



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0013101  
(43) 공개일자 2020년02월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/46 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
C07K 14/71 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/46 (2013.01)  
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7002708(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년06월24일  
심사청구일자 2020년01월29일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7037811  
원출원일자(국제) 2016년06월24일  
심사청구일자 2017년12월29일
- (85) 번역문제출일자 2020년01월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2016/053794
- (87) 국제공개번호 WO 2017/001990  
국제공개일자 2017년01월05일
- (30) 우선권주장  
62/185,716 2015년06월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
올제네시스 바이오테라퓨틱스 아이엔씨.  
대만, 105, 타이페이 시티, 송산 디스트릭트, 베이드 로드, 섹션 4, 넘버 760, 1, 7층
- (72) 발명자  
우 페이-즈  
대만 타이페이 105 송산 디스트릭트 베이드 로드 섹션 4 넘버 760 7층-1  
시 지아-하오  
대만 타이페이 105 송산 디스트릭트 베이드 로드 섹션 4 넘버 760 7층-1  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인 플러스

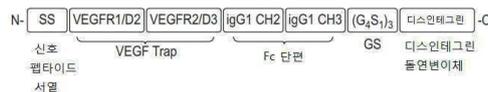
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **혈관신생 억제용 융합 단백질**

(57) 요약

본 발명은 혈관신생을 억제하는 생물학적 제제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인테그린 활성화 경로 및 하나의 기타 혈관신생 인자-활성화 경로를 억제하는 융합 단백질, 융합 단백질의 조성물, 및 이의 생산 방법 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C07K 14/71** (2013.01)

*C07K 2319/00* (2013.01)

*C07K 2319/02* (2013.01)

*C07K 2319/30* (2013.01)

(72) 발명자

**첸 케빈**

대만 타이페이 105 송산 디스트릭트 베이드 로드  
섹션 4 넘버 760 7층-1

**구엔 탄**

대만 타이페이 105 송산 디스트릭트 베이드 로드  
섹션 4 넘버 760 7층-1

**첸 케빈**

대만 타이페이 105 송산 디스트릭트 베이드 로드  
섹션 4 넘버 760 7층-1

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인테그린  $\alpha v \beta x$  또는  $\alpha 5 \beta 1$ 에 결합하는 디스인테그린(disintegrin) 또는 이의 인테그린 결합 단편을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드 ;

안지오포이에틴(angiopoietin: ANG), 에프린(ephlin: Eph), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor: FGF), 뉴로필린(neuropilin: NRP), 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen Activators), 유로키나아제형 플라스미노겐 활성화제 수용체(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR), 혈소판-유도 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), 종양 성장 인자 베타(Tumor Growth Factor beta, TGF- $\beta$ ), 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), 혈관 내피 카드헤린(Vascular Endothelial cadherin, VE-cadherin), 인슐린-유사 성장 인자(Insulin-like Growth Factor, IGF), 결합 조직 성장 인자(Connective-Tissue Growth Factor, CTGF), 종양 괴사 인자 알파(Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- $\alpha$ ), 인터루킨 1(IL-1), 인터루킨 6(IL-6), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), 및 이의 수용체를 포함하는 혈관신생 인자에 결합하는 기타 단백질 결합 펩타이드; 및

Fc 도메인을 포함하는, 융합 단백질로서,

여기서 x는 1, 3, 5, 6 또는 8인, 융합 단백질.

#### 청구항 2

서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인테그린 결합 펩타이드;

VEGF 수용체의 세포의 도메인을 포함하는 기타 단백질 결합 펩타이드; 및

Fc 도메인을 포함하는, 융합 단백질로서,

여기서 인테그린 결합 펩타이드는 RGD 모티프 상에 또는 15 내지 20 개 아미노산 내에 적어도 하나의 돌연변이를 갖는, 융합 단백질.

#### 청구항 3

디스인테그린 및 이의 인테그린 결합 단편을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드;

VEGF 수용체의 세포의 도메인을 포함하는 기타 단백질 결합 펩타이드; 및

Fc 도메인을 포함하는, 융합 단백질로서,

인테그린 결합 펩타이드는 RGD 모티프 상에 또는 15 내지 20 개 아미노산 내에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 융합 단백질.

#### 청구항 4

RGD 모티프 상에 또는 15 내지 20 개 아미노산 내에 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 서열번호 1의 아미노산 서열, 서열번호 1과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인테그린 결합 부위;

면역글로불린 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 인간 또는 인간화된 불변 소-영역(humanized constant sub-

region);

VEGFR1의 Ig-유사 도메인 D2 및 VEGFR2의 Ig-유사 도메인 D3을 갖는 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함하는, 융합 단백질.

#### 청구항 5

제1항, 제2항 또는 제3항에 있어서,

인테그린 결합 펩타이드, Fc 도메인, 및 C-말단에서 N-말단으로의 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함; 또는

인테그린 결합 펩타이드, Fc 도메인, 및 N-말단에서 C-말단으로의 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함; 또는

Fc 도메인과 인테그린 결합 펩타이드 또는 기타 단백질 결합 펩타이드 사이에 GS 또는 G<sub>9</sub> 링커를 더 포함;하는, 융합 단백질.

#### 청구항 6

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서,

인테그린 결합 펩타이드는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 또는 서열번호 7과 적어도 85% 서열 동일성을 갖으며; 바람직하게는 상기 인테그린 결합 펩타이드는 서열번호 2와 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나; 또는

상기 인테그린 결합 펩타이드와 상기 기타 단백질 결합 펩타이드 사이에 링커 서열을 더 포함하거나; 또는

상기 기타 단백질 결합 펩타이드의 상류(upstream)에 신호 펩타이드 서열을 더 포함하는, 융합 단백질.

#### 청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 핵산.

#### 청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질의 이량체(dimer).

#### 청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터.

#### 청구항 10

융합 단백질을 생산하는 조건하에, 제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포에 의해 생산된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 융합 단백질의 생산 방법.

#### 청구항 11

제2항 또는 제3항에 있어서,

VEGF 수용체의 세포의 도메인이 VEGF 수용체의 Ig-유사 도메인 D1 내지 D7을 포함하거나; 또는

VEGF 수용체의 세포외 도메인은 i) VEGFR1의 Ig-유사 도메인 D2 및 VEGFR2의 Ig-유사 도메인 D3; ii) 서열번호 10의 아미노산 서열; 또는 iii) 서열번호 10과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

**청구항 12**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질, 및 약제학적으로 허용 가능한 보조제, 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.

**청구항 13**

혈관신생 질환의 치료 또는 예방을 위한 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질로서, 상기 혈관신생 질환은 류마티스성 관절염, 염증성 관절염, 골관절염, 안구암 및 전신암, 종양 관련 전이 및 침습, 특발성 폐 섬유증(idiopathic lung fibrosis, IPF), 비 알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 또는 간 섬유증, 당뇨병성 신장병 및/또는 신장 섬유증, 피부 섬유증 또는 켈로이드, 상처 치유, 심혈관-섬유증 및 허혈-유발성 뇌졸중을 포함하는 전신 섬유증 질환, 신생혈관증식 또는 허혈을 특징으로 하는 안 질환(일예로 맥락막 신생혈관증식), 포도막염, 색소성 망막염, 연령-관련 황반변성(age-related macular degeneration, AMD), 당뇨병성 망막증 및 당뇨 황반 부종(DME)을 포함하는, 융합 단백질.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 혈관신생(angiogenesis)을 억제하는 생물학적 제제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 혈관신생 인자-활성화 경로(angiogenic factor-activated pathways)를 억제하는 융합 단백질, 융합 단백질의 조성물, 및 이의 생산 방법 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0002] EFS 웹을 통해 텍스트 파일로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0003] 서열 목록의 공식 사본은 EFS-Web을 통해 2016년 6월 17일 자로 작성되었으며 크기가 37kb이고 명세서와 동시에 제출된 479685SEQLIST.TXT로 명명된 파일과 함께 ASCII 형식의 서열 목록으로서 전자 방식으로 제출된다. 이 ASCII 형식의 문서에 포함된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며, 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다.

**배경 기술**

[0004] 혈관신생은 기존 혈관구조에서 새로운 혈관을 성장시키는 과정이다. 혈관신생은 배아 발달 뿐만 아니라 조직 및 상처 복구를 포함한 여러가지 생리학적 과정에서 중요한 역할을 한다 (참조문헌: Folkman J 외, Angiogenic factors. Science 1987; 235:442-7). 혈관신생의 생리학적 단계는 잘 특징지어져 있으며, 세포외 매트릭스의 단백질 분해, 증식, 이동 및 내피 세포의 관형 채널로의 조립, 벽 세포(mural cell) 모집 및 분화, 및 세포외 매트릭스 생산을 포함한다(참조문헌: Carmeliet P 외, Nature. 2011; 473:298-307). 병리학적 혈관신생은 종양 형성, 안 질환(예: 당뇨병성 망막증, 당뇨 황반 부종 또는 황반 변성), 관절염, 건선, 섬유성 질환, 염증성 질환, 및 동맥 경화증에서 발생할 수 있다(참조문헌: Polverini PJ. Crit Rev Oral Biol Med. 1995; 6(3):230-47).

[0005] 병리학적 혈관신생은 더 이질적이고 혼잡스러우며, 구불구불한 혈관 조직, 여러가지 크기의 저산소 공극, 불균 등하고 불완전한 혈관 벽과 내벽, 비효율적인 관류를 종종 입증한다(참조문헌: Jain RK., Nat Med. 2003; 9(6):685-93). 질병에서의 새로운 혈관 형성의 이러한 별개의 특성은 혈관신생의 치료학적 표적화를 도전과제로 삼았다. 루센티스®(Lucentis®), 아일리아®(Eylea®)와 같은 항-VEGF 치료법, 또는 아바스틴®(Avastin®)의 인가되지 않은 약품의 사용이 일반적으로 시각 기능을 안정화시키거나 또는 개선시킬 수 있지만, 망막막 반흔(섬유증)은 항-VEGF 치료 후 2 년 이내에 모든 치료된 눈의 약 절반에서 발생할 수 있고, 성공하지 못한 결과의 하나의 원인으로 확인되고 있다(참조문헌: Daniel E 외, Ophthalmology.

2014;121(3):656-66). 망막하 섬유소에서 다수의 중요한 플레이어들은 섬유화 과정(세포 증식, 이동 및 ECM 리모델링)에 관여하는 성장 인자 및 모세포 단백질이 될 가능성이 있다. 복잡성에도 불구하고, 혈관신생 과정에 대한 지식이 증가함에 따라, 항-혈관신생 약물 개발은 여전히 관심이 큰 영역으로 남아 있다.

[0006] 현재 신생혈관 증식 과정에서 많은 핵심 요소가 밝혀졌으며 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor: VEGF) 계열이 주된 역할을 한다. 인간 VEGF 계열은 6개의 멤버: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, 및 태반 성장 인자(placental growth factor: PlGF)로 구성된다. 또한 VEGF-A, VEGF-B 및 PlGF의 여러 가지 아형이 대안적 RNA 스플라이싱(splicing)을 통해 발생된다(참조문헌: Sullivan 외, MABS, 2002, 2 (2) : 165 - 75). VEGF-A는 혈관신생과 관련된 주요 인자이며; VEGFR-1 및 VEGFR-2 둘 다에 결합한다. VEGF-A 시그널링을 차단함으로써 혈관신생을 억제하는 전략은 망막 신생혈관 및 허혈성 질환뿐만 아니라 특정 암 치료에 대한 성공적인 치료법을 확립했다(참조문헌: Major 외, J Pharmacol Exp Ther., 1997, 283(1):402-10; Willet 외, Nat. Med. 2004, 10:145-7; Papadopoulos 외, Angiogenesis, 2012, 15(2):171-85; Aiello 외, PNAS, 1995, 92:10457-61).

[0007] 기타 성장 인자인 사이토킨, 케모카인은 혈소판 유도 성장 인자(Platelet Derived Growth Factors, PDGF), 변형 성장 인자 베타(Transforming Growth Factors beta, TGF-β), 표피 성장 인자(Epidermal Growth Factors, EGF), 신경 성장 인자(Nerve Growth Factors, NGF), 저산소 유발 인자(Hypoxia-Induced Factor, HIF), 결합 조직 성장 인자(Connective-Tissue Growth Factor, CTGF), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), 인슐린-유사 성장 인자(Insulin-Like Growth Factor, IGF), 간세포 성장 인자/산란 인자(Hepatocyte Growth Factors/Scatter Factor, HGF/SF), 종양 괴사 인자 알파(Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-α), 인터루킨 1(IL-1), 인터루킨 6(IL-6), 인터루킨 8(IL-8), 인터루킨 17(IL-17), 인터루킨 18(IL-18), 인터루킨 20(IL-20), 인터루킨 23(IL-23), C-C 모티프 리간드(CCL28, CCL21) 및 C-X-C 모티프 리간드(CXCL1, CXCL5)와 같은 화학유인물질, 대식세포 이동 저해 인자(Macrophage migration Inhibitory Factor, MIF) 및 분화 클러스터(clusters of differentiation: CD)와 같은 면역 세포 표면 단백질을 포함한다. 이러한 인자들은 과발현되고 혈관신생-관련 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (참조문헌: Elshabrawy 외, Angiogenesis (2015) 18:433-448; Brian P. Eliceiri, Circ Res. 2001 Dec 7;89(12):1104-10). 하류 경로 활성화를 감소시키기 위해 이들 인자를 표적화함으로써 혈관신생-관련 질환을 감소시킬 수 있다.

[0008] 세포 표면 수용체의 계열인 인테그린(integrin)은 또한 내피 세포 표면에서 과발현되는 것으로 밝혀졌으며, 혈관신생 과정에서 새로 형성되는 혈관의 성장 및 생존을 촉진하는 것으로 여겨진다. 인테그린은 세포외 매트릭스 단백질과 상호 작용하며 많은 생물학적 과정에 결정적인 이종이량체적(heterodimeric) 세포 표면 수용체이다. 다양한 세포 유형에서 인테그린의 발현은 종양 진행에 관여하며, 성장 인자 수용체와의 크로스토크(crosstalk) 능력은 매력적인 치료 표적이 되었다(참조문헌: Staunton DE 외, Adv Immunol. 2006;91:111-57; Avraamides, C. J. 외, Nat Rev Cancer 2008;8:604-617.). 특히, 인테그린 αvβ3는 종양 세포 및 혈관신생 내피세포 둘 다에서 상호 조절되며, 종양 세포 이동, 혈관신생 및 조절되지 않은 세포 신호 전달에 중요하다. 따라서, 인테그린 αvβ3의 길항제는 이의 항-혈관신생 및 항-종양 특성에 대해 집중적으로 연구된다(참조문헌: Desgrosellier JS 외, Nat Rev Cancer. 2010 10:9-22).

