



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0087164
(43) 공개일자 2008년09월30일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 45/00</i> (2006.01) <i>A61P 17/00</i> (2006.01)
 <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C07K 16/22</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7020003
 (22) 출원일자 2008년08월14일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년08월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/001309
 국제출원일자 2007년01월18일
 (87) 국제공개번호 WO 2007/084599
 국제공개일자 2007년07월26일</p> <p>(30) 우선권주장
 60/760,328 2006년01월18일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 더 제너럴 하스피탈 코퍼레이션
 미국, 메사추세츠 02114, 보스턴 프룻트 스트리트 55</p> <p>(72) 발명자
 데트마, 미카엘
 스위스 체하-8113 보켈젠 레버쉬트라쎄 5
 가지야 겐타로
 스위스 체하-8044 쥐리히 글라트바흐 슈트라쎄 54</p> <p>(74) 대리인
 문기상, 문두현</p> |
|---|---|

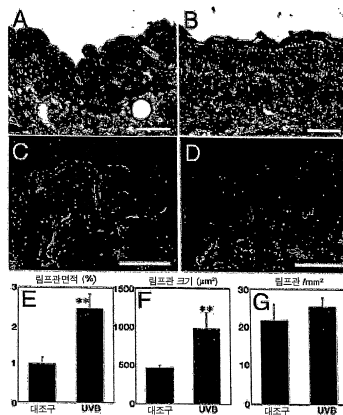
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 림프 기능을 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 개체의, 예를 들면, 피부의 VEGF-A의 수준 또는 활성을 감소시킴으로써, 피부 손상(예, UVB에 의해 유도되는 피부 손상)을 치료(예, 감소, 완화, 방지)하는 방법을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

피부의 VEGF-A 활성 또는 수준을 감소시키는 단계를 포함하는, UVB 유도 피부 손상의 감소 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

피부의 림프관형성 인자(lymphangiogenic factor)의 활성 또는 수준을 증가시키는 단계를 더 포함하는, UVB 유도 피부 손상의 감소 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 림프관형성 인자가 VEGF-C 또는 VEGF-D인, UVB 유도 피부 손상의 감소 방법.

청구항 4

VEGF-A의 활성 또는 수준을 감소시키는 단계를 포함하는, 부종(edema) 감소 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

피부의 림프관형성 인자의 활성 또는 수준을 증가시키는 단계를 더 포함하는, 부종 감소 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 림프관형성 인자가 VEGF-C 또는 VEGF-D인, 부종 감소 방법.

청구항 7

VEGF-A에 결합하여 반응할 수 있는 막형단 수용체를 세포에 제공하는 단계;

시험 화합물의 존재하에, 상기 세포와, VEGF-A 또는 그 단편을 포함하는 폴리펩티드를, 접촉시키는 단계; 및

상기 세포에 대한 상기 폴리펩티드의 결합을 평가하는 단계를 포함하고, 상기 세포에 대한 상기 폴리펩티드의 결합을 저해하는 시험 화합물이 VEGF-A 활성 저해제인, VEGF-A 활성 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 막형단 수용체가 VEGFR-2의 VEGF-A 결합 부분을 포함하는, VEGF-A 활성 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 시험 화합물이 천연물 또는 천연추출물인, VEGF-A 활성 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 10

VEGF-A와 결합할 수 있는 막형단 수용체 부분을 포함하는 제1 폴리펩티드를 제공하는 단계;

시험 화합물의 존재하에, 상기 폴리펩티드와, VEGF-A 또는 그 단편을 포함하는 제2 폴리펩티드를, 접촉시키는 단계; 및

상기 제2 폴리펩티드에 대한 상기 제1 폴리펩티드의 결합을 평가하는 단계를 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드에 대한 상기 제1 폴리펩티드의 결합을 저해하는 시험 화합물이 VEGF-A 활성 저해제인, VEGF-A 활성 저해제의 스크

리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,
상기 막횡단 수용체가 VEGFR-2의 VEGF-A 결합 부분을 포함하는, VEGF-A 활성 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,
상기 시험 화합물이 천연물 또는 천연추출물인, VEGF-A 활성 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 13

- (a) VEGF-A 프로모터 영역을 갖는 세포를 제공하는 단계;
- (b) 상기 세포를 UVB 방사선에 노출시키는 단계;
- (c) 상기 (b)의 전, 동안, 또는 후에, 상기 세포와 시험 화합물을 접촉시키는 단계; 및
- (d) 상기 프로모터 영역에 의해 유도(direct)되는 발현을 측정하는 단계를 포함하고, 발현을 감소시키는 시험 화합물이 VEGF-A 발현 저해제인, VEGF-A 발현 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 막횡단 수용체는 VEGFR-2의 VEGF-A 결합 부분을 포함하는, VEGF-A 발현 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,
상기 시험 화합물이 천연물 또는 천연추출물인, VEGF-A 발현 저해제의 스크리닝 방법.

청구항 16

만성 또는 급성 UVB-유도 피부 손상을 감소시키는 의약의 제조를 위한 VEGF-A의 발현, 활성, 또는 수준을 감소시키는 작용물질(agent)의 용도.

청구항 17

제16항에 있어서,
상기 의약이 림프관형성 인자의 발현, 활성, 또는 수준을 증가시키는 작용물질을 더 포함하는, VEGF-A의 발현, 활성, 또는 수준을 감소시키는 작용물질의 용도.

청구항 18

제17항에 있어서,
상기 림프관형성 인자가 VEGF-C, VEGF-D 또는 VEGFR-3인, VEGF-A의 발현, 활성, 또는 수준을 감소시키는 작용물질의 용도.

명세서

배경 기술

<1> 림프관 계통(lymphatic vascular system)은 세포의 공간(extracellular space)으로부터 단백질이 풍부한 림프를 배출(drain)하는 얇은 벽으로 된 모세관의 조밀한 그물망(network)으로 구성된다. 그 주요한 역할로는 조직액의 항상성 유지 및 구심성(afferent) 면역반응의 중재(mediation)를 들 수 있다(Oliver et al.(2002) Genes Dev. 16:773-83; Witte et al.(2001) Microsc. Res. Tech. 55:122-45). 림프관의 알려진 기능의 하나는 정상

및 염증 조직으로부터 조직액의 배출이다(Kunstfeld et al. (2004) Blood 104:1048-57).

<2> [발명의 개요]

<3> 본 발명자들은, 마우스 피부의 급성 및 만성 UVB-조사 결과, 림프관의 현저한 확장이 일어남을 보고한다. 놀랍게도, 이들 확장된 림프관은, 생체 림프관조영술로 검출 시, 기능적으로 손상되어 있고 고투과성이다. UVB-조사된 표피에서는, 혈관내피 성장 인자 VEGF(vascular endothelial growth factor)-A의 발현 수준은 증강되었으나, 알려진 림프관형성 인자(lymphangiogenesis factor) VEGF-C 또는 VEGF-D의 발현 수준은 증강되지 않았다. 형질전환 마우스 표피에서의 VEGF-A의 표적 발현은 급성 UVB 조사 후 증가된 림프관 확장 및 누출을 유도하는 한편, VEGF-A 신호전달의 전신적인 차단(systemic blockade)은 UVB에 의해 유도되는 림프관 이상 및 광손상을 방지하였다. 아울러, 이 발견들은, 림프관이 UVB-유도 피부 광손상에 대한 표적이며, VEGF-A가 림프관 기능 손상을 중재하고 그로 인해 피부에 대한 UVB 조사의 유해 효과의 원인이 됨을 나타낸다.

<4> 일 측면에서, 본 발명은 피부, 예를 들면, 얼굴, 가슴, 목, 손, 또는 기타 신체 부위에서의 VEGF-A의 활성 또는 수준을 감소시킴으로써, UVB-유도 피부 손상을 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 이들 방법은 피부에서의 림프관형성 인자, 예를 들면, VEGF-C 또는 VEGF-D의 활성 또는 수준을 증가시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

<5> 또 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF-A의 활성 또는 수준을 감소시킴으로써 부종(edema)을 감소시키는 방법을 특징으로 한다.

<6> 또 다른 측면에서, 본 발명은 림프 기능을 증진시킴으로써, 예를 들면, 얼굴, 가슴, 목, 손, 또는 기타 신체 부위에서의 UVB-유도 피부 손상을 감소시키는 방법을 특징으로 한다.

<7> 또 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF-A에 결합하여 반응할 수 있는 막횡단 수용체(transmembrane receptor)를 세포에 제공하고; 시험 화합물(예를 들면, 천연물 또는 천연추출물)의 존재 하에, VEGF-A 또는 그 단편을 포함하는 폴리펩티드를 상기 세포와 접촉시키고; 및 상기 세포에 대한 폴리펩티드의 결합을 평가함에 의해, VEGF-A 활성 저해제를 스크리닝하는 방법을 특징으로 하며, 이때, 상기 세포에 대한 폴리펩티드의 결합을 저해하는 시험 화합물은 VEGF-A 활성 저해제이다.

<8> 또 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF-A에 결합할 수 있는 막횡단 수용체 부분을 포함하는 제1 폴리펩티드를 제공하고; 시험 화합물(예를 들면, 천연물 또는 추출물)의 존재 하에, 상기 폴리펩티드를 VEGF-A 또는 그 단편을 포함하는 제2 폴리펩티드와 접촉시키고; 및 상기 제2 폴리펩티드에 대한 상기 제1 폴리펩티드의 결합을 평가함에 의해, VEGF-A 활성의 저해제를 스크리닝하는 방법을 특징으로 하며, 이때, 상기 제2 폴리펩티드에 대한 상기 제1 폴리펩티드의 결합을 저해하는 시험 화합물은 VEGF-A 활성 저해제이다.

<9> 또 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF-A 발현 저해제를 스크리닝하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은: (a) VEGF-A 프로모터 영역을 가진 세포를 제공하는 단계; (b) 상기 세포를 UVB 방사선에 노출시키는 단계; (c) 상기 (b)의 전, 동안, 또는 후에, 상기 세포를 시험 화합물(예를 들면, 천연물 또는 추출물)과 접촉시키는 단계; 및 (d) 상기 프로모터 영역에 의해 유도되는 발현을 측정하는 단계를 포함하며, 이때, 발현을 감소시키는 시험 화합물은 VEGF-A 발현 저해제이다.

<10> 일 측면에서, 본 발명은, 예를 들면, 얼굴, 가슴, 목, 손, 또는 기타 신체 부위에 UVB-유도 피부 손상을 가진 개체를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 본 방법은 상기 개체에, VEGF/VEGFR 조정자(modulator)를 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

<11> 일 측면에서, 상기 조정자는 VEGF-A/VEGFR(예, VEGFR-2) 길항제(antagonist)이다. VEGF-A/VEGFR 길항제는 세포 또는 개체내에서의 VEGF-A/VEGFR 활성을 직접 또는 간접적으로 감소시키는 약제이다. 길항제로는 핵산 및 단백질, 예를 들면, 항체 또는 가용성 VEGF-A 수용체 단편을 들 수 있다. 예를 들면, 상기 길항제는 VEGF-A와 상호작용하여, 예를 들면, 세포 표면 VEGFR(예, VEGFR-2)에 대한 VEGF-A 결합 친화성을 감소시키는 단백질일 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질은 (i) VEGF-A 또는 VEGFR을 인식하는 항체, 또는 (ii) VEGFR, 예를 들면, 가용성 VEGF-A의 수용체(예, Fc 도메인(domain)에 융합된)의 세포의 영역을 포함하는 단백질일 수 있다. 길항제의 예로는 VEGF-A mRNA에 결합하거나 또는 그렇지 않으면 VEGF-A mRNA를 저해(예를 들면, mRNA 생성, 프로세싱, 또는 번역을 저해)하는 핵산 분자를 들 수 있다. 또 다른 길항제로는 우성 음성 VEGF-A 단백질 또는 그 단편 및 VEGF-A 핵산 발현을 감소시키는 작용물질(agent)(예, 인공적인 전사 인자 또는 인공적인 전사 인자를 코딩하는 핵산)를 들 수 있다. 기타 적합한 VEGF-A/VEGFR(예, VEGFR-2) 길항제로는 소분자, 천연물, 또는 천연추출물을 들 수 있다.

- <12> 일부 실시형태에서, 상기 조정인자는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 내인성 수준을 감소시킨다.
- <13> 일 실시형태에서, 상기 조정인자는 VEGF-C/D/VEGFR(예, VEGFR-3) 작용제(agonist)이다. VEGF-C/D/VEGFR 작용제는 개체에서의 VEGF-C/D/VEGFR 활성을 직접 또는 간접적으로 증가시키는 작용물질이다.
- <14> 많은 VEGF-C/D/VEGFR(예, VEGFR-3) 작용제는 VEGFR 신호전달 활성을 증가시킨다. VEGF-C/D/VEGFR 작용제의 예로는 VEGF-C/D 폴리펩티드(예, 그 성숙한 이질이량체 형태로 변형되었을 때) 또는 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편 또는 유사체, VEGF-C/D를 코딩하는 핵산 또는 그들의 생물학적으로 활성이 단편 또는 유사체를 들 수 있다. 기타 단백질 또는 분자들, 예를 들면, 항체 및 소분자는 VEGFR 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, VEGFR(예, VEGFR-3)에 결합, 및 경우에 따라 가교 결합(예, 이량화)하는 항체는 VEGFR(예, VEGFR-3) 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 기타 적합한 VEGF-C/D/VEGFR(예, VEGFR-3) 작용제로는 소분자, 천연물, 및 천연 추출물을 들 수 있다.
- <15> 상기 조정인자는 증가된 림프관 기능이 요구되는 상태(condition)를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 상태로는 부종, 예를 들면, UVB 조사로 인한 부종을 들 수 있다. 기타 증가된 림프관 기능이 요구되는 상태로는 노화된 피부 또는 손상된 피부(예를 들면, UVB-손상 피부)를 들 수 있다. 또 다른 상태로는 유전 또는 환경인자, 예를 들면, 자외선 방사에 의해 부분적으로 유발되는 것들을 들 수 있다. 예를 들면, 상기 상태는, 예를 들면, 노화 또는 자외선 광에 대한 과도한 노출에 의해 유발되는 피부 세포의 기질 손상이다.
- <16> 또 다른 측면에서, 본 발명은 림프 기능을 조정하는 화합물을 식별(identifying)하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은: VEGF-A/VEGFR(예, VEGFR-2) 활성이 모니터링될 수 있는 세포 또는 유기체를 제공하는 단계; 상기 세포 또는 유기체를 시험 화합물(예, 천연물 또는 천연추출물)과 접촉시키는 단계; 및 상기 세포 또는 유기체 중의 VEGF-A/VEGFR(예, VEGFR-2) 활성을 평가하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 세포는 VEGF-A/VEGFR(예, VEGFR-2) 활성의 리포터(reporter) 또는 이러한 세포로 구성되는 유기체를 포함한다. VEGF-A/VEGFR 활성은, 예를 들면, 단백질 또는 mRNA 발현 또는 리포터 활성을 평가함에 의해 평가할 수 있다. 리포터 활성 또는 기타 관련 파라미터의 변화는, 예를 들면, VEGF-A/VEGFR 활성의 변화를 나타낸다. 상기 방법은 세포 증식 또는 세포 이동, 예를 들면, 림프 내피세포 증식 또는 이동에 대한 상기 시험 화합물의 효과를 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- <17> 일 실시형태에서, 상기 리포터는 검출가능한 단백질을 코딩하는 서열, 및 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자의 프로모터 영역(예를 들면, 전사 개시 부위로부터 적어도 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 또는 5000 염기 상류 위치까지의 영역, 개시자 MET 코돈으로부터 적어도 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 또는 5000 염기 상류 위치까지의 영역, 또는 TATA 박스(box)로부터 적어도 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 또는 5000 염기 상류 위치까지의 영역)을 포함하는 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 유전자이다.
- <18> 상기 세포 또는 유기체는 일반적으로 포유동물, 예를 들면, 인간 또는 인간이 아닌, 예를 들면, 마우스, 래트, 햄스터, 기니픽, 원숭이 등이다.
- <19> 또 다른 측면에서, 본 발명은 시험 화합물, 예를 들면, 시험 유기체(예를 들면, VEGF-A/VEGFR(예, VEGFR-2) 경로 활성의 리포터(reporter)를 포함하는 형질전환 유기체)에 국소적으로 적용할 수 있는 화합물(예, 천연물 또는 천연추출물)을 평가하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 시험 화합물을 상기 시험 유기체에 접촉시키는 단계, 및 VEGF-A/VEGFR 경로 활성을 평가하는 단계를 포함한다. 예를 들면, VEGF-A, VEGFR(예, VEGFR-2), 또는 VEGFR에 의해 조절되는 유전자 또는 유전자 산물의 단백질 또는 mRNA 발현을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 상기 방법은 또 다른 VEGF-A/VEGFR 경로 조정자의 존재(예를 들면, 가용성 VEGF를 포함하는 단백질, VEGFR의 가용성 세포외 도메인을 포함하는 단백질, 또는 VEGF-A 또는 VEGFR에 대한 항체의 존재)하에 시험 화합물을 평가하는 단계도 포함할 수 있다.
- <20> 일 실시형태에서, 상기 리포터는 검출가능한 단백질을 코딩하는 서열, 및 VEGF-A 또는 VEGFR 유전자의 프로모터 영역(예를 들면, 전사 개시점으로부터 적어도 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 또는 5000 염기 상류 위치까지의 영역, 개시자 MET 코돈으로부터 적어도 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 또는 5000 염기 상류 위치까지의 영역, 또는 TATA 박스(box)로부터 적어도 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 또는 5000 염기 상류 위치까지의 영역)을 포함하는 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 유전자이다. 또한, 상기 방법은 둘 이상의 상기한 리포터를 평가하는 단계도 포함할 수 있다.
- <21> 상기 방법은 시험 화합물이 VEGF/VEGFR 경로 활성을 변화(예, 증가 또는 감소)시키는 경우, 그 시험 화합물을 (예를 들면, 천연물 또는 천연추출물로 된 시험 화합물의 라이브러리로부터) 선별하는 단계를 포함할 수 있다.

