



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월08일

(11) 등록번호 10-1766627

(24) 등록일자 2017년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 14/705 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7005386(분할)

(22) 출원일자(국제) 2009년03월18일

심사청구일자 2017년02월24일

(85) 번역문제출일자 2017년02월24일

(65) 공개번호 10-2017-0024163

(43) 공개일자 2017년03월06일

(62) 원출원 특허 10-2010-7023301

원출원일자(국제) 2009년03월18일

심사청구일자 2014년03월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/001689

(87) 국제공개번호 WO 2009/117096

국제공개일자 2009년09월24일

(30) 우선권주장

61/069,910 2008년03월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02008091781 A1

J Pathol. 2005 Aug;206(4):466-75.

(73) 특허권자

차이나 신테틱 러버 코포레이션

대만 타이페이 시티 104, 종산 디스트릭트, 종산
노쓰 로드, 섹션 2, 넘버 113, 8층

(72) 발명자

카오, 쿠오-장

미국 플로리다 32607, 게이네스빌, 119 엔더블유
101 코트

후앙, 앤드류, 티.

미국 노스 캐롤라이나 27707, 멀햄, 4841 모리아
힐 로드

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이준혁

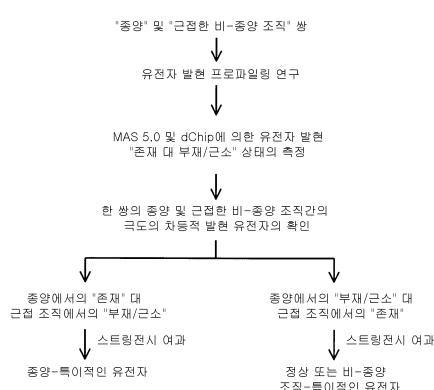
(54) 발명의 명칭 간세포 암종의 진단 및 치료를 위한 방법 및 제제

(57) 요약

본 발명은 대상체에서 간세포 암종을 진단하는 방법, 및 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 같은, PLVAP 단백질의 길항제, 및 PLVAP 단백질의 길항제를 포함하는 조성물 및 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

극도의 차등적 발현 유전자의 확인을 위한 알고리즘



(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)

C12Q 1/68 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기로부터 선택된 적어도 하나의 항체 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산:

A) 하기를 포함하는 항체 가변 도메인:

- a) 서열 번호 5로 이루어진 CDR1;
- b) 서열 번호 6으로 이루어진 CDR2; 및
- c) 서열 번호 7로 이루어진 CDR3;

B) 하기를 포함하는 항체 가변 도메인:

- a) 서열 번호 10으로 이루어진 CDR1;
- b) 서열 번호 11로 이루어진 CDR2; 및
- c) 서열 번호 12로 이루어진 CDR3;

C) 하기를 포함하는 항체 가변 도메인:

- a) 서열 번호 15로 이루어진 CDR1;
- b) 서열 번호 16으로 이루어진 CDR2; 및
- c) 서열 번호 17로 이루어진 CDR3; 및

D) 하기를 포함하는 항체 가변 도메인:

- a) 서열 번호 20으로 이루어진 CDR1;
- b) 서열 번호 21로 이루어진 CDR2; 및
- c) 서열 번호 22로 이루어진 CDR3, 또는

이들의 조합.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 V_H 도메인, 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 V_L 도메인, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 분리된 핵산.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 V_H 도메인, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 V_L 도메인, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 분리된 핵산.

청구항 4

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 영장류화된 항체, 베니어된 항체, 일본쇄 항체 및 전술한 것들 중 하나의 항원-결합 단편으로부터 선택된 항체인 것인, 분리된 핵산.

청구항 5

제4항에 있어서, 폴리펩티드가 인간화된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 분리된 핵산.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 분리된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 분리된 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

제6항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 대상체에서 간세포 암종을 진단 및 치료하는 방법, 및 이를 위한 제제에 관한 것이다. 본 출원은 2008년 3월 19일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/069,910호의 우선권을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시는 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 간세포 암종(HCC)은 간의 가장 흔한 원발성 암이며 세계적으로 사람에서 5번째로 가장 흔한 암이다. HCC는 또한 암-관련 사망의 4번째 주요 원인이다(참조: Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001;94:153-156). 1990년에, 세계 보건 기구는, 세계적으로 약 430,000개의 신규 경우의 간암이 존재하며, 유사한 수의 환자가 당해 질병의 결과로서 그해 사망하였음을 발표하였다.

[0004] HCC의 발병기전은 간의 만성 B형 간염 바이러스(HBV) 및 C형 간염 바이러스(HCV) 감염은 물론, 간경화-유발 상태와 관련되어 있다(참조: Bruix J, et al. J Hepatol 35:421-430, 2001; Bruix J, et al. Cancer Cell 5:215-219, 2004). 따라서, HCC의 발병은 HBV 및 HCV 감염이 가장 빈번한, 중국, 홍콩, 타이완, 한국 및 일본과 같은 동아시아 나라에서 가장 높다(참조: Bruix J, et al. Cancer Cell 5:215-219, 2004; Haskell CM. Chapter 46 Liver: Natural History, Diagnosis and Staging in "Cancer Treatment" 5th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, editors:Haskell CM & Berek JS). 그러나, 서방 국가에서 HCC의 발생이 서서히 증가하고 있다(참조: Parkin DM, et al. Int J Cancer 94:153-156, 2001). 미국에서 지난 10년에 걸쳐, HCC는 모든 암 중 발병에서 두번째로 높은 증가, 및 사망율에서 가장 높은 증가를 나타내었다(참조: Ann Int Med 139:817-823, 2003). 따라서, 미국 및 전세계에서, HCC는 치사율 및 이완율의 주요 원인이며, HCC에 걸린 사람에 의한 병원비 및 근로 손실로 인하여 상당한 경제적 부담이 되고 있다.

[0006] * HCC의 성공적인 조절은 질병 진행의 초기 단계에서 질병의 정확한 진단이 요구된다. 그러나, 전이성 종양, 담관암종, 초점성 결절성 과증식, 형성이상 및 재생 간 소절을 포함하는, 다른 악성 또는 비-악성 간 질병으로부터 영상진단 연구, 침 코어 생검(needle core biopsy) 및/또는 미세 침 흡인과 같은 현재의 기술을 사용하여 소 HCC 종양을 구별하는 것이 시도되고 있는 것으로 입증되어 있다(참조: Ferrell LD, et al. Am J Surg Pathol 17:1113-1123, 1993; Horigome H, et al. Hepato-Gastroenterology 47:1659-1662, 2000; Kalar S, et al. Arch Pathol Lab Med 131:1648-1654, 2007; Seki S, et al. Clin Cancer Res 6:3460-3473, 2000). 더우기, HCC를 치료학적으로 치료하는 시도는 크게 성공적이지 않았다(참조: Bruix J, et al. J Hepatol 35:421-430, 2001; Bruix J, et al. Cancer Cell 5:215-219, 2004; Haskell CM. Chapter 46 Liver: Natural History, Diagnosis and Staging in "Cancer Treatment" 5th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, editors:Haskell CM & Berek JS; Szklaruk J, et al. AJR 180:441-453, 2003). 그 결과, 활성 치료요법에도 불구하고, 미국에서 HCC에 걸린 환자의 5년 생존율은 10.5%에 불과하며, 이는 단지 췌장 암에 대한 규모에서만 두번째이다[참조: ACS Cancer Facts & Figures(2007)]. 따라서, 다른 간 발병기전으로부터 HCC를 차별화시키고 당해 질병의 초기 검출을 촉진하는 보다 신뢰성있는 마커를 확인하는 것이 시급하게 요구되고 있다. 또한, HCC의 치료를 위한 새롭고 보다 효과적인 치료제를 개발하는 것이 시급하게 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 하나의 실시양태에서, 간세포암종(HCC)의 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들면, 사람)에게, 상기 대상체의 간에서 하나 이상의 HCC 종양의 형성, 성장 및/또는 진행을 억제하는 적어도 하나의 원형질막 소포-관련 단백질(PLVAP) 길항제를 치료학적 유효량으로 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 간세포암종을 치료하는 방법을 포함한다. 하나의 실시양태에서, PLVAP 길항제는 PLVAP 단백질(예를 들면, 사람 PLVAP 단백질)에 특이적으로 결합하는 항체이다. 특수 실시양태에서, PLVAP 길항제는 화학치료제와 같은 제2의 치료제와 함께 투여된다.
- [0009] 다른 실시양태에서, 본 발명은 간세포암종(HCC)의 치료를 필요로 하는 대상체에게 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 적어도 하나의 화학치료제를 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 간세포암종(HCC)을 치료하는 방법에 관한 것이다. PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 동맥내 주입(예를 들면, 간 동맥 주입, 경동맥 색전술)에 의해 대상체에게 투여되어 대상체의 간에서 종양 형성, 종양 성장, 종양 혈관화 또는 종양 진행을 억제할 수 있다. 특수 실시양태에서, 항체는 대상체의 간에서 HCC 종양내 또는 주변에서 혈관의 내피 세포에 전달된다.
- [0010] 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체(예를 들면, 사람)로부터의 시료에서 PLVAP 유전자 생성물(예를 들면, PLVAP RNA, PLVAP 단백질)의 수준을 검출하고 시료내 PLVAP 유전자의 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는지를 측정하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 간세포암종(HCC)을 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라서, 대조군에 비해 시료중 PLVAP 유전자 생성물의 증가된 수준은 대상체에서 HCC의 존재의 지표이다. 특수 실시양태에서, PLVAP에 특이적으로 결합하는 항체는 대상체로부터의 시료에서 PLVAP 단백질의 수준을 검출하는데 사용된다.
- [0011] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 대상체로부터의 간 조직 시료에서 PLVAP 유전자 생성물의 발현을 검출하는 것을 포함하는, 대상체에서 간세포암종(HCC)을 진단하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 간 조직 시료에서 PLVAP 유전자 생성물의 발현은 HCC의 지표이다. 특수 실시양태에서, PLVAP 유전자 생성물의 발현은 간 조직 시료에서 혈관 내피 세포에서 검출된다.
- [0012] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 PLVAP에 특이적으로 결합하는 방사성동위원소-표지된 항체를 동맥내 주사 또는 정맥내 주사에 의해 투여하고, 대상체(예를 들면, 사람)의 간의 영상을 수득하여 대상체의 간내에 항체의 축적을 측정함을 포함하는, 상기 대상체에서 HCC를 검출하는 생체내 방법에 관한 것이다.
- [0013] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 포유동물(예를 들면, 사람) PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 특수 양태에서, 폴리펩티드는 항체이다. 추가의 실시양태에서, 항체는 사람 PLVAP 단백질에 대한 결합에 대해 모노클로날 항체 KFCC-GY4 또는 KFCC-GY5와 경쟁하는 항체이다.
- [0014] 다른 실시양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 PLVAP 길항제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 하나의 실시양태에서, PLVAP 길항제는 PLVAP 단백질(예를 들면, 인간 PLVAP 단백질)에 특이적으로 결합하는 항체이다. 다른 실시양태에서, 약제학적 조성물은 또한 화학치료제와 같은 제2의 치료제를 추가로 포함한다.
- [0015] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 HCC를 진단하기 위한 키트에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 키트는 PLVAP RNA 전사체에 특이적으로 하이브리드화하는[예를 들면, 고 스트링전시(hight stringency) 조건하에서] 적어도 하나의 핵산 프로브를 포함한다. 다른 실시양태에서, 키트는 PLVAP 단백질(예를 들면, 사람 PLVAP 단백질)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드(예를 들면, 항체)를 포함한다.
- [0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 간세포암종(HCC)의 치료를 필요로 하는 대상체에게 PLVAP에 특이적으로 결합하는 치료학적 유효량의 인간화 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 간세포암종(HCC)을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특수 실시양태에서, 항체는 대상체에게 동맥내 주입(예를 들면, 간 동맥 주입, 경동맥 색전술)에 의해 투여되며 대상체의 간에서 종양 형성, 종양 성장, 종양 혈관화 또는 종양 진행을 억제할 수 있다.
- [0017] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호 23에 대한 결합에 대해 모노클로날 항체 KFCC-GY4 또는 모노클로날 항체 KFCC-GY5와 특이적으로 경쟁하는 인간화된 항체를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0019] 정의

[0020] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "원형질막 소포-관련 단백질", "PLVAP", 및 "PV-1"은 천연적으로 존재하거나 내인성인 PLVAP(예를 들면, 포유동물, 인간) 단백질, 및 천연적으로 존재하거나 내인성 PLVAP 단백질(예를 들면, 재조합체 단백질, 합성 단백질)과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 말한다. 따라서, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "원형질막 소포-관련 단백질", "PLVAP", 및 "PV-1"은 포유동물(예를 들면, 인간)에서 천연적으로 존재하는, 예를 들면, 교호적인 스팸라이싱(splicing) 또는 다른 세포 과정에 의해 생산된 PLVAP 단백질의 다형성 또는 대립유전자 변이체 및 다른 동형(isoform)을 포함한다. 바람직하게는, PLVAP 단백질은 서열 번호 23의 아미노산 서열을 갖는 인간 단백질이다[참조: 진뱅크(Genbank) 수탁 번호 제NP_112600호 및 도 24].

[0021] 본원에 정의한 것으로서, "PLVAP 길항체"는 하나의 실시양태에서, PLVAP 단백질의 활성을 억제(예를 들면, 감소 또는 방지)하거나; 다른 실시양태에서, PLVAP 유전자 및/또는 유전자 생성물의 발현을 억제(예를 들면, 감소, 방지)하는 제제(예를 들면, 항체, 소 분자, 웨타이드, 웨티도미메틱, 핵산)이다. 본 발명의 길항체에 의해 억제될 수 있는 PLVAP 단백질의 활성은 간세포 암종 종양의 형성, 성장, 혈관화 및/또는 진행을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특수 실시양태에서, PLVAP 길항체는 포유동물(예를 들면, 인간) PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하여 PLVAP 단백질의 활성을 억제한다.

[0022] 본원에 사용된 것으로서, "특이적으로 결합하는"은 PLVAP 길항체가 비-PLVAP 단백질에 결합하는 친화성보다 적어도 약 5배, 바람직하게는 적어도 약 10배 큰 친화성(예를 들면, 결합 친화성)을 갖는 PLVAP 유전자 생성물(예를 들면, RNA, 단백질)에 대한 제제(예를 들면, 항체)의 결합을 말한다.

[0023] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "폴리웨타이드"는 아미노산의 중합체를 말하며 특정 길이를 말하지는 않는다. 따라서, "폴리웨타이드"는 단백질, 웨타이드 및 올리고웨타이드를 포함한다.

[0024] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "항체"는 표적인, 항원 또는 에피토프에 대해 친화성을 갖는 폴리웨타이드를 말하며 천연적으로-존재하는 항체 및 가공된 항체 둘다를 포함한다. 용어 "항체"는 폴리클로날, 모노클로날, 인간, 키메라, 인간화된, 영장류화된, 베니어된(veneered) 및 일본쇄 항체는 물론, 항체의 단편(예를 들면, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab'), scFv, scFab, dAb)을 포함한다(참조: 예를 들면, Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

[0025] 용어 "항체 가변 영역"은, 독립적으로 또는 다른 항체 가변 영역과 조합된 경우(예를 들면, V_H/V_L 쌍), 에피토프(예를 들면, V_H, V_{HH}, V_L)에 특이적으로 결합하는 항체의 영역을 말한다.

[0026] 용어 "에피토프"는 항체 V_H/V_L 쌍에 의해 통상적으로 결합된 구조의 단위를 말한다. 에피토프는 항체에 대한 최소 결합 부위를 정의하므로, 항체의 특이성의 표적을 나타낸다.

[0027] 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원성 표적(예를 들면, 에피토프)에 특이적으로 결합할 수 있는 아미노산 서열을 함유하는, 중쇄 또는 경쇄로부터의 항체 가변 영역의 초가변 영역을 말한다. 대표적인 중쇄 또는 경쇄는 3개의 CDR(CDR1, CDR2, CDR3)을 가질 것이며, 이는 특수 에피토프에 대한 항체의 특이성을 나타낸다. 본원에 정의된 것으로서, 용어 "항원 결합 단편"은 하나 이상의 CDR을 함유하고 자체로 항원 결정인자에 대해 친화성을 갖는 항체의 부위를 말한다. 비-제한적 예는 Fab 단편, F(ab')₂단편, 중-경쇄 이량체, 및 완전한 경쇄 또는 완전한 중쇄와 같은 일본쇄 구조를 포함한다.

[0028] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "특이성"은 에피토프에 우선적으로 결합하는 항체의 능력을 말하며, 필수적으로 고 친화성을 의미하지는 않는다.

[0029] 용어 "친화성"은 항체 및 항원 결정인자간의 결합 강도의 척도를 말한다. 친화성은 항체와 항원성 결정인자간의 입체화학적 부착(fit)의 근접성, 이들사이의 부착 부위의 크기, 및 하전된 그룹과 소수성 그룹의 분포를 포함하는 다수의 인자들에 의존한다.

[0030] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "친화성 상수" 또는 "K_d"는 항원에 대한 항체의 친화성을 측정하기 위해 사용된 해리 상수를 말한다. 친화성 상수가 낮을수록, 항원 또는 항원성 결정인자에 대한 면역글로불린의 친화성이 높으며, 친화성 상수가 높을 수록, 항원 또는 항원성 결정인자에 대한 면역글로불린의 친화성이 낮다. 이러한 상

수는 항체 반응에 대한 표준 역학적 방법에 의해 측정한 것으로서 연합-해리 반응에 대한 속도 상수로부터 용이하게 계산된다.

[0031] 본원에 언급한 것으로서, 용어 "경쟁하다"는, 표적 항원에 대한 제1의 폴리펩티드(예를 들면, 항체)의 결합이 제2의 폴리펩티드(예를 들면, 항체)의 결합에 의해 억제됨을 의미한다. 예를 들면, 결합은 예를 들면, 결합 도메인의 물리적 차단에 의해 또는 결합 도메인의 구조 또는 환경의 변형에 의해 표적에 대한 이의 친화성 또는 항원항체결합력이 감소되도록 입체적으로 억제될 수 있다.

[0032] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "펩타이드"는 약 2 내지 약 100개의 아미노산 잔기로 이루어진 화합물을 말하며, 여기서, 하나의 아미노산의 아미노 그룹은 펩타이드 결합에 의해 다른 아미노산의 카복실 그룹에 연결된다. 이러한 펩타이드는, 통상적으로 길이가 약 100개 미만의 아미노산 잔기, 및 바람직하게는 약 10, 약 20, 약 30, 약 40 또는 약 50개 잔기이다.

[0033] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "펩티도미메틱"은, 펩타이드 또는 단백질은 아니지만, 이들의 구조의 측면을 모사하는 분자를 말한다. 펩티도미메틱 길항제는 통상의 화학적 방법(참조: 예를 들면, Damewood J.R. "Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry" in *Reviews in Computational Biology*, 2007, Vol. 9, pp.1-80, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1996; Kazmierski W.K., "Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols," Humana Press, New Jersey, 1999)에 의해 제조될 수 있다.

[0034] 용어 "간세포 암종", "HCC", 및 "간암"은 간의 주요 세포 유형인 간세포로부터 발생한 암을 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0035] 본원에 정의된 것으로서, "치료요법"은 대상체(예를 들면, 포유동물, 인간)에게 특수 치료제 또는 예방제를 투여하는 것이며, 이는 대상체에게 바람직한 치료학적 또는 예방학적 이익을 초래한다.

[0036] 본원에 정의된 것으로서, "치료학적 유효량"은 HCC를 지닌 환자의 간에서 종양 형성, 종양 성장(증식, 크기), 종양 혈관화 및/또는 종양 진행(침입, 전이)를 억제하기(즉, 감소시키거나 예방하는)에 충분한 양과 같이, 투여 조건하에서 바람직한 치료학적 또는 예방학적 효과를 달성하는데 충분한 양이다. 치료요법의 효능(예를 들면, 종양의 감소/제거 및/또는 종양 성장의 방지)은 어떠한 적합한 방법[예를 들면, 반응계내 면역조직화학, 영상(초음파, CT 스캔, MRI, NMR), ³H-티미딘 혼입]으로도 측정할 수 있다.

[0037] 본원에 정의된 것으로서, "치료 섭생"은, 하나 이상의 치료제 또는 예방제가 포유동물 대상체에게 특수 투여량(예를 들면, 수준, 양, 수량)으로 및 특수 스케줄 또는 특수 간격(예를 들면, 분, 일, 주, 달)으로 투여되는 섭생이다.

[0038] 본원에 사용된 것으로서, "대상체"는 포유동물 대상체를 말한다. 용어 "포유동물 대상체"는 본원에서 영장류(예를 들면, 인간), 암소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 기니아 퍼그, 햄스터, 마우스 또는 기타 소(bovine), 양(ovine), 말(equine), 개(canine), 고양이(feline), 설치류 또는 쥐 종과 같은 포유동물을 포함하는 것으로 정의된다. 적합한 대상체의 예는 HCC로 진행될 위험을 가지거나 또는 위험에 처해있는 사람 환자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. HCC로 발전되는 고-위험군의 예는 만성 간염 감염(B형 간염, C형 간염)된 개체 및 간경화 또는 관련된 간 상태를 가진 개체를 포함한다.

[0039] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "예방하다", "예방하는" 또는 "예방"은 대상체에 의해 HCC 종양 형성 또는 진행 가능성/경향성 또는 위험을 감소시키거나, 대상체에서 HCC와 관련된 상태의 발병을 저연시키거나, 대상체에서 HCC-관련 상태의 하나 이상의 증상의 중증도를 완화시키거나, 또는 이의 어떠한 조합을 의미한다. 일반적으로, 예방적 섭생의 대상체는 대부분 "위험상태(at-risk)", 예를 들면, 대상체가 HCC로 진행될 위험이 관련 기본 집단에 의해 나타낸 개체에 대한 위험보다 더 큰 것으로 범주화될 것이다.

[0040] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는, 의학 증상(예를 들면, HCC와 관련된 증상)이 임상적으로-허용되는 표준(예를 들면, 대상체의 간에서 HCC 종양의 감소된 수 및/또는 크기)에 따라 개선되는 정도로 의학 상태에 길항작용함을 의미한다.

[0041] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "저 스트링전시", "중간 스트링전시", "고 스트링전시", 또는 "매우 높은 스트링전시 조건"은 핵산 하이브리드화 및 세척용 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 안내는, 이의 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌[참조: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6]에서 찾을 수 있다. 참조될 수 있는 수성 및 비수성 방법이 기술되어 있다. 본원에 언급된 특수 하이브리드화 조건은 다음과 같다: (1) 약 45°C에서 6X 염화나트륨/시트르산나트륨(SSC) 속에서의

저 스트링전시 하이브리드화 조건에 이은, 0.2X SSC, 0.1% SDS 속에서 적어도 50°C에서의 2회 세척(세척 온도는 저 스트링전시 조건의 경우 55°C로 증가시킬 수 있다); (2) 약 45°C에서 6X SSC 속에서 중간 스트링전시 하이브리드화 조건 후 0.2X SSC, 0.1% SDS 속에서 60°C로 1회 이상 세척; (3) 약 45°C에서 6X SSC 속에서 고 스트링전시 하이브리드화 조건에 이은, 0.2X SSC, 0.1% SDS 속에서 65°C로 1회 이상 세척; 및 바람직하게는 (4) 매우 높은 스트링전시 하이브리드화 조건은 0.5M 인산나트륨, 65°C에서 7% SDS에 이은, 0.2X SSC, 1% SDS에서 65°C로 1회 이상 세척이다. 매우 높은 스트링전시 조건 (4)는 바람직한 조건이며 달리 정의하지 않는 한 사용될 수 있는 것이다.

[0042] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당해 분야(예를 들면, 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학, 하이브리드화 기술 및 생화학)의 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 표준 기술은 분자, 유전 및 생화학적 방법[참조: 일반적으로 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed.(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology(1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. 이들은 본원에 참조로 포함되어 있다] 및 화학 방법에 사용된다.

PLVAP

[0044] PV1으로 또한 공지된 원형질막 소포-관련 단백질(PLVAP)은, 이의 발현이 특정의 혈관 내피 세포에 의해 제한되는 제II형 통합 막 당단백질이다[참조: Mol Biol 세포 15:3615-3630(2004)]. PLVAP는 창내피 Id(fenestrated endothelia Id)의 창 및 입 가로막의 주요 구조 성분인 것으로 밝혀졌다. 또한, PLVAP 발현은 내피 창 가로막의 형성에 필수적이며 내피 침투성 및 수송을 조절하는데 관여할 수 있다(참조: Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H1347-1353, 2004). 사람 PLVAP 유전자의 게놈 조직화는 보고되어 있다(참조: Stan RV, Arden KC, Palade GE. cDNA and protein sequence, genomic organization, and analysis of cis regulatory elements of mouse and human PLVAP genes. Genomics 72:304-313, 2001).

[0045] 본원에 기술된 것으로서, 본 발명자들은, PLVAP 유전자 발현이 사람 HCC 환자의 간에서 근접한 비-종양 조직에 비해 간세포 암종 조직에서 상당히 상승되어 있음을 입증하였다. 또한, 본 발명자들은, PLVAP 단백질이 HCC 종양 주변 또는 내에서 혈관 내피 세포에서 주로 발현되고, 이에 국재화(localized)하지만, 다른 간 병리학과 관련된 세포에서 발현되거나, 이에 국재화하지 않음을 측정하였다. 따라서, PLVAP는 HCC의 진단 및 치료를 위한 새로운 표적을 나타낸다.

치료요법의 방법

[0047] 하나의 측면에서, 본 발명은 간세포 암종(HCC)의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료학적 유효량의 적어도 하나의 PLVAP 길항체를 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 간세포 암종(HCC)을 치료하는 방법에 관한 것이며, 여기서, PLVAP 길항체는 대상체의 간에서 하나 이상의 HCC 종양의 형성, 성장, 혈관화 및/또는 진행을 억제한다. 특수 측면에서, 본 발명의 PLVAP 길항체는 HCC 환자의 간에서 간세포 주변의 혈관 내피 세포의 PLVAP 단백질의 발현 또는 활성을 억제한다.

[0048] 하나의 측면에서, 치료학적 유효량의 PLVAP 길항체는 종양 성장을 억제하거나 종양 세포를 사멸시키기 위해 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 예를 들면, 종양 성장을 직접 억제하는 제제(예를 들면, 화학치료제)는 특수 투여량 스케줄 및 가장 효과적인 치료요법을 탈성하기 위한(예를 들면, 종양 세포를 가장 잘 사멸시키기 위한) 수준으로 편리하게 투여된다. 일반적으로, 약 최대 허용되는 투여량이 비교적 짧은 치료 기간(예를 들면 1일 내지 수일) 동안 투여되며, 이후 치료요법 중지기(off-therapy period)가 이어진다. 구체 예에서, 화학치료제 사이클로포스파미드는 3회의 투여량에 대해 매 격일로 150 mg/kg의 최대 허용되는 투여량으로 제1 주기후 21일째에 제공되는 제2 주기를 사용하여 투여된다(참조: Browder et al. Can Res 60:1878-1886, 2000).

[0049] 치료학적 유효량의 PLVAP 길항체[예를 들면, 억제성 소 분자, 중화 항체, 억제성 핵산(예를 들면, siRNA, 안티센스 뉴클레오타이드)]를 예를 들면, 제1 주기에서 투여할 수 있으며, 여기서, 약 최대 허용되는 투여량의 길항체가 1회 간격/투여량으로, 또는 수회의 근접하게 배치된 간격(분, 시간, 일)으로 적합한 치료요법 중단기(예를 들면, 하나 이상의 주) 후 투여된 다른/제2 주기와 함께 투여된다. PLVAP 길항체에 대한 적합한 투여 스케줄 및 양은 숙련된 임상의에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 화학치료제와 비교한 것으로서 특수 PLVAP 길항체의 감소된 독성은 투여 주기 사이의 시간이 보다 짧아지도록 할 수 있다. 항원보강제 치료요법(예를 들면, 수술, 방사선 치료요법, 기타 주요 치료요법에 대해)으로 사용되는 경우, 치료학적 유효량의 PLVAP 길항체는 바람직하게는 다른 암 치료요법의 것(예를 들면 화학치료제)과 유사한 투여 스케줄, 또는 숙련된 임상의가 종양 성장을

억제(감소, 예방)하는데 있어 보다/가장 효과적이도록 결정한 투여량 스케줄로 투여된다. 치료학적 유효량의 항체 PLVAP 길항제에 대한 치료 섭생은 예를 들면, 약 4 내지 약 6 개월의 기간에 걸쳐 매 1 내지 7일마다 치료당 약 0.01 mg/kg 내지 약 300 mg/kg 체중 및 바람직하게는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg일 수 있다. 항-종양 유효량의 소 분자 PLVAP 길항제에 대한 치료 섭생은 예를 들면, 약 4 내지 6개월의 기간에 걸쳐 매 1 내지 7일마다 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 1 mg/kg일 수 있다.

