



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년01월11일
(11) 등록번호 10-1218889
(24) 등록일자 2012년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/00 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7004047
(22) 출원일자(국제) 2004년08월26일
심사청구일자 2009년08월26일
(85) 번역문제출일자 2006년02월27일
(65) 공개번호 10-2006-0121836
(43) 공개일자 2006년11월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/027612
(87) 국제공개번호 WO 2005/020972
국제공개일자 2005년03월10일
(30) 우선권주장
60/498,407 2003년08월27일 미국(US)
60/556,837 2004년03월26일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
The Journal of Clinical Investigation 11(9)
pp. 1287-1295. (2003)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
옵소테크 코퍼레이션
미국 뉴저지 (우편번호 08540) 프린스턴 본 드라
이브 5
(72) 발명자
쉬마, 데이비드
미국 02118 매사추세츠주 보스턴 트레몬트 스트리
트 #3 603
칼리아스, 페리
미국 02176 매사추세츠주 멜로스 스웨인즈 폰드
애비뉴 39
아다미스, 안쑤니, 피.
미국 02130 매사추세츠주 보스턴 폰드 씨클 15
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 7 항

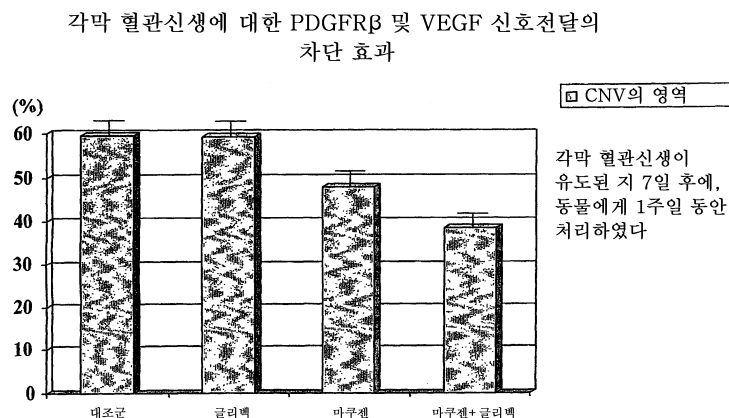
심사관 : 이정아

(54) 발명의 명칭 안구의 혈관신생성 장애를 치료하기 위한 조합 치료법

(57) 요약

본 발명은 혈관신생성 장애를 앓는 것으로 진단되거나 발병 위험이 있는 환자에게 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 투여함으로써 상기 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 함유하
는 혈관신생성 장애의 치료 또는 예방용 제약 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

환자에서 습성 노인성 황반 변성을 치료하는데 유용한, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF) 길항제 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 길항제를 포함하는 제약 조합물로서,

상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제는 동시에 또는 서로 90일 이내에 순차적으로 투여되고;

상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제는, 위치 6, 20, 및 30에 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘, 위치 8, 21, 28, 및 29에 2'-플루오로-2'-데옥시시티딘, 위치 9, 15, 17, 및 31에 2'-O-메틸-2'-데옥시구아노신, 위치 22에 2'-O-메틸-2'-데옥시아데노신, 헥사에틸렌-글리콜 포스포르아미다이트로부터 유래한 위치 10 및 23 중의 "N", 및 위치 32에 역 방향 T(3'-3'-연결됨)를 갖고 서열 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 을 갖는 폐길화되거나, 폐길화되지 않은 앵타미고;

상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제는 혈소판-유래 성장 인자-B의 활성을 감소시키는 것이고;

상기 혈관 내피 성장 인자 길항제는 혈관 내피 성장 인자-A의 활성을 감소시키는 항체 또는 결합 단편인

제약 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 상기 혈관 내피 성장 인자 길항제가 분리된 조성물에 존재하는, 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제를 포함하는 제약 조합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 상기 혈관 내피 성장 인자 길항제가 서로 10일 이내에 투여되는, 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제를 포함하는 제약 조합물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 상기 혈관 내피 성장 인자 길항제가 서로 5일 이내에 투여되는, 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제를 포함하는 제약 조합물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 상기 혈관 내피 성장 인자 길항제가 서로 24시간 이내에 투여되는, 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제를 포함하는 제약 조합물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 상기 혈관 내피 성장 인자 길항제가 동시에 투여되는, 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제를 포함하는 제약 조합물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 상기 혈관 내피 성장 인자 길항제가 동일한 조성물 내에 존재하는, 혈소판-유래 성장 인자 길항제 및 혈관 내피 성장 인자 길항제를 포함하는 제약 조합물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

명세서

[0001] 본 출원은 2003년 8월 27일자로 출원된 미국 가출원 제60/498,407호 (대리인 관리 번호: EYE-013P) 및 2004년 3월 26일자로 출원된 미국 가출원 제60/556,837호 (대리인 관리 번호: EYE-013P2)를 우선권 주장하며, 이들 문헌은 그의 전문이 둘 다 본원에 참고로 포함된다.

기술분야

[0002] 본 발명은 안과학 및 의학 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 둘 다를 억제하는 작용제들의 조합물을 이용한, 안구의 혈관신생 장애의 치료에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 혈관신생(neovascularization)이라 불리기도 하는 혈관형성(angiogenesis)은 기존 혈관으로부터 돌출부가 형성되고 이들이 주변 조직으로 침윤하는 단계를 수반한다. 이와 연관이 있는 과정인 맥관형성(vasculogenesis)은, 조직 전체에 이미 존재하고 있는 내피 세포와 혈관모세포가 분화하고 이후에는 이들이 함께 연결되면서 혈관이 형성되는 단계를 수반한다.

[0004] 혈관형성은 발생 동안에 광범위하게 이루어지며, 또한 건강한 신체에서도 손상이나 상해 후에 조직으로의 혈류 복구를 위한 창상 치유 동안에 이루어진다. 그러나, 혈관형성은 암 및 종양 형성과도 연관이 있다. 사실, 종양 조직 중 혈관의 양은 유방암 [Weidner et al., (1992) J. Natl. Cancer Inst. 84: 1875-1887], 전립선암 [Weidner et al., (1993) Am. J. Pathol. 143: 401-409], 뇌종양 [Li et al., (1994) Lancet 344: 82-86] 및 흑색종 [Foss et al., (1996) Cancer Res. 56: 2900-2903]에서 강력한 음성 예후 지표이다. 최근에는, 혈관형성이 류마티스학, 피부학, 심장학 및 안과학 등을 비롯한 많은 의학 분야에서의 다른 질환 상태에도 연관이 있는 것으로 밝혀졌다. 특히, 바람직하지 못한 혈관형성 또는 병리 조직에 특이적인 혈관형성은 류마티스성 관절염, 아테롬성경화증 및 건선 등을 비롯한 몇가지 특정한 질환 상태와 관련이 있었다 (예를 들어, 문헌 [Fan et al., (1995) Trends Pharmacol. Sci. 16: 57] 및 [Folkman (1995) Nature Med. 1: 27] 참조). 추가로, 혈관 투과도의 변경은 정상적인 생리 과정과 병리적 생리 과정 둘 다에 있어서 소정의 역할을 수행한다고 여겨진다 ([Cullinan-Bove et al., (1993) Endocrinol. 133: 829], [Senger et al., (1993) Cancer and Metastasis

Reviews 12: 303]). 이들 질환 각각에서의 혈관형성 과정은 발생시의 혈관형성 및 종양에서의 혈관형성과 많은 특징을 공유한다고 여겨지지만, 각각이 주변 세포의 영향으로 인한 독특한 측면을 갖고 있을 수도 있다.

[0005] 각종 안구 장애는 혈관형성에서의 변형을 수반한다. 예를 들어, 성인 실명의 제3 원인 (미국에서 실명 원인의 거의 7%에 상응함)인 당뇨병성 망막병증은 과도한 혈관형성 사건과 관련이 있다. 비증식성 망막병증은 망막 내 혈관주위세포의 선택적 소실을 수반하고, 이러한 소실로 인해 관련 모세관이 확장되어 혈류가 증가한다. 확장된 모세관에서는 내피 세포가 증식하고 낭상돌출을 형성하여 미세동맥류가 되고 인접 모세관이 차단되어 이들 미세동맥류 주변의 망막 영역에서 관류가 일어나지 않는다. 실제로, 미세동맥류의 인접 영역 사이에서는 단락 혈관이 나타나고, 초기 당뇨병성 망막병증의 임상적 상은 미세동맥류 및 관류되지 않는 망막 영역이 있는 것으로 나타난다. 미세동맥류에서 누출이 일어나고 모세 혈관이 터지는 수가 있어서 삼출과 출혈을 일으킬 수 있다. 배경이 되는 당뇨병성 망막병증의 초기 단계가 일단 수립되면, 상기한 상태가 수년의 기간에 걸쳐 진행되어 약 5%의 증례에서 증식성 당뇨병성 망막병증 및 실명으로 진행된다. 증식성 당뇨병성 망막병증은, 망막의 일부 영역이 계속 모세 혈관을 소실하고 관류되지 않는 상태가 되어 디스크 및 망막상의 다른 영역에서 새로운 혈관이 나타나게 될 때 발생한다. 이러한 새로운 혈관은 유리질 및 출혈 부위로 쉽게 성장하여 망막앞 출혈을 일으킨다. 증식성 당뇨병성 망막병증이 진전되면, 과도한 유리질 출혈이 유리질강의 대부분을 채우는 수가 있다. 또한, 새로운 혈관은 건인성 망막 박리를 일으킬 수 있는 섬유상 조직 증식을 수반한다.

[0006] 당뇨병성 망막병증은 1차적으로 진성 당뇨병의 기간과 관련이 있다. 따라서, 해당 집단이 노화하고 당뇨병 환자가 더 오래 살수록, 당뇨병성 망막병증의 유병률은 증가할 것이다. 최근에는, 비증식성과 증식성 당뇨병성 망막병증 둘 다에 레이저 치료법이 이용된다. 황반부 주변의 누출 미세동맥류에 국소 레이저 처치를 행하면, 임상적으로 유의한 황반 부종이 있는 환자의 50%에서 시력 상실이 줄어든다. 증식성 당뇨병성 망막병증에서는, 범망막 광응고로 인해 (황반부를 보존하며) 망막 전체에 수천개의 작은 화상이 생긴다. 이러한 처치는 실명률을 60% 감소시킨다. 황반 부종 및 증식성 당뇨병성 망막병증의 초기 치료는 95%의 환자에서 5년 동안 실명을 예방하지만, 치료가 늦어지면 단지 50%의 환자에서만 실명이 예방된다. 따라서, 조기 진단 및 초기 치료가 필수적이다.

[0007] 혈관신생을 수반하는 또다른 안구 장애는, 65세를 넘는 미국인 10명 중 대략 1명 꼴로 발병하는 질환인 노인성 황반 변성 (AMD)이다. AMD는 망막의 중앙 영역인 황반에서 일어나는 일련의 병리 변화를 특징으로 하며, 특히 중심부 시력에 영향을 미치는 시력 문제를 수반한다. AMD는 감각성 망막 바로 아래에 존재하는, 망막 색소 상피라 불리는 단일층 세포들과 관련이 있다. 이들 세포는 망막에서 이들과 접촉하는 부분, 즉 시각 색소를 함유하는 광수용체 세포를 지지하면서 이 세포에 영양분을 공급한다. 망막 색소 상피는, AMD에서 두꺼워지고 경화되는 기저막 복합체인 브루크막 상에 존재한다. 새로운 혈관은 풍부한 혈관 층을 함유하는 아래쪽 맥락막으로부터 브루크막을 지나면서 생성될 수 있다. 이어서, 이들 혈관은 망막 색소 상피 아래쪽 뿐만이 아니라 망막 색소 상피와 감각성 망막 사이에서 유액을 누출시키거나 출혈을 일으킬 수 있다. 이후의 섬유상 반흔형성은 광수용체 세포로의 영양분 공급을 차단하여 이들 세포를 사멸시켜서 중심부 시력의 상실을 초래한다. 이러한 유형의 노인성 황반병증은 누출 혈관 및 망막하 부종 또는 혈액 때문에 "습성(wet type)"이라 불린다. 습성은 노인성 황반병증 증례의 단지 10%에 불과하지만, 노인에서 황반 변성으로 인한 법적 실명 사건의 90%를 초래한다. "건성(dry type)" 노인성 황반병증은 망막 색소 상피가 그 위에 존재하는 광수용체 세포의 소실과 더불어 붕괴되는 것을 수반한다. 이러한 건성은 시력을 저하시키지만 통상적으로는 단지 20/50 내지 20/100의 수준으로만 저하시킨다.

[0008] AMD는 중심부 시력의 뒤틀림을 수반하여, 사물이 더 크거나 더 작게 보이거나 또는 직선이 뒤틀리거나 휘어지거나 가운데 부분이 없는 것으로 보인다. 습성 AMD에서는 황반부에서 감각성 망막이 약간 박리될 수 있지만, 망막하 신생혈관막의 명확한 진단에는 플루오레신 혈관조영술이 필요하다. 건성 AMD에서는 초자소구병(drusen)이 황반부에서 색소침착 양상을 변화시킬 수 있다. 초자소구병은 망막 색소 상피의 기저막 돌출로서, 세포 쪽으로 돌출되어 전방으로 불거지게 한다. 노인성 황반병증에서 위험 인자로서의 이들의 역할은 명확하지 않다. 현재로는 건성 노인성 황반병증을 위한 치료법이 전혀 없다. 레이저 처치는 습성 노인성 황반병증에서 이용되며, 초기에 신생혈관막을 제거하고 제18개월에는 약 50%의 환자에서 시력 상실을 추가로 예방한다. 그러나, 제60개월에는 단지 20%에만 실질적으로 유익하다.

[0009] 염기성 및 산성 섬유아세포 성장 인자 (aFGF, bFGF), 형질전이 성장 인자 알파 및 베타 (TGF α , TGF β), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 안지오텐신, 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 인터루킨-8 (IL-8) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 등을 비롯하여, 혈관형성의 여러가지 분자 매개자가 확인되었다. 혈관형성에 관여하는 다른 자극자로는 안지오프이에틴-1, Del-1, 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자

(HGF), 렙틴, 미드킨, 태반 성장 인자, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프롤리페린 및 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파) 등이 있다. 또한, 혈관형성의 제어는 안지오어레스틴, 안지오스타틴 (플라스미노겐 단편), 항-혈관형성성 안티트롬빈 III, 연골-유래 억제제 (CDI), CD59 보체 단편, 엔도스타틴 (콜라겐 XVIII 단편), 피브로넥틴 단편, gro-베타, 헤파리나제, 헤파린 헥사사카라이드 단편, 인간 융모막 고나도트로핀 (hCG), 인터페론 알파/베타/감마, 인터페론-유도가능한 단백질 (IP-10), 인터루킨-12, 크링글 5 (플라스미노겐 단편), 메탈로프로테이나제 억제제 (TIMP), 2-메톡시에스트라디올, 태반 리보뉴클레아제 억제제, 플라스미노겐 활성화 억제제, 혈소판 인자-4 (PF4), 프롤락틴 16 kD 단편, 프롤리페린-관련 단백질 (PRP), 레티노이드, 테트라히드로코르티졸-S, 트롬보스폰딘-1 (TSP-1), 바스칼로스타틴 및 바소스타틴 (칼레티쿨린 단편) 등을 비롯하여 신체에서 생성되는 수많은 혈관형성 음성 조절자에 의해 추가로 매개된다.

[0010] 이러한 혈관형성 조절자 중에서, VEGF는 종양 성장에 수반되는 비정상적인 혈관형성의 양성 조절자로서 핵심적인 역할을 수행한다고 여겨진다 (문헌 [Brown et al., (1996) Control of Angiogenesis (Goldberg and Rosen, eds.)], [Birkhauser, Basel, and Thomas (1996) J. Biol. Chem. 271: 603-606]에서 검토됨). 추가로, 최근에는 신호전달 분자의 PDGF 족에 속하는 PDGF-B 구성원의 역할이 연구되고 있는데, 이들이 때로는 벽재성 세포, 예를 들어 혈관 평활근, 혈관사이세포 및 혈관주위세포라고 지칭되기도 하는 혈관주위 세포의 형성, 증식 및 적당한 기능수행에 있어서 소정의 역할을 수행한다고 여겨지기 때문이다.

[0011] 발생, 창상 치유 및 종양 형성에 수반되는 혈관형성 또는 혈관신생에 대하여 많은 사실들이 알려져 있지만, 이러한 형태의 혈관형성과 안구 혈관형성 사이에 차이가 있는지 여부에 대해서는 아직 결정되지 않았다. 유의하게, 심장에서 측부 혈관 형성 등을 수반하는 혈관형성은 유기체에 유익하고 적응성일 수 있지만, 예를 들어 AMD 등에 수반되는 병리적 안구 혈관신생에는 유익한 점이 알려진 바 없으며 종종 실명을 초래한다 (검토를 위해서는 문헌 [Campochiaro (2000) J. Cell. Physiol. 184: 301-10] 참조). 따라서, 혈관신생을 수반하는 분자 사건들에 대한 이해에 진전이 있긴 하지만, 이러한 이해를 이용하여 안구의 혈관신생성 질환 및 장애, 예를 들어 AMD 및 당뇨병성 망막병증에서 발생하는 맥락막 혈관신생 등을 비롯한 혈관신생성 질환 및 장애를 치료하는 주가의 방법을 개발할 필요가 있다.

[0012] **발명의 요약**

[0013] 본 발명에 이르러, 항-VEGF 및 항-PDGF 작용제의 조합이 놀랍게도 안구의 혈관신생성 질환 치료에 상승작용적 치료 효과를 제공하는 것으로 밝혀졌다.

[0014] 따라서, 본 발명은 혈관신생성 장애를 앓는 것으로 진단되거나 혈관신생성 장애의 발병 위험이 있는 환자를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은, 상기 환자에게 1차 치료제 또는 보조 치료제로서 항-VEGF 작용제 및 항-PDGF 작용제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 한 측면에서, 본 발명은 혈관신생성 장애의 억제가 필요한 환자에게 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 상기 환자에서 혈관신생성 장애를 억제하기에 충분한 양으로 동시에 또는 서로 약 90일 이내에 투여함으로써 상기 환자에서 혈관신생성 장애를 억제하는 방법을 제공한다.

[0016] 또다른 측면에서, 본 발명은 혈관신생성 장애를 앓는 것으로 진단되거나 혈관신생성 장애의 발병 위험이 있어서 혈관신생성 장애의 치료가 필요한 환자에게 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 상기 환자를 치료하기에 충분한 양으로 동시에 또는 서로 90일 이내에 투여함으로써 상기 환자의 혈관신생성 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0017] 이러한 측면의 특별한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 서로 약 10일 이내에 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법의 또다른 실시양태에서, PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 서로 5일 이내에 투여된다. 본 발명의 방법의 또다른 실시양태에서, PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 서로 약 24시간 이내에 투여된다. 본 발명의 방법의 특별한 실시양태에서, PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 동시에 투여된다.

[0018] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 PDGF-B 길항제인 PDGF 길항제의 투여를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 VEGF-A 길항제인 VEGF 길항제의 투여를 포함한다.

[0019] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 핵산 분자, 앵타머, 안티센스 RNA 분자, 리보자임, RNAi 분자, 단백질, 펩티드, 시클릭 펩티드, 항체, 항체 단편의 결합 단편, 당, 중합체 또는 소형 유기 화합물인 PDGF 길항제의 투여를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 핵산 분자, 앵타머, 안티센스 RNA 분자, 리보자임, RNAi 분자, 단백질, 펩티드, 시클릭 펩티드, 항체, 항체 단편의 결합 단편, 당, 중합체, 또는 소형 유기 화합물인 VEGF 길항제의 투여를 포함한다.

- [0020] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 앵타머, 예를 들어 EYE001 앵타머인 VEGF 길항제의 투여를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 항체 또는 그의 결합 단편인 VEGF 길항제의 투여를 포함한다.
- [0021] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 앵타머, 항체 또는 그의 결합 단편인 PDGF 길항제의 투여를 포함한다. 또다른 특별한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 PDGF 길항제의 투여를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 이러한 측면에 따른 또다른 실시양태에서, PDGF 길항제 및(또는) VEGF 길항제는 프로드럭이다.
- [0023] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 안구의 혈관신생성 장애를 억제하거나 치료하는 수단을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 방법으로 치료되거나 억제될 수 있는 안구 혈관신생성 장애로는 허혈성 망막병증, 홍채 혈관신생, 안내 혈관신생, 노인성 황반 변성, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생, 맥락막 혈관신생, 당뇨병성 망막 허혈 또는 증식성 당뇨병성 망막병증 등이 있다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 건선 또는 류마티스성 관절염의 억제 또는 치료가 필요한 환자 또는 그러한 장애를 앓는 것으로 진단되거나 그러한 장애의 발병 위험이 있는 환자에서 건선 또는 류마티스성 관절염을 억제하거나 치료하기 위한 수단을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 PDGF 길항제와 VEGF 길항제 둘 다 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 이러한 측면에서, PDGF와 VEGF 길항제는 둘 다 환자에서 혈관신생성 장애를 억제하기에 충분한 양으로 존재한다.
- [0025] 이러한 측면의 한 실시양태에서, 제약 조성물은 PDGF-B 길항제인 PDGF 길항제를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 VEGF-A 길항제인 VEGF 길항제를 포함한다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 핵산 분자, 앵타머, 안티센스 RNA 분자, 리보자임, RNAi 분자, 단백질, 펩티드, 시클릭 펩티드, 항체, 항체 단편의 결합 단편, 당, 중합체 또는 소형 유기 화합물인 PDGF 길항제를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 핵산 분자, 앵타머, 안티센스 RNA 분자, 리보자임, RNAi 분자, 단백질, 펩티드, 시클릭 펩티드, 항체, 항체 단편의 결합 단편, 당, 중합체 또는 소형 유기 화합물인 VEGF 길항제를 포함한다.
- [0027] 다른 특별한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 앵타머, 예를 들어 EYE001 앵타머인 VEGF 길항제를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 항체 또는 그의 결합 단편인 VEGF 길항제를 포함한다.
- [0028] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 항체 또는 그의 결합 단편인 PDGF 길항제를 포함한다. 또다른 특별한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 PDGF 길항제를 포함한다.
- [0029] 본 발명의 제약 조성물은 미소구 또는 히드로겔 제제 등을 비롯한 제약상 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0030] 또다른 실시양태에서, PDGF 길항제 및(또는) VEGF 길항제는 프로드럭이다.
- [0031] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 안구의 혈관신생성 장애를 억제하거나 치료하기 위한 수단을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 의해 치료 또는 억제될 수 있는 안구의 혈관신생성 장애로는 허혈성 망막병증, 홍채 혈관신생, 안내 혈관신생, 노인성 황반 변성, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생, 맥락막 혈관신생, 당뇨병성 망막 허혈 또는 증식성 당뇨병성 망막병증 등이 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 건선 또는 류마티스성 관절염의 억제 또는 치료가 필요한 환자 또는 그러한 장애를 앓는 것으로 진단되거나 그러한 장애의 발병 위험이 있는 환자에서 건선 또는 류마티스성 관절염을 억제하거나 치료하기 위한 수단을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 둘 다 포함하는 제약 팩을 제공한다. 이러한 측면의 한 실시양태에서, 상기 제약 팩은 PDGF-B 길항제인 PDGF 길항제를 포함한다. 이러한 측면의 또다른 실시양태에서, 상기 제약 팩은 VEGF-A 길항제인 VEGF 길항제를 포함한다.
- [0033] 또다른 실시양태에서, 상기 제약 팩의 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 개개의 투여량으로 개별적으로 제제화된다. 또다른 실시양태에서, 상기 제약 팩의 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 함께 제제화된다.
- [0034] 몇몇 특별한 실시양태에서, 본 발명의 제약 팩은 앵타머, 예를 들어 EYE001 앵타머인 VEGF 길항제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 팩은 항체 또는 그의 결합 단편인 VEGF 길항제를 포함한다.
- [0035] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 제약 팩은 항체 또는 그의 결합 단편인 PDGF 길항제를 포함한다. 다른 특별한 실시양태에서, 본 발명의 제약 팩은 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 PDGF 길항제를 포함한다. 이러한 측면의 또

다른 실시양태에서, PDGF 길항제 및(또는) VEGF 길항제는 프로드럭이다.

발명의 상세한 설명

- [0069] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허문헌 및 특허 출원서는 본원에 참고로 포함된다.
- [0070] **정의**
- [0071] 본원에 사용된 바와 같이, 하기 용어 및 어구는 이하에 기재된 의미를 갖는다. 달리 정의하지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0072] "길항제"는 표적 분자의 활성 또는 생성을 부분적으로 또는 완전히 억제하는 작용제를 의미한다. 특히, 본원에서 선택적으로 적용되는 용어 "길항제"는 PDGF, PDGFR, VEGF 또는 VEGFR 유전자 발현의 수준, mRNA 수준, 단백질 수준 또는 단백질 활성을 감소시킬 수 있는 작용제를 의미한다. 길항제의 예시적인 형태로는 예를 들면 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 (예, 시클릭 펩티드), 항체 또는 항체 단편, 펩티드 모방체, 핵산 분자, 안티센스 분자, 리보자임, 앵타머, RNAi 분자, 및 유기 소분자를 들 수 있다. VEGF/VEGFR 및 PDGF/PDGFR 리간드/수용체 표적의 길항제 억제의 예시적인 비-제한적 메카니즘은 리간드 합성 및(또는) 안정성의 저해 (예, 리간드 유전자/핵산을 표적화하는 안티센스, 리보자임 또는 RNAi 조성물 사용), 리간드와 그의 동족 수용체의 결합 차단 (예, 항-리간드 앵타머, 항체 또는 가용성 데코이 동족 수용체 사용), 수용체 합성 및(또는) 안정성의 저해 (예, 리간드 수용체 유전자/핵산을 표적화하는 안티센스, 리보자임 또는 RNAi 조성물 사용), 수용체와 그의 동족 수용체의 결합 차단 (예, 수용체 항체 사용) 및 동족 리간드에 의한 수용체 활성화의 차단 (예, 수용체 티로신 키나제 억제제 사용)을 포함한다. 또한, 길항제는 표적 분자를 직접적으로 또는 간접적으로 억제할 수 있다.
- [0073] 용어 "항체"는, 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어 임의의 이소형 (IgG, IgA, IgM, IgE 등)의 온전한 항체를 포함하는 의미이며, 척추동물 (예, 포유동물)의 단백질, 탄수화물 등을 인식하여 이들과 특이적으로 반응하기도 하는 항체 단편을 포함한다. 통상의 기술을 이용해서 항체를 단편화할 수 있으며, 상기에서 온전한 항체에 대해 기술된 것과 동일한 방식으로 항체 단편을 유용성에 대해서 스크리닝한다. 따라서, 상기 용어는 특정 단백질과 선택적으로 반응할 수 있는 항체 분자를 단백질분해에 의해 절단하거나 또는 재조합 방법으로 제조하여 얻은 일부의 절편을 포함한다. 이러한 단백질분해 및(또는) 재조합 단편의 비-제한적 예는 Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, 및 펩티드 링커에 의해 연결된 V[L] 및(또는) V[H] 도메인을 함유하는 단일쇄 항체(scFv)를 포함한다. scFv를 공유적으로 또는 비공유적으로 연결하여 2개 이상의 결합 부위를 갖는 항체를 형성시킬 수 있다. 본 발명은 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 또는 기타 정제된 항체 및 재조합 항체 체제를 포함한다.
- [0074] 본원에서 용어 "핵산 리간드"와 서로 바꾸어 쓸 수 있는 용어 "앵타머"는 특정의 3차원 입체형태를 채택하는 능력에 의해 표적과 결합하여 표적에 대해 길항 (즉, 억제) 효과를 갖는 핵산을 의미한다. 본 발명의 표적은 PDGF 또는 VEGF (또는 이들의 동족 수용체인 PDGFR 또는 VEGFR 중 하나)이며, 따라서 용어 PDGF 앵타머 또는 핵산 리간드 또는 VEGF 앵타머 또는 핵산 리간드 (또는 PDGFR 앵타머 또는 핵산 리간드 또는 VEGFR 앵타머 또는 핵산 리간드)가 사용된다. 앵타머에 의한 표적의 억제는 표적의 결합에 의해, 표적을 촉매적으로 변화시키는 것에 의해, 표적 또는 표적의 기능적 활성을 변경/변화시키는 방식으로 표적과 반응하는 것에 의해, 자살 억제제에서와 같이 표적에 공유적으로 부착하는 것에 의해, 표적과 다른 분자 사이의 반응을 촉진시키는 것에 의해 일어날 수 있다. 앵타머는 다수의 리보뉴클레오타이드 단위, 데옥시리보뉴클레오타이드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오타이드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 앵타머는 본원에 더 상세히 기술된 바와 같이 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.
- [0075] "항체 길항제"는 표적 PDGF 또는 VEGF의 하나 이상의 활성을 차단하거나 또는 유의하게 감소시킬 수 있는, 본원에 정의된 바와 같은 항체 분자를 의미한다. 예를 들면, VEGF 억제성 항체는 VEGF가 혈관형성을 자극하는 능력을 억제하거나 또는 감소시킬 수 있다.
- [0076] 뉴클레오타이드 서열과 다른 뉴클레오타이드 서열의 각 염기가 매치되는, 즉 왓슨 크릭(Watson Crick) 염기쌍을 형성할 수 있는 경우에, 상기 두 서열을 "상보적"이라 한다. 용어 "상보적 가닥"은 본원에서 용어 "상보체"와 서로 바꾸어 쓸 수 있다. 핵산 가닥의 상보체는 코딩 가닥의 상보체 또는 비-코딩 가닥의 상보체일 수 있다.
- [0077] 어구 "보존된 잔기" 또는 "보존적 아미노산 치환"은 특정의 공통된 특성을 기초로 한 아미노산의 그룹화를 지칭한다. 개별 아미노산들 사이의 공통의 특성을 정의하는 기능적 방식은 동종 유기체의 상응하는 단백질들 사이에서 아미노산 변화의 정규화된 빈도를 분석하는 것이다. 이러한 분석에 따라, 그룹 내의 아미노산들이 서로

우선적으로 교환되며, 따라서 전체 단백질 구조에 대한 이들의 충격에 있어서 서로 가장 유사한 경우, 아미노산 그룹들이 정의될 수 있다 [Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag]. 이러한 방식으로 정의된 아미노산 그룹의 예는 이하의 것들을 포함한다:

- [0078] (i) Glu 및 Asp, Lys, Arg 및 His로 이루어진 하전된 그룹,
- [0079] (ii) Lys, Arg 및 His로 이루어진, 양으로 하전된 그룹,
- [0080] (iii) Glu 및 Asp로 이루어진, 음으로 하전된 그룹,
- [0081] (iv) Phe, Tyr 및 Trp로 이루어진 방향족 그룹,
- [0082] (v) His 및 Trp로 이루어진 질소 환 그룹,
- [0083] (vi) Val, Leu 및 Ile로 이루어진, 거대 지방족 비극성 그룹,
- [0084] (vii) Met 및 Cys로 이루어진, 약간 극성인 그룹,
- [0085] (viii) Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gin 및 Pro로 이루어진, 소형-잔기 그룹,
- [0086] (ix) Val, Leu, Ile, Met 및 Cys로 이루어진 지방족 그룹, 및
- [0087] (x) Ser 및 Thr로 이루어진, 소형 히드록실 그룹.

[0088] 상기 제시된 그룹들 이외에도, 각 아미노산 잔기가 그 자신의 그룹을 형성할 수 있으며, 개별 아미노산에 의해 형성된 그룹은 간단하게는 당업계에서 통상적으로 사용되는 아미노산에 대한 한 문자 및(또는) 세 문자 약어로써 언급될 수 있다.

[0089] 용어 "상호작용하다"는 본원에 사용된 바와 같이 분자들 사이의 검출가능한 관계 또는 회합 (예, 생화학적 상호작용), 예를 들어 본래 단백질-단백질, 단백질-핵산, 핵산-핵산, 및 단백질-소분자 또는 핵산-소분자 사이의 상호작용을 포함하는 의미이다.

[0090] 용어 "상호작용성 단백질"은 대상 단백질, 예를 들면 PDGF 또는 VEGF 단백질, 또는 이들의 상응하는 동족 수용체와 상호작용, 결합, 및(또는) 회합할 수 있는 단백질을 지칭한다.

[0091] 용어 "단리된"은 바와 같이, 각각 거대 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 DNA 또는 RNA로부터 분리된 분자와 관련된다. 유사하게, 용어 "단리된"은 폴리펩티드에 대해 본원에 사용된 바와 같이 폴리펩티드 공급원에 존재하는 다른 단백질로부터 분리된 단백질 분자와 관련된다. 또한, 용어 "단리된"은 본원에 사용된 바와 같이 세포 물질, 바이러스 물질, 또는 재조합 DNA 기술에 의해 제조되는 경우에는 배양 배지, 또는 화학적으로 합성되는 경우에는 화학물질 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없는 핵산 또는 펩티드와 관련된다.

[0092] "단리된 핵산"은 단편으로서 자연 발생적이지 않으며 천연 상태에서 존재하지 않는 핵산 단편을 포함하는 의미이다. 또한, 용어 "단리된"은 본원에서 다른 세포 단백질로부터 단리된 폴리펩티드와 관련하여 사용되며, 정제된 폴리펩티드 및 재조합 폴리펩티드를 둘 다 포함하는 의미이다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표지" 및 "검출가능한 표지"는 방사성 동위원소, 형광단, 화학발광 부분, 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 억제제, 염료, 금속 이온, 및 리간드 (예, 비오틴 또는 합텐) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 검출가능한 분자를 지칭한다. 용어 "형광물질"은 검출가능한 범위에서 형광을 나타낼 수 있는 물질 또는 그의 부분을 지칭한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 표지의 특정 예로는 플루오레신, 로다민, 단실, 움벨리페론, 텍사스(Texas) 레드, 루미놀, NADPH, 알파-베타-갈락토시다제 및 홀스래디쉬 퍼옥시다제를 들 수 있다.

[0094] "세포 내 유전자 발현 수준"은 세포 내 유전자에 의해 코딩되는 mRNA, 및 mRNA 이전의 초기(nascent) 전사체(들), 전사체 프로세싱 중간체, 성숙 mRNA(들) 및 분해 생성물의 수준, 및 해당 유전자로부터 번역된 단백질의 수준을 지칭한다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 테옥시리보핵산 (DNA), 및 경우에 따라 리보핵산 (RNA)을 지칭한다. 또한, 이 용어는 등가물로서 뉴클레오티드 동족체로부터 만들어진 RNA 또는 DNA의 동족체를 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 기재된 실시양태에 대해 적용가능한 것으로서는 단일 (센스 또는 안티센스) 및 이중-가닥 폴리뉴클레오티드, EST, 염색체, cDNA, mRNA, 및 rRNA가 핵산으로서 지칭될 수 있는 분자의 대표적인 예이다.

- [0096] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 자연 발생적인 염기, 당 및 당간(intersugar) (주쇄) 연결로 이루어진 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드 단량체의 올리고머 또는 중합체를 지칭한다. 또한, 이 용어는 유사하게 기능하는 비-자연 발생적인 단량체 또는 그의 부분을 포함하는 변형된 또는 치환된 올리고머를 포함한다. 치환된 올리고머의 혼입은 세포 흡수 증대 또는 뉴클레아제 내성 증가를 비롯한 인자에 기초하며, 당업계에 공지된 바와 같이 선택된다. 전체 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 일부분이 치환된 올리고머를 함유할 수 있다.
- [0097] 용어 "동일성(%)"은 2개의 아미노산 서열들 사이 또는 2개의 뉴클레오타이드 서열들 사이의 서열 동일성을 지칭한다. 동일성은 각각 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교되는 서열에서 등가의 위치를 동일한 염기 또는 아미노산이 차지하는 경우, 분자들은 이 위치에서 동일하며; 등가의 부위를 동일 또는 유사한 아미노산 잔기 (예, 입체 및(또는) 전자적 특징이 유사한 잔기)가 차지하는 경우, 분자들은 이 위치에서 상동성인 (유사한) 것으로서 언급될 수 있다. 상동성, 유사성 또는 동일성의 백분율 (%)로서의 발현은 비교되는 서열에 의해 공유되는 위치에서 동일 또는 유사한 아미노산의 수의 함수로서 지칭된다. 히든 마코브 모델(Hidden Markov Model; HMM), FASTA 및 BLAST를 비롯한 다양한 정렬 알고리즘 및(또는) 프로그램이 사용될 수 있다. HnIM, FASTA 및 BLAST가 [National Center for Biotechnology Information], [National Library of Medicine], [National Institutes of Health, Bethesda, Md.] 및 [European Bioinformatic Institute EBI]를 통해 이용가능하다. 한 실시양태에서, 두 서열의 동일성(%)은 1의 갭 중량(gap weight)으로 상기 GCG 프로그램에 의해 결정될 수 있는데, 예를 들면 각 아미노산 갭은 마치 두 서열 사이의 단일 아미노산 또는 뉴클레오타이드 미스매치인 것처럼 칭량된다. 정렬을 위한 다른 기술은 문헌 [Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA]에 기재되어 있다. 바람직한 경우, 서열 내에서 갭을 허용하는 정렬 프로그램을 사용하여 서열을 정렬시킨다. 스미스 워터맨(Smith Waterman)은 서열 정렬에서 갭을 허용하는 알고리즘의 한가지 유형이다 (문헌 [(1997) Meth. Mol. Biol. 70: 173-187] 참조). 또한, 니들맨 앤드 운쉬 (Needleman and Wunsch) 정렬 방법을 이용하는 GAP 프로그램을 사용해서 서열을 정렬시킬 수 있다. HMM의 사용을 비롯한 더 많은 기술 및 알고리즘이 문헌 [Sequence, Structure, and Databanks: A Practical Approach (2000), ed. Oxford University Press, Incorporated and in Bioinformatics: Databases and Systems (1999) ed. Kluwer Academic Publishers]에 기재되어 있다. 다른 조사 전략은 MASPAR 컴퓨터에서 수행되는 MPSRCH 소프트웨어를 이용한다. MPSRCH는 스미스-워터맨 알고리즘을 이용해서 초병렬(massively parallel) 컴퓨터 상에서 서열의 점수를 매긴다. 이러한 접근법은 관계가 먼 매치들을 가려내는 능력을 향상시키며, 특히 작은 갭 및 뉴클레오타이드 서열 에러에 대해 관용적이다. 핵산에 의해 코딩된 아미노산 서열을 사용해서 단백질 및 DNA 데이터베이스 둘 다를 검색할 수 있다. 개별 서열을 갖는 데이터베이스는 문헌 [Methods in Enzymology, ed. Doolittle, *supra*]에 기재되어 있다. 데이터베이스로는 젠뱅크, EMBL, 및 DNA 데이터베이스 오브 저팬(DNA Database of Japan)(DDBJ)을 들 수 있다.
- [0098] 이중나선에 관하여 "완전하게 매치된"은 이중나선을 구성하는 폴리- 또는 올리고뉴클레오타이드 가닥들이 각 가닥 내의 모든 뉴클레오타이드가 다른 가닥 내의 뉴클레오타이드와 왓슨-크릭 염기쌍 형성을 수행하도록 서로 이중 가닥 구조를 형성하는 것을 의미한다. 또한, 이 용어는 사용될 수 있는 뉴클레오시드 동족체, 예를 들면 테옥사이노신, 및 2-아미노퓨린 염기를 갖는 뉴클레오시드 등의 염기쌍 형성을 포함한다. 표적 폴리뉴클레오타이드와 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 사이의 이중나선 내 미스매치는 이중나선 내 뉴클레오타이드의 쌍이 왓슨-크릭 결합을 수행하지 못함을 의미한다. 삼중나선과 관련하여, 이 용어는 삼중나선이 완전하게 매치된 이중나선 및 제3의 가닥 (여기서, 모든 뉴클레오타이드는 완전하게 매치된 이중나선의 염기쌍과 후그스틴 (Hoogsteen) 또는 역(reverse) 후그스틴 결합을 수행함)으로 이루어짐을 의미한다.
- [0099] 용어 "RNA 간섭(interference)," "RNAi" 또는 "siRNA"는 모두 대상 유전자와 상동성인 (특히, 대상 유전자, 예를 들어 PDGF 또는 VEGF의 메신저 RNA와 상동성인) 하나 이상의 이중-가닥 RNA를 표적 세포에 도입함으로써 유전자 또는 유전자 생성물의 발현을 감소시키는 임의의 방법과 관련된다.
- [0100] 다형성 변이체는 폴리뉴클레오타이드 서열이 하나의 염기에서 달라지는 "단일 뉴클레오타이드 다형성" (SNP)을 포함할 수도 있다 (예를 들어, PDGF 또는 VEGF에서 하나의 염기 변이). SNP의 존재는 예를 들면 특정 집단, 질환 상태, 또는 질환 상태에 대한 경향을 나타낼 수 있다.
- [0101] 비정상적인, 예를 들어 종양 세포의 생물학적 상태의 "프로파일"은 질환 상태에 반응에서의 변화하는 세포의 다양한 구성성분의 수준과 관련된다. 세포의 구성성분으로는 RNA의 수준, 단백질 관다분 수준 또는 단백질 활성 수준을 들 수 있다.

- [0102] 용어 "단백질"은 본원에서 용어 "펩티드" 및 "폴리펩티드"와 서로 바꾸어 쓸 수 있다. 용어 "재조합 단백질"은 재조합 DNA 기술에 의해 제조되는 본 발명의 단백질을 지칭하는데, 일반적으로 발현시킬 단백질 또는 RNA를 코딩하는 DNA를 적합한 발현 벡터에 삽입하고, 이 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킴으로써 이중 단백질 또는 RNA를 생성시킨다. 또한, 재조합 단백질을 코딩하는 재조합 유전자에 대하여 어구 "~로부터 유도된"은 "재조합 단백질"의 의미 내에서 천연 단백질의 아미노산 서열, 또는 이 서열과 유사하며 자연 발생적인 단백질의 치환 및 결실을 비롯한 돌연변이에 의해 생성되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함하는 의미이다.
- [0103] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "트랜스진(transgene)"은 세포로 도입된 핵산 서열 (예를 들면, 표적 핵산 또는 그에 대한 안티센스 전사체 중 하나를 코딩함)을 의미한다. 트랜스진은 그가 도입되는 트랜스제닉 동물 또는 세포에 대해 부분적으로 또는 완전히 이중, 즉 외래적일 수 있거나 또는 그가 도입되는 트랜스제닉 동물 또는 세포의 내인성 유전자에 대해 상동성이지만, 그가 삽입되는 세포의 게놈을 변화시키는 방식으로 동물의 게놈에 삽입되도록 설계되거나 또는 삽입된다 (예를 들면, 트랜스진은 천연 유전자의 부위와는 다른 부위에 삽입되거나 또는 그의 삽입은 녹아웃(knockout)을 일으킨다). 또한, 트랜스진은 세포 내에서 에피솜 형태로 존재할 수도 있다. 트랜스진은 하나 이상의 전사 조절 서열 및 선택된 핵산의 최적 발현에 필요할 수 있는 임의의 다른 핵산, 예를 들어 인트론을 포함할 수 있다.
- [0104] "혈관신생성 장애"는 종양발생 또는 신생물 형질전환, 즉 암을 수반하는 것 이외의 변화되거나 조절되지 않는 혈관형성을 특징으로 하는 장애를 의미한다. 혈관신생성 장애의 예로는 건선, 류마티스성 관절염, 및 당뇨병성 망막병증 및 노인성 황반 변성을 비롯한 안구의 혈관신생성 장애를 들 수 있다.
- [0105] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "혈관신생" 및 "혈관형성"은 서로 바꾸어 쓸 수 있다. 혈관신생 및 혈관형성은 새로운 혈관이 세포, 조직, 또는 기관 내로 발생하는 것을 지칭한다. 혈관형성의 조절은 전형적으로는 특정 질환 상태에서 변화하며, 많은 경우에서, 이 질환과 관련된 병리학적 손상은 변화되거나, 조절되지 않거나 제어되지 않는 혈관형성과 관련된다. 지속적이며 조절되지 않는 혈관형성이 내피 세포에 의한 비정상적 성장을 특징으로 하는 것들을 비롯한 다수의 질환 상태에서 일어나며, 혈관의 누출 및 투과성을 비롯한 이들 상태에서 관찰되는 병리학적 손상을 뒷받침한다.
- [0106] "안구의 혈관신생성 장애"는 환자의 눈에서 변화되거나 조절되지 않는 혈관형성을 특징으로 하는 장애를 의미한다. 예시적인 안구의 혈관신생성 장애로는 시신경유두 혈관신생, 홍채 혈관신생, 망막 혈관신생, 맥락막 혈관신생, 각막 혈관신생, 유리체 혈관신생, 녹내장, 판누스, 익상편, 황반 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 혈관 망막병증, 망막 변성, 포도막염, 망막의 염증성 질환, 및 증식성 유리체망막병증을 들 수 있다.
- [0107] 대상체에서 혈관신생 질환을 "치료하는" 또는 혈관신생 질환을 앓는 대상체를 "치료하는"이라는 용어는 혈관신생 질환의 한가지 이상의 증상이 감소되도록 대상체를 약물 치료로 처치, 예를 들면 대상체에게 약물을 투여하는 것을 지칭한다. 따라서, 용어 "치료하는"은 본원에 사용된 바와 같이 혈관신생 상태 또는 질환의 한가지 이상의 증상을 완화시키는 것뿐만 아니라 치료하는 것을 포함하는 의미이다. 따라서, 용어 "치료하는"은 본원에 사용된 바와 같이 안구의 혈관신생성 장애의 치료 또는 예방을 위해 제약 조성물을 투여하거나 또는 처방하는 것을 포함한다.
- [0108] "환자"는 임의의 동물을 의미한다. 용어 "동물"은 인간 및 기타 영장류를 포함하지만 이에 한정되지 않는 포유동물을 포함한다. 또한, 이 용어는 가축화된 동물, 예를 들어 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이를 포함한다.
- [0109] "PDGF" 또는 "혈소판-유래 성장 인자"는 혈관형성 또는 혈관형성 과정에 영향을 주는 포유동물 혈소판-유래 성장 인자를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "PDGF"는 PDGF-B (도 1 (A) 및 (B) 참조), 및 PDGF-A (도 1 (C) 및 (D) 참조)를 비롯한 PDGF의 다양한 아형을 포함한다. 추가로, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "PDGF"는 동종 PDGF 수용체를 통해 혈관형성 또는 혈관형성 과정을 자극하는 작용을 하는 PDGF-관련 혈관형성 인자, 예를 들면 PDGF-C 및 PDGF-D를 지칭한다. 특히, 용어 "PDGF"는 (i) PDGF 수용체, 예를 들면 PDGFR-B (도 3 (A) 및 (B) 참조), 또는 PDGFR-A (도 3 (C) 및 (D) 참조)에 결합하고; (ii) VEGF 수용체와 관련된 티로신 키나제 활성을 활성화하고; (iii) 이에 따라, 혈관형성 또는 혈관형성 과정에 영향을 주는 성장 인자 부류의 임의의 구성원을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 일반적으로 용어 "PDGF"는 반응성 세포 유형에 대한 혈소판-유래 성장 인자 세포 표면 수용체 (즉, PDGFR)의 결합 및 활성화를 통해 DNA 합성 및 유사분열을 유도하는 성장 인자 부류의 구성원들을 지칭한다. PDGF는 예를 들면 지정된 세포 이동 (화학주성) 및 세포 활성화; 포스포리파제 활성화; 포스포티딜이노시톨 턴오버(turnover) 증가 및 프로스타글란딘 대사; 반응성 세포에 의한 콜라겐 및 콜라게나제 합성 둘 다의 자극; 매트릭스 합성, 사이토킨 제조 및 지단백질 흡수를 비롯한 세포 대사

활성의 변화; PDGF 수용체가 결합된 세포에서 증식성 반응의 간접 유도; 및 강력한 혈관수축신경 활성을 비롯한 특성의 생물학적 효과에 영향을 준다. 용어 "PDGF"는 "PDGF" 폴리펩티드 및 그의 상응하는 "PDGF" 코딩 유전자 또는 핵산 둘 다를 포함하는 의미이다.

[0110] "PDGF-A"는 PDGF의 A쇄 폴리펩티드 및 그의 상응하는 코딩 유전자 또는 핵산을 의미한다.

[0111] "PDGF-B"는 PDGF의 B쇄 폴리펩티드 및 그의 상응하는 코딩 유전자 또는 핵산을 의미한다.

[0112] "VEGF" 또는 "혈관 내피 성장 인자"는 혈관형성 또는 혈관형성 과정에 영향을 주는 포유동물 혈관 내피 성장 인자를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "VEGF"는 예를 들어 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ 및 VEGF₁₈₉를 비롯하여 VEGF-A/VPF 유전자의 다른 스플라이싱에 의해 발생하는 VEGF의 다양한 아형 (혈관 투과성 인자 (VPF) 및 VEGF-A로도 알려져 있음)(도 2 (A) 및 (B) 참조)을 포함한다. 추가로, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "VEGF"는 동족 VEGF 수용체를 통해 혈관형성 또는 혈관형성 과정을 자극하는 작용을 하는 VEGF-관련된 혈관형성 인자, 예를 들면 PlGF (태반 성장 인자), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 및 VEGF-E를 지칭한다. 특히, 용어 "VEGF"는 (i) VEGF 수용체, 예를 들면 VEGFR-1 (Flt-1)(도 4 (A) 및 (B) 참조), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (도 4 (C) 및 (D) 참조), 또는 VEGFR-3 (FLT-4)에 결합하고; (ii) VEGF 수용체와 관련된 티로신 키나제 활성을 활성화하고; (iii) 이에 따라, 혈관형성 또는 혈관형성 과정에 영향을 주는 성장 인자 부류의 임의의 구성원을 의미한다. 용어 "VEGF"는 "VEGF" 폴리펩티드 및 그의 상응하는 "VEGF" 코딩 유전자 또는 핵산 둘 다를 포함하는 의미이다.

