



등록특허 10-2466794



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월11일

(11) 등록번호 10-2466794

(24) 등록일자 2022년11월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 17/02 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7026917(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월18일
심사청구일자 2022년08월03일
- (85) 번역문제출일자 2022년08월03일
- (65) 공개번호 10-2022-0115815
- (43) 공개일자 2022년08월18일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7019187
원출원일자(국제) 2014년12월18일
심사청구일자 2019년12월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2014/050431
- (87) 국제공개번호 WO 2015/089585
국제공개일자 2015년06월25일
- (30) 우선권주장
2013904942 2013년12월18일 오스트레일리아(AU)
2013904966 2013년12월19일 오스트레일리아(AU)
- (56) 선행기술조사문헌
W02003063904 A1
W02009126698 A2
Plastic and Reconstructive Surgery, 제132권,
제4호, 996-1004면(2013.10.)

- (73) 특허권자
씨에스엘 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45
비-크리에이티브 스웨덴 아베
스웨덴 볼스타 27 에스-746 34 헤게베겐
556906-5740
- (72) 발명자
에릭슨 올프
스웨덴 스톡홀름 에스-171 77 카롤린스카 인스티
튜트 디파트먼트 오브 메디컬 바이오킴이스트리
앤드 바이오피직스
팔케발 아넬리
스웨덴 스톡홀름 에스-171 77 카롤린스카 인스티
튜트 디파트먼트 오브 메디컬 바이오킴이스트리
앤드 바이오피직스
멜렘 아니카
스웨덴 스톡홀름 에스-171 77 카롤린스카 인스티
튜트 디파트먼트 오브 메디컬 바이오킴이스트리
앤드 바이오피직스
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 8 항

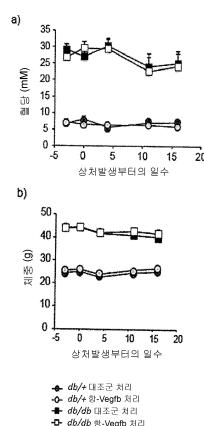
심사관 : 김혜민

(54) 발명의 명칭 상처 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상에서 상처 치료를 처리하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

상처를 갖고 있는 대상에서 상처를 치료하거나, 상처 치료를 증진시키거나, 상처 진행을 예방하거나 지연시키기 위한 약학 조성물로서,

상기 조성물은 혈관 내피 성장 인자 B(VEGF-B) 신호전달을 억제하는 항-VEGF-B 항체를 포함하고,

상기 상처가 진피 상처이며,

상기 대상이 당뇨병을 앓고 있고,

상기 항체는 VEGF-B에 결합하거나 특이적으로 결합하여 VEGF-B 신호전달을 상쇄시키는 항체 가변 영역을 포함하고,

상기 항체 가변 영역은

(i) (a) 서열번호 3의 아미노산 25 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1, (b) 서열번호 3의 아미노산 49 내지 65에 나타난 서열을 포함하는 CDR2, 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 98 내지 108에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H); 및

(ii) (a) 서열번호 4의 아미노산 23 내지 33에 나타난 서열을 포함하는 CDR1, (b) 서열번호 4의 아미노산 49 내지 55에 나타난 서열을 포함하는 CDR2, 및 (c) 서열번호 4의 아미노산 88 내지 96에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)

을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상처가 급성 또는 일반적인 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상처가 만성인, 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

대상이 비만을 앓고 있는, 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

항-VEGF-B 항체가

(a) 항체가 투여되지 않은 대상에서의 속도와 비교하여 상처 봉합 속도를 증진시키는 효과;

(b) 항체가 투여되지 않은 대상에서의 속도와 비교하여 특정 시점에서 상처 봉합의 양을 증진시키는 효과; 및

(c) 항체가 투여되지 않은 대상과 비교하여 대상에서 혈관의 성숙을 증진시키는 효과

중 하나 이상의 효과를 가지기에 효과적인 양으로 존재하는, 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

항체가 (서열번호 3에 나타난 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 4에 나타난 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는) 항체 2H10의 VEGF-B에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는, 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

항체가 항체 2H10의 인간화 가변 영역을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

항체가 서열번호 5에 나타난 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 6에 나타난 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 상처를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.

관련 출원 데이터

[0003] 본원은 2013년 12월 18일자로 출원된, 발명의 명칭 "상처 치료 방법(Method of Treating Wounds)"의 호주 특허출원 제 2013904942 호, 및 2013년 12월 19일자로 출원된, 발명의 명칭 "상처 치료 방법"의 호주 특허출원 제 201304966 호를 우선권 주장한다.

서열 목록

[0005] 본원은 전자 형태의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록의 전체 내용은 본원에 참고로 인용된다.

배경 기술

[0006] 상처 치료는 응고 단계, 염증 단계, 육아 조직 생성 단계 및 조직 재구성 단계를 수반하는 복잡한 과정이다. 상기 사건들은 부상 부위에서 방출되는 사이토카인 및 성장 인자들에 의해 유발된다. 많은 요인들이 정상적인 적절한 상처 치료를 복잡하게 만들거나 방해할 수 있다. 예를 들면, 상기 요인들로는 연령, 감염, 영양 부족, 면역억제, 약물치료, 방사선, 당뇨병, 말초 혈관 질환, 진신 질환, 흡연, 스트레스 등이 포함된다.

[0007] 만성 상처는 해부학적 및 기능적 완전성을 제공하기 위해 규칙적이고 시기적절한 복구 과정을 통해 진행되지 않는 상처들이다. 만성 상처는 미국에서만 매년 570만 명의 환자들에게 발생하고 약 200억 US\$의 비용이 드는 것으로 평가된다.

[0008] 2008년에 미국에서 약 3억 4700만명에게 발생된 만성 허약성 질환인 당뇨가 있는 환자의 경우, 당뇨병 족부 궤양(상처, 또는 일부 경우에는 만성 상처로도 지칭됨)의 발생이 흔한 합병증이다. 피부는 환경에 대한 1차 장벽으로 작용하기 때문에, 개방된 난치성 상처는 최악일 수 있으며; 주 장애(사지 손실 포함) 및 심지어 사망이 야기될 수 있다. 족부 궤양화는 당뇨가 있는 사람에서 약 85%의 하지 절단의 전조이다.

[0009] 당뇨병에서는, 상처 치료 단계들의 임의 단계가 방해받을 수 있다. 그러나, 당뇨병 상처의 핵심 특징은 세포외 기질 단백질의 합성과 분해의 불균형이다. 또한, 만성 염증은 성숙한 육아 조직의 생성의 지연 및 상처 인장 강도의 감소를 야기한다.

[0010] 현재의 상처 관리 치료법은 외과적 및 의학적 접근방법을 포함한다. 약물치료는 감염을 억제하거나 예방하고, 허혈 및 부종을 예방하고, 통증을 감소시키고, 대사 상태를 개선시키는 것을 목적으로 한다. 국소 치료는, 예를 들면, 성장 인자 및 혈소판-풍부 혈장의 국소 적용, 및 예를 들면, 하이드로콜로이드 및 하이드로겔의 상처 드레싱을 포함한다. 외과적 개입은 혈관성형술, 피부 이식 및 압력 감소를 위한 기계적 지지를 포함한다. 각

각의 치료법은 올바른 치료 단계에서의 개입에 대한 결정적인 필요성, 실망스러운 효능 및 고비용과 같은 그 자체의 단점들을 갖고 있다. 따라서, 당해 분야에서 개선된 상처 치료법이 요구된다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명을 개발함에 있어서, 본 발명자들은 상처발생, 예를 들면, 당뇨병 상처의 용인된 마우스 모델에서 혈관 내피 성장 인자 B(VEGF-B)의 신호전달을 억제하는 효과를 연구하였다. 본 발명자들은 상처가 유도된 당뇨병 마우스에게 VEGF-B의 길항물질(예를 들면, 길항성 항체)을 투여함으로써 상기 성장 인자의 효과를 연구하였다. 본 발명자들은 VEGF-B의 억제가 훨씬 더 신속한 상처 봉합 및 치료를 야기하였음을 밝혀내었다. 본 발명자들은 또한 상기 개선된 상처 치료가 상처 봉합의 초기 단계에, 예를 들면, 상처가 최대이고 개방되었을 때 특히 현저하였음을 밝혀내었다. 일부 경우에서(예를 들면, 본원에 기술된 실험에서), 당뇨병 대상에서 혈당 수준에 대한 보통의 효과에도 불구하고 상처 치료에 변화가 발생하여, VEGF-B를 억제하는 것이 혈당 조절에 추가적인 경로 또는 혈당 조절 이외의 다른 경로를 통해 상처 치료 이점을 제공함을 시사하였다.
- [0012] 본 발명자들에 의한 발견은 VEGF-B 신호전달을 억제함으로써 대상에서 상처 치료를 유도하거나 증진시키기 위한 방법에, 또는 상처를 치료하는데 있어서 또는 상처의 합병증을 지연시키거나 예방하는데 있어서 기반을 제공한다. 예를 들면, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 상처를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0013] 또 다른 예에서, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 상처 치료를 유도하거나 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0014] 상처 치료의 평가는, 예를 들면, 상처 면적의 감소율, 또는 완전한 상처 봉합에 의해 결정할 수 있다. 상처 면적은 정량적 분석, 예를 들면, 상처의 면적 측정, 상처의 면적측정 추적 등에 의해 측정될 수 있다. 완전한 상처 봉합은, 예를 들면, 배액 또는 드레싱이 필요없는 피부 봉합에 의해 결정될 수 있다. 상처의 사진, 상처의 물리적 검사 등도 또한 상처 치료를 평가하는데 이용될 수 있다. 상처 치료의 측정은 퍼센트 측진을 면에서 나타내거나, 시간 대 치료로서 위험비(Hazard ratio) 면에서 나타낼 수 있다.
- [0015] 또 다른 예에서, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상처의 진행 또는 상처의 합병증을 예방하거나 지연시키는 방법을 제공한다.
- [0016] 한 예에서, 상처는 급성이거나 일반적이고, 예를 들면, 열 손상(예, 화상), 외상, 수술, 광범위한 피부 암의 제거, 심부 진균 및 세균 감염, 혈관염 또는 경피증이다.
- [0017] 또 다른 예에서, 상처는 만성이다. 예를 들면, 상처는 동맥 궤양, 당뇨병 상처, 당뇨병 궤양, 욕창 또는 정맥 궤양이다.
- [0018] 한 예에서, 상처는 진피 상처이다.
- [0019] 한 예에서, 대상은 비만 및/또는 당뇨병을 앓고 있다.
- [0020] 예를 들면, 대상은 당뇨병, 예를 들면, 제 1형 또는 제 2형 당뇨병을 앓고 있다. 그러한 경우에, 상처는 당뇨병 상처(즉, 당뇨병 대상에서의 상처) 또는 당뇨병 궤양(즉, 당뇨병 대상에서의 궤양)으로 지칭될 수도 있다. 예를 들면, 상처는 당뇨병 족부 궤양 또는 당뇨병 다리 궤양이다.
- [0021] 한 예에서, 상처는 욕창이다.
- [0022] 한 예에서, 대상은 하나 이상의 신경병증(예를 들면, 당뇨병 신경병증), 말초혈관 질환, 불충분한 혈당 조절, 선행 족부 궤양화 또는 절단, 신장병증(또는 당뇨병 신장병증), 소혈관 및 대혈관의 허혈, 또는 나쁜 시력을 앓고 있다.
- [0023] 한 예에서, 대상은 상처를 갖는다.
- [0024] 또 다른 예에서, 대상은 상처(예를 들면, 만성 상처)가 발생할 위험이 있으며, 예를 들면, 수술전에(상처가 유도될 것일 때) 화합물이 투여된다. 예를 들면, 본 개시내용은 상처, 예를 들면, 유도된, 예를 들어, 수술에 의해 유도된 상처의 중증도를 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0025] 본원에 예시된 바와 같이, VEGF-B 신호전달의 억제는 당뇨병 상처의 치료에 효과적이다. 따라서, 한 예에서, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병 대상에서 상처

를 치료하는 방법을 제공한다.

- [0026] 본 개시내용은 또한, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상처를 갖고 있는 당뇨병 대상에서 상처 치료를 증진시키거나 유도하는 방법을 제공한다.
- [0027] 한 예에서, 대상은 상처 진행의 위험이 있다. 예를 들면, 대상은 당뇨병을 앓고 있다. 예를 들면, 대상은 당뇨병 및 하나 이상의 당뇨병 신경병증, 말초혈관 질환, 불충분한 혈당 조절, 선행 족부 궤양화 또는 절단, 신장 병증(또는 당뇨병 신장병증), 소혈관 및 대혈관의 허혈, 또는 나쁜 시력을 앓고 있다.
- [0028] 한 예에서, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병 대상에서 상처 진행을 경감시키거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0029] 또 다른 예에서, 본 개시내용은, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 상처를 갖고 있는 대상(예를 들면, 당뇨병 대상)에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상이 절단을 필요로 할 위험을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0030] 한 예에서, 화합물은 하기 효과들 중 하나 이상을 나타내기에 효과적인 양으로 투여된다:
- [0031] - 화합물이 투여된 적 없는 대상에서(예를 들면, 당뇨병 및 상처를 갖고 있는 대상에서)의 속도에 비해 상처 봉합의 속도를 증진시키고/시키거나;
- [0032] - 화합물이 투여된 적 없는 대상에서(예를 들면, 당뇨병 및 상처를 갖고 있는 대상에서)의 속도에 비해 특정 시점에서(예를 들면, 치료 개시 후에) 상처 봉합의 분량을 증진시키고/시키거나;
- [0033] - 화합물이 투여된 적 없는 대상(예를 들면, 당뇨병 및 상처를 갖고 있는 대상)에 비해 대상에서 혈관의 성숙을 증진시킨다.
- [0034] 본 개시내용은 또한, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 상처를 입었던 적이 있는(및, 선택적으로 당뇨병을 앓고 있는) 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상에서 하기 효과들 중 하나 이상을 나타내는 방법을 제공한다:
- [0035] - 화합물이 투여된 적 없는 대상에서의 속도에 비해 상처 봉합의 속도를 증진시키고/시키거나;
- [0036] - 화합물이 투여된 적 없는 대상에서의 속도에 비해 특정 시점에서 상처 봉합의 분량을 증진시키고/시키거나;
- [0037] - 화합물이 투여된 적 없는 대상에 비해 대상에서 혈관의 성숙을 증진시킨다.
- [0038] 한 예에서, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물은 VEGF-B 신호전달을 특이적으로 억제한다. 이것은 본 개시내용의 방법이 다수의 VEGF 단백질의 신호전달을 억제하는 것을 포함하지 않는 것을 의미하는 것이 아니고, 단지 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물(또는 그의 일부)이 VEGF-B에 특이적임, 예를 들면, VEGF 단백질의 일반적인 억제제가 아님을 의미하는 것이다. 상기 용어는 또한, 예를 들면, 1개(이상)의 결합 도메인을 갖는 VEGF-B 신호전달을 특이적으로 억제할 수 있고 또 다른 결합 도메인을 갖는 또 다른 단백질의 신호전달을 특이적으로 억제할 수 있는 이중특이성 항체 또는 그의 결합 도메인을 포함하는 단백질을 배제하지 않는다.
- [0039] 한 예에서, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물은 VEGF-B에 결합한다. 예를 들면, 상기 화합물은 VEGF-B에 결합하거나 그에 특이적으로 결합하고 VEGF-B 신호전달을 상쇄시키는 항체 가변 영역을 포함하는 단백질이다.
- [0040] 한 예에서, 상기 화합물은 항체 모방체이다. 예를 들면, 상기 화합물은 면역글로불린의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질, 예를 들면, IgNAR, 카멜리드(camelid) 항체 또는 T 세포 수용체이다.
- [0041] 한 예에서, 화합물은 도메인 항체(예를 들면, VEGF-B에 결합하는 중쇄 가변 영역만을 포함하거나 경쇄 가변 영역만을 포함하는) 또는 중쇄만 있는 항체(예를 들면, 카멜리드 항체 또는 IgNAR) 또는 그의 가변 영역이다.
- [0042] 한 예에서, 화합물은 Fv를 포함하는 단백질이다. 예를 들면, 상기 단백질은 다음으로 이루어진 군에서 선택된다:
- [0043] (i) 단일쇄 Fv 단편(scFv);
- [0044] (ii) 이량체성 scFv(다이-scFv);
- [0045] (iii) 디아바디(diabody);
- [0046] (iv) 트리아바디(triabody);

- [0047] (v) 테트라바디(tetrabody);
- [0048] (vi) Fab;
- [0049] (vii) F(ab')₂;
- [0050] (viii) Fv; 및
- [0051] (ix) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 C_H2 및/또는 C_H3에 결합된 (i) 내지 (viii) 중 하나.
- [0052] 또 다른 예에서, 화합물은 항체이다. 대표적인 항체는 전장(full length) 및/또는 네이키드(naked) 항체이다.
- [0053] 한 예에서, 화합물은 재조합, 키메라, CDR 그래프트화, 인간화, 합성인간화(synhumanized), 영장류화, 탈면역화 또는 인간 단백질이다.
- [0054] 한 예에서, 화합물은 VEGF-B에 대한 항체 2H10의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체 가변 영역을 포함하는 단백질이다. 한 예에서, 상기 단백질은 서열번호 3에 나타난 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 4에 나타난 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.
- [0055] 한 예에서, 화합물은 항체 2H10의 인간화 가변 영역을 포함하는 단백질이다. 예를 들면, 상기 단백질은 항체 2H10의 V_H 및/또는 V_L의 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 예를 들면, 상기 단백질은 다음을 포함한다:
- [0056] (i) (a) 서열번호 3의 아미노산 25 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 3의 아미노산 49 내지 65에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 98 내지 108에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H; 및/또는
- [0057] (ii) (a) 서열번호 4의 아미노산 23 내지 33에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 4의 아미노산 49 내지 55에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 4의 아미노산 88 내지 96에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L.
- [0058] 한 예에서, 상기 화합물은 항체 2H10의 인간화 가변 영역인 V_H 및 V_L을 포함하는 단백질이다. 예를 들면, 상기 단백질은 다음을 포함한다:
- [0059] (i) (a) 서열번호 3의 아미노산 25 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 3의 아미노산 49 내지 65에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 98 내지 108에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H; 및
- [0060] (ii) (a) 서열번호 4의 아미노산 23 내지 33에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 4의 아미노산 49 내지 55에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 4의 아미노산 88 내지 96에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L.
- [0061] 한 예에서, 임의의 상기 단락들에서 가변 영역 또는 V_H는 서열번호 5에 나타난 서열을 포함한다.
- [0062] 한 예에서, 임의의 상기 단락들에서 가변 영역 또는 V_L은 서열번호 6에 나타난 서열을 포함한다.
- [0063] 한 예에서, 상기 화합물은 항체이다.
- [0064] 한 예에서, 화합물은 서열번호 5에 나타난 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 6에 나타난 서열을 포함하는 V_L을 포함한다.
- [0065] 한 예에서, 상기 단백질 또는 항체는 임의의 전술한 단백질들 또는 항체들을 암호화하는 핵산 또는 상기 단백질 또는 항체를 발현하는 세포에 의해 암호화된 단백질 또는 항체의 임의의 형태이다(예를 들면, 번역후 변형된 단백질 또는 항체 포함).
- [0066] 한 예에서, 단백질 또는 항체는 다음을 포함한다:
- [0067] (i) (a) 서열번호 11을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 12를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 18의 아미노산 서열

