



(72) 발명자

**패커 4세, 레온 에이취.**

미국 94122 캘리포니아주 샌 프란시스코 17번 애비뉴 1510

**슈미트, 마이케**

미국 94131 캘리포니아주 샌 프란시스코 아파트먼트 #4 코르벳애비뉴 775

**예, 웨일란**

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 바켄타인 스트리트 119

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

EGFL7-유도된 내피 세포 이동을 저해할 수 있는 EGFL7 길항제를 포함하는, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 갖는 대상체에서 혈관신생을 감소 또는 억제하기 위한 제약 조성물이며, 여기서 상기 혈관신생과 관련된 병리학적 상태가 암 또는 안내 신생혈관 질환(intraocular neovascular disease)으로부터 선택되고, EGFL7-유도된 내피 세포 이동을 저해하는 EGFL7 길항제의 능력이 시험관내 세포 이동 분석으로 검출되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, EGFL7 길항제가 항-EGFL7 항체인 제약 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 병리학적 상태가 신생물인 제약 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 신생물이 암종인 제약 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 병리학적 상태가 눈과 관련되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 병리학적 상태가 안내 신생혈관 질환인 제약 조성물.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 항혈관신생제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 항혈관신생제가 EGFL7 길항제의 투여 전 또는 후에 투여되는 제약 조성물.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 항혈관신생제가 EGFL7 길항제와 동시에 투여되는 제약 조성물.

### 청구항 10

제7항에 있어서, 항혈관신생제가 혈관 내피 세포 성장 인자 (VEGF)의 길항제인 제약 조성물.

### 청구항 11

제10항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 제약 조성물.

### 청구항 12

제11항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙 (bevacizumab)인 제약 조성물.

### 청구항 13

삭제

### 청구항 14

혈관신생을 억제할 수 있는 항혈관신생제와 함께 EGFL7 길항제를 포함하는, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 갖는 대상체에서 항혈관신생제의 효능을 향상시키기 위한 제약 조성물이며, 여기서 상기 혈관신생과 관련된 병리학적 상태가 암 또는 안내 신생혈관 질환으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, EGFL7 길항제가 항-EGFL7 항체인 제약 조성물.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 병리학적 상태가 신생물인 제약 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 신생물이 암종인 제약 조성물.

#### 청구항 18

제14항에 있어서, 병리학적 상태가 눈과 관련되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 병리학적 상태가 안내 신생혈관 질병인 제약 조성물.

#### 청구항 20

제17항에 있어서, 화학치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

### 명세서

#### 관련 출원

[0001]

37 CFR § 1.53(b) 하에 출원된 비-가출원은 2004년 4월 14일자 출원된 미국 가출원 60/562,054의 35 USC § 119(e) 하의 권리를 주장한다.

[0002]

### 기술분야

[0003]

본 발명은 일반적으로 혈관 발달을 조절하기 위해 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 신규한 내피 세포-유래 분비 인자인 EGF-유사 도메인 7 (EGFL7)에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 혈관신생과 관련된 상태 및 질병의 진단 및 치료에 관한 것이다.

### 배경기술

[0004]

혈관 공급의 발달은 생리학 및 병리학 과정의 기본 요건이다. 활발하게 성장하는 조직, 예를 들어 배아 및 종양은 적절한 혈액 공급을 필요로 한다. 이들은 혈관신생으로 불리는 과정을 통해 새로운 혈관 형성을 촉진하는 전혈관신생 인자를 생산함으로써 상기 필요를 만족시킨다. 혈관 형성은 하기 단계를 모두 또는 많이 포함하는 복잡하지만 규칙적인 생물학적 사건이다: a) 내피 세포 (EC)가 기존 EC로부터 증식하거나 기원 세포로부터 분화하고; b) EC가 이동하고 융합하여 코드 (cord) 유사 구조를 형성하고; c) 이어서 혈관 코드는 관생성을 거쳐 중심 관강 (lumen)을 갖는 관을 형성하고; d) 기존 코드 또는 관이 싹을 내밀어 2차 관을 형성하고; e) 원시 혈관총은 추가의 재형성 및 재성형을 거치고; f) 주변-내피 세포가 모집되어 내피관을 둘러싸, 관에 유지 및 조절 기능을 제공하며; 상기 세포는 작은 모세혈관에 대한 혈관주위세포, 보다 큰 혈관에 대해 평활근 세포, 심장에서 심근 세포를 포함한다 [Hanahan, D. Science 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. Nature Reviews Genetics. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. Cell. 112:19-28 (2003)].

[0005]

현재 혈관신생이 다양한 질환의 발병기전에서 관련됨은 잘 확립되어 있다. 이들은 고형 종양 및 전이, 아테롬성 동맥경화증, 수정체후 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질병, 예를 들면 증식 망막병증, 예를 들어, 당뇨 망막병증, 연령관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 다른 조직의 면역 거부, 류마티스성 관절염 및 건선을 포함한다 [Folkman et al., J. Biol. Chem., 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); 및 Garner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710].

[0006]

종양 성장의 경우에, 혈관신생은 과다증식에서 신생물로의 이행에 및 종양의 성장 및 전이를 위한 자양분을 공

급하는데 중대한 것으로 보인다 [Folkman et al., Nature 339:58 (1989)]. 신생혈관형성은 정상 세포에 비해 종양 세포가 성장 이익과 증식 자율성을 획득하도록 한다. 종양은 보통 이용가능한 모세혈관층으로부터의 거리 때문에 수 세제곱밀리미터의 크기에서만 증식할 수 있는 단일 이상 세포로서 시작하고, 장시간 동안 추가의 성장 및 씨딩 없이 '휴면상태'로 머무를 수 있다. 이어서 몇몇 종양 세포는 혈관신생 표현형으로 전환되어 내피 세포를 활성화시키고, 이는 증식하여 새로운 모세혈관으로 성숙한다. 이들 새로 형성된 혈관은 1차 종양의 지속적인 성장을 허용할 뿐만 아니라, 전이성 종양 세포의 씨딩 및 재콜로니형성을 허용한다. 따라서, 종양 섹션 내의 미세혈관의 밀도와 유방암 및 몇몇 다른 종양에서 환자 생존율 사이에 상호관련이 관찰되었다 [Weidner et al., N. Engl. J. Med 324:1-6 (1991); Horak et al., Lancet 340:1120-1124 (1992); Macchiarini et al., Lancet 340:145-146 (1992)]. 혈관신생 전환을 제어하는 정확한 기전은 잘 알려지지 않았지만, 종양 덩어리의 신생혈관형성은 많은 혈관신생 자극제와 억제제의 순수한 균형으로부터 생성되는 것으로 생각된다 [Folkman, 1995, Nat Med 1(1):27-31].

[0007] 혈관 발달의 과정은 엄밀하게 조절된다. 지금까지, 대부분 주변 세포에 의해 생산된 분비형 인자인 상당한 수의 분자가 EC 분화, 증식, 이동 및 코드 유사 구조로의 융합을 조절하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 혈관내피 성장인자 (VEGF)는 혈관신생을 자극하고 혈관 투과성을 유도하는데 관여하는 핵심 인자로서 확인되었다 [Ferrara et al., Endocr. Rev. 18:4-25 (1997)]. 심지어 단일 VEGF 대립유전자의 상실이 배아 치사를 일으킨다는 발견은 혈관계의 발달 및 분화에서 상기 인자에 의한 대체불가한 역할을 지적한다. 또한, VEGF는 종양 및 안내 질환과 관련된 신생혈관형성의 주요 매개체인 것으로 나타났다 [Ferrara et al., Endocr. Rev. 상기 문헌]. VEGF mRNA는 검사된 대다수의 인간 종양에서 과다발현된다 [Berkman et al., J. Clin. Invest. 91:153-159 (1993); Brown et al., Human Pathol. 26:86-91 (1995); Brown et al., Cancer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern et al., Brit. J. Cancer 73:931-934 (1996); Dvorak et al., Am. J. Pathol. 146:1029-1039 (1995)].

[0008] 또한, 안구액 내 VEGF의 농도 수준은 당뇨 및 다른 허혈-관련 망막병증의 환자에서 혈관의 활발한 증식의 존재와 고도로 상호관련된다 [Aiello et al., N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994)]. 또한, 연구에 의해 AMD 환자에서 맥락 신생혈관막에서 VEGF의 편재화가 증명되었다 [Lopez et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996)].

[0009] 항-VEGF 중화 항체는 누드 (nude) 마우스에서 다양한 인간 종양 세포주의 성장을 억제하고 (Kim et al., Nature 362:841-844 (1993); Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgstrom et al., Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); Melnyk et al., Cancer Res. 56:921-924 (1996)], 또한 허혈 망막 질환의 모델에서 안내 혈관신생을 억제한다 [Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)]. 따라서, 항-VEGF 모노클로날 항체 또는 다른 VEGF 작용의 억제제는 종양 및 다양한 안내 신생혈관 질환의 치료를 위한 유망한 후보물이다. 상기 항체는 예를 들어 EP 817,648 (1998년 1월 14일자 공개); 및 W098/45331과 W098/45332 (둘 모두 1998년 10월 15일자 공개)에 기재되어 있다. 항-VEGF 항체의 하나인 베바시주맙 (bevacizumab)는 전이성 결장직장암 (CRC)을 치료하기 위한 화학치료 방법과의 조합 사용에 대해 FDA에서 승인되었다. 베바시주맙은 다양한 암 적응증을 치료하기 위한 많은 진행중인 임상 시험에서 연구되고 있다.

[0010] 세포의 매트릭스 (ECM)가 혈관신생 과정 동안 중요한 역할을 하는 것이 공지되어 있다 [Madri, Transpl. Immunol. 5:179-83 (1997)]. EC는 이동하는 동안 임시 ECM에 둘러싸이고, 관강을 형성한 후 새로 합성된 혈관 기저막에 부착한다. 모세관 형태형성 동안 골격을 제공하는 외에, ECM은 EC의 기능에 대한 복잡한 국소 제어를 발휘하는 것으로 나타났다. 예를 들어, ECM은 EC에 대한 가용성 혈관신생 매개체의 이용가능성을 조절하고 인테그린 및 세포성 부착 분자의 상호작용의 특성 및 유형을 특정할 수 있다. EC 생존율은 성장 인자 수용체와 인테그린 사이의 협동에 의해 조절되고, 이는 다시 국소 ECM의 구성에 의해 지배되는 것으로 또한 제안되었다 [Stupack and Chersesh, Oncogene 22:9022-29 (2003)].

[0011] 혈관신생 분야의 많은 진보에도 불구하고, 혈관 형성에서 몇몇 단계는 아직 거의 규명되지 않았다. 특히, 관생성이 조절되는 방식 - 혈관줄이 진행하여 관을 형성하는 방식 및 상기 이행을 조절하는 인자에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 많은 질병 및 질환에서 혈관신생의 역할에 비추어 볼 때, 이들 과정을 일으키는 하나 이상의 생물학적 효과를 감소 또는 억제하는 수단을 갖는 것이 바람직하다. 정상 및 질병 상태, 특히 암에서 발병 폴리펩티드의 존재를 분석하는 수단을 갖는 것이 또한 바람직하다. 기존 항-혈관신생 치료의 효능을 향상시키고 표적을 확인할 수 있는 수단을 개발하는 것이 또한 필요하다.

[0012] <발명의 개요>

- [0013] 본 발명은 신규한 EC-유래 분비 인자인 EGF 유사 도메인 7 (EGFL7)의 확인 및 특성화에 기초한다. EGFL7은 조직 증식과 관련된 맥관계에서 고수준으로 발현되고, 정상 성인 조직에서 대부분의 성숙 혈관에서 하향조절된다. EGFL7 기능의 손실은 동물 배아에서 심각한 혈관 결함을 일으켰고, 종양 성장을 감소시켰다. 그의 구조, 발현 및 활성을 기초로, EGFL7은 신규한 ECM 분자로 여겨진다. 또한, EGFL7은 EC 부착 및 이동을 지지하는 것으로 밝혀졌고, 종양 혈관신생에서 혈관신생 인자에 대한 지지하는 역할을 하는데 관여한다. 반면, EGFL7 길항제는 EGFL7-관련된 EC 부착 및 이동을 효과적으로 차단하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 혈관신생에 관여된 과정을 조절하는 (예를 들어, 촉진하거나 억제하는) 신규한 조성물 및 그의 용도를 제공한다.
- [0014] 한 실시태양에서, 본 발명은 EGFL7 길항제를 제약학상 허용되는 담체와의 혼합물로 포함하는 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 조성물은 치료 유효량의 길항제를 포함한다. 다른 측면에서, 조성물은 추가의 활성 성분, 예를 들어, 항혈관신생제를 포함한다. 바람직하게는, 조성물은 멸균된다. EGFL7 길항제는 액체 제약 제 형태로 투여될 수 있고, 이는 저장 안정성을 연장시키기 위해 보존처리될 수 있다. 보존처리된 액체 제약 제제는 다수 용량의 EGFL7 길항제를 함유할 수 있고, 따라서, 반복 사용에 적합할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 조성물이 항체를 포함하는 경우, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 인간화 항체, 또는 단쇄 항체이다.
- [0015] 다른 실시태양에서, 본 발명은 치료 유효량의 EGFL7 길항제를 제약학상 허용되는 담체와 혼합하는 것을 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 치료에 유용한 상기 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0016] 또다른 측면에서, 본 발명은
- [0017] (a) EGFL7 길항제를 포함하는 물질의 조성물;
- [0018] (b) 상기 조성물을 수용하는 용기; 및
- [0019] (c) 혈관신생 관련 질환의 치료에서 상기 EGFL7 길항제의 용도를 언급하는, 상기 용기에 고정시키는 라벨 또는 상기 용기에 포함되는 패키지 삽입물 (package insert)를 포함하는 제조 용품을 제공하고, 여기서 길항제는 EGFL7에 결합하여 그의 활성을 차단하는 항체일 수 있다. 조성물은 치료 유효량의 EGFL7 길항제를 포함할 수 있다.
- [0020] 다른 실시태양에서, 본 발명은 시험 화합물을 EGFL7 폴리펩티드와, 시험 화합물 및 폴리펩티드가 상호작용하도록 하기에 충분한 시간 동안 충분한 조건 하에 접촉시키고, EGFL7 폴리펩티드의 활성이 억제되는지 결정하는 것을 포함하는, EGFL7 폴리펩티드의 활성을 억제하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 특정 바람직한 측면에서, 시험 화합물 또는 EGFL7 폴리펩티드가 고체 지지체 상에 고정된다. 다른 바람직한 측면에서, 비고정된 성분은 검출가능한 표지를 갖는다. 바람직한 측면에서, 상기 방법은
- [0021] (a) 세포 및 스크리닝할 시험 화합물을 EGFL7 폴리펩티드의 존재 하에 EGFL7 폴리펩티드에 의해 정상적으로 유도되는 세포 반응의 유도에 적합한 조건 하에 접촉시키고;
- [0022] (b) 시험 화합물이 효과적인 길항제인지 결정하기 위해 상기 세포 반응의 유도를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0023] 다른 바람직한 측면에서, 상기 과정은
- [0024] (a) 세포 및 스크리닝할 시험 화합물을 EGFL7 폴리펩티드의 존재 하에 EGFL7 폴리펩티드에 의한 세포 증식의 자극에 적합한 조건 하에 접촉시키고;
- [0025] (b) 시험 화합물이 효과적인 길항제인지 결정하기 위해 세포의 증식을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0026] EGFL7 폴리펩티드의 하나 이상의 기능 또는 활성을 억제하는 EGFL7 폴리펩티드의 길항제의 한 종류는 항체이다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 EGFL7 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 바람직한 측면에서, 항체는 모노클로날 항체이고, 이는 바람직하게는 비-인간 상보성 결정 영역 (CDR) 잔기 및 인간 프레임워크 (framework) 영역 (FR) 잔기를 갖는다. 항체는 표지될 수 있고 고체 지지체 상에 고정될 수 있다. 추가 측면에서, 항체는 항체 단편, 단쇄 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체이다. 바람직하게는, 항체는 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다.
- [0027] 또다른 측면에서, 본 발명은 (a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 샘플에서, 및 (b) 동일한 세포 종류의 공지의 정상 조직 세포의 대조군 샘플에서, EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 분석하는 것을 포함하는, 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환을 진단하는 방법을 제공하고, 여기서 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 보다 높거나 보다 낮은 발현 수준은 상기 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환의 존재를 나타낸다. EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현은 임의로 대조군 샘플에 비해 시험 샘플 내의



mRNA 또는 폴리펩티드의 수준을 측정함으로써 달성할 수 있다.

- [0028] 또다른 측면에서, 본 발명은 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 샘플에서 EGFL7 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환을 진단하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 시험 샘플 내의 상기 EGFL7 폴리펩티드의 존재 또는 부재는 상기 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환의 존재를 나타낸다.
- [0029] 추가의 실시태양에서, 본 발명은 (a) 항-EGFL7 항체를 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 샘플과 접촉시키고, (b) 시험 샘플 내에서 항체와 EGFL7 폴리펩티드 사이의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환을 진단하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 복합체의 형성은 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환의 존재를 나타낸다. 검출은 정성적 또는 정량적일 수 있고, 동일한 세포 종류의 공지의 정상 조직 세포의 대조군 샘플에서 복합체 형성을 모니터링한 것에 비교하여 수행할 수 있다. 시험 샘플에서 형성된 복합체의 보다 많거나 보다 적은 양은 시험 조직 세포를 얻은 포유동물에서 심혈관, 내피 또는 혈관신생 기능장애의 존재를 나타낸다. 항체는 바람직하게는 검출가능한 표지를 갖는다. 복합체 형성은 예를 들어 광학 현미경, 유동 세포측정법, 형광측정법, 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 모니터링할 수 있다. 시험 샘플은 보통 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환에 걸린 것으로 의심되는 개인으로부터 얻는다.
- [0030] 다른 실시태양에서, 본 발명은 EGFL7 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 항-EGFL7 항체에 노출시키고 상기 샘플의 성분에 대한 상기 항체의 결합을 측정하는 것을 포함하는, 샘플에서 EGFL7 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법을 제공한다. 특정 측면에서, 샘플은 EGFL7 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 세포를 포함하고, 항체는 세포에 결합한다. 항체는 바람직하게는 검출가능하게 표지되고(되거나) 고체 지지체에 결합된다.
- [0031] 추가 측면에서, 본 발명은 적합한 패키징 내에 항-EGFL7 항체 및 담체를 포함하는 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환 진단 키트를 제공한다. 바람직하게는, 상기 키트는 EGFL7 폴리펩티드의 존재를 검출하기 위해 상기 항체를 사용하기 위한 지시서를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 담체는 예를 들어 버퍼이다. 바람직하게는, 심혈관, 내피 또는 혈관신생 질환은 암이다.
- [0032] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 EGFL7-유도된 내피 세포 이동을 저해할 수 있는 EGFL7 길항제를 대상체에게 투여하여 대상체에서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 것을 포함하는, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 갖는 대상체에서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, EGFL7 길항제는 항-EGFL7 항체이다. EGFL7-유도된 EC 이동을 저해하는 길항제의 능력은 예를 들어 시험관내 세포 이동 분석으로 검출할 수 있다.
- [0033] 한 바람직한 실시태양에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태는 암이다. 다른 바람직한 실시태양에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태는 안내 신생혈관 질병이다. 또다른 바람직한 실시태양에서, EGFL7 길항제는 다른 항혈관신생제, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맵과 동시투여된다. 본 발명은 또한 대상체에게 EGFL7 길항제를 항혈관신생제와 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 갖는 대상체에서 항혈관신생제 치료 효능을 향상시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 암 또는 안내 신생혈관 질병, 특히 항혈관신생제 단독 치료에 불량하게 반응하는 질병 또는 질병의 단계를 치료하는데 유용할 것이다. 항혈관신생제는 VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 포함하는 혈관신생을 감소 또는 억제할 수 있는 임의의 약제일 수 있다. 종양을 치료할 때, EGFL7 길항제 단독 또는 항혈관신생제와의 조합물은 하나 이상의 화학치료제를 포함하는 화학치료 방법과 추가로 조합될 수 있다. 향상된 효능을 위해 방사성 치료가 또한 조합될 수 있다.
- [0034] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 포유동물에게 EGFL7 폴리펩티드 또는 EGFL7 폴리펩티드의 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 혈관 형성을 촉진하는 방법을 제공하고, 상기 포유동물에서 혈관 형성은 자극된다. 바람직하게는, 포유동물은 사람이다.
- [0035] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 치료 유효량의 EGFL7 폴리펩티드 또는 그의 효능제를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 혈관신생을 자극하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 포유동물은 사람이고, 보다 바람직하게는 혈관신생은 조직 재생 또는 상처 치유를 촉진할 것이다.
- [0036] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 포유동물에게 EGFL7 폴리펩티드, 그의 효능제 또는 길항제를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 혈관 형성을 조절하는 (예를 들어, 억제하거나 자극하는) 방법을 제공한다.
- [0037] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 포유동물에게 EGFL7 폴리펩티드, 그의 효능제 또는 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 내피 세포 이동을 조절함으로써 (예를 들어, 유도하거나 감소시킴으로써) 혈관신생을 조

절하는 (예를 들어, 유도하거나 감소시키는) 방법을 제공하고, 여기서 상기 포유동물에서 내피 세포 이동이 조절된다.

## 발명의 상세한 설명

### [0045] 정의

[0046] 달리 정의하지 않으면, 본원에서 사용된 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다 (예를 들어 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)] 참조). 본 발명의 목적에서, 하기 용어를 아래에 정의한다.

[0047] 상호교환가능하게 사용되는 본원에서 사용되는 용어 "EGFL7" 및 "EGFL7 폴리펩티드"는 각각 본원에서 정의하는 천연 서열 EGFL7, EGFL7 변이체, 및 키메라 (chimeric) EGFL7를 나타낸다. 임의로, EGFL7은 천연 글리코실화와 관련되지 않는다. "천연 글리코실화"는 포유동물 세포에서, 특히 자연에서 생산되는 세포에서 생산될 때 EGFL7에 공유 결합되는 탄수화물 잔기를 나타낸다. 따라서, 비-인간 세포에서 생산된 인간 EGFL7은 "천연 글리코실화와 관련되지 않을" 수 있는 EGFL7의 한 예이다. 때때로, EGFL7은 원핵세포, 예를 들어 이. 콜리 (E. coli)에서 생산되는 경우에서와 같이 전혀 글리코실화되지 않을 수 있다.

[0048] EGFL7 핵산은 상기 정의한 EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 RNA 또는 DNA, 또는 상기 DNA 또는 RNA에 혼성화되고 엄격한 혼성화 조건 하에 그에 안정하게 결합되어 유지되고 약 10개 초과 뉴클레오티드 길이인 것이다. 엄격한 조건은 are those which (1) 세척을 위해 저이온 강도 및 고온, 예를 들어, 50°C에서 0.15M NaCl/0.015 M 시트르산나트륨/0.1% NaDodSO<sub>4</sub>를 이용하거나, (2) 혼성화 동안 변성제, 예를 들어 42°C에서 포름아미드, 예를 들어, 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750 mM NaCl, 75 mM 시트르산나트륨을 갖는 50 mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.5)를 갖는 50% (vol/vol) 포름아미드를 사용하는 것이다.

[0049] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 작동가능하게 연결된다. EGFL7 핵산은 특정 숙주 유기체 내에서 발현될 수 있도록 벡터 내에서 다른 핵산 서열과 작동가능하게 연결될 수 있다. 이는 당업계에 잘 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 전서열 (presequence) 또는 분비 리더 (secretory leader)에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되면 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치면 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치하면 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우에는 인접하고 관독상에 있는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 수행된다. 상기 부위가 존재하지 않으면, 통상적인 실행에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (adapter) 또는 링커 (linker)가 사용된다.

[0050] "천연 서열 EGFL7"은 그의 제조 방식 또는 종에 상관없이 자연으로부터 유래된 EGFL7과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 EGFL7은 천연 인간 EGFL7, 쥐 EGFL7, 제노푸스 EGFL7, 체브라피시 EGFL7 또는 임의의 다른 종으로부터의 EGFL7의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어 바람직한 전체 길이 천연 서열 인간 EGFL7 아미노산 서열을 도 1a (서열 1)에 도시한다. 천연 서열 마우스 EGFL7 아미노산 서열을 도 1a (서열 2)에 도시한다. 상기 천연 서열 EGFL7은 자연으로부터 분리할 수 있거나, 제조합 및(또는) 합성 수단에 의해 제조할 수 있다. 용어 "천연 서열 EGFL7"은 구체적으로 EGFL7의 천연 프레프로 (prepro), 프로(pro) 및 성숙 형태, 및 끝이 잘린 (truncated) 형태, 천연 변이체 형태, 및 천연 대립유전자 변이체를 포함한다.

[0051] "EGFL7 변이체"는 천연 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입, 결실, 변형 및(또는) 치환의 면에서 천연 서열 EGFL7 폴리펩티드의 서열, 예를 들어 각각 인간, 쥐, 제노푸스 및 체브라피시 EGFL7에 대해 도 1a (서열 1-4)에 도시된 것과 상이한 아미노산 서열을 갖는 생물학적 활성 EGFL7 폴리펩티드이다.

[0052] EGFL7 변이체는 일반적으로 천연 서열 EGFL7, 예를 들어 서열 1의 인간 EGFL7과 100% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 그러나, 통상적으로 생물학적 활성 EGFL7 변이체는 천연 EGFL7, 예를 들어 서열 1의 인간 EGFL7의 아미노산 서열과 적어도 약 70% 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 75%, 보다 바람직하게는 적어도 약 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 85%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는



아미노산 서열을 가질 것이고, 1% 증분으로 적어도 약 95% 내지 적어도 약 99% 아미노산 서열 동일성의 바람직함이 증가한다. EGFL7 변이체는 대응하는 천연 서열 EGFL7 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유하는 적어도 5개의 아미노산의 펩티드 단편을 포함한다. EGFL7 변이체는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연 EGFL7 서열의 N- 또는 C-말단에 또는 내부에 첨가되는 EGFL7 폴리펩티드를 포함한다. EGFL7 변이체는 또한 많은 아미노산 잔기가 결실되고 임의로 하나 이상의 아미노산 잔기로 치환되는 EGFL7 폴리펩티드를 포함한다. EGFL7 변이체는 또한 예를 들어 천연 아미노산 이외의 잔기로 치환함으로써, 또는 아미노산 잔기를 변형시켜 비-천연 아미노산을 생산함으로써 공유 변형될 수 있다. EGFL7 변이체는 헤파린 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0053] EGFL7 서열에 관하여 "아미노산 서열 동일성 비율"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후 EGFL7 서열 내의 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 후보 EGFL7 서열 내로의 삽입은 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 미치는 것으로 간주되어서는 안된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 공지되어 있다. 하나의 그러한 컴퓨터 프로그램은 미국 저작국 (United States Copyright Office, 미국 워싱턴 디. 씨. 20559)에서 사용자 제출서류로 출원된, 미국 저작권 TXU510087 하에 등록된 제넨테크 (Genentech) 소유의 "ALIGN-2"이다.

[0054] "키메릭 EGFL7" 분자는 이중성 폴리펩티드에 융합되거나 결합된 전체 길이 EGFL7 또는 그의 하나 이상의 도메인을 포함하는 폴리펩티드이다. 키메릭 EGFL7 분자는 일반적으로 천연 EGFL7과 공통으로 적어도 하나의 생물학적 특성을 공유할 것이다. 키메릭 EGFL7 분자의 예는 정제 목적으로 에피토프 태깅된 것이다. 다른 키메릭 EGFL7 분자는 EGFL7 면역어드헤신 (immunoadhesin)이다.

[0055] "단리된 EGFL7"는 EGFL7 공급원으로부터 정제되거나 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조되고 정제된 EGFL7을 의미한다. 정제된 EGFL7은 다른 폴리펩티드 또는 펩티드가 실질적으로 없다. "실질적으로 없는"은 본원에서 약 5% 미만, 바람직하게는 약 2% 미만, 보다 바람직하게는 약 1% 미만, 훨씬 더 바람직하게는 약 0.5% 미만, 가장 바람직하게는 약 0.1% 미만의 다른 공급원 단백질의 오염물을 의미한다.

[0056] "본질적으로 순수한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 90 중량%, 바람직하게는 적어도 약 95 중량%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90 중량%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 95 중량%의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다. "본질적으로 균질한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 99 중량%의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다.

[0057] 용어 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 천연 EGFL7 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. 적합한 길항제 분자는 구체적으로 길항제 항체 또는 항체 단편, 천연 EGFL7 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, EGFL7 수용체(들)의 가용성 단편, 작은 유기 분자 등을 포함한다. EGFL7 폴리펩티드의 효능제 또는 길항제를 확인하는 방법은 EGFL7 폴리펩티드를 후보 효능제 또는 길항제 분자와 접촉시키고 정상적으로 EGFL7 폴리펩티드와 관련된 하나 이상의 생물학적 활성의 검출가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0058] 본원의 목적에서 "활성인" 또는 "활성"은 천연 또는 자연발생 EGFL7의 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 보유하는 형태(들)를 나타내고, 여기서 "생물학적" 활성은 천연 또는 자연발생 EGFL7이 갖는 항원성 에피토프에 대한 항체의 생산을 유발하는 능력 이외의 천연 또는 자연발생 EGFL7이 일으키는 생물학적 기능 (억제성 또는 자극성)을 나타내고 "면역학적" 활성은 천연 또는 자연발생 EGFL7이 갖는 항원성 에피토프에 대한 항체의 생산을 유발하는 능력을 나타낸다.

[0059] 따라서, "EGFL7" 또는 "단리된 EGFL7" 또는 EGFL7의 효능제와 관련되어 사용될 때 "생물학적 활성"은 천연 서열 EGFL7의 효과기 기능을 나타내거나 공유하는 EGFL7 폴리펩티드를 의미한다. EGFL7의 주요 효과기 기능은 혈관 형성을 촉진하는 능력이다. 훨씬 더 바람직하게는, 생물학적 활성은 관생성을 조절하는 능력이다.

[0060] "EGFL7 수용체"는 EGFL7가 결합하고 EGFL7의 생물학적 특성을 매개하는 분자이다.

[0061] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 인간, 비-인간 (예를 들어, 쥐) 및 인간화 모노클로날 항체 (전체 길이 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.

[0062] "항체" (Ab) 및 "면역글로불린" (Ig)은 동일한 구조 특징을 갖는 당단백질이다. 항체는 특이적 항원에 결합 특이성을 나타내는 한편, 면역글로불린은 항체 및 항원 특이성이 없는 다른 항체 유사 분자 모두를 포함한다. 후

자의 폴리펩티드 종류는 예를 들어 림프계에 의해 낮은 수준으로 및 골수종에 의해 증가된 수준으로 생산된다.

