



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0114415  
(43) 공개일자 2014년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)  
*C12Q 1/68* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7021823

(22) 출원일자(국제) 2013년01월11일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년08월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/021306

(87) 국제공개번호 WO 2013/106765  
국제공개일자 2013년07월18일

(30) 우선권주장  
61/586,660 2012년01월13일 미국(US)

(71) 출원인  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사  
우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자  
바이스, 카를로스  
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1  
브라우어, 매튜  
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 VEGF 길항제로의 치료를 위한 환자를 확인하기 위한 생물학적 마커

### (57) 요 약

VEGF 길항제 요법에 대해 반응성일 가능성이 있는 환자를 확인 및 치료하기 위해 하나 이상의 바이오마커의 발현을 검출하기 위한 방법 및 조성물이 개시되어 있다. 또한, 방법에 사용하기 위한 키트 및 제조품이 개시되어 있다.

(72) 발명자

슈미트, 마이케

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔  
에이 웨이 1

싱, 말리카

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔  
에이 웨이 1

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을 검출하고;
- (b) 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인시켜주는 것인,  
환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는지의 여부를 결정하는 방법.

### 청구항 2

- (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을 검출하고;
- (b) 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인시켜주는 것인,  
환자에 대한 VEGF 길항제의 치료 효능을 최적화하는 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자가 VEGF 길항제에 대한 반응성에 대해 시험되는 환자 집단 내에 있고, 참조 수준이 환자 집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준인 방법.

### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 참조 수준에 대한 증가인 방법.

### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 참조 수준에 대한 감소인 방법.

### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현을 mRNA를 측정함으로써 검출하는 것인 방법.

### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현을 혈장 단백질 수준을 측정함으로써 검출하는 것인 방법.

### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 종양 조직인 방법.

### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제2 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제3 유전자의 발현을 검출하

는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제4 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 Alk1, CD34, CD105, CD144, Col4a1, Col4a2, Dll4, EFNB2, EGFL7, ESM1, LAMA4, NG2, Nid2, Notch1, NRP1, NRP2, RGS5, Sema3f, TSP1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 및 VIM으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 방법.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

### 청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자가 혈관신생 장애를 앓고 있는 것인 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 환자가 결장직장암, 유방암, 폐암, 교모세포종, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 앓고 있는 것인 방법.

### 청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, (c) 참조 수준에 대한 상기 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 검출되는 경우에, 환자의 치료를 위해 VEGF 길항제를 선택하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, (d) 환자에게 VEGF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 방법.

### 청구항 20

제19항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

### 청구항 21

(a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을 검출하고;

(b) 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준과 비교하며,

여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인시켜주는 것이고,

(c) 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인되는 경우에, 요법으로서 VEGF 길항제를 선택하거나; 또는

(d) 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인되지 않는 경우에, VEGF 길항제가 아닌 요법을 선택하는 것

을 포함하는, 요법에 대해 고려되는 환자 집단 내의 특정한 환자를 위한 요법을 선택하는 방법.

### 청구항 22

제21항에 있어서, 참조 수준이 환자 집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준인 방법.

### 청구항 23

제21항에 있어서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 참조 수준에 대한 증가인 방법.

### 청구항 24

제21항에 있어서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 참조 수준에 대한 감소인 방법.

### 청구항 25

제21항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제2 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제3 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 27

제26항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제4 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 28

제21항에 있어서, (c)의 요법이 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 작용제인 방법.

### 청구항 29

제21항에 있어서,

(e) 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인되는 경우에, 환자에게 유효량의 VEGF 길항제를 투여하는 것

을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 30

제29항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 방법.

### 청구항 31

제30항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

### 청구항 32

제31항에 있어서, 적어도 제2 작용제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 제2 작용제가 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 34

제21항에 있어서, (d)의 요법이 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 및 그의 조합으로 이루어

진 군으로부터 선택된 작용제인 방법.

### 청구항 35

(a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 후보 바이오마커의 발현을 검출하고;

(b) 후보 바이오마커의 발현을 후보 바이오마커의 참조 발현 수준과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 후보 바이오마커의 발현 수준의 변화는 후보 바이오마커를 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자의 바이오마커로서 확인시켜주는 것인,

VEGF 길항제에 대한 반응성을 결정하기 위한 바이오마커를 확인하는 방법.

### 청구항 36

제35항에 있어서, 참조 수준이, VEGF 길항제에 반응할 가능성에 대해 시험되는 환자 집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준인 방법.

### 청구항 37

제35항에 있어서, 참조 수준이 이전에 환자로부터 수득한 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준인 방법.

### 청구항 38

제35항에 있어서, 환자가 이전에 VEGF 길항제로 치료되었고, 현재 전이를 경험하고 있는 것인 방법.

### 청구항 39

제35항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체인 방법.

### 청구항 40

제39항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

### 청구항 41

제35항에 있어서, (c) VEGF 길항제 치료에 대한 반응성을 결정하기 위한 바이오마커로 사용하기 위해, 참조에 대한 발현 수준의 변화를 갖는 후보 바이오마커를 선택하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 42

(a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자 또는 제31항의 방법에 따라 확인된 바이오마커의 발현 수준을 검출하는 단계; 및

(b) 적어도 하나의 유전자 또는 바이오마커의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 수준과 비교하는 단계를 포함하며,

여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 혈관신생 장애를 앓고 있는 환자를 확인시켜주는 것인,

환자에서 혈관신생 장애를 진단하는 방법.

### 청구항 43

제42항에 있어서, (c) 참조 수준에 대한 상기 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 검출되는 경우에, 환자의 치료를 위해 VEGF 길항제를 선택하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 44

제43항에 있어서, (d) 환자에게 VEGF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 45

제1항, 제2항, 제21항, 제35항 또는 제42항에 있어서, 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자 또는 바이오마커의 발현 수준의 변화가 하기 알고리즘에 따라 환자 샘플에 대한 VDV 서명 점수 ( $VDV_i$ )를 계산함으로써 결정되는 것인 방법.

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

여기서,  $Z_{g=1,i}$ ,  $Z_{g=2,i}$ , ...,  $Z_{g=n,i}$ 는 샘플  $i$ 의 각각의 유전자 또는 바이오마커  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 발현 값의 정규화된  $z$ -점수이고,

제1 규정 역치 미만의  $VDV_i$ 는 참조 수준에 대한 감소를 나타내고, 제2 규정 역치 초과의  $VDV_i$ 는 참조 수준에 대한 증가를 나타낸다.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 각각의 유전자 또는 바이오마커  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 발현 값이 각각의 유전자  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 qRT-PCR 값인 방법.

#### 청구항 47

제45항에 있어서, 제1 규정 역치가 -4 내지 -0.5이고, 제2 규정 역치가 0.5 내지 4인 방법.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 제1 규정 역치가 -4 내지 -1이고, 제2 규정 역치가 1 내지 4인 방법.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 제1 규정 역치가 -4 내지 -1.5이고, 제2 규정 역치가 1.5 내지 4인 방법.

#### 청구항 50

제49항에 있어서, 제1 규정 역치가 -4 내지 -2이고, 제2 규정 역치가 2 내지 4인 방법.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체로의 치료로부터 이익을 얻을 환자를 확인하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 바이오마커 (예를 들어, 혈장 중의 분비된 단백질)의 발현 수준 측정은, 예를 들어 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료를 비롯한 특정 요법에 반응할 환자 및 환자 집단을 확인하기 위한 유효 수단일 수 있다.

[0003] 어느 환자가 어느 치료에 반응할 것인지를 결정하고, 이러한 결정을 VEGF 길항제 요법 (단일 작용제로 사용되는 다른 작용제와 조합되거나 관계없이)을 이용하는 환자를 위한 유효 치료 요법에 통합시키기 위한 유효 수단에 대한 필요성이 있다.

#### 발명의 내용

[0004] 발명의 개요

[0005] 본 발명은 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료로부터 이익을 얻을 환자를 확인하는 방법을 제공한다. 이들 환자는 표 1 또는 2에 제시된 유전자의 발현 수준에 기반하여 확인된다.

[0006] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을 검출하고; (b) 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환

자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인시켜주는 것인, 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는지의 여부를 결정하는 방법을 제공한다.

[0007] 본 발명의 추가 실시양태는 (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을 검출하고; (b) 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인시켜주는 것인, 환자에 대한 VEGF 길항제의 치료 효능을 최적화하는 방법을 제공한다.

[0008] 상기 제시된 실시양태에 관하여, 일부 추가 실시양태에서, 환자는 VEGF 길항제에 대한 반응성에 대해 시험되는 환자 집단 내에 있고, 참조 수준은 환자 집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준이다. 일부 실시양태에서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 참조 수준에 대한 증가이다. 일부 실시양태에서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 참조 수준에 대한 감소이다. 일부 실시양태에서, 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서의 적어도 하나의 유전자는 mRNA를 측정함으로써 검출된다. 일부 실시양태에서, 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현은 혈장 단백질 수준을 측정함으로써 검출된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 종양 조직이다. 일부 실시양태에서, 방법은 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제2, 제3, 제4, 또는 그 초과의 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 Alk1, CD34, CD105, CD144, Col4a1, Col4a2, D114, EFNB2, EGFL7, ESM1, LAMA4, NG2, Nid2, Notch1, NRP1, NRP2, RGS5, Sema3f, TSP1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 및 VIM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 환자는 혈관신생 장애를 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 환자는 결장직장암, 유방암, 폐암, 교모세포종, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 앓고 있다.

[0009] 또한 상기 제시된 실시양태에 관하여, 방법은 (c) 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 검출되는 경우에, 환자의 치료를 위해 VEGF 길항제를 선택하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 추가로, 방법은 (d) 환자에게 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)를 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 실시양태는 (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을 검출하고; (b) 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준과 비교하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 확인시켜주는 것이고, (c) 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인되는 경우에, 요법으로서 VEGF 길항제를 선택하거나; 또는 (d) 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인되지 않는 경우에, VEGF 길항제가 아닌 요법을 선택하는 것을 포함하는, 요법에 대해 고려되는 환자 집단 내의 특정한 환자를 위한 요법을 선택하는 방법을 제공한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 참조 수준은 환자 집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준이다. 일부 실시양태에서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 참조 수준에 대한 증가이다. 일부 실시양태에서, 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 참조 수준에 대한 감소이다. 일부 실시양태에서, 방법은 환자로부터의 생물학적 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 제2, 제3, 제4, 또는 그 초과의 유전자의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, (d)의 요법은 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 작용제이다. 일부 실시양태에서, 방법은 (e) 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 확인되는 경우에, 환자에게 유효량의 VEGF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 제2 작용제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 본 발명의 추가 실시양태는 (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 투여 전에 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 후보 바이오마커의 발현을 검출하고; (b) 후보 바이오마커의 발현을 후보 바이오마커의 참조 발현 수준과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 후보 바이오마커의 발현 수준의 변화는 후보 바이오마커를 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자의 바이오마커로서 확인시켜주는 것인,

VEGF 길항제에 대한 반응성을 결정하기 위한 바이오마커를 확인하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 VEGF 길항제에 반응할 가능성에 대해 시험되는 환자 집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 이전에 환자로부터 수득한 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준이다. 일부 실시양태에서, 환자는 이전에 VEGF 길항제로 치료되었고, 현재 전이를 경험하고 있다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙이다. 추가로, 방법은 (c) VEGF 길항제 치료에 대한 반응성을 결정하기 위한 바이오마커로 사용하기 위해, 참조에 대한 발현 수준의 변화를 갖는 후보 바이오마커를 선택하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 환자에 대한 VEGF 길항제의 임의의 투여 전에 환자로부터 수득한 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자 또는 상기 기재된 것과 같은 방법에 따라 확인된 바이오마커의 발현 수준을 검출하는 단계; 및 (b) 적어도 하나의 유전자 또는 바이오마커의 발현 수준을 적어도 하나의 유전자의 참조 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화는 혈관신생 장애를 앓고 있는 환자를 확인시켜주는 것인, 환자에서 혈관신생 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (c) 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준의 변화가 검출되는 경우에, 환자의 치료를 위해 VEGF 길항제를 선택하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 방법은 (d) 환자에게 VEGF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본원에 기재된 방법은 본원에 기재된 바와 같이 환자로부터 샘플을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 방법을 본원에 기재된 바와 같이 암으로 진단된 환자에 대해 수행하여, 최적 치료 요법을 결정할 수 있다.

[0014] 상기 제시된 임의의 실시양태에서, 참조 수준에 대한 환자 샘플에서의 적어도 하나의 유전자 또는 바이오마커의 발현 수준의 변화는 하기 알고리즘에 따라 환자 샘플에 대한 VDV 서명 점수 ( $VDV_i$ )를 계산함으로써 결정될 수 있다.

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

[0015] 여기서,  $Z_{g=1,i}$ ,  $Z_{g=2,i}$ , ...  $Z_{g=n,i}$ 는 샘플  $i$ 의 각각의 유전자 또는 바이오마커  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 발현 값의 정규화된  $z$ -점수이고, 제1 규정 역치 미만의  $VDV_i$ 는 참조 수준에 대한 감소를 나타내고, 제2 규정 역치 초과의  $VDV_i$ 는 참조 수준에 대한 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 각각의 유전자 또는 바이오마커  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 발현 값은 각각의 유전자  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 qRT-PCR 값이다. 일부 실시양태에서, 제1 규정 역치는 -4 내지 -0.5 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5, -2, -1.5, -1 또는 -0.5)이고, 제2 규정 역치는 0.5 내지 4 (예를 들어, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)이다. 일부 실시양태에서, 제1 규정 역치는 -4 내지 -1 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5, -2, -1.5 또는 -1)이고, 제2 규정 역치는 1 내지 4 (예를 들어, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)이다. 일부 실시양태에서, 제1 규정 역치는 -4 내지 -1.5 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5, -2 또는 -1.5)이고, 제2 규정 역치는 1.5 내지 4 (예를 들어, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)이다. 다른 실시양태에서, 제1 규정 역치는 -4 내지 -2 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5 또는 -2)이고, 제2 규정 역치는 2 내지 4 (예를 들어, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)이다.

[0017] 이러한 실시양태 및 다른 실시양태는 하기 상세한 설명에 의해 추가로 설명된다.

### 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a는 항-VEGF mAb로 치료후 72시간, 7일 및 14일의 뮤린 츄장 신경내분비 종양 (PNET) 세포의 미세-혈관 밀도 (MVD) 및 종식 지수 결정의 조직학적 및 그래프 분석을 보여준다. 항-VEGF 치료 후 다양한 시간의 MECA-32 염색을 통한 종양 혈관 밀도 (좌측) 및 Ki67을 통한 종식 지수 (우측)의 조직학적 분석으로부터의 대표적인 이미지 (20X 배율). 각각의 경우에 4-6개의 종양으로부터의 정량화를 평균 +/- SEM으로서 하기 막대 그래프에 나타내었다. \* $P<0.05$ , NS = 유의하지 않음.

도 1b는 RIP-T $\beta$ Ag 모델에서의 종양 부담에 대한 항-VEGF 효과의 동역학을 보여주는 그래프이다. 연구에서 21일에, 항-VEGF-치료된 마우스 (적색 막대)에서의 종양 부담은 대조군-치료된 마우스 (흑색 막대)보다 유의하게 낮았지만, 14일에는 그렇지 않았다. \*\* $p<0.05$  (t-검정),  $n=5-8$ 마리의 마우스/군/시점.

도 1c는 VEGF 길항제로의 치료에 대한 반응으로서의 VDV 유전자 발현 수준의 변화를 보여주는 그래프이다.

유전자의 발현 수준 (적색 선으로 나타냄)은 모든 유전자 (회색 히스토그램)에 대해 유의하게 감소하였다. 적색 파선은 이들 선택된 유전자에 대한 평균 변화를 나타낸다. 흑색 파선은 나머지 유전자에 대한 평균 배수 변화를 나타낸다.

도 1d는 qPCR에 의해 평가된 VEGF 길항제로의 치료에 대한 반응으로서의 유전자의 하위군에서의 유전자 발현 수준의 변화를 보여주는 그래프이다. 막대는 3개의 독립적 생물학적 복제물로부터의 평균 발현을 나타낸다. 오차 막대 =  $\log_2$  표준 편차.

도 2a는 확립된 피하 유방 암종 종양 모델 (MDA-MB-231)에서의 VEGF 차단에 대한 VDV 유전자 반응의 변화를 보여주는 그래프 세트이다. 항-VEGF 또는 대조군 치료 24시간 후에 종양 샘플을 수집하였다. VDV 서명에서의 유전자 (적색 선)는 기질 (상부 그래프, 마우스 칩,  $p<0.0001$ )에서 모든 유전자 (회색 히스토그램으로 나타냄)에 대해 유의하게 감소하였지만, 종양 세포 (하부 그래프, 인간 칩, 유의차 없음)에서는 그렇지 않았다. 마이크로어레이 밀도 플롯에서 개별 proxVDV 전사체 배수-변화를 흑색 문자로 주석을 달았다. 각각의 치료 코호트에 대해  $n = 5-10$ 의 예를 들었다.

도 2b는 동소 (두개내) U87 교모세포종 모델에서의 VEGF 차단에 대한 VDV 유전자 반응의 변화를 보여주는 그래프 세트이다. 항-VEGF 또는 대조군 치료 13-42일 후에 종양 샘플을 수집하였다. VDV 서명에서의 유전자 (적색 선)는 기질 (상부 그래프, 마우스 칩,  $p<0.0105$ )에서 모든 유전자 (회색 히스토그램으로 나타냄)에 대해 유의하게 감소하였지만, 종양 세포 (하부 그래프, 인간 칩, 유의차 없음)에서는 그렇지 않았다. 마이크로어레이 밀도 플롯에서 개별 proxVDV 전사체 배수-변화를 흑색 문자로 주석을 달았다. 각각의 치료 코호트에 대해  $n = 5-10$ 의 예를 들었다.

도 2c는 피부 상처에 대한 국소 항-VEGF 도포시 하향조절 (상부 그래프,  $p=0.0125$ )이 관찰되었고, 재조합 VEGF를 12시간 동안 도포하였을 때 정반대의 상향조절 ( $p<0.0001$ )이 관찰되었음을 보여주는 그래프 세트이다. 개별 proxVDV 전사체 배수-변화를 흑색 문자로 주석을 달았다.

도 2d는 VEGF 신호전달이 VDV 유전자 발현을 유도하였음을 보여주는 조직학적 데이터 및 그래프를 나타낸다. MDA-MB-231 모델에서 48시간 후에 VDV 유전자 서명의 항-VEGF 하향조절 (우측 상부 그래프,  $p<0.0001$ )과는 대조적으로, 항-D114 치료는 대부분의 VDV 유전자의 상향조절 (우측 하부 그래프,  $p<0.0001$ )을 유발하였고, 이는 대조군 치료와 비교하여 CD31/PECAM에 대한 면역형광 염색에 의한 명백한 과다혈관화 (좌측)와 일치하였다. 개별 proxVDV 전사체 배수-변화를 흑색 문자로 주석을 달았다. 각각의 치료 코호트에 대해  $n = 5-10$ 의 예를 들었다.

도 3은 시험관내에서 대부분의 proxVDV 유전자가 rVEGF에 의해 분명하게 상향조절되지 않았음을 보여주는 열지도이다. HUVEC의 rVEGF 자극의 유전자 발현 분석. H (시간)는 rVEGF 자극의 길이를 나타낸다. 여기에 나타낸 열지도는 선택된 VDV 프로브에 대한 마이크로어레이 발현 분석의 결과를 강조한다. 암청색은 최대의 상대적 하향조절을 나타내고, 암적색은 최대 정도의 전사체 상향조절을 나타낸다. 시험관내에서 ProxVDV 유전자는 rVEGF에 의해 현저하게 조절되지 않았다. 그러나, 아직 특성화되지 않은 VDV 유전자의 작은 군 (EHD3, PCHD17 및 THBD)은 HUVEC의 rVEGF 자극시 강하게 상향조절되는 것으로 보인다. 각각의 시점에 대한 발현 데이터는 3개의 독립적인 복제물로부터의 것이다.

도 4a는 proxVDV 유전자 ESM1이 종양-연관 혈관계에서 특이적으로 발현되는 생체내 VEGF 표적임을 보여주는 계내 혼성화 (ISH) 이미지이다. 상부 사진 (좌측 및 우측): 센스 올리고를 사용한 ISH 음성 대조군은 유의하지 않은 백그라운드 (비-특이적 염색)를 보여준다. 하부 사진은 항-VEGF 또는 대조군 치료된 동물로부터의 HM7 종양 절편에서의 (안티센스 올리고를 사용한 ISH에 의한) ESM1 mRNA 발현을 보여준다. 흑색 화살표는 대조군 치료된 종양 슬라이드에서의 강한 ESM1 mRNA 혈관 발현 (갈색 염색)의 여러 영역을 나타낸다 (하부 사진 슬라이드 좌측). 대조적으로, 항-VEGF 치료된 동물로부터의 종양 슬라이드에서는 ESM1이 거의 검출가능하지 않았다 (하부 사진 우측). 모든 슬라이드를 또한 혈마록실린 염색 (H&E)으로 대조 염색하였다.

도 4b는 대조군 및 항-VEGF-치료된 동물로부터의 종양 슬라이드에서의 ESM1 (ISH) 염색의 정량화를 보여주는 그래프이다.  $n=10$ .

도 4c는 대조군 및 항-VEGF-치료된 동물로부터의 종양 슬라이드에서의 MECA32 (PLVAP) 염색의 정량화를 보여주는 그래프이다.  $n=10$ .

도 4d는 MDA-MB-231 종양에서의 VEGF 경로 억제제의 생체내 활성에 대한 증거를 보여주는 조직학적 이미지 세트 및 상응하는 정량적 그래프이다. 항-VEGF mAb, 수니티닙 또는 악시티닙 생체내 치료는 치료후 72시간에

종양에서 MVD를 효율적으로 감소시켰다. MDA-MB-231 종양을 보유하는 동물을 지시된 바와 같은 물질 및 방법으로 72시간 동안 치료한 다음, 조직학적 및 유전자 발현 분석을 위해 종양을 수집하였다. 상부 이미지: MECA-32 (PLVAP) 및 CD31 염색 (적색)을 통한 종양 혈관 밀도. 핵은 DAPI (청색)로 대조염색하였다. 이미지는 20X 배율로 획득하였다. 하부 그래프는 각각의 치료군에서의 8개의 종양으로부터의 정량화 (평균 +/- SEM으로서의 것)를 보여준다. \*P<0.05.

도 4e는 생체내 VEGF 차단 또는 VEGFR-2 하류 신호전달 억제가 proxVDV 유전자의 지속적 하향조절을 유도하였음을 보여주는 그래프 세트이다. VEGF 및 VEGFR-2 억제제 (수니티닙 및 악시티닙)로의 치료 8시간 후 (하부 패널), 16시간 후 (중앙 패널) 또는 72시간 후 (상부 패널)에 수집한 400 mm<sup>3</sup> MDA-MB-231 이종이식 종양에서의 유전자 발현의 qRT-PCR 분석. 값은 대조군 치료 평균 유전자 발현과 비교시의 VEGF/VEGFR-2 억제제에 의해 유도된 상대적 유전자 발현의 평균  $\log_2$  배수 변화를 나타낸다. 비-혈관 마커, 예컨대 E-cadherin 및 CD45는 이들 억제제에 반응하여 유의하게 변화하지 않았다. 하부 패널 (치료후 8시간)은 악시티닙 및 수니티닙이 이 특정한 시점에 명백한 활성을 갖지 않았기 때문에 단지 항-VEGF 치료만을 보여준다. 유전자 발현 데이터는 각각의 치료에 대한 8개의 생물학적 복제물의 평균을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 5a는 다중 VEGF 경로 억제제에 의한 지속적 proxVDV 하향조절을 보여주는 그래프이다. VEGF 및 VEGFR-2 억제제 (수니티닙 및 악시티닙)로의 치료 8, 16 또는 72시간 후에 수집한 MDA-MB-231 이종이식 종양에서의 유전자 발현의 분석. 값은 대조군 치료와 비교시의 VEGF/VEGFR-2 억제제에 의해 유도된 상대적 유전자 발현의  $\log_2$  배수 변화의 평균을 나타낸다. 유전자 발현 데이터는 각각의 치료에 대한 8개의 생물학적 복제물의  $\log_2$  평균을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 5b는 돼지풀 또는 항-VEGF mAb로 치료된 MDA-MB-231 이종이식 종양으로부터 분류된 내피 세포에서의 qRT-PCR에 의한 proxVDV 유전자 발현의 정량화를 보여주는 그래프이다. 값은 3개의 복제물의  $\log_2$  배수 변화의 평균을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 6은 새로이 FACS 단리된 종양-연관 내피 세포 (TAEC) 대 GFP-MDA-MB-231 종양 세포에서의 VDV 전사체의 생체외 농축 발현 분석에 의한 TAEC에서의 VDV 마커의 농축을 보여주는 그래프이다. TAEC 대 종양 세포에서의 상대적 유전자 발현을 선택된 유전자의 qRT-PCR에 의해 측정하였다. 시험된 모든 VDV 유전자는 TAEC에서 고도로 농축되었다 (25-200배). 대조적으로, Zeb1 mRNA 발현 (상피 마커)은 TAEC에서 감소되고, 종양 세포에서 농축되었다. 값은 TAEC를 종양 세포와 비교하였을 때의 상대적  $\log_2$  배수 유전자 농축의 평균을 나타낸다. TAEC 세포는 CD31 양성, CD45 음성 및 GFP 음성 세포로서 분류하였다. 종양 세포는 GFP 양성에 의해 분류하였다. 유전자 발현 데이터는 각각의 FACS 분류 실험에 대한 풀링된 6개의 종양의 평균을 나타낸다. qRT-PCR은 3별로 실행하였다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 7은 19명의 염증성 유방암 환자로부터의 생검 샘플에서의 유전자 발현의 변화 (치료후 대 치료전)를 보여주는 그래프이다. VDV 서명에서의 유전자 (적색 선)는 모든 유전자 (회색 히스토그램)에 대해 유의하게 감소되었다 (p=0.0275).

도 8a는 N016966 시험에서 입수 가능한 치료전 mRNA를 갖는 103명의 결장직장암 환자의 무진행 (상부) 및 전체 생존 (하부)을 보여주는 그래프 세트이다.

도 8b는 혈관신생 플루이드(Fluidigm) qRT-PCR 칩을 사용하여 22개의 VDV 유전자의 유전자 발현을 정량화하기 위한 실험 개관의 개략도이다.

도 8c는 결장암 샘플에서의 22개의 VDV 유전자의 발현 수준의 상관관계를 보여주는 그래프이다.

도 8d는 22-유전자 VDV 서명이 진행성 결장직장암을 앓고 있는 환자에 대한 베바시주맙 (bevacizumab) 치료의 효과를 계층화한다는 것을 보여주는 그래프 세트이다. XELOX (흑색) 또는 XELOX+베바시주맙으로 치료된 "VDV-고" (실선) 대 "VDV-저" 환자 (파선)의 무진행 (상부) 또는 전체 생존 (하부)을 나타내었다 (문헌 [Mullen et al. Cell. 147(3): 565-576, 2011]). 발현 수준에 의해 계층화된 PFS (상부) VDV 유전자 세트 효과 (상호작용 p=0.036), 및 발현 수준에 의해 계층화된 OS (하부) VDV 유전자 세트 효과 (상호작용 p=0.37).

도 9a는 보존용 임상 물질로부터 정보를 얻는데 이용된 전체 VDV 서명 "VDV" (x-축) 및 22-유전자 대표 하위 세트 "VDV-22" (y-축) 사이의 일치성을 검증하는 그래프 세트이다. 전이성 1차 시험 세팅 (N016966과 유사함)에 대해 자격을 얻을 환자로부터의 보존용 샘플을 사용하여 유병률 샘플 세트를 나타내었다. 보존용 샘플을 일루미나(Illumina) DASL 비드 어레이 상에서 전체 게놈 RNA 발현에 대해 평가하였다; NSCLC = 비소세

포 폐 암종, BR = 유방암, CRC = 결장직장 암종.

도 9b는 VEGF-A 발현 수준에 의한 N016966 환자의 계층화를 보여주는 그래프 세트이다 (PFS (상부), 상호작용 p=0.76 및 OS (하부), 상호작용 p=0.33).

도 9c는 CD31 발현 수준에 의한 N016966 환자의 계층화를 보여주는 그래프 세트이다 (PFS (상부) 상호작용 p=0.15 및 OS (하부), 상호작용 p=0.99).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0019] I. 서론

본 발명은 VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체로의 치료에 대해 감수성이거나 또는 반응성인 환자를 모니터링 및/또는 확인하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 VEGF 길항제 (예컨대, 항-VEGF 항체)로의 치료 전에 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들)의 발현 수준을 결정하는 것이 VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체에 대해 감수성이거나 또는 반응성인 환자를 확인하는데 유용하다는 발견에 기반한다. 임의로, 이어서 VEGF 길항제 요법이 환자에 대해 선택될 수 있고, 추가로, VEGF 길항제 요법이 임의로 환자에게 투여될 수 있다.