선별된 시험 화합물은, 예를 들면, 국소 투여 또는 기타 투여 경로에 적합한 약제학적 조성물로서 제제화할 수 있다. 상기 방법은 약제학적 조성물을 개체, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 질환에 걸렸거나 걸릴 위험이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

<22> 일 측면에서, 본 발명은 피부 손상, 예를 들면, 만성 또는 급성 UVB-유도 피부 손상 등의 방사선 유도 피부 손상을 조정(예, 감소)하는 작용물질을 식별하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 VEGF-A 신호전달을 조정(예, 감소)하는 작용물질(예, VEGF-A 또는 VEGF 수용체(VEGFR(예, VEGFR-2)))의 발현, 활성 또는 수준을 감소시키는 작용물질을 식별하는 단계, 및 VEGF-A의 신호전달, 수준 또는 활성을 조정하는 작용물질의 능력과 피부 손상(예, 만성 또는 급성 UVB-유도 피부 손상 등의 피부 손상을 유도하는 방사선)을 조정하는 능력을 서로 관련시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 식별된 작용물질, 예를 들면, 피부 손상을 조정하는 작용물질을 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

<23> 일 실시형태에서, 상기 작용물질은 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)과 상호작용하는 시험 작용물질의 능력을 평가함에 의해 식별된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 작용물질은 VEGF-A 또는 VEGFR 조절 영역, 예를 들면, 프로모터(예, VEGF-A 또는 VEGFR 프로모터)와 상호작용하는 시험 작용물질의 효과를 평가함에 의해 식별된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 작용물질은 피부 세포(예, 각질형성세포)에서의 VEGF-A 생성에 대한 시험 작용물질의 효과를 평가함에 의해 식별된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 작용물질은 전체 동물 모델(예, VEGF-A 과다발현 동물 등의 VEGF-A 형질전환 동물)에서의 급성 VEGF-A 신호전달을 조정하는 시험 작용물질의 능력을 양적 또는 질적으로 평가함에 의해 식별된다.

<24> 상기 시험 작용물질은, 예를 들면, 핵산(예, 안티센스, 리보자임), 폴리펩티드(예, 항체 또는 그들의 항원-결합 단편), 펩티드 단편, 펩티드모방체(peptidomimetic), 또는 소분자(예, 분자량 2000 달톤 미만의 유기 소분자 (small organic molecule)일 수 있다. 상기 시험 작용물질은, 예를 들면, 적어도 10, 50, 70, 80, 90, 또는 99% 순도의 정제된 형태로, 예를 들면, 다른 시험 작용물질을 포함하지 않는 균질한 조성물 중에서 평가될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 시험 작용물질은 조합 라이브러리(예를 들면, 펩티드 또는 유기 조합 라이브러리), 또는 천연물 또는 천연추출물 라이브러리의 일원이다. 바람직한 실시형태에서, 복수의 시험 작용물질, 예를 들면 라이브러리 일원들이 시험된다. 바람직하게는, 복수(예, 라이브러리)의 시험 작용물질은 구조적 또는 기능적인 특징을 공유한다. 또한, 상기 시험 작용물질은 조정인자 또는 반정제 추출물, 예를 들면, 식물(plant) 추출물 등의 식물성(botanical) 추출물 또는 해조(algal) 추출물일 수 있다.

<25> 상기 방법은, 예를 들면, 작용물질 또는 그 용도에 관한 정보, 마케팅, 사용설명 자료, 예를 들면, 인쇄물 또는 컴퓨터 판독가능 매체(예, 라벨, 이메일)를 (예를 들면, 정부, 건강 관리자, 보험회사 또는 환자에게) 제공함으로써, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 발현, 수준 또는 활성에 대한 작용물질의 효과와 포유동물(예, 인간)에 대한 작용물질의 예상 효과를 비교하거나, 서로 관련시키거나, 연관시키는 단계, 및 상기 작용물질의 효과를 포유동물(예, 인간)에서의 상기 작용물질의 잠재 또는 예상되는 효과로서 식별하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은, 상기 작용물질이 참조예에 비해, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 발현, 수준 또는 활성을 감소시키는 경우, 상기 작용물질을 급성 UVB-유도 피부(예, 인간 피부) 손상을 감소시키는 작용물질로서 식별하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 식별은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 정보, 마케팅 또는 사용설명 자료 형태일 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 작용물질의 효과에 대한 값과 피부 손상을 감소시키는 능력을 서로 관련시키는 단계(예를 들면, 상기 작용물질의 효과에 대한 값(value)과 피부 손상 감소 능력을 서로 관련시키는 데이터세트를 생성하는 단계)를 포함한다.

<26> 일 실시형태에서, 상기 방법은 적어도 2가지 평가 단계를 포함하며, 예를 들면, 상기 방법은 제1 시스템(예를 들면, 무세포(cell-free), 세포기반(cell-based), 조직 시스템(tissue system) 또는 동물 모델)에서 시험 작용물질을 평가하는 제1 단계, 및 제2 시스템(예를 들면, 2차 세포 또는 조직 시스템 또는 인간이 아닌 동물)에서 시험 작용물질을 평가하는 제2 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 평가 단계 중의 하나는 개체의 피부 또는 피부 이식편(explant)에 대한 작용물질의 효과를 평가하는 단계(예를 들면, 피부의 피부 손상의 존재, 정도 또는 종류를, 바람직하게는 급성 UVB 노출 전 및 후에 평가하는 단계)를 포함한다. 상기 개체는 실험동물 또는 인간일 수 있다. 일 실시형태에서, 제1 평가는 리포터 유전자 등의 이질 서열(heterologous sequence)에 연결되어 있는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 프로모터에 대한 시험 작용물질의 효과를 시험하는 단계를 포함하고, 상기 제2 평가는 상기 시험 작용물질을 시스템(예, 세포기반 또는 동물 시스템)에 투여하는 단계 및 피부 손상 및/또는 VEGF 생성에 대한 작용물질의 효과를 평가하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 동일한 종류의 시스템에서 2개의 평가 단계를 포함하며, 예를 들면, 상기 작용물질은 동일 또는 상이한 인간 아닌 동물에서의 1차 평가 후에 인간이 아닌 동물에서 재평가된다. 상기 두 평가는 시간의 길이(예, 수일, 수

주, 수개월 또는 수년)에 따라 나뉠 수 있다.

- <27> 바람직한 실시형태에서, 상기 식별 단계는 (a) 그 게놈이, 이질 서열, 예를 들면, 리포터 폴리펩티드(예, 색갈(예, LacZ), 발광(예, 루시페라제), 또는 형광에 의해 검출가능한 리포터 폴리펩티드, 예를 들면, GFP, EGFP, BFP, RFP)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된, VEGF-A 또는 VEGFR(VEGFR-2) 유전자의 조절 영역(예를 들면, VEGF-A 프로모터에 대해서는 Gille et al., EMBO J. 1997 vol. 16(4): 750-9; 및 VEGFR-2(flkl1) 프로모터에 대해서는 Giraud et al., J Biol Chem. 1998 vol. 273(34):22128-35 참조)를 포함하는 외인성 핵산을 포함하는 세포, 조직 또는 인간이 아닌 동물에, 작용물질을 제공하는 단계; (b) 상기 세포, 조직 또는 인간이 아닌 동물에서의 리포터 폴리펩티드의 발현을 조정하는 시험 작용물질의 능력을 평가하는 단계; 및 (c) 상기 리포터 폴리펩티드의 발현을 조정하는 시험 작용물질을 급성 UVB-유도 피부 손상을 조정하는 작용물질로서 선별하는 단계를 포함한다.
- <28> 일 실시형태에서, 상기 동물은 실험 설치류이다. 상기 동물은 야생형 또는 형질전환 실험동물, 예를 들면, VEGF-A 형질전환 설치류(예, VEGF-A 형질전환 마우스)일 수 있다. 또한, 상기 개체는 인간일 수도 있다. 바람직한 실시형태에서, 상기 평가 단계는 상기 작용물질을 개체에 투여하는 단계와 피부 손상(예, UVB에 급성 노출되어 유발되는 피부 손상)을 평가하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 세포 또는 조직은 피부 세포, 예를 들면, 각질형성세포(keratinocyte); 또는 조직, 예를 들면, 피부 이식편이다. 또 다른 실시형태에서, 세포, 예를 들면, 피부세포(예, 각질형성세포) 또는 조직, 예를 들면, 피부 이식편은 형질전환 동물로부터 유래한다.
- <29> 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체, 예를 들면, 인간 개체를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 (a) 부종 또는 피부 손상, 예를 들면, 방사선 노출(예, 만성 또는 급성 UVB-노출)로 인한 피부 손상 위험이 있거나 피부 손상을 가진 개체를 식별하는 단계; 및 (b) 상기 개체에서의 VEGF-A 신호전달을 조정하는 작용물질(천연물 또는 천연추출물)을 상기 개체에 투여, 예를 들면, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 활성, 수준 또는 발현을 감소시키는 작용물질(예, 본 명세서에 기재된 작용물질)를 상기 개체에 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 작용물질은 개체의 피부에, 예를 들면, 국소적으로 투여된다. 바람직한 실시형태에서, 만성 또는 급성 UVB-유도 피부 발적, 염증, 부종, 수포(blistering), 종창(swelling) 및/또는 선번(sunburn)이 방지 또는 감소된다. 급성 UVB-노출은 적어도 1MED의 UVB 광에, 바람직하게는 적어도 2, 3, 또는 5 MED으로 노출됨을 의미한다. 일 실시형태에서, 상기 개체는 3-8 MED 사이, 예를 들면, 3-5, 5-7, 또는 7-8 MED 사이로 노출된다. 일부 실시형태에서, 상기 개체는, 예를 들면, 선번을 일으키기에 충분한 시간 동안, UV 지수가 보통에서 최고까지일 때의 태양에 노출될 예정이거나, 노출되고 있거나 또는 노출된 것이다. 상기 개체는 하나 이상의 급성 UVB 노출 증상, 예를 들면, 피부 염증, 발적, 종창, 수포, 압통(tenderness) 또는 부종을 나타낼 수 있다. 통상적으로, 상기 개체는 적어도 5세이다. 바람직하게는, 상기 개체는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 그 이상의 나이이다.
- <30> 바람직한 실시형태에서, 상기 작용물질은 리포솜 담체(liposome carrier), 예를 들면, 레시틴 리포솜 또는 알킬 포스포리피드 리포솜을 통해서 투여된다. 상기 작용물질은 얼굴, 가슴, 목, 손, 및 기타 신체 부위에 투여될 수 있다. 상기 치료는 1회 이상 작용물질 투여(예를 들면, 적어도 2회, 3회, 또는 4회 투여)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 치료는 작용물질을 매일 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- <31> 일 실시형태에서, 상기 방법은 상기 작용물질을 2차 치료제, 예를 들면, 피부에 대한 2차 치료제(예, 일광차단제, 항생제, 보습제, 레티노산, 레티노이드 유도제, 또는 알파-히드록시산)과 조합하여 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 작용물질은 제어된 방출 장치(예, 생체접합성 폴리머, 마이크로 입자, 또는 메쉬(mesh))와 함께 개체에 투여된다. 상기 장치는 작용물질의 분해를 감소시킬 수 있고 작용물질의 방출을 제어할 수 있다.
- <32> 일부 실시형태에서, 상기 방법은 개체의 피부 손상을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 평가는 작용물질을 투여하기 전, 동안, 및/또는 후에 수행할 수 있다. 예를 들면, 상기 평가는 투여하기 적어도 4시간, 8시간, 12시간, 1일, 2일, 4일, 7일, 14일 또는 그 이상 일 전 및/또는 후에 수행할 수 있다.
- <33> 바람직한 실시형태에서, 작용물질의 투여는 UVB 광에 노출되기 전(예, 태양 노출 전); 만성 또는 급성 UVB 유도 피부 손상이 인지되거나 진단될 때(예, 선번, 종창, 발적, 및/또는 염증); 피부 손상 관련 질환에 대한 치료가 시작되거나 또는 그 효과를 발휘하기 시작할 때; 또는, 일반적으로, 피부 건강을 유지할 필요가 있을 때에 수행할 수 있다.