[0113] "PDGF 길항제"는 PDGF의 활성 또는 생성을 부분적으로 또는 완전히 감소시키거나 또는 억제하는 작용제를 의미한다. PDGF 길항제는 특성의 PDGF, 예를 들면 PDGF-B를 직접적으로 또는 간접적으로 감소시키거나 또는 억제하는 작용제를 의미한다. 또한, "길항제"의 상기 정의와 일치하는 "PDGF 길항제"는 PDGF 리간드 또는 그의 동족 수용체 상에서 작용함으로써 PDGF-관련된 수용체 신호를 감소시키거나 또는 억제하는 작용제를 포함할 수 있다. 이러한 "PDGF 길항제"의 예로는, 예를 들면 안티센스, 리보자임 또는 RNAi 조성물 (PDGF 핵산을 표적화함); 항-PDGF 앵타머, 항-PDGF 항체 또는 가용성 PDGF 수용체 테코이 (PDGF와 그의 동족 수용체의 결합을 방지함); 안티센스, 리보자임 또는 RNAi 조성물 (동족 PDGF 수용체 (PDGFR) 핵산을 표적화함); 항-PDGFR 앵타머 또는 항-PDGFR 항체 (동족 PDGFR 수용체와 결합함); 및 PDGFR 티로신 키나제 억제제를 들 수 있다.

[0114] "VEGF 길항제"는 VEGF의 활성 또는 생성을 부분적으로 또는 완전히 감소시키거나 또는 억제하는 작용제를 의미한다. VEGF 길항제는 특성의 VEGF, 예를 들면 VEGF₁₆₅를 직접적으로 또는 간접적으로 감소시키거나 또는 억제할 수 있다. 또한, "길항제"의 상기 정의와 일치하는 "VEGF 길항제"는 VEGF 리간드 또는 그의 동족 수용체 상에서 작용함으로써 VEGF-관련된 수용체 신호를 감소시키거나 또는 억제하는 작용제를 포함할 수 있다. 따라서, 이러한 "VEGF 길항제"의 예로는, 예를 들면 안티센스, 리보자임 또는 RNAi 조성물 (VEGF 핵산을 표적화함); 항-VEGF 앵타머, 항-VEGF 항체 또는 가용성 VEGF 수용체 테코이 (VEGF와 그의 동족 수용체의 결합을 방지함); 안티센스, 리보자임, 또는 RNAi 조성물 (동족 VEGF 수용체 (VEGFR) 핵산을 표적화함); 항-VEGFR 앵타머 또는 항-VEGFR 항체 (동족 VEGFR 수용체와 결합함); 및 VEGFR 티로신 키나제 억제제를 들 수 있다.

[0115] "혈관신생성 장애를 억제하는데 충분한 양"은 혈관신생성 장애 또는 그의 증상을 치료하거나 또는 예방하는데 필요한, 본 발명의 조합물 중의 길항제의 유효량을 의미한다. 혈관신생성 장애에 의해 유발되거나 또는 이러한 장애의 원인이 되는 상태의 치유 처치를 위해 본 발명을 실시하는데 사용되는 활성 길항제의 "유효량"은 투여 방식, 혈관신생성 장애의 해부학적 부위, 환자의 연령, 체중 및 전반적인 건강상태에 따라 달라진다. 결국, 의사 또는 수의사가 적정량 및 투여 치료법을 결정하게 될 것이다. 이러한 양은 혈관신생성 장애를 억제하는데 충분한 양으로서 언급된다.

[0116] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 특허청구의 범위로부터 분명해질 것이다.

[0117] 폴리펩티드 X의 "변이체"는 하나 이상의 아미노산 잔기에서 변화된 펩티드 X의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 변이체는 "보존적" 변화를 가질 수 있는데, 이 경우에 치환된 아미노산은 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 갖는다 (예를 들면, 루이신을 이소루이신으로 대체함). 보다 드물게는, 변이체는 "비보존적" 변화를 가질 수 있다 (예를 들면, 글리신을 트립토판으로 대체함). 유사한 소수의 변이는 아미노산 결실 또는 삽입, 또는 이들 둘 다를 포함할 수도 있다. 생물학적 또는 면역학적 활성을 제거하지 않으면서 아미노산 잔기를 치환, 삽입 또는 결실시킬 수 있는지의 여부를 결정하는 지침은, 당업계에 잘 알려진 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, LASERGENE 소프트웨어 (DNASTAR)를 사용하여 찾을 수 있다.

[0118] 폴리뉴클레오티드 서열의 경우에 사용되는 용어 "변이체"는 유전자의 것과 관련된 폴리뉴클레오티드 서열 또는

그의 코딩 서열을 포함할 수 있다. 이 정의는 예를 들면 "대립유전자," "스플라이스," "중" 또는 "다형성" 변이체를 포함할 수도 있다. 스플라이스 변이체는 기준(reference) 분자와 유의한 동일성을 가질 수 있지만, 일반적으로는 mRNA 프로세싱 동안 엑손의 다른 스플라이싱으로 인해 더 많거나 또는 더 적은 수의 폴리뉴클레오타이드를 가질 것이다. 상응하는 폴리펩티드는 추가의 기능적 도메인을 보유할 수 있거나 또는 도메인이 존재하지 않을 수 있다. 중 변이체는 하나의 종과 다른 종에서 달라지는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 생성된 폴리펩티드는 일반적으로 서로에 대해 유의한 아미노산 동일성을 가질 것이다. 다형성 변이체는 주어진 종의 개체들 사이의 특정 유전자의 폴리뉴클레오타이드 서열에서의 변이이다.

[0119] 용어 "벡터"는 연결되는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 유용한 벡터의 한 유형은 에피솜, 즉 염색체 외부에서의 복제할 수 있는 핵산이다. 유용한 벡터로는 연결되는 핵산을 자율적으로 복제하고(하거나) 발현할 수 있는 것들이 있다. 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 검출할 수 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 흔히 "플라스미드" 형태이며, 이는 일반적으로 벡터 형태에서 염색체에 결합되지 않은 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 본 명세서에서, 플라스미드는 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에, "플라스미드" 및 "벡터"는 서로 바꾸어 쓸 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 하며 이에 대하여 이후에 당업계에 공지될 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.

[0120] 조합 치료법

[0121] 본 발명은, 부분적으로, 혈관신생성 장애를 갖는 환자에 대한 강력한 치료제로서 적절한 성장 인자 길항제를 사용하여 VEGF 및 PDGF 활성 둘 다를 특이적으로 억제하는 것에 기초한다. PDGF 길항제와 VEGF 길항제의 조합물의 투여는 안구의 혈관신생성 장애를 치료하는데 있어서 길항제를 단독으로 투여하는 경우보다 더 큰 치료 이점을 제공한다. 항-VEGF 작용제와 항-PDGF 작용제의 복합 작용은 망막 내피 세포계의 혈관형성을 자극하는데 있어서 상기 두 인자들 사이에 분명한 협동작용이 없음을 입증하는 연구 측면에서 예상하지 못한 것이다 (문헌 [Castellon et al., (2001) Exp. Eye Res. 74: 523-35] 참조).

[0122] PDGF 및 VEGF는 신체 전반, 특히 눈에서의 새로운 혈관의 성장에 대한 중요한 자극이다. PDGF 및 VEGF 생물학적 활성 둘 다를 억제하는 것으로 지정된 조합 치료법은 혈관신생성 장애를 치료하거나 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0123] 따라서, 본 발명은 조합 치료법을 이용하여 혈관신생성 장애를 억제하기 위한 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 특히, 본 발명은 혈관신생성 장애, 예를 들면 안구의 혈관신생성 장애의 치료에서의 치료 표적으로서 혈관 세포에서 작동하는 두 가지 상이한 세포간 통신 신호전달 경로, 즉 PDGF 및 VEGF 신호전달 경로를 이용한다. 이러한 조합 방법은 시신경유두 혈관신생, 홍채 혈관신생, 망막 혈관신생, 맥락막 혈관신생, 각막 혈관신생, 유리체 혈관신생, 녹내장, 판누스, 익상편, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종, 혈관 망막병증, 망막 변성, 황반 변성, 포도막염, 망막의 염증성 질환, 및 증식성 유리체망막병증을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 안구의 혈관신생의 발생이 현저한 임의의 다수의 안과적 질환 및 장애를 치료하는데 특히 유용하다. PDGF (예, PDGF-B) 및 VEGF (예, VEGF-A) 신호전달을 억제하는 길항제들로 이루어진 조합 치료법은 독립적으로 이용되는 두 가지 치료법의 각각에 비해 치료 효능의 증가를 나타낸다. 하기 논의된 예들은 단일 PDGF 길항제와 단일 VEGF 길항제의 조합을 기술하지만, 다수의 길항 작용제들의 조합이 바람직한 것으로 여겨진다.

[0124] 본 발명에 따른 항-PDGF 및 항-VEGF 조합 치료법은 단독으로 또는 또다른 치료법과 함께 수행될 수 있고, 가정, 진료소, 클리닉, 병원 외래국 또는 병원에서 제공될 수 있다. 일반적으로, 치료는 의사가 치료법의 효과를 면밀히 관찰하고 필요한 임의의 조치를 취할 수 있도록 병원에서 시작한다. 조합 치료법의 기간은 치료될 혈관신생성 장애의 유형, 환자의 연령 및 상태, 환자 질환의 단계 및 유형, 및 치료에 대한 환자의 반응에 따라 달라진다. 추가로, 혈관신생성 장애의 발병 위험이 보다 큰 사람 (예를 들어, 당뇨병 환자)은 징상의 발병을 억제하거나 지연시키는 치료를 받을 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 하나의 상당한 이점은, 혈관신생성 장애의 치료를 위한 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제의 조합물이 각각의 길항제 및 전체 활성 길항제의 적은 투여량 투여를 가능하게 하여, 낮은 독성 및 부작용, 및 감소된 비용으로 유사한 효과를 제공할 수 있다는 것이다.

[0125] 조합물의 각 성분의 투여량 및 투여 빈도는 독립적으로 제어될 수 있다. 예를 들어, 제1 길항제는 1일 3회 투여하는 반면, 제2 길항제는 1일 1회 투여될 수 있다. 조합 치료법은 환자의 신체가 임의의 예기치 못한 부작용으로부터 회복할 기회를 갖도록 휴지기를 포함하는 온-오프(on-and-off) 사이클로 제시될 수 있다. 길항제는 또한 상기 두 길항제가 한번의 투여에 의해 전달되도록 함께 제제화될 수 있다.

[0126] **PDGF 및 VEGF 길항제 표적**

[0127] PDGF는 원래 혈소판 용해물로부터 분리되고, 혈장이 아니라 혈청에서 주요 성장-촉진 활성이 존재하는 것으로 확인되었다. PDGF의 유사분열 활성은 먼저 섬유아세포 및 평활근 세포와 같은 결합 조직 세포 상에서 및 배양물 중의 아교 세포에서 작용하는 것으로 밝혀졌다. 별도의 유전자에 의해 (염색체 7 및 22 상에서) 코딩되는 두가지 동종 PDGF 이소형인 PDGF A 및 B가 확인되었다. 모든 가능한 세가지 이합체 (AA, AB 및 BB)가 자연 발생되지만, 혈소판에 가장 풍부한 종은 AB 이종 이합체이다. 번역 후에, PDGF 이합체는 대략 30 kDa 분비된 단백질로 가공된다.

[0128] 고친화성으로 PDGF와 결합하는 2가지 세포 표면 단백질인 알파 및 베타가 확인되었다 (문헌 [Heldin et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 3664] 및 [Williams et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 5867]). 상기 두 종은 5가지 이뮤노글로불린-유사 세포외 도메인, 단일 막횡단 도메인, 및 키나제 삽입 도메인에 의해 분리된 세포내 티로신 키나제 도메인을 함유한다. 최근 수년간, 3가지 수용체 이합체 (알파/알파, 알파/베타, 및 베타/베타)에 대한 3가지 PDGF 이소형의 특이성이 밝혀졌다. 알파-수용체 동종 이합체는 3가지 모든 PDGF 이소형과 고친화성으로 결합하고, 베타-수용체 동종 이합체는 PDGF BB하고만 고친화성으로 결합하고 PDGF AB와는 대략 10 배 낮은 친화성으로 결합하며, 알파/베타-수용체 이종 이합체는 PDGF BB 및 PDGF AB와 고친화성으로 결합한다 (문헌 [Westermarck & Heldin (1993) Acta Oncologica 32: 101]). 이러한 특이성 패턴은 알파-수용체하고만 결합하는 A-쇄의 능력 및 알파 및 베타-수용체 서브유닛 둘 다와 고친화성으로 결합하는 B-쇄의 능력에서 기인한 것으로 여겨진다.

[0129] 일반적으로, 본 발명은 하나 이상의 PDGF 활성을 억제하는 작용제를 제공한다. 이들 PDGF-억제제 또는 PDGF 길항제는 PDGF 리간드의 하나 이상의 형태에 대해 작용할 수 있다. 혈소판 유래 성장 인자는 2가지 관련 수용체 티로신 키나제인 [알파]-수용체 (PDGFR-[알파]) 및 [베타]-수용체 (PDGFR-[베타])의 결합 및 이합체화를 통해 작용하는, A-쇄 (PDGF-A) 및 B-쇄 (PDGF-B)의 동종 이합체 또는 이종 이합체를 포함한다. 또한, PDGFR 복합체에 대한 신규한 2가지 프로테아제-활성화된 리간드인 PDGF-C 및 PDGF-D가 확인되었다 (문헌 [Li et al., (2000) Nat. Cell. Biol. 2: 302-9], [Bergsten et al., (2001) Nat. Cell. Biol. 3: 512-6] 및 [Utele et al., (2001) Circulation 103: 2242-47] 참조). PDGFR의 상이한 리간드 결합 특이성으로 인해, PDGFR-[알파][알파]가 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB 및 PDGF-CC와 결합하고, PDGFR-[베타][베타]가 PDGF-BB 및 PDGF-DD와 결합하는 반면, PDGFR-[알파][베타]는 PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC 및 PDGF-DD와 결합한다는 것은 공지되어 있다 (문헌 [Betsholtz et al., (2001) BioEssays 23: 494-507] 참조).

[0130] VEGF는 내피 세포를 선택적으로 자극하여 매트릭스-분해 효소를 증식, 이동 및 생성하는 (이들 모든 과정은 새로운 혈관의 형성을 필요로 함) 분비된 디설파이드-연결된 동종 이합체이다 (문헌 [Conn et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 1323-1327], [Ferrara and Henzel (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 851-858], [Pepper et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 902-906], [Unemori et al., (1992) J. Cell. Physiol. 153: 557-562] 참조). VEGF 유전자의 상이한 스플라이싱의 결과에 의해 VEGF는 4가지 형태 (VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206)로 나타난다 (문헌 [Houck et al., (1991) Mol. Endocrinol. 5: 1806-1814] 및 [Tischer et al., (1991) J. Biol. Chem. 266: 11947-11954]). 보다 작은 두 형태는 확산가능한 반면에, 보다 큰 두 형태는 헤파린에 대한 고친화성으로 인해 세포막에 우세하게 국소화된다. VEGF-165 또한 헤파린에 결합하며, 가장 풍부한 형태이다. VEGF-121은 헤파린에 결합하지 않는 유일한 형태이며, VEGF 수용체에 대해 낮은 친화성 (문헌 [Gitay-Goren et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 5519-5523]), 뿐만 아니라 낮은 유사분열 효력 (문헌 [Keyt et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 7788-7795])을 갖는 것으로 여겨진다. VEGF의 생물학적 효과는 내피 기원의 세포에만 매우 제한되어 발현되는 2가지 티로신 키나제 수용체 (Flt-1 및 Flk-1/KDR)에 의해 매개된다 (문헌 [de Vries et al., (1992) Science 255: 989-991], [Millauer et al., (1993) Cell 72: 835-846], [Terman et al., (1991) Oncogene 6: 519-524]). 상기 두 기능적 수용체의 발현을 위해서는 고친화성 결합이 요구되지만, 내피 세포에서의 화학주성 및 유사분열 신호전달은 KDR 수용체를 통해 주로 일어나는 것으로 여겨진다 (문헌 [Park et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 25646-25654], [Seetharam et al., (1995) Oncogene 10: 135-147], [Waltenberger et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 26988-26995]). 최근 혈관의 발생에 대한 VEGF 및 VEGF 수용체의 중요성은 VEGF 유전자에 대한 단일 대립 유전자가 결여된 마우스 (문헌 [Carmeliet et al., (1996) Nature 380: 435-439], [Ferrara et al., (1996) Nature 380: 439-442]) 또는 Flt-1 (문헌 [Fong et al., (1995) Nature 376: 66-70]) 또는 Flk-1 유전자 (문헌 [Shalaby et al., (1995) Nature 376: 62-66])의 두 대립 유전자가 결여된 마우스에서 입증되었다. 각각의 경우, 혈관 형성에서의 뚜렷한 비정상에 의해 배아 치명상이 나타나는 것으로 관찰되었다.

- [0131] 조직 저산소증에 의해 유도되는 보상성 혈관형성은 VEGF에 의해 매개되는 것으로 공지되어 있다 (문헌 [Levy et al., (1996) J. Biol. Chem. 274:2753], [Shweiki et al., (1992) Nature 359: 843-845]). 인간에서의 연구에 의해, 고농도의 VEGF가 혈관형성성 망막 장애에서는 유리질에 존재하지만, 비활성 또는 비-혈관신생성 질환 상태에서는 존재하지 않는다는 것이 밝혀졌다. 실험용 황반하 수술 후에 절단된 인간 맥락막 조직 또한 높은 VEGF 수준을 나타내었다.
- [0132] 유일하게 공지된 내피 세포 특이적 마이토젠 이외에도, 혈관형성 성장 인자 중에서 VEGF는 거대 분자에 대한 혈관 투과성의 일시적인 증가를 유도하는 능력의 면에서 유일하다 (그의 다른 원래 명칭이 혈관 투과성 인자 VPF 임) (문헌 [Dvorak et al., (1979) J. Immunol. 122: 166-174], [Senger et al., (1983) Science 219: 983-985], [Senger et al., (1986) Cancer Res. 46: 5629-5632]). 증가된 혈관 투과성, 및 그로 인해 혈관의 공간에서 혈장 단백질의 침착은 내피 세포의 이동을 위한 임시적인 매트릭스를 제공함으로써 새로운 혈관 형성을 보조한다 (문헌 [Dvorak et al., (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029-1039]). 실제로, 과투과성은 종양과 관련된 것을 비롯한 새로운 혈관의 특징적인 성질이다.
- [0133] **PDGF 및 VEGF 길항제**
- [0134] **개론**
- [0135] 본 발명은 혈관신생성 장애를 위한 조합 치료법에서 함께 사용되는 PDGF 및 VEGF의 길항제 (즉, 억제제)를 제공한다. 특이적 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 당업계에 공지되어 있고, 하기에 간략히 기재된다. 당업자에게 현재 유용한 또는 유용하게 될 다른 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제로는 항체, 앵타머, 안티센스 올리고머, 리보자임 및 RNAi 조성물이 있으며, 이들은 하기에 추가로 제공되는 부분을 비롯하여 명세서의 교시 및 지침과 함께 당업계의 일반적인 실무를 이용하여 확인 및 제조될 수 있다.
- [0136] **PDGF 길항제**
- [0137] 일반적으로, PDGF (예를 들어, PDGF-B)의 억제는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, PDGF의 활성 또는 생성을 억제하는 다양한 PDGF 길항제가 유용하고, 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 PDGF 길항제로는 하기 기재된 것과 같은 PDGF의 핵산 리간드 또는 앵타머가 있다. 대안적으로, PDGF 길항제는 예를 들어 항-PDGF 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 따라서, PDGF 분자는 수용체와의 결합이 억제됨으로써 비활성으로 된다. 또한, 핵산 수준에서 PDGF 발현을 억제하는 핵산 분자, 예컨대 안티센스 RNA, 리보자임 및 RNAi 분자는 본 발명에서 길항제로서 유용하다. 다른 PDGF 길항제로는 펩티드, 단백질, 시클릭 펩티드, 또는 소형 유기 화합물이 있다. 또한, PDGF의 신호전달 활성은 그의 하류 신호전달을 분열시킴으로써, 예를 들어 하기 기재된 것을 비롯한 수많은 소분자 티로신 키나제 억제 길항제를 사용함으로써 억제될 수 있다. 화합물 또는 작용제가 PDGF 길항제로서 작용하는 능력은 당업계에 공지된 방법에 따라, 또한 예를 들어 문헌 [Dai et al., (2001) Genes & Dev. 15: 1913-25], [Zippel, et al., (1989) Eur. J. Cell. Biol. 50(2): 428-34] 및 [Zwiller, et al., (1991) Oncogene 6: 219-21]에서 설명된 바와 같이 억제될 수 있다.
- [0138] 본 발명은 또한 당업계에 공지된 것 뿐만 아니라 하기에 기재된 PDGF 길항제, 및 통상의 기술 범위 내에서 생성될 수 있는 임의의 모든 등가물을 포함한다. 예를 들어, PDGF에 대해 지정된 억제 항체는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제5,976,534호, 동 제5,833,986호, 동 제5,817,310호, 동 제5,882,644호, 동 제5,662,904호, 동 제5,620,687호, 동 제5,468,468호, 및 PCT WO 2003/025019호 (상기 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 또한, 본 발명은 PDGF 길항제인 N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체, 예컨대 미국 특허 제5,521,184호, WO 2003/013541호, WO 2003/078404호, WO 2003/099771호, WO 2003/015282호 및 WO 2004/05282호 (상기 문헌들은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 개시된 것을 포함한다.
- [0139] PDGF의 작용을 차단하는 소분자는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,528,526호 (PDGFR 티로신 키나제 억제제), 제6,524,347호 (PDGFR 티로신 키나제 억제제), 제6,482,834호 (PDGFR 티로신 키나제 억제제), 제6,472,391호 (PDGFR 티로신 키나제 억제제), 제6,696,434호, 동 제6,331,555호, 동 제6,251,905호, 동 제6,245,760호, 동 제6,207,667호, 동 제5,990,141호, 동 제5,700,822호, 동 제5,618,837호 및 동 제5,731,326호 (상기 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0140] PDGF의 작용을 차단하는 단백질 및 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,350,731호 (PDGF 펩티드 동족체), 제5,952,304호 (상기 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

- [0141] EGF 및(또는) PDGF 수용체 티로신 키나제를 억제하는 비스 모노- 및 비시클릭 아릴 및 헤테로아릴 화합물은 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제5,476,851호, 동 제5,480,883호, 동 제5,656,643호, 동 제5,795,889호 및 동 제6,057,320호 (상기 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0142] PDGF의 억제를 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제5,869,462호 및 동 제5,821,234호 (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0143] PDGF의 억제를 위한 앵타머 (핵산 리간드로도 공지됨)는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,582,918호, 동 제6,229,002호, 동 제6,207,816호, 동 제5,668,264호, 동 제5,674,685호 및 동 제5,723,594호 (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0144] 당업계에 공지된 PDGF의 억제를 위한 다른 화합물로는 미국 특허 제5,238,950호, 동 제5,418,135호, 동 제5,674,892호, 동 제5,693,610호, 동 제5,700,822호, 동 제5,700,823호, 동 제5,728,726호, 동 제5,795,910호, 동 제5,817,310호, 동 제5,872,218호, 동 제5,932,580호, 동 제5,932,602호, 동 제5,958,959호, 동 제5,990,141호, 동 제6,358,954호, 동 제6,537,988호 및 동 제6,673,798호 (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 것을 들 수 있다.
- [0145] *VEGF 길항제*
- [0146] VEGF (예를 들어, VEGF-A)의 억제는 다양한 방식으로 달성된다. 예를 들어, VEGF의 활성 또는 생성을 억제하는 다양한 VEGF 길항제, 예를 들어 핵산 분자, 예컨대 앵타머, 안티센스 RNA, 리보자임, RNAi 분자 및 VEGF 항체가 유용하고, 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 VEGF 길항제로는 하기 기재된 것과 같은 VEGF의 핵산 리간드 또는 앵타머가 있다. 특히 유용한 VEGF-A에 대한 길항제는 개질된 PEG화 앵타머인 EYE001 (이미 NX1838로서 지칭됨)이며, 이는 주요 가용성 인간 VEGF 이소형에 대해 특이적인 높은 친화성으로 결합한다 (미국 특허 제6,011,020호, 동 제6,051,698호 및 동 제6,147,204호 참조). 앵타머는 VEGF에 대해 지정된 고친화성 항체와 유사한 방식으로 VEGF와 결합하고 이를 불활성화시킨다. 또다른 유용한 VEGF 앵타머는 비-PEG화 형태인 EYE001이다. 대안적으로, VEGF 길항제는 예를 들어 항-VEGF 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 따라서, VEGF 분자는 수용체와의 결합을 억제함으로써 비활성으로 된다. 또한, 핵산 수준에서 VEGF 발현 또는 RNA 안정성을 저해하는 핵산 분자, 예컨대 안티센스 RNA, 리보자임 및 RNAi 분자는 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 길항제이다. 다른 VEGF 길항제로는 펩티드, 단백질, 시클릭 펩티드, 및 소형 유기 화합물이 있다. 예를 들어, 수반되는 신호전달 활성이 없이 VEGF 수용체와 결합하는 VEGF의 가용성 말단 절단된 형태 또한 길항제로서 작용한다. 또한, VEGF의 신호전달 활성은 그의 하류 신호전달을 분열시킴으로써, 예를 들어 하기 기재된 것과 같은 VEGF 수용체 티로신 키나제 활성의 소분자 억제제를 비롯한 수많은 길항제를 사용함으로써 억제될 수 있다.
- [0147] 화합물 또는 작용제가 VEGF 길항제로서 작용하는 능력은 당업계에 널리 공지된 수많은 표준 방법에 따라 측정될 수 있다. 예를 들어, VEGF의 생물학적 활성 중 하나는 혈관 내피 세포 상에서 수용체와의 특이적 결합을 통해 혈관 투과성을 증가시키는 것이다. 상기 상호작용으로 인해 단단한 내피 결합의 이완이 일어나고, 이후에 혈액이 누출되게 된다. VEGF에 의해 유도된 혈관 누출은 VEGF의 피내 주사 결과 기니피그(guinea pig)의 혈관계로부터 에반스 블루(Evans Blue) 염료의 누출을 추적함으로써 생체내에서 측정될 수 있다 (문헌 [Dvorak et al., in Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis; and (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029]). 유사하게, VEGF의 이러한 생물학적 활성을 차단하는 길항제의 능력을 측정하기 위해 검정법이 이용될 수 있다.
- [0148] 혈관 투과성 검정법의 한 유용한 예에서, VEGF₁₆₅ (20 내지 30 nM)는 생체외에서 EYE001 (30 nM 내지 1 μ M) 또는 후보 VEGF 길항제와 미리 혼합한 후, 피내 주사에 의해 기니피그의 제모한 등 피부에 투여한다. 주사한 지 30분 후, 주사 부위 주위에서 에반스 블루 염료의 누출량을 컴퓨터화된 형태계측학 분석 시스템을 사용하여 표준 방법에 따라 정량화한다. 혈관계로부터 지시약 염료의 VEGF-유도된 누출을 억제하는 화합물은 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 길항제로 간주한다.
- [0149] 화합물이 VEGF 길항제인지 여부를 측정하는 또다른 검정법은 소위 각막 혈관형성 검정법이다. 이 검정에서는, VEGF₁₆₅ (3 pmol)을 함유하는 메타시레이트 중합체 펠렛을 래트의 각막 기질로 이식하여, 일반적으로 무혈관성인 각막에서 혈관 성장을 유도한다. 그 후, 후보 VEGF 길항제 1 mg/kg, 3 mg/kg 및 10 mg/kg을 1일 1회 또는 2회 5일 동안 래트의 정맥내로 투여한다. 치료 기간의 마지막에, 모든 개체의 각막을 현미경 사진으로 찍는다. 그

후, 각막 조직에서 새로운 혈관이 발달한 정도, 및 후보 화합물에 의한 그들의 억제를 현미경 사진의 표준화된 형태계측학 분석에 의해 정량화한다. 인산염 완충된 염수 (PBS)를 이용한 치료와 비교할 때, 각막에서 VEGF-의 존성 혈관형성을 억제하는 화합물은 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 길항제로 간주한다.

[0150] 후보 VEGF 길항제는 또한 미숙아 망막병증의 마우스 모델을 이용하여 확인된다. 한 유용한 예로는, 각각 9, 8, 8, 7 및 7 마리의 마우스 새끼를 실내 공기에 또는 과산소하에 두고, 인산염 완충된 염수 (PBS) 또는 후보 VEGF 길항제 (예를 들어, 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg/일)을 복강내 처치한다. 검정의 마지막에, 망막의 내부 경계막을 통해 유리질액으로 새로운 모세관의 성장에 대해, 처치군 및 대조군 마우스 모두로부터의 각 눈의 20 개의 조직 단편에서 현미경 확인 및 혈관신생성 눈의 개수로 평가한다. 비처리 대조군에 비해 처치군 마우스에서 망막 신생혈관계가 감소되면 유용한 VEGF 길항제를 확인한 것으로 간주한다.

[0151] 또다른 예시적인 스크리닝 검정법에서, 후보 VEGF 길항제는 생체내에서 인간 종양 이종 이식편 검정법을 이용하여 확인된다. 이 스크리닝 검정법에서, 생체내에서 후보 VEGF 길항제의 효능은 누드 마우스에 이식된 인간 종양 이종 이식편 (A673 횡문근육종 및 빌름스(Wilms) 종양)에서 시험한다. 그 후, 마우스를 후보 VEGF 길항제 (예를 들어, 수립된 종양 (200 mg)의 발달 후, 매일 1회 10 mg/kg 복강내 투여)로 처치한다. 대조군은 대조 작용제로 처치한다. 대조군에 비해 A673 횡문근육종 종양 성장 및 빌름스 종양을 억제하는 것으로 확인된 후보 화합물을 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 길항제로 간주한다.

[0152] VEGF 길항제 활성을 검정하는 추가의 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 하기에 보다 상세히 기재된다.

[0153] 본 발명은 또한 당업계에 공지된 것 뿐만 아니라 하기에 기재된 VEGF 길항제, 및 통상의 기술 범위 내에서 생성될 수 있는 임의의 모든 등가물을 포함한다. 예를 들어, VEGF에 대해 지정된 억제 항체는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,524,583호, 동 제6,451,764호 (VRP 항체), 제6,448,077호, 동 제6,416,758호, 동 제6,403,088호 (VEGF-C에 대해), 제6,383,484호 (VEGF-D에 대해), 제6,342,221호 (항-VEGF 항체), 제6,342,219호, 동 제6,331,301호 (VEGF-B 항체) 및 제5,730,977호, 및 PCT 공보 WO 96/30046호, WO 97/44453호 및 WO 98/45331호 (상기 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0154] VEGF 수용체에 대한 항체 또한 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제5,840,301호, 동 제5,874,542호, 동 제5,955,311호, 동 제6,365,157호 및 PCT 공보 WO 04/003211호 (상기 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0155] 예를 들어 VEGFR-관련된 티로신 키나제 활성을 억제함으로써 VEGF의 작용을 차단하는 소분자는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,514,971호, 동 제6,448,277호, 동 제6,414,148호, 동 제6,362,336호, 동 제6,291,455호, 동 제6,284,751호, 동 제6,177,401호, 동 제6,071,921호 및 동 제6,001,885호 (VEGF 발현의 레티노이드 억제제) (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0156] VEGF의 작용을 차단하는 단백질 및 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,576,608호, 동 제6,559,126호, 동 제6,541,008호, 동 제6,515,105호, 동 제6,383,486호 (VEGF 유인 수용체), 제6,375,929호 (VEGF 유인 수용체), 제6,361,946호 (VEGF 펩티드 동족체 억제제), 제6,348,333호 (VEGF 유인 수용체), 제6,559,126호 (VEGF와는 결합하고 VEGFR와의 결합은 차단하는 폴리펩티드), 제6,100,071호 (VEGF 유인 수용체) 및 제5,952,199호 (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0157] VEGF 및(또는) VEGFR 유전자 발현 및(또는) 활성에 대한 RNA 간섭 (RNAi)를 매개할 수 있는 짧은 간섭 핵산 (siNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 이중 가닥 RNA (dsRNA), 마이크로RNA (miRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 PCT 공보 WO 03/070910호, (상기 문헌의 내용은 그의 전문이 본원에 참고로 포함됨).

[0158] VEGF를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제5,611,135호, 동 제5,814,620호, 동 제6,399,586호, 동 제6,410,322호 및 동 제6,291,667호 (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0159] VEGF를 억제하는 앵타머 (핵산 리간드로도 공지됨)는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제6,762,290호, 동 제6,426,335호, 동 제6,168,778호, 동 제6,051,698호 및 동 제5,859,228호 (상기 각 문헌들의 내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0160] 항체 길항제

[0161] 본 발명은 PDGF 및 VEGF에 대해 지정된 길항제 항체 뿐만 아니라, 그의 동족 수용체 PDGFR 및 VEGFR을

포함한다. 본 발명의 항체 길항제는 리간드와 그의 동족 수용체의 결합을 차단한다. 따라서, 본 발명의 PDGF 길항제 항체는 PDGF 뿐만 아니라 PDGFR 표적에 대해 지정된 항체를 포함한다.

[0162] 본 발명의 길항제 항체는 모노클로날 억제 항체를 포함한다. 모노클로날 항체 또는 그의 단편은 모든 이뮤노글로불린 부류, 예컨대 IgM, IgG, IgD, IgE, IgA, 또는 그의 하위부류, 예컨대 IgG 하위부류 또는 이들의 혼합물을 포함한다. IgG 및 그의 하위부류, 예컨대 IgG₁, IgG₂, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ 또는 IgG₄이 유용하다. 유용한 예로는 IgG 아형 IgG_{1/카파} 및 IgG_{2b/카파}가 있다. 언급될 수 있는 단편으로는 포유동물 PDGF 또는 VEGF (또는 이들의 동족 수용체)에 대해 높은 결합 및 중화 활성을 보이는 1 또는 2개의 항원-상보적 결합 부위를 갖는 모든 말단 절단된 또는 개질된 항체 단편, 예컨대 항체에 상응하며 경쇄 및 중쇄, 예컨대 Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 단편, 또는 단일 가닥 단편에 의해 형성된 결합 부위를 갖는 항체의 일부분이 있다. 말단 절단된 이중 가닥 단편, 예컨대 Fv, Fab 또는 F(ab')₂가 특히 유용하다. 이들 단편은 예를 들어 파파인 또는 펩신과 같은 효소에 의한 항체의 Fc 부분의 제거에 의한 효소적 수단에 의해, 화학적 산화에 의해, 또는 항체 유전자의 유전자 조작에 의해 취득할 수 있다. 유전자 조작된 말단 절단되지 않은 단편을 사용하는 것 또한 가능하며 유리하다. 항-PDGF 또는 VEGF 항체 또는 그의 단편은 단독으로 또는 혼합물로 사용될 수 있다.

[0163] 유리하게는, 신규한 항체, 항체 단편, 그의 혼합물 또는 유도체는 PDGF 또는 VEGF (또는 이들의 동족 수용체)에 대해 1×10^{-7} M 내지 1×10^{-12} M, 또는 1×10^{-8} M 내지 1×10^{-11} M, 또는 1×10^{-9} M 내지 5×10^{-10} M의 범위의 결합 친화성을 갖는다.

[0164] 유전자 조작을 위한 항체 유전자는 예를 들어 당업자에게 공지된 방법으로 하이브리도마 세포로부터 단리될 수 있다. 이를 위해, 항체-생산 세포를 배양하고, 세포의 광학 밀도가 충분할 때, 구아니딘염 티오시아네이트로 세포를 용해시키고, 아세트산나트륨으로 산성화시키고, 페놀, 클로로포름/이소아밀 알콜로 추출하고, 이소프로판올로 침전하고, 에탄올로 세척함으로써 공지된 방법으로 세포로부터 mRNA를 단리한다. 그 후, 역전사효소를 이용하여 mRNA로부터 DNA를 합성한다. 합성된 cDNA는 직접, 또는 예를 들어 부위-지정 돌연변이, 삽입, 역위, 결실 또는 염기 교체의 도입에 의해 유전자 조작한 후에, 적합한 동물, 진균, 박테리아 또는 바이러스 벡터에 삽입되고, 적절한 숙주 유기체에서 발현될 수 있다. 유용한 박테리아 또는 효모 벡터는 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 박테리아에서 또는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모에서 유전자의 클로닝 및 발현을 위한 pBR322, pUC18/19, pACYC184, 람다 또는 효모 류 벡터이다.

[0165] 본 발명은 또한 PDGF 또는 VEGF 항체를 합성하는 세포에 관한 것이다. 이들에는 상기 언급한 바와 같이 형질전환된 후의 동물, 진균, 박테리아 세포 또는 효모 세포가 있다. 이들은 하이브리도마 세포 또는 트리오마 세포가 유리하며, 하이브리도마 세포가 전형적이다. 이들 하이브리도마 세포는 PDGF 또는 VEGF (또는 그들의 동족 수용체)로 면역화된 동물로부터 공지된 방식으로, 예를 들어 그들의 항체-생산 B 세포를 단리하고, PDGF 또는 VEGF-결합 항체에 대한 이들 세포를 선택한 다음, 이들 세포를 예를 들어 인간 또는 동물, 예를 들어 마우스 흑색종 세포, 인간 림프아구양 세포 또는 헤테로하이브리도마 세포와 융합함으로써 (예를 들어, 문헌 [Koehler et al., (1975) Nature 256: 496] 참조) 또는 이들 세포를 적절한 바이러스로 감염시킴으로써 불멸화 세포주를 생산함으로써 제조할 수 있다. 융합에 의해 제조된 하이브리도마 세포주가 유용하고, 마우스 하이브리도마 세포주가 특히 유용하다. 본 발명의 하이브리도마 세포주는 IgG 유형의 유용한 항체를 분비한다. 본 발명의 mAb 항체의 결합은 고친화성으로 결합하고, PDGF 또는 VEGF의 생물학적 (예를 들어, 혈관형성) 활성을 감소 또는 중화시킨다.

[0166] 본 발명은 또한 PDGF 또는 VEGF-억제 활성은 보유하면서 제약 제제로서의 용도와 관련된 하나 이상의 다른 특성 (예를 들어, 혈청 안정성 또는 생산 효율)은 변경된 상기 항-PDGF 또는 VEGF 항체의 유도체를 포함한다. 이러한 항-PDGF 또는 VEGF 항체 유도체로는 펩티드, 항체의 항원-결합 영역으로부터 유래된 펩티드 모방체, 및 고체 또는 액체 담체 (예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 유리, 합성 중합체, 예컨대 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리프로파일렌, 폴리에틸렌 또는 천연 중합체, 예컨대 셀룰로즈, 세파로즈 또는 아가로스)에 결합된 항체, 항체 단편 또는 펩티드, 또는 효소, 독소 또는 방사선 활성 또는 방사선 비활성 마커 (예컨대, ³H, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ⁷⁵Se)와의 접합체, 또는 형광/화학발광 표지 (예컨대, 로다민, 플루오레신, 이소티오시아네이트, 피코에리트린, 피코시아닌, 플루오레스아민, 금속 킬레이트, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 비오틴)에 공유결합된 항체, 단편 또는 펩티드가 있다.

[0167] 신규한 항체, 항체 단편, 그의 혼합물 및 유도체는 직접, 건조 (예를 들어, 동결 건조) 후에, 상기 언급한 담체

에 부착 후에, 또는 제약 제제의 제조를 위한 다른 제약 활성 및 보조 물질과의 제제화 후에 사용될 수 있다. 언급될 수 있는 활성 및 보조 물질의 예로는 다른 항체, 살미생물 또는 미생물 증식 억제 작용을 갖는 항미생물 활성 물질, 예컨대 일반적으로 항생제, 또는 스킨아미드, 항종양제, 물, 완충액, 염수, 알콜, 지방, 왁스, 불활성 비히클, 또는 비경구용 제품에 사용되는 다른 물질, 예컨대 아미노산, 증점제 또는 당이 있다. 이들 제약 제제는 질환을 제어하는데 사용되며, AMD 및 당뇨병성 망막병증을 비롯한 안구의 혈관신생성 장애 및 질환의 제어에 유용하다.

[0168] 신규한 항체, 항체 단편, 이들의 혼합물 또는 유도체는 직접, 또는 상기 기재된 바와 같이 고체 또는 액체 담체, 효소, 독소, 방사선 활성 또는 방사선 비활성 표지, 또는 형광/화학발광 표지에 커플링된 후에 치료법 또는 진단에 사용될 수 있다.

[0169] 본 발명의 인간 PDGF 또는 VEGF 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어, 포유동물을 인간 PDGF 또는 VEGF (또는 그들의 동족 수용체)로 면역화시킨다. 정제된 인간 PDGF 및 VEGF를 상업적으로 구입한다 (예를 들어, 메릴랜드주 노르우드 소재의 셀 사이언스(Cell Sciences) 뿐만 아니라 다른 시판 업체로부터). 대안적으로, 인간 PDGF 또는 VEGF (또는 그들의 동족 수용체)는 인간 태반 조직으로부터 용이하게 정제될 수 있다. 항-인간 PDGF 또는 VEGF 항체를 증식시키기 위해 사용되는 포유동물은 제한되지 않으며, 영장류, 설치류 (예컨대, 마우스, 래트 또는 토끼), 소, 양, 염소 또는 개일 수 있다.

[0170] 다음으로, 비장 세포와 같은 항체-생산 세포는 면역화된 동물로부터 제거되어 흑색종 세포와 융합될 수 있다. 흑색종 세포는 당업계에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, p3x63-Ag8-653, NS-0, NS-1 또는 P3U1 세포가 사용될 수 있음). 세포 융합 작업은 당업계에 공지된 임의의 통상적인 방법에 의해 수행할 수 있다.

[0171] 세포 융합 작업을 거친 후의 세포는 하이브리도마를 선택하기 위해 HAT 선택 배지에서 배양된다. 그 후, 항-인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 스크리닝한다. 이 스크리닝은 예를 들어 인간 PDGF 또는 VEGF (또는 그들의 동족 수용체)가 고정화된 웰에 제조된 모노클로날 항체가 결합되어 있는 샌드위치 효소-연결된 면역흡수 검정 (ELISA)에 의해 수행될 수 있다. 이 경우, 제2 항체로서, 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 글루코스 옥시다제, 베타-D-갈락토시다제 등과 같은 효소로 표지된 면역화된 동물의 이뮤노글로불린에 특이적인 항체를 사용할 수 있다. 표지화 효소와 그의 기질을 반응시키고, 형성된 색을 측정함으로써 표지를 검출할 수 있다. 기질로서, 3,3'-디아미노벤지딘, 2,2'-디아미노비스-o-디아니시딘, 4-클로로나프톨, 4-아미노안티피린, o-페닐렌디아민 등이 제조될 수 있다.

[0172] 상기 기재된 작업에 의해, 항-인간 PDGF 또는 VEGF 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택할 수 있다. 그 후, 선택된 하이브리도마를 통상적인 제한 희석 방법 또는 연한전 방법으로 클로닝한다. 원한다면, 클로닝된 하이브리도마를 혈청 함유 또는 혈청 비함유 배지를 이용하여 대규모로 배양할 수 있거나, 마우스의 복강으로 접종하고 복수에서 회수함으로써 다수의 클로닝된 하이브리도마를 수득할 수 있다.

[0173] 그 후, 선택된 항-인간 PDGF 또는 VEGF 모노클로날 항체 중에서, (예를 들면, 세포-기준의 PDGF 또는 VEGF 분석 시스템 (상기 참조)에서) 상응하는 리간드/수용체 쌍의 결합 및 활성화를 방지하는 능력을 가진 항체를 추가의 분석 및 조작을 위해 선택한다. 항체가 수용체/리간드 결합 및(또는) 활성화를 차단한다면, 이는 시험된 모노클로날 항체가 인간 PDGF 또는 VEGF의 PDGF 또는 VEGF 활성을 감소시키거나 중화시키는 능력을 가짐을 의미한다. 즉, 모노클로날 항체는 특이적으로 인간 PDGF 또는 VEGF (또는 그들의 동족 수용체)의 결정적인 결합 부위를 인식하고(하거나) 간섭한다.

[0174] 본원에서 모노클로날 항체는, 그것이 원하는 생물학적 활성을 발휘하는 한, 기원 종 또는 이뮤노글로불린 군 또는 하위군 명칭과 상관 없이, 항-PDGF 또는 VEGF 항체의 가변 (초가변 포함) 도메인과 불변 도메인 (예를 들어, "인간화" 항체)을, 또는 경쇄와 중쇄를, 또는 어떤 종으로부터의 쇄와 다른 종으로부터의 쇄를, 또는 융합체와 이중 단백질을 스플라이싱함으로써 제조된 하이브리드 및 재조합 항체 뿐만 아니라 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab)₂ 및 Fv)을 추가로 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 및 문헌 [Mage & Lamoyi, in Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 79-97 (Marcel Dekker, Inc.), New York (1987)] 참조).

[0175] 따라서, 용어 "모노클로날"은 수득된 항체의 특성이 항체의 실질적으로 동종인 개체군으로부터 얻어진 것임을 의미하며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler & Milstein, Nature 256: 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법으로 생산될 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)에 의해 생산될 수 있다. "모

노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 발생된 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0176] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유도된 최소의 서열을 함유하는 특이적인 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 또는 항체의 기타 항원-결합 결과물)이다. 대체로, 인간화 항체는 수용자 항체의 상보적 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 몇몇 사례에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 FR 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서도 도입된 CDR 또는 FR 서열에서도 발견되지 않은 잔기를 포함할 수도 있다. 상기 변형을 행하여 항체 성능을 추가로 정련하고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비-인간 이뮤노글로불린의 영역과 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 잔기가 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 잔기인 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이다. 인간화 항체는 또한 최적으로는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다.

[0177] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 그로 도입되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입" 잔기라고 지칭되며, 이는 전형적으로는 "도입" 가변 도메인으로부터 얻어진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법에 따라 (문헌 [Jones et al., (1986) Nature 321: 522-525]; [Riechmann et al., (1988) Nature 332: 323-327]; 및 [Verhoeyen et al., (1988) Science 239: 1534-1536]) 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 하나 미만의 무손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다. 실제로, 인간화 항체는 몇몇 CDR 잔기 및 가능한 몇몇 FR 잔기가 설치류 항체에서의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체인 것이 전형적이다.

[0178] 인간화 항체의 제조에 사용될 인간 가변 도메인의 선택은 경쇄 및 중쇄 모두 항원성을 감소시키기 위해 매우 중요하다. 소위 "최상-맞춤" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 그 후, 설치류의 서열과 가장 가까운 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 받아들인다 (문헌 [Sims et al., (1993) J. Immunol., 151: 2296]; 및 [Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196: 901]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유도된 특정 프레임워크를 이용한다. 몇몇 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89: 4285]; 및 [Presta et al., (1993) J. Immunol., 151: 2623]).

[0179] 항체가 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 성질을 보유하여 인간화되는 것이 또한 중요하다. 상기 목표를 달성하기 위하여, 한 유용한 방법에 따라, 모체 서열 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 이용하여 모체 서열 및 다양한 개념의 인간화 산물의 분석 과정에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 시판되며, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 예상되는 3차원 배열 구조를 제시하고 표시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 상기 표시를 검사함으로써, 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉, 그의 항원에 결합하는 후보 이뮤노글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석이 가능하다. 상기 방법으로, FR 잔기는 원하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도를 달성하도록 컨센서스 및 도입 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 주는 데에 직접적으로 및 가장 실질적으로 관련된다.

[0180] PDGF 또는 VEGF에 대해 지정된 인간 모노클로날 항체도 또한 본 발명에 포함된다. 이러한 항체는 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어, 문헌 [Kozbor (1984) J. Immunol., 133, 3001]; [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., (1991) J. Immunol., 147: 86-95]에 기재되어 있다.

[0181] 이제, 면역화시 내인성 이뮤노글로불린 생산이 없이 인간 항체의 전부의 레파토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이체 마우스에서의 항체 중쇄 결합 영역 (J_H) 유전자의 동질접합적 결실은 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 야기한다고 기재되

어 있다. 이러한 생식계열 돌연변이체 마우스에서의 인간 생식계열 이뮤노글로불린 유전자 배열의 이동은 항원 투여시 인간 항체의 생산을 유발시킨다 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90: 2551]; [Jakobovits et al., (1993) Nature, 362: 255-258]; 및 [Bruggermann et al., (1993) Year in Immuno., 7: 33] 참조).

[0182] 방법으로, 파지 디스플레이 기술 (문헌 [McCafferty et al., (1990) Nature, 348: 552-553])을 사용하여, 시험 관내에서 비면역화된 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레파토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다 (검토를 위해 예를 들어 문헌 [Johnson et al., (1993) Current Opinion in Structural Biology, 3: 564-571] 참조). 파지 디스플레이를 위해 V-유전자 절편의 몇몇 공급원을 사용할 수 있다. 예를 들어, 클락슨(Clackson) 등 (문헌 [(1991) Nature, 352: 624-628])은 면역화된 마우스의 비장으로부터 유도된 V 유전자의 작은 랜덤한 조합의 라이브러리로부터 다양한 배열의 항-옥사졸론 항체를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여자로부터 V 유전자의 레파토리가 구축될 수 있고, 다양한 배열의 항원 (자가-항원을 포함)에 대한 항체가 본질적으로 마르크스(Marks) 등 (문헌 [(1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597]), 또는 그리프스(Griffith) 등 (문헌 [(1993) EMBO J., 12: 725-734])에 의해 기재된 기술에 따라 단리될 수 있다.