#### [0021] II. 정의

용어 "바이오마커" 및 "마커"는 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물 또는 당지질-기반 분자 마커를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 대상체 또는 환자의 샘플에서의 그의 발현 또는 존재는 표준 방법 (또는 본원에 개시된 방법)에 의해 검출될 수 있고, VEGF 길항제에 대한 포유동물 대상체의 반응성 또는 감수성을 모니터링하는데 유용하다. 이러한 바이오마커는 표 1 및 2에 제시된 유전자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 바이오마커의 발현은 VEGF 길항제에 대해 감수성이거나 또는 반응성인 환자로부터 수득한 샘플에서 참조 수준 (예를 들어, VEGF 길항제에 대한 반응성에 대해 시험되는 환자의 군/집단으로부터의 샘플에서의 바이오마커의 중앙 발현 수준; 사전에 개체로부터 미리 수득한 샘플에서의 수준; 또는 원발성 종양 세팅에서 VEGF 길항제 (예컨대, 항-VEGF 항체)로의 선행 치료를 받았고, 현재 전이를 경험하고 있을 수 있는 환자로부터의 샘플에서의 수준 포함)보다 높거나 또는 낮은 것으로 결정될 수 있다. 적어도 하나의 유전자, 예컨대 표 1 및 2에 제시된 것들의 참조 발현 수준보다 높거나 낮은 발현 수준을 갖는 개체는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 대상체/환자로 확인될 수 있다. 예를 들어, 참조 수준 (예컨대, 중앙 수준, 상기 언급됨)에 대해 최대 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 차이나는 (즉, 더 높거나 낮은) 유전자 발현 수준을 나타내는 이러한 대상체/환자는 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료에 반응할 가능성이 있는 대상체/환자로 확인될 수 있다.

용어 "샘플" 및 "생물학적 샘플"은 체액, 신체 조직 (예를 들어, 종양 조직), 세포 또는 다른 공급원을 비롯한 개체로부터 수득한 임의의 생물학적 샘플을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 체액은 예를 들어 림프, 혈청, 신선한 전혈, 말초혈 단핵 세포, 동결된 전혈, 혈장 (예를 들어, 신선하거나 동결된 것), 소변, 타액, 정액, 활액 및 척수액이다. 샘플은 또한 유방 조직, 신장 조직, 결장 조직, 뇌 조직, 근육 조직, 활막 조직, 피부, 모낭, 골수 및 종양 조직을 포함한다. 포유동물로부터 조직 생검 및 체액을 얻기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.

VEGF 길항제로의 치료에 대한 환자의 "유효 반응" 또는 그에 대한 환자의 "반응성" 또는 "감수성"은 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료로부터 또는 그의 결과로서 혈관신생 장애의 위험이 있거나 혈관신생 장애를 앓고 있는 환자에게 부여된 임상적 또는 치료 이익을 나타낸다. 이러한 이익은 길항제 치료로부터 또는 그러한 치료의 결과로서의 세포적 또는 생물학적 반응, 완전 반응, 부분 반응, 안정적 질환 (진행 또는 재발이 없음), 또는 환자의 후기 재발이 있는 반응을 포함한다. 예를 들어, 유효 반응은 표 1 또는 2에 제시된 하나 이상의 바이오마커를 발현하지 않는 환자와 비교하여 상기 하나 이상의 바이오마커를 발현하는 것으로 진단된 환자에서 감소된 종양 크기 또는 무진행 생존일 수 있다. 유전자 바이오마커(들)의 발현은 이러한 유효 반응을 효과적으로 예측하거나 또는 높은 감수성으로 예측한다.

본원에 사용된 "길항제"는 그가 결합하는 분자의 생물학적 활성을 억제하거나 또는 감소시키는 화합물 또는 작용제를 지칭한다. 길항제는 VEGF에 결합하고, 임의로는 또 다른 분자에 접합되거나 융합된 항체, 합성 또는 천연 서열 웹티드, 이뮤노어드헤신 및 소분자 길항제를 포함한다. "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그

가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 또는 감소시키는 항체이다.

[0026] 본원에 사용된 "효능제 항체"는 관심 폴리펩티드의 기능적 활성 중 하나 이상을 부분적으로 또는 전부 모방하는 항체이다.

[0027] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.

[0028] "단리된" 항체는 그의 자연 환경의 성분으로부터 확인되고 분리 및/또는 회수된 것이다. 이것의 천연 환경의 오염물 성분은 항체의 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 이는 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 (1) 예를 들어 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 95 중량% 초과의 항체로, 일부 실시양태에서는 99 중량% 초과로, (2) 예를 들어 스피닝 컵 서열분석기를 이용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들어 쿠마시 블루 또는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제하였다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0029] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 공유 디슬피드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디슬피드 연결의 수는 상이한 이谬노글로불린 이소형의 중쇄마다 달라진다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 일정하게 이격된 쇄내 디슬피드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 ( $V_H$ )을 갖고, 그 뒤에는 수많은 불변 도메인이 존재한다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 ( $V_L$ )을, 다른쪽 말단에 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0030] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 도메인은 "VH"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "VL"로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적인 부분이고, 항원-결합 부위를 함유한다.

[0031] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에서 광범위하게 상이하며, 각각의 특정한 항체의 그의 특정한 항원에 대한 결합 및 특이성에 이용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성이 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이것은 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초가변 영역 (HVR)이라 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 주로 베타-시트 배위를 채택하여 3개의 HVR에 의해 연결되어 있는 4개의 FR 영역을 포함하며, 이는 베타-시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 상기 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 쇄에서의 HVR들은 FR 영역에 의해 함께 근접하게 위치되어 있고, 다른 쇄로부터의 HVR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데는 직접 관여하지 않지만, 항체의 존성 세포 독성에서의 항체 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0032] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (이谬노글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여, 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )로 불리는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.

[0033] 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (이谬노글로불린)는 상이한 부류로 지정될 수 있다. 5종의 주요 부류의 이谬노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> 및 IgA<sub>2</sub>로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 이谬노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 불린다. 상이한 부류의 이谬노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배위는 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000)]에 개괄적으로 기재되어 있다. 항체는 항체와 하나 이상의 다른 단백질 또는 웨პ티드의 공유 또는 비-공유 결합에 의해 형성되는, 더 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0034] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는, 아래에 정의된 항체 단편이 아닌, 실질적으로 무손상 형

태인 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0035] 본원의 목적상 "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체이다.

[0036] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 그의 항원-결합 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0037] 항체를 파파인으로 소화시키면, "Fab" 단편으로 불리는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편이 생성되며, 이러한 명칭은 그의 용이하게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성한다.

[0038] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소의 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 2-쇄 Fv 종은 단단히 비-공유 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인 이량체로 이루어진다. 단일-쇄 Fv (scFv) 종에서는, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인이 유연한 펩티드 링커에 의해 공유 연결되어 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서의 구조와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있다. 이러한 배위에서, 각 가변 도메인의 3개의 HVR은 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면의 항원 결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 HVR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0039] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체-힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0040] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇄에 존재하는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 VH 도메인 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv를 검토하기 위해서는, 예를 들어 문헌 [Pluckthuen, in The Pharmacology of Mono-clonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York: 1994), pp 269-315]을 참조한다.

[0041] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭하는데, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 (VH-VL) 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 즉 상기 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 개별 항체들의 혼합물이 아닌 것으로서의 항체의 특징을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서 표적 결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열을 선택하는 것을 포함하는 과정에 의해 수득하였다. 예를 들어, 선택 과정은 다수의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 독특한 클론을 선택하는 것일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열을 추가로 변경시켜서, 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고 표적 결합 서열을 인간화하고 세포 배양물 중에서의 그의 생산을 개선시키며 생체내 그의 면역원성을 감소시키고 다중특이적 항체를 생성하는 것 등을 할 수 있으며, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체 또한 본 별명의 모노클로날 항체라는 것을 이해해야 한다. 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각 모노클로날 항체는 항원

상의 단일결정기에 대해 지시된다. 모노클로날 항체 제제는 그의 특이성 이외에도, 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다.

[0043] 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생산이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. 1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *PNAS USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자좌 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., *PNAS USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 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 Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0044] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정한 종으로부터 유래되거나 또는 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 이와 상동성이지만, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또는 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 이와 상동성이 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 및 문헌 [Morrison et al., *PNAS USA* 81:6851-6855 (1984)]). 키메라 항체는, 항체의 항원-결합 영역이, 예를 들어 마카크 원숭이를 관심 항원으로 면역화시켜 생산된 항체로부터 유래된 것인 프리마티즈드(PRIMATIZED)® 항체를 포함한다.

[0045] 비-인간 (예를 들어, 뮤란) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 HVR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 예를 들어 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)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다.

[0046] "인간 항체"는 인간에 의해 생산된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체의 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 배제된다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브리리를 비롯한 다양한 당업계에 공지된 기술을 이용하여 생산할 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한, 문헌 [Dijk and

van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는 항원 시험접종에 반응하여 이러한 항체를 생산하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스에 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 예를 들어 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체에 관해서는 문헌 [Li et al., PNAS USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열 내에서 초가변적이고/거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체-가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중에서 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체에 정밀한 특이성을 부여하는데 특유의 역할을 수행한다고 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al. Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재 하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993) 및 Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0048] 다수의 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트(Kabat) 상보성 결정 영역 (CDR)인 HVR은 서열 가변성에 기반하여 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 지칭한다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체-모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기반한다. 각각의 이러한 HVR로부터의 잔기는 하기 언급된다.

| 루프 | 카바트      | AbM      | 코티아      | 접촉                 |
|----|----------|----------|----------|--------------------|
| L1 | L24-L34  | L24-L34  | L26-L32  | L30-L36            |
| L2 | L50-L56  | L50-L56  | L50-L52  | L46-L55            |
| L3 | L89-L97  | L89-L97  | L91-L96  | L89-L96            |
| H1 | H31-H35B | H26-H35B | H26-H32  | H30-H35B (카바트 넘버링) |
| H1 | H31-H35  | H26-H35  | H26-H32  | H30-H35 (코티아 넘버링)  |
| H2 | H50-H65  | H50-H58  | H53-H55  | H47-H58            |
| H3 | H95-H102 | H95-H102 | H96-H101 | H93-H101           |

[0049]

[0050] HVR은 하기와 같이 "연장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변-도메인 잔기는 각각의 이러한 연장된-HVR 정의에 대해 상기 문헌 [Kabat et al.]에 따라 넘버링된다.

[0051] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 HVR 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다.

[0052] 표현 "카바트에서와 같은 가변-도메인 잔기-넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산-위치 넘버링", 및 그의 변형은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서의 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대해, 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬하여 결정할 수 있다.

[0053] "친화도-성숙" 항체는 변경(들)을 보유하지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 발생시키는, 그의 하나 이상의 HVR에서의 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 친화도-성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도-성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 생산된다. 예를 들어, 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH- 및 VL-도메인 셀플링에 의한 친화도 성숙을 기재한다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은, 예를 들어 문헌 [Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9

(1995); 및 Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0054] "성장-억제" 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지하거나 감소시키는 항체이다.

[0055] "아폽토시스를 유도하는" 항체는 표준 아폽토시스 검정, 예컨대 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 세포질 세망의 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막 소포 (아폽토시스체로 불림)의 형성에 의해 결정되는 프로그램화된 세포 사멸을 유도하는 항체이다.

[0056] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연-서열 Fc 영역 또는 아미노산-서열-변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체-의존 성 세포독성 (CDC); Fc-수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포-표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체)의 하향조절, 및 B-세포 활성화를 포함한다.

[0057] 본원의 용어 "Fc 영역"은 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226 또는 Pro230의 아미노산 잔기로부터 이것의 카르복실-말단까지의 스트레치인 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 생산 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.

[0058] 본원에서 달리 나타내지 않는 한, 이뮤노글로불린 중쇄 내 잔기의 넘버링은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다. "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0059] "기능적 Fc 영역"은 천연-서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc-수용체 결합; ADCC; 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체; BCR)의 하향조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체-가변 도메인)과 결합하는 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원의 정의에서 개시된 바와 같은 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다.

[0060] "천연-서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연-서열 인간 Fc 영역은 천연-서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연-서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연-서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연-서열 인간 IgG4 Fc 영역, 뿐만 아니라 이들의 자연 발생 변이체를 포함한다.

[0061] "변이체 Fc 영역"은 적어도 1개의 아미노산 변형, 바람직하게는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 통해 천연-서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 1개 이상의 아미노산 치환을 갖고, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 바람직하게는 적어도 약 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 이것과 적어도 약 90%의 상동성, 보다 바람직하게는 이것과 적어도 약 95%의 상동성을 가질 것이다.

[0062] 용어 "Fc-영역-포함 항체"는 Fc 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 정제 동안 또는 항체를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 항체를 포함하는 조성물은 K447을 갖는 항체, 모든 K447이 제거된 항체, 또는 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0063] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연-인간 FcR이다. 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체를 포함하며, 이들은 이를 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc $\gamma$ RII 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (예를 들어, 문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은, 예를 들어 문헌 [Ravetch and Kinet,

Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 추후에 확인될 것들을 비롯한 다른 FcR이 본원에서의 용어 "FcR"에 포함된다.

[0064] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG에서 태아로의 전달 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]) 및 이뮤노글로불린의 항상성 조절을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward, Immunology Today, 18 (12):592-8 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15 (7):637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem., 279(8):6213-6 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조).

[0065] 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 인간 FcRn에 대한 생체내 결합 및 혈청 반감기는, 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서 또는 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 투여한 영장류에서 검정할 수 있다. WO 2000/42072 (Presta)는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체를 기재하고 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다.

[0066] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 특정 실시양태에서, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 천연-킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0067] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어 NK 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR) 상에 결합된 분비된 Ig가, 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 세포독소로 표적 세포를 사멸시킬 수 있도록 하는 세포독성의 한 형태를 나타낸다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337 또는 미국 특허 번호 6,737,056 (Presta)에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 PBMC 및 NK 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성을 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0068] "보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전형적 보체 경로의 활성화는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합되어 있는 (적절한 하위부류의) 항체에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 변이체 (변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드) 및 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.

[0069] "결합 친화도"는 일반적으로, 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 전체 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것들을 비롯하여 당업계에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 서서히 결합하고 용이하게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 신속하게 결합하고 보다 길게 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이들 중 임의의 방법이 이용될 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 예시적 및 대표적 실시양태를 하기 기재한다.

[0070] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 하기 검정에 기재되는 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원-결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액-결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 ( $^{125}$ I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터

플레이트 (디넥스 테크놀로지스, 인크.(DYNEX Technologies, Inc.))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5  $\mu$  g/mL의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후에 PBS 중 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2시간 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단한다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [ $^{125}$ I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중 0.1% 트윈(TWEEN)-20™ 계면활성제로 8회 세척한다. 플레이트가 건조되면, 150  $\mu$  l/웰의 섬광제 (마이크로신트(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드)에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다.

[0071]

또 다른 실시양태에 따라, Kd 또는 Kd 값은 25°C에서 ~10 반응 단위 (RU)의 고정화된 항원 CM5 칩으로 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 기기 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)를 사용한 표면-플라즈몬 공명 검정으로 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5  $\mu$ g/mL (약 0.2  $\mu$ M)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5  $\mu$ l/분의 유속으로 주입한다. 항원의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응 기를 차단한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25  $\mu$ l/분의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20™ 계면활성제를 함유하는 PBS (PBST) 중에 주입한다. 간단한 일-대-일 랜덤 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합률 ( $k_{on}$ ) 및 해리율 ( $k_{off}$ )을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는  $k_{off}/k_{on}$ 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면-플라즈몬 공명 검정에 의한 온-레이트(on-rate)가  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우, 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(AMINCO)™ 분광광도계 (씨모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0072]

본 발명에 따른 "온-레이트", "회합의 비율", "회합률" 또는 " $k_{on}$ "은 또한 비아코어®-2000 또는 비아코어®-3000 시스템 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 결정할 수 있다.

[0073]

본원에 사용된 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 2개의 수치값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주하도록 하는 상기 2개의 값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 연관되고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관됨) 사이의 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 값의 합수로서, 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만 및/또는 약 10% 미만이다.

[0074]

본원에 사용된 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 2개의 수치값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주하도록 하는 상기 2개의 값 (일반적으로 하나는 분자와 연관되고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 연관됨) 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 분자에 대한 값의 합수로서, 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과 및/또는 약 50% 초과이다.

[0075]

특정 실시양태에서, 본원에서 유용한 인간화 항체는 IgG Fc에 아미노산 변경을 추가로 포함하고, 야생형 IgG Fc를 갖는 항체에 비해 인간 FcRn에 대해 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 보다 바람직하게는 적어도 100배, 바람직하게는 적어도 125배, 보다 더 바람직하게는 적어도 150배 내지 약 170배 만큼 증가된 결합 친화도를 나타낸다.

[0076]

"장애" 또는 "질환"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법으로의 치료로부터 이익을 얻을 임의의 상태이다. 이는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 해당 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 상태 포함)을 포함한다. 본원

에서 치료할 장애의 비제한적 예는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프성 악성 종양; 뉴런, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선상, 대식세포, 상피, 기질 및 포배강 장애; 및 염증성, 면역학적 및 다른 혈관신생장애를 포함한다.

[0077] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 혈관신생이다.

[0078] 본원에 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성이든 또는 양성이든), 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 언급될 때 상호 배타적이지 않다.

[0079] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 증식을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평 세포 암, 폐암 (소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종 포함), 복막암, 간세포성 암, 위암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 각종 유형의 두경부암, 및 B-세포 림프종 (저등급/여포성 비호지킨 림프종 (NHL); 소림프구성 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 소형 비-분할 세포 NHL; 거대 종양 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 포함); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 림프모구성 백혈병; 및 이식 후 림프구증식성 장애 (PTLD) 및 모반증과 관련된 비정상적인 혈관 증식, 부종 (예컨대, 뇌 종양과 관련된 부종), 및 메이그스 증후군을 포함한다.

[0080] 용어 "항신생물성 조성물" 또는 "항암 조성물" 또는 "항암제"는 하나 이상의 활성 치료제, 예를 들어 "항암제"를 포함하는, 암을 치료하는데 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제 (항암제)의 예는, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용된 작용제, 항혈관신생제, 아폽토시스제, 항튜불린제, 및 암을 치료하기 위한 기타 작용제, 예를 들어 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바(Tarceva)<sup>TM</sup>)), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡(Gleevec)<sup>TM</sup> (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토카인, 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA VEGF 또는 VEGF 수용체(들), TRAIL/ Apo2, 및 기타 생물활성 및 유기 화학적 작용제 등 중의 하나 이상과 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 그의 조합이 또한 본 발명에 포함된다.

[0081] "혈관신생 인자 또는 혈관신생제"는 혈관 발생을 자극하는, 예를 들어 혈관신생, 내피 세포 성장, 혈관 안정성, 및/또는 혈관생성 등을 증진시키는 성장 인자이다. 예를 들어, 혈관신생 인자는 VEGF 및 VEGF 부류 구성원, PIGF, PDGF 부류, 섬유아세포 성장 인자 부류 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴(Angiopoietin)), 에프린, Del-1, 섬유아세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), 폴리스타틴, 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자 (HGF)/스캐터 인자 (SF), 인터루킨-8 (IL-8), 렙틴, 미드카인, 태반 성장 인자, 혈소판 유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)/혈관 침투성 인자 (VPF) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이는 또한 상처 치유를 가속화하는 인자, 예컨대 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 표피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 그의 패밀리의 구성원, 및 TGF-알파 및 TGF-베타를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (예를 들어, 공지된 혈관신생 인자를 열거한 표 1); 및 Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)]을 참조한다.

[0082] 본원에 사용된 용어 "VEGF"는 문헌 [Leung et al., Science, 246:1306 (1989), 및 Houck et al., Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)]에 기재된 바와 같은 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 189- 및 206- 아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자와 함께, 그의 자연 발생 대립유전자 형태 및 프로세싱된 형태를 지칭한다. 용어 "VEGF"는 또한, 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 지칭한다. 때때로, 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF의 경우에는 hVEGF, 뮤린 VEGF의 경우에는 mVEGF 등

과 같은 용어로 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단된 형태를 지칭하는데 사용된다. 임의의 이러한 형태의 VEGF에 대한 참고는 본원에서, 예를 들어 "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF<sub>165</sub>"에 의해 확인할 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 VEGF와 대등한 결합 친화도를 갖는다. 바람직한 실시양태에 따르면, VEGF는 인간 VEGF이다.

[0083] "VEGF 길항제"는 VEGF 활성 (VEGF 또는 하나 이상의 VEGF 수용체 또는 이를 코딩하는 핵산과의 결합성 포함)을 중화, 차단, 억제, 폐기, 감소 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. 바람직하게는, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체에 결합한다. VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF 및 VEGF 수용체에 결합하고 리간드-수용체 상호작용을 차단하는 폴리펩티드 (예를 들어, 이뮤노어드헤신, 웹티바디), 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예컨대 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제, VEGF에 결합하는 암타머, 및 엄격한 조건 하에 VEGF 또는 VEGF 수용체를 코딩하는 핵산 서열과 혼성화하는 핵산 (예를 들어, RNAi)을 포함한다. 한 바람직한 실시양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF에 결합하고, 시험관 내에서 VEGF-유도된 내피 세포 증식을 억제한다. 한 바람직한 실시양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 비-VEGF 또는 비-VEGF 수용체보다 큰 친화도로 결합한다. 한 바람직한 실시양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 1uM 내지 1pM의 Kd로 결합한다. 또 다른 바람직한 실시양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 500nM 내지 1pM로 결합한다.

[0084] 바람직한 실시양태에 따르면, VEGF 길항제는 폴리펩티드, 예컨대 항체, 웹티바디, 이뮤노어드헤신, 소분자 또는 암타머로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 항-VEGF 항체, 예를 들어 아바스틴(AVASTIN)® 항체 또는 항-VEGF 수용체 항체, 예를 들어 항-VEGFR2 또는 항-VEGFR3 항체이다. VEGF 길항제의 다른 예는 VEGF-트랩, 뮤카젠(Mucagen), PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (소라페닙), ZD-6474, CP632, CP-547632, AZD-2171, CDP-171, SU-14813, CHIR-258, AEE-788, SB786034, BAY579352, CDP-791, EG-3306, GW-786034, RWJ-417975/CT6758 및 KRN-633을 포함한다.

[0085] "항-VEGF 항체"는 VEGF와 충분한 친화도 및 특이성으로 결합하는 항체이다. 바람직하게는, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 방해하는 치료제로 사용될 수 있다. 항-VEGF 항체는 통상적으로 다른 VEGF 상동체, 예컨대 VEGF-B 또는 VEGF-C에도 결합하지 않을 것이고, 다른 성장 인자, 예컨대 P1GF, PDGF 또는 bFGF에도 결합하지 않을 것이다. 바람직한 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생성되는 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 애피토프에 결합하는 모노클로날 항체이다. 보다 바람직하게는, 항-VEGF 항체는 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체인데, 이는 베바시주맙 (BV; 아바스틴®)으로서 공지된 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 실시양태에 따르면, 사용될 수 있는 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359에 개시된 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359의 도 24, 25, 26, 27 및 29에 개시된 항체 중 어느 하나의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 포함한다 (예를 들어, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 및 B20.4.1). 또 다른 바람직한 실시양태에서, 라니비주맙으로 공지된 항-VEGF 항체는 안구 질환, 예컨대 당뇨병성 신경병증 및 AMD에 대해 투여되는 VEGF 길항제이다.

[0086] "rhuMAb VEGF" 또는 "아바스틴®"으로도 또한 공지된 항-VEGF 항체 "베바시주맙 (BV)"은 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다. 이것은 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF의 그의 수용체에 대한 결합을 차단하는 뮤린 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성-결정 영역을 포함한다. 대다수의 프레임워크 영역을 포함하는 베바시주맙의 아미노산 서열의 대략 93%는 인간 IgG1로부터 유래되고, 서열의 약 7%는 뮤린 항체 A4.6.1로부터 유래된다. 베바시주맙은 분자량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 기타 항-VEGF 항체는 미국 특허 번호 6884879 및 WO 2005/044853에 기재된 항체를 포함한다.

[0087] 항-VEGF 항체 라니비주맙 또는 루센티스(LUCENTIS)® 항체 또는 rhuFab V2는 인간화, 친화도-성숙 항-인간 VEGF Fab 단편이다. 라니비주맙은 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli) 박테리아 발효에 있어서의 표준 재조합 기술 방법에 의해 생성된다. 라니비주맙은 글리코실화되지 않고 ~48,000 달톤의 분자량을 갖는다. WO98/45331 및 US20030190317을 참조한다.

[0088]

혈관신생의 조절이상, 즉 병든 상태에서 과도한, 불충분한, 또는 달리 부적절한 새로운 혈관의 성장 (예를 들어, 혈관신생의 위치, 시기 또는 개시가 의학적 관점에서 바람직하지 않음)은 비정상적인 혈관신생으로 이어질 수 있거나, 또는 혈관신생의 조절이상은 비정상적인 혈관신생으로 이어져 병든 상태, 즉 혈관신생 장애를 유발할 수 있다. 과도한, 부적절한 또는 제어되지 않은 혈관신생은 병든 상태를 유발시키거나 병든 상태를 악화시키는데 일조하는 새로운 혈관 성장이 있는 경우에 일어난다. 새로운 혈관은 병든 조직에 양분을 공급하고, 정상 조직을 파괴하고, 암의 경우, 새로운 혈관은 종양 세포가 순환계로 벗어나서 다른 기관에 머무르게 할 수 있다 (종양 전이). 비정상적인 혈관신생과 관련된 질환 상태 (즉, 혈관신생 장애)는 비-신생물성 및 신생물성 상태 둘 모두, 예컨대 암, 특히 혈관성 고형 종양 및 전이성 종양 (결장암, 유방암, 폐암 (특히, 소세포 폐암), 뇌암 (특히 교모세포종) 또는 전립선암 포함), 바람직하지 못하거나 이상한 비대증, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 염증성 장 질환 또는 IBD (크론병 및 케양성 결장염), 건선, 판상 건선, 사르코이드증, 아테롬성동맥경화증, 아테롬성동맥경화판, 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 예를 들어 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증, 신생혈관성 녹내장, 연령 관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관형성, 각막 이식 신생혈관증식, 각막 이식편 거부, 망막/흉모막 신생혈관형성, 전방각 신생혈관형성 (피부홍조), 안구 신생혈관 질환, 혈관 재협착, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 증식증 (그레이브스병 포함), 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 빨작/폐쇄성 두부 손상/외상과 관련된 부종), 활막 염증, 골화성 근염, 비후성 골 형성, 골관절염 (OA), 난치성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 제3 유체 공간형성 질환 (췌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 근종, 조기 분만, 만성 염증, 예컨대 IBD, 신장 동종이식편 거부, 염증성 장 질환, 신증후군, 바람직하지 못하거나 이상한 조직 덩어리 성장 (비-암), 혈우병성 관절, 비후성 반흔, 모발 성장 억제, 오슬러-웨버(Osler-Weber) 증후군, 화농성 육아종, 수정체후 섬유증식증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 활막염, 피부염, 전자간증, 복수, 심낭 삼출 (예컨대 심막염과 관련된 삼출), 및 흉막 삼출을 포함한다.

[0089]

본원에 사용된 "치료"는 치료될 개체 또는 세포의 자연적인 경과를 변경하려는 시도에서의 임상적 개입을 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리상태의 과정 도중에 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발병을 지연시키기 위해 사용된다.

[0090]

"유효량"은 목적하는 치료 또는 예방 결과 달성을 위하여 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 유효한 양을 지칭한다.

[0091]

본 발명의 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 "치료 유효량"은 인자, 예컨대 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 도출하는 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 능력에 따라 달라질 수 있다. 또한 치료 유효량은 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 치료상 유익한 효과가 임의의 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 양이다. 용어 "치료 유효량"은 포유동물 (즉, 환자)에서 질병 또는 질환의 "치료"에 유효한 본 발명의 항체, 폴리펩티드 또는 길항제의 양을 지칭한다. 암의 경우, 약물의 치료 유효량은 암 세포 수를 감소시키고/거나; 종양 크기 또는 중량을 감소시키고/거나; 암 세포가 말초 기관 내로 침윤되는 것을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지)시키고/거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지)시키고/거나; 종양 성장을 어느 정도 억제하고/거나; 암과 관련된 한 가지 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 약물이 암세포 성장을 억제하고/거나 존재하는 암세포를 사멸시킬 정도로, 상기 약물은 세포증식 억제성 및/또는 세포독성을 일 수 있다. 한 실시양태에서, 치료 유효량은 성장 억제량이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 유효량은 환자의 생존을 연장시키는 양이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 유효량은 환자의 무진행 생존을 개선시켜 주는 양이다.

[0092]

"예방 유효량"은 목적하는 예방 결과 달성을 위하여 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 반드시 그런 것은 아니지만 전형적으로, 예방적 용량은 질환이 발생하기에 앞서 또는 질병의 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적다.

[0093]

본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방해하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ , 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜랄란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제, 효소 및 그의 단편, 예컨대 핵산분해 효소, 항생제, 및 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물

또는 동물 기원의 효소 활성 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함), 및 하기 개시되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하도록 의도된다. 다른 세포독성제는 하기 기재되어 있다. 종양사멸제는 종양 세포의 파괴를 유발한다.

[0094]

"화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)® 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 멜타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCAMTIN)®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 폐메트렉세드; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; TLK-286; CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 폐네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 디네미신, 예컨대 디네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 콕티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로페오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 웬티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 폐나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠 (JHS Natural Products), 오리건주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아준산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오태파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스큅 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 아브락산(ABRAXANE)™ 크레모포르-무함유 (아메리칸 파마슈티칼 파트너즈(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤큘버그), 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀 (롱-프랑 로리(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로란부실; 켐시타빈 (�자르(GEMZAR)®); 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빙크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르나틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®); 임의의 상기한 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)에 의한 치료 요법에 대한 약

어 FOLFOX를 포함한다. 부가적인 화학요법제는 항체 약물 접합체로서 유용한 세포독성제, 예컨대 메이탄시노이드 (예를 들어, DM1) 및 아우리스타틴, 예를 들어 MMAE 및 MMAF를 포함한다.

