



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

(45) 공고일자

2006년12월20일

(11) 등록번호

10-0659477

(24) 등록일자

2006년12월13일

(21) 출원번호	10-2001-7015839	(65) 공개번호	10-2002-0019070
(22) 출원일자	2001년12월08일	(43) 공개일자	2002년03월09일
심사청구일자	2005년05월23일		
번역문 제출일자	2001년12월08일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/014142	(87) 국제공개번호	WO 2000/75319
국제출원일자	2000년05월23일	국제공개일자	2000년12월14일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬랜드, 일본, 캐냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 캐냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장

60/138,133

1999년06월08일

미국(US)

(73) 특허권자

리제네론 파라마큐티칼스 인코포레이티드

미합중국, 뉴욕주 10591, 타리타운, 올드 소우 밀 리버 로드 777

(72) 발명자

파파도풀로스니콜라스제이.

미국뉴저지07405버틀러힐리어코드2

데이비스사무엘

미국뉴욕10024뉴욕웨스트.88스트리트#비2332

얀코풀로스죠지디.

미국뉴욕10598욕타운하이츠밸티스트쳐치로드1519

(74) 대리인

박종혁

심사관 : 조명선

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 개선된 약물동태학적 성질을 가지는 변형된 키메라 폴리펩티드**(57) 요약**

개선된 약물동태를 가지는 변형된 키메라 폴리펩티드를 개시한다. 구체적으로, 약물동태학적 프로파일을 개선시키는 방식으로 변형된 키메라 Flt1 수용체 폴리펩티드가 개시된다. 또한 포유동물에서 혈장 유출 및/또는 혈관 투과성을 감소 또는 억제하기 위한 변형된 폴리펩티드를 사용하는 것을 제한없이 포함하는 변형된 폴리펩티드의 제조 및 사용 방법을 개시한다.

특허청구의 범위**청구항 1.**

(a) 필수적으로 제1의 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 수용체의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 제2의 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3으로 구성되는 VEGF 수용체 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및

(b) 다량체화 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며,

제1의 VEGF 수용체는 Flt1이고 제2의 VEGF 수용체는 Flk1 또는 Flt4이고, VEGF 수용체 성분은 융합 폴리펩티드의 유일한 VEGF 수용체 성분인 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 3을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 업스트림에 존재하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 다량체화 성분은 면역글로불린 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 면역글로불린 도메인은 IgG 의 Fc 도메인 및 IgG 의 중쇄로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

청구항 5.

제 1 항에 있어서,

- (a) SEQ ID NO:11에 제시된 뉴클레오티드 서열;
- (b) SEQ ID NO:13에 제시된 뉴클레오티드 서열;
- (c) SEQ ID NO:15에 제시된 뉴클레오티드 서열; 및

(d) 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서, 뉴클레오티드 서열 (a), (b) 또는 (c) 와는 상이한 뉴클레오티드 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 문자.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 융합 폴리펩티드의 성분은 1,2,3로 배열되고, 1은 제1의 VEGF 수용체 성분이고, 2는 제2의 VEGF 수용체 성분이고, 3은 다양체화 성분인 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 문자.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 분리된 핵산 문자로 코딩된 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 핵산 문자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 9.

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 핵산 문자를 포함하는 발현 벡터로서, 핵산 문자는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 10.

적당한 숙주 세포에서 제 9 항의 발현 벡터를 포함하는 융합 폴리펩티드를 생산하기 위한 숙주-벡터 시스템.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 적당한 숙주 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포인 것을 특징으로 하는 숙주-벡터 시스템.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 적당한 숙주 세포는 *E.coli* 또는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 숙주-벡터 시스템.

청구항 13.

융합 폴리펩티드의 생산을 가능하게 하는 조건하에서 제 10 항의 숙주-벡터 시스템의 세포를 증식시키는 단계, 및 이렇게 생산된 융합 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드를 생산하는 방법.

청구항 14.

2개의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 각각의 융합 폴리펩티드는

(a) 필수적으로 Flt1 VEGF 수용체의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 Flk1 또는 Flt4 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3 으로 구성되는 VEGF 수용체 성분; 및

(b) 다량체화 성분을 포함하며,

VEGF 수용체 성분은 각각의 융합 단백질의 유일한 VEGF 수용체 성분인 것을 특징으로 하는 이량체 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF) 안타고니스트.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 아세틸화 또는 폐길화에 의해 변형되는 것을 특징으로 하는 이량체 안타고니스트.

청구항 16.

(a) 필수적으로 Flt1 VEGF 수용체의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 Flk1 또는 Flt4 VEGF 수용체의 Ig 도메인 3 으로 구성되는 VEGF 수용체 성분; 및

(b) 다량체화 성분을 포함하며,

VEGF 수용체 성분은 융합 단백질의 유일한 VEGF 수용체 성분인 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드.

청구항 17.

제 16 항에 있어서, 다량체화 성분은 면역글로불린 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드.

청구항 18.

제 17 항에 있어서, 면역글로불린 도메인은 IgG 의 Fc 도메인 및 IgG 의 중쇄로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징 으로 하는 융합 폴리펩티드.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, 또는 SEQ ID NO:15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징 으로 하는 융합 폴리펩티드.

청구항 20.

담체 및 제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩티드 또는 제 14 항 또는 제 15 항에 따른 이량체 안타고 니스트를 포함하는 것을 특징으로 하는 사람에서 종양 증식의 감약 또는 예방, 부종의 감약 또는 예방, 복수 형성의 감약 또는 예방, 혈장 유출 감소 또는 억제, 또는 혈관 성장의 차단을 위해 사용하기 위한 약학적 조성물.

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

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

청구항 51.

삭제

청구항 52.

삭제

명세서

기술분야

본 발명의 기술분야는 개선된 약물동태를 가지는 변형된 폴리펩티드이다. 구체적으로, 본 발명의 분야는 약물동태학적 프로파일을 개선하는 방식으로 변형된 Flt1 수용체 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 분야는 또한 포유동물에서 혈장 유출 및/또는 혈관 투과성을 감소 또는 억제하도록 변형된 폴리펩티드를 사용하는 것을 제한없이 포함하는 변형된 폴리펩티드의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

세포에 폴리펩티드 리간드가 결합하는 능력 및 이에 의해서 세포 성장, 생존, 세포 산물 분비, 또는 분화와 같은 표현형 반응을 유발하는 능력은 종종 세포의 트랜스멤브레인 수용체를 통하여 매개된다. 이러한 수용체의 세포외 도메인(즉, 세포의 표면에 전개된 수용체의 부분)은 그것의 리간드 결합 성질을 가지는 단백질을 제공하기 때문에, 일반적으로 분자의 가장 구별 가능한 부분이다.

세포외 도메인에 대한 리간드의 결합은 일반적으로 세포내 표적에 생물학적 신호를 전달하는 신호 전달을 초래한다. 종종, 신호 전달은 촉매성 세포내 도메인에 의해서 작용한다. 촉매 세포내 도메인의 서열 모티프의 특정 배열은 잠재적인 키나제 기질에의 접근을 결정한다(Mohammadi, et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 11: 5068-5078; Fantl, et al., 1992, Cell 69: 413-413). 촉매 세포내 도메인에 의한 신호를 전달하는 수용체의 예는 일반적으로 신경계 세포에 제한되는 Trk 부류의 수용체와 같은 수용체 티로신 키나제(RTK), 일반적으로 신경계 세포에 제한되는 3으로 나누어진 CNTF 수용체 복합체를 포함하는 시토킨 부류의 수용체(Stahl & Yancopoulos, 1994, J. Neurobio. 25: 1454-1466), 예를 들어, 심근 세포에서 발견된 β_2 아드레날린 수용체와 같은 G-단백질 결합 수용체, 및 대부분 비만 세포 및 호염기성 세포에 위치하는 다량체 IgE 고 친화성 수용체 Fc ϵ R1을 포함한다(Sutton & Gould, 1993, Nature 366: 421-428).

현재까지, 이량체화, 다량체화, 또는 어떤 관련된 구조적 변형 후에 리간드 결합(Schlessinger, J., 1988, Trend Biochem. Sci. 13: 443-447; Ullrich & Schlessinger, 1990, Cell 61: 203-212; Schlessinger & Ullrich, 1992, Neuron 9: 383-391) 및 이량체화하는 세포내 도메인간의 분자 상호작용을 겪는 것으로 확인된 모든 수용체는 촉매 기능의 활성을 유발한다. 혈소판-유도 성장 인자(PDGF)와 같은 경우에, 리간드는 2 수용체 분자를 결합하는 이량체인 반면에(Hart, et al., 1988, Science, 240: 1529-1531; Heldin, 1989, J. Biol. Chem. 264: 8905-8912) 예를 들어, 표피 성장 인자(EGF)의 경우에, 리간드는 단량체이다(Weber, et al., 1984, J. Biol. Chem. 259: 14631-14636). Fc ϵ RI 수용체의 경우에, 리간드, IgE는 단량체형태로 Fc ϵ RI에 결합하여 존재하고, 항원이 IgE/Fc ϵ RI 복합체에 결합하여 인접한 IgE 분자와 교차 결합하는 경우에만 활성화된다(Sutton & Gould, 1993, Nature 366: 421-428).

종종, 고등 유기체내에서 특정 수용체의 조직 분배는 수용체의 생물학적 기능에 대한 통찰력을 제공한다. 섬유아세포 성장 인자(FGF)와 같은 어떤 성장 및 분화 인자에 대한 RTK는 광범위하게 발현되므로 조직 성장 및 유지에서 어떤 일정한 역할을 하는 것 같다. 수용체의 Trk RTK 부류의 요소(Glass & Yancopoulos, 1993, Trends in Cell Biol. 3: 262-268)는 신경계 세포, 및 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유도 신경향성 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3(NT-3) 및 뉴로트로핀-4/5(NT-4/5)로 구성되는 신경 성장 인자 부류에 더욱 일반적으로 제한되고, Trk RTK 부류 수용체에 결합하여, 뇌 및 말초에서 다양한 군의 뉴런의 분화를 촉진한다(Lindsay, R. M, 1993, in Neurotrophic Factors, S. E. Loughlin & J. H. Fallon, eds., pp. 257-284, San Diego, CA, Academic Press). Fc ϵ RI은 비만 세포 및 호염기성 세포와 같은 제한된 많은 형태의 세포에 위치한다. 비만 세포는 골수 다효험 조혈 스템 세포계로부터 유도되지만, 혈류로부터의 이동 후에 조직에서 그들의 성숙을 완결하고(Janeway & Travers, 1996, in Immunobiology, 2d. Edition, M. Robertson & E. Lawrence, eds., pp. 1: 3-1: 4, Current Biology Ltd., London, UK, Publisher참조), 알레르기 반응에 관련된다.

많은 연구는 수용체의 세포외 도메인이 특정 리간드 결합 특징을 제공한다는 것을 증명했다. 더욱이, 수용체가 발현되는 세포 환경은 수용체와 리간드 결합에 기초하여 나타난 생물학적 반응에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, Trk 수용체를 발현하는 뉴런 세포가 수용체에 결합하는 뉴로트로핀에 노출되는 경우, 뉴런 생존 및 분화를 초래한다. 같은 수용체가 섬유아세포에 의해서 발현되는 경우에, 뉴로트로핀에의 노출은 섬유아세포의 분화를 초래한다(Glass, et al., 1991, Cell 66: 405-413).

혈관 내피 세포에 대한 선택성을 가지는 세포-유도 이량체 미토겐의 유형이 확인되었고, 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF)로 지시되었다. VEGF는 래트 신경교종 세포의 조정 성장 배지[Conn et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, pp 2628–2632]; 소 뇌하수체 여포 방사선모양 세포의 조정 성장 배지[Ferrara and Henzel, (1989), Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, pp. 851–858; Gozpadorowicz et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, pp. 7311–7315] 및 사람의 U937 세포의 조정 성장 배지[Connolly, D. T. et al. (1989), Science, 246, pp. 1309–1312]로부터 정제되었다. VEGF는 약 23 kDa 의 명백한 분자 질량을 가지는 각 서브유닛으로 약 46 KDa 의 명백한 분자 질량을 가지는 이량체이다. VEGF는 비만 혈관의 혈관 내피세포에 대한 미토겐은 아니지만, 연결 조직에 대해서는 미토겐인 혈소판 성장 인자(PDGF)에 어떤 구조적인 유사성을 가진다.

Flt로 알려진 멤브레인-결합 트로신 키나제 수용체는 VEGF 수용체로 밝혀졌다[DeVries, C. et al., (1992), Science, 255, pp. 989 991]. Flt 수용체는 유사분열을 유발하는 VEGF에 특이적으로 결합한다. KDR로 표시된, VEGF 수용체의 다른 형태는 VEGF에 결합하여 유사분열을 유발하는 것으로 알려진다. KDR의 부분적인 cDNA 서열 및 거의 총 길이 단백질 서열 역시 공지된다[Terman, B. I. et al., (1991) Oncogene 6, pp. 1677–1683; Terman, B. I. et al., (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 187, pp. 1579–1586].

지속적인 혈관형성은 건선, 류마트시성 관절염, 혈관종, 혈관섬유종, 당뇨병성 망막병증 및 신혈관 녹내장과 같은 어떤 질환을 유발 또는 가속화시킬 수 있다. VEGF 활성의 억제제는 이러한 질환 및 다른 VEGF-유발 병인 혈관형성 및 종양 혈관 신생과 같은 혈관 투과 상태에 대한 치료에 유용할 것이다. 본 발명은 VEGF 수용체 Flt1에 기초한 VEGF 억제제에 관한 것이다.

염증의 주요 성분인 혈장 유출은 미세혈관의 구별되는 서브셋에서 발생한다. 특히, 대부분의 기관에서, 혈장 유출은 세정맥에서 특이적으로 발생한다. 소동맥 및 미세혈관과 달리, 세정맥은 히스타민, 브라디키닌 및 세로토닌을 포함하는 많은 염증성 매개자에 반응하여 유출된다. 염증의 특징은 세정맥의 내피세포를 형성하는 세포간 캡으로부터 야기된 혈장 유출이다. 염증의 대부분의 실험 모델은 이러한 세포간 캡은 후모세혈관 및 집합 세정맥의 내피세포간에 발생한다는 것을 나타낸다(Baluk, P., et al., Am. J. Pathol. 1998 152: 1463–76). 어떤 렉틴은 염증이 일어난 세정맥내의 내피세포 경계에서 혈장 유출, 내피세포 캡, 및 손가락-유사 돌기의 병소 부위의 특징을 밝히는데 사용될 수 있다(Thurston, G., et al., Am. J. Physiol, 1996, 271: H2547–62). 특히, 식물 렉틴은 예를 들어, 래트 기도의 염증이 일어난 세정맥내의 내피세포 경계에서 형태 변형을 가시화하는 데 사용되었다. 염증이 일어난 세정맥에 집중적으로 결합하는 콘코나발린 A 및 리신과 같은 렉틴은 혈장 유출 부위에 해당하는 캡에 의해 노출된 아내피세포 혈관벽의 영역을 밝힌다(Thurston, G., et al., Am J Physiol, 1996, 271: H2547–62).

미세혈관의 성질은 동적이다. 만성 염증 질환은 예를 들어, 혈관형성 및 미세혈관 확장을 포함하는 미세혈관 재형성과 관련된다. 미세혈관은 또한 이상 표현형 성질을 획득함으로써 재형성될 수 있다. 만성 기도 염증의 뮤린 모델에서, 기도 모세혈관은 확장된 혈관 직경, Willebrand 인자에 대한 증가된 면역 반응성, 및 P-선택에 대한 증가된 면역 반응성을 포함하는 세정맥의 성질을 획득한다. 게다가, 재형성된 혈관은 염증 매개자에 반응하여 유출되는 반면에, 같은 위치의 정상 마우스 기도의 혈관은 그러하지 아니하다.

어떤 물질은 혈관 투과성 및/또는 혈장 유출을 감소 또는 억제하는 것을 보였다. 예를 들어, 미스틱신(mystixin)은 내피세포 캡 형성을 차단하지 않고 혈장 유출을 억제하는 것으로 보고된 합성 폴리펩티드이다(Baluk, P., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, 284: 693–9). 또한, β 2-아드레날린 수용체 아고니스트 포르모테롤(formoterol)은 내피세포 캡 형성을 억제함으로써 미세혈관 유출을 감소시킨다(Baluk, P. and McDonald, D. M., Am. J. Physiol., 1994, 266: L461–8).

안지오포이에틴 및 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF) 부류는 혈관 내피세포에 대부분 특이적으로 생각되는 유일한 성장 인자이다. 마우스에서 표적 유전자 불활성화 연구는 VEGF는 혈관 발생의 초기 단계에 필요하고, Ang-1은 혈관 재형성의 후기 단계에 요구된다는 것을 밝혀냈다.

Metris Therapeutics Limited에 의하여 2000, 1, 4 일 공표된 US 특허번호 6,011,003은 VEGF에 결합할 수 있어서 그 것에 대하여 억제 효과를 나타내는 5 이하의 완전한 면연글로불린 도메인을 포함하는 FLT 폴리펩티드의 변형되고, 가용성 형태를 개시한다.

Merck & Co.가 출원한 1998, 1, 27 공표된 US 특허번호 5,712,380은 천연발생 또는 VEGF에 대한 수용체의 C-말단 트랜스멤브레인 영역의 존재 또는 부재로 재조합으로 유전적 설계된 가용성 형태인 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF) 억제제를 개시한다.

역시 Merck & Co가 출원한, 1998, 4, 2 일 공개된 PCT 공개번호 WO 98/13071 은 VEGF 와 결합하는 가용성 수용체 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 유전자 전이에 의해 제1차 종양 성장 및 악성종양의 억제를 위한 유전자 요법을 개시한다.

Genentech, Inc. 의 1997, 11, 27 공개된 PCT 공개번호 WO 97/44453 는 키메라 VEGF 수용체 단백질이 VEGF 에 결합하여 내피세포 증식 및 그것의 혈관형성 활성으로 혈관을 형성하는 사람의 KDR 수용체 FLK1 에 대해 상동성인 뮤린을 포함하는 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF)수용체 Flt1 및 KDR로부터 유래된 아미노산으로 구성된 신규한 VEGF 수용체 단백질을 개시한다.

Toa Gosei Co., LTD. 가 출원한 1997, 4, 17 일 공개된 PCT 공개번호 WO 97/13787 은 충실성 종양과 같은 신혈관형성으로 수반된 질환의 치료에서 유용한 저분자량 VEGF 억제제를 개시한다. 폴리펩티드는 VEGF 수용체 Flt 의 세포외 영역에서 제1의 면역글로불린-유사 도메인 및 제2의 면역글로불린-유사 도메인을 포함하지만, 6번째 면역글로불린-유사 도메인을 포함하지 않고, 그것의 7번째 면역글로불린-유사 도메인은 VEGF 억제 활성을 도시한다.

Sharifi, J. et al., 1998, The Quarterly Jour. of Nucl. Med. 42: 242-249 은 단일클론 항체(MAb)가 염기성, 양으로 하전된 단백질이고, 포유동물세포는 음으로 하전되었기 때문에, 양자 간의 전기전 상호작용은 더 높은 수준의 기초결합을 형성하여 낮은 종양을 정상의 기관 비율을 초래하도록 할 수 있다는 것을 개시한다. 이 효과를 극복하기 위해서, 조사자는 제2차 항체뿐만 아니라 MAb 그 자체의 화학 및 전하 변형과 같은 다양한 방법을 사용하여 MAb 확실성을 개선하고자 하는 시도를 했다.

Jensen-Pippo, et al., 1996, Pharmaceutical Research 13: 102-107 은 치료 단백질, 재조합 사람의 과립백혈구 콜로니 자극 인자(PEG-G-CSF)가 관내 경로로 투여되는 경우에 체내에서 안정성 및 체류의 증가를 초래한다는 것을 개시한다.

Tsutsumi, et al., 1997, Thromb Haemost. 77: 168-73 은 천연 IL-6 와 비교할 때, 54% 의 IL 의 14 리신 아미노기가 PEG 와 결합하는 폴리에틸렌 글리콜-변형 인터루킨-6 에 대한 실험을 개시한다.

Yang, et al., 1995, Cancer 76: 687-94 은 폴리에틸렌 글리콜과 재조합 사람의 인터루킨-2(IL-2)의 결합으로 화합물을 생성한다는 것을 개시한다. 폴리에틸렌 글리콜-변형 IL-2(PEG-IL-2)은 체외에 보유되고, IL-2 의 체내 활성은 현저하게 지연된 순환 반감기를 나타낸다.

R. Duncan and F. Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290-306,296 (1994) 은 폴리에틸렌 글리콜 결합에 의해서 혈장 반감기를 향상시키려는 노력을 개관한다.

Regeneron Pharmaceuticals, Inc. and The Regents of The University of California 의 출원, 1999, 1,28 공개된 PCT 국제 공개번호 WO 99/03996 는 염기 아미노산 영역의 결실을 가지는 사람의 노긴 폴리펩티드를 개시한다. 변형된 사람의 노긴 폴리펩티드는 비변형 사람의 노긴에 비하여 동물에서 해파린에 대한 감소된 친화력 및 우수한 약물동태를 가지면서 생물학적 활성을 보유하는 것을 개시한다.

(발명의 개요)

본 발명은 개선된 약물동태학적 성질을 가지는 VEGF 안타고니스트에 관한 것이다.

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

더 이상의 구체예에서, 제1의 VEGF 수용체의 분리된 핵산은 Flt1이다.

더 이상의 구체예에서, 제2의 VEGF 수용체의 분리된 핵산은 Flk1이다.

더 이상의 구체예에서, 제2의 VEGF 수용체의 분리된 핵산은 Flt4이다.

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

더욱 바람직한 구체예에서, 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 3를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 다운스트림이다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 다량체화 성분은 면역글로불린 도메인을 포함한다.

다른 구체예에서, 면역글로불린 도메인은 IgG 의 Fc 도메인, IgG 의 중쇄, 및 IgG 의 경쇄로 구성되는 군으로부터 선택된다.

바람직한 구체예는 변형된 Flt1 수용체 융합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자를 포함하고, 여기에서 핵산 분자의 코딩 영역은 (a) 도13A-13D에 제시된 뉴클레오티드 서열; (b) 14A-14C에 개시된 뉴클레오티드 서열; (c) 15A-15C에 제시된 뉴클레오티드 서열; (d) 16A-16D에 제시된 뉴클레오티드 서열; (e) 21A-21C에 제시된 뉴클레오티드 서열; (f) 22A-22C에 제시된 뉴클레오티드 서열; (g) 24A-24C에 제시된 뉴클레오티드 서열; 및 (h) 유전자 코드의 축퇴성의 결과로 (a), (b), (c), (d), (e), (f), 또는 (g)의 뉴클레오티드 서열과 다르며, 변형된 Flt1 수용체 융합 폴리펩티드의 생물학적 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열로 구성된다.

발명의 더 이상의 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 상기에 개시된 분리된 핵산 분자에 의해 코딩된다.

바람직한 구체예는 융합 폴리펩티드의 다량체로 구성되는 비기능 복합체를 형성하도록 VEGF 분자에 결합할 수 있는 조성물이다.

또한 바람직한 것은 다량체가 이량체인 조성물이다.

더 이상의 구체예에서, 조성물은 담체내이다.

다른 구체예는 개시된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 상기에 개시된 핵산 분자를 포함하는 벡터이고, 여기에서 핵산 분자는 발현 조절 서열에 공유결합으로 연결된다.

다른 포함된 구체예는 적당한 숙주 세포에서 발현 벡터를 포함하는 융합 폴리펩티드의 생산을 위한 숙주-벡터 시스템이고; 적당한 숙주 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포인 숙주-벡터 시스템; 적당한 숙주 세포는 E.Coli 인 숙주-벡터 시스템; 적당한 숙주 세포는 COS 세포인 숙주-벡터 시스템; 적당한 숙주 세포는 COH 세포인 숙주-벡터 시스템이다.

본 발명의 다른 구체예는 융합 폴리펩티드의 생산을 허용하고 그렇게 생산된 융합 폴리펩티드를 수집하는 조건하에서 숙주-벡터 시스템의 세포를 배양하는 것을 포함하는 융합 폴리펩티드를 생산하는 방법이다.

추가적인 구체예는 도10A-10D 또는 도24A-24C에 제시된 핵산 서열로 코딩된 융합 폴리펩티드를 포함하고, 이것은 적어도 약 10 배 몰 과량 내지 약 100 배 몰 과량의 범위내의 몰과량의 아세틸화 시약으로 이루어지는 아세틸화 및 10 K 또는 20 K PEG로 이루어지는 폐길화에 의해 변형되었다.

바람직한 구체예는 상기에 개시된 융합 폴리펩티드를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 혈장 유출을 감소 또는 억제하는 방법을 포함하고, 여기에서 포유동물은 사람이고, 융합 폴리펩티드는 아세틸화되거나 융합 폴리펩티드는 폐길화된다.

더 이상의 구체예는 VEGF 수용체와 리간드 VEGF가 특이적으로 결합하는 융합 폴리펩티드이다.

본 발명의 바람직한 구체예는 상기에 개시된 융합 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 사람에서 혈관 성장을 차단하는 방법이다.

또한 바람직한 것은 상기에 개시된 융합 폴리펩티드의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 VEGF 수용체 리간드 활성을 억제하는 방법이다.

본 발명의 바람직한 구체예는 포유동물이 사람이다.

본 발명의 더 이상의 구체예는 사람에서 종양 억제의 감약 또는 예방; 특히 부종은 뇌부종인 사람에서의 부종의 감약 또는 예방; 특히 복수는 난소 암-관련 복수인 사람에서의 복수 형성의 감약 또는 예방을 포함한다.

본 발명의 바람직한 구체예는 VEGF 수용체 성분은 융합 폴리펩티드의 유일한 VEGF 수용체 성분이고, 필수적으로 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2의 아미노산 서열 및 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 3 도메인 3의 아미노산 서열로 구성되는 (a) 다량체화 성분에 (b) 작동가능하게 연결된 VEGF 수용체 성분을 포함하는 VEGF 폴리펩티드에 결합할 수 있는 융합 폴리펩티드를 포함한다.

융합 폴리펩티드의 더 이상의 구체예에서, 제1의 VEGF 수용체는 Flt1 이다.

융합 폴리펩티드의 더 이상의 구체예에서, 제2의 VEGF 수용체는 Flk1 이다.

융합 폴리펩티드의 더 이상의 다른 구체예는 제2의 VEGF 수용체는 Flt4 인 것이다.

바람직한 구체예는 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2의 아미노산 서열은 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 3의 아미노산 서열의 업스트림이고, 제1의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 2의 아미노산 서열은 제2의 VEGF 수용체의 세포외 도메인의 Ig 도메인 3의 아미노산 서열의 다운스트림인 융합 폴리펩티드를 포함한다.

더 이상의 구체예에서, 융합 폴리펩티드 다량체화 성분은 IgG 의 Fc 도메인, IgG 의 중쇄, 및 IgG 의 경쇄로 구성되는 군으로부터 선택되는 면역글로불린 도메인을 포함한다.

바람직한 구체예는 아미노산 서열이 (a) 도13A-13D에 도시된 아미노산 서열; (b) 도 14A-14C에 도시된 아미노산 서열; (c) 도15A-15C 에 제시된 아미노산 서열; (d) 도16A-16D 에 제시된 아미노산 서열;(e) 도21A-21C 에 제시된 아미노산 서열;(f) 도 22A-24C 에 제시된 아미노산 서열; 및 (g) 도24A-24C 에 제시된 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 변형된 Flt1 수용체의 아미노산 서열을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함한다.

다른 바람직한 구체예는 포유동물에 상기에 개시된 융합 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 혈장 유출을 감소 또는 억제하는 방법이다.

택일적인 바람직한 구체예는 상기에 개시된 융합단백질의 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 VEGF 수용체 리간드 활성을 억제하는 방법이다.

발명의 상세한 설명

치료제로서 안타고니스트를 적당한 고려대상으로 하여 약물동태학적 프로파일을 가지는 수용체 기초 VEGF 길항체를 생산하는 것은 당업계에 오래 지속된 문제였다. 본 출원인은 최초로, 다른 공지된 수용체-기초 VEGF 안타고니스트에 비교하여 개선된 약물동태학적 성질을 나타내는 VEGF 활성을 길항할 수 있는 키메라 폴리펩티드 분자를 개시한다. 그러므로, 본원에 개시된 키메라 폴리펩티드 분자는 원하는 결과를 가지는 VEGF의 길항작용의 요법에의 사용을 위한 적당한 분자를 최초로 제공한다.

본 발명은 IgG 의 Fc 영역에 Flt1 수용체의 변형된 세포외 리간드 결합 도메인을 융합함으로써 신규한 키메라 폴리펩티드 분자를 제공한다.

세포외 리간드 결합 도메인은 세포막의 천연 성분으로 그것의 동질 리간드와 접촉할 수 있도록 세포외로 향하고 있는 수용체 부분으로 정의된다.

