

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 3월 7일 (07.03.2019)

WIPO PCT

WO 2019/045477 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 38/16* (2006.01) *A61K 8/64* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/010049
- (22) 국제출원일: 2018년 8월 30일 (30.08.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0110924 2017년 8월 31일 (31.08.2017) KR
PCT/KR2017/013706
2017년 11월 28일 (28.11.2017) KR
- (71) 출원인: 주식회사 이뮤네드 (IMMUNEMED INC.)
[KR/KR]: 24232 강원도 춘천시 소양강로 32, 2-2호,
Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자: 김윤원 (KIM, Yoon-Won); 24414 강원도 춘천시 지석로 67, 206동 1301호, Gangwon-do (KR). 박성만 (PARK, Sungman); 24290 강원도 춘천시 으뜸길4번길 17, Gangwon-do (KR). 김민수 (KIM, Min Soo); 24278 강원도 춘천시 후석로 325, 108동 703호, Gangwon-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로 135 대명타워 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING SKIN DISEASE COMPRISING SUBSTANCE SPECIFICALLY BINDING TO VIMENTIN-DERIVED PEPTIDE

(54) 발명의 명칭: 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 피부질환 예방 및 치료용 조성물

	AA	BB	CC
DD	Pityriasis rosea(장미색 반점)	19/19	100
EE	Herpes zoster virus(대상포진)	3/3	100
FF	Lichen simplex chronicus(만성단순박진)	13/14	93
GG	Herpes simplex virus(단순포진)	9/10	90
HH	Nummular eczema(원형습진)	19/17	88
II	Molluscum contagiosum(무시딱기)	10/14	71
JJ	Pсориаз(건선)	19/16	67
KK	Verruca vulgaris(시디기)	10/15	67
LL	Atopic dermatitis(아토피피부염)	8/9	67
MM	Allergic contact dermatitis(알레르기 피부염)	2/3	67
NN	Total	88/100	60

AA ... Disease
BB ... VR expression (No. of positive case/No. of total case)
CC ... VR expression (%)
DD ... Pityriasis rosea
EE ... Herpes zoster virus
FF ... Lichen simplex chronicus
GG ... Herpes simplex virus
HH ... Nummular eczema
II ... Molluscum contagiosum
JJ ... Psoriasis
KK ... Verruca vulgaris
LL ... Atopic dermatitis
MM ... Allergic contact dermatitis
NN ... Total

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating a skin disease, comprising a substance specifically binding to a peptide of SEQ ID NO: 1, wherein the substance specifically binding to the peptide of SEQ ID NO: 1 of the present invention, particularly an antibody specifically binding to the peptide of SEQ ID NO: 1 or a binding fragment of said peptide, may be applied to a skin disease expressing the peptide of SEQ ID NO: 1 to effectively prevent and treat the skin disease, and thus the substance may be usefully used as a therapeutic agent for various skin diseases with no known specific causes.

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질, 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 서열번호 1의 펩타이드를 발현하는 피부 질환에 대하여 적용되어 피부 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있으므로, 구체적인 원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부 질환에 대한 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 피부질환 예방 및 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 분리된 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 화장료 조성물, 의약품 조성물, 피부 외용제, 피부 질환의 예방 또는 치료 방법, 치료 용도, 의약, 화장료, 의약품 또는 피부 외용제를 제조하기 위한 용도 등에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 피부질환은 사람을 포함하는 동물의 피부에서 나타나는 모든 이상소견을 의미하는데, 현대 사회에서는 산업화가 고도화됨에 따라 각종 유해물질로 인해 과거에는 발생하지 않았던 다양한 피부 질환이 발병하고 있다. 특히 피부는 세월이 지남에 따라 피부 세포의 증식작용이나 신진대사작용이 약화되어 피부조직의 탄력이 줄거나 주름이 발생하는 자연적인 노화가 진행되며, 그 이외에도 직사광선에 장시간 노출되거나, 화상, 찰과상 등의 원인에 의해서도 다양한 피부병변이 발생하여 건강한 피부를 해치기도 한다. 이렇게 자연적인 노화나 사고에 의한 피부병변은 인간 신체의 최외각에 존재하는 피부의 방어 기능 저하를 일으켜, 바이러스, 미생물 또는 박테리아 등에 의한 감염 등의 원인을 제공하며, 이로 인해 다양한 피부 질환이 발생한다.

[4]

- [5] 구체적인 원인이 밝혀지지 않은 대표적 질환인 아토피성 피부염은 대부분 유아기나 소아때 발생하여 호전과 악화를 반복하는 만성 염증성 피부질환으로, 감염, 정신적인 스트레스, 계절과 기후변화, 자극 및 알레르겐에 의해 악화될 수 있다. 이러한 아토피 피부염은 면역학적인 이상이 관여하는 유전적인 질환으로 생각되고 있으나, 아직 구체적인 병인론이 밝혀지지 않았으며, 다른 피부 질환인 건선, 만성단순태선 등 역시 명확한 발병 원인이 밝혀지지 않은 상황이다.

[6]

- [7] 이처럼 아토피성 피부염, 건선, 만성단순태선, 장미색 비강진, 등과 같이 구체적인 원인이 밝혀지지 않은 피부 질환에 대해서는, 현재는 화학 약물로 구성된 항염증제, 항바이러스제, 또는 식물 추출물이나 천연물 유래 화합물 등으로 치료하는 것이 대다수이다. 예를 들어, 한국등록특허공보 제10-1741281호에서는 "A3 아데노신 수용체 작동약

(I B-M E C A/C F -101)을 포함하는 건선 치료를 위한 제약학적 조성물"을, 한국공개특허공보 제10-2017-0041149호에서는 "효소분해 아로니아 추출물 및 와송 추출물을 함유하는 아토피 피부 개선용 조성물"을 개시하고 있다.

- [8] 그러나, 이러한 치료법으로는 해당 피부 질환이 완치될 확률이 높지 않고, 환부의 피부 조직 및 피부 세포만을 표적으로 하는 치료제가 아닌 점에서 치료 효율이 다소 떨어지며, 부작용 발생 가능성이 비교적 높다는 문제점이 있다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 예의 노력한 결과, 구체적인 발명 원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부염 환자의 피부 조직에 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질, 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체를 처리할 경우, 상기와 같은 피부 질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 하나의 목적은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제를 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물을, 이를 필요로 하는 개체에 도포하는 단계를 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 피부 질환 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 피부 질환을 예방 또는 치료하는 의약을

제조하기 위한, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

- [19] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 피부 질환을 개선하는 화장품, 의약품, 또는 피부 외용제를 제조하기 위한, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[20]

발명의 효과

- [21] 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질, 보다 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 비멘틴 유래 펩타이드를 발현하는 피부 질환에 대하여, 피부 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있으므로, 구체적인 원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부 질환에 대한 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 chimeric VSF의 제조를 위한 벡터의 모식도이다.
- [24] 도 2는 chimeric VSF의 모식도이다.
- [25] 도 3은 chimeric VSF의 발현을 확인한 도이다.
- [26] 도 4는 VSF의 scFv의 DNA 서열을 나타낸 도이다.
- [27] 도 5는 VSF의 scFv를 벡터에 클로닝한 모식도이다.
- [28] 도 6은 VSF의 scFV를 정제하여 확인한 도이다.
- [29] 도 7은 인간화 항체인 hzVSF의 제조를 위한 벡터의 모식도이다.
- [30] 도 8은 본 발명의 인간화 항체인 hzVSF의 모식도이다.
- [31] 도 9는 인간화 항체인 hzVSF의 발현을 확인한 도이다.
- [32] 도 10은 인간화 항체인 hzVSF_var13의 물성을 확인한 환원 및 비환원 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- [33] 도 11은 인간화 항체인 hzVSF_var13의 물성을 확인한 LC/MS 결과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 12는 인간화 항체인 hzVSF_var13의 물성을 확인한 SEC-HPLC 결과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 13은 인간화 항체인 hzVSF_var13의 물성을 확인한 IF (Isoelectric focusing)를 나타낸 도이다.
- [36] 도 14는 51명의 혈액 기증자 중 KLH, hzVSF_var12 및 hzVSF_var13에 반응하여 T 세포의 증식이 일어난 기증자의 수를 나타내는 도이다.
- [37] 도 15는 인간화 항체인 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF_var12 및 hzVSF_var13에 대한 51명의 T 세포 증식 반응의 정도를 나타낸 도이다.
- [38] 도 16은 KLH, hzVSF_var12 및 hzVSF_var13에 의해 유도된 T 세포 증식을 평균 SI 값으로 나타낸 도이다.

- [39] 도 17은 사람의 정상 조직과 VSF간의 반응성 조사결과를 나타낸 도이다.
- [40] 도 18은 다양한 피부질환에서의 VR 발현을 확인한 도이다.
- [41] 도 19는 장미색 비강진, 대상포진, 만성단순태선, 단순포진, 화폐상습진 및 물사마귀 피부질환에서의 VR 발현을 확인한 것이다.
- [42] 도 20은 건선, 사마귀, 아토피 피부염 및 접촉성 피부염 피부질환에서의 VR 발현을 확인한 것이다.
- [43] 도 21은 1번 건선 환자에 대한 VSF의 치료 효능을 확인한 도이다.
- [44] 도 22는 2번 건선 환자에 대한 VSF의 치료 효능을 확인한 도이다.
- [45] 도 23은 1번 만성단순태선 환자에 대한 VSF의 치료 효능을 확인한 도이다.
- [46] 도 24는 2번 만성단순태선 환자에 대한 VSF의 치료 효능을 확인한 도이다.
- [47] 도 25는 3번 만성단순태선 환자에 대한 VSF의 치료 효능을 확인한 도이다.
- [48] 도 26은 화폐상습진 환자에 대한 VSF의 치료 효능을 확인한 도이다.
- [49] 도 27은 VSF를 적용한 만성단순태선(Lichen simplex chronicus), 화폐상습진(Nummular dermatitis), 습진(Eczema), 아토피 피부염(Atopic dermatitis), 및 피부염(Dermatitis) 환자에서 홍반, 부종/결절/구진, 찰상, 및 태선화를 측정 한 eczema area and severity index(EASI) score와 건선 환자에서 홍반, 두께, 인설을 측정 한 psoriasis area sevetiry index(PASI) score를 나타낸 도이다.
- [50] 도 28은 VSF를 도포한 만성단순태선, 화폐상습진, 습진, 아토피 피부염, 피부염, 및 건선 환자에서 소양감(Visual Analogue Scale; VAS)을 나타낸 도이다.

[51]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [52] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [53]
- [54] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [55] 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [56] 본 발명에서 비멘틴은 VIM 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 세포 내 소기관(organelle)을 지지하고 위치에 고정시키는 기능을 하는 것으로, 주로 세포의 골격, 단백질의 이동 및 세포신호전달에 관여함이 알려져 있다. 본 발명에서는 이러한 비멘틴이 정상적인 세포에서는 세포 외부로 발현되지 않으나, 구체적인

원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부질환 환자의 피부 조직에서는 세포 외부로 발현되는 것을 확인하였으며, 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적인 항체와 같이 이에 결합할 수 있는 물질을 처리할 경우, 다양한 피부질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

- [57] 구체적으로, 상기 비멘틴 유래 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드일 수 있다.
- [58] 본 발명에서 "비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질"은 상기 비멘틴 유래 펩타이드와 결합능을 갖는 물질로서, 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질일 수 있다.
- [59] 본 발명에서 서열번호 1의 분리된 펩타이드는 비멘틴의 아미노산 142번 내지 294번의 위치에 해당하는 것으로, 본 발명의 항체 또는 이의 단편이 결합할 수 있는 한, 상기 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [60] 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질은, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 화합물, 펩타이드, 또는 엡타머인 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [62] 상기 항체는 이에 제한되지 않으나, 그 예로 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.
- [63] 본 발명의 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 항원과 직접적으로 결합하는 마우스의 단클론 또는 단일클론 항체의 가변 영역의 상보성 결정 부위를 인간 항체 골격에 이식하여, 본래의 마우스 항체의 친화도 및 특이성을 유지하면서 인체 내에서 HAMA (human anti-mouse antibody) 반응을 억제하는 우수성을 갖고 있다. 더욱이, de-immunization 방법을 이용해 면역원성을 낮춘 인간화 항체로서, 인간에게 투여 시 면역원성을 현저하게 낮추어 안전한 제제로 사용될 수 있다. 즉, 이는 서열번호 1의 펩타이드 부위가 외부로 노출된 세포에 반응하여 영향을 주면서도 인간 면역 체계와 보다 양호하게 상호작용하여, 예를 들어 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 또는 항체-의존성 세포성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)을 일어나지 않게 하여 목적 세포를 보다 효율적으로 치료할 수 있다. 아울러, 면역원성 감소에 의해 인간 면역 체계가 상기 항체를 외래의 것으로 인식하지 않는 이점이 있다. 또한, 더 적은 양, 보다 적은 빈도의 약물을 투여하였을 때에도 인간 순환계 내 반감기가 천연 발생 항체와 유사하다는 이점이 있다.

[64]

[65] 본 발명에서 상기 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는 마우스 항체는 "mVSF(mouse Virus Suppressing Factor)"로 통칭될 수 있고, 키메라 항체는 "chVSF(chimeric Vrus Suppressing Factor)"로 통칭될 수 있으며, 인간화 항체는 "hzVSF (humainzed Virus Suppressing Factor)"로 통칭될 수 있다. 본 발명에서 용어, 인간화 항체 hzVSF 또는 이의 변이체는 서로 혼용될 수 있으며, hzVSF는 hzVSF 야생형 (hzVSF_wt) 및 hzVSF의 변이체 (예를 들어, hzVSF_var1, hzVSF_v1 또는 hzVSF_1 등으로 표기)와 혼용될 수 있다.

[66] 상기 서열번호 1의 분리된 펩타이드는 에피토프를 포함하는 항원 영역으로, 항체 또는 이의 단편과 결합되어 본 발명과 유사한 기능을 나타낼 수 있는 한, 비멘틴 아미노산의 142번 내지 211번 또는 211번 내지 294번일 수 있다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 비멘틴은 *VIM* 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 세포 내 소기관 (organelle)을 지지하고 위치에 고정시키는 기능을 하는 것으로, 주로 세포의 골격, 단백질의 이동 및 세포신호전달에 관여함이 알려져 있으며, 암 마커로 사용됨이 알려져 있으나, 이에 결합할 수 있는 항체가 피부 질환에 대한 치료 용도가 있음에 대해서는 전혀 알려진 바 없었다.

[67] 본 발명의 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 피부 질환이 발병한 환자의 피부 세포에 특이적으로 반응하는 것으로, 상기 질환이 발병한 부위의 피부 조직 또는 피부 세포에서 VSF (Virus suppressing factor)의 수용체, 즉 VR이 외부로 나타나, 이에 결합하는 것이다. 이와 같은 본 발명의 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 구체적인 발병 원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부 질환에 대한 예방 또는 치료 분야에 있어서 유용하게 사용할 수 있다.

[68] 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은, 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드의 9 번째, 45 번째, 54 번째, 76 번째, 94 번째 또는 129 번째 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드의 9 번째, 45 번째, 54 번째, 76 번째, 94 번째 및 129 번째 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는 한, 이에 제한되지 않는다.

[69]

[70] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 리간드 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 듀린 항체) 및 이가(bivalent) 또는 이중특이성 분자(예를 들어, 이중특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함한다. 상기 용어는 추가로 FcRn에

대한 결합 기능을 보유한 단쇄 항체, 스캐프, 항체 불변영역의 유도체 및 단백질 스캐폴드에 기초한 인공 항체를 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 여기에서 사용되는 용어 "단편," "펩타이드의 결합 단편" 및 "항체 단편"은 항체의 항원-결합 활성을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로 호환적으로 사용된다. 예시적인 항체 단편은 단일 쇄 항체, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂, dsFv 또는 scFv를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 Fd는 Fab 단편에 포함되어 있는 중쇄 부분을 의미한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중디설파이드 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고, 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

- [71] 구체적으로, 상기 펩타이드의 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 이들의 이량체, 미니바디(minibodies), 디아바디(diabodies) 및 다량체(multimer) 또는 이중 특이성 항체 단편인 것일 수 있다.
- [72] 본 발명에서 용어, "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [73] 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 도메인으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역(complementarity-determining region, 이하 "CDR"이라 함)이라 불리는 3개의 다변 가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region, 이하 "FR"이라 함)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.
- [74] 또한, 상기와 같은 본 발명의 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한

불변 영역을 포함할 수 있다.

