

특 허 법 원

제 1 부

판 결

사 건 2024허15257 등록무효(특)

원 고 A 주식회사

대표이사 미합중국인 B

소송대리인 법무법인(유한) 태평양

담당변호사 강기중, 이상현, 한예인, 최주리, 김재훈

소송대리인 법무법인(유한) 해광

담당변호사 김동규, 함석천

피 고 C

(C)

미합중국

대표자 D

소송대리인 변호사 장덕순, 김종석, 손천우

소송복대리인 변호사 김상동, 변리사 여호섭, 이상영, 한예진, 김

지연

변 론 종 결 2025. 9. 9.

판 결 선 고 2025. 10. 30.

주 문

1. 특허심판원이 2024. 10. 31. 2022당3445 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.
2. 소송비용은 피고가 부담한다.

청 구 취 지

주문과 같다.

이 유

1. 기초사실

가. 이 사건 특허발명(갑 제2호증)¹⁾

1) 발명의 명칭: 유리체내 투여에 적당한 VEGF 길항제 제형

2) 출원일 등

국제출원일	2007. 6. 14.
번역문제출일	2008. 12. 8.
우선권주장일	2006. 6. 16.
등록일	2014. 6. 5.
등록번호	10-1406811

3) 청구범위(2025. 8. 29. 정정심결에 따른 것,²⁾ 을 제93호증)

-
- 1) 이 사건 특허발명의 발명의 명칭, 청구범위 등은 맞춤법이나 띄어쓰기를 고려하지 않고 명세서 등에 기재된 대로 실시함을 원칙으로 한다.
 - 2) 이 사건 특허발명의 청구범위는 심판 과정에서 이루어진 피고의 2024. 6. 20. 자 정정청구에 의하여 정정되었다(원고는 위 정정의 적법성에 관하여 다투지 않는다, 제1차 변론조서 참조). 그 후 이 사건 특허발명의 청구범위는 다시 특허심판원 2025정66에 의해 위와 같이 정정되었는데, 원고는 위 정정의

【청구항 1】 (a) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 40-50mg/ml VEGF 길항제; (b) 폴리소르베이트 0.015-0.1%(w/v)의 유기 공용매; (c) 염화나트륨 또는 염화칼륨으로부터 선택되는 40-135mM의 등장제; 및 (d) 5-10mM의 인산나트륨 완충제를 포함하며, 선택적으로 추가로 포함되는 1.0-7.5%(w/v)의 안정화제는 수크로오스, 소르비톨, 글리세롤, 트레할로오스, 또는 만니톨로 구성되는 군으로부터 선택되며, pH는 5.8-7.0이고, 상기 VEGF 길항제는 포유동물 셀라인에서 제조된 것인, 유리체내 투여를 위한 혈관 내피 성장 인자(VEGF⁴) 길항제⁵의 안약 제형.

【청구항 2】 제1항에 있어서, 40-50mg/ml의 VEGF 길항제, 10mM 인산나트륨 완충제, 40mM NaCl, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트 및 5%(w/v) 수크로오스, pH 6.2-6.3을 포함하는 것을 특징으로 하는 안약 제형.

【청구항 3】 제2항에 있어서, 40mg/ml의 농도로 VEGF 길항제를 포함하는 것을 특징으로 하는 안약 제형.

【청구항 4】 제1항에 있어서, 40-50mg/ml VEGF 길항제, 10mM 인산나트륨, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 및 135mM 염화나트륨, pH 6.2-6.3을 포함하는 것을 특징으로 하는 안약 제형.

【청구항 5】 (a) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 40mg/ml의 VEGF 길항제; (b) 5-10mM의 pH가 5.8-7.0인 인산나트륨 완충제; (c) 폴리소르베이트인 0.015-0.1%(w/v)의 유기 공용매; 및 (d) 수크로오스, 소르비톨, 글리세롤, 트레할로오스,

적법 여부에 관하여 특별히 다투지 않는다.

3) 'Sequence Identifier Number'의 약어이고, 이하 '서열번호'라는 국문 용어와 혼용한다.

4) **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor: 신생혈관 생성을 유도하는 강력한 성장인자로, 내피세포의 증식과 생존을 자극하면 혈관 투과성을 촉진한다.

5) VEGF의 대량 분비로 인한 원치 않는 신생혈관의 생성을 억제할 수 있도록 VEGF를 표적화하여 그 기능을 억제하는 물질이다.

및 만니톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 1-10%(w/v)의 안정화제; 또는 40-135mM의 등장제; 또는 수크로오스, 소르비톨, 글리세롤, 트레할로오스, 및 만니톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 1-10%(w/v)의 안정화제와 40-135mM의 등장제;를 포함하고 상기 VEGF 길항제는 포유동물 셀라인에서 제조된 것인, 유리체내 투여를 위한 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 길항제의 동결건조 가능한 제형.

【청구항 6】 내지 【청구항 8】 (삭제)

【청구항 9】 제5항에 따르는 동결건조 가능한 제형을 동결건조시켜 동결건조된 제형을 생성하는 것을 포함하는 VEGF 길항제의 동결건조된 제형을 제조하는 방법.

【청구항 10】 제1항의 제형을 포함하는 유리체내 투여에 미리 채워진 시린지.

【청구항 11】 (삭제)

4) 이 사건 특허발명의 주요 내용은 별지 1 기재와 같다.

나. 선행발명들⁶⁾

1) 선행발명 5(갑 제42호증)

2006. 2. 21. Ophthalmology Times에 실린 '유리체내 VEGF 트랩이 유망해 보인다(Intravitreal VEGF Trap looking promising)'라는 제목의 기사이다. VEGF 트랩의 유리체내 투여의 유효성에 관한 것으로, 그 주요 내용은 별지 2의 제1항과 같다.

2) 선행발명 6(갑 제57호증)

2004. 11. 23. 공개된 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90 (2):1114-1122에 게재된 'VEGF 트랩 단일 주사로 인한 마카크 원숭이의 배란 차단 및 난소 기능의 용량 관련 억제의 장기간 생성(Single Injections of Vascular Endothelial

6) 선행발명 1 내지 4에 관하여는 별다른 주장이 없으므로, 그 기재를 생략한다.

Growth Factor Trap Block Ovulation in the Macaque and Produce a Prolonged, Dose-related Suppression of Ovarian Function)'이라는 제목의 논문이다. VEGF 트랩의 정맥 주사용 제제설계에 관한 것으로, 그 주요 내용은 별지 2의 제2항과 같다.

3) 선행발명 7(갑 제115호증의1)

2006. 2. 9. 미국 공개특허공보 US 2006/0030529 A1에 게재된 '안과 질환 치료를 위한 VEGF 억제제의 사용(Use of VEGF Inhibitors for Treatment of Eye Disorders)'이라는 명칭의 발명이다. '개선된 약물동태학적 특성과 향상된 조직 침투 능력을 가진 VEGF Trap이 연령 관련 황반변성 및 당뇨병성 망막증을 포함한 안과 질환 치료에 유효하고 동물모델에서 유리체내로 안전하게 투여할 수 있다'는 것으로, 그 주요 내용은 별지 2의 제3항과 같다.

다. 이 사건 심결의 경위

1) 원고는 2022. 12. 13. 특허심판원에 피고를 상대로, '이 사건 특허발명은 명세서 기재요건을 충족하지 않고, 이 사건 특허발명의 청구항 제1 내지 4, 10항은 선행발명 1 내지 4의 결합에 의하여 진보성이 부정된다.'고 주장하면서 이 사건 특허발명에 대한 등록무효심판을 청구하였다. 위 무효심판 절차에서 피고는 2024. 6. 20. 이 사건 특허발명의 청구범위를 정정하는 정정청구를 하였다.

2) 특허심판원은 위 심판청구를 2022당3445로 심리한 다음, 2024. 10. 31. '피고의 정정을 인정한다. 이 사건 특허발명은 명세서 기재요건을 충족하고, 선행발명 1 내지 4의 결합에 의하여 진보성이 부정되지 않는다.'는 이유로 위 심판청구를 기각하는 심결(이하 '이 사건 심결'이라 한다)을 하였다.

3) 피고는 이 사건 소송계속 중이던 2025. 7. 7. 특허심판원에 이 사건 특허발명의

청구범위를 위 1. 가. 3)과 같이 정정하는 정정심판을 청구하였다. 특허심판원은 위 심판청구를 2025정66으로 심리한 다음, 2025. 8. 29. 이를 인용하는 심결을 하였고, 위 심결은 그대로 확정되었다.

【인정근거】 다툼 없는 사실, 갑 제1, 2, 3, 42, 57, 115호증(가지번호 있는 것은 각 가지번호 포함, 이하 같다), 을 제80, 93호증의 각 기재, 변론 전체의 취지

2. 당사자 주장의 요지

가. 원고

다음과 같은 이유로, 이 사건 특허발명은 무효로 되어야 한다.

1) 이 사건 특허발명의 활성성분⁷⁾은 청구범위 문언 그대로 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'로 보아야 하므로, 이 사건 특허발명은 아래와 같이 미완성 발명에 해당하거나 명세서 기재불비의 위법이 있다.

가) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 위 활성성분을 생산하는 방법이 기재되어 있지 않아, 이 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람(이하 '통상의 기술자'라 한다)이 과도한 실험이나 특수한 지식을 부가하지 않고서는 위 활성성분을 제조할 수 없다. 따라서 이 사건 특허발명의 발명의 설명은 특허법 제42조 제3항 각 호의 요건을 충족하지 못한다.

나) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에 기재된 실험데이터는 '에플리머셉트'⁸⁾를

7) 활성성분(active ingredient)은 약물 제제 중에서 질병의 예방·치료·진단 등 약리 작용을 직접 나타내는 핵심 물질로, 유효성분이라고도 한다.

8) 피고의 상용화 제품인 '아일리아[®]'의 활성성분 단백질이다. 에플리머셉트는 이 사건 특허발명의 식별번호 [0051]의 특정 구체예에 기재된 기술특징 중 'SEQ ID NO:4의 아미노산 25-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화'된 2합체로 융합된 단백질에 해당한다.

이용하여 얻은 것인데, 애플리버셉트에 대응되는 'SEQ ID NO:4의 27-457번 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'는 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'와 아미노산 서열, 번역 후 번역 등의 차이로 인해 물리화학적 성질이 상이하다. 따라서 위 발명의 설명에 기재된 실시예 등으로는 이 사건 특허발명의 활성성분에 대한 안약 제형을 쉽게 재현할 수 없고 그 안정화 효과도 예측할 수 없다.

다) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 '유리체 내 투여'가 가능한지 여부를 알 수 있는 실험결과가 기재되어 있지 않다. 결국 이 사건 특허발명의 청구범위는 발명의 설명에 의해 뒷받침되지 않고(특허법 제42조 제4항 제1호), 이 사건 특허발명의 발명의 설명은 통상의 기술자가 이 사건 특허발명을 쉽게 실시할 수 있도록 기재되어 있지 않다(같은 조 제3항 제1호).

2) 청구범위 활성성분의 해석과 관계없이, 이 사건 제5항 특허발명은 아래와 같이 명세서 기재불비의 위법이 있다.

가) 피고 주장과 같이, 이 사건 특허발명 청구항 제5항의 '동결건조 가능한'을 '동결 건조 전 예비 제형'뿐 아니라 '동결건조 가능성이 있는 모든 제형을 복원한 제형'까지 포함하는 것으로 폭넓게 해석한다면, 청구항 제5항의 청구범위는 '동결건조 가능한'이라는 부분으로 인하여 발명이 명확하게 기재되어 있다고 할 수 없으므로 특허법 제42조 제4항 제2호에 위배된다.

나) 이 사건 특허발명 청구항 제5항은 동결건조 가능한 제형에 관한 발명으로 활성성분의 농도를 40mg/ml로 한정하고 있다. 그러나 이와 관련하여 이 사건 특허발명의 발명의 설명에 기재된 실시예 7, 8에는 20mg/ml의 활성성분만을 함유하고 있을 뿐이므로, 청구항 제5항의 활성성분 농도에 대하여도 실시예 7, 8에서 보인 안정화 효과를

달성할 수 있는지 알 수 없다. 따라서 청구항 제5항은 특허법 제42조 제4항 제1호에 위배된다.

3) 설령 이 사건 특허발명의 활성성분을 '애플리머셉트'로 보더라도, 이 사건 특허발명은 선행발명 5, 6, 7의 결합에 의하여 진보성이 부정된다.

나. 피고

이 사건 특허발명에는 원고 주장과 같은 무효사유가 존재하지 않는다.

1) 아래와 같은 점을 볼 때, 이 사건 특허발명의 활성성분인 'SEQ ID NO:4의 아미노산을 포함하는 단백질'은 'SEQ ID NO:4의 27-457의 아미노산을 포함하는 단백질'로 해석되므로, 이 사건 특허발명의 우선일 당시 통상의 기술자는 이 사건 특허발명이 '애플리머셉트'에 관한 제형 특허임을 명확히 이해할 수 있다.

가) 이 사건 특허발명은 제형 발명이므로, 통상의 기술자라면 활성성분을 공지 단백질로서 인체에 적용될 수 있는 최종 단계 생성물, 즉, 단백질 합성 단계의 번역⁹⁾ 과정만을 거친 중간체 생성물이 아니라 번역 후 변형¹⁰⁾ 과정을 통해 신호서열¹¹⁾ 등이 제거된 '성숙한 형태의 단백질'로 이해할 것이다.

9) 단백질 생성 과정에서 특정 단백질을 암호화하는 유전자(DNA)의 유전정보가 RNA로 복사되는 과정이 전사(transcription)이고, RNA 정보로부터 단백질이 합성되는 과정이 번역(translation)이다(갑 제109호 증 16면 79 단락, 갑 제9호증 4면 그림 28-1 등 참조).

10) 번역 후 변형(Post-Translational Modification, PTM)은 단백질이 번역을 통해 합성된 후, 단백질의 특성에 영향을 줄 수 있는 추가적인 변형이 일어나는 과정을 의미하고, 그 유형으로 폴리펩타이드가 작은 조각으로 잘리는 단백질 분해, 당이 첨가되는 당화, 인산기가 첨가되는 인산화 등이 있다[갑 제10호증(=갑 제97호증) 1면 첫 상자 등 참조].

11) 세포 내에서 분비되거나 다양한 위치에 도달하여야 하는 폴리펩타이드 사슬은 전사/번역 단계에서 그 폴리펩타이드 사슬의 N-말단에 짧은 펩타이드 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드, 즉 신호서열[Signal Sequence, 신호 펩타이드(Signal peptide), 리더 서열(leader sequence)이라고도 한다]을 추가로 포함하는데, 이 서열은 세포의 수송 기구를 작동시켜 폴리펩타이드 사슬이 올바른 위치로 갈 수 있도록 인도한다. 신호서열은 폴리펩타이드 서열이 세포 내 목적지에 정확하게 위치하면 신호 펩타이드 효소에 의해 폴리펩타이드 사슬의 나머지 부분으로부터 절단되고 그 후 폴리펩타이드 사슬은 '성숙한 형태'로 접힌다(갑 제109호 90-95 단락 등 참조).

나) ① 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 '융합 단백질이 Flt1 단백질 등으로 구성된다'(식별번호 [0007] 참조), 'SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함하고, 포유 동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다'(식별번호 [0051] 참조)고 기재되어 있고, ② 서열번호 4의 아미노산에서 아미노산 1-26이 신호서열이고, 단백질 C-말단의 라이신은 단백질 합성 중 클리핑(Clipping)¹²⁾에 의해 제거된다는 것은 이 사건 특허발명의 우선일 당시의 기술상식에 해당하며, ③ 시그널 펩티드를 포함한 단백질이 VEGF 길항 능력을 갖는지 여부는 알 수 없는 점 등을 고려할 때, 통상의 기술자는 활성성분을 서열번호 4의 아미노산에서 신호서열과 458번 위치의 Lys이 제거된 형태인 'SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457의 단백질'로 인식할 것이다.

2) 이 사건 특허발명은 유리체내 투여를 위한 애플리버셉트의 '제형'에 관한 발명이므로 유리체내 투여에 관한 약리데이터가 반드시 제시될 필요는 없다. 따라서 이 사건 특허발명에서 원고가 주장하는 바와 같은 기재불비는 문제되지 않는다.

3) 이 사건 특허발명 청구항 제5항의 '동결건조 가능한 제형'은 말 그대로 동결건조 가능한 모든 제형을 의미하는 것으로 명확히 이해되고, 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 이에 대응되는 내용이 충분히 기재되어 있으므로, 청구항 제5항의 기재불비에 관한 원고의 주장도 이유 없다.

4) 이 사건 특허발명은 통상의 기술자가 선행발명 5, 6, 7로부터 쉽게 발명할 수 없으므로 진보성이 부정되지 않는다.

12) 클리핑(Clipping)은 이 사건 소송에서, 유전자 서열 정보에 기초하여 그 존재가 예상된 C-말단 Lys(라이신) 또는 Arg(아르기닌) 잔기가 종종 포유동물 세포 배양물로부터 분리된 단백질에 없는 현상을 의미하는 것으로 사용되었다. 전문가 증인(Lorenz Meinel)은 이러한 C-말단 Lys 잔기의 절단은 포유동물 셀라인에서 IgG1 계열 단백질(이 사건의 경우 다량체를 만들기 위해 도입된 Fc 도메인에 대응된다)을 제조하는 경우에 대부분 발생하고, 카복시펩티다제라는 효소의 존재로 인해서 자연적으로 탈락되는 현상이라고 설명하였다(을 제49호증 21-24 단락, 을 제50호증, 갑 제108호증 등 참조).

3. 판단

가. 이 사건 특허발명의 청구범위 해석

1) 관련 법리

특허발명의 보호범위는 청구범위에 적혀 있는 사항에 의하여 정하여지고(특허법 제97조), 발명의 설명이나 도면 등에 의하여 그 보호범위를 제한하거나 확장하는 것은 원칙적으로 허용되지 않는다. 다만 청구범위에 적혀 있는 발명의 설명이나 도면 등을 참작해야 그 기술적인 의미를 정확하게 이해할 수 있으므로, 청구범위에 적혀 있는 사항의 해석은 문언의 일반적인 의미 내용을 기초로 하면서도 발명의 설명이나 도면 등을 참작하여 문언에 의하여 표현하고자 하는 기술적 의의를 고찰한 다음 객관적·합리적으로 하여야 한다. 그러나 발명의 설명과 도면 등을 참작한다고 하더라도 발명의 설명이나 도면 등 다른 기재에 따라 청구범위를 제한하거나 확장하여 해석하는 것은 허용되지 않는다(대법원 2025. 6. 26. 선고 2024후10115 판결, 대법원 2015. 5. 14. 선고 2014후2788 판결 등 참조).

2) 구체적 판단

이 사건 특허발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 억제할 수 있는 약제를 포함하는 유리체내 투여에 적당한 약학 제형 및 이러한 제형을 제조하고 사용하는 방법에 관한 발명인데(식별번호 [0001] 참조), 청구항 제1, 5항¹³⁾은 활성성분을 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제로서 포유동물 셀라인에서 제조된 것'으로 기재하고 있다.

앞서 든 증거, 갑 제105, 109호증의 각 기재, 변론 전체의 취지에 따라 인정할 수

13) 나머지 청구항은 청구항 제1, 5항의 종속항이다.

있는 아래의 사실 내지 사정을 종합하여 보면, 이 사건 특허발명의 청구항 제1, 5항의 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'는 문언 그대로 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'로 해석된다.

