



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043242  
(43) 공개일자 2013년04월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/435 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7008481(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년03월11일  
심사청구일자 2013년04월02일
- (62) 원출원 특허 10-2011-7023819  
원출원일자(국제) 2010년03월11일  
심사청구일자 2011년10월12일
- (85) 번역문제출일자 2013년04월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/027041
- (87) 국제공개번호 WO 2010/105097  
국제공개일자 2010년09월16일
- (30) 우선권주장  
61/159,322 2009년03월11일 미국(US)
- (71) 출원인  
아브락시스 바이오사이언스, 엘엘씨  
미국 90025 캘리포니아주 로스앤젤레스 스위트  
2100 윌라이어 불바드 11755
- (72) 발명자  
트리에우 부웅  
미국 캘리포니아 91302 칼라바사스 샤프에이치 노  
스 시노투스 플레이스 3965  
크나우어 다니엘  
미국 캘리포니아 92626 코스타 메사 카미노 드라  
이브 1109 이1  
테자이 네일  
미국 캘리포니아 90025 로스앤젤레스 스위트 2000  
윌라이어 불바드 11755
- (74) 대리인  
이훈, 이두희

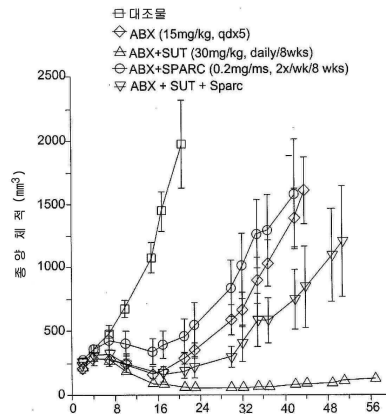
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 SPARC 혈관형성 영역과 사용방법

(57) 요약

이 발명은 SPARC 카르복시 혈관형성 영역의 발견을 개발한 조성물과 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하나 이상의 카르복시와 아미노 말단에 추가되는 0 내지 15개의 부가적 아미노산을 갖는, SEQ ID NO: 2 또는 SEQ ID NO: 2의 5개 이하의 아미노산 변환체를 갖는 서열로 이루어지는 단리된 SPARC 폴리펩티드.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 SEQ ID NO: 2인 단리된 SPARC 폴리펩티드.

### 청구항 3

제1항의 폴리펩티드를 코드화하는 핵산 서열을 갖는 단리된 폴리뉴클레오티드.

### 청구항 4

제3항의 핵산 서열 중 어느 하나를 발현하는 발현 벡터.

### 청구항 5

제3항의 핵산 서열 중 어느 하나를 함유하는 형질전환된 세포.

### 청구항 6

동물의 종양치료용 약물을 제조하기 위하여 사용하는 단리된 SPARC 폴리펩티드.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 종양이 구강종양, 인두종양, 소화계종양, 호흡계종양, 골종양, 연골종양, 골전이병, 육종, 피부종양, 흑색종, 유방종양, 생식계종양, 요로종양, 안구공종양, 뇌와 중추신경계종양, 교세포종, 내분비계종양, 갑상선종양, 식도종양, 위종양, 소장종양, 결장종양, 직장종양, 항문종양, 간종양, 담낭종양, 췌장종양, 후두종양, 폐종양, 기관지종양, 비-소세포 폐암종, 소세포 폐종양, 자궁경관종양, 자궁내분비선종양, 난소종양, 음부종양, 질종양, 전립선종양, 전립선암종, 고환암종, 음경종양, 방광종양, 신장종양, 신우종양, 요관종양, 머리와 목종양, 부갑상선 암, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병에서 선택되는 단리된 SPARC 폴리펩티드.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 동물이 사람인 단리된 SPARC 폴리펩티드.

## 명 세 서

### 기술분야

[0001] 이 특허출원은 2009년 03월 11일에 제출된 미국 가특허출원번호 61/159,322의 이점을 청구한 것이다.

[0002] 이 발명은 단리된 SPARC 혈관형성 영역을 갖는 SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 더우기, 5개이하의 보존성 아미노산 변환체이거나 또는 SEQ ID NO: 1과 90% 동일하고, 돌연변이의 단리된 SPARC 폴리펩티드가 최소한 60%의 혈관형성 활성의 SEQ ID NO: 1을 보유하는, SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0003] 또한, 이 발명은 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체이고, 돌연변이의 단리된 SPARC 폴리펩티드가 최소한 60%의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는, SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

### 배경기술

[0004] 오스테오넥틴으로도 알려져있는 시스테인의 풍부한, 산성 분비 단백질(SPARC)은 286 아미노산 당단백질이다.

SPARC는 양이온(예를들어,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), 성장 인자[예를들어, 성장 인자에서 유도된 혈소판(PDGF)와, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)], 세포외 기질(ECM), 단백질(예를들어, 콜라겐 I-V와 콜라겐 IX, 비트로넥틴과 트롬보스 폰딘-1), 내피세포, 혈소판, 알부민과 수산화 인회석을 포함하는 광범위한 리간드의 친화성을 갖는다. SPARC 발현은 발전적으로 조절되고, 정상 발육하는 동안 또는 상처에 대한 반응에 있어 개조를 받는 조직에서 우세하게 발현된다.(참조, 예를들어, Lane 등., FASEB J., 8, 163-173(1994)). 높은 수준의 SPARC 단백질은 뼈와 치아 발육에 발현된다.

[0005] SPARC는 몇몇 공격성 암에서는 조절되지 않지만, 아주 대부분의 정상 조직에는 존재하지 않는다(Porter, 등. J. Histochem. Cytochem., 43, 791(1995), 하기 참조). SPARC는 여러가지 종양(예를들어, 방광, 간, 난소, 신장, 장, 유방) 사이에서 유발된다. 방광암에서, 예를들어, SPARC 발현은 진전된 암종과 연관된다. 단계 T2 또는 그 이상의 침입성 방광 종양이 나타나서 단계 T1의 방광 종양보다 더 높은 수준의 SPARC(또는 그 이하의 외면의 종양)가 발현하고, 더 불량한 예후를 갖는다(참조, 예를들어, Yamanaka 등., J. Urology, 166, 2495-2499 (2001)). 수막종에서, SPARC 발현은 침입성 종양만이 관련된다(참조, 예를들어, Rempel 등., Clinical Cancer Res., 5, 237-241 (1999)). 또한 SPARC 발현은 74.5%의 침입성 유방 암종 병변의 원위치(참조, 예를들어, Bellahcene 등., Am. J. Pathol., 146, 95-100 (1995))와, 54.2%의 유방 유관 상피내 암종의 침윤(참조, 예를들어, KIM 등., J Korean Med. Sci., 13, 652-657 (1998))에서 검출된다. 또한, SPARC 발현은 유방암에서 흔한 미세석회화와 관련되고(참조, 예를들어, 상기한 Bellahcene 등.), SPARC 발현은 뼈에 대한 유방전이 친화성에 있는 것으로 예상된다. 또한, SPARC는 알부민과 결합하는 것으로 알려져 있다(참조, 예를들어 Schnitzer, J Biol. Chem., 269, 6072 (1994)).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 따라서, 질병에 있어 SPARC의 역할, 예를들어 몇몇 암에서 SPARC의 역할의 이점을 갖는 조성물과 방법이 필요하다. 특히 SPARC 카르복시 혈관형성 영역과 같은, SPARC 영역의 특이적 활성의 이점을 조성물과 방법이 필요하다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 또한 이 발명은 SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 정제된 폴리펩티드 와/또는 SEQ ID NO: 1의 돌연변이된 서열을 함유하는 단리된 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 투여하여서하는 혈관형성이 필요한 동물의 혈관형성을 자극하는 방법을 제공하며, 여기서, 폴리펩티드는 5개이하의 보존성 아미노산 변환체이거나 또는 SEQ ID NO: 1과 90% 동일하고, 돌연변이의 단리된 SPARC 폴리펩티드는 최소한 60%의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유한다.

[0008] 또한, 이 발명은 SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 정제된 폴리펩티드 와/또는 SEQ ID NO: 1의 돌연변이된 서열을 갖는 단리된 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 투여하여서하는 혈관형성이 필요한 동물의 혈관형성을 자극하는 방법을 제공하며, 여기서, 폴리펩티드는 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체이고 돌연변이의 단리된 SPARC 폴리펩티드는 최소한 60%의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유한다.

[0009] 이 발명은 SEQ ID NO: 2를 함유하는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 이는 전장 SPARC 폴리펩티드의 카르복시 말단의 효소적 소화의 생성물이고 5% 이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 단리된, 카르복시 절단 SPARC 폴리펩티드와 SEQ ID NO: 1의 보존성 아미노산을 결여한 돌연변이 SPARC 폴리펩티드를 함유한다.

[0010] 이 발명은 예를들어, 전장 SPARC 폴리펩티드의 카르복시 말단의 효소적 소화의 생성물이고, 특히 SEQ ID NO: 2DP 기술되어 있는, 5% 이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 단리된 카르복시 절단, SPARC 폴리펩티드를 포함하는, 혈관형성 활성을 결여한 하나 또는 그 이상의 SPARC 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 동물에 투여하여서하는 종양치료 방법을 제공한다.

[0011] 이 발명은 전장 SPARC 폴리펩티드의 카르복시 말단의 효소적 소화의 생성물이고, 특히 SEQ ID NO: 2에 기술되어 있는 5% 이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는, 단리된 카르복시 절단, SPARC 폴리펩티드와 비-SPARC 치료를 포함하는, 혈관형성 활성을 결여한 하나 또는 그 이상의 SPARC 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 동물에 투여하여서하는 종양 감작 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 이 발명은 (a)SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하거나 또는, 5개이하의 보존성 아미노산 변환체 이거나, SEQ ID NO: 1과 90% 동일하고 혈관형성 모델 시스템으로 최소한 60%의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 돌연

변이의 단리된 폴리펩티드를 형성하는 돌연변이체 형태의 SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 유효량의 조성물을 투여하고; (b)후보 혈관형성 억제제와 (a)의 조성물을 모델 시스템의 혈관형성 조성물에 분리하여 동시에 투여하고; (c)(a)와(b)에서 생성된 혈관형성의 양을 정량하고; (d)혈관형성이 (a)와 비교하여 (b)에서 감소하면, 혈관형성 억제제로서 후보 혈관형성 억제제를 동정하여서하는, 혈관형성 억제제의 동정 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 이 발명은 (a)SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하거나, 또는 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체이거나, 혈관 모델 시스템으로 최소한 60%의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 돌연변이의 단리된 폴리펩티드를 형성하는 돌연변이체 형태의 SEQ ID NO: 1의 서열을 함유하는 유효량의 조성물을 투여하고;(b)후보 혈관형성 억제제와 (a)의 조성물을 모델 시스템의 혈관형성 조성물에 분리하여 동시에 투여하고; (c)(a)와(b)에서 생성된 혈관형성의 양을 정량하고; (d)혈관형성이 (a)와 비교하여 (b)에서 감소하면, 혈관형성 억제제로서 후보 혈관형성 억제제를 동정하여서하는 혈관형성 억제제의 동정 방법을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 PC3 모델로 Abraxane<sup>®</sup> 및 Sutent<sup>®</sup>와 외인성 SPARC 투여의 효과를 증명하는 데이터의 대표적 그래프이다.

도 2는 SPARC의 혈관형성 활성의 특징을 나타내는 HUVEC 3-D 튜브 형성 검정에서 나온 결과를 표시한 것이다.

도 3은 야생형 SPARC를 SPARC-d(두 c-말단의 절단된 SPARC 단백질의 혼합물)와 함께 행한 SDS-PAGE 검정 결과를 표시한 것이다.

도 4는 야생형 SPARC와 SPARC-d의 특징을 나타내는 HUVEC 3-D 튜브 형성 검정에서 얻은 데이터의 대표적 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] SPARC 폴리펩티드의 전- 혈관형성 활성이 성숙 SPARC 폴리펩티드의 아미노233-286 (SEQ ID NO: 1)에 위치되는 것을 결정한 것은 놀라운 것이다. 사전에 이 활성은 SPARC의 N-말단 영역에 있는 것으로 보고되었다(Sage H. Adv Dent Res. 1995 9(3 Suppl):5) SPARC의 프로아포토틱 영역에는 더 많은 아미노 말단이 있기때문에, 이러한 발견으로 카르복시 말단 혈관형성 영역(예를들어, SEQ ID NO: 2)을 결여한 SPARC 폴리펩티드가 전장 숙성 SPARC 폴리펩티드 보다; 예를들어, 종양과 같은 SPARC 의존성 질병에 대하여 더 많은 활성을 가짐을 예상할 수 있다. 더불어, 어떠한 특별한 이론에 의하여 구속되는 것을 원치 않으면, 혈관형성은 종양 성장에 필요하기 때문에, 말단 혈관형성 영역(SEQ ID NO: 2)이 없는 SPARC는 전장 야생형 SPARC에 대하여 경쟁하고 생체내의 그의 활성을 부정하는 것이 가능하다.

