(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0102684
(43) 공개일자 2007년10월19일

(51) Int. Cl.
C07K 7/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7016985
(22) 출원일자 2007년07월23일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2007년07월23일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2005/004058
국제출원일자 2005년12월21일
(87) 국제공개번호 WO 2006/067633
국제공개일자 2006년06월29일
(30) 우선권주장
60/638,158 2004년12월23일 미국(US)

(71) 출원인
몰메드 에스피에이
이탈리아 밀란 비아 올게티나 58 (우: 20132)
폰다지오네 센트로 산 라파엘 델 몬테 테이보
이탈리아, 밀라노 아이-20132, 60, 비아 올게티나
(72) 발명자
코티, 안젤로
이탈리아 아이-20132 밀란 비아 올제티나 58 몰메드 에스피에이
쿠니스, 플라비오
이탈리아 아이-20132 밀란 비아 올제티나 58 몰메드 에스피에이
(74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 111 항

(54) 접합 생성물

(57) 요 약

NGR 모티프를 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 선택적으로 억제한다.

특허청구의 범위

청구항 1

$\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 선택적으로 억제하는 펩티드로서, NGR 모티프(motif)를 함유하는 펩티드의 탈아미노화(deamination) 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 2

비트로넥틴(vitronectin)에 대한 내피 세포 부착(endothelial cell adhesion)을 억제하는 펩티드로서, NGR 모티프를 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 3

세포외 기질 단백질 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 피브로넥틴 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 6

제 5항에 있어서, 피브로넥틴의 FN-I, $FN\text{-}I_7$, $FN\text{-}II_1$ 또는 $FN\text{-}III_9$ 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 7

제 6항에 있어서, 피브로넥틴의 FN-I 모듈, 또는 이의 단편 또는 이의 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 8

제 6항에 있어서, 피브로넥틴의 $FN\text{-}I_7$ 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 9

XNGRX' 서열을 포함하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드로서,

여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 이루어진 군에서 선택됨을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 10

CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, CVLNGRMEC, CNGRC, CNGRCG, LNGRE, YNGRT, LQCICTGNGRGEWKCE, LQCISTGNGRGEWKCE, CICTGNGRGEWKC, CISTGNGRGEWKC, MRCTCVGNGRGEWTCY, MRCTSVGNGRGEWTCY, CTCVGNGRGEWTC 및 CTSVGNGRGEWTC 중에서 선택된 서열을 포함하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드.

청구항 11

제 10항에 있어서, 시클로CVLNGRMEC, 직선형 CNGRC, 고리형 CNGRC, 직선형 CNGRCG 또는 고리형 CNGRCG를 포함하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, NGR 모티프 또는 세포외 기질 단백질 또는 이의 단편 또는 이의 유도체를 포함하는 펩티드를 열처리하여 획득할 수 있는 펩티드.

청구항 13

이소DGR 모티프를 함유하는 펩티드.

청구항 14

제 13항에 있어서, X이소DGRX' 서열을 포함하는 펩티드로서,

여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 이루어진 군에서 선택됨을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 15

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 상기 펩티드가 C이소DGRCVSGCAGRC, 이소DGRAHA, G이소DGRG, CVL이소DGRMEC, C이소DGRC, C이소DGRCG, L이소DGRE, Y이소DGRT, LQCICTG이소DGRGEWKCE, LQCISTG이소DGRGEWKCE, CICTG이소DGRGEWKC, CISTG이소DGRGEWKC, MRCTCVG이소DGRGEWTCY, MRCTSVG이소DGRGEWTCY, CTCVG이소DGRGEWTC 또는 CTSVG이소DGRGEWTC 에서 선택된 서열을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 펩티드가 시클로CVL이소DGRMEC, 직선형 C이소DGRC, 고리형 C이소DGRC, 직선형 C이소DGRCG 또는 고리형 C이소DGRCG를 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 17

$_{L}$이소DGR 모티프를 함유하는 펩티드.

청구항 18

제 17항에 있어서, X_{L}이소DGRX' 서열을 포함하는 펩티드로서,

여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 이루이진 군에서 선택됨을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 19

제 17항 또는 제 18항에 있어서, 상기 펩티드가 C_{L}이소DGRCVSGCAGRC, $_{L}$이소DGRAHA, G_{L}이소DGRG, CVL_{L}이소DGRMEC, C_{L}이소DGRC, C_{L}이소DGRCG, L_{L}이소DGRE, Y_{L}이소DGRT, LQCICTG$_{L}$이소DGRGEWKCE, LQCISTG$_{L}$이소DGRGEWKCE, CICTG$_{L}$이소DGRGEWKC, CISTG$_{L}$이소DGRGEWKC, MRCTCVG$_{L}$이소DGRGEWTCY, MRCTSVG$_{L}$이소DGRGEWTCY, CTCVG$_{L}$이소DGRGEWTC 및 CTSVG$_{L}$이소DGRGEWTC 중에서 선택된 서열을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 펩티드가 시클로CVL_{L}이소DGRMEC, 직선형 C_{L}이소DGRC, 고리형 C_{L}이소DGRC, 직선형 C_{L}이소DGRCG 또는 고리형 G_{L}이소DGRCG를 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 21

$_{D}$DGR 모티프를 함유하는 펩티드.

청구항 22

제 21항에 있어서, X_{D}DGRX' 서열을 포함하는 펩티드로서,

여기서 상기 X는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 X'은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P으로 이루어진 군에서 선택됨을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 23

제 21항 또는 제 22항에 있어서, 상기 펩티드가 $C_DDGRCVSGCAGRC$, $_DDGRAHA$, G_DDGRG, $CVL_DDGRMEC$, C_DDGRC, C_DDGRCG, L_DDGRE, Y_DDGRT, LQCICTG$_D$DGRGEWKCE, LQCISTG$_D$DGRGEWKCE, CICTG$_D$DGRGEWKC, CISTG$_D$DGRGEWKC, MRCTCVG$_D$DGRGEWTCY, MRCTSVG$_D$DGRGEWTCY, CTCVG$_D$DGRGEWTC 및 CTSVG$_D$DGRGEWTC 중에서 선택된 서열을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 펩티드가 시클로$CVL_DDGRMEC$, 직선형 C_DDGRC, 고리형 C_DDGRC, 직선형 C_DDGRCG 또는 고리형 C_DDGRCG에서 선택된 서열을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 25

제 13항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 세포외 기질 단백질 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 펩티드가 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 27

제 26항에 있어서, 상기 펩티드가 피브로넥틴 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 28

제 27항에 있어서, 상기 펩티드가 피브로넥틴의 $FN\text{-}I_5$, $FN\text{-}I_7$, $FN\text{-}II_1$ 또는 $FN\text{-}III_9$ 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 펩티드가 피브로넥틴의 $FN\text{-}I_5$ 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 30

제 28항에 있어서, 상기 펩티드가 피브로넥틴의 $FN\text{-}I_7$ 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 31

제 2항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 선택적으로 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 억제함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 32

제 1항 또는 제 3항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 비트로넥틴에 대한 내피 세포 부착을 억제함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 33

제 1항 내지 제 32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 종양 성장을 억제함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 34

제 1항 내지 제 33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 혈관신생을 억제함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 35

제 1항 내지 제 34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 부가적인 치료제를 포함하지 않음을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 36

제 35항에 있어서, 상기 부가적인 치료제가 항암-펩티드임을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 37

제 35항 또는 제 36항에 있어서, 상기 부가적인 치료제가 사이토카인임을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 38

제 1항 내지 제 37항중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 DGR 모티프의 G 및 R 잔기가 관여하는 턴(Turn)을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 39

제 1항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 350개 까지의 아미노산을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 40

제 1항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 100개 까지의 아미노산을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 41

제 1항 내지 제 40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 50개 까지의 아미노산을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 42

제 1항 내지 제 41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 25개 까지의 아미노산을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 43

제 1항 내지 제 42항중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드가 15개 까지의 아미노산을 포함함을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 44

제 1항 내지 제 43항 중 어느 한 항에 있어서, NGR 모티프를 함유하는 펩티드의 대사에 의해 형성되는 경우는 제외됨을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 45

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드 및 약물, 사이토카인, 사이토카인 단편, 독소, 세포사멸 펩티드, 생물학적 반응 조절물질(biological response modifier), 방사선핵종(radionuclide), 바이러스 입자, 유전자 또는 이미지화 화합물(imaging compound)을 포함하는 접합 생성물.

청구항 46

유효량의 제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드 또는 제 45항의 접합 생성물을 포함하는 약제학적 조성

물.

청구항 47

제 46항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함께 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 48

제 46항 또는 제 47항에 있어서, NGR 모티프에 상응하는 모티프를 가지는 펩티드를 필수적으로 포함하지 않음을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 49

제 46항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 있어서, 주사가능한 용액 또는 현탁액 또는 조영(infusions)용 액체의 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 50

제 49항에 있어서, 리포좀 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 51

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드, 제 45항의 접합 생성물, 또는 제 46항 내지 제 50항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 $\alpha_v\beta_3$ 관여 질환(disorder involving $\alpha_v\beta_3$)을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법.

청구항 52

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드, 제 45항의 접합 생성물, 또는 제 46항 내지 제 50항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 골다공증, 관절염, 당뇨병성 망막증, 시력감퇴, 재협착(restenosis) 또는 혈관종(hemangioma)에서 선택된 $\alpha_v\beta_3$ 관여 질환(disorder involving $\alpha_v\beta_3$)을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법.

청구항 53

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드, 제 45항의 접합 생성물, 또는 제 46항 내지 제 50항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 골다공증, 관절염, 당뇨병성 망막증, 시력감퇴, 재협착 또는 혈관종을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법.

청구항 54

제 53항에 있어서, 상기 방법이 골다공증을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법임을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 53항에 있어서, 상기 방법이 관절염을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법임을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제 53항에 있어서, 상기 방법이 당뇨병성 망막증을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법임을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제 53항에 있어서, 상기 방법이 시력감퇴를 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법임을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제 53항에 있어서, 상기 방법이 재협착을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법임을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제 53항에 있어서, 상기 방법이 혈관종을 앓고 있는 환자의 치료 또는 진단 방법임을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드, 제 45항의 접합 생성물 또는 제 46항 내지 제 50항 중 어느 한 항의 조성물의 투여를 포함하는 암을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 61

제 60항에 있어서, 상기 암이 고형암을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제 60항 또는 제 61항에 있어서, 상기 암이 폐암, 췌장암, 유방암, 대장암, 후두암 또는 난소암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드 및 사이토카인 간의 접합 생성물.

청구항 64

사이토카인 및 NGR 모티프의 탈아미노화 생성물을 포함하는 표적화 모이에티 간의 접합 생성물.

청구항 65

사이토카인 및 DGR 모티프를 포함하는 표적 부분간의 접합 생성물.

청구항 66

제 65항에 있어서, 상기 DGR이 이소DGR임을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 67

제 65항에 있어서, 상기 DGR이 $_{D}$DGR임을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 68

제 65항에 있어서, 상기 DGR이 $_{L}$이소DGR임을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 69

제 63항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토카인이 TNF, IFNγ, IL-12 IP-10, IL-7 또는 EMAP II인 접합 생성물.

청구항 70

제 63항 내지 제 68항에 있어서, 상기 사이토카인이 TNF 또는 IFNγ인 접합 생성물.

청구항 71

제 70항에 있어서, 상기 사이토카인이 TNFα 또는 TNFβ인 접합 생성물.

청구항 72

제 64항 내지 제 71항중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이에티가 XDGRX' 서열을 포함하며,

여기서 상기 X는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 구성된 군에서 선택되며,

상기 X'은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 이루어진 군에서 선택됨을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 73

제 64항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이에티가 CDGRCVSGCAGRC, DGRAHA, GDGRG, CVLDGRMEC, CDGRC, CDGRCG, LDGRE, YDGRT, LQCICTGDGRGEWKCE, LQCISTGDGRGEWKCE, CICTGDGRGEWKC, CISTGDGRGEWKC, MRCTCVGDGRGEWTCY, MRCTSVGDGRGEWTCY, CTCVGDGRGEWTC 또는 CTSVGDGRGEWTC으로 이루어진 군에서 선택됨을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 74

제 73항에 있어서, 상기 표적화 모이에티가 시클로CVLDGRMEC, 직선형 CDGRC, 고리형 CDGRC, 직선형 CDGRCG 및 고리형 CDGRCG로 구성된 군에서 선택됨을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 75

제 63항 내지 제74항중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토카인이 폴리에틸렌 글리콜 또는 아실 잔기로 유도체화되는 것을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 76

제 63항 내지 제 75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토카인이 항체, 항체 단편, 및 비오틴으로 구성된 군에서 선택된 화합물과 추가로 컨주게이트되며,

상기 항체 또는 이의 단편은 종양성 항원(tumoral antigen), 종양성 신생혈관 마커(tumoral angiogenic marker) 또는 세포 또는 세포외 기질 구성요소로 구성된 군에서 선택된 화합물에 이끌리는 것을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 77

제 76항에 있어서, 상기 사이토카인이 TNF이고,

표적화 모이에티 및 항체, 항체 단편 및 비오틴으로 구성된 군에서 선택된 화합물 둘 모두에 컨주게이트됨을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 78

제 63항 내지 제 77항 중 어느 한 항에 있어서, NGR 모티프를 함유하는 펩티드의 대사에 의해 생체내에서 형성되는 경우는 제외됨을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 79

약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 유효량의 제 63항 내지 제 78항 중 어느 한 항의 접합 생성물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 80

제 79항에 있어서, 주사용액 또는 현탁액 또는 주입용 액체의 형태인 약제학적 조성물.

청구항 81

제 80항에 있어서, 리포좀의 형태인 약제학적 조성물.

청구항 82

TNF와 제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항의 펩티드의 접합 생성물, 및 IFNγ 또는 이를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 유효량으로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 83

TNF와 NGR 모티프의 탈아미노화 생성물을 포함하는 표적화 모이에티의 접합 생성물, 및 IFNγ 또는 이를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 유효량으로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 84

TNF와 DGR 모티프를 포함하는 표적화 모이에티(targeting moiety)의 접합 생성물, 및 IFNγ 또는 이를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 유효량으로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 85

제 84항에 있어서, 상기 DGR이 이소DGR임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 86

제 84항에 있어서, 상기 DGR이 $_{D}$DGR임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 87

제 86항에 있어서, 이소DGR이 $_{L}$이소DGR임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 88

제 82항 내지 제 87항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 함께 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 89

제 82항 내지 제88항중 어느 한 항에 있어서, 상기 TNF가 TNFα 또는 TNFβ임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 90

제 82항 내제 제 89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이에티가 XDGRX' 서열 모티프를 포함하며,

여기서 상기 X는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 또는 I로 구성된 군에서 선택되며,

X'은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 또는 P로 구성된 군에서 선택됨을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 91

제 82항 내지 제 90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이에티가 CDGRCVSGCAGRC, DGRAHA, GDGRG, CVLDGRMEC, CDGRC, CDGRCG, LDGRE, YDGRT, LQCICTGDGRGEWKCE, LQCISTGDGRGEWKCE, CICTGDGRGEWKC, CISTGDGRGEWKC, MRCTCVGDGRGEWTCY, MRCTSVGDGRGEWTCY, CTCVGDGRGEWTC 및 CTSVGDGRGEWTC로 구성된 군에서 선택됨을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 92

제 91항에 있어서, 상기 표적화 모이에티가 시클로CVLDGRMEC, 직선형 CDGRC, 고리형 CDGRC, 직선형 CDGRCG 및 고리형 CDGRCG로 구성된 군에서 선택됨을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 93

제 82항 내지 제 92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TNF가 폴리에틸렌 글리콜 또는 아실 잔기로 유도체화됨을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 94

제 82항 내지 제 93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TNF가 항체, 항체 단편, 및 비오틴으로 구성된 군에서 선택된 화합물과 추가로 컨주게이트되며,

상기 항체 또는 이의 단편은 종양성 항원(tumoral antigen), 종양성 신생혈관 마커(tumoral angiogenic marker) 또는 세포 또는 세포외 기질 구성요소로 구성된 군에서 선택된 화합물에 이끌리는 것을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 95

제 94항에 있어서, 상기 TNF가 표적화 모이에티 및 항체, 항체 단편 및 비오틴으로 구성된 군에서 선택된 화합물 둘 모두에 컨주게이트됨을 특징으로 하는 접합 생성물.

청구항 96

제 82항 내지 제 95항에 있어서, 주사용액 또는 현탁액 또는 주입용 액체의 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 97

제 82항 내지 제 96항 중 어느 한 항에 있어서, 리포좀 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 98

제 46항 내지 제 50항 및 제 79항 내지 제 97항 중 어느 한 항에 있어서, 다른 항암제 또는 진단용 종양-이미지화 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 99

제 98항에 있어서, 상기 다른 항암제가 독소루비신, 멜팔란, 시스-플라틴, 젬시타빈, 탁솔임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 100

제 63항 내지 제 78항 중 어느 한 항의 접합 생성물, 또는 제 79항 내지 제 99항중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 $\alpha_v\beta_3$ 관여 질환(disorder involving $\alpha_v\beta_3$)를 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 101

제 63항 내지 제 78항 중 어느 한 항의 접합 생성물, 또는 제 79항 내지 제 99항중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 골다공증, 관절염, 당뇨성 망막증, 시력감퇴, 재협착 또는 혈관종 중에서 선택된 $\alpha_v\beta_3$ 관여 질환(disorder involving $\alpha_v\beta_3$)를 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 102

제 63항 내지 제 78항 중 어느 한 항의 접합 생성물, 또는 제 79항 내지 제 99항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 골다공증, 관절염, 당뇨성 망막증, 시력감퇴, 재협착 또는 혈관종을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 103

제 102항에 있어서, 상기 방법이 골다공증을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 104

제 102항에 있어서, 상기 방법이 관절염을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 105

제 102항에 있어서, 상기 방법이 당뇨병성 망막증을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 106

제 102항에 있어서, 상기 방법이 시력감퇴를 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 107

제 102항에 있어서, 상기 방법이 재협착을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 108

제 102항에 있어서, 상기 방법이 혈관종을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 109

제 63항 내지 제 78항 중 어느 한 항의 접합 생성물, 또는 제 79항 내지 제 99항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 암으로 고통받고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법.

청구항 110

제 109항에 있어서, 상기 암이 고형암을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 111

제 109항 또는 제 110항에 있어서, 상기 암이 상기 암이 폐암, 췌장암, 유방암, 대장암, 후두암 또는 난소암인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본원발명은 혈관신생(angiogenesis) 및 암과 관련된 질병의 치료에 사용될 수 있는 신규한 펩티드와 관련이 있다. 보다 구체적으로, 본원발명은 DGR 모티프 및 이의 이성질체(isomer)를 포함하는 세포외 기질 단백질(extracellular matrix protein) 및 이의 유도체, 특히 펩티드에 관한 것이다. 본원발명은 또한 신생혈관을 "생착(homing)" 시킬 수 있는 변형된 사이토카인, 특히 사이토카인 유도체와 관련되어 있다.

배 경 기 술

<2> 세포외 기질은 세포 및 조직 행동양상의 중요한 조절자이다. 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 및 라미닌과 같은 세포외 기질 단백질들은, 예컨대 혈관신생, 세포 이동, 조직 복구, 암 세포 분화, 표적 부위에 대한 혈소판 응집 및 면역 세포의 생착 및 신경과정과 같은 의학적으로 중요한 많은 생물학적 현상을 조절하는 수많은 세포 수용체에 결합한다. 세포외 기질에 결합하는 중요한 수용체의 한 패밀리가 인테그린(integrins)이다.

<3> 피브로넥틴은 인테그린 결합에 관여하는 거대 세포외 기질 글리코단백질(~4,0 KDa)이다. 상기 피브로넥틴은 이황화 결합에 의해 결합된 2개의 거의 동일한 소단위체로 구성되어 있으며, 각각의 소단위체는 FN-I, FN-II 및 FN-III 반복체로 일컬어지는 3가지 유형의 반복 상동 모듈(repeating homologous module)로 구성되어 있다. 게다가, EDA, EDB 및 IIICS로 불리우는, 다른 방식으로 스플라이싱된 모듈들이 또한 존재할 수 있다(Mohri, 1997; Pankov and Yamada, 2002). 단일의 모듈 또는 일군의 모듈들은 황함유 점액 다당류(sulfated glycosaminoglycans), DNA, 젤라틴, 헤파린 및 피브린을 포함하는 상이한 분자들에 대한 결합부위를 함유할 수 있다(Mohri, 1997; Pankov and Yamada, 2002; Yamada, 1989). 더욱이, 피브로넥틴은 공지의 세포 표면 인테그린 수용체들 중 대략 반수에 대한 결합 부위를 함유하고 있다(Johansson *et al.*, 1997; Plow *et al.*, 2000). 특히, FN-III_{10} 반복체는 $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_8\beta_1$ 및 $\alpha IIb\beta_3$ 인테그린에 결합할 수 있는 RGD 부위를 함유하며, 한편 FN-III_9 반복체는 $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha IIb\beta_3$ 의 결합에서 RGD와 공조하는 소위 "시너지 부위(synergy site)" PHSRN를 함유한다(Busk *et al.*, 1992; Dedhar and Gray, 1990; Gardner and Hynes, 198,; Johansson *et al.*, 1997; Pankov and Yamada, 2002; Plow *et al.*, 198,; Pytela et al., 198,; Smith *et al.*, 1990; Takada *et al.*, 1987; Vogel et al., 1990; Weinacker *et al.*, 1994). FN-III_{14}-IIICS 지역은 $\alpha_4\beta_1$ 및 $\alpha_4\beta_7$ 인식에 관여하는 LDV 모티프 및 보조 REDV 및 IDA 부위의 존재에 의해 특징지워지는 세개의 부

위(CS_1, CS_5, 및 H_1으로 칭해짐)를 함유하고 있다(Johansson *et al.*, 1997; Pankov and Yamada, 2002). 게다가, FN-III_5 반복체는 $\alpha_4\beta_1$ 및 $\alpha_4\beta_7$ 에 결합하는 KLDAPT 서열을 함유하며(Moyano *et al.*, 1997), 한편 FN-I_{1-9} 및 FN-II_{1-2} 는 아직 확인되지는 아니하였으나, $\alpha_5\beta_1$과 상호작용할 수 있는 부위를 함유한다(Hocking *et al.*, 1998).

<4> 사람 피브로넥틴의 1차 및 3차 구조 분석은 상기 단백질이 소과의 동물(bovine), 쥐과의 동물(murine), 래트(rat), 양서류(amphibian) 및 물고기(fish)에 보존된, FN-I_5 및 FN-I_7 모듈에 위치한, 2개의 GNGRG 루프를 함유하고 있음을 보여준다(Di Matteo *et al.*). 또한 덜 보존된, 2개의 추가적인 NGR 부위가 사람 FN-II_1 및 FN-III_9에 존재한다. 최근 실험에 따른 성과는 NGR 모티프를 함유하는 펩티드들이 피브로넥틴에 대한 $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha_v\beta_1$-매개성 세포 부착을 억제할 수 있음을 보여주었다(Koivunen*et al.*, 1993).

<5> 세포 표면 부착 인테그린들(cell surface anchored integrins)과 세포외 기질 구성요소들간의 상호작용은 신생아 성장과 조직 염증, 관절염, 종양성장, 당뇨병성 망막증, 망막의 신혈관형성에 의한 시력감퇴 및 유사 병태를 포함하는 매우 다양한 임상적 질병의 발병에서 중요한 과정인 혈관신생과 관련되어 있다. 비트로넥틴 수용체인, $\alpha_v\beta_3$ 인테그린은 혈관신생에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hynes, 2002). 세포외 기질 단백질과 상기 인테그린의 상호작용을 억제할 수 있는 화합물들은 혈관신생 및 종양성장을 억제하는 것으로 공지되어 있다(Brooks *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 199,; Friedlander *et al.*, 199,; Friedlander *et al.*, 1996; Hammes et al., 1996). 그러나, 이러한 억제제(inhibitors)들이 갖는 한가지 문제점은 이들이 많은 인테그린 종들에 대해 교차-반응성(cross-reactivity)을 나타낸다는 것이다.

<6> 생물학적 과정 및 질병 발달에 있어서 세포외 기질의 역할에 대한 향상된 깨달음의 견지에서, 여전히 이러한 분야를 겨냥한 신규한 치료제에 대한 필요성이 존재한다. 본원발명은 이러한 필요성에 초점을 맞추고 있다.

<7> 몇몇 사이토카인의 항종양 활성은 잘 알려져 있으며, 기술되어 있다. 또한 몇몇 사이토카인은 이미 사람에게 치료적으로 사용되어 왔다(Fiers *et al.*, 199,). 예를 들어, 인터루킨-2(IL-2) 및 인터페론 α(IFNα)와 같은 사이토카인은 신장 전이암, 모발상세포 백혈병, 카포시 육종, 흑색종, 다발성 골수종(multiple mieloma) 등과 같은 상이한 유형의 종양을 앓고 있는 환자들에게서 양성 항종양 활성을 보여주었다. IFNB, 종양괴사인자(TNF)α, TNFB, IL-I, 4, 6, 12, 1, 및 세포집락자극인자(CFSs)와 같은 다른 사이토카인들은 몇몇 유형의 종양들에 대해 특별한 항종양활성을 보여주었으며 추후 연구 대상이 된다.

<8> 일반적으로, 사이토카인의 치료학적 용도는 이들의 전신 독성(systemic toxicity)으로 인하여 크게 제한된다. 예를 들어, TNF는 몇몇 종양의 중심출혈괴사(hemorrhagic necrosis)를 유도하는 능력이 있음이 최초로 발견되었고(Carswell *et al.*, 197,), 생체외 조건에서 다른 종양주(tumoral lines)에 대한 세포독성 효과를 나타냄이 밝혀졌으나(Helson *et al.*, 197,), 뒤이어 과생산 상태에서, 인체에 해로운 영향을 끼칠 수 있는 강한 호-염증성 활성(pro-inflammatory activity)을 가짐이 입증되었다(Tracey *et al.*, 1993).

<9> 인간에게 약리학적으로 활성양의 사이토카인을 사용하는데 있어서, 상기 전신 독성은 근본적인 문제점이므로, 이러한 부류의 생물학적 작용제(biological effectors)의 독성 효과를 감소시키는 한편 이들의 치료학적 효능을 그대로 유지시키는 것을 목표로 한, 신규한 유도체 및 치료학적 전략이 현재 평가 중에 있다. 예를 들어, WO 제01/61017호는 TNF 또는 IFNɣ와 CD13 수용체의 리간드 간의 접합 생성물에 대해 개시하고 있으며; WO 제03/093478호는 사이토카인과 종양 표적화(targeting) 모이에티(moiety) 간의 컨주게이트를 포함하는 약제학적 조성물에 대해 개시하고 있고(여기서 상기 사이토카인은 음성 피드백 기작을 유도하지 않는 분량으로 함유됨); WO 제03/092737호는 다양한 사이토카인과 종양 표적화 모이에티 간의 컨주게이트를 개시하고 있다. 본원발명은 치료 잠재력을 갖는 신규한 사이토카인 컨주게이트를 제공한다.

<10> **<u>발명의 요약</u>**

<11> 비-효소적 단백질 번역후 변형(post-translational modification)인, 아스파라긴(N) 탈아미노화는 일반적으로 단백질 노화(protein ageing)과 관련된 해로운 사건으로 여겨져 왔다. 본원에서 본 발명자들은 세포외 기질의 아스파라긴-글리신-아르기닌(NGR) 서열이, 새로운 세포 부착 모티프를 생성시키는, 아스파라긴의 아스파르트산 및 이소아스파르트산으로의 비-효소적 탈아미노화에 기반한 특이 기작을 통해 내피세포 부착을 촉진할 수 있음을 개시한다. 특히, 본 발명자들은 이러한 탈아미노화가 비트로넥틴에 대한 내피세포부착을 억제하며, $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 억제하고, 종양 성장을 억제할 수 있는 탈아미노화(deamination)된 단편;"기능 획득(gain of

function)"과 관련되어 있음을 개시한다.