[0009] 디스인테그린(disintegrin)은 독사 계열의 뱀 독에서 발견되는 펩타이드이며 주로 β1- 및 β3-관련 인테그린의 기능을 억제한다. 이들은 처음에 인테그린 αIIbβ3의 억제제로 밝혀졌고, 이후 인테그린과 RGD-함유 단백질의 상호 작용을 차단하면서, 기타 인테그린과 높은 친화성으로 결합하는 것으로 나타났다. 이들은 약 4 내지 7 개의 이황화 결합을 갖는 47 내지 84 개의 아미노산을 함유하고 동일한 RGD 모티프를 운반한다(참조문헌: McLane MA 외, Proc Soc Exp Biol Med 1998 219: 109-119; Niewiarowski S 외, Semin Hematol 1994 31: 289-300; Calvete JJ., Curr Pharm Des. 2005 11: 829-835; Blobel CP 외, Curr Opin Cell Biol 1992 4: 760-765). 디스인테그린 계열의 보존된 RGD 서열은 인테그린을 인식하는데 가장 중요한 역할을 한다. 디스인테그린은 24 개의 인테그린 중 8 개와 상호작용을 하며 인테그린이 매개하는 세포 부착, 이동 및 혈관신생을 억제하는 것으로 밝혀졌다(참조문헌: McLane MA 외, Front Biosci., 2008 13 : 6617-6637, Swenson S 외, Curr Pharm Des. 2007 13 : 2860-2871). 동물 실험에 따르면 디스인테그린은 신생 혈관 내피 및 전이성 종양을 표적으로 하여 암 치료에 잠재적인 사용 가능성이 있음을 나타낸다. 인테그린에 대한 RGD-함유 단백질의 특이적 결합은 RGD 모티프를 둘러싼 구조 및 국소 서열 모두의 기능이다. 다수의 연구에 따르면, RGD-함유 단백질의 RGD 모티프에 인접한 잔기가, 인테그린에 대한 결합 특이성 및 친화도에 영향을 미친다는 사실이 밝혀졌다(참조문헌: Scarborough RM 외, J Biol Chem 1993 268: 1058-1065; Rahman S 외, Biochem J 1998 335: 247-257).

[0010] 혈관신생은 다양한 성장 인자 및 신호 수용체를 포함하는 복잡한 생물학적 과정이며, 신호 전달 캐스케이드(signaling cascade)에서 단일 분자를 표적으로 하는 것은 암과 같은 질병에서 제어되지 않는 혈관신생에 효과적인 임상 치료법을 제공하지 못할 수도 있다. 따라서, 혈관신생 및 이의 진행을 효과적으로 억제하기 위해 협력적인 방식으로 몇몇 핵심 혈관신생 인자를 결합할 수 있는 혁신적인 치료제를 개발할 필요성이 증가하고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 발명의 요약

[0012] 본 명세서에 제공된 본 발명은 여러 혈관신생 인자를 길항하기(antagonize) 위해 다중 표적에 특이적으로 결합하기 위한 폴리펩타이드를 개시한다. 본 발명은 또한 선택적 인테그린 경로 및 기타 혈관신생 경로를 억제하는 융합 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 이들 융합 단백질을 갖는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 갖는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 혈관신생 질환(angio-genic diseases), 안 질환(ocular diseases), 자가 면역 질환, 염증성 질환, 섬유성 질환(fibrotic diseases) 및/또는 암의 치료 또는 예방을 위한 이들 융합 단백질의 생산 방법 및 이들 융합 단백질의 사용 방법을 기재한다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 본 발명에 따르면, 디스인테그린, 항-인테그린  $\alpha v \beta x$  항체, 항-인테그린  $\alpha 5 \beta 1$  항체, 인테그린  $\alpha v \beta x$  또는  $\alpha 5 \beta 1$ 를 표적으로 하는 피브로넥틴, 및 이의 인테그린 결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인테그린 결합 펩타이드, 혈관신생 인자를 표적으로 하는 기타 단백질 결합 펩타이드, 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 여기서 x는 1, 3, 5, 6 또는 8이다. 일부 실시 형태에서, 혈관신생 인자는 안지오펌에틴(angiotensin: ANG), 에프린(efhrin: Eph), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor: FGF), 뉴로필린(neuropilin: NRP), 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen Activators), 혈소판-유도 성장 인자(PDGF), 종양 성장 인자 베타(TGF- $\beta$ ), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 혈관 내피 카드헤린(Vascular Endothelial cadherin, VE-cadherin), 표피 성장 인자(EGF), 신경 성장 인자(NGF), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 간세포 성장 인자/산란 인자(HGF/SF), 종양 괴사 인자 알파(TNF- $\alpha$ ), 인터루킨 1(IL-1), 인터루킨 6(IL-6), 인터루킨 8(IL-8), 인터루킨 17(IL-17), 인터루킨 18(IL-18), 인터루킨 20(IL-20), 인터루킨 23(IL-23), C-C 모티프 리간드(CCL28, CCL21) 및 C-X-C 모티프 리간드(CXCL1, CXCL5)와 같은 화학유인물질, 대식세포 이동 저해 인자(MIF) 및 분화 클러스터(clusters of differentiation: CD)와 같은 면역 세포 표면 단백질, 및 이의 수용체를 포함한다.

[0014] 하나의 국면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인테그린 결합 펩타이드, VEGF 수용체의 세포외 도메인을 포함하는 기타 단백질 결합 펩타이드, 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 여기서 인테그린 결합 펩타이드는 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 갖는, 융합 단백질을 제공한다.

[0015] 다른 국면에 따르면, 본 발명은 디스인테그린 및 이의 인테그린 결합 단편을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드, VEGF 수용체의 세포외 도메인을 포함하는 기타 단백질 결합 펩타이드, 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 여기서 인테그린 결합 펩타이드는 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 융합 단백질을 제공한다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 인테그린 결합 펩타이드, Fc 도메인, 및 C-말단에서 N-말단으로의 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 인테그린 결합 펩타이드, Fc 도메인, 및 N-말단에서 C-말단으로의 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함한다. 융합 단백질의 추가의 실시형태에서, 인테그린 결합 펩타이드는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7과 적어도 85 %의 서열 동일성을 갖는다.

[0016] 기타 실시형태에 따르면, 본 발명은 또한 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 갖는, 서열번호 1의 아미노산 서열, 서열번호 1과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드, 면역 글로불린(immunoglobulin) CH2 도메인 및 CH3 도메인

을 포함하는 인간 또는 인간화된 불변 소-영역(humanized constant sub-region), 및 VEGFR1의 Ig-유사 도메인 D2 및 VEGFR2의 Ig-유사 도메인 D3를 갖는 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 융합 단백질의 추가의 실시형태에서, 인테그린 결합 펩타이드는 서열번호 2와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는다.

[0017] 하나의 국면에 따르면, 본 발명은 본 명세서에 개시된 본 발명의 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 제공한다.

[0018] 다른 국면에 따르면, 본 발명은 본 명세서에 개시된 본 발명의 융합 단백질의 이량체를 제공한다.

[0019] 다른 국면에 따르면, 본 발명은, 융합 단백질을 생산하는 조건하에, 본 발명의 핵산 서열을 포함하는, 벡터로 형질 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포에 의해 생산된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 융합 단백질의 생산 방법을 제공한다.

[0020] 다른 국면에 따르면, 본 발명은 유효량의 융합 단백질을 혈관신생 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 혈관신생 질환은 류마티스성 관절염, 염증성 관절염, 골관절염, 안구암 및 전신암(systemic cancer), 종양 관련 전이 및 침습, 특발성 폐 섬유증(idiopathic lung fibrosis, IPF)을 포함한 전신 섬유증 질환, 비 알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 또는 간 섬유증, 당뇨병성 신장병 및/또는 신장 섬유증, 피부 섬유증 또는 켈로이드(keloid), 상처 치유, 심혈관-섬유증 및 허혈-유발성 뇌졸중; 신생혈관증식 또는 허혈을 특징으로 하는 안 질환(예: 맥락막 신생혈관증식), 포도막염(uveitis), 색소성 망막염(retinitis pigmentosa), 연령-관련 황반변성(age-related macular degeneration, AMD), 당뇨병성 망막증 및 당뇨 황반 부종(diabetic macular edema, DME), 중심성 및 분지 망막 정맥 폐색(central and branch retinal vein occlusion, CRVO 및 BRVO), 인간 미숙아 망막병증(human retinopathy of prematurity, ROP), 결절맥락막 혈관병증(polypoidal choroidal vasculopathy, PCV), 증상성 유리체황반 부착(symptomatic vitonomacular adhesion) 및 녹내장을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 융합 단백질은 인테그린 결합 펩타이드와 기타 단백질 결합 펩타이드 사이에 링커 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 융합 단백질은 기타 결합 도메인의 상류에 신호 펩타이드 서열을 포함한다.

[0021] 다른 국면에 따르면, 본 발명은 본 발명의 융합 단백질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0022] 다른 국면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 배열 번호 3, 배열 번호 4, 배열 번호 5, 배열 번호 6 및 배열 번호 7과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드; VEGF 수용체의 세포의 도메인, 항-VEGF 항체, 항-PDGF 항체 및 이의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 기타 단백질 결합 펩타이드; 및 Fc 도메인을 포함하는 다중 혈관신생 인자를 표적으로 하는 폴리펩타이드로서, 여기서 인테그린 결합 펩타이드는 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 폴리펩타이드를 제공한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 내의 VEGF 수용체의 세포의 도메인은 VEGF 수용체의 Ig-유사 도메인 D1 내지 D7을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 내의 VEGF 수용체의 세포의 도메인은 i) VEGFR1의 Ig-유사 도메인 2 (D2) 및 VEGFR2의 Ig-유사 도메인 3 (D3); ii) 서열번호 10의 아미노산 서열; 또는 iii) 서열번호 10과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 내의 PDGF 수용체의 세포의 도메인은 PDGF 수용체의 Ig-유사 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 내의 PDGF 수용체의 세포의 도메인은 i) PDGFRβ의 Ig-유사 도메인 1 내지 3; ii) 서열번호 11의 아미노산 서열; 또는 iii) 서열번호 11과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 Fc 도메인과 인테그린 결합 펩타이드 또는 VEGF 또는 PDGF 수용체의 세포의 도메인 사이에 Gly-Ser (GS) 또는 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (G<sub>9</sub>) 링커를 더 포함한다.

[0024] 본 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하는데 충분하다고 여겨진다. 본 명세서에 도시되고 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형은 진술한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이며 첨부된 청구 범위의 범주 내에 속할 것이다. 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다.

**발명의 효과**

**도면의 간단한 설명**

- [0026] 예시적인 실시예의 상기 및 다른 목적, 측면, 특징 및 장점은 첨부된 도면과 관련하여 기재된 다음의 설명을 참조함으로써 더욱 명백해지고 보다 잘 이해될 것이다.
- 도 1은 본 발명의 일 실시형태에 따른 예시적인 융합 단백질의 구성을 도시하는 개략도이다.
- 도 2는 SDS-PAGE로 분석한, 정제된 융합 단백질 1을 도시하는 개략도이다.
- 도 3은 VEGF-리간드 결합 분석(VEGF-ligand binding assay)을 도시하는 개략도이다.
- 도 4는  $\alpha v \beta 3$  경쟁적 결합 분석( $\alpha v \beta 3$  competitive binding assay)을 도시하는 개략도이다.
- 도 5는 VEGF-유도된 HUVEC 증식을 도시하는 개략도이다.
- 도 6은 CHO- $\alpha v \beta 3$  세포 부착의 억제를 도시하는 개략도이다.
- 도 7a 내지 7g는 융합 단백질에 의한 튜브 형성 억제 효과를 도시하는 개략도이다.
- 도 8a 내지 8d는 융합 단백질에 의한 네덜란드 벨티드 래빗(Dutch Belted Rabbit)에서의 VEGF-유도된 누출의 투여량-반응(dose-response) 억제를 보여주는 하나의 실시형태를 제공한다.
- 도 9a 내지 9c는 융합 단백질에 의한 랫트에서의 레이저-유도된 맥락막 신생혈관증식(choroidal neovascularization: CNV)에서의 병변 크기의 감소를 보여주는 하나의 실시형태를 제공한다. 화살표 (▼)는 레이저 병변의 위치를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 단수 형태 "한", "하나" 및 "그"는 문맥 상 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "결합 도메인"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 다수의 결합 도메인 및 이의 증가물을 포함한다.
- [0029] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 자연 단백질의 아미노산 서열 또는 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 첨가, 결합 및/또는 치환과 같은 하나 이상의 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 긴 사슬의 펩타이드를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0030] "융합 단백질"은 함께 공유 결합된 2개 이상의 부분을 갖는 단백질을 지칭하며, 여기서 각 부분은 상이한 단백질로부터 유도된다.
- [0031] 본 발명은 디스인테그린(disintegrin)(아미노산 서열의 설명은 미국 특허 제7,943,728호 및 PCT 출원 PCT/US 15/46322호를 참조하며, 이들 각각은 전체가 참고 문헌으로 인용됨), 항-인테그린  $\alpha v \beta x$  항체(아미노산 서열의 설명은 미국 특허 제6,160,099호 및 제8,350,010호를 참조하며, 이들 각각은 전체가 참고 문헌으로 인용됨), 항-인테그린  $\alpha 5 \beta 1$  항체, 인테그린 아형  $\alpha v \beta x$  또는  $\alpha 5 \beta 1$ 을 표적으로 하는 피브로넥틴(아미노산 서열의 설명은 미국 공개 특허 공보 제2015/0218251호를 참조하며, 이는 전체가 참고 문헌으로 인용됨), 및 이의 인테그린 결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인테그린 결합 펩타이드, 혈관신생 인자를 표적으로 하는 기타 단백질 결합 펩타이드, 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 여기서 x는 1, 3, 5, 6 또는 8인, 융합 단백질을 제공한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는 4 개의 폴리펩타이드 체, 2 개의 중쇄 및 2 개의 경쇄가 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 면역글로불린 분자를 지칭하는 것으로 의도한다. 전장 중쇄(full-length heavy chain)는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. VH 도메인은 폴리펩타이드의 아미노-말단에 있고, CH3 도메인은 카복시-말단에 있다. 전장 경쇄(full-length light chain)는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함한다. 항원 결합 단편(Fab)은 하나의 경쇄 및 CH1 및 하나의 중쇄의 가변 영역으로 구성된다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 함께 디설파이드 결합을 형성할 수 없다. Fab'

단편은 CH1 및 CH2 도메인 사이에 불변 영역을 더 함유하는 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 함유하여 2개의 중쇄 사이에 쇠간 디설파이드 결합(interchain disulfide bond)이 형성되어 디아바디(diabody)를 형성할 수 있다. 가변 단편(Fv) 영역은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역을 포함하지 않는다. 단일-사슬 단편(scFv)은 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 가요성 링커에 의해 연결되어 항원-결합 영역을 형성하는 단일 폴리펩타이드 쇠를 형성하는 Fv 분자이다. 단일쇄 항체(Single chain antibodies)는 WO 제88/01649 및 미국 특허 제 4,946,778호 및 제5,260,203호에 상세하게 기재되어 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "항체"는 2 개의 전장(full-length) L-쇄(chain) 및 2 개의 전장 H-쇄를 갖는 면역글로불린 분자, 및 이의 단편, 예를 들어 항원 결합 단편(Fab), Fv 영역, scFv 등을 포함한다.