[0095] "화학요법제"는 또한 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절하거나, 감소시키거나, 차단하거나 또는 억제하도록 작용하는 "항호르몬제"를 포함하며, 종종 전신성, 또는 전신 치료제의 형태로 존재한다. 이들은 그 자체가 호르몬일 수 있다. 예는 항에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어, 놀바덱스(NOLVADEX)® 타목시펜), 에비스타(EVISTA)® 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)® 토레미펜; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향조절제 (ERD); 난소를 저해하거나 또는 그의 기능을 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체화 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 루프론(LUPRON)® 및 엘리가드 (ELIGARD)® 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 다른 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 널루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세 (MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르 (RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 래트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸을 포함한다. 또한, 화학요법제의 이러한 정의는 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 디드로칼(DIDROCAL)® 에티드로네이트, NE-58095, 조메타(ZOMETTA)® 콜레드론산 /콜레드로네이트, 포사막스(FOSAMAX)® 알렌드로네이트, 아레디아(AREDIA)® 파미드로네이트, 스켈리드 (SKELID)® 텔루드로네이트 또는 악토넬(ACTONEL)® 리세드로네이트; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 연루된 신호전달 경로 중의 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신 및 백시드(VAXID)® 백신; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소마라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 라파티닙 디토실레이트 (GW572016으로도 또한 공지되어 있는, ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기한 것들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0096] 본원에 사용된 경우의 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포 (예를 들어, Robo4를 발현하는 세포)의 성장 및/또는 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 Robo4-발현성 세포 비율을 상당히 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에서) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 통상적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소마라제 II 억제제, 예컨대 안트라시클린 항생제 독소루비신 ((8S-시스)-10-[3-(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- $\alpha$ -L-리소-헥사파라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라하이드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온), 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블래오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S-기 정지로까지 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목으로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테레®, 롱-프랑 로러)은 파클리탁셀 (탁솔®, 브리스톨-마이어스 스큅)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합으로써 미세관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 유발한다.

[0097] 본원에 사용된 용어 "환자"는 치료가 요망되는 모든 단일 동물, 보다 바람직하게는 포유동물 (비-인간 동물, 예를 들어 개, 고양이, 말, 토끼, 동물원 동물, 소, 돼지, 양 및 비-인간 영장류 포함)을 지칭한다. 가장 바람직하게는, 본원의 환자는 인간이다.

[0098] 본원의 "대상체"는 혈관신생 장애의 하나 이상의 징후, 증상 또는 다른 지표를 경험하고 있거나 또는 경험한 적이 있는, 치료에 대해 적격인 환자를 비롯한 임의의 단일 인간 대상체이다. 대상체는 질환의 임의의 임상적 징후를 나타내지 않는 임상 연구 시험에 포함된 임의의 대상체, 역학적 연구에 포함된 대상체, 또는 대조군으로 이용된 대상체를 포함한다. 대상체는 이전에 VEGF 길항제로 치료된 적이 있을 수 있거나 또는 그렇게 치료되지 않았을 수 있다. 대상체는 본원의 치료를 시작할 때 사용할 제2 의약에 대해 나이브(naive)할 수 있는데, 즉 대상체는 "기준선" (즉, 본원의 치료 방법에서 제1 용량의 길항제를 투여하기 전의 설정 시점, 예

컨대 치료 시작 전에 대상체를 스크리닝하는 날)에서, 예를 들어 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포 독성제로 이전에 치료된 적이 없을 수 있다. 이러한 "나이브"한 대상체가 일반적으로, 이러한 제2 의약으로의 치료에 대한 후보인 것으로 고려된다.

[0099] 표현 "유효량"은 혈관신생 장애를 치료하는데 유효한 의약의 양을 지칭한다.

[0100] 용어 "제약 제제"는 의약의 생물학적 활성이 유효하게 할 수 있는 형태로 존재하고, 해당 제제가 투여되는 대상체에 대해 허용가능하지 않게 독성인 추가의 성분을 전혀 함유하지 않은 멸균 제제를 지칭한다.

[0101] "멸균" 제제는 무균이거나 또는 모든 살아있는 미생물 및 그의 포자가 없다.

[0102] "포장 삽입물"은, 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기, 포장된 제품과 조합되는 다른 치료 제품, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 관한 경고 등에 관한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업용 패키지에 관례상 포함되는 지침서를 지칭하기 위해 사용된다.

[0103] "키트"는 적어도 하나의 시약, 예를 들어 혈관신생 장애를 치료하기 위한 의약 또는 본 발명의 바이오마커 유전자 또는 단백질을 특이적으로 검출하기 위한 프로브를 포함하는 임의의 제조품 (예를 들어, 패키지 또는 용기)이다. 제조품은 바람직하게는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 유닛으로 프로모션되거나, 유통되거나 또는 판매된다.

[0104] 의약(들)에 대해 반응하지 않을 목적으로, 적어도 하나의 의약을 이용한 이전의 또는 최근의 치료로부터 "임상적으로 허용되지 않는 높은 수준의 독성"을 경험한 대상체는 경험이 풍부한 임상의에 의해 유의한 것으로 고려되는, 예를 들어 심각한 감염, 울혈성 심부전, 탈수초화 (다발성 경화증으로 이어짐), 심각한 과민증, 신경병리학적 사례, 고도의 자가면역, 암, 예컨대 자궁내막암, 비-호지킨 림프종, 유방암, 전립선암, 폐암, 난소암, 또는 흑색종, 결핵 (TB) 등과 같은 그와 관련된 하나 이상의 부정적 부작용 또는 유해 사례를 경험하게 된다.

[0105] "부정적 부작용의 위험 감소"는, 본원의 길항제 치료로 인한 부작용의 위험이 이전에 투여된 의약을 동일 환자 또는 또 다른 환자에게 처리하여 관찰되는 위험보다 낮은 정도로 감소된 것을 의미한다. 이러한 부작용은 독성에 관하여 상기한 것들을 포함하고, 바람직하게는 감염, 암, 심부전 또는 탈수초화이다.

[0106] "상호연관시키다" 또는 "상호연관시키는"은 임의의 방식으로 제1 분석 또는 프로토콜의 성과 및/또는 결과를 제2 분석 또는 프로토콜의 성과 및/또는 결과와 비교하는 것을 의미한다. 예를 들어, 제2 프로토콜의 수행시에 제1 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용할 수 있고/거나 제1 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용하여 제2 분석 또는 프로토콜을 수행해야 하는지의 여부를 결정할 수 있다. 본원에서의 다양한 실시양태와 관련하여, 분석 검정의 결과를 사용하여 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체를 사용한 특정 치료 요법이 수행되어야 하는지의 여부를 결정할 수 있다.

[0107] 본원에서 사용된 경우의 용어 "표지"는 시약, 예를 들어 핵산 프로브 또는 항체와 직접 또는 간접적으로 접합 또는 융합되고, 이와 접합 또는 융합되는 시약의 검출을 촉진시켜 주는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체가 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 기질 화합물 또는 조성물의 검출가능한 화학적 변경을 촉매할 수도 있다. 상기 용어는 검출가능한 물질을 상기 프로브 또는 항체와 커플링 (즉, 물리적 연결)시킴으로써 프로브 또는 항체를 직접 표지하는 것뿐만 아니라 직접 표지되는 또 다른 시약과의 반응성에 의해 프로브 또는 항체를 간접적으로 표지하는 것도 포함한다. 간접 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용하고 DNA 프로브를 비오틴으로 말단-표지하여 1차 항체가 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있게 하여 1차 항체를 검출하는 것을 포함한다.

[0108] 용어 "발현의 수준" 또는 "발현 수준"은 상호교환적으로 사용되고, 일반적으로 생물학적 샘플 중 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 생성물 또는 단백질의 양을 지칭한다. "발현"은 일반적으로 유전자-코딩 정보가, 세포 내에 존재하고 작동하는 구조로 전환되는 과정을 지칭한다. 따라서, 본 발명에 따르면, 유전자의 "발현"은 폴리뉴클레오티드로의 전사, 단백질로의 번역, 또는 심지어는 단백질의 번역후 변형을 지칭할 수 있다. 전사된 폴리뉴클레오티드, 번역된 단백질 또는 번역후 변형된 단백질의 단편은 또한 이들이 선택적 스플라이싱에 의해 생성된 전사체 또는 분해된 전사체로부터 유래하든지 또는 예를 들어 단백질분해에 의한 단백질의 번역후 프로세싱으로부터 유래하든지 발현되는 것으로 여겨질 것이다. "발현된 유전자"는 mRNA로서 폴리뉴클레오티드로 전사되고, 이어서 단백질로 번역되는 것, 또한 RNA로 전사되지만 단백질로 번역되지 않는 것 (예를 들어, 운반 및 리보솜 RNA)을 포함한다.

[0109] 본원에 사용된 용어 "공변량"은 환자에 관한 특정 변수 또는 정보를 지칭한다. 임상적 종점은 빈번하게 회귀

모델에서 고려되며, 여기서 종점은 종속 변수를 나타내고 바이오마커는 주요 또는 표적 독립 변수 (리그레서 (regressor))를 나타낸다. 임상 데이터 풀로부터의 추가의 변수가 고려된다면, 이들은 (임상적) 공변량으로 기재된다.

[0110] 용어 "임상적 공변량"은 본원에서, 일반적으로 기준선에서 이용가능한 환자에 대한 모든 임상 정보를 기재하기 위해 사용된다. 이러한 임상적 공변량은 성별, 연령 등과 같은 통계학적 정보, 기타 기억 정보, 수반되는 질환, 동시 요법, 신체 검사의 결과, 수득된 통상의 실험 파라미터, 혈관신생 장애의 공지된 특성, 임상적 질환 병기분류, 사전치료의 시기 및 결과, 질환 병력, 뿐만 아니라 치료에 대한 임상 반응과 관련이 있을 수 있는 모든 유사한 정보를 포함한다.

[0111] 본원에 사용된 용어 "원시 분석" 또는 "미조정 분석"은 고려되는 바이오마커 외에 어떠한 추가의 임상적 공변량도 독립 요인으로서 또는 계층화 공변량으로서 회귀 모델에 사용되지 않는 회귀 분석을 지칭한다.

[0112] 본원에 사용된 용어 "공변량에 의해 조정된"은 고려되는 바이오마커 외에 추가의 임상적 공변량이 독립 요인으로서 또는 계층화 공변량으로서 회귀 모델에 사용되는 회귀 분석을 지칭한다.

[0113] 본원에 사용된 용어 "단일변량"은 독립 변수로서 단지 하나의 표적 바이오마커만이 모델의 일부인 회귀 모델 또는 그래픽 접근법을 지칭한다. 이러한 단일변량 모델은 추가의 임상적 공변량과 함께 또는 이것 없이 고려될 수 있다.

[0114] 본원에 사용된 용어 "다변량"은 독립 변수로서 하나 초과의 표적 바이오마커가 모델의 일부인 회귀 모델 또는 그래픽 접근법을 지칭한다. 이러한 다변량 모델은 추가의 임상적 공변량과 함께 또는 이것 없이 고려될 수 있다.

### III. VEGF 길항제에 대해 반응성인 환자를 확인하는 방법

[0115] 본 발명은 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 요법에 대해 반응성일 가능성이 있는 환자를 확인 및/또는 모니터링하는 방법을 제공한다. 방법은 특히 환자에 대한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)의 투여가 효능 있을 가능성을 증가시키는데 유용하다. 방법은 환자로부터의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 유전적 바이오마커의 발현을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 하나 이상의 이러한 바이오마커의 발현은 환자가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대해 감수성이거나 또는 반응성일 것인지의 여부를 나타낸다. 보다 특히, 환자로부터의 샘플에서의 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23개의 유전자의 발현은 환자가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대해 반응성이거나 또는 감수성이거나 또는 반응성일 것인지의 여부를 모니터링하는데 유용하다. 방법은 임의로, 환자에 대한 투여를 위한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베마시주맙)의 선택을 추가로 포함할 수 있고, 임의로 환자에 대한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베마시주맙)의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0116] 개시된 방법 및 검정은 환자를 치료하기에 적절하거나 또는 효과적인 요법을 평가하는데 유용한 데이터 및 정보를 얻기 위한, 편리하고, 효율적이며 잠재적으로 비용-효과적인 수단을 제공한다. 예를 들어, 환자는 VEGF 길항제로의 치료 전에 조직 샘플 (예를 들어, 종양 생검 또는 혈액 샘플)을 제공할 수 있고, 샘플은 환자의 세포가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대해 감수성일지의 여부를 결정하기 위해 다양한 시험관내 검정에 의해 검사될 수 있다.

[0117] 본 발명은 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대한 환자의 감수성 또는 반응성을 모니터링하는 방법을 제공한다. 방법은 유전자 또는 단백질 발현을 검출하는 검정 (예컨대, PCR 및 효소 면역검정) 및 적절한 활성을 검출하는 생화학적 검정을 포함하는, 다양한 검정 포맷으로 수행될 수 있다. 샘플에서의 이러한 바이오마커의 발현 또는 존재의 결정은 샘플을 제공하는 환자가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체의 생물학적 효과에 대해 감수성일 것임을 예측한다. 본 발명은 환자로부터의 샘플에서의 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들)의 발현에서의 변화 (즉, 증가 또는 감소)가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대한 이러한 환자의 관찰된 치료 효능과 상호연관된다는 것이다. 실시예 1은 표 2의 유전자의 증가된 수준이 이러한 치료 효능과 상호연관됨을 보여주며, 따라서 다양한 실시양태에서 본원에 기재된 방법으로의 이러한 수준의 검출이 본 발명에 포함

된다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 표 1 또는 표 2의 유전자의 발현의 분석을 위한 시험 패널, 예를 들어 이들 유전자 또는 그의 하위세트 (예를 들어, 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들))에 특이적인 프로브를 포함하는 시험 패널을 포함한다. 이러한 시험 패널은, 예를 들어 이 분석에 사용하기 위한 마이크로칩 어레이 상의 프로브를 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명의 방법에 따르면, 특정한 개체 (예를 들어, 환자)가 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성은, 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 검출하고 유전자의 발현 수준을 참조 발현 수준과 비교함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 참조 발현 수준은 VEGF 길항제에 대한 반응성에 대해 시험되는 환자의 군/집단에서의 적어도 하나의 유전자의 중앙 발현 수준일 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조 발현 수준은 사전에 개체로부터 미리 수득한 샘플에서의 적어도 하나의 유전자의 발현 수준이다. 다른 실시양태에서, 개체는 원발성 종양 세팅에서 VEGF 길항제로의 선행 치료를 받은 환자이다. 일부 실시양태에서, 개체는 전이를 경험하고 있는 환자이다. 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 참조 발현 수준보다 높거나 낮은 발현 수준을 갖는 개체는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 대상체/환자로 확인된다. 중앙값에 대해 최대 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 차이나는 (즉, 더 높거나 낮은) 유전자 발현 수준을 나타내는 대상체/환자는 VEGF 길항제로의 치료에 반응할 가능성이 있는 환자로 확인된다. 유전자 발현 수준은, 당업계에 공지되고 예를 들어 문헌 [Sokal R.R. and Rholf, F.J. (1995) "Biometry: the principles and practice of statistics in biological research," W.H. Freeman and Co. New York, NY]에 기재된 방법을 이용하여 표 1 또는 2에 제시된 유전자 중 적어도 하나 또는 표 1 또는 2에 제시된 유전자의 임의의 선형 조합 (예를 들어, 평균, 각종 평균 또는 중앙값)을 이용하여 결정될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 방법은 임의로, 환자에 대한 투여를 위한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 선택을 추가로 포함할 수 있고, 임의로 환자에 대한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0120] 상기 기재된 임의의 방법에서, 특정한 유전자 세트의 발현이 중심 평균에 대해 집합적으로 과다발현되거나 또는 저발현되는 정도에 관한 정량적 정보를 제공하는 VDV 서명 스코어 ( $VDV_i$ )를 계산할 수 있다. 예를 들어, 각각의 샘플  $i$ 에 대해 모든 VDV 유전자 (예를 들어, 표 1 또는 2 참조)를 분석하여  $VDV_i$ 를 계산할 수 있으며, 이는 분석된 VDV 유전자에 걸친 z-점수의 각종 평균을 나타내고, 하기 알고리즘에 의해 주어진다.

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

[0121] 여기서,  $Z_{g=1,i}$ ,  $Z_{g=2,i}$ , ...  $Z_{g=n,i}$ 는 샘플  $i$ 의 각각의 유전자 또는 바이오마커  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 발현 값의 정규화된 z-점수이고, 제1 규정 역치 미만의  $VDV_i$ 는 참조 수준에 대한 감소 (예를 들어, 집합적 저발현)를 나타내고, 제2 규정 역치 초과의  $VDV_i$ 는 참조 수준에 대한 증가 (예를 들어, 집합적 과다발현)를 나타낸다. 각각의 유전자 또는 바이오마커  $g$  ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 발현 값은, 예를 들어 각각의 유전자  $g$  또는 바이오마커 ( $g=1$ 에서  $g=n$ 까지)에 대한 qRT-PCR 값일 수 있다. 제1 규정 역치는 -4 내지 -0.5 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5, -2, -1.5, -1 또는 -0.5)일 수 있고, 제2 규정 역치는 0.5 내지 4 (예를 들어, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)일 수 있다. 일부 경우에, 제1 규정 역치는 -4 내지 -1 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5, -2, -1.5 또는 -1)일 수 있고, 제2 규정 역치는 1 내지 4 (예를 들어, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)일 수 있다. 다른 경우에, 제1 규정 역치는 -4 내지 -1.5 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5, -2 또는 -1.5)일 수 있고, 제2 규정 역치는 1.5 내지 4 (예를 들어, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)일 수 있다. 다르게는, 제1 규정 역치는 -4 내지 -2 (예를 들어, -4, -3.5, -3, -2.5 또는 -2)일 수 있고, 제2 규정 역치는 2 내지 4 (예를 들어, 2, 2.5, 3, 3.5 또는 4)일 수 있다.

[0123] 한 측면에서, 본 발명은 환자에게 임의의 VEGF 길항제를 투여하기 전에 수득한 환자로부터의 샘플에서의 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자 (예를 들어, Alk1, CD34, CD105, CD144, Col4a1, Col4a2, Dll4, EFNB2, EGFL7, ESM1, LAMA4, NG2, Nid2, Notch1, NRP1, NRP2, RGS5, Sema3f, TSP1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 및 VIM 중 적어도 하나)의 발현을 바이오마커로서 평가하는 것을 포함하는, 혈관신생 장애를 앓고 있는 환자가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료에 반응할 것인지의 여부를 모니터링하는 방법을 제공한다. 참조 수준 (상기 참조)에 대한 표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현의 변화 (즉, 증가 또는 감

소)는 환자가 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료에 반응할 것임을 나타낸다.

[0124] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대한 환자의 감수성 또는 반응성을 모니터링하는 방법을 제공한다. 이 방법은 환자 샘플로부터 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들)의 유전자 발현을 평가하고, VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대한 환자의 감수성 또는 반응성을 예측하는 것을 포함하며, 여기서 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들)의 발현의 변화 (즉, 증가 또는 감소)는 VEGF 길항제로의 유효 치료에 대한 환자의 감수성 또는 반응성과 상호연관된다. 이 방법에 따르면, 생물학적 샘플을 임의의 VEGF 길항제의 투여 전에 환자로부터 수득하고, 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들)의 발현 산물이 샘플에 존재하는지의 여부를 평가하기 위한 검정에 적용시킨다. 표 1 또는 2에 제시된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 또는 그 초과의 유전자(들)의 발현이 참조 수준 (예를 들어, 상기 참조)에 대해 변화 (즉, 증가 또는 감소)되는 경우에, 환자는 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료에 대해 감수성이거나 또는 반응성이 것으로 결정된다. 상기 언급된 바와 같이, 방법은 임의로, 환자에 대한 투여를 위한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 선택을 추가로 포함할 수 있고, 임의로 환자에 대한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0125] 특히 진단 시험 및 치료제로의 치료의 적용에 관한 의학 분야의 당업자는 생물학적 시스템이 다소 가변적이고 언제나 전체적으로 예측가능한 것이 아니기 때문에 여러가지 우수한 진단 시험 또는 치료제도 때때로 효과가 없다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 시험 결과, 환자 상태 및 병력, 환자 고유의 경험에 기반하여 개개의 환자에게 가장 적절한 치료 과정을 결정하는 것은 궁극적으로 담당의의 판단에 달려 있다. 예를 들어, 심지어는 진단 시험 또는 다른 기준으로부터의 데이터에 기반하여 환자가 VEGF 길항제에 대해 특히 감수성인 것으로 예측되지 않는 경우라 할지라도, 특히 모든 또는 대부분의 다른 명백한 치료 옵션이 실패한 경우에, 또는 또 다른 치료가 주어졌을 때 약간의 상승작용이 예상되는 경우에 전문의가 환자를 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로 치료하는 것을 선택하는 경우가 종종 있을 수 있다.

[0126] 추가로 나타낸 실시양태에서, 본 발명은 샘플에서 발현되는 본원에서 확인된 적어도 하나의 유전자 바이오마커의 수준을 평가하고; VEGF 길항제에 의한 억제에 대한 환자의 감수성을 예측하는 것을 포함하며, 여기서 하나 이상의 이를 유전자 바이오마커의 발현 수준은 VEGF 길항제로의 치료에 대해 효과적인 반응에 대한 환자의 높은 감수성과 상호연관되는 것인, VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로의 치료에 대한 환자의 감수성을 예측하거나, 또는 환자가 VEGF 길항제로의 치료에 대해 효과적으로 반응할지 예측하는 방법을 제공한다.

[0127] 본 발명은 추가로 (a) VEGF 길항제에 대해 소정의 범위의 감수성을 나타내는 세포의 패널에서 후보 바이오마커의 발현 수준을 측정하고, (b) 세포에서 상기 후보 바이오마커의 발현 수준, 이에 대한 혈청 양성, 또는 그의 존재와 VEGF 길항제에 대한 환자의 감수성 또는 반응성 사이의 상관관계를 확인하는 것을 포함하며, 여기서 상관관계는 상기 바이오마커의 발현 수준, 혈청 양성 또는 존재가 VEGF 길항제에 의한 치료에 대한 환자의 반응성을 예측한다는 것을 나타내는 것인, 발현 수준이 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대한 특정 환자의 감수성 또는 반응성을 예측하는 바이오마커를 확인하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포의 패널은 환자 또는 실험 동물 모델로부터 유래된 샘플로부터 제조된 샘플의 패널이다. 추가의 실시양태에서, 세포의 패널은 마우스 이종이식편의 세포주의 패널이고, 여기서 반응성은 예를 들어 반응성의 분자 마커, 예를 들어 Alk1, CD34, CD105, CD144, Col4a1, Col4a2, D114, EFNB2, EGFL7, ESM1, LAMA4, NG2, Nid2, Notch1, NRP1, NRP2, RGS5, Sema3f, TSP1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 및 VIM 중 적어도 하나를 모니터링하여 결정될 수 있다.

[0128] 본 발명은 또한 (a) 임의의 용량의 VEGF 길항제가 환자에게 투여되기 전에 수득한 혈관신생 장애를 앓고 있는 환자로부터의 샘플에서의 후보 바이오마커의 수준을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 대조군에 대한 후보 바이오마커의 발현의 변화 (즉, 증가 또는 감소)는 바이오마커가 VEGF 길항제로의 혈관신생 장애의 보다 효과적인 치료에 대한 진단임을 나타내는 것인, VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체에 대한 감수성 또는 반응성을 모니터링하는데 유용한 바이오마커를 확인하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 바이오마커는 유전자이고, 그의 발현이 분석된다.

[0129] 샘플은 혈관신생 장애를 앓고 있는 것으로 의심되거나 혈관신생 장애를 앓고 있는 것으로 진단되어 치료가 필요할 수 있는 환자로부터 또는 임의의 장애를 앓고 있는 것으로 의심되지 않는 정상적인 개체로부터 수득할

수 있다. 마커 발현을 평가하기 위해서, 환자 샘플, 예컨대 세포, 또는 이를 세포에 의해 생산된 단백질 또는 핵산을 함유하는 샘플을 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 본 발명의 방법에서, 바이오마커의 수준은 샘플, 바람직하게는 조직 샘플 (예를 들어, 종양 조직 샘플, 예컨대 생검)에서의 마커의 양 (예를 들어, 절대량 또는 농도)을 평가함으로써 결정될 수 있다. 또한 바이오마커의 수준은 검출가능한 수준의 바이오마커를 함유하는 체액 또는 배출물에서 평가될 수 있다. 본 발명에서 샘플로서 유용한 체액 또는 분비물은, 예를 들어 혈액, 소변, 타액, 대변, 흉막액, 림프액, 객담, 복수, 전립선액, 뇌척수액 (CSF), 또는 임의의 다른 신체 분비물 또는 이들의 유도체를 포함한다. 단어 혈액은 전혈, 혈장, 혈청, 또는 혈액의 임의의 유도체를 포함하도록 의도된다. 이러한 체액 또는 배출물 중 바이오마커의 평가는 침습적 샘플링 방법이 부적합하거나 불편한 상황에서 때때로 바람직할 수 있다. 그러나, 체액인 샘플의 경우에, 본원에서 시험되는 샘플은 바람직하게는 혈액, 활막 조직 또는 활액, 가장 바람직하게는 혈액이다.

[0130] 샘플은 예컨대 동결되고/거나, 신선하고/거나, 고정 (예를 들어, 포르말린으로 고정)되고/거나, 원심분리되고/거나, 포매 (예를 들어, 파라핀에 포매)될 수 있다. 물론, 세포 샘플은 샘플 중 마커의 양을 평가하기 전에 다양한 널리 공지된 수집후 정제 및 저장 기술 (예를 들어, 핵산 및/또는 단백질 추출, 고정, 저장, 냉동, 한외여과, 농축, 증발, 원심분리 등)에 적용할 수 있다. 마찬가지로, 생검 역시 수집후 정제 및 저장 기술, 예를 들어 고정에 적용할 수 있다.

[0131] 상기 언급된 바와 같이, 방법은 임의로, 환자에 대한 투여를 위한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 선택을 추가로 포함할 수 있고, 임의로 환자에 대한 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

#### A. 유전자 발현의 검출

[0133] 본원에 기재된 유전자 바이오마커는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 포유동물로부터의 조직 또는 세포 샘플은 노던, 도트-블롯팅 또는 폴리미라제 연쇄 반응 (PCR) 분석, 어레이 혼성화, RNase 보호 검정, 또는 DNA SNP 칩 마이크로어레이 (상업적으로 입수가능함), 예컨대 DNA 마이크로어레이 스냅샷을 이용하여, 예를 들어 관심 유전자 바이오마커로부터의 mRNA 또는 DNA에 대해 편리하게 검정될 수 있다. 예를 들어, 실시간 PCR (RT-PCR) 검정, 예컨대 정량적 PCR 검정은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 예시적인 실시양태에서, 생물학적 샘플에서 관심 유전자 바이오마커로부터 mRNA를 검출하는 방법은 하나 이상의 프라이머를 사용한 역전사에 의해 샘플로부터 cDNA를 생성하고; 이렇게 생산된 cDNA를 증폭시키고; 증폭된 cDNA의 존재를 검출하는 것을 포함한다. 또한, 이러한 방법은 생물학적 샘플에서 표적 mRNA 수준의 결정 (예를 들어, "하우스키핑" 유전자, 예컨대 액틴 폐밀리 구성원의 비교 대조 mRNA 서열 수준을 동시에 조사함으로써 결정됨)을 허용하는 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다. 임의로, 증폭된 cDNA의 서열을 결정할 수 있다.

#### 1. 핵산의 검출

[0135] 한 구체적 실시양태에서, 표 1 또는 2에 제시된 유전자의 발현은 RT-PCR 기술에 의해 수행될 수 있다. PCR에 사용되는 프로브는 검출가능한 마커, 예를 들어 방사선동위원소, 형광 화합물, 생물발광 화합물, 화학발광 화합물, 금속 퀄레이트화제 또는 효소로 표지될 수 있다. 이러한 프로브 및 프라이머는 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 발현된 유전자의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 매우 많은 상이한 프라이머 및 프로브를 본원에 제공된 서열에 기반하여 제조하고, 표 1 또는 2에 제시된 발현된 유전자의 존재 및/또는 수준을 증폭, 클로닝 및/또는 결정하는데 효과적으로 사용할 수 있다.