[0016] 이 발명은 카르복시 와/또는 아미노 말단에 부가되는 15개이하의 부가적 아미노산, 바람직하기로는 12개이하의 부가적 아미노산, 더 바람직하기로는 10개이하의 부가적 아미노산, 더 바람직하기로는 8개이하의 부가적 아미노산, 더 바람직하기로는 5개이하의 부가적 아미노산, 더 바람직하기로는 4개이하의 부가적 아미노산, 더 바람직하기로는 3개이하의 부가적 아미노산, 더 바람직하기로는 2개이하의 부가적 아미노산, 가장 바람직하기로는 하나의 부가적 아미노산을 갖는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0017] 이 발명은 5개이하의 보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 보존성 아미노산 변환체를 갖고, 최소한 60%, 바람직하기로는 최소한 50%, 더 바람직하기로는 최소한 40%, 가장 바람직하기로는 최소한 30%의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SEQ ID NO: 1의 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0018] 또한 이 발명은 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 비보존성 아미노산 변환체를 갖고, 최소한 60%, 바람직하기로는 최소한 50%, 더 바람직하기로는 최소한 40%, 가장 바람직하기로는 최소한 30%의 혈관형성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SEQ ID NO: 1의 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0019] 이 발명은 최소한 90% SEQ ID NO: 1과 동일하고, 바람직하기로는 최소한 85% SEQ ID NO: 1과 동일하고, 더 바람직하기로는 최소한 80% SEQ ID NO: 1과 동일하고, 더 바람직하기로는 최소한 70% SEQ ID NO: 1과 동일하고, 최소한 60%, 바람직하기로는 최소한 50%, 더 바람직하기로는 최소한 40%, 가장 바람직하기로는 최소한 30%의 혈관

형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

- [0020] 이 발명은 SEQ ID NO: 1과 2와 여기에 기술된 이들의 돌연변이체, 이러한 핵산 서열을 발현하는 발현 벡터와 이러한 폴리뉴클레오티드를 함유하는 형질전환 세포를 포함하여, 여기에 기술된 이 발명의 SPARC 폴리펩티드 중 어느 하나를 코드화하는 핵산 서열을 함유하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0021] 이 발명은 SEQ ID NO: 1 서열을 함유하는 폴리펩티드를 코드화하는 치료적 유효량의 단리된 폴리뉴클레오티드를 혈관형성을 필요로하는 동물에 투여하여서하는 동물의 혈관형성 자극 방법을 제공한다. 이 발명은 SEQ ID NO: 2의 서열을 함유하는 폴리펩티드를 코드화하는 치료적 유효량의 단리된 폴리뉴클레오티드를 동물에 투여하여서하는 SPARC 의존성 질병의 치료 및 예방 방법을 제공한다.
- [0022] 이 발명은 이 발명에 의하여서 와/또는 여기에 기술되어 있는 SEQ ID NO: 1의 서열 또는 이들의 돌연변이체를 함유하는 치료적 유효량의 정제된 폴리펩티드를 동물에 투여하여서하는 혈관형성이 필요한 동물의 혈관형성을 자극하는 방법을 제공한다. 따라서, 이 발명은 재발협착증, 주상동맥경화증과 변연 뇌졸중과 병적뇌졸중; 또한 예를들어, 국소성 빈혈이 심장 국소성 빈혈과 뇌졸중인 것을 포함한 국소성 빈혈을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0023] 이 발명은 SEQ ID NO: 2, 즉 SEQ ID NO: 1의 보존성 아미노산을 결여한 성숙 SPARC 폴리펩티드를 함유하는 단리된 SPARC 폴리펩티드를 제공한다. 이 발명은 카르복시 절단인 에피토프 표지 폴리펩티드, 즉. 전장 SPARC 폴리펩티드의 카르복시 말단의 효소적 소화의 생성물이고, 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SPARC 폴리펩티드를 포함한, 단리된 SPARC 폴리펩티드를 제공한다.
- [0024] 카르복실 소화는 효소적 및 화학적 소화를 포함한 어떠한 적당한 방법으로 행할 수 있다. 예를들면, 통상적 전 문가는 이를 위하여 세린 카르복시펩티다아제, 리소소말 Pro-X 카르복시펩티다아제, 카르복시펩티다아제 C, 카르복시펩티다아제 D, 시스템인형 카르복시펩티다아제, 금속에스소펩티다아제 등으로 일반적으로 행할 수 있다. 참조, Nakazawa 등, Terminal proteomics: N- and C-terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using MS., Proteomics. 2008 Feb;8(4):673-85 이는 여기에 참조적으로 혼입되어 있다.
- [0025] 이 발명은 5개이하의 보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 보존성 아미노산 변환체를 갖고, 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SEQ ID NO: 2의 단리된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0026] 또한 이 발명은 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 비보존성 아미노산 변환체를 갖고 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SEQ ID NO: 2의 단리된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0027] 이 발명은 최소한 90% SEQ ID NO: 2와 동일하고, 바람직하기로는 최소한 85% SEQ ID NO: 2와 동일하고, 더 바람직하기로는 최소한 80% SEQ ID NO: 2와 동일하고, 더 바람직하기로는 최소한 75% SEQ ID NO: 2와 동일하고, 더 바람직하기로는 최소한 70% SEQ ID NO: 2와 동일하고, 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0028] 이 발명은 5개이하의 보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 보존성 아미노산 변환체를 갖고 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SEQ ID NO: 2의 하나 또는 그 이상의 단리된 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 동물에 투여하여서하는 종양치료방법을 제공한다.
- [0029] 이 발명은 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 비보존성 아미노산 변환체를 갖고 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는

3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1을 보유하는 SEQ ID NO: 2의 하나 또는 그 이상의 단리된 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 동물에 투여하여서하는 종양치료방법을 제공한다.

[0030] 이 발명은 5개이하의 보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 2개이하의 보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 보존성 아미노산 변환체를 갖고, 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1과 비-SPARC 치료를 보유하는 SEQ ID NO: 2의 하나 또는 그 이상의 단리된 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 동물에 투여하여서하는 종양의 감작 방법을 제공한다.

[0031] 이 발명은 5개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 바람직하기로는 4개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 3개이하의 비보존성 아미노산 변환체, 더 바람직하기로는 단일 비보존성 아미노산 변환체를 갖고, 5%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 바람직하기로는 3%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 더 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1, 가장 바람직하기로는 1%이하의 혈관형성 활성 SEQ ID NO: 1과 비-SPARC 치료를 보유하는 SEQ ID NO: 2의 하나 또는 그 이상의 단리된 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 동물에 투여하여서하는 종양의 감작 방법을 제공한다.

[0032] 또한 이 발명은 SEQ ID NO: 2의 하나 또는 그 이상의 단리된 폴리펩티드 또는 여기에 기술된 이들의 돌연변이체의 치료적 유효량으로 종양 또는 암 이외의 증식성 질병의 치료 또는 감작을 제공한다. 치료에 적합한 증식성 질병에는 비대성 반흔과 켈로이드, 증식성 당뇨병, 류마티스성 관절염, 동정맥기형, 주상동맥 경화성 플라크, 창상치유지연, 호열관절, 유착불능골절, 오슬러-웨버 증후군, 건선, 화농성 욕아종, 경피증, 트라코마, 월경과다증, 혈관성 유착증과 재발 협착증이 있다.

[0033] 이 발명은 동물의 종양을 치료 또는 감작하는 방법을 제공하며, 여기서 종양은 구강종양, 인두종양, 소화계종양, 호흡계종양, 골종양, 연골종양, 골전이병, 육종, 피부종양, 흑색종, 유방종양, 생식계종양, 요로종양, 안구공종양, 뇌와 중추신경계종양, 교세포종, 내분비계종양, 갑상선종양, 식도종양, 위종양, 소장종양, 결장종양, 직장종양, 항문종양, 간종양, 담낭종양, 췌장종양, 후드종양, 폐종양, 기관지종양, 비-소세포 폐암종, 소세포 폐종양, 자궁경관종양, 자궁내분비 선종양, 난소종양, 음부종양, 질종양 전립선종양, 전립선암종, 고환암종, 음경종양, 방광종양, 신장종양, 신우종양, 요관종양, 머리와 목종양, 부갑상선 암, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병에서 선택된다.

[0034] 이 발명은 동물의 종양 감작 방법을 제공하며, 여기서 예를들어, 비-SPARC 요법에는 하나 또는 그 이상의 도제탁셀, 파클리탁셀, 탁산, 백금화합물, 항염산제, 항대사물질, 항유사분열물질, DNA-손상제, 프로아포토틱스, 분화유도제, 항혈관형성제, 항생물질, 호르몬, 펩티드, 항체과 이들의 조합물을 함유하는 것을 포함하여, 여기서 비-SPARC 치료는 하나 또는 그 이상의 화학요법, 방사선 또는 생물학적 요법을 뜻한다.

[0035] 이 발명은 (a)유효량의 SEQ ID NO: 1 또는 이들의 돌연변이체 중 어느 하나의 조성물을 혈관형성 모델 시스템에 투여하고; (b)특허청구범위 1~4항 중 어느 한 항의 조성물과 후보 혈관형성 억제제를 혈관형성 모델 시스템에 분리하여 동시에 투여하고; (c)(a)와(b)에서 생성된 혈관형성 양을 정량하고; (d)혈관형성이 (a)와 비교하여 (b)에서 감소되면, 실제 혈관형성 억제제로서 후보 혈관형성 억제제를 동정하여서하는, 혈관형성 억제제의 동정 방법을 제공한다. 적당한 혈관형성 모델 시스템이 이 발명에 따라서 사용될 수 있고, 예를들면, 여기에서, 혈관형성 모델 시스템에는 HUVEC 튜브 형성 검정이 있다.

[0036] 여기서 사용되는 "약물"이란 환자 또는 시험 대상체에 투여하여 효과를 가져올 수 있는 조성물을 뜻한다. 효과는 화학적, 생물학적 또는 물리화학적 것을 뜻하고, 환자 또는 시험 대상체는 사람 또는, 설치류 또는 형질전환 마우스와 같은 비-사람 동물을 뜻한다. 조성물은 유기 또는 무기 소분자를 포함하고 다른 분자 조성물은 합성으로 만들거나, 자연에서 발견하거나 또는 부분합성으로 제조한다. 이러한 그룹에 포함되는 것은 뉴클레오타이드, 핵산, 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 펩티드 핵산 또는 최소한 하나의 이들 구성요소를 함유하는 복합체가 있다. 약물은 유효적 조성물 단독 또는 약학적으로 허용할 수 있는 부형제와 조합하여 이루어질 수 있다.

[0037] 여기서 사용된 "약학적으로 허용할 수 있는 부형제"란 생리적으로 화합할 수 있는 용매, 분산매, 피복물, 항박테리아제, 항균제 또는 항진균제, 등장제와 흡수 지연제 등의 어느 하나 또는 모두를 포함한다. 부형제는 정맥내, 복강내, 근육내, 척수강내, 또는 경구 투여에 적합하다. 부형제는 멸균주사액 또는 분산액을 임식 제조하기

위하여 멸균수용액 또는 분산액을 포함할 수 있다. 약물을 제조하기 위한 이러한 매체의 사용은 이 분야에 알려져 있다.

[0038] 여기에 사용된 약물의 "약리학적 유효량" 또는 "유효량"이란 약제를 사용하는 용어에서 유래된 것으로 약제의 치료적 수준을 가져오는 이러한 농도로 존재하는 약물의 사용하는 것을 뜻한다. 이것은 약물 받는 대상체에 대한, 방출 형태, 투약기간, 나이, 체중, 일반건강, 성별과 식이에 따른다. 투약에서 "약리학적 유효량"의 결정에는 통상의 최적 조건이 요구되며, 이는 이 분야의 통상의 지식을 가진자가 할 수 있다.

[0039] 여기에서 사용된 "암" 또는 "종양"이란 용어는 정상 성장억제에 대한 감수성을 손실한 세포의 증식에 의하여 일어나거나 특징을 갖는 증식성 질병을 뜻한다. 이 출원에 사용된 암이란 용어는 종양과 어떠한 다른 증식성 질병을 포함한다. 동일한 조직형의 암은 통상 동일한 조직에서 나오고, 이들의 생물학적 특성을 기초로한 다른 아형으로 분할된다. 암의 네가지 일반 카테고리에는 암종(상피 조직 유도), 육종(결합조직 또는 중배엽 유도), 백혈병(혈액-형성 조직 유도)와 림프종(림프조직 유도)이 있다. 200가지 이상의 다른 형의 암이 알려져 있고, 몸체의 모든 기관과 조직에 영향을 미친다. 암의 정의가 한정되어 있지 않은 특수한 암의 예를들면, 흑색종, 백혈병, 성상세포종, 교모세포종, 망막모세포종, 림프종, 교세포종, 호지킨 림프종과 만성 림프구 백혈병이 있다. 여러가지 암에 의하여 영향을 받는 기관과 조직의 예를들면, 췌장, 유방, 갑상선, 난소, 자궁, 고환, 전립선, 뇌하수체, 부신, 신장, 위, 식도, 결장 또는 직장, 머리와 목, 골, 신경계, 피부, 혈액, 상인두 조직, 폐, 노관, 자궁, 질, 외분비선과 내분비선이 있다. 선택적으로, 암은 다중심 또는 알려지지 않은 주부위(CUPS)에 있다.

[0040] 여기에서 사용된 "암세포"란 암화를 받고 이 암화전과 동일한 범위로 성장이 더이상 조절되지 않는 세포를 뜻한다. 종양은 조직내 또는 조직상 또는 환자나 시험 대상체에서 고체 또는 반-고체 덩어리로서 흔히 발견되는, 암세포의 집합을 뜻한다.

[0041] 병리학적 관류저하를 갖는 질병 또는 증상은 이 발명에 따라, SEQ ID NO: 1을 함유하는 유효량의 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드를 사람과 같은 동물에 투여하여 치료한다. 이 발명에 따라 치료에 적합한 관류저하 질병 또는 증상에는 심장 국소성 빈혈, 심근경색, 당뇨병, 신경병, ALS, 경구궤양, 위궤양, 재발협착증, 뇌졸중, TIAs, 자간전구등이 있다(참조, Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nature Medicine 9, 653 - 660 (2003), 이는 여기에 부가적인 적당한 질병과 증상을 위하여 참고적으로 혼입하였다).

[0042] 강조된 혈관형성을 갖는 질병은 특히 SPARC-의존성이면, 이 발명에 따라 SPARC 혈관형성 영역 또는 기타 항-SPARC 치료를 목표로하는 예를들어, 유효량의 하나 또는 그 이상의 항체를 사람과 같은 동물에 투여하여서 치료할 수 있다. 이 발명에 따라 치료하는데 적합한 강조된 혈관형성을 갖는 질병에는 암, 종양, 혈관종, 자궁내막염, 당뇨병 망막병증, 미숙 망막병증, 건선, 관절염, 화농성육아종, 혈관면역증식성 림프절장해, 치주질환 등이 있다(참조, Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nature Medicine 9, 653 - 660 (2003), 이는 부가적인 적당한 질병과 증상을 위하여 여기에 참고적으로 혼입하였다).

[0043] 강조된 창상 치료와 개조를 갖는 질병이 특히 SPARC-의존성이면, 이 발명에 따라 SPARC 혈관형성 영역 또는 기타 항-SPARC 치료를 목표로하는 유효량의 하나 또는 그 이상의 항체를 사람과 같은 동물에 투여하여서 치료할 수 있다. 이 발명에 따라 치료하는데 적합한 강조된 창상 치료와 개조를 갖는 질병에는 켈로이드, 이상 비대형 반흔, 폐 섬유증 등이 있다(참조, Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nature Medicine 9, 653 - 660 (2003), 이는 부가적인 적당한 질병과 증상을 위하여 여기에 참고적으로 혼입하였다).