[0033] 용어 "Fc 도메인"은 단량체 또는 다량체 형태의 항체의 비-항원 결합 부분의 서열을 포함하는 분자 또는 서열을 지칭한다. Fc의 본래의 면역글로불린 공급원은 바람직하게는 인간 유래이며 임의의 아이소 타입(isotype), 예를 들어 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD일 수 있다. 전장 Fc는 하기 Ig 중쇄 영역: CH1, CH2 및 CH3으로 구성되고, 여기서 CH1 및 CH2 영역은 전형적으로 가요성 힌지 영역에 의해 연결된다.

[0034] 본 발명은 디스인테그린 및 이의 인테그린 결합 단편을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드, VEGF 수용체의 세포 외 도메인을 포함하는 기타 단백질 결합 펩타이드, 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 여기서, 인테그린 결합 펩타이드는 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 융합 단백질을 제공한다. 본 발명의 실시형태에 따르면, 디스인테그린 및 이의 인테그린 결합 단편은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 "디스인테그린"은 인테그린의 강력한 가용성 리간드인 시스테인-풍부 단백질 또는 폴리펩타이드의 부류를 지칭한다. RGD 모티프는 대부분의 단량체 디스인테그린에서 보존된 트리-펩타이드(Arg-Gly-Asp)이며 인테그린-결합 루프에 위치한다. 본 명세서에 기재된 디스인테그린은 뱀 독으로부터 분리되거나 또는 야생형으로부터 유도되고, RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 가져서 다양한 인테그린 아형에 선택적으로 결합하거나 다양한 인테그린 아형을 표적으로 한다. 본 명세서에 사용된 용어 "RGD 모티프에 인접한(adjacent to a RGD motif)"은 주어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열에서 RGD 모티프로부터 15 내지 20 개 아미노산 내의 임의의 아미노산 잔기에서 발생하는 임의의 돌연변이를 의미한다.

[0036] 디스인테그린의 기타 아미노산 서열 변이체가 또한 고려된다. 예를 들어, 디스인테그린의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성은 단백질을 암호화하는 아미노산 서열을 변경함으로써 개선될 수 있다. 디스인테그린 돌연변이체는 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 적절한 변형을 도입하거나 또는 펩타이드 합성에 의한 변형을 도입함으로써 제조될 수 있다. 이러한 변형은 디스인테그린의 핵산 또는 아미노산 서열로부터의 결실, 이들 내로의 삽입 및/또는 이들 내의 치환과 같은 돌연변이를 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은, 최종 구조물이 인테그린 슈퍼패밀리 멤버(integrin superfamily member)에 대한 결합 및/또는 인테그린 활성화 경로의 억제와 같은 바람직한 특성을 지니고 있는 한, 디스인테그린의 최종 아미노산 구조물에 도달하도록 만들 수 있다.

[0037] 단백질 또는 폴리펩타이드의 생물학적 특성에 대한 실질적인 변형은 (a) 치환 영역에서 폴리펩타이드 주쇄(backbone)의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선형 형태, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄(side chain)의 벌크를 유지하는 효과가 현저히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다.

[0038] 돌연변이유발을 위한 바람직한 위치인 융합 단백질의 특정 잔기 또는 부위를 확인하는 유용한 방법은 참조문헌 [Science, 1989, 244 : 1081-1085]에 기재된 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis)"로 알려져 있다. 예를 들면, 잔기 또는 표적 잔기의 그룹(예를 들어, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 하전된 잔기)을 확인하고, 아미노산과 표적 결합 파트너와의 상호 작용에 영향을 주도록 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체한다. 이후, 치환에 대한 기능적 민감성을 입증하는 아미노산 위치는 치환 부위에 또는 치환 부위를 위해 추가의 또는 기타 변이체를 도입함으로써 개선된다. 따라서, 아미노산 서열 변이 도입 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 자체의 성질은 미리 결정될 필요가 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서 돌연변이의 수행을 분석하기 위해, 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행될 수 있고, 발현된 융합 폴리펩타이드 변이체가 목적하는 활성화에 대해 스크리닝된다. 예를 들어, 시스테인 결합(들)은 융합 단백질 또는 단백질 성분에 첨가되어 이의 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0039] 따라서, 본 명세서에 개시된 임의의 융합 단백질의 성분일 수 있는 디스인테그린 돌연변이체가 제공된다. 일부 실시형태에서, 디스인테그린은 로도스토민(Rhodostomin) (서열번호 1), 트리플라빈(Triflavin) (서열번호 3),

에키스타틴(Echistatin) (서열번호 4), 트리무크린(Trimucrin)(서열번호 5), 엘레강틴(Elegantin)(서열번호 6) 및 트라이그라민(Trigramin)(서열번호 7)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 디스인테그린의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 디스인테그린은 로도스토민(서열번호 1), 트리플라빈(서열번호 3), 에키스타틴(서열번호 4), 트리무크린(서열번호 5), 엘레강틴(서열번호 6) 또는 트라이그라민(서열번호 7)의 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 디스인테그린은, 디스인테그린 돌연변이체(서열번호 2)의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 서열 번호 2의 Xaa는 삼입, 치환 또는 결실에 의해 변형되어 야생형 형태의 디스인테그린과 상이한 아미노산 서열 변이체를 생성할 수 있는 다양한 위치를 나타낸다. 일부 예에 따르면, 야생형 로도스토민(서열번호 1)의 RGD 모티프에서 글리신(Gly)에 상응하는 서열번호 2의 위치 50의 Xaa는 글리신 이외의 천연 발생 아미노산으로 치환되어 로도스토민 돌연변이체를 생성한다. 기타 예에서, 서열번호 2의 하나 이상의 Xaa는 또한 야생형 로도스토민(서열번호 1)의 상응하는 위치에서 원래 발견된 것 이외의 천연 발생 아미노산으로 치환되어 다양한 로도스토민 돌연변이체를 생성할 수 있다. 디스인테그린 돌연변이체는 서열번호 2의 임의의 Xaa에서 단지 단일 돌연변이를 포함하는 것에 제한되지 않고, 서열번호 2에서 Xaa의 몇몇 위치 또는 디스인테그린의 기타 컨센서스 서열(consensus sequences)(예를 들어, 서열번호 3 내지 7)에서 상응하는 위치에서 발생하는 다중 돌연변이가 또한 본 발명의 범위에 포함될 수 있음이 또한 주목된다.

[0040] 디스인테그린의 변이체는 위에 논의된 아미노산 서열을 참조하여 대부분 논의되었으나, 뱀독, 예를 들어, 알볼라브린(albolabrin), 아프라긴(applagin), 바실리신(basilicin), 바트록소스타틴(batroxostatin), 비티스타틴(bitistatin), 세레베린(cereberin), 세라스틴(cerastin), 크로타트록신(crotatroxin), 듀리신(durissin), 플라보리딘(flavoridin), 플라보스타틴(flavostatatin), 할리신(halysin), 할리스타틴(halystatin), 자라라신(jararacin), 자라스타틴(jarastatin), 키스트린(kistrin), 라케신(lachesin), 루토신(lutosin), 몰로신(molossin), 살모신(salmosin), 삭사틸린(saxatilin), 테르게미닌(tergeminin), 트리메스타틴(trimestatin), 트리무타제(trimutase), 우수리스타틴(ussuristatin), 비리디안(viridian)을 암호화하는 폴리펩타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열 및 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 이의 돌연변이체 또한 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0041] 이론에 얽매이지 않고, 디스인테그린은 인테그린 슈퍼패밀리 멤버에 결합하여 다가(multivalent) 인테그린 수용체와의 상호 작용을 차단함으로써 인테그린 활성화 경로를 억제하는 것이 고려된다. 일부 국면에서, 디스인테그린은 인테그린 아형  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 6$ ,  $\alpha v \beta 8$ ,  $\alpha 5 \beta 1$  및/또는  $\alpha v \text{IIb} \beta 3$ 을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 인테그린 슈퍼패밀리 멤버에 결합한다.

[0042] 본 발명에 따르면, 융합 단백질의 기타 단백질 결합 펩타이드는 종양 항원(tumor antigen), TNF 수용체 슈퍼패밀리 멤버(TNF receptor superfamily member), 헤지호그계 멤버(Hedgehog family member), 수용체 티로신 키나아제(Hedgehog family member), 프로테오글리칸-관련 분자(proteoglycan-related molecule), TGF-베타 슈퍼패밀리 멤버(TGF-beta superfamily member), Wnt-관련 분자(Wnt-related molecule) 및 혈관신생 표적(angiogenesis target)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 결합하는 수용체 단백질일 수 있다.

[0043] 본 발명의 일부 실시형태에 따르면, 기타 단백질 결합 펩타이드는 안지오펀이에틴(Angiopoietin, ANG), 에프린(Ephrin, Eph), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, FGF), 뉴로필린(neuropilin, NRP), 플라스미노겐 활성화제(Plasminogen Activators), 혈소판-유도 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), 종양 성장 인자 베타(TGF- $\beta$ ), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 혈관 내피 카드헤린(VE-cadherin) 및 이의 수용체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 혈관신생 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시형태에 따르면, 기타 단백질 결합 펩타이드는 혈관신생 표적에 결합하고 혈관신생 표적을 길항하는 수용체 단백질의 세포외 부분을 포함할 수 있다. 기타 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 혈관신생 인자 수용체의 세포외 부분에 결합할 수 있다.

[0044] 일부 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 VEGF 리간드에 결합하는 항-VEGF 항체(이의 아미노산 서열의 기재에 대해서는 WO 제2015/200905호를 참조하며, 전체가 본 명세서에 참고로 인용됨) 또는 VEGF 수용체에 결합하는 항-VEGFR1 또는 항-VEGFR2 항체(이의 아미노산 서열의 기재에 대해서는 미국 특허 제5,874,542호를 참조하며, 전체가 본 명세서에 참고로 인용됨)일 수 있다. 기타 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 또한 PDGF 리간드에 결합하는 항-PDGF 항체(예를 들어, 이의 아미노산 서열의 기재에 대해서는 미국 특허 제 5,094,941 호를 참조하며, 전체가 본 명세서에 참고로 인용됨) 또는 PDGF 수용체에 결합하는 항-PDGF 베타 항체(이의 아미노산 서열의 기재에 대해서는 미국 특허 제 9,265,827 호를 참조하며, 모든 목적을 위해 전체가 본

명세서에 참고로 인용됨)를 포함한다.

- [0045] 특정 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 VEGF 수용체(VEGFR) : VEGFR1, VEGFR2 및 VEGFR3 중 어느 하나와 동일한 VEGF에 결합한다. 일부 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 본 명세서에 기재된 임의의 VEGFR의 VEGFR의 적어도 하나의 세포의 부분(extracellular portion)을 포함한다. 예를 들어, 기타 단백질 결합 펩타이드는 VEGFR1의 적어도 하나의 세포의 부분 또는 VEGFR2의 세포의 부분을 포함한다. 다른 예에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 Ig-유사 도메인 2(D2)와 같은 VEGFR1의 하나의 세포의 부분 및 Ig-유사 도메인 3(D3)과 같은 VEGFR2의 하나의 세포의 부분을 포함한다. 일부 국면에서, 다른 단백질 결합 펩타이드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VEGFR1의 하나의 세포의 부분 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VEGFR2의 하나의 세포의 부분을 포함한다. 일부 국면에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VEGFR1 및 VEGFR2의 하나의 세포의 부분의 융합을 포함한다.
- [0046] 기타 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 PDGF 수용체(PDGFR): PDGFR- $\alpha$  및 PDGFR- $\beta$  중 어느 하나와 동일한 PDGF에 결합한다. 일부 실시형태에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 본 명세서에 기재된 임의의 PDGFR의 PDGFR의 적어도 하나의 세포의 부분을 포함한다. 예를 들어, 기타 단백질 결합 펩타이드는 PDGFR- $\alpha$ 의 적어도 하나의 세포의 부분 또는 PDGFR- $\beta$ 의 하나의 세포의 부분을 포함한다. 다른 예에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 Ig-유사 도메인 1 내지 3과 같은 PDGFR- $\beta$ 의 하나의 세포의 부분을 포함한다. 일부 국면에서, 기타 단백질 결합 펩타이드는 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 11의 아미노산 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PDGFR의 세포의 부분을 포함한다.
- [0047] 기타 실시형태에 따르면, 본 발명은 또한 RGD 모티프 상에 또는 이에 인접한 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 서열번호 1의 아미노산 서열, 서열번호 1과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드; 면역글로불린 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 인간 또는 인간화된 불변 소-영역(humanized constant sub-region); 및 VEGFR1의 Ig-유사 D2 및 VEGFR2의 Ig-유사 D3를 갖는 기타 단백질 결합 펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 융합 단백질의 추가의 실시형태에서, 인테그린 결합 펩타이드는 서열번호 2와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0048] 기준 폴리펩타이드 또는 핵산 서열에 대한 용어 "퍼센트(%) 서열 동일성"은, 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 기준 폴리펩타이드 내 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드 또는 핵산 서열과 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 백분율로서 정의한다. 퍼센트 아미노산 또는 핵산 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 예를 들어 공개적으로 입수할 수 있는 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 사용하여 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방법, 예를 들어 참고문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 외, eds., 1987)]에 기재된 방법, 및 블라스트(BLAST), 블라스트-2, 얼라인(ALIGN) 또는 메갈라인(Megalign)(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬 측정을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 본 명세서에서의 목적을 위해, 주어진 아미노산 서열 B와 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성은 다음과 같이 계산된다: 분율(fraction) X/Y의 100 배, 여기서 X는 A와 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일하게 일치하는 아미노산 잔기 점수의 수이며, Y는 B에서 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, A 대 B의 퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성은 B 대 A의 퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성과 같지 않음을 이해할 것이다.
- [0049] 본 발명은 2개의 융합 단백질을 포함하는 이량체 융합 단백질(dimeric fusion protein)을 제공하며, 여기서 각 융합 단백질은 본 명세서에 개시된 임의의 융합 단백질을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 이량체 융합 단백질은 2개의 동일한 융합 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 이량체 융합 단백질은 2개의 상이한 융합 단백질을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 융합 단백질은 둘 이상의 동일한 융합 단백질의 다량체를 형성할 수 있거나 또는 인간 또는 인간화된 항체의 일정한 소-영역(sub-region)을 포함하는 다량화 도메인을 통해 이중 융합 단백질을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간 또는 인간화된 항체의 불변 소-영역은 IgG Fc 영역, IgA Fc 영역, IgM Fc 영역, IgD Fc 영역 및 IgE Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가의 실시형태에서, 인간 또는 인간화된 항체의 불변 소-영역은 IgG1 Fc 영역, IgG2 Fc 영역, IgG3 Fc 영역 및 IgG4 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 국면에서, 소-영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 CH2 영역 및 CH3 영역을 포함한다. Fc 영역을 포함하는 면역글로불린을 암호화하는 아미노산 서열은 당업계에 잘 알려져

있다.