- [0063] "천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진, 약 150,000 달톤의 보통 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 디설피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디설피드 연결기의 수는 상이한 면역글로불린 이소타입 (isotype)의 중쇄 사이에 변한다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 한 단부에서 가변 도메인 ( $V_H$ )에 이어 많은 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 한 단부에서 가변 도메인 ( $V_L$ ) 및 그의 다른 단부에서 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 경계면을 형성하는 것으로 생각된다.
- [0064] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체를 사이에서 서열이 광범하게 상이하고 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 나타낸다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 균등하게 분포되지는 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역으로 불리는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인의 보다 많이 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 연결하는 루프를 형성하고 몇몇 경우에  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결되는, 주로  $\beta$ -시트 형상을 취하는 4개의 FR (각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함한다. 각 사슬에서 초가변 영역은 FR에 의해 함께 근접하게 유지되고, 다른 사슬로부터의 초가변 영역과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), pages 647-669 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관여되지는 않지만, 다양한 효과기 기능, 예를 들어 항체-의존적 세포 독성에서 항체의 참여를 보인다.
- [0065] 본원에서 사용되는 용어 "초가변 영역"은 항원 결합에 작용하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 영역은 경쇄 가변 도메인의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" (즉, 경쇄 가변 도메인의 잔기 약 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3)과 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 및(또는) "초가변 루프"로부터의 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인의 잔기 약 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR"은 본원에서 규정되는 초가변 영역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.
- [0066] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 잔류 "Fc" 단편 (상기 명칭은 쉽게 결정화하는 능력을 반영한다)을 생성시킨다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는  $F(ab')_2$  단편을 생성시킨다.
- [0067] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 긴밀하게 비공유 회합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 상기 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 초가변 영역은 상호작용하여  $V_H$ - $V_L$  이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)도 통상 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하여 결합할 능력을 갖는다.
- [0068] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역에 하나 이상의 시스테인(들)을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에 복수개의 잔기의 부가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 명칭이다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 결합이 또한 공지되어 있다.
- [0069] 임의의 척추동물종으로부터 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )로 불리는 2개의 명백하게 구분되는 종류 중 하나로 지정될 수 있다.
- [0070] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM가 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입),

예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 및  $\mu$ 로 불린다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 잘 알려져 있다.

[0071] "항체 단편"은 전체 길이 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 도메인을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0072] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 말하는데, 즉 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 특이성이 높다. 또한, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 일반적으로 포함하는 통상적인 (폴리클로날) 항체 제제에 비해, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 변경 표현 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의해 항체 제조를 필요로 하는 것으로서 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 4,816,567 참조)에 의해 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 과지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0073] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부가 특정 중에서 유래하거나 특정 항체 종류 또는 서브클래스에 속하는 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬(들)의 나머지는 다른 중에서 유래하거나 다른 항체 종류 또는 서브클래스에 속하는 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메릭" 항체 (면역글로불린) 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; 및 Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

[0074] 비-인간 (예를 들어, 쥐) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메릭 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수여자의 추가변 영역의 잔기가 요구되는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린 (수여자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변경은 항체 성능을 보다 개선하기 위한 것이다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 영역은 비-인간 면역글로불린의 추가변 영역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR에 대응한다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)] 참조.

[0075] "단쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 요구되는 구조를 형성하게 하는 V<sub>H</sub> 도메인과 V<sub>L</sub> 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv에 대해서는, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)] 참조.

[0076] 용어 "디아바디 (diabody)"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미하고, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>) 내의 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 페어링하여 2개의 항원 결합 부위를 생성시키게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 상세하게 기재되어 있다.

[0077] 본원 전반에 걸쳐 사용된 표현 "선형 항체"는 문헌 [Zapata et al., Protein Eng., 8 (10):1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 의미한다. 간단히 설명하면, 상기 항체는 한쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한쌍의 탠덤 Fd

세그먼트 ( $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ )를 포함한다. 선형 항체는 2 특이적 또는 1 특이적일 수 있다.

- [0078] 용어 "에피토프"는 단백질 항원 상의 (모노클로날 또는 폴리클로날) 항체에 대한 결합 부위를 나타내는 것으로 사용된다.
- [0079] "효능제 항체"는 EGFL7 효능제이고, 따라서 천연 서열 EGFL7의 하나 이상의 생물학적 특성을 갖는 항체를 의미한다.
- [0080] 용어 "EGFL7 면역어드헤신"은 용어 "EGFL7-면역글로불린 키메라"와 상호교환가능하게 사용되고, EGFL7 분자 (천연 또는 변이체)의 적어도 일부를 면역글로불린 서열과 조합한 키메라 분자를 나타낸다. 면역글로불린 서열은 반드시 아니지만 바람직하게는 면역글로불린 불변 도메인이다. 면역어드헤신은 인간 항체의 많은 유용한 화학적 및 생물학적 특성을 가질 수 있다. 면역어드헤신은 적절한 인간 면역글로불린 힌지 및 불변 도메인 (Fc) 서열에 연결된 목적하는 특이성을 갖는 인간 단백질 서열로부터 구성될 수 있으므로, 관심있는 결합 특이성은 전적으로 인간 성분을 사용하여 달성될 수 있다. 상기 면역어드헤신은 환자에게 최소한으로 면역원성이고, 장기 또는 반복 사용에 안전하다.
- [0081] 치료 용도로 설명된 동중다량체 (homomultimeric) 면역어드헤신의 예는 세포 표면 CD4에 대한 HIV를 차단하기 위한 CD4-IgG 면역어드헤신을 포함한다. CD4-IgG를 분만 직전의 임부에게 투여하는 I상 임상 시험으로부터 얻은 데이터는 상기 면역어드헤신이 HIV의 모-태아 전달의 예방에서 유용할 수 있음을 시사한다 (Ashkenaziet al., Intern. Rev. Immunol. 10:219-227 (1993)). 종양 괴사 인자 (TNF)에 결합하는 면역어드헤신이 또한 개발되었다. TNF는 패혈성 쇼크의 주요 매개체인 것으로 나타난 전염증성 시토킨이다. 패혈성 쇼크의 마우스 모델에 기초로, TNF 수용체 면역어드헤신은 패혈성 쇼크를 치료하는데 있어서 임상 사용을 위한 후보물로서 유망한 것으로 나타났다 (Ashkenazi, A. et al. PNAS USA 88:10535-10539 (1991)). IgG Fc 영역에 융합된 TNF 수용체 서열을 포함하는 면역어드헤신인 ENBREL(등록상표) (에타네르셉트)는 류마티스성 관절염의 치료용으로 미국 식품의약청 (FDA)에서 1998년 11월 2일에 승인되었다. 류마티스성 관절염 치료에서 ENBREL(등록상표)의 새로 확장된 용도는 FDA에서 2000년 6월 6일에 승인되었다. ENBREL(등록상표)를 포함하는 TNF 차단제에 대한 최근 정보는 문헌 [Lovell et al., N. Engl. J. Med. 342:763-169 (2000), 및 첨부되는 편집자 글 p810-811; 및 Weinblatt et al., N. Engl. J. Med. 340:253-259 (1999); reviewed in Maini and Taylor, Annu. Rev. Med. 51:207-229 (2000)]을 참조한다.
- [0082] 면역어드헤신 구조의 2개의 팔이 상이한 특이성을 가지면, 면역어드헤신은 이중특이적 항체에 유사하게 "이중특이적 면역어드헤신"로 불린다. 문헌 [Dietsch et al., J. Immunol. Methods 162:123 (1993)]에서는 상기 이중특이적 면역어드헤신이 부각 분자의 세포외 도메인, E-선택틴 및 P-선택틴에 결합하고, 그의 각각의 선택틴은 자연에서 상이한 세포 종류에서 발현됨을 설명한다. 결합 연구는 이렇게 형성된 이중특이적 면역글로불린 융합 단백질이 그가 유래되는 단일특이적 면역어드헤신에 비해 골수세포주에 결합하는 능력이 향상되었음을 나타낸다.
- [0083] 용어 "이중어드헤신"은 표현 "키메라 이중다량체 (heteromultimer) 어드헤신"과 상호교환가능하게 사용되고, 각각의 키메라 분자가 생물학적 활성 부분, 예를 들어 각각의 이중다량체성 수용체 단량체의 세포외 도메인을 다량체화 도메인과 결합시키는 키메라 분자 (아미노산 서열)의 복합체를 나타낸다. "다량체화 도메인"은 이중다량체 복합체 내에서 키메라 분자의 안정한 상호작용을 촉진한다. 다량체화 도메인은 면역글로불린 서열, 류신 지퍼, 소수성 영역, 친수성 영역, 또는 키메라 이중다량체의 키메라 분자 사이에 분자간 디설피드 결합을 형성하는 유리 티올을 통해 상호작용할 수 있다. 다량체화 도메인은 면역글로불린 불변 영역을 포함할 수 있다. 또한, 다량체화 영역은 입체 상호작용이 안정한 상호작용을 촉진할 뿐만 아니라 단량체의 혼합물로부터 동종이량체에 비해 이중이량체의 형성을 추가로 촉진하도록 공학처리될 수 있다. "융기"는 제1 폴리펩티드의 경계면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예를 들어 티로신 또는 트립토판)으로 교체함으로써 구성된다. 융기와 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티 (cavity)"는 임의로 제2 폴리펩티드의 경계면 상에서 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 형성된다. 면역글로불린 서열은 반드시 아니지만 바람직하게는 면역글로불린 불변 도메인이다. 본 발명의 키메라 내의 면역글로불린 잔기는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서브타입, IgA, IgE, IgD 또는 IgM, 그러나 바람직하게는 IgG1 또는 IgG3으로부터 얻을 수 있다.
- [0084] 본원에서 사용되는 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 방법이다. 본 발명의 목적에서, 유익하거나 바람직한 임상 결과는 검출가능하거나 검출가능하지 않거나 증상의 완화, 질병 정도의 감소, 안정화된 (즉, 악화하지 않는) 질병 상태, 질병 진행의 지연 또는 서행, 질병 상태의 개량 또는 경감, 및 완화 (부분 또



는 완전)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 경우의 기대 생존율에 비해 연장되는 생존율을 의미한다. "치료"는 질환의 발생을 예방하거나 질환의 병리학을 변경시키는 의도로 수행된 개입이다. 따라서, "치료"는 치료적 치료 및 예방적 수단을 모두 나타낸다. 치료를 필요로 하는 이는 이미 질환에 걸린 이와 질환을 예방해야 하는 이를 포함한다. 구체적으로, 치료는 직접적으로 세포성 변형 또는 손상의 병리학, 예를 들어 암 치료에서 종양 세포의 병리학을 예방하거나, 감속시키거나 감소시킬 수 있거나, 세포를 다른 치료제에 의한 치료에 보다 감수성이 되도록 할 수 있다.

[0085] "장기" 투여는 연장된 기간 동안 초기 치료 효과 (활성)을 유지하기 위해 단기 방식에 반대로 연속 방식의 약제 (들)의 투여를 나타낸다. "간헐" 투여는 중단하지 않고 연속적으로 수행되지 않고, 대신 사실상 주기적인 치료이다.

[0086] 치료를 목적으로 하는 "포유동물"은 포유동물로 분류되는 임의의 동물, 예를 들어 인간, 다른 고등 영장류, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 경주용 또는 애완 동물, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 나타낸다. 바람직하게는, 포유동물은 사람이다.

[0087] 본원에서 사용되는 "종양"은 악성이든지 양성이든지 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다.

[0088] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 폐암 (예를 들어 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종), 복막의 암, 간세포 암, 위암 (예를 들어 위장관암), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선 암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 다양한 종류의 두경부암, 및 B-세포 림프종 (예를 들어 저급/소포 비호지킨 (non-Hodgkin) 림프종 (NHL); 소림프구성 (SL) NHL; 중간 등급/소포 NHL; 중간 등급 확산 NHL; 고급 면역모세포 NHL; 고급 림프아구성 NHL; 고급 소 비분할 세포 NHL; 벌키 (bulky) 질병 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 (Waldenstrom) 거대글로불린혈증); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 모(hairy)세포 백혈병; 만성 골수모세포성 백혈병; 및 이식후 림프세포 증식성 질환 (PTLD), 및 모반증과 관련된 비정상 혈관 증식, 부종 (예를 들어, 뇌종양과 관련된), 및 메이그스 (Meigs) 증후군을 포함한다.

[0089] "화학치료제"는 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학치료제의 예는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 CYTOXAN(등록상표) 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술허, 임프로술허 및 피포술허; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄포테신 (예를 들어 합성 유사체 토포테칸); 브리오스타틴; 칼리스트타틴; CC-1065 (예를 들어 그의 아도제레신, 카르제레신 및 비제레신 합성 유사체); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 도라스타틴; 두오카르마이신 (예를 들어 합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1); 에류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디타이인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스포아미드, 에스트라무스틴, 이포스포아미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 염산염, 멜파란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포아미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디와인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오키르지노스타틴 흡광단 (chromophore) 및 관련 크로모단백질 에네디와인 항생제 흡광단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캇티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN(등록상표) 독소루비신 (예를 들어 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사체, 예를 들어 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메토평렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토평린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈,



디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 예를 들어 아미노글루테치미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프로리닌산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소잔트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당체 복합체 (제이에이치에스 내추럴 프로덕츠 (JHS Natural Products), 미국 오레곤주 유진); 자족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안퀴딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미도락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL(등록상표) 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스쿼브 옹콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology), 미국 뉴저지주 프린스턴), ABRAXANE™ Cremophor-free, 파클리탁셀의 알부민-처리된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스, (American Pharmaceutical Partners), 미국 일리노이주 샤움버그), 및 TAXOTERE(등록상표) 독세탁셀 (롱-프랑로라 (Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안톤); 클로람부실; GEMZAR(등록상표) 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토프린; 메토트렉세이트; 백금 배위 착물, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빈크리스틴; NAVELBINE(등록상표) 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈; 및 상기 물질의 제약학상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0090] 또한 상기 정의에 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제, 예를 들어 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어 NOLVADEX(등록상표) 타목시펜 포함), 탈록시펜, 드로록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 FARESTON 토레미펜; 부신선에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테치미드, MEGASE(등록상표) 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN(등록상표) 엑세메스탄, 포르메스탄, 파드로졸, RIVISOR(등록상표) 보로졸, FEMARA(등록상표) 레트로졸, 및 ARIMIDEX(등록상표) 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 트룩사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 (abherent) 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Ralf 및 H-Ras; 리보자임, 예를 들어 VEGF 발현 억제제 (예를 들어 ANGIOZYME(등록상표) 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예를 들어 유전자 치료 백신, 예를 들어 ALLOVECTIN(등록상표) 백신, LEUVECTIN(등록상표) 백신 및 VAXID(등록상표) 백신; PROLEUKIN(등록상표) rIL-2; LURTOTECAN(등록상표) 토포이소머라제 1 억제제; ABARELIX(등록상표) rmRH; 및 이들의 제약학상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0091] "안내 신생혈관 질병"은 눈 신생혈관형성을 특징으로 하는 질병이다. 안내 신생혈관 질병의 예는 증식 망막병증, 맥락막 신생혈관형성 (CNV), 연령관련 황반 변성 (AMD), 당뇨 및 다른 허혈-관련 망막병증, 당뇨 황반부종, 병리학적 근시, 폰 힙펠-린다우 (von Hippel-Lindau) 질병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 중심 정맥 폐쇄 (CRVO), 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0092] 질병의 "병리학"은 환자의 안녕을 손상하는 모든 현상을 포함한다. 암에 대해, 이는 비제한적으로 비정상 또는 제어불가능한 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상 기능의 저해, 비정상 수준으로 시토킨 또는 다른 분비성 생성물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화 등을 포함한다.

[0093] 하나 이상의 추가의 치료제와 조합한 투여는 동시 (병행) 및 임의의 순서로 연속 투여를 포함한다.

[0094] 본원에 사용되는 "담체"는 사용되는 용량 및 농도에서 노출되는 세포 또는 포유동물에게 무독성인 제약학상 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충된 용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 또는 리신; 당당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및(또는) 비

이온계 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 PLURONICS™를 포함한다.

- [0095] "리포좀"은 포유동물에 약물 (예를 들어, EGFL7 폴리펩티드 또는 그에 대한 항체)의 전달에 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 구성된 소포이다. 리포좀의 성분은 일반적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사하게 복층 형성으로 배열된다.
- [0096] "소분자"는 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 본원에서 정의된다.
- [0097] 본원에서 사용되는 용어 "혈관내피 성장인자", "VEGF", "VEGF 폴리펩티드" 및 "VEGF 단백질"은 천연 서열 VEGF 및 VEGF 변이체 (본원에서 추가로 정의된다)를 포함한다. VEGF 폴리펩티드는 다양한 공급원, 예를 들어 인간 조직 종류로부터 또는 다른 공급원으로부터 분리되거나, 재조합 및(또는) 합성 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0098] "천연 서열 VEGF"는 자연에서 유래된 VEGF와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 상기 천연 서열 VEGF는 자연으로부터 분리될 수 있거나, 재조합 및(또는) 합성 수단에 의해 제조될 수 있다. 용어 "천연 서열 VEGF"는 구체적으로 VEGF의 자연 생성된 끝이 잘리거나 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 천연 변이체 형태 (예를 들어, 별법으로 스플라이싱 (spliced) 형태) 및 천연 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 한 실시태양에서, 천연 서열 VEGF는 예를 들어 미국 특허 5,332,671과 5,240,848; PCT 공개 WO 98/10071; 문헌 [Leung et al., Science 246:1306-1309 (1989); 및 Keck et al., Science 246:1309-1312 (1989)]에 기재된 바와 같은 각각 121, 145, 165, 189, 및 206 아미노산 잔기로 이루어진 5가지 공지의 이소형 중 하나이다.
- [0099] "VEGF 변이체 폴리펩티드"는 천연 서열 VEGF의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 95%, 가장 바람직하게는 적어도 약 98% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아래 정의한 바와 같은 활성 VEGF 폴리펩티드를 의미한다. 상기 VEGF 변이체 폴리펩티드는 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연 서열의 N- 및(또는) C-말단 및 하나 이상의 내부 도메인에서 부가되거나 삭제되는 VEGF 폴리펩티드를 포함한다.
- [0100] VEGF에 대한 서열 동일성 (아미노산 또는 핵산)은 EGFL7에 관하여 구체적으로 설명된 것과 동일한 방법을 이용하여 결정된다. 유사하게, 비제한적으로 항체를 포함하는 EGFL7의 효능제 및 길항제에 대해 제공된 정의가 VEGF 효능제 및 길항제에 적용될 것이다.
- [0101] 본 발명을 수행하기 위한 방법
- [0102] EGFL7
- [0103] EGFL7 유전자는 진화적으로 보존되는 ~30 kD의 분비형 ECM 관련 단백질을 코딩한다. 인간 (호모 사피엔스) 아미노산 서열 (서열 1)은 마우스 (무스 무스쿨루스; 서열 2), 개구리 (제노푸스 래비스; 서열 3) 및 제브라피시 (다니오 레리오; 서열 4)의 아미노산 서열에 각각 77%, 47% 및 43% 상동성을 공유한다. EGFL7 단백질은 시그널 서열, N-말단에서 EMI 도메인 (EMI 도메인은 세포 부착을 조절하는데 관여하는 많은 세포외 매트릭스 관련 단백질 내에 존재한다)에 이어, 2개의 EGF 유사 도메인 및 류신 및 발린 풍부 C-말단 영역을 함유한다.
- [0104] 핵산 및 폴리펩티드 분자가 본 발명에서 사용된다. 인간, 마우스, 제노푸스 및 제브라피시 EGFL7 아미노산 서열이 각각 서열 1-4로서 제공된다 (도 1a 참조). 제브라피시 cDNA (부분 게놈 인트론 서열을 갖는)는 서열 5 (도 1b 참조)로서 제공된다. 본 발명에서 사용된 폴리뉴클레오티드는 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 표준 기술, 예를 들어, 혼성화 스크리닝 및 PCR 방법을 사용하여 얻을 수 있다.
- [0105] EGFL7에 대한 기탁 번호는: NM\_016215 (호모 사피엔스 EGFL7/VE-스타틴), NM\_178444 (무스 무스쿨루스 EGFL7), AF184973 (무스 무스쿨루스 Notch4-유사), P\_AAZ37135 (무스 무스쿨루스 TANGO125), BC044267 (제노푸스 래비스 NEU1), AY542170 (다니오 레리오 EGFL7)이다. Egf18 기탁 번호는: NM\_030652 (호모 사피엔스), NM\_152922 (무스 무스쿨루스)이다.
- [0106] EGFL7 활성의 조절제의 제조 및 확인
- [0107] 본 발명은 또한 EGFL7의 하나 이상의 생물학적 활성을 모방하거나 향상시키는 것 (효능제); 또는 EGFL7의 효과를 억제하거나 감소시키는 것 (길항제)을 확인하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다. EGFL7 효능제 및 길항제는 또한 EGFL7 조절제로도 불린다. 길항제 약물 후보에 대한 스크리닝 분석은 EGFL7 폴리펩티드에 결합하거나 복합체를 형성하거나, 또는 달리 EGFL7와 다른 세포성 단백질의 상호작용을 저해하는 화합물을 확인하도록 설계된다.

- [0108] 소분자 스크리닝
- [0109] 소분자는 EGFL7 효능제 또는 길항제로서 작용하는 능력을 갖고 따라서 치료적으로 유용할 수 있다. 상기 소분자는 천연 소분자, 합성 유기 또는 무기 화합물 및 펩티드를 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명에서 소분자는 이들 형태로 제한되지 않는다. 소분자의 광범한 라이브러리가 상업적으로 입수가능하고, 목적하는 활성에 대해 이들 분자를 스크리닝하기 위한 매우 다양한 분석이 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0110] 후보 EGFL7 효능제 또는 길항제 소분자는 바람직하게는 먼저 EGFL7 활성의 효능있는 조절제를 신속하게 확인할 수 있는 분석으로 확인된다. 상기 분석의 예는 EGFL7 수용체에 결합하는 후보 분자의 능력을 측정하는 단백질-단백질 결합 분석이다. 다른 예에서, EGFL7 수용체에 결합하는 EGFL7를 저해하는 후보 분자의 능력을 측정한다.
- [0111] 바람직한 실시태양에서, 소분자 EGFL7 효능제는 EGFL7의 하나 이상의 생물학적 활성을 모방하는 그들의 능력에 의해 확인된다. 예를 들어, 소분자는 내피 세포의 증식을 유도하거나, 하기 실시예 2 및 3에 기재된 바와 같이 내피 세포 생존을 촉진하거나, 아래 실시예 4에 기재된 바와 같이 혈관신생을 유도하는 그들의 능력에 대해 스크리닝된다.
- [0112] 다른 실시태양에서, 소분자 EGFL7 길항제는 EGFL7의 하나 이상의 생물학적 활성을 억제하는 그들의 능력에 의해 확인된다. 이어서 후보 화합물은 EGFL7과 접촉된다. 이어서 EGFL7의 생물학적 활성이 평가된다. 한 실시태양에서, 내피 세포 증식을 자극하는 EGFL7의 능력이 예를 들어 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정된다. 다른 실시태양에서, 내피 세포 생존을 촉진하는 EGFL7의 능력이 예를 들어 실시예 3에 기재된 바와 같이 결정된다. EGFL7의 생물학적 활성을 억제하는 경우 화합물은 길항제로서 확인된다.
- [0113] EGFL7 효능제 또는 길항제로서 확인된 화합물은 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, EGFL7 길항제는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0114] EGFL7과 상호작용하는 단백질에 대한 스크리닝 분석
- [0115] 단백질-단백질 상호작용을 검출하기에 적합한 임의의 방법은 트랜스멤브레인 또는 세포내 단백질을 포함하여 이로 제한되지 않는, EGFL7와 상호작용하는 단백질 또는 다른 분자를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 전통적인 방법 중에는, EGFL7과 상호작용하는 단백질을 확인하기 위한 동시면역침전, 가교결합 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 동시정제가 존재한다. 상기 분석을 위해, EGFL7 성분은 전체 길이 단백질, 그의 가용성 유도체, 목적하는 도메인에 대응하는 펩티드 또는 EGFL7의 일부 구역을 포함하는 융합 단백질일 수 있다.
- [0116] EGFL7과 상호작용할 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자의 동시 확인이 가능한 방법을 사용할 수 있다. 상기 방법은 예를 들어 표지된 EGFL7 또는 그의 변이체를 사용하는 공지의  $\lambda$ gt11 라이브러리의 항체 프로빙 기술에 유사한 방식의 발현 라이브러리의 프로빙을 포함한다.
- [0117] 생체 내에서 단백질 상호작용을 검출하는 방법인 2 하이브리드 시스템은 단지 예시를 위해 상세하게 설명하지만 이로 제한되지 않는다. 상기 시스템의 한 형태는 문헌 [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582 (1991)]에 기재되어 있고, 클론테크 (Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로 알토)로부터 상업적으로 입수가능하다.
- [0118] 간략하게 설명하면, 상기 시스템을 사용하여 한 플라스미드는 EGFL7, 또는 그로부터의 폴리펩티드, 펩티드 또는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 융합된 전사 활성화제 단백질의 DNA-결합 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드로 구성되고, 다른 플라스미드는 cDNA 라이브러리의 일부로서 플라스미드 내로 조합된 미지의 단백질을 코딩하는 cDNA에 융합된 전사 활성화제 단백질의 활성화 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된 2개의 하이브리드 단백질을 코딩하는 플라스미드를 제조한다. DNA-결합 도메인 융합 플라스미드 및 cDNA 라이브러리는 그의 조절 구역이 전사 활성화제 결합 부위를 포함하는 리포터 유전자 (예를 들어 HBS 또는 lacZ)를 포함하는 효모 사카로마이세스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 내로 형질전환된다. 어느 한 하이브리드 단백질 단독으로는 리포터 유전자의 전사를 활성화시킬 수 없고, 그 이유는 DNA-결합 도메인 하이브리드는 활성화 기능을 제공하지 않기 때문이고, 활성화 도메인 하이브리드는 활성화제의 결합 부위에 위치할 수 없기 때문이다. 두 하이브리드 단백질의 상호작용은 기능적 활성화제 단백질을 재구성하고, 리포터 유전자의 발현을 야기하고, 이는 리포터 유전자 생성물에 대한 분석으로 검출된다.
- [0119] 2 하이브리드 시스템 또는 관련 방법은 "미끼 (bait)" 유전자 생성물과 상호작용하는 단백질에 대해 활성화 도

메인 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 제한되지 않는 방식으로, EGFL7은 미끼 유전자 생성물로서 사용될 수 있다. 전체 게놈 또는 cDNA 서열은 활성화 도메인을 코딩하는 DNA에 융합된다. 이 라이브러리 및 DNA-결합 도메인에 융합된 미끼 EGFL7 유전자 생성물의 하이브리드를 코딩하는 플라스미드는 효모 리포터 균주 내로 동시 형질전환되고, 생성되는 형질전환체가 리포터 유전자를 발현하는 것에 대해 스크리닝된다. 예를 들어, 제한되지 않는 방식으로, 미끼 EGFL7 유전자 서열, 예를 들어 유전자 개방 해독 프레임, GAL4 단백질의 DNA-결합 도메인을 코딩하는 DNA에 번역 가능하게 융합되도록 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 상기 콜로니는 정제하고, 리포터 유전자 발현을 위해 기능하는 라이브러리 플라스미드를 단리한다. 이어서, DNA 서열결정을 사용하여 라이브러리 플라스미드에 의해 코딩되는 단백질을 확인한다

[0120] 미끼 EGFL7 유전자 생성물과 상호작용하는 단백질이 그로부터 검출되는 모든 세포주의 cDNA 라이브러리는 당업계에서 통상 실시되는 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에서 설명되는 특정 시스템에 따라, 예를 들어 cDNA 단편은 GAL4의 전사 활성화 도메인에 번역가능하게 융합되도록 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기 라이브러리는 미끼 EGFL7 유전자-GAL4 융합 플라스미드와 함께 GAL4 활성화 서열을 포함하는 프로모터에 의해 작동되는 lacZ 유전자를 포함하는 효모 균주 내로 동시 형질전환될 수 있다. 미끼 EGFL7 유전자 생성물과 상호작용하는 GAL4 전사 활성화 도메인에 융합된 단백질을 코딩하는 cDNA는 활성화 GAL4 단백질을 재구성하여 발현을 유도할 것이다. 발현을 유도하는 콜로니는 당업계에 통상적인 방법으로 검출할 수 있다. 이어서, cDNA는 상기 균주로부터 정제하고, 당업계에서 통상 실시되는 기술을 사용하여 미끼 EGFL7 유전자-상호작용 단백질을 생산 및 단리하기 위해 사용될 수 있다.

[0121] *EGFL7 발현 또는 활성을 조절하는 화합물에 대한 분석*

[0122] 다음 분석은 EGFL7과 상호작용 (예를 들어 결합)하는 화합물, EGFL7의 그의 결합 파트너, 동족체 또는 수용체와의 상호작용을 저해하는 화합물 및 EGFL7 유전자 발현의 활성을 조절 (즉, EGFL7 유전자 발현 수준을 조절)하거나 신체에서 EGFL7 수준을 조절하는 화합물을 확인하도록 설계된다. EGFL7 유전자 조절 서열 (예를 들어 프로모터 서열)에 결합하여 EGFL7 유전자 발현을 조절할 수 있는 화합물을 확인하는 분석을 추가로 이용할 수 있다 (예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 Platt, K.A., J. Biol. Chem. 269:28558-28562 (1994) 참조).

[0123] 본 발명에 따라 스크리닝할 수 있는 화합물은 펩티드, 항체 및 그의 단편, 및 EGFL7 또는 EGFL7 수용체에 결합하고 천연 리간드에 의해 촉발되는 활성을 모방하거나 (즉, 효능제) 천연 리간드에 의해 촉발되는 활성을 억제하는 (즉, 길항제) 다른 유기 화합물 (예를 들어, 펩티드 모방체)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0124] 상기 화합물은 랜덤 펩티드 라이브러리 (예를 들어, Lam, K. S. et al., Nature 354:82-84 (1991); Houghten, R. et al., Nature 354:84-86 (1991) 참조)의 멤버를 포함하여 이로 제한되지 않는 펩티드, 예를 들어 가용성 펩티드, 및 D- 및(또는) L-배열 아미노산, 인산화펩티드 (예를 들어 랜덤 또는 부분 축퇴성 (degenerate), 지정 인산화펩티드 라이브러리의 멤버 (이로 제한되지 않음); 예를 들어, Songyang, Z. et al., Cell 72:767-778 (1993) 참조), 항체 (예를 들어 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 항-개체특이형, 키메라 또는 단쇄 항체, 및 FAb, F(ab')<sub>2</sub> 및 FAb 발현 라이브러리 단편, 및 그의 에피토프-결합 단편), 및 작은 유기 또는 무기 분자로 이루어진 조합 화학-유도 분자 라이브러리를 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0125] 본 발명에 따라 스크리닝될 수 있는 다른 화합물은 적절한 세포 (예를 들어 내피 세포) 내로 도입되고 EGFL7 유전자 또는 EGFL7 매개 경로에 관련되는 몇몇 다른 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 (예를 들어 유전자 발현에 관련되는 조절 구역 또는 전사 인자와 상호작용함으로써) 작은 유기 분자; 또는 EGFL7의 활성 또는 EGFL7 시그널 전달, 이화 또는 대사 경로에 관련되는 몇몇 다른 세포내 인자의 활성에 영향을 주거나 이 활성을 대체하는 화합물을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0126] 컴퓨터 모델링 및 탐색 기술은 EGFL7 발현 또는 활성을 조절할 수 있는 화합물의 확인 또는 기확인된 화합물의 개선을 가능하게 한다. 상기 화합물 또는 조성물을 확인하여 활성 부위 또는 구역이 확인된다. 상기 활성 부위는 일반적으로 리간드 결합 부위일 수 있다. 활성 부위는 예를 들어 펩티드의 아미노산 서열로부터, 핵산의 뉴클레오타이드 서열로부터 또는 관련 화합물 또는 조성물과 그의 천연 리간드의 복합체 연구로부터 당업계에 공지된 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 후자의 경우에, 화학적 또는 X선 결정학적 방법을 사용하여 복합체화된 리간드가 인자의 어디에 존재하는지를 밝혀냄으로써 활성 부위를 발견할 수 있다.