[0044] 암 또는 암세포는 암세포를 괴사시키거나 종양크기를 감소시키고, 전체 암 성장을 감소시키거나(즉, 혈관형성 감소를 통하여), 전이를 억제시키는 영역의 능력을 기초로하는 주어진 치료영역 또는 화학요법제에 대한 "감수성" 또는 "내성"과 같이 기술될 수 있다. 치료 영역에 내성을 갖는 암세포는 영역에 대하여 반응하지 않고 증식을 계속한다. 치료 영역에 대하여 감수성을 갖는 암세포는 세포괴사, 종양 크기 감소, 감소된 전체 성장(종양반복), 또는 전이 억제를 가져오는 영역에 대하여 반응한다. 예를들면, 이것은 그 자체 약 2-배, 약3-배, 약4-배, 약5-배, 약10배, 약15배, 약20-배 또는 그 이상으로 종양 크기, 전체 성장/종양 반복 또는 전이 발생이 약 10% 또는 그 이상, 예를들어 약 30%, 약40%, 약50%, 약60%, 약70%, 약80% 또는 그 이상으로 감소하는 것을 나타낸다. 반응의 감시는 이 분야의 전문가에게 알려져 있고 여기에 기술되어 있는 여러가지 병리학적, 임상학적과 영상학적 방법으로 성취할 수 있다.

[0045] 화학요법제 또는 제제의 조합물에 있어 통상의 주제는 암세포의 괴사를 유도하는데 있다. 예를들면, 니트로소우레아, 부술판, 티오테파, 클로람부실, 시스플라틴, 미토마이신, 프로카르바진, 또는 다카카르바진과 같은 DNA

부가물은 M-상의 세포 주기전에 손상된 DNA를 회복하기위하여 복제 세포를 강화하르로서 암세포의 성장을 늦추거나, 또는 암세포의 자연사를 유발하기위하여 그들 자신에 의하여 손상을 충분히 일으킬 수 있다. 예를들면, 유전자 발현 또는 전사, 단백질 번역 또는 복제된 DNA의 메틸화와 같은 경우는 임상이가 이용할 수 있는 화학요법제의 여러가지 수집에 의하여 방해될 수 있고 암세포 내에서 세포자연사 과정을 일으키는데 도움이 된다. 또한, 화학요법제는 환자 또는 시험 대상체의 체액 또는 후천성 면역계의 모양, 예를들어, 보체 카스케이드 또는 림프구 침입에 의하여 암세포를 괴사시킬 수 있다.

[0046] 어떠한 특수한 이론의 결합을 원치않으면, 화학요법제 또는 제제의 조합물에 내성을 갖는 암세포는 세포로부터 약제를 활성적으로 수송하르로서, 예를들어 ABC 수송체 MDR1 p-당단백질(FORD 등 1993. Cytotechnol. 12:171-212)의 과발현 또는 약제와 반작용하기위한 역-돌연변이의 취득에 의하여 그의 생존을 위하여 싸울 수 있다. 세포 DNA의 손상을 검출하는 능력에 영향을 미치는 DNA 회복 효소의 돌연변이는 손상된 DNA를 복제할 수 있고 암세포가 계속하여 종양을 복제하고 확대시킨다. 돌연변이체가 축적될 때, 정상 세포주기에서 다른 방법으로 활동하는 다른 조절점은 기능을 끝내고, 비조절된 성장 주기에 종속한다. 화학요법제 내성에 관한 다른 면은 세포자연사의 종양 세포 회피를 포함한다. 불량하게 조절된 세포 성장에 대한 숙주 생체의 정상 반응은 비제어된 복제에 종속이 시작되기 전에 결손 세포를 제거하고 세포 자연사를 개시하는 것이다. 그러나, 이것은 예를들어, 신호 형질도입 경우의 분단, 부착 종속의 손실, 또는 암세포에서 접촉억제, 또는 흔히 '종양 억제유전자', 예를들어 p53, BRCA1 또는 RB로 생각되는 세포자연사-촉진 인자의 손실로 암세포에 의하여 파괴된다. 암치료에 있어 세포자연사에 대한 이러한 감수성의 중요성은 단지 약제에 의하여서 만이 치료되는 비교적 거의 없는 종양에 대한 화학요법의 선택은 넓은 범위로 세포자연사를 받는 그들의 용이한 감수성에 따른다(Johnstone 등. 2002. Cell. 108(2): 153-64).

[0047] 여기에 사용된 "치료요법" 또는 "치료"는 암세포에 유해한 최소한 하나의 제제의 투여를 뜻한다. 이 발명에 의하여 사용하는데 적합한 치료요법은, 제한되는 것은 아니나, "화학 치료요법", "방사선 치료요법", "선택적 치료요법"과 이들의 조합에 있다.

[0048] 여기에 사용된, "화학 치료요법" 또는 "화학요법"은 암세포를 파괴하는데 유해한 최소한 하나의 화학요법제를 투여하는 것을 뜻한다. 임상이가 이용할 수 있는 이와 같은 화학요법제에는 미리아드가 있다. 화학요법제는 대형환제의 단일 투약량으로 대상체에 투여하거나, 시간에 따라 더 작은 투약량으로 투여할 수 있다. 단일 화학요법제를 사용하거나(단일-제제치료) 또는 하나 이상의 제제를 조합하여 사용할 수 있다(조합치료), 화학요법은 단독으로 사용하여 몇가지 형의 암을 치료할 수 있다. 예를들면, 상기한 바와같은 방사선 요법 또는 선택적 요법(예를들어 면역요법)이 있다. 더불어 화학감작제는 화학요법제와 조합한 요법으로 투여할 수 있다.

[0049] 여기에 사용된 "화학요법제"는 암치료에 사용하고 일반적으로 직접 암세포를 괴사시키는 능력을 갖는 약물을 뜻한다. 화학요법제의 예를들면, 알킬화제, 항대사물질, 천연생성물, 호르몬 및 길항물질과 기타 제제가 있다. 교대 명칭의 예는 괄호에 표시했다. 알킬화제의 예를들면, 메클로르에타민, 시클로포스파미드, 이소스파미드, 멜파란(L-사르콜리신)과 클로람부신과 같은 질소 머스타드; 에틸에니민 및 헥사메틸멜라민과 같은 메틸멜라민과 티오테파; 부술판과 같은 알킬 술포네이트; 카르무스틴(BCNU), 세무스틴(메틸-CCNU); 로무스틴(CCNU)과 스트렙토조신(스트렙토조토신)과 같은 니트로소우레아; 인산에스트라무스틴과 같은 DNA 합성 길항물질; 다카르바진(PTIC, 디메틸-트리아제노이미다졸카르복스아미드)와 테모졸로미드와 같은 트리아진이 있다. 항대사물질의 예를들면, 메토트렉에이트(아메토프테린)와 같은 폴산 유사체; 플루오로우라신(5-플루오로우라실, 5-FU, 5FU), 플록수리딘(플루오로데옥시우리딘, FUDR), 시타라빈(시토신 아라비노시드)와 겐시타빈과 같은 피리미딘; 머캅토프린(6-머캅토프린, 6-MP), 티오구아닌(6-티오구아닌, TG), 및 펜토스타틴(2'-데옥시코포르마이신), 클라드리빈과 플루다라빈과 같은 푸린 유사체; 암사크린과 같은 위상이성질화 효소가 있다. 천연 생성물의 예를들면 빈블라스틴(VLB)과 같은 빈카 알카로이드; 파클리탁셀과 도세탁셀(탁소테르)과 같은 타산; 에토포시드와 테나포시드와 같은 에피토포필로톡신; 토토테칸과 이리노테칸과 같은 캄토테신; 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노루비신(다우노마이신, 루비도마이신), 독소루비신, 블레오마이신, 미토마이신(미토마이신 C), 이다루비신, 에피루비신과 같은 항생물질; L-아스파라기나아제와 같은 효소; 인터페론 알파와 인터류킨 2와 같은 생물학적 반응 수식 인자가 있다. 호르몬과 길항물질의 예를들면, 부세레린과 같은 항체형성 호르몬 방출 작동체; 프레드니손과 같은 아드레노코르티코스테로이드와 관련 제제; 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 초산 메테록시프로게스테론과, 초산 메게스트롤과 같은 프로게스틴; 디에틸stil베스트롤과 에틴일 에스트라디올과 같은 에스트로젠과 관련 제제; 타목시펜과 안아스트로졸과 같은 에스트로젠 길항물질; 프로피온산 테스토스테론과 플루옥시메스테론과 같은 안드로젠과 관련 제제; 류프롤리드와 같은 고나도트로핀-방출 호르몬 유사체가 있다. 기타 제제의 예를들면, 탈리도미드; 시스플라틴(cis-DDP), 옥사리플라틴과 카르보플라틴과 같은 백금 배위 복합체; 미톡산트론과

같은 안트라센에디온; 히드록시우레아와 같은 치환된 우레아; 프로카르바진(N-메틸히드라진, MIH)과 같은 메틸 히드라진 유도체; 미토탄(o,p'-DDD)과 아미노글루테티미드와 같은 아드레노코르티칼 억제제; 백사로텐과 같은 RXR 작용제; 이마티니브와 같은 티로신 키나아제 억제제가 있다. 이들의 교호명과 상품명과 화학요법제의 부가적 예와, 투약과 투여 영역을 포함한 이들의 사용 방법은 이 분야의 전문가에게 알려져 있고, 통상의 전문가에게 알려져 있는 어떠한 적당한 참고 문헌에서 볼 수 있다. 특히 이 발명에 의하여 사용하는데 적합한 화학요법제에는 제한없이, 나노입자 알부민-결합 파클리탁셀이 있다.

[0050] 여기에 사용된 "방사선 치료요법" 또는 "방사선 치료"란 용어는 암세포를 괴사시키기 위한 방사선 투여를 뜻한다. 방사선은 세포내의 여러가지 분자와 상호작용하지만, 세포괴사를 가져오는 일차 표적은 데옥시리보핵산(DNA)이다. 그러나, 방사선 치료는 세포 및 핵막과 기타 세포 소기관에 손상을 가져온다. 통상 DNA 손상에는 당분-인산 주쇄에서 단쇄 및 이중쇄 파괴를 포함한다. 더우기, 세포기능을 와해 시킬 수 있는 DNA와 단백질의 파괴될 수 있다. 방사선 형에 따라, DNA 손상의 메카니즘은 상대의 생물학적 효과에 따라 변할 수 있다. 예를들면, 중 입자(즉, 양자, 중성자)는 직접 DNA에 손상을 주고 더 큰 상대의 생물학적 효과를 가져온다. 전자기 방사선은 세포 수분의 이온화에 의하여 일차적으로 생성되는 단수명 히드록시 유리기를 통하여 간접 이온화 작용을 가져온다. 방사선의 임상적 적용은 외부 비입 방사선(외부 공급원으로부터)과 근접치료(환자에게 이식되거나 삽입되는 방사선 공급원을 사용하여)로 구성된다. 외부 비입 방사선은 X-선 과/또는 감마선으로 구성되고, 근접 치료에서는 감마선에 따라 알파 입자, 또는 베타입자를 붕괴하고 방출하는 방사성 핵을 사용한다.

[0051] 방사선 치료는 방사선 증감제로서 화학요법제와 함께 조합하여 화학 요법에 사용할 수 있다. 개별 환자에 적합한 특별한 방사선 요법의 선택은 암의 조직과 단계를 고려하여 전문가에 의하여 주의하여 결정할 수 있다.

[0052] 여기서 사용되는 "선택적 치료요법" 또는 "선택적 치료"란 용어 예를들어, 생물학적 반응 수식인자(폴리펩티드-, 카르보하이드레이트-,와 지질-생물학적 반응 수식인자 포함), 독신, 렉틴, 항혈관형성제, 수용체 트로신 키나아제 억제제, 예를들어 Iressa®(게피티니브), Tarceva®(에르로티니브), Erbitux®(세툽시마브), 이마티니브 메실레이트(Gleevec®), 프로테오솜 억제제(예를들어, 보르테조미브 벨카드); PTK787 (ZK222584)와 같은 VEGFR2억제제, 아우로라 키나아제 억제제(예를들어 ZM447439); 포유류 표적의 라파마이신(mTOR)억제제, 시클로옥시게나아제-2(COX-2)억제제, 라파마이신 억제제(예를들어 시로리무스, 라파문.TM); 파르네실트란스페라아제 억제제(예를들어, 티피파르니브, 자르네스타); 기질 금속단백질 분해효소(예를들어, BAY 12-9566; 황산화 다당류 테코갈란); 혈관형성 억제제(예를들어, Avastin.TM(베바시주마브)); TNP-4와 같은 푸마길린의 유도체; 카르복시아미노트리아졸 BB-94와 BB-2516; 탈리도미드; 인터류킨-12; 리노미드; 펩티드 단편; 혈관 성장인자와 혈관 성장인자 수용체에 대한 항체; 혈소판 유도 성장인자 수용체 억제제; 단백질 키나아제 C억제제, 미토겐-활성화 키나아제 억제제, 미토겐-활성화 단백질 키나아제 키나아제 억제제, 라우스 육종 바이러스 형질전환 암유전자(SRC)억제제 히스톤데아세틸라아제 억제제, 소 저산소증-유도성인자 억제제, 헤지호그 억제제와 TGF-베타, 신호 억제제를 포함한다. 더우기, 면역요법제에서는 선택적 치료요법을 고려하여야한다. 예를들면, 케모킨, 케모탁신, 시토킨, 인터류킨, 또는 조직인자가 있다. 또한 적당한 면역요법제에는 전성 항체를 함유하는 혈청 또는 감마 글로불린; 비특이성 면역자극 보조제; 활성 특이적 면역요법과 양자 면역요법이 있다. 더불어, 선택적 치료에는 안티센스 분자, 폴리펩티, 유전자 요법 벡터 등을 포함한 폴리뉴클레오티드와 같은 기타 생물학적-기초 화학적 구성물이 있다. 이와 같은 선택적 치료는 단독으로 또는 조합하여, 또는 여기에 기술된 다른 치료요법과 조합하여 투여할 수 있다. 선택적 치료요법에 사용된 이들 제제의 교대명과 상품명 및 선택적 치료요법에 사용된 제제의 부가적 예와 투약과 투여요법을 포함한 이들의 사용 방법은 이 분야의 전문 의사에게 알려져 있다. 더우기 화학요법제의 사용 방법과 투약 및 투여 요법을 포함한 조합 치료에서의 선택적 치료요법에 사용되는 기타 약제는 이 분야의 전문가에게 알려져 있다.

[0053] 특히, 적당한 선택적 치료요법은 한정되는 것은 아니나 Her2(예를들어, 트라스투루마브), EGF 또는 EGF수용체, VEGF(예를들어, 베바시주마브) 또는 VEGF수용체, CD20 등에 대한 항체와 같은 암세포 표면상의 분자에 대한 항체를 포함한다. 치료제는 하나 또는 그 이상의 보체 활성화, 세포 매개 세포독성, 세포 자연사 유도, 세포 괴사 유도와 흡인화를 매개하는 어떠한 항체 또는 항체 단편을 함유할 수 있다. 이와 같은 항체는 전체 또는 부분적 Fc영역을 가질 수 있다.