세포외 리간드 결합 도메인은 수용체의 트랜스멤브레인 도메인과 관련된 소수성 아미노산 또는 수용체의 세포내 도메인과 관련된 어떤 아미노산을 포함하지 않는다. 일반적으로, 수용체의 세포내 또는 세포질 도메인은 통상 양으로 하전된 또는 극성 아미노산으로 구성된다(즉, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산) 선행하는 15-30, 우세하게 소수성 또는 무극 아미노산(즉, 류신, 발린, 이소류신, 및 페닐알라닌)은 트랜스멤브레인 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 아미노산의 소수성 트랜스멤브레인 신장의 아미노산에 선행하는 아미노산을 포함한다. 일반적으로, 트랜스멤브레인 도메인은 리신 또는 아르기닌과 같은 양으로 하전 또는 극성 아미노산이 양쪽 측면에 위치한다. Heijne는 주어진 수용체의 아미노산이 세포외, 트랜스멤브레인, 또는 세포내 도메인에 속하는지를 결정하는 경우에 흔히 당업자에 의해 언급된 상세한 법칙을 공개했다(von Heijne, 1995, BioEssays 17: 25-30 참조). 택일적으로, http://uirec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html. 과 같은 인터넷상의 웹싸이트는 단백질 도메인을 예전토록 하는 정보와 함께 단백질 화학자를 제공하는 데 이용될 수 있었다.

본 발명은 적당한 숙주 세포에 도입되는 경우에 키메라 폴리펩티드 분자를 발현할 수 있는 벡터에 삽입된 키메라 폴리펩티드 분자를 코딩하는 핵산 분자의 제조를 제공한다. 적당한 숙주 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 포유동물 세포를 제한없이 포함한다. 벡터에 DNA 단편을 삽입하는 당업계에 공지된 어떤 방법은 전사/번역 조절 신호의 조절하에서 키메라 폴리펩티드 분자를 코딩하는 발현 벡터를 제조하는 데 사용할 수 있다. 본 방법은 체외 재조합 DNA 및 합성 기법 및 체내 재조합(유전적 재조합)을 포함할 수 있다(Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY 참조).

키메라 폴리펩티드 분자를 코딩하는 핵산 분자의 발현은 제2의 핵산 서열로 조절되어서 키메라 폴리펩티드 분자가 재조합 DNA 분자로 형질전환된 숙주에서 발현될 수 있도록 한다. 예를 들어, 본원에 개시된 키메라 폴리펩티드 분자의 발현은 당업계에 공지된 어떤 프로모터/인핸서 요소로 조절될 수 있다. 키메라 폴리펩티드 분자의 조절 발현에 사용될 수 있는 프로모터는 Squinto et al., (1991, Cell 65: 1-20)에 개시된 긴 말단 반복; SV40 초기 프로모터 영역(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), CMV 프로모터, 라우스 육종 바이러스의 3'긴 말단 반복에 포함된 M-MuLV 5'말단 반복(Yamamoto, et al., 1980, Cell 22: 787-797), 허프스 티미딘 키나제 프로모터(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 144-1445), 메탈로티오닌 유전자의 조절 서열(Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42); β-락타마제 프로모터와 같은 원핵생물 발현 벡터(Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 3727-3731), 또는 tac 프로모터(DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 21-25, see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242: 74-94); Gal 4 프로모터와 같은 효모 또는 다른 균류의 프로모터 요소, ADH(알코올 디히드로게나제) 프로모터, PGK (포스포글리세롤 키나제) 프로모터, 알칼리 포스파타제 프로모터, 및 조직 특이성을 나타내고 트랜스제닉 동물에 사용된 하기의 동물 전사 조절 영역; 췌장 포상 세포에서 활성이 있는 엘라스타제 I 유전자 조절 영역(Swift et al., 1984, Cell 38: 639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515); 췌장 β 세포에서 활성이 있는 인슐린 유전자 조절 영역(Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122), 림프양 세포에서 활성이 있는 면역글로불린 유전자 조절 영역(Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444), 고환, 유방, 림프양 및 비대 세포에서 활성이 있는 마우스 유방 종양 바이러스 조절 영역(Leder et al., 1986, Cell 45: 485-495), 간에서 활성이 있는 일부 유전자 조절 영역(Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268-276), 간에서 활성이 있는 α-페토단백질 유전자 조절 영역(Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58); 간에서 활성이 있는 α 1-항트립신 유전자 조절 영역(Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171), 골수 세포에서 활성이 있는 β-글로빈 유전자 조절 영역(Mogram et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94); 뇌의 희소돌기아교세포에서 활성이 있는 수초 염기 단백질 유전자(Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712); 골격 근육에서 활성이 있는 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역(Shani, 1985, Nature 314: 283-286), 및 시상하부에서 활성이 있는 성선자극 해리 호르몬 조절 영역(Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378)을 제한없이 포함한다.

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

본원에 개시된 키메라 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터는 3 개의 일반적인 접근법으로 확인될 수 있다:(a) DNA-DNA 혼성화, (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재, 및 (c) 삽입 서열의 발현. 첫 번째 접근법에서, 발현 벡터에 삽입된 외래 유전자의 존재는 삽입된 키메라 폴리펩티드 분자 서열에 상동성 서열을 포함하는 프로브를 사용하여 DNA-DNA 혼성화로

검출될 수 있다. 두 번째 접근법에서, 벡터에 의해 유전자의 삽입으로 야기된 재조합 벡터/숙주 시스템은 어떤 "마커"유전자 기능의 존재 또는 부재에 기초하여 확인되고 선택될 수 있다(예를 들어, 티미딘 키나제 활성, 항생제에 대한 내성, 형질 전환 표현형, 바큐로바이러스에서 봉입체 형성 등). 예를 들어, 키메라 폴리펩티드 분자 DNA 서열이 벡터의 마커 유전자 서열에 삽입되는 경우에, 삽입체를 포함하는 재조합체는 마커 유전자 기능의 부재로 확인될 수 있다. 3번째 접근법에서, 재조합 발현 벡터는 재조합체로 발현된 의해 유전자 산물을 분석함으로써 확인될 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어, 키메라 폴리펩티드 분자의 물리적 또는 기능적 성질에 기초할 수 있다.

본 발명의 세포는 일시적으로 또는 바람직하게는 구성적으로 그리고 영구적으로 키메라 폴리펩티드 분자를 발현할 수 있다.

키메라 폴리펩티드 분자는 안정한, 생물학적으로 활성 키메라 폴리펩티드 분자의 연속적인 형성을 허용하는 어떤 기법으로 정제될 수 있다. 예를 들어, 제한하지 않는 방식으로, 인자는 가용성 단백질 또는 봉입체로서 8M 구아니디움 히드로클로라이드 및 투석으로 정량적으로 추출될 수 있는 세포로부터 수집될 수 있다(예를 들어, Builder, et al., US Patent No. 5,663,304 참조). 인자의 더 이상의 정제를 위해서, 종래의 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 또는 겔 여과가 사용될 수 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 제1의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 제2의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 업스트림이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 제1의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 제2의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 다운스트림이다. 본 발명의 더 이상의 구체예는 제1, 제2 및 제3의 융합 폴리펩티드 성분의 순서로 재배열되어 제조될 수 있다. 예를 들어, 제1의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 1로 지시되고, 제2의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 2로 지시되고, 제3의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 3으로 지시되고, 그 다음 본 발명의 분리된 핵산에서 성분의 순서는 5' 내지 3'로 읽혀질 때 다음의 6 개의 조합중 어느 하나 일 수 있다 : 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2; 또는 3,2,1.

본 발명은 또한 진단 및 치료 이용을 가진다. 본 발명의 특정 구체예에서, 본원에 개시된 키메라 폴리펩티드 분자의 기능 또는 발현에서 이상을 검출하는 방법은 장애의 진단에 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 키메라 폴리펩티드 분자 또는 키메라 폴리펩티드 분자에 결합하는 아고니스트 또는 안타고니스트의 조작은 질환의 치료에 사용될 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 키메라 폴리펩티드 분자는 그것의 표적에 결합제의 결합을 차단하기 위한 약제로서 사용된다.

제한되지 않은 실시예에 의해서, 본 발명의 방법은 혈관 투과성, 상해, 뇌졸증 또는 종양과 관련된 뇌부종과 같은 부종 또는 염증; 류마티스 관절염을 포함하는 건선 또는 관절염과 같은 염증성 장애와 관련된 부종; 천식; 화상과 관련된 전신 부종; 종양, 염증 또는 외상과 관련된 복수 및 흉막누출; 만성 기도 염증; 모세혈관 누출 증후군; 패혈증; 증가된 단백질 누출과 관련된 신장 질환; 및 노화 관련 반상퇴화 및 당뇨병성 망막병증과 같은 시각 장애를 특징으로 하는 임상 상태를 치료하는데 유용할 수 있다.

Flt1(1-3)-Fc의 아미노산 서열 분석은 염기 아미노산 잔기 리신의 흔하지 않은 높은 번호(46)의 존재를 밝혀냈다. Flt1(1-3)-Fc의 IEF 분석은 단백질이 9.3 이상의 pl을 가지고 있어서, 단백질이 매우 염기성일 것이라는 예전을 확증한다. Flt1(1-3)-Fc 단백질의 염기성 성질은 그것을 세포외 매트릭스 성분에 결합시키고, 이 상호작용이 마우스에 투여되는 경우에, Flt1(1-3)-Fc에 의해 나타난 매우 짧은 검출가능한 순환 혈청 반감기의 원인임에 틀림없다는 것을 가정하게 했다. 본 가설을 시험하기 위해서, Flt1(1-3)-Fc 단백질을 리신 잔기에서 아세틸화하여 염기 전하를 감소시켰다. 그다음, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 하기에 개시된 분석법에서 시험했다.

하기의 실시예는 제한의 방법이 아닌 예시의 방법으로 제공된다.

실시예 1: CHO K1 세포에서 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 발현

표준 분자 생물학 기법(예를 들어, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory), 분자 생물학에서 통상의 프로토콜(Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)을 사용하여, Flt1(1-3)-Fc를 코딩하는 유전자를 발현 벡터 pEE14.1(Lonza Biologics, plc)의 CMV 프로모터의 다중 클로닝 부위에 삽입하였다. CHO K1 세포를 리포펙타민(Gaithersburg, MD)을 사용하여 pEE14.1/Flt1(1-3)-Fc DNA 구조체로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션된 CHO K1 세포를 Sigma Inc., St Louis, MO로부터의 25 μM 메티오닌 술포시민(MSX)을 함유하는 무글루타민 DMEM(JRH, Kansas City, MO)에서 배양했고, 고 재조합 단백질 발현체를 사람의 Fc를 포

획 및 검출하는 표준 면역분석법을 사용하여 100 이상의 수동-선택 콜로니 분리균의 CHO K1 세포 상청액을 스크리닝함으로써 얻었다. 선택된 수동-선택 클론을 100 μM MSX 의 존재하에서 증폭시킨 다음, 증폭된 클론을 다시 스크리닝했다. 가장 생산성이 좋은 클론은 55 pg/세포/일의 재조합 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 특이적 생산성을 가졌다.

선택된 클론을 225cm² T-플라스크(Corning, Acton, MA)에서 확장시킨 다음, 상기에 개시된 세포 배지를 사용하여 8.5L 롤러병에 넣었다(Corning, Acton, MA). 표준 트립신화에 의해 롤러병으로부터 세포를 제거했고, 3.5L 의 혼탁액 배지에 넣었다. 혼탁액 배지는 5L Celligen 생물학적 반응기에서(New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) 0.3×10^6 세포/ml 의 밀도로 5% 태아 소 혈청(FBS from Hyclone Labs, Logan, UT), 100 μM MSX 및 GS 보충물(JRH Scientific, Kansas City, MO)을 함유하는 무글루타민 ISCHO 배지(Irvine Scientific, Santa Ana, CA)로 구성된다. 세포가 3.6×10^6 mL 의 밀도에 달하고, 혼탁액에 적용시킨 후에, 5% 태아 소 혈청을 가진 20 L 의 ISCHO 배지에서 0.5×10^6 세포/mL 의 밀도로 60 L 생물학적 반응기(ABEC, Allentown, PA)에 옮겼다. 2일 후에, 추가적인 20 L 의 ISCHO + 5% 태아 소 혈청을 생물학적 반응기에 첨가했다. 세포를 추가적인 2 일동안 배양되어 최종 밀도 3.1×10^6 세포/mL 에 이르도록 허용했고, 수집시에 최종 Flt1(1-3)-Fc 농도는 95mg/L 였다. 수집시에 세포를 0.45 μm Prostak 여과기(Millipore, Inc., Bedford, MA)를 사용하여 접선 유동 여과에 의해 제거했다.

실시예 2: CHO K1 세포로부터 얻은 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 정제

Flt1(1-3)-Fc 단백질을 친화성 크로마토그래피에 의해 최초로 정제했다. 단백질 A 컬럼을 분자의 Fc 부분에 고특이성으로 결합시키는데 사용했다. 그 다음, 친화성-정제 단백질을 농축했고, SEC 컬럼상에 통과시켰다. 그 다음, 단백질을 공식화 완충액에 용리시켰다. 하기에서 이러한 과정을 상세하게 개시한다.

물질 및 방법

모든 화학제를 J. T. Baker, Phillipsburg, NJ로부터 얻었고, PBS 는 예외적으로 Life Technologies, Gaithersburg, MD로부터 얻었다. 단백질 A Fast Flow 및 Superdex 200 제제 등급 수지를 Pharmacia, Piscataway, NJ로부터 얻었다. 단백질 농축용 장비 및 멤브레인을 Millipore, Bedford, MA로부터 얻었다.

Flt1(1-3)-Fc 단백질을 함유하는 약 40L 의 0.45 μm -여과된 CHO 조정 배지를 PBS 로 평형화된 290 mL 단백질 A Fast Flow 컬럼(10cm 직경)에 적용시켰다. 컬럼을 350 mM NaCl 및 0.02% CHAPS를 함유하는 PBS 로 세척하고, 결합 단백질을 10 mM Na₂HPO₄를 함유하는 20 mM 시트르산으로 용리시켰다. 용리물에서 단일 피크를 수거했고, 그것의 pH를 1M NaOH 로 중성으로 올렸다. 용리물 분획을 접선 유동 여과 및 교반된 세포 농축 모두로 10 K 재생성 셀룰로스 멤브레인을 사용하여 약 9mg/mL 로 농축시켰다. 응집물 및 다른 오염물을 제거하기 위해서, 농축된 단백질을 Superdex 200 제제 등급 수지(10 cm × 55 cm)로 팩된 컬럼에 적용시켰고, 5% 글리세롤을 함유하는 PBS 에서 전개했다. 주요 피크 분획을 모았고, 무균 여과했고, 엘리퀴트했고, -80°C 에서 저장했다.

실시예 3: Flt1(1-3)-Fc 단백질의 아세틸화

2 μg 의 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 술포-NHC-아세테이트 변형 키트와 함께 제공된 지시 매뉴얼에 개시된 대로 아세틸화했다(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, Cat.#;26777).

실시예 4: 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 특징

(a) IEF 분석: Flt1(1-3)-Fc 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc를 표준 IEF 분석으로 분석했다. 도1에 도시된 대로, Flt1(1-3)-Fc 단백질은 젤로 이동할 수 없어서 표준에서 가장 높은 pl 9.3 이상을 가져야만 한다. 그러나, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 젤상으로 이동할 수 있고, 약 5.2 의 pl로 평형화될 수 있다. 결과는 아세틸화는 단백질의 순 양전하와 따라서 그것의 pl 도 상당히 감소시킨다.

(b.) 세포와 매트릭스 성분에의 결합

세포와 매트릭스 성분에의 결합을 시험하기 위해서, 세포와 매트릭스 성분과의 상호작용을 모방하도록 설계된 분석법에서 Flt1(1-3)-Fc 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc를 시험했다. 분석법에서, 96 웰 조직 배양물 플레이트를 Matrigel(BioCoat MATRIGEL® matrix thin layer 96 well plate, Catalog#;40607, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)로 코팅한

다. 플레이트를 웰에 첨가된 다양한 농도의 Flt1 (1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 또는 rTie2-Fc(무관한 대조군)단백질과 함께 인큐베이션한다. 플레이트를 실내온도 또는 37°C에서 1-2시간동안 인큐베이션한 다음에, 결합된 단백질의 검출은 웰에 제2의 알칼리 포스파타제-결합 항-사람의 Fc 항체의 첨가로 이루어진다. 최종적으로, 알칼리 포스파타제 기질을 웰에 첨가하고 광밀도를 측정한다. 도 2는 분석 결과를 도시한다. 무관한 조절 단백질 rTie2-Fc와 마찬가지로, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 Matrigel 코팅 플레이트에 어떤 결합도 보이지 않은 반면에, 비-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 의미있는 결합을 나타낸다. 결과는 염기 아미노산 잔기의 아세틸화는 체내에 노출된 양으로 하전된 단백질 및 음으로 하전된 세포외 매트릭스 성분간에 존재하는 전하 상호작용을 방해하는 데 효과적인 방식이라는 것을 나타낸다.

실시예 5: Flt1 (1-3)-Fc 단백질의 폐길화

단백질의 폐길화(폴리에틸렌 글리콜-PEG)는 면역성을 최소화하는 반면에, 안정성 및 생물학적 이용가능성을 개선시킴으로써 체내 잠재성을 증가시키는 것을 보였지만(상기 언급된 참고문헌 참조), 신장 사구체에 의해서 여과되기에 너무 큰 폐길화 분자는 그들의 약물동태학적 성질을 개선시킬 것이라는 것이 역직관된다. 이론에 뒷받침되지 않고도, 출원인은 Flt1 (1-3)-Fc 분자의 폐길화는 아마도 양 전하를 변경시키거나, Flt1(1-3)-Fc의 pI를 감소시키는 것이 아니라 양전하가 세포외 매트릭스와 상호작용하는 것을 물리적으로 차단함으로써 약물동태학적 성질을 개선시킬 수 있다는 것을 가정했다. 출원인은 하기에 개시된 20 K PEG의 서열을 부착함으로써 Flt1(1-3)-Fc 분자의 약물동태학적 성질을 개선시키려는 시도를 결심했다.

물질 및 방법

CHO 세포로부터 유래된 정제된 Flt1(1-3)-Fc(상기 참조)를 하기의 폐길화 실험에 사용했다. 기능화된 PEG를 Shearwater Polymers, Huntsville, AL; Bicine from Sigma, St Louis, MO로부터 얻었고; Superose 6 컬럼을 Pharmacia, Piscataway, NJ로부터 얻었고; PBS를 Life Technologies, Gaithersburg, MD로부터 10X 농축물로서 얻었고; 글리세롤을 J. T. Baker, Phillipsbur, NJ로부터 얻었고; Bis-Tris precast 겔을 Novex, CA로부터 얻었다.

아민-특이적 말단 부분으로 기능화된 20K PEG 가닥을 PEG:단백질 화학량론이 다양한 서로 다른 반응 상태를 평가하기 위해서 셋업된 소규모 반응 연구에 사용했다. 표준 SDS-PAGE에 대한 샘플의 반응 및 분석에 기초하여, 1.5 mg/mL 농도의 Flt1(1-3)-Fc를 1:6의 PEG-대-Flt1(1-3)-Fc 단량체 몰비율에서 20K SPA-PEG(PEG 숙신이미딜 프로피오네이트)분자와 pH 8.1에서 재반응시켰다. 반응을 하룻밤동안 8 °C에서 진행되도록 허용했다. 최초 정제를 위해서, 반응 산물을 5% 글리세롤을 함유하는 PBS로 평형화된 10 mm × 30 cm Superose 6 컬럼에 적용시켰다. 폐길화 Flt1(1-3)-Fc를 분리하는 것으로 보인 컬럼은 폐길화 정도에 기초했다. 감소 및 비-감소 SDS-PAGE 겔에 대한 밴딩 패턴을 판단함으로써 제1의 모노-폐길화 및 디-폐길화 이량체 Flt1(1-3)-Fc로 보이는 것에 해당하는 분획을 모았다. 단백질 농도를 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정했다. 폐길화 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 무균 여과했고, 엘리퀴트했고, -40 °C에서 저장했다.

실시예 6: Biocore-기초 분석법에서 비변형, 아세틸화, 및 폐길화 Flt1(1-3)-Fc의 결합

비변형, 아세틸화, 및 폐길화 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 Flt1 리간드, VEGF에 결합하는 능력을 평가하기 위한 Biocore-기초 분석법에서 시험했다. 분석법에서, 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 Biacore 칩 표면상에 고정되었고(Biacore Instruction Manual, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, for standard procedures 참조), 0.2 µg/ml VEGF 및 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 또는 폐길화 Flt1(1-3)-Fc(각 25µg/ml)를 함유하는 샘플을 Flt1(1-3)-Fc-코팅 칩상에 통과시켰다. 비특이적 결합의 효과를 최소화하기 위해서, 결합 샘플을 0.5M NaCl 세척물로 세척했다. 1 샘플에서, 비변형 Flt1(1-3)-Fc를 혜라핀과 혼합했다. 혜라핀은 음으로 하전된 분자이고, Flt1(1-3)-Fc 단백질은 양으로 하전된 분자여서, 2 분자가 함께 혼합된 경우에, 그들은 각각의 전하를 통해 상호작용하여야만 한다. 이것은 본질적으로 분자가 키메라 또는 유전적으로 변형된 것과 같이 행동하도록 만들어서 전하 상호작용에 의해서 결합에 대한 그것의 전하 및 경향을 감소시키도록 하는 Flt1(1-3)-Fc 본래 양 전하를 중성화시킨다. 도 3에 도시된 대로, 아세틸화(컬럼 13-16), 폐길화(컬럼 17-20), 및 혜라핀-처리 Flt1(1-3)-Fc(컬럼 21-24)각각은 대조군(컬럼 1-4) 및 무관한 단백질(컬럼 5-8)에 비하여, VEGF 결합에 대한 Biacore 칩-결합 Flt1(1-3)-Fc와 완전하게 경쟁할 수 있다. 비변형 Flt1(1-3)-Fc(컬럼 5-6)은 VEGF 결합에 대한 Biacore 칩-결합 Flt1(1-3)-Fc와 단지 부분적으로 경쟁하는 것을 보였다. 그러나, 0.5M NaCl(컬럼 7-8)로 결합 샘플을 세척하는 것은 변형된 형태의 Flt1(1-3)-Fc와 유사한 결합 프로파일을 초래하여 비변형 단백질이 염세척에 의해 제거될 수 있는 칩에 대한 비특이적 결합을 나타냈다.

실시예 7: ELISA-기초 분석법에서 비변형, 아세틸화, 및 폐길화 Flt1(1-3)-Fc의 결합

Flt 수용체 리간드 VEGF 와의 결합력을 평가하기 위해서 표준 ELISA-기초 분석법에서 비변형, 아세틸화, 및 페길화 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 시험했다. 도 4 에 도시된 대로, 페길화 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질 모두 VEGF 와 결합할 수 있었고, 페길화 또는 아세틸화에 의하여 단백질을 변형하는 것은 그것의 리간드와의 결합력을 파괴하지 않는다는 것을 증명한다.

실시예 8: 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 및 페길화 Flt1(1-3)-Fc의 약물동태학적 분석.

체내 실험은 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 및 페길화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 약물동태학적 프로파일을 평가하도록 설계되었다. Balb/c 마우스 (23-28g; 3 마우스/군)에 4mg/kg 의 비변형, 아세틸화, 또는 페길화 Flt1(1-3)-Fc 를 피하로 주입했다. 단백질 주입 후 1, 2, 4, 6, 24 시간, 2 일 및 3 일 후에 마우스의 꼬리를 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc 단백질을 검출하기 위해 설계된 표준 ELISA-기초 분석법으로 혈청을 분석했다. 요약하면, 분석법은 VEGF 로 ELISA 플레이트를 코팅하는 단계, 혈청을 함유하는 비변형, 아세틸화, 또는 페길화 Flt1(1-3)-Fc 에 결합하는 단계, 및 알칼리 포스파타제에 연결된 항-Fc 항체로 리포터하는 단계를 포함한다. 도 5 에 도시된 대로, 모든 Flt1(1-3)-Fc 단백질에 대한 Tmax 는 6 시간 및 24 시간 시간 포인트내였다. 상이한 단백질에 대한 Cmax는 하기와 같았다: 비변형 : 0.06 µg/ml – 0.15µg/ml; 아세틸화: 1.5µg/ml-4.0µg/ml; 및 페길화: 약 5µg/ml.

실시예 9: Flt1(1-3)-Fc 의 단계 아세틸화

세포외 매트릭스 성분에의 결합을 제거하는데 필요한 아세틸화의 최소량을 결정하기 위해서, 아세틸화 반응 혼합물에서 증가하는 아세틸화 몰과량을 사용함으로써 단계식 형태로 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 아세틸화하도록 설계했다. 몰과량의 범위는 하기와 같았다: Flt1(1-3)-Fc 단량체의 1 몰당 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 및 100 몰의 아세틸화 시약. 반응을 술포-NHS-아세테이트 변형 키트로 제공된 지시 매뉴얼에서 상세하게 개시된 대로 수행했다(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, Cat.#; 26777).

실시예 10: 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 의 특징

(a). IEF 분석 비변형 Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 표준 IEF 분석으로 분석했다. 도 6A-6B 에 도시된 대로, 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 그것의 최고치 pl(9.3 이상)때문에 젤로 이동시킬 수 없었다. 그러나, 대부분의 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 샘플(30-100 배 몰과량 샘플)은 젤로 이동하고 단백질의 아세틸화의 정도에 따라서, 4.55-8.43 사이 범위에서 pl 로 평형화될 수 있다. 결과는 아세틸화는 투여량-의존 방식으로 단백질의 양 전하를 변화시킬 수 있고, pl 의 감소는 아세틸화의 정도를 조절함으로써 조절될 수 있다는 것이 증명된다.

(b) 세포외 매트릭스 성분에 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 의 결합

세포외 매트릭스 성분에의 결합을 시험하기 위해서, 세포외 기질 성분과 상호작용을 모방하도록 설계된 상기-개시된 분석법에서 Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 를 시험했다. 다양한 농도의 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc (10, 20, 및 30 배 몰과량 샘플), 또는 rTie2-Fc(무관한 대조군) 단백질을 웰에 첨가했다. 플레이트를 실내온도 또는 37 °C 에서 1-2 시간동안 인큐베이션한 다음 결합 단백질의 검출을 웰에 제2의 알칼리 포스파타제-결합 항-사람 Fc 항체를 첨가함으로써 수행했다. 연이어서, 알칼리 포스파타제 기질을 웰에 첨가하고, 광학밀도를 측정했다. 도 7 은 분석 결과를 도시한다. 무관한 대조군 단백질 rTie2-Fc 와 같이, 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc(20 및 30 배 몰과량 샘플)은 Matrigel 코팅된 플레이트에 어떤 의미있는 결합을 나타내지 않은 반면에, 비아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 의미 있는 결합을 나타냈다. 결합은 Flt1(1-3)-Fc 단백질이 포화시킬 수 없는 더욱 전체적인 전하-매개 상호작용보다는 특정 부위에 결합할 수 있다는 것을 나타내면서 포화될 수 있다. 10 배 몰과량 샘플은 감소된 결합을 보였지만, 아세틸화의 정도는 세포외 기질 성분과의 결합을 완전히 차단하기에 충분하지 않았다. 20 배 몰과량 및 그 이상의 샘플은 IEF 분석(도 6A 및 6B)이 더 낮은 몰과량 샘플은 여전히 더 큰 순 양전하를 가졌다는 사실을 제외하고는 어떤 검출가능한 결합을 보이지 않았다. 결과는 세포외 기질 성분과의 결합을 제거하기 위해서 모든 이용가능한 염기 아미노산을 완전히 아세틸화시킬 필요는 없다는 것을 증명한다.

(c). Biacore-기초 분석법에서 단계 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc의 결합

비변형 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 Flt1 리간드, VEGF 에의 결합 능력을 분석하기 위해서 Biacore-기초 분석법에서 시험했다. 분석법에서, 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질(0.5, 1.0, 또는 5.0 µg/ml)을 Biacore 칩의 표면에 고정시켰고(표준 과정은 Biacore Instruction Manual, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, 참조), 0.2 µg/ml VEGF 및 비변형

Flt1(1-3)-Fc(0.5, 1.0, 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 10 개의 서로 다른 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 샘플(각각 0.5, 1.0, 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 용액을 Flt1(1-3)-Fc-코팅된 칩위로 통과시켰다. 도 8에 도시된 대로, 아화학량론 비율(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비변형 Flt1(1-3) 또는 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 대 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) VEGF에서, 용액내에 VEGF에 완전히 결합하기 위한 충분한 Flt1(1-3)-Fc(비변형 또는 단계-아세틸화)는 없다. 약 1:1 화학량론 비율인 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서, 비변형 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 VEGF 결합에 대하여 더욱 경쟁할 수 있지만, 이용가능한 VEGF에 완전히 결합할 수 있는 더 충분한 Flt1(1-3)-Fc 단백질(비변형 또는 단계-아세틸화)이 여전히 불충분하다. 그러나, 1:1 화학량론보다 몇 배 더 큰 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서, Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질 모두 아세틸화의 정도에 무관하게 VEGF에 결합할 수 있었다. 이것은 아세틸화는 VEGF에 결합하는 Flt1(1-3)-Fc 능력을 변경시키지 않는다는 것을 증명한다.