- <34> 작용물질을 투여하는 기간, 또는 개체에서 임상적으로 유효한 수준으로 유지되는 기간은 단기간(예, 1일, 2일, 1주 동안) 또는 장기간(예, 6개월 이상 또는 1년 이상 동안), 또는 단기간(예, 1년 미만, 6개월, 1개월, 2주 이하 동안)일 수 있다.
- <35> 피부 손상의 변화를 필요로 하는 개체의 식별은, 예를 들면, 그 개체, 건강 관리자, 피부 손상 치료사, 또는 또 다른 관계자에 의해 수행될 수 있다. 상기 작용물질은, 예를 들면, 그 개체, 건강 관리자, 피부 손상 치료사, 또는 또 다른 관계자에 의해 투여될 수 있다. 마찬가지로, 피부 손상에 대한 효과의 평가는, 예를 들면, 그 개체, 건강 관리자, 피부 손상 치료사, 또는 또 다른 관계자에 의해 수행될 수 있다.
- <36> VEGF-A 신호전달을 감소시키는 작용물질은, 예를 들면, VEGF-A 결합 단백질 또는 VEGFR-2 결합 단백질 일 수 있다. 예를 들면, 상기한 결합 단백질은 VEGF-A에 결합하여 활성을 저해하거나 또는 VEGFR-2에 결합하여 활성을 저해할 수 있다. 상기 결합 단백질은 VEGF-A 또는 VEGFR-2 서로 또는 또 다른 결합 상대와의 상호작용 능력을 저해할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 결합 단백질은 VEGF-A 또는 VEGFR-2에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들면, 결합 상대 또는 서로에 결합할 수 있는 VEGF 또는 VEGFR-2의 능력을 저해하는 항체일 수 있다. 또 다른 대표적인 작용물질은 VEGF-A 또는 VEGFR-2에 결합하지만 VEGF 신호전달을 교란시키는 변이된 불활성 VEGF-A이다. 또 다른 대표적인 작용물질은 VEGF-A 또는 VEGFR-2에 결합하지만 VEGF-A 신호전달을 교란시키는 VEGFR-2(예, 비신호전달 변이체) 또는 그 단편(예, VEGFR-2의 세포외 도메인)이다. 부가적인 대표 작용물질로는 세포성 VEGF-A 또는 VEGFR-2 핵산 서열(예, mRNA)에 결합할 수 있고 그 단백질의 발현을 저해할 수 있는 VEGF-A 또는 VEGFR-2 핵산 분자(예를 들면, 안티센스, siRNA 분자 또는 리보자임); 및 VEGF-A 또는 VEGFR-2 유전자 발현을 감소시키는 작용물질(예를 들면, VEGF-A 또는 VEGFR-2의 프로모터에 결합하는 소분자); 또는 조정인자 또는 반정제 추출물(예를 들면, 식물 추출물 등의 식물성 추출물 또는 해조 추출물)을 들 수 있다.
- <37> 예를 들면, 개체는 VEGF 길항제, 예를 들면, 베바시주마브(bevacizumab) 등의 항-VEGF 항체; 또는 VEGF 수용체 길항제, 예를 들면, 항-VEGF 수용체 항체 또는 소분자 저해제(예를 들면, 분자량이 1500달톤 미만인 화합물)로 치료할 수 있다.
- <38> 대표적인 저해제 및 VEGF 수용체 길항제로는 VEGF 수용체 티로신 키나제 활성의 저해제를 들 수 있다. 4-[4-(1-아미노-1-메틸에틸)페닐]-2-[4-(2-모르폴린-4-일-에틸)페닐아미노]피리미딘-5-카르보니트릴(JNJ-17029259)는 혈관 내피 성장인자 수용체-2(VEGFR-2)의 경구적으로 적용할 수 있는 선택적인 나노몰 농도의 저해제인 5-시아노피리미딘 구조 클래스 중 하나이다. 부가적인 예로는 PTK-787/ZK222584(Astra-Zeneca), SU5416, SU11248(Pfizer), 및 ZD6474([N-(4-브로모-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[(1-메틸피페리딘-4-일)메톡시]퀴나졸린-4-아민])를 들 수 있다. 사용할 수 있는 또 다른 작용물질은 넓은 특이성의 티로신 키나제 저해제, 예를 들면, SU6668이다. 예를 들면, Bergers, B. et al. (2003) J. Clin. Invest. 111. 1287-1295를 참조한다.
- <39> 또 다른 바람직한 실시형태에서, VEGF-A 또는 VEGFR-2는 내인성 VEGF-A 또는 VEGFR-2 유전자의 발현 수준을 감소(예를 들면, VEGF-A 또는 VEGFR-2 유전자의 전사를 감소)시킴에 의해 저해된다. 바람직한 실시형태에서, VEGF-A 또는 VEGFR-2 유전자의 전사는, 예를 들면, 전사 억제인자에 대한 DNA 결합 부위 등의 음성 조절 서열을 부가함에 의해, 또는 인핸서(enhancer) 또는 전사 활성화인자에 대한 DNA 결합 부위 등의 양성 조절 서열을 제거함에 의해, 내인성 VEGF-A 또는 VEGFR-2 유전자의 조절 서열을 변경함으로써 감소시킬 수 있다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, VEGF-A 또는 VEGFR-2에 결합하는 항체는 단일클론 항체, 예를 들면, 인간화된 키메라 항체 또는 인간 단일클론 항체이다.
- <40> 일 실시형태에서, VEGF 발현을 감소시키는 작용물질은 세포성 VEGF-A 또는 VEGFR-2 핵산 서열(예, mRNA)에 결합할 수 있고, 그 단백질 발현을 저해할 수 있는 VEGF-A 또는 VEGFR-2 핵산(예, 안티센스, siRNA 분자 또는 리보자임); VEGF-A 또는 VEGFR-2 유전자 발현을 감소시키는 작용물질(예, VEGF-A 또는 VEGFR-2의 프로모터에 결합하는 소분자); 또는 조정인자 또는 반정제 추출물(예, 식물 추출물 등의 식물성 추출물 또는 해조 추출물, 예를 들면, 석류씨 오일 또는 포도씨 오일)이다.
- <41> 상기 방법은 하나 이상의 림프관형성 인자의 활성을 증가시키는 단계(예, 개체에서 자연적으로 발생하는 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 등의 림프관형성 단백질의 활성을 증가시키는 단계)를 더 포함할 수 있다. VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 활성은, 예를 들면, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 활성을 증가시키는 작용물질을 투여함에 의해 증가시킬 수 있다. 바람직한 실시형태에서, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 활성을 증가시키는 작용물질은 다음 중 하나 이상일 수 있다: VEGF-C 또는 -D 폴리펩티드, 또는 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편 또는 유사체, 예를 들면, VEGF-C 또는 -D 유래 폴리펩티드 또는 그들의 레트로-인verso 폴리펩티드(retro-inverso polypeptide); VEGF-C 또는 -D 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 또는 그

들의 생물학적으로 활성이 있는 단편 또는 유사체; VEGF-C 또는 -D의 작동제, 예를 들면, VEGF-C 또는 -D 활성을 갖거나 증가시키는 항체 또는 소분자; 또는 VEGF-C 또는 -D 핵산 발현을 증가시키는 작용물질, 예를 들면, VEGF-C 또는 -D의 프로모터 영역에 결합하여 발현을 증가시키는 소분자.

- <42> 바람직한 실시형태에서, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3)는 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 발현을 유도하는 작용물질(예, 소분자)에 의해 증가된다. 바람직한 실시형태에서, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 발현을 유도하는 작용물질은 국소적으로 투여된다. 바람직한 실시형태에서, 상기 작용물질은 UVB 노출 시에 개체의 피부에 림프관형성 효과가 나타나도록, UVB 노출(예, 태양광 노출) 전에 개체에 충분히 투여된다.
- <43> 또한, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 활성은 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 핵산, 또는 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 단백질, 단편, 또는 유사체를 개체에 제어 전달함으로써 증가시킬 수 있다. VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 핵산, 단백질, 단편, 또는 유사체는 개체에 제어 방출 장치(예, 생체적합성 폴리머, 마이크로 입자, 또는 메쉬)와 함께 투여될 수 있다. 상기 장치는 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 핵산, 단백질, 단편 또는 유사체의 분해를 감소시키고 방출을 제어할 수 있다. 이러한 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 생체적합성 제어 방출 시스템은, 예를 들면, 근육내, 피하, 정맥내 또는 기관, 관절강, 또는 병변에 주사 또는 이식함에 의해 투여할 수 있다.
- <44> 또한, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3)의 수준은 내인성 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 활성을 증가시킴에 의해 증가시킬 수 있다. 활성은, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 유전자의 전사를 증가시키는 등에 의해, 그 유전자 발현 수준을 증가시키고; VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) mRNA의 2차 또는 3차 구조를 변경하는 등에 의해, 그 mRNA의 안정성을 증가; VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) mRNA의 서열을 변경함에 의해, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) mRNA의 번역을 증가시키고; 및/또는 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 단백질의 안정성을 증가시킴으로써, 증가시킬 수 있다. VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 유전자의 전사는, 예를 들면, 내인성 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 유전자의 조절 서열을 변경함에 의해 증가시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 조절 서열은 양성 조절 요소(element)의 부가(인핸서 또는 전사 활성화인자에 대한 DNA 결합 부위 등); 음성 조절 요소의 결실(전사 억제인자에 대한 DNA 결합 부위); 및/또는 내인성 조절 서열 또는 그 내부의 요소를 또 다른 유전자의 것으로 치환함으로써, VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3) 유전자가 더 효율적으로 전사되게 한다.
- <45> 일 실시형태에서, 상기 작용물질은 VEGF-C 또는 -D 또는 VEGFR(예, VEGFR-3)을 유도하는 조성물, 예를 들면, 소분자 또는 조정인자 또는 반정제 추출물(예, 식물 추출물 등의 식물성 추출물)이다.
- <46> 또 다른 측면에서, 본 발명은 만성 또는 급성 UVB 유도 피부 손상을 감소시키는 위해, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 발현, 활성, 또는 수준을 감소시키는 작용물질, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 작용물질(예, 본 명세서에 기재된 스크리닝 방법에 의해 식별된 작용물질)를 함유하는 조성물을 특징으로 한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 조성물은 화장품 조성물(cosmetic composition), 예를 들면, 국소 투여용으로 제제화된 조성물이다. 바람직한 실시형태에서, 상기 조성물은 향(fragrance), 방부제, 또는 기타 화장품 원료(예, 보습제, 또는 일광차단제(예, 옥틸 메톡시신나메이트, 아미노벤조산, 옥시벤존, 페디메이트 0, 호모살레이트, 또는 이산화티탄))도 함유한다. 상기 조성물은 샴푸, 오일, 크림, 로션, 비누, 폼, 젤, 또는 기타 화장 제제에 제공될 수 있다. 또한, 바람직한 실시형태에서, 상기 조성물은 화장품 원료(예, 향 또는 보습제)도 함유한다.
- <47> 또 다른 측면에서, 본 발명은 만성 또는 급성 UVB 유도 피부 손상을 감소시키는 의약(medicament)의 제조를 위해, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 발현, 활성, 또는 수준을 감소시키는 작용물질, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 작용물질(예, 본 명세서에 기재된 스크리닝 방법에 의해 식별된 작용물질)의 용도를 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 상기 의약은 VEGF-C, VEGF-D 또는 VEGFR-3의 발현, 활성 또는 수준을 증가시키는 작용물질을 더 포함한다.
- <48> 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체의 피부 손상을 조정하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 성분의 발현, 활성, 또는 수준에 영향을 미치는 작용물질, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 작용물질(예, 본 명세서에 기재된 스크리닝 방법에 의해 식별된 작용물질)를 함유하는 조성물을 개체에 공급하는 단계와, 예를 들면, 급성 UVB-유도 피부 손상 등의 피부 손상을 처리하기 위해, 상기 작용물질의 적용을 위한 사용설명서를 개체에 공급하는 단계를 포함한다.
- <49> 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 조성물, 예를 들면, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 성분의

발현, 활성, 또는 수준에 영향을 미치는 작용물질을 함유하는 조성물; 및 사용 설명서, 예를 들면, 급성 UVB-유도 피부 손상(예, 발적, 종창, 선반, 및/또는 염증)에 대한 치료가 필요한 신체 부위에 상기 조성물을 적용하기 위한 사용 설명서를 포함하는, 개체의 피부 손상 조정용 키트를 특징으로 한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 조성물은 화장품 원료, 예를 들면, 향 또는 보습제를 함유한다.

- <50> 본 발명의 작용물질의 유효량은 개체(예, 인간)에 투여했을 때, 개체의 피부 손상을 감소시키는 조성물의 양으로서 정의된다. 개체에 투여되는 유효량은 통상적으로 나이, 성별, 표면적, 몸무게, 및 피부 상태를 포함한 다양한 인자에 따라 다르다. 체 표면적은 대체로 환자의 키와 체중으로부터 결정할 수 있다(참조, 예를 들면, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537). 유효 투여량은, 당업자에게 인지되어 있는 바와 같이, 투여 경로, 부형제 사용, 및 기타 피부 손상 조정 화합물의 사용 등과 같은 다른 치료제와의 병용 가능성에 따라 달라질 것이다.
- <51> 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 개체의 피부 영역(예, 아래팔, 다리, 등, 몸통, 머리, 얼굴, 두피)에 VEGF 신호전달 저해제를 보호량(protective amount)으로 적용하는 단계; 및 상기 개체를 방사선 조사, 예를 들면, 태양광(예를 들면, 직접 또는 고강도 태양광), 또는 자외광(예를 들면, 태닝 영업장에서와 같이)에 노출시키는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다. 보호량은 검출가능한 또는 통계학적으로 유효한 수준으로 피부 손상을 감소시키기에 충분한 양이다.
- <52> 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체 또는 개체로부터의 세포(예, 피부 세포)를 모니터링하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 VEGF-A, -C, 및 -D 중 하나 이상의 발현을 평가한 단계를 포함한다. VEGF-A 수준의 증가 및 VEGF-C 또는 -D 수준의 감소는, 참조예(예, 대조구 또는 방사선 미조사 세포)에 대하여, 개체 또는 개체로부터의 세포가 피부 손상 조건(예, 방사선 조사, 예를 들면, UVB 조사)에 노출될 위험이 있거나 또는 이미 노출되었음을 나타낼 수 있다.
- <53> 본 명세서에 사용되는 바와 같이, UVB-방사선에 대한 노출은 적어도 1 MED의 자연 태양광 또는 인공 UVB 방사선(예, 태닝용 또는 광치료(예, 건선, 아토피피부염, 또는 백반증 치료)용 UVB 태양 램프)에 대한 노출을 의미한다.
- <54> 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 상세한 내용은 하기 도면 및 상세한 설명에 기재한다. 기타 본 발명의 특징, 목적, 및 이점은 발명의 상세한 설명 및 도면, 및 청구항으로부터 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

- <65> 피부의 자외선 B(UVB) 조사는 홍반, 세포의 기질 분자의 분해, 및 피부 주름을 유도한다. 림프관은 정상 피부에서의 액 균형 유지에 중요한 역할을 한다. 본 발명자들은 마우스 피부의 급성 및 만성 UVB 조사 결과, 림프관이 현저하게 확장됨을 알아내었다. 놀랍게도, 이들 확장된 림프관은, 생체 림프관조영술에 의해 검출된 바와 같이, 기능적으로 손상되었고 고투과성이었다. 혈관 내피 성장인자(VEGF)-A(VEGF-C 또는 -D가 아니라)의 발현 수준은 UVB 조사된 표피에서 증가되었다. 형질전환 마우스의 표피에서의 VEGF-A의 표적 과다발현은 증가된 확장을 유도하였으며, 놀랍게도, 급성 UVB 조사 후에 림프관 누출도 유도한 반면, VEGF-A 신호전달의 전신적인 차단(systemic blockade)은 림프관 이상(abnormality)을 대부분 방지하였으며 또한 UVB에 의해 유도되는 광손상을 방지하였다. 동시에, 이들 발견은 UVB 유도 피부 광손상을 방지하기 위한 신규한 표적으로서의 림프관을 나타내며, 그들은 또한, 예를 들면, VEGF-C 등의 림프관형성 인자에 의한 림프 기능의 증진이 피부상에서의 UVB 조사에 의한 손상 효과(VEGF-A에 의해 부분적으로 중재된)를 경감시킬 수 있음을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 개체(예, 개체의 피부)에서의 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 수준 또는 활성을 감소시킴으로써 피부 손상(예, UVB에 의해 유도된 피부 손상)을 치료(예, 감소, 경감, 또는 방지)하는 방법을 특징으로 한다.
- <66> VEGF 및 VEGFR 수용체는, 예를 들면, Shibuya 및 Claesson-Welsh(2006) Exp. Cell Res. 312:549-60; Byrne et al.(2005) J. Cell. Mol. Med. 9:777-94; 및 Coultas et al.(2005) Nature 438:937-45에 검토되어 있다.
- <67> UVB 손상
- <68> UV 지수(미국 환경보호청에 의해 개발됨)는 소정의 날에 태양의 UV선 강도를 나타낸다. 이들은 4개의 카테고리로 나뉜다 - 보통(UV 지수가 3 미만임), 높음(UV 지수가 3~6임), 매우 높음(UV 지수가 6~10임), 및 극도(UV 지수가 10보다 큼). 보통 UV 지수는 피부를 태우는데 한 시간 넘게 걸림을 의미하며; 극도의 수준은 15분 미만으로 걸림을 의미한다. 상기 지수는 종종 기상 보고서에도 포함된다. 임상적으로, UVB 노출은 최소 홍반량(minimal erythema dose: MED)으로 측정된다. 1 MED는 민감성 피부에서 선반(sunburn)을 생성하는데 요구되는

UVB의 양이다. 보통에서 심한 급성 UVB 유도 피부 손상, 예를 들면, 선반은 3-8 MED에서 발생할 수 있다.

<69> 스크리닝 방법

<70> 작용물질이 VEGF-A 신호전달, 예를 들면, VEGF-A 또는 VEGFR의 유전자 발현, 활성 또는 수준을 조정할 수 있는지를 평가하는 방법이 다수 존재한다. 일 실시형태에서, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터로부터의 발현을, 예를 들면, 영구적으로 또는 일시적으로 조정(예, 증가 또는 감소)하는 시험 작용물질의 능력은, 예를 들면, 통상적인 리포터(예, LacZ 또는 GFP 또는 루시페라제) 전사 측정법에 의해 평가된다. 예를 들면, 그 게놈이 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 세포 또는 형질전환 동물을, 시험 작용물질과 접촉시킬 수 있으며, 리포터 활성을 증가 또는 감소시키는 시험 작용물질의 능력은 급성 UVB 피부 손상을 조정하는 시험 작용물질의 능력을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 발현 또는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 활성 또는 수준을 조정하는 시험 작용물질의 능력은 형질전환 동물, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 형질전환 동물에서 평가된다.