[0054] 여기서 "항체"란 한정되어 있는 것은 아니나, 단클론 항체, 다클론 항체, 이량체, 다량체, 다특이성 항체(예를들어, 이특이성 항체)를 뜻한다. 항체는 다른 종에서 교배, 키메라 또는 유도된 마우스, 사람일 수 있다. 항체는 특이한 항원으로 인식 및 결합할 수 있는 면역계에 의하여 발생 되는 단백질이다. 일반적으로 표적 항원은 다수 항체상에서 CDRs에 의하여 인식되는 에피토프라 불리우는 여러결합 부위를 갖는다. 다른 에피토프에 특이

하게 결합하는 각 항체는 다른 구조를 갖는다. 따라서, 하나의 항원은 하나의 대응하는 항체보다 더 많이 가질 수 있다.

[0055] 항체는 전장 면역글로불린 분자 또는 전장 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉, 관련 표적의 항원 또는 이들의 부분이 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 표적물에는 자가 면역 질병과 연관되는 자가 면역 항체를 생성시키는 암세포 또는 세포들이 있다.

[0056] 여기에 기술된 면역글로불린은 면역글로불린 분자 중 어떠한 종류(예들들어, IgG, IgE, IgM, IgD, and IgA)일 수 있다. 면역글로불린은 어떠한 종에서 유도될 수 있다.

[0057] "항체 단편"은 원하는 생물학적 활성을 유지하는 전장 항체의 일부분을 함유한다. 통상 "항체 단편"은 항원 결합 또는 이들의 가변성 영역이다. 항체 단편의 예들들면, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>와 Fv단편; 디아보디; 선형항체; Fab 발현 라이브러리, 항- 이디오타입성(항-Id)항체, CDR(상보성 측정 영역)과, 암세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원, 단일-쇄 항체 분자에 면역특이적으로 결합하는 상기 중 어느 하나의 에피토프-결합 단편에 의하여 생성되는 단편; 항체 단편에서 형성된 다효성 항체가 있다.

[0058] 단클론 항체는 중쇄 와/또는 경쇄의 일부분이 특별한 종에서 유도된 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 동종이거나 또는 특별한 항체류 또는 아류에 속하고,쇄의 나머지는 다른 종에서 유도된 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 동종이거나 또는 다른 항체류 또는 아류에 속하는 "키메라"항체는 물론 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는한 이와 같은 항체의 단편을 포함한다(미국 특허번호 4,816,567), 여기서 중요 키메라 항체에는 비-사람 영장류에서 유도된 가변성 영역 항원-결합 서열(예들들어, Old World Monkey 또는 Ape)과 사람 불변영역 서열을 함유하는 "프라이머타이즈도(primatized)"항체가 포함된다.

[0059] "항체-의존성 세포-매개 세포독성"과 "ADCC"란 Fc수용체(FcRs)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예들들어, Natural Killer(NK)세포, 뉴트로필과, 대식세포)가 표적 세포상에 결합되는 항체를 인식한 다음 표적 세포의 용해를 일으키는 세포-매개 반응을 뜻한다. ADCC, NK 세포를 매개하는 1차 세포는 Fc, 감마 RIII 만을 발현하고, 반면에 단세포는 Fc감마RI, Fc감마RII과 Fc감마RIII를 발현한다. 중요 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 생체의 ADCC 검정을 행한다(미국 특허번호5,003,621; 미국 특허번호 5,821,337). 이와 같은 검정에 유용한 효과 세포에 말초혈 단핵세포(PBMC)와 내츨 킬러(NK)세포가 있다. 선택적으로, 또는 부가적으로 관련분자의 ADCC 활성은 생체내, 예들들어 Clynes 등 PNAS(미국), 95:652-656(1998)에 기술되어 있는 것과 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0060] "세포 사멸 유도" 항체는 생존가능한 세포가 비 생존가능한 세포로 되는 것이다. 생체의 세포사멸은 보체와 면역 효과 세포 없이 측정하여 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)에 의하여 유도되는 세포 사멸을 구별할 수 있다. 따라서, 세포사멸에 대한 검정은 열 비활성화 혈청(즉 보체없이)을 사용하여 면역 효과 세포없이 행할 수 있다. 항체가 세포 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 측정하기 위하여, 요오드 프로피듐(PI), 트리판 블루 또는 7AAD의 섭취량에 따라 평가되는 막 보존성 손실을 미반응 세포와 비교하여 평가할 수 있다. 세포 사멸-유도항체는 BT474 세포의 PI 섭취량 검정에서 PI 섭취량을 유도하는 것이다.

[0061] "세포 자연사 유도" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포수축, 소포체의 이완, 세포 단편화 와/또는 막 소포의 형성(세포 자연사 몸체)에 의하여 측정되는 계획된 세포 사멸을 유도하는 것이다.

[0062] 여기서 사용된 "화학합작제" 또는 "감작제"란 화학요법제, 방사선 치료요법 또는 선택적 치료요법의 치료효과를 강화하는 약물을 뜻하며 따라서 이와 같은 치료 또는 제제의 효능을 개량한다. 종양 또는 암세포의 치료에 대한 감수성 또는 내성은 예들들어, 일정기간 이상 종양크기, 종양 덩어리 또는 전이 발생율을 측정하여, 사람 또는 설치류 같은 동물에서 측정한다. 예들들면, 사람에게 대하여 약2, 약3, 약4 또는 약6개월과 마우스에 대하여는 약 2-4, 약3-5, 또는 약4-6주 측정한다. 조성물 또는 치료방법은 치료 감수성의 증가 또는 내성의 감소가 이러한 조성물 또는 방법 없이 치료한 감수성 또는 내성에 비하여 약 2-배, 약3-배, 약4-배, 약10-배, 약15-배, 약20-배 또는 그 이상으로 약 10% 또는 그 이상, 예들들어 약 30%, 약40%, 약50%, 약60%, 약70%, 약80% 또는 그 이상이면 치료요법에 대한 종양 또는 암세포의 반응을 감작시킨다. 치료요법에 대한 감수성 또는 내성의 결정은 이 분야에서와 이 분야의 전문가에게는 일반적인 것이다.

[0063] "펩티드", "폴리펩티드"와 "단백질"이란 용어는 교체하여 사용할 수 있고, 펩티드 결합 또는 수식된 펩티드결합, 예들들어, 증가된 반감기와 같이, 펩티드에 대하여 부가적으로 원하는 성질을 제공하는 펩티드 등 입체(수식된 펩티드 결합)에 의하여 공유 결합되는 최소한 두개의 아미노산 잔기로 구성되는 화합물을 뜻한다. 펩티드는 최소한 두개의 아미노산을 함유한다. 또한 여기에 기술된 펩티드 또는 단백질을 함유하는 아미노산은

번역 후 과정과 같은 자연 과정에 의하여 아니면, 이 분야에 잘 알려져 있는 화학적 수식법에 의하여 수식될 수 있다. 수식은 펩티드 주쇄, 아미노산 측쇄와 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여, 펩티드 어느 곳에서나 일어날 수 있다. 동일한 형의 수식은 주어진 펩티드의 몇몇 부위에서 동일 또는 변동한 정도로 존재할 수 있다.

[0064] 펩티드에 대한 수식의 예를들면, PEG화, 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아마이드화, 플라빈의 공유 결합, 헴 부분의 공유 결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유 결합, 포스포티딜이노시톨의 공유 결합, 가교 결합, 고리화, 이황화물 결합 형성, 디메틸화, 공유 가교 결합 형성, 시스틴 형성, 피로글루탐산의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 분해 공정, 포스포릴화, 프렌일화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화 같은 단백질에 아미노산의 전이- RNA 매개 부가와, 유비퀴틴화가 있다. 참조, 예를들어, Proteins-Structure and Molecular Properties, 2.sup.nd ed., T. E. Creighton, W H. Freeman and Company, New York, 1993 and Wold F, Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter 등, Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646과 Rattan 등(1992), Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging," Ann NY Acad Sci 663: 48-62.

[0065] 실질적으로 유사한 서열은 여기에 서술된 바와 같이 하나 또는 그 이상의 보존성 치환에 의하여서만 기준 서열과 다른 아미노산 서열을 뜻한다. 이러한 서열은 예를들면 실질적으로 유사한 다른 서열과 기능적으로 동종이다. 치환될 수 있는 이 발명의 펩티드에서 개개의 아미노산의 모양은 이 분야의 전문가가 알 수 있을 것이다.

[0066] 아미노산 서열의 유사성 또는 동일성은 예를들어 BLAST(기본국소정렬조사기구)2.0 알고리즘을 사용하는 BLASTP와 TBLASTN 프로그램을 사용하여 측정할 수 있다. 아미노산 서열의 유사성 또는 동일성을 측정하는 방법은 이 분야의 전문가에게 잘 알려져 있고 BLAST 알고리즘의 사용은 ALTSCHUL 등, 1990, J Mol. Biol. 215: 403-410과 ALTSCHUL 등,(1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402에 기술되어 있다.

[0067] 정렬을 실행하는 서열은 여러가지 데이터베이스에서 수집한다. 단백질 데이터베이스의 예를들면 SWISS-PROT가 있고, 또한 이는 단백질 기능에 관련하는 높은 수준의 주석, 변이체(Bairoch A. and Apweiler R. (2000) Nucleic Acids Res. 28(1):45-48; Bairoch A. and Apweiler R. (1997) J. Mol. Med. 75(5):312-316; Junker V. L. 등(1999) Bioinformatics 15(12):1066-1007), TrEMBL, EMBL 뉴클레오티드 서열 엔트리의 번역 모두를 함유하는 SWISS-PROT의 컴퓨터-주석 보충(Bairoch A. and Apweiler R. (2000) Nucleic Acids Res. 28(1):45-48)을 제공하고, nr 데이터베이스는 PDB, SwissProt, PIR과 PRF와 같은 다른 데이터베이스를 모든 비-중복 GenBank CDS 번역물플러스 단백질 서열과 비교한다.

[0068] 단백질 서열의 정렬은 질의 서열과 유사한 서열의 데이터베이스를 조사하기위한 기존 알고리즘을 사용하여 행한다. 하나의 정렬 방법에는 Smith- Waterman 알고리즘(Smith, T. F. and Waterman, M. S. 1981. Journal of Molecular Biology 147(1):195-197)이 있고, 이는 질의 서열과 데이터베이스 서열 사이의 최적 정렬이 어떻게 생성될 수 있는지를 측정하는데 유용하다. 이와 같은 정렬은 데이터베이스 서열의 매치를 받는데 질의 서열이 필요한 형질전환이 무엇인지를 측정하여 얻는다. 형질전환에는 하나의 캐릭터를 다른 것으로 대체하고 캐릭터의 줄을 삽입하거나 삭제하는 것을 포함한다. 스코어는 각 캐릭터 - 대 - 정확한 매치의 캐릭터 비교- 양의 스코어와 몇몇 치환물, 다른 치환물의 음의 스코어와 삽입/삭제로 설정된다. 스코어는 통계적으로 유도되는 스코어 매트릭스에서 얻는다. 최고의 스코어를 가져오는 형질 전환의 조합을 사용하여 질의 서열과 데이터베이스 서열 사이의 정렬을 일으킨다. Needleman-Wunsch (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. 1970. Journal of Molecular Biology 48(3):443-453) 알고리즘은 Smith- Waterman 알고리즘과 비슷하지만, 서열 비교는 국소적이 아니라 포괄적이다. 포괄적 비교는 전체 데이터 베이스 서열에 대하여 전체 질의 서열의 정렬을 강행시킨다. 국소 정렬은 항상 매치로 시작하고 끝나고 포괄적 정렬은 삽입 또는 삭제(indel)로 시작하고 끝난다. 주어진 질의 서열과 데이터베이스에 있어서, 포괄적 스코어는 끝에 indel로 인하여 국소적 스코어와 같거나 그 이하가 된다. 상기 알고리즘의 선택에 따라, Hidden Markov Model (HMM) 조사(Eddy, S. R. 1996. Current Opinion in Structural Biology 6(3):361-365)를 사용하여 단백질 서열 정렬을 발생시킨다. HMM 스코어는 매치의 확률로 측정한 다음 삽입/삭제 또는 역으로 측정한다. HMMs는 삽입을 삭제 번역(과 역으로)을 허용하며 시작과 끝상태의 스코어는 조사가 포괄적으로 또는 국소적으로 행하였는지 여부를 조절한다.

[0069] 상기한 하나 또는 그 이상의 알고리즘을 정렬 프로그램에 사용하여 단백질 서열 정렬을 발생시킨다. 이 분야의

전문가는 여러가지 다른 알고리즘을 혼합한 것을 선택하기 위하여 여러가지 서열 정렬 프로그램을 갖는다. 한가지 정렬 프로그램의 예를들면, BLASTP (Altschul, S. F., et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)가 있고, 다른 정렬 프로그램으로는 CLUSTAL 과 PILEUP가 있다. BLASTP 운영에서 표준 출력은 충분한 정보를 함유하여 하술한 indel 분석을 더 실행한다.

[0070] 아미노산은 예를들어, 극성, 비-극성, 산성, 염기성, 방향족 또는 중성으로 기술할 수 있다. 극성 아미노산은 생물학적 또는 중성에 가까운 pH에서 결합하는 수소에 의하여 물과 상호작용할 수 있는 아미노산이다. 아미노산의 극성은 생물학적 또는 중성에 가까운 pH에서 결합하는 수소의 정도의 지표이다. 극성 아미노산의 예를들면, 세린, 프로린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민, 리신, 히스티딘, 알기닌, 아스팔테이트, 티로신과 글루탐산이 있다. 비-극성 아미노산의 예를들면 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌과 트립토판이 있다. 산성 아미노산은 중성 pH에서 순 음전하를 갖는다. 산성 아미노산의 예로는 아스팔테이트와 글루탐산이 있다. 염기성 아미노산은 중성 pH에서 순 음전하를 갖는다. 염기성 아미노산의 예로는 알기닌, 리신과 히스티딘이 있다. 방향족 아미노산은 일반적으로 비극성이고 소수성 상호작용에 관여한다. 방향족 아미노산의 예를들면, 페닐알라닌, 티로신과 트립토판이 있다. 또한 티로신은 방향족 측쇄상의 히드록실기를 통하여 결합하는 수소에 관여한다. 중성, 지방족 아미노산은 일반적으로 비극성과 소수성이다. 중성 아미노산의 예를들면, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신과 메티오닌이 있다. 아미노산은 하나의 기술적 범주 이상으로 기술될 수 있다. 통상의 기술적 범주를 공유하는 아미노산은 펩티드에서 서로 치환할 수 있다.