- [75] 본 발명에서 용어, "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그 예로, IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 불변 영역으로부터 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.
- [76] 본 발명에서 용어, "하이브리드(hybrid)"란 단쇄 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하며, 그 예로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다.
- [77] 본 발명의 인간화 항체는 이에 제한되지는 않으나, 인간 면역글로불린 $\gamma 4$ 를 기반으로 인간화될 수 있으며, 보체 결합성이 없어 CDC를 일으키지 않는 장점이 있을 수 있다.
- [78]
- [79] 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 3 또는 서열번호 14 (서열번호 3의 9번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로 치환)로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 4 또는 서열번호 15 (서열번호 4의 4번째 아미노산인 쓰레오닌이 아르파라긴으로 치환)로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 6, 서열번호 16 (서열번호 6의 3번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로 치환), 서열번호 17 (서열번호 6의 3번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로, 6번째 아미노산인 알라닌이 글리신으로 치환), 또는 서열번호 18 (서열번호 6의 3번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로, 5번째 아미노산인 류신이 아르기닌으로, 6번째 아미노산인 알라닌이 글리신으로 치환)로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7 또는 서열번호 19 (서열번호 7의 6번째 아미노산인 세린이 쓰레오닌으로 치환)로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있다.
- [80] 또한, 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 인간의 FR (framework region)을 포함하며, 이에 제한되지는 않으나, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31로 기재된 인간 면역글로불린 감마일 수 있으며, 또는 서열번호 20으로 기재된 중쇄 FR1 (Framework region 1); 서열번호 21로 기재된 중쇄 FR2; 서열번호 22 또는 서열번호 28 (서열번호 22의 8번째 아미노산인 라이신이 쓰레오닌으로, 10번째 아미노산인 이소류신이 알라닌으로 치환)로 기재된 중쇄 FR3; 및 서열번호 23으로 기재된 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 FR1; 서열번호 25로 기재된 경쇄 FR2; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 FR3; 및 서열번호 27로 기재된 경쇄 FR4를 포함하는, 경쇄

가변 영역일 수 있다.

- [81] 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 구체적으로, (a) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (b) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 16, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (c) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 17, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (d) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (e) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 19로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (f) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (g) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (h) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (i) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 15로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (j) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (k) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 15로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및

서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (l) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 19로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (m) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 15로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 19로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; 또는 (n) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 16, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3를 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있다.

- [82] 상기 (a) 항체는 hzVSF_WT, (b) 항체는 hzVSF_var1, (c) 항체는 hzVSF_var2, (d) 항체는 hzVSF_var3, (e) 항체는 hzVSF_var4, (f) 항체는 hzVSF_var5, (g) 항체는 hzVSF_var6, (h) 항체는 hzVSF_var7, (i) 항체는 hzVSF_var8, (j) 항체는 hzVSF_var9, (k) 항체는 hzVSF_var10, (l) 항체는 hzVSF_var11, (m) 항체는 hzVSF_var12, (n) 항체는 hzVSF_var13을 각각 포함할 수 있다.
- [83] 상기 인간화 항체 및 상기 펩타이드의 결합 단편은 이에 제한되지 않으나, 각각 서열번호 10 및 서열번호 12; 서열번호 32 및 서열번호 34; 서열번호 36 및 서열번호 38; 서열번호 40 및 서열번호 42; 서열번호 44 및 서열번호 46; 서열번호 48 및 서열번호 50; 서열번호 52 및 서열번호 54; 서열번호 56 및 서열번호 58; 서열번호 60 및 서열번호 62; 서열번호 64 및 서열번호 66; 서열번호 68 및 서열번호 70; 서열번호 72 및 서열번호 74; 서열번호 76 및 서열번호 78; 또는 서열번호 80 및 서열번호 82로 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있다.
- [84] 상기 마우스 항체는 구체적으로, 서열번호 137로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 138로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 139로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 134로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 135로 기재된 경쇄 CDR2; 서열번호 136으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로, 서열번호 9로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [85] 상기 키메라 항체는 구체적으로 서열번호 141 또는 서열번호 142로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 140으로 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로, 서열번호 146 또는 서열번호 148로 기재된 중쇄 및 서열번호 144로 기재된 경쇄를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [86] 상기 scFv는 이에 제한되는 것은 아니나, mVSF를 안전성을 위해 제조한 scFv 역시 포함될 수 있다. 그 예로, 도 4에 기재된 서열에 의해 제조된 scFv일 수 있다. 또한, 서열번호 131로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 133으로 기재된 경쇄 가변 영역이 링커로 연결된 형태일 수 있다. 또한, 서열번호 130의 염기 서열로 코딩되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 132의 염기 서열로 코딩되는 경쇄 가변 영역이 링커로 연결된 형태일 수 있다. 이와 같은 scFv는 *E. coli* 발현 벡터내에 서열번호 150의 염기서열로 클로닝될 수 있다.
- [87]
- [88] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명자들은 hzVSF_wt, 3개의 얼터너티브(alternative) 및 이의 13개의 변이체인 인간화 항체를 제조하였다 (실시예 5). 아울러, FDA 승인을 받아 시판 중인 의약품과 면역원성을 비교한 결과, 면역원성이 가장 낮은 인간 항체인 Humira와 유사한 수준의 면역원성을 나타내는 것을 확인하여 (표 7), 피부 질환 치료제로 사용시 야기될 수 있는 부작용 없이 안전한 의약품, 의약외품, 피부 외용제 등으로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [89] 또한, hzVSF_wt 변이체를 이용하여 T 세포 분석을 통해 T 세포의 증식에 크게 영향을 주지 않는 것을 확인하여(표 8), 임상에 사용할 때 면역원으로 작용하여 부작용을 일으킬 가능성이 낮다는 것을 확인하였다.
- [90]
- [91] 본 발명에서 상기 피부 질환은 장미색 비강진, 대상포진, 만성단순태선, 단순포진, 화폐상습진, 습진, 물사마귀, 건선, 사마귀, 아토피 피부염 또는 접촉성 피부염일 수 있으며, 구체적으로 만성단순태선, 건선, 화폐상습진, 습진, 아토피 피부염 또는 접촉성 피부염일 수 있다. 다만, 본 발명의 상기 피부 질환은 피부 조직 또는 피부 세포에서 VR이 발현되는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [92] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 다양한 피부질환이 발생한 피부 조직에서는 서열번호 1의 비멘틴 유래 펩타이드가 발현되나, 정상세포에서는 발현되지 않음을 확인하였다 (도 17). 또한, 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질이 실제 건선, 만성단순태선, 화폐상습진, 습진, 아토피 피부염 또는 접촉성 피부염이 발병한 환자에 대해서도, 피부 질환에 대한 우수한 치료 효능을 나타냄을 검증하여 (도 21 내지 도 28), 원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [93]

- [94] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [95] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [96] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [97] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [98] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [99] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로

최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 다른 치료제는 인터페론일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[100] 본 발명에서 용어, "예방"이란 상기 조성물의 투여에 의해 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있으며, 상기 "치료"란 상기 조성물의 투여에 의해 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[101]

[102] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[103] 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[104] 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질, 서열번호 1의 펩타이드, 항체, 펩타이드 결합 단편, 피부질환, 예방에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[105] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질이 실제 건선, 만성단순태선, 화폐상습진, 습진, 아토피 피부염 또는 접촉성 피부염이 발병한 환자에 대해서도, 우수한 치료 효능을 나타냄을 검증하여 (도 21 내지 도 28), 원인이 밝혀지지 않은 다양한 피부 질환의 예방 및 개선용 화장품 조성물로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[106] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 용액, 외용연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[107] 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 일반 피부 화장품에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알콜, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[108] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 제형에 따라 다양하다.

[109] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 또는 이들의

혼합물이 이용될 수 있다.

- [110] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있다.
- [111] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 이용될 수 있으며, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.
- [112] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [113] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알콜, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있다.
- [114]
- [115] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [116] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [117] 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질, 서열번호 1의 펩타이드, 항체, 펩타이드 결합 단편, 피부질환, 예방에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.
- [118] 본 발명의 의약외품 조성물에는 상기 성분 외에 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 제한되지 않으며, 예를 들어 추진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [119] 본 발명의 의약외품 조성물은 소독 청결제, 샤워폼, 연고액, 물티슈, 코팅제 등을 예시할 수 있으나 이에 제한되는 것이 아니며, 의약외품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히

선택될 수 있다.

[120]

[121] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[122] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[123] 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질, 서열번호 1의 펩타이드, 항체, 펩타이드 결합 단편, 피부질환, 예방에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[124] 본 발명의 용어 "피부 외용제"는 일반적으로 피부 외용에 사용하는 물질 전반을 포함하는 포괄적인 개념으로, 상기 약학 조성물을 포함하는 제형의 비제한적인 예로는 경고제(PLASTERS), 로션제(LOTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 캡슐제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 연질, 경질 젤라틴 캡슐, 첩부제, 또는 서방화제제가 있다.

[125] 본 발명에 따른 피부 외용제는 상용되는 무기 또는 유기 담체, 부형제 및 희석제를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 제제화된 비경구 투여제일 수 있다. 상기 비경구 투여를 위한 제제로는 점적제, 연고, 로션, 겔, 크림, 패취, 스프레이, 현탁제 및 유제로 이루어진 군에서 선택되는 경피 투여형 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[126] 상기 외용제에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[127] 각 제형에 의한 피부 외용제 조성물에 있어서, 상기한 본 발명의 조성물 이외의 다른 성분들을 기타 피부 외용제의 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승효과가 일어날 수 있다.

[128]

[129] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물을, 이를 필요로 하는 개체에 도포하는 단계를 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [130] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 도포하는 단계를 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [131] 상기 피부 질환을 치료하는 방법은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 상기 피부 질환이 발병되거나 발병 의심이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법일 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [132] 상기 개체는 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 상기 조성물의 투여에 의해 피부 질환이 치료되는 개체는 제한 없이 포함한다.
- [133] 이때, 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [134]
- [135] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 피부 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [136] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 피부 질환을 예방 또는 치료하는 의약을 제조하기 위한, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [137] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 피부 질환을 개선하는 화장품, 의약품, 또는 피부 외용제를 제조하기 위한, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[138]

발명의 실시를 위한 형태

- [139] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[140]

[141] **실시예 1: VSF (Virus suppressing factor)의 제조**

[142]

[143] 실시예 1-1: chVSF (chimeric VSF)의 제조

[144]

[145] 마우스 VSF(mVSF)의 주요 기능적 부분이 단세포군 항체인 것으로 가정하고, 이와 인간면역글로불린을 유전자조작법으로 교잡 (chimerization)하여 마우스/인간 교잡 항체 (chAb)를 만들었다.

[146] 구체적으로, 교잡 항체를 만들기 위하여, 마우스 VSF의 경쇄 및 중쇄의 불변 영역 (constant region)을 인간면역항체 (κ , $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$)의 불변 영역으로 대체하였다. chVSF는 pCAGGS 벡터를 주형으로 하여 발현벡터를 만들었다 (도 1). mVSF의 가변 중쇄 (mVH)(서열번호 9)는 *SacI*과 *KpnI* 제한효소 부위를 포함하여 PCR로 증폭하였다. 가변 경쇄 (mVL)(서열번호 8)는 *ClaI*과 *XhoI* 제한효소 부위를 포함하여 PCR법으로 증폭하였다. PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 기재된 프라이머를 이용하였으며, PCR 조건은 94 °C에서 45초, 60 °C에서 45초, 72 °C에서 45초로 35 사이클을 수행하고, 72 °C에서 10분간 진행하였다.

[147]

[148] [표1]

프라이머	서열	서열번호
mVH F	cgagctcatgggatggagctggatc	124
mVH R	cggtagctgaggagacgggtgactg	125
KpnI_delR	gggcccttggtggaagctgaggagacgggtgactgagg	126
mVL F	catcgatatgagtgtgccactcag	127
mVL R	cctcgagtttgattccagcttg	128
Xho_modR	agatggtgcagccaccgtgcgttgattccagcttggtgcc	129

[149]

[150] 사람의 중쇄(서열번호 11)는 *KpnI*과 *SphI* 제한효소 부위를 이용하였으며, 경쇄(서열번호 13)는 *XhoI*과 *BglI*제한효소를 이용하여 클로닝을 하였다. 경쇄와 중쇄를 동시에 발현시키기 위하여 IRES (internal ribosome entry site)를 *SphI*과 *ClaI* 제한효소 부위를 이용하여 경쇄와 중쇄 사이에 클로닝하였다. 선별마커는 *SalI* 제한효소 부위에 삽입하였다. 이와 같은 방식으로 도 2의 모식도에 개시된 바와 같은 chVSF 들을 제조하였다.

[151]

[152] 실시예 1-2: two vector 발현 시스템을 이용한 chVSF 발현

[153]

[154] 1 mg/ml의 PEI (Polyethyleneimine)를 이용하여 15 μ g의 pCAGGS-GFP를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션하여, 트랜스펙션 정도 및 발현 수준을 확인하였다. 동일한 방법으로 상기 실시예 1-1의 chVSF를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션한 후

6시간 후에 배지를 2% FBS를 포함하는 배지로 교체하였다. 3일 마다 세포 배양액을 모아서 0.45 μ m의 필터를 이용하여 불순물을 제거하였다. 단백질 A 세파로우즈 비드 (nProtein A sepharose bead)를 이용하여 chVSF를 정제하였다. chVSF는 0.2 M 글라이신/염산 버퍼 (Glycine/HCl) (pH 2.5)로 용출하며, 중화 버퍼로는 1 M 트리스-Cl (Tris-Cl)버퍼 (pH 9.0)를 사용하였다. 구체적으로, 1M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)를 레진 볼륨의 10배로 사용하여 레진이 균질화되게 한 후, VSF 배양액을 컬럼에 통과시켰다. 0.1 M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)를 컬럼 볼륨의 5배 이상을 흘려주며 세척하였다. 용출은 0.2 M Glycine/HCl 버퍼 (pH 2.5)를 레진 볼륨의 5배로 흘려주며, 중화버퍼를 미리 넣어둔 튜브에 정제된 VSF를 수득하였다. 이 후에 정제된 VSF를 SDS-PAGE로 확인하였다.

[155]

[156] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, chVSF는 면역글로불린의 특성을 지닌 50 kDa의 중쇄와 25 kDa의 경쇄로 이루어져 있는 구조임을 확인할 수 있었다.

[157]

[158] **실시예 2: scFv(single-chain variable fragment)의 제조**

[159]

[160] VSF의 가변 영역을 이용하여 scFv를 제조하였다. scFv는 서열번호 150의 DNA 서열을 가지며, 상기 DNA를 *E. coli* 발현벡터인 pET-22b(+)에 클로닝하여 scFv를 제조하였다(도 4 및 도 5).

[161] 구체적으로 mVSF의 VH와 VL을 링커로 연결하여 scFv를 제작하고, 박테리아 발현 벡터인 pET22b(+)에 삽입한 후, IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 뒤, Ni-NTA 컬럼을 이용하여 정제하였다(도 6).

[162]

[163] **실시예 3: 인간화 항체인 VSF의 제조**

[164]

[165] 상기 실시예 1을 바탕으로 chVSF를 이용하여 인간화 항체인 hzVSF (Humanized VSF)를 제조하였다.

[166]

[167] 진핵 세포를 사용하여 두 가지 종류의 제조합 단백질을 발현시키고자 할 때 사용하는 발현 시스템 중 하나인 two gene expression vector에 해당하는 pdCMV-dhfr-vector (도 7)를 이용하였다. 상기 벡터는 두 가지 종류의 유전자를 하나의 벡터 내에서 서로 다른 transcription unit으로 구성하여 각각 자체의 프로모터와 polyA signal을 사용하여 발현하는 것으로, 강력한 포유류 발현 프로모터인 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 이용하는 벡터 시스템이다. 이를 이용하여, 도 8의 모식도와 같은 hzVSF를 제조하였다.

[168] 이에, 상기 hzVSF의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열번호 10으로, 중쇄 영역을 서열번호 11로, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열번호 12로, 경쇄 영역을 서열번호 13으로 표시하였다.

[169]

[170] 1 mg/ml의 PEI (Polyethyleneimine)를 이용하여 15 μ g의 pCAGGS-GFP를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션하여, 트랜스펙션 정도 및 발현 수준을 확인하였다. 동일한 방법으로 상기 chVSF 및 hzVSF를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션한 후 6시간 후에 배지를 2% FBS를 포함하는 배지로 교체하였다. 3일 마다 세포 배양액을 모아서 0.45 μ m의 필터를 이용하여 불순물을 제거하였다. 단백질을 A 세파로우즈 비드 (nProtein A sepharose bead)를 이용하여 chVSF 및 hzVSF를 정제하였다. chVSF 및 hzVSF는 0.2 M 글라이신/염산 버퍼 (Glycine/HCl) (pH 2.5)로 용출하며, 중화 버퍼로는 1 M 트리스-Cl (Tris-Cl)버퍼 (pH 9.0)를 사용하였다. 구체적으로, 1 M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)를 레진 볼륨의 10배로 사용하여 레진이 균질화되게 한 후, VSF 배양액을 컬럼에 통과시켰다. 0.1 M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)을 컬럼 볼륨의 5배 이상을 흘려주며 세척하였다. 용출은 0.2 M Glycine/HCl 버퍼 (pH 2.5)를 레진 볼륨의 5배로 흘려주며, 중화버퍼를 미리 넣어둔 튜브에 정제된 VSF를 수득하였다. 이 후에 정제된 VSF를 SDS-PAGE로 확인하였으며, 활성은 MVIT assay를 통해 확인하였다.