- [0050] 융합 단백질의 성분은 서로 직접 연결되거나 링커를 통해 연결될 수 있다. 일반적으로, 용어 "링커"는 하나 이상의 분자, 예를 들면, 하나 이상의 성분 도메인 사이에 삽입될 수 있는 핵산, 아미노산 또는 비-펩타이드 잔기를 의미한다. 예를 들어, 링커는 조각을 용이하게 하기 위해 성분간에 관심있는 바람직한 부위를 제공하는데 사용될 수 있다. 링커는 또한 숙주세포로부터 융합 단백질의 발현을 증진시키고, 성분이 이의 최적의 3차 구조를 취하고/취하거나 표적 분자와 적절하게 상호 작용할 수 있도록 입체 장애를 감소시키기 위해 제공될 수 있다. 링커 서열은, 수용체 성분에 자연적으로 연결된 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 융합 단백질의 발현을 증진시키기 위해, 특이적으로 관심있는 바람직한 부위를 제공하기 위해, 성분 도메인이 최적의 3 차 구조를 형성할 수 있도록 하기 위해, 및/또는 성분과 이의 표적 분자와의 상호 작용을 증진시키기 위해 사용되는 첨가된 서열일 수 있다.
- [0051] 바람직하게는, 링커는 융합 단백질 내의 각각의 기능성 성분의 구조를 간섭하지 않고 융합 단백질 성분의 유연성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 링커 잔기는 2 내지 100 개의 아미노산 길이를 갖는 펩타이드 링커이다. 예시적인 링커는 Gly-Gly, Gly-Ala-Gly, Gly-Pro-Ala, Gly (G)<sub>n</sub> 및 Gly-Ser (GS) 링커와 같은 적어도 2 개의 아미노산 잔기를 갖는 선형 펩타이드를 포함한다. 본 명세서에 기재된 GS 링커는 (GS)<sub>n</sub>, (GSGSG)<sub>n</sub>, (G<sub>2</sub>S)<sub>n</sub>, G<sub>2</sub>S<sub>2</sub>G, (G<sub>2</sub>SG)<sub>n</sub>, (G<sub>3</sub>S)<sub>n</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub>G<sub>n</sub> 및 GSG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 n은 1 이상이다. (G)<sub>n</sub> 링커의 하나의 예는 G<sub>9</sub> 링커를 포함한다. 적합한 선형 펩타이드는 알라닌 및/또는 세리닌 및/또는 프롤리닌 및/또는 글리실 아미노산 잔기로 구성된 폴리글리신, 폴리세린, 폴리프롤린, 폴리알라닌 및 올리고펩타이드를 포함한다. 링커 잔기는 본 명세서에 개시된 융합 단백질의 임의의 성분을 연결시키는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 수용체 단백질의 세포의 부분과 면역글로불린의 불변 소-영역 사이에서 사용된다. 기타 실시형태에서, 링커는 디스인테그린 또는 이의 변이체와 면역글로불린의 불변 소-영역 사이에서 사용된다. 특정 실시형태에서, 융합 단백질은 수용체 단백질의 세포의 부분과 디스인테그린 또는 이의 변이체 사이의 링커, 및 디스인테그린 또는 이의 변이체와 면역글로불린의 불변 소-영역 사이의 링커를 포함한다. 본 발명에서 구체화되는 바와 같이, 융합 단백질은 적어도 하나이지만 4 개 이하인 링커를 포함할 수 있다.
- [0052] 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 숙주 세포로부터 융합 단백질을 분비하기 위해 기능하는 신호 펩타이드를 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 신호 펩타이드를 포함하지 않는다.
- [0053] 또한, 본 발명에서 기술된 융합 단백질은 단백질 결합 펩타이드의 변형된 형태를 포함할 수 있다. 예를 들면, 융합 단백질 성분은 예를 들어 임의의 단백질 결합 펩타이드에 대한 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화 및 인산화를 포함하는 변역 후 변형을 가질 수 있다.
- [0054] 실시형태는 일반적으로 융합 단백질에 포함된 2개의 단백질 결합 펩타이드를 참조하여 기술되었지만, 본 발명은 또한 혈관신생 과정을 억제하는 측면에서 2 개를 초과하는 단백질 결합 펩타이드를 포함하여 임의의 추가 또는 상승 효과를 제공하는 융합 단백질을 고려한다. 예를 들어, 기타 혈관신생 표적에 결합하거나 기존의 2 개의 단백질 결합 펩타이드에 연결되는 혈관신생 인자 길항제로서 작용하는 추가적인 단백질 결합 펩타이드가 있을 수 있다.
- [0055] 본 발명은 본 명세서에 개시된 본 발명의 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 융합 단백질의 생산 방법을 제공한다. 생산 방법은 적절한 조건 하에, 본 발명의 핵산 서열을 포함하는, 벡터로 형질 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포에 의해 생산된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0056] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 중 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 단일-가닥, 이중-가닥 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 또는 피리미딘 염기를 포함하는 중합체, 또는 기타 천연의, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된, 천연이 아닌 또는 유도체화된 뉴클레오타이드 염기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0057] 융합 단백질 또는 융합 단백질의 성분을 암호화하는 분리된 핵산 분자는, RNA의 형태, 예를 들어 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 기타 형태, 또는 클로닝에 의해 수득된 또는 합성적으로 생산된 cDNA 및 게놈 DNA 또는 이들

의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 삼중-가닥, 이중-가닥 또는 단일-가닥, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 하나의 가닥의 임의의 부분은 센스 가닥으로 알려진 코딩 가닥 일 수 있거나, 또는 안티-센스 가닥으로 또한 지칭되는 비-코딩 가닥일 수 있다. 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분을 암호화하는 분리된 핵산은 천연 공급원으로부터 분리 또는 올리고 뉴클레오타이드-매개 돌연변이유발 및 초기 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분의 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조될 수 있다[참조문헌: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook 외., 4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor, N.Y. 2012) and *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel 외. eds., 2003)].

[0058] "벡터"는 시험관내 또는 생체 내에서 숙주 세포 내로 전달되는 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드를 지칭한다.

[0059] 본 발명은 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 상기 단백질의 발현을 위한 세포 내로 도입하기 위한 핵산 전달 비히클의 용도를 고려한다. 핵산 전달 비히클의 예는, 다양한 진핵 숙주 및 원핵 숙주에 기술되어 있는 리포솜, 천연 중합체 및 합성 중합체를 포함하는 생체 적합성 중합체; 지단백질; 폴리펩타이드; 다당류; 지질 다당류; 인공 바이러스성 엔벨로프; 금속 입자; 및 박테리아, 바쿨로바이러스(baculovirus), 아테노바이러스 및 레트로바이러스와 같은 바이러스, 박테리오파지, 코스미드, 플라스미드, 곰팡이 벡터 및 당업계에서 통상적으로 사용되는 기타 재조합 비히클이다. 일부 실시형태에서, 핵산 전달 비히클은 플라스미드와 같은 발현 벡터이다. 벡터는 발현 벡터의 통상적인 기능(예를 들어, 프로모터, 리보솜 결합 요소, 터미네이터, 인핸서, 선택 마커) 및 복제 기점을 확립하기 위한 임의의 요소를 포함할 수 있다. 프로모터는 구성성, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 핵산을 세포에 전달할 수 있는 다수의 발현 벡터가 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에서 세포 내 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분의 생산에 사용될 수 있다. 발현된 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분은 당해 분야에 공지된 통상적인 기술 및 본 명세서에 기재된 바에 따라 세포로부터 수거되고 정제될 수 있다.

[0060] 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다. 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분(예를 들어, 혈관신생 인자 수용체의 세포외 부분, 디스인테그린 또는 이의 변이체 및/또는 면역글로불린의 불변 소-영역)을 암호화하는 핵산은 공지된 임의의 수단에 의해 표적 세포에 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산은 플라스미드와 같은 발현 벡터에 존재한다. 다른 실시형태에서, 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산은 바이러스 벡터에 존재하고, 벡터는 패키징(packaging)된 다음, 비리온(virion)을 사용하여 세포를 감염시킬 수 있다. 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산을 표적 세포로 도입하기 위해 형질감염 및 형질전환 과정이 적절히 사용되는 것으로 알려져 있다. 중합체, 리포솜 또는 나노구체를 이용하는 제제는 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산의 전달에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 재조합 구조물로 형질전환되거나 형질감염된 세포는 당업자에게 편리한 임의의 세포일 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 세포 유형은 박테리아, 효모, 진균, 곤충, 식물 및 포유동물 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 형질전환되거나 형질감염된 세포는 세포 또는 포유동물 숙주에게 제공될 수 있다. 세포 또는 포유동물 숙주에 전달하기에 적합한 세포는 임의의 기원, 종양 또는 세포주에서 유래된 임의의 포유 동물 세포 유형을 포함한다.

[0061] 본 발명의 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분을 생산하는데 사용되는 세포는 당업자에게 공지된 배지에서 성장하고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합하다. 주어진 배지는 일반적으로 필요에 따라 호르몬 및/또는 기타 성장 인자, DHFR, 염, 완충액, 뉴클레오사이드, 항생제, 미량 원소 및 글루코스 또는 이와 동등한 에너지 공급원으로 보충된다. 임의의 기타 필요한 보충물도 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 세포와 함께 이전에 사용된 것들이며, 당업자에게 명백할 것이다.

[0062] 단백질은 면역 친화성 또는 이온-교환 컬럼상의 분획; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 DEAE와 같은 양이온 교환 수지상의 크로마토 그래피; 크로마토 포커싱; SDS-PAGE; 황산 암모늄 침전; 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 사용한 겔 여과; 소수성 친화성 수지, 매트릭스 상에 고정화된 적합한 결합 파트너를 사용하는 리간드 친화도, 원심 분리, 효소결합면역흡착측정(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), 바이어코어(BIAcore), 웨스턴 블랏 분석, 아미노산 및 핵산 시퀀싱 및 생물학적 활성과 같은 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 정제 및 동정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 숙주 세포에서 발현되고, 단백질 A 친화성 크로마토 그래피, 단백질 G 친화성 크로마토 그래피, 완충액 교환, 크기 배제 크로마토 그래피, 한외 여과(ultrafiltration) 및 투석을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 표준 정제 기술의 조합을 사용하여 숙주세포로부터 정제된다. 이에 따라, 회수된 융합 단백질은 실질적으로 순수하다. 추가의 실시형태에서, 회

수된 융합 단백질은 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 순도 중 적어도 어느 하나이다.

- [0063] 본 명세서에 개시된 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분은 표적 결합 파트너에 대한 친화력, 경쟁적 결합, 억제 활성, 세포 증식 억제, 종양 성장 억제 및 혈관신생 억제를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 생물학적 활성으로 특징지어지거나 또는 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분은 시험관내 및 생체 내에서 생물학적 활성에 대해 평가될 수 있다. 결합 친화성을 평가하기 위한 다수의 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 결합 파트너에 대한 융합 단백질 또는 융합 단백질 성분의 결합 친화력을 확인하는데 사용될 수 있다. 결합 친화력은 해리 상수(Kd) 값 또는 최대 유효 농도(EC<sub>50</sub>) 값의 절반으로 표현될 수 있다.
- [0064] 본 명세서에서 임의의 실시형태에서, 융합 단백질은 활성의 억제(예를 들어, 혈관신생 인자 활성 및/또는 인테그린 활성의 억제)에 대해 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM, 또는 0.001 nM 이하의 EC<sub>50</sub>를 갖는다. 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 융합 단백질은 이들 숫자 사이의 임의의 값을 포함하여, 약 1.0 mM, 500 μM, 100 μM, 50 μM, 10 μM, 5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM 또는 5 pM 미만의, 결합 파트너(혈관신생 인자 및/또는 인테그린)에 대한 Kd를 갖는다.
- [0065] 본 발명은 또한, 디스인테그린, 항-인테그린 αvβx 항체, 항-인테그린 α5β1 항체, 인테그린 αvβx 또는 α5β1를 표적으로 하는 피브로블라스트 및 이의 인테그린 결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인테그린 결합 펩타이드; 혈관신생 인자를 표적으로 하는 기타 단백질 결합 펩타이드; 및 Fc 도메인을 포함하고, 여기서 x는 1, 3, 5, 6 또는 8인, 융합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 치료학적 유효량의 융합 단백질을 포함한다.
- [0066] 용어 "치료학적 유효량"은 바람직한 생물학적 효과 또는 임상적 효과를 유도하는데 필요한 치료학적 활성 화합물의 양을 의미한다. 본 발명의 실시형태에 따르면, "치료학적 유효량"은 임상 결과를 비롯한 유의한 또는 바람직한 결과를 달성하기에 충분한 양이다. 치료학적 유효량은 하나 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질병 상태의 관점에서, 치료학적 유효량은 질병의 개선, 안정화 또는 발달을 지연시키는데 충분한 양이다. 본 발명의 특정 실시형태에 따르면, 치료학적 유효량은 신생혈관증식(neovascularization), 혈관 침투성(vascular permeability), 부종(edema), 염증, 망막병증(retinopathies), 섬유증(fibrosis) 또는 암을 특징으로 하는 질환과 같은 비정상적인 혈관신생을 특징으로 하는 장애를 치료 또는 예방하는데 필요한 융합 단백질의 양이다.
- [0067] 일부 실시형태에서, 융합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 약 0.5 내지 약 100 mg/mL, 바람직하게는 약 40 내지 약 80 mg/mL의 단백질 농도, 예를 들어 약 40, 50, 60, 70 또는 80 mg/mL, 가장 바람직하게는 약 40 ± 5 mg/mL의 단백질 농도로 완충액에 제형화 된 융합 단백질을 포함한다. 기타 바람직한 실시형태에서, 융합 단백질은 약 40 mg/mL 초과와 단백질 농도로 완충액에 제형화 된다.
- [0068] 특정 실시형태에서, 완충액은 pH가 약 6.5 내지 8, 보다 바람직하게는 약 7 내지 7.5, 더욱 더 바람직하게는 약 7.2 인 인산 완충액이다. 인산 완충액은 약 5 내지 20 mM 인산 나트륨, 예를 들면, 5, 10, 15 또는 20 mM 인산 나트륨, 보다 바람직하게는 약 10 mM 인산 나트륨; 약 20 내지 60 mM의 염화나트륨, 보다 바람직하게는 약 40 mM의 염화나트륨; 약 1 내지 10%(부피당 중량: w/v) 수크로스, 보다 바람직하게는 약 5% w/v 수크로스; 및 약 0.01 내지 0.05% w/v의 계면 활성제, 보다 바람직하게는 약 0.03% w/v 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0069] 기타 특정 실시형태에서, 완충액은 pH가 약 5 내지 8, 보다 바람직하게는 약 6 내지 7, 보다 더 바람직하게는 약 6.8 인 히스티딘 완충액이다. 히스티딘 완충액은 약 10 내지 50 mM 히스티딘, 예를 들면, 10, 20, 30, 40 또는 50 mM 히스티딘, 보다 바람직하게는 약 25 mM 히스티딘; 약 10 내지 30 mM 염화나트륨, 예를 들면, 10, 20 또는 30 mM 염화나트륨, 보다 바람직하게는 약 20 mM 염화나트륨; 약 1 내지 10% w/v 수크로스, 예를 들면, 1, 2, 4, 6, 8 또는 10% w/v 수크로스, 보다 바람직하게는 약 6% w/v 수크로스; 및 약 0.01 내지 0.05% w/v의 계면 활성제, 보다 바람직하게는 약 0.03% w/v 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0070] 본 발명은 또한 개체 또는 대상에서 인테그린-관련 질환을 치료 또는 예방하기 위한 본 발명에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다. "개체" 또는 "대상"은 포유류이다. 포유류는 가축(예: 암소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예: 인간 및 원숭이와 같은 인간이 아닌 영장류), 래빗 및 설치류(예: 생쥐 및 랫트)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 질환의 하나 이상의 국면 또는 증상의 치료 또는 예방 방법은 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0071] 본 명세서에 기재된 방법은 염증성 질환, 안 질환, 자가 면역 질환 또는 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는다

다양한 질병의 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료하고자 하는 질환은 류마티스성 관절염, 염증성 관절염, 골관절염, 암, 섬유증, 색소성 망막염, 포도막염(예: 전방 포도막염 또는 후방 포도막염), 및 신생혈관증식 또는 허혈을 특징으로 하는 안 질환(예: 맥락막 신생혈관증식), 당뇨병성 망막증 및 당뇨 황반 부종, 연령-관련 황반변성(AMD), 망막 정맥 폐쇄, 결절맥락막 혈관병증(polypoidal choroidal vasculopathy, PCV)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 본 명세서에 기재된 조성물은 정맥, 복강 내, 안구, 동맥 내, 폐내, 구강, 흡입, 방광내(intravesicular), 근육 내, 기관 내, 피하, 경막 내, 경피, 흉막경유, 동맥, 국소, 흡입, 점막, 피하, 경피, 위장, 관절 내, 수조내(intracisternal), 심실내(intraventricular), 두개 내, 요도 내, 간내, 및 종양 내를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 경로를 통해 개체에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 전신 투여(예를 들어, 정맥 내 주입에 의함)된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 국소 투여(예를 들어, 동맥 내 또는 안구 내 주입에 의함)된다.