<12> 특히, 본 발명자들은 $_{L}$이소DGR 및 $_{D}$DGR 이성질체가 다른 이성질 형태들을 능가하는 강화된 세포부착 결합 및 항-암 특성을 나타낸다는 것을 발견하였다. 대다수의 펩티드들이 아스파르트산의 L 거울상이성질체를 포함할 것임을 전제한다면 이러한 발견은 놀라운 것이다. 유전자 발현으로 생산된 펩티드는 모두 L 거울상이성질체를 포함할 것이다.

<13> 본 발명자들은 또한 탈아미노화된 NGR 펩티드에 컨주게이트된 사이토카인이 놀라운 활성을 가짐을 발견하였다. 본 발명자들은 이전에 특정 사이토카인의 치료 지수가 현저하게 개선될 수 있으며, 예컨대, 아미노펩티다제-N 수용체(CD13)의 변형된 리간드와 같은, NGR 모티프를 함유하는 리간드와의 커플링에 의해 이들의 면역치료 특성이 강화될 수 있음을 발견하였다. CD13은 다양한 종에서 매우 보존된 150KD의 막투과성 당단백질이다. 상기 단백질은 정상 세포에서 뿐만 아니라, 골수종양세포주(myeloid tumor lines), 혈관신생 내피(angiogenic endothelium) 및 일부 상피(epithelia)에서도 발현된다. CD13 수용체는 일반적으로 이의 펩티드 리간드들이 아미노산의 "NGR" 모티프를 공통적으로 지니고 있다는 점에서, "NGR" 수용체로 식별된다. 본 발명자들은 놀랍게도 본원에서 동일 또는 실제로 개선된 결과 탈아미노화에 의해 NGR 모티프의 아스파라긴(Asn 또는 N) 잔기가 아스파르트산 잔기(Asp 또는 D), 즉, "DGR" 모티프로 변형된, 변형 리간드를 사용하여 획득될 수 있음을 발견하였다. CD13 수용체 및 IFNγ의 이러한 변형된 리간드와 커플링된 TNF도 또한 상승적으로 작용하므로 유효한 1회 투여용량(dose) 미만인 투약량(dosages)으로 개별적으로 병용-투여(co-administration)함으로써 효과적인 항-종양 활성을 기대할 수 있다. 또한, 본 발명자들은 상기 변형된 TNF 및 예컨대, 멜팔란, 또는 독소루비신 또는 시스-플라틴 또는 젬시타빈 또는 탁솔과 같은 또 다른 항-암제를 조합한 조합체의 항-종양 활성이 IFNγ의 투여로 인하여 증가된다는 것을 발견하였다.

발명의 상세한 설명

<14> **발명의 설명**

<15> 본원발명의 첫번째 측면에 따라, 본원발명은 NGR 모티프를 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하며, $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 선택적으로 억제하는 펩티드를 제공한다.

<16> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명은 NGR 모티프를 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하며, 비트로넥틴에 대한 내피 세포 부착(endothelial cell adhesion)을 억제하는 펩티드를 제공한다.

<17> 본원발명의 또 다른 측면에 따르면, 본원발명은 예컨대 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌 또는 이의 단편 또는 유도체와 같은, 그러나 이에만 한정되지 아니하는, 세포외 기질 단백질의 탈아미노화 생성물을 포함하는 펩티드를 제공한다. 바람직하게는, 상기 단편은 상기 탈아미노화된 기질 단백질의 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 100개의 연속된 아미노산을 포함하며, 바람직하게는 상기 단백질의 탈아미노화된 NGR 모티프를 함유한다.

<18> 바람직하게는 상기 펩티드는 피브로넥틴의 탈아미노화 생성물, 보다 바람직하게는 피브로넥틴의 FN-I_5, FN-I_7, FN-II_1 또는 FN-III_9 모듈의 탈아미노화 생성물, 보다 바람직하게는 피브로넥틴의 FN-I_5 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물 또는 피브로넥틴의 FN-I_7 모듈, 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함한다. 바람직하게는 상기 단편은 상기 피브로넥틴의 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 100개의 연속된 아미노산을 포함하며, 바람직하게는 상기 단백질의 탈아미노화된 NGR 모티프를 함유한다.

<19> 일 구체예에서, 펩티드는 세포외 기질 단백질 또는 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물로 구성된다.

<20> 본원발명에 따른 또 다른 측면에서, 본원발명은 XNGRX' 서열을 포함하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 제공하며, 여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 이루어진 군에서 선택되며, 상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 이루어진 군에서 선택된다.

<21> 바람직하게는 상기 펩티드는 CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, CVLNGRMEC, CNGRC, CNGRCG, LNGRE, YNGRTLQCICTGNGRGEWKCE, LQCISTGNGRGEWKCE, CICTGNGRGEWKC, CISTGNGRGEWKC, MRCTCVGNGRGEWTCY, MRCTSVGNGRGEWTCY, CTCVGNGRGEWTC 및 CTSVGNGRGEWTC에서 선택된 서열을 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함한다.

<22> 일 구체예에서, 펩티드는 CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, CVLNGRMEC, CNGRC, LNGRE, YNGRT, LQCICTGNGRGEWKCE, LQCISTGNGRGEWKCE, CICTGNGRGEWKC, CISTGNGRGEWKC, MRCTCVGNGRGEWTCY, MRCTSVGNGRGEWTCY, CTCVGNGRGEWTC 및 CTSVGNGRGEWTC 중에서 선택된 서열을 가지는 펩티드의 탈아미노화 생성물로 구성된다.

<23> 바람직하게는, 펩티드는 시클로CVLNGRMEC, 직선형(linear) CNGRC, 고리형(cyclic) CNGRC, 직선형 CNGRCG 및 고리형 CNGRCG 중에서 선택된 서열을 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함한다.

<24> 일 구체예에서, 펩티드는 시클로CVLNGRMEC, 직선형 CNGRC, 고리형 CNGRC, 직선형 CNGRCG 및 고리형 CNGRCG 중에서 선택된 서열을 가지는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함한다.

<25> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명은 DGR 모티프를 함유하며, $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 선택적으로 억제하는 펩티드를 제공한다.

<26> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명은 DGR 모티프를 함유하는 펩티드의 탈아미노화 생성물을 포함하며, 비트로넥틴(vitronectin)에 대한 내피 세포 부착(endothelial cell adhesion)을 억제하는 펩티드를 제공한다.

<27> 바람직하게는 상기 펩티드는 XDGRX' 서열을 포함하며, 여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 구성된 군에서 선택되며, 상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 구성된 군에서 선택된다.

<28> 바람직하게는 상기 펩티드는 CDGRCVSGCAGRC, DGRAHA, GDGRG, CVLDGRMEC, CDGRC, CDGRCG, LDGRE, YDGRT, LQCICTGDGRGEWKCE, LQCISTGDGRGEWKCE, CICTGDGRGEWKC, CISTGDGRGEWKC, MRCTCVGDGRGEWTCY, MRCTSVGDGRGEWTCY, CTCVGDGRGEWTC 또는 CTSVGDGRGEWTC에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVLDGRMEC, 직선형 CDGRC, 고리형 CDGRC, 직선형 CDGRCG 및 고리형 CDGRCG 중에서 선택된 서열을 포함한다.

<29> 일 구체예에서, 상기 펩티드는 CDGRCVSGCAGRC, DGRAHA, GDGRG, CVLDGRMEC, CDGRC, CDGRCG, LDGRE, YDGRT, LQCICTGDGRGEWKCE, LQCISTGDGRGEWKCE, CICTGDGRGEWKC, CISTGDGRGEWKC, MRCTCVGDGRGEWTCY, MRCTSVGDGRGEWTCY, CTCVGDGRGEWTC 또는 CTSVGDGRGEWTC에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVLDGRMEC, 직선형 CDGRC, 고리형 CDGRC, 직선형 CDGRCG 및 고리형 CDGRCG 중에서 선택된 서열을 포함한다.

<30> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명은 이소DGR 모티프를 함유하는 펩티드들 제공한다.

<31> 바람직하게는 상기 펩티드는 X이소DGRX' 서열을 포함하며, 여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 구성된 군에서 선택되며, 상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 구성된 군에서 선택된다.

<32> 바람직하게는 상기 펩티드는 C이소DGRCVSGCAGRC, 이소DGRAHA, G이소DGRG, CVL이소DGRMEC, C이소DGRC, C이소DGRCG, L이소DGRE, Y이소DGRT, LQCICTG이소DGRGEWKCE, LQCISTG이소DGRGEWKCE, CICTG이소DGRGEWKC, CISTG이소DGRGEWKC, MRCTCVG이소DGRGEWTCY, MRCTSVG이소DGRGEWTCY, CTCVG이소DGRGEWTC 또는 CTSVG이소DGRGEWTC에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVL이소DGRMEC, 직선형 C이소DGRC, 고리형 C이소DGRC, 직선형 C이소DGRCG 및 고리형 C이소DGRCG 중에서 선택된 서열을 포함한다.

<33> 일 구체예에서, 상기 펩티드는 C이소DGRCVSGCAGRC, 이소DGRAHA, G이소DGRG, CVL이소DGRMEC, C이소DGRC C이소DGRCG, L이소DGRE, Y이소DGRT LQCICTG이소DGRGEWKCE, LQCISTG이소DGRGEWKCE, CICTG이소DGRGEWKC, CISTG이소DGRGEWKC, MRCTCVG이소DGRGEWTCY, MRCTSVG이소DGRGEWTCY CTCVG이소DGRGEWTC 및 CTSVG이소DGRGEWTC 중에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVL이소DGRMEC, 직선형 C이소DGRC, 고리형 C이소DGRC, 직선형 C이소DGRCG 및 고리형 C이소DGRCG 중에서 선택된 서열로 구성된다.

<34> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명은$_L$이소DGR 모티프를 함유하는 펩티드를 제공한다.

<35> 바람직하게는 상기 펩티드는 X_L이소DGRX' 서열을 포함하며, 여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I로 구성된 군에서 선택되며, 상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P로 구성된 군에서 선택된다.

<36> 바람직하게는 상기 펩티드는 C_L이소DGRCVSGCAGRC, $_L$이소DGRAHA, G_L이소DGRG, CVL_L이소DGRMEC, C_L이소DGRC, C_L이소DGRCG, L_L이소DGRE, Y_L이소DGRT, LQCICTG$_L$이소DGRGEWKCE, LQCISTG$_L$이소DGRGEWKCE, CICTG$_L$이소DGRGEWKC, CISTG$_L$이소DGRGEWKC, MRCTCVG$_L$이소DGRGEWTCY, MRCTSVG$_L$이소DGRGEWTCY, CTCVG$_L$이소DGRGEWTC 및 CTSVG$_L$이소DGRGEWTC 로 구성된 군에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVL_L이소DGRMEC, 직선형 C_L이소DGRC, 고리형 C_L이소DGRC, 직선형 C_L이소DGRCG 및 고리형 C_L이소DGRCG로 구성된 군에서 선택된 서열을 포함한다.

<37> 일 구체예에서, 상기 펩티드는 C_L이소DGRCVSGCAGRC, $_L$이소DGRAHA, G_L이소DGRG, CVL_L이소DGRMEC, C_L이소DGRC, C_L이소DGRCG, L_L이소DGRE, Y_L이소DGRT, LQCICTG$_L$이소DGRGEWKCE, LQCISTG$_L$이소DGRGEWKCE, CICTG$_L$이소DGRGEWKC, CISTG$_L$이소DGRGEWKC, MRCTCVG$_L$이소DGRGEWTCY, MRCTSVG$_L$이소DGRGEWTCY, CTCVG$_L$이소DGRGEWTC 및 CTSVG$_L$이소DGRGEWTC 중에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVL_L이소DGRMEC, 직선형 C_L이소DGRC, 고리형 C_L이소DGRC, 직선형 C_L이소DGRCG 및 고리형 C_L이소DGRCG 중에서 선택된 서열로 구성된다.

<38> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명은$_D$DGR 모티프를 함유하는 펩티드를 제공한다.

<39> 바람직하게는 상기 펩티드는 X$_D$DGRX' 서열을 포함하며, 여기서 상기 X 는 L, V, A, C, G, Y, P, H, K, Q 및 I 로 구성된 군에서 선택되며, 상기 X' 은 C, G, H, L, E, T, Q, R, S 및 P 로 구성된 군에서 선택된다.

<40> 바람직하게는 상기 펩티드는 C_DDGRCVSGCAGRC, $_D$DGRAHA, G_DDGRG, CVL_DDGRMEC, C_DDGRC, C_DDGRCG, L_DDGRE, Y_DDGRT, LQCICTG$_D$DGRGEWKCE, LQCISTG$_D$DGRGEWKCE, CICTG$_D$DGRGEWKC, CISTG$_D$DGRGEWKC, MRCTCVG$_D$DGRGEWTCY, MRCTSVG$_D$DGRGEWTCY, CTCVG$_D$DGRGEWTC 및 CTSVG$_D$DGRGEWTC 로 구성된 군에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로CVL_DDGRMEC, 직선형 C_DDGRC, 고리형 C_DDGRC, 직선형 C_DDGRCG 및 고리형 C_DDGRCG 로 구성된 군에서 선택된 서열을 포함한다.

<41> 일 구체예에서, 상기 펩티드는 C_DDGRCVSGCAGRC, $_D$DGRAHA, G_DDGRG, CVL_DDGRMEC, C_DDGRC, C_DDGRCG, L_DDGRE, Y_DDGRT, LQCICTG$_D$DGRGEWKCE, LQCISTG$_D$DGRGEWKCE, CICTG$_D$DGRGEWKC, CISTG$_D$DGRGEWKC, MRCTCVG$_D$DGRGEWTCY, MRCTSVG$_D$DGRGEWTCY, CTCVG$_D$DGRGEWTC 및 CTSVG$_D$DGRGEWTC 중에서 선택된 서열, 보다 바람직하게는 시클로 CVL_DDGRMEC, 직선형 C_DDGRC, 고리형 C_DDGRC, 직선형 C_DDGRCG 및 고리형 C_DDGRCG 중에서 선택된 서열로 구성된다.

<42> 일 구체예에서, 이소DGR 모티프, $_L$이소DGR 모티프 또는 $_D$DGR 모티프를 함유하는 상기 펩티드는 예컨대, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌과 같은 세포외 기질 단백질의 탈아미노화 생성물, 보다 바람직하게는 피브로넥틴의 탈아미노화 생성물, 보다 바람직하게는 피브로넥틴의 FN-I_5, FN-I_7, FN-II_1 또는 FN-III_9 모듈, 이의 단편 또는 유도체의 탈아미노화 생성물을 포함하나 이에만 한정되는 것은 아니다.

<43> 바람직하게는 상기 단편은 세포외 기질 단백질 또는 모듈의 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 100 개 이상의 연속된 아미노산을 포함한다.

<44> 바람직하게는 본원발명의 상기 펩티드는 선택적으로 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린을 억제하고/하거나 비트로넥틴에 대한 내피세포 부착을 억제한다. 바람직하게는 상기 펩티드는 $\alpha_v\beta_3$ 를 억제하나, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha_1\beta_1$ 을 억제하지 아니한다.

<45> 바람직하게는 $\alpha_v\beta_3$ 억제와 관련하여 상기 펩티드의 IC_{50} 은 < 0.5μM, 보다 바람직하게는 < 0.2μM 이다. '실험재료 및 실험방법'에 기술된 바와 같이 스트렙트아비딘-퍼옥시다제 컨주게이트 복합체를 사용한 분석을 통해 상기 IC_{50} 을 계산하는 것이 바람직하다. $\alpha_v\beta_5$ 및/또는 $\alpha_1\beta_1$ 와 관련하여 상기 펩티드의 IC_{50} 은 >1.0μM인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는>2.0μM, >3.0μM, >4.0μM 이다.

<46> 바람직하게는 본원발명의 상기 펩티드는 종양 성장을 억제한다.

<47> 바람직하게는 본원발명의 상기 펩티드는 혈관신생을 억제한다.

<48> 일 구체예에서, 본원발명의 펩티드는 항암제 또는 사이토카인을 포함하는, 추가의 치료제를 포함하지 않는다.

<49> 바람직하게는 본원발명의 펩티드는 DGR 모티프의 G 및 R 잔기가 관여하는 턴(turn)을 포함한다.

<50> 일 구체예에서, 본원발명의 펩티드는 350, 100, 50, 25, 15, 10 또는 5개까지의 아미노산을 포함한다.

<51> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명의 펩티드를 포함하는 접합 생성물을 제공된다. 바람직하게는 상기 접합 생성물은 본원발명의 펩티드 및 약물(drug), 사이토카인, 사이토카인 단편, 독소, 세포사멸 펩티드, 생물학적 반응 조절물질(biological response modifier), 방사선핵종(radionuclide), 바이러스 입자, 유전자 또는 이미지화 화합물(imaging compound) 간의 접합 생성물이다. 일 구체예에서 상기 약물은 예컨대, 독소루비신,

멜팔란, 시스-플라틴, 젬시타빈 또는 탁솔과 같은 항암제이다.

<52> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 약제학적으로 유효량으로 본원발명의 펩티드 또는 접합 생성물, 바람직하게는 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

<53> 바람직하게는 상기 조성물은 NGR 모티프를 가지는 펩티드 또는 접합체를 필수적으로 포함하지 아니한다. 특히, 상기 조성물이 탈아미노화된 펩티드를 포함하는 경우, 전구체 펩티드, 즉 출발 물질을 필수적으로 포함하지 않는 것이 바람직하다. 바람직하게는 상기 조성물의 펩티드 또는 접합체는 출발물질을 40, 30, 20, 15, 10, 5, 3 또는 1 % 이하로 포함한다.

<54> 바람직하게는 DGR 모티프를 함유하는 펩티드 및 접합체를 포함하는 본원발명의 조성물은 상기 모티프에 상응하는 NGR 모티프를 함유하는 상기 펩티드 및 접합체에 대응되는 펩티드 및 접합체를 실질적으로 포함하지 아니한다. 바람직하게는 총 펩티드(즉, DGR 및 NGR을 포함하는 펩티드)와 대비한 DGR 함유 펩티드의 비율은 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 99% (w/w) 이상이다.

<55> 본원발명의 조성물은 주사용 용액 또는 현탁액 또는 조영용(infusions) 액체의 형태로 제조될 수 있다.

<56> 본원발명의 조성물은 리포좀(liposome) 형태로 제조될 수 있다.

<57> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명의 펩티드, 접합 생성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 예컨대, 골다공증, 관절염, 당뇨병성 망막증, 시력감퇴, 재협착(restenosis) 또는 혈관종(hemangioma)과 같은, 그러나 이에만 한정되지 아니하는 $\alpha_v\beta_3$ 관여 질환(disorder involving $\alpha_v\beta_3$)을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법이 제공된다.

<58> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명의 펩티드, 접합 생성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 골다공증, 관절염, 당뇨병성 망막증, 시력감퇴, 재협착 또는 혈관종을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법이 제공된다.

<59> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명의 펩티드, 접합 생성물 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 예컨대, 폐암, 췌장암, 유방암, 대장암, 후두암 또는 난소암과 같은, 그러나 이에만 한정되지 아니하는 암을 앓고 있는 환자를 치료 또는 진단하는 방법이 제공된다.

<60> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 본원발명의 펩티드와 사이토카인 간의 접합 생성물이 제공된다.

<61> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 사이토카인과 NGR 모티프의 탈아미노화 생성물을 포함하는 표적화 모이에티 간의 접합 생성물이 제공된다.

<62> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 사이토카인과 DGR 모티프를 함유하는 표적화 모이에티 간의 접합 생성물이 제공되며, 상기 DGR 모티프는 CDGRCVSGCAGRC, DGRAHA, GDGRG, CVLDGRMEC, CDGRC, CDGRCG, LDGRE, YDGRT, LQCICTGDGRGEWKCE, LQCISTGDGRGEWKCE, CICTGDGRGEWKC, CISTGDGRGEWKC, MRCTCVGDGRGEWTCY, MRCTSVGDGRGEWTCY, CTCVGDGRGEWTC 또는 CTSVGDGRGEWTC, 보다 바람직하게는 시클로CVLDGRMEC, 직선형 CDGRC, 고리형 CDGRC, 직선형 CDGRCG 또는 고리형 CDGRCG 를 포함하나, 이에만 국한되지 아니한다. 바람직하게는 상기 DGR 모티프는 이소DGR 모티프, 보다 바람직하게는 $_L$이소DGR 이다. 일 구체예에서 상기 DGR 모티프는 $_D$DGR 이다.

<63> 본원발명의 접합체에 사용된 사이토카인의 비-한정된 목록은 TNFα, TNFβ, IFNα, IFNβ, IFNɣ, IL-I, 2, 4, 6, 7, 12, 15, EMAP II, 혈관내피성장인자(VEGF), PDGF, PD-ECGF 또는 케모카인이다. 바람직하게는 상기 접합체의 사이토카인은 TNF, IFNɣ, IL- 12, IP-10, IL-7 또는 EMAP II 에서 선택된다. 보다 바람직하게는 상기 사이토카인은 TNF, IFNɣ 또는 IL- 12 에서 선택된다.

<64> 상기 TNF 는 TNFα 또는 TNFβ 인 것이 바람직하다.

<65> 일 구체예에서, 상기 사이토카인은 폴리에틸렌 글리콜 또는 아실 잔기로 유도체화(derivatization)된다.

<66> 또 다른 구체예에서, 상기 사이토카인은 항체, 항체 단편, 및 비오틴으로 구성된 군에서 선택된 화합물과 추가로 접합되며, 여기서 상기 항체 또는 이의 단편은 종양성 항원(tumoral antigen), 종양성 신생혈관 마커(tumoral angiogenic marker) 또는 세포외 기질 구성요소(component of the extracellular matrix)로 구성된 군에서 선택된 화합물에 이끌린다.

<67> 또 다른 구체예에서, 상기 사이토카인은 TNF 이며 표적화 모이에티 및 항체, 항체 단편 및 비오틴으로 구성된 군에서 선택된 화합물 둘 모두에 접합된다.

<68> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 유효량의 본원발명의 TNF의 접합 생성물, 및 유효량의 IFNγ 또는 이를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

<69> 바람직하게는 본원발명의 펩티드 또는 접합체는 NGR 모티프를 함유하는 펩티드 또는 접합체의 대사(metabolism)에 의해 생체내에서 형성되는 경우는 제외된다.

<70> 본원발명의 또 다른 측면에 따라, 열처리(heat treatment)에 의해 획득될 수 있는 본원발명의 펩티드 또는 접합체가 제공된다.

<71> 본원발명의 조성물은 예컨대, 독소루비신 또는 멜팔란, 또는 시스-플래틴 또는 젬시타빈 또는 탁솔 또는 진단용 종양-이미지화 화합물(diagnostic tumor-imaging compound)과 같은, 그러나 이에만 국한되지 않는, 또 다른 항암제를 추가로 포함할 수 있다.

<72> **상세한 설명**

<73> 본 발명의 여러 가지 바람직한 특질 및 실시예가 비-제한적 예로써 지금부터 기술될 것이다.

<74> 본원발명의 실시는, 달리 특별히 기술하지 않는 한, 본원발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자의 창작능력범위 내에 속하는, 화학, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술 및 면역학의 보편적인 기술을 채용하게 될 것이다. 이러한 기술들은 문헌에 설명되어 있다. 예를 들어, 하기의 문헌들을 참조하기 바란다: J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (199, and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA 이소lation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IrI Press; and, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press. 상기한 각각의 일반 참고서적은 본원발명의 참조로서 여기에 통합된다.

<75> **DGR 모티프**

<76> 아스파르트산이 상이한 구조 이성질 형태, 즉 이소아스파르트산으로 존재할 수 있음은 잘 알려져 있다(도 14 참조).

<77> 아스파르트산 및 이소아스파르트산은 각각 키랄 분자이고, 상이한 이성질체들은 $_{L}$-Asp(LD), $_{L}$이소Asp($_{L}$이소D), $_{D}$Asp($_{D}$D) 및 $_{D}$이소Asp($_{D}$이소D)로 설명될 수 있고, 여기서 $_{L}$이소D 및 $_{D}$이소D는 이소아스파르트산의 거울상이성질체를 의미하며, $_{L}$D 및 $_{D}$D는 아스파르트산의 거울상이성질체를 의미한다.

<78> 종래 기술분야에서 DGR을 언급할 경우에, 이는 본질적으로 $_{L}$DGR를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 마찬가지로, 용어 DGR은 $_{D}$D 및/또는 $_{L}$이소D 또는 이의 혼합물을 포함한 DGR 모티프로 정의되며, 상기 모티프는 $_{L}$D 및 $_{D}$이소D를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 DGR은 상응하는 NGR 모티프의 탈아미노화로 생성된다. 일 구체예에서, 상기 DGR 모티프는 적어도 10 w/w % $_{L}$이소DGR을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 DGR 모티프는 적어도 10 w/w % $_{D}$DGR을 포함한다.

<79> 이소DGR 모티프를 함유하는 펩티드 또는 표적화 모이에티는, DGR 모티프가 실질적으로 이소DGR 형태인 펩티드 또는 표적화 모이에티를 의미한다. 실질적으로라는 의미는, DGR을 함유한 전체 펩티드 또는 표적화 모이에티와 대비하여 이소DGR 모티프를 함유한 펩티드 또는 표적화 모이에티의 w/w% 가 55%, 보다 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 65%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 75%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99%를 초과한다는 것이다. 이소DGR은 $_{L}$/$_{D}$이소D의 두 거울상이성질체를 모두 포함할 수 있으나, $_{L}$이소D의 w/w% 가 5 이상, 보다 바람직하게는 10 이상, 보다 바람직하게는 30 이상, 보다 바람직하게는 40 이상, 보다 바람직하게는

50 이상인 것이 바람직하다.

<80> $_{L}$이소DGR 모티프를 함유하는 펩티드 또는 표적화 모이에티는, DGR 모티프가 실질적으로 $_{L}$이소DGR의 형태인 펩티드 또는 표적화 모이에티를 의미한다. 실질적으로라는 의미는, DGR을 함유한 전체 펩티드 또는 표적화 모이에티와 대비하여 $_{L}$이소DGR 모티프를 함유한 펩티드 또는 표적화 모이에티의 w/w% 가 55%, 보다 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 65%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 75%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99%를 초과한다는 것이다.

<81> $_{D}$DGR 모티프를 함유하는 펩티드 또는 표적화 모이에티는, DGR 모티프가 실질적으로 $_{D}$DGR의 형태인 펩티드 또는 표적화 모이에티를 의미한다. 실질적으로라는 의미는, DGR을 함유한 전체 펩티드 또는 표적화 모이에티와 대비하여 $_{D}$DGR 모티프를 함유한 펩티드 또는 표적화 모이에티의 w/w% 가 55%, 보다 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 65%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 75%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99%를 초과한다는 것이다.