가) 이 사건 특허발명의 명세서는 활성성분으로 특정 순서대로 배열된 아미노산 서열을 포함하는 화합물을 기재하고 있다. 갑 제109호증의 기재 및 변론 전체의 취지에 따르면, 여러 아미노산들이 일련의 펩타이드 결합으로 연결된 사슬을 '폴리펩타이드' 또는 '단백질'이라 부르고, 해당 사슬을 구성하는 아미노산 선형 서열에 의해 그 정체를 파악하고 식별하는 것은 이 사건 특허발명이 속한 기술분야의 기술상식에 해당한다(갑 제109호증 71-76 단락¹⁴⁾ 참조). 즉, 단백질을 다른 단백질과 분별할 수 있게 하

14)

단백질과 세포 단백질 합성

71. 아미노산은 동일한 전체 구조를 공유하는 단순하고 작은 자연 발생 유기 분자이다. 아미노산은 아미노기(NH₂), 카르복실산기(COOH), 수소 원자(H), 그리고 중심 탄소 원자(알파 탄소)에 모두 결합된 곁사슬기로 구성된다. 아미노산의 종류는 곁사슬의 특성에 따라 달라지며, 아미노산의 다양한 특성은 이러한 곁사슬에 따라 결정된다.

72. 일반적으로 자연적으로 생성되는 아미노산은 20종이며, 각각은 다음과 같이 3글자 약어 또는 코드와 1글자 코드로 표시된다.

Amino Acid	1-Letter Code	3-Letter Code
Alanine	A	Ala
Cysteine	C	Cys
Aspartic acid	D	Asp
Glutamic acid	E	Glu
Phenylalanine	F	Phe
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Lysine	K	Lys
Leucine	L	Leu
Methionine	M	Met
Asparagine	N	Asn
Proline	P	Pro
Glutamine	Q	Gln
Arginine	R	Arg
Serine	S	Ser
Threonine	T	Thr
Valine	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr

는 가장 근본적인 실마리는 아미노산 서열이다. 따라서 특허청 생명공학분야 특허심사 기준은 단백질을 활성성분으로 포함하는 의약발명을 특허출원할 때에 그 단백질을 서열로 특정할 수 없는 경우를 제외하고는 원칙적으로 청구범위에 '아미노산 서열 또는 아미노산 서열을 코딩하는 구조유전자의 염기서열을 특정'하여 기재한다고 정하고 있다(갑 제105호증 4, 5, 6면¹⁵⁾ 참조).

나) 이 사건 특허발명의 청구범위에는 활성성분으로 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열'이 기재되고 있고, 이 사건 특허발명 명세서의 서열목록에는 SEQ ID NO:4가 '458개 아미노산이 인공적으로 합성된 서열(Artificial Synthetic Sequence)을 가진 단백질(PRT)'로 기재되어 있는데, 이를 통해 1번부터 458번 위치를 구성하는 각 아미노산의 종류 및 결합 순서를 모두 확인할 수 있다. 위와 같은 기재내용으로부터, 특허출원인이 특허로써 보호받고자 하는 단백질이 분명하게 특정된다.

이 사건 특허발명의 청구범위에 '포유동물 셀라인에서 제조된 것'이라는 제조방법

73. 단백질의 구성에서 각 아미노산은 펩타이드 결합으로 다음 아미노산과 연결된다. 짧은 아미노산 사슬을 "펩타이드"라고 하고 긴 아미노산 사슬을 "폴리펩타이드"라고 한다.
단백질
74. 단백질은 폴리펩타이드 사슬로 구성된 비교적 크고 복잡한 자연 발생 유기 분자이다. 세포의 기본 구성 요소 대부분과 자연에 존재하는 다른 많은 중요한 화학물질이 단백질이다.
75. 단백질의 구조는 여러 수준에서 고찰될 수 있다. 1차 구조는 아미노산의 선형 서열이다. 2차 구조는 선형 사슬의 개별 부분 (또는 분절)이 특정 방식으로 배열된 물리적 모습으로 설명할 수 있다. 2차 구조의 요소들은 더 나아가 서로 접혀 3차 구조를 형성하고, 3차 구조는 2차 구조와 아미노산 측쇄를 함께 묶어 도메인이라고 하는 안정된 구조를 형성한다.
76. 단백질은 단일 도메인으로 구성될 수도 있고, 여러 도메인이 함께 묶여 완전한 단백질 구조를 이룰 수도 있다.

15) (6) 단백질, 재조합 단백질

① 단백질, 재조합 단백질은 아미노산 서열 또는 이 아미노산 서열을 코딩하는 구조유전자의 염기서열로 특정하여 기재한다.

예1. 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 000 단백질.

예2. 서열번호 1의 유전자 서열에 의해 코딩되는 000 단백질. (중략)

③ 단백질을 서열로 특정하여 기재할 수 없을 때에는 단백질의 기능, 물리화학적 성질, 기원 (또는 유래) 및 제법을 모두 기재하여 특정해야 한다. 단, 물리화학적 성질은 측정방법이 병기된 분자량, 최적활성조건, 등전점, 안정성 등을 기재하여야 한다. 이 경우 단백질을키('단백질을'의 오기로 보인다) 서열로 특정할 수 없는 사유가 타당한 것이어야 한다.

에 관한 한정 기재가 있기는 하다. 그러나 ① 특허청 생명공학분야 특허심사기준에 따르면 단백질은 서열로 특정할 수 없는 경우에 한하여 그 제조방법, 기능 또는 물리화학적 성질 등을 청구범위에 기재할 수 있는데, 이 사건 특허발명의 활성성분은 서열번호 4의 아미노산 서열에 의해 명확히 파악되는 단백질인 점, ② 위 제조방법에 관한 한정에는 특허심판원 2025정66 정정심판을 통해서 부가되었는데, 특허심판원은 정정 전후의 단백질이 동일하다고 판단한 점¹⁶⁾ 등을 고려할 때, 위와 같은 한정 기재로 인하여 활성성분 단백질이 달라진다고 볼 수 없다.

다) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 활성성분에 관하여 다음과 같이 기재하고 있다.

갑 제2호증

[0007] 제1 양태에서, VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액체 안약 제형이 제공되며, 제1 VEGF 수용체의 면역 글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 제2 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3으로 필수적으로 구성되는 수용체 성분과 다합체 성분(또한 “VEGF 트랩”으로 언급됨)을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 특정 구체예에서, 제1 VEGF 수용체는 Flt1이고, 제2 VEGF 수용체는 Flt1 또는 Flt4이다. 더 이상의 구체예에서, 융합 단백질은 각각 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 가진다. 바람직하게는, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:4의 2개의 융합 단백질을 포함하는 2합체이다.

[0051] VEGF 길항제는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 생물학적 작용을 차단 또는 억제할 수 있는 화합물이며, VEGF를 포획할 수 있는 융합 단백질을 포함한다. 바람직한 구체예에서, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:2 또는 4; 더 바람직하게는 SEQ ID NO:4의 융합 단백질이다. 특정 구체예에서, VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다. 특정 구체예에서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 251⁷⁾-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다. 바람직하게는, VEGF 길항제 SEQ ID

16) "정정 후 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'는 공지된 제조방법에서 '포유동물 셀라인'을 사용하고 있는 것을 한정하고 있을 뿐이므로, 정정 전 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'는 정정 후 '포유동물 셀라인에서 제조된 것'으로 한정된 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'와 동일한 아미노산 서열을 가지고 있는 동일한 물질(단백질)로 보는 것이 타당하다."(을 제93호증 13면 밑에서 1행-14면 5행).

NQ:4의 2개의 융합 단백질로 구성되는 2합체이다.

즉, 이 사건 특허발명의 발명의 설명에도 'VEGF-특이적 융합 단백질 길항제'의 구체예로 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열'이 기재되어 있다. 따라서 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'를 포함하는 이 사건 특허발명의 청구범위 기재가 발명의 설명의 기재에 비추어 볼 때 명백한 오기라고 할 수도 없다.

라) 이 사건 특허발명의 발명의 설명은 '여기 사용된 용어는 특정 구체예를 기술하기 위한 목적일 뿐이며, 제한을 의도하지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부한 청구범위에 의해서만 제한될 것임을 이해하여야 한다.'(식별번호 [0040])라고 전제하고 있고, VEGF 길항제 단백질을 '바람직한 구체예', '더 바람직한 구체예', '특정 구체예' 등으로 세분화하면서 'SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질'을 '특정 구체예'로서 언급하고 있다(식별번호 [0051] 참조). 위와 같은 기재내용을 볼 때, 이 사건 특허발명의 활성성분을 청구범위의 문언과 달리 'SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질'로 한정할 수 없다.

갑 제2호증

[0040] 본 발명은 구체적인 방법, 기술된 실험 조건들에 제한되지 않으며, 방법과 조건 자체는 다양할 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 여기 사용된 용어는 특정 구체예를 기술하기 위한 목적일 뿐이며, 제한을 의도하지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부한 청구범위에 의해서만 제한될 것임을 이해하여야 한다.

[0051] VEGF 길항제는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 생물학적 작용을 차단 또는 억제할 수 있는 화합물이며, VEGF를 포획할 수 있는 융합 단백질을 포함한다. 바람직한 구체예에서, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:2 또는 4; 더 바람직하게는 SEQ ID NO:4의 융합 단백질이다. 특정 구체예에서, VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있

17) 피고는 '27'의 오기라고 주장하고 있다. 이에 대하여 원고도 특별히 다투지 않으므로, 이하에서는 '27'로 기재한다.

다. 특정 구체예에서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 25¹⁸⁾-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다. 바람직하게는, VEGF 길항제 SEQ ID NQ:4의 2개의 융합 단백질로 구성되는 2합체이다.

3) 피고의 주장에 대한 판단

가) 피고는, 이 사건 특허발명의 발명의 설명 등을 참작하면 'SEQ ID NO:4의 VEGF 길항제'는 '신호서열'과 '클리핑 현상'에 의해 '서열번호 4의 1-26 아미노산 서열'과 '458번 아미노산 서열'이 제거된 서열번호 4의 27-457 아미노산을 포함하는 단백질 '로 해석되어야 한다고 주장한다.

그러나 앞서 본 바와 같이, 이 사건 특허발명의 청구범위는 활성성분인 단백질의 아미노산 서열이 명확하게 이해될 수 있게 기재되어 있어 문언 그대로 해석되어야 한다. 설령, 이 사건 특허발명의 발명의 설명 기재 등을 보더라도, 아래와 같은 이유에서 피고의 주장은 받아들일 수 없다.

갑 제2호증

[0001] 본 발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 억제할 수 있는 약제를 포함하는 유리체내 투여에 적당한 약학 제형 및 이러한 제형을 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 증가된 안정성을 가지는 액체 약학 제형들 및 유리체내 투여를 위해 동결건조되고 복원될 수 있는 제형들을 포함한다.

[0002] 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 발현은 인간 암에서 거의 편재하며, 종양 신혈관신생의 중요한 매개자로서 그것의 역할과 일관된다. 분자 또는 그것의 VEGFR-2 수용체에 결합함으로써 VEGF 기능의 차단은 다양한 다른 이종이식 모델에서 이식된 종양 세포의 성장을 억제한다(예를 들어, Gerber et al. (2000) Cancer Res. 60:6253-6258 참조). “VEGF 트랩”으로 칭해지는 가용성 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제가 기술되었다(Kim et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11399-404; Holash et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11393-8).

[0006] VEGF¹⁹⁾-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 제형이 제공된다. 약학적으로 허용가능한

18) 피고는 '27'의 오기라고 주장하고 있다. 이에 대하여 원고도 특별히 다투지 않으므로, 이하에서는 '27'로 기재한다.

담체와 함께 VEGF “트랩” 길항제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 제형이 제공된다. (중략)

[0007] 제1 양태에서, VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액체 안약 제형이 제공되며, 제1 VEGF 수용체의 면역 글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 제2 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3으로 필수적으로 구성되는 수용체 성분과 다합체 성분(또한 “VEGF 트랩”으로 언급됨)을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 특정 구체예에서, 제1 VEGF 수용체는 Flt1이고, 제2 VEGF 수용체는 Flt1 또는 Flt4이다. 더 이상의 구체예에서, 융합 단백질은 각각 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 가진다. 바람직하게는, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:4의 2개의 융합 단백질을 포함하는 2합체이다.

[0051] VEGF 길항제는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 생물학적 작용을 차단 또는 억제할 수 있는 화합물이며, VEGF를 포획할 수 있는 융합 단백질을 포함한다. 바람직한 구체예에서, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:2 또는 4; 더 바람직하게는 SEQ ID NO:4의 융합 단백질이다. 특정 구체예에서, VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다. 특정 구체예에서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다. 바람직하게는, VEGF 길항제 SEQ ID NQ:4의 2개의 융합 단백질로 구성되는 2합체이다.

[0052] 본 발명의 방법 및 제형의 VEGF 길항제는 당업계에서 공지된 또는 공지될 어떤 적당한 방법으로 제조될 수 있다. VEGF 길항제는 약학적으로 허용가능한 제형을 제조하기 위해 사용되는 시점에서 바람직하게는 단백질 오염물질이 실질적으로 없다. (후략)

(1) 위 발명의 설명 기재내용을 볼 때, 통상의 기술자는 이 사건 특허발명이 유리체내 투여에 적당한 VEGF 트랩 길항제의 안정한 약학 제형을 제공하려는 발명으로서(식별번호 [0002] 참조), 그 약학 제형에 포함되는 VEGF 트랩 길항제가 '제1 VEGF 수용체의 면역 글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 제2 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3으로 구성되는 수용체 성분과 다합체 성분'이 융합된 단백질이고, 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 VEGF 길항제가 그에 해당하는 단백질 중 하나임을 명확히 이해할 수 있다 (식별번호 [0007], [0051] 참조).

(2) 앞서 본 바와 같이, 단백질에 관한 발명은 원칙적으로 그 단백질이 가지는

19) 'VEGF'의 오기로 보인다.

아미노산 서열 또는 그 단백질을 암호화하는 유전자 서열로 특정하여야 하는데(갑 제 105호증 참조), 이 사건 특허발명은 발명의 설명 전반에 걸쳐 VEGF 길항제 단백질을 그 단백질이 가지는 아미노산 서열 자체로 특정하고 있고, 그 단백질을 암호화하는 유전자 서열로 특정하고 있지는 않다. 따라서 통상의 기술자라면 이 사건 특허발명을 특정된 아미노산 서열을 그대로 가진 단백질의 제형 설계에 관한 발명으로 이해할 것이다.

(3) 더욱이 이 사건 특허발명의 명세서 어디에도 'VEGF 길항제 단백질을 특정하는 아미노산 서열이 신호서열을 포함하고 있다'고 기재되어 있지 않고, 달리 통상의 기술자가 '신호서열'의 존재를 직접적으로 인식할 수 있을 만한 기재도 없다.

(4) 피고는, 발명의 설명 식별번호 [0051]의 기재, 즉 '특정 구체예에서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함한다.', '특정 구체예에서, VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다.'는 내용을 고려하면, 이 사건 특허발명의 활성성분이 '서열번호 4의 27-457 아미노산을 포함하는 단백질'로 해석된다고 주장한다. 그러나 아래와 같은 사정에 비추어 보면, 피고의 위 주장은 이 사건 특허발명의 청구범위를 합리적 이유 없이 특정 구체예로 제한하여 해석하는 것이어서 받아들일 수 없다.

(가) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에 '특정 구체예로서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다.'(식별번호 [0051] 참조)고 기재되어 있기는 하다. 그러나 위 [0051]은 전체적으로 볼 때, VEGF 길항제의 구성을 아미노산 서열, 제법, 다량체 특성 측면에서 다각적으로 설명하고 있는 문단으로, 통상의 기술자라면 특정 구체예로서 언급된 '서열번

호 4의 27-457 아미노산의 VEGF 길항제'를 '서열번호 4의 VEGF 길항제'와 구별되는 활성성분으로 이해할 것이다.

(나) 피고가 언급한 식별번호 [0051]의 위 두 문장은 '특정 구체예에서, VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다. 특정 구체예에서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다.'로 서로 다른 특정 구체예로써 병렬적으로 기재되어 있다. 즉, '포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형된 단백질로서 서열번호 4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질'이라고 기재되어 있지 않다.

(다) 다만, 포유동물 셀라인에서 단백질을 발현시키는 경우 번역 후 변형 과정이 단백질의 성숙에 관여하는 주요 단계이고, 그 과정에서 단백질 분비를 위해 신호서열이 제거되는 것이 일반적이어서, 연이어 기재된 위 두 문장에 의해 서열번호 4의 아미노산 서열 중 N-말단의 1-26번 위치가 신호서열임을 암시하고 있는 것으로 볼 여지는 있다. 그러나 ① 바로 그 다음의 식별번호 [0052]에 '본 발명의 방법 및 제형의 VEGF 길항제는 당업계에서 공지된 또는 공지될 어떤 적당한 방법으로 제조될 수 있다.'라고 기재되어 있는 점, ② 갑 제87호증의 기재, 증인 로렌츠 메이넬의 증언 및 변론 전체의 취지에 따르면, 신호서열을 제거하는 효소(신호 펩티다아제)를 제거하거나 그 효소의 기능을 억제하는 방법, 신호서열 앞에 다른 신호서열을 붙여서 합성하는 방법 등을 통하여 포유동물 셀라인에서 서열번호 4의 1-458 아미노산 서열을 가진 단백질의 생산이 완전히 불가능하지는 않은 점 등을 고려할 때, 발명의 설명 식별번호 [0051]의 해당 기재를 '포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형된 단백질로서 서열번호 4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질'로 제한 해석할 수 없다.

(라) '서열번호 4의 아미노산을 포함하는 단백질'과 '서열번호 4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질'은 아미노산 1-26의 서열 존부뿐만 아니라 아미노산 458의 존부에 있어서도 다르다. 이러한 차이에 대하여, 피고는 발명의 설명 식별번호 [0051]의 특정 구체예에 기초하여, 서열번호 4의 아미노산 458의 부재는 포유동물 셀라인에서 단백질을 생산할 때 나타나는 클리핑(clipping) 현상으로 설명될 수 있으므로 이 사건 특허발명의 청구범위는 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 펩타이드 사슬에서 458번 아미노산(라이신)이 제거된 형태로 해석하여야 한다고 주장한다.

그러나 앞서 본 '신호서열'과 마찬가지로, 이 사건 특허발명의 명세서에는 C-말단 위치의 클리핑 현상에 대하여 직접적으로 언급되어 있지 않다. 식별번호 [0051]의 '아미노산 27-457을 포함하는 단백질'을 클리핑 현상의 결과물로 볼 여지는 있으나, 이러한 기재내용도 '특정 구체예'에 불과하므로, 이를 근거로 청구범위의 아미노산 서열을 제한하여 해석할 수 없다.

오히려 발명의 설명 식별번호 [0043]에는 아래와 같이, '펩티드 백본의 클리핑'²⁰⁾을 단백질의 화학적 불안정성 요인으로 기재되어 있다. 즉, 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 단백질과 서열번호 4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질은 단백질 제형 설계 시 중요하게 고려하여야 할 안정성에서 차이가 나는 등 화학적 특성이 서로 다르다. 이 사건 특허발명의 명세서를 접하는 통상의 기술자는 아미노산 458 위치를 보유한 단백질과 그 위치가 탈락된 457번까지만 존재하는 단백질 사이에 체계학적 특성이 상이하여 서로 다른 제형 설계가 필요하다고 인식할 것이므로, 서열번호 4의 아미노산 458이 당연히 부재한 것으로 해석하는 것은 기술적 관점에서도 타당하지 않다.

20) 'peptide'를 '펩타이드', '펩티드'로, 'clipping'을 '클리핑', '클리핑'으로 혼용하여 표기하고 있다.