[0073] 일부 실시형태에서, 조성물은 눈 또는 눈 조직에 직접 투여된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 눈에 국소적으로, 예를 들어 점안제로 투여된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 눈(안구 내 주입) 또는 눈과 관련된 조직에 주입하여 투여된다. 조성물은 예를 들어, 안구 내 주입, 안구 주위 주입, 망막하 주입, 유리체강내 주입, 수피맥락막(superchoroidal) 주입, 사이막경유(trans-septal) 주입, 공막하(subscleral) 주입, 맥락내(intrachoroidal) 주입, 전방내(intracameral) 주입, 결막 하(subconjunctival) 주입, 서브-테논 주입(sub-Tenon's injection), 안구 후(retrobulbar) 주입, 안구 둘레(peribulbar) 주입, 또는 후 공막옆 배달(posterior juxtасcleral delivery)에 의해 투여될 수 있다. 이들 방법은 당업계에 공지되어 있다. 조성물은 예를 들어, 유리체, 수면체, 공막, 결막, 공막과 결막 사이의 영역, 망막 맥락막 조직, 황반, 또는 개체의 눈 안 또는 눈에 인접한 다른 영역에 투여될 수 있다.

[0074] 조성물의 최적 유효량은 경험적으로 결정될 수 있으며, 질병의 유형 및 중증도, 투여 경로, 질병 진행 및 건강, 개체의 질량 및 신체면적에 좌우될 것이다. 이러한 결정은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 용합 단백질을 포함하는 조성물은 또한 주 6 회, 주 5 회, 주 4 회, 주 3 회, 주 2 회, 주 1 회, 2 주에 1 회, 3 주마다 1 회, 1개월에 1 회, 2개월 마다 1회, 3 개월 마다 1회, 6 개월 마다 1회, 9 개월 마다 1회, 또는 매년 1회로 투여될 수 있다.

[0075] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 이하에 설명된다. 본 명세서에 언급된 모든 문헌은 인용되는 문헌과 관련하여 방법 및/또는 물질을 설명하기 위해 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0076] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 더 설명되는데, 이는 제한보다는 입증의 목적으로 제공된다.

[0077] **실시예 1: 로도스토민 돌연변이 단백질의 생산**

[0078] 디스인테그린 발현 방법

[0079] 오버랩 익스텐션 유전자증폭기술(overlap extension polymerase chain reaction: PCR) 기술을 사용하여 로도스토민(Rho) 돌연변이체 작제물을 제조하였다. 발현 키트 및 효모 전달 벡터, pPICZa는 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 구입하였다. 유전자 돌연변이체에 상보적인 서열, EcoR1 인식 부위 및 정체를 용이하게 하기 위한 6 개의 히스티딘 잔기를 함유하는 센스 프라이머 및 SacII 인식 부위 및 TTA 정지 코돈을 함유하도록 고안된 안티센스 프라이머를 사용하여 유전자 서열을 PCR-증폭함으로써 유전자 돌연변이체 작제물을 제조하였다. PCR 생성물을 정제한 다음 효모 재조합 벡터 pPICZa의 EcoR1 및 SacII 부위에 클로닝하였다. 재조합 플라스미드를 대장균 컴피턴트 세포(E coli competent cell) DH5a로 형질 전환시키고, 저염 루리아 배지(low salt Luria Broth: LB, 1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 0.5% NaCl 및 pH 7.0의 1.5% 한천) 및 25 µg/mL의 항생제 제오신(Zeocin)을 함유한 한천 플레이트에 의해 콜로니를 선택하였다. 단일 콜로니를 선택하여 시퀀싱을 위한 플라스미드를 증폭하였다. 클론이 DNA 시퀀싱에 의해 확인된 후, 플라스미드 10 µg을 제조한 다음 Sac I 효소로 분해시켜 선형화시켰다. 선형화된 작제물을 키트(Pichia EasyComp; Invitrogen)를 사용하여 피치아(Pichia) 균주 X33으로 형질 전환시키고, YPDS(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 글루코스, 2% 한천 및 1M 소르비톨) 및 100 µg/mL의 제오신을 사용하여 한천 플레이트에 의해 콜로니를 선택하였다. PCR 분석을 통해 피치아 인티그라นต์(Pichia integrant)를 분석하여 유전자가 피치아 게놈에 통합되었는지 여부를 결정하였다. 여러가지 유전자 삽

입 복제물을 가진 다수의 클론으로부터 가장 높은 단백질 발현을 가진 클론이 선택되었다.

**[0080]** 디스인테그린 정제 방법

**[0081]** Rho 돌연변이체는 다음과 같이 생산되었다: 세포 스톡(stock) 100  $\mu$ L를, 효모 추출물 펩톤 텍스트로스(yeast extract peptone dextrose, YPD) 배지(1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 텍스트로스) 200 ml 및 100  $\mu$ g/mL 제오신에서 30°C에서 48 시간 동안 성장시켰다. 이어서 세포를 800 mL의 YPD 배지에 옮겼다. 48 시간 후, 세포를 원심분리로 수집하고, 1L의 최소 메탄올 배지(아미노산을 함유하지 않은 황산 암모늄,  $4 \times 10^{-5}$  % 비오틴, 및 1% 메탄올을 함유한 1.34% 효모 질소 염기(yeast nitrogen base, YNB))에서 성장시켰다. 24 시간마다 1%의 메탄올을 첨가하여 2일 동안 단백질 발현을 유도하였다. 상층액을 원심분리한 후 수집하고, 5L의 H<sub>2</sub>O에 대해 2회 투석하고, pH 8에서 5L의 20 mM Tris-HCl 및 200 mM NaCl에 대해 1회 투석하였다. 최종 용액을 니켈-킬레이트(nickel-chelating) 컬럼에 로딩하고 200 mM 이미다졸의 구배로 용리시켰다. 피. 파스토리스(P. pastoris)에서 생산된 재조합 Rho 단백질은 15% 내지 18%의 아세트니트릴 구배로 역상 C18 HPLC로 추가 정제하였다. 트리신-SDS-PAGE 분석 결과 단백질 정제율이 95%를 초과함을 확인하였다.

**[0082]** 실시예 2: VEGFR/Rho 돌연변이체 융합 단백질의 생성

**[0083]** 종합적으로 VEGF 트랩(trap)으로 알려진, 서열번호 8의 F1t-1 수용체(VEGFR1)의 세포외 도메인 D2 및 서열번호 9의 F1t-1 수용체(VEGFR2)의 세포외 도메인 D3은 VEGF 리간드에 결합하기 위한 단백질 성분을 제공하였다. VEGF 리간드 및 인테그린 둘 다에 결합하기 위해, 서열번호 10의 VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 및 서열번호 13의 Rho 돌연변이체를 포함하는 융합 단백질이 생성되었다.

**[0084]** 인간 면역글로불린 G1 CH2 및 CH3 도메인(IgG1 Fc)에 연결된 이전에 생성된 VEGF 트랩을 사용하여 VEGFR1 D2/VEGFR2 D3-Rho 돌연변이체 하이브리드를 암호화하는 DNA 작제물을 생성시켰다. VEGF 트랩에 대한 설명은 본 명세서에 전문이 참조로 인용되어 있는 참조문헌(Holash, J. 외, PNAS, 2002, 99 (17) : 11393-11398)을 참조한다. 서열번호 10의 VEGFR1 D2/VEGFR2 D3와 서열번호 13의 Rho 변이체를 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G<sub>4</sub>S)의 적어도 하나의 펩타이드 링커를 통해 연결시킴으로써 서열번호 16의 융합 단백질을 작제하였다.

**[0085]** 유사하게, 서열번호 15 및 17의 융합 단백질 2 및 3은 또한 서열번호 12 및 14의 Rho 돌연변이체를 서열번호 10의 VEGFR1 D2/VEGFR2 D3와 각각 융합시킴으로써 생성되었다. 서열번호 18의 융합 단백질 4는 시판중인 VEGF 트랩인 아플리버셉트(aflibercept, Eylea®, Regeneron) 및 서열번호 13의 Rho 돌연변이체를 융합시켜 생성하였다. 도 1은 본 발명의 일 실시형태에 따른 융합 단백질의 구조를 보여주는 개략도를 제공한다. SS는 CHO 세포로부터 단백질 분비를 돕는 서열번호 20의 신호 펩타이드 서열이다. VEGF 트랩은 인간 VEGFR1 및 VEGFR2의 세포외 Ig-유사 도메인 2 및 3으로 이루어진다. Fc 단편은 인간 IgG1의 CH2 및 CH3 영역이다. GS는 링커이다. Rho 돌연변이체는 미국 특허 제7,943,728 호 및 PCT 출원 제PCT/US 15/46322호에 개시되어 있으며, 이들의 서열은 본 명세서에 참고로 인용되어 있다.

**[0086]** 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질 1을 생성하기 위해, 융합 단백질 1을 암호화하는 DNA 서열은 CHO 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되었다. 서열번호 21의 핵산 서열을 갖는 신호 펩타이드와 함께 서열번호 19의 핵산 서열을 갖는 합성된 코돈-최적화된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하였다. CHO K1 숙주 세포를 형질감염 72 시간 전에 4 mM 글루타민(J.T Baker 2078-06) 및 1% HT 보충제(Gibco 11067-030)를 함유하는 CD CHO(Gibco 12490-003)에  $2 \times 10^5$  세포/mL로 접종하였다. 숙주 세포를 인포스(Infors) 진탕기(36.5°C, 75% 습도, 6% CO<sub>2</sub>, 110 RPM)에서 항온처리하고 사용 전에 세포 밀도를 계수하였다. 적당량의 발현 플라스미드 DNA를 숙주 세포에 첨가하고(1L 또는 5L 작동 부피), 중합체-기반 형질감염 시약을 첨가하였다. 형질감염된 배양물을 인포스 진탕기(36.5°C, 75% 습도, 6% CO<sub>2</sub>, 110 RPM)에서 4 시간 동안 항온처리하고 독점 공급 용액(proprietary feed solution)을 첨가하였다. 이후, 형질감염된 배양물을 인포스 진탕기(32°C, 75% 습도, 6% CO<sub>2</sub>, 110 RPM)에서 항온처리하였다. 형질감염된 배양액을 형질감염 후 10 일째에 수확하였다. 상층액은 연구 물질의 생성을 위해 정제되었다. 정제 과정은 정화(clarification), 단백질 A 친화성 크로마토 그래피, 아미콘 울트라셀(Amicon Ultracel)에 의한 농도, 크기 배제 크로마토 그래피, 슬라이드-에이-라이저(Slide-A-Lyzer)에 의한 투석 및 제형 완충액 중의 아미콘 울트라셀에 의한 최종 농도를 포함하였다.

**[0087]** 항-VEGF 및 항-인테그린 활성을 동시에 갖는 융합 단백질을 작제, 발현, 정제 및 특징화하였다. 도 2는 정제된 융합 단백질 1을 SDS-PAGE로 특징화한 개략도를 제공한다. 분자 마커를 라인 M에 로딩하였다. 환원되지 않은

형태 및 환원된 형태의, 인간 IgG1의 Fc 부분에 융합된 인간 VEGFR1 및 VEGFR2의 부분으로 구성된 조각된 VEGF-트랩(양성 대조군 1; 서열 번호 22)을 레인 1 및 2에 각각 로딩하였다. 환원되지 않은 형태 및 환원된 형태의 시판중인 VEGF-트랩인 아플리버셉트(Eylea®, Regeneron) (양성 대조군 2)를 각각 레인 3 및 4에 로딩하였다. 환원되지 않은 형태 및 환원된 형태의 융합 단백질 1을 레인 5 및 6에 로딩하였다. 각 단백질 시료는 각 레인 당 3 µg의 부피로 로딩하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 양성 대조군 및 융합 단백질 1 둘 다는 환원 및 환원되지 않은 조건 하에서 높은 완전성 및 순도를 나타내는 결과를 보여주었다. 융합 단백질 1의 최종 농도는 지정된 제형 완충액(280 nm에서의 흡수 기준)에서 약 40 mg/mL이었다.

[0088] SDS-PAGE 및 생체활성 분석을 통해 각각의 작제물로 세포 형질감염에 의한 단백질 호모다имер의 생산을 확인하였다.

[0089] **실시예 3: 인간 VEGF<sub>165</sub>에 대한 융합 단백질의 결합 친화력**

[0090] 직접 결합 효소결합면역흡착측정(ELISA)을 사용하여 VEGF-A의 스플라이스 변이체인 인간 VEGF<sub>165</sub>에 대한 본 발명의 융합 단백질의 결합 친화도를 측정하였다.

[0091] VEGF 트랩은 치료용으로 설계된 가용성 VEGF 수용체이며 현재 AMD 치료를 위해 FDA의 승인을 받았다. VEGF 트랩은 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합된 VEGFR2의 제 3 Ig-유사 도메인 3(D3)에 융합된 VEGFR1의 제 2 Ig-유사 도메인 2(D2)를 함유한다(참조문헌 Holash, J. 외, Proc Natl Acad Sci.USA 2002 Aug 20; 99 (17) : 11393-8). VEGF 트랩은 VEGF-A, VEGF-B 및 PlGF를 표적으로 한다. 시판중인 VEGF Trap 인 아플리버셉트(Eylea®, Regeneron)를 양성 대조군 2로 포함시켰다.