[0050] 다른 측면에서, PLVAP 길항제는 규칙적인 투여 섭생으로 투여될 수 있으며, 이에 의해, 보다 적은 투여량이 최대로 허용되는 투여량에 대해 보다 흔하게 투여된다. 다수의 전임상 연구는 최대 허용되는 투여량(MTD) 대응물과 비교하여 규칙적인 섭생의 우수한 항-종양 효능, 강력한 항혈관형성 효과, 및 감소된 독성 및 부작용(예를 들면, 골수억제)를 입증하였다[참조: Bocci, et al., Cancer Res, 62:6938-6943, (2002); Bocci, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 100(22):12917-12922, (2003); 및 Bertolini, et al., Cancer Res, 63(15):4342-4346, (2003)]. 규칙적인 화학치료요법은 화학치료요법과 관련된 단점중 일부를 극복하는데 효과적인 것으로 여겨진다.

[0051] PLVAP 길항제는 항-혈관형성 치료요법의 일부로서 이를 필요로 하는 환자에서 혈관형성을 억제(감소, 예방)하기 위한 규칙적인 투여 섭생으로 투여될 수 있다. 이러한 항-혈관형성 치료요법은 종양 성장을 유지하고 종양이 전이할 수 있도록 하는데 요구되는 영양물을 종양에 공급하는 신규 혈관의 형성을 차단함으로써 종양 성장을 간접적으로 영향(억제, 감소)을 미칠 수 있다. 이러한 방식으로 영양물 및 혈액 공급을 종양으로부터 차단하는 것은 궁극적으로 종양 세포가 괴사 및/또는 세포자멸사에 의해 사멸하도록 한다. 선행 연구는, 혈관형성 인자(예를 들면, VEGF, bFGF, TGF- α , IL-8, PDGF) 또는 이들의 시그널링의 차단을 포함하는 암 치료요법의 임상 결과(내피 세포-매개된 종양 혈관형성 및 종양 성장의 억제)가, 보다 적은 용량 수준을 보다 자주 투여하여 항혈관형성제의 연속적인 혈액 수준을 제공하는 경우 보다 효과적임을 나타내어 왔다(참조: Browder et al. Can. Res. 60:1878-1886, 2000; Folkman J., Sem. Can. Biol. 13:159-167, 2003). 항-혈관형성 치료 섭생은 혈관형성의 표적화된 억제제[트롬보스폰дин 1 및 혈소판 성장 인자-4(TNP-470)] 및 화학치료제 사이클로포스파미드와 함께 사용되어 왔다. 매 6일마다, TNP-470을 최대 허용되는 투여량보다 적은 투여량으로 투여하였고 사이클로포스파미드를 170 mg/kg의 투여량으로 피하내 투여하였다. 당해 치료 섭생은 종양의 완전한 퇴행을 초래하였다. 동일하게, 실제로, 항-혈관형성 피하 치료는 다른 항-암 치료제, 예를 들면, 종양 성장을 직접 억제하는 제제(예를 들면, 화학치료제)와 함께 피하 투여되는 경우 가장 효과적이다.

[0052] 본원에 기술된 치료 방법은 PLVAP 길항제를 대상체에게 투여함을 포함한다. PLVAP 길항제는 이를 필요로 하는 개체에게 주요 치료요법(예를 들면, 치료요법 또는 치료 섭생에서 근본적인 치료제로서)으로서; 항원보강제 치료요법(예를 들면, 치료요법 또는 치료 섭생에서 다른 치료제와 함께 사용된 치료제로서, 여기서, 치료제의 조합은 바람직한 치료를 제공하며; "항원보강제 치료요법"은 또한 "항원보강적 치료요법"으로 언급된다)으로서; 항원보강제 치료요법과 함께; 항원보강제 치료요법[예를 들면, 제공된 치료요법 또는 치료 섭생에서 근본적인 치료제 이후에 이를 필요로 하는 대상체에게 제공된 치료제로서]으로서; 항원보강제 치료요법[예를 들면, 화학치료요법(예를 들면, 타목시펜, 시스플라틴, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 소라페니브, 옥트레오타이드, 다카르바진(DTIC), 시스-백금, 시메티딘, 사이클로포스파미드), 방사선 치료요법(예를 들면, 양성자 빔 치료요법), 호르몬 치료요법(예를 들면, 항-에스트로겐 치료요법, 안드로겐 박탈 치료요법(ADT), 황체화 호르몬-방출 호르몬(LH-RH) 효능제, 아로마타제 억제제(AI, 예를 들면, 아나스트로졸, 엑세메스탄, 레트로졸), 에스트로겐 수용체 조절인자(예를 들면, 타목시펜, 란록시펜, 토레미펜)), 또는 생물학적 치료요법]과 함께 투여될 수 있다. 다수의 다른 치료요법 또한 암 치료 섭생동안 투여되어, 모두 당해 분야의 숙련가에게 매우 익숙한, 통증을 이겨내기 위한 치료요법(마약, 침술), 위장 장애를 이겨내기 위한 치료요법(제산제), 현기증을 이겨내기 위한 치료요법(항-어지러움 의약), 오심을 이겨내기 위한 치료요법(항-오심 의약), 감염을 이겨내기 위한 치료요법(예를 들면, 적/백혈구 세포 수를 증가시키기 위한 의약) 등을 포함하는 질병 및/또는 암 치료의 부작용 효과를 완화시킬 수 있다.

[0053] 따라서, PLVAP 길항제는 항원보강제 치료요법(예를 들면, 다른 주요 암 치료요법 또는 치료와 함께)으로서 투여될 수 있다. 항원보강제 치료요법으로서, PLVAP 길항제는 방사선 및/또는 종양(들)의 외과적 제거와 같은 주요 치료요법 이전에, 이후에 또는 이와 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 당해 방법은 치료학적 유효량의 PLVAP 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제(예를 들면, 항원보강제 치료요법, 기타 표적화된 치료요법)를 투여함을 포함한다. 항원보강제 치료요법(예를 들면, 화학치료제) 및/또는 하나 이상의 다른 표적화된 HCC 치료

요법 및 PLVAP 길항제는 별개의 제형 또는 결합 제형으로서 동시에(예를 들면, 연속적으로) 공-투여될 수 있다. 또는, 치료요법은 별개의 조성으로서, 숙련된 임상의가 결정한 것으로서 적절한 시간 구조(예를 들면, 1.5 내지 5시간과 같은 암 치료 기간/간격)(예를 들면, 치료요법의 약제학적 효과를 중복시키기에 충분한 시간)내에 연속적으로 투여될 수 있다. 항원보강제 치료요법 및/또는 하나 이상의 다른 표적화된 HCC 치료요법 및 PLVAP 길항제는 단일 투여량 또는 다수 투여량으로 바람직한 치료 효과(예를 들면, 종양 성장의 억제, 혈관형성의 억제 및/또는 암 전이의 억제)를 달성하기에 적합한 순서 및 스케줄로서 투여될 수 있다.

[0054] PLVAP 길항제인 하나 이상의 제제는 단일 또는 다수 투여량으로 투여될 수 있다. 적합한 투여량 및 투여 섭생은 임상의에 의해 결정될 수 있으며 선택된 제제(들), 약제학적 제형 및 투여 경로, 다양한 환자 인자 및 기타 고려사항에 따른다. PLVAP 길항제와 하나 이상의 다른 치료제 또는 치료(항원보강제, 표적화된, 암 치료-관련 등)의 투여와 관련하여, PLVAP 길항제는 통상적으로 단일 투여량(예를 들면, 주사, 주입, 경구에 의해)으로 투여된 후 경우에 따라 또는 필요한 경우 특수 간격(예를 들면, 1시간 이상)으로 반복된 투여량으로 투여된다.

[0055] 투여될 PLVAP 길항제의 양(예를 들면, 치료학적 유효량)은 임상의에 의해 본원에 제공된 안내 및 당해 분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 결정될 수 있으며 예를 들면, 선택된 특수 제제, 대상체의 연령, 민감성, 약물에 대한 내성 및 전체적으로 양호한 상태를 포함하는 다수 인자들에 따른다. 예를 들어, 소 분자에 대해 적합한 투여량은 치료당 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 0.01 mg/kg 내지 약 1 mg/kg 체중일 수 있다. 항체에 대한 적합한 투여량은 치료당 약 0.01 mg/kg 내지 약 300 mg/kg 체중 및 바람직하게는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 체중일 수 있다. PLVAP 길항제가 폴리펩티드(선형, 환형, 모사체)인 경우, 바람직한 투여량은 약 0.1 µg/mL 내지 약 200 µg/mL의 웨타이드의 혈장 농도를 초래할 것이다. 특수 제제, 환자 및 암에 대한 용량의 결정은 당해 분야의 숙련가의 능력내에 있다. 바람직하게는, 투여량은 최소한의 부작용(예를 들면, 면역원성 반응, 오심, 현기증, 급성위연동이상항진, 과다점성증후군, 울혈성 심마비, 뇌졸중, 폐 부종)을 유발하거나 생산하지 않는다.

투여 방법

[0057] 본 발명의 방법에 따르면, 치료학적 유효량의 PLVAP 길항제(예를 들면, 방사활성 동위원소로 표지된 항체와 같은 항체)를 포유동물 대상체에게 투여하여 HCC를 치료한다.

[0058] 예를 들면, 제제 및 치료될 특수 암에 따라 경구, 식이, 국소, 경피, 직장, 비경구(예를 들면, 동맥내, 정맥내, 근육내, 피하 주사, 피내 주사), 정맥내 주입 및 흡입(예를 들면, 기관지내, 비강내 또는 경구 흡입, 비강내 점액) 투여 경로를 포함하는, 각종의 투여 경로가 사용될 수 있다. 투여는 나타낸 바와 같이 국소 또는 전신계적 일 수 있다. 바람직한 투여 유형은 선택된 특수 제제에 따라 변할 수 있으나; 동맥내 투여[예를 들면, 간 동맥 주입, 경-동맥 화학색진술(TACE)]가 간세포 암종을 치료하기 위한 본 발명의 치료제(예를 들면, 방사활성 동위원소로 표지된 항체와 같은 항체)를 투여하기에 일반적으로 바람직하다.

[0059] 예를 들면, 간 동맥 주입을 사용하여, 화학치료제(예를 들면, 방사활성 동위원소로 표지된 PLVAP 항체와 같은 PLVAP 항체)를 간 동맥을 통해, 예를 들면, HCC의 정규적인 TACE 치료 동안 HCC 종양에 직접 전달될 수 있다(참조: Camma, et al. Radiology 224:47-54, 2002; Befeler, et al. Clinics in Liver Disease 9:287-300, 2005; Abou-Alfa JAMA 299:1716-1718, 2008). 당해 공정은 형광현미경(x-선 유형) 영상의 도움으로 수행한다. 요약하면, 카테테르를 서혜부의 넓다리 동맥내로 삽입하고 대동맥내로 흘린다. 대동맥으로부터, 카테테르를 간 동맥 또는 이의 가지대로 전진시킨다. 간암에 영양을 공급하는 간 동맥의 가지가 확인되면, 화학치료요법제를 주입한다. 당해 공정을 일반적으로 수행하는 중재 방사선과의사는, 환자가 각각의 기간에 제공받는 화학치료요법제의 양을 결정할 수 있다. 일부 환자들은 6 내지 12주 간격으로 반복된 주기를 겪을 수 있다. 간의 영상 연구는 치료에 대한 반응시 종양의 크기를 평가하기 위해 6 내지 12주내에 반복된다.

[0060] 또는, 경-동맥 화학색전술(TACE), 즉 동맥내 주입과 유사한 과정이 PLVAP 길항제(예를 들면, 항체)를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위해 사용할 수 있다. TACE에서, 치료제의 동맥내 주입은 겔 발포제, 오일 에멀젼 또는 심지어 작은 금속 코일과 같은 특수 차단 화합물을 사용하여 소 혈관을 차단(즉, 색전화)하는 추가의 단계와 결합된다. 따라서, TACE는 종양을 고 농도의 화학치료요법제에 노출시키고 제제를 국소적으로 제한하여 혈류에 의해 이들이 운반되는 것을 방지하거나 감소시키는 강력한 잇점을 지닌다. 동시에, TACE는 종양이 필요로 하는 혈액 공급을 종양으로부터 고갈시키며, 이는 종양 세포의 손상 또는 사멸을 초래한다.

[0061] PLVAP 항체의 동맥내 투여를 위해, PLVAP에 대해 고 친화성(예를 들면, $10^{-7}M$ 미만의 K_d)을 갖는 항체를 사용함

으로써 주입된 항체가 HCC의 혈관 속에서 놓축되도록 하는 것이 바람직하다. 키메라 및 인간화된 항체는 각각 4일까지 및 14 내지 21일까지의 순환하는 반감기를 가지는 것으로 예상된다. 특수 실시양태에서, 짧은 순환 반감기(예를 들면, 약 1일 내지 약 5일, 예를 들면, 약 1, 2, 3, 4 또는 5일)를 갖는 고 친화성 PLVAP 항체(예를 들면, 항원 결합 단편, 일본쇄 항체)를 환자에게 투여하여 이들의 투여로부터 초래되는 어떠한 독성 및 다른 부작용도 감소시킨다. 다른 실시양태에서, 저 순환 반감기(예를 들면, 약 5일 내지 약 24일)를 갖는 고 친화성 PLVAP 항체를 환자에게 투여하여 HCC를 치료한다.

[0062] 많은 경우에, 치료 기간에 걸쳐 다량의 배합 투여량을 투여한 후 주기적인(예를 들면, 주간) 유지 투여량을 투여하는 것이 바람직할 것이다. 항체는 또한 서방성 전달 시스템, 펌프 및 HCC내로 연속 주입하기 위한 다른 공지된 전달 시스템에 의해 전달할 수 있다. 투여량 섭생은 이의 약력학을 기준으로 특수 항체의 바람직한 순환 수준을 제공하기 위해 변할 수 있다. 따라서, 투여량은, 바람직한 치료 수준이 유지되도록 계산될 것이다.

[0063] 실제 투여량 및 치료 섭생은 암의 특성(원발성 또는 전이성), 종양의 수 및 크기, 기타 치료요법, 및 환자 특성을 고려하여 임상의에 의해 결정될 것이다. 간세포 암종의 생명을 위협하는 특성의 측면에서, 현저한 부작용이 있는 다량의 투여량도 사용될 수 있다.

[0064] 핵산계 PLVAP 길항제(예를 들면, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 천연 또는 합성 핵산, 핵산 유사체)를 목적한 포유동물 대상체내로 다수의 방법으로 도입할 수 있다. 예를 들면, 핵산은 발현 벡터 또는 PCR 생성물로부터 숙주 세포내에서 내인성으로 발현되거나 이후에 포유동물 대상체의 혈류내로 직접 도입(예를 들면, 주사, 주입에 의해)될 수 있는 합성 또는 가공된 조성물(예를 들면, 리포좀, 중합체, 나노입자)내로 패키지될 수 있다. 항-PLVAP 핵산 또는 핵산 발현 벡터(예를 들면, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 및 헤르페스 단성 바이러스 벡터, 가공된 벡터, 비-바이러스-매개된 벡터)를 포유동물 대상체내로 확립된 유전자 치료요법 방법 및 프로토콜을 사용하여 직접 도입할 수 있다(참조: Tochilin V.P. Annu Rev Biomed Eng 8:343-375, 2006; Recombinant DNA and Gene Transfer, Office of Biotechnology Activities, National Institutes of Health Guidelines).

[0065] 유사하게, 제제가 단백질 또는 폴리펩티드인 경우, 제제는 재조합체 단백질의 생체내 발현을 통해 투여할 수 있다. 생체내 발현은 적합한 방법(참조: 예를 들면, 미국 특허 제5,399,346호)에 따라 체세포 발현에 의해 달성될 수 있다. 또한, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 또한 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 전달용의 다른 적합한 벡터(바람직하게는, 복제 결핍 감염성 벡터)내로 도입시키거나, 전달용 폴리펩티드를 발현할 수 있는 형질감염되거나 형질전환된 숙주 세포내로 도입시킬 수 있다. 후자의 실시양태에서, 세포는 치료학적 유효량으로 폴리펩티드를 발현하기에 효과적인 양으로 삽입(단독 또는 장벽 장치 속에서)되거나, 주사되거나 또는 그렇지 않으면 주입될 수 있다.

0066] 진단 및 예후 방법

[0067] 본 발명은 포유동물 대상체(예를 들면, 간 종양을 가진 포유동물 대상체)로부터 시료(예를 들면, 간 생검, 미세 침 흡인 시료) 속에서 PLVAP의 발현을 평가함을 포함하는 진단 및 예후 방법을 포함한다. 본 발명의 진단 방법을 위해, 시료속에서 PLVAP의 발현, 또는 적합한 대조군과 비교하여 시료 속에서 PLVAP의 증가된 발현은, 대상체가 HCC를 가지고 있고/있거나 대상체가 PLVAP 길항체를 사용한 항-암 치료요법에 대한 후보대상임을 나타낸다.

[0068] 본 발명의 진단 방법을 위해, 대상체로부터의 시료 속에서 PLVAP의 발현, 또는 적합한 대조군과 비교하여 시료 속에서 PLVAP의 증가된 발현은 불량한 예후를 나타낸다. 예후는 환자 생존에 대한 예후, 전이의 위험에 대한 예후 및/또는 재발 위험에 대한 예후일 수 있다.

[0069] 이를 방법을 위한 적합한 시료는 조직 시료, 생물학적 유액 시료, 세포(들)(예를 들면, 종양 세포) 시료 등을 포함한다. 예를 들면, 혈액 채취, 요추 천자, 조직 바른표본 또는 조직 찰파(scrape), 또는 조직 생검에 의해 대상체로부터 시료채취의 어떠한 수단도 시료를 수득하는데 사용할 수 있다. 따라서, 시료는 생검 표본[예를 들면, 종양, 폴립(polyt), 덩어리(고형물, 세포), 흡인물, 바른 표본 또는 혈액 시료일 수 있다. 시료는 종양(예를 들면, 암성 성장)을 가진 간으로부터의 조직 및/또는 종양 세포일 수 있거나, 종양 및/또는 종양 세포를 가진 것으로 추정되는 간으로부터의 조직일 수 있다. 예를 들면, 종양 생검을 전체(절제 생검) 또는 부분(절개 생검) 덩어리를 표적 부위로부터 제거하는 과정인, 개방 생검으로 수득할 수 있다. 또는, 종양 시료를 작은 절개 또는 천공(영상 장치의 도움하에 또는 도움없이)을 통해 침-유사 장치로 수행하여 개개의 세포 또는 세포의 집단[예를 들면, 미세 침 흡인(FNA)] 또는 조직의 코어 또는 단편(코어 생검)을 수득하는 과정인 경피 생검을

통해 수득할 수 있다. 생검 시료는 세포학적으로(예를 들면, 바른표본), 조직학적으로(예를 들면, 동결건조되거나 파라핀 단면) 또는 어떠한 다른 적합한 방법(예를 들면, 분자 진단 방법)으로 시험할 수 있다. 종양 시료는 또한 개인의 조직으로부터 기원한 배양된 사람 세포의 시험관내 수거에 의해 수득할 수 있다. 종양 시료는, 경우에 따라 신속한 동결, 또는 조절된 동결 요법과 같은 분석가능한 상태에서 시료의 단백질 및/또는 핵산을 보존하는 적합한 저장 수단으로 분석 전에 저장할 수 있다. 경우에 따라, 동결은 동결방지제, 예를 들면, 디메틸 셀록사이드(DMSO), 글리세롤, 또는 프로판디올-슈크로즈의 존재하에 수행할 수 있다. 종양 시료는 경우에 따라, 분석 목적을 위해 저장 전 또는 저장 후에 혼주시킬 수 있다. 종양 시료는 간암, 예를 들면, 간세포 암종을 가진 환자로부터의 것일 수 있다.

[0070] 시료(예를 들면, 생물학적 시료) 속에서 PLVAP의 존재 또는 양을 평가하는데 사용될 수 있는 적합한 검정은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. PLVAP 단백질 또는 웨타이드를 검출하는 방법은 유동 세포분석기(예를 들면, FACS 분석), 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA), 예를 들면, 화학루미네센스 검정, 방사면역검정, 면역블롯(예를 들면, 웨스턴 블롯), 면역조직화학(IHC), 및 기타 항체계 정량적 방법(예를 들면, Luminex® 비드계 검정)을 포함한다. 다른 적합한 방법은 예를 들면, 질량 분광법을 포함한다. 예를 들면, PLVAP에 대한 항체를 사용하여 시료 속에서 PLVAP의 존재 및/또는 발현 수준을 직접적으로 또는 예를 들면, 면역조직화학(IHC)을 사용하여 간접적으로 측정할 수 있다. 예를 들면, 파라핀 단면을 생검으로부터 취하여, 슬라이드에 고정시키고 하나 이상의 항체와 적합한 방법으로 결합시킬 수 있다. 특수 실시양태에서, 시료내 간세포 주변의 혈관 내피 세포에서 PLVAP 단백질의 검출은 HCC의 지표이다.

[0071] PLVAP 유전자 발현을 검출하기 위한 방법은 PLVAP 핵산 증폭 및/또는 가시화를 포함한다. PLVAP 유전자 발현을 검출하기 위해, 핵산을 개인으로부터 당해 분야에서 통상적인 적합한 방법(참조: 예를 들면, Sambrook et al., 1989)으로 분리할 수 있다. 이후에, 분리된 핵산을 증폭[예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)(예를 들면, 직접적인 PCR, 적량적인 실시간 PCR, 역전사효소 PCR), 리가제 쇄 반응, 자가 지속된 서열 번호 복제, 전사 증폭 시스템, Q-베타 래플리카제 등]시키고 가시화(예를 들면, 증폭 동안 핵산의 표지, 중격 화합물/염료에 대한 노출, 프로브)시킬 수 있다. PLVAP RNA(예를 들면, mRNA) 또는 이의 발현은 또한 예를 들면, 종양 생검으로부터 취한 조직 시료의 파라핀 단면에서 직접 핵산 프로브, 예를 들면, 표지된 핵산 프로브[예를 들면, 형광성 반응 계내 하이브리드화(FISH)]를 사용하거나 다른 적합한 방법을 사용하여 검출할 수 있다. 이의 PLVAP 유전자 발현은 또한 서던 블롯 또는 용액(예를 들면, 염료, 프로브)에 의해 평가할 수 있다. 또한, 유전자 칩, 미세배열, 프로브[예를 들면, 퀀텀 도트(quantum dots)] 또는 다른 이러한 장치(예를 들면, 센서, 나노센서/검출기)를 사용하여 PLVAP 유전자의 발현 및/또는 차등적 발현을 검출할 수 있다.

[0072] 하나의 실시양태에서, 간세포 암종은 환자로부터의 시료에서 PLVAP 유전자 생성물(예를 들면, PLVAP mRNA, PLVAP 단백질)의 발현을 검출함으로써 진단할 수 있다. 따라서, 당해 방법은, 환자로부터의 시료에서 PLVAP 발현을 대조군에서 PLVAP의 발현과 비교하는 것을 요구하지 않는다. PLVAP의 존재 또는 부재는 본원에 기술된 방법 또는 기타 다른 적합한 검정으로 추정할 수 있다. 다른 실시양태에서, PLVAP의 발현에 있어서의 증가는 시료에서 PLVAP 발현을 적합한 대조군의 것과 비교함으로써 측정할 수 있다. 적합한 대조군은 예를 들면, 개체로부터의 비-신생물성 조직 시료, 비-암 세포, 비-전이 암 세포, 비-악성(양성) 세포 등, 또는 적합하게 공지되거나 측정된 참조 표준물을 포함한다. 참조 표준물은 PLVAP 단백질 또는 RNA(예를 들면, 발현 표준물)의 발현의 대표적이거나, 정상이거나 정상화된 범위 또는 수준일 수 있다. 따라서, 당해 방법은, 유전자/단백질의 발현을 적합한 대조군에서 평가하는 것을 필요로 하지 않는다.

[0073] 다른 실시양태에서, 간세포 암종은 환자로부터의 시료에서 PLVAP 유전자 카피 수를 검출함으로써 진단할 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 2개보다 큰 PLVAP 유전자 카피 수(예를 들면, 3 또는 4개의 유전자 카피 수)는 HCC의 진단일 수 있다. 대표적으로, 정상의 인간 세포는 2개의 PLVAP 유전자 카피 수를 가질 것이다. 따라서, PLVAP 유전자 카피 수를 기준으로 하는 진단 방법은, 비록 대조군이 사용될 수 있다고 해도, 환자로부터의 대조군 시료에서 PLVAP 유전자 카피 수를 검출하는 것을 필요로 하지 않는다. 적합한 대조군은 예를 들면, 개체로부터의 비-신생물성 조직 시료, 비-암성 세포, 비-전이성 암세포, 비-악성(양성) 세포 등, 또는 적합하게 공지되거나 측정된 참조 표준물(예를 들면, 2의 PLVAP 유전자 카피 수)을 포함한다. 환자로부터의 시료에서 PLVAP 유전자의 카피 수는 예를 들면, 형광 반응계내 하이브리드화(FISH)와 같은 적합한 기술로 추정할 수 있다.

[0074] PLVAP 항체

[0075] 본원에 사용된 것으로서, PLVAP에 결합하는 항체는 사람 대상체에서 HCC의 진단 및 치료에 있어서의 용도를 갖

는다. 예를 들면, PLVAP에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 간 코어 생검 또는 면역조직화학적 염색(IHC)에 의한 침 흡인의 검체에서 간세포 암종의 모세혈관 내피 세포상에서 PLVAP의 존재를 검출할 수 있다. 또한, PLVAP에 대한 항체(예를 들면, 인간화된 항체, 키메라 항체)를 면역-양전자방출 단층촬영(면역-PET)(참조: Clin Cancer Res 12:1958-1960, 2006; Clin Cancer Res 12:2133-2140, 2006)용의 적절한 추적자(예를 들면, 방사성동위원소)를 사용하여 표지시켜 대상체의 간내 병변(들)을 차지하는 공간이 간세포 암종인지를 측정할 수 있다. 항-PLVAP 항체(예를 들면, 인간화된 항체)를 또한 치료 목적용의 세포독성제(방사활성 또는 비-방사활성)로 표지할 수 있다(참조: Weiner LM, Adams GP, Von Mehren M. Therapeutic monoclonal antibodies: General principles. In: Cancer: Principles & Practice of Oncology. 6th ed. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:495-508.; Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology & Immunology. 4th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1996:307-47. ; Scheinberg DA, Sgouros G, Junghans RP. Antibody-based immunotherapies for cancer. In: Cancer Chemotherapy & Biotherapy : Principles and Practice. 3rd ed. Chabner BA, Longo DL, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:850-82).

[0076]

따라서, 하나의 실양태에서, 본 발명은 PLVAP 단백질[예를 들면, 인간 PLVAP 단백질(서열 번호 23)]에 결합하는(예를 들면, 특이적으로 결합하는) 항체를 제공한다. PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 인간, 키메라, 인간화된, 영장류화된, 베니어된 및 일본돼 항체, 및 다른 것들 중에서 항체의 단편(예를 들면, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab'), scFv, scFab, dAb)일 수 있다(참조: 예를 들면,, Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 통상의 방법 또는 다른 적합한 기술에 의해 생산, 작제, 가공 및/또는 분리할 수 있다. 예를 들면, PLVAP 단백질에 대해 특이적인 항체는 재조합체 포유동물(예를 들면, 인간) PLVAP 단백질(예를 들면, 서열 번호 23) 또는 이의 일부(예를 들면, 서열 번호 2)(합성 분자, 예를 들면, 합성 웨타이드 포함)에 대해 생성될 수 있다. 다양한 이러한 면역화 방법이 기술되어 있다[참조: 예를 들면, Kohler et al., Nature, 256: 495-497(1975) 및 Eur. J. Immunol. 6: 511-519(1976); Milstein et al., Nature 266: 550-552(1977); Koprowski et al., 미국 특허 제4,172,124호; Harlow, E. and D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2(Supplement 27, Summer '94), Ausubel, F.M. et al., Eds.,(John Wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11, (1991)]. 항체는 또한 PLVAP를 발현하는 세포(예를 들면, 암 세포/세포주) 또는 PLVAP를 발현하도록 가공된 세포(예를 들면, 형질감염된 세포)를 사용하여 적합한 숙주(예를 들면, 마우스)를 면역화시킴으로써 생성시킬 수 있다[참조: 예를 들면, Chuntharapai et al., J. Immunol., 152:1783-1789(1994); Chuntharapai et al. 미국 특허 제5,440,021호].