(d). 단계 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 의 약물동태학적 분석

비변형 Flt1(1-3)-Fc 및 단계 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 약물동태학적 프로파일을 평가하기 위해서 체내 실험을 설계했다. Balb/c 마우스에(23~28g) 4mg/kg의 비변형 또는 10, 20, 40, 60 및 100 배 몰과량 샘플의 단계 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc(비변형, 10, 20 및 40 배 몰과량 샘플용 2 마우스 및 60 및 100 배 몰과량 샘플용 2 마우스)를 피하로 주입했다. 마우스를 주입 후 1, 2, 4, 6, 24 시간, 2 일 및 3 일에서 꼬리를 잘라 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc를 검출하도록 설계된 ELISA-기초 분석법에서(상기 개시) 혈청을 분석했다. 도 9는 연구 결과를 상세히 개시한다. 시험된 모든 Flt1(1-3)-Fc 단백질에 대한 Tmax은 6 시간 시간 포이트이지만, Cmax는 하기와 같았다: 비변형 Flt1(1-3)-Fc: 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 10 배 몰과량 샘플: -0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 배 몰과량 샘플: -2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 배 몰과량 샘플: -4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 60 배 몰과량 샘플: -2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 배 몰과량 샘플: -1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 결과는 Flt1(1-3)-Fc의 아세틸화 또는 폐길화는 약물동태학적 프로파일을 개선시킨다는 것을 증명한다.

실시예 11: Mut1: Flt1(1-3 ΔB)-Fc 로 표시된 Flt1(1-3)-Fc 염기 영역 결실

돌연변이체의 제조

6 이하의 pl를 가지는 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 매우 양성으로 비변형된 Flt1(1-3)-Fc(pl > 9.3) 보다 더 나은 약물동태를 가진다는 관찰에 기초하여, 약물동태의 차이가 음으로 하전된 세포외 매트릭스 성분때문에 만들어지는 단백질의 순전하에 기인하는지 또는, 세포외 매트릭스 성분에 대하여 특정 결합 부위를 구성하는 Flt1(1-3)-Fc 단백질 표면상에 특정 위치가 있는지에 대한 의문이 있었다. 예를 들어, 많은 단백질은 종종 염기 잔기군으로 구성되는 헤라핀 결합 부위를 가지는 것으로 알려진다. 때때로, 잔기는 단백질의 제1차 서열상의 군으로 발견되고; 어떤 문헌은 이러한 헤라핀 결합 부위에 대하여 "공통 서열"으로 정의한다(예를 들어, Hileman, et al., 1998, Bioessays 20 (2): 156-67 참조). 다른 경우에, 단백질의 공지된 결정 구조는 단백질 표면상의 양으로 하전된 잔기를 나타내지만, 잔기는 제1차 서열의 상이한 영역에서 기원하고, 단백질이 제3차 구조로 폴딩되는 경우에만 함께 나타난다. 그러므로, 분리된 아미노산 잔기가 단백질 표면상의 염기 잔기군의 일부를 형성하는지를 추정하는 것은 어렵다. 그러나, 제1차 서열에서 양으로 하전된 아미노산 잔기군이 있다면, 잔기가 공간상 서로 가까이 위치하여 세포외 매트릭스 성분 결합 부위의 부분이 됨에 틀림없다고 추정하는 것이 합리적이다. Flt1 수용체가 광범위하게 연구되어 왔고, 다양한 도메인이 개시되었다(예를 들어, Tanaka et al., 1997, Jpn. J. Cancer Res 88: 867-876 참조). 본 출원의 도 10A-10D에 제시된 핵산 및 아미노산 서열과 관련하여, 서열의 개시에 위치한 분비를 위한 신호 서열을 확인하고, 뉴클레오티드 76-78에 의해 코딩된 글리신으로 확장하는 것이 가능할 수 있다. 성숙한 단백질은 핵산 서열의 뉴클레오티드 79에서 시작하여, Ser-Lys-Leu-Lys으로 시작한다. Flt1 Ig 도메인 1은 아미노산 Ser-Asp-Thr을 코딩하는 뉴클레오티드 79 내지 393으로 확장된다. Flt1 Ig 도메인 2는 뉴클레오티드 394 내지 687로 확장되고(Gly-Arg-Pro 내지 Asn-Thr-Ile로 코딩), Flt1 Ig 도메인 3는 뉴클레오티드 688 내지 996으로 확장된다(Ile-Asp-Val 내지 Asp-Lys-Ala를 코딩). 뉴클레오티드 997-1005로 코딩된 연결 아미노산 Gly-Pro-Gly 다음에 사람 Fc를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 있다(뉴클레오티드 1006-1701 또는 아미노산 Glu-Pro-Lys 내지 Pro-Gly-Lys-정지).

Flt 아미노산 서열의 더욱 상세한 분석은 군, 즉 도 10A-10D의 10 개중 6 개의 아미노산 잔기가 염기인 아미노산 잔기 272-281(KNKRASVRR)가 있다는 것을 밝혀냈다. 아미노산 서열은 수용체의 Flt Ig 도메인 3 내에 위치하고(도 11 참조), 이것은 그 자체로 VEGF 리간드의 결합에 필수적이지는 않지만, 리간드에 대한 더욱 높은 친화성 결합을 부여한다. 영역에서 Ig 도메인 2의 서열과 Ig 도메인 3의 서열 베열은 2 개의 Ig 도메인간의 매우 나쁜 베열이 있고, Ig 도메인 3에 약 10 개의 추가적인 아미노산 서열이 있다는 것을 나타낸다. 2 개의 도메인의 친화성 프로파일의 분석(MacVector computer software)은 단백질의 친화성 영역의 존재(도 12A-12B)를 나타낸다. 본 관찰은 Flt1 Ig 도메인 3의 실제 3 차원 구조는 Flt1 Ig 도메인 2가 아닌 어떤 형태의 돌출을 허용했다는 가설을 제기했다. 가설을 시험하기 위해서, 10 개의 추가적인 아미노산을 결실했고, 결과적인 단백질이 VEGF에 대한 수용체의 친화성을 심각하게 손상시키지 않고, 유리하게 약물동태

에 영향을 줄 수 있는지를 관찰하는데 시험되었다. 표준 분자 생물학 기법(예를 들어, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory), 포유동물 발현 벡터 pMT21 (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA)의 분자 생물학의 통상적인 프로토콜(Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)을 사용하여 제조된 DNA 구조체는 Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc 라 한다. Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc 구조체를 뉴클레오티드 814-843의 결실로 Flt1(1-3)-Fc로부터 유도했고(도 10A-10D로 제시), 이것은 Flt1 Ig 도메인 3의 고 염기성 10-아미노산 서열 Lys-Asn-Lys-Ar-Ala-Ser-Val-Arg-Arg-Arg가 결실된다.

최종 DNA 구조체를 ABI 373A DNA 시퀀서 및 Taq 디데옥시 종결자 순환 시퀀싱 키트(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)를 사용하여 서열을 확증한다. Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc의 서열은 도13A-13D에 제시된다.

실시예 12: Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc로 표시된 Flt1(1-3)-Fc 염기 영역 결실 돌연변이체의 제조

Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc로 표시된 제2의 결실 돌연변이체 구조체를 뉴클레오티드 79-393에 의해 코딩된; Flt1 Ig 도메인 1의 결실에 의하여 Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc 구조체로부터 유도했고, 용이하게는 뉴클레오티드 73-78(TCA GGT)를 TCC GGA로 변경했다. 이것은 관련 아미노산 서열, Ser-Gly를 변경하지 않고, 제한 부위(BspE1)를 도입했다. 표준 분자 생물학 기법(예를 들어, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory 참조), 포유동물 발현 벡터 pMT21(Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA)에서 분자 생물학의 통상의 프로토콜(Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)을 사용하여 제조된 DNA 구조체는 또한 ABI 373A DNA 시퀀서 및 Taq 디데옥시 종결자 순환 시퀀싱 키트(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)를 사용하여 서열을 확증했다. Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc의 서열은 도 14A-14C에 제시된다.

실시예 13: Mut3: Flt1(2-3)-Fc로 표시된 Flt1(1-3)-Fc 결실 돌연변이체의 제조

Mut3: Flt1(2-3)-Fc로 표시된 제3의 결실 돌연변이 구조체를 Flt Ig 도메인 3가 본래대로라는 것을(염기 영역 아미노산은 결실되지 않음) 제외하고는 Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc 구조체와 같은 방식으로 제조했다. 구조체를 표준 생물학 기법을 사용하여 제조했고, 최종 구조체를 상기 개시대로 서열을 확증했다. Mut3:Flt1(2-3)-Fc의 서열은 도 15A-15C에 제시된다.

실시예 14: Flt1(1-3)-Fc 염기 영역 N-글리코실화 돌연변이체 표시된 Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc의 제조

N-글리코실화 부위가 Flt Ig 도메인 3의 염기 영역의 가운데 도입된 최종 구조체를 만들었다. 구조체를 Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc로 표시했고, GA에서 AC로 뉴클레오티드 824-825를 변경시키고, 결과적으로 코딩된 Arg 잔기(AGA)를 Asn 잔기(AAC)로 변경시켜서 만들었다(도 10A-10D 참조). 그러므로, 결과적인 아미노산 서열은 Ar-Ala-Ser에서 Asn-Ala-Ser으로 변경되고, 이것은 Asn 잔기에서 N-글리코실화의 첨가에 대한 표준 신호(Asn Xxx-Ser/Thr)와 일치한다. Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc의 서열은 도 16A-16D에 제시된다.

실시예 15: 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc, 및 Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc 돌연변이체의 특징.

(a) 세포외 매트릭스 성분에의 결합

3개의 변형된 단백질이 다소 개선된 약물동태학적 성질을 가지는지를 결정하기 위해서, Matrigel 코팅된 96-웰 디쉬(상기 개시)를 다양한 농도의 돌연변이체 단백질과 함께 인큐베이션했고, 항-사람 Fc/알칼리-포스파타제 결합 항체로 검출했다. 도 18에 도시된대로, 본 실험은 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 이들 벽에 열심히 결합할 수 있는 반면에, Mut3:Flt1(2-3)-Fc 단백질은 다소 더욱 약하게 결합하고, Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc 단백질은 더욱 약하게 결합하고, Mut2:Flt1(2-3_{△B})-Fc 단백질은 어떤 다른 돌연변이체 단백질보다 더욱 약하게 결합하는 최상의 프로파일을 도시했다. Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc 글리코실화 돌연변이체 단백질은 Matrigel 분석법에 대한 단지 부수적인 잇점만을 보였다. 결과는 양성 아미노산의 1차 서열이 세포외 매트릭스 성분과 전하 상호작용에서 감소를 초래하는 제1의 서열로부터 제거될 수 있다는 가설과 일치한다.

(b) Biacore-기초 분석법에서 Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc 및 Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc의 결합

Flt1 리간드, VEGF에 결합하는 비변형 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 및 유전적으로 변형된 Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc 및 Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc 단백질의 능력을 평가하기 위해서 Biacore-기초 분석법에서 시험했다. 분석법에서, 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질(0.25, 0.5, 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 Biocore 칩의 표면상에 고정시켰고(Biacore Instruction Manual, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, for standard procedures 참조), 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF 및 비변형 Flt1(1-3)-Fc(약(0.25, 0.5, 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 정제된 아세틸화 Flt1(1-3)Fc (약(0.25, 0.5, 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함유하는 정제되거나 COS 세포 상청액, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc(약(0.25, 0.5, 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함유하는 COS 세포 상청액, 또는 Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc(약(0.25, 0.5, or 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함유하는 COS 세포 상청액을 함유하는 용액을 Flt1(1-3)-Fc-코팅 칩상에 통과시켰다. 도 17에 도시된 대로, 아화학량론 비율에서(0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Flt1(1-3)-Fc의 비변형, 아세틸화 또는 유전적으로 변형된 샘플 대 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF), Biacore 칩상에 고정된 Flt1(1-3)-Fc에 대한 VEGF의 결합을 차단하기에 불충분한 Flt1(1-3)-Fc 단백질이 있다. 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비변형, 아세틸화 또는 유전적으로 변형된 Flt1(1-3)-Fc 단백질에서, 화학량론 비율은 약 1:1이고, Biacore 칩과 VEGF 결합 차단력의 증가가 있다. 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비변형, 아세틸화 또는 유전적으로 변형된 Flt1(1-3)-Fc 단백질에서, 화학량론 비율은 약 10:1이고, Flt1(1-3)-Fc 단백질은 Biacore 칩과 VEGF의 결합을 차단할 수 있었지만, 등가는 아니다. 비변형, 아세틸화, 및 Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc는 VEGF 결합을 차단할 수 있는 능력이 본질적으로 같은 반면에, Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc는 결합을 차단하는데 다소 덜 충분하다. 결과는 우세하게 음으로 하전된 아미노산의 1차 서열을 유전적으로 제거함으로써 양으로 하전된 분자의 비특이적 결합을 감소시키는 것이 가능하다는 가설을 확증한다.

(c) ELISA-기초 분석법에서 Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc, Mut2 : Flt1(2-3_{△B})-Fc Mut3: Flt1(2-3)-Fc의 결합

3 개의 돌연변이체 단백질이 Flt 리간드 VEGF에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해서, VEGF로 코팅된 96-웰 플레이트가 다양한 농도의 각 돌연변이체 단백질과 함께 인큐베이션하여 결합실험을 하고, 세척 후에 결합된 양을 알칼리 포스파타제 결합 항-사람 Fc 항체와 함께 인큐베이션하여 검출했고, 적당한 알칼리 포스파타제 기질의 첨가에 의해서 비색으로 정량화했다. 도 19에서 도시된 대로, 본 실험은 모든 돌연변이체 단백질은 시험된 농도에서 VEGF에 유사하게 결합할 수 있다는 것을 도시했다.

실시예 16: 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc 및 비변형 Flt1(1-3)-Fc의 약물동태학적 분석.

체내 실험은 비변형 Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc, 및 40 배 몰과량 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 약물동태학적 프로파일을 평가하도록 설계되었다. Balb/c 마우스(25-30g)에 4mg/kg의 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 40 배 몰과량 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 및 Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc 단백질(각 4 마우스)을 함께 피하로 주입했다. 마우스를 주입 후 1, 2, 4, 6, 24 시간, 2 일, 3 일, 및 5 일에서 꼬리를 출혈시켰다. VEGF와 ELISA 플레이트를 코팅하는 단계, Flt1(1-3)-Fc를 결합하는 단계 및 알칼리 포스포타제에 연결된 항-Fc 항체로 리포트하는 단계를 포함하는 Flt1(1-3)-Fc를 검출하도록 설계된 ELISA에서 혈청을 분석했다. 도 20에 도시된 대로, 3 개의 시약에 대한 Cmax는 하기와 같았다: 비변형 Flt1(1-3)-Fc - 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 40 배 몰과량 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc - 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 및 Flt1(1-3_{△B})-Fc - 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

실시예 17: 변형된 Flt1 수용체 벡터 구조체

Flt 수용체의 변형된 버전(VEGFR1 으로도 공지)을 제조하는 이유는 Flt1의 단백질 서열이 매우 염기성이어서, 세포외 기질(ECM)에 부착할 것 같기 때문이다. Flt의 매우 염기성 성질은 아마도 비변형 Flt1(1-3)-Fc(상기 개시)를 치료제로서 사용하는 것을 어렵게 만드는 나쁜 약물동태를 가지는 이유를 설명한다. 상기에 개시된 대로, 화학적으로 변형된 형태의 40 배 몰과량의 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 이하 A40은 비아세틸화 Flt1(1-3)-Fc에 비하여 매우 개선된 약물동태학적(PK) 프로파일을 나타냈다. 그러므로, A40에 의해 나타난 개선된 PK 프로파일을 가지고 VEGF에 대한 강한 결합력을 유지할 수 있는 Flt1 수용체 분자의 변형된 형태를 재조합적으로 발현시키는데 사용될 수 있는 DNA 분자를 유전적으로 제조하려는 시도를 했다.

Flt1의 제1의 Ig 도메인(중성 pH에서 순전하 +5를 가짐)은 VEGF에 대한 강한 결합에 필수적이지 않아서, 이 도메인은 결실되었다는 것이 문헌에 공지된다. 제3의 Ig 도메인(순전하 +11을 가짐)은 결합에 필수적이지는 않지만, 제2의 Ig 도메

인보다 VEGF에 대한 더욱 강한 친화성을 부여하므로, 그것을 완전히 제거하는 대신에, Flt1 수용체 유사체 Flk1(VEGFR2로 공지) 및 Flt4(VEGFR3로 공지)의 등가 도메인으로 대체되었다. 키메라 분자(R1R2(각각 Flt1.D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc△C1(a) 및 R1R3(Flt1D2.VEGFR3D3-Fc△C1(a) 및 VEGFR1R3-Fc△C1(a)이고, 여기에서 R1 및 Flt1D2 = Flt1의 Ig 도메인 2(VEGFR1); R2 및 Flk1D3 = Flk1의 Ig 도메인 3(VEGFR2); 및 R3 및 VEGFR3D3 = Flt4의 Ig 도메인 3(VEGFR3)로 표시)는 하기에 개시된대로 체외에서 ECM 결합 분석법으로 판단될 때, ECM에 훨씬 덜 부착하여서, 하기에 개시된대로 훨씬 개선된 PK를 가졌다. 게다가, 이 분자는 하기에 개시된 VEGF에 강하게 결합할 수 있고, 하기에 개시된 내피세포에서 발현된 천연 Flk1 수용체의 인산화를 차단할 수 있었다.

(a) 발현 플라스미드 pFlt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)의 제조

발현 플라스미드 pMT21.Flt1(1-3).Fc(6519bp) 및 pMT21.Flk-1(13).Fc(5230bp)는 각각, 암피실린 내성 및 사람의 Flt1 및 사람의 Flk1의 Ig 도메인 1-3의 Fc-표지 버전을 코딩하는 플라스미드이다. 이 플라스미드는 각각의 Ig 도메인의 PCR 증폭에 이어서, 2 도메인의 단일 단편으로의 융합을 얻기 위해서 더이상의 PCR 순환을 사용하여 Flk1의 Ig 도메인 3과 Flt1의 Ig 도메인 2의 융합으로 구성되는 DNA 단편의 제조에 사용되었다. Flt1의 Ig 도메인 2의 경우에, 5' 및 3' 증폭 프라이머는 하기와 같다:

5': bsp/flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTCGTAGAGATG-3')

3': Flt1D2-Flk1D3.as (5'-CGGACTCAGAACACATCTATGATTGTATTGGT-3')

5' 증폭 프라이머는 Flt1의 Ig 도메인 2 업스트림의 BspE1 제한 효소 부위를 코딩하고, 아미노산 서열 GRPFVEM(도21A-21C의 아미노산 서열 27-33에 해당)으로 한정된다. 3'프라이머는 Flt1의 TIID로 한정되고(도21A-21C의 아미노산 123-126에 해당), Flk1의 VVLS(도21A-21C의 아미노산 127-130에 해당)로 연속된 융합점을 가지고, Flk1 Ig 도메인 3의 5' 개시점에 직접적으로 융합된 Flt Ig 도메인 2의 역보체를 코딩한다.

Flk1의 Ig 도메인 3의 경우 5' 및 3' 증폭 프라이머는 하기와 같다:

5': Flt1D2-Flk1D3.s (5'-ACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGG-3')

3': Flk1D3/apa/srf.as (5'-GATAATGCCCGGGCCCTTTCATGGACCCTGACAAATG-3')

5' 증폭 프라이머는 상기에 개시된 대로, Flk1 Ig 도메인 3의 개시점에 직접 융합된 Flt Ig 도메인 2의 말단을 코딩한다. 3' 증폭 프라이머는 아미노산 VRVHEK(도21A-도21C의 아미노산 223-228에 해당)로 한정되고, 이어서 제한 효소 SrfI에 대한 인식 서열을 포함하는 브리지 서열로 연결된 Flk1 Ig 도메인 3의 말단을 코딩하고, 아미노산 GPG를 코딩한다. 연결 서열은 도 21A-21C의 아미노산 229-231에 해당한다.

각 도메인을 생산하기 위한 1 순환의 PCR 증폭후에, 산물을 튜브에서 결합시켰고, 융합 산물을 생산하기 위해서 프라이머 bsp/Flt1D2 및 Flk1D3/apa/srf.as(상기 개시)와 함께 더이상의 PCR 순환에 놓았다. PCR 산물은 제한 효소 BspE1 및 SmaI로 연속적으로 분해되었고, 플라스미드 pMT21/Flt1D2.Flk1D3.Fc를 제조하기 위해서 결과적인 614 bp 단편을 벡터 pMT21/△B2.Fc의 BspE1 내지 SrfI 제한 부위에 아클론했다. Flt1D2-Flk1D3 유전자 융합 삽입체의 뉴클레오티드 서열은 표준 서열 분석으로 증명되었다. 그 다음, 플라스미드를 제한효소 EcoRI 및 SrfI으로 분해하였고, 플라스미드 pFlt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)를 생산하기 위해서, 플라스미드 pFlt1(1-3)B2-Fc△C1(a)의 EcoRI 내지 SrfI에 결과적인 702 bp 단편을 옮겼다. Flt1D2.Flk1D3. Fc△C1(a) 키메라 분자의 완전한 DNA 및 추정된 아미노산 서열이 도21A-21C에 제시된다.

(b) 발현 플라스미드 pFlt1D2VEGFR3D3Fc△C1(a)의 제조

발현 플라스미드 pMT21.Flt1(1-3).Fc(6519bp)는 암피실린 내성 및 사람 Flt1 수용체의 Ig 도메인 1-3의 Fc-표지 버전을 코딩한다. 플라스미드를 PCR로 Flt1의 Ig 도메인 2를 함유하는 DNA 단편 생산에 사용했다. 세포 라인 HEL921.7의 RNA를 표준 RT-PCR 방법학을 사용하여 Flk1의 Ig 도메인 3를 생산하기 위하여 사용했다. 더이상의 PCR 증폭 순환은 단일 융합된 단편으로 2개의 Ig 도메인의 융합을 얻기 위해서 사용했다. Flt1의 Ig 도메인 2의 경우, 5' 및 3' 증폭 프라이머는 하기와 같았다.

5': bsp/Flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTCGTAGAGATG-3')

3': Flt1D2. VEGFR3D3. as (TTCCTGGCAACAGCTGGATATCTATGATTGTATTGGT)

5' 증폭 프라이머는 Flt1 의 Ig 도메인 2 업스트림의 BspE1 제한 부위를 업스트림을 코딩하고, 아미노산 서열 GRPFVEM(도22A-22C 의 아미노산 서열 27-33 에 해당)으로 한정된다. 3' 증폭 프라이머는 Flt1 의 TIID 로 정의되고(도22A-22C 의 아미노산 123-126 에 해당) VEGFR3의 IQLL(도22A-22C 의 아미노산 127-130에 해당)에 연속된 융합점을 가지고 VEGFR3 Ig 도메인 3 의 개시점에 직접적으로 융합된 Flt Ig 도메인 2 의 역보체를 코딩한다.

VEGFR3 의 Ig 도메인 3 의 경우, 5' 및 3' 증폭 프라이머는 하기와 같다:

5' : R3D3.s (ATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTA)

3' : R3D3.as (ATTTCATGCACAATGACCTCGGTGCTCTCCGAAATCG)

5' 및 3' 증폭 프라이머 모두 VEGFR3 의 서열에 일치한다. RT-PCR 반응의 296bp 증폭 산물을 표준 기법으로 분리했고, GPG 브리지(하기 참조)에 의해서 Flk1D3 도메인을 가진 Flt1D2 의 융합 및 Flk1D3 및 Fc 도메인의 융합을 허용하는 적당한 서열을 첨가하기 위해서 두번째 PCR 순환에 놓았다. 증폭 프라이머는 하기와 같았다:

5': Flt1D2.VEGFR3D3.s

(TCATAGATATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAG)

3' : VEGFR3D3/srf.as

(GATAATGCCGGGCCATTTCATGCACAATGACCTCGGT)

5' 증폭 프라이머는 상기에 개시된 대로, VEGFR3 Ig 도메인 3 의 개시점(5'말단)에 직접 융합된 Flt1 Ig 도메인 2 의 3'말단을 코딩한다. 3'증폭 프라이머는 VEGFR3 Ig 도메인 3 의 3' 말단을 코딩하고, 아미노산 VIVHEN(도22A-22C 의 아미노산 221-226 에 해당)으로 한정되고 이어서, Srf1 에 대한 제한 서열을 포함하는 연결서열이 따르고, 아미노산 GPG 를 코딩한다. 연결서열은 도 22A-22C 의 아미노산 227-229 에 해당한다.

각각의 Ig 도메인을 생산하기 위한 1 순환(Flt1 Ig 도메인 2) 또는 2 순환(Flt4 Ig 도메인 3)의 PCR 후에, PCR 산물을 투브에서 결합시켰고, 상기에 개시된 증폭 프라이머 bsp/Flt1D2 및 VEGFR3D3/srf.as 와 함께 더이상의 PCR 순환에 놓았다. 연이어, PCR 산물을 BspEI 및 SmaI 으로 분해했고, 플라스미드 pMT21/Flt1D2.VEGFR3D3.Fc를 제조하기 위해서 벡터 pMT21/Flt1△B2.Fc(상기 개시)의 BspE 내지 SrfI 제한 부위에 아클론했다. Flt1D2-VEGFR3D3 유전자 융합 삽입체의 서열을 표준 서열 기법으로 증명했다. 그다음, 플라스미드를 제한 효소 EcoRI 및 SrfI 으로 분해했고, pFlt1D2-VEGFR3D3.Fc△C1(a)로 표시된 플라스미드를 생산하기 위해서, 결과적인 693 bp 를 플라스미드 pFlt1(1-3)AB2-Fc△C1(a)의 EcoRI 내지 SrfI 제한 부위에 아클론했다.

Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a) 키메라 분자의 완전한 DNA 추정 아미노산 서열이 도22A-22C 에 제시된다.

실시예 18: 세포외 매트릭스 결합(ECM)결합 분석법

ECM-코팅 플레이트(Becton Dickinson catalog#; 35-4607)를 샘플을 첨가하기 전에 적어도 1 시간동안 글루타민(2mM), 100U 폐니실린, 100U 스트렙토마이신, 및 10% BCS 로 보충된 따뜻한 DME 로 재수화시켰다. 그 다음, 플레이트를 PBS + 10% BCS 에서 연속적인 2 배 희석으로 10 nM 에서 시작하면서, 다양한 농도의 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)로 실내온도에서 1 시간동안 인큐베이션했다. 그 다음 플레이트를 PBS + 0.1% Triton-X 를 가지고 3 번 세척했고, 1 시간동안 실내온도에서 알칼리 포스파타제-결합 항-사람 Fc 항체와 함께 인큐베이션했다(Promega, PBS 및 10% BCS 에서 1:4000). 그 다음, 플레이트를 PBS 0.1% Triton-X 로 4 회 세척했고, 알칼리 포스파타제 완충액/pNPP 용액(Sigma)을 색상 전개를 위해 첨가했다. 플레이트를 I = 405-570nm 에서 해독했다. 실험 결과는 도 23 에 도시되고, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a) 단백질은 Flt1(1-3)-Fc 단백질에 비하여 ECM 에 상당히 덜 고정적인것이 증명된다.

실시예 19: CHO-K1(E1A) 세포에서 pFlt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)의 일시적인 발현

상기에 개시된 pFlt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 플라스미드를 운반하는 E. coli DH10B 세포의 대규모(2L) 배양물을 Terrific 육즙(TB) 및 100 μ g/ml 암피실린에서 하룻밤동안 배양했다. 다음날, 플라스미드 DNA 를 제조자의 지시에 따라서 QIAgen Endofree Megaprep 키트를 사용하여 추출했다. 정제된 플라스미드 DNA 의 농도를 UV 분광계 및 형광계를 사용하여 표준 기법으로 결정했다. 플라스미드 DNA 를 제한효소 EcoRI 및 NotI 및 AseI 을 사용하여 앤리퀴트의 표준 제한 효소 분해에 의해 증명했다. 1% 아가로스 겔상에서 분석된 경우에 모든 제한효소 분해 단편은 예상된 크기에 해당한다.

40 개의 15 cm 페트리 디쉬를 4×10^6 세포/플레이트의 밀도로 CHO-K1/E1A 로 시팅했다. 플레이팅 배지는 10% Hyclone 태아 소 혈청(FBS), 100 U 폐니실린/100U 스트렙토마이신 및 글루타민(2mM)으로 보충된 Gibco Ham's F-12 였다. 다음날, 각 플레이트의 세포를 제조자의 지시에 따라서, 12 ml 부피로 Gibco Optimem 및 Gibco Lipofectamine 을 사용하여 6 μ g 의 pFlt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 플라스미드 DNA 로 트랜스펙션시켰다. 세포에 트랜스펙션 혼합물을 첨가한 4 시간 후에, 10% FBS 로 보충된 12 ml/플레이트의 Optimem 을 첨가했다. 플레이트를 하룻밤동안 5% CO₂, 37 °C 에서 인큐베이션했다. 다음날, 배지를 각 플레이트로부터 제거했고, 25 ml 발현 배지(글루타민(2mM) 및 1mM 나트륨 낙산 염으로 보충된 Gibco CHO-S-SFM II)를 첨가했다. 플레이트를 3 일동안 37 °C 에서 인큐베이션했다. 인큐베이션 3 일후에, 배지를 각 플레이트로부터 흡출했고, 세포를 웰렛하기 위해 와동하는 버킷 로터에서 400 rpm 으로 원심분리했다. 상청액을 무균 1L 병으로 기울여 따르고 하기에 개시된대로 발현 단백질을 정제했다.

