(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 1 월 30 일 (30.01.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/017743 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 1/10 (2006.01) *C40B 40/10* (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/005196

(22) 국제출원일: 2013 년 6 월 12 일 (12.06.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0082696 2012 년 7 월 27 일 (27.07.2012) KR

(71) 출원인: **광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 500-712 광주시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).

(72) 발명자: **전상용 (JON, Sangyong)**; 305-701 대전시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생명공학과, Daejeon (KR). **김성현 (KIM, Sung Hyun)**; 500-712 광주시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 생명과학과 118 호, Gwangju (KR). **김대진 (KIM, Dae Jin)**; 500-712 광주시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 생명과학과 118 호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 151-832 서울시 관악구 인헌동 1659-2, 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).

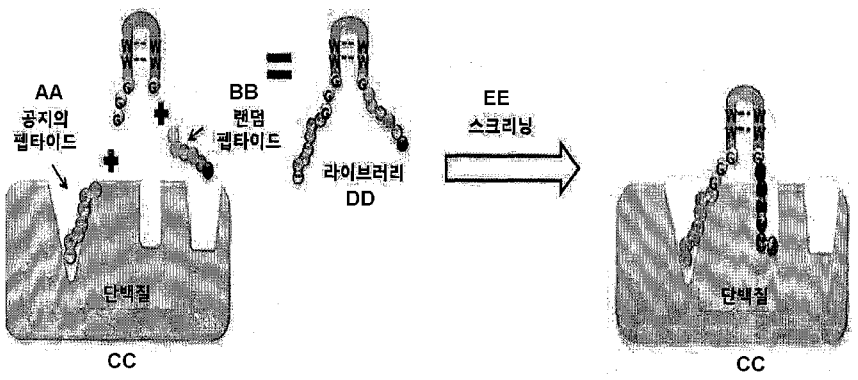
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: METHOD FOR IMPROVING TARGET AFFINITY OF PEPTIDE

(54) **발명의 명칭** : 펩타이드의 타겟 친화도 개선방법



AA ... Known peptide
BB ... Random peptide
CC ... Protein
DD ... Library
EE ... Screening

(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for improving the target affinity of a peptide binding to a protein target. The present invention provides a very effective and simple method capable of improving the target affinity of a known peptide in an innovative manner. According to the present invention, the target affinity of the known peptide may be increased, for example, by 1,000 times. The KPI-bipodal peptide binder technique according to the present invention can significantly improve the applicability of the known peptide.

(57) **요약서**: 본 발명은 단백질 타겟에 결합하는 펩타이드의 타겟 친화도를 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 공지 펩타이드의 타겟 친화도를 획기적으로 향상시킬 수 있는 방법으로서, 매우 효율적이면서도 간단하다. 본 발명에 의하여, 공지 펩타이드의 타겟 친화도를 예컨대 1000 배 증가킬 수 있다. 본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더 기술은 공지의 펩타이드의 응용성을 크게 향상시킬 수 있다.

WO 2014/017743 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

펩타이드의 타겟 친화도 개선방법

【기술분야】

본 특허출원은 2012년 07월 27일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2012-0082696호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 펩타이드 또는 BPB(bipodal peptide binder)의 타겟 친화도 개선방법에 관한 것이다.

【배경기술】

항체는 B 세포가 생산하는 혈장단백질의 일종인 면역글로불린 단백질로써 외부에서 들어온 항원의 특정부위를 특이적으로 인식하여 결합함으로써 항원을 비활성화하거나 무력화시킨다. 이러한 항원-항체 반응의 특이성과 고도의 친화도 및 수천만 종류의 항원을 구별할 수 있는 항체의 다양성을 응용하여 오늘날 진단제와 치료제 등을 포함하는 많은 종류의 항체 제품이 출현하게 되었다. 현재 FDA에서는 21개의 단일클론항체를 승인하였으며 리턱시맵(Rituximab) 및 헤르셉틴(Herceptin)과 같은 항체는 다른 치료에서 전혀 반응을 보이지 않던 환자들의 50% 이상에서 효과를 보인바 있으며 실질적으로 여러 연구에서 단일클론항체를 이용하여 림프종, 대장암 또는 유방암 등에 성공적인 임상치료를 보여주고 있다. 치료용 항체의 전체 시장 규모는 2004년 100억 달러 규모에서 2010년에는 300억 달러로 연평균 20%의 성장률을 보일 것으로 추정하고 있으며, 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정되고 있다. 항체를 이용한 신약개발이 활발해지는 이유는 약품의 개발기간이 짧으며 투자비용이 작고 부작용을 쉽게 예측할 수 있기 때문이다. 또한 항체는 생약이어서 인체가 거의 영향을 받지 않으며 체내에서의 반감기가 저 분자량 약품에 비하여 압도적으로 길어서 환자에게 친화적이다. 이러한 유용성에도 불구하고 인간에서

단일클론항체는 외래 항원으로 인식하여 심한 알레르기 반응 또는 과민반응을 일으키기도 한다. 또한, 이러한 항암 기능의 단클론 항체를 임상적으로 사용할 경우 생산 단가가 높기 때문에 치료제로서의 가격이 급격히 상승한다는 단점이 있으며, 항체를 배양하는 방법 및 정제 방법 등 광범위한 분야의 기술들이 각종 지적 소유권에 의해 보호받고 있기 때문에 비싼 라이센싱비를 지불해야 한다.

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

한편, 펩타이드는 항체에 비해 적절한 약물동력학, 대량생산성, 낮은 독성, 항원성 억제 및 낮은 생산 단가 등으로 인해 현재 항체 치료제를 대체하여 다양하게 활용되고 있다. 치료용 약으로서의 펩타이드의 장점은 생산 단가가 낮고, 안전성 및 반응성이 높으며, 특허 로얄티가 상대적으로 저렴하고, 원하지 않는 면역시스템에 덜 노출되어 펩타이드 자체에 대한 항체 생산을 억제 할 수 있으며, 합성을 통한 변형이 쉽고 정확하다는

것이다. 그러나 대부분의 펩타이드는 항체에 비해 특정 단백질 타켓에 대해 낮은 친화력 및 특이성을 보이기 때문에 여러 응용분야에 사용되지 못하는 단점이 있다. 따라서, 펩타이드의 단점을 극복할 수 있는 새로운 펩타이드 기반 항체 대체 단백질 개발에 대한 요구가 당업계에 대두되고 있다.

이에 본 발명자들은 생물학적 타겟 분자에 높은 친화성으로 특이적 결합이 가능한 펩타이드 물질을 개발하고자 노력하였고, 그 결과 독특한 구조적 전략이 내포된 "바이포달 펩타이드 바인더(BPB)"를 제안한 바 있다(참조: WO 2010/047515). 이 BPB는 분자량이 비교적 매우 작지만, 타겟에 대한 친화도가 우수하여 항체 대체 물질로서 개발 가능성이 매우 큰 물질이다.

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

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 공지의 타겟-결합 펩타이드의 타겟 친화도를 개선할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 공지의 타겟-결합 펩타이드에 본 발명자들에 의해 종래 개발된 바이포달 펩타이드 바인더(Bipodal Peptide Binder: BPB)의 구조적 특징을 부가하는 경우에는, 공지의 타겟-결합 펩타이드의 타겟 친화도가 크게 증가함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

또한, 본 발명자들은 본 발명자들에 의해 종전에 개발된 바이포달 펩타이드 바인더의 타겟 친화도를 최적화할 수 있는 기술을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 BPB의 전체적인 구조는 유지하면서 매우 효과적으로 BPB의 타겟 친화도를 최적화 또는 최대화할 수 있는 방법을 개발함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 단백질 타겟에 결합하는 펩타이드의 타겟 친화도를 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 KPI-바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 제공하는 데 있다.

따라서 본 발명의 목적은 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)의 타겟 친화도(target affinity)를 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

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

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 단백질 타겟에 결합하는 펩타이드의 타겟 친화도를 증가시키는 방법을 제공한다:

(a) 상기 단백질 타겟에 대하여 결합 친화도를 갖는 공지 펩타이드(known peptide)를 수득하는 단계;

(b) (i) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성되는 패러럴(parallel), 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과 안티패러럴(antiparallel) 아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); (ii) 상기 구조 안정화 부위의 한쪽 말단에 결합된 타겟 결합 부위 I(target binding region I)으로서의 상기 공지 펩타이드, 상기 구조 안정화 부위의 다른 쪽 말단에 n개의 아미노산을 포함하는 타겟 결합 부위 II(target binding region II)를 포함하는 KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리를 제공하는 단계;

(b) 상기 라이브러리와 타겟을 접촉시키는 단계; 그리고,

(c) 상기 타겟과 결합된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더를 선택하는 단계.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법에 의해 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 KPI-바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 제공한다.

본 발명자들은 공지의 타겟-결합 펩타이드의 타겟 친화도를 개선할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 공지의 타겟-결합 펩타이드에 본 발명자들에 의해 종래 개발된 바이포달 펩타이드 바인더(Bipodal Peptide Binder: BPB)의 구조적 특징을 부가하는 경우에는, 공지의 타겟-결합 펩타이드의 타겟 친화도가 크게 증가함을 규명하였다.

본 발명은 기본적으로 BPB의 구조를 응용한다. BPB는 본 발명자들에 의해 최초로 제안된 타겟-친화성 펩타이드로서 이에 대한 상세한 설명은 WO 2010/047515를 참조할 수 있다.

공지의 펩타이드들은 대부분 낮은 타겟 친화력 때문에 여러 가지 응용에 한계점을 가지고 있다. 본 발명은 공지의 펩타이드의 친화력을 개선하는 새롭고 획기적인 방법을 제시한다. 본 발명의 기본적인 사상은 공지의 펩타이드가 결합하는 타겟 단백질의 부위에 인접한 새로운 결합 부위에 결합하는 펩타이드를 상기 공지 펩타이드와 함께 구조안정화 스케폴드에 연결하여 타겟 친화도가 개선된 타겟-결합 펩타이드 물질을 제공하는 것이다.

본 발명의 방법은 공지 펩타이드(Know Peptide)의 친화력을 개선(Improving)하는 기술이며 이 경우 본 발명자들의 BPB 구조가 채택된다. 따라서, 본 발명의 기술은 "KPI-바이포달 펩타이드 바인더" 또는 "KPI-BPB"라 명명된다.

본 발명의 방법에 따르면, 우선 단백질 타겟에 대하여 결합 친화도를 갖는 공지 펩타이드(known peptide)를 수득한다.

본 명세서에서 용어 “공지 펩타이드(known peptide) 수득”은 공지 펩타이드 또는 공지 펩타이드를 코딩하는 핵산서열의 합성, 또는 공지 펩타이드의 아미노산 서열 및 핵산서열에 대한 정보를 얻는 것을 의미한다.

본 발명에서 이용될 수 있는 공지 펩타이드는 단백질 타겟에

결합하는 어떠한 공지 펩타이드도 포함한다.

본 명세서에서 단백질 타겟은 당업계에 공지된 어떠한 단백질 타겟도 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질 타겟은 효소, 리간드, 수용체, 바이오마커, 호르몬, 전사인자, 성장인자, 면역글로블린, 신호전달단백질, 결합단백질, 이온채널, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인 및 혈액 응고 인자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 상세하게는, 상기 단백질 타겟은 ED-B(Fibronectin extra domain B), VEGF(vascular endothelial growth factor), VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor), VCAM1(vascular cell adhesion molecule-1), nAchR(Nicotinic acetylcholine receptor), HSA(Human serum albumin), MyD88, EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor), HER2/neu, CD20, CD33, CD52, EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), IgE (Immunoglobulin E), CD11A (α-chain of lymphocyte function-associated antigen 1), CD3, CD25, 당단백질 IIb/IIIa, 인테그린, AFP(Alpha-fetoprotein), β_2M(Beta$_2$-microglobulin), BTA(Bladder Tumor Antigens), NMP22, 암항원 125, 암항원 15-3, 칼시토닌, Carcinoembryonic Antigen, 크로모그라닌 A, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, hCG(Human Chorionic Gonadotropin), 뉴런-특이 에놀라아제, PSA(Prostate-Specific Antigen), PAP(Prostatic Acid Phosphatase), 타이로글로블린; 사이토카인[TNF(tumor necrosis factor) alpha, TNF beta, 인터루킨-10(IL-10), 인터페론beta(IFNβ), 인터페론 alpha(IFNα), 인터페론 gamma (IFNγ), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), leukemia inhibitory factor (LIF), 인간성장호르몬(hGH), ciliary neurotrophic factor (CNTF), 렙틴, oncostatin M, 인터루킨-6 (IL-6), 인터루킨-12 (IL-12), EPO(erythropoietin), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), 인터루킨-2 (IL-2), 인터루킨-3 (IL-3), 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-5 (IL-5), 인터루킨-13 (IL-13), Flt13 ligand 및 줄기세포인자(SCF)]; G-단백질 커플드 수용체(GPCR)[바람직하게는 Class A (or 1) (Rhodopsin-like), Class B (or 2) (Secretin receptor family), Class C (or 3) (Metabotropic glutamate/pheromone), Class D (or 4) (Fungal mating pheromone receptors), Class E (or 5) (Cyclic AMP

receptors) 및 Class F (or 6) (Frizzled/Smoothened) GPCRs를 포함하며, 보다 바람직하게는 a luteinizing hormone 수용체, a follicle stimulating hormone 수용체, a thyroid stimulating hormone 수용체, a calcitonin 수용체, a glucagon 수용체, a glucagon-like peptide 1 수용체(GLP-1), a metabotropic glutamate 수용체, a parathyroid hormone 수용체, a vasoactive intestinal peptide 수용체, a secretin 수용체, a growth hormone releasing factor (GRF) 수용체, protease-activated 수용체(PARs), cholecystokinin 수용체, somatostatin 수용체, melanocortin 수용체, ADP 수용체, adenosine 수용체, thromboxane 수용체, platelet activating factor 수용체, adrenergic 수용체, 5-HT 수용체, CXCR4, CCR5, chemokine 수용체, neuropeptide 수용체, opioid 수용체, parathyroid hormone (PTH) 수용체, ghrelin 수용체 및 vasoactive intestinal peptide (VIP) 수용체, formyl peptide 수용체, sex peptide 수용체]; RTK(Receptor tyrosine kinase)[예컨대, Epidermal growth factor 수용체 패밀리, Insulin 수용체 패밀리, Platelet derived groowth factor 수용체 패밀리, Fibroblast growth factor 수용체 패밀리, Vascular endothelial growth factor 수용체 패밀리, HGF 수용체 패밀리, Trk 수용체 패밀리, Eph 수용체 패밀리, AXL 수용체 패밀리, LTK 수용체 패밀리, TIE 수용체 패밀리, ROR 수용체 패밀리, DDR 수용체 패밀리, RET 수용체 패밀리, KLG 수용체 패밀리 및 RYK 수용체 패밀리, MuSK 수용체 패밀리]; 그리고 전사인자[예컨대, AP1, AP-2, ARE, Brn-3, C/EBP, CBF, CDP, c-Myb, CREB, E2F-1, EFR, ERE, Ets, Ets-1/PEA3, FAST-1, GAS/ISRE, GATA, GRE, HNF-4, IRF-1, MEF-1, MEF-2, Myc-Max, NF-1, NFATc, NF-E1, NF-E2, NFKB, Oct-1, p53, Pax-5, Pbx1, Pit 1, PPAR, PRE, RAR, RAR (DR-5), SIE, Smad SBE, Smad3/4, SP1, SRE, Stat1, Stat3, Stat4, Stat4, Stat5, Stat6, TFIID, TR, TR(DR-4), USF-1, VDR (DR-3), HSE, 및 MRE]를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명에서 이용되는 공지 펩타이드는 타겟 단백질에 대하여 친화도를 갖는 범위 내에서, 특별한 서열 및 길이가 요구되지 않는다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 공지 펩타이드의 길이는 4-100 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 4-50 아미노산 잔기, 5-30 아미노산 잔기, 5-20 아미노산 잔기 또는 5-10 아미노산 잔기이다.

KPI-바이포달 펩타이드 바인더에서, 구조 안정화 부위는 타겟 결합 부위 I으로서의 공지 펩타이드와 타겟 결합 부위 II가 효율적으로 안정되게 타겟 단백질에 결합하도록 한다. 타겟 결합 부위 II는 바람직하게는, 공지 펩타이드가 결합하는 타겟 단백질의 부위에 인접한 부위에 결합하는 펩타이드이다.

본 발명에서 이용 가능한 구조안정화 부위는 패러럴, 안티패러럴 또는 패러럴과 안티패러럴 아미노산 가닥들을 포함하며, 가닥간(interstrand) 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용, 양이온-파이 상호작용 또는 이들의 조합에 의한 비공유결합이 형성되는 단백질 구조 모티프들을 포함한다. 가닥간 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용, 양이온-파이 상호작용 또는 이들의 조합에 의한 형성되는 비공유결합은 구조안정화 부위의 견고성(rigidity)에 기여한다.

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

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

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

링커는 패러럴, 안티패러럴 또는 패러럴과 안티패러럴 아미노산 가닥들을 연결한다. 예컨대, 패러럴 방식으로 정렬된 최소 2개의

가닥(바람직하게는 2개의 가닥), 안티패러럴 방식으로 정렬된 최소 2개의 가닥(바람직하게는 2개의 가닥), 패러럴 및 안티패러럴 방식으로 정렬된 최소 3개의 가닥(바람직하게는 3개의 가닥)을 링커가 연결하게 된다.

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

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 턴 서열은 β-턴, γ-턴, α-턴, π-턴 또는 ω-loop이다(Venkatachalam CM (1968), *Biopolymers*, 6, 1425-1436; Nemethy G and Printz MP. (1972), *Macromolecules*, 5, 755-758; Lewis PN et al., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 303, 211-229; Toniolo C. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 9, 1-44; Richardson JS. (1981), *Adv. Protein Chem.*, 34, 167-339; Rose GD et al., (1985), *Adv. Protein Chem.*, 37, 1-109; Milner-White EJ and Poet R. (1987), *TIBS*, 12, 189-192; Wilmot CM and Thornton JM. (1988), *J. Mol. Biol.*, 203, 221-232; Milner-White EJ. (1990), *J. Mol. Biol.*, 216, 385-397; Pavone V et al. (1996), *Biopolymers*, 38, 705-721; Rajashankar KR and Ramakumar S. (1996), *Protein Sci.*, 5, 932-946). 가장 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 턴 서열은 β-턴이다.

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

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

본 발명의 일 구현예에 따라, 구조안정화 부위로서 β-쉬트 또는 루이신 지퍼가 이용되는 경우, 패러럴 방식으로 정렬된 2개의 가닥 또는

안티패러럴 방식으로 정렬된 2개의 가닥을 펩타이드 링커가 연결하는 것이 바람직하다.