을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 13을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H ; 및/또는

- [0068] (ii) (a) 서열번호 14를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 15를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 16을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L .
- [0069] 한 예에서, 단백질 또는 항체는 다음을 포함한다:
- [0070] (i) (a) 서열번호 23을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 24를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 25를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H ; 및/또는
- [0071] (ii) (a) 서열번호 26을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 27을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 28을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L .
- [0072] 한 예에서, 단백질 또는 항체는 다음을 포함한다:
- [0073] (i) (a) 서열번호 35를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 36을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 37을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H ; 및/또는
- [0074] (ii) (a) 서열번호 38을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 39를 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 40을 포함하는 핵산에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L .
- [0075] 한 예에서, 화합물은 조성물 내에 존재한다. 예를 들면, 상기 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 항체 가변 영역 또는 V_H 또는 V_L 을 포함하는 단백질 또는 항체를 포함한다. 한 예에서, 상기 조성물은 상기 단백질 또는 항체의 하나 이상의 변이체(예를 들면, 번역후 변형된 변이체)를 추가로 포함한다. 예를 들면, 상기 조성물은 암호화된 C-말단 라이신 잔기가 소실된 변이체, 탈아미드화 변이체, 및/또는 글리코실화 변이체, 및/또는 예를 들면, 단백질의 N-말단에 피로글루타메이트를 포함하는 변이체, 및/또는 항체 또는 V 영역에서 N-말단 잔기, 예를 들면, N-말단 글루타민이 결여된 변이체, 및/또는 분비 신호 전체 또는 일부를 포함하는 변이체를 포함한다. 암호화된 아스파라진 잔기의 탈아미드화 변이체는 이소아스파르트산 및 아스파르트산 이소폼(isoform)이 생성되게 하거나 심지어 인접 아미노산 잔기를 포함하는 숙신아미드를 생성할 수 있다. 암호화된 글루타민 잔기의 탈아미드화 변이체는 글루탐산을 생성할 수 있다. 상기 서열들 및 변이체들의 이중 혼합물을 포함하는 조성물은 특정 아미노산 서열을 언급할 때 포함되는 것이다.
- [0076] 한 예에서, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물은 VEGF-B의 발현을 억제하거나 방지한다. 예를 들면, 상기 화합물은 안티센스, siRNA, RNAi, 리보자임 및 DNA자임의 군에서 선택된다.
- [0077] 한 예에서, VEGF-B는 포유동물 VEGF-B, 예를 들면, 인간 VEGF-B이다.
- [0078] 한 예에서, 대상은 포유동물, 예를 들면, 인간과 같은 영장류이다.
- [0079] 본원에 기술된 치료 방법은 또한 상처를 위한 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0080] 본원에 기술된 당뇨병 상처 또는 궤양의 치료 방법은 또한 당뇨병을 치료하거나 예방하기(또는 그의 진행을 지연시키기) 위한 추가의 화합물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 대표적인 화합물들은 본원에 기술되어 있다.
- [0081] 또 다른 예로, 본 개시내용은 대상에서 상처 치료를 유도하거나 증진시키고/시키거나, 대상에서 상처 또는 상처 합병증의 진행을 예방하거나 지연시키는 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 제공한다.

- [0082] 또 다른 예로, 본 개시내용은 대상에서 상처 치료를 유도하거나 증진시키고/시키거나, 대상에서 상처 또는 상처 합병증의 진행을 예방하거나 지연시키기 위한 약제의 제조에 있어서 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물의 용도를 제공한다.
- [0083] 본 개시내용은 또한 상처의 치료 또는 예방 및/또는 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 설명서와 함께 포장된, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0084] 대표적인 상처 및 화합물은 본원에 기술되어 있으며, 앞의 세 단락에 나타난 개시내용의 예들에 적절한 변경을 가하여 적용하는 것으로 이해해야 한다.
- [0085] 본 개시내용의 예들은 상처 치료를 개선하거나, 상처(예를 들면, 당뇨병 궤양)의 재발 또는 재발 가능성을 감소시키거나, 상처 치료를 촉진하는 것에 적절한 변경을 가하여 적용하는 것으로 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0086] 도 1은 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리가 심한 당뇨병 동물 모델에서 상처발생시 혈당 수준 또는 체중 감소에 별로 영향을 미치지 않음을 보여주는 일련의 그래프들이다. 패널 A는 동물들(n = 4-7/군)의 상처발생 전 및 후에 당뇨병 db/db 또는 비-당뇨성 db/+ 대조군 또는 항-VEGF-B 처리된 마우스에서 먹이공급시 혈당 수준을 나타내고, 패널 B는 먹이공급시 체중을 나타낸다. 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다.
- 도 2는 2H10을 사용한 VEGF-B의 약리학적 억제가 심한 당뇨병 마우스 모델에서 상처 봉합을 증진시킴을 보여주는 그래프이다. 당뇨병 db/db BKS 동물들에서 약리학적 VEGF-B 억제시 개선된 상처 봉합이 확인된다. VEGF-B 억제시 비-당뇨성 db/+ BKS 마우스에서는 상처 봉합에 차이가 확인되지 않는다(n = 8 내지 14/군). 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다. db/db 대조군 처리된 마우스 대비 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.
- 도 3은 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리가, 혈당 수준에 차이가 없음에도 불구하고, 단기간에 상처 치료를 촉진함을 보여주는 일련의 그래프들을 포함한다. 2H10 또는 대조군 항체로 처리된 db/db 동물, 및 db/+ 동물의 분석. 패널 A는 먹이공급시 혈당 수준(n = 5 또는 6/군)을 나타내고, 패널 B는 처음 4일동안의 상처 봉합을 나타낸다(n = 10 내지 12/군). 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다. db/db 대조군 처리 대비 ***P<0.001.
- 도 4는 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리가, 당뇨병 상처발생시 상향조절되는 여러 유전자들의 발현을 감소시킴을 보여주는 그래프이다. 종료점 IGF-1, TGF- β , TNF- α , α -SMA, COL1 α , Fgf-7 및 IFN- γ 발현 수준을 2H10 또는 대조군 항체로 처리된 db/db 마우스에서 및 대조군 처리된 db/+ 마우스에서 측정하였다(n = 8 내지 14/군). 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다. 대조군 처리된 db/db 마우스 대비 *P<0.05, 대조군 처리된 db/+ 마우스 동물 대비 #P<0.05, ##P<0.01. IGF-1: 인슐린-유사 성장 인자 1, TGF- β : 형질전환 성장 인자 베타, TNF- α : 종양 괴사 인자, α -SMA: 알파 평활근 액틴, COL1 α : 알파-1 제 I 형 콜라겐, Fgf-7: 섬유아세포 성장 인자 7.
- 도 5는 db/db 마우스에서 VEGF-B 억제가 혈관 형태에는 영향을 미치지만 세포 증식은 촉진하지 않음을 보여주는 일련의 그래프들을 포함한다. 상단 그래프는 Brdu/DAPI 염색의 정량화를 나타내고, 하단 그래프는 대조군 또는 2H10 항체를 사용한 db/db 마우스로부터 CD45, CIV 및 CD31 염색의 정량화를 나타낸 것이다. n = 4 내지 6/군. 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다. db/db 대조군 처리 대비 *P<0.05, **P<0.01.
- 도 6은 VEGF-B 신호전달 경로가 당뇨병 상처에서 상향조절됨을 보여주는 그래프이다. 종료점 Vegfb, Vegfr1, Fatp4, Vegfa 및 Vegfr2 발현 수준을 당뇨병 db/db 마우스 및 비-당뇨성 db/+ 마우스로부터의 상처로부터 수득된 조직에서 측정하였다. 발현 수준은 TUBB5로 표준화시켰다. 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다. #P<0.05, ##P<0.01, db/+ 대조군 처리 대비 db/db 대조군 처리. n = 3 내지 5. Vegfb: 혈관 내피 성장 인자 B; Vegfr1: 혈관 내피 성장 인자 수용체 1, Fatp4: 지방산 운반체 4, Vegfa: 혈관 내피 성장 인자 A; Vegfr2: 혈관 내피 성장 인자 수용체 2.
- 도 7은 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리가 db/db 마우스에서 피부에 지질 축적을 감소시킴을 보여주는 그래프이다. 도시된 그래프는 대조군 또는 2H10 항체로 처리된 db/db 및 db/+ 마우스에서 오일 레드 O(Oil red O) 염색의 정량화를 나타낸다. 값들은 평균 $\pm$ s.e.m이다. ***P<0.001, db/db 2H10 처리된 마우스 대비 db/db 대조군 처리된 마우스. ### P<0.001, db/db 대조군 처리된 마우스 대비 Db/+ 동물.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0087] 서열 목록에 대한 설명

- [0088] 서열번호 1은 21개 아미노산 N-말단 신호 서열을 함유하는 인간 VEGF-B₁₈₆ 이소폼의 아미노산 서열이다.
- [0089] 서열번호 2는 21개 아미노산 N-말단 신호 서열을 함유하는 인간 VEGF-B₁₆₇ 이소폼의 아미노산 서열이다.
- [0090] 서열번호 3은 항체 2H10의 V_H로부터의 아미노산 서열이다.
- [0091] 서열번호 4는 항체 2H10의 V_L로부터의 아미노산 서열이다.
- [0092] 서열번호 5는 항체 2H10의 인간화 형태의 V_H로부터의 아미노산 서열이다.
- [0093] 서열번호 6은 항체 2H10의 인간화 형태의 V_L로부터의 아미노산 서열이다.
- [0094] 서열번호 7은 항체 4E12의 V_H로부터의 아미노산 서열이다.
- [0095] 서열번호 8은 항체 4E12의 V_L의 아미노산 서열이다.
- [0096] 서열번호 9는 항체 2F5의 V_H로부터의 아미노산 서열이다.
- [0097] 서열번호 10은 항체 2F5의 V_L의 아미노산 서열이다.
- [0098] 서열번호 11은 항체 2H10의 V_L CDR1로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0099] 서열번호 12는 항체 2H10의 V_L CDR2로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0100] 서열번호 13은 항체 2H10의 V_L CDR3으로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0101] 서열번호 14는 항체 2H10의 V_H CDR1로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0102] 서열번호 15는 항체 2H10의 V_H CDR2로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0103] 서열번호 16은 항체 2H10의 V_H CDR3으로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0104] 서열번호 17은 항체 2H10의 V_L CDR1로부터의 아미노산 서열이다.
- [0105] 서열번호 18은 항체 2H10의 V_L CDR2로부터의 아미노산 서열이다.
- [0106] 서열번호 19는 항체 2H10의 V_L CDR3으로부터의 아미노산 서열이다.
- [0107] 서열번호 20은 항체 2H10의 V_H CDR1로부터의 아미노산 서열이다.
- [0108] 서열번호 21은 항체 2H10의 V_H CDR2로부터의 아미노산 서열이다.
- [0109] 서열번호 22는 항체 2H10의 V_H CDR3으로부터의 아미노산 서열이다.
- [0110] 서열번호 23은 항체 2F5의 V_L CDR1로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0111] 서열번호 24는 항체 2F5의 V_L CDR2로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0112] 서열번호 25는 항체 2F5의 V_L CDR3으로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0113] 서열번호 26은 항체 2F5의 V_H CDR1로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0114] 서열번호 27은 항체 2F5의 V_H CDR2로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0115] 서열번호 28은 항체 2F5의 V_H CDR3으로부터의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0116] 서열번호 29는 항체 2F5의 V_L CDR1로부터의 아미노산 서열이다.
- [0117] 서열번호 30은 항체 2F5의 V_L CDR2로부터의 아미노산 서열이다.

[0118] 서열번호 31은 항체 2F5의 V_L CDR3으로부터의 아미노산 서열이다.

[0119] 서열번호 32는 항체 2F5의 V_H CDR1로부터의 아미노산 서열이다.

[0120] 서열번호 33은 항체 2F5의 V_H CDR2로부터의 아미노산 서열이다.

[0121] 서열번호 34는 항체 2F5의 V_H CDR3으로부터의 아미노산 서열이다.

[0122] 서열번호 35는 항체 4E12의 V_L CDR1로부터의 뉴클레오티드 서열이다.

[0123] 서열번호 36은 항체 4E12의 V_L CDR2로부터의 뉴클레오티드 서열이다.

[0124] 서열번호 37은 항체 4E12의 V_L CDR3으로부터의 뉴클레오티드 서열이다.

[0125] 서열번호 38은 항체 4E12의 V_H CDR1로부터의 뉴클레오티드 서열이다.

[0126] 서열번호 39는 항체 4E12의 V_H CDR2로부터의 뉴클레오티드 서열이다.

[0127] 서열번호 40은 항체 4E12의 V_H CDR3으로부터의 뉴클레오티드 서열이다.

[0128] 서열번호 41은 항체 4E12의 V_L CDR1로부터의 아미노산 서열이다.

[0129] 서열번호 42는 항체 4E12의 V_L CDR2로부터의 아미노산 서열이다.

[0130] 서열번호 43은 항체 4E12의 V_L CDR3으로부터의 아미노산 서열이다.

[0131] 서열번호 44는 항체 4E12의 V_H CDR1로부터의 아미노산 서열이다.

[0132] 서열번호 45는 항체 4E12의 V_H CDR2로부터의 아미노산 서열이다.

[0133] 서열번호 46은 항체 4E12의 V_H CDR3으로부터의 아미노산 서열이다.

[0134] 일반설명

[0135] 본 명세서 전체에 걸쳐서, 특별히 달리 언급되거나 문맥상 달리 필요하지 않는 한, 단일 단계, 물질 조성물, 단계들의 군, 또는 물질 조성물들의 군에 대한 언급은 상기 단계들, 물질 조성물들, 단계들의 군, 또는 물질 조성물들의 군의 1개 및 다수(즉, 1개 이상)를 포함하는 것으로 이해해야 한다.

[0136] 당해 분야에 숙련된 자라면 본 개시내용이 명확하게 기술된 것들 이외의 다른 변화 및 수정을 허용함을 인지할 것이다. 본 개시내용은 모든 상기 변화 및 수정을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 본 개시내용은 또한 본 명세서에 언급되거나 나타난 단계, 특징, 조성물 및 화합물 모두를 개별적으로 또는 총괄적으로, 및 상기 단계 또는 특징들의 모든 조합 또는 임의의 2개 이상을 포함한다.

[0137] 본 개시내용은 본원에 기술된 특정 예들에 의해 범위가 제한되지 않으며, 상기 예들은 오직 예시의 목적을 위한 것이다. 기능적으로 등가의 생성물, 조성물 및 방법들은 명백하게 본 개시내용의 범위내에 속한다.

[0138] 본 개시내용의 임의의 예는 본원에서 특별히 달리 언급되지 않는 한 개시내용의 임의의 다른 예에 적절한 변경을 가하여 적용되는 것으로 이해해야 한다.

[0139] 특별히 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 당해 분야(예를 들면, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학 및 생화학)에 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는 것으로 이해해야 한다.

[0140] 달리 나타내지 않는 한, 본 개시내용에 사용된 재조합 단백질, 세포 배양 및 면역학적 기술들은 당해 분야에 숙련된 자에게 공지되어 있는 표준 절차들이다. 상기 기술들은 문헌 [J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel *et al.*

(editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988), and J.E. Coligan *et al.* (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons](현재까지 모든 업데이트 포함)과 같은 출처들에 문헌 전체에 걸쳐 기술되고 설명되어 있다.

[0141] 본원에서 가변 영역 및 그의 부분들, 면역글로불린, 항체 및 그의 단편들에 대한 설명 및 정의는 문헌 [Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991, Bork *et al.*, J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994, Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901 -917, 1987, Chothia *et al.* Nature 342, 877-883, 1989 and/or or Al-Lazikani *et al.*, J Mol Biol 273, 927-948, 1997]에서의 논의에 의해 더 명확해질 수 있다.

[0142] 본원에서 단백질 또는 항체에 대한 임의의 논의는 제조 및/또는 저장시에 생성된 단백질 또는 항체의 임의의 변이체를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 제조 또는 저장시 항체는 탈아미드화(예를 들면, 아스파라긴 또는 글루타민 잔기에서)되고/되거나, 변이된 글리코실화를 가지고/가지거나, 피로글루타민으로 전환된 글루타민 잔기를 가지고/가지거나, 제거되거나 "고정된(clipped)" N-말단 또는 C-말단을 가지고/가지거나, 불완전하게 처리되어 그 결과 항체의 말단에 남아 있는 신호 서열의 일부 또는 전체를 가질 수 있다. 특정 아미노산 서열을 포함하는 조성물은 명시되거나 암호화된 서열 및/또는 상기 명시되거나 암호화된 서열의 변이체의 이중 혼합물일 수 있는 것으로 이해된다.

[0143] 용어 "및/또는", 예를 들면, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해해야 하며, 두 의미 모두에 대해 또는 어느 한 의미에 대해 명백히 지지하는 것으로 이해해야 한다.

[0144] 본 명세서 전체에 걸쳐, 단어 "포함하다", 또는 "포함하는"과 같은 변형은 명시된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 군의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 군의 배제를 의미하는 것은 아님을 이해할 것이다.

[0145] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "로부터 유도된"은 명시된 정수가 특정 공급원으로부터 꼭 직접적으로는 아닐 지라도 상기 특정 공급원으로부터 획득될 수 있음을 나타내는 것으로 이해해야 한다.