[0077]

면역화 후 적절한 시기에, 예를 들면, 항체 역자가 최대가 될 때, 항체-생산 세포를 면역화된 동물로부터 수득하여 표준 기술, 예를 들면, 코흘러(Kohler) 및 밀슈타인(Milstein)에 의해 원래 기술된 하이브리도마 기술[참조: Nature 256:495-497, 1975], 사람 B 세포 하이브리도마 기술(참조: Kozbor et al., Immunol. Today 4:72, 1983), EBV-하이브리도마 기술(참조: Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985) 또는 트리오마 기술에 의해 모노클로날 항체를 제조하는데 사용할 수 있다. 하이브리도마를 생산하는 기술은 잘 공지되어 있다(참조: 일반적으로 Current Protocols in Immunology, Coligan et al.,(eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1994). 요컨대, 무한증식 세포주(통상적으로 골수종)를 위에서 기술된 바와 같은 면역원으로 면역화시킨 포유동물로부터의 림프구(통상적으로 비장세포)에 융합시키고, 수득되는 하이브리도마 세포의 배양 상충액을 스크리닝하여 본원에 기술된 폴리펩티드에 결합하는 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 동정한다.

[0078]

림프구 및 무한증식 세포주를 융합하는데 사용된 많은 잘 공지된 프로토콜 중 어느 것도 본 발명의 폴리펩티드에 대한 모노클로날 항체를 생성시키기 위한 목적으로 적용시킬 수 있다(참조: 예를 들면, Current Protocols in Immunology, 상기 참조; Galfre et al., Nature, 266:55052, 1977; R.H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York, 1980; 및 Lerner, Yale J. Biol. Med. 54:387-402, 1981). 또한, 통상의 숙련가들은, 또한 유용할 수 있는 이러한 방법들의 많은 변형들이 존재함을 인식할 것이다.

[0079]

모노클로날 항체-분비 하이브리도마를 제조하기 위한 하나의 대안에서, PLVAP 단백질에 대한 모노클로날 항체를 확인하고 재조합체 조합 면역글로불린 라이브러리(예를 들면, 항체 파아지 디스플레이 라이브러리)를 표적 폴리

펩티드를 사용하여 스크리닝함으로써 분리하여 폴리펩티드에 결합하는 면역글로불린 라이브러리 구성원을 분리할 수 있다. 파아지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위한 키트는 시판되고 있다[예를 들면, 파마시아 리컴비넌트 파아지 안티바디 시스템(Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), 제품 번호 27-9400-01; 및 스트라타젠(Stratagene) SurfZAP™ 파아지 디스플레이 키트, 제품 번호 240612]. 또한, 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는데 사용하기 위해 특히 수정가능한 방법 및 시약의 예는 예를 들면, 미국 특허 제5,223,409호; PCT 공보 제WO 92/18619호; PCT 공보 제WO 91/17271호; PCT 공보 제WO 92/20791호; PCT 공보 제WO 92/15679호; PCT 공보 제WO 93/01288호; PCT 공보 제WO 92/01047호; PCT 공보 제WO 92/09690호; PCT 공보 제WO 90/02809호; Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372, 1991; Hay et al., Hum. Antibodies Hybridomas 3:81-85, 1992; Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989; 및 Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734, 1993에서 찾을 수 있다.

[0080] 항체 단편(예를 들면, 항원-결합 단편)은 효소 분해 또는 재조합 기술에 의해 생산할 수 있다. 예를 들면, 파라핀 또는 펩신 분해로 Fab 또는 $F(ab')_2$ 단편을 각각 생성시킬 수 있다. 필수적인 기질 특이성을 갖는 다른 프로테아제도 또한 Fab 또는 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는데 사용할 수 있다.

[0081] 항체는 또한, 하나 이상의 정지 코돈이 천연의 정지 부위의 상부에 도입된 항체 유전자를 사용하여 각종의 트렁 케이트된(truncated) 형태로 생산될 수 있다. 예를 들면, $F(ab')_2$ 중쇄 부위를 암호화하는 키메라 유전자를 CH₁ 도메인 및 중쇄의 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열을 포함하도록 설계할 수 있다.

[0082] 상이한 종으로부터 기원한 부위를 포함하는 일본쇄, 사람, 키메라, 사람화된, 영장류화된(CDR-이식된), 또는 베니어된 항체가 또한 본 발명 및 용어 "항체"에 포함된다. 이들 항체의 각종 부위는 통상의 기술에 의해 화학적으로 함께 결합되거나, 유전 공학 기술을 사용하여 연속 단백질로 제조할 수 있다. 예를 들면, 키메라 또는 사람화된 쇄를 암호화하는 핵산을 발현시켜 연속 단백질을 생산할 수 있다[참조: 예를 들면, Cabilly et al., 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly et al., 유럽 특허 제0,125,023 B1호; Boss et al., 미국 특허 제4,816,397호; Boss et al., 유럽 특허 제0,120,694 B1호; Neuberger, M.S. et al., 제WO 86/01533호; Neuberger, M.S. et al., 유럽 특허 제0,194,276 B1호; Winter, 미국 특허 제5,225,539호; Winter, 유럽 특허 제0,239,400 B1호; Queen et al., 유럽 특허 제0 451 216 B1호; 및 Padlan, E.A. et al., 유럽 특허원 제0 519 596 A1호; 또한 참조: 영장류화된 항체와 관련하여 Newman, R. et al., BioTechnology, 10: 1455-1460(1992), 및 일본쇄 항체와 관련하여 Ladner et al., 미국 특허 제4,946,778호 및 Bird, R.E. et al., Science, 242: 423-426(1988)].

[0083] 특수 실시양태에서, 본 발명은 PLVAP(예를 들면, 서열 번호 23을 포함하는 사람 PLVAP 단백질)에 특이적으로 결합하는 키메라 항체에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키메라 항체는 사람 IgG4의 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄(예를 들면, 카파 경쇄)를 포함한다.

[0084] 다른 실시양태에서, 본 발명은 PLVAP(예를 들면, 서열 번호 23을 포함하는 사람 PLVAP 단백질)에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체에 관한 것이다. 인간화된 항체는 표준 방법 또는 다른 적합한 기술을 사용하여 합성 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 인간화된 가변 영역을 암호화하는 핵산(예를 들면, cDNA) 서열을 또한 PCR 돌연변이유발 방법을 사용하여 작제함으로써 이미 인간화된 가변 영역으로부터의 DNA 주형과 같은, 인간 또는 인간화된 쇄를 암호화하는 DNA 서열을 변경할 수 있다[참조: 예를 들면, Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17: 5404(1989); Sato, K., et al., Cancer Research, 53: 851-856(1993); Daugherty, B.L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476(1991); 및 Lewis, A.P. and J.S. Crowe, Gene, 101: 297-302(1991)]. 이들 또는 다른 적합한 방법을 사용하여, 변이체를 또한 용이하게 생산할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 클로닝된 가변 영역(예를 들면, dAb)을 돌연변이시키고, 바람직한 특이성을 갖는 변이체를 암호화하는 서열을 선택(예를 들면, 파아지 라이브러리로부터; 참조: 예를 들면, Krebber et al., 미국 특허 제5,514,548호; Hoogenboom et al., 1993년 4월 1일자로 발표된 제WO 93/06213호)할 수 있다. 인간화된 항체는 또한 예를 들면, 안티토프 리미티드(Antitope Limited)(영국 캠프릿지 소재)를 포함하는 업자로부터 입수하고/하거나 제조할 수 있다.

[0085] 예를 들면, 라이브러리(예를 들면, 파아지 디스플레이 라이브러리)로부터의 재조합체 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들면, dAb)을 선택하거나, 유전자삽입 동물(예를 들면, 마우스)의 면역화에 의존하는 방법을 포함하는, 필수적인 특이성의 항체를 생산하거나 분리하는 다른 적합한 방법이 사용될 수 있다. 사람 항체의 레퍼토리를

생산할 수 있는 유전자삽입 동물은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며[예를 들면, Xenomouse[®](제조원: 암게닉스(Abgenix), 카나다 프레몬트 소재] 적합한 방법[참조: 예를 들면, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555(1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258(1993); Lonberg et al., 미국 특허 제5,545,806호; Surani et al., 미국특허 제5,545,807호; Lonberg et al., 제WO 97/13852호]을 사용하여 생산할 수 있다.

[0086] 일단 생산되면, PLVAP에 대해 특이적인 항체를 당해 분야에 잘 공지된 특이적인 항체를 스크리닝 및 분리하는 방법을 사용하여 용이하게 확인할 수 있다[참조: 예를 들면, Paul(ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43:1-98, 1988; Goding(ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984]. 각종 검정을 이용하여 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 검출할 수 있다. 예시적인 검정은 문헌[참조: Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988]에 기술되어 있다. 이러한 검정의 대표적인 예는 동시 면역전기영동, 방사면역검정, 방사면역-침전, 효소-결합된 효소흡착 검정(ELISA), 도트 블롯 또는 웨스턴 블롯 검정, 억제 또는 경쟁 검정 및 샌드위치 검정을 포함한다.

[0087] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 PLVAP에 대해 높은 결합 친화성을 갖는다. 이러한 항체는 바람직하게는 K_d로 표현된, 적어도 약 10^{-7} M(예를 들면, 약 0.4×10^{-7} M, 약 0.6×10^{-7} M, 또는 그 이상, 예를 들면, 적어도 약 10^{-8} M, 적어도 약 10^{-9} M, 또는 적어도 약 10^{-10} M)의 PLVAP에 대한 친화성(예를 들면, 결합 친화성)을 가질 것이다. 항체의 결합 친화성은 예를 들면, 스캐차드 분석(Scatchard analysis)(참조: Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949)에 의해 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 결합 친화성은 또한 시판되는 바이오센서 장치[BIACORE, 제조원: 파마시아 바이오센서(Pharmacia Biosensor), 미국 뉴저지 피츠카타웨이 소재]를 사용하여 측정할 수 있으며, 여기서, 단백질은 수용체 칩의 표면상에 고정화된다(참조: Karlsson, J. Immunol. Methods 145:229-240, 1991 및 Cunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234:554-563, 1993). 당해 시스템은, 결합 친화성이 계산될 수 있는 온- 및 오프-율(on- and off-rates)의 측정, 및 결합 임체화학의 평가를 가능하게 한다.

[0088] 본 발명의 항체는 예를 들면, 항체의 검출을 가능하게 하는 검출가능한 표지, 생물학적 시료 속에서 항체(예를 들면, PLVAP)가 결합한 단백질과 같은 표지를 포함할 수 있다. 검출가능한 표지는 특히 진단 적용에 적합하다. 예를 들면, PLVAP 항체는 방사활성 동위원소(방사성동위원소)로 표지할 수 있으며, 이는 감마 카운터, 신틸레이션 카운터 또는 자가조직방사선촬영 또는 다른 적합한 수단으로 검출할 수 있다. 본 발명의 목적에 유용한 동위원소는 ³H, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe 및 ⁷⁵Se를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0089] 본 발명의 항체는 또한 형광성 화합물(예를 들면, 염료)로 표지시킬 수 있다. 형광성 표지된 항체를 적절한 파장 길이의 빛에 노출시키는 경우, 이후 이의 존재는 화합물의 형광성으로 인해 검출될 수 있다. 가장 흔히 사용된 형광성 표지는 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈알데하이드 및 플루오레스카민이다. 본 발명의 항체는 또한 ¹⁵²Eu와 같은 형광성 방사 금속, 또는 란탄족 중 다른 원소를 사용하여 표지할 수 있다. 이들 금속은 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA), 테트라아자-사이클로데칸-테트라아세트산(DOTA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 금속 칠레이트화제를 사용하여 항체 분자에 부착될 수 있다.

[0090] 본 발명의 항체는 또한 화학발광성 화합물에 커플링될 수 있다. 유용한 화학발광성 표지 화합물의 예는 루미놀, 이소루미놀, 테로마틱 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르이다.

[0091] 마찬가지로, 생발광성 화합물은 본 발명의 항체를 표지하는데 사용될 수 있다. 생발광은, 촉매 단백질이 화학발광성 반응의 효율을 증가시키는 생물학적 시스템에서 발견된 화학발광의 유형이다. 생발광성 단백질의 존재는 발광의 존재를 검출함으로써 측정된다. 항체를 표지할 목적으로 유용한 생발광성 화합물은 루시페린, 루시페라제 및 아쿠오린이다.

[0092] 표지된 항체의 검출은, 예를 들면, 검출가능한 표지가 방사활성 감마 방출체인 경우, 신틸레이션 카운터에 의해, 또는 예를 들어 표지가 형광성 물질인 경우, 형광측정기에 의해 달성할 수 있다. 효소 표지의 경우, 검출은 효소에 대한 기질을 사용하는 비색계적 방법으로 달성할 수 있다. 검출은 또한 기질의 효소 반응의 정도

를 유사하게 제조한 표준물과 가시적 비교함으로써 달성을 할 수 있다.

[0093] 따라서, 본 발명의 항체는 또한 조직 단면에 대한 염색으로서 사용할 수 있다. 예를 들면, PLVAP에 결합하는 표지된 항체는 조직 시료, 예를 들면, 환자로부터의 간 조직 생검 또는 미세 침 흡인물과 접촉시킬 수 있다. 이후에, 당해 단면을 세척하고 표지를 적절한 수단을 사용하여 검출할 수 있다.

[0094] HCC의 치료 목적으로, 본 발명의 PLVAP 항체는 PLVAP를 발현하는 세포의 파괴를 증진시키는 방사성 표지 또는 기타 치료제(예를 들면, HCC 세포 주변의 혈관 내피 세포)를 포함할 수 있다. HCC 치료요법에 사용하기에 적합한 방사성동위원소

[0095] 표지의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Bi , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{111}In 및 ^{118}Re 를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 임의로, 봉소와 같이 중성자 방사선을 사용한 충격시 α 및 β 입자를 방사하는 표지를 치료학적 PLVAP 항체에 대한 표지로 사용할 수 있다.

[0096] 치료학적 항체는 또한 PLVAP를 발현하는 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있는 세포독성제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 디프테리아 독소 또는 리친과 같은 세균 독소를 사용할 수 있다. 디프테리아 독소의 단편 A를 포함하는 항체를 생산하는 방법은 미국 특허 제4,675,382호(1987)에 교시되어 있다. 디프테리아 독소는 2개의 폴리펩티드 쇄를 함유한다. B 쇄는 세포 표면상의 수용체에 대한 독소에 결합한다. A 쇄는 실제로 세포질로 도입되어 ETP의 가수분해와 동시에 mRNA를 따라 리보소음을 전좌시키는 인자인, 연장 인자 2를 불활성화시킴으로써 단백질 합성을 억제한다[참조: Darnell, J. et al., in Molecular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., page 662(1986)]. 달리는, 리친, 독성 랙틴을 포함하는 항체를 제조할 수 있다. 다른 적합한 세포독성제는 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0097] 생체내 검출을 위해, 본 발명의 PLVAP 항체를 직접적으로 또는 중간 작용 그룹을 사용함으로써 방사핵에 접합시킬 수 있다. 금속성 양이온으로서 존재하는 방사성동위원소를 결합시키는데 흔히 사용되는 중간 그룹은 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 또는 테트라아자-사이클로도데칸-테트라아세트산(DOTA)이다. 이러한 방식으로 결합된 금속성 양이온의 대표적인 예는 ^{99}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga , 및 ^{68}Ga 이다.

[0098] 또한, 본 발명의 항체는 상자성 원자를 포함하는 NMR 영상화제로 태그시킬 수 있다. NMR 영상화제의 사용은 NMR 기술을 사용하여 환자에서 HCC의 존재 및 정도를 생체내 진단하도록 한다. 이러한 방식에 특히 유용한 성분은 ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr , 및 ^{56}Fe 이다.

[0099] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 미국 버지니아 20108 마나사스 피.오.박스 1549에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC)에 _____로 기탁된 하이브리도마인 하이브리도마 KFCC-GY4(ATCC 수탁번호_____)에 의해 생산된 PLVAP 항체에 관한 것이다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 미국 버지니아 20108 마나사스 피.오.박스 1549에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC)에 _____로 기탁된 하이브리도마인 하이브리도마 KFCC-GY5(ATCC 수탁번호_____)에 의해 생산된 PLVAP 항체를 제공한다.

[0100] 다른 실시양태에서, 본 발명은 하이브리도마 KFCC-GY4(ATCC 수탁 번호_____)에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 하이브리도마 KFCC-GY5(ATCC 수탁번호_____)를 제공한다.

0101] PLVAP 길항제

[0102] 본 발명의 PLVAP 길항제는 PLVAP 유전자 생성물의 활성을 억제(예를 들면, 감소, 예방)하는 특정 제제일 수 있다. PLVAP 활성은 HCC 종양의 형성, 성장, 혈관화 또는 진행을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특수 실시양태에서, PLVAP 길항제는 PLVAP 유전자 생성물에 특이적으로 결합함으로써 PLVAP 유전자 생성물(예를 들면, PLVAP RNA, PLVAP 단백질)의 활성을 억제한다. PLVAP 길항제는 또한 PLVAP 유전자 또는 유전자 생성물(예를 들면, PLVAP RNA, PLVAP 단백질)의 발현(예를 들면, 전사 mRNA 프로세싱, 해독)을 억제(감소, 저하, 방지)하는 제제를 포함한다. PLVAP 길항제는 다른 것들 중에서 항체, 소분자, 웹타이드, 웹타이드미메틱 또는 혁산일 수 있다.

[0103] 항체 길항제

[0104] 본 발명의 PLVAP 길항제는 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 이러한 항체는 본원에 기술된 어떠한 PLVAP-특이적인 항체도 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0106] *소 문자 길항제

- [0107] PLVAP 길항제는 또한 소 분자일 수 있다. 소 분자의 예는 유기 화합물, 유기금속성 화합물, 무기 화합물, 및 유기, 유기금속성 또는 무기 화합물의 염을 포함한다. 소 분자내 원자는 통상적으로 공유 및/또는 이온 결합을 통해 서로 연결되어 있다. 소 유기 분자내 원자의 배열은 쇄(예를 들면, 탄소-탄소 쇄 또는 탄소-이종원자 쇄)로 나타낼 수 있거나, 탄소 원자를 함유하는 환, 예를 들면, 벤젠 또는 폴리사이클릭 시스템, 또는 탄소와 이종원자의 조합, 즉, 피리딘 또는 퀴나졸린과 같은 헤테로사이클로 나타낼 수 있다. 비록 소 분자가 어떠한 분자량도 가질 수 있다고 해도, 이들은 일반적으로 약 5,000 달톤 미만의 분자를 포함한다. 예를 들면, 이러한 소 분자는 약 1000 달톤 미만, 및 바람직하게는, 약 750 달톤 미만, 또는 보다 바람직하게는 약 500 달톤 미만일 수 있다. 소 분자 및 다른 비-펩타이드성 PLVAP 길항제는 천연적으로(예를 들면, 확인된, 분리된, 정제된) 발견될 수 있고/있거나 합성적으로(예를 들면, 전통적인 유기 합성, 생-매개된 합성, 또는 이의 조합에 의해) 생산될 수 있다[참조: Ganesan, Drug Discov. Today 7(1): 47-55(January 2002); Lou, Drug Discov. Today, 6(24): 1288-1294(December 2001)]. 천연적으로 존재하는 소 분자의 예는 호르몬, 신경전달물질, 뉴클레오타이드, 아미노산, 당, 지질 및 이들의 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0108] 펩타이드 길항제
- [0109] 본 발명의 PLVAP 길항제는 PLVAP 단백질에 결합하는 펩타이드일 수 있다. 펩타이드는 어떠한 적합한 L- 및/또는 D-아미노산, 예를 들면, 일반적인 α -아미노산(예를 들면, 알라닌, 글리신, 발린), 비- α -아미노산(예를 들면, β -알라닌, 4-아미노부티르산, 6-아미노프로인산, 사르코신, 스타틴) 및 특수 아미노산(예를 들면, 시트룰린, 호모시트룰린, 호모세린, 노르루이신, 노르발린, 오르니틴)을 포함할 수 있다. 펩타이드상의 아미노, 카복실 및/또는 기타 작용성 그룹은 유리되거나(예를 들면, 변형되지 않거나) 또는 적합한 보호 그룹으로 보호될 수 있다. 아미노 그룹 및 카복실 그룹에 대한 적합한 보호 그룹, 및 보호 그룹을 가하거나 제거하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 예를 들면, 문헌(참조: Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis" John Wiley and Sons, 1991)에 게재되어 있다. 펩타이드의 작용성 그룹은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 유도체화(예를 들면, 알킬화)시킬 수 있다.
- [0110] 펩타이드 PLVAP 길항제는 경우에 따라 하나 이상의 변형[예를 들면, 아미노산 링커, 아실화, 아세틸화, 아미드화, 메틸화, 말단 개질제(예를 들면, 고리화 변형)]을 포함할 수 있다. 펩타이드는 또한 화학적 변형(예를 들면, N-메틸- α -아미노 그룹 치환)을 함유할 수 있다. 또한, 펩타이드 길항제는 공지되고/되거나 천연적으로 존재하는 펩타이드의 유사체, 예를 들면, 보존적 아미노산 잔기 치환(들)을 갖는 펩타이드 유사체일 수 있다. 이들 변형은 이의 PLVAP 길항제 활성을 포함하여, 펩타이드의 각종 특성(예를 들면, 가용성, 결합)을 개선시킬 수 있다.
- [0111] 펩타이드인 PLVAP 길항제는 선형, 가지형 또는 사이클릭일 수 있는 펩타이드, 예를 들면 수개의 아미드 결합을 포함하는 이종원자 환 구조를 갖는 펩타이드일 수 있다. 특수 실시양태에서, 펩타이드는 사이클릭 펩타이드이다. 이러한 펩타이드는 당해 분야의 숙련가에 의해 표준 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들면, 펩타이드는 효소적 또는 화학적 분해에 의해 천연 단백질로부터 유도되거나 제거될 수 있거나, 적합한 방법, 예를 들면, 고체상 펩타이드 합성[예를 들면, 메리필드-형 합성(Merrifield-type synthesis)](참조: 예를 들면, Bodanszky et al. "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976)에 의해 합성될 수 있다. PLVAP 길항제인 펩타이드는 또한 예를 들면, 재조합체 DNA 방법 또는 기타 적합한 방법(참조: 예를 들면, Sambrook J. and Russell D.W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001)을 사용하여 생산할 수 있다.
- [0112] 펩타이드는 합성하여 약간 내지 많은 별개의 분자 종을 포함하는 라이브러리로 조합할 수 있다. 이러한 라이브러리는 복합 화학의 방법을 사용하여 제조할 수 있고, 라이브러리가 목적한 생물학적 활성을 지닌 펩타이드를 포함하는지를 측정하기 위한 어떠한 적합한 방법도 사용하여 스크리닝할 수 있다. 이러한 펩타이드 길항제는 이후에 당해 분야의 숙련가에게 공지된 적합한 방법을 사용하여 분리할 수 있다.
- [0113] 펩티도미메틱 길항제
- [0114] PLVAP 길항제는 또한 펩티도미메틱일 수 있다. 예를 들어, 펩타이드와 동일한 작용 그룹을 갖는 다당류를 제조할 수 있다. 펩티도미메틱은 예를 들면, 이것이 결합하거나 표적 분자에 결합할 환경에서 펩타이드 제제의 3차원 구조를 확립함으로써 설계할 수 있다. 펩티도미메틱은 적어도 2개의 성분인, 결합 잔기 또는 잔기들과 골격 또는 지지 구조를 포함한다.
- [0115] 결합 잔기는 표적 분자, 예를 들면, 사람 PLVAP와 반응하거나 이들과 함께 복합체(예를 들면, 소수성 또는 이온

성 상호반응을 통해)를 형성할 그룹 또는 화학 원자들이다. 예를 들면, 펩티도미메틱에서 결합 분자는 펩타이드 또는 단백질 길항제 속의 것들과 동일할 수 있다. 결합 잔기는 펩타이드 길항제에서 결합 잔기와 동일하거나 유사한 방식으로 수용체와 반응하는 원자 또는 화학 그룹일 수 있다. 예를 들어, 컴퓨터 화학을 사용하여 PLVAP 단백질에 결합하는 펩타이드의 펩타이드 모사체를 설계할 수 있다. 펩타이드내 기본 아미노산에 대한 펩티도미메틱을 설계하는데 사용하기에 적합한 결합 잔기의 예는 질소 함유 그룹, 예를 들면, 아민, 암모늄, 구아니딘 및 아미드 또는 포스포늄을 포함한다. 산성 아미노산에 대한 펩티도미메틱을 설계하는데 사용하기에 적합한 결합 잔기의 예는 예를 들면, 카복실, 저급 알킬 카복실산 에스테르, 살론산, 저급 알킬 살론산 에스테르 또는 인산 또는 이의 에스테르를 포함한다.

[0116] 지지 구조는, 결합 잔기 또는 잔기들에 결합하는 경우 펩티도미메틱의 3차원 구조를 제공하는 화학 실체이다. 지지 구조는 유기 또는 무기일 수 있다. 유기 지지 구조의 예는 다당류, 중합체 또는 유기 합성 중합체(예를 들면, 폴리비닐 알코올 또는 폴리락타이드)의 올리고머를 포함한다. 지지 구조가 실질적으로 펩타이드 골격 또는 지지 구조와 동일한 크기 및 면적을 소유하는 것이 바람직하다. 이는 펩타이드 및 펩티도미메틱의 원자 및 결합의 크기를 계산하거나 측정함으로써 결정할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 펩타이드 결합의 질소는 예를 들면, 폴리에스테르 골격을 형성하는 산소 또는 황으로 치환시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 카보닐은 살포닐 그룹 또는 살피닐 그룹으로 치환시킴으로써 폴리아미드(예를 들면, 폴리살폰아미드)를 형성할 수 있다. 펩타이드의 역 아미드는 예를 들면, $-NHCO-$ 그룹을 하나 이상의 $-CONH-$ 그룹으로 치환시켜 제조할 수 있다. 여전히 다른 양태에서, 펩타이드 골격은 폴리실란 골격으로 치환시킬 수 있다.

[0117] 이들 화합물은 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들면, 폴리에스테르 펩티도미메틱은 아미노산에서 상응하는 α -아미노 그룹을 하이드록실 그룹으로 치환시켜, 하이드록시산을 제조하고 후속적으로 하이드록시산을 에스테르화하고, 임의로 염기성 및 산성 측쇄를 차단시켜 부 반응을 최소화시킴으로써 제조할 수 있다. 적절한 화학 합성 경로의 측정은 일반적으로 화학 구조의 측정시 용이하게 확인할 수 있다.

[0118] 펩티도미메틱은 합성하여 소수 내지 많은 별개의 문자 종을 포함하는 라이브러리로 조립할 수 있다. 이러한 라이브러리는 복합 화학의 잘-공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있으며, 라이브러리가 목적한 활성을 갖는 하나 이상의 펩티도미메틱을 포함하는지를 측정하기 위해 스크리닝할 수 있다. 이후에, 이러한 펩티도미메틱 길항제를 적합한 방법으로 분리할 수 있다.

핵산 길항제

[0120] PLVAP 길항제는 또한 PLVAP 유전자 발현을 억제하는 핵산 분자(예를 들면, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임)을 포함하는 각종 핵산을 포함한다. 세포내에서 짧은 siRNA-유사 문자로 프로세싱되는, 예를 들면, 작은 방해 리보핵산(siRNA) 및 유사하게, 짧은 헤어핀 리보핵산(shRNA)은 PLVAP 단백질의 발현(해독)를 방지할 수 있다. siRNA 분자는, 길이가 일반적으로 약 20 내지 약 25 뉴클레오타이드이고 특수 RNA 서열(예를 들면, PLVAP mRNA 서열)에 결합하도록 설계된 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 서열-특이적인 방식의 siRNA 사일런스(silence) 유전자 발현은 표적 RNA(예를 들면, 상보성 서열을 갖는 RNA)에 결합하여 RNA가 엔도뉴클레아제에 의해 분해되도록 한다. PLVAP 유전자 생성물의 발현을 억제할 수 있는 siRNAs 분자는 적합한 방법으로 생산할 수 있다. 목적 유전자의 서열에 결합하는 siRNA 분자를 설계하는데 사용될 수 있는 수개의 알고리즘이 존재한다(참조: 예를 들면, Mateeva O. et al., Nucleic Acids Res. 35(8):Epub, 2007; Huesken D. et al., Nat. Biotechnol. 23:995-1001; Jagla B. et al., RNA 11:864-872, 2005; Shabalina S.A. BMC Bioinformatics 7:65, 2005; Vert J.P. et al., BMC Bioinformatics 7:520, 2006). siRNA 또는 shRNA를 안정하게 발현할 수 있는 발현 벡터도 이용가능하다(참조: 예를 들면, Brummelkamp, T.R., Science 296: 550-553, 2002, Lee, NS, et al., Nature Biotechnol. 20:500-505, 2002; Miyagishi, M., and Taira, K. Nature Biotechnol. 20:497-500, 2002; Paddison, P.J., et al., Genes & Dev. 16:948-958, 2002; Paul, C.P., et al., Nature Biotechnol. 20:505-508; 2002; Sui, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(6):5515-5520, 2002; Yu, J-Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052, 2002; Elbashir, SM, et al., Nature 411:494-498, 2001). siRNA/shRNA 분자의 안정한 발현은, 이것이 분자의 장기간의 발현을 가능하도록 하며, 반복된 치료에 대한 필요성을 강력히 감소시키고/시키거나 제거할 수 있으므로 암을 치료하는데 있어 유리할 수 있다.

