

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 2월 5일 (05.02.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/016616 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007013
- (22) 국제출원일: 2014년 7월 30일 (30.07.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0090468 2013년 7월 30일 (30.07.2013) KR
10-2014-0097461 2014년 7월 30일 (30.07.2014) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-752 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 1층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 홍성유 (HONG, Sung Yu); 130-775 서울시 동대문구 제기로 131 한신아파트 106동 1504호, Seoul (KR). 허지희 (HEO, Ji Hoe); 121-916 서울시 마포구 마포대로 109 롯데캐슬프레지던트아파트 102-1504, Seoul (KR). 권일 (KWON, Il); 449-831 경기도 용인시 처인구 이동면 백옥대로 320 번길 61-17, Gyeonggi-do (KR). 김동익 (KIM, Dong Ik); 110-521 서울시 종로구 성균관로 69-5, Seoul (KR). 장양수 (JANG, Yang Soo);

137-826 서울시 서초구 방배중앙로 207-10 아크로리버 101-701, Seoul (KR). 김영대 (KIM, Young Dae); 143-751 서울시 광진구 아차산로 552 극동아파트 7동 1001호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이문섭 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

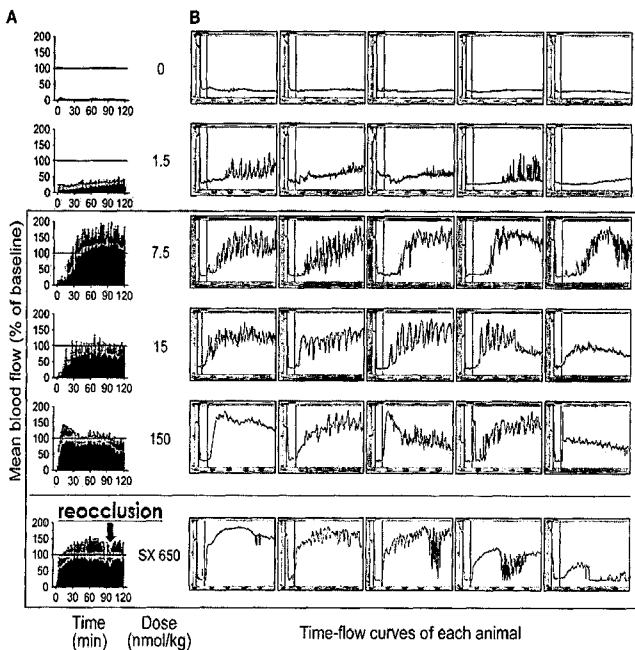
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, 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, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SAXATILIN-FC FUSION PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 삭사틸린-F c 융합 단백질 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a saxatilin derivative having an increased half life and a use thereof. The saxatilin derivative of the present invention has thrombolytic ability similar to that of saxatilin, which is the mother protein, a remarkably increased protein half life, and efficiently dissolves, for long period of time, blood clots already formed in blood vessels of an animal model with a FeCl₃-induced carotid by using the same. Therefore, a composition containing, as an active ingredient, the saxatilin derivative of the present invention does not cause reocclusion after penetration and effectively opens to microvessels, and is thus very useful for treating angiostenosis or occlusive diseases (for example, cerebrovascular diseases, cardiovascular diseases, arteriosclerotic vascular diseases, coronary artery diseases, and peripheral vascular diseases).

(57) 요약서: 본 발명은 증가된 반감기를 가지는 삭사틸린 유도체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 삭사틸린 유도체는 모 단백질인 삭사틸린과 유사한 혈전 용해능을 가질 뿐 아니라 현저하게 증가된 단백질 반감기를 가지고, 이를 이용하여 FeCl₃-유도된 경동맥 동물 모델에서 혈관 내 이미 형성된 혈전을 장기간 동안 매우 효율적으로 용해시킨다. 따라서, 본 발명의 삭사틸린 유도체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 관통 후 재협착도 일으키지 않고, 미세혈관까지 효과적으로 개방시켜 혈관의 협착 또는 폐색 질환(예컨대, 뇌혈관질환, 심혈관질환, 동맥경화성 혈관질환, 관상동맥질환, 말초혈

관질환, 등)의 치료에 매우 효과적이다.

WO 2015/016616 A1

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 삭사틸린-F c 융합 단백질 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 A085136에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “선도형특성화연구개발사업”, 연구과제명은 “선도형 뇌심혈관질환 융합연구사업단”, 주관기관은 연세대학교 산학협력단, 연구기간은 2012. 12. 01 ~ 2013. 11. 30 이다.
- [2] 본 특허출원은 2013년 7월 30일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0090468호 및 2014년 7월 30일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2014-0097461호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [3] 본 발명은 증가된 반감기를 가지는 삭사틸린 유도체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] 대부분의 뇌졸중은 주 또는 더 작은 뇌내 동맥의 혈전색전성폐색(thromboembolic occlusion)에 의해 야기된다(Wardlaw, Murray et al., 2009). 허혈성 뇌졸중의 경우, 빠른 혈전용해만이 불가피한 완전한 경색의 발병을 억제하기 위한 유일하게 확립된 치료방법이다(1995; 및 Choi, Bateman et al., 2006). 재조합 조직 플라스미누겐 활성인자(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)의 정맥내 투여에 의한 치료법은 허혈성 뇌졸중의 발병(onset) 후 4.5시간 내에 행할 수 있는 현재 유일하게 승인된 허혈성 뇌졸중에 대한 치료법이다(Caplan, Mohr et al., 1997; 및 Lopez-Yunez, Bruno et al., 2001). 하지만, 절반 이상의 환자들이 혈전용해 치료 후 성공적인 재관통(recanalization)을 이루는데 실패한다(Rha and Saver, 2007; 및 Lee et al., Stroke, 2007; 38: 192-193). 비록 폐색된 동맥이 혈전용해 치료법에 의해 성공적으로 재관통된다 할 지라도, 이러한 회복(benefits)은 재관류 손상(Hallenbeck and Dutka, 1990), 뇌출혈(Adams et al., 2005) 및 재폐색(Heo, Lee et al., 2003)의 위험에 의해 다시 약화된다. 또한, rt-PA는 신경독성을 가지는 것으로 보고되었다(Chen and Strickl, 1997; Wang, Tsirka et al., 1998; Nicole, Docagne et al., 2001; Yepes, Sandkvist et al., 2002; 및 Matys and Strickl, 2003).
- [6] 재관통 전략은 그 효능이 증명되었지만, 적용가능성의 한계 및 잠재적인 부작용을 유발하기 때문에, rt-PA보다 더 효능이 좋은 신규한 혈전용해 제제(agents)를 개발하기 위한 많은 시도(efforts)가 있었다. 이러한 시도들은 t-PA의 변이체들, 동물 소스로부터 유래한 플라스미노겐 활성인자들 및

마이크로플라스민을 포함한다. 상술한 약물들(drugs)은 다음과 같은 목적을 지닌다: (a) 피브린 특이성의 증대; (b) 혈장 내 반감기의 연장; (c) 플라스미노겐 활성화인자 억제제-1에 의한 억제능 감소; 및 (d) 신경독성의 회피. 여러 가지 약물들은 임상 실험을 완료하였으며, 몇몇 약물들은 현재 효능을 연구하고 있는 상태이다. 이러한 약물들은 혈전 내 피브린을 타겟으로 하며, 예를 들어 rt-PA, 유로키나제(urokinase) 등의 혈전용해제가 이에 해당된다. 하지만, 혈전은 혈소판-피브리노겐 상호작용에 의해 형성된다. 또한, 트롬빈, 백혈구 및 적혈구세포도 혈전의 구성성분들이다. 피브린을 타겟으로 하는 혈전용해 제제들에 대한 혈전의 저항성은 뇌졸중 환자들에서 보여지는 낮은 재개통율(recanalization rates)의 주된 이유들 중 하나이고, 이러한 현상은 혈소판-풍부 혈전에 의한 폐색에서 보다 더 일반적으로 일어날 수 있다. 이러한 측면에서, 혈소판을 타겟으로 하는 치료법이 개선된 혈전용해 효능을 위해 피브린을 타겟팅하는 치료법에 대한 선택적인 또는 추가적인 방법일 수 있다.

- [7] 인테그린 패밀리의 멤버인 혈소판 당단백질(Platelet glycoprotein, GP) IIb/IIIa는 고밀도로 혈소판 막 표면에 존재한다(Shattil and Ginsberg, 1997). GPIIb/IIIa 수용체는 피브리노겐에 특이적으로 결합함으로써 혈소판 응집 경로의 최종 단계를 매개한다(Phillips, Charo et al., 1988). 따라서, 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체를 타겟팅하는 것이 혈소판에 작용하는 약물 개발을 위한 대들보(mainstay)였다. 많은 혈소판 GPIIb/IIIa 길항제들이 개발되어 졌는데, 이들은 GP IIb/IIIa에 대한 인간-마우스 키메릭 항체의 Fab 단편(abciximab), RGD 펩타이드의 비-펩타이드 유사체들(티로피반 및 라미피반) 및 KGD 모티프를 포함하는 원형 헵타펩타이드 디스인테그린(eptifibatide)을 포함한다(Seitz, Meisel et al., 2004; Abou-Chebl, Bajzer et al., 2005; 및 Eckert, Koch et al., 2005). 상술한 GPIIb/IIIa 길항제들은 불안정성 협심증, 급성 심근경색, 그리고 경피적 관상동맥 성형술(percutaneous transfemoral coronary angioplasty, PTCA) 및 스텐트시술을 받은 환자들에게 효과적이었다. 뇌졸중의 경우, 압식시맙(abciximab)은 증상이 발병한 지 5시간 내지 6시간이 지나고 처리된 환자들에서 그 효능을 나타내지 못했다(Adams, Effron et al., 2008). 하지만, GPIIb/IIIa 길항제들은 재폐색된 뇌졸중 환자들에서 혈전을 용해시키고 선택된 환자들에 효과적이다(Heo, Lee et al., 2003; Seitz, Hamzavi et al., 2003; Seitz, Meisel et al., 2004; Eckert, Koch et al., 2005; 및 Chen, Mo et al., 2007).

- [8] 한국 뱀독으로부터 정제되고 클로닝된 신규한 디스인테그린인 삭사틸린(Saxatilin)은 트리펩타이드 서열인 ArgGlyAsp(RGD)를 가지는데, 이 서열은 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체에 대한 디스인테그린의 인지 부위(recognition site)이다(Hong, Koh et al., 2002; 및 Hong, Sohn et al., 2002). 삭사틸린은 혈소판 응집(Hong, Koh et al., 2002) 및 혈소판 활성화(Jang, Jeon et al., 2007) 상에 강력한 억제효능을 가져서, 혈전 생성을 방해하는 것으로 알려져 있다.

- [9]

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

[11]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

[12] 본 발명자들은 혈관 내 혈전의 생성을 억제하거나 또는 이미 생성된 혈전을 효과적으로 용해하여 부분적으로 또는 완전 폐색된 혈관을 재관통시킬 수 있는 혈전 용해제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 디스인테그린, 구체적으로는 뱀독으로부터 유래한 삭사틸린(saxatilin)과 면역글로블린 Fc 단편으로 이루어진 재조합 단백질(또는 삭사틸린 유도체)이 삭사틸린 단백질과 유사한 혈전 용해능을 가질 뿐 아니라 현저하게 증가된 단백질 반감기를 나타내고, 이를 이용한 FeCl₃-유도된 경동맥 동물 모델에서 혈관 내 이미 형성된 혈전을 매우 효율적으로 용해시킬 수 있고 그 효능도 모단백질인 삭사틸린보다 장기간 지속될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[13] 따라서, 본 발명의 목적은 삭사틸린 유도체를 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 삭사틸린 유도체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 혈전 용해용 조성물을 제공하는 데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료에 이용되는 삭사틸린 유도체의 용도를 제공하는 데 있다.

[21]

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

[23]

과제 해결 수단

[24] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 삭사틸린(saxatilin)과 면역글로블린(immunoglobulin)의 Fc 영역이

- 컨주게이션(conjugation)된 삭사틸린 유도체를 제공한다.
- [25] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 삭사틸린 유도체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [26] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 재조합 벡터로 형질전환된 세포 또는 형질전환체를 제공한다.
- [28]
- [29] 본 발명자들은 혈관 내 혈전의 생성을 억제하거나 또는 이미 생성된 혈전을 효과적으로 용해하여 부분적으로 또는 완전 폐색된 혈관을 재관통시킬 수 있는 혈전 용해제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 디스인테그린, 구체적으로는 뱀독으로부터 유래한 삭사틸린과 면역글로블린 Fc 단편으로 이루어진 재조합 단백질(또는 삭사틸린 유도체)이 삭사틸린 단백질과 유사한 혈전 용해능을 가질 뿐 아니라 현저하게 증가된 단백질 반감기를 나타내고, 이를 이용한 FeCl₃-유도된 경동맥 동물 모델에서 혈관 내 이미 형성된 혈전을 매우 효율적으로 용해시킬 수 있고 그 효능도 모단백질인 삭사틸린보다 장기간 지속될 수 있음을 확인하였다.
- [30] 본 발명의 삭사틸린 유도체, 즉 삭사틸린(서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열)과 Fc의 융합 단백질은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 삭사틸린과 면역글로블린(immunoglobulin)의 Fc 영역으로 구성된 단백질로, 혈전 내 존재하는 인테그린, 구체적으로는 혈전을 구성하는 혈소판 표면의 GP(glycoprotein)IIb-IIIa에 경쟁 결합(competition binding)하여 혈소판 등을 피브리노겐 등 혈전의 구성 성분으로부터 떼어 내는 원리로 혈전을 효율적으로 분해할 수 있다.
- [31] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 모단백질인 삭사틸린과 유사한 혈전용해능을 가진다.
- [32] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 혈소판 응집에 대한 IC₅₀ 값이 100-500 nM, 바람직하게는 100-250 nM이다.
- [33] 구체적으로는, 모단백질인 삭사틸린, 그리고 본 발명의 Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc의 IC₅₀ 값은 각각 150 nM, 196 nM 및 362 nM이었다(참고: 도 4). 본 명세서에서 사용되는 용어 "IC₅₀ 값(half maximal inhibitory concentration)"은 생물학적 또는 생화학적 활성을 억제하는 화합물의 효능을 평가하는 지표로, 특정 약물 또는 다른 물질(예컨대, 본 발명의 삭사틸린 유도체)가 특정 생물학적 과정(예컨대, 혈전 용해) 또는 상기 과정에 포함된 구성성분(예컨대, 효소, 세포 수용체, 등)을 절반까지 억제하는 데 필요한 정량적인 농도 측정치를 제공한다. 통상적으로, 약리학적 연구에서 길항제로서 약물의 강력함(potency)을 평가하는 데 이용된다. 한편, 혈전용해능은 당업계에서 공지된 다양한 방법, 예를 들어,