[0146] 선택된 정의

[0147] VEGF-B는 VEGF-B₁₈₆ 및 VEGF-B₁₆₇로 지칭되는 2개의 주 이소폼으로 존재하는 것으로 알려져 있다. 제한하는 것이 아니고 단지 명명을 위해, 인간 VEGF-B₁₈₆의 대표적인 서열은 NCBI 참조 서열(Reference Sequence): NP_003368.1에, NCBI 단백질 등록 번호 NP_003368, P49765 및 AAL79001에, 및 서열번호 1에 나타나 있다. 본 개시내용의 맥락에서, VEGF-B₁₈₆의 서열은 21개 아미노산 N-말단 신호 서열(예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 1 내지 21에 나타난 바와 같은)이 결합될 수 있다. 제한하는 것이 아니고 단지 명명을 위해, 인간 VEGF-B₁₆₇의 대표적인 서열은 NCBI 참조 서열: NP_001230662.1에, NCBI 단백질 등록 번호 AAL79000 및 AAB06274에, 및 서열번호 2에 나타나 있다. 본 개시내용의 맥락에서, VEGF-B₁₆₇의 서열은 21개 아미노산 N-말단 신호 서열(예를 들면, 서열번호 2의 아미노산 1 내지 21에 나타난 바와 같은)이 결합될 수 있다. VEGF-B의 또 다른 서열은 본원에 및/또는 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에 제공된 서열을 이용하여 결정될 수 있고/있거나 표준 기술(예를 들면, 문헌 [Ausubel *et al.*, (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present) or Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]에 기술된 바와 같은)을 이용하여 결정될 수 있다. 인간 VEGF-B에 대한 언급은 hVEGF-B로 약칭될 수 있다. 한 예로, 본원에서 VEGF-B에 대한 언급은 VEGF-B₁₆₇ 이소폼에 대한 것이다.

[0148] 본원에서 VEGF-B에 대한 언급은 또한 WO 2006/012688 호에 기술된 바와 같은 VEGF-B₁₀₋₁₀₈ 펩티드를 포함한다.

[0149] 용어 "상처"는 대상의 조직이 손상되는(예를 들면, 찢어지거나, 찢어지거나, 베이거나 그렇지 않으면 다치는) 임의의 부상을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0150] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "진피 상처"는 대상의 피부의 1개 이상의 층의 병변을 의미하는 것으로 이해해야 하며, 예를 들면, 이때 상기 병변은 하나 이상의 세포사멸성(apoptotic) 진피 세포 및/또는 하나 이상의 괴사성 진피 세포를 포함한다. 용어 "진피 상처"는 대상의 상피층 및/또는 대상의 진피층 및/또는 대상의 피하

층에 발생하는 상처를 포함하는 것으로 이해해야 한다.

- [0151] 용어 "만성 상처"는 규칙적인 세트의 단계들에서 및 예측가능한 기간에 치료되지 않는 상처를 말한다. 일반적으로, 3개월 이내에 치료되지 않는 상처는 만성으로 간주된다. 만성 상처로는, 예를 들면, 동맥 궤양, 당뇨병 궤양, 욕창, 정맥 궤양 등이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 급성 상처는 만성 상처로 발전될 수 있다.
- [0152] 용어 "급성 상처" 또는 "일반적인 상처"는 정상적인 상처 치료 복구가 일어나는 상처를 말한다.
- [0153] 용어 "상처 진행"은 상처의 악화, 예를 들면, 크기 및/또는 깊이의 증가 및/또는 더 진전된 단계로의 진행 및/또는 감염의 발생을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0154] 본 개시내용의 맥락에서 용어 "치료"는 화합물이 투여될 때부터 상당하거나 완전한 상처 봉합(전체 상처 축소)까지의 시간의 증진 또는 촉진이다.
- [0155] 용어 "조직"은 무리를 지어 특정 기능을 형성하는 인체내 세포의 덩어리를 말한다. 조직은 피부, 연골 및 결합 조직을 포함하나, 이로 한정되지는 않는다.
- [0156] 용어 "재조합체"는 인공적인 유전학적 재조합의 생성물을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 따라서, 항체 가변 영역을 포함하는 재조합 단백질의 맥락에서, 상기 용어는 B 세포 성숙시 일어나는 천연 재조합의 산물인 대상 신체내에서 자연적으로 생기는 항체를 포함하지 않는다. 그러나, 상기 항체가 단리되는 경우, 상기 항체는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 단백질로 간주될 것이다. 마찬가지로, 상기 단백질을 암호화하는 핵산이 단리되고 재조합 수단을 이용하여 발현되는 경우, 생성된 단백질은 항체 가변 영역을 포함하는 재조합 단백질이다. 재조합 단백질은 또한, 예를 들면, 그것이 발현되는 세포, 조직 또는 대상내에 존재할 때 인공적인 재조합 수단에 의해 발현된 단백질을 포함한다.
- [0157] 용어 "단백질"은 단일 폴리펩티드 쇄, 즉, 펩티드 결합에 의해 결합된 일련의 연속 아미노산 또는 서로에 공유적 또는 비-공유적으로 결합된 일련의 폴리펩티드 쇄(즉, 폴리펩티드 복합체)를 포함하는 것으로 이해해야 한다. 예를 들면, 일련의 폴리펩티드 쇄들은 적당한 화학적 또는 다이설파이드 결합을 이용하여 공유 결합될 수 있다. 비-공유 결합의 예로는 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스(Van der Waals) 힘 및 소수성 상호작용이 포함된다.
- [0158] 용어 "폴리펩티드" 또는 "폴리펩티드 쇄"는 앞 단락으로부터 펩티드 결합에 의해 결합된 일련의 연속 아미노산들을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0159] 숙련된 전문가라면, "항체"가 일반적으로 다수의 폴리펩티드 쇄, 예를 들면, 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 폴리펩티드 및 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 폴리펩티드로 구성된 가변 영역을 포함하는 단백질을 인지할 것이다. 항체는 또한 일반적으로 불변 도메인을 포함하며, 상기 불변 도메인의 일부는, 중쇄의 경우, 불변 단편 또는 결정화가능 단편(F_c)을 포함하는 불변 영역으로 배열될 수 있다. V_H 및 V_L 은 상호작용하여, 1개 또는 일부 밀접하게 관련된 항원들에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 포함하는 F_v 를 형성한다. 일반적으로, 포유동물로부터의 경쇄는 κ 경쇄 또는 λ 경쇄이고, 포유동물로부터의 중쇄는 α , δ , ϵ , γ 또는 μ 이다. 항체는 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 서브클래스의 항체일 수 있다. 용어 "항체"는 또한 인간화 항체, 영장류화 항체, 인간 항체, 합성인간화 항체 및 키메라 항체를 포함한다.
- [0160] 용어 "전장 항체", "온전한(intact) 항체" 또는 "전항체(whole antibody)"는 항체의 항원 결합 단편과 대조적으로, 그의 실질적으로 온전한 형태의 항체를 말하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 특히, 전항체는 F_c 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체를 포함한다. 불변 도메인은 야생형 서열 불변 도메인(예를 들면, 인간 야생형 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.
- [0161] 본원에서 사용된 바와 같이, "가변 영역" 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 본원에 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분들을 말하며, 상보성 결정 영역(CDR); 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 골격 영역(framework region)(FR)의 아미노산 서열을 포함한다. 대표적인 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3 또는 4개의 FR(예를 들면, FR1, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)을 포함한다. IgNAR로부터 유도된 단백질의 경우, 상기 단백질은 CDR2가 결여될 수 있다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 말한다. V_L 은 경쇄의 가변 영역을 말한다.
- [0162] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역"(동의어: CDR; 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3)은 그 존재가 항원

결합에 필수적인 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 말한다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 식별된 3개의 CDR을 갖는다. CDR 및 FR에 지정된 아미노산 위치들은 문헌 [Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991], 또는 본 개시내용의 시행시 다른 번호 체계, 예를 들면, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al. Nature 342, 877-883, 1989; and/or Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273: 927-948, 1997]의 정규 번호 체계; 문헌 [Lefranc et al., Devel. And Compar. Immunol., 27: 55-77, 2003]의 IMGT 번호 체계; 또는 문헌 [Honnegher and Plukthun J. Mol. Biol., 309: 657-670, 2001]의 AHO 번호 체계에 따라 정의될 수 있다.

[0163] "골격 영역"(FR)은 CDR 잔기들 이외의 다른 가변 도메인 잔기들이다.

[0164] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Fv"는, 다수의 폴리펩티드로 이루어지든지 또는 단일 폴리펩티드로 이루어지든지, V_L 및 V_H 가 결합하여 항원 결합 부위를 갖는, 즉, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 복합체를 형성하는 임의의 단백질을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 항원 결합 부위를 형성하는 V_H 및 V_L 은 단일 폴리펩티드 내에 존재하거나 상이한 폴리펩티드 내에 존재할 수 있다. 또한, 본 개시내용의 Fv(및 본 개시내용의 임의의 단백질)는 동일 항원에 결합하거나 결합하지 않을 수 있는 다수의 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 상기 용어는 항체로부터 직접 유도된 단편 뿐 아니라 재조합 수단을 이용하여 생성된 상기 단편에 상응하는 단백질을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 일부 예에서, V_H 는 중쇄 불변 도메인(C_H) 1에 결합되지 않고/않거나 V_L 은 경쇄 불변 도메인(C_L)에 결합되지 않는다. 대표적인 Fv 함유 폴리펩티드 또는 단백질은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 더 고차 복합체, 또는 그의 불변 영역 또는 도메인, 예를 들면, C_H2 또는 C_H3 도메인에 결합된 상기 단편들 중 임의 단편, 예를 들면, 미니바디(minibody)를 포함한다. "Fab 단편"은 항체의 1가 항원-결합 단편으로 이루어지며, 전항체를 효소 파파인으로 절단하여 온전한 경쇄 및 중쇄의 일부로 이루어진 단편을 수득함으로써 생성될 수 있거나, 재조합 수단을 이용하여 생성될 수 있다. 항체의 "Fab' 단편"은 전항체를 펩신으로 처리한 후 환원시켜 온전한 경쇄, 및 V_H 및 단일 불변 도메인을 포함하는 중쇄 일부로 이루어진 분자를 생성함으로써 수득될 수 있다. 상기 방식으로 처리된 항체 당 2개의 Fab' 단편이 수득될 수 있다. Fab' 단편은 또한 재조합 방법에 의해 생성될 수 있다. 항체의 "F(ab')₂ 단편"은 2개의 다이설파이드 결합에 의해 결속되는 2개의 Fab' 단편의 이량체로 이루어지며, 전항체 분자를 효소 펩신으로 처리함으로써 후속 환원없이 수득된다. "Fab₂" 단편은, 예를 들면, 류신 지퍼 또는 C_H3 도메인을 사용하여 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 재조합 단편이다. "단일쇄 Fv" 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역이 적절한 유연성 폴리펩티드 링커에 의해 공유 결합되는 항체의 가변 영역 단편(Fv)을 함유하는 재조합 분자이다.

[0165] 본원에서 사용된 바와 같이, 단백질 또는 그의 항원 결합 부위와 항원과의 상호작용과 관련하여 용어 "결합하다"는 상기 상호작용이 항원 상의 특정 구조(예를 들면, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존함을 의미한다. 예를 들면, 항체는 일반적으로 단백질이 아니라 특정 단백질 구조를 인식하고 그에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 표지된 "A" 및 단백질을 함유하는 반응에서, 에피토프 "A"(또는 유리, 비표지된 "A")를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0166] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하다"는 본 개시내용의 단백질이 대체 항원 또는 세포와 보다 더 자주, 더 신속하게, 더 긴 기간하에 및/또는 더 큰 친화도하에 특정 항원 또는 이를 발현하는 세포와 반응하거나 결합하는 것을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 예를 들면, 단백질은 다른 성장 인자(예, VEGF-A)에 대해서보다, 또는 다반응성 천연 항체에 의해(즉, 인간에서 자연적으로 발견되는 다양한 항원에 결합하는 것으로 알려진 천연 항체에 의해) 통상적으로 인식되는 항원에 대해서보다 실질적으로 더 큰 친화도(예를 들면, 20배 또는 40배 또는 60배 또는 80배 내지 100배 또는 150배 또는 200배)하에 VEGF-B에 결합한다. 반드시 그렇지 않지만, 일반적으로, 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미하며, 각각의 용어는 다른 용어에 대해 명백하게 지지하는 것으로 이해해야 한다.

[0167] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상쇄시키다"는 단백질이 VEGF-R1을 통해 세포에서 VEGF-B-신호전달을 차단하거나, 감소시키거나, 방지할 수 있음을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 상쇄를 측정하는 방법은 당해 분야에 알려져 있고/있거나 본원에 기술되어 있다.

[0168] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방하는", "예방하다" 또는 "예방"은 본 개시내용의 화합물을 투여함으로써

질병의 하나 이상의 증상의 발전을 중단시키거나 방해하는 것을 포함한다.

[0169] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 본원에 기술된 단백질을 투여함으로써 명시된 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 경감시키거나 제거하거나, 상기 질환 또는 질병의 진행을 지연시키는 것을 포함한다.

[0170] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상"은 인간을 포함한 임의의 동물, 예를 들면, 포유동물을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 대표적인 대상으로는 인간 및 비-인간 영장류가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 예를 들면, 대상은 인간이다.

[0171] 상처의 치료

[0172] 본 개시내용은 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여함으로써 상처의 치료를 촉진하고/하거나 개선하고/하거나 증진시키는 방법을 제공한다. 예를 들면, 방법은 화합물을 대상의 상처에 또는 대상에게 전신적으로 투여하는 것을 포함한다.

[0173] 한 예에서, 대상은 상처를 가지고 있다. 상기 상처는 만성, 급성 또는 일반적인 상처일 수 있다. 한 예에서, 상처는 만성이다. 한 예에서, 치료되는 상처는 표 1에 나타난 바와 같은 0A 단계 상처 또는 1A 단계 상처 또는 2A 단계 상처 또는 3A 단계 상처이다. 한 예에서, 치료되는 상처는 표 1에 나타난 바와 같은 0B 단계 상처 또는 1B 단계 상처 또는 2B 단계 상처 또는 3B 단계 상처이다. 한 예에서, 치료되는 상처는 표 1에 나타난 바와 같은 0C 단계 상처 또는 1C 단계 상처 또는 2C 단계 상처 또는 3C 단계 상처이다. 한 예에서, 치료되는 상처는 표 1에 나타난 바와 같은 0D 단계 상처 또는 1D 단계 상처 또는 2D 단계 상처 또는 3D 단계 상처이다.

표 1

[0174] 상처 단계(텍사스 상처 분류 시스템(Texas Wound Classification System)에 의해 정의된 바와 같음)

	상처 등급/깊이			
단계/공존질환	0	1	2	3
A	완전히 상피화된 궤양-전 또는 -후 병 변	힘줄, 피낭 또는 뼈는 수반하지 않는 표재성 궤양	힘줄 또는 피낭까지 침투되는 궤양	뼈 또는 관절까지 침투되는 궤양
B	0에 대해, 감염 있음	1에 대해, 감염 있음	2에 대해, 감염 있음	3에 대해, 감염 있음
C	0에 대해, 허혈 있음	1에 대해, 허혈 있음	2에 대해, 허혈 있음	3에 대해, 허혈 있음
D	0에 대해, 감염 및 허혈 있음	1에 대해, 감염 및 허혈 있음	2에 대해, 감염 및 허혈 있음	3에 대해, 감염 및 허혈 있음

[0175] 한 예에서, 대상은 감염되고/되거나 허혈성인 상처를 갖고 있다. 한 예에서, 상처는 전층 상처이다.

[0176] 한 예에서, 상처는 당뇨병성 궤양, 예를 들면, 당뇨병 족부 궤양이다. 당뇨병성 궤양은 표 1에 나타난 시스템을 사용하여 분류될 수 있다. 또 다른 예에서, 궤양은 표 2에 나타난 바와 같은 와그너 궤양 분류 시스템(Wagner Ulcer Classification System)에 따라 분류된다.

표 2

[0177] 와그너 궤양 분류 시스템

등급	병변
1	표재성 당뇨병성 궤양
2	농양 또는 골수염이 없이 인대, 힘줄, 관절낭 또는 근막을 수반하는 궤양 확대
3	농양 또는 골수염을 갖는 심부 궤양
4	앞발 일부분에 괴저
5	발의 광범위한 괴저

[0178] 당뇨병성 족부 궤양에 대한 위험 요인들중 일부의 예로는 발의 운동 및 감각 기능 둘 다에 영향을 미치는 말초 신

경병증, 제한된 관절 가동성, 발의 변형, 발 압력의 비정상적 분포, 반복적인 경미한 외상 및 손상된 시력이 포함된다. 말초 감각 신경병증이 주 요인이다. 모든 당뇨병 궤양화의 약 45 내지 60%가 신경병증성인 반면, 45% 이하의 신경병증 및 허혈성 요소를 둘 다 갖는다. 감각이 없는 발의 경우, 환자는, 예를 들면, 일상 생활의 보행 및 활동시 잘 맞지 않는 신발에 의해 야기된 발에 반복적인 손상을 인지할 수 없다. 보행의 변화된 생체역학과 함께 신경병증은 둔력 외상 및 발의 취약한 부분에 비정상적으로 높은 응력 하중의 분포를 유발하여 굳은살 생성 및 피부 짓무름을 야기한다. 일단 궤양이 형성되면, 궤양은 종종 치료를 지연시키고, 계속 확대될 수 있으며, 국소 또는 전신 감염의 기회를 제공하고, 치료를 촉진하기 위해 포괄적인 의학적 및 외과적 관리를 필요로 한다. 한 예에서, 상처는 본원에 기술된 화합물을 투여하기 전 적어도 약 2 주동안 대상에 존재하거나 존재하였다. 한 예에서, 상처는 본원에 기술된 화합물을 투여하기 전 적어도 약 4 주동안 대상에 존재하거나 존재하였다. 한 예에서, 상처는 본원에 기술된 화합물을 투여하기 전 적어도 약 6 주동안 대상에 존재하거나 존재하였다.

[0179] 본 개시내용의 방법은 또한, 상처 치료를 지연시키거나 비효과적인 상처 치료를 제공하는 치료를 받고 있거나 받았던 대상에게 적용될 수 있다. 치료는 약물치료, 방사선, 억제된 면역계를 야기하는 치료 등을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 한 예에서, 대상은, 상처 치료를 지연시키거나 비효과적인 상처 치료를 제공하는 2차 질병을 갖는다. 2차 질병으로는, 예를 들면, 당뇨병, 말초 혈관 질환, 감염, 자가면역 또는 콜라겐 혈관 질환, 억제된 면역계를 야기하는 질환 상태 등이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다.