[0127] 이어서, 활성 부위의 3차원 기하 구조를 결정한다. 이것은 완전한 분자 구조를 결정할 수 있는 X선 결정학을 포함하여 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 다른 한편으로, 고상 또는 액상 NMR을 사용하여 특정 분자내 거리를 결정할 수 있다. 임의의 다른 실험적 구조 결정 방법을 사용하여 부분적인 또는 완전한 기하 구조를 얻을



수 있다. 기하 구조는 결정되는 활성 부위의 정확성을 증가시킬 수 있는, 천연 또는 인공 복합체화된 리간드를 사용하여 측정할 수 있다.

[0128] 불완전한 또는 정확도가 불충분한 구조가 결정될 경우, 컴퓨터 기반 수치 모델링 방법을 사용하여 구조를 완전하게 하거나 그 정확도를 개선시킬 수 있다. 특정 생체고분자, 예를 들어 단백질 또는 핵산에 특이적인 파라미터 모델, 분자 운동 계산에 기초한 분자 동역학, 열 앙상블에 기초한 통계적 기계학 모델 또는 조합 모델을 포함하여 임의의 승인된 모델링 방법을 사용할 수 있다. 대부분의 종류의 모델에 대해, 구성 원자와 기 사이의 힘을 나타내는 표준 분자력장이 필요하고, 물리화학에 공지된 역장으로부터 선택할 수 있다. 불완전하거나 정확도가 낮은 실험 구조는 상기 모델링 방법으로 계산된 완전하고 보다 정확한 구조에 대한 제약 인자로서 기능할 수 있다.

[0129] 마지막으로, 실험에 의해, 모델링에 의해 또는 이들 조합에 의해 활성 부위 (또는 결합 부위)의 구조를 결정하여 후보 조절 화합물은 그들의 분자 구조에 대한 정보와 함께 화합물을 포함하는 데이터베이스를 검색하여 확인할 수 있다. 상기 검색은 결정된 활성 부위 구조와 일치하고 활성 부위를 규정하는 기와 상호작용하는 구조를 갖는 화합물을 찾는다. 상기 검색은 수동으로 수행할 수 있지만, 바람직하게는 컴퓨터를 사용할 수 있다. 상기 검색에서 발견된 이들 화합물은 EGFL7 활성의 잠재적인 조절제이다.

[0130] 별법으로, 이들 방법을 사용하여 이미 알려진 조절 화합물 또는 리간드로부터 개선된 조절 활성 부위를 확인할 수 있다. 공지의 화합물의 조성물을 변형할 수 있고, 구조적 변형 효과는 새로운 조성물에 적용한, 상기 설명한 실험 및 컴퓨터 모델링 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 변형된 구조는 이어서 개선된 맞춤 또는 상호작용이 발생하는지를 결정하기 위해 화합물의 활성 부위 구조와 비교한다. 이러한 방식으로, 예를 들어 측기를 변경시켜 조성물의 체계적인 변동을 신속하게 평가하여 개선된 특이성 또는 활성을 갖는 변형된 조절 화합물 또는 리간드를 얻을 수 있다.

[0131] EGFL7의 활성 부위 (또는 결합 부위)의 확인을 기초로 한 조절 화합물, 및 관련 형질도입 및 전사 인자 확인에 유용한 추가의 실험 및 컴퓨터 모델링 방법은 당업계의 숙련인에게 자명할 것이다.

[0132] 분자 모델링 시스템의 예는 CHARMM 및 QUANTA 프로그램 (폴리젠 코퍼레이션 (Polygen Corporation), 미국 매사추세츠주 윌탐)이다. CHARMM은 에너지 최소화 및 분자 동역학 기능을 수행한다. QUANTA는 분자 구조의 구성, 그래픽 모델링 및 분석을 수행한다. QUANTA는 분자의 상호작용하는 구성, 변형, 가시화 및 서로간의 행동 분석을 가능하게 한다.

[0133] 많은 문헌은 특정 단백질과 상호작용하는 약물의 컴퓨터 모델링을 검토한 바 있다 [예를 들어 Rotivinen, et al., Acta Pharmaceutical Fennica 97:159-166 (1988); Ripka, New Scientist 54-57 (June 16, 1988); McKinaly and Rossmann, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:111-122 (1989); Perry and Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis and Dean, Proc. R. Soc. Lond. 236:125-140 (1989) and 141-162; 및 핵산 성분에 대한 모델 수용체에 대해서는 Askew, et al., J. Am. Chem. Soc. 111:1082-1090 (1989)]. 화학물질을 스크리닝하고 그래픽으로 도시하는 다른 컴퓨터 프로그램은 예를 들어 바이오디자인 인크. (BioDesign, Inc., 미국 캘리포니아주 파사데나), 알렐릭스, 인크. (Allelix, Inc., 캐나다 온타리오주 메시소가) 및 하이퍼큐브, 인크. (Hypercube, Inc., 캐나다 온타리오주 캄브리지)로부터 입수가능하다. 이들은 1차적으로 특정 단백질에 특이적인 약물에 대한 적용을 위해 디자인되었지만, DNA 또는 RNA 구역이 확인되면 이들 구역에 특이적인 약물의 디자인에 적용될 수 있다.

[0134] 결합을 변경시킬 수 있는 화합물의 디자인 및 생성에 대해 상기 설명하였지만, 합성 화학물질의 천연 생성물 및 활성화제의 억제제인 화합물에 대한 생물학적 활성 물질 (단백질 포함)을 포함하여 공지 화합물의 라이브러리를 스크리닝할 수도 있다.

[0135] 본원에서 설명한 것과 같은 분석을 통해 확인된 화합물은 예를 들어 EGFL7 유전자 생성물의 생물학적 기능 규명에 유용할 수 있다. 상기 화합물은 임의의 다양한 생리학적 질환 치료를 위해 치료 유효량으로 환자에 투여될 수 있다. 치료 유효 투여량은 임의의 생물학적 증상의 임의의 개량, 장애, 억제 또는 변형을 야기하는데 충분한 화합물의 양을 의미한다.

[0136] *EGFL7에 결합하는 화합물에 대한 분석*

[0137] EGFL7와 상호작용하거나 (예를 들어, 결합하거나) 모방할 수 있거나, 동족체 수용체, 결합 파트너 또는 기질에 대한 EGFL7의 결합을 저해할 수 있는 화합물을 확인하기 위한 시스템을 설계할 수 있다. 확인된 화합물은 예를



들어 야생형 및(또는) 돌연변이체 EGFL7 유전자 생성물의 활성을 조절하는데 유용할 수 있거나; EGFL7의 생물학적 기능을 설명하는데 유용할 수 있거나; 정상적인 EGFL7 상호작용을 파괴하는 화합물을 확인하기 위한 스크린에서 사용될 수 있거나; 자체가 상기 상호작용을 파괴하거나 활성화시킬 수 있다.

[0138] EGFL7, 또는 EGFL7 동족체 수용체 또는 기질에 결합하는 화합물을 확인하기 위해 사용된 분석의 원리는 EGFL7 및 시험 화합물의 반응 혼합물을, 2개의 성분이 상호작용하여 결합하고, 반응 혼합물 내에서 제거되고(되거나) 검출될 수 있는 복합체를 형성하기에 충분한 시간 동안 충분한 조건 하에 제조하는 것을 포함한다. 사용된 EGFL7 물질종은 스크리닝 분석의 목표에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 자연 수용체의 효능체가 요망되면, 전체 길이 EGFL7, 또는 가용성의 끝이 잘린 EGFL7, 펩티드, 또는 분석 시스템에 유익한 단백질 또는 폴리펩티드에 융합된 하나 이상의 EGFL7 도메인을 함유하는 융합 단백질 (예를 들어, 생성되는 복합체의 표지, 단리 등)이 사용될 수 있다. EGFL7와 직접 상호작용하는 화합물이 검색되는 경우, EGFL7 및 EGFL7를 함유하는 융합 단백질에 대응하는 펩티드가 사용될 수 있다.

[0139] 스크리닝 분석은 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 분석을 수행하기 위한 하나의 방법은 EGFL7, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 그로부터의 융합 단백질을, 또는 시험 물질을 고체상 상에 고정시키고, 반응의 끝에 고체상에 고정된 EGFL7/시험 화합물 복합체를 검출하는 것을 포함할 것이다. 상기 방법의 한 실시태양에서, EGFL7 반응물은 고체 표면 상에 고정될 수 있고, 고정되지 않은 시험 화합물은 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있다.

[0140] 실제로, 미세적정판이 고체상으로서 편리하게 사용될 수 있다. 고정된 성분은 비공유 또는 공유 부착에 의해 고정화될 수 있다. 비공유 부착은 단순히 고체 표면을 단백질의 용액으로 코팅하고 건조시킴으로써 달성할 수 있다. 별법으로, 고정화시킬 단백질에 특이적인 고정화된 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체가 단백질을 고체 표면에 고정시키기 위해 사용될 수 있다. 표면은 미리 제조되어 보관될 수 있다.

[0141] 분석을 수행하기 위해, 비고정화된 성분을 고정된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 첨가한다. 반응이 완료된 후, 미반응 성분은 형성된 임의의 복합체가 고체 표면 상에 고정화되어 남도록 하는 조건 하에 제거한다 (예를 들어, 세척에 의해). 고체 표면 상에 고정된 복합체의 검출은 많은 방식으로 달성할 수 있다. 앞서 비고정화된 성분이 예비-표지된 경우, 표면 상에 고정화된 표지의 검출은 복합체가 형성되었음을 나타낸다. 앞서 비고정화된 성분이 예비-표지되지 않은 경우, 예를 들어, 앞서 비고정화된 성분에 특이적인 표지된 항체 (다시, 표지된 항-Ig 항체로 직접적으로 표지되거나 간접적으로 표지될 수 있는 항체)를 사용하여 표면 상에 고정된 복합체를 검출하기 위해 간접 표지를 사용할 수 있다.

[0142] 별법으로, 반응은 액체상으로 수행될 수 있고, 반응 생성물은 미반응 성분으로부터 분리되고, 예를 들어 EGFL7 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 융합 단백질에 특이적인 고정화된 항체 또는 용액에 형성된 임의의 복합체를 고정하기 위한 시험 화합물 및 고정된 복합체를 검출하기 위해서 가능한 복합체의 다른 성분에 특이적인 표지된 항체를 사용하여 복합체가 검출된다.

[0143] *EGFL7 상호작용을 저해하는 화합물의 분석*

[0144] EGFL7과 상호작용하는 거대분자는 본원의 목적상 "결합 파트너"로 부른다. 이들 결합 파트너는 EGFL7 매개 생물학적 경로에 관련되는 것으로 보인다. 따라서, 신체에서 EGFL7 활성의 조절 또는 증가 및(또는) 상기 활성 (또는 그의 결핍)과 관련된 질환의 조절에 유용할 수 있는 상기 결합 파트너의 상호작용을 저해하거나 붕괴시키는 화합물을 확인하는 것이 바람직하다.

[0145] EGFL7과 결합 파트너(들) 사이의 상호작용을 저해하는 화합물을 확인하기 위해 사용되는 분석 시스템의 기본 원리는 EGFL7, 또는 일부의 그의 변이체 및 결합 파트너를 포함하는 반응 혼합물을 이들이 상호작용 및 결합하여 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 충분한 시간 동안 제조하는 것을 포함한다. 억제 활성에 대해 시험 화합물을 시험하기 위해서, 반응 혼합물을 시험 화합물의 존재 및 부재 하에 제조한다. 시험 화합물은 초기에 반응 혼합물에 첨가될 수 있거나, EGFL7 및 그의 결합 파트너의 첨가 후에 첨가할 수 있다. 대조군 반응 혼합물은 시험 화합물 없이 또는 위약과 함께 인큐베이션된다. 이어서, EGFL7과 결합 파트너 사이의 임의의 복합체의 형성을 검출한다. 시험 화합물을 포함하는 반응 혼합물에서가 아니라 대조 반응에서 복합체의 형성은 화합물이 EGFL7과 상호작용성 결합 파트너의 상호작용을 저해함을 나타낸다. 추가로, 시험 화합물 및 정상 EGFL7 단백질을 포함하는 반응 혼합물 내에서의 복합체 형성도 시험 화합물 및 돌연변이체 EGFL7를 포함하는 반응 혼합물 내에서의 복합체 형성에 비교할 수 있다. 이러한 비교는 정상 단백질이 아니라 돌연변이체 또는 돌연변이된 EGFL7의 상호작용을 특이적으로 붕괴시키는 화합물을 확인하는 것이 바람직한 경우에 중요할 수 있다.

- [0146] EGFL7과 결합 파트너 사이의 상호작용을 저해하는 화합물에 대한 분석은 불균질 또는 균질 포맷으로 수행할 수 있다. 불균질 분석은 EGFL7 또는 결합 파트너를 고체상에 고정시키고 반응 종료시 고체상에 고정된 복합체를 검출하는 것을 포함한다. 균질 분석에서, 전체 반응은 액체상으로 수행된다. 어느 방식에서든, 반응물의 첨가 순서를 변경하여 시험되는 화합물에 대한 상이한 정보를 얻을 수 있다. 예를 들어, 경쟁에 의해 상호작용을 저해하는 시험 화합물은 시험 화합물의 존재 하에 반응을 수행함으로써, 즉 EGFL7 및 상호작용성 결합 파트너 첨가 전에 또는 첨가와 동시에 시험 물질을 반응 혼합물에 첨가함으로써 확인할 수 있다. 별법으로, 기형성된 복합체를 붕괴시키는 시험 화합물, 예를 들어 복합체로부터 성분의 하나를 대체하는 더 큰 결합 상수를 갖는 화합물은 복합체 형성 후에 시험 화합물을 반응 혼합물에 첨가함으로써 시험할 수 있다. 다양한 포맷을 아래에서 간략하게 설명한다.
- [0147] 불균질 분석 시스템에서, EGFL7 또는 상호작용성 결합 파트너는 고체 표면 상에 고정되고, 비고정된 물질종은 직접적으로 또는 간접적으로 표지된다. 실행시에, 미세적정판이 편리하게 이용된다. 고정된 물질종은 비공유 또는 공유 부착에 의해 고정될 수 있다. 비공유 부착은 EGFL7 또는 결합 파트너의 용액으로 고체 표면을 코팅하고 건조시켜 간단히 달성할 수 있다. 별법으로, 고정되는 물질종에 특이적인 고정화된 항체를 사용하여 물질종을 고체 표면에 고정시킬 수 있다. 표면은 미리 제조하여 보관할 수 있다.
- [0148] 분석을 수행하기 위해서, 고정화된 물질종의 파트너를 시험 화합물이 존재하거나 존재하지 않는 코팅된 표면에 노출시킨다. 반응이 완료된 후, 미반응 성분을 제거하고 (예를 들어, 세척에 의해), 형성된 임의의 복합체는 고체 표면 상에 고정된 상태로 유지될 것이다. 고체 표면 상에 고정된 복합체의 검출은 많은 방식으로 달성할 수 있다. 비고정화된 물질종이 미리 표지된 경우, 표면 상에 고정된 표지의 검출은 복합체가 형성되었음을 나타낸다. 비고정된 물질종이 미리 표지되지 않은 경우, 간접적인 표지를 사용하여, 예를 들어 초기에 비고정된 물질종에 특이적인 표지된 항체 (항체는 다시 직접적으로 표지되거나 표지된 항-Ig 항체를 사용하여 간접적으로 표지됨)를 사용하여 복합체를 검출할 수 있다. 반응 성분의 첨가 순서에 따라, 복합체 형성을 억제하거나 기형성된 복합체를 붕괴시키는 시험 화합물을 검출할 수 있다.
- [0149] 별법으로, 반응은 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에 액체상으로 수행할 수 있고, 반응 생성물을 미반응 성분으로부터 분리하고, 복합체를 예를 들어 용액에 형성된 임의의 복합체를 고정하기 위해 결합 성분의 하나에 특이적인 고정화된 항체 및 고정된 복합체를 검출하기 위해 다른 파트너에 특이적인 표지된 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 다시, 액체상에 대한 반응물의 첨가 순서에 따라 복합체를 억제하거나 기형성된 복합체를 붕괴시키는 시험 화합물을 확인할 수 있다.
- [0150] 본 발명의 다른 실시태양에서, 균질 분석을 사용할 수 있다. 이 방법에서, EGFL7 또는 그의 결합 파트너가 표지되지만 표지에 의해 생성된 시그날이 복합체의 형성에 의해 소멸되는, EGFL7과 상호작용성 결합 파트너의 기형성된 복합체가 제조된다 (예를 들어 면역분석을 위한 상기 방법을 이용하는 미국 특허 4,109,496 (루벤스타인 (Rubenstein))) 참조). 기형성된 복합체로부터 물질종의 하나와 경쟁하여 이를 대체하는 시험 물질의 첨가는 배경을 초과하는 시그날을 생성시킬 것이다. 이러한 방식으로, 상호작용을 붕괴시키는 시험 물질을 확인할 수 있다.
- [0151] 특정 실시태양에서, EGFL7 융합체는 고정화를 위해 제조할 수 있다. 예를 들어, EGFL7 또는 그의 펩티드 단편은 그의 결합 활성이 생성되는 융합 단백질에서 유지되는 방식으로 융합 벡터, 예를 들어 pGEX-5X-1을 사용하여 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST) 유전자에 융합될 수 있다. 상호작용성 결합 파트너를 정제하여 당업계에서 통상 실시되고 상기 설명한 방법을 사용하여 모노클로날 항체를 생성시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 항체는 예를 들어 당업계에서 통상 실시되는 방법에 의해 방사성 동위원소 <sup>125</sup>I로 표지될 수 있다. 불균질 분석에서, 융합 단백질은 글루타티온-아가로스 비드에 고정될 수 있다. 이어서, 상호작용성 결합 파트너는 상호작용 및 결합이 발생하도록 하는 방식으로 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에 첨가될 수 있다. 반응 종료시에, 미결합 물질은 세척할 수 있고, 표지된 모노클로날 항체를 시스템에 첨가하여 복합체화된 성분에 결합시킬 수 있다. EGFL7과 상호작용성 결합 파트너 사이의 상호작용은 글루타티온-아가로스 비드와 연합된 상태로 유지되는 방사성의 양을 측정함으로써 검출할 수 있다. 시험 화합물에 의한 상호작용의 성공적인 억제는 측정된 방사성의 감소를 야기할 것이다.
- [0152] 별법으로, GST 융합 단백질 및 상호작용성 결합 파트너는 고상 글루타티온-아가로스 비드의 부재 하에 액체 중에서 함께 혼합될 수 있다. 시험 화합물은 물질종을 상호작용하게 하는 동안 또는 그 후에 첨가될 수 있다. 이어서, 혼합물은 글루타티온-아가로스 비드에 첨가할 수 있고, 미결합 물질은 세척한다. 다시, EGFL7과 결합 파트너 사이의 상호작용의 억제 정도는 표지된 항체를 첨가하여 비드와 연합된 방사성을 측정함으로써 검출할

수 있다.

- [0153] 본 발명의 다른 실시태양에서, 전체 길이 단백질의 하나 또는 둘 모두 대신에 EGFL7의 결합 도메인 및(또는) 상호작용성 또는 결합 파트너 (결합 파트너가 단백질인 경우)에 대응하는 펩티드 단편을 사용하여 상기와 동일한 기술을 사용할 수 있다. 당업계에서 통상 실시되는 임의의 수의 기술을 사용하여 결합 부위를 확인 및 단리할 수 있다. 상기 방법은 단백질의 하나를 코딩하는 유전자의 돌연변이 유발 및 동시면역침전 분석에서 결합의 붕괴에 대한 스크리닝을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 이어서, 복합체 내의 제2 물질종을 코딩하는 유전자의 보상적 돌연변이를 선택할 수 있다. 각각의 단백질을 코딩하는 유전자의 서열 분석을 통해 상호작용성 결합에 관련되는 단백질의 구역에 대응하는 돌연변이를 밝힐 수 있다. 별법으로, 한 단백질은 상기한 방법을 사용하여 고체 표면에 고정될 수 있고, 단백질 분해 효소, 예를 들어 트립신으로 처리된 그의 표지된 결합 파트너에 상호작용하여 결합하도록 만들 수 있다. 세척 후에, 결합 도메인을 포함하는 비교적 짧은 표지된 펩티드는 고체 물질과 연합된 상태로 유지될 수 있고, 이는 단리되어 아미노산 서열 결정에 의해 확인될 수 있다. 또한, 세포내 결합 파트너를 코딩하는 유전자를 얻은 후에, 짧은 유전자 절편을 단백질의 펩티드 단편을 발현하도록 공학적으로 처리한 후, 결합 활성화에 대해 시험하고 정제 또는 합성할 수 있다.
- [0154] 예를 들어, 제한되지 않는 방식으로, EGFL7은 GST 융합 단백질을 제조하여 글루타티온 아가로스 비드에 결합시킴으로써 상기한 고상 물질에 고정될 수 있다. 상호작용성 결합 파트너는 방사성 동위원소, 예를 들어 <sup>35</sup>S로 표지하여 단백질 분해 효소, 예를 들어 트립신으로 절단할 수 있다. 이어서, 절단 생성물은 고정된 융합 단백질에 첨가하여 결합시킬 수 있다. 미결합 펩티드를 세척하여 제거한 후, 세포내 결합 파트너 결합 도메인을 나타내는 표지된 결합 물질을 용출, 정제하여 공지의 방법으로 아미노산 서열을 분석할 수 있다. 이와 같이 확인된 펩티드는 합성방식으로 생산하거나 재조합 DNA 기술을 사용하여 적합한 촉진 단백질에 융합시킬 수 있다.
- [0155] EGFL7 조성물의 용도
- [0156] 심혈관, 내피 및 혈관신생 활성의 분석
- [0157] 다양한 분석을 사용하여 본원의 폴리펩티드를 심혈관, 내피 및 혈관신생 활성화에 대해 시험할 수 있다. 상기 분석은 하기 예에 제시되는 것을 포함한다.
- [0158] 조직 생성 활성화에 대한 분석은 WO 95/16035 (뼈, 연골, 건); WO 95/05846 (신경, 뉴런) 및 WO 91/07491 (피부, 내피)에 기재된 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0159] 상처 치유 활성화에 대한 분석은 예를 들어 문헌 [Winter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI and Rovee, DT, eds. (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112, 및 이의 변형 문헌 Eaglstein and Mertz, J. Invest. Dermatol. 71:382-384 (1978)]에 기재된 것을 포함한다.
- [0160] 복수개의 심장비대 분석이 존재한다. 시험관내 분석은 성체 래트 심근세포의 확산 유도를 포함한다. 이 분석에서, 심실 근세포는 본질적으로 문헌 [Piper et al., "Adult ventricular rat heart muscle cells" in Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research, H. M. Piper, ed. (Berlin: Springer-Verlag, 1990), pp. 36-60]에 상세하게 기재된 과정을 변형하여 단일 (수컷 Sprague-Dawley) 래트로부터 단리된다. 이 과정은 성체 심실 근세포의 단리 및 상기 세포의 막대형 표현형으로의 장기간 배양을 가능하게 한다. 페닐에프린 및 프로스타글란딘 F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)는 상기 성체 세포에서 확산 반응을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 심장비대의 상이한 효능 있는 억제제에 의한 PGF<sub>2α</sub> 또는 PGF<sub>2α</sub> 유사체 (예를 들어 플루프로스테놀) 및 페닐에프린에 의해 유도된 근세포 확산의 억제를 이어서 시험한다.
- [0161] 암에 대해, 다양한 공지된 동물 모델을 사용하여 종양의 발생 및 발병기전에서 EGFL7의 역할을 보다 이해하고, 천연 EGFL7 폴리펩티드의 항체 및 다른 길항제, 예를 들어 소분자 길항제를 포함하여 후보 치료제의 효능을 시험할 수 있다. 상기 모델의 생체내 특성은 인간 환자의 반응을 특히 예상할 수 있게 한다. 종양 및 암 (예를 들어 유방암, 결장암, 전립선암, 폐암 등)의 동물 모델은 비재조합 및 재조합 (트랜스제닉 (transgenic)) 동물을 모두 포함한다. 비재조합 동물 모델은 예를 들어 설치류, 예를 들어 쥐 모델을 포함한다. 상기 모델은 표준 기술, 예를 들어 피하 주사, 꼬리 정맥 주사, 비장 매식, 복강내 매식, 신피막하 매식, 또는 오르토피 (orthopin) 매식, 예를 들어, 결장암 세포의 결장 조직 내로의 매식을 사용하여 종양 세포를 동계 마우스 내로 도입함으로써 생성시킬 수 있다 (예를 들어 1997년 9월 18일 공개된 PCT 공개 WO 97/33551 참조). 종양학 연구에서 아마도 가장 자주 사용되는 동물종은 면역결핍 마우스, 특히 누드 마우스이다. 흉선 저형성 누드 마우스가 인간 종양 이종이식을 위한 숙주로서 성공적으로 작용할 수 있다는 발견을 통해 이 마우스가 상기 목적을 위

해 광범위하게 사용되었다. 상염색체 열성 *nu* 유전자가 예를 들어 ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII 및 SJL을 포함하여 매우 많은 특유한 유사유전자형의 누드 마우스 종에 도입되었다. 또한, 누드 마우스 이외의 면역학적 결함이 유전된 매우 다양한 다른 동물도 교배되어 종양 이종이식 수여자로서 사용되었다. 보다 상세한 내용은 예를 들어 문헌 [The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven and B. Winograd, eds. (CRC Press, Inc., 1991)]을 참조한다.

[0162] 상기 동물에 도입된 세포는 공지의 종양/암 세포주, 예를 들어 상기 언급한 임의의 종양 세포주 및 예를 들어 B 104-1-1 세포주 (*neu* 원발암유전자로 형질감염된 안정한 NIH-3T3 세포주); *ras*-형질감염된 NIH-3T3 세포; Caco-2 (ATCC HTB-37); 또는 중등도로 잘 분화된 II등급 인간 결장 선암종 세포주, HT-29 (ATCC HTB-38)로부터; 또는 종양 및 암으로부터 유래할 수 있다. 종양 또는 암 세포의 샘플은 액체 질소에 동결 보관하는 것을 포함하는 표준 조건을 사용하여 수술 중의 환자로부터 얻을 수 있다 (Karmali et al., Br. J. Cancer 48:689-696 (1983)).

[0163] 종양 세포는 다양한 절차에 의해 동물, 예를 들어 누드 마우스 또는 EGFL7 넉아웃 마우스 내로 도입될 수 있다. 마우스의 피하 (s.c.) 공간이 종양 이식에 매우 적합하다. 종양은 고체 블록으로서, 투관침을 사용한 바늘 생검으로서 또는 세포 현탁액으로서 s.c. 이식될 수 있다. 고체 블록 또는 투관침 매식을 위해, 적합한 크기의 종양 조직 단편을 s.c. 공간 내로 도입한다. 세포 현탁액은 1차 종양 또는 안정한 종양 세포주로부터 새로 제조하여 피하 주사된다. 또한, 종양 세포는 피하 이식으로서 주사될 수도 있다. 이 위치에서, 접종물은 피부 연결 조직의 하부와 s.c. 조직 사이에 침적된다.

[0164] 유방암 동물 모델은 본질적으로 문헌 [Drebin et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9129-9133 (1986)]에 기재된 바와 같이 예를 들어 래트 신경모세포종 세포 (그로부터 *neu* 종양유전자가 처음 단리됨) 또는 *neu*-형질전환된 NIH-3T3 세포를 누드 마우스 내로 매식함으로써 생성될 수 있다.

[0165] 유사하게, 결장암 동물 모델은 결장암 세포를 동물, 예를 들어, 누드 마우스에서 계대배양하여 상기 동물에서 종양을 발생시켜 생성할 수 있다. 누드 마우스에서 인간 결장암의 동소 이식은 예를 들어 문헌 [Wang et al., Cancer Research 54:4726-4728 (1994) 및 Too et al., Cancer Research 55:681-684 (1995)]에 기재되어 있다. 이 모델은 안티캐서, 인크. (AntiCancer, Inc., 미국 캘리포니아주 샌디에고)에서 시판하는 "METAMOUSE™"을 기초로 한 것이다.

[0166] 동물에서 발생하는 종양은 제거하여 시험관 내에서 배양할 수 있다. 이어서, 시험관내 배양액으로부터의 세포를 동물에 계대배양시킬 수 있다. 상기 종양은 추가의 시험 또는 약물 스크리닝을 위한 표적으로 작용할 수 있다. 별법으로, 계대배양으로부터 생성되는 종양을 단리하고, 계대배양전 세포 및 1회 이상의 라운드의 계대배양 후에 단리된 세포를 목적하는 유전자의 차등 발현에 대해 분석할 수 있다. 상기 계대배양 기술은 임의의 공지의 종양 또는 암 세포주를 사용하여 수행할 수 있다.

[0167] 예를 들어, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21 및 WEHI-164는 BALB/c 암컷 마우스의 화학적으로 유도된 섬유육종이고 (DeLeo et al., J. Exp. Med. 146:720 (1977)), 상이한 물질의 항-종양 활성 연구를 위한 고도로 조절가능한 모델 시스템을 제공한다 (Palladino et al., J. Immunol. 138:4023-4032 (1987)). 간략하게, 종양 세포는 세포 배양시에 시험관 내에서 번식한다. 동물에 주사하기 전에, 세포주를 세척하고, 약  $10 \times 10^6$  내지  $10 \times 10^7$  세포/ml의 세포 밀도로 버퍼에 현탁시킨다. 이어서, 동물을 10 내지  $100 \mu\text{l}$ 의 세포 현탁액으로 피하 감염시키고, 종양이 나타나도록 1 내지 3주 방치한다.

[0168] 또한, 가장 철저하게 연구된 실험 종양의 하나인 마우스의 루이스 (Lewis) 폐 암종을 연구 종양 모델로서 사용할 수 있다. 상기 종양 모델에서의 효능은 소세포 폐 암종 (SCCL)으로 진단된 인간 환자 치료시에 유익한 효과와 밀접한 관계가 있었다. 상기 종양은 이환된 마우스로부터의 종양 단편 또는 배양시에 유지된 세포의 주사시에 정상 마우스에 도입될 수 있다 (Zupi et al., Br. J. Cancer 41:suppl. 4, 30 (1980)). 증거는 종양이 단일 세포의 주사로부터 출발할 수 있고 매우 높은 비율의 감염 종양 세포가 생존함을 나타낸다. 상기 종양 모델에 대한 추가의 정보는 문헌 [Zacharski, Haemostasis 16:300-320 (1986)]를 참고한다.