피브린 플레이트 어세이 방법(Astrup A and Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351(1952)), 혈전분해를 나타내는 D-다이머(D-dimer)를 검출하는 방법(미국공개 특허번호 제US2009/0305301 A1호), 방사선 동위원소를 이용하는 방법(국제공개 특허번호 제WO94/22494호), 혈관 내 혈전무게 측정법, 혈전용해 후 유리된 분쇄물의 탁도(turbidity) 측정법 등을 이용하여 측정될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [34] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 중성구(neutrophil)에 존재하는 integrin $\alpha_M\beta_2$ 에 대하여 1×10^{-8} 내지 1×10^{-10} M의 Kd(dissociation constant) 값의 결합력을 갖는다.
- [35] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 중성구(neutrophil)에 존재하는 integrin $\alpha_L\beta_2$ 에 대하여 1×10^{-8} 내지 1×10^{-10} M의 Kd(dissociation constant) 값의 결합력을 갖는다.
- [36] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체의 처리량은 1-20 mg/kg이고, 보다 구체적으로는 3-15 mg/kg이며, 가장 구체적으로는 5-10 mg/kg이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 적은 투여량으로 완전 폐색된 혈관의 재관통에 효과를 나타냈다(참고: 도 6a 내지 도 6c). 도 6에서 확인할 수 있듯이, 130 nmol/kg의 삭사틸린, Fc-삭사틸린 또는 삭사틸린-Fc 처리는 완전 폐색된 혈관의 재관통에 약 30% 정도의 혈류량 회복 효과를 나타냈다. 더 나아가, 삭사틸린 처리 그룹은 약 90분 쯤 재폐색이 진행되었으나, Fc-삭사틸린 또는 삭사틸린-Fc 처리 그룹은 지속적으로 재관통 효과를 나타냈다.
- [37] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 경구 또는 비경구, 구체적으로는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 볼루스(bolus) 주입, 정맥내 주입, 동맥내 주입, 근육 주입, 피하 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 가장 구체적으로는 볼루스 주입이다.
- [38] 또한, 혈관의 재관통 효과를 가지는 약물(예컨대, 본 발명의 삭사틸린 유도체)은 적합한 지속시간을 가지는 것이 바람직하며, 구체적으로는 10분 내외의 지속시간을 가지는 것이 임상적으로 가장 적합하고 유효하다.
- [39] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체에 포함된 면역글로블린(immunoglobulin)의 Fc 영역은 삭사틸린의 N-말단 또는 C-말단에 컨쥬게이션되고, 보다 구체적으로는 N-말단에 컨쥬게이션된다.
- [40] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 N-말단에 리더 서열(leader sequence)을 추가적으로 포함한다.
- [41] 통상적으로, 목적 단백질에 면역글로블린의 Fc 영역이 결합된 융합 단백질은 모 단백질보다 효능이 낮게 나타나거나, 또는 반감기 증가 효과가 그리 크지 않다. 이에 반해, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 삭사틸린 모 단백질과 유사한 혈전 용해 활성을 가질 뿐 아니라, 삭사틸린 모 단백질보다 훨씬 증가된

반감기를 나타냈다(참고: 도 5a 내지 도 5c). 구체적으로는, 본 발명의 Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc의 반감기는 각각 8.6분 및 12.5분으로, 모단백질인 삭사틸린의 반감기(2.0분) 보다 훨씬 더 길었다.

- [42] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 모단백질인 삭사틸린보다 4배 이상 증가된 반감기를 가지고, 보다 구체적으로는 약 4-6.5배의 증가된 반감기를 가진다.
- [43] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fc 영역"은 면역글로블린 연쇄 불변 영역의 카르복실 말단 부분을 의미하고, 구체적으로는 면역글로블린 중쇄 불변 영역 또는 이의 일부를 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 삭사틸린 유도체의 제조에 이용될 수 있는 면역글로블린 Fc 영역은 (a) CH1 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인; (b) CH1 도메인 및 CH2 도메인; (c) CH1 도메인 및 CH3 도메인; (d) CH2 도메인 및 CH3 도메인; 또는 (e) 2개 이상의 도메인과 면역글로블린 힌지 영역의 조합을 포함할 수 있다.
- [44] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 삭사틸린 유도체의 제조에 이용된 면역글로블린 Fc 영역은 인간 면역글로블린 Fc 영역(GenBank Accession No., CAA49866.1) 및 이의 단편들(예컨대, 서열목록 제7서열)을 포함한다.
- [45] 또한, 본 발명은 인간 면역글로블린 Fc 영역 이외에도 GenBank 및/또는 EMBL 데이터베이스에 개시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열, 예를 들어 AF045536.1(*Macaca fuscicularis*), AF045537.1(*Macaca mulatta*), AB016710(*Felix catus*), K00752(*Oryctolagus cuniculus*), U03780(*Sus scrofa*), Z48947(*Camelus dromedarius*), X62916(*Bos taurus*), L07789(*Mustela vison*), X69797(*Ovis aries*), U17166(*Cricetulus migratorius*), X07189(*Rattus rattus*), AF57619.1(*Trichosurus vulpecula*) 또는 AF035195(*Monodelphis domestica*) 등을 포함하는 다른 면역글로블린 Fc 영역 또는 이의 단편 서열도 이용될 수 있다.
- [46] 더 나아가, 면역글로블린 중쇄 불변 영역 내의 아미노산 서열의 치환 또는 결실이 본 발명의 삭사틸린 유도체 제조에 유용할 수 있다. 상기 치환 또는 결실을 통해 제조된 Fc 변이체들은 융합 단백질의 안정성, 용해성 및 구조적 무결성(integrity) 등을 개선시켜 보다 최적화된 융합 단백질의 제조에 유용하다.
- [47] 본 발명은 서열목록 제2서열의 삭사틸린(saxatilin)과 서열목록 제7서열의 면역글로블린(immunoglobulin)의 Fc 영역으로 구성된 융합 단백질(서열목록 제4서열 또는 서열목록 제6서열)을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공하며, 구체적으로는 서열목록 제3서열 및 서열목록 제5서열로 예시되어 있지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이라면 어떠한 것도 이용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다.
- [48] 또한, 본 발명의 융합 단백질은 다양한 검출 가능한 표지 인자(tag)로 태깅될 수 있으며, 상기 태그는 His(n), 플랙(flag), c-Myc, HA, V5, VSV-G 및 HSV를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서에서 사용되는 용어

"태그(tag)"은 3-40개의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드 서열을 의미하며, 본 발명의 융합 단백질, 펩타이드, 단백질 리간드(예컨대, 본 발명의 융합 단백질) 또는 비-펩타이드 리간드에 특이적인 결합 친화성(affinity)을 부여한다. 또한, 본 발명에서 이용될 수 있는 태그은 형광(fluorescent) 태그, 발광(luminescent) 태그 및 발색(chromogenic) 태그을 포함할 수 있다.

- [49] 본 발명의 삭사틸린 유도체는 (a) 상기 삭사틸린 유도체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 저-비용으로 대량 생산될 수 있다.
- [50] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 발현벡터에서 발현대상물질(즉, 삭사틸린-Fc 융합 단백질)-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 언급되는 용어 "작동적으로 결합된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.
- [51] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [52] 본 발명의 발현 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, *pL*프로모터, *pR*프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, *SP6* 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 이때, 박테리아 복제 개시점은 긴 DNA 삽입물(inserts)의 안정적인 박테리아 복제에 유용한 당업계에 잘 알려진 복제 개시점들로부터 선택될 수 있으며, ColE1, F-인자(F-factor) 및 P1 레플리콘(replicon)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 박테리아 선택마커는 당업계에 알려진 박테리아 선택마커 유전자를 이용할 수 있다. 예를 들어, 박테리아 선택마커 유전자는 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 제오신, 네오마이신, 하이그로마이신 및 클로람페니콜 같은 항생제에 대한 저항성을 부여하는 유전자들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(*pL*프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

- [53] 또한, 본 발명의 재조합 벡터가 진핵세포에 적용되는 경우에 이용될 수 있는 프로모터는 본 발명의 발현대상물질의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [54] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 재조합 벡터는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터 또는 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).
- [55] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 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(Dower, W.J. et al., Nucleic Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 트랜스덕션(transduction), 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.
- [56] 또한, 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 형질전환된 동물세포의 제조는 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기동공법(electroporation), 리포솜-매개 전이방법(Wong, 등, 1980) 및 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, H.Y., et al., (1990), J. Reprod. Fert. 41:173-182; Kopchick, J.J. et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In Transgenic Animals, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. 16, 107-110)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [57] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상술한 형질전환된 동물세포는 포유동물-유래된 세포이다.
- [58] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 외래 유전자가 도입된 동물세포를 선택함에 있어, 상기 외래 유전자는 선택 마커로서 바람직하게는 항생제 내성 유전자를 포함한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 선택 마커는, 진핵세포에 항생제를 부여하는 어떠한 유전자도 가능하며, 예컨대, 네오마이신 및 카나마이신 내성 유전자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [59]

- [60] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 삭사틸린 유도체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 혈전 용해용 조성물을 제공한다.
- [61] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 혈전 용해용 조성물을 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [62] 본 발명의 조성물은 유효성분으로써 상술한 본 발명의 삭사틸린 유도체를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [63] 본 발명의 조성물은 이미 생성되어 덩어리진 혈전을 효과적으로 용해하여 다양한 혈관 협착 또는 폐색 질환의 치료에 간편하고 효율적으로 적용될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물은 이미 생긴 혈전을 녹여내어 혈관을 효과적으로 뚫는 원리로 혈관 협착 또는 폐색 질환 치료에 적용될 수 있다.
- [64] 본 명세서의 용어 "폐색(occlusion)"은 혈관이 완전히 막히거나 또는 부분적으로 막혀 혈관이 좁아져 있는 상태를 포괄하는 용어이다. 본 발명에서 언급된 폐색의 정도는 측정된 혈류량에 기초하여 판단될 수 있다. 즉, 폐색의 정도는 부분적 폐색(partial occlusion) 또는 완전 폐색(complete occlusion)으로 분류되며, 부분적 폐색은 정상 혈류량(baseline blood flow)의 40-80% 수준으로 감소된 경우를 의미하며, 완전 폐색은 90-100% 수준으로 감소된 경우를 의미한다.
- [65] 혈관 내 혈류량을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 실시될 수 있으며, 예를 들어 초음파 희석법(Lee KH, Park JY, Choi SJ, Kim JK, Hwang SD, Joh JH, Clinical utility of access blood flow measurement by ultrasound dilution in hemodialysis patients. Korean J Nephrol, 24: 265-273(2005)), 도플러 초음파법(Strauch B, O'Connell R, Geoly K, Forecasting thrombosis of vascular access with doppler flow imaging. Am J Kidney Dis, 19: 554-557, (1992)), 글루코오스 펌프 테스트(glucose pump test, GPT; Magnasco A, Alloatti S, Martinoli C, Solari P, Glucose pump test: a new method for blood flow measurements. Nephrol Dial Transplant, 17: 2244-2248(2002)), 근적외선(700-1000 nm)을 이용하는 방법(Buunk G, van der Hoeven JG, Meinders AE, A comparison of near-infrared spectroscopy and jugular bulb oximetry in comatose patients resuscitated from a cardiac arrest. Anesthesia, 53: 13-19(1998)), 열전도혈류측정법(Ogata N, Fournier JY, Imhof HG, et al., Thermal diffusion blood flow monitoring during aneurysm surgery. Acta Neurochir(Wien), 138: 726-731(1996)) 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명에서 혈류량 측정 방법은 초음파를 이용한 도플러 초음파법을 이용한다.
- [66] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 동물은 특별하게 제한되지 않으며, 구체적으로는 포유동물이고, 보다 구체적으로는

인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 및 고양이이고, 보다 더 구체적으로는 인간 및 마우스이다.