갑 제2호증

[0043] 단백질을 포함하는 제형의 안전한 취급 및 투여는 약학 처방인에게 상당한 도전을 나타낸다. 단백질은 안정성 문제를 나타내는 독특한 화학 및 물리적 특성을 소유한다: 다양한 분해 경로가 단백질들에 대해 존재하며, 화학적 및 물리적 불안정성이 모두 관련된다. 화학적 불안정성은 탈아미노화, 응집, 펩티드 백본의 클리핑, 및 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 물리적 불안정성은 예를 들어, 응집 및/또는 침전을 포함하는 많은 현상을 포함한다.

(마) 게다가, 식별번호 [0051]의 위 기재에 근거한 피고 청구범위 해석은, 포유동물 셀라인에서의 단백질 발현에 의해 성숙한 형태를 얻는 과정에서 특정 '아미노산의 서열 제거'라는 특성만을 고려하고 같은 문장 내의 'Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다.'는 특성은 반영하지 않은 것이어서 불합리하다. 신호서열의 제거 못지않게 글리코실화는 포유동물 셀라인에서 나타나는 번역 후 변형의 대표적인 현상에 해당한다. 따라서 피고 주장처럼, 포유동물 셀라인에서 생산된 단백질이어서 성숙한 형태의 단백질로 해석되어야 한다면 적어도 같은 문장으로 기재된 '번역 후 변형' 관련 기술 특징을 모두 반영하는 것이 자연스럽다. 피고의 주장은 그중 일부만을 취사하여 청구범위를 해석하겠다는 것이어서 받아들일 수 없다.

나) 또한 피고는, 이 사건 특허발명은 '제형' 발명이므로 임상적으로 실제 의도하는 약리효과를 달성할 수 있는 **성숙한 형태의 공지 단백질**이 활성성분으로 포함된 것으로 해석해야 한다는 취지로 주장한다.

그러나 갑 제2, 8호증, 을 제18호증의 각 기재 및 변론 전체의 취지를 종합하여 알 수 있는 아래와 같은 사정을 종합하여 볼 때, 피고의 위 주장 역시 받아들일 수 없다.

(1) 이 사건 특허발명은 '제형' 발명이고, 이 사건 특허발명의 발명의 설명에

'VEGF 트랩 길항제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 제형을 제공한다.'(식별번호 [0006])라고 기재되어 있기는 하다. 그러나 이러한 사정만으로 이 사건 특허발명의 활성성분이 임상적으로 실제 약효를 나타내는 '공지의 단백질'임을 의미한다고 보기는 어렵다.

의약분야에서 약리작용을 가져 의약으로 작용할 수 있는 물질을 약물(활성성분)이라 하는데, 이러한 약물이 그 자체로 사용되는 경우는 극히 드물다. 즉, 약물은 사용목적에 따라 여러 형태로 가공되어 의약품으로 공급하는 것이 일반적이고, 그 약물을 표적 기관에 전달하기 위해 제제화한 의약품의 형태를 '제형'이라 한다. 제형 발명은 특정 약리활성을 나타내는 약물에 그 약물의 전달 효율을 증가시키기 위한 첨가제 성분의 조합에 의해 투여 경로에 적합한 물리적 형태를 가진 발명인 경우가 대다수이다. 이러한 이유로, 제형 발명은 공지 물질을 투여에 적합하도록 제제학적 성질을 개선한 발명이 많기는 하다. 그렇다고 하여 '약학 제형' 또는 '약학 조성물' 발명이 반드시 공지 물질에 관한 것이어야 하는 것은 아니다. 신규 물질을 공개하거나 의약용도를 제공하려는 특허출원의 청구범위에 제형 발명도 얼마든지 포함될 수 있다.

또한 이제까지 개발되지 않은 신규한 물리적 투여 형태나 약물 전달 시스템 그 자체를 제공하는 제형 발명도 있다. 이 경우에는 약물을 구체적으로 특정하지 않고도 물리적 전달 형태 그 자체로서의 기술적 사상을 보호받을 수 있다. 따라서 제형 발명의 활성성분은 공지의 물질이어야 한다는 피고의 주장은 타당하지 않다.

(2) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에 기재된 '약학적으로 허용가능한'의 의미는, 인체에 안전하게 투여될 수 있어야 한다는 것이지, 이 사건 특허발명이 의도하는 약효가 실제로 달성되어야 하는 것을 뜻하지 않는다. 특허출원된 명세서에 활성성분으

로 기재된 약물이 실제로 목적하는 효과를 나타내는지는 의약품 규제기관에 의해 품목 허가를 받은 이후에야 확인할 수 있다. 피고가 이 사건 특허발명의 활성성분이라고 주장하는 '애플리버셉트'는 2011. 11. 미국 FDA의 승인을 받았고(을 제18호증), 국내에서는 2013. 3. 20. 수입품목허가를 받았는데(갑 제8호증), 이 사건 특허발명은 2007. 12. 27. 국제공개되었다(갑 제2호증). 따라서 제3자가 이 사건 특허발명의 명세서 공개 시점에 이 사건 특허발명의 활성성분이 실제로 목적하는 효과를 달성할 수 있는지를 판단하는 것이 현실적으로 가능하지도 않다.

설령, 피고가 언급한 'VEGF 길항제로서 작동 가능한'이 임상적인 사용 가능성을 의미하는 것이 아니라 'VEGF에 결합'하여 목적하는 길항 효과를 나타내는 것을 의미하는 것으로 보더라도, '서열번호 4의 아미노산을 포함하는 VEGF 길항제' 단백질이 VEGF에 결합하지 못한다고 볼 만한 증거 또한 없다.

(3) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 청구범위의 '서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 단백질'이 'VEGF 트랩 길항제'로 기능한다고 명시되어 있으므로, 통상의 기술자는 서열번호 4의 단백질을 VEGF 길항제 활성을 나타내는 약물로 인식할 것이라고 봄이 합리적이다.

(4) 즉, 피고의 위 주장은 약학 제형 발명인 이 사건 특허발명의 청구범위와 발명의 설명에 서열번호 4의 단백질이 VEGF 길항제인 것으로 명백하게 기재되어 있음에도 불구하고, 이 사건 특허발명이 목적하는 효과를 실제로 나타내는지를 따져 그 활성성분을 확정하여야 한다는 것이어서 받아들일 수 없다.

다) 피고는, 이 사건 정정발명의 우선일 이전에 '애플리버셉트' 물질특허(을 제9호증)가 이미 공개된 상태였고 그 물질특허에 서열번호 4의 아미노산 1-26이 신호서열에

해당한다고 명시되어 있을 뿐만 아니라, 이 사건 정정발명에 인용된 문헌(갑 제61호증)에도 같은 취지의 기재가 있는 점을 고려할 때, 당시 기술수준을 참작하면 통상의 기술자는 이 사건 정정발명의 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 단백질이 서열번호 4의 아미노산 27-457의 아미노산을 포함하는 단백질과 제제학적으로 동일한 단백질에 해당하는 것으로 분명하게 인식할 수 있다고도 주장한다.

그러나 앞서 본 바와 같이, 이 사건 특허발명의 청구범위는 문언적으로 명확하고, 발명을 반드시 기술적으로 가장 바람직한 실시 형태로 이해해야 하는 것도 아니므로, 이 사건 특허발명의 청구범위 해석을 위하여 피고 주장과 같은 별도의 자료를 참작할 필요성이 없다.

설령 피고 주장과 같이 물질특허에 관한 자료를 참작할 수 있다고 하더라도, 갑 제2, 61, 93, 100, 101, 102, 108, 109, 212호증, 을 제9호증의 각 기재, 증인 로렌츠 메이넬의 증언 및 변론 전체의 취지에 따라 알 수 있는 아래의 사정을 종합하여 보면, 이 사건 특허발명의 단백질을 서열번호 4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질이라고 볼 수 없으므로, 피고의 주장은 어느 모로 보나 받아들일 수 없다.

(1) 피고가 물질발명으로 제시한 을 제9호증에서 VEGF 길항제 단백질의 물리·화학적 특성에 대한 서술은 찾아볼 수 없고, 더욱이 을 제9호증의 기재를 참작하더라도, 이 사건 특허발명의 청구범위의 '서열번호 4의 단백질'이 일의적으로 '서열번호 4의 아미노산 27-457을 포함하는 단백질'로 해석된다고 볼 수 없다. 그 이유는 다음과 같다.

(가) 을 제9호증은 '개선된 약물동태학적 성질을 가지는 변형된 키메라 폴리펩티드²¹⁾'라는 명칭의 발명으로, 구체적으로 '개선된 약물동태를 가지는 Flt1 수용체 폴

리펩티드'에 관한 것이다.

을 제9호증

[7면] 기술분야

본 발명의 기술분야는 개선된 약물동태를 가지는 변형된 폴리펩티드이다. (중략)

[9면] (발명의 개요)

본 발명은 개선된 약물동태학적 성질을 가지는 VEGF 안타고니스트에 관한 것이다.

바람직한 구체예에는 (a) 다량체와 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 (b) 작동가능하게 연결된 VEGF 수용체 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 VEGF 폴리펩티드에 결합할 수 있는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 분리된 핵산 분자이고, 여기에서, VEGF 수용체 성분은 단지 융합 폴리펩티드의 VEGF 수용체 성분이고, 뉴클레오티드 서열은 필수적으로 (a) 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 3의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성된다.

더 이상의 구체예에서, 제1의 VEGF 수용체의 분리된 핵산은 Flt1이다.

더 이상의 구체예에서, 제2의 VEGF 수용체의 분리된 핵산은 Flk1이다.

더 이상의 구체예에서, 제2의 VEGF 수용체의 분리된 핵산은 Flt4이다.

다른 바람직한 구체예에서, 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 3를²²⁾ 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 업스트림이다. (중략)

[12면] 그러므로, 본 발명에 따라서, 본원에 개시된 키메라 폴리펩티드 분자-코딩 핵산을 포함하는 박테리아 또는 진핵생물 숙주에서 복제할 수 있는 발현 벡터는 숙주를 트랜스펙션시키기 위해 사용되고, 이에 의해서 키메라 폴리펩티드 분자를 생산하기 위한 이러한 핵산의 발현을 지시하고, 그 다음 생물학적 활성 형태로 수집될 수 있다. 본원에 사용될 때, 생물학적 활성 형태는 VEGF에 결합할 수 있는 형태를 포함한다.

[17면] 돌연변이체의 제조

(전략) 본 출원의 도 10A-10D에 제시된 핵산 및 아미노산 서열과 관련하여, 서열의 개시에 위치한 분비를 위한 신호서열을 확인하고, 뉴클레오티드 76-78에 의해 코딩된 글리신으로 확장하는 것이 가능할 수 있다. 성숙한 단백질은 핵산 서열의 뉴클레오티드 79에서 시작하여, Ser-Lys-Leu-Lys으로 시작한다. (중략)

[22면] 실시예 20: pVEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 발현 벡터의 제조

21) '폴리펩타이드'와 마찬가지로 'polypeptide'를 의미한다.

pVEGFR1R2.Fc△C1(a) 발현 플라스미드를 도21A-21C(GG)의 Flt1d2-Flk1d3-Fc△C1(a) 아미노산 26 및 27 사이의 아미노산 SDT(도24A-24C 의 아미노산 27-29 에 해당)를 코딩하는 DNA 삽입 및 도의 아미노산 229-231 에 해당하는 아미노산 GPG 를 코딩하는 DNA 의 제거로 제조했다. (중략) GPG(브리지 서열)는 제거되어서 Flt1 및 Flk1 Ig 도메인을 서로 직접 융합시켰다. pVEGFR1R2.Fc△C1 의 완전한 DNA 및 추정된 아미노산 서열은 도24A-24C 에 제시된다.

[30면] 도 24A-24C. VEGFR1R2-Fc△C1(a)로 명명된 변형된 Flt1 수용체의 뉴클레오타이드 및 추정된 아미노산 서열.

도면24A

10	20	30	40	50	60
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GGG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC	TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACC CCG GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG	M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L L	1	5	20
70	80	90	100	110	120
ACA GGA TCT AGT TCC GGA AGT GAT ACC GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC	TGT CCT AGA TCA AGG CCT TCA CTA TGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG	T G S S S G	21_hFLT1	신호서열_26>	
130	140	150	160	170	180
CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC GGG GTT AGG TCA	GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACC GGC CAA TGC AGT	P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S	41	45	60
190	200	210	220	230	240
CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA	GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT	P N I T V T L K K F P L D T L I P D G I	61	65	80
250	260	270	280	290	300
CCC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA	GGG TAT TAG ACC CTG TCA ACT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT	R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I	81	85	100
310	320	330	340	350	360
GGG CTT CTG ACT TGT GAA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA	CCC GAA GAC TGG ACA CTT CTT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT	G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T	101	105	120
370	380	390	400	410	420
CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT CAT GGA ATT GAA CTA	GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GTA CCT TAA CTT GAT	H R Q T N T I I D	121	125	140
V V L S P S H G I E L					
130_hFLK1 IG 도메인 3_140>					

22) '을'의 오기로 보인다.

도면24B

430 440 450 460 470 480
TCT GTT GGA AAG CTT GTC TTA AAT TGT ACA GGA ACT GAA CTA AAT GTG GGG ATT
AGA CAA CCT CTT TTC GAA CAG AAT TTA ACA TGT CTT TCT TGA CTT GAT TTA CAC CCC TAA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G L>
141 145 hFLK1 IG 도메인3 155 160>

490 500 510 520 530 540
GAC TTC AAC TGG GAA TAC CCT TCT TCG AAG CAT CAG CAT AAG AAA CTT GTA AAC CGA GAC
CTG AAG TTG ACC CTT ATG GGA AGA AGC TTC GTA GTC GTA TTC TTT GAA CAT TTG GCT CTG
D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R D>
161 165 hFLK1 IG 도메인3 175 180>

550 560 570 580 590 600
CTA AAA ACC CAG TCT GGG AGT GAG ATG AAG AAA TTT TTG AGC ACC TTA ACT ATA GAT GGT
GAT TTT TGG GTC AGA CCC TCA CTC TAC TTC TTT AAA AAC TGG TGG AAT TGA TAT CTA CCA
L K T Q S G S E M K K F L S T L T I D G>
181 185 hFLK1 IG 도메인3 195 200>

610 620 630 640 650 660
GTA ACC CGG AAT GAC CAA GGA GTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG AAG ACC AAG
CAT TGG GGC TCA CTT GTT CCT AAC ATG TGG ACA CTT CTT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC
V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
201 205 hFLK1 IG 도메인3 215 220>

670 680 690 700 710 720
AAG AAC AGC ACA TTT GTC AGG GTC CAT GAA AAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
TTC TTG TCG TGT AAA CAG TCC CAG GTA CTT TTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG
K N S T F V R V H E K>
221 hFLK1 IG 도메인3 231>

D K T H T C P P C>
232 hFCM1 A 240>

730 740 750 760 770 780
CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
GTT CTT GGA CTT GAG CAC CCC CTT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D>
241 245 hFCM1 A 255 260>

790 800 810 820 830 840
ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TCC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
TGG GAG TAC TAG AAG GGC TGG GGA CTC CAG TGT AGC CAC CAC CAC CTG CAC TGG GTG CTT
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E>
261 265 hFCM1 A 275 280>

850 860 870 880 890 900
GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GGC AAG ACA
CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAG CTC CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K P>
281 285 hFCM1 A 295 300>

도면24C

910 920 930 940 950 960
AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CTT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG
TTC GGC GGC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L>
301 305 hFCM1 A 315 320>

970 980 990 1000 1010 1020
CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TCC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCA
GTG GTC CTC ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC AGC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P>
321 325 hFCM1 A 335 340>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CAG TTT CCG CTC GGG CTT GGT GTC CAC ATG
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y>
341 345 hFCM1 A 355 360>

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
TGG GAC GGG GGT AGG GGC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG AGG GAC CAG
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>
361 365 hFCM1 A 375 380>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
AAA GGC TTC TAT CCC ACC GAC ATC GGC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA GGC GTC GGC CTC TTG
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N>
381 385 hFCM1 A 395 400>

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC CTC TAC AGC AAG
TTG ATG TTC TGG TCG GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K>
401 405 hFCM1 A 415 420>

1270 1280 1290 1300 1310 1320
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TCC TCC GTG ATG CAT
GAG TGG CAC CTG TTC TCG ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H>
421 425 hFCM1 A 435 440>

1330 1340 1350 1360 1370
GAG GGT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TCC GTC TTC TCG GAG AGG AGA GGC CCA TTT ACT
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K K>
441 445 hFCM1 A 455 458>

을 제9호증의 명세서에는 이 사건 특허발명의 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드 사슬에 대응되는 폴리펩타이드가 도 24A-24C로 제시되어 있고, 그 중 아미노산 서열 1-26이 'hFLT1 신호서열'이라고 기재되어 있다.

그런데 ① 을 제9호증의 물질특허는 아미노산 서열로만 특정된 이 사건 특허발명의 청구범위와 달리 그 단백질을 암호화(코딩)하는 핵산 서열까지 동시에 기재하고 있으므로, 그 문언의 기술적 의미가 이 사건 특허발명과는 다르게 해석될 여지가 있는 점, ② 서열번호 4의 단백질과 Flt1 단백질은 일부 아미노산 서열이 공통되기는 하나, 전체 아미노산의 길이 및 조성이 서로 다른 점,²³⁾ ③ 단백질 생산 과정 중 신호서열 뒤에 붙는 아미노산 서열이 달라지면 다양한 신호 수용체 상호작용에 영향을 미쳐 신호서열의 기능에 영향을 줄 수 있다는 점이 이 사건 특허발명의 우선일 이전에 이미 알려져 있었던 점(갑 제90호증 참조), ④ 증인 로렌츠 메이넬은 서열번호 4의 아미노산 서열을 유니프롯(UniProt)²⁴⁾에 입력하면 신호서열을 확인할 수 있을 것이라고 증언하였으나, 실제로 Uniprot에 SEQ ID NO:4의 전체 서열을 입력하면, Flt1과 달리 서열이 100% 일치하는 단백질이 검색되지 않아 아미노산 1-26이 신호서열인지 알 수 없는 점(갑 제212호증 참조), ⑤ 설명 아미노산 1-26을 신호서열로 보더라도, 앞서 본 바와 같이 그 서열이 제거되지 않은 단백질 생산도 가능하다는 점 등을 종합하여 보면, 통상의 기술자가 이 사건 특허발명의 우선일 당시 이 사건 특허발명의 서열번호 4의 단백질에서 아미노산 1-26이 신호서열로 작동하여 최종적으로 제거되는 것으로 인

23) 서열번호 4는 458개 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이고(갑 제2호증 참조), Flt1은 1338개 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이다(갑 제197호증 참조).

24) 유니프롯(UniProt)은 자유롭게 접근할 수 있는 단백질 서열 및 기능 정보 데이터베이스로, Swiss-Prot, TrEMBL 및 PIR-PSD 데이터베이스를 결합하여 생성된 단백질 데이터의 중앙 저장소인 Universal Protein resource이다(위키백과 참조).

식하였을 것이라고 단정할 수 없다.

(나) 또한 피고가 제시한 을 제9호증의 도 24A-24C을 보면, 단백질의 C-말단 부분에 458번 아미노산을 그대로 표시하고 있어, 458번 아미노산이 배제된다는 피고의 주장과 상충된다. 을 제9호증의 명세서에는 이에 관한 어떠한 설명도 없다.

이에 대하여 피고는, C-말단 Lys 잔기의 절단 현상은 해당 기술분야에서 널리 알려져 있어 그 서열의 유무에 따라 다른 단백질로 취급되지 않는다는 취지로 주장하나, 갑 제100, 101, 102, 108의 각 기재, 증인 로렌츠 메이넬의 증언 및 변론 전체의 취지에 따르면, C-말단 Lys의 절단은 단백질 생산 환경 내에 존재하는 효소에 의해 의도치 않게 발생하는 현상이기는 하나, 단백질의 전하 이질성, 용해성, 응집성 등에 영향을 미치는 인자인 사실이 인정되므로, C-말단에 458번 아미노산이 있는 단백질을 그렇지 않은 단백질과 같게 볼 수 없다.