[0136] 다른 방법은 마이크로어레이 기술에 의해 조직 또는 세포 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 유전자 중 적어도 하나로부터의 mRNA (예를 들어, Alk1, CD34, CD105, CD144, Col4a1, Col4a2, D114, EFNB2, EGFL7, ESM1, LAMA4, NG2, Nid2, Notch1, NRP1, NRP2, RGS5, Sema3f, TSP1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 및 VIM mRNA)를 검사 또는 검출하는 프로토콜을 포함한다. 핵산 마이크로어레이를 이용하여, 시험 및 대조 조직 샘플로부터의 시험 및 대조 mRNA 샘플을 역전사시키고, 표지하여 cDNA 프로브를 생성한다. 이어서, 프로브를 고체 지지체 상에 고정된 핵산의 어레이에 혼성화시킨다. 어레이는 어레이의 각각의 구성원의 서열 및 위치를 알 수 있도록 구성된다. 예를 들어, 특정 질환 상태에서 발현될 잠재력을 갖는 유전자의 선택물을 고체 지지체 상에 배열할 수 있다. 특정한 어레이 구성원을 갖는 표지된 프로브의 혼성화는 프로브가 유래된 샘플이 그 유전자를 발현한다는 것을 나타낸다. 질환 조직의 차등 유전자 발현 분석은 가치있는 정보를 제공할 수 있다. 마이크로어레이 기술은 핵산 혼성화 기술 및 전산 기술을 이용하여 단일 실험 내에서 수천개의 유전자의 mRNA 발현 프로파일을 평가한다 (예를 들어, WO 2001/75166 참조). 어레이 제작 논의를 위해, 예를 들어 미국 특허

5,700,637, 미국 특허 5,445,934, 및 미국 특허 5,807,522, 문헌 [Lockart, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680 (1996); 및 Cheung et al., *Nature Genetics* 21(Suppl):15-19 (1999)]을 참조한다.

[0137] 또한, EP 1753878에 기재된 마이크로어레이를 이용한 DNA 프로파일링 및 검출 방법을 이용할 수 있다. 이 방법은 짧은 텐덤 반복부 (STR) 분석 및 DNA 마이크로어레이를 사용하여 상이한 DNA 서열들 사이를 신속하게 확인하고 구별한다. 한 실시양태에서, 표지된 STR 표적 서열은 상보적 프로브를 보유하는 DNA 마이크로어레이에 혼성화된다. 이들 프로브는 가능한 STR의 범위를 포함하기 위해 길이가 다양하다. DNA 하이브리드의 표지된 단일 가닥 영역은 혼성화후 효소 소화를 이용하여 마이크로어레이 표면으로부터 선택적으로 제거하였다. 미지의 표적 중 반복부의 수는 마이크로어레이에 혼성화된 채로 유지되는 표적 DNA의 패턴에 기반하여 추정된다.

[0138] 마이크로어레이 프로세서의 한 예는 아페메트릭스 진침(Affymetrix GENECHIP)® 시스템으로, 이것은 상업적으로 입수 가능하며 유리 표면 상에서 올리고뉴클레오티드를 직접 합성하여 제작된 어레이를 포함한다. 당업자에게 공지된 바와 같은 다른 시스템이 이용될 수도 있다.

[0139] RT-PCR 또는 또 다른 PCR-기반의 방법 이외에 바이오마커의 수준을 결정하는 다른 방법은 프로테오믹스 기술, 뿐만 아니라 분자 수준에서의 환자 반응에 기반하여 혈관신생 장애를 치료하는데 필요한 개별화된 유전자 프로파일을 포함한다. 본원에서의 특정 마이크로어레이, 예를 들어 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 또는 cDNA 마이크로어레이에는 하나 이상의 항-VEGF 항체에 대한 감수성 또는 내성과 상호연관되는 발현 프로파일을 갖는 하나 이상의 바이오마커를 포함할 수 있다. 본 발명에 이용하기 위한, 핵산을 검출하는데 이용될 수 있는 다른 방법은 고처리량 RNA 서열 발현 분석, 예컨대 RNA-기반 게놈 분석, 예컨대 예를 들어 RNASeq를 포함한다.

[0140] 상기 기술을 적용하는데 있어서의 지침을 제공하는 다수의 참조문헌이 입수 가능하다 (문헌 [Kohler et al., *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, *Monoclonal Antibody Technology* (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982); 및 Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)]). 노던 블롯 분석은 당업계에 널리 공지된 통상적인 기술이고, 예를 들어 문헌 [Molecular Cloning, a Laboratory Manual, second edition, 1989, Sambrook, Fritch, Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 10 Skyline Drive, Plainview, NY 11803-2500]에 기재되어 있다. 유전자 및 유전자 산물의 상태를 평가하기 위한 전형적인 프로토콜은, 예를 들어 문헌 [Ausubel et al. eds., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*] (유닛 2 (노던 블롯팅), 4 (서던 블롯팅), 15 (이뮤노블롯팅) 및 18 (PCR 분석))에서 찾을 수 있다.

## 2. 단백질의 검출

[0141] 예를 들어, Alk1, CD34, CD105, CD144, Col4a1, Col4a2, Dll4, EFNB2, EGFL7, ESM1, LAMA4, NG2, Nid2, Notch1, NRP1, NRP2, RGS5, Sema3f, TSP1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 및 VIM 중 적어도 하나와 같은 단백질 바이오마커의 검출에 관하여, 예를 들어 항체-기반 방법 뿐만 아니라 질량 분광분석법 및 당업계에 공지된 다른 유사한 수단을 비롯한 다양한 단백질 검정이 이용 가능하다. 예를 들어, 항체-기반 방법의 경우에, 샘플을 항체-바이오마커 복합체 형성에 충분한 조건 하에서 상기 바이오마커에 특이적인 항체와 접촉시킨 후에 상기 복합체를 검출할 수 있다. 단백질 바이오마커의 존재의 검출은 수많은 방법, 예컨대 웨스턴 블롯팅 (면역침전을 병용하거나 병용하지 않음), 2차원 SDS-PAGE, 면역침전, 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 유동 세포측정법, 및 혈장 또는 혈청을 포함하는 다양한 조직 및 샘플 검정을 위한 ELISA 절차로 수행될 수 있다. 이러한 검정 포맷을 이용한 광범위한 면역검정 기술이 이용 가능하고, 예를 들어 미국 특허 번호 4,016,043, 4,424,279, 및 4,018,653을 참조한다. 이들은 비-경쟁적 유형의 단일-부위 및 2-부위 또는 "샌드위치" 검정 뿐만 아니라, 통상적인 경쟁적 결합 검정을 둘 다 포함한다. 또한, 이러한 검정은 표적 바이오마커에 대한 표지된 항체의 직접 결합을 포함한다.

[0143] 샌드위치 검정은 가장 유용하고 일반적으로 이용되는 검정 중 하나이다. 샌드위치 검정 기술의 수많은 변형이 존재하고, 모두가 본 발명에 포함된다. 간략하게, 전형적인 정방향 검정에서, 표지되지 않은 항체를 고체 기판에 고정시키고, 시험할 샘플을 결합된 분자와 접촉시킨다. 항체-항원 복합체 형성에 충분한 기간 동안의 적합한 인큐베이션 기간 후, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 리포터 분자로 표지되고 항원에 특이적인 제2 항체를 첨가하고, 항체-항원-표지된 항체의 또 다른 복합체 형성에 충분한 시간 동안 인큐베이션한다. 임의

의 미반응 물질을 세척하고, 항원의 존재를 리포터 분자에 의해 생성된 신호를 관찰하여 결정한다. 결과는 시각적인 신호의 단순 관찰에 의해 정성적일 수도 있고, 또는 공지된 양의 바이오마커를 함유하는 대조군 샘플과의 비교로 정량화할 수도 있다.

[0144] 정방향 검정의 변형은 결합된 항체에 샘플 및 표지된 항체 둘 다를 동시에 첨가하는 동시 검정을 포함한다. 이러한 기술은 용이하게 명백해질 임의의 근소한 변형을 포함하여 당업자에게 공지되어 있다. 전형적인 정방향 샌드위치 검정에서, 바이오마커에 특이성을 갖는 제1 항체는 고체 표면에 공유 또는 수동 결합된다. 고체 표면은 전형적으로 유리 또는 중합체이고, 가장 일반적으로 사용되는 중합체는 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌이다. 고체 지지체는 튜브, 비드, 마이크로플레이트의 디스크의 형태, 또는 면역검정 수행에 적합한 임의의 다른 표면일 수 있다. 결합 과정은 당업계에 공지되어 있고, 일반적으로 가교 공유 결합 또는 물리적 흡착으로 이루어지고, 중합체-항체 복합체는 시험 샘플 제조시에 세척하였다. 시험되는 샘플의 분취액을 이어서 고상 복합체에 첨가하고, 항체에 존재하는 임의의 서브유닛의 결합에 적합한 조건 (예를 들어, 실온 내지 40°C, 예를 들어 25°C 내지 32°C) 하에 충분한 시간 (예를 들어, 2-40분 또는 보다 편리할 경우 밤새) 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 기간 후, 항체 서브유닛 고체 상을 세척하여 건조시키고, 바이오마커의 일부에 특이적인 제2 항체와 함께 인큐베이션한다. 제2 항체는 분자 마커에 대한 제2 항체의 결합을 표시하는데 사용되는 리포터 분자에 연결된다.

[0145] 대안적 방법은 샘플 중의 표적 바이오마커를 고정시킨 후, 상기 고정된 표적을 리포터 분자로 표지될 수도 있고 표지되지 않을 수도 있는 특이적 항체에 노출시키는 것을 포함한다. 표적의 양 및 리포터 분자 신호의 강도에 따라, 항체를 사용한 직접 표지에 의해 결합된 표적을 검출할 수 있다. 다르게는, 제1 항체에 특이적인 제2 표지된 항체를 표적-제1 항체 복합체에 노출시켜 표적-제1 항체-제2 항체의 3원 복합체를 형성시킨다. 상기 복합체는 리포터 분자에 의해 방출되는 신호에 의해 검출된다. 본 명세서에서 사용된 "리포터 분자"는 그의 화학적 성질에 의해 항원 결합된 항체의 검출을 허용하는 분석적으로 확인가능한 신호를 제공하는 분자를 나타낸다. 이러한 유형의 검정에서 가장 일반적으로 사용되는 리포터 분자는 효소, 형광단 또는 방사성핵종 함유 분자 (즉, 방사성동위원소) 및 화학발광 분자이다.

[0146] 효소 면역검정의 경우에, 효소는 일반적으로 글루타르알데히드 또는 퍼아이오데이트에 의해 제2 항체에 접합된다. 그러나, 용이하게 인지되는 바와 같이, 당업자가 용이하게 이용가능한 다양한 여러가지 접합 기술이 존재한다. 통상적으로 사용되는 효소는 특히 양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제 및 알칼리성 포스파타제를 포함한다. 특이적 효소와 함께 사용될 기질은 일반적으로 상응하는 효소에 의한 가수분해시에 검출가능한 색상 변화가 생성되는 것으로서 선택된다. 적합한 효소의 예는 알칼리성 포스파타제 및 퍼옥시다제를 포함한다. 상기 언급된 발색 기질보다는 형광 생성물을 생성하는 형광 기질을 사용하는 것이 또한 가능하다. 모든 경우에서, 효소-표지된 항체를 1차 항체-분자 마커 복합체에 첨가하여 결합시킨 후에 과잉 시약을 세척한다. 이어서, 적절한 기질을 함유하는 용액을 상기 항체-항원-항체의 복합체에 첨가한다. 기질은 2차 항체에 연결된 효소와 반응하여 정성적인 가시적 신호를 생성할 것이고, 이는 샘플 내에 존재하는 바이오마커의 양을 표시하도록 일반적으로는 분광학적으로 추가로 정량화될 수 있다. 다르게는, 플루오레세인 및 로다민과 같은 형광 화합물이 이들의 결합 능력을 변경시키지 않으면서 항체에 화학적으로 커플링될 수 있다. 특정한 파장의 광을 사용한 조명으로 활성화될 때, 형광색소-표지된 항체는 광 에너지를 흡수하여 분자를 여기가능 상태로 유도한 후, 광학 현미경으로 시각적으로 검출가능한 특징적인 색상의 광을 방출한다. EIA에서와 같이, 형광 표지된 항체는 제1 항체-분자 마커 복합체에 결합하게 된다. 결합되지 않은 시약을 세척한 후에, 남아있는 3원 복합체를 적절한 파장의 광에 노출시키고, 관찰된 형광은 관심 분자 마커의 존재를 나타낸다. 면역형광 및 EIA 기술 둘 다 당업계에 널리 확립되어 있다. 그러나, 다른 리포터 분자, 예를 들어 방사성동위원소, 화학발광 또는 생물발광 분자를 사용할 수도 있다.

#### B. 키트

[0147] 바이오마커의 검출에 사용하기 위한 키트 또는 제조품도 또한 본 발명에서 제공된다. 이러한 키트는 혈관신생 장애를 앓고 있는 대상체가 VEGF 길항체에 대해 효과적으로 반응할 것인지 결정하는데 사용될 수 있다. 이러한 키트는 방법에 사용되는 별개의 요소 중 하나를 각각 포함하는 1개 이상의 용기 수단, 예컨대 바이알, 튜브 등을 가까이 모아 수용하도록 구획화된 운반 수단을 포함할 수 있다. 예를 들어, 용기 수단 중 하나는 검출가능하게 표지된 것이거나 검출가능하게 표지될 수 있는 프로브를 포함할 수 있다. 이러한 프로브는 각각 단백질 또는 메세지에 특이적인 항체 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 키트가 표적 핵산을 검출하기 위해 핵산 혼성화를 이용하는 경우에, 키트는 또한 표적 핵산 서열의 증폭을 위한 뉴클레오티드(들)를 함유하는 용기, 및/또는 리포터 분자, 예컨대 효소, 형광 또는 방사성동위원소 표지에 결합된 리포터-수단, 예컨대 비

오톤-결합 단백질, 예를 들어 아비딘 또는 스트렙타비딘을 포함하는 용기를 가질 수 있다.

[0149] 이러한 키트는 전형적으로 상기 기재된 용기, 및 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 사용 지침서를 갖는 포장 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 물질을 포함하는 1개 이상의 다른 용기를 포함할 것이다. 조성물이 특정 용도로 사용된다는 것을 나타내는 라벨이 용기 상에 존재할 수도 있고, 라벨이 생체내 또는 시험관내 사용, 예컨대 상기한 사용에 관한 지시 내용을 나타낼 수도 있다.

[0150] 본 발명의 키트는 다수의 실시양태를 갖는다. 전형적인 실시양태는 용기, 상기 용기 상의 라벨, 및 상기 용기 내에 함유된 조성물을 포함하는 키트이고, 여기서 조성물은 단백질 또는 자가항체 바이오마커에 결합하는 1차 항체를 포함하고, 상기 용기 상의 라벨은 조성물이 샘플에서 이러한 단백질 또는 항체의 존재를 평가하는데 사용될 수 있음을 나타내고, 키트는 특정 샘플 유형에서 바이오마커 단백질의 존재를 평가하는데 항체를 사용하는 것에 관한 지침서를 포함한다. 키트는 샘플을 제조하고 항체를 샘플에 적용하기 위한 지침서 및 물질의 세트를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 1차 및 2차 항체 둘 다를 포함할 수 있고, 여기서 2차 항체는 표지, 예를 들어 효소 표지에 접합된다.

[0151] 또 다른 실시양태는 용기, 상기 용기 상의 라벨, 및 상기 용기 내에 함유된 조성물을 포함하는 키트이고, 여기서 조성물은 엄격한 조건 하에서 표 1 또는 2에 제시된 바이오마커의 상보체에 혼성화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 용기 상의 라벨은 조성물이 샘플에서 표 1 또는 2에 제시된 바이오마커의 존재를 평가하는데 사용될 수 있음을 나타내고, 키트는 특정 샘플 유형에서 바이오마커 RNA 또는 DNA의 존재를 평가하는데 폴리뉴클레오티드(들)를 사용하는 것에 관한 지침서를 포함한다.

[0152] 키트의 다른 임의적 성분은 하나 이상의 완충제 (예를 들어, 차단 완충제, 세척 완충제, 기질 완충제 등), 기타 시약, 예컨대 효소 표지에 의해 화학적으로 변경되는 기질 (예를 들어, 발색체), 에피토프 복구 용액, 대조 샘플 (양성 및/또는 음성 대조군), 대조 슬라이드(들) 등을 포함한다. 키트는 또한 키트를 이용하여 얻은 결과를 해석하기 위한 지침서를 포함할 수 있다.

[0153] 추가의 구체적인 실시양태에서, 항체-기반 키트의 경우, 키트는 예를 들어 (1) 바이오마커 단백질에 결합하는 제1 항체 (예를 들어, 고체 지지체에 부착됨), 및 임의로는 (2) 단백질 또는 제1 항체에 결합하고 검출가능한 표지에 접합된 상이한 제2 항체를 포함할 수 있다.

[0154] 올리고뉴클레오티드-기반 키트의 경우, 키트는 예를 들어 (1) 바이오마커 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드 또는 (2) 바이오마커 핵산 분자를 증폭시키는데 유용한 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 키트는 또한 예를 들어 완충제, 보존제 또는 단백질 안정화제를 포함할 수 있다. 키트는 검출가능한 표지 (예를 들어, 효소 또는 기질)를 검출하는데 필요한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 검정되고 시험 샘플과 비교될 수 있는 대조 샘플 또는 일련의 대조 샘플을 함유할 수 있다. 키트의 각 성분은 개개의 용기 내에 있을 수 있고, 모든 다양한 용기는 상기 키트를 사용하여 수행한 검정의 결과를 해석하기 위한 지침서와 함께 단일 포장물 내에 있을 수 있다.

### C. 통계

[0156] 본원에 사용된 바와 같이, 일반적인 형태의 예측 규칙은 반응 또는 비-반응을 예측하거나, 또는 보다 일반적으로는 적합하게 규정된 임상적 종점과 관련하여 이익 또는 이익의 부재를 예측하는, 임상적 공변량을 잠재적으로 포함하는 하나의 또는 다중 바이오마커의 함수의 명세로 이루어진다.

[0157] 가장 단순한 형태의 예측 규칙은 공변량이 없는 단일변량 모델로 이루어지며, 여기서 예측은 컷오프(cutoff) 또는 역치로 결정된다. 이는 특정 컷오프  $c$  및 바이오마커 측정치  $x$ 에 대한 헤비사이드(Heaviside) 함수로 표현될 수 있고, 여기서 2원성 예측 A 또는 B가 생성되며,  $H(x-c)=0$ 인 경우에는 예측 A이다.  $H(x-c)=1$ 인 경우에는 예측 B이다.

[0158] 이것이 단일변량 바이오마커 측정치를 예측 규칙에 이용하는 가장 단순한 방식이다. 이러한 단순한 규칙이 충분한 경우에는, 효과의 방향, 즉 높거나 낮은 발현 수준이 환자에게 유익한지의 여부에 대한 단순 확인이 가능하다.

[0159] 임상적 공변량이 고려될 필요가 있고/거나 다중 바이오마커가 다변량 예측 규칙에 사용되는 경우에는 상황이 보다 복잡해질 수 있다. 하기 2가지 가설 예가 이와 관련된 문제를 예시한다:

[0160] 공변량 조정 (가설 예):

[0161] 바이오마커 X의 경우, 높은 발현 수준이 더 좋지 않은 임상 반응과 관련이 있다는 것이 임상 실험 집단에서

발견된다 (단일변량 분석). 보다 근접한 분석은 집단 내에 2가지 유형의 임상 반응이 있다는 것을 보여주고, 이 중 첫번째 군은 두번째 군보다 더 좋지 않은 반응을 갖고, 동시에 첫번째 군에 대한 바이오마커 발현은 하나 이상의 용량의 VEGF 길항제를 투여한 후에 일반적으로 더 높다. 조정된 공변량 분석은 각각의 군에서 임상적 이익 및 임상 반응의 관련성이 역전된다는 것을 나타내고, 즉 군 내에서 보다 낮은 발현 수준이 보다 우수한 임상 반응과 연관된다는 것을 나타낸다. 전체적인 반대 효과는 예측 규칙의 일부가 방향을 역전시키기 때문에 공변량 유형 및 공변량 조정된 분석에 의해 가려진다.

[0162] 다변량 예측 (가설 예):

바이오마커 X의 경우, 높은 발현 수준이 더 좋지 않은 임상 반응과 약간 연관된다는 것이 임상 실험 집단에서 발견된다 (단일변량 분석). 제2 바이오마커 Y의 경우, 유사한 관찰이 단일변량 분석으로 이루어진다. X 및 Y의 조합은 이들 바이오마커가 둘 모두 낮은 경우에는 우수한 임상 반응이 나타남을 보여준다. 이것은 이들 바이오마커가 둘 모두 약간의 컷오프 (및 헤비사이드 예측 함수 관련) 미만인 경우에 규칙에 예측 이익을 부가한다. 조합 규칙의 경우, 단순한 규칙은 더 이상 단일변량 센스로 적용되지 않고; 예를 들어 X의 낮은 발현 수준을 갖는 것이 자동적으로 보다 우수한 임상적 반응을 예측하지 않을 것이다.

[0164] 이러한 단순한 예는 공변량을 사용하거나 사용하지 않는 예측 규칙이 각 바이오마커의 단일변량 수준에 따라 판단될 수 없음을 보여준다. 다중 바이오마커의 조합 및 공변량에 의한 잠재적 조정은 단일 바이오마커에 단순한 관계를 부여하는 것을 허용하지 않는다. 특히 혈청 중의 마커 유전자는 다른 임상적 공변량을 잠재적으로 포함하는 다중 마커 예측 모델에서 사용될 수 있기 때문에, 이러한 모델 내에서 단일 마커 유전자의 유익한 효과의 방향은 단순한 방법으로는 결정될 수 없고, 단일변량 분석에서 발견되는 방향과 모순될 수 있다 (즉, 단일 마커 유전자에 대해 기재된 바와 같은 상황이 일어날 수 있음).

[0165] 임상의는 VEGF 길항제의 특정한 투여량 계획의 유효성을 평가하는 것으로 당업계에 공지된 몇 가지 방법 중 어느 하나를 이용할 수 있다. 예를 들어, 생체내 영상화 (예를 들어, MRI)를 이용하여, 종양 크기를 결정하고 임의의 전이를 확인하여, 요법의 비교적 유효한 반응성을 결정할 수 있다. 투여 요법은 목적하는 최적의 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 한 용량을 투여할 수 있거나, 여러 회분으로 나누어진 용량을 시간 경과에 따라 투여할 수 있거나, 또는 치료 상황의 위급성에 의해 지시된 바에 비례하여 용량을 감소시키거나 증가시킬 수 있다.

[0166] 당업계 통상의 기술을 갖는 전문의는 특정 길항제의 유형과 같은 인자에 따라 필요한 제약 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 전문의는 바람직한 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것 보다 낮은 수준으로 제약 조성물에 사용되는 이러한 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체의 용량으로 시작하고, 바람직한 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 길항제의 주어진 용량 또는 치료 요법의 유효성은, 예를 들어 표준 효능 측정치를 이용하여 환자에서 정후 및 증상을 평가하여 결정할 수 있다.

[0167] 또 다른 실시양태에서, 대상체는 동일한 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체로 2회 이상 치료된다. 따라서, 초기 및 2차 길항제 노출은 바람직하게는 동일한 길항제로 수행되고, 보다 바람직하게는 모든 길항제 노출이 동일한 길항제로 수행되는데, 즉 처음 2회의 노출, 바람직하게는 모든 노출에 대한 치료는 한 가지 유형의 VEGF 길항제, 예를 들어 VEGF에 결합하는 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체 (예를 들어, 모두 베바시주맙을 사용함)를 사용하여 수행된다.

[0168] 본원에 열거된 본 발명의 모든 방법에서, 길항제 (예컨대, VEGF에 결합하는 항체)는 접합되지 않은 것, 예컨대 네이키드 항체일 수 있거나, 또는 예를 들어 반감기 개선과 같은 추가의 효과를 위해 또 다른 분자와 접합될 수도 있다.

[0169] 본원에서 바람직한 길항제 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 보다 바람직하게는 항-VEGF 항체, 가장 바람직하게는 베바시주맙이다.

[0170] 또 다른 실시양태에서, VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)는 대상체에 투여되는 유일한 의약이다.

[0171] 한 실시양태에서, 길항제는 1, 2, 3 또는 4주마다 약 100 또는 400 mg의 용량으로 투여되거나, 또는 1, 2, 3 또는 4주마다 약 1, 3, 5, 10, 15 또는 20 mg/kg의 용량으로 투여되는 항-VEGF 항체이다. 상기 용량은 단일 용량으로서 또는 다중 용량 (예를 들어, 2 또는 3회의 용량)으로서 투여, 예컨대 주입될 수 있다.

[0172] 또 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)를 첫번째로 투여한 후에 영상화 기술, 예컨대 방사선촬영 및/또는 MRI를 이용하여 종양 크기의 감소를 측정하고, 상기 길항제를 두번째로 투여한 후에 영상화 기술, 예컨대 방사선촬영 및/또는 MRI를 이용하여 혈관신생 장애를 앓고 있는 대상체에서 종양 크

기 감소를 측정하고, 첫번째와 두번째의 대상체에서의 영상화 소견을 비교하고, 스코어가 첫번째보다 두번째에서 더 낮은 경우에는 길항제를 계속 투여하는 것을 포함하는, 진단 단계 이후에 혈관신생 장애를 앓고 있는 대상체에게 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)를 계속 투여할 것인지의 여부를 결정하는 방법을 제공한다.

[0173] 추가 실시양태에서, 반응의 수준이 혈관신생 장애를 치료하는데 유효한지를 결정하기 위해 투여 단계 이후 대상체의 치료에 대한 반응을 시험하는 단계가 치료 방법에 포함된다. 예를 들어, 투여후 영상화 (방사선촬영 및/또는 MRI) 스코어를 시험하고, 이것을 투여 이전에 수득된 기준선 영상화 결과와 비교하여 이것이 변화되었는지 및 얼마나 변화되었는지를 측정함으로써 치료가 유효한지의 여부를 결정하는 단계가 포함된다. 이러한 시험은 임의의 부분적 또는 완전한 차도의 유지를 결정하기 위해 투여 이후에 다양한 예정되거나 예정되지 않은 시간 간격으로 반복될 수 있다. 다르게는, 본원의 방법은 투여 이전에 상기 열거된 바와 같이 혈관신생 장애에 대한 하나 이상의 바이오마커 또는 증상이 존재하는지 여부를 알아보기 위해 대상체를 시험하는 단계를 포함한다.

[0174] 본 발명의 한 실시양태에서, VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체 이외의 다른 의약이 혈관신생 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여되지 않는다.

[0175] 본원의 임의의 방법에서, VEGF 길항제는 (VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)가 제1 의약인 경우에) 유효량의 제2 의약과 조합되어 투여될 수 있다. 적합한 제2 의약은, 예를 들어 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0176] 모든 이들 제2 의약은 서로 조합되어 사용될 수 있거나 또는 그 자체가 제1 의약과 함께 사용될 수 있으므로, 본원에 사용된 바와 같은 표현 "제2 의약"은 이것이 제1 의약에 추가되는 유일한 의약이라는 것을 의미하지 않는다. 따라서, 제2 의약은 단일 의약일 필요는 없고, 하나 초과의 이러한 약물로 이루어지거나 이것을 포함할 수 있다.

[0177] 본원에 기재된 바와 같은 이들 제2 의약은 일반적으로 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나 또는 지금까지 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다. 이러한 제2 의약이 조금이라도 사용되는 경우에, 바람직하게는 이들은 특히 제1 의약의 초기 투여 이후의 투여시에 제1 의약이 존재하지 않는 경우보다 더 적은 양으로 사용되어, 이에 의해 유발되는 부작용을 제거하거나 감소시킨다.

[0178] 본원에 기재된 재치료 방법에서, 제2 의약이 길항제 노출과 함께 유효량으로 투여되는 경우, 이것은 임의의 노출, 예를 들어 단지 1회의 노출, 또는 1회 초과의 노출과 함께 투여된다. 한 실시양태에서, 제2 의약은 초기 노출과 함께 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 제2 의약은 초기 및 제2 노출과 함께 투여된다. 추가 실시양태에서, 제2 의약은 모든 노출과 함께 투여된다. 예컨대 스테로이드의 초기 노출 후 이러한 제2 의약의 양을 감소시키거나 제거하여 부작용을 갖는 작용제, 예컨대 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 및 시클로포스파미드에 대한 대상체의 노출을 감소시키는 것이 바람직하다.

[0179] 제2 의약의 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 공-투여 (동시 투여), 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성제 (의약)가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 기간이 존재한다.

[0180] 본원의 길항제는 임의의 적합한 수단, 예컨대 비경구, 국소, 피하, 복강내, 폐내, 비강내 및/또는 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내 (i.v.), 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 척수강내 투여가 또한 고려된다. 또한 길항제는 펠스 주입에 의해, 예를 들어 감소되는 길항제 용량으로 적합하게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 정맥내 또는 피하, 보다 바람직하게는 정맥내 주입(들)에 의해 이루어진다.

[0181] 길항제의 다중 노출이 제공되는 경우, 각각의 노출은 동일한 또는 상이한 투여 수단을 사용하여 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 노출은 정맥내 투여에 의한다. 또 다른 실시양태에서, 각각의 노출은 피하 투여에 의해 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 노출은 정맥내 및 피하 투여 둘 다에 의해 제공된다.

[0182] 한 실시양태에서, 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체는 정맥내 푸쉬 또는 볼루스 보다는 오히려 느린 정맥내 주입으로 투여된다. 예를 들어, 프레드니솔론 또는 메틸프레드니솔론과 같은 스테로이드 (예를 들어, 약 80-120 mg i.v., 보다 구체적으로 약 100 mg i.v.)는 항-VEGF 항체의 임의의 주입 전 약 30분에 투여된다. 항-VEGF 항체는, 예를 들어 전용 경로를 통해 주입된다.