- [67] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상기 동물 혈관은 동맥, 정맥, 모세혈관을 포함하고, 보다 구체적으로는 대동맥, 경동맥, 쇄골하 동맥, 복강동맥, 장간막동맥(mesenteric arteries), 신동맥, 장골동맥, 소동맥, 모세혈관, 소장맥을 포함하며, 가장 바람직하게는 대동맥 및 경동맥을 포함한다.
- [68] 본 발명의 조성물에 의해 치료될 수 있는 질환은 다양한 혈관 협착 또는 폐색 질환들을 포함하며, 예컨대 뇌혈관질환(cerebrovascular disease, CVD), 심혈관질환(cardiovascular disease), 동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease), 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 말초혈관질환(peripheral artery disease, PAD) 등이 있으며, 보다 구체적으로는 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 편두통, 각차단, 뇌허혈, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 정맥혈전색전증, 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis), 폐색전증(pulmonary embolism), 말초혈관질환, 혈관성 두통, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 기구 혈관형성술 이후 재협착증 및 혈관염에 의한 혈관 폐색증을 포함하고, 가장 구체적으로는 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증 및 심근경색증을 포함한다.
- [69] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뇌혈관질환(cerebrovascular disease, CVD)"은 산소-풍부 혈액을 안면 및 뇌에 공급하는 혈관에서 일어나는 동맥경화성 혈관질환으로, 일반적으로 CAD 및/또는 PAD(peripheral artery disease)와 함께 발생하는 동반질환(comorbid disease) 뿐 아니라, 허혈성 질환 또는 혈류량의 부족을 야기하는 질환도 포함한다. 예를 들어, CVD는 허혈성 뇌혈관질환, 급성 뇌경색, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 정맥류, 경증인지장애(mild cognitive impairment, MCI) 또는 일과성 허혈발작(transient ischemic attacks, TIA)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [70] 본 명세서에서 사용되는 용어 "심혈관질환(cardiovascular disease)" 또는 "동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease)"은 심장, 심장 판막, 혈액 및 몸의 혈관구조(vasculature)에 영향을 미치는 수많은 상태를 분류하는데 이용되는 일반적인 용어로, 심장 또는 혈관에 영향을 미치는 질병들을 포함한다. 구체적으로는, 대사증후군, 증후군 X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥 질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 급성 허혈성 동맥경화성 이벤트를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 특히, 동맥경화성 혈관질환(arteriovascular disease)은 비-허혈성 질환보다는 허혈성 질환 또는 허혈유발성(proischemic) 질환을 의미한다.
- [71] 본 명세서에서 언급하는 용어 "관상동맥질환(coronary artery disease, CAD)"은 심근에 혈액을 공급하는 동맥(관상동맥)이 죽상경화(atherosclerotic), 칼슘 침전에

의한 경화 및/또는 좁아져서 발생하는 동맥경화성 혈관질환을 의미한다. CAD는 심근으로의 혈류량 감소를 초래하며 이에 따라 심근이 충분한 양의 산소를 공급받지 못하고 궁극적으로 괴사(necrosis)를 야기한다. CAD는 급성 관상동맥증후군, 심근경색(심장마비), 협심증(안정 및 불안정) 또는 심장으로 혈액을 공급하는 혈관에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [72] 본 명세서에서 사용되는 용어 "말초혈관질환(peripheral artery disease, PAD)"은 심장 및 뇌 이외의 곳에서 발생하는 아테롬성 동맥경화증 및 죽상혈전증 같은 질환으로 일반적으로 CAD와 함께 발생하는 동반질환(comorbid disease)을 포함한다.
- [73] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 삭사틸린 유도체의 효능 또는 활성(즉, 혈전 용해능)을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [74] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [75] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 볼루스 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 가장 구체적으로는 혈관 내로 직접 주입되는 방식(예컨대, 볼루스 주입 또는 정맥내 주입)으로 투여될 수 있다. 혈관 내로 직접 투입되는 방식이란 동맥, 정맥, 모세혈관을 포함하는 혈관, 예컨대 대동맥, 경동맥, 쇄골하동맥, 복강동맥, 장간막동맥(mesenteric arteries), 신동맥, 장골동맥, 소동맥, 모세혈관, 소정맥을 포함하는 혈관 내로 투여되는 것을 의미하며 혈전이 생긴 혈관 부위에 따라 적절하게 그 투여방법을 선택할 수 있다.
- [76] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류 및 처방의 결정에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 삭사틸린 유도체의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-1,000 mg/kg이다.

[77] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[78] 본 발명의 약제학적 조성물은 단순히 혈전 생성을 예방하는 원리로 상기 질병들을 예방 또는 치료하는 것이 아니라, 이미 생긴 혈전을 녹여내어 혈관을 효과적으로 뚫는 원리로서 상기 혈관 협착 또는 폐색성 질환을 치료하는 데 그 특징이 있다. 예컨대 뇌경색의 경우, 혈전 생성을 예방하는 방식의 약제학적 조성물(예컨대, 아스피린)은 이미 잘 알려져 있다. 그러나, 일단 혈전이 생성되고 뇌혈관을 폐색시켜 뇌경색이 발병한 이상 이를 효과적으로 치료할 수 있는 약제학적 조성물은 거의 없는 실정이며, 플라스미노겐 활성인자(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)의 정맥내 투여에 의한 치료법은 뇌경색 발병 후 3시간 내에 행할 수 있는 현재 유일하게 승인된 뇌경색 치료법이다. 하지만, 플라스미노겐 활성인자를 이용한 치료법의 경우 상기와 같은 시간적 제한을 받을 뿐만 아니라, 절반 이상의 환자들이 혈전용해 치료 후 성공적인 재관통(recanalization)을 이루는데 실패하는 현실에서, 이미 생성된 혈전을 효과적으로 용해해 낼 수 있는 본 발명의 약제학적 조성물은 일단 발병한 혈관의 협착 또는 폐색 질환의 치료에 있어 매우 현실적이고 획기적인 방안이라 할 것이다. 그 뿐만 아니라, 본 발명의 혈관 협착 또는 폐색 질환의 치료용 약제학적 조성물은 미세 혈관의 폐색도 효과적으로 치료하며 또한 재협착도 일으키지 않는다는 점에서 그 가치가 크다고 할 것이다.

[79]

[80] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 삭사틸린 유도체의 약제학적 유효량을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[81] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 혈관의 협착 또는 폐색 질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 편두통, 각차단, 뇌허혈, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 정맥혈전색전증, 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis), 폐색전증(pulmonary embolism), 말초혈관질환, 혈관성 두통, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 기구 혈관형성술 이후 재협착증 및 혈관염에 의한 혈관 폐색증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[82] 본 발명의 예방 또는 치료 방법은 상기 본 발명의 다른 일 양태인 ‘삭사틸린 유도체’를 대상에 투여함으로써 이루어지므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

[83]

[84] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 혈관의 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료를 위한 삭사틸린 유도체의 용도를 제공한다.

[85] 본 발명의 용도는 상기 본 발명의 다른 일 양태인 ‘삭사틸린 유도체’를 이용하는 용도에 관한 것이므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

[86]

발명의 효과

[87] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[88] (a) 본 발명은 증가된 반감기를 가지는 삭사틸린 유도체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[89] (b) 본 발명의 삭사틸린 유도체는 모 단백질인 삭사틸린과 유사한 혈전 용해능을 가질 뿐 아니라 현저하게 증가된 단백질 반감기를 가지고, 이를 이용하여 FeCl₃-유도된 경동맥 동물 모델에서 혈관 내 이미 형성된 혈전 장기간 동안 매우 효율적으로 용해시킨다.

[90] (c) 따라서, 본 발명의 삭사틸린 유도체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 관통 후 재협착도 일으키지 않고, 미세혈관까지 효과적으로 개방시켜 혈관의 협착 또는 폐색 질환(예컨대, 뇌혈관질환, 심혈관질환, 동맥경화성 혈관질환, 관상동맥질환, 말초혈관질환, 등)의 치료에 매우 효과적이다.

[91]

도면의 간단한 설명

[92] 도 1은 각각 pYK603 벡터 및 pYK602 벡터의 멀티클로닝 위치에 클로닝된 삭사틸린 유도체의 구조를 도식적으로 나타내는 도면이다. 구성성분들 간의 거리 또는 제한효소 위치들 간의 거리는 비율에 따라 표시되어 있지 않다. leader(리더 서열), 면역글로블린 G2a 감마 체인.

[93] 도 2는 본 발명의 삭사틸린 유도체의 발현을 확인한 웨스턴 블랏팅 결과이다. 정제된 단백질의 안정성을 확인하기 위해, 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전물의 생성 유무를 조사하였다(레인 2 및 레인 4). 그 결과, 본 발명의 삭사틸린 유도체는 매우 안정하였다(침전물이 생기지 않았음).

[94] 도 3a 및 도 3b는 각각 Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc의 정제 결과를 보여주는 도면으로, 겔-전기영동 이미지(좌측 패널) 및 전기이동그램(electropherogram; 우측 패널)이 제시된다.

[95] 도 4는 모단백질인 삭사틸린 및 본 발명의 삭사틸린 유도체(Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc)의 혈소판 응집 억제 활성을 측정된 결과이다. 혈소판 응집

어세이를 위해, 모단백질인 삭사틸린과 Fc-삭사틸린은 50, 100, 150, 200, 250 및 300 nM을 사용하였으며, 삭사틸린-Fc는 200, 300, 350, 400, 500 및 600 nM을 사용하였다.

- [96] 도 5a 내지 도 5c는 각각 모단백질인 삭사틸린 및 본 발명의 삭사틸린 유도체(Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc)의 반감기를 측정한 결과이다.
- [97] 도 6은 삭사틸린 650 nmol/kg의 효과와 삭사틸린 유도체의 혈전용해 효과를 비교한 결과를 나타낸다. 또한, 혈류량을 측정함으로써 재관통 여부 및 그 정도를 측정한 결과를 나타낸다.
- [98] 도 7은 용량-반응 연구에서 얻어진 각 그룹의 평균값에 대한 용량반응곡선을 나타낸다. 선행연구에서 얻어진 삭사틸린 650 nmol/kg의 혈전용해효과(평균; 적색 선, 표준편차; 적색 영역)와 비교한 결과를 나타내었다.
- [99] 도 8은 혈전용해 효과를 측정한 2시간 중 마지막 10분 동안의 정상혈류량 대비 혈류량 평균 백분율을 분석한 결과를 나타낸다.

[100]

발명의 실시를 위한 형태

- [101] 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.

[102] 실시예

[103] 실험방법 및 실험결과

[104] 재조합 삭사틸린(*saxatilin*) 단백질 발현 벡터 제작, 발현 및 정제

[105] Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc 단백질 발현 벡터 제작

[106] 재조합 삭사틸린 단백질을 발현시키기 위하여, 본 발명자들은 하기 표 1에 기재된 프라이머쌍(삭사틸린-F 및 삭사틸린-R)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 얻어진 PCR 산물을 제한효소 *Sfi*I(thermo scientific)으로 절단하여 pYK603 벡터 및 pYK602 벡터(에이앤알씨라퓨틱스)에 T4 DNA 리가제(thermo scientific)를 이용하여 클로닝하여 각각 Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc 단백질 발현용 재조합 벡터를 제조하였다(도 1).

[107] 표 1

[Table 1]

Fc-삭사틸린의 발현 벡터용 프라이머 서열(제한효소 절단 서열, 밑줄로 표시됨).

프라이머 이름	서열(5' -> 3')
삭사틸린-F	agtagg <u>ccg</u> tgggggccgaggccggagaagaatgtgactgt
삭사틸린-R	gcatg <u>gccg</u> acggccaaggcatggaagggatttctgggaca

[108]

[109] *Fc-작사틸린 및 작사틸린-Fc 단백질 발현 확인*

[110] 상술한 Fc-작사틸린 또는 작사틸린-Fc를 포함하는 재조합 벡터를 각각 292E 세포에 PEI(polyethylenimine; Polysciences)를 이용하여 트랜스펙션(transfection)시켰다. 트랜스펙션 후 세포 배양 2일 또는 5일 째에 상층액(supernatant)을 수거하여 SDS-PAGE를 실시한 후 NC 막(membrane; Millipore)으로 옮기고 2차 항체인 항-HuFc-HRP(1:2000 희석; thermo scientific)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 NC 막을 PBS/T로 3번에 걸쳐서 세척한 후 ECL 용액으로 필름을 현상하여 웨스턴 블랏팅을 실시하였다(도 2).

[111]

[112] *Fc-작사틸린 및 작사틸린-Fc 단백질 정제*

[113] 상술한 바와 같이 트랜스펙션된 293E 세포의 배양에서 3, 5 또는 7일 째의 배양 상층액을 0.22 μm 탑-필터(top-filter; Millipore)를 사용하여 여과하였다. 여과된 상층액을 500 μl 단백질 A 비드(GE healthcare가 패키징되어 있는 5 ml 컬럼에 로딩하여 비드와 결합시켰다. 펌프(peristaltic pump; Bio-rad)를 사용하여 0.9 ml/min의 유속으로 4°C에서 하룻밤 동안 결합시킨 후, 100 ml 이상의 PBS로 세척하고 0.1 M 글라이신(Glycine)-HCl을 이용하여 6개의 분획(fraction)으로 용출시켰다. 상기 용출액들은 1 M Tris(pH 9.0) 용액으로 중화(neutralization)시켰다. 이후, 단백질의 양을 정량하고 2-3개의 분획에 포함된 단백질들을 아미콘 울트라 원심분리 필터(amicon ultra centrifugal filter; Millipore)를 사용하여 농축시켰다. PBS로 10번 이상 완충액을 교환시켰다.

[114] 얻어진 단백질 농축액의 순도(purity)는 Agilent 2100 생체분석기(Bioanalyzer)를 이용하여 분석하였다(도 3a 및 도 3b). Agilent 2100 생체분석기는 랩-온-어-칩(lab-on-a-chip) 기술을 기반으로 한 분석 장비로 단백질의 크기와 농도를 동시에 자동으로 분석할 수 있는 시스템으로, 마이크로칩 안에서 샘플 처리, 분리 및 검출 전-과정을 동시에 수행하여 신뢰성 높은 데이터를 두 가지 형태(겔-전기영동 이미지 및 크로마토그래피 같은 전기이동그램(electropherogram))으로 분석결과를 확인할 수 있다.