(2) 갑 제2, 61호증의 각 기재에 따르면, 이 사건 특허발명의 발명의 설명(식별번호 [0002])에 배경기술로 'VEGF 트랩: 강력한 항암 효과를 지닌 VEGF 차단제 (VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects)'라는 제목의 문헌(갑 제61호증)이 기재되어 있는 사실이 인정된다.

그러나 ① 위 문헌의 아래와 같은 내용을 보면 VEGF-트랩은 'VEGF-Trap_{△B1}', 'VEGF-Trap_{△B2}', 'VEGF-Trap_{R1R2}' 등 여러 VEGF-Trap 변이체를 포괄하는 표현임을 알 수 있으므로, 이 사건 정정발명의 발명의 설명(식별번호 [0002])에서 언급된 'VEGF 트랩 길항제'가 하나의 특정 융합 단백질만을 가리키는 것이라고 보기 어려운 점, ② 위 문헌에는 단백질의 서열정보가 직접적으로 제시되어 있지 않을 뿐만 아니라, 신호 서열에 대하여도 별다른 언급이 없는 점 등을 종합하여 보면, 서열번호 4의 단백질이

이 사건 정정발명의 출원 당시 알려진 VEGF 트랩 길항제 중 번역 후 가공된 형태에 의해 신호서열이 제거된 서열번호 4의 27-457 아미노산을 포함하는 단백질만을 의미한다고 보기는 어렵다.

갑 제61호증²⁵⁾

재료 및 방법

VEGF-Trap 유전공학.

모체 VEGF-트랩은 VEGFR₁의 처음 3개의 Ig 도메인을 인간 IgG1의 불변 영역 (Fc)에 융합시킴으로써 생성되었다. VEGF-Trap_{△B1}은 모체 VEGF-Trap의 제3 Ig 도메인으로부터 고도로 염기성인 10-aa 스트레치를 제거함으로써 생성되었다. VEGF-Trap_{△B2}는 VEGF-Trap_{△B1}로부터 전체 제1 Ig 도메인을 제거함으로써 생성되었다. VEGF-Trap_{R1R2}는 VEGFR1의 제2 Ig 도메인을 VEGFR2의 제3 Ig 도메인과 융합시켜 생성하였다. 모든 VEGF-Trap 변이체는 중국 햄스터 난소(CHO, Chinese Hamster Ovary) 세포에서 생산되고 정제되었다.

4) 소결

이 사건 특허발명의 청구범위는 문언상 '서열번호 4의 아미노산을 포함하는 VEGF 길항제'로 명확하게 특정되고, 선행 발명의 설명 및 우선일 당시의 기술수준을 고려하더라도 이와 다른 아미노산의 구성으로 볼 이유가 없으므로, 이 사건 특허발명의 청구항 제1, 5항의 활성성분은 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 VEGF 길항제 단백질로 해석된다.

나. 발명의 설명 기재요건 충족 여부

1) 관련 법리

특허법 제42조 제3항 제1호는 발명의 설명은 통상의 기술자가 그 발명을 쉽게 실시할 수 있도록 명확하고 상세하게 적어야 한다고 규정하고 있다. 이는 특허출원된 발명의 내용을 제3자가 명세서만으로 쉽게 알 수 있도록 공개하여 특허권으로 보호받

25) Holash et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11393-8.

고자 하는 기술적 내용과 범위를 명확하게 하기 위한 것이다. 위 조항에서 요구하는 명세서 기재의 정도는 통상의 기술자가 출원 시의 기술수준으로 보아 과도한 실험이나 특수한 지식을 부가하지 않고서도 명세서의 기재에 의하여 당해 발명을 정확하게 이해할 수 있고 동시에 재현할 수 있는 정도를 말한다(대법원 2024. 1. 11. 선고 2020후 10292 판결 등 참조).

한편, 일반적으로 기계장치 등에 관한 발명에 있어서는 특허출원의 명세서에 실시예가 기재되지 않더라도 통상의 기술자가 발명의 구성으로부터 그 작용과 효과를 명확하게 이해하고 용이하게 재현할 수 있는 경우가 많으나, 이와는 달리 이른바 실험의 과학이라고 하는 화학발명의 경우에는 당해 발명의 내용과 기술수준에 따라 차이가 있을 수는 있지만 예측가능성 내지 실현가능성이 현저히 부족하여 실험데이터가 제시된 실험예가 기재되지 않으면 통상의 기술자가 그 발명의 효과를 명확하게 이해하고 용이하게 재현할 수 있다고 보기 어려워 완성된 발명으로 보기 어려운 경우가 많다(대법원 2001. 11. 30. 선고 2001후65 판결 등 참조).

2) 구체적 판단

이 사건 특허발명은 'SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제의 유리체내 투여를 위한 안약 제형'에 관한 발명으로, SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 길항제 단백질에 공용매, 등장제, 완충제, 안정화제 등 여러 첨가제를 조합함으로써 만들어진。

갑 제2, 41, 108, 155호증, 을 제 8, 10, 85호증의 각 기재, 증인 로렌츠 메이넬의 증언에 변론 전체의 취지를 더하여 알 수 있는 아래와 같은 사정을 종합하여 보면, 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 이 사건 특허발명의 활성성분인 'SEQ ID NO:4의

VEGF 길항제'를 생산하는 방법이나, 위 활성성분에 첨가제 등을 조합하여 안정한 제형을 제공하기 위한 방법이 구체적으로 기재되어 있지 아니하여, 통상의 기술자가 이 사건 특허발명을 정확하게 이해할 수 있고 동시에 재현할 수 있는 정도로 기재되어 있지 아니하다. 따라서 이 사건 특허발명의 발명의 설명은 통상의 기술자가 그 발명을 쉽게 실시할 수 있도록 명확하고 상세하게 적혀있다고 할 수 없으므로, 이 사건 특허발명은 특허법 제42조 제3항 제1호에 위배된다.

가) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 'VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다.'(식별번호 [0051]), '본 발명의 방법 및 제형의 VEGF 길항제는 당업계에서 공지된 또는 공지될 어떤 적당한 방법으로 제조될 수 있다.'(식별번호 [0052])라고 기재되어 있다.

그런데 피고는 이 사건 소송에서, 포유동물에서 유전자 재조합을 통해 단백질을 생산하면 '신호서열'은 단백질이 소포체로 이동하는 과정에서 신호서열 펩티다아제에 의해 분해된다고 일관되게 주장하여 왔다. 을 8, 10, 85호증의 각 기재, 증인 로렌츠 메이넬의 증언에 따르면, 포유동물 세포주에서 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 생산하는 것은 현실적으로 불가능하거나 극히 어렵다고 인정된다.²⁶⁾

위와 같은 발명의 설명 기재내용 및 기술수준 등을 고려할 때, 통상의 기술자가 과도한 실험이나 특수한 지식을 부가하지 않고서도 발명의 설명에 기재된 사항에 의하여 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 생산할 수 있다고 보기는 어렵다.

나) 이 사건 특허발명의 발명의 설명에는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 단백질의 안정성을 기하기 위하여 여러 첨가제를 조합하여 제조하는 방법이 실시예를 통

26) 증인 로렌츠 메이넬은 이것이 완전히 불가능하지는 않지만 상당히 이례적이어서 의약적으로 제형화하기 위해 필요한 양만큼 얻는 것은 매우 어렵다는 취지로 증언하였다(녹취서 17, 25면 참조).

해 구체적으로 제시되어 있다. 그러나 을 제10호증의 기재 및 변론 전체의 취지에 따르면, 이러한 실시예는 모두 'SEQ ID NO:4의 27-457번 아미노산 서열을 포함하는 VEGF 길항제'를 사용하여 얻은 실험데이터를 기재한 것으로 인정된다.²⁷⁾ 즉, 이 사건 특허발명의 발명의 설명에 제시된 실험데이터는 모두 '서열번호 4의 아미노산 27-457을 갖는 단백질을 구성요소로 포함하는 애플리버셉트'에 관한 것이다.

그런데 앞서 본 바와 같이, 단백질을 구성하는 아미노산의 서열이 다르면 그 단백질의 물리·화학적 특성이 같다고 볼 수 없고, 갑 제41, 108, 155호증의 각 기재, 증인 로렌츠 메이넬의 증언 및 변론 전체의 취지에 따르더라도, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 서열번호 4의 아미노산 27-457을 갖는 단백질은 소수성, 전하 이질성, 용해도, 응집성 등에 있어서 서로 다른 특성을 보임을 알 수 있다. 따라서 '서열번호 4의 아미노산 27-457을 갖는 단백질을 구성요소로 포함하는 애플리버셉트'의 안정성을 제고시킨 제형 설계를 '서열번호 4의 아미노산을 포함하는 단백질'에 적용할 경우 위와 같은 특성의 차이로 인해 저장 안정성이 동일할 것으로 기대하기 어려우므로, 위와 같은 발명의 설명 기재만으로는 통상의 기술자가 이 사건 특허발명을 통해 달성하려는 약학 제형의 안정성 효과를 명확하게 이해하고 용이하게 재현할 수 있다고 보기 어렵다.

그 밖에 이 사건 특허발명의 실시 가능성에 관한 피고의 주장은, 앞서 인정된 청

27) 을 제10호증(그레이엄 박사 진술서) 제5항에는 'KR 811에 이르는 연구를 수행하는데 있어, 리제네론의 제형 개발 그룹에 속한 저와 저의 동료들은 애플리버셉트, 즉 SEQ ID NO:4의 아미노산 27-457을 갖는 단백질만을 사용했습니다. 이 과정에서, 우리는 SEQ ID NO:4의 전체 서열, 즉 아미노산 1-457의 단백질은 연구한 적이 없습니다. 우리 연구에서는 CHO 세포를 사용하여 애플리버셉트를 얻었는데, CHO 세포는 단백질 가공 공정의 분비 과정 중 단백질의 시그널 펩티드 부분(즉, SEQ ID NO:4의 아미노산 1-26)을 절단합니다. 적어도 의약품에 대해 적절한 양으로, SEQ ID NO:4의 서열 전체를 갖는 단백질을 CHO 세포로부터 얻기는 어렵고, 저는 오늘날까지도 리제네론이나 다른 회사 혹은 연구소에서 치료적 목적으로 시그널 서열을 갖는 이러한 전체 길이 서열의 단백질을 연구한 사례를 알지 못합니다.'라고 기재되어 있다.

구범위 해석과 다른 전제에 기한 것이므로 모두 받아들일 수 없다.

다. 소결

이 사건 특허발명은 특허법 제42조 제3항 제1호의 기재요건에 위배되므로 그 등록이 무효로 되어야 한다. 따라서 원고가 주장하는 나머지 무효사유에 관하여는 나아가 살필 필요 없이, 이와 결론을 달리한 이 사건 심결은 위법하다.

4. 결론

그렇다면 이 사건 심결의 취소를 구하는 원고의 청구는 이유 있으므로 이를 인용한다.

재판장 판사 구자현

판사 김영기

판사 노지환

별지 1

이 사건 특허발명의 주요 내용

① 기술분야

[0001] 본 발명은 혈관내피성장인자(VEGF)를 억제할 수 있는 약제를 포함하는 유리체내 투여에 적당한 약학 제형 및 이러한 제형을 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 증가된 안정성을 가지는 액체 약학 제형들 및 유리체내 투여를 위해 동결건조되고 복원될 수 있는 제형들을 포함한다.

② 배경기술

[0002] 혈관내피성장인자(VEGF) 발현은 인간 암에서 거의 편재²⁸⁾하며, 종양 신혈관신생의 중요한 매개자로서 그것의 역할과 일관된다. 분자 또는 그것의 VEGFR-2 수용체에 결합함으로써 VEGF 기능의 차단은 다양한 다른 이종이식 모델에서 이식된 종양 세포의 성장을 억제한다(예를 들어, Gerber et al. (2000) Cancer Res. 60:6253-6258 참조). "VEGF 트랩"으로 칭해지는 가용성 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제가 기술되었다(Kim et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11399-404; Holash et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11393-8).

[0003] 안약 제형은, 예를 들어, 미국 특허 7,033,604 및 6,777,429에 공지되어 있다. VEGF 항체의 안약 제형은 미국특허 6,676,941에 기술되어 있다.

[0004] 동결건조(제어된 조건하에서 냉동건조)는 단백질의 장기간의 저장을 위해 흔히 사용된다. 동결건조된 단백질은 동결건조된 상태인 동안 분해, 응집, 산화 및 기타 변질 과정에 실질적으로 저항성이다(예를 들어, 미국 특허 6,436,897 참조).

③ 발명의 상세한 설명

[0005] 발명의 개요

[0006] VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 제형이 제공된다. 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 VEGF "트랩" 길항제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 제형이 제공된다. 특정 구체예에서, 액체 및 동결건조된 제형이 제공된다.

[0007] 제1 양태에서, VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액체 안약 제형이 제공되며, 제1 VEGF 수용체의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 제2 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3으로 필수적으로 구성되는 수용체 성분과 다합체 성분(또한 "VEGF 트랩"으로 언급됨)을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 특정 구체예에서, 제1

VEGF 수용체는 Flt1이고, 제2 VEGF 수용체는 Flt1 또는 Flt4이다. 더 이상의 구체예에서, **융합 단백질**은 각각 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:4의 **아미노산 서열**을 가진다. 바람직하게는, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:4의 2개의 융합 단백질을 포함하는 2합체이다.

[0008] 한 양태에서, 1-100mg/ml의 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제, 0.01-5%(w/v)의 하나 이상의 유기 공용매, 30-150mM의 하나 이상의 등장제(들), 5-40mM의 완충제 및 선택적으로 1.0-7.5%(w/v)의 안정화제, pH 약 5.8-7.0를 포함하는 **안정한 액체 안약 제형**이 제공된다.

[0009] 하나 이상의 특정 구체예에서, **유기 공용매**는 **폴리소르베이트**, 예를 들어, **폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80**, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예를 들어, PEG 3350 또는 프로필렌 글리콜, 또는 그것의 조합일 수 있고; **등장제**는, 예를 들어, **염화나트륨 또는 염화칼륨**일 수 있고; **안정화제**는 **수크로오스, 소르비톨, 글리세롤, 트레할로오스, 또는 만니톨**이고; **완충제**는 예를 들어, **인산염 완충제**일 수 있다. 특정 구체예에서, **인산염 완충제**는 **인산나트륨 완충제**이다.

[0010] 다양한 구체예에서, 유기 공용매는 폴리소르베이트 및/또는 PEG이고, 안정화제는 수크로오스이고, 완충제는 인산염 완충제이고, 등장제는 염화나트륨이다.

[0011] 더 구체적으로는, **안정한 액체 안약 제형**은 약 40-50mg/ml의 VEGF 길항제(SEQ ID NO:4), 약 10mM 인산염 완충제, 0.01-3%(w/v) 폴리소르베이트 및/또는 PEG, 40-135mM 염화나트륨 및 선택적으로 5.0%(w/v) 수크로오스, pH 약 6.2-6.3을 포함한다.

[0012] 구체적인 바람직한 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 약 50mg/ml의 VEGF 길항제(SEQ ID NO:4), 10mM 인산나트륨 완충제, 50mM 염화나트륨, 0.1%(w/v) 폴리소르베이트, 및 5%(w/v) 수크로오스, pH 약 6.2-6.3을 포함한다.

[0013] 구체적인 바람직한 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 약 50mg/ml의 VEGF 길항제(SEQ ID NO:4), 10mM 인산나트륨 완충제, 50mM 염화나트륨, 3%(w/v) PEG, 및 5%(w/v) 수크로오스, pH 약 6.2-6.3을 포함한다.

[0014] 구체적인 바람직한 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 약 40mg/ml의 VEGF 길항제(SEQ ID NO:4), 10mM 황산나트륨 완충제, 40mM 염화나트륨, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 및 5%(w/v) 수크로오스를 pH 약 6.2-6.3에서 포함한다.

[0015] 구체적인 바람직한 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 약 40mg/ml의 VEGF 길항제(SEQ ID NO:4), 10mM 인산나트륨 완충제, 135mM 염화나트륨, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 및 5%(w/v) 수크로오스, pH 약 6.2-6.3을 포함한다.

[0016] 다른 양태에서, **안정한 액체 안약 제형**이 제공되며, 이는 1-100mg/ml VEGF-특이적 융합 단백질 길항제; 0.01-5%(w/v)의 하나 이상의 유기 공용매(들); 5-40mM의 완충제; 및 선택

적으로 30-150mM의 하나 이상의 등장제(들) 및/또는 pH 약 5.8-7.0인 1.0-7.5%(w/v)의 안정화제를 포함한다.

[0022] 한 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 10mM 인산나트륨 완충제, 약 0.03 내지 약 0.1%(w/v) 폴리소르베이트 및/또는 약 3%(w/v) PEG 또는 프로필렌 글리콜, 약 40mM 염화나트륨, 및 약 5%(w/v) 수크로오스를 포함한다. 특정 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 10mM 인산나트륨 완충제, 약 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 약 40mM 염화나트륨, 및 약 5%(w/v) 수크로오스를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 제형의 pH는 약 6.2 내지 6.3이다. 다른 특정 구체예에서, pH는 산/염기 적정없이 요망되는 pH로 1- 및 2 염기성 인산나트륨을 혼합함으로써 달성된다.

[0023] 특정 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 필수적으로 40mg/ml의 VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4), 10mM 인산나트륨 완충제, 0.03%(w/v)의 폴리소르베이트, 40mM의 염화나트륨 및 5%(w/v)의 수크로오스, pH 6.2-6.3으로 구성된다.

[0024] 다른 양태에서, 약 10 내지 약 80mg/ml VEGF 길항제, 약 10 내지 약 80mg/ml VEGF 길항제, 약 10mM 인산나트륨 완충제, 약 0.03%(w/v)(w/v) 폴리소르베이트, 및 약 135mM 염화나트륨, pH 6.2 내지 6.3을 포함하는 **안정한 액체 안약 제형**이 제공된다.

[0026] 한 구체예에서, **안정한 액체 안약 제형**은 40mg/ml의 VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4), 10mM 인산나트륨 완충제, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 및 135mM 염화나트륨, pH 6.2-6.3을 포함한다. 특정 구체예에서, 안정한 액체 안약 제형은 필수적으로 40mg/ml의 VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4), 10mM 인산나트륨 완충제, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 및 135mM 염화나트륨, pH 6.2-6.3으로 구성된다.

[0027] 다른 양태에서, VEGF 길항제의 동결건조 가능한 제형이 제공되며, 동결건조 후 복원 시에, 본원에 기재된 바와 같은 **안정한 액체 안약 제형**이 획득된다.

[0028] 다른 양태에서, 혈관내피성장인자(VEGF)-특이적 용합 단백질 길항제의 **동결건조 가능한 제형**이 제공되며, 5-50mg/ml의 VEGF 길항제, 5-25mM 완충제, 예로써, 인산 완충제, 0.01 내지 0.15%(w/v)의 한 가지 이상의 유기 공용매, 예로써 폴리소르베이트, 프로필렌 글리콜 및/또는 PEG 및 선택적으로 1-10%(w/v)의 안정화제, 예로써, 수크로오스, 소르비톨, 트레할로오스, 글리세롤 또는 만니톨, pH 약 5.8-7.0을 포함한다. 다양한 구체예에서, VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4)는 약 5, 약 10, 약 20, 약 30, 또는 약 40mg/ml에서 존재한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 **동결건조 가능한 안약 제형**은 20mg/ml의 VEGF 길항제, 10mM 인산나트륨 완충제, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트, 0.1%(w/v) PEG, 및 2.5%(w/v) 수크로오스, pH 약 6.2-6.3을 포함한다. 추가 구체예에서, 동결 건조 가능한 제형은 염화나트륨을 추가로 포함한다. 특정

구체예에서, 염화나트륨은 약 20mM의 농도로 존재한다. 다른 특정 구체예에서, 염화나트륨은 약 67.5mM의 농도로 존재한다.