실시예 20: pVEGFR1R2-Fc△C1(a) 발현 벡터의 제조

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

실시예 21. 변형된 Flt1 수용체 생산에 사용된 세포 배양 방법(a) Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 생산에 사용된 세포 배양 방법

상기 실시예 1 에 개시된 발현 플라스미드 pFlt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)를 사용하여 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 단백질을 생산하는 방법은 단백질 산물을 구성적으로 발현하는 재조합 차이니스 햄스터 난소(CHO K1/E1A) 세포의 혼탁 배양물을 포함한다. 세포를 생물학적 반응기에서 배양한 후 단백질 산물을 분리하고, 친화성 및 크기 배척 크로마토그래피로 정제하였다. 과정은 하기에 더 상세하게 제공된다.

세포 확장

세포 라인을 발현하는 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)를 함유하는 2 함유 T-225 cm² 플라스크를 배지에(GMEM + 10% 혈청, GIBCO) 8 개의 T-225 cm² 플라스크로 세포를 계대배양하여 확장했고, 37 °C 및 5% CO₂ 에서 인큐베이션했다. 플라스크가 합류점에 이른 경우에(약 3 내지 4 일), 세포를 트립신을 사용하여 분리했다. 신선한 배지를 트립신에 대한 더 이상의 노출로부터 세포를 보호하기 위해서 첨가했다. 세포를 원심분리했고 신선한 배지에서 재현탁한 후에 8 개의 850 cm² 롤로병에 옮기고, 합류할 때까지 37 °C, 5 % CO₂ 에서 인큐베이션했다.

생물학적반응기에서 혼탁 배양물

롤러병에서 배양된 세포를 표면으로부터 분리하기 위해서 트립신처리했고, 혼탁 배지로 세척했다. 세포가 3.5L 의 혼탁 배양물에서 배양된 5 L 생물학적반응기에 세포를 무균으로 옮긴다(New Brunswick Celligen Plus). 혼탁 배지는 5% 태아 소 혈청(Hyclone), GS 보충물(Life Technologies) 및 25 μ M 메티오닌 술폴시민(Sigma)이 첨가된 IS-CHO(Irvine Scientific)의 무글루타민 저 글루코스 변형이었다. 삽입 개스에 이산화탄소 또는 생물학적반응기에 탄산나트륨의 액체 용액을 첨가함으로써 pH 를 7.2 로 조정했다. 삽입 개스에 산소 또는 질소를 첨가함으로써 용해된 산소 수준을 30% 의 포화

에서 유지시켰고, 온도를 37 °C에서 조정했다. 밀도 4×10^6 세포/mL에 도달한 경우에, 생물학적반응기를 조절하기 위해서 같은 배지 및 조정포인트를 함유하는 40 L 생물학적반응기에 세포를 옮겼다. 온도 조정포인트를 세포 성장을 늦추도록 34 °C 까지 감소시켰고, 단백질 발현의 상대 비율을 증가시켰다.

(b) Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a) 생산에 사용된 세포 배양 방법

Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)에 대한 상기에 개시된 같은 방법학이 Flt1D2. VEGFR3D3.Fc△C1(a) 생산에 사용되었다.

실시예 22: 변형된 Flt1 수용체의 수집 및 정제

(a) Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)의 수집 및 정제

단백질 산물을 Millipore Prostak 접선 여과 분자 및 저절단 기계 펌프(Fristam)를 사용하여 세포를 보유하면서 생물학적 반응기로부터 무균으로 수집했다. 신선한 배지를 생물학적 반응기에 첨가하여 수집 여과동안 제거된 것을 대체했다. 그 다음, 약 40 L의 수집 여과물을 단백질 A Sepharose 수지(Amersham Pharmacia)를 함유하는 400 mL 컬럼에 로딩했다. 로딩후에, 수지를 10 mM 나트륨 포스페이트, 500 mM 염화나트륨, pH 7.2를 함유하는 완충액으로 세척하여 어떤 비결합 오염 단백질을 제거했다. Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 단백질을 pH 3.0 시트르산염 완충액으로 용리했다. 용리된 단백질을 Tris 염기의 첨가로 중화시켰고, -20 °C에서 동결시켰다.

단백질 A 단계로부터 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 단백질의 몇 개의 동결된 랫을 녹였고, 수거했고, Millipore 30kD 표시 분자량 컷오프(NMWCO) 접선 유동 여과멤브레인을 사용하여 농축시켰다. 단백질을 교반 세포 농축기(Millipore)에 옮겼고, 30kD NMWCO 멤브레인을 사용하여 30 mg/mL 까지 더 농축시켰다. 농축된 단백질을 포스페이트 완충 식염수 및 5% 글리세롤로 평형화된 Superdex 200 수지(Amersham Pharmacia)로 팩된 크기배척 컬럼상에 로딩했다. 같은 완충액을 컬럼을 전개하기 위해서 사용했다. Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 이량체에 해당하는 분획을 모았고, 0.22 마이크론 필터로 무균 여과했고, 앤리퀴트했고, 동결했다.

(b) Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)의 수집 및 정제

Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)에 대하여 상기에 개시된 것과 같은 방법을 Flt1D2. VEGFR3D3.Fc△C1(a)를 수집하고 정제하는데 사용했다.

실시예 23 : 일시적으로 발현된 VEGFR2에 대한 인산화 분석

사람의 제1차 복부중심의 정맥 내피세포(HUVEC), 통과 4-6을 무혈청 DME 고 글루코스 배지에서 2 시간동안 굽졌다. VEGF 수용체 Flt1, Flk1 및 Flt4 (VEGFR3)에 대한 리간드인 40 ng/ml(1nM) 사람의 VEGF165를 함유하는 샘플을 준비했고, 1 시간동안 실내온도에서 0.1% BSA를 함유하는 무혈청 DME-고 글루코스 배지에서 다양한 양의 변형된 Flt1 수용체 Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1 D2VEGFR3D3.Fc△C1을 예비인큐베이션했다. 세포를 상기 제조된 샘플 +/- VEGF165로 5 분동안 감염시킨 후에, 완전한 용해 완충액을 사용하여 전 세포를 용해했다. 세포 용리물을 VEGFR2 수용체의 C-말단에 대한 항체로 면역침전시켰다. 면역침전된 용리물을 4-12% SDS-PAGE Novex 겔에 로딩했고, 그 다음 표준 전이 방법학을 사용하여 PVDF 멤브레인에 옮겼다. 인산화 VEGFR2의 검출은 소위 4G10(UBI)인 항-포스포 티로신 mAb로의 면역블로팅으로 행했고, ECL-시약(Amersham)을 사용하여 전개했다. 도 25A-25C 및 26A-26B는 실험의 결과를 도시한다. 도 25A-25C는 VEGF165 리간드 자극으로 티로신 인산화된 VEGFR2(Flt1)의 웨스턴 블럿으로의 검출은 세포-표면 수용체는 VEGF와 함께 예비인큐베이션동안 사용된 변형된 Flt1 수용체에 따라 다양한 수준으로 인산화된다는 것을 도시한다. 도 25A에 도시된 대로, 1.5 몰과량의 Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) 또는 일시적인 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)에서, 대조군 배지 감염에 비하여 3 개의 변형된 Flt 수용체에 의해 수용체 자극의 완전한 차단이 있다. 대조적으로, 일시적인 Flt1D2VEGFR3D3.Fc△C1(a)는 VEGF 양성 대조군 감염에 비하여, 몰과량에서 의미있는 차단을 나타내지 않는다. 유사한 결과는 변형된 Flt 수용체가 VEGF165 리간드에 대하여 3 배 몰과량인 도 25B에 나타난다. 변형된 Flt 수용체가 VEGF165 리간드에 대해 6 배 몰과량인 도 25C에서, 일시적인 Flt1D2VEGFR3D3.Fc△C1(a)는 세포 표면 수용체의 VEGF165-유발 자극이 부분적으로 차단되는 것을 볼 수 있다.

도26A-26B에서, VEGF165 리간드 자극에 의한 트로신 인산화된 VEGFR2(Flt1)의 웨스턴 블럿으로의 검출은 세포-표면 수용체는 일시적인 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1 (a), 안정한 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a), 또는 일시적인 VEGFR1R2-Fc△C1(a)의 1 및 2 배 몰과량(도26A) 또는 3 및 4 배 몰과량(도26B)과 함께 예비인큐베이션된 VEGF165를 가지는 감

염 샘플에 의해서 인산화되지 않는다는 것을 도시한다. 시험된 모든 변형된 Flt1 수용체의 농도에서, 예비침전동안 VEGF165 리간드의 완전한 결합에 의해서 조정 배지 감염과 비교하여 비결합 VEGF165에 의한 세포-표면 수용체의 검출가능한 자극은 없다.

실시예 24: 세포 증식 생물학적분석법

시험 세포군은 TrkB 세포내 키나제 도메인에 융합되어서 키메라 분자를 생산하는 VEGFR2(Flk1)세포와 도메인을 코딩하는 DNA 삽입체를 포함하는 발현 플라스미드로 안정하게 트랜스펙션된 MG87 세포이다. 천연 VEGFR2(Flk1)세포내 키나제 도메인보다 TrkB 세포내 키나제 도메인이 사용된 이유는 VEGFR2(Flk1)의 세포내 키나제 도메인은 세포에서 vegf165로 자극된 경우에 강한 증식성 반응을 유발할 수 없기 때문이다. 총 길이 TrkB 수용체를 함유하는 MG87 세포는 BDNF로 자극된 경우에 강한 증식성 반응을 유발하여, TrkB 세포내 키나제 도메인이 증식성 반응 능력을 이용하기 위해서 VEGFR2(Flk1)의 세포내 키나제 도메인을 대체하도록 유전적으로 설계된다는 것이 공지이다.

5×10^3 세포/웰을 96 웰 플레이트에 플레이팅했고, 37 °C에서 2시간동안 정착하도록 허용했다. 하기의 변형된 Flt 수용체 Flt(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3. Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a), 및 천연 조절자로서 Tie2-Fc로 명명된 무관한 수용체를 40nM 내지 20pM으로 적정했고, 37 °C에서 1시간동안 인큐베이션했다. 그 다음, 규정 배지에서 사람의 재조합 VEGF165를 농도 1.56nM으로 모든 웰에 첨가했다. 플레이트를 37 °C에서 72시간동안 인큐베이션했고, 그 다음 MTS(Owen's reagent, Promega)를 첨가했고, 플레이트를 추가의 4시간동안 인큐베이션했다. 최종적으로, 플레이트를 450/570nm에서 분광광도계에서 해독했다. 실험 결과는 도 27에 도시된다. 대조군 수용체 Tie2-Fc는 어떤 농도에서 VEGF165-유발 세포 증식을 차단하지 않는 반면에, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)는 0.8nM의 반최대투여량으로 1.56nM VEGF165를 차단한다. Flt1(1-3)-Fc 및 Flt1D2.VEGFR3D3. Fc△C1(a)는 반최대투여량 ~2nM을 가지는 분석법에서 VEGF165를 차단하는 데 덜 효과적이다. VEGF165 만이 1.2 흡광도 단위의 해독 및 최저점 0.38 흡광도 단위의 해독을 나타낸다.

실시예 25: VEGF165에 대한 변형된 Flt 수용체의 결합 화학량론

(a) BIACore 분석법

사람의 VEGF165와 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc△C1(a)과의 상호작용의 화학량론을 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a) 표면에의 VEGF 포화 결합의 수준을 측정하거나, VEGF BIACore 칩 표면에의 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)의 결합을 완전하게 방해하는데 필요한 VEGF165 농도를 측정함으로써 결정했다.

변형된 Flt 수용체 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc△C1(a)를 아민-결합 화학을 사용하여 Biacore 칩(BIACORE)상에 1차 고정된 항-Fc 특정 항체로 포획했다. 블랭크 항체 표면을 네가티브 대조군으로 사용했다. VEGF165를 1시간동안 10 μl/분으로 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc△C1(a) 표면위에 1 nM, 10 nM, 및 50 nM의 농도로 주입했다. 실제 시간 결합 신호를 기록하고 포화 결합을 각 주입의 말기에 얻었다. 1 ng/ml에 등가의 1000 RU의 전환 인자를 사용하여, 결합 화학량론을 고정된 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)에 대해 결합된 VEGF165의 몰 비율로서 계산했다. 결과는 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 1 VEGFR1R2-Fc△C1(a) 분자(도 28)당 VEGF165 이량체 분자의 결합 화학량론을 나타냈다.

용액에서, 1nM 농도에서 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a) (Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)/VEGF165 상호작용의 KD 보다 1000배 높게 측정)를 다양한 농도의 VEGF165와 함께 혼합했다. 1시간 인큐베이션 후에, 용액에서 무 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)의 농도가 아민-결합된 VEGF165 표면에 대한 결합 신호로서 측정했다. 눈금 커브는 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) BIACore 결합 신호를 그것의 몰농도로 전환하는데 사용되었다. 데이타는 Flt1D2Flk1D3. Fc△C1(a) 용액에의 1nM VEGF165의 첨가는 VEGF165 표면에의 Flt1D2Flk1D3. Fc△C1(a) 결합을 완전하게 차단했다는 것을 도시했다. 결과는 1 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 분자(도 29 및 도 30)당 1 VEGF165 분자의 결합 화학량론을 제시했다. Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)의 농도가 첨가된 농도의 VEGF165의 함수로서 플롯된 경우에, 선형 부분의 경사는 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)에 대하여 1.06이고, VEGFR1R2-Fc△C1(a)에 대하여 -1.07이었다. 네가티브에 가장 가까운 경사의 정도는 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)의 1 분자에 결합된 1 분자의 VEGF165의 지표이다.

(b) 크기 배척 크로마토그래피

Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)를 3배 과량의 VEGF165 와 혼합했고, 수용체-리간드 복합체를 Pharmacia Superose 6 크기 배척 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 정제했다. 그 다음, 수용체-리간드 복합체를 그것을 그것의 성분 단백질로 분리하기 위하여 6M 구아니딘 히드로클로라이드를 함유하는 완충액에서 인큐베이션했다.

Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)를 6M 구아니디움 클로라이드에서 전개된 Superose 6 크기 배척 크로마토크래피 컬럼을 사용하여 VEGF165로부터 분리했다. 복합체 화학량론을 결정하기 위해서, 몇몇의 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 및 VEGF165를 주입했고, 최고치 피크 또는 피크 융화 강도를 주입된 단백질의 농도 함수로 플롯했다. Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)/VEGF 복합체의 성분을 분리하는데 사용된 것과 일치하는 조건에서 눈금을 교정했다. Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)/VEGF 복합체 조성물의 정량은 눈금 커브에 기초했다. 실험의 결과는 도 28에서 제시되고, 이것은 복합체에서 VEGF165 대 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)의 비율이 1: 1인 것을 도시한다.

실시예 26: 크기배척 크로마토그래피에 의한 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1 (a)/VEGF165 복합체의 결합 화학량론의 결정

Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)/VEGF165 복합체 제조

VEGF165(농도= 3.61 mg/ml) 를 몰비율 3:1(VEGF165:Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1 (a))로 일시적으로 발현된 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)(농도 = 0.9 mg/ml) CHO 세포와 함께 혼합했고, 하룻밤동안 4 °C 에서 인큐베이션했다.

(a) 음성 조건하에서 크기 배척 크로마토그래피(SEC)

비결합 VEGF165의 과량으로부터 복합체를 제거하기 위해서, 50 μl 의 복합체를 PBS 완충액으로 평형화된 Pharmacia Superose 12 PC 3.2/30 상에 로딩했다. 샘플을 유동율 40 $\mu\text{l}/\text{분}$ 으로 동일 온도, 동일 완충액으로 용리시켰다. SEC의 결과는 도 31에서 보여진다. 피크 #1은 복합체를 나타내고, 피크#2는 비결합 VEGF165를 나타낸다. 1.1 및 1.2 ml 사이에서 용리된 분획을 조합하였고, 구아니디움 히드로클로라이드(GuHCl)를 최종 농도 4.5M에 첨가하여 복합체를 해리시켰다.

(b) 해리 조건하에서 크기 배척 크로마토그래피(SEC)

수용체-리간드 복합체의 성분을 분리하고, 몰비율을 결정하기 위해서, 상기에 개시된 50 μl 의 해리된 복합체를 6 M GuHCl에서 평형화된 Superose 12 PC 3.2/30에 로딩했고, 실내온도에서 유동율 40 $\mu\text{l}/\text{분}$ 으로 동일 용액으로 용리했다. SEC의 결과는 도32에 도시된다. 피크 #1은 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)를 나타내고, 피크 #2는 VEGF165를 나타낸다.

(c) Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a):VEGF165 복합체 화학량론의 계산

수용체-리간드 복합체의 화학량론을 성분의 피크 영역 또는 가장 높은 피크로부터 결정했다. 각각 가장 높은 피크 또는 피크 영역에 해당하는 VEGF165 및 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)의 농도를 VEGF165 및 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)에 대한 표준 커브로부터 얻었다. 표준 커브를 얻기 위해서, 4 개의 서로 다른 농도(0.04 mg/ml-0. 3mg/ml)의 성분을 6M 구아니디움 클로라이드로 평형화된 Pharmacia Superose 12 PC 3.2/30 컬럼상에 주입했고, 실내온도에서 유동율 40 $\mu\text{l}/\text{분}$ 에서 동일 용액으로 용리시켰다. 표준 커브를 피크 영역 또는 최고 피크 대 단백질 농도를 도표화하여 얻었다. 성분의 피크 영역으로부터 결정된 VEGF165:Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)의 몰비율은 1:16 이었다. 성분의 최고 피크로부터 결정된 VEGF165:Flt1D2Flk1D3.Fc△C1 (a)의 몰비율은 1.10 이었다.

실시예 27: 온-라인 광산란을 가지는 크기 배척 크로마토그래피로 Flt1 D2Flk1D3.Fc△C1(a)/VEGF165 복합체의 화학량론의 결정

복합체 제조

VEGF165 를 몰 비율 3:1로 CHO 가 순간적으로 발현된 Flt1D2.Flk1D3. Fc△C1(a) 단백질과 함께 혼합했고 (VEGF165:Flt1D2Flk1D3.Fc△C1 (a)), 4 °C 에서 하룻밤동안 인큐베이션했다.

(a) 온-라인 광산란을 가지는 크기 배척 크로마토그래피(SEC)

MiniDawn 온-라인 산란 검출기(Wyatt Technology, Santa Barbara, California) 및 굴절률(RI) 검출기(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 가지는 크기 배척 크로마토그래피를 사용하여 수용체-리간드 복합체의 몰 중량(MW)을 결정했다. 샘플을 PBS 완충액에서 평형화된 Superose 12 HR 10/30 컬럼(Pharmacia)에 주입했고, 실내온도에서 유동율 0.5 ml/분으로 같은 완충액으로 용리했다. 도 33에 도시한 대로, 용리 프로파일은 2 피크를 보였다. 피크 #1은 수용체-리간드 복합체를 나타내고, 피크 #2는 비결합 VEGF-165를 나타낸다. MW는 LS 및 RI 신호로 계산했다. 같은 과정을 수용체-리간드 복합체의 각각의 성분의 MW를 결정하기 위해서 사용했다. 이 결정의 결과는 하기와 같다: 피크 위치에서 Flt1D2Flk1D3.Fc \triangle C1(a)/VEGF165 복합체의 MW는 157 300(도33)이고, 피크 위치에서 VEGF165의 MW는 44 390(도34)이고, 피크에서 R1R2의 MW는 113 300(도35)이다.

데이타는 Flt1D2Flk1D3.Fc \triangle C1(a)/VEGF 복합체의 화학량론이 1:1인 것은 Flt1D2Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 VEGF165에 대한 분자량의 총계에 대한 것에 상응하는 것을 나타낸다. 중요한 것은, 본 방법은 결론적으로 Flt1D2Flk1D3.Fc \triangle C1(a)/VEGF165 복합체는 단지 1 분자의 VEGF165 리간드 및 단지 1 분자의 Flt1D2Flk1D3.Fc \triangle C1(a)로 구성되었다는 것을 증명했다.

실시예 28 : Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)의 펩티드 맵핑

Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)에서 이황화 구조 및 글리코실화 부위를 펩티드 맵핑 방법으로 결정했다. 본 방법에서, 단백질은 최초로 트립신으로 절단되었다. 트립신 단편을 질량 분광계뿐만 아니라 N-말단 서열결정 기법과 결합된 HPLC로 분석하고, 확인했다. 트립신 분해물의 감소를 이황화-결합 함유 단편의 확인을 돋기 위해서 사용했다. PNGase F(Glyko, Novato, CA)로 트립신 분해물의 처리는 N-연결 글리코실화 부위를 가지는 단편의 확인을 돋기 위해서 사용했다. 결과는 수록된 도 36에 요약된다.

Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)에서 총 10개의 시스테인이 있고; 그중 6개는 Fc 영역에 속한다. Cys27은 Cys76에 확실히 이황화 결합을 한다. Cys121은 Cys 182에 확실히 이황화 결합을 한다. Fc 영역의 최초의 2개의 시스테인(Cys211 및 Cys214)은 다른 Fc 사슬에서 같은 2개의 시스테인을 가지는 분자내 이황화 결합을 형성한다. 그러나, 2 시스테인이 서로 효소적으로 분리되지 않을 수 있기 때문에, 디설파이드 결합이 같은 시스테인(예를 들어, Cys211과 Cys211) 또는 Cys211 및 Cys214 사이에서 발생하는지를 결정할 수 없었다. Cys216은 Cys306에 확실히 이황화 결합된다. Cys352는 Cys410에 확실히 이황화결합된다.

Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)에 5개의 가능한 N-연결 글리코실화 부위가 있다. 5개 모두가 다양한 정도로 글리코실화된 것으로 밝혀졌다. 완전한 글리코실화는 Asn33(아미노산 서열 NIT), Asn193(아미노산 서열 NST), 및 Asn282(아미노산 서열 NST)에서 관찰되었다. 게다가, 부분적인 글리콜실화는 Asn65 및 Asn120에서 관찰되었다. 글리코실화 부위는 도 36에서 밑줄로 강조된다.

실시예 29. 변형된 Flt 수용체의 약물동태학적 분석

(a) Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)의 약물동태학적 분석

Balb/c 마우스(25-30g)에 4mg/kg의 Flt1(1-3)-Fc(A40)를 피하로 주입했고, CHO는 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 일시적으로 발현했고, CHO는 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 안정하게 발현했고, CHO는 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)를 일시적으로 발현했다. 주입 후, 1, 2, 4, 6, 24시간, 2일, 3일 및 6일에서 마우스를 꼬리를 잘라 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)를 검출하도록 설계된 ELISA에서 혈청을 분석했다. ELISA는 VEGF165로 ELISA 플레이트를 코팅하는 단계, 검출 Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)를 결합하는 단계 및 호스 래디쉬 과산화효소에 연결된 항-Fc 항체로 리포트하는 단계를 포함한다. 실험 결과는 도 37에서 도시된다. Flt1(1-3)-Fc(A40)에 대한 Tmax은 6시간인 반면에 일시적인 그리고 안정한 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 일시적인 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)에 대한 Tmax은 24시간이었다. Flt1(1-3)-Fc(A40)에 대한 Cmax은 8 μ g/ml였다. 양 일과성(transient)의 경우(Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)), Cmax은 18 μ g/ml였고, 안정한 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)에 대한 Cmax은 30 μ g/ml였다.

(b) Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc \triangle C1(a)의 약물동태학적 분석

Balb/c 마우스(25-30g)에 4mg/kg의 Flt1(1-3)-Fc(A40)를 피하로 주입했고, CHO는 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 일시적으로 발현했고, CHO는 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc \triangle C1(a)를 일시적으로 발현했다. 주입 후, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 및

20 일에서 마우스의 꼬리를 잘라 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)를 검출하도록 설계된 ELISA 에서 혈청을 분석했다. ELISA 는 165 로 ELISA 플레이트를 코팅하는 단계, Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)를 결합시키는 단계 및 호스 래디쉬 과산화효소에 연결된 항-Fc 항체로 리포트하는 단계를 포함한다. Flt1(1-3)Fc(A40)는 5 일 후에 혈청에서 더이상 검출되지 않은 반면에, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)는 15 일 이상동안 검출가능했다. 실험의 결과는 도 38 에서 도시된다.

실시예 30 : 체내에서 종양 성장을 억제하는 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)의 능력 평가

체내에서 종양 성장을 억제하는 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)의 능력을 평가하기 위해서, 종양 세포 혼탁액이 심각한 조합 면역결핍성(SCID) 수컷 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하로 주입된 마우스가 사용되었다. 각각 서로 다른 형태 및 성장 특징을 나타내는 2 세포 라인, 사람의 HT-1080 섬유육종 세포 라인(ATCC 접수번호. CCL-121) 및 래트 C6 교종 세포 라인(ATCC 접수번호. CCL-107)이 분석법에 사용되었다. Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1 (a)(25mg/Kg 또는 도 39 및 40 에 지시된 대로)를 종양 착상일에 투여했다. 연이어서, 2 주동안 이틀에 한번(EOD) 또는 주당 2 회(2X/wk) 동물에 Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 운반체를 피하로 투여했고, 동물을 고정액으로 관류했고, 종양을 제거했고, 샘플을 맹검했다. 종양 부피를 가시적인 피하 종양의 길이 및 넓이를 측정함으로써 결정했다. Flt1(1-3)-Fc(A40) 및 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 모두는 HT-1080 및 C6 세포에 의해 형성된 종양의 성장을 현저하게 감소시켰다. 본 실험의 결과는 도 39 및 도 40 에 도시된다.

실시예 31: 여성 생식계에서 VEGF165 및 변형된 Flt 수용체의 효과

생식 주기과정에 걸쳐 자궁 및 난소에서 발생하는 혈관 재구성의 정형적인 패턴은 혈관형성, 혈관 재구성 및 혈관 퇴화를 조절하는 메카니즘 연구에 특히 적합한 조직을 만드는 것에 의해서 특징화되었다. 게다가, 생식조직에서 제자리 혼성화 연구는 VEGF 가 성숙한 설치류뿐만 아니라 사람 및 비사람 영장류에서 생리적인 혈관형성의 매개자로서 작용한다는 제1의 분명한 증거임을 제공했다(Phillips et al, 1990; Ravindranath et al, 1992; Shweiki et al, 1993; Kamat et al, 1995). 주기적인 혈관형성 및 혈관 재구성이 정상 난소 및 자궁의 중요한 특징이기 때문에, 이상 혈관 성장 및/또는 혈관 비기능이 이러한 기관에 영향을 주는 많은 병인 상태를 특징화한다는 것이 밝혀졌다는 것은 놀라운 일이 아니다. 더욱이, 이러한 병인 혈관 이상은 하나 이상의 혈관형성 또는 항-혈관형성 인자, 가장 중요하게는 VEGF 의 비조절 발현에 의해서 야기되거나 영속되는 것으로 여겨진다.

예를 들어, 이상 혈관형성은 다낭 난소 질환, 자궁내막증 및 자궁내막 육종을 특징으로 하고, 각 경우에 VEGF 는 감염된 조직에서 과발현된다(Kamat et al, 1995; Shifren et al, 1996; Guidi et al, 1996; Donnez et al, 1998). VEGF 의 과발현은 또한 난소 과자극 증후군(McClure et al, 1994; Levin et al, 1998) 및 자간전증(Baker et al, 1995; Sharkey et al, 1996)의 체내 혈관 과투과성 확립에서 병인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 게다가, VEGF 는 난소 육종 및 다른 종양과 관련된 복수의 생산에 책임이 있는 투과성 인자와 관련이 있었다(Senger et al, 1983; Boocock et al, 1995). VEGF 의 생물학적 작용을 효과적으로 중성화시키는 약제는 상기 및 관련 상태에서 치료적 잇점이 있는 것으로 기대된다.

혈관형성 및 혈관 재구성은 또한 배반세포 이식 및 태반 발생의 특징이다(Findlay, 1986). VEGF 는 우선, 예비착상 기간 동안 자궁 혈관형성의 확장 및 과투과성을 자극하고, 연이어 태반 혈관형성의 임산부 및 배아 성분 모두의 형성을 매개하는 것으로 여겨지는 모 탈락막 및 배아 영양모세포 모두에서 발현되었다(Shweiki et al, 1993; Cullinan-Bove and Koos, 1993; Chakraborty et al, 1995; Das et al, 1997). VEGF 는 또한 황체 혈관형성 및 자궁을 착상에 준비시키는데 필요한 관련된 프로게스테론 분비에 요구된다(Ferrara et al, 1998). 그러므로, VEGF 의 생물학적 활성을 억제하는 약제는 임신 초기에 (착상을 예방함으로써)피임약 또는 낙태약으로 유용하다는 것이 증명될 수 있다. 후자의 적용은 자궁외 임신의 종결을 위한 비외과적 개입으로의 사용이 특히 발견될 수 있다.