<82> 본원발명의 DGR 모티프는 G 및 R 잔기들(residues)이 관여하는 턴(Turn)을 포함하는 것이 바람직하다. DGR 모티프가 이에 상응하는 NGR 모티프의 탈아미노화에 의해 생성될 때, 상기 NGR 모티프가 G 및 R 잔기들이 관여하는 턴(Turn)을 포함하는 것이 바람직하다. NGR 모티프를 함유하는 직선형 및 고리형 펩티드의 구조-활성 관계(structure-activity relationship) 및 표적 종양에 대한 이들의 활성은 콜롬보와 그 동료 저자들의 논문에서 논의된 바 있다(Colombo *et al*., J. Biol. Chem., 2002, 49, 47891-47897). 동물 모델을 이용하여 수행된 실험은 GNGRG 및 CNGRC 둘 모두가 종양으로의 TNF 를 타겟팅할 수 있음을 보여주었다. 고리형 CNGRC의 분자 동적 자극시험(molecular dynamic simulation)은 이황화 결합(disulphide bridge)의 형성으로 안정화된, Gly^{3}-Arg^{4} 잔기들이 관여하는 벤드 기하형상(bend geometry)의 존재를 보여주었다. 이황화결합 제약없이 동일 펩티드에 대한 분자 동적 자극은 가장 많으며(populated) 열역학적으로 선호되는 배열이 Gly^{3}-Arg^{4} 잔기들이 관여하는 베타-턴(β-turn)의 존재에 의해 특징지워짐을 보여주었다. 이러한 결과들은 NGR 모티프가 직선형 펩티드에서 베타-턴을 형성하고자 하는 강한 성향을 가진다는 것을 제시하며, 비록 CNGRC 보다는 그 정도가 낮기는 하지만, GNGRG 펩티드가 종양으로의 TNF를 타겟팅할 수 있다는 발견을 설명할 수 있게 한다.

<83> 피브로넥틴 도메인 $FN\text{-}I_{5}$ 의 3차원 구조 분석은 GNGRG 모티프가, 물 및 수용체에 접촉할 것으로 예상되는, 노출된 루프(loop)를 형성함을 보여주었다(도. 1B 참조). 피브로넥틴 NGR 모티프의 분자 대체체(molecular surrogate)로서 본원에서 사용된, 양 측면에 시스테인을 가진 NGR-펩티드(CNGRC)에 대한 분자 동적 자극은, 상기 펩티드의 구조가 FN 루프의 펩티드에 포개어짐을 보여주었다(Di Matteo*et al*., 2002).

<84> **탈아미노화**

<85> 아스파라긴 잔기들의 탈아미노화는 결국 이소아스파르테이트 및 아스파르테이트로의 전환을 일으킨다. 상기 과정은 도 14에 제시되어 있다.

<86> 본원에서 언급하는 상기 탈아미노화는 통상의 기술자에 의해 용이하게 파악되는 임의의 적절한 조건하에서 수행될 수 있다. 본원발명의 상기 탈아미노화는 생체외 조건에서(in vitro) 수행된다.

<87> 일 구체예에서, 탈아미노화는 NGR을 포함한 펩티드를 가열함으로써 실행된다. 필요한 온도는 펩티드의 정확한 특성에 따라서 달라질 수 있으며, 이는 통상의 기술자가 용이하게 결정할 수 있다. 바람직하게는 상기 온도는 아스파라긴 잔기의 탈아미노화를 유발할 수 있을 정도면 충분하나, 펩티드를 변성시키거나 손상시킬 정도로 높아서는 아니된다. 예를 들어, 적당한 온도는 25-50, 30-40 또는 35-40 ℃ 이내일 수 있다.

<88> 탈아미노화는 또한 일반적으로 약 pH 8의 염기성 조건에서 펩티드를 인큐베이션함으로써, 예들 들어, 중탄산 암모늄(ammonium bicarbonate) 용액에서 인큐베이션함으로써, 실행될 수 있다.

<89> 염기성 조건의 정확한 특성은 펩티드의 정확한 특성에 따라 달라질 수 있으나, 통상의 기술자가 용이하게 결정할 수 있다. 바람직하게는 상기 염기성 조건은 아스파라긴 잔기의 탈아미노화를 유발할 수 있을 정도이면 충분하나, 잔여 펩티드를 변성시키거나 손상시킬 정도로 염기도가 높아서는 아니된다. 예를 들어, 적당한 염기성 조건은 pH 7.5-9.0, 8.0-9.0 또는 8.0-8.5 사이의 범위이다.

<90> 바람직한 일 구체예에서, 상기 탈아미노화는 염기성 용매내에서 가열하는 조건에서 실행된다.

<91> **펩티드**

<92> 본원에서 사용된 용어 "펩티드"는 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 용어 "폴리펩티드"는 단일-사슬 폴리펩티드 분자뿐만 아니라, 개개의 구성 폴리펩티드가 공유 또는 비공유 수단에 의해 연결된 다중-폴리펩티드 복합체를 포함한다. 용어 "폴리펩티드"는 길이면에서 2개 이상의 아미노산을 가진 펩티드를 포함하며, 전형적으로 5, 10 ,20, 30, 40 , 50 또는 100개 이상의 아미노산을 가진다.

<93> 본원발명의 펩티드는 환자에게 치료용으로 투여될 수 있다. 천연 생성 아미노산만으로 구성된 펩티드가 아니라, 예를 들어, 면역원(immunogenicity)의 감소, 환자의 체내에서 순환 반감기의 증가, 생체이용도의 강화 및/또는 효능 및/또는 특이성의 강화를 위해 변형(개질)된 펩티드를 사용하는 것이 바람직하다.

<94> 다수의 접근법들이 치료적 응용을 위한 펩티드의 변형에 사용되어 왔다. 하나의 방법은 펩티드 또는 단백질을 여러 가지 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글콜(PEG) 및 폴리프로필렌 글리콜(PPG)에 결합시키는 것이다 - 참조: 예컨대, 미국특허 제5,091,176호, 제5,214,131호 및 미국특허 제5,264,209호.

<95> 천연 생성 아미노산을 여러 가지 암호화되지 않거나 변형된 아미노산, 예를 들어 D-아미노산 및 N-메틸 아미노산으로 대체하는 방법이 또한 펩티드를 변형시키는데 사용될 수 있다.

<96> 다른 접근법은 이작용성 가교제(bifunctional crosslinker), 예를 들어 N-숙신이미딜 3-(2피리딜디티오) 프로피오네이트, 숙신이미딜 6-[3-(2피리딜디티오) 프로피온아미도] 헥사노에이트, 및 설포숙신이미딜 6-[3-(2 피리딜디티오) 프로피온아미도] 헥사노에이트를 사용하는 것이다(참조: 미국특허 제 5,580,853호 참조).

<97> 입체형태적으로 제한된 본 발명의 펩티드 유도체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 입체형태 제한(Conformational constraint)이란 용어는 펩티드가 취할 것으로 예상되는 3차원 형상의 안정성 및 선호되는 입체형태를 의미한다. 입체형태 제한은 펩티드내의 단일 잔기의 입체형태 이동성을 제한하는 것을 포함하는 국소 제한; 잔기 그룹의 입체형태 이동성을 제한하는 것을 포함하는 영역 제한(regional constrains)(여기서 잔기는 소정의 2차 구조 단위체를 형성할 수 있다); 및 전체 펩티드 구조를 포함하는 전영역 제한(global constraints)을 포함한다.

<98> 펩티드의 활성 입체형태는 예를 들어 고리화와 같은 공유결합의 변형에 의해서 또는 감마-락탐 또는 다른 유형의 브릿지의 혼입에 의해 안정화될 수 있다. 예를 들면, 측쇄가 주골격에 고리화됨으로써, L-감마 락탐 부분이 상호작용 부위 각 측면에 형성될 수 있다. 흐루비와 그 동료 저자들의 논문을 전체적으로 참조하라(Hruby *et al.*, 'Applications of Synthetic Peptides, 'in Synthetic Peptides: A User's Guide: 259-345 (W. H. Freeman amp; Co. 1992). 고리화는 또한, 예를 들어 시스테인 브릿지의 형성, 각각의 말단 아미노산의 아미노 및 카복시 말단 그룹의 결합, 또는 Lys 잔기 또는 관련 상동체의 아미노 그룹과 Asp, Glu 또는 관련 상동체의 카복시 그룹의 결합에 의해 이루어질 수 있다. 요오도아세트산 무수물을 사용하여 폴리펩티드의 알파 아미노 그룹을 리신 잔기의 엡실론-아미노산 그룹과 결합시키는 것이 또한 채택될 수 있다. 우드 및 웨첼의 논문을 참조하라(Wood and Wetzel, 1992,Int'l J. Peptide Protein Res. 39: 533-39).

<99> 미국특허 제5,891,418호에 기재된 또 다른 접근방법은 금속-이온 착물화 골격(metal-ion complexing backbone)을 펩티드 구조에 포함시키는 것이다. 전형적으로, 바람직한 금속-펩티드 골격은 소정의 착물화 금속 이온의 배위 구체(coordination sphere)에 필요한 수의 특정 배위 그룹을 기본으로 한다. 일반적으로, 유용한 것으로 입증된 대부분의 금속이온은 4 내지 6의 배위수를 갖는다. 펩티드 사슬의 배위 그룹은 아민, 아미드, 이미다졸 또는 구아니디노 작용기와 함께 질소 원자; 티올 또는 이황화물의 황원자; 및 하이드록시, 페놀계, 카보닐 또는 카복실 작용기의 산소 원자를 포함한다. 또한, 펩티드 사슬 또는 개개의 아미노산은 화학적으로 변형되어 배위 그룹, 예를 들어 옥심, 하이드라지노, 설프하이드릴, 포스페이트, 시아노, 피리디노, 피페리디도 또는 모르폴리노를 포함할 수 있다. 펩티드 컨스트럭트는 직선형 또는 고리형 중 어느 하나이나, 직선형 컨스트럭트가 일반적으로 바람직하다. 작은 직선형 펩티드의 일례는 Gly-Gly-Gly-Gly이고, 이는 골격에 4개의 질소(N_4 착물형성 시스템)를 지녀 4개의 배위수를 갖는 금속 이온과 착물을 형성할 수 있다.

<100> 치료학적 펩티드의 특성을 개선하기 위한 추가 기술은 비(non)-펩티드 펩티드모방체(peptidomimetics)를 사용하는 것이다. 광범위한 여러 가지 기술을 사용하여 펩티드의 정확한 구조를 밝힐 수 있다. 이러한 기술들은 아미노산 시퀀싱, x선 결정분석, 질량 분광법, 핵자기공명 분광법, 컴퓨터-보조 분자 모델링, 펩티드 맵핑, 및 이의 병용을 포함한다. 펩티드의 구조 분석은 일반적으로는 펩티드의 아미노산 서열뿐만 아니라, 이의 원자 성분

의 3차원적 위치결정을 포함하는 광대한 자료를 제공한다. 이러한 정보로부터, 치료활성을 위해 화학 작용기는 갖지만 보다 안정한, 예를 들어 생물학적 분해에 덜 민감한 비펩티드 펩티드모방체가 설계될 수 있다. 이러한 방법의 일예는 미국특허 제5,811,512호에 개시되어 있다.

<101> 본원발명의 치료적 펩티드를 화학적으로 합성하기 위한 방법은 상기 참조문헌들에 기재되어 있으며, 또한 보르지아 및 필드에 의해 고찰된바 있으며(Borgia and Fields, 2000, TibTech 18: 243-251), 본원에 포함된 참고문헌에 구체적으로 기술되어 있다.

<102> **펩티드 변이체, 유도체 및 단편**

<103> 본 발명의 아미노산 서열과 관련된 용어 '변이체' 또는 '유도체'는, 서열로부터 또는 서열에 대한 하나(또는 그 이상)의 아미노산의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 또는 첨가를 포함하는데, 그 결과 생성된 아미노산 서열은 바람직하게는 표적화 활성을 가지며, 바람직하게는 서열 목록에 제시된 폴리펩티드 활성의 25 내지 50% 이상, 더욱 바람직하게는 적어도 거의 동일한 활성을 갖는다.

<104> 따라서, 서열은 본 발명에 사용하기 위해 변형될 수 있다. 전형적으로, 서열의 활성이 유지되는 변형이 이루어진다. 따라서 일 구체예에서, 아미노산 치환은, 예를 들면, 1, 2 또는 3 내지 10, 20 또는 30개의 치환으로 이루어질 수 있으며, 다만 변형된 서열은 최소한 약 25 내지 50%의 활성을 유지하거나, 거의 동일한 활성을 유지한다. 그러나 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 서 열에 대한 변형은 의도적으로 폴리펩티드의 생물학적 활성을 감소시키기 위해 행해질 수 있다. 예를 들면, 표적 분자에 결합할 수 있지만 기능성 효능제 도메인이 결여된 분절된(truncated) 폴리펩티드가 유용하게 사용될 수 있다.

<105> 일반적으로, 서열 목록에 도시된 상응하는 영역과 비교하여 바람직하게는 변이체 또는 유도체의 20%, 10% 또는 5% 미만의 아미노산 잔기가 변형된다.

<106> 아미노산 치환은 예를 들면, 치료용으로 투여되는 폴리펩티드의 혈장 반감기를 증가시키기 위해 비-천연 생성 유사체의 사용을 포함할 수 있다(치료에 사용되는 펩티드 유도체의 생산과 관련한 더 상세한 내용은 하기를 참조).

<107> 보존적 치환이, 예를 들면 하기 표에 따라 이루어질 수 있다. 제 2컬럼에서 동일한 블록의 아미노산 및 바람직하게는 제 3컬럼에서 동일한 라인의 아미노산이 상호 치환될 수 있다:

<108>

지방족	비극성	G A P
		I L V
	극성-비하전	C S T M
		N Q
	극성-하전	D E
		K R H
방향족		F W Y

<109> 본원발명의 폴리펩티드는 또한 상기 언급한 바와 같은 폴리펩티드 및 이의 변이체의 단편을 포함하며, 서열의 단편을 포함한다. 바람직한 단편은 에피토프 또는 결합 도메인을 함유하는 그러한 단편들을 포함한다. 적어도 약 5개, 예를 들어 10, 12, 15 또는 20개의 아미노산이 적합한 단편의 길이일 것이다. 이들은 또한 길이가 200, 100 또는 50 미만의 아미노산일 수 있다. 단백질 및 이의 대립유전자 및 종 변이체의 폴리펩티드 단편은 보존적 치환을 포함하여, 하나 이상의(예를 들어 2, 3, 5, 또는 10) 치환, 결실 또는 삽입을 포함할 수 있다. 예를 들어 재조합기술에 의해 치환, 결실 및/또는 삽입이 일어난 경우, 바람직하게는, 서열 목록에 도시된 아미노산 잔기의 20%, 10% 또는 5% 미만이 변경된다.

<110> 본원발명의 단백질은 전형적으로는 재조합 방식에 의해, 예를 들면 하기한 바와 같이 제조된다. 그러나 고체상

합성법과 같이 통상의 기술자에게 익히 공지된 기술을 이용한 합성 수단에 의해서도 상기 단백질은 제조될 수 있다. 화학 합성 펩티드에 대한 여러 가지 기술은 보르지아 및 필드에 의해 고찰된 바 있으며(Borgia and Fields, 2000, TibTech 18: 243-251), 본원에 포함된 참고문헌들에 상세히 기술되어 있다..

<111> **폴리뉴클레오티드**

<112> 본 발명에 사용되는 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 펩티드 및 접합체를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특히, 상기 폴리뉴클레오티드는 NGR 모티프를 함유하는 전구체 펩티드 또는 접합체를 엔코딩할 수 있으며, 탈아미노화는 상기 모티프에 상응하는 DGR 모티프를 함유하는 펩티드 및 접합체가 되도록 한다.

<113> 통상의 기술자는 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여 다수의 상이한 폴리뉴클레로타이드가 동일한 폴리펩티드를 암호화할 수 있다는 사실을 이해할 수 있을 것이다. 또한, 통상의 기술자는, 일반적인 기술을 사용하여, 본원 발명의 폴리펩티드가 발현될 수 있는 임의의 숙주 개체의 코돈 사용빈도(usage)를 반영하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드 서열에 영향을 주지않는 뉴클레오티드 치환을 할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

<114> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 이들은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 이들은 또한 이들내에 합성 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 다수의 상이한 유형의 올리고뉴클레오티드 변형이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 변형들은 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 골격을 포함하고, 당해 분자의 3' 및/또는 5' 말단에서 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 첨가를 포함한다. 본원발명의 목적을 위해, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 당업계에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있다.

<115> 이러한 변형을 실시하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 생체내 활성 또는 반감기를 개선할 수 있다.

<116> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 재조합된 복제가능한 벡터내로 삽입될 수 있다. 벡터를 사용하여 적합한 숙주세포에서 핵산을 복제할 수 있다. 따라서 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 복제가능한 벡터내로 도입하고, 상기 벡터를 적합한 숙주세포에 도입하고, 상기 숙주 세포를 벡터의 복제가 일어나는 조건하에서 배양함으로써, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 벡터는 숙주세포로부터 회수될 수 있다. 적합한 숙주세포는 대장균과 같은 박테리아, 세균, 효모, 포유동물 세포주 및 기타 진핵 세포주, 예를 들어 곤충 Sf9 세포를 포함한다.

<117> 바람직하게는, 벡터내의 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에 의해서 코딩 서열의 발현이 이루어지도록 하는 조절서열에 작동가능하게 연결되며, 즉 상기 벡터는 발현 벡터이다. 용어 '작동가능하게 연결된(operably linked)'은 기술된 구성요소들이 이들을 이들의 의도된 방법으로 기능하도록 할 수 있는 관계에 있음을 의미한다. 코딩 서열에 '작동가능하게 연결된' 조절 서열은 상기 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 호환되는 조건하에서 이루어지는 방식으로 라이게이션된다.

<118> 조절 서열은 예를 들어, 조절 서열에 의해 유도되는 전사 수준을 전사 조정자에 대해 더 반응적이도록 하는 추가의 전사 조절 인자(elements)의 부가에 의해 변형될 수 있다.

<119> 본 발명의 벡터는 본 발명의 단백질 발현을 위해 제공되는 하기의 적합한 숙주세포에 형질전환시키거나 형질감염될 수 있다. 이러한 방법은 단백질을 코딩하는 코딩 서열의 벡터에 의한 발현을 제공하기 위한 조건하에서, 상기한 바와 같은 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 발현된 단백질을 회수하는 단계를 임의적으로 포함할 수 있다.

<120> 벡터는 예를 들면, 복제 기원, 선택적으로 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터, 및 선택적으로 프로모터의 조절자가 구비된 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 벡터는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자, 예를 들면 박테리아 플라스미드의 경우는 엠피실린 내성 유전자 또는 포유동물 벡터의 경우는 네오마이신 내성 유전자를 포함할 수 있다. 벡터는 예를 들면 숙주세포를 형질감염시키거나 형질전환시키는데 사용될 수 있다.

<121> 본 발명의 단백질을 엔코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열은 프로모터/인핸서 및 기타 발현 조절 신호를 포함한다. 이들 조절 서열은 숙주 세포내에서 사용될 수 있도록 고안된 발현 벡터를 위해 상기 숙주 세포와 호환가능하도록 선택될 수 있다. 용어 '프로모터'는 당업계에 익히 알려져 있는 것이고 크기 및 복잡성에 있어서 최소 프로모터에서부터 업스트림 요소 및 인핸서를 포함하는 프로모터까지의 핵산 영역을 포함한다.

<122> 프로모터는 일반적으로 포유동물 세포에서 기능성인 프로모터로부터 선택되지만 원핵세포 프로모터 및 다른 진

핵세포에서 기능성인 프로모터를 사용할 수 있다. 프로모터는 일반적으로 바이러스 또는 진핵 유전자의 프로모터 서열로부터 유래한다. 예를 들면, 발현이 일어날 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터일 수 있다. 진핵 프로모터에 대해서는, 보편적인 방식으로(예를 들어, a-액틴, b-액틴, 튜불린의 프로모터) 또는, 대안으로, 조직 특이적 방식으로(예를 들어, 피루베이트 키나아제 유전자의 프로모터) 기능하는 프로모터일 수 있다. 특정 세포에 특이적인 조직-특이적 프로모터를 또한 사용할 수 있다. 이들은 또한 특이적 자극에 반응하는 프로모터일 수 있는데, 예를 들면 스테로이드 호르몬 수용체에 결합하는 프로모터일 수 있다. 바이러스 프로모터를 또한 사용할 수 있는데, 예들 들면 몰로니(Moloney) 쥐과 백혈병 바이러스 긴 말단 반복(Mmℓ VLTR) 프로모터, 로우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터 또는 사람 사이토메갈로바이러스(CMV) IE 프로모터를 사용할 수 있다.

<123> 이종유전자 발현 수준이 세포의 생존기간 중에 조절될 수 있도록 상기 프로모터들을 유도할 수 있는 것이 또한 유리할 수 있다. 유도할 수 있다는 의미는 프로모터를 사용하여 수득되는 발현 수준을 조절할 수 있다는 의미이다.

<124> 또한, 이들 프로모터는 추가 조절 서열, 예를 들면 인핸서 서열을 부가함으로써 변형될 수 있다. 상기한 바와 같은 2개 이상의 상이한 프로모터에서 유래한 서열 구성요소(element)들을 포함하는 키메릭 프로모터를 또한 사용할 수 있다.

<125> 본원발명의 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 상기 벡터/폴리뉴클레오티드를 복제하고/거나 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 발명의 단백질을 발현시키기 위해 숙주세포로 도입할 수 있다. 본원발명의 단백질은 원핵 세포를 숙주세포로서 사용하여 제조될 수 있지만 진핵 세포, 예를 들어, 효모, 곤충 또는 포유 동물, 특히 포유동물 세포를 사용하는 것이 바람직하다.

<126> 본원발명의 벡터/폴리뉴클레오티드는, 당업계에 공지된 여러 가지 방법, 예를 들어 형질 감염, 형질 전환 및 일렉트로포레이션을 사용하여 적합한 숙주 세포로 도입될 수 있다. 본원발명의 벡터/폴리뉴클레오티드는, 당업계에 공지된 몇 가지 방법, 예를 들어 레트로바이러스, 단순포진 바이러스 및 아데노바이러스와 같은 재조합 바이러스 벡터를 이용한 형질감염, 핵산의 직접 주입 및 바이오리스틱 형질전환으로 동물의 투여된다.

<127> 본원발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 접합체를 발현시킬 수 있다. 숙주 세포는 본원발명의 폴리펩티드 및 접합체를 발현시킬 수 있는 적합한 조건하에서 배양될 수 있다. 본 발명의 단백질의 발현은 이들이 연속적으로 생산되거나 유도되도록 조작될 수 있는데, 이는 발현을 개시하기 위한 자극을 필요로 한다. 유도성 발현의 경우, 필요하다면, 예를 들어 배양 배지에 인듀서 물질(예를 들어 덱사메타손 또는 IPTG)을 첨가함으로써 단백질 생산이 개시되도록 할 수 있다.

<128> **접합체(Conjugates)**

<129> 본원발명은 유전적 융합 또는 화학적 커플링을 통해 형성된, 약물, 사이토카인, 독소, 자가사멸(apoptotic) 펩티드, 방사성핵종, 바이러스 입자, 유전자 또는 이미지화 화합물을 포함하나, 이에만 한정되지 아니하는 적어도 하나의 다른 제제(agent)와 연결된 본원발명의 펩티드 또는 표적화 모이에티를 함유하는 분자인 접합체에 관한 것이다. 본원발명의 접합체에서 사용된 사이토카인의 목록은 TNFα, TNFβ, IFNα, IFNβ, IFNɣ, IL-I, 2, 4, 6, 7, 12, 15, EMAP II, 혈관내피성장인자(VEGF), PDGF, PD-ECGF 또는 케모카인이나, 이에만 한정되는 것은 아니다.

<130> 접합체는 융합 단백질(펩티드 또는 표적화 모이에티가 당해 단백질을 엔코딩하는 DNA 분자의 유전자 발현을 통해 생성된 폴리펩티드 골격을 통해 제제(agent)에 연결됨), 직접적으로 합성되는 단백질 및 커플링된 단백질(단백질 내의 미리 형성된 서열이 가교 결합제에 의해 연결됨)을 포함한다. 본원에서 사용된 상기 접합체라는 용어는 또한 예들 들어, 집합체(aggregates)와 같은 회합체(associations)을 포함한다.

<131> 펩티드 또는 표적화 모이에티는 상기 제제에 직접적으로 또는 스페이서를 통해 간접적으로 커플링될 수 있는데, 상기 스페이서는 단일 아미노산(예를 들어, G(글리신)), 아미노산 서열 또는 예를 들어 6-아미노카프릴-N-하이드록시숙신이미드와 같은 유기 잔기(organic residue)일 수 있다.

<132> 일 구체예에서, 펩티드 리간드는 사이토카인 N-말단 또는 C-말단에 결합하여, 변형된 사이토카인이 이의 수용체에 결합하는데 있어 어떠한 간섭도 최소화하는 것이 바람직하다. 다른 대안으로, 펩티드는 아미노산 잔기에 연결되는데, 상기 아미노산 잔기는 아미도-또는 카복실산-결합 수용체(acceptors)이고, 이는 분자에서 자연발생하거나 유전공학기술을 이용하여 인공적으로 삽입될 수 있다. 상기 변형된 사이토카인은 펩티드를 엔코딩하는 5'-연속 서열을 포함하는 cDNA를 사용하여 제조되는 것이 바람직하다.

<133> 본원발명의 바람직한 구체예에 따르면, TNF 및 CDGRC, C이소DGRC, C_L이소DGRC 또는 CDDGRC 펩티드 간의 접합 생성물이 제공된다. 바람직하게는 TNF의 아미노 말단이 상기 펩티드에 연결되며, 바람직하게는 스페이서를 통해 연결된다. 바람직하게는 상기 스페이서는 G(글리신)이다.

<134> 본원발명의 바람직할 구체예에 따르면, IFNγ 및 CDGRC, C이소DGRC, C_L이소DGRC or C_DDGRC 펩티드간의 접합 생성물이 제공된다. 바람직하게는 TNF의 아미노 말단이 상기 펩티드에 연결되며, 바람직하게는 스페이서를 통해 연결된다. 바람직하게는 상기 스페이서는 G(글리신)이다.

<135> 본원발명의 바람직할 구체예에 따르면, IL- 12 및 CDGRC, C이소DGRC, C_L이소DGRC 또는 C_DDGRC 펩티드 간의 접합 생성물이 제공된다. 바람직하게는 TNF의 아미노 말단이 상기 펩티드에 연결되며, 바람직하게는 스페이서를 통해 연결된다. 바람직하게는 상기 스페이서는 G(글리신)이다.

<136> TNF/DGR 접합체의 치료 지수는 2가지 TNF 수용체들(p75TNFR 및 p55TNFR) 중 어느 하나에 선택적으로 결합할 수 있는 돌연변이형 TNF를 사용함으로써 추가로 개선될 수 있다. 자리-지정 돌연변이유발을 이용하여 상기 TNF 돌연변이체를 획득할 수 있다(Loetscher *et al.*, 1993, Van Ostade *et al.*, 1993).

<137> 본원발명에 따른 변형된 사이토카인의 약동학은 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 제조함으로써 개선될 수 있으며, 이는 사이토카인 자체의 혈장(plasmatic) 반감기가 연장되도록 한다.

<138> **이작용성 유도체(Bifunctional derivatives)**

<139> 본 발명의 추가의 구체예는 이작용성 유도체에 의해 제공되는데 여기서 본원발명의 펩티드 또는 접합체는 종양 항원 또는 기타 종양 항원성 마커에 대한 항체 또는 이의 단편과 접합되거나, 예를 들어 αv 인테그린, 메탈로프로테아제 또는 혈관성장인자, 또는 항테나신 항체 또는 항피브로넥틴 EDB 도메인과 같은 세포외 기질의 성분에 대한 항체 또는 이의 단편과 접합된다. 위 및 난소 선종(adenocarcinoma)에 의해 발현된 종양-관련 TAG72 항원에 대한 mAb의 힌지 영역과 TNF 간의 융합 생성물을 제조하는 방법이 최근 보고되었다(Yang*et al.*, 1995).