[0121] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예를 들면, DNA, 리보프로브)를 또한 PLVAP 발현을 억제하기 위한 PLVAP 길항제로서 사용할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산 서열(예를 들면, mRNA)에 특이적으로 하이브리드화하여 표적 핵산의 분해(RNase H-의존성 메카니즘을 통한 RNA의 분해)를 유도하거나 스플라이싱 또는

해독 기구의 진행을 입체적으로 방해하는 일반적으로 짧은(~13 내지 ~25개 뉴클레오타이드) 일본쇄 핵산이다(참조: 예를 들면, Dias N. and Stein C.A., Mol. Can. Ther. 1:347-355, 2002). 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드, 0-알킬 그룹(예를 들면, 메틸 그룹)에 의해 치환된 리보스의 2'-위치에서 수소를 갖는 올리고뉴클레오타이드, 폴리아미드 핵산(PNA), 포스포디아미데이트 모르풀리노 올리고머(데옥시리보스 잔기는 모르풀린 환으로 치환된다), PN(리보스의 3' 위치에서 아민 그룹에 의한 산소의 N3' → P5' 치환) 및 키메라 올리고뉴클레오타이드(예를 들면, 2'-0-메틸/포스포로티오에이트)를 포함하여 PLVAP 길항제로서 사용될 수 있는 수개의 상이한 유형의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 존재한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 예측된 알고리즘을 사용하여 단백질에 대해 특이적이라도 설계할 수 있다(참조: 예를 들면, Ding, Y., and Lawrence, C. E., Nucleic Acids Res., 29:1034-1046, 2001; Sczakiel, G., Front. Biosci., 5:D194-D201, 2000; Scherr, M., et al., Nucleic Acids Res., 28:2455-2461, 2000; Patzel, V., et al. Nucleic Acids Res., 27:4328-4334, 1999; Chiang, M.Y., et al., J. Biol. Chem., 266:18162-18171, 1991; Stull, R. A., et al., Nucleic Acids Res., 20:3501-3508, 1992; Ding, Y., and Lawrence, C. E., Comput. Chem., 23:387-400, 1999; Lloyd, B. H., et al., Nucleic Acids Res., 29:3664-3673, 2001; Mir, K. U., and Southern, E. M., Nat. Biotechnol., 17:788-792, 1999; Sohail, M., et al., Nucleic Acids Res., 29:2041-2051, 2001; Altman, R. K., et al., J. Comb. Chem., 1:493-508, 1999). 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 적합한 방법; 예를 들면, 자동화된 핵산 합성기[제조원: 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)]를 사용한 핵산((예를 들면, DNA, RNA, PNA)의 합성으로 생산할 수 있다(참조: 또한, Martin, P., Helv. Chim. Acta 78; 486-504, 1995). 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 적절한 발현 벡터를 함유하는 세포내에서 안정하게 발현시킬 수 있다.

[0122]

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 세포(예를 들면, 종양 세포)에 의해 흡착성 세포내이입의 과정을 통해 도입될 수 있다. 즉, 대상체(예를 들면, 포유동물)의 치료시, 안티센스 PLVAP 올리고뉴클레오타이드를 표적 세포(예를 들면, 종양 세포)에 예를 들면, 주사 또는 주입에 의해 전달할 수 있다. 예를 들면, 정제된 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA/shRNA를 단독으로 또는 적합한 약물 전달 비히클(예를 들면, 리포좀, 양이온서 종합체(예를 들면, 폴리-L-라이신'PAMAM 덴드리머(dendrimer), 폴리알킬시아노아크릴레이트 나노입자 및 폴리에틸렌이민)과의 제형으로 투여하거나 적합한 담체 웨بت아이드(예를 들면, 호메오틱 전사 인자(homeotic transcription factor), 안테나페디아 웨بت아이드(Antennapedia peptide), HIV-1의 Tat 단백질, E5CA 웨بت아이드)에 커플링시킬 수 있다.

[0123]

리보자임을 또한 PLVAP 길항제로 사용하여 PLVAP 발현을 억제할 수 있다. 리보자임은 효소 활성을 지닌 RNA 분자이다. 리보자임의 하나의 부류는 2개 이상의 종내로 뉴클레오타이드 염기 서열 번호 특이적인 방식으로 다른 별개의 RNA 분자를 반복적으로 분해할 수 있다[참조: Kim et al., Proc Natl Acad Sci USA, 84:8788(1987); Haseloff & Gerlach, Nature, 334:585(1988); 및 Jefferies et al., Nucleic Acid Res, 17:1371(1989)]. 이러한 리보자임은 통상적으로 2개의 작용성 도메인: 촉매적 도메인 및 상보성 염기-쌍화를 통해 표적 RNA에 리보자임을 결합시키는 것을 안내하는 결합 서열을 갖는다. 특이적으로-설계된 리보자임이 표적 mRNA에 결합하면, 이는 표적 mRNA를 효소적으로 분해하여, 통상적으로 자체의 안정성을 감소시키고 암호화된 단백질을 직접적으로 해독하는 자체의 능력을 파괴한다. 리보자임이 이의 RNA 표적을 분해한 후, 이는 표적 RNA로부터 방출된 후 다른 표적에 결합하여 이를 분해한다. 즉, 단일 리보자임 분자가 반복적으로 결합하여 신규 표적을 분해할 수 있다.

[0124]

본 발명에 따르면, 리보자임은 PLVAP를 암호화하는 mRNA의 어떠한 부위도 표적화할 수 있다. 리보자임 표적 서열을 선택하고 리보자임을 설계하며 제조하는 방법은 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다(참조: 미국 특허 제4,987,071호; 제5,496,698호; 제5,525,468호; 제5,631,359호; 제5,646,020호; 제5,672,511호; 및 제6,140,491호, 이들 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 포함된다). 예를 들어, 적합한 리보자임은 해머헤드 모티프(hammerhead motif), 헤어핀 모티프(hairpin motif), 간염 텔타 바이러스 모티프, 그룹 I 인트론 모티프 또는 RNase P RNA 모티프와 같은 각종 구조로 설계할 수 있다[참조: 예를 들면, 미국 특허 제4,987,071호; 제5,496,698호; 제5,525,468호; 제5,631,359호; 제5,646,020호; 제5,672,511호; 및 제6,140,491호; Rossi et al., AIDS Res Human Retroviruses 8:183(1992); Hampel & Tritz, Biochemistry 28:4929(1989); Hampel et al., Nucleic Acids Res, 18:299(1990); Perrotta & Been, Biochemistry 31:16(1992); 및 Guerrier-Takada et al., Cell, 35:849(1983)].

[0125]

리보자임은 정상의 RNA 합성에 사용된 바와 동일한 방법으로 합성할 수 있다. 예를 들면, 적합한 방법은 문헌 [참조: Usman et al., J Am Chem Soc, 109:7845-7854(1987) 및 Scaringe et al., Nucleic Acids Res,

18:5433-5441(1990)]에 개재되어 있다. 변형된 리보자임은 예를 들면, 미국 특허 제5,652,094호; 국제 공보 제WO 91/03162호; 제WO 92/07065호 및 제WO 93/15187호; 유럽 특허원 제92110298.4호; Perrault et al., *Nature*, 344:565(1990); Pieken et al., *Science*, 253:314(1991); 및 Usman & Cedergren, *Trends Biochem Sci*, 17:334(1992)에 게재된 방법으로 합성할 수 있다.

[0126] 본 발명의 PLVAP 길항체는 PLVAP 단백질에 결합하여 이의 활성을 억제하는 핵산 분자(예를 들면, 올리고뉴클레오타이드)일 수 있다. 적합한 핵산 PLVAP 길항체는 아프타머를 포함하며, 이는 전통적인 왓슨-크릭 염기 쌍(Watson-Crick base pairing)[참조: Tuerk and Gold, *Science* 249:505(1990); Ellington and Szostak, *Nature* 346:818(1990)] 외에 상호작용을 통해 높은 친화성 및 특이성을 갖는 특수 목적 분자(예를 들면, 사람 PLVAP)에 결합할 수 있다.

[0127] 파지 디스플레이 또는 모노클로날 항체(MAb)에 의해 생성된 웨타이드와 같은 아프타머는 선택된 표적에 특이적으로 결합할 수 있으며, 결합을 통해 이들의 표적의 특이성을 차단시켜 작용할 수 있다. 무작위적인 서열 번호 올리고뉴클레오타이드의 혼주물로부터의 시험판내 선택 과정에 의해 생성된, 아프타머는 성장 인자, 전사 인자, 효소, 면역글로불린 및 수용체를 포함하는 100에 걸친 단백질에 대해 생성되어졌다. 대표적인 아프타머는, 크기가 10 내지 15 kDa(30 내지 45개 뉴클레오타이드)이며, 이의 표적에 아-나노몰 친화성으로 결합하고, 밀접하게 관련된 표적에 대해 차별화된다(예를 들면, 통상적으로 동일한 유전자 속으로부터 다른 단백질에 결합하지 않을 것이다). 일련의 구조 연구는, 아프타머가 항체-항원 복합체에서 친화성 및 특이성을 구동하는 동일한 유형의 결합 상호작용(수소 결합, 정전기 상보성, 소수성 접촉, 입체 배출 등)을 사용할 수 있음을 나타낸다.

[0128] 목적한 표적(예를 들면, 인간 PLVAP 단백질)에 결합하는 아프타머는 미국 특허 제5,475,096호 및 미국 특허 제5,270,163호에 기술된, "기하급수적 농축에 의한 리간드의 체계적인 진화(SELEX)"로서 공지된 표준 과정을 사용하여 생성시키고 동정할 수 있다.

[0129] PLVAP 길항체의 동정

[0130] PLVAP 유전자 생성물에 대해 결합 특이성을 갖는 제제는 스크리닝, 예를 들면, 화학적 화합물의 고-배출 스크리닝 및/또는 라이브러리(예를 들면, 화학적, 웨타이드, 핵산 라이브러리)로 동정할 수 있다.

[0131] 사람 PLVAP에 특이적으로 결합하는 항체는 예를 들면, 시판되는 복합 항체 라이브러리[제조원: 다이악스 코포레이션(Dyax Corp.), 모프포시스 에이지(MorphoSys AG)]에 의해 동정할 수 있다. 적합한 복합 항체 라이브러리 및 이를 라이브러리를 스크리닝하는 표준 방법은 문헌[참조: Hoet et al., *Nature Biotechnology* 23(3):344-348(2005) 및 Rauchenberger et al., *J. Biol. Chem.* 278(40):38194-38205(2003)]에 기술되어 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 분자의 이러한 라이브러리 또는 수집은 또한 잘 공지된 화학 방법으로 제조할 수 있다.

[0132] 또는, 인간 PLVAP에 특이적으로 결합하는 쥐 항체를 예를 들면, PLVAP 단백질, 단백질 단편 또는 웨타이드를 항원에 대한 내성을 파괴하는 항원 보강제와 함께 사용하여 마우스를 면역화시킴으로써 확인할 수 있다. 이러한 항체는 목적한 특이성 및 활성을 대해 스크리닝한 후 사람 질병의 치료를 위한 적합한 제제를 창조하는 공지된 기술을 사용하여 인간화시킬 수 있다.

[0133] 화합물 또는 소 분자는 예를 들면, 국립 암 기구의 화학물질 기탁기관(the Chemical Repository of the National Cancer Institute) 및 분자 라이브러리 소 분자 기탁기관(the Molecular Libraries Small Molecules Repository(PubChem), 및 하버드대 화학 및 세포 생물학 기관의 라이브러리 및 업자[예를 들면, 캠브릿지(Cambridge), 피크데일(Peakdale), 체랩(CEREP), 마이브릿지(MayBridge), 바이오넷(Bionet)])로부터 이용 가능한 기타 라이브러리로부터의 다수의 이용 가능한 화학적 화합물의 라이브러리로부터 동정할 수 있다. 분자의 이러한 라이브러리 또는 수집은 또는 복합 화학의 잘-공지된 방법과 같은 잘-공지된 화학 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 라이브러리는 PLVAP에 결합하여 이를 억제하는 화합물을 동정하기 위해 스크리닝할 수 있다.

[0134] 동정된 화합물은 의약 화학의 잘 공지된 방법을 사용하여 추가의 다양화를 위한 선도 화합물로서 제공할 수 있다. 예를 들면, 선도 화합물의 구조적 변이체인 화합물의 수집은 PLVAP 결합 및/또는 억제 활성을 위해 제조하고 스크리닝할 수 있다. 이는 화합물의 구조를 생물학적 활성에 결합시키는 구조 활성 관계의 발달을 초래할 수 있다. 적합한 결합 및 억제 활성을 갖는 화합물을 생체내 사용을 위해 추가로 개발할 수 있다.

[0135] PLVAP에 결합하는 제제는 PLVAP 길항체 활성을 대해 추가로 평가할 수 있다. 예를 들면, PLVAP 단백질을 포함하는 조성물을 스크리닝 또는 결합 검정에 사용하여 PLVAP 단백질에 결합하여 길항하는 제제를 검출하고/하거나 동정할 수 있다. 사용하기에 적합한 조성물은 예를 들면, PLVAP 단백질(예를 들면, 간 혈관 내피 세포), 이러

한 세포의 추출물, 및 재조합체 PLVAP 단백질을 천연적으로 발현하는 세포를 포함한다.

[0136] PLVAP 단백질에 결합하는 제제는 예를 들면, 참조 제제에 대한 PLVAP의 결합을 억제하는 시험 제제의 능력을 평가하는 경쟁적 결합 검정으로 동정할 수 있다. 참조 제제는 완전한 길이의 PLVAP 단백질 또는 이의 일부일 수 있다. 참조 제제는 적합한 표지[예를 들면, 방사성동위원소, 에피토프 표지, 친화성 표지(예를 들면, 바이오틴 및 아비딘 또는 스트렙타바딘), 스펀 표지, 효소, 형광성 그룹, 화학발광성 그룹, 염료, 금속(예를 들면, 금, 은), 자기 비드]로 표지할 수 있으며 검정에서 PLVAP 단백질을 포화시키는데 요구되는 표지된 참조 제제의 양을 측정할 수 있다. PLVAP 단백질 및 시험 제제사이의 복합체 형성의 특이성은 적합한 대조군(예를 들면, 표지되지 않은 제제, 표지 단독)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0137] 참조 제제와 PLVAP 단백질사이에 복합체의 형성을 억제하는 시험 제제의 능력은 표지된 참조 제제의 특이적인 결합을 50% 억제(IC_{50} 값)하는데 요구되는 시험 제제의 농도로서 측정할 수 있다. 특이적인 결합은 바람직하게는 전체 결합(예를 들면, 복합체내 총 표지)에서 비-특이적인 결합을 뺀 값으로 정의한다. 비-특이적인 결합은 바람직하게는 과량의 표지되지 않은 참조 제제의 존재하에 형성된 복합체에서 여전히 검출된 표지의 양으로 정의한다. 당해 방법에 사용하기에 적합한 참조 제제는 PLVAP에 특이적으로 결합하는 문자 및 화합물, 예를 들면, PLVAP에 결합하는 항체를 포함한다.

[0138] PLVAP 단백질을 길항하는 제제는 예를 들면, 종양 혈관화와 같이, PLVAP의 하나 이상의 활성을 길항(감소, 방지, 억제)하는 능력을 가진 제제를 스크리닝함으로써 동정할 수 있다. 이러한 활성은 당해 분야의 숙련가에 의해 어떠한 적절한 시험관내 또는 생체내 검정에 의해 평가할 수 있다.

약제학적 조성물

[0141] 본 발명의 PLVAP 길항제는 포유동물 대상체에게 약제학적 조성물 또는 생리학적 조성물의 일부, 예를 들면, PLVAP 길항제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. PLVAP 길항제(예를 들면, PLVAP에 특이적으로 결합하는 항체)를 포함하는 제형 또는 조성을 또는 PLVAP 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제(예를 들면, 화학치료제, 예를 들면, 독소루비신, 5-플루오로우라실, 타목시펜, 옥트레오타이드)를 포함하는 조성물은 선택된 투여 경로에 따라 변할것이다(예를 들면, 액제, 유제 또는 캡슐제). 적합한 약제학적 담체는 PLVAP 길항제와 상호작용하지 않는 불활성 성분들을 함유할 수 있다. 표준 약제학적 제형 기술, 예를 들면, 문헌(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA)에 기술된 것들을 사용할 수 있다. 비경구 투여용으로 적합한 약제학적 담체는 예를 들면, 멸균수, 생리학적 염수, 정균 염수(약 0.9% mg/ml의 벤질 알코올을 함유하는 염수), 포스페이트-완충된 염수, 행크스 용액(Hank's solution), 링거스 락테이트(Ringer's lactate) 등을 포함한다. 제형은 또한 활성 성분의 효능을 증진시키는 물질(예를 들면, 유화제, 가용화제, pH 완충제, 습윤제)을 소량 포함할 수 있다. 조성을 캡슐화하는 방법(예를 들면, 경 젤라틴 또는 사이클로텍스트란의 피복물 속에 캡슐화하는 방법)은 당해 분야에 공지되어 있다. 흡입용으로, 제제를 가용화시켜 투여에 적합한 분배기[예를 들면, 분쇄기(atomizer) 또는 분무기(nebulizer) 또는 가압 에어로졸 분배기]내로 적재할 수 있다.

진단 키트

[0143] 본 발명은 또한 대상체에서 간세포 암종의 존재를 검출하기 위한 진단 키트를 제공한다. 이러한 키트는 시료(예를 들면, 포유동물 대상체로부터의 생물학적 시료)에서 PLVAP 유전자 발현을 검출하기 위한 적어도 하나의 제제(예를 들면, 핵산 프로브, 항체)를 포함한다. PLVAP 유전자 발현은 예를 들면, 시료속에서 PLVAP mRNA 또는 PLVAP 단백질과 같은, PLVAP 유전자 생성물을 검출함으로써 검출할 수 있다.

[0144] 따라서, 하나의 실시양태에서, 키트는 PLVAP RNA(예를 들면, mRNA, hnRNA) 전사체에 특이적으로 하이브리드화하는 적어도 하나의 핵산 프로브(예를 들면, 올리고뉴클레오타이드 프로브)를 포함한다. 이러한 프로브는 고스트링전시 조건하에서 PLVAP RNA에 하이브리드화할 수 있다.

[0145] 다른 실시양태에서, 키트는 시료에서 PLVAP 유전자 생성물(예를 들면, mRNA, cDNA)에 특이적으로 하이브리드화 할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 쌍을 포함한다. 이러한 프라이머는 시료에서 PLVAP 유전자 생성물의 수준을 측정하기 위해 어떠한 표준 핵산 증폭 과정[예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR), 예를 들면, RT-PCR, 적량적 실시간 PCR]에서 사용할 수 있다.

[0146] 다른 실시양태에서, 본 발명의 키트는 PLVAP 단백질(예를 들면, 사람 PLVAP 단백질)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 이러한 항체는 본원에 기술된 본 발명의 어떠한 PLVAP 항체도 포함한다. 하나의 양태에서, 항

체는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는 V_H 도메인 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 V_L 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항체는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 V_H 도메인 및 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 V_L 도메인을 포함한다.

[0147] 본 발명의 키트내 진단제는 하나 이상의 표지(예를 들면, 검출가능한 표지)를 포함할 수 있다. 진단제용의 다수의 적합한 표지는 당해 분야에 공지되어 있으며 본원에 기술된 표지들 중 어느 것도 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특수 실시양태에서, 진단제(예를 들면, 항체)는 방사성동위원소를 포함함으로써, 제제는 면역-양전자 방출 단층촬영(면역-PET)에 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0149] 본 발명은 대상체에서 간세포 암종을 진단하는 방법, 및 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 같은, PLVAP 단백질의 길항제, 및 PLVAP 단백질의 길항제를 포함하는 조성물 및 키트에 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 PLVAP 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0151] 도 1은 종양 및 근접한 비-종양 조직간에 극도의 차등적 발현을 나타내는 유전자를 동정하기 위한 알고리즘을 묘사하는 흐름도이다.

도 2는 아피메트릭스 유전자 칩(Affymetrix gene chip)을 사용한 mRNA 전사 프로파일링에 의해 측정한 것으로서, 한 쌍의 HCC(PHCC) 및 근접한 비-종양 간 조직(PN) 시료(n=18), 및 쌍을 이루지 않은 HCC 시료(n=82)에서 PLVAP 유전자 발현 강도를 묘사하는 그래프이다.

도 3a는 태크만 정량적(Taqman quantitative) RT-PCR에 의해 측정한 것으로서, 한 쌍의 HCC(PHCC) 및 근접한 비-종양 간 조직(PN) 시료에서 상대적인 PLVAP 발현 양을 묘사하는 그래프이다. PLVAP mRNA 수준은 비-종양 간 조직에 비해 HCC에서 현저히 더 높다.

도 3b는 미세배열 분석에 의해 측정한 것으로서, 18개 쌍의 HCC(PHCC) 및 근접한 비-종양 간 조직(PN) 시료에서 PLVAP 유전자 발현 강도를 묘사하는 그래프이다. PLVAP 전사 수준은 하나를 제외하고는 시험한 모든 개인에 대해 각각의 개인으로부터의 근접한 비-종양 간 조직에서보다 HCC에서 보다 더 높다.

도 4a 및 4b는 마우스 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청을 생성하기 위해 사용된 His-태그된 사람 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질 재조합체 융합 단백질의 뉴클레오파이드 서열(서열 번호 1) 및 유추된 아미노산 서열(서열 번호 2)를 나타낸다.

도 5는 His 태그를 제거하기 위해 트롬빈 분해 전 및 후 재조합체 PLVAP 단백질의 검출을 묘사하는 웨스턴 블롯(Western blot)의 영상이다. 블롯의 좌측으로의 화살은 블롯상의 His-PLVAP와 PLVAP의 위치를 나타낸다. 블롯의 좌측으로의 번호는 분자량 표준의 위치를 나타낸다.

도 6a는 2-단계 실시간 정량적 RT-PCR에 의해 측정된 것으로서, 2개의 HCC 조직 시료[시료 A(검정색) 및 시료 B(회색)]로부터 레이저-포획된 미세해부에 의해 수득된 HCC 내피 세포내 PLVAP mRNA의 현저한 상대적 양의 존재를 묘사하는 그래프이다. 점선은 PLVAP mRNA의 정량적 RT-PCR에 사용된 동일한 시료에서 베타-액틴 mRNA로부터의 태그만 정량적 RT-PCR 시그널을 나타낸다. 당해 결과는 해부된 내피 세포에서 용이하게 측정가능한 PLVAP mRNA의 존재(실선)를 나타낸다.

도 6b는 2-단계 태크만 실시간 정량적 RT-PCR에 의해 측정한 것으로서 2개의 HCC 시료[시료 A(검정색) 및 시료 B(회색)]에서 HCC 조직에 근접한 비-종양 간 조직으로부터 레이저-포획된 미세해부에 의해 수득된 세포내 PLVAP mRNA의 현저한 상대적 양의 부재를 묘사하는 그래프이다. 당해 결과는 해부된 세포에서 검출가능한(검정색 실선) 및 간신히 검출가능한(회색 실선) PLVAP mRNA가 존재하지 않음을 나타낸다.

도 6c는 2-단계 태크만 실시간 정량적 RT-PCR에 의해 측정한 것으로서 2개의 HCC 조직 시료[시료 A(검정색) 및 시료 B(회색)]로부터 레이저-포획된 미세해부로 수득된 HCC 종양 세포에서 PLVAP mRNA의 상대적 양을 묘사한 그래프이다. 당해 결과는, 해부된 HCC 세포에 부착된 혈관 내피 세포의 일부로부터 불필요한 소량의 오염으로 인하여 해부된 HCC 세포내 극소량의 PLVAP mRNA(실선)의 존재를 나타낸다.

도 7은 ELISA에 의해 측정된 것으로서 재조합 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질에 대새 생성된 마우스 항혈청내 항-PLVAP 항체

역가를 묘사하는 그래프이다.

도 8a 내지 8f는 PLVAP 단백질의 국재화를 검출하기 위해 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청을 사용하여 면역조직화학적으로 염색한 간세포 암종을 가진 3명의 환자로부터의 포르말린 고정된 한 쌍의 HCC(도 8a, 8c, 8e) 및 근접한 비-종양 간 조직(도 8b, 8d, 8f)의 단면을 나타내는 영상이다. 한 쌍의 조직은 도 8a, 8b; 도 8c, 8d; 및 도 8e, 8f에 나타낸다. HCC 영상에서 갈색 염색(화살표)으로 나타나는 PLVAP 단백질은 간세포 암종의 모세 내피 세포에서만 검출되었다(도 8a, 8c, 8e). 검출가능한 HCC는 비-종양 간 조직에 존재하지 않았다(도 8b, 8d, 8f).

도 9a 내지 9f는 PLVAP 단백질의 국재화(localization)를 검출하기 위해 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청을 사용하여 면역조직화학적으로 염색한 간세포 암종을 가진 3명의 추가의 환자로부터의 포르말린-고정된 HCC(도 9a, 9c, 9e, 9f) 및 비-종양 간 조직(도 9b, 9d)의 단면을 나타내는 영상이다. 도 9a, 9b 및 도 9c, 9d는 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직의 한 쌍의 조직 시료를 나타낸다. HCC 영상에서 갈색 염색(화살표)으로 나타나는 PLVAP 단백질은 간세포 암종의 모세 내피 세포에서만 검출되었다(도 9a, 9c, 9e, 9f). 검출가능한 HCC는 비-종양 간 조직에서 존재하지 않았다(도 9b, 9d).

도 10a 내지 10f는 PLVAP 단백질의 국재화를 검출하기 위해 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청을 사용하여 면역조직화학적으로 염색한 6명의 상이한 환자로부터의 포르말린-고정된 초점성 결절성 과증식 조직의 단면을 나타내는 영상이다. PLVAP 단백질은 초점성 결절성 과증식의 비-종양 간 조직의 혈관 굴/모세혈관 내면의 내피 세포에서 검출되지 않았다. 일부 양성 염색(갈색)이 담즙관(도 10a, 10d 및 10f) 및 문맥로의 혈관(도 10d 및 10f)의 내피 세포에서 관측되었으나, 간 실질의 내피 세포에서는 관측되지 않았다. 담즙관 내피 세포의 양성 염색은 PLVAP 항혈청 속에서 비-특이적인 항체의 결합에 기인하였다.

도 11a 및 11b는 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청으로 면역조직화학적으로 염색한 간 혈관종을 가진 2명의 환자로부터의 포르말린-고정된 조직의 단면을 나타내는 영상이다. 간 혈관종의 내피 내면 세포는 PLVAP 단백질의 현저한 발현을 나타내지 않았다.

도 12a 및 12b는 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청으로 면역조직화학적으로 염색한 만성 활성 B형 간염을 가진 2명의 환자로부터의 포르말린-고정된 조직의 단면을 나타내는 영상이다. PLVAP 단백질은 만성 B형 간염 환자로부터의 비-종양 간 조직의 혈관 굴/모세혈관 내면의 내피 세포에서 검출되지 않았다.

도 13a 내지 13d는 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청으로 면역조직화학적으로 염색한 만성의 활성 C형 간염을 가진 3명의 상이한 환자로부터의 포르말린-고정된 조직의 단면을 나타내는 영상이다. 도 13b 및 13d에서 나타낸 조직 단면은 동일한 환자로부터의 것이다. PLVAP 단백질은 만성 C형 간염 환자로부터의 비-종양 간 조직의 혈관 굴/모세혈관 내면의 내피 세포에서 검출되지 않았다.

도 14a 내지 14d는 항-PLVAP 폴리클로날 항혈청으로 면역조직화학적으로 염색한 전이성 간암을 가진 3명의 상이한 환자로부터의 포르말린-고정된 조직의 단면을 나타내는 영상이다. 조직 단면은 전이성 결장직장 샘암종(도 14a), 간내 담관암종(도 14b 및 14c) 또는 전이성 난소 암종(도 14d)을 가진 환자로부터의 것이다. 도 14b 및 14c에 나타낸 조직 단면은 동일한 환자로부터의 것이다. PLVAP 단백질은 전이성 암 조직의 혈관 굴/모세혈관의 내면의 내피 세포에서 검출되지 않았다.