<71> 또한, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 발현 또는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 활성 또는 수준에 대한 시험 작용물질의 효과는 세포, 세포 용해물(lysate), 또는 개체, 바람직하게는 인간이 아닌 실험 포유동물, 및 더 바람직하게는 설치류(예, 래트, 마우스, 또는 토끼), 또는 그들의 이식편(예, 피부)에서 평가할 수 있다. VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 발현을 평가하는 방법은, 예를 들면, 노던 분석법(Northern analysis), 리보뉴클레아제 보호 측정법(ribonuclease protection assay), 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 또는 RNA 제자리 혼성화법(RNA in situ hybridization) 등이 당업계에 잘 알려져 있다(참조, 예를 들면, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd ed. 2001)). VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2)의 수준은, 예를 들면, 웨스턴 분석(Western analysis), 면역측정법(immunoassay), 또는 제자리 혼성화법에 의해 모니터링할 수 있다. VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 활성(예, 변경된 프로모터 결합 및/또는 전사 활성)은, 예를 들면, 전기영동 이동도 시프트 측정법(electrophoretic mobility shift assay), DNA 발자국법(footprinting) 또는 리포터 유전자 측정법에 의해 결정할 수 있다. 바람직하게는, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 발현 또는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 활성 또는 수준에 대한 시험 작용물질의 효과는 개체의 피부 손상의 변화로서 관찰된다. 더 바람직하게는, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 발현 또는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 활성 또는 수준에 대한 시험 작용물질의 효과는, 야생형 세포 또는 인간이 아닌 동물, 또는 그들로부터 유래하는 이식편 또는 세포에 비해, 변경된 VEGF 신호전달을 가진 형질전환 세포 또는 인간이 아닌 동물, 또는 그들로부터 유래한 이식편 또는 세포에 대해 평가된다.

<72> 상기 시험 작용물질은 LacZ에 융합된 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터를 포함하는 형질전환 유전자(transgene)를 발현하는 세포, 세포 추출물, 이식편 또는 개체에 투여될 수 있다. 리포터(예, LacZ 또는 GFP) 등의 형질전환 유전자 전사의 증강 또는 저해는, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터 또는 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터로부터 전사를 조절하는 인자에 대한 상기 시험 작용물질의 효과의 결과로서, 색깔 변화로 쉽게 관찰할 수 있다. 리포터 전사체 수준, 및 요컨대 VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터 활성은 노던 분석법, 리보뉴클레아제 보호 측정법, 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 또는 RNA 제자리 혼성화법 등의 확립된 방법에 의해 모니터링될 수 있다(참조, 예를 들면, Cuncliffe et al.(2002) *Mamm. Genome* 13:245). 작용물질은 무세포 시스템, 예를 들면, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터-리포터 형질전환 유전자(예, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터-LacZ 형질전환 유전자), VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터에 결합하는 전사 인자, 조(粗)세포 용해물 또는 핵 추출물, 및 시험 작용물질을 포함하는 환경을 이용하여 평가할 수 있으며, 이때, VEGF-A 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 유전자 프로모터 활성에 대한 작용물질의 효과는 색깔 변화로서 검출된다.

<73> 일부 실시형태에서, VEGF-A 및 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편은 정제된 폴리펩티드로서 제공된다. 정제된 폴리펩티드로는 시험관내(in vitro)에서 생성한 폴리펩티드(예, 시험관내 번역에 의해 또는 자동 폴리펩티드 합성기를 사용하여 생성한 폴리펩티드), 및 세포(예, 원핵 세포, 진핵 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 식물 세포)에서 초기에 발현시킨 후 정제된 폴리펩티드를 들 수 있다. 정제된 폴리펩티드를 발현하는 세포로는 내인성 유전자를 코딩하는 세포, 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 도입한 세포, 및 해당 세포 종류에서 일반적으로 발현되지 않는 내인성 유전자의 발현을 유도하기 위해서 실험적으로 조작된 세포(예, 유전자 활성화 기술)를 들 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 융합 단백질을 개개의 폴리펩티드로 절단 또는 분리할 수 있도록 단백질분해효소 절단 부위를 포함할 수 있는 융합 단백질(예, VEGFR-글루타치온-S-트랜스퍼라제 융합)이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 그 폴리펩티드의 정제를 촉진하는 아미노산 서열(예,

다중 히스티딘 태그, FLAG 태그 등)을 포함할 수 있다. 세포 또는 세포에 의해 발현되는 폴리펩티드로부터 단백질을 분리하는 방법으로는 친화성 정제법, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 및 기타 크로마토그래피 정제법을 들 수 있다. 상기 폴리펩티드는 전사후 변형(예, 글리코시화)된다.

<74> 또 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF-A 폴리펩티드와 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드 간의 단백질-단백질 상호작용을 조정하는 화합물을 식별하기 위해 시험 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다. 전사 조절인자 간의 단백질-단백질 상호작용을 조정할 수 있는 화합물의 고처리 스크리닝에 유용한 방법은 본 명세서에 전적으로 참고로 기입한 Lepourcelet *et al.*, *Cancer Cell* 5:91-102(2004)에 기재되어 있다. 일반적으로, 제1 화합물이 제공된다. 상기 제1 화합물은 VEGF-A 폴리펩티드 또는 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편이거나, 또는 VEGFR(예 VEGFR-2) 폴리펩티드 또는 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편이다. 제2 화합물은 제1 화합물과는 다른 것이 제공되며, 표지되어 있다. 상기 제2 화합물은 VEGF-A 폴리펩티드 또는 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편이거나, 또는 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드 또는 그들의 생물학적으로 활성이 있는 단편이다. 상기 제1 화합물, 상기 제2 화합물, 및 시험 화합물을 서로 접촉시킨다. 그 다음, 상기 제1 화합물에 결합된 표지의 양을 결정한다. 결합된 표지에 의해 측정 시, 상기 제1 화합물과 상기 제2 화합물 간의 단백질-단백질 상호작용의 변화는 VEGF-A와 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드간의 단백질-단백질 상호작용을 조정함에 있어서의 화합물의 유용성(usefulness)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 상기 변화는 시험 화합물이 부가되지 않은 동일한 반응에 대하여 평가된다.

<75> 특정 실시형태에서, 제공된 제1 화합물은 고체 지지체에 부착된다. 고체 지지체로는, 예를 들면, 수지(예, 아가로스), 비즈, 및 멀티웰 플레이트(multiwell plate)를 들 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 접촉 단계 후에, 결합된 표지와 결합되지 않은 표지를 분리하기 위한 세정 단계를 포함한다.

<76> 특정 실시형태에서는, 복수의 시험 화합물이 제1 화합물 및 제2 화합물과 접촉된다. 상기 상이한 시험 화합물은 그룹으로 또는 개별적으로 다른 화합물과 접촉시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 시험 화합물들 각각은 개별 웰(well)에서 제1 화합물 및 제2 화합물 둘다와 접촉된다. 예를 들면, 상기 방법은 시험 화합물의 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 시험 화합물의 라이브러리는 하기에 구체적으로 논의된다. 라이브러리는, 예를 들면, 천연물, 유기 화합물, 펩티드, 및/또는, 예를 들면, D-아미노산, 비통상(unconventional) 아미노산, 및 N-치환 아미노산을 포함한 변형된 펩티드를 포함한다. 일반적으로, 상기 라이브러리는 멀티웰 플레이트(예, 96-웰 플레이트)에서 스크리닝하기에 적합한 형태이다. 상기 측정법은 다수의 단계가 컴퓨터에 의해 조절되고 로봇 장치에 의해 수행되는 멀티웰 포맷에서의 자동 실행에 특히 유용하다. 또한, 상기 라이브러리는 다른 포맷, 예를 들면, 고체 지지체에 고정되어있고 미세방울(microdroplet) 속으로의 방출용으로 이용가능한 합성 화합물 라이브러리에서도 사용될 수 있다.

<77> 특정 실시형태에서, 상기 제1 화합물은 VEGF-A 폴리펩티드, 또는 그 단편이고, 상기 제2 화합물은 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드, 또는 그 단편이다. 상기 제1 화합물이 부착된 고체 지지체는, 예를 들면, 세파로스 비즈, SPA 비즈(섬광(scintillant)을 주입한 마이크로스피어(microsphere)) 또는 멀티웰 플레이트일 수 있다. SPA 비즈는 상기 측정법이 세정 단계 없이, 예를 들면, 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay)으로 수행되는 경우 사용될 수 있다. 세파로스 비즈는 상기 측정법이 세정 단계를 수행하는 경우에 사용될 수 있다. 상기 제2 화합물은 그 검출이 가능하도록 하는 임의의 표지(예, 방사선표지, 형광제, 비오틴, 펩티드 태그, 또는 효소 단편)로 표지시킬 수 있다. 상기 제2 화합물은, 예를 들면, ¹²⁵I 또는 ³H로 방사선 표지시킬 수 있다.

<78> 특정 실시형태에서, 제1 화합물 또는 제2 화합물에 화학적으로 접합된, 또는 제1 화합물 또는 제2 화합물과의 융합 단백질로서 발현되는 효소의 효소 활성은 결합된 단백질 검출용으로 사용된다. 결합된 단백질을 검출하기 위해 표준 면역학적 방법이 사용되는 결합 측정법(binding assay)도 들 수 있다. 특정 실시형태에서, VEGF-A 폴리펩티드 또는 그 단편과, VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드 또는 그 단편의 상호작용은 VEGF-A(예, VEGF-A에 화학적으로 접합된 형광 기, 또는 VEGF-A-GFP 키메라 단백질로서 발현되는 녹색 형광 단백질(GFP)의 변이체)에 공유적으로 연결된 공여자 형광단(donor fluorophore)과 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드 또는 그 단편에 공유적으로 결합된 수용자 형광단(acceptor fluorophore) 간의 형광 공명 에너지 전달에 의해 검출되며, 여기서, VEGF-A 폴리펩티드와 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드의 단백질-단백질 상호작용을 통해서 형광단이 밀접한 근접성을 유발하는 경우, 효율적인 비방사선 에너지 전달을 위한 상기 공여자 발광 스펙트럼 및 수용자 여기 스펙트럼의 적합한 중첩(overlap)이 있다.

<79> 다른 실시형태에서, 상기 단백질-단백질 상호작용은 효소(예, β-갈락토시다제)의 재구성 도메인

(reconstitution domain)에 의해 검출된다(참조, Rossi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8405-8410(1997)).

- <80> 또 다른 실시형태에서, 상기 단백질-단백질 상호작용은 세포 중의 EspFu 폴리펩티드 및 Tir 또는 N-WASP 폴리펩티드의 적합한 키메라 구성물의 형광 비율 화상화(fluorescence ratio imaging)에 의해, 또는 VEGF-A 및 VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드의 적합한 구성물을 채용하고 VEGF-A/VEGFR 상호작용을 저해하는 화합물을 검출하기 위한 고처리 측정법에 맞춰진, 변형된 이중 혼성화 측정법(two-hybrid assay)(Fearon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7958-7962(1992); Takacs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10375-10379(1993); Vidal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10315-10320(1996); Vidal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10321-10326(1996))에 의해 측정된다. 이들 실시태양은 상기 측정법에서 조정인자로서 작용하는 화합물의 세포 투과성이 확인되는 이점이 있다.
- <81> 예를 들면, 하나의 측정법에서, 그 유일한 측정법은 아니지만, VEGF-A 폴리펩티드 또는 그 단편은 ELISA 플레이트에 흡착된다. VEGF-A 폴리펩티드는 시험 화합물에 노출된 다음, 글루타치오닌-S-트랜스퍼라제(GST)-VEGFR(예, VEGFR-2) 폴리펩티드 융합 단백질에 노출된다. 결합된 단백질은 염소 항-GST 항체, 알칼린 포스파타제(AP)-커플링된 항-염소 IgG, 및 AP 기질을 사용하여 검출한다. 단백질-단백질 상호작용을 방해하는 화합물은 ELISA 플레이트에 감소된 AP 신호를 발생시킨다.
- <82> 대표 작용물질
- <83> 다양한 작용물질이 피부 손상을 치료 또는 방지하기 위한 VEGF(예, VEGF-A, -C, 또는 -D) 또는 VEGFR(예, VEGFR-2 또는 -3) 조정인자로서 사용될 수 있다. 상기 작용물질은 개체에 투여될 수 있는 어떠한 종류의 화합물(예, 항체, 단백질, 펩티드, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 다당류, 올리고당류, 핵산, 생체 유기분자, 펩티드 모방체, 약리작용제(pharmacological agent) 및 그들의 대사산물, 전사 및 번역 조절 서열, 천연물 및 천연추출물 등)일 수 있다. 일 실시형태에서, VEGF/VEGFR 조정인자는 생물체제, 예를 들면, 분자량이 5-300 킬로달톤인 단백질이다.
- <84> 예를 들면, VEGF/VEGFR 조정인자는 VEGF의 VEGFR에 대한 결합을 저해하거나 또는, 예를 들면, VEGFR 단백질(예, VEGFR-2)에 의해 전달(transduce)시, VEGF-중재 신호전달을 방해할 수 있다. VEGF에 결합하는 VEGF/VEGFR 조정인자는 VEGF의 입체구조(conformation)를 변경하거나, VEGFR에 대한 VEGF의 결합을 방해하거나, 그렇지 않으면 VEGFR에 대한 VEGF의 친화성을 감소하거나 VEGF와 VEGFR 간의 상호작용을 방해할 수 있다. 필요에 따라서, VEGF/VEGFR 조정인자는 VEGFR에 대한 VEGF의 결합을 자극하거나 또는 VEGF 부재시 VEGFR을 활성화시켜 VEGFR 신호전달을 유도할 수 있다.
- <85> VEGF/VEGFR 조정인자(예, 항체)는 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 또는 10^{-10} M 미만의 K_d 로 VEGF에 결합하거나 VEGFR에 결합할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 VEGF/VEGFR 조정인자는 VEGF(즉, 비(non)-VEGF-A 단백질(예, VEGF-C 또는 VEGF-D)에 대한 친화성보다 적어도 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 또는 1000 더 많은 친화성을 가진 VEGF-A)에 결합한다. 바람직한 VEGF/VEGFR 조정인자는 VEGF 또는 VEGFR 특이적 항체 등의 VEGF 또는 VEGFR에 특이적으로 결합한다.
- <86> 대표적인 VEGF/VEGFR 조정인자로는 VEGF 또는 VEGFR에 결합하는 항체 및 VEGF에의 결합에 대하여 세포 표면 VEGFR과 경쟁하는 가용성 형태(soluble form)의 VEGFR을 들 수 있다. 가용성 형태의 VEGFR의 예로는 적어도 VEGFR의 세포외 도메인 부분(예, 예를 들면, VEGF에 결합하는 부분을 포함한, VEGFR-2 또는 VEGFR-3의 가용성 VEGF-결합 단편)을 포함하는 단백질이 있다.
- <87> 대표적인 가용성 형태의 VEGFR 단백질의 예로는 세포외 도메인(예, 세포외 영역에 있는 도메인) 등의 VEGF에 결합하는 VEGFR 단백질 영역을 들 수 있다. 이 영역은 또 다른 아미노산 서열(예, Fc 도메인)의 N- 또는 C-말단에 물리적으로 결합(예, 융합)될 수 있다. VEGFR로부터의 상기 영역은 링커에 의해 이중 아미노산 서열로부터 떨어져 있을 수 있다. 기타 가용성 형태의 VEGFR, 예를 들면, Fc 도메인을 포함하지 않는 형태도 사용될 수 있다.
- <88> 대표적인 VEGF/VEGFR 조정인자로는 VEGF 및/또는 VEGFR에 결합하는 항체를 들 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항체는, 예를 들면, VEGF와 VEGFR 간의 상호작용을 물리적으로 차단하거나, VEGF 및/또는 VEGFR의 그들의 상대방(counterpart)에 대한 친화성을 감소시키거나, VEGF 복합체를 붕괴 또는 불안정화시키거나, VEGF 또는 VEGFR을 격리시키거나, 또는 분해를 위해 VEGF 또는 VEGFR를 표적으로 함으로써, VEGF와 VEGFR 간의 상호작용을 저해

한다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 VEGF/VEGFR 결합 계면에 관여하는 1개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 항원결정기(epitope)에서 VEGF 또는 VEGFR에 결합할 수 있다. 이러한 아미노산 잔기는 알라닌 스캐닝(alanine scanning) 등에 의해 식별할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 항체는 VEGF/VEGFR 결합에 관여하지 않는 잔기에 결합할 수 있다. 예를 들면, 상기 항체는 VEGF 또는 VEGFR의 입체구조를 변경시킬 수 있고 그로 인해 결합 친화성을 감소시킬 수 있으며, 또는 상기 항체는 VEGF/VEGFR 결합을 입체구조적으로 방해할 수 있다.

<89> VEGF 및/또는 VEGFR에 결합하는 항체 외에도, 기타 항체를 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 VEGF/VEGFR-중재 사건(event) 또는 활성의 활성화를 방지할 수 있다.