[0180] 상처 치료를 평가하기 위해 정량적 분석, 예를 들면, 상처 면적의 %감소율의 측정 또는 완전 상처 봉합(예를 들면, 배액 또는 드레싱이 필요없는 피부 봉합으로 측정됨)을 이용할 수 있다. 상처 면적은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 치료 전에, 중에 및 후에 평가된다. 예를 들면, 평가는, 예를 들어, 정량적 면적측정, 사진, 물리적 검사 등에 의해 측정될 수 있다. 상처 면적은 치료 전에, 중에 및 후에 측정될 수 있다. 한 예에서, 상처 면적은, 상처의 길이, L, 즉 가장 가장자리에서 가장자리까지 길이(예를 들면, cm), 및 폭, W, 즉 L에 수직인 가장 가장자리에서 가장자리까지 폭(예를 들면, cm)을 측정하고, LxW를 곱하여 추정 표면적(cm)을 구함으로써 평가될 수 있다. 치료를 위한 상처의 크기는 달라질 수 있다. 본 발명의 한 예에서, 치료전 상처 면적은 약 0.4 cm^2 이상, 또는 약 1.0 cm^2 이상, 또는 약 0.4 내지 약 10 cm^2 , 또는 약 1 내지 약 10 cm^2 , 또는 약 1 내지 약 7 cm^2 , 또는 약 1 내지 약 5 cm^2 , 또는 4.0 cm^2 보다 크다. 상기 면적은 괴사조직제거(debridement) 전이나 후에 측정될 수 있다.

[0181] 상처 치료의 촉진은 상처 치료의 %촉진을 및/또는 위험비로 기술될 수 있다. 예를 들면, 화합물의 투여는, 대조군과 비교시, 상처 치료를 50%보다 많이, 또는 60% 이상, 70% 이상, 74% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 100% 이상, 110% 이상 촉진시킨다.

[0182] 본 개시내용의 방법은 대상들의 집단에서 상처 치료를 촉진하고/하거나 개선하고/하거나 증진시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 방법은 화합물을 상기 집단의 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 이때 상기 화합물의 투여는 대조군에 비해 상기 집단에서 상처 치료에 10%보다 더 큰(또는 12%, 또는 14%, 또는 15%, 또는 17%, 또는 20%, 또는 25%, 또는 30%, 또는 33%, 또는 35%, 또는 40%, 또는 45%, 또는 50% 이상보다 더 큰) 개선을 제공한다.

[0183] 상처(또는 궤양)의 재발을 감소시키기 위한 방법도 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 예를 들면, 방법은 궤양 재발 발생이 감소되도록 대상에게 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0184] 예를 들면, 수술을 받을(상처가 유도될 것일 때), 상처(예를 들면, 만성 상처)가 발생할 위험이 있는 대상에서 상처의 중증도를 감소시키기 위한 방법도 또한 제공된다.

[0185] 대안적 예로, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 상처로부터 야기된 흉터를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0186] 또 다른 대안적 예에서, 본 개시내용은, 대상에게 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상처(즉, 새로운 상처)의 형성을 예방하는 방법을 제공한다.

[0187] **VEGF-B 신호전달 억제제**

[0188] 항체 가변 영역을 포함하는 단백질

[0189] 대표적인 VEGF-B 신호전달 억제제는 항체 가변 영역을 포함하고, 예를 들면, VEGF-B에 결합하고 VEGF-B 신호전달을 상쇄시키는 항체 또는 항체 단편이다.

- [0190] 한 예에서, 항체 가변 영역은 VEGF-B에 특이적으로 결합한다.
- [0191] 적절한 항체 및 그의 가변 영역을 포함하는 단백질은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0192] 예를 들면, 항-VEGF-B 항체 및 그의 단편은 WO 2006/012688 호에 기술되어 있다.
- [0193] 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 VEGF-B에 대한 2H10의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 항체 2H10 또는 그의 키메라, CDR 그라프트화 또는 인간화 변형체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 이와 관련하여, 항체 2H10은 서열번호 3에 나타난 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 4에 나타난 서열을 포함하는 V_L 을 포함한다. 상기 항체의 대표적인 키메라 및 인간화 변형체는 WO 2006/012688 호에 기술되어 있다.
- [0194] 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 서열번호 5에 나타난 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 6에 나타난 서열을 포함하는 V_L 을 포함한다.
- [0195] 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 VEGF-B에 대한 4E12의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 항체 4E12 또는 그의 키메라, CDR 그라프트화 또는 인간화 변형체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 이와 관련하여, 항체 4E12는 서열번호 7에 나타난 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 8에 나타난 서열을 포함하는 V_L 을 포함한다.
- [0196] 한 예에서, 화합물은 항체 4E12의 인간화 가변 영역을 포함하는 단백질이다. 예를 들면, 상기 단백질은 항체 4E12의 V_H 및/또는 V_L 의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 예를 들면, 상기 단백질은 다음을 포함한다:
- [0197] (i) (a) 서열번호 7의 아미노산 25 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 7의 아미노산 49 내지 65에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 7의 아미노산 98 내지 105에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H ; 및/또는
- [0198] (ii) (a) 서열번호 8의 아미노산 24 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 8의 아미노산 50 내지 56에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 8의 아미노산 89 내지 97에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L .
- [0199] 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 VEGF-B에 대한 2F5의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 한 예에서, 항-VEGF-B 항체 또는 그의 단편은 항체 2F5 또는 그의 키메라, CDR 그라프트화 또는 인간화 변형체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 이와 관련하여, 항체 2F5는 서열번호 9에 나타난 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 10에 나타난 서열을 포함하는 V_L 을 포함한다.
- [0200] 한 예에서, 화합물은 항체 2F5의 인간화 가변 영역을 포함하는 단백질이다. 예를 들면, 상기 단백질은 항체 2F5의 V_H 및/또는 V_L 의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 예를 들면, 상기 단백질은 다음을 포함한다:
- [0201] (i) (a) 서열번호 9의 아미노산 25 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 9의 아미노산 49 내지 65에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 9의 아미노산 98 내지 107에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H ; 및/또는
- [0202] (ii) (a) 서열번호 10의 아미노산 24 내지 34에 나타난 서열을 포함하는 CDR1; (b) 서열번호 10의 아미노산 50 내지 56에 나타난 서열을 포함하는 CDR2; 및 (c) 서열번호 10의 아미노산 89 내지 96에 나타난 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_L .
- [0203] 또 다른 예에서, 항체 또는 그의 가변 영역을 포함하는 단백질은, 예를 들면, 당해 분야에 공지되어 있거나 본원에 간략하게 기술된 바와 같은 표준 방법을 이용하여 생성된다.
- [0204] 면역화-기반 방법
- [0205] 항체를 제조하기 위해, 선택적으로 임의의 적절하거나 바람직한 보조제 및/또는 약학적으로 허용되는 담체를 사용하여 제형화된 VEGF-B 또는 에피토프 함유 단편 또는 그의 일부 또는 그의 변형된 형태 또는 그를 암호화하는

핵산("면역원")을 주사가 가능한 조성물의 형태로 대상(예를 들면, 마우스, 래트, 닭 등과 같은 비-인간 동물 대상)에게 투여한다. 대표적인 비-인간 동물은 포유동물, 예를 들어, 뮤린 동물(예, 래트 또는 마우스)이다. 주사는 비강내, 근육내, 피하, 정맥내, 피내, 복강내, 또는 다른 공지된 경로에 의할 수 있다. 선택적으로, 면역원은 수차례 투여된다. 항체를 제조하고 특성화하기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] 참조). 마우스에서 항-VEGF-B 항체를 생성하는 방법은 WO 2006/012688 호에 기술되어 있다.

[0206] 다클론성 항체의 생성은 면역화후 여러 시점에서 면역화된 동물의 혈액을 채혈하여 모니터링할 수 있다. 목적하는 항체 역가를 달성하기 위해 필요한 경우, 2차 추가접종(booster) 주사가 제공될 수 있다. 추가접종 및 역가측정 과정은 적절한 역가가 달성될 때까지 반복된다. 목적하는 수준의 면역원성이 달성되면, 면역화된 동물을 출혈시키고 혈청을 분리하고 저장하고/하거나, 상기 동물을 이용하여 단클론성 항체(mAb)를 제조한다.

[0207] 단클론성 항체는 본 개시내용에 포함되는 대표적인 항체이다. 일반적으로, 단클론성 항체의 생성은, 항체 생성 세포를 자극하기에 충분한 조건하에서 대상(예를 들면, 설치류, 예, 마우스 또는 래트)을 면역원으로 면역화시키는 것을 포함한다. 몇몇 예에서, 인간 항체를 발현하고 뮤린 항체 단백질은 발현하지 않도록 유전자-조작된 마우스를 면역화시켜 항체를 생성한다(예를 들면, PCT/US2007/008231 호 및/또는 문헌 [Lonberg et al., Nature 368 (1994): 856-859]에 기술된 바와 같이). 면역화후, 항체 생성 체세포(예를 들면, B 림프구)를 불멸 세포, 예를 들면, 불멸 골수종 세포와 융합시킨다. 상기 융합 세포(하이브리도마)를 생성하기 위한 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975]에 기술되어 있다. 하이브리도마 세포는 이어서 항체 생성에 충분한 조건하에서 배양될 수 있다.

[0208] 본 개시내용은 항체를 생성하기 위한 다른 방법, 예를 들면, ABL-MYC 기술(예를 들면, 문헌 [Largaespada et al, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 166, 91-96. 1990]에 기술된 바와 같은)을 고려한다.

[0209] 라이브러리-기반 방법

[0210] 본 개시내용은 또한 VEGF-B 결합 항체 또는 그의 가변 영역을 포함하는 단백질을 동정하기 위해 항체 또는 그의 항원 결합 도메인을 포함하는(예를 들면, 그의 가변 영역을 포함하는) 단백질의 라이브러리의 스크리닝을 포함한다.

[0211] 본 개시내용에 의해 고려되는 라이브러리의 예로는 미감작(naive) 라이브러리(항원자극되지 않은 대상으로부터의), 면역화 라이브러리(항원으로 면역화된 대상으로부터의) 또는 합성 라이브러리가 포함된다. 항체 또는 그의 영역(예를 들면, 가변 영역)을 암호화하는 핵산은 통상적인 기술(예를 들면, 문헌 [Sambrook and Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed, vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001]에 기술된 바와 같은)에 의해 클로닝되고, 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 단백질을 암호화하고 디스플레이하기 위해 사용된다. 단백질의 라이브러리를 제작하기 위한 다른 기술은, 예를 들면, US 6300064 호(예를 들면, 모르포시스 AG(Morphosys AG)의 HuCAL 라이브러리); US 5885793 호; US 6204023 호; US 6291158 호; 또는 US 6248516 호에 기술되어 있다.

[0212] 본 개시내용에 따른 단백질은 분비된 가용성 단백질일 수 있거나, 세포 표면 상의 융합 단백질로서, 또는 입자(예를 들면, 파지 또는 다른 바이러스, 리보솜 또는 포자)로서 제공될 수 있다. 다양한 디스플레이 라이브러리 포맷이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 라이브러리는 시험관내 디스플레이 라이브러리(예를 들면, US 7270969 호에 기술된 바와 같은, 리보솜 디스플레이 라이브러리, 공유성 디스플레이 라이브러리 또는 mRNA 디스플레이 라이브러리)이다. 또 다른 예에서, 디스플레이 라이브러리는, 예를 들면, US 6300064 호; US 5885793 호; US 6204023 호; US 6291158 호; 또는 US 6248516 호에 기술된 바와 같은, 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질이 파지상에서 발현되는 파지 디스플레이 라이브러리이다. 다른 파지 디스플레이 방법들도 당해 분야에 공지되어 있으며 본 개시내용에 고려된다. 유사하게, 세포 디스플레이 방법, 예를 들면, US 5516637 호에 기술된 바와 같은, 예를 들면, 세균 디스플레이 라이브러리; 예를 들면, US 6423538 호에 기술된 바와 같은 효모 디스플레이 라이브러리, 또는 포유동물 디스플레이 라이브러리가 본 개시내용에 고려된다.

[0213] 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 한 예로, 본 개시내용의 디스플레이 라이브러리는, 예를 들면, 문헌 [Scopes, In: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994]에 기술된 바와 같은 친화성 정제를 이용하여 스크리닝된다. 친화성 정제 방법은 전형적으로 라이브러리에 의해 디스플레이된 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질을 표적 항원(예를 들면, VEGF-B)과 접촉시키고, 세척 후에, 항원에 결합되어 남아있는 도메인들을 용출시키는 것을 포함한다.

- [0214] 스크리닝에 의해 확인된 임의의 가변 영역 또는 scFv는 필요한 경우 완전 항체로 용이하게 변형된다. 가변 영역 또는 scFv를 완전 항체로 변형하거나 재포맷화하기 위한 대표적인 방법은, 예를 들면, 문헌 [Jones et al., J Immunol Methods. 354:85-90, 2010; or Jostock et al., J Immunol Methods, 289: 65-80, 2004]에 기술되어 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 예를 들면, 문헌 [Ausubel et al (In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987] 및/또는 [Sambrook et al (In: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001]에 기술된 바와 같은 표준 클로닝 방법들이 이용된다.
- [0215] 탈면역화, 키메라, 인간화, 합성인간화, 영장류화 및 인간 단백질
- [0216] 본 개시내용의 단백질은 인간화 단백질일 수 있다.
- [0217] 용어 "인간화 단백질"은, 인간 항체로부터의 FR에 그래프트되거나 그에 삽입된 비-인간 중(예를 들면, 마우스 또는 래트 또는 비-인간 영장류)으로부터의 항체로부터의 CDR을 포함하는, 인간-유사 가변 영역을 포함하는 단백질을 말하는 것으로 이해해야 한다(상기 유형의 항체는 또한 "CDR-그래프트된 항체"로도 지칭된다). 인간화 단백질은 또한, 인간 단백질의 하나 이상의 잔기가 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형되고/되거나 인간 단백질의 하나 이상의 FR 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 치환된 단백질을 포함한다. 인간화 단백질은 또한 인간 항체에서도 비-인간 항체에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 단백질의 임의의 추가의 영역(예를 들면, Fc 영역)은 일반적으로 인간 영역이다. 인간화는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, US 5225539 호, US 6054297 호, US 7566771 호 또는 US 5585089 호의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 용어 "인간화 단백질"은 또한, 예를 들면, US 7732578 호에 기술된 바와 같은 초-인간화 단백질을 포함한다.
- [0218] 본 개시내용의 단백질은 인간 단백질일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "인간 단백질"은, 인간에서, 예를 들면, 인간 생식선 또는 체세포에서 발견되거나 상기 영역을 이용하여 제작된 라이브러리로부터 발견되는 가변 및 선택적으로 불변 항체 영역을 갖는 단백질을 말한다. "인간" 항체는 인간 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기, 예를 들면, 시험관내에서 랜덤 또는 부위 지향 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이(특히 보존적 치환을 포함하는 돌연변이 또는 단백질의 소수의 잔기, 예를 들면, 단백질의 잔기들 중 1, 2, 3, 4 또는 5개 잔기에서의 돌연변이)를 포함할 수 있다. 상기 "인간 항체"는 반드시 인간의 면역 반응의 결과로서 생성되어야 하는 것은 아니며, 오히려 이들은 재조합 수단(예를 들면, 파지 디스플레이 라이브러리 스크리닝)을 이용하고/하거나 인간 항체 불변 및/또는 가변 영역을 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자원이 동물(예, 마우스)에 의해서 및/또는 유도 선택(예를 들면, US 5565332 호에 기술된 바와 같은)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 용어는 또한 상기 항체들의 친화도 증진된 형태를 포함한다. 본 개시내용에 있어서, 인간 단백질은 또한 인간 항체로부터의 FR 또는 인간 FR의 공통 서열로부터의 서열을 포함하는 FR을 포함하는 단백질을 포함하는 것으로 간주될 것이며, 여기서 CDR 중 하나 이상은, 예를 들면, US 6300064 호 및/또는 US 6248516 호에 기술된 바와 같이, 랜덤 또는 준-랜덤이다.
- [0219] 본 개시내용의 단백질은 합성인간화 단백질일 수 있다. 용어 "합성인간화 단백질"은 WO 2007/019620 호에 기술된 방법에 의해 제조된 단백질을 말한다. 합성인간화 단백질은, 뉴월드(New World) 영장류 항체 가변 영역으로부터의 FR 및 비-뉴월드 영장류 항체 가변 영역으로부터의 CDR을 포함하는 항체의 가변 영역을 포함한다. 예를 들면, 합성인간화 단백질은 뉴월드 영장류 항체 가변 영역으로부터의 FR 및 마우스 또는 래트 항체로부터의 CDR을 포함하는 항체의 가변 영역을 포함한다.
- [0220] 본 개시내용의 단백질은 영장류화 단백질일 수 있다. "영장류화 단백질"은 비-인간 영장류(예를 들면, 사이노물거스 마카크(cynomolgus macaque))의 면역화 후에 제조된 항체로부터의 가변 영역을 포함한다. 선택적으로, 비-인간 영장류 항체의 가변 영역은 인간 불변 영역에 결합되어 영장류화 항체를 생성한다. 영장류화 항체를 생성하기 위한 대표적인 방법은 US 6113898 호에 기술되어 있다.
- [0221] 한 예에서, 본 개시내용의 단백질은 키메라 단백질이다. 용어 "키메라 단백질"은, 항원 결합 도메인이 특정 중(예를 들면, 마우스 또는 래트와 같은 뮤린)으로부터의 것이거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 반면, 단백질의 나머지 부분은 또 다른 중(예를 들면, 인간 또는 비-인간 영장류와 같은)으로부터 유래된 단백질로부터의 것이거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 단백질을 말한다. 한 예로, 키메라 단백질은 비-인간 항체(예를 들면, 뮤린 항체)로부터의 V_H 및/또는 V_L 를 포함하는 키메라 항체이며, 상기 항체의 나머지 영역들은 인간 항체로부터의 영역들이다. 상기 키메라 단백질의 제조는 당해 분야에 공지되어 있으며, 표준 방법(예를 들면, US 6331415 호; US 5807715 호; US 4816567 호 및 US 4816397 호에 기술된 바와 같은)에

의해 달성될 수 있다.