[171]

[172] 실험에 사용된 VSF를 표시하면 다음 표 2와 같다.

[173]

[174] [표2]

VSF 종류	발현 세포	mg/l (harvested sup.)
mVSF	마우스 하이브리도마	4.14
*rmVSF	HEK293T	5.71
chVSF γ 2	HEK293T	5.15
chVSF γ 4	HEK293T	7.32
hzVSF γ 2	HEK293T	5.01
hzVSF γ 4	HEK293T	9.38

[175] *rmVSF: recombinant of mouse VSF

[176]

[177] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있듯이, chVSF γ 2 및 chVSF γ 4, hzVSF γ 2 및 hzVSF γ 4는 면역글로불린의 특성을 지닌 50 kDa의 중쇄와 25 kDa의 경쇄로 이루어져 있는 것을 확인하였다.

[178]

[179] **실시예 4: 인간화 항체인 VSF의 물성 확인**

[180]

[181] 상기 실시예 3에서 제조한 hzVSF의 물성을 다음과 같이 확인하였다.

[182]

[183] 실시예 4-1: 기본적인 분자량 패턴 및 순도 확인

[184]

[185] 환원 및 비환원 SDS-PAGE를 이용하여 분자량 패턴 및 순도를 확인하고자 하였다. 구체적으로, hzVSF_v13을 SDS-PAGE로 분자량에 따라 코마시 염색법 (Coomassie Staining)으로 염색하여 hzVSF_v13의 분자량 및 순도를 확인하였다.

[186]

[187] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 1 레인은 비환원 젤로서, IgG 항체 (150 kDa)에서 예상되는 위치에 주요 밴드가 관찰되었고, 2 레인은 환원 젤로 IgG 항체의 중쇄 (약 50 kDa)와 경쇄 (약 25 kDa)에서 해당되는 위치에 밴드가 관찰하여, hzVSF_v13가 일반적인 IgG 항체 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[188]

[189] 실시예 4-2: 분자량, 당 패턴 및 크기 변이 등 확인

[190]

[191] hzVSF_v13의 분자량, 당 패턴, 크기 변이 등을 확인하기 위하여 액체크로마토그래피/질량분석 (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)을 수행하였다. 소량의 hzVSF_v13을 HPLC에 주입하여, 피크를 관찰하였다.

[192]

[193] 그 결과, hzVSF_v13는 면역글로불린 G (IgG)의 특성을 나타내는 것을 확인하였다(도 11). Intact Mass에서는 전체 분자량 (약 140 kDa)이 관찰되었고, G0/G0, G0F/G1, G1/G1 등 일반적인 당화된 IgG에서 해당하는 피크의 패턴이 관찰되었다. 또한, 당 제거 후의 중쇄 (약 49 kDa) 및 경쇄 (약 23 kDa)가 관찰되었다. PNGase F 처리로 당쇄가 제거된 중쇄와 PNGase F를 처리하지 않은 중쇄의 분자량을 중합할 때 일반적인 IgG의 glycan 패턴을 확인할 수 있었다 (G0F, G1F, G2F).

[194]

[195] 실시예 4-3: 순도 및 응집도 확인

[196]

[197] hzVSF_v13의 순도와 응집도를 확인하기 위하여 SEC-HPLC를 이용하였다.

[198] SEC-HPLC 조건은 다음과 같다.

[199] - HPLC system: Dionex Ultimate 3000

[200] - Column: Tosoh TSKgel G3000 SWxl

[201] - Mobile phase: phosphate buffer, 0.5 ml/min

[202] - Injection Volume: 10 μ l

[203]

[204] 그 결과, 전형적인 IgG 항체의 단량체에 해당하는 위치 (정체시간 약 16분에서) 92.44%의 주요 피크가 관찰되었고, 이량체 위치 (정체시간 약 13분)에서 약

6.84%의 피크가 관찰되었다(도 12).

[205]

[206] 실시예 **4-4: pI 및 charge heterogeneity** 확인

[207]

[208] hzVSF_v13의 등전하점을 알아보기 위하여, pH 3에서 pH 10까지 구배를 나타내는 젤에서 러닝을 하였다.

[209]

[210] 그 결과, 도 13에서 나타낸 바와 같이, hzVS_v13의 pI는 7.7로 분석되었고, 주요 밴드 외에 산성 및 염기성 isoform (acidic/basic isoform)도 관찰되었다. 이는 IgG 항체에서 일반적으로 관찰되는 이성체 [isomer (예를 들어, C-말단 영역의 deamination)]에 해당된다.

[211]

[212] 상기와 같은 결과들은, 본 발명의 인간화 항체인 hzVSF_v13 들이 IgG 항체와 유사한 물성을 나타내는 것을 뒷받침하는 것이다.

[213]

[214] **실시예 5: 면역원성이 감소된 인간화 항체인 hzVSF의 변이체 제조**

[215]

[216] 실시예 **5-1: hzVSF alternative**의 제조

[217]

[218] 상기 실시예 3에서 제조한 hzVSF를 기반으로, 세 개의 alternative를 제조하였다. 각 alternative의 활성은 wild-type의 활성과 비슷하거나 떨어졌다 ($0.5 \leq 1 \text{ U} < 1 \text{ mg/ml}$)(표 3 및 표 4). 각각의 alternative의 CDR 1 내지 3의 아미노산 서열을 표 3에 각각의 변이체의 FR1 내지 FR4의 아미노산 서열을 표 4에 기재하였다.

[219]

[220] [표3]

항체		CDR1	CDR2	CDR3
hzVSF_WT	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT(서열번호 7)
hzVSF_a1	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT(서열번호 7)
hzVSF_a2	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT(서열번호 7)
hzVSF_a3	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT(서열번호 7)

[221]

[222] [표4]

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hzVSF_WT	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_a1	중쇄	서열번호 151	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_a2	중쇄	서열번호 20	서열번호 152	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_a3	중쇄	서열번호 151	서열번호 152	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27

[223]

[224] 실시예 5-2: hzVSF 변이체의 제조

[225]

[226] 상기 실시예 3에서 제조한 hzVSF를 기반으로, 실제 생체 내에서 활용하기 위한 면역원성 감소 및 affinity maturation을 통한 hzVSF 변이체를 제조하였다. 그 결과, 13개의 변이체를 제조하였다 (표 5 및 표 6). 각각의 변이체의 CDR 1 내지 3의 아미노산 서열을 표 5에 각각의 변이체의 FR1 내지 FR4의 아미노산 서열을 표 6에 기재하였다.

[227]

[228] [표5]

hzVSF_var 7	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETGTRAMD Y(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGSPT(서열번호 7)
hzVSF_var 8	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETG <u>N</u> RAMD(서열번호 15)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGSPT(서열번호 7)
hzVSF_var 9	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETGTRAMD Y(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>NR</u> GD(서열번호 18)	QHFYGSPT(서열번호 7)
hzVSF_var 10	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETG <u>N</u> RAMD Y(서열번호 15)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>NR</u> GD(서열번호 18)	QHFYGSPT(서열번호 7)
hzVSF_var 11	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETGTRAMD Y(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>NR</u> GD(서열번호 18)	QHFYGT <u>P</u> RT(서열번호 19)
hzVSF_var 12	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETG <u>N</u> RAMD Y(서열번호 15)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>NR</u> GD(서열번호 18)	QHFYGT <u>P</u> RT(서열번호 19)

hzVSF_var 13	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQ G(서열번호 14)	ETGTRAMD Y(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>N</u> LAD(서열번호 16)	QHFYGSPT(서열번호 7)

[229]

[230] [표6]

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hzVSF_W T	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r1	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r2	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r3	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r4	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r5	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r6	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r7	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27

hzVSF_var8	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var9	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var10	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var11	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var12	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var13	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27

[231]

[232] 상기에서 제조한 13개의 변이체는 야생형에 비해 면역원성이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[233]

[234] 실시예 5-3: hzVSF 야생형 및 이의 변이체의 epitope count 확인

[235]

[236] hzVSF 야생형과 이의 면역원성을 감소시킨 상기 변이체 중 대표적인 변이체인 hzVSF_var12 및 hzVSF_var13의 epitope count와 현재 항체의약품으로 제약시장에서 블록버스터 의약품인 4종의 epitope count를 비교한 결과, 표 7에 나타낸 바와 같이, 각 HLA class II에서 상대적인 면역원성 가능성을 확인할 수 있었다.

[237]

[238] [표 7]

단백질 종류	DRB1	DRB 3/4/5	DQ	DP	Total
hzVSF w	31	17	1	3	52
hzVSF_var1	30	18	1	3	52
hzVSF_var2	30	17	0	3	50
hzVSF_var3	30	16	0	3	49
hzVSF_var4	28	16	0	3	47
hzVSF_var5	30	16	1	3	50
hzVSF_var6	29	16	1	3	49
hzVSF_var7	28	15	1	3	47
hzVSF_var8	27	14	1	3	45
hzVSF_var9	27	14	0	3	44
hzVSF_var10	26	13	0	3	42
hzVSF_var11	25	14	0	3	42
hzVSF_var12	24	13	0	3	40
hzVSF_var13	29	17	0	3	49
Humira (human)	25	12	4	1	42
Remicade (chimeric)	74	37	3	1	115
Rituxan (chimeric)	65	33	9	3	110
Herceptin (humanized)	40	20	3	1	64

[239]

[240] 상기 표 7에서 total 값이 높을수록 세계전체인구에서 HLA class II에 의한 부작용의 가능성이 높음을 의미한다. 상기 결과를 통해 면역원성이 감소된 본 발명의 hzVSF_var12 및 hzVSF_var13의 epitope count가 전 세계적으로 시판되고 있는 4종의 의약품 중 면역원성이 가장 낮은 Humira와 비슷한 것을 확인할 수 있으며, 이와 같은 결과는 본 발명의 인간화 항체들이 야기할 수 있는 중대한 부작용이 매우 낮을 것임을 시사하는 것으로, 안전한 의약품으로서의 안정성을 뒷받침하는 것이다.

[241]

[242] 실시예 5-4: hzVSF 변이체의 T 세포 분석 확인

[243]

- [244] hzVSF_var12 및 hzVSF_var13의 면역원성을 평가하기 위하여 51명의 건강한 기증자의 혈액을 이용하여, Lonza의 *in vitro* T 세포 분석으로 본 물질이 T 세포의 증식에 영향을 미치는지를 확인하였다. 각 기증자의 전체 말초혈액 단핵구(Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC)에 hzVSF_var12, hzVSF_var13 또는 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)를 처리한 후, 7일간 배양하였다. KLH는 산소를 운반하는 기능을 하는 메탈로단백질(metalloprotein)로서 항체 생산시 캐리어 단백질로 이용되며, 효과적으로 면역반응을 일으키기 때문에 양성 대조군으로 사용하였다. 이 후 CD3+CD4+Edu+로 염색되는 T 세포의 비율(%)을 측정하였다. 그 결과, KLH는 45 명의 혈액 기증자에서 T 세포의 증식이 일어나 88 %가 반응하였으나, hzVSF_var12 또는 hzVSF_var13에 반응하여 T 세포의 증식을 유도한 개체는 각각 3개체로, 5.8%만이 본 물질에 반응하였다(도 14).
- [245] 한편, 대조군으로 7일간 배양한 PBMC를 이용하여 KLH, hzVSF_v12 또는 hzVSF_v13에 의해 유도된 T 세포 증식의 자극지수(stimulation index; SI)를 계산하였다. SI값이 2보다 크면 사람에게 적용하였을 때 면역원성이 클 것으로 예상되고, SI 값이 0.5보다 작으면 오히려 T 세포의 증식을 억제하는 것으로 예상된다. 그 결과 hzVSF_v12 및 hzVSF_v13은 1.12 및 1.03의 낮은 값의 SI 값으로, 대부분의 개체에서 0.6 이상 2 이하의 SI 값을 나타내는 것을 확인하였다. 반면에 양성 대조군으로 사용된 KLH는 3.91의 높은 SI 값을 보였다(도 15, 도 16, 및 표 8).

[246]

[247] [표8]

Product(Antigen)	Mean SI	p-value
hzVSF_var12	1.12	0.008
hzVSF_var13	1.05	0.3229
KLH	3.91	<0.0001

[248]

- [249] 이러한 결과로 hzVSF_v12 및 hzVSF_v13은 실제로 피부 질환에 걸린 환자에게 투여 시 면역원성이 적을 것으로 보이며, 이에 따른 부작용이 낮을 것으로 예상된다.

[250]

[251] **실시예 6: 사람의 정상 조직과 VSF간의 반응성 조사**

[252]

- [253] 이하에서는 상기 실시예 1 내지 5에서 제조 및 확인한 hzVSF (이하, VSF)의 피부 질환에 대한 치료 효과를 다방면으로 확인하고자 하였다.

[254]

- [255] 먼저, 사람의 정상 조직과 VSF간의 반응성을 조사하기 위해, 사람의 주요

장기에 대한 정상조직이 배열 되어있는 슬라이드인 조직마이크로어레이(tissue microarray, TMA)를 이용하여 mVSF로 면역조직화학염색을 수행하였다.

[256]

[257] 그 결과, 정상 조직들에서는 mVSF로 인한 염색이 전혀 이루어지지 않았다 (도 17). 따라서, 정상 조직에서는 VSF의 수용체인 VR이 발현되지 않으며, VSF는 실질적으로 피부 질환이 발생한 피부 세포에만 작용할 것임을 알 수 있다. 또한, VSF는 정상 조직에 영향을 미치지 않아, 약학 조성물 등으로 사용되더라도 부작용이 낮으며, 약리 효과가 우수할 것임을 알 수 있다.

[258]

[259] **실시예 7: 다양한 피부질환에서의 VR 발현 확인**

[260]

[261] 상기 실시예 6에서는 정상 조직 (정상 세포)에서는 VR이 발현되지 않음을 확인하였는바, 피부 질환이 발생한 피부 조직에서는 VR이 발현되는지 여부를 확인하고자 하였다.

[262]

[263] 먼저, 다양한 피부 질환자의 피부조직이 고정된 슬라이드를 이용하여 mVSF로 면역조직화학염색을 수행하였다. 각 단계의 구체적인 실험 방법은 아래와 같다.

[264]

[265] **실시예 7-1: 파라핀 포매**

[266]

[267] 피부질환자 유래 조직의 피부 시편을 10% NBF(Neutral buffered formalin)에 48시간 고정하였다. 고정된 피부 시편에서 고정액(10% NBF)을 제거한 후 1X PBS에 30분 간 교반기를 이용하여 수세하였다. 1X PBS를 제거한 후 70%, 90%, 100% 알코올에 1시간씩 교반기에서 탈수화 과정을 진행하였다. Xylene : 100% 알콜(1:1)의 용액에서 1시간 동안 투명화 과정 전처리를 진행 하였다. 이후, Xylene을 1시간씩 3번 투명화 과정을 진행 하였으며, 60 °C에서 녹인 파라핀을 이용하여 1시간 동안 2번의 침투 과정을 진행하였다. 이후, 60 °C 오븐에 녹인 파라핀을 12시간 피부 시편에 처리하여 침투 과정을 진행하였다. 파라핀 조각 제조 기계를 이용하여 60 °C로 녹인 파라핀을 몰드에 50% 만 채우고 피부 시편을 넣은 후, 녹인 파라핀을 50% 추가하였다. 그 후 콜드 패드 위에서 1시간, 실험 테이블 위에서 6시간 동안 파라핀 몰드를 건조하였다.

[268]

건조가 끝난 후 몰드를 제거하여 파라핀 블록을 얻었으며, 이는 냉장보관(4°C) 하였다. 구체적으로는, 아이스 상자에 얼음을 80% 채운 후 적당량 수돗물을 넣어 차가운 상태를 만든 후, 냉장 보관된 파라핀 블록을 시편이 있는 방향으로 하여 아이스 상자에 넣어 두었다. 이는, 블록 상태가 차가워져 있지 않으면 조직이 갈라져서 올바른 조직을 얻을 수가 없기 때문이다.