[0183] 항-VEGF 항체에 대한 다중 용량 노출의 초기 용량에 대해, 또는 노출이 단지 1회분 용량만을 포함하는 경우

단일 용량에 대해서는 이러한 주입을 약 50 mg/시간의 속도로 시작하는 것이 바람직하다. 이는, 예를 들어 약 30분마다 약 50 mg/시간의 속도로 단계적으로 상승시켜 최대 약 400 mg/시간이 되도록 할 수 있다. 그러나, 대상체가 주입-관련 반응을 경험하게 되면, 주입 속도를 예를 들어 현 속도의 절반으로, 예를 들어 100 mg/시간에서 50 mg/시간으로 줄이는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 이러한 용량의 항-VEGF 항체 (예를 들어, 약 1000-mg 총 용량)의 주입은 약 255분 (4시간 15분)에 완료된다. 임의로, 주입을 시작하기 약 30분 내지 60분 전에 대상체는 경구로 아세트아미노펜/파라세타몰 (예를 들어 약 1 g) 및 디펜히드라민 HCl (예를 들어 약 50 mg 또는 등가 용량의 유사 작용제)의 예방적 치료를 받는다.

[0184] 총 노출을 달성하기 위해 항-VEGF 항체를 1회 초과 주입 (용량)으로 투여하는 경우에는, 이러한 주입 실시양태에서 제2 또는 후속 항-VEGF 항체 주입을 초기 주입보다 고속으로, 예를 들어 약 100 mg/시간으로 시작하는 것이 바람직하다. 이러한 속도는, 예를 들어 약 30분마다 약 100 mg/시간의 속도로 단계적으로 상승시켜 최대 약 400 mg/시간이 되도록 할 수 있다. 주입-관련 반응을 경험하는 대상체는 주입 속도를 현 속도의 절반으로, 예를 들어 100 mg/시간에서 50 mg/시간으로 줄이는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 이러한 제2 또는 후속 용량의 항-VEGF 항체 (예를 들어, 약 1000-mg 총 용량)의 주입은 약 195분 (3시간 15분)에 완료된다.

[0185] 바람직한 실시양태에서, 길항제는 항-VEGF 항체이고, 약 0.4 내지 4 g의 용량으로 투여되고, 보다 바람직하게는 항체는 약 1 개월의 기간 내에 1회 내지 4회 투여 빈도로 약 0.4 내지 1.3 g의 용량으로 투여된다. 보다 더 바람직하게는, 용량은 약 500 mg 내지 1.2 그램이고, 다른 실시양태에서는 약 750 mg 내지 1.1 그램이다. 이러한 측면에서, 길항제는 바람직하게는 2 내지 3회의 용량으로 투여되고/거나 약 2 내지 3주의 기간 내에 투여된다.

[0186] 한 실시양태에서, 대상체는 이전에 혈관신생 장애를 치료하기 위한 어떠한 약물(들)도 투여받은 적이 없다. 또 다른 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 혈관신생 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 의약(들)을 이전에 투여받은 적이 있다. 추가 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 이전에 투여받았던 적어도 하나의 의약에 대해 반응하지 않았다. 대상체가 반응하지 않을 수 있는 이러한 약물은, 예를 들어 항신생물제, 화학요법제, 세포독성제 및/또는 성장 억제제를 포함한다. 보다 특히, 대상체가 반응하지 않을 수 있는 약물은 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체를 포함한다. 추가 측면에서, 이러한 길항제는 항체 또는 이뮤노어드헤신을 포함하여, 대상체가 이전에 비-반응성이었던 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 이뮤노어드헤신을 사용한 재치료가 고려된다.

#### IV. 길항제로의 치료

[0188] 길항제로의 치료에 대해 가장 반응성 또는 감수성인 환자 집단이 확인되면, 본원의 길항제를 단독으로 또는 다른 의약과 조합하여 사용한 치료는 혈관신생 장애를 개선시킨다. 예를 들어, 이러한 치료는 종양 크기의 감소 또는 무진행 생존을 유발할 수 있다. 추가로, 본원의 길항제 및 하나 이상의 제2 의약(들)의 조합물로의 치료는 바람직하게는 환자에게 상가적인, 보다 바람직하게는 상승작용적인 (또는 상가적인 것보다 더 우수한) 치료 이익을 나타낸다. 바람직하게는, 이 조합 방법에서, 제2 의약의 1회 이상의 투여와 본원의 길항제의 1회 이상의 투여 사이의 시간 간격은 약 1개월 이하, 보다 바람직하게는 약 2주 이하이다. 본원에 기재된 바와 같은 VEGF 길항제의 투여는 임의로 본 발명에 포함된다. 따라서, 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법에 따라 이러한 치료로부터 이익을 얻을 환자인 것으로 확인되거나 확인된 바 있는 환자에서, VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙)의 투여에 의해 암 (예를 들어, 결장직장암, 유방암, 폐암 또는 교모세포종)을 치료하는 방법을 제공한다.

[0189] 의학 분야의 당업자는, VEGF 길항제에 대한 환자의 반응가능성을 진단한 후에 상기 환자에게 치료 유효량의 VEGF 길항제를 투여하는 정확한 방식이 담당의의 판단에 따라 좌우될 것임을 인지할 것이다. 투여 방식, 예컨대 투여량, 다른 작용제와의 조합, 투여 시기 및 빈도 등은 이러한 길항제에 대한 환자의 반응가능성의 진단 뿐만 아니라 환자의 상태 및 병력에 의해 영향을 받을 수 있다. 따라서, 심지어 상대적으로 길항제에 대해 감수성이지 않을 것으로 예측된 혈관신생 장애로 진단된 환자도 여전히 길항제로의 치료로부터, 특히 다른 작용제 (길항제에 대한 환자의 반응성을 변경시킬 수 있는 작용제)와 조합된 길항제로의 치료로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0190] 길항제를 포함하는 조성물은 양호한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화되어 용량에 따라 분배되고 투여될 것이다. 이러한 맥락에서 고려할 인자는 치료할 혈관신생 장애의 특정 유형, 치료할 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 혈관신생 장애의 원인, 길항제의 전달 부위, 가능한 부작용, 길항제의 유형, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 진료의에게 공지된 기타 요인을 포함한다. 투여할 길항제의 유효량은 이러한 고려사항에 의

해 좌우될 것이다.

[0191] 일반적인 제안으로, 1회 이상의 투여량에 의해 용량 당 비경구 투여되는 길항제의 유효량은 약 20 mg 내지 약 5000 mg의 범위일 것이다. 항체, 예컨대 항-VEGF 항체의 경우 예시적인 투여 요법은 1, 2, 3 또는 4주마다 100 또는 400 mg을 포함하거나, 또는 1, 2, 3 또는 4주마다 약 1, 3, 5, 10, 15 또는 20 mg/kg의 용량으로 투여된다. 상기 용량은 단일 용량으로서 또는 다중 용량 (예를 들어, 2 또는 3회의 용량)으로서 투여, 예컨대 주입될 수 있다.

[0192] 그러나, 상기 언급된 바와 같이, 이들 제안된 길항제의 양은 수많은 치료적 판단에 따라 결정된다. 적절한 용량을 선택하고 스케줄을 작성하는데 있어서의 주요 인자는 상기 표시된 바와 같은 획득된 결과이다. 일부 실시양태에서, 길항제는 혈관신생 장애의 첫번째 징후, 진단, 시작 또는 발생과 가능한 한 가까운 시점에 투여된다.

[0193] 길항제는 임의의 적합한 수단, 예컨대 비경구, 국소, 피하, 복강내, 폐내, 비강내, 및/또는 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 척수강내 투여가 또한 고려된다. 또한 길항제는 펄스 주입에 의해, 예를 들어 감소되는 길항제 용량으로 적합하게 투여될 수 있다. 가장 바람직하게는, 투여는 정맥내 주사에 의해 이루어진다.

[0194] 본원의 길항제와 함께, 상기 언급된 바와 같이, 제2 의약을 투여할 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 공-투여, 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하며, 여기서 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 기간이 존재한다.

[0195] 길항제를 상기 언급된 바와 같은 전통적인 경로에 의해 환자에게 투여하는 것 이외에도, 본 발명은 유전자 요법에 의한 투여를 포함한다. 길항제를 코딩하는 핵산의 이러한 투여는 "유효량의 길항제를 투여하는"이라는 표현에 의해 포괄된다. 예를 들어, 세포내 항체를 생성시키기 위한 유전자 요법의 이용에 관한 WO 1996/07321을 참조한다.

[0196] 핵산 (임의로 벡터에 함유된 것)을 생체내 및 생체외에서 환자의 세포에 도입하기 위한 2가지 주요 접근법이 존재한다. 생체내 전달의 경우, 핵산은 통상적으로 길항제가 필요한 부위에서 환자에게 직접 주사된다. 생체외 치료의 경우, 환자의 세포를 꺼내어 핵산을 상기 단리된 세포에 투입하고, 변형된 세포를 환자에게 직접, 또는 예를 들어 환자에게 이식될 다공성 막 내로 캡슐화하여 투여한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,892,538 및 5,283,187 참조). 핵산을 살아있는 세포에 도입하는 다양한 기술이 이용가능하다. 이러한 기술은 핵산이 시험관내 배양된 세포 내로 전달되는지 또는 의도한 숙주의 세포로 생체내 전달되는지의 여부에 따라 달라진다. 핵산을 포유동물 세포로 시험관내 전달하는데 적합한 기술은 리포솜, 전기천공, 미세주사, 세포 융합, DEAE-덱스트란, 인산칼슘 침전 방법 등의 이용을 포함한다. 유전자의 생체외 전달을 위해 일반적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

[0197] 현재 바람직한 생체내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터 (예컨대, 아데노바이러스, 제I형 단순 헤르페스 바이러스 또는 아데노-연관 바이러스) 및 지질-기반 시스템 (유전자의 지질 매개 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 사용한 형질감염을 포함한다. 일부 상황에서는, 핵산 공급원에 표적 세포에 대해 특이적인 작용제, 예를 들어 표적 세포 상의 세포 표면 막 단백질에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜을 사용하는 경우, 세포내이입과 연관된 세포-표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정한 세포 유형에 대해 주성인 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 순환시 내재화되는 단백질에 대한 항체, 세포내 국재화를 표적화하고 세포내 반감기를 향상시키는 단백질을 표적화 및/또는 흡수를 용이하게 하는데 사용할 수 있다. 수용체-매개 세포내이입의 기술은, 예를 들어 문헌 [Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); 및 Wagner et al., PNAS USA 87:3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 유전자-표식 및 유전자 요법 프로토콜은, 예를 들어 문헌 [Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)] 및 WO 1993/25673에 기재되어 있다.

[0198] VEGF 길항제는 조합 요법으로서의 투여 방식 또는 제약 조합 제제에서, 항암 특성을 지닌 적어도 하나의 추가의 화합물과 조합될 수 있다. 제약 조합 제제 또는 투여 요법의 적어도 하나의 추가의 화합물은 바람직하게는 VEGF 길항제 조성물에 대해 상보적 활성을 지녀, 서로 불리한 영향을 미치지 않는다.

[0199] 하나 이상의 추가의 화합물은 화학요법제, 세포독성제, 시토카인, 성장 억제제, 항호르몬제, 및 그의 조합일 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)를 함유하는 제약 조성물은 또한 치료 유효량의 항신생물제, 화학요법제, 성장 억제제, 세

포독성제, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0200] 한 측면에서, 제1 화합물은 항-VEGF 항체이고, 적어도 하나의 추가의 화합물은 항-VEGF 항체 이외의 치료 항체이다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 화합물은 암 세포 표면 마커와 결합하는 항체이다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 화합물은 항-HER2 항체, 트라스투주맙 (예를 들어, 헤르셉틴(Herceptin)®, 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.), 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)이다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 화합물은 항-HER2 항체, 폐르투주맙 (옴니타르그(Omnitarg)™, 제넨테크, 인크., 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코, US6949245 참조)이다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 화합물은 항체 (네이키드 항체 또는 ADC)이고, 추가의 항체는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 그 초과의 항체로, 이러한 (네이키드 또는 ADC로서의) 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 그 초과의 항체의 조합은 혈관신생 장애를 치료하는데 유효하다.

[0201] 방사선 요법 및/또는 골수 및 말초 혈액 이식, 및/또는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 본 발명에 따른 다른 치료 요법은 VEGF-길항체 항암제의 투여를 포함할 수 있다. 이러한 한 실시양태에서, 화학요법제는 작용제 또는 작용제들의 조합물, 예컨대 예를 들어 시클로포스파미드, 허드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빙크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)™), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예컨대 항-PSCA, 항-HER2 (예를 들어, 헤르셉틴®, 옴니타르그™)이다. 조합 요법은 동시 또는 순차 요법으로서 투여될 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우에, 조합물은 2회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 공투여, 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 기간이 존재한다.

[0202] 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체로의 치료는 본원에서 확인된 항암제와, 하나 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (상이한 화학요법제의 칵테일을 동시 투여하는 것 포함)를 포함한다. 화학요법제는 턱산 (예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라시클린 항생제를 포함한다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 제조사의 지시에 따라 또는 숙련의에 의해 경험적으로 결정되는 바와 같이 사용될 수 있다. 이러한 화학 요법을 위한 제제 및 투여 스케줄은 또한 문헌 ["Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md]에 기재되어 있다.

[0203] 상기 공투여되는 작용제 중 임의의 것에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 투여량이며, 새로 확인된 작용제 및 다른 화학요법제 또는 치료제의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 감량될 수 있다.

[0204] 조합 요법은 "상승작용"을 제공할 수 있고, "상승작용적"인 것으로 입증되었는데, 즉 활성 성분들을 함께 사용한 경우에 달성된 효과는 화합물을 개별적으로 사용하여 얻은 효과들의 합보다 크다. 상승작용 효과는 활성 성분들이 (1) 공동-제제화되어 투여되거나 또는 조합된 단위 투여 제제 중에서 동시에 전달되는 경우, (2) 별개의 제제로서 교대로 전달되거나 또는 동시에 전달되는 경우, 또는 (3) 일부 다른 요법으로 전달되는 경우에 달성될 수 있다. 교대 요법으로 전달되는 경우의 상승작용적 효과는 화합물들이 순차적으로 투여되거나 또는 전달되는 경우, 예를 들어 별개의 시린지에서 상이한 주사로 순차적으로 투여되거나 또는 전달되는 경우에 달성될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안에는 유효 투여량의 각 활성 성분이 순차적으로, 즉 연속적으로 투여되지만, 조합 요법에서는 유효 투여량의 2종 이상의 활성 성분이 함께 투여된다.

[0205] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 추가의 치료제의 적절한 투여량은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, VEGF 길항제 및 추가의 작용제가 예방 목적으로 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 VEGF 길항제 및 추가의 작용제에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의존적일 것이다. VEGF 길항제 및 추가의 작용제는 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. VEGF 길항제는 전형적으로 상기한 바와 같이 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 약 20 mg/m<sup>2</sup> 내지 600 mg/m<sup>2</sup>의 추가의 작용제가, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의하든지 또는 연속 주입에 의하든지, 환자에의 투여를 위한 초기 후보 투여량이다. 한가지 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라, 약 20 mg/m<sup>2</sup>, 85 mg/m<sup>2</sup>, 90 mg/m<sup>2</sup>, 125 mg/m<sup>2</sup>, 200 mg/m<sup>2</sup>, 400 mg/m<sup>2</sup>, 500 mg/m<sup>2</sup> 또는 그 초과의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 상태에 따라 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 치료를 지속한다. 따라서, 약 20 mg/m<sup>2</sup>, 85 mg/m<sup>2</sup>, 90 mg/m<sup>2</sup>, 125 mg/m<sup>2</sup>, 200 mg/m<sup>2</sup>, 400 mg/m<sup>2</sup>, 500 mg/m<sup>2</sup>, 600 mg/m<sup>2</sup> (또는 그의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량을 환자에게 투여할 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 2, 3, 4, 5 또는 6주마다 투여될 수 있다 (예를 들어 환자가 추가의 작용제를 약 2 내지 약 20회, 예를 들

어 약 6회의 용량으로 제공받을 수 있도록 함). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

#### [0206] V. 제약 제제

본 발명에 따라 사용되는 길항제의 치료 제제는, 목적하는 정도를 갖는 길항제를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 동결건조된 제제 또는 수용액 형태로 저장하도록 제조된다. 제제에 관한 일반적인 정보에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Gilman et al., (eds.) (1990), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th Ed., Pergamon Press; A. Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Eastori, Pennsylvania.; Avis et al., (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, New York; Lieberman et al., (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, New York; 및 Lieberman et al., (eds.) (1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, New York, Kenneth A. Walters (ed.) (2002) *Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, Vol 119, Marcel Dekker]을 참조한다.

허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐파리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 퀼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0209] 예시적인 항-VEGF 항체는 미국 특허 번호 6,884,879에 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 1회용 바이알 내에 25 mg/mL로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 100 mg의 항-VEGF 항체는 240 mg의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 2수화물, 23.2 mg의 인산나트륨 (일염기성, 1수화물), 4.8 mg의 인산나트륨 (이염기성 무수), 1.6 mg의 폴리소르베이트 20, 및 주사용수, USP로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 400 mg의 항-VEGF 항체는 960 mg의  $\alpha$ ,  $\alpha$ -트레할로스 2수화물, 92.8 mg의 인산나트륨 (일염기성, 1수화물), 19.2 mg의 인산나트륨 (이염기성 무수), 6.4 mg의 폴리소르베이트 20, 및 주사용수, USP로 제제화된다.

[0210] 피하 투여에 적합한 동결건조 제제는, 예를 들어 미국 특허 번호 6,267,958 (안댜(Andya) 등)에 기재되어 있다. 이러한 동결건조 제제는 적합한 희석제를 사용하여 높은 단백질 농도로 재구성될 수 있고, 재구성된 제제가 본원에서 치료될 포유동물에게 피하 투여될 수 있다.

[0211] 길항제의 결정화된 형태도 또한 고려된다. 예를 들어, US 2002/0136719A1을 참조한다.

[0212] 본원에서의 제제는 또한 하나 초과의 활성 화합물 (상기 언급된 바와 같은 제2의 의약), 바람직하게는 서로에게 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 것을 함유할 수도 있다. 이러한 의약의 유형 및 유효량은, 예를 들어 제제 중에 존재하는 VEGF 길항제의 양 및 유형, 및 대상체의 임상적 파라미터에 따라 달라진다. 바람직한 이러한 제2 의약은 상기 언급되어 있다.

[0213] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드 성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 마크로에멀젼에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0214] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 지속 방출형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체,

비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로구체), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0215] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0216] 표 1.

|          |           |         |          |         |          |          |         |
|----------|-----------|---------|----------|---------|----------|----------|---------|
| ABCC9    | CD97      | DLC1    | GIMAP5   | LEPREL2 | PCDH18   | RRAS     | THSD1   |
| ACVRL1   | CD105     | DLL4    | GIMAP6   | LHFP    | PDGFB    | SIPRI    | THY1    |
| ADAM12   | CD144     | DPYS    | GJA4     | LIX1L   | PDGFD    | SIPR3    | TIMP3   |
| ADAMTS1  | CD276     | DUSP6   | GJC1     | LIMS2   | PDGFRB   | SCARF1   | TMEM88  |
| ADAMTS2  | CARD11    | EBF2    | GPR4     | LMO2    | PHACTR2  | SEMA3F   | TMEM204 |
| ADAMTS12 | CDC42EP1  | EFNB2   | GPR124   | LPAR6   | PLK2     | SEPT4    | TM4SF1  |
| AFAP1L2  | CDH11     | EGFL7   | HAPLN1   | LRP4    | PLVAP    | SERPINE1 | TNFAIP2 |
| AHR      | CDH5      | EHD4    | HEY2     | LRRC33  | PLXDC2   | SERPINH1 | TNNT2   |
| Alk1     | CDRT4     | ELTD1   | HEYL     | LY6E    | PPAP2A   | SLC9A3R2 | TP53    |
| AMOTL1   | CES2      | EMCN    | HIGD1B   | MAPK12  | PPAP2B   | SLC11A1  | TREML4  |
| ANGPT2   | CHST15    | ENG     | HLX      | MCAM    | PPFIA4   | SLC5A2   | TRDN    |
| ANXA1    | CLEC4D    | ERG     | HOXA3    | MECOM   | PPM1F    | SLC22A9  | TRIB2   |
| APLNR    | CLEC6A    | ESAM    | HOXD8    | MED24   | PTAFR    | SLC22A25 | TRIM5   |
| ARAP3    | CLEC14A   | ESM1    | ICAM2    | MDFIC   | PRICKLE2 | SLC43A3  | TSLP    |
| ARHGAP29 | CLEC1A    | ETS1    | IDI1     | MEF2C   | PROCR    | SLFN5    | TSP1    |
| ARHGAP31 | CNN2      | F2R     | IFI44    | MFGE8   | PRKCDBP  | SNCG     | TUSC5   |
| ART3     | COL15A1   | F2RL3   | IGFBP3   | MMRN2   | PRKCH    | SOD3     | UBXN10  |
| ASB2     | COL18A1   | FAM19B8 | IL2RG    | MYCT1   | PRND     | SOX7     | USHBP1  |
| ATP1B4   | COL1A2    | FANCI   | INHBB    | NAALAD2 | PRR5L    | SOX18    | VAMP5   |
| BGN      | COL4A1    | FBLN5   | ITPR1PL2 | NFIB    | PTPRB    | SPARC    | VEGFR1  |
| BHMT2    | COL4A2    | FBN1    | JUB      | NHSL2   | PTPRG    | SPIC     | VEGFR2  |
| BTNL9    | COL4A3    | FKBP10  | KANK3    | NID1    | PTPRM    | SRGN     | VEGFR3  |
| BMPR2    | COL8A1    | FLII    | KCNE3    | NID2    | QKI      | SPRY4    | VIM     |
| BPIFB1   | COMM7     | FLT1    | KDR      | NNMT    | RAPGEF3  | STAT1    | WISP1   |
| BST2     | CRTAM     | FMOD    | KIAA1274 | NOS3    | RAPGEF5  | STEAP4   | WWTR1   |
| C3orf64  | CSPG4     | FREM1   | KIAA1462 | NOTCH1  | RASIP1   | STON1    | ZFP36L1 |
| C8orf4   | CTGF      | FSTL1   | KLHL4    | NRARP   | RASGRP3  | STON1-   |         |
| C13orf15 | CTTNBP2NL | FXYD5   | KLHL5    | NRP1    | RPB7     | ST8SIA4  |         |
| C1S      | CYYR1     | GAS6    | KLHL6    | NRP2    | RBMS1    | ST8SIA6  |         |
| CAV1     | DAPK2     | GAS7    | KLRB1    | NRXN3   | RGS5     | SWAP70   |         |
| CCND1    | DCHS1     | GIMAP1  | KPNA7    | P2RX7   | REST     | TEK      |         |
| CD34     | DDAH1     | GIMAP2  | LAMA4    | PBX2    | RHOJ     | TFAP2C   |         |
| CD40     | DEF6      | GIMAP3  | LAMB1    | PCDH12  | RIN3     | THBS1    |         |
| CD93     | DKK2      | GIMAP4  | LATS2    | PCDH17  | ROBO4    | THBS2    |         |

[0217]

표 2.

|        |        |        |
|--------|--------|--------|
| Alk1   | EGFL7  | RGS5   |
| CD34   | ESM1   | Sema3f |
| CD105  | LAMA4  | TSP1   |
| CD144  | NG2    | VEGFR1 |
| Col4a1 | Nid2   | VEGFR2 |
| Col4a2 | Notch1 | VEGFR3 |
| Dll4   | NRP1   | VIM    |
| EFNB2  | NRP2   |        |

[0219]

실시예

[0220] 하기 실시예는 예시를 위해 제공되는 것이지, 청구하고 있는 본 발명을 제한하기 위한 것은 아니다.

[0221] 실시예 1. 물질 및 방법

[0222] 마우스 계통 및 모델

[0223] 본 발명자들은 엑셀리시스, 인크.(Exelixis, Inc.)로부터 RIP-TβAg 마우스를, 하를란(Harlan)으로부터 베이

지 누드 XID 마우스를 입수하였다. 동물은 제넨테크, 인크.에서 동물 실험 윤리 위원회 (IACUC)로부터의 가이드라인에 따라 하우징 및 관리하였다.

#### [0225] 치료 요법 및 투여

모든 투여 요법은 IACUC 가이드라인에 따라 수행하였다. 연구 동물을 매일 모니터링하고, 체중을 매주 적어도 2회 측정하였다. 생물발광 영상화에 의한 종양 성장 및 요법에 대한 반응의 모니터링을 비롯하여 두개내 종양 확립에 이용된 절차는 이전에 기재된 바 있다 (문헌 [Ozawa and James. *J Vis Exp.* 41: 1-5, 2010]). 항-혈관계 내피 성장 인자 (VEGF) 모노클로날 항체 B20-4.1.1, 항-페지풀 (대조군) 및 항-D114를 이전에 기재된 바와 같이 제조 및 정제하고 (문헌 [Fuh et al. *J Biol Chem.* 281: 6625-6631, 2006]), 면역손상 마우스에서 모든 실험에 대해 복강내 (i.p.) 주사에 의해 5 또는 10mg/kg으로 매주 2회, RIP-T $\beta$ Ag 마우스에서 매주 1회 (5mg/kg) 투여하였다. 수니티닙을 경구 위관영양에 의해 60mg/kg으로 매일 투여하였다. 상처 치유 검정을 이전에 문헌 [Bais et al. (*Cell.* 141: 166-177, 2010)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

#### [0227] 면역형광 염색 & 조직학적 정량화

종양-보유 RIP-T $\beta$ Ag 마우스로부터 절제한 전체 췌장을 4°C에서 5-10분 동안 수크로스 (30%) 중에서 인큐베이션하고, 이어서 PBS로 세척 (각각 2회 15분)하였다. 이어서, 췌장을 옵티멈 컷팅 템퍼러처(Optimum Cutting Temperature) (OCT, 사쿠라 파인텍(Sakura Finetek)) 배지를 함유하는 크리오몰드(cryomold)에 넣고, -70°C에서 유지하였다. 췌장의 절편 (6  $\mu$ m)을 크리오스탯(cryostat) 기기 (라이카 마이크로시스템즈(Leica Microsystems))를 사용하여 각각의 OCT 블록으로부터 절단하고, 염색에 사용할 때까지 -70°C에서 유지하였다. 면역형광 염색을 위해, 동결 절편을 실온에서 공기-건조시키고, 차가운 아세톤으로 5-10분 동안 고정하였다. 이어서, 절편을 다시 건조시키고, PBS 중 2.5% BSA 및 5% 당나귀 혈청을 함유하는 완충제로 30-60분 동안 차단하였다. 차단 완충제 중에 희석 (제조업체의 가이드라인에 따른 희석)된 1차 항체로의 염색을 4°C에서 밤새 수행하였다. 이어서, 절편을 PBS로 세척하고, 차단 완충제 중에 1:300 희석된 2차 항체에 30-60분 동안 노출시킨 다음, PBS 중에서 다시 세척하였다. 최종적으로, 핵 시각화를 위해 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI, 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))를 함유하는 다코(DAKO) (다코)에 절편을 마운팅하였다.

하기 항체를 면역형광 염색에 사용하였다: 1차 래트 항-마우스 메카-32 항체 (인비트로젠, 인크.(Invitrogen, Inc.)), 토끼 항-Ki67, 및 클론 SP6 (리서치 디아그노스틱스, 인크.(Research Diagnostics, Inc.)). 2차 항체는 알렉사-594 접합된 당나귀 항-래트 및 항-토끼 및 알렉사-488 접합된 당나귀 항-토끼 및 염소 항-닭 (인비트로젠, 인크.)을 포함하였다. 염색된 슬라이드 상의 종양을 현미경으로 확인하고, 악시오스콥(Axioskop) 및 악시오비전(Axiovision) 소프트웨어 (자이스, 인크.(Zeiss, Inc.))를 이용하여 촬영하고, 이미지 상의 조직학적 정량화를 메타모르프(Metamorph) 소프트웨어 (몰레큘라 다이나믹스(Molecular Dynamics))에서 특화된 알고리즘을 이용하여 수행하였다. 각각의 시점에서, 섬/종양 당 적어도 3-5개의 이미지 x 각각의 마우스로부터의 5개의 종양 x 3마리의 마우스 = 15개의 독립적 병변으로부터의 45-75개의 이미지/시점/치료로부터 평균 측정치를 계산하였다. 이식된 종양 모델에서의 미세-혈관 밀도 (MVD) 분석을 위해, 치료군당 6마리의 마우스로부터의 종양을 수집하고, O.C.T. 블록에 포매시켰다. 조직을 라이카 CM3050S 상에서 16- $\mu$ m 두께로 초저온-절단하고, CD31 항체 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))로 염색하였다. 이미지를 티슈FAXS(TissueFAXS) 소프트웨어에 의해 제어되는 자이스 악시오이미저(AxioImager) Z1 형광 현미경으로 획득하였다. 이미지 파일을 티슈스튜디오(TissueStudio) 분석 패키지 (v1.5, 데피니엔즈(Definiens))에 로딩하였다. 괴사성 조직 및 염색 허상, 예컨대 피부 조직 및 주름은 핵 염색에 기반하여 자동으로 확인 및 제외되었다. 혈관 밀도를 총 생존 종양 면적에 대한 CD31-양성 핵 셀의 비로 계산하였다.