<140> 본 발명의 추가의 구체예는 비오틴/아비딘 시스템으로 종양을 사전에 표적화하는 것(pre-tarketing)에 의해 제공된다. 이러한 방법에 따르면, 3 성분 복합체가 상이한 단계에서 종양 항원 부위에서 수득되며, 이는 1) 비오티닐화된 mAb, 2) 아비딘(또는 스트렙트아비딘) 및 3) 본원발명의 펩티드 또는 접합체 및 비오틴으로 형성된다. 다수의 논문들이 면역접합체를 이용한 통상적인 표적화에 비해, 사전에 표적화시키는 방법이 실제로 자유 활성 분자에 대한 표적에 생착되는 활성분자의 비율을 증가시킬 수 있어, 치료 독성이 감소된다는 것을 입증하였다(Colombo *et al.*, 1993; Modorati *et al.*, 1994; Paganelli *et al.*, 1995, 1991). 이러한 방법은 비오티닐화된 TNF를 사용하여 유리한 결과를 보여주었으며, 이 방법은 시험관내에서 세포독성을 유도하여 정상 TNF가 비활성이었던 조건하에서의 종양 세포 성장을 감소시킬 수 있었다(Moro *et al.*, 1997; Gasparri *et al.*, 1999). 사전 표적화 방법은 또한 종양 항원과 변형된 사이토카인에 동시에 결합하는 이특이적(bispecific) 항체를 사용하여 2-상(phase) 절차로 수행될 수 있다. TNF 및 암배아 항원(carcinoembroyonic antigen)에 대한 이특이적 항체의 사용은 TNF 종양 사전 표적화를 위한 수단으로서 최근에 개시되었다(Robert*et al.*, 1996).

<141> 추가 구체예에 따라, 본원발명은 상이한 TNF 소위위체들 상에서, 본원발명의 펩티드(예를 들어, DGR을 함유한 펩티드) 및 항체, 또는 이의 단편(비오틴-아비딘 브릿지를 통하여 직접적으로 또는 간접적으로) 둘 모두에 접합된 TNF 분자를 포함하며, 여기서 상기 항체 또는 이의 단편은 종양 세포 또는 종양 스트로마의 다른 성분, 예를 들어 테나신 및 피브로넥틴 EDB 도메인 상에서 발현된 항원에 이끌린다. 이로써 결과적으로 변형된 사이토카인의 종양 생착 특성이 더 개선되고, 삼량체-단량체-삼량체 전이를 통해 종양 미세환경에서 후자가 느리게 방출되게 된다. 이전 성과에서 제시된 바와 같이, 사실상, 상기 TNF 접합체의 변형된 소단위체들은 표적화 복합체로부터 분리 및 재결합되어 비변형된 삼량체 TNF 분자를 형성할 수 있으며, 상기 삼량체 분자 형성하고 난 이후에 종양 미세환경 내에서 확산될 수 있다. 생체 활성 TNF의 방출은 표적 후 24-48시간내에 일어나는 것으로 밝혀졌다(Corti *et al.*, 1998)

<142> **세포외 기질**

<143> 본원에서 사용된, 용어 "세포외 기질 성분" (ECM)은 조직의 세포외 공간을 점유하는 분자를 의미한다.

<144> 일 구체예에서, 상기 ECM 성분은 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌에서 선택된다. 바람직한 ECM 성분은 피브로넥틴의 $FN\text{-}I_5$, $FN\text{-}I_7$, $FN\text{-}II_1$ 또는 $FN\text{-}III_9$ 모듈, 또는 이의 단편이다. 상기 단편은 NGR 모티프, 또는 탈아미노화 후의, DGR 모티프를 함유하는 것이 바람직하다.

<145> 본원발명에 따른 바람직한 상기 ECM 성분은 변형된 특성을 나타내는 그러한 것들이며, 상기 변형된 특성으로서, 예컨대, 아스파라긴 잔기의 탈아미노화 이후의 내피세포 부착 증가 및/또는 인테그린(예들 들어, $\alpha_v\beta_3$) 결합력 증가를 그 예로 들 수 있다. 특히 바람직한 ECM 성분은 NGR 모티프를 함유하는 그러한 성분들이며, 상기 모티프는 DGR, 바람직하게는 $_L$이소DGR 또는 $_D$DGR로의 탈아미노화를 겪게 된다.

<146> 사이토카인

<147> 종양 세포로의 약물 침투는 고형-종양 화학요법의 효과에 있어서 중요한 문제이다. 고형 종양의 암세포에 도달하기 위해서, 화학요법 약물은 약물 혈관에 들어가서 혈관벽을 통과하여 최종적으로는 간질(interstitium)을 통해 이동해야 한다. 이종 종양 관류, 혈관 투과성 및 세포 밀도 및 증가된 간질압은 종양 세포내로의 약물 침투 및 결과적으로는 화학요법의 효과를 제한할 수 있는 중요한 장애요인으로 드러날 수 있다. 따라서 이들 인자에 영향을 미치는 효과를 갖는 사이토카인은 본원발명에서 유용하다. 본원발명에서 사용할 수 있는 사이토카인의 목록을 다음과 같이 열거할 수 있으며, 그러나 이에만 제한되지 아니한다: TNFα, TNFβ, IFNα, IFNβ, IFNɣ, IL-1, 2, 4, 6, 12, 15, EMAP II, 혈관내피성장인자(VEGF), PDGF, PD-ECGF 또는 케모카인.

<148> TNF

<149> TNF는 염증성 사이토카인으로서 역할하여 내피 장벽 기능의 변경을 유도하고 종양 간질압을 감소시키며, 화학요법상 약물 침투 및 종양 혈관 손상을 증가시키는 효과를 나타낸다.

<150> 이따금 암환자들에게 있어서, 세균 감염 이후에 환자들의 종양의 자발적 퇴화가 나타난다는 사실이 관찰되면서, 종양 괴사 분자가 존재할 것이라는 최초의 제안이 이루어졌다. 1960대 연이은 연구에서는 세균 생성물에 대한 반응으로 제조된 숙주-관련(또는 내인성) 조정자가 관찰된 효과에 관여할 가능성이 있는 것으로 지적되었다. 1975년에는, 세균으로-유도된 순환 인자가 마우스 피부에 이식된 종양에 대한 강한 항-종양 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 종양괴사인자(TNF)로 지정된, 이러한 인자는 순차적으로 단리되고, 클로닝된 다음, 면역 조절 및 염증과 관련된 분자 패밀리의 원형인 것으로 밝혀졌다. TNF에 대한 수용체 및 TNF 서브패밀리의 다른 구성원들은 또한 관련 단백질의 수퍼패밀리를 구성한다.

<151> TNF-관련 리간드는 일반적으로 많은 공통된 특성들을 공유한다. 이들 특성들에는 높은 정도의 전반적인 아미노산(aa) 서열 상동성이 포함되지 않는다. 신경 성장 인자(NGF) 및 TNF-베타를 제외하고는, 모든 리간드가 짧은 세포질 세그먼트(10-80 aa 잔기) 및 상대적으로 긴 세포외 영역(140-215 aa 잔기)을 포함하는 유형 II 막투과 단백질(세포외 C 말단)로 합성된다. 구조적으로 TNF와 관련이 없는, NGF는 TNFRSF 저친화성 NGF 수용체(LNGFR)에 대한 이의 결합능 때문에 단지 당해 수퍼패밀리에 포함된다. NGF는 전형적인 신호 서열 펩티드를 가지며, 분비된다. 이와 대조적으로, TNF-β는, 또한 완전히 분비되긴 하지만, 유형 II 막투과 단백질과 훨씬 더 관련이 있는 1차 구조를 갖는다. TNF-β는 무작용성 또는 비효율성 막투과 세그먼트를 갖는 유형 II 단백질로서 간주될 수 있었다. 일반적으로, TNFSF 막은 삼량체 구조를 형성하고, 이들의 단량체는 그 자체를 두개의 시트 구조로 배향되도록 하는 베타-가닥으로 이루어 진다. 이들 분자의 삼량체 구조에 기한 결과로서, TNSF 및 TNFRSF 수퍼패밀리의 리간드 및 수용체는 신호 전달 도중 '클러스터링'을 겪게 된다.

<152> TNF-α: 사람 TNF-α는 233개의 aa 잔기, 비당화(nonglycosylated) 폴리펩티드인데, 이는 막투과 또는 가용성 단백질 중 어느 하나로 존재한다. 26 kDa 막투과 결합 단백질로 발현된 경우, TNF-α는 29개의 aa잔기 세포질 도메인, 28개의 aa 잔기 트랜스멤브레인 분절 및 176개의 aa 잔기 세포외 영역으로 구성된다. 가용성 단백질은 85 kDa TNF-알파 전환 효소(TACE)를 통해 단백질분해 절단 현상에 의해 생성되는데, 이는 통상 동종삼량체로서 순환되는 17 kDa, 157개의 aa 잔기 분자를 생성시킨다.

<153> TNF-β/LT-α: 달리 림포톡신-α(LT-α)으로 공지되어 있는 TNF-β는 이의 클로닝이 TNF-α의 클로닝과 동시에 일어났었던 분자이다. TNF-β가 171개의 aa 잔기, 25 kDa 당화 폴리펩티드로서 순환하지만, 194개의 aa 잔기 길이의더 큰 형태가 발견되었다. TNF-β cDNA는 205개의 aa 잔기(202 마우스에서)의 해독틀을 코딩하며 아마도 특정한 유형의 단백질분해 과정이 분비도중 일어난다. TNF-α에서와 마찬가지로, TNF-β는 비공유적으로 결합된 삼량체로서 존재하고 TNF-α와 동일 수용체에 결합하는 것으로 알려져 있다.

<154> 일 구체예에서, TNF는 TNF 수용체 중 하나에 선택적으로 결합할 수 있는 TNF의 돌연변이 형태이다[참조:(Loetscher H *et al* (1993) J BiolChem 268: 26350-7; Van Ostade X et al (1993) Nature 361: 266-9)].

<155> 인간에 있어서, TNF 볼루스의 최대 내성 투여량은 동물에 있어서의 유효 투여량 보다 약 10배 낮은 218-410㎍/㎡(Fraker *et al.*, 199,)이다. 쥐과 동물 모델로부터 얻은 데이타에 근거하여, 인간에게서 항-종양 효과를 얻

기위해서는 적어도 10배 높은 투여량이 요구될 것으로 믿어지고 있다(Schraffordt Koops *et al.*, 1998). 고온 적출-사지(hyperthermic isolated-limb) 관류에 관한 최초 임상 연구에서, 멜팔란 및 인터페론 γ와 조합하여 TNF를 4mg의 특정 투여량으로 투여하는 경우 높은 반응율이 획득되었다(Lienard *et al.*, 1992). 다른 연구는 인터페론 γ가 제외될 수 있으며, 심지어 TNF를 훨씬 더 적은 투여량으로 투여하더라도 치료 반응이 충분히 유도될 수 있음을 개시하였다(Hill *et al.*, 1993; Eggermont *et al.*, 1996). 상기 2가지 사이토카인들은 내피세포에서 상승 효과를 나타내기 때문에, 이들의 조합된, 선택적인 표적화가 더 강한 항-종양 활성을 나타내어 결국 조합되어 사용되는 동일 사이토카인을 이용한 암 치료시에 일반적으로 마주치게 되는 전신 독성 문제를 극복하게 할 거으로 기대된다. 더욱이, TNF가 내피 내혈관(endothelial lining vessels)의 기능 장애를 감소시킬 수 있으며, 이로써 거대분자에 대한 그들의 투과도를 향상시킬 수 있다는 것은 공지되어 있다. 본원발명에 따른 변형된 TNF 분자들을 사용한 보다 낮은 독성 치료, 및 이들 종양 혈관 호밍 특성을 이용한, 대안적인 적용은 치료 또는 진단 목적 중 어느 하나로, 다른 화합물에 대한 종양 혈관의 투과성을 증가시키기 위한 상기 TNF 분자들의 용도와 관련되어 있다. 예를 들어, 상기 변형된 TNF는 종양에 대한 방사선면역신티그래피(radioimmunoscintigraphy) 또는 방사선면역요법(radioimmunotherapy)에서의 방사성동위원소표지 항체 또는 호르몬(종양-이미지화 화합물)의 종양 섭취를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 대안으로, 화학요법 약물, 면역독소, 약물 또는 유전자를 운반하는 리포좀, 또한 다른 항암제의 섭취가 또한 증가될 수 있으며, 이로써 이들의 항암 효과가 강화되게 된다.

<156> 많은 다른 염증성 사이토카인은 또한 내피 혈관 투과성을 증가시키는 성질을 갖고, 본원발명이 이러한 사이토카인의 발현을 증가시키는 제제와 함께, 상기 사이토카인에 적용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 또한 호-염증성 사이토카인으로서 공지된 염증성 사이토카인은 다수의 폴리펩티드 및 당단백질이며, 이들의 분자량은 5kDa 내지 70 kDa 사이이다. 이들은 염증 반응을 자극하는 효과가 있다. 가장 중요한 염증성 사이토카인은 TNF, IL-1, IL-6 및 IL-8이다.

<157> 염증성 사이토카인으로 분류되는 몇몇 사이토카인을 하기 표에 제시되어 있다:

<158> **염증성 사이토카인**

<159>

그룹	개별 사이토카인
내인성 사이토카인	IL-1, TNF-α,IL-6
상향-조절	IL-1, TNF-α,IL-6, IFN-α, INF-β, 케모카인
급성상 반응물의 생산 자극	IL-1, IL-6, TNF-α, INF-γ, TGF-β, LIF, OSM, CNTF
화학주성 사이토카인	
CXC 케모카인	IL-8, PF-4, PBP, NAP-2, β-TG
CC 케모카인	MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES
C 케모카인	림포탁틴
염증성 사이토카인의 자극	IL-12

<160> TGF-β : 형질전환 성장 인자, LIF: 백혈병 억제 인자; OSM: 온코스태틴 M; CNTF: 섬모 향신경 인자; PF-4: 혈소판 인자 4; PBP: 혈소판 기본 단백질; NAP-2: 호중구 활성화 단백질 2; β-TG: β-트롬보글로불린; MIP: 대식세포 염증성 단백질; MCP: 단핵구 화학유인물질 단백질.

<161> 염증성 반응의 상향 조절은 또한 IL-11, IFN-α, IFN-β 및 특히 케모카인 수퍼패밀리의 구성원들에 의해 수행된다. TGF-β는 어떤 경우에는 호중구, T 림프구 및 불활성화 단핵구에 대한 화학주성 효과를 포함하는 다수의 염증 활성을 갖는다.

<162> **IFN-γ**

<163> 많은 구체적인 증거가 인터페론-γ(IFNγ), T-임파구 및 자연 살해 세포에 의해 주로 생산되는 다면발현성 사이토카인(Farrar, *et al.*, 1993; Boehm *et al.*, 1997)이 항-암 반응을 촉진할 수 있다는 것을 제시한다(Curnis *et al.*, 200,). 예를 들어, IFNγ는 많은 유형의 종양 세포들에 대하여 항증식 및 전-자가사멸 효과를 유도할

수 있고, 종양 혈관신생을 억제할 수 있으며, 다양한 종양 세포 표적을 사멸시키는 자연살해 세포 및 대식세포를 활성화 할 수 있다. IFNγ는 또한 CD4+ T 헬퍼 세포의 중요한 조절자이며, 주요 생리적 대식세포-활성화 인자이고, 암 및 내피 세포상에서의 MHC-I 및 MHC-II의 발현이 개시되도록 할 수 있다. 종양 기질(stroma)내의 IFNγ는 IP-10(IFN-유도 단백질 10), 혈관신생 단백질 및 임파구 및 단핵구에 관한 화학주성 인자를 포함하는, 사이토카인 및 케모카인 분비를 유도할 수 있다. 획득되 증거가 종양-침윤 대식세포에 의해 생산된 IFNγ가 종양 혈관 파괴에 중요한 역할을 담당한다는 것을 제시한다. IFNγ 및 종양 괴사 인자-α(TNF)를 이용한 내피세포의 복합 치료는 아마도 종양 맥관구조 파괴에 중요한, 상승된 세포독성 효과를 나타낸다. IFNγ는 또한 활성화된 대식세포에 의한 TNF의 생산 뿐만 아니라, 다양한 유형의 세포에서의 TNF-수용체들의 발현을 증가시킬 수 있다. 종양 맥관구조 및 면역 체계 상에서의 이러한 효과의 결과로서, IFNγ는 기생성된 종양에 대한 염증/면역 반응을 활성화시키고 종양 성장을 억제할 수 있다.

<164> IFNγ는 2개의 비공유적으로 결합된 폴리펩티드 소단위체들의 동형이합체로 존재한다. 야생형 사람 IFNγ(huIFNG)의 주요 서열은 여러 논문 및 특허문헌에 개시되어 있다[참조 : Gray와 동료 저자들(1982); Taya와 동료 저자들(1982); Devos와 동료 저자들(1982); 및 Rinderknecht와 동료 저자들(1984), 및 EP 제 77670호, EP 제 89676호 및 EP 제 110044호]. 에알릭(Ealick)과 그 동료 저자들은 상기 huIFNG의 3D 구조를 보고하였다(참조: Ealick *et al.*, 1991).

<165> IL-12

<166> 자연 살해 세포 자극 인자("NKSF") 또는 세포독성 임파구 노화 인자("CLMF")로도 칭해지는, 인터루킨 12(IL-12)은 광범위한 질병들에 있어서 강력한 면역조절 분자로서 역할을 한다. 인간 IL-12은 독특한 구조 및 다양한 효과를 갖는 사이토카인으로서 식별되어 왔다(Kobayashi, *et al.*, 1989; Seder, *et al.*, 1993; Ling, *et al.*, 199,; Podlaski, *et al.*, 1992). IL-12은 면역 및 염증 반응을 수반한 몇몇 질병과 관련된 병리에 있어서 중요한 역할을 한다. 게이틀리와 그 동료 저자들은 상기 IL- 12, 이의 생물학적 활성, 및 질병에 있어서의 이의 역할에 대하여 재검토하였으며, 이에 대해서는 그들의 리뷰논문을 참고할 수 있다(Gately *et al.*,1998). 생체내에서 IL-12는 중요한 역할을 하는데, 자연살해세포(NK) 및 T 세포 둘 모두에 의한 IFNγ 생산을 유도할 수 있다.

<167> 구조적으로, IL-12는 35kDa 소단위체(p3,) 및 40kDa 소단위체(p40)을 포함하는 이형이합체 단백질("p70 소단위체로" 일컬어짐)이며, 상기 두 소단위체들은 이황화결합에 의해 서로 연결되어 있다. 예컨대, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포들이 주로 상기 이형이합체 단백질을 생산한다. 이러한 유형의 세포들은 또한 p70 소단위체에 비해 p40 소단위체를 더 많이 분비한다.

<168> IL-2

<169> 면역 및 염증 반응의 매개에 있어서 IL-2/IL-2R 시스템의 중추적인 역할 때문에, 이러한 시스템을 탐지하고 조작하는 것은 중요한 진단 및 치료학적 의미를 갖는다. IL-2는 LAK 및 TIL(종양 침윤 임파구) 세포의 증식 및 종양-공격 활성을 자극하는 이의 능력 때문에 항암제로의 가능성이 기대되어 왔다. 그러나 IL-2 독성의 문제는 여전히 관심을 가져야 하며 조사하여야 할 이점이 있다. 본 발명은 이 문제에 주안점을 두고 있다.

<170> IL- 15

<171> 인터루킨 15(IL-15)는 IL-2와 다수의 생물학적 특성을 공유하나, IL-2와의 아미노산 서열 상동성이 결여된 신규한 사이토카인이다. IL-15는 뮤린 T 세포주인 CTLL-2에 대한 이의 분열촉진 활성에 기초한 원숭이 신장 상피세포주(CVI/EBNA)로 조건화한(conditioned) 배지(media)에서 최초로 동정되었다. IL-15는 또한 T 세포 증식을 자극하여 성인 T 세포 백혈병 세포주 (HuT-102)에 의해 생산된 사이토카인으로서 독립적으로 발견되었으며, IL-T로 지칭되었었다. T 세포, NK 세포, LAK 세포 및 TIL의 자극제로서의 이의 활성으로 인해, IL-2는 현재 암 및 바이러스 감염 치료에서 이의 사용 가능성에 관한 임상 시험중에 있다. 이의 유사한 생물학적 활성 때문에, IL-15는 유사한 치료 잠재력을 가질 수 있다.

<172> 케모카인

<173> 케모카인은 백혈구 트래픽킹(trafficking), 리쿠르팅 및 재순환에 기능하는 대부분 소형의 분비 단백질의 수퍼패밀리이다. 이들은 알러지 반응, 감염성 및 자기면역 질환, 혈관신생, 염증, 종양 성장 및 조혈 발생과 같은 많은 병리생리학적 과정에서도 중요한 역할을 한다. 이들 단백질의 약 80%가 이들의 노화 형태에서 66 내지 78개의 아미노산(aa)를 갖는다. 나머지 단백질들은 단백질 코어 또는 신장된 C 말단 세크먼트의 일부로서 추가의 아미노산(aa)이 존재하는 업스트림을 가짐으로 인해 더 크다. 모든 케모카인은 7개의 막투과 도메인 G-단백질

커플링된 수용체를 통해 신호를 전달한다. 17개 이상의 공지된 케모카인 수용체가 있으며 이들 수용체의 다수는 무차별 결합 특성을 나타내기 때문에 수개의 케모카인은 동일한 수용체를 통해 신호를 전달할 수 있다.

<174> 케모카인은 보존된 아미노산 서열 모티프에 기초하여 서브패밀리로 구분된다. 대부분의 패밀리 구성원은 4개 이상의 보존된 시스테인 잔기를 갖는데 이는 2개의 분자내 이황화 결합을 형성한다. 서브패밀리는 첫번째 2개의 시스테인 잔기 위치에 의해 정해진다:

<175> ·CXC 케모카인으로도 칭해지는, 알파 서브패밀리는 첫번째 2개의 시스테인 잔기들을 분리시키는 하나의 아미노산을 갖는다. 이 그룹은 첫번째 시스테인 잔기에 바로 앞서 위치하는 glu-leu-arg(ELR) 아미노산 모티프의 존재 또는 부재에 기초하여 더 세분화될 수 있다. 현재 5개의 CXC-특이적 수용체가 있고 이들은 CXCR1 내지 CXCR5로 지칭된다. ELR+ 케모카인은 CXCR2에 결합하고 일반적으로 호중구 화학유인물질 및 활성제로서 작용한다. ELR-케모카인이 CXCR3 내지 CXCR5에 결합하고 주로 림파구에서 작용한다. 본원발명의 출원 당시, 대체 스플라이싱에 의해 기인하는 몇몇의 추가적인 다양성을 수반할 것이라는 사실과 함께 CXC를 암호화하는 14개의 상이한 사람 유전자가 과학문헌에 보고되었다.

<176> ·CC 케모카인으로도 칭해지는, 베타 서브패밀리에서, 첫번째 2개의 시스테인은 개입되는 아미노산 없이 서로 인접한다. 이들은 현재 24개의 구분되는 사람 베타 서브패밀리의 구성원이다. 상기 그룹에 대한 수용체는 CCR1 내지 CCR11로 칭해진다. 상이한 CC 패밀리 구성원에 대한 표적 세포는 대부분의 유형의 백혈구를 포함한다.

<177> ·알파 및 베타 서브패밀리에는 속하지 않으면서 케모카인 상동성이 있는 2개의 공지된 단백질이 있다. 림포탁틴은 감마 부류의 유일한 구성원(C 케모카인)으로 첫번째 및 세번째 시스테인이 결실되어 있다. 림포탁틴 수용체는 XCR1로 칭해진다. 델타 부류의 유일하게 공지된 구성원인 프랙탈킨(CX_3C 케모카인)은 첫번째 2개의 시스테인 잔기 사이에 3개의 끼어든 아미노산들을 갖는다. 상기 분자는, 긴 뮤신-유사 줄기에 융합된 N-말단 케모카인을 갖는 트랜스멤브레인 단백질이라는 점에서, 케모카인들 중에서도 독특하다. 프랙탈킨 수용체는 CX_3CR1로 알려져 있다.

<178> VEGF

<179> 본원발명은 혈관 내피 성장인자(VEGF)에 또한 적용될 수 있다. 혈관신생은 이미-존재하는 맥관구조로부터 새로운 혈관 발달의 과정이다. 이는 배아 발생, 조직의 정상 성장, 상처 치유, 암컷의 생식 주기(즉, 배란, 월경 및 태반 발생)에서 본질적인 역할을 할 뿐만 아니라, 많은 질병에서도 중요한 역할을 한다. 종양은 새로운 혈액의 공급을 일으키지 않고서는 수밀리미터 크기 이상으로 성장할 수 없기 때문에, 암에 특히 관심이 집중된다. 혈관신생은 또한 종양 세포 전이에서 확산 및 생장에 필수적이다.

<180> 내피에 관한 가장 중요한 성장 및 생존 인자 중의 하나가 VEGF이다. VEGF는 혈관신생 및 내피 세포 증식을 유도하며 혈관형성을 조절하는데 중요한 역할을 한다. VEGF는 동종이량체 45 kDa로서 분비되는 헤파린-결합 당단백질이다. 일반적으로 그 자체가 내피 세포가 아닌, 대부분의 유형의 세포가 VEGF를 분비한다. 초기 발견된 VEGF인, VEGF-A는 혈관투과성을 증가시키기 때문에, 혈관 투과성 인자로 공지되었다. 또한, VEGF는 부분적으로 내피 세포의 산화질소 합성효소의 자극을 통해 혈관확장을 유발한다. VEGF는 또한 세포 이동을 자극하고 자가 세포사멸을 억제한다. 수개의 VEGF-A 스플라이스 변이체가 존재한다. 주요한 변이체들은 121, 165, 189 및 206개의 아미노산 (aa)을 포함하고, 각각은 특이적 엑손 부가를 포함한다.

<181> EMAP II

<182> 내피-단핵구 활성화 폴리펩티드-II(EMAP-II)는 종양 혈관 발달에 있어서 항혈관생성 인자인 사이토카인이고, 종양 성장을 강하게 억제한다. 재조합 사람 EMAP-II는 166개의 아미노산 잔기를 함유하는 18.3 kDa 단백질이다. EMAP-II는 또한 내피 혈관 침투성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

<183> PDGF

<184> 혈소판-유도 성장 인자(PDGF) 길항제는 통상의 고형 종양에서의 광범위 항-종양제의 치료 효과 및 약물 흡수를 증가시킬 수 있을 것으로 또한 제안되어 왔다. PDGF는 30kDA의 사이토카인이고 상처발생시 혈소판으로부터 방출되어 인접 세포의 성장을 자극하여 상처를 회복시킨다.

<185> PD-ECGF

<186> 이의 명칭이 암시하는 바와 같이, 혈소판-유도 내피세포 성장 인자(PD-ECGF)는 처음에 내피 세포에서 유사분열

을 유도하는 이의 능력에 근거하여 혈소판으로부터 분리되었다. 이와 관련된 단백질은 글리오스태틴이다.

<187> **항체**

<188> 본원에 사용된 바와 같이, '항체'는 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 실질적으로 엔코딩된 하나 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 의미한다. 항체는 온전한 면역글로불린으로서 또는 다수의 단편으로서 존재할 수 있는데, 이는 여러 가지 펩티다제에 의해 분해되어 생성된 잘-이해된(well-characterized) 단편을 포함한다. 여러 가지 항체 단편이 온전한 항체의 분해의 견지에서 정의되어 있고, 한편 당업자는 항체 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 이용함으로써 새롭게 합성될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서 상기 용어 항체는, 또한 본원에서 사용된 바와 같이 전체 항체의 변형에 의해 생성되거나 아니면 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새롭게 합성한 항체 단편을 포함한다. 용어 '항체'의 사용으로 포함되게 된 항체 단편은, 이에 제한되는 것은 아니지만, Fab, Fab', F (ab')2, scFv, Fv, dsFv diabody, 및 Fd 단편을 포함한다.