[0183] 자연적인 면역 반응에서, 항체 유전자는 돌연변이를 고비용으로 축적한다 (체세포 과돌연변이). 도입되는 변화 중 몇몇은 고 친화도를 제공하고, B 세포 디스플레이 고-친화도 표면 이뮤노글로불린은 그 후의 항원 투여 동안 우선적으로 복제 및 분화된다. 상기 자연적 과정은 "섞 셔플링(shuffling)"으로 공지된 기술을 사용함으로써 모방될 수 있다 (문헌 [Marks et al., (1992) Bio. Technol., 10: 779-783] 참조). 상기 방법에서, 파지 디스플레이로 수득된 "1차" 인간 항체의 친화도는 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 비면역화된 공여자로부터 얻은 V 도메인 유전자의 자연 발생 변형체의 레파토리 (레파토리)로 순차적으로 대체함으로써 개선될 수 있다. 상기 기술은 nM 범위의 친화성을 갖는 항체 및 항체 단편의 생산을 가능하게 한다. 매우 큰 파지 항체 레파토리를 제조하기 위한 전략은 워터하우스(Waterhouse) 등 (문헌 [(1993) Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266])에 의해 기재되어 있다.

[0184] 또한, 유전자 셔플링을 사용하여 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도할 수 있으며, 여기서 인간 항체는 출발 설치류 항체와 유사한 친화성 및 특이성을 갖는다. "에피토프 각인"이라고도 언급되는 상기 방법에 따라, 파지 디스플레이 기술로 수득한 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자는 인간 V 도메인 유전자의 레파토리로 대체되어 설치류-인간 키메라를 생성한다. 항원에서의 선택으로 인해 기능적 항원-결합 부위를 복구할 수 있는 인간 가변부가 단리되며, 즉, 에피토프가 파트너의 선택을 지배한다 (각인시킨다). 남아있는 설치류 V 도메인을 대체하기 위해 상기 과정을 반복하는 경우, 인간 항체가 수득된다 (1993년 4월 1일자로 공개된 PCT WO 93/06213호 참조). CDR 그래프팅에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 상기 기술은 설치류 기원의 CDR 잔기 또는 프레임워크가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0185] **애타머 길항제**

[0186] 본 발명은 PDGF 및(또는) VEGF (또는 그의 동족 수용체)에 대하여 지정된 애타머 길항제를 제공한다. 핵산 리간드로도 공지된 애타머는 미리선택된 표적과 결합하여 일반적으로 그를 길항하는 (즉, 억제하는) 비자연 발생적 핵산이다.

[0187] 애타머는 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 생산에 관한 임의의 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 많은 합성 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 잔여 퓨린 리보뉴클레오타이드를 함유하고, 3'-엑소뉴클레아제에 의한 궁극적인 분해를 막기 위해 적합한 3'-말단, 예를 들어 역전된 티미딘 잔기 (문헌 [Ortigao et al., Antisense Research and Development, 2: 129-146 (1992)]) 또는 3'-말단에서의 2개의 포스포로티오에이트 연결기를 보유하는 2'-O-알릴 개질된 올리고머는 임의의 시판되는 DNA/RNA 합성기에서 고상 베타-시아노에틸 포스포르아미드트 화학 (문헌 [Sinha et al., Nucleic Acids Res., 12: 4539-4557 (1984)])에 의해 합성할 수 있다. 한 방법은 리보뉴클레오타이드를 위한 2'-O-tert-부틸디메틸실릴 (TBDMS) 보호 전략이고 (문헌 [Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109: 7845-7854 (1987)]), 모든 필요한 3'-O-포스포르아미드트는 시판된다. 또한, 아미노메틸폴리스티렌은 그의 유리한 성질 때문에 지원 물질로서 사용될 수 있다 (문헌 [McCullum and Andrus (1991) Tetrahedron Lett., 32: 4069-4072]). 플루오레신은 시판되는 플루오레신 포스포르아미드트를 이용함으로써, 합성 중에 기질 RNA의 5'-말단에 첨가될 수 있다. 일반적으로, 애타머 올리고머는 표준 RNA 주기를 이용하여 합성될 수 있다. 조립이 종료되면, 모든 염기 불안정 보호기는 55°C에서 밀봉 바이알 중의 진한 암모니아/에탄올 (3: 1 v/v) 수용액으로 8시간 처리함으로써 제거한다. 에탄올은 달리 탈보호의 염기성 조건하에서

생성된 리보뉴클레오티드 위치에서 뚜렷한 가닥 절단을 유발시킬 수 있는 2'-O-TBDMS 기의 조속한 제거를 억제한다 (문헌 [Usman et al., (1987) J. Am. Chem. Soc., 109: 7845-7854]). 동결건조 후, TBDMS 보호된 올리고머를 60℃에서 2시간 동안 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드/트리에틸아민/N-메틸피롤리디논의 혼합물로 처리하여 중성 조건하에서의 실릴 보호기의 신속하고 효율적인 제거를 달성한다 (문헌 [Wincott et al., (1995) Nucleic Acids Res., 23: 2677-2684] 참조). 그 후, 완전히 탈보호된 올리고머는 카탈라(Cathala) 및 브루넬(Brunel) (문헌 [(1990) Nucleic Acids Res., 18: 201])의 방법에 따라 부탄올로 침전될 수 있다. 정제는 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 역상 HPLC와 이온 교환 HPLC의 조합 (문헌 [Sproat et al., (1995) Nucleosides and Nucleotides, 14: 255-273])으로 수행할 수 있다. 세포에서 사용하기 위해, 아세톤 중의 과염소산나트륨으로의 침전으로 합성 올리고머를 그의 나트륨 염으로 전환시킬 수 있다. 그 후, 잔류 염의 흔적은 시판되는 작은 일회용 겔 여과 컬럼을 이용하여 제거할 수 있다. 최종 단계로서, 매트릭스 보조의 레이저 탈착 질량 분석법 (문헌 [Pieves et al., (1993) Nucleic Acids Res., 21: 3191-3196]) 및 뉴클레오티드 염기 조성물 분석에 의해 분리된 올리고머의 진위를 확인할 수 있다.

[0188] 뉴클레오티드 서브유닛이 효소적 조작에 이용가능한 경우, 개시된 앵타머는 또한 효소적 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 시험관내 RNA 폴리머라제 T7 반응을 통해 제조될 수 있다. 이는 또한 T7을 발현하는 박테리아 균주 또는 세포주에 의해 제조되고, 그 후 상기 세포로부터 분리될 수 있다. 하기 논의하는 바와 같이, 개시된 앵타머는 또한 벡터 및 프로모터를 직접 이용하여 세포에서 발현될 수 있다.

[0189] 본 발명의 다른 핵산 분자와 마찬가지로 앵타머는 화학 개질된 뉴클레오티드를 더 함유할 수 있다. 핵산의 진단적 또는 치료적 사용에서 제기될 논쟁점은 원하는 효과가 나타나기 전에 세포내 및 세포외 효소, 예를 들어 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제에 의해 체액 중 그의 포스포디에스테르 형태인 올리고뉴클레오티드가 잠재적으로 신속하게 분해되는 것이다. 핵산 리간드의 특정 화학적 변형을 발생시켜 핵산 리간드의 생체내 안정성을 증가시키거나 핵산 리간드의 전달을 향상시키거나 매개할 수 있다 (예를 들어, 본원에 참고로 구체적으로 포함되는 발명의 명칭이 "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides"인 미국 특허 출원 제5,660,985호 참조).

[0190] 본 발명에서 고려되는 핵산 리간드의 변형으로는, 핵산 리간드 염기 또는 핵산 리간드 전체에 추가의 전하, 극성, 소수성, 수소 결합, 정전 상호작용 및 유동성을 혼입시키는 다른 화학적 기를 제공하는 것이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 이러한 변형으로는 2'-위치 당 변형, 5-위치 피리미딘 변형, 8-위치 퓨린 변형, 엑소시클릭 아민에서의 변형, 4-티오우리딘의 치환, 5-브로모 또는 5-요오도-우라실의 치환; 주쇄 변형, 포스포로티오에이트 또는 알킬 포스페이트 변형, 메틸화, 이상 염기쌍 조합, 예를 들어 이소염기 이소사이티딘 및 이소구아니딘 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 또한, 변형에는 3' 및 5' 변형, 예를 들어 캡핑 또는 당 잔기로의 변형이 포함될 수 있다. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 핵산 리간드는 피리미딘 잔기의 당 부위에서 변형된 2'-플루오로 (2'-F)인 RNA 분자이다.

[0191] 앵타머의 안정성은 이러한 변형의 도입 뿐만 아니라 RNA의 포스페이트 주쇄에서의 변형 및 치환에 의해 크게 증가될 수 있다. 또한, 다양한 변형이 핵염기 자체에서 행해질 수 있으며, 이는 분해를 억제하고, 원하는 뉴클레오티드 상호작용을 증가시키거나 원치않는 뉴클레오티드 상호작용을 감소시킬 수 있다. 따라서, 앵타머의 서열이 일단 공지되면, 하기 기재된 합성 절차 또는 당업자에게 공지된 절차에 따라 변형 또는 치환이 행해질 수 있다.

[0192] 다른 변형으로는 리보핵산 (즉 A, C, G 및 U) 및 데옥시리보핵산 (즉 A, C, G 및 T)에서 발생하는 표준 염기, 당 및(또는) 포스페이트 주쇄 화학적 구조의 변형체인 변형된 염기 (또는 변형된 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드의 혼입이 포함된다. 상기 범위 내에는, 예를 들어 Gm (2'-메톡시구아닐산), Am (2'-메톡시아데닐산), Cf (2'-플루오로사이티딜산), Uf (2'-플루오로우리딜산), Ar (리보아데닐산)이 존재한다. 또한, 앵타머는 시토신 또는 임의의 시토신-관련 염기, 예를 들어 5-메틸시토신, 4-아세틸시토신, 3-메틸시토신, 5-히드록시메틸 시토신, 2-티오시토신, 5-할로시토신 (예를 들어, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, 5-클로로시토신, 및 5-요오도시토신), 5-프로피닐 시토신, 6-아조시토신, 5-트리플루오로메틸시토신, N4,N4-에타노시토신, 페녹사진 사이티딘, 페노티아진 사이티딘, 카르바졸 사이티딘 또는 피리도인돌 사이티딘을 포함할 수 있다. 추가로, 앵타머는 구아닌 또는 임의의 구아닌-관련 염기, 예를 들어 6-메틸구아닌, 1-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 2-프로파일구아닌, 6-프로파일구아닌, 8-할로구아닌 (예를 들어, 8-플루오로구아닌, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 및 8-요오도구아닌), 8-아미노구아닌, 8-술프히드릴구아닌, 8-티오알킬구아닌, 8-히드록실구아닌, 7-메틸구아닌, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌 또는 3-데아자구아닌을 포함할 수 있다. 또한, 앵타머는 아데닌 또는 임의의 아데닌-관련 염기, 예를 들어 6-메틸아데닌, N6-이소펜테닐

아데닌, N6-메틸아데닌, 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 8-할로아데닌 (예를 들어, 8-플루오로아데닌, 8-브로모아데닌, 8-클로로아데닌, 및 8-요오도아데닌), 8-아미노아데닌, 8-술포히드릴아데닌, 8-티오알킬아데닌, 8-히드록실아데닌, 7-메틸아데닌, 2-할로아데닌 (예를 들어, 2-플루오로아데닌, 2-브로모아데닌, 2-클로로아데닌, 및 2-요오도아데닌), 2-아미노아데닌, 8-아자아데닌, 7-데아자아데닌 또는 3-데아자아데닌을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 우라실 또는 임의의 우라실-관련 염기, 예를 들어 5-할로우라실 (예를 들어, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 및 5-요오도우라실), 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 1-메틸슈도우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 5'-메톡시카르보닐메틸우라실, 5-메톡시우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 슈도우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로파일)우라실, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-프로피닐 우라실, 6-아조우라실, 또는 4-티오우라실을 포함된다.

[0193] 당업계에서 공지된 다른 변형된 염기 변이체의 예로는 37 C.F.R. § 1.822(p)(1)에 나열된 것, 예를 들어 4-아세틸사이티딘, 5-(카르복시히드록실메틸)우리딘, 2'-메톡시사이티딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우리딘, 디히드로우리딘, 2'-O-메틸슈도우리딘, b-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데노신, 1-메틸아데노신, 1-메틸슈도우리딘, 1-메틸구아노신, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아노신, 2-메틸아데노신, 2-메틸구아노신, 3-메틸사이티딘, 5-메틸사이티딘, N6-메틸아데노신, 7-메틸구아노신, 5-메틸아미노메틸우리딘, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우리딘, b-D-만노실큐에오신, 5-메톡시카르보닐메틸우리딘, 5-메톡시우리딘, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, N-((9-b-D-리보푸라노실-2-메틸티오피린-6-일)카르바모일)트레오닌, N-((9-b-D-리보푸라노실-6-일)N-메틸-카르바모일)트레오닌, 우리딘-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우리딘-5-옥시아세트산 (v), 와이부토신, 슈도우리딘, 큐에오신, 2-티오사이티딘, 5-메틸-2-티오우리딘, 2-티오우리딘, 4-티오우리딘, 5-메틸우리딘, N-((9-b-D-리보푸라노실-6-일)카르바모일)트레오닌, 2'-O-메틸-5-메틸우리딘, 2'-O-메틸우리딘, 와이부토신, 3-(3-아미노-3-카르복시프로파일)우리딘이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0194] 또한, 미국 특허 제3,687,808호, 동 제3,687,808호, 동 제4,845,205호, 동 제5,130,302호, 동 제5,134,066호, 동 제5,175,273호, 동 제5,367,066호, 동 제5,432,272호, 동 제5,457,187호, 동 제5,459,255호, 동 제5,484,908호, 동 제5,502,177호, 동 제5,525,711호, 동 제5,552,540호, 동 제5,587,469호, 동 제5,594,121호, 동 제5,596,091호, 동 제5,614,617호, 동 제5,645,985호, 동 제5,830,653호, 동 제5,763,588호, 동 제6,005,096호, 및 동 제5,681,941호에 기재된 변형된 핵염기도 포함된다. 당업계에서 공지된 변형된 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 당 주쇄 변이체의 예로는, 예를 들어 2' 리보실 치환기, 예를 들어 F, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂, CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, OCH₂OCH₂N(CH₃)₂, O(C1-10 알킬), O(C2-10 알케닐), O(C2-10 알키닐), S(C1-10 알킬), S(C2-10 알케닐), S(C2-10 알키닐), NH(C1-10 알킬), NH(C2-10 알케닐), NH(C2-10 알키닐), 및 O-알킬-O-알킬이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바람직한 2' 리보실 치환기로는 2'-메톡시 (2'-OCH₃), 2'-아미노프로폭시 (2'OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-알릴 (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-알릴 (2'-O-CH₂-CH=CH₂), 2'-아미노 (2'-NH₂), 및 2'-플루오로 (2'-F)가 포함된다. 2'-치환기는 아라비노 (상향) 위치 또는 리보 (하향) 위치로 존재할 수 있다.

[0195] 본 발명의 앵타머는 본원에 기재된 것과 같은 뉴클레오티드 및(또는) 뉴클레오티드 동족체 또는 이의 조합으로 구성될 수 있거나, 올리고뉴클레오티드 동족체이다. 본 발명의 앵타머는 PDGF 또는 VEGF (또는 그의 동족 수용체)에 결합하는 올리고머의 기능에 영향을 주지 않는 위치에서 뉴클레오티드 동족체를 함유할 수 있다.

[0196] 특정 표적 분자와의 핵산 리간드 결합의 정련 또는 강화 또는 추가의 앵타머의 선택을 위해 개조될 수 있는 몇몇 기술이 존재한다. 일반적으로 "시험관내 유전학" (문헌 [Szostak (1992) TIBS, 19: 89] 참조)으로 언급되는 한 기술은 랜덤한 서열의 풀로부터의 선택에 의한 앵타머 길항제의 단리를 포함한다. 개시된 앵타머가 단리될 수 있는 핵산 분자의 풀은 대략 20 내지 40개의 뉴클레오티드의 가변 서열을 플랭킹(flanking)하는 불변 서열을 포함할 수 있다. 상기 방법은 지수적 향상에 의한 리간드의 선택적 진전 (Selective Evolution of Ligands by EXponential Enrichment; SELEX)이라고 명명되어 왔다. SELEX 및 관련 방법에 의해 본 발명의 앵타머 길항제를 발생시키기 위한 조성물 및 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 발명의 명칭이 "Nucleic Acid Ligands"인 미국 특허 제5,475,096호 및 발명의 명칭이 "Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands"인 미국 특허 제5,270,163호에 교시되어 있으며, 이 각각은 그의 전문이 본원에 참고로 구체적으로 포함된다. 일반적으로 SELEX 방법 및 특허 VEGF 및 PDGF 앵타머 및 구조는 예를 들어 미국 특허 제5,668,264호, 동 제

5,696,249호, 동 제5,670,637호, 동 제5,674,685호, 동 제5,723,594호, 동 제5,756,291호, 동 제5, 811,533호, 동 제5,817,785호, 동 제5,958,691호, 동 제6,011,020호, 동 제6,051,698호, 동 제6,147,204호, 동 제6,168,778호, 동 제6,207,816호, 동 제6,229,002호, 동 제6,426,335호, 동 제6,582,918호에 추가로 기재되어 있으며, 이 각각의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다.

[0197] 요컨대, SELEX 방법은 결합 친화도 및 선택도에 대한 사실상 임의의 원하는 기준을 달성하기 위해, 동일한 일반적인 선택 계획을 이용하여, 후보 올리고뉴클레오타이드의 혼합물로부터의 선택 및 선택된 표적으로의 결합의 단계적 반복, 분리 및 증폭을 포함한다. 핵산의 혼합물로부터 출발하고, 전형적으로는 랜덤화된 서열의 절편을 포함하면서, SELEX 방법은 결합에 유리한 조건하에서 혼합물을 표적과 접촉시키는 단계, 미결합 핵산을 표적 분자에 특이적으로 결합된 상기 핵산으로부터 분리하는 단계, 핵산-표적 복합체를 해리시키는 단계, 핵산-표적 복합체로부터 해리된 핵산을 증폭시켜 핵산의 리간드-풍부 혼합물을 수득하는 단계, 그 후 원하는 대로 다수의 주기를 통해 결합의 단계를 반복, 분리, 해리 및 증폭하여 표적 분자에 대한 고특이적성 고친화도 핵산 리간드를 수득하는 단계를 포함한다.

[0198] 기본적인 SELEX 방법을 변형시켜 많은 구체적인 목적을 달성하였다. 예를 들어, 발명의 명칭이 "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure"인 미국 특허 제5,707,796호는 구체적인 구조적 특성, 예를 들어 구부러진 DNA를 갖는 핵산 분자를 선택하기 위해 겔 전기영동과 함께 SELEX를 사용하는 것을 기재하고 있다. 발명의 명칭이 "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"인 미국 특허 제5,763,177호는 표적 분자에 결합 및(또는) 광가교할 수 있고(있거나) 표적 분자를 광불활성시킬 수 있는 광반응기를 함유하는 핵산 리간드를 선택하기 위한 SELEX-기준의 방법을 기재한다. 발명의 명칭이 "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine"인 미국 특허 제5,580,737호는 카운터-SELEX로 명명되는, 비-펩티드성일 수 있는 밀접하게 관련된 분자 사이를 구별할 수 있는 고특이적 핵산 리간드를 확인하기 위한 방법을 기재한다. 발명의 명칭이 "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Solution SELEX"인 미국 특허 제5,567,588호는 표적 분자에 대해 고친화도를 갖는 올리고뉴클레오타이드와 저친화도를 갖는 올리고뉴클레오타이드 사이의 고효율 분리를 달성하는 SELEX-기준의 방법을 기재한다.

[0199] SELEX 방법은 리간드에서의 개선된 특성, 예를 들어 개선된 생체내 안정성 또는 개선된 전달 특성을 부여하는 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화도 핵산 리간드의 확인을 포함한다. 이러한 변형의 예로는 리보스 및(또는) 포스페이트 및(또는) 염기 위치에서의 화학적 치환이 포함된다. 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 SELEX 방법으로 확인된 핵산 리간드는 발명의 명칭이 "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides"인 미국 특허 제5,660,985호에 기재되어 있으며, 상기 특허는 피리미딘의 5- 및 2'-위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 유도체를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기재한다. 미국 특허 제5,580,737호 (상기 문헌)는 2'-아미노 (2'-NH₂), 2'-플루오로 (2'-F) 및(또는) 2'-O-메틸 (2'-OMe)로 변형된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 함유하는 고특이적 핵산 리간드를 기재한다. 1994년 6월 22일자로 출원되고 이제는 포기된 발명의 명칭이 "Novel Method of Preparation of Known and Novel 2'-Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement"인 미국 특허 출원 제08/264,029호는 다양한 2'-변형된 피리미딘을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기재한다.

[0200] 각각 발명의 명칭이 "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Chimeric SELEX"인 미국 특허 제5,637,459호 및 발명의 명칭이 "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Blended SELEX"인 미국 특허 제5,683,867호에 기재된 바와 같이, SELEX 방법은 선택된 올리고뉴클레오타이드와 다른 선택된 올리고뉴클레오타이드 및 비-올리고뉴클레오타이드 관능 단위를 조합하는 것을 포함한다. 상기 특허는 올리고뉴클레오타이드의 광범위한 모양 및 다른 성질 및 효율적인 증폭 및 복제 성질과 다른 분자의 바람직한 성질의 조합을 고려한다.

[0201] SELEX 방법은 추가로 발명의 명칭이 "Nucleic Acid Ligand Complexes"인 미국 특허 제6,011,020호에 기재된 바와 같은, 진단적 또는 치료적 복합체에서 선택된 핵산 리간드를 친지성 화합물 또는 비-면역성 고분자량 화합물과 조합하는 것을 포함하며, 상기 특허는 그의 전문이 본원에 참고로 구체적으로 포함한다.

[0202] 또한, 애플타머 길항제는 컴퓨터 모델링 기술의 사용을 통해 정련될 수 있다. 분자 모델링 시스템의 예는 폴리젠 코퍼레이션(Polygen Corporation) (Waltham, Mass.) 제품인 CHARMM 및 QUANTA 프로그램이다. CHARMM은 에너지 최소화 및 분자 동력 기능을 수행한다. QUANTA는 분자 구조의 구축, 도식적 모델링 및 분석을 수행한다. QUANTA는 분자 서로간의 행동의 상호작용 구축, 변형, 가시화, 및 분석을 수행한다. 상기 적용은 RNA 및 DNA

분자의 2차 구조를 정의하고 표시하기 위해 개조될 수 있다.

- [0203] 그 후, 상기 다양하게 변형된 앵타머는 관심 PDGF 또는 VEGF 기능을 위한 임의의 적합한 분석법, 예를 들어 PDGF 세포-기준 증식 활성 분석법을 이용하여 기능에 대해 시험할 수 있다.
- [0204] 변형은 전-SELEX 또는 후-SELEX 과정 변형일 수 있다. 전-SELEX 과정 변형으로 그의 SELEX 표적 및 개선된 생체내 안정성에 대해 모두 특이성을 갖는 핵산 리간드를 수득한다. 2'-OH 핵산 리간드에 SELEX 과정-후 변형을 행하면 핵산 리간드의 결합 능력에 반대 영향을 주지 않으면서 개선된 생체내 안정성을 유발시킬 수 있다.
- [0205] 본 발명의 앵타머 생산에 유용한 다른 변형이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 변형은 후-SELEX 방법 (이전에 확인된 변형되지 않은 리간드의 변형)으로 개발되거나 또는 SELEX 방법내로 혼입되어 개발될 수 있다.
- [0206] 일반적으로는 앵타머 또는 핵산 리간드, 및 특히 VEGF 앵타머는 엑소뉴클레아제에 대한 감수성을 감소시키고 전체적인 안정성을 증가시키는 방식으로 5'-캡핑 및 3'-캡핑된 경우에 가장 안정하고, 따라서 가장 효율적인 것으로 관찰된 바 있다. 따라서, 본 발명은 일반적으로 앵타머 및 특히 항-VEGF 앵타머를 5' 말단에서는 5'-5' 역전 뉴클레오타이드 캡 구조로, 3' 말단에서는 3'-3' 역전 뉴클레오타이드 캡 구조로 캡핑하는 것에 따른 한 실시양태를 기초로 한다. 따라서, 본 발명은 5' 말단에서는 5'-5' 역전 뉴클레오타이드 캡으로 캡핑되고 3' 말단에서는 3'-3' 역전 뉴클레오타이드 캡으로 캡핑된 항-VEGF 및(또는) 항-PDGF 앵타머, 즉 핵산 리간드를 제공한다.
- [0207] 특히, 본 발명의 유용한 특정 앵타머는 항-VEGF 앵타머 조성물로서, 이들의 말단에 5'-5' 및 3'-3' 역전 뉴클레오타이드 캡 구조 둘 다를 갖는 것들이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 캡핑된 항-VEGF 앵타머는 RNA 앵타머, DNA 앵타머 또는 혼합된 조성물 (즉, RNA 및 DNA 둘 다)을 갖는 앵타머일 수 있다. 본 발명의 적합한 항-VEGF 앵타머 서열은 뉴클레오타이드 서열 GAAGAAUUGG (서열 15); 또는 뉴클레오타이드 서열 UUGACGC (서열 16); 또는 뉴클레오타이드 서열 GUGAAUGC (서열 17)를 포함한다. 특히, 하기 서열을 갖는 본 발명의 캡핑된 항-VEGF 앵타머가 유용하다.
- [0208] X-5'-5'-CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCG-3'-3'-X (서열 18)
- [0209] 여기서, 각각의 C, G, A 및 U는 각각 천연-발생 뉴클레오타이드 사이티딘, 구아니딘, 아데닌 및 우라실, 또는 이들에 상응하는 변형 뉴클레오타이드를 나타내고; X-5'-5'는 앵타머의 5' 말단을 캡핑한 역전 뉴클레오타이드이고; 3'-3'-X는 앵타머의 3' 말단을 캡핑한 역전 뉴클레오타이드이고; 나머지 뉴클레오타이드 또는 변형 뉴클레오타이드는 5'-3'포스포디에스테르 연결을 통해 순서대로 연결된다. 일부 실시양태에서, 캡핑된 항-VEGF 앵타머의 각각의 뉴클레오타이드는 개별적으로 -OH (리보핵산 (RNA)에 대한 표준임) 또는 -H (데옥시리보핵산 (DNA)의 표준임)와 같은 2' 리보실 치환을 수반한다. 다른 실시양태에서, 2'리보실 위치는 O(C₁₋₁₀ 알킬), O(C₁₋₁₀ 알케닐), F, N₃ 또는 NH₂ 치환기로 치환된다.
- [0210] 여전히 특정 예로 제한되지는 않지만, 5'-5' 캡핑된 항-VEGF 앵타머는 하기 구조를 가질 수 있다.
- [0211] T_d-5'-5'-C_fG_mG_mA_rU_fC_fA_mG_mU_fG_mA_mU_fG_mC_fU_fA_mU_fA_mC_fA_mU_fC_fG_m 3'-3'-T_d (서열 19)
- [0212] 여기서, "G_m"은 2'-메톡시구아닐산을 나타내고, "A_m"은 2'-메톡시아데닐산을 나타내고, "C_f"은 2'-플루오로시티딜산을 나타내고, "U_f"은 2'-플루오로우라실산을 나타내고, "A_r"은 리보아데닐산을 나타내고, "T_d"은 데옥시리보티미딜산을 나타낸다.
- [0213] *안티센스, 리보자임 및 DNA 효소 길항제*
- [0214] PDGF 및 VEGF를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 리보자임은 PDGF 및 VEGF의 매신저 RNA로부터 단백질 번역을 억제함으로써 또는 각각 상응하는 PDGF 또는 VEGF mRNA의 분해를 표적으로 함으로써 PDGF/VEGF를 억제한다. 상기 기재된 이러한 PDGF 및 VEGF-표적화 핵산은 이들 PDGF 및 VEGF 리보자임 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 고안 및 합성에 유용한 서열을 제공한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 리보자임의 고안 및 합성 방법은 당업계에 공지되어 있다. 추가 지침이 본원에서 제공된다.
- [0215] 특이적이고 효과적인 mRNA-표적화 올리고뉴클레오타이드 (안티센스 ODN) 및 리보자임 및 안티센스를 고안하는 데 있어서 한 사안은 표적 mRNA (부분적으로 자가-쌍형성된 2차 구조내로 그 자체를 폴딩시킴) 내에서 안티센스 쌍형성이 이루어지기 쉬운 부위를 확인하는 것이다. RNA 쌍형성 접근성의 예측 및 분자 스크리닝용 컴퓨터-보조의 알고리즘 조합은 대부분의 mRNA 표적에 대하여 지정된 특이적이고 효과적인 리보자임 및(또는) 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 생성을 가능하게 한다. 실제로, 몇몇 접근법은 안티센스 또는 리보자임 억제제에 대한 표

적 RNA 분자의 접근성을 결정하기 위해 기재된 바 있다. 한 접근법은 가능한 많은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 시험관내 스크리닝 검정법을 이용한다 (문헌 [Monia et al., (1996) Nature Med., 2: 668-675]; 및 [Milner et al., (1997) Nature Biotechnol., 15: 537-541] 참조). 또다른 접근법은 ODN의 랜덤 라이브러리를 사용한다 (문헌 [Ho et al., (1996) Nucleic acids Res., 24: 1901-1907]; [Birikh et al., (1997) RNA 3: 429-437]; 및 [Lima et al., (1997) J. Biol. Chem., 272: 626-638]). 접근하기 쉬운 부위는 RNase H 절단에 의해 모니터링될 수 있다 (문헌 [Birikh et al., 상기 문헌]; 및 문헌 [Ho et al., (1998) Nature Biotechnol., 16: 59-63] 참조). RNase H는 DNA-RNA 이중나선의 RNA 가닥의 포스포디에스테르 주쇄의 가수분해성 절단을 촉매한다.

[0216] 또다른 접근법에서, 화학적으로 합성된 반-랜덤의 키메라성 ODN의 풀의 사용을 포함하는 것은 시험관내 합성된 RNA 표적에서 RNase H에 의해 절단된 접근하기 쉬운 부위를 확인하는 데 사용된다. 이어서, 프라이머 확장 분석은 표적 분자에서 이러한 부위를 확인하는 데 이용된다 (문헌 [Lima et al., 상기 문헌] 참조). RNA로 안티센스 표적을 고안하기 위한 다른 접근법은 RNA에 대한 컴퓨터 보조의 폴딩 모델을 근거로 한다. 효과적인 절단을 스크리닝하기 위해 랜덤 리보자임 라이브러리를 사용한 것에 대한 여러 보고가 공개되어 있다 (문헌 [Campbell et al., (1995) RNA 1: 598-609]; [Lieber et al., (1995) Mol. Cell Biol., 15: 540-551]; 및 [Vaish et al., (1997) Biochem., 36: 6459-6501] 참조).

[0217] ODN 및 RNase H의 랜덤 또는 반-랜덤 라이브러리를 이용하는 다른 시험관내 접근법은 컴퓨터 시뮬레이션보다 더 유용할 수 있다 (문헌 [Lima et al., 상기 문헌]). 그러나, 최근의 관찰에서는 폴리뉴클레오타이드의 어닐링 상호작용이 RNA-결합 단백질에 의해 영향을 받는 것으로 제안되기 때문에, 시험관내 합성된 RNA를 사용해서는 생체내 안티센스 ODN의 접근성이 예측되지 않는다 (문헌 [Tsuchihashi et al., (1993) Science, 267: 99-102]; [Portman et al., (1994) EMBO J., 13: 213-221]; 및 [Bertrand and Rossi (1994) EMBO J., 13: 2904-2912] 참조). 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,562,570호는 생체내 조건을 모방한 세포 추출물의 존재하에서 mRNA 내의 접근하기 쉬운 부위를 결정하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0218] 요컨대, 상기 방법은 내인성 RNA-결합 단백질을 함유한 세포 추출물을 포함한 반응 배지 또는 하나 이상의 RNA-결합 단백질이 존재하여 세포 추출물을 모방한 반응 배지 중의 혼성화 조건하에 천연 또는 시험관내-합성된 RNA를 소정의 안티센스 ODN, 리보자임 또는 DNAzyme과, 또는 랜덤 또는 반-랜덤 ODN, 리보자임 또는 DNAzyme 라이브러리와 인큐베이션하는 것을 포함한다. 표적 RNA 내의 접근하기 쉬운 부위와 상보적인 임의의 안티센스 ODN, 리보자임 또는 DNAzyme은 그러한 부위에 혼성화될 것이다. 소정의 ODN 또는 ODN 라이브러리가 사용되는 경우, RNase H는 혼성화 동안 존재하거나 또는 혼성화 후에 첨가되어 혼성화가 일어난 RNA를 절단한다. 리보자임 및 DNAzyme가 혼성화가 일어나는 RNA 절단하기 때문에 RNase H는 리보자임 또는 DNAzyme이 사용되는 경우에 존재할 수 있지만, 이것이 요구되는 것은 아니다. 일부 예에서, 내인성 mRNA, RNA-결합 단백질 및 RNase H를 함유한 세포 추출물 중 랜덤 또는 반-랜덤 ODN 라이브러리가 사용된다.

[0219] 다음으로, 다양한 방법이 안티센스 ODN, 리보자임 또는 DNAzyme가 결합하여 절단되는 표적 RNA 상의 부위를 인식하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제-의존성 폴리머라제 연쇄 반응 (TDPCR)은 이러한 목적을 위해 이용될 수 있다 (문헌 [Komura and Riggs (1998) Nucleic acids Res., 26: 1807-11]). 역전사 단계는 RNA 주형을 DNA로 전환시킨 다음, TDPCR에 이용된다. 본 발명에서, TDPCR 방법에 필요한 3' 말단은 임의의 적합한 RNA 의존성 DNA 폴리머라제 (예를 들어, 역전사효소)를 사용하여 관심 표적 RNA를 역 전사시킴으로써 생성된다. 이는 연구하고자 하는 표적 RNA 분자의 부분으로부터 하류 영역으로 (즉, RNA 분자 상의 5'에서 3' 방향으로) 제1 ODN 프라이머 (P1)를 RNA에 혼성화시킴으로써 달성될 수 있다. dNTP의 존재하에서 폴리머라제는 P1의 3' 말단으로부터 RNA를 DNA로 카피하고, 안티센스 ODN/RNase H, 리보자임 또는 DNAzyme 중 하나에 의해 생성된 절단 부위에서 카피를 중단한다. 새로운 DNA 분자 (제1 가닥 DNA로도 지칭됨)는 TDPCR 방법의 PCR 부분에서 제1 주형으로써 작용하며, RNA 상에 존재하는 접근하기 쉬운 상응하는 표적 서열을 확인하는 데 사용된다.

[0220] 예를 들어, TDPCR 절차는 이어서, 즉 역-전사된 DNA를 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 (TdT)의 존재하에 구아노신 트리포스페이트 (rGTP)와 반응시켜 DNA 분자의 3' 말단에 (rG)2-4 테일을 추가하는 데 이용될 수 있다. 다음으로, (rG)2-4 테일을 갖는 그러한 염기-쌍의 하나의 가닥에 3' 2-4 오버행(overhang)을 갖는 이중-가닥 ODN 링커를 라이게이션한다. 다음으로, 2개의 PCR 프라이머를 가한다. 첫번째 프라이머는 (rG)2-4 테일에 라이게이션된 TDPCR 링커의 가닥과 상보적인 링커 프라이머 (LP)이다 (종종 하류 가닥으로도 지칭됨). 다른 프라이머 (P2)는 P1과 동일한 것일 수 있지만, P1에 내포될 수 있으며, 즉, P1에 의해 결합되는 영역으로부터 적어도 부분적으로 상류 (즉, RNA 분자 상의 3'에서 5'의 방향)이지만 연구에서의 표적 RNA 분자 부분의 하류인

영역에서 표적 RNA에 상보적이다. 즉, 접근하기 쉬운 결합 부위를 갖는지 결정하기 위한 연구에서, 표적 RNA 분자의 부분은 P2에 상보적인 영역의 상류 부분이다. 이어서, PCR은 DNA 폴리머라제 및 dNTP의 존재하에 공지된 방식으로 수행되어 프라이머 LP 및 P2에 의해 한정된 DNA 절편을 증폭시킨다. 이어서, 임의의 공지된 다양한 방법으로 증폭된 생성물을 포획하여 그후 절단 부위를 정확하게 확인하는 자동화된 DNA 서열분석기 상에서 서열화할 수 있다. 이렇게 확인되면, 한정된 안티센스 DNA 서열 또는 리보자임을 시험관내 또는 생체내 사용하기 위해 합성할 수 있다.

[0221] 합성 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열을 사용하여 특이적 유전자의 발현에 안티센스를 개입시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Lefebvre-d'Hellencourt et al., (1995) Eur. Cytokine Netw., 6: 7]; [Agrawal (1996) TIBTECH, 14: 376]; 및 [Lev-Lehman et al, (1997) Antisense Therap. Cohen and Smicek, eds. (Plenum Press, New York)]). 요컨대, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 관심 표적 mRNA에 상보적이고 RNA: AS 이중나선을 형성하도록 고안된, 전형적으로 15 내지 30mer이지만 7mer보다 작지 않은 짧은 DNA 서열일 수 있다 (문헌 [Wagner et al., (1994) Nature 372: 333] 참조). 이러한 이중나선의 형성은 해당 mRNA의 프로세싱, 스플라이싱, 수송 또는 번역을 저해할 수 있다. 게다가, 특정 AS 뉴클레오타이드 서열은 RNase H의 표적 mRNA와 혼성화되는 경우 세포내 RNase H를 활성화시켜 mRNA를 분해할 수 있다 (문헌 [Calabretta et al., (1996) Semin.Oncol., 23: 78]). 이러한 경우, RNase H는 이중나선의 RNA 성분을 절단할 것이고, 잠재적으로 AS를 방출하여 표적 RNA의 추가 분자와 추가로 혼성화될 수 있다. 작동의 추가 모드는 게놈 DNA와 AS와의 상호작용으로부터 생성되어 전사적으로 비활성일 수 있는 삼중 나선을 형성한다.

[0222] 본원에서 상기 논의된 안티센스 서열로의 추가 또는 안티센스 서열에 대한 치환의 비제한적인 예에서, 리보자임은 유전자 기능을 저하하는데 사용될 수 있다. 이것은 안티센스 치료법이 화학양론적인 고려로 제한되는 경우에 특히 필수적이다. 게다가, 리보자임은 동일한 서열을 표적으로 하여 사용될 수 있다. 리보자임은 표적 RNA에서 특이적 부위를 절단하는 RNA 촉매능을 보유한 RNA 분자이다. 리보자임에 의해 절단되는 RNA 분자의 수는 1: 1 화학양론에 의해 예측되는 수보다 많다 (문헌 [Hampel and Tritz (1989) Biochem., 28: 4929-33]; 및 [Uhlenbeck (1987) Nature, 328: 596-600] 참조). 따라서, 본 발명에서는 또한, PDGF 또는 VEGF mRNA 중의 접근하기 쉬운 도메인을 표적으로 하고 적절한 촉매 중심을 함유한 리보자임을 사용하는 것이 허용된다. 리보자임은 당업계에 공지되어 있는 바와 같이 그리고 본원에 추가로 논의되는 바와 같이 제조되고 전달될 수 있다. 리보자임은 안티센스 서열과 함께 사용될 수 있다.

[0223] 리보자임은 RNA의 포스포디에스테르 결합의 절단을 촉매한다. 여러가지 리보자임의 구조적 부류는 담배 운문병 바이러스 위성 RNA (sTRSV)의 네가티브 가닥으로부터 최초로 유래된 I군 인트론, RNase P, 간염 델타 바이러스 리보자임, 해머헤드 리보자임 및 헤어핀 리보자임을 포함하는 것으로 확인된 바 있다 (문헌 [Sullivan (1994) Invest.Dermatology (Suppl.) 103: 95S]; 및 미국 특허 제5,225,347호 참조). 해머헤드 리보자임 및 헤어핀 리보자임의 두 부류는 비로이드 및 비루소이드로부터 유래되며, 여기서 리보자임은 고리형 회전환 복제 동안 생성된 올리고머로부터 단량체를 분리하는 것으로 여겨진다 (문헌 [Symons (1989) TIBS, 14: 445-50]; [Symons (1992) Ann. Rev. Biochem., 61: 641-71] 참조). 해머헤드 및 헤어핀 리보자임 모티프는 유전자 치료법을 위한 mRNA의 트랜스-절단에 가장 일반적으로 적용된다. 본 발명에서 사용된 리보자임 유형은 당업계에 공지된 것들로부터 선택된다. 헤어핀 리보자임은 현재 임상 시험 중이고 특히 유용한 유형이다. 일반적으로, 리보자임의 길이는 뉴클레오타이드 30 내지 100개이다.

[0224] 표적 mRNA 전사체를 촉매적으로 절단하기 위해 고안된 리보자임 분자가 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, PDGF (서열 1) 또는 VEGF (서열 3)), 이들 분자는 또한 mRNA 번역을 저해하는 데 사용될 수 있다 (예를 들어, PCT 국제 공개 WO 90/11364; 문헌 [Sarver et al., (1990) Science, 247: 1222-1225] 및 미국 특허 제 5,093,246호 참조). 부위 특이적 인식 서열에서 mRNA를 절단하는 리보자임이 특정 mRNA를 파괴하는데 사용되는 경우, 해머헤드 리보자임을 사용하는 것이 특히 유용하다. 해머헤드 리보자임은 표적 mRNA와 상보적 염기 쌍을 형성하는 플랭킹 영역에 의해 지시되는 위치에서 mRNA를 절단한다. 유일한 요건은 표적 mRNA가 염기의 서열 5'-UG- 3'를 2개 갖는다는 것이다. 해머헤드 리보자임의 구조 및 제조는 당업계에 공지되어 있고, 문헌 [Haseloff and Gerlach (1988) Nature, 334 : 585]에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0225] 본 발명의 리보자임은 또한 RNA 엔도리보뉴클레아제 (이하, "Cech-형 리보자임"), 예를 들어 테트라히메나 썬모필라(*Tetrahymena thermophila*)에서 천연 발생된 RNA 엔도리보뉴클레아제 (IVS 또는 L-19 IVS RNA로서도 공지됨)를 포함하고, 이는 토마스 케치(Thomas Cech)와 동료들에 의해 광범위하게 기재되어 있다 (문헌 [Zaug et al., (1984) Science, 224: 574-578]; [Zaug and Cech (1986) Science, 231: 470-475]; [Zaug, et al., (1986) Nature, 324: 429-433]; 국제 특허 출원 WO 88/04300호; [Been and Cech (1986) Cell, 47: 207-216]

참조). Cech-형 리보자임은 8개 염기 쌍 활성 부위를 가지며, 이 부위는 표적 RNA를 절단한 후에 그 자리에서 표적 RNA 서열과 혼성화된다. 본 발명은 8개 염기-쌍 활성 부위 서열을 표적으로 하는 이러한 Cech-형 리보자임을 포함한다. 본 발명은 작동 메카니즘의 특정 이론에 제한되지는 않지만, 본 발명에서 해머헤드 리보자임을 사용하는 것은 해머헤드 리보자임이 mRNA 표적의 RNA 번역 및(또는) mRNA 표적의 특이적 절단을 차단시킴으로써 작동하는 것을 나타낸 최근의 보고에서처럼 PDGF/VEGF-직접 안티센스의 사용보다 잇점을 가질 수 있다.

[0226] 안티센스 접근법에서와 같이, 리보자임은 개선된 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 개선된 안정성, 표적화 등)로 이루어질 수 있고, 표적 mRNA를 발현하는 세포로 전달된다. 유용한 전달 방법은 강한 구조의 pol III 또는 pol II 프로모터의 조절하에 리보자임을 "코딩"하는 DNA 구조를 사용하는 것을 포함하여, 형질감염된 세포가 충분한 양의 리보자임을 생성함으로써 표적화된 메세지를 파괴하고 번역을 억제할 것이다. 안티센스 분자와 달리 리보자임은 촉매성이기 때문에, 효율을 위해 세포내 농도가 낮을 것이 요구된다.

[0227] 상기 기재된 바와 같이, 필요한 경우의 뉴클레아제 내성은 사용 방법 및 전달 방법에 대해 필요에 따라 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드 또는 리보자임의 생물학적 활성을 실질적으로 간섭하지 않는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제공된다 (문헌 [Iyer et al., (1990) J. Org. Chem., 55: 4693-99]; [Eckstein (1985) Ann. Rev. Biochem., 54: 367-402]; [Spitzer and Eckstein (1988) Nucleic acids Res., 18: 11691-704]; [Woolf et al., (1990) Nucleic acids Res., 18: 1763-69]; 및 [Shaw et al., (1991) Nucleic acids Res., 18: 11691-704]). 앵타머에 대해 상기 기재된 바와 같이, 뉴클레아제 내성을 향상시키기 위해 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 리보자임에 만들어질 수 있는 비제한적이지만 대표적인 변형은 포스포이트 주쇄 내의 인 또는 산소 헤테로원자, 단쇄 알킬 또는 시클로알킬의 당 사이의 연결 또는 단쇄 헤테로원자성 또는 헤테로시클릭의 당 사이의 연결을 변형시키는 것을 포함한다. 여기에는, 예를 들어 2'-플루오르화 0-메틸화 메틸 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트와 모르폴리노 올리고머를 제조하는 것이 포함된다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 리보자임은 4 내지 6개의 3'-말단 뉴클레오타이드 염기 사이를 연결한 포스포로티오에이트 결합을 가질 수 있다. 다르게는, 포스포로티오에이트 결합은 모든 뉴클레오타이드 염기를 연결할 수 있다. 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 유효한 농도의 유의한 독성을 나타내지 않고, 동물에서 충분한 약동학적 반감기를 나타내며 (문헌 [Agarwal et al., (1996) TIBTECH, 14: 376] 참조), 뉴클레아제 내성이다. 다르게는, AS-ODN에 대한 뉴클레아제 내성은 뉴클레오타이드 서열 CGCGAAGCG을 갖는 3'-말단에서 9개의 뉴클레오타이드 루프 형성 서열을 가짐으로써 제공될 수 있다. 아비딘-비오틴 접합 반응은 또한 혈청 뉴클레아제 분해에 대한 개선된 AS-ODN 보호를 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Boado and Pardridge (1992) Bioconj. Chem., 3: 519-23] 참조). 이러한 개념에 따르면, AS-ODN 작용제는 이들의 3'-말단에서 모노비오틴화된다. 아비딘과 반응하는 경우, 이들은 비-접합 ODN에 대해 6배 개선된 안정성을 갖는 단단한 뉴클레아제-내성의 복합물을 형성한다.

[0228] 다른 연구에서는 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드의 생체내 확장을 나타내 있다 (문헌 [Agarwal et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7595]). 순환으로부터 외래 AS-올리고뉴클레오타이드를 제거하는 스캐빈징(scavenging) 메카니즘으로서 유용할 수 있는 이러한 과정은 확장이 발생하는 부착된 올리고뉴클레오타이드에 자유로운 3'-말단이 존재하는가에 의존적이다. 따라서, 이러한 중요한 위치에서의 부분 포스포로티오에이트, 루프 보호 또는 비오틴-아비딘은 이러한 AS-올리고데옥시뉴클레오타이드의 안정성을 보장하는 데 충분할 수 있다.

[0229] 상기 기재된 바와 같은 변형된 염기를 사용하는 것 이외에, 뉴클레오타이드의 동족체는 뉴클레오타이드의 구조가 본질적으로 변경되고 치료제 또는 실험 시약으로서 더 적합하도록 제조될 수 있다. 뉴클레오타이드 동족체의 예로는 펩티드 핵산 (PNA)이 있으며, 여기서 DNA (또는 RNA) 중 데옥시리보스 (또는 리보스) 포스포에이트 주쇄는 폴리아미드 주쇄로 대체되는데, 이들은 펩티드에서 발견되는 것과 유사하다. PNA 동족체는 효소에 의한 분해에 내성인 것으로 나타나고, 생체내 및 시험관내에서 연장된 수명을 갖는 것으로 나타난다. 추가로, PNA는 상보적인 DNA 서열에 DNA 분자보다 더 강하게 결합하는 것으로 나타났다. 이것은 PNA 가닥과 DNA 가닥 사이의 전하 반발의 부족으로 인해 관찰되는 것이다. 올리고뉴클레오타이드에 발생할 수 있는 다른 변형은 중합체 주쇄, 모르폴리노 중합체 주쇄 (예를 들어, 그 내용이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제5,034,506호 참조), 시클릭 주쇄, 또는 비시클릭 주쇄, 당 모방체 또는 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 성질을 개선할 수 있는 것을 포함한다. 임의의 다른 변형을 포함한다.

[0230] 본 발명의 추가 측면은, 예를 들어 PDGF 또는 VEGF와 같이 표적 mRNA의 발현을 감소시키는 DNA 효소의 사용에 관한 것이다. DNA 효소는 안티센스 및 리보자임 기술 둘 다의 기계적 특징의 일부를 포함한다. DNA 효소 측은 이들이 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 매우 유사하게 특정 표적 핵산 서열을 인지하도록 고안되지만, , 리보자

임과 매우 유사하게도 이들은 촉매성이고 표적 핵산을 특이적으로 절단한다.