[115]

[116] *Fc-작사틸린 및 작사틸린-Fc 단백질의 혈소판 응집 억제능*

[117] 졸레틸(zoletil 50; VirBac)과 럼푼(rompun; Bayer)을 3:1의 비율로 혼합한 후, 생리식염수로 10배 희석시킨 마취 용액을 제조하였다. 수컷 ICR(Institute of Cancer Research) 마우스((주)오린엔트 바이오, 대한민국)의 체중을 측정하여 g 당 10 μl 의 상기 마취용액을 복강내 주입하였다. 마취된 마우스를 고정시켜 개복한 후, 복대정맥에서 혈액을 채취하여 소듐 시트레이트 튜브(sodium citrate tube, #363048; BD Science)에 넣고 잘 섞어주었다. 상기 채취된 혈액을 15 ml 튜브로 옮겨 1,000 rpm으로 15분 동안 원심분리시켜 혈소판(platelet)을 포함하는 혈장층(platelet-rich plasma, PRP)을 수득하였다. 또한, 아래쪽의 혈구층을 다시

3,000 rpm으로 10-15분 동안 원심분리시켜 상층액(혈장)을 얻었다. 상기 상층액(600 μ l)을 10,000 rpm으로 2분 동안 원심분리시켜 혈구세포 등이 제거된 PPP(platelet-poor plasma, PPP)를 수득하고, 남은 혈장은 이전 단계에서 분리한 PRP와 혼합하여 이후 실험에 이용하였다. 혈소판 응집 어세이는 응집측정기(Aggregometer Model 700; Chrono-log)를 이용하여 실시하였다. PPP(500 μ l)을 첨가한 첫 번째 큐벳(cuvettes, #312; Chrono-log)과 PRP(480 μ l)과 삭사틸린(10 μ l) 또는 재조합 삭사틸린(Fc-삭사틸린 또는 삭사틸린-Fc; 10 μ l)을 첨가한 두 번째 큐벳(cuvette)을 응집측정기에 꽂고 기준선(baseline)을 셋팅한 후, 상기 두 번째 큐벳에 10 μ l의 ADP(최종농도, 20 μ M; #384; Chrono-log)를 넣어 파이펫팅(pipetting)으로 혼합시키고 응집 정도를 측정하였다. 이때, ADP만을 넣었을 때의 응집 정도를 100%로 산정하고 이에 대한 상대적인 수치로 각 시료의 응집 정도를 계산하였다. 즉, 100%에서 각 시료의 응집율(%)을 제한 값이 억제율(%)로 계산된다. 혈소판 응집에 대한 천연 삭사틸린의 IC₅₀ 농도는 150 nM이고, 본 발명의 Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc의 IC₅₀ 농도는 각각 196 nM 및 362 nM이었는데(도 4), 이는 본 발명의 재조합 삭사틸린이 삭사틸린과 비교될 정도의 우수한 혈소판 응집 활성을 나타낸다는 것을 보여준다.

[118]

[119] Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc 단백질의 반감기

[120] 삭사틸린, Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc(in PBS, pH 7.4)을 포함하는 반응 튜브에 NHS-로다민(N-Hydroxysuccinimide-Rhodamine; #46406, 10 mg/ml; Thermo Scientific Pierce, 미국)을 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PD10 탈염 칼럼(salting column)(#17-0851-01; GE Healthcare, 미국)을 이용하여 반응하지 않은(non-reacted) NHS-로다민을 제거하였다. 로다민-컨쥬게이션된(conjugated) 단백질의 농도를 BCA 단백질 어세이 키트(#23225; Thermo Scientific Pierce, 미국)로 측정된 후, 실험에 이용할 때까지 4°C에서 암 조건으로 보관하였다.

[121] 로다민-표지된 삭사틸린을 0.5 mg/ml이 되도록 PBS 완충액으로 희석시킨 후, 8-주령된 ICR 마우스(3마리; (주)오린엔트 바이오, 대한민국)에 인슐린 주사기(#32882; BD Science, 미국)를 이용하여 꼬리정맥에 주입하였다. 이때, 투여 용량은 5 mg/10 ml/kg(마우스 무게)으로 실시하였다. 상기 단백질 투여 후 0분, 5분, 10분, 20분, 40분 및 80분 후에 상기 마우스의 경정맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 30분 동안 암 조건으로 유지시켜 혈액을 응고시켰다. 상기 혈액을 4°C에서 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 상층액(혈청)을 분리하였다. 상기 수득된 혈청 80 μ l를 검은색 96-웰 플레이트(#43711; Thermo Scientific Pierce, 미국)에 넣고 마이크로플레이트 형광측정기(microplate fluorometer; 552 nm의 여기 파장 및 575 nm의 발광 파장; Thermo Scientific Pierce, 미국)를 이용하여 형광 측정하여 반감기를 계산하였다.

[122] 로다민-컨쥬게이션된 Fc-삭사틸린 또는 삭사틸린-Fc를 0.5 mg/ml이 되도록 PBS 완충액으로 희석시킨 후, 9-주령된 ICR 마우스(5마리)에 인슐린 주사기를

이용하여 꼬리정맥에 주입하였다. 이때, 투여 용량은 5 mg/10 ml/kg(마우스 무게)으로 실시하였다. 상기 단백질 투여 후 0분, 5분, 10분, 30분 및 60분, 그리고 2시간, 4시간 및 8시간 췌에 상기 마우스의 경정맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 30분 동안 암 조건으로 유지시켜 혈액을 응고시켰다. 상기 혈액을 4°C에서 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 상층액(혈청)을 분리하였다. 상기 수득된 혈청 80 μ l를 검은색 96-웰 플레이트(#43711; Thermo Scientific Pierce, 미국)에 넣고 마이크로플레이트 형광측정기(microplate fluorometer; 552 nm의 여기 파장 및 575 nm의 발광 파장)를 이용하여 형광 측정하여 반감기를 계산하였다.

[123] 그 결과, 로다민-컨쥬게이션된 삭사틸린, Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc의 반감기는 각각 2.0분, 8.6분 및 12.5분이었다(도 5a 내지 도 5c). 따라서, 본 발명의 Fc-삭사틸린 및 삭사틸린-Fc는 삭사틸린과 비교하여 현저하게 증가된 반감기를 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

[124]

[125] 인테그린과 삭사틸린의 결합

[126] 96-웰 플레이트에 각 인테그린($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_M\beta_2$ 및 $\alpha_L\beta_2$)을 100 ng/웰씩 첨가하고, 4°C에서 밤새 코팅하였다. 코팅 후 PBS-T(0.5% Tween 20)로 3차례 세척하였다. 1% BSA(in PBS-T) 용액으로 상온에서 2시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 블로킹 후 PBS-T로 3차례 세척하였다. 삭사틸린-Fc 또는 Fc-삭사틸린을 100 nM 부터 1/4씩 연속 희석하여 8개의 샘플 용액을 제조하였다.

[127] 상기 샘플 용액을 100 μ l씩 3 중으로 각 웰에 로딩하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBS-T로 3차례 세척하였다. 항-인간 IgG(Fc) 컨쥬게이티드 HRP 항체를 1:2,000으로 희석하여 각 웰에 100 μ l씩 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBS-T로 4차례 세척하였다. TMB 용액을 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, 종결 용액(stop solution, 0.5 M H₂SO₄)를 첨가하여 반응을 종결시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하여, 중성구 및 내피세포의 상호작용에 관여하는 인테그린과 삭사틸린의 결합을 확인하였다.

[128] 인테그린 $\alpha_M\beta_2$ 및 $\alpha_L\beta_2$ 는 중성구에 존재하는 인테그린으로, 내피세포에 존재하는 ICAM-1(Intercellular Adhesion Molecule 1)과 상호작용하여 중성구가 내피세포에 모이도록 한다. ELISA를 이용한 결합 분석 결과, Fc-삭사틸린은 인테그린 $\alpha_M\beta_2$ 및 $\alpha_L\beta_2$ 와 강하게 결합하였다(Kd, 6.9×10^{-9} M 및 9.2×10^{-9} M). 또한 Fc-삭사틸린 보다는 약하지만 삭사틸린-Fc도 인테그린 $\alpha_M\beta_2$ 및 $\alpha_L\beta_2$ 와 결합하였다(Kd, 3.0×10^{-7} M 및 4.4×10^{-7} M)(도 9).

[129] FeCl₃에 의한 혈전생성모델을 이용한 재조합 삭사틸린 유도체의 혈전용해 효과

[130] 32-34 g의 8-주령된 수컷 ICR 마우스를 이용하였다. 실험실 동물의 관리 및 이용은 국제실험동물관리인증협회(AAALAC)의 지침에 합당한 기준으로 연세대학교 의과대학 동물실험윤리위원회(IACUC)의 검토와 승인을 받은

프로토콜에 따라 실시하였다. 수술 과정을 살펴보면, 동물은 70% N₂O 및 30% O₂로 구성된 혼합물(대한특수가스, 대한민국) 내 5% 이소플루란(일성신약, 대한민국)의 흡입을 통해 마취시켰다. 마취는 2% 이소플루란으로 유지시켰다. 수술 과정 동안, 동물의 체온은 직장용 프로브로 지속적으로 모니터링하였으며, 항온피복 조절 유니트(Homeothermic blanket control unit) 및 히팅 패드(Harvard Apparatus, Holliston, MA)를 이용하여 37.0±0.2°C로 유지하였다. 삭사틸린 및 삭사틸린-Fc의 인 비보 혈전용해 활성을 테스트하기 위해 FeCl₃(Sigma-Aldrich, 미국)-유도된 경동맥 혈전 모델을 이용하였다. 경부 정중절개(midline cervical incision)를 실시하여 좌측 총경동맥을 수술 현미경(SEILER, 미국) 하에서 조심스럽게 해부하였다. 초음파 도플러 유속프로브(ultrasonic Doppler flow probe; Transonic MA0.7PSB)를 총경동맥(CCA)의 중앙부위에 위치시켰다. 경동맥 혈류량은 초음파 TS420 혈류량계(Transonic Instruments, Ithaca, NY) 및 iWorx IX-304T 데이터 획득 시스템(iWorx Systems, Inc., Dover, NH)을 이용하여 측정하였다. 대조군으로서 CCA의 기본 혈류량을 5분 동안 측정하였다. 대조군 기본혈류량의 결정 후, 프로브를 제거하였다. 노출된 CCA 중앙지점의 바깥쪽 표면(adventitial surface)에 50% FeCl₃로 포화된 여과지(700 × 500 μm; ADVANTEC, 일본)를 5분 동안 접촉시킴으로써 화학적 스트레스에 의한 산화적 혈관 손상이 유도되었다. 여과지를 제거한 후, CCA를 생리식염수로 세척하고 이의 혈류량을 측정하였다. 혈류량의 감소를 통해 혈전 형성 및 동맥 폐색을 결정하였으며, 완전 폐색(complete occlusion)은 혈류가 10분 동안 부재한 경우로 정의되었다.

[131] CCA 폐색 10분 후, PE-10 튜빙(Becton Dickinson and Company, 미국)과 연결된 주입펌프(KD Scientific Inc., 미국)를 이용하여 좌측 대퇴정맥을 통해 0, 1.5, 7.5, 15, 150 nmol/kg의 Fc-삭사틸린을 볼루스 주입하였다. 경동맥 혈류량을 주입 개시시간부터 2시간동안 연속적으로 모니터링하였다. 각 그룹 당 5 마리의 마우스를 이용하여 혈전용해 효과를 평가하고, 선행연구에서 평가한 삭사틸린 650 nmol/kg의 효과와 비교하였다.

[132] 또한, 혈류량을 측정함으로써 재관통 여부 및 그 정도를 측정하였다(도 6의 B). 기본 혈류량에 대한 데이터 및 CCA 폐색 후 2시간동안 지속적으로 모니터링된 혈류량에 대한 데이터가 iWorx Labscribe2 데이터 획득 소프트웨어(version 2.045000)를 이용하여 얻어졌다. 그 결과 얻어진 혈류시간(flow-time) 곡선 아래의 면적을 계산하여 경동맥 혈류량을 분석하였다. 동물들 간의 생리학적 조건의 변이에 따라 야기되는 오차(differences)를 피하기 위해, 모든 측정된 수치들은 각 동물의 최소 혈류량에 의해 표준화되었다. 혈전용해 효과를 아래와 같이 계산하고 정상 혈류량의 평균값에 대한 백분율로 표시하였다: (삭사틸린 유도체 투여 후 2시간 동안의 평균 혈류량/정상혈류량의 평균값) × 100(%). 용량-반응 연구에서 각 그룹의 평균값이 계산되고 이를 용량반응곡선으로 나타냈다(평균값±표준편차, 도 7). 또한, 선행연구에서 얻어진 삭사틸린 650

nmol/kg의 혈전용해효과(평균; 적색 선, 표준편차; 적색 영역)와 비교하였다. 한편, 각 동물에서 매 1분 동안 혈류량의 평균을 계산하였고, 투여량 및 투여방법에 대해 각각 대표적인 패턴을 시간-의존적으로 확인하였다(도 6의 A). 각 그룹에서 모든 동물의 평균값을 계산하였으며 시간에 따른 변화를 연속적인 막대그래프로 보여줬다(평균값±표준편차).

[133] 정상 혈류량과 비교하여 투여 그룹들에서의 혈류량의 평균백분율은 다음과 같았다(도 7): (a) 생리식염수 투여 그룹, $3.03 \pm 0.75\%$; (b) Fc-삭사틸린 1.5 nmol/kg 투여 그룹, $17.81 \pm 12.22\%$; (c) Fc-삭사틸린 7.5 nmol/kg 투여 그룹, $89.40 \pm 41.18\%$; (d) Fc-삭사틸린 15 nmol/kg 투여 그룹, $59.94 \pm 16.97\%$; (e) Fc-삭사틸린 150 nmol/kg 투여 그룹, $74.68 \pm 20.53\%$; 및 (f) 삭사틸린 650 nmol/kg 투여 그룹, $78.24 \pm 48.61\%$ (평균값±표준편차).

[134] 혈전용해 효과를 측정된 2시간 중 마지막 10분 동안의 정상혈류량 대비 혈류량 평균 백분율을 분석하였다(도 8). (a) 생리식염수 투여 그룹, $3.29 \pm 1.25\%$; (b) Fc-삭사틸린 1.5 nmol/kg 투여 그룹, $23.06 \pm 11.75\%$; (c) Fc-삭사틸린 7.5 nmol/kg 투여 그룹, $119.52 \pm 46.32\%$; (d) Fc-삭사틸린 15 nmol/kg 투여 그룹, $69.05 \pm 26.07\%$; (e) Fc-삭사틸린 150 nmol/kg 투여 그룹, $72.49 \pm 22.49\%$; 및 (f) 삭사틸린 650 nmol/kg 투여 그룹, $81.54 \pm 57.50\%$ (평균값±표준편차).