<189> 본 발명은 또한 표면 단백질에 대한 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 제공한다. 따라서 본 발명은 추가로 본 발명의 폴리펩티드에 대한 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 생산 방법을 제공한다.

<190> 폴리클로날 항체를 목적으로 할 경우, 선택된 포유동물(예를 들어, 마우스, 래빗, 염소, 말 등)을 에피토프 함유 면역원성 폴리펩티드로 면역화시킨다. 면역화된 동물로부터의 혈청을 수집하고 공지된 방법으로 처리한다. 에피토프에 대한 폴리클로날 항체를 함유하는 혈청이 다른 항원에 대한 항체를 함유한 경우, 폴리클로날 항체는 면역친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 폴리클로날 항혈청을 제조하고 처리하는 기술은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 항체를 제조할 수 있도록 하기 위해, 본 발명은 또한 동물 또는 사람에서 면역원으로 사용되는 또 다른 폴리펩티드로 합텐화된(haptenised) 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편을 제공한다.

<191> 폴리펩티드의 결합 세포 표면 에피토프에 대해 유도된 모노클로날 항체는 또한 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 하이브리도마에 의해 모노클로날 항체를 제조하는 일반적인 방법론은 익히 공지되어 있다. 불멸 항체-생성 세포주는 세포 융합에 의해, 그리고 또한 기타 기술, 예를 들어, 종양유전자 DNA로 B 림프구를 직접 형질전환하거나 엡슈타인-바르 바이러스로 형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 에피토프에 대해 생성된 모노클로날 항체의 패널이 여러 가지 특성(즉, 이소타입 및 에피토프 친화성)에 대해 스크리닝될 수 있다.

<192> 대체 기술로는 스크리닝 파지 디스플레이 라이브러리가 포함되는데, 여기서, 파지는 광범위한 상보성 결정 영역(CDR)과 함께 이들의 외피 표면상에서 scFV 단편을 발현시킨다. 이러한 기술은 당업계에 공지되어 있다.

<193> 본 발명의 목적을 위해, 용어 '항체'는, 달리 언급이 없는한, 표적 항원에 대한 이들의 결합 활성을 유지하는 전체 항체의 단편을 포함한다. 상기에서 언급한 바와 같이, 이러한 단편은 Fv, F (ab') 및 F $(ab')_2$ 단편뿐만 아니라 단일 사슬 항체(scFv)를 포함한다. 더욱이, 항체 및 이의 단편은 예를 들면, EP-A-239400에 기재된 바와 같이 인간화된 항체일 수 있다.

<194> **제제**

<195> 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제제"는 임의의 적합한 천연 또는 비천연 재료로부터 얻을 수 있거나 상기 재료에 이해 생산될 수 있는 예컨대, 검정 화합물(test compound)과 같은 화합물을 포함하나, 이에만 한정되는 것은 아니다. 상기 제제는 펩티드 뿐만 아니라, 예컨대 작은 유기 분자 및 특히 신규한 납 화합물과 같은, 기타 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리에서 디자인되거나 획득될 수 있다. 일예로서, 상기 제제는 천연 물질, 생물학적 거대분자, 또는 예컨대 박테리아, 곰팡이, 또는 동물(특히 포유류)의 세포 또는 조직에서 획득한 추출물, 유기 또는 무기 분자, 합성 검정 화합물, 반-합성 검정 화합물, 구조적 또는 기능적 모방체(mimetic), 펩티드, 펩디드모방체(peptidomimetic), 유도체화된 검정 화합물, 전체 단백질이 분해되어 생성된 펩티드, 또는 (일예로서, 예들 들면, 펩티드 합성장치를 사용하거나), 재조합 기술들을 이용하여 또는 이들의 조합에 의해 인공적으로 합성된 펩티드, 재조합 검정 화합물, 천연 또는 비-천연 검정 화합물, 융합 단백질 또는 이의 등가물 및 돌연변이체, 유도체 또는 이의 조합일 수 있다.

<196> 상기 제제는 아미노산 서열 또는 이의 화학적 유도체일 수 있다. 상기 물질은 심지어 유기 화합물 또는 기타 화합물일 수 있다. 상기 제제는 심지어 핵산 서열일 수 있다-상기 핵산 서열은 센스 서열 또는 안티-센스 서열일 수 있다.

<197> **약제학적 조성물**

<198> 본원발명은 또한 피검체를 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 치료학적으로 유효한 용량으로 본원발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 접합체 및 약물 조합을 포함한다.

<199> 이소DGR 모티프를 함유한 본원발명의 펩티드 또는 접합체를 포함하는 본원발명의 조성물은 실질적으로 다른 형태의 DGR을 함유하는 펩티드 또는 접합체를 포함하지 아니한다. 실질적으로 포함하지 않는다는 것은 상기 조성물내에 존재하는 DGR 함유 전체 펩티드 또는 접합체(즉, DGR의 모든 이성질체 형태를 함유한 펩티드 또는 접합체)와 대비하여 조성물내에 존재하는 이소DGR을 함유한 펩티드 또는 접합체(즉, 함유된 DGR 모티프가 모두 이소DGR 형태인 펩티드 또는 접합체)의 w/w% 가 50%, 보다 바람직하게는 55%, 보다 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 65%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 75%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99%를 초과한다는 것을 의미한다.

<200> $_{L}$이소DGR 모티프를 함유한 본원발명의 펩티드 또는 접합체를 포함하는 본원발명의 조성물은 실질적으로 다른 형태의 DGR을 함유하는 펩티드 또는 접합체를 포함하지 아니한다. 실질적으로 포함하지 않는다는 것은 상기 조성물내에 존재하는 DGR 함유 전체 펩티드 또는 접합체(즉, DGR의 모든 이성질체 형태를 함유한 펩티드 또는 접합체)와 대비하여 조성물내에 존재하는 $_{L}$이소DGR을 함유한 펩티드 또는 접합체(즉, 함유된 DGR 모티프가 모두 $_{L}$이소DGR 형태인 펩티드 또는 접합체)의 w/w% 가 50%, 보다 바람직하게는 55%, 보다 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 65%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 75%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99%를 초과한다는 것을 의미한다.

<201> $_{D}$DGR 모티프를 함유한 본원발명의 펩티드 또는 접합체를 포함하는 본원발명의 조성물은 실질적으로 다른 형태의 DGR을 함유하는 펩티드 또는 접합체를 포함하지 아니한다. 실질적으로 포함하지 않는다는 것은 상기 조성물내에 존재하는 DGR 함유 전체 펩티드 또는 접합체(즉, DGR의 모든 이성질체 형태를 함유한 펩티드 또는 접합체)와 대비하여 조성물내에 존재하는 $_{D}$DGR을 함유한 펩티드 또는 접합체(즉, 함유된 DGR 모티프가 모두 $_{D}$DGR 형태인 펩티드 또는 접합체)의 w/w% 가 50%, 보다 바람직하게는 55%, 보다 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 65%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 75%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99%를 초과한다는 것을 의미한다.

<202> 상기 약제학적 조성물은 인간 또는 동물용일 수 있다. 전형적으로, 내과의사가 개별 피검체에게 가장 적합한 실제 투여량을 결정할 것이고, 이는 나이, 몸무게 및 특정 피검체의 반응에 맞추어 달라지게 될 것이다.

<203> 조성물은 선택적으로 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 애주번트를 포함할 수 있다. 약제학적 담체, 부형제 또는 희석제는 요망하는 투여 경로 및 표준 약제 기준을 고려하여 취사선택할 수 있다. 약제학적 조성물은 (예를 들어, 지질 운반 시스템과 같은) 표적 부위로의 바이러스 진입을 보조하거나 증가시킬 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제, 임의의 적합한 결합제(binder)(들), 윤활제(들), 현탁제(들), 코팅제(들), 가용화제(solubilising agent)(들), 및 다른 담체-또는 이들 이외의 것-을 포함할 수 있다. 적합한 담체 및 희석제는 예를 들어 인산-완충 염수와 같은 등장 염수 용액을 포함한다. 부형제에 관한 더 상세한 내용은 약제학적 '부형제에 관한 핸드북(The Handbook of Pharmaceutical Excipients)' 제 2판에서 찾아 볼 수 있다(참조 : The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edn, Eds Wade & Weller, American Pharmaceutical Association).

<204> 약제학적 조성물은 흡입, 좌제 또는 페서리 형태, 로션, 용액, 크림, 연고 또는 살포 분말의 형태, 피부 패치, 전분 또는 유당과 같은 부형제를 포함하는 정제 형태, 또는 단독으로 또는 부형제와 함께 혼합되어 투여되는 캡슐 또는 난세포(ovules), 향미제 또는 착색제를 함유하는 용액 또는 현탁액 중 에서 선택되는 어느 하나 이상을 이용하여 적절한 부위에 투여될 수 있으며, 또한 상기 조성물은 비경구적으로 예를 들어, 해면체 주사, 정맥내 주사, 근육내주사 또는 피하주사로 주입될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 상기 조성물은 예들 들어, 혈액과 등장인 용액을 제조하기 위하여 기타 물질들(예들 들어, 충분한 염 또는 단당류)을 함유하는 정제 수용액의 형태로 사용되는 것이 가장 좋을 수 있다. 버칼 또는 설하 투여의 경우, 조성물은 통상적인 방식으로 제형화될 수 있는 정제 또는 마름모꼴제(lozenges) 형태로 투여될 수 있다.

<205> 경구 또는 비경구 투여를 위한 제형이 선호된다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사가능한 용액 또는 현탁액 및 흡입용 액체를 포함한다. 비경구 제형의 제조에 있어서, 유효량의 활성 성분은 살균된 담체 중에서 용해 또는

현탁될 것이고, 선택적으로 예컨대 가용화제(solubilizers), 등장제, 보존제, 안정화제, 유화제 또는 분산제와 같은 부형제가 부가되며, 연이어서 밀폐된 유리병 또는 앰플에 나뉘어 담기게 될 것이다.

<206> 조성물은 일단위, 주단위 또는 월단위 투여와 같이 요망되는 일일 복용량(dosage)으로 제공되도록 제형화될 수 있다. 조성물은 예컨대, 매 2, 2, 4, 6, 8, 10 또는 12 시간마다, 보다 적은 빈도로 투여되기 위하여 제형화될 수 있을 것으로 생각된다.

<207> 폴리펩티드 성분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드/벡터는 네이키드(naked) 핵산 컨스트럭트로서, 바람직하게는 숙주 세포의 게놈과 상동성이 있는 플랭킹 서열을 추가로 포함하여 직접적으로 투여될 수 있다.

<208> 포유류 세포에 의한 네이키드 핵산 컨스트럭트의 흡수는 예를 들어, 트랜스펙션 제제의 사용을 포함하는 그러한 것과 같은 몇몇 공지된 트랜스펙션 기술에 의해 강화된다. 이러한 트랜스펙션 제제의 일예로서 양이온 제제(예를 들어, 인산칼슘 및 DEAE-덱스트란) 및 리포펙틴트(lipofectants)(예를 들어, lipofectam™ 및 transfectam™). 전형적으로, 조성물 제조를 위해 핵산 컨스트럭트는 트랜스펙션 제제와 혼합된다.

<209> 바람직하게는 본원발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 약제학적 조성물을 제조하기 위해서 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합된다. 적합한 담체 및 희석제는 등장 염수, 예를 들어 인산-완충 염수를 포함한다. 상기 조성물은 비경구, 근육내, 정맥내, 피하조직내, 안구내 또는 경피 투여용으로 제형화될 수 있다.

<210> 상기한 투여 경로 및 복용 섭생은 단지 하나의 지침을 제공할 의도로 제시된 것이며, 통상의 기술자는 임의의 특정 환자 및 병태를 위한 최적의 투여 경로 및 복용 섭생을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

<211> 펩티드, 그리고 특히 그 중에서도, 리포좀 형태로의, 사이토카인의 제조가 이들의 생물학적 활성을 개선시킬 수 있다. 사실상, TNF 아미노 그룹의 아실화가 시험관내 조건에서 생물학적 활성의 손실 없이 이의 소수성의 증가를 유도할 수 있음이 관찰되어 왔다. 더욱이, 지질에 결합된 TNF가 시험관 조건에서 변함없는 세포독성, 면역조절 효과(immunomodulating effects) 및 생체내에서 감소된 독성을 갖는다는 사실이 보고되었다(Deb *et al.*, 1989, 1990).

<212> 바람직하게는 본원발명에 따른 DGR 모티프를 함유하는 펩티드 및 접합체를 포함하는 본원발명의 조성물은 실질적으로 상기 모티프에 상응하는 NGR 모티프를 함유하는 상기 펩티드 및 접합체에 상응하는 펩티드 및 접합체가 결여되어 있다. 바람직하게는 전체 펩티드(즉, DGR 및 NGR 함유 펩티드)와 대비하여 DGR 함유 펩티드의 비율이 60%, 보다 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 99% w/w 이상이다.

<213> **치료**

<214> 본원발명의 펩티드, 접합체 및 조성물은 치료학상의 치료에 사용될 수 있다.

<215> 본원에서 사용된 치료는 치유력이 있는, 경감시키는 그리고 예방적인 치료를 모두 포함하는 것임을 인식하여야 한다.

<216> 비록 본원발명에서 제시한 본원발명의 원리가 "환자"라는 용어에 포함되도록 의도한 모든 포유동물에게도 효과적이라는 것이 이해될 수 있을지라도, 본원의 많은 구체예에서 본원발명에서 치료한 환자는 바람직하게 인간 환자이다. 이러한 맥락에서, 포유동물은 혈관신생과 관련된 질병의 치료가 요망되는 임의의 포유류 종이며, 바람직하게는 농업상의 그리고 길들여진 포유류 종을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.

<217> 일 구체예에서, 펩티드, 접합체 또는 약제학적 조성물은 이에만 한정되지 아니하나, 폐암, 췌장암, 유방암, 대장암, 후두암 또는 난소암을 포함하는 암의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 암은 고형암을 포함한다.

<218> 또 다른 구체예에서, 펩티드 및/또는 접합체는 혈관신생 예컨대, $\alpha_v\beta_3$ 발현과 관련된 질병을 포함하는 질병의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

<219> 혈관신생은 조직에서 새로이 발달하는 혈관의 성장을 포함하는 조직 혈관화(tissue vascularization)의 한 과정이며, 또한 신-혈관화(neo-vascularization)로도 일컬어 지고 있다. 상기 과정은 내피 세포 및 연한 근육 세포의 침윤에 의해 매개된다. 상기 과정은 다음 세 가지 과정 중 어느 하나로 진행되는 것으로 믿어지고 있다: 혈관들이 이미-존재하던 혈관으로부터 발생하거나, 새로운 혈관 발달이 전구 세포로부터 일어날 수 있거나(혈관형성, vasculogenesis), 기존의 작은 혈관들의 직경이 확장될 수 있다(Blood*et al.*, 1990).

<220> 혈관신생이 중요한 것으로 믿어지는 다양한 질병들, 즉 신생혈관형성 질병으로 칭해지는 것들이 존재하며, 이러한 질병들로는 예컨대, 면역 및 비-면역 염증과 같은 염증성 질환, 관절염, 부적절 또는 부적당한 시기의 혈관 침입과 관련된 장애[예컨대, 당뇨병성 망막증, 시력감퇴, 신생혈관성 녹내장, 재협착, 죽상경화반(atherosclerotic plaque)에서의 모세혈관 증식 및 골다공증] 및 종양 성장을 유지하기 위해 신생혈관형성이 필요한 질병과 관련된 암[예컨대, 고형 종양, 고형 종양 전이, 맥관섬유종(angiofibromas), 수정체후부 섬유증식증(retrolental fibroplasia), 혈관종, 카포시 육종 등]이 포함되나, 이에만 한정되는 것은 아니다.

<221> 따라서, 질병에 걸린 조직에서의 혈관신생을 억제시키는 방법은 질병의 증상을 경감시키며, 질병에 따라서는, 질병의 완치에 기여할 수 있다.

<222> 또 다른 관련 구체예에서, 치료될 조직은 당뇨병성 망막증, 시력 감퇴 또는 신생혈관성 녹내장이 있는 환자의 망막 조직이며, 억제되는 혈관신생은 신생혈관화된 망막 조직이 있는 곳의 망막 조직 혈관신생이다.

<223> 추가 관련 구체예에서, 치료될 조직은 고형 종양, 전이, 피부암, 유방암, 혈관종 또는 맥관섬유종 및 유사한 암이 있는 환자의 종양 조직이며, 억제되는 혈관신생은 신생혈관화된 종양조직 있는 곳의 종양 조직 혈관신생이다. 본원발명의 방법에 의해 치료가능한 전형적인 고형 종양 조직은 폐, 췌장, 유방, 대장, 후두, 난소, 및 유사 조직을 포함한다. 대표적인 종양 조직 혈관신생, 및 이의 억제는 하기 실시예들에 기술되어 있다.

<224> 종양 조직 혈관신생의 억제는 신생혈관화가 종양 성장에 중요한 역할을 하기 때문에 특히 바람직한 구체예가 된다. 종양 조직의 신생혈관화가 없이는, 종양 조직은 필요한 영양분을 획득하지 못하며, 성장이 느려지고, 추가적인 성장이 중단되며, 퇴화되고, 궁극적으로는 괴사상태가 되어 결국 종양은 사멸하게 된다.

<225> 본원발명의 방법은 또한 전이암(metastases) 형성에 대응하여 특히 효과적이며, 이는 (1) 이들 전이암 형성이 초기 종양의 혈관화를 필요로 하여 전이성 암 세포가 초기 종양에 존재할 수 있으며, (2) 이차 부위에 정착한 전이암은 이의 성장을 유지하기 위하여 신생혈관화를 필요로 하기 때문이다.

<226> 관련 구체예에서, 본원발명은 고형 종양을 겨냥한 그리고 정착한 전이암의 조절을 위한 통상의 화학요법과 같은 기타 요법과 병합하여 상기 방법의 실시를 염두에 두고 있다. 종양 조직으로의 혈액 및 영양분의 공급에 의해 혈관신생의 회복이 유도되어 독성 공격에 대하여 대체하게 될 종양 조직에는 때때로 화학요법의 섭생 후 혈관신생을 억제시키는 것이 보다 바람직할지라도, 일반적으로 혈관신생 억제제의 투여는 화학요법 실시 중 또는 이후에 수행된다. 게다가, 고형 종양의 전이에 대응한 예방책으로서 이를 절제하는 외과수술 후에 혈관신생 억제 방법을 실시하는 것이 선호된다.

<227> 지금까지 본원발명의 방법이 종양 신생혈관화 억제와 관련하여 적용될 수 있음을 기술하여 왔으나, 상기 방법은 또한 종양 조직 성장의 억제, 종양 전이 형성의 억제 및 정착된 종양의 퇴화에도 적용될 수 있다.

<228> 재협착은 경피경혈관심장동맥확장술(percutaneous transluminal coronary angioplasty) 부위에서의 소근육세포(SMC) 이동 및 증식의 과정이며 이는 혈관형성술의 성공을 방해한다. 재협착에서의 상기 SMC들의 이동 및 증식은 본원발명의 방법에 의해 억제되는 혈관신생의 일 과정으로 고려될 수 있다. 그러므로, 본원발명은 또한 혈관형성 시술 이후 환자를 대상으로 본원발명에 따라 혈관신생을 억제함으로써 재협착을 억제하는 방법을 제공한다.

<229> 본원발명의 펩티드, 접합체 및 약제학적 조성물은 배합된, 개별의 또는 순차 복용하는 조제약으로, 또한 기타 진단용 또는 치료용 물질과 함께 사용될 수 있다.

<230> **TNF/IFN 병용(Combinations)**

<231> 본원발명의 또 다른 측면은 변형된 TNF, 및 IFNγ의 병용 사용과 관련되어 있다. 상기 병용은 조합된, 별개의 또는 순차복용하는 조제약에 사용될 수 있다. 유리하게도, 상기 결합체는 또한 암의 치료 또는 진단시, 예컨대 독소루비신 및 멜팔란과 같은, 기타 진단용 또는 치료용 물질과 함께 사용될 수 있다. 그리하여 본원발명은 변형된 TNF 및 IFNγ의 조합을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 선택적으로 또 다른 종양-진단용 또는 항-암 치료용 물질을 포함한다. 또 다시, 이러한 병용은 조합된, 별개의 또는 순차복용하는 조제약에 사용될 수 있다.

<232> 본 발명자들의 국제 공개 특허 WO 제03/093478호에서, 본원발명자들은 피코그램(picogram)의 1회복용분량 사이토카인의 표적화된 전달이 화학요법 약물의 투과성을 증진시킴을 입증하였으며, 이는 화학요법 약물의 치료 지수를 증가시키기 위한 신규하고 놀라운 전략을 제공한다. 국제 공개 특허 WO 제03/093478호는 전체 내용이 본

원발명의 참조로서 여기에 통합되어 있다. 보다 구체적으로, 본 발명자들은 종양 및 종양 맥관구조를 포함하는 종양-연관 환경으로의 매우 적은 복용분량의 사이토카인을 전달하는 것이 음성 피드백 기작을 회피하게 하며, 약물-투과 장벽을 변화시키는 이들 약물의 활성을 유지시킬 수 있는 신규한 접근책이 된다는 사실을 발견하였다.

<233> 본원발명의 이러한 측면에 따른 일 구체예에서, 본원발명의 접합체는 0.5 내지 500ng/kg, 바람직하게는 1 내지 50ng/kg, 보다 바람직하게는 5 내지 15ng/kg 범위 이내에서 선택되는 1회복용분량(dose)으로 투여될 수 있다.

<234> 본원발명의 이러한 측면의 대안적인 구체예에서, IFNγ와 배합된 본원발명의 접합체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공되며, 여기서 상기 접합체는 소정의 양으로, 예컨대 접합체 또는 이의 대사산물이 치료되어야 할 피검체의 혈장에 약 35,000ng/일(day), 바람직하게는 약 35,00ng/일, 보다 바람직하게는 약 1,000ng/일(day)를 초과하는 양으로 제공되는 그러한 양으로 존재한다.

<235> 상기 투약량은 70kg의 피검체를 위한 투약량이다. 통상의 기술자는 70kg 이상의 중량을 갖는 피검체를 위하여 위 상기에 열거된 투약량을 용이하게 변형할 수 있을 것이다.

<236> 상기한 투여 경로 및 투약량 섭생은 단지 하나의 지침을 제공할 의도로 제시된 것이며, 통상의 기술자는 임의의 특정 환자 및 병태를 위한 최적의 투여 경로 및 복용 섭생을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

실 시 예

<267> 하기 실시예는 본원발명을 더 상세히 설명한다.

<268> **실시예 1 - 실시예 1 내지 7의 실험재료 및 실험방법**

<269> **세포주 및 시약**

<270> 생쥐 RMA 림프종 세포 및 EA.hy926 세포(인간 폐암종 A549 세포와 융합된 인간 내피 세포)를 이전에 기술한 바와 동일하게 배양하였다(Curnis *et al.*, 200,; Ljunggren and Karre, 198,). 크리스탈 바이올렛(Fluka Chemie); 소혈청알부민(BSA), 염소 항-토끼 IgG 양고추냉이과산화효소 접합체, FN-70 KDa, FN- 4, BCDa 및 FN-30 KDa 단편(Sigma); 레트로넥틴(RetroNectin, Takara Biomedicals). 인간 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha_1\beta_1$ 인테그린(Immunological Sciences); 스트렙트아비딘-퍼옥시다제(Societa Prodotti Antibiotici).

<271> **재조합 FN-I_{4-5} 및 FN-I_{4-5}SGS의 제조 및 동정**

<272> 인간 피브로넥틴 4-5 번째 I형 반복체(FN-I_{4-5}; 피브로넥틴의 잔기 184-273)를 엔코딩하는 cDNA를 하기 프라이머를 사용하여 MSR-3-멜(mel) 세포 전체 RNA(Tanzarella *et al.*, 1999)에 대한 RT-PCR로 제조하였다: 5'-CTGGATCCGAGAAGTGTTTTGATCATGCTGCTGGG (정방향) 및 5'-TATATTAAGCTTTCAGTGCCTCTCACACTTCC (역방향). SGS(FN-I_{4-5}SGS)로 대체된 NGR을 가진 대조군 단편을 상기 정방향 프라이머 및 하기 역방향 프라이머를 사용하여 FN-I_{4-5} 플라스미드에 대한 PCR로 제조하였다:

<273> 5'-TATATTAAGCTTTCAGTGCCTCTCACACTTCCACTCTCCACTGCCGCTG. 증폭된 단편을 pRSET-A 플라스미드(Invitrogen)에 클로닝하였으며, BL21(DE3)pLysS 대장균 세포에서 가용성 단백질(N-말단에 His-태그를 가짐)로 발현시키고, 금속-킬레이트 친화성 크로마토그래피로 세포추출물로부터 정제하였다.

<274> **합성 펩티드의 제조 및 동정**

<275> 어플라이드 바이오시스템 모델 433A 펩티드 신테싸이저를 사용하여 화학적 합성에 의해 (비오티닐화된 및 비오티닐화되지 않은) 다양한 펩티드를 제조하였다. 명시한 경우를 제외하고 L-배열의 아미노산을 사용하였다. 부가적인 N-말단 아세틸-글리신 및 Asp^{250}을 대신하여 Glu^{250}을 가진 인간 피브로넥틴의 5번째 I형 반복체(FN-I_5), 노화 단백질의 잔기 230-274(접근 번호 P02751, Swiss-Prot)에 상응하는 합성 펩티드를 또한 합성하였다. FN-I_5의 Cys^{258}-Cys^{270} 와 Cys^{231}-Cys^{260} 사이에 이황화 결합 형성을 촉진하기 위해(도. 1 참조), Cys^{258} 및 Cys^{270} 를 S-트리틸 그룹으로 보호하였으며(겉-사슬의 탈보호 및 레진으로부터의 분리 후 트리플루오로아세트산에 의해 제거가능), 반면 Cys^{231} 및 Cys^{260} 을 S-아세트아미도메틸 그룹으로 보호하였다(요오드 처리에 의해 제거가능). 펩티드를 RP-HPLC로 정제한 후, pH 7의 8% DMSO 300㎖ 중에서 20μmoles의 펩티드를 인큐베이션하여 Cys^{258}-Cys^{270}

이황화 결합을 형성시켰다(실온, 밤새). 이후 펩티드를 RP-HPLC로 정제하고 동결건조하였다. 두번째 Cys^{231}-Cys^{260} 이황화 결합을 형성시키기 위해, 13.5μmoles의 펩티드를 80% v/v 아세트산 67 ㎖에 용해시키고, 1 N 염산 0.135 ㎖에 혼합하였다. 이후, 메탄올 2 ㎖ 중에 용해된, 21mg의 요오드를 상기 펩티드 용액에 첨가하고 스터링하였다. 90분후, 1밀리몰(mmole)의 아스코브산을 첨가하여, 요오드를 제거(quenching)하였다. 이후 상기 펩티드를 RP-HPLC로 정제하였다.

<276> 모든 펩티드를 정제수에 용해시키고 분할검액(aliquots)을 -20℃에서 저장하였다. 펩티드 정제를 RP-HPLC로 분석하였다. 엘만 시약(Pierce, Rockford, Illinois)을 이용한 적정에 의해 확인한 결과 모든 펩티드에서 유리 설프히드릴 그룹은 <0.1% 이었다. 펩티드 동일성을 MALDI-TOF 또는 ESI-MS 질량분광광도법으로 확인하였다. 본 실험 내내 사용된 펩티드의 분자량은 예상된 값과 일치하였다. FN-I_5의 ESI-MS 분석은 +144 Da의 부가 성분이 존재함을 보여주었으며, 이는 제거되지 않은 아세트아미도메틸 그룹을 가진 FN-I_5에 상응하는 것으로 분석되었다.