[0169] 매식 종양을 갖는 동물 모델에서 시험 화합물의 효능을 평가하는 한 방법은 처리 전 및 후의 종양 크기를 측정하는 것이다. 전통적으로, 매식된 종양의 크기는 2차원 또는 3차원으로 슬라이드 캘리퍼스를 사용하여 측정하였다. 2차원으로 제한된 측정치는 종양 크기를 정확하게 반영하지 못하고, 따라서 측정치는 일반적으로 수학 공식을 사용하여 대응하는 부피로 전환된다. 그러나, 종양 크기의 측정치는 매우 부정확하다. 약물 후보물질



의 치료 효과는 처리 유도된 성장 지연 및 특이적인 성장 지연으로서 보다 우수하게 설명될 수 있다. 종양 성장 설명시의 다른 중요한 변수는 종양 부피 배가 시간이다. 종양 성장의 계산 및 설명을 위한 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 문헌 [Rygaard and Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu and Sheng eds. (Basel, 1989), p. 301]에 보고된 프로그램도 이용가능하다. 그러나, 처리 후의 괴사 및 염증 반응은 실제로 종양 크기를 적어도 초기에 증가시킬 수 있다. 따라서, 상기 변화는 형태학적 방법 및 유동 세포 분석의 조합에 의해 유의하여 모니터링할 필요가 있다.

[0170] 또한, 재조합 (트랜스제닉) 동물 모델은 트랜스제닉 동물을 생산하기 위한 표준 기술을 사용하여 본원에서 확인된 EGFL7 유전자의 코딩 부분을 목적하는 동물의 게놈 내로 도입함으로써 공학적으로 처리할 수 있다. 트랜스제닉 조작을 위한 표적으로 기능할 수 있는 동물은 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그, 양, 염소, 돼지 및 비-인간 영장류, 예를 들어 비비, 침팬지 및 원숭이를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 도입 유전자 (transgene)를 상기 동물에 도입하기 위해 당업계에 공지된 기술은 전핵 미세주사 (미국 특허 4,873,191); 배계열 내로의 레트로바이러스-매개 유전자 전달 (예를 들어, Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-615 (1985)); 배아 줄기 세포에서의 유전자 표적화 (Thompson et al., Cell 56:313-321 (1989)); 배아의 전기천공 (Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814 (1983)); 및 정자 매개 유전자 전달 (Lavitrano et al., Cell 57:717-73 (1989))을 포함한다 (검토를 위해 예를 들어 미국 특허 4,736,866 참조).

[0171] 본 발명의 목적에서, 트랜스제닉 동물은 단지 그들의 세포 일부에서만 도입 유전자를 보유하는 것 ("모자이크 동물")을 포함한다. 도입 유전자는 단일 도입 유전자로서 또는 콘카타머 (concatamer), 예를 들어 헤드 대 헤드 또는 테일 대 테일 직렬 형태로 통합될 수 있다. 특정 세포 종류 내로 도입 유전자의 선택적인 도입은 또한 예를 들어 문헌 [Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-636 (1992)]의 기술에 따라 실시할 수 있다. 트랜스제닉 동물에서 도입 유전자의 발현은 표준 기술에 의해 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 서던 블로트 분석 또는 PCR 증폭을 사용하여 도입 유전자의 통합을 확인할 수 있다. 이어서, mRNA 발현 수준을 계내 혼성화, 노던 블로트 분석, PCR 또는 면역세포화학과 같은 기술을 사용하여 분석할 수 있다. 동물은 종양 또는 암 발생 징후에 대해 추가로 조사된다.

[0172] 별법으로, EGFL7을 코딩하는 내인성 유전자와 동물의 배아 세포 내로 도입된 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 변경된 게놈 DNA 사이의 상동 재조합의 결과로서 본원에서 확인된 EGFL7을 코딩하는 결함 또는 변경 유전자를 갖는 "넉아웃" 동물을 제조할 수 있다. 예를 들어, 특정 EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA를 사용하여 확립된 기술에 따라 폴리펩티드를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있다. 특정 EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 게놈 DNA의 일부가 결실되거나, 다른 유전자, 예를 들어 통합을 모니터링하기 위해 사용될 수 있는 선택가능한 마커를 코딩하는 유전자로 대체될 수 있다. 일반적으로, 수킬로베이스의 비변경 인접 DNA (5' 및 3' 말단 모두에서)가 벡터에 포함된다 (예를 들어, 상동 재조합 벡터의 설명을 위해 Thomas and Capecchi, Cell 51:503 (1987) 참조). 벡터는 배아줄기세포주에 도입되고 (예를 들어 전기천공에 의해), 도입된 DNA가 내인성 DNA와 상동 재조합된 세포가 선택된다 (예를 들어 Li et al., Cell 69:915 (1992) 참조). 선택된 세포는 이어서 응집 키메라를 형성하기 위해서 동물 (예를 들어, 마우스 또는 래트)의 포배 내로 주사된다 (예를 들어, Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152 참조). 이어서, 키메라 배아는 적합한 거짓임신 암컷 대리모 동물 내로 이식될 수 있고, 배아는 "넉아웃" 동물로 분만된다. 그들의 생식 세포에 상동 재조합된 DNA를 포함하는 자손체는 표준 기술로 확인할 수 있고, 동물의 모든 세포가 상동 재조합된 DNA를 포함하는 동물을 번식시키기 위해 사용될 수 있다. 넉아웃 동물은 예를 들어 특정 병리학적 상태에 방어하는 그들의 능력 및 EGFL7 부재에 의한 그들의 병리학적 상태의 발생에 의해 특징지을 수 있다.

[0173] 본원에서 확인된 EGFL7에 특이적으로 결합하는 항체 및 다른 약물 후보의 효능은 또한 자연 발생 동물 종양의 치료에 시험할 수 있다. 상기 연구를 위한 적합한 표적은 고양이 구강 편평세포 암종 (SCC)이다. 고양이 구강 SCC는 고양이에서 보고되는 구강 종양의 60% 이상을 차지하는 고양이의 가장 흔한 구강 악성종양인 침습성이 높은 악성 종양이다. 먼 부위로 거의 전이되지 않지만, 이러한 낮은 전이율은 상기 종양을 갖는 고양이의 짧은 생존 시간을 반영하는 것일 수 있다. 이들 종양은 대체로 주로 고양이 구강의 해부학적 구조 때문에 수술이 불가능하다. 현재, 상기 종양에 대한 효과적인 치료법은 존재하지 않는다. 연구에 들어가기 전에, 각각의 고양이에 대해 완전한 임상 조사 및 생검을 실시하고, 컴퓨터 단층 촬영 (CT)으로 스캔한다. 설하 구강 편평세포 종양으로 진단된 고양이는 연구로부터 배제한다. 혀는 상기 종양의 결과로서 마비될 수 있고, 치료가 종양을 치사시키더라도 동물은 스스로 먹이를 섭취할 수 없다. 각각의 고양이를 보다 긴 기간에 걸쳐서 반복적으로 치료한다. 종양 사진을 치료 기간 동안 매일 및 각각의 후속 재조사시에 찍을 것이다. 치료 후에, 각각의 고양이



이에 대해 추가의 CT 스캔을 실시한다. CT 스캔 및 흉부 방사선 사진을 이후 8주마다 평가한다. 데이터를 대조군에 비교한 생존, 반응 및 독성의 차이에 대해 평가한다. 양성 반응은 바람직하게는 삶의 질 개선 및(또는) 수명 연장과 함께 종양 퇴행의 증거를 필요로 할 수 있다.

[0174] 또한, 개, 고양이 및 비비의 다른 자연발생 동물 종양, 예를 들어 섬유육종, 선암종, 림프종, 연골종 또는 평활근육종도 시험할 수 있다. 물론, 그의 외형과 거동이 인간과 매우 유사하기 때문에 개 및 고양이의 유선암종이 바람직한 모델이다. 그러나, 상기 모델의 사용은 동물에서 상기 종류의 종양의 드문 발생율에 의해 제한된다.

[0175] 또한, 당업계에 공지된 다른 시험관내 및 생체내 심혈관, 내피 및 혈관신생 시험도 본 발명에 적합하다.

[0176] 조직 분포

[0177] 본원의 심혈관, 내피 및 혈관신생 분석 결과는 추가의 연구, 예를 들어 상이한 인간 조직에서 mRNA 발현의 결정에 의해 확인할 수 있다.

[0178] 상기한 바와 같이, 상이한 조직에서 유전자 증폭 및(또는) 유전자 발현은 본원에서 제공되는 서열을 기초로 하여 mRNA의 전사를 정량화하는 통상적인 서던 블로팅, 노던 블로팅 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205 (1980)), 도트 블로팅 (DNA 분석), 또는 적절하게 표지된 프로브를 사용한 계내 혼성화에 의해 측정할 수 있다. 별법으로, DNA 이중체, RNA 이중체, 및 DNA-RNA 하이브리드 이중체 또는 DNA-단백질 이중체를 포함하여 특이적인 이중체를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다.

[0179] 별법으로, 상이한 조직에서 유전자 발현은 면역학적 방법, 예를 들어 조직 절편의 면역조직화학 염색 및 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량하는 세포 배양액 또는 체액의 분석에 의해 측정할 수 있다. 면역조직화학 염색 및(또는) 샘플 유체의 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있고, 임의의 포유동물에서 제조할 수 있다. 편리하게는, 항체는 천연 서열 EGFL7 폴리펩티드에 대항하여 또는 본원에서 제공되는 DNA 서열을 기초로 한 합성 펩티드에 대항하여 또는 EGFL7 DNA에 융합되고 특정 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대항하여 제조할 수 있다. 항체 생성을 위한 일반적인 기술 및 계내 혼성화를 위한 특수 프로토콜을 아래에서 설명한다.

[0180] 항체 결합 연구

[0181] 심혈관, 내피 및 혈관신생 연구의 결과는 내피 세포 또는 심혈관, 내피 및 혈관신생 분석에 사용되는 다른 세포에 대한 EGFL7의 효과를 억제하는 항-EGFL7 항체의 능력을 시험하는 항체 결합 연구에 의해 추가로 확인할 수 있다. 예시적인 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 이중특이적, 및 이중컨쥬게이트 (heteroconjugate) 항체를 포함하고, 그의 제조는 아래에서 설명될 것이다.

[0182] 항체 결합 연구는 임의의 공지의 분석 방법, 예를 들어 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석으로 수행할 수 있다 (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc., 1987), pp.147-158).

[0183] 경쟁적 결합 분석은 제한된 양의 항체에 결합하기 위해 시험 샘플 분석물과 경쟁하는 표지된 표준물질의 능력에 의존한다. 시험 샘플 내의 표적 단백질의 양은 항체에 결합하게 되는 표준물질의 양에 반비례한다. 결합하게 되는 표준물질의 양의 결정을 용이하게 하기 위해, 항체는 항체에 결합한 표준물질 및 분석물을 미결합 상태의 표준물질 및 분석물로부터 편리하게 분리할 수 있도록 경쟁 전 또는 후에 불용성인 것이 바람직하다.

[0184] 샌드위치 분석은 각각의 항체가 검출되는 단백질의 상이한 면역원성 부분 또는 에피토프에 결합할 수 있는 두개의 항체의 사용을 포함한다. 샌드위치 분석에서, 시험 샘플 분석물은 고체 지지체 상에 고정화된 제1 항체에 의해 결합된 후, 제2 항체가 분석물에 결합하여 불용성의 3부분 복합체를 형성한다 (예를 들어 미국 특허 4,376,110 참조). 제2 항체 자체는 검출가능한 잔기로 표지될 수 있거나 (직접 샌드위치 분석), 검출가능한 잔기로 표지된 항-면역글로불린 항체를 사용하여 측정할 수 있다 (간접 샌드위치 분석). 예를 들어, 한 종류의 샌드위치 분석은 ELISA 분석으로서, 여기서 검출가능한 잔기는 효소이다.

[0185] 면역조직화학을 위해, 조직 샘플은 신선하거나 동결될 수 있거나, 파라핀에 포매되어 예를 들어 포르말린과 같은 방부제로 고정시킬 수 있다.

[0186] 세포 기반 종양 분석

[0187] 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환, 예를 들어 종양에 대한 세포 기반 분석 및 동물 모델을 사용하여 본원의 심혈관, 내피 및 혈관신생 분석의 발견을 확인하고 본원에서 확인된 유전자와 바람직하지 않은 심혈관, 내피 및 혈

관상생 세포 성장의 발생 및 발병 기전 사이의 관계를 추가로 이해할 수 있다. 바람직하지 않은 심혈관, 내피 및 혈관신생 세포 성장의 발생 및 병리학, 예를 들어, 종양 세포에서 본원에서 확인된 유전자 생성물의 역할은 본 발명에서 EGFL7에 의해 자극되거나 억제되는 것으로 확인된 세포 또는 세포주에 의해 시험할 수 있다. 상기 세포는 예를 들어 아래 실시예에서 제시되는 것을 포함한다.

[0188] 상이한 방법에서, 특정 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환에 관련되는 것으로 알려진 세포 종류의 세포를 본원에서 cDNA로 형질감염시키고, 과도한 성장을 유도하거나 성장을 억제하는 상기 cDNA의 능력을 분석한다. 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환이 암일 경우, 적합한 종양 세포는 예를 들어 요구되는 유전자로 형질감염되고 종양형성원 성장에 대해 모니터링될 수 있는 안정한 종양 세포주, 예를 들어 B104-1-1 세포주 (*neu* 원발암유전자로 형질감염된 안정한 NIH-3T3 세포주) 및 *ras*-형질감염된 NIH-3T3 세포를 포함한다. 이어서, 상기 형질감염된 세포주를 사용하여 형질전환된 세포의 세포증식 억제 또는 세포독성 활성을 나타내거나 항체-의존적 세포독성 (ADCC)을 매개함으로써 종양형성원 세포 성장을 억제하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 또는 항체 조성물의 능력을 시험할 수 있다. 본원에서 확인된 유전자의 코딩 서열로 형질감염된 세포는 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환, 예를 들어 암의 치료를 위한 약물 후보를 확인하기 위해 추가로 사용될 수 있다.

[0189] 또한, 트랜스제닉 동물 (상기한 바와 같은)에서 종양으로부터 유도된 1차 배양액을 본원의 세포 기반 분석에 사용할 수 있지만, 안정한 세포주가 바람직하다. 트랜스제닉 동물로부터 연속적인 세포주를 유도하는 기술은 당 업계에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, Small et al., Mol. Cell. Biol. 5:642-648 (1985) 참조).

#### [0190] 진단제로서 유전자의 용도

[0191] 본 발명은 또한 EGFL7 코딩 유전자의 진단제로서의 용도에 관한 것이다. EGFL7의 돌연변이 형태의 검출은 심혈관, 내피 및 혈관신생 질병 또는 심혈관, 내피 및 혈관신생 질병, 예를 들어 종양에 대한 감수성의 진단을 가능하게 할 것이다.

[0192] 인간 EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 유전자에서 돌연변이를 갖는 개체는 다양한 기술에 의해 DNA 수준에서 검출할 수 있다. 진단용 핵산은 환자의 세포, 예를 들어 혈액, 소변, 침, 조직 생검 및 부검 물질로부터 얻을 수 있다. 게놈 DNA는 검출에 직접적으로 사용되거나, 분석 전에 PCR을 사용하여 효소적으로 증폭될 수 있다 (Saiki et al., Nature 324:163-166 (1986)). RNA 또는 cDNA도 동일한 목적을 위해 사용될 수 있다. 예로서, EGFL7을 코딩하는 핵산에 상보성인 PCR 프라이머를 사용하여 EGFL7 돌연변이를 확인 및 분석할 수 있다. 예를 들어, 결실 및 삽입은 정상 유전자형에 비교시 증폭 생성물의 크기의 변화에 의해 검출될 수 있다. 점 돌연변이는 EGFL7을 코딩하는 방사성 표지된 RNA 또는 EGFL7을 코딩하는 방사성 표지된 안티센스 DNA 서열에 증폭된 DNA를 혼성화시킴으로써 확인할 수 있다. 완전하게 매치된 서열을 RNase A 소화 또는 융점의 차이에 의해 미스 매치된 이중체로부터 구분할 수 있다.

[0193] DNA 서열 차이를 기초로 한 유전자 시험은 변성제가 존재하거나 존재하지 않는 DNA 단편의 전기영동 이동성의 변경을 검출하여 달성할 수 있다. 작은 서열 결실 및 삽입은 고해상도 겔 전기영동에 의해 가시화될 수 있다. 상이한 서열의 DNA 단편은 상이한 DNA 단편의 이동성이 그들의 특정 융점 또는 부분 융융점에 따라 상이한 위치에서 겔에서 지연되는 변성 포름아미딘 구배 겔 상에서 구분될 수 있다 (예를 들어, Myers et al., Science 230:1242 (1985) 참조).

[0194] 특정 위치에서 서열의 변화는 또한 뉴클레아제 보호 분석, 예를 들어 RNase 및 S1 보호 또는 화학적 절단 방법에 의해 밝혀낼 수 있다 (예를 들어, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401 (1985) 참조).

[0195] 따라서, 특정 DNA 서열의 검출은 혼성화, RNase 보호, 화학적 절단, 직접 DNA 서열결정 또는 제한효소의 사용, 예를 들어 제한 단편 길이 다형성 (RFLP), 및 게놈 DNA의 서던 블로팅과 같은 방법에 의해 달성할 수 있다.

#### [0196] 폴리펩티드 발현 수준의 검출을 위한 용도

[0197] 보다 통상적인 겔-전기영동 및 DNA 서열결정에 추가하여, 돌연변이는 또한 계내 분석에 의해 검출될 수 있다.

[0198] EGFL7을 코딩하는 핵산의 발현은 종양 형성과 관련된 혈관 질병 또는 신생혈관형성과 연결될 수 있다. EGFL7이 시그널 서열을 갖고, mRNA가 내피 세포에서 고도로, 평활근 세포에서는 보다 작은 정도로 발현될 경우, 이것은 EGFL7이 혈청에 존재함을 나타낸다. 따라서, 상기 EGFL7 폴리펩티드의 변형 수준이 상기 질환의 지표일 수 있기 때문에, 항-EGFL7 폴리펩티드 항체는 종양 형성과 관련된 혈관 질병 또는 신생혈관형성의 진단에 사용될 수 있다.

[0199] EGFL7에 특이적인 항체가 고체 지지체에 부착되고 표지된 EGFL7 폴리펩티드 및 숙주에서 유래한 샘플을 고체 지

지체 상에 통과시켜 고체 지지체에 부착된 표지의 검출량을 샘플 내의 EGFL7의 양과 대비시키는 경쟁 분석을 사용할 수 있다.

[0200] 염색체 맵핑

[0201] 또한, 본 발명의 서열은 염색체 확인에 유용하다. 서열은 개별 인간 염색체 상의 특정 위치에 특이적으로 표적화되어 혼성화될 수 있다. 또한, 염색체 상의 특정 부위를 확인할 필요성이 현재 존재한다. 실제 서열 데이터(반복 다형성)에 기초한 염색체 마킹 시약은 현재 염색체 위치 마킹을 위해 유용한 것이 거의 존재하지 않는다. 본 발명에 따라 염색체에 대한 DNA의 맵핑은 상기 서열을 질병과 관련되는 유전자와 상호관련시킬 때 중요한 첫 단계이다.

[0202] 간략하게, 서열은 cDNA로부터 PCR 프라이머 (바람직하게는 15-25 bp)를 제조함으로써 염색체에 맵핑될 수 있다. 3'-비번역 구역에 대한 컴퓨터 분석을 사용하여 증폭 과정을 복잡하게 만드는 게놈 DNA 내의 1 초과의 엑손에 걸치지 않는 프라이머를 신속하게 선택한다. 이어서, 상기 프라이머를 개별 인간 염색체를 포함하는 체세포 하이브리드의 PCR 스크리닝에 사용한다. 프라이머에 대응하는 인간 유전자를 포함하는 하이브리드만이 증폭 단편을 생성시킬 것이다.

[0203] 체세포 하이브리드의 PCR 맵핑은 특정 염색체에 특정 DNA를 할당하는 신속한 과정이다. 동일한 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 함께 본 발명을 이용하여 유사한 방식으로 특이적인 염색체로부터 단편의 패널 또는 큰 게놈 클론의 풀을 사용하여 하위위치결정 (sublocalization)을 달성할 수 있다. 그의 염색체에 맵핑하기 위해 유사하게 사용될 수 있는 다른 맵핑 전략은 계내 혼성화, 표지된 유동 분류된 염색체를 사용한 예비스크리닝, 및 염색체-특이적 cDNA 라이브러리를 구성하기 위한 혼성화에 의한 예비선택을 포함한다.

[0204] cDNA 클론의 중기 염색체 확산에 대한 형광 계내 혼성화 (FISH)를 사용하여 1단계로 정확한 염색체 위치를 제공할 수 있다. 이 기술은 500 또는 600 염기의 짧은 cDNA를 사용하여 수행할 수 있지만, 2,000 bp보다 큰 클론이 간단한 검출을 위한 충분한 시그널 강도로 특유한 염색체 위치에 대한 보다 큰 결합 가능성을 갖는다. FISH는 EGFL7을 코딩하는 유전자가 유래된 클론의 사용을 요구하고 더 길수록 더 우수하다. 예를 들어, 2,000 bp가 우수하고, 4,000 bp가 더 우수하며, 4,000을 초과하는 것이 반드시 아니지만 아마도 합당한 시간 비율로 우수한 결과를 얻을 것이다 (상기 기술의 개관에 대해서는 문헌 [Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988)] 참조).

[0205] 일단 서열이 정확한 염색체 위치로 맵핑되면, 염색체 상의 서열의 물리적인 위치는 유전자 지도 데이터와 상호관련될 수 있다. 상기 데이터는 예를 들어 문헌 [V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available online through Johns Hopkins University Welch Medical Library)]에서 찾을 수 있다. 이어서 동일한 염색체 영역에 맵핑된 질병과 유전자 사이의 관계는 연결기 (linkage) 분석 (물리적으로 인접한 유전자의 공동유전)에 의해 확인된다.

[0206] 이어서, 병에 걸린 개인과 병에 걸리지 않은 개인 사이의 cDNA 또는 게놈 서열의 차이를 결정하는 것이 필요하다. 병에 걸린 개인의 일부 또는 전부에서 돌연변이가 관찰되지만 임의의 정상 개인에서 관찰되지 않으면, 돌연변이는 아마도 질병의 원인제일 것이다.

[0207] 물리적 맵핑 및 유전자 맵핑 기술의 최근의 해상력으로, 질병과 관련된 염색체 영역에 정확하게 국소화된 cDNA는 50 내지 500개의 잠재적인 원인 유전자 중 하나일 수 있다 (이는 1 메가염기 맵핑 해상력 및 20 kb당 1 유전자를 가정한다).

[0208] 약물 후보의 스크리닝 분석

[0209] 본 발명은 EGFL7를 모방하거나 (효능제) EGFL7의 효과를 방지하는 (길항제) 것을 확인하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다. 길항제 약물 후보에 대한 스크리닝 분석은 EGFL7에 결합하거나 복합체를 형성하거나, 또는 달리 코딩된 폴리펩티드와 다른 세포성 단백질의 상호작용을 저해하는 화합물을 확인하도록 설계된다. 상기 스크리닝 분석은 소분자 약물 후보를 확인하기에 특히 적합하게 만드는 화합물 라이브러리의 고효율 스크리닝에 적용할 수 있는 분석을 포함할 것이다.

[0210] 분석은 당업계에 잘 특성화된 단백질-단백질 결합 분석, 생화학적 스크리닝 분석, 면역분석, 및 세포 기반 분석을 포함하는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다.

[0211] 길항제에 대한 모든 분석은 약물 후보를 EGFL7과 이들 2가지 성분들이 상호작용하도록 허용하기에 충분한 시간

동안 충분한 조건 하에 접촉시키는 것을 요구하는 점에서 일반적이다.

[0212] 결합 분석에서, 상호작용은 결합이고 형성된 복합체는 반응 혼합물에서 단리되거나 검출될 수 있다. 특정 실시태양에서, EGFL7 또는 약물 후보는 공유 또는 비공유 부착에 의해 고체상, 예를 들어 미세적정판 상에 고정화된다. 비공유 부착은 일반적으로 고체 표면을 EGFL7의 용액으로 코팅하고 건조시킴으로써 달성된다. 별법으로, 고정화시킬 EGFL7에 특이적인 고정화된 항체, 예를 들어 모노클로날 항체가 이를 고체 표면에 고정시키기 위해 사용될 수 있다. 분석은 검출가능한 표지로 표시될 수 있는 비고정된 성분을 고정화된 성분, 예를 들어, 고정된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 첨가함으로써 수행한다. 반응이 완료된 후, 미반응 성분을 예를 들어 세척에 의해 제거하고, 고체 표면 상에 고정된 복합체를 검출한다. 원래 비고정된 성분이 검출가능한 표지를 갖는 경우, 표면 상에 고정화된 표지의 검출은 복합체 형성이 일어났음을 나타낸다. 원래 비고정된 성분이 표지를 갖지 않는 경우, 복합체 형성은 예를 들어 고정화된 복합체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용함으로써 검출할 수 있다.

[0213] 후보 화합물이 특정 EGFL7 폴리펩티드와 상호작용하지만 그에 결합하지 않으면, 상기 폴리펩티드와 그의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위한 잘 공지된 방법으로 분석할 수 있다. 상기 분석은 전통적인 방법, 예를 들어 가교결합, 동시면역침전, 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 동시정제를 포함한다. 또한, 단백질-단백질 상호작용은 필즈 (Fields) 및 공동작업자에 의해 설명되고 (Fields and Song, Nature (London) 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582 (1991)), 문헌 [Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5789-5793 (1991)]에 개시된 효모계 유전자 시스템을 사용하여 모니터링할 수 있다. 많은 전사 활성화제, 예를 들어 효모 GAL4는 하나는 DNA-결합 도메인으로 작용하고 다른 하나는 전사 활성화 도메인으로 작용하는 두개의 물리적으로 분리된 모듈 도메인으로 구성된다. 상기 문헌에 기재된 효모 발현 시스템 (일반적으로 "2 하이브리드 시스템"으로 언급됨)은 상기 특성을 이용하고, 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인에 융합된 한 단백질 및 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인에 융합된 다른 단백질의 2 하이브리드 단백질을 사용한다. GAL4-활성화된 프로모터의 조절 하에 GAL1-lacZ 리포터 유전자의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 의존한다. 상호작용 폴리펩티드를 포함하는 콜로니는  $\beta$ -갈락토시다제의 발색 기질을 사용하여 검출된다. 2 하이브리드 기술을 사용하여 두 특이적 단백질 사이의 단백질-단백질 상호작용을 확인하기 위한 완전한 키트 (MATCHMAKER™)은 클론테크로부터 상업적으로 입수가능하다. 상기 시스템은 또한 특이적 단백질 상호작용에 관련되는 단백질 도메인을 맵핑하고 상기 상호작용에 중요한 아미노산 잔기의 위치를 정확하게 나타내는 것까지 연장될 수 있다.

[0214] EGFL7 및 다른 세포내 성분 또는 세포의 성분의 상호작용을 저해하는 화합물은 다음과 같이 시험할 수 있다. 두 생성물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건 하에 허용하는 시간 동안 EGFL7 및 세포내 또는 세포의 성분을 포함하는 반응 혼합물을 제조한다. 결합을 억제하는 후보 화합물의 능력을 시험하기 위해서, 시험 화합물의 존재 및 부재 하에 반응을 실시한다. 또한, 양성 대조군으로서 기능하기 위해 제3 반응 혼합물에 위약을 첨가할 수 있다. 시험 화합물과 혼합물 내에 존재하는 세포내 또는 세포의 성분 사이의 결합 (복합체 형성)을 상기 설명한 바와 같이 모니터링한다. 시험 화합물을 포함하는 반응 혼합물이 아니라 대조 반응(들)에서 복합체의 형성은 시험 화합물과 그의 반응 파트너의 상호작용을 시험 화합물이 방해함을 나타낸다.

[0215] EGFL7 길항제는 EGFL7 및 효능있는 길항제를 멤브레인 결합 EGFL7 폴리펩티드 수용체 또는 재조합 수용체를 경쟁적 억제 분석에 적합한 조건 하에서 조합함으로써 검출할 수 있다. EGFL7는 수용체에 결합한 EGFL7 폴리펩티드 분자의 수가 효능있는 길항제의 효능을 결정하기 위해 사용될 수 있도록, 예를 들어 방사선으로 표시될 수 있다. 수용체를 코딩하는 유전자는 당업계 숙련인에게 공지된 많은 방법, 예를 들어 리간드 패닝 (panning) 및 FACS 분류에 의해 확인할 수 있다 [Coligan et al., Current Protocols in Immun. 1(2):Chapter 5 (1991)]. 바람직하게는, EGFL7에 반응성인 세포로부터 폴리아데닐화 RNA가 제조되고 상기 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리가 풀(pool)로 분할되어 EGFL7에 반응성이 아닌 COS 세포 또는 다른 세포의 형질감염에 사용되는 발현 클로닝이 사용된다. 유리 슬라이드 상에서 성장한 형질감염된 세포는 표지된 EGFL7 폴리펩티드에 노출된다. EGFL7은 부위 특이적 단백질 키나제의 인식 부위의 요오드화 또는 봉입을 포함하는 다양한 수단에 의해 표시될 수 있다. 고정 및 인큐베이션 후에, 슬라이드를 방사능 사진 분석에 적용한다. 양성 풀을 확인하고 하위풀을 준비하여 상호작용성 하위풀 분할 및 재스크리닝 과정을 사용하여 재형질감염시키고, 최종적으로 추정 수용체를 코딩하는 단일 클론을 생성시킨다.

[0216] 수용체 확인을 위한 다른 방법으로서, 표지된 EGFL7 폴리펩티드는 세포막 또는 수용체 분자를 발현하는 추출물 제제와 광친화도 연결될 수 있다. 가교결합된 물질은 PAGE에 의해 분해되고 X선 필름에 노출된다. 수용체를 포함하는 표지된 복합체를 절제하여 펩티드 단편으로 분해한 후, 단백질 미세서열결정에 적용하였다. 미세서열



결정으로부터 얻은 아미노산 서열은 추정 수용체를 코딩하는 유전자를 확인하기 위한 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 변성 올리고뉴클레오타이드 프로브 세트를 설계하는데 사용될 것이다.

[0217] 길항제에 대한 다른 분석에서, 수용체를 발현하는 포유동물 세포 또는 멤브레인 제제를 후보 화합물의 존재 하에 표지된 EGFL7 폴리펩티드와 함께 인큐베이션할 것이다. 상기 상호작용을 향상 또는 차단하는 화합물의 능력을 이어서 측정할 수 있다.

[0218] 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환의 치료에 유용한 조성물은 표적 유전자 생성물의 발현 및(또는) 활성을 억제하는 항체, 작은 유기 및 무기 분자, 펩티드, 인산화펩티드, 안티센스 및 리보자임 분자, 삼중 나선 분자 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0219] 효능있는 길항제의 보다 구체적인 예는 면역글로불린과 EGFL7의 융합체에 결합하는 올리고뉴클레오타이드 및 특히 폴리클로날 및 모노클로날 항체 및 항체 단편, 단쇄 항체, 항-개체특이형 항체, 및 상기 항체 또는 단편의 키메라 또는 인간화 형태, 및 인간 항체 및 항체 단편을 포함하고 이로 제한되지 않는 항체를 포함한다. 별법으로, 효능있는 길항제는 매우 밀접한 단백질, 예를 들어 수용체를 인식하지만 효과를 발휘하지 못하여 EGFL7의 작용을 경쟁적으로 억제하는 EGFL7의 돌연변이 형태일 수 있다.