펩타이드 링커는 당업계에 공지된 어떠한 것도 이용 가능하다. 적합한 펩타이드 링커의 서열은 다음과 같은 요소를 고려하여 선택될 수 있다: (a) 유연한 연장된 컨포메이션(flexible extended conformation)에 적용될 수 있는 능력; (b) 생물학적 타겟 분자와 상호작용 하는 이차구조를 생성하지 않는 능력; 및 (c) 생물학적 타겟 분자와 상호작용하는 소수성 잔기 또는 전하를 갖는 잔기의 부재. 바람직한 펩타이드 링커는 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 포함한다. Thr 및 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 제4,935,233호, 제4,751,180호 및 제5,990,275호에 개시되어 있다. 펩타이드 링커 서열은 1-50 아미노산 잔기로 구성될 수 있다.

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

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

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

본 발명의 예시적인 실시예에 따르면, 타입 I 턴 서열은 Asp-Asp-Ala-Thr-Lys-Thr이고, 타입 I' 턴 서열은 Glu-Asn-Gly-Lys이며, 타입 II 턴

서열은 X-Pro-Gly-Glu-Val; 또는 Ala-X-Gly-Glu-Val (X는 20개의 아미노산으로부터 선택된다)이고, 타입 Ⅱ' 턴 서열은 Glu-Gly-Asn-Lys 또는 Glu-D-Pro-Asn-Lys이다.

β-헤어핀 콘포메이션을 갖는 펩타이드는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,914,123호 및 Andrea G. Cochran et al., PNAS, 98(10):5578-5583)에 개시되어 있는 트립토판 지퍼, WO 2005/047503에 개시되어 있는 주형-고정된 β-헤어핀 미멕틱, 미국 특허 제5,807,979호에 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. 1:584-590에 개시되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

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

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

일반식 I

X_1-Trp(X_2)X_3-X_4-X_5(X'_2)X_6-X_7

X_1은 Ser 또는 Gly-Glu이고, X_2 및 X'_2는 서로 독립적으로 Thr, His, Val, Ile, Phe 또는 Tyr이며, X_3는 Trp 또는 Tyr이고, X_4는 타입 I, 타입 I', 타입 Ⅱ, 타입 Ⅱ' 또는 타입 Ⅲ 또는 타입 Ⅲ' 턴 서열이고, X_5는 Trp 또는

Phe이며, X_6는 Trp 또는 Val이고, X_7는 Lys 또는 Thr-Glu이다.

보다 바람직하게는, 상기 일반식 I에서 X_1은 Ser 또는 Gly-Glu이고, X_2 및 X'_2는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val이며, X_3는 Trp 또는 Tyr이고, X_4는 타입 I, 타입 I', 타입 II 또는 타입 II' 턴 서열이고, X_5는 Trp 또는 Phe이며, X_6는 Trp 또는 Val이고, X_7는 Lys 또는 Thr-Glu이다.

보다 더 바람직하게는, 일반식 I에서 X_1은 Ser 또는 Gly-Glu이고, X_2 및 X'_2는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val이며, X_3는 Trp이고, X_4는 타입 I, 타입 I', 타입 II 또는 타입 II' 턴 서열이고, X_5는 Trp이며, X_6는 Trp이고, X_7는 Lys 또는 Thr-Glu이다.

보다 더욱 더 바람직하게는, 일반식 I에서 X_1은 Ser이고, X_2 및 X'_2는 Thr이며, X_3는 Trp이고, X_4는 타입 I' 또는 타입 II' 턴 서열이고, X_5는 Trp이며, X_6는 Trp이고, X_7는 Lys이다.

가장 바람직하게는, 일반식 I에서 X_1은 Ser이고, X_2 및 X'_2는 Thr이며, X_3는 Trp이고, X_4는 타입 I' 턴 서열 (ENGK) 또는 타입 II' 턴 서열(EGNK)이고, X_5는 Trp이며, X_6는 Trp이고, X_7는 Lys이다.

본 발명에 적합한 트립토판 지퍼의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제1서열 내지 제3서열 및 제5서열 내지 제10서열에 기재되어 있다.

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

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

일반식 II

X_1-Trp-X_2-Tyr-X_3-Phe-Thr-Val-X_4

X_1은 Arg, Gly-Glu 또는 Lys-Lys이고, X_2는 Gln 또는 Thr이며, X_3는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_4는 Gln, Thr-Glu 또는 Gln-Glu이다.

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

일반식 II

X_1-Trp-Thr-Tyr-X_2-Phe-Thr-Val-X_3

X_1은 Gly-Glu 또는 Lys-Lys이고, X_2는 타입 I, 타입 I', 타입 II,

타입 Ⅱ' 또는 타입 Ⅲ 또는 타입 Ⅲ' 턴 서열이고, X_3는 Thr-Glu 또는 Gln-Glu이다.

본 발명에 적합한 GB1 β-헤어핀의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제4서열 및 제14서열 내지 제15서열에 기재되어 있다.

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

일반식 Ⅲ

X_1-X_2-X_3-Trp-X_4-X_5-Thr-X_6-X_7

X_1은 Lys 또는 Lys-Lys이고, X_2는 Trp 또는 Tyr이고, X_3는 Val 또는 Thr이며, X_4는 타입 Ⅰ, 타입 Ⅰ', 타입 Ⅱ, 타입 Ⅱ' 또는 타입 Ⅲ 또는 타입 Ⅲ' 턴 서열이고, X_5는 Trp 또는 Ala이며, X_6는 Trp 또는 Val이고, X_7은 Glu 또는 Gln-Glu이다.

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

일반식 Ⅳ

X_1-X_2-X_3-Trp-X_4

X_1은 Lys-Thr 또는 Gly이고, X_2는 Trp 또는 Tyr이고, X_3는 타입 Ⅰ, 타입 Ⅰ', 타입 Ⅱ, 타입 Ⅱ' 또는 타입 Ⅲ 또는 타입 Ⅲ' 턴 서열이고, X_4는 Thr-Glu 또는 Gly이다.

일반식 III 및 IV의 β-헤어핀의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제11서열 내지 제12서열, 제15서열 및 제16서열 내지 제19서열에 기재되어 있다.

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

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

본 발명의 다른 변형예에 따르면, 구조안정화 부위로서 루이신 지퍼 또는 링커로 연결된 루이신 지퍼가 이용될 수 있다. 루이신 지퍼는 패러럴한 2개의 α-사슬의 다이머화를 야기하는 보존성 펩타이드 도메인이며, 일반적으로 유전자 발현에 관여하는 단백질에 발견되는 다이머화 도메인이다("Leucine scissors". Glossary of Biochemistry and Molecular Biology (Revised). (1997). Ed. David M. Glick. London: Portland Press; Landschulz WH, et al. (1988) Science 240:1759-1764). 루이신 지퍼는 일반적으로 헵태드(heptad) 반복 서열을 포함하며, 루이신 잔기가 4번째 또는 5번째에 위치해 있다. 예를 들어, 본 발명에 이용될 수 있는 루이신 지퍼는 LEALKEK, LKALEKE, LKKLVGE, LEDKVEE, LENEVAR 또는 LLSKNYH의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명에서 이용되는 루이신 지퍼의 구체적인 예를 서열목록 제39서열에 기재되어 있다. 루이신 지퍼의 각각의 반은 짧은 α-사슬로 이루어져 있으며, α-사슬간의 직접적인 루이신 접촉이 있다. 전사인자에 있는 루이신 지퍼는 일반적으로 소수성 루이신 지퍼 부위 및 염기성 부위(DNA 분자의 주 그루브와 상호작용하는 부위)로 이루어져 있다. 본 발명에서 루이신 지퍼가 이용되는 경우에는 염기성 부위는 반드시 필요로 하지 않는다. 루이신 지퍼 구조에서 두 개의 아미노산 가닥(즉, 두 개의 α-사슬)의 인접한 두 말단은 링커에 의해 연결될 수 있다. 링커로서는 상술한 다양한 턴-서열 또는 펩타이드 링커가 이용될 수 있으며, 바람직하게는 루이신 지퍼의 구조에 영향을 미치지 않는 펩타이드 링커가 이용된다.

상술한 구조안정화 부위의 양 말단에는 타겟 결합 부위 I으로서의 공지 펩타이드 및 무작위 아미노산 서열을 포함하는 타겟 결합 부위 II(target binding region II)이 결합되어 있다.

본 발명의 가장 큰 특징 중 하나는, 타겟-결합 공지 펩타이드를 구조안정화 부위의 한쪽 말단에 결합시키고 무작위 아미노산 서열을 다른 쪽 말단에 결합시켜 KPI-바이포달 펩타이드 바인더를 제작하는 것이다. 타겟 결합 부위 I으로서의 공지 펩타이드 타겟 결합 부위 I 및 무작위 아미노산 서열의 타겟 결합 부위 II는 서로 협동적으로(cooperatively) 타겟에 결합함으로써, 타겟에 대한 친화도를 크게 증가시킨다.

타겟 결합 부위 II의 아미노산 개수는 특별하게 제한되지 않으며,

바람직하게는 4-100 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 4-50 아미노산 잔기, 5-30 아미노산 잔기, 5-20 아미노산 잔기 또는 5-10 아미노산 잔기이다.

타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II에는 서로 각각 다른 또는 동일한 개수의 아미노산 잔기가 포함될 수 있다.

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

생물학적 타겟 분자에 결합되는 본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 생체 내 생리학적 반응의 조절, 생체 내 물질의 검출, *인 비보* 분자 이미징, *인 비트로* 세포 이미징 및 약물전달용 타겟팅을 하는 데 이용될 수 있으며, 에스코트 분자로도 이용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구조 안정화 부위, 타겟 결합 부위 I 또는 타겟 결합 부위 II(보다 바람직하게는, 구조안정화 부위, 보다 더 바람직하게는 구조안정화 부위의 링커)에 추가적으로 기능성 분자가 결합되어 있다. 상기 기능성 분자의 예는 검출가능한 신호를 발생시키는 레이블, 화학약물, 바이오약물, 세포막투과 펩타이드(CPP) 또는 나노입자를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 검출가능한 신호를 발생시키는 레이블은 T1 조영물질(예컨대, Gd 킬레이트 화합물), T2 조영물질(예컨대, 초상자성 물질(예: 마그네타이트, Fe_3O_4, γ-Fe_2O_3, 망간 페라이트, 코발트 페라이트 및 니켈 페라이트)), 방사성 동위 원소(예컨대, ^{11}C, ^{15}O, ^{13}N, P^{32}, S^{35}, ^{44}Sc, ^{45}Ti, ^{118}I, ^{136}La, ^{198}Tl, ^{200}Tl, ^{205}Bi 및 ^{206}Bi), 형광물질(플루오리신(fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5), 화학발광단, 자기입자, 매스 표지 또는 전자밀집입자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

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

항파킨스질환 약물, 콜린성 아고니스트, 항암제, 항혈관신생억제제, 면역억제제, 항바이러스제, 항생제, 식욕억제제, 진통제, 항콜린제, 항히스타민제, 항편두통제, 호르몬제, 관상혈관, 뇌혈관 또는 말초혈관 확장제, 피임약, 항혈전제, 이뇨제, 항고혈압제, 심혈관질환 치료제, 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), 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 (adrenocorticotropic hormone), TNF (tumor necrosis factor), 아토비스반(atobisban), 부세레린(buserelin), 세트로렉릭스(cetrorelix), 데스로레린(deslorelin), 데스모프레신(desmopressin), 디노르핀 A (dynorphin A) (1-13), 엘카토닌(elcatonin), 엘레이도신(eleidosin), 엡티피바타이드(eptifibatide), GHRH-II(growth hormone releasing hormone-II), 고나도레린(gonadorelin), 고세레린(goserelin), 히스트레린(histrelin), 류프로레린(leuprorelin), 라이프레신(lypressin), 옥트레오타이드(octreotide), 옥시토신(oxytocin), 피트레신(pitressin), 세크레틴(secretin), 신칼라이드(sincalide), 테르리프레신(terlipressin), 티모펜틴(thymopentin), 티모신(thymosine) α1, 트리프토레린(triptorelin), 바이발리루딘(bivalirudin), 카르베토신(carbetocin), 사이클로스포린, 엑세딘(exedine), 란레오타이드(lanreotide), LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone), 나파레린(nafarelin), 부갑상선 호르몬, 프람린타이드(pramlintide), T-20 (enfuvirtide), 타이말파신(thymalfasin), 지코노타이드, RNA, DNA, cDNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA가 될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 세포 표면에 노출된 생체 분자(예컨대, 단백질)에 결합할 수도 있지만, 세포 내 생체

분자(예컨대, 단백질)에도 결합하여 생체 분자의 활성을 조절할 수 있다.

KPI-바이포달 펩타이드 바인더가 세포 내 단백질을 타겟팅 하는 경우, 바람직하게는 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 추가적으로 세포막투과 펩타이드(CPP)를 포함한다.

상기 CPP는 당업계에 공지된 다양한 CPP를 포함하며, 예를 들어 HIV-1 Tat 단백질, Tat 펩타이드 유사체(예컨대, 올리고알지닌), ANTP 펩타이드, HSV VP22 전사조절단백질, vFGF에서 유래된 MTS 펩타이드, Penetratin, Transportan 또는 Pep-1 펩타이드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 CPP를 KPI-바이포달 펩타이드에 결합시키는 방법은 다양한 방법이 있으며, 예를 들어 KPI-바이포달 펩타이드의 구조 안정화 부위에 있는 루프 부분의 라이신 잔기와 CPP를 공유결합 시킨다.

세포 내에는 생리 활성에 중요한 역할을 하는 많은 타겟 단백질이 있으며, CPP가 결합된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 세포 내로 유입되어 이 타겟 단백질에 결합하여 활성을 조절(예컨대, 억제)한다.

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

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

상술한 컨스트럭트를 갖는 본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 얻을 수 있다. 이 라이브러리에서 KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 타겟 결합 부위 II는

무작위 서열을 갖게 되며, 이는 타겟 결합 부위 II의 어떤 위치에서도 서열 선호도(sequence preference)가 없거나 또는 지정(또는 고정)된 아미노산 잔기가 없다는 것을 의미한다.

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

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

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

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

KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리를 파아지 디스플레이 방식으로 구축하는 경우, 본 발명의 바람직한 구현예는 다음의 단계를 포함한다: (i) 파아지 코트 단백질(예컨대, M13과 같은 필라멘트성 파아지의 유전자 III 또는 유전자 VIII 코트 단백질)을 코딩하는 유전자와 KPI-바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 유전자가 융합된 융합 유전자; 및 상기 융합 유전자에 작동적으로 결합된 전사 조절 서열(예컨대, lac

프로모터)을 포함하는 발현 벡터의 라이브러리를 제작하는 단계; (ii) 상기 발현 벡터 라이브러리를 적합한 숙주 세포에 도입시키는 단계; (iii) 상기 숙주세포를 배양하여 재조합 파아지 또는 파아지미드 바이러스 파티클을 형성시켜 융합 단백질이 표면에 디스플레이 되도록 하는 단계; (iv) 생물학적 타겟 분자와 상기 바이러스 파티클을 접촉시켜 파티클을 타겟 분자에 결합시키는 단계; 및 (v) 타겟 분자에 결합하지 않은 파티클을 분리하는 단계.

파아지 디스플레이를 이용하여 펩타이드 라이브러리를 구축하고 이들 라이브러리를 스크리닝 하는 방법은 미국 특허 제5,723,286호, 제5,432,018호, 제5,580,717호, 제5,427,908호, 제5,498,530호, 제5,770,434호, 제5,734,018호, 제5,698,426호, 제5,763,192호 및 제5,723,323호에 개시되어 있다.

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

대부분의 파아지 디스플레이 방법이 필라멘트성 파아지를 이용하여 실시되지만, 람다 파아지 디스플레이(WO 95/34683; 미국 특허 제5,627,024호), T4 파아지 디스플레이(Ren et al. (1998) Gene 215:439; Zhu (1997) CAN 33:534) 및 T7 파아지 디스플레이(미국 특허 제5,766,905호)도 KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리를 구축하는 데 이용될 수 있다.

벡터 라이브러리를 적합한 숙주 세포에 도입시키는 방법은 다양한 형질전환 방법에 따라 실시될 수 있으며, 가장 바람직하게는 전기천공(electroporation) 방법에 따라 실시된다(참조: 미국 특허 제5,186,800호, 제5,422,272호, 제5,750,373호). 본 발명에 적합한 숙주는 세포는 *E. coli*와 같은 그람 음성 박테리아 세포이며, 적합한 *E. coli* 숙주는 JM101, *E. coli* K12 strain 294, *E. coli* strain W3110 및 *E. coli* XL-1Blue (Stratagene)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

숙주세포는 형질전환 전에 컴피턴스 세포로 준비하는 것이 바람직하다(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 형질전환된 세포의 선별은 일반적으로 항생제(예컨대, 테트라사이클린 및 암피실린)를 포함하는 배지에서 배양하여 실시된다. 선별된 형질전환 세포를 헬퍼 파아지의 존재하에서 추가적으로 배양하여 재조합 파아지 또는 파아지미드 바이러스 파티클을 생성시킨다. 상기 헬퍼 파아지 파아지로 적합한 것은, Ex 헬퍼 파아지, M13-KO7, M13-VCS 및 R408을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 방법에 있어서, 단계 (c)는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 우선, KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리에서 타겟과 결합하는 클론을 선별하며, 이 경우 바이오패닝 과정을 통하여 선별할 수 있다(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Clackson and Lowman, *Phage Display*, Oxford University Press(2004)). 이어, 바이오패닝 과정을 통하여 선별된 클론에서 생산되는 펩타이드들의 타겟 친화도를 분석한다. 타겟 친화도는 당업계에 공지된 다양한 방법, 예를 들어 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis: BIA)(예컨대, BIAcore™)(Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:23382345(1991), Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699705(1995); Smith EA, et al., *Appl. Spectroscopy*, 57:320A-332A(2003))에 따라 실시할 수 있으며, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (c)에서 선택된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 상기 공지 펩타이드와 비교하여 2-10000배 증가된 타겟 친화도, 보다 바람직하게는 2-5000배, 2-4000배, 2-3000배, 2-2000배, 50-10000배, 50-5000배, 50-4000배, 50-3000배 또는 50-2000배, 보다 더 바람직하게는 100-2000배, 200-2000배, 500-2000배, 700-1500배 또는 500-1300배를 갖는다. 본 발명에 의한 타겟 친화도 증가는 매우 획기적이며 예상치 못한 수준이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (c)에서 선택된 KPI-

바이포달 펩타이드 바인더는 상기 단백질 타겟에 대하여 0.1-10000 nM의 해리상수(K_D) 값을 갖는다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (c)에서 선택된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 최초 바이포달 펩타이드 바인더(original BPB)이고, 상기 방법은 상기 단계 (c) 이후에 다음의 단계를 추가적으로 포함하며, 다음의 단계에 의해 최초 BPB의 타겟 친화도(target affinity)가 증가된다: (a') 최초 BPB의 타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II 중에서 어느 한 부위의 서열을 랜덤화 하여 제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축하는 단계; (b') 상기 제1 친화도 BPB 라이브러리에서 최초 BPB보다 타겟 친화도가 증가된 제1 친화도 최적화 BPB 분자를 선별하는 단계; (c') 제1 친화도 최적화 BPB 분자의 타겟 결합 부위 I, 타겟 결합 부위 II 또는 타겟 결합 부위 I와 타겟 결합 부위 II의 말단에 1-10개의 랜덤 아미노산을 추가하여 제2 친화도 BPB 라이브러리를 구축하는 단계; 및 (d') 제2 친화도 BPB 라이브러리에서 제1 친화도 최적화 BPB 분자보다 타겟 친화도가 증가된 제2 친화도 최적화 BPB 분자를 선별하는 단계.