<277> **CNGRC-TNF, CDGRC-TNF 및 CNGRC-TNF_{1-11} 접합체의 제조 및 동정**

<278> 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 뮤린 TNF 및 CNGRC-TNF(CNGRCG의 C-말단에 융합된 뮤린 TNF로 구성됨)를 제조하였다(Curnis *et al.*, 2000). 하기 프라이머를 사용하여 CNGRC-TNF 플라스미드(Curnis *et al.*, 2000)에 대한 PCR에 의해 CDGRC-TNF(CNGRCG의 C-말단에 융합된 뮤린 TNF)를 엔코딩하는 cDNA를 제조하였다: 5'-CACCATGGGCAACGGCCGTGGCGGCGTC (정방향); 5'-TCAGGATCCTCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGAC (역방향). 증폭된 cDNA를 pET101/D-TOPO 플라스미드(Invitrogen)에 클로닝하고, BL21(DE3) 대장균 세포(Novagen)에서 발현시키고, 이전에 기술된 바와 본질적으로 동일하게 가용성 p75-TNF 수용체-세파로즈 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 추출물로부터 CNGRC-TNF를 정제하였다(Colombo *et al.*, 2002). CNGRC-TNF 및 CDGRC-TNF 둘 모두 이전에 기술된 바와 같이 리폴딩 절차를 거쳐야 했다(Curnis*et al.*, 2000).

<279> 단백질 순도 및 동일성을 SDS-PAGE, 전자분사 질량 분석법 및 겔-여과 크로마토크래피로 확인하였다. CNGRC-TNF 및 CDGRC-TNF의 생체외조건 생포용해 활성을 L-M 생쥐 섬유아세포를 이용한 표준 세포용해검정(Corti et al., 1994)으로 측정하였으며, 그 값은 각각 2.96(±0.56)x10^8U/mg 및 2.59(±0.69)x10^8 U/mg 이었다.

<280> NGR-TNF(TNF 활성 결핍) 및 CARAC-TNF_{1-11} 펩티드의 N-말단 서열에 상응하는, CNGRC-TNF1-11을 상기 기술된 바와 같이 화학적 합성으로 제조하였다.

<281> **피브로넥틴 단편 및 펩티드의 가속화된 노화(열 처리)**

<282> 피브로넥틴 단편, 펩티드 및 펩티드-TNF 접합체를 pH 8.5의 0.1 M 중탄산암모늄 완충액에 희석시키고, 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션하고, 분석시까지 -20℃에서 저장하였다. 이들 생성물은 이하 "열 처리된" 생성물로 칭해진다.

<283> **이소아스파르트(이소Asp) 정량**

<284> 비처리된 및 "열 처리된" CNGRC-TNF 및 펩티드의 이소Asp 함량을 ISOQUANT™ 이소아스파르트 검출 키트를 사용하여 정량하였다(Promega).

<285> **세포 부착 검정 및 PIMT 처리**

<286> 비처리된 및 "열 처리된" 피브로넥틴 단편, 펩티드 및 펩티드-TNF 접합체를 150 mM 염화나트륨, 50 mM 인산나트륨을 이용하여 요망되는 농도로 조성된 용액(pH 7.3)으로 희석하고, 96-웰 폴리비닐 클로라이드 마이크로티터판에 부가하였다(Falcon, Becton Dickinson). 4℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 상기 판을 세척하고, 0.1% BSA를 함유한 DMEM 중의 EA.hy926 세포(40000 cells/웰)를 파종하고 인큐베이션을 위해 5% CO_2에서 2-3시간 동안 37℃에 두었다. 부착된 세포들을 고정하고 기술한 바와 같이 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다(Curnis *et al.*, 200,).

<287> 상이한 단편들의 친-부착(pro-adhesive) 특성에 대한 단백질L-이소Asp/D-AspO-메틸트랜스퍼라제(PIMT) 효과를 하기와 같이 조사하였다: 마이크로티터 프파판을 상기 기술한 바와 같이 다양한 생성물로 코팅시키고 0.9% 염화나트륨으로 세척하였다. 이후 각각의 웰을 150mM 염화나트륨, 50mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8) 5㎕의 PIMT 용액(IsoQuant 이소아스파르트 검출 키트로부터 획득, Promega)(최종 부피 50㎕/웰)중에 0.02 mM S-아데노실-L-메

티오닌을 함유하는 45㎕의 용액으로 채우고 37℃ 에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 판을 0.9% 염화나트륨으로 세척하고 상기한 바대로 세포부착검정을 실시하였다.

<288> **인테그린에 대한 펩티드 및 단백질의 결합**

<289> Ca^{2+} 및 Mg^{2+}를 함유하며 인산으로 완충된 염수(DPBS, Cambrex) 중에 0.5-2㎍/㎖의 인간 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha_1\beta_1$ 인테그린 용액을 96-웰 폴리비닐클로라이드 마이크로티터 판에 첨가하고(50㎕/웰) 밤새 인큐베이션을 위해 4℃에 두었다. 연속된 모든 단계들을 실온에서 수행하였다. 상기 판을 DPBS으로 세척하고 3% BSA를 함유하는 DPBS(200㎕/웰, 1 h)을 처리하여 추가로 인큐베이션하였다. 그런 다음 상기 판을 세척하고 CNGRC-TNF 또는 TNF 용액(3% BSA-DPBS중의 5㎍/㎖, 50 ㎕/웰)으로 채우고 인큐베이션을 위해 2 시간 동안 두었다. DPBS로 세척한 다음, 각각의 웰을1% 일반 염소 혈청을 함유하는 3% BSA-DPBS 중의 정제된 토끼 항-뮤린 TNF IgG과 함께 인큐베이션하고(10㎍/㎖, 50㎕/웰, 1시간) 뒤이어 동일 완충액 중의 염소 항-토끼 퍼옥시다제 접합체와 함께 인큐베이션 하였다(50㎕/웰, 1시간). o-페닐렌디아민 발색 기질을 첨가하여 결합된 퍼옥시다제를 검출하였다.

<290> 정제된 인테그린에 대한 비오티닐화된 펩티드($CNGRC-TNF_{1-11}$, $CARAC-TNF_{1-11}$ 및 $FN-I_5$)의 결합을 스트렙트아비딘-퍼옥시다제 복합체를 사용하여 연구하였다. 복합체를 0.03 유닛의 스트렙트아비딘-퍼옥시다제(결합 용량: 비오틴 1㎍/스트렙트아비딘-퍼옥시다제의 유닛)과 함께 3% BSA를 함유한 DPBS 중에 열-처리된 비오티닐화된 펩티드를 다양한 량(0.5-1 ㎍)으로 혼합하여 제조하였다(최종 부피 15㎕). 복합체를 3% BSA-DPBS(1:500)중에서 희석하고, 상기한 바대로 인테그린으로 코팅된 마이크로티터판에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. DPBS로 세척한 후, 상기한 바와 같이 발색 반응으로 결합된 퍼옥시다제를 검출하였다. 각각의 검정을 3회 반복 수행하였다.

<291> **생체내 조건 연구**

<292> 동물 모델을 이용한 연구는 산라파엘 에이치 과학 연구소(SanRaffaele H Scientific Institute)의 윤리 위원회에 의해 승인되었으며 설명된 가이드라인에 따라 수행하였다. 계량한 무게가 16-18g인 C57BL/6 생쥐(Charles River Laboratories, Calco, Italy)를 왼쪽 옆구리의 피하 주사로 7×10^4 살아있는 RMA 세포를 주입하여 공격(challenge)하였다; 4일 후, 상기 생쥐를 매일 0.9% 염화나트륨 중의 200㎍의 열-처리된 $FN-I_5$(100㎕)으로 처리하였다(i.p.). 이전에 기술한 바와 같이 캘리퍼스를 이용하여 종양을 측정함으로써 종양 성장을 모니터링하였다(Gasparri *et al.*, 1999). 종양의 직경이 1.0-1.3cm에 도달하기 전에 동물을 절명시켰다. 종양 크기는 평균±SE(동물 5마리/그룹)로 제시된다.

<293> **실시예 2 - 피브로넥틴 단편의 가속화된 노화은 NGR-의존성 부착 부위를 생성시킨다.**

<294> **NGR-의존성 부착 부위를 생성시키는 피브로넥틴 단편의 가속화된 노화**

<295> NGR 모티프를 함유하는 천연, 재조합 및 합성 피브로넥틴 단편에 대한 EA.hy926 세포 부착을 연구하였다. 제일 처음, 하기 피브로넥틴의 가수분해 단편을 연구하였다: a) $FN-I_{1-9}$ 및 $FN-II_{1-2}$ 반복체를 포함하는, FN-70 KDa; b) $FN-I_{1-5}$ 반복체를 포함하는 FN-30 KDa; c) $FN-I_{6-9}$ 및 $FN-II_{1-2}$ 를 포함하는, FN-45 KDa(개략적인 설명을 위한 도. 1 참조). 마이크로티터판에 흡착 후, 모든 단편들은 세포 부착 및 퍼짐이 유도되었으며(도. 2), 이는 이들 지역에 친-부착 부위의 존재를 제시하는 것이다.

<296> $FN-I_5$ 반복체 내의 NGR 모티프의 역할을 조사하기 위해, 이후 본 발명자들은 $FN-I_5$, $FN-I_{4-5}$ 및 $FN-I_{4-5}SGS$ 단편의 친-부착 특성을 분석하였으며, 후자는 NGR(잔기 263-265)을 대신하여 SGS로 대체된 돌연변이에 상응하는 것이다. SGS 돌연변이는 그러하지 아니하였으나, 재조합 $FN-I_{4-5}$는 세포 부착을 촉진하였다(도. 3A). 본 발명자들이 0.1 M 중탄산 암모늄 완충액(pH 8.5) 중의 이들 단편을 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였을 때(이하 이러한 처리를 "열-처리"라고 칭함), 본 발명자들은 FN-I4-5에 대한 세포 부착의 증가를 관찰하였으나, $FN-I_{4-5}SGS$에 대해서는 그러하지 못하였다(도. 3A). 이러한 관찰은 다소 NGR 서열과 관련되어 있는, 세포부착부위가 가속화된 노화에 의해 생성되었음을 제시하는 것이다. 합성 $FN-I_5$ 의 경우에도 유사한 결과가 획득되었다(도. 3B).

<297> NGR 모티프가 이러한 현상을 매개하는 데 충분한 능력이 있는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 열-처리 전과 후의, 상기 NGR-모티프를 함유하는 짧은 길이 펩티드의 친-부착 특성을 조사하였다. NGR 트리펩티드가 폴

딩되지 않고 마이크로티터판에 결합하지 아니할 가능성이 있기 때문에, 본 발명자들은 2개의 플랭킹 시스테인을 도입하였다. 상기 플랭킹 시스테인을 사용하는 이론적 근거는 분자 다이나믹 시뮬레이션에 의한, CNGRC 펩티드의 예상된 형태가 FN-I_5 반복체의 GNGRG 루프의 형태와 유사하다는 데 근거하였다(Colombo *et al.*, 2002). 더욱이, 본 발명자들은 상기 펩티드를 TNF(CNGRC-TNF) 또는 TNF 첫번째 11개 잔기(TNF 활성이 없는, CNGRC-TNF_{1-11})에 융합시켜 마이크로티터판에 흡착될 수 있도록 하였다. 예상한 바대로, CNGRC-TNF에 대한 열처리는 세포부착을 증가시켰다(도. 3C). TNF 단독의 경우에는 열처리 전과 후 어느 경우에서나 부착을 관찰하지 못하였다(데이타 미제시). 유사하게, CNGRC-TNF_{1-11}에 대한 열처리는 세포부착을 증가시켰으나, CARAC-TNF_{1-11}(대조군 펩티드)의 경우에는 그렇지 못하였다(도. 3 C, 우측).

<298> 이러한 결과들은 NGR 모티프가 열처리 이후에 세포부착을 촉진시키는 충분한 능력을 보유할 것이라는 가정을 지지한다. 흥미롭게도, 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 CDGRC-TNF 접합체는 심지어 열처리 이후에도 완전히 불활성이었으며(도. 3D)(데이타 미제시), 이는 Asn이 활성 강화에 중요한 잔기임을 시사한다. 결론적으로, 이러한 결과들은 다소 FN-I_5내의 NGR 모티프 중의 Asn 잔기와 관련된 구조적 변화가 친-부착 부위의 생성을 유도한다는 것을 제시한다.

<299> **실시예 3 - 세포부착증가와 관련되어 있는 NGR의 탈아미노화**

<300> Asn 잔기, 특히 Gly가 뒤따르는 Asn 잔기가 생리학적 pH에서 비-효소적 탈아미노화를 겪게 된다는 것은 잘 알려져 있다(Robinson and Robinson, 2001; Robinson *et al.*, 2004; Stephenson and Clarke, 1989; Tyler-Cross and Schirch, 1991). 이러한 반응은 비록 L-배열이 우세하지만, Asp 또는 이소Asp, L-Asp($_L$D), L-이소Asp,($_L$이소D), D-Asp($_D$D), 및 D-이소Asp ($_D$이소D)의 형성을 유도한다(Geiger and Clarke, 1987). 따라서, 본 발명자들은 열처리후 FN-I_5, CNGRC-TNF 및 CNGRC 펩티드의 분자량이 약 1Da 증가됨을 질량 분석기 분석에 의해 발견하였다. 더욱이, CNGRC-TNF의 이소Asp 분석은 열처리 후, 이소Asp/CNGRC-TNF 유닛(mole)이 >0.5 피코몰(pmoles)로 존재함을 보여주었다.

<301> FN-I_5의 증진된 부착 특성이 열처리 후 NGR 탈아미노화에 의존하지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 단백질L-이소Asp/D-AspO-메틸트랜스퍼라제(PIMT)와 함께 "열-처리된" FN-I_5 및 CNGRC-TNF를 인큐베이션하였으며, 상기 PIMT는 L-이소Asp 및 D-Asp 잔기를 L-Asp로 전환시키는 효소이다(Aswad, 1984; Galletti *et al.*, 1988; Lowenson and Clarke, 1992; McFadden and Clarke, 1987; Murray and Clarke, 1984). PIMT는 거의 완전히 열-처리된 FN-I_5 및 CNGRC-TNF의 친-부착 활성을 억제하였다(도. 4A). 더 나아가, 이러한 효소 처리는 부분적으로 천연 FN-30 KDa(도. 4B) 및 FN-45 KDa 단편(데이타 미제시)의 친-부착 활성을 억제하였으며, 이는 Asn 탈아미노화가 또한 천연 피브로넥틴 단편에서도 발생할 수 있음을 시사하는 것이다. 이 반응의 특이성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 또한 레트로넥틴에 대한 PIMT의 효과를 평가하였으며, FN 단편은 RGD를 통해 세포부착을 촉진하는 것으로 알려져 있다(도. 1 참조). 예상한 바대로, 상기 경우에 있어서 효소 처리후 억제가 관찰되지 아니하였다(도. 4B). 반대로, 상기 경우에 있어서 본 발명자들은 적절하지만 상당한 증가가 있음을 관찰하였다. 또한 RGD가 이소Asp의 형성 및 기능 상실을 수반하는, Asp 잔기의 이성질체화를 겪을 수 있기 때문에, 이는 완전히 예상외의 결과였다(Geiger and Clarke, 1987; Lanthier and Desrosiers, 2004; Reissner and Aswad, 2003; Stephenson and Clarke, 1989). 따라서, 상기한 경우에 있어서 PIMT가 RGD를 "수선"하고 세포부착을 증가시키는 것으로 예상된다. 결론적으로, 이러한 결과들은 RGD 이성질화와는 대조적으로, NGR 탈아미노화가 세포부착검정에서 "기능획득"과 연관되어 있다는 것을 시사한다.

<302> **실시예 4 - NGR 탈아미노화의 키네틱스**

<303> 이후 pH 7.3(DMEM) 및 pH 8.5(중탄산 암모늄)에서의 NGR 안정성 및 형성된 $_L$이소DGR 또는 $_D$DGR의 키네틱스를 조사하였다. 상기 목적을 위해, CNGRCGVRY 펩티드 (NGR-펩으로 약칭)를 합성하였으며 37℃에서 인큐베이션하기 전과 후에 역-상 HPLC로 분석하였다. 컬럼 흡착이 가능하도록 하기 위해 GVRY 잔기를 CNGRC의 C-말단에 부가하였다. 게다가 DGR-펩, $_D$DGR-펩, 이소DGR-펩, $_D$-이소DGR 및 SGR-펩으로 칭해지는 5개의 펩티드를 제조하였으며, 이들 각각은 N 대신에 D, $_D$-D, $_L$-이소D, $_D$-이소D 및 S가 각각 존재하는 것을 제외하고 동일한 서열의 NGR-펩에 상응한다. 주 크로마토그래피흡착 피크(피크 1)의 높이로부터 pH 7.3 및 8.5에서의 NGR-펩의 반감기를 측정하였으며, 각각 약 4시간 및 2시간으로 계산되었다(도. 5A, 인세트). 탈아미노화 생성물에 상응하는 펩티드들은

이러한 조건에서 안정하였다(도. 5B).

<304> 피크를 식별하고 측정된 반감기가 Asn 탈아미노화에 기인하는 것이고, 다른 구조적 변화 때문이 아님을 입증하기 위해, 본 발명자들은 열-처리된 NGR-펩 펩티드를 분석하였으며, 상기 펩티드는 새로운 NGR-펩, 또는 DGR-펩 또는 이소DGR-펩 펩티드로 스파이킹되었다. 그 결과 NGR-펩 인큐베이션 후 관찰된 피크 1, 2 및 3들은 각각 NGR-펩, DGR-펩 및 이소DGR-펩 펩티드에 대응하는 것으로 드러났다. 주목할 사항은 상기 NGR-펩을 물에 저장하였을 경우 이의 안정성이 37℃에서 일 주일 이상 유지되었다는 사실이다.

<305> **실시예 5 - $_D$이소DGR 및 $_D$DGR 모티프의 수용체인 $\alpha_v\beta_3$**

<306> 이후 정제된 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 및 $\alpha_1\beta_1$ 에 대한 열-처리된 FN-I_5, CNGRC-TNF 및 짧은 길이 펩티드의 결합을 마이크로티터판 상에 흡착된 인테그린고의 직접적 ELISA 및 경쟁적 ELISA를 통해 조사하였다.

<307> 본 발명자들은 모든 (열-처리된) NGR-함유 분자들의 다른 인테그린에 대한 결합을 관찰하고자 하였으나, 거의, 또는 조금도 결합하지 아니하였다(도. 6A 및 B). 열-처리된 TNF 또는 대조군 CARAC-TNF_{1-11} 펩티드의 경우에도 결합은 관찰되지 아니하였으며(도. 6A 및 B), 이는 NGR이 중요함을 시사하였다. 주목할 사항으로써, 본 발명자들은 비록 그 정도는 낮지만 열 처리 전에도 CNGRC-TNF가 $\alpha_v\beta_3$ 에 대하여 결합함을 관찰하였으며(데이타 미제시), 이는 아마도 제조 및/또는 검정 인큐베이션 과정 중간의 탈아미노화 때문인 것으로 추정된다.

<308> 인테그린 결합에 있어서 FN-I_5 의 NGR 루프의 중요성을 입증하기 위해, 본 발명자들은 재조합 FN-I_{4-5} 및 FN-I_{4-5}SGS를 이용한 경쟁적 결합 실험을 실행하였으며, 후자는 NGR이 결여되어 있다. 예상한 바와 같이, 단지 NGR을 가진 단편만이 $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 FN-I5의 결합과 경쟁할 수 있었다(도. 6C). 결합 경쟁은 또한 FN-I5의 전체 256-271 루프에 상응하는 펩티드의 경우에서도 관찰되었으나(도. 1C 참조), GNGRG 부위의 서열이 뒤섞인 대조군 펩티드의 경우에는 그러하지 아니하였다(도. 6 C).

<309> 따라서 이러한 결합은 효율적으로 $_D$DGR-펩 및 이소DGR-펩(EC_{50}, 0.1μM) 및 열-처리된 FN-I5(EC_{50}, 0.4μM)과 경쟁하였고 $_D$이소DGR-펩 또는 DGR-펩, NGR-펩, SGR-펩(EC_{50}, >10μM)과는 좀더 덜 효율적으로 경쟁하였다(도. 7).

<310> 이소DGR-펩 또는 DDGR-펩 펩티드가 이러한 검정 조건에서 안정하다는 사실을 고려할 때, 이러한 결과들은 이소DGR-펩 또는 $_D$DGR-펩이 $\alpha_v\beta_3$의 새로운 리간드로 고려될 수 있는 동기를 제시한다.

<311> **실시예 6 - FN-I_5 내의 인테그린 결합 부위 형성의 키네틱스**

<312> FN-I_5 내의 인테그린 결합 부위 형성의 키네틱스를 조사하기 위해, 본 발명자들은 DMEM 중에서 37℃에서 상이한 시간 동안 인큐베이션한 다양한 투여량의 FN-I_5로 추가의 경쟁적 결합 연구을 수행하였다. 흥미롭게도, 본 발명자들이 인큐베이션 시간 대 억제 농도(IC_{50})를 플로팅하였을 때, 본 발명자들은 최대 경쟁적 결합 활성이 24 내지 48 시간의 인큐베이션 후 도달됨을 관찰하였다(반감기 3.4 시간)(도. 7B). 이러한 수치는 상기 기술한 탈아미노화된 NGR-펩의 반감기와 매우 잘 일치되며, 더 나아가 열처리된 FN-I_5의 인테그린 결합 특성이 실제로 NGR-탈아미노화와 연관이 있다는 개념을 지지한다.

<313> **실시예 7 - 탈아미노화된 FN-I_5 단편의 생체외 조건에서의 비트로넥틴에 대한 세포부착 억제 및 생쥐 모델에서의 종양성장 억제**

<314> 비트로넥틴 수용체인 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린이 혈관신생에 있어서 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다(Hynes, 2002). ECM 단백질과 이러한 인테그린의 반응을 억제할 수 있는 화합물들이 혈관신생 및종양 성장을억제하는 것으로 알려져 있(Brooks *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 199,; Friedlander *et al.*, 199,; Friedlander *et al.*, 1996; Hammes *et al.*, 1996). 본 발명자들은 탈아미노화된 FN-I_5 단편들이 비트로넥틴에 대한 EA.hy926 세포들의 부착을 억제할 수 있음을 발견하였다(도. 8A). 더욱이, 이러한 단편을, RMA 림프종 유발 생쥐에 일단위로 투여하였을 때, 생체내 조건에서 종양 성장이 상당히 억제되었다(도. 8B). 이러한 결과들은 FN의 탈아미노화된 단편이 세포부착 및 종양 생활사에 있어서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

<315> **실시예 8 - NGR-TNF의 탈아미노화된 형태의 분리**

<316> 뮤린 Cys-Asp-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF(DGR-TNF) 및 Cys-이소Asp- Gly-Arg-Cys-Gly-TNF(이소DGR-TNF)를 제조하기 위해, 본 발명자들은 클로닝하였으며, 대장균 세포에서 Cys-Asn-Gly-Arg- Cys-Gly-TNF (NGR-TNF)를 발현시키고, 발현된 생성물로부터 탈아미노화된 형태(발현 과정 동안에 자발적으로 생성되었음)를 정제하였다.

<317> 제일 처음 대장균 세포를 이용하여 재조합 DNA 기술에 의해 NGR-TNF(CNGRCG의 C-말단에 융합된 TNF로 구성됨)를 엔코딩하는 cDNA를 제조하였으며, 기술된 바대로 정제하였다(Curnis *et al*., 2000). 상기 제조물에서 탈아미노화된 형태를 분리하기 위해 본 발명자들은 C-4 컬럼(Hi-pore Reversed Phase column, 250 x 4.6㎜, Biorad) 상에서 역상 크로마토그래피(RP-HPLC)에 근거하여 하기와 같이 추가 정제 단계를 진행하였다: 이동상 A; 물 중에 5%의 아세토니트릴을 포함하는 5mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8); 이동상 B, 물 중에 70&의 아세토니트릴을 포함하는 5mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8); 10분간 0% B, 5분간 30% B, 35분 이내의 직선형 농도구배 30-65% B 10분간 100% B, 10분간 0% B, 유속 2㎖/분(min). 214nm 및 280nm에서 용출액을 모니터링하였다(HPLC, LC-126 nM, Beckman Coulter). NGR-TNF의 RP-HPLC은 F2 및 F4로 지칭되는 2개의 메이저 피크와 F1 및 F3로 지칭되는 2개의 마이너 피크를 나타내었다(도. 9). 이들 피크들에서 탈아미노화된 형태의 존재는 이들 분획내의 이소Asp의 양을 측정함으로써 확인되었다. 그 결과 F2가 F4보가 훨씬 더 많은 이소Asp를 함유하는 것으로 나타났다(표 1).

<318> RP-HPLC에 의한 F2 및 F4의 재-크로마토그래피는 머무름 시간이 분리 후에 변화되지 않음을 보여주었으며, 이는 이들 생성물이 안정하다는 것을 의미하는 것이다. TNF 단량체에서 예상한 바대로, 비-환원 SDS-PAGE의 쿠마시 염색으로 F2 및 F4 생성물 둘 모두에서 17-18 kDa의 주 밴드를 확인하였다(도. 10, 인세트)

<319> F2 및 F4의 생화학 및 생물학적 특성을 추가로 분석하였다(표 1). 전자분사 질량 분광광도법 분석은 F2의 분자량이 F4의 분자량보다 1 Da 더 크다는 것을 보여주었다. 더 나아가, L-M 세포에 대한 F2 및 F4의 세포용해 활성은 유사하였다. 이소Asp 함량에 대한 데이터와 함께, 이러한 결과는 F2가 GR-TNF의 탈아미노화된 형태에 상응하는 것임을 제시한다.

<320> 탈아미노화가 CNGRC 도메인의 N-말단에서 발생하였는지를 평가하기 위해 본 발명자들은 에드만 분해 방법에 의해 N-말단의 서열 분석을 실행하였다(데이타 미제시). 그 결과 Asn^2를 대신하여 Asp^2가 검출되었기 때문에, 상기 탈아미노화가 N-말단에서 일어났음을 확증하였다. 이 데이터 및 상기 데이터는 F2가 2번 위치에 이소아스파티딜 및 아스파티딜 잔기를 가진, 이소DGR-TNF(75%) 및 DGR-TNF의 혼합물임을 제시한다.

<321> RMA 임프종 모델을 이용하여 이후 F2의 생체내 조건 항-종양 특성을 조사하였다. 동물 모델을 이용한 연구는 산라파엘 에이치 과학 연구소(SanRaffaele H Scientific Institute)의 윤리 위원회에 의해 승인되었으며 설명된 가이드라인에 따라 수행하였다. 계량한 무게가 16-18g인 C57BL/6 생쥐(Charles River Laboratories, Calco, Italy)를 왼쪽 옆구리의 피하 주사로 7 x 10^4 살아있는 RMA 세포를 주입하여 공격(challenge)하였다; 10일 후, 생쥐를 0, 25 또는 100pg의 F2(100㎕)으로 처치하고 난 다음, 2시간 후에 멜팔란(100㎕ 중의 50㎍)(Glaxo Wellcome Operations, Dartford, Great Britain)을 투여하였다. 엔도톡신이 존재하지 않는 100㎍/㎖의 인간 혈청 알부민(Farma-Biagini SpA, Lucca, Italy)을 포함하는 0.9% 염화나트륨에 희석시킨, 모든 약물을 복막 안쪽에 투여하였다. 이전에 기술한 바대로 캘리퍼스를 이용하여 종양을 계측함으로써 종양 성장을 모니터링하였다(34). 종양의 직경이 1.0-1.3㎝에 도달하기 전에 동물을 절명시켰다. 종양 크기는 평균±SE로 제시되어 있다(동물 5 마리/그룹).