[269]

이후, 조직 박절기를 이용하여 4 μ m로 조직을 박절하였고, 이를 50% 알코올에 담근 후 43 °C의 항온 수조에 넣었다. slide를 이용하여 박절된 피부 조직을

slide에 붙였다. Slide를 43 °C로 데워진 히팅 패드 위에 올려서 1시간 동안 건조 후, 냉장보관(4 °C) 하였다.

[270]

[271] 실시예 7-2: 헤마톡실린-에오신 염색 (H&E staining)

[272]

[273] Xylene에 피부 시편 slide를 10분간 정치하였다. 새로운 Xylene을 채우고, slide를 10분간 정치하였으며, 이후 Xylene : 100% 알코올(1:1)에 3분간 정치하였다. 그 다음, 100%, 95%, 90%, 70%, 50% 알코올에 각각 3분간 정치하여 탈-파라핀 과정을 진행하였다. 이를 흐르는 수돗물에 10분간 수화 시킨 후, 해리스 헤마톡실린(Harris Hematoxylin)을 3분간 정치하여 먼저 핵을 염색을 하였다. 그 후 흐르는 수돗물에서 5분간 수화 과정을 진행하였다.

[274] 염색된 헤마톡실린을 제거 하고자 1% 염산(몇 방울)을 첨가하여 탈색하고, 에오신(Eosin)을 3분간 정치하여 주변 조직을 염색하였으며, 흐르는 수돗물에서 3분간 수화 과정을 진행 하였다. 그 다음, 70%, 90%, 95%, 100% 알코올에서 3분간 정치시키고, Xylene에서 5분간 정치한 후 유기용매 봉입제로 봉입하였다. 후드에서 slide를 xylene 냄새가 없어 질 때까지 건조한 후 현미경을 이용하여 조직을 관찰하였다.

[275]

[276] 실시예 7-3: 면역조직화학 염색 (Immunohistochemistry, IHC)

[277]

[278] Xylene에 피부 시편 slide를 10분간 정치하였다. 새로운 Xylene을 채우고, slide를 10분간 정치하였으며, 이후 Xylene : 100% 알코올(1:1)에 3분간 정치하였다. 그 다음, 100%, 95%, 90%, 70%, 50% 알코올에 각각 3분간 정치하여 탈-파라핀 과정을 진행하였다. 이를 흐르는 수돗물에 10분간 수화 시킨 후, 3% 과산화수소에 5분간 정치하고, PBS로 3분씩 2번 수세하였다. Retrieval buffer에 slide를 넣은 후 전자레인지(95 °C)에서 10분간 끓이고 (조직이 마르지 않게 buffer가 끓어서 넘치면 부족한 buffer를 채워 주었다), 실온에서 30분간 buffer를 식혔다. 이를 PBS로 3분씩 2번 수세하였다. 1% BSA(Bovine Serum Albumin)를 1xTBST(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)를 이용하여 만든 후 실온에서 1시간 정치하였다. mVSF(1:50)와 함께 4 °C 항습 챔버에서 하루 밤 동안 배양하였다. 1xTBST로 10분씩 3번 수세하였다. HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 항체(1:2000;)와 함께 30분 동안 상온에서 배양하였다. 1xTBST로 10분씩 3번 수세하였다. 이후, DAB(Diaminobenzidine) : 과산화수소(1:20) 용액에 5분간 정치하여 색원체(chromogen)를 검출하였으며, 해리스 헤마톡실린(Harris Hematoxylin)을 30초간 정치하여 핵을 염색 하고, 흐르는 수돗물에서 수화 과정을 진행하였다. 마지막으로, 수용성 봉입제를 이용하여 봉입하였다.

[279]

- [280] 실시예 7-4: 피부질환 환자의 피부조직에서의 VR 발현 확인 결과
- [281]
- [282] 상기와 같은 방법으로, 다양한 피부 질환자의 피부조직에서 VSF의 수용체이면서, 피부 질환이 발생한 피부 세포에서만 발현되는 바이오마커인 VR의 발현을 면역조직화학염색을 통해 확인하였다.
- [283] 구체적으로, 피부 질환 환자의 피부조직에 편치 생검을 하여, 상기 방법으로 파라핀 블록을 만들었으며, 이에 H&E 염색을 수행하고 mVSF로 면역조직화학염색을 수행하여 VR 발현을 확인하였다.
- [284]
- [285] 그 결과, 도 18 내지 도 20에서 볼 수 있듯이, 10 명의 장미색비강진 환자의 모든 피부조직에서 VR이 발현되었으며, 그 외 대상포진, 만성단순태선, 단순포진 환자의 피부 조직에서는 VR이 90% 이상 발현되었다. 또한, 원형습진, 물사마귀, 건선, 사마귀, 아토피피부염, 접촉성 피부염 환자의 피부조직에서도 67% 이상의 VR 발현율을 보였으며, 최종적으로 총 110건의 피부질환자의 피부조직에서 88건, 즉 80%의 발현율로 VR이 발현됨을 확인하였다.
- [286]
- [287] 따라서, 현재까지 구체적이고도 정확한 발병원인이 밝혀지지 않은 피부질환인 장미색비강진, 만성단순태선, 화폐상습진, 건선, 아토피 피부염 등의 피부 조직에서는 상기 VSF와 결합할 수 있는 VR이 발현되므로, VSF를 처리하여 상기 피부질환에 대한 치료 효과를 기대할 수 있음을 알 수 있다.
- [288]
- [289] 이에, 피부 질환 환자에 대한 VSF의 치료 효과를 보다 구체적으로 확인하고자 하였다.
- [290]
- [291] 실시예 8: 피부질환 환자에서 VSF의 치료 효능 평가
- [292]
- [293] 실제 피부질환 환자를 대상으로 VSF의 치료 효과를 확인하고자 하였다.
- [294]
- [295] 본 평가는 보다 객관적인 효능 평가를 위해 피부과 전문의의 주도하에 진행 되었으며, hzVSF의 도포를 자발적으로 요구한 환자에 적용하였다.
- [296] hzVSF의 효능 평가는 1회 도포시 PBS에 녹아있는 5 mg/ml의 hzVSF를 50 μ l씩 사용하였으며, 피부과 전문의가 육안으로 치료 효과를 평가하였다.
- [297]
- [298] 실시예 8-1: 건선 환자에 대한 VSF의 치료 효능 확인
- [299]
- [300] 대상이 되는 1번 건선 환자는 오른쪽 다리에 건선이 있었으며 초진(2016년 8월 17일)에서 무릎쪽의 병변 부위에 hzVSF를 도포하고 2016년 8월 29일, 2016년 9월 7일에 추가적으로 도포하였다.

[301] 그 결과, 2016년 9월 15일 관찰 시, 다른 부위에 비해 hzVSF를 도포한 무릎 부위에서 현저한 치료효과가 확인되었으며, 2016년 9월 15일 4회째 도포 후 약 한달 후인 2016년 10월 20일에 병변 부위를 관찰한 결과, 도포 부위의 병변 부위가 90% 이상 감소함을 확인하였다 (도 21).

[302]

[303] 따라서, 상기 실시예 5에서 제조한 hzVSF는 건선과 같이 VR을 발현하는 피부질환에 대해 우수한 치료 효과가 있음을 알 수 있다.

[304]

[305] 한편, 2번 건선환자는 등에 건선이 있었으며 초진(2016년 8월 19일)시 생검을 하여 hzVSF의 수용체인 VR의 발현을 조직면역염색법을 통해 확인하여, VR 발현 정도를 확인하였으며, 초진시 등의 병변부위에 hzVSF를 도포하였으며 5일 후인 8월 24일 관찰 시 각질 생성 정도와 발적의 정도가 50% 이상 감소하였다 (도 22). 따라서, 2번 환자의 경우에서도 우수한 치료 효과를 확인하였다.

[306]

[307] 실시예 8-2: 만성단순태선 환자에 대한 VSF의 치료 효능 확인

[308]

[309] 1번 만성단순태선 환자는 오른쪽 다리에 병변 부위가 있었으며 초진(2016년 8월 7일)시 정강이쪽의 병변 부위에 hzVSF를 도포하였고 5일에 한번씩 도포하여 3회 도포 후인 2016년 8월 22일에 관찰 한 결과, 각질 생성 정도 및 발적 정도가 70% 이상 억제됨을 확인하였다 (도 23).

[310] 이후, 발목 쪽의 병변 부위에도 도포를 하였다. 구체적으로 정강이 부위는 2016년 9월 2일까지 총 6회 도포하고 한달 후인 2016년 10월 2일 관찰한 결과, 질환의 재발 없이 치료 효과가 유지됨을 확인하였다. 발목 쪽은 2016년 9월 2일까지 총 3회 투여하고 한달 후인 2016년 10월 2일 관찰한 결과 병변 부위가 50% 이상 감소됨을 확인하였다 (도 23).

[311]

[312] 2번 만성단순태선 환자는 양쪽 다리의 발목에 병변 부위가 있었으며 초진(2016년 8월 7일)시 병변 부위에 hzVSF를 도포하였다. 2016년 8월 19일에 두 번째 도포하고 약 6주 후인 2016년 9월 30일에 관찰 한 결과 거의 완치에 가까운 치료 효과를 보였다. 특히, hzVSF를 도포함에 따라 각질 생성부위가 거의 사라졌으며, 병변 부위가 90% 이상 감소하는 치료 효과가 나타났다 (도 24).

[313]

[314] 3번 만성단순태선 환자는 오른쪽 다리의 정강이에 병변 부위가 있었으며 초진(2016년 9월 17일)시 hzVSF를 1회 도포하였으며 이틀 후인 2016년 9월 19일 관찰 시 병변 부위가 50% 이상 감소함을 확인하여, 마찬가지로 hzVSF의 우수한 치료 효과를 확인하였다 (도 25).

[315]

[316] 실시예 8-3: 화폐상습진 환자에 대한 VSF의 치료 효능 확인

[317]

[318] 화폐상습진 환자는 오른쪽 종아리에 병변 부위가 있었으며 초진(2018년 2월 9일)시부터 hzVSF를 병변 부위에 매일 2회 도포하였고 2018년 2월 23일과 2018년 3월 26일에 관찰한 결과, 육안적으로 병변부위가 개선됨을 확인할 수 있었고 습진의 질환 정도를 홍반, 부종/결절/구진, 찰상, 태선화를 점수화한 EASI score가 초진에 비해 3차 방문 시(45일 후) EASI score가 11에서 4로 개선됨을 확인하였고, 소양감의 개선도도 3차 방문 시 10에서 5로 개선되어 치료 효과를 확인하였다 (도 26).

[319]

[320] 실시예 8-4: 피부질환 환자에 대한 VSF의 치료 효능의 정량적 측정

[321]

[322] 만성단순태선, 화폐상습진, 습진, 아토피 피부염, 및 건선이 발병한 환자들에서 초진 시부터 hzVSF를 병변 부위에 매일 2회 도포하였고 2차 및 3차 방문 때에 관찰하였다. 만성단순태선의 경우 초진 시부터 3차 방문 시까지 평균 40일 동안 진행하였으며 EASI score는 평균 8.5에서 4로 개선되었으며 소양감도 6.5에서 2.5로 개선되었다. 화폐상습진은 초진 시부터 3차 방문 시까지 평균 36일 동안 진행하였으며 EASI score는 평균 8.3에서 3으로 개선되었으며 소양감도 8에서 3으로 개선되었다. 습진은 초진 시부터 3차 방문 시까지 35일 동안 진행하였으며 EASI score는 5에서 1로 개선되었으며 소양감도 5에서 2로 개선되었다. 아토피 피부염은 초진 시부터 3차 방문 시까지 42일 동안 진행하였으며 EASI score는 10에서 4로 개선되었으며 소양감도 6에서 2로 개선되었다. 피부염은 초진 시부터 3차 방문 시까지 35일 동안 진행하였으며 EASI score는 6에서 3으로 개선되었으며 소양감도 5에서 4로 개선되었다. 건선은 초진 시부터 3차 방문 시까지 평균 26일 동안 진행하였으며 PASI score는 평균 8에서 3.6으로 개선되었으며 소양감도 6.3에서 2.6으로 개선되었다. 이러한 결과에서 육안적으로 병변부위가 개선됨을 확인할 수 있었고 습진의 질환 정도를 홍반, 부종/결절/구진, 찰상, 태선화를 점수화한 EASI score 및 건선 질환의 정도를 홍반, 두께, 인성을 점수화한 PASI score가 초진에 비해 3차 방문 시 모든 피부염 질환에서 개선됨을 확인하였고, 소양감의 개선도도 3차 방문 시 모두 개선되어 치료 효과를 확인하였다 (도 27 및 28).

[323]

[324] 이를 종합하면, 본 발명의 VSF, 즉 실시예 5 및 실시예 8에서 제조한 hzVSF는 건선, 만성단순태선, 장미색 비강진, 단순포진, 화폐상 습진, 물사마귀, 사마귀, 아토피 피부염, 접촉성 피부염과 같이, VR을 발현하는 피부질환에 적용될 경우 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있는바, VR을 발현하는 피부 질환에 대한 예방 및 치료용 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있다.

[325]

[326] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그

기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[327]

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 화합물, 펩타이드, 또는 앵타머인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 항체는 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 펩타이드의 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 이들의 이량체, 미니바디(minibodies), 디아바디(diabodies) 및 다량체(multimer) 또는 이중 특이성 항체 단편인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 피부 질환은 장미색 비강진, 대상포진, 만성단순태선, 단순포진, 화폐상습진, 습진, 물사마귀, 건선, 사마귀, 아토피 피부염 또는 접촉성 피부염인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 피부 질환은 만성단순태선, 건선, 화폐상습진, 습진, 아토피 피부염 또는 접촉성 피부염인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 7] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 화합물, 펩타이드, 또는 앵타머인 것인, 화장품 조성물.
- [청구항 9] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 화합물, 펩타이드, 또는 앵타머인 것인, 의약외품 조성물.
- [청구항 11] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 피부 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제.
- [청구항 12] 제12항에 있어서, 상기 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 화합물, 펩타이드, 또는 앵타머인 것인, 피부 외용제.
- [청구항 13] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물을, 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부 질환의 예방

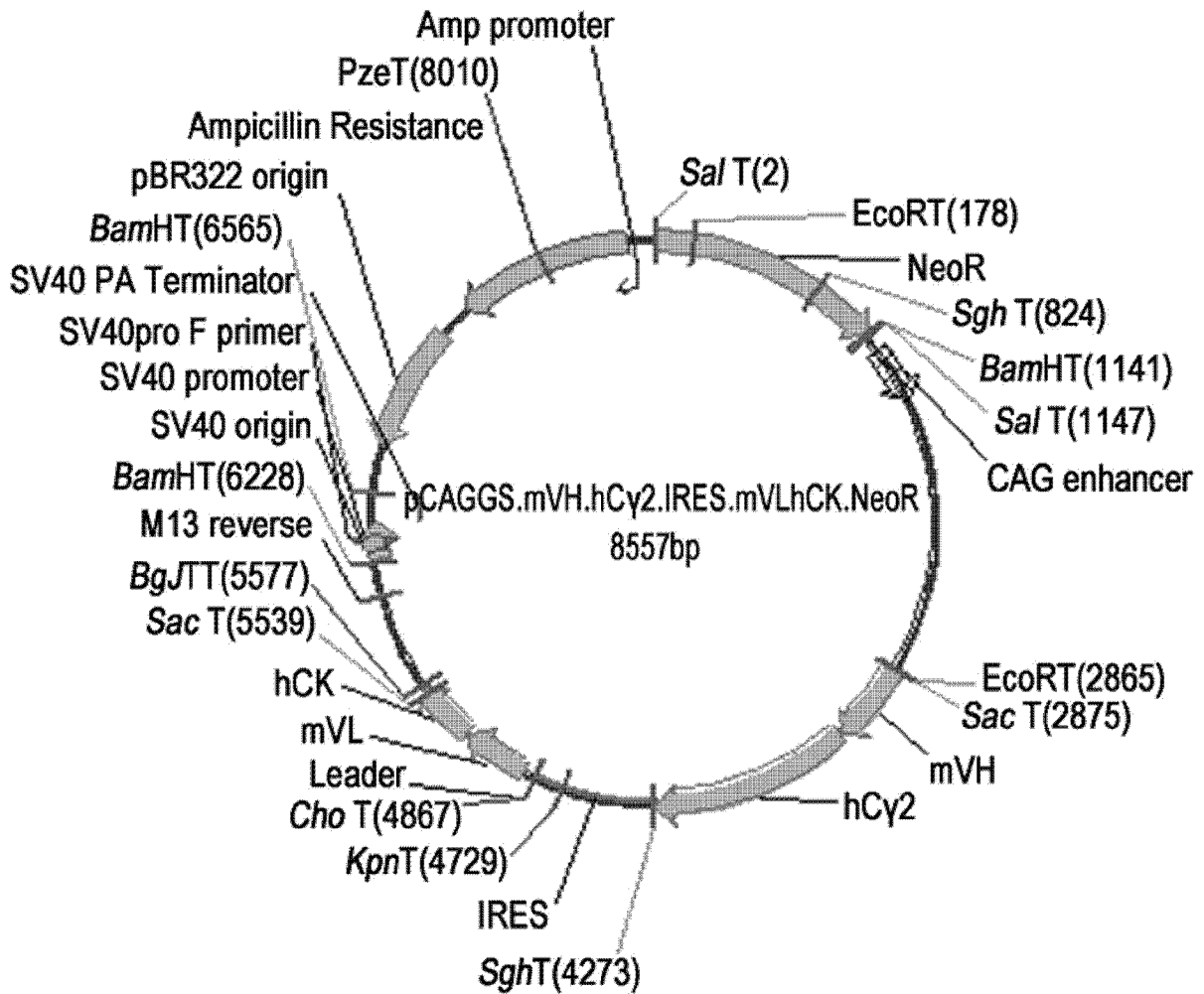
또는 치료 방법.