<90> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "항체"라 함은 적어도 하나의 면역글로불린 가변 영역(variable region)(예를 들면, 면역글로불린 가변 도메인(domain) 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 제공하는 아미노산 서열)을 포함하는 단백질을 말한다. 예를 들면, 항체는 중쇄(H) 가변 영역(여기서는 VH라고 함), 및 경쇄(L) 가변 영역(여기서는 VL이라고 함)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 영역과 2개의 경쇄(L) 가변 영역을 포함한다. "항체"라고 함은 항체의 항원결합 단편(예, 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 및 dAb 단편)은 물론, 완전한 항체(예, 타입 IgA, IgG(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM(또는 그들의 서브타입)의 손상없는(intact) 및/또는 진장 면역글로불린)을 포괄한다. 상기 면역글로불린의 경쇄는 카파(kappa) 또는 람다(lambda) 타입일 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 글리코실화된다. 항체는 항체 의존적 세포독성 및/또는 보체-중재 세포독성에 대해 기능적이거나 또는 이들 활성 중의 하나 또는 둘다에 대해 비기능적일 수 있다.

<91> 상기 VH 및 VL 영역은, "골격 영역(framework region)"(FR)이라고 불리는 좀더 보존된 영역 사이에 산재된, "상보성 결정 영역(complementarity determining regions)"("CDR")라고 불리는 고변이성 영역으로 다시 나눌 수 있다. FR 및 CDR의 정도는 정확히 규정되어 있다(참조, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; 및 Chothia, C. et al.(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). 본 명세서에서는 Kabat 정의가 사용된다. VH 및 VL 각각은 통상적으로 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되며, 아미노 말단에서부터 카르복실 말단까지 다음과 같은 순서로 배치된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

<92> "면역글로불린 도메인(immunoglobulin domain)"이라 함은 면역글로불린 분자의 가변 또는 불변 도메인으로부터의 도메인을 말한다. 면역글로불린 도메인은 통상적으로 약 7개의 β-가닥으로 형성된 2개의 β-시트(sheet)와, 보존된 이황화 결합을 포함한다(참조, 예를 들면, A. F. Williams and A. N. Barclay(1988) *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405). "면역글로불린 가변 도메인 서열"이라 함은 항원 결합에 적합한 입체구조로 CDR 서열을 위치시키기에 충분한 구조를 형성할 수 있는 아미노산 서열을 말한다. 예를 들면, 상기 서열은 자연적으로 발생한 가변도메인의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 서열은 하나, 둘 또는 그 이상의 N-말단 또는 C-말단 아미노산, 내부 아미노산(internal amino acid)이 빠져있을 수 있고, 하나 이상의 삽입 또는 부가적인 말단 아미노산을 포함하거나, 또는 다른 변형(alteration)을 포함할 수 있다. 하나의 태양에서, 면역글로불린 가변도메인 서열을 포함하는 폴리펩티드는 또 다른 면역글로불린 가변도메인 서열과 결합하여 표적 결합 구조(또는 "항원 결합 부위"), 예를 들면, VEGFR과 상호작용하는 구조를 형성할 수 있다.

<93> 항체의 VH 또는 VL 쇄는 중쇄 또는 경쇄 불변영역 전부 또는 일부를 더 포함함으로써, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄를 각각 형성할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 2개의 면역글로불린 중쇄와 2개의 면역글로불린 경쇄의 4량체이다. 상기 면역글로불린 중쇄 및 경쇄는 이황화 결합에 의해 연결될 수 있다. 상기 중쇄 불변영역은 통상적으로 3개의 불변도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 상기 경쇄 불변영역은 통상적으로 CL 도메인을 포함한다. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 상기 항체의 불변영역은 통상적으로, 면역계의 각종 세포(예, 효과기 세포(effector cell)) 및 전형적인 보체계의 제1 성분(C1q)을 포함한, 숙주 조직 또는 인자에 대한 항체의 결합을 중재한다.

<94> 항체의 하나 이상의 영역은 인간이거나, 유효하게 인간(effectively human)이거나, 또는 인간화될 수 있다. 예를 들면, 상기 CDR(예, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3) 중 하나 이상은 인간일 수 있다. 경쇄 CDR 각각은 인간일 수 있다. HC CDR3은 인간일 수 있다. 골격 영역 중의 하나 이상은 인간일 수 있다(예, HC 또는 LC의 FR1, FR2, FR3, 및 FR4). 일 실시형태에서, 모든 골격 영역은 인간, 예를 들면, 인간 체세포(예, 면역글로불린을 생성하는 조혈 세포 또는 비조혈 세포)로부터 유래하는 인간이다. 일 실시형태에서, 상기 인간 서열은 생식선(germline) 서열, 예를 들면, 생식선 핵산에 의해 코딩되는 서열이다.

상기 불변영역 중 하나 이상은 인간이거나, 유효하게 인간이거나, 또는 인간화될 수 있다. 또 다른 실시형태에서는, 상기 골격 영역(예, FR1, FR2, 및 FR3, 총괄, 또는 FR1, FR, FR3, 및 FR4, 총괄)의 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 또는 98% 또는 전체 항체가 인간이거나, 유효하게 인간이거나, 또는 인간화될 수 있다. 예를 들면, FR1, FR2 및 FR3은 인간 생식선 단편(segment)에 의해 코딩되는 인간 서열에 대하여 총괄하여 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 또는 99% 일치하거나, 또는 완전히 일치한다.

<95> "유효하게 인간(effectively human)"의 면역글로불린 가변 영역은, 그 면역글로불린 가변 영역이 정상적인 인간에서는 면역원성 응답을 유발하지 않을 정도로 충분한 수의 인간의 골격(framework) 아미노산 위치를 포함하는 면역글로불린 가변 영역이다. "유효하게 인간"의 항체는, 그 항체가 정상적인 인간에서는 면역원성 응답을 유발하지 않을 정도로 충분한 수의 인간의 아미노산 위치를 포함하는 항체이다.

<96> "인간화(humanized)" 면역글로불린 가변 영역은, 그 변형된 형태가 변형되지 않은 형태보다 인간에서 면역반응을 더 적게 유도하도록 변형된(예를 들면, 그 면역글로불린 가변 영역이 정상 인간에서의 면역원성 응답을 유도하지 않을 정도로 충분한 수의 인간의 골격 아미노산 위치를 포함하도록 변형된) 면역글로불린 가변 영역이다. "인간화" 면역글로불린에 대한 설명으로는, 예를 들면, 미국특허번호 6,407,213 및 5,693,762를 들 수 있다. 몇몇 경우에는, 인간화 면역글로불린은 하나 이상의 골격 아미노산 위치에 인간이 아닌 아미노산을 포함할 수 있다.

<97> VEGF 또는 VEGFR에 결합하는 항체는, 예를 들면, 동물을 이용한 면역화(immunization), 또는 파지 디스플레이(phage display) 등의 시험관내 방법을 포함한 다양한 수단에 의해 생성할 수 있다. VEGF 또는 VEGFR의 전부 또는 일부는 면역원(immunogen)으로서 또는 선별용 표적으로서 사용될 수 있다. 예를 들면, VEGF 또는 그 단편, VEGFR 또는 그 단편은 면역원으로서 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 면역화된 동물은 천연, 인간, 또는 부분적으로 인간의 면역글로불린 유전자좌(loci)를 가진 면역글로불린 생산 세포를 함유한다. 일 실시형태에서, 인간이 아닌 동물은 인간 면역글로불린 유전자의 적어도 일부를 포함한다. 예를 들면, 인간 Ig 유전자좌의 큰 단편을 이용하여, 마우스 항체 생산이 결핍된 마우스 종을 설계(engineering)할 수 있다. 따라서, 하이브리도마 기술을 사용함으로써, 원하는 특이성을 가진, 적어도 부분적으로 인간의, 항원 특이적 단일클론성 항체를 생산하여 선별할 수 있다. 예를 들면, XENOMOUSE™, Green *et al.*(1994) *Nat. Gen.* 7:13-21; US 2003-0070185; 미국특허번호 5,789,650; 및 WO 96/34096을 참조한다.

<98> VEGF 및 VEGFR에 대한 인간이 아닌 항체는, 예를 들면, 설치류에서도 생산할 수 있다. 상기 인간이 아닌 항체는, 예를 들면, EP 239 400; 미국특허번호 6,602,503; 5,693,761; 및 6,407,213에 기재되어 있는 바와 같이, 인간화시킬 수 있고; 탈면역화시킬 수 있거나, 또는 유효하게 인간화 되도록 변형시킬 수 있다.

<99> EP 239 400(Winter *et al.*)은 하나의 종에 대한 그들의 상보성 결정 영역(CDR)을 다른 하나로부터의 상보성 결정 영역으로 치환(정해진 가변 영역내에서의 치환)함에 의한 항체의 변경(altering)을 기재하고 있다. 통상적으로, 인간이 아닌(예, 마우스) 항체의 CDR은 재조합 핵산 기술을 사용하여 인간 항체 종의 대응 영역내로 치환되어 원하는 치환된 항체를 코딩하는 서열을 생성한다. 상기 원하는 동종형(isotype)의 인간 불변영역 유전자 단편(통상 CH에 대해서는 감마 I이고 CL에 대해서는 카파임)이 추가될 수 있으며 상기 인간화 중쇄 및 경쇄 유전자는 포유동물 세포에서 함께 발현되어 가용성 인간화 항체를 생산할 수 있다. 항체를 인간화시키는 다른 방법도 사용할 수 있다. 예를 들면, 다른 방법은 항체의 3차원 구조, 결합 결정기에 3차원적으로 근접해 있는 골격 위치, 및 면역원성 펩티드 서열을 밝힐 수 있다. 예를 들면, WO 90/07861; 미국특허번호 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 및 5,530,101; Tempest *et al.*(1991) *Biotechnology* 9:266-271 및 미국특허번호 6,407,213을 참조한다.

<100> VEGF 및 VEGFR에 결합하는 전장 인간 단일클론성 항체는, 예를 들면, Boerner *et al.*(1991) *J. Immunol.* 147:86-95에 의해 기재된 바와 같이, 시험관내 초회감작 인간 비장세포(in vitro-primed human splenocytes)를 이용하여 생산할 수 있다. 그들은 Persson *et al.*(1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2432-2436에 의해 또는 Huang and Stollar(1991) *J. Immunol. Methods* 141:227-236에 의해; 또한 미국특허번호 5,798,230에 의해 기재된 바와 같은 레퍼토리 클로닝(repertoire cloning)에 의해 제조될 수 있다. 큰 비면역화 인간 파지 디스플레이 라이브러리는 표준 파지 기술을 이용하여 인간 치료제로서 개발될 수 있는 고친화성 항체를 단리하는데 사용할 수도 있다(참조, 예를 들면, Hoogenboom *et al.*(1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom *et al.*(2000) *Immunol Today* 2:371-378; 및 US 2003-0232333).

<101> 본 명세서에 기재된 항체 및 기타 단백질은 원핵 세포 및 진핵 세포에서 생산할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항체들(예, scFv's)은 피키아(*Pichia*)(참고, 예를 들면, Powers *et al.*(2000) *J. Immunol. Methods*

251:123-35), 한세올라(*Hanseula*), 또는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 등의 효모 세포에서 발현된다.

- <102> 항체, 특히 전장 항체(예를 들면, IgG)는 포유동물 세포에서 생산할 수 있다. 대표적인 재조합 발현용 포유동물 숙주 세포로는 차이니즈 햄스터 난소(CHO 세포)(예를 들면, Kaufman and Sharp(1982) *Mol. Biol.* 159:601-621에 기재된 바와 같은 DHFR 선택성 마커가 사용된, Urlaub and Chasin(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220에 기재된 디하이드로폴레이트 리덕타제-음성 CHO 세포를 포함), 림프구 세포주(예, NS0 골수종 세포 및 SP2 세포), COS 세포, K562, 및 형질전환 동물(예, 형질전환 포유동물)로부터의 세포를 들 수 있다. 예를 들면, 상기 세포는 유방 상피세포이다.
- <103> 상기 재조합 발현 벡터는, 상기 면역글로불린 도메인을 코딩하는 핵산 서열 외에도, 숙주 세포에서의 그 벡터의 복제를 조절하는 서열(예, 복제 기점(origin)) 및 선별 마커 유전자(selectable marker gene) 등의 추가적인 핵산 서열을 운반할 수 있다. 상기 선별 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 용이하게 한다(참조, 예를 들면, 미국특허번호 4,399,216; 4,634,665; 및 5,179,017). 대표적인 선별 마커 유전자로는 디하이드로폴레이트 리덕타제(dihydrofolate reductase: DHFR) 유전자(메토티렉세이트(methotrexate) 선별/증폭을 이용한 *dhfr*⁻ 숙주 세포에서의 사용용) 및 neo 유전자(G418 선별용)를 들 수 있다.
- <104> 대표적인 항체의 재조합 발현용 시스템(예, 전장 항체 또는 그들의 항원 결합 부분)에서, 항체의 중쇄와 경쇄 둘다를 코딩하는 재조합 발현 벡터는 인산칼슘-중재 트랜스펙션(transfection)에 의해 *dhfr*⁻ CHO 세포에 도입된다. 상기 재조합 발현 벡터 내에는, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄 유전자가 유전자의 고수준 전사를 유도하는 인핸서/프로모터 조절 요소(예를 들면, CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소 또는 SV40 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소 등의, SV40, CMV, 아데노바이러스 등에서 유래된 것)에 각각 작동적으로 연결되어 있다. 또한, 상기 재조합 발현 벡터는 메토티렉세이트 선별/증폭을 이용하여 벡터에 의해 트랜스펙션된 CHO 세포의 선별이 가능하도록 하는 DHFR 유전자도 운반한다. 상기 선별된 형질전환 숙주 세포는 배양되어 상기 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현이 가능해지고 무손상 항체(intact antibody)는 배양 배지로부터 회수된다. 표준 분자생물학 기술을 사용하여, 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 트랜스펙션시키고, 형질전환체를 선별하고, 그 숙주세포를 배양하고, 그 배양 배지로부터 항체를 회수한다. 예를 들면, 일부 항체는 단백질 A 또는 단백질 G에 의한 친화성 크로마토그래피에 의해 분리할 수 있다.
- <105> 또한, 항체(및 Fc 융합)는, 예를 들어, Fc 기능을 변경시키는(예, Fc 수용체 또는 C1q, 또는 둘다와의 상호작용을 감소 또는 제거하는) 변형(modification)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 인간 IgG1 불변영역은 하나 이상의 잔기(예를 들면, 미국특허번호 5,648,260에서의 넘버링에 따라, 잔기 234 및 237 중의 하나 이상)에서 변이될 수 있다. 기타 대표적인 변형으로는 미국특허번호 5,648,260에 기재된 것들을 들 수 있다.
- <106> Fc 도메인을 포함하는 일부 단백질에 대하여, 항체/단백질 생산 시스템은 Fc 도메인이 글리코실화된 항체 또는 기타 단백질을 합성하도록 설계할 수 있다. 예를 들면, IgG 분자의 Fc 도메인은 CH2 도메인 중의 아스파라긴 297에서 글리코실화된다. 또한, 상기 Fc 도메인은 다른 진핵 번역후 변형(eukaryotic post-translational modification)을 포함할 수 있다. 다른 경우에서, 상기 단백질은 글리코실화되지 않은 형태로 생산된다. 기타 경우에, 단백질은 글리코실화되지 않은 형태로 생산된다.
- <107> 항체 및 기타 단백질은 형질전환동물에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, 미국특허번호 5,849,992는 형질전환 포유동물의 유선에서의 항체 발현 방법을 기재하고 있다. 형질전환유전자(transgene)는 밀크 특이적 프로모터 및 목적으로 하는 항체(예를 들면, 본 명세서에서 기재된 항체)를 코딩하는 핵산 서열, 및 분비용 신호서열을 포함하도록 구성된다. 이러한 형질전환포유동물의 암컷에 의해 생산된 밀크는 그 내부에 분비된, 목적으로 하는 단백질, 예를 들면, 항체 또는 Fc 융합 단백질을 포함한다. 상기 단백질은 상기 밀크로부터 정제되거나, 또는 일부 응용예에서는 직접 사용할 수 있다.
- <108> 상기 항체 관련 문맥에 기재된 방법들은 기타 단백질, 예를 들면, Fc 융합 및 가용성 수용체 단편에 적용할 수 있다.
- <109> 특정한 실시태양에서는, VEGF 또는 VEGFR을 코딩하는 내인성 유전자의 발현을 감소시키기 위해, 핵산 길항제를 사용한다. 일 실시형태에서, 상기 핵산 길항제는 VEGF 또는 VEGFR을 코딩하는 mRNA를 표적으로 하는 siRNA이다. 또한, 다른 타입의 길항적 핵산으로는, 예를 들어, dsRNA, 리보자임, 3중나선 구성체, 또는 안티센스 핵산을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서는, 핵산 길항제는 VEGFR 활성화의 하류 작용자(downstream effector) 표적으로 될 수 있다(direct).