- [0231] 현재 2종의 기본 유형의 DNA 효소가 존재하고, 이들 둘 다 산토로와 조이스(Santoro and Joyce)에 의해 확인되었다 (예를 들어, 미국 특허 제6,110,462호 참조). 10-23 DNA 효소는 2개의 암(arm)을 연결하는 루프 구조를 포함한다. 2개의 암은 특정 표적 핵산 서열을 인식함으로써 특이성을 제공하며, 루프 구조는 생리학적 조건 하에 촉매적 기능을 제공한다.
- [0232] 요컨대, 표적 핵산을 특이적으로 인식하고 절단하는 DNA 효소를 고안하기 위해, 당업자는 먼저 독특한 표적 서열을 확인해야만 한다. 이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대해 개략적으로 설명한 바와 동일한 접근법으로 달성될 수 있다. 특정 예에서, 독특하거나 또는 실질적인 서열은 뉴클레오타이드가 대략 18 내지 22개인 G/C 풍부 영역이다. 높은 G/C 함량은 DNA 효소와 표적 서열 사이에 보다 강한 상호작용을 보장하는 데 도움을 준다.
- [0233] DNA 효소를 합성하는 경우, 메세지에 대한 효소를 표적으로 하는 특이적 안티센스 인식 서열을 분할하여 이것이 DNA 효소의 2개의 암을 포함하도록 하고, DNA 효소 루프가 2개의 특이적 암 사이에 위치하도록 한다.
- [0234] DNA 효소를 제조하고 관리하는 방법은, 예를 들어 미국 특허 제6110462호에서 발견할 수 있다. 유사하게, 시험 관내 또는 생체내에서 DNA 리보자임을 전달하는 방법은 상기 언급한 바와 같이 RNA 리보자임을 전달하는 방법을 포함한다. 추가적으로, 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같이, DNA 효소를 임의로 변형시켜 안전성을 개선하고 분해에 대한 내성을 개선할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0235] *RNAi 길항제*
- [0236] 본 발명의 일부 실시양태는 RNA 간섭 (RNAi)을 이용하여 VEGF 및 PDGF의 억제를 달성하기 위한 물질 및 방법의 사용을 고안한 것이다. RNAi는 진핵 세포에서 발생할 수 있는 서열-특이적 전사후 유전자 억제 과정이다. 일반적으로, 이 과정은 서열과 상동성인 이중-가닥 RNA (dsRNA)에 의해 유도되는 특정 mRNA 서열의 분해를 포함한다. 예를 들어, 특정 단일-가닥 mRNA (ssmRNA)의 서열에 상응하는 긴 dsRNA의 발현은 메세지를 불안정하게 할 것이고, 이로써 상응하는 유전자의 발현을 "간섭"할 것이다. 따라서, 임의의 선택된 유전자는 그 유전자에 대한 mRNA의 모든 또는 중요한 부분에 상응하는 dsRNA를 도입함으로써 억제될 수 있다. 이러한 억제는 긴 dsRNA가 발현될 때 나타나고, 이는 초기에 리보뉴클레아제 III에 의해 염기 쌍이 21 내지 22개의 길이만큼 적게 더 짧은 dsRNA 올리고뉴클레오타이드로 프로세싱된다. 따라서, RNAi는 상대적으로 짧은 상동성 dsRNA의 도입 또는 발현에 의해 달성될 수 있다. 사실상, 상대적으로 짧은 상동성 dsRNA를 사용하여 하기 논의되는 특정 잇점을 가질 수 있다.
- [0237] 포유동물 세포는 이중-가닥 RNA (dsRNA)에 의해 영향을 받는 적어도 2개의 경로를 갖는다. RNAi (서열-특이적) 경로에서, 개시 dsRNA는 먼저 상기 기재한 바와 같이 짧은 간섭 (si) RNA로 분해된다. siRNA는 약 21개의 뉴클레오타이드 센스 및 안티센스 가닥을 가지며, 이들은 각각의 3' 말단에 2개 뉴클레오타이드의 오버행을 갖는 대략 19개의 뉴클레오타이드 siRNA를 형성한다. 짧은 간섭 RNA는 특이적 매신저 RNA가 분해의 표적이 되도록 하는 서열 정보를 제공하는 것으로 생각된다. 반대로, 비특이적 경로는 염기 쌍의 길이가 약 30개 이상인 임의의 서열의 dsRNA에 의해 유발된다. 비특이적 효과는 dsRNA가 2종의 효소, 즉 PKR (이중-가닥 RNA-활성화 단백질 키나제) (이것은 이것의 활성형에서 번역 개시 인자 eIF2를 인산화시켜 모든 단백질 합성을 막음) 및 2',5'올리고아데닐레이트 신테타제 (2',5'-AS) (이것은, RNase L을 활성화시키는 분자를 합성하고, 모든 mRNA를 표적으로 하는 비특이적 효소임)를 활성화시키기 때문에 발생한다. 비특이적 경로는 스트레스 또는 바이러스 감염에 대한 숙주 반응을 나타낼 수 있고, 일반적으로, 비특이적 경로의 효과는 본 발명의 특히 유용한 방법에서 최소화된다. 유의하게는, 보다 긴 dsRNA가 비특이적 경로를 유도하는 데 요구되는 것으로 나타나며, 따라서 염기 쌍이 약 30개 보다 짧은 dsRNA는 RNAi에 의한 유전자 억제를 달성하는 데 특히 유용하다 (예를 들어, 문헌 [Hunter et al., (1975) J. Biol. Chem., 250: 409-17]; [Manche et al., (1992) Mol. Cell Biol., 12: 5239-48]; [Minks et al., (1979) J. Biol. Chem., 254: 10180-3]; 및 [Elbashir et al., (2001) Nature, 411: 494-8] 참조).
- [0238] RNAi를 달성하는 데 사용되는 특정 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 길이가 염기 쌍 30개 이하이고, 리보핵산의 염기 쌍 약 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 또는 17개를 포함할 수 있다. 임의로, 본 발명의 dsRNA 올리고뉴클레오타이드는 3' 오버행 말단을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서의 2-뉴클레오타이드 3' 오버행은 임의의 유형의 리보뉴클레오타이드 잔기로 이루어질 수 있고, 심지어 RNA 합성 비용을 낮추는 2'-데옥시티미딘 잔기로 이루어질 수도 있고, 세포 배양 배지 중의 형질감염된 세포 내에서 siRNA의 뉴클레아제 내성을 향상시킬 수 있다 (문헌 [Elbashi et al., (2001) Nature, 411: 494-8] 참조).

- [0239] 50, 75, 100 또는 500개 또는 그 이상의 염기 쌍을 갖는 보다 긴 dsRNA가 본 발명의 특정 실시양태에서 사용될 수 있다. RNAi를 달성하기 위한 예시적인 dsRNA의 농도는 약 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM, 1.0 nM, 1.5 nM, 25 nM 또는 100 nM이지만, 처리하고자 하는 세포의 성질, 표적 유전자 및 당업자들이 용이하게 확인할 수 있는 다른 인자에 따라 다른 농도로 활용될 수 있다. 예시적인 dsRNA는 화학적으로 합성하거나 또는 적절한 발현 벡터를 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 생성될 수 있다. 예시적인 합성 RNA는 당업계에 공지된 방법으로 화학적으로 합성된 21개 뉴클레오타이드 RNA를 포함한다 (예를 들어, 신속한 RNA 포스포르아미디트 및 티미딘 포스포르아미디트 (Proligo, Germany)). 합성 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 방법으로 탈보호되고 겔-정제될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Elbashir et al., (2001) Genes Dev., 15: 188-200] 참조). 보다 긴 RNA가 당업계에 공지된 프로모터, 예를 들어 T7 RNA 폴리머라제 프로모터로부터 전사될 수 있다. 단일 RNA 표적은 시험관내 프로모터의 가능한 양쪽 배향의 하류에 위치하여 표적의 양 가닥을 전사시켜 목적하는 표적 서열의 dsRNA 올리고뉴클레오타이드를 생성할 것이다.
- [0240] 올리고뉴클레오타이드의 고안에 활용되는 특이적 서열은 표적 (예를 들어, PDGF (예를 들어, 서열 2) 또는 VEGF (예를 들어, 서열 4))의 발현된 유전자 메세지내에 함유된 임의의 뉴클레오타이드 인접 서열일 수 있다. 당업계에 공지된 프로그램 및 알고리즘은 적절한 표적 서열을 선택하는데 이용된다. 추가로, 최적의 서열은, 상기 추가로 기재된 바와 같이, 명시된 단일 가닥 핵산 서열의 2차 구조를 예측하기 위해 고안된 프로그램을 이용하여 선택될 수 있고, 폴딩된 mRNA의 노출된 단일 가닥 영역에서 유사하게 발견되는 서열을 선택할 수 있다. 적절한 올리고뉴클레오타이드를 고안하기 위한 방법 및 조성물은, 예를 들어 그 내용이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,251,588호에서 발견할 수 있다. mRNA는 일반적으로 리보뉴클레오타이드 서열 내에 단백질 합성을 지시하는 정보를 함유한 선형 분자로서 여겨진다. 그러나, 여러 연구에서 대부분의 mRNA가 다양한 2차 및 3차 구조임이 밝혀졌다. RNA에서의 2차 구조 요소는 동일한 RNA 분자의 상이한 영역 사이에서의 왓슨-클릭 유형의 상호작용에 의해 대부분 형성된다. 중요한 2차 구조 요소는 분자내 이중 가닥 영역, 헤어핀 루프, 이중나선 RNA 중불지(bulge) 및 내부 루프를 포함한다. 3차 구조 요소는 2차 구조 요소가 서로 접촉하거나 단일 가닥 영역과 접촉하여 보다 복잡한 3차원 구조를 생성하는 경우에 형성된다. 많은 연구자들은 다수의 RNA 이중나선 구조의 결합 에너지를 측정하였고, RNA 2차 구조를 예측하기 위해 사용될 수 있는 법칙을 도출하였다 (예를 들어, 문헌 [Jaeger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 7706 (1989)]; 및 문헌 [Turner et al., (1988) Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 17: 167] 참조). 이러한 법칙은 RNA 구조 요소의 확인에 유용하고, 특히 스플라이싱 RNAi, 리보자임 또는 안티센스 기술에 대해 표적이 되는 특히 유용한 mRNA 절편을 나타낼 수 있는 단일 가닥 RNA 영역을 확인하는 데 유용하다. 따라서, mRNA 표적의 특정 절편은 RNAi를 매개하는 dsRNA 올리고뉴클레오타이드의 고안 뿐 아니라 본 발명의 적절한 리보자임 및 헤어페드 리보자임 조성물의 고안을 확인할 수 있다.
- [0241] dsRNA 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지되어 있는 리포솜과 같은 담체 조성물, 예를 들어 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000 (Life Technologies, Rockville MD)을 제조자 지침에 따라 사용하여 부착 세포주를 이중 표적 유전자로 형질감염시킴으로써 세포내로 도입될 수 있다. 내인성 유전자를 표적으로 하는 dsRNA 올리고뉴클레오타이드의 형질감염은 올리고펙타민(Oligofectamine) (Life Technologies)을 사용하여 수행할 수 있다. 형질감염 효율은 hGFP 코딩 pAD3의 공동-형질감염 후에 포유동물 세포주에 대해 형광 현미경을 이용하여 체크할 수 있다 (문헌 [Kehlenback et al., (1998) J. Cell. Biol., 141: 863-74]). RNAi의 유효성은 dsRNA의 도입에 따라 여러가지 임의의 분석법으로 평가할 수 있다. 이러한 분석법에는, 새로운 단백질 합성이 저해된 후 내인성 폴의 충분한 전환 시간에 이어 표적 유전자 생성물을 인식하는 항체를 사용한 웨스턴 블로팅 분석(Western blot analysis) 및 존재하는 표적 mRNA의 수준을 측정하는 노던 블로팅 분석(Northern blot analysis)이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0242] 본 발명에 사용되는 RNAi 기술의 추가 조성물, 방법 및 적용은 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,278,039호, 동 제5,723,750호 및 동 제5,244,805호에서 제공된다.
- [0243] 수용체 티로신 키나제 억제제 길항제
- [0244] 또한, 당업계에 공지된 티로신 키나제 길항제 및 이의 변이체 및 변형체는 본 발명에 포함되며, 이들은 당업계의 통상적인 기술 및 본원에 참고로 포함되는 기술의 교시를 이용하여 수득할 수 있다. PDGF (및 VEGF)의 세포외 신호는 PDGF 수용체 (및 VEGF 수용체)에 의해 야기된 티로신 키나제 매개 인산화 사건을 통해 세포의 다른 부분에 전달되며, 이는 세포막 결합 신호전달 복합체의 하류 기질 단백질에 영향을 미친다. 따라서, PDGF (및 (또는) VEGF) 신호전달의 수용체 키나제 단계에서 작용하는 길항제는 또한 본 발명의 방법에 효과적이다.

- [0245] PDGFR 또는 VEGFR과 같은 티로신 키나제 수용체 효소에 선택적인 다수 유형의 티로신 키나제 억제제는 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Spada and Myers, (1995) Exp. Opin. Ther. Patents, 5: 805] 및 [Bridges, (1995) Exp. Opin. Ther. Patents, 5: 1245] 참조). 또한, 로(Law) 및 라이든(Lydon)은 티로신 키나제 억제제의 항암 잠재력을 개괄하였다 (문헌 [(1996) Emerging Drugs: The Prospect For Improved Medicines, 241-260]). 예를 들어, 미국 특허 제6,528,526호에는 혈소판-유래 성장 인자-수용체 (PDGFR) 티로신 키나제 활성을 선택적으로 억제하는 것으로 나타난 치환된 퀴놀린 화합물이 개시되어 있다. PDGFR 티로신 키나제 활성의 공지된 억제제는 문헌 [Maguire et al., (1994) J. Med. Chem., 37: 2129]] 및 [Dolle et al., (1994) J. Med. Chem., 37: 2627])에 의해 보고된 퀴놀린-기재 억제제를 포함한다. 페닐아미노-피리미딘-기재 억제제 부류는 최근 트락슬러(Traxler) 및 그의 동료들의 유럽 특허 제56440호 및 문헌 [Zimmerman et al., (1996) Biorg. Med. Chem. Lett., 6: 1221-1226]] 및 [Buchdunger, et al., (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 92: 2558]에 보고되었다. PDGF 수용체 티로신 키나제 활성을 억제하는데 유용한 퀴나졸린 유도체로는 비스모노- 및 비시클릭 아릴 화합물 및 헤테로아릴 화합물 (예를 들어, WO 92/20642호 참조), 퀴놀린 유도체 (문헌 [(1994) Cancer Res., 54: 6106-6114] 참조), 피리미딘 유도체 (일본 공개 특허 출원 제87834/94호) 및 디메톡시퀴놀린 유도체 (일본 약학회 116차 연례학술대회 (가나자와)의 요약서 [(1996), 2, p. 275,29 (C2) 15-2] 참조)를 포함한다.
- [0246] VEGFR 티로신 키나제 억제제의 예로는 시놀린 유도체, 예를 들어 미국 특허 제6,514,971호 (이 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 것들을 포함한다. 이러한 시놀린 유도체의 다른 것들도 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [(1995) J. Med. Chem., 38: 3482-7]에는 4-(3-브로모아닐리노)시놀린이 개시되어 있고; 문헌 [(1968) J. Chem. Soc. C, (9): 1152-5]에는 6-클로로-4-페녹시시놀린이 개시되어 있고; 문헌 [(1984) J. Karnatak Univ., Sci., 29: 82-6]에는 특정한 4-아닐리노시놀린이 개시되어 있으며; 문헌 [(1973) Indian J. Chem., 11: 211-13]에는 특정한 4-페닐티오시놀린이 개시되어 있다. 또한, 문헌 [(1973) J. Karnatak Univ., 18: 25-30]에는 특정한 4-페녹시시놀린이 개시되어 있고, 문헌 [(1984) J. Karnatak Univ., Sci., 29: 82-6]에는 2가지 화합물: 4-(4-메톡시아닐리노)-6,7-디메톡시시놀린 및 4-(3-클로로아닐리노)-6,7-디메톡시시놀린이 개시되어 있다. 또한, --O--, --S--, --NH-- 및 --CH₂--로부터 선택된 기를 통해 4번 위치에서 연결된 페닐기를 갖는 특정한 시놀린은 미국 특허 제5,017,579호, 동 제4,957,925호, 동 제4,994,474호 및 EP 0302793 A2에 개시되어 있다.
- [0247] VEGFR 및(또는) PDGFR 억제를 위한 다른 관련 화합물은 통상의 분석법을 이용하여 관심 수용체 티로신 키나제 활성에 대한 그들의 효능에 대해 신규 화합물을 스크리닝함으로써 이용가능하다. 후보 PDGFR 또는 VEGFR 소분자 유기 억제제에 의한 효과적인 억제는 세포-기준 분석 시스템 뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 분석 시스템을 이용하여 모니터링할 수 있다.
- [0248] 예를 들어, VEGF-수용체 티로신 키나제에 대한 활성에 대한 한가지 시험은 하기와 같이 수행한다. 시험은 Flt-1 VEGF-수용체 티로신 키나제를 사용하여 수행한다. 자세한 절차는 하기와 같다: 키나제 용액 30 μ l (20 mM 트리스.HCl (pH 7.5) 중 Flt-1의 키나제 도메인 (문헌 [Shibuya, et al., (1990) Oncogene, 5: 519-24] 참조) 10 ng, 3 mM 이염화망간 (MnCl₂), 3 mM 염화마그네슘 (MgCl₂), 10 μ M 바나듐산나트륨, 0.25 mg/ml 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 20000, 1 mM 디티오프레이톨 및 3 μ g/.mu.l 폴리(Glu, Tyr) 4: 1 (스위스 부크스 소재의 시그마 (Sigma)), 8 μ M [³³P]-ATP (0.2 μ Ci), 1% 디메틸 술폭시드) 및 0 내지 100 M의 시험 화합물을 실온에서 10분 동안 함께 인큐베이션한다. 이어서 0.25 M 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) (pH 7) 10 μ l를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 다중채널 분사기 (미국 랩 시스템즈(LAB SYSTEMS))를 이용하여 진공기가 연결된 마이크로적정 여과 배분기를 통해 분취액 20 μ l를 PVDF (=폴리비닐 디플루오라이드) 이모빌론(Immobilon) P 막 (미국 밀리포어(Millipore))에 적용한다. 액체를 완전히 제거하고, 상기 막을 후속적으로 0.5% 인산 (H₃PO₄)를 함유한 욕조에서 4회 및 에탄올로 1회 세척하고, 세척시마다 교반하면서 10분 동안 인큐베이션하고, 이어서 휴렛 팩커드 탐카운트 매니폴드(Hewlett Packard Top Count Manifold)로 계수하고, 마이크로신티.(Microscint.) RTM. (베타-신티레이션 계수 액체) 10 μ l를 첨가한 후에 방사능을 측정하였다. 각 화합물의 억제 백분율을 3가지 농도 (일반적으로, 0.01 μ mol, 0.1 μ mol, 및 1 μ mol)에서 선형 회귀 분석법으로 IC₅₀-값을 결정하였다. 활성 티로신 억제제 화합물의 IC₅₀-값은 0.01 μ M 내지 100 μ M의 범위 내에 존재할 수 있다.
- [0249] 또한, VEGF-유도된 VEGFR 티로신 키나제/자가인산화 활성의 억제를 추가로 세포 실험으로 확인할 수 있었다. 요컨대, 형질감염시켜 인간 VEGF 수용체 (VEGFR/KDR)를 영구적으로 발현하는 CHO 세포를 6-웰 세포 플레이트 내의 완전 세포 배지 (10% 소태아 혈청 (FCS)을 함유함)에 시딩하고, 이들이 약 80% 전면성장을 나타낼 때까지

5% CO₂하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 시험할 화합물을 배양 배지 (0.1% 소 혈청 알부민을 갖는 FCS를 함유함)로 희석하고, 세포에 첨가하였다 (대조군은 시험 화합물 무함유 배지로 이루어짐). 37℃에서 2시간 후에, 재조합 VEGF를 첨가하여 최종 VEGF 농도는 20 ng/ml가 되게 한다. 37℃에서 추가 5분 동안 인큐베이션한 후에, 세포를 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 웰 당 용해 완충액 100 μ l 중에서 즉시 용균시켰다. 이어서, 용균물을 원심분리하여 세포 핵을 제거하고, 상업적인 단백질 분석법 (바이오라드(BIORAD))을 이용하여 상등액의 단백질 농도를 측정하였다. 이어서, 용균물을 즉시 사용하거나, 경우에 따라 -200℃에 보관하였다.

[0250] 이어서, 샌드위치 ELISA를 수행하여 KDR-수용체 인산화를 측정하였으며: KDR에 대한 모노클로날 항체를 블랙 ELISA 플레이트 (패커드사의 옵티플레이트(OptiPlate)TM, HTRF-96) 상에 고정화하였다. 이어서, 상기 플레이트를 세척하고, 잔류 유리 단백질-결합 부위를 PBS 중 1% BSA로 포화시켰다. 이어서, 세포 용균물 (웰 당 단백질 20 μ g)을 알칼리 포스파타제와 커플링된 항포스포티로신 항체와 함께 상기 플레이트 내 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 상기 플레이트를 다시 세척하고, 이어서 발광 AP 기질 (즉시 사용 가능하고, 에메랄드(Emerald) II를 함유한 CDP-스타(Star); 미국 매사추세츠주 베드폴드 소재의 어플라이드-바이오시스템즈 트로픽스(Applied-Biosystems TROPIX))를 사용하여 항포스포티로신 항체가 포획 인산화 수용체와 결합하였음을 입증하였다. 패커드 탑 카운트 마이크로플레이트 신틸레이션 카운터로 발광을 측정하였다. 양성 대조군 (VEGF 또는 PDGF로 자극함)의 신호와 음성 대조군 (VEGF 또는 PDGF로 자극하지 않음)의 신호 차는 VEGF-유도된 KDR-수용체 인산화 (=100%)에 상응한다. 시험 화합물의 활성은 VEGF-유도된 KDR-수용체 인산화의 억제율 (%)로 계산하며, 여기서 최대 억제의 절반을 유도하는 기질의 농도를 ED₅₀ (50% 억제에 대한 유효선량)으로 정의한다. 활성 티로신 억제제 화합물은 0.001 μ M 내지 6 μ M, 전형적으로 0.005 μ M 내지 0.5 μ M의 범위 내의 ED₅₀ 값을 갖는다.

[0251] 제약 제제 및 치료 투여

[0252] 항-VEGF 및 항-PDGF 작용제는 건선, 류마티스성 관절염 및 안구의 혈관신생성 장애를 비롯한 혈관신생성 장애를 치료하는데 유용하다. PDGF-B 길항제 화합물을 VEGF-A 길항제와 조합하여 안구의 혈관신생성 장애, 예컨대 황반 변성 또는 당뇨병성 망막병증을 억제하는 치료법이 특히 주목할 만하다. 따라서, 일단 환자가 혈관신생성 장애의 발병 위험이 있거나 이를 앓는 것으로 진단되면, 상기 환자에게 PDGF 길항제를 VEGF 길항제와 함께 투여함으로써 치료하여 PDGF 및 VEGF 각각의 음성 효과를 차단하고, 이에 의해 혈관신생성 장애의 발병을 억제하고 혈관신생과 관련된 유해 효과를 완화시킨다. 본 발명에 따른 방법의 실시는 각막 부종을 야기시키지 않는다. 상기 논의한 바와 같이, 매우 다양한 PDGF 및 VEGF 길항제가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0253] 본 발명에 따른 항-PDGF 및 항-VEGF 조합 치료법은 단독으로 또는 또다른 치료법과 함께 수행될 수 있고, 가정, 진료소, 클리닉, 병원 외래국 또는 병원에서 제공될 수 있다. 일반적으로, 치료는 의사가 치료법의 효과를 면밀히 관찰하고 필요한 임의의 조치를 취할 수 있도록 병원에서 시작한다. 조합 치료법의 기간은 치료될 혈관신생성 장애의 유형, 환자의 연령 및 상태, 환자 질환의 단계 및 유형, 및 치료에 대한 환자의 반응에 따라 달라진다. 추가로, 혈관신생성 장애의 발병 위험이 보다 큰 사람 (예를 들어, 당뇨병 환자)은 징상의 발병을 억제하거나 지연시키는 치료를 받을 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 하나의 상당한 이점은, 혈관신생성 장애의 치료를 위한 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제의 조합물이 각각의 길항제 및 전체 활성 길항제의 적은 투여량 투여를 가능하게 하여, 낮은 독성 및 부작용, 및 감소된 비용으로 유사한 효과를 제공할 수 있다는 것이다.

[0254] 조합 치료법에서 각 길항제의 투여는 다른 길항제와 합하여 혈관신생성 장애를 치료하는데 효과적인 길항제 농도를 생성시킬 수 있는 임의의 적합한 수단일 수 있다. 예를 들어, 각 길항제는 적합한 담체 물질과 혼합할 수 있으며 일반적으로 조성물 총 중량의 1 내지 95% 양으로 존재할 수 있다. 조성물은 안구 투여용, 경구 투여용, 비경구 (예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하) 투여용, 직장 투여용, 경피 투여용, 비강 투여용 또는 흡입 투여용으로 적합한 투여 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 조성물은 예를 들어 정제, 캡슐제, 환제, 산제, 과립제, 현탁액제, 유제, 액제, 히드로겔을 비롯한 겔제, 페이스트, 연고, 크림, 고약, 전달 장치, 좌제, 관장제, 주사제, 임플란트, 스프레이 또는 에어로졸 형태일 수 있다. 단일 길항제 또는 2종 이상의 길항제를 함유하는 제약 조성물은 통상의 제약 실시예에 따라 제제화될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A.R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.] 및 [Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds., J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-2002, Marcel Dekker, New York] 참조).

[0255] PDGF 및 VEGF 길항제의 조합물은 하나의 유용한 측면에서 비경구로 (예를 들어, 근육내, 복강내, 정맥내, 안구

내, 유리체내, 안구후, 결막하, 힘줄하 또는 피하 주사 또는 임플란트) 또는 전신적으로 투여한다. 비경구 또는 전신 투여용 제제로는 멸균한 수성 또는 비수성 액제, 현탁액제, 또는 유제를 포함한다. 다양한 수성 담체로는 예를 들어 물, 완충수, 염수 등을 사용할 수 있다. 다른 적합한 비히클의 예로는 폴리프로파일렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 젤라틴, 히드로겔, 수소화 나팔렌 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 포함한다. 이러한 제제는 또한 보조 물질, 예컨대 보존제, 습윤제, 완충제, 유화제 및(또는) 분산제를 함유할 수 있다. 생적합하고 생분해가능한 락티드 중합체, 락티드/글리콜리드 공중합체, 또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로파일렌 공중합체는 활성 성분의 방출을 제어하는데 사용할 수 있다.

[0256] 별도로, PDGF와 VEGF 길항제의 조합물은 경구 복용으로 투여할 수 있다. 경구용 조성물은 제약 조성물 제조 업계에 공지된 임의의 방법에 따라 고체 또는 액체 형태로 제조될 수 있다.

[0257] 경구 투여용 고체 투여 형태로는 캡슐제, 정제, 환제, 산제 및 과립제를 포함한다. 일반적으로, 이들 제약 제제는 제약상 허용가능한 비-독성 부형제와 혼합된 활성 성분 (예컨대, PDGF 유기 소분자 길항제 및 VEGF 유기 소분자 길항제)을 함유한다. 이들은 예를 들어, 불활성 희석제, 예컨대 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 셀룰로스, 전분, 인산칼슘, 인산나트륨, 카올린 등을 포함할 수 있다. 결합제, 완충제 및(또는) 윤활제 (예를 들어, 스테아르산마그네슘)를 또한 사용할 수 있다. 정제 및 환제는 추가로 장용 코팅으로 제조할 수 있다. 조성물은 임의로 감미제, 향미제, 착색제, 방향제 및 보존제를 함유하여 맛있는 제제로 제공할 수 있다.

[0258] 예를 들어, PDGF 및 VEGF 길항제를 눈 및 결막하에 유리체내 주사 및 힘줄하 주사로 안구내 투여할 수 있다. 투여의 다른 경로로는 공막을 통한 투여, 안구후 투여, 복강내 투여, 근육내 투여 및 정맥내 투여를 포함한다. 별도로, 길항제 조합물은 약물 전달 장치 또는 안구내 임플란트를 이용하여 전달할 수 있다 (하기 참조).

[0259] 경구 투여용 액체 투여 형태로는 제약상 허용가능한 유제, 액제, 현탁액제, 시럽제 및 연질 젤라틴 캡슐제를 포함한다. 이들 형태는 당업계에서 통상적으로 사용하는 불활성 희석제, 예컨대 물 또는 오일 매질을 함유하며, 또한 보조제, 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁제를 포함한다.

[0260] 일부 예에서, PDGF와 VEGF 길항제의 조합물은 또한 국소적으로, 예를 들어 패치로, 또는 혈관신생성 장애에 감수성이거나 영향을 받는 부위, 예컨대 표피 또는 눈에 바로 적용하여, 또는 이온영동으로 투여할 수 있다.

[0261] 안구용 제제로는 활성 성분(들)을 제약상 허용가능한 비-독성 부형제와의 혼합물 형태로 함유하는 정제를 포함한다. 이들 부형제는 예를 들어 불활성 희석제 또는 충전제 (예를 들어, 수크로스 및 소르비톨), 윤활제, 활택제 및 항접착제 (예를 들어, 스테아르산마그네슘, 스테아르산아연, 스테아르산, 실리카, 수소화 식물성 오일, 또는 활석)일 수 있다.

[0262] PDGF 및 VEGF 길항제는 정제 또는 다른 비히클 내에서 함께 혼합될 수 있으며 분할시킬 수도 있다. 한 예에서는, 제1 길항제를 정제의 한쪽에 함유시키고, 제2 길항제는 바깥쪽에 함유시켜 제2 길항제의 상당 분량이 방출된 다음 제1 길항제가 방출된다. 경우에 따라 정제 형태의 길항제는 약물 전달 장치를 이용하여 전달할 수 있다 (하기 참조).

[0263] 일반적으로, 각 길항제는 혈관신생성 장애의 해로운 영향 또는 증상을 억제하거나 감소시키거나 제거시키기에 충분한 양으로 투여해야 한다. 단독 투여량을 생성시키기 위해 담체 물질과 합한 활성 길항제 성분의 양은 치료할 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다.

[0264] 청구되는 조합물의 각 길항제 투여량은 상태의 중증도, 상태를 치료하기 위해서인지 예방하기 위해서인지의 선택, 치료할 사람의 연령, 체중 및 건강 정도를 비롯한 몇가지 요인에 따라 달라진다. 추가로, 특정 환자의 약물대사유전체(pharmacogenomic) (치료제의 약동학, 약역학 또는 효능 프로파일에 대한 유전형의 영향) 정보는 사용 투여량에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 당업자는 투여될 PDGF와 VEGF 길항제의 특정 조합물, 투여 시간, 투여 경로, 제제의 특성, 장애의 중증도 및 혈관신생성 장애의 해부학적 위치 (예를 들어, 안구 내 체강)를 비롯한 다양한 요인에 따라 정확한 개별 투여량을 어느 정도 조정할 수 있다. 요구되는 투여량의 광범위한 변화율은 다양한 투여 경로의 상이한 효능의 관점에서 예측할 수 있을 것이다. 예를 들어, 경구 투여는 일반적으로 정맥내 주사 또는 유리체내 주사에 의한 투여보다 더 높은 투여량 수준을 요구할 것으로 예측할 수 있다. 이러한 투여량 수준의 변화율은 최적화를 위한 표준 실험 경로를 이용하여 조정할 수 있으며, 이는 당업계에 익히 공지되어 있다. 정확한 치료 효과 투여량 수준 및 형태는 상기-확인된 요인을 고려하여 안과 의사와 같은 수행 의사에 의해 전형적으로 결정된다.

[0265] 일반적으로, 인간에게 경구로 투여하는 경우, PDGF 길항제 또는 VEGF 길항제의 투여량은 통상적으로 1일에 약

0.001 mg 내지 약 200 mg, 더 바람직하게는 1일에 약 1 mg 내지 100 mg, 보다 바람직하게는 1일에 약 5 mg 내지 약 50 mg이다. 1일에 약 200 mg 이하의 투여량이 요구될 수 있다. 주사로 PDGF 길항제 또는 VEGF 길항제를 투여하는 경우, 투여량은 통상적으로 1일에 약 0.1 mg 내지 약 250 mg, 바람직하게는 1일에 약 1 mg 내지 약 20 mg, 또는 1일에 약 3 mg 내지 약 5 mg이다. 주사는 1일에 약 4회 이하로 행할 수 있다. 일반적으로 인간에게 비경구 또는 전신적으로 투여하는 경우, PDGF 길항제와 조합하는 VEGF 길항제의 투여량은 통상적으로 1일에 약 0.1 mg 내지 약 1500 mg, 또는 1일에 약 0.5 mg 내지 약 10 mg, 또는 1일에 약 0.5 mg 내지 약 5 mg이다. 1일에 약 3000 mg 이하의 투여량이 요구될 수 있다.

[0266] 인간에게 안과학적으로 투여하는 경우, PDGF 길항제와 조합하는 VEGF 길항제의 투여량은 통상적으로 1일에 약 0.15 mg 내지 약 3.0 mg, 또는 1일에 약 0.3 mg 내지 약 3.0 mg, 또는 1일에 약 0.1 mg 내지 약 1.0 mg이다.

[0267] 예를 들어, 안구용 PDGF-B 및 VEGF-A 앵타머 약물 물질은 pH 5 내지 7인 인산염 완충된 염수에서 제제화한다. pH 조절을 위해 수산화나트륨 또는 염산을 첨가할 수 있다. 한 실시 제제에서, PDGF-B 앵타머 및 VEGF-A 앵타머, 예컨대 EYE001을 하기 3개의 상이한 농도에서 개별적으로 제제화한다: 멸균 27-게이지 니들이 장착된 USP 타입 I 눈금을 매긴 유리 시린지 내에 멸균액 1 mL에 3 mg/100 μ l, 2 mg/100 μ l 및 1 mg/100 μ l를 패킹한다. 조합 약물 생성물은 보존제-비함유이며 오로지 유리체내 주사용으로만 사용한다. 활성 성분은 농도가 30 mg/ml, 20 mg/ml 및 10 mg/ml인 PDGF-B 및 VEGF-A 약물 물질이다. 부형제로는 염화나트륨, USP; 인산나트륨 1가산, 1수화물, USP; 인산나트륨 2가산, 7수화물, USP; 수산화나트륨, USP; 염산, USP; 및 주사용수, USP가 있다. 이러한 형태에서, PDGF-B 및 VEGF-A 앵타머 약물 제품은 1회용 유리 시린지에 제공된 바로 사용가능한 멸균 용액이다. 이러한 시린지는 사용전 최소 30분 (4시간을 넘어서서는 안됨)에는 냉장 보관에서 꺼내어 용액이 실온이 되게 한다. 시린지 내용물의 투여는 시린지 원통의 내부 고무 마개에 실로 연결된 플라스틱 플런저(plunger) 막대를 부착시키는 것을 필요로 한다. 이어서, 고무 캡을 제거하고 제품을 투여한다. PDGF-B 및 VEGF-A 앵타머를 28일 간격으로 3회 100 μ l 유리체 주사로 투여한다. 환자는 방문시 3 mg/주사를 투여받는다. 투여량은 경우에 따라 2 mg 또는 1 mg, 및 추가로 0.1 mg으로 감소된다.

[0268] 투여되는 약물의 특정 양은 성분의 특정 조합에 따라 달라진다. 바람직한 투여 조합물에서, PDGF 길항제 대 VEGF 길항제의 비율은 중량으로 약 50:1, 약 20:1, 약 10:1, 또는 약 4:1, 약 2:1, 또는 약 1:1이다.

[0269] 유용한 조합 치료법은 PDGF-B 앵타머 길항제 및 VEGF-A 앵타머 길항제를 포함한다. 길항제는 PDGF-B 앵타머 길항제 대 VEGF-A 앵타머 길항제를 약 0.1 대 약 5.0 내지 약 5.0 대 0.1의 중량 비율 범위로 조합하여 사용한다. 이들 2가지 길항제 (PDGF-B 대 VEGF-A 길항제)의 유용한 범위는 약 0.5 내지 약 2.0, 또는 약 2.0 내지 0.5이고, 또다른 유용한 비율은 약 1.0 내지 약 1.0이며, PDGF-B 앵타머 길항제 및 VEGF-A 앵타머 길항제의 선택에 궁극적으로 달려 있다.

[0270] 조합 치료법에서 각 약물의 투여는 독립적으로 1일 내지 1년에 1회 내지 4회일 수 있으며, 심지어 환자의 전 생애 동안 일 수도 있다. 만성적 장기 투여는 많은 경우에 지시될 것이다. 투여는 단일 투여 또는 다중 분할 투여일 수 있다. 일반적으로, 몇 달 이상의 투여라는 장기간이 필요할 지라도 바람직한 투여는 장기간 동안 (보통 몇 주 이상) 설정된 간격으로 투여해야 한다.

[0271] 사전 혈관신생성 장애를 치료하는 것 이외에, PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 포함하는 조합 치료법은 이들 장애의 개시를 예방하거나 늦추기 위해 예방적으로 투여할 수 있다. 예방적 적용에서, PDGF 및 VEGF 길항제는 특정 혈관신생성 장애에 감수성이거나, 다르게는 이의 위험이 있는 환자에게 투여한다. 또한, 투여의 정확한 시기 및 투여될 양은 환자의 건강 상태, 체중 등과 같은 다양한 요인에 따라 달라진다.

[0272] 한 실시예에서, PDGF 길항제 및 VEGF 길항제의 조합물은 이것으로 치료할 필요가 있는 동물에게 전형적으로 주사용 제약 조성물 형태로 투여한다. 조합 측면에서, 예를 들어 PDGF-B 앵타머 및 VEGF-A 앵타머는 분리해서 또는 둘 다를 포함하는 제약 조성물로 투여할 수 있다. 이러한 투여는 주사 또는 약물 전달 장치를 이용하는 것이 일반적으로 바람직하다. 비경구 투여, 전신 투여 또는 경피 투여가 또한 가능하다.

[0273] 상기에서 논의한 바와 같이, PDGF 길항제 및 VEGF 길항제는 투여를 시간 연속적으로 또는 투여의 한 방식인 순차 방법으로 동시일 수 있는 것처럼 함께 투여한다. PDGF 및 VEGF 길항제를 연속적으로 투여하는 경우, 각각의 투여는 동일하거나 상이한 방법에 의할 수 있다. 그러나, 순차 투여의 경우, 약 5초에 걸쳐 PDGF 길항제를 투여하고 (약 3회 이하 주사), 이어서 VEGF 길항제의 1년 당 약 9회 이하 주사에 대해 6주에 한번 투여를 지속한다. PDGF 길항제는 의사가 결정한 바대로 매 VEGF 길항제 주사시마다 투여하거나 더 적은 빈도로 투여할 수 있다. 순차적인 투여는 또한 개별 길항제가 상이한 시간 또는 상이한 경로 또는 둘 다로 투여하나 이는 이로온

효과를 제공하는 조합으로 작용하여, 예를 들어 혈관신생성 장애를 억제한다. 또한, 주사에 의한 투여가 특히 유용한 것으로 나타나 있다.

[0274] 본 발명에 따른 제약 조성물은 투여시 실질적으로 즉시 또는 제어 방출 제제를 이용하여 투여 후 임의로 미리 결정된 시기에 활성 PDGF 및 VEGF 길항제를 방출하도록 제제화할 수 있다. 예를 들어, 각 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제 중 하나 이상을 포함하는 제약 조성물은 지속 방출 조성물로 제공할 수 있다. 즉시 또는 지속 방출 조성물은 치료될 상태의 특성에 따라 달라진다. 상태가 급성 또는 초급성 장애로 이루어진 경우, 전형적으로 즉시 방출 형태로 치료하는 것이 장기 방출 조성물보다 유용할 것이다. 특정 예방 또는 장기 치료의 경우, 지속 방출 조성물이 또한 적절할 수 있다.

[0275] 제어 방출 제제의 각 길항제의 투여는 단독 또는 조합인 길항제가 좁은 치료 지수 (예를 들어, 해로운 부작용 또는 독성 반응을 야기시키는 혈장 농도와 치료 효과가 작게 되는 혈장 농도의 차이; 일반적으로, 치료 지수 TI는 치사 투여량의 중앙값 (LD₅₀) 대 효과 투여량의 중앙값 (ED₅₀)의 비율로 정의됨); (ii) 소화관의 좁은 흡수 창; (iii) 짧은 생물학적 반감기 (따라서, 치료 수준의 혈장 수준을 유지하기 위해 1일 동안 잦은 투여가 요구됨)를 갖는 경우 유용하다.

[0276] 다수의 전략을 실행하여 치료용 길항제의 방출률이 분해율 또는 대사율보다 중요한 제어 방출을 획득할 수 있다. 예를 들어, 제어 방출은 예를 들어 적절한 제어 방출 조성물 및 코팅물을 비롯한 제제 파라미터 및 성분의 적절한 선택에 의해 획득할 수 있다. 예로는 단일 또는 다중 단위 정제 또는 캡슐제 조성물, 오일 액제, 현탁액제, 유제, 미세캡슐제, 미소구, 나노입자, 패치 및 리포솜을 포함한다. 이러한 지속 또는 제어 방출 제제의 제조 방법은 당업자에게 익히 공지되어 있다.

[0277] PDGF 길항제 및(또는) VEGF 길항제 또는 둘 다를 포함하는 제약 조성물은 또한 약물 전달 장치, 예컨대 임플란트일 수 있다. 이러한 임플란트는 생분해성 및(또는) 생적합성 임플란트일 수 있거나, 비-생분해성 임플란트일 수 있다. 임플란트는 활성 제제에 대해 투과적이거나 불투과적일 수 있다. 안구용 약물 전달 장치는 안구방, 예컨대 전방 또는 후방에 삽입할 수 있거나 공막, 맥락막 공간 또는 유리체 뒤의 구혈 영역 내 또는 이들 위에 임플란팅할 수 있다. 한 실시양태에서, 임플란트는 구혈 영역 위에, 예컨대 공막 위에 위치할 수 있어서 약물이 공막을 통해 원하는 치료 부위, 예를 들어 안구내 공간 및 안구 황반으로 확산되게 한다. 또한, 공막을 통한 확산 부위는 혈관신생 부위, 예컨대 황반에 근접한 부위에 근접할 수 있다.

[0278] 상기한 바와 같이, 본 발명은 제약 팩에서 분리 제약 조성물을 조합하는 것에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 조합물은 제약 팩의 성분으로서 제공된다. 둘 이상의 길항제는 개별 투여량으로 함께 또는 분리해서 제제화할 수 있다. 본 발명의 길항제는 또한 염으로 제제화하는 경우 유용하다.

[0279] 일반적으로 제약 팩은 (1) 제1 단위 투여량 형태로 일정량의 PDGF 길항제 및 제약상 허용가능한 담체, 비히클 또는 희석제; (2) 제2 단위 투여량 형태로 일정량의 VEGF 길항제 및 제약상 허용가능한 담체, 비히클 또는 희석제; (3) 용기를 포함한다. 용기는 성분을 분리하는데 사용할 수 있으며, 예를 들어 분할된 병 또는 분할된 호일 패킷(foil packet)을 포함한다. 분리 길항제 조성물은 또한 경우에 따라 단일의 분할되지 않은 용기에 함유할 수 있다. 제약 팩은 또한 분리 PDGF 및 VEGF 길항제의 투여를 위한 지시서를 포함한다. 제약 팩은 분리 성분을 상이한 투여량 형태로 투여하는 경우, 또는 상이한 투여량 수준으로 투여하는 경우, 또는 조합물의 개별 성분의 적정량이 처방하는 의사에 의해 요망되는 경우에 특히 유리하다. 한 실시양태에서, 제약 팩은 그들의 의도된 사용 순서대로 차례대로 PDGF 및 VEGF 길항제의 투여량을 분배하도록 설계된다. 또다른 실시예에서, 제약 팩은 길항제 한쌍을 투여할 사용자에게 팩 지시대로 팩에 나란히 정렬된 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제를 함유하게 설계된다. 예시 제약 팩은 제약 패킹 산업에 익히 공지되어 있는 소위 블리스터 팩(blister pack)이다.

[0280] 효능

[0281] 혈관신생성 장애의 억제는 혈관형성을 지연시키거나 감소시키는지를 측정하는 임의의 수용된 방법에 의해 평가한다. 이는 직접 관찰 및 비간접 평가, 예컨대 주관적 증상 또는 객관적 생리적 증후를 평가하는 것을 포함한다. 치료 효능은 예를 들어 혈관신생, 혈관 누수 또는 혈관 부종 또는 이들의 임의의 조합을 예방하거나 역전시키는 것을 기준으로 하여 평가할 수 있다. 안구의 혈관신생성 장애의 억제를 평가하는 치료 효능은 또한 시력을 안정시키거나 개선시키는 관점에서 정의될 수 있다.

[0282] 안구의 혈관신생성 장애의 치료 또는 예방의 특정 조합 치료법의 효능을 측정하는데 있어서, 환자들은 주사 후 수일째 및 다음 주사 전 적어도 1달 후에 안과 의사에 의해 임상적으로 평가될 수 있다. ETDRS 시력, 코다크롬 포토그래피(kodachrome photography) 및 플루오레신 혈관조영술은 또한 안과 의사에 의해 요구되는 바와 같

이 처음 4개월 동안 1달에 한 번 수행한다.

[0283] 예를 들어, 안구 혈관신생에 대한 PDGF 길항제 및 VEGF 길항제 조합 치료법의 효능을 평가하기 위해 안과 업계에 익히 공지된 표준 방법에 따라 노인성 황반 변성에 대한 속발성 황반하 맥락막 혈관신생을 앓고 있는 환자에게서 PDGF-B 앵타머를 VEGF-A 앵타머와 함께 (예를 들어, EYE001의 PEG화 형태) 1회 또는 다수회 유리체내 주사로 투여하는 것을 포함하여 연구를 수행한다. 한 실시 연구에서, 노인성 황반 변성에 대한 속발성 황반하 맥락막 혈관신생 (CNV)를 앓고 있는 환자는 PDGF-B 앵타머 및 VEGF-A 앵타머의 유리체내 주사를 1회 투여받는다. 조합 효능을 예를 들어 안구용 평가에 의해 모니터링한다. 치료 후 3개월 동안 안정하고 개선된 시력을 나타내는, 예를 들어 ETDRS 차트에서 시력이 3-라인 이상 더 개선된 것으로 입증된 환자는 안구의 혈관신생성 장애를 억제하는 PDGF-B 앵타머 및 VEGF-A 앵타머의 유효한 투여량 조합물을 투여받은 것으로 간주된다.

[0284] 연구 실시예에서, 노인성 황반 변성에 2차적인 황반하 CNV 및 ETDRS 차트 상의 20/200보다 더 악화된 시력을 갖는 환자에게 PDGF-B 앵타머 및 VEGF-A 앵타머를 단일 유리체내 주사한다. 개시 투여량은 유리체내로 1회 주사하는 각 길항제에 대해 0.25 mg이다. 각 길항제 투여량 0.5 mg, 1.2 mg 및 3 mg을 또한 시험하였다. 안저 사진 및 플루오레신 혈관조영술로 완전한 안과 조사를 또한 수행한다. 조합 약물 생성물은 플라스틱 플런저에 부착된 코팅 중지 및 예비-부착 27 게이지 바늘 상의 고무 말단 캡을 갖는 멸균 및 발열원 무함유 1 cc 유리 몸체 주사기 통 중의 10 mM 인산나트륨 및 0.9% 염화나트륨 완충 주사액에 용해시킨 PDGF-B 앵타머 및 VEGF-A 앵타머로 이루어진 즉석 멸균 용액이다. PDGF-B 및 VEGF-A 앵타머를 각 앵타머에 대해 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 또는 30 mg/ml (올리고뉴클레오티드 함량으로서 나타냄)의 약물 농도로 제공하여 100 μ l 전달 부피를 제공한다. PDGF-B 및 VEGF-A 앵타머의 주사 후 대략 3개월째에 치료의 유효성을 평가하기 위해 시력 조사하였다. 치료 후 안정하거나 또는 개선된 시력을 나타내는, 예를 들어 ETDRS 차트에서 3-라인 이상 증가된 시력을 나타내는 환자는 안구의 혈관신생성 장애를 억제하는 PDGF-B 및 VEGF-A 앵타머의 유효한 투여량 조합물을 투여받은 것으로 선택된다.

실시예

[0285] 하기 실시예는 본 발명을 수행하고 실행하는 특정 방식을 설명하지만, 다른 방법도 유사한 결과를 얻기 위해 사용할 수 있기 때문에 이는 본 발명의 범위를 제한하려는 의미가 아니다.