BPB의 타겟 친화도를 증가시키는 방법은 아래에서 상세하게 설명된다.

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

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

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

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

본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성

단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

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

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

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 파아지 코트 단백질, 바람직하게는 M13과 같은 필라멘트성 파아지의 유전자 Ⅲ 또는 유전자 Ⅷ 코트 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 박테리아의 복제원점(예컨대, ColE1) 및/또는 박테리오파아지의 복제원점을 포함한다. 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다.

본 발명의 형질전환체는 바람직하게는 *E. coli*와 같은 그람 음성 박테리아 세포이며, 적합한 *E. coli* 숙주는 JM101, *E. coli* K12 strain 294, *E. coli* strain W3110 및 *E. coli* XL-1Blue (Stratagene)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, $CaCl_2$ 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-

2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (미국 특허 제5,186,800호, 제5,422,272호, 제5,750,373호) 등에 의해 실시될 수 있다.

본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 공지의 펩타이드를 타겟 친화도 측면에서 개선 또는 개량하여 매우 낮은 수준(예컨대, nM 수준)의 K_D 값(해리상수)을 나타내어, 생물학적 타겟 분자에 매우 높은 친화도를 나타내는 펩타이드를 제공한다.

따라서, 본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더 기술은 공지의 펩타이드의 응용성을 크게 향상시킬 수 있다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)의 타겟 친화도(target affinity)를 증가시키는 방법을 제공한다:

(a) (i) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성되는 패러럴(parallel), 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과 안티패러럴(antiparallel) 아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); (ii) 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 결합되어 있고 랜덤하게 선택된 각각 n 및 m개의 아미노산을 포함하는 타겟 결합 부위 I(target binding region I) 및 타겟 결합 부위 II(target binding region II)를 포함하는 최초 바이포달 펩타이드 바인더(original BPB)의 타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II 중에서 어느 한 부위의 서열을 랜덤화 하여 제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축하는 단계;

(b) 상기 제1 친화도 BPB 라이브러리에서 최초 BPB보다 타겟 친화도가 증가된 제1 친화도 최적화 BPB 분자를 선별하는 단계;

(c) 제1 친화도 최적화 BPB 분자의 타겟 결합 부위 I, 타겟 결합 부위 II 또는 타겟 결합 부위 I와 타겟 결합 부위 II의 말단에 1-10개의 랜덤 아미노산을 추가하여 제2 친화도 BPB 라이브러리를 구축하는 단계; 및

(d) 제2 친화도 BPB 라이브러리에서 제1 친화도 최적화 BPB 분자보다 타겟 친화도가 증가된 제2 친화도 최적화 BPB 분자를 선별하는 단계.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법에 의해 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 제공한다.

본 발명자들은 본 발명자들에 의해 종전에 개발된 바이포달 펩타이드 바인더의 타겟 친화도를 최적화할 수 있는 기술을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 BPB의 전체적인 구조는 유지하면서 매우 효과적으로 BPB의 타겟 친화도를 최적화 또는 최대화할 수 있는 방법을 개발하였다.

본 명세서에서 타겟 친화도를 언급하면서 사용되는 용어 "최적화"는 다른 특별한 언급이 없으면 최대화와 동일한 의미로 사용된다.

본 발명은 기본적으로 BPB의 구조를 채택한다. BPB는 본 발명자들에 의해 최초로 제안된 친화성 펩타이드로서 이에 대한 상세한 설명은 WO 2010/047515를 참조할 수 있다.

본 발명의 BPB 타겟 친화도 최적화 방법은 상술한 펩타이드의 타겟 친화도 개선방법과 공통되는 부분이 많으며, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

본 발명에서 이용되는 최초 바이포달 펩타이드 바인더(original BPB)의 구체적인 예는 서열목록 제20서열-제38서열 및 제40서열-제41서열에 기재되어 있다.

본 발명에 따르면, 상술한 최초 바이포달 펩타이드 바인더(original BPB) 구조에서, 타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II 중에서 어느 한 부위의 서열을 랜덤화 하여 제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축한다.

제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시할 수 있다.

이 라이브러리에서 제1 친화도 BPB 라이브러리는 무작위 서열을 갖게 되며, 이는 타겟 결합 부위 I 및/또는 타겟 결합 부위 II의 어떤 위치에서도 서열 선호도(sequence preference)가 없거나 또는 지정(또는 고정)된 아미노산 잔기가 없다는 것을 의미한다.

예를 들어, 제1 친화도 BPB 라이브러리는 고상지지체(예컨대, 폴리스틸렌 또는 폴리아크릴아미드 수지) 상에서 실시되는 스플리트-합성 방법(Lam et al. (1991) Nature 354:82; WO 92/00091)에 따라 구축될 수 있다.

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

제1 친화도 BPB 라이브러리를 파아지 디스플레이 방식으로 구축하는 경우, 본 발명의 바람직한 구현예는 다음의 단계를 포함한다: (i) 파아지 코트 단백질(예컨대, M13과 같은 필라멘트성 파아지의 유전자 Ⅲ 또는 유전자 Ⅷ 코트 단백질)을 코딩하는 유전자와 바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 유전자가 융합된 융합 유전자; 및 상기 융합 유전자에 작동적으로 결합된 전사 조절 서열(예컨대, lac 프로모터)을 포함하는 발현 벡터의 라이브러리를 제작하는 단계; (ii) 상기 발현 벡터 라이브러리를 적합한 숙주 세포에 도입시키는 단계; (iii) 상기 숙주세포를 배양하여 재조합 파아지 또는 파아지미드 바이러스 파티클을 형성시켜 융합 단백질이 표면에 디스플레이 되도록 하는 단계; (iv) 생물학적 타겟 분자와 상기 바이러스 파티클을 접촉시켜 파티클을 타겟 분자에 결합시키는 단계; 및 (v) 타겟 분자에 결합하지 않은 파티클을 분리하는 단계.

파아지 디스플레이를 이용하여 제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축하고 이들 라이브러리를 스크리닝 하는 방법은 미국 특허 제5,723,286호, 제5,432,018호, 제5,580,717호, 제5,427,908호, 제5,498,530호, 제5,770,434호, 제5,734,018호, 제5,698,426호, 제5,763,192호 및 제5,723,323호에 개시되어 있다.

제1 친화도 BPB 라이브러리의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제작하는 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 실시될 수 있다. 예를 들어, 공지의 파아지미드 또는 파아지 벡터(예컨대, pIGT2, fUSE5, fAFF1, fd-CAT1, m663, fdtetDOG, pHEN1, pComb3, pComb8, pCANTAB 5E (Pharmacia),

LamdaSurfZap, pIF4, PM48, PM52, PM54, fdH 및 p8V5)에 바이포달 펩타이드 바인더를 유전자를 삽입시켜 발현 벡터를 제작할 수 있다.

제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축한 다음, 제1 친화도 BPB 라이브러리에서 최초 BPB보다 타겟 친화도가 증가된 제1 친화도 최적화 BPB 분자를 선별한다. 우선, 제1 친화도 BPB 라이브러리에서 최초 BPB보다 타겟 친화도가 증가된 클론을 선별하며, 이 경우 바이오패닝 과정을 통하여 선별할 수 있다(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Clackson and Lowman, *Phage Display*, Oxford University Press(2004)). 이어, 바이오패닝 과정을 통하여 선별된 클론에서 생산되는 펩타이드들의 타겟 친화도를 분석한다. 타겟 친화도는 당업계에 공지된 다양한 방법, 예를 들어 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis: BIA)(예컨대, BIAcore™)(Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:23382345(1991), Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699705(1995); Smith EA, et al., *Appl. Spectroscopy*, 57:320A-332A(2003))에 따라 실시할 수 있으며, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

제1 친화도 최적화 BPB 분자의 선별 후, 제1 친화도 최적화 BPB 분자의 타겟 결합 부위 I, 타겟 결합 부위 II 또는 타겟 결합 부위 I와 타겟 결합 부위 II의 말단에 1-10개의 랜덤 아미노산을 추가하여 제2 친화도 BPB 라이브러리를 구축한다.

제2 친화도 BPB 라이브러리의 구축은 상술한 제1 친화도 BPB 라이브러리를 구축하는 방법에 따라 실시될 수 있다.

제2 친화도 BPB 라이브러리의 구축에서, 추가되는 랜덤 아미노산의 개수는 1-10개이며, 바람직하게는 1-5개, 보다 바람직하게는 1-3개, 보다 더 바람직하게는 1-2개이다.

제2 친화도 BPB 라이브러리를 구축한 다음, 제2 친화도 BPB 라이브러리에서 제1 친화도 최적화 BPB 분자보다 타겟 친화도가 증가된 제2 친화도 최적화 BPB 분자를 선별한다. 제2 친화도 최적화 BPB 분자는 상술한 제1 친화도 최적화 BPB 분자의 선별과 동일한 방법으로 실시할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 제2 친화도 최적화 BPB 분자는 최초 BPB와 비교하여 2-40배 증가된 타겟 친화도를 나타낸다. 보다 바람직하게는, 제2 친화도 최적화 BPB 분자는 최초 BPB와 비교하여 5-40배, 보다 더 바람직하게는 10-35배, 보다 더욱 더 바람직하게는 20-25배 증가된 타겟 친화도를 나타낸다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 제2 친화도 최적화 BPB 분자는 타겟에 대하여 0.1-20 nM의 해리상수(K_D) 값을 갖는다. 보다 바람직하게는, 제2 친화도 최적화 BPB 분자는 타겟에 대하여 0.1-10 nM, 보다 더 바람직하게는 1-8 nM의 해리상수(K_D) 값을 갖는다.

즉, 본 발명의 방법에 의해 타겟 친화도가 최적화 된 BPB는 타겟에 대하여 매우 높은 친화도를 가질 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법에 의해 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

a) 본 발명은 공지 펩타이드의 타겟 친화도를 획기적으로 향상시킬 수 있는 방법으로서, 매우 효율적이면서도 간단하다.

(b) 본 발명에 의하여, 공지 펩타이드의 타겟 친화도를 예컨대 1000배 증가킬 수 있다.

(c) 본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더 기술은 공지의 펩타이드의 응용성을 크게 향상시킬 수 있다.

(d) 본 발명은 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal peptide binder: BPB)의 타겟 친화도(target affinity)를 증가시키는 방법으로서, 매우 효율적이면서도 간단하다.

(e) 본 발명의 방법에 의하여, 예컨대 BPB의 타겟 친화도를 20-25배 증가시킬 수 있다.

(f) 본 발명의 방법에 의하여 증가된 타겟 친화도를 갖는 BPB는 매우 낮은 수준(예컨대, nM 수준)의 K_D 값(해리상수)을 나타내어, 타겟에 매우 높은 친화도를 나타낸다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 종래의 공지 펩타이드의 타겟 친화도를 증가시키는 본 발명의 KPI-바이포달 펩타이드 바인더 기술에 대한 모식도이다.

도 2는 스트렙타비딘에 결합하는 공지 펩타이드의 친화력 향상을 위한 스크리닝 결과이다.

도 3a-3b는 본 발명의 KPI-BPB 기술에 의하여 타겟 스트렙타비딘에 대하여 친화도 개선을 한 후의 콜로니 ELISA 결과이다.

도 4a-4b는 본 발명의 KPI-BPB 기술에 의하여 선별된 스트렙타비딘에 대한 KPI-BPB인 Strep_opti1과 Strep_opti2의 타겟 특이성을 분석한 결과이다.

도 5는 KPI-BPB 기술에 의하여 선별된 스트렙타비딘에 대한 KPI-BPB인 Strep_opti1의 타겟 친화도에 대한 분석 결과이다.

도 6은 VEGFR1에 결합하는 공지 펩타이드의 친화력 향상을 위한 스크리닝 결과이다.

도 7은 KPI-BPB 기술에 의하여 타겟 VEGFR1에 대하여 친화도 개선을 한 후의 콜로니 ELISA 결과이다.

도 8은 KPI-BPB 기술에 의하여 선별된 VEGFR1에 대한 KPI-BPB인 VEGFR1_opti1, VEGFR1_opti2 및 VEGFR1_opti3의 타겟 특이성을 분석한 결과이다.

도 9는 KPI-BPB 기술에 의하여 선별된 VEGFR1에 대한 KPI-BPB인 VEGFR1_opti1의 타겟 친화도에 대한 분석 결과이다.

도 10은 최초 바이포달 펩타이드 바인더(original BPB)의 모식도이다.

도 11는 본 발명에 따른 BPB의 최적화 과정을 보여주는 모식도이다.

도 12은 $BPB1_{EDB}$ 최적화 후의 콜로니 ELISA 결과이다.

도 13은 첫 번째 최적화 후 구축된 제1 친화도 BPB 라이브러리에서 선택된 제1 친화도 최적화 BPB 분자 세 개에 대한 타겟 친화도 측정 결과이다.

도 14는 두 번째 최적화 후 구축된 제2 친화도 BPB 라이브러리, BPB3 최적화 라이브러리를 이용한 바이오패닝의 아웃풋/인풋 파아지 비율을 보여주는 그래프이다.

도 15는 두 번째 최적화 후 구축된 제2 친화도 BPB 라이브러리, BPB4 최적화 라이브러리를 이용한 바이오패닝의 아웃풋/인풋 파아지 비율을 보여주는 그래프이다.

도 16은 두 번째 최적화 후 구축된 제2 친화도 BPB 라이브러리, BPB3 최적화 라이브러리에 있는 펩타이드들에 대하여 타겟 친화도 스크리닝을 통해 얻은 아미노산서열들에 대한 멀티플 얼라인먼트이다.

도 17은 두 번째 최적화 후 구축된 제2 친화도 BPB 라이브러리, BPB4 최적화 라이브러리에 있는 펩타이드들에 대하여 타겟 친화도 스크리닝을 통해 얻은 아미노산서열들에 대한 멀티플 얼라인먼트이다.

도 18은 제2 친화도 최적화 BPB 분자, BPB3의 친화력 측정 결과이다.

도 19는 제2 친화도 최적화 BPB 분자, BPB4의 친화력 측정 결과이다.

도 20은 250nM에서의 BPB1, BPB2, BPB3 및 BPB4에 대한 타겟 결합 속도론적 데이터이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

실시예 I(친화력 최적화 펩타이드의 제조)

실험 방법

$BPB2_{EDB}$의 최적화 라이브러리 제작

$BPB2_{EDB}$ 최적화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5' -TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC $(NNK)_6$ GGA TCT TGG

ACA TGG GAA AAC GGA AAA-3' ; 및 5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC TTG CTC CAA CCT AAT AAT TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3') ($BPB2_{EDB}$_F1)와 (5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC TTG CTC CAA CCT AAT AAT TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3') ($BPB2_{EDB}$_B1), (N =A, T, G, or C); (K =G or T); (M= C or A) 합성하였다. 이중가닥을 만들기 위하여, $BPB2_{EDB}$_F1 4 μM(최종 농도), $BPB2_{EDB}$_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 5μl를 섞고 총 50 μl가 되도록 증류수를 추가한 혼합액을 25개를 만들었다. 이 혼합액을 PCR 반응 (94℃ 5분, 60 cycle: 30℃ 30초와 72℃ 30초, 72℃ 7분)을 하여 이중가닥으로 만든 후 PCR 정제 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. $BPB2_{EDB}$ 의 인서트 유전자를 pIGT2 phagemid 벡터(Ig therapy, Chuncheon, Korea)에 연결하기 위해 인서트 유전자와 pIGT2 phagemid 벡터에 제한효소처리를 시행하였다. 약 11μg의 인서트 DNA를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 그리고 약 40 μg의 pIGT2 phagemid 벡터를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 CIP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(NEB, Ipswich)를 1시간 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 μg과 18℃에서 15시간 동안 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE 버퍼 100 μℓ로 DNA를 용해시켰다. 이를 *E.coli* XL-1 competent 세포에 전기천공으로 형질전환시켜 최종적으로 8×10^7 의 라이브러리를 만들었다.

스트렙타비딘 결합 펩타이드(WSHPQFEK) 및 VEGFR1(GNQWFI)의 친화력 향상 라이브러리 제작

스트렙타비딘 결합 펩타이드 WSHPQFEK는 1996년에 72 μM의 친화력을 가지며 스트렙타비딘 단백질에 특이적으로 결합한다고 알려져 있다. VEGFR1(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1) 결합 펩타이드 GNQWFI는 2005년에 VEGFR1 단백질에 특이적으로 결합한다고 보고되었다. 여기서는 이들의 펩타이드의 친화력을 향상시키기 위해서 친화력 향상

라이브러리를 디자인 및 제작하였다. 스트렙타비딘 성숙화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5' -TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC TGG AGC CAT CCG CAG TTT GAA AAA GGC GGA GGA TCT TGG ACA TGG GAA AAC GGA AAA-3') (F1)와 (5'- AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC MNN MNN MNN MNN MNN MNN TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT -3') (B1), (N =A, T, G, or C); (K =G or T); (M= C or A)를 합성하였다. VEGFR1 성숙화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5' -TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC GGC AAC CAG TGG TTT ATT GGA GGA GGA TCT TGG ACA TGG GAA AAC GGA AAA-3') (F1) 과 (5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC MNN MNN MNN MNN MNN MNN TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT -3') (B1), (N =A, T, G, or C); (K =G or T); (M= C or A)를 합성하였다. 각각의 이중가닥을 만들기 위하여, F1 4 μM(최종 농도), 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 5μl를 섞고 총 50 μl가 되도록 증류수를 추가한 혼합액을 25개를 만들었다. 이 혼합액을 PCR 반응 (94℃ 5분, 60 cycle: 30℃ 30초와 72℃ 30초, 72℃ 7분)을 하여 이중가닥으로 만든 후 PCR 정제 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. 성숙화 라이브러리를 위한 두 개의 각각 다른 인서트 유전자를 pIGT2 phagemid 벡터(Ig therapy, Chuncheon, Korea)에 연결하기 위해 인서트 유전자와 pIGT2 phagemid 벡터에 제한효소처리를 시행하였다. 약 10μg의 인서트 DNA를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 그리고 약 40 μg의 pIGT2 phagemid 벡터를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 CIP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(NEB, Ipswich)를 1시간 반응한 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 이들을 UV-가시광선 분광기(Ultrospec 2100pro, Amersham Bioscience)로 정량하여 3 μg의 인서트 유전자를 T4 DNA 리가아제(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 pIGT2 파아지미드 벡터 12 μg과 18℃에서 15시간 동안 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE 버퍼 100 μℓ로 DNA를 용해시켰다. 이를 *E.coli* XL-1 competent 세포에 전기천공으로 형질전환시켜 최종적으로 각각 6×10^7 와5×10^7의 라이브러리를 만들었다.