[0092] 96-웰 ELISA 플레이트의 각 웰에 100 µL 피복 용액(1x 인산염 완충 용액(PBS) 중 1 µg/mL VEGF<sub>165</sub>, pH 7.2)를 첨가하고 플레이트를 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 웰을 400 µL의 1 x PBS 완충액으로 2 회 세척하고 과량의 액체를 종이 타월로 조심스럽게 제거하였다.

[0093] 400 µL의 블로킹 용액(100 mL 1x PBS에 5g 비-지방 탈지 분유)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 웰을 1x PBS 완충액으로 2 회 세척하였다.

[0094] 융합 단백질 및 대조군 시료를 10 nM의 가장 높은 단백질 농도로 블로킹 용액에서 3 배 연속 희석하였다. 100 µL의 연속 희석된 시료를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 덮고 실온에서 1 시간동안 플레이트 진탕기(약 100 rpm)에서 항온처리하였다. 웰을 세척완충액(1x PBS, 0.05 % Tween-20)으로 3 회 세척하였다.

[0095] 블로킹 용액 중 100 µL의 1:2500 희석된 호스래디시 퍼옥시다제-결합된 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG Fc specific antibodies)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1 시간동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 3 회 세척하였다.

[0096] 100 µL의 3,5,3',5'-테트라메틸벤지딘(3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine, TMB)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 반응이 일어나도록 3 내지 5 분 동안 항온처리하였다. 반응을 정지시키기 위해, 100 µL의 정지 용액(1N HCl)을 각 웰에 첨가하였다.

[0097] 각 웰의 광학 밀도(OD)는 450 nm의 흡광 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 결정하였다. 흡광도를 융합 단백질 또는 대조군의 단백질 농도에 대해 플로팅하고, 신호가 최대 유효 농도 (EC<sub>50</sub>)의 절반인 경우의 농도를 결정하였다.

[0098] EC<sub>50</sub> 값으로 나타낸 결합 친화도는 본 발명의 시험된 융합 단백질에 대해 0.10 내지 0.21 nM 사이의 값이었다. ELISA 결과를 표 1에 나타내었다.

**표 1**

시험 물질	EC <sub>50</sub> (nM)
양성 대조군 2 (아플리버셉트: aflibercept)	0.088-0.195
융합 단백질 1 (서열번호 16)	0.106-0.207

[0100] 실시예 3의 결과는 본 발명의 실시형태에 따른 융합 단백질이 VEGF<sub>165</sub>를 높은 친화도로 결합한다는 것을 보여주

었다. 이는 도 3에도 도시된다.

**[0101] 실시예 4 - 인테그린  $\alpha v\beta 3$ 에 대한 융합 단백질의 경쟁적 결합**

[0102] 경쟁적 결합을 사용하여 인테그린  $\alpha v\beta 3$ 에 대한 본 발명의 융합 단백질 1의 결합 친화도를 측정하였다. 야생형 Rho(서열번호 1) 및 Rho 변이체 KG(서열번호 13)를 실시예 1에 따라 합성하고 경쟁적 결합 분석에서 양성 대조군 3 및 양성 대조군 4로서 각각 포함시켰다.

[0103] 피복 용액에 용해된 1  $\mu\text{g/mL}$  빅트로넥틴(Victronectin)을 96-웰 ELISA 플레이트의 각 웰에 첨가하고 플레이트를 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 웰을 PBS 완충액으로 2 회 세척하고 과량의 액체를 종이 타월로 조심스럽게 제거하였다.

[0104] 블로킹 용액(100 mL 1x PBS에 5g 비-지방 탈지 분유)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 웰을 1x PBS 완충액으로 2 회 세척하였다.

[0106] \*다양한 농도의 양성 대조군 3, 양성 대조군 4 및 융합 단백질 1을 특정 농도의 가용성 인테그린  $\alpha v\beta 3$ 와 혼합하였다. 100  $\mu\text{L}$ 의 연속 희석된 시료를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 덮고 실온에서 1 시간동안 플레이트 진탕기(약 100 rpm)에서 항온처리하였다. 웰을 세척완충액(1x PBS, 0.05 % Tween-20)으로 3 회 세척하였다.

[0107] 희석된 1차 항-인테그린  $\alpha v$  항체를 첨가하고 항온처리한 다음 세척하였다. 블로킹 용액 중 호스래디시 퍼옥시다제-결합된 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 항체를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1 시간동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 3 회 세척하였다.

[0108] 100  $\mu\text{L}$ 의 3,5,3',5'-테트라메틸벤지딘(TMB)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 반응이 일어나도록 3 내지 5 분 동안 항온처리하였다. 반응을 정지시키기 위해, 100  $\mu\text{L}$ 의 정지 용액(1N HCl)을 각 웰에 첨가하였다.

[0109] 각 웰의 광학 밀도(OD)는 450 nm의 흡광 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 결정하였다. 흡광도를 융합 단백질 또는 대조군의 단백질 농도에 대해 플로팅하고, 신호가 최대 유효 농도 ( $IC_{50}$ )의 절반인 경우의 농도를 결정하였다.

[0110]  $IC_{50}$  값으로 나타낸 경쟁적 결합은 본 발명의 시험된 융합 단백질에 대해 2.2 내지 16 nM 사이의 값이었다. 결과를 표 2에 나타내었으며 도 4에 도시하였다.

**표 2**

시험 물질	$IC_{50}$ (nM)
양성 대조군 3 (야생형 Rho, 서열번호 1)	2.6-3.2
양성 대조군 4 (Rho 변이체 KG, 서열번호 13)	2.2-2.9
융합 단백질 1 (서열번호 16)	2.2-16.0

[0112] **실시예 5 - 융합 단백질에 의한 HUVEC 증식의 억제** 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC) 증식 분석을 수행하여 본 발명의 융합 단백질의 기능을 시험하였다. 시판중인 VEGF Trap 인 아플리버셉트(Eylea®, Regeneron)를 양성 대조군 2로 포함시켰다.

[0113] 96-웰 ELISA 플레이트의 각 웰에 100  $\mu\text{L}$ 의 피복 용액(재증류수 중 1% 젤라틴)을 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 2 시간 또는 밤새 항온처리하였다. 웰을 1x PBS 완충액으로 2 회 세척하였다.

[0114] 내피 세포 성장 배지에서 인간 제대 정맥 내피 세포 3500 카운트를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 밤새 항온처리하였다.

[0115] 융합 단백질 시료를 300 nM의 가장 높은 단백질 농도를 갖는 분석 완충액(배지-199 1x Earle's Salts, 10% 태아 소 혈청, 10 mM HEPES, 1x 항생제/항균제)으로 희석시켰다. 융합 단백질 시료를 VEGF<sub>165</sub> (8 ng/mL)와 혼합하고, 혼합물을 실온에서 밤새 항온처리하였다. 이어서 웰을 200 $\mu\text{L}$ 의 1x PBS로 세척하였다.

[0116] 100  $\mu\text{L}$ 의 VEGF<sub>165</sub>/시료 혼합물을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 5% CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 72 시간 동안 항온처리 하였다. 항온처리 후, 희석된 PBS 중 10  $\mu\text{L}$  MTS 검출

시약(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨)((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)) 및 페나진 메토설페이트(phenazine methosulfate)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 2.5 시간 동안 항온처리하였다.

[0117] 각 웰의 광학 밀도(OD)는 490 nm의 흡광 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 결정하였다. 흡광도를 용합 단백질 또는 대조군의 단백질 농도에 대해 플롯팅하고, 세포 증식이 50%(EC<sub>50</sub>)로 억제되는 농도를 결정하였다.

[0118] 세포 증식 억제(IC<sub>50</sub>)는 본 발명의 시험된 용합 단백질에 대해 0.039 내지 0.103 nM 사이인 것으로 결정되었다. 증식 분석의 결과는 표 3에 나타내었으며 도 5에 또한 도시하였다. 양성 대조군 2 및 용합 단백질 1 둘 다는 VEGF 의존성 HUVEC 증식 억제에 대해 유사한 활성을 나타냈다.

표 3

시험 물질	IC <sub>50</sub> (nM)
양성 대조군 2 (아플리버셉트)	0.026-0.136
용합 단백질 1 (서열번호 16)	0.039-0.103

[0120] 실시예 6 - 용합 단백질에 의한 αvβ3 및 α5β1 세포 접착의 억제용합 단백질 존재 하에서 피브리노겐에 대한 αvβ3 -과발현 CHO 세포의 접착 및 피브로넥틴에 대한 α5β1-발현 K562 세포의 접착을 평가하였다.

[0121] 96-웰 Immulon-2 마이크로터더 플레이트(Costar, Corning, NY)를 50 내지 500 nM 농도의 기질을 함유하는 100 μL의 인산염-완충 식염수(PBS : 10 mM 인산 완충액, 0.15 M NaCl, pH 7.4)로 피복하고 4°C에서 밤새 항온처리 하였다. 기질 및 이의 피복 농도는 200 μg/mL의 피브리노겐 (Fg) 및 25 μg/mL의 피브로넥틴 (Fn)이었다. 비 특이적 단백질 결합 부위는 각 웰을 200 μL의 열-변성 1% 소 혈청 알부민(BSA) (Calbiochem)으로 실온에서 1.5 시간 동안 항온처리함으로써 차단시켰다. 열-변성된 BSA를 버리고 각 웰을 200 μL의 PBS로 2 회 세척하였다.

[0122] 특허 출원 제62/US2015/46322 호의 동일한 공급원으로부터 인테그린 αvβ3(CHO-αvβ3)을 발현한 CHO 세포를 DMEM에서 유지하였다. 인간 적백혈병 K562는 ATCC의 특허 출원 번호 제62/US2015/46322호에 기재된 바와 같이 유지하였고, 5% FCS를 함유하는 로스웰 파크 기념 연구소(Roswell Park Memorial Institute, RPMI)-1640 배지에서 배양하였다. 수확된 K562를, 1 mM EDTA를 함유하는 PBS 완충액에서 세척하고 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> 및 500 μM MnCl<sub>2</sub>를 함유하는 티로드(Tyrode) 완충액(150 mM NaCl, 5 mM KCl 및 10 mM HEPES, pH 7.35)에 재현탁 시켰다. 세포(CHO 및 K562)를 3 × 10<sup>5</sup> 세포/mL로 희석하고, 100 μL의 세포를 분석에 사용하였다. Rho 및 이의 돌연변이체를 배양된 세포에 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15분 동안 항온처리하였다. Rho 및 이의 변이체는 0.001 내지 500 μM의 농도에서 억제제로 사용되었다. 이후, 처리된 세포를 피복된 플레이트에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 이 후, 항온처리된 용액을 버리고 200 μL PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 결합한 세포를 크리스탈 바이올렛 염색으로 정량화하였다. 간략하게는, 웰을 100 μL의 10% 포르말린으로 10 분 동안 고정시키고 건조시켰다. 이어서 50 마이크로리터(50 μL)의 0.05 % 크리스탈 바이올렛을 실온에서 20분 동안 웰에 첨가하였다. 각 웰을 200 μL의 증류수로 4 회 세척하고 건조시켰다. 150 μL의 착색 용액(50% 알코올 및 0.1% 아세트산)을 첨가하여 착색을 수행하였다. 생성된 흡광도는 600 nm에서 판독되고 판독값은 부착 세포의 수와 상관 관계에 있다.

[0123] 세포 접착의 억제에 대한 계산은 하기 식에 따라 수행하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = 100 - \frac{OD_{600}(TA) - OD_{600}(NC)}{OD_{600}(PC) - OD_{600}(NC)} \times 100$$

[0124]

[0125] 위의 식에서, TA는 "시험 항목(test article)"을 지칭하고; NC는 "음성 대조군(negative control)"을 지칭하고, PC는 "양성 대조군(positive control)"을 지칭한다.

[0126] IC<sub>50</sub>은 특정 인테그린에 의해 매개되는 세포 부착의 50% 억제에 필요한 디스인테그린 변이체의 농도(nM)로 정의 된다. 따라서, IC<sub>50</sub>이 낮으면, 각각의 인테그린의 세포 부착 활성을 억제하는데 있어서 디스인테그린 변이체의

더 큰 특이성 또는 효능을 의미하므로 각각의 인테그린에 대한 디스인테그린 변이체의 결합 활성(또는 선택성)이 높아진다. IC<sub>50</sub> 결과를 표 4에 요약하였다. 도 6은 융합 단백질 1에 의한 CHO-αvβ3 세포 접착의 억제를 도시하는 개략도를 제공한다.

**표 4**

[0127]	시험 물질	αvβ3, IC <sub>50</sub> (nM)	α5β1, IC <sub>50</sub> (nM)
	양성 대조군 3 (서열번호 1)	24.7	252.5
	양성 대조군 4 (서열번호 13)	19.6	17.5
	융합 단백질 1 (서열번호 16)	4.76	3.4

[0128] **실시예 7: 융합 단백질에 의한 HUVEC 튜브 형성의 억제** HUVEC (1.5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 96-웰 매트릭셀-피복된 (matrigel-coated) 플레이트 상에 위치시켰다. 융합 단백질 1(0.1 μM, 0.3 μM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM)의 6 회 투여량과 비히클을 37°C에서 5 % CO<sub>2</sub> 대기 하에서 성장 배지의 각 웰에 첨가하였다. 18 시간의 항온처리 기간 후에, 모세혈관-유사 네트워크와 비슷한 내피 세포 튜브의 형태가 현미경으로 평가되었다. 총 튜브 길이의 파괴(항-혈관신생)를 각 사진으로부터 측정하고 비히클 대조군에 대해 측정하였다. 튜브 형성의 최소 저해 농도(MIC ≥ 30 %)를 측정하여 항-혈관신생 정도를 평가 하는데 사용하였다. 모든 연구에서 수라민 (Suramin)을 항-혈관신생 양성 대조군(양성 대조군 5)으로 사용하였다.

[0129] 튜브 형성의 억제(IC<sub>50</sub>)는 시험된 융합 단백질 1에 대해 0.1 μM 미만으로 측정되었으며, 이는 양성 대조군 4보다 높은 효능을 나타내었다. 튜브 형성 검정 결과를 하기 표 5에 나타내었다. 도 7a 내지 도 7g는 융합 단백질 1을 각각 0.1 μM, 0.3 μM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM의 투여량으로 첨가했을 때의 튜브 형성에 대한 융합 단백질 1의 억제 효과를 나타내는 개략도를 제공한다.