VEGF 수용체의 발현은 대부분 정상 생식 조직에서 혈관 내막세포에 국한되는 반면에, Flt 역시 영양모세포 침투에 역할을 하는 것으로 제안된 사람 및 동물 (Clark et al, 1996; He et al, 1999)태반에서 영양모세포에 의해 발현된다. 흥미롭게도, 모든 Flt1 및 KDR (Flk1)은 융모막암종 세포 라인 BeWo(Charnock-Jones et al, 1994)에 의해 발현되고, VEGF 는 이들 세포에서 DNA 합성 및 MAP 키나제의 티로신 인산화를 촉진하는 것을 보였다. 더욱이, 1차 및 전이성 난소 육종은 고수준의 VEGF 를 발현시킬뿐만 아니라, 그자체로 KDR 및/또는 Flt1을 발현하는 혈관 내피-종양 세포를 발현시킨다(Boocock et al, 1995). 이러한 발견은 VEGF 는 종양 혈관형성의 생성 및 유지에 중요하게 관여될 수 있을뿐만 아니라, 적어도 어떤 생식 기관의 종양에서 VEGF 는 종양 세포의 생존 및 증식을 직접적으로 보조하는 오토크린 역할을 보조할 수 있다는 것을 제안한다. 그러므로, VEGF 의 작용을 차단할 수 있는 약제는 생식 기관의 종양의 치료에 특히 유용한 이용을 가질 수 있다.

방법 및 결과

(a) VEGF-유발 자궁 과투과성의 평가

임신한 암말의 혈청 성선자극호르몬(PMSG)을 피하로(5IU) 주입하여 전사춘기 암컷 래트에서 배란을 유발한다. 이것은 2일후에, 자궁에서 교대로 VEGF 의 유발을 초래하는 에스트라디올의 고조를 초래한다. 유발은 자궁의 과투과성 및 6 시간 후에 자궁 습윤 중량의 증가를 초래하여 변형된 Flt 수용체 Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)에 의하여 잠재적으로 차단될 수 있다는 것을 보고한다. 체내 모델에서, 래트 자궁의 정상 중량은 약 50 mg 이고 이것은 PMSG 에 의해서 300~350 mg 을 유발할 수 있다. 조직 해부는 모든 습윤 중량을 보여준다. PMSG 주입 후 1 시간에서 25 mg/kg 으로 Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)의 피하 주입은 습윤 자궁 중량의 약 50% 억제를 초래한다. 변형된 Flt 수용체의 증가된 투여량은 더이상 습윤 중량의 증가를 감소시키지 않아서, 모델에 VEGF-독립 성분이 있다는 것을 제시한다. 실험의 결과는 도 41 에 도시된다.

(a) 리드아웃으로 프로게스테론을 사용하여 황체 혈관형성의 평가

임신한 암말 혈청 성선자극호르몬(PMSG)을 전사춘기 암컷 래트에서 배란을 유발하도록 피하로(5 IU) 주입한다. 결과는 자궁이 착상가능하도록 하기 위해서 프로게스테론을 혈류로 분비하는 것을 허용한 4 일 후 조밀한 혈관망을 함유하는 전기능 황체를 초래한다. 황체에서 혈관형성의 유발은 VEGF 를 요구하여, VEGF 를 차단하는 것은 신혈관의 결핍에 의한 혈류에 분비된 프로게스테론의 결핍을 초래할 것이다. 체내 모델에서, 프로게스테론의 휴면 수준은 약 5ng/ml 이고, 이것은 PMSG 후에 25~40ng/ml 의 수준을 유발할 수 있다. PMSG 주입후 1 시간에서 25mg/kg 또는 5mg/kg 의 Flt1(1-3)-Fc (A40) 또는 Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)의 피하 주입은 4 일에서 프로게스테론 유발의 완전한 억제를 초래한다. 실험 결과는 도 42A-42B 에 도시된다.

실시예 33: Fltl(1-3)-Fc (A40) 및 Flt1(1-3)-Fc 의 약물동태학적 분석

Flt1(1-3)-Fc를 10kD PEG 또는 20kD PEG 로 폐길화했고, 그들의 약물동태학적 프로파일에 대하여 balb/c 마우스에서 시험했다. Flt(1-3)-Fc 의 양 폐길화 형태는 Flt(1-3)-Fc(A40)에 대한 6 시간에 대립하여 폐길화에 대한 24 시간마다 Tmax 를 가지고 Flt1(1-3)-Fc(A40)보다 훨씬 큰 PK 프로파일을 가지는 것으로 관찰되었다.

실시예 34: 변형된 Flt1 수용체 변이체의 친화성을 시험하기 위한 VEGF165 ELISA.

10pM 의 VEGF165 를 160 pM 내지 0.1 pM 의 범위내의 변형된 Flt1 수용체 변이체를 가지고 실내온도에서 하룻밤동안 인큐베이션했다. 본 실험에 사용된 변형된 Flt1 수용체 변이체는 Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc(A40)였고, 일시적으로 Flt1 D2Flk1D3.Fc△C1(a)를 발현했고, 일시적으로 Flt1D2VERGFR3D3-Fc△C1(a), Flt1-(1-3_{NAS})-Fc, Flt1(1-3_{R->C})-Fc 및 Tie2-Fc 를 발현했다. Flt1(1-3_{NAS})-Fc는 매우 염기성 아미노산 서열인 KNKRASVRRR 가 NASVNGSR 로 대체되어, PK 상에서 서열의 바람직하지 않은 결과를 감소시키는 목적으로 2 개의 새로운 글리코실화 부위의 통합 및 5 개의 양전하의 순 감소를 초래하는 변형된 벼전의 Flt(1-3)-Fc 이다. Flt(1-3_{R->C})-Fc 는 같은 염기 아미노산 서열내의 단일 아르기닌(R)이 시스테인(C) (KNKRASVRRR->KNKCASVRRR)으로 변형되어, 그 잔기에서 폐길화를 허용하고, 그 다음 염기 영역이 PK 상에서 바람직하지 않은 효과를 나타내는 것을 차단할 수 있었다. 인큐베이션 후에, 용액을 VEGF165(R&D)에 대한 포획 항체를 포함하는 플레이트에 옮겼다. 그 다음, 무 VEGF165 양을 무 VEGF165 를 리포트하는 항체를 사용하여 결정했다. 이것은 VEGF165 에 대한 고친화성을 가지는 변형된 Flt1 수용체(가장 낮은 양의 무 VEGF165 로 결정)는 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 에 이어서 Flt1(1-3)-Fc 및 Flt1(1-3)-Fc(A40) 및 그 다음 Flt1(1-3_{R->C})-Fc, Flt1(1-3_{NAS})-Fc 및 Flt1D2VERGFR3D3-Fc△C1(a)였다. Tie2Fc 는 VEGF165 에 대한 친화성이 없다.

도면의 간단한 설명

도 1. 비변형 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 IEF 젤 분석. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 그것의 > 9.3 pl 때문에 젤에 들어갈 수 없는 반면에, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 젤에 들어가고, pl 5.2에서 평형화 될 수 있다.

도 2. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질과 Matrigel[®] 코팅 플레이트의 결합. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 Matrigel[®]의 세포외 매트릭스 성분에 광범위하게 결합하는 반면에, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc는 결합하지 않는다.

도 3. Biacore-기초 분석법에서 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 및 폐길화 Flt1(1-3)-Fc의 결합. 아세틸화(컬럼 13-16), 폐길화(컬럼 17-20), 및 헤라핀-처리 Flt1(1-3)-Fc(컬럼 21-24)는 각각 대조군(컬럼 1-4) 및 무관한 단백질(컬럼 5-8)과 비교하여 VEGF 결합에 대해서 Biacore 칩-결합 Flt1(1-3)-Fc와 완전하게 경쟁할 수 있다. 비변형 Flt1(1-3)-Fc(컬럼 5-6)은 VEGF 결합에 대한 Biacore 칩-결합 Flt1(1-3)-Fc와 부분적으로 경쟁하는 것 같다. 그러나, 0.5M NaCl(컬럼 7-8)을 가지는 결합 샘플을 세척하는 것은 변형된 형태의 Flt1(1-3)-Fc와 유사한 결합 프로파일을 초래하여, 비변형 단백질은 염 세척으로 제거될 수 있는 칩과의 비특이적 결합을 나타낸다.

도 4. ELISA-기초 분석법에서 VEGF에 대한 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 및 폐길화 Flt1(1-3)-Fc의 결합. 폐길화 및 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 모두 비변형 Flt1(1-3)-Fc의 결합과 유사한 친화성으로 VEGF에 결합한다.

도 5. 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 아세틸화 Flt1(1-3)-Fc, 및 폐길화 Flt1(1-3)-Fc의 약물동태학적 프로파일. Balb/c 마우스(23-28g)에 4 mg/kg의 비변형, 아세틸화, 또는 폐길화 Flt1(1-3)-Fc를 피하로 주입했다. 단백질을 주입한 후에, 1, 2, 4, 6, 24시간, 및 3일에서 꼬리를 출혈시켜 Flt1(1-3)-Fc 단백질을 검출하도록 설계된 표준 ELISA-기초 분석법에서 혈청을 분석했다. 모든 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 Tmax는 6h 및 24h 시간 시간 포인트내였다. 상이한 단백질에 대한 Cmax는 하기와 같았다: 비변형: 0.06 µg/ml-0.15 µg/ml; 아세틸화: 1.5 µg/ml-4.0 µg/ml; 및 폐길화: 약 5µg/ml.

도 6A-6B. 비변형 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 IEF 젤 분석. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 > 9.3 pl 때문에 젤내로 들어갈 수 없는 반면에, 대부분의 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 샘플(30-100 배 과량 샘플)이 젤내로 이동할 수 있고, 아세틸화의 정도에 따라서 4.55-8.43의 범위내의 pl에서 평형화할 수 있는 것이다.

도 7. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질의 Matrigel[®] 코팅 플레이트에의 결합. 무관한 대조 단백질과 같이, rTie2-Fc, 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc(20 및 30 배 과량 샘플)는 Matrigel 코팅 플레이트에 어떤 결합도 나타내지 않는 반면에, 비-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 의미있는 결합을 나타낸다. 10 배 과량 샘플은 감소된 결합을 보이지만, 아세틸화의 정도는 세포외 매트릭스 성분에의 결합을 완전히 차단하기에 충분하지 않다.

도 8. Biacore-기초 분석법에서 비변형 Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc의 결합. 아화학량론 비율에서(비변형 Flt1(1-3) 또는 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc의 0.5 µg/ml 대 0.2 µg/ml VEGF), 용액에서 VEGF에 완전하게 결합할 수 있는 Flt1(1-3)-Fc(비변형 또는 단계-아세틸화)가 없다. 약 1:1 화학량론 비율의 1.0 µg/ml에서, 비변형 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 모두 VEGF 결합에 대하여 더욱 경쟁할 수 있으나, 이용가능한 VEGF를 완전히 포화시키기에는 Flt1(1-3)-Fc 단백질(비변형 또는 단계-아세틸화)이 여전히 불충분하다. 그러나, 1:1 화학량론 비율보다 몇 배 큰 5.0 µg/ml에서, Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 모두 아세틸화의 정도와 무관하게 VEGF를 포화시킬 수 있다.

도 9. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 및 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc의 약물동태학적 프로파일. Balb/c 마우스(23-28g)에 4mg/kg의 비변형 또는 10, 20, 40, 60 및 100 배 과량 샘플의 단계-아세틸화 Flt1(1-3)-Fc를 피하로 주입했다(비변형, 10, 20 및 40 배 과량 샘플에 대한 3 마우스 및 60 및 100 배 과량 샘플에 대한 2 마우스). 주입 후 1, 2, 4, 6, 24시간, 2일 및 3일 후에 마우스의 꼬리를 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc를 검출하기 위해 설계된 ELISA-기초 분석법으로 혈청을 분석했다.

시험된 모든 Flt1(1-3)-Fc 단백질에 대한 Tmax 는 6 시간 시간 포인트였으나, Cmax 는 하기와 같았다: 비변형 Flt1(1-3)-Fc: 0.06 µg/ml ; 10 배 과량 샘플: - 0.7µg/ml, 20 배 과량 샘플 - 2µg/ml, 40 배 과량 샘플 - 4 µg/ml, 60 배 과량 샘플 - 2µg/ml, 100 배 과량 - 1 µg/ml.

도 10A-10D. Flt1(1-3)-Fc 의 핵산 및 추정된 아미노산 서열.

도 11. Flt1 구조의 체계적인 도표.

도 12A 및 12B. Flt1 의 Ig 도메인 2 및 Ig 도메인 3 의 아미노산 서열의 친수성 분석.

도 13A-13D. Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc 의 핵산 및 추정된 아미노산 서열.

도 14A-14D. Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc 의 핵산 및 추정된 아미노산 서열.

도 15A-15D. Mut3: Flt1(2-3)-Fc 의 핵산 및 추정된 아미노산 서열.

도 16A-16D. Flt1(1-3_{R→N})-Fc 의 핵산 및 추정된 아미노산 서열.

도 17. Biacore-기초 분석법에서 비변형 Flt1(1-3)-Fc, 염기 영역 결실 돌연변이체 Flt1(1-3)-Fc, 및 Flt1(1-3)_{R→N} 돌연변이체 단백질의 결합. 아-화학량론 비율에서(비변형, 아세틸화 또는 유전적으로 변형된 샘플의 0.25 µg/ml Flt1(1-3)-Fc 대 0.1 µg/ml VEGF), Biacore 칩에 고정된 Flt1(1-3)-Fc 와 VEGF 의 결합을 충분히 차단하기에 불충분한 Flt1(1-3)-Fc 단백질이 존재한다. 0.5 µg/ml 의 비변형, 아세틸화 또는 유전적으로 변형된 Flt1(1-3)-Fc 단백질에서, 화학량론 비율은 약 1:1 이고, Biocare 칩에 대한 증가된 VEGF 결합 차단력이 있다. 화학량론의 비율이 약 10:1 인 1.0 µg/ml 의 비변형, 아세틸화 또는 유전적으로 변형된 Flt1(1-3)-Fc 단백질에서, Flt1(1-3)-Fc 단백질은 Biacore 칩에 대한 VEGF 의 결합을 차단할 수 있으나, 등가는 아니다. 비변형, 아세틸화, 및 Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc 는 VEGF 결합을 차단할 수 있는 능력이 본질적으로 같지는 않은 반면에, Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc 는 차단 결합에서 다소 덜 효율적이다.

도 18. Matrigel® 코팅된 플레이트에 비변형 Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc, 및 Flt1(2-3) 돌연변이체 단백질의 결합. 비변형 Flt1(1-3)-Fc 단백질은 웰에 열광적으로 결합하고, Mut3:Flt1(2-3)-Fc 단백질은 다소 약하게 결합하고, Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc 단백질은 더욱 약하게 결합하고, Mut2:Flt1(2-3_{△B})-Fc 단백질은 다른 돌연변이체 단백질의 어느 것보다 더욱 약하게 결합하는 최상의 프로파일을 보인다. Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc 글리코실화 돌연변이체 단백질은 Matrigel 분석법에 대한 불충분한 잇점만을 도시한다.

도 19. ELISA-기초 분석법에서 비변형 Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc, 및 Flt1(2-3) 돌연변이체 단백질의 결합. 시험된 농도에서, 비변형 Flt1(1-3)-Fc, Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc, Mut2:Flt1(2-3_{△B})-Fc, 및 Flt1(2-3) 돌연변이체 단백질은 VEGF 에 유사하게 결합한다.

도 20. 비변형 Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{△B})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{△B})-Fc, 및 Flt1(2-3) 돌연변이체 단백질의 약물 동태학적 프로파일. 이러한 시약에 대한 Cmax 는 하기와 같았다: 비변형 Flt1(1-3)-Fc - 0.15µg/ml; 40 배 몰과량 아세틸화 Flt1 (1-3)Fc - 1.5 µg/ml; 및 Mut1:Flt1(1-3_{△B})-Fc - 0.7 µg/ml.

도 21A-21C. Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)로 명명된 변형된 Flt 수용체의 뉴클레오티드 및 추정된 아미노산 서열.

도 22A-22C. Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)로 명명된 변형된 Flt 수용체의 뉴클레오티드 및 추정된 아미노산 서열.

도 23. 세포외 매트릭스(ECM) 분석법. 분석법의 결과는 Flt1D2.Flk1D3. Fc△C1 (a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a) 는 Flt1(1-3)-Fc 단백질에 비하여 ECM에 상당히 덜 부착한다는 것을 증명한다.

도 24A-24C. VEGFR1R2-Fc△C1(a)로 명명된 변형된 Flt1 수용체의 뉴클레오티드 및 추정된 아미노산 서열.

도 25A-25C. 인산화 분석법. 1.5 몰과량의 Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) 또는 일시적인 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)에서, 대조군 배지 감염에 비하여 이러한 3 개의 변형된 Flt1 수용체에 의하여 수용체 자극의 완전한 차단이 있다. 대조적으로, 일시적인 Flt1D2VEGFR3D3.Fc△C1(a)는 VEGF 양성 대조군 감염과 비교하여 상기 몰과량에서 의미있는 차단을 보이지 않는다. 유사한 결과가 변형된 Flt 수용체가 VEGF165 리간드에 대하여 3 배 몰과량인 도 25B 에서 도시된다. 변형된 Flt 수용체가 VEGF165 리간드에 대하여 6 배 몰과량인 도 25C 에서, 일시적인 Flt1D2VEGFR3D3.Fc△C1(a)는 세포-표면 수용체의 VEGF165-유발 자극을 부분적으로 차단하는 것으로 도시될 수 있다.

도 26A-26B. 인산화 분석법. VEGF165 리간드 자극에 의한 티로신 인산화 VEGFR2(Flk1)의 웨스턴 블러트에 의한 검출은 세포-표면 수용체가 1 및 2 배 몰과량(도 26A) 또는 3 및 4 배 몰과량(도 26B)의 일시적인 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a), 안정한 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a), 또는 일시적인 VEGFR1R2-Fc△C1(a)와 함께 예비인큐베이션된 VEGF154 를 가지는 감염 샘플에 의해서 인산화되지 않는다는 것을 도시한다. 시험된 모든 변형된 Flt1 수용체 농도에서, 예비인큐베이션동안 VEGF165 리간드의 완전한 결합이 있는 대조군 배지 감염에 비하여 비결합 VEGF165 에 의한 세포-표면 수용체의 검출 가능한 자극이 없다는 결과를 초래한다.

도 27. MG/R2 세포 증식 분석법. 하기의 변형된 Flt 수용체 Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a), 및 음성 대조군으로서 Tie2-Fc 로 명명된 무관한 수용체는 40nM 내지 20pM 으로 적정되었고, 37°C에서 1 시간동안 세포상에서 인큐베이션했다. 그 다음, 규정 배지에서 사람의 재조합 VEGF165 를 1.56nM 의 농도로 웰에 첨가했다. 음성 대조군 수용체 Tie2-Fc 는 어떤 농도에서도 VEGF165-유발 세포 증식을 차단하지 않은 반면에, Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)는 0.8 nM 반최대 투여량으로 1.56nM VEGF165 를 차단한다. 분석법에서 Flt1(1-3) Fc 및 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc△C1(a)는 ~2nM 의 반최대투여량으로 VEGF165 를 차단하는 데 덜 효과적이다. VEGF165 만이 1.2 흡광도 단위의 해독을 나타내고, 최저점은 0.38 흡광도 단위이다.

도 28. 결합 화학량론의 Biacore 분석법. 결합 화학량론을 1 ng/ml 에 등가인 1000 RU 의 전환 인자를 사용하여 고정된 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)와 결합된 VEGF165 의 몰비율로 계산했다. 결과는 1 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a) 분자당 1 VEGF165 이량체 분자의 결합 화학량론을 나타내었다.

도 29 및 도 30. 크기 배척 크로마토그래피 화학량론. 1nM 농도에서, Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)(Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc△C1(a)/VEGF165 상호작용의 KD 보다 1000 배 이상으로 측정)를 다양한 농도의 VEGF165 와 혼합했다. 인큐베이션 후에, 용액의 무 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)의 농도를 측정했다. 데이터는 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)용액에의 1nM VEGF165 의 첨가는 VEGF165 표면에 대한 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 결합을 완전히 차단한다는 것을 도시한다. 결과는 1 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a) 분자당 1 VEGF165 분자의 결합 화학량론을 제시한다.

도 31. 음성 조건하에서 크기 배척 크로마토그래피(SEC). 피크#1 은 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)/VEGF165 복합체를 나타내고 피크#2 는 비결합 VEGF165 를 나타낸다. 1.1 및 1.2 ml 사이로 용리된 분획을 조합하였고, 구아니디움 히드로클로라이드(GuHCl)를 최종 농도 4.5M 에 첨가하여 복합체를 해리시켰다.

도 32. 해리 조건하에서 크기 배척 크로마토그래피(SEC). 수용체-리간드 복합체의 성분을 분리하고 그들의 몰 비율을 결정하기 위해서, 50 μl 의 해리 복합체를 Superose 12 PC 3.2/30 에 로딩했고, 6M GuHCl 로 평형화하고, 용리했다. 피크 #1 은 Flt1D2Flk1D3.Fc△C1(a)를 나타내고 피크#2 는 VEGF165 를 나타낸다.

도 33, 도 34 및 도 35. 온라인 광분산을 가지는 크기 배척 크로마토그래피. MiniDawn 온라인 광분산 검출기(Wyatt Technology, Santa Barbara, California) 및 굴절률(RI) 검출기(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 가지는 크기 배척 크로마토그래피 컬럼을 수용체-리간드 복합체의 분자량(MW)을 결정하기 위해서 사용했다. 도 33 에 도시된대로, 용리 프로파일은 2 피크를 도시한다. 피크 #1 은 수용체-리간드 복합체를 나타내고, 피크 #2 는 비결합 VEGF165 를 나타낸다. MW 는 LS 및 RI 신호로부터 계산했다. 같은 과정을 수용체-리간드 복합체의 각각의 성분의 MW 를 결정하는데 사용했다. 이 결정의 결과는 하기와 같다: 피크 위치에서 Flt1D2Flk1D3. Fc△C1(a) /VEGF165 복합체의 MW 는 157 300(도 33)이고, 피크 위치에서 VEGF165 의 MW 는 44 390 (도 34)이고, 피크에서 RIR2 의 MW 는 113 300 이다(도 35).

도 36. 웹티드 맵핑 및 글리코실화 분석. Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)에서 이황화 구조 및 글리코실화 부위를 웹티드 맵핑 방법으로 결정했다. Flt1D2.Flk1D3.Fc△C1(a)에서 총 10 개의 시스테인이 있고; 그들 중 6 개는 Fc 영역에 속한다. Cys27 은 Cys76에 이황화결합한다. Cys121 는 Cys182에 이황화결합한다. Fc 영역에서 첫번째 2 개의 시스테인은

(Cys211 및 Cys214) 다른 Fc 사슬에서 같은 2 개의 시스테인을 가지는 분자간 이황화 결합을 형성한다. 그러나, 이황화 결합이 같은 시스테인 (예컨대, Cys211 과 Cys211) 또는 Cys211 및 Cys214 사이에서 일어나는지를 결정할 수 없었다. Cys216 은 Cys306 에 이황화결합한다. Cys 352 는 Cys410 에 이황화결합한다.

Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)에 5 개의 가능한 N-연결 글리코실화 부위가 있고, 다양한 정도로 글리코실화되는 것이 발견된다. 완전한 글리코실화는 Asn33, Asn193, 및 Asn282 에서 관찰된다. 부분적인 글리코실화는 Asn65 및 Asn120 에서 관찰된다. 글리코실화 부위는 도에서 밑줄로서 강조된다.

도 37. Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc \triangle C1 (a)의 약물동태학. Balb/c 마우스(23-28g)에 4 mg/kg 의 Flt1(1-3)-Fc(A40)를 피하로 주입했고, CHO 는 일시적으로 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 발현했고, CHO 는 Flt1 D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 안정하게 발현했고, CHO 는 순간적으로 VEGFR1R2-Fc \triangle C1 (a)을 발현했다. 주입 후에 1, 2, 4, 6, 24 시간, 2 일, 3 일 및 6 일에서 마우스의 꼬리를 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 또는 VEGFR1R2-Fc \triangle C1 (a)를 검출하도록 설계된 ELISA 에서 혈청을 분석했다. Flt1(1-3)-Fc(A40)에 대한 Tmax 는 6 시간인 반면에, 일시적이고 안정한 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 일시적인 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)에 대한 Tmax 는 24시간이었다. Flt1(1-3)-Fc(A40)에 대한 Cmax 는 8 μ g/ml였고, 양 일과성(transient) (Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a))의 경우에, Cmax 는 18 μ g/ml 였고, 안정한 VEGFR1R2-Fc \triangle C1(a)에 대한 Cmax 는 30 μ g/ml였다.

도 38. Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3. Fc \triangle C1(a)의 약물동태학. Balb/c 마우스에 4 mg/kg 의 Flt1(1-3)-Fc(A40)를 피하로 주입했고, CHO 는 일시적으로 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 발현했고, CHO 는 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)를 일시적으로 발현했다. 주입 후에 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 및 20 일에서 마우스 꼬리를 출혈시켰다. Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3. Fc \triangle C1(a)를 검출하도록 설계된 ELISA 에서 혈청을 분석했다. Flt1(1-3)-Fc(A40)는 5 시간 후에 더이상 혈청에서 검출되지 않은 반면에, Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3. Fc \triangle C1(a)는 15 일 이상동안 검출되었다.

도 39. 체내에서 HT-1080 섬유육종 종양 성장을 억제하기 위한 Flt1D2. Flk1D3.Fc \triangle C1(a)의 능력. 이를에 한번 또는 주마다 2 회, 25mg/Kg 으로 Flt1D2. Flk1D3.Fc \triangle C1(a)로 SCID 마우스의 치료는 피하 HT-1080 섬유육종 종양의 성장을 현저히 감소시킨다.

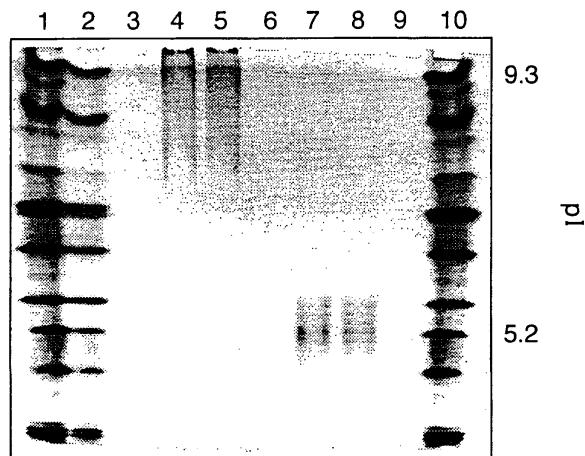
도 40. 체내에서 G6 교종 종양 성장을 억제하기 위한 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1 (a)의 능력. 이를에 한번 또는 주마다 2 회, 2.5 mg/Kg 의 낮은 투여량으로 Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a)로의 SCID 마우스의 치료는 피하 C6 교종 종양의 성장을 현저히 감소시킨다.

도 41. VEGF-유발 자궁 과투과성. 전사춘기 암컷 래트에서 배란을 유발하도록 피하로(5 IU) 주입된 PMSG 는 2 일 후에 자궁에서 교대로 VEGF 유발을 야기하는 에스트라디올의 고조를 초래한다. 유발은 자궁의 과투과성 및 자궁 습윤의 증가를 초래한다. PSMG 주입 후 1 시간에서 25mg/kg 으로 Flt1(1-3)-Fc(A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc \triangle C1(a) 및 Flt1D2.VEGFR3D3. Fc \triangle C1(a)의 피하 주입은 습윤 자궁 중량 증가의 약 50% 억제를 초래한다.

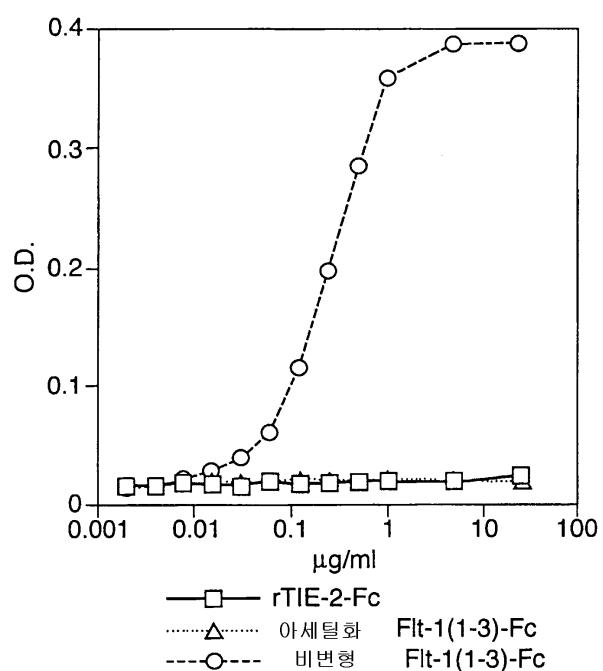
도 42A-42B. 리드아웃으로 프로게스테론을 사용하여 황체 혈관형성의 평가. PSMG 를 전사춘기 암컷 래트에서 배란을 유발하도록 피하로 (5IU) 주입하여, 자궁에 착상가능하도록 프로게스테론을 혈류에 분비하는 혈관의 조밀한 네트워크를 함유하는 전기능적인 황체를 유발한다. 황체에서 혈관형성의 유발은 VEGF 를 요구한다. 프로게스테론의 휴면 수준은 약 5ng/ml 이고 PSMG 후에 25-40 ng/ml 로 유발될 수 있다. PSMG 1 시간후에 25mg/kg 또는 5mg/kg 으로 Flt1(1-3)-Fc (A40) 또는 Flt1D2.Flk1 D3.Fc \triangle C1(a)의 피하 주입은 4 일에서 프로게스테론 유발의 완전한 억제를 초래했다.