[청구항 14] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의, 피부 질환 예방 또는 치료 용도.

[청구항 15] 피부 질환을 예방 또는 치료하는 의약을 제조하기 위한, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도.

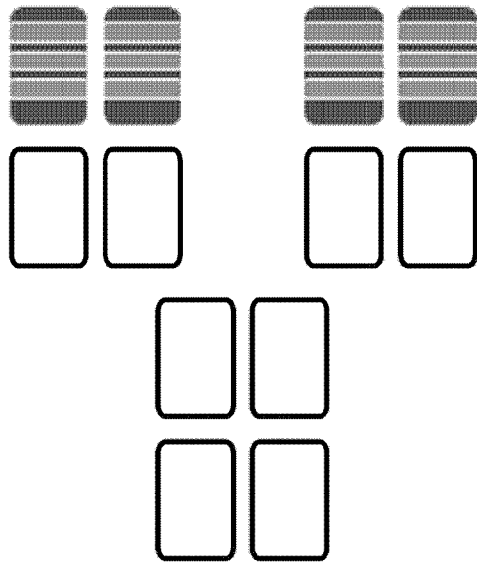
[청구항 16] 피부 질환을 개선하는 화장료, 의약품, 또는 피부 외용제를 제조하기 위한, 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도.

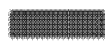
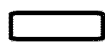
[도1]

pCAGGS.Ck.mVL.IRES.C γ ₂.mVH.neo

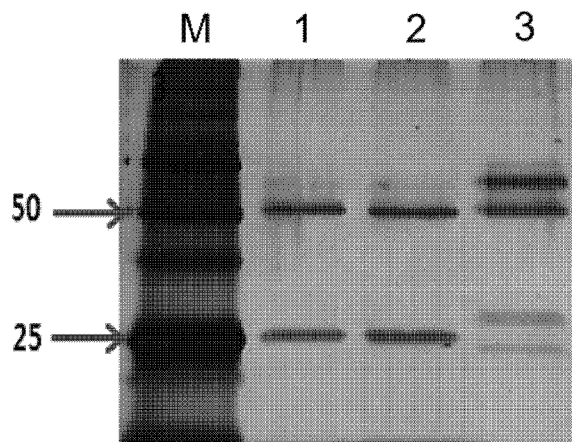
chVSF HC and LC
(simultaneous expression vectors)

[도2]



 Mouse sequence
 Human sequence

[도3]



1. chVSF γ 2
2. chVSF γ 4
3. mVSF

[도4]

CGTCGACGAGATCCAGCTGCAGCAGTCT

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCT

GGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACT
 CATTCACTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATT
 GGAAATATTGATCCTTACTATGGTAGTACTACTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACA
 TTGACTGTAGACAAATCTTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGA
 CTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGACTGGGACGAGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA
 GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

CCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTCCACCTCCACCGAGACCACTCCTCCTAGGCCACCT

CAGGAGGATCCGGTGA

GGTGGCTCTGGTGGAGGTGGCTCTGACATCCAGATGACTCAGTC

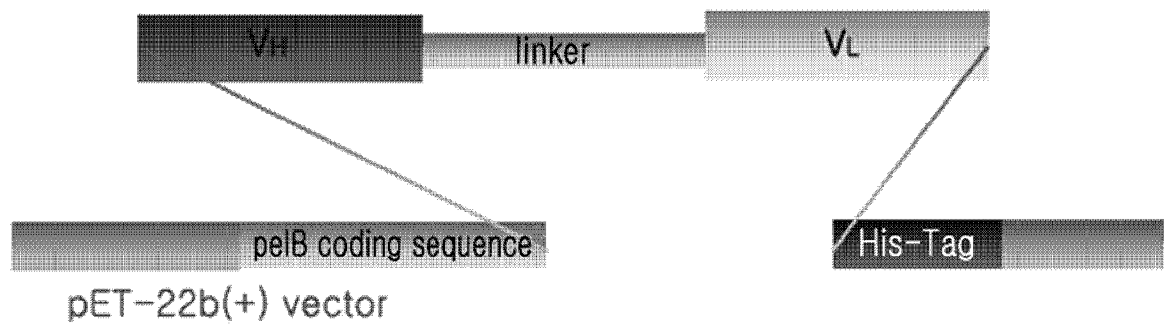
GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG

CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATGACATGTGAGCAAGTGAGAAATATTTACAGTAATTTAG
 CATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGTTGCAACAACTTAG
 CAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATC
 AACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTATGGTTCTCCTCGG
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

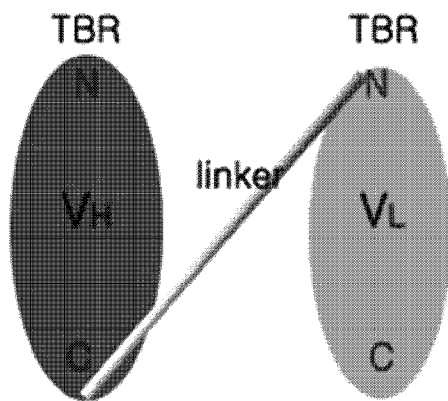
CCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGGAGCTCC

[도5]

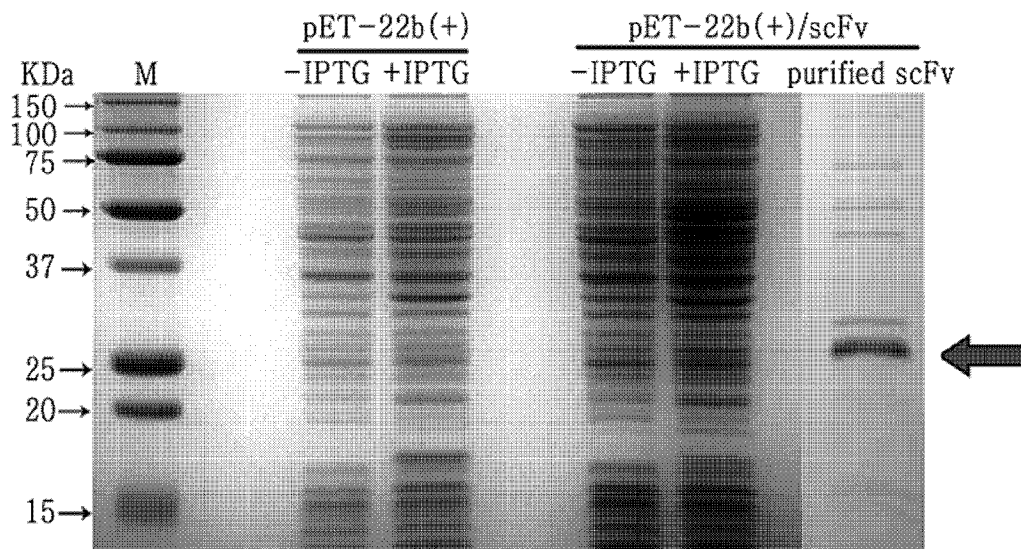
(A)



(B)



[도6]



Lane 1: molecular weight marker.

Lane 2: pET-22b (+) (no induction).

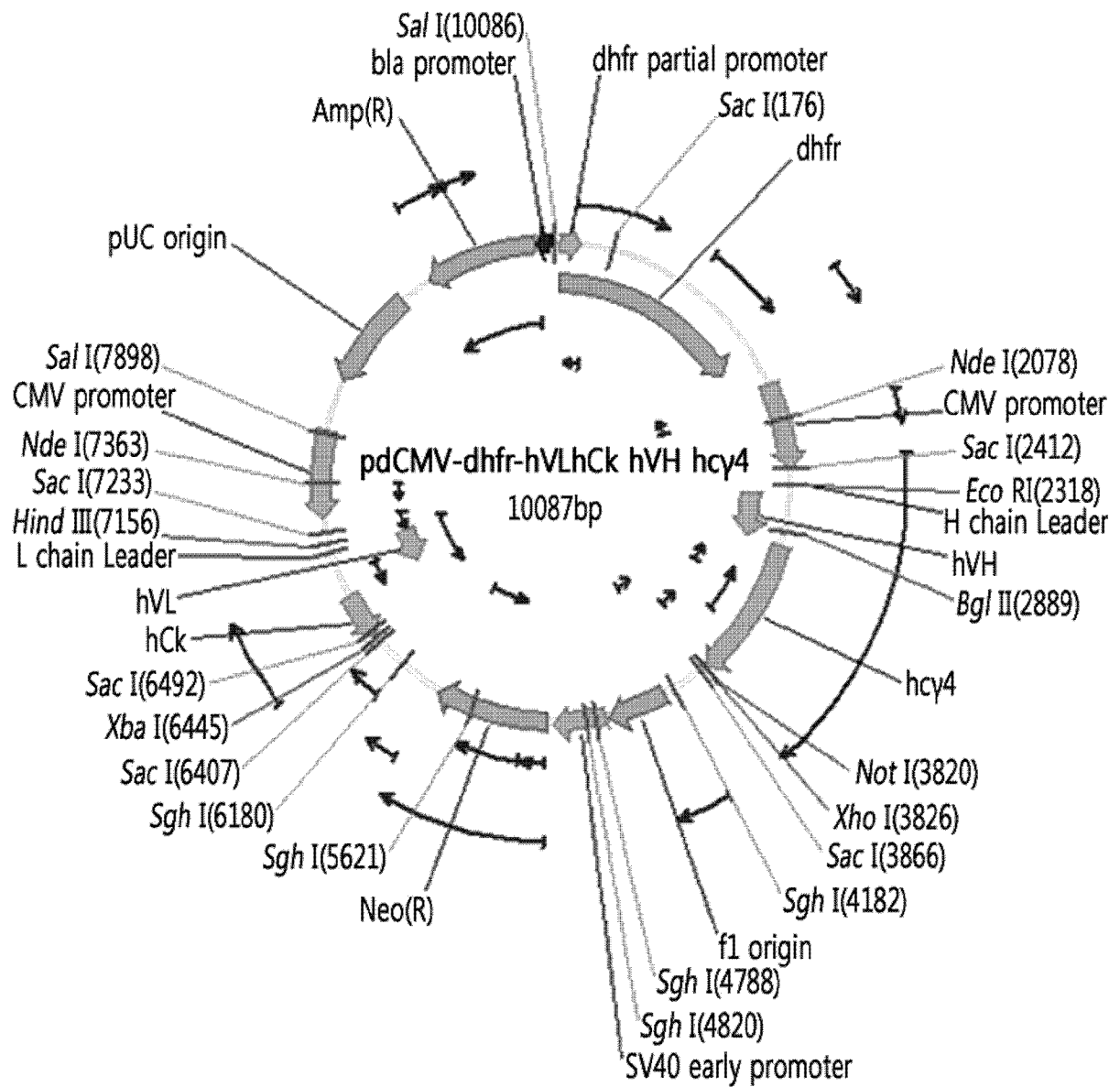
Lane 3: pET-22b (+) (IPTG induction)

Lane 4: pET-22b (+)/scFv (no induction)

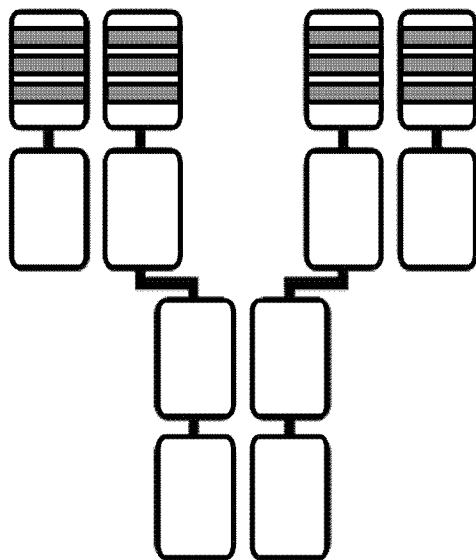
Lane 5: pET-22b (+)/scFv (IPTG induction)

Lane 6: purified scFv by Ni-NTA column (IPTG induction)

[도7]

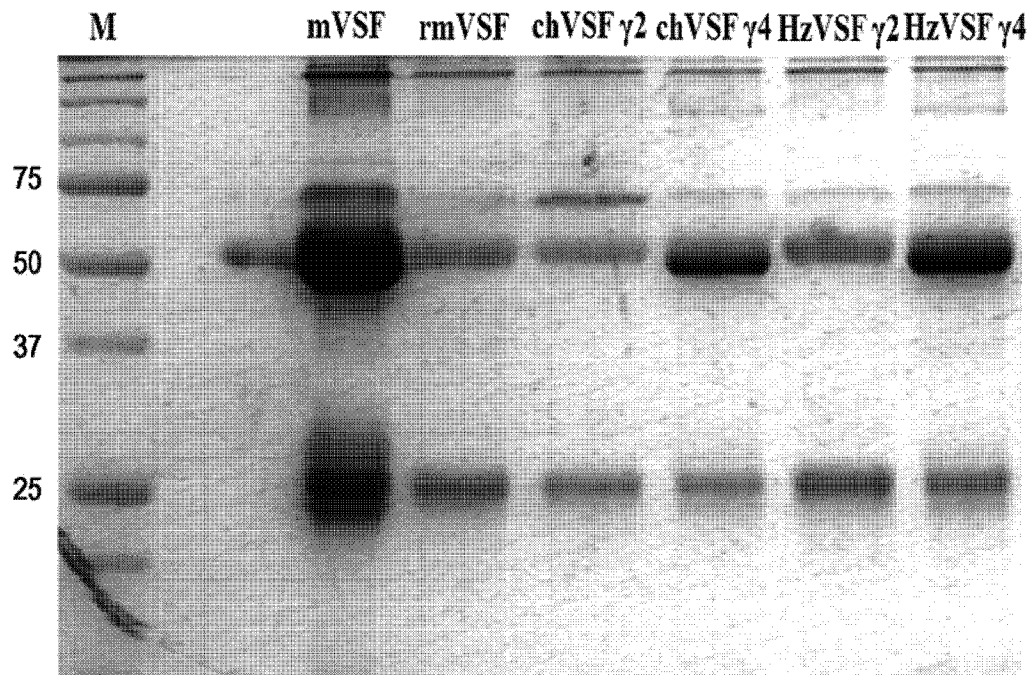


[도8]