[0029] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 동결건조 가능한 안약 제형은 20mg/ml의 VEGF 길항제, 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트, 20mM 염화나트륨 및 2.5%(w/v) 수크로오스, pH 약 6.2-6.3을 포함한다.

[0030] 다른 구체예에서, 동결건조 가능한 안약 제형은 5mg/ml, 10mg/ml, 또는 40mg/ml VEGF 길항제, 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트, 20mM 염화나트륨 및 2.5%(w/v) 수크로오스, pH 6.2-6.3을 포함한다. 특정 구체예에서, 동결건조 가능한 안약 제형은 필수적으로 5mg/ml, 10mg/ml, 또는 40mg/ml VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4), 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트, 20mM 염화나트륨 및 2.5%(w/v) 수크로오스, pH 6.2-6.3으로 구성된다.

[0031] 다른 특정 구체예에서, 동결건조 가능한 안약 제형은 20mg/ml의 VEGF 길항제, 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트, 및 67.5mM 염화나트륨, pH 약 6.2-6.3을 포함한다. 더욱 특정한 구체예에서, 동결건조 가능한 안약 제형은 필수적으로 20mg/ml의 VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4), 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트, 및 67.5mM 염화나트륨, pH 6.2-6.3으로 구성된다.

[0032] 다른 특정 구체예에서, 동결건조 가능한 안약 제형은 5mg/ml, 10mg/ml, 또는 40mg/ml VEGF 길항제, 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트 및 67.5mM 염화나트륨, pH 약 6.2-6.3을 포함한다. 더욱 특정한 구체예에서, 동결건조 가능한 안약 제형은 필수적으로 5mg/ml, 10mg/ml, 또는 40mg/ml VEGF 길항제 (SEQ ID NO:4), 5mM 인산나트륨 완충제, 0.015%(w/v) 폴리소르베이트 및 67.5mM 염화나트륨, pH 약 6.2-6.3으로 구성된다.

[0033] 일반적으로, 복원된 제형은 예비-동결건조된 제형 농도의 약 2배이며, 예를 들어 20mg 융합 단백질/ml 예비-동결건조된 제형은 40mg 융합 단백질/ml의 최종 제형으로²⁹⁾ 복원된다.

[0034] 일반적으로, 동결건조된 제형은 주사에 적합한 멸균수로 복원된다. 한 가지 구체예에서, 복원 액체는 정균수이다.

[0035] 다른 양태에서, 본 발명은 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 동결건조된 제형을 제조하는 방법을 특징으로 하며, 동결건조된 제형을 발생시키기 위해 본 발명의 동결건조 가능한 제형을 동결건조시키³⁰⁾ 것을 포함한다. 동결건조된 제형은 액체를 동결건조시키기 위한 당 업계에 공지된 어떤 기술로도 동결건조될 수 있다.

[0036] 다른 관련된 양태에서, 본 발명은 VEGF 길항제의 복원 동결건조된 제형을 제조하는 방법을 특징으로 하며, 본 발명의 동결건조된 제형을 복원된 제형으로³¹⁾ 복원하는 것을 포함한다.

다. 한 구체예에서, 복원된 제형은, 예를 들어, 본 발명의 방법이 (a) VEGF-특이적 용합 단백질 길항제의 예비-동결건조된 제형을 제조하는 단계, (b) 단계 (a)의 예비-동결건조된 제형을 동결건조시키는 단계; 및 (c) 단계 (b)의 동결건조된 제형을 복원하는 단계를 포함한다.

[0037] 본 발명은 추가로 **미리 채워진** 시린지 또는 바이알에 제공된, 특히, 유리체내 투여에 적당한 안약 제형을 특징으로 한다.

[0039] 발명의 상세한 설명

[0040] 본 발명은 구체적인 방법, 기술된 실험 조건들에 제한되지 않으며, 방법과 조건 자체는 다양할 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 여기 사용된 용어는 특정 구체예를 기술하기 위한 목적일 뿐이며, 제한을 의도하지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부한 청구범위에 의해서만 제한 될 것임을 이해하여야 한다.

[0041] 달리 정의되어 있지 않다면, 여기 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속 하는 당업자에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 여기 기술된 것들과 유사하거나 동등한 어떤 방법 및 재료도 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법 및 재료를 이제 기술하기로 한다.

[0042] 일반적인 설명

[0043] 단백질을 포함하는 제형의 안전한 취급 및 투여는 약학 처방인에게 상당한 도전을 나 타낸다. 단백질은 안정성 문제를 나타내는 독특한 화학 및 물리적 특성을 소유한다: 다양한 분해 경로가 단백질들에 대해 존재하며, 화학적 및 물리적 불안정성이 모두 관련된다. 화학적 불안정성은 탈아미노화, 응집, 펩티드 백본의 클리핑, 및 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 물리적 불안정성은 예를 들어, 응집 및/또는 침전을 포함하는 많은 현상을 포함한다.

[0044] 화학적 및 물리적 안정성은 단백질로부터 물을 제거함으로써 증진될 수 있다.

[0045] 동결건조(제어된 조건하에서 냉동 건조)는 통상 단백질의 장기간 저장을 위해 사용된 다. 동결건조된 단백질은 동결 건조된 상태 동안 분해, 응집, 산화 및 기타 변질 과정에 실질 적으로 저항성이다.

[0046] 정의

[0049] 용어 "동결건조된" 또는 "냉동건조된"은 적어도 90%의 수분이 제거된 동결건조와 같은 건조 과정을 받은 물질의 상태를 포함한다.

[0050] VEGF 길항제

[0051] VEGF 길항제는 혈관내피성장인자(VEGF)의 생물학적 작용을 차단 또는 억제할 수 있는 화합물이며, VEGF를 포획할 수 있는 용합 단백질을 포함한다. 바람직한 구체예에서, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:2 또는 4; 더 바람직하게는 SEQ ID NO:4의 용합 단백질이다. 특정 구

체에서, VEGF 길항제는 CHO 세포와 같은 포유동물 셀라인에서 발현되고 번역 후 변형될 수 있다. 특정 구체에서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 25-457을 포함하며 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화된다. 바람직하게는, VEGF 길항제 SEQ ID NO:4의 2개의 융합 단백질로 구성되는 2합체이다.

[0052] 본 발명의 방법 및 제형의 VEGF 길항제는 당업계에서 공지된 또는 공지될 어떤 적당한 방법으로 제조될 수 있다. VEGF 길항제는 약학적으로 허용가능한 제형을 제조하기 위해 사용되는 시점에서 바람직하게는 단백질 오염물질이 실질적으로 없다. "단백질 오염물질이 실질적으로 없다"는 바람직하게는 제형을 만드는 데 사용되는 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제 제제의 단백질의 적어도 90 중량%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99%가 VEGF 융합 단백질 길항제 단백질임을 의미한다. 융합 단백질은 바람직하게는 **실질적으로 응집이 없다**. "실질적으로 응집이 없다"는 융합 단백질이 약학적으로 유효한 제형로³²⁾ 제조되기 위해 사용되는 시점에서 적어도 90 중량%의 융합 단백질이 덩어리로 존재하지 않음을 의미한다. 달리 언급되지 않는다면 사용되는 인산염은 인산나트륨이고 요망되는 완충 pH는 1- 또는 2 염기성 인산나트륨의 적절한 양을 혼합함으로써 이루어진다.

[0053] 안정한 액체 안약 제형

[0054] 한 양태에서, 본 발명은 VEGF 길항제를 포함하는 안정한 약학적으로 허용가능한 제형을 제공하며, 제형은 **안약 용도에 적당한 액체 제형**이다. 바람직하게는, 액체 제형은 약학적으로 유효한 양의 VEGF 길항제를 포함한다. 제형은 또한 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 완충제, 등장제, 안정화제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 **액체 제형**의 예는 약학적으로 유효한 양으로 VEGF 길항제, 완충제, 폴리소르베이트와 같은 유기 공용매, NaCl과 같은 등장제 및 선택적으로 수크로오스 또는 트레할로오스와 같은 안정화제를 포함한다.

[0055] 안정성은 pH의 결정, 색 및 외관의 시각 검사, 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, UV 스펙트럼에 의한 총 단백질 함량의 결정을 포함하는 구체적인 시점에서 많은 방법으로 결정되며, 순도는 예를 들어, SDS-PAGE, 크기 배제 HPLC, 활성의 생물검정 결정, 등전점 전기영동(isoelectric focusing) 및 이소아스파르테이트(isoaspartate) 정량에 의해 결정된다. 생물검정의 한 가지 예는 VEGF 길항제 활성을 결정하는데 유용하며, BAF/3 VEGFR1/EPOR 셀라인은 본 발명의 VEGF 길항제에 의해 결합하는 VEGF165를 결정하는데 사용된다.

[0056] 액체 제형은 산소-유도³³⁾ 환경에서 저장될 수 있다. 산소-유도 환경은 예를 들어, 질소 또는 아르곤과 같은 불활성 기체 하에서 제형을 저장함으로써 발생될 수 있다. 액체 제형은 바람직하게는 약 5°C에서 저장된다.

[0057] 안약의 동결건조된 제형

[0058] 본 발명의 한 양태에서, VEGF 길항제를 포함하는 안약으로 허용가능한 제형이 제공되며, 제형은 동결건조 가능한 제형이다. 동결건조 가능한 제형은 용액, 현탁액, 에멀전 또는 투여 또는 사용을 위한 어떤 다른 적당한 형태로 복원될 수 있다. 동결건조 가능한 제형은 우선 액체로서 전형적으로 제조되고, 이어서 냉동 및 동결건조된다. 동결건조 전 총 액체 부피는 동결건조된 제형의 최종 복원된 부피보다 더 적거나, 동일하거나 또는 더 많을 수 있다. 동결건조 과정은 당업자에게 알려져 있으며, 제어된 조건하에서 냉동된 제형로부터³⁴⁾ 물의 승화를 전형적으로 포함한다.

[0060] 동결건조된 제형은 동결건조된 제형을 용해시키기 위한 수용액의 첨가에 의해 전형적으로 복원하여 사용된다. 크게 다양한 수용액은 동결건조된 제형을 복원하는데 사용될 수 있다. (후략)

[0061] 냉동-건조 또는 동결건조된 제형은 전형적으로 액체, 즉, 용액, 현탁액, 에멀전 등으로부터 제조된다. 따라서, 냉동-건조 또는 동결건조를 받는 액체는 바람직하게는 최종의 복원된 액체 제형에서 요망되는 모든 성분을 포함한다. 결과로서, 복원될 때, 냉동-건조 또는 동결건조된 제형은 복원시 요망되는 액체 제형을 제공할 것이다.

④ 실시예

[0062] 본 방법이 기술되기 전에, 본 발명은 특정 방법 및 기재된 실험 조건으로 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건이 다양할 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 여기 사용된 용어는 특정 구체예를 기술하기 위한 목적일 뿐이며, 제한을 의도하지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부한 청구범위에 의해서만 제한될 것임을 이해하여야 한다.

[0064] 실시예 1. 3mL 유리 바이알 내 5°C에서 저장한 50mg/mL VEGF 트랩 액체 제형의 안정성.

[0065] 50mg/mL VEGF 트랩(SEQ ID NO: 4), 10mM 인산염, 50mM NaCl, 0.1%(w/v) 폴리소르베이트 20, 5%(w/v) 수크로오스 및 pH 6.25를 함유하는 안약 액체 제형을 3mL 유리 바이알 내 5°C에서 저장하였고 샘플을 3, 6, 9, 12, 18 및 24개월에 시험하였다. 안정성을 SE-HPLC로 결정하였다. 결과를 표 1에 나타낸다. 탁도를 OD₄₀₅ nm에서; 그리고 회수한 단백질 백분율 및 크기 배제 HPLC에 의한 순도를 측정하였다.

표 1

[0066] 50mg/mL VEGF 트랩 단백질(VGFT-SS065)의 안정성

개월수	시각적 외관	탁도 (OD ₄₀₅ nm)	pH	회수한 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고유 구성 %
0	통과	0.00	6.2	100	98.8
3	통과	0.00	6.2	101	98.7
6	통과	0.01	6.3	100	98.3
9	통과	0.01	6.3	101	98.3
12	통과	0.01	6.3	104	98.4
18	통과	0.01	6.3	96	98.1
24	통과	0.01	6.3	105	98.1

[0070] 실시예 3. 3mL 유리 바이알 내 5°C에서 저장한 40mg/mL VEGF 트랩 액체 제형의 안정성

[0071] 40mg/mL VEGF 트랩(SEQ ID NO:4). 10mM 인산염, 40mM NaCl, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트 20, 5%(w/v) 수크로오스 및 pH 6.3을 함유하는 액체 제형을 3mL 유리 바이알 내 5°C에서 저장하였고 샘플을 0.5, 1, 2, 3, 및 4 개월에 시험하였다. 안정성 결과를 표 3에 나타낸다. 탁도, 회수한 단백질 백분율 및 순도를 상기 기재한 바와 같이 결정하였다.

표 3

[0072] 40mg/mL VEGF 트랩 단백질(VGFT-SS207)의 안정성

개월수	시각적 외관	탁도	pH	회수한 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고유 구성 %
0	통과	0.00	6.3	100	99.5
0.5	통과	0.00	6.3	99	99.4
1	통과	0.00	6.2	98	99.5
2	통과	0.00	6.2	95	99.2
3	통과	0.01	6.4		
4	통과	0.01	6.3		

[0073] 실시예 4. 미리 채운 유리 시린지 내 5°C에서 저장한 40mg/mL VEGF 트랩 액체 제형의 안정성

[0074] 40mg/mL VEGF 트랩 (SEQ ID NO:4), 10mM 인산염, 40mM NaCl, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트 20, 5%(w/v) 수크로오스 및 pH 6.3을 함유하는 액체 제형을 4023/50 FluroTec 코팅된 플런저와 함께 미리 채운 1mL 루어 글래스 시린지 내 5°C에서 저장하였고, 샘플을 0.5, 1, 2, 3 및 4개월에 시험하였다. 안정성 결과를 표 4에 나타낸다. 탁도, 회수한 단백질 백분율 및 순도를 상기 기재한 바와 같이 측정하였다.

표 4

[0075] 40mg/mL VEGF 트랩 단백질(VGFT-SS207)의 안정성

개월수	시각적 외관	탁도	pH	회수한 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고유 구성 %
0	통과	0.00	6.3	100	99.4
0.5	통과	0.00	6.3	100	99.3
1	통과	0.00	6.3	100	99.4
2	통과	0.00	6.3	97	99.1
3	통과	0.01	6.4		
4	통과	0.01	6.3		

[0076] 실시예 5. 3mL 유리 바이알 내 5°C에서 저장한 40mg/mL VEGF 트랩 액체 제형의 안정성

[0077] 40mg/mL VEGF 트랩 (SEQ ID NO:4), 10mM 인산염, 135mM NaCl, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트 20, pH 6.3을 함유하는 액체 제형을 3mL 유리 바이알 내 5°C에서 저장하였고 0.5, 1, 2, 3 및 4 개월에 시험하였다. 안정성 결과를 표 5에 나타낸다. 탁도, 회수한 단백질 백분율 및 순도를 상기 기재한 바와 같이 측정하였다.

표 5

[0078] 40 mg/mL VEGF 트랩 단백질(VGFT-SS203)의 안정성

개월수	시각적 외관	탁도	pH	회수한 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고유 구성 %
0	통과	0.00	6.3	100	99.3
0.5	통과	0.00	6.2	87	99.2
1	통과	0.00	6.2	88	99.1
2	통과	0.00	6.3	103	99.2
3	통과	0.00	6.3	88	99.0
4	통과	0.00	6.2	85	98.9
5	통과	0.00	6.3	84	99.0

[0079] 실시예 6. 1mL 미리 채운 유리 바이알 내 5°C에서 저장한 40mg/mL VEGF 트랩 액체 제형의 안정성

[0080] 40mg/mL VEGF 트랩 (SEQ ID NO:4), 10mM 인산염, 135mM NaCl, 0.03%(w/v) 폴리소르베이트 20 및 pH 6.3을 함유하는 액체 제형을 5°C에서 4023/50 FluroTec 코팅된 플런저를 가지는 1mL의 미리 채운 유리 루어 시린지에 저장하고 샘플을 0.5, 1, 2, 3, 4 및 5개월에 시험하였다. 안정성 결과는 표 6에 나타냈다. 탁도, 회수한 단백질 백분율 및 순도를 상기 기재한 바와 같이 측정하였다.

표 6

[0081] 40mg/mL VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS203)

4	통과	0.01	6.3	103	98.8
5	통과	0.00	6.3	99	98.9

개월수	시각적 외관	탁도	pH	회수한 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고유 구성 %
0	통과	0.00	6.3	100	99.2
0.5	통과	0.01	6.3	101	99.2
1	통과	0.00	6.3	101	99.2
2	통과	0.00	6.3	-	-
3	통과	0.01	6.3	102	99.1

[0082] 실시예 7. 3ml 유리 바이알 내 5°C에서 저장하고 40mg/ml로 복원하는 동결건조된 20 mg/ml VEGF 트랩 액체 제형의 안정성

[0083] 20mg/ml VEGF 트랩 (SEQ ID NO:4), 5mM 인산염, 20mM NaCl, 0.015%(w/v) 폴리소 르베이트 20, 2.5%(w/v) 수크로오스 및 pH 6.3을 함유하는 0.8ml의 액체 제형을 3ml 유리 바 이알에서 동결건조시켰다. 샘플을 5°C에서 저장하였고 1 및 2개월에 시험하였다. VEGF 트랩 을 40mg/ml VEGF 트랩의 최종 농도(0.4ml의 최종부피)로 복원하였다. 안정성 결과를 표 7(t = 개월 수; * = 시각적 외관; ** = 복원 시간)에 나타낸다. 탁도, 회수한 단백질 백분율 및 순도 를 상기 기재한 바와 같이 측정하였다.

표 7

[0084] 동결건조된 20mg/ml VEGF 트랩 단백질(VGFT-SS216)의 안정성

t	시각적 외관*	복원 시간(min)**	시각적 외관* 복원된 액체	탁도	pH	회수한 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고 유 구성 %
0	통과	0.6	통과	0.00	6.3	100	99.5
1	통과	0.6	통과	0.01	6.3	106	99.4
2	통과	0.4	통과	0.01	6.2	103	99.3

[0085] 실시예 8. 3ml 유리 바이알 내 5°C에서 저장한 동결건조된 20mg/ml VEGF 트랩 제형 의 안정성

[0086] 20mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4), 5mM 인산염, 67.5mM NaCl, 0.015%(w/v) 폴리소 르베이트 20 및 pH 6.3을 함유하는 0.8ml의 액체 제형을 3ml 유리 바이알에서 동결건조시켰 다. 샘플을 5°C에서 저장하였고 1, 2 및 3개월에 시험하였다. VEGF 트랩을 40mg/ml VEGF 트 랩의 최종 농도(0.4ml의 최종 부피)로 복원하였다. 안정성 결과를 표 8에 나타낸다(t = 개월 수; * = 시각적 외관; ** = 복원 시간).