[0286] 실시예 1 : 각막 혈관신생 (각막 NJ)

[0287] 각막 혈관신생은 눈에서 비정상 혈관 성장의 명확한 시각화를 허용하는 동물 모델을 널리 사용한다. 정상적으로 무혈관 각막으로 성장하는 혈관은 잘 수립될 수 있고, 이를 통해 혈관 퇴화를 연구하는 매력적인 모델을 개발한다. 실험적 각막 NV를 유도하기 위해, 수컷 C57BL/6 마우스 (18-20 g; 미국 매사추세츠주 윌밍톤 소재의 찰스 리버(Charles River))를 근육내 케타민 히드로클로라이드 (25 mg/kg) 및 크실라진 (10 mg/kg)으로 마취시켰다. NaOH (0.2 mM의 2 μ l)를 국소적으로 가하였다. 각막 및 윤부 상피는 #21 블레이드 (일본 오사카시 페서(Feather))를 사용하여 가장자리에 평행하게 회전 운동을 가함으로써 제거하였다. 7일 후에, 마우스는 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠™ (미국 뉴욕주 뉴욕 소재의 아이테크 파마슈티칼즈(Eyetech Pharmaceuticals), EYE001로도 공지된 항-VEGF 앵타머 제제) 25 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사로 또는 글리벡®/STI57 ((CGP57148B로도 공지됨) 스위스 바젤 소재의 노바티스 파마 아게(Novartis Pharma AG)로부터의 2-페닐아미노피리미딘-관련, 티로신 키나제-억제 항-PDGF 제제) 50 mg/kg을 1일 2회 급식을 통해 경구 투여하거나 또는 7일 동안 모두에 의해 처리하였다. 각막 NV 유도 후 14일째에, 마우스에 크실라진 히드로클로라이드 및 케타민 히드로클로라이드로 깊게 마취시킨 동안에 플루오레신-이소티오시아네이트 연결 콘카나발린 A 렉틴 (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 벡터 래버러토리즈(Vector Laboratories)) 20 μ g/g을 정맥내 투여하였다. 30분 후에, 마우스 눈을 적출하고, 각막을 평평하게 탑재하였다. 각막 NV를 형광 현미경을 사용하여 시각화하고, 오픈랩(Openlab) 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. 혈관에 의해 덮힌 각막의 백분율을 총 각막 영역의 백분율로서 계산하였다.

[0288] 가장자리 및 각막의 상피에 대한 NaOH 처리 및 상해 후 각막의 혈관신생에 대한 페가프타니브 나트륨 및 글리벡의 영향을 조사하였다. 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠)으로 처리한 동물은 처리하지 않은 눈 및 글리벡 처리 눈 모두에 비해 혈관 성장에서 19.6% ($p=0.0014$) 감소를 나타냈다 (도 5). 페가프타니브 나트륨 및 글리벡 (Mac+Glee)으로 처리한 동물은 대조군 및 글리벡 단독으로 처리한 동물에 비해 각막에서 혈관신생 성장을 유의하게 덜 나타냈다 (35.6% $p<0.0001$) (도 5). 조합 처치는 또한 감소된 혈관 성장 (16% $p<0.0145$)에서 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠) 단독보다 더 효과적이었다.

[0289] 대표적인 각막 혈관신생 실험의 결과는 또한 도 6 및 7에 나타낸다. 도 6(D)는 마쿠젠 (도 6(C)) 또는 글리벡

(도 6(B))의 개별 처치에 비해 조합 (Mac+글리벡)-처리 각막에서 신규 혈관 형성의 효과적 억제를 나타내는 형광-현미경 이미지의 사진이다. 도 6(A)는 대조군 (PEG-처리) 각막에서 혈관신생의 정도를 나타내는 형광-현미경 이미지의 사진이다. 도 7은 개별 (도 7(A) (APB5-처리) 및 도 7(B) (글리벡-처리)) 및 조합 처리 (도 7(C))가 단지 신규 혈관 성장만을 억제하고, 수립된 혈관에는 영향을 미치지 않았음을 나타내는 형광-현미경 이미지의 사진이다. 도 7(D)는 대조군 (PEG-처리) 각막에서 혈관신생의 정도를 나타내는 형광-현미경 이미지의 사진이다.

[0290] 실시예 2 : 맥락막 혈관신생 (CNV)

[0291] 실험적 CNV는 노인성 황반 변성 (AMD)에 대한 모델로서 종종 사용한다. 이 모델에서, 맥락막의 혈관이 AMD 환자에서 관찰되는 것과 유사하게 브루크막(Bruch's membrane)에서의 파괴를 통해 망막 내로 성장한다. 실험적 CNV를 유도하기 위해, 수컷 C57BL/6 마우스 (18-20 g; 미국 매사추세츠주 월링톤 소재의 칼스 리버)를 근육내 케타민 히드로클로라이드 (25 mg/kg) 및 크실라진 (10 mg/kg)으로 마취시키고, 동공을 1% 트로피카마이드로 팽창시켰다. 4개의 화상은 다이오드 레이저 광응고 (75- μ m 스팟 크기, 0.1-초 지속, 90 mW, 오쿨라이트 (Oculight) SL 레이저, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 IRIDEX) 및 콘택트 렌즈로서 핸드-헬드(hand-held)형 커버 슬라이드를 사용하여 생성시켰다. 화상을 망막 후극의 3, 6, 9 및 12시 부위에 위치시켰다. 브루크막의 파괴를 나타내는 레이저 시간에서의 거품 발생은 맥락막 혈관신생을 얻는 중요한 인자이므로, 거품이 모든 4개의 화상에 대해 생성된 마우스만 연구에 포함시켰다. 7일 후에, 마우스는 페가프타니브 나트륨 25 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사로 또는 글리벡®/STI57 (스위스 바젤 소재의 노바티스 파마 아게) 50 mg/kg을 1일 2회 급식으로 또는 7일 동안 모두에 의해 처리하였다. APB5 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 이바이오사이언스(eBioscience)로부터의 항-마우스 PDGFR β (CD140b) 항체 (항-PDGF 제제))를 사용하는 실험에서, 항체 5 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사로 투여하였다. 맥락막 NV 병소의 영역을 PECAM으로 염색한 평평-탐재 맥락막에서 조사하였다. 평평-탐재물을 형광 현미경으로 조사하고, 오픈랩 소프트웨어로 정량하였다.

[0292] 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠™)으로 처리한 눈은 처리하지 않은 대조군에 비해 CNV 영역에서 24% ($p=0.007$) 감소를 나타냈다 (도 8). 대조적으로, APB5-처리 눈은 대조군과 유의하게 상이하지 않았다 (대조군에 비해 CNV 영역에서 6.5% 감소). 페가프타니브 나트륨 및 APB5 모두로 처리한 눈은 대조군 눈 (46% $p=0.001$) 또는 페가프타니브 나트륨 (22% $p=0.011$) 또는 APB5 (39.5% $p<0.0001$) 단독으로 처리한 눈에 비해 CNV 영역을 유의하게 덜 나타냈다 (도 8).

[0293] 유사한 경향이 PDGFR β 억제제를 사용하는 경우에도 관찰되었다. 글리벡® 처리 눈은 대조군 눈에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다 (4.2%) (도 9). 그러나, 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠™) 처리 눈에서 CNV의 영역은 대조군과 유의하게 상이하였다 (27% 미만 $p=0.0034$). 중요하게는, 페가프타니브 나트륨 및 글리벡 (마쿠젠+글리벡) 모두로 처리한 동물은 대조군 눈에 비해 최소량의 CNV (46% $p<0.0001$)를 나타내고, 페가프타니브 나트륨 단독 처리 눈에 비해 CNV 영역에서 19% 감소를 나타냈다 ($p=0.0407$) (도 9).

[0294] 실시예 3 : 신생 마우스 모델

[0295] 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠™), 및 ARC-127 (미국 매사추세츠주 캠브리지 소재의 아르케믹스 코포레이션 (Archemix Corp.)), 위치 6, 20 및 30에 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘, 위치 8, 21, 28 및 29에 2'-플루오로-2'-데옥시시티딘, 위치 9, 15, 17, 및 31에 2'-O-메틸-2'-데옥시구아노신, 위치 22에 2'-O-메틸-2'-데옥시아데노신, 위치 10 및 23 중 "N"에 헥사에틸렌-글리콜 포스포라미다이트, 및 위치 32에 역 방향 T (즉, 3'-3'-연결됨)를 갖는 서열 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (서열 20) (미국 특허 제6,582,918호로부터의 서열 146 참조, 상기 문헌은 본원에 그의 전체로서 인용됨)를 갖는 폐길화된 항-PDGF 앵타머 또는 모두의 망막의 발생 혈관 상에서의 투여 영향을 조사하였다. 신생 C57BL/6 마우스에 ARC-127 100 μ g 또는 마쿠젠 100 μ g, 또는 이들 모두를 매일 (복강내) 주사하여, 출생 0 (P0)일째에 시작하였다. 마우스 눈을 P4에 적출하였다. 망막 혈관 구조는 평평-탐재 망막에서 PECAM 및 NG-2로 면역염색하거나 또는 ConA-FITC로 관류시킴으로써 시각화하고, 형광 현미경으로 분석하였다. ARC-127의 주사는 망막의 발생 혈관에 대한 벽 세포 동원을 완전히 차단하였다. 또한, 대조군 비-처리 망막에 비해 혈관 성장이 P4에서 덜 관찰되었다. 대조적으로, 마쿠젠은 정상 혈관 발생을 방해하지 않았다. 그러나, 마쿠젠 및 ARC-127 모두로 처리한 마우스가 유사하게 나타나지만, 유의하게 ARC-127 단독 처리 마우스보다 더 심각한 결함을 나타냈다. 도 10에 도시한 이들 결과는 마쿠젠이 발생 망막의 혈관 상에 아무런 영향을 미치지 않았음을 나타낸다. PDGFR-B 길항제 ARC-127은 혈관 발생결과 및 형태에 영향을 미친다. 그러나, 마쿠젠은 ARC-127과 조합하여 이들 중 하나의 단독보다 더 심각하게 혈관에 영향을 미친다.

[0296] 실시예 4 : 항-PDGF 앵타머 및 항-VEGF 항체를 사용하는 조합 치료법

[0297] 이 실시예에서, 항-PDGF 앵타머 및 항-VEGF 항체를 사용하는 조합 치료법의 유효성은 상기 기재한 각막 혈관신생 모델을 사용하여 입증한다. 실험적 각막 NV를 유도하기 위해, 수컷 C57BL/6 마우스 (18-20 g; 미국 매사추세츠주 윌밍톤 소재의 찰스 리버)를 근육내 케타민 히드로클로라이드 (25 mg/kg) 및 크실라진 (10 mg/kg)으로 마취시켰다. NaOH (0.2 mM의 2 μ l)를 국소적으로 가하였다. 각막 및 윤부 상피는 #21 블레이드 (일본 오사카시 페쎌)를 사용하여 가장자리에 평행하게 회전 운동을 가함으로써 제거하였다. 7일 후에, 마우스는 구조 40Kd PEG-5'-CAGGCTACGCGTAGAGCATCATGATCCTG(iT)-3' (서열 21) (여기서, iT는 최종 뉴클레오티드가 역 방향 (3'-3' 연결됨)인 것을 나타냄)을 갖는 항-PDGF 앵타머 25 mg/kg을 미국 특허 제6,342,221호 (본원에 참고로 포함됨)에 기재된 항-VEGF 항체 2C3 100 μ g과 조합하여 복막내 주사함으로써 처리하였다. 각막 NV 유도 후 14일째에, 마우스에 크실라진 히드로클로라이드 및 케타민 히드로클로라이드로 깊게 마취시킨 동안에 플루오레신-이소티오시아네이트 연결 콘카나발린 A 력틴 (미국 캘리포니아주 버링게임 소재의 벡터 래버러토리즈) 20 μ g/g을 정맥내 투여하였다. 30분 후에, 마우스 눈을 적출하고, 각막을 평평하게 탑재하였다. 각막 NV를 형광 현미경을 사용하여 시각화하고, 오픈랩 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. 혈관에 의해 덮힌 각막의 백분율을 총 각막 영역의 백분율로서 계산하였다. 그 결과는 항-PDGF 앵타머 또는 항-VEGF 항체를 단독으로 사용하는 개개의 치료에 대한 조합 치료법의 효능을 나타낸다.

[0298] 개별 실험으로, 2개의 관련 항-PDGF 앵타머의 영향은 미국 특허 제6,342,221호에 기재된 항-VEGF 항체 2C3 100 μ g과 조합하여 시험하였다. 하기 2개의 항-PDGF 앵타머의 폐길화 및 비-폐길화 형태를 조사하였다: (i) 위치 6, 20 및 30에 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘, 위치 8, 21, 28 및 29에 2'-플루오로-2'-데옥시시티딘, 위치 9, 15, 17, 및 31에 2'-O-메틸-2'-데옥시구아노신, 위치 22에 2'-O-메틸-2'-데옥시아데노신, 위치 10 및 23 중 "N"에 핵사에틸렌-글리콜 포스포르아미다이트, 및 위치 32에 역 방향 T (즉, 3'-3'-연결됨)를 갖는 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (서열 20) (미국 특허 제6,582,918호로부터의 서열 146 참조, 상기 문헌은 그 전체로서 본원에 참고로 포함됨); 및 (ii) 위치 8의 C에 O-메틸-2-데옥시시티딘, 위치 9, 17 및 31의 G에 2-O-메틸-2-데옥시구아노신, 위치 22의 A에 2-O-메틸-2-데옥시아데닌, 위치 30에 2-O-메틸-2-데옥시우리딘, 위치 6 및 20의 U에 2-플루오로-2-데옥시우리딘, 위치 21, 28 및 29의 C에 2-플루오로-2-데옥시시티딘, 위치 10 및 23의 N에 펜타에틸렌 글리콜 포스포르아미다이트 스페이서, 및 위치 32에 역 방향 T (즉, 3'-3'-연결됨)를 갖는 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (서열 22) (미국 특허 제5,723,594호로부터의 서열 87 참조, 상기 문헌은 그 전체로서 본원에 참고로 포함됨). 개개의 항-PDGF 앵타머 또는 항-VEGF 항체 처리에 대한 조합 치료법의 개선된 항-혈관신생 효과를 검출하기 위해 적절한 대조군을 제공한다. 그 결과는 항-PDGF 앵타머 또는 항-VEGF 항체를 단독으로 사용하는 개개의 치료에 대한 조합 치료법의 효능을 입증한다.

[0299] 실시예 5 : 항-PDGF 앵타머 및 항-VEGF 앵타머의 조합이 맥락막 혈관신생 (CNV)을 차단한다.

[0300] 이 실시예에서, 맥락막 혈관신생의 블로킹에서 항-PDGF 앵타머 및 항-VEGF 앵타머를 사용하는 조합 치료법의 유효성은 상기 기재한 맥락막 혈관신생 모델을 사용하여 입증한다. 실험적 CNV는 노인성 황반 변성 (AMD)에 대한 모델로서 종종 사용된다. 이 모델에서, 맥락막의 혈관이 AMD 환자에서 관찰되는 것과 유사하게 브루크막에서의 파괴를 통해 망막 내로 성장한다. 실험적 CNV를 유도하기 위해, 수컷 C57BL/6 마우스 (18-20 g; 미국 매사추세츠주 윌밍톤 소재의 찰스 리버)를 근육내 케타민 히드로클로라이드 (25 mg/kg) 및 크실라진 (10 mg/kg)으로 마취시키고, 동공을 1% 트로피카마이드로 팽창시켰다. 4개의 화상은 다이오드 레이저 광원고 (75- μ m 스팟 크기, 0.1-초 지속, 90 mW, 오클라이트(Oculight) SL 레이저, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 IRIDEX) 및 콘택트 렌즈로서 핸드-헬드형 커버 슬라이드를 사용하여 생성시켰다. 화상을 망막 후극의 3, 6, 9 및 12시 부위에 위치시켰다. 브루크막의 파괴를 나타내는 레이저 시간에서의 거품 발생은 맥락막 혈관신생을 얻는 중요한 인자이므로, 거품이 모든 4개의 화상에 대해 생성된 마우스만 연구에 포함시켰다. 7일 후에, 마우스는 페가프타니브 나트륨 25 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사로 처리하였다. 항-PDGF 앵타머를 사용하는 실험에서, 구조 40Kd PEG-5'-CAGGCTACGCGTAGAGCATCATGATCCTG(iT)-3' (서열 21) (여기서, iT는 최종 뉴클레오티드가 역 방향 (3'-3' 연결됨)인 것을 나타냄)을 갖는 항-PDGF 앵타머 25 mg/kg을 페가프타니브 나트륨과 공동-투여하였다. 맥락막 NV 병소의 영역을 PECAM으로 염색한 평평-탑재 맥락막에서 조사하였다. 평평-탑재물을 형광 현미경으로 조사하고, 오픈랩 소프트웨어로 정량하였다. 그 결과는 조합 치료법으로 처리한 눈이 대조군 눈 또는 페가프타니브 나트륨 또는 항-PDGF 앵타머 단독으로 처리한 눈에 비해 CNV 영역을 유의하게 덜 나타냈음을 나타낸다.

[0301] 개별 실험으로, 2개의 관련 항-PDGF 앵타머의 영향은 페가프타니브 나트륨 25 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사함으로써 항-VEGF 처리와 조합하여 시험하였다. 하기 2개의 항-PDGF 앵타머의 폐길화 및 비-폐길화 형태를 조사하였다: (i) 위치 6, 20 및 30에 2'-플루오로-2'-데옥시우리딘, 위치 8, 21, 28 및 29에 2'-플루오로-2'-데옥시

시티딘, 위치 9, 15, 17, 및 31에 2'-O-메틸-2'-데옥시구아노신, 위치 22에 2'-O-메틸-2'-데옥시아데노신, 위치 10 및 23 중 "N"에 헥사에틸렌-글리콜 포스포르아미다이트, 및 위치 32에 역 방향 T (즉, 3'-3'-연결됨)를 갖는 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (서열 20) (미국 특허 제6,582,918호로부터의 서열 146 참조, 상기 문헌은 그 전체로서 본원에 참고로 포함됨); 및 (ii) 위치 8의 C에 0-메틸-2-데옥시시티딘, 위치 9, 17 및 31의 G에 2-O-메틸-2-데옥시구아노신, 위치 22의 A에 2-O-메틸-2-데옥시아데닌, 위치 30에 2-O-메틸-2-데옥시우리딘, 위치 6 및 20의 U에 2-플루오로-2-데옥시우리딘, 위치 21, 28 및 29의 C에 2-플루오로-2-데옥시시티딘, 위치 10 및 23의 N에 펜타에틸렌 글리콜 포스포르아미다이트 스페이서, 및 위치 32에 역 방향 T (즉, 3'-3'-연결됨)를 갖는 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (서열 22) (미국 특허 제5,723,594호로부터의 서열 87 참조, 상기 문헌은 그 전체로서 본원에 참고로 포함됨). 개개의 항-PDGF 앵타머 또는 항-VEGF 항체 처리에 대한 조합 치료법의 개선된 항-혈관신생 효과를 검출하기 위해 적절한 대조군을 제공한다. 그 결과는 항-PDGF 앵타머 또는 항-VEGF 앵타머를 단독으로 사용하는 개개의 처리에 대한 맥락막 혈관신생 블로킹에서의 조합 치료법의 효능을 입증한다.

[0302] 실시예 6 : 각막 혈관신생 (각막 NV)-퇴화

[0303] 실시예 1의 각막 NV 모델을 사용하여 항-VEGF 앵타머 및 항-PDGF 앵타머의 조합을 조사하였다. 10일 후에, 마우스는 10일 동안 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠™, 미국 뉴욕주 뉴욕 소재의 아이테크 파마슈티칼즈, 항-VEGF 앵타머 제제) 25 mg/kg을 1일 2회 및(또는) ARC-127 (미국 매사추세츠주 캠브리지 소재의 아르케믹스 코포레이션, 구조 40Kd PEG-5'-CAGGCTACGCGTAGAGCATCATGATCCTG(iT)-3' (서열 21)를 갖는 항-PDGF 앵타머 (여기서, iT는 최종 뉴클레오티드가 역 방향 (3'-3' 연결됨)인 것을 나타냄)) 50 mg/kg을 1일 1회 복막내 주사하여 처리하였다. 각막 NV 유도 후 20일째에, 눈을 적출하고, 각막을 평평-탐재하였다. 각막 NV는 CD31 염색 (미국 캘리포니아주 샌디에고 비디 바이오사이언스즈 파르민젠(BD Biosciences Pharmingen))을 사용하여 시각화하고, 메타모르프(Metamorph) 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. 혈관에 의해 덮힌 각막의 백분율을 총 각막 영역의 백분율로서 계산하였다.

[0304] 가장자리 및 각막의 상피에 대한 NaOH 처리 및 상해 후 각막의 혈관신생의 퇴화에 대한 페가프타니브 나트륨 및 (또는) ARC-127의 영향을 도 11 및 12에 도시한다. ARC-127로 처리한 동물은 20일 대조군에 비해 혈관 성장에서 유의한 감소를 나타내지 않았다. 20일 대조군은 10일 대조군에 비해 각막 혈관신생에서 12.92% 증가를 나타냈다. 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠) 단독으로 처리한 동물은 20일 대조군에 비해 혈관 성장에서 13.81% ($p \leq 0.016$) 감소를 나타냈다. 페가프타니브 나트륨 및 ARC-127로 처리한 동물은 대조군에 비해 각막 상에서 혈관신생 성장을 유의하게 덜 나타냈다 (26.85%, $p \leq 0.002$).

[0305] 실시예 7 : 각막 혈관신생 (각막 NV)-퇴화

[0306] 실시예 1의 각막 NV 모델을 사용하여 항-VEGF 앵타머 및 PDGFB 수용체에 대한 항체의 조합을 조사하였다. 14일 후에, 마우스는 14일 동안 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠, 항-VEGF 앵타머 제제) 25 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사하고(거나) APB5 (PDGFB 수용체에 대한 폴리클로날 항체) 50 mg/kg을 1일 2회 급식시켜 경구 투여함으로써 처리하였다. 각막 NV 유도 후 28일째에, 마우스에 크실라진 히드로클로라이드 및 케타민 히드로클로라이드로 깊게 마취시킨 동안에 플루오레신-이소티오시아네이트 연결 콘카나발린 A 렉틴 (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 벡터 래버러토리즈) 20 $\mu\text{g/g}$ 을 정맥내 투여하였다. 30분 후에, 마우스 눈을 적출하고, 각막을 평평하게 탐재하였다. 각막 NV를 형광 현미경을 사용하여 시각화하고, 오픈랩 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. 혈관에 의해 덮힌 각막의 백분율을 총 각막 영역의 백분율로서 계산하였다.

[0307] 가장자리 및 각막의 상피에 대한 NaOH 처리 및 상해 후 각막의 혈관신생의 퇴화에 대한 페가프타니브 나트륨 및 APB5의 영향을 도 13에 도시하였다. 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠)으로 처리한 동물은 대조군에 비해 혈관 성장에서 8.3% 감소를 나타냈다. 페가프타니브 나트륨 및 APB5로 처리한 동물은 대조군에 비해 각막 상에서 혈관신생 성장을 유의하게 덜 나타냈다 (21.4%).

[0308] 실시예 8 : 각막 혈관신생 (각막 NV)-퇴화 (치료제의 첨가 순서)

[0309] 실시예 1의 각막 NV 모델을 사용하여 항-VEGF 앵타머 및 PDGFB 수용체에 대한 항체를 사용하는 조합 치료법의 첨가 순서의 영향을 조사하였다. 14일 후에, 마우스에 7일 동안 상이한 시간에 페가프타니브 나트륨 (마쿠젠, 항-VEGF 앵타머 제제) 25 mg/kg을 1일 2회 복막내 주사하고(거나) PDGFB 수용체에 대한 폴리클로날 항체인 APB5 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 이바이오사이언스) 50 mg/kg을 1일 2회 급식시켜 경구 투여함으로써 처리하였다. 각막 NV 유도 후 28일째에, 마우스에 크실라진 히드로클로라이드 및 케타민 히드로클로라이드로 깊게

마취시킨 동안에 플루오레신-이소티오시아네이트 연결 콘카나발린 A 렉틴 (미국 캘리포니아주 벨링게임 소재의 벡터 래버러토리즈) 20 $\mu\text{g/g}$ 을 정맥내 투여하였다. 30분 후에, 마우스 눈을 적출하고, 각막을 평평하게 탑재하였다. 각막 NV를 형광 현미경을 사용하여 시각화하고, 오픈랩 소프트웨어를 사용하여 정량하였다. 혈관에 의해 덮힌 각막의 백분율을 총 각막 영역의 백분율로서 계산하고, 그 결과를 도 14에 나타낸다.

[0310] 차후 처리가 없는 21-28일 동안의 페가프타니브 나트륨 단독 또는 14-21일 동안의 APB5 단독 처리는 가장자리 및 각막의 상피에 대한 NaOH 처리 및 상해 후 각막의 혈관신생의 퇴화에 대해 대조군에 비해 거의 영향을 나타내지 않았다. 14-21일 동안 APB5로 처리하고, 21-28일 동안 페가프타니브 나트륨으로 처리한 동물은 대조군에 비해 각막 상에서 혈관신생 성장을 덜 나타냈다 (13.4%).

[0311] **등가물**

[0312] 본 발명의 기재된 방법 및 시스템의 각종 변경 및 변형은 본 발명의 범위 및 취지로부터 벗어남 없이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명이 특정 바람직한 실시양태와 관련하여 기재되었지만, 청구된 본 발명이 이러한 특정 실시양태에 부당하게 제한되지는 않아야 하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시양태에 대한 다수의 등가물인 통상의 실험만을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있다. 이러한 등가물은 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1(A)는 인간 PDGF-B의 핵산 서열 (젠뱅크(GenBank) 등록 번호 X02811) (서열 1)에 대한 개략도이다.
- [0037] 도 1(B)는 인간 PDGF-B의 아미노산 서열 (젠뱅크 등록 번호 CAA26579) (서열 2)에 대한 개략도이다.
- [0038] 도 1(C)는 인간 PDGF-A의 핵산 서열 (젠뱅크 등록 번호 X06374) (서열 11)에 대한 개략도이다.
- [0039] 도 1(D)는 인간 PDGF-A의 폴리펩티드 서열 (젠뱅크 등록 번호 CAA29677) (서열 12)에 대한 개략도이다.
- [0040] 도 2(A)는 인간 VEGF의 핵산 서열 (젠뱅크 등록 번호 NM_003376) (서열 3)에 대한 개략도이다.
- [0041] 도 2(B)는 인간 VEGF 폴리펩티드의 아미노산 서열 (젠뱅크 등록 번호 NP_003367) (서열 4)에 대한 개략도이다.
- [0042] 도 3(A)는 인간 PDGFR-B의 핵산 서열 (젠뱅크 등록 번호 NM_002609) (서열 5)에 대한 개략도이다.
- [0043] 도 3(B)는 인간 PDGFR-B의 폴리펩티드 서열 (젠뱅크 등록 번호 NP_002600) (서열 6)에 대한 개략도이다.
- [0044] 도 3(C)는 인간 PDGFR-A의 핵산 서열 (젠뱅크 등록 번호 NM_006206) ((서열 13)에 대한 개략도이다.
- [0045] 도 3(D)는 인간 PDGFR-A의 폴리펩티드 서열 (젠뱅크 등록 번호 NP_006197) (서열 14)에 대한 개략도이다.
- [0046] 도 4(A)는 인간 VEGFR-1 (Flt-1)의 핵산 서열 (젠뱅크 등록 번호 AF063657) (서열 7)에 대한 개략도이다.
- [0047] 도 4(B)는 인간 VEGFR-1 (Flt-1)의 폴리펩티드 서열 (젠뱅크 등록 번호) (서열 8)에 대한 개략도이다.
- [0048] 도 4(C)는 인간 VEGFR-2 (KDR/Flk-1)의 핵산 서열 (젠뱅크 등록 번호 AF035121) (서열 9)에 대한 개략도이다.
- [0049] 도 4(D)는 인간 VEGFR-2 (KDR/Flk-1)의 폴리펩티드 서열 (젠뱅크 등록 번호AAB88005) (서열 10)에 대한 개략도이다.
- [0050] 도 5는 대조군 처치 (대조군), 글리벡 처치 (항-PDGF 작용제) 및 마쿠젠(Macugen)TM 처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 작용제)를 마쿠젠TM과 글리벡을 사용한 조합 처치 (항-PDGF/항-VEGF 조합 치료법) 결과와 비교한, 각막 혈관신생 검정에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0051] 도 6(A)는 대조군 (PEG-처치) 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0052] 도 6(B)는 글리벡으로 처치한 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0053] 도 6(C)는 마쿠젠TM으로 처치한 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0054] 도 6(D)는 마쿠젠TM과 글리벡 둘 다로 처치한 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0055] 도 7(A)는 정상적인 각막의 맥관구조가 APB5 (PDGFR 항체, 항-PDGF 작용제) 투여에 영향을 받지 않음을 보여주

는 형광-현미경 화상의 사진이다.

- [0056] 도 7(B)는 정상적인 각막의 맥관구조가 글리벡 투여에 영향을 받지 않음을 보여주는 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0057] 도 7(C)는 정상적인 각막의 맥관구조가 마쿠젠™ (마쿠젠)과 글리벡의 동시 투여에 영향을 받지 않음을 보여주는 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0058] 도 7(D)는 정상적인 각막의 맥관구조가 PEG 투여에 영향을 받지 않음을 보여주는 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0059] 도 8은 대조군 처치 (대조군), 글리벡 처치 (항-PDGF 작용제) 및 마쿠젠™ 처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 작용제)를 마쿠젠™과 글리벡을 사용한 조합 처치 (항-PDGF/항-VEGF 조합 치료법) 결과와 비교한, 레이저로 유도된 맥락막 혈관신생 검정에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0060] 도 9는 대조군-처치 (대조군), APB5-처치 (항-PGFR 항체, 항-PDGF 작용제로 작용함) 및 마쿠젠 처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 앵타머)를 마쿠젠과 APB5를 사용한 조합 처치 (마쿠젠 + APB5) 결과와 비교한, 레이저로 유도된 맥락막 혈관신생 검정에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0061] 도 10은 대조군 처치 (대조군), ARC-127 처치 (항-PDGF 작용제) 및 마쿠젠 처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 작용제)를 마쿠젠과 ARC-127을 사용한 조합 처치 (항-PDGF/항-VEGF 조합 치료법) 결과와 비교한, 망막의 발생 모델에서의 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0062] 도 11은 대조군 처치 (대조군), ARC-127 처치 (항-PDGF 작용제) 및 마쿠젠 처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 작용제)를 마쿠젠과 ARC-127을 사용한 조합 처치 (항-PDGF/항-VEGF 조합 치료법) 결과와 비교한, 각막 혈관신생 검정에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0063] 도 12(A)는 대조군 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0064] 도 12(B)는 ARC-127을 처치한 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0065] 도 12(C)는 마쿠젠을 처치한 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0066] 도 12(D)는 마쿠젠과 ARC-127 둘 다를 처치한 마우스 각막에서 발생하는 각막 혈관신생에 대한 형광-현미경 화상의 사진이다.
- [0067] 도 13은 대조군 처치 (대조군), APB-5 처치 (항-PDGF 작용제) 및 마쿠젠 처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 작용제)를 마쿠젠과 APB-5를 사용한 조합 처치 (항-PDGF/항-VEGF 조합 치료법) 결과와 비교한, 각막 혈관신생 검정에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0068] 도 14는 대조군 처치 (대조군), APB-5 처치 (항-PDGF 작용제) 및 마쿠젠-처치 (즉, 페가프타니브 처치, 항-VEGF 작용제)를 마쿠젠과 APB-5를 사용한 조합 처치 (항-PDGF/항-VEGF 조합 치료법) 결과와 비교한, 각막 혈관신생 검정에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1A-1

삭제

도면1A-2

삭제

도면1B

PDGF-B 프로펩티드의 서열 (젠뱅크 등록 번호 CAA26579) (서열 2)

1 MNRCWALFLS LCCYLRLVSA EGDPIPEELY EMLSDHSIRS FDDLQRLHGH DPGEEDGAEL
61 DLNMTTRSHSG GELESLARGR RSLGSLTIAE PAMIAECKTR TEVFEISRRL IDRTNANFLV
121 WPPCVEVQRC SGCCNNRNVQ CRPTQVQLRP VQVRKIEIVR KKPIFKKATV TLEDHLACKC
181 ETVAARFVT RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RTVRVRRPPK GKHRRFKHTH DKTALKETLG
241 A

도면1C-1

삭제

도면1C-2

삭제

도면1D

PDGF-A 폴리펩티드의 서열 (젠뱅크 등록 번호 CAA29677) (서열 12)

1 MRTLACLLLL GCGYLAHVLA EEAEIPREVI ERLARSQIHS IRDLQRLLEI DSVGSEDSLD
61 TSLRAHGVHA TKHVPEKRPL PIRRKRSIEE AVPAVCKTRT VIYEIPRSQV DPTSANFLIW
121 PPCVEVKRCT GCCNTSSVKC QPSRVHHRV KVAKVEYVRK KPKLKEVQVR LEEHLEACA
181 TTSLNPDYRE EDTDVR

도면2A-1

삭제

도면2A-2

삭제

도면2B

VEGF 폴리펩티드의 서열 (젠뱅크 등록 번호 NP 003367) (서열 4)

1 MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQAAPMA EGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD
61 IFQEYPDEIE YIFKPCVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHQGQHIGEM
121 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE KKSVRGKGGK QKRKRKKSRY KSWSVPCGPC SERRKHLFVQ
181 DPQTCKCSCK NTDSCRKARQ LELNERTCRC DKPRR

도면3A-1

삭제

도면3A-2

삭제

도면3A-3

삭제

도면3A-4

삭제

도면3B

PDGFR-B 폴리펩티드의 서열 (젠뱅크 등록 번호 NP 002600) (서열 6)

```

1  MRLPGAMPAL ALKGELLLLS LLLLLLPQIS QGLVVTPPGP ELVLNVSTTF VLTCSGSAPV
61  VWERMSQEPQ QEMAKAQDGT FSSVLTITNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV
121 PDPTVGFLPN DAEELFIFLT EITEITIPCR VTDPLVVTI HEKKGDVLP VPYDHQRGFS
181 GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SDAYVYRLQ VSSINVSNA VQTVVRQGEN ITLMCIVIGN
241 EVVFEWTFY RKESGRLVEP VTDFLDMPY HIRSIHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH
301 QDEKAINITV VESGYVRLG EVGTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLW FKDNRTLGDG
361 SAGEIALSTR NVSETRYVSE LTLVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSFQ LQINVPVRVL
421 ELSHSHPDG EQTVRCRGRG MPQPNIIWSA CROLRKCPRE LPPTLLGNSS EESQLETNV
481 TYWEEQEFQ VVSTLRQLHV DRPLSVRCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF KVVVISAILA
541 LVVLTIIISLI ILIMLWQKKP RYEIRWKVIE SVSSDGHEYI YVDPMLQLEYD STWELPRDQL
601 VLGRITLGSGA FGQVVEATAH GLSHSQATMK VAVKMLKSTA RSSEKQALMS ELKIMSHLGP
661 HLNVVNLLGA CTKGGPIYII TEYCRYGDLV DYLRNKHFT LQHHSKRRP PSAELYSNAL
721 PVGLPLPSHV SLTGESDGGY MDMSKDESVD YVPMMDKGD VKYADIESSN YMAPYDNYVP
781 SAPERTCRAT LINEFPVLSY MDLVGFSYQV ANGMEFLASK NCVHRDLAAR NVLICEGKLV
841 KICDFGLARD IMRDSNYISK GSTFLPLKWM APESIFNSLY TTLSDVWSFG ILLWEIFTLG
901 GTPYPELPMN EQFYNAIKRG YRMAQPAHAS DEIYEIMQKC WEEKFEIRPP FSQVLVLLER
961 LLGEGYKKKY QQVDEEFLRS DHPAILRSQA RLPGFHGLRS PLDTSSVLYT AVQPNEGND
1021 YIIFLPDPKP EVADEGPLEG SPSLASSTLN EVNTSSTISC DSPLEPQDEP EPEPQLELQV
1081 EPEPELEQLP DSGCPAPRAE AEDSFL

```

도면3C-1

삭제

도면3C-2

삭제

도면3C-3

삭제

도면3C-4

삭제

도면3C-5

삭제

도면3D

인간 PDGFR-A 폴리펩티드의 서열 (젠뱅크 등록 번호 NP 006197) (서열 14)

```

1  MGTSHPAFLV LGCLLTGLSL ILCQLSLPSI LPNENEKVQVQ LNSSFSLRCF GESEVSWQYP
61  MSEEESDVE IRNEENNSGL FVTVLEVSSA SAAHTGLYTC YYNHTQTEEN ELEGRHIYIY
121 VPDPDVAFVP LGMTDYLIV EDDDSAIIPC RTTDPETPVT LHNSEGVPVA SYDSRQGFNG
181 TFTVGPIYCE ATVKGKKFQT IPFNVYALKA TSELDLEMEA LKTVYKSGET IVVTCAVFNN
241 EVVDLQWTYP GEVKGKGITM LEEIKVPSIK LVYTLTVPEA TVKDSGDYEC AARQATREVK
301 EMKKVTISVH EKGFIKIKPT FSQLEAVNLH EVKHFVVEVR AYPPIRISWL KNNLTLIENL
361 TEITTDVEKI QEIRYRSKLK LIRAKEEDSG HYTTIVAQNED AVKSYTFELL TQVPSSILD
421 VDDHHGSTGG QTVRCTAEGT PLPDIEWMIC KDIKKCNET SWTILANNVS NIITEIHSRD
481 RSTVEGRVTF AKVEETIAVR CLAKNLLGAE NRELKLVAPT LRSELTVAAA VLVLLVIVII
541 SLIVLVVIWK QKPRYEIRWR VIESISPDGH EYIYVDPMQL PYDSRWEFFR DGLVLGRVLG
601 SGAFGKVVEG TAYGLSRSQP VMKVAVKMLK PTARSSEKQA LMSELKIMTH LGPHLNIVNL
661 LGACTKSGPI YIITEYCFYG DLVNYLHKNR DSFLSHHPEK PKKELDIFGL NPADESTRSY
721 VILSFENNGD YMDMKQADTT QYVPMLEKE VSKYSIDIQR LYDRPASYKK KSMLDSEVKN
781 LLSDDNSEGL TLLDLSFTY QVARGMEFLA SKNCVHRDLA ARNVLLAQGK IVKICDFGLA
841 RDIMHDSNYV SKGSTFLPVK WMAPESIFDN LYTTLSDVWS YGILLWEIFS LGGTPYPGMM
901 VDSTFYNNIK SGYRMAKPDH ATSEVYEIMV KCWNSEPEKR PSFYHLSEIV ENLLPGQYKK
961 SYEKIHLDFL KSDHFAVARM RVDSNAYIG VTYKNEEDKL KDWEGLDEQ RLSADSGYII
1021 PLPDIDPVPE EEDLGKRRNH SSQTSEESAI ETGSSSSTFI KREDETIEDI DMMDDIGIDS
1081 SDLVEDSFL

```

도면4A-1

삭제

도면4A-2

삭제

도면4A-3

삭제

도면4B

VEGFR-1 (Flt-1) 폴리펩티드의 서열 (젠뱅크 등록 번호) (서열 8)

```

1  MVS YWDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPESLSKGTQ HIMQAGQTLH LQCRGEAAHK
61  WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS TLTNTAQAN HTGFYSCKYL AVPTS KKKET
121 ESAIYIFIŠD TGRPFVEMYS EIP EIIHMT E GRELVIPCRV TSPNITVTLK KFPLOTLIPD
181 GKRIIWDSRK GFII SNATYK EIGLLTCEAT VNGHLYKTNY LTHRQNTNII DVQISTPRFV
241 KLLRGHTLVL NCTATTP LNT RVQMTWSYPD EKNKRASVRR RIDQSNSHAN IFYSVLTIDK
301 MQNKDKGLYT CRVRSGPSFK SVNTSVHIYD KAFITVKHRK QOVLETVAGK RSYRLSMKVK
361 AFPSP EVVWL KDGLPATEKS ARYLTRGYSL IIKDVTEEDA GNYTILLSIK QSNVFNK LTA
421 TLIVNVK PQI YEKAVSSFPD PALYPLGSRQ ILTCTAYGIP OPTIKWFVHP CNHNHSEARC
481 DFCSNNEESF ILDADSNMGN RIESITQMA IIEGKNKMAS TLVVADSRIS GIYICIASNK
541 VGTVGRNISF YITDVPNGFH VNLEKMPTEG EDLKL SCTVN KFLYRDVTWI LLRTVNNRTM
601 HYSISKQKMA ITKEHSITLN LTIMNVSLQD SGTYACRARN VYTGE EILQK KEITIRDQEA
661 PYLLRNLSDH TVAISSSTL DCHANGVPEP QITWFKNNHK IQQEPGIILG PGSSTLFIER
721 VTEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVQG TSDKSNLELI TLTCTCVAAT LFWLLLT LFI
781 RKMKRSSSEI KTDYLSIIMD PDEVPLDEQC ERLPYDASKW EFARERLKLK KSLGRGAFGK
841 VVQASAFGIK KSPTCRTVAV KMLKEGATAS EYKALMTELK ILTHIGHHLN VVNLLGACTK
901 QGGPLMVIVE YCKYGNLSNY LKSKRDLFFL NKDAALHMEP KKEKMEPGLE QGKKPRLDSV
961 TSSESFASSG FQEDKSLSDV EEEEDSDGFY KEPITMEDLI SYSFQVARGM EFLSSRKCIH
1021 RDLAARNILL SENNVVKICD FGLARDIYKN PDYVRKGDTR LPLKWMAPES IFDKIYSTKS
1081 DVWSYGVLLW EIFSLGGSPY PGVQMD EFC SRLREGMRMR APEYSTPEIY QIMLDCWHRD
1141 PKERPRFAEL VEKLGDLLQA NVQQDGKDYI PINAILTGNS GFTYSTPAFS EDDFKESIS A
1201 PKFNSGSSDD VRYVNAFKFM SLERIKTFEE LLPNATSMFD DYQGDSTLL ASPMLKRFTW
1261 TDSKPKASLK IDLRVTSKSK ESGLSDVSRP SFC HSSCGHV SEGKRRFTYD HAELEKRIAC
1321 CSPPPDYNSV VLYSTPPI

```

도면4C-1

삭제

도면4C-2

삭제

도면4C-3

삭제

도면4C-4

삭제

도면4D

VEGFR-1 (KDR/Fik-1) 폴리펩티드의 서열 (겐뱅크 등록 번호 AAB88005) (서열 10)

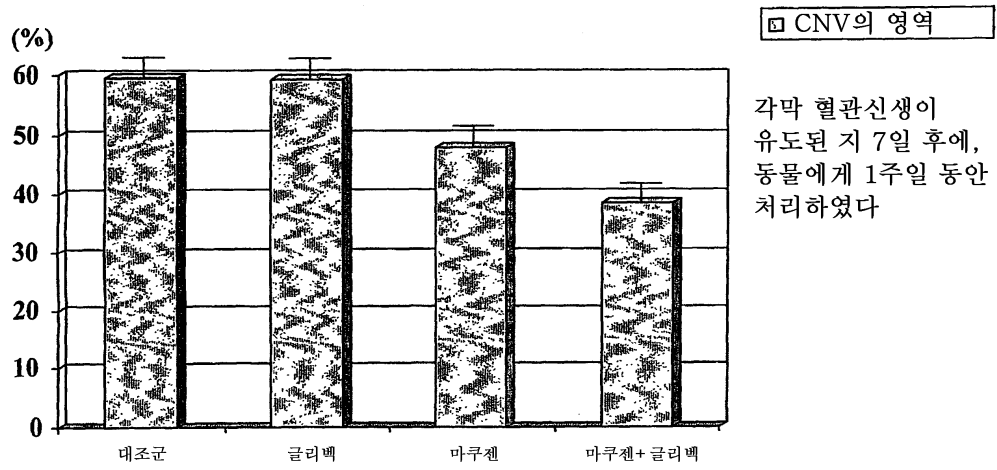
```

1  MQSKVLLAVA LNLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDL
61  WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD
121 YRSPFIASVS DQHGVMYITE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD
181 SKKGFTIPSY MISYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSL SHGIELSVGE
241 KLVNLCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS
301 DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYPVP
361 EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL TNPISKEKQS HVVSLVYVVP
421 PQIGEKSLIS PVDYQYGTQ QTLTCTVYAI PPPHHIHWYW QLEEECANEP SQAVSVTNPY
481 PCEEWRSVED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC EAVNKVGRGE
541 RVISFHVTRG PEITLQPDQM PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGPPQ LPIHVGLPPT
601 PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVVRLT
661 VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPQIMW FKDNELTVED SGIVLKDGNR
721 NLTIIRVRKE DEGLYTCQAC SVLGCAKVEA FFIIEGAQEK TNLEIILVG TAVIAMFFWL
781 LLVIILRTVK RANGGELKTG YLSIVMDPDE LPLDEHCERL PYDASKWEFP RDRLKLGKPL
841 GRGAFGQVIE ADAFGIDKTA TCRTVAVKML KEGATHSEHR ALMSELKILI HIGHHLNVVN
901 LLGACTKPGG PLMVIVEFCK FGNLSTYLRK KRNEFVPYKT KGARFRQGD YVGAIPVDLK
961 RRLDSITSSQ SSASSGFVEE KSLSDVEEEE APEDLYKDFL TLEHLICYSF QVAKGMEFLA
1021 SRKCIHRDLA ARNILLSEKN VVKICDFGLA RDIYKDPDYV RKGDLRLPLK WMAPETIFDR
1081 VYTIQSDVWS FGVLLWEIFS LGASPYPGVK IDEEFCRRLK EGTRMRAPDY TTPEMYQTM
1141 DCWHGEPSQR PTFSELVEHL GNLLQANAQQ DGKDYIVLPI SETLSMEEDS GLSLPTSPVS
1201 CMEEEVCDP KFHYDNTAGI SQYLQNSKRK SRPVSVKTFE DIPLEEPEVK VIPDDNQTD
1261 GMLASEELK TLEDRTKLSP SFGGMVPSKS RESVASEGSN QTSQYQSGYH SDDTDTTVYS
1321 SEEAECLKLI EIGVQTGSTA QILQPDSTT LSSPPV

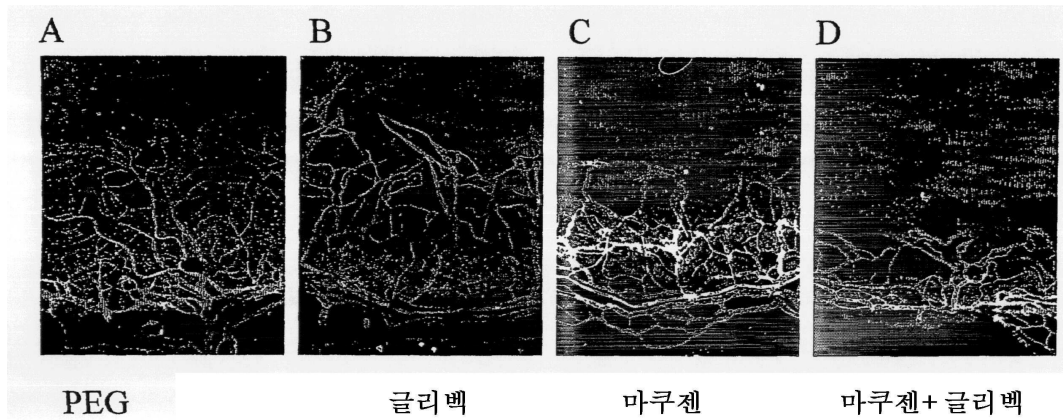
```

도면5

각막 혈관신생에 대한 PDGFR β 및 VEGF 신호전달의
차단 효과



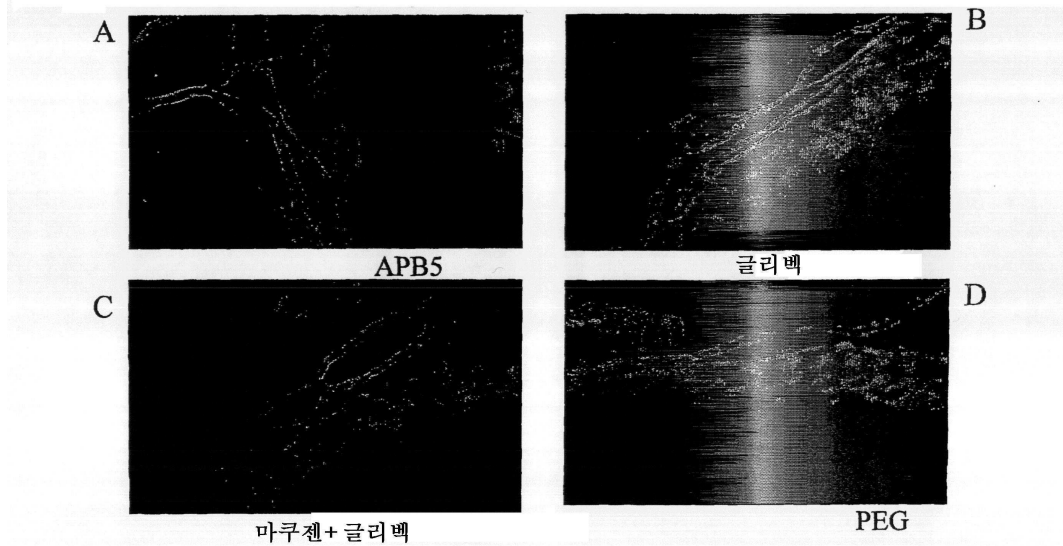
도면6



도면7

정상 혈관계에 대한 PDGFR β 및 VEGF 신호전달 억제제의 효과

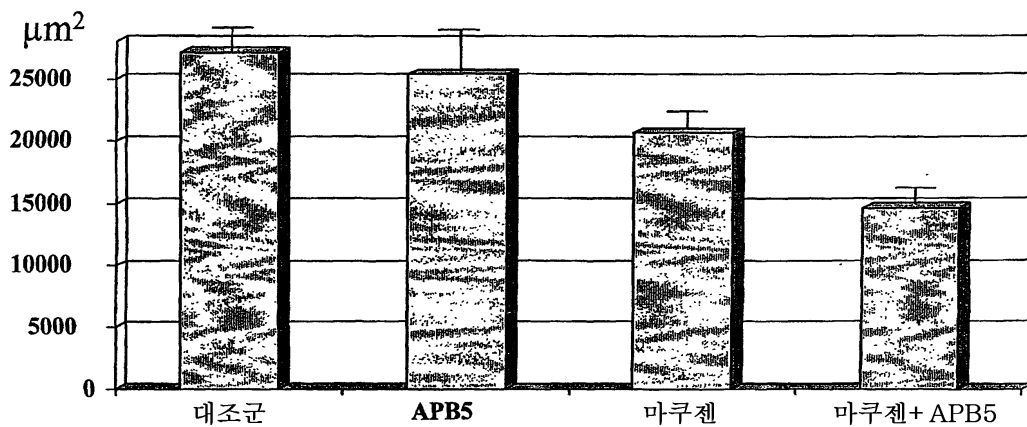
대조군 눈의 혈관구조는 글리벡, APB5, PEG 또는 마쿠젠의 투여에 의해 영향을 받지 않았으며, 이는 PDGFR β 또는 VEGF 신호전달의 차단 또는 둘 다가 신생되는 혈관을 표적으로 하지만 수립된 혈관을 표적으로 하지 않는다는 것을 제한한다