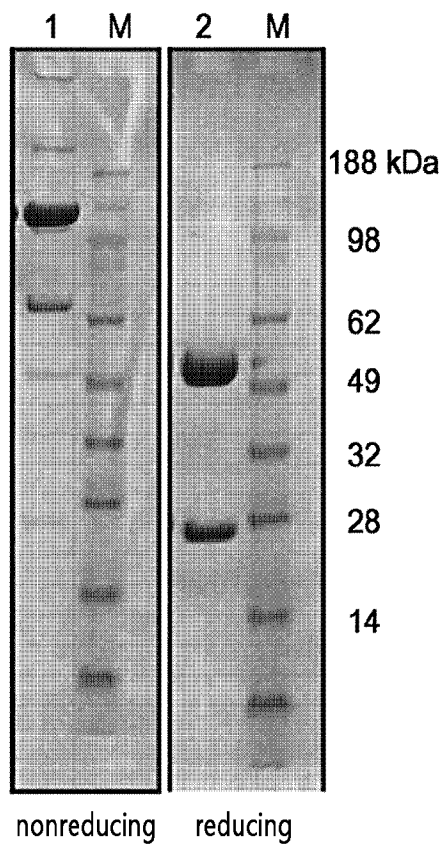


Humanized Ab

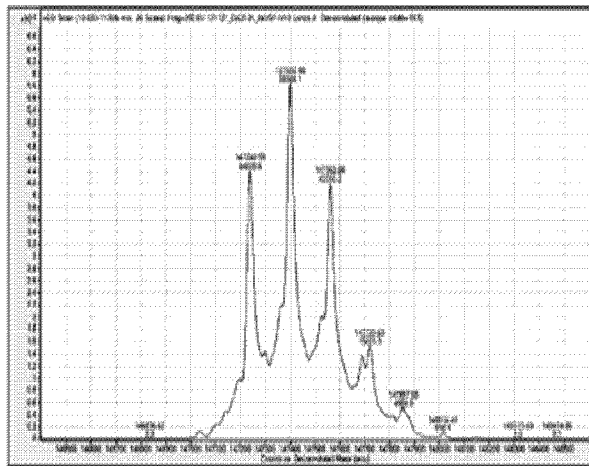
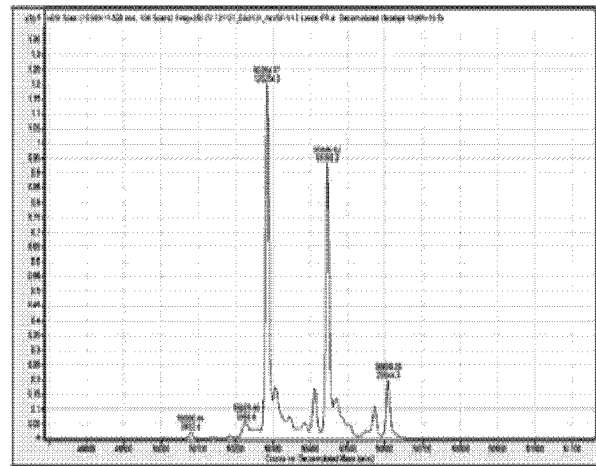
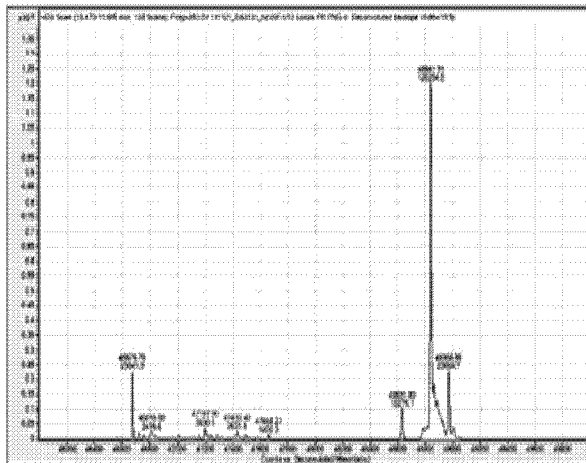
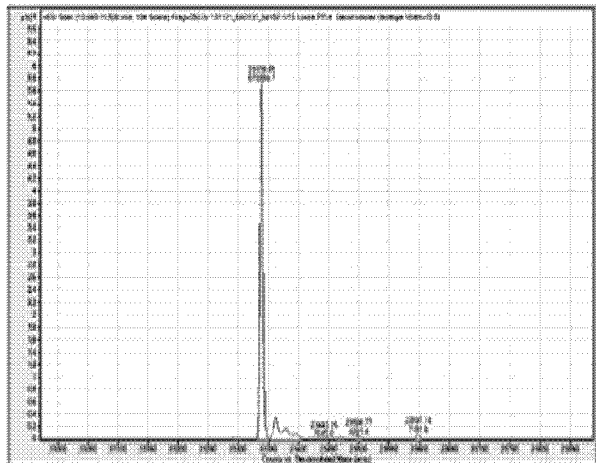
[도9]



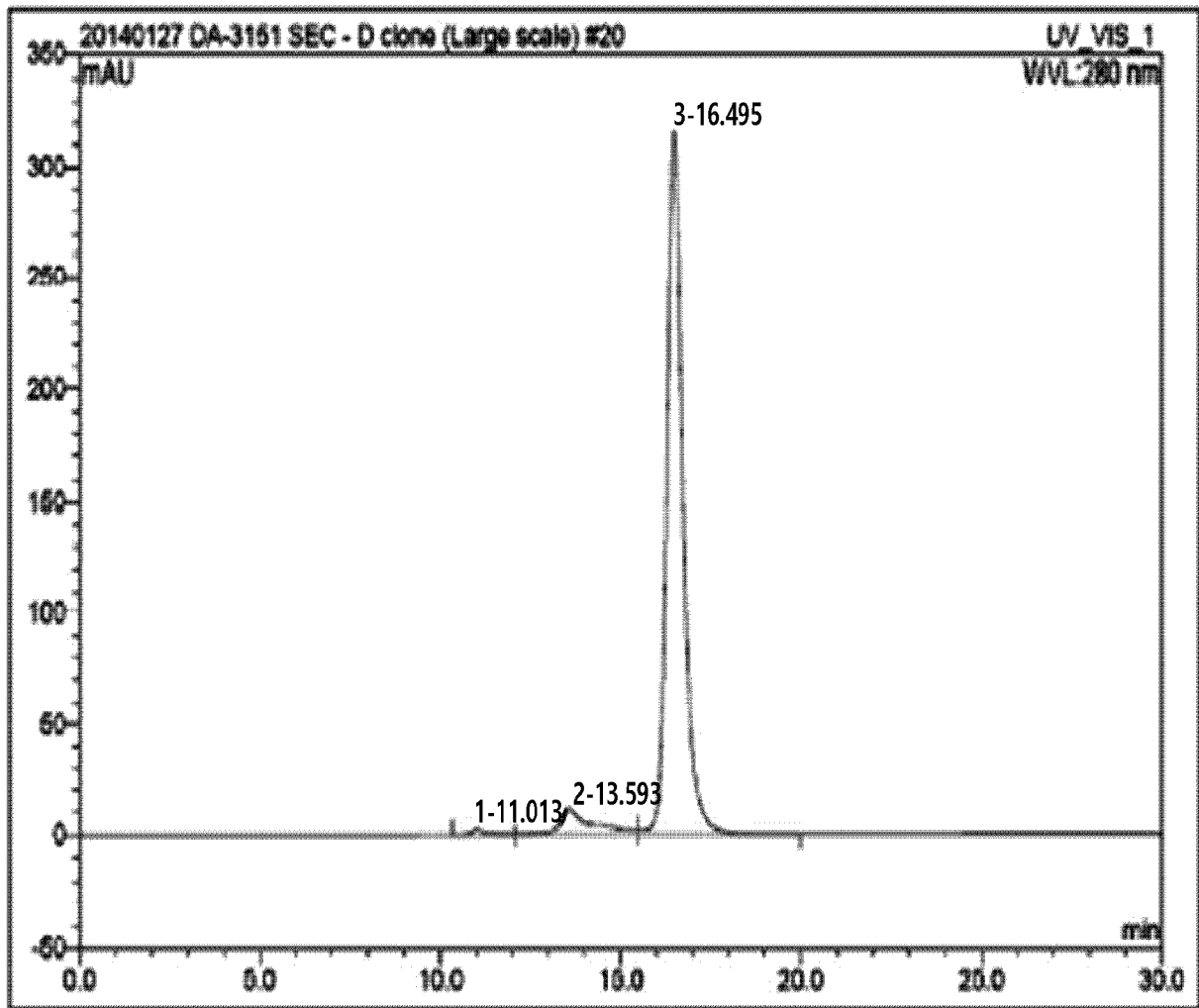
[도10]



[도 11]

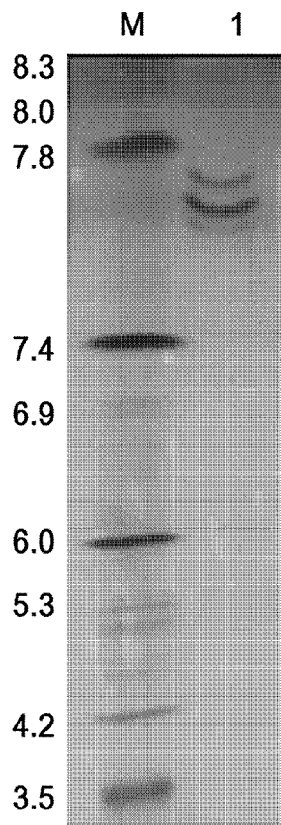
- Intact mass**Major 147242.59, 147402.98, 147562.86 Da ...****-Heavy chain (after partial reduction)****Major 50284.37, 50446.62, 50609.35 Da****- Heavy chain (partial reduction)
+PNGase F treatment (to remove N-linked glycans)****Major 48841.31 Da****-Light chain (after partial reduction)****Major 23338.88 Da**

[도 12]

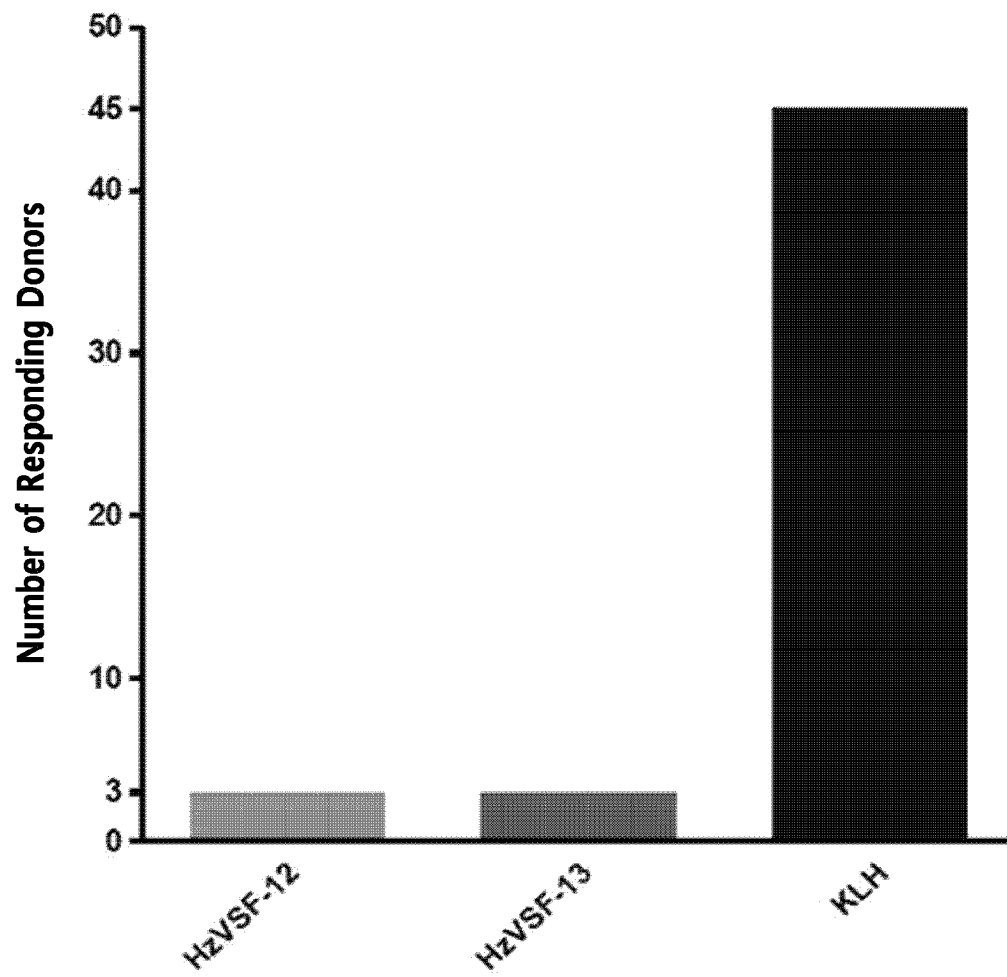


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	11.01	n.a.	2.262	1.304	0.72	n.a.	BM
2	13.59	n.a.	11.330	12.308	6.84	n.a.	M
3	16.49	n.a.	316.673	166.343	92.44	n.a.	MB
Total:			330.265	179.955	100.00	0.000	

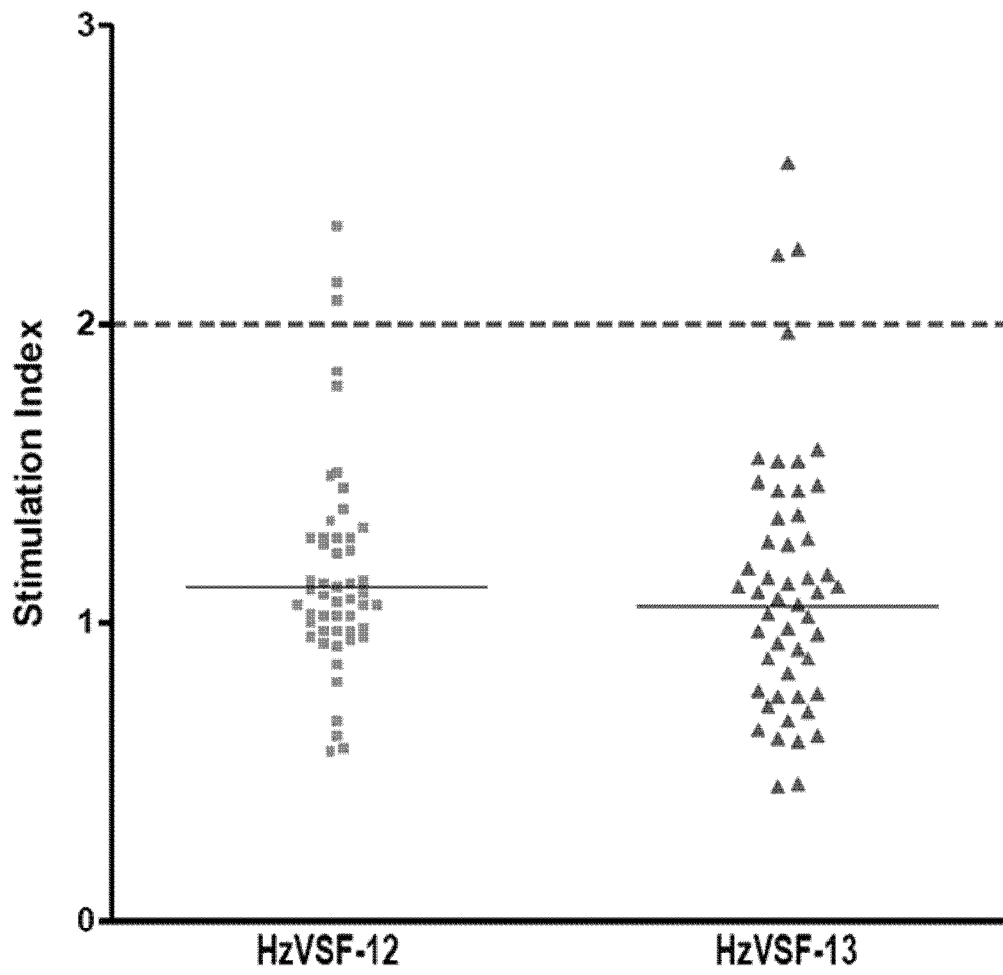
[도13]



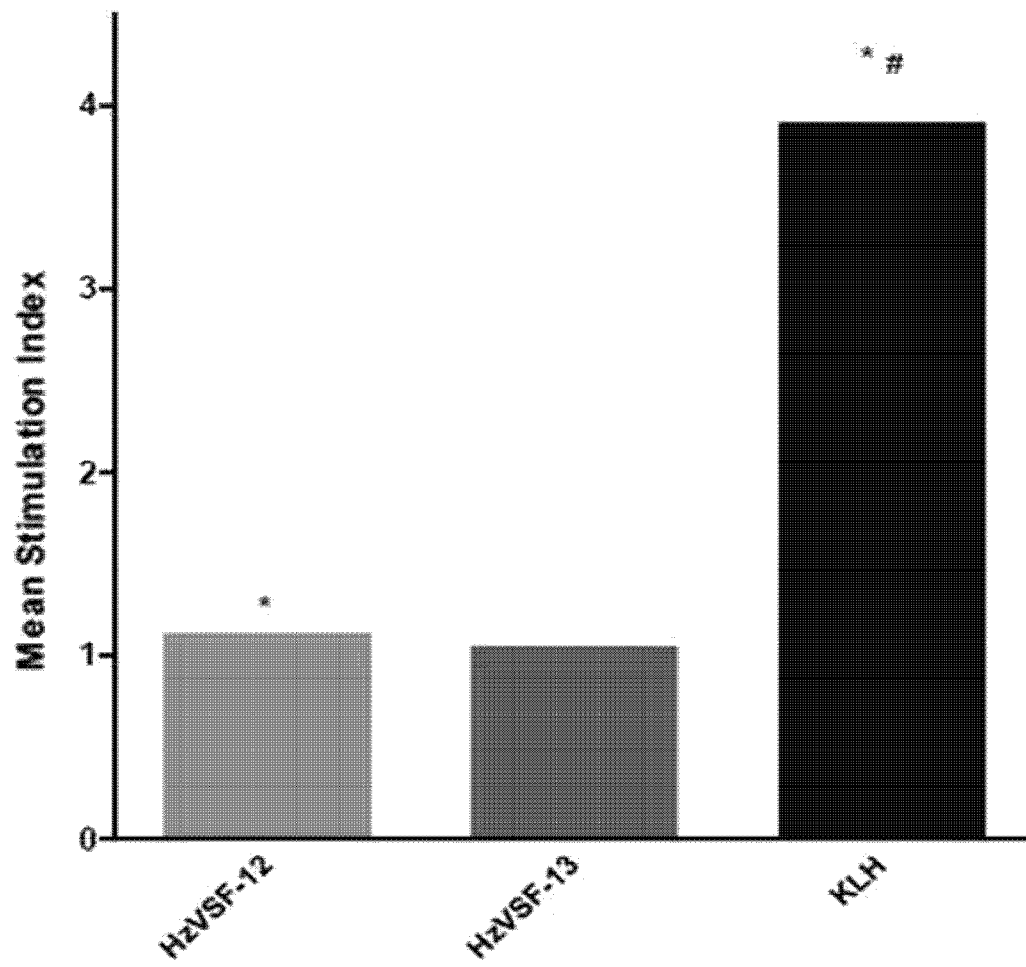
[도14]