표 8

[0087] 동결건조된 20mg/ml VEGF 트랩 단백질(VGFT-SS216)의 안정성

t	시각적 외관*	복원 시간(min)**	시각적 외관* 복원된 액체	탁도	pH	회수된 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩 고 유 구성 %
0	통과	0.7	통과	0.00	6.3	100	99.0
1	통과	0.7	통과	0.01	6.2	105	98.9
2	통과	0.4	통과	0.01	6.2	103	98.9

서열목록

<210> 4
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 4
 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 Ser Asp Thr Gly Arg Pro
 20 25 30
 Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
 35 40 45
 Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
 50 55 60
 Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
 65 70 75 80
 Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 85 90 95
 Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
 100 105 110
 Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115 120 125
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130 135 140
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145 150 155 160
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 165 170 175
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Aso Ser Thr

210 215 220
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285

 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430

 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

끝.

29) '제형로'의 오기로 보인다.

30) '동결건조시키는'의 오기로 보인다.

31) '제형으로'의 오기로 보인다.

32) '제형으로'의 오기로 보인다.

33) 대응 특허 원문은 'oxygen-deprived'로 '산소-고갈' 또는 '산소 결핍'의 의미이다. 단백질 불안정성의 주요 원인이 '산화'이므로 '산소를 제거한 환경' 즉 불활성 기체인 '질소' 또는 '아르곤'으로 충전한 후 밀봉하는 것이 일반적이어서 '산소-유도 환경'은 문맥상 부적합하다.

34) '제형으로부터'의 오기로 보인다.

[별지 2]

선행발명들의 주요 내용

1. 선행발명 5³⁵⁾

유리체내 VEGF 트랩이 유망해 보인다.

세계 안과학회(World Ophthalmology Congress)에서 Quan Dong Nguyen 박사는 1상 임상시험의 중간 결과에 따르면 유리체내 주사로 VEGF 트랩(Regeneron Pharmaceuticals)을 주입하는 것이 연령관련 삼출성 황반변성(age-related macular degeneration) 치료에 유망한 새로운 접근법이라고 밝혔다.

세계 안과학회에서 Quan Dong Nguyen 박사는 1상 임상시험의 중간 결과에 따르면 유리체내 주사로 VEGF 트랩(Regeneron Pharmaceuticals)을 주입하는 것이 연령관련 삼출성 황반변성 치료에 유망한 새로운 접근법이라고 밝혔다.

VEGF 트랩은 VEGF 수용체 1 및 2의 핵심 도메인과 태반성장인자(PIGF)의 융합 단백질로, 알려진 항-VEGF 항체보다 작지만 이러한 화합물보다 결합 친화도가 상당히 높다. 또한 다양한 전임상 암 및 안구 모델에서 효능을 입증하였다.

유리체내 주사에 대한 1상 임상시험에서는 0.05~4.0mg의 용량 범위에서 VEGF Trap을 1회 주사한 21명의 환자가 등록되었다. 현재까지의 추적 관찰 결과에 따르면, 최대 투여용량에서도 전신적 또는 안과적 용량 제한 독성이 관찰되지 않았고, 광학 단층 촬영(optical coherence tomography)을 통해 측정된 망막 두께의 빠르고 현저한 감소와 관련이 있었으며, 이러한 효과는 최소 8주 동안 지속되었다.

"최적의 투여량과 투여 간격을 결정하기 위한 추가 연구가 진행될 예정이고, 또 다른 1상 임상시험에서는 VEGF Trap 또는 pegaptanib sodium(Macugen, OCI/Eyetech Pharmaceuticals)를 무작위 배정하여 비교할 것이다. 또한, 3가지 다른 용량의 VEGF Trap을 다른 빈도로 투여하는 2상 임상시험이 시작될 예정이다." 미국 존스홉킨스대학교 윌머안과연구소(Wilmer Eye Institute)의 Nguyen 박사가 말했다.

2. 선행발명 6³⁶⁾

VEGF 트랩 단일 주사가 마카크 원숭이에서 배란을 차단하고 용량 의존적으로 난소 기능

35) 제출된 번역문(갑 제42호증의1)을 기초로 하였다.

을 장기 억제한다.

초록

난포 발달은 혈관내피성장인자(VEGF)와 같은 국소적으로 생성된 혈관 신생 인자의 조절하에 혈관 신생 및 혈관 투과성 증가와 관련이 있다. 본 연구의 목적은 VEGF의 일시적인 억제가 마카크 원숭이의 뇌하수체-난소 기능에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 동물들은 강력한 수용체 기반 VEGF 길항제인 **VEGF 트랩을 단일 정맥 주사(IV injection)로 투여받았다**. (중략) 초기 난포기에서 투여가 시작되었을 때, 대조군 마카크 원숭이는 평균 7.2 ± 0.4 일 후에 배란했지만, VEGF 트랩은 용량 의존적으로 배란을 지연시켜 0.25, 1, 또는 4mg/kg 투여 후 각각 23 ± 0.7 일, 30 ± 1.4 일, 그리고 43 ± 0.8 일 후에 배란을 하였다. 따라서 VEGF 트랩은 난소 기능에 대해 강력하며 용량 의존적이지만 가역적인 억제 효과를 발휘한다.

도입

(전략) 최근 몇 년 동안, 정의된 혈관 신생 인자나 그 수용체를 타겟팅하는 개선된 시약의 개발은 난소 기능에서 혈관 신생의 중요성을 명확하게 확인할 수 있는 연구를 가능하게 했으며, 특히 혈관내피성장인자(VEGF)-A와 그 수용체들이 이 과정의 주요 매개체로 지목되었다.

이 실험들에서는 VEGF 자체에 대한 항체(8, 9), VEGF 수용체 VEGFR-2/Fik에 대한 항체(10, 11), VEGF 수용체 티로신 키나제 억제제(12), 또는 decoy VEGF 수용체(13, 14)를 사용하여 VEGF 경로를 억제하였다. 본 연구진은 매우 강력한 수용체 기반 VEGF 길항제(VEGF antagonists)를 사용했다. 초기 마르모셋을 이용한 연구에서는 VEGF Trap_{A40}이라는 전형적인 수용체 기반 길항제를 사용했으며, 이는 VEGFR-1의 면역글로불린 도메인 1-3과 인간 IgG의 Fc 부분이 융합된 형태를 포함하였다. 놀랍게도, 초기 항체기 동안 급성 전신 투여는 항체 혈관 신생(15)뿐만 아니라 난포 혈관 신생(16)도 억제했다. 그 후의 연구에서는 후속 분자인 VEGF Trap_{R1R2}를 사용하여 난포기 동안의 VEGF 억제 효과를 평가하였다. 이 연구들은 VEGF의 선택적 억제가 난포막 혈관 신생을 현저하게 감소시키고 마르모셋에서 난포 성장을 제한한다는 것을 확인하였다(17).

(중략) 현재 연구의 첫 번째 목적은 마카크 원숭이의 초기 난포기에서 **VEGF Trap_{R1R2}의 단일 정맥 주사가** 미치는 급성 및 장기적인 영향을 평가하는 것이다. 이 단계는 궁극적으로 배란할 난포가 선택되는 시점이기 때문에 자세한 연구를 위해 선택되었다. 본 연구진의 이전 마르모셋 연구는 VEGF 매개 혈관 신생이 우성 난포(dominant follicle)의 선택과 성장에 중요한 역할을 하며, VEGF 작용이 효과적으로 차단되면 난포 주기가 계속되지 않고 새로운 난포 모집 단계가 시작되어야 한다는 점을 제시하였다. 두 번째 목표는 난포 발달을 방해하는 데 필요한 최소 용량의 VEGF Trap_{R1R2}를 결정하고, 그 후 난소 기능 억제의 지속 기간이 용량에

따라 달라지는지 여부를 확인하는 것이다. 세 번째 목표는 배란 난포의 난포막 혈관이 이미 완전히 발달한 후 후기 난포기 동안 급성 VEGF 억제 효과를 평가하는 것이다.

실험 재료 및 방법

투여 방법(Treatments)

내인성 VEGF는 VEGF Trap_{R1R2}(인간 Fc과 연속하여 발현되는 인간 VEGF-R1의 Ig 도메인 2와 인간 VEGF-R2의 Ig 도메인3으로 구성된 재조합 키메라 단백질)의 투여를 통해 억제되었다. 이전 버전의 수용체 기반 융합 단백질과 비교하여, VEGF Trap_{R1R2}는 VEGF-A에 대해 더 높은 친화도(친화 상수 ~약 1 pM)를 가지며, 생체 이용률과 약동학적 특성이 개선되었다(21). VEGF Trap_{R1R2}(C, Tarrytown, NY)는 5mM 인산염(phosphate), 5mM 시트르산염(citrate), 100mM NaCl(pH 6.0), 0.1% wt/vol Tween 20과 함께 20% 글리세롤(glycerol) 또는 20% 수크로스(sucrose)를 포함한 완충액에 24.3mg/mL의 농도로 2mL 분량으로 제공되었다. 대조 처리를 위해 사용된 인간 Fc는 40mM 인산염과 20mM NaCl(pH 7.4)로 구성된 완충액에 19.7mg/mL의 농도로 제공되었다. VEGF Trap의 vehicle만 단독으로 사용된 대조 군도 포함되었다. 이 화합물들은 사용 전까지 -20°C에서 보관되었으며, 필요 시 해동되었다. 남은 화합물은 4°C에서 저장되었고, 2주 이내에 사용되었다.

결과

(전략) VEGF Trap_{R1R2}는 모든 용량에서 잘 견디며 투여된 것으로 나타났다. VEGF Trap_{R1R2}를 0.25, 1.0, 4.0mg/kg로 투여한 후 나타난 전형적인 호르몬 반응은 그림 1에 제시되어 있다. (후략)

3. 선행발명 7³⁸⁾

발명의 명칭: 안과 질환 치료를 위한 VEGF 억제제의 사용

[초록]

개선된 약물동태학과 향상된 조직 침투 능력을 가진 변형된 융합 폴리펩티드가 개시되었으며, 이는 연령 관련 황반 변성 및 당뇨병성 망막증을 포함한 안과 질환 치료에 유용함

[배경]

[0003] 미국 특허 제6,011,003호는 VEGF와 결합할 수 있는 Flt 폴리펩타이드의 변형된 융합 형태를 설명하며, 이는 다섯 개 이하의 완전한 면역글로불린 도메인을 포함한다. WO 97/44453은 VEGF 수용체인 Flt1과 KDR에서 유래한 아미노산 서열을 포함하는 키메라 VEGF

36) 제출된 번역문(갑 제57호증의1)을 기초로 하였다.

Binding Stoichiometry of hVEGF165 to Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) & VEGFR1R2-FcΔC1(a)		
hVEGF165 (nM)	VEGF/Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)	VEGF/VEGFR1R2-FcΔC1(a)
1	0.93	0.98
10	0.97	0.94
50	1	0.99
Average ± StDev	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02

Fig. 1

수용체 단백질을 설명한다.

[발명의 요약]

[0004] 본 발명은 안과 질환을 치료하거나 개선하는 치료 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 해당 치료가 필요한 환자에게 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 억제제를 투여하는 방법이다. 하나의 실시예에서는 치료되는 안과 질환이 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration)이다. 또 다른 실시예에서는 치료되는 안과 질환이 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy)이다.

[0005] 바람직하게, 본 발명에서 사용되는 VEGF 억제제는 제1 VEGF 수용체의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2와 제2 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3; 그리고 다량체화 성분(multimerizing component)을 포함한다. 여기서 제1 VEGF 수용체는 Flt1이고, 제2 VEGF 수용체는 Flk1 또는 Flt4이며, 다량체화 성분은 (i) 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 약 1~200개의 아미노산으로 구성된 아미노산 서열, (ii) 면역글로불린 도메인 또는 면역글로불린 도메인의 절편으로 선택된다. 특정 태양에서는 VEGF 억제제는 **서열번호 2 (Flt1D2.Flk1D3FcΔCI(a))**, **서열번호 4 (Flt1D2.VEGFR3D3.FCΔCI1(a))**, **서열번호 6 (VEGFR1R2 FcΔC1(a))** 및 서열번호 23에서 선택된 융합 폴리펩타이드 "**VEGF 트랩**"이다. 또 다른 태양에서는 VEGF 억제제는 서열번호 1, 3, 5, 22에서 선택된 뉴클레오타이드 서열 또는 유전자 코드의 다양성(degeneracy) 때문에 서열번호 1, 3, 5, 22의 뉴클레오타이드 서열과 다를 수 있는 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩된 융합 폴리펩타이드일 수 있다.

[0006] 두 번째 측면에서, 본 발명은 안과 질환이 진단된 인간 대상에 대한 치료 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 해당 인간 대상에게 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 억제제의 효과적인 양을 투여하는 방법이다. 이 방법은 **대상에게 영향을 받은 눈에 약 25-4000μg의 VEGF 억제제 단백질을 초기 용량을 투여**하고, 이후 대상에게 초기 용량과 같거나 적은 양으로 VEGF 억제제 단백질을 여러 번의 후속 용량으로 복수회 투여하는 방법을 포함한다. 후속 용량은 각 용

량 간에 최소한 2주 이상 간격을 두고 투여된다. 안과 질환은 연령 관련 황반 변성 또는 당뇨병성 망막병증 중 하나이다. 다양한 태양에서 초기 용량은 약 25 내지 4000 μ g의 VEGF 억제제 단백질이다. 다양한 태양에서 후속 용량은 최소 2주에서 12개월 간격으로 투여되며, 더욱 바람직하게는 후속용량은 최소 3-6개월 간격으로 투여된다. VEGF 억제제 단백질은 질환이 있는 눈(affected eye)에 직접 투여되며, 이는 안약 또는 유리체 내 주사를 통해 이루어질 수 있다. 바람직하게는 VEGF 억제제는 Flt1의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2와 Flk1 또는 Flt4의 Ig 도메인 3, 그리고 다량체화 성분을 포함하는 두 개의 융합 폴리펩타이드로 구성된 이합체이다. 특정 태양에서는 VEGF 억제제가 서열번호 2, 4, 6 또는 23의 융합 폴리펩타이드로 구성된 이합체이다.

[발명의 상세한 설명]

[0019] 치료 후보 물질로서의 길항제로 고려하기 적합한 약물동태학적 프로파일을 갖는 수용체-기반 VEGF 길항제를 생산하는 것이 당업계의 오랜 과제였다. 본 출원인은 여기에서 처음으로 VEGF 활성을 길항할 수 있는 융합 폴리펩타이드 분자를 설명하며, 이 분자는 기존의 수용체 기반 VEGF 길항제들에 비해 개선된 약물동태학적 특성을 보인다. 따라서 본 발명에서 설명하는 융합 폴리펩타이드 분자들은 VEGF 길항이 필요한 치료에 적합한 분자들이다.

[0020] 세포막에서 원래의 형태로 존재하는 수용체의 외부 리간드 결합 도메인은 외부로 향해 있어 리간드와 결합할 수 있는 부분으로 정의된다. 외부 리간드 결합 도메인에는 수용체 중 막을 통과하는 도메인과 수용체의 세포 내 도메인에 연관된 소수성 아미노산은 포함되지 않는다. 일반적으로 수용체의 세포 내 도메인은 양전하를 가진 아미노산(예: 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산)으로 구성된다. 그리고 그 앞에 위치한 15~30개의 주로 소수성 또는 비극성 아미노산(예: 류신, 발린, 아이소류신, 페닐알라닌)은 막을 통과하는 도메인을 구성한다. 세포 밖 도메인은 소수성 막을 통과하는 아미노산 전에 위치한 아미노산들을 포함한다. 일반적으로 막을 통과하는 도메인은 라이신이나 아르기닌과 같은 양전하를 가진 아미노산으로 둘러싸여 있다. von Heijne는 수용체의 외부, 막을 통과하는, 또는 세포 내 도메인에 속하는 아미노산을 결정하는 데 필요한 상세한 규칙을 발표하였다(참조: von Heijne (1995) BioEssays 17:25).

핵산 구조물 및 인코딩된 융합 폴리펩타이드

[0021] 본 발명은 적절한 숙주 세포에 도입되었을 때 융합 폴리펩타이드 분자를 발현할 수 있는 벡터에 삽입되는, 융합 폴리펩타이드 분자를 인코딩하는 핵산 분자의 구성을 제공한다. 적절한 숙주 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유류 세포 등을 포함하되 이에 한정되지 않는다. 본 기술 분야에서 숙련된 기술자가 알고 있는 DNA 조각을 벡터에 삽입하는

모든 방법은 전사/번역 조절 신호의 조절 하에 키메라 폴리펩티드 분자들을 인코딩하는 발현 벡터를 생산하는 데에 사용할 수 있다. 이러한 방법에는 in vitro 재조합 DNA 및 합성 기술, in vivo 재조합 방법 등이 포함될 수 있다(참조: Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

[0023] 따라서, 본 발명에 따라, 여기서 설명한 대로 **박테리아 또는 진핵세포인 숙주**에서 복제가능한 융합 폴리펩타이드 분자를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 숙주를 형질 전환시키고, 이를 통해 해당 핵산의 발현을 유도하여 융합 폴리펩타이드 분자를 생성하고 이후 이러한 폴리펩타이드 분자는 생물학적으로 활성인 형태로 회수될 수 있다. 여기서 "생물학적으로 활성인 형태"란 VEGF와 결합할 수 있는 형태를 포함한다. 본 발명에 포함된 융합 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터는 다음 세 가지 일반적인 방법으로 확인할 수 있다: (a) DNA-DNA 혼성화, (b) "표지" 유전자 기능의 존재 여부, (c) 삽입된 서열의 발현. 첫 번째 방법에서는, 발현 벡터에 삽입된 외래 유전자의 존재를 DNA-DNA 혼성화를 사용하여 삽입된 융합 폴리펩타이드 분자 서열과 상동적인 서열을 포함하는 프로브(probe)로 검출할 수 있다. 두 번째 방법에서는, 재조합 벡터/숙주 시스템을 특정 "표지" 유전자 기능(예: 티미딘 키나제 활성, 항생제에 대한 저항성, 형질전환 표현형, 박테리오파지에서의 폐쇄체 형성 등)의 존재 여부에 따라 식별하고 선택할 수 있다. 예를 들어, 키메라 폴리펩타이드 분자 DNA 서열이 벡터의 표지 유전자 서열 내에 삽입되면, 삽입된 재조합체는 표지 유전자 기능의 부재로 식별될 수 있다. 세 번째 방법에서는, 재조합 발현 벡터는 재조합체가 발현한 외래 유전자 산물을 분석하여 확인할 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어 융합 폴리펩타이드 분자의 물리적 또는 기능적 특성을 기반으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명의 방법은 **제1 및 제2 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 수용체 구성 요소와 다량체화 성분으로 구성된 융합 단백질을** 사용하는 것을 포함한다. 여기서 제1 VEGF 수용체 구성 요소는 Flt1의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2이고, 제2 VEGF 수용체 구성 요소는 Flk1 또는 Flt4의 Ig 도메인 3이며, **다량체화 성분은 다음 그룹에서 선택된 성분이다: (i) 절단 가능한 영역(C-영역)을 포함하는 다량체화 성분, (ii) 절단된 다량체화 성분, (iii) 약 1~200개의 아미노산 길이를 가지며 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 서열, (iv) 류신 지퍼, (v) 나선 루프 모티프, (vi) 코일-코일 모티프, (vii) 면역글로불린 도메인.** 본 발명의 방법에 유용한 VEGF 억제제의 예로는 서열번호 1, 3, 5, 22의 핵산 서열 또는 유전자 코드의 다양성 때문에 서열번호 1, 3, 5 또는 22의 핵산 서열과 차이가 나는 핵산 서열에 의해 인코딩된 융합 단백질, 그리고 **서열번호 2(Flt1D2.Flk1D3Fc△C1(a)), 서열번호 4(Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)),**

서열번호 6(VEGFR1R2Fc△C1(a)) 및 서열번호 23에서 선택된 융합 단백질이다.