- <110> siRNA는 필요에 따라 오버행(overhang)을 포함하는 작은 이중 가닥 RNA(dsRNA)이다. 예를 들면, siRNA의 이중 영역은 길이가 약 18~25 뉴클레오티드이고, 예를 들면, 길이가 약 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 뉴클레오티드이다. 통상, 상기 siRNA 서열은 표적 mRNA에 정확히 상보적이다. dsRNA 및 siRNA는 특히 포유동물 세포(예, 인간 세포)에서의 유전자 발현을 침묵시키기 위해 사용할 수 있다. 또한 siRNA는 29염기쌍의 스텝과 2-뉴클레오티드 3' 오버행을 가진 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함한다. 예를 들면, Clemens *et al.*(2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6499-6503; Billy *et al.*(2001) *Proc. Natl. Sci. USA* 98:14428-14433; Elbashir *et al.*(2001) *Nature*. 411:494-8; Yang *et al.*(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9942-9947; Siolas *et al.*(2005), *Nat. Biotechnol.* 23(2):227-31; 20040086884; U.S.20030166282; 20030143204; 20040038278; 및 20030224432를 참조한다.
- <111> 안티센스체는, 예를 들면, 약 8~80 핵산염기(즉, 약 8~80 뉴클레오티드), 예를 들면, 약 8~50 핵산염기, 또는 약 12~30 핵산염기를 포함할 수 있다. 안티센스 화합물로는 표적 핵산과 혼성화하여 그 발현을 조정하는, 리보자임, 외부 유도 서열(external guid sequence: EGS) 올리고뉴클레오티드(올리고자임), 및 기타 짧은 촉매 RNA 또는 촉매 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다. 안티센스 화합물은 표적 유전자 서열에 상보적인 적어도 8개의 연속적인 핵산염기의 스트레치(stretch)를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 특이적으로 혼성화할 표적 핵산 서열에 100% 상보적인 필요는 없다. 올리고뉴클레오티드는 표적에 대한 올리고뉴클레오티드의 결합이 표적 분자의 정상적 기능을 방해하여 유용성(utility)의 손실을 유발할 때 특이적으로 혼성화될 수 있으며, 특이적 결합이 요구되는 조건 하에서, 즉, 생체내 측정 또는 치료 처리의 경우에 생리학적 조건 하에서, 또는, 시험관내 측정의 경우에 그 측정이 수행되는 조건 하에서, 표적이 아닌 서열에 대한 올리고뉴클레오티드의 비특이적 결합을 회피하기에 충분한 정도의 상보성이 있다.
- <112> 안티센스 올리고뉴클레오티드와 mRNA(예, VEGF 또는 VEGFR을 코딩하는 mRNA)의 혼성화는 mRNA의 정상적인 기능 중 하나 이상을 방해할 수 있다. 방해되는 mRNA의 기능으로는, 예를 들어, 단백질 번역 부위로의 RNA의 전위(translocation), RNA로부터 단백질의 번역, 하나 이상의 mRNA 종을 생성하기 위한 RNA의 스플라이싱(splicing), 및 RNA가 관여할 수 있는 촉매 활성 등의 모든 주요 기능을 들 수 있다. 또한, RNA에 대한 특이적인 단백질의 결합은 RNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 혼성화에 의해 방해될 수 있다.
- <113> 대표적인 안티센스 화합물로는 표적 핵산(예, VEGF 또는 VEGFR을 코딩하는 mRNA)에 특이적으로 혼성화하는 DNA 또는 RNA 서열을 들 수 있다. 그 상보적인 영역은 약 8~80 핵산염기 사이로 연장할 수 있다. 상기 화합물은 하나 이상의 변형된 핵산염기를 포함할 수 있다. 변형된 핵산염기로는, 예를 들면, 5-요오도우라실, 5-요오도 시토신 등의 5-치환 피리미딘류, 및 C5-프로피닐시토신 및 C5-프로피닐우라실 등의 C5-프로피닐 피리미딘류를 들 수 있다. 기타 적합한 변형 핵산염기로는 N^4 --(C₁-C₁₂)알킬아미노시토신류 및 N^4, N^4 --(C₁-C₁₂)디알킬아미노시토신류를 들 수 있다. 또한, 변형된 핵산염기로는 7-치환-8-아자-7-데아자퓨린류 및, 7-요오드-7-데아자퓨린, 7-시아노-7-데아자퓨린, 7-아미노카르보닐-7-데아자퓨린 등의 7-치환-7-데아자퓨린류를 들 수 있다. 이들의 예로는 6-아미노-7-요오도-7-데아자퓨린류, 6-아미노-7-시아노-7-데아자퓨린류, 6-아미노-7-아미노카르보닐-7-데아자퓨린류, 2-아미노-6-히드록시-7-요오도-7-데아자퓨린류, 2-아미노-6-히드록시-7-시아노-7-데아자퓨린류, 및 2-아미노-6-히드록시-7-아미노카르보닐-7-데아자퓨린류를 들 수 있다. 또한, N^6 -메틸아미노아데닌 및 N^6, N^6 -디메틸아미노아데닌을 포함한, N^6 --(C₁-C₁₂)알킬아미노퓨린류 및 N^6, N^6 --(C₁-C₁₂)디알킬아미노퓨린류도 적합한 변형된 핵산염기이다. 마찬가지로, 예를 들어, 6-티오구아닌을 포함한 기타 6-치환 퓨린류는 적합한 변형된 핵산염기를 구성할 수 있다. 기타 적합한 핵산염기로는 2-티오우라실, 8-브로모아데닌, 8-브로모구아닌, 2-플루오로아데닌, 및 2-플루오로구아닌을 들 수 있다. 또한, 상기한 변형된 핵산염기 중 어느 것의 유도체류도 적합하다. 상기한 화합물 중 어느 것의 치환체로는 C₁-C₃₀ 알킬, C₂-C₃₀ 알케닐, C₂-C₃₀ 알키닐, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 할로, 아미노, 아미도, 니트로, 티오, 설포닐, 카르복실, 알콕시, 알킬카르보닐, 알콕시카르보닐 등을 들 수 있다.
- <114> 다른 종류의 핵산체에 대한 기재도 이용할 수 있다. 예를 들면, 미국특허번호 4,987,071; 5,116,742; 및 5,093,246; Woolf *et al.*(1992) *Proc Natl Acad Sci USA*; *Antisense RNA and DNA*, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.(1988); 89:7305-9; Haselhoff and Gerlach(1988) *Nature* 334:585-59; Helene, C.(1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Helene(1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; 및 Maher(1992) *Bioassays* 14:807-15를 참조한다.
- <115> 또한, 인공적인 전사인자를 사용하여 VEGF 또는 VEGFR의 발현을 조절할 수 있다. 상기 인공적인 전사인자는

VEGF 또는 VEGFR을 코딩하는 내인성 유전자, 예를 들면, 조절영역(예, 프로모터)의 서열에 대한 결합력을 갖도록 설계하거나 또는 라이브러리로부터 선별할 수 있다. 예를 들면, 상기 인공적인 전사 인자는 시험관내(예, 파지 디스플레이 사용, 미국특허번호 6,534,261), 또는 생체내 선별에 의해 제조하거나, 또는 인식 코드에 근거하여 설계하여 제조할 수 있다(참조, 예를 들면, WO 00/42219 및 미국특허번호 6,511,808). 예를 들면, Rebar *et al.*(1996) *Methods Enzymol.* 269:129; Greisman and Pabo(1997) *Science* 275:657; Isalan *et al.*(2001) *Nat. Biotechnol* 19:656; 및 Wu *et al.*(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:344를 참조하며, 이들 중에서도, 다양한 징크 핑거 도메인의 라이브러리를 만드는 방법에 대하여 참조한다.

<116> 필요에 따라, 인공적인 전사 인자는 전사 조절 도메인, 예를 들면, 전사를 활성화시키는 활성화 도메인 또는 전사를 억제하는 억제 도메인에 융합될 수 있다. 특히, 억제 도메인은 VEGF 또는 VEGFR을 코딩하는 내인성 유전자의 발현 감소에 사용될 수 있다. 상기 인공적인 전사인자는 세포에 전달되는 이중 핵산에 의해 그 자체가 코딩되거나 또는 그 단백질 자체가 세포에 전달될 수 있다(참조, 예를 들면, 미국특허번호 6,534,261). 상기 인공적인 전사인자를 코딩하는 서열을 포함하는 이중 핵산은 유도성 프로모터에 작동적으로 연결되어, 예를 들면, 세포 내에서의 그 인공적인 전사인자의 수준을 미세하게 제어할 수 있게 된다.

<117> 투여

<118> 본 명세서에 기재된 작용물질은 전신적으로 또는 국부적으로(예를 들면, 국소적으로) 투여될 있다. 본 명세서에 기재된 작용물질의 국소 투여는 바람직한 투여 경로이다. 국소 투여를 위해, 본 발명의 조성물은 세포, 이식편 또는 개체에 적합한 매체(medium)를 포함할 수 있다. 이러한 국소적인 약제학적 조성물은 다수의 형태, 예를 들면, 용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 샴푸, 비누 또는 에어로졸 형태로 존재한다. 본 발명의 조성물에는 알콜, 알로에 베라 젤, 알란토인, 글리세린, 비타민 A 및 E 오일, 미네랄 오일, 및 폴리에틸렌 글리콜 등의 다양한 담체 재료를 채용할 수 있다. 상기 조성물에는 기타 첨가제, 예를 들면, 방부제, 향, 일광차단제, 또는 기타 화장품 원료를 첨가할 수 있다.

<119> 국소 전달용으로 적합한 운반체(vehicel)는 리포솜(liposome)이다. 리포솜은 세포에 작용물질(예, 본 명세서에 기재된 작용물질)을 운반 또는 전달하는데 사용할 수 있다. 상세한 안내(guidance)는, 예를 들면, Yarosh *et al.*(2001) *Lancet* 357: 926 및 Bouwstra *et al.*(2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 Suppl 1:S41에서 확인할 수 있다.

<120> 전신 투여를 위해, 상기 작용물질은 경구적인 경로, 또는 피하, 복강내, 근육내, 정맥내 또는 기타 경로를 포함한 비경구적인 경로를 통해서 투여될 수 있다. 국부 투여를 위해서, 상기 작용물질은 국소적, 경피, 경점막, 비강내 또는 기타 경로로 투여된다. 세포는, 예를 들면, 마이크로주입 또는 트랜스펙션에 의해, 세포외적으로 또는 세포내적으로 상기 작용물질과 접촉시킬 수 있다. 상기 작용물질은 일시적으로 적용 및 제거하거나, 적용은 되지만 제거되지 않거나, 및/또는 일정한, 증가 또는 감소된 빈도로 및/또는 증가 또는 감소된 투여량 또는 농도로 반복적으로 적용할 수 있다. 하나 이상의 투여 경로를 동시에 이용(예를 들면, 경구 투여와 함께 국소 투여)할 수 있다. 비경구 투여 형태의 예로는 등장 식염수, 5% 글루코오스, 또는 기타 잘 알려진 약제학적으로 허용가능한 부형제 중에 활성제를 함유한 수성 용액을 들 수 있다. 시클로덱스트린 등의 가용화제 또는 당업계에 잘 알려진 기타 가용화제는 색소 조정 조성물을 전달하기 위한 약제학적 부형제로서 이용할 수 있다.

<121> 상기 조성물은, 예를 들면, 화장품, 의약 또는 피부관리 제품 등으로서 제공될 수 있다. 또한 상기 조성물은 종래의 방법을 이용하는 기타 투여 경로용 투여 형태로 제제화될 수 있다. 약제학적 조성물은 운반체(예, 전분, 글루코스, 과일당, 슈크로스, 젤라틴 등), 윤활제(예, 스테아르산 마그네슘), 붕해제(예, 전분 및 결정 셀룰로스) 및 바인더(예, 락토스, 만니톨, 전분 및 아라비아검) 등의 고체 조성물을 제조용으로 적합한 필요에 따른 약제학적 담체를 이용하여, 예를 들면, 분말 또는 그라놀과 같은 경구 투여용 투여 형태, 또는 캡슐, 정제(tablet)(각각은 서방성 제제 및 지효성 제제를 포함함), 또는 젤 씬(gel seal) 형태로 제제화할 수 있다. 상기 조성물이 주사액인 경우, 예를 들면, 용제(예, 주사용 멸균수), 안정화제(예, 에데트산 나트륨), 등장화제(예, 염화나트륨, 글리세린 및 만니톨), pH 조정인자(예, 염화수소산, 시트르산 및 수산화나트륨), 현탁화제(예, 메틸셀룰로스) 등을 사용할 수 있다.

<122> 상기 작용물질은 기타 약제학적 성분, 예를 들면, 피부용 2차 치료제(예, 보습제, 일광차단제)를 함유할 수 있다.

<123> 키트

<124> 본 명세서에 기재된 작용물질(예, VEGF 항체 또는 VEGF 또는 VEGFR을 조정하는 작용물질)이 키트에 제공될 수

있다. 상기 키트는 (a) 작용물질, 예를 들면, 작용물질을 포함하는 조성물, 및 (b) 정보 자료(informational material)을 포함한다. 상기 정보 자료는 본 명세서에 기재된 방법 및/또는 본 명세서에 기재된 방법에 대한 VEGF 또는 VEGFR의 용도와 관련된, 설명, 지시, 마케팅 또는 기타 자료일 수 있다. 예를 들면, 상기 정보 자료는 급성 UVB 피부 손상, 예를 들면, 선변에 관한 것이다.

<125> 일 실시형태에서, 상기 정보 자료는 본 명세서에 기재된 방법을 수행하기에 적합한 방식, 예를 들면, 적합한 투여량, 투여 형태, 또는 투여 방식(예, 본 명세서에 기재된 투여량, 투여 형태, 또는 투여 방식)으로 본 명세서에 기재된 작용물질을 투여하는 사용설명서(instruction)를 포함할 수 있다. 바람직한 투여량, 투여 형태, 또는 투여 방식은 국소적이고 경피적이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 정보 자료는 본 명세서에 기재된 작용물질을 적합한 개체, 예를 들면, 인간(예, 급성 UVB 손상이 있거나, 손상될 위험이 있는 인간)에게 투여하는 사용설명서를 포함할 수 있다.

<126> 상기 키트의 정보 자료는 그 형태에 제한되지 않는다. 많은 경우, 상기 정보 자료, 예를 들면, 사용설명서는 인쇄물, 예를 들면, 인쇄된 텍스트, 도면, 및/또는 사진, 예를 들면, 라벨 또는 인쇄된 시트로 제공된다. 하지만, 상기 정보 자료는 점자(Braille), 컴퓨터 판독가능 자료, 비디오 기록, 또는 오디오 기록 등의 다른 포맷으로 제공될 수도 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 키트의 정보 자료는, 상기 키트의 사용자가 본 명세서에 기재된 방법으로 VEGF 또는 VEGFR 및/또는 그 용도에 관한 실질적인 정보를 얻을 수 있는, 접촉 정보(예를 들면, 물리적 주소, 전자메일 주소, 웹 주소, 또는 전화번호)이다. 물론, 상기 정보 자료는 포맷의 어떠한 조합으로도 제공될 수도 있다.

<127> 상기 키트의 조성물은, 본 명세서에 기재된 작용물질 외에, 용매 또는 완충액, 안정화제, 방부제, 향 또는 기타 화장품 원료, 및/또는 본 명세서에 기재된 상태 또는 질환을 치료하기 위한 2차 작용물질(예, 일광차단제) 등의 기타 성분들을 포함할 수 있다. 필요에 따라, 상기 기타 성분들은 상기 키트에 포함될 수 있으나, 본 명세서에 기재된 작용물질과 다른 조성물 또는 용기 내에 포함될 수도 있다. 이러한 실시형태에서, 상기 키트는 본 명세서에 기재된 작용물질과 기타 성분들을 혼합하거나, 또는 본 명세서에 기재된 작용물질을 다른 성분들과 함께 사용하는 설명서를 포함할 수 있다.

<128> 본 명세서에 기재된 작용물질은 어떠한 형태, 예를 들면, 액체, 건조 또는 동결된 형태로 제공될 수 있다. 본 명세서에 기재된 작용물질은 실질적으로 순수 및/또는 멸균된 것이 바람직하다. 본 명세서에서 기재된 작용물질이 액체 용액으로 제공되는 경우, 그 액체 용액은 바람직하게는 수성 용액이며, 멸균된 수성 용액이 바람직하다. 본 명세서에 기재된 작용물질이 건조 형태로 제공되는 경우, 통상적으로 적합한 용매를 첨가하여 재구성(reconstitution)한다. 상기 용매(예, 멸균수 또는 완충액)는 필요에 따라 키트에 제공될 수 있다.