[0071] 이 발명의 펩티드 화합물을 기술하는데 사용된 명명법은 아미노기가 좌측에 카르복실기 각 아미노산 잔기의 우측에 존재하는 일반적 관례에 따른다. 이 발명의 선택된 특이한 구성을 나타내는 서열에 있어, 특별히 표시되지는 않았지만 아미노-와 카르복시-말단기는 다른 언급이 없는한, 이들이 생리적 pH값으로 예측하는 형태인 것을 이해할 것이다. 아미노산 구조식에서, 각 잔기는 일반적으로 아미노산의 통속명에 해당하는, 하나의 문자 또는 세-문자 표시에 의하여 나타낼 수 있다.

[0072] 아미노산의 수치요법 지수는 수성 환경(음의 값) 또는 소수성 환경(양의 값)을 찾으려고하는 아미노산의 경향을 나타내는 스케일을 뜻한다.(Kyte & Doolittle 1982. J Mol Biol 157:105-132). 표준 아미노산의 수치 요법 지수는 알라닌(1.8), 알기닌(-4.5), 아스파라긴(-3.5), 아스팔트산(-3.5), 시스테인(2.5), 글루타민(-3.5), 글루탐산(-3.5), 글리신(-0.4), 히스티딘(-3.2), 이소류신(4.5), 류신(3.8), 리신(-3.9), 메티오닌(1.9), 페닐알라닌(2.8), 프로린(-1.6), 세린(-0.8), 트레오닌(-0.7), 트립토판(-0.9), 트로신(-1.3)과 발린(4.2)이다. 유사한 수치요법 지수를 갖는 아미노산은 펩티드에서 서로 치환할 수 있다.

[0073] 여기에서 기술한 펩티드를 함유하는 아미노산은 L- 또는 D- 배치인 것을 이해할 것이다. 이 발명의 펩티드와 펩티도미메틱스에서, D- 아미노산을 L- 아미노산으로 치환할 수 있다.

[0074] 이 발명의 펩티드내에, 특히 카르복시- 또는 아미노- 말단에 함유되는 아미노산은 메틸화, 아미드와, 아세틸화 또는 치환에 의하여 역으로 그들의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 펩티드의 순환 반감기를 변경할 수 있는 다른 화학기로 수식할 수 있다. 더불어, 이황화물 결합은 이 발명의 펩티드에 존재 또는 부존재 할 수 있다.

[0075] 비표준 아미노산은 자연에서 일어나고, 유전적으로 코드화되거나 또는 되지 않을 수 있다. 유전적 코드화 비표준 아미노산의 예를들면, 정상적으로 정지 코돈인 UGA 코돈에서 때때로 몇몇 단백질에 혼합되는 셀레노시스테인, 또는 정상적으로 정지 코돈인 UAG 코돈에서 때때로 몇몇 단백질에 포함되는 피롤리신이다. 유전적으로 코드화되지 않는 몇몇 비표준 아미노산은 펩티드에 미리 혼합되는 표준 아미노산의 수식에서 나오거나, 또는 예를들어 대사 중간체 또는 전구물질일 수 있다. 비표준 아미노산의 예를들면, 4-히드록시프로린, 5-히드록시리신, 6-N-메틸리신, 감마-카르복시글루탐산, 데스모신, 오미틴, 시톨린, 란티오닌, 1-아미노 시클로프로판-1-카르복실산, 감마-아미노부티르산, 카르니틴, 사르코신, 또는 N-포르밀메티오닌이 있다. 또한 표준과 비표준 아미노산의 합성 변이체는 알려져있고, 화학적으로 유도된 아미노산, 동정 또는 추적으로 표지된 아미노산, 또는 알파탄소상에 여러가지 측쇄기를 갖는 아미노산이 있다. 이러한 측쇄기는 알려져 있고, 예를들어 지방족, 단일 방향족, 다환식 방향족, 이중환식, 이중핵, 아미노, 알킬아미노, 카르복실, 카르복시아미드, 카르복실 에스테르, 구아니딘, 아미딘, 히드록실, 알콕시, 머캅토-, 알킬머캅토-, 또는 이중원자- 함유 측쇄가 있다. 기타 합성 아미노산에는 알파- 아미노산, 베타- 아미노산과 같은 비- 알파 아미노산, 데스- 카르복시 또는 데스- 아미노산이 있다. 아미노산의 합성 변이체는 이 분야에 알려져 있는 일반 방법을 사용하여 합성하거나, 또는 보통의 공급자, 예를들어, RSP Amino Acids LLC (Shirley, Mass)에서 구매할 수 있다.

[0076] 보존성 아미노산 치환의 의미를 더 예시하기 위하여, 그룹A-F를 하기에 열거했다. 다음 그룹 중 하나의 멤버를 동일한 그룹의 다른 멤버로 대체하는 것은 보존성 치환으로 생각된다.

- [0077] 그룹 A에는 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 시스테인, 트레오닌, 다음 측쇄: 에틸, 이소부틸,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ 와  $\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 를 갖는 수식된 아미노산이 있다.
- [0078] 그룹 B에는 글리신, 알라닌, 발린, 세린, 시스테인, 트레오닌과, 에틸 측쇄를 갖는 수식된 아미노산이 있다.
- [0079] 그룹 C에는 페닐알라닌, 페닐글리신, 티로신, 트립토판, 시클로헥실메틸과 치환된 벤질 또는 페닐 측쇄를 갖는 수식된 아미노 잔기가 있다.
- [0080] 그룹 D에는 글루탐산, 아스파르트산, 치환 또는 비치환된 글루탐산 또는 아스파르트산의 지방족, 방향족 또는 벤질 에스테르(예를들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, 시클로헥실, 벤질 또는 치환된 벤질), 글루타민, 아스파라긴, CO-NH-알킬화 글루타민 또는 아스파라긴(예를들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필)과, 측쇄- $(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 를 갖는 수식된 아미노산, 이들의 에스테르(치환 또는 비치환 지방족, 방향족 또는 벤질 에스테르), 이들의 아마이드와 이들의 치환 또는 비치환 N-알킬화 아마이드가 있다.
- [0081] 그룹 E에는 히스티딘, 리신, 알기닌, N-니트로알기닌, P-시클로알기닌, g-히드록시알기닌, N-아미디노시트루린, 2-아미노 구아니디노부탄산, 리신의 동족체, 알기닌의 동족체와, 오르니틴이 있다.
- [0082] 그룹 F에는 세린, 트레오닌, 시스테인과, -OH 또는 -SH로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 직 또는 분지 알킬 측쇄를 갖는 수식된 아미노산이 있다.
- [0083] 그룹 A-F는 예시한 것이고 이 발명을 한정하는 것은 아니다.
- [0084] 펩티도미메틱은 모 펩티드의 생물학적 활성을 모의한 비-펩티드 구조 요소를 함유하는 화합물이다. 펩티도미메틱은 효소적 절단성 펩티드 결합과 같은 고전적 펩티드 특성을 갖지 않는다. 모 펩티드는 관련 단백질 상에서 결합 서열 또는 포스포틸화 부위로서 초기에 확인되거나 또는 자연적으로 발생하는 펩티드, 예를들어 펩티드 호르몬일 수 있다. 펩티도미메틱을 동정하는 검정에는 펩티도미메틱 라이브러리와 같은 라이브러리를 선별할 때, 비교를 위하여 양성 대조물로서 모펩티드를 포함할 수 있다. 펩티도미메틱 라이브러리는 모 펩티드와 유사한 생물학적 활성을 갖는 화합물의 라이브러리이다.
- [0085] 여기에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 RNA, cDNA, 게놈 DNA, 합성 형태와 혼합된 중합체, 두 센스 및 안티 센스 가닥을 포함하고, 화학적으로 또는 생화학적으로 수식되거나, 비-천연 또는 유도된 뉴클레오티드 염기를 함유하고, 이들은 이 분야의 전문가들이 쉽게 알 수 있다. 이와 같은 수식에는 라벨, 메틸화, 유사체로 하나 또는 그 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 치환, 비 하전 연쇄(예를들어, 포스포산 메틸, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등)와 같은 인터뉴클레오티드 수식, 하전 연쇄(예를들어 포스포로디티오에이트, 등), 페넨트 부분(예를들어, 펩티드)와 수식된 연쇄(예를들어, 알파 아노머 폴리뉴클레오티드, 등)가 있다. 또한 수소 결합과 다른 화학적 상호작용을 통하여 표시된 서열에 결합하는 그들의 능력에 있어 폴리뉴클레오티드를 모의하는 합성 분자가 포함된다.
- [0086] 여기에 사용된 "펩티드 핵산(PNA)"란 핵산의 당분 인산 골격이 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격으로 변환되는 수식된 핵산을 뜻한다. DNA/RNA의 당분-인산 골격이 보체성 채 사이의 정전 반발을 가져오는 중성 조건하에서 음하전을 받더라도, PNA의 골격구조는 본질적으로 하전을 갖지 않는다. 그러므로, 정전 반발은 없다. 따라서, PNA는 통상의 핵산과 비교하여 이중 가닥을 형성하는 더 높은 능력을 갖고, 염기 서열을 인식하는 높은 능력을 갖는다. 더우기, PNA는 일반적으로 핵산이상의 안정성을 갖는다. 또한, PNA는 배열에 및 다른 교잡에 또는 상술한 기타 반응과 여기서 올리고뉴클레오티드에 사용될 수 있다.
- [0087] 여기에 사용된 용어 "벡터"란 외인성 또는 내인성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 주입하는데 사용되는 폴리뉴클레오티드 화합물을 뜻한다. 벡터는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 분자를 코드화하는, 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 중성 상태에서 또는 재조합 공학을 받는 플라스미드, 코스미드, 바이러스와 박테리오파아지는 비제한적 예를들면, 최소한 하나의 원하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자를 함유하는 재조합 벡터를 제공하는데 통상적으로 사용되는 벡터가 있다.
- [0088] 여기에 사용된 "종양 억제제"란 세포의 비 조절된 성장을 억제하는 정상적 생물학적 역할을 갖는 유전자 또는 유전자 생성물을 뜻한다. 종양 억제제의 기능을 상실하면, 비 조절된 세포 성장이 일어난다. 종양 억제제에 대한 기능적 대응물은 정상 세포 성장을 촉진하는 암 유전자--유전자이고 "원암유전자"로 알려져 있다. 이러한 유전자 또는 유전자 생성물을 활성화하는 돌연변이는 이를 암유전자로 더 변환 시키고, 이는 세포 성장 활성을 계속하지만 불량 조절 방법에 속한다. 문헌에 잘 알려져있는 종양 억제제 유전자와 유전자 생성물의 예를들면

PTC, BRCA1, BRCA2, p16, APC, RB, WT1, EXT1, p53, NF1, TSC2, NF2, VHL 또는 SPARC가 있다.

- [0089] 이 발명은 여기에 기술되어 있는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 발현을 위한 효과적으로 결합되어 있는 핵산 분자와 대조물 요소(예를들어, 적당한 촉진제)를 함유하는 핵산 구조물을 더 제공한다. 단백질 발현은 DNA 신호를 교대로 조절하는 RNA 전사 수준에 따른다. 비슷하게, mRNA의 번역은 메세지의 5'말단의 약10 내지 약100 뉴클레오타이드내에 통상 위치하는, 최소한의 AUG 개시 코돈을 요구한다. AUG개시체 코돈에 인접하는 서열은 최적의 번역을 가져오는 코자크 공동서열의 완성에 따라서, 진행 리보솜에 의하여 이의 인식에 영향을 미치는 것으로 나타났다(참조, 예를들어, Kozak, J. Molec. Biol. 196: 947-950 (1987)), 세포에서 외인성 핵산의 성공적 발현으로는 생성된 단백질의 번역 후 수식을 요구할 수 있다. 따라서, 이 발명은 벡터가 예를들어 pCDNA3.1 또는 이들의 유도체인, 폴리펩티드를 코드화하는 플라스미드를 제공한다.
- [0090] 여기에 기술된 핵산 분자는 적당한 촉진제에 효과적으로 연결되어 있는 코드 영역을 바람직하게 함유하고, 이 촉진제는 진행 세포에서 기능성을 갖는 것이 바람직하다. 한정되어 있는 것은 아니나, RSV 촉진제와 아데노바이러스 후기 촉진제와 같은 바이러스성 촉진제를 이 발명에 사용할 수 있다. 비-바이러스성 촉진제로는 한정되어 있는 것은 아니나, 포스포글리세로키나아제(PGK)촉진제와 연장 인자1 알파 촉진제가 적합하다. 비-바이러스성 촉진제는 사람 촉진제가 바람직하다. 또한, 이 분야에 많이 알려져 있는 부가적인 적당한 유전자 요소는 이 발명의 핵산에 결합되거나, 삽입되고 부가적 기능, 발현수준, 또는 발현 패턴을 제공하는 구조물에 결합될 수 있다. SPARC계 유전자를 발현하는 자연 촉진제도 사용할 수 있으며, 이 경우에 이들은 실질적으로 그 염색체를 변환시키는 방법에 의하여 수식하지 않는한 이들을 자연적으로 암호하는 염색체에 사용되지 않는 것이 바람직하다. 이와 같은 실질적으로 변환된 염색체에는 레트로바이러스 벡터 또는 유사한 공정에 의하여 이입되고 변경된 염색체가 있다. 또한, 이와 같은 실질적으로 변환된 염색체는 HAC, YAC 또는 BAC와 같은 인공적 염색체를 함유할 수 있다.
- [0091] 더불어, 여기에 기술된 핵산 분자는 전사를 용이하게 하는 증강제에 효과적으로 연결될 수 있다. 증강제는 인접한 유전자의 전이를 자극하는 DNA의 시스-활동 요소이다. 여러가지 중에서 여러가지 다른 세포형의 연결된 유전자에 관하여 높은 수준의 전사를 부여하는 증강제의 예를들면 한정적인 것은 아니나, SV40과 RSV-LTR의 증강제가 있다. 이와 같은 증강제는 세포형-특이적 효과를 갖는 다른 증강제와 조합하거나, 어떠한 증강제를 단독으로 사용할 수 있다.
- [0092] 폴리펩티드 생성을 최적화하기 위하여, 이 발명의 핵산 분자는 핵산 분자의 코드 영역에 따라 폴리 아데닐화 부위를 더 함유할 수 있다. 또한, 모든 적당한 전사 신호(와 적당한 번역 신호)는 외인성 핵산이 이를 도입하는 세포에 적당히 발현되도록 정확하여 정렬되는 것이 바람직하다. 또한, 필요하다면, 외인성 핵산은 골격내에 유지하는 동안 MRNA 생성을 용이하게 하고, 전장을 전사하는 슬라이스 부위(즉, 슬라이스 수용체와 슬라이스 공여체 부위)를 혼합할 수 있다. 더우기, 이 발명 핵산 분자는 공정, 분비, 세포내 위치화 등에 적당한 서열을 더 함유할 수 있다.
- [0093] 핵산은 어떠한 적당한 벡터로 삽입될 수 있다. 적당한 벡터는 한정적인 것은 아니나, 레트로바이러스 벡터, 알파바이러스, 아데노바이러스, 아데노관련 바이러스, 헤르페스 바이러스와 계두 바이러스 벡터가 있다. 벡터는 진행 세포, 예를들어 CHO-K1 세포를 형질 전환하기 위하여 자연 또는 공학적 능력을 갖는 것이 바람직하다. 더불어, 이 발명에 유용한 벡터는 플라스미드 또는 에피솜과 같은 "나출" 핵산 벡터(즉, 단백질, 당분 과/또는 이들을 캡슐화하는 지질)이거나, 또는 벡터는 다른 분자와 복합될 수 있다. 이 발명의 핵산과 적당하게 조합될 수 있는 다른 분자로는 한정적인 것은 아니나 바이러스 피복물, 양이온 지질, 리포솜, 폴리아민, 금 입자와, 리간드와 같은 표적 부분, 수용체, 또는 세포 분자를 표적으로하는 항체가 있다.
- [0094] 이 발명에 따른 SPARC 폴리펩티드는 재조합 숙주 세포로 발현되고 정제될 수 있다. 재조합 숙주 세포는 한정되어 있는 것은 아니나, 이.콜리와 같은 박테리아, 효모와 같은 살균세포, 한정적인 것은 아니나, 초파리와 누에 유도 세포계를 포함한 곤충 세포와, 포유류세포 및 세포계가 있다. 세포, 예를들어 사람 세포에 이 발명에 따른 SPARC 폴리펩티드를 발현할때, 생체의 또는 생체 내에서, Q3 SPARC를 코드화하는 이러한 폴리뉴클레오타이드에 대하여 선택한 코돈을 주어진 세포형(즉, 종)으로 최적화할 수 있다. 여러가지 코돈의 최적화 방법은 이 분야에 알려져 있다(참조, 예를들어, Jayaraj 등 Nucleic Acids Res. 33(9):3011-6 (2005); Fuglsang 등., Protein Expr. Purif. 31(2):247-9 (2003); Wu 등., "The Synthetic Gene Designer: a Flexible Web Platform to Explore Sequence Space of Synthetic Genes for Heterologous Expression," csbw, 2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference- Workshops (CSBW'05), pp. 258-259 (2005)).
- [0095] 어떠한 구성에 있어 SPARC 폴리펩티드를 발현하고 정제할때, 단백질 용해성을 개량하는 방법을 사용하여 봉입체