- [0222] 본 개시내용은 또한, 예를 들면, WO 2000/34317 호 및 WO 2004/108158 호에 기술된 바와 같은 탈면역화 단백질을 고려한다. 탈면역화 항체 및 단백질은 하나 이상의 에피토프, 예를 들면, B 세포 에피토프 또는 T 세포 에피토프가 제거(즉, 돌연변이)됨으로써 대상이 항체 또는 단백질에 대한 면역 반응을 야기할 가능성을 감소시킨다.
- [0223] 항체 가변 영역을 포함하는 기타 단백질
- [0224] 본 개시내용은 또한 다음과 같은 항체의 가변 영역 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 다른 단백질을 고려한다:
- [0225] (i) 항체의 V_H 또는 V_L 의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 체인 단일-도메인 항체(예를 들면, US 6248516 호 참조);
- [0226] (ii) 예를 들면, US 5844094 호 및/또는 US 2008152586 호에 기술된 바와 같은 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디;
- [0227] (iii) 예를 들면, US 5260203 호에 기술된 바와 같은 scFv;
- [0228] (iv) 예를 들면, US 5837821 호에 기술된 바와 같은 미니바디;
- [0229] (v) US 5731168 호에 기술된 바와 같은 "키 앤 홀(key and hole)" 이중특이성 단백질;
- [0230] (vi) 예를 들면, US 4676980 호에 기술된 바와 같은 헤테로접합체 단백질;
- [0231] (vii) 예를 들면, US 4676980 호에 기술된 바와 같은 화학적 가교결합체를 사용하여 생성된 헤테로접합체 단백질;
- [0232] (viii) 예를 들면, 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225, 1992]에 기술된 바와 같은 Fab'-SH 단편; 또는
- [0233] (ix) Fab₃(예를 들면, EP 19930302894 호에 기술된 바와 같은).
- [0234] 불변 도메인 융합
- [0235] 본 개시내용은 항체의 가변 영역 및 그의 불변 영역 또는 Fc 또는 도메인, 예를 들면, C_H2 및/또는 C_H3 도메인을 포함하는 단백질을 포함한다. 적절한 불변 영역 및/또는 도메인은 숙련된 전문가에게 명백할 것이고/이거나 상기 폴리펩티드의 서열은 공개적으로 이용가능한 데이터베이스로부터 용이하게 이용가능하다. 카밧 등(Kabat et al.)은 일부 적절한 불변 영역/도메인에 대한 설명을 또한 제공하고 있다.
- [0236] 그의 불변 영역 및/또는 도메인은 생물 활성, 예를 들면, 이량체화, 예를 들면, FcRn(신생아 Fc 수용체)에 결합 시킴으로써 연장된 혈청 반감기, 항원 의존성 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC), 항원 의존성 세포식균작용(ADCP)을 제공하는데 유용하다.
- [0237] 본 개시내용은 또한, 예를 들면, US 7217797 호; US 7217798 호; 또는 US 20090041770 호(증가된 반감기 가짐) 또는 US 2005037000 호(증가된 ADCC)에 기술된 바와 같은, 돌연변이 불변 영역 또는 도메인을 포함하는 단백질을 고려한다.
- [0238] 안정화된 단백질
- [0239] 본 개시내용의 상쇄 단백질은 IgG4 불변 영역 또는 안정화된 IgG4 불변 영역을 포함할 수 있다. 용어 "안정화된 IgG4 불변 영역"은, Fab 팔 교환, 또는 Fab 팔 교환 또는 절반-항체(half-antibody)의 생성이 일어나는 경향 또는 절반-항체를 생성하는 경향을 감소시키도록 변형된 IgG4 불변 영역을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "Fab 팔 교환"은, IgG4 중쇄 및 결합된 경쇄(절반-분자)가 또 다른 IgG4 분자로부터의 중쇄-경쇄 쌍과 교환되는, 인간 IgG4에 대한 일종의 단백질 변형을 말한다. 따라서, IgG4 분자는 2개의 별개의 항원을 인식하는 2개의 별개의 Fab 팔을 획득할 수 있다(이중특이성 분자 생성). Fab 팔 교환은 생체내에서 자연적으로 일어나며, 시험관내에서는 정제된 혈액 세포 또는 환원된 글루타티온과 같은 환원제에 의해 유도될 수 있다. "절반 항체"는 IgG4 항체가 해리되어 각각 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 함유하는 2개의 분자를 생성할 때 생성된다.
- [0240] 한 예로, 안정화된 IgG4 불변 영역은 카밧 시스템[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 and/or 1991]에 따른

힌지 영역의 위치 241에 프롤린을 포함한다. 상기 위치는 EU 번호 체계[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001 and Edelman et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85, 1969]에 따른 힌지 영역의 위치 228에 상응한다. 인간 IgG4에서, 상기 잔기는 일반적으로 세린이다. 프롤린의 세린으로의 치환 후에, IgG4 힌지 영역은 서열 CPPC를 포함한다. 이와 관련하여, 숙련된 자라면 "힌지 영역"이 Fc 및 Fab 영역을 결합시켜 항체의 2개의 Fab 팔에 이동성을 부여하는 항체 중쇄 불변 영역의 프롤린-풍부 부분인 것을 인지할 것이다. 힌지 영역은 중쇄내 다이설파이드 결합에 포함되는 시스테인 잔기를 포함한다. 상기 힌지 영역은 일반적으로 카바트의 번호 체계에 따른 인간 IgG1의 Glu226으로부터 Pro243까지의 연장부로 정의된다. 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역들은, 중쇄내 다이설파이드(S-S) 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일 위치에 배치함으로써 IgG1 서열에 맞추어 정렬될 수 있다(예를 들면, WO 2010/080538 호 참조).

- [0241] 추가된 단백질-기반 VEGF-B 신호전달 억제제
- [0242] VEGF-B와 그의 수용체와의 생산적 상호작용을 방해할 수 있는 다른 단백질로는 돌연변이 VEGF-B 단백질이 포함된다.
- [0243] 한 예로, 억제제는 VEGF-B에 결합하는(및, 예를 들면, VEGF-A에는 실질적으로 결합하지 않는) VEGF-R1의 하나 이상의 도메인을 포함하는 가용성 단백질이다. 한 예에서, 가용성 단백질은 또한 항체, 예를 들면, IgG1 항체의 불변 영역을 포함한다. 예를 들면, 가용성 단백질은 Fc 영역, 및 선택적으로 항체, 예를 들면, IgG1 항체의 힌지 영역을 추가로 포함한다.
- [0244] 한 예에서, 단백질 억제제는 항체 모방체, 예를 들면, 항체와 유사한 방식으로 표적 단백질에 결합하는 가변 영역을 포함하는 단백질 스캐폴드(scaffold)이다. 대표적인 항체 모방체에 대한 설명은 뒤에 이어진다.
- [0245] 면역글로불린 및 면역글로불린 단편
- [0246] 본 개시내용의 화합물의 한 예는 면역글로불린, 예를 들면, T 세포 수용체 또는 중쇄 면역글로불린(예를 들면, IgNAR, 카멜리드 항체)의 가변 영역을 포함하는 단백질이다.
- [0247] 중쇄 면역글로불린
- [0248] 중쇄 면역글로불린은, 이들이 중쇄를 포함하고 경쇄를 포함하지 않는 한 많은 다른 형태의 면역글로불린(예를 들면, 항체)과 구조적으로 상이하다. 따라서, 상기 면역글로불린은 또한 "중쇄만 있는 항체"로도 지칭된다. 중쇄 면역글로불린은, 예를 들면, 카멜리드 및 연골 어류에서 발견된다(IgNAR로도 불림).
- [0249] 천연 중쇄 면역글로불린에 존재하는 가변 영역은 일반적으로, 이들을 통상적인 4-쇄 항체에 존재하는 중쇄 가변 영역("V_H 도메인"으로 지칭됨) 및 통상적인 4-쇄 항체에 존재하는 경쇄 가변 영역("V_L 도메인"으로 지칭됨)과 구별하기 위해, 카멜리드 Ig 및 IgNAR중 V-NAR에서 "V_{HH} 도메인"으로 지칭된다.
- [0250] 중쇄 면역글로불린은 관련 항원에 고 친화도 및 고 특이성 하에 결합하기 위해 경쇄의 존재를 필요로 하지 않는다. 이것은 단일 도메인 결합 단편이, 발현하기에 용이하고 일반적으로 안정하고 가용성인 경쇄 면역글로불린으로부터 유도될 수 있음을 의미한다.
- [0251] 카멜리드로부터의 중쇄 면역글로불린 및 그의 가변 영역 및 그의 제조 및/또는 단리 방법 및/또는 용도에 대한 일반적인 설명은 특히 하기 참조 WO 94/04678 호, WO 97/49805 호 및 WO 97/49805 호에서 확인된다.
- [0252] 연골 어류로부터의 중쇄 면역글로불린 및 그의 가변 영역 및 그의 제조 및/또는 단리 방법 및/또는 용도에 대한 일반적인 설명은 특히 WO 2005/118629 호에서 확인된다.
- [0253] V-유사 단백질
- [0254] 본 개시내용의 화합물의 한 예는 T-세포 수용체이다. T 세포 수용체는 항체의 Fv 모듈과 구조적으로 유사하게 결합하는 2개의 V-도메인을 갖는다. 문헌 [Novotny et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 8646-8650, 1991]은, T-세포 수용체의 2개의 V-도메인(알파 및 베타로 지칭)이 융합되고 단일쇄 폴리펩티드로 발현될 수 있는 방법, 및 또한, 항체 scFv와 직접적으로 유사한 소수성을 감소시키기 위해 표면 잔기를 변화시키는 방법을 기술하고 있다. 2개의 V-알파 및 V-베타 도메인을 포함하는 단일쇄 T-세포 수용체 또는 다량체성 T-세포 수용체의 생성을 기술하고 있는 다른 공개공보로는 WO 1999/045110 호 또는 WO 2011/107595 호가 포함된다.
- [0255] 항원 결합 도메인을 포함하는 다른 비-항체 단백질로는, 일반적으로 단량체성인 V-유사 도메인을 갖는 단백질이

포함된다. 상기 V-유사 도메인을 포함하는 단백질의 예로는 CTLA-4, CD28 및 ICOS가 포함된다. 상기 V-유사 도메인을 포함하는 단백질에 대한 추가의 개시는 WO 1999/045110 호에 포함되어 있다.

[0256] 에드넥틴(Adnectin)

[0257] 한 예에서, 본 개시내용의 화합물은 에드넥틴이다. 에드넥틴은, 루프 영역이 변이되어 항원 결합을 제공하는 인간 피브로넥틴의 열번째 제 III형 피브로넥틴(¹⁰Fn3) 도메인을 기반으로 한다. 예를 들면, ¹⁰Fn3 도메인의 β-샌드위치의 한쪽 말단에서 3개의 루프가 에드넥틴이 항원을 특이적으로 인식할 수 있게 조작될 수 있다. 추가의 세부사항에 대해서는 US 20080139791 호 또는 WO 2005/056764 호를 참조하시오.

[0258] 안티칼린(Anticalin)

[0259] 또 다른 예로, 본 개시내용의 화합물은 안티칼린이다. 안티칼린은, 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질과 같은 소형 소수성 분자들을 운반하는 세포의 단백질의 한 계열인 리포칼린으로부터 유도된다. 리포칼린은, 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 원추형 구조의 개방 말단에 다수의 루프를 갖는 견고한 β-시트 2차 구조를 갖는다. 상기 조작된 리포칼린은 안티칼린으로 알려져 있다. 안티칼린에 대한 추가의 설명은 US 7250297B1 호 또는 US 20070224633 호를 참조하시오.

[0260] 어피바디(Affibody)

[0261] 또 다른 예로, 본 개시내용의 화합물은 어피바디이다. 어피바디는 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 스태필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A의 Z 도메인(항원 결합 도메인)으로부터 유도된 스캐폴드이다. Z 도메인은 약 58개 아미노산의 3-나선형 다발로 이루어진다. 라이브러리는 표면 잔기의 무작위화에 의해 제작되었다. 추가의 세부사항에 대해서는 EP 1641818 호를 참조하시오.

[0262] 아비머(Avimer)

[0263] 또 다른 예로, 본 개시내용의 화합물은 아비머이다. 아비머는 A-도메인 스캐폴드 계열로부터 유도된 다중도메인 단백질이다. 약 35개 아미노산의 천연 도메인은 정의된 다이설파이드 결합된 구조를 갖는다. 다양성은 A-도메인 계열에 의해 나타난 천연 변이의 서플링에 의해 제공된다. 추가의 세부사항에 대해서는 WO 2002088171 호를 참조하시오.

[0264] DARPin

[0265] 또 다른 예로, 본 개시내용의 화합물은 설계된 안키린 반복 단백질(Designed Ankyrin Repeat Protein, DARPin)이다. DARPin은 세포골격에 대한 내재막 단백질의 결합을 매개하는 단백질 계열인 안키린으로부터 유도된다. 단일 안키린 반복서열은 2개의 α-나선 및 β-회전으로 이루어지는 33개 잔기 모티프이다. 이들은, 각 반복서열의 첫번째 α-나선 및 β-회전에 잔기들을 무작위배정함으로써 상이한 표적 항원들에 결합하도록 조작될 수 있다. 그의 결합 계면은 모듈(친화도 증진 방법)의 수를 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 추가의 세부사항에 대해서는 US 2004013208 호를 참조하시오.

[0266] 단백질 제조 방법

[0267] 재조합체 발현

[0268] 재조합 단백질의 경우에, 이를 암호화하는 핵산을 발현 벡터에 클로닝시킬 수 있으며, 이어서 숙주 세포, 예를 들면, 달리 항체를 생성하지 않는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포, 예를 들면, 유인원 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포 또는 골수종 세포에 형질감염시킨다. 본 개시내용의 단백질을 발현시키기 위해 사용되는 대표적인 세포는 CHO 세포, 골수종 세포 또는 HEK 세포이다. 상기 목적을 달성하기 위한 분자 클로닝 기술은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Ausubel et al., (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present) or Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]에 기술되어 있다. 매우 다양한 클로닝 및 시험관내 증폭 방법이 재조합 핵산 제조에 적합하다. 재조합 항체를 제조하는 방법은 또한 당해 분야에 공지되어 있다(US 4816567 호 또는 US 5530101 호 참조).

[0269] 달리 후에, 핵산은 추가의 클로닝(DNA의 증폭)을 위해 또는 무세포 시스템에서 또는 세포에서의 발현을 위해 발현 구조물 또는 발현 벡터에 삽입되고 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

- [0270] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터"는 그의 가장 넓은 맥락으로 이해되어야 하며, 예를 들면, 발달상 및/또는 외부 자극에 반응하여 또는 조직 특이적 방식으로 핵산의 발현을 변화시키는 추가의 조절 요소(예를 들면, 상류 활성화 서열, 전사 인자 결합 부위, 인핸서 및 사이렌서(silencer))의 존재 또는 부재하에서, 정확한 전사 개시에 필요한 TATA 박스 또는 개시 요소를 포함한 게놈 유전자의 전사 조절 서열을 포함한다. 본원에서, 용어 "프로모터"는, 또한 재조합, 합성 또는 융합 핵산, 또는 그에 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 제공하거나 활성화하거나 증대시키는 유도체를 기술하기 위해 사용된다. 대표적인 프로모터는, 발현을 더 증대시키고/시키거나 상기 핵산의 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변화시키기 위한 하나 이상의 특정 조절 요소들의 추가의 복제물을 함유할 수 있다.
- [0271] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 핵산의 발현이 프로모터에 의해 조절되도록 프로모터를 핵산에 대해 위치시키는 것을 의미한다.
- [0272] 세포내 발현을 위한 많은 벡터들이 이용가능하다. 벡터 성분으로는 일반적으로 다음 중 하나 이상이 포함되지만, 이로 한정되지는 않는다: 신호 서열, 항체(예를 들면, 본원에 제공된 정보로부터 유도된)를 암호화하는 서열, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종료 서열. 숙련된 전문가라면 항체의 발현에 적합한 서열을 인지할 것이다. 대표적인 신호 서열로는 원핵세포 분비 신호(예, pelB, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II), 효모 분비 신호(예, 인버타제 리더, α 인자 리더 또는 산 포스파타제 리더) 또는 포유동물 분비 신호(예, 단순 헤르페스 gD 신호)가 포함된다.
- [0273] 포유동물 세포에서 활성인 대표적인 프로모터로는 사이토메갈로바이러스 극초기발현(immediate early) 프로모터(CMV-IE), 인간 연장 인자 1- α 프로모터(EF1), 소핵 RNA 프로모터(U1a 및 U1b), α -미오신 중쇄 프로모터, 유인원 바이러스 40 프로모터(SV40), 라우스 육종(Rous sarcoma) 바이러스 프로모터(RSV), 아데노바이러스(Adenovirus) 주요 말기발현 프로모터, β -액틴 프로모터; CMV 인핸서/ β -액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터 또는 그의 활성 단편을 포함하는 하이브리드 조절 요소가 포함된다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 인간 배아 신장 세포주(293 또는 293 세포); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 또는 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)이다.
- [0274] 효모 세포, 예를 들면, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 사카로마이세스 폼베(*S. pombe*)를 포함하는 군에서 선택된 효모 세포에서의 발현에 적합한 전형적인 프로모터로는 ADH1 프로모터, GAL1 프로모터, GAL4 프로모터, CUP1 프로모터, PHO5 프로모터, nmt 프로모터, RPR1 프로모터 또는 TEF1 프로모터가 포함되나 이로 한정되지는 않는다.
- [0275] 단리된 핵산 또는 이를 포함하는 발현 구조물을 발현을 위해 세포에 도입하기 위한 수단은 당해 분야에 숙련된 자에게 공지되어 있다. 주어진 세포에 사용되는 기술은 공지된 성공적인 기술에 따라 달라진다. 재조합 DNA를 세포에 도입하기 위한 수단은 미세주사, DEAE-텍스트란에 의해 매개된 형질감염, 예를 들면, 리포펙타민(깁코(Gibco), MD, USA) 및/또는 셀펙틴(깁코, MD, USA)을 사용함으로써 리포솜에 의해 매개된 형질감염, PEG-매개된 DNA 흡수, 전기천공, 및 특히, 예를 들면, DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자(어그레이스터스 인코포레이티드(Agracetus Inc.), WI, USA)를 사용한 미립자 충격을 포함한다.
- [0276] 항체를 생성하기 위해 사용되는 숙주 세포는 사용되는 세포 유형에 따라서 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 시판하는 배지, 예를 들면, 함 F10(Ham's F10)(시그마(Sigma)), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium, MEM)(시그마), RPMI-1640(시그마) 및 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(시그마)가 포유동물 세포를 배양하기에 적합하다. 본원에서 논의된 다른 세포 유형을 배양하기 위한 배지는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0277] 단백질 정제
- [0278] 생성/발현 후에, 본 개시내용의 단백질은 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 정제한다. 상기 정제는 비특이적 단백질, 산, 지질, 탄수화물 등을 실질적으로 함유하지 않는 본 개시내용의 단백질을 제공한다. 한 예에서, 단백질은 제제중 단백질의 약 90% 이상(예를 들면, 95%, 98% 또는 99%)이 본 개시내용의 단백질인 제제로 존재할 것이다.
- [0279] 본 개시내용의 단리된 단백질을 수득하기 위해, 다양한 고압(또는 고성능) 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 비-HPLC 폴리펩티드 단리 프로토콜, 예를 들면, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 혼합방식 크로마토그래피, 상 분리 방법, 전기영동 분리, 침전법, 염용/염석 방법, 면

역크로마토그래피 및/또는 기타 방법을 포함하는(이로 한정되지는 않는다) 펩티드 정제의 표준 방법을 이용한다.