[135] 종합해 보면, Fc-삭사틸린은 투여용량-의존적인 혈전용해효과를 보였고 Fc-삭사틸린 7.5 nmol/kg, 15 nmol/kg, 150 nmol/kg 투여에 의한 평균 혈전용해효과 및 마지막 10분 동안의 혈전용해효과는 기존의 삭사틸린 650 nmol/kg를 투여했을 때와 비교했을 때 통계적으로 비슷한 수준의 효과를 보였다.

[136] 650 nmol/kg 삭사틸린을 투여한 경우 시간이 지나감에 따라 삭사틸린 투여군에서 혈전용해 효과 및 혈전 재형성 억제 효과의 뚜렷한 감소가 관찰되었다. 상술한 갑작스런 재폐색은 삭사틸린을 볼루스 주입한 총 5마리 마우스 중 3마리에서 평균 약 90분째 관찰되었다(도6의 A 화살표). 이에 반해, Fc-삭사틸린 7.5 nmol/kg 이상의 용량을 투여한 경우 혈관의 재개통 이후에 재폐색이 없이 2시간 동안 혈전용해 및 혈전형성 억제효과가 일정하게 유지되는 것을 확인하였다.

[137]

[138] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 어떤 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[139]

[140] 참고문헌

[141] 1. (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group." *N Engl J Med* 333(24): 1581-1587.

- [142] 2. Abou-Chebl, A., C. T. Bajzer, et al. (2005). "Multimodal therapy for the treatment of severe ischemic stroke combining GPIIb/IIIa antagonists and angioplasty after failure of thrombolysis." *Stroke* 36(10): 2286-2288.
- [143] 3. Abumiya, T., R. Fitridge, et al. (2000). "Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia." *Stroke* 31(6): 1402-1409; discussion 1409-1410.
- [144] 4. Adams, H., R. Adams, et al. (2005). "Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke* 36(4): 916-923.
- [145] 5. Adams, H. P., Jr., M. B. Effron, et al. (2008). "Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II)." *Stroke* 39(1): 87-99.
- [146] 6. Alexandrov, A. V. and J. C. Grotta (2002). "Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." *Neurology* 59(6): 862-867.
- [147] 7. Caplan, L. R., J. P. Mohr, et al. (1997). "Should thrombolytic therapy be the first-line treatment for acute ischemic stroke? Thrombolysis--not a panacea for ischemic stroke." *N Engl J Med* 337(18): 1309-1310; discussion 1313.
- [148] 8. Chen, H., W. Mo, et al. (2007). "Characterization of a novel bifunctional mutant of staphylokinase with platelet-targeted thrombolysis and antiplatelet aggregation activities." *BMC Mol Biol* 8: 88.
- [149] 9. Chen, Z. L. and S. Strickland (1997). "Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin." *Cell* 91(7): 917-925.
- [150] 10. Choi, J. H., B. T. Bateman, et al. (2006). "Endovascular recanalization therapy in acute ischemic stroke." *Stroke* 37(2): 419-424.
- [151] 11. Choudhri, T. F., B. L. Hoh, et al. (1998). "Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation." *J Clin Invest* 102(7): 1301-1310.
- [152] 12. Ciccone, A., I. Abraha, et al. (2007). "Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors for Acute Ischemic Stroke." *Stroke*.
- [153] 13. Eckert, B., C. Koch, et al. (2005). "Aggressive therapy with intravenous abciximab and intra-arterial rtPA and additional PTA/stenting improves clinical outcome in acute vertebrobasilar occlusion: combined local fibrinolysis and intravenous abciximab in acute vertebrobasilar stroke treatment (FAST): results of a multicenter study." *Stroke* 36(6): 1160-1165.
- [154] 14. Hallenbeck, J. M. and A. J. Dutka (1990). "Background review and current concepts of reperfusion injury." *Arch Neurol* 47(11): 1245-1254.

- [155] 15. Heo, J. H., K. Y. Lee, et al. (2003). "Immediate reocclusion following a successful thrombolysis in acute stroke: a pilot study." *Neurology* 60(10): 1684-1687.
- [156] 16. Hong, S. Y., Y. S. Koh, et al. (2002). "Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration." *Thromb Res* 105(1): 79-86.
- [157] 17. Hong, S. Y., Y. D. Sohn, et al. (2002). "Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 530-536.
- [158] 18. Hussain, M. S., R. Lin, et al. (2010). "Symptomatic delayed reocclusion after initial successful revascularization in acute ischemic stroke." *J Stroke Cerebrovasc Dis* 19(1): 36-39.
- [159] 19. Jang, Y. J., O. H. Jeon, et al. (2007). "Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial cell migration and invasion." *J Vasc Res* 44(2): 129-137.
- [160] 20. Konstantinides, S., K. Schafer, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice." *Circulation* 103(4): 576-583.
- [161] 21. Kurz, K. D., B. W. Main, et al. (1990). "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." *Thromb Res* 60(4): 269-280.
- [162] 22. Lopez-Yunez, A. M., A. Bruno, et al. (2001). "Protocol violations in community-based rTPA stroke treatment are associated with symptomatic intracerebral hemorrhage." *Stroke* 32(1): 12-16.
- [163] 23. Matys, T. and S. Strickland (2003). "Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage." *Nat Med* 9(4): 371-372; author reply 372-373.
- [164] 24. Nicole, O., F. Docagne, et al. (2001). "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling." *Nat Med* 7(1): 59-64.
- [165] 25. Phillips, D. R., I. F. Charo, et al. (1988). "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." *Blood* 71(4): 831-843.
- [166] 26. Qureshi, A. I., A. M. Siddiqui, et al. (2004). "Reocclusion of recanalized arteries during intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke." *AJNR Am J Neuroradiol* 25(2): 322-328.
- [167] 27. Rha, J. H. and J. L. Saver (2007). "The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis." *Stroke* 38(3): 967-973.
- [168] 28. Seitz, R. J., M. Hamzavi, et al. (2003). "Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations." *Stroke* 34(8): 1932-1935.
- [169] 29. Seitz, R. J., S. Meisel, et al. (2004). "The effect of combined thrombolysis with

- rtPA and tirofiban on ischemic brain lesions." *Neurology* 62(11): 2110-2112.
- [170] 30. Shattil, S. J. and M. H. Ginsberg (1997). "Integrin signaling in vascular biology." *J Clin Invest* 100(11 Suppl): S91-95.
- [171] 31. Sohn, Y. D., S. Y. Hong, et al. (2008). "Acute and repeated dose toxicity studies of recombinant saxatilin, a disintegrin from the Korean snake (*Gloydius saxatilis*)." *Toxicon* 51(3): 406-417.
- [172] 32. Wang, Y. F., S. E. Tsirka, et al. (1998). "Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice." *Nat Med* 4(2): 228-231.
- [173] 33. Wardlaw, J. M., V. Murray, et al. (2009). "Thrombolysis for acute ischaemic stroke." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD000213.
- [174] 34. Yepes, M., M. Sandkvist, et al. (2002). "Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent." *J Clin Invest* 109(12): 1571-1578.
- [175]

청구범위

- [청구항 1] 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 삭사틸린(saxatilin)과 면역글로블린(immunoglobulin)의 Fc 영역이 컨쥬게이션(conjugation)된 삭사틸린 유도체.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 면역글로블린(immunoglobulin)의 Fc 영역은 상기 삭사틸린의 N-말단 또는 C-말단에 컨쥬게이션되어 있는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 N-말단에 리더 서열(leader sequence)이 추가적으로 컨쥬게이션되어 있는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 천연의 삭사틸린보다 4-6.5배의 증가된 반감기를 가지는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 천연의 삭사틸린과 유사한 혈전용해능을 가지는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 혈소판 응집에 대한 IC₅₀ 값이 100-500 nM인 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 혈소판 응집에 대한 IC₅₀ 값이 100-250 nM인 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 혈전 내 존재하는 인테그린(integrin)에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 혈전을 구성하는 혈소판 표면의 GP(glycoprotein)IIb-IIIa에 결합하여 혈전을 분해하는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 중성구(neutrophil)에 존재하는 integrin $\alpha_M\beta_2$ 에 대하여 1×10^{-8} 내지 1×10^{-10} M의 Kd(dissociation constant) 값의 결합력을 갖는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 삭사틸린 유도체는 중성구(neutrophil)에 존재하는 integrin $\alpha_L\beta_2$ 에 대하여 1×10^{-8} 내지 1×10^{-10} M의 Kd(dissociation constant) 값의 결합력을 갖는 것을 특징으로 하는 삭사틸린 유도체.
- [청구항 12] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 삭사틸린 유도체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열.

- [청구항 13] (a) 제 12 항의 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 14] 제 13 항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 15] (a) 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 삭사틸린 유도체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 혈전 용해용 조성물.
- [청구항 16] 제 15 항의 조성물을 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 혈관은 대동맥, 경동맥, 쇄골하동맥, 복강동맥, 장간막동맥(mesenteric arteries), 신동맥, 장골동맥, 소동맥, 모세혈관 또는 소정맥인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 18] 제 16 항에 있어서, 상기 혈관의 협착 또는 폐색 질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 편두통, 각차단, 뇌허혈, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 정맥혈전색전증, 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis), 폐색전증(pulmonary embolism), 말초혈관질환, 혈관성 두통, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 기구 혈관형성술 이후 재협착증 및 혈관염에 의한 혈관 폐색증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 19] 제 16 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 혈관 내로 직접 주입되는 방식으로 투여되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 20] 제 16 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 혈전에 의해 혈관이 폐색된 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 21] 제 20 항에 있어서, 상기 폐색은 부분적 폐색 또는 완전 폐색인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 22] 제 16 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen activator)를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 23] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 삭사틸린 유도체의 약제학적 유효량을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 혈관의 협착 또는 폐색 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 24] 제 23 항에 있어서, 상기 혈관의 협착 또는 폐색 질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌혈전증, 뇌색전증, 열공성 뇌경색, 급성 관동맥 증후군, 협심증, 대동맥 협착증, 심근경색증, 편두통, 각차단, 뇌허혈, 급성

허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event), 혈전성 정맥염, 정맥혈전색전증, 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis), 폐색전증(pulmonary embolism), 말초혈관질환, 혈관성 두통, 아테롬성 동맥경화증, 혈관경련, 재협착증, 기구 혈관형성술 이후 재협착증 및 혈관염에 의한 혈관 폐색증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