도 15a는 모노클로날 항체 KFCC-GY4의 V_H 도메인의 뉴클레오타이드 유전자(상단)(서열 번호 3) 및 유추된 아미노산(중간)(서열 번호 4) 서열을 나타낸다. CDR 1(서열 번호 5), 2(서열 번호 6) 및 3(서열 번호 7)에서 아미노산 잔기의 서열을 또한 나타낸다(하단).

도 15b는 모노클로날 항체 KFCC-GY4의 V_L 도메인의 뉴클레오타이드 유전자(상단)(서열 번호 8) 및 유추된 아미노산(중간)(서열 번호 9) 서열을 나타낸다. CDR 1(서열 번호 10), 2(서열 번호 11) 및 3(서열 번호 12)에서 아미노산 잔기의 서열을 또한 나타낸다(하단).

도 16a는 모노클로날 항체 KFCC-GY5의 V_H 도메인의 뉴클레오타이드 유전자(상단)(서열 번호 13) 및 유추된 아미노산(중간)(서열 번호 14) 서열을 나타낸다. CDR 1(서열 번호 15), 2(서열 번호 16) 및 3(서열 번호 17)에서 아미노산 잔기의 서열을 또한 나타낸다(하단).

도 16b는 모노클로날 항체 KFCC-GY5의 V_L 도메인의 뉴클레오타이드 유전자(상단)(서열 번호 18) 및 유추된 아미노산(중간)(서열 번호 19) 서열을 나타낸다. CDR 1(서열 번호 20), 2(서열 번호 21) 및 3(서열 번호 22)에서

아미노산 잔기의 서열을 또한 나타낸다(하단).

도 17은 ELISA에 의해 측정된 것으로서, 각종 항체 농도에서 재조합체 PLVAP 단백질에 대한 KFCC-GY4(흰색 원) 및 KFCC-GY5(검은색 원) 모노클로날 항체의 결합을 묘사하는 그래프이다.

도 18은, KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 모노클로날 항체가 5 ng의 재조합체 PLVAP 단백질을 검출할 수 있음을 나타내는 면역블롯이다. 레인 1: 분자량 표준; 레인 2: KFCC-GY4 모노클로날 항체를 사용한 면역블롯; 레인 3: KFCC-GY5 모노클로날 항체를 사용한 면역블롯. 재조합체 PLVAP 단백질의 분자량은 45kD이다.

도 19a 및 19c는 코마지에(Coomassie) 블루-염색된 SDS 아크릴아미드 겔이다. 레인 1: 분자량 표준; 레인 2: 추출 전 72시간 동안 VEGF(40 ng/ml)로 자극시킨 사람 혈관 내피 세포로부터의 TX-114로 추출한 소수성 막 단백질.

도 19b는, 도 19a의 레인 2에 나타낸 추출물이 KFCC-GY4 모노클로날 항체로 프로브된 면역블롯이다. 레인 1: 분자량 표준; 레인 2: 추출 전 72시간 동안 VEGF(40 ng/ml)로 염색시킨 사람 혈관 내피 세포로부터의 TX-114로 추출한 소수성 막 단백질.

도 19d는, 도 19c의 레인 2에 나타낸 추출물이 KFCC-GY-5 모노클로날 항체로 프로브된 면역블롯이다. 레인 1: 분자량 표준; 레인 2: 추출 전 72시간 동안 VEGF(40 ng/ml)로 염색시킨 사람 혈관 내피 세포로부터의 TX-114로 추출한 소수성 막 단백질.

도 20a는 대조군 정상 마우스 IgG를 사용한 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)의 면역형광성 염색을 묘사하는 형광 현미경사진이다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다. 확대 = 600x.

도 20b는 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor: VWF)에 대해 모노클로날 항체를 사용한 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)의 면역형광성 염색을 묘사하는 형광 현미경사진이다. VWF는 사람 혈관 내피 세포에 대한 양성 마커이다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다. 확대 = 600x.

도 20c는 PLVAP에 대한 KFCC-GY4 모노클로날 항체를 사용한 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)의 면역형광성 염색을 묘사하는 형광 현미경사진이다. KFCC-GY4 모노클로날 항-PLVAP 항체는 사람 혈관 내피 세포와 양성적으로 반응하였다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다. 확대 = 600x.

도 20d는 PLVAP에 대한 KFCC-GY5 모노클로날 항체를 사용한 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)의 면역형광성 염색을 묘사하는 형광 현미경사진이다. KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체는 사람 혈관 내피 세포와 양성적으로 반응하였다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다. 확대 = 600x.

도 21a는 KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체로 염색한, 파라핀 블록 속에 함몰된 포르말린-고정된 간 조직의 단면의 광학 현미경사진이다. 강력한 PLVAP 시그널(암회색 염색)이 간암의 혈관 내피 세포에서 검출되었다. 확대는 100X이다.

도 21b는 KFCC-GY4 모노클로날 항-PLVAP 항체로 염색한, 도 21a에 나타낸 시료와 동일한 환자로부터의 포르말린-고정된 간암 조직의 단면의 광학 현미경사진이다. 중간의 PLVAP 시그널(담회색 염색)이 간암의 혈관 내피 세포에서 검출되었다. 확대는 100X이다.

도 21c는 KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체로 염색한, 도 21a 및 21b에 나타낸 시료와 상이한 환자로부터의 포르말린-고정된 간 조직의 단면의 광학 현미경사진이다. 강력한 PLVAP 시그널(암회색 염색)이 혈관 내피 세포에서 검출되었다. 확대는 100X이다.

도 21d는 KFCC-GY4 모노클로날 항-PLVAP 항체로 염색한, 파라핀 블록 속에 함몰시킨 도 21c에 나타낸 시료와 동일한 환자로부터의 포르말린-고정된 간암 조직의 단면의 광학 현미경사진이다. 중간의 PLVAP 시그널(담회색 염색)이 혈관 내피 세포에서 검출되었고, 이는, KFCC-GY4 모노클로날 항체가 KFCC-GY5 항체보다 PLVAP 항원에 거의 잘 결합하지 않음을 나타낸다. 확대는 100X이다.

도 22a 내지 22h는 4명의 상이한 무작위적으로 선택된 간암 환자로부터 간암 조직의 단면(도 22a, 22c, 22e, 및 22g) 및 근접한 비-종양 간 조직(도 22b, 22d, 22f, 및 22h)의 단면의 광학 현미경사진이다. 단면은 KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체로 염색하였다. PLVAP 시그널(회색 염색)이 간암 조직의 혈관 내피 세포에서 검출되었으나, 혈관 내피 세포 비-종양 간 조직에서 검출되지 않았다. 확대는 100X이다. 도 22a와 22b, 22c와 22d, 22e와 22f, 및 22g와 22h는 한 쌍의 간암 및 비-종양성 간 조직의 4개 세트를 나타낸다.

도 23a는 대조군 마우스 IgG로 염색된 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)를 묘사하는 형광 현미경사진이다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다.

도 23b는 PLVAP에 대한 KFCC-GY4 모노클로날 항체로 염색한 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)를 묘사하는 형광 현미경사진이다. KFCC-GY4 모노클로날 항-PLVAP 항체는 사람 혈관 내피 세포의 표면과 양성적으로 반응하였다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다.

도 23c는 PLVAP에 대한 KFCC-GY5 모노클로날 항체로 염색한 사람 혈관 내피 세포(HUVEC)를 묘사하는 형광 현미경사진이다. KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체는 사람 혈관 내피 세포의 표면과 양성적으로 반응하였다. 핵은 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다.

도 24는 사람 PLVAP 단백질[진뱅크(Genbank) 수탁번호 제NP_112600호; 서열 번호 23)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 25a 및 25b는 완전한 길이의 사람 PLVAP cDNA(진뱅크 수탁 번호 제NM_031310호; 서열 번호 24)의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0152] 이제 본 발명을 다음 실시예로 예시할 것이며, 이들 실시예는 어떠한 방식으로도 제한되는 것으로 의도되어서는 안된다.

[0153] 실시예 1: 비-HCC 간 조직에 비하여 HCC 간 조직에서 상승되어 있는 PLVAP 발현

[0154] 물질 및 방법:

[0155] 조직 시료

[0156] HCC 및 근접한 비-종양 간을 치료 목적을 위해 사람 환자로부터 와과적으로 제거한 신선한 표본으로부터 수집하였다. 이들 표본은 집도 병리의사의 직접적인 감독하에 수집하였다. 수집된 조직을 즉시 쿠 파운데이션 선 야트-센 센터[the Koo Foundation Sun Yat-Sen Cancer Center(KF-SYSCC)]의 종양 은행에서 액체 질소 속에 즉시 보관하였다. 18명의 HCC 환자로부터의 한 쌍의 조직 시료를 본 연구에 이용하였다. 본 연구는 기관(the Institutional Review Board)에 의해 승인되었고 서면으로 통지된 승락을 모든 환자로부터 입수하였다. 본 연구로부터의 18명의 HCC 환자의 임상 특성은 표 1에 요약한다.

[0157] [표 1]

한 쌍의 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직 시료를 입수한 18명의 HCC 환자에

대한 임상 데이터

번호	성별	연령	HBsAg	HBsAb	HCV IgG	TNM 단계	AFP(ng/ml)	구별
1	M	70	+		-	2	2	보통
2	M	75	-	+	+	4A	5	양호
3	M	59	+		-	4A	1232	보통
4	F	53	+		+	1	261	보통
5	M	45	+		-	2	103	보통
6	M	57	+	+	-	2	5	보통
7	M	53	+	+	-	3A	19647	보통
8	M	54	-	-	+	3A	7	보통
9	M	44	+		-	4A	306	보통
10	M	76	-	-	+	3A	371	보통
11	F	62	+	-	-	3A	302	보통
12	F	73	-	-	+	2	42	보통
13	M	46	+		-	4A	563	보통
14	M	45	-		-	3A	64435	보통
15	M	41	+		-	2	33.9	양호
16	M	44	+	+	-	2	350	보통
17	M	67	+		-	3A	51073	보통
18	M	34	+		-	4A	2331	보통

[0158]

[0160] mRNA 전사 프로파일링

[0161]

전체 RNA를 트리졸 시약[제조원: 인비트로겐(Invitrogen), 미국 캘리포니아 칼스바드 소재]을 사용하여 액체 질소 속에서 동결된 조직으로부터 분리하였다. 분리된 RNA를 RNAeasy 미니 키트[제조원: 쿼아젠(Qiagen), 미국 캘리포니아 발렌시아가 소재]를 사용하여 추가로 정제하고, 이의 양을 RNA 6000 나노 검정(Nano assay)을 사용

하여 아질런트 2100 생분석기[제조원: 아질런트 테크놀로지즈(Agilent Technologies), 독일 발트브론 소재] 속에서 평가하였다. 연구에 사용된 모든 RNA 시료는 $5.7(8.2 \pm 1.0$, 평균 \pm SD)보다 큰 RNA 통합 수(integrity number: RIN)를 가졌다. 하이브리드화 표적은 $8\mu\text{g}$ 의 총 RNA로부터 아피메트릭스(Affymetrix) 프로토콜에 따라 제조하고 대략 13,000개의 사람 유전자에 대한 22,238개의 프로브-세트를 함유하는 아피메트릭스(Affymetrix) U133A 유전자칩에 하이브리드화시켰다. 하이브리드화 직후, 하이브리드화된 배열을 자동화된 세척 및 아피메트릭스 유전자칩 응용유체역학 고정 400(Affymetrix GeneChip fluidics station 400) 및 EukGE WS2v4 프로토콜을 사용한 염색에 적용시켰다. 이후에, U133A 유전자칩을 아피메트릭스 유전자배열 스캐너(Affymetrix GeneArray scanner) 2500 속에서 스캐닝하였다.

[0162] 미세배열 데이터의 존재 및 부재 신호(call)의 측정

아피메트릭스 미세배열 분석 슈트(Affymetrix Microarray Analysis Suite: MAS) 5.0 소프트웨어를 사용하여 모든 18쌍의 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직에 대한 미세배열 데이터에 대한 존재 신호를 생성시켰다. 존재 신호 측정을 위한 모든 매개변수는 디폴트 값이었다. 각각의 프로브-세트를 MAS 5.0에 의해 "존재", "부재" 또는 "근소(marginal)"로 측정하였다. 유사하게, 동일한 미세배열 데이터를 dChip 버전-2004 소프트웨어를 사용하여 처리함으로써 미세배열상의 각각의 프로브-세트에 대한 "존재", "부재" 또는 "근소" 상태를 측정하였다.

[0164] 극도의 차등적 발현을 갖는 프로브-세트의 동정

HCC와 근접한 비-종양 간 조직간의 극도의 차등적 발현을 갖는 유전자를 동정하기 위해, 실제 추출 및 보고 언어[Practical Extraction and Report Language(PERL)]를 사용하여 기록된 소프트웨어를 다음 규칙에 따라 사용하였다: "종양-특이적인 유전자"를 MAS 5.0 및 dChip 둘다에 의해 HCC에서 "존재" 및 근접한 비-종양 간 조직에서 "부재" 또는 "근소"로 신호된 프로브-세트로서 정의하였다. "비-종양 간 조직-특이적인 유전자"는 MAS 5.0 및 dChip 둘다에 의해 HCC에서 '부재' 또는 '근소' 및 한 쌍의 근접한 비-종양 간 조직에서 '존재'로 신호된 프로브-세트로서 정의하였다. 확인 알고리즘을 묘사하는 흐름도를 도 1에 나타낸다.

[0166] 실시간 정량적 역-전사효소 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)

TaqManTM 실시간 정량적 역전사효소-PCR(qRT-PCR)을 사용하여 mRNA를 정량하였다. cDNA를 $8\mu\text{g}$ 의 총 RNA로부터 각각의 시료에 대해 1500 ng의 올리고(dT) 프라이머 및 600 단위의 SuperScriptTM II 역전사효소(제조원: 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 $60\mu\text{l}$ 의 최종 용적에서 제조업자의 지시에 따라 합성하였다. 각각의 RT-PCR 반응을 위해, $0.5\mu\text{l}$ 의 cDNA를 $25\mu\text{l}$ 의 최종 용적으로 제조업자[에이비아이(ABI) 및 로슈(Roche)]의 지시에 따라 주형으로 사용하였다. PCR 반응을 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems) 7900HT 실시간 PCR 시스템을 사용하여 수행하였다. 실험에 요구된 프로브 및 시약은 어플라이드 바이오시스템스[Applied Biosystems(ABI), 미국 캘리포니아 포스터 시티 소재]로부터 입수하였다. PLVAP의 실시간 적량적 RT-PCR에 사용된 프라이머와 프로브의 서열은 5'-CCTGCAGGCATCCCTGTA-3'(전방 프라이머)(서열 번호 25); 5'-CGGGCCATCCCTTGGT-3'(역 프라이머)(서열 번호 26); 및 5'-CCCCATCCAGTGGCTG-3'(프로브)(서열 번호 27)이다. 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 살림 유전자(housekeeping gene)를 정상화용의 내인성 참조물질로서 사용하였다. 모든 시료를 동일한 PCR 플레이트 상에서 동일한 표적 mRNA 및 내인성 참조물질 HPRT mRNA에 대해 2회 수행하였다. 표적 mRNA의 상대적인 양은 비교 Ct 방법에 의해 제조업자의 지시(User Bulletin #2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System)에 따라 계산하였다. 비-종양 간 시료를 계산을 위한 비교 교정기로 선택하였다.

결과:

18개 쌍의 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직의 PLVAP 유전자 발현 강도를 도 2에 나타낸다. 평균 유전자 발현 강도는 쌍을 이룬 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직에 대해 각각 759.8 ± 436.5 및 170.6 ± 53.4 (평균 \pm SD)이었다. 2개 그룹간의 쌍을 이룬 t-시험의 p 값은 2.8×10^{-5} 이었다. 당해 결과는, PLVAP가 HCC에서 발현되고 비-종양 간 조직에서는 발현되지 않음을 나타낸다. HCC에서 PLVAP의 상승된 발현은, 82개의 쌍을 이루지 않은 HCC 시료가 810.4 ± 482.0 (평균 \pm SD)의 평균 발현 강도를 나타내었을 때 확인되었으며, 당해 발현 강도는 18 쌍의 HCC 시료로부터의 발견과 필수적으로 동일하였다(t-시험에 의한 p=0.62)(도 2).

PLVAP가 HCC 간 조직에서 현저히 발현되고 비-종양 간 조직에서는 발현되지 않음을 확인하기 위하여, 실시간 적량적 RT-PCR을 18 쌍의 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직으로부터의 RNA 시료에서 수행하였다. PLVAP mRNA의 양은 비-종양 간 조직보다 HCC에서 현저히 보다 높았다(참조: 도 3a 및 표 2). 비록 당해 결과가 2개 그룹사이에

일부 중첩을 나타내었다 하더라도, PLVAP 전사체는 하나를 제외하고 시험한 모든 개인에 대해 동일한 개인에서 근접한 비-종양 간 조직보다 HCC에서 보다 높았다(도 3b). 이러한 예외는 조직의 저장 과정 동안 RNA 분해의 균일하지 않은 정도에 연관된 것으로 여겨진다.

[0171] [표 2]

18개 쌍의 HCC 및 근접한 비-종양 간 조직에 대한 PLVAP 유전자 발현 강도

시료 번호	발현 강도*	
	HCC	근접한 비-종양 간 조직
1	1757	195
2	1329	210
3	1148	168
4	1130	211
5	1096	213
6	1068	181
7	932	101
8	804	60
9	630	155
10	612	175
11	607	125
12	519	146
13	478	300
14	422	180
15	275	105
16	251	204
17	251	155
18	186	184

[0172]

[0174] 실시예 2: HCC 혈관 내피세포에 의해 특이적으로 발현되는 PLVAP

[0175] 물질 및 방법:

[0176] 포르말린-고정된 파라핀 함몰 조직의 레이저 포획된 미세해부(LCM)

[0177] 파라핀 블록으로부터의 포르말린 고정된 조직의 LCM을 Arcturus PixCell^R IIe 시스템, CapSureTM HS LCM 캡스 (caps), 및 ParadiseTM 시약 시스템[제조원: 아크투러스 바이오사이언스, 인코포레이티드(Arcturus Bioscience, Inc.), 미국 캘리포니아 마운틴 뷰 소재]를 사용하여 수행하였다. 7マイ크로미터 두께의 조직 단면을 제조업자의 지시에 따라 절단하고, 탈파라핀처리하고, 탈수하고, LCM에 대해 제조업자의 지시에 따라 탈수하였다. 표적 세포를 CapSureTM HS LCM 캡스 상에 7.5 μm 레이저 스폿 크기를 사용하여 50 mW 동력 및 1.3 ms 경과시간을 사용하여 포획하였다. 대략, 5000 내지 6000개의 세포가 각각의 캡 상에 포획되었다. 그러나, 단지 1000 내지 2000개의 간세포 암종 혈관 내피 세포 만이 불충분한 세포로 인해 각각의 캡 상에 포획되었다.

[0179] *정량적 RT-PCR을 위한 LCM 조직 단면으로부터의 RNA 추출

[0180] 위에서 기술한 바와 같이 CapSureTM HS LCM 캡 위로 포획된 세포를 RNA 추출, cDNA 합성, 시험관내 전사 및 안티센스 RNA 증폭을 위해 ParadiseTM 시약 시스템을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 가공하였다. 이후에, 합성된 안티-센스 RNA를 LCM으로 포획된 세포 속에서 PLVAP 및 베타-액틴 mRNA의 적량을 위해 2-단계 TaqMan 실시간 적량적 RT-PCR을 위한 주형으로서 사용하였다. 제1 단계(즉, 역전사)는 4.5 μl 의 항-센스 RNA 및 TaqMan 역전사 시약(ABI)을 사용하여 10 μl 의 최종 용적으로 제조업자의 프로토콜에 따라 수행하였다. 제2 단계(즉, 실시간 PCR)을 2.4 μl 의 cDNA 주형, 프라이머/프로브 혼합물 및 태크만 유니버설 PCR 마스터 믹스(TaqMan universal PCR Master Mix)[제조원: 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)]를 사용하여 25 μl 의 최종 용적으로 수행하였다. 실시간 PCR을 스마트 사이클러(Smart Cycler) II[제조원: 케피드, 인코포레이티드(Cepheid, Inc.), 미국 캘리포니아 서니베일 소재] 속에서 수행하였다. 반응물을 초기에 50°C에서 1분 동안 및 이후에 95°C에서 10분 동안 배양하였다. 이후에, 95°C에서 15초 동안 45회의 변성 주기 및 60°C에서 40초 동안 어닐링/연장을 수행하였다. 프라이머 및 프로브의 서열을 표 3에 나열한다.

[0181]

[표 3]

레이저-포획된 미세해부에 의해 제조된 시료에서 PLVAP 및 베타-액틴 수준에

대한 실시간 정량적 RT-PCR용 프라이머 및 프로브 서열

	PLVAP 유전자	베타-액틴 유전자
전방 프라이머	5'-CCTTGAGCGTGAGTGTTC-3' (서열번호 28)	5'-GTCCTCCAACTTGAGATGTATGAAG-3' (서열번호 29)
역 프라이머	5'-GGCAGGGCTGGAGTTG-3' (서열번호 30)	5'-GTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (서열번호 31)
태크만 프로브	5'-CTCCAGGGAGACCAA-3' (서열번호 32)	5'-AAGGAGTGGCTCCCTCC-3' (서열번호 33)

[0182]

[0184] 재조합체 융합 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질에 대한 발현 벡터의 제조

플라스미드 pGEM® T Easy-PLVAP₅₁₋₄₄₂는 PLVAP의 51 내지 442번 아미노산 잔기를 암호화하는 PCR 단편을 pGEM® T 이지 벡터(Easy Vector)[제조원: 프로메가 인코포레이티드(Promega, Inc.), 미국 위스콘신 메디슨 소재]내로 삽입시켜 생성시켰다. PCR 단편을 오리젠(Or iGene, 미국 메릴랜드 록크빌 소재)으로부터의 PLVAP의 cDNA 클론으로부터 5'-_CATATGAACGTGCACGTGAGCACAGAGTCC-3'(서열 번호 34) 및 5'-_GGATCCTGAGCATATCCCTGCATCCTCC-3'(서열 번호 35)의 프라이머 세트를 사용함으로써 증폭시켰다. 플라스미드 pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂를 삭제하기 위해, PLVAP의 51 내지 442번 아미노산 잔기와 각각의 말단에 NdeI 및 BamHI 인식 서열을 암호화하는 cDNA 단편을 pGEM® -T Easy -PLVAP₅₁₋₄₄₂로부터 절개하여 pET-15b[제조원: 노바젠 인코포레이티드(Novagen, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재]내로 삽입하였다. 위에서 기술한 발현 삭제물을 DNA 서열분석으로 입증하였다.

[0186]

재조합체 융합 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질의 발현 및 정제

재조합체 His-태그된 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질(서열 번호 2)(도 4)을 생산하기 위해, 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli)[Rosetta-gami2(DE3)pLysS](제조원:노바젠)을 면역적격 세포를 pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂ 플라스미드 DNA와 함께 빙상에서 5분 동안 배양한 후, 42°C 수욕 속에서 30초 동안 배양한 후 다시 빙상에서 2분 동안 배양하여 형질전환시켰다. 선택적 배지에 플레이팅하기 전에, 형질전환체를 250 rpm에서 SOC 배지(0.5% 효모 추출물; 2% 트립톤; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM 글루코즈)와 함께 60분 동안 진탕시키면서 37°C에서 배양하였다. Rosetta-gami2(DE3)pLysS 에스케리키아 콜라이 속에서 His-태그된 융합 단백질의 발현을 1 mM 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드를 사용하여 16시간 동안 30°C에서 유도시켰다. 유도 후, 세균 세포를 8M 우레아가 보충된 평형 완충액(50 mM 나트륨 포스페이트, 300 mM NaCl, pH 7) 속에서 초음파처리하여 분해하고 5,600 x g에서 30분 동안 원심분리함으로써 가용성 및 불용성 분획으로 하였다. His-PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질의 추가 정제를 위해, 가용성 분획을 TALON® 금속 친화성 수지[제조원: 클론테크 인코포레이티드(Clontech, Inc.), 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재]에 부하하고, 평형 완충액으로 세척하며 용출 완충액(50 mM 나트륨 포스페이트, 300 mM NaCl, pH 7, 250 mM 이미다졸)으로 용출시켰다. 정제된 융합 단백질의 His-태그를 트롭빈 분해(제조원: 노바젠)에 의해 제조업자의 지시에 따라 제거하였다(참조: 도 5). 수득되는 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질을 PBS에 대해 연장 투석으로 회수하였다. 재조합체 PLVAP 단백질의 실체를 입증하기 위해, GST-PLVAP₃₃₁₋₄₃₀ 융합 단백질에 대한 소량의 마우스 항혈청을 바이오디자인 인스티튜트(Biodesign Institute: 미국 아리조나 텁프 소재)로부터 입수하였다. His-태그가 없는 재조합체 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질을 당해 항체를 사용하여 웨스턴 블로트 분석으로 검출하였으나, His-태그에 대한 항체와 반응하지 않았다. 당해 결과는 재조합체 PLVAP 단백질의 실체를 입증한다.

[0188]

마우스 항-인간 PLVAP 혈청의 생성

PBS중 정제된 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 재조합체 단백질을 사용하여 6주령의 Balb/cByj 마우스를 면역화시켰다. 각각의 마우스를 초기에 다수 부위에서 완전 프루언드 항원보강제[complete Freund's adjuvant: 제조원: 시그마 인코포레이티드(Sigma, Inc.), 미국 미주리 세인트 루이스 소재]중 총 14μg의 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질을 다수 부위에 피하 주사하여 면역화시켰다. 이후에, 면역화를 불완전 프루언드 항원보강제 중 7μg의 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 재조합체 단백질로 매

2주마다 1회씩 3회 동안 추가접종하였다. 마지막 추가접종 면역화 후 1주째에, 마우스를 항혈청의 제조를 위해 방혈시켰다.

[0190] 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA)

[0191] 시약 및 용액:

[0192] 1. 재조합체 PLVAP 단백질

[0193] 2. 항-마우스 IgG-알칼린 포스파타제 접합체[제품 번호: AP124A, 제조원: 케미콘(CHEMICON)]

[0194] 3. 피복 완충액(0.137 M 염화나트륨, 0.01 M 인산나트륨 이염기성 헵타하이드레이트, 2 mM 인산칼륨 일염기성, 0.002%(0.3 mM) 나트륨 아지드, pH 7.2-7.4)

[0195] 4. 세척 완충액(0.137 M 염화나트륨, 0.01 M 인산나트륨 이염기성 헵타하이드레이트, 2 mM 인산칼륨 일염기성, 0.2% 트윈20[제품 번호 P1379, 제조원: 시그마(SIGMA), pH 7.2-7.4]

[0196] 5. 차단 완충액[0.137 M 염화나트륨, 0.01 M 인산나트륨 이염기성 헵타하이드레이트, 2 mM 인산칼륨 일염기성, 2% 소 혈청 알부민[제품 번호: 82-045, 제조원: 펜텍스(PENTEX)], 0.05% 트윈20(제품 번호: P1379, 제조원: 시그마), pH 7.2-7.4]

[0197] 6. 카보네이트 완충액(0.016 M 중탄산나트륨, 0.014 M 탄산나트륨,

[0198] 2 mM 염화마그네슘, 0.002%(0.3 mM) 나트륨 아지드, pH 9.6)

[0199] 7. 알칼린 포스파타제 기질: 40ml의 카보네이트 완충액 속에 용해된 하나의 40mg 포스파타제 기질 정제(제품 번호: P5994, 제조원: 시그마)

[0200] 과정:

[0201] 항-PLVAP 혈청 중 항체의 역ガ를 ELISA를 사용하여 측정하였다. 첫째로, 96 웰 ELISA 플레이트를 0.002 % 나트륨 아지드를 함유하는 포스페이트 완충된 염수(PBS)(즉, 피복 완충액)에 2.5 μ g/ml 범위의 농도로 용해된 50 μ l의 PLVAP 단백질로 4°C에서 밤새 피복시켰다. 200 μ l의 세척 완충액(0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS)로 3회 세척한 후, 피복된 플레이트의 각각의 웰을 150 μ l의 차단 완충액(즉, 2% 소 혈청 알부민을 함유하는 세척 완충액)으로 실온에서 30분 동안 차단하였다. 추가의 3회 세척 후, 각각의 웰을 회석 완충액 속에 제조된 50 μ l의 회석된 항 혈청(1,000x 내지 128,000x로 일련 2배 회석)과 함께 45분 동안 실온에서 배양하였다. 이후에, 각각의 웰을 항 마우스 IgG 알칼린 포스파타제 접합체와 함께 5,000X 회석[제조원: 케미코, 인코포레이티드(Chemico, Inc.), 미국 캘리포니아주 테메큘라 소재]으로 30분 동안 실온에서 배양하였다. 3회 세척 후, 결합된 항체를 100 μ l의 알 칼린 포스파타제 기질(제조원: 시그마, 인코포레이티드, 미국 미주리 세인트 루이스 소재)로 적량화하고 흡광도 측정을 25 내지 40분의 배양 기간 후 405nm에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 수행하였다.