[0280] 한 예로, 친화성 정제는 표지를 포함하는 융합 단백질을 분리하기에 유용하다. 친화 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 분리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Scopes, In: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994]에 기술되어 있다. 예를 들면, 표지(폴리히스티딘 태그의 경우, 이것은, 예를 들면, 니켈-NTA일 수 있다)에 결합하는 항체 또는 화합물을 고체 지지체 상에 고정화시킨다. 이어서, 단백질을 포함하는 샘플을 고정화된 항체 또는 화합물과 결합이 일어나기에 충분한 시간동안 그러한 조건하에서 접촉시킨다. 세척하여 임의의 미결합 또는 비-특이적 결합 단백질을 제거한 후, 단백질을 용출한다.

[0281] 항체의 Fc 영역을 포함하는 단백질의 경우, 단백질 A 또는 단백질 G 또는 그의 변형된 형태를 친화성 정제에 사용할 수 있다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄 Fc 영역을 포함하는 정제된 단백질을 분리하는데 유용하다. 단백질 G는 모든 마우스 Fc 이소타입 및 인간 $\gamma 3$ 에 추천된다.

[0282] 핵산-기반 VEGF-B 신호전달 억제제

[0283] 본 개시내용의 한 예에서, 본 개시내용의 임의의 예에 따라 본원에 기술된 바와 같은 치료 및/또는 예방 방법은 VEGF-B의 발현을 감소시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 상기 방법은 핵산의 전사 및/또는 번역을 감소시키는 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 한 예에서, 상기 화합물은 핵산, 예를 들면, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, PNA, 간섭 RNA, siRNA 또는 마이크로RNA이다.

[0284] 안티센스 핵산

[0285] 용어 "안티센스 핵산"은, 본 개시내용의 임의의 예에서 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 암호화하고 mRNA 번역과 같은 전사후 사건을 방해할 수 있는 특정 mRNA 분자의 적어도 일부분에 상보적인 DNA 또는 RNA 또는 그의 유도체(예를 들면, LNA 또는 PNA) 또는 그의 조합을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 안티센스 방법의 사용은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 문헌 [Hartmann and Endres (editors), Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999)] 참조).

[0286] 본 개시내용의 안티센스 핵산은 생리적 조건하에서 표적 핵산과 하이브리드화될 것이다. 안티센스 핵산은, 구조적 유전자 또는 암호화 영역에, 또는 유전자 발현 또는 스플라이싱에 대한 조절을 수행하는 서열에 상응하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 안티센스 핵산은 VEGF-B를 암호화하는 핵산의 표적화된 암호화 영역, 또는 이들의 5'-미번역 영역(UTR) 또는 3'-UTR에 상응할 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 부분적으로 인트론 서열에 상보적일 수 있으며, 상기 인트론 서열은 전사 중이나 후에, 예를 들면, 표적 유전자의 엑손 서열에만 스플라이싱될 수 있다. 안티센스 서열의 길이는 VEGF-B를 암호화하는 핵산의 적어도 19개의 연속 뉴클레오타이드, 예를 들면, 적어도 50개 뉴클레오타이드, 예를 들면, 적어도 100, 200, 500 또는 1000개 뉴클레오타이드이어야 한다. 전체 유전자 전사체에 상보적인 전장 서열을 사용할 수 있다. 길이는 100 내지 2000개 뉴클레오타이드일 수 있다. 표적화된 전사체에 대한 안티센스 서열의 동일성 정도는 적어도 90%, 예를 들면, 95 내지 100%이어야 한다.

[0287] VEGF-B에 대한 대표적인 안티센스 핵산은, 예를 들면, WO 2003/105754 호에 기술되어 있다.

[0288] 촉매 핵산

[0289] 용어 "촉매 핵산"은, 별개의 기질을 특이적으로 인식하고 상기 기질의 화학적 변형을 촉진하는 DNA 분자 또는 DNA-함유 분자(당해 분야에서는 "데옥시리보자임" 또는 "DNA자임"으로도 알려져 있음) 또는 RNA 또는 RNA-함유 분자("리보자임" 또는 "RNA자임"으로도 알려져 있음)를 말한다. 촉매 핵산에서 핵산 염기들은 염기 A, C, G, T(및 RNA의 경우 U)일 수 있다.

[0290] 전형적으로, 촉매 핵산은 표적 핵산을 특이적으로 인식하기 위한 안티센스 서열, 및 핵산 절단 효소 활성(본원에서 "촉매 도메인"으로도 지칭됨)을 함유한다. 본 개시내용에 유용한 리보자임의 유형은 해머헤드(hammerhead) 리보자임 및 헤어핀 리보자임이다.

[0291] RNA 간섭

[0292] RNA 간섭(RNAi)은 특정 단백질의 생성을 특이적으로 억제하는데 유용하다. 이론으로 제한시키는 것이 아니고, 상기 기술은, 해당 유전자 또는 그의 일부의 mRNA, 이 경우에는 VEGF-B를 암호화하는 mRNA와 필수적으로 동일한 서열을 함유하는 dsRNA 분자의 존재에 의존한다. 편리하게, 상기 dsRNA는 재조합 벡터 숙주 세포에서 단일 프

로모터로부터 생성될 수 있으며, 이때 센스 및 안티센스 서열이 하이브리드화되어 루프 구조를 형성하는 비관련 서열을 갖는 dsRNA 분자를 형성할 수 있게 하는 비관련 서열이 센스 및 안티센스 서열 측면에 인접해 있다. 본 개시내용에 적합한 dsRNA 분자의 설계 및 생성은, 특히 WO 99/32619 호, WO 99/53050 호, WO 99/49029 호 및 WO 01/34815 호를 고려하여, 당해 분야에 숙련된 자의 능력안에서 이루어질 것이다.

[0293] 하이브리드화되는 센스 및 안티센스 서열의 길이는 각각 적어도 19개 연속 뉴클레오티드, 예를 들면, 적어도 30 또는 50개 뉴클레오티드, 예를 들면, 적어도 100, 200, 500 또는 1000개 뉴클레오티드이어야 한다. 전체 유전자 전사체에 상응하는 전장 서열을 사용할 수 있다. 길이는 100 내지 2000개 뉴클레오티드일 수 있다. 표적화된 전사체에 대한 센스 및 안티센스 서열의 동일성 정도는 적어도 85%, 예를 들면, 적어도 90%, 예를 들어, 95 내지 100%이어야 한다.

[0294] 대표적인 소형 간섭 RNA("siRNA") 분자는 표적 mRNA의 약 19 내지 21개 연속 뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들면, siRNA 서열은 다이뉴클레오티드 AA로 시작하고, 약 30 내지 70%(예를 들면, 30 내지 60%, 예를 들어 40 내지 60%, 예를 들면, 약 45% 내지 55%)의 GC-내용물을 포함하고, 예를 들면, 표준 BLAST 검색에 의해 측정시, 그것이 도입될 포유동물의 게놈내 표적 이외의 다른 임의의 뉴클레오티드 서열에 대해 높은 동일성 퍼센트를 갖지 않는다. VEGF-B의 발현을 감소시키는 대표적인 siRNA는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology) 또는 노버스 바이올로지칼스(Novus Biologicals)에서 상업적으로 시판중이다.

[0295] VEGF-B의 발현을 감소시키는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)도 또한 당해 분야에 공지되어 있으며 산타 크루즈 바이오테크놀로지로부터 상업적으로 시판중이다.

[0296] 스크리닝 분석법

[0297] VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물은, 예를 들면, 하기에 기술하는 바와 같은 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 확인할 수 있다. 유사하게, 본원에 기술된 방법에 사용하기에 적합한 VEGF-B 신호전달 억제제의 양은, 예를 들면, 하기에 기술하는 바와 같은 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 측정하거나 평가할 수 있다.

[0298] 상쇄 분석법

[0299] VEGF-B에 결합하고 신호전달을 억제하는 화합물의 경우, 상쇄 분석법을 이용할 수 있다.

[0300] 한 예에서, 상쇄 분석법은 검출가능하게 표지된 가용성 VEGF-R1의 존재 또는 부재하에서 VEGF-B를 화합물과 접촉시키거나, VEGF-R1 또는 가용성 VEGF-R1을 발현하는 세포의 존재 또는 부재하에서 검출가능하게 표지된 VEGF-B를 화합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 이어서, VEGF-R1에 결합된 VEGF-B의 수준을 평가한다. 화합물의 부재하에서와 비교하여 화합물의 존재하에서 결합된 VEGF-B의 감소된 수준은 화합물이 VEGF-B 신호전달의 결과로서 VEGF-R1에 대한 VEGF-B의 결합을 억제함을 시사한다.

[0301] 또 다른 상쇄 분석법은 WO 2006/012688 호에 기술되어 있으며, 고체 지지체 상에 고정화된 제 2의 Ig-유사 도메인을 포함하는 VEGF-R1의 단편을 화합물과 함께 사전배양된 준포화 농도의 재조합 VEGF-B와 접촉시키는 것을 포함한다. 세척하여 미결합 단백질을 제거한 후, 고정화된 단백질을 항-VEGF-B 항체와 접촉시키고 결합된 항체의 양(고정화된 VEGF-B을 나타냄)을 측정한다. 화합물 부재하에서의 수준에 비해 결합된 항체의 수준을 감소시키는 화합물이 VEGF-B 신호전달의 억제제로 간주된다.

[0302] 또 다른 예에서, VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물은, 증식을 위해 VEGF-B 신호전달에 의존성인 세포, 예를 들면, 인간 에리트로포이에틴 수용체의 세포내 도메인 및 VEGF-R1의 세포외 도메인을 혼입시킨 키메라 수용체를 발현시키기 위해 WO 2006/012688 호에 기술된 바와 같이 변형된 BaF3 세포를 사용하여 확인된다. 세포는 VEGF-B의 존재하에서 및 화합물의 존재 또는 부재하에서 배양된다. 이어서, 표준 방법, 예를 들면, 콜로니 생성 분석법, 티미딘 혼입 또는 세포 증식의 또 다른 적절한 마커의 흡수(예를 들면, MTS 염료 환원 분석법)를 이용하여 세포 증식을 평가한다. VEGF-B의 존재하에서 증식 수준을 감소시키는 화합물이 VEGF-B 신호전달의 억제제로 간주된다.

[0303] 화합물은 또한 표준 방법을 이용하여 VEGF-B에 결합하는 그의 능력에 대해 평가될 수 있다. 단백질에 대한 결합을 평가하는 방법은, 예를 들면, 문헌 [Scopes, In: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994]에 기술된 바와 같이 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 방법은 일반적으로 화합물을 표지화시키고 이것을 고정화된 VEGF-B와 접촉시키는 것을 포함한다. 세척하여 비-특이적 결합된 화합물을 제거한 후, 표지의 양, 및 결과로서 결합된 화합물을 검출한다. 물론, 화합물은 고정화되고 VEGF-B 표지화

될 수 있다. 패닝(panning)-형 분석법도 또한 이용할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 표면 플라즈몬 공명 분석법도 이용할 수 있다.

[0304] 발현 분석법

[0305] VEGF-B의 발현을 감소시키거나 방지하는 화합물은 세포를 상기 화합물과 접촉시키고 VEGF-B의 발현 수준을 측정함으로써 확인된다. 핵산 수준에서의 유전자 발현을 측정하기에 적합한 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR) 또는 마이크로어레이 분석법이 포함된다. 단백질 수준에서의 발현을 측정하기에 적합한 방법은 또한 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA), 형광 결합 면역흡착 분석법(FLISA), 면역형광 또는 웨스턴 블로팅(Western blotting)이 포함된다.

[0306] 시험관내 분석법

[0307] 내피 세포 또는 섬유아세포의 배양물을 스크레이핑하여 무세포 면적 및 상기 무세포 면적의 봉합 속도를 화합물의 존재 또는 부재하에서 평가하는 스크레이프 또는 스크래치 분석법을 포함하여, 상처 치료를 평가하기 위한 많은 시험관내 분석법들이 기술되었다.

[0308] 다른 분석법으로는 병아리 장노막(CAM) 모델이 포함된다.

[0309] 생체내 분석법

[0310] 상처 치료를 평가하기 위한 많은 생체내 분석법들이 있다. 예를 들면, 본 발명자들은 당뇨병 동물에 상처를 입히고(예를 들면, 전층 상처를 만듦) 시험 화합물의 존재 또는 부재하에서 시간 경과에 따른 상처 봉합 속도 및/또는 양을 평가하는 모델을 이용하였다.

[0311] 만성 상처의 다른 모델로는, 예를 들면, 토끼 귀 "궤양" 모델, 피부판 모델, 욕창 모델(예를 들면, 깁스를 이용하여 그레이하운드의 다리에 압력을 가함으로써) 또는 피하 아드리아마이신(Adriamycin) 투여가 포함된다.

[0312] 급성 상처의 모델로는, 예를 들면, 절개 모델, 절제 모델 및 화상 모델이 포함된다.

[0313] 상처는 다른 결함, 예를 들면, 대사 결함(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같거나, 스트렙토조토신의 투여에 의해)을 앓고 있는 동물에서 발생시킬 수 있다.

[0314] 다양한 상처 모델은, 예를 들면, 문헌 [Demling et al., WOUNDS. 13(1 Suppl A):514, 2001 and in the FDA Guidelines for Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wound]에 기술되어 있다.

[0315] **약학 조성물 및 치료 방법**

[0316] VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물(동의어: 활성 성분)은 비경구, 국부, 경구 또는 국소 투여, 에어로졸 투여 또는 경피 투여에, 예방적 또는 치료적 처치에 유용하다. 한 태양에서, 상기 화합물은 비경구적으로, 예를 들면, 피하 또는 정맥내로 투여된다.

[0317] 투여될 화합물의 제형은 선택된 투여 경로 및 제형(예를 들면, 용액, 유화액, 캡슐)에 따라 달라질 것이다. 투여될 화합물을 포함하는 적절한 약학 조성물은 생리적으로 허용되는 담체중에 제조될 수 있다. 용액 또는 유화액의 경우, 적절한 담체로는, 예를 들면, 식염수 및 완충 배지를 포함하여, 수성 또는 알콜/수성 용액, 유화액 또는 현탁액이 포함된다. 비경구용 비히클로는 염화나트륨 용액, 링거(Ringer) 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거액 또는 고정유가 포함될 수 있다. 물, 완충수, 완충 식염수, 폴리에틸렌(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜), 텍스트로스 용액 및 글리신을 포함하여 다양한 적절한 수성 담체가 숙련된 전문가에게 공지되어 있다. 정맥내 비히클은 다양한 첨가제, 방부제 또는 유체, 영양소 또는 전해질 보충제를 포함할 수 있다(일반적으로, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980] 참조). 조성물은 선택적으로 대략적인 생리 조건에 필요한 바와 같은 약학적으로 허용되는 보조제 물질, 예를 들면, pH 조정 및 완충제 및 독성 조절제, 예를 들면, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 락트산나트륨을 함유할 수 있다. 화합물은 당해 분야에 공지된 동결건조 및 복원 기술에 따라 저장을 위해 동결건조되고 사용전에 적절한 담체에 복원될 수 있다.

[0318] 한 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 화합물을 포함하는 국부용 조성물을 제공한다. 한 예에서, 상기 화합물은 국부용 제형에 적합한 담체에 의해 제형화된다. 적절한 담체로는 피부의 외부층에는 필수적이지 않은, 하나 이상의 진피층에 적용하기에 적합하고 다른 환경에서 사용하기에 적합할 수 있는 화합물 또는 그의 혼합물이 포함된다. 본 개시내용의 국부용 조성물에 유용한 담체 및 부형제는 일반적으로 활성 화합물의 관련 생물 활성

을 의미있는 정도로 억제하지는 않을 것이다, 예를 들면, 담체 또는 부형제는 VEGF-B와 관련하여 활성 화합물의 억제 활성을 유의적으로 억제하지는 않을 것이다. 예를 들면, 담체 또는 부형제는 화합물을 적절한 pH에서 유지시킴으로써 그의 생물 활성을 나타내게 하는 완충 활성을 제공하고, 예를 들면, 담체 또는 부형제는 포스페이트 완충 식염수이다. 대안적으로 또는 추가로, 담체 또는 부형제는 억제제의 흡수를 증대시키고/시키거나 억제제의 경피 전달을 증대시키는 화합물을 포함한다. 예를 들면, 담체 또는 부형제는 피부 침투 증진제, 예를 들면, 다이프로필렌 글리콜 및/또는 올레일 알콜을 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 담체 또는 부형제는 세포 흡수를 촉진하기 위해 리포솜을 포함한다.