Fig. 1

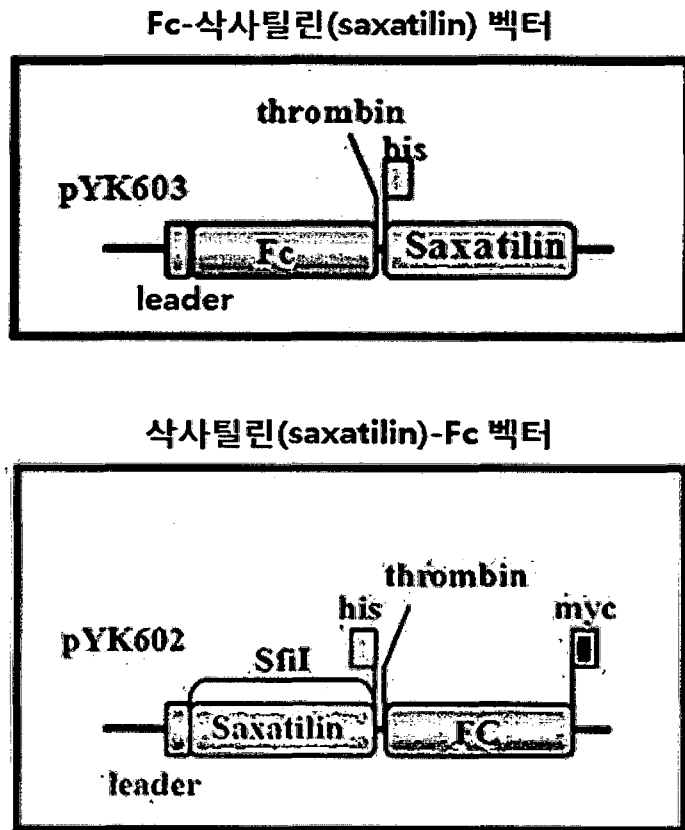


Fig. 2

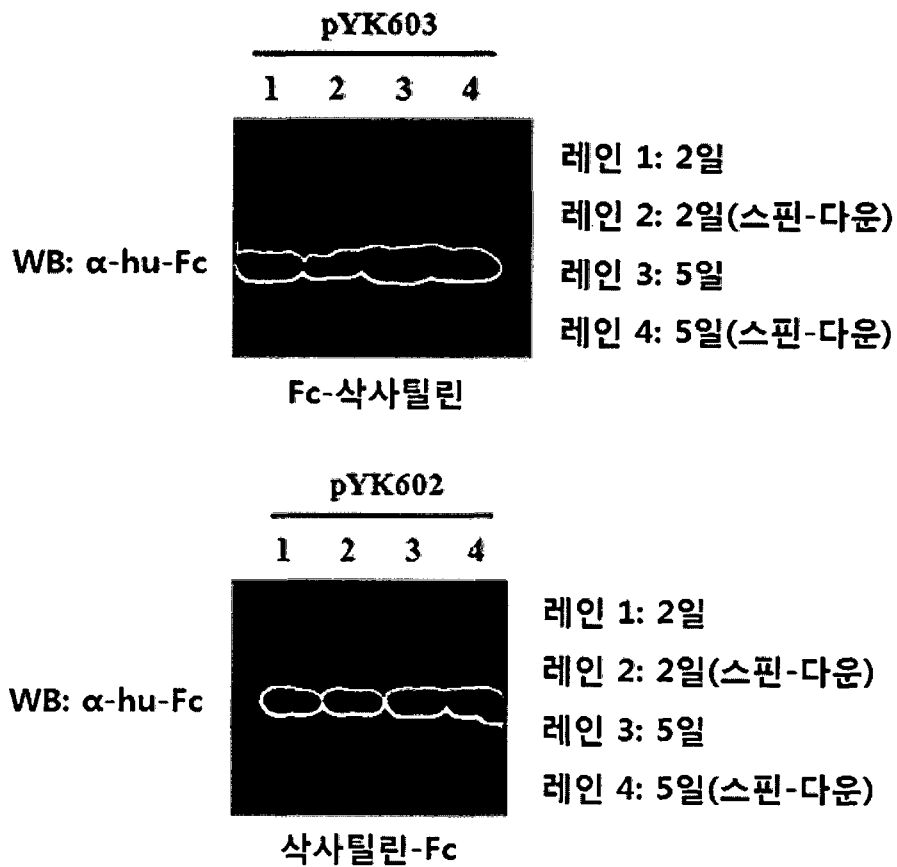


Fig. 3a

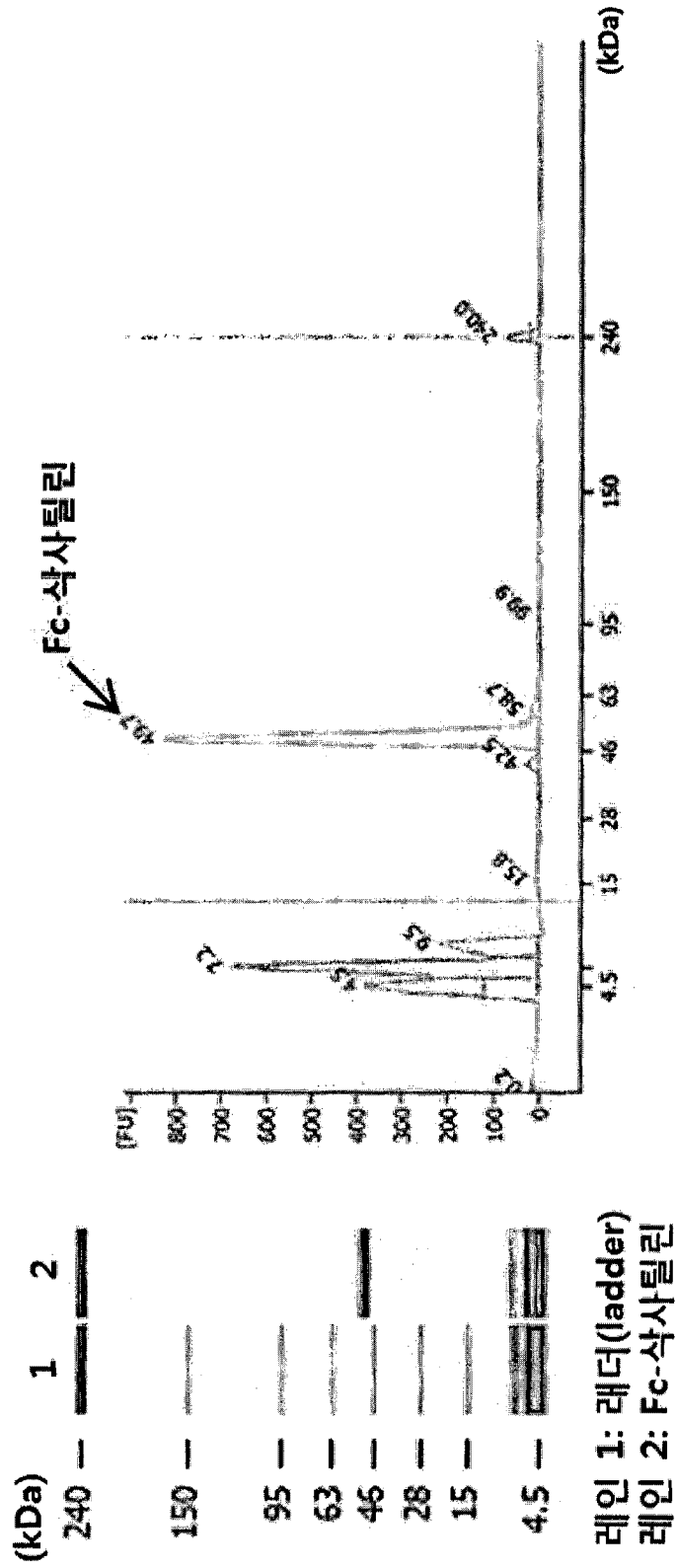


Fig. 3b

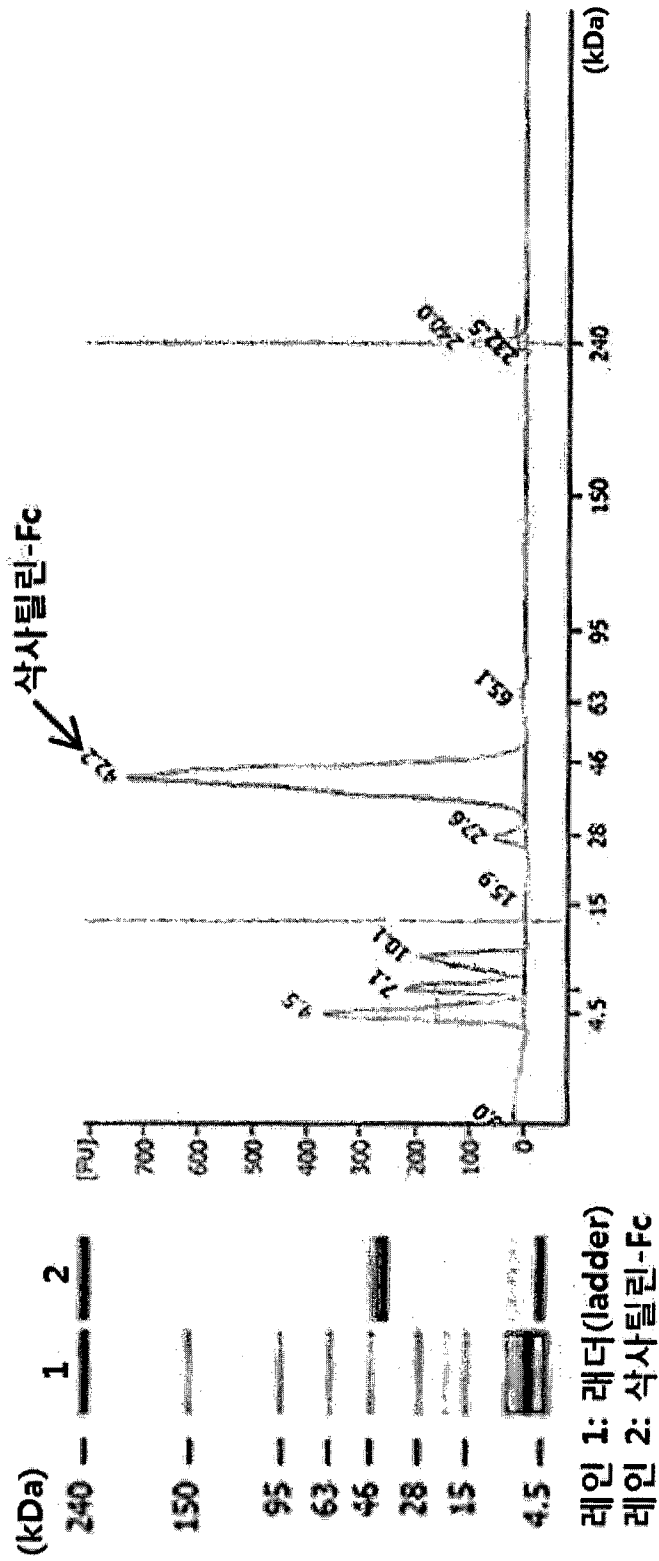


Fig. 4

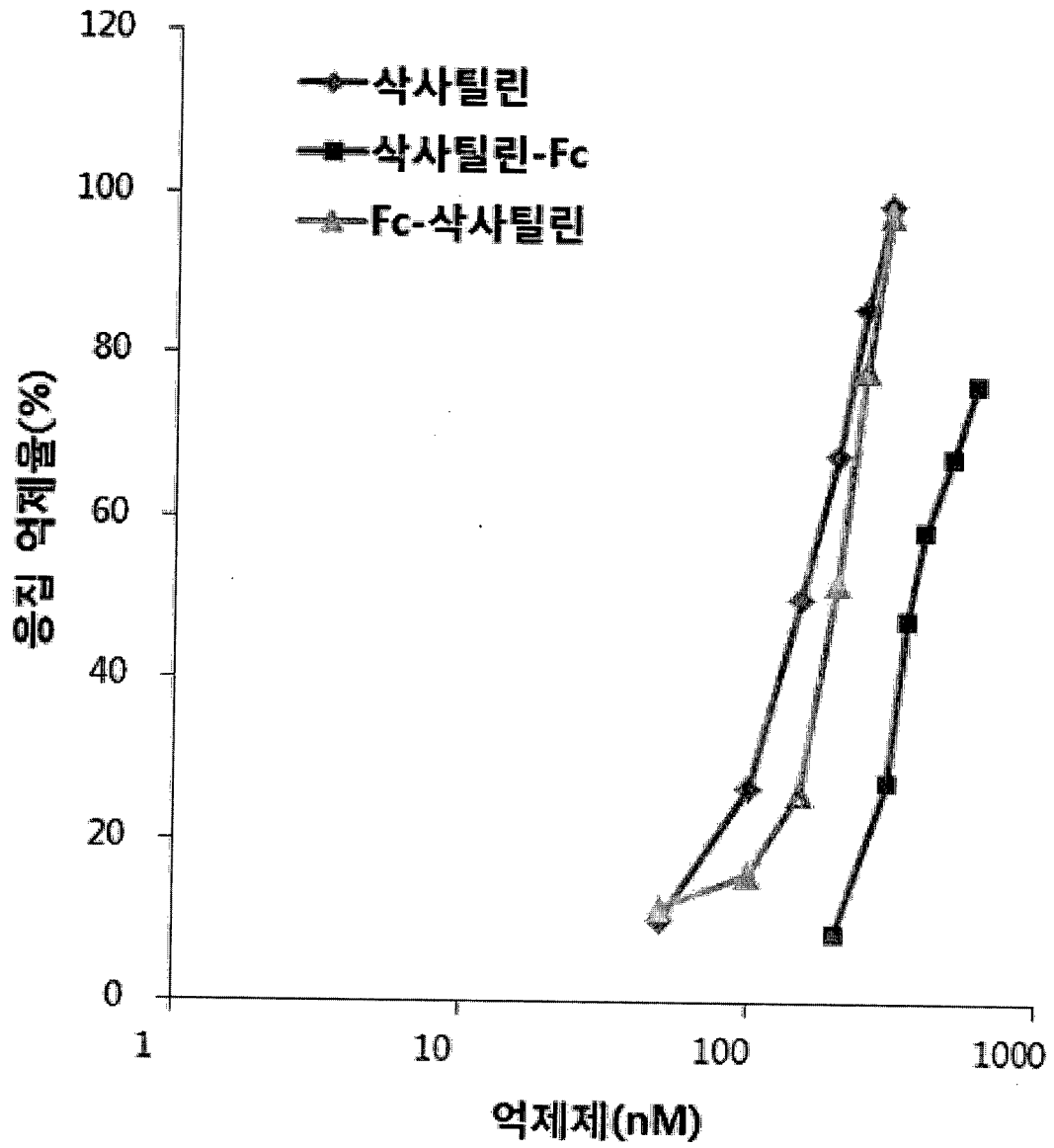


Fig. 5a

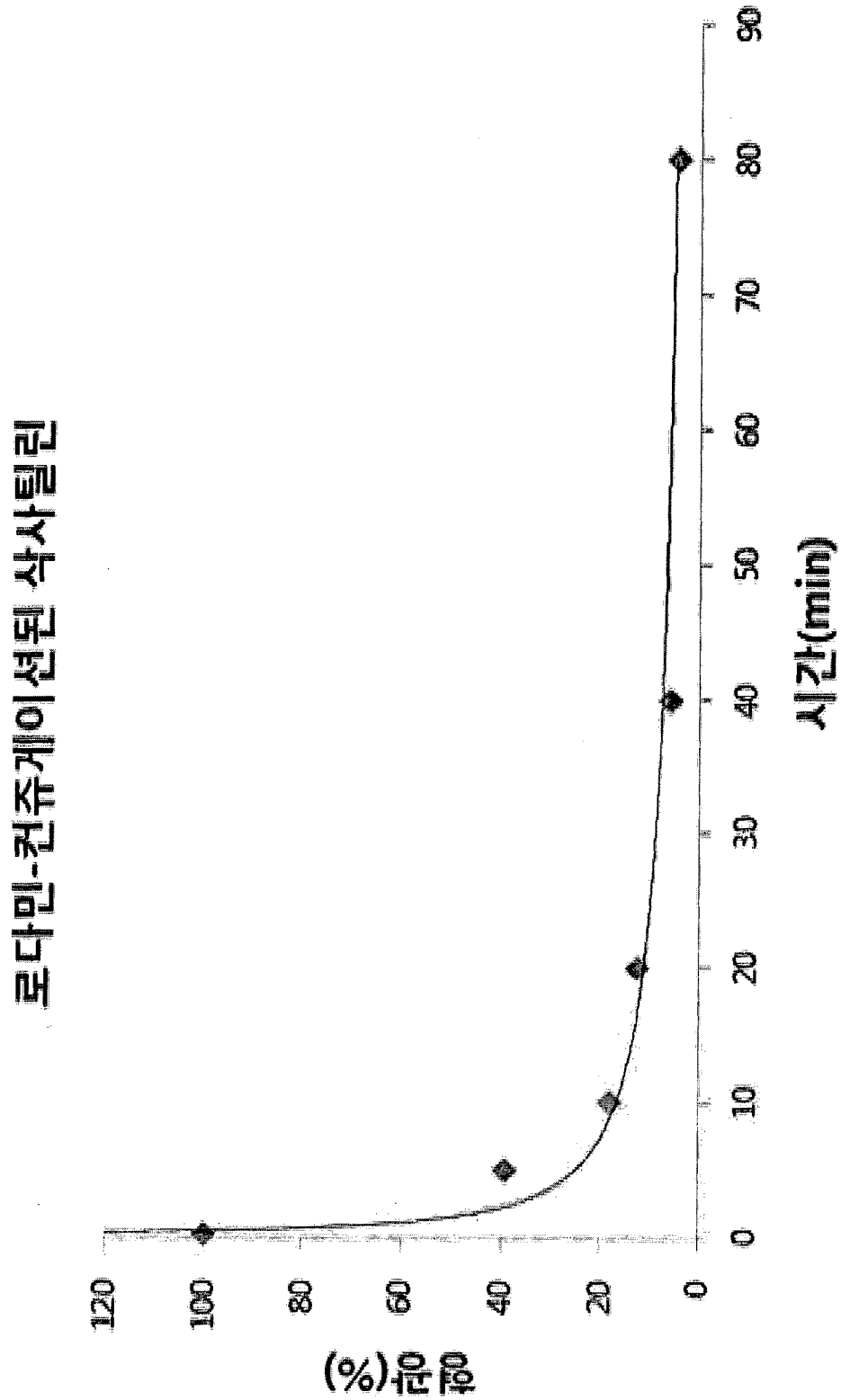


Fig. 5b

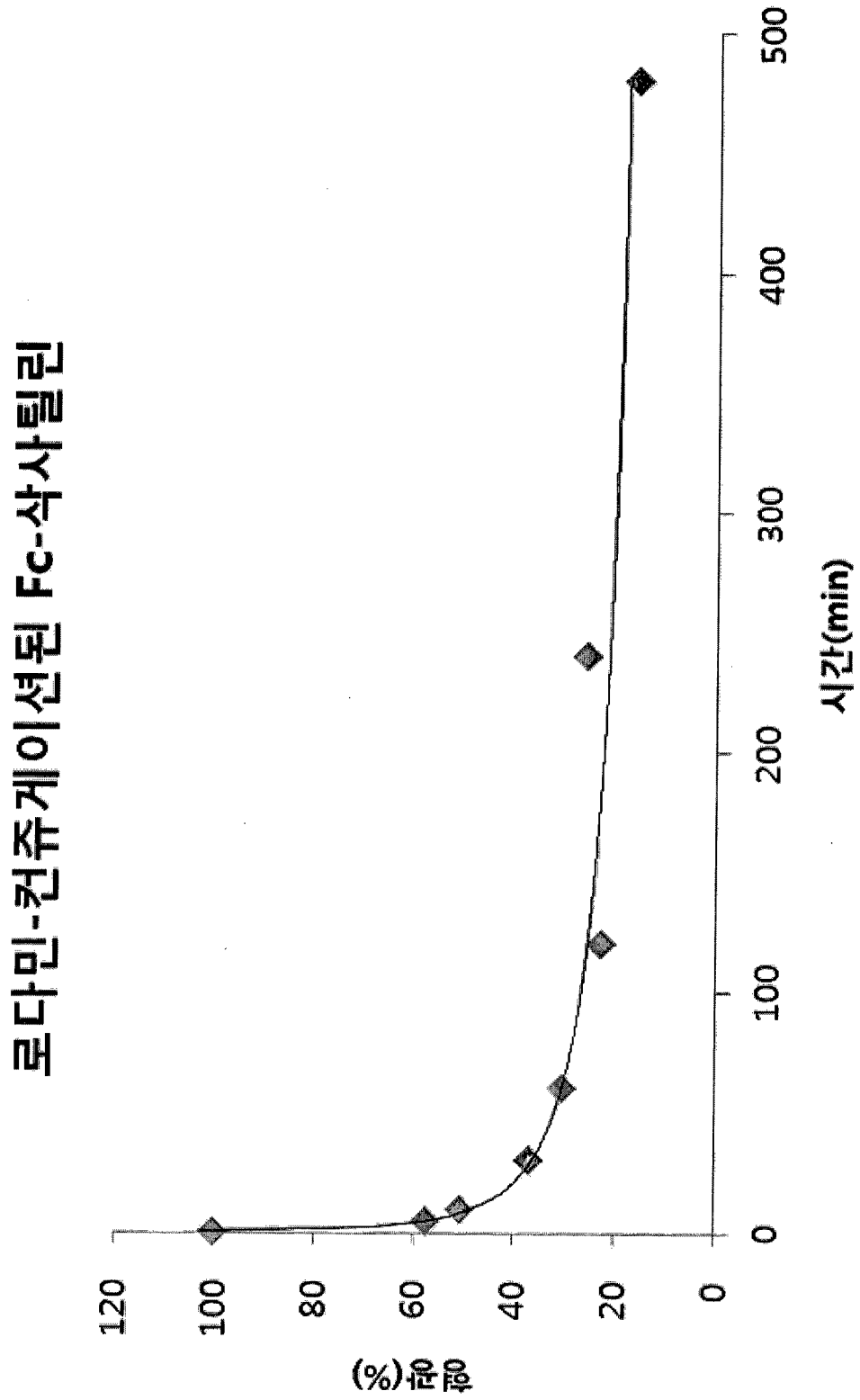


Fig. 5c

로다민-컨쥬게이션된 삭사틸린-Fc

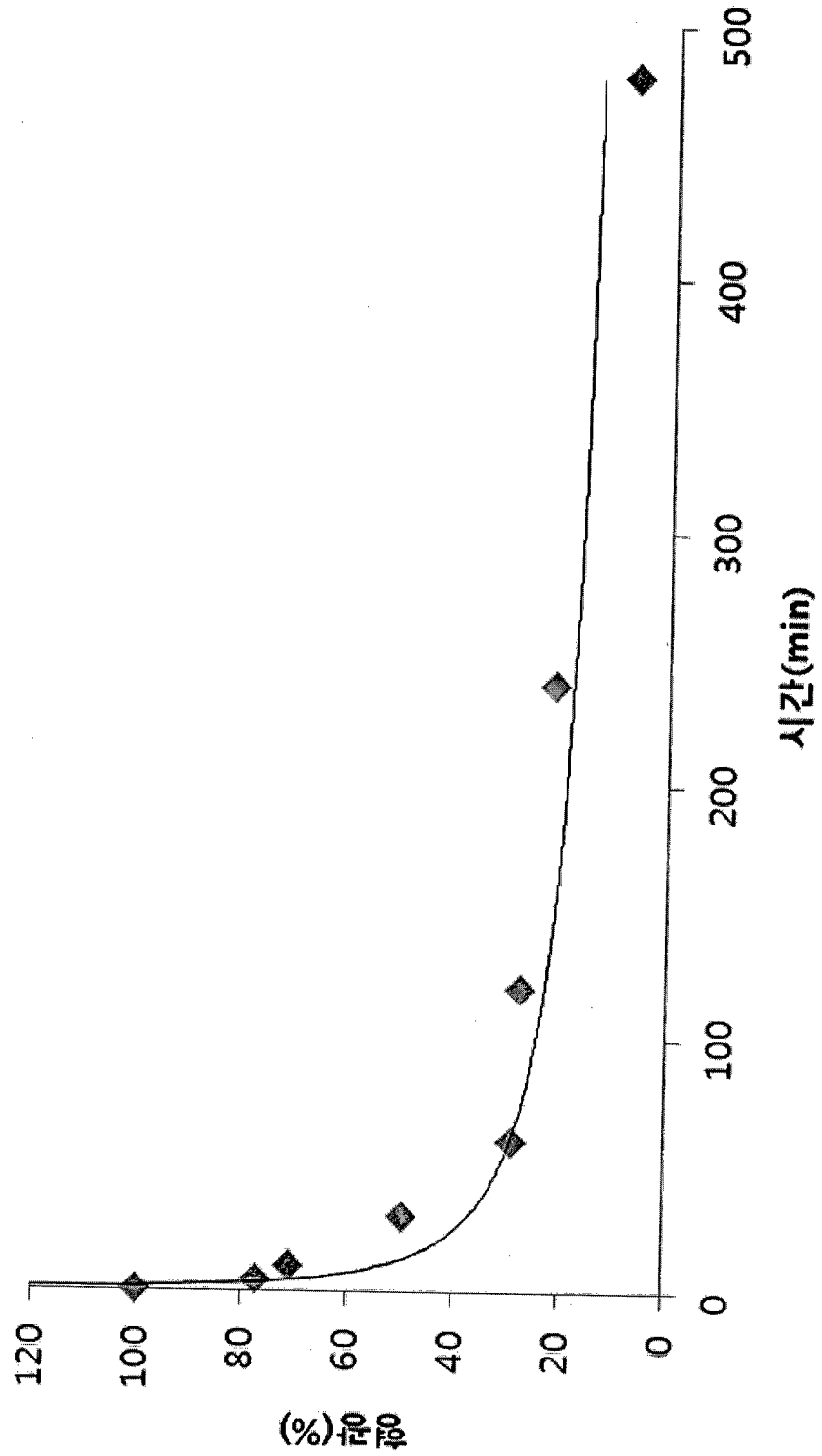


Fig. 6

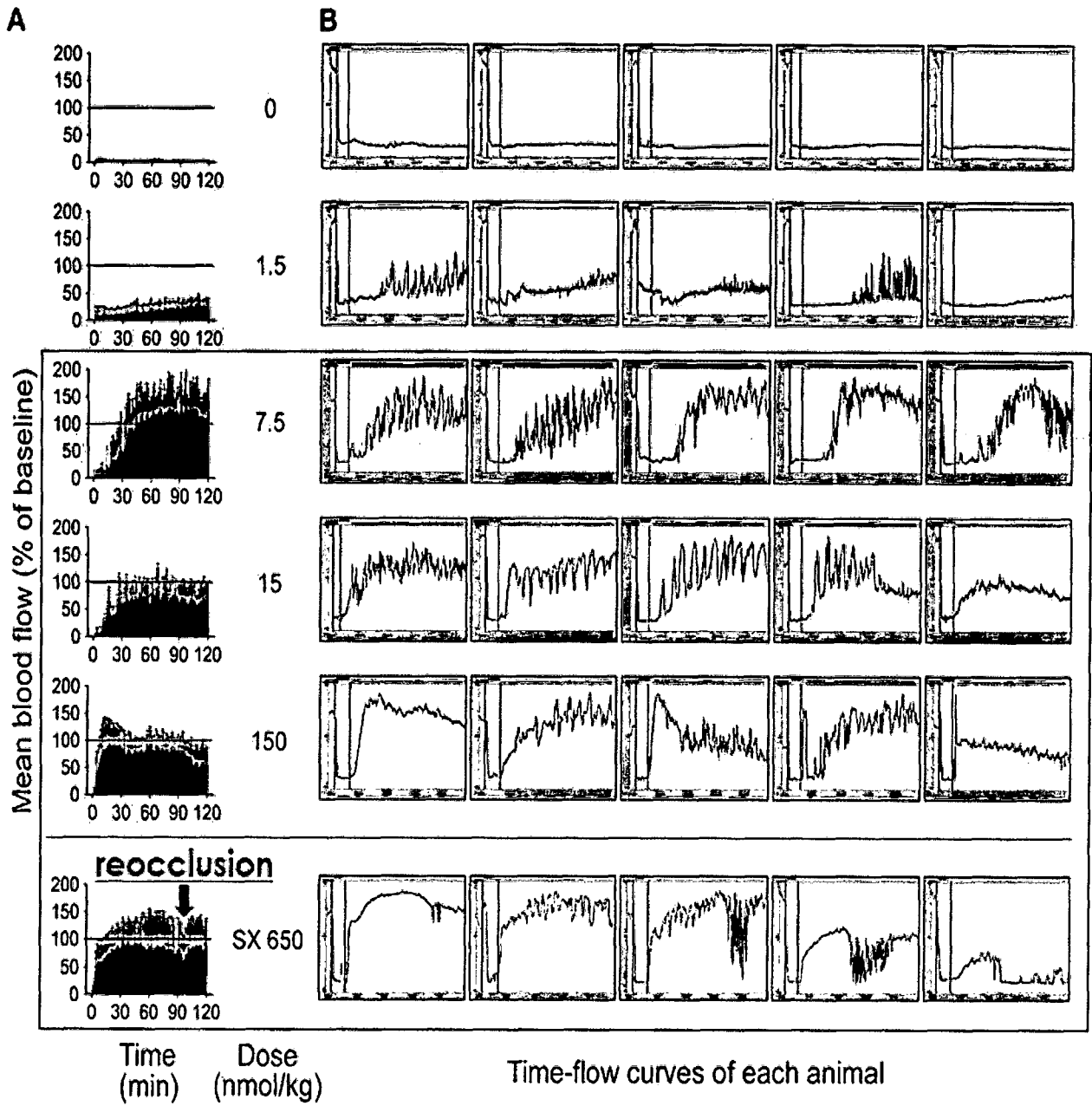


Fig. 7

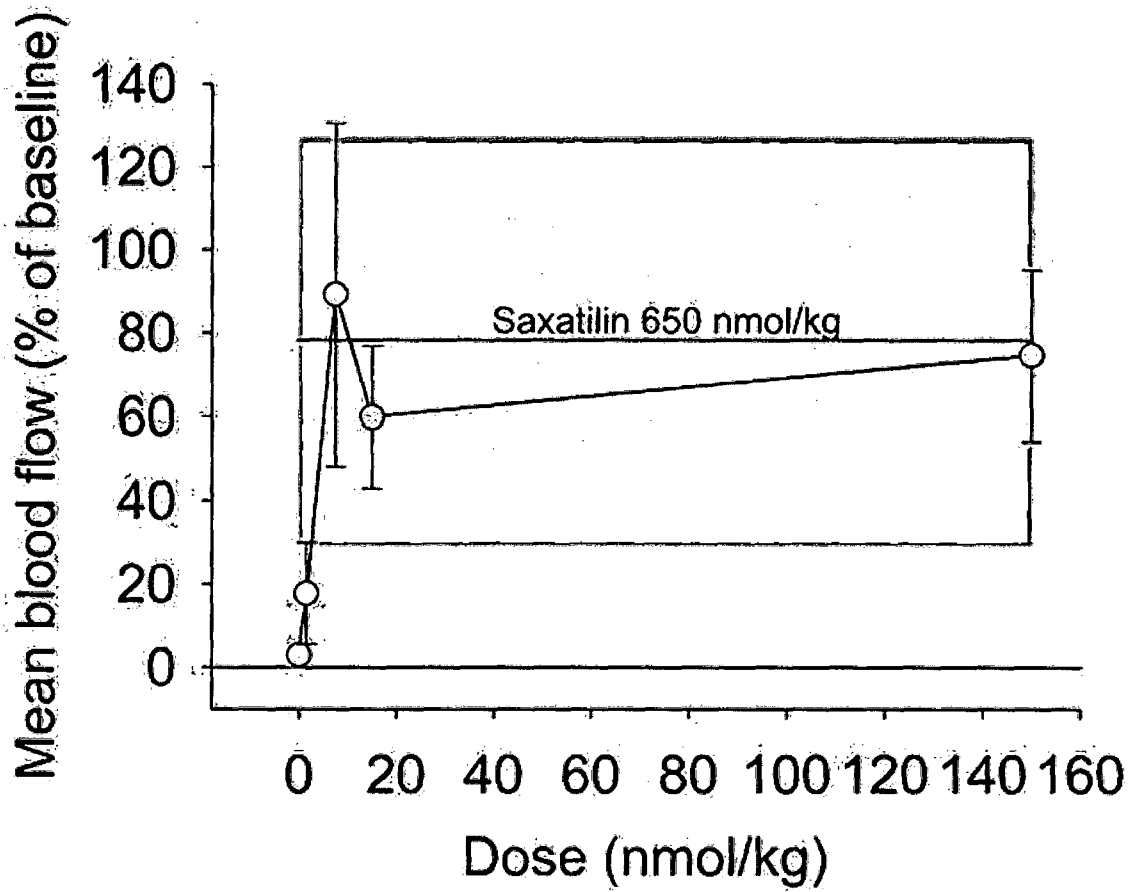


Fig. 8

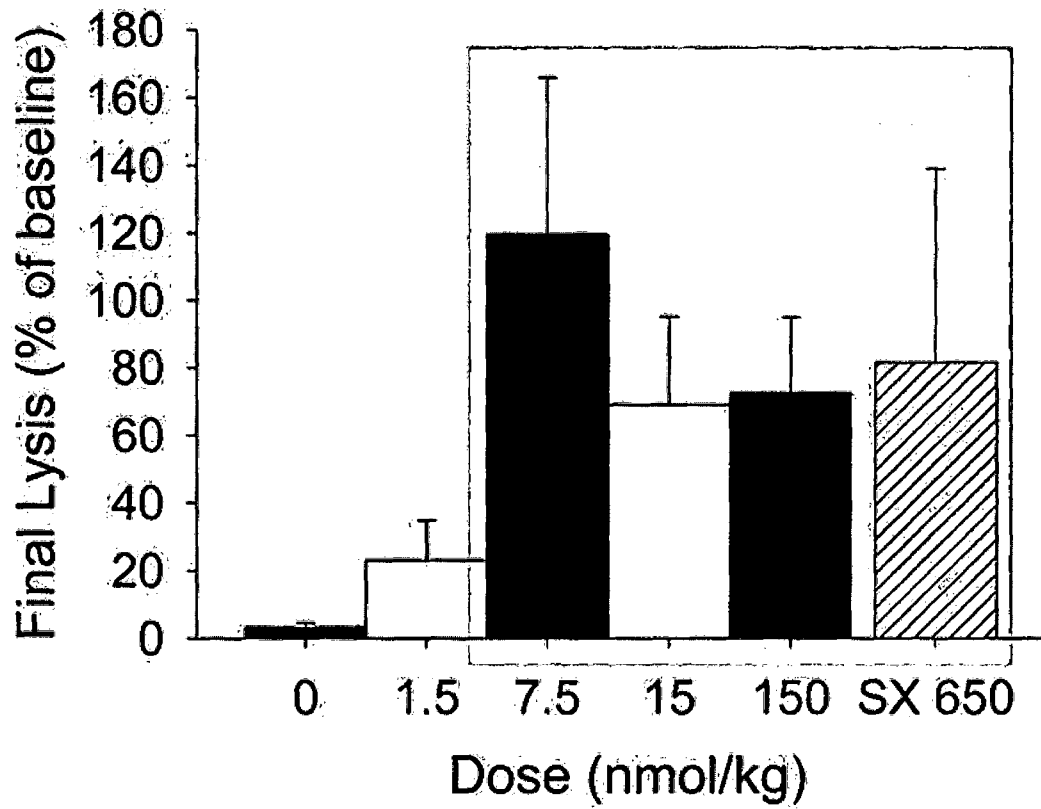
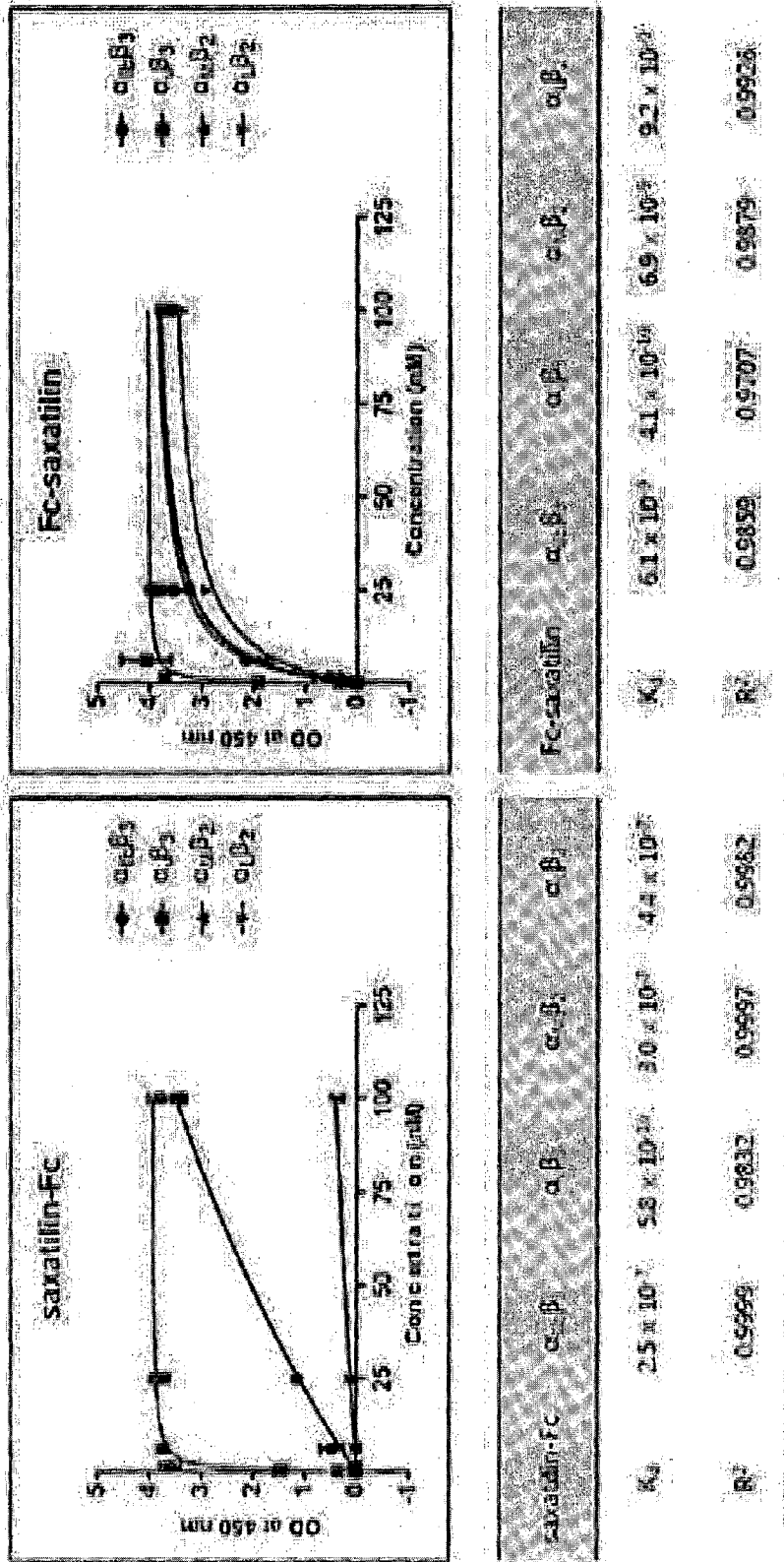


Fig. 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 19/00; A61P 9/10; A61K 38/17; A61K 38/16; A61P 19/10; A61K 38/06; C12N 15/62; A61P 9/00

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: saxatilin, immunoglobulin Fc, fusion protein, half-life

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2012-0061036 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 12 June 2012 See sequence number 12 etc.	1-22
Y	Jing, Y., Inhibition of ovarian cancer by RGD-P125A-endostatin-Fc fusion proteins. Int. J. Cancer 129(3):751-761(01 August 2011) See abstract etc.	1-22
A	KR 10-2009-0036908 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 15 April 2009 See sequence number 1 etc.	1-22
A	KR 10-2009-0108049 A (NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY et al.) 14 October 2009 See sequence number 120 etc.	1-22
A	Hong, S. Y., et al., Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. Thromb. Res. 105(1): 79-86(01 January 2002) See figure 2 etc.	1-22



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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 NOVEMBER 2014 (03.11.2014)

Date of mailing of the international search report

03 NOVEMBER 2014 (03.11.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007013