<129> 상기 키트는 본 명세서에 기재된 작용물질을 함유하는 조성물용으로 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 조성물 및 정보 자료용으로 개별 용기, 분리기, 또는 구획(compartment)을 포함한다. 예를 들면, 상기 조성물은 병, 바이알, 또는 주사기에 담을 수 있으며, 상기 정보 자료는 플라스틱 슬리브(sleeve) 또는 패킷(packet)에 담을 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 키트의 개별 요소는 단독의, 분리되지 않은 용기에 담긴다. 예를 들면, 상기 조성물은, 라벨 형태의 정보 자료가 부착된 병, 바이알 또는 주사기에 담긴다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 복수의 개개의 용기(예, 팩)를 포함하며, 각각은 본 명세서에 기재된 작용물질의 하나 이상의 단위 투여 형태(예를 들면, 본 명세서에 기재된 투여 형태)를 포함한다. 예를 들면, 상기 키트는 복수의 주사기, 앰플, 포일 패킷, 또는 블리스터 팩을 포함하며, 각각은 본 명세서에 기재된 작용물질의 단일 단위 투여량을 포함한다. 상기 키트의 용기는 기밀 및/또는 방수일 수 있다.

<130> 상기 키트는 필요에 따라 상기 조성물의 투여에 적합한 장치, 예를 들면, 주사기, 흡입기, 피펫, 포셉, 계량 스푼, 점적기(예, 눈 점적기), 스왑(swab)(예, 면봉 또는 나무 스왑) 또는 임의의 전달 장치를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 장치는 스왑이다.

실시예

<131> 재료와 방법

<132> UVB 조사 처방

<133> 암컷 무모 Skh1 마우스(8주)를, 4개 형광램프(Southern New England Ultraviolet, Bradford, CN)가 동일한 간격을 두고 배치된 랙크를 사용하여, Kochevar et al.(1993) J. Invest. Dermatol. 100: 186-93에 기재된 대로, UVB 방사선에 노출시켰다. 마우스(군당 n=7)는 주 3회 10주 동안 UVB 방사선에 허위조사시키거나, 또는 초기

조사량을 40 mJ/cm²(0.5 최소 홍반량; MED)으로 하여 0.5 MED에서 최고 조사량 4.5 MED의 증분으로 점차 증가하여 노출시켰다. UVB의 총 누적 조사량은 5.46 J/cm²이었다. 급성 선반 반응은 관찰되지 않았다. 추가적인 연구에서, K14 프로모터의 조절 하에 마우스 VEGF164가 피부 특이적으로 과다발현하는 FVB 형질전환 마우스 (Detmar et al.(1998) *J. Invest. Dermatol.* 111:1-6)인, 8주된 암컷 Skh1 마우스 또는 야생형 FVB 마우스(군당 n=5)에, UVB를 일회조사량 40 mJ/cm²(0.5 MED) 또는 80 mJ/cm²(1MED)로 조사하였다. 또한, 야생형 마우스(n=5/군)에는 Hirakawa et al.(2005) *Blood* 105:2392-9에 기재된 대로, 54 mJ/cm²의 UVB 방사선에 노출시키기 24시간 전에, 복강내 주사로 50 μg의 항 마우스 VEGF 중성화 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 50 μg의 대조구 IgG를 처리하였다. 모든 동물 연구는 메사추세츠 종합 병원의 연구동물 관리 소위원회에 의해 승인되었다.

<134> 생체 림프관조영술

<135> 에버틴(averitin)(0.4 g/kg, Sigma)을 사용하여 마우스를 마취시키고, 에반스 블루 염료(Evans blue dye)를 1% 함유한 0.9% NaCl 용액 1μl을, 10μl 해밀톤(Hamilton) 주사기를 사용하여 귀 바퀴의 내표면에 진피내 주사하여, 림프관을 눈에 보이게 하였다. 마우스 귀를 염료 주입 1분, 3분, 및 5분 후에 촬영하였다.

<136> 정량적 실시간 RT-PCR

<137> TRIZOL(상표명) 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여, 최종 UVB 조사(n=7/군) 2일 후에 마우스의 전체 등 피부로부터 총 세포성 RNA를 단리한 다음, RQ1 RNase-free DNase(Promega, Madison, WI)를 처리하였다. 상기 전체 피부는 티슈 라이저(Tissue Lyser)(Qiagen GmbH, Germany)를 사용하여 균일화시켰다. Hong et al.(2004) *Nat. Genet.* 36:683-5에 기재된 대로, ABI PRISM(상표명) 7000 서열 검출 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여, 정량적 실시간 RT-PCR에 의해 VEGF-A, -C 및 -D mRNA를 조사하였다. 마우스 VEGF-A, -C 및 -D에 대한 프라이머 및 프로브는 이미 기재되었다(Kunstfeld et al.(2004) *Blood* 104:1048-57). 각 반응은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(GAPDH) 프라이머(정방향 5'-TCACTGGCATGGCCTCC-3'(서열번호 1), 역방향 5'-GGCGGGCACGTCAGATCCA-3'(서열번호 2)) 및 프로브(5'-JOE-TTCCTACCCCAATGTGTCCGTCG-TAMRA-3'(서열번호 3))를 내부 대조구로서 다중처리(multiplex)하였다.

<138> 면역염색 및 컴퓨터보조 형태계측학적 맥관 분석(immunostainig and computer-assisted morphometric vessel analysis)

<139> ALEXA FLUOR(상표명) 488 또는 ALEXA FLUOR(상표명) 594(Molecular Probes, Eugene, OR)로 표지된, 마우스 LYVE-1(Banerji et al.(1999) *J. Cell Biol.* 144:789-801), 마우스 CD31(BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA)에 대한 다클론 항체 및 대응하는 2차 항체를 사용하여, 마우스 조직의 6μm 냉동미세절단 절편(cryostat section)에 대한 면역형광 분석을 수행하였다(Kajiya et al.(2005) *EMBO J.* 24:2885-95). 니콘(Nikon) E-600 현미경(Nikon, Melville, NY)으로 절편을 검사하였으며 화상은 SPOTTM 디지털 카메라(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI)로 포착(capture)하였다. 형태계측학적 분석은, Hirakawa et al. (2005) *Blood* 105:2392-9에 기재된 대로, IPLABTM 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 각 절편의 다른 3군데를 시험하였으며 표피-진피 접합부로부터 200μm 거리내의 도메인의 진피에서 평방 마이크로미터당 맥관 수, 평균 맥관 크기, 및 림프관에 의해 점유되는 해당 조직 면적을 측정하였다. 독립된 스튜던트 t-검정(unpaired Student t-test)를 사용하여 미세맥관 밀도 및 크기의 차이를 분석하였다. 또한, 상기한 바와 같이 상용 해마톡실린-에오신 염색을, 이미 Prophet, Arrington, 및 Sobin(1992) *Laboratory Methods in Histotechnology*에 기재된 대로 수행하였다.

<140> 실시예 1. 만성 UVB 조사는 피부 림프관의 확장을 유도한다

<141> 림프 맥관계에 대한 UVB 조사 효과를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 먼저 Skh1 무모 쥐(Kligman(1996) *Clin. Dermatol.* 14:183-95)에 10주에 걸쳐 5.46 J/cm²의 누적 조사량으로 만성적인 UVB 조사를 수행하였다. 만성적인 UVB 조사 결과, 이미 보고된 바와 같이 뚜렷한 주름이 형성되었으나(Yano et al.(2002) *J. Invest. Dermatol.* 118:800-5), 허위조사된 마우스에서 상기한 변화가 검출되지 않았다. 조직학적 검사 결과, 표피 과다증식, 염증 세포 침윤 및 부종 형성을 포함한 만성적인 UVB 손상의 통상적인 징후가 나타났다(도 1의 A 및 B). 범맥관(panvascular) 마커 CD31 및 림프 특이적 히알루로난 수용체 LYVE-1에 대한 이중 면역형광 염색 결과, 이전 연구와 일치하여, CD31+/LYVE-1- 혈관의 중등도 확장이 나타났다(Yano et al.(2005) *Br. J. Dermatol.* 152:115-21). 놀랍게도, LYVE-1 양성 피부 림프관은 불규칙적인 모양으로 갖고 간혹 맥관 벽의 불완전한 내피 세포 내막을 가지면서, 크기가 극적으로 증가하였으나, 허위조사된 마우스에서는 단지 정상, 붕괴된 림프관은 확인되

었다(도 1의 C 및 D). 컴퓨터 보조 형태계측학적 분석 결과, 림프관에 의해 점유된 평균 진피 면적(허위조사 마우스에 비해 2.5배 증가; $P < 0.01$) 및 진피 림프관의 평균 크기(허위조사 마우스에 비해 2.1배 증가; $P < 0.01$)가 UVB 조사 피부에서, 허위조사 마우스(도 1의 E 및 F)에 비해, 유의하게 증가됨이 확인되었다. 이와 대조적으로, 림프관의 밀도는 양쪽 군 모두 유사하였다(도 1의 G).

<142> 실시예 2. 만성 UVB 조사 후 림프관의 손상된 기능 및 증가된 누출

<143> 피부 림프관 기능에 대한 만성적인 UVB 조사 효과를 더 조사하기 위해서, 에반스 블루 염료를 마우스 귀 바퀴속으로 진피내 주입하였다. 잉크 주입 1 및 3 분 후에, 허위조사된 마우스에 비해, 만성적으로 UVB 조사된 마우스 피부에서 두드러지게 팽창된 림프관이 눈에 보였다(도 2의 A, B, D, E). 5 분 후, 만성적으로 UVB 조사한 피부의 림프관으로부터는 에반스 블루 염료가 흘러나오는 반면, 허위조사된 마우스에서는 상기한 누출이 관찰되지 않았다(도 2의 C 및 F). 이러한 발견들은 UVB 조사 후 확장된 림프관은 누출되고 기능적으로 손상됨을 나타낸다.

<144> 실시예 3. 만성적인 UVB 조사는 VEGF-A 발현의 상향조절을 유도하지만, VEGF-C 또는 -D 발현의 상향조절은 유도하지 않는다

<145> 다음으로, 만성적인 UVB 조사에 의해, 알려진 림프관형성 인자 VEGF-A(Nagy et al.(2002) J. Exp. Med. 196:1497-506), VEGF-C 또는 VEGF-D(Jussila et al. (2002) Physiol. Rev. 82:673-700) 중 어느 것이 상향 조절되는지를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 귀 피부의 표피로부터 총 RNA를 단리한 다음, mRNA 발현의 정량적 실시간 TAQMAN™ RT-PCR 분석을 행하였다. 본 발명자들은 허위조사 대조구에 비해, UVB 조사된 표피에서 VEGF-A mRNA 발현이 2.2배 상향조절됨을 확인하였다($P < 0.01$; 도 3의 A). 이와 대조적으로, VEGF-C 및 VEGF-D mRNA 발현 수준은 두 군에서 유사하였다(도 3의 B 및 C). 표피와 진피 둘다를 포함한 전체 피부 용해물로부터 단리한 총 RNA를 시험한 경우, 유사한 결과가 얻어졌다.

<146> 실시예 4. 급성 UVB 조사는 피부 림프관의 확장 및 고투과성을 유도한다

<147> 다음으로, 본 발명자들은 급성 UVB 조사의 일회조사량이 림프관 기능을 손상시키기에 충분한지를 조사하였다. 일회조사량 40 mJ/cm²의 UVB 조사 2일 후(0.5 최소 홍반량; MED), 에반스 블루 염료를 진피내 주입하여 피부 림프관을 눈에 보이게 한 결과, 그 림프관은 미조사 피부의 림프관으로부터 구별할 수 없었고 고투과성이 아닌 것으로 드러났다(도 4의 A-F). 이와 대조적으로, UVB를 80 mJ/cm² 조사량으로 조사한 결과, 피부 림프관이 확장된 것으로 드러났으며(도 4의 G-H), 현저한 누출이 관찰되었다(도 4의 I). 피부 절편의 분별 면역형광 분석 결과, 80 mJ/cm²의 UVB 조사 후에, LYVE-1+ 림프관이 현저하게 확장되었으나, CD31+/LYVE-1- 혈관은 중등도 확장된 것으로 드러났다(도 4의 L). 이러한 변화는 조사되지 않은 피부 또는 40 mJ/cm²의 UVB가 조사된 피부에서는 관찰되지 않았다(도 4의 J, K).

<148> 실시예 5. UVB-조사된 VEGF-A 형질전환 마우스의 림프관의 증가된 확장

<149> 본 발명자들은 VEGF-A의 mRNA 발현이 UVB 조사 후의 표피 각질형성세포에 의해 상향조절됨을 확인하였으므로, 그 다음으로, 표피 유래 VEGF-A가 림프관의 UVB 유도 확장 및 누출을 직접 조장하는지를 조사하였다. 그 결과, 케라틴 14 프로모터의 제어 하에 마우스의 VEGF164를 과다발현하는 형질전환 FVB 마우스(Detmar et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111:1-6) 및 FVB 야생형 마우스를 일회조사량 40 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출시키거나 또는 허위조사하였다. UVB 조사 2일 후 귀 절편의 분별 면역형광 분석 결과, 허위조사된 마우스와 UVB 조사된 야생형 마우스에서 CD31+/LYVE-1- 혈관 및 LYVE-1+ 림프관의 수와 크기가 유사한 것으로 드러났다(도 5의 A 및 C). 허위조사된 VEGF 형질전환 마우스는 이미 야생형 마우스에 비해서, 림프관 크기에서 약간의 증가를 앞서 나타내었다(도 5의 B). 중요하게도, VEGF 형질전환 마우스에 UVB를 조사한 후에는, 증가된 귀 두께 및 부종 형성과 함께, 림프관이 극적으로 확장되었다(도 5의 D). 컴퓨터 보조 형태계측학적 분석 결과, 허위조사된 VEGF 형질전환 마우스에서, 야생형 마우스에 비해, 림프관 크기가 1.3배 증가하고($p < 0.05$), UVB 조사 후에는 유의하게 1.9배 확장됨($p < 0.01$; 도 5의 E)이 확인되었다. 림프관의 밀도는 모든 군에서 유사하였다(도 5의 F).

<150> 실시예 6. VEGF-A의 전신적 차단은 림프관의 UVB-유도 확장을 저해한다

<151> 다음으로 본 발명자들은 VEGF-A의 전신적 차단이 UVB-유도 림프관 확장을 방지하는지를 조사하였다. 야생형 FVB 마우스를, VEGF-A에 대한 차단 항체(blocking antibody) 또는 동량의 대조구 IgG를 복강내 주입 1일 후, 일회조사량 54 mJ/cm²의 UVB 조사에 노출시켰다. UVB 조사 2일 후 CD31 및 LYVE-1에 대한 이중 면역형광 염색 결과, 대조구 IgG로 처리한 마우스에서, LYVE-1 양성 림프관의 현저한 확장은 물론, CD31+/LYVE-1- 혈관의 중등

도 팽창이 확인되었다(도 6의 A 및 C). 이와 대조적으로, VEGF-A 차단 항체로 전신 처리함으로써, 림프관 및 혈관의 확장이 완전히 방지하였다(도 6의 B 및 D).

<152> [기타 실시형태]

<153> 본 발명의 다수의 실시형태를 기재하였다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상과 범위로부터 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 알 수 있을 것이다. 따라서, 기타 실시형태는 하기 청구항의 범위내이다.

<154> 모든 인용된 특허, 출원, 및 참조문헌은 본 명세서에 참고로 기입한다.

도면의 간단한 설명

<55> 도 1의 A-B는 만성 UVB 조사 후에는 림프관 확장이 나타나지만(도 1의 B), 허위조사 피부(sham-irradiated skin)에서는 림프관 확장이 나타나지 않는(도 1의 A), 헤마톡실린/에오신-염색 피부 조직 시료의 현미경 사진이다. 스케일 바: 100 μ m.

<56> 도 1의 C-D는 UVB 조사(도 1의 D) 및 허위조사(도 1의 C)된 피부 조직 시료 중의 CD31 및 LYVE-1에 대한 면역형광 현미경 사진이다. UVB 조사 피부 시료는 UVB 조사 피부에서 CD31+/LYVE-1- 혈관의 중등도(moderate) 확장을 나타내었다. LYVE-1 양성 피부 림프관은 불규칙한 모양 및 때때로 불완전한 내피 내막(lining)을 가진 채 사이즈가 상당히 증가한 반면, 허위조사 마우스에서는 단지 정상적, 붕괴된 림프관이 확인되었다(도 1의 D). 스케일 바: 100 μ m.