- [0319] 대안적으로 또는 추가로, 담체 또는 부형제는 화합물의 활성을 증대시키고/시키거나 화합물, 예를 들면, 프로테아제 억제제 및/또는 DNase 억제제 및/또는 RNase 억제제의 억제를 감소시킴으로써 억제제의 안정성을 증대시키는 화합물을 포함한다.
- [0320] 선택된 배지중 활성 성분의 최적 농도는, 숙련된 전문가에게 공지된 절차에 따라서 실험적으로 결정될 수 있으며, 목적하는 최종 약학 제형에 따라 달라질 것이다.
- [0321] 본 개시내용의 화합물의 투여를 위한 투여량 범위는 목적하는 효과를 제공할 만큼 충분히 큰 범위이다. 예를 들면, 조성물은 치료적으로 또는 예방적으로 효과적인 양의 화합물을 포함한다.
- [0322] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "효과량"은 대상에서 VEGF-B의 신호전달을 억제/감소/방지하기에 충분한 화합물의 양을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 숙련된 전문가라면 상기 양이, 예를 들면, 화합물 및/또는 특정 대상 및/또는 치료되는 상처의 유형 및/또는 중증도에 따라 달라질 것임을 인지할 것이다. 따라서, 상기 용어는 특정한 양, 예를 들면, 화합물의 중량 또는 수로 본 개시내용을 제한하는 것으로 이해해서는 안된다.
- [0323] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료 효과량"은 상처 치료를 증진시키거나 유도하기에 충분한 화합물의 양을 의미하는 것으로 이해해야 한다.
- [0324] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방 효과량"은 상처 진행을 예방하거나 억제하거나 지연시키기에 충분한 화합물의 양을 의미하는 것으로 이해해야 한다.
- [0325] 투여량은 고점도 증후군, 폐부종, 울혈성 심부전 등과 같은 불리한 부작용을 야기할 만큼 크지 않아야 한다. 일반적으로, 투여량은 연령, 질병, 성별 및 환자에서 질환 정도에 따라 달라질 것이며, 당해 분야의 기술을 가진 자에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 합병증의 경우에 개별 의사에 의해 조정될 수 있다.
- [0326] 투여량은, 1일 또는 수일동안, 하루에 하나 이상의 용량 투여로, 약 0.1 내지 약 300 mg/kg, 예를 들면, 약 0.2 내지 약 200 mg/kg, 예를 들어, 약 0.5 내지 약 20 mg/kg으로 달라질 수 있다.
- [0327] 일부 예에서, 화합물은 후속 용량(유지 용량)보다 높은 초기(또는 부하) 용량으로 투여된다. 예를 들면, 화합물은 약 1 내지 약 30 mg/kg의 초기 용량으로 투여된다. 이어서, 화합물은 약 0.0001 내지 약 1 mg/kg의 유지 용량으로 투여된다. 유지 용량은 7 내지 35일마다, 예를 들면, 14일 또는 21일 또는 28일마다 투여될 수 있다.
- [0328] 일부 예에서, 화합물이 초기에 후속 용량에 사용되는 것보다 낮은 용량으로 투여되는 용량 증가 요법이 사용된다. 상기 투여량 요법은 대상의 초기에 겪는 부작용의 경우에 유용하다.
- [0329] 치료에 적절하게 반응하지 않는 대상의 경우, 1주일에 다중 용량이 투여될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 증가하는 용량이 투여될 수 있다.
- [0330] 대상은, 하나보다 많은 노출 또는 세트의 용량들을 제공함으로써, 예를 들면, 화합물의 약 2회 이상의 노출, 예를 들면, 약 2 내지 60회 노출, 보다 특히는 약 2 내지 40회 노출, 가장 특히는 약 2 내지 20회 노출을 제공함으로써 화합물로 재치료될 수 있다.
- [0331] 또 다른 예에서는, 임의의 재치료가 정해진 간격으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 후속 노출은 다양한 간격으로, 예를 들면, 약 24 내지 28주 또는 48 내지 56주 또는 그 이상동안 제공될 수 있다. 예를 들면, 상기 노출은 약 24 내지 26주 또는 약 38 내지 42주 또는 약 50 내지 54주 각각의 간격으로 제공된다.
- [0332] 본 개시내용의 방법은 또한 상처 및/또는 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 또 다른 치료 효과적인 약제의 투여와 함께 본 개시내용에 따른 하나 이상의 화합물의 공-투여를 포함할 수 있다.
- [0333] 한 예에서, 본 개시내용의 화합물은, 당뇨병을 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용되고 있거나 개발중에 있는 하나 이상의 추가의 공지된 화합물과 함께 사용된다. 상기 공지된 화합물의 예로는 통상적인 항-당뇨 약물, 예

를 들면, 설포닐우레아(예, 글리카지드, 글리피지드), 메트포르민, 글리타존(예, 로시글리타존, 피오글리타존), 프란디알 글루코스 방출제(예, 레파글리니드, 나테글리니드), 아카보스 및 인슐린(모든 천연, 합성 및 변형된 형태의 인슐린, 예를 들면, 인간, 소 또는 돼지 기원의 인슐린; 예를 들면, 이소판 또는 아연에 현탁된 인슐린, 및 인슐린 글루리신, 인슐린 리스프로, 인슐린 리스프로 프로타민, 인슐린 글라르진, 인슐린 디터미르 또는 인슐린 아스파르트와 같은 유도체 포함)이 포함되지만, 이로 한정되지는 않는다.

[0334] 한 예에서, 본 개시내용의 화합물은 상처를 치료하는데 유용한 것으로 알려진 화합물과 함께 투여된다. 예를 들면, 상기 화합물은 항-감염제(예, 항생물질 또는 항진균제), VEGF-A, IGF-1, IGF-2, PDGF, TGF- β , EGF 또는 줄기 세포(예, 간엽성 줄기 또는 전구 세포 또는 내피 줄기 세포)와 함께 투여된다.

[0335] 한 예에서, 본 개시내용의 화합물은 또 다른 상처 치료법, 예를 들면, 드레싱 및/또는 그라프트 및/또는 음압과 함께 투여된다.

[0336] 본 개시내용에 따른 화합물과 함께 공-투여될 수 있는 약제의 또 다른 예는 코르티코스테로이드 및 면역억제성 약제들이다.

[0337] 상기 설명으로부터 명백하듯이, 본 개시내용은, 효과량의 제 1 화합물 및 제 2 화합물을 그를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상의 동반 치료 방법을 제공하며, 이때 상기 약제는 본 개시내용의 화합물(즉, VEGF-B 신호전달 억제제)이고, 제 2의 약제는 상처 또는 당뇨병의 예방 또는 치료를 위한 것이다.

[0338] 본원에서 사용된 바와 같이, "동반 치료"라는 어구에서 용어 "동반"은 제 2 약제의 존재하에서 제 1 약제를 투여하는 것을 포함한다. 동반 치료 방법은 제 1, 제 2, 제 3, 또는 추가의 약제들이 공-투여되는 방법을 포함한다. 동반 치료 방법은 또한, 제 1 또는 추가의 약제가 제 2 또는 추가 약제의 존재하에서 투여되고 이때 상기 제 2 또는 추가 약제가, 예를 들면, 사전에 투여될 수 있었던 방법을 포함한다. 동반 치료 방법은 상이한 관계자에 의해 단계적으로 시행될 수 있다. 예를 들면, 한 관계자가 대상에게 제 1 약제를 투여할 수 있고, 제 2의 관계자가 대상에게 제 2의 약제를 투여할 수 있으며, 투여 단계는 제 1 약제(및/또는 추가의 약제)가 제 2 약제(및/또는 추가 약제)의 존재하에서의 투여를 추구하는 한 동시에, 또는 거의 동시에, 또는 별개 시간에 실행될 수 있다. 관계자 및 대상은 동일한 존재(예, 인간)일 수 있다.

[0339] 한 예에서, 본 개시내용은 또한, 본 개시내용의 하나 이상의 화합물을 포함하는 제 1 약학 조성물 및 하나 이상의 추가 화합물을 포함하는 제 2 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 상처를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0340] 한 예에서, 본 개시내용의 방법은 VEGF-B 신호전달 억제제를 상처(예를 들면, 당뇨병 궤양)를 갖고 있으며 또 다른 치료(예를 들면, 당뇨병을 위한)를 받고 있는 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0341] 키트 및 다른 물질 조성물

[0342] 본 개시내용의 또 다른 예는 전술한 바와 같은 상처의 치료에 유용한 화합물을 함유하는 키트를 제공한다.

[0343] 한 예에서, 상기 키트는 (a) 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제 중에 본원에 기술된 바와 같은 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물을 포함하는 용기; 및 (b) 대상에서 상처를 치료하기 위한 설명서를 갖는 패키지 삽입물을 포함한다.

[0344] 본 개시내용의 상기 예에 따르면, 패키지 삽입물은 용기상에 존재하거나 용기에 부착된다. 적합한 용기로는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 제조될 수 있다. 용기는 상처를 치료하기에 효과적인 조성물을 유지시키거나 함유하며, 멸균 접속구(access port)를 가질 수 있다(예를 들면, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 주머니 또는 바이알일 수 있다). 조성물중 하나 이상의 활성 약제는 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물이다. 표지 또는 패키지 삽입물은, 화합물의 복용량 및 간격 및 제공되어 있는 임의의 다른 약제에 관한 구체적인 지침과 함께, 조성물이 치료에 적당한 대상, 예를 들면, 상처를 가지고 있거나 상처가 생기기 쉬운 대상을 치료하기 위해 사용될 것을 지시하고 있다. 키트는 또한 약학적으로 허용되는 희석제 완충제, 예를 들면, 주사용 정균수(BSFI), 포스페이트-완충 식염수, 링거액 및/또는 텍스트로스 용액을 포함하는 추가의 용기를 포함할 수 있다. 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여, 상업적 및 사용자의 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0345] 키트는 선택적으로 제 2의 약제(이때 VEGF-B 신호전달을 억제하는 화합물은 제 1 약제이며, 상기 제품은 제 2 약제로 대상을 치료하기 위한 패키지 삽입물에 설명서를 추가로 포함한다)를 효과량으로 또는 상처를 위한 또

다른 치료제를 포함하는 용기를 추가로 포함한다. 제 2의 약제는 상기에 나타난 것들 중 임의의 약제일 수 있다.

[0346] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 바와 같은 화합물로 함침되거나 그 중에 고정화된(예를 들면, 가역적으로 고정화된) 상처용 드레싱을 제공한다. 대표적인 드레싱으로는 붕대, 예를 들면, 천 붕대 또는 플라스틱 붕대 또는 거즈 붕대 또는 거즈 드레싱 또는 외상용 드레싱이 포함된다. 대안적으로 또는 추가로, 드레싱은 스캐폴드, 예를 들면, 생분해성 스캐폴드를 포함한다. 예를 들면, 스캐폴드는 콜라겐 및/또는 폴리(락트)산 및/또는 폴리(글리콜)산 및/또는 피브린을 포함한다. 상기 스캐폴드는 다공성 또는 비다공성 또는 그의 혼합물일 수 있다. 상기 스캐폴드의 이점은 이들이 상처의 형태에 맞춰지고 상처 부위에 치료 화합물을 전달한다는 것이다. 또한, 상처가 치료될 때, 스캐폴드는 분해되어 생물 폐기물을 감소시킨다.

[0347] 본 개시내용은 하기의 비-제한 실시예를 포함한다.

[0348] **실시예 1: 상쇄 항-VEGF-B 항체는 당뇨병 마우스에서 상처를 치료한다**

[0349] VEGF-B의 항체-매개된 억제는 당뇨병 db/db//BKS 마우스에서 혈당 수준에 적절하게 영향을 미친다

[0350] 내부 사육된 수컷 C57BKS/Leprdb(db/db/BKS) 마우스를 잭슨 래버러토리(Jackson Laboratory)에서 구입하였다. 마우스에게 상처를 내기 전에 및 실험동안 우리당 1-마우스로 마우스를 수용하였다. 동물 시설은 사료와 물은 무제한으로 이용하게 하면서 12-시간 암/명 주기를 갖는다. 장식은 스트레스를 줄이기 위해 래트 터널 및 등지 재료를 포함하였다. db/db/BKS 수컷 마우스(8주)를 상처내기 전 4주동안 400 μ g VEGF-B-항체(2H10) 또는 이소타입 매칭된 대조군 항체(BM4)로 2회/주(i.p.) 사전처리하였다. 동물을 희생시킬 때까지 상처를 낸 후에도 동일한 처리 방법을 지속하였다. 실험 전 및 실험 동안 체중 및 혈당을 모니터링하였다. 혈당계(카운터 스틱(Countour stick), 바이엘(Bayer))를 사용하여 꼬리에서 혈당 수준을 분석하고 실험실 저울로 체중을 측정하였다.

[0351] 도 1에서 보이듯이, 본 실험에서 항-VEGF-B 처리는 심한 당뇨병 db/db BKS 마우스에서 또는 비-당뇨성 db/+ BKS 마우스에서 혈당 수준 또는 체중 증가를 변화시키지 않았다.

[0352] 2H10을 사용한 VEGF-B의 약리학적 억제는 심한 당뇨병 마우스 모델에서 상처 봉합을 증진시킨다

[0353] 15 mM 이상의 비-공복 혈당 수준에 이른 후에, 2H10 또는 BM4(대조군) 처리된 db/db 또는 db/+ 마우스를 상처내기 전 2주동안 더 유지시켰다. 이것은 상처발생 때에 심한 당뇨병 동물을 얻기 위한 것이었다. 상처내기는 이소플루란 흡입에 의한 일반적인 마취하에 수행하였다. 목 뒤의 털을 전기 이발기를 사용하고 체모제 크림(비트(Veet))을 도포하여 제거하였다. 피부를 70% 에탄올로 소독한 후, 피부 및 근육층을 관통하는 2 쌍의 원형 전층 상처를 6 mm 생검 펀치를 사용하여 만들었다. 상처를 낸 후 처음 2일동안, 마우스에게 0.05 내지 0.1 mg/kg 부프레노르핀의 피하 진통 주사를 하루 2회 제공하였다. 상처발생 후 상처 크기 및 치료 진행을 디지털 사진촬영으로 직접 추적하였다. 상처 면적은 이미지 J(Image J) 소프트웨어를 사용하여 모든 상처마다 2회 측정하였다. 카메라와 상처 사이의 거리는 상처 크기를 모든 영상에 포함된 기준 물체와 비교시켜 보정하였다. 단일 상처(동물당 2개)를 단일 실험 측정점으로서 처리하였다.

[0354] 도 2에서 보이듯이, 상처 봉합은 항-VRGF-B 항체로 처리되었을 때 당뇨병 마우스 모델(db/db BKS)에서 상당히 증진되었다.

[0355] 항-VEGF-B 처리는 당뇨병 마우스 모델에서 상처 봉합 및 치료의 속도를 증가시켰다. 항-VEGF-B 처리의 가장 두드러진 효과는 상처 봉합의 초기 단계(제 4일 및 6일)에서 확인되었다. 이것은 도 3에서도 또한 나타나는데, 여기서는 항-VEGF-B 처리가 혈당 수준에 차이가 없음에도 불구하고 처음 4일동안 상처 치료를 촉진한다.

[0356] 본원에 제공된 데이터는 당뇨병에서의 고혈당증 자체는 손상된 상처 치료 과정에 주 원인이 아님을 시사한다.

[0357] 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리는 상처 치료에서 상향조절된 유전자 발현을 감소시킨다

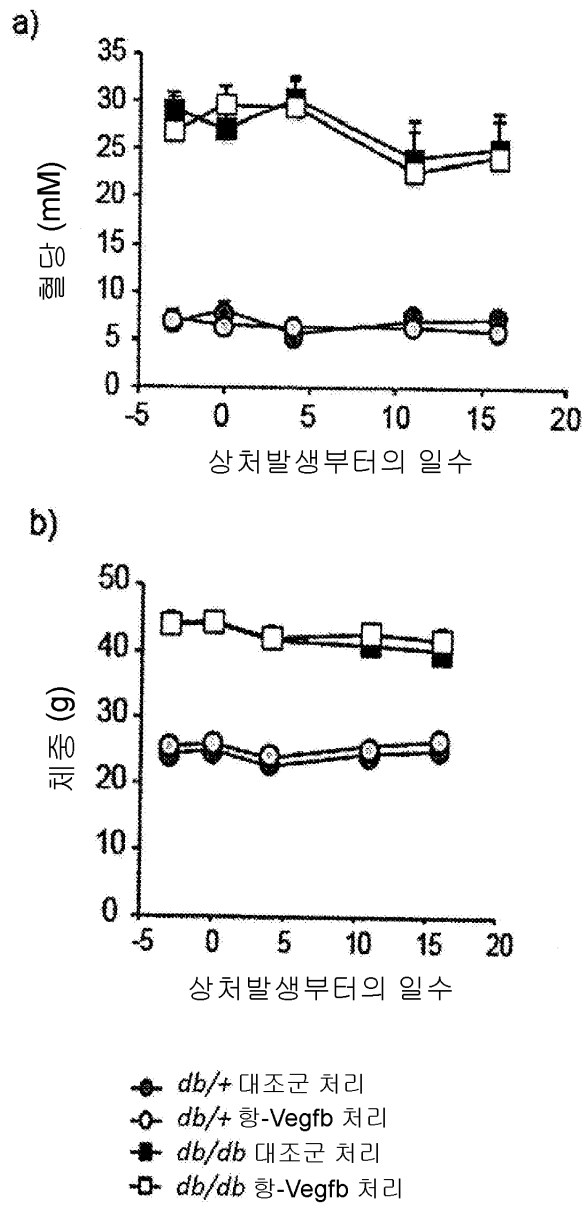
[0358] 수컷 db/db 및 db/+ 마우스(전술한 바와 같이 처리되고 제 16일에 희생됨)를 발현 분석에 사용하였다. 상처를 해부하고 드라이아이스 상에서 순간 냉동시켰다. RNeasy 미니 키트(키아젠(Qiagen))를 제조사의 지시에 따라 사용하여 상처로부터 전체 RNA를 추출하고 정제하였다. 첫번째 가닥 cDNA를 iScript cDNA 합성 키트(바이오-래드(Bio-Rad))를 사용하여 0.5 내지 1 μ g의 총 RNA로부터 합성하였다. 로터-진 Q(Rotor-Gene Q)(키아젠) 실시간 PCR 열 순환기에서 카파 SYBR 패스트 qPCR 키트 마스터 믹스(2x) 유니버설(KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix(2x) Universal, 카파 바이오시스템즈(KAPA Biosystems))를 제조사의 지시에 따라 사용하여 실시간 정량적

PCR을 수행하였다. 발현 수준은 L19의 발현에 대해 표준화시켰다.