[0202] 포르말린-고정된 조직에서 PLVAP의 면역조직화학(IHC)적 검출

[0203] 6 마이크로미터의 단면을 포르말린-고정시킨 조직의 파라핀 블록으로부터 절단하였다. 단면을 슈퍼프로스트(SuperFrost) 및 부착 유리 슬라이드[제조원: 멘젤 글라서 게엠베하(Menzel Glaser GmbH), 독일 브라운슈바이크 소재] 위에 놓았다. 이후에, 단면을 헨크마크 XT 자동화 염색 장치(Benchmark XT automated staining instrument)[제조원: 벤타나 메디칼 시스템스 인코포레이티드(Ventana Medical Systems, Inc.), 미국 아리조나 툭손 소재] 속에서 XT-iView-DAB-V.1 프로토콜을 사용하여 온화한 CCI 조건화로 30분 동안 PLVAP의 면역염색을 진행하고 단면들을 400X 회석시킨 항-사람 PLVAP 혈청과 함께 37°C에서 36분 동안 배양하였다. 마우스 항-사람 PLVAP 항체의 결합을 검출하는데 사용된 제2의 항체 및 시약은 iView™ DAB 검출 키트(제조원: 벤타나 메디칼 시스템스 인코포레이티드, 미국 아리조나 툭손 소재)로부터 입수하였다. 모든 시약 및 완충액은 벤타나 메디칼 시스템스에서 시판되었다.

[0204] 결과:

[0205] HCC 시료에서 PLVAP의 세포 공급원을 측정하기 위하여, 내층 굴모양 내피 세포를 포함하는, HCC 혈관 내피 세포, 간세포 암종의 종양 세포 및 비-종양 간세포를 시료로부터 레이저 포획 미세해부[laser capture microdissection(LCM)]로 해부하였다. 간 세포와 모세-내층 내피 세포사이의 근접한 위치로 인하여, 해부동안 모세-내층 내피 세포가 혼입되지 않도록 하는 노력이 수반되었다. 해부된 세포로부터 추출한 RNA를 2-단계 실시간 적량적 RT-PCR을 사용하여 PLVAP mRNA의 상대적 양을 측정하였다. 2명의 상이한 환자로부터의 검사물을

연구하였다. 표 4에 및 도 6a 내지 6c에 나타낸 결과는, PLVAP가 HCC 혈관 내피 세포에 의해 발현된(도 6a) 반면, 검출가능한 PLVAP 전사체는 근접한 비-종양 간 조직에서 검출되지 않았음(도 6b)을 나타낸다.

[0206] [표 4]

레이저-포획된 미세해부에 의해 해부된 세포에서 테크만 실시간 적량적

RT-PCR에 의한 2개의 HCC 시료에서 PLVAP mRNA 상대적 양의 측정

HCC 시료	PLVAP mRNA의 상대적 양		
	HCC 내피 세포	근접한 비-종양 간 조직	HCC 종양 세포
A	1	0	0.002
B	1	0.001	0.057

[0207] [0209] PLVAP 발현의 조직 및 질병 특이성을 추가로 시험하기 위하여, 면역조직화학(IHC) 연구에 사용하기 위한 폴리를 로날 항체를 사람 PLVAP의 세포의 도메인(아미노산 51 내지 442)에 대해 생성시켰다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 항혈청을 고 역가의 항-PLVAP 항체를 함유한 재조합체 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 단백질로 면역화시킨 Balb/c 마우스로부터 입수하였다.

[0210] 이후에, 항-PLVAP 항혈청을 사용하여 간세포 암종을 가진 환자(n=7)(도 8a-8f 및 도 9a-9f), 촉점성 결절성 과증식을 가진 환자(n=4)(도 10a-10f), 간 혈관종을 가진 환자(n=2)(도 11a 및 11b), 만성 활성 B형 간염을 가진 환자(n=2)(도 12a 및 12b) 또는 만성 활성 C형 간염을 가진 환자(n=4)(도 13a 내지 13d), 및 전이 암을 가진 환자(n=4)(즉, 간내 담관암종, 전이성 결장직장 샘암종, 또는 전이성 난소 암종)(도 14a 내지 14d)로부터 조직 단면내 PLVAP 발현의 국제화를 측정하였다. 결과는, 간세포 암종의 모세 내피 세포만이 PLVAP 단백질을 발현하였음을 나타내었다(도 8a, 8c, 8e 및 도 9a, 9c, 9e, 9f). PLVAP 단백질은 경화성 간, 촉점성 결정성 과증식의 간(도 10a 내지 10f), 및 만성 간염의 간(도 12a 및 12b; 도 13a-13d)을 포함하는 비-종양 간 조직의 굴모양/모세 혈관 내충의 내피 세포에 의해 발현되지 않았다. 간 혈관종의 내피 내충 세포도 또한 PLVAP의 현저한 발현을 나타내지 않았다(도 11a 및 11b). 당해 결과는, PLVAP가 간세포 암종에 특이적인 혈관 내피 생마커이나, 간의 다른 질병에 대해서는 그렇지 않음을 입증한다. 따라서, PLVAP는 HCC용 진단 마커 및 치료학적 표적으로서 사용될 수 있다.

[0212] 실시예 3: PLVAP에 특이적으로 결합하는 마우스 모노클로날 항체의 생산 및 특성화

[0213] 물질 및 방법

[0215] *면역화 과정

[0216] 56주령의 암컷 Balb/cByJ 마우스를 0.125mL의 포스페이트 완충된 염수(PBS) 속에 용해시키고 동 용적의 완전 프로인드 항원보강제 속에 유화시킨 20 μ g의 정제된 재조합체 PLVAP 단백질로 초기에 면역화시켰다. PLVAP-항원보강제 혼합물을 견드랑 및 서해부 립프 근처의 마우스의 배쪽 측면상의 4개의 별개의 피하 부위 각각, 및 견갑사이에 위치한 5번째 피하 부위내로 0.05mL 용적을 주사하였다. 모든 마우스에게 20 μ g의 재조합체 PLVAP 단백질을 매 2주마다 3회씩 복강내 주사하여 추가접종 면역화하였다. 마지막 추가접종 면역화 후 첫째 주에, 시험 방혈을 수거하여 마우스가 충분한 고 역가의 항-PLVAP 항체(>10,000X)를 생산하였는지를 측정하였다. 고체-상 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA)을 당해 목적을 위해 사용하였다. 고 역가의 PLVAP 항체를 생산한 마우스를 하이브리도마 생산을 위해 선택하였다.

[0217] 쥐 모노클로날 항-PLVAP 항체의 개발

[0218] 하이브리도마를 생산하기 위한 계획된 융합 실험 3일 전에, 고 역가의 PLVAP 항체를 생산한 마우스에게 20 μ g의 재조합체 PLVAP를 정맥내 주사하였다. PLVAP에 대해 모노클로날 항체(MAb)를 생산하는 하이브리도마를 앞서 기술한 프로토콜(참조: Unit 2.5 Production of Monoclonal Antibodies, in Current Protocols in Immunology, editors: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, 및 Strober W. Published by John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001)에 따라 약간의 변형과 함께 생산하였다. 상세하게는, 면역화된 마우스로부터 수거한 비장 세포를 SP2/0 흑색종 세포와 7.5:1(비장 세포: 흑색종 세포)의 비로 50% 폴리에틸렌 글리콜 1540을 사용하여 융합시켰다. 융합 생성물을 96-웰 평편-바닥 조직 배양 플레이트내로 종균하고, 하이포크산틴-아미노프테린-티미딘(HAT) 선택 배지를 다음날에 가하였다. 7 내지 10일 후에, 성장-양성 웰의 상층액을 항-PLVAP 항체의 생산을 위해 ELISA로 스크리닝하였다. 초기에 항-PLVAP MAb를 생산하는 하이브리도마를 증식시키고 재-

크리닝하였다. 항체의 연속 생산을 나타낸 하이브리도마를 제한 회석 방법으로 클로닝하였다. MAb 동형을 ELISA를 사용하여 측정하였다. 모노클로날 항체를 단백질 G 친화성 컬럼 크로마토그래피(Unit 2.7 Purification and Fragmentation of Antibodies, in Current Protocols in Immunology, editors: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, and Strober W. Published by John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001)에 의해 복수 또는 배양 배지로부터 정제하였다.

- [0219] ELISA 검정
- [0220] ELISA 검정을 본원에 기술된 바와 같이 수행하였다(참조: 실시예 2)
- [0221] 결합 친화성의 측정
- [0222] KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 항-PLVAP 모노클로날 항체의 결합 친화성을 업체[에이엔티 테크놀로지 코포레이션 리미티드(ANT Technology Co., Ltd.), 타이완 타이페이 소재]에서 ANTO300 석영 결정 미세균형 기술[참조: Lin S., et al. J Immunol Methods 239:121-124(2000)]을 사용하여 측정하였다.
- [0223] 사람 제대 혈관 내피 세포(HUVEC)의 분리 및 배양
- [0224] HUVEC의 분리 및 배양은 문헌[참조: Baudin B, Brunee A, Bosselut N and Vaubourdonne M. Nature Protocols 2:481-485(2007)]에 기술된 확립되어 있는 프로토콜에 따라 수행하였다. 내피 세포 배양을 유지하는 동안, 포스페이트 완충된 염수 속에 용해시킨 1% 젤라틴[제조원: 디프코 코포레이션(DIFCO, Corp.)]을 사용하여 배양 플레이트 또는 커버슬립 피복용 콜라겐 용액을 교체하였다.
- [0225] 트리톤(Triton) X-114(TX-114) 함유 완충액에 의한 HUVEC의 소수성 막 단백질의 추출
- [0226] 50만개의 HUVEC를 10 cm의 배양 접시에 24시간 동안 종균배양하였다. 이후에, 세포를 사람 VEGF로 40 ng/ml에서 추가로 72시간 동안 자극하였다. 배양된 세포를 5 ml 포스페이트 완충된 염수(PBS)로 2회 세척하였다. 이후에, 세포를 2 mM EDTA를 함유하는 1 ml의 PBS와 함께 배양함으로써 접시로부터 탈착시키고 들어올려, 원심분리 투브에 두고, 300xg에서 5분 동안 원심분리하여 수집하였다. 원심분리에 의해 생산된 펠렛 속에 약 2백만 개의 세포가 존재하였다. 세포 펠렛을 5 mM EDTA 및 0.5%(v/v) 트리톤 X-114(TX-114)을 함유하는 200 μ l의 빙냉 0.05 M 트리스 완충액, pH 7.4 속에 재-현탁시켰다. 가용화된 세포 현탁액을 빙상에서 때때로 온화하게 와동시키면서 배양하였다. 이후에, 세포 현탁액을 10,000xg에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하여 불용성 세포 부스러기를 제거하였다. 상층액을 투명한 원심분리 투브로 이전시키고 37°C에서 5분 동안 배양하였다. 배양 동안 TX-114는 수성 상으로부터 분리되었다. 이후에, 원심분리 투브를 1000xg에서 10분 동안 실온에서 원심분리 함으로써, TX-114가 투브의 바닥에 원심분리되도록 하였다. 투브의 상단에서 수성 상을 제거하고 소수성 세포 단백질을 함유하는 TX-114 펠렛을 2x SDS 아크릴아미드 겔 시료 완충액 속에 50 μ l의 최종 용적으로 용해하였다. 15 μ l의 시료를 SDS 아크릴아미드 겔 전기영동에 사용하였다.
- [0227] SDS 아크릴아미드 겔 전기영동, 웨스턴 블롯 및 면역블로팅의 제조
- [0228] 과정들은 약간의 변형과 함께, 문헌[참조: Kao KJ, Scornik JC and McQueen CF. Human Immunol 27:285-297(1990)]에 이미 기술된 것과 동일하다. 웨스턴 블롯에서 항체 결합의 검출은 알칼린 포스파타제 화학발광성 기질 및 LAS-4000 발광성 영상 분석기[제조원: 후지필름 코포레이션(Fujifilm Corp.)]을 사용하여 수행하였다.
- [0229] 면역형광성 현미경
- [0230] 물질:
- [0231] 1) 제1 항체:
- [0232] a) 정상 마우스, IgG(제조원: 시그마 코포레이션, 제품 번호: I-5381)을 포스페이트 완충된 염수(PBS) 속에 1mg/mL로 스톡 용액으로서 용해시키고, 사용하기 전 PBS-0.5% BSA를 사용하여 5 μ g/mL의 농도로 회석하였다;
- [0233] b) 모노클로날 마우스 항-사람 혈-빌레블란트 인자(vWF)[제조원: 다코사이토메이션 코포레이션(DakoCytomation Corp.), 제품 번호: M0616]를 사용 전에 0.5% BSA를 함유하는 PBS를 사용하여 50x로 회석시켰다;
- [0234] c) 정제된 KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 항-PLVAP 모노클로날 항체를 사용 전에 0.5% BSA를 함유하는 PBS를 사용하여 5 μ g/mL로 회석시켰다;
- [0235] 2) 제2 항체: FITC-접합된 염소 F(ab')₂ 항-마우스 IgG(H&L)[제조원: 세로테크, 코포레이션(Serotec, Corp.),

제품 번호: Star105F];

[0236] 3) DAPI가 들어있는 벡타쉴드 마운팅 배지(VectaShield Mounting Medium)[제조원: 벡터 랩스 코포레이션(Vector Labs, Corp.), 제품 번호: H-1200];

[0237] 4) 100% 메탄올[제조원: 머크 코포레이션(Merck corp.) 제품 번호: 1.06009); 및

[0238] 5) 사용 전에 1x로 희석시킨 헹크스 균형 염 용액(HBSS)[제조원: 기브코 코포레이션(Gibco, Corp.), 제품 번호: 12065-056]

과정:

[0240] 면역형광성 연구용의 사람 제대 혈관 내피 세포를 제조하기 위해서, 5만개의 세포를 각각의 웰의 바닥에 위치한 1.5 cm²의 멸균된 등근 커버슬립이 들어있는 24-웰 배양 플레이트의 각각의 웰에 놓았다. 각각의 웰은 20% 태아소 혈청, 1% L-글루타민, 1% 항생제/항진균제 용액, 50µg/ml 해파린 및 75µg/ml 내피 세포 성장 보충물(제조원: 시그마 코포레이션, E0760)이 보충된 0.5ml의 M199 배양 배지를 함유하였다. 각각의 커버슬립은 0.04% 아세트산(v/v) 중 0.4mg/ml 송아지 피부 콜라겐(제조원: 시그마 코포레이션, c9791) 200µl으로 밤새 예비-피복하였다. 이후에, 커버슬립을 멸균된 1x 포스페이트 완충 염수(PBS)로 세척하고 후속적으로 사용을 위해 공기-건조시켰다. 세포를 밤새 배양한 후 40ng/ml 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 사용하여 추가로 72시간 동안 자극시켰다. 커버슬립상의 세포를 면역형광성 과정에 사용하였다.

[0241] 면역형광성 현미경을 위해 세포를 염색하기 위해, 각각의 웰내 커버슬립에서 성장한 세포를 0.5ml의 1 x HBSS로 세척하였다. 이후에, 세포를 고정시키고 0.5ml의 빙냉 메탄올 속에서 5분 동안 투과시켰다. 고정된 세포를 0.5ml의 1x PBS로 세척당 5분 동안 3회 세척하였다. 이후에, 고정된 세포를 0.5% BSA를 함유하는 0.5ml의 1 x PBS로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 고정된 세포를 함유하는 커버슬립을 제거하고 5µg/ml의 정상 IgG, KFCC-GY4 또는 KFCC-GY5 항-PLVAP 모노클로날 항체 또는 항-사람 vWF 모노클로날 항체의 50x 희석물을 함유하는 0.2ml의 희석된 제1 항체 용액의 상부에, 아래로 향하여 항체 용액과 접촉하는 고정 세포와 함께 두었다. 항체 용액을 뚜껑이 덮힌 작은 플라스틱 용기 속에 파라필름의 한 조각 위에 두었다. 내부 습도는 물로 습윤시킨 여과지의 작은 조각을 두어 유지시켰다.

[0242] 습윤화된 용기 속에서 37°C로 1시간 동안 배양한 후, 커버슬립을 제거하고, 커브슬립 상의 세포를 0.5ml의 PBS로 매번 5분 동안 3회 세척하였다. 이후에, 고정된 세포를 0.2 ml의 200x-희석된 FITC-접합된 염소 F(ab')₂ 항-마우스 IgG 제2 항체와 함께 50분 동안 37°C에서 제1 항체 용액과의 배양에 대해 기술한 바와 같이 배양하였다. 이후에, 세포를 위에서 기술한 바와 같이 PBS로 3회 세척하였다. 염색된 세포를 벡타쉴드 항-페이드 용액(VectaShield anti-fade solution)을 사용하여 유리 슬라이드 위에 두었다. 과량의 올려진 배지를 커버슬립의 가장자리로부터 제거하고 가장자리를 매니큐어 액으로 밀봉하였다. 염색된 세포를 형광 현미경을 사용하여 시험하였다.

결과

[0244] 재조합체 인간 PLVAP 단백질을 사용한 Balb/cByJ 마우스의 면역화는 사람 PLVAP 단백질을 인지하는 모노클로날 항체(MAb)를 생산하는 하이브리도마의 발달을 초래하였다. 2개의 하이브리도마를 추가의 연구를 위해 선택하였다. 당해 하이브리도마에 의해 생산된 항체를 KFCC-GY4 및 KFCC-GY5로 명명하였다. 모노클로날 항체 KFCC-GY4 및 KFCC-GY5의 V_H 및 V_L 도메인의 서열, 및 이들 도메인의 CDR을 도 15a 및 15b, 및 도16a 및 16b에 각각 나타낸다.

[0245] KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 모노클로날 항체 둘다는 ELISA(도 17) 및 면역블롯(도 18c 및 18d) 검정에서 재조합체 PLVAP 단백질에 결합하였다.

[0246] 이들 항체는 또한 면역블롯 검정에서 사람 제대 혈관 내피 세포로부터의 추출물에서 PLVAP 단백질과 특이적으로 반응하였다(도 19b 및 19d). 또한, 면역형광성 염색 실험은, PLVAP-발현 사람 혈관 내피 세포에 대한 KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 모노클로날 항체의 결합을 나타내었다(도 20c 및 20d).

[0247] 재조합체 PLVAP 단백질에 대한 모노클로날 항체의 결합 친화성(K_d)은 ANTO300 석영 결정 미세균형(참조: Lin, et al. J. Immunol. Methods 239:121-124, 2000)을 사용하여 KFCC-GY5 mAb의 경우 0.41×10^{-7} 및 KFCC-GY4 mAb의 경우 0.6×10^{-7} M인 것으로 측정되었다.

- [0248] KFCC-GY4 또는 KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체를 사용하여 2개의 상이한 간암 환자의 간으로부터의 간암 단면에서 수행한 면역조직화학 실험은, KFCC-GY5 모노클로날 항체가 KFCC-GY4 모노클로날 항체(도 21b 및 21d)보다 혈관 내피 세포에서 보다 강력한 시그널을 생산하였음(도 21a 및 21c)을 나타내었다.
- [0249] 동일한 환자의 간으로부터의 근접한 간암 및 비-종양 간 조직 단면에서 수행한 면역조직화학 실험을 KFCC-GY4 모노클로날 항-PLVAP 항체를 사용하여 4개의 상이한 무작위적으로 선택한 간암 환자로부터의 시료에서 수행하였다. PLVAP 발현은 간암 조직의 혈관 내피 세포에서 검출되었으나(도 22a, 22c, 22e, 및 22g), 근접한 비-종양 간 조직에서는 검출되지 않았다(도 22b, 22d, 22f, 및 22h).
- [0250] 실시예 4: 혈관 내피 세포의 표면에서 발현되는 PLVAP 단백질
- [0251] 물질 및 방법
- [0252] 면역형광성 현미경
- [0253] 시약:
- [0254] 다음 과정에 사용된 시약은 하기 변형과 함께 실시예 3에서 기술된 바와 같다:
- 0.1% 나트륨 아지드를 함유한 1x HBSS 세척 완충액, 이는 세포 표면에 결합한 항체의 세포내이입을 방지하는데 사용되었다.;
 - KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 모노클로날 항-PLVAP 항체를 0.1% 나트륨 아지드가 들어있는 1x HBSS 세척 완충액 속에 희석시켰다.
- [0255] 과정:
- [0256] 사람 제대 혈관 내피 세포(HUVEC)의 면역형광성 염색은 세포를 고정시키지 않고 메탄올로 투과시키지 않는 것을 제외하고는, 실시예 3에 기술된 바와 같이 수행하였다. 대신, 항-PLVAP 모노클로날 항체와의 배양 후, 세포를 세척하고 4% 과라포름알데하이드를 사용하여 실온에서 10분 동안 고정시켰다. 당해 배양 후, 세포를 3회 세척한 후, FITC-접합된 염소 F(ab')₂ 항-마우스 IgG와 함께 배양하였다. 3회 추가로 세척한 후, 세포를 실시예 3에 기술된 바와 같이 면역 형광 현미경을 위해 가공하였다.
- [0257] 결과
- [0258] 상기 기술된 시도를 사용하여, 세포 표면에서 발현된 PLVAP 단백질 만 검출할 수 있다. 당해 실험의 결과는, KFCC-GY4 및 KFCC-GY5 항-PLVAP 모노클로날 항체 둘다가 HCC 혈관 내피 세포의 표면에 결합하였으며(도 23b, 23c), 이는, PLVAP 단백질이 이를 세포의 표면에서 발현됨을 나타낸다. 이러한 발견은, 고 친화성으로 PLVAP에 특이적으로 결합하는 항체가 간세포 암종 종양의 혈관내로 주사할 때 HCC 혈관 내피 세포의 표면에 결합할 수 있을 것임을 제안한다.

출원인 또는 대리인의 파일 참조 번호	국제 출원 번호: 4261.1001002
기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질과 관련된 표시 (PCT/규칙 13bis)	
하기 이루어진 내용은 명세서 제34면, 제13, 17 및 20행에서 언급된 기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에 관한 것이다.	
기탁자의 확인 기탁 기관	추가의 기탁물을 추가의 지면에서 확인된다.
아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION)	
기탁 기관의 주소(우편 번호 및 국가 포함) 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 미국 버지니아 20110-2209 마나사스 유니버시티 불리바드 2001	
기탁물: 이용 불가	수탁 번호: 이용 불가
추가의 표시(적용되지 않는 경우 공란) 당해 정보는 추가의 지면에서 계속된다. 유럽 특허를 고려하는 지정국과 관련하여, 출원인은, 본 지면을 통해 출원인이 국제 기관에 대해, 유럽 특허의 승인이 발표될 때까지 또는 출원이 거절되거나 포기되거나 포기되는 것으로 여겨지는 날로부터 20년 동안, 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션에 수탁 번호 N/A로 기탁된 생물학적 물질이 요청자에 의해 임명된 독립된 숙련가(규칙 28(4) EPC)에 의한 요청에 의해서만 규칙 28(3) EPC에 제공된 바와 같이 이용 가능함을 요구한다는 것을 공지한다.	
표시된 지정국(표시가 모든 지정국에 대해 이루어지지 않는 경우)	
표시의 추가 제공(적용되지 않는 경우 공란) 하기 나열된 표시는 후에 국제 기관에 제출될 것이다(표시의 일반적인 특성, 예를 들면, "기탁 번호"를 명시)	
수령국만 사용 <input type="checkbox"/> 본 지면은 국제 출원과 함께 수령되었다.	국제 기관만 사용 <input type="checkbox"/> 본 지면은 국제 기관에 의해 수령되었다.
공식 사무관 공식 사무관	

PCT/R0/134 양식(1998년 7월; 2004년 1월 재인쇄)

기탈된 미생물 또는 다른 생물학적 물질과 관련된 표시(추가의 지면)

추가의 퓨시(계속)

본 PCT 출원에서 및 오스트레일리아 지정국과 관련하여, 및 오스트레일리아 특히 규칙의 규칙 3.25(3)에 따라, 출원인은 본 지면을 통해 수탁 번호 N/A하에 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션에 기탁된 생물학적 물질의 시료의 제공이 단지 특히 승인 전, 또는 출원의 정지, 거절 또는 포기 전에, 본 발명에 관심없는 숙달된 수취인이고 시료의 제공에 대한 요청에 있어 승인된 사람에게만 수행될 수 있음을 통지한다.

본 PCT 출원에서 카나다 지정국과 관련하여, 출원인은, 본 지면을 통해 국제 기관에게, 출원인이 카나다 특허가 출원을 기초로 하여되거나, 출원이 거절되거나, 포기되고 더 이상 회복되지 않거나, 취하될 때까지, 특허청장이 단지 수탁번호 N/A하에 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션에 기탁되고 본 출원에 언급된 생물학적 물질의 시료의 제공을 특허청장에 의해 승인된 별도의 전문가에게만 승인함을 요구한다는 사실을 통지한다.