도면8

APB5 항체 및 마쿠젠으로의 치료 이후의 맥락막 혈관신생의 영역

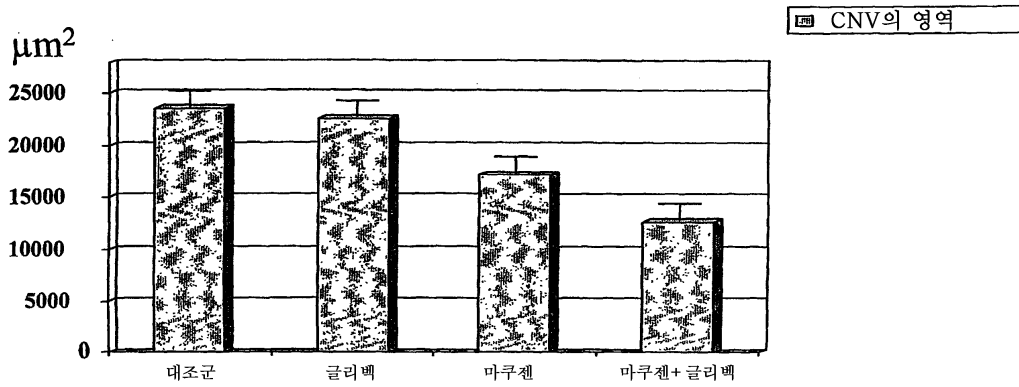
모든 치료는 레이저 화상시킨 지 7일 후에 시작하여, 일주일 동안 마쿠젠 25 mg/kg 및 APB5 5 mg/kg을 정맥내로 하루에 2회 주사하였다



도면9

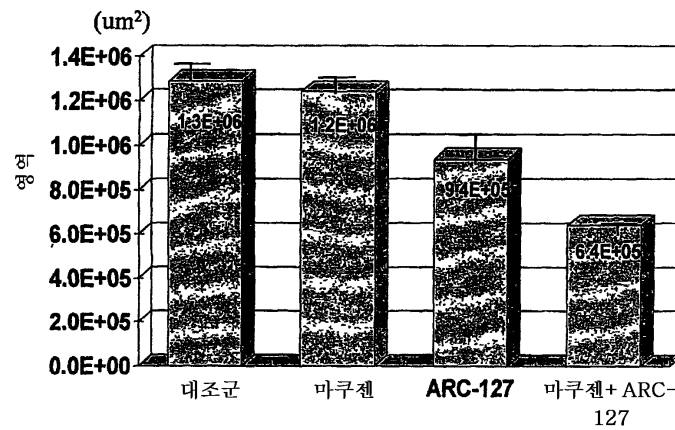
글리벡 및 마쿠젠으로의 치료 이후의 맥락막 혈관신생의 영역

모든 치료는 레이저 화상시킨 지 7일 후에 시작하여,
일주일 동안 마쿠젠 25 mg/kg을 정맥내로 하루에 2회 주사하고,
글리벡 50 mg/kg을 급식으로 하루에 2회 투여하였다

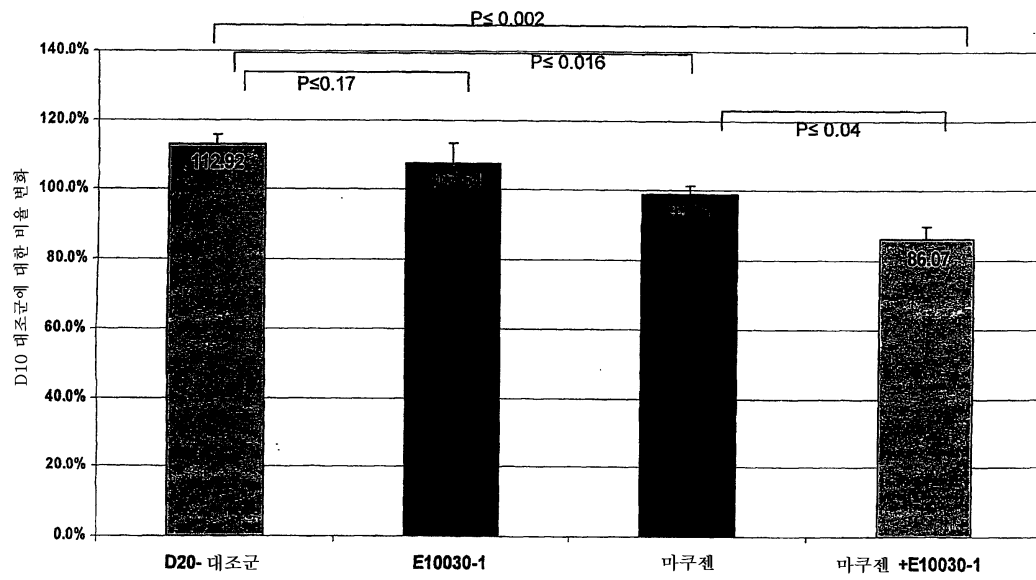


도면10

혈관의 영역



도면11



도면1a1

PDGF-B 핵산의 서열 (젠뱅크 등록 번호 X02811) (서열 1)

```

1  CCCTGCCTGC CTCCCTGCGC ACCCGCAGCC TCCCCCGCTG CCTCCCTAGG GCTCCCCCTCC
61  GGCCGCCAGC GCCCATTTT CATTCCTAG ATAGAGATAC TTTGCGCGCA CACACATACA
121 TACGCGCGCA AAAAGGAAAA AAAAAAAAAA AAGCCACCC TCCAGCCTCG CTGCAAAGAG
181 AAAACCGGAG CAGCCGCAGC TCGCAGCTCG CAGCCCGCAG CCCGCAGAGG ACGCCAGAG
241 CGGCGAGCGG GCGGGCAGAC GGACCGACGG ACTCGCGCCG CGTCCACCTG TCGGCCGGGC
301 CCAGCCGAGC GCGCAGCGG CACGCCGCGC GCGCGGAGCA GCCGTGCCCG CGGCCGGGC
361 CGCCGCCAGG GCGGCACACG CTCCCGCCCC CCTACCCGGC CGGGCGGGA GTTTGCACCT
421 CTCCCTGCCG GGGTGCTCGA GCTGCCGTTG CAAAGCCAAC TTTGGA AAAA GTTTTTGGG
481 GGAGACTTGG GCCTTGAGGT GCCCAGCTCC GCGCTTTCG ATTTTGGGG CCTTTCCAGA
541 AAATGTTGCA AAAAGCTAA GCGGCGGGC AGAGGAAAC GCCTGTAGCC GCGGAGTGAA
601 GACGAACCAT CGACTGCCGT GTTCCTTTTC CTCTTGAGG TTGGAGTCCC CTGGGCGCCC
661 CCACACGGCT AGACGCCTCG GCTGGTTCGC GACGCAGCC CCCGGCCGTG GATGCTGCAC
721 TCGGGCTCGG GATCCGCCCA GGTAGCGGCC TCGGACCCAG GTCTGCGCC CAGGTCTTCC
781 CCTGCCCCC AGCGACGGAG CCGGGGCCG GGGCGCGGC GCCGGGGCA TCGGGGTGAG
841 CCGCGGCTGC AGAGGCCTGA GCGCCTGATC GCCGCGGACC CGAGCCGAGC CCACCCCCT
901 CCCCAGCCCC CCACCTGGC GCGGGGGCG GCGCGCTCGA TCTACGCGTT CGGGCCCCG
961 CGGGGCCGGG CCCGGAGTCS GCATGAATCG CTGCTGGGCG CTCTTCTGT CTCTCTGCTG
1021 CTACCTGCGT CTGGTCAGCG CCGAGGGGGA CCCCATTTCC GAGGAGCTTT ATGAGATGCT
1081 GAGTGACCAC TCGATCCGCT CCTTTGATGA TCTCCAACGC CTGCTGCACG GAGACCCCG
1141 AGAGGAAGAT GGGGCCGAGT TGGACCTGAA CATGACCCGC TCCCACCTG GAGGCGAGCT
1201 GGAGAGCTTG GCTCGTGGA GAAGGAGCCT GGGTTCCCTG ACCATTGCTG AGCCGCCAT
1261 GATCGCCGAG TGCAAGACGC GCACCGAGGT GTTCGAGATC TCCCGGCGCC TCATAGACCG
1321 CACCAACGCC AACTTCCTGG TGTGGCCGCC CTGTGTGGAG GTGCAGCGCT GCTCCGGCTG
1381 CTGCAACAAC CGCAACGTGC AGTGCCGCC CACCCAGGTG CAGCTGCGAC CTGTCCAGGT

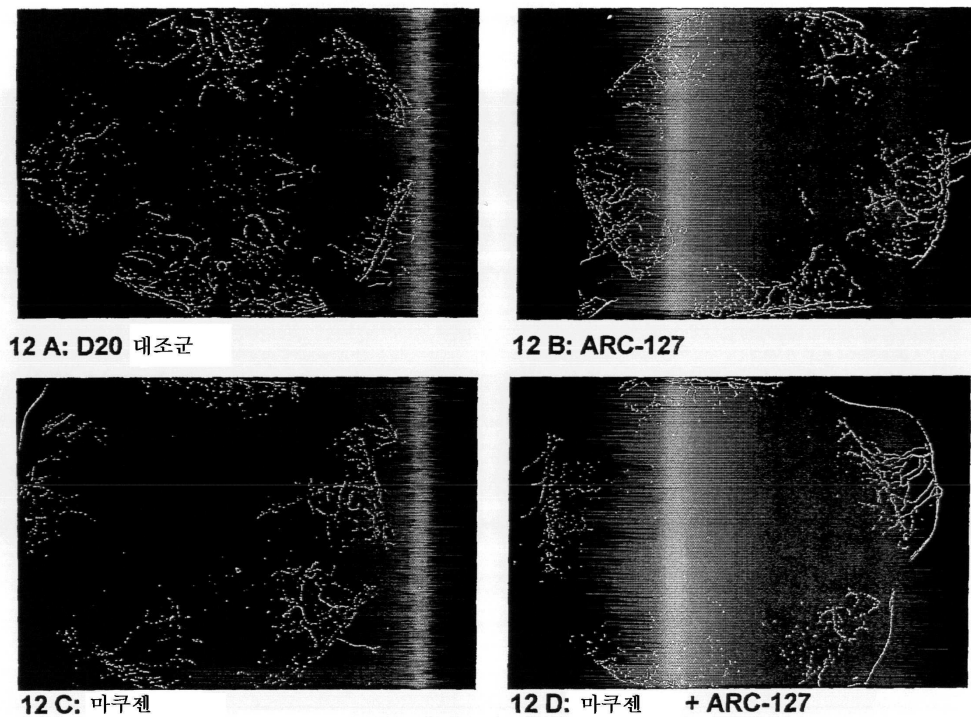
```

도면1c1

PDGF-A 핵산의 서열 (제본크 등록 번호 X06374) (서열 11)

1 TTCTTGGGGC TGATGTCCGC AAATATGCAG AATTACCGGC CGGGTCGCTC CTGAAGCCAG
61 CGCGGGGAGC GAGCGCGGCG GCGGCCAGCA CCGGGAACGC ACCGAGGAAG AAGCCCAGCC
121 CCCGCCCTCC GCGCCCTCCG TCCCCACCCC CTACCCGCGC GCCCAGSAGG CTCGCCGGCT
181 GCGGCGCGCA CTCCTGTTT CTCCTCCTCC TGGCTGGGCG TGCTTGCCTC TCCGCACTCA
241 CTGCTCGCCG GCGCGCGTCC GCCAGCTCCG TGCTCCCGC GCCACCCTCC TCCGGGCCCG
301 GCTCCCTAAG GGATGGTACT GAATTTCGCC GCCACAGGAG ACCGGCTGGA GCGCCCGCCC
361 CGCGCCTCGC CTCTCCTCCG AGCAGCCAGC GCCTCGGGAC GCGATGAGGA CCTTGGCTTG
421 CCTGCTGCTC CTCGGCTGCG GATACCTCGC CCATGTTCTG GCCGAGGAAG CCGAGATCCC
481 CCGCGAGGTG ATCGAGAGGC TGGCCGCGAG TCAGATCCAC AGCATCCGGG ACCTCCAGCG
541 ACTCCTGGAG ATAGACTCCG TAGGGAGTGA GGATTCTTTG GACACCAGCC TGAGAGCTCA
601 CGGGGTCCAC GCCACTAAGC ATGTGCCCCA GAAGCGGGCC CTGCCCATTC GGAGGAAGAG
661 AAGCATCGAG GAAGCTGTCC CCGCTGTCTG CAAGACCAGG ACGGTCATTT ACGAGATTCC
721 TCGGAGTCAG GTCGACCCCA CGTCCGCCAA CTTCTGATC TGGCCCCCGT GCGTGGAGGT
781 GAAACGCTGC ACCGGCTGCT GCAACACGAG CAGTGTCAAG TGCCAGCCCT CCCGCGTCCA
841 CCACCGCAGC GTCAGGTGG CCAAGGTGGA ATACGTCAGG AAGAAGCCAA AATTAAAAGA
901 AGTCCAGGTG AGGTAGAGG AGCATTGGA GTGCGCTGC GCGACCACAA GCCTGAATCC
961 GGATTATCGG GAAGAGGACA CGGATGTGAG GTGAGGATGA GCCGCAGCCC TTCTCTGGGA
1021 CATGGATGTA CATGGCGTGT TACATTCCTG AACCTACTAT GTACGGTGCT TTATTGCCAG
1081 TGTGCGGTCT TTGTTCTCCT CCGTGAAAAA CTGTGTCCGA GAACACTCGG GAGAACAAG

도면12



도면1a2

```

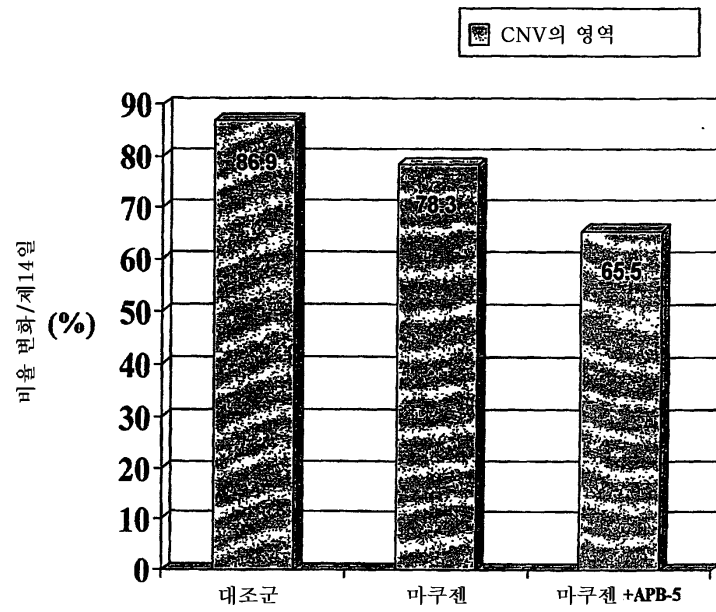
1441 GAGAAAGATC GAGATTGTGC GGAAGAAGCC AATCTTTAAG AAGGCCACGG TGACGCTGGA
1501 AGACCACCTG GCATGCAAGT GTGAGACAGT GGCAGCTGCA CGGCTGTGA CCCGAAGCCC
1561 GGGGGGTTC CAGGAGCAGC GAGCCAAAAC GCCCCTGACCA TTCGGACGGT
1621 GCGAGTCCGC CGGCCCCCA AGGGCAAGCA CCGGAAATTC AAGCACACGC ATGACAAGAC
1681 GGCAGTGAAG GAGACCCTTG GAGCCTAGGG GCATCGGCAG GAGAGTGTGT GGGCAGGGTT
1741 ATTTAATATG GTATTGCTG TATTGCCCC ATGGGGCCTT GGAGTAGATA ATATTGTTTC
1801 CCTCGTCCGT CTGTCTCGAT GCCTGATTG GACGGCCAAT GGTGCCTCCC CCACCCCTCC
1861 ACGTGTCCGT CCACCCTTCC ATCAGCGGGT CTCTCCCAG CGGCCTCCGG CTCTTGCCCA
1921 GCAGCTCAAG AAGAAAAAGA AGGACTGAAC TCCATCGCCA TCTTCTTCCC TTAAGTCCAA
1981 GAACTTGGA TAAGAGTGTG AGAGAGACTG ATGGGGTCGC TCTTTGGGG AAACGGGTTC
2041 CTTCCCTGC ACCTGGCCTG GGCACACCT GAGCGCTGTG GACTGTCCTG AGGAGCCCTG
2101 AGGACCTCTC AGCATAGCCT GCCTGATCCC TGAACCC

```

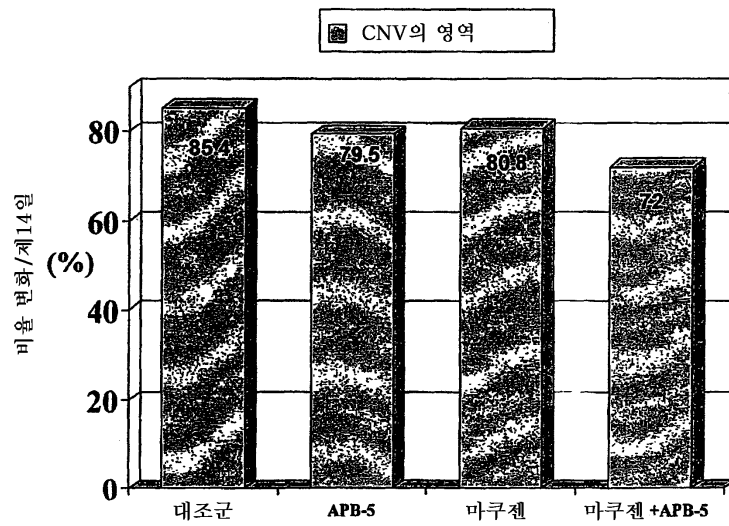
도면1c2

1141 AGACAGTGCA CATTTGTTTA ATGTGACATC AAAGCAAGTA TTGTAGCACT CGGTGAAGCA
 1201 GTAAGAAGCT TCCTTGTCAG AAAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAAAA CAAAACCACA
 1261 AATGACAAAA AAAAAACGGA CTCACAAAAA TATCTAAACT CGATGAGATG GAGGGTCGCC
 1321 CCGTGGGATG GAAGTGCAGA GGTCTCAGCA GACTGGATTT CTGTCCGGGT GGTACACAGT
 1381 GCTTTTTTGC CGAGGATGCA GAGCCTGCTT TGGGAACGAC TCCAGAGGGG TGCTGGTGGG
 1441 CTCTGCAGGG CCCGCAGGAA GCAGGAATGT CTTGGAAACC GCCACGCGAA CTTTAGAAAC
 1501 CACACCTCCT CGCTGTAGTA TTTAAGCCCA TACAGAAACC TTCCTGAGAG CTTAAGTGG
 1561 TTTTTTTTTT TGTTTTTGTT TTGTTTTTTT TTTTTTTGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
 1621 TTACACCATA AAGTGATTAT TAAGCTTCCT TTTACTCTTT GGCTAGCTTT TTTTTTTTTT
 1681 TTTTTTTTTT TTTTTTTTAA TTATCTCTTG GATGACATTT ACACCGATAA CACACAGGCT
 1741 GCTGTAACGT TCAGGACAGT GCGACGGTAT TTTCCCTAGC AAGATGCAAA CTAATGAGAT
 1801 GTATTAAAAA AAACATGGTA TACCTACCTA TGCATCATTT CCTAAATGTT TCTGGCTTTG
 1861 TGTTTCTCCC TTACCCTGCT TTATTTGTTA ATTTAAGCCA TTTTGAAAGA ACTATGCGTC
 1921 AACCAATCGT ACGCCGTCCT TGCGGCACCT GCCCAGAGC CCGTTTGTGG CTGAGTGACA
 1981 ACTTGTTCCC CGCAGTGAC ACCTAGAATG CTGTGTTCCC ACGCGGCACG TGAGATGCAT
 2041 TGCCGCTTCT GTCTGTGTTG TTGGTGTGCC CTGGTGCCGT GGTGGCGGTC ACTCCCTCTG
 2101 CTGCCAGTGT TTGGACAGAA CCCAAATTCT TTATTTTGG TAAGATATTG TGCTTTACCT
 2161 GTATTAAACAG AAATGTGTGT GTGTGTTTG TTTTTTTGTA AAGGTGAAGT TTGTATGTTT
 2221 ACCTAATATT ACCTGTTTTG TATACCTGAG AGCCTGCTAT GTTCTTCTTT TGTGATCCA
 2281 AAATTAAAAA AAAAATACCA CCAAC

도면13



도면14



도면2a1

VEGF 핵산의 서열 (젠뱅크 등록 번호 NM 003376) (서열 3)

```

1 TCGCGGAGGC TTGGGGCAGC CGGGTAGCTC GGAGGTCGTG GCGCTGGGGG CTAGCACCAG
61 CGCTCTGTCTG GGAGGCGCAG CGGTTAGGTG GACCGGTCAG CGGACTCACC GGCCAGGCGG
121 CTCGGTGCTG GAATTTGATA TTCATTGATC CGGGTTTTAT CCCTCTTCTT TTTCTTAA
181 CATTTTTTTT TAAACTGTA TTGTTTCTCG TTTTAATTTA TTTTGCTTG CCATTCCCCA
241 CTTGAATCGG GCCGACGGCT TGGGGAGATT GCTCTACTTC CCCAAATCAC TGTGGATTTT
301 GGAAACCAGC AGAAAGAGGA AAGAGGTAGC AAGAGCTCCA GAGAGAAGTC GAGGAAGAGA
361 GAGACGGGGT CAGAGAGAGC GCGCGGGCGT GCGAGCAGCG AAAGCGACAG GGGCAAAGTG
421 AGTGACCTGC TTTTGGGGGT GACCGCCGGA GCGCGGCGTG AGCCCTCCCC CTGGGATCC
481 CGCAGCTGAC CAGTCGCGCT GACGGACAGA CAGACAGACA CCGCCCCCAG CCCAGCTAC
541 CACCTCCTCC CCGGCCGGCG GCGGACAGTG GACGCGGCGG CGAGCCGCGG GCAGGGGCGG
601 GAGCCCGCGC CCGGAGGCGG GGTGGAGGGG GTCGGGGCTC GCGGCGTCGC ACTGAACTT
661 TTCGTCCAAC TTCTGGGCTG TTCTCGCTTC GGAGGAGCCG TGGTCCGCGC GGGGAAGCC
721 GAGCCGAGCG GAGCCCGAG AAGTGCTAGC TCGGGCCGGG AGGAGCCGCA GCCGAGGAG
781 GGGGAGGAGG AAGAAGAGAA GGAAGAGGAG AGGGGGCCGC AGTGGCGACT CGGCGCTCGG
841 AAGCCGGGCT CATGGACGGG TGAGGCGGCG GTGTGCGCAG ACAGTGCTCC AGCCGCGCGC
901 GCTCCCCAGG CCCTGGCCCG GCCTCGGGC CGGGGAGGAA GAGTAGCTCG CCGAGGCGCC
961 GAGGAGAGCG GGCCGCCCA CAGCCCGAGC CGGAGAGGGA GCGCGAGCCG GCCTGGCCCC
1021 GGTGCGGCCT CCGAAACCAT GAACTTTCTG CTGTCTTGGG TGCAATTGGAG CCTTGCCTTG
1081 CTGCTCTACC TCCACCATGC CAAGTGGTCC CAGGCTGCAC CCATGGCAGA AGGAGGAGGG
1141 CAGAATCATC ACGAAGTGGT GAAGTTCATG GATGTCTATC AGCGCAGCTA CTGCCATCCA
1201 ATCGAGACCC TGGTGGACAT CTTCAGGAG TACCCTGATG AGATCGAGTA CATCTTCAAG
1261 CCATCCTGTG TGCCCTGAT GCGATGCGGG GGCTGCTGCA ATGACGAGGG CTTGGAGTGT
1321 GTGCCCACTG AGGAGTCCAA CATCACCATG CAGATTATGC GGATCAAACC TCACCAAGGC
1381 CAGCACATAG GAGAGATGAG CTTCTACAG CACAACAAAT GTGAATGCAG ACCAAAGAAA

```

도면2a2

```

1441 GATAGAGCAA GACAAGAAAA AAAATCAGTT CGAGGAAAGG GAAAGGGGCA AAAACGAAAG
1501 CGCAAGAAAT CCCGGTATAA GTCCTGGAGC GTTCCCTGTG GGCCTTGCTC AGAGCGGAGA
1561 AAGCATTGTG TTGTACAAGA TCCGACAGAC TGTAATGTT CCTGCAAAAA CACAGACTCG
1621 CGTTGCAAGG CGAGGCAGCT TGAGTTAAAC GAACGTACTT GCAGATGTGA CAAGCCGAGG
1681 CGGTGAGCCG GGCAGGAGGA AGGAGCCTCC CTCAGGGTTT CGG

```

도면3a1

PDGFR-B 핵산의 서열 (젠뱅크 등록 번호 NM 002609) (서열 5)

```

1  GGGCCCTCAG CCCTGCTGCC CAGCAGGAGC CTGTGCTCGC CTTGCCCAAC GCAGACAGCC
61  AGACCCAGGG CGGCCCTCTT GCGGGCTCTG CTCCTCCCGA AGGATGCTTG GGGAGTGAGG
121 CGAAGCTGGG CGCTCCTCTC CCCTACAGCA GCGCCCTTCC TCCATCCCTC TGTTCCTCTG
181 AGCCTTCAGG AGCCTGCACC AGTCCTGCCT GTCCTTCTAC TCAGCTGTTA CCCACTCTGG
241 GACCAGCAGT CTTTCTGATA ACTGGGAGAG GGCAGTAAGG AGGACTTCCT GGAGGGGGTG
301 ACTGTCCAGA GCCTGGAAGT GTGCCACAC CAGAAGCCAT CAGCAGCAAG GACACCATGC
361 GGGTTCCGGG TGCATGCCA GCTCTGGCCC TCAAAGGCGA GCTGCTGTTG CTGTCTCTCC
421 TGTACTTCTT GGAACACAG ATCTCTCAGG GCCTGGTCGT CACACCCCGG GGGCCAGAGC
481 TTGTCTCAA TGTCTCCAGC ACCTTCGTTT TGACCTGCTC GGGTTCAGCT CCGGTGGTGT
541 GGAACGGAT GTCCAGGAG CCCCCACAGG AAATGGCCAA GGGCCAGGAT GGCACCTTCT
601 CCAGCGTGCT CACACTGACC AACCTCACTG GGCTAGACAC GGGAGAATAC TTTTGCACCC
661 ACAATGACTC CCGTGGACTG GAGACCGATG AGCGGAAACG GCTCTACATC TTTGTGCCAG
721 ATCCCACCGT GGGCTTCCTC CTAATGATG CCGAGGAACT ATTCTCTTT CTCACGGAAA
781 TAACTGAGAT CACCATTCCTA TGCCGAGTAA CAGACCCACA GCTGGTGGTG AACTGCACG
841 AGAAGAAAGG GGACGTTGCA CTGCCTGTCC CCTATGATCA CCAACGTGGC TTTTCTGGTA
901 TCTTTGAGGA CAGAAGCTAC ATCTGCAAAA CCACCATTTG GGACAGGGAG GTGGATTCTG
961 ATGCCTACTA TGTCTACAGA CTCCAGGTGT CATCCATCAA CGTCTCTGTG AACGCAGTGC
1021 AGACTGTGGT CCGCCAGGGT GAGAACATCA CCCTCATGTG CATTGTGATC GGAATGAGG
1081 TGGTCAACTT CGAGTGACA TACCCCGCA AAGAAAGTGG GCGGCTGGTG GAGCCGGTGA
1141 CTGACTTCCT CTTGGATATG CCTTACCACA TCCGCTCCAT CCTGCACATC CCCAGTGCCG
1201 AGTTAGAAGA CTCGGGGACC TACACCTGCA ATGTGACGGA GAGTGTGAAT GACCATCAGG
1261 ATGAAAAGGC CATCAACATC ACCGTGGTTG AGAGCGGCTA CGTGCGGCTC CTGGGAGAGG
1321 TGGGCACACT ACAATTTGCT GAGCTGCATC GGAGCCGGAC ACTGCAGGTA GTGTTGAGG
1381 CCTACCCACC GCGCACTGTC CTGTGGTCA AAGACAACCG CACCCTGGGC GACTCCAGCG

```

도면3c1

PDGFR-A 핵산의 서열 (센벡크 등록 번호 NM 006206) (서열 13)

```

1  TTCTCCCCGC CCCCAGTTG TTGTCGAAGT CTGGGGGTTG GGA CTGGACC CCCTGATTGC
61  GTAAGAGCAA AAAGCGAAGG CGCAATCTGG AACTGGGAG ATTCGGAGCG CAGGGAGTTT
121 GAGAGAAACT TTTATTTTGA AGAGACCAAG GTTGAGGGGG GGCTTATTTC CTGACAGCTA
181 TTTACTTAGA GCAAATGATT AGTTT TAGAA GGATGGACTA TAACATTGAA TCAATTACAA
241 AACGCGGTTT TTGAGCCCAT TACTGTTGGA GCTACAGGGA GAGAAACAGG AGGAGACTGC
301 AAGAGATCAT TTGGAAGGC CGTGGGCACG CTC TTTACTC CATGTGTGGG ACATTCATTG
361 CGGAATAACA TCGGAGGAGA AGTTTCCCAG AGCTATGGGG ACTTCCCATC CGGCGTTCCT
421 GGTCTTAGGC TGTCTTCTCA CAGGGCTGAG CCTAATCCTC TGCCAGCTTT CATTACCCTC
481 TATCCTTCCA AATGAAAATG AAAAGGTTGT GCAGCTGAAT TCATCCTTTT CTCTGAGATG
541 CTTTGGGGAG AGTGAAGTGA GCTGGCAGTA CCCCATGTCT GAAGAAGAGA GCTCCGATGT
601 GGAAATCAGA AATGAAGAAA ACAACAGCGG CCTTTTGTG ACGGTCTTGG AAGTGAGCAG
661 TGCTCGGCG GCCCACACAG GGTGTACAC TTGCTATTAC AACCACACTC AGACAGAAGA
721 GAATGAGCTT GAAGGCAGGC ACATTACAT CTATGTGCCA GACCCAGATG TAGCCTTTGT
781 ACCTCTAGGA ATGACGGATT ATTTAGTCAT CGTGGAGGAT GATGATTCTG CCATTATACC
841 TTGTCGCACA ACTGATCCCG AGACTCCTGT AACCTTACAC AACAGTGAGG GGGTGGTACC
901 TGCTCCTAC GACAGCAGAC AGGGCTTTAA TGGGACCTTC ACTGTAGGGC CCTATATCTG
961 TGAGGCCACC GTCAAAGGAA AGAAGTTCCA GACCATCCCA TTTAATGTTT ATGCTTTAAA
1021 AGCAACATCA GAGCTGGATC TAGAAATGGA AGCTCTTAAA ACCGTGTATA AGTCAGGGGA
1081 AACGATTGTG GTCACCTGTG CTGTTTTTAA CAATGAGGTG GTTGACCTTC AATGGACTTA
1141 CCCTGGAGAA GTGAAAGGCA AAGGCATCAC AATGCTGGAA GAAATCAAAG TCCCATCCAT
1201 CAAATTGGTG TACACTTTGA CGGTCCCGA GGCCACGGTG AAAGACAGTG GAGATTACGA
1261 ATGTGCTGCC CGCCAGGCTA CCAGGGAGGT CAAAGAAATG AAGAAAGTCA CTATTTCTGT
1321 CCATGAGAAA GGTTTCATTG AAATCAAACC CACCTTCAGC CAGTTGGAAG CTGTCAACCT

```

도면3a2

1441 CTGGCGAAAT CGCCCTGTCC ACGCGCAACG TGTCGGAGAC CCGGTATGTG TCAGAGCTGA
 1501 CACTGGTTTCG CGTGAAGGTG GCAGAGGCTG GCCACTACAC CATGCGGGCC TTCCATGAGG
 1561 ATGCTGAGGT CCAGCTCTCC TTCCAGCTAC AGATCAATGT CCCTGTCCGA GTGCTGGAGC
 1621 TAAGTGAGAG CCACCCTGAC AGTGGGGAAC AGACAGTCCG CTGTCGTGGC CGGGGCATGC
 1681 CCCAGCCGAA CATCATCTGG TCTGCCTGCA GAGACCTCAA AAGGTGTCCA CGTGAGCTGC
 1741 CGCCACGCT GCTGGGGAAC AGTTCCGAAG AGGAGAGCCA GCTGGAGACT AACGTGACGT
 1801 ACTGGGAGGA GGAGCAGGAG TTTGAGGTG TGAGCACACT GCGTCTGCAG CACGTGGATC
 1861 GGCCACTGTC GGTGCGCTGC ACGCTGCGCA ACGCTGTGGG CCAGGACACG CAGGAGGTCA
 1921 TCGTGGTGCC AACTCTCTG CCCTTTAAGG TGGTGGTGAT CTCAGCCATC CTGGCCCTGG
 1981 TGGTGCTCAC CATCATCTCC CTTATCATCC TCATCATGCT TTGGCAGAAG AAGCCACGTT
 2041 ACGAGATCCG ATGGAAGGTG ATTGAGTCTG TGAGCTCTGA CGGCCATGAG TACATCTACG
 2101 TGGACCCCAT GCAGCTGCCC TATGACTCCA CGTGGGAGCT GCCGCGGGAC CAGCTTGTGC
 2161 TGGGACGCAC CCTCGGCTCT GGGGCCTTTG GGCAGGTGGT GGAGGCCACG GCTCATGGCC
 2221 TGAGCCATTC TCAGGCCACG ATGAAAGTGG CCGTCAAGAT GCTTAAATCC ACAGCCCGCA
 2281 GCAGTGAGAA GCAAGCCCTT ATGTCGGAGC TGAAGATCAT GAGTCACCTT GGGCCCCACC
 2341 TGAACGTGGT CAACCTGTTG GGGGCCTGCA CCAAAGGAGG ACCCATCTAT ATCATCACTG
 2401 AGTACTGCCG CTACGGAGAC CTGGTGGACT ACCTGCACCG CAACAAACAC ACCTTCCTGC
 2461 AGCACCACCTC CGACAAGCGC CGCCCGCCCA GCGCGGAGCT CTACAGCAAT GCTCTGCCCCG
 2521 TTGGGCTCCC CCTGCCCAGC CATGTGTCCT TGACCGGGGA GAGCGACGGT GGCTACATGG
 2581 ACATGAGCAA GGACGAGTCG GTGGACTATG TGCCCATGCT GGACATGAAA GGAGACGTCA
 2641 AATATGCAGA CATCGAGTCC TCCAACATA TGGCCCCTTA CGATAACTAC GTTCCCTCTG
 2701 CCCCTGAGAG GACCTGCCGA GCAACTTTGA TCAACGAGTC TCCAGTGCTA AGCTACATGG
 2761 ACCTCGTGGG CTTAGCTAC CAGGTGGCCA ATGGCATGGA GTTCTGTGGC TCCAAGAACT
 2821 GCGTCCACAG AGACCTGGCG GCTAGGAACG TGCTCATCTG TGAAGGCAAG CTGGTCAAGA
 2881 TCTGTGACTT TGGCCTGGCT CGAGACATCA TCGGGGACTC GAATTACATC TCCAAAGGCA

도면3c2

1381 GCATGAAGTC AAACATTTTG TTGTAGAGGT GCGGGCCTAC CCACCTCCCA GGATATCCTG
 1441 GCTGAAAAAC AATCTGACTC TGATTGAAAA TCTCACTGAG ATCACCACCTG ATGTGGAAAA
 1501 GATTCAAGAA ATAAGGTATC GAAGCAAATT AAAGCTGATC CGTGCTAAGG AAGAAGACAG
 1561 TGGCCATTAT ACTATTGTAG CTCAAAATGA AGATGCTGTG AAGAGCTATA CTTTGAACCT
 1621 GTTAACTCAA GTTCCTTCAT CCATTCTGGA CTTGGTCGAT GATCACCATG GCTCAACTGG
 1681 GGGACAGACG GTGAGGTGCA CAGCTGAAGG CACGCCGCTT CCTGATATTG AGTGGATGAT
 1741 ATGCAAAGAT ATTAAGAAAT GTAATAATGA AACTTCCTGG ACTATTTTGG CCAACAATGT
 1801 CTCAAACATC ATCACGGAGA TCCACTCCCG AGACAGGAGT ACCGTGGAGG GCCGTGTGAC
 1861 TTTCGCCAAA GTGGAGGAGA CCATCGCCGT GCGATGCCTG GCTAAGAATC TCCTTGAGAC
 1921 TGAGAACCGA GAGCTGAAGC TGGTGGCTCC CACCTGCGT TCTGAACCTA CGGTGGCTGC
 1981 TGCAGTCCTG GTGCTGTTGG TGATTGTGAT CATCTCACTT ATTGCTCTGG TTGTCACTTG
 2041 GAAACAGAAA CCGAGGTATG AAATTCGCTG GAGGGTCATT GAATCAATCA GCCCGGATGG
 2101 ACATGAATAT ATTTATGTGG ACCCGATGCA GCTGCCTTAT GACTCAAGAT GGGAGTTTCC
 2161 AAGAGATGGA CTAGTGCTTG GTCGGGTCTT GGGGTCTGGA GCGTTTGGGA AGGTGGTTGA
 2221 AGGAACAGCC TATGGATTAA GCCGGTCCCA ACCTGTCATG AAAGTTGCAG TGAAGATGCT
 2281 AAAACCCACG GCCAGATCCA GTGAAAAACA AGCTCTCATG TCTGAACCTA AGATAATGAC
 2341 TCACCTGGGG CCACATTGTA ACATTGTAAA CTTGCTGGGA GCCTGCACCA AGTCAGGCCC
 2401 CATTACATC ATCACAGAGT ATTGCTTCTA TGGAGATTG GTCAACTATT TGCATAAGAA
 2461 TAGGGATAGC TTCCTGAGCC ACCACCCAGA GAAGCCAAAG AAAGAGCTGG ATATCTTTGG
 2521 ATTGAACCTT GCTGATGAAA GCACACGGAG CTATGTTATT TTATCTTTTG AAAACAATGG
 2581 TGAATACATG GACATGAAGC AGGCTGATAC TACACAGTAT GTCCCCATGC TAGAAAGGAA
 2641 AGAGGTTTCT AAATATTCCG ACATCCAGAG ATCACTCTAT GATCGTCCAG CCTCATATAA
 2701 GAAGAAATCT ATGTTAGACT CAGAAGTCAA AAACCTCCTT TCAGATGATA ACTCAGAAGG
 2761 CCTTACTTTA TTGGATTTGT TGAGCTTCAC CTATCAAGTT GCCCGAGGAA TGGAGTTTTT
 2821 GGCTTCAAAA AATTGTGTCC ACCGTGATCT GGCTGCTCGC AACGTCCTCC TGGCACAAGG

도면3a3

2941 GCACCTTTTT GCCTTTAAAG TGGATGGCTC CGGAGAGCAT CTTCAACAGC CTCTACACCA
 3001 CCCTGAGCGA CGTGTGGTCC TTCGGGATCC TGCTCTGGGA GATCTTCACC TTGGGTGGCA
 3061 CCCCTTACCC AGAGCTGCCC ATGAACGAGC AGTTCTACAA TGCCATCAAA CGGGGTTACC
 3121 GCATGGCCCA GCCTGCCCAT GCCTCCGAGC AGATCTATGA GATCATGCAG AAGTGCTGGG
 3181 AAGAGAAATT TGAGATTCGG CCCCCCTTCT CCCAGCTGGT GCTGCTTCTC GAGAGACTGT
 3241 TGGGCGAAGG TTACAAAAAG AAGTACCAGC AGGTGGATGA GGAGTTTCTG AGGAGTGACC
 3301 ACCCAGCCAT CCTTCGGTCC CAGGCCCGCT TGCCCTGGGT CCATGGCCTC CGATCTCCCC
 3361 TGACACCCAG CTCCGTCCTC TATACTGCCG TGCAGCCCAA TGAGGGTGAC AACGACTATA
 3421 TCATCCCCCT GCCTGACCCC AAACCCGAGG TTGCTGACGA GGGCCCACTG GAGGGTTCCC
 3481 CCAGCCTAGC CAGCTCCACC CTGAATGAAG TCAACACCTC CTCAACCATC TCCTGTGACA
 3541 GCCCCTGGA GCCCAGGAC GAACCAGAGC CAGAGCCCCA GCTTGAGCTC CAGGTGGAGC
 3601 CGGAGCCAGA GCTGGAACAG TTGCCGGATT CGGGGTGCCG TGCGCCTCGG GCGGAAGCAG
 3661 AGGATAGCTT CCTGTAGGGG GCTGGCCCTT ACCCTGCCCT GCCTGAAGCT CCCCCCTGC
 3721 CAGCACCCAG CATCTCCTGG CCTGGCCTGA CCGGGCTTCC TGTCAGCCAG GCTGCCCTTA
 3781 TCAGCTGTCC CCTTCTGGAA GCTTCTTGCT CCTGACGTGT TGTGCCCCAA ACCCTGGGGC
 3841 TGGCTTAGGA GGCAAGAAAA CTGCAGGGGC CGTGACCAGC CCTCTGCCTC CAGGGAGGCC
 3901 AACTGACTCT GAGCCAGGGT TCCCCAGGG AACTCAGTTT TCCCATATGT AAGATGGGAA
 3961 AGTTAGGCTT GATGACCCAG AATCTAGGAT TCTCTCCCTG GCTGACAGGT GGGGAGACCG
 4021 AATCCCTCCC TGGGAAGATT CTTGGAGTTA CTGAGGTGGT AAATTAACCT TTTTCTGTTC
 4081 AGCCAGCTAC CCCTCAAGGA ATCATAGCTC TCTCCTCGCA CTTTTTATCC ACCCAGGAGC
 4141 TAGGGAAGAG ACCCTAGCCT CCCTGGCTGC TGGCTGAGCT AGGGCCTAGC CTTGAGCAGT
 4201 GTTGCCTCAT CCAGAAGAAA GCCAGTCTCC TCCCTATGAT GCCAGTCCCT GCGTTCCCTG
 4261 GCCCGAGCTG GTCTGGGGCC ATTAGGCAGC CTAATTAATG CTGGAGGCTG AGCCAAGTAC
 4321 AGGACACCCC CAGCCTGCAG CCCTTGCCCA GGGCACTTGG AGCACACGCA GCCATAGCAA
 4381 GTGCCTGTGT CCCTGTCCTT CAGGCCCATC AGTCCTGGGG CTTTTTCTTT ATCACCTCA

도면3c3

2881 AAAAATTGTG AAGATCTGTG ACTTTGGCCT GGCCAGAGAC ATCATGCATG ATTCGAACTA
 2941 TGTGTCGAAA GGCAGTACCT TTCTGCCCCG GAAGTGGATG GCTCCTGAGA GCATCTTTGA
 3001 CAACCTCTAC ACCACACTGA GTGATGTCTG GTCTTATGGC ATTCTGCTCT GGGAGATCTT
 3061 TTCCCTTGGT GGCACCCCTT ACCCCGGCAT GATGGTGGAT TCTACTTTCT ACAATAAGAT
 3121 CAAGAGTGGG TACCGGATGG CCAAGCCTGA CCACGCTACC AGTGAAGTCT ACGAGATCAT
 3181 GGTGAAATGC TGGAAACAGT AGCCGGAGAA GAGACCCTCC TTTTACCACC TGAGTGAGAT
 3241 TGTGGAGAAT CTGCTGCCCTG GACAATATAA AAAGAGTTAT GAAAAAATTC ACCTGGACTT
 3301 CCTGAAGAGT GACCATCCTG CTGTGGCAGC CATGCGTGTG GACTCAGACA ATGCATACAT
 3361 TGGTGTCACC TACAAAAACG AGGAAGACAA GCTGAAGGAC TGGGAGGGTG GTCTGGATGA
 3421 GCAGAGACTG AGCGCTGACA GTGGCTACAT CATTCCTCTG CCTGACATTG ACCCTGTCCC
 3481 TGAGGAGGAG GACCTGGGCA AGAGGAACAG ACACAGCTCG CAGACCTCTG AAGAGAGTGC
 3541 CATTGAGACG GGTTCAGCA GTTCCACCTT CATCAAGAGA GAGGACGAGA CCATTGAAGA
 3601 CATCGACATG ATGGACGACA TCGGCATAGA CTCTTCAGAC CTGGTGAAG ACAGCTTCCT
 3661 GTAACTGGCG GATTGAGGG GTTCCTTCCA CTCTGGGGC CACCTCTGGA TCCCGTTCAG
 3721 AAAACCACTT TATTGCAATG CGGAGGTTGA GAGGAGGACT TGGTTGATGT TTAAGAGAA
 3781 GTTCCCAGCC AAGGGCCTCG GGGAGCGTTC TAAATATGAA TGAATGGGAT ATTTTGAAAT
 3841 GAACTTTGTC AGTGTTCCT CTCGCAATGC CTCAGTAGCA TCTCAGTGGT GTGTGAAGTT
 3901 TGGAGATAGA TGGATAAGGG AATAATAGGC CACAGAAGGT GAACTTTGTG CTTCAAGGAC
 3961 ATTGGTGAGA GTCCAACAGA CACAATTTAT ACTGCGACAG AACTTCAGCA TTGTAATTAT
 4021 GTAAATAACT CTAACCAAGG CTGTGTTTAG ATTGTATTAA CTATCTTCTT TGGACTTCTG
 4081 AAGAGACCAC TCAATCCATC CATGTACTTC CCTCTTGAAA CCTGATGTCA GCTGCTGTTG
 4141 AACTTTTTAA AGAAGTGCAT GAAAAACCAT TTTTGAACCT TAAAAGGTAC TGGTACTATA
 4201 GCATTTTGCT ATCTTTTTTA GTGTTAAGAG ATAAAGAATA ATAATTAACC AACCTTGTTT
 4261 AATAGATTTG GSTCATTAG AAGCCTGACA ACTCATTTTC ATATTGTAAT CTATGTTTAT
 4321 AATACTACTA CTGTATCAG TAATGCTAAA TGTGTAATAA TGTAACATGA TTTCCTCCA

도면3a4

4441 GTCTTAATCC ATCCACCAGA GTCTAGAAGG CCAGACGGGC CCCGCATCTG TGATGAGAAT
 4501 GTAAATGTGC CAGTGTGGAG TGGCCACGTG TGTGTGCCAG TATATGGCCC TGGCTCTGCA
 4561 TTGGACCTGC TATGAGGCTT TGGAGGAATC CCTCACCCCTC TCTGGGCCTC AGTTTCCCCT
 4621 TCAAAAAATG AATAAGTCGG ACTTATTAAC TCTGAGTGCC TTGCCAGCAC TAACATTCTA
 4681 GAGTATTCCA GGTGGTTGCA CATTGTCCA GATGAAGCAA GGCCATATAC CCTAACTTC
 4741 CATCCTGGGG GTCAGCTGGG CTCCTGGGAG ATTCCAGATC ACACATCACA CTCTGGGGAC
 4801 TCAGGAACCA TGCCCTTCC CCAGGCCCCC AGCAAGTCTC AAGAACACAG CTGCACAGGC
 4861 CTTGACTTAG AGTGACAGCC GGTGTCCTGG AAAGCCCCAA GCAGCTGCCC CAGGGACATG
 4921 GGAAGACCAC GGGACCTCTT TCACTACCCA CGATGACCTC CGGGGGTATC CTGGGCAAAA
 4981 GGGACAAAGA GGGCAAATGA GATCACCTCC TGCAGCCAC CACTCCAGCA CCTGTCCGA
 5041 GGTCTGCGTC GAAGACAGAA TGGACAGTGA GGACAGTTAT GTCTTGTAAG AGACAAGAAG
 5101 CTTGAGATGG TACCCAAGA AGGATGTGAG AGGTGGCCGC TTGGAGTTTG CCCCTCACCC
 5161 ACCAGCTGCC CCATCCCTGA GGCAGCGCTC CATGGGGTA TGGTTTGTG ACTGCCAGA
 5221 CCTAGCAGTG ACATCTCATT GTCCCAGCC CAGTGGGCAT TGGAGGTGCC AGGGGAGTCA
 5281 GGGTTGTAGC CAAGACGCCC CCGCACGGGG AGGGTTGGGA AGGGGGTGCA GGAAGCTCAA
 5341 CCCCTCTGGG CACCAACCCT GCATTGCAGG TTGGCACCTT ACTTCCCTGG GATCCCAGA
 5401 GTTGGTCCAA GGAGGGAGAG TGGGTCTCA ATACGGTACC AAAGATATAA TCACCTAGGT
 5461 TTACAAATAT TTTTAGGACT CACGTTAAC CACATTTATA CAGCAGAAAT GCTATTTTGT
 5521 ATGCTGTAA GTTTTCTAT CTGTGTACTT TTTTAAAGG GAAAGATTTT AATATTAAAC
 5581 CTGGTGCTTC TCACTCAC