#### [0230] 마이크로어레이 실험

전체 RNA를 하기와 같이 치료 7일 후의 대조군 및 항-VEGF-치료된 RIP-T $\beta$ Ag 종양으로부터 추출하였다: 0.25% 아베르틴을 체중에 따라 복강내로 주사하여 사용함으로써 마우스를 마취하였다. 복강을 개방시켜 췌장관에 접근하고 총담관을 통해 췌장을 관류시켰다. 췌장을 제조업체의 지침에 따라 희석된 리버라제(Liberase) TL (로슈(Roche)) 대략 2.5 ml로 관류시켰다. 이어서, 췌장을 복강으로부터 절제하고, 종양을 외분비 췌장으로부터 추가로 육안-절제하였다. 종양을 신선한 관류 용액 중에 혼탁시키고, 5-6분 동안 37°C에서 교반한 다음, 해부 현미경 하에 재검사하고, 외분비 췌장의 임의의 남아있는 단편을 제거하였다. 이어서, 깨끗한 종양을 RNA레이터(RNALater) 용액 (퀴아젠, 인크.(Qiagen, Inc.)) 중에서 급속-동결시켰다. 면역-결핍 마우스에서의 모든 이식 실험에 대해, 동물을 연구 간격의 종료시에 안락사시키고, 종양을 절제하고 급속 동결시켰다. 전체 RNA를 추출하고, 애질런트(Agilent) 전체 마우스 게놈 44K 어레이, 아피메트릭스 HGU133-플러스2

또는 애질런트 전체 인간 게놈 어레이를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 마이크로어레이를 실행하였다.

[0232] 세포 배양

D551 (ATCC) 피부 섬유모세포 세포를 태아 소 혈청 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 폐니실린 (100 유닛/mL), 스트렙토마이신 (100  $\mu$ g/mL)에 의해 보충된 M199 배지 (인비트로젠) 중에서 배양하였다. 1차 인간 제대 혈관 내피 세포 (HUVEC)를 (론자 워커스빌(Lonza Walkersville))로부터 구입하고, EGM-2 배지 (론자 워커스빌) 중에서 유지하였다. 조건 배지: D551 세포를 90% 전면생장률로 성장시키고, 배지를 EGM-2로 교체하고, 7일의 인큐베이션 후, 상청액을 수집하고, 4°C에 저장하였다.

[0234] HUVEC 형질감염 및 발아 검정

COL4A2, NID2 및 MEST 유전자 발현 침묵화: 세포를 70% 전면생장률로 성장시키고, 다르마펙트1(DharmaFECT1)을 제조업체의 지침 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 따라 사용하여 siRNA를 형질감염시켰다. 형질감염을 위한 모든 siRNA의 최종 농도는 12.5 nM이었고, 각각의 유전자에 대한 mRNA 하향조절은 qRT-PCR에 의해 확인하였다. 형질감염 24시간 후, 세포를 트립신처리하고, 사이토덱스(Cytodex) 마이크로캐리어 비드 (시그마-알드리치)와 2,500개 비드당  $1 \times 10^6$ 개 세포의 비로 혼합하였다. 코팅을 37°C에서 4시간 동안 수행하고, 혼합물을 20분마다 손으로 진탕시켰다. 이어서, 코팅된 비드를 6-웰 접시로 옮기고, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 EGM-2 중에서 18-20시간 동안 정착하였다. 다음날, 코팅된 비드를 EGM-2로 세척하고, EGM-2 중 피브리노겐 (2 mg ml<sup>-1</sup>; 시그마-알드리치)의 용액 중에 용해시켰다. 24-웰 조직 배양 플레이트의 1개의 웰에서 약 200개의 HUVEC 코팅된 비드를 함유하는 용액을 0.625 U ml<sup>-1</sup>의 트롬빈 (시그마)에 첨가하였다.  $8 \times 10^4$ 개의 피부 섬유모세포 세포 (D551)를 덩어리의 상부에 플레이팅하고, 20ug/ml의 항체를 함유하는 2 ml D551 조건 배지/EGM-2 (1:3)와 함께 인큐베이션하였다. 배지를 2일마다 교체하고, 검정을 제4일에 종결하였다. 4% 파라포름알데히드 (PFA) 중에서 고정된 피브린 젤에서 실온에서 2시간 동안 면역염색한 다음, 차단 완충제 (다코)로 실온에서 4시간 동안 차단하고, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 팔로이딘 (1:100) 및 휘스트 (Hoechst) 33258 (1:1000) (인비트로젠)과 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하고, 이어서 영상화함으로써 HUVEC 발아를 가시화하였다. 이미지 엑스프레스 마이크로(Image Xpress Micro)를 사용하여 이미지를 캡처하고, HUVEC 발아를 메타엑스프레스(MetaXpress) 소프트웨어에서 분석하였다. 혈관 성장의 3개의 성분을 측정하였다. 전체 성장은 비드당 모든 발아의 누적 길이를 나타내고, 평균 성장은 비드당 발아 분기의 수를 나타내고, 비드당 총 프로세스는 비드의 표면에 라이닝된 세포로부터 직접 유래된 발아의 수를 계수함으로써 결정하였다. 통계적 분석을 위해, 4개의 웰을 각각의 조건에 대해 평가하였고, 각각의 실험을 3회 반복하였다.

[0236] 정량적 유전자 발현 분석

[0237] RNA를 RNeasy 미니 키트 (퀴아젠)로 제조업체의 프로토콜에 따라 제조하였다. 500 ng의 전체 RNA를 고용량 cDNA 역전사 키트 (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용한 역전사에 적용시켰다. 실시간 PCR을 어플라이드 바이오시스템즈 7500 기계 상에서 실행하였다. 시험된 모든 유전자에 대한 택맨(Taqman) 프로브는 어플라이드 바이오시스템즈로부터 획득하였다. 각각의 유전자의 상대적 발현 수준을 액틴으로 정규화하였다.

[0238] 임상 샘플에서의 서명 유전자 발현의 결정

[0239] N016966의 XELOX 치료 아암에 등록된 환자로부터의 보존용 종양 샘플로부터의 절편을 병리학자에 의해 평가하고, FFPE RNA 단리 키트 (로슈; 환자당 7-10개의 절편)를 사용한 후속 RNA 단리를 위해 높은 총량 영역을 육안-절제하였다. 표준 기술에 따른 cDNA 합성 후에, 플루이딕 바이오마크 플랫폼 상에서 제조업체의 프로토콜에 따른 qPCR 프로토콜에 의해 RNA 수준을 평가하였다.

[0240] 유전자 서명 도출 및 적용

[0241] 애질런트 WMG 마이크로어레이로부터의  $\log_2$  비 강도 값 및 아피메트릭스 마우스430.2 마이크로어레이로부터의 견실한 다중-어레이 평균 (RMA) 정규화 강도 (또한 로그 눈금 상의 것임)를 패키지 "바이오베이스(Biobase)"를 이용하여 발현 세트로서의 R로 불러오고, 선형 모델을 "리마(limma)" 패키지에서 함수 "lmFit" 및 "eBayes"를 사용하여 각각의 특징에 적합시켰다. 항-VEGF 치료된 샘플에서 (항-꽤지풀 대조군 치료된 샘플과 비교시) 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 하향-조절된 특징을 유지하고, 엔트레즈진(EntrezGene) 식별자로 변환시켰다. 이를 유전자의 조합을 VEGF-반응성 혈관계의 대표인 것으로 하였다. 다른 실험에서 상기 VDV 유전자 발현 서명이 변하는 정도는 "리마" 패키지 (상기와 같음)를 사용하여 마이크로어레이 데이터에 선형 모델을 적합시키

고, 팔콘(Falcon) 및 젠틀맨(Gent leman)의 방법 (문헌 [Bioinformatics. 23: 257-258, 2007])에 따라 서명 내의 유전자로부터의 t-통계의 평균을 계산함으로써 결정하였다.

[0242] 바이오마커 선택의 통계적 방법

[0243] 통계 작업은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0244] 1. 후보 바이오마커의 사전 선택

[0245] 2. 관련 임상 효능 반응 예측 공변량의 사전 선택

[0246] 3. 단일변량 수준에서의 바이오마커 예측 함수의 선택

[0247] 4. 단일변량 수준에서의 임상적 공변량을 포함하는 바이오마커 예측 함수의 선택

[0248] 5. 다변량 수준에서의 바이오마커 예측 함수의 선택

[0249] 6. 다변량 수준에서의 임상적 공변량을 포함하는 바이오마커 예측 함수의 선택

[0250] 하기 내용은 다양한 단계를 상세히 설명한다:

[0251] 1: 후보 바이오마커의 사전 선택

후보 바이오마커의 통계적 사전 선택은 임상적 이익의 측정치와의 연관성의 강도에 따른다. 이러한 목적을 위해서, 여러가지 임상적 종점을 유도된 대용 점수, 예를 들어 TTP에 관한 임상적 이익 점수 정도에 관한 통상적 할당치 (관찰 중단을 포함)로 변환시킬 수 있다. 이러한 변환된 대용 측정치는 단순한 상관관계 분석을 위해, 예를 들어 비-모수 스퍼어만(Spearman) 랭크 상관관계 접근법을 통해 용이하게 사용될 수 있다. 대안은 바이오마커 측정치를 시간-대-사건 회귀 모델, 예를 들어 콕스(Cox) 비례 위험 회귀에서의 계량 공변량으로 사용하는 것이다. 바이오마커 값의 통계적 분포에 따라, 이러한 단계는 일부 사전-프로세싱, 예를 들어 분산-안정화 변환 및 적합한 스케일의 사용 또는 대안적으로 표준화 단계, 예컨대 원시 측정치 대신 백분위수의 사용을 필요로 할 수 있다. 추가의 접근법은 예를 들어 단일 환자를 기초로 한 산란점 ( $x$ -축 = 바이오마커 값,  $y$ -축 = 임상적 이익의 측정치)을 나타내어 이변량 산포도를 조사하는 것이다. 예를 들어 스플라인을 부드럽게 하여 달성되는 바와 같은 일부 비-모수 회귀선이 바이오마커와 임상적 이익의 연관성을 가시화하기에 유용할 수 있다.

[0253] 이러한 여러가지 접근법의 목적은, 사용된 이익 측정치 중 적어도 하나에서 임상적 이익과의 일부 연관성을 보여주지만 다른 측정치에 대한 결과와 모순되지 않는 바이오마커 후보물질의 사전 선택이다. 이용 가능한 대조군이 있는 경우, 상이한 측면에서 바이오마커와 임상적 이익의 연관성에서의 차이는 바이오마커(들)를 추가로 고려하기에 적절하게 하는 차별적 예측의 징후일 수 있다.

[0254] 2: 적절한 임상 효능 반응 예측 공변량의 사전 선택

[0255] 본원에 정의된 바와 같은 임상적 공변량의 통계적 사전 선택은 바이오마커의 사전 선택을 위한 접근법과 유사하고, 또한 임상적 이익의 측정치와의 연관성의 강도에 따른다. 따라서, 원칙적으로, 상기 1번에서 고려된 것과 동일한 방법이 적용된다. 통계적 기준에 추가하여, 임상적 경험 및 이론적 지식으로부터의 기준이 관련 임상적 공변량의 사전 선택에 적용될 수 있다.

[0256] 임상적 공변량의 예측 값은 바이오마커의 예측 값과 상호작용할 수 있다. 이들은 필요한 경우에는 규정된 예측 규칙에 따라 고려될 것이다.

[0257] 3: 단일변량 수준에서의 바이오마커 예측 함수의 선택

[0258] 용어 "예측 함수"는 일반적인 의미에서 표적 예측을 제공하도록 조절된 수를 생성하는 바이오마커 측정치의 수치적 함수를 의미하는데 사용될 것이다.

[0259] 단순한 예는 특정 컷오프  $c$  및 바이오마커 측정치  $x$ 에 대한 헤비사이드 함수의 선택이고, 여기서 2원성 예측  $A$  또는  $B$ 가 생성되며,  $H(x-c)=0$ 인 경우에는 예측  $A$ 이다.  $H(x-c)=1$ 인 경우에는 예측  $B$ 이다.

[0260] 이것이 아마도 단일변량 바이오마커 측정치를 예측 규칙에 이용하는 가장 일반적인 방식일 것이다. 상기한 바와 같이 "예측 함수"의 정의는 예측 가능성을 조사하는데 사용될 수 있는 기준의 트레이닝 데이터 세트에 대한 언급을 포함한다. 상이한 경로를 이용하여 트레이닝 세트로부터 적합한 컷오프  $c$ 를 구할 수 있다. 우선, 1번에서 언급된 부드러운 스플라인을 갖는 산포도를 이용하여 컷오프를 정할 수 있다. 대안적으로, 분포

의 몇가지 백분위수, 예를 들어 중앙값 또는 사분위수를 선택할 수 있다. 컷오프는 또한 임상적 이익의 측정치에 관한 예측 능력에 따라 모든 가능한 컷오프를 조사하여 체계적으로 추출될 수 있다. 이후, 이러한 결과를 플로팅하여 매뉴얼을 선택하거나 최적성을 위한 일부 검색 알고리즘을 이용할 수 있다. 이것은 콕스 모델을 사용한 특정 임상적 종점을 기초로 실현될 수 있으며, 여기서의 각각의 시험 컷오프에서 바이오마커는 2원성 공변량으로 사용된다. 이후, 임상적 종점에 대한 결과를 함께 고려하여 종점 둘 모두와 유사한 예측을 보여주는 컷오프를 선택할 수 있다.

[0261] 예측 함수를 선택하는 또 다른 비통상적인 접근법은 트레이닝 세트 및 바이오마커 값 (가능하게는 변환된 값)을 공변량으로 하여 수득된 고정된 파라미터 콕스 회귀 모델을 기초로 할 수 있다. 추가의 가능성은 약간의 우도비 (또는 그의 일률적 변환)에 대한 결정을 기초로 하는 것이며, 여기서 표적 확률 밀도는 예측 상태의 분리를 위해 트레이닝 세트에서 사전 결정된다. 이후, 바이오마커는 예측 기준의 일부 함수와 연결지어진다.

[0262] 4: 단일변량 수준에서의 임상적 공변량을 포함하는 바이오마커 예측 함수의 선택

단일변량은 오직 하나의 바이오마커를 사용하는 것을 지칭한다 -- 임상적 공변량에 관해서, 이것은 다변량 모델일 수 있다. 이 접근법은 임상적 공변량을 사용하지 않는 검색과 대등하지만, 상기 방법이 관련 공변량 정보의 혼입을 허용해야 한다는 점은 예외이다. 컷오프 선택의 산포도 방법은 오직 제한된 공변량 사용만을 허용하며, 예를 들어 2원성 공변량은 플롯 내에 코딩된 색상일 수 있다. 분석이 일부 회귀 접근법에 의존적인 경우, 공변량의 사용 (또한, 이들 중 많은 것들의 동시 사용)이 일반적으로 용이해진다. 상기 3번에 기재된 콕스 모델을 기초로 하는 컷오프 검색은 공변량의 용이한 혼입을 허용하여 공변량 조절된 단일변량 컷오프 검색을 유도한다. 공변량에 의한 조절은 상기 모델에서의 공변량으로서 또는 계층화된 분석 내에 포함시켜서 수행될 수 있다.

[0264] 또한, 예측 함수의 다른 선택은 공변량의 혼입을 허용한다.

[0265] 이것은 예측 함수로서 콕스 모델을 선택하게 한다. 이것은 예를 들어 다양한 연령 군의 경우에 상이한 예측 기준을 적용한다는 것을 의미하는, 상호작용 수준에 대한 공변량의 영향을 추정하기 위한 옵션을 포함한다.

[0266] 예측 함수의 우도비 유형의 경우, 예측 밀도는 공변량을 포함하여 추정되어야 한다. 이러한 목적상, 다변량 패턴 인식의 방법이 이용될 수도 있고, 또는 바이오마커 값이 공변량에 대한 다중 회귀에 의해 조절될 수도 있다 (밀도 추정 이전).

[0267] 바이오마커 (원시 측정 수준) 및 임상적 공변량을 사용하고 반응으로서 임상적 이익 측정치를 사용하는 CART 기술 (Classification and Regression Trees; 문현 [Breiman et al. (Wadsworth, Inc.: New York, 1984)])이 이러한 목적에 사용될 수 있다. 컷오프를 조사하고, 함수의 의사결정-트리 유형은 예측을 위한 공변량을 포함하는 것으로 확인될 것이다. CART에 의해 선택된 컷오프 및 알고리즘은 흔히 최적에 가깝고, 상이한 임상적 이익 측정치를 고려하여 조합되고 단일화될 수 있다.

[0268] 5: 다변량 수준에서의 바이오마커 예측 함수의 선택

[0269] 상이한 단일변량 예측 함수 선택 내에 예측 잠재력을 유지하는 여러 바이오마커 후보물질이 존재하는 경우, 바이오마커를 조합하여, 즉 다변량 예측 함수를 고려하여 추가의 개선이 달성될 수 있다.

[0270] 단순한 헤비사이드 함수 모델에 기반하여, 예를 들어 최적의 컷오프가 표시된 바이오마커 값의 이변량 산포도를 고려하여 바이오마커의 조합을 평가할 수 있다. 이후, 논리적인 "AND" 및 "OR" 연산자에 의해 여러가지 헤비사이드 함수를 조합하여 바이오마커의 조합을 달성함으로써 예측이 개선될 수 있다.

[0271] 다중 바이오마커 (원시 측정 수준) 및 반응으로서의 임상적 이익 측정치를 이용하는 CART 기술을 이러한 목적에 이용하여 바이오마커에 대한 컷오프 및 함수의 의사결정-트리 유형을 구하여 예측을 달성할 수 있다. CART에 의해 선택된 컷오프 및 알고리즘은 흔히 최적에 가깝고, 상이한 임상적 이익 측정치를 고려하여 조합되고 단일화될 수 있다.

[0272] 콕스 회귀는 상이한 수준으로 이용될 수 있다. 첫번째 방법은 2원성 방법으로 다중 바이오마커를 혼입하는 것이다 (즉, 몇가지 컷오프를 사용한 헤비사이드 함수에 기반함). 다른 옵션은 바이오마커를 계량적 방법 (적절한 변환 이후) 또는 2원성 및 계량적 접근법의 혼합 방식으로 이용하는 것이다. 전개되는 다변량 예측 함수는 상기 3번에 기재된 바와 같이 콕스 유형의 것이다.

- [0273] 다변량 우도비 접근법은 실시하기 어렵지만, 다변량 예측 함수에 대한 또 다른 옵션을 제공한다.
- [0274] 6: 다변량 수준에서의 임상적 공변량을 포함하는 바이오마커 예측 함수의 선택
- [0275] 적절한 임상적 공변량이 존재하는 경우, 다중 바이오마커를 다중 임상적 공변량과 조합하여 추가의 개선을 달성할 수 있다. 상이한 예측 함수 선택은 임상적 공변량을 포함하기 위한 가능성과 관련하여 평가될 것이다.
- [0276] 바이오마커에 대한 헤비사이드 함수의 단순한 논리적 조합에 기반하여, 추가의 공변량을 트레이닝 세트에서 구한 로지스틱 회귀 모델에 기반한 예측 함수에 포함시킬 수 있다.
- [0277] CART 기술 및 전개되는 의사결정-트리는 이들을 예측 알고리즘에 포함시키는 추가의 공변량과 함께 용이하게 사용될 수 있다.
- [0278] 콕스 회귀에 기반한 모든 예측 함수는 추가의 임상적 공변량을 사용할 수 있다. 상호작용 수준에 대한 공변량의 영향을 추정하기 위한 옵션이 있으며, 이것은 예를 들어 상이한 연령 군에는 상이한 예측 기준이 적용된다는 것을 의미한다.
- [0279] 다변량 우도비 접근법은 추가의 공변량 사용으로 직접 확장될 수 없다.
- [0280] 조직학적 및 임상 데이터 분석의 통계적 방법
- [0281] 다양한 동물 실험으로부터의 정량적 조직학적 데이터를 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel) 소프트웨어를 사용하여 플로팅하였다. 스튜던트 t 검정을 적용시켜 관심 데이터 세트를 비교하였고, 0.05 미만의 p 값을 갖는 차이를 유의한 것으로 간주하였다. N016966 시험의 XELOX (카페시타빈 및 옥살리플라틴)-함유 아암으로부터의 1017명의 환자 중 103개의 생검을 VDV 유전자의 유전자 발현에 대해 분석하였다. qRT-PCR 값을 하우스키핑 유전자에 의해 정규화하고, 보편적 참조 샘플과 비교하여 델타-델타 Ct 값을 유도하였다. 후속적으로, 각각의 22개의 VDV 유전자의 델타-델타 Ct 값을 Z-점수에 대해 평균 중심화 및 분산 조정하였다.
- [0282] 모든 VDV 유전자가 분석된 각각의 샘플 i에 대해, VDV 서명 점수 ( $VDV_i$ )를 계산하였다.  $VDV_i$ 는 분석된 VDV 유전자에 걸친 z-점수의 가중 평균을 나타내고, 하기 알고리즘에 의해 주어진다.
- $$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$
- [0283] 여기서,  $Z_{g,i}$ 는 샘플 i의 유전자 g에 대한 qRT-PCR 값의 정규화된 z-점수이고, n은 이 경우에는 22이다.  $VDV_i$  값은 특정한 유전자 세트의 발현이 중심화된 평균에 비해 집합적으로 과다발현되거나 또는 저발현되는 정도에 관한 정량적 정보를 제공한다.
- [0284] 마커 및/또는 치료 하위군 사이의 임상 결과 (PFS 및 OS)를 비교하기 위해, 로그-순위 시험 및 콕스 회귀를 이용하였고, 여기서 중앙 시간은 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 분석에 의해 계산하였다. 모든 통계적 검정은 양측이었다.
- [0285] 실시예 2. 항-VEGF에 의해 표적화되는 종양 혈관 구획에서 발현되는 유전자의 확인
- [0286] VEGF 경로 억제 활성의 직접적인 생체내 바이오마커의 확인을 향한 제1 단계로서, 본 발명자들은 췌장 신경내 분비 종양 (PNET)의 확립된 트랜스제닉 뮤린 모델에서 VEGF 중화의 생물학적 결과를 특성화하였다. 고도로 혈관화된 RIP-T $\beta$ Ag 유전자 조작 종양 마우스 모델 (GEMM)에서, 항-VEGF 모노클로날 항체 (mAb) 치료는 항종양 효능을 가지며 전체 생존을 증가시키는 것으로 이전에 밝혀졌다 (문헌 [Singh et al. J. Pathology 227(4): 417-430, 2012]). RIP-T $\beta$ Ag 후기 종양의 조직학적 분석은 항-VEGF 치료가 치료후 72시간에 검출 가능한 미세-혈관 밀도 (MVD)의 빠른 감소를 유발하였고, 제7일에 대략 50%의 안정기에 도달하였음을 보여주었다 (도 1a, 좌측). 종양 혈관의 이러한 분획의 항-VEGF 유도된 전정 (이하에서 "VEGF-의존성 혈관계" 또는 VDV로 지칭함)은 후기 치료 시점에 유의하게 역전되지도 않고 증가되지도 않았다 (도 1a, 좌측). 이들 실험에서, 종양 혈관 밀도 및 종식 지수를 각각 MECA-32 염색 (적색, 좌측) 및 Ki67 염색 (적색, 우측)을 통해 조직학적으로 평가하였다. 핵을 DAPI (청색)로 대조염색하였다. 관찰된 빠른 항-혈관 효과와는 대조적으로, VEGF 중화의 간접적인 항종양 효과는 보다 천천히 진행되었다: 대조군 (항-돼지풀) 치료군과 비교시 항-VEGF 치료군의 종양 종식 지수의 감소는 제7일에는 관찰되지 않았지만 제14일에는 명백하였고 (도 1a, 우측), 결과적인 종양 부담의 감소는 단지 제21일에만 분명하였다 (도 1b). 이는 초기 시점에, 이 모델에서의 VEGF 차단의 생물학적 결과가 주로 혈관 특이적임을 시사한다.

[0288]

항-VEGF로 7일 동안 치료된 동물로부터의 전체 종양의 발현 마이크로어레이 분석은 대조군 황체로 치료된 동물로부터의 종양과 비교하여 대부분의 유전자가 발현에 있어 변하지 않았음을 보여주었다. 그러나, 유전자의 작은 집단은 유의한 (조정된  $p<0.01$ ) 전사체 존재량의 감소로 항-VEGF 치료에 반응하였다 (표 3). 흥미롭게도, 본 발명자들은 유전자 발현의 상응하는 상향조절이 없음을 관찰하였고, 이는 유전자 발현 변화가 주로 VEGF-의존성 종양-연관 내피 세포의 물리적 제거에 의해 유발된 것임을 시사한다 (도 1c 및 표 3). 하기 표 3에 도시된 바와 같이, VDV 서명의 유전자를 인간 IBC 시험에서의 항-VEGF 반응의 정도에 의해 배열하였다. 인간과 마우스 사이의 오르토로그를 양상블 바이오마트(Ensembl Biomart)를 이용하여 맵핑하였고, 여기서 "Log2FC"는 치료전과 비교시 아바스틴 치료후 유전자의 발현의  $\log(2)$  배수-변화를 나타낸다. 19쌍의 환자 샘플 및 뮤린 PNET를 애질런트 마이크로어레이 상에서 분석하였다. 소수의 VDV 유전자는 애질런트 마이크로어레이 상에서 인간 프로브를 갖지 않았고, 표의 마지막에 NA로 표시하였다. 또한, 일부 뮤린 VDV 유전자에 대한 프로브는 애질런트 플랫폼 상에 존재하지 않았고; 이들 유전자에 대해서는 뮤린 아피메트릭스 어레이 플랫폼 상에서의 반복 실험으로부터의 Log2Fc를 나타내었으며, 별표\*로 표시하였다.

[0289]

차등 (감소된) 발현을 갖는 이러한 세트 내의 유전자의 특성화는 혈관 발생 (표 4)에 관련된 공지된 내피 특이적 유전자 (표 3)에 대한 농축을 밝혀내었다. 또한, 이러한 유전자 세트에 대한 발현의 중앙 배수-변화는 범-혈관 마커 CD31 및 PLVAP에서 보이는 것과 유사하였고, 또한 범-혈관 마커 PLVAP의 면역조직화학에 의해 측정된 MVD 감소의 정도와 일치하였다 (도 1a 및 1c).

[0290]

전체 종양의 정량적 PCR (qRT-PCR)은 종양 (인슐린); 상피 (E-Cad 및 Epcam); 범-조혈 (CD45); 또는 대식세포 (CD68) 세포에 대해 특이적인 마커가 항-VEGF 치료에 의해 유의하게 변하지 않았음을 검증하는 마이크로어레이 결과를 확인시켜주었다. 또한 마이크로어레이 데이터를 확인하여, qRT-PCR은 VEGF 전사체 수준이 유의하게 변하지 않은 반면에 다수의 공지된 내피 마커는 상기 치료에 의해 하향조절되었음을 보여주었다 (도 1d).

[0291]

마이크로어레이 및 qRT-PCR은 둘 다 서명에서 항-VEGF에 대한 반응으로서의 하향조절이 다른 유전자보다 더 현저한 유전자의 하위세트를 확인시켜주었고 (도 1d), 이는 서명 유전자 중 일부가 항-VEGF 치료에 대해 감수성인 혈관에서 보다 선택적으로 발현된 것일 수 있음을 시사한다. 저- 및 중간-반응 유전자 (도 1d, 각각 황색 및 적색 막대)와는 대조적으로, 특히 반응성인 유전자의 이러한 세트 (도 1d, 자주색 막대)는 단부-세포 마커 및 발달 망막 혈관신생과 관련하여 공지된 VEGF 표적을 포함한다 (문헌 [Toro et al. Blood. 116: 4025-4033, 2010; Roberts et al. Mol Cell Biol. 24: 10515-10528, 2004; Testori et al. Blood. 117: 2735-2744, 2011; Lobov et al. Blood. 117: 6728-6737, 2011]). 따라서, 본 발명자들은 이들 후자의 유전자가 VEGF 경로 억제제 활성의 후보 근위 바이오마커 (proxVDV 유전자)이고, VEGF-의존성 종양 혈관계에서 보다 선택적으로 발현되는 VEGF 표적일 가능성이 있는 것으로 상정하였다. 종합하면, 이들 결과는 VDV 유전자 발현 서명이 적어도 2개의 관련된 생물학적 과정을 반영한다고 제안한다: (i) 직접적인 VEGF 하류 신호전달 억제, 및 (ii) 생존을 위한 VEGF 신호전달에 의존성인 혈관의 후속적 상실. 상기 작업 가설에 따르면, VDV 내피 유전자는 종양-연관 내피 세포에서의 VEGF 신호전달 억제의 근위 (proxVDV) 뿐만 아니라 보다 원위의 (distVDV) 하류 대용물 마커를 포함할 가능성이 있다.