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hong, S. Y., et al., Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293(1): 530-536(26 April 2002) See table 2 etc.	1-22
A	Jang, Y. J., et al. Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial cell migration and invasion. J. Vasc. Res. 44 (2): 129-137(11 January 2007) See abstract and introduction part etc.	1-22

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.: **23, 24**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23-24 pertain to a method for treatment of the human by surgery or therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/007013

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0061036 A	12/06/2012	CN 103327996 A	25/09/2013
		EP 2636412 A2	11/09/2013
		JP 2013-542952 A	28/11/2013
		US 2013-0316951 A1	28/11/2013
		WO 2012-060607 A2	10/05/2012
		WO 2012-060607 A3	23/08/2012
KR 10-2009-0036908 A	15/04/2009	NONE	
KR 10-2009-0108049 A	14/10/2009	AU 2007-343734 A1	24/07/2008
		CA 2672091 A1	24/07/2008
		CN 101677537 A	24/03/2010
		EP 2124548 A2	02/12/2009
		EP 2522676 A2	14/11/2012
		EP 2522676 A3	27/02/2013
		JP 2010-514444 A	06/05/2010
		JP 2013-151502 A	08/08/2013
		TW 200848070 A	16/12/2008
		TW 1392738 B	11/04/2013
		US 2008-0188413 A1	07/08/2008
		US 2011-0166072 A1	07/07/2011
		US 7943728 B2	17/05/2011
US 8183201 B2	22/05/2012		
WO 2008-088548 A2	24/07/2008		
WO 2008-088548 A3	16/10/2008		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 19/00(2006.01)j, C12N 15/62(2006.01)j, A61K 38/17(2006.01)j, A61P 9/00(2006.01)j

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 19/00; A61P 9/10; A61K 38/17; A61K 38/16; A61P 19/10; A61K 38/06; C12N 15/62; A61P 9/00

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: saxatilin, immunoglobulin Fc, fusion protein, half-life

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2012-0061036 A (연세대학교 산학협력단) 2012.06.12. 서열번호 12 등 참조	1-22
Y	Jing, Y., Inhibition of ovarian cancer by RGD-P125A-endostatin-Fc fusion proteins. Int. J. Cancer 129(3):751-761(2011. 08. 01.) 초록 등 참조	1-22