[0220] 또다른 효능있는 EGFL7 길항제는 예를 들어 안티센스 RNA 또는 DNA 분자가 표적 mRNA에 혼성화하여 단백질 번역을 억제함으로써 mRNA의 번역을 직접적으로 차단하는 작용을 하는 안티센스 기술을 사용하여 제조된 안티센스 RNA 또는 DNA 구성체이다. 안티센스 기술은 삼중 나선 형성 또는 안티센스 DNA 또는 RNA를 통해 유전자 발현을 조절하기 위해 사용될 수 있고, 두 방법은 폴리뉴클레오타이드의 DNA 또는 RNA에 대한 결합에 기초한 것이다. 예를 들어, 본원에서 성숙 EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 5' 코딩 부분은 약 10 내지 40 염기쌍 길이의 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드를 설계하기 위해 사용된다. DNA 올리고뉴클레오타이드는 전사에 관련되는 유전자의 구역에 상보성이어서 EGFL7의 전사 및 생산을 억제하도록 설계된다 (삼중 나선 - Lee et al., Nucl. Acids Res. 6:3073 (1979); Cooney et al., Science 241:456 (1988); Dervan et al., Science 251:1360 (1991) 참조). 본원에서 언급되는 RNA의 일부에 대한 서열 "상보성"은 RNA에 혼성화되어 안정한 이중체를 형성할 수 있는 충분한 상보성을 갖는 서열을 의미하고, 이중가닥 안티센스 핵산의 경우에, 이중체 DNA의 단일 가닥이 시험될 수 있거나 삼중 나선 형성이 분석될 수 있다. 혼성화 능력은 안티센스 핵산의 상보성 정도 및 길이 모두에 의존할 것이다. 일반적으로, 혼성화 핵산이 길수록 RNA와의 염기 미스매치가 더 많을 수 있고, 안정한 이중체 (또는 삼중체)를 계속 형성할 수 있다. 당업계의 숙련인은 혼성화된 복합체의 용점을 결정하기 위해 표준 과정을 사용하여 허용될 수 있는 미스매치 수준을 확인할 수 있다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드는 생체 내에서 mRNA에 혼성화하여 mRNA 분자의 EGFL7로의 번역을 차단한다 (안티센스 - Okano, Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)).

[0221] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 또는 그의 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 변형 형태, 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 분자의 안정성, 혼성화 등을 개선시키기 위해 염기 잔기, 당 잔기 또는 포스페이트 주쇄에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 다른 매달린 기, 예를 들어 펩티드 (예를 들어, 생체 내에서 숙주 세포 수용체를 표적하기 위한), 또는 세포막을 가로지른 수송을 촉진하는 물질 (예를 들어 Letsinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556 (1989); Lemaitre, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:648-652 (1987); 1988년 12월 15일 공개된 PCT 공개 W088/09810) 또는 혈관-뇌 장벽 (예를 들어, 1988년 4월 25일 공개된 PCT 공개 W089/10134), 혼성화-촉발 절단제 (예를 들어, Krol et al., BioTechniques 6:958-976 (1988)) 또는 삽입제 (intercalating agent) (예를 들어, Zon, Pharm. Res. 5:539-549 (1988))를 포함할 수 있다. 이를 위해, 올리고뉴클레오타이드는 다른 분자, 예를 들어 펩티드, 혼성화 촉발 가교결합제, 수송제, 혼성화-촉발 절단제 등에 컨쥬게이팅될 수 있다.

[0222] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 히포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸) 우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실큐에오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미



노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)<sub>w</sub> 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하여 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 변성 염기 잔기를 포함할 수 있다.

[0223] 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일룰로스 및 핵소스를 포함하여 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 당 잔기를 포함할 수 있다.

[0224] 또다른 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포라미도티오에이트, 포스포라미데이트, 포스포르디아미데이트, 메틸포스포네이트, 알킬 포스포트리에스테르 및 포름아세탈 또는 이들의 유사체로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 변성 포스포에이트 주쇄를 포함한다.

[0225] 또다른 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 -아노머 올리고뉴클레오타이드이다. -아노머 올리고뉴클레오타이드는 통상적인 -단위와 달리 스트랜드가 서로 평행하게 연장되는 상보성 RNA와 특이적인 이중가닥 하이브리드를 형성한다 (Gautier, et al., Nucl. Acids Res. 15:6625-6641 (1987)). 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 (Inoue, et al., Nucl. Acids Res. 15:6131-6148 (1987)) 또는 키메릭 RNA-DNA 유사체이다 (Inoue, et al., FEBS Lett. 215:327-330 (1987)).

[0226] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 당염기에 공지된 표준 방법, 예를 들어 자동 DNA 합성기 (예를 들어 바이오서치 (Biosearch), 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 등으로부터 상업적으로 입수가능한 것)에 의해 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 문헌 [Stein, et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)]에 기재된 방법에 의해 합성할 수 있고, 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오타이드는 제어된 공극 유리 중합체 지지체를 사용하여 제조할 수 있다 (Sarin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451 (1988)).

[0227] 상기한 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 RNA 또는 DNA가 EGFL7의 생성을 억제하기 위해 체내에서 발현될 수 있도록 세포에 전달될 수도 있다. 안티센스 DNA를 사용할 때, 표적 유전자 뉴클레오타이드 서열의 번역 개시 부위, 예를 들어 약 -10 내지 +10 위치로부터 유도된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드가 바람직하다.

[0228] 안티센스 RNA 또는 DNA 분자의 길이는 일반적으로 적어도 약 5개 염기, 약 10개 염기, 약 15개 염기, 약 20개 염기, 약 25개 염기, 약 30개 염기, 약 35개 염기, 약 40개 염기, 약 45개 염기, 약 50개 염기, 약 55개 염기, 약 60개 염기, 약 65개 염기, 약 70개 염기, 약 75개 염기, 약 80개 염기, 약 85개 염기, 약 90개 염기, 약 95개 염기, 약 100개 염기, 또는 그 이상이다.

[0229] 효능있는 길항제는 활성 부위, 수용체 결합 부위 또는 성장 인자 또는 EGFL7의 다른 관련 결합 부위에 결합하여 EGFL7의 정상적인 생물학적 활성을 차단하는 소분자를 추가로 포함한다. 소분자의 예는 작은 펩티드 또는 펩티드-유사 분자, 바람직하게는 가용성 펩티드, 및 합성 비펩티딜 유기 또는 무기 화합물을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0230] 추가의 효능있는 길항제는 RNA의 특이적인 절단을 촉매화할 수 있는 효소 활성의 RNA 분자인 리보자임이다. 리보자임은 상보성 표적 RNA에 서열 특이적 혼성화, 이어서 뉴클레오타이드 내부 분해(endonucleolytic)에 의한 절단에 의해 작용한다. 잠재적인 RNA 표적 내의 특이적인 리보자임 절단 부위는 공지의 기술로 확인할 수 있다. 추가의 상세한 내용은 예를 들어 문헌 [Rossi, Current Biology 4:469-471 (1994)] 및 PCT 공개 WO 97/33551 (1997년 9월 18일 공개)을 참고한다.

[0231] 부위 특이적 인식 서열에서 mRNA를 절단하는 리보자임을 사용하여 표적 유전자 mRNA를 파괴할 수 있지만, 해머헤드 리보자임의 사용이 바람직하다. 해머헤드 리보자임은 표적 mRNA와 상보성 염기쌍을 형성하는 인접 구역에 의해 지시되는 위치에서 mRNA를 절단한다. 유일한 요건은 표적 mRNA가 두개의 염기로 이루어진 서열 5'-UG-3'을 갖는 것이다. 해머헤드 리보자임의 구성 및 생산은 당업계에 잘 공지되어 있고, 문헌 [Myers, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York (1995), 특히 도 4, 페이지 833 참조] 및 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Haseloff and Gerlach, Nature, 334:585-591 (1988)]에 보다 상세히 설명되어 있다.

[0232] 바람직하게는, 리보자임은 절단 인식 부위가 표적 유전자 mRNA의 5' 말단 가까이에 위치하도록, 즉 효율을 증가시키고 비기능성 mRNA 전사체의 세포내 축적을 최소화하기 위해 처리된다.

[0233] 또한, 본 발명의 리보자임은 RNA 엔도리보뉴클레아제 (이하 "Cech-형 리보자임"으로 칭함), 예를 들어 테트라히메나 써모필라 (Tetrahymena thermophila) (IVS 또는 L-19 IVS RNA로 알려짐)에서 천연 생성되고 토마스 체크

(Thomas Cech) 및 동료연구자들에 의해 상세하게 설명된 바 있는 것을 포함한다 [Zaug, et al., Science, 224:574-578 (1984); Zaug and Cech, Science, 231:470-475 (1986); Zaug, et al., Nature, 324:429-433 (1986); PCT 공개 WO 88/04300 (유니버시티 패턴즈 인크. (University Patents Inc.)); Been and Cech, Cell, 47:207-216 (1986)]. Cech-형 리보자임은 표적 RNA 서열에 혼성화한 후 표적 RNA의 절단이 발생하는 8개 염기쌍의 활성 부위를 갖는다. 본 발명은 표적 유전자에 존재하는 8개 염기쌍의 활성 부위 서열을 표적으로 하는 Cech-형 리보자임을 포함한다.

[0234] 안티센스 방법에서와 같이, 리보자임은 변성 올리고뉴클레오티드로 구성될 수 있고 (예를 들어 개선된 안정성, 표적화 등을 위해), 생체 내에서 표적 유전자를 발현하는 세포로 전달되어야 한다. 바람직한 전달 방법은 형질 감염된 세포가 내인성 표적 유전자 메시지를 파괴하고 번역을 억제하기에 충분한 양의 리보자임을 생산하도록 강력한 구성적 pol III 또는 pol II 프로모터의 조절 하에 리보자임을 "코딩"하는 DNA 구성체를 사용하는 것을 포함한다. 안티센스 분자와는 달리, 리보자임은 촉매활성을 갖기 때문에, 효율을 위해 보다 낮은 세포내 농도가 필요하다.

[0235] 전사를 억제하기 위해 사용되는 삼중 나선 형성시의 핵산 분자는 단일가닥이어야 하고, 데옥시뉴클레오티드로 구성되어야 한다. 상기 올리고뉴클레오티드의 염기 조성은 일반적으로 이중체의 한 가닥 상에 퓨린 또는 피리미딘의 상당한 크기의 스트레치를 필요로 하는 혹스틴 (Hoogsteen) 염기쌍 규칙을 통해 삼중 나선 형성을 촉진하도록 설계된다. 보다 상세한 내용은 예를 들어 PCT 공개 WO 97/33551를 참고할 수 있다.

[0236] 상기 소분자는 상기 논의한 임의의 하나 이상의 스크리닝 분석에 의해 및(또는) 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 다른 스크리닝 기술에 의해 확인할 수 있다.

[0237] 치료되는 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환의 종류

[0238] EGFL7 또는 본원에서 설명되는 심혈관, 혈관신생 및 내피 분석에서 활성을 갖는 그에 대한 효능제는 혈관에 영향을 주는 전신성 질환, 예를 들어 당뇨병을 포함하여 다양한 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환에서 치료 용도를 가질 가능성이 있다. 그들의 치료 유용성은 동맥, 모세혈관, 정맥 및(또는) 림프관의 질병을 포함할 수 있다. 치료의 예는 근육 쇠약 질병의 치료, 골다공증의 치료, 이식체 주변의 세포 성장을 자극하여 그의 의도하는 부위로의 부착을 용이하게 하기 위한 이식체 고정 도움, 적용가능한 경우 조직 또는 혈청 내에서의 IGF 안정성의 증가 및 IGF 수용체에 대한 결합의 증가 (IGF는 시험관 내에서 인간 골수 적혈구 및 과립구 기원 세포 성장을 증강시키는 것으로 밝혀졌기 때문에)를 포함한다.

[0239] EGFL7 또는 그에 대한 효능제는 적혈구 생성 또는 과립구 형성의 자극, 상처 치유 또는 조직 재생 및 조직, 예를 들어 연결 조직, 피부, 뼈, 연골, 근육, 폐 또는 신장의 재생장에 관한 관련 요법의 자극, 혈관신생의 촉진, 내피 세포의 이동 자극 또는 억제, 및 혈관 평활근의 성장 및 내피 세포 생성의 촉진을 위해 사용될 수도 있다. EGFL7 또는 효능제에 의해 매개되는 혈관신생의 증가는 허혈 조직 및 관상동맥협착 후의 심장에서 부형 관상동맥 발생에 유익할 것이다. 길항제는 상기 폴리펩티드의 작용을 억제하기 위해, 예를 들어 EGFL7이 과도한 연결 조직의 생산을 촉진할 경우 상처 치유 또는 폐섬유증 동안 상기 조직의 생산을 제한하기 위해 사용된다. 이것은 급성 심근경색 및 심부전 치료를 포함할 것이다.

[0240] EGFL7이 혈관 관련 약물 표적화를 위해 유용하거나 또는 질환의 치료 또는 예방을 위한 치료 표적으로서 작용할 수 있는 특정 종류의 질병을 아래에서 설명한다. 아테롬성 동맥경화증은 지질 축적에 의한 동맥 내막 비후 플라크의 축적, 평활근 세포의 증식 및 동맥벽 내의 섬유 조직의 형성이라는 특징을 갖는 질병이다. 이 질병은 임의의 기관에서 대동맥, 중동맥 및 소동맥에 영향을 줄 수 있다. 내피 및 혈관 평활근 세포 기능의 변화는 상기 플라크의 축적 및 퇴화 조절시에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

[0241] 고혈압은 체동맥, 폐동맥 또는 문정맥 시스템의 혈압 증가라는 특징을 갖는다. 혈압 증가는 손상된 내피 기능 및(또는) 혈관 질병으로부터 발생하거나 이를 야기할 수 있다.

[0242] 염증성 혈관염은 거세포 동맥염, 다카야스 (Takayasu) 동맥염, 결절다발동맥염 (예를 들어 미세혈관병 형태), 가와사키 (Kawasaki) 질병, 현미경적 다발성혈관염, 베게너 육아종, 및 다양한 감염 관련 혈관 질환 (예를 들어 헤노흐-손라인 (Henoch-Schonlein) 자반증)을 포함한다. 변경된 내피 세포 기능은 상기 질병에서 중요한 것으로 밝혀졌다.

[0243] 레이노 (Reynaud) 병 및 레이노 현상은 냉기에 노출시에 사지를 통한 순환의 간헐적인 비정상적인 장애를 특징으로 한다. 변경된 내피 세포 기능은 상기 질병에서 중요한 것으로 밝혀졌다.

- [0244] 동맥류는 변경된 내피 세포 및(또는) 혈관 평활근 세포와 관련되는 동맥 또는 정맥 가지의 낭상 또는 방추상 팽창이다.
- [0245] 동맥 재협착 (동맥벽의 재협착)은 내피 및 혈관 평활근 세포의 기능 및 증식의 변경 결과로서 혈관확장 후에 발생할 수 있다.
- [0246] 혈전정맥염 및 림프관염은 변경된 내피 세포 기능에 의해 발생하고(하거나) 변경된 기능을 야기할 수 있는, 각각 정맥 및 림프관의 염증성 질환이다. 유사하게, 림프부종은 내피 세포 기능에 의해 발생하는 손상된 림프관을 수반하는 병이다.
- [0247] 양성 및 악성 혈관 종양 패밀리는 혈관계의 세포 성분의 비정상적인 증식 및 성장을 특징으로 한다. 예를 들어, 림프관종은 신생아에서 대체로 발생하는 림프관의 선천성, 종종 낭성의 기형인 림프계의 양성 종양이다. 양성 종양은 인접 조직으로 성장하는 경향이 있다. 양성 종양은 대체로 경부 및 겨드랑이 영역에서 발생한다. 이들은 또한 사지의 연조직에서 발생할 수 있다. 주요 증상은 연결조직으로 둘러싸인 팽창된, 때때로 망상의 구조 림프관 및 림프낭종이다. 림프관종은 부적절하게 연결된 배아 림프관 또는 이의 결핍에 의해 발생하는 것으로 추정된다. 그 결과는 손상된 국소 림프 배액이다 (Griener et al., Lymphology 4:140-144 (1971)).
- [0248] EGFL7 길항제의 다른 용도는 성장 및(또는) 전이를 가능하게 하는 종양의 혈관형성을 수반하는 종양 혈관신생의 억제이다. 상기 과정은 새 혈관의 성장에 의존한다. 종양 혈관신생을 수반하는 신생물 및 관련 상태의 예는 편평세포암, 폐암 (예를 들어 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종), 복막암, 간세포 암, 위암 (위장관암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종 및 다양한 종류의 두경부암, 및 B-세포 림프종 (예를 들어 저급/소포 비호지킨 림프종 (NHL); 소림프구성 (SL) NHL; 중간 등급/소포 NHL; 중간 등급 확산 NHL; 고급 면역모세포 NHL; 고급 림프아구성 NHL; 고급 소 비분할 세포 NHL; 벌키 질병 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 모세포 백혈병; 만성 골수모세포성 백혈병; 및 이식후 림프세포 증식성 질환 (PTLD), 및 모반증과 관련된 비정상 혈관 증식, 부종 (예를 들어, 뇌종양과 관련된), 및 메이그스 증후군을 포함한다.
- [0249] 또한, EGFL7 길항제는 증식 망막병증, 맥락막 신생혈관형성 (CNV), 연령관련 황반 변성 (AMD), 당뇨 및 다른 허혈-관련 망막병증, 당뇨 황반부종, 병리학적 근시, 폰 힙펠-린다우 질병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 중심 정맥 폐쇄 (CRVO), 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 안내 신생혈관 질환의 치료에 유용할 수 있다.
- [0250] 류마티스성 관절염은 또다른 적응증이다. 맥관계를 통한 염증 세포의 혈관 성장 및 표적화는 류마티스의 발병 기전 및 관절염의 음성 혈청반응 형태에서 중요한 성분이다.
- [0251] 상기 내용에 비추어, 내피 세포 기능 및 이동을 변경시키거나 영향을 주는 것으로 밝혀진, EGFL7, 본원에서 설명한 그의 효능제 또는 길항제는 상기 설명한 많은 또는 모든 질환의 병인 및 발병기전에서 중요한 역할을 수행할 것으로 보이고, 따라서 상기 과정을 증가 또는 억제하기 위한 치료 표적으로서 상기 질환에서 혈관 관련 약물 표적화를 위해 기능할 수 있다.
- [0252] 투여 프로토콜, 계획, 투여량 및 제제화
- [0253] 본원에서 제시된 분자 및 그에 대한 효능제 및 길항제는 상기 논의한 다양한 질환 및 질병에 대한 예방제 및 치료제로서 제약상 유용하다.
- [0254] EGFL7 또는 효능제 또는 길항제의 치료 조성물은 보관을 위해 적합한 정도의 순도를 갖는 목적하는 분자를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 용량 및 농도에서 수여자에게 무독성이고, 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르

기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및(또는) 비이온계 계면활성제, 예를 들어 TWEEN (등록상표), PLURONICS(등록상표) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

- [0255] 상기 담체의 추가의 예는 이온 교환제, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민, 버퍼 물질, 예를 들어 포스페이트, 글리신, 소르브산, 소르브산칼륨, 포화 식물지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염, 또는 전해질, 예를 들어 황산프로타민, 제이인산나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스계 물질 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 효능제 또는 길항제의 국소 또는 겔 형태를 위한 담체는 다당류, 예를 들어 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 또는 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴레이트, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 및 목재 왁스 알콜을 포함한다. 모든 투여를 위해, 통상적인 저장 형태가 적합하게 사용된다. 상기 형태는 예를 들어 마이크로캡슐, 나노캡슐, 리포솜, 고약, 흡입 형태, 코 스프레이, 설하 정제 및 지연 방출 제제를 포함한다. EGFL7 또는 효능제 또는 길항제는 일반적으로 약 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도에서 상기 비히클에 제제화될 것이다.
- [0256] 또다른 제제화는 형성된 물품 내로 EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제를 포함시키는 것을 포함한다. 상기 물품은 내피 세포 성장 및 혈관신생의 조절에 사용될 수 있다. 또한, 중앙 침습 및 전이는 상기 물품을 사용하여 조절할 수 있다.
- [0257] 생체내 투여를 위해 사용되는 EGFL7 폴리펩티드 또는 효능제 또는 길항제는 멸균되어야 한다. 이것은 동결건조 전 또는 후에 멸균 여과막을 통해 여과하고 재구성함으로써 쉽게 달성된다. EGFL7 폴리펩티드는 통상 전신투여될 경우 동결건조 형태 또는 용액 형태로 저장될 것이다. 동결건조 형태일 경우, EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제는 일반적으로 사용시에 적절한 희석제로 재구성하기 위한 다른 성분과 조합되어 제제화된다. EGFL7 또는 효능제 또는 길항제의 액체 제제의 일례는 피하 주사용 단일 투여 바이알 내에 충전된 멸균된 투명 무색의 비보존된 용액이다. 반복 사용에 적합한 보존된 제약 조성물은 예를 들어 주로 폴리펩티드의 적응증 및 종류에 따라
- [0258] EGFL7 폴리펩티드 또는 그의 효능제 또는 길항제;
- [0259] 용액 내의 폴리펩티드 또는 다른 분자의 최대 안정성 범위 내의 pH, 바람직하게는 약 4-8을 유지할 수 있는 버퍼;
- [0260] 교반 유도 응집에 대해 폴리펩티드 또는 분자를 1차적으로 안정화시키는 세제/계면활성제;
- [0261] 등장제 (isotonifier);
- [0262] 페놀, 벤질 알콜 및 벤제토늄 할라이드, 예를 들어 클로라이드로 이루어지는 군 중에서 선택되는 보존제; 및
- [0263] 물을 포함할 수 있다.
- [0264] 사용되는 세제가 비이온성일 경우, 이는 예를 들어 폴리소르베이트 (예를 들어 POLYSORBATE™ (TWEEN™) 20, 80 등) 또는 폴록사머 (예를 들어 POLOXAMER™ 188)일 수 있다. 비이온성 계면활성제를 사용하면 폴리펩티드의 변성을 야기하지 않으면서 전단 표면 스트레스에 노출시킬 수 있다. 또한, 상기 계면활성제 함유 제제는 에어로졸 장치, 예를 들어 폐 투여에 사용하는 것 및 무바늘 제트 주사총 (예를 들어 EP 257,956 참조)에 사용될 수 있다.
- [0265] 등장제는 EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제의 액체 조성물의 등장성을 보장하기 위해 존재할 수 있고, 다가 당 알콜, 바람직하게는 삼가 이상의 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다. 상기 당 알콜은 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있다. 별법으로, 염화나트륨 또는 다른 적합한 무기 염을 용액을 등장성으로 만들기 위해 사용할 수 있다.
- [0266] 버퍼는 요구되는 pH에 따라 예를 들어 아세테이트, 시트레이트, 숙시네이트 또는 포스페이트 버퍼일 수 있다. 본 발명의 액체 제제의 한 형태의 pH는 약 4 내지 8, 바람직하게는 약 생리학적 pH로 완충된다.
- [0267] 보존제 페놀, 벤질 알콜 및 벤제토늄 할라이드, 예를 들어, 클로라이드는 사용될 수 있는 공지의 항미생물제이다.
- [0268] 본원에서 설명되는 치료 활성의 폴리펩티드 조성물은 일반적으로 멸균 접근부를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주



사 바늘이 투과될 수 있는 스톱퍼 (stopper)를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 공급된다. 제제는 바람직하게는 반복된 정맥내 (i.v.), 피하 (s.c.) 또는 근내 (i.m.) 주사 또는 비내 또는 폐내 전달에 적합한 에어로졸 제제 (폐내 전달에 대해서는 예를 들어 EP 257,956 참조)로서 투여된다.

[0269] 치료 활성의 폴리펩티드는 또한 자연 방출 제제의 형태로 투여될 수도 있다. 자연 방출 제제의 적합한 예는 단백질 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 자연 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 문헌 [Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981) 및 Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)]에 기재된 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919, EP 58,481), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman et al., Biopolymers 22:547-556 (1983)), 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트 (Langer et al., 상기 문헌), 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 Lupron Depot™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 미세구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988)을 포함한다.

[0270] 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 단백질이 장기간 동안 신체에서 유지될 때, 이들은 37°C에서 습기에 노출될 때 변성 또는 응집되어 생물학적 활성 및 가능하게는 면역원성의 변경을 야기할 수 있다. 관련되는 메카니즘에 따라 단백질 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설파이드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

[0271] 자연 방출 EGFL7 폴리펩티드 조성물은 또한 리포솜에 포획된 EGFL7 폴리펩티드를 포함한다. EGFL7 폴리펩티드를 포함하는 리포솜은 DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본 특허 출원 83-118008; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 EP 102,324에 공지된 방법에 의해 제조된다. 통상 리포솜은 지질 함량이 약 30 mol% 초과인 콜레스테롤인 작은 (약 200-800Å) 단일 라멜라 종류이고, 선택되는 비율은 최적 요법을 위해 조절된다.

[0272] EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제의 치료 유효량은 물론 치료 (예방 포함)되는 병리학적 상태, 투여 방법, 치료에 사용되는 화합물의 종류, 관련되는 임의의 동시 치료법, 환자의 연령, 체중, 일반적인 의학적 상태, 병력 등과 같은 인자에 따라 상이할 것이고, 이는 의사가 용이하게 결정할 수 있다. 따라서, 치료자는 최대 치료 효과를 얻기 위해 필요한 투여량을 결정하고 투여 경로를 변경할 필요가 있을 것이다. EGFL7이 환자 치료를 위한 좁은 대상체 범위를 가질 경우, 인간 EGFL7 폴리펩티드, 보다 바람직하게는 천연 서열 인간 EGFL7 폴리펩티드를 포함하는 제제가 바람직하다. 임상적은 해당 상태의 치료의 요구되는 효과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 EGFL7을 투여할 것이다. 예를 들어, 목적이 CHF의 치료인 경우, 양은 상기 상태와 관련된 진행성 심장 비대를 억제하는 양일 것이다. 상기 요법의 과정은 심초음파 검사에 의해 쉽게 모니터링된다. 유사하게, 비대 심근병증 환자에서, EGFL7은 경험을 기초로 하여 투여될 수 있다.

[0273] 상기 가이드라인에서, 유효량은 일반적으로 약 0.001 내지 약 1.0 mg/kg, 보다 바람직하게는 약 0.01-1.0 mg/kg, 가장 바람직하게는 약 0.01-0.1 mg/kg이다.

[0274] 인간 성인 고혈압 치료시에 비경구 사용을 위해, EGFL7을 주사 형태로 체중 1 kg당 약 0.01 내지 50 mg, 바람직하게는 약 0.05 내지 20 mg, 가장 바람직하게는 1 내지 20 mg을 1일 1 내지 3회 정맥내 주사에 의해 투여하는 것이 유리하다. 경구 투여를 위해, EGFL7을 기초로 한 분자는 바람직하게는 체중 1 kg당 약 5 mg 내지 1 g, 바람직하게는 약 10 내지 100 mg으로 1일 1 내지 3회 투여된다. 내독소 오염을 안전한 수준에서 최소로, 예를 들어 0.5 ng/mg 단백질 미만으로 유지하여야 함을 이해하여야 한다. 또한, 인간 투여를 위해, 제제는 바람직하게는 FDA 및 생물학제제 (Biologics) 표준에서 요구되는 멸균성, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순도를 충족시키는 것이 바람직하다.

[0275] 조직 재생에 사용되는 EGFL7을 포함하는 제약 조성물의 투여 요법은 폴리펩티드의 작용을 변경시키는 상이한 인자, 예를 들어 형성이 요구되는 조직 중량, 손상 부위, 손상된 조직의 상태, 상처 크기, 손상된 조직의 종류 (예를 들어 뼈), 환자의 연령, 성별 및 식단, 임의의 감염증의 심도, 투여 시간 및 다른 임상 인자를 고려하여 의사가 결정할 것이다. 투여량은 제구성에서 사용되는 매트릭스의 종류 및 제약 조성물 내의 다른 단백질의 포함에 따라 상이할 수 있다. 예를 들어, 다른 공지의 성장인자, 예를 들어 IGF-I를 최종 조성물에 첨가하는 것도

투여량에 영향을 줄 수 있다. 과정은 조직/뼈 성장 및(또는) 회복의 주기적인 평가, 예를 들어, X선, 조직형태학적 결정 및 테트라사이클린 표지에 의해 모니터링할 수 있다.

[0276] EGFL7 폴리펩티드 또는 길항제 또는 효능제의 투여 경로는 공지의 방법에 따라, 예를 들어 정맥내, 근내, 뇌내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 안내, 관절내, 활액내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의한 주사 또는 주입에 의해 또는 아래 설명되는 지연 방출 시스템에 의해 수행된다. EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제도 국소 및 전신 치료 효과를 발휘하기 위해 종양내, 종양주위, 병소내 또는 병소주위 경로에 의해 적절하게 투여된다. 복강내 경로는 예를 들어 난소 종양의 치료에 특히 유용한 것으로 예상된다.

[0277] 펩티드 또는 소분자가 길항제 또는 효능제로서 사용될 경우, 액체 또는 고체 형태로 포유동물에게 경구 또는 비경구 투여되는 것이 바람직하다.

[0278] 염을 형성하고 유용한 분자의 약리학상 허용되는 염의 예는 알칼리 금속염 (예를 들어, 나트륨염, 칼륨염), 알칼리토금속염 (예를 들어 칼슘염, 마그네슘염), 암모늄염, 유기염기염 (예를 들어 피리딘염, 트리에틸아민염), 무기산 염 (예를 들어 염산염, 술페이트, 니트레이트), 및 유기산의 염 (예를 들어, 아세테이트, 옥살레이트, p-톨루엔술포네이트)을 포함한다.

[0279] 뼈, 연골, 건 또는 인대 재생에 유용한 조성물을 위해, 치료 방법은 조성물을 국소, 전신적으로 또는 임플란트 또는 장치로서 국부적으로 투여하는 것을 포함한다. 투여될 때, 사용하기 위한 치료 조성물은 발열원 부재의 생리학상 허용되는 형태이다. 또한, 조성물은 바람직하게는 캡슐화되거나 뼈, 연골, 또는 조직 손상 부위에 전달하기 위한 점성 형태로 주사된다. 국소 투여는 상처 치유 및 조직 회복에 적합할 수 있다. 바람직하게는, 뼈 및(또는) 연골 형성을 위해, 조성물은 뼈 및(또는) 연골 손상 부위에 단백질 함유 조성물을 전달하여 뼈 및 연골 발생을 위한 구조를 제공할 수 있고, 바람직하게는 신체 내로 재흡수될 수 있는 매트릭스를 포함할 것이다. 상기 매트릭스는 다른 매식된 의료 적용을 위해 현재 사용되는 물질로 형성될 수 있다.