(이는 불용해성 분획이다)의 형성을 예방하므로써, 대량의 폴리펩티드를 얻는다. 봉입체에 축적된 SPARC는 흔히 이의 생리학적 활성을 보유하는 비활성-형 SPARC는 아니다.

[0096] 정제된 SPARC 폴리펩티드의 용해성은 이 분야에 알려져 있는 방법에 의하여 개량할 수 있다. 예를들면 용해성은 전장 폴리펩티드는 아니나 기능적 단편을 발현하여 개량할 수 있다. 더불어, 발현된 단백질(예들들어, 이.콜리에서)을 증가시키기 위하여 이는 Georgiou & Valax (Current Opinion Biotechnol. 7:190-197 (1996))에 기술되어 있는 바와 같이, 성장온도를 낮추고 더 약한 촉진제를 사용하고, 더 낮은 복사번호의 플라스미드를 사용하고, 유발물질 농도를 낮추고, 성장 배지를 변환시켜서 단백질 합성율을 감소시킬 수 있다. 이러한 단백질 합성율의 감소로 통상 더 많은 용해성 단백질을 얻는다. 또한 적당한 주름 형성 또는 단백질 안정성에 필요한 배합군 또는 보조 인자를 첨가할 수 있고, 또는 성장하는 동안 배지의 pH 동요를 조절하기 위하여 완충제를 첨가하고, 또는 가장 풍부한 배지(LB, 2xYT와 같은 것)에 존재하는, 락토오스에 의하여 lac 촉진제의 유도를 억제하기 위하여 1% 글루코오스를 첨가할 수 있다. 또한 이들 첨가에 의하여 일어나는 삼투압의 증가가 세포에서 삼투보호제의 축적을 가져오기 때문에 폴리올(예들들어, 솔비톨)과 수크로오스를 배지에 첨가할 수 있고, 이는 자연 단백질 구조를 안정화시킨다. 에탄올, 저분자량의 티올과 이황화물과 NaCl을 첨가한다. 더불어, 샤프롱 과/또는 폴다아제를 원하는 폴리펩티드와 공동-발현시킬 수 있다. 분자 샤프롱은 적당한 이성질화와 주름형성 중간체와 일시적으로 상호작용하여 표적으로하는 세포를 촉진시킨다. 이.콜리 샤프롱계는 한정적인 것은 아니나, GroES-GroEL, DnaK-DnaJ-GrpE, ClpB가 있다.

[0097] 폴다아제는 주름형성 경로에 따라 속도-제한 단계를 가속화 한다. 세가지 형의 폴다아제는 중요한 역할: 펩티딜 시스/트랜스 이성질화 효소(PPI's), 이황화물 산화환원효소(DsbA)와 이황화물 이성질화 효소(DsbC), 두 단백질 시스테인 산화와 이황화물 결합 이성질화를 촉진하는 진행 단백질인 단백질 이황화물 이성질화 효소(PDI)의 역할을 한다. 표적 단백질과 하나 또는 그 이상의 이들 단백질의 공동-발현은 더 높은 수준의 용해성 표적 단백질을 유도한다.

[0098] SPARC 폴리펩티드는 이의 용해성과 생성을 개량하기 위하여 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 융합 단백질은 SPARC 폴리펩티드와 골격내에서 함께 융합되는 제이 폴리펩티드를 함유한다. 제이 폴리펩티드는 융합되는 폴리펩티드의 용해성을 개량하기 위한 이 분야에 알려져 있는 융합 파트너, 예들들어 NusA, 박테리오페리틴(BFR), GrpE, 티오레독신(TRX)과 글루타티온-S-전이 효소가 있다. Novagen Inc. (Madison, Wis)는 NusA-표적 융합의 형성을 허용하는 pET 43.1 벡터 시리즈를 제공한다. 또한 DsbA 와 DsbC는 융합 파트너로서 사용했을 때, 발현 수준에 관한 양의 효과를 나타내므로써, 더 높은 용해성을 성취하기 위한 SPARC에 융합하는데 사용될 수 있다.

[0099] 한 구성에 있어, SPARC 폴리펩티드는 전체적으로 여기에 참고적으로 혼입되어 있는 미국특허번호 6,387,664에 기술되어 있는, Q3 SPARC 삭제 돌연변이 폴리펩티드와 융합 파트너 티오레독신을 함유하는 융합 폴리펩티드로서 생성된다. 티오레독신은 생리학적 활성을 상실하지 않고 대량으로 용해성 단백질을 용이한 제제로서, 이.콜리에서 생성시킬 수 있다. 미국특허번호 6,387,664에서 티오레독신의 C-말단에 융합된 SPARC를 갖는 융합 SPARC 단백질을 제공하더라도, 이 발명에 있어서, SPARC 폴리펩티드가 이의 감각 기능을 보유하는 한 제이 폴리펩티드의 N-말단 아니면 C-말단에 융합될 수 있음을 알 수 있을 것이다.

[0100] 또한 이 발명의 폴리펩티드는 예들들어 어떠한 적당한 생체의 번역계, 예들들어 TNT<sup>®</sup> 신속 결합 전사/번역계(Promega, Madison, WI), 토끼 망상적혈구 여액, 밀 씨눈 추출물 등을 사용하여 합성할 수 있다. 또한 이 발명에 따라 제조한 폴리펩티드는 예들들어, 석판, Fmoc 고체-상과 t-Boc 고체-상 펩티드합성 방법을 포함한, 어떠한 고체상 또는 액체상 프로토콜에 의하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0101] 단리된 또는 정제된, 최소한 75%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99%로 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 구성함을 의미한다. 이 발명에 따라 폴리뉴클레오티드는 어떠한 적당한 수단에 의하여 정제될 수 있다. 이 발명의 폴리펩티드는 예들들어, 여기에 참고적으로 전체가 혼입되어 있는 the methods discussed in Sage: Purification of SPARC/osteonectin, Curr. Protocols Cell Biol. 2003 Feb; Chapter 10: Unit 10.11을 포함한 통상의 전문가에게 알려져 있는 어떠한 적당한 방법에 의하여 정제할 수 있다. 또한 예들들어, myc, gfp, V5, FITC, HA, S-tag, T7 등을 포함한 어떤 적당한 항체 에피토프 태그를 사용한 친화성 크로마토그래피와 침전 또는 다른 적당한 친화성 시스템을 예들들어 비오틴/아비딘, 폴리히스티딘/니켈, GST 등을 포함하여 사용할 수 있다.

[0102] 상술한 핵산과 단백질과 관련하여 여기에서 사용한 핵산, 펩티드 또는 단백질의 "대응"이란 하나의 측정은 서열 사이의 상대 "동정"을 뜻한다. 펩티드 또는 단백질의 경우에, 또는 코드화된 펩티드 또는 단백질 대응에 따라 정의된 핵산의 경우에, 최소한 약50% 동정, 선택적으로 최소한 약90% 동정, 더우기 약95%까지 동정을 갖는 펩티

드를 포함하고, 또한 명시된 펩티드 또는 단백질에 대하여 최소한 약98-99% 동정을 갖는다. 핵산 사이에서 바람직한 동정의 측정은 펩티드에 대하여는 상기한 것과 동일하고 최소한 약90% 또는 최소한 약98-99% 동정이 가장 바람직하다.

[0103] 여기에 사용된 "동정"이란 용어는 두 펩티드사이 또는 두 핵산분자 사이의 서열 동정의 측정을 뜻한다. 동정은 비교용 라인인, 각 서열의 위치를 비교하여 측정할 수 있다. 두 아미노산 또는 핵산 서열은 이들이 최소한 약 75% 서열 동정 바람직하기로는 최소한 약90% 서열 동정, 더욱 바람직하기로는 최소한 95% 서열 동정, 가장 바람직하기로는 최소한 약98-99% 동정을 분배하면 실질적으로 동일한 것으로 생각된다.

[0104] 서열 동정은 일반적으로 사용하고 있는 BLAST 알고리즘에 의하여 측정될 수 있고, 이는 최초로 Altschul 등. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410에 기술되어 있다. BLAST 알고리즘은 공고된 디폴트 지정으로 사용될 수 있다. 비교 서열의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의하여 점유될 때, 분자는 그 위치에서 분배된 동정을 갖는 것으로 생각된다. 서열 사이의 동정 정도는 서열에 의하여 분배된 위치를 조화시키는 수의 기능을 뜻한다. 핵산 서열 동정의 선택적 측정은 두 서열이 낮은 긴축, 바람직하기로는 높은 긴축 조건하에서 서로 교잡하는지 여부를 측정하는데 있다. 이와 같은 서열은 이들이 높은 긴축 조건하에서 교잡할때 실질적으로 동일하다. 낮은 긴축 조건하에서 필터-결합 서열에 대한 교잡은 예를들어 65℃에서 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>, 7% 황산 도데실 나트륨(SDS), 1mM EDTA에서 행하고 42℃에서 0.2시간 SSC/0.1 SDS에서 세척한다(참조, Ausubel 등. (eds.) 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York, at p. 2.10.3). 또한, 높은 긴축 조건하에서 필터-결합 서열에 대한 교잡은 예를들어, 65℃에서 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>, 7%(SDS), 1mM EDTA에서 행하고, 68℃에서 0.2시간 SSC/0.1 SDS에서 세척한다(참조. Ausubel et al. (eds.) 1989, 상기 참조), 교잡 조건은 관련 서열에 따른 공지된 방법에 따라 수식할 수 있다(참조, Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 "Overview of Principles in Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Probe Assays", Elsevier, N.Y.). 일반적으로 긴축 조건은 정의된 이온 강도와 pH에서 특이한 서열에 대한 열용점 보다 더 낮은 약 5℃로 선택한다.

[0105] 서열내에서 돌연변이체의 위치의 수치 표시는 특이한 서열에 관한 것이다. 또한 동일한 위치에서도 서열에 번호를 부여하고 서열을 선택하는 방법에 따라 다른 수치 표시가 부여될 수 있음을 이 분야의 전문가가 알 수 있을 것이다. 더우기 삽입 또는 삭제와 같은 서열 변화는 상대 위치를 변경시킨 다음 돌연 변이 부위에서와 그 주위에서 특별한 뉴클레오티드의 수치 표시를 변경시킨다.

[0106] 유전자 요법은 질병과 싸우는 생 세포의 유전자 물질의 수식을 포함한 의료적 중재이다. 유전자 요법은 여러가지 다른 형의 암과 기타질병에 대한 임상적 시험(사람에 대하여 조사연구)으로 연구되고 있다. 따라서, 이 발명은 "유전자 요법"에 사용하는데 적합한 SPARC 폴리펩티드를 코드화하는 단리된 핵산을 더 제공한다(참조, 예를들어, Patil 등., AAPS J. 7(1):E61-77 (2005))

[0107] 일반적으로, 유전자는 여기에 기술된 것과 같은 "벡터"를 사용하여 세포에 전달된다. 유전자 요법에 사용되는 가장 보편적인 벡터는 바이러스이다. 유전자 요법에 벡터로서 사용되는 바이러스는 유전적으로 무력화되고; 이들은 그들 자신 재생될 수 없다. 최선의 유전자 요법 임상 실험은 원하는 유전자를 방출하는 마우스 레트로바이러스에 따른다. 벡터로서 사용되는 다른 바이러스로는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 폭스바이러스와 헤르페스 바이러스가 있다. 적당한 바이러스 유전자 요법 벡터와 이들의 생체내 및 생체외의 투여 형태는 이 분야에 알려져 있다.