<322> 그 결과 멜팔란과 함께 병용 투여될 때, 매우 적은 1회 투여량(25pg)의 F2가 항-종양 효과를 유발할 수 있음을 확인하였다(도. 11).

<323> **실시예 9 - 0.1 M 중탄산암모늄 완충액과 함께 NGR-TNF 처리에 의한 이소DGR-TNF/DGR-TNF의 제조**

<324> 완충액 조성, 이온 강도, pH 및 온도가 Asn 잔기의 탈아미노화/이성질화를 증가시킬 수 있다. 따라서, F2(iDGR-TNF/DGR-TNF)를 신속하게 제조할 수 있는 방법을 개발하기 위해, 본 발명자들은 0.1M 중탄산암모늄 완충액(pH 8.5) 중에서 NGR-TNF를 희석시키고 다양한 시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 열처리된 NGR-TNF를 RP-HPLC로 분석하였다. 도 12는 열처리 후에 F4가 빠르게 F2로 전환되었음을 보여준다. 놀랍게도, 4시간 처리 후에 세포용해 활성은 전혀 손실되지 ㅇ아니하였으며, 이는 상기 공정이 이소DGR-TNF/DGR-TNF를 생산하는데 이바지할 수 있음을 시사한다.

<325> **실시예 10 - 재조합 DNA 기술에 의한 DGR-TNF의 제조**

<326> The coding for DGR-TNF(CDGRCG의 C-말단에 융합된 생쥐 TNF)를 엔코딩하는 cDNA를 하기 프라이머를 사용하여

NGR-TNF 플라스미드에 대한 PCR에 의해 획득하였다: 5' CACCATGTGCGACGGCCGTTGCGGC 3' (5' 프라이머); 5' CTGGATCCTCACAGAGCAATGATCCCAAAG '3 (3' 프라이머). 프라이머 둘 모두가 pET101/D-TOPO 플라스미드 발현 키트(Invitrogen)로의 방향유지 클로닝(directional cloning)이 가능하도록 디자인되었다. 5' 프라이머에서 밑줄이 그어진 서열은 방향유지 클로닝이 가능하도록 하는 서열 및 번역 개시 코돈을 포함하며, 반면 3' 프라이머는 정지 코돈을 포함한다(밑줄). PCR 반응 및 클로닝 절차는 제조업자의 지침에 의해 권장된 방식대로 수행되었다. DGR-TNF cDNA를 BL21(DE3) 대장균 세포(Novagen)에서 발현시키고, 하기 절차에 따라 가용성 p75-TNF 수용체-세파로즈를 이용하여 친화성 크로마토그래피로 세포 추출물로부터 정제하였다: 제조업자의 지침을 준수하여 10mg의 상업적으로 구입가능한 재조합 p75-TNF 수용체(Embrel)를 2.5mℓ의 활성화-CH-세파로즈(Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany)에 커플링시켰다. 컬럼을 pH 8.0를 포함하는 100mM 트리스-HCl 완충액으로 전체적으로 세척하고, DGR-TNF 조 추출물을 로딩하고, 2 mM EDTA(pH 8.0)을 포함하는 20mM 트리스-HCl 완충액으로 희석시키고, 7 M 우레아, 100mM 트리스-HCl(pH 8.0)으로 용출시켜 흡착된 물질을 용리시켰다. 이후 DGR-TNF를 기술한 바대로 리폴딩시켰다(1). 간단히 요약하여, 변성시킨(Denatured) 생성물을 2.33M 우레아, 100mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 투석시키고(4℃, 140분), 이어서 차례로 1.55M 우레아, 100 mM 트리스-HCl(pH 8.0)(140분), 및 1M 우레아, 100mM 트리스-HCl(pH 8)(140분)로 투석시켰다. 최종적으로 생성물을 100mM 트리스-HCl(pH 8.0)로 투석시켰다(48시간). 생성물을 13000 x g로 원심분리하고(10분, 4℃) 10 KDa 컷-오프 필터를 이용한 초-원심분리로 농축하였다. 정제 및 리폴딩 단계에서 사용된 모든 용액을 무균이며 엔도톡신이 존재하지 않는 물로 제조하였다(S.A.L.F. Laboratorio Farmacologico SpA, Bergamo, Italy). 단백질 농도를 BCA 단백질 검정 시약을 사용하여 측정하였다(Pierce, Rockford, Illinois). 단백질 순도 및 동일성을 SDS-PAGE, 전자분사 질량 분광광도법(ESI-MS) 및 분석용 겔-여과 크로마토그래피들 이용하여 확인하였다. 그 결과 생성물의 동일성을 확증하였다(데이타 미제시). 생체내 조건에서의 DGR-TNF의 세포용해 활성(2.5 x 108 U/mg)을 L-M 생쥐 섬유아세포를 이용한 표준 세포용해 검정을 통해 측정하였다.

<327> DGR-TNF의 RP-HPLC는 이의 머무름 시간이 NGR-TNF로부터 획득한 F2의 그것과 유사하다는 것을 보여주었다(도. 13).

표 1

F2 및 F4의 분자량, 세포용해활성 및 이소Asp 함량

샘플	분자량(Da)[a]	세포용해활성 (U/㎎)[b]	이소Asp (%)[c]
NGR-TNF	-	2.9×10^8	29.8
F2	17844.5	$(3.5 \pm 0.6) \times 10^8$	75
F4	17843.5	$(2.9 \pm 0.7) \times 10^8$	14
TNF	-	8×10^8	2.6

<328>

<329> a)는 전자분사 질량-분광광도법에 의한 것이고,

<330> b)는 L-M 뮤린 섬유아세포를 이용한 세포용해 검정에 의한 것이고,

<331> c)는 이소아스파티딜 잔기를 효소검정으로 정량한 결과이며(ISOQUANT, 단백질 탈아미노화 검출 키트, Promega), 이소Asp(pmol)/펩티드(pmol)(%)로 표현하였다.

<332> 본 명세서에 언급된 모든 문헌들은 본원의 참조 문헌으로서 여기에 통합된다. 본원 발명의 기술된 방법 및 시스템의 여러 가지 변형 및 수정이 본 발명의 영역 및 사상을 벗어남이 없이 이루어질 수 있다는 것은 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본원 발명을 구체적인 바람직한 구체예와 관련시켜 기술하였지만, 청구된 발명이 이러한 구체적인 실시예로 부당하게 제한되어서는 안된다는 것을 이해하여야 할 것이다. 실제로, 생화학 및 분자

생물학 또는 관련 분야의 숙련가에게 명백한 본원발명을 실시하기 위한 기술된 방법의 여러 가지 변형들은 하기 특허청구범위의 청구항에 기술된 발명의 범주내에서 이루어지도록 의도되어 있다.

<333> **참고문헌**

<334> Aswad, D. W. (1984). Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. J Biol Chem 259, 10714-10721.

<335> Blood et al., (1990) Bioch. Biophys. Acta, 1032:89-118.

<336> Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. Annu. Rev. Immunol. 15:749-795

<337> Borgia and Fields, (2000) TibTech 18: 243-251

<338> Brooks, P. C, Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh, D. A. (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 79, 1157-1164.

<339> Brooks, P. C, Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., and Cheresh, D. A. (1995). Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. J Clin Invest 96, 1815-1822.

<340> Busk, M., Pytela, R., and Sheppard, D. (1992). Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein. J Biol Chem 267, 5790-5796.

<341> Carswell, E. A., et al., (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:3666-70.

<342> Colombo, G., Curnis, F., De Mori, G. M., Gasparri, A., Longoni, C, Sacchi, A., Longhi, R., and Corti, A. (2002). Structure-activity relationships of linear and cyclic peptides containing the NGR tumor-homing motif. Journal of Biological Chemistry 277, 47891-47897.

<343> Colombo, P., et al., (1993) Immunoscintigraphy with anti-chromogranin A antibodies in patients with endocrine/neuroendocrine tumors. J. Endocr. Invest. 16:841-3.

<344> Corti, A., Poiesi, C, Merli, S., and Cassani, G. (1994). Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. Journal of Immunological Methods 777, 191-198.

<345> Corti, A., et al., (1998) Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: Structure activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. Cancer Res. 58:3866-3872.

<346> Curnis, F., Gasparri, A., Sacchi, A., Cattaneo, A., Magni, F., and Corti, A. (2005). Targeted delivery of IFNgamma to tumor vessels uncouples antitumor from counterregulatory mechanisms. Cancer Res 65, 2906-2913.

<347> Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A., and Corti, A. (2000). Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD 13). Nature Biotechnology 18, 1185- 1190.

<348> Debs, R. J., et al., (1989) Liposome-associated tumor necrosis factor retains bioactivity in the presence of neutralizing anti-tumor necrosis factor antibodies. J. Immunol. 143:1192-7.

<349> Debs, R. J., et al., Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome- encapsulated tumor necrosis factor alpha in rats. Cancer Res. 1990. 50:375-80.

<350> Dedhar, S., and Gray, V. (1990). Isolation of a novel integrin receptor mediating Arg- Gly-Asp-directed cell adhesion to fibronectin and type I collagen from human neuroblastoma cells. Association

of a novel beta 1 -related subunit with alpha v. J Cell Biol 110, 2185-2193.

<351> Devos et al., (1982) Nucleic Acids Res. 10:2487-2501.

<352> Di Matteo, P., Curnis, F., Longhi, R., Colombo, G., Sacchi, A., Crippa, L., Protti, M. P., Ponzoni, M., Toma, S., and A., C. Immunogenic and structural properties of the Asn-Gly-Arg (NGR) tumor neovasculature-homing motif. Molecular Immunology (in press).

<353> Ealick et al., (1991) Science 252:698-702.

<354> Eggermont, A. M., et al., (1996) Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. Ann. Surg. 224:756-65.

<355> Farrar, M. A., and R.D. Schreiber. (1993). The molecular cell biology of interferon- gamma and its receptor. Annu. Rev. Immunol. 11:571-611;

<356> Fraker, D.L., Alexander, H.R. & Pass, H.I., (1995). Biologic therapy with TNF: systemic administration and isolation-perfusion. In Biologic therapy of cancer: principles and practice, De Vita, V., Hellman, S. & Rosenberg, S. (eds) pp. 329- 345. J.B. Lippincott Company: Philadelphia.

<357> Fiers, W. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. In V. De Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg Eds. Biologic therapy of cancer: principles and practice. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995. P. 295-327.

<358> Friedlander, M., Brooks, P. C, Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., and Cheresh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrals. Science 270, 1500-1502.

<359> Friedlander, M., Theesfeld, C. L., Sugita, M., Fruttiger, M., Thomas, M. A., Chang, S., and Cheresh, D. A. (1996). Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9764-9769.

<360> Galletti, P., Ingrosso, D., Manna, C, Sica, F., Capasso, S., Pucci, P., and Marino, G. (1988). Enzymatic methyl esterification of synthetic tripeptides: structural requirements of the peptide substrate. Detection of the reaction products by fast-atom- bombardment mass spectrometry. Eur J Biochem 177, 233-239.

<361> Gardner, J. M., and Hynes, R. O. (1985). Interaction of fibronectin with its receptor on platelets. Cell 42, 439-448.

<362> Gasparri, A., Moro, M., Curnis, F., Sacchi, A., Pagano, S., Veglia, F., Casorati, G., Siccardi, A. G., Dellabona, P., and Corti, A. (1999). Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. Cancer Research 59, 2917-2923.

<363> Gately et al. (1998) Ann. Rev. Immunol. 16:495-521

<364> Geiger, T., and Clarke, S. (1987). Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J Biol Chem 262, 785-794.

<365> Gray et al. Nature 298:859-863, 1982

<366> Hammes, H. P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A., and Preissner, K. T. (1996). Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. Nat Med 2, 529-533.

<367> Helson, L., et al., Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature 1975. 258:731-732.

<368> Hill, S., et al., Low-dose tumour necrosis factor alpha and melphalan in hyperthermic isolated limb perfusion. Br. J. Sugr. 1993. 80:995-7.

<369> Hocking, D. C, Sottile, J., and McKeown-Longo, P. J. (1998). Activation of distinct alpha5beta1 -mediated signaling pathways by f?bronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. J Cell Biol 141, 241-253.

<370> Humphries, M. J., Obara, M., Olden, K.5 and Yamada, K. M. (1989). Role of fibronectin in adhesion, migration, and metastasis. Cancer Invest 7, 373-393.

<371> Hynes, R. O. (2002). A revaluation of integrins as regulators of angiogenesis. Nat Med 5, 918-921.

<372> Johansson, S., Svineng, G., Wennerberg, K., Armulik, A., and Lohikangas, L. (1997). Fibronectin-integrin interactions. Front Biosci 2, d 126- 146.

<373> Kobayashi, et al. (1989) J: Exp Med. 170:827-845

<374> Koivunen, E., Gay, D. A., and Ruoslahti, E. (1993). Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. Journal of Biological Chemistry 268, 20205-20210.

<375> Lanthier, J., and Desrosiers, R. R. (2004). Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration. Exp Cell Res 293, 96-105.

<376> Lienard, D., et al., In transit metastases of malignant melanoma treated by high dose rTNF alpha in combination with interferon-gamma and melphalan in isolation perfusion. World Journal of Surgery 1992. 16:234-40.

<377> Ling, et al (1995) J. Exp Med. 154:116-127.

<378> Ljunggren, H. G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. Journal of Experimental Medicine 162, 1745-1759.

<379> Loetscher, H., et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75kDa TNF receptors. J. Biol. Chem. 1993. 268:26350-7.

<380> Lowenson, J. D., and Clarke, S. (1992). Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. J Biol Chem 267, 5985-5995.

<381> McFadden, P. N., and Clarke, S. (1987). Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins. Proc Natl Acad Sci U S A W, 2595-2599.

<382> Modorati, G., et al., Immunoscintigraphy with three step monoclonal pretargeting technique in diagnosis of uveal melanoma: preliminary results. Br. J. Ophtalm. 1994. 78:19-23.

<383> Mohri, H. (1997). Interaction of f?bronectin with integrin receptors: evidence by use of synthetic peptides. Peptides 18, 899-907.

<384> Moro, M., et al., Tumor cell targeting with antibody-avidin complexes and biotinylated tumor necrosis factor alpha. Cancer Res. 1997. 57:1922-8.

<385> Moyano, J. V., Carnemolla, B., Dominguez- Jimenez, C, Garcia-Gila, M., Albar, J. P., Sanchez-Aparicio, P., Leprini, A., Querze, G., Zardi, L., and Garcia-Pardo, A. (1997). Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated alpha4betal and alpha4beta7 integrins. J Biol Chem 272, 24832-24836.

<386> Murray, E. D., Jr., and Clarke, S. (1984). Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues. J Biol Chem 259, 10722-10732.

<387> Pankov, R., and Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. J Cell Sci 115, 3861-3863.

<388> Paganelli, G., et al., Clinical application of the avidin-biotin system for tumor targeting. In D.

Goldenberg Ed. Cancer therapy with radiolabeled antibodies. CRC Press, Boca Raton, 1995. P. 239-253.

<389> Pennica, D., et al., (1984). Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature, 321, 724-729.

<390> Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. J Biol Chem 275, 21785-21788.

<391> Plow, E. F., McEver, R. P., Coller, B. S., Woods, V. L., Jr., Marguerie, G. A., and Ginsberg, M. H. (1985). Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. Blood 66, 724-727.

<392> Podlaski, et al. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237

<393> Pytela, R., Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. Cell 40, 191-198.

<394> Rathjen, D. A., et al., (1992). Selective enhancement of the tumour necrotic activity of TNF alpha with monoclonal antibody. Brit. J. Cancer 65:852.

<395> Reissner, K. J., and Aswad, D. W. (2003). Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? Cell MoI Life Sci 60, 1281- 1295.

<396> Rinderknecht et al. (J. Biol. Chem. 259:6790-6797, 1984.

<397> Robert, B., et al., 1996. Cytokine targeting in tumors using a bispecific antibody directed against carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. Cancer Res. 56:4758.

<398> Robinson, A. B., McKerrow, J. H., and Gary, P. (1970). Controlled deamidation of peptides and proteins: an experimental hazard and a possible biological timer. Proc Natl Acad Sci U S A 66, 753-757.

<399> Robinson, N. E., and Robinson, A. B. (2001). Molecular clocks. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 944-949.

<400> Robinson, N. E., Robinson, Z. W., Robinson, B. R., Robinson, A. L., Robinson, J. A., Robinson, M. L., and Robinson, A. B. (2004). Structure-dependent nonenzymatic deamidation of glutaminyl and asparaginyl pentapeptides. J Pept Res 63, 426-436.

<401> Schraffordt Koops, et al., (1998) Hyperthermic isolated limb perfusion with tumour necrosis factor and melphalan as treatment of locally advanced or recurrent soft tissue sarcomas of the extremities. Radiothepray & Oncology. 48:1-4.

<402> Seder, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-10192.

<403> Smith, J. W., Vestal, D. J., Irwin, S. V., Burke, T. A., and Cheresh, D. A. (1990). Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. J Biol Chem 265, 11008-11013.

<404> Stephenson, R. C, and Clarke, S. (1989). Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. J Biol Chem 264, 6164-6170.

<405> Takada, Y., Huang, C, and Hemler, M. E. (1987). Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers. Nature 326, 607-609.

<406> Tanzarella, S., Russo, V., Lionello, I., Dalerba, P., Rigatti, D., Bordignon, C, and Traversari, C. (1999). Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. Cancer Res 59, 2668-2674.

<407> Taya et al., (1982) EMBO J. 1:953-958.

<408> Tracey, K. J., and A. Cerami. (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. Ann. Rev. Cell Biol, 9:317-43.

<409> Tyler-Cross, R., and Schirch, V. (1991). Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. J Biol Chem 266, 22549-22556.

<410> Van Ostade, X., et al., (1993) Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. Nature. 361 :266-9.

<411> Vogel, B. E., Tarone, G., Giancotti, F. G., Gailit, J., and Ruoslahti, E. (1990). A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition (alpha v beta 1). J Biol Chem 265, 5934-5937.

<412> Weber, D. J., and McFadden, P. N. (1997b). Injury-induced enzymatic methylation of aging collagen in the extracellular matrix of blood vessels. J Protein Chem 16, 269- 281.

<413> Weinacker, A., Chen, A., Agrez, M., Cone, R. L, Nishimura, S., Wayner, E., Pytela, R., and Sheppard, D. (1994). Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. J Biol Chem 269, 6940-6948.

<414> Wood and Wetzel, (1992), Int'l J. Peptide Protein Res. 39: 533-39.

<415> Yamada, K. M. (1989). Fibronectins: structure, functions and receptors. Curr Opin Cell Biol 1, 956-963.

<416> Yang, J., et al., (1995) A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possesses the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. MoI. Immunol. 32:873-81.

도면의 간단한 설명

<237> **도 1**. 피브로넥틴 단편의 주요 서열 및 3-차원 구조에 대한 도식적 설명.

<238> (A) 각각의 단편 및 피브로넥틴 소단위체에서의 반복체들이 도식적으로 제시되어 있다: I형 반복체(직사각형); II형 반복체(타원); III형 반복체(정사각형). NGR 및 RGD 서열을 포함하는 모듈이 표시되어 있다. 카텝신(FN-70 KDa) 또는 카텝신-트립신(FN-4, 및 FN-30 KDa)으로 단백질 가수분해됨으로써 획득된 천연 단편이 도식적으로 도시되어 있다. 레트로넥틴, 재조합 FN-I_{4-5} 단편, 및 합성 FN-I_5 또한 도시되어 있다.

<239> (B) FN-I_{4-5} 의 3차원 PDB-구조(단백질 데이타 뱅크 코드: 1FBR.pdb). NGR 모티프의 곁-사슬(Asn^{263}, Gly^{264} 및 Arg^{265})이 도시되어 있다.

<240> (C) 합성 FN-I_5 및 루프-GNGRG 및 루프-RGGNG 펩티드의 주요 서열, 및 FN-I_7 및 루프-GNGRG 펩티드의 주요 서열 (참조 : 실험방법).

<241> **도 2**. 천연 피브로넥틴 단편의 세포 부착 촉진 특성.

<242> 천연 단백질가수분해 단편(FN-70 KDa, FN-4, KDa 및 FN-30 KDa)으로 코팅된 마이크로티터 판(micortiter plates)은 내피의 EA.hy926 세포 부착을 촉진한다.

<243> **도 3**. FN 단편의 친-부착(pro-adhesive) 특성을 증가시키는 FN 단편에 대한 가속화된 노화(accelerated aging).

<244> 가속화된 노화 전과 후에 다양한 펩티드 및 단백질로 코팅된 마이크로티어 판에 대한 EA.hy926 세포의 부착. 가속화된 노화는 37℃에서 16시간 동안 pH 8.5의 0.1 M 중탄산 암모늄 완충액에서 단백질 인큐베이션에 의해 수행되었다("열-처리"). 재조합 FN-I_{4-5} 또는 대조군 단백질(FN-I_{4-5}(SGS)) (A), 합성 FN-I_5 (B), 재조합 NGR-TNF, CNGRCG-TNF_{1-11} 및 대조군 CARACG-TNF_{1-11} 펩티드 (C), DGR-TNF (D)에 대한 부착. 열-처리된(37℃) 및 비처리된(-20℃) 생성물을 마이크로티터 웰의 플라스틱 표면 위에 흡착시켰다(4℃에서 밤새). 30㎍/㎖의 열-처리된 FN-I_5 또는 BSA(B, 우측)로 코팅된 웰 또는 10㎍/㎖의 재조합 NGR-TNF 또는 DGR-TNF(C, 좌측)로 코팅된 웰의 마이크로사진(x200). 세포 부착 검정을 하기 실험재료 및 실험방법에 기술된 바와 같이 수행하였다.

<245> **도 4**. FN 단편의 친-부착 특성은 PIMT에 의해 억제된다.

<246> 마이크로티터 판을 열-처리된 FN-I_5 또는 NGR-TNF (A), 또는 천연 FN-30 KDa, FN-45 KDa 또는 레트로넥틴(RN) (B)으로 코팅하였다. 흡착된 단백질을 이후 37℃에서 16시간 동안 PIMT 효소로 처리하였다. 인큐베이션 후, 세척을 통해 상기 효소용액을 제거하였다. EA.hy926 세포 부착 검정을 하기 실험재료 및 실험방법에 기술된 바와 같이 수행하였다.

<247> **도 5**. NGR, DGR 및 이소DGR 모티프들의 안정성.

<248> NGR-펩 및 이의 합성 탈아미노화 생성물(DGR-펩 및 이소DGR-펩)을 pH 8.5의 0.1M 탄산수소암모늄 완충액(A 및 B) 및 pH 7.3의 DMEM(A, 인세트) 중에서 37℃로 4시간 동안 배양하기 전과 후의 RP-HPLC 분석. RP-HPLC를 C-18 컬럼상에서 하기와 같은 조건으로 수행하였다(PepMap C18, PerSeptive Biosystem): 완충액 A, 물 중의 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA); 완충액 B, 95% 아세토니트릴, 0.1% TFA; 10분간 0% B, 30분 이내의 직선 농도구배 20-40% B, 10분간 100% B; 15분간 0% B(유속, 0.5 ㎖/min). 인큐베이션 2시간 후, 동일한 양의 표시된 펩티드(C)로 NGR-펩을 스파이킹하여 피크 1, 2 및 3을 확인하였다. NGR-펩(피크 1)은 DGR-펩(피크 2) 및 이소DGR-펩(피크 3)에 상응하는 화합물로 빠르게 전환되었다(반감기, 2-4 시간).

<249> **도 6**. 가속화된 노화 이후 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린에 결합하는 NGR 모티프를 함유하는 FN-I₅ 및 펩티드.

<250> (A) 정제된 인간 인테그린으로 코팅된 고체상에 열-처리된 CNGRC-TNF 및 TNF의 결합. 단일 농도(5 ㎍/㎖) 또는 다양한 농도(인세트)의 CNGRC-TNF 및 TNF을 사용하였다. 하기 실험재료 및 실험방법에 기술된 바와 같이 항-TNF 항체로 결합을 검출하였다.

<251> (B) 정제된 인간 인테그린에 비오티닐화된 CNGRC-TNF_{1-11}, CARAC-TNF_{1-11} 및 FN-I_5의 결합(스트렙트아비딘-퍼옥시다제와 복합체 형성). o-페닐렌디아민을 이용한 발색 반응으로 결합을 검출하였다.

<252> (C) 다양한 양의 FN-I_{4-5}, 또는 FN-I_{4-5}SGS(위쪽 판넬) 또는 열처리 전과 후(아래쪽 판넬)의 FN-I_5의 NGR 루프에 상응하는 펩티드(잔기 258-271)와 같이 $\alpha_v\beta_3$-코팅된 판에 비오티닐화된 FN-I_5/스트렙트아비딘-퍼옥시다제 복합체의 경쟁적 결합.

<253> **도 7**. NGR-펩티드와 이의 탈아미노화된 생성물의 $\alpha_v\beta_3$에 대한 경쟁적 결합과 NGR-TNF의 $\alpha_v\beta_3$에 대한 경쟁적 결합.

<254> 비오티닐화된 NGR-TNF(4㎍/㎖)를 다른 양의 표시된 펩티드와 혼합하고, $\alpha_v\beta_3$ 코팅된 판에 첨가하였다. 하기 실험재료 및 실험방법에 기술된 바와 같이 항-TNF 항체로 결합을 검출하였다. 그래프패트 프리즘 소프트웨어(GraphPad Prism software)를 사용하여 비직선형 회귀 분석으로 IC_{50}을 결정하였다. 탈아미노화된 FN-I5의 키네틱스를 인큐베이션 시간 대비 억제 농도(IC_{50})를 플로팅하여 결정하였다. 막대는 각각의 결정된 IC_{50}에 대한 신뢰 구간을 나타낸다.

<255> **도 8**. 생체외 조건에서 비트로넥틴에 대한 세포 부착 및 생쥐 모델에서의 종양 성장을 억제시키는 탈아미노화된 FN-I_5 단편.

<256> (A) 열-처리된 FN-I_5에 의한 비트로넥틴에 대한 EA.hy926 세포 부착의 억제. 비트로넥틴(3㎍/㎖)를 마이크로티터 판에 흡착시키고 세포부착검정을 하기 실험재료 및 실험방법에 기술된 바와 같이 수행하였다.

<257> (B) "열-처리된" FN-I_5의 RMA-종양 유발 생쥐에 반복된 투여에 의한 항-종양 효과. 종양 이식후 동물(5/그룹)을 200㎍의 "열-처리된" FN-I5(i.p.)로 처치하였다. * 14일째 p=0.0003, 양측 t-검정으로 통계적 분석.

<258> **도 9**. NGR-TNF에 대한 RP-HPLC 분석.

<259> NGR-TNF의 RP-HPLC 분석은 2개의 메이저 피크, F2 및 F4 및 2개의 마이너 피크 F1 및 F3를 보여주었다. 이러한 피크들에서 탈아미노화된 형태의 존재는 이러한 분획에서 이소Asp의 양을 측정함으로써 확인되었다. 결과는 F2가 F4보다 훨씬 더 많은 이소Asp를 포함하는 것으로 나타났다(표 1).

<260> **도 10**. F2 및 F4의 RP-HPLC 와 SDS-PAGE.

<261> A) RP-HPLC에 의한 F2 및 F4의 재-크로마토그래피는 분리후 머무름 시간(retention time)이 변화하지 아니한다

는 것을 보여주었다. B) 비-환원 SDS-PAGE의 쿠마시 염색은, TNF 단량체에서 예상한 바와 같이, F2 및 F4 생성물 둘 모두에서 17-18 kDa의 메이저 밴드를 보여주었다.