수탁번호

기탁기판명 : The Am

구약번호 : PIA-9963

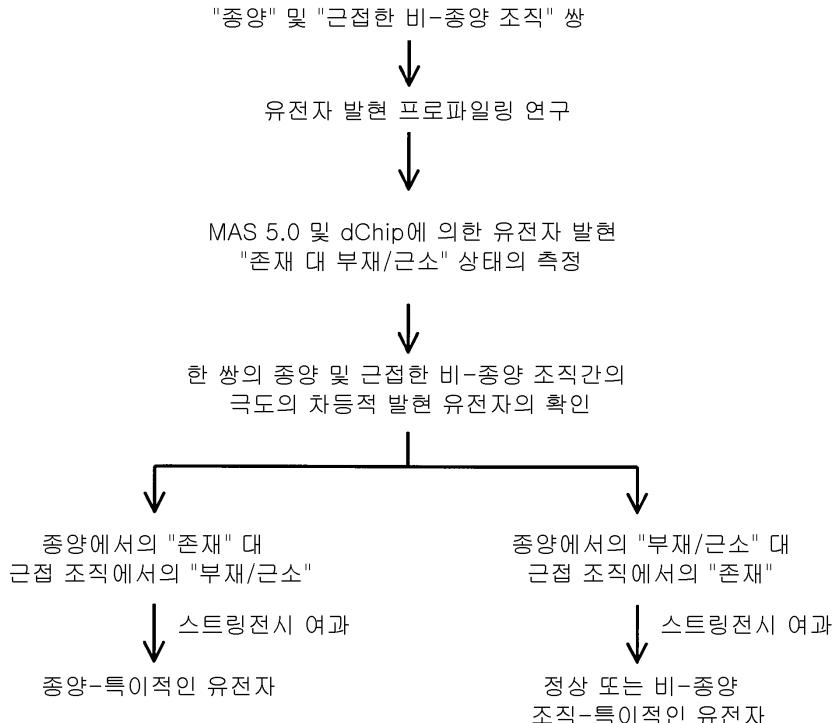
기극기군 8 · The Arm

1470 · FM 5504

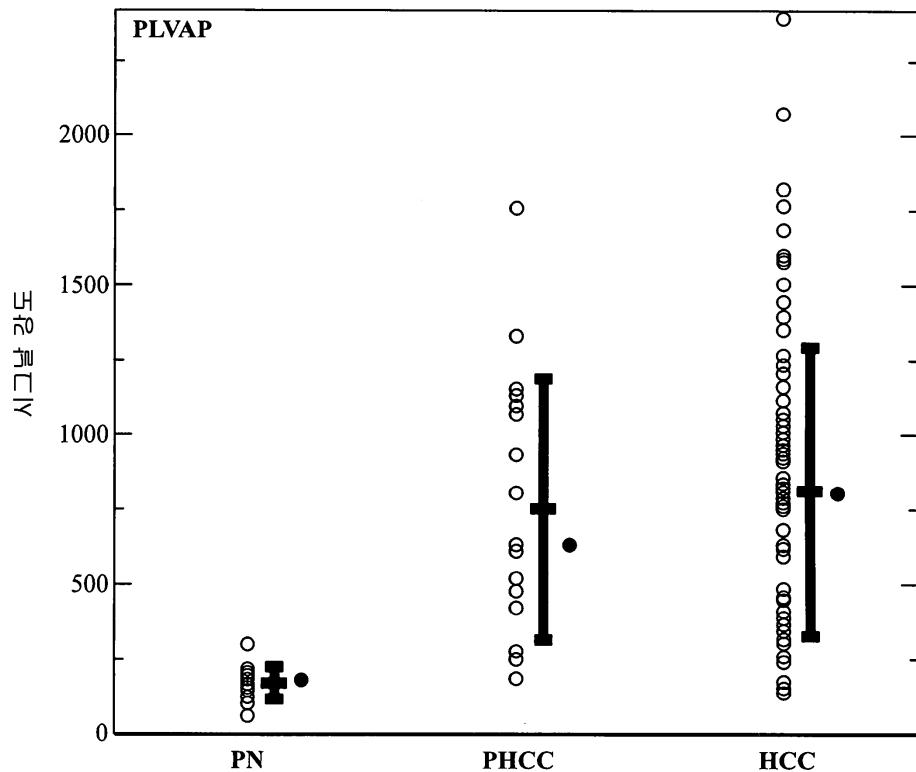
도면

도면1

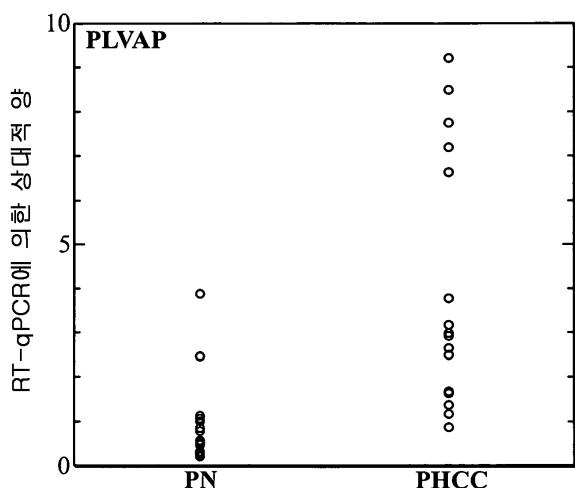
극도의 차등적 발현 유전자의 확인을 위한 알고리즘



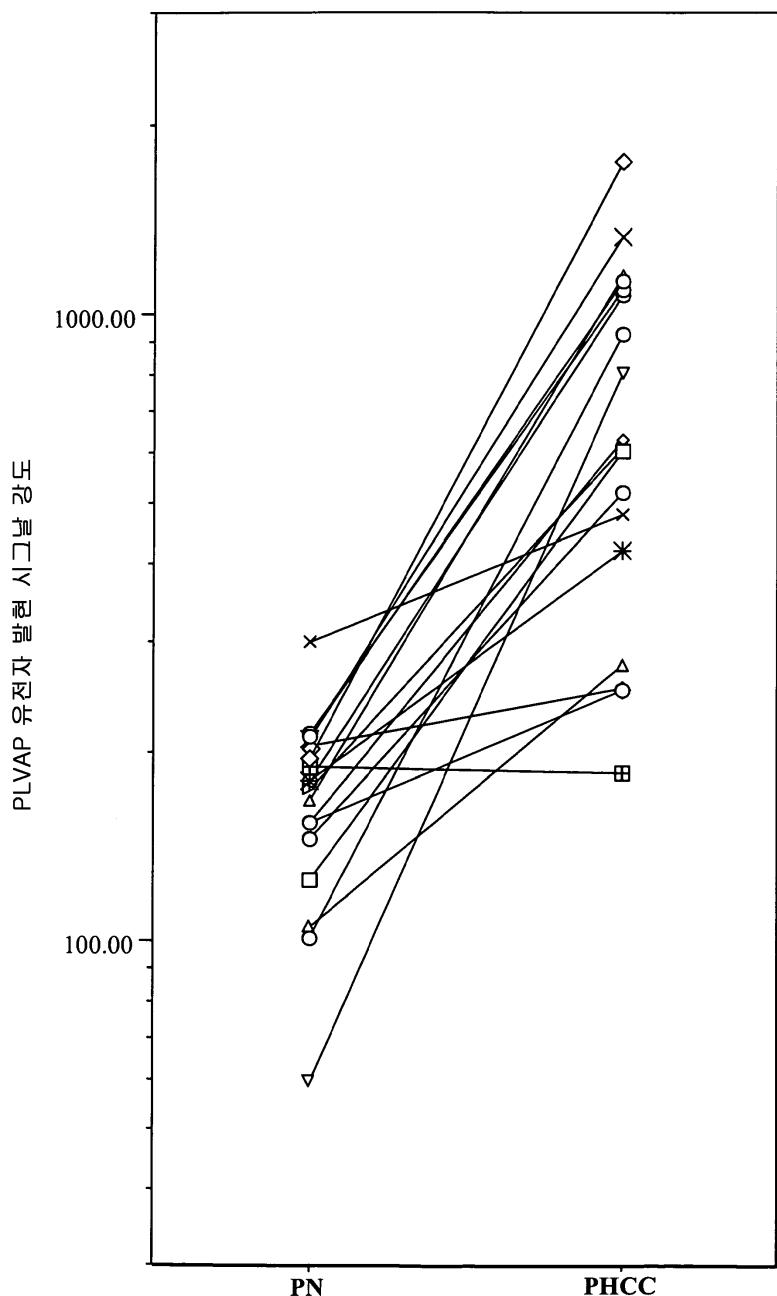
도면2



도면3a



도면3b



도면4a

```

1 atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctggtg
M G S S H H H H H H S S G L V
46 ccgcgcggcagccatatgaacgtgcacgtgaggcacagactcaac
P R G S H M N V H V S T E S N
91 ctgcaggccaccgagcgccgagccgagggcctatacagttagtc
L Q A T E R R A E G L Y S Q L
136 ctagggctcacggcctccctggatccaaacttgcaccaaggagctcaac
L G L T A S Q S N L T K E L N
181 ttcaccacccgcgccaaggatgccatcatgcagatgtggctgaat
F T T R A K D A I M Q M W L N
226 gctcgccgcgacacctggaccgcataatgccagctccggcagtgc
A R R D L D R I N A S F R Q C
271 cagggtaaccgggtcatctacacgaaatcagggatcatggct
Q G D R V I Y T N N Q R Y M A
316 gccatcatcttgagtgagaagcaatgcagagatcaattcaaggac
A I I L S E K Q C R D Q F K D
361 atgaacaagagactgcgatgccttgcattcatgcataatcagaag
M N K S C D A L L F M L N Q K
406 gtgaagacgctggaggatggatagccaaggagaagaccattgc
V K T L E V E I A K E K T I C
451 actaaggataagggaaagcgtgctgtaacaaaacgcgtggcggag
T K D K E S V L L N K R V A E
496 gaacagctggttgaatgcgtaaaaaccggagctgcagcaccaa
E Q L V E C V K T R E L Q H Q
541 gagcgcctggactggccaaaggagcaactgcaaaaagggtgcaagccctc
E R Q L A K E Q L Q K V Q A L
586 tgcctgcctggacaaggacaaggatggatggaccttcgttaac
C L P L D K D K F E M D L R N
631 ctgtggaggactccattatcccacgcagcctggacaacctgggt
L W R D S I I P R S L D N L G
676 tacaacctctaccatccccctggctcgaaattggccatccgc
Y N L Y H P L G S E L A S I R
721 agagcctgcgaccacatgcccagcctcatgagctcaagggtggag
R A C D H M P S L M S S K V E
766 gagctggcccgagcctccggcgatatcgaacgcgtggccgc
E L A R S L R A D I E R V A R
811 gagaactcagacacctcaacgccagaagctggaaagcccagcaggc
E N S D L Q R Q K L E A Q Q G
856 ctgcggccactcaggaggcgaaacagaaggatggagaaggaggct
L R A S Q E A K Q K V E K E A
901 caggcccggaggccaaggctcaagactgaaatgtccggcagacc
Q A R E A K L Q A E C S R Q T
946 cagctagcgctggaggagaaggcggtgcgcgaaggacgagac
Q L A L E E K A V L R K E R D

```

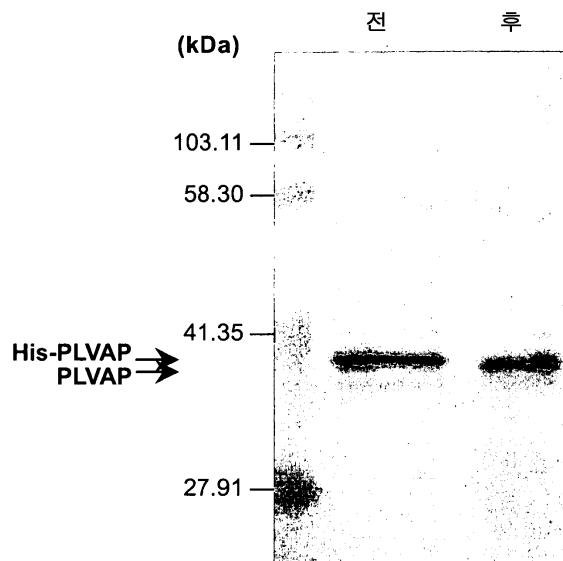
도면4b

```

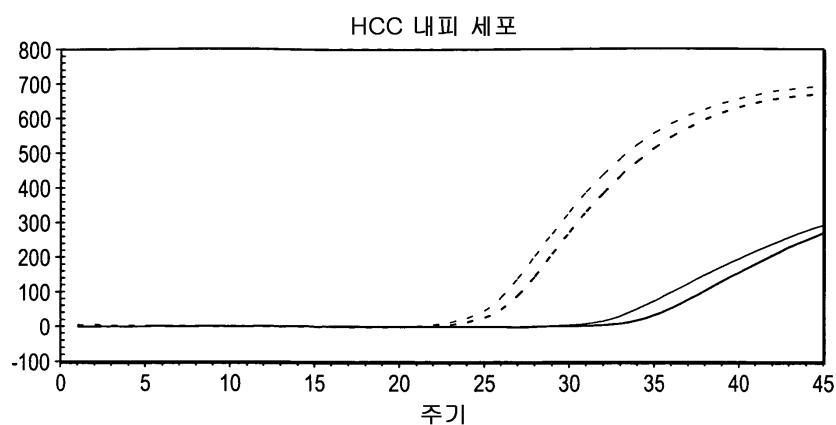
991 aacctggccaaggagactgaaagagaagaagaggaggaggcggaggcag
N L A K E L E E K K R E A E Q
1036 ctcaggatggactggccatcagaaaactcagccctggacacactgc
L R M E L A I R N S A L D T C
1081 atcaagaccaaggctcgccatgcgtatgcctggatgtcaaggccatg
I K T K S Q P M M P V S R P M
1126 gcccctgtcccccaaccccccagccatcgaccctggatgtccggag
G P V P N P Q P I D P A S L E
1171 gagttcaagagagaagatcctggatgtcccgaggccccctgcaggc
E F K R K I L E S Q R P P A G
1216 atccctgttagccccatccactgtggatgtcaaggatgtccggcaggc
I P V A P S S G * (서열번호 2)
ggaggctcaggcctgaggacaaggatggccactcgccggatgtcaaggatgtcaaggatgtccggcaggc (서열번호 1)

```

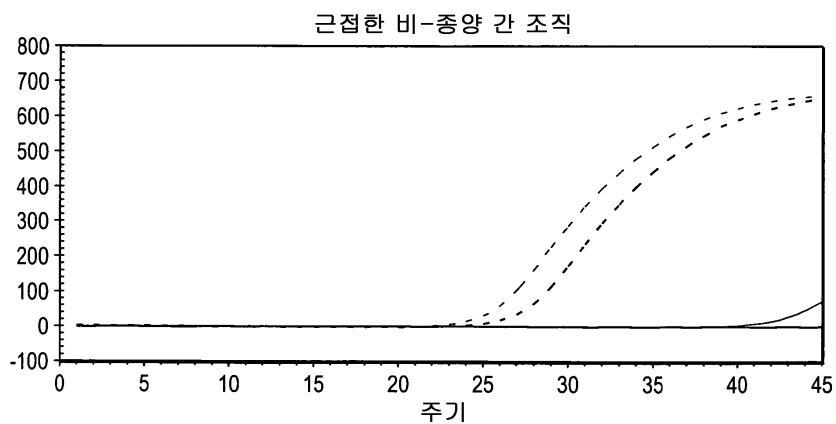
도면5



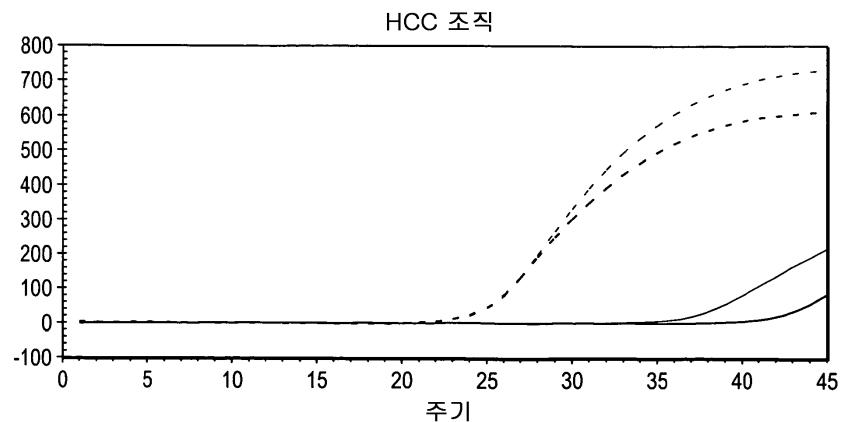
도면6a



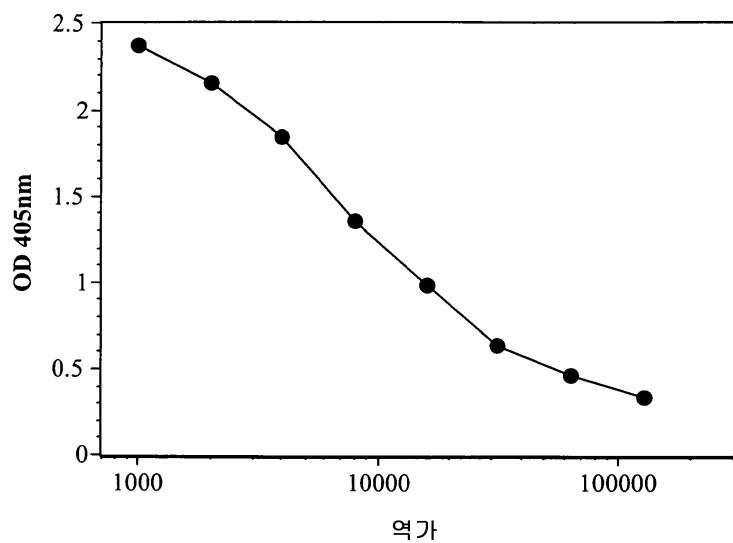
도면6b



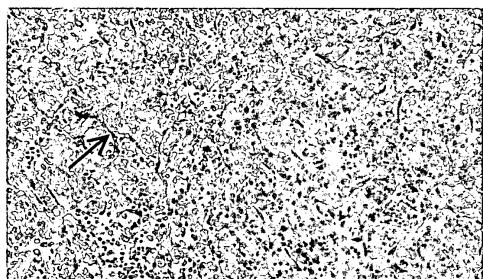
도면6c



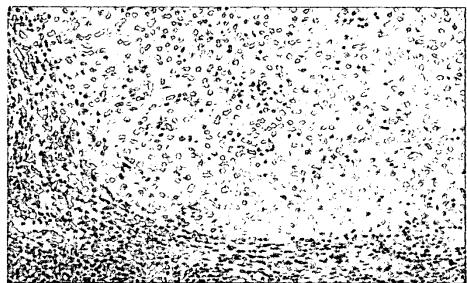
도면7



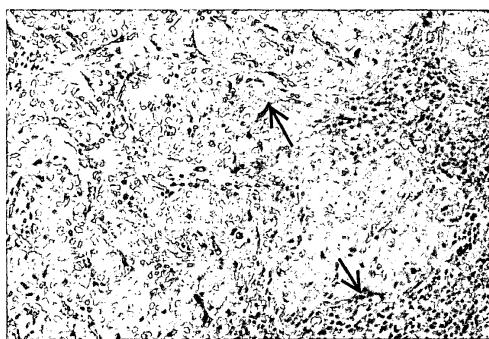
도면8a



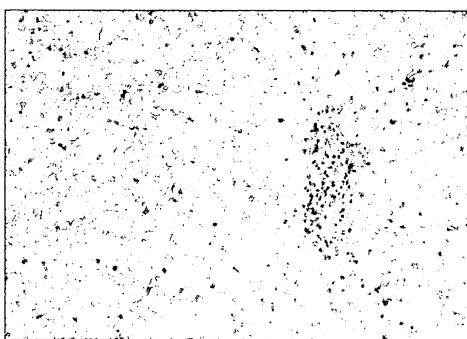
도면8b



도면8c



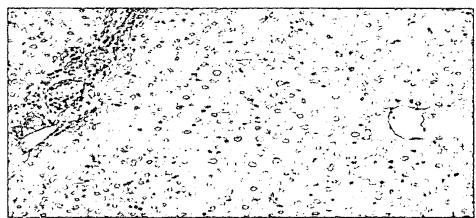
도면8d



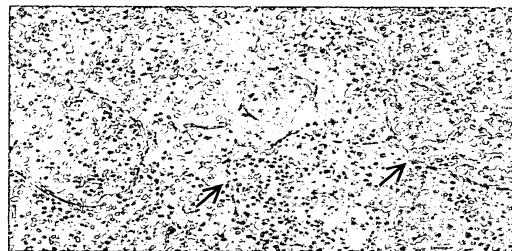
도면8e



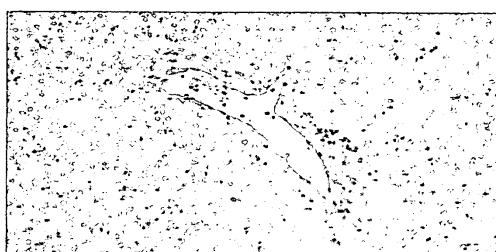
도면8f



도면9a



도면9b



도면9c



도면9d

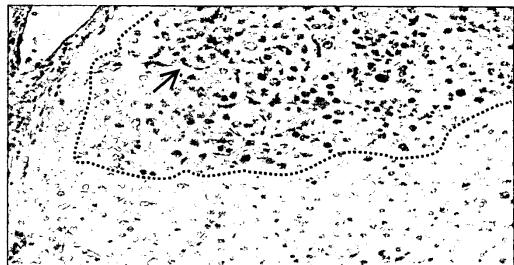


점선내부의 HCC 조직

도면9e



도면9f

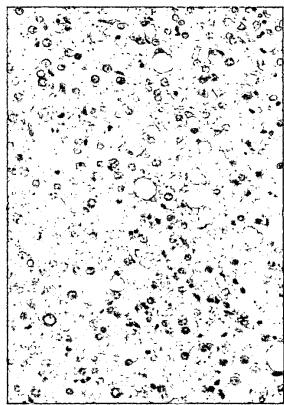


점선외부의 근접한 비-종양 조직

도면10a



도면10b



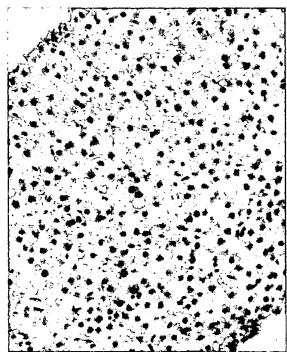
도면10c



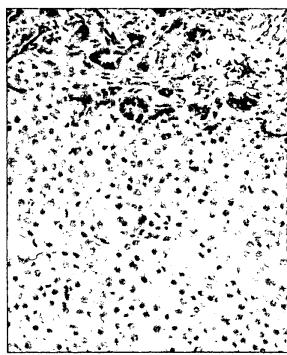
도면10d



도면10e



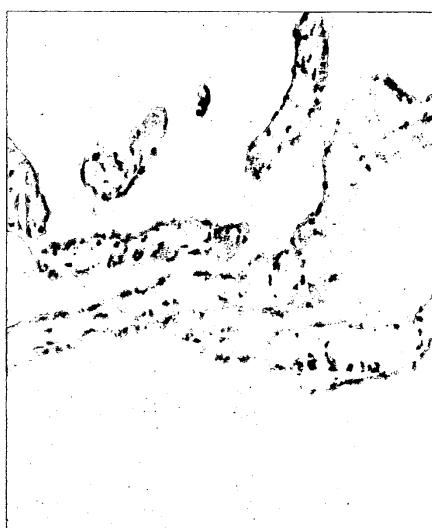
도면10f



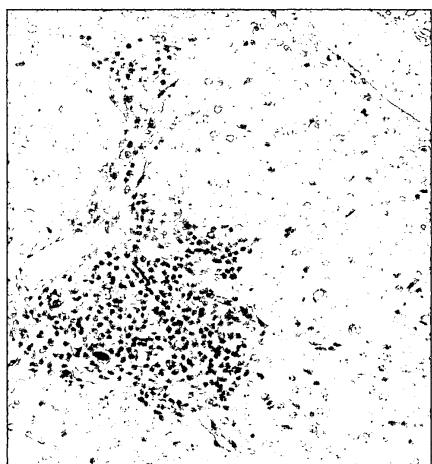
도면11a



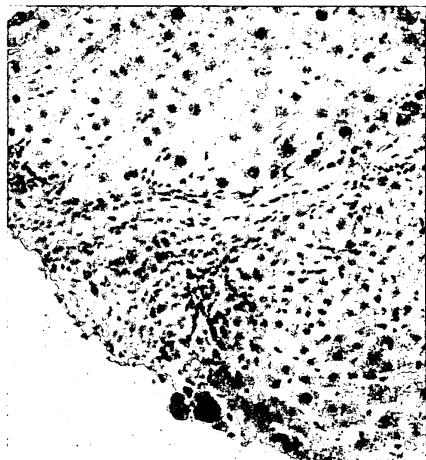
도면11b



도면12a



도면12b



도면13a



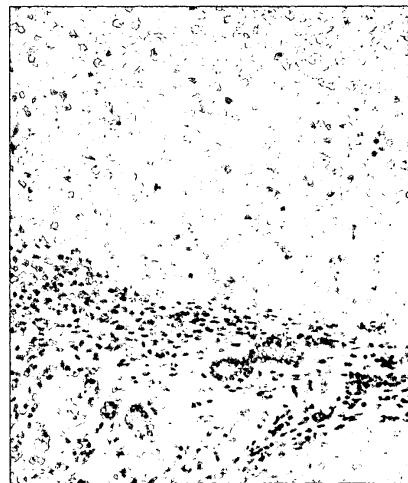
도면13b



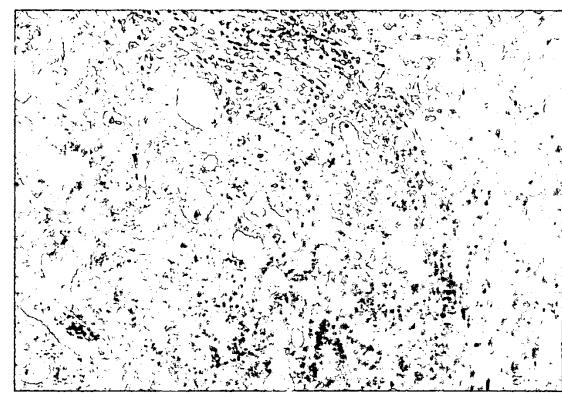
도면13c



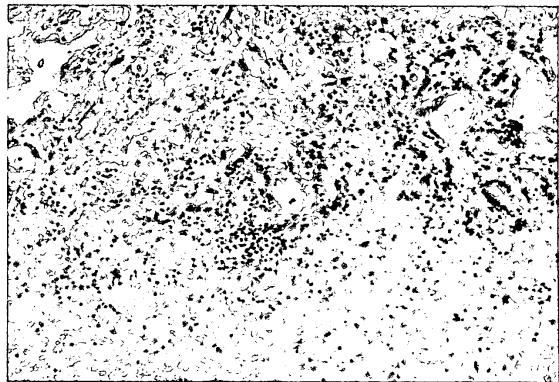
도면13d



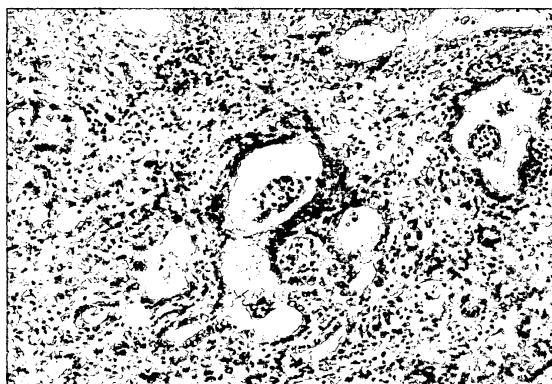
도면14a



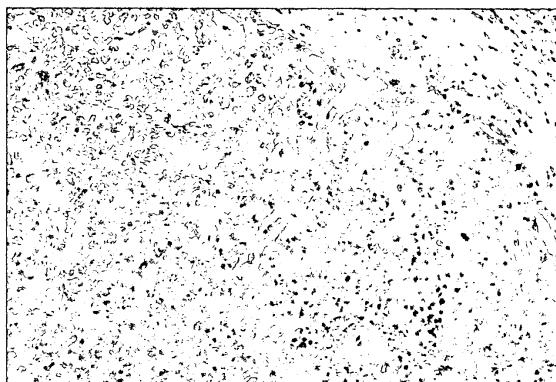
도면14b



도면14c



도면14d



도면15a

GAGGTTCAGCTGGCAGCTGGGCCAGAGTTGTGAGGTCAAGTTGTCAGACAGCTTCTGGCTAACATTAA 90
 GACTACTATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAAACAGGGCTGGAGTGGAATTGGATCTGAGAATGGTATATGATA 180
 GCCCGGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAAACAGCCTACCTGCAAGTCAGCCTGACATCTGAGGAC 270
 ACTGCGCTCTATTACTGTCCTACCAAGAAGCTCTGGGCCAAGGCCACTCTCACAGTCCTCAGCC 342 (서열번호 3)

E V Q L Q Q S G A E F V R S G A S V K L S C T A S G F N I K	<u>D Y Y I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D I E Y</u>	
CDR1		
A P K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y L Q F S S L T S E D	<u>T A V Y Y C L Y Q E G S W G Q G T T L T V S S A</u> (서열번호 4)	
CDR2		
CDR3		

CDR1: D Y Y I H (서열번호 5)
 CDR2: W I D P E N G D I E Y A P K F Q G (서열번호 6)
 CDR3: Q E G S (SEQ ID NO:7)

도면15b

GATGTGTGATGCCAGACTCACTTGTGGTTACCATGGACAACCGCCTCCATCTTGCAAGTCAGGCCTCTTA 90
 AATAGTGATGCCAGACATATTGAAATTGGTGTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGAC 180
 TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCAACTGAAATCAGCAGACTGGGGAGTTGGAGTT 270
 TATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCCGTTCACGGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA 336 (서열번호 8)

D	V	V	M	T	Q	T	P	L	T	L	S	V	T	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	<u>K</u>	<u>s</u>	<u>s</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>L</u>					
N	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>D</u>					
CDR1																																		
S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V					
Y	Y	C	<u>W</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>H</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	(서열번호 9)												
CDR2																																		
CDR3																																		

CDR1: K S S Q S L L N S D G K T Y L N (서열번호 10)
 CDR2: L V S K L D S (서열번호 11)
 CDR3: W Q G T H F P F T (서열번호 12)

도면16a

CAGGTCCAACTGCAGCAGCTGGGCTGAGCTGGTGAAGCTGTCAGGCTTCTGGCTACACTTCACC 90
 AGCAACTACATAACTGGGTGAAACAGAGGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGGATCGGAAATTATTTCTGATGGTTTAAC 180
 AATCAAAGTTCAAGGACAGGGCACATTGACTGTAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGAGCCCACATGTGAGGAC 270
 TCTGGGTCTTACTGTACAAGAACTTCGATGTCGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCAGCC 342 (서열번호 13)

Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S C K A S G Y T F T	
<u>S N Y I N</u>	<u>W V K Q R P G Q G L E W I G N I Y P S D G F T N Y</u>
CDR1	
N Q K F K D R A T L T V D K S S S T A Y M Q L S S P T S E D	
CDR2	
S A V Y Y C T R <u>N F D V</u> W G A G T T V T V S S A (서열번호 14)	
CDR3	

CDR1: S N Y I N (서열번호 15)
 CDR2: N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D (서열번호 16)
 CDR3: N F D V (SEQ ID NO:17)