[0028] 예시를 들자면, 본 발명의 방법은 혈관 투과성, 부종 또는 염증이 특징인 임상 상태 (질환)를 치료하는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 부상, 뇌졸중 또는 종양과 관련된 뇌 부종; 건선이나 류마티스 관절염을 포함한 염증성 질환과 관련된 부종; 천식; 화상과 관련된 일반적인 부종; 종양, 염증 또는 외상과 관련된 복수 및 흉막 삼출액; 만성 기도 염증; 모세혈관 누출 증후군; 패혈증; 단백질 누출이 증가된 신장 질환; 그리고 연령 관련 황반 변성 및 당뇨병성 망막병증과 같은 안구 질환 등이 있다.

치료 대상 집단

[0030] 눈은 시력 유지에 중요한 역할을 하는 안구성분을 공급하는 여러 구조적 및 기능적으로 구분된 혈관망을 포함하고 있다. 이에는 망막의 내측 및 외측 부분을 공급하는 망막과 맥락막 혈관이 포함되며, 각막의 주변에 위치한 각막 주변 혈관도 포함된다. 이러한 혈관망의 정상적인 구조나 기능을 손상시키는 부상 및 질병은 시각 장애 및 실명의 주요 원인 중 하나이다. 예를 들어, 당뇨병성 망막병증은 망막 혈관에 영향을 미치는 가장 흔한 질병으로, 미국에서 근로 연령층의 시력 상실의 주요 원인이다. 부상이나 질병으로 인한 각막 혈관형성도 또 다른 유형의 안구 혈관 질환으로, 심각한 시력 손상을 초래할 수 있다.

[0031] "황반 변성"은 망막 중앙에 위치한 황색 황반 영역의 세포와 조직 퇴화로 인해 시력이 점진적으로 상실되거나 손상되는 여러 질병 증후군에 적용되는 의학적 용어이다. 황반 변성은 종종 두 가지 형태인 비삼출형(건성) 또는 삼출형(습성)으로 구분된다. 두 형태 모두 양측성이고 진행적이나, 각 형태는 서로 다른 병리적 과정을 반영할 수 있다. 연령 관련 황반 변성(AMD)의 습성 형태는 맥락막 신생혈관형성의 가장 흔한 형태이며 노인의 실명의 주요 원인이다. AMD는 60세 이상의 수백만 명의 미국인에게 영향을 미치며, 노인 사이에서 새로운 실명의 주요 원인으로 자리잡고 있다. 이 질환은 보통 망막 내에서 두 종류의 세포 잔여물인 드루젠(drusen)과 리포푸신(lipofuscin)의 농도가 높아짐에 따라 진단된다.

[0032] 삼출성(습성) 황반 변성 치료에 사용된 다양한 유형의 증상 치료법이 존재하지만, 환자의 특정 상태에 따라 제한적이고 개별적인 성공만을 거두었다. 레이저 광응고 치료는 황반 변성 환자에게 이익을 줄 수 있다. 그러나 레이저 치료에 초기 반응을 보일 수 있는 선택된 맥락막 신생혈관막에서는 재발률이 높았다. 또한 레이저 치료로 인해 시력 상실이 발생할 수도 있다. 저용량 방사선(방사선치료)은 맥락막 신생혈관형성의 퇴화를 유도하는 가능한 치료법으로 가설이 제시되기도 했다. 신생혈관막의 수술적 제거도 또 다른 가능한 치료법이지만, 이는 고도로 전문화된 절차로, 현재까지 유망한 결과를 보이지 않았다고 보고되고 있다. 현재 비삼출성(건성) 황반 변성에 대한 효과적인 치료법은 없다. 비삼출성 황반 변성의 관리 방법은

조기 진단과 신중한 추적 관찰로 환자에서 맥락막 신생혈관형성이 나타나는지 확인하는 것에 제한된다. 자외선 노출을 막고, 항산화 비타민(예: 비타민 A, 베타카로틴, 루테인, 지아잔틴, 비타민 C, 비타민 E) 및 아연을 처방된 용량으로 섭취하는 것이 어느 정도 도움이 될 수 있으나, 이 치료법들은 아직 입증되지 않았다.

[0033] 따라서 본 발명의 방법으로 치료할 대상 집단은 (i) 황반 변성으로 진단된 인간 피험자, (ii) 당뇨병성 망막병증으로 진단된 인간 피험자, (iii) 부상이나 질병으로 인한 각막의 병리학적 혈관형성을 앓고 있는 인간 피험자이다.

투여 방법 및 조성물

[0034] 바람직하게는, 본 발명의 VEGF 억제제는 주로 눈에 직접적으로 예를 들어, 국소적으로 투여된다. 국소 투여 방법에는 예를 들어, 점안, 결막하 주사 또는 이식, **유리체 내 주사** 또는 이식, 서브테논(sub-Tenon) 주사 또는 이식, 외과적 세척 용액에 포함시키는 방법 등이 포함된다.

[0035] 국소 투여에 적합한 조성물은 기술 분야에서 알려져 있다(예: 미국 특허 출원 2005/0059639 참조). 본 발명의 다양한 태양에서는 액체 조성물이 활성 성분이 용해되거나 현탁된 형태로 포함될 수 있다. 여기서 액체 조성물에는 젤이 포함된다. 바람직하게는 액체 조성물은 수용성이다. 대안적으로 조성물은 연고 형태일 수 있다. 바람직한 태양에서 조성물은 그 자리에서(in-situ) 젤화 가능한 수용성 조성물이며, 더 바람직하게는 그 자리에서(in-situ) 젤화 가능한 수용성 용액이다. 이러한 조성물은 눈 또는 눈의 외부에서 눈물액과 접촉 시 젤화가 촉진되도록 하는 농도의 젤화제를 포함할 수 있다. 본 발명의 수용성 조성물은 안과적으로 호환 가능한 pH 및 삼투압을 가진다. (중략)

[0036] 본 발명의 방법 중 하나의 실시예에서는 **최소한 하나의 시각 장애가 있는 인간 피험자에게 유리체 내 주사를 통해 25-4,000 μ g(원문에는 '254000 μ g'으로 되어 있으나, 이는 '25-4000 μ g'의 오타로 보임. 청구항 12 참조)의 VEGF 억제제 단백질을 투여한다.** 임상 증상의 개선은 기술 분야에서 알려진 하나 이상의 방법을 통해 모니터링된다. 예를 들어, 간접 안저 검사, 안저 촬영, 형광 안저 촬영, 전기망막검사, 외부 안구 검사, 세극등 현미경 검사, 안압 측정, 각막 두께 측정, 자동 굴절 검사 등이 있다. 이후의 용량은 매주 또는 매월 투여될 수 있으며, 예를 들어 2-8주 또는 1-12개월 간격으로 투여될 수 있다.

실시예 1 변형된 Flt1 수용체 벡터 구성

[0038] 키메릭 분자는 R1R2 (Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a))와 R1R3(Flt1.D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1(a) 및 VEGFR1R3-Fc Δ C1(a))로 각각 구성이 되었으며, 여기서 R1과 Flt1D2는 Flt1(VEGFR1)의 Ig 도메인 2이고, R2와 Flk1D3는 Flk1(VEGFR2)의 Ig 도

메인 3이며, R3와 VEGFR3D3는 Flt4(VEGFR3)의 Ig 도메인 3이다. 이들 분자는 in vitro ECM 결합 분석 결과 ECM에 대한 결합성이 훨씬 낮았으며, 여기에서 설명된 것처럼 PK(약물동태학적 특성)가 크게 향상되었다. 또한, 이 분자들은 VEGF와 강하게 결합하여 내피 세포에서 발현된 원래의 Flk1 수용체의 인산화를 억제하였다.

[0040] Flk1의 Ig 도메인 3에 대해 5' 및 3' 증폭 프라이머는 다음과 같다: 5': Flt1D2-Flk1D3.s (5'-ACMT-CATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGG-3') (서열번호 11); 3': Flk1D3/apa/srf.as (5'-GATAATGCCGGGCCCTTTTCATGGACCCTGACAAATG-3') (서열번호 12). 5' 증폭 프라이머는 위에서 설명한 것처럼 Flt1의 Ig 도메인 2 말단을 Flk1의 Ig 도메인 3 시작 부분과 직접 융합되도록 인코딩한다. 3' 증폭 프라이머는 Flk1의 Ig 도메인 3의 말단을 인코딩하며, 이는 아미노산 VRVHEK (서열번호 13) (서열번호 2의 아미노산 223-228에 해당)로 정의되며, 그 후 제한 효소 Srf1의 인식 서열을 포함한 브릿지 서열을 인코딩하고, 아미노산 GPG를 인코딩한다. 이 브릿지 서열은 서열번호 2의 아미노산 229-231에 해당한다.

[0042] 발현 플라스미드 pFlt1D2VEGFR3D3Fc Δ C1(a)의 구축. 발현 플라스미드 pMT21.Flt1(1-3).Fc(6519 bp)는 암피실린 저항성과 인간 Flt1 수용체의 Ig 도메인 1-3의 Fc-태그된 버전을 인코딩한다. 이 플라스미드는 PCR을 사용하여 Flt1의 Ig 도메인 2를 포함하는 DNA 조각을 생성하는 데 사용되었다. HEL921.7 세포주의 RNA를 사용하여 Flk1의 Ig 도메인 3을 생성하고, 표준 RT-PCR 방법을 사용하였다. 추가적인 PCR 증폭을 통해 두 Ig 도메인을 하나의 융합된 조각으로 융합하였다. Flt1의 Ig 도메인 2에 대해 5' 및 3' 증폭 프라이머는 다음과 같다: 5' bsp/flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3') (서열번호 14), 3': Flt1D2.VEGFR3D3.as (TTCCTGGGCMCAGCTG-GATATCTATGATTGTATTGGT) (서열번호 15). 5' 증폭 프라이머는 Flt1의 Ig 도메인 2 상류에 BspE1 제한 효소 사이트를 인코딩하며, 이 사이트는 아미노산 서열 GRPFVEM (서열번호 10) (서열번호 1-2의 아미노산 27-33에 해당)으로 정의된다. 3' 증폭 프라이머는 Flt1 Ig 도메인 2의 말단의 역보체를 인코딩하여 VEGFR3 Ig 도메인 3의 시작 부분과 직접 융합되도록 하며, 융합 지점은 Flt1의 TIID (서열번호 4의 아미노산 123-126에 해당)로 정의되고, VEGFR3의 IQLL(서열번호 4의 아미노산 127-130에 해당)에 이어진다.

실시에 2 pVEGFR1R2-Fc Δ C1(a)발현 벡터의 구성

[0045] pVEGFR1R2.Fc Δ CI(a) (서열번호 15-16) 발현 플라스미드는 Flt1d2-Flk1d3-Fc Δ CI(a) 아미노산 26과 27 (서열번호 2의 GG) 사이에 아미노산 SDT (서열번호 6의 아미노산 27-29에 해당)를 삽입하고, 아미노산 GPG (서열번호 2의 아미노산 229-231에 해당)를 인코딩하는 DNA를 제거하여 구축되었다. SDT 아미노산 서열은 Flt1 수용체가 천연적으로 갖고 있

는 것이며, 이 서열은 이질적인 N-말단 변형의 가능성을 줄이기 위해 추가되었다. GPG (브릿지 서열)는 Flt1과 Flk1 Ig 도메인이 서로 직접 융합되도록 하기 위해 제거되었다. pVEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 융합 분자의 완전한 DNA 및 그로부터 유도된 아미노산 서열은 서열번호 5-6에 나와 있다.

실시에 3 변형된 Flt1 수용체 생산에 사용되는 세포 배양 공정

[0046] Flt1D2.FlklD3.Fc Δ C1(a)을 생산하기 위해 사용된 세포 배양 공정. Flt1D2.FlklD3.Fc Δ C1(a) 단백질을 생산하는 과정은 발현 플라스미드 pFlt1D2.FlklD3.Fc Δ C1(a)을 사용하여 재조합 중국햄스터난소(CHO K1/E1A) 세포를 현탁 배양하는 과정이다. 이 세포들은 단백질 산물을 지속적으로 발현한다. 세포들은 바이오리액터에서 배양되며, 단백질 산물은 친화성 크로마토그래피와 크기 배제 크로마토그래피를 통해 분리 및 정제된다.

실시에7 VEGF 억제제를 통한 혈액-망막 장벽 붕괴 회복(reversed)

[0059] 쥐(rat)들은 스트렙토조토신(65mg/kg, i.v.)에 의한 당뇨 유도 후 4주 후에 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) (서열번호 6) (25mg/kg, i.p.) 또는 PBS를 1회 주사받았다. 망막 혈관의 투과성은 24시간 후, 혈액 내 알부민과 결합하는 Evans Blue 염료의 유출을 측정하여 평가되었다. 깊은 마취 하에 Evans Blue 염료(45mg/kg)가 정맥 주사되었고, 60분 동안 순환하게 한 후, 주기적으로 혈액 샘플을 채취하여 혈액 내 염료 농도를 측정하였다. 이후 동물들은 혈관에서 염료와 혈액을 제거하기 위해 관류 처리되었고, 눈을 적출하여 망막을 제거하였다. Evans Blue 염료를 추출한 후, 망막의 염료 농도를 망막 무게와 혈액 내 Evans Blue의 시간 평균 농도(단위: 혈장 μ l x 망막 무게 g⁻¹ x 시간⁻¹)로 정규화하여 혈관 누출 지표를 제공하였다. VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)는 비당뇨 쥐에서 나타나는 수준으로 망막 혈관의 투과성을 정규화시켰다.

실시에 8 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)는 망막 허혈에 의해 유도된 신생혈관생성을 방지함

[0060] VEGF 발현의 과도한 상향 조절은 많은 망막 질환에서 병리학적 신생혈관생성을 초래하는 원인이다. VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)의 항혈관형성 특성은 산소 유도 허혈성 망막병증(OIR) 마우스 모델에서 연구되었다. OIR은 마우스 새끼를 일시적으로 고농도의 산소(과산소)에 노출시켜 중앙 망막 내에서 발달 중인 미세혈관을 소실시키는 방법으로 유도되었다. 이후 동물들을 실내 공기로 돌려보내면 망막에서 상대적으로 저산소 상태가 발생하게 되고, 이는 당뇨병성 망막병증, 조산성 망막병증 및 기타 허혈성 망막병증과 유사한 특성을 가진 혈관형성 반응을 자극한다.

VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) (25mg/kg, i.p.)는 과산소에서 실내 공기(일반적인 농도)로 돌아온 후 12-24시간 이내에 매일마다 투여되었으며, 같은 일정에 따라 대조군에게는 인간 Fc가 주입되

었다. 실내 공기로 돌아온 후 1주일 뒤에 망막을 수집하였다. 각 동물에서 얻은 한 쌍의 망막에서 평평한 박리 샘플(Flat mounts)을 준비하고, 망막 혈관을 형광 염색된 렉틴(Griffonia simplicifolia)으로 염색하였다. 나머지 망막은 임베딩(embedding)하여 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

[0061] 과산소에 노출된 모든 대조군 마우스의 망막은, 내부 한계막을 침투하는 혈관 터프트의 존재 및 망막 표면에서의 혈관의 혼돈스러운 생성을 특징으로 하는 두드러진 병리학적 혈관형성을 보였다. 특히 시신경 두부 주변에서 뚜렷했다. **VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)를 투여한 경우, 이러한 혈관 이상 발생을 거의 완전히 차단할 수 있었으며, 이는 비정상적인 전-망막(preretinal) 혈관에서 내피세포 핵을 세어 본 결과로 확인되었다 (도 4). 병리학적 혈관형성은 극적으로 억제되었지만, VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)의 전신(systemic) 투여는 이 동물들에서 정상적으로 관찰되는 망막 내 혈관의 성장을 차단하지 않았다.**

실시에 9 맥락막 신생혈관 형성 억제

[0062] 비록 동물들이 연령 관련 황반변성(AMD)을 직접적으로 발병하지는 않지만, AMD에서 나타나는 것과 유사한 맥락막 신생혈관 형성을 레이저를 사용하여 브루크막(Bruch's membrane)과 그 위의 망막 색소상피(RPE)를 파괴하는 방식으로 유도할 수 있다. 이 손상은 기저 맥락막 모세혈관의 비정상적인 성장을 유도하여 RPE층과 망막하 공간으로 침투하게 한다. 브루크막의 파괴는 모든 형태의 맥락막 신생혈관 형성(CNV)에서 공통적으로 나타나며, 이는 습성 AMD를 특징짓는 원인이다. 레이저 유도 맥락막 신생혈관 형성 모델에서, 9마리 또는 10마리의 쥐에게 레이저 손상 하루 전에 25mg/kg의 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 또는 인간 Fc를 피하주사(sc)로 주입하고, 레이저 후 2일, 5일, 8일, 11일에 다시 주입하였다. 레이저 손상 14일 후, 마우스들에게 형광 표지된 덱스트란(50mg)을 정맥주사하고, 안구를 적출하여 맥락막 평면 박리(flat mount)를 준비하거나, 최적 절단 온도 임베딩 화합물(OPT)을 사용하여 동결시킨 후 병변을 평가하기 위해 절단하였다. VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)의 투여는 CNV 병변의 크기를 약 70% 감소시켰다(도 5).

[0063] VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)의 레이저 유도 맥락막 신생혈관 형성에 대한 효과는 성체 사이노물구스 원숭이에서도 평가되었다. 이 실험에서 **VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)는 정맥주사 또는 유리체내 주사로 투여되었다.** 각 동물은 각 망막에 9개 또는 10개의 레이저 화상을 받았고, 활성 맥락막 신생혈관 병변의 발달은 형광 안저촬영을 통해 치료 시작 전, 레이저 후 15일, 20일, 29일에 평가되었다. VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)는 레이저 손상 1주일 전부터 매주 정맥주사로 3mg/kg 또는 10mg/kg 의 용량으로 투여되었다. 유리체내 주사는 레이저 1주일 전부터 시작하여, 50, 250 또는 500mcg/eye의 용량으로 매 2주마다 1회 또는 레이저 후 2주 뒤 (500

mcg 용량만) 활성 CNV 병변이 이미 형성된 시점에 한 번 주사되었다. 대조군 동물들은 레이저 전 1주일부터 매주 정맥주사 또는 2주 간격으로 유리체내 주사로 위약을 투여받았다. 위 실험군과 대조군은 각각 6마리(수컷 3마리, 암컷 3마리)로 구성되었다. CNV 병변은 형광 안저촬영으로 시각화하여 등급을 매겼다. 정맥투여 또는 유리체 내 투여로 위약을 투여받은 동물들에서, 활성 CNV 병변은 밝은 형광으로 나타났으며, 늦은 시점에 레이저 손상 부위(laser spot)의 경계를 넘어서는 누출(4등급)이 각각 레이저 화상 부위의 32% 및 48%에서 발생하였다. 대조적으로, VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)를 정맥주사 하거나 유리체내 주사한 모든 그룹에서는 4등급 병변의 발생이 완전히 또는 거의 완전히 차단되었다(도 9). 또한, 레이저 손상 후 한 번의 유리체내 주사(500 mcg)로, 투여 후 10일 내에 4등급 병변의 발생 비율이 44%에서 0%로 감소하였다(도 9).