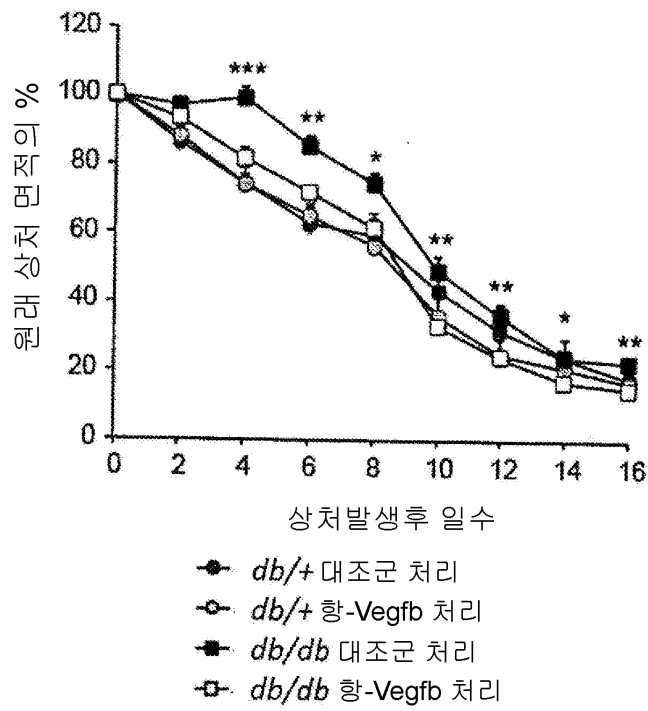
- [0359] 도 4에서 보이듯이, db/db 마우스에서 항-VEGF-B 처리는 당뇨병 상처발생시 상향조절되는 여러 유전자들의 발현을 감소시킨다.
- [0360] 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리는 혈관 형태에 영향을 미치지만 세포 증식은 촉진하지 않는다
- [0361] 수컷 db/db 마우스(전술한 바와 같이 처리되고 제 16일에 희생됨)를 면역학 분석에 사용하였다. 상처를 해부하고 +4 °C에서 24 시간동안 파라폼알데하이드에 고정시키고, 70% 에탄올에 수화시키고, 파라핀에 매립하고, 3 μm 두께 십자 절편들로 절편화하였다. 항원 복구 용액(pH 6)(다코(DAKO))을 사용하고 절편을 +98 °C로 10분동안 가열하여 항원 복구를 수행하였다. 절편들을 +4 °C에서 12 시간동안 적절한 1차 항체(BrdU, CD45, CIV 및 CD31, 1 내지 5 μg/mL로 희석)와 함께 배양하였다. 매칭되는 형광 표지된 2차 항체들(인비트로젠(Invitrogen), 알렉사 플루오르, 1:1000으로 희석)을 적용하고, 절편들을 실온(RT)에서 1 시간동안 배양한 후 현미경검사용으로 준비하였다. 절편들을 악시오비전(AxioVision) 현미경(칼 자이스(Carl Zeiss))으로 20x 배율에서 촬영하였다. 이어서, 악시오비전 런 위저드 프로그램(픽셀2)을 사용하여 절편들을 평가하고 정량화하였다. BrdU 염색 강도를 DAPI의 대비염색 강도와 비교하여 정량화하고, 모든 다른 염색을 총 픽셀 면적에 대해 정량화하였다.
- [0362] 도 5에서 보이듯이, 항-VEGF-B 처리는 당뇨병 상처 치료시 혈관의 성숙을 촉진한다.
- [0363] VEGF-B 신호전달 경로는 당뇨병 상처에서 상향조절된다
- [0364] 대조군 항체(BM4) 처리된 db/db 또는 db/+ 마우스를 근본적으로 전술한 바와 같이 상처를 내고 상처발생후 제 16일에 희생시켰다. 발현 및 조직학 분석을 위해 6 mm 생검 편치를 사용하여 상처를 입혔다. 조직들은 액체 질소에서 냉동시키고 더 처리할 때까지 -80 °C에서 유지시켰다. 트리졸(TRIzol) 시약(인비트로젠) 및 키아젠 RNeasy(키아젠)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 RNA를 단리하였다. 전체 RNA(500 ng)를 제조사의 지시에 따라(iScript cDNA 합성 키트, 바이오-래드) 역전사시켰다. 플래티넘 SYBR 그린 슈퍼믹스(Platinum SYBR green SuperMix, 인비트로젠) 및 반응당 25 ng cDNA를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 발현 수준은 TUBB5(튜불린, 베타 5 클래스 I)의 발현에 대해 표준화시켰다.
- [0365] 도 6에서 보이듯이, Vegfb 및 VEGF-B 결합 수용체, Vegfr1의 발현은 당뇨병 및 비만하에 상처에서 증가된다. 이들 데이터는 VEGF-B 신호전달 경로가 당뇨병 상처를 치료하기에 적합한 표적임을 시사한다.
- [0366] 2H10을 이용한 항-VEGF-B 처리는 db/db 마우스에서 피부에 지질 축적을 감소시킨다
- [0367] 수컷 db/db 및 db/+ 마우스(전술한 바와 같이 처리됨)를 오일 레드 O(Oil red O, ORO) 분석에 사용하였다. 상처를 해부하고 드라이아이스 상에서 순간 냉동시키고 저온유지장치(cryostat)의 주형위에 직접 티슈-텍(Tissue-Tek, 등록상표)(사쿠라(Sakura))에 매립시켰다. 동결절편(12 μm)을 12 분동안 오일 레드 O 작업 용액[2.5 g 오일 레드 O(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 400 ml 99% 이소프로판올에 용해시키고, H₂O에 6:10으로 더 희석하고, 22 μm 필터(코닝(Corning))를 통해 여과시킴]에 침지시키고, 이들을 설치하기 전에 흐르는 수돗물 하에서 20 분동안 세정하였다. 염색된 절편들을 명시야 현미경검사(악시오 비전 현미경, 칼 자이스)로 40x 배율에서 검사하고, 동물당 최소 4개 프레임을 포착하였다. 영상은 상처의 중심 부분으로부터 포착하였다. 액체 소적의 정량화를 위해, 각 프레임에서의 레드 픽셀의 양을 전체 ORO 염색에 대해 악시오 비전 런 위저드 프로그램을 이용하여 정량화하였다(픽셀, a.u.).
- [0368] 도 7에서 보이듯이, 2H10을 사용한 항-VEGF-B 처리는 수컷 db/db 마우스에서 상처발생 후 피부에 지질 축적을 감소시킨다.

도면

도면1

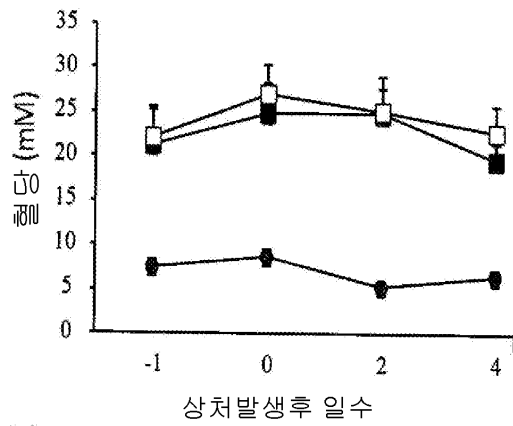


도면2

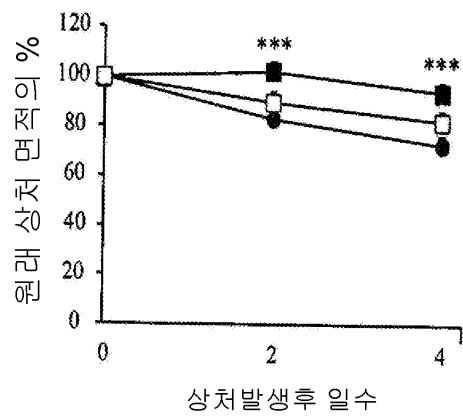


도면3

a)

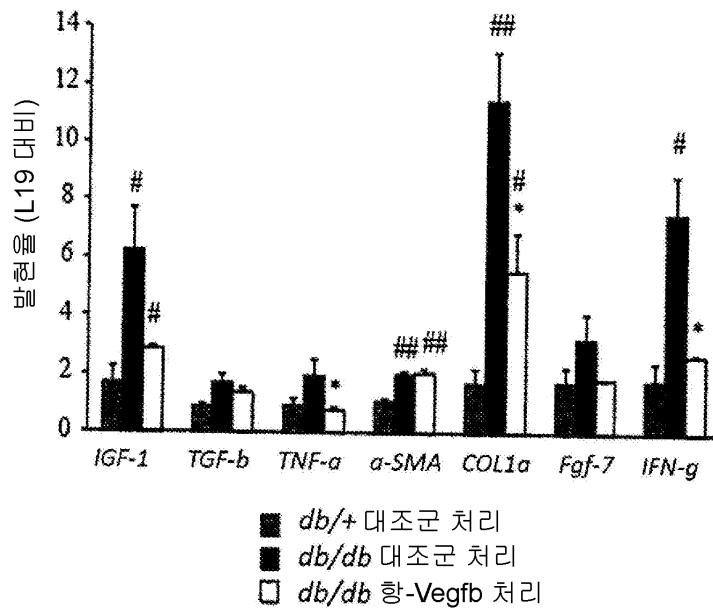


b)

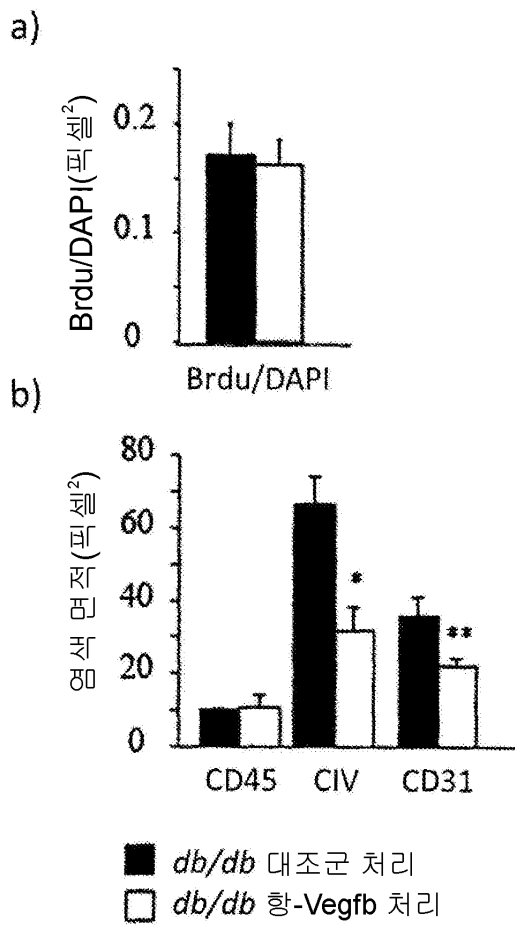


- *db/+* 대조군 처리
- *db/db* 대조군 처리
- *db/db* 항-Vegfb 처리

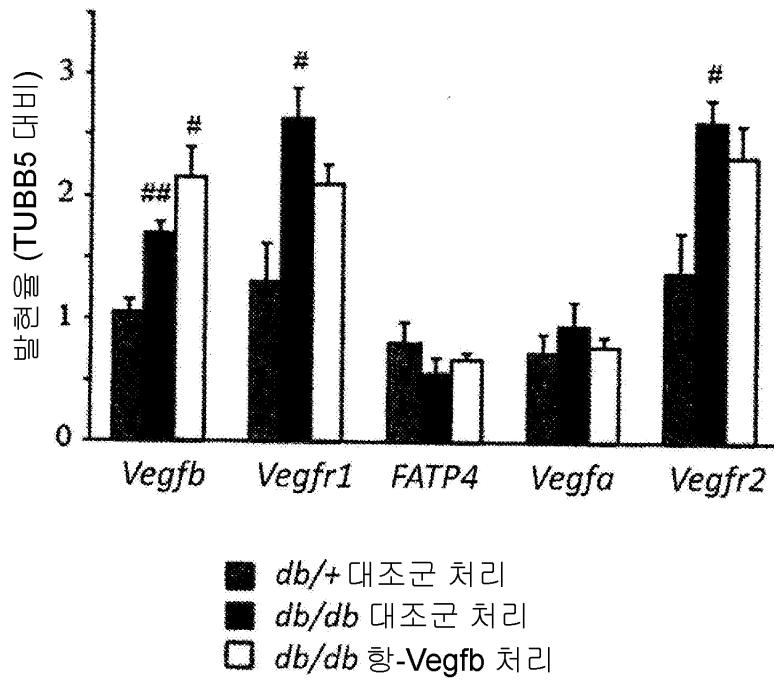
도면4



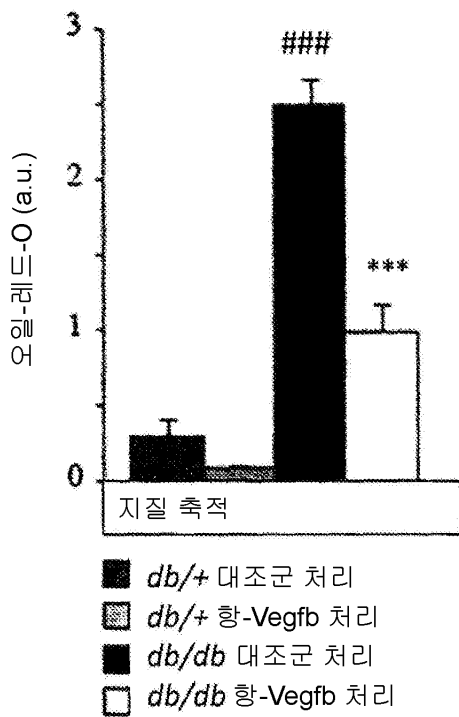
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CSL Limited

B-Creative Sweden AB

<120> Method of treating wounds

<130> 516120

<140> PCT/AU2014/050431

<141> 2014-12-18

<150> AU2013904942

<151> 2013-12-18

<150> AU2013904966

<151> 2013-12-19

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(21)

<223> Signal sequence

<400> 1

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln

20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln

35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val

50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly

65 70 75 80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln

85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly

100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
 130 135 140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
 165 170 175
 His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
 180 185 190
 Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
 195 200 205

<210> 2
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> SIGNAL
 <222> (1)..(21)
 <223> Signal sequence
 <400> 2

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
 20 25 30
 Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
 50 55 60
 Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
130 135 140

Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Arg Arg
145 150 155 160

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
165 170 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
180 185

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence from a VH of antibody 2H10

<400> 3

Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Trp
20 25 30

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

His Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
50 55 60

Arg Met Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Tyr Ser Asn Tyr Val Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence from a VL of antibody 2H10
 <400> 4
 Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence from a VH of a humanized form of antibody
 2H10
 <400> 5

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Trp

20 25 30
Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

35 40 45
His Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

50 55 60
Arg Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80
Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Arg Ser Tyr Ser Asn Tyr Val Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of a VL of a humanized form of antibody 2H10

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence from a VH of antibody 4E12

<400> 7

Val Gln Pro Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Asn Ser Trp

20

25

30

Ile Gly Trp Val Thr Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35

40

45

Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

50

55

60

Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val

85

90

95

Ile Glu Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of a VL of antibody 4E12

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ser Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asn

20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Cys Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60
Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Ala Lys Leu Asp Leu Lys

100 105

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence from a VH of antibody 2F5

<400> 9

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr Ser

1 5 10 15

Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe Tyr

20 25 30

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys

50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr

85 90 95

Arg Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of a VL of antibody 2F5

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Ala Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 2H10 VL CDR1

<400> 11

agggcaagtc aggacattag caatttttta aac

33

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 2H10 VL CDR2

<400> 12

tacacatcaa cattacactc a 21

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 2H10 VL CDR3

<400> 13

caacagggta aaacgcttcc tcccacg 27

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 2H10 VH CDR1

<400> 14

ggctacactt tcaactggctt ctggatacac 30

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 2H10 VH CDR2

<400> 15

catattaatc ctggcaatgg tggcactaac tacaatgaga agttcaagag a 51

<210> 16

<211

> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 2H10 VH CDR3

<400> 16

tcctatagta actacgtgcg ggctatggac tac 33

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of 2H10 VL CDR1

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2H10 VL CDR2

<400> 18

Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2H10 VL CDR3

<400> 19

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2H10 VH CDR1

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Trp Ile His

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2H10 VH CDR2

<400> 21

His Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Arg

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2H10 VH CDR3

<400> 22

Ser Tyr Ser Asn Tyr Val Arg Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 2F5 VL CDR1

<400> 23

aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gcc

33

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 2F5 VL CDR2

<400> 24

tgggcatcca cccggcacac t

21

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 2F5 VL CDR3

<400> 25
caacaatata gcagctctct cacg 24

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence of 2F5 VH CDR1
<400> 26
ggctacacct tcacaacctt ctatatacac 30
<210> 27
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence of 2F5 VH CDR2
<400> 27
tggttttatc ctggaaatgt taataccaac tacaatgaga agctcaaggg c 51
<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence of 2F5 VH CDR3

<400> 28
tccccttact acggctacgt ttttgactac 30
<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of 2F5 VL CDR1
<400> 29
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10
<210> 30
<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2F5 VL CDR2

<400> 30

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 31

<211>

8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2F5 VL CDR3

<400> 31

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2F5 VH CDR1

<400> 32

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe Tyr Ile His

1 5 10

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2F5 VH CDR2

<400> 33

Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 2F5 VH CDR3

<400> 34

Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 4E12 VL CDR1

<400> 35

aaggccagtc agaattgtgaa cactaatgta gcc 33

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 4E12 VL CDR2

<400> 36

tcggcatcct cccggtgcag t 21

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 4E12 VL CDR3

<400> 37

cagcaatatc acagctttcc gctcagc 27

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of 4E12 VH CDR1

<400> 38
 ggcgacacct tcaccaactc ctggataggc 30
 <210> 39
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence of 4E12 VH CDR2
 <400> 39
 gatatttttc ctgggagtgg tcatactaac tacaatgaga agttcaagaa c 51
 <210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence of 4E12 VH CDR3
 <400> 40
 gagaattatg cctggtttgc ttat 24
 <210> 41
 <211>
 > 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid sequence of 4E12 VL CDR1
 <400> 41
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asn Val Ala
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid sequence of 4E12 VL CDR2
 <400> 42
 Ser Ala Ser Ser Arg Cys Ser
 1 5
 <210> 43
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 4E12 VL CDR3

<400>

43

Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 4E12 VH CDR1

<400> 44

Gly Asp Thr Phe Thr Asn Ser Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 4E12 VH CDR2

<400> 45

Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of 4E12 VH CDR3

<400> 46

Glu Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5