스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드 및 VEGFR1에 결합하는 펩타이드를 찾기 위한 바이오패닝

스트렙타비딘(10 ㎍/㎖) 및 BSA(10 ㎍/㎖)을 각각 96-웰 ELISA 플레이트(Corning)의 웰에 50 ㎕씩 넣은 후, 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였고, 다음 0.1%의 PBST로 3회 세척한 후, PBS로 희석한 2% BSA를 사용하여 상온에서 2시간 동안 블로킹한 후, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST로 3회 세척하였다.

여기에 스트렙타비딘 성숙화(maturation) 재조합 파아지 포함용액 800 ㎕ 및 10% BSA 200 ㎕을 혼합하여 BSA에 결합하는 파아지들을 제거하기 위해 BSA 코팅했던 웰에 넣어 1시간 동안 27℃에 두었다. 상층액을 회수하여 1시간 동안 스트렙타비딘 단백질과 27℃에서 반응시켰다. 그런 다음, 0.05% PBST로 10회 세척한 뒤 0.2 M 글리신/HCl(pH 2.2) 1 ㎖을 50 ㎕/웰 넣어 20분간 파아지를 용리시키고 1 ㎖을 튜브에 모아 여기에 2 M Tris-base(pH 9.0) 150 ㎕를 넣어 용액을 중화시켰다.

각 바이오패닝마다 인풋 파아지 및 일루트 파아지의 수를 측정하기 위해 OD=0.7인 *E.coli* ER 세포에 섞어 주어 암피실린이 포함된 아가 배지에 도말하였다. 패닝을 반복하기 위해 10 ㎖의 *E.coli* ER 세포와 섞어 37℃에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 암피실린(50 ㎍/㎖) 및 20 mM 글루코오스를 혼합한 후, 2×10^{10} pfu의 Ex 헬퍼 파아지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 배양액을 1,000×g로 10분 동안 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 세포들을 암피실린(50 ㎍/㎖) 및 카나마이신(25 ㎍/㎖)이 포함된 40 ㎖ LB 액체 배지로 재현탁하여 30℃에서 200 rpm의 속도로 혼합하며 하룻밤 동안 배양하였다. 배양액을 4,000×g, 20분 및 4℃의 조건으로 원심 분리하였다. 상층액에 8 ㎖의 5x PEG/NaCl[20% PEG(w/v) 및 15% NaCl(w/v)]을 첨가한 후 4℃에서 1시간 동안 정치시켰다. 원심분리 후 PEG 용액을 완전히 제거하고 1 ㎖의 PBS 용액으로 파아지 펩타이드 펠렛을 녹인 다음 2차 바이오패닝에 사용하였다. 각 패닝 단계마다 상기와 동일한 방법을 사용했으며, 세척과정만 0.1% PBST 10회, 20회, 30회로 단계별로 증가시켰다. VEGFR1 에 관한 바이오패닝도 위와 같은 과정으로 진행했다. 각 패닝 단계마다 위와 같은 똑같은 방법을 사용했으며, 단 세척과정만 0.1% PBST 10회, 20회,

30회로 단계별로 증가시켰다.

스트렙타비딘 및 VEGFR1 단백질에 특이적인 파아지 펩타이드 검색(파아지 ELISA)

스트렙타비딘 성숙화 라이브러리에서 네 번째 바이오패닝 단계에서 회수한 파아지를 *E.coli* ER cell 세포에 감염시킨 후 플라크가 플레이트당 100-200개 정도가 되도록 도말하였다. 멸균된 팁을 이용하여 플라크 60개를 2 ㎖의 LB-암피실린(50 ㎍/㎖) 배양액에 접종한 후 37℃에서 5시간 동안 진탕 배양하여 OD=0.8-1에서 5×10^9 pfu의 Ex 헬퍼 파아지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 배양액을 1,000×g로 10분 동안 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 세포들을 암피실린(50 ㎍/㎖) 및 카나마이신(25 ㎍/㎖)이 포함된 1 ㎖의 LB 액체배지로 재현탁하여 30℃에서 200 rpm의 속도로 혼합하며 하루 동안 배양하였다. 배양액을 10,000×g, 20분 및 4℃의 조건으로 원심 분리하여 상층액을 회수한 후 2%의 탈지 우유를 넣고 이를 파아지 펩타이드 검색에 사용하였다.

96웰 ELISA 플레이트에 10 ㎍/㎖ 스트렙타비딘을 각 웰당 50 ㎕씩 30개의 웰에 넣고, 또한 10 ㎍/㎖의 BSA을 각 웰당 50 ㎕씩 30개의 웰에 넣어 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 그런 다음, 모든 웰을 0.1% PBST로 3회 세척하고 PBS로 희석한 2% 탈지 우유를 사용하여 상온에서 2시간 동안 블록킹 한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST로 3회 세척하였다. 각 클론별로 증폭된 파아지 펩타이드 용액 100 ㎕씩을 스트렙타비딘 단백질이 부착된 웰과 BSA 단백질이 부착된 웰에 분주하고 27℃에서 1시간 30분 동안 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 10회 세척한 다음 HRP-컨쥬게이트 항-M13 항체(GE Healthcare)를 1:1,000으로 희석하여 27℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBST로 5회 세척한 후 TMB용액 100 ㎕를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 100 ㎕의 1 M HCl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하여 BSA에 비해 스트렙타비딘의 흡광도가 20배 이상 높은 클론들을 선택하였다. 이들의 파아지를 XL1 세포에 감염시킨 후 플라크가 플레이트당 100-200개 정도가 되도록 도말하였다. 멸균된 팁을 이용하여 플라크를 4 ㎖의 LB-암피실린(50 ㎍/㎖) 배양액에 접종한 후

37℃에서 하루 동안 진탕 배양하여 플라스미드 프랩 키트을 이용하여 플라스미드를 정제하여 시퀀싱을 의뢰하였다(Genotech, Daejeon, Korea). 시퀀싱 프라이머는 벡터 시퀀스인 5'-GATTACGCCAAGCTTTGGAGC-3'을 사용하였다. VEGFR1도 위와 같은 방법으로 똑같이 진행하였다.

스트렙타비딘 단백질에 결합하는 파아지의 특이성 실험

시퀀싱을 통해 찾은 펩타이드(Strep_opti1과 Strep_opti2)의 스트렙타비딘에 대한 특이성을 조사하기 위해서 이 펩타이드들을 발현하는 재조합 파지들을 이용하여 스트렙타비딘, BSA, 오브알부민 및 VEGF에 대해서 특이성을 조사하였다. 먼저 96-웰 ELISA 플레이트에 5 ㎍/ml 스트렙타비딘, BSA, 오브알부민 및 VEGF 을 50 ㎕/웰씩 넣고 4℃에서 하룻밤 방치하였고, 다음날 모든 웰을 0.1% PBST로 3회 세척하고 PBS로 희석한 2% BSA를 사용하여 상온에서 2시간 동안 블록킹한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST로 3회 세척하였다. 여기에 Strep_opti1과 Strep_opti2의 각각의 재조합 파지 800 ㎕과 10% BSA 200 ㎕을 잘 혼합하여 100 ㎕씩 스트렙타비딘, BSA, 오브알부민 및 VEGF 웰에 분주하고 27℃에서 1시간 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 5번 세척한 다음 HRP-접합 항-M13 항체(GE Healthcare)를 1:1,000으로 희석하여 27℃에서 1시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 5번 세척한 후 TMB용액 100 ㎕를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 100 ㎕의 1 M HCl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

VEGFR1 단백질에 결합하는 파아지의 특이성 실험

시퀀싱을 통해 찾은 펩타이드(VEGFR1_opti1, VEGFR1_opti2, VEGFR1_opti3)의 VEGFR1에 대한 특이성을 조사하기 위해서 이 펩타이드들을 발현하는 재조합 파지들을 이용하여 VEGFR1, VEGFR2, 스트렙타비딘, HSA, TNF 및 VEGF 에 대해서 특이성을 조사하였다. 먼저 96-웰 ELISA 플레이트에 5 ㎍/ml VEGFR1, VEGFR2, 스트렙타비딘, HSA, TNF 및 VEGF 을 50 ㎕/웰씩 넣고 4℃에서 하룻밤 방치하였고, 다음날 모든 웰을 0.1% PBST로 3회 세척하고 PBS로 희석한 2% BSA를 사용하여 상온에서 2시간 동안 블록킹한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST로 3회 세척하였다. 여기에 VEGFR1_opti1,

VEGFR1_opti2, VEGFR1_opti3의 각각의 재조합 파지 800 ㎕과 10% BSA 200 ㎕을 잘 혼합하여 100 ㎕씩 스트렙타비딘, BSA, 오브알부민, VEGF 웰에 분주하고 27℃에서 1시간 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 5번 세척한 다음 HRP-접합 항-M13 항체 (GE Healthcare)를 1:1,000으로 희석하여 27℃에서 1시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 5번 세척한 후 TMB 용액 100 ㎕를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 100 ㎕의 1 M HCl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Strep_opti1 및 대조군 펩타이드의 결합 분석(SPR)

스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드를 최적화한 펩타이드와 기존의 펩타이드를 합성(Anygen)하였다. 친화도의 측정은 BIAcore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 수행하였다. CM5 칩(Biacore)에 스트렙타비딘을 2000 RU 만큼 흘려주어 고정시켰다. 러닝 버퍼로는 PBS(pH 7.4)을 사용하였고, 플로우는 분당 30 ㎕로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정한 후 BIAevaluation 소프트웨어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)로 친화도를 계산하였다.

VEGFR1_opti1 및 대조군 펩타이드의 결합 분석(SPR)

VEGFR1에 결합하는 펩타이드를 최적화한 펩타이드와 기존의 펩타이드를 합성(Anygen)하였다. 친화도의 측정은 BIAcore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 수행하였다. CM5 칩(Biacore)에 VEGFR1을 7000 RU 만큼 흘려주어 고정시켰다. 러닝 버퍼로는 PBS(pH 7.4)을 사용하였고, 플로우는 분당 30 ㎕로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정한 후 BIAevaluation 소프트웨어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)로 친화도를 계산하였다.

실험 결과

기존의 펩타이드의 친화력을 향상시키는 방법 디자인

기존 공지의 펩타이드는 대부분 낮은 타겟 친화력 때문에 여러 가지 응용에 한계점을 가지고 있다. 본 발명은 기존의 펩타이드의 친화력을 개선하는 새로운 방법을 제시한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 공지의

펩타이드(Reported linear peptide, Known peptide)의 타겟 상 결합 부위에 인접한 새로운 결합 부위에 결합하는 펩타이드를 찾은 다음, 상기 공지 펩타이드와 신규 결합부위-결합 펩타이드를 구조 안정화 스케폴드에 같이 연결하면 100-1000 배 이상의 친화력 향상을 이끌어 낼 수 있다.

스트렙타비딘 성숙화 및 VEGFR1 성숙화 라이브러리 제작

실시예로서 공지의 펩타이드인 스트렙타비딘-결합 펩타이드(WSHPQFEK) 및 VEGFR1에 결합하는 펩타이드 (GNQWFI)를 이용하여 파지 라이브러리를 제작하였다.

스트렙타비딘-결합 펩타이드의 최적화 라이브러리: WSHPQFEKGGGSWTWENGKWTWKGXXXXXX (X=랜덤 아미노산); VEGFR1-결합 펩타이드의 최적화 라이브러리: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGXXXXXX (X=랜덤 아미노산).

스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드의 최적화 스크리닝

스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드 (WSHPQFEK)의 친화력 향상을 유도하기 위해서 위와 같은 파지 라이브러리를 제작하였고 이를 통해 스크리닝을 하였다. 도 2는 스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드의 친화력 향상을 위한 스크리닝 과정으로써 아웃풋 파아지/인풋 파아지의 수를 비교한 것이다. 4번째 바이오패닝이 끝나고 관찰한 결과 첫 번째 바이오패닝에 비해서 30배 정도 아웃풋 파아지/인풋 파아지 비(ratio)가 증가함을 보였다.

스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드의 친화력 최적화 후의 파아지 ELISA

스트렙타비딘에 결합하는 펩타이드의 친화력 향상 라이브러리의 마지막 패닝단계에서 회수한 파아지를 플라크 형태로 확보하였다. 각 플라크로부터 60개의 파아지를 증폭시킨 후 스트렙타비딘과 BSA에 대해 ELISA를 시행하였다(도 3a-3b). 스트렙타비딘 보다 3배 이상 흡광도를 보이는 클론 16개에 대하여 DNA 시퀀싱을 하였다. 2개의 중복된 펩타이드 서열을 얻었다: Strep_opti1: WSHPQFEKGGGSWTWENGKWTWKG AHPQVR(서열목록 제42서열); Strep_opti2: WSHPQFEKGGGSWTWENGKWTWKG TLIHPM(서열목록

제43서열)

Strep_opti1과 Strep_opti2의 특이성 조사

최적화된 펩타이드인 Strep_opti1과 Strep_opti2의 특이성을 조사하기 위해서 스트렙타비딘, BSA, 오브알부민 및 VEGF에 대해서 ELISA를 하였다. 도 4a-4b에서 보듯이, 두 개의 펩타이드들은 스트렙타비딘에 대해서 특이적으로 결합함을 알 수 있다.

친화도 측정

최적화된 펩타이드 Strep_opti1 및 대조군 펩타이드인 WSHPQFEK을 합성하여 SPR Biacore system을 이용하여 친화도를 측정하였다. 친화도를 측정한 결과, 대조군 펩타이드인 WSHPQFEK는 K_d 값이 82 μM 그리고 이를 친화력 최적화한 Strep_opti1은 67 nM로 친화도가 1223 배 증가함을 보였다(도 5).

따라서, 본 발명에서 제시된 방법을 통해 1000배 이상의 친화력을 쉽게 최적화 할 수 있음을 알 수 있다.

VEGFR1에 결합하는 펩타이드의 최적화 스크리닝

VEGFR1에 결합하는 펩타이드 (GNQWFI)를 친화력 향상을 유도하기 위해서 위와 같은 파지 라이브러리를 제작하였고 이를 통해 스크리닝을 하였다. 도 6은 VEGFR1에 결합하는 펩타이드의 친화력 향상을 위한 스크리닝 과정으로써 아웃풋 파아지/인풋 파아지의 수를 비교한 것이다. 4번째 바이오패닝이 끝나고 관찰한 결과 첫번째 바이오패닝에 비해서 2배 정도 아웃풋 파아지/인풋 파아지 비(ratio)가 증가함을 보였다.

VEGFR1에 결합하는 펩타이드의 친화력 최적화 후의 파지 ELISA

VEGFR1에 결합하는 펩타이드의 친화력 향상 라이브러리의 마지막 패닝 단계에서 회수한 파아지를 플라크 형태로 확보하였다. 각 플라크로부터 30개의 파아지를 증폭시킨 후 VEGFR1과 BSA에 대해 ELISA를 시행하였다(도 7). VEGFR1 보다 3배 이상 흡광도를 보이는 클론 12개에 대하여 DNA 시퀀싱을 하였다. 3개의 중복된 펩타이드 시퀀스를 얻었다:

VEGFR1_opti1: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGRIPKNR(서열목록 제44서열);
VEGFR1_opti2: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGKLQNPM(서열목록 제45서열);
VEGFR1_opti3: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGQQAIQP(서열목록 제46서열).

VEGFR1_opti1, VEGFR1_opti2 및 VEGFR1_opti3의 특이성 조사

최적화된 펩타이드의 특이성을 조사하기 위해서 VEGFR1, VEGFR2, 스트렙타비딘, HSA, TNF 및 VEGF에 대해서 ELISA를 하였다. 도 8에서 보듯이 세 개의 펩타이드들이 VEGFR1에 대해서 특이적으로 결합함을 알 수 있다.

VEGFR1_opti1, VEGFR1_opti2 그리고 VEGFR1_opti3의 특이성

최적화된 펩타이드 VEGFR1_opti1 그리고 대조군 펩타이드인 GNQWFI을 합성하여 SPR Biacore system을 이용하여 친화력를 측정하였다. 친화도를 측정한 결과, 대조군 펩타이드인 WSHPQFEK는 200 μM 에서 5 RU 증가한 것에 비해 VEGFR1_opti1은 5 μM에서 45 RU 증가하였다(도 9). 이를 통해 대략 360배 정도의 친화력이 증가함을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에서 제시한 방법에 의해 공지의 펩타이드에 대하여 수 백 배 이상의 친화력을 쉽게 최적화 할 수 있음을 알 수 있다.

실시예 II(친화력 최적화 BPB의 제조)

실험 방법

$BPB2_{EDB}$의 최적화 라이브러리 제작

$BPB2_{EDB}$ 최적화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5' -TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC $(NNK)_6$ GGA TCT TGG ACA TGG GAA AAC GGA AAA-3' ; 및 5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC TTG CTC CAA CCT AAT AAT TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3') ($BPB2_{EDB}$_F1)와 (5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC TTG CTC CAA CCT AAT AAT TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3') ($BPB2_{EDB}$_B1), (N =A, T, G, or C); (K =G or T); (M= C or A) 합성하였다. 이중가닥을 만들기 위하여, $BPB2_{EDB}$_F1 4 μM(최종 농도), $BPB2_{EDB}$_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 5μl를 섞고 총 50 μl가 되도록 증류수를 추가한 혼합액을 25개를 만들었다. 이 혼합액을 PCR 반응 (94℃ 5분, 60 cycle: 30℃ 30초와 72℃ 30초, 72℃ 7분)을 하여 이중가닥으로 만든 후 PCR 정제 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. $BPB2_{EDB}$ 의 인서트 유전자를 pIGT2 phagemid 벡터(Ig therapy, Chuncheon, Korea)에 연결하기 위해 인서트 유전자와 pIGT2 phagemid 벡터에 제한효소처리를 시행하였다. 약 11μg의 인서트 DNA를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 그리고 약 40 μg의 pIGT2 phagemid 벡터를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 CIP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(NEB, Ipswich)를 1시간 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 μg과 18℃에서 15시간 동안 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE 버퍼 100 μl로 DNA를 용해시켰다. 이를 *E.coli* XL-1 competent 세포에 전기천공으로 형질전환시켜 최종적으로 8×10^7 의 라이브러리를 만들었다.

$BPB2_{EDB}$ 을 찾기 위한 바이오패닝

2 ml의 스트랩타비딘(10 μg/ml)을 96웰 ELISA 플레이트(Corning)의 40개의 웰에 50 μl씩 넣은 후, 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였고, 다음날 20개의 웰에만 0.1%의 PBST(tween-20)로 3회 세척한 후, 바이오틴 ED-B(10 μg/ml)를 넣고 상온에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 40개의 웰 모두를 0.1% PBST로 3회 세척하고 PBS로 희석한 2% BSA를 사용하여 상온에서 2시간 동안 블로킹한 후, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST로 3회 세척하였다.