[0292]

표 3. 인간 IBC 시험에서의 항-VEGF 반응의 정도에 의해 배열된 VDV 서명의 유전자.

| 인간 염증성 유방암 |           |        | 뮤린 췌장 신경내분비 종양 |               |         |
|------------|-----------|--------|----------------|---------------|---------|
| 엔트레즈진      | 기호        | Log2FC | 엔트레즈진          | 기호            | Log2FC  |
| 11082      | ESM1      | -1.928 | 71690          | Esm1          | -3.625  |
| 25780      | RASGRP3   | -1.278 | 240168         | Rasgrp3       | -1.777  |
| 10060      | ABCC9     | -1.229 | 20928          | Abcc9         | -1.232  |
| 3910       | LAMA4     | -1.219 | 16775          | Lama4         | -2.712  |
| 22795      | NID2      | -1.094 | 18074          | Nid2          | -3.818  |
| 4162       | MCAM      | -1.005 | 84004          | Mcam          | -1.731  |
| 8828       | NRP2      | -0.897 | 18187          | Nrp2          | -1.842  |
| 7127       | TNFAIP2   | -0.854 | 21928          | Tnfaip2       | -0.367  |
| 6678       | SPARC     | -0.843 | 20692          | Sparc         | -1.746  |
| 27253      | PCDH17    | -0.829 | 219228         | Pcdh17        | -1.909  |
| 23743      | BHMT2     | -0.808 | 64918          | Bhmt2         | -0.163  |
| 51313      | FAM198B   | -0.794 | 68659          | Fam198b       | -0.26   |
| 9444       | QKI       | -0.763 | 19317          | Qk            | -0.652  |
| 1306       | COL15A1   | -0.736 | 12819          | Col15a1       | -2.274  |
| 23627      | PRND      | -0.732 | 26434          | Prnd          | -2.48   |
| 6772       | STAT1     | -0.709 | 20846          | Stat1         | -0.227  |
| 8829       | NRP1      | -0.707 | 18186          | Nrp1          | -1.434  |
| 2200       | FBN1      | -0.701 | 14118          | Fbn1          | -1.139  |
| 28984      | C13orf15  | -0.698 | 66214          | 1190002H23Rik | -2.238  |
| 285        | ANGPT2    | -0.685 | 11601          | Angpt2        | -0.85   |
| 419        | ART3      | -0.675 | 109979         | Art3          | -0.643  |
| 85480      | TSLP      | -0.646 | 53603          | Tslp          | 0.108   |
| 4208       | MEF2C     | -0.644 | 17260          | Mef2c         | -1.316  |
| 10008      | KCNE3     | -0.643 | 57442          | Kcne3         | -1.938  |
| 10395      | DLC1      | -0.64  | 50768          | Dlc1          | -0.745* |
| 22918      | CD93      | -0.636 | 17064          | Cd93          | -2.406  |
| 25937      | WWTR1     | -0.631 | 97064          | Wwtr1         | -1.261  |
| 1848       | DUSP6     | -0.614 | 67603          | Dusp6         | -1.427  |
| 6649       | SOD3      | -0.578 | 20657          | Sod3          | 0.144   |
| 4005       | LMO2      | -0.572 | 16909          | Lmo2          | -0.057  |
| 29969      | MDFIC     | -0.569 | 16543          | Mdfic         | -0.183  |
| 51088      | KLHL5     | -0.557 | 71778          | Klhl5         | -0.489* |
| 83595      | SOX7      | -0.553 | 20680          | Sox7          | -0.765* |
| 5414       | SEPT4     | -0.531 | 18952          | Sept4         | -0.814  |
| 55917      | CTTNBP2NL | -0.531 | 80281          | Cttnbp2nl     | -0.501  |
| 1282       | COL4A1    | -0.501 | 12826          | Col4a1        | -1.998  |
| 301        | ANXA1     | -0.5   | 16952          | Anxa1         | -1.31   |
| 1284       | COL4A2    | -0.499 | 12827          | Col4a2        | -1.742  |
| 7431       | VIM       | -0.493 | 22352          | Vim           | -1.321  |
| 8613       | PPAP2B    | -0.488 | 67916          | Ppap2b        | -2.638  |
| 112464     | PRKCDBP   | -0.487 | 109042         | Prkcdbp       | -1.395  |

[0293]

|        |          |        |        |          |         |
|--------|----------|--------|--------|----------|---------|
| 1009   | CDH11    | -0.487 | 12552  | Cdh11    | -1.326  |
| 1295   | COL8A1   | -0.483 | 12837  | Col8a1   | -1.433  |
| 23493  | HEY2     | -0.481 | 15214  | Hey2     | -0.327  |
| 10186  | LHFP     | -0.467 | 108927 | Lhfp     | -0.481  |
| 2331   | FMOD     | -0.462 | 14264  | Fmod     | 0.007   |
| 7057   | THBS1    | -0.46  | 21825  | Thbs1    | -0.743  |
| 659    | BMPR2    | -0.442 | 12168  | Bmpr2    | -0.346* |
| 10544  | PROCR    | -0.441 | 19124  | Procr    | -0.743  |
| 7070   | THY1     | -0.435 | 21838  | Thy1     | -0.757  |
| 5027   | P2RX7    | -0.431 | 18439  | P2rx7    | -0.227  |
| 5159   | PDGFRB   | -0.43  | 18596  | Pdgfrb   | -1.35   |
| 871    | SERPINH1 | -0.419 | 12406  | Serpinh1 | -2.022  |
| 8490   | RGS5     | -0.419 | 19737  | Rgs5     | -1.002  |
| 54510  | PCDH18   | -0.418 | 73173  | Pcdh18   | -0.074  |
| 5787   | PTPRB    | -0.409 | 19263  | Ptprb    | -2.028  |
| 857    | CAV1     | -0.404 | 12389  | Cav1     | -0.826  |
| 54538  | ROBO4    | -0.386 | 74144  | Robo4    | -1.605  |
| 8611   | PPAP2A   | -0.385 | 19012  | Ppap2a   | -0.933  |
| 10791  | VAMP5    | -0.378 | 53620  | Vamp5    | -0.815  |
| 5552   | SRGN     | -0.378 | 19073  | Srgn     | -0.902  |
| 162073 | ITPRIPL2 | -0.378 | 319622 | Itpripl2 | -0.707* |
| 51294  | PCDH12   | -0.362 | 53601  | Pcdh12   | -1.515  |
| 4781   | NFIB     | -0.362 | 18028  | Nfib     | -0.945  |
| 716    | C1S      | -0.357 | 50908  | C1s      | -0.122  |
| 595    | CCND1    | -0.355 | 12443  | Ccnd1    | -1.116  |
| 1464   | CSPG4    | -0.355 | 121021 | Cspg4    | -1.713  |
| 54922  | RASIP1   | -0.348 | 69903  | Rasip1   | -1.423  |
| 3384   | ICAM2    | -0.347 | 15896  | Icam2    | -2.346  |
| 80781  | COL18A1  | -0.342 | 12822  | Col18a1  | -1.659  |
| 2828   | GPR4     | -0.341 | 319197 | Gpr4     | -0.14   |
| 2313   | FLI1     | -0.334 | 14247  | Fli1     | -1.218  |
| 57381  | RHOJ     | -0.33  | 80837  | Rhoj     | -1.463  |
| 79890  | RIN3     | -0.329 | 217835 | Rin3     | -0.137  |
| 51705  | EMCN     | -0.328 | 59308  | Emcn     | -2.347  |
| 11167  | FSTL1    | -0.324 | 14314  | Fstl1    | -1.146  |
| 79689  | STEAP4   | -0.321 | 117167 | Stearp4  | 0.26    |
| 3200   | HOXA3    | -0.319 | 15400  | Hoxa3    | 0.271   |
| 25925  | ZNF521   | -0.319 | 225207 | Zfp521   | -0.482  |
| 5797   | PTPRM    | -0.308 | 19274  | Ptprm    | -0.479  |
| 8642   | DCHS1    | -0.301 | 233651 | Dchs1    | -0.367* |
| 29015  | SLC43A3  | -0.301 | 58207  | Slc43a3  | -0.647  |
| 116362 | RBP7     | -0.299 | 63954  | Rbp7     | -2.883  |
| 1404   | HAPLN1   | -0.294 | 12950  | Hapln1   | 0.2     |
| 1490   | CTGF     | -0.286 | 14219  | Ctgf     | -2.002  |
| 5937   | RBMS1    | -0.282 | 56878  | Rbms1    | -0.663  |

|        |          |        |        |               |         |
|--------|----------|--------|--------|---------------|---------|
| 158326 | FREM1    | -0.281 | 329872 | Frem1         | -0.307* |
| 56892  | C8orf4   | -0.279 | 69068  | 1810011O10Rik | -2.026  |
| 161198 | CLEC14A  | -0.273 | 66864  | Clec14a       | -0.563  |
| 10769  | PLK2     | -0.27  | 20620  | Plk2          | -1.322  |
| 51751  | HIGD1B   | -0.264 | 75689  | Higd1b        | -0.913  |
| 8038   | ADAM12   | -0.264 | 11489  | Adam12        | 0.019   |
| 55901  | THSD1    | -0.261 | 56229  | Thsd1         | -1.379  |
| 51162  | EGFL7    | -0.259 | 353156 | Egfl7         | -0.934  |
| 25960  | GPR124   | -0.248 | 78560  | Gpr124        | -0.78   |
| 26524  | LATS2    | -0.247 | 50523  | Lats2         | -0.33   |
| 90952  | ESAM     | -0.244 | 69524  | Esam          | -1.027  |
| 1265   | CNN2     | -0.243 | 12798  | Cnn2          | -0.726  |
| 51676  | ASB2     | -0.243 | 65256  | Asb2          | -0.012  |
| 10536  | LEPREL2  | -0.242 | 14789  | Leprel2       | -0.925  |
| 2022   | ENG      | -0.235 | 13805  | Eng           | -2.167  |
| 28951  | TRIB2    | -0.235 | 217410 | Trib2         | -0.782* |
| 64411  | ARAP3    | -0.232 | 106952 | Arap3         | -2.098  |
| 196    | AHR      | -0.228 | 11622  | Ahr           | -0.693  |
| 10003  | NAALAD2  | -0.227 | 72560  | Naalad2       | -0.356  |
| 256949 | KANK3    | -0.226 | 80880  | Kank3         | -0.888  |
| 81848  | SPRY4    | -0.225 | 24066  | Spry4         | -1.589  |
| 2122   | MECOM    | -0.223 | 14013  | Mecom         | -0.175  |
| 51363  | CHST15   | -0.221 | 77590  | Chst15        | -0.101  |
| 6623   | SNCG     | -0.215 | 20618  | Sncg          | -0.7    |
| 4071   | TM4SF1   | -0.215 | 17112  | Tm4sf1        | -0.752  |
| 116159 | CYYR1    | -0.211 | 224405 | Cyvr1         | 0.114   |
| 2149   | F2R      | -0.21  | 14062  | F2r           | -0.815  |
| 79899  | PRR5L    | -0.209 | 72446  | Prr5l         | -0.617  |
| 84898  | PLXDC2   | -0.209 | 67448  | Plxdc2        | -1.16   |
| 53827  | FXYD5    | -0.206 | 18301  | Fxyd5         | -0.728  |
| 10561  | IFI44    | -0.203 | 99899  | Ifi44         | -1.481  |
| 166336 | PRICKLE2 | -0.203 | 243548 | Prickle2      | -0.003  |
| 80310  | PDGFD    | -0.2   | 71785  | Pdgfd         | -0.386  |
| 2321   | FLT1     | -0.2   | 14254  | Flt1          | -2.762  |
| 2621   | GAS6     | -0.198 | 14456  | Gas6          | -0.895  |
| 83878  | USHBP1   | -0.191 | 234395 | Ushbp1        | -2.261  |
| 3625   | INHBB    | -0.19  | 16324  | Inhbb         | -1.283  |
| 677    | ZFP36L1  | -0.187 | 12192  | Zfp36l1       | -1.117  |
| 84632  | AFAP1L2  | -0.186 | 226250 | Afap1l2       | -1.297  |
| 10516  | FBLN5    | -0.186 | 23876  | Fbln5         | -0.457* |
| 23075  | SWAP70   | -0.184 | 20947  | Swap70        | -0.19   |
| 5724   | PTAFR    | -0.18  | 19204  | Ptafr         | -0.639* |
| 84962  | JUB      | -0.178 | 16475  | Jub           | -0.318  |
| 92747  | BPIFB1   | -0.175 | 228801 | Bpifb1        | 0.146   |
| 2078   | ERG      | -0.163 | 13876  | Erg           | -1.816  |

|        |          |        |        |               |         |
|--------|----------|--------|--------|---------------|---------|
| 27123  | DKK2     | -0.159 | 56811  | Dkk2          | -2.214  |
| 26508  | HEYL     | -0.153 | 56198  | Heyl          | -0.699  |
| 51267  | CLEC1A   | -0.151 | 243653 | Clec1a        | -0.636  |
| 5793   | PTPRG    | -0.151 | 19270  | Ptprg         | -1.015  |
| 10161  | LPAR6    | -0.148 | 67168  | Lpar6         | -0.587  |
| 154810 | AMOTL1   | -0.147 | 75723  | Amotl1        | -0.114  |
| 286753 | TUSC5    | -0.146 | 237858 | Tusc5         | -0.358  |
| 9411   | ARHGAP29 | -0.145 | 214137 | Arhgap29      | -0.42   |
| 6237   | RRAS     | -0.143 | 20130  | Rras          | -0.164  |
| 57514  | ARHGAP31 | -0.141 | 12549  | Arhgap31      | -0.98   |
| 81792  | ADAMTS12 | -0.139 | 239337 | Adamts12      | -0.352* |
| 947    | CD34     | -0.136 | 12490  | Cd34          | -2.707  |
| 149951 | COMMD7   | -0.135 | 99311  | Commd7        | 0.073   |
| 9509   | ADAMTS2  | -0.13  | 216725 | Adamts2       | -1.263  |
| 7010   | TEK      | -0.13  | 21687  | Tek           | -0.57   |
| 9369   | NRXN3    | -0.128 | 18191  | Nrxn3         | 0.422   |
| 94     | ACVRL1   | -0.123 | 11482  | Acvrl1        | -0.364  |
| 5978   | REST     | -0.123 | 19712  | Rest          | -0.851  |
| 64123  | ELTD1    | -0.122 | 170757 | Eltd1         | -1.681  |
| 128077 | LIX1L    | -0.12  | 280411 | Lix1l         | -0.488* |
| 684    | BST2     | -0.119 | 69550  | Bst2          | -0.637  |
| 3397   | ID1      | -0.113 | 15901  | Id1           | -2.744  |
| 958    | CD40     | -0.109 | 21939  | Cd40          | -0.623* |
| 4811   | NID1     | -0.103 | 18073  | Nid1          | -2.257  |
| 3486   | IGFBP3   | -0.101 | 16009  | Igfbp3        | -1.989  |
| 10345  | TRDN     | -0.1   | 76757  | Trdn          | -0.338* |
| 114571 | SLC22A9  | -0.099 | 319800 | Slc22a30      | 0.088   |
| 4837   | NNMT     | -0.097 | 18113  | Nnmt          | -0.29*  |
| 57608  | KIAA1462 | -0.091 | 240185 | 9430020K01Rik | -1.869  |
| 9749   | PHACTR2  | -0.09  | 215789 | Phactr2       | -0.597* |
| 7078   | TIMP3    | -0.084 | 21859  | Timp3         | -1.573  |
| 2113   | ETS1     | -0.079 | 23871  | Ets1          | -1.224  |
| 80381  | CD276    | -0.078 | 102657 | Cd276         | -0.282* |
| 30844  | EHD4     | -0.07  | 98878  | Ehd4          | -0.483  |
| 2701   | GJA4     | -0.068 | 14612  | Gja4          | -0.431  |
| 170575 | GIMAP1   | -0.066 | 16205  | Gimap1        | -1.332  |
| 285203 | C3orf64  | -0.06  | 101351 | A130022J15Rik | -0.485  |
| 4240   | MFGE8    | -0.06  | 17304  | Mfge8         | -1.199  |
| 5089   | PBX2     | -0.057 | 18515  | Pbx2          | -0.127  |
| 3234   | HOXD8    | -0.052 | 15437  | Hoxd8         | 0.089   |
| 9647   | PPM1F    | -0.052 | 68606  | Ppm1f         | -0.385  |
| 474344 | GIMAP6   | -0.052 | 231931 | Gimap6        | -1.191  |
| 83483  | PLVAP    | -0.051 | 84094  | Plvap         | -0.983  |
| 5155   | PDGFB    | -0.05  | 18591  | Pdgfb         | -0.884* |
| 55340  | GIMAP5   | -0.049 | 317757 | Gimap5        | -1.194  |

|        |          |        |        |          |         |
|--------|----------|--------|--------|----------|---------|
| 7157   | TP53     | -0.045 | 22059  | Trp53    | -0.207* |
| 4061   | LY6E     | -0.042 | 17069  | Ly6e     | -0.375  |
| 79812  | MMRN2    | -0.04  | 105450 | Mmrn2    | -2.415  |
| 23576  | DDAH1    | -0.031 | 69219  | Ddah1    | -0.14   |
| 153579 | BTNL9    | -0.031 | 237754 | Btnl9    | -0.913  |
| 633    | BGN      | -0.029 | 12111  | Bgn      | -0.797* |
| 27143  | KIAA1274 | -0.027 | 27355  | X99384   | -0.52   |
| 375387 | LRRC33   | -0.025 | 224109 | Lrrc33   | -0.333  |
| 127733 | UBXN10   | -0.023 | 212190 | Ubxn10   | -0.293* |
| 3820   | KLRB1    | -0.017 | 80782  | Klrb1b   | -0.301* |
| 80177  | MYCT1    | -0.015 | 68632  | Myct1    | -1.574  |
| 3791   | KDR      | -0.014 | 16542  | Kdr      | -1.778  |
| 9862   | MED24    | -0.012 | 23989  | Med24    | -0.242* |
| 8522   | GAS7     | -0.011 | 14457  | Gas7     | -0.122  |
| 56062  | KLHL4    | -0.011 | 237010 | Klhl4    | -0.462  |
| 54345  | SOX18    | -0.008 | 20672  | Sox18    | -1.532  |
| 85363  | TRIM5    | -0.008 | 20128  | Trim30a  | -0.837  |
| 285852 | TREML4   | -0.006 | 224840 | Treml4   | -0.134  |
| 9510   | ADAMTS1  | -0.005 | 11504  | Adamts1  | -0.491  |
| 8840   | WISP1    | -0.005 | 22402  | Wisp1    | -0.866  |
| 10411  | RAPGEF3  | -0.004 | 223864 | Rapgef3  | -1.67   |
| 7903   | ST8SIA4  | -0.003 | 20452  | St8sia4  | -0.286  |
| 55303  | GIMAP4   | 0.002  | 107526 | Gimap4   | -1.127  |
| 8824   | CES2     | 0.003  | 234673 | Ces2e    | -2.514  |
| 89857  | KLHL6    | 0.009  | 239743 | Klhl6    | -0.442  |
| 10052  | GJC1     | 0.009  | 14615  | Gjc1     | -0.894  |
| 3561   | IL2RG    | 0.01   | 16186  | Il2rg    | -0.028  |
| 56253  | CRTAM    | 0.02   | 54698  | Crtam    | -0.022  |
| 5583   | PRKCH    | 0.026  | 18755  | Prkch    | -0.104  |
| 6300   | MAPK12   | 0.026  | 29857  | Mapk12   | -0.182  |
| 162394 | SLFN5    | 0.029  | 327978 | Slfn5    | -0.515* |
| 1807   | DPYS     | 0.029  | 64705  | Dpys     | -0.085  |
| 4038   | LRP4     | 0.029  | 228357 | Lrp4     | -1.971  |
| 387601 | SLC22A25 | 0.038  | 319800 | Slc22a30 | 0.088   |
| 3142   | HLX      | 0.041  | 15284  | Hlx      | -0.189  |
| 6556   | SLC11A1  | 0.044  | 18173  | Slc11a1  | -0.133  |
| 6524   | SLC5A2   | 0.046  | 246787 | Slc5a2   | -0.306* |
| 92162  | TMEM88   | 0.048  | 67020  | Tmem88   | -1.771  |
| 64641  | EBF2     | 0.048  | 13592  | Ebf2     | -0.12   |
| 6405   | SEMA3F   | 0.048  | 20350  | Sema3f   | -0.581  |
| 9351   | SLC9A3R2 | 0.054  | 65962  | Slc9a3r2 | -0.611  |
| 7022   | TFAP2C   | 0.054  | 21420  | Tcfap2c  | -0.159  |
| 187    | APLNR    | 0.055  | 23796  | Aplnr    | -0.024  |
| 7139   | TNNT2    | 0.058  | 21956  | Tnnt2    | -1.175  |
| 55679  | LIMS2    | 0.059  | 225341 | Lims2    | -0.69   |

|           |               |       |           |          |         |
|-----------|---------------|-------|-----------|----------|---------|
| 11135     | CDC42EP1      | 0.062 | 104445    | Cdc42ep1 | -1.568  |
| 976       | CD97          | 0.067 | 26364     | Cd97     | -1.036  |
| 121599    | SPIC          | 0.07  | 20728     | Spic     | -0.668  |
| 23604     | DAPK2         | 0.072 | 13143     | Dapk2    | -1.32   |
| 1903      | S1PR3         | 0.073 | 13610     | S1pr3    | 0.028   |
| 23439     | ATP1B4        | 0.083 | 67821     | Atp1b4   | 0.141   |
| 338339    | CLEC4D        | 0.091 | 17474     | Clec4d   | -0.149  |
| 9002      | F2RL3         | 0.093 | 14065     | F2rl3    | -0.122  |
| 4846      | NOS3          | 0.112 | 18127     | Nos3     | -0.819  |
| 1901      | S1PR1         | 0.127 | 13609     | S1pr1    | -0.315  |
| 11037     | STON1         | 0.144 | 77057     | Ston1    | -0.387* |
| 50619     | DEF6          | 0.146 | 23853     | Def6     | -0.068  |
| 1003      | CDH5          | 0.149 | 12562     | Cdh5     | -2.001  |
| 55215     | FANCI         | 0.15  | 208836    | Fanci    | 0.342   |
| 84433     | CARD11        | 0.15  | 108723    | Card11   | -0.205* |
| 8497      | PPFIA4        | 0.155 | 68507     | Ppfia4   | -0.241* |
| 3912      | LAMB1         | 0.181 | 16777     | Lamb1    | -2.313  |
| 5054      | SERPINE1      | 0.194 | 18787     | Serpine1 | -1.055  |
| 286749    | STON1-GTF2A1L | 0.217 | 77057     | Ston1    | -0.387* |
| 1285      | COL4A3        | 0.223 | 12828     | Col4a3   | 0.038   |
| 9771      | RAPGEF5       | 0.269 | 217944    | Rapgef5  | -0.991  |
| 93978     | CLEC6A        | NA    | 56620     | Clec4n   | -0.421  |
| 284040    | CDRT4         | NA    | 66338     | Cdrt4    | -0.306  |
| 79652     | TMEM204       | NA    | 407831    | Tmem204  | -0.708  |
| 100527949 | GIMAP1-GIMAP5 | NA    | 317757    | Gimap5   | -1.194  |
| 7058      | THBS2         | NA    | 21826     | Thbs2    | -0.18   |
| 338596    | ST8SIA6       | NA    | 241230    | St8sia6  | -0.569  |
| 340527    | NHSL2         | NA    | 100042480 | Nhsl2    | 0.383   |
| 8578      | SCARF1        | NA    | 380713    | Scarf1   | -1.018  |
| 402569    | KPNA7         | NA    | 381686    | Kpna7    | -0.362* |
| 441478    | NRARP         | NA    | 67122     | Nrarp    | -0.218  |
| 60681     | FKBP10        | NA    | 14230     | Fkbp10   | -0.893  |

[0298]

[0299] 표 4. VDV 서명에서 과다-표현되는 유전자 온톨로지 용어.

| a. 생물학적 과정 온톨로지 |           |       |        |     |      |                       |
|-----------------|-----------|-------|--------|-----|------|-----------------------|
| GOBPID          | P 값       | 오즈 비  | 예상 카운트 | 카운트 | 크기   | 용어                    |
| GO:0001568      | 1.659e-30 | 10.57 | 6.785  | 51  | 385  | 열관 발생                 |
| GO:0072358      | 9.829e-27 | 11.35 | 5.111  | 42  | 307  | 진혈관계 발생               |
| GO:0032501      | 8.002e-20 | 3.465 | 78.43  | 145 | 4610 | 다세포 유기체 과정            |
| GO:0001525      | 6.98e-17  | 9.984 | 3.435  | 27  | 205  | 열관신생                  |
| GO:0009653      | 7.513e-14 | 4.884 | 10.34  | 40  | 698  | 해부학적 구조 형태발생          |
| GO:2000145      | 1.642e-12 | 6.281 | 5.146  | 27  | 292  | 세포 운동성의 조절            |
| GO:2000026      | 3.997e-12 | 3.818 | 14.26  | 45  | 809  | 다세포 유기체 발생의 조절        |
| GO:0009888      | 5.801e-12 | 3.667 | 15.58  | 47  | 901  | 조직 발생                 |
| GO:0023052      | 7.066e-12 | 2.478 | 70.26  | 120 | 3987 | 신호전달                  |
| GO:0007166      | 1.25e-10  | 2.676 | 33.91  | 72  | 1924 | 세포 표면 수용체 연결된 신호전달 경로 |
| GO:0032879      | 1.428e-10 | 3.256 | 17.69  | 48  | 1004 | 국재화의 조절               |
| GO:0007155      | 4.022e-10 | 4.398 | 8.01   | 30  | 486  | 세포 부착                 |
| GO:0000902      | 6.839e-10 | 3.51  | 13.06  | 39  | 741  | 세포 형태발생               |
| GO:0051716      | 1.061e-09 | 2.433 | 52.42  | 92  | 3224 | 자극에 대한 세포 반응          |
| GO:0022603      | 1.467e-09 | 4.37  | 7.419  | 28  | 421  | 해부학적 구조 형태발생의 조절      |
| GO:0001570      | 8.696e-09 | 15.27 | 0.8459 | 10  | 48   | 열관생성                  |
| GO:0048869      | 1.529e-08 | 3.118 | 15.44  | 40  | 1031 | 세포 발생 과정              |
| GO:0040013      | 1.842e-08 | 8.857 | 1.745  | 13  | 99   | 이동의 음성 조절             |
| GO:0048468      | 1.947e-08 | 2.812 | 19.23  | 46  | 1115 | 세포 발생                 |
| GO:0048731      | 2.693e-08 | 2.53  | 31.52  | 62  | 2288 | 계 발생                  |
| GO:0030336      | 3.752e-08 | 9.341 | 1.533  | 12  | 87   | 세포 이동의 음성 조절          |
| GO:0042330      | 6.307e-08 | 3.522 | 9.376  | 29  | 532  | 주성                    |
| GO:0009893      | 1.02e-07  | 2.496 | 24.48  | 52  | 1389 | 대사 과정의 양성 조절          |
| GO:0051271      | 1.021e-07 | 8.436 | 1.674  | 12  | 95   | 세포 성분 이동의 음성 조절       |
| GO:0044093      | 1.213e-07 | 2.808 | 16.41  | 40  | 931  | 분자 기능의 양성 조절          |
| GO:0007411      | 3.51e-07  | 4.087 | 5.78   | 21  | 328  | 축삭 유도                 |
| GO:0048812      | 3.608e-07 | 3.374 | 9.023  | 27  | 512  | 뉴런 투사 형태발생            |
| GO:0030182      | 3.819e-07 | 2.824 | 14.52  | 36  | 824  | 뉴런 분화                 |
| GO:0007154      | 5.952e-07 | 2.121 | 47.13  | 78  | 2982 | 세포 커뮤니케이션             |
| GO:0040017      | 6.315e-07 | 5.375 | 3.155  | 15  | 179  | 이동의 양성 조절             |
| GO:0016310      | 6.357e-07 | 2.528 | 19.53  | 43  | 1108 | 인산화                   |
| GO:0051272      | 6.783e-07 | 5.342 | 3.172  | 15  | 180  | 세포 성분 이동의 양성 조절       |
| GO:0042221      | 7.279e-07 | 2.602 | 18.43  | 41  | 1141 | 화학적 자극에 대한 반응         |
| GO:0048667      | 9.499e-07 | 3.275 | 8.9    | 26  | 505  | 뉴런 분화와 관련된 세포 형태발생    |
| GO:0050789      | 1.172e-06 | 2.17  | 74.81  | 105 | 5270 | 생물학적 과정의 조절           |
| GO:0032990      | 1.185e-06 | 3.084 | 10.19  | 28  | 578  | 세포 부분 형태발생            |
| GO:0006793      | 1.34e-06  | 2.38  | 22.21  | 46  | 1260 | 인 대사 과정               |
| GO:0030030      | 1.641e-06 | 2.758 | 13.48  | 33  | 765  | 세포 투사 구조화             |
| GO:0010646      | 1.784e-06 | 2.444 | 19.6   | 42  | 1112 | 세포 커뮤니케이션의            |