도면16b

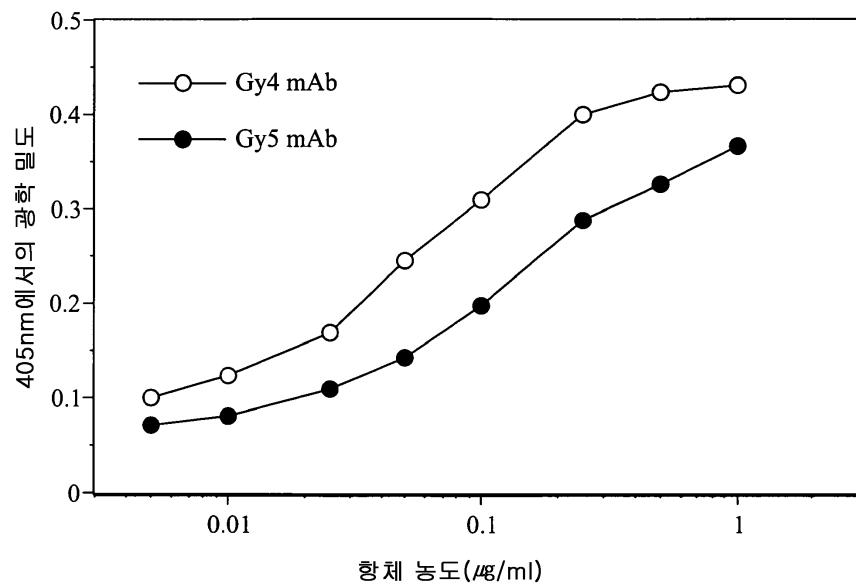
GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCTTGCGTCACTTGAGATCAAGGCCCATCTCTTGCGAGTCAGTCAGAGCCTTGTC
CACAGTATGGAAACACCTATTACAGTGGTACCTGCAGAGGCCAGTCTCCAAGGCTCTGATCTACACAGTTCAACCGATT 90
TCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAGGTGAGGAGATCTGGGAGTT 180
TATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTTCACGGTTCGGCTGGGGACAAGTGGAAATAAAA 336 (서열번호 18)
270

D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	V
<u>H</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	F
<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	G	V
Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	(서열번호 19)							

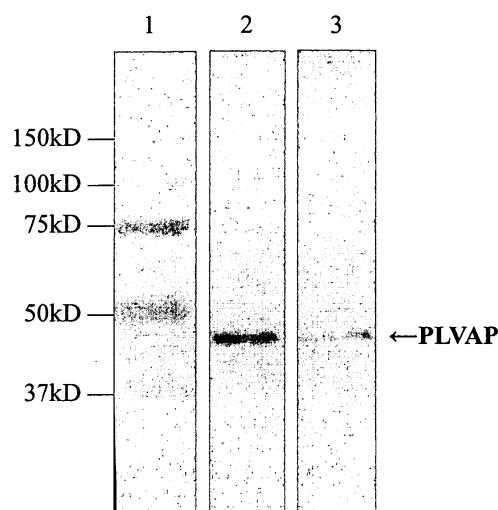
CDR3

CDR1: R S S Q S L V H S N G N T Y L Q (서열번호 20)
CDR2: T V S N R F S (서열번호 21)
CDR3: S Q S T H V P F T (서열번호 22)

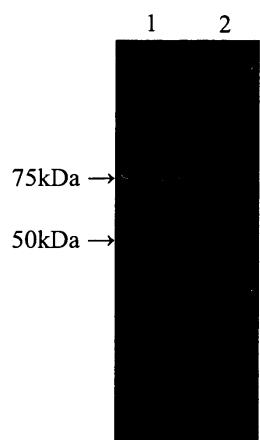
도면17



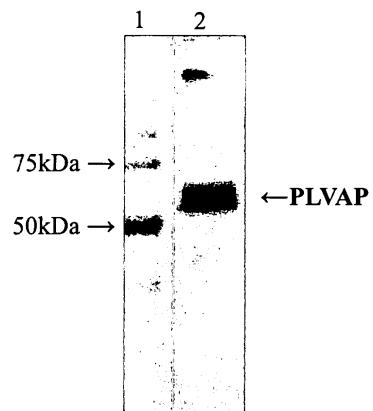
도면18



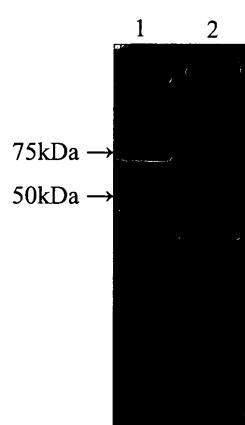
도면19a



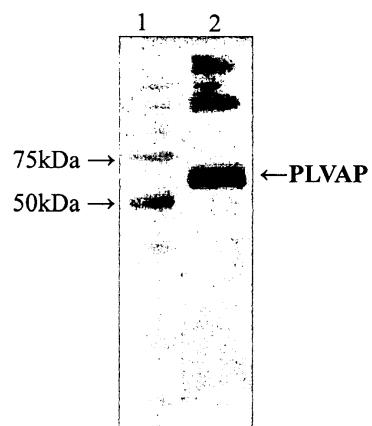
도면19b



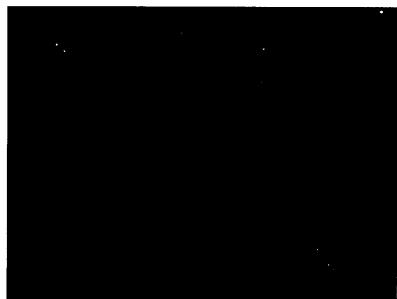
도면19c



도면19d

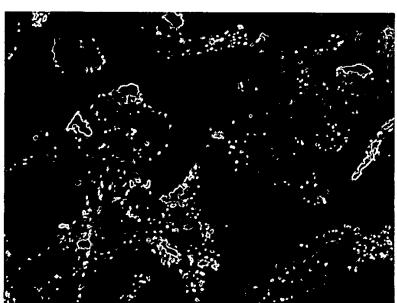


도면20a



마우스 IgG

도면20b



마우스 vWF

도면20c



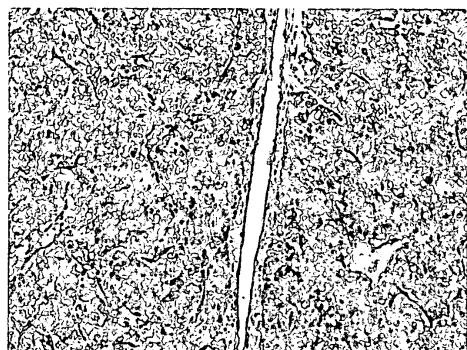
KFCC-GY4

도면20d



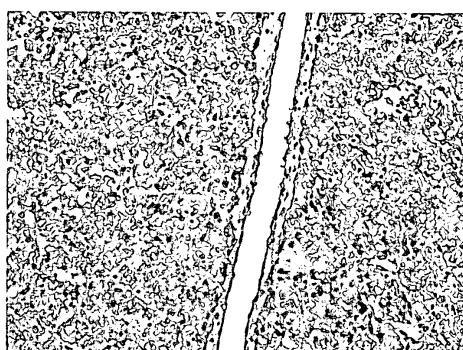
KFCC-GY5

도면21a



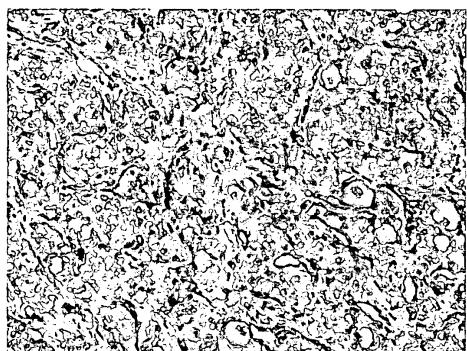
A-GY4

도면21b



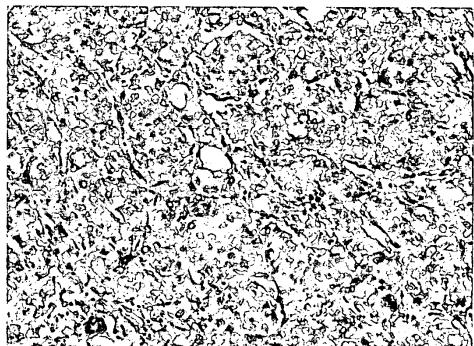
A-GY5

도면21c



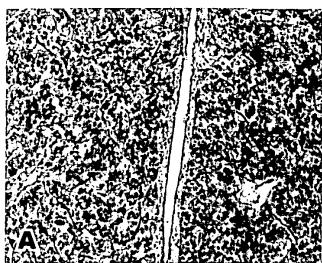
B-GY4

도면21d

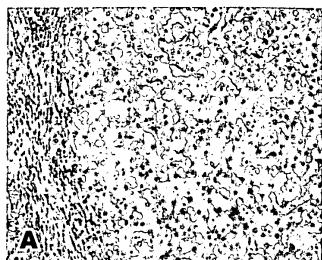


B-GY5

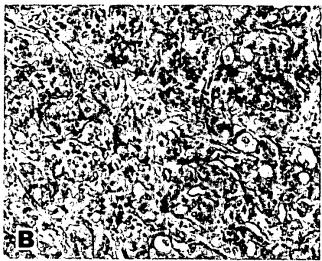
도면22a



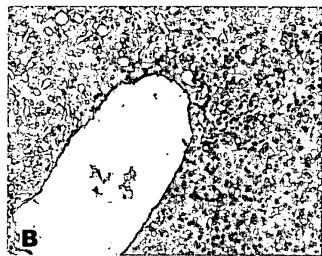
도면22b



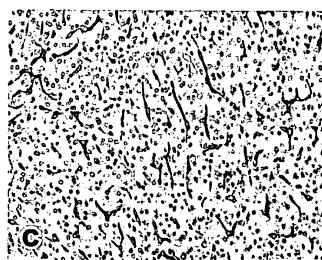
도면22c



도면22d



도면22e



도면22f



도면22g



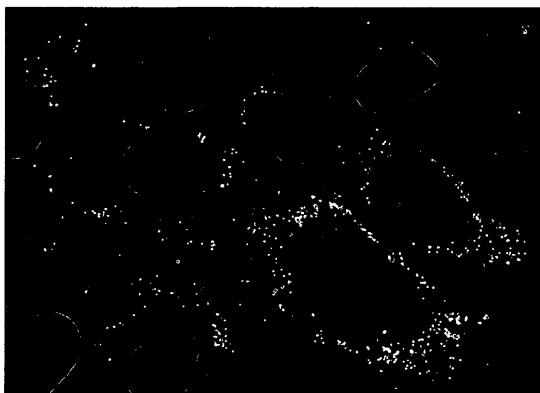
도면22h



도면23a



도면23b



도면23c



도면24

```

1 mglamehggs yaraggssrg cwyylryffl fvsliqflii lglvlfmvyg nvhvstesnl
61 qaterraegl ysqllgltas qsnltkelnf ttrakdaimq mwlnarrldl rinasfrqcq
121 gdrviytnnq rymaailse kqcrdqfkdm nkscdallfm lnqkvktlev eiakektict
181 kdkesvllnk rvaeeqlvec vktrelqhqe rqlakeqlqk vgalclpldk dkfemdlrn1
241 wrdsiiprsl dnlgynlyhp lgselasirr acdhmpslms skveelarsl radievare
301 nsdlqrqkle aqqqlrasqe akqkvekeaq areaklqaec srqtqlalee kavlkerdn
361 lakeleekkr eaeqlrmela irnsaldtci ktksqpmpmv srpmgpvpnp qpidpaslee
421 fkrkilesqr ppagipvaps sg (서울번호 23)

```

도면25a

```

1 cggacgcgtg ggtgagcagg gacgggtcac cggacggcg gatcgagcaa atgggtctgg
61 ccatggaga cggagggtcc tacgctcggg cggggggcg ctctcggggc tgctggatt
121 acctgcgcta cttcttcctc ttctgtctcc tcataccaatt cctcatcatc ctggggctcg
181 tgctcttcat ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaaacctg cagggcaccg
241 agcgccgagc cgagggccta tacagtcaac tccttagggct cacggcctcc cagtccaaact
301 tgacccaagg gctcaacttc accaccgcgc ccaaggatgc catcatgcag atgtggctga
361 atgctcgccg cgacctggac cgcatcaatg ccagcttccg ccagtgccag ggtgaccggg
421 tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttagtgag aagcaatgca
481 gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gegatgcctt gctcttcatg ctgaatcaga
541 aggtgaagac gctggagggtg gagatagcca aggagaagac catttgcact aaggataagg
601 aaagcgtgct gctgaacaaa cgctggcg aggaaacagct ggttgaatgc gtgaaaaccc
661 gggagctgca gcaccaagag cgccagctgg ccaaggagca actgcaaaag gtgcaagccc
721 tctgcctgcc cctggacaag gacaagttt agatggaccc tcgtaacctg tggaggact
781 ccattatccc acgcagcctg gacaacactgg gttacaacct ctaccatccc ctgggtctgg
841 aattggcctc catccgcaga gcctgcgacc acatgcccag cctcatgagc tccaagggtgg
901 aggagctggc cggagcctc cggcggtata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc
961 tccaacgcua gaagctggaa gcccagcagg gcctgcgggc cagtcaggag gcgaaacaga
1021 aggtggagaa ggaggctcag gcccggggagg ccaagctcca agctgaatgc tccccggcaga
1081 cccagctagc gctggaggag aaggcggtgc tgcgaaagga acgagacaac ctggccaagg
1141 agctggaaga gaagaagagg gaggcgaggag agctcaggat ggagctggcc atcagaaact
1201 cagccctgga cacctgcatac aagaccaagt cgcagccgat gatgccagtg tcaaggccca
1261 tggccctgt ccccaacccc cagcccatcg acccagctag cctggaggag ttcaagagga
1321 agatcctgga gtcccagagg ccccctgcag gcattccctgt agcccatcc agtggctgag
1381 gaggctccag gcctgaggac caagggatgg cccgactcgg cggttgcgg aggtgcagg
1441 gatatgctca cagcgcccgca cacaaccccc tccccggcc cccaaaccacc cagggccacc
1501 atcagacaac tccctgeatg caaaccctca gtaccctctc acacccgcac ccgcgcctca
1561 cgatccctca cccagagcac acggcccgcc agatgacgac acgcaagcaa cggcgctgac
1621 gtcacatatac accgtggta tggcgtcagc tggccatgta gacgtcacga agagatata

```

도면25b

1681 cgatggcgtc gtgcagatgc agcacgtcgc acacagacat gggaaacttg gcatgacgtc
 1741 acaccgagat gcagcaacga cgtcacggc catgtcgacg tcacacatat taatgtcaca
 1801 cagacgcggc gatggcatca cacagacggt gatgtatca cacacagaca cagtgacaac
 1861 acacaccatg acaacgacac ctatagatat ggcaccaaca tcacatgcac gcatgccctt
 1921 tcacacacac ttcttaccca attctcacct agtgtcacgt tccccggacc ctggcacacg
 1981 ggccaaggta cccacaggat cccatcccct cccgcacagc cctggggccc agcacctccc
 2041 ctccctccagc ttccctggcct cccagccact tcctcacccc cagtgcctgg accccggaggt
 2101 gagaacagga agccattcac ctccgcctct tgagcgttag tgtttccagg accccctcg
 2161 ggccctgagc cgggggttag ggtcacctgt tgtcgggagg ggagccactc cttctcccc
 2221 aactcccagc cctgcctgtg gcccgttgaa atgttggtag cacttaataa atattagtaa
 2281 atccctaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa (서열번호 24)

서 열 목 록

- <110> China Synthetic Rubber Corporation
- <120> METHODS AND AGENTS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA
- <130> IPA100583-US-D1
- <150> US 61/069,910
- <151> 2008-03-19
- <160> 35
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 1322
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Coding sequence for recombinant His-tagged human PLVAP amino acid residues 51-442
- <400> 1

atggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgca cggcagccat	60
--	----

atgaacgtgc acgtgagcac agagtccaac ctgcaggcca ccgagcggcg agccgaggc	120
ctatacagtc agctcctagg gtcacggcc tcccagtcca acttgaccaa ggagctcaac	180
ttcaccaccc ggcaccaagga tgccatcatg cagatgtggc tgaatgctcg ccgcacactg	240
gaccgcacca atgcacgtt ccgcacgtgc cagggtgacc gggtcatcta cacgaaata	300
cagaggtaca tggctccat catcttgagt gagaagcaat gcagagatca attcaaggac	360
atgaacaaga gctgcgatgc cttgccttc atgctgaatc agaaggtagaa gacgctggag	420

gtggagatag ccaaggagaa gaccattgc actaaggata agaaaagcgt gctgctgaac 480

aaacgcgtgg cgaggaaca gctggttgaa tgcgtaaaa cccggagct gcagcaccaa 540

gagcgccagc tggccaagga gcaactgcaa aaggtgcaag ccctctgcct gcccctggac 600

aaggacaagt ttgagatgaa cttcgtaac ctgtggaggg actccattat cccacgcagc 660

ctggacaacc tgggttacaa cctctaccat cccctggct cggaattggc ctccatccgc 720

agagcctgct accacatgcc cagcctcatg agctccaagg tggaggagct ggcccgagc 780

ctccggcgg atatcgaacg cgtggccgc gagaactcag acctccaacg ccagaagctg 840

gaagccccagc agggcctgct ggccagtcag gaggcgaaac agaaggtgga gaaggaggct 900

caggccccgg aggccaagct ccaagctgaa tgctccggc agacccagct agcgctggag 960

gagaaggcgg tgcgtcgaa ggaacgagac aacctggca aggagctgga agagaagaag 1020

aggaggcgg agcagctcag gatggagctg gccatcagaa actcagccct ggacacctgc 1080

atcaagacca agtgcagcc gatgatgcca gtgtcaaggc ccatggccc tgtcccaac 1140

ccccagccca tcgaccaggc tagcctggag gagttcaaga ggaagatct ggagtccag 1200

aggccccctg caggcatccc tgtagccca tccagtggct gaggaggctc caggcctgag 1260

gaccaaggga tggccgact cggcggttg cggaggatgc agggatatgc tcacagggat 1320

tc 1322

<210> 2

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant His-tagged human PLVAP amino acid residues 51-442

<400> 2

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Gly Ser His Met Asn Val His Val Ser Thr Glu Ser Asn Leu Gln

20	25	30
----	----	----

Ala Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser Gln Leu Leu Gly Leu

35	40	45
----	----	----

Thr Ala Ser Gln Ser Asn Leu Thr Lys Glu Leu Asn Phe Thr Thr Arg

50	55	60
----	----	----

Ala Lys Asp Ala Ile Met Gln Met Trp Leu Asn Ala Arg Arg Asp Leu

65	70	75	80
Asp Arg Ile Asn Ala Ser Phe Arg Gln Cys Gln Gly Asp Arg Val Ile			
85	90	95	
Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Tyr Met Ala Ala Ile Ile Leu Ser Glu Lys			
100	105	110	
Gln Cys Arg Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu			
115	120	125	
Leu Phe Met Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala			
130	135	140	
Lys Glu Lys Thr Ile Cys Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys			
145	150	155	160
Arg Val Ala Glu Thr Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu			
165	170	175	
Leu Gln His Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val			
180	185	190	
Gln Ala Leu Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu			
195	200	205	
Arg Asn Leu Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu			
210	215	220	
Gly Tyr Asn Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg			
225	230	235	240
Arg Ala Cys Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu			
245	250	255	
Leu Ala Arg Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn			
260	265	270	
Ser Asp Leu Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala			
275	280	285	
Ser Gln Glu Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu			
290	295	300	
Ala Lys Leu Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu			
305	310	315	320

Glu Lys Ala Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu

325 330 335

Glu Glu Lys Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile

340 345 350

Arg Asn Ser Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met

355 360 365

Met Pro Val Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile

370 375 380

Asp Pro Ala Ser Leu Glu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln

385 390 395 400

Arg Pro Pro Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly

405 410

<210> 3

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY4 VH domain coding sequence

<400> 3

gagggtcagc tgcagcagtc tggggcagag tttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg	60
tcctgcacag ctctggctt caacattaaa gactactata tacactgggt gaagcagagg	120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatggta tattgaatat	180
ccccccaatg tccaggcaa ggccactatg actgcagaca catcctcaa tacagctac	240

ctgcagttca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtct ctaccaagaa	300
ggctcctggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcag cc	342

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY4 VH domain

<400> 4

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ile Glu Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Tyr Gln Glu Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

100 105 110

Ser Ala

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 sequence

<400> 5

Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> CDR2 sequence

<400> 6

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ile Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 sequence

<400> 7

Gln Glu Gly Ser

1

<210> 8

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY4 VL domain coding sequence

<400> 8

gatgttgtga tgaccagac tccactca	ttgtcggtta ccattggaca accagc	c	60
atctcttgca agtcaagtca gaggc	c tta aatagtgtat gaaagacata tttgaa	tttgg	120
tgttacaga ggcaggcca gtctccaa	ag cgccatct atctgggtc taaattggac	c	180
tctggagtcc ctgacagg	ttt cactggcagt ggatcaggga cagattcac actgaaaatc	c	240

agcagagtgg aggctgagga ttgggagtt tattattgtt ggcaagg	tac acat tttccg	300
ttcacgttcg gagggggac caagctggaa ataaaa		336

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY4 VL domain

<400> 9

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asp

20	25	30
----	----	----

Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro

35	40	45
----	----	----

Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp

50	55	60
----	----	----

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr
 85 90 95
 His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 sequence
 <400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 sequence
 <400> 11

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212>
 PRT

<213> CDR3 sequence
 <400> 12

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr

1 5
 <210> 13
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY-5-VH domain coding sequence

<400> 13

caggtccaac tgcagcagcc tggggcttag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttcacc agcaactaca taaactgggt gaaacagagg	120
cctggacagg gccttgagtg gatcgaaat atttatcctt ctatgtgttt tactaactac	180
aatcaaaagt tcaaggacag ggccacattt actgttagaca aatcctccag cacagcctac	240

atgcagctca gcagccgac atctgaggac tctgcggctt attactgtac aagaaacttc	300
gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctcag cc	342

<210> 14

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY5 VH domain

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

Thr Arg Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser Ala

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> CDR1 Sequence

<400> 15

Ser Asn Tyr Ile Asn

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 sequence

<400> 16

Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 sequence

<400> 17

Asn Phe Asp Val

1

<210> 18

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KFCC-GY5 VL domain coding sequence

<400> 18

gatttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc	60
atctttgca gatctagtca gagccttgc cacagtaatg gaaacaccta tttacagtgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acacagttc caaccgattt	180
tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggc cagattcac actcaagatc	240

agcagagtgg aggctgagga tctggagtt tatttctgct ctc当地gtac acatgttcct 300
 ttcacgttcg gctcgggac aaagttggaa ataaaa 336
 <210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KFCC-GY5 VL domain
 <400> 19
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 sequence
 <400> 20
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 sequence

<400> 21

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 sequence

<400> 22

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 23

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Gly Leu Ala Met Glu His Gly Gly Ser Tyr Ala Arg Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser Arg Gly Cys Trp Tyr Tyr Leu Arg Tyr Phe Phe Leu Phe Val

20 25 30

Ser Leu Ile Gln Phe Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Phe Met Val

35 40 45

Tyr Gly Asn Val His Val Ser Thr Glu Ser Asn Leu Gln Ala Thr Glu

50 55 60

Arg Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser Gln Leu Leu Gly Leu Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Ser Asn Leu Thr Lys Glu Leu Asn Phe Thr Thr Arg Ala Lys Asp

85 90 95

Ala Ile Met Gln Met Trp Leu Asn Ala Arg Arg Asp Leu Asp Arg Ile

100 105 110

Asn Ala Ser Phe Arg Gln Cys Gln Gly Asp Arg Val Ile Tyr Thr Asn
 115 120 125
 Asn Gln Arg Tyr Met Ala Ala Ile Ile Leu Ser Glu Lys Gln Cys Arg
 130 135 140
 Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu Leu Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala Lys Glu Lys
 165 170 175
 Thr Ile Cys Thr Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys Arg Val
 180 185 190
 Ala Glu Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu Leu Gln His
 195 200 205
 Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val Gln Ala Leu
 210 215 220
 Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu Arg Asn Leu
 225 230 235 240
 Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu Gly Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg Arg Ala Cys
 260 265 270
 Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu Leu Ala Arg
 275 280 285
 Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn Ser Asp Leu
 290 295 300
 Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala Ser Gln Glu
 305 310 315 320
 Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu Ala Lys Leu
 325 330 335
 Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu Glu Lys Ala
 340 345 350
 Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu Glu Glu Lys
 355 360 365

Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile Arg Asn Ser
 370 375 380
 Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met Met Pro Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile Asp Pro Ala
 405 410 415
 Ser Leu Glu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 420 425 430
 Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly
 435 440
 <210> 24
 <211> 2317
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 cggacgcgtg ggtgagcagg gacggtgac acggacggcg gatcgagcaa atgggtctgg 60
 ccatggagca cggagggtcc tacgctcggg cggggggcag ctctcgggc tgctggatt 120
 acctgcgcta ctcttcctc ttctgttccc tcatccaatt cctcatcatc ctggggctcg 180
 tgctcttcat ggtctatgcc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaaacctg cagggccaccg 240
 agcggcgagc cgagggccta tacagtgcacg tccatggct cacggcctcc cagttcaact 300
 tgaccaagga gctcaacttc accaccccgcc ccaaggatgc catcatgcag atgtggctga 360
 atgctcgccg cgacctggac cgcataatg ccagcttccg ccagtgccag ggtgaccggg 420
 tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttgagtgag aagcaatgca 480
 gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgtatgcctt gctttcatg ctgaatcaga 540
 aggtgaagac gctggaggtg gagatagcca aggagaagac cattgcact aaggataagg 600
 aaagcgtgct gctgaacaaa cgcgtggcg aggaaacagct ggttgaatgc gtgaaaaccc 660
 gggagctgca gcaccaagag cgccagctgg ccaaggagca actgaaaaag gtgcaagccc 720
 tctgcctgcc cctggacaag gacaagttt agatggaccc tcttaacactg tggagggact 780
 ccattatccc acgcagccctg gacaacctgg gttacaacctt ctaccatccc ctgggctgg 840
 aattggcctc catccgcaga gcctgcgacc acatgccag cctcatgagc tccaaagggtgg 900
 aggagctggc cggagccctc cggggcgata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc 960

tccaaacgcca gaagctggaa gcccagcagg gcctgcgggc cagt caggag gcgaa acaga	1020
aggtggagaa ggaggctcgag gcccgggagg ccaagtc当地 agctgaatgc tccggcaga	1080
cccagctagc gctggaggag aaggcggtgc tgccgaagga acgagacaac ctggccaagg	1140
agcttggaaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc atcagaaact	1200
cagccctgga cacctgcatc aagaccaagt cgccagccat gatgccagt tcaaggccca	1260
tggccctgt ccccaacccc cagcccatcg acccagctag cctggaggag ttcaagagga	1320
agatcctgga gtcccagagg cccctgcag gcatccctgt agccccatcc agtggctgag	1380
gaggctccag gcctgaggac caagggatgg cccgactcg cggtttgcgg aggatgcagg	1440
gatatgtcta cagccccgca cacaaccccc tccgc当地 cccaccacc cagggccacc	1500
atcagacaac tccctgcatg caaaccctta gtaccctctc acacccgcac ccgc当地tca	1560
cgatccctca cccagagcac acggccgegg agatgacgac acgcaagcaa cggcgctgac	1620
gtcacatatac accgttgta tggcgtcactg tggccatgta gacgtcacga agagatata	1680
cgatggcgtc gtgcagatgc agcacgtc acacagacat gggaaacttg gcatgacgac	1740
acaccgagat gcagcaacga cgtcacggc catgtcgacg tcacacatat taatgtcaca	1800
cagacgc当地 gatggcatca cacagacgt gatgtgtca cacacagaca cagt gacaac	1860
acacaccatg acaacgacac ctatagatgg ggc当地aca tcacatgcac gcatgccc当地	1920
tcacacacac tttctaccca attctcacct agtgc当地tgc当地 tccccgacc ctggcacacg	1980
ggccaaggta cccacaggat cccatccc当地 cccgc当地acgc cctggccccc agcacctccc	2040
ctcctccagc ttccctggc当地 cccagccact tcctc当地cc cagtgc当地tgg acccggaggt	2100
gagaacagga agccattc当地 ctccgctct tgagcgtgag tgccctgg accccctcg	2160
ggccctgagc cgggggtgag ggtcacctgt tgccggagg ggagccactc cttctcccc	2220
aactcccagc cctgc当地tgc当地 gcccgtt当地aa atgttggtgg cacttaataa atatttagtaa	2280
atcccttaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	2317
<210> 25	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> oligonucleotide primer	
<400> 25	
cctgcaggca tccctgta	18
<210> 26	
<211> 16	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide primer	
<400>	26	
cggccatcc cttgtt		16
<210>	27	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide probe	
<400>	27	
ccccatccag tggctg		16
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide primer	
<400>	28	
ccttgagcgt gagtgttcc a		21
<210>	29	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide primer	
<400>	29	
gtccccaac ttgagatgta tgaag		25
<210>	30	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide primer	
<400>	30	
ggcaggcgt ggagtgt		17

<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide primer
<400> 31
gtctcaagtc agtgtacagg taaggc 25
<210> 32

<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide probe
<400> 32
ctcccaggga gaccgg 16
<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide probe
<400> 33
aaggagtggc tccctcc 18
<210> 34
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide primer
<400>
> 34
catatgaacg tgcacgttag cacagagtcc 30
<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide primer

<400> 35

ggatcctgag catatccctg catcctcc

28