여기에 $BPB2_{EDB}$ 성숙화(maturation) 재조합 파아지 포함용액 800 μl 및 10% BSA 200 μl을 혼합하여 스트랩타비딘 및 BSA에 결합하는 파아지들을 제거하기 위해 스트랩타비딘에 BSA 코팅했던 20개의 웰에 넣어 1시간 동안 27℃에 두었다. 상층액을 회수하여 100 μg/ml $BPB1_{EDB}$ 와 혼합하여 경쟁적 바이오패닝을 진행하였다. 즉, 이 용액을 ED-B가 결합된 20개의 웰에 옮겨 27℃에서 30분간 반응하면 $BPB1_{EDB}$ 보다 친화력이 더 우수한 파아지만이 EDB에 결합할 수 있다. 20개 웰의 용액을 모두 제거하고 0.5% PBST로 15회

세척한 뒤 0.2 M 글리신/HCl(pH 2.2) 1 ㎖을 각 웰당 50 ㎕씩 넣어 20분간 파아지를 용리시키고 1 ㎖을 튜브에 모아 여기에 2M Tris-base(pH 9.0) 150 ㎕를 넣어 용액을 중화시켰다. 각 바이오패닝마다 인풋 파아지 및 일루트 파아지의 수를 측정하기 위해 OD=0.7인 XL-1 BLUE 세포에 섞어 주어 암피실린이 포함된 아가 배지에 도말하였다. 패닝을 반복하기 위해 10 ㎖의 *E. coli* XL1-BLUE 세포와 섞어 37℃에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 암피실린(50 ㎍/㎖) 및 20 mM 글루코오스를 혼합한 후, 2×10^{10} pfu의 Ex 헬퍼 파아지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 배양액을 1,000×g로 10분 동안 원심분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 세포들을 암피실린(50 ㎍/㎖) 및 카나마이신(25 ㎍/㎖)이 포함된 40 ㎖ LB 액체 배지로 재현탁하여 30℃에서 200 rpm의 속도로 혼합하며 하루 동안 배양하였다. 배양액을 4,000×g, 20분 및 4℃의 조건으로 원심 분리하였다. 상층액에 8 ㎖의 5x PEG/NaCl[20% PEG(w/v) 및 15% NaCl(w/v)]을 첨가한 후 4℃에서 1시간 동안 정치시켰다. 원심분리 후 PEG 용액을 완전히 제거하고 1 ㎖의 PBS 용액으로 파아지 펩타이드 펠렛을 녹인 다음 2차 바이오패닝에 사용하였다. 각 패닝 단계마다 상기와 동일한 방법을 사용했으며, 세척과정만 단계별로 각각 25회 및 35회(0.5% PBST) 증가시켰다.

$BPB3_{EDB}$와 $BPB4_{EDB}$의 최적화 라이브러리 제작 및 스크리닝

$BPB3_{EDB}$ 최적화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5' -TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC NNK TGT GTT CTC CTA TTC AGG GAT CTT GGA CAT GGG AAA ACG GAA AA-3') ($BPB3_{EDB}$_F1)와 (5' -AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC MNN TTG CTC CAA CCT AAT AAT TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3') ($BPB3_{EDB}$_B1), (N =A, T, G, or C); (K =G or T); (M= C or A) 합성하였다.

$BPB4_{EDB}$ 최적화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5' -TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC NNK NNK TGT GTT CTC CTA TTC AGG GAT CTT GGA CAT GGG AAA ACG GAA AA-3') ($BPB4_{EDB}$_F1)와 (5' -AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC MNN MNN TTG CTC CAA CCT AAT AAT TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3') ($BPB4_{EDB}$_B1), (N =A, T, G, or

C); (K =G or T); (M= C or A) 합성하였다.

$BPB3_{EDB}$ 이중가닥을 만들기 위해서 $BPB3_{EDB}$_F1 4μM(최종 농도), $BPB3_{EDB}$_B1 4μM(최종 농도), 2.5 mM dNTP 혼합물 4 μl, Ex TaqDNA 중합효소 1 μl (10 U)(Takara, Seoul, Korea), 10 x PCR 완충액 5μl를 섞고 총 50 μl가 되도록 증류수를 추가한 혼합액을 10개 만들었다. 또한 $BPB4_{EDB}$ 이중가닥 인서트를 만들기 위해서 $BPB4_{EDB}$_F1 4μM(최종 농도), $BPB4_{EDB}$_B1 4μM(최종 농도), 2.5 mM dNTP 혼합물 4 μl, Ex TaqDNA 중합효소 1 μl (10 U)(Takara, Seoul, Korea), 10 x PCR 완충액 5μl를 섞고 총 50 μl가 되도록 증류수를 추가한 혼합액을 10개 만들었다.

이 혼합액을 PCR 반응 (94℃ 5분, 60 cycle: 30℃ 30초와 72℃ 30초, 72℃ 7분)을 하여 이중가닥으로 만든 후 PCR 정제 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. $BPB3_{EDB}$ 와 $BPB4_{EDB}$ 의 인서트 유전자를 pIGT2 phagemid 벡터(Ig therapy, Chuncheon, Korea)에 연결하기 위해 인서트 유전자와 pIGT2 phagemid 벡터에 제한효소처리를 시행하였다. 약 10μg의 인서트 DNA를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 그리고 약 40 μg의 pIGT2 phagemid 벡터를 *SfiI* (NEB)와 *NotI* (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후 CIP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(NEB, Ipswich)를 1시간 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 μg과 18℃에서 15시간 동안 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE 버퍼 100 μl로 DNA를 용해시켰다. 이를 *E.coli* XL-1 competent 세포에 전기천공으로 형질전환시켜 최종적으로 각각 1 x 10^6 의 $BPB3_{EDB}$ 와 $BPB4_{EDB}$ maturation 라이브러리를 만들었다.

ED-B 단백질에 특이적인 파아지 펩타이드 검색 (파아지 ELISA)

$BPB2_{EDB}$, $BPB3_{EDB}$ 와 $BPB4_{EDB}$ 최적화 라이브러리에서 네 번째 바이오패닝 단계에서 회수한 파아지를 XL1-BLUE 세포에 감염시킨 후 플라크가 플레이트당 100-200개 정도가 되도록 도말하였다. 멸균된 팁을 이용하여 플라크 60개를 2 ml의 LB-암피실린(50 μg/ml) 배양액에 접종한 후

37℃에서 5시간 동안 진탕 배양하여 OD=0.8-1에서 5×10^9 pfu의 Ex 헬퍼 파아지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 배양액을 1,000×g로 10분 동안 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 세포들을 암피실린(50 ㎍/㎖) 및 카나마이신(25 ㎍/㎖)이 포함된 1 ㎖의 LB 액체배지로 재현탁하여 30℃에서 200 rpm의 속도로 혼합하며 하루 동안 배양하였다. 배양액을 10,000×g, 20분 및 4℃의 조건으로 원심 분리하여 상층액을 회수한 후 2%의 탈지 우유를 넣고 이를 파아지 펩타이드 검색에 사용하였다.

96웰 ELISA 플레이트에 5 ㎍/㎖ 스트렙타비딘을 각 웰당 50 ㎕씩 30개의 웰에 넣고, 또한 10 ㎍/㎖의 BSA을 각 웰당 50 ㎕씩 30개의 웰에 넣어 4℃에서 하루 동안 방치하였다. 다음날 스트렙타비딘 30 웰만 0.1% PBST(tween-20)로 3회 세척하고 Biotin ED-B (10 ㎍/㎖)을 넣고 상온에서 1시간 동안 두었다.

모든 웰을 0.1% PBST로 3회 세척하고 PBS로 희석한 2% 탈지 우유를 사용하여 상온에서 2시간 동안 블로킹한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST로 3회 세척하였다. 각 클론별로 증폭된 파아지 펩타이드 용액 100 ㎕씩을 ED-B 단백질이 부착된 웰과 BSA 단백질이 부착된 웰에 분주하고 27℃에서 1시간 30분 동안 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 10회 세척한 다음 HRP-컨쥬게이트 항-M13 항체(GE Healthcare)를 1:1,000으로 희석하여 27℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBST로 5회 세척한 후 TMB용액 100 ㎕를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 100 ㎕의 1 M HCl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하여 BSA에 비해 ED-B의 흡광도가 20배 이상 높은 클론들을 선택하였다. 이들의 파아지를 XL1 세포에 감염시킨 후 플라크가 플레이트당 100-200개 정도가 되도록 도말하였다. 멸균된 팁을 이용하여 플라크를 4 ㎖의 LB-암피실린(50 ㎍/㎖) 배양액에 접종한 후 37℃에서 하루 동안 진탕 배양하여 플라스미드 프랩 키트을 이용하여 플라스미드를 정제하여 시퀀싱을 의뢰하였다(Genotech, Daejeon, Korea). 시퀀싱 프라이머는 벡터 시퀀스인 5'-GATTACGCCAAGCTTTGGAGC-3'을 사용하였다.

결합력 분석(SPR)

$BPB2_{EDB}$, $BPB3_{EDB}$ 와 $BPB4_{EDB}$ 성숙화 라이브러리에서 찾은 바이포달 펩타이드 바인더를 합성(애니젠, 한국) 하였다. 친화도의 측정은 BIAcore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 수행하였다. 스트랩타비딘 SA 칩(Biacore)에 바이오틴-EDB을 2,000 RU 만큼 흘려주어 고정시켰다. 러닝 버퍼로는 PBS(pH 7.4)을 사용하였고, 플로우는 분당 30 ㎕로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정한 후 BIAevaluation 소프트웨어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)로 친화도를 계산하였다.

실험 결과

BPB 최적화 라이브러리 제작방법

BPB(Bipodal-peptide binder)의 스캐폴드로서 안정한 베타-헤어핀 모티프를 사용하였다. 특히 트립토판-트립토판 아미노산의 상호 작용에 의해 베타-헤어핀 모티프 구조를 안정하게 이루어 주는 Trpzip을 이용하였다. 뼈대인 Trpzip의 N-말단 및 C-말단 부분에 각각 6개 아미노산을 무작위로 배열함으로써 두 부분의 가변적 부위를 생성하였다(도 10). BPB의 친화력 최적화 라이브러리를 만드는 과정은 도 11과 같다. 우선 한 타겟에 대해서 찾은 바이포달-펩타이드 바인더(BPB1)의 한 쪽 결합 부분을 고정시키고 다른 쪽 결합 부분을 다시 무작위(random)로 만드는 라이브러리를 만들어 타겟에 대해서 스크리닝하여 BPB2를 찾는다. 그 다음에 BPB2의 양쪽 결합 부분 끝에 하나 또는 두 개의 무작위(random) 서열을 추가하는 라이브러리를 만들어 스크리닝을 하여 BPB3와 BPB4를 찾아 BPB1을 최적화할 수 있다.

BPB2 최적화 라이브러리 제작 및 스크리닝

BPB2 최적화 라이브러리(XXXXXXGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ, X= 무작위 아미노산)를 8×10^7 을 만들었다. 이를 이용하여 ED-B 단백질에 대해 3차에 걸쳐 바이오패닝을 실시하고 각 패닝 단계에서 회수한 파아지 펩타이드들의 아웃풋 파아지/인풋 파아지 비(ratio)를 결정하였다.

【표 1】

ED-B 도메인에 대한 바이오패닝

라운드	인풋 파아지(pfu)	일루트 파아지(pfu)	수율
1회	4×10^{10}	6.3×10^{7}	1.6×10^{-3}
2회	1×10^{10}	2.8×10^{8}	28×10^{-3}
3회	2.5×10^{10}	1.2×10^{9}	50×10^{-3}

첫 번째 친화력 최적화 후의 파아지 ELISA

BPB2 친화력 최적화 라이브러리의 마지막 패닝 단계에서 회수한 파아지를 플라크 형태로 확보하였다. 각 플라크로부터 54개의 파아지를 증폭시킨 후 ED-B와 스트렙타비딘에 대해 ELISA를 시행하였다(참조: 도 12). 대부분 ED-B가 스트렙타비딘 보다 흡광도가 높았고 스트렙타비딘 보다 20배 이상 흡광도를 보이는 클론 24개를 DNA 시퀀싱 하였다. 총 3개의 중복된 펩타이드 시퀀스를 얻었다:

1: WGGPVRGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ(서열목록 제47서열);

2: ADGRVRGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ(서열목록 제48서열);

3: CSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ(서열목록 제49서열).

친화도 측정

펩타이드 1, 2 및 3을 합성하여 SPR biacore system을 이용하여 친화도를 측정하였다. 측정 결과 펩타이드 1은 115 nM, 펩타이드 2는 35 nM, 펩타이드 3은 16 nM의 K_D 값을 나타내었다(참조: 도 13).

두 번째 최적화 라이브러리 제작 및 스크리닝

첫 번째 최적화 후 얻은 BPB2 중에서 가장 우수한 친화도를 나타내는 펩타이드 3(CSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ)을 다시 최적화하기 위하여 양쪽 끝에 하나 또는 두 개의 가변 부위를 추가하는 라이브러리를 10^6 만들었다. BPB3 최적화 라이브러리(XCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQX, X= 무작위 아미노산)와 BPB4 최적화 라이브러리 (XXCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQXX, X= 무작위 아미노산)를 각각 10^6 을 만들었다. 이를 이용하여 ED-B 단백질에 대해 4차에 걸쳐 바이오패닝을 실시하고 각 패닝 단계에서 회수한 파아지

펩타이드들의 아웃풋 파아지/인풋 파아지 비(ratio)를 결정하였다(도 14-15).

두 번째 최적화 후의 파아지 ELISA

BPB3와 BPB4 최적화 라이브러리의 마지막 패닝 단계에서 회수한 파아지를 플라크 형태로 확보하였다. 각 플라크로부터 60개의 파아지를 증폭시킨 후 ED-B와 스트렙타비딘에 대해 ELISA를 시행하여 스트렙타비딘보다 20배 이상 흡광도를 보이는 클론에 대하여 DNA 시퀀싱을 하였다. 이를 통해 도 16-17과 같은 서열을 얻었다.

친화도 측정

BPB3와 BPB4 펩타이드를 합성하여 SPR biacore system을 이용하여 친화도를 측정하였다. 친화도 측정 결과 BPB3는 5.7 nM, BPB4는 3.5 nM의 K_D 값을 나타내었으며, 이는 BPB2와 비교하여 개선된 친화도 값이다(도 18-19).

친화도 비교

250 nM $BPB1_{EDB}$, $BPB2_{EDB}$, $BPB3_{EDB}$ 및 $BPB4_{EDB}$에 대하여 SPR biacore system을 이용하여 친화도를 비교하였다(도 20). 도 20에서 보듯이, 최적화 과정을 통해 친화력이 향상됨을 볼 수 있다. 최종적으로 이 최적화 시스템을 통해 BPB1에 비해 BPB4의 친화도가 21배 증가되어 수 nM의 친화도를 나타내는 BPB를 쉽게 얻을 수 있음을 증명하였다(표 2).

【표 2】

BPB1, BPB2, BPB3 및 BPB4의 타겟 결합에 대한 kinetics

BPB_명	K_{on} [$M^{-1}S^{-1}$]	K_{off} [S^{-1}]	K_D [M] $=K_{off}/K_{on}$
$BPB1_{EDB}$	1.0×10^4	8.0×10^{-4}	75×10^{-9}
$BPB2_{EDB}$	3.0×10^4	5.1×10^{-4}	16×10^{-9}
$BPB3_{EDB}$	6.2×10^4	3.6×10^{-4}	5.7×10^{-9}
$BPB4_{EDB}$	1.3×10^5	4.7×10^{-4}	3.5×10^{-9}

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 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 단백질 타겟에 결합하는 펩타이드의 타겟 친화도를 증가시키는 방법:

(a) 상기 단백질 타겟에 대하여 결합 친화도를 갖는 공지 펩타이드(known peptide)를 수득하는 단계;

(b) (i) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성되는 패러럴(parallel), 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과 안티패러럴(antiparallel) 아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); (ii) 상기 구조 안정화 부위의 한쪽 말단에 결합된 타겟 결합 부위 I(target binding region I)으로서의 상기 공지 펩타이드, 상기 구조 안정화 부위의 다른 쪽 말단에 n개의 아미노산을 포함하는 타겟 결합 부위 II(target binding region II)를 포함하는 KPI-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리를 제공하는 단계;

(b) 상기 라이브러리와 타겟을 접촉시키는 단계; 그리고,

(c) 상기 타겟과 결합된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더를 선택하는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 선택된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 상기 공지 펩타이드와 비교하여 2-10000배 증가된 타겟 친화도를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 선택된 KPI-바이포달 펩타이드 바인더는 상기 단백질 타겟에 대하여 0.1-10000 nM의 해리상수(K_D) 값을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

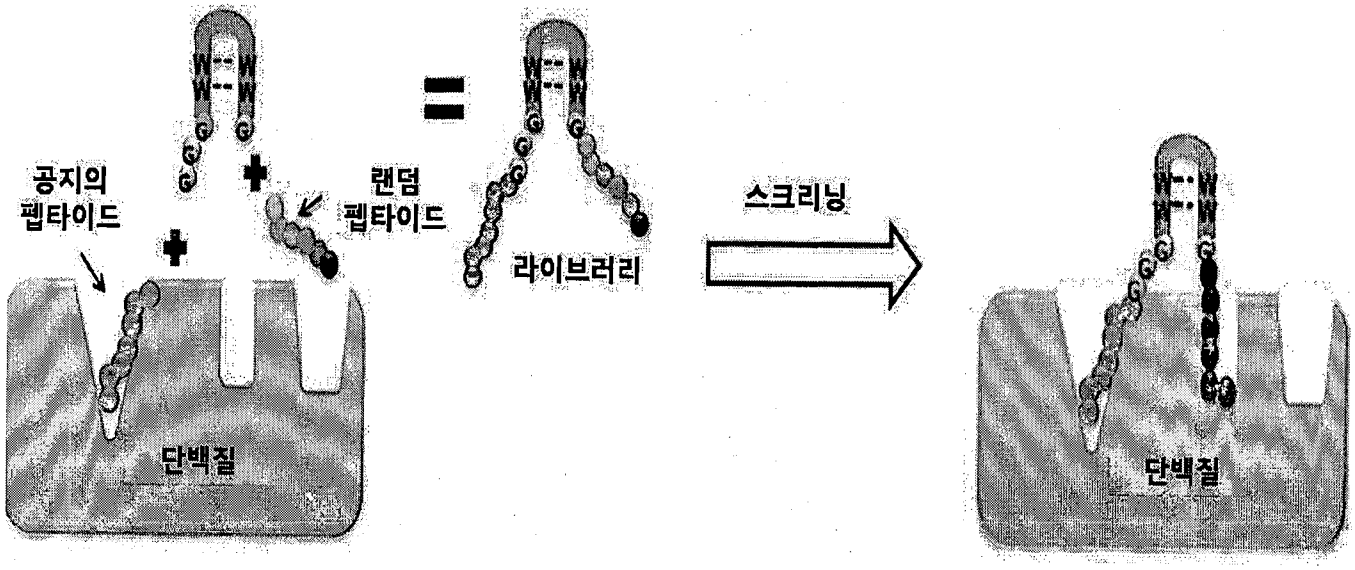
상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 증가된 타겟 친화도(target affinity)를 갖는 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal

peptide binder: BPB).