도면

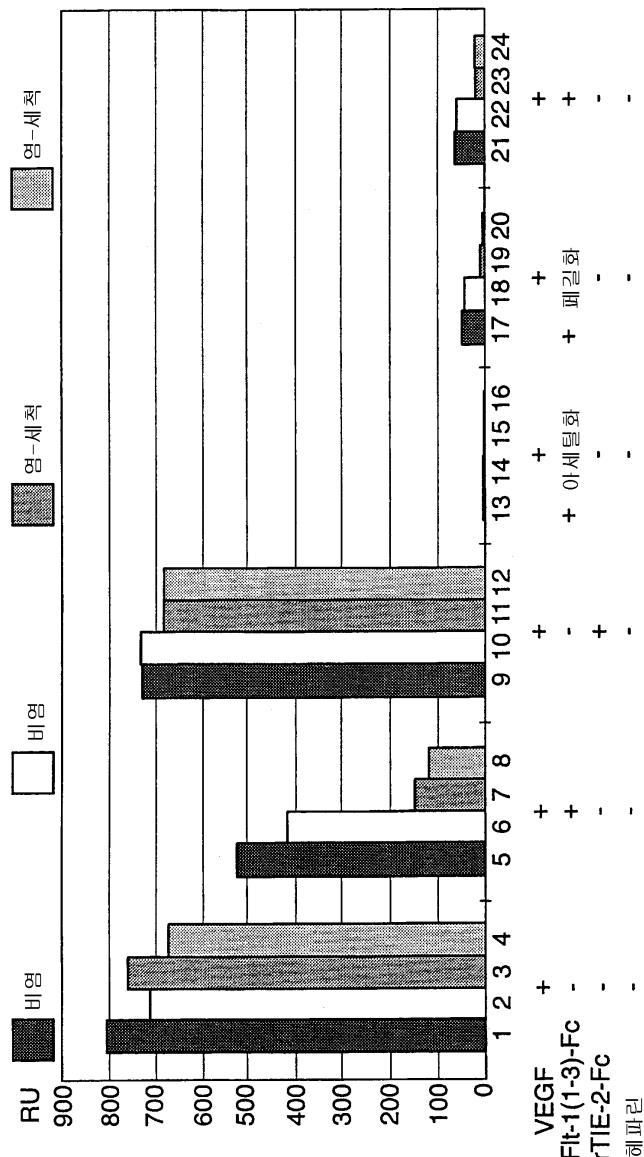
도면1



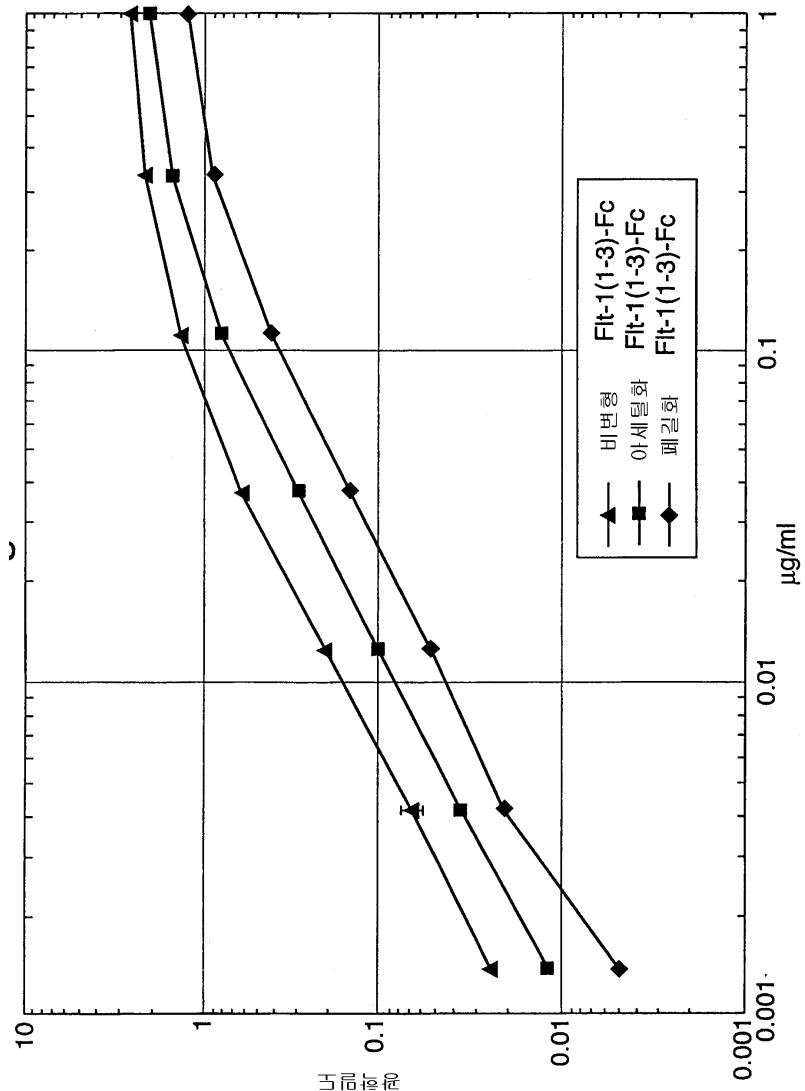
도면2



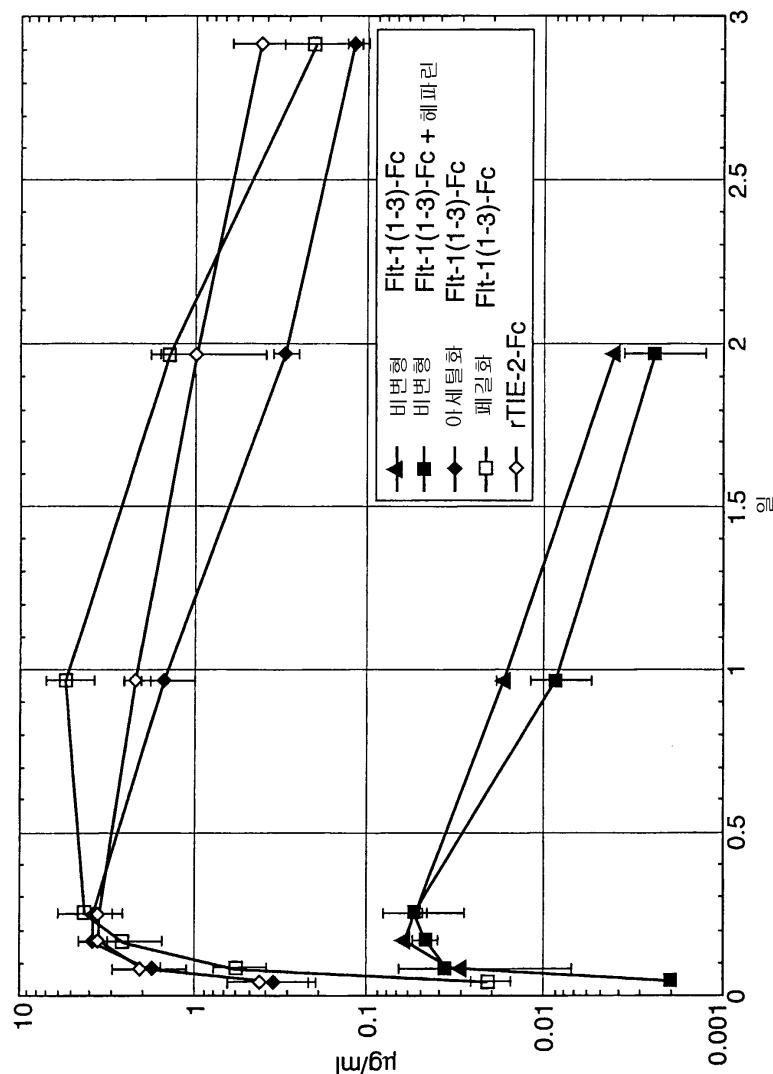
도면3



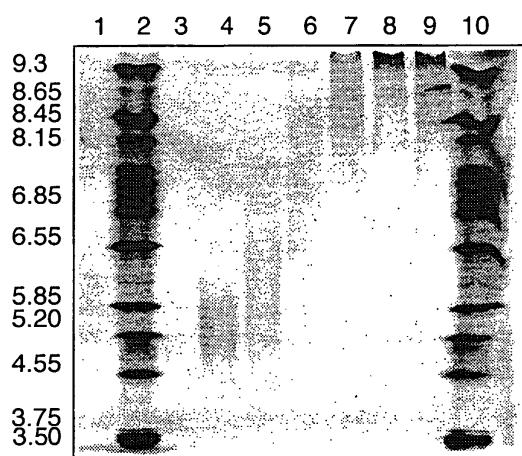
도면4



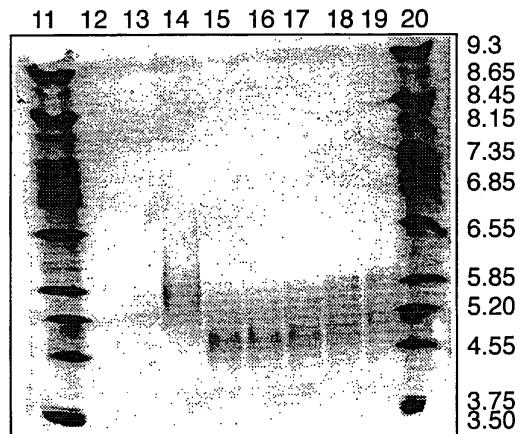
도면5



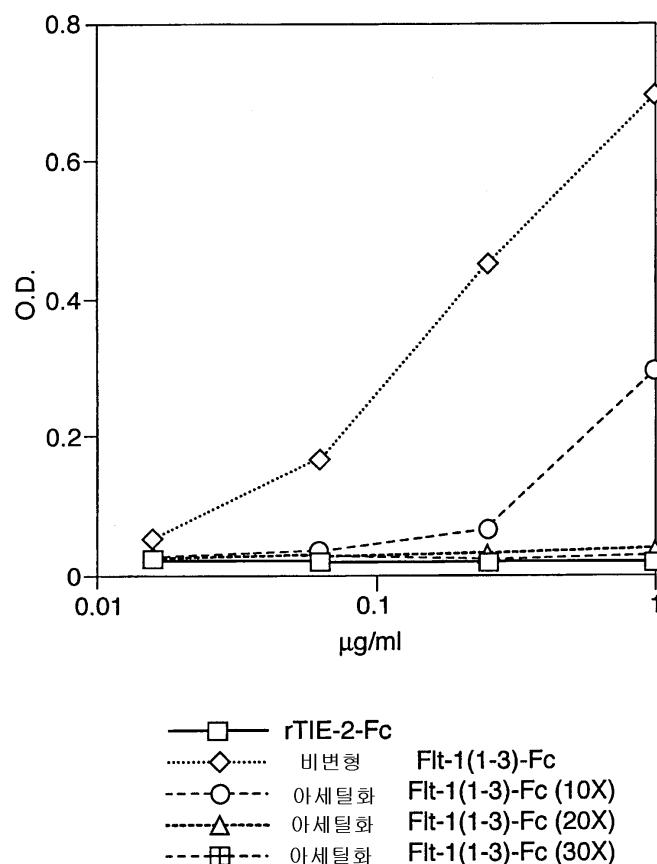
도면6A



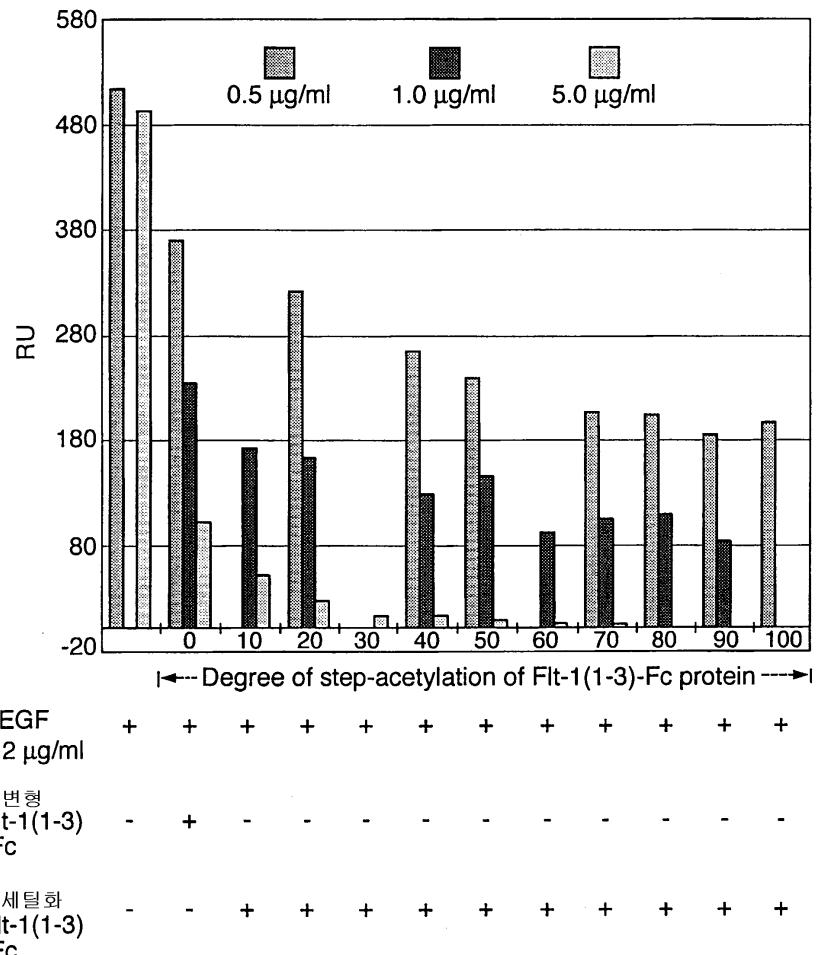
도면6B



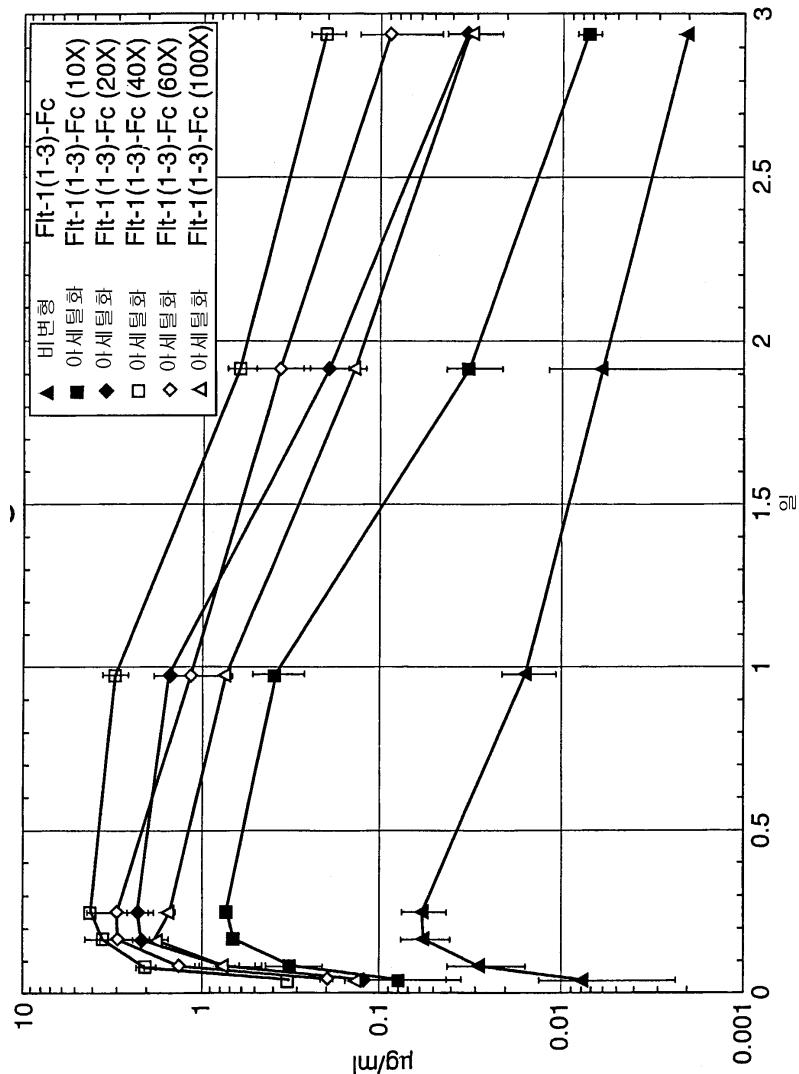
도면7



도면8



도면9



도면10A

10 20 30 40 50 60

* * * * * *

ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

70 80 90 100 110 120

* * * * * *

ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

130 140 150 160 170 180

* * * * * *

CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CGG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Ala Ala His Lys>

190 200 210 220 230 240

* * * * * *

TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CGG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

250 260 270 280 290 300

* * * * * *

TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG AGC TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

310 320 330 340 350 360

* * * * * *

CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC CTT CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Glu Thr>

370 380 390 400 410 420

* * * * * *

GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

430 440 450 460 470 480

* * * * * *

GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG AGC CCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

490 500 510 520 530 540

* * * * * *

ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

도면10B

550 560 570 580 590 600
 * * * * * *
 GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
 CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
 Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>
 610 620 630 640 650 660
 * * * * * *
 GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
 CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTC AAC ATA TTC TGT TTG ATA
 Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>
 670 680 690 700 710 720
 * * * * * *
 CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
 GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
 Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>
 730 740 750 760 770 780
 * * * * * *
 AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
 TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
 Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>
 790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
 AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA
 TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT
 Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg>
 850 860 870 880 890 900
 * * * * * *
 CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
 GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
 Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>
 910 920 930 940 950 960
 * * * * * *
 ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
 TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
 Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>
 970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * *
 TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CGG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
 AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CGG GGC CGG CTC GGG TTT AGA ACA
 Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * *
 GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CGG TCA GTC
 CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CCT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val>

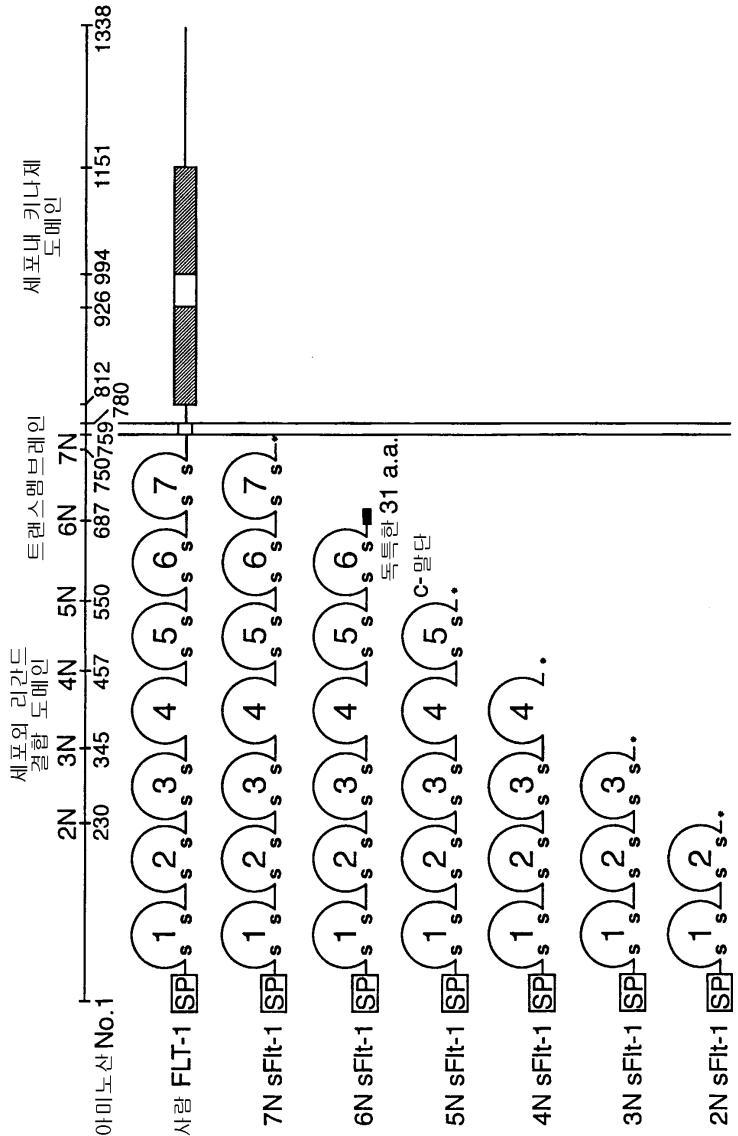
도면10C

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * *
 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA
 AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TCG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr>
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * *
 TGC GTG GTG GTG GAC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC
 ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp>
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * *
 GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
 CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * *
 CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG
 GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys>
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * * *
 TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
 ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * *
 GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
 CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC GAC TGG TTC
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys>
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * *
 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG
 TIG GTC CAG TCG GAC TGG AGC GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 * * * * * *
 TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC
 ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG
 Trp Glu Ser Asn Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser>
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 * * * * * *
 GAC GGC TCC TTC TCT CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC TGG CAG CAG GGG
 CTG CGG AGG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC
 Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly>

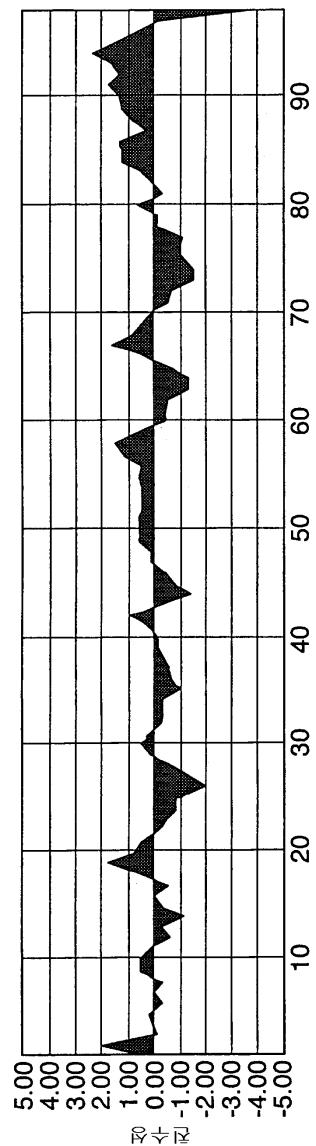
도면10D

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * * *
 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC
 TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>
 1690 1700
 * * *
 CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

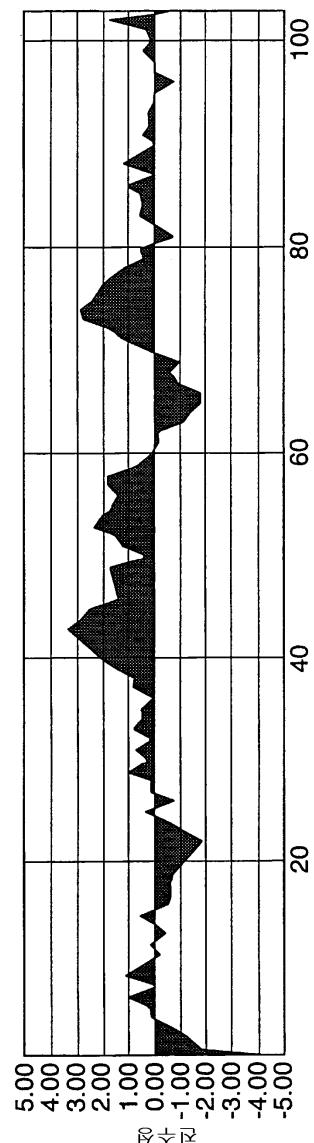
도면11



도면12A



도면12B



도면13A

10 20 30 40 50 60

* * * * * *

ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

70 80 90 100 110 120

* * * * * *

ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

130 140 150 160 170 180

* * * * * *

CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CGG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

190 200 210 220 230 240

* * * * * *

TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CGG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

250 260 270 280 290 300

* * * * * *

TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

310 320 330 340 350 360

* * * * * *

CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTC CCT ACT TCA AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Glu Thr>

370 380 390 400 410 420

* * * * * *

GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA AGA CCT TTC GTC GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

430 440 450 460 470 480

* * * * * *

GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACC GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

490 500 510 520 530 540

* * * * * *

ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

도면13B

550 560 570 580 590 600

* * * * * *

GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GGG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

610 620 630 640 650 660

* * * * * *

GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

670 680 690 700 710 720

* * * * * *

CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

730 740 750 760 770 780

* * * * * *

AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

790 800 810 820 830 840

* * * * * *

AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn>

850 860 870 880 890 900

* * * * * *

ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT
TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TGT TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA
Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr>

910 920 930 940 950 960

* * * * * *

TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT
ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA
Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp>

970 980 990 1000 1010 1020

* * * * * *

AAA GCA GGC CGG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
TTT CGT CCG GGC CGG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>

1030 1040 1050 1060 1070 1080

* * * * * *

GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr>

도면13C

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * *
 CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC
 GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CTC CAC TCG GAG CTT CTG
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp>

 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * *
 CCT GAG GTC AAC TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG
 GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTC CAG CAC CTC CAC GTC TTA CCG TTC TGT TTC
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys>

 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * *
 CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
 GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His>

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * *
 CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC
 GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CGG
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala>

 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * * *
 CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
 GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr>

 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * *
 CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA
 GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG AGC GAC CAG TTT
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys>

 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * *
 GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
 CCG AAG ATA GGG TGG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TGG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn>

 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 * * * * * *
 TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC
 ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CGG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu>

 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 * * * * * *
 ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG
 TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTC CTC
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu>

도면13D

1630 1640 1650 1660 1670
 * * * * *
 GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

도면14A

10 20 30 40 50 60

* * * * * *

ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CCC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

70 80 90 100 110 120

* * * * * *

ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

130 140 150 160 170 180

* * * * * *

ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

190 200 210 220 230 240

* * * * * *

ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

250 260 270 280 290 300

* * * * * *

TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT ACT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

310 320 330 340 350 360

* * * * * *

ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

370 380 390 400 410 420

* * * * * *

ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

430 440 450 460 470 480

* * * * * *

CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT CCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

490 500 510 520 530 540

* * * * * *

TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val>

도면14B

550 560 570 580 590 600
 * * * * * *
 CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT
 GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA
 Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser>
 610 620 630 640 650 660
 * * * * * *
 GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC
 CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG
 Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly>
 670 680 690 700 710 720
 * * * * * *
 GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
 CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT AGC GGT GGC ACY GGT CGT GGA CTT GAG GAC
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu>
 730 740 750 760 770 780
 * * * * * *
 GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG
 CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>
 790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
 ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC
 TGG GGA CTC CAG TGT AGC CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe>
 850 860 870 880 890 900
 * * * * * *
 AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG CAG
 TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GCA TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln>
 910 920 930 940 950 960
 * * * * * *
 TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
 ATG TTG TCG ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TTG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn>
 970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * *
 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC
 CCG TTC CTC ATG TTC AGC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * *
 ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG
 TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg>

도면14C

1090 1100 1110 1120 1130 1140

* * * * * *

GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC
CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser>

1150 1160 1170 1180 1190 1200

* * * * * *

GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT
CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro>

1210 1220 1230 1240 1250 1260

* * * * * *

CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser>

1270 1280 1290 1300 1310 1320

* * * * * *

AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC
TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His>

1330 1340 1350

* * * * * *

TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

도면15A

10 20 30 40 50 60
 * * * * * *
 ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
 TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

70 80 90 100 110 120
 * * * * * *
 ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
 TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
 Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

130 140 150 160 170 180
 * * * * * *
 ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
 TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
 Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

190 200 210 220 230 240
 * * * * * *
 ACT GGT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
 TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
 Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

250 260 270 280 290 300
 * * * * * *
 TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
 ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

310 320 330 340 350 360
 * * * * * *
 ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
 TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
 Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

370 380 390 400 410 420
 * * * * * *
 ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
 TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
 Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

430 440 450 460 470 480
 * * * * * *
 CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
 GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
 His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

490 500 510 520 530 540
 * * * * * *
 TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTC GAA AGG CGA CGA ATT GAC CAA AGC
 ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT GCT TAA CTG GTT TCG
 Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Ile Asp Gln Ser>

도면15B

550 560 570 580 590 600

AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC
TTA ACG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG
Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp>

610 620 630 640 650 660

AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA
TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT
Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser>

670 680 690 700 710 720

G TG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA
CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT
Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr>

730 740 750 760 770 780

TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TIC CCC CCA
ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro>

790 800 810 820 830 840

AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC
TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG ACG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CTC
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp>

850 860 870 880 890 900

G TG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTC
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His>

910 920 930 940 950 960

AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>

970 980 990 1000 1010 1020

CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAC GTC TCC AAC
GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTG CAG AGG TTG
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn>

1030 1040 1050 1060 1070 1080

AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu>

도면15C

1090 1100 1110 1120 1130 1140

* * * * * *

CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG
GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu>

1150 1160 1170 1180 1190 1200

* * * * * *

ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>

1210 1220 1230 1240 1250 1260

* * * * * *

CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TCC
GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe>

1270 1280 1290 1300 1310 1320

* * * * * *

CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>

1330 1340 1350 1360 1370 1380

* * * * * *

TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG
AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro>