도면3c4

4381 GAGAAAGCAC AATTTAAAC AATCCTTACT AAGTAGGTGA TGAGTTTGAC AGTTTTTGAC
 4441 ATTTATATTA AATAACATGT TTCTCTATAA AGTATGGTAA TAGCTTTAGT GAATTAATTT
 4501 TAGTTGAGCA TAGAGAACAA AGTAAAAGTA GTGTGTGCCA GGAAGTCAGA ATTTTAACT
 4561 GTACTGAATA GGTTCCCAA TCCATCGTAT TAAAAACAA TTAAGTCCCC TCTGAAATAA
 4621 TGGGATTAGA AACAAACAAA ACTCTTAAGT CCTAAAAGTT CTCAATGTAG AGGCATAAAC
 4681 CTGTGCTGAA CATAACTTCT CATGTATATT ACCCAATGGA AAATATAATG ATCAGCAAAA
 4741 AGACTGGATT TGCAGAAGTT TTTTTTTTTT TTCTTCATGC CTGATGAAAG CTTTGCCAAC
 4801 CCCAATATAT GTATTTTTTG AATCTATGAA CCTGAAAAGG GTCAGAAGGA TGCCAGACA
 4861 TCAGCCTCCT TCTTTCACCC CTTACCCCAA AGAGAAAGAG TTTGAAACTC GAGACCATAA
 4921 AGATATTCTT TAGTGGAGGC TGGATGTGCA TTAGCCTGGA TCCTCAGTTC TCAATGTGT
 4981 GTGGCAGCCA GGATGACTAG ATCCTGGGTT TCCATCCTTG AGATTCTGAA GTATGAAGTC
 5041 TGAGGGAAAC CAGAGTCTGT ATTTTCTTAA ACTCCCTGGC TGTCTGATC GGCCAGTTTT
 5101 CGGAAACACT GACTTAGGTT TCAGGAAGTT GCCATGGGAA ACAAATAATT TGAACCTTGG
 5161 AACAGGGTTG GAATTCACCC ACGCAGGAAG CCTACTATTT AAATCCTTGG CTTCAGGTTA
 5221 GTGACATTTA ATGCCATCTA GCTAGCAATT GCGACCTTAA TTTAACTTTC CAGTCTTAGC
 5281 TGAGGCTGAG AAAGCTAAAG TTTGGTTTTG ACAGGTTTTT CAAAAGTAAA GATGCTACTT
 5341 CCCACTGTAT GGGGAGATT GAACTTCCCT CGTCTCCCGT CTTCTGCCTC CCACTCCATA
 5401 CCCCGCCAAG GAAAGGCATG TACAAAAATT ATGCAATTCA GTGTTCCAAG TCTCTGTGTA
 5461 ACCAGCTCAG TGTGTTGGTG GAAAAACAT TTTAAGTTTT ACTGATAATT TGAGGTTAGA
 5521 TGGGAGGATG AATTGTCACA TCTATCCACA CTGTCAAACA GGTGTTGGTG GGTTCATTGG
 5581 CATTCTTTGC AATACTGCTT AATTGCTGAT ACCATATGAA TGAAACATGG GCTGTGATTA
 5641 CTGCAATCAC TGTGCTATCG GCAGATGATG CTTTGAAGA TGCAGAAGCA ATAATAAAGT
 5701 ACTTGACTAC CTAAGGCTGT AATCTCAATG CAAGCCCAA CTTTCTTATC CAACTTTTTC
 5761 ATAGTAAGTG CGAAGACTGA GCCAGATTGG CCAATTAAAA ACGAAACCT GACTAGGTTT
 5821 TGTAGAGCCA ATTAGACTTG AAATACGTTT GTGTTTCTAG AATCACAGCT CAAGCATTCT

도면3c5

5881 GTTTATCGCT CACTCTCCCT TGTACAGCCT TATTTTGTG GTGCTTTGCA TTTTGATATT
 5941 GCTGTGAGCC TTGCATGACA TCATGAGGCC GGATGAACT TCTCAGTCCA GCAGTTTCCA
 6001 GTCCTAACAA ATGCTCCAC CTGAATTTGT ATATGACTGC ATTTGTGGGT GTGTGTGTGT
 6061 TTTCAGCAA TTCCAGATTT GTTCTCTTTT GGCTCCTGC AAAGTCTCCA GAAGAAATTT
 6121 TGCCAATCTT TCCTACTTTC TATTTTATG ATGACAATCA AAGCCGCCCT GAGAAACACT
 6181 ATTTGTGACT TTTTAAACGA TTAGTGATGT CCTTAAATG TGCTCTGCCA ATCTGTACAA
 6241 AATGGTCCTA TTTTGTGAA GAGGGACATA AGATAAATG ATGTTATACA TCAATATGTA
 6301 TATATGTATT TCTATATAGA CTTGGAGAAT ACTGCCAAA CATTATGAC AAGCTGTATC
 6361 ACTGCCTTCG TTTATATTTT TTAACTGTG ATAATCCCA CAGGCACATT AACTGTTGCA
 6421 CTTTGAATG TCCAAAATTT ATATTTTAGA AATAATAAAA AGAAAGATAC TTACATGTTT
 6481 CCAAAACAAT GGTGTGGTGA ATGTGTGAGA AAACTAACT TGATAGGGTC TACCAATACA
 6541 AAATGTATTA CGAATGCCCC TGTTCATGTT TTTGTTTAA AACGTGTAAA TGAAGATCTT
 6601 TATATTTCAA TAAATGATAT ATAATTTAAA GTT

도면4a1

VEGFR-1 (Flt-1) 핵산의 서열 (젠뱅크 등록 번호 AF063657) (서열 7)

```

1 ATGGTCAGCT ACTGGGACAC CGGGGTCCTG CTGTGCGCGC TGCTCAGCTG TCTGCTTCTC
61 ACAGGATCTA GTTCAGGTTC AAAATTAAAA GATCCTGAAC TGAGTTTAAA AGGCACCCAG
121 CACATCATGC AAGCAGGCCA GACACTGCAT CTCCAATGCA GGGGGGAAGC AGCCCATAAA
181 TGGTCTTTGC CTGAAATGGT GAGTAAGGAA AGCGAAAGGC TGAGCATAAC TAAATCTGCC
241 TGTGGAAGAA ATGGCAAACA ATTCTGCAGT ACTTTAACCT TGAACACAGC TCAAGCAAAC
301 CACACTGGCT TCTACAGCTG CAAATATCTA GCTGTACCTA CTTCAAAGAA GAAGGAAACA
361 GAATCTGCAA TCTATATATT TATTAGTGAT ACAGGTAGAC CTTTCGTAGA GATGTACAGT
421 GAAATCCCGG AAATTATACA CATGACTGAA GGAAGGGAGC TCGTCATTCC CTGCCGGGTT
481 ACGTCACCTA ACATCACTGT TACTTTAAAA AAGTTCCAC TTGACACTTT GATCCCTGAT
541 GGAACACGCA TAATCTGGGA CAGTAGAAAG GGCTTCATCA TATCAAATGC AACGTACAAA
601 GAAATAGGGC TTCTGACCTG TGAAGCAACA GTCATGGGC ATTTGTATAA GACAACTAT
661 CTCACACATC GACAAACCAA TACAATCATA GATGTCCAAA TAAGCACACC ACGCCCAGTC
721 AAATTACTTA GAGGCCATAC TCTTGTCCTC AATTGTA CTACTCTCC CTGTAACACG
781 AGAGTTCAAA TGACCTGGAG TTACCTGAT GAAAAAATA AGAGAGCTTC CGTAAGGCGA
841 CGAATTGACC AAAGCAATTC CCATGCCAAC ATATTCTACA GTGTTCTTAC TATTGACAAA
901 ATGCAGAAC AAGACAAAGG ACTTTATACT TGTCGTGTAA GGAGTGGACC ATCATTCAAA
961 TCTGTTAACA CCTCAGTGCA TATATATGAT AAAGCATTCA TCACTGTGAA ACATCGAAAA
1021 CAGCAGGTG TGAACCCGT AGCTGGCAAG CGGTCTTACC GGCTCTCTAT GAAAGTGAAG
1081 GCATTTCCCT CGCCGGAAGT TGTATGGTTA AAAGATGGGT TACCTGCGAC TGAGAAATCT
1141 GCTCGCTATT TGACTCGTGG CTACTCGTTA ATTATCAAGG ACGTAACTGA AGAGGATGCA
1201 GGAATTATA CAATCTTGCT GAGCATAAAA CAGTCAAATG TGTTTAAAAA CCTCACTGCC
1261 ACTCTAATTG TCAATGTGAA ACCCCAGATT TACGAAAAGG CCGTGTATC GTTTCCAGAC
1321 CCGGCTCTCT ACCCACTGGG CAGCAGACAA ATCCTGACTT GTACCGCATA TGGTATCCCT

```

도면4c1

VEGFR-1 (KDR/Flk-1) 핵산의 서열 (생뱅크 등록 번호 AF035121) (서열 9)

```

1  ACTGAGTCCC GGGACCCCGG GAGAGCGGTC AGTGTGTGGT CGCTGCGTTT CCTCTGCCTG
61  CGCCGGGCAT CACTTGCGCG CCGCAGAAAG TCCGTCTGGC AGCCTGGATA TCCTCTCCTA
121 CCGGCACCCG CAGACGCCCC TGCAGCCGCC GGTCGGCGCC CGGGCTCCCT AGCCCTGTGC
181 GCTCAACTGT CCTGCGCTGC GGGGTGCCGC GAGTTCCACC TCCGCGCCTC CTTCTCTAGA
241 CAGGCGCTGG GAGAAAGAAC CGGCTCCCGA GTTCTGGGCA TTTCGCCCGG CTCGAGGTGC
301 AGGATGCAGA GCAAGGTGCT GCTGGCCGTC GCCCTGTGGC TCTGCGTGGA GACCCGGGCC
361 GCCTCTGTGG GTTTGCCTAG TGTTCCTCTT GATCTGCCCA GGCTCAGCAT AAAAAAGAC
421 ATACTTACAA TTAAGGCTAA TACAACTCTT CAAATTACTT GCAGGGGACA GAGGGACTTG
481 GACTGGCTTT GGGCAATAA TCAGAGTGGC AGTGAGCAAA GGGTGGAGGT GACTGAGTGC
541 AGCGATGGCC TCTTCTGTAA GACACTCACA ATTCCAAAAG TGATCGGAAA TGACACTGGA
601 GCCTACAAGT GCTTCTACCG GGAAACTGAC TTGGCCTCGG TCATTTATGT CTATGTTCAA
661 GATTACAGAT CTCCATTAT TGCTTCTGTT AGTGACCAAC ATGGAGTCGT GTACATTACT
721 GAGAACAAAA ACAAACTGT GGTGATTCCA TGTCTCGGGT CCATTTCAAA TCTCAACGTG
781 TCACTTTGTG CAAGATACCC AGAAAAGAGA TTTGTTCTCTG ATGGTAACAG AATTTCCTGG
841 GACAGCAAGA AGGGCTTTAC TATTCACGAC TACATGATCA GCTATGCTGG CATGGTCTTC
901 TGTGAAGCAA AAATTAATGA TGAAAGTTAC CAGTCTATTA TGACATAGT TGTCGTTGTA
961 GGGTATAGGA TTTATGATGT GGTTCAGAGT CCGTCTCATG GAATTGAACT ATCTGTTGGA
1021 GAAAAGCTTG TCTTAAATTG TACAGCAAGA ACTGAACTAA ATGTGGGGAT TGACTTCAAC
1081 TGGGAATACC CTTCTTCGAA GCATCAGCAT AAGAACTTG TAAACCGAGA CCTAAAAACC
1141 CAGTCTGGGA GTGAGATGAA GAAATTTTTC AGCACCTTAA CTATAGATGG TGTAACCCGG
1201 AGTGACCAAG GATTGTACAC CTGTGCAGCA TCCAGTGGGC TGATGACCAA GAAGAACAGC
1261 ACATTTGTCA GGTCCATGA AAAACCTTTT GTTGCTTTTG GAAGTGGCAT GGAATCTCTG
1321 GTGGAAGCCA CGGTGGGGGA GCGTGTGAGA ATCCCTGCGA AGTACCTTGG TTACCCACCC

```

도면4a2

1381 CAACCTACAA TCAAGTGGTT CTGGCACCCC TGTAACCATA ATCATTCCGA AGCAAGGTGT
 1441 GACTTTTGT CCAATAATGA AGAGTCCTTT ATCCTGGATG CTGACAGCAA CATGGGAAAC
 1501 AGAATTGAGA GCATCACTCA GCGCATGGCA ATAATAGAAG GAAAGAATAA GATGGCTAGC
 1561 ACCTTGGTTG TGGCTGACTC TAGAATTTCT GGAATCTACA TTTGCATAGC TTCCAATAAA
 1621 GTTGGGACTG TGGGAAGAAA CATAAGCTTT TATATCACAG ATGTGCCAAA TGGGTTTCAT
 1681 GTTAACTTGG AAAAAATGCC GACGGAAGGA GAGGACCTGA AACTGTCTTG CACAGTTAAC
 1741 AAGTTCTTAT ACAGAGACGT TACTTGGATT TTAATGCGGA CAGTTAATAA CAGAACAATG
 1801 CACTACAGTA TTAGCAAGCA AAAAATGGCC ATCACTAAGG AGCACTCCAT CACTCTTAAT
 1861 CTTACCATCA TGAATGTTTC CCTGCAAGAT TCAGGCACCT ATGCCTGCAG AGCCAGGAAT
 1921 GTATACACAG GGGGAAGAAAT CCTCCAGAAG AAAGAAATTA CAATCAGAGA TCAGGAAGCA
 1981 CCATACCTCC TGCGAACCT CAGTGATCAC ACAGTGGCCA TCAGCAGTTC CACCACTTTA
 2041 GACTGTCATG CTAATGGTGT CCCCAGCCT CAGATCACTT GGTAAAAA CAACCACAAA
 2101 ATACAACAAG AGCCTGGAAT TATTTTAGGA CCAGGAAGCA GCACGCTGTT TATTGAAAGA
 2161 GTCACAGAAG AGGATGAAG TGTCTATCAC TGCAAAGCCA CCAACCAGAA GGGCTCTGTG
 2221 GAAAGTTCAG CATACCTCAC TGTTCAAGGA ACCTCGGACA AGTCTAATCT GGAGCTGATC
 2281 ACTCTAACAT GCACCTGTGT GGCTGCGACT CTCTTCTGGC TCCTATTAAC CCTCTTTATC
 2341 CGAAAAATGA AAAGGTCTTC TTCTGAAATA AAGACTGACT ACCTATCAAT TATAATGGAC
 2401 CCAGATGAAG TTCCTTTGGA TGAGCAGTGT GAGCGGCTCC CTTATGATGC CAGCAAGTGG
 2461 GAGTTTGCCC GGGAGAGACT TAACTGGGC AAATCACTTG GAAGAGGGGC TTTTGGAATA
 2521 GTGGTTCAAG CATCAGCATT TGGCATTAAAG AAATCACCTA CGTGCCGGAC TGTGGCTGTG
 2581 AAAATGCTGA AAGAGGGGGC CACGGCCAGC GAGTACAAAG CTCTGATGAC TGAGCTAAAA
 2641 ATCTTGACCC ACATTGGCCA CCATCTGAAC GTGGTTAACC TGCTGGGAGC CTGCACCAAG
 2701 CAAGGAGGGC CTCTGATGGT GATTGTTGAA TACTGCAAAT ATGGAAATCT CTCCAACCTAC
 2761 CTCAAGAGCA AACGTGACTT ATTTTTTCTC AACAAGGATG CAGCACTACA CATGGAGCCT
 2821 AAGAAAGAAA AAATGGAGCC AGGCCTGGAA CAAGGCAAGA AACCAAGACT AGATAGCGTC

도면4c2

1381 CCAGAAATAA AATGGTATAA AAATGGAATA CCCCTTGAGT CCAATCACAC AATTAAAGCG
 1441 GGGCATGTAC TGACGATTAT GGAAGTGAGT GAAAGAGACA CAGGAAATTA CACTGTCATC
 1501 CTTACCAATC CCATTTCAAA GGAGAAGCAG AGCCATGTGG TCTCTCTGGT TGTGTATGTC
 1561 CCACCCAGAG TTGGTGAGAA ATCTCTAATC TCTCCTGTGG ATTCCTACCA GTACGGCACC
 1621 ACTCAAACGC TGACATGTAC GGTCTATGCC ATTCCTCCCC CGCATCACAT CCACTGGTAT
 1681 TGGCAGTTGG AGGAAGAGTG CGCCAACGAG CCCAGCCAAG CTGTCTCAGT GACAAACCCA
 1741 TACCCTTGTG AAGAATGGAG AAGTGTGGAG GACTTCCAGG GAGGAAATAA AATTGAAGTT
 1801 AATAAAAAATC AATTGTCTCT AATTGAAGGA AAAAACAAAA CTGTAAGTAC CCTTGTATTC
 1861 CAAGCGGCAA ATGTGTCAGC TTTGTACAAA TGTGAAGCGG TCAACAAAGT CGGGAGAGGA
 1921 GAGAGGGTGA TCTCCTTCCA CGTGACCAGG GGTCTTGAAA TTACTTTGCA ACCTGACATG
 1981 CAGCCCCTAG AGCAGGAGAG CGTGTCTTTG TGGTGCACTG CAGACAGATC TACGTTTGAG
 2041 AACCTCACAT GGTACAAGCT TGGCCACAG CCTCTGCCAA TCCATGTGGG AGAGTTGCCC
 2101 ACACCTGTTT GCAAGAACTT GGATACTCTT TGGAAATTGA ATGCCACCAT GTTCTCTAAT
 2161 AGCACAAATG ACATTTTGAT CATGGAGCTT AAGAATGCAT CCTTGCAGGA CCAAGGAGAC
 2221 TATGTCTGCC TTGCTCAAGA CAGGAAGACC AAGAAAAGAC ATTGCGTGGT CAGGCAGCTC
 2281 ACAGTCCTAG AGCGTGTGGC ACCCACGATC ACAGGAAACC TGGAGAATCA GACGACAAGT
 2341 ATTGGGGAAA GCATCGAAGT CTCATGCACG GCATCTGGGA ATCCCCCTCC ACAGATCATG
 2401 TGGTTTAAAG ATAATGAGAC CCTTGTAGAA GACTCAGGCA TTGTATTGAA GGATGGGAAC
 2461 CGGAACCTCA CTATCCGAG AGTGAGGAAG GAGGACGAAG GCCTCTACAC CTGCCAGGCA
 2521 TGCAGTGTTC TTGGCTGTGC AAAAGTGGAG GCATTTTCA TAATAGAAGG TGCCAGGAA
 2581 AAGACGAATC TGGAAATCAT TATTCTAGTA GGCACGGCGG TGATTGCCAT GTTCTTCTGG
 2641 CTACTTCTTG TCATCATCCT ACGGACCGTT AAGCGGGCCA ATGGAGGGGA ACTGAAGACA
 2701 GGCTACTTGT CCATCGTCAT GGATCCAGAT GAACTCCCAT TGGATGAACA TTGTGAACGA
 2761 CTGCCTTATG ATGCCAGCAA ATGGGAATTC CCCAGAGACC GGCTGAAGCT AGGTAAGCCT
 2821 CTTGGCCGTG GTGCCTTTGG CCAAGTGATT GAAGCAGATG CCTTGGAAT TGACAAGACA

도면4a3

2881 ACCAGCAGCG AAAGCTTTGC GAGCTCCGGC TTTCAGGAAG ATAAAAGTCT GAGTGATGTT
 2941 GAGGAAGAGG AGGATTCTGA CGGTTTCTAC AAGGAGCCCA TCACTATGGA AGATCTGATT
 3001 TCTTACAGTT TTCAGTGGC CAGAGGCATG GAGTTCCTGT CTTCCAGAAA GTGCATTGAT
 3061 CGGGACCTGG CAGCGAGAAA CATTCTTTTA TCTGAGAACA ACGTGGTGAA GATTGTGAT
 3121 TTTGGCCTTG CCCGGGATAT TTATAAGAAC CCCGATTATG TGAGAAAAGG AGATACTCGA
 3181 CTTCTCTGA AATGGATGGC TCCTGAATCT ATCTTTGACA AAATCTACAG CACCAAGAGC
 3241 GACGTGTGGT CTTACGGAGT ATTGCTGTGG GAAATCTTCT CCTTAGGTGG GTCTCCATAC
 3301 CCAGGAGTAC AAATGGATGA GGACTTTTGC AGTCGCCTGA GGAAGGCAT GAGGATGAGA
 3361 GCTCCTGAGT ACTCTACTCC TGAAATCTAT CAGATCATGC TGGACTGCTG GCACAGAGAC
 3421 CCAAAAGAAA GGCCAAGATT TGCAGAACTT GTGGAAAAAC TAGGTGATTT GCTTCAAGCA
 3481 AATGTACAAC AGGATGGTAA AGACTACATC CCAATCAATG CCATACTGAC AGGAAATAGT
 3541 GGGTTTACAT ACTCAACTCC TGCTTCTCT GAGGACTTCT TCAAGGAAAG TATTTAGCT
 3601 CCGAAGTTTA ATTCAGGAAG CTCTGATGAT GTCAGATATG TAAATGCTTT CAAGTTCATG
 3661 AGCCTGGAAA GAATCAAAAC CTTGAAGAA CTTTACCAG ATGCCACCTC CATGTTTGAT
 3721 GACTACCAGG GCGACAGCAG CACTCTGTTG GCCTCTCCCA TGCTGAAGCG CTTACCTGG
 3781 ACTGACAGCA AACCCAAGGC CTCGCTCAAG ATTGACTTGA GAGTAACCAG TAAAAGTAAG
 3841 GAGTCGGGGC TGTCTGATGT CAGCAGGCC AGTTTCTGCC ATTCCAGCTG TGGGCACGTC
 3901 AGCGAAGGCA AGCGCAGGTT CACCTACGAC CACGCTGAGC TGGAAAGGAA AATCGCGTGC
 3961 TGCTCCCCGC CCCAGACTA CAACTCGGTG GTCCTGTACT CCACCCACC CATCTAG

도면4c3

2881 GCAACTTGCA GGACAGTAGC AGTCAAAATG TTGAAAGAAG GAGCAACACA CAGTGAGCAT
 2941 CGAGCTCTCA TGTCTGAACT CAAGATCCTC ATTCATATTG GTCACCATCT CAATGTGGTC
 3001 AACCTTCTAG GTGCCTGTAC CAAGCCAGGA GGGCCACTCA TGGTGATTGT GGAATTCTGC
 3061 AAATTTGGAA ACCTGTCCAC TTACCTGAGG AGCAAGAGAA ATGAATTTGT CCCCTACAAG
 3121 ACCAAAGGGG CACGATTCCG TCAAGGGAAA GACTACGTTG GAGCAATCCC TGTGGATCTG
 3181 AAACGGCGCT TGGACAGCAT CACCAGTAGC CAGAGCTCAG CCAGCTCTGG ATTTGTGGAG
 3241 GAGAAGTCCC TCAGTGATGT AGAAGAAGAG GAAGCTCCTG AAGATCTGTA TAAGGACTTC
 3301 CTGACCTTGG AGCATCTCAT CTGTTACAGC TTCCAAGTGG CTAAGGGCAT GGAGTTCTTG
 3361 GCATCGCGAA AGTGTATCCA CAGGGACCTG GCGGCACGAA ATATCCTCTT ATCGGAGAAG
 3421 AACGTGGTTA AAATCTGTGA CTTTGGCTTG GCCCGGATA TTTATAAAGA TCCAGATTAT
 3481 GTCAGAAAAG GAGATGCTCG CCTCCCTTTG AAATGGATGG CCCCAGAAAC AATTTTGGAC
 3541 AGAGTGATCA CAATCCAGAG TGACGTCTGG TCTTTTGGTG TTTTGCTGTG GGAAATATTT
 3601 TCCTTAGGTG CTTCTCCATA TCCTGGGGTA AAGATTGATG AAGAATTTTG TAGGCGATTG
 3661 AAAGAAGGAA CTAGAATGAG GGCCCTGAT TATACTACAC CAGAAATGTA CCAGACCATG
 3721 CTGGACTGCT GGCACGGGGA GCCCAGTCAG AGACCCACGT TTTCAGAGTT GGTGGAACAT
 3781 TTGGGAAATC TCTTGCAAGC TAATGCTCAG CAGGATGGCA AAGACTACAT TGTCTTCCG
 3841 ATATCAGAGA CTTTGAGCAT GGAAGAGGAT TCTGGACTCT CTCTGCCTAC CTCACCTGTT
 3901 TCCTGTATGG AGGAGGAGGA AGTATGTGAC CCCAAATTC ATTATGACAA CACAGCAGGA
 3961 ATCAGTCAGT ATCTGCAGAA CAGTAAGCGA AAGAGCCGGC CTGTGAGTGT AAAACATTT
 4021 GAAGATATCC CGTTAGAAGA ACCAGAAGTA AAAGTAATCC CAGATGACAA CCAGACGGAC
 4081 AGTGGTATGG TTCTTGCCTC AGAAGAGCTG AAAACTTTGG AAGACAGAAC CAAATTATCT
 4141 CCATCTTTTG GTGGAATGGT GCCCAGCAAA AGCAGGGAGT CTGTGGCATC TGAAGGCTCA
 4201 AACCAGACAA GCGGCTACCA GTCCGGATAT CACTCCGATG ACACAGACAC CACCGTGATC
 4261 TCCAGTGAGG AAGCAGAACT TTAAAGCTG ATAGAGATTG GAGTGCAAAC CGGTAGCACA
 4321 GCCCAGATTC TCCAGCCTGA CTCGGGGACC AACTGAGCT CTCCTCCTGT TTAAGGAA

도면4c4

4381 GCATCCACAC CCCAACTCCC GGACATCACA TGAGAGGTCT GCTCAGATTT TGAAGTGTG
 4441 TTCTTTCCAC CAGCAGGAAG TAGCCGCATT TGATTTTCAT TTCGACAACA GAAAAAGGAC
 4501 CTCGGACTGC AGGGAGCCAG TCTTCTAGGC ATATCCTGGA AGAGGCTTGT GACCCAAGAA
 4561 TGTGCTGTG TCTTCTCCCA GTGTTGACCT GATCCTCTTT TTTCATTCAT TTA AAAAGCA
 4621 TTATCATGCC CCTGCTGCGG GTCTCACCAT GGGTTTAGAA CAAAGAGCTT CAAGCAATGG
 4681 CCCCATCCTC AAAGAAGTAG CAGTACCTGG GGAGCTGACA CTTCTGTAAA ACTAGAAGAT
 4741 AAACCAGGCA ACGTAAGTGT TCGAGGTGTT GAAGATGGGA AGGATTGCA GGGCTGAGTC
 4801 TATCCAAGAG GCTTTGTTTA GGACGTGGGT CCCAAGCCAA GCCTTAAGTG TGGAATTCGG
 4861 ATTGATAGAA AGGAAGACTA ACGTTACCTT GCTTTGGAGA GTACTGGAGC CTGCAAAATGC
 4921 ATTGTGTTTG CTCTGGTGA GGTGGGCATG GGGTCTGTTC TGAATGTAA AGGGTTCAGA
 4981 CGGGGTTTCT GGTTTTAGAA GGTTCGCTGT TCTTCGAGTT GGGCTAAAGT AGAGTTCGTT
 5041 GTGCTGTTTC TGACTCCTAA TGAGAGTTCC TTCCAGACCG TTAGCTGTCT CCTTGCCAAG
 5101 CCCCAGGAAG AAAATGATGC AGCTCTGGCT CTTGTCTCC CAGGCTGATC CTTTATTCAG
 5161 AATACCACAA AGAAAGGACA TTCAGCTCAA GGCTCCCTGC CGTGTGAAG AGTTCGACT
 5221 GCACAAACCA GCTTCTGTT TCTTCTGGAA TGAATACCT CATATCTGTC CTGATGTGAT
 5281 ATGTCTGAGA CTGAATGCGG GAGGTTCAAT GTGAAGCTGT GTGTGGTGTC AAAGTTTCAG
 5341 GAAGGATTTT ACCCTTTTGT TCTTCCCCT GTCCCCAACC CACTCTCACC CCGCAACCCA
 5401 TCAGTATTTT AGTTATTTGG CCTCTACTCC AGTAAACCTG ATTGGGTTTG TTCACTCTCT
 5461 GAATGATTAT TAGCCAGACT TCAAAATTAT TTTATAGCCC AAATTATAAC ATCTATTGTA
 5521 TTATTAGAC TTTTAACATA TAGAGCTATT TCTACTGATT TTGCCCCTTG TTCTGTCTCT
 5581 TTTTCAAAA AAGAAAATGT GTTTTGTGTT TGGTACCATA GTGTGAAATG CTGGGAACAA
 5641 TGA CTATAAG ACATGCTATG GCACATATAT TTATAGTCTG TTTATGTAGA AACAAATGTA
 5701 ATATATTAAA GCCTTATATA TAATGAACCT TGTACTATTC ACATTTTGTA TCAGTATTAT
 5761 GTAGCATAAC AAAGTCATA ATGCTTTCAG CAATTGATGT CATTTTATTA AAGAACATTG
 5821 AAAA ACTTGA

서열목록

<110> EYETECH PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMBINATION THERAPY FOR THE TREATMENT OF OCULAR
 NEOVASCULAR DISORDERS

<130> EYE-013PCT

<140> PCT/US04/027612

<141> 2004-08-26

<150> 60/556,837

<151> 2004-03-26

<150> 60/498,407

<151> 2003-08-27

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 2137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ccctgctgc ctccctgccc acccgcagcc tccccctgtg cctccctagg gctccccctcc 60
ggccgcccagc gcccattttt cattccctag atagagatac tttgcgcgca cacacataca 120
tacgcgcgca aaaaggaaaa aaaaaaaaaa aagcccaccc tccagcctcg ctgcaaagag 180
aaaaccggag cagccgcagc tcgcagctcg cagcccgcag cccgcagagg acgcccagag 240
cggcgagcgg gcgggcagac ggaccgcagg actcgcgcgc cgtccacctg tcggccgggc 300
ccagccgagc gcgcagcggg cagccgcgcg gcgcggagca gccgtgcccg ccgcccgggc 360
ccgccgccag ggcgcacacg ctcccgcgcc cctaccgcgc ccgggcggga gtttgcacct 420

ctccctgccc ggggtgctga gctgccgttg caaagccaac tttggaaaaa gttttttggg 480
ggagacttgg gccttgaggt gccagctcc gcgctttccg attttggggg cctttccaga 540
aaatgttgca aaaaagctaa gccggcgggc agaggaaaaa gcctgtagcc ggcgagtga 600
gacgaacat cgactgccgt gtctcttttc ctcttgaggg ttggagtccc ctgggcgccc 660
ccacacggct agacgcctcg gctggttcgc gacgcagccc cccggccctg gatgctgcac 720
tcgggctcgg gatccgcccc ggtagcggcc tcggaccag gtctctgcgc caggtcctcc 780
cctgcccccc agcgacggag ccggggccgg gggcggcggc gccgggggca tgcgggtgag 840

ccgcggctgc agaggcctga gcgcctgat gccgcggacc cgagccgagc ccacccccct 900
ccccagcccc ccacctggc cgcgggggcg gcgcgctga tctacgcgtt cggggccccc 960
cggggccggg ccgggagtc gcatgaatcg ctgctgggcg ctcttctgt ctctctgctg 1020
ctacctgcgt ctggtcagcg ccgaggggga cccattccc gaggagcttt atgagatgct 1080
gagtgaccac tcgatccgt cctttgatga tctccaacgc ctgctgcacg gagaccccg 1140
agaggaagat ggggcagat tggacctgaa catgaccgcg tcccactctg gaggcgagct 1200
ggagagcttg gctcgtggaa gaaggagcct gggttccctg accattgctg agccggccat 1260

gatcgccgag tgcaagacgc gcaccgaggt gttcgagatc tcccggcgcc tcatagaccg 1320
caccaacgcc aacttctgg tgtggccgcc ctgtgtggag gtgcagcgt gctccggctg 1380
ctgcaacaac cgcaacgtgc agtggcgccc caccaggtg cagctgcgac ctgtccaggt 1440
gagaaagatc gagattgtgc ggaagaagcc aatctttaag aaggccacgg tgacgtgga 1500
agaccacctg gcatgcaagt gtgagacagt ggcagctgca cggcctgtga cccgaagccc 1560
gggggggttc caggagcagc gagccaaaac gcccctaaact cgggtgacca ttcggacggt 1620
gcgagtcgc cgcccccca agggcaagca ccggaattc aagcacacgc atgacaagac 1680