<57> 도 1의 E-G는 만성 UVB 조사 및 허위조사 마우스로부터의 피부 시료의 형태계측학적 분석(morphometric analysis)을 도시한 막대 그래프이다. 도 1의 E는 만성 UVB-조사 및 허위조사 마우스로부터의 피부 시료의 림프관에 의해 덮인 면적을 도시한다. 도 1의 F는 만성 UVB-조사 및 허위조사 마우스로부터의 피부 시료의 림프관의 평균 크기를 도시한다. 도 1의 G는 만성 UVB-조사 및 허위조사 마우스로부터의 피부 시료의 림프관의 밀도를 도시한다. 림프관에 의해 덮인 면적(도 1의 E) 및 림프관의 평균 크기(도 1의 F)는 허위조사 피부에 비해 UVB-조사 피부에서 유의하게 증가하였다(**, p<0.01).

<58> 도 2의 A-F는 에반스 블루 색소(Evans blue dye)를 진피내 주입한 마우스의 귀 사진이다. 도 2의 A-C는 허위조사 마우스를 도시한다. 도 2의 D-F는 만성적으로 UVB-조사된 마우스를 도시한다. 색소 주입 1분 후(도 2의 A 및 D), 3분 후(도 2의 B 및 E), 및 5분 후(도 2의 C 및 F)의 색소 퍼짐을 나타낸다. 잉크 주입 1분 및 3분 후에, 만성적으로 UVB 조사된 마우스 피부(도 2의 D-E)에서는 허위조사 마우스(도 2의 A-B)에 비해, 현저하게 팽창된 림프관이 눈에 보였다. 5분 후에, 만성적으로 UVB 조사된 피부(도 2의 F)에서는 에반스 블루 색소가 림프관으로부터 흘러나오지만, 허위조사 마우스(도 2의 C)에서는 그러한 누출이 관찰되지 않았다.

<59> 도 3의 A-C는 만성적인 UVB 조사 48시간 후에 귀 피부의 표피로부터 단리한 총 RNA(total RNA)의 실시간 RT-PCR 정량 분석을 도시한 막대 그래프이다. VEGF-A mRNA 발현(도 3의 A)는 UVB-조사 표피에서, 허위조사 대조구에 비해, 상향조절(upregulate)되었다(***, P<0.01). 이와 대조적으로, VEGF-C(도 3의 B) 및 VEGF-D(도 3의 C) mRNA 발현 수준은 두 군 모두에서 유사(comparable)하였다.

<60> 도 4의 A-I는 에반스 블루 색소를 진피내 주입한 마우스의 귀 사진이다. 도 4의 A-C는 허위조사 마우스(0 mJ/cm²)를 도시한다. 도 4의 D-F는 40 mJ/cm²의 UVB(0.5 MED)를 1회 조사한 후 2일 된 마우스를 도시한다. 도 4의 G-I는 80 mJ/cm²의 UVB(1 MED)를 1회 조사한 후 2일 된 마우스를 도시한다. 색소 주입 1분 후(도 2의 A, D, 및 G), 3분 후(도 2의 B, E, 및 H), 및 5분 후(도 2의 C, F 및 I)의 색소 퍼짐을 나타낸다. UVB를 조사량 80 mJ/cm²로 조사한 것은 피부 림프관 확장 및 현저한 누출을 나타내었다.

<61> 도 4의 J-L은 0 mJ/cm²(도 4의 J), 40 mJ/cm²(도 4의 K) 및 80 mJ/cm²(도 4의 L)로 조사된 피부 시료 중의 CD31 및 LYVE-1에 대한 면역형광 현미경 사진이다. LYVE-1 및 CD1에 대한 피부 절편(section)의 분별 면역형광 분석(differential immunofluorescence analysis) 결과, 80 mJ/cm²의 UVB 조사 후에 LYVE-1 + 림프관이 현저하게 확장한 것으로 드러났다(도 4의 L). 이러한 변화가 미조사 피부(도 4의 J) 또는 40 mJ/cm² 조사 피부(도 4의 K)에서는 관찰되지 않았다. 스케일 바: 100 μ m.

<62> 도 5의 A-D는 일회조사량 40 mJ/cm²로 조사(도 5의 C-D)되었거나 또는 허위조사(도 5의 A-B)된 야생형(도 5의 A 및 C) 및 VEGF 형질전환(도 5의 B 및 D) 마우스의 피부 시료 중의 CD31 및 LYVE-1에 대한 면역형광 현미경 사진이다. 허위조사된 VEGF 형질전환 마우스는 야생형 마우스(도 5의 A)에 비해, 림프관 크기에서 약간의 증가를 나타내었다(도 5의 B). 림프관은 UVB-조사 형질전환 마우스(5의 D)에서, 부종 형성과 함께, 극적으로 확장되었

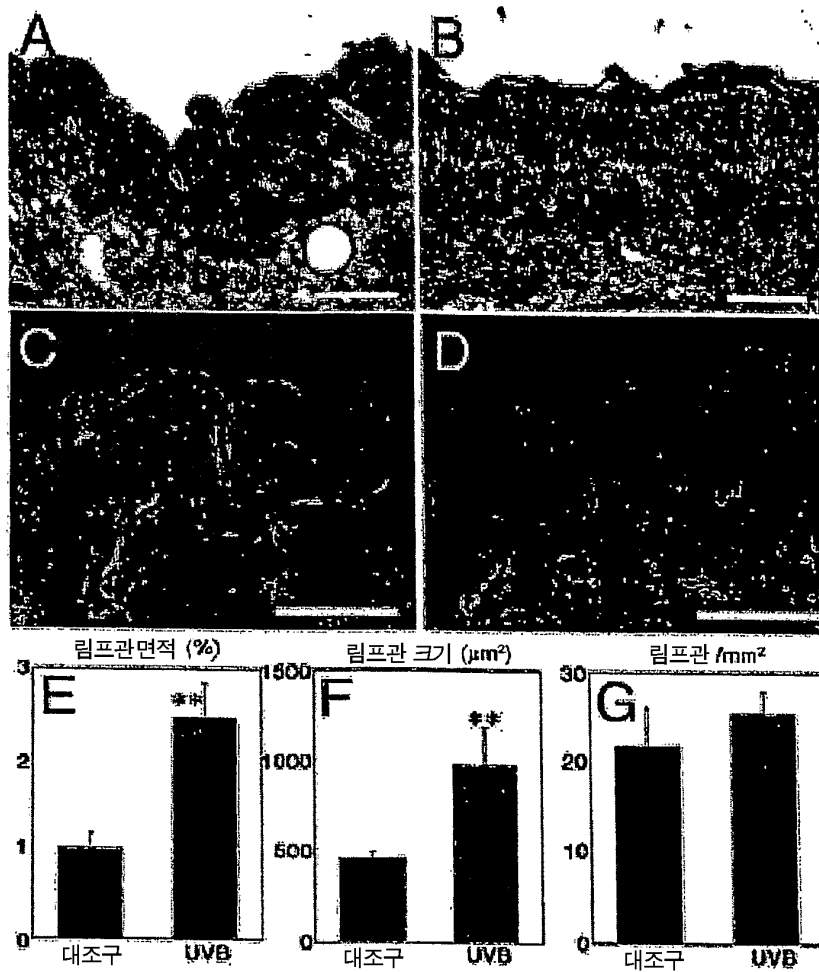
다. 스케일 바:100 μ m.

<63> 도 5의 E-F는 만성적으로 UVB 조사 및 허위조사된 야생형 및 VEGF 형질전환 마우스로부터의 피부 시료의 형태계측학적 분석을 도시한 막대 그래프이다. 도 5의 E는 만성적으로 UVB 조사 및 허위조사된 야생형 및 VEGF 형질전환 마우스로부터의 피부 시료의 림프관 평균 크기를 도시한다. 도 5의 F는 만성적으로 UVB 조사 및 허위조사된 야생형 및 VEGF 형질전환 마우스로부터의 피부 시료의 림프관 밀도를 도시한다. 형태계측학적 분석은 야생형 마우스에 비해, 허위조사 VEGF 형질전환 마우스에서 림프관 사이즈가 1.3배 증가되고(*, p<0.05), UVB 조사 후에 1.9배 확장된 것으로 나타났다(**, p<0.01)(도 5의 E). 림프관의 밀도는 모든 군에서 유사하였다(도 5의 F).

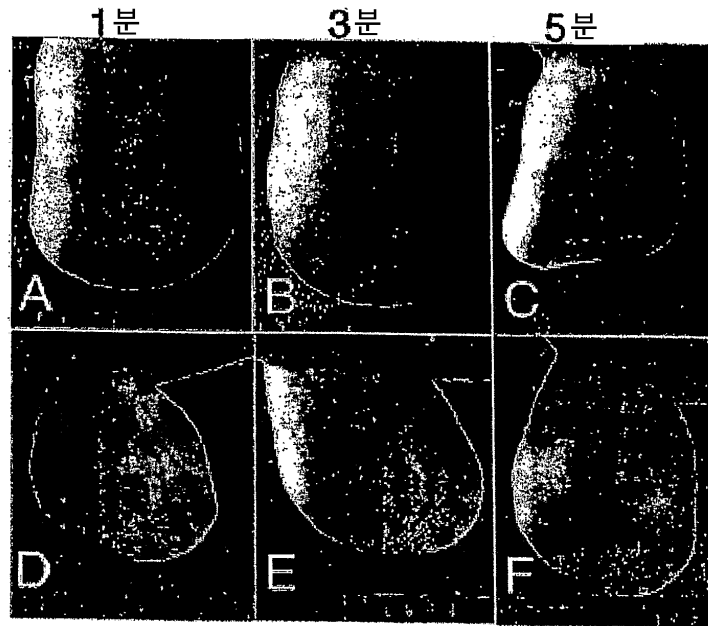
<64> 도 6의 A-D는 VEGF-A에 대한 차단 항체(blocking antibody)(도 6의 B 및 D) 또는 대조구 IgG(도 6의 A 및 C)의 복막내 주입 1일 후에 일회조사량 54 mJ/cm²의 UVB를 조사한 마우스의 피부 시료 중의 CD31 및 웨스트(Hoechst) 염색(도 6의 A-B) 또는 CD31 및 LYVE-1(도 6의 C-D)에 대한 면역형광 현미경사진이다. UVB 조사 2일 후에 CD31 및 LYVE-1에 대한 이중 면역형광 염색 결과, LYVE-1 양성 림프관(화살표 머리)의 확장은 물론, 대조구 IgG로 처리한 마우스에서 CD31+/LYVE-1- 혈관(화살표)의 중등도 팽창이 나타났다(도 6의 A 및 C). 항 VEGF-A 처리는 림프관 및 혈관의 확장을 방지하였다(도 6의 B 및 D). 스케일 바: 100 μ m.

도면

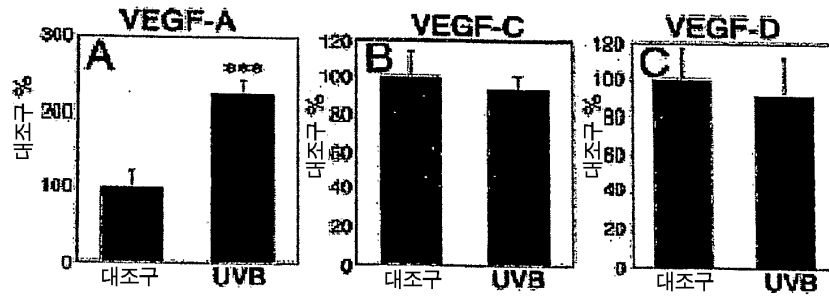
도면1



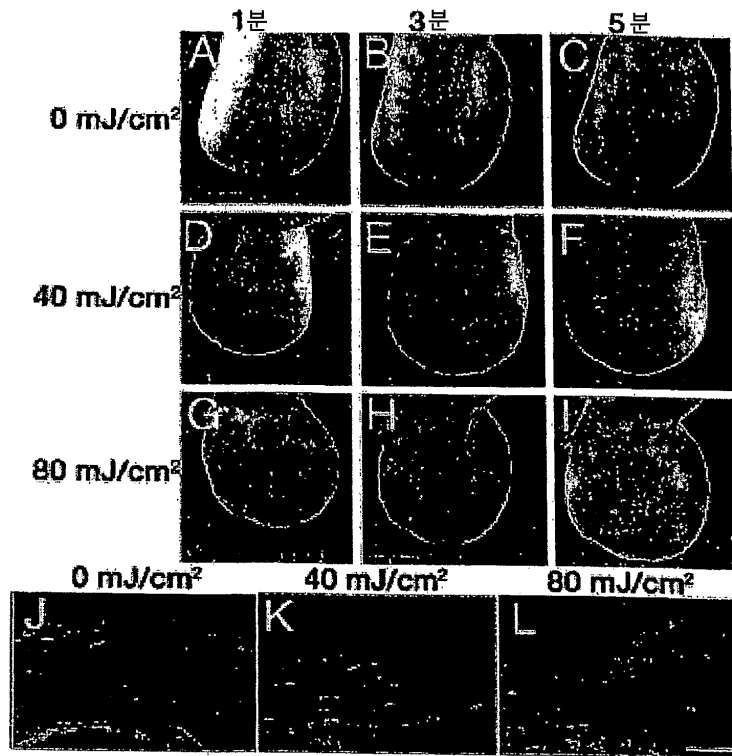
도면2



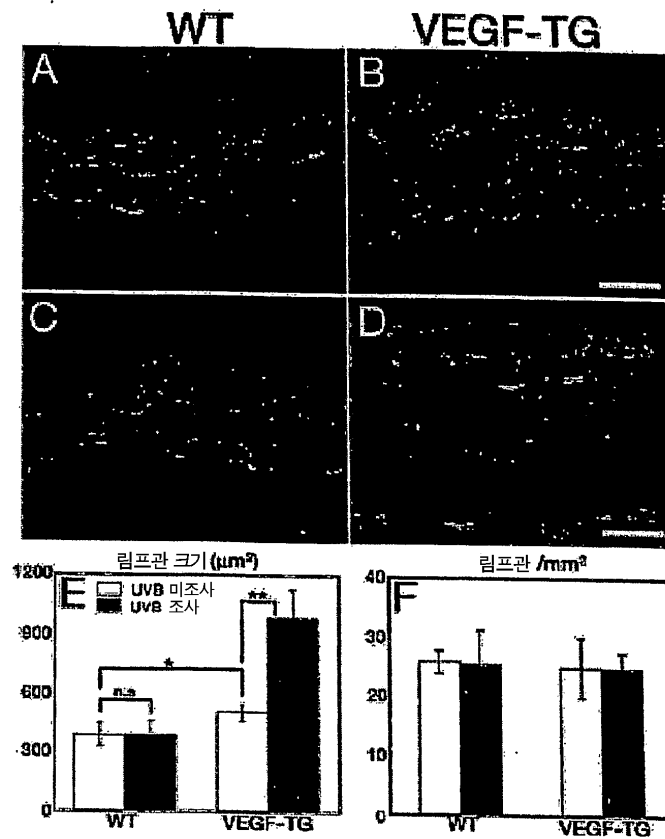
도면3



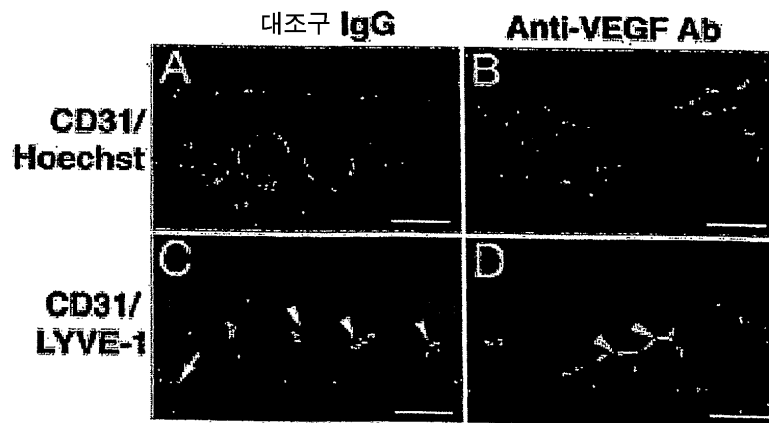
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
 <120> METHODS OF INCREASING LYMPHATIC FUNTION

<130> P2008-0314

<150> US
 <151> 2006-01-18

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRIMER

<400> 1
 tcactggcat ggccttcc

18

<210> 2
 <211> 19

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PRIMER

<400> 2
ggcgggcacg tcagatcca 19

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PROBE

<400> 3
ttcctacccc caatgtgtcc gtcg 24