*

GGT AAA TGA
CCA TTT ACT
Gly Lys ***>

도면16A

10 20 30 40 50 60
 * * * * * *
 ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
 TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

70 80 90 100 110 120
 * * * * * *
 ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
 TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
 Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

130 140 150 160 170 180
 * * * * * *
 CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
 GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CGG GTA TTT
 His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

190 200 210 220 230 240
 * * * * * *
 TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
 ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CGG
 Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

250 260 270 280 290 300
 * * * * * *
 TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
 ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
 Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

310 320 330 340 350 360
 * * * * * *
 CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
 GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC CTT CTT TGT
 His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Glu Thr>

370 380 390 400 410 420
 * * * * * *
 GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
 CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
 Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

430 440 450 460 470 480
 * * * * * *
 GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT
 CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT CTC GAG CAG TAA GGG AGC GCC CAA
 Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

490 500 510 520 530 540
 * * * * * *
 ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
 TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
 Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

도면16B

550 560 570 580 590 600

* * * * * *

GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GGG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

610 620 630 640 650 660

* * * * * *

GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

670 680 690 700 710 720

* * * * * *

CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

730 740 750 760 770 780

* * * * * *

AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Pro Leu Asn Thr>

790 800 810 820 830 840

* * * * * *

AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AAC GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TTG CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Asn Ala Ser Val Arg Arg>

850 860 870 880 890 900

* * * * * *

CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

910 920 930 940 950 960

* * * * * *

ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

970 980 990 1000 1010 1020

* * * * * *

TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

1030 1040 1050 1060 1070 1080

* * * * * *

GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

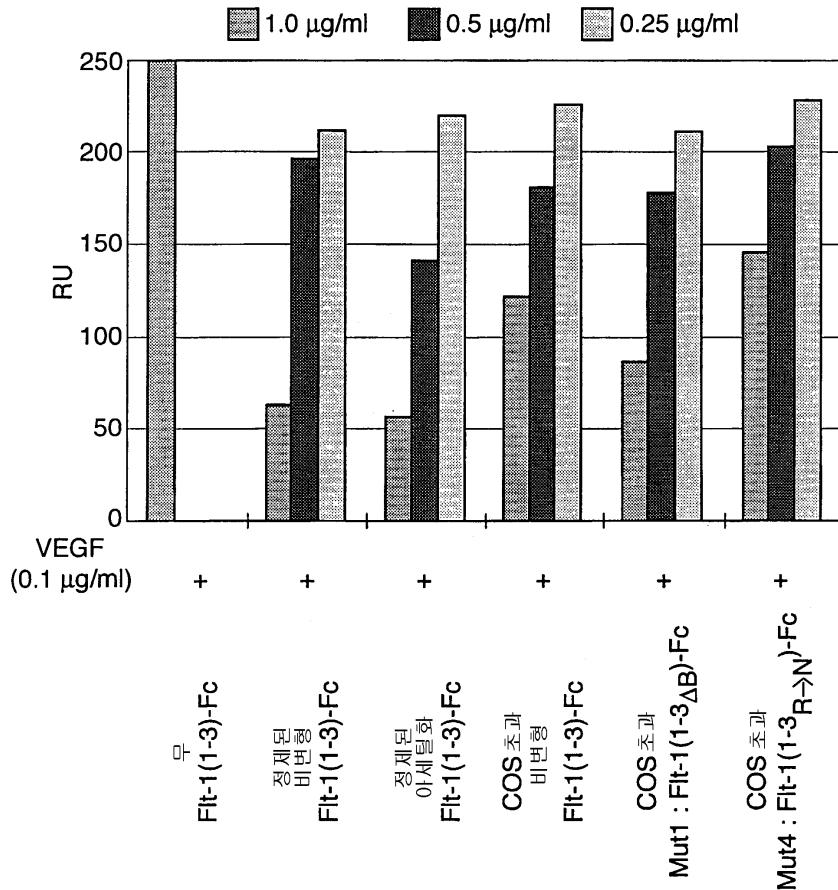
도면16C

1090	1100	1110	1120	1130	1140
*	*	*	*	*	*
TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA	AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GGC TGG GGA CTC CAG TGT	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr>			
1150	1160	1170	1180	1190	1200
*	*	*	*	*	*
TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC	ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp>			
1210	1220	1230	1240	1250	1260
*	*	*	*	*	*
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC	CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>			
1270	1280	1290	1300	1310	1320
*	*	*	*	*	*
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG	GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys>			
1330	1340	1350	1360	1370	1380
*	*	*	*	*	*
TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA	ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>			
1390	1400	1410	1420	1430	1440
*	*	*	*	*	*
GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG	CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys>			
1450	1460	1470	1480	1490	1500
*	*	*	*	*	*
AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG	TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>			
1510	1520	1530	1540	1550	1560
*	*	*	*	*	*
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC	ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser>			
1570	1580	1590	1600	1610	1620
*	*	*	*	*	*
GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG	CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly>			

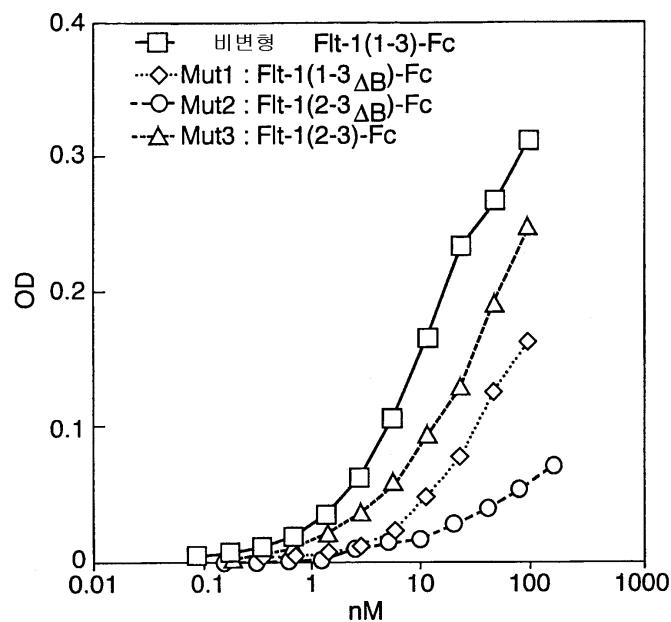
도면16D

1630	1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*	*
AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC	TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>			
1690	1700				
*	*	*	*	*	*
CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA					
GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT					
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>					

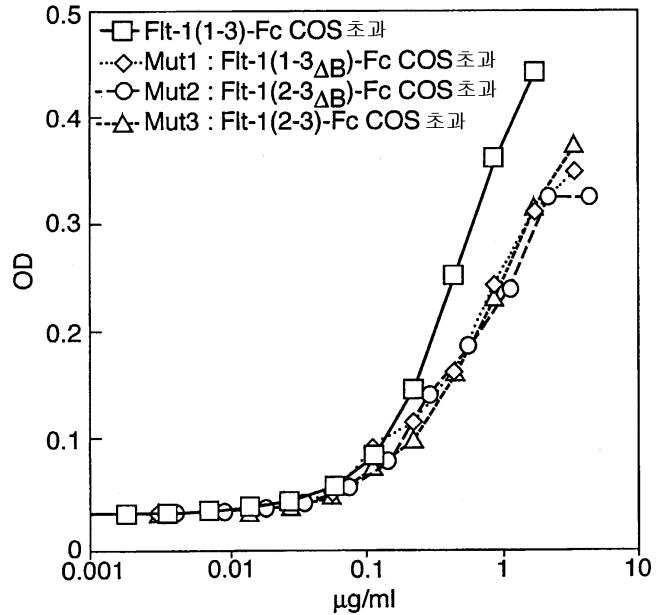
도면17



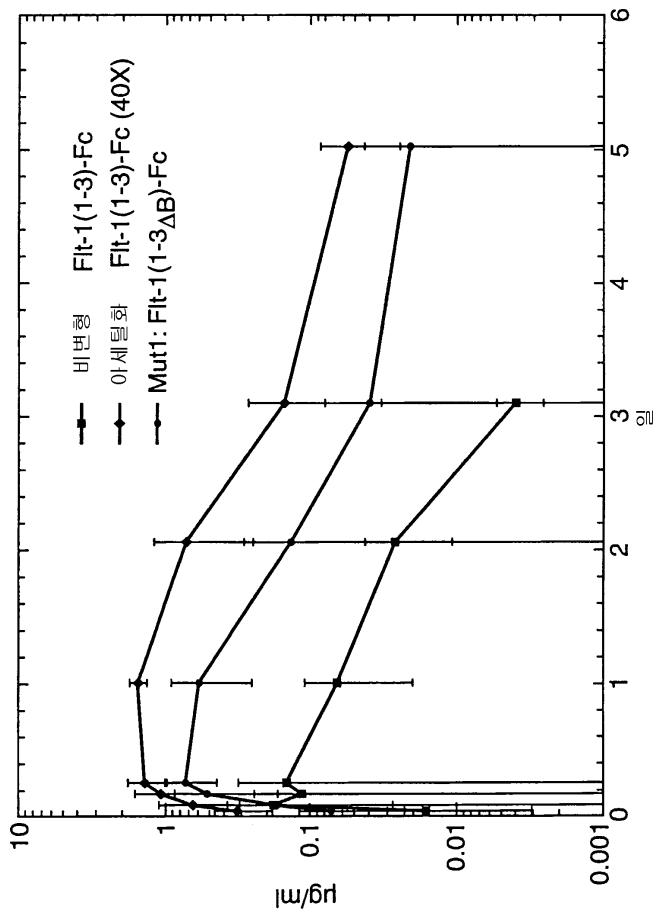
도면18



도면19



도면20



도면21A

>EcoRI_부위

10	20	30	40	50	60	70	80
AAGCTTGCGTGCAGGTGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCCGGCGAGCTCGAAATTGCAACCACCATGGTCAGCTAC							
TTCGAACCCGACGTCCAGCTAGCTGAGATCTCCTAGCTAGGGGCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTGGTACCAAGTCGATG							
						M V S Y>	
						1 4	
_____>							

>BspEI_브리지

90	100	110	120	130	140	150	160
TGGGACACGGGGTCCCTGCTGCGCGTGCCTCAGCTGCTCGCTTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTCGT							
ACCCGTGGCCCCAGGACGACACGGCGACGAGTCGACAGAACAGAGTCTCTAGATCAAGGCCTCCATCIGGAAAGCA							
W D T G V L L C A L L S C L L T G S S>							
FLT1 SS_____>							
S G>							
_____>							
G R P F V>							
31							
_____>							
170	180	190	200	210	220	230	240
AGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCTGCCGGTTACGTAC							
TCTCTACATGTCACTTAGGGCTTAAATATGTTACTGACTCTCCCTCCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCAATGCAGTG							
E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>							
57							
HFLT1 D2_____>							
250	260	270	280	290	300	310	320
CTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTGTGATCCCTGATGGAAAACGATAATCTGGACAGTAGA							
GATTGTTAGTACAATGAAATTTCAGAAAGGTGAACCTGTTGAAACTAGGGACTACCTTTGCCTATTTAGACCCCTGTCATCT							
P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R>							
84							
HFLT1 D2_____>							
330	340	350	360	370	380	390	400
AAGGGCTCATCATATCAAATGCAACGTAACAAAGAAATAGGGCTCTGACCTGTGAAGAACAGTCATGGCATTGTA							
TTCCCGAAGTAGTATAGTTACGTGTCATGTTATCCGAAGACTGGACACTTCGTTGTCAGTTACCCGAAACAT							
K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y>							
111							
HFLT1 D2_____>							
410	420	430	440	450	460	470	480
TAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATAACATAGATGTGGTCTGAGTCCGTCATGAAATTGAAACTAT							
ATTCTGTTGATAGAGTGTGAGCTGTTGGTATGTTAGTATCTACACCAAGACTCAGGCAGAGTACCTTAACCTGATA							
K T N Y L T H R Q T N T I I D>							
HFLT1 D2_____>							
V V L S P S H G I E L>							
137							
HFLK1 D3_____>							

도면21B

도면21B

```

  490      500      510      520      530      540      550      560
CTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTAAATIGTACAGCAAGAACTGAACATAATGTGGGATTGACTTCACGTGGGAATACCCCT
GACAACCTCTTTCGAACAGAATTAAACATGTCGTTCTGACTTGATTTACACCCCTAACGTGACCTTATGGGA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P>
                                         164
                                         HFLK1 D3 >

  570      580      590      600      610      620      630      640
TCTTCGAAGCATCAGCATTAAGAAAAGCTTGTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTGAG
AGAAGCTCTCGTAGTCGTATTCTTGAACATTGGCTCTGGATTTGGGTACAGACCCCTACACTACTCTCTTAAACCTC
S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G S E M K K F L S>
                                         191
                                         HFLK1 D3 >

  650      660      670      680      690      700      710      720
CACCTTAACTATAGATGGTGTAAACCGGAGTGACCAAGGATTGACACCTGTGCAGCATCCAGTGGCTGATGACCAAGA
GTGGAATTGATATCTACCACATTGGGCTCACTGGTTCTAACATGTGACACGTGTCGTTAGGTACCCGACTACTGGTTCT
T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
                                         217
                                         HFLK1 D3 >

  730      740      750      760      770      780      790      800
>Srf_부리지-
|          |
  AGAACAGCACATTGTCAAGGGTCCATGAAAAGGGCCGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
TCTTGTCGTAAACAGTCCCAGGTACTTTCCCGGGCCGCTGTTGAGTGTACGGGTGGCACGGGTGGACTTGGACTT
K N S T F V R V H E K>
                                         HFLK1 D3 >
                                         G P G >
                                         D K T H T C P P C P A P E>
                                         244
                                         FCAC1 (A) >

  810      820      830      840      850      860      870      880
CTCTGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTAC
GAGGACCCCCCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTGGGTCTCTGGAGTACTAGAGGGCCTGGGACTCCAGTG
L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T>
                                         271
                                         FCAC1 (A) >

  890      900      910      920      930      940      950      960
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCAATAATG
TACGCACCAACCCACTGCACTGGTGCTCTGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACTGGCCACCTCCACGTATTAC
C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N>
                                         297
                                         FCAC1 (A) >

  970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
CCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGGAGCTACAAACAGCACGTACCGTGTGTCACCGTCTCACCGTCTGCCACCAAGGACTGG
GGTTCTGTTCTGGGCCCTCCCTCGTCATGTTGTCGTGCAATGGCACACCCAGTGGCAGGAGTGGCAGGACGTGGTCCCTGACC
A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W>
                                         324
                                         FCAC1 (A) >

```

도면21C

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CTGAATGGCAAGGAGTACAACTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAAGCCAA
 GACTTACCGTCTCTCATGTTACAGTTCAGGGAGGTGTTGGGGGGTAGGCTCTTTGGTAGAGGTTTCGGTT
 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K >
 351
 FCΔC1 (A)

>A>C_A_동종0이인자형
 |
 >G>T_A_동종0이인자형
 |

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTGTACACCCCTGCCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCTGACCT
 TCCCCTCGGGGCTCTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACATGGTTCTGGTCCAGTCGGACTGGA
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T >
 377
 FCΔC1 (A)

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 GCCTGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGACCAATGGCAAGCCGGAGAACAACTACAAGACCC
 CGGACAGTTCCGAAGATAGGGTGCCTGTAGCGGCCACTCACCTCTCGTTACCGTCGGCTCTGGTGTGATGTTCTGG
 C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T >
 404
 FCΔC1 (A)

>T>C
 |

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCCTCTCCCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
 TGGGGAGGGCACGACCTGAGGTGCGCAGGAAGAGGAGATATCGCTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCACCGTGCTCC
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q >
 431
 FCΔC1 (A)

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGGCAGAACAGGCCTCTCCCTGCTCCGGTA
 CCTGCAGAAGAGTACGAGGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGTGATGTCGCTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCAT
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G >
 457
 FCΔC1 (A)

>NotI_부위
 |
 |1450
 AATGAGCGCCGCG
 TTACTCGCCGCG
 K *>
 458
 >

도면22A

>EcoRI_부위

10	20	30	40	50	60	70	80
AAGCTTGGGCTGCAGGTGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCGGGGGAGCTCGAATTGCGAACCACTGGTCAGCTAC TTCGAACCCGACGTCCAGCTAGCTGAGATCTCCTAGCTAGGGGCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTAGACCAGTCGATG							
M V S Y> 1 4							

>BspEI_브리지

90	100	110	120	130	140	150	160
TGGGACACGGGGTCCCTGCTGCGCGCTGCTCAGCTGTCAGCTTGCTTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTCG ACCTCTGGCCCCAGGACAGCACCGCGAGCTGACAGACGAAGAGTGTCTAGATCAAGGCCATCTGGAAAGCA							
W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S> FLT1 신호서열							
S G>							
G R P F V> 31							

170 180 190 200 210 220 230 240

AGAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTAC TCTCTACATGTCACTTAGGGCTTTAATATGTGACTGACTCTCCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCAATGGCAGTG							
E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S> 57							

FLT1 IG 도메인2

250 260 270 280 290 300 310 320

CTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCACTTGTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGATAATCTGGGACAGTAGA GATTGAGTGACAATGAAATTTCAGGTAAGTGTGAAACTAGGGACTACCTTTGCGTATTAGACCCCTGTCATCT							
P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R> 84							

FLT1 IG 도메인2

330 340 350 360 370 380 390 400

AAGGGCTCATCATATCAAATGCAACGTACAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAACCAACAGTCATGGCATTGTA TTCCCGAAGTAGTATAGTTACGTTGATGTTCTTATCCGAAGACTGGACACTTGTGTCAGTTACCCGTAACAT							
K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y> 111							

FLT1 IG 도메인2

410 420 430 440 450 460 470 480

TAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATATCCAGCTTGTGCCAGGAAGTCCTGGAGCTGC ATTCIGTTGATAGAGTGTGAGCTGTTAGTTATCTATAGGTCGACAACGGGCTTCAGGGACCTCGAC							
K T N Y L T H R Q T N T I I D>							

FLT1 IG 도메인2

I Q L L P R K S L E L>
137

VEGFR3 (FLT4) IG 도메인3

도면22B

490 500 510 520 530 540 550 560
 TGGTAGGGAGAAGCTGGTCCCTCAACTGCCCCGAGCTGGCTGAGTTAACCTCAGGTGTCACCTTGACTGGGACTACCCA
 ACCATCCCCCTCTTCGACCAGGAGTTGACCGTGGCACACCCGACTCAAATTGAGTCCACAGTGGAAACTGACCCCTGATGGGT
 L V G E K L V L N C T V W A E F N S G V T F D W D Y P >
 164
VEGFR3 (FLT4) IG 도메인 3 >

570 580 590 600 610 620 630 640
 GGGAGCAGGAGACGGGGTAAGTGGGCCGAGGACGCCTCCAAACAGACCCACACAGAACTCTCCAGCATCCTGAC
 CCCCTCCTCGCTCTCGCCCCATTCAACCCACGGCTCGCTCGAGGGTTGCTCTGGGTGTCCTTGAGAGGTGCTAGGACTG
 G K Q A E R G K W V P E R R S Q Q T H T E L S S I L T >
 191
VEGFR3 (FLT4) IG 도메인 3 >

650 660 670 680 690 700 710 720
 CATCCACACGTCAGCCAGCACGACCTGGCTCGTATGTGCAAGGCCAACACCGCATTCCAGCGATTTCGGGAGAGCA
 GTAGGTGTTGAGTCGGCTCGCTGGACCATCACACGTCACGGTTGCTGAGGTGCTAAACCCCTCTCGT
 I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N G I Q R F R E S >
 217
VEGFR3 (FLT4) IG 도메인 3 >

730 740 750 760 770 780 790 800
 CCGAGGTGATTGTCATGAAAATGGCCGGCGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACCTGGGG
 GGCCTCAGTAACACGTAACCTGGCTGTTTACCGGGCCGCTGTTGAGTGTGACGGGTGGCACGGGCTGGACTTGAGGACCC
 T E V I V H E N >
VEGFR3 (FLT4) IG >

G P G >
FCΔC1 - A 동종이인자형 >

D K T H T C P P C P A P E L L G >
 244
FCΔC1 - A 동종이인자형 >

810 820 830 840 850 860 870 880
 GGACCGTCAGTCCTCCCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAACATGGGTGGT
 CCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTGGGTTCCCTGGGAGTACTAGAGGGCTGGGACTCCAGTGTACGCACCA
 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V >
 271
FCΔC1 - A 동종이인자형 >

890 900 910 920 930 940 950 960
 GGTGGACGTGAGGCCAGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCAATAATGCCAAGACAA
 CCACCTCCACTCGGTGCTCTGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGACCCCTCACGTATTACGGTCTGTT
 V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T >
 297
FCΔC1 - A 동종이인자형 >

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 AGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCGTACCGTGTGGTCACCGCTCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGGC
 TCGCGCCCTCTCGTCATGTTGTCGTGCATGGCACACCCAGTCGCAGGAGTGGCAGGACGTGGCTCTGACCGACTTACCG
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G >
 324
FCΔC1 - A 동종이인자형 >

도면22C

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCAAAGGGCAGCC
 TTCCCATGTTCACGTTCCAGAGGTGTTGGGAGGGTCGGGGTAGCTTTGGTAGAGGTTTCGGTTCCGGTTCGGTCGG
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P >
 351

FCΔC1 - A 동종이인자형 _____>

1130 1140 1150 1160 |1170 1180 1190 1200
 CCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCTATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGACCTGCCTGGCTGGTCA
 GGCTTGGTGTCCACAGTGAGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTCTTGGTCCAGTCGGACTGGACGGACCAGT
 R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V >
 377

FCΔC1 - A 동종이인자형 _____>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 AAGGCTCTATCCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCC
 TTCCGAAGATAGGGTGTGCTGTAGCGGCACCTCACCCCTCGTTACCCGTCGGCTCTTGATGTTCTGGTGGAGGG
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P >
 404

FCΔC1 - A 동종이인자형 _____>

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCCTCTCCCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTT
 CACGACCTGAGGCTGCCAGGAAGAAGGAGATACTCGTGGCACCTCTCGTCCACCGTGTCCCCCTGGAGAA
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F >
 431

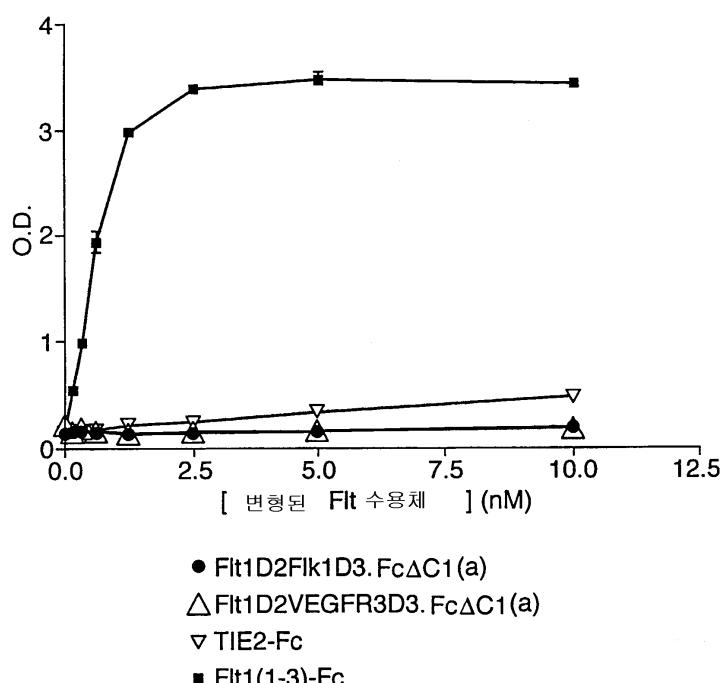
FCΔC1 - A 동종이인자형 _____>

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTCATGCTCCGTGATGCAATGGGCTCTGCCACAACCACTACACCGAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGCGG
 GAGTACGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGATGCGTCTCTCGAGAGGGACAGAGGCCATTACTCGCC
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K * >
 455

FCΔC1 - A 동종이인자형 _____>

CCGC
GGCG

도면23



도면24A

10 20 30 40 50 60
 * * * * * *

ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
 TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
 M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L>
 1 5 hFLT1 신호서열 15 20>

70 80 90 100 110 120
 * * * * * *

ACA GGA TCT AGT TCC GGA AGT GAT ACC CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC
 TGT CCT AGA TCA AGG CCT TCA CTA TGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG
 T G S S S G>
 21_hFLT1 신호서열_26>

S D T G R P F V E M Y S E I>
 27 30 hFLT1 IG 도메인2 40>

130 140 150 160 170 180
 * * * * * *

CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GIT ACG TCA
 GGG CCT TAA TAT GTG TAC TGA CCT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT
 P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>
 41 45 hFLT1 IG 도메인2 55 60>

190 200 210 220 230 240
 * * * * * *

CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CCT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA
 GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT
 P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K>
 61 65 hFLT1 IG 도메인2 75 80>

250 260 270 280 290 300
 * * * * * *

CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA
 GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CCT TAT
 R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I>
 81 85 hFLT1 IG 도메인2 95 100>

310 320 330 340 350 360
 * * * * * *

GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA
 CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT
 G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T>
 101 105 hFLT1 IG 도메인2 115 120>

370 380 390 400 410 420
 * * * * * *

CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG CCT CAT GGA ATT GAA CTA
 GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GAA GTC CCT TAA CTT GAT
 H R Q T N T I I D>
 121 hFLT1 IG 도메인2 129>

V V L S P S H G I E L>
 130 hFLKL IG 도메인3 140>

도면24B

430 440 450 460 470 480
 * * * * * *

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

490 500 510 520 530 540
 * * * * * *

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

550 560 570 580 590 600
 * * * * * *

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

610 620 630 640 650 660
 * * * * * *

GTA ACC CGG AGT GAC CAA GGA TTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG ATG ACC AAG
 CAT TGG GCC TCA CTG GTT CCT AAC ATG TGG ACA CGT CGT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC
 V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
 201 _____ 205 hFLK1 IG 도메인3 215 220>

670 680 690 700 710 720
 * * * * * *

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

D K T H T C P P C>
 232 _____ hFCAC1 A 240>

730 740 750 760 770 780
 * * * * * *

CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
 GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
 P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D>
 241 _____ 245 hFCAC1 A 255 260>

790 800 810 820 830 840
 * * * * * *

ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
 TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CTC CAC TOG GTG CTT
 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E>
 261 _____ 265 hFCAC1 A 275 280>

850 860 870 880 890 900
 * * * * * *

GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
 CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CGG CAC CTC CAC GTC TTA CGG TTC TGT
 D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
 281 _____ 285 hFCAC1 A 295 300>

도면24C

910 920 930 940 950 960
 * * * * * *

AAG CGG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG
 TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L>
 301 305 hFCAC1 A 315 320>

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * *

CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
 GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT
 H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P>
 321 325 hFCAC1 A 335 340>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * *

GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
 CCG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG
 A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y>
 341 345 hFCAC1 A 355 360>

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * *

ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
 TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC GAC TGG TTC TIG GTC CAG TCG GAC TGG AGC GAC CAG
 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>
 361 365 hFCAC1 A 375 380>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * *

AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
 TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N>
 381 385 hFCAC1 A 395 400>

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * *

AAC TAC AAG ACC ACC CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
 TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CGG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC
 N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K>
 401 405 hFCAC1 A 415 420>

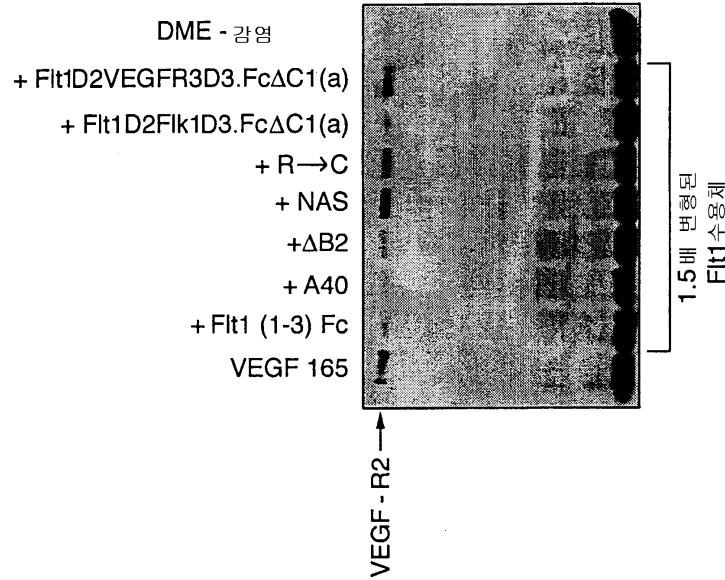
1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * *

CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
 GAG TGG CAC CTG TTC TCG ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA
 L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H>
 421 425 hFCAC1 A 435 440>