[도15]



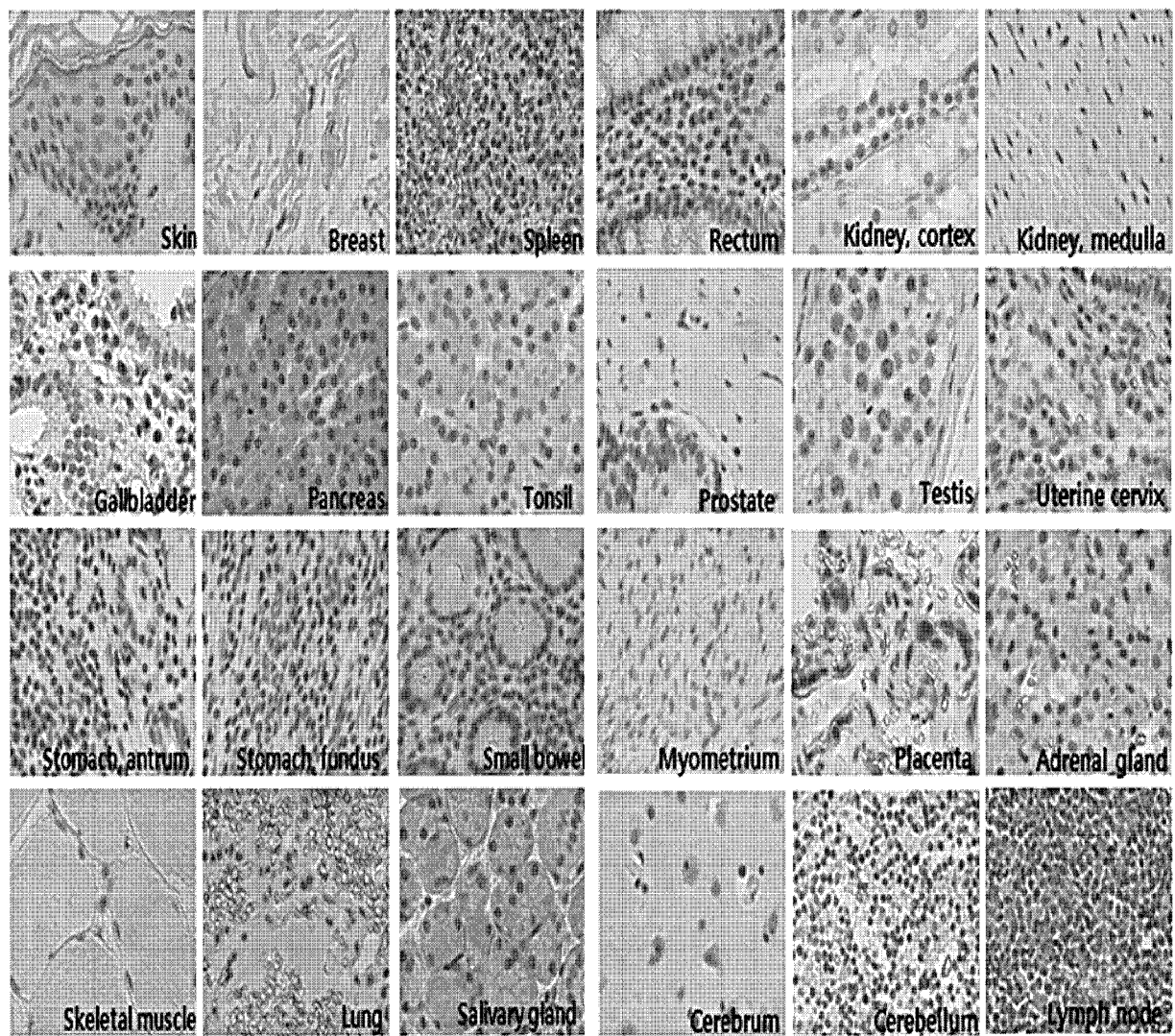
[도16]



* Significantly different to the blank

significantly different to HzVSF-12 and HzVSF-13

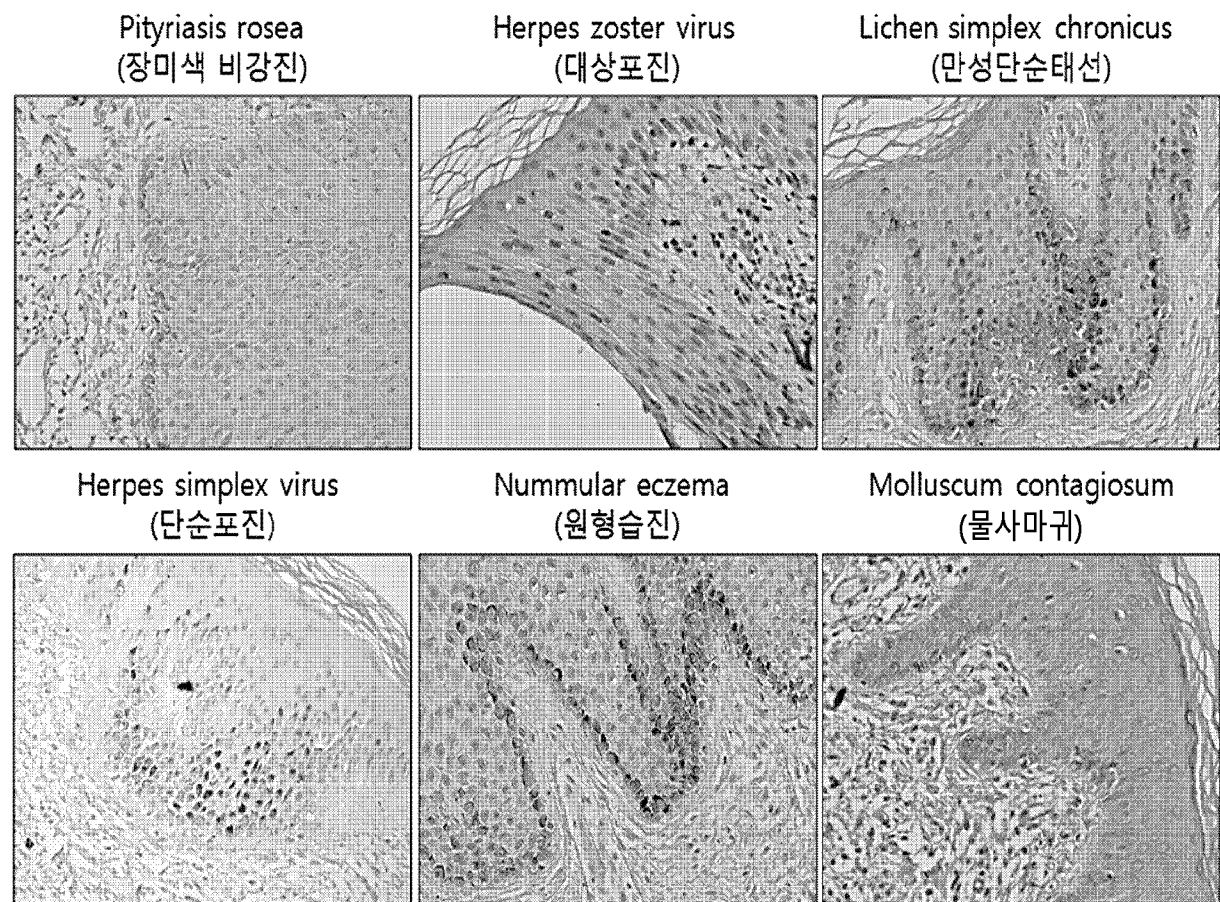
[도17]



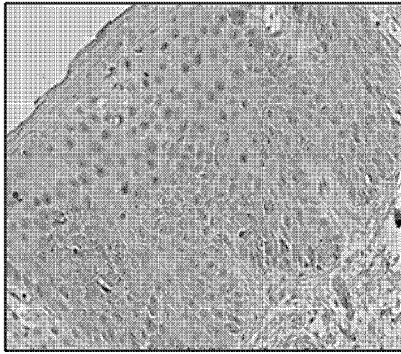
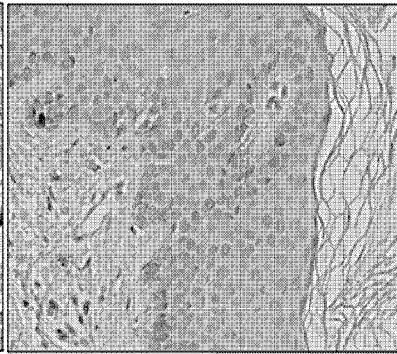
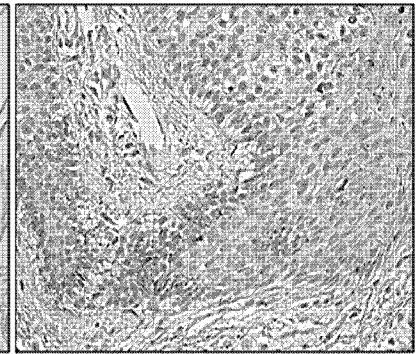
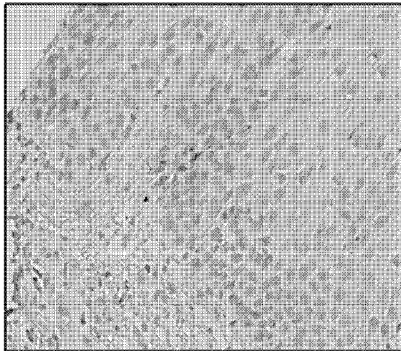
[도 18]

질병	VR 발현 (No. of positive case/No. of total case)	VR 발현 (%)
Pityriasis rosea(장미색 비강진)	10/10	100
Herpes zoster virus(대상포진)	3/3	100
Lichen simplex chronicus(만성단순태선)	13/14	93
Herpes simplex virus(단순포진)	9/10	90
Nummular eczema(원형습진)	15/17	88
Molluscum contagiosum(무사마귀)	10/14	71
Psoriasis(건선)	10/15	67
Verruca vulgaris(사마귀)	10/15	67
Atopic dermatitis(아토피 피부염)	6/9	67
Allergic contact dermatitis(접촉성 피부염)	2/3	67
Total	88/110	80

[도 19]

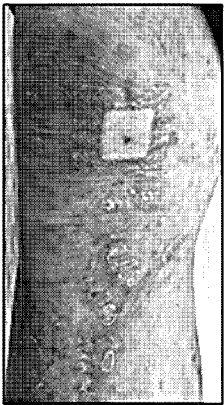
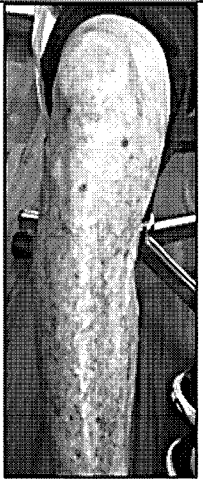
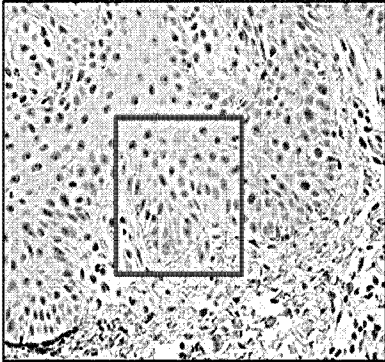
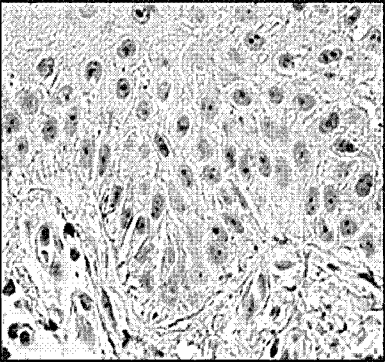


[도20]

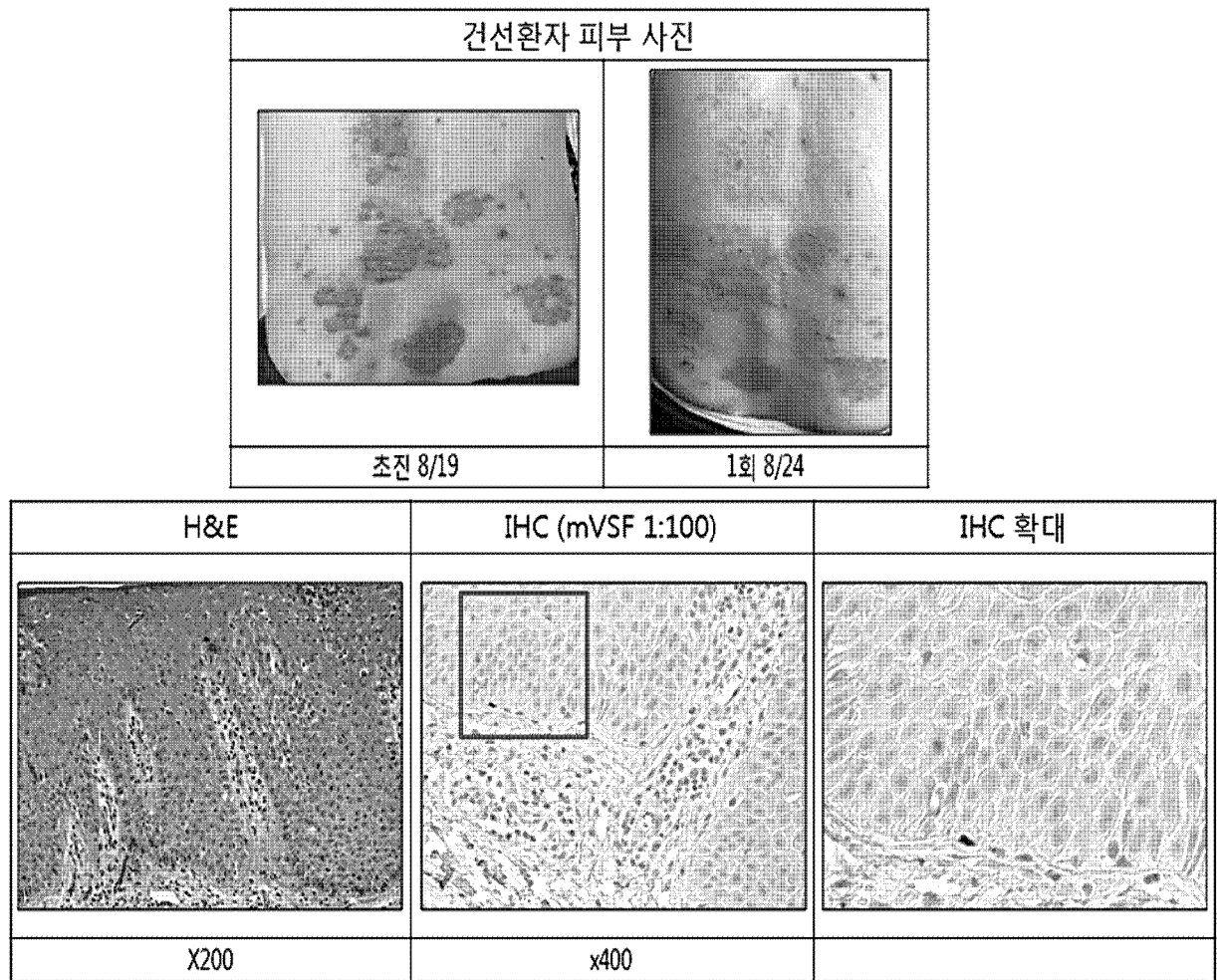
Psoriasis
(건선)Verruca vulgaris
(사마귀)Atopic dermatitis
(아토피 피부염)Allergic contact dermatitis
(접촉성 피부염)