[0280] 매트릭스 물질은 생체적합성, 생분해성, 기계적 특성, 표면적 외형 및 경계면 특성을 기초로 선택된다. 조성물의 특정 용도는 적합한 제제를 규정할 것이다. 조성물에 효능있는 매트릭스는 생분해성의 화학적으로 규정된 황산칼슘, 3인산칼슘, 히드록시아파타이트, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 폴리안히드라이드일 수 있다. 다른 효능있는 물질은 생분해성의 생물학적으로 잘 규정된, 예를 들어 뼈 또는 피부 콜라겐이다. 추가의 매트릭스는 순수 단백질 또는 세포외 매트릭스 성분으로 이루어진다. 다른 효능있는 매트릭스는 비생분해성의 화학적으로 규정된, 예를 들어 소성된 히드록시아파타이트, 바이오글래스 (bioglass), 알루미늄이트 또는 다른 세라믹이다. 매트릭스는 상기 언급한 임의의 물질 종류의 조합물, 예를 들어 폴리락트산 및 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 3인산칼슘으로 이루어질 수 있다. 바이오세라믹은 조성물에서, 예를 들어 칼슘-알루미늄이트-포스페이트에서 및 공극 크기, 입자 크기, 입자 형태 및 생분해성을 변경시키기 위한 가공시에 변경될 수 있다.

[0281] 한 특정 실시태양은 직경이 150 내지 800 마이크로인 다공성 입자 형태의 락트산과 글리콜산의 50:50 (몰 중량) 공중합체이다. 일부 적용시에, 폴리펩티드 조성물이 매트릭스로부터 이탈되는 것을 방지하기 위해서 격절형성제, 예를 들어 카르복시메틸 셀룰로스 또는 자가 혈액 응고를 이용하는 것이 유용할 것이다.

[0282] 격절형성제의 적합한 한 패밀리는 셀룰로스계 물질, 예를 들어 알킬셀룰로스 (예를 들어 히드록시알킬셀룰로스), 예를 들어 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스 및 카르복시메틸셀룰로스이고, 카르복시메틸셀룰로스 (CMC)의 양이온염이 바람직하다. 다른 바람직한 격절형성제는 히알루론산, 알긴산나트륨, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리옥시에틸렌 옥사이드, 카르복시비닐 중합체 및 폴리(비닐 알콜)을 포함한다. 본원에서 유용한 격절형성제의 양은 제제의 총 중량을 기준으로 0.5-20 wt%, 바람직하게는 1-10 wt%이고, 이는 중합체 매트릭스로부터 폴리펩티드 (또는 그의 길항제)의 탈착을 방지하고 조성물의 적절한 취급성을 제공하지만 기원 세포가 매트릭스를 침윤하는 것을 방지하여 폴리펩티드 (또는 그의 길항제)가 기원 세포의 골발생 활성을 도울 기회를 제공하는데 필요한 양을 나타낸다.

[0283] 조합 요법

[0284] 목적하는 질환의 예방 또는 치료시에 EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제의 효능은 활성 성분을 연속적으로 또는 동일한 조성물 또는 별개의 조성물로 상기 목적을 위해 효과적인 다른 약제와 조합하여 투여함으로써 개선될 수 있다.

[0285] 예를 들어, 혈관신생 관련 상태, 예를 들어 암 또는 안질환 치료에 사용되는 EGFL7 길항제는 상기 설명한 세포독성, 화학요법 또는 항혈관신생제와 조합될 수 있다. 종양 모델에서, EGFL7은 종양이 항-VEGF 항체로 처리된 후에 퇴행 종양 혈관의 통로에 남아있는 것으로 밝혀졌다 (실시에 참조). 특정 이론에 매이기를 바라지

않지만, EGFL7이 기존 ECM 통로를 따라 EC 이동을 지지하는 작용을 하여 항-혈관신생 처리 후에 종양 혈관 재성장을 돕는 것이 가능하다. 따라서, 항혈관신생제의 활성을 향상시키거나 민감화시키기 위해 EGFL7 길항제를 항혈관신생제와 조합 사용하는 것이 바람직하다. 바람직한 실시태양에서, EGFL7 길항제는 그의 항-종양 효능을 향상시키기 위해서 항-VEGF 항체 베바시주맙과 조합 사용된다.

[0286] EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제와 조합 투여되는 치료제의 유효량은 의사 또는 수의사의 판단에 따를 것이다. 투여량은 치료되는 상태의 최대 치료를 달성하도록 투여 및 조정된다. 예를 들어, 고혈압 치료를 위해 상기 양은 이상적으로는 이노제 또는 디지탈리스의 사용, 및 고혈압 또는 저혈압, 신장 손상 등과 같은 상태를 고려한다. 투여량은 사용되는 치료제의 종류 및 치료되는 특정 환자와 같은 인자에 의해 추가로 결정될 것이다. 일반적으로, 사용되는 양은 소정의 치료제가 EGFL7 없이 투여될 경우 사용되는 투여량과 동일할 것이다.

[0287] 제조품

[0288] 상기 설명한 질환의 진단 또는 치료에 유용한 EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제를 포함하는 키트와 같은 제조품은 적어도 용기 및 라벨을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 및 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 상태의 진단 또는 치료에 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 접근부를 가질 수 있다 (예를 들어 용기는 피하 주사 바늘이 투과될 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 활성 성분은 EGFL7 또는 그의 효능제 또는 길항제이다. 용기 상의 또는 용기과 연합되어 있는 라벨은 조성물이 선택되는 상태의 진단 또는 치료에 유용함을 표시한다. 제조품은 추가로 제약상 허용되는 버퍼, 예를 들어 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함할 수 있다. 제조품은 버퍼, 희석액, 필터, 바늘, 주사기 및 사용 지시서를 갖는 패키지 삽입물을 포함하여 상업적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 또한 상기한 다른 활성제를 갖는 제2 또는 제3 용기를 포함할 수 있다.

[0289] **EGFL7 항체**

[0290] 본 발명에 따른 가장 유망한 약물 후보의 일부는 본원에서 확인된 유전자 생성물의 생산의 억제 및(또는) 유전자 생성물의 활성 감소를 야기할 수 있는 항체 및 항체 단편이다.

[0291] 폴리클로날 항체

[0292] 폴리클로날 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 예를 들어 면역화제 및 필요한 경우 어쥬번트의 1회 이상의 주사에 의해 포유동물에서 생성시킬 수 있다. 일반적으로, 면역화제 및(또는) 어쥬번트는 다중 피하 또는 복강내 주사에 의해 포유동물에 주사될 것이다. 면역화제는 EGFL7 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 이는 면역화제를 면역화되는 포유동물에서 면역원성인 것으로 알려진 단백질에 컨쥬게이션시키기 위해 유용할 수 있다. 상기 면역원성 단백질의 예는 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 및 대두 트립신 억제제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 어쥬번트의 예는 프로인트 (Freund) 완전 어쥬번트 및 MPL-TDM 어쥬번트 (모노포스포릴 리피드 A 또는 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 과도한 실험 없이도 당업계의 숙련인이 선택할 수 있다.

[0293] 모노클로날 항체

[0294] 항-EGFL7 항체는 별법으로 모노클로날 항체일 수 있다. 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터 또는 다른 적절한 숙주 동물을 전형적으로 면역화제로 면역화시켜 면역화제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 생성시킨다. 별법으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다.

[0295] 면역화제는 일반적으로 EGFL7 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 바람직한 경우 말초혈액 림프구 ("PBL")가 사용되거나, 비인간 포유동물 공급원이 바람직할 경우 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불사 세포주와 융합된다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103). 불사 세포주는 대체로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 일반적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된 불사 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적합한 배지 중에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 모세포에 효소 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트

랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우, 하이브리도마의 배지는 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 히포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 ("HAT 배지")을 포함할 것이다.

[0296] 바람직한 불사 세포주는 효율적으로 융합되어 선택된 항체 생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 발현을 지지하는 것이고, HAT 배지와 같은 배지에 민감하다. 보다 바람직한 불사 세포주는 쥐 골수종 세포주이고, 이는 예를 들어 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고) 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나사)로부터 얻을 수 있다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주도 인간 모노클로날 항체의 생산에 대해 설명된 바 있다 (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63).

[0297] 이어서, 하이브리도마 세포가 배양되는 배지를 EGFL7 폴리펩티드에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역분석 (RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 결정된다. 상기 기술 및 분석은 당업계에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정된다.

[0298] 요구되는 하이브리도마 세포를 확인한 후에, 제한 회석 과정에 의해 클론을 서브클로닝하여 표준 방법으로 성장시킬 수 있다 [Goding, 상기 문헌]. 이를 위해 적합한 배지는 예를 들어 돌베코 (Dulbecco) 개질 이글 배지 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 별법으로, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 복수로서 생체 내에서 성장할 수 있다.

[0299] 서브클론에서 분리된 모노클로날 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 방법, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배지 또는 복수 유체로부터 분리 또는 정제할 수 있다.

[0300] 또한, 모노클로날 항체는 제조할 DNA 방법, 예를 들어 미국 특허 4,816,567에 기재된 방법으로 제조할 수도 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 방법 (예를 들어 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브)를 사용하여 쉽게 분리하고 서열결정할 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용할 수 있다. 일단 분리된 후에, DNA는 발현 벡터 내로 도입된 후, 숙주 세포, 예를 들어 제조할 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성하기 위해서 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염된다. 또한, DNA는 예를 들어 상동성 쥐 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 코딩 서열을 사용하거나 (미국 특허 4,816,567; Morrison et al., 상기 문헌), 비-면역글로불린 폴리펩티드의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 연결시킴으로써 변형시킬 수 있다. 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드가 본 발명의 항체의 불변 도메인 대신에 사용되거나 본 발명의 항체의 한 항원 결합 부위의 가변 도메인 대신에 사용되어 키메라 2가 항체를 생성시킬 수 있다.

[0301] 항체는 1가 항체일 수 있다. 1가 항체를 제조하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 한 방법은 면역글로불린 경쇄 및 변형 중쇄의 제조할 발현을 수반한다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가교결합을 방지하기 위해서 Fc 구역 내의 임의의 지점에서 끝이 잘린다. 별법으로, 관련 시스테인 잔기는 다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실되어 가교결합을 방지한다.

[0302] 시험관내 방법도 1가 항체 제조에 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생성시키기 위한 항체의 소화는 당업계에 공지된 통상적인 기술을 사용하여 달성할 수 있다.

#### [0303] 인간 및 인간화 항체

[0304] 항-EGFL7 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 비인간 (예를 들어, 쥐) 항체의 인간화 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬, 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 또는 항체의 다른 항원-결합 서열)이다. 인간화 항체는 수여자의 CDR로부터의 잔기가 비인간종 (공여 항체), 예를 들어 요구되는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수여 항체)를 포함한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 인간화 항체는 수여 항체나 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 모든 적어도 하나의, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이고, 모든 또는 실질적으로 모든



CDR 구역은 비-인간 면역글로불린의 CDR 구역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 구역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 바람직하게는 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다 (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op.Struct. Biol. 2:593-596 (1992)).

[0305] 비-인간 항체를 인간화하기 위한 방법은 당업계에 기술되어 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 비-인간 공급 원으로부터 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 일반적으로 "도입 (import)" 가변 도메인으로부터 취한 "도입" 잔기로서 종종 언급된다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 대응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써 윈터 (Winter) 및 공동연구자의 방법 (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536 (1988))을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 상기 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 대응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

[0306] 또한, 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)]. 콜 (Cole) 등 및 보르너 (Boerner) 등의 기술도 인간 모노클로날 항체의 제조에 사용할 수 있다 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 및 Boerner et al., J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)]. 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 로커스를 트랜스제닉 동물, 예를 들어 내인성 면역글로불린 유전자를 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스에 도입함으로써 제조할 수 있다. 켈린지 시에, 유전자 재배열, 회합 및 항체 레파토리를 포함하여 모든 면에서 인간에서 관찰된 것과 근접하게 유사한 인간 항체 생성이 관찰된다. 이러한 방법은 예를 들어 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425 및 5,661,016, 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)]에 기재되어 있다.

[0307] 이중특이적 항체

[0308] 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 결합 특이성을 갖는, 바람직하게는 인간 또는 인간화된 모노클로날 항체이다. 본 발명에서, 한 결합 특이성은 EGFL7 폴리펩티드에 대한 것이고, 다른 특이성은 임의의 다른 항원, 바람직하게는 세포 표면 단백질 또는 수용체 또는 수용체 서브유닛에 대한 것이다.

[0309] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 제조법 생성은 2개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (Millstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 랜덤 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (쿠아드로마 (quadroma))는 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 정확한 분자의 정제는 보통 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행된다. 유사한 절차가 W093/08829 (1993년 5월 13일 공개) 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0310] 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)를 갖는 항체 가변 도메인이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합될 수 있다. 융합은 바람직하게는 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 융합체의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및, 필요한 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이중특이적 항체의 생산에 대한 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0311] 이중컨주게이트 항체

[0312] 이중컨주게이트 항체는 2개의 공유 연결된 항체로 이루어진다. 상기 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089) 제안되었다. 항체는 가교결합제를 수반하는 것을 포함하여 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사

용하여 시험관 내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 디설파이드-교환 반응 또는 티오에테르 결합 형성에 의해 면역독소를 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트 및 예를 들어 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있는 것을 포함한다.

[0313] 면역컨쥬게이트

[0314] 본 발명은 또한 화학치료제, 독소 (예를 들어 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성의 독소 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 컨쥬게이트)와 같은 세포독성제에 컨쥬게이팅된 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이다.

[0315] 상기 면역컨쥬게이트 생성에 유용한 화학치료제는 상기 설명한 바 있다. 사용될 수 있는 효소 활성의 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이토라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트락토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 다양한 방사성핵종이 방사성 컨쥬게이팅된 항체의 생산에 이용될 수 있다. 그 예는  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  및  $^{186}\text{Re}$ 를 포함한다.

[0316] 항체와 세포독성제의 컨쥬게이트는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미노에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 항체에 방사성 뉴클레오타이드의 컨쥬게이팅을 위한 예시적인 킬레이팅제이다. W094/11026을 참조한다.

[0317] 또다른 실시태양에서, 항체는 종양 예비타게팅 (pretargeting)에 사용하기 위한 "수용체" (예를 들어 스트렙타비딘)에 컨쥬게이팅될 수 있고, 여기서 항체-수용체 컨쥬게이트는 환자에게 투여된 후, 제거제 (clearing agent)를 사용하여 순환계로부터 비결합 컨쥬게이트를 제거하고 세포독성제 (예, 방사성 뉴클레오타이드)에 컨쥬게이팅된 "리간드" (예, 아비딘)를 투여한다.

[0318] 면역리포솜

[0319] 본원에 개시된 항체는 또한 면역리포솜으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545]에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.

[0320] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하는 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 리포솜은 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득하도록 규정된 공극 크기의 필터를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설파이드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 컨쥬게이팅될 수 있다. 화학치료제 (예를 들어 독소루비신)는 임의로 리포솜 내에 함유된다. 문헌 [Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19)1484 (1989)]를 참조한다.

[0321] 항체의 제약 조성물

[0322] 본원에서 확인된 EGFL7 폴리펩티드 및 상기 개시된 스크리닝 분석에 의해 확인된 다른 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 상기한 다양한 질환의 치료를 위해 아래 설명하는 제약 조성물 형태로 투여될 수 있다.

[0323] 본원에서 제제는 또한 치료되는 특정 증상에 필요하면 바람직하게는 서로 불리한 영향을 끼치지 않는 상보적인 활성을 갖는 하나 초과와 활성 화합물을 함유할 수 있다. 별법으로, 또는 이에 추가하여, 조성물은 그의 기능을 향상시키는 약제, 예를 들어 세포독성제, 시토킨, 화학치료제 또는 성장억제제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분자는 의도하는 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적절하게 존재한다.

- [0324] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 콜로이드성 약물 전달체 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌]에 개시되어 있다.
- [0325] 생체내 투여를 위해 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0326] 지연 방출 제제를 제조할 수 있다. 지연 방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품의 형태, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐이다. 지연 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)) (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능 미세구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일에 걸쳐 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 보다 단기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체가 장기간 동안 그 내부에 유지될 때, 항체는 37°C에서 습기에 노출되어 변성 또는 응집하여 생물학적 활성을 상실하고, 가능하게는 면역원성이 변경될 수 있다. 합리적인 전략은 수반되는 메커니즘에 따라 안정화를 고안할 수 있다. 예를 들어, 티오-디설파이드 상호 교환을 통해 분자간 S-S 결합 형성이 되도록 하는 응집 메커니즘이 밝혀질 경우, 안정화는 술폰히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.
- [0327] 항체를 사용한 치료 방법
- [0328] EGFL7 폴리펩티드에 대한 항체는 상기 설명한 다양한 혈관신생 관련 상태의 치료에 사용될 수 있음이 고려된다.
- [0329] 항체는 공지의 방법, 예를 들어 볼러스로서 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입에 의한 정맥내 투여, 근내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의한 투여에 의해 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여된다. 항체의 정맥내 투여가 바람직하다.
- [0330] 다른 치료 요법을 상기한 본 발명의 항체 투여와 조합할 수 있다. 예를 들어, 항체가 암을 치료하기 위한 것일 경우, 상기 항체로 치료되는 환자는 방사선 요법을 받을 수 있다. 별법으로, 또는 이에 추가로, 화학치료제가 환자에게 투여될 수 있다. 상기 화학치료제의 제제 및 투여 계획은 제조업자의 지시에 따라 사용하거나 또는 숙련의에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 상기 화학치료법을 위한 제제 및 투여 계획은 또한 문헌 [Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992)]에 기재되어 있다. 화학치료제는 항체 투여 전 또는 후에 투여될 수 있거나, 동시에 투여될 수도 있다. 항체는 그 분자에 대해 공지된 투여량의 항-에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜 또는 EVISTA™ 또는 항-프로게스테론, 예를 들어 오나프리스톤 (EP 616812 참조)과 조합될 수 있다.
- [0331] 항체가 암 치료에 사용될 경우, 다른 종양 관련 항원에 대한 항체, 예를 들어 하나 이상의 ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 또는 VEGF 수용체(들)에 결합하는 항체를 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 다른 관련 항체는 상기 제시된 약제를 포함한다. 또한, 항체는 방사선 조사 또는 방사성 물질의 투여를 수반하는 방사선 치료와 순차적으로 또는 조합하여 적절하게 투여된다. 별법으로, 이에 추가하여, 본원에서 개시된 동일하거나 2 이상의 상이한 항원에 결합하는 2 이상의 항체를 환자에게 동시에 투여할 수 있다. 때때로, 환자에게 하나 이상의 시토킨을 투여하는 것이 유리할 수도 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 성장억제제와 동시에 투여된다. 예를 들어, 성장억제제가 먼저 투여된 후, 본 발명의 항체가 투여될 수 있다. 그러나, 동시에 투여 또는 본 발명의 항체의 선행 투여도 고려된다. 성장억제제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 양이고, 성장억제제 및 본 발명의 항체의 조합 작용 (시너지)에 의해 감소될 수 있다.
- [0332] 한 실시태양에서, 종양의 혈관형성이 조합치료시에 공격된다. 항-EGFL7 항체 및 다른 항체 (예를 들어 항-VEGF)가 예를 들어 종양 또는 임의의 존재하는 그의 전이성 환부의 괴사를 관찰함으로써 결정되는 치료 유효량으로 종양 보유 환자에게 투여된다. 추가의 항-종양제, 예를 들어 알파-, 베타- 또는 감마-인터페론, 항-HER2 항체, 헤레굴린, 항-헤레굴린 항체, D-인자, 인터루킨-1 (IL-1), 인터루킨-2 (IL-2), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 또는 종양의 미세혈관 응고를 촉진하는 약제, 예를 들어 항-단백질 C 항체, 항-단백질 S

항체, 또는 C4b 결합 단백질 (1991년 2월 21일 공개된 WO 91/01753 참조), 또는 열 또는 방사선이 추가로 투여될 수 있다.

[0333] 다른 실시태양에서, FGF 또는 PDGF 길항제, 예를 들어 항-FGF 또는 항-PDGF 중화 항체가 항-EGFL7 항체와 함께 환자에게 투여된다. 항-EGFL7 항체를 사용한 치료는 바람직하게는 상처 치유 기간 또는 바람직한 신생혈관형성 동안 유지될 수 있다.

[0334] 심혈관, 내피 및 혈관신생 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량은 상기 정의된 치료되는 질환의 종류, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지에 상관없이 질병의 심도 및 경과, 이전 치료법, 환자의 병력 및 항체에 대한 반응, 및 치료 의사의 판단에 따라 결정될 것이다. 항체는 일정 시점에 또는 일련의 치료 기간에 걸쳐서 환자에게 적합하게 투여된다.

[0335] 예를 들어, 질환의 종류 및 심도에 따라 항체 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 50  $\text{mg}/\text{kg}$  (예를 들어, 0.1-20  $\text{mg}/\text{kg}$ )이 예를 들어 하나 이상의 별개의 투여 또는 연속적인 주입에 의해 환자에게 투여를 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 1일 또는 매주 투여량은 상기 언급한 요인에 따라 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 100  $\text{mg}/\text{kg}$  또는 그 이상일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 상태에 따라 치료는 요망되는 질환의 증상 억제가 발생할 때까지 반복되거나 유지된다. 그러나, 다른 투여 요법도 사용할 수 있다. 상기 치료법의 진행은 통상적인 기술 및 분석, 예를 들어 방사선 종양 영상에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0336] 항체를 포함하는 제조품

[0337] 항체를 포함하는 용기 및 라벨을 포함하는 제조품도 제공된다. 상기 제조품은 상기한 바 있고, 여기서 활성 성분은 항-EGFL7 항체이다.

[0338] 항체를 사용하는 종양의 진단 및 예후

[0339] 항체가 사용되는 적응증이 암이고, 특정 종양에서 과다 발현되는 세포 표면 단백질, 예를 들어 성장 수용체가 약물 후보 또는 종양 (예를 들어, 암) 치료를 위한 우수한 표적일 경우, EGFL7 폴리펩티드와 함께 동일한 단백질이 종양의 진단 및 예후에서 추가의 용도를 갖는다. 예를 들어, EGFL7 폴리펩티드에 대해 작용하는 항체는 종양 진단제 또는 예후제로서 사용될 수 있다.

[0340] 예를 들어, 항체 단편을 포함하여 항체는 EGFL7 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자의 발현을 검출하기 위해 정성적으로 또는 정량적으로 사용될 수 있다. 항체에는 바람직하게는 검출가능한, 예를 들어 형광 표지가 제공되고, 결합은 광학현미경, 유동 세포측정법, 형광측정법 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 모니터링할 수 있다. 상기 결합 분석은 본질적으로 상기한 바와 같이 수행된다.

[0341] 마커 유전자 생성물에 결합하는 항체의 계내 검출은 예를 들어 면역형광 또는 면역전자현미경으로 수행할 수 있다. 이를 위해, 조직학적 시편을 환자로부터 절제하고, 바람직하게는 생물학적 샘플 상에 항체를 씌워 표지된 항체를 시편에 부착시킨다. 또한, 이 과정을 통해 검사되는 조직 내의 마커 유전자 생성물의 분포를 확인할 수 있다. 매우 다양한 조직학적 방법을 계내 검출을 위해 쉽게 이용할 수 있음은 당업계의 숙련인에게 자명할 것이다.

[0342] 하기 실시예는 단지 예시의 목적으로만 제공되며, 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로도 제한하고자 한 것이 아니다.

[0343] 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 문헌의 개시 내용은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

## 실시예

[0344] 실시예에 나타낸 상업적으로 입수가능한 시약은 달리 지시하지 않으면 제조회사의 지시에 따라 사용하였다. 하기 실시예에서 및 명세서 전체에서 ATCC 기탁 번호로 확인된 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬처 컬렉션이다.

[0345] 본원에 인용된 모든 참고문은 참고로 본원에 포함된다.

[0346] 실시예 1. EGFL7의 클로닝

[0347] EGFL7은 신규한 인간 분비형 및 트랜스멤브레인 단백질, 특히 혈관 발달 조절에 관여하는 것을 발견하기 위한 노력으로 확인 및 클로닝되었다. 인간 EGFL7의 클로닝 및 발현의 상세한 내용은 예를 들어 특허 출원 US20030224984A1 (EGFL7는 PR01449로 확인됨)에 기재되어 있다. 간략하게 설명하면, 홀 마운트 계내 혼성화 스크리닝을 수행하여 분비된 인자 및 마우스 배아 맥관계에서 풍부한 수용체를 확인하였다. 시그널 서열 예측 및



세포의 도메인 상동성 검색에 의해 추정 분비형 인자 및 수용체를 제시하는 수백개의 인간 및 마우스 cDNA를 확인하고 수거하였다. 주형으로서 마우스 cDNA를 사용하여, 리보프로브를 생성시키고, 계내 혼성화를 E7.5에서 E14.5까지의 전체 마우스 배아에 대해 수행하였다. 상기 발달 시간범위를 선택한 이유는 이 시간 범위가 혈관 형성 및 혈관신생의 많은 중요한 단계를 포함하고 있기 때문이다. 상기 스크리닝으로부터 확인된 많은 유전자 중에서, EGFL7는 활발하게 성장하는 혈관의 내피에서 특유하게 발현된다. 발현의 상세한 내용은 아래를 참고한다.

[0348] 제노푸스 EGFL7은 단일 유전자는 기탁번호 BC044267로부터 유래된 초안 (rough draft)으로서 확인되었다. 제브라피시 EGFL7은 3개의 공지의 종 (인간, 마우스 및 제노푸스) 사이의 상동성을 기초로 하여 24hpf 배아로부터 제조된 cDNA 라이브러리의 저염격도 PCR 및 후속 스크리닝에 의해 클로닝하였다. 제브라피시 EGFL7 cDNA, 부분 게놈 DNA 및 아미노산의 서열은 도 1b에 제시한다. EGFL8은 EGFL7 서열을 사용하여 BLAST에 의해 확인하였다.

[0349] T51 패널을 사용한 방사선 하이브리드 맵핑 실험은 제브라피시 EGFL7을 EST 마커 fk20d12.y1 (기탁 번호 AW566846)에 근접한 연관군 21 (LG21)에 위치시켰다. 상기 제브라피시 LG21의 영역은 인간 EGFL7이 위치하는 로커스인 인간 염색체 9q33 내지 9q34와 신테니 (synteny) 관계인 것으로 보인다. 다음 유전자가 상기 인간 로커스 내에서 발견되었다: Notch1 (9q34), 카르복실 에스테르 리파제 (CELL; 9q34), 및 프로테아좀 서브유닛 베타 7 (psmb7; 9q33). 상기 유전자는 제브라피시 EGFL7이 맵핑되는 LG21의 영역에 존재한다 (LG21, 19.6-29.0 CM).

[0350] EGFL7 유전자는 상대 분자 질량이 ~30kD인 추정 분비형 단백질을 코딩한다. EGFL은 진화적으로 보존된다 (도 1a 참조). 인간 (호모 사피엔스) 아미노산 서열은 마우스 (무스 무스쿨루스), 제노푸스 (제노푸스 레비스) 및 제브라피시 (다니오 레리오)의 아미노산 서열에 대해 각각 77.45%, 47.12% 및 42.96% 상동성을 공유한다.

[0351] EGFL7 단백질은 시그날 서열, N-말단의 EMI 도메인 (EMI 도메인은 세포 부착 조절에 관여하는 많은 세포의 매트릭스 관련 단백질에 존재함), 이어서 2개의 EGF 유사 도메인 및 류신 및 발린 풍부 C-말단 영역을 포함한다. 포유동물 EGFL7은 작은 유전자 패밀리에 속한다. BLAST 검색은 EGFL7과 동일한 도메인 구성을 갖는 하나의 밀접하게 관련된 유전자 EGFL8을 확인하였다. 흥미롭게도, 어떠한 EGFL8 상동분자종 (orthologue)도 복수개의 어류 게놈 (다니오 레리오, 메다카 (Medaka) 및 푸구 (Fugu))에서 확인되지 않았기 때문에 상기 유전자 패밀리는 포유동물에서 보다 복잡한 것으로 보인다.

[0352] 인간 EGFL7을 코딩하는 cDNA는 부다페스트 조약 하에 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC)에 ATCC 기탁번호 203243 (1998년 9월 9일 기탁)으로 기탁되었다.

[0353] 상기 기탁은 특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약 (부다페스트 조약)의 규정 하에 이루어졌다. 이것은 기탁일로부터 30년 동안 기탁물의 생존가능한 배양의 유지를 보장한다. 기탁은 부다페스트 조약의 규정 하에 ATCC로부터 이용가능할 것이고, 이는 본원의 양수인과 ATCC 사이의 협정에 따르고, 관련된 미국 특허의 등록시에 또는 어떠한 미국 또는 외국 출원의 공개시에 (어느 것이 먼저 처리되든지 간에) 공중에게 기탁물의 배양 자손체의 영구적이고 비제한적인 이용가능성을 보장하고, 35 USC 122 및 그에 따른 청장의 규칙에 의해 미국 특허상표청의 청장에 의해 결정되는 사람에게 자손체의 이용가능성을 보장한다. (예를 들어 특허 886 OG 638과 관련하여 37 CFR 1.14).

[0354] 본원의 양수인은 기탁물질의 배양물이 적절한 조건 하에 배양시에 치사 또는 상실 또는 파괴될 경우 기탁물질이 동일한 다른 배양물로 신속하게 대체될 것임을 동의하였다. 기탁물질의 이용가능성은 해당국 특허법에 따라 임의의 정부 당국에서 승인된 권리를 위배하여 본 발명의 실시할 권리로서 간주되지 않는다.

## [0355] 실시예 2. EGFL7의 발현

[0356] EGFL7의 발현 패턴을 밝히기 위해, 홀 마운트 계내 혼성화, 면역형광 염색 및 방사성 계내 혼성화를 마우스 및 제브라피시 배 및 마우스 및 인간 조직 섹션에 대해 수행하였다.

### [0357] 제브라피시 및 마우스 균주

[0358] 마우스 배를 시간이 지정된 임신 (timed-pregnant) CD-1 마우스로부터 수거하였다. 뉘빙겐 (Tübingen) 긴 지느러미 (TL) 야생형 제브라피시 세포주, ~30 hpf 클로슈 (*clo<sup>m39</sup>*) 동종접합 돌연변이체 배아 및 그들의 야생형 형제 (sibling) 배아를 아래에서 설명하는 발현 및 활성 연구에 사용하였다. 성체 제브라피시 및 배아를 문헌에 기재된 바와 같이 유지하였다 (Westerfield 1993 Zebrafish Book).