ggcactgaag gagacccttg gagcctaggg gcatcggcag gagagtgtgt gggcagggtt 1740
atttaatatg gtatttgctg tattgcccc atggggcctt ggagtagata atattgttc 1800
cctcgtccgt ctgtctgat gcctgattcg gacggccaat ggtgcctccc ccacccctcc 1860
acgtgtccgt ccacccctcc atcagcgggt ctctctccag cggcctccgg ctcttgccc 1920
gcagctcaag aagaaaaaga aggactgaac tccatcgcca tcttcttccc ttaactccaa 1980
gaacttggga taagagtgtg agagagactg atggggtcgc tctttggggg aaacgggttc 2040
cttccctgc acctggcctg ggccacacct gagcgtgtg gactgtctg aggagccctg 2100

```

aggacctctc agcatagcct gcctgatecc tgaaccc

2137

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Asn	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Cys	Cys	Tyr	Leu	Arg
1				5					10					15	

Leu	Val	Ser	Ala	Glu	Gly	Asp	Pro	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Tyr	Glu	Met
			20					25						30	

Leu	Ser	Asp	His	Ser	Ile	Arg	Ser	Phe	Asp	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu
		35						40					45		

His	Gly	Asp	Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu	Asn	Met
	50					55						60			

Thr	Arg	Ser	His	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Arg
65					70					75					80

Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Ile	Ala	Glu	Pro	Ala	Met	Ile	Ala	Glu
			85						90					95	

Cys	Lys	Thr	Arg	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Ile	Ser	Arg	Arg	Leu	Ile	Asp
		100						105						110	

Arg	Thr	Asn	Ala	Asn	Phe	Leu	Val	Trp	Pro	Pro	Cys	Val	Glu	Val	Gln
		115					120					125			

Arg	Cys	Ser	Gly	Cys	Cys	Asn	Asn	Arg	Asn	Val	Gln	Cys	Arg	Pro	Thr
	130					135						140			

Gln	Val	Gln	Leu	Arg	Pro	Val	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Glu	Ile	Val	Arg
145					150					155					160

Lys	Lys	Pro	Ile	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	His	Leu
				165					170					175	

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
180 185 190

Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
195 200 205

Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
210 215 220

Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
225 230 235 240

Ala

<210> 3
<211> 1723
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
tcgcggaggc ttggggcagc cgggtagctc ggaggtcgtg gcgctggggg ctagcaccag 60
cgctctgtcg ggaggcgag cggtaggtg gaccggtcag cggactcacc ggccagggcg 120
ctcgggtctg gaatttgata ttcattgatc cgggttttat cctcttctt tttcttaaa 180
cattttttt taaaactgta ttgtttctcg ttttaattta tttttgcttg ccattccca 240
cttgaatcgg gccgacggct tggggagatt gctctacttc cccaaatcac tgttgatttt 300
ggaaaccagc agaaagagga aagaggtagc aagagctcca gagagaagtc gaggaagaga 360
gagacggggt cagagagagc gcgcggggtg gcgagcagcg aaagcgacag gggcaaagtg 420

agtacactgc ttttgggggt gaccgccgga gcgcggcgtg agccctcccc ctgtggatcc 480
cgcagctgac cagtgcgct gacggacaga cagacagaca ccgccccag cccagctac 540
cacctctcc ccggccggcg gcggacagtg gacgcggcgg cgagccggcg gcaggggccg 600
gagcccgcg ccggaggcgg ggtggagggg gtccgggctc gcggcgctgc actgaaactt 660
ttcgtccaac ttctgggctg ttctcgcttc ggaggagccg tggctcgcgc gggggaagcc 720
gagccgagcg gagccgcgag aagtctagc tcgggcccgg aggagccgca gccggaggag 780
ggggaggagg aagaagagaa ggaagaggag agggggccgc agtggcgact cggcgctcgg 840

aagccgggct catggacggg tgaggcggcg gtgtgcgcag acagtgtcc agccgcgcgc 900
gtccccagg ccttggcccg ggcctcgggc cggggaggaa gtagtctcg ccgagcgcc 960
gaggagagcg ggcgccccca cagcccgagc cggagaggga gcgcgagccg cgccggcccc 1020
ggtcgggcct ccgaaacct gaactttctg ctgtcttggg tgcatgtgag ccttgccttg 1080
ctgtctacc tccacctgc caagtgttc caggtgcac ccatggcaga aggaggaggg 1140
cagaatcatc acgaagtgtt gaagtctat gatgtctatc agcgagcta ctgcatcca 1200
atcgagacc tggtggacat ctccaggag taccctgatg agatcgagta catcttcaag 1260

ccatctgtg tgccctgat gcgatcggg ggctgtgca atgacgagg cctggagtgt 1320
gtgccactg aggagtcaa catccatg cagattatgc ggaatcaaacc tcaccaagc 1380
cagcatag gagagatgag ctctctacag cacaacaaat gtgaatgcag accaaagaaa 1440
gatagagcaa gacaagaaaa aaaatcagtt cgaggaaagg gaaaggggca aaaacgaaag 1500
cgcaagaaat cccggtataa gtctggagc gttccctgtg ggccttgctc agagcggaga 1560

aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg tgtaaattgtt cctgcaaaaa cacagactcg 1620
 cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg 1680
 cggtgagccg ggcaggagga aggagcctcc ctcagggttt cgg 1723

<210> 4
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
 130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His

165

170

175

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
180 185 190

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
195 200 205

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
210 215

<210> 5

<211> 5598

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggccccctcag cctgtctgcc cagcacgagc ctgtgctcgc cctgcccac gcagacagcc 60
agaccaggcg cgccccctct ggcggtctctg ctctctccga aggatgcttg gggagtgagg 120
cgaagctggg cgctctctc cctacagca gcccccttc tccatccctc tgttctcttg 180
agccttcagg agcctgcacc agtctgcct gtcttctac tcagctgtta cccactctgg 240
gaccagcagt ctttctgata actgggagag ggcagtaagg aggacttcct ggaggggggtg 300
actgtccaga gcttggaaact gtgccacac cagaagccat cagcagcaag gacaccatgc 360
ggcttccggg tgcgatgcca gctctggccc tcaaaggcga gctgctgttg ctgtctctcc 420

tgttacttct ggaaccacag atctctcagg gcttggctgt cacacccccg gggccagagc 480
ttgtctctcaa tgtctccagc accttcgttc tgacctgctc gggttcagct ccggtggtgt 540
gggaacggat gtcccaggag cccccacagg aaatggccaa ggcccaggat ggcaaccttct 600
ccagcgtgct cacactgacc aacctcactg ggctagacac gggagaatac ttttgcaccc 660
acaatgactc ccgtggactg gagaccgatg agcggaaacg gctctacatc tttgtgccag 720
atccccccgt gggcttctct cctaataatg ccgaggaact attcatcttt ctacaggaag 780
taactgagat caccattcca tgccgagtaa cagaccaca gctggtggtg acactgcacg 840

agaagaaagg ggacgttgca ctgctgttcc cctatgatca ccaacgtggc ttttctggtg 900
tctttgagga cagaagctac atctgcaaaa ccaccattgg ggacaggagg gtggattctg 960
atgctacta tgtctacaga ctccagggtg catccatcaa cgtctctgtg aacgcagtgc 1020
agactgtggt ccgccagggt gagaacatca cctcatgtg cattgtgatc gggaatgagg 1080
tggatcaact cgagtggaca taccctcgca aagaaagtgg gcggtggtg gagccggtga 1140
ctgacttctt cttggatatg ccttaccaca tccgtccat cctgcacatc cccagtgcgc 1200
agttagaaga ctcggggacc tacacctgca atgtgacgga gagtgtgaat gaccatcagg 1260

atgaaaaggc catcaacatc accgtggttg agagcggtc cgtgcggctc ctgggagagg 1320
tgggcacact acaatttctg gagctgcac ggagccggac actgcaggta gtgttcgagg 1380
cctaccacac gccactgtc ctgtggttca aagacaaccg caccctgggc gactccagcg 1440
ctggcgaaat cgcctgtcc acgcgaacg tgtcgagac ccggtatgtg tcagagctga 1500
cactggttcg cgtgaagggt gcagaggctg gccactacac catgcgggcc ttccatgagg 1560
atgctgaggt ccagctctcc ttccagctac agatcaatgt cctgtccga gtgctggagc 1620
taagtgagag ccacctgac agtggggaac agacagtccg ctgtcgtggc cggggcatgc 1680

cccagccgaa catcatctgg tctgctgca gagacctcaa aagggtgtcca cgtgagctgc 1740
cgccacgct gctggggaac agttccgaag aggagagcca gctggagact aacgtgacgt 1800

actgggagga ggagcaggag tttaggtgg ttagcacact gcgtctgcag cacgtggatc 1860
ggccactgtc ggtgcgtctc acgtctgcga acgtctggg ccaggacacg caggaggtca 1920
tcgtggtgcc acactccttg ccctttaagg tggtagtgat ctacgccatc ctggccctgg 1980
tggtagctac catcatctcc cttatcatcc tcatcatgct ttggcagaag aagccacgtt 2040
acgagatccg atggaagggtg attgagttctg ttagctctga cggccatgag tacatctacg 2100

tggaccccat gcagctgccc tatgactcca cgtgggagct gccgcgggac cagcttgtgc 2160
tgggacgcac cctcggctct ggggcctttg ggcaggtggt ggaggccacg gctcatggcc 2220
tgagccattc tcaggccacg atgaaagtgg ccgtcaagat gcttaaatcc acagcccga 2280
gcagtgagaa gcaagccctt atgtcggagc tgaagatcat gattcacctt gggccccacc 2340
tgaacgtggt caacctgttg ggggcctgca ccaaaggagg acccatctat atcatcactg 2400
agtactgccg ctacggagac ctggtggact acctgcaccg caacaacac accttcctgc 2460
agcaccactc cgacaagcgc cgcccgcga gcgcggagct ctacagcaat gctctgcccg 2520

ttgggtctcc cctgcccagc catgtgtcct tgaccgggga gagcgacgtt ggctacatgg 2580
acatgagcaa ggacgagtcg gtggactatg tgcccatgct ggacatgaaa ggagacgtca 2640
aatatgcaga catcgagtc tccaactaca tggcccttta cgataactac gttccctctg 2700
ccctgagag gacctgccga gcaactttga tcaacgagtc tccagtgtca agctacatgg 2760
acctcgtggg cttcagctac caggtggcca atggcatgga gtttctggcc tccaagaact 2820
gcgtccacag agacctggcg gctaggaacg tgctcatctg tgaaggcaag ctggtcaaga 2880
tctgtgactt tggcctggct cgagacatca tgcgggactc gaattacatc tccaaaggca 2940

gcaccttttt gcctttaaag tggatggctc cggagagcat cttcaacagc ctctacacca 3000
ccctgagcga cgtgtgttcc ttcgggatcc tgctctggga gatcttcacc ttgggtggca 3060
ccccttacc agagctgccc atgaacgagc agttctacaa tgccatcaa cgggggtacc 3120
gcatggccca gctgcccatt gctccgacg agatctatga gatcatgcag aagtgtctgg 3180
aagagaagtt tgagattcgg ccccccttct ccagctggt gctgtctctc gagagactgt 3240
tggcggaagg ttacaaaag aagtaccagc aggtggatga ggagtttctg aggagtacc 3300
accagccat ccttcggtcc caggcccgtc tgcttgggtt ccatggcctc cgatctcccc 3360

tggacaccag ctccgtctc tatactgccg tgcagcccaa tgagggtgac aacgactata 3420
tcatccccct gctgacccc aaaccgagg ttgctgacga gggccactg gaggttccc 3480
ccagcctagc cagctccacc ctgaatgaag tcaacacctc ctcaaccatc tctgtgaca 3540
gccccctgga gcccagac gaaccagagc cagagccca gcttgagctc caggtggagc 3600
cggagccaga gctggaacg ttgccgatt cggggtgccc tgcgcctcgg gcggaagcag 3660
aggatagctt cctgtagggg gctggccctt acctgcctt gctgaagct cccccctgc 3720
cagcaccag catctcttgg cctggcctga ccgggcttc tgtcagccag gctgccccta 3780

tcagctgtcc cttctggaa gctttctgct cctgacgtgt tgtgccccaa accctggggc 3840
tggcttagga ggcaagaaaa ctgcaggggc cgtgaccagc cctctgcctc cagggaggcc 3900
aactgactct gagccagggt tccccagggt aactcagttt tcccatatgt aagatgggaa 3960
agtttagctt gatgaccag aatctaggat tctctcctg gctgacaggt ggggagaccg 4020
aatccctccc tgggaagatt cttggagtta ctgaggtggt aaattaactt tttctgttc 4080
agccagctac cctcaagga atcatagctc tctcctcga cttttatcc acccaggagc 4140
tagggaagag accctagcct ccctggctgc tggctgagct agggcctagc cttgagcagt 4200

gttgctcat ccagaagaaa gccagtctcc tcctatgat gccagtcct gcgttcctg 4260
gcccagctg gtctggggcc attaggcagc ctaattaatg ctggaggctg agccaagtac 4320
aggacacccc cagcctgcag cccttgccca gggcacttgg agcacacga gccatagcaa 4380
gtgcctgtgt cctgtctctt caggcccatc agtcctgggg cttttcttt atcacctca 4440
gtcttaatcc atccaccaga gtctagaagg ccagacgggc cccgcatctg tgatgagaat 4500
gtaaatgtgc cagtgtggag tggccacgtg tgtgtgccag tatatggccc tggctctgca 4560
ttggacctgc tatgaggctt tggaggaatc cctcacctc tctgggcctc agtttccct 4620

tcaaaaaatg aataagtcgg acttattaac tctgagtgc ttgccagcac taacattcta 4680
gagtattcca ggtggttgca catttgctca gatgaagcaa ggccatatac cctaaacttc 4740
catcctgggg gtcagctggg ctctggggag attccagatc acacatcaca ctctggggac 4800

tcaggaacca tgcccttcc ccaggccccc agcaagtctc aagaacacag ctgcacaggc 4860
 cttagacttag agtgacagcc ggtgtcctgg aaagcccca gcagctgccc caggacatg 4920
 ggaagaccac gggacctctt tcaactacca cgatgacctc cgggggtatc ctgggcaaaa 4980
 gggacaaaga gggcaaatga gatcacctcc tgcagccac cactccagca cctgtgccga 5040

ggtctgcgtc gaagacagaa tggacagtga ggacagttat gtcttgtaaa agacaagaag 5100
 cttcagatgg taccccaaga aggatgtgag aggtggccgc ttggagtttg cccctcacc 5160
 accagctgcc ccattccctga ggcagcgtc catgggggta tggttttgtc actgcccaga 5220
 cctagcagt acatctcatt gtccccagcc cagtgggcat tggaggtgcc aggggagtca 5280
 gggttgtagc caagacgccc ccgcacgggg agggttggga agggggtgca ggaagctcaa 5340
 cccctctggg caccaaccct gcattgcagg ttggcacctt acttccctgg gatccccaga 5400
 gtgtgtccaa ggaggagag tgggttctca atacggtacc aaagatataa tcacctagt 5460

ttacaaatat ttttaggact caggttaact cacatttata cagcagaaat gctattttgt 5520
 atgtgttaa gtttttctat ctgtgtactt tttttaagg gaaagatttt aatattaaac 5580
 ctggtgcttc tcaactac 5598

<210> 6
 <211> 1106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
 20 25 30

Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
 35 40 45

Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 50 55 60

Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
 65 70 75 80

Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 85 90 95

Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
 100 105 110

Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu

115	120	125
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu		
130	135	140
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu		
145	150	155
		160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln		
	165	170
		175
Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr		
	180	185
		190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg		
	195	200
		205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val		
	210	215
		220
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn		
225	230	235
		240
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg		
	245	250
		255
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile		
	260	265
		270
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr		
	275	280
		285
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys		
	290	295
		300
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly		
305	310	315
		320
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu		
	325	330
		335

Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
340 345 350

Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
355 360 365

Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
370 375 380

Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
385 390 395 400

Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
405 410 415

Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
420 425 430

Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
435 440 445

Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
450 455 460

Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
465 470 475 480

Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
485 490 495

Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
500 505 510

Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
515 520 525

Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu
530 535 540

Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro
545 550 555 560

Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Lys Val Ile Glu Ser Val Ser Ser Asp Gly
565 570 575

His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Thr
580 585 590

Trp Glu Leu Pro Arg Asp Gln Leu Val Leu Gly Arg Thr Leu Gly Ser
595 600 605

Gly Ala Phe Gly Gln Val Val Glu Ala Thr Ala His Gly Leu Ser His
610 615 620

Ser Gln Ala Thr Met Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala
625 630 635 640

Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser
645 650 655

His Leu Gly Pro His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr
660 665 670

Lys Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ile Thr Glu Tyr Cys Arg Tyr Gly Asp
675 680 685

Leu Val Asp Tyr Leu His Arg Asn Lys His Thr Phe Leu Gln His His
690 695 700

Ser Asp Lys Arg Arg Pro Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ser Asn Ala Leu
705 710 715 720

Pro Val Gly Leu Pro Leu Pro Ser His Val Ser Leu Thr Gly Glu Ser
725 730 735

Asp Gly Gly Tyr Met Asp Met Ser Lys Asp Glu Ser Val Asp Tyr Val
740 745 750

Pro Met Leu Asp Met Lys Gly Asp Val Lys Tyr Ala Asp Ile Glu Ser
755 760 765

Ser Asn Tyr Met Ala Pro Tyr Asp Asn Tyr Val Pro Ser Ala Pro Glu

770

775

780

Arg Thr Cys Arg Ala Thr Leu Ile Asn Glu Ser Pro Val Leu Ser Tyr
785 790 795 800

Met Asp Leu Val Gly Phe Ser Tyr Gln Val Ala Asn Gly Met Glu Phe
805 810 815

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
820 825 830

Leu Ile Cys Glu Gly Lys Leu Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala
835 840 845

Arg Asp Ile Met Arg Asp Ser Asn Tyr Ile Ser Lys Gly Ser Thr Phe
850 855 860

Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Ser Leu Tyr
865 870 875 880

Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
885 890 895

Phe Thr Leu Gly Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Leu Pro Met Asn Glu Gln
900 905 910

Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Arg Gly Tyr Arg Met Ala Gln Pro Ala His
915 920 925

Ala Ser Asp Glu Ile Tyr Glu Ile Met Gln Lys Cys Trp Glu Glu Lys
930 935 940

Phe Glu Ile Arg Pro Pro Phe Ser Gln Leu Val Leu Leu Leu Glu Arg
945 950 955 960

Leu Leu Gly Glu Gly Tyr Lys Lys Lys Tyr Gln Gln Val Asp Glu Glu
965 970 975

Phe Leu Arg Ser Asp His Pro Ala Ile Leu Arg Ser Gln Ala Arg Leu
980 985 990

Pro Gly Phe His Gly Leu Arg Ser Pro Leu Asp Thr Ser Ser Val Leu
995 1000 1005

Tyr Thr Ala Val Gln Pro Asn Glu Gly Asp Asn Asp Tyr Ile Ile Pro
1010 1015 1020

Leu Pro Asp Pro Lys Pro Glu Val Ala Asp Glu Gly Pro Leu Glu Gly
1025 1030 1035 1040

Ser Pro Ser Leu Ala Ser Ser Thr Leu Asn Glu Val Asn Thr Ser Ser
1045 1050 1055

Thr Ile Ser Cys Asp Ser Pro Leu Glu Pro Gln Asp Glu Pro Glu Pro
1060 1065 1070

Glu Pro Gln Leu Glu Leu Gln Val Glu Pro Glu Pro Glu Leu Glu Gln
1075 1080 1085

Leu Pro Asp Ser Gly Cys Pro Ala Pro Arg Ala Glu Ala Glu Asp Ser
1090 1095 1100

Phe Leu
1105

<210> 7
<211> 4017
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttcaggttc aaaattaaaa gatcctgaac tgagtttaaa aggcacccag 120
cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaagc agcccataaa 180
tggtctttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcgaaaggc tgagcataac taaatctgcc 240
tgtggaagaa atggcaaaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac 300
cacttggtct tctacagctg caaatatcta gctgtacctt cttcaaagaa gaaggaaaca 360
gaatctgcaa tctatatatt tattagtgat acaggtagac ctttcgtaga gatgtacagt 420

gaaatccccg aaattatata catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgccgggtt 480
acgtcaccta acatcactgt tactttaaaa aagtttccac ttgacacttt gatccctgat 540
ggaaaacgca taatctggga cagtagaaaag ggcttcatca tatcaaagc aacgtacaaa 600
gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgtataa gacaaactat 660
ctcacacatc gacaaaccaa tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgcccagtc 720
aaattactta gaggccatac tcttgctctc aattgtactg ctaccactcc cttgaacacg 780
agagttcaaa tgacctggag ttacctgat gaaaaaata agagagcttc cgtaaggcga 840

cgaattgacc aaagcaattc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa 900
 atgcagaaca aagacaaagg actttatact tctcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa 960
 tctgttaaca cctcagtga tataatatgat aaagcattca tctactgtgaa acatcgaaaa 1020
 cagcagggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggctcttacc ggctctctat gaaagtgaag 1080
 gcattttccct cgccggaagt tgtatgggta aaagatgggt tacctgcgac tgagaaatct 1140
 gctcgcctatt tgactcgtgg ctactcgtta attatcaagg acgtaactga agaggatgca 1200
 gggaattata caatcttgct gagcataaaa cagtcaaatg tgtttaaaaa cctcactgcc 1260

 actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcatc gtttccagac 1320
 ccggctctct acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgcata tggatatccct 1380
 caacctacaa tcaagtgggt ctggcacccc tgtaaccata atcatccga agcaagggtg 1440
 gacttttgtt ccaataatga agagtccttt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac 1500
 agaattgaga gcatcactca gcgcattggca ataataagaag gaaagaataa gatggctagc 1560
 accttgggtt tggtcactc tagaatttct ggaatctaca tttgcatagc ttccaataaa 1620
 gtgggactg tgggaagaaa cataagcttt tatatcacag atgtgccaaa tgggtttcat 1680

 gttaacttgg aaaaaatgcc gacggaagga gaggacctga aactgtcttg cacagttaac 1740
 aagttcttat acagagacgt tacttggatt ttactgcgga cagttaataa cagaacaatg 1800
 cactacagta ttagcaagca aaaaatggcc atcactaagg agcactccat cactcttaac 1860
 cttaccatca tgaatgttcc cctgcaagat tcaggcacct atgcctgcag agccaggaat 1920
 gtatacacag gggaagaaat cctccagaag aaagaaatta caatcagaga tcaggaagca 1980
 ccatacctcc tgcgaaacct cagtgtacac acagtggcca tcagcagttc caccacttta 2040
 gactgtcatg ctaatgggtg ccccgagcct cagatcactt ggtttaaaaa caaccacaaa 2100

 atacaacaag agcctggaat tatttttagga ccaggaagca gcacgtgtt tattgaaaga 2160
 gtacacagaag aggatgaagg tgtctatcac tgcaagcca ccaaccagaa gggctctgtg 2220
 gaaagttag catacctcac tgttcaagga acctcggaac agtctaactt ggagctgac 2280
 actctaacaat gcacctgtgt ggctcgcact ctcttctggc tcttattaac cctctttatc 2340
 cgaaaaatga aaaggtcttc ttctgaaata aagactgact acctatcaat tataatggac 2400
 ccagatgaag ttcttttggg tgagcagtg gagcggctcc cttatgatgc cagcaagtgg 2460
 gattttgccc gggagagact taaactgggc aaatcacttg gaagaggggc ttttggaaaa 2520

 gtggttcaag catcagcatt tggcattaag aaatcaccta cgtgccggac tgtggctgtg 2580
 aaaatgctga aagagggggc cacggccagc gactacaaag ctctgatgac tgagctaaa 2640
 atcttgacc acattggcca ccatctgaac gtggttaacc tgctgggagc ctgcaccaag 2700
 caaggagggc ctctgatggt gattgttgaa tactgcaaat atggaaatct ctccaactac 2760
 ctcaagagca aacgtgactt atttttctc aacaaggatg cagcactaca catggagcct 2820
 aagaaagaaa aaatggagcc aggcctggaa caaggcaaga aaccaagact agatagcgtc 2880
 accagcagcg aaagctttgc gagctccggc ttccaggaag ataaaagtct gagtgtgtt 2940

 gaggaagagg aggtattctga cggtttctac aaggagccca tctactatgga agatctgatt 3000
 tcttacagtt ttcaagtggc cagaggcatg gatttctgt cttccagaaa gtcatctcat 3060
 cgggacctgg cagcgagaaa cattctttta tctgagaaca acgtggtgaa gatttgtgat 3120
 tttggccttg cccgggatat ttataagaac cccgattatg tgagaaaagg agatactcga 3180
 ctctctctga aatggatggc tctgaatct atctttgaca aaatctacag caccaagagc 3240
 gacgtgtggt cttacggagt attgctgtgg gaaatcttct ccttaggtgg gtctccatac 3300
 ccaggagtac aaatggatga ggacttttgc agtcgcctga gggaaggcat gaggatgaga 3360

 gctcctgagt actctactcc tgaaatctat cagatcatgc tggactgtg gcacagagac 3420
 ccaaaagaaa ggccaagatt tgcagaactt gtggaaaaac taggtgattt gcttcaagca 3480
 aatgtacaac aggatggtaa agactacatc ccaatcaatg ccatactgac aggaaatagt 3540
 gggttacat actcaactcc tgccttctct gaggacttct tcaaggaaag ttttcagct 3600
 ccgaagttaa attcaggaag ctctgatgat gtcagatgat taaatgctt caagtcatg 3660
 agcctggaaa gaatcaaac ctttgaagaa cttttaccga atgccacctc catgtttgat 3720
 gactaccagg gcgacagcag cactctgttg gcctctccca tgctgaagcg cttcacctgg 3780

 actgacagca aaccaaggc ctgcctcaag attgacttga gagtaaccag taaaagtaag 3840

gagtcggggc tgtctgatgt cagcagggccc agtttctgcc attccagctg tgggcacgtc 3900
 agcgaaggca agcgcaggtt cacctacgac cacgctgagc tggaaaggaa aatcgcgctgc 3960
 tgctccccgc ccccagacta caactcgggtg gtcctgtact ccaccccacc catctag 4017

<210> 8
 <211> 1338
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
 20 25 30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
 35 40 45

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
 50 55 60

Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
 65 70 75 80

Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 85 90 95

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
 100 105 110

Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
 115 120 125

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 130 135 140

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 145 150 155 160

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

165

170

175

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
180 185 190

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
195 200 205

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
210 215 220

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
225 230 235 240

Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
245 250 255

Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
260 265 270

Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
275 280 285

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
325 330 335

Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
370 375 380

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
405 410 415

Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
420 425 430

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
435 440 445

Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile
450 455 460

Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
465 470 475 480

Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
485 490 495

Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile
500 505 510

Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg
515 520 525

Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val
530 535 540

Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His
545 550 555 560

Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser
565 570 575

Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu
580 585 590

Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys
595 600 605

Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met
610 615 620

Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn
625 630 635 640

Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg
645 650 655

Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val
660 665 670

Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro
675 680 685

Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu
690 695 700

Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg
705 710 715 720

Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln
725 730 735

Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Gly Thr Ser
740 745 750

Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr Cys Thr Cys Val Ala
755 760 765

Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Phe Ile Arg Lys Met Lys
770 775 780

Arg Ser Ser Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp
785 790 795 800

Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp
805 810 815

Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu Gly Lys Ser

820	825	830
Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Gln Ala Ser Ala Phe Gly		
835	840	845
Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys		
850	855	860
Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys		
865	870	875
880		
Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly		
885	890	895
Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys		
900	905	910
Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe		
915	920	925
Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys		
930	935	940
Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val		
945	950	955
960		
Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser		
965	970	975
Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu		
980	985	990
Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg		
995	1000	1005
Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala		
1010	1015	1020
Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile Cys Asp		
1025	1030	1035
1040		

Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr Val Arg Lys
 1045 1050 1055

Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe
 1060 1065 1070

Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Leu
 1075 1080 1085

Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Gln
 1090 1095 1100

Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu Arg Glu Gly Met Arg Met Arg
 1105 1110 1115 1120

Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu Ile Tyr Gln Ile Met Leu Asp Cys
 1125 1130 1135

Trp His Arg Asp Pro Lys Glu Arg Pro Arg Phe Ala Glu Leu Val Glu
 1140 1145 1150

Lys Leu Gly Asp Leu Leu Gln Ala Asn Val Gln Gln Asp Gly Lys Asp
 1155 1160 1165

Tyr Ile Pro Ile Asn Ala Ile Leu Thr Gly Asn Ser Gly Phe Thr Tyr
 1170 1175 1180

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Glu Asp Phe Phe Lys Glu Ser Ile Ser Ala
 1185 1190 1195 1200

Pro Lys Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Asp Val Arg Tyr Val Asn Ala
 1205 1210 1215

Phe Lys Phe Met Ser Leu Glu Arg Ile Lys Thr Phe Glu Glu Leu Leu
 1220 1225 1230

Pro Asn Ala Thr Ser Met Phe Asp Asp Tyr Gln Gly Asp Ser Ser Thr
 1235 1240 1245

Leu Leu Ala Ser Pro Met Leu Lys Arg Phe Thr Trp Thr Asp Ser Lys
 1250 1255 1260

Pro Lys Ala Ser Leu Lys Ile Asp Leu Arg Val Thr Ser Lys Ser Lys
1265 1270 1275 1280

Glu Ser Gly Leu Ser Asp Val Ser Arg Pro Ser Phe Cys His Ser Ser
1285 1290 1295

Cys Gly His Val Ser Glu Gly Lys Arg Arg Phe Thr Tyr Asp His Ala
1300 1305 1310

Glu Leu Glu Arg Lys Ile Ala Cys Cys Ser Pro Pro Pro Asp Tyr Asn
1315 1320 1325

Ser Val Val Leu Tyr Ser Thr Pro Pro Ile
1330 1335

<210> 9

<211> 5830

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

actgagtcce gggaccccg gaggacgggc agtgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg 60
cgccgggcat cacttgcgcg ccgcagaaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta 120
ccggcaccgc cagacgcccc tgcagccgcc ggtcggcgcc cgggctccct agccctgtgc 180
gctcaactgt cctgcgtgc ggggtgccgc gatttccacc tccgcgcctc ctctctaga 240
caggcgctgg gagaaagac cggtccccga gttctgggca tttcgcccg ctcgaggtgc 300
aggatgcaga gcaaggtgct gctggccgct gcctgtggc tctgcgtgga gaccggggc 360
gcctctgtgg gttgcctag tgtttctctt gatctgcca ggctcagcat acaaaaagac 420

atacttaca ttaaggctaa tacaactctt caaattactt gcaggggaca gagggacttg 480
gactggcttt ggccaataa tcagagtggc agtgagcaaa gggtggaggt gactgagtgc 540
agcgatggcc tcttctgtaa gacactcaca attccaaaag tgatcggaat tgacactgga 600
gcctacaagt gcttctacc ggaaactgac ttggcctcgg tcatttatgt ctatgttcaa 660
gattacagat ctccatttat tgcctctgtt agtgaccaac atggagtcgt gtacattact 720
gagaacaaaa acaaaactgt ggtgattcca tgtctcgggt ccatttcaa tctcaacgtg 780
tcattttgtg caagataccc agaaaagaga ttgttctctg atggtaacag aatttctctg 840

gacagcaaga agggctttac tattcccagc tacatgatca gctatgctgg catggctctc 900
tgtgaagcaa aaattaatga tgaagttac cagtctatta tgtacatagt tgcgttgta 960
gggtatagga tttatgatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttga 1020
gaaaagcttg tcttaaatg tacagcaaga actgaactaa atgtggggat tgacttcaac 1080
tggaataacc cttcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga ctaaaaacc 1140
cagtcctggga gtgagatgaa gaaattttt agcaccttaa ctatagatgg tgaaccggg 1200
agtgaaccaag gatgtgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgaccaa gaagaacagc 1260

acatttgtca gggccatga aaaacctttt gttgcttttg gaagtggcat ggaatctctg 1320
gtggaagcca cgggtgggga gcgtgtcaga atccctgcga agtaccttgg ttaccacccc 1380

ccagaaataa aatggtataa aaatggaata ccccttgagt ccaatcacac aattaaagcg 1440
 gggcatgtac tgacgattat ggaagtgtgt gaaagagaca caggaaatta cactgtcatc 1500
 cttaccaatc ccatittcaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgtc 1560
 ccaccccaga ttggtgagaa atctctaata tctcctgtgg attcctacca gtacggcacc 1620
 actcaaacgc tgacatgtac ggtctatgcc attcctcccc cgcatcacat ccactggtat 1680

tggcagttgg aggaagagtg cgccaacgag cccagccaag ctgtctcagt gacaaacca 1740
 tacccttgtg aagaatggag aagtgtggag gacttccagg gaggaataa aattgaagtt 1800
 aataaaaatc aatttgtctt aattgaagga aaaaacaaaa ctgtaagtac ccttgttata 1860
 caagcggcaa atgtgtcagc tttgtacaaa tgtgaagcgg tcaacaaagt cgggagagga 1920
 gagagggtag tctccttcca cgtgaccagg ggtcctgaaa ttactttgca acctgacatg 1980
 cagccactg agcaggagag cgtgtctttg tggtagcactg cagacagatc tacgtttgag 2040
 aacctcacat ggtacaagct tggccacag cctctgcaa tccatgtggg agagttgccc 2100

acacctgttt gcaagaactt ggatactctt tggaaattga atgccacat gttctctaata 2160
 agcacaaatg acatittgat catggagctt aagaatgcat ccttgcagga ccaaggagac 2220
 tatgtctgcc ttgctcaaga caggaagacc aagaaaagac attgctgtgt caggcagctc 2280
 acagtcttag agcgtgtggc acccagatc acaggaaacc tggagaatca gacgacaagt 2340
 attggggaaa gcatcgaagt ctcatgcacg gcatctggga atccccctcc acagatcatg 2400
 tggtttaaag ataataagag cctttagtaa gactcaggca ttgtattgaa ggatgggaac 2460
 cggaacctca ctatccgcag agtgaggaag gaggacgaag gcctctacac ctgccaggca 2520

tgcagtggtc ttggctgtgc aaaagtggag gcatttttca taatagaagg tgcccaggaa 2580
 aagacgaact tggaaatcat tattctagta ggcacggcgg tgattgccat gttcttctgg 2640
 ctacttcttg tcatcatcct acggaccgtt aagcgggcca atggagggga actgaagaca 2700
 ggctacttgt ccatcgtcat ggatccagat gaactcccat tggatgaaca ttgtgaacga 2760
 ctgccttatg atgccagcaa atgggaattc ccagagacc ggctgaagct aggtgaagct 2820
 ctggccgtg gtgcctttgg ccaagtgtat gaagcagatg cctttggaat tgacaagaca 2880
 gcaacttgca ggacagttag agtcaaatg ttgaaagaag gagcaacaca cagttagcat 2940

cgagctctca tgtctgaact caagatctc attcatattg gtcaccatct caatgtggc 3000
 aaccttctag gtgcctgtac caagccagga gggccactca tgggtattgt ggaattctgc 3060
 aaatttgaa acctgtccac ttacctgagg agcaagagaa atgaatttgt cccctacaag 3120
 accaaagggg cagattccg tcaagggaat gactacgttg gagcaatccc tgtggtatctg 3180
 aaacggcgct tggacagcat caccagttag cagagctcag ccagctctgg atttgtggag 3240
 gagaagtccc tcagtgtatg agaagaagag gaagctcctg aagatctgta taaggacttc 3300
 ctgaccttgg agcatctcat ctgttacagc ttccaagtgg ctaagggcag ggagttcttg 3360

gcatcgcgaa agtgtatcca caggacctg gcggcacgaa atatcctctt atcggagaag 3420
 aacgtggtta aaatctgtga ctttggcttg gcccgggata ttataaaga tccagattat 3480
 gtcagaaaag gagatgtctg cctccctttg aaatggatgg cccagaaac aatttttgac 3540
 agagtgtaca caatccagag tgacgtctgg tcttttggtg ttttctgtg ggaaatattt 3600
 tccttaggtg cttctccata tctgggggta aagattgatg aagaattttg taggcgattg 3660
 aaagaaggaa ctagaatgag ggcccctgat tatactacac cagaatgta ccagaccatg 3720
 ctggactgct ggcacgggga gcccagtcag agaccacgt tttcagagtt ggtggaacat 3780

ttgggaaatc tcttgcaagc taatgctcag caggatggca aagactacat tgttcttccg 3840
 atatcagaga ctttgagcat ggaagaggat tctggactct ctctgcctac ctacacctgt 3900
 tcctgtatgg agggaggaga agtatgtgac cccaaattcc attatgaca cacagcagga 3960
 atcagtcagt atctgcagaa cagtaagcga aagagccggc ctgtgagtgt aaaaacattt 4020
 gaagatatcc cgttagaaga accagaagta aaagtaatcc cagatgacaa ccagacggac 4080
 agtggatagg ttcttgctc agaagagctg aaaacttttg aagacagaa caaattatct 4140
 ccatcttttg gtggaatggt gccagcaaa agcaggaggt ctgtggcatc tgaaggctca 4200

aaccagacaa gcggctacca gtccggatat cactccgatg acacagacac caccgtgtac 4260
 tccagtggag aagcagaact tttaaagctg atagagattg gagtgcacaa cggtagcaca 4320
 gccagattc tccagctga ctcggggacc aactgagct ctctctctgt ttaaaaggaa 4380

gcattccacac cccaactccc ggacatcaca tgagaggtct gctcagattt tgaagtgttg 4440
 ttctttccac cagcaggaag tagccgcatt tgattttcat ttcgacaaca gaaaaaggac 4500
 ctgggactgc agggagccag tcttctaggc atatcctgga agaggcttgt gacccaagaa 4560
 tgtgtctgtg tcttctccca gtgttgacct gatcctcttt tttcattcat ttaaaaagca 4620

ttatcatgcc cctgctgcgg gtctcacat gggttttagaa caaagagctt caagcaatgg 4680
 ccccatcctc aaagaagtag cagtacctgg ggagctgaca cttctgtaaa actagaagat 4740
 aaaccaggca acgtaagtgt tcgagggtgt gaagatggga aggatttga gggtgagtc 4800
 tatccaagag gctttgttta ggacgtgggt cccaagccaa gccttaagtg tggaattcgg 4860
 attgatagaa aggaagacta acgttacctt gctttggaga gtactggagc ctgcaaatgc 4920
 attgtgtttg ctctggtgga ggtgggcatg gggtctgttc tgaaatgtaa agggttcaga 4980
 cggggtttct ggttttagaa ggttgcgtgt tcttcgagtt gggtctaaagt agagttcgtt 5040

gtgctgtttc tgactcctaa tgagagttcc ttccagaccg ttagctgtct ccttgccaag 5100
 ccccggaag aaaaatgatgc agctctggct ccttgtctcc caggctgac ctttattcag 5160
 aataccacaa agaaaggaca ttcagctcaa ggctccctgc cgtgttgaag agttctgact 5220
 gcacaaacca gcttctggtt tcttctggaa tgaataacct catatctgtc ctgatgtgat 5280
 atgtctgaga ctgaatgcgg gaggttcaat gtgaagctgt gtgtggtgtc aaagtttcag 5340
 gaaggatttt acccttttgt tcttccccct gtccccaacc cactctcacc ccgcaaccca 5400
 tcagtatttt agttatttgg cctctactcc agtaaacctg attgggtttg ttcactctct 5460

gaatgattat tagccagact tcaaaattat tttatagccc aaattataac atctattgta 5520
 ttatttagac tttaacata tagagctatt tctactgatt ttgccccttg ttctgtcctt 5580
 tttttcaaaa aagaaaatgt gttttttgtt tggtagcata gtgtgaaatg ctgggaacaa 5640
 tgactataag acatgctatg gcacatatat ttatagtctg tttatgtaga aacaaatgta 5700
 atatatataa gccttatata taatgaactt tgtactattc acattttgta tcagtattat 5760
 gtagcataac aaaggtcata atgctttcag caattgatgt catittatta aagaacattg 5820
 aaaaacttga 5830

<210> 10
 <211> 1356
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
 1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
 20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
 35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
 50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser

65	70	75	80
Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn	85	90	95
Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser	100	105	110
Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser	115	120	125
Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys	130	135	140
Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser	145	150	155
Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg	165	170	175
Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile	180	185	190
Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser	195	200	205
Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr	210	215	220
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu	225	230	235
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile	245	250	255
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu	260	265	270
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe	275	280	285

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
290 295 300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
305 310 315 320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
325 330 335

Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
340 345 350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
355 360 365

Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
370 375 380

Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
385 390 395 400

Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
405 410 415

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val
420 425 430

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr
435 440 445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu
450 455 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr
465 470 475 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys
485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr

725

730

735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile
770 775 780

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
785 790 795 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His
805 810 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
820 825 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val
835 840 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr
850 855 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg
865 870 875 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu
885 890 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu
900 905 910

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
915 920 925

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg
930 935 940

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys
 945 950 955 960

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly
 965 970 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys
 1010 1015 1020

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn
 1025 1030 1035 1040

Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp
 1045 1050 1055

Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met
 1060 1065 1070

Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp Val
 1075 1080 1085

Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser
 1090 1095 1100

Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys
 1105 1110 1115 1120

Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr
 1125 1130 1135

Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr
 1140 1145 1150

Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala
 1155 1160 1165

Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu
1170 1175 1180

Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser
1185 1190 1195 1200

Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn
1205 1210 1215

Thr Ala Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg
1220 1225 1230

Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
1235 1240 1245

Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu
1250 1255 1260

Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro
1265 1270 1275 1280

Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser
1285 1290 1295

Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp
1300 1305 1310

Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu Lys
1315 1320 1325

Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile Leu Gln
1330 1335 1340

Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val
1345 1350 1355

<210> 11
<211> 2305
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

ttcttggggc tgatgtccgc aaatatgcag aattaccggc cgggtcgcctc ctgaagccag 60
cgcgggggagc gagcgcggcg gcggccagca ccgggaacgc accgaggaag aagcccagcc 120
cccgcctcc gccccttccg tccccacccc ctacccggcg gcccaggagg cccccggct 180
gcggcgcgca ctccctgttt ctctctctcc tggctggcgc tgctgcctc tccgactca 240
ctgctgcgcg ggcgccgtcc gccagctccg tgctccccgc gccacctcc tccgggccc 300
gtcctctaag ggatggtact gaatttcgcc gccacaggag accggctgga gcgcccggcc 360
cgcgctcgc ctctctccg agcagccagc gcctcgggac gcgatgagga ccttggcttg 420

cctgtctctc ctcggtcgcg gataacctgc ccatgttctg gccgaggaag ccgagatccc 480
ccgcgaggtg atcgagaggc tggcccgcag tcagatccac agcatccggg acctccagcg 540
actctgggag atagactccg tagggagtga ggattctttg gacaccagcc tgagagctca 600
cgggggtccac gccactaagc atgtccccga gaagcggccc ctgccattc ggaggaagag 660
aagcatcgag gaagctgtcc ccgtgtctg caagaccagg acggtcattt acgagattcc 720
tcggagttag gtcgacccca cgtccgcca cttctgatac tggcccccg gcgtggaggt 780
gaaacgctgc accggctgct gcaacacgag cagtgtcaag tgccagccct cccgcgtcca 840

ccaccgcagc gtcaaggtgg ccaaggtgga atacgtcagg aagaagccaa aattaaaaga 900
agtccaggtg aggttagagg agcatittga gtgcgcctgc gcgaccacaa gcctgaatcc 960
ggattatcgg gaagaggaca cggatgtgag gtgaggatga gccgcagccc ttctctggga 1020
catggatgta catggcgtgt tacattctg aacctactat gtacgggtgt ttattgccag 1080
tgtgcggtct ttgttctct ccgtgaaaaa ctgtgtccga gaacactcgg gagaacaaag 1140
agacagtgca catttgttta atgtgacatc aaagcaagta ttgtagcact cgggtgaagca 1200
gtaagaagct tccttgtcaa aaagagagag agagagagag agagagaaaa caaaaccaca 1260

aatgacaaaa acaaaacgga ctcaaaaaa tatctaaact cgatgagatg gagggctcgc 1320
ccgtgggatg gaagtgcaga ggtctcagca gactggattt ctgtccgggt ggtcacaggt 1380
gcttttttgc cgaggatgca gagcctgctt tgggaacgac tccagagggg tgctggtggg 1440
ctctgcaggg ccgcagga gcaagaaatgt ctggaaaacc gccacgcgaa ctttagaaac 1500
cacacctctc cgtgtagta tttaagccca tacagaaacc ttctgagag ccttaagtgg 1560
ttttttttt ttgttttgt ttgtttttt tttttttgt ttttttttt ttttttttt 1620
ttacaccata aagtgattat taagcttct tttactctt ggctagcttt ttttttttt 1680

ttttttttt tttttttta ttatctctt gatgacattt acaccgataa cacacaggct 1740
gctgtaactg tcaggacagt gcgacggat ttttctagc aagatgcaaa ctaatgagat 1800
gtattaaaaa aaacatggtat tactaccta tgcattctt cctaaatgt tctggctttg 1860
tgtttctccc ttacctgct ttatttgta attaaagcca ttttgaaaga actatgcgtc 1920
aaccaatcgt acgccgtccc tgcggcacct gccccagagc ccgtttgtgg ctgagtgaca 1980
acttgttccc cgcagtgcac acctagaatg ctgtgttccc acgcggcacg tgagatgcat 2040
tgccgcttct gtctgtgtg ttggtgtgcc ctggtgccgt ggtggcggtc actccctctg 2100

ctgccagtgt ttggacagaa cccaaattct ttatttttgg taagatatg tgctttacct 2160
gtattaacag aaatgtgtgt gtgtggtttg tttttttgta aaggtgaagt ttgtatgtt 2220
acctaatatt acctgtttg tatacctgag agcctgctat gttcttctt tgttgatcca 2280
aaattaaaaa aaaaatacca ccaac 2305

```

<210> 12

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
1 5 10 15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
20 25 30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
35 40 45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
50 55 60

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
65 70 75 80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
100 105 110

Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
115 120 125

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
130 135 140

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
145 150 155 160

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
165 170 175

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
180 185 190

Thr Asp Val Arg
195

<210> 13

<211> 6633
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13

```

ttctccccgc cccccagttg ttgtcgaagt ctgggggttg ggactggacc ccctgattgc 60
gtaagagcaa aaagcgaagg cgcaatctgg acactgggag attcggagcg caggagagttt 120
gagagaaaact tttattttga agagaccaag gttgaggggg ggcttatttc ctgacagcta 180
tttacttaga gcaaatgatt agtttttagaa ggatggacta taacattgaa tcaattacaa 240
aacgcggttt ttgagcccat tactgttggg gctacaggga gagaacacagg aggagactgc 300
aagagatcat ttgggaaggc cgtgggcacg ctctttactc catgtgtggg acattcattg 360
cggaataaca tcggaggaga agtttcccag agctatgggg acttcccatc cggcgttcct 420

ggctcttaggc tgtcttctca cagggtcag cctaatectc tgccagcttt cattaccctc 480
tatecttcca aatgaaaatg aaaagggttg gcagctgaat tcatectttt ctctgagatg 540
ctttggggag agtgaagtga gctggcagta ccccatgtct gaagaagaga gctccgatgt 600
ggaaatcaga aatgaagaaa acaacacgag cctttttgtg acggtcttgg aagtgagcag 660
tgcctcggcg gccacacagc ggtttgtacac ttgctattac aaccacactc agacagaaga 720
gaatgagctt gaaggcaggc acatttacat ctatgtgcca gaccagatg tagcctttgt 780
acctctagga atgacggatt atttagtcat cgtggaggat gatgattctg ccattatacc 840

ttgtcgaca actgatcccg agactcctgt aaccttacac aacagtgagg ggggtgtacc 900
tgctcctac gacagcagac agggctttta tgggaccttc actgtagggc cctatatctg 960
tgaggccacc gtcaaaggaa agaagttcca gaccatccca tttaatgttt atgctttaaa 1020
agcaacatca gagctggatc tagaaatgga agctcttaaa accgtgtata agtcagggga 1080
aacgattgtg gtcacctgtg ctgtttttta caatgagggt gttgacctc aatggactta 1140
ccctggagaa gtgaaaggca aaggcatcac aatgctggaa gaaatcaaag tcccatccat 1200
caaattgggt tacactttga cgggtccccg ggccacggtg aaagacagtg gagattacga 1260

atgtgctgcc cgccaggcta ccaggaggt caaagaaatg aagaaagtca ctatttctgt 1320
ccatgagaaa ggtttcattg aaatcaaacc cacttcagc cagttggaag ctgtcaacct 1380
gcatgaagtc aaacattttg ttgtagaggt gcgggcctac ccacctcca ggatatcctg 1440
gctgaaaaac aatctgactc tgattgaaaa tctcactgag atcaccactg atgtgaaaaa 1500
gattcaggaa ataaggtatc gaagcaaat aaagctgac cgtgctaagg aagaagacag 1560
tggccattat actattttag ctcaaaatga agatgctgtg aagagctata cttttgaact 1620
gttaactcaa gttccttcat ccattctgga ctgggtcgat gatcaccatg gctcaactgg 1680

gggacagacg gtgagggtca cagctgaagg cagcccgctt cctgatattg agtggatgat 1740
atgcaaagat attaagaaat gtaataatga aacttcctgg actattttgg ccaacaatgt 1800
ctcaaacatc atcacggaga tccactcccg agacaggagt accgtggagg gccgtgtgac 1860
tttcgccaaa gtggaggaga ccatcgccgt gcgatgcctg gctaagaatc tccttggagc 1920
tgagaaccga gagctgaagc tgggtggtcc caccctgcgt tctgaactca cgggtggtgc 1980
tgagctcctg gtgctgttgg tgattgtgat catctcactt attgtcctgg ttgtcatttg 2040
gaaacagaaa ccgaggatag aaattcgctg gaggttcatt gaatcaatca gcccgatagg 2100

acatgaatat atttatgtgg acccgatgca gctgccttat gactcaagat gggagtittc 2160
aagagatgga ctagtcttg gtcggtctt ggggtctgga gcgtttggga aggtggttga 2220
aggaacagcc tatggattaa gccgttcca acctgtcatg aaagttgcag tgaagatgct 2280
aaaacccacg gccagatcca gtgaaaaaca agctctcatg tctgaactga agataatgac 2340
tcacctgggg ccacatttga acattgtaaa ctgtctggga gcctgcacca agtcaggccc 2400
catttacatc atcacagagt attgtcttca tggagatttg gtcaactatt tgcataagaa 2460
tagggatagc ttctgagcc accaccaga gaagccaaag aaagagctgg atatctttgg 2520

attgaacctt gctgatgaaa gcacacggag ctatgttatt ttatcttttg aaaacaatgg 2580
tgactacatg gacatgaagc aggtgatac tacacagtat gtcccatgc tagaaaggaa 2640
agaggtttct aaatatccg acatccagag atcactctat gatcgtccag cctcatataa 2700
    
```

gaagaaatct atgttagact cagaagtcaa aaacctcctt tcagatgata actcagaagg 2760
ccttacttta ttggatttgt tgagcttcac ctatcaagtt gcccgaggaa tggagttttt 2820
ggcttcaaaa aattgtgtcc accgtgatct ggctgctcgc aacgtcctcc tggcacaagg 2880
aaaaattgtg aagatctgtg actttggcct ggccagagac atcatgcatg attcgaacta 2940

tgtgtcgaaa ggcagtagct ttctgcccgt gaagtggatg gctcctgaga gcatctttga 3000
caacctctac accacactga gtgatgtctg gtcttatggc attctgctct gggagatctt 3060
ttcccttggg ggcaccctt accccggcat gatggtggat tctactttct acaataagat 3120
caagagtggg taccggatgg ccaagcctga ccacgtacc agtgaagtct acgagatcat 3180
ggtgaaatgc tggaacagtg agccggagaa gagaccctcc ttttaccacc tgagtgagat 3240
tgtggagaat ctgctgctg gacaatataa aaagattat gaaaaaatc acctggactt 3300
cctgaagagt gaccatcctg ctgtggcacg catgctgtg gactcagaca atgcatacat 3360

tgggtgcacc taaaaaacg aggaagacaa gctgaaggac tgggaggggtg gtctggatga 3420
gcagagactg agcgtgaca gtggctacat cattcctctg cctgacattg accctgtccc 3480
tgaggaggag gacctgggca agaggaacag acacagctcg cagacctctg aagagagtgc 3540
cattgagacg ggttccagca gtccacctt catcaagaga gaggacgaga ccattgaaga 3600
catcgacatg atggacgaca tcggcataga ctcttcagac ctggtggaag acagcttctt 3660
gtaactggcg gattcgaggg gtctcttcca ctctggggc cacctctgga tcccgttcag 3720
aaaaccactt tattgcaatg cggagggtga gaggaggact tggttgatgt ttaaagagaa 3780

gttcccagcc aagggcctcg gggagcgttc taaatatgaa tgaatgggat attttgaat 3840
gaactttgtc agtgttgctt ctgcgaatgc ctgagtagca tctcagtggt gtgtgaagtt 3900
tggagataga tggataaggg aataataggc cacagaagggt gaactttgtg cttcaaggac 3960
attggtgaga gtccaacaga cacaatttat actgcgacag aacttcagca ttgtaattat 4020
gtaataaact ctaaccaagg ctgtgtttag attgtattaa ctatcttctt tggacttctg 4080
aagagaccac tcaatccatc catgtacttc cctcttgaaa cctgatgtca gctgctgttg 4140
aactttttaa agaagtgcac gaaaaacat ttttgaacct taaaaggtac tggtagtata 4200

gcattttgct atctttttta gtgttaagag ataaagaata ataattaacc aaccttgttt 4260
aatagatttg ggtcatttag aagcctgaca actcattttc atattgtaat ctatgtttat 4320
aatactacta ctgttatcag taatgctaaa tgtgtaataa tgaacatga ttccctcca 4380
gagaaagcac aatttaaac aatccttact aagttaggtga tgagtttgac agtttttgac 4440
atztatatta aataacatgt ttctctataa agtatggtaa tagctttagt gaattaaatt 4500
tagttgagca tagagaacaa agtaaaagta gtgttgtcca ggaagtcaga atttttaact 4560
gtactgaata gggtcccaa tccatcgtat taaaaacaa ttaactgccc tctgaaataa 4620

tgggattaga aacaacaaa actcttaagt cctaaaagtt ctcaatgtag aggcataaac 4680
ctgtgctgaa cataacttct catgtatatt acccaatgga aaatataatg atcagcaaaa 4740
agactggatt tgcagaagtt tttttttttt ttcttcatgc ctgatgaaag ctttggcaac 4800
cccaatatat gtattttttg aatctatgaa cctgaaaagg gtcagaagga tgcccagaca 4860
tcagcctcct tctttcacc cttaccccaa agagaaagag tttgaaactc gagaccataa 4920
agatatcttt tagtggaggc tggatgtgca ttagcctgga tcctcagttc tcaaatgtgt 4980
gtggcagcca ggatgactag atcctgggtt tccatccttg agattctgaa gtatgaagtc 5040

tgagggaaac cagagtctgt atttttctaa actccctggc tgttctgac ggccagtttt 5100
cggaaacact gacttaggtt tcaggaagtt gccatgggaa acaataaatt tgaactttgg 5160
aacagggttg gaattcaacc acgcaggaag cctactattt aaatccttgg cttcaggtta 5220
gtgacattta atgcatccta gctagcaatt gcgaccttaa ttttaactttc cagtcttagc 5280
tgaggctgag aaagctaag tttggttttg acaggttttc caaaagtaaa gatgctactt 5340
cccactgtat gggggagatt gaactttccc cgtctccctt cttctgcctc cactccata 5400
ccccccaag gaaagcatg taaaaaatt atgcaattca gtgttccaag tctctgtgta 5460

accagctcag tgttttgggt gaaaaaacat ttttaagttt actgataatt tgaggttaga 5520
tgggaggatg aattgtcaca tctatccaca ctgtcaaaca ggttgggtgtg ggttcatttg 5580
cattctttgc aatactgctt aattgtgat accatatgaa tgaacatgg gctgtgatta 5640
ctgcaatcac tgtgctatcg gcagatgatg ctttgggaaga tgcagaagca ataataaagt 5700

acttgactac ctactgggtg aatctcaatg caagcccaaa ctttcttate caactttttc 5760
atagtaagtg cgaagactga gccagattgg ccaattaaaa acgaaaacct gactagggtc 5820
tgtagagcca attagacttg aaatacgttt gtgtttctag aatcacagct caagcattct 5880

gtttatcgct cactctccct tgtacagcct tttttgttg gtgctttgca ttttgatatt 5940
gctgtgagcc ttgcatgaca tcatgaggcc ggatgaaact tctcagtcga gcagtttcca 6000
gtcctaacaa atgctccac ctgaatttgt atatgactgc atttgtgggt gtgtgtgtgt 6060
tttcagcaaa ttccagattt gtttcctttt ggctcctgc aaagtctcca gaagaaaatt 6120
tgccaatctt tctactttc ttttttatg atgacaatca aagccggcct gagaaacact 6180
atgtgtgact ttttaacga ttagtgatgt ccttaaaatg tggctcgcca atctgtacaa 6240
aatggtccta tttttgtgaa gagggacata agataaaatg atgttatata tcaatatgta 6300

tatatgtatt tctatataga cttggagaat actgccaaaa catttatgac aagctgtatc 6360
actgccttcg tttatatatt ttttaactgtg ataatcccca caggcacatt aactgttgca 6420
cttttgaatg tccaaaattt atattttaga aataataaaa agaaagatac ttacatgttc 6480
ccaaaacaat ggtgtggtga atgtgtgaga aaaactaact tgatagggtc taccaatata 6540
aaatgtatta cgaatgcccc tgttcatgtt tttgttttaa aacgtgtaaa tgaagatctt 6600
tatatttcaa taaatgatat ataatttaaa gtt 6633

<210> 14
<211> 1089
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Gly Thr Ser His Pro Ala Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Asn Glu Asn Glu Lys Val Val Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg
35 40 45

Cys Phe Gly Glu Ser Glu Val Ser Trp Gln Tyr Pro Met Ser Glu Glu
50 55 60

Glu Ser Ser Asp Val Glu Ile Arg Asn Glu Glu Asn Asn Ser Gly Leu
65 70 75 80

Phe Val Thr Val Leu Glu Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Gly
85 90 95

Leu Tyr Thr Cys Tyr Tyr Asn His Thr Gln Thr Glu Glu Asn Glu Leu
100 105 110

Glu Gly Arg His Ile Tyr Ile Tyr Val Pro Asp Pro Asp Val Ala Phe
115 120 125

Val Pro Leu Gly Met Thr Asp Tyr Leu Val Ile Val Glu Asp Asp Asp
130 135 140

Ser Ala Ile Ile Pro Cys Arg Thr Thr Asp Pro Glu Thr Pro Val Thr
145 150 155 160

Leu His Asn Ser Glu Gly Val Val Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Arg Gln
165 170 175

Gly Phe Asn Gly Thr Phe Thr Val Gly Pro Tyr Ile Cys Glu Ala Thr
180 185 190

Val Lys Gly Lys Lys Phe Gln Thr Ile Pro Phe Asn Val Tyr Ala Leu
195 200 205

Lys Ala Thr Ser Glu Leu Asp Leu Glu Met Glu Ala Leu Lys Thr Val
210 215 220

Tyr Lys Ser Gly Glu Thr Ile Val Val Thr Cys Ala Val Phe Asn Asn
225 230 235 240

Glu Val Val Asp Leu Gln Trp Thr Tyr Pro Gly Glu Val Lys Gly Lys
245 250 255

Gly Ile Thr Met Leu Glu Glu Ile Lys Val Pro Ser Ile Lys Leu Val
260 265 270

Tyr Thr Leu Thr Val Pro Glu Ala Thr Val Lys Asp Ser Gly Asp Tyr
275 280 285

Glu Cys Ala Ala Arg Gln Ala Thr Arg Glu Val Lys Glu Met Lys Lys
290 295 300

Val Thr Ile Ser Val His Glu Lys Gly Phe Ile Glu Ile Lys Pro Thr
305 310 315 320

Phe Ser Gln Leu Glu Ala Val Asn Leu His Glu Val Lys His Phe Val

325

330

335

Val Glu Val Arg Ala Tyr Pro Pro Pro Arg Ile Ser Trp Leu Lys Asn
340 345 350

Asn Leu Thr Leu Ile Glu Asn Leu Thr Glu Ile Thr Thr Asp Val Glu
355 360 365

Lys Ile Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Ser Lys Leu Lys Leu Ile Arg Ala
370 375 380

Lys Glu Glu Asp Ser Gly His Tyr Thr Ile Val Ala Gln Asn Glu Asp
385 390 395 400

Ala Val Lys Ser Tyr Thr Phe Glu Leu Leu Thr Gln Val Pro Ser Ser
405 410 415

Ile Leu Asp Leu Val Asp Asp His His Gly Ser Thr Gly Gly Gln Thr
420 425 430

Val Arg Cys Thr Ala Glu Gly Thr Pro Leu Pro Asp Ile Glu Trp Met
435 440 445

Ile Cys Lys Asp Ile Lys Lys Cys Asn Asn Glu Thr Ser Trp Thr Ile
450 455 460

Leu Ala Asn Asn Val Ser Asn Ile Ile Thr Glu Ile His Ser Arg Asp
465 470 475 480

Arg Ser Thr Val Glu Gly Arg Val Thr Phe Ala Lys Val Glu Glu Thr
485 490 495

Ile Ala Val Arg Cys Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gly Ala Glu Asn Arg
500 505 510

Glu Leu Lys Leu Val Ala Pro Thr Leu Arg Ser Glu Leu Thr Val Ala
515 520 525

Ala Ala Val Leu Val Leu Leu Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Ile Val
530 535 540

Leu Val Val Ile Trp Lys Gln Lys Pro Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Arg
 545 550 555 560

Val Ile Glu Ser Ile Ser Pro Asp Gly His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp
 565 570 575

Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Arg Trp Glu Phe Pro Arg Asp Gly
 580 585 590

Leu Val Leu Gly Arg Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Val
 595 600 605

Glu Gly Thr Ala Tyr Gly Leu Ser Arg Ser Gln Pro Val Met Lys Val
 610 615 620

Ala Val Lys Met Leu Lys Pro Thr Ala Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala
 625 630 635 640

Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Thr His Leu Gly Pro His Leu Asn
 645 650 655

Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Ser Gly Pro Ile Tyr Ile
 660 665 670

Ile Thr Glu Tyr Cys Phe Tyr Gly Asp Leu Val Asn Tyr Leu His Lys
 675 680 685

Asn Arg Asp Ser Phe Leu Ser His His Pro Glu Lys Pro Lys Lys Glu
 690 695 700

Leu Asp Ile Phe Gly Leu Asn Pro Ala Asp Glu Ser Thr Arg Ser Tyr
 705 710 715 720

Val Ile Leu Ser Phe Glu Asn Asn Gly Asp Tyr Met Asp Met Lys Gln
 725 730 735

Ala Asp Thr Thr Gln Tyr Val Pro Met Leu Glu Arg Lys Glu Val Ser
 740 745 750

Lys Tyr Ser Asp Ile Gln Arg Ser Leu Tyr Asp Arg Pro Ala Ser Tyr
 755 760 765

Lys Lys Lys Ser Met Leu Asp Ser Glu Val Lys Asn Leu Leu Ser Asp
770 775 780

Asp Asn Ser Glu Gly Leu Thr Leu Leu Asp Leu Leu Ser Phe Thr Tyr
785 790 795 800

Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His
805 810 815

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ile Val
820 825 830

Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Met His Asp Ser Asn
835 840 845

Tyr Val Ser Lys Gly Ser Thr Phe Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
850 855 860

Glu Ser Ile Phe Asp Asn Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser
865 870 875 880

Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Thr Pro Tyr
885 890 895

Pro Gly Met Met Val Asp Ser Thr Phe Tyr Asn Lys Ile Lys Ser Gly
900 905 910

Tyr Arg Met Ala Lys Pro Asp His Ala Thr Ser Glu Val Tyr Glu Ile
915 920 925

Met Val Lys Cys Trp Asn Ser Glu Pro Glu Lys Arg Pro Ser Phe Tyr
930 935 940

His Leu Ser Glu Ile Val Glu Asn Leu Leu Pro Gly Gln Tyr Lys Lys
945 950 955 960

Ser Tyr Glu Lys Ile His Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp His Pro Ala
965 970 975

Val Ala Arg Met Arg Val Asp Ser Asp Asn Ala Tyr Ile Gly Val Thr

980	985	990
Tyr Lys Asn Glu Glu Asp Lys Leu Lys Asp Trp Glu Gly Gly Leu Asp		
995	1000	1005
Glu Gln Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Pro Asp		
1010	1015	1020
Ile Asp Pro Val Pro Glu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Arg Asn Arg His		
1025	1030	1035
		1040
Ser Ser Gln Thr Ser Glu Glu Ser Ala Ile Glu Thr Gly Ser Ser Ser		
1045	1050	1055
Ser Thr Phe Ile Lys Arg Glu Asp Glu Thr Ile Glu Asp Ile Asp Met		
1060	1065	1070
Met Asp Asp Ile Gly Ile Asp Ser Ser Asp Leu Val Glu Asp Ser Phe		
1075	1080	1085

Leu

<210> 15
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 anti-VEGF aptamer

<400> 15	
gaagaaugg	10

<210> 16
 <211> 8
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
anti-VEGF aptamer

<400> 16
uuggacgc

8

<210> 17
<211> 8
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
anti-VEGF aptamer

<400> 17
gugaaugc

8

<210> 18
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
anti-VEGF aptamer

<400> 18
cggaaucagu gaaugcuuau acauccg

27

<210> 19
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
anti-VEGF aptamer

<400> 19
cggaaucagu gaaugcuuau acauccg

27

<210> 20
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:
 Synthetic anti-PDGF aptamer

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 anti-PDGF aptamer

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> hexaethylene-glycol phosphoramidite

<220>
 <221> modified_base
 <222> (23)
 <223> hexaethylene-glycol phosphoramidite

<400> 20
 caggcuacgn cgtagagcau cantgatccu gt 32

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 anti-PDGF aptamer

<400> 21
 caggctacgc gtagagcatc atgacctgt 30

<210> 22
 <211> 32
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic anti-PDGF aptamer

<220>

<221> modified_base

<222> (10)

<223> pentaethylene-glycol phosphoramidite

<220>

<221> modified_base

<222> (23)

<223> pentaethylene-glycol phosphoramidite

<400> 22

caggcuacgn cgtagagcau cantgatecu gt

32