[0108] 유전자 요법은 생체외 및 생체내에서 행할 수 있다. 대표적으로 생체외 유전자 요법 임상 실험은 환자의 혈액 또는 골수에서 나온 세포를 제거하여 실험실에서 증식시킨다. 세포는 원하는 유전자를 운반하고 있는 바이러스에 노출된다. 바이러스는 세포에 들어가고, 원하는 유전자는 세포의 DNA 부분이 된다. 세포는 실험실에서 증식한 다음 주사에 의하여 환자의 정맥으로 돌아온다. 생체내 유전자 요법을 사용하여, 예를들어, 바이러스 또는 리포솜과 같은 벡터를 환자의 몸체 내의 세포에 원하는 유전자를 전달하는데 사용한다.

[0109] 이 분야의 전문가는 유전자 코드의 보편성 때문에, 어떠한 주어진 아미노산 서열의 지식으로 이 분야의 전문가가 상기 아미노산 서열의 폴리펩티드를 코드화할 수 있는 유한수의 특이한 폴리뉴클레오티드 서열을 쉽게 예상할 수 있도록 함을 인식할 것이다. 더우기, 이 분야의 전문가는 이 분야에 잘 알려져 있는 "코돈 최적화" 과정을 통하여 어떤 주어진 중에서 발현하는 상기 아미노산 서열의 폴리펩티드를 코드화하는 최적의 폴리뉴클레오티드 서열을 쉽게 측정할 수 있다(참조, 예를들어, Villalobos 등., Gene Designer: a synthetic biology tool

for constructing artificial DNA segments. BMC Bioinformatics. 2006 Jim. 6;7:285).

[0110] 여기에 사용된 "담체"란 적당한 생체의 또는 생체내 활동 부위에 활성 약학적 성분(API)을 전달하는 매개체로서 적당한 어떠한 물체를 뜻한다. 이와 같은, 담체는 API를 함유하는 치료적 또는 실험적 시약의 제제용 부형제로서 활동할 수 있다. 바람직한 담체는 T 세포와 상호 작용할 수 있는 형태의 API를 유지할 수 있다. 이러한 담체의 예를들면, 한정되어 있는 것은 아니나, 물, 인산 완충 염수, 식염수, 링거액, 텍스트로제 용액, 세륨 함유 용액, 헥스 용액과 기타 생리학적 균형 수용액 또는 세포 배지가 있다. 또한, 수성 담체는 수용체의 생리학적 조건, 예를들어 화학적 안정성과 등장성에 근접하는데 요구되는 적당한 보조물질을 함유할 수 있다. 적당한 보조물질의 예를들면, 초산 나트륨, 염화 나트륨, 락트산 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 일라우르산, 솔비탄, 올레산 트리에탄올아민과 인산 완충제, 트리스 완충제 및 이탄산염 완충제를 제조하는데 사용되는 기타 물질이 있다.

[0111] 여기에 사용된 "항-암 백신"이란 면역 반응에 대하여 봉입 될 수 있는 종양 관련 항원 또는 에피토프를 함유하는 조성물을 뜻한다.

[0112] 다른 구성에 있어, 이 발명은 SEQ ID NO: 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드 항원; 또는 SEQ ID NO: 1로 표시되는 아미노산 서열에 관한 하나 또는 몇몇의 아미노산의 치환, 삭제, 삽입 과/또는 부가로 이루어지는 아미노산 서열을 갖고 또한 면역-자극 활성을 갖는 펩티드 항원을 함유하는 항-암 백신을 제공한다. 다른 면에서, 이 발명은 SEQ ID NO: 1의 상술한 펩티드 부분을 함유하고 면역-자극 활성을 갖는 펩티드 항원을 제공한다. 또 다른 면에서, 이 발명은 SEQ ID NO: 1의 펩티드 항원의 상술한 부분에 관한 하나 또는 몇몇의 아미노산의 치환, 삭제, 삽입 과/또는 부가로 이루어지는 아미노산 서열을 갖고, 또한 면역-자극 활성을 갖는 펩티드 항원을 제공한다. 상술한 펩티드 항원은 암 항원 단백질을 인식하는 세포독성 T 림프구를 바람직하게 활성화할 수 있다.

[0113] 다른 면으로, 이 발명은 상술한 펩티드 항원, 또는 이들의 혼합물을 사용하여 생체의 자극에 의하여 유도되는, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 림프구, 또는 이들 세포를 함유하는 면역 세포 개체군을 제공한다.

[0114] 다른 면으로, 이 발명은 상술한 펩티드 항원, 또는 이들의 혼합물을 사용하여 생체의 자극에 의하여 유도되는 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 림프구, 또는 이들 세포를 함유하는 면역 세포 개체군과, 면역 활성화제를 제공한다. 면역 활성화제는 세포 성장 인자 또는 시토킨이 바람직하다.

[0115] 백신은 완전 프로인트보조제, 불완전 프로인트 보조제, 명반, 바실루스 칼메트-구에린, 부착 분자의 작동제와 수식제, 테타누스 독소이드, 이미퀴노드, MPL과 QS21과 같은 보조제를 더 함유하는 것이 바람직하다.

[0116] 다른 면으로, 이 발명은 상술한 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 림프구, 또는 이들 세포를 함유하는 면역세포 개체군을 몸체에 주입하는 것으로 이루어지는, 종양 억제 방법을 제공한다: 상술한 방법은 암을 예방 과/또는 치료하는데 바람직하게 사용된다.

[0117] 다른 면으로는, 이 발명은 상술한 펩티드 항원, 또는 이들의 혼합물을 함유하는 이 발명의 헬퍼 T 세포 또는 세포독성 T 림프구 또는 이들 세포를 함유하는 면역세포 개체군을 생성시키는데 사용되는 세포배양액을 제공한다.

[0118] 다른 면에서, 이 발명은 상술한 세포 배양액과 세포 배양 혈관을 함유하는, 이 발명의 헬퍼 T 세포 또는 세포독성 T 림프구 또는 이들 세포를 함유하는 면역세포 개체군을 제조하는 세포 배양 키트를 제공한다.

[0119] 다른 면에서, 이 발명은 상술한 펩티드 항원을 코딩화하는 DNA를 제공한다. 또다른 면에서, 이 발명은 이 발명의 상술한 DNA, 또는 재조합 바이러스 또는 상술한 DNA를 함유하는 재조합 박테리아를 함유하는 암 백신을 제공한다. 상술한 암 백신은 보조제를 더 함유하는 것이 바람직하다.

[0120] 백신은 하나 이상의 펩티드를 함유할 수 있고, 다수의 펩티드는 처리되는 종양에 따른다: 백신은 수지상 세포, 특히 펩티드로 펄스되거나 부하된 수지상 세포와 같은 항원 존재 세포를 함유하고 펩티드에 대하여 T 세포 면역성을 자극하므로써 종양을 자극하는 세포백신으로 사용된다.

[0121] 이 발명의 약학적 조성물의 투여는 제한된 것은 아니나 정맥내, 피하 근육내, 복강내, 종양내, 경구, 직장 질, 소포내와 흡입투여를 포함한 어떠한 적당한 방법을 통하여 성취될 수 있으며, 정맥내와 종양내 투여가 가장 바람직하다. 또한 조성물은 특히 조성물의 안정성 과/또는 이의 최종 사용을 증강하는 다른 적당한 성분을 함유할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물제제는 광범위하다. 다음 제제와 방법은 단지 예시한 것이며 제한한 것은 아니다.

- [0122] 또한, 필요하면, 약학적 조성물은 부가적으로 치료적 또는 생물학적-활성제를 함유할 수 있다. 예를들면 특별한 지정의 치료에 유용한 치료 인자를 존재시킬 수 있다. 이부프로펜 또는 스테로이드와 같은 염증을 억제하는 인자는 약학적 조성물의 생체내 투여와 생리적 고통과 연관되는 종창과 염증을 감소시키는 조성물의 부분일 수 있다.
- [0123] 일반적으로 담체는 액체이지만, 고체 또는 액체와 고체 성분의 조합물일 수도 있다. 담체는 생리적으로 허용할 수 있는(예를들어, 약학적으로 또는 약리학적으로 허용할 수 있는) 담체(예를들어, 부형제 또는 희석제)가 바람직하다. 생리적으로 허용할 수 있는 담체는 잘 알려져 있고 쉽게 이용할 수 있다. 담체의 선택은 표적 조직 과/또는 세포의 위치와 조성물 투여자에게 사용되는 특별한 방법에 의하여 최소한 부분적으로 결정된다.
- [0124] 일반적으로, 이와 같은 조성물은 액체 용액 또는 현탁액과 같은 주사액으로 제조할 수 있고; 주사전 액체의 첨가시 용액 또는 현탁액으로 제조하기 위하여 사용하는데 적합한 고체 형태로도 제조할 수 있고; 제제를 유화시킬 수 있다. 주사용으로 적합한 약학적 제제에는 멸균 수용액 또는 분산액; 공지된 단백질 안정화제와 리오프로텍탄트를 함유하는 제제, 참기름, 땅콩기름 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제제와 멸균 주사 용액 또는 분산액을 일시 제조하기 위한 멸균 분말이 있다. 모든 경우에 제제는 살균되어야하고 쉽게 주사할 수 있는 범위까지 유체이어야 한다. 이는 제조와 저장의 조건하에 안정성을 가져야하고, 박테리아와 균류와 같은 미생물의 오염 활동에 대하여 보호되어야 한다. 유리 염기 또는 약리학적으로 허용할 수 있는 염으로서 활성 화합물의 용액은 히드록시 셀룰로오스와 같은 계면 활성제와 적당히 혼합된 물에서 제조할 수 있다. 또한 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜과, 이들의 혼합물에서와 오일에서 제조할 수 있다. 통상의 저장과 사용 조건하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위하여 방부제를 함유한다.
- [0125] 이 발명의 펩티드는 중성 또는 염 형태의 조성물로 제조할 수 있다. 약학적으로 허용할 수 있는 염에는 산부가 염(단백질의 유리 아미노기와 형성)이 있고 이는 예를들어 염산, 또는 인산과 같은 무기산, 또는 초산, 옥살산, 타르타르산, 만델산등과 같은 유기산과 형성된다. 또한 유리 카르복실기와 형성된 염은 예를들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 제2철 수산화물과 같은 무기 염기와 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기에서 유도될 수 있다.
- [0126] 비경구 투여용에 적합한 제제에는 수용성 및 비수용성, 등장성 무균 주사액이 있고, 이는 황산화제, 완충제, 정균제와 의도된 수용체의 혈액과 제제 등장성을 이루는 용질과 현탁제, 가용화제, 농후제, 안정화제와 방부제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 함유할 수 있다. 제제는 앰플 또는 작은 병과 같은 밀봉된 용기에 단위 용량 또는 다수 용량으로 넣을 수 있고, 사용직전에 주사용으로 멸균 액체 부형제, 예를들어, 물의 첨가만을 요구하는 알립 건조(동결건조) 조건하에 저장할 수 있다. 일시 주사액과 현탁액은 이미 기술한 종류의 무균 분제, 입제와 정제로 제조할 수 있다. 이 발명의 바람직한 구성에 있어, 펩티드 리간드 영역-함유 접합체는 주사(예를들어, 비경구 투여)용으로 제조된다. 이에 관하여, 바람직한 제제는 종양내 투여에 적합하지만, 정맥내 주사, 복강내 주사, 피하 주사용 등으로 제조할 수 있다.
- [0127] 또한 이 발명은 필요하면, 이 발명의 펩티드가 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 더 접합되는 구성을 제공한다. PEG 접합은 이들 폴리펩티드의 순환 반감기를 증가시키고, 폴리펩티드의 면역원성과 항원성을 감소시키고, 이들의 생체 활성을 개량시킬 수 있다. PEG 접합의 어느 적당한 방법을 사용할때, 제한적인것은 아니나, 펩티드의 이용가능한 아미노기 또는 예를들어, 히스티딘 또는 시스테인과 같은 다른 반응성 부위와 메톡시-PEG를 반응시켜서 사용할 수 있다. 더불어, 재조합 DNA 접근법을 사용하여 펩티드-반응성 기를 갖는 아미노산을 첨가할 수 있다. 또한, 방출성 및 혼성 PEG화 방법은 폴리펩티드의 PEG화와 같은 이 발명의 특징에 따라 사용할 수 있고, 여기서, 펩티드 리간드 영역-함유 접합 분자의 어떠한 부위에 첨가되는 PEG 분자는 생체내에 방출된다. PEG 접합방법의 예는 이 분야에 알려져 있다. 참조. 예를들어, Greenwald 등., Adv. Drug Delivery Rev. 55:217-250 (2003).
- [0128] 흡입을 통하여 투여하는데 적합한 제형은 에어로솔 제형이 있다. 에어로솔 제형에 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 허용할 수 있는 가압된 분사제를 넣을 수 있다. 또한 이들은 분무기 또는 분사기 방출용으로 비 가압된 제제로 제조할 수 있다.
- [0129] 항문 투여에 적합한 제형은 유화 염기 또는 수용성 염기와 같은 여러가지 염기와 활성 성분을 혼합하여 좌약으로 제조할 수 있다. 질 투여에 적합한 제형은 질 좌약, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 포말, 또는 활성 성분을 더 함유하는 분무제로서 나타낼 수 있고, 이러한 담체는 이 분야에 잘 알려져 있다.
- [0130] 더불어, 이 발명의 조성물은 부가적으로 치료적 또는 생물학적 활성제를 함유할 수 있다. 예를들면 특별한 적응증 치료에 유용한 치료 인자가 존재할 수 있다. 이부프로펜 또는 스테로이드와 같은 염증을 억제하는 인자는 약

학적 조성물의 생체내 투여와 연관되는 종창 및 염증과 생리적 고통을 감소시키는 조성물의 부분일 수 있다.

[0131] 흡입 치료법의 경우, 이 발명의 약학적 조성물은 에어로솔 형태로 하는 것이 바람직하다. 투여하는 약제가 고체 형태이면 에어로솔과 분무 발생기를 이용할 수 있다. 이들 발생기는 호흡 또는 흡입할 수 있는 입자를 제공하고, 사람투여에 적합한 비율로 미리측정된 복용량의 의약을 함유하는 체적의 에어로솔을 발생시킨다. 이와 같은 에어로솔과 분무 발생기의 예를들면, 이 분야에 알려져 있는 측정된 복용량의 흡입 및 취입기가 있다. 액체 형태이면, 이 발명의 약학적 조성물은 어떠한 적당한 기구에 의하여 분무 주입시킬 수 있다.