- [0359] 방사성 계내 혼성화
- [0360] 문헌에 기재된 방법에 의해 조직을 계내 혼성화를 위해 처리하였다 [Phillips et al. (1990) Science 250:290-4]. <sup>33</sup>P-UTP-표지된 RNA 프로브를 문헌에 기재된 바와 같이 생성시켰다 [Melton et al. (1984) Nucleic Acids Research 12:7035-56]. EGFL7 센스 및 안티센스 프로브를 각각 뉴클레오티드 382 내지 1062, -137 내지 150, 및 173 내지 774에 대응하는 두개의 인간 cDNA 및 하나의 쥐 cDNA로부터 합성하였다 (개시 코돈 내의 뉴클레오티드 A가 뉴클레오티드 #1로서 계산됨).
- [0361] 홀 마운트 계내 혼성화
- [0362] 홀 마운트 계내 혼성화를 문헌 내용을 약간 변형시켜 수행하였다 [Shimamura et al. Development 120:2225-2234 (1994)]. 염색된 배를 사진 촬영을 위해 벤질 알콜/벤질 벤조에이트의 2:1 혼합물로 세정하였다. 센스 및 안티센스 리보프로브를 다음 주형을 사용하여 제조하였다: 쥐 EGFL7 부분 cDNA 클론 (이미지 (IMAGE) 클론 519249, 젠뱅크 기탁번호 AA107358); 뉴클레오티드 169 내지 807에 대응하는 제브라피시 EGFL7 부분 cDNA 클론. 모든 다른 분자 마커는 Fishman (MGH), Stainier (UCSF) 및 Weinstein (NIH) 실험실로부터 입수하였다. 홀 마운트 계내 혼성화 분석 후에, 배아를 1XPBS 중의 4% 파라포름알데히드 (PFA)에 재고정시키고, 에탄올 시리즈를 통해 탈수시키고, JB-4Plus 플라스틱 (폴리사이언스 (Polysciences))에 함침시켰다. 5  $\mu$ m 섹션을 0.2% 뉴클레어 패스트 레드로 반대염색하고, Cytomount 60에 위치시켰다.
- [0363] AP 염색
- [0364] 48 hpf 홀 마운트 제브라피시 배아의 내인성 알칼린 포스파타제 활성을 문헌에 기재된 바와 같이 검출하였다 [Childs et al. Development 129:973-982 (2002)].
- [0365] 디컨볼루션 (deconvolution) 현미경 분석
- [0366] 배아를 4% PFA 중에서 4°C에서 철야 고정시키고, 20% 수크로스/PBS에서 동해방지시키고, 7.5% 젤라틴/15% 수크로스 중에 순간 동결시키고, 섹션을 만들었다. 슬라이드를 공기 건조시키고, 1X PBS/0.1% Triton X-100/1% DMSO 중에서 투과처리하고, 상기 용액 + 1% BSA로 20분 동안 차단하고, 66 nM ALEXA Fluor594-팔로이딘 (몰레큘라 프로브 (Molecular Probes))로 20분 동안 염색하고, 세척하여 Vectashield DAPI (벡터, 랩스. (Vector labs.))에 배치하고, 60X 오일 대물렌즈가 구비된 델타비전 디컨볼루션 현미경 (Deltavision Deconvolution Microscope)으로 분석하였다.
- [0367] 면역형광 염색
- [0368] 아르메니아 햄스터를 이. 콜리에서 발현된 제조함 쥐 EGFL7 단백질로 면역화시켰다. 모노클로날 항체를 하이브리도마 융합 및 서브클로닝에 의해 생성시켰다. 상이한 에피토프를 인식하는 2개의 모노클로날 항체 1C8 및 5H7을 면역형광 염색에 사용하였다. 마우스 조직은 순간 동결시키고 동결 섹션을 제조하였다. 고정된 세포 또는 5  $\mu$ m 비고정된 조직 섹션을 문헌에 기재된 바와 같이 염색하였다 [Parker et al. Methods in Cell Biology 59:313-36 (1999)]. 상기 연구에 사용된 항체는 항-ZO-1 mab (지메드 인크. (Zymed Inc.), Cat. # 33-9100); 항-GFP (토레이 파인즈 바이오랩스 (Torrey Pines Biolabs), Cat. # TP401); 항-빈쿨린 mab (시그마 (Sigma))이었다.
- [0369] 결과
- [0370] EGFL7의 발현 패턴도 중에 걸쳐 진화적으로 보존된다. 마우스, 인간 및 제브라피시 배에서, 고수준의 EGFL7 전사체가 내피 기원세포 및 모든 혈관의 EC 및 심장내막에서 검출되었다 (도 2a, 2b, 2g, 2j-2m). 강한 혈관 발현은 배아 및 신생아 발생 전반에 걸쳐 지속되었지만, 메시지는 많은 성체 장기에서 검출가능하지 않았다 (도 2h). 성체 마우스에서, 고도로 혈관형성된 몇몇 장기, 예를 들어 폐, 심장 및 신장은 혈관의 작은 하위세트에서 EGFL7을 계속 발현하였다. 흥미롭게도, EGFL7 발현은 종양 (도 2i), 임신 동안 생식 기관 (도 2c) 및 염증 발생 조직을 포함하여 많은 증식성 조직에서 강하게 상향조절되었다. 또한, 강한 EGFL7 발현이 폐 선암종 및 편평세포 암종, 신장세포 암종, 전립선 암종, 난소 암종, 간 암종, 위 암종, 연골육종, 골육종, 발병 눈의 신생혈관 멤브레인 및 염증 부위를 포함하여 이로 제한되지 않는 주요 인간 질병에서 발견되었다.
- [0371] 상기 특유한 발현 패턴은 고수준의 EGFL7이 혈관 성장 및 리모델링에 관련됨을 시사한다. EGFL7은 심혈관 및 조혈 시스템 외에서 검출되지 않았고, 이러한 관찰은 EGFL7 발현이 혈관 제브라피시 돌연변이체 클로슈에서 완전히 파괴되었다는 사실에 의해 확인되었다 (도 2n) [Stainier et al. Dev. Suppl. 121:3141-3150 (1995)].

[0372] 면역형광 염색은 EGFL7 단백질이 분비되지만 EC 근처에서 유지되어 (도 2c의 삽입 사진), 세포의 매트릭스와 분명하게 관련됨을 보여준다. 항-VEGF 항체로 처리된 종양 모델을 사용한 추가의 연구는 종양 맥관계가 항-VEGF 처리에 의해 단편화된 후, EGFL7이 퇴행된 종양 혈관의 ECM 통로에 남아있음을 보여주었다. 이것은 종국적으로 다시 성장하여 항-VEGF 처리를 "벗어나기" 위해 종양을 지지할 때 EGFL7의 효능있는 중요한 역할을 제시할 수 있다.

[0373] **실시예 3. EGFL7 활성이 감소된 동물의 표현형 분석**

[0374] A. EGFL7 녹다운 제브라피시의 혈관 결함

[0375] 최근 보고서에서, 재조합 EGFL7 단백질을 포함하는 조건화 배지는 시험관 내에서 평활근 세포 (SMC) 이동을 억제하는 것으로 밝혀졌다 [Soncin et al. EMBO J. 22:5700-5711 (2003)]. 그러나, 그의 생체내 기능은 규정되지 않았다. EGFL7의 생체내 생물학적 기능을 규명하기 위해서, 혈관형성 및 혈관신생을 연구하기 위한 툴의 이용가능성 및 배아에서 유전자 발현 조작의 용이성 때문에 모델 유기체 제브라피시를 사용하였다 [Fishman et al. Circulation. Research 74:757-63 (1994); Weinstein et al. Cardiovascular Research 31:E17-24 (1996); Dooley et al. Current Opinion in Genetics & Development 10:252-6 (2000); Nasevicius & Ekker Nature Genetics 26:216-20 (2000)]. 또한, Egf18이 마우스 배아에서 혈관 및 말초신경의 서브세트에서 발현되었고, 이에 의해 Egf18이 EGFL7에 대한 효능있는 풍부한 인자가 될 수 있음이 밝혀졌다. 다른 한편으로, 어떠한 Egf18 상동분자종도 제브라피시 및 복수의 다른 어류 계통에서 발견되지 않았다. 따라서, 제브라피시는 상기 유전자 패밀리의 생물학적 기능을 규정하기 위한 특유한 툴을 제공한다.

[0376] 유전자 녹다운 실험은 생체 내에서의 안정성 및 특이성을 보장하는, 제브라피시 EGFL7을 표적화하는 2개의 상이한 모르폴리노 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수행하였고, 이들 올리고뉴클레오티드는 표적화된 유전자의 번역 또는 스플라이싱을 특이적으로 억제함으로써 기능한다. 올리고 AS<sub>Z(-47)</sub>은 5' UTR에 혼성화하고, 번역을 차단하고, 올리고 AS<sub>195</sub>는 엑손-인트론 연결체와 혼성화하여 인트론 보유 및 이에 따른 조기 번역 종결을 야기한다. 2개의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 위치는 도 1b에 나타내었다. 랜덤화 대조군은 다음과 같다:

[0377] CON(-47): ACGACGGTCACGATGAA TGGAGAGT (서열 10); 및

[0378] CON(195): CATGTTCATCGTCTTGTGCGTGT (서열 11)

[0379] 적절하게 주사된 배아의 확인을 돕고 배아 발생시에 올리고뉴클레오티드의 균일한 분포를 확인하기 위해서 플루오레세인 태그를 첨가하였다. 물 중의 5 mM 올리고뉴클레오티드 원액 (~40 mg/ml)을 0.25% 페놀 레드가 존재하는 1X 다뉴 (Danieu) 용액 (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.6)으로 희석하였다. 약 4.6 nl의 볼러스를 드루몬드 나노젝트 (Drummond Nanoject) 미세주사기를 사용하여 각각의 1-세포 내지 8-세포 단계의 배아에 주사하였다. 적정 실험은 배아당 4 ng 안티센스 올리고뉴클레오티드의 주사가 랜덤화 대조군 올리고뉴클레오티드 주사된 배아에서 유의한 치사율 증가를 야기하지 않으면서 다른 구조의 결함이 관찰되지 않은 상태에서 특이적인 혈관 결함을 야기하였음을 보여주었다.

[0380] 두 올리고뉴클레오티드는 동일한 표현형 결과를 제시하였다. 순환 개시 후에 [수정후 ~24 시간 후 (hpf)]에 조사할 때, 40% 초과 EGFL7 녹다운 배아 (KD)가 명백한 혈관 결함 시그널을 보였고, 이들은 순환을 전혀 보이지 않았거나 불완전한 순환 루프를 발생시켰고, 많은 배아는 심장막 부종 및 출혈을 가질 수 있다 (도 3a). 이와 대조적으로, 대조군 올리고뉴클레오티드가 주사된 어류는 단지 3%만이 작은 혈관 결함을 보였다.

[0381] 또한, flil<sup>14</sup>, flkl<sup>15</sup> 및 tie1, ephrinB2 및 gridlock (동맥 EC 마커), flt4 및 EphB4 (정맥 EC 마커)를 포함하는 복수개의 혈관 내피 마커의 발현 패턴 및 내인성 알칼린 포스파타제 활성을 분석하였다 [Brown et al. Mech. Dev. 90:237-252 (2000); Fouquet et al. Dev. Biol. 183:37-48 (1997); Liao et al. Development 124:381-389 (1997); Lyons et al. Dev. Dyn. 212:133-140 (1998); Lawson & Weinstein Nature Rev. Genet. 3:674-682 (2002); Zhong et al. Science 287:1820-1824 (2000); Childs et al. Development 129:973-982 (2002)]. 또한, 녹다운 실험을 flkl-프로모터-GFP 트랜스제닉 라인에서 수행하였다. 7-세포 단계로부터 30 hpf까지, 상기 마커의 전체 공간 분포 및 강도는 KD에서 영향받지 않았고, 모든 주요 동맥 및 정맥이 KD에서 제 위치에서 형성되었고 (도 3,4), 이것은 30 hpf (수정후 시간)에서 초기 EC 분화, 증식 및 이동에 유의한 결함이 존재하지 않음을 나타낸다. 그러나, 전체 시스템에 걸친 관생성은 KD에서 붕괴되었다. 30 hpf에서, Z(-47)KD에서 많은 주요 혈관이 붕괴된 관강을 갖거나 관강을 전혀 갖지 않았다 (도 3c-d, 3h). 48 hpf에서 분극화된 내피를 검출하는 내인성 AP 염색이 모든 Z(-47) 주사된 어류에서 Se를 보이지 않는 반면에 대조군 올리고

뉴클레오티드 주사된 어류에서 Se가 영향을 받지 않기 때문에 (도 4d 및 4e), 30 hpf에서 검출된 부분적으로 형성된 Se는 불안정한 것으로 보인다. 또한, AP 염색된 어류의 횡단면에서, Se와 유사한 어떠한 구조도 Z(-47) 어류에서 발견될 수 없었고 (도 4f), 이것은 발생이 진행되면서 30 hpf에서 관찰된 부분적인 Se가 퇴행될 수 있음을 시사한다. 분자 마커에 의해 제시된 관생성 결함의 우세한 분포는 다수회 실험에서 75 내지 85%이다 (도 3d). 예를 들어, 30 hpf에서의 flil1 염색은 76% (28/37)의 Z(-47)KD가 심하게 이상형성된 관생성 결함의 맥관계를 갖는 반면에, 모든 대조군 배아 (n=37)는 정상 혈관을 발생시켰음을 보여주었다. 너다운 특이성을 확인하기 위해서, AS<sub>-47</sub>에 의해 야기된 혈관 표현형은 5' 비번역 구역이 없는 EGFL7 코딩 RNA에 의해 구제되었다.

[0382] EGFL7 KD에서 관강 형성의 결여는 상기 배아에서 주요 혈관이 염료로 충전될 수 없다는 발견에 의해 지지되었다. 관생성 결함이 혈류 결여에 의한 혈관 붕괴의 결과일 가능성이 있지만, 다음 발견은 그렇지 않을 수 있음을 제시한다. 먼저, 심장 수축 기능은 EGFL7 KD에서 정상이었으며, 두번째로 1차 혈관 관강 형성 및 단기 간 유지는 순환이 결여된 침묵 심장 돌연변이에서 정상이었다 [Sehnert et al. *Nature Genet.* 31:106-110 (2002); Isogai et al. *Development* 130:5281-5290 (2003)].

[0383] 또한, EGFL7 KD 동물은 진행성 혈관신생 결함을 보였다. 체절간 혈관 (ISV)의 초기 발아는 22-24 hpf에서 돌연변이체에서 정상적으로 발생하였다 (도 3b). 그러나, ISV가 30 hpf에서 부분적으로 상실되었고 (도 2c-d), 48-72 hpf에 의해 완전히 제거되었기 때문에 2차 혈관은 점진적으로 사라졌다. ISV가 혈류 부재시에 퇴행을 겪는다고 문헌에 보고되었기 때문에 순환의 결여는 부분적으로 혈관신생 결함이 원인이 될 가능성이 있다 [Isogai et al. *Development* 130:5281-5290 (2003)]. 1차 혈관에서 우세한 표현형 때문에, EGFL7의 혈관신생에서의 정확한 역할은 유도가능 너아웃과 같은 방법을 사용하여 추가로 규정될 수 있다.

[0384] 혈관 발달은 이웃 조직에 의존적이기 때문에, EGFL7 KD에서 발견되는 혈관 결함이 주위 조직의 붕괴의 간접적인 결과인지에 대한 문제가 남는다 [Brown et al. *Mech. Dev.* 90:237-252 (2000); Sumoy et al. *Mech. Dev.* 63:15-27 (1997); Vokes & Krieg *Dev. Suppl.* 129:775-785 (2002)]. KD의 횡단면에서, 조직의 정상적인 보체가 존재하는 것으로 보인다 (도 3). 또한, fkd7, ntl, axial/fkd1 및 gata1의 계내 혼성화는 모든 축 (axial) 구조 및 조혈 계통이 KD에서 정상적으로 발생함을 보여주었다 [Odenthal & Nusslein-Volhard *Dev. Genes Evol.* 208:245-258 (1998); Schulte-Merker et al. *Development* 116:1021-1032 (1992); Strahle et al. *Genes Dev.* 7:1436-1446 (1993); Parker et al. *Methods Cell Biol.* 59:313-336 (1999)]. 순환 개시 후에, KD의 gata1<sup>+</sup> 세포는 이들이 초기에 발생하는 배아의 후복외측 구역에 유지되었고, 이것은 맥관계가 결함이 있음을 확인해 준다. 마지막으로, 혈관 결함이 KD에서 자명한 시점에서 26-체절 단계의 야생형 배아에서 혈관주위 SM22A 발현의 증거가 존재하지 않기 때문에 SMC의 결함 점증 현상은 원인이 되는 인자일 것으로 보이지 않는다. 이와 함께, 데이터는 혈관 관생성의 실패는 EGFL7 너다운에 의해 발생하는 주요 결함임을 시사한다.

[0385] EC수가 혈관 형태형성을 지시하기 때문에, 추가의 관찰은 EC수가 EGFL7 KD에서 변경되었는지에 대해 초점을 맞추었다 [Fong et al. *Development* 126:3015-3025 (1999)]. 순차적인 횡단면은 EGFL7의 너다운이 발생 단계에 무관하게 모든 축 수준에서 EC의 총수를 변경시키지 않았음을 보여주었다 (도 4). 또한, ephrinB2 및 flt4 발현 및 flk1:GFP 배아에서 동맥과 정맥 사이의 flk1 프로모터의 차등 조절을 기초로 하여 동맥 및 정맥 EC수도 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다 (도 4). EGFL7와 대조적으로, EC에 대한 공지의 분열촉진인자인 vegf의 너다운은 EC 수를 유의하게 감소시키고, 이어서 관 형성을 붕괴시켰다. 따라서, 데이터는 EGFL7이 VEGF와 구별되는 특유한 역할을 수행하고 혈관 관생성 동안 주로 요구됨을 나타내었다.

[0386] 세포 수준에서 혈관 표현형을 설명하기 위해서, flk1:GFP 어류를 사용하여 시간 경로 분석을 수행하였다. 몸통의 순차적인 횡단면 및 머리의 종단면을 22-, 24-, 26-체절 (순환 전), 24 hpf (순환 개시) 및 30 hpf 단계에서 취하였다. 상기 단면의 분석은 대조군 배아에서 코드에서 관으로의 과도기 동안의 일련의 세포 사건을 보여주었다. 22-체절 단계에서, 동맥 및 정맥 혈관모세포는 단일 코드로 융합되었다. 광범한 단단한 연결부는 혈관모세포 사이의 긴밀한 연결을 보여주었다. 24-체절 단계 정도에서 혈관모세포의 점진적인 분리가 단단한 연결부의 실질적인 순화에 의해 명백하였다. 26-체절 단계에 의해, 혈관모세포는 동맥 및 정맥 혈관모세포가 특유한 도메인을 점유하고 혼적관의 형태로 정렬되도록 충분히 분리되었다. 후속적으로, EC는 광범한 형태학적 변형을 겪고, 편평해져 혈관을 그들의 최종 형태로 만든다. 1차 혈관의 형성을 야기하는 사건의 상기 순서는 EGFL7 KD에서 심하게 손상되었다. 조사된 모든 단계에서, 너다운 혈관모세포는 광범위한 단단한 연결부의 분리 및 보유에 실패하였다. 이들은 또한 후기 단계에서 형태 변경에 실패하였다 (도 4h).

[0387] B. EGFL7 너아웃 마우스에서 감소된 종양 성장 및 결함 맥관계



- [0388] 포유동물에서 EGFL7의 기능을 추가로 규명하기 위해서, mEGFL7 녹아웃 (KO) 마우스를 생성시키고, 종양 매식을 위한 숙주 동물로서 사용하였다. KO 마우스는 129/BL6 배경에서 본래 생성되었고, BL6에 역교배되었다. 실험에 사용된 동물은 3 내지 4 세대 역교배되었다.
- [0389] 500,000개 이상의 B16(F10) 흑색종 종양 세포를 각 동물의 등쪽 옆구리에서 피하 주사하였다. 주사 부위를 종양 발생에 대해 매일 검사하였다. 성장 속도를 결정하기 위해서 종양을 규칙적으로 조사하였다. EGFL7<sup>-/-</sup> 동종접합 동물의 종양 성장율을 EGFL7<sup>+/-</sup> 이종접합 또는 야생형 한배새끼와 비교하였다.
- [0390] 도 6 및 7에 도시된 바와 같이, B16 흑색종 종양 성장은 EGFL7이 완전한 녹아웃된 동물에서 크게 감소되었다.
- [0391] 루이스 (Lewis) 폐 암종 (LLC) 종양 매식을 사용한 유사한 종양 성장 연구도 동종접합 EGFL7<sup>-/-</sup> KO 마우스에서 종양 성장의 감소를 보였다. 또한, EGFL7<sup>-/-</sup> KO 마우스의 서브세트에서 LLC 종양이 혈관형성에 실패하였고, 이것은 종양 혈관형성에서 EGFL7의 역할을 시사한다.
- [0392] EGFL7<sup>-/-</sup> KO 마우스 대 야생형 마우스에서 망막 맥관계 형성의 비교 연구는 EGFL7 기능의 결여가 상대적인 정상 망막 형성에도 불구하고 망막 혈관 이동을 지연시켰음을 보여주었다. 또한, 야생형 마우스에서 EGFL7 발현은 망막 발생의 이동전면으로 국소화되었다.
- [0393] **실시예 4. EGFL7은 EC 부착 및 이동을 지지한다**
- [0394] 실시예 3에서 제시된 EC 분리의 실패는 EC 이동 또는 부착이 EGFL7 KD에서 부적절하게 조절됨을 나타낸다. 상기 두가지 가능성을 구별하기 위해서 시험관내 내피 세포 이동 및 부착 분석을 수행하였다.
- [0395] 플레이트를 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  단백질 [BSA (시그마), 콜라겐 (업스테이트 (Upstate)), 피브로넥틴 (시그마), 제넨테크에서 이. 콜리에서 생산된 재조합 인간 EGFL7]로 코팅하였다. PBS 세정 후에, HUVEC (캄브렉스 (Cambrex))을 EGM2 배지 (캄브렉스)에  $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 의 밀도로 플레이팅하고, 세포 부착을 동조시키기 위해서 140xg에서 5분 동안 원심분리한 후 인큐베이팅하였다. 특이성을 분석하기 위해서, 플레이트를 HUVEC 플레이팅 전에 나타낸 농도의 항체와 예비인큐베이팅하였다.
- [0396] 면역원으로서 재조합 인간 및 마우스 EGFL7 폴리펩티드를 사용하여 모노클로날 항-인간 EGFL7 항체를 생성시켰다. 항체-항원 결합을 ELISA로 평가하였다. 상기 항체의 차단 활성은 HUVEC 부착 분석과 같은 분석으로 시험하였다. 초기 분석을 통해, 하이브리도마 10G9, 18F7, 3A5 및 1B12로부터의 항-EGFL7 Mab가 가장 강한 억제 활성을 갖는 것을 확인하였다.
- [0397] 부착 강도를 결정하기 위해, 거꾸로 된 플레이트를 인큐베이션 60분 후에 46, 183 또는 411xg에서 원심분리하였다. 부착 세포의 수는 형광 기반 분석(CyQUANT, 분자칼라 프로브스)을 사용하여 정량화하였고, 형광판 판독기를 사용하여 판독치를 구하였다 (Spectramax, 분자칼라 디바이시스 (Molecular Devices)).
- [0398] 그 결과는 배양 플레이트에 코팅된 EGFL7이 HUVEC 부착을 향상시켰음을 보여주었다 (도 5). 흥미롭게도, EGFL7에 의해 촉진된 부착 강도는 다른 전통적인 세포 부착 분자, 예를 들어 피브로넥틴 및 콜라겐보다 유의하게 약하였다 (도 5e). 또한, EGFL7에 대한 HUVEC 부착의 동역학은 다른 기관보다 훨씬 더 느렸다 (도 5g). EGFL7 발현 패턴, 하위세포 편재, 생체내 기능 및 세포 부착 특성을 고려하여, 활발한 혈관 성장 동안 EGFL7은 안정한 부착보다 이동에 우호적인 허용성 기관을 제공할 수 있고, 이에 의해 관 형성에 필요한 혈관모세포의 국소 이동을 가능하게 한다. 또한, 차단 항-EGFL7 Mab가 존재하거나 존재하지 않는 EGFL7 코팅 기관을 사용한 이동 분석은 EGFL7 기관이 HUVEC 이동을 지지함을 보여주었다.
- [0399] 선택된 항-EGFL7 Mab의 존재 하의 시험관내 관 형성 분석은 하이브리도마 18F7, 3A5, 10G9 및 1B12로부터의 항체를 포함하는 일부 차단 항체가 시험관내 관 형성을 크게 변경시킴을 보여주었고, 이는 혈관 형성 동안 EGFL7의 중요한 기능을 추가로 지지한다.
- [0400] 상기 명세서 기재 내용은 당업계의 숙련인이 본 발명을 실시할 수 있도록 하기 위해 충분한 것으로 생각된다. 그러나, 본원에서 제시되고 설명된 것에 추가하여 당업계의 숙련인은 상기한 설명으로부터 본 발명의 다양한 변형을 쉽게 알 수 있을 것이고, 이는 첨부된 청구의 범위에 포함된다.

## 도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1a 및 1b는 EGFL7이 척추동물 진화 동안 보존됨을 보여준다. a: 인간, 마우스, 제노푸스 (Xenopus) 및 제브라피시 (zebrafish) EGFL7 사이의 아미노산 정렬. EGFL7 유전자는 ~30kD의 추정 분비형 단백질을 코딩한다. 인간 (호모 사피엔스 (Homo sapiens)) 아미노산 서열은 마우스 (무스 무스쿨루스 (Mus musculus)), 개구리 (제노푸스 래비스 (Xenopus laevis)) 및 제브라피시 (다니오 레리오 (Danio rerio))의 아미노산 서열에 각각 77.45%, 47.14% 및 42.96% 상동성을 공유한다. 많은 알고리즘을 사용하는 구조 분석은 EGFL7 단백질이 다음 도메인을 함유하는 것으로 예측한다 (N'-말단으로부터 출발하는 박스 내에서): 시그널 서열, EMI 도메인 a, 중앙 부분에 2개의 EGF 유사 도메인, 이어서 류신 및 발린 풍부 C-말단 영역. b: 제브라피시 EGFL7 cDNA, 아미노산, 및 인트론 서열. 화살선은 2개의 안티센스 올리고, AS<sub>-47</sub> (서열 6) 및 AS<sub>195</sub> (서열 7), 및 인트론 잔류를 검출하기 위해 사용된 PCR 프라이머 (서열 8 및 9)를 나타낸다.
- [0039] 도 2a-2n은 EGFL7 발현 프로필을 묘사한다. 마우스 (a-b) 및 제브라피시 (j-n) 배아에서 EGFL7 홀 마운트 (whole mount) 계내 (in situ) 혼성화. b: 뉴클레어 패스트 레드 (nuclear-fast-red)로 염색된 a의 단면. RBC = 적혈구. j-m: 밝은 화살표 = 측판 중배엽, 어두운 화살표 = 등쪽 대동맥, 어두운 화살촉 = ISV. 삽입 사진: 몸통의 클로즈업 (close-up) 사진. n: 클로슈 (cloche) 돌연변이체. so = 체절 (somite). c: EGFL7 및 PECAM에 대해 염색된 임신 마우스 자궁. Bracket = 탈락막. d-i: 인간 폐 절편에서 방사성 계내 혼성화 (g-i) 및 H&E (d-f). 스케일 막대: 0.45mm (a, m, n), 0.07mm (b), 0.38mm (c-i), 0.25mm (j, l), 0.15mm (k), 0.26mm (m 삽입 사진), 및 0.04mm (c 삽입 사진).
- [0040] 도 3a-3d는 EGFL7 유전자 녹다운 (knockdown)이 제브라피시 배아에서 혈관 관생성 결함을 일으킴을 보여준다. 제브라피시 배아에 대조군 (Con<sub>-47</sub> 또는 Con<sub>195</sub>) 또는 EGFL7안티센스 (AS<sub>-47</sub> 또는 AS<sub>195</sub>) 올리고를 주사함. a: 48hpf에서 전체 형태 (gross morphology). 화살표는 심장막 부종을 나타내고, 화살촉은 출혈을 나타낸다. b-d: 23hpf (b) 및 30hpf (c-d)에서 *fli1* 발현. d: c에서 네모진 중간 몸통 맥관계의 클로즈업 사진. 백색 화살촉: 등쪽 대동맥의 관강, 흑색 화살촉: 앞 기본정맥의 관강, 흑색 화살표: 체절간 혈관. 스케일 막대: 0.6mm (a), 0.23mm (d) 및 0.5mm (b, c).
- [0041] 도 4a-4h는 EC수가 EGFL7 KD에서 변경되지 않음을 보여준다: 대조군 (a, c, e, g) 또는 안티센스 (b, d, f, h) 올리고를 주사한 f1k1:GFP 트랜스제닉 어류를 22-체절 (a-d) 또는 30hpf (e-h)에서 분석하였다. a, b: 등쪽 사진. e, f: 측면 사진. c, d, g, h: a-b에서 백색선으로 나타난 수준에서 취한 단면도, e-f는 팔로이딘 및 DAPI로 카운터 염색하였다. PD: 앞콩팥관, So: 체절, N: 척삭, 백색 화살표: 등맥 EC, 백색 화살촉 = 정맥 EC, DA = 등쪽 대동맥, PCV = 앞 기본 정맥. 스케일 막대: 0.33mm (a, b), 0.03mm (c, d, g, h), 0.47mm (e, f).
- [0042] 도 5a-5g는 EGFL7이 EC 부착을 촉진시킴을 보여준다. 인간 제대 혈관 내피 세포 (HUVEC)를 빈쿨린 염색하면 피브로넥틴 (b), 타입 I 콜라겐 (c) 및 EGFL7 (d)에서 국소 (focal) 부착 형성이 보이지만, BSA (a)에서는 보이지 않았다. 46g에서 회전시킨 후 EGFL7 기질에 보다 적은 세포가 부착되어 남아 있기 때문에 EGFL7에서 부착 강도는 콜라겐 또는 피브로넥틴에서보다 더 약하다 (e). 항-EGFL7 항체가 EGFL7에 대한 HUVEC 부착을 용량 의존적으로 차단하지만, 피브로넥틴에 대해서는 차단하지 않는다는 것을 통해 기질 특이성을 확인한다. 대조군 항체 (항-B7x)는 어떠한 기질에도 영향을 미치지 않는다 (f). g: 다양한 기질에 대한 HUVEC 부착의 운동학. 스케일 막대: 0.03mm (a-d).
- [0043] 도 6은 EGFL7<sup>-/-</sup> 동종접합 (n=11) 및 EGFL7<sup>+/-</sup> 이종접합 (n=11) 녹아웃 (knockout) 마우스에서 B16 흑색종 종양 성장률의 비교를 설명한다.
- [0044] 도 7a-7b는 EGFL7<sup>-/-</sup> 동종접합 녹아웃 마우스 (n=10) 대 그들의 야생형 한배새끼 (n=13)에서 B16 흑색종 종양 발생 및 성장률의 비교를 설명한다. 7b에서, 종양이 없는 마우스는 제외하였다.