**표 5**

[0130]	시험 물질	IC <sub>50</sub> (μM)
	양성 대조군 5 (수라민®)	15.8
	양성 대조군 4 (서열번호 13)	5.9
	융합 단백질 1 (서열번호 16)	<0.1

[0131] **실시예 8 - 융합 단백질에 의한 네덜란드 벨티드 래빗에서의 VEGF-유도된 누출의 억제**

[0132] 본 발명의 융합 단백질을 생체 내 모델에서 혈관 투과성에 대해 시험하여 혈관 누출을 방지하는 효능을 결정하였다. 이 모델에서 VEGF를 래빗 눈의 유리체에 유리체강내 주입하여 조절되지 않은 망막 누출을 유도하였다. 인간 IgG1의 Fc 부분에 융합된 인간 VEGFR1과 VEGFR2의 부분으로 구성된 재조합 융합 단백질인 아플리버셉트 (Eylea®, Regeneron), 및 VEGF-A를 억제함으로써 혈관신생을 차단하는 재조합 인간화된 모노클로날 항체인 베바시주맵(Avastin®, Roche)를 양성 대조군 2 및 6으로 각각 포함시켰다.

[0133] 하나의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 25 mM 히스티딘 완충액, 20 mM NaCl, 6% (w/v) 수크로스, 0.03 % (w/v) 폴리소르베이트, pH 6.0을 포함하는 제형 완충액에 20,000 μg/mL의 융합 단백질 1을 함유하였다.

[0134] 네덜란드 벨티드 래빗(Dutch Belted rabbits)은 이소플루란(isoflurane) (3 내지 5%)을 사용하여 마취하였고, 눈은 안과용 베타딘(Betadine) 용액으로 처리하였다. 이후, 래빗의 눈을 멸균된 생리 식염수로 세척하고, 염산 리도카인(lidocaine hydrochloride)(2% 주사제) 또는 프로파라카인(proparacaine)(0.5%)을 안구 표면에 적용하였다.

[0135] 1일 째에, 네덜란드 벨티드 래빗에 BD 300 μL 인슐린 주사기(31 ga x 5/16 인치)를 사용하여 소정 용량으로 본 발명의 융합 단백질, 비히클(음성) 대조군 또는 기준(양성) 대조군을 유리체강내 주입하였다. 바늘은 눈의 상측두(dorsotemporal quadrant)를 통해 삽입되었고, 운부 후방에서 약 3-4 mm 및 후방 직근 근육의 3-4 mm 측방에 삽입되었고, 50 μL의 용액이 전달되었다. 혈관 누출은 외인성 VEGF<sub>165</sub>를 동일한 눈에 주입하고 3일 째에 유도되었다.

[0136] 플루오레세인 혈관 조영법(Fluorescein angiography: FA)은 0 (정상)에서 4 (중증)까지의 척도를 사용하여 누출

및 비틀림(tortuosity)을 평가하기 위해 VEGF 주입 3일 후 모든 투여량 그룹에서 실시되었다.

[0137] 안구 자극의 징후는 용합 단백질 투여, VEGF 유도 및 평가 이전에 드레이즈(Draize) 스코어링 시스템을 사용하여 점수를 매겼다. 드레이즈 분석에 따르면, 모든 래빗 눈은 투여 시작 전에 정상이었다. 유리체내 투여 후 모든 치료군에서 최소 안구 염증의 일시적인 징후가 관찰되었고, 이들은 유리체내 시술에 기인한 것이었다. 연구 과정에서 입증된 약물-관련 결과는 존재하지 않았다.

[0138] 비히클 대조군과 관련된 FA는 망막 혈관계 누출 및 비틀림과 관련하여 가장 높은 평균 점수(2.58)를 나타냈다. 2 개의 기준 양성 대조군 2와 6은 평균 점수가 0과 0.25였으며, 이는 망막 혈관계 누출과 비틀림이 상당히 감소하였음을 의미한다. 본 발명의 시험된 용합 단백질은 0.167의 평균 점수를 가졌으며, 양성 대조군에 필적하는 VEGF-유도된 망막 유출 및 비틀림을 감소시키는 효과를 나타냈다. 생체 내 검정 결과를 하기 표 6에 나타내었다. 도 8a 내지 도 8d는 용합 단백질 1 및 양성 대조군에 의한 네덜란드 벨티드 래빗에서 VEGF-유도된 누출의 억제체를 나타내는 대표적인 FA를 제공한다.

표 6

[0139]

시험 물질	투여량 (µg)	점수	6일 평균 누출 점수
비히클	0	12	2.583
양성 대조군 6 (베바시주맙: bevacizumab)	1250	12	0.250
양성 대조군 2 (아플리버셉트)	625	12	0
용합 단백질 1 (서열번호 16)	1000	12	0.417

[0140] 실시예 9 - 용합 단백질에 의한 네덜란드 벨티드 래빗에서의 VEGF-유도된 누출의 투여량-반응 억제본 발명의 용합 단백질을 다양한 투여량으로 생체 내 모델에서 망막혈관 투과성에 대해 시험하여 혈관 누출을 방지하는 투여량-반응 효능을 결정하였다. 이 모델에서 인간 VEGF<sub>165</sub>를 래빗 눈의 유리체에 유리체강내 주입하여 망막 유출을 유도하였다.

[0141] 1일 째에, 네덜란드 벨티드 래빗에, 다양한 투여량의 본 발명의 구현 예에 따른 용합 단백질 1, 비히클(음성) 대조군 또는 기준(양성) 대조군을 유리체강내 주입하였다. 혈관 누출은 외인성 VEGF<sub>165</sub>를 동일한 눈에 주입하고 3일 째에 유도되었다.

[0142] FA는 0 (정상)에서 4 (중증)까지의 척도를 사용하여 누출 및 비틀림을 평가하기 위해 VEGF-유도 (6일째) 후 모든 투여량 그룹에서 3일 동안 실시되었다.

[0143] 안구 자극의 징후는 용합 단백질 투여, VEGF 유도 및 평가 이전에 드레이즈(Draize) 스코어링 시스템을 사용하여 점수를 매겼다. 드레이즈 분석에 따르면, 모든 래빗 눈은 투여 시작 전에 정상이었다. 유리체강내 투여 후 모든 치료군에서 최소 안구 염증의 일시적인 징후가 관찰되었고, 이들은 유리체강내 시술에 기인한 것이었다. 연구 과정에서 약물-관련 결과는 분명하지 않았다.

[0144] 제1 외인성 VEGF 주입의 경우, 비히클 대조군과 관련된 FA는 망막 혈관계 누출 및 비틀림과 관련하여 가장 높은 평균 점수(3.4)를 나타냈다. 2 개의 기준 양성 대조군 그룹은 평균 점수가 0이었으며, 이는 망막 혈관계 누출과 비틀림이 상당히 감소하였음을 의미한다. 본 발명의 시험된 용합 단백질(용합 단백질 1)은 각각 100, 500 및 1000 µg의 투여량에서 0.08, 0.42 및 0.17의 점수를 가졌으며, 양성 대조군에 필적하는 VEGF-유도된 망막 유출 및 비틀림을 감소시키는 효과를 나타냈다.

[0145] 시험관내 검정에서의 투여량-반응 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0146]

시험 물질	투여량 (µg)	점수	6일 평균 누출 점수
비히클	0	10	3.400
양성 대조군 6 (베바시주맙)	1250	12	0.17
양성 대조군 2 (아플리버셉트)	625	12	0
용합 단백질 1 (서열번호 16)	1000	12	0.33
용합 단백질 1 (서열번호 16)	500	10	0.40
용합 단백질 1 (서열번호 16)	100	10	0.60

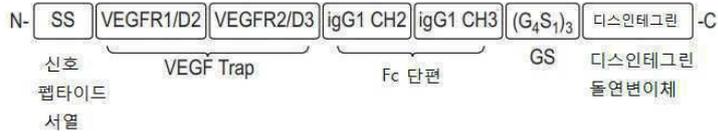
- [0147] **실시예 10 - 용합 단백질에 의한 랫트에서의 레이저-유도된 맥락막 신생혈관증식 (CNV)의 병변 크기의 감소**
- [0148] 브라운 노르웨이 랫트의 시력은 1% 사이크로질(Cyclogyl) 용액으로 확장되어 빛으로부터 보호되었다. 확장시킨 후, 랫트를 케타민 및 크실라진 혼합물을 사용하여 마취시켰다. 1일 째에 532 nm의 레이저를 사용하여 각 눈의 망막에 3 개의 병변 화상을 도입했다.
- [0149] 3일 째에, 동물을 케타민(ketamine) 및 크실라진(xylazine) 혼합물로 마취시키고, 눈을 확장시키고, 5  $\mu$ L의 용합 단백질 1, 비히클(음성 대조군) 또는 양성 대조군 2(기준)를 미리 정해진 양으로, 33 게이지 바늘로 해밀턴 주사기(Hamilton syringe)를 사용하여 동물의 양안에 유리체강내 주입하였다.
- [0150] 성공적인 병변 형성을 확인하기 위해, 병변이 도입되기 전, 병변 화상 후, 및 22일 째에 마이크론(Micron) III 작은 동물 안저경(Phoenix Research)을 사용하여 안저 이미지를 촬영하였다. 동물들은 병변 화상의 신생혈관증식을 평가하기 위해 22 일째 체중 1  $\mu$ L/g으로 10% 플루오레세인 나트륨(fluorescein sodium)을 IP 주입하였다. 플루오레세인 혈관 조영상으로부터, 병변 크기를 결정하고 도 9a 내지 9c에 나타난 바와 같이 투여량 그룹을 통해 비교하였으며, 도 9a는 비히클의 개략도를 도시하고, 도 9b는 양성 대조군 2의 개략도를 도시하고, 도 9c는 용합 단백질 1의 개략도를 도시한다. 도 9a 내지 9c의 화살표(▼)는 레이저 병변 스폿을 나타낸다.
- [0151] **실시예 11 - 용합 단백질에 의한 원숭이에서의 레이저-유도된 맥락막 신생혈관증식 (CNV)의 병변 크기의 감소**
- [0152] 용합 단백질은 원숭이에서 확립된 레이저-유도된 CNV 모델에서 시험한다. 532 nm 다이오드 레이저 광응고법(diode laser photocoagulation)을 사용하여 각 눈의 황반 주변에 6 내지 9 번 화상을 도입하고, 동일한 날에 0.5 내지 4 mg의 본 발명의 용합 단백질을 유리체강내 주입하였다.
- [0153] 동물은 20 일 후 정맥내 2.5% 가용성 펜토바비톤(pentobarbitone) (1 mL/kg)으로 진정시킨다. 눈꺼풀은 눈을 뜬 채로 고정되고, 컬러 사진은 안저 카메라를 사용하여 촬영된다.
- [0154] 플루오레세인 염료(20% 플루오레세인 나트륨, 0.05 mL/kg)를 하지 정맥에 주입한다. CNV 병변과 관련된 플루오레세인의 누출을 모니터링하기 위해 동맥 기, 초기 동정맥 기 및 여러 개의 후기 동정맥 기를 포함하여 염료 주입 후 여러 시점에서 사진을 촬영한다.
- [0155] **실시예 12 - 용합 단백질에 의한 이종 이식 마우스에서의 동소 인간 아교모세포종 종양 성장의 억제**
- [0156] 인간 아교모세포종(human glioblastoma) 세포주 U87-MG( $2.5 \times 10^5$  세포/2  $\mu$ L, 루시퍼라제 세포)를 BALB/c 누드 마우스에 이식하여 동소 이종 이식 모델(orthotopic xenograft model)을 만든다.
- [0157] 종양 성장에 대한 본 발명의 용합 단백질의 억제 효과를 평가하기 위해, 종양 세포를 누드 마우스에 이식하고, 3 내지 30 mg/kg의 범위로 본 발명의 실시형태에 따른 다양한 농도의 용합 단백질을 주 2 회 마우스에 정맥내 투여한다. 동물의 종양 성장 및 생존율은 매주 최대 8주 동안 측정된다.
- [0158] **실시예 13-용합 단백질에 의한 블레오마이신-유도된 섬유증 마우스에서의 폐 섬유증의 억제**
- [0159] 체중  $20 \pm 2$ g의 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하여 폐 섬유증 및 섬유증 억제에 대한 용합 단백질의 효과를 유도한다. 동물을 이소플루란(isoflurane)으로 마취시킨 후 1일 째에 1.5 IU/kg (25 ml 생리 식염수에 용해)의 단일 투여량의 블레오마이신(bleomycin)을 기관 내에 투입한다. 블레오마이신의 이러한 투여량은 폐 섬유증을 재발성으로 유발하고 10 내지 20%의 사망률을 유발할 수 있는 것으로 알려져있다.
- [0160] 닌테다닙(Nintedanib)은 양성 대조군으로 매일 10 내지 50 mg/kg의 경구 위관영양법(oral gavage)으로 매일 투여된다 투여 용량은 10 mL/kg 체중이다. 음성 대조군으로서, 용합 단백질 비히클은 IV 주입에 의해 동물에게 투여된다. 무처리 대조군을 사용하여 블레오마이신 투여 후 폐 병리학적 변화를 모니터링한다. 다양한 투여량의 용합 단백질 1 및 비히클을 1일을 시작으로 21 일까지 1일 1회 정맥내 투여한다. 체중을 포함한 임상 관찰은 매일 모니터링된다. 동물들은 22일에 희생된다. 기관지 폐포 세척액을 채취하여 세포 수와 TGF- $\beta$ 1을 조사하였다.
- [0161] 섬유증 형성에 대한 본 발명의 용합 단백질의 억제 효과를 평가하기 위해 표준 곡선과 비교하여 하이드록시 프롤린의 변화를 측정하기 위해 폐 조직을 제거하고 완충액에서 균질화시킨다. 기타 조직 병리학적 실험은 섬유증 및 염증 특이적 바이오 마커의 발현을 수집하기 위해 수행된다.

[0162]

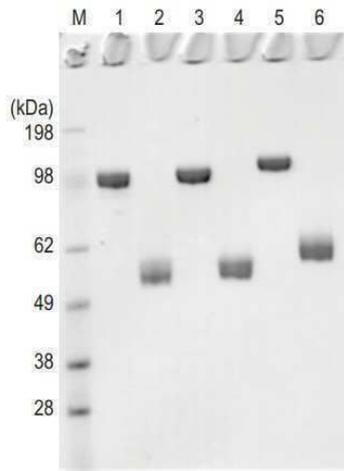
본 발명은 본 발명의 특정 실시형태를 참조하여 상세히 설명되었지만, 당업자에게는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경 및 수정이 이루어질 수 있음이 명백할 것이다.