[0132] 정맥내, 복강내, 또는 종양내 투여와 관련하여 사용할때, 이 발명의 약학적 조성물은 활성 화합물의 무균 수성 및 비-수성 주사용액, 현탁액 또는 유탁액을 함유할 수 있고, 이들 제제는 의도된 수용체의 혈액과 등장성을 갖는 것이 바람직하다. 이들 제제는 하나 또는 그 이상의 항산화제, 완충제, 계면활성제, 공동용매, 정균제, 의도된 수용체의 혈액과 조성물 등장성을 이루는 용질과, 기타 이 분야에 알려져 있는 제제 성분을 함유할 수 있다. 수성 및 비-수성 무균 현탁액은 현탁제와 농후제를 포함할 수 있다. 조성물은 단위-복용량 또는 다수-복용량 용기, 예를들어, 밀봉된 앰플과 작은 병에 넣을 수 있다.

[0133] 또한 이 발명의 방법은 조합 치료법의 부분일 수 있다. "조합 치료법"이란 어구는 이 조합의 유의한 효과가 치료를 받는 포유류에 실현되도록 연속 또는 동시방법으로 다른 치료적 조성물과 함께 이 발명에 따른 치료제를 투여하는 것을 뜻한다. 이 발명 조성물의 최적 투약량은 이 분야의 전문가에 알려져 있는 통상의 방법에 의하여 결정할 수 있다.

### 실시예 1

[0134] 이 실시예는 PC3 모델에서 SPARC 및 Abraxane®과 항혈관 형성제 Sutent®의 상호작용을 증명한 것이다. Abraxane 단독(5일동안 매일 15mg/kg 투여), Abraxane과 Sutent(Sutent는 8주동안 매일 30mg/kg 투여), Abraxane과 외인성 SPARC(8주동안 매주 2회 0.2mg/ms로 SPARC투여)와 끝으로 Abraxane, Sutent와 SPARC 함께 처리한 마우스에서 종양 체적을 측정한다.

[0135] 도1은 이들 시험 조건의 시간(일)에 대한 종양 체적(mm³)을 나타낸 그래프이다. 그래프에서 볼 수 있는 바와 같이 Abraxane®의 투여는 실험과정의 대조물과 비교하여, 현저하게 더 낮은 종양 체적을 가져온다. Abraxane®을 SPARC에 투여 했을때 종양 체적은 약간 더 크게 외인성으로 투여된 SPARC가 이 시스템에서 Abraxane®을 탈감작 시킴을 나타내고 있다. 항혈관형성제를 SPARC와 Abraxane®에 따라 투여했을때, SPARC/Abraxane® 조합의 효능은 뚜렷하게 개선되었다.

[0136] 또는 도1은 Abraxane®과 항혈관 형성제 Sutent®의 투여는 Abraxane®의 단독 투여시보다 훨씬 더 큰 종양 체적의 감소를 가져옴을 증명한다. 놀랍게도, Abraxane®과 Sutent®에 따른 외인성 SPARC의 투여는 Abraxane®과 Sutent®의 약간의 상승적 영향을 부정한다. 이것은 SPARC가 Sutent®의 항-혈관 형성 활성에 길항 작용하는 것으로 예상된다.

[0137] 이들 데이터는 SPARC가 이들의 특별한 항-종양제를 탈감작하는 메카니즘은 혈관형성 활성을 통합을 예상하게 한다.

### 실시예 2

[0138] 이 실시예는 SPARC의 혈관 형성 작용의 특징을 증명한 것이다.

[0139] 재조합 사람 SPARC와 유전자적으로 구성된 변이체를 중공 섬유 바이오-반응기에 유지되는 HEK 293 세포를 사용하여 발현하고 정제한다. rhSPARC와 이들의 변이체의 혈관형성 활성을 HUVEC 튜브 형성 검정과 HUVEC 발아 형성 비드 검정을 사용하여 평가한다.

[0140] HUVEC 튜브 형성 검정에서, rhSPARC는 10 µg/mL에서 사전-혈관형성을 갖고 100 µg/mL에서는 항-혈관형성을 갖는다. 튜브형성 검정결과를 도2에서 볼 수 있다. 발아 형성 검정에서, rhSPARC의 첨가는 주연 세포에 의하여 잘 지지되는 더 성숙한 혈관을 가져오고, 그 자체 혈관형성의 최초 자극 이상으로 SPARC 역할을 예상할 수 있다. 이들 검정에서 시험된 삭제와 단일/이중 아미노산 치환을 갖는 부가적 rhSPARC 변이체는: Q3 삭제(BI02), 추정 혈관형성 영역의 전위(BI05), 제안된 혈관형성 영역의 이중 K>Q 치환(BI011), 추정 카테프신 K 인식부위의 유전적 절제(BI08)와 rhSPARC의 단백질 분해 산물이 있다. 혈관형성 활성을 나타내는 최종 말단 아미노산 분석은 SEQ

ID NO: 1에 위치하는 것을 나타낸다.

### 실시예 3

[0141] 이 실시예는 SPARC의 혈관형성 영역이 동정을 나타내는 것이다.

[0142] SPARC의 단백질 분해 산물을 제조하고 SPARC-d로 표시했다. SPARC-d는 C-말단 절단된 SPARC의 두가지 형태로 이루어지는 혼합물이다. 도3은 SPARC를 야생형 SPARC와 함께 실행한 SDS PAGE 검정을 나타낸 것이다. SPARC-d의 영역 형태, 도3의 겔상에 표시된 B는 아미노산 233-286(SEQ ID NO. 2)를 구성하는 C-말단 서열의 결손 부분이다.

[0143] 도4는 야생형 SPARC와 SPARC-D로 행한 HUVEC 3-D 튜브형성 검정의 결과를 나타낸다. 상술한 실시예에서와 같은 야생형 SPARC의 혈관형성 행동은 그래프에서 볼 수 있고; 혈관형성 행동은 농도가 10ug/ml에 접근하므로서 증가하고 농도가 100ug/ml에 접근하므로서 하강한다. 그러나, SPARC-d의 결과는 단백질의 C-말단 단부의 절단이 SPARC 혈관형성 활성을 완전 파괴함을 나타낸다.

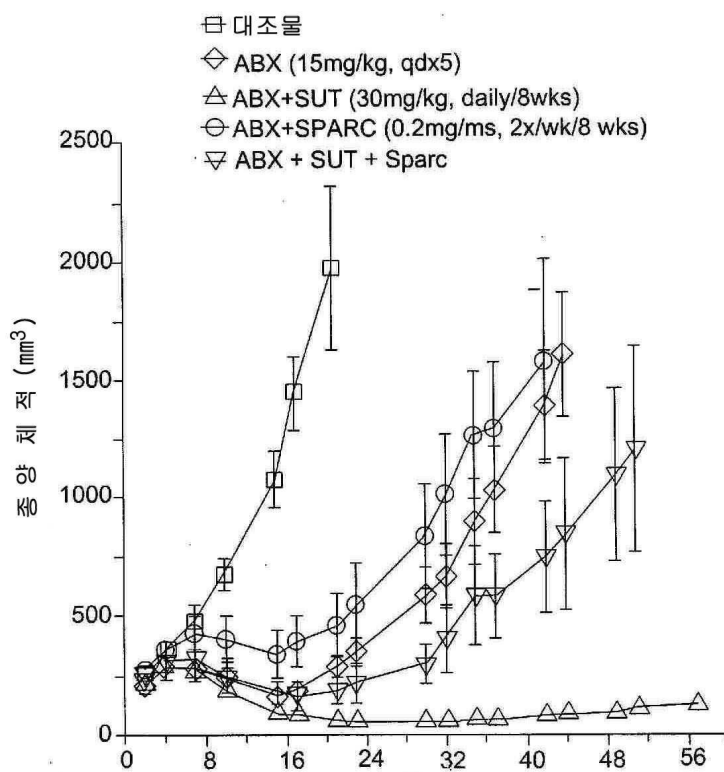
[0144] 이러한 검사 결과를 기초로하여 C-말단 54 아미노산 서열(SEQ ID NO 1)내에 위치하는 SPARC의 혈관형성 영역의 위치를 동정하는 것이 가능하다.

[0145] 이 발명을 기술한 문맥에서(특히 다음 특허 청구 범위의 문맥에서)"a"와 "an"과 유사한 지시 대상의 용어 사용은 여기서 다른 표시가 없거나 문맥에 분명한 부인이 없는한 단일과 복수를 둘다 커버하는 것으로 해석된다. "comprising," "having," "including,"과 "containing"이란 용어는 다른 언급이 없는한 제한없는 용어(즉, "including, but not limited to"의 의미)로 해석된다. 여기에서 값 범위의 기술은 다른 언급이 없는한, 단지 범위에 들어가는 각 분리된 값으로 개별적으로 나타내는 속기 방법으로 표시하고자 하는 것이고 각 분리된 값은 여기서 개별적으로 열거된 경우 명세서에 혼입된다. 여기에 기술된 모든 방법은 여기에 다른 언급이 없거나 문맥에서 다른 분명한 부인이 없으면 어떠한 적당한 순서로 행할 수 있다. 여기에서 제공된 어떠한 및 모든 실시예, 또는 예시한 언어(예를들어, "와 같은")의 사용은 다른 청구가 없는한, 이 발명을 단지 더 좋게 예시한 것이고 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 명세서의 언어는 발명의 실시예 필수적인 어떠한 특허 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 않된다.

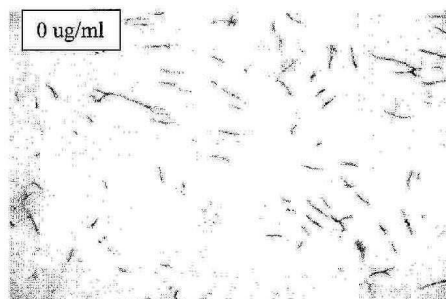
[0146] 이 발명의 바람직한 구성은 발명을 행하는 발명자에게 알려져 있는 가장 좋은 방법을 포함하여, 여기에 기술되어 있다. 이들 바람직한 구성의 변경은 전술한 설명의 관독에 따라 이 분야의 통상의 숙련자는 분명하게 알 수 있을 것이다. 발명자는 이러한 적당한 변경을 사용하는 숙련자를 예상하고 발명자는 여기에 특별히 기술된 것 이상의 다른 방법으로 발명을 실시하고자 할 것이다. 따라서, 이 발명에는 적용법에서 허용되는 첨부된 특허 청구 범위에 열거된 동등한 주제와 모든 수정이 포함된다. 더우기, 이의 모든 가능한 변경에 있어 상술한 요소의 어떠한 조합은 여기에 다른 언급이 없거나 문맥에 다른 분명한 부인이 없으면 이 발명에 포함된다.

도면

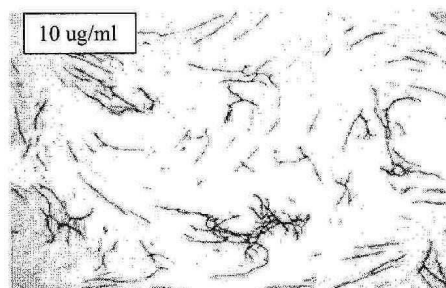
도면1



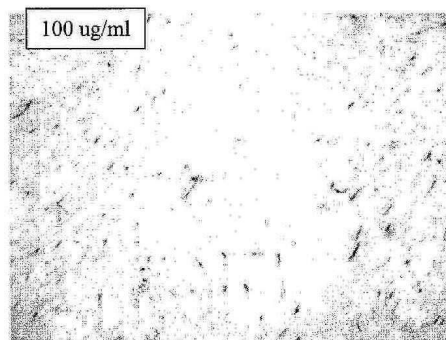
도면2



대조물

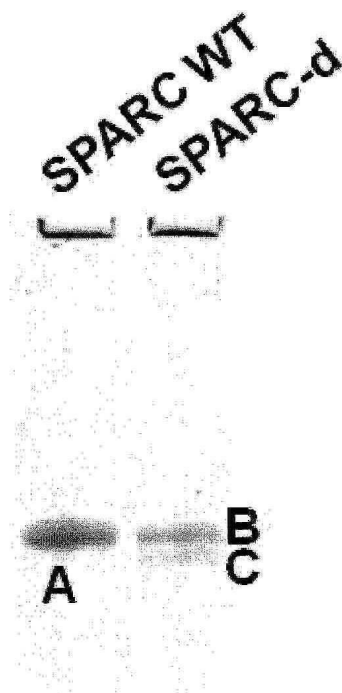


혈관형성



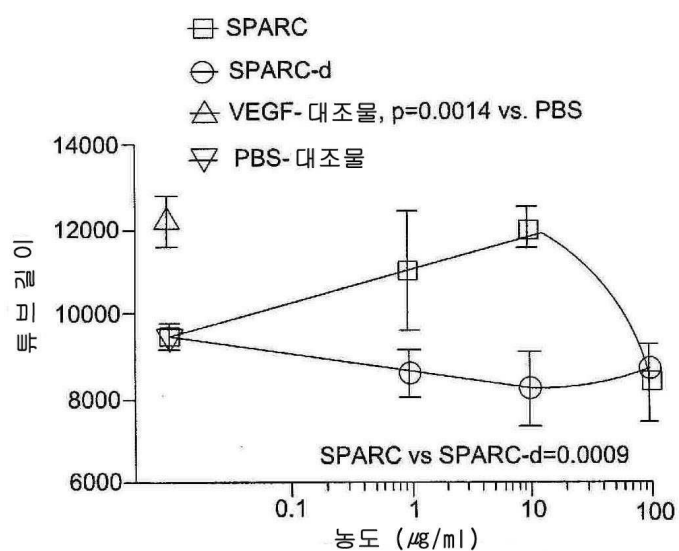
항-혈관형성

도면3



## SDS-PAGE

도면4



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC

Trieu, Vuong

Knauer, Daniel

Desai, Neil

<120> SPARC ANGIOGENIC DOMAIN AND METHODS OF USE

<130> 706127

<150> 61/159,322

<151> 2009-03-11

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Glu Leu Ala Pro Leu Arg Ala Pro Leu Ile Pro Met Glu His Cys

1 5 10 15

Thr Thr Arg Phe Phe Glu Thr Cys Asp Leu Asp Asn Asp Lys Tyr Ile

20 25 30

Ala Leu Asp Glu Trp Ala Gly Cys Phe Gly Ile Lys Gln Lys Asp Ile

35 40 45

Asp Lys Asp Leu Val Ile

50

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Gln Gln Glu Ala Leu Pro Asp Glu Thr Glu Val Val Glu Glu

1 5 10 15

Thr Val Ala Glu Val Thr Glu Val Ser Val Gly Ala Asn Pro Val Gln

20 25 30

Val Glu Val Gly Glu Phe Asp Asp Gly Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu

35 40 45

Val Val Ala Glu Asn Pro Cys Gln Asn His His Cys Lys His Gly Lys

50 55 60

Val Cys Glu Leu Asp Glu Asn Asn Thr Pro Met Cys Val Cys Gln Asp

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