<262> **도 11.** RMA 림프종 모델에서 F2의 항-종양 활성.

<263> 2개의 실험을 수행하였다(실험.1 및 실험.2). 계량한 무게가 16-18g인 C57BL/6 생쥐(Charles River Laboratories, Calco, Italy)를 왼쪽 옆구리의 피하 주사로 7 x 10^4 살아있는 RMA 세포를 주입하여 공격(challenge)하였다; 10일 후, 생쥐를 0, 25 또는 100pg의 F2(100㎕)로 처리하고, 이어서 2시간 후에 멜팔란을 투여하였다(100㎕ 중의 50㎍. 종양 크기는 평균±SE로 나타낸다(5 동물/그룹).

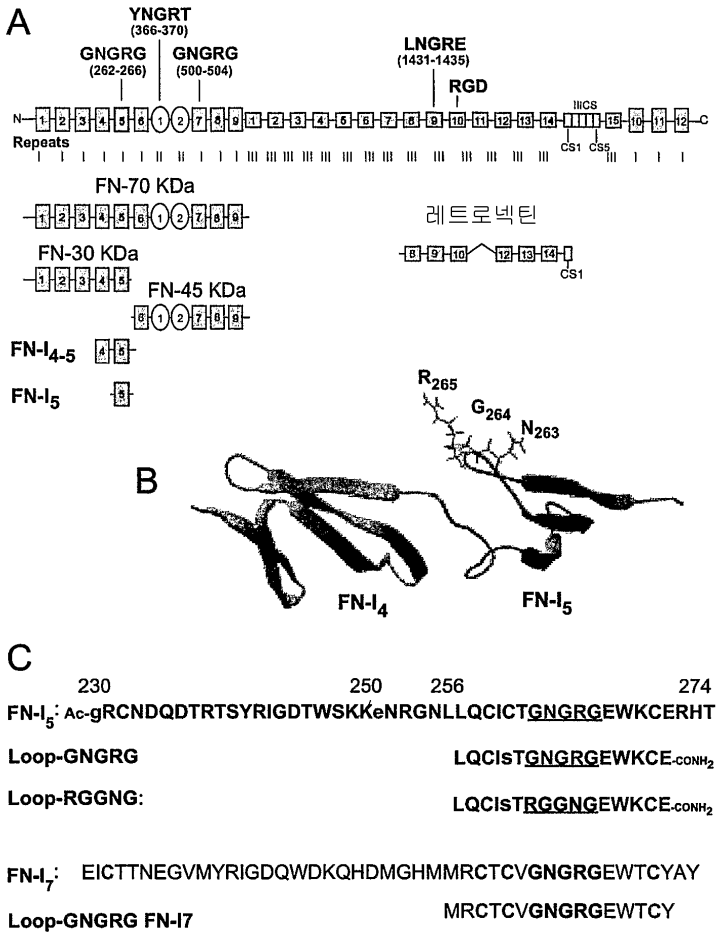
<264> **도 12.** 다양한 시간 동안 pH 8.5의 중탄산 암모늄 중에서 37℃로 처리후 NGR-TNF의 RP-HPLC.

<265> NGR-TNF를 pH 8.5의 0.1M 중탄산암모늄에 희석시키고 37 ℃로 다양한 시간동안 인큐베이션하였다. 열처리된 NGR-TNF를 RP-HPLC로 분석하였다.

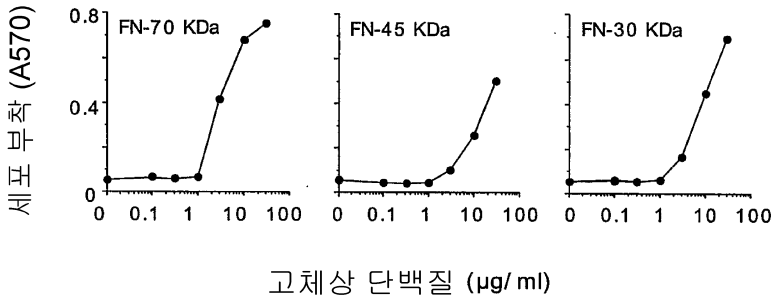
<266> **도 13.** 재조합 DGR-TNF 및 NGR- 73VF의 RP-HPLC (A)와 SDS-PAGE (B).

도면

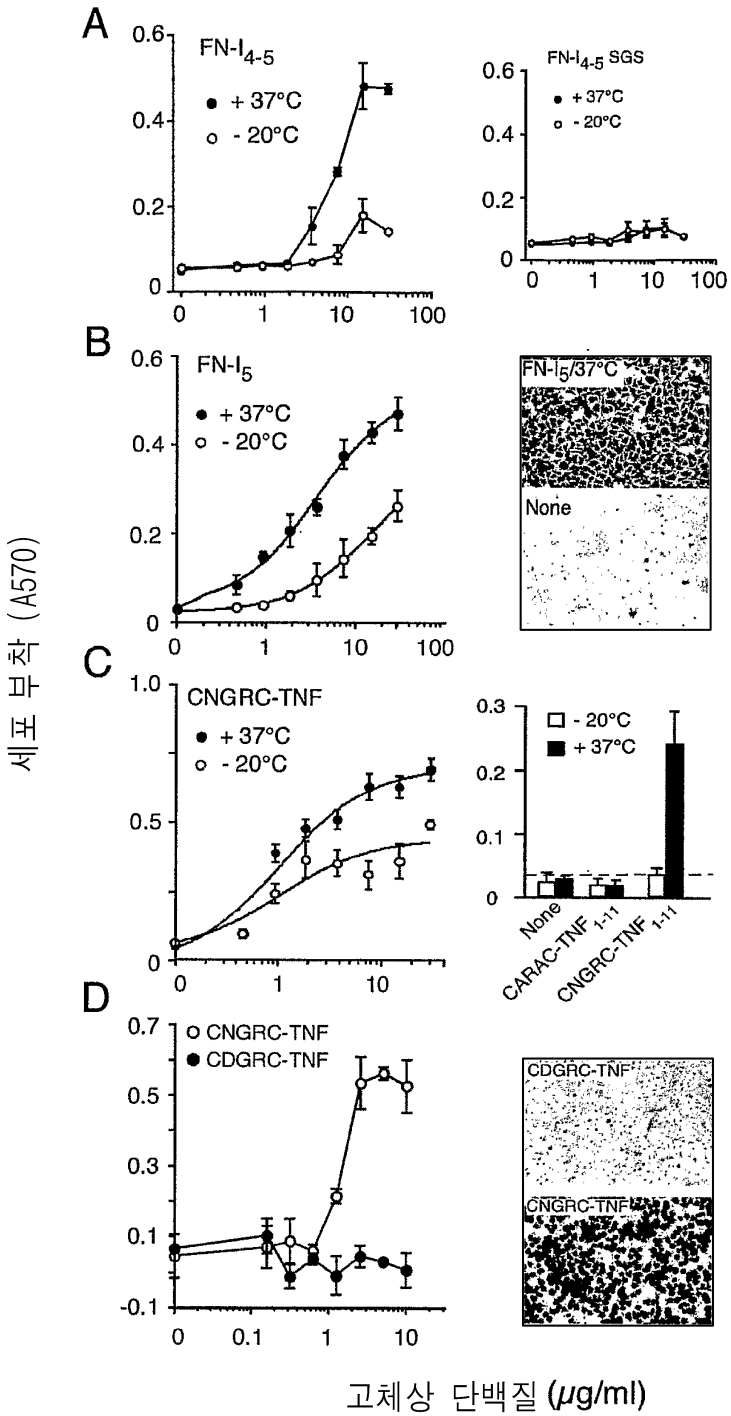
도면1



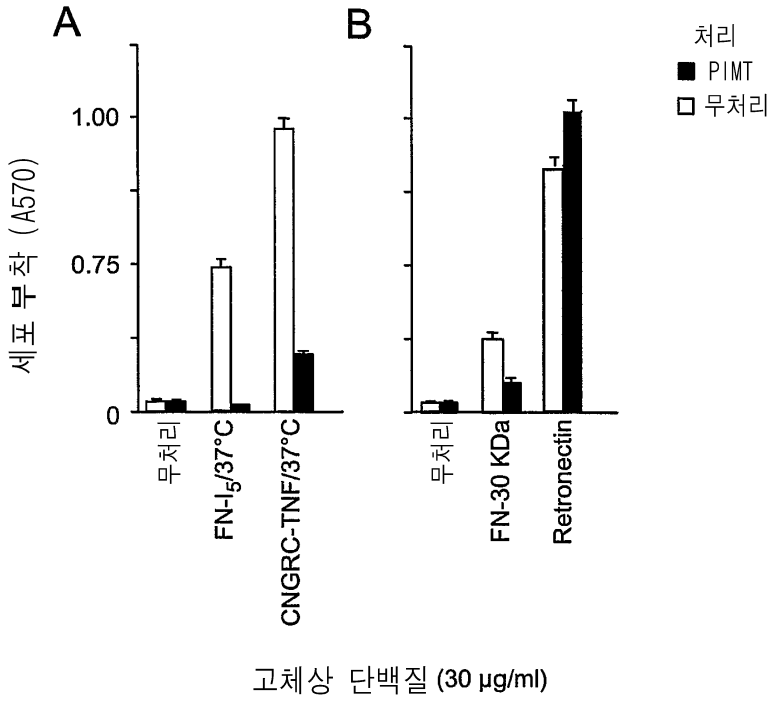
도면2


세포 부착 (A570)
0.8
0.4
0
FN-70 KDa
FN-45 KDa
FN-30 KDa
0 0.1 1 10 100
0 0.1 1 10 100
0 0.1 1 10 100
고체상 단백질 (μg/ml)

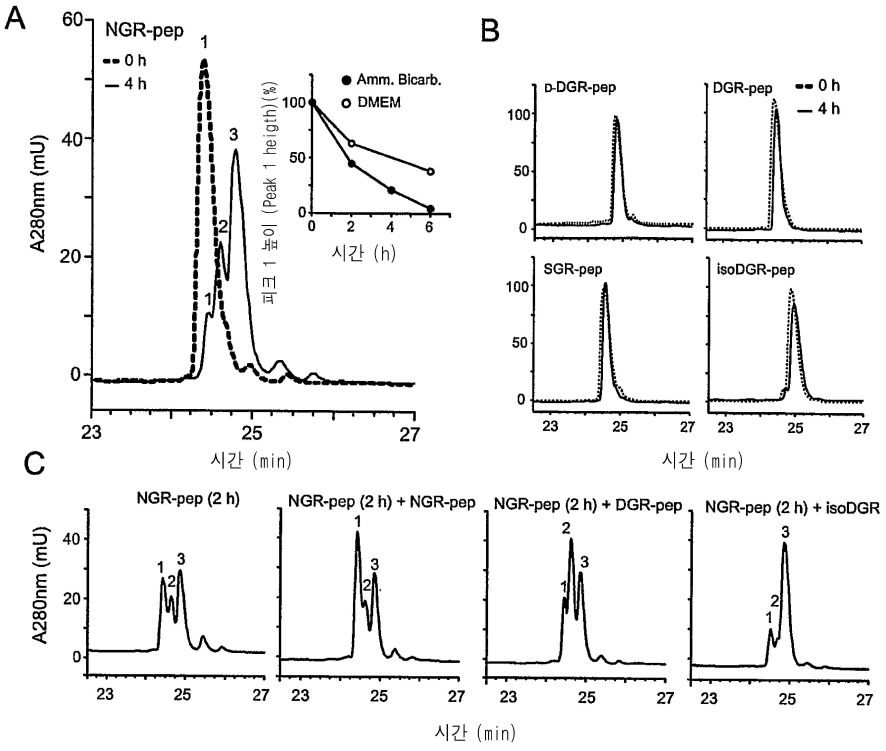
도면3


A
FN-I4-5
+ 37°C
- 20°C
FN-I4-5 SGS
B
FN-I5
FN-I5/37°C
None
C
CNGRC-TNF
- 20°C
+ 37°C
None
CARAC-TNF 1-11
CNGRC-TNF 1-11
D
CNGRC-TNF
CDGRC-TNF
세포 부착 (A570)
고체상 단백질 (μg/ml)

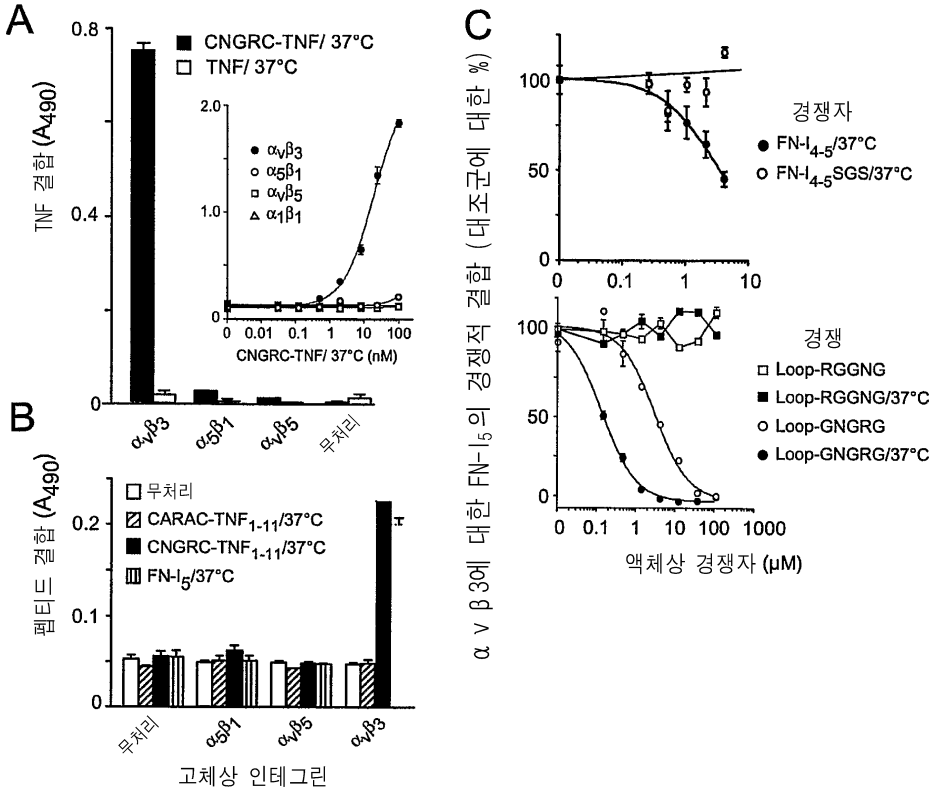
도면4


A
B
처리
PIMT
무처리
세포 부착 (A570)
1.00
0.75
0
무처리
FN-I5/37°C
CNGRC-TNF/37°C
무처리
FN-30 KDa
Retronectin
고체상 단백질 (30 μg/ml)

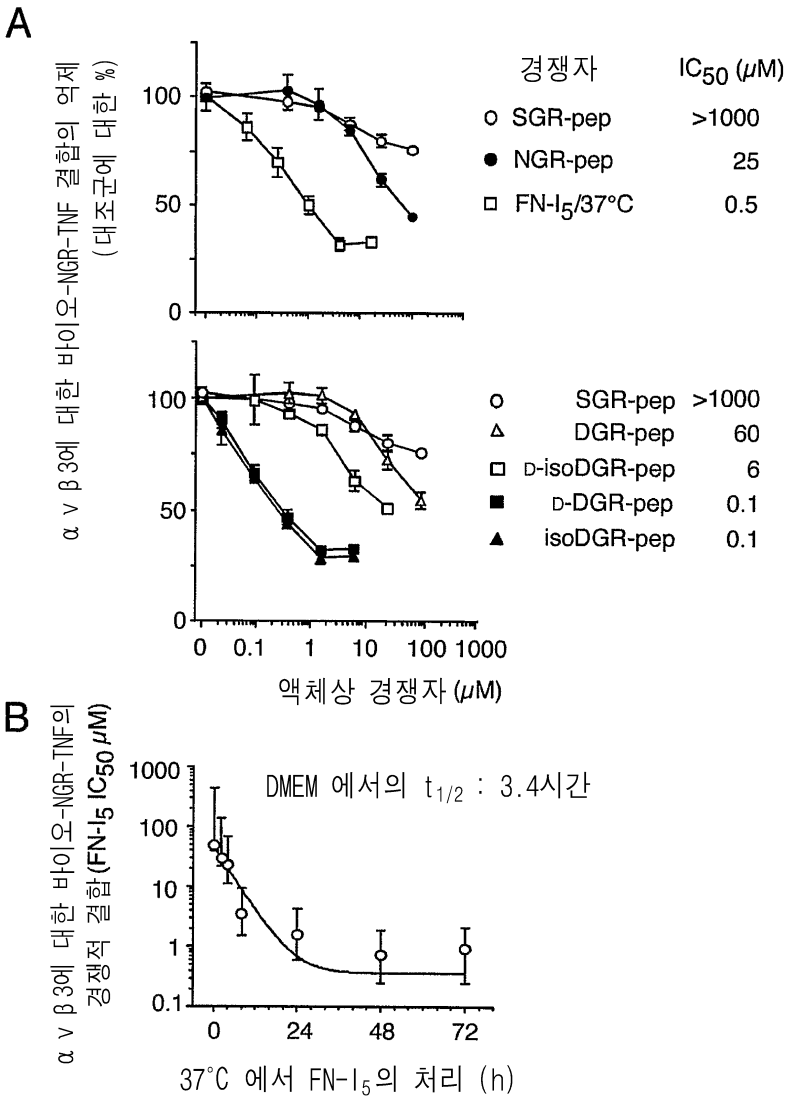
도면5


A
NGR-pep
0 h
4 h
A280nm (mU)
시간 (min)
Amm. Bicarb.
DMEM
피크 1 높이 (Peak 1 heigth)(%)
시간 (h)
B
D-DGR-pep
DGR-pep
SGR-pep
isoDGR-pep
시간 (min)
C
NGR-pep (2 h)
NGR-pep (2 h) + NGR-pep
NGR-pep (2 h) + DGR-pep
NGR-pep (2 h) + isoDGR
A280nm (mU)
시간 (min)

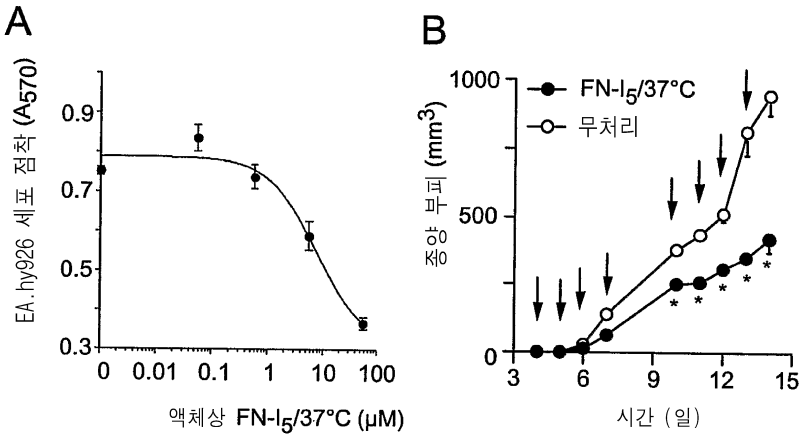
도면6


A
TNF 결합 (A_{490})
CNGRC-TNF/ 37°C
TNF/ 37°C
$\alpha_v\beta_3$
$\alpha_5\beta_1$
$\alpha_v\beta_5$
$\alpha_1\beta_1$
CNGRC-TNF/ 37°C (nM)
무처리
B
펩티드 결합 (A_{490})
무처리
CARAC-TNF$_{1-11}$/37°C
CNGRC-TNF$_{1-11}$/37°C
FN-I$_5$/37°C
고체상 인테그린
C
$\alpha_v\beta_3$에 대한 FN-I$_5$의 경쟁적 결합 (대조군에 대한 %)
경쟁자
FN-I$_{4-5}$/37°C
FN-I$_{4-5}$SGS/37°C
경쟁
Loop-RGGNG
Loop-RGGNG/37°C
Loop-GNGRG
Loop-GNGRG/37°C
액체상 경쟁자 (μM)

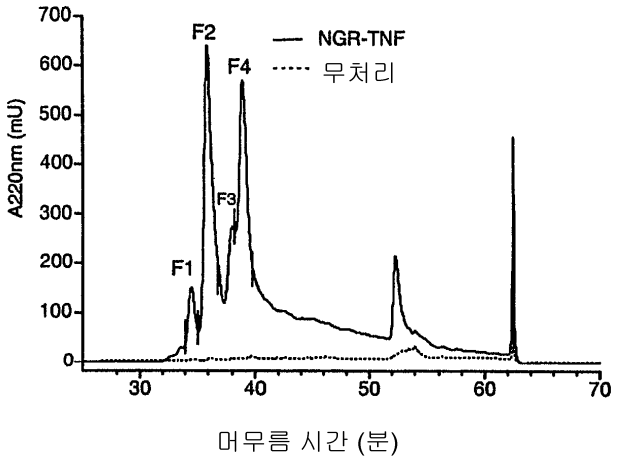
도면7


A
αvβ3에 대한 바이오-NGR-TNF 결합의 억제
(대조군에 대한 %)
100
50
0
경쟁자
IC50 (μM)
SGR-pep >1000
NGR-pep 25
FN-I5/37°C 0.5
SGR-pep >1000
DGR-pep 60
D-isoDGR-pep 6
D-DGR-pep 0.1
isoDGR-pep 0.1
0 0.1 1 10 100 1000
액체상 경쟁자 (μM)
B
αvβ3에 대한 바이오-NGR-TNF의
경쟁적 결합 (FN-I5 IC50 μM)
1000
100
10
1
0.1
DMEM 에서의 t1/2 : 3.4시간
0 24 48 72
37°C 에서 FN-I5의 처리 (h)

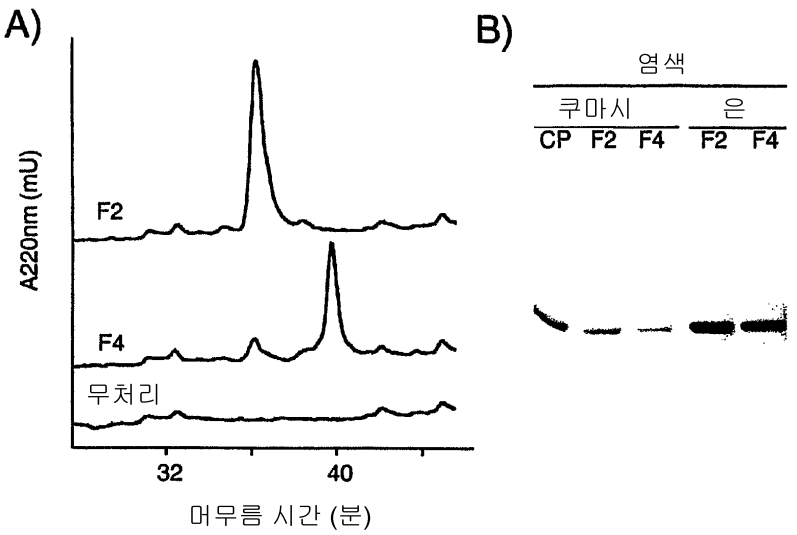
도면8


A
EA.hy926 세포 점착 (A570)
0.9
0.7
0.5
0.3
0
0.01
0.1
1
10
100
액체상 FN-I5/37°C (μM)
B
종양 부피 (mm3)
1000
500
0
FN-I5/37°C
무처리
3
6
9
12
15
시간 (일)

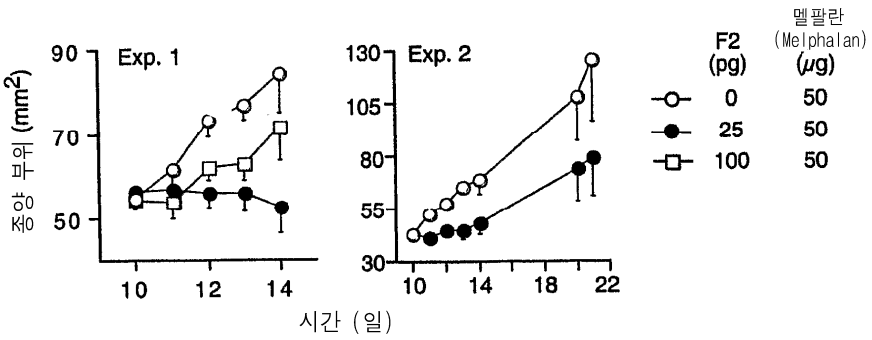
도면9


A220nm (mU)
700
600
500
400
300
200
100
0
F1
F2
F3
F4
NGR-TNF
무처리
30
40
50
60
70
머무름 시간 (분)

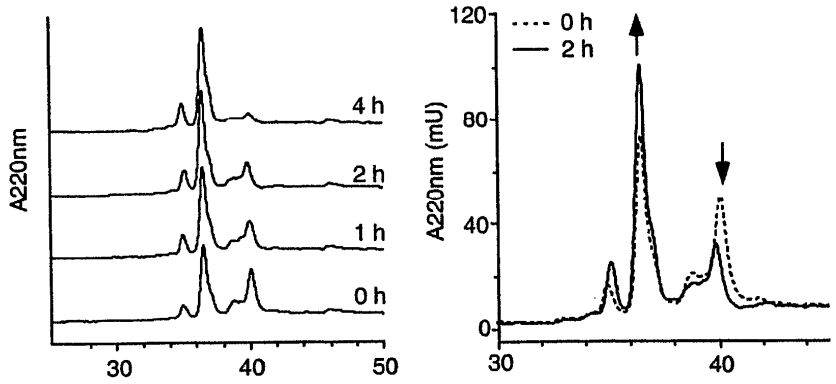
도면10


A)
A220nm (mU)
F2
F4
무처리
32
40
머무름 시간 (분)
B)
염색
쿠마시
은
CP F2 F4 F2 F4

도면11

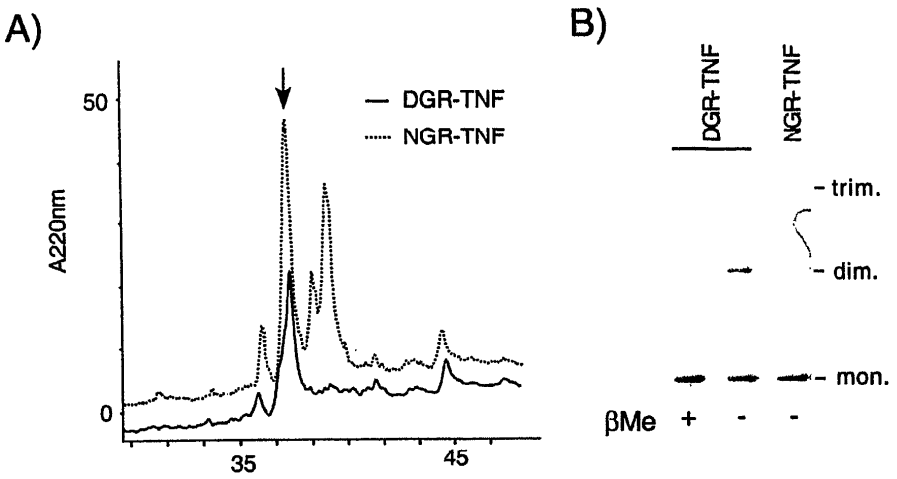

종양 부위 (mm2)
Exp. 1
90
70
50
10 12 14
Exp. 2
130
105
80
55
30
10 14 18 22
시간 (일)
F2 (pg)
멜팔란 (Melphalan) (μg)
0 50
25 50
100 50

도면12



머무름 시간 (분)

도면13



머무름 시간 (분)

도면14