도면

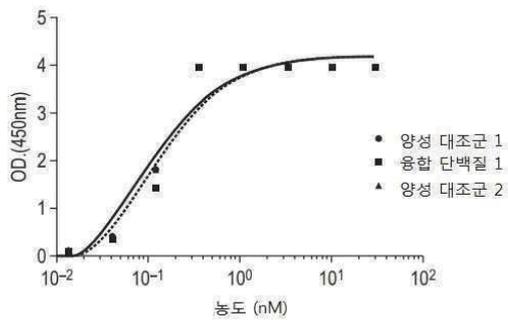
도면1



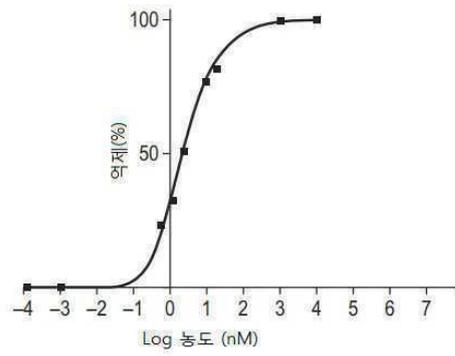
도면2



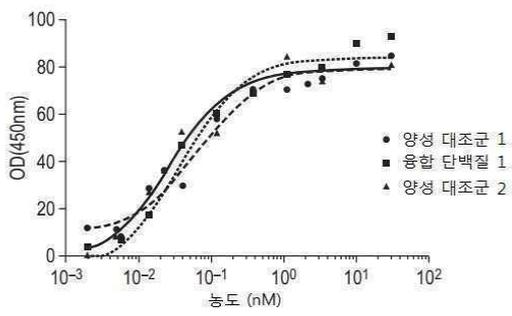
도면3



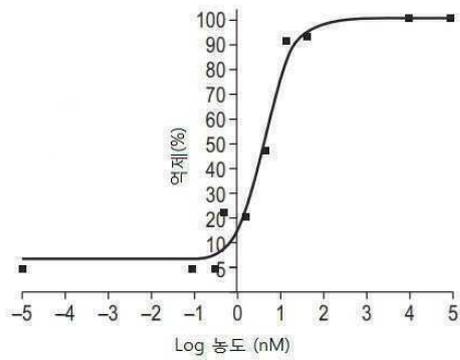
도면4



도면5



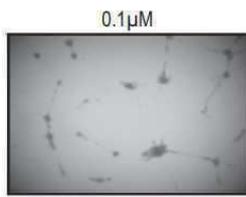
도면6



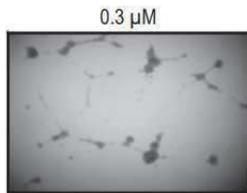
도면7a



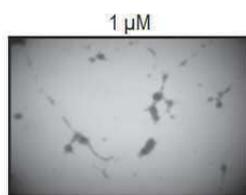
도면7b



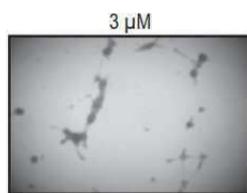
도면7c



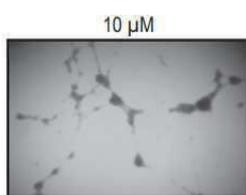
도면7d



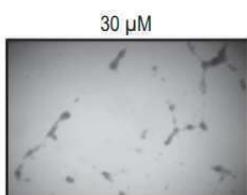
도면7e



도면7f

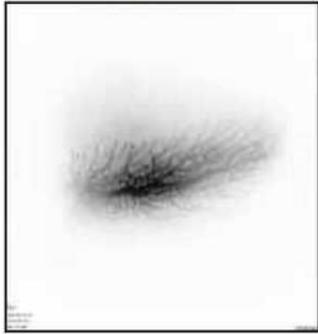


도면7g



도면8a

비히클



도면8b

양성 대조군 2

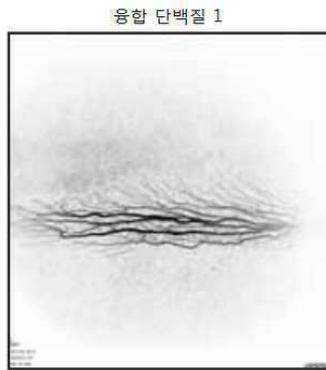


도면8c

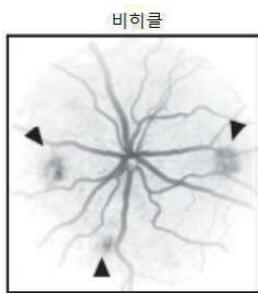
양성 대조군 6



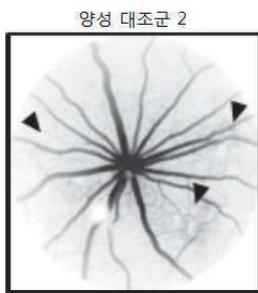
도면8d



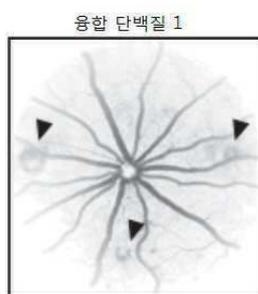
도면9a



도면9b



도면9c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALLGENESIS BIOTHERAPEUTICS INC.

<120> Fusion Proteins for Inhibiting

Angiogenesis

<130> 063426/479685

<150> 62/185,716

<151> 2015-06-28

<160> 23

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> Snake

<400> 1

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala

1                    5                    10                    15

Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Glu Leu Cys

20                    25                    30

Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro

35                    40                    45

Arg Gly Asp Met Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys

50                    55                    60

Pro Arg Tyr His

65

<210> 2

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 9, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 52, 53, 65, 66, 67, 68

<223> Xaa = Any Amino Acid

<220>

<223> Rhodostomin mutant

<400> 2

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Glu Leu Cys  
                   20                    25                    30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Cys Xaa Xaa Xaa  
                   35                    40                    45  
 Arg Xaa Asp Xaa Xaa Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
                   50                    55                    60

Xaa Xaa Xaa Xaa

65

<210> 3

<211> 70

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Rhodostomin mutant

<400> 3

Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Ser Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Asp Gly Leu Cys  
                   20                    25                    30  
 Cys Asp Gln Cys Arg Phe Lys Lys Lys Arg Thr Ile Cys Arg Ile Ala  
                   35                    40                    45  
 Arg Gly Asp Phe Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
                   50                    55                    60

Pro Arg Trp Asn Gly Leu

65

70

<210> 4

<211> 49

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Echistatin

<400> 4

Gln Cys Glu Ser Gly Pro Cys Cys Arg Asn Cys Lys Phe Leu Lys Glu

1 5 10 15

Gly Thr Ile Cys Lys Arg Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys

20 25 30

Asn Gly Lys Thr Cys Asp Cys Pro Arg Asn Pro His Lys Gly Pro Ala

35 40 45

Thr

<210> 5

<211> 73

<212> PRT

<213> unknown

<220>

<223> Trimucin

<400> 5

Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys

1 5 10 15

Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly

20 25 30

Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Lys Lys Lys Arg Thr Ile Cys Arg

35 40 45

Arg Ala Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala

50 55 60

Asp Cys Pro Arg Asn Gly Leu Tyr Gly

65 70

<210> 6

<211> 73

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Elegant in

<400> 6

Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys  
 1                      5                      10                      15

Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Asp Gly  
                     20                      25                      30

Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Lys Lys Lys Arg Thr Ile Cys Arg  
                     35                      40                      45

Arg Ala Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala  
                     50                      55                      60

Asp Cys Pro Arg Asn Gly Leu Tyr Ser  
 65                      70

<210> 7

<211> 62

<212> PRT

<213>

> Unknown

<220>

<223> Trigramin

<400> 7

Glu Ala Gly Glu Asp Cys Asp Cys Gly Ser Pro Ser Asn Pro Cys Cys  
 1                      5                      10                      15

Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Ile Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly  
                     20                      25                      30

Leu Cys Cys Asp Gln Cys Ser Phe Ile Glu Glu Gly Thr Val Cys Arg  
                     35                      40                      45

Ile Ala Arg Gly Asp Asp Leu Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Arg  
                     50                      55                      60

<210> 8

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VEGFR1 extracellular domain D2

<400> 8

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His

1                    5                    10                    15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro

                  20                    25                    30

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro

                  35                    40                    45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser

                  50                    55                    60

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val

65                    70                    75                    80

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn

                  85                    90                    95

Thr Ile Ile Asp

                  100

<210> 9

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VEGFR2 extracellular domain D3

<400> 9

Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys

1                    5                    10                    15

Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp

                  20                    25                    30

Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val

                  35                    40                    45

Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu

50 55 60

Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr

65 70 75 80

Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe

85 90 95

Val Arg Val His Glu Lys

100

<210> 10

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VEGFR1 extracellular domain D2/VEGFR2  
extracellular domain D3

<400> 10

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His

1 5 10 15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro

20 25 30

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro

35 40 45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser

50 55 60

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val

65 70 75 80

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn

85 90 95

Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser

100 105 110

Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn





Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
                   20                    25                    30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly  
                   35                    40                    45

Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
                   50                    55                    60  
 Pro Arg Trp Asn Asp Leu  
 65                    70

<210> 13

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Rhodostomin variant KG

<400> 13

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
                   20                    25                    30

Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly  
                   35                    40                    45  
 Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
                   50                    55                    60

Pro Arg Tyr His

65

<210> 14

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Rhodostomin variant KA

<400> 14

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1                    5                    10                    15

Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
                   20                    25                    30

Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Ala  
                   35                    40                    45

Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
                   50                    55                    60

Pro Arg Tyr His

65

<210> 15

<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

Fusion of VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 and Rhodostomin  
 variant KG-WN

<400> 15

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His  
 1                    5                    10                    15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro  
                   20                    25                    30

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro  
                   35                    40                    45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser  
                   50                    55                    60

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val  
 65                    70                    75                    80

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn  
                   85                    90                    95

Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser



Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
                   355                                  360                                  365  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
                   370                                  375                                  380  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 385                                  390                                  395                                  400  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
                                   405                                  410                                  415  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                                   420                                  425                                  430  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
                                   435                                  440                                  445  
 Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala Ala  
                                   450                                  455                                  460  
 Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys Cys  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly Arg  
                                   485                                  490                                  495  
 Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys Pro  
                                   500                                  505                                  510  
 Arg Trp Asn Asp Leu  
                                   515  
 <210> 16  
 <211> 516  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Fusion of VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 and Rhodostomin  
                   variant KG  
 <400> 16  
 Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile  
 1                                  5                                  10                                  15

Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr  
 20 25 30  
  
 Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu  
 35 40 45  
 Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile  
 50 55 60  
 Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln  
 85 90 95  
  
 Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu  
 100 105 110  
 Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu  
 115 120 125  
 Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His  
 130 135 140  
 Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
  
 Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg  
 165 170 175  
 Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr  
 180 185 190  
 Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp  
 195 200 205  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 210 215 220  
  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 225 230 235 240  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 245 250 255  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His



Pro Arg Tyr His

515

<210> 17

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion of VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 and Rhodostomin

variant KA

<400> 17

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His

1	5	10	15
Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro			
	20	25	30
Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro			
	35	40	45
Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser			
	50	55	60
Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val			
65	70	75	80
Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn			
	85	90	95
Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser			
	100	105	110
Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn			
	115	120	125
Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His			
130	135	140	
Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met			
145	150	155	160
Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp			
	165	170	175

Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys  
 180 185 190

Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr  
 195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 210 215 220

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 225 230 235 240

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 245 250 255

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 260 265 270

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 275 280 285

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 290 295 300

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 305 310 315 320

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 325 330 335

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 340 345 350

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 355 360 365

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 370 375 380

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 385 390 395 400

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 405 410 415

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

420 425 430  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

435 440 445  
 Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala Ala

450 455 460  
 Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys Cys

465 470 475 480  
 Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Ala Arg

485 490 495  
 Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys Pro

500 505 510

Arg Tyr His

515

<210> 18

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion of Eylea and Rhodostomin variant KG

<400> 18

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu  
 1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val  
 20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr  
 35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe

50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu  
 65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg  
 85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile  
 100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr  
 115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys  
 130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly  
 145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr  
 165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met  
 180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr  
 195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 210 215 220

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 225 230 235 240

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 245 250 255

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 260 265 270

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 275 280 285

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 290 295 300

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 305 310 315 320

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 325 330 335

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys



gaaggcaggg agctcgtgat cccttgcagg gtcacatccc ccaacatcac cgtcacctc 120  
 aagaagtcc ccctggatac cctcatcccc gacggcaagc ggatcatttg ggatagccgg 180  
 aagggttca tcattccaa cgctacctac aaagaaattg gactgctgac ctgcgaggct 240

accgtcaacg gccacctcta taagaccaac tacctgacct acaggcagac caataccatc 300  
 atcgatgtgg tcctcagccc cagccacgga atcgaactgt ccgtgggcga gaagctggtc 360  
 ctgaactgta cagccaggac agaactcaac gtgggcatcg acttcaactg ggagtacct 420  
 agctccaagc accagcacia gaagctggtc aaccgggacc tgaagacca gtccggctcc 480  
 gaaatgaaga agttcctgtc caccctcacc atcgatggag tcaccggag cgatcagga 540  
 ctgtatacct gcgccgctc ctccggcctg atgacaaaga agaacagcac cttcgtgagg 600  
 gtgcacgaga aaggccccgg cgacaagaca cacacctgcc ctccctgccc gcccccgag 660  
 ctgctcgcg gaccagcgt gttcctgttc cccctaagc ccaaggacac cctcatgatc 720

agcaggacct ctgaggtagc atgcgtcgtc gtggactga gccatgaaga ccccagggtg 780  
 aagttcaact ggtatgtgga cggcgtcgag gtgcataacg ccaagaccaa accccgggag 840  
 gagcaataca acagcacata cagggtggtg tccgtgctga ccgtcctgca ccaggattgg 900  
 ctgaacggca aagagtataa gtgcaaggtg agcaacaaag ccctgcccgc tccatcgag 960  
 aagacaatct ccaaggccaa gggccaacc agggagcctc aggtgtacac actgcctcct 1020  
 tccccggagc agctgacaaa aaaccaagtg agcctgacct gcctcgtcaa gggcttctac 1080  
 cttccgata tcgccgtgga gtgggagtcc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1140  
 accctcccg tgetcgattc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct cacagtggac 1200

aatcccggg ggcagcaggg caatgtgttc agctgttccg tgatgcacga ggccctccac 1260  
 aatcactaca ccagaagag cctgtccctg tccccggcg gaggcggcgg ctccggcgga 1320  
 ggcggctccg gggcgggcgg atccggaaaa gactgctgatt gcagctcccc cgagaacccc 1380  
 tgctcgatg ccgctacatg caaactgcgg cctggagccc agtgtggaga aggcctgtgc 1440  
 tgcgagcagt gcaagttcaa gaagccccgg accatttgtg ctaggggccc gggagacaac 1500  
 cctgacgate ggtgcaccgg ccaaagcgt gactgteccc ggtaccactg a 1551

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> A Signal Peptide

<400> 20

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Arg Asp Thr Gly

1 5 10 15

Ser Trp Ala

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide Sequence of a Signal Peptide

<400> 21

atggcctggg ctctcctgct gctgaccctg ctgacacggg acacaggatc ctgggcc 57

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signaling Peptide of Fusion Protein of SEQ ID NO: 18

<400> 22

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly

20 25

<210> 23

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGFR1 extracellular domain D2/VEGFR2 extracellular domain D3 fusion with human IgG 1 Fc region

<400> 23

Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile

1 5 10 15

Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr



Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 275 280 285  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 290 295 300  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 325 330 335  
  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 340 345 350  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 355 360 365  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 370 375 380  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 385 390 395 400  
  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 405 410 415  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 420 425 430