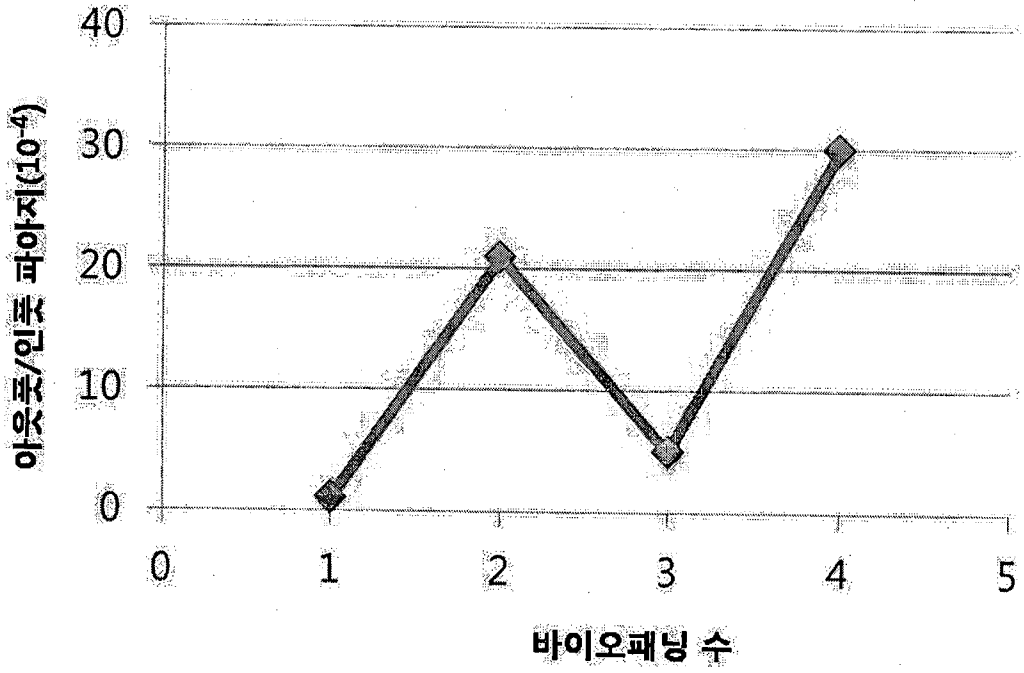
【청구항 5】

상기 제 4 항의 바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자.

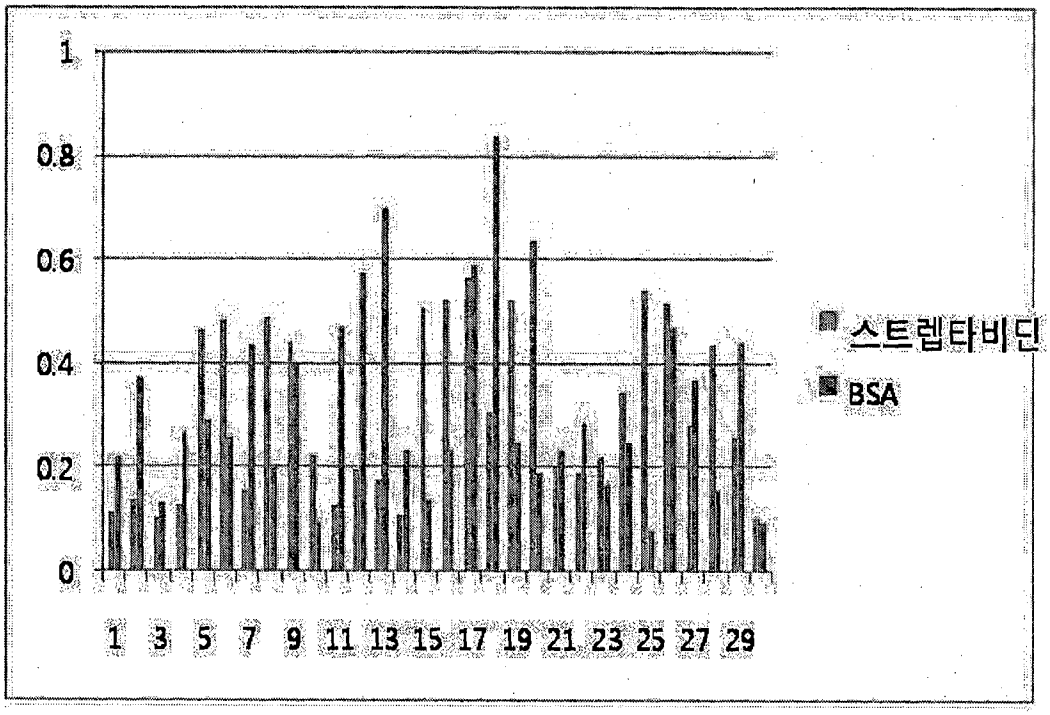
도 1


공지의
펩타이드
랜덤
펩타이드
라이브러리
스크리닝
단백질
단백질

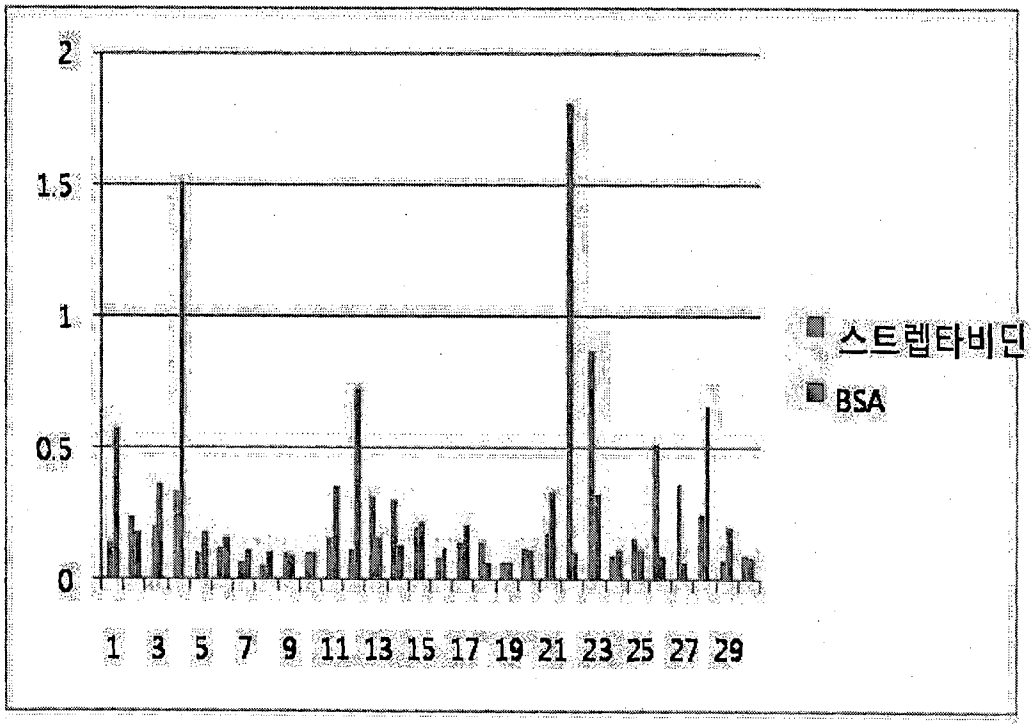
도 2


40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
아웃풋/인풋 파아지(10-4)
바이오패닝 수

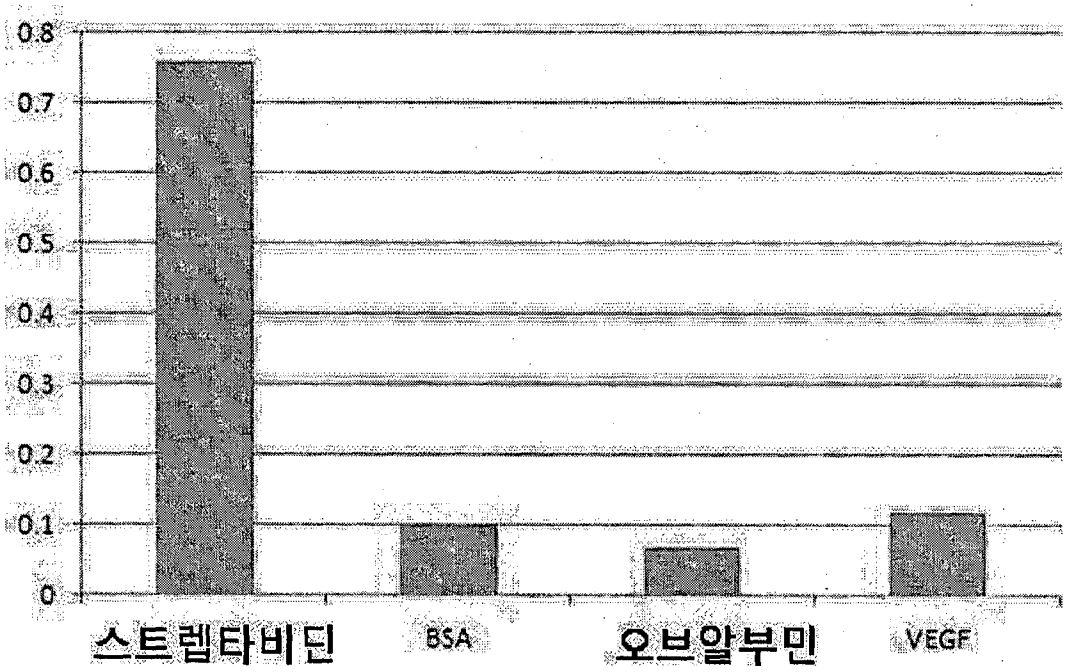
도 3a


1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29
스트렙타비딘
BSA

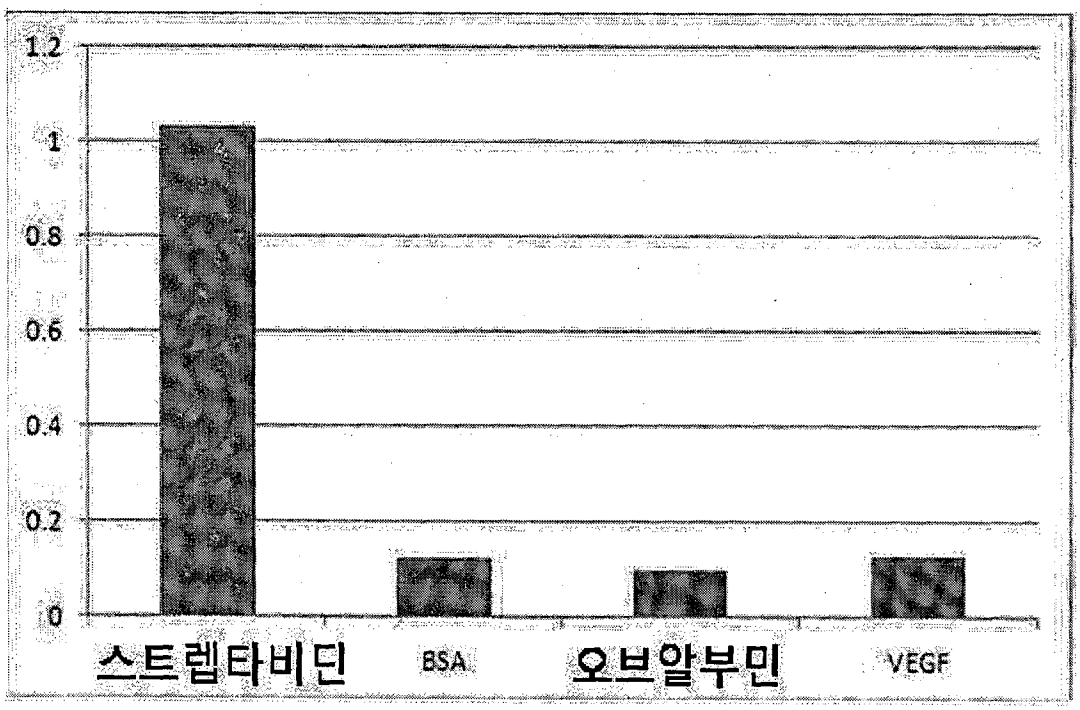
도 3b


2
1.5
1
0.5
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29
스트렙타비딘
BSA

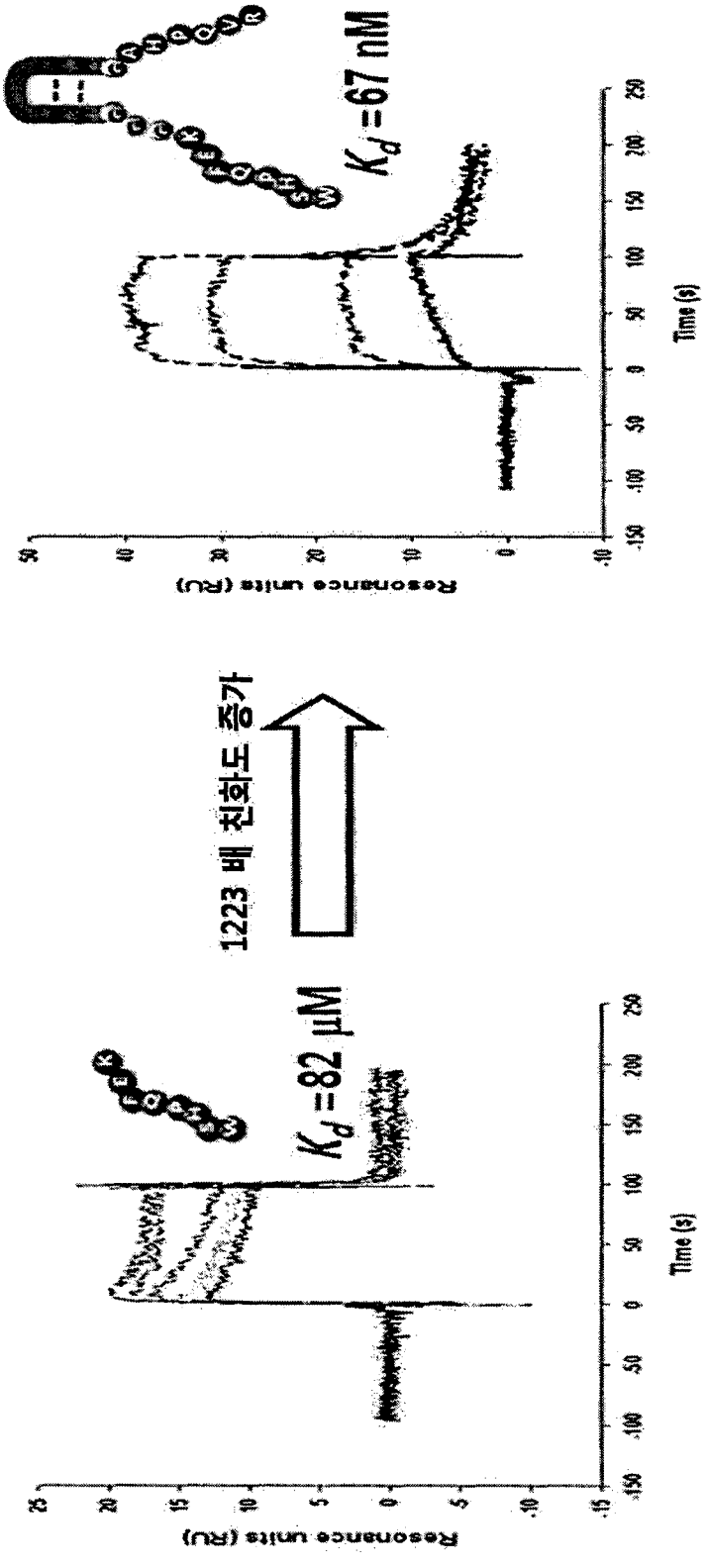
도 4a


0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
스트렙타비딘
BSA
오브알부민
VEGF

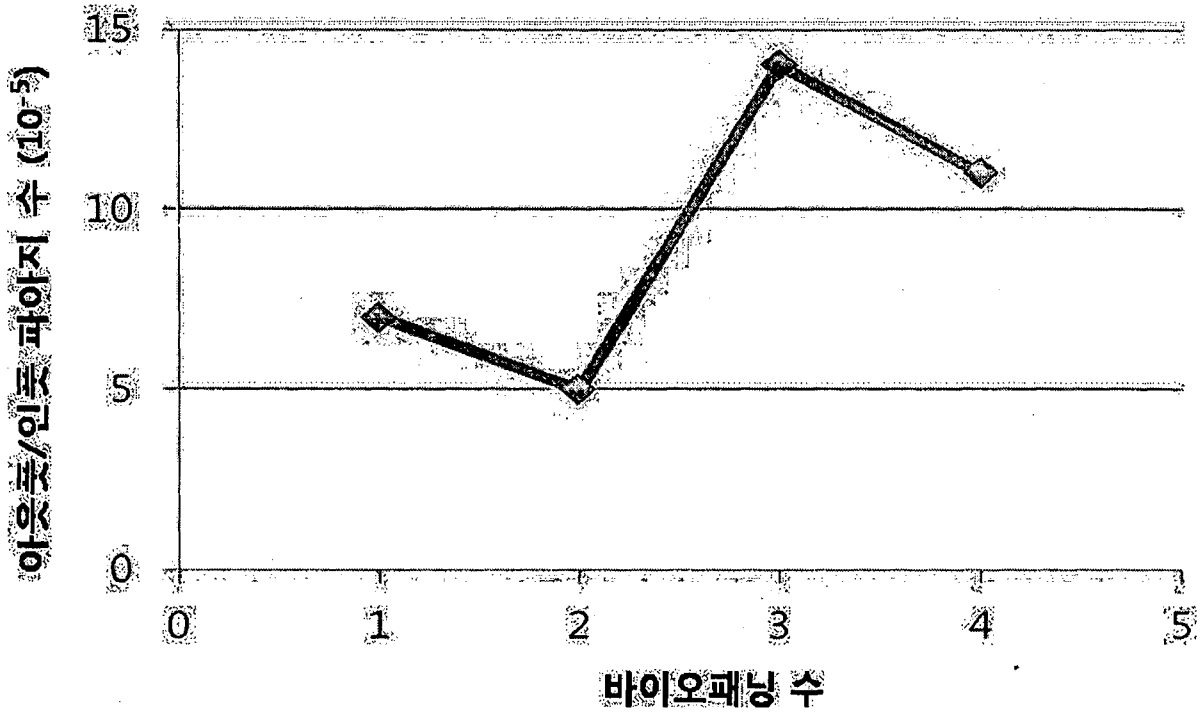
도 4b


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
스트렙타비딘
BSA
오브알부민
VEGF

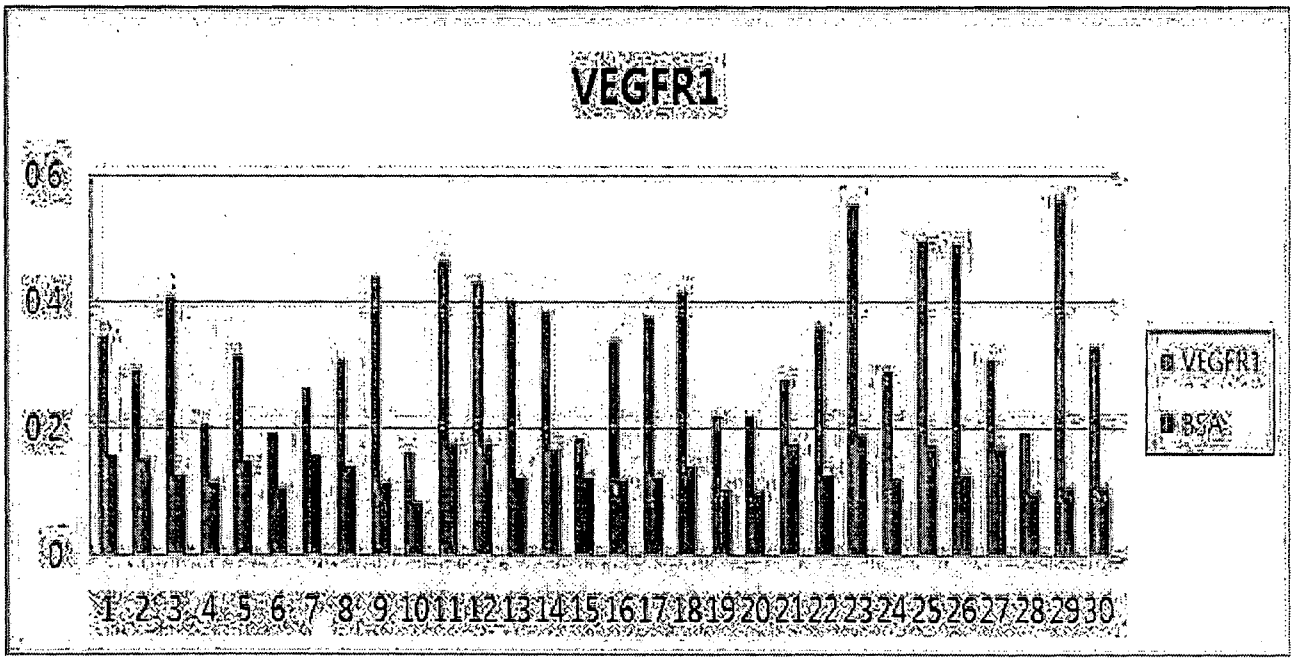
도 5


K_d=67 nM
Resonance units (RU)
Time (s)
1223 배 친화도 증가
K_d=82 μM
Resonance units (RU)
Time (s)