A	KR 10-2009-0036908 A (연세대학교 산학협력단) 2009.04.15. 서열번호 1 등 참조	1-22
A	KR 10-2009-0108049 A (내셔널 타이완 유니버시티 외 1명) 2009.10.14. 서열번호 120 등 참조	1-22
A	Hong, S. Y., et al., Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. Thromb. Res. 105(1): 79-86(2002. 01. 01.) 그림 2 등 참조	1-22

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 2014년 11월 03일 (03.11.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 11월 03일 (03.11.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 조경주 전화번호 +82-42-481-3486
---	------------------------------------



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Hong, S. Y., et al., Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293(1): 530-536(2002. 04. 26.) 표2 등 참조	1-22
A	Jang, Y. J., et al. Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial cell migration and invasion. J. Vasc. Res. 44(2): 129-137(2007. 01. 11.) 초록 및 도입 부분 등 참조	1-22

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: 23, 24
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제23항 및 제24항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치 방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당하는 것으로 인정됩니다.
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 10-2012-0061036 A	2012/06/12	CN 103327996 A EP 2636412 A2 JP 2013-542952 A US 2013-0316951 A1 WO 2012-060607 A2 WO 2012-060607 A3	2013/09/25 2013/09/11 2013/11/28 2013/11/28 2012/05/10 2012/08/23
KR 10-2009-0036908 A	2009/04/15	없음	
KR 10-2009-0108049 A	2009/10/14	AU 2007-343734 A1 CA 2672091 A1 CN 101677537 A EP 2124548 A2 EP 2522676 A2 EP 2522676 A3 JP 2010-514444 A JP 2013-151502 A TW 200848070 A TW I392738 B US 2008-0188413 A1 US 2011-0166072 A1 US 7943728 B2 US 8183201 B2 WO 2008-088548 A2 WO 2008-088548 A3	2008/07/24 2008/07/24 2010/03/24 2009/12/02 2012/11/14 2013/02/27 2010/05/06 2013/08/08 2008/12/16 2013/04/11 2008/08/07 2011/07/07 2011/05/17 2012/05/22 2008/07/24 2008/10/16