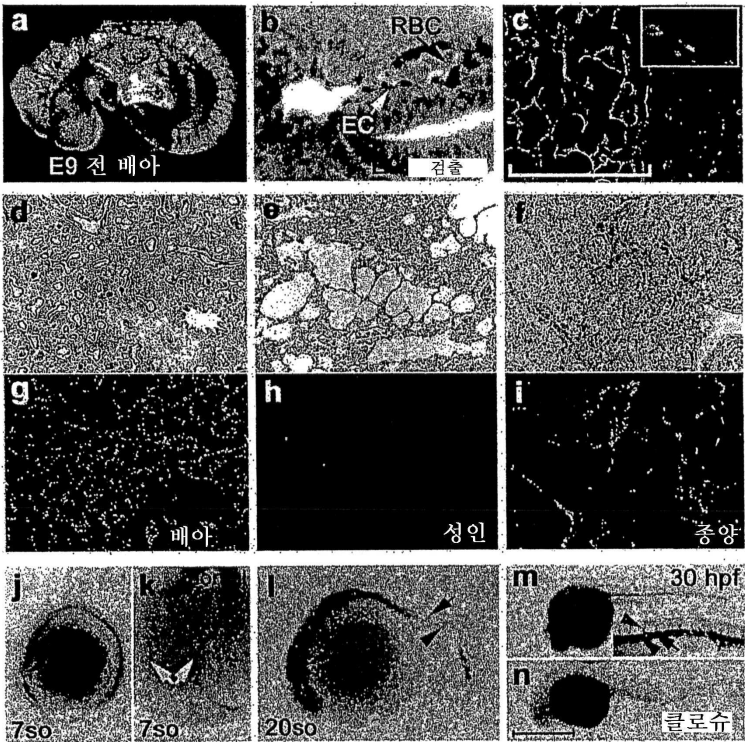
도면

도면1

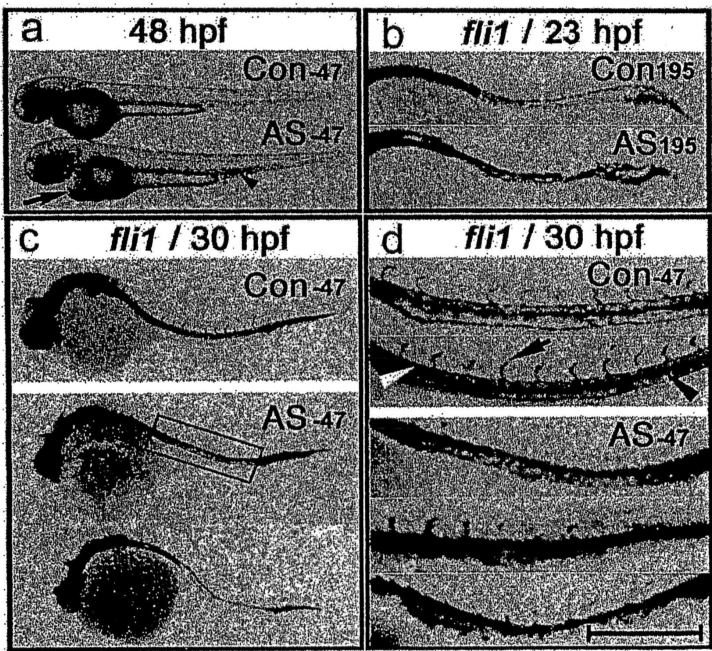
1	...MRGSDVFLIMWLTLYAVGGT	EHAYRP	GRRVCAVRAHG	---DPVSES	43	인간			
2	MQTMWGSGLLVAVFLVLAADGT	TEHVYRP	SRRVCTVGISG	---GSISET	47	마우스			
3	1-MWKVSCLVGYLLIIVTSAAD	D-HLYRT	GRRICSDGHPG	-TVSVTQS	47	제노푸스*			
4	...MYTALLSSSLFLLHVTCT	PQTHSHH	GRRVCGDVWSRRVSYSTES		46	제브라피시			
44	EVGRVYQPIYLDTCDGHRACSTYRT	IYRTAYR	RSPGLAPARPRYA	-CCPGW	92	인간			
45	EVGRVYQPIYLDTCDGHRACSTYRT	IYRTAYR	RSPGVIPARPRYA	-CCPGW	96	마우스			
46	EVGPVHSPIMTLCEGHRICSTYRT	YKVSYS	QVRS-RKTSFPLYS	-CCPGW	95	제노푸스*			
47	ELCPVHKPYITMCONHRMGSTYKTI	YKVSYS	QVIRAAPNLQI	PECCPGW	96	제브라피시			
93	KRTSGLPAGCAAI	QPPORNGGSCVOPGRRC	PAGWRGDTGS	DVDECS	142	인간			
97	KRTSGLPAGCAAI	QPPPGNGGSCIRPGHOR	PPVWQGDTCQTV	DVDECS	146	마우스			
96	RTIGAQTHSGCAAL	CRLOCGNGGTCVSSNKCE	PAGWRGIHCOM	DVDECS	145	제노푸스*			
97	RR-MH-SHNGCAV	CEQSCANGGSCVRPNHCA	CLRWTRGRFC	DVDECK	144	제브라피시			
143	ARRGGSPQRGIN	TAGSYWQCWEGHSL	SADGTLQVPK	GPPRVAPNPT	--	인간			
147	TGEASQPRQVNT	VGSYWCQGWEGQSP	SADGTRLSKE	GPSPVAPNPTA	--	마우스			
146	DGTHQSSQAC	INSAGFSSECELE	GYRLMABGKTC	RKVPAPTVPASPTSV		제노푸스*			
145	EAQH-SGQKCVNT	LGSFQVCEEGFSL	DEBKVTC	SKNPASSRNTGGG	---	제브라피시			
192	...QVDSAMKEEVQR	QSRVDLT	EEKQLVLAP	LHSLASQALEHG	---L	인간			
197	...QVDSMAREEVRL	QARYDVL	EQKLQVLAP	LHSLASRSTENG	---L	마우스			
196	QESGIPHSVKEEMAE	LRSKIDVL	BQKLHLLTR	FQGLTTFSPDD	-----A	제노푸스*			
193	...LVLNVTE	EVQIL	KNRVELLE	EQKLEMVCA	FTTLLPLD	GAGDTNSFL	제브라피시		
234	PDPGSLLVHSE	COLORIDSL	SEFISFLEE	QLGSSQKKDS	273	인간 (서열 1)			
239	QDPGSLLVHSE	FOOLDRIDSL	SEFVSFLEE	HLGSCSKKDL	278	마우스 (서열 2)			
241	ADPIAL	TRSLDOLDRIDSL	SEFISFLEE	RLETGCKTEL	280	제노푸스* (서열 3)			
238	SERTNFLSHS	LQQLDRIES	SEFVGFL	ERIGAGCQEN	277	제브라피시 (서열 4)			
b	CGCCGACAG	GTGGACCGAA	TGGCCTCGGG	CTCGCGAAG	CATCACGTGA	TATTATTGAC	AGGGTAGCTG	ATTACACGCT	-80
	GTACCGAGAG	CAAAACAGCA	CACCTGCAGT	CTCTCTTCT	CTCTCTCAGAC	ACACCTGAGA	AACAGACAGA	CTGACAGAGA	1
				AS <sub>47</sub>					인티센스 올리고
									인트론
	7GTACACAGC	ACTTCGCTC	TCCCTCTCT	7TCTTCTCT	GCATGTGAC	TGCACAGTC	AGACTCAGS	TCATCAGGG	81
	Y T A	L L L	S S L	F L L	H V T	C T F Q	T H S	N H G	
									전방향 PCR 프라이머
	AGGAGAGTGT	GTGTGTGTA	TGTCTGGAGT	CTCTGTGTGT	CTTACAGCAC	AGAATCTTTT	CTTACAGCTG	TACACAAACC	161
	R R V C	V G D	V V S	R R V S	Y S T	E S F	L Q P V	N K P	
	CTACATCACC	ATGTGCAAA	ACCACGCAAT	GTGCAGCAG	TACAGTAG	AACAGCAGG	GAAGACACAT	ATCAAAACCG	241
	Y I T	H C Q N	N R H	C S T	Y X				(표적화된 인트론)
									AS <sub>195</sub> 인티센스 올리고
	TACCATGAC	GATCAACTCA	CTGTATTCG	7TCTTACAG	SACCATCTAC	AAAGTTTCTT	ATAGGCAGGT	GACCAAGACA	321
					T I Y	K V S Y	R Q V	T R A	
	GCCTCTAATC	TACAAATTA	CCCAAAATGC	TGTCCGAGAT	GGAGACGAT	GCATTCAGC	AACTGCAGAC	AAAGCGATG	401
	A F H L	Q I Y	F E C	C P S W	R R H	H S H	H C H Q	A V C	
									역방향 PCR 프라이머
	TGAACACTCT	TGTSCAAAG	GAGGCTCGTG	TGTAAAGCCC	ATCACTGTG	CTGTCTGAG	AGGATGAGCA	GGACATTCT	481
	E Q S	C A N G	G S C	V R F	H H C A	C L R	G W T	G R F C	
	GCACAAATAGA	TGTGACAGG	TGTAAAGAG	CTCAGCACTG	CTCTCAGAG	TGTGTGAATA	CGCTGGGCA	TITTCAGAT	561
	Q I D	V D E	C K E A	Q H C	S Q K	C V H T	L S S	F Q C	
	GTGTGTGAGG	AGGATTCAG	TTTGGAGAA	GATAAAGTCA	CATGTTCAAA	AAATCTGCT	TCTCAGGGA	ACACTGGTG	641
	V C E E	G F S	L D E	D K V T	C S K	H P A	S S R N	T G G	
	AGCTTGGGG	TTGGTGASA	ACGTACTGA	AGAGGTTGAG	ATCCTAAGAA	ACCGAGTGA	GCTCTGGAG	CAGAACTGG	721
	G L B	L V E N	V T E	E V Q	I L K N	R V E	L L E	Q K L E	
	AGATGCTCT	AGCACCTTC	ACCACCTGC	TACCTCTGGA	TGGAGCAGGG	GACACCAACA	GCTTCTGTC	TGACGAGAC	801
	H V L	A F F	T T L L	F L D	S A G	D T N S	F L S	E R T	
	AACTTCTCT	CCCATCTCT	GCAGCAGTG	GACGCTATG	AGTGCCTG	CGACAGGTC	GGCTTCTTG	AGGAGAGAT	881
	N F L S	H S L	Q Q L	D R I E	E L S	E Q V	G F L E	E R I	
	CGAGGCTGT	GGCTGTGAG	AAAATGATC	GATCAAGCC	ATCACTGATC	ACAGGCTGAC	CCATCAACA	TGTTCTCAAG	961
	G A C	G C Q E		N 경지					
	AACACAGGG	AAATCATGTT	GAACCTCTTT	ATTGGGACA	CGAGCGGTC	ATTGATATG	TTCATGTCT	GTCAATTAC	1041
	TGTGTGTAA	GTTSAGTCA	GGAGAAATGT	AAATTTATGT	ATTATTAATT	CCATGTCTTC	GTCAATGAT	ATGCTTTTTT	1121
	GATAGGTGC	ATTCCTTTTT	TAGCTCTCAT	TTTGTGTAT	AAAATGCTT	AAATCTTAAA	AAAAAAGAAA	AAAAAAGAAA	1201
	AAAA	(서열 5)							



도면2

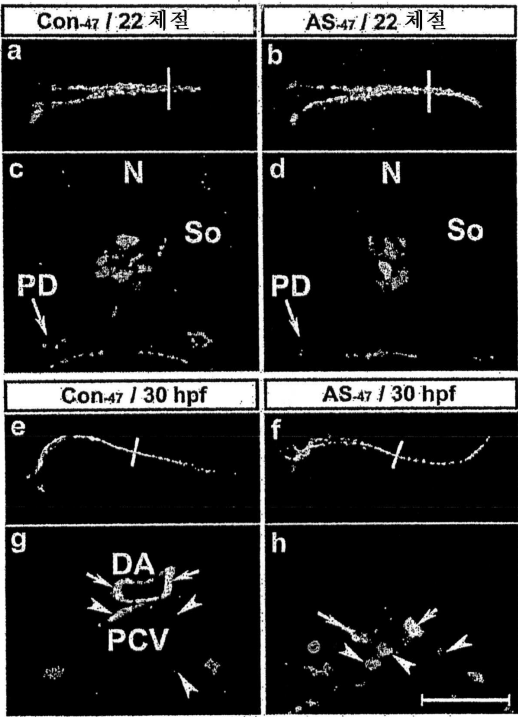


도면3

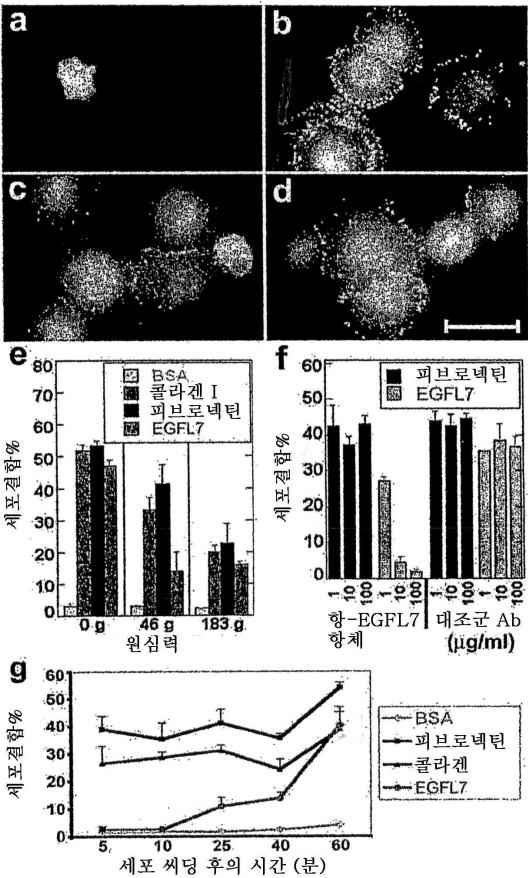




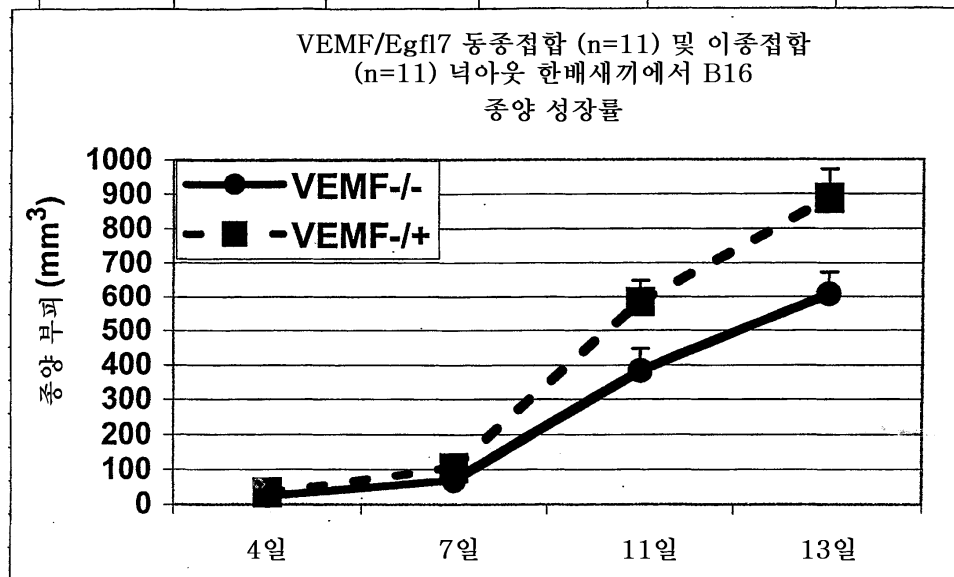
도면4



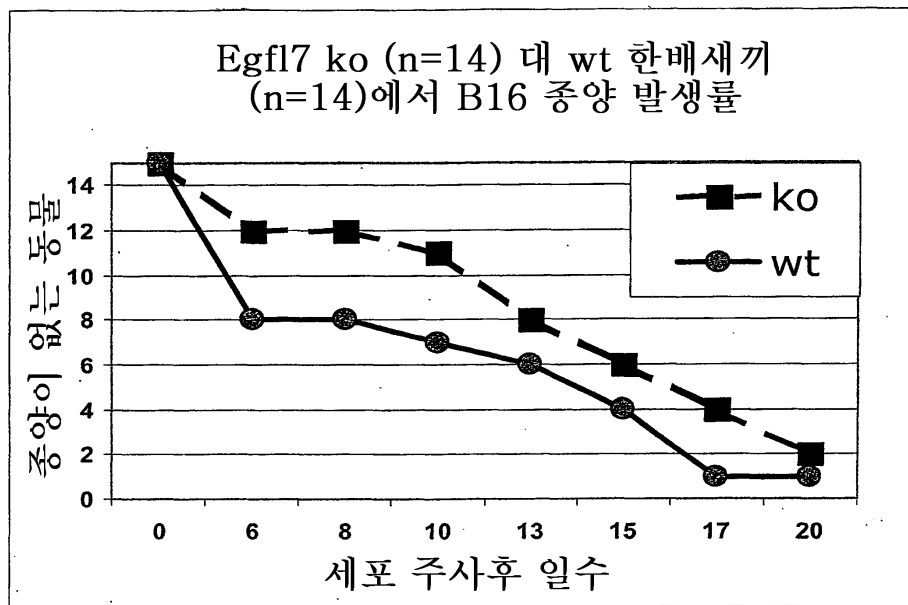
도면5



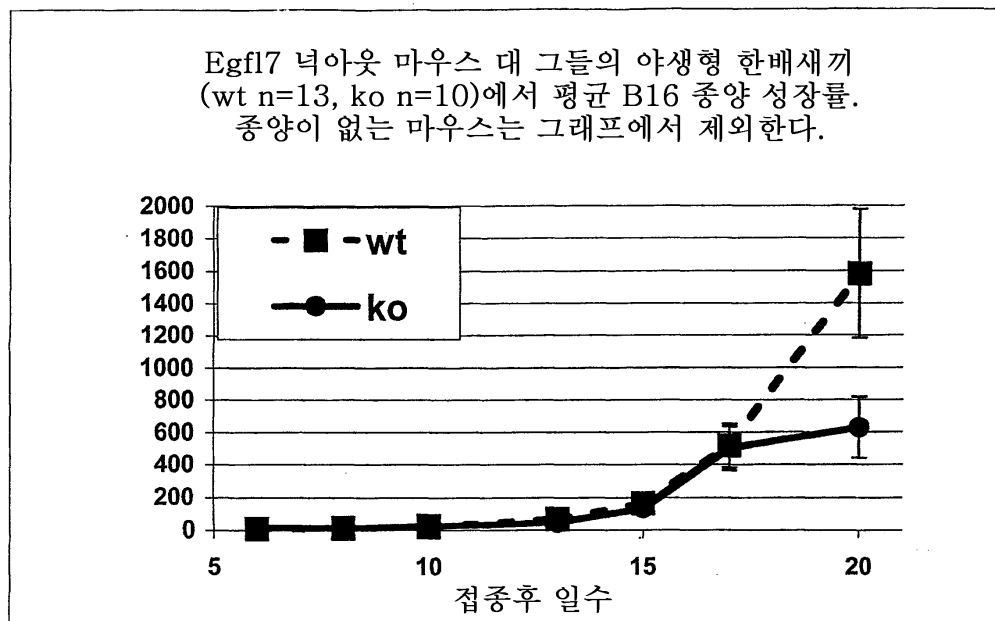
도면6



도면7A



도면7B



서열 목록

<110> Genentech, Inc.

<120> Compositions and Methods for Modulating Vascular Development

<130> P2103R1

<140> PCT/US/2005/013658

<141> 2005-04-15

<150> US 60/562,054

<151> 2004-04-14

<160> 11

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Gly Ser Gln Glu Val Leu Leu Met Trp Leu Leu Val Leu  
1 5 10 15

Ala Val Gly Gly Thr Glu His Ala Tyr Arg Pro Gly Arg Arg Val  
20 25 30

Cys Ala Val Arg Ala His Gly Asp Pro Val Ser Glu Ser Phe Val  
35 40 45

Gln Arg Val Tyr Gln Pro Phe Leu Thr Thr Cys Asp Gly His Arg  
50 55 60

Ala Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Ile Tyr Arg Thr Ala Tyr Arg Arg  
65 70 75

Ser Pro Gly Leu Ala Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Ala Cys Cys Pro  
80 85 90

Gly Trp Lys Arg Thr Ser Gly Leu Pro Gly Ala Cys Gly Ala Ala  
95 100 105

Ile Cys Gln Pro Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Val Gln Pro  
110 115 120

Gly Arg Cys Arg Cys Pro Ala Gly Trp Arg Gly Asp Thr Cys Gln  
125 130 135

Ser Asp Val Asp Glu Cys Ser Ala Arg Arg Gly Gly Cys Pro Gln  
140 145 150

Arg Cys Ile Asn Thr Ala Gly Ser Tyr Trp Cys Gln Cys Trp Glu  
155 160 165

Gly His Ser Leu Ser Ala Asp Gly Thr Leu Cys Val Pro Lys Gly  
170 175 180

Gly Pro Pro Arg Val Ala Pro Asn Pro Thr Gly Val Asp Ser Ala  
185 190 195

Met Lys Glu Glu Val Gln Arg Leu Gln Ser Arg Val Asp Leu Leu  
200 205 210

Glu Glu Lys Leu Gln Leu Val Leu Ala Pro Leu His Ser Leu Ala



215 220 225

Ser Gln Ala Leu Glu His Gly Leu Pro Asp Pro Gly Ser Leu Leu  
230 235 240

Val His Ser Phe Gln Gln Leu Gly Arg Ile Asp Ser Leu Ser Glu  
245 250 255

Gln Ile Ser Phe Leu Glu Glu Gln Leu Gly Ser Cys Ser Cys Lys  
260 265 270

Lys Asp Ser

<210> 2

<211> 277

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Gln Thr Met Trp Gly Ser Gly Glu Leu Leu Val Ala Trp Phe  
1 5 10 15

Leu Val Leu Ala Ala Asp Gly Thr Thr Glu His Val Tyr Arg Pro  
20 25 30

Ser Arg Arg Val Cys Thr Val Gly Ile Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
35 40 45

Glu Thr Phe Val Gln Arg Val Tyr Gln Pro Tyr Leu Thr Thr Cys  
50 55 60

Asp Gly His Arg Ala Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Ile Tyr Arg Thr  
65 70 75

Ala Tyr Arg Arg Ser Pro Gly Val Thr Pro Ala Arg Pro Arg Tyr  
80 85 90

Ala Cys Cys Pro Gly Trp Lys Arg Thr Ser Gly Leu Pro Gly Ala  
95 100 105

Cys Gly Ala Ala Ile Cys Gln Pro Pro Cys Gly Asn Gly Gly Ser

110	115	120
Cys Ile Arg Pro Gly His Cys Arg Cys Pro Val Gly Trp Gln Gly		
125	130	135
Asp Thr Cys Gln Thr Asp Val Asp Glu Cys Ser Thr Gly Glu Ala		
140	145	150
Ser Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Val Gly Ser Tyr Trp Cys		
155	160	165
Gln Gly Trp Glu Gly Gln Ser Pro Ser Ala Asp Gly Thr Arg Cys		
170	175	180
Leu Ser Lys Glu Gly Pro Ser Pro Val Ala Pro Asn Pro Thr Ala		
185	190	195
Gly Val Asp Ser Met Ala Arg Glu Glu Val Tyr Arg Leu Gln Ala		
200	205	210
Arg Val Asp Val Leu Glu Gln Lys Leu Gln Leu Val Leu Ala Pro		
215	220	225
Leu His Ser Leu Ala Ser Arg Ser Thr Glu His Gly Leu Gln Asp		
230	235	240
Pro Gly Ser Leu Leu Ala His Ser Phe Gln Gln Leu Asp Arg Ile		
245	250	255
Asp Ser Leu Ser Glu Gln Val Ser Phe Leu Glu Glu His Leu Gly		
260	265	270
Ser Cys Ser Cys Lys Lys Asp		
275		

<210> 3

<211> 280

<212> PRT

<213> Xenopus Laevis

<400> 3

Met Trp Lys Val Ser Cys Leu Val Thr Gly Tyr Leu Leu Ile Leu

1	5	10	15
Ala Val Thr Ser	Ala Ala Ala Asp His	Leu Tyr Arg Thr	Gly Arg
	20	25	30
Arg Ile Cys Ser	Ala Asp Gly His Pro	Gly Thr Val Ser	Val Thr
	35	40	45
Gln Ser Phe Val	Gln Pro Val His Ser	Pro Ile Met Thr	Leu Cys
	50	55	60
Glu Gly His Arg	Ile Cys Ser Thr Tyr	Arg Thr Thr Tyr	Lys Val
	65	70	75
Ser Tyr Arg Gln	Val Ser Arg Lys Thr	Ser Phe Pro Leu	Tyr Ser
	80	85	90
Cys Cys Pro Gly	Trp Arg Arg Ile Gly	Ala Gln Thr His	Ser Cys
	95	100	105
Gly Gln Ala Leu	Cys Arg Leu Gln Cys	Gln Asn Gly Gly	Thr Cys
	110	115	120
Val Ser Ser Asn	Lys Cys Glu Cys Pro	Ala Gly Trp Arg	Gly Ile
	125	130	135
His Cys Gln Met	Asp Val Asp Glu Cys	Ser Asp Gly Thr	His Gln
	140	145	150
Cys Ser Gln Ala	Cys Ile Asn Ser Ala	Gly Ser Phe Ser	Cys Glu
	155	160	165
Cys Leu Glu Gly	Tyr Arg Leu Met Ala	Asp Gly Lys Thr	Cys Arg
	170	175	180
Lys Val Pro Ala	Pro Thr Val Pro Pro	Ala Ser Pro Thr	Ser Val
	185	190	195
Gln Glu Ser Gly	Ile Pro His Ser Val	Lys Glu Glu Met	Ala Glu
	200	205	210

Leu Arg Ser Lys Ile Asp Val Leu Glu Gln Lys Leu His Leu Leu  
215 220 225

Leu Thr Pro Phe Gln Gly Leu Thr Thr Phe Ser Pro Asp Asp Ala  
230 235 240

Ala Asp Pro Ile Ala Leu Leu Thr Arg Ser Leu Gln Gln Leu Asp  
245 250 255

Arg Ile Asp Ser Leu Ser Glu Gln Ile Ser Phe Leu Glu Glu Arg  
260 265 270

Leu Glu Thr Cys Ser Cys Lys Thr Glu Leu  
275 280

<210> 4

<211> 277

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 4

Met Tyr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Ser Ser Leu Phe Leu Leu His  
1 5 10 15

Val Thr Cys Thr Pro Gln Thr His Ser His His Gly Arg Arg Val  
20 25 30

Cys Val Gly Asp Val Trp Ser Arg Arg Val Ser Tyr Ser Thr Glu  
35 40 45

Ser Phe Leu Gln Pro Val His Lys Pro Tyr Ile Thr Met Cys Gln  
50 55 60

Asn His Arg Met Cys Ser Thr Tyr Lys Thr Ile Tyr Lys Val Ser  
65 70 75

Tyr Arg Gln Val Thr Arg Ala Ala Pro Asn Leu Gln Ile Tyr Pro  
80 85 90

Glu Cys Cys Pro Gly Trp Arg Arg Met His Ser His Asn Cys Asn  
95 100 105



Gln Ala Val Cys Glu Gln Ser Cys Ala Asn Gly Gly Ser Cys Val  
110 115 120

Arg Pro Asn His Cys Ala Cys Leu Arg Gly Trp Thr Gly Arg Phe  
125 130 135

Cys Gln Ile Asp Val Asp Glu Cys Lys Glu Ala Gln His Cys Ser  
140 145 150

Gln Lys Cys Val Asn Thr Leu Gly Ser Phe Gln Cys Val Cys Glu  
155 160 165

Glu Gly Phe Ser Leu Asp Glu Asp Lys Val Thr Cys Ser Lys Asn  
170 175 180

Pro Ala Ser Ser Arg Asn Thr Gly Gly Gly Leu Gly Leu Val Glu  
185 190 195

Asn Val Thr Glu Glu Val Gln Ile Leu Lys Asn Arg Val Glu Leu  
200 205 210

Leu Glu Gln Lys Leu Glu Met Val Leu Ala Pro Phe Thr Thr Leu  
215 220 225

Leu Pro Leu Asp Gly Ala Gly Asp Thr Asn Ser Phe Leu Ser Glu  
230 235 240

Arg Thr Asn Phe Leu Ser His Ser Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ile  
245 250 255

Glu Ser Leu Ser Glu Gln Val Gly Phe Leu Glu Glu Arg Ile Gly  
260 265 270

Ala Cys Gly Cys Gln Glu Asn  
275

<210> 5

<211> 1364

<212> DNA

<213> Danio rerio

<400> 5

cgcgcgacag gtggaccgaa tggcctcggg ctgggcaagg catcacgtga 50

tattattgac agggtagctg attaacagct gtaccagagg caaacagaca 100

cacctgcagt ctctctttct gctgtcagac acacctgaga aacagacaga 150

ctgacagaga tgiacacagc acttctgctc tctctctctc tgtttctct 200

gcatgtgacc tgcacacctc agactcacag tcatcacggg aggagagtgt 250

gtgttggtga tgtctggagt cgtcgtgtgt cttacagcac agagtctttt 300

cttcagcctg tacacaaacc ctacatcacc atgtgccaaa accaccgcat 350

gtgcagcacg tacaagtaag aacagcacag gaaaacacat atcaaaaccg 400

taccatgcac catcaactca ctgtattgcg tgttttacag gaccatctac 450

aaggtttctt ataggcaggt gaccagagca gctcctaate tacaattta 500

cccagaatgc tgtccgggat ggagacgcat gcattcacac aactgcaacc 550

aagcggtagt tgaacagtct tgtgcaaacg gaggctcgtg tgtaaggccc 600

aatcactgtg cctgtctgag aggatggaca ggacgattct gccaaataga 650

tgtggacgag tgtaaggagg ctgagcactg ctctcagaag tgtgtgaata 700

cgctgggcag ttttcaatgt gtgtgtgagg agggattcag tttggacgaa 750

gataaagtca catgttcaaa aaatcctgct tcctcacgga aactgggtgg 800

aggtttgggg tigggtggaga acgttactga agaggttcag atcctaaaaa 850

accgagtgga gctcctggag cagaaactgg agatggttct agcaccttc 900

accacctcc tacctctgga tggagcaggg gacaccaaca gtttctgtc 950

tgagcgaacc aatttctgt cccactctct gcagcagctg gaccgcatcg 1000

agtcgctcag cgaacaggtc ggcttcctgg aggagagaat cggagcctgt 1050

ggctgtcagg aaaactagac gatcaacgcc atcactgac acaggctgac 1100

ccatcaaaca tgttctcaag aacacgaggg aaatcatgtt gaaactcttt 1150

atttggcaca cgagccggtg attgatatg ttcattgtgt gtcatttaac 1200

tgttgtgtaa gtttgagtca ggagaaatgt aaatttatgt attataatt 1250

ccatgttctc gtcattgagt atgctttttg gataagttgc attccttttt 1300

tacgtctcat tttgtgtaat aaaactgctt aaatcttaaa aaaaaaaaaa 1350

aaaaaaaaaa aaaa 1364

<210> 6  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> AS-47 antisense oligonucleotide

<400> 6  
 cagggtgtgtc tgacagcaga aagag 25

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> AS195 antisense oligonucleotide

<400> 7  
 tgtgtgtgtc ttacttgtac gtgct 25

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Forward PCR primer

<400> 8

tacacagcac ttctgctctc ct 22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Reverse PCR primer

<400> 9

agttgtgtga atgcatgcgt 20

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Control oligonucleotide

<400> 10

acgacgggtca cgatgaatgg agagt 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Control oligonucleotide

<400> 11

cattgttcat cgtcttggtg cgtgt 25