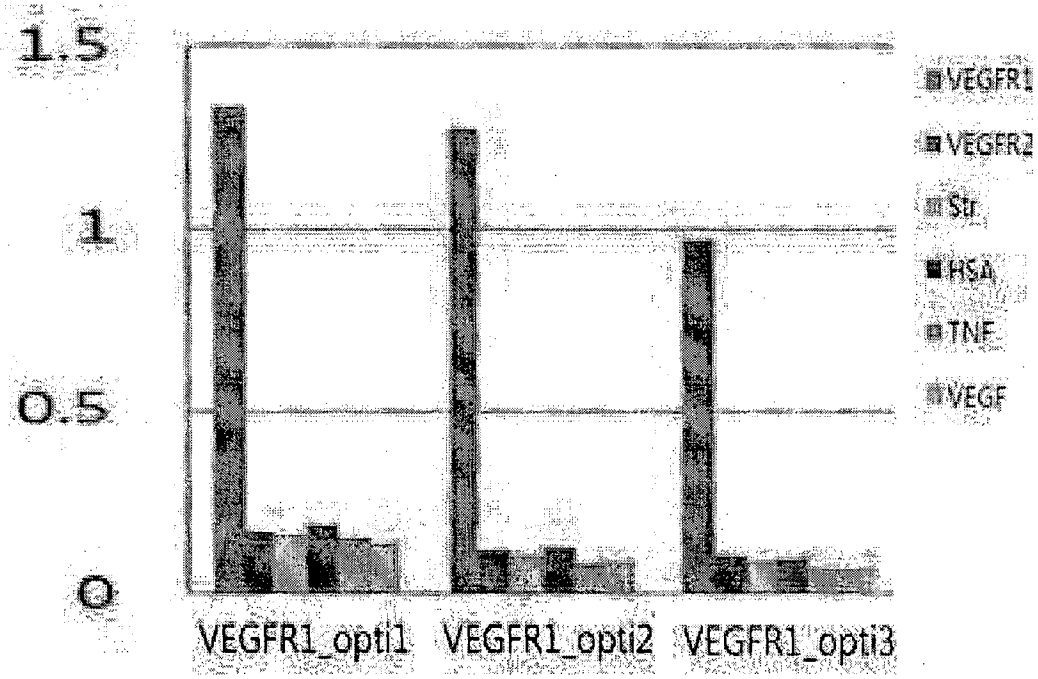
도 6


15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
바이오패닝 수

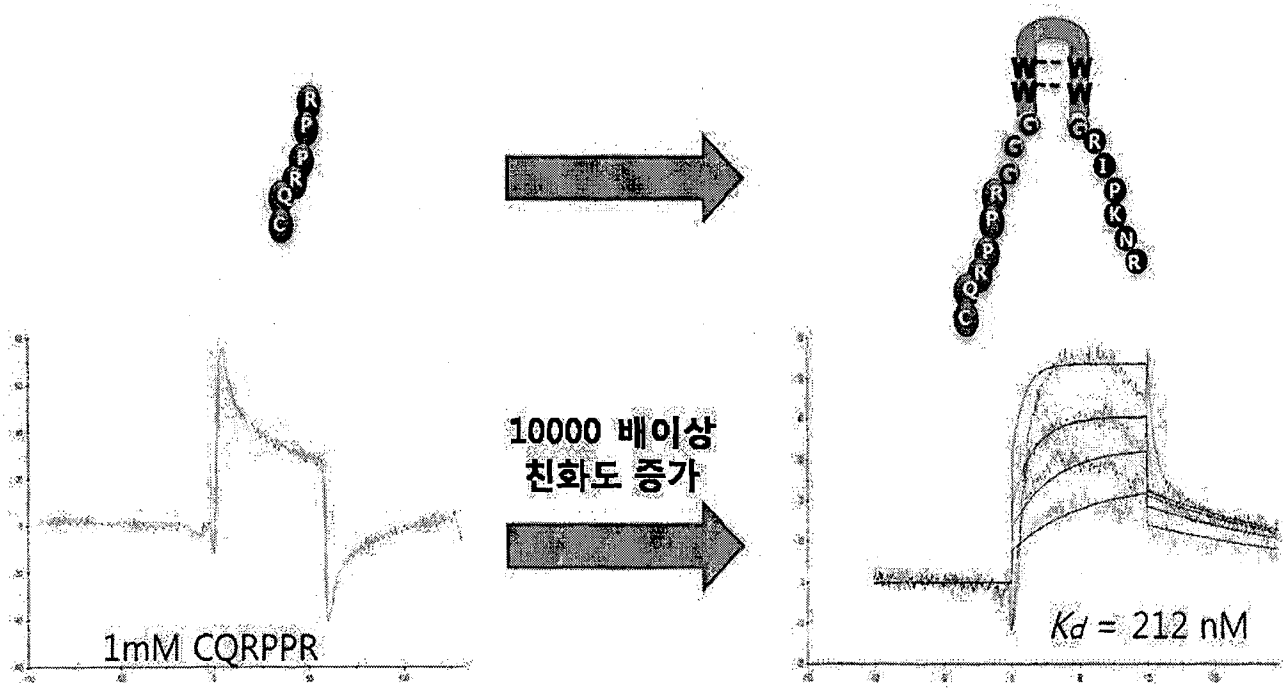
도 7


VEGFR1
0.6
0.4
0.2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
VEGFR1
BSA

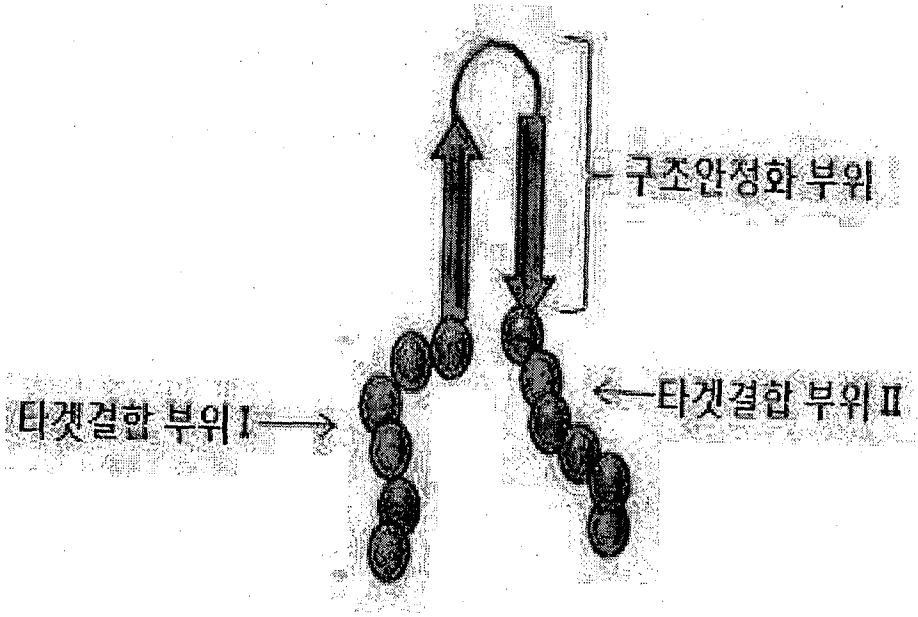
도 8


1.5
1
0.5
0
VEGFR1
VEGFR2
Str
HSA
TNF
VEGF
VEGFR1_opti1
VEGFR1_opti2
VEGFR1_opti3

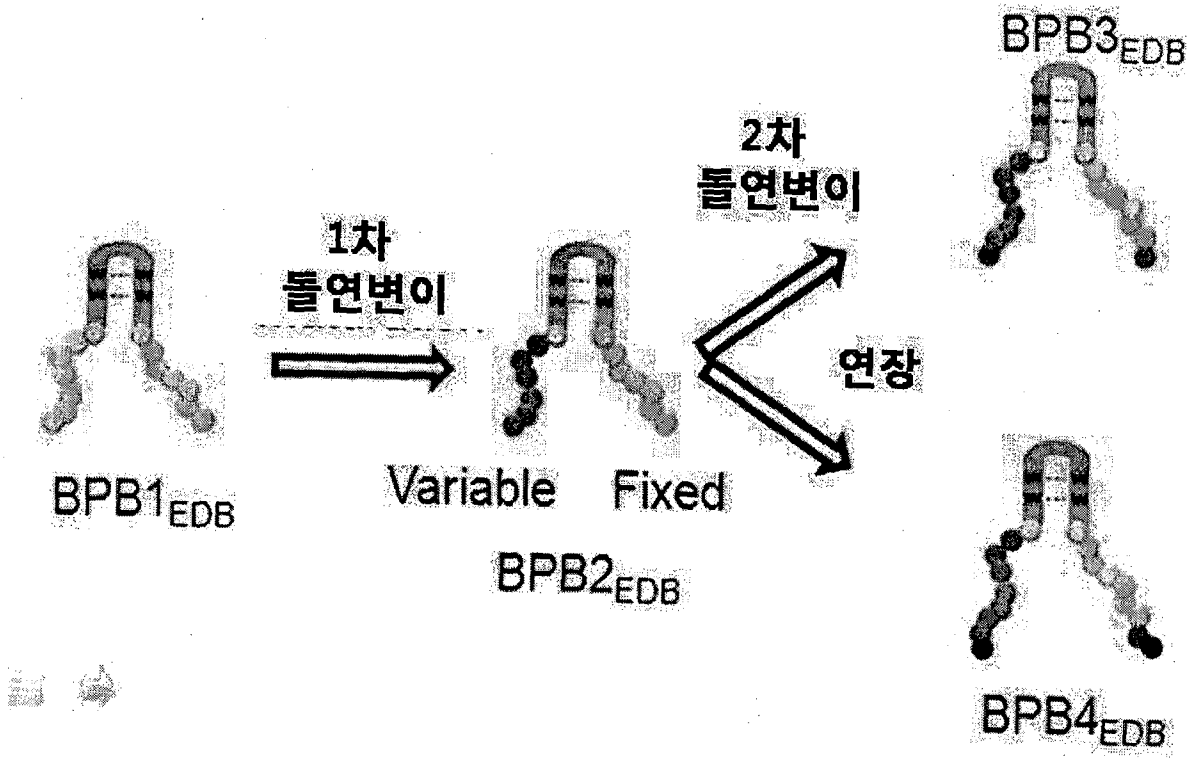
도 9


1mM CQRPPR
10000 배이상
친화도 증가
Kd = 212 nM

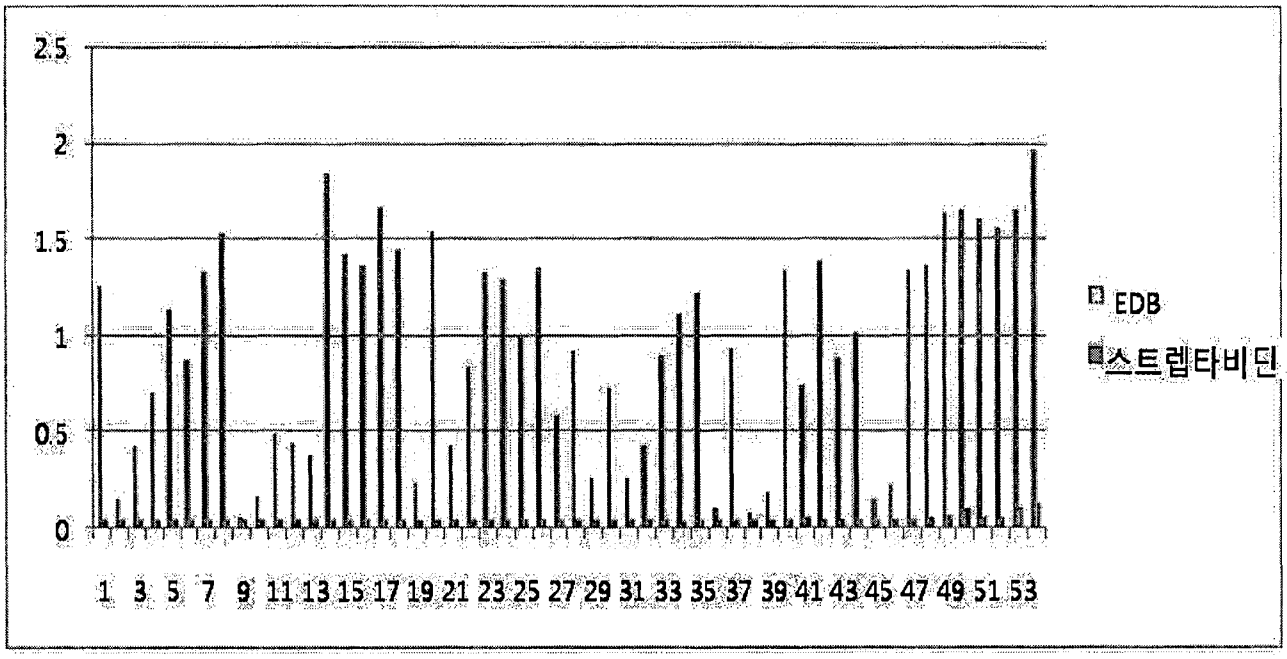
도 10


구조안정화 부위
타겟결합 부위 I
타겟결합 부위 II

도 11

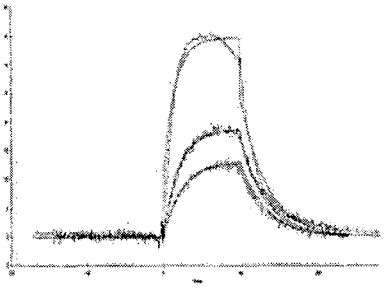

BPB3EDB
2차
돌연변이
1차
돌연변이
연장
BPB1EDB
Variable
Fixed
BPB2EDB
BPB4EDB

도 12



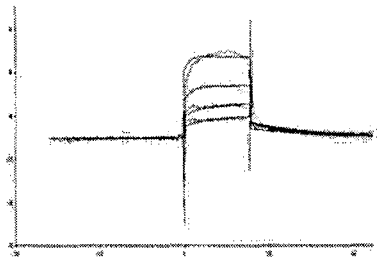
도 13

펩타이드 1



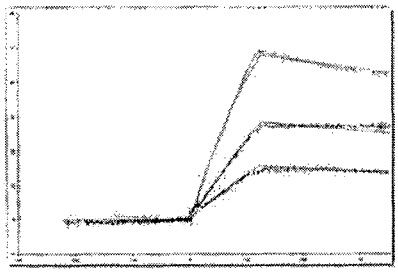
Ka(l/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
2.5e5	0.02	115 nM

펩타이드 2



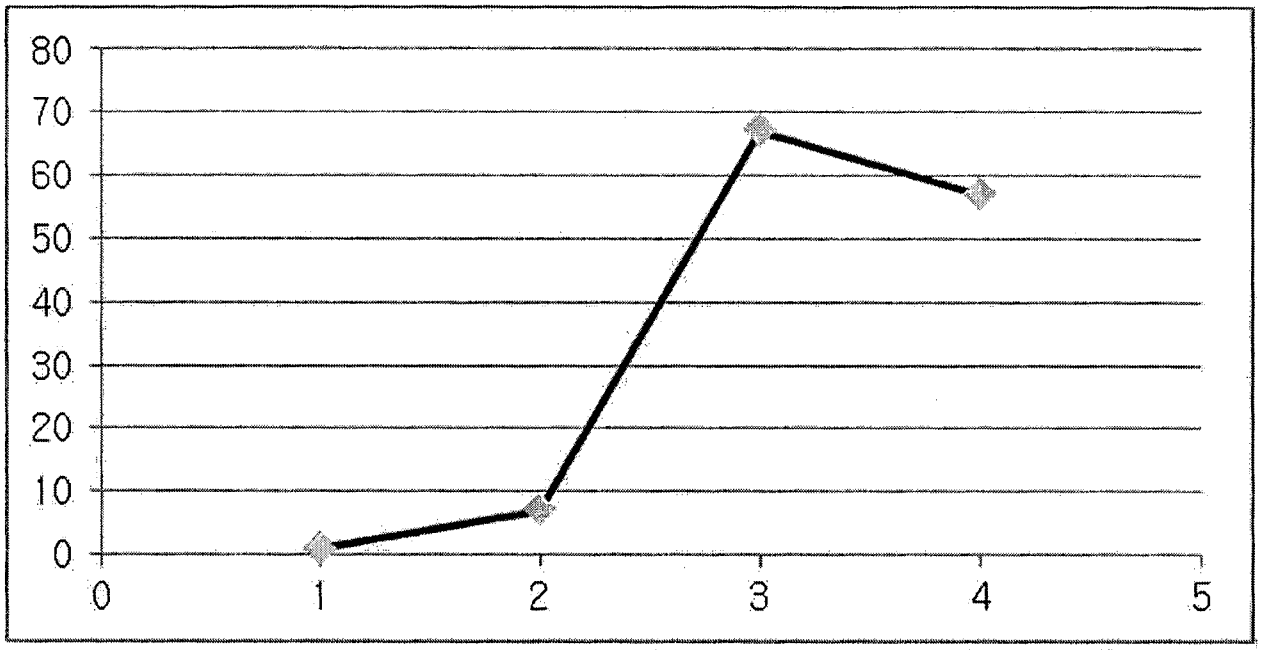
Ka(l/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
3.7e5	0.01	35nM