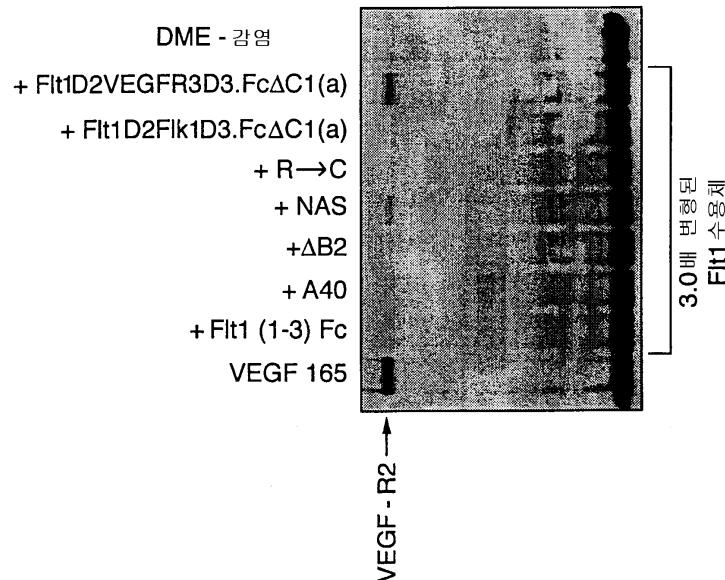
1330 1340 1350 1360 1370
 * * * * *

GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *>
 441 445 hFCAC1 A 455 458 >

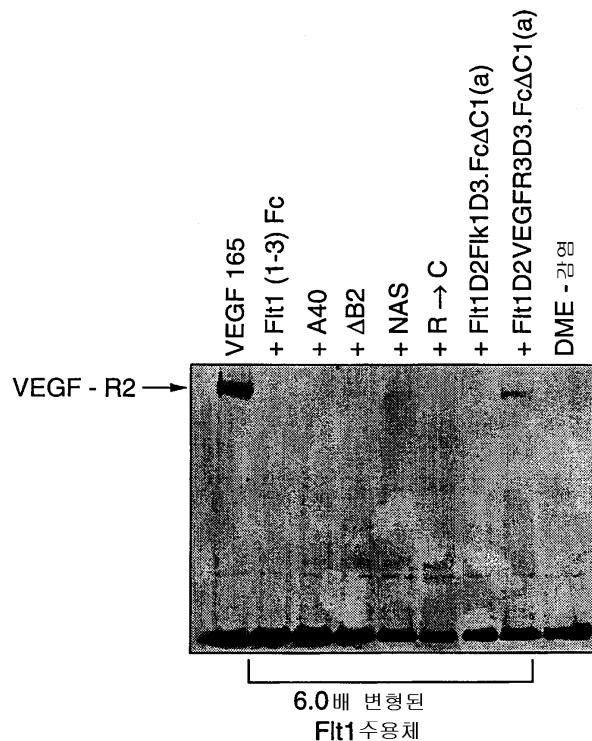
도면25A



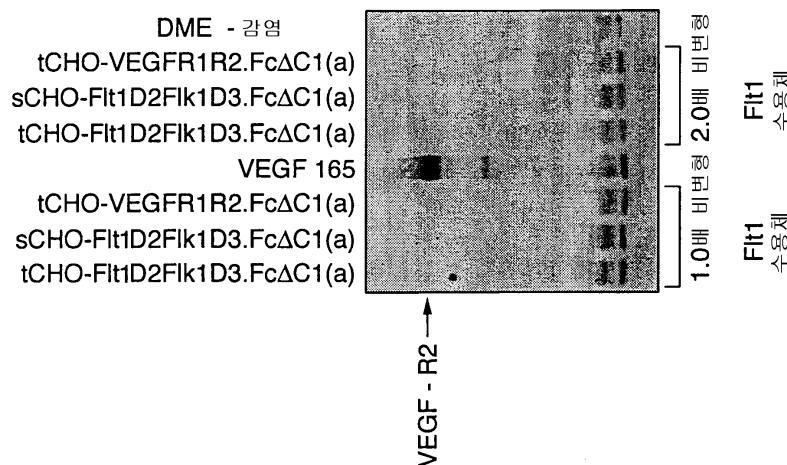
도면25B



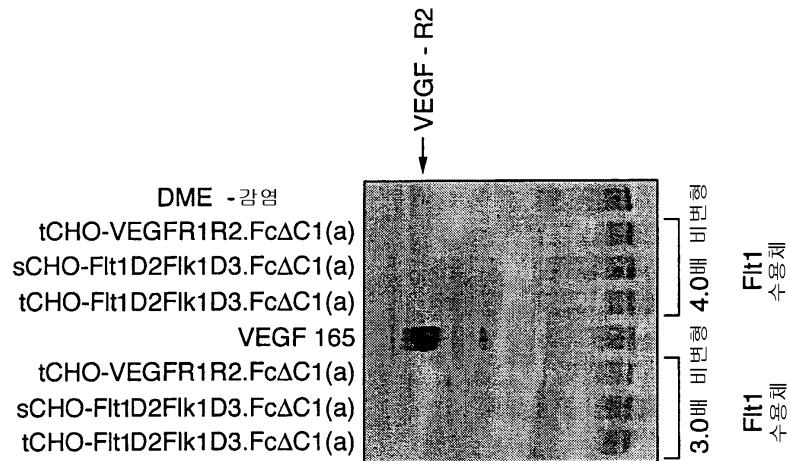
도면25C



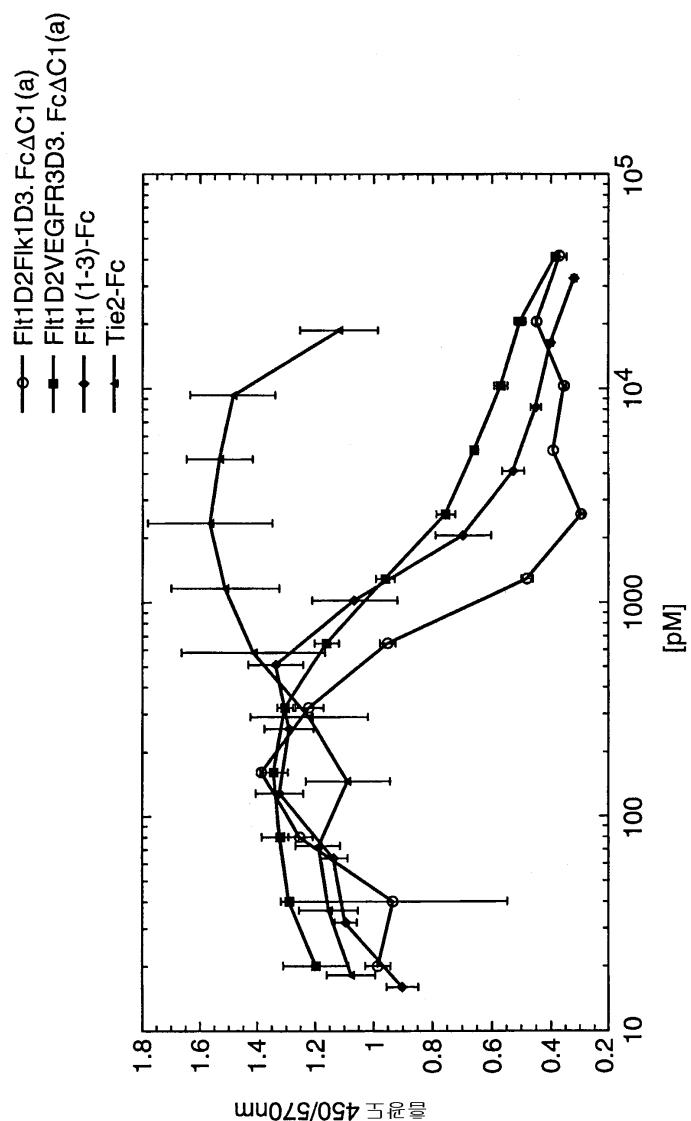
도면26A



도면26B



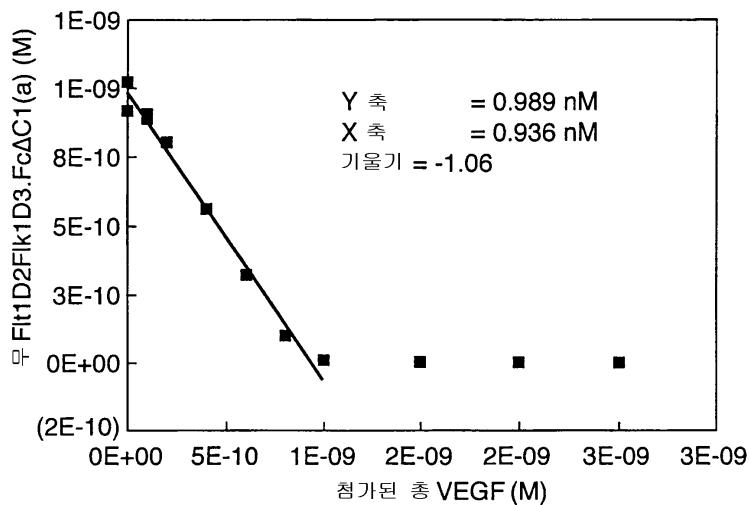
도면27



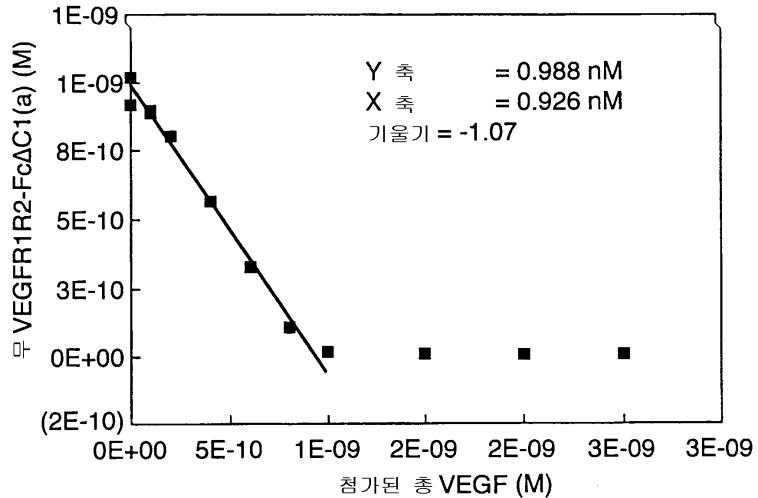
도면28

hVEGF165 (nM)		VEGF/Fit1D2Flk1D3.FcΔC1(a)	VEGF/VEGFR1R2-FcΔC1(a)
1		0.93	0.98
10		0.97	0.94
50		1	0.99
평균 ± StDev		0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02

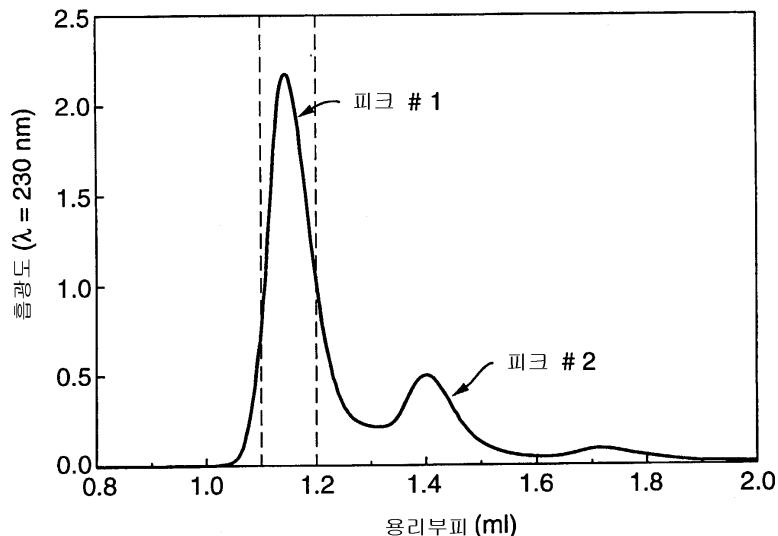
도면29



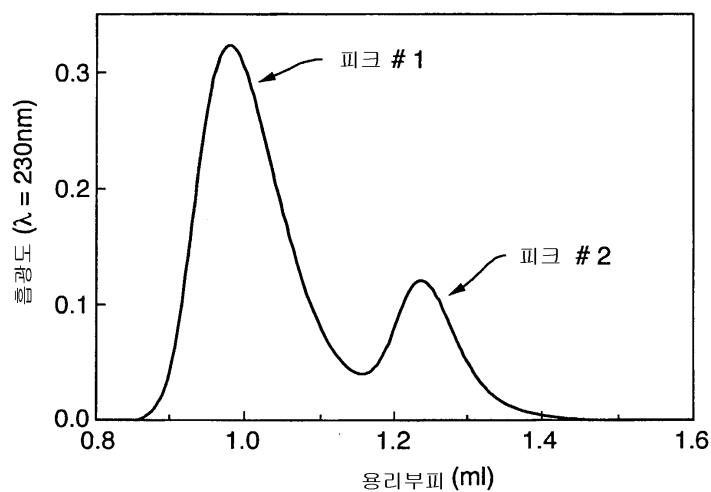
도면30



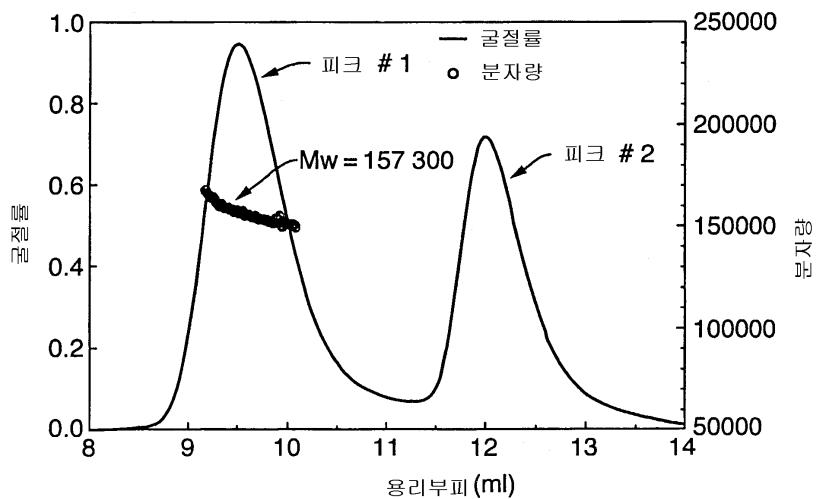
도면31



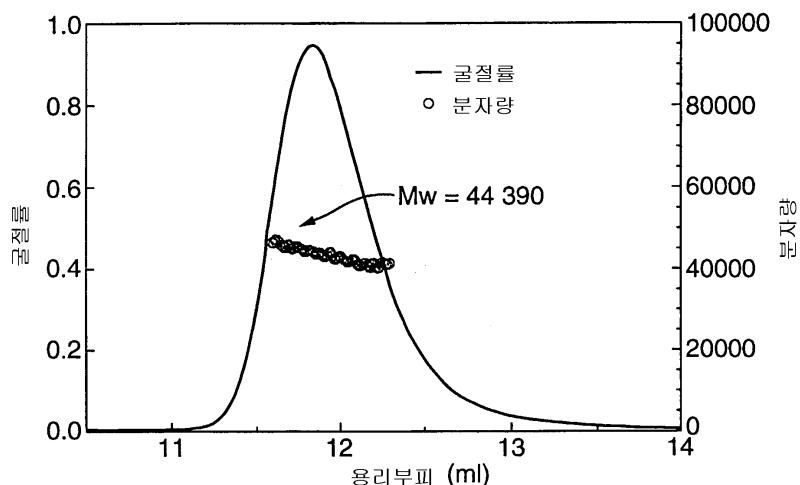
도면32



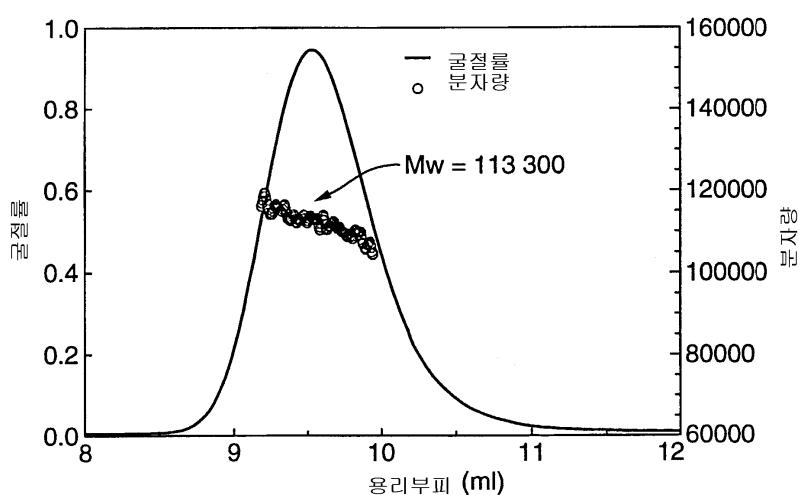
도면33



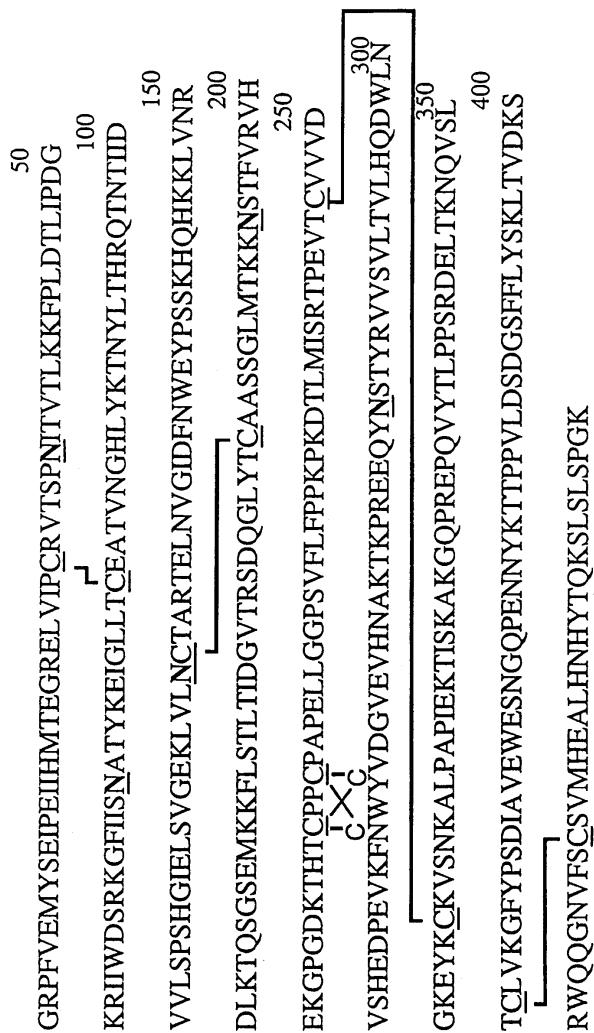
도면34



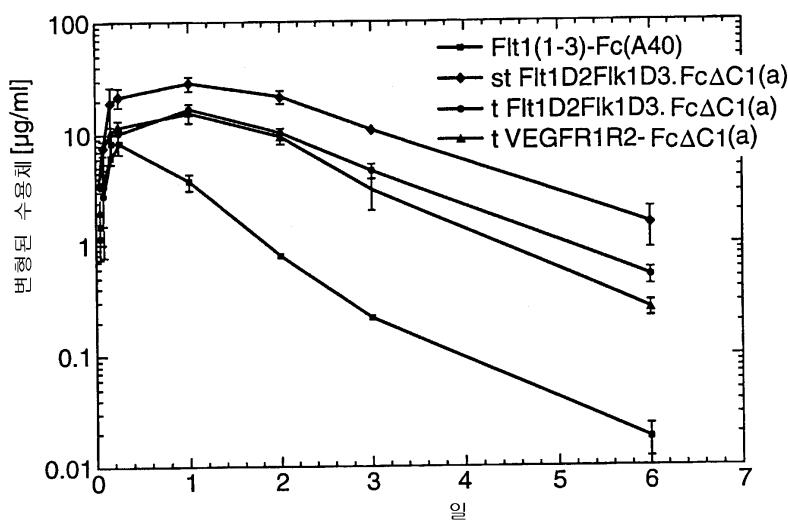
도면35



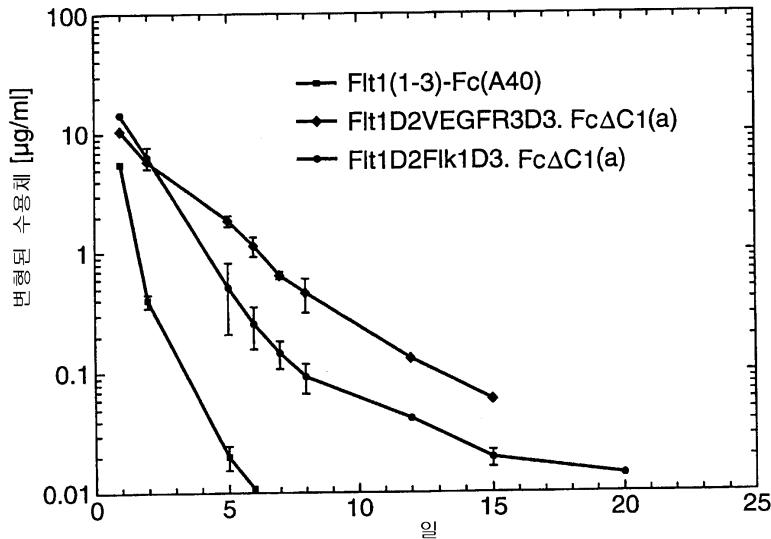
도면36



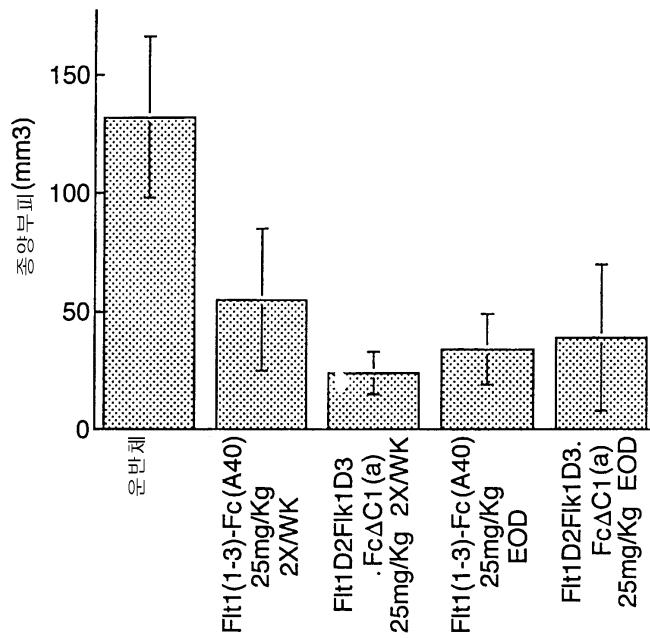
도면37



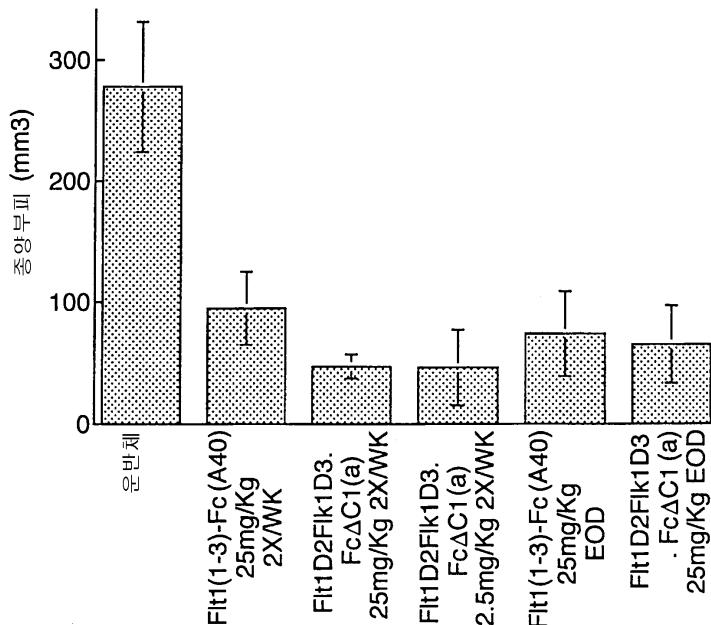
도면38



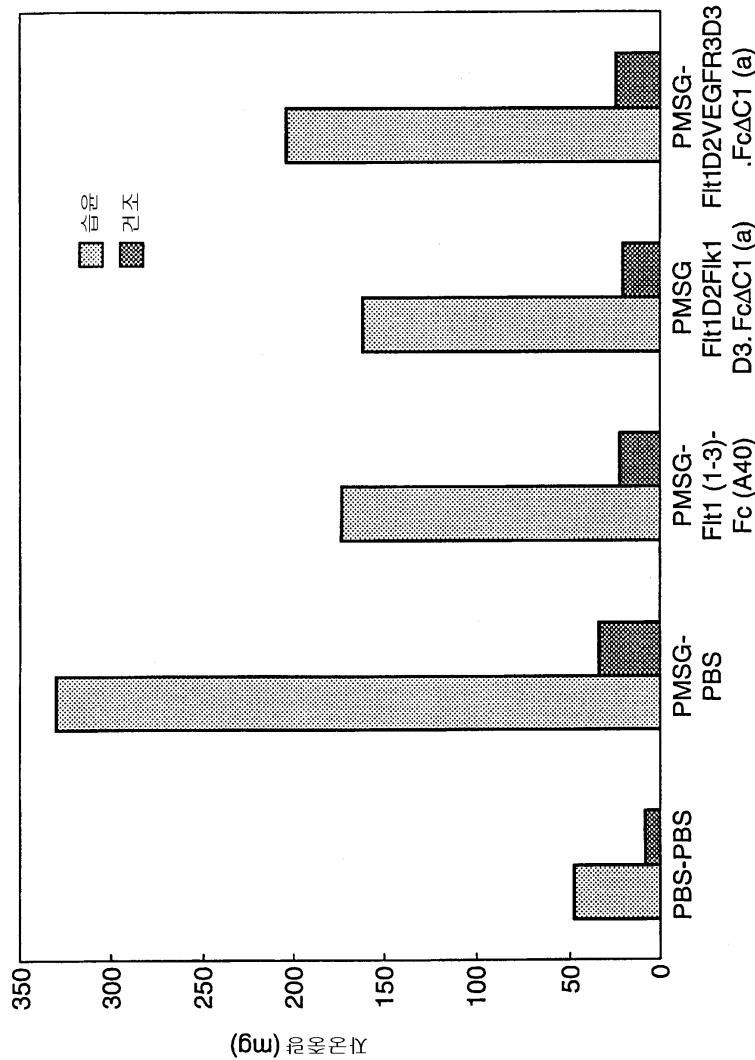
도면39



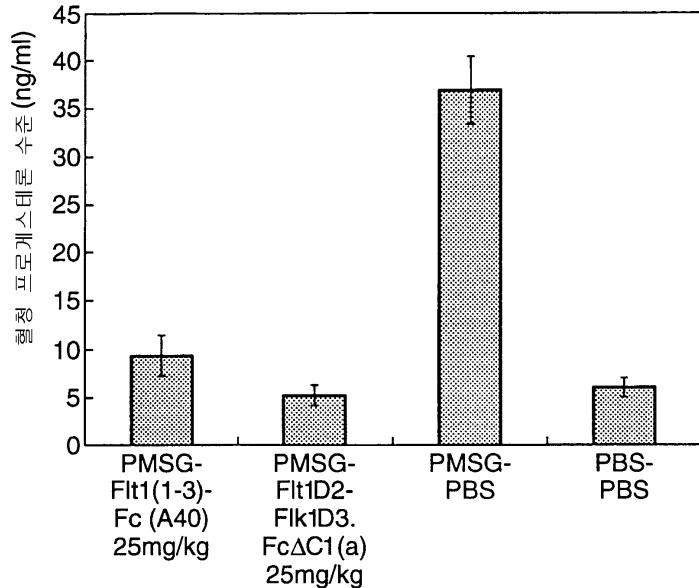
도면40



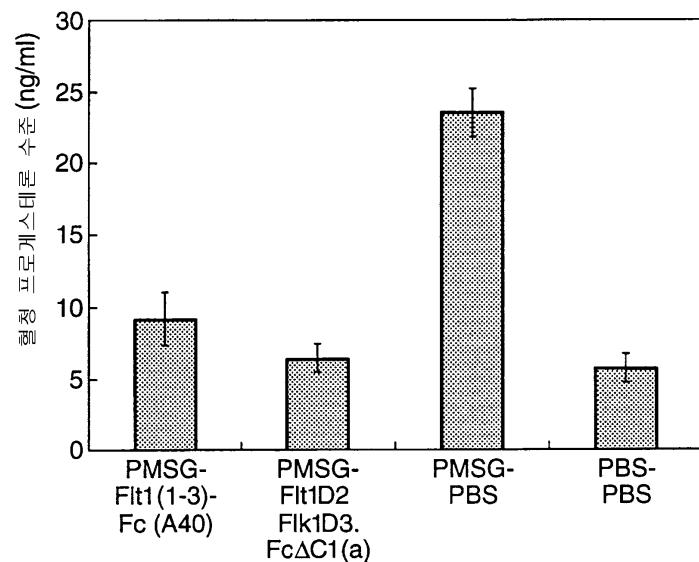
도면41



도면42A



도면42B



서열목록

서열목록 전자파일 첨부