[0063] VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)의 레이저 유도 맥락막 신생혈관 형성에 대한 효과는 성체 사이노물구스 원숭이에서도 평가되었다. 이 실험에서 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)는 정맥주사 또는 유리체내 주사로 투여되었다. 각 동물은 각 망막에 9개 또는 10개의 레이저 화상을 받았고, 활성 맥락막 신생혈관 병변의 발달은 형광 안저촬영을 통해 치료 시작 전, 레이저 후 15일, 20일, 29일에 평가되었다. VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)는 레이저 손상 1주일 전부터 매주 정맥주사로 3mg/kg 또는 10mg/kg 의 용량으로 투여되었다. 유리체내 주사는 레이저 1주일 전부터 시작하여, 50, 250 또는 500 mcg/eye의 용량으로 매 2주마다 1회 또는 레이저 후 2주 뒤 (500 mcg 용량만) 활성 CNV 병변이 이미 형성된 시점에 한 번 주사되었다. 대조군 동물들은 레이저 전 1주일부터 매주 정맥주사 또는 2주 간격으로 유리체내 주사로 위약을 투여받았다. 위 실험군과 대조군은 각각 6마리(수컷 3마리, 암컷 3마리)로 구성되었다. CNV 병변은 형광 안저촬영으로 시각화하여 등급을 매겼다.

실시에 15 두 가지 상이한 VEGF 억제제에 의한 VEGF 성장 반응 억제

[0076] 위에서 설명한 생체 외 Baf/Flt 세포주 분석법을 사용하여 두 가지 VEGF 억제제가 VEGF에 대한 반응에 미치는 영향을 측정했다. 세포는 70pM VEGF에서 3일 동안 배양되었고, VEGF 트랩(서열번호 6)(0-500 pM) 또는 항-VEGF 항체(Avastin™ Genentech)(0-500 nM)의 다양한 농도에 노출되었다. 결과는 도 11에 나타나 있다. VEGF 트랩의 IC₅₀은 44pM였고, 항-VEGF 항체의 IC₅₀은 1.4nM였다.

실시에 16 두 가지 VEGF 억제제의 유리체내 전달의 약물동태학적 분석

[0077] 두 가지 VEGF 억제제의 안구 내 및 전신 농도를 수컷 Pigmented New Zealand Cross Bred 토끼에 1회 안구 내 주사 후 측정하였다. 주사 후 다양한 시간 지점에서 토끼들이 희생되었고, 유리체, 망막, 맥락막 조직이 수집되었으며, 혈액 샘플도 채취하여 혈장과 혈

청을 분석하였다.

모든 샘플은 VEGF 트랩 단백질(서열번호 6) 또는 항체 Fc 성분이 제거되어 "미니-VEGF 트랩"이라고 불리는 절단된 형태(서열번호 24³⁷) (미국 특허 2004/0014667 및 2005/0043236에 설명되어 있으며, 여기에서 전반적으로 참조되어 포함됨)에 대해 분석되었으며, 이 분석을 통해 안구 조직 및 혈장에서 이들 단백질의 약물동태학적 성질을 결정하였다. 이 정보는 안구 내 주사된 단백질이 원하는 작용 부위, 예를 들어 황반 변성의 경우 황반에 도달할 수 있는 능력을 결정할 수 있게 한다.

[0078] 66마리의 수컷 Pigmented New Zealand Cross Bred 토끼(F1 교배: New Zealand White와 New Zealand Red)는 무작위로 2그룹으로 나누어, 각 그룹은 33마리씩 구성되었다. 그룹 1의 동물들은 각 눈에 500 μ g/eye의 용량으로 전체 길이의 VEGF 트랩 단백질(서열번호 6)을 1회 유리체내 주사받았고, 그룹 2의 동물들은 각 눈에 250 μ g/eye의 용량으로 미니-VEGF 트랩을 1회 유리체내 주사받았다. 각 시간 지점(주사 전, 주사 후 0.25, 1, 6, 24, 72, 168, 336, 504, 672시간)에 세 마리씩 마취하여 혈액을 심장 천자법으로 채취하고, 혈장과 혈청을 얻었다. 희생 시, 각 동물의 두 눈을 적출하고 망막, 맥락막, 유리체를 수집하였다.

[0079] 샘플 처리. 일반적으로 유리체 샘플은 실온에서 해동한 후 개별 5mL 폴리프로필렌 튜브에 옮겨졌다. 각 샘플에 동일한 비율의 RIPA 버퍼(20mM Tris HCl, pH 7.5, 5mM 벤자미딘, 150mM 염화나트륨, 50mM 플루오르화나트륨, 1mM 나트륨 오르토반다테, 1mM EDTA)를 추가하고, 혼합기(Cyclone I.Q. Microprocessor, Sentry)에서 5,500 rpm으로 45초씩 2회 회전하여 균질화하였다. 샘플은 얼음 위에서 20분간 배양한 후, 5,500 rpm에서 4°C에서 30분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 -80°C에서 보관하여 분석하였다. 망막과 맥락막 샘플은 유사한 방식으로 처리되었으며, 샘플은 Ultra Tunax T8 균질기(IKA Laboratories)에서 최고 속도로 30-60초 동안 균질화되었다. 샘플은 개별 1.5mL Eppendorf 튜브로 옮겨져 얼음 위에서 20분간 배양한 후, 5,500 rpm에서 4°C에서 30분 동안 원심분리되었다. 상층액을 제거하여 새 1.5mL Eppendorf 튜브에 옮겨 -80°C에서 보관하여 분석하였다.

[0080] 샘플 분석. 일반적으로 VEGF 트랩 단백질 농도는 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA) 시스템을 사용하여 측정되었다. 마이크로 타이터 플레이트는 인간 VEGF₁₆₅ 항원으로 코팅되었다.

[0081] 결과. 전체 길이 또는 절단된 VEGF 트랩 단백질을 토끼의 두 눈에 단회 유리체내 주사한 후, 이 단백질은 최대 672시간까지 안구 조직(유리체 액, 망막, 맥락막)과 혈장에서 검출되었다. 이 결과는 물질이 유리체 액에 주입되면 혈액 순환에 도달하여 체외로 배출되기 전에 그 지역에서 제거되고 주변 조직인 망막과 맥락막으로 분포된다는 것을 보여준다. 이는 다

양한 조직과 혈장에서 두 가지 트랩 단백질의 농도를 검출하고 측정할 수 있었던 사실뿐만 아니라, 단백질이 특정 조직에서 최대 농도(C_{max})에 도달하는 시간에 의해서도 뒷받침된다. 미니-VEGF 트랩 단백질은 주사 후 1시간만에 유리체 액에서 최대 농도에 도달하였다. 이후 단백질은 망막으로 이동하고 6시간 후에 C_{max} 에 도달하였다. 망막에 인접해 있는 맥락막의 경우 T_{max} 값은 24시간이고, 그 후 혈액 순환으로 들어가 72시간 후에 최고 농도를 기록하였다. 전체 길이 VEGF 트랩도 유사한 조직 진행을 보였으나, 대부분의 경우 미니-VEGF 트랩에 비해 최대 농도에 도달하는 시간이 더 길었다. 전체 길이 VEGF 트랩의 유리체 최고 농도는 주사 후 6시간에 도달했고, 망막은 24시간 후 T_{max} 에 도달하였다. 맥락막 조직은 T_{max} 가 15분(0.25시간)으로 나타났는데, 다만 이는 특정 샘플에서 단백질 농도가 매우 높았기 때문으로 보인다. 미니-VEGF 트랩과 마찬가지로 전체 길이 VEGF 트랩의 최고 혈장 농도는 주사 후 72시간에 도달하였다. 미니-VEGF 트랩을 주사받은 동물은 전체 길이 단백질의 절반 용량(각각 250mg/eye vs. 500mg/eye)을 주사받았으므로, C_{max} 와 AUC 값은 VEGF 트랩에 비해 다소 낮았다. 유리체 액에서 미니-VEGF 트랩의 C_{max} 는 전체 길이 단백질의 거의 절반인 253mg/ml였고 (vs 491mg/ml), AUC는 VEGF 트랩의 절반이었다. $t_{1/2}$ (반감기)에는 두 단백질 간에 현저한 차이가 없었다(115hr vs 112hr). 미니-VEGF 트랩을 투여받은 토끼에서 얻은 맥락막 조직에서 C_{max} 와 AUC 값은 VEGF 트랩을 투여받은 동물의 샘플에 비해 현저히 낮았다(AUC의 경우 1/3, C_{max} 의 경우 1/8). 이 차이는, 특히 AUC 값의 경우, 이는 미니-VEGF 트랩 샘플들의 제거 반감기가 짧아진 것으로 설명할 수 있다. 더 큰 단백질은 $t_{1/2}$ 이 131시간인 반면, 작은 단백질은 70.9시간이었다. 혈장 샘플에서도 같은 결과가 나타났다. 전체 길이 VEGF 트랩 샘플은 미니-VEGF 트랩 샘플에 비해 더 높은 C_{max} , AUC 및 $t_{1/2}$ 값을 보였다. 이러한 다른 조직들과는 달리, 망막 균질화물에서는 VEGF 트랩과 미니-VEGF 트랩이 유사한 약물동태학적 특성을 보였다. 두 단백질은 매우 다른 유리체 내 주사 용량을 받았음에도 불구하고, 망막 균질화물에서 C_{max} 와 AUC 값은 거의 동일하였다. 그러나 미니-VEGF 트랩을 주사한 토끼에서 얻은 망막 조직의 반감기는 VEGF 트랩을 주사한 토끼보다 짧았다(132 hr vs. 114 hr).

[0082] 이 연구의 결과는 전체 길이 VEGF 트랩과 미니-VEGF 트랩 모두가 유리체 내 투여가 가능하며, 이들 단백질이 망막 또는 관련 구조물과 같은 원하는 작용 부위로 침투할 수 있음을 보여준다. 연구 결과는 단백질이 최대 672시간 동안 눈 조직에 존재함을 보여주며, 이를 통해 월 단위의 투여 패러다임이 가능함을 나타낸다. 또한, 미니-VEGF 트랩이 일단 눈 조직을 벗어나 전신 순환으로 이동한 후에는 전체 길이 VEGF 트랩보다 더 빨리 체내에서 배설되어 원치 않는 전신 작용을 감소시킨다.

연령 관련 황반 변성의 치료

[0083] 연령 관련 황반변성이 나타나는 환자는 **서열번호 6** 또는 23에 해당하는 VEGF 트랩 단백질의 유리체 내 주사를 투여받는다. 이 치료의 목적은 신생혈관 형성, 황반 질환 및 망막 손상의 발생을 감소시키거나 예방하는 것이다. 환자가 60세에 도달하면 AMD의 존재를 감지하기 위해 안과 감시를 강화한다. 이 강화된 감시에는 주기적인 망막 검사와 형광안저촬영이 포함되어야 하며, 이를 통해 망막하액, 출혈, 삼출물, RPE 분리, 낭성 망막 변화 또는 회녹색의 망막하 신생혈관막 존재 여부를 모니터링해야 한다. AMD가 진단되면 VEGF 트랩 단백질 치료가 시작되며, 이는 광응고술과 같은 다른 치료와 함께하거나 단독으로 시행될 수 있다. 치료의 첫 단계로, 환자는 안구 건강의 기준선을 설정하기 위해 전체 안과 검사를 받아야 한다. 안과 검사는 간접적 망막검사, 슬릿 램프 생체 현미경 검사, 주변 망막 검사, 안압 측정, 시력 검사(보정 전 및 최적 보정 후), 증상 체크, 안저 사진 촬영, 형광안저촬영, 전기망막도 검사 및 A-스캔 측정을 포함한다. **예비 검사를 마친 후, 환자의 AMD가 나타난 눈에 VEGF 트랩 단백질의 유리체 내 주사가 진행된다.** 두 눈이 모두 영향을 받는 경우, 각각의 눈을 별도로 치료할 수 있다. 치료할 눈에는 25-4000 μ g의 VEGF 트랩 단백질이 안과 용액으로 주입된다.

[0084] 치료 후 환자의 눈은 첫째 날(1), 둘째 날(2), 일곱째 날(7), 열다섯째 날(15), 서른째 날(30) 및 예순째 날(60)에 검사된다. 재발 가능성이 있기 때문에 이후에는 매월 정기적으로 검사를 받도록 해야 한다. 각 검사일에는 환자의 유리체 액화 상태를 모니터링한다. 추가적으로 공막 압박(scleral depression)을 통한 간접 망막검사를 통해 후방 유리체 분리 여부를 검사한다. 마지막으로 환자가 나타낸 AMD의 정도는 주기적인 망막 검사와 형광안저촬영을 통해 계속 모니터링되어야 하며, 이를 통해 망막하액, 출혈, 삼출물, RPE 분리, 낭성 망막 변화 또는 회녹색의 망막하 신생혈관막의 존재 여부를 확인한다. **재발하는 신생혈관 형상의 징후가 관찰되면 추가적인 VEGF 트랩 단백질 치료가 필요할 수 있다.** 추가 치료는 매주 또는 매월 시행될 수 있다. 바람직한 실시예에서는 초기 치료 후 1-6개월 간격으로 후속 치료가 진행된다.

실시에 18 신생혈관성 연령 관련 황반 변성 환자를 대상으로 한 이중맹검, 위약 대조, 용량 증량의 정맥투여 VEGF Trap 1상 임상시험

[0085] 신생혈관성 연령 관련 황반 변성(AMD) 환자를 대상으로 VEGF Trap 길항제(**서열번호 6**)의 단일 및 반복 정맥주사(IV) 투여에 대한 안전성, 약물동태학(PK), 그리고 생물학적 활성에 대한 예비적 평가를 얻기 위한 연구가 수행되었다.

[0086] 방법. 신생혈관성 AMD 환자(활동성 맥락막 신생혈관(CNV) 면적이 12 시신경원판 면적 (disc areas) 이하이고 전체 병변 면적의 50% 이상을 차지하며, 중심시력검사(ETDRS)로 측정한 최고교정시력이 20/40 이하인 환자들)를 연속적인 코호트로 나누어, VEGF Trap 또

는 위약을 0.3, 1.0, 또는 3.0mg/kg 용량으로 3:1 비율로 무작위 배정하였다. 환자들은 단일 정맥주사(IV) 투여를 받은 후 4주 동안 안전성 관찰 및 약물동태학(PK) 평가 기간을 거쳤으며, 그 후 격주로 3회 IV 투여를 받았다. 안전성 평가는 실험실 검사(혈액학, 생화학, 소변검사, 항-VEGF Trap 항체 측정), 활력징후, 그리고 안과 검사로 구성되었다. 생물학적 활성의 평가 지표는 빛간섭단층촬영(OCT)을 이용한 과잉 망막 두께(ERT)의 평균 백분율 변화와 ETDRS 기준의 최고교정시력(BCVA)이었다.

이상반응(AE)은 국립암연구소(NCI)의 공통 이상반응 용어 기준(NCI CTCAE v.3.0)을 사용해 등급이 매겨졌다. 용량 제한 독성(DLT)은 등급 2 또는 3의 안구 관련 AE, 또는 고혈압과 단백뇨에 대해 수정된 기준을 적용한 등급 3 또는 4의 전신 AE로 정의되었다. **최대 내약 용량(MTD)은 DLT를 경험한 환자가 2명 이하인 용량 단계로 정의되었다.**

[0087] 결과. 총 25명의 환자가 등록되었으며(남성 11명, 여성 14명, 평균 연령 76세), 이 중 19명은 VEGF Trap을 투여받았고(0.3mg/kg 7명, 1.0mg/kg 7명, 3.0mg/kg 5명), 6명은 위약을 투여받았다. VEGF Trap 치료와 관련된 대부분의 이상반응(AE)은 경증에서 중등도 수준이었다. 3.0mg/kg 용량군의 5명 중 2명이 임상시험 프로토콜에서 정의된 용량 제한 독성(DLT)을 경험하였는데, 이는 각각 4등급 고혈압(1명)과 2등급 단백뇨(1명)였다. 따라서 **3.0mg/kg 용량군의 모든 환자는 조기 시험 중단되었다. 시험에 참여한 환자들 중 항-VEGF Trap 항체가 형성된 경우는 없었다.** 망막 과잉 두께(ERT)의 평균 백분율 변화는 다음과 같았다: 15일째에서 위약 그룹 -12%, 0.3mg/kg 그룹 -10%, 1.0mg/kg 그룹 -66%, 3.0mg/kg 그룹 -60% (ANOVA, $p < 0.02$)이었고, 71일째에서 위약 그룹 -5.6%, 0.3mg/kg 그룹 +47.1%, 1.0mg/kg 그룹 -63.3% (ANOVA, $p < 0.02$). 최고교정시력(BCVA)의 변화는 다음과 같았다: 15일째에서 위약 그룹 +1.9, 0.3mg/kg 그룹 +1.8, 1.0mg/kg 그룹 +3.4, 3.0mg/kg 그룹 +4.6이었고, 71일째에서 위약 그룹 +2.8, 0.3mg/kg 그룹 +3.9, 1.0mg/kg 그룹 +3.9. BCVA의 변화는 통계적으로 유의하지는 않았다.

[0088] 빛간섭단층촬영(OCT) 스캔(측두부에서 비강부로, 아래쪽에서 위쪽으로)과 맵(map)이 얻어졌다. 한 예시 환자에서는, 초기에는 중심오목(망막 중심부)의 두께(foveal thickness)는 $348\mu\text{m}$ 였으며, 중심오목 아래에 망막하액이 있음을 확인할 수 있었다. 29일째에는 해부학적 개선의 증거가 거의 없었지만, 71일째(VEGF Trap의 네 번째 투여로부터 2주 후)에는 망막하액 주머니가 사라졌고, 중심오목 두께는 $232\mu\text{m}$ 로 개선되었으며, 황반 부피는 6.69mm^3 로 정상 범위에 들었다. 99일째(VEGF Trap의 마지막 투여로부터 6주 후)에는 악화되었는데, 중심오목 아래 망막하액 주머니가 다시 나타났고, 중심오목 두께는 $248\mu\text{m}$ 로 증가했으며, 황반 부피는 7.31mm^3 로 증가하였다.

[0089] 디지털 형광안저촬영이 치료 시작 전과 1.0mg/kg의 VEGF Trap 투여를 시작한 후 3번의 시점에서 수행되었다. 초기에는, 망막 중심오목 아래에 숨겨진 맥락막 신생혈관(CNV)가 크게 보였으며, 혈관조영술의 중기와 후기 단계에서 누출이 발생하여 전체 황반 아래에 흰색 염료가 모였다. 29일째에는 누출이 약간 감소했지만, 71일째에는 염료의 누출과 축적이 상당히 감소했다. 99일째에는 71일째에 비해 누출이 약간 증가했지만, 초기에 본 정도보다는 적었다.

[0090] 결론: 이 연구에서 신생혈관성 황반 변성(AMD) 환자들에 대한 정맥내 VEGF Trap의 최대 내약 용량은 1.0mg/kg이었다. 금번 작은 수의 환자들을 대상으로 한 연구에서 빛간섭단층촬영(OCT)을 통해 평가한 과잉 망막 두께(ERT)에서의 용량 의존적인 개선은 3.0mg/kg 용량이 1.0mg/kg 용량에 비해 초기의 개선 기간이 더 길게 나타남을 제시하였다. 또한, 최고교정시력 (BCVA)에서도 용량 의존적인 개선 경향을 보여주었다.

서열 목록

<210> 서열번호 6

<211> 길이: 458

<212> 종류: 단백질

<213> 생물: 사람(homo sapien)

<400> 서열: 6

```

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      260              265              270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      275              280              285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      290              295              300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      305              310              315              320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      325              330              335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      340              345              350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      355              360              365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      370              375              380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      385              390              395              400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      405              410              415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      420              425              430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      435              440              445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      450              455

```

```

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

```

37) '서열번호 23'의 오기로 보인다.

38) 제출된 번역문(갑 제115호증의2)을 기초로 하였다.

<210> 서열번호 23

<211> 길이: 240

<212> 종류: 단백질

<213> 생물: 사람(homo sapien)

<400> 서열: 23

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

끝.