펩타이드 3

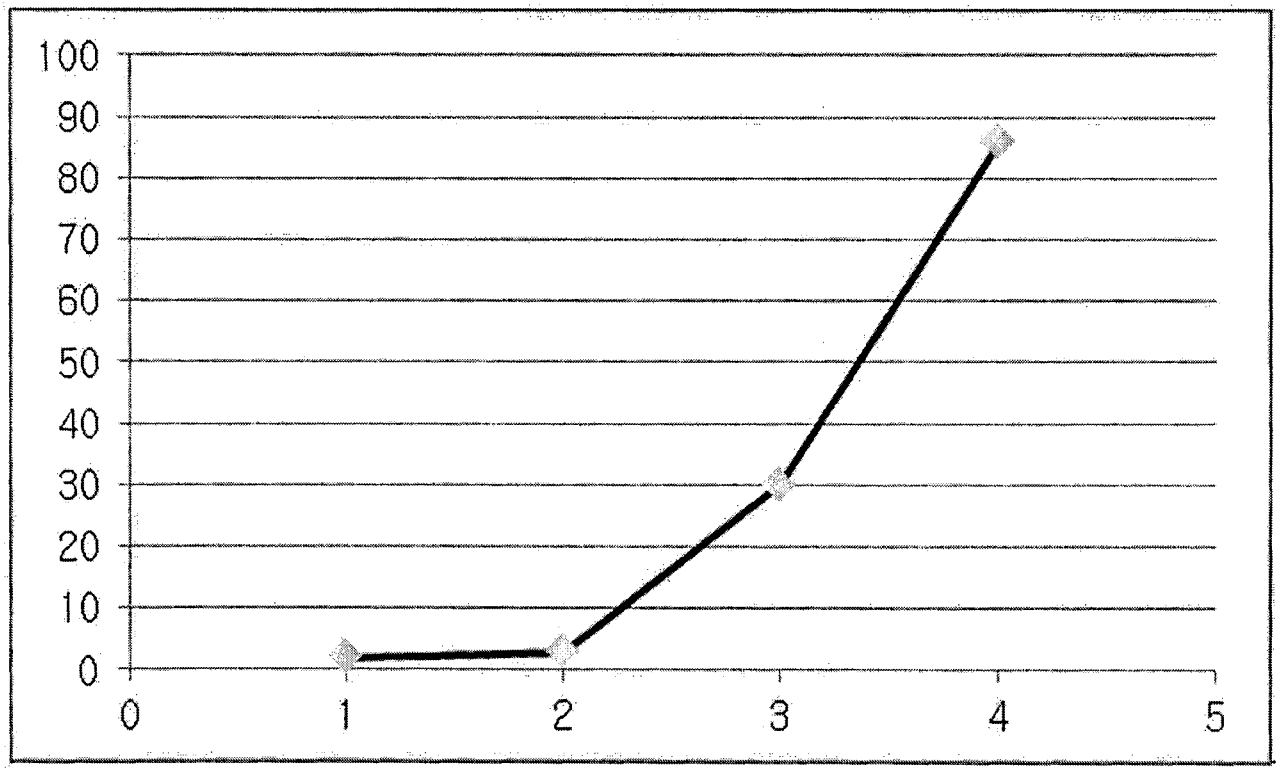


Ka(l/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
3.0e4	5.1e-4	16 nM

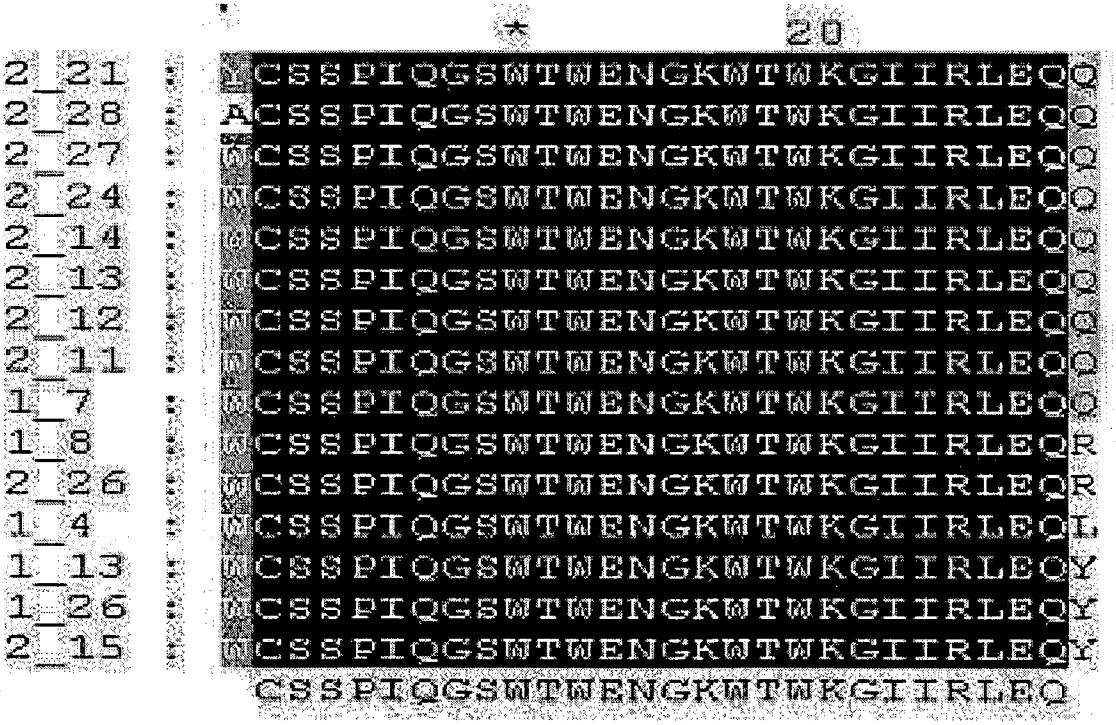
도 14


80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5

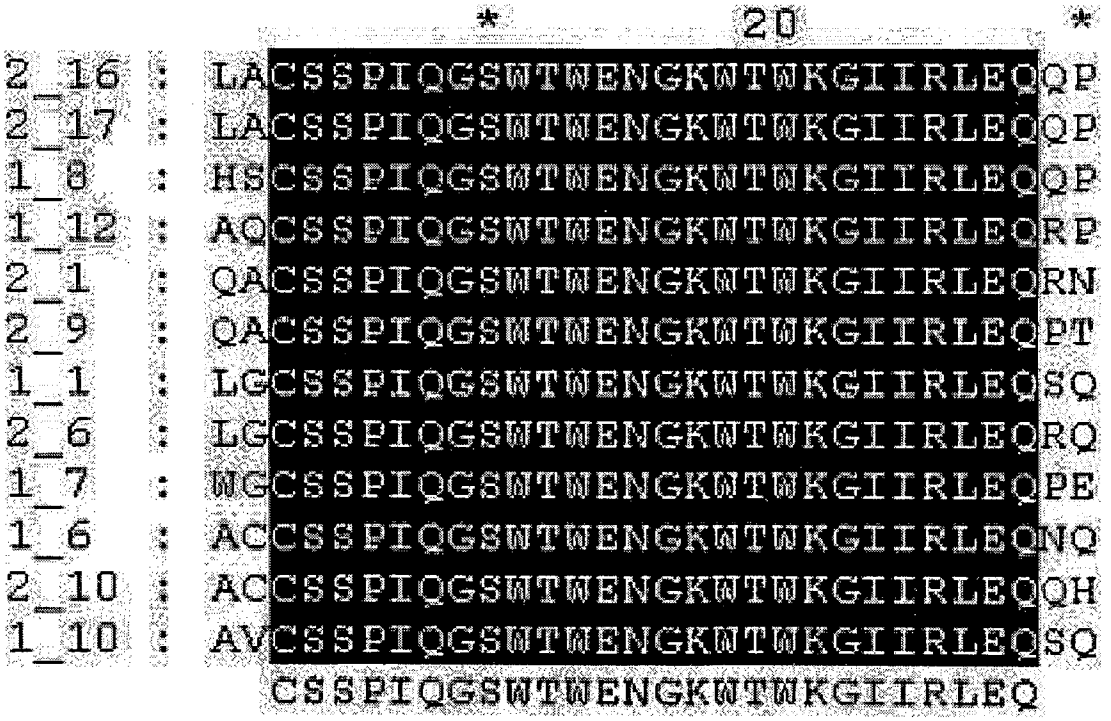
도 15


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5

도 16


20
2_21 : YCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQ
2_28 : ACSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
2_27 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
2_24 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
2_14 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
2_13 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
2_12 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
2_11 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQQ
1_7 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQ
1_8 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQR
2_26 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQR
1_4 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQL
1_13 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQY
1_26 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQY
2_15 : WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQY
CSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ

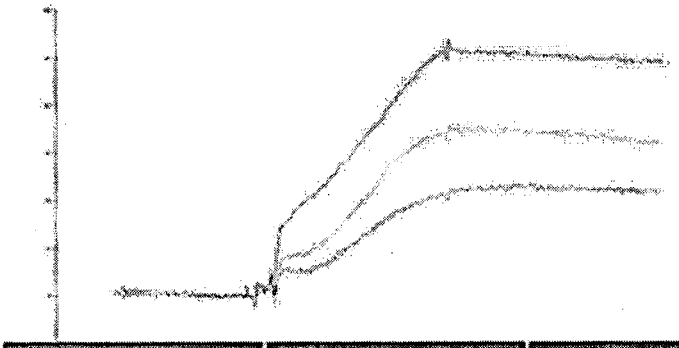
도 17


20
2_16 : LACSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQP
2_17 : LACSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQP
1_8 : HSCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQP
1_12 : AQCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQRP
2_1 : QACSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQRN
2_9 : QACSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQPT
1_1 : LGCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQSQ
2_6 : LGCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQRQ
1_7 : WGCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQPE
1_6 : ACCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQNQ
2_10 : ACCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQQH
1_10 : AVCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQSQ
CSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ

도 18

● $BPB3_{EDB}$

WCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLQ

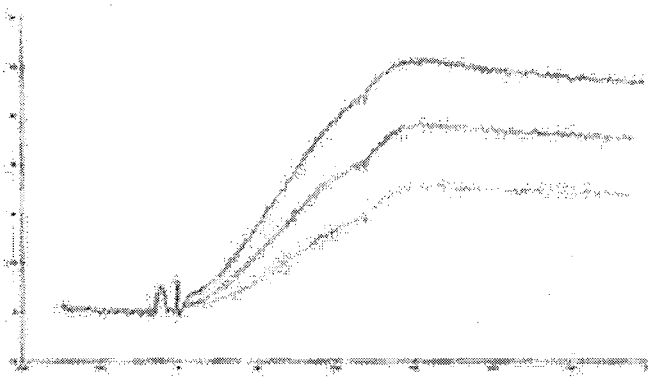


Ka(l/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
6.2e4	3.5e-4	5.7 nM

도 19

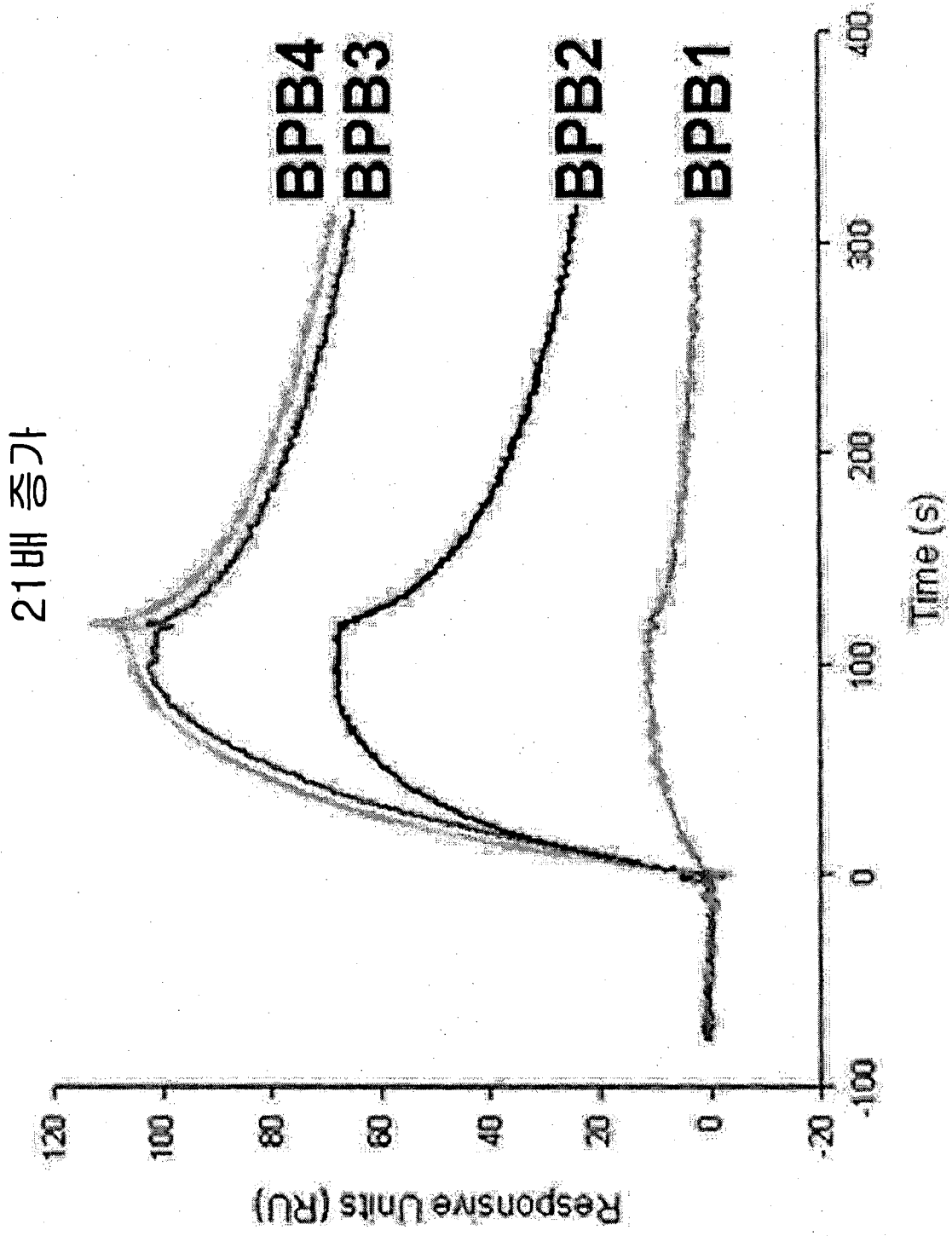
● $BPB4_{EDB}$

HSCSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLQP



Ka(l/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
1.3e5	4.7e-4	3.5 nM

도 20


21배 증가
BPB4
BPB3
BPB2
BPB1
Response Units (RU)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-100
0
100
200
300
400
Time (s)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/005196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/10(2006.01)i, C07K 1/00(2006.01)i, C40B 40/10(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 1/10; C07H 21/04; C07K 19/00; C07K 7/08; C07K 7/06; C12N 15/11; C12N 15/62; C07K 1/00; C40B 40/10

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: , ,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0044128 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 29 April 2010 See abstract and claim 1.	1-3
A	US 5,856,456 A (WHITLOW, M. D. et al.) 05 January 1999 See claims 1-14.	1-3
A	KOIDE, A. et al. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. Journal of Molecular Biology. 11 December 1998, vol. 284, no. 4, pages 1141-51. See pages 1141-1147.	1-3
A	KR 10-2011-0099600 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 September 2011 See claims 1, 5 and 6.	1-3

☐ 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	Date of mailing of the international search report
27 SEPTEMBER 2013 (27.09.2013)	**27 SEPTEMBER 2013 (27.09.2013)**

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/KR2013/005196

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **4, 5**
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:

Claims 4 and 5 are too broad to carry out a meaningful international search since the claims include a bipodal peptide binder containing amino acid sequences in various combinations.

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/KR2013/005196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0044128 A	29/04/2010	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 2012-505929A	08/03/2012
		KR 10-1216008 B1	28/12/2012
		US 2011-0152500 A1	23/06/2011
		WO 2010-047515 A2	29/04/2010
		WO 2010-047515 A3	29/07/2010
US 05856456 A	05/01/1999	US 05990275 A	23/11/1999
		WO 94-12520 A1	09/06/1994
KR 10-2011-0099600 A	08/09/2011	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/005196

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 1/10(2006.01)i, C07K 1/00(2006.01)i, C40B 40/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 1/10; C07H 21/04; C07K 19/00; C07K 7/08; C07K 7/06; C12N 15/11; C12N 15/62; C07K 1/00; C40B 40/10

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: , ,

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2010-0044128 A (광주과학기술원) 2010.04.29. 요약 및 청구항 1 참조.	1-3
A	US 5,856,456 A (WHITLOW, M. D. et al.) 1999.01.05. 청구항 1-14 참조.	1-3
A	KOIDE, A. et al. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. Journal of Molecular Biology. 11 December 1998, Vol. 284, No. 4, pages 1141-51. 페이지 1141-1147 참조.	1-3
A	KR 10-2011-0099600 A (한국과학기술원) 2011.09.08. 청구항 1, 5, 6 참조.	1-3

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 09월 27일 (27.09.2013)	2013년 09월 27일 (27.09.2013)

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

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/005196

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:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 4,5
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
제4항 및 제5항은 수많은 조합의 아미노산 서열로 구성된 바이포탈 펩타이드 바인더를 포함하고 있어 청구항이 너무 광범위하므로 유효한 국제조사를 수행할 수 없습니다.

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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/005196

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0044128 A	2010/04/29	AU 2009-307249 A1	2010/04/29
		CA 2741040 A1	2010/04/29
		CN 102224162 A	2011/10/19
		EP 2360172 A2	2011/08/24
		JP 2012-505929A	2012/03/08
		KR 10-1216008 B1	2012/12/28
		US 2011-0152500 A1	2011/06/23
		WO 2010-047515 A2	2010/04/29
		WO 2010-047515 A3	2010/07/29
US 05856456 A	1999/01/05	US 05990275 A	1999/11/23
		WO 94-12520 A1	1994/06/09
KR 10-2011-0099600 A	2011/09/08	없음	