[도21]

1. 홍OO (남, 64)

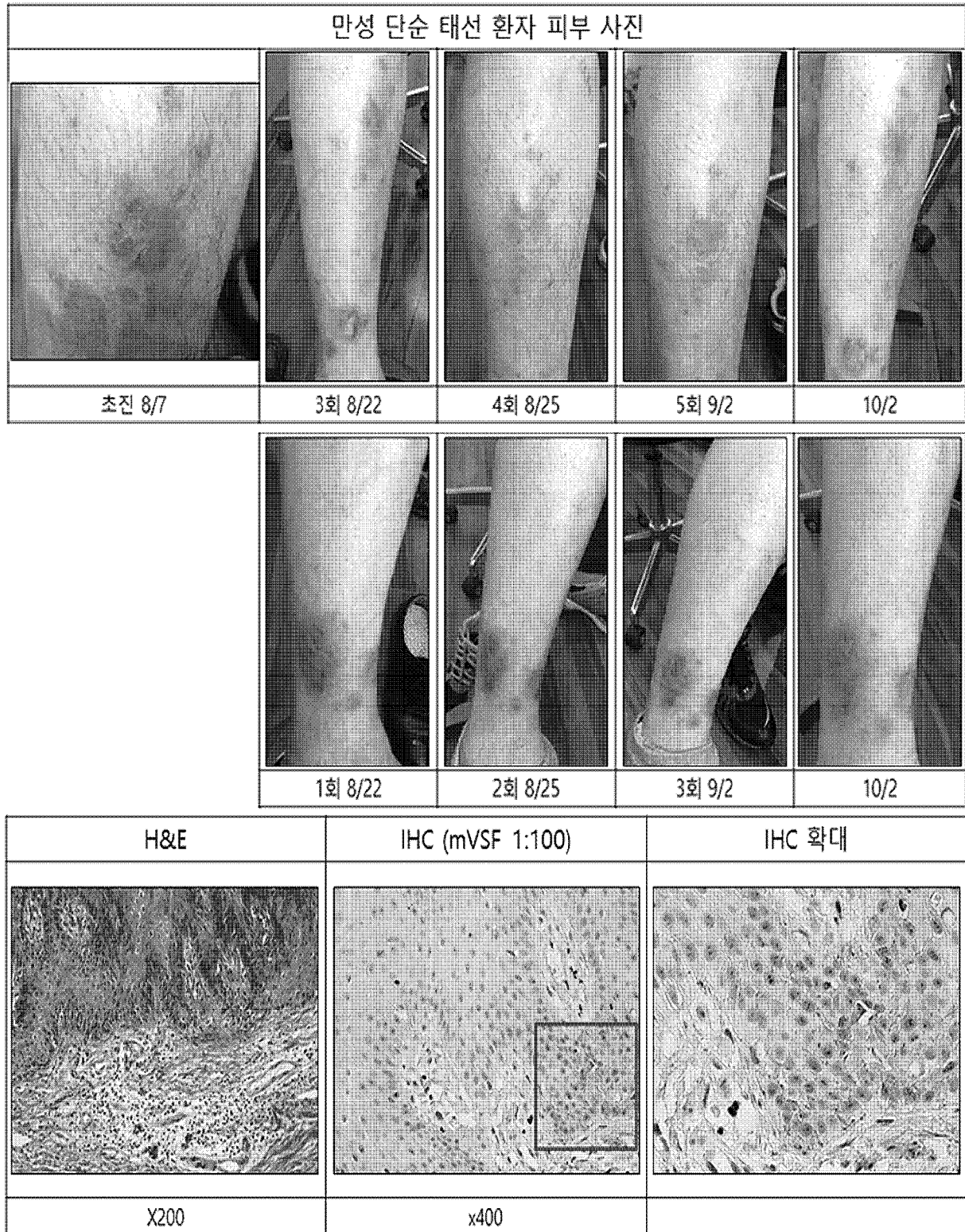
건선환자 피부 사진					
					
초진 8/17	1회 후 호전 8/29	2회 9/7	3회 9/15	바른 부위 호전 10/20	
H&E	IHC (mVSF 1:100)		IHC 확대		
					
x200	x400				

[도22]



[도23]

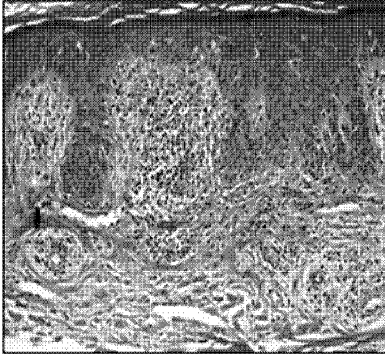
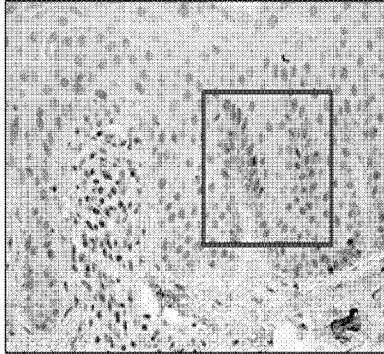
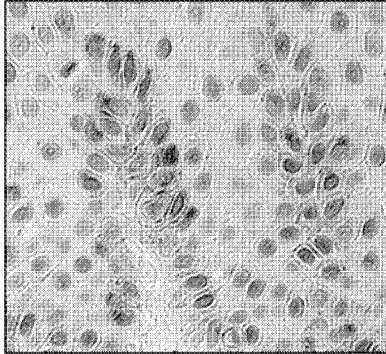
1. 정OO (남, 59)



[도24]

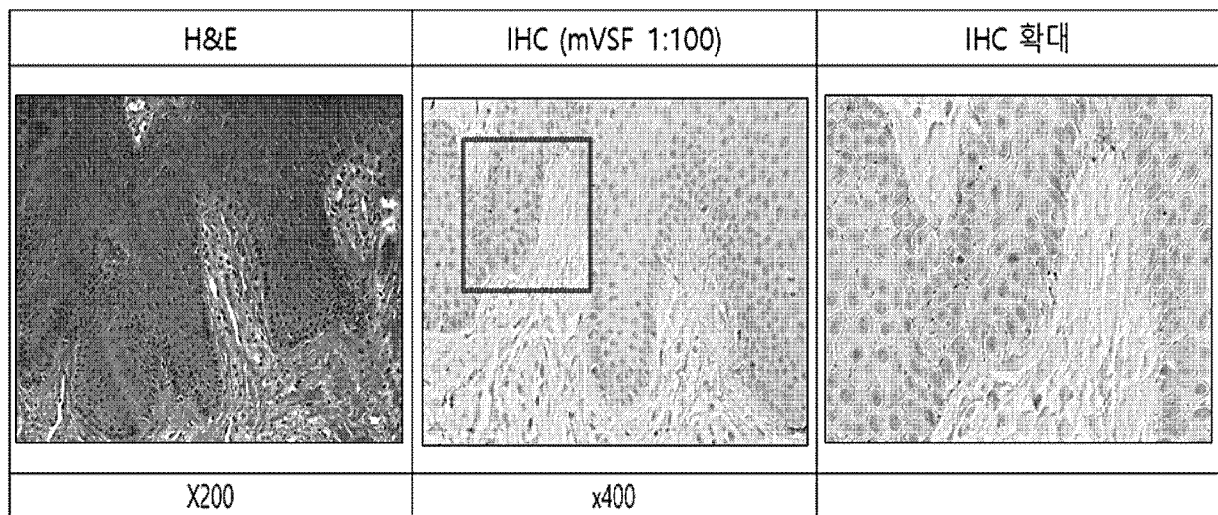
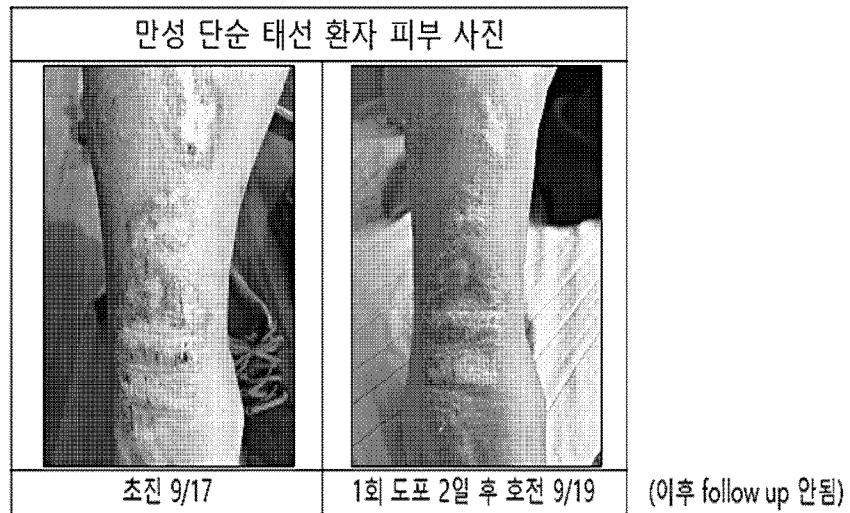
2. 함OO (남, 62)

만성 단순 태선 환자 피부 사진		
		
초진 8/7	1회 8/19	2회 도포 6주 후 9/30

H&E	IHC (mVSF 1:100)	IHC 확대
		
X200	x400	

[도25]

3. 이○○ (남, 63)



[도26]

KYI (김 ○○), M/62, 화폐상습진(nummular dermatitis)

	1차 방문 (18.02.09)	2차 방문 (18.02.23)	3차 방문 (18.03.26)	4차 방문 (18.04.26)
hzVSF-v13				

EASI-hzVSF-v13	1st	2nd	3rd
홍반	3	2	1
부종/결절/구진	3	2	2
찰상	2	2	1
태선화	3	2	0
소계	11	8	4

Visit	1st	2nd	3rd
hzVSF-v13	10	9	5

[도27]

			EASI/PASI hzVSF-v13			EASI/PASI hzVSF-v13
			1st	2nd	3rd	
001	F/27	Lichen simplex chronicus	8	6	2	-6
008	M/47	Lichen simplex chronicus	9	7	6	-3
002	M/62	nummular dermatitis	11	8	4	-7
003	M/52	nummular dermatitis	5	1	1	-4
011	F/63	nummular dermatitis	9	5	4	-5
006	M/29	eczema	5	4	1	-4
009	M/52	Atopic dermatitis	10	5	4	-6
012	M/58	dermatitis	6	4	3	-3
005	F/32	psoriasis	7	6	3	-4
007	M/71	severe psoriasis vulgaris	10	6	5	-5
010	M/66	psoriasis	7	7	3	-4

Difference from day 0, p value 0.4569

paired-t p 0.0002035

[도28]

			VAS hzVSF-v13			VAS hzVSF-v13
			1st	2nd	3rd	
001	F/27	Lichen simplex chronicus	7	5	1	-6
008	M/47	Lichen simplex chronicus	6	4	4	-2
002	M/62	nummular dermatitis	10	9	5	-5
003	M/52	nummular dermatitis	6	2	1	-5
011	F/63	nummular dermatitis	8	4	3	-5
006	M/29	eczema	5	5	2	-3
009	M/52	Atopic dermatitis	6	3	2	-4
012	M/58	dermatitis	5	4	4	-1
005	F/32	psoriasis	4	2	1	-3
007	M/71	severe psoriasis vulgaris	8	6	3	-5
010	M/66	psoriasis	7	8	4	-3

Difference from day 0, p value 0.491

paired-t p 0.0053038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 8/64(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; A61K 39/00; C07K 16/18; C12Q 1/68; G01N 33/574; A61K 39/395; A61K 8/64; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: vimentin-derived peptide, skin disease, vimentin, cellmembrane exterior, exposure

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2016-0146579 A (IMMUNEMED INC.) 21 December 2016 See paragraphs [0046], [0058] and [0067]; claims 1-3, 20, 21, 24 and 28; sequence no. 1.	1-12,14-16
A	DU, N. et al., "Cell Surface Vimentin Is an Attachment Receptor for Enterovirus 71", Journal of Virology, May 2014, vol. 88, no. 10, pages 5816-5833 See abstract; page 5816; and "Reagents and antibodies" section.	1-12,14-16
A	GenBank: AAV38414.1 (26 July 2016) See DEFINITION; and the sequences.	1-12,14-16
A	LIANG, J.-J. et al., "Vimentin Binding Is Critical for Infection by the Virulent Strain of Japanese Encephalitis Virus", Cellular Microbiology, 2011, vol. 13, no. 9, pages 1358-1370 See the entire document.	1-12,14-16
A	HOFMANN, I. et al., "Interference in Vimentin Assembly in Vitro by Synthetic Peptides Derived from the Vimentin Head Domain", Journal of Cell Science, 1992, vol. 101, pages 687-700 See the entire document.	1-12,14-16
A	US 2004-0259112 A1 (GEORGES, E. et al.) 23 December 2004 See the entire document.	1-12,14-16



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

07 DECEMBER 2018 (07.12.2018)

Date of mailing of the international search report

10 DECEMBER 2018 (10.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010049

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.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of entities including humans, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
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/KR2018/010049

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0146579 A	21/12/2016	AU 2016-277027 A1	21/12/2017
		CA 2988715 A1	15/12/2016
		CN 108026167 A	11/05/2018
		EP 3309169 A1	18/04/2018
		JP 2018-522582 A	16/08/2018
		WO 2016-199964 A1	15/12/2016
		WO 2016-200220 A1	15/12/2016
US 2004-0259112 A1	23/12/2004	AU 2003-296857 A1	14/07/2005
		CA 2509987 A1	07/07/2005
		EP 1695089 A1	30/08/2006
		JP 2007-515924 A	21/06/2007
		US 2006-0014225 A1	19/01/2006
		US 2010-0260667 A1	14/10/2010
		US 7550256 B2	23/06/2009
		US 7670604 B2	02/03/2010
		WO 2005-062058 A1	07/07/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 8/64(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; A61K 39/00; C07K 16/18; C12Q 1/68; G01N 33/574; A61K 39/395; A61K 8/64; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 비멘틴 유래 펩타이드, 피부질환, 비멘틴, 세포막 외부, 노출

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2016-0146579 A (주식회사 이문메드) 2016.12.21 단락 [0046], [0058] 및 [0067]; 청구항 1-3, 20, 21, 24 및 28; 서열번호 1 참조.	1-12,14-16
A	DU, N. 등, 'Cell surface vimentin is an attachment receptor for enterovirus 71', Journal of Virology, 2014.05, 88권, 10호, 페이지 5816-5833 초록; 페이지 5816; 및 "Reagents and antibodies" 섹션 참조.	1-12,14-16
A	GenBank: AAV38414.1 (2016.07.26) DEFINITION; 및 서열 참조.	1-12,14-16
A	LIANG, J.-J. 등, 'Vimentin binding is critical for infection by the virulent strain of Japanese encephalitis virus', Cellular Microbiology, 2011, 13권, 9호, 페이지 1358-1370 전체 문헌 참조.	1-12,14-16
A	HOFMANN, I. 등, 'Interference in vimentin assembly in vitro by synthetic peptides derived from the vimentin head domain', Journal of Cell Science, 1992, 101권, 페이지 687-700 전체 문헌 참조.	1-12,14-16
A	US 2004-0259112 A1 (GEORGES, E. 등) 2004.12.23 전체 문헌 참조.	1-12,14-16

☐ 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

2018년 12월 07일 (07.12.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 12월 10일 (10.12.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



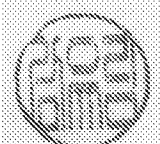
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



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: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 인간을 포함하는 개체에 대한 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0146579 A	2016/12/21	AU 2016-277027 A1 CA 2988715 A1 CN 108026167 A EP 3309169 A1 JP 2018-522582 A WO 2016-199964 A1 WO 2016-200220 A1	2017/12/21 2016/12/15 2018/05/11 2018/04/18 2018/08/16 2016/12/15 2016/12/15
US 2004-0259112 A1	2004/12/23	AU 2003-296857 A1 CA 2509987 A1 EP 1695089 A1 JP 2007-515924 A US 2006-0014225 A1 US 2010-0260667 A1 US 7550256 B2 US 7670604 B2 WO 2005-062058 A1	2005/07/14 2005/07/07 2006/08/30 2007/06/21 2006/01/19 2010/10/14 2009/06/23 2010/03/02 2005/07/07