[0300]

|            |           |       |        |    |      | 조절                      |
|------------|-----------|-------|--------|----|------|-------------------------|
| GO:0009966 | 2.756e-06 | 2,621 | 15.19  | 35 | 923  | 신호 전달의 조절               |
| GO:0022008 | 3.002e-06 | 2,528 | 16.53  | 37 | 938  | 신경발생                    |
| GO:0048870 | 3.186e-06 | 3,659 | 6,098  | 20 | 382  | 세포 운동성                  |
| GO:0009887 | 4.196e-06 | 2,871 | 10.87  | 28 | 617  | 기관 형태발생                 |
| GO:0007507 | 4.451e-06 | 3,866 | 5.164  | 18 | 293  | 심장 발생                   |
| GO:0045446 | 4.495e-06 | 17.35 | 0.4527 | 6  | 26   | 내피 세포 분화                |
| GO:0001569 | 4.818e-06 | 17.13 | 0.4582 | 6  | 26   | 혈관의 폐단화                 |
| GO:0048584 | 4.947e-06 | 2,568 | 14.86  | 34 | 843  | 자극에 대한 반응의 양성 조절        |
| GO:0043549 | 7.131e-06 | 3,048 | 8.724  | 24 | 495  | 키나제 활성의 조절              |
| GO:0045937 | 7.801e-06 | 4,308 | 3.86   | 15 | 219  | 포스페이트 대사 과정의 양성 조절      |
| GO:0001936 | 1.231e-05 | 8,512 | 1,093  | 8  | 62   | 내피 세포 증식의 조절            |
| GO:0008284 | 1.364e-05 | 3,179 | 7,289  | 21 | 425  | 세포 증식의 양성 조절            |
| GO:0030198 | 1.997e-05 | 5.91  | 1,898  | 10 | 109  | 세포의 메트릭스 구조화            |
| GO:0008015 | 2.281e-05 | 3,708 | 4,741  | 16 | 269  | 혈액 순환                   |
| GO:0009725 | 2.406e-05 | 2,638 | 11.3   | 27 | 641  | 호르몬 자극에 대한 반응           |
| GO:0048534 | 2.486e-05 | 3,138 | 6,997  | 20 | 397  | 조혈 또는 림프 기관 발생          |
| GO:0019220 | 2.551e-05 | 2,954 | 8,206  | 22 | 489  | 포스페이트 대사 과정의 조절         |
| GO:0010595 | 2.975e-05 | 11.81 | 0.6168 | 6  | 35   | 내피 세포 이동의 양성 조절         |
| GO:0010810 | 3.38e-05  | 7,291 | 1,251  | 8  | 71   | 세포-기질 부착의 조절            |
| GO:0042698 | 3.434e-05 | 6,244 | 1,621  | 9  | 92   | 배란 주기                   |
| GO:0001934 | 3.78e-05  | 4,201 | 3,401  | 13 | 193  | 단백질 인산화의 양성 조절          |
| GO:0048010 | 4.137e-05 | 11.04 | 0.6521 | 6  | 37   | 혈관 내피 성장 인자 수용체 신호전달 경로 |
| GO:0006950 | 5.219e-05 | 1,815 | 44.18  | 69 | 2507 | 스트레스에 대한 반응             |
| GO:0032101 | 5.353e-05 | 3,606 | 4,547  | 15 | 258  | 외부 자극에 대한 반응의 조절        |
| GO:0061041 | 5.373e-05 | 8,175 | 0.9869 | 7  | 56   | 상처 치유의 조절               |
| GO:0032268 | 5.635e-05 | 2,661 | 9,924  | 24 | 594  | 세포 단백질 대사 과정의 조절        |
| GO:0001945 | 5.934e-05 | 25.18 | 0.2291 | 4  | 13   | 림프관 발생                  |
| GO:0007162 | 6.034e-05 | 8,011 | 1,005  | 7  | 57   | 세포 부착의 음성 조절            |
| GO:0045766 | 6.761e-05 | 7,853 | 1,022  | 7  | 58   | 혈관신생의 양성 조절             |
| GO:0008285 | 6.909e-05 | 2,899 | 7,525  | 20 | 427  | 세포 증식의 음성 조절            |
| GO:0043627 | 6.995e-05 | 4,577 | 2,644  | 11 | 150  | 에스트로겐 자극에 대한 반응         |
| GO:0050900 | 7.404e-05 | 3,915 | 3.63   | 13 | 206  | 백혈구 이동                  |
| GO:0021700 | 7.715e-05 | 4,973 | 2,221  | 10 | 126  | 발생 성숙                   |
| GO:0001974 | 7.921e-05 | 13.54 | 0.4582 | 5  | 26   | 혈관 재형성                  |
| GO:0032835 | 7.921e-05 | 13.54 | 0.4582 | 5  | 26   | 사구체 발생                  |
| GO:0032270 | 8.472e-05 | 2,943 | 7,032  | 19 | 399  | 세포 단백질 대사 과정의 양성 조절     |
| GO:0035556 | 9.397e-05 | 1,921 | 29.33  | 50 | 1664 | 세포내 신호 전달               |
| GO:0001932 | 9.729e-05 | 3,013 | 6,515  | 18 | 391  | 단백질 인산화의 조절             |
| GO:0042060 | 9.976e-05 | 2,741 | 8,357  | 21 | 492  | 상처 치유                   |

[0301]

|            |           |       |         |    |      |  |
|------------|-----------|-------|---------|----|------|--|
| GO:0016337 | 0.0001106 | 3.214 | 5.41    | 16 | 307  | 세포-세포 부착                               |
| GO:0071363 | 0.0001128 | 5.282 | 1.886   | 9  | 107  | 성장 인자 자극에 대한 세포 반응                     |
| GO:0010628 | 0.0001161 | 2.276 | 14.47   | 30 | 821  | 유전자 발현의 양성 조절                          |
| GO:0050790 | 0.0001167 | 2.351 | 13.11   | 28 | 783  | 촉매 활성의 조절                              |
| GO:0051093 | 0.0001208 | 7.078 | 1.117   | 7  | 67   | 발생 과정의 음성 조절                           |
| GO:0045165 | 0.0001249 | 4.267 | 2.82    | 11 | 160  | 세포 운동 결정                               |
| GO:0007220 | 0.0001449 | 18.88 | 0.282   | 4  | 16   | Notch 수용체 프로세싱                         |
| GO:0051345 | 0.000164  | 2.876 | 6.785   | 18 | 385  | 히드롤라제 활성의 양성 조절                        |
| GO:0018212 | 0.0001647 | 4.503 | 2.432   | 10 | 138  | 웹티딜-티로신 변형                             |
| GO:0070887 | 0.0001692 | 2.072 | 19.16   | 36 | 1087 | 화학적 자극에 대한 세포 반응                       |
| GO:0001886 | 0.0001795 | 42.33 | 0.1234  | 3  | 7    | 내피 세포 형태발생                             |
| GO:0001541 | 0.0001858 | 8.144 | 0.8459  | 6  | 48   | 난포 발생                                  |
| GO:0010557 | 0.0002096 | 2.164 | 15.68   | 31 | 890  | 거대분자 생합성 과정의 양성 조절                     |
| GO:0043086 | 0.0002104 | 2.728 | 7.543   | 19 | 428  | 촉매 활성의 음성 조절                           |
| GO:0030195 | 0.0002225 | 10.52 | 0.564   | 5  | 32   | 헬액 응고의 음성 조절                           |
| GO:0034446 | 0.0002369 | 16.18 | 0.3172  | 4  | 18   | 기질 부착-의존성 세포 확산                        |
| GO:0006897 | 0.0002547 | 3.098 | 5.234   | 15 | 297  | 세포내이입                                  |
| GO:0050679 | 0.0002688 | 5.27  | 1.674   | 8  | 95   | 상피 세포 증식의 양성 조절                        |
| GO:0030168 | 0.0002748 | 3.396 | 4.142   | 13 | 235  | 헬소판 활성화                                |
| GO:0065008 | 0.0002799 | 1.783 | 34.8    | 55 | 2016 | 생물학적 품질의 조절                            |
| GO:0070168 | 0.0002835 | 33.86 | 0.141   | 3  | 8    | 생물미네랄 조직 발생의 음성 조절                     |
| GO:0051128 | 0.0002838 | 2.469 | 9.684   | 22 | 574  | 세포 성분 구조화의 조절                          |
| GO:0007178 | 0.0002866 | 6.079 | 1.281   | 7  | 75   | 막횡단 수용체 단백질 세린/트레오닌 키나제 신호전달 경로        |
| GO:0090101 | 0.0002906 | 7.434 | 0.9164  | 6  | 52   | 막횡단 수용체 단백질 세린/트레오닌 키나제 신호전달 경로의 음성 조절 |
| GO:0045596 | 0.0002939 | 3.054 | 5.305   | 15 | 301  | 세포 분화의 음성 조절                           |
| GO:0042246 | 0.0002987 | 9.796 | 0.5992  | 5  | 34   | 조직 재생                                  |
| GO:0002682 | 0.0003018 | 2.271 | 12.44   | 26 | 706  | 면역계 과정의 조절                             |
| GO:0070482 | 0.0003078 | 3.56  | 3.648   | 12 | 207  | 산소 수준에 대한 반응                           |
| GO:0001300 | 0.0003093 | 무한대   | 0.03525 | 2  | 2    | 연대순의 세포 노화                             |
| GO:0007521 | 0.0003093 | 무한대   | 0.03525 | 2  | 2    | 근육 세포 운동 결정                            |
| GO:0048522 | 0.0003187 | 1.841 | 30.24   | 49 | 1922 | 세포 과정의 양성 조절                           |
| GO:0050818 | 0.000323  | 7.275 | 0.934   | 6  | 53   | 응고의 조절                                 |
| GO:0045860 | 0.0003382 | 3.01  | 5.375   | 15 | 305  | 단백질 키나제 활성의 양성 조절                      |
| GO:0007599 | 0.0003383 | 2.549 | 8.477   | 20 | 481  | 지혈                                     |
| GO:0001933 | 0.0003581 | 7.123 | 0.9517  | 6  | 54   | 단백질 인산화의 음성 조절                         |
| GO:0034329 | 0.0003606 | 4.054 | 2.679   | 10 | 152  | 세포 접합부 어셈블리                            |

|            |           |       |        |    |      |                               |
|------------|-----------|-------|--------|----|------|-------------------------------|
| GO:0014706 | 0.0003664 | 3.487 | 3.719  | 12 | 211  | 평균 조직 발생                      |
| GO:0035239 | 0.0003664 | 3.487 | 3.719  | 12 | 211  | 관 형태발생                        |
| GO:0071841 | 0.0003674 | 1.663 | 49.66  | 72 | 2818 | 세포 수준에서의 세포 성분 구조화 또는 생물 발생   |
| GO:0030509 | 0.0003759 | 5.797 | 1.339  | 7  | 76   | BMP 신호전달 경로                   |
| GO:0051384 | 0.000388  | 4.418 | 2.221  | 9  | 126  | 글루코코르티코이드 자극에 대한 반응           |
| GO:0008354 | 0.0004197 | 28.22 | 0.1586 | 3  | 9    | 배 세포 이동                       |
| GO:0022617 | 0.0004197 | 28.22 | 0.1586 | 3  | 9    | 세포의 매트릭스 해체                   |
| GO:0045601 | 0.0004197 | 28.22 | 0.1586 | 3  | 9    | 내피 세포 분화의 조절                  |
| GO:0051918 | 0.0004197 | 28.22 | 0.1586 | 3  | 9    | 섬유소 용해의 음성 조절                 |
| GO:0060627 | 0.0004433 | 3.942 | 2.749  | 10 | 156  | 소포-매개 수송의 조절                  |
| GO:0009968 | 0.0004471 | 2.717 | 6.742  | 17 | 391  | 신호 전달의 음성 조절                  |
| GO:0048732 | 0.0004527 | 3.401 | 3.807  | 12 | 216  | 전 발생                          |
| GO:0002009 | 0.0004607 | 3.205 | 4.371  | 13 | 248  | 상피의 형태발생                      |
| GO:0051130 | 0.0004695 | 2.8   | 6.151  | 16 | 349  | 세포 성분 구조화의 양성 조절              |
| GO:0002576 | 0.0004767 | 5.554 | 1.392  | 7  | 79   | 헬소판 털과 험화                     |
| GO:0002064 | 0.0004815 | 6.702 | 1.005  | 6  | 57   | 상피 세포 발생                      |
| GO:0017015 | 0.0004815 | 6.702 | 1.005  | 6  | 57   | 형질전환 성장 인자 배터 수용체 신호전달 경로의 조절 |
| GO:0030855 | 0.0005169 | 4.232 | 2.308  | 9  | 136  | 상피 세포 분화                      |
| GO:0009612 | 0.0005305 | 4.723 | 1.85   | 8  | 105  | 기계적 자극에 대한 반응                 |
| GO:0048762 | 0.0005305 | 4.723 | 1.85   | 8  | 105  | 중간엽 세포 분화                     |
| GO:0050730 | 0.0005305 | 4.723 | 1.85   | 8  | 105  | 펩타딜-티로신 인산화의 조절               |
| GO:0061061 | 0.0005315 | 2.766 | 6.221  | 16 | 353  | 근육 구조 발생                      |
| GO:0030335 | 0.0005443 | 4.201 | 2.325  | 9  | 135  | 세포 이동의 양성 조절                  |
| GO:0002274 | 0.000555  | 5.403 | 1.427  | 7  | 81   | 골수 백혈구 활성화                    |
| GO:0001503 | 0.0005782 | 3.302 | 3.912  | 12 | 222  | 골화                            |
| GO:0006936 | 0.0005782 | 3.302 | 3.912  | 12 | 222  | 근육 수축                         |
| GO:0048660 | 0.0005806 | 6.448 | 1.04   | 6  | 59   | 평활근 세포 증식의 조절                 |
| GO:0008585 | 0.0005979 | 5.331 | 1.445  | 7  | 82   | 여성 생식선 발생                     |
| GO:0014910 | 0.0006398 | 11.92 | 0.4053 | 4  | 23   | 평활근 세포 이동의 조절                 |
| GO:2000379 | 0.0006398 | 11.92 | 0.4053 | 4  | 23   | 반응성 산소 종 대사 과정의 양성 조절         |
| GO:0019538 | 0.0006644 | 1.598 | 56.89  | 79 | 3228 | 단백질 대사 과정                     |
| GO:0071900 | 0.0006835 | 2.921 | 5.146  | 14 | 292  | 단백질 세린/트레오닌 카나제 활성의 조절        |
| GO:0051347 | 0.0006995 | 2.793 | 5.763  | 15 | 327  | 트랜스퍼라제 활성의 양성 조절              |
| GO:0016044 | 0.0007038 | 2.34  | 9.658  | 21 | 548  | 세포 막 구조화                      |
| GO:0051704 | 0.0007045 | 2.023 | 16.09  | 30 | 913  | 다중-유기체 과정                     |
| GO:0009790 | 0.0007198 | 2.202 | 11.75  | 24 | 667  | 매아 발생                         |
| GO:0033002 | 0.0007424 | 5.124 | 1.498  | 7  | 85   | 근육 세포 증식                      |
| GO:0045944 | 0.0007803 | 2.432 | 8.389  | 19 | 476  | RNA 폴리머제 II 프로모터로부터의          |

[0303]

|            |           |       |         |    |      | 전사의 양성 조절         |
|------------|-----------|-------|---------|----|------|-------------------|
| GO:0032496 | 0.0007913 | 3.639 | 2.961   | 10 | 168  | 리포폴리사카라이드에 대한 반응  |
| GO:0001775 | 0.0007992 | 2.571 | 7.103   | 17 | 419  | 세포 활성화            |
| GO:0001953 | 0.0008032 | 21.16 | 0.1939  | 3  | 11   | 세포-네트릭스 부착의 음성 조절 |
| GO:0017187 | 0.0008032 | 21.16 | 0.1939  | 3  | 11   | 펩타딜-글루탐산 카르복실화    |
| GO:0080090 | 0.0008098 | 1.558 | 67.27   | 90 | 3817 | 1 차 대사 과정의 조절     |
| GO:0050673 | 0.0008897 | 4.954 | 1.543   | 7  | 90   | 상피 세포 증식          |
| GO:0010757 | 0.0009171 | 112.4 | 0.05287 | 2  | 3    | 플라스미노겐 활성화의 음성 조절 |
| GO:0001819 | 0.0009233 | 3.881 | 2.503   | 9  | 142  | 시토카인 생산의 양성 조절    |
| GO:0031328 | 0.0009347 | 1.962 | 17.13   | 31 | 972  | 세포 생합성 과정의 양성 조절  |
| GO:0008360 | 0.000975  | 5.79  | 1.146   | 6  | 65   | 세포 형상의 조절         |
| GO:0030099 | 0.0009911 | 3.526 | 3.049   | 10 | 173  | 골수 세포 분화          |

[0304]

## b. 세포 성분 온톨로지

| GOCCID     | P 값       | 오즈비   | 예상 카운트 | 카운트 | 크기   | 용어               |
|------------|-----------|-------|--------|-----|------|------------------|
| GO:0044421 | 6.134e-11 | 6.593 | 3.923  | 22  | 252  | 세포외 영역 부분        |
| GO:0005581 | 1.2e-08   | 10.43 | 1.384  | 12  | 81   | 콜라겐              |
| GO:0005615 | 6.927e-08 | 3.082 | 12.87  | 35  | 753  | 세포외 공간           |
| GO:0005886 | 2.337e-07 | 2.486 | 24.72  | 51  | 1707 | 형질 막             |
| GO:0044459 | 3.383e-07 | 2.294 | 28.98  | 57  | 1748 | 형질 막 부분          |
| GO:0005604 | 3.837e-07 | 11.44 | 0.9494 | 9   | 57   | 기저막              |
| GO:0030141 | 7.723e-06 | 4.297 | 3.846  | 15  | 225  | 저장 분비 과립         |
| GO:0005887 | 1.712e-05 | 2.235 | 19.92  | 40  | 1174 | 형질 막에의 통합        |
| GO:0005796 | 5.637e-05 | 14.64 | 0.4273 | 5   | 25   | 골지(Golgi) 내강     |
| GO:0009897 | 6.485e-05 | 5.071 | 2.171  | 10  | 127  | 형질 막의 외부         |
| GO:0005587 | 9.504e-05 | 58.16 | 0.1026 | 3   | 6    | 제 IV 형 콜라겐       |
| GO:0031093 | 0.0001243 | 8.805 | 0.7862 | 6   | 46   | 헬소판 암파 과립 내강     |
| GO:0005605 | 0.0001291 | 19.45 | 0.2735 | 4   | 16   | 기저층              |
| GO:0005606 | 0.0001642 | 43.62 | 0.1196 | 3   | 7    | 라미닌-1 복합체        |
| GO:0060205 | 0.0001778 | 8.189 | 0.8375 | 6   | 49   | 세포질 막- 결합된 소포 내강 |
| GO:0045121 | 0.0004315 | 3.947 | 2.735  | 10  | 160  | 막 레프트            |
| GO:0005788 | 0.0005969 | 4.621 | 1.88   | 8   | 110  | 세포질 세망 내강        |
| GO:0005912 | 0.0006938 | 3.697 | 2.906  | 10  | 170  | 부착성 접합부          |

[0305]

|            |           |       |         |    |     |                       |
|------------|-----------|-------|---------|----|-----|-----------------------|
| GO:0043259 | 0.0008633 | 115.9 | 0.05128 | 2  | 3   | 라미닌-10 복합체            |
| GO:0070022 | 0.0008633 | 115.9 | 0.05128 | 2  | 3   | 형질전환 성장 인자 베타 수용체 복합체 |
| GO:0005578 | 0.0009301 | 3.548 | 3.018   | 10 | 191 | 단백질성 세포외 매트릭스         |

[0306]

## c. 분자 기능 온톨로지

| GOMFID     | P 값       | 오즈비   | 예상 카운트  | 카운트 | 크기   | 용어                        |
|------------|-----------|-------|---------|-----|------|---------------------------|
| GO:0005201 | 4.706e-11 | 13.3  | 1.329   | 14  | 80   | 세포외 매트릭스 구조적 구성성분         |
| GO:0005021 | 5.369e-10 | 182.3 | 0.1329  | 6   | 8    | 헬관 내피 성장 인자- 활성화된 수용체 활성  |
| GO:0005509 | 1.059e-08 | 3.583 | 10.28   | 32  | 619  | 칼슘 이온 결합                  |
| GO:0005178 | 3.02e-08  | 10.98 | 1.213   | 11  | 73   | 인테그린 결합                   |
| GO:0019199 | 1.52e-07  | 9.187 | 1.412   | 11  | 85   | 막횡단 수용체 단백질 키나제 활성        |
| GO:0050431 | 5.162e-07 | 50.39 | 0.1827  | 5   | 11   | 형질전환 성장 인자 베타 결합          |
| GO:0060089 | 2.742e-06 | 2.354 | 21.36   | 44  | 1286 | 분자 전달자 활성                 |
| GO:0005518 | 8.458e-06 | 11.21 | 0.7476  | 7   | 45   | 콜라겐 결합                    |
| GO:0038023 | 6.846e-05 | 2.287 | 15.45   | 32  | 930  | 신호전달 수용체 활성               |
| GO:0017154 | 8.724e-05 | 59.96 | 0.09968 | 3   | 6    | 세마포린 수용체 활성               |
| GO:0005024 | 0.000149  | 18.52 | 0.2824  | 4   | 17   | 형질전환 성장 인자 베타-활성화된 수용체 활성 |
| GO:0008289 | 0.0001585 | 2.793 | 7.376   | 19  | 444  | 지질 결합                     |
| GO:0030246 | 0.0001911 | 2.937 | 6.263   | 17  | 377  | 탄수화물 결합                   |
| GO:0005539 | 0.0002787 | 4.192 | 2.592   | 10  | 156  | 글리코사미노글리칸 결합              |
| GO:0019899 | 0.0003593 | 2.176 | 14      | 28  | 843  | 효소 결합                     |
| GO:0001871 | 0.0005776 | 3.797 | 2.841   | 10  | 171  | 페틴 결합                     |
| GO:0005520 | 0.0006073 | 12.03 | 0.3987  | 4   | 24   | 인슐린-유사 성장 인자 결합           |
| GO:0048407 | 0.0006767 | 22.48 | 0.1827  | 3   | 11   | 헬소판-유래 성장 인자 결합           |
| GO:0019834 | 0.0008154 | 119.4 | 0.04984 | 2   | 3    | 포스포리파제 A2 억제제 활성          |

[0307]

- [0308] 실시예 3. VEGF 신호전달 차단에 대한 혈관 반응은 다수의 종양 모델에 걸쳐 보존된다
- [0309] VEGF 신호전달 차단에 대한 VDV 반응은 기질 특이적이며 다수의 종양 모델에 걸쳐 보존된다
- [0310] 본 발명자들은 뮤린 후기 PNET 모델에서 확인된 VDV 전사 서명이 다른 종양 모델에서도 또한 검출가능한지의 여부를 결정하고자 하였다.
- [0311] 첫째로, 본 발명자들은 확립된 (400 mm<sup>3</sup>) 피하 인간 유방 암종 종양 모델 (MDA-MB-231)로부터의 샘플에서 항-VEGF 치료에 대한 전체-종양 반응을 분석하였다. 무감독 발현 분석은 항-VEGF와 대조군 치료 샘플을 구별하는데 실패한 반면, 단기간 (즉, 24시간)의 항-VEGF 치료는 다른 모든 유전자에 대한 대부분의 VDV 유전자의 발현의 유의한 하향 이동을 유도하기에 충분하였다 ( $p<0.0001$ ; 도 2a, 상부 패널). VDV 유전자가 내피 특이적이라는 가설과 일치하게, 이들 유전자의 발현 변화는 단지 뮤린 상의 프로브에 의해서만 검출되고 인간 마이크로어레이에서는 그렇지 않았으며, 이는 기질 및 종양 세포 사이의 차이에 해당한다 (도 2a). 또한, RIP-T $\beta$ Ag GEMM으로부터의 데이터와 일치하게, 항-VEGF로의 MDA-MB231 피하 이종이식편 유방암 종양의 치료는 범-혈관 마커 및 다른 VDV 유전자에 대해 후보 proxVDV 유전자 후보의 더 급격한 하향조절을 유도하였다.
- [0312] 본 발명자들은 제3 모델인 동소 두개내 U87 교모세포종에서의 장기간 항-VEGF 치료의 효과도 또한, 후보 proxVDV 유전자의 보다 현저한 하향조절과 함께 마우스-특이적 프로브에 의한 독점적 검출을 갖는 감소된 VDV 유전자 발현의 패턴을 생성하였음을 밝혀내었다 (도 2b). 항-VEGF 항체에 대한 반응의 비슷한 VDV 패턴이 또한 시험된 다수의 항-VEGF 치료된 인간 이종이식편 및 뮤린 종양 모델에 걸쳐 일관성 있게 관찰되었다.
- [0313] 따라서, 종양 모델 및 이식 부위에 관계없이, 그리고 항체 치료의 길이에 독립적으로, VDV 서명 (proxVDV 및 distVDV 유전자로 구성됨)은 전체 종양 mRNA 샘플에서의 VEGF 경로 억제의 혈관 하류 생물학적 결과를 반영하는 유전자 발현 변화의 지속적 검출을 가능하게 한다.
- [0314] VEGF 신호전달은 VDV 유전자 발현을 유도한다
- [0315] 다음으로, 본 발명자들은 VEGF 자극이 서로 내피 VDV 유전자 발현을 증가시키는 것에 의해 미성숙 신생-혈관계의 형성을 2가지 상이한 병리학적 관점에서 표시할 수 있는 범위를 평가하였다: D114/Notch1 신호전달 경로의 차단에 대한 반응으로서의 상처 치유 및 증가된 종양 혈관신생.
- [0316] 생체내 마우스 피부-상처 검정에서, 12시간 동안의 제조합 VEGF (rVEGF)의 국소 부가는 피부 상처 부위에서의 대부분의 VDV 유전자의 발현을 증가시켰고, 반면에 항-VEGF 치료는 예상된 정반대의 효과를 가졌다 (도 2c). 종양에서 보인 반응과 일치하게, VEGF 차단 및 국소 VEGF의 효과는 proxVDV 유전자 후보에서 가장 현저하였다.
- [0317] D114/Notch1 신호전달 경로의 억제를 통해 신생-혈관화를 유도하는 결과를, MDA-MB-231 종양 보유 마우스를 항-D114, 항-VEGF 또는 대조군 항-돼지풀 항체로 48시간 동안 치료함으로써 평가하였다. D114/Notch1 경로는 부분적으로 VEGF 신호전달의 증진을 통해 비생산적 혈관신생을 증가시킨다 (문헌 [Jakobsson et al. Biochem Soc Trans. 37: 1233-1236, 2009; Ridgway et al. Nature. 444: 1083-1087, 2006; Jakobsson et al. Nat. Cell Biol. 12(10): 943-953, 2010]). 조직학적 분석은 예상한 바와 같이 항-VEGF 치료가 종양 혈관계의 혈관 전정을 유도하였음을 보여주었고, 반면에 항-D114로 치료된 종양은 대조군과 비교시 증가된 MVD를 보여주었다 (도 2d, 좌측). VDV 유전자의 발현은 항-VEGF 치료시 감소하고 D114의 차단에 반응하여 증가함으로써 일치하게 변하였다 (도 2d, 우측). 다시, 다른 모델에서 보인 바와 같이, proxVDV 유전자 후보의 발현의 변화가 다른 VDV 유전자의 것보다 명백하였다.
- [0318] 전체적으로, 이들 데이터는 대부분의 VDV 유전자가 VEGF-유도된 신생-혈관계에서 발현되고, 이들의 집합적 발현은 VEGF 생물학적 활성 뿐만 아니라 VEGF-의존성 혈관계의 상대적 존재량을 반영할 가능성이 있음을 시사한다.
- [0319] VEGF 경로 활성화의 전사 효과는 시험관내 및 생체내 시스템 둘 다에서 이전에 연구된 바 있다는 것이 주목할 만하다. 그러나, 시험관내에서의 내피 세포의 rVEGF 자극이라는 전사 결과는 유전자가 정말 진정한 VEGF 생체내 표적인지를 결정하기에 충분한 정보를 제공하지 않는다. 실제로, 본 발명자들은 시험관내에서의 HUVEC의 rVEGF 자극이 본 발명자들이 확인한 바 있는 대부분의 proxVDV 유전자의 전사를 유도하지 않는다는 것을 다수의 조건 하에 밝혀내었다 (도 3). 이러한 불일치는 혈류 및 기계적 힘을 비롯한 다수의 자극의 통합자로서의 혈관계의 시스템 상 역할, 및 VEGF가 용량 의존적일 뿐만 아니라 문맥 의존적임을 고려할 때 놀라운 일이 아니다.

[0320] 한편, 본원에서 확인된 유전자 (ESM1 포함) 뿐만 아니라 본 발명자들이 가능성 있는 표적으로서 확인하지 않은 유전자 (특히 Pcdh17, EHD3, PRDM1 및 THBD 포함; 도 3 참조) 중 일부는 시험관내에서 VEGF 자극에 의해 확실하게 상향조절된다. 따라서, 본원에 제시된 proxVDV 유전자의 목록은 총망라한 것이 아닐 가능성이 있으며, 본 발명자들은 현재 추가의 생체내 VEGF 표적을 확인하기 위한 노력으로 생체내 및 시험관내 데이터-세트를 통합하고 있다.

[0321] 실시예 4. proxVDV 유전자는 VEGF/VEGFR-2 하류 생물활성의 생체내 근위 마커이다

[0322] 계내 혼성화 (ISH)로부터의 데이터는, Esm1이 HM7 결장 이종이식 종양으로부터의 혈관의 유의한 분화에서 고도로 발현되고, 반면에 항-VEGF 치료된 종양으로부터의 혈관에서는 거의 검출불가능하다는 것을 나타내었다 (도 4a-4c). 이는 Esm1이 진정한 proxVDV 유전자인 것과 일치한다. 그러나, ESM1은 VEGF 외에 다른 자극에 의해 조절되고 (문헌 [Scherpereel et al. Crit. Care Med. 34(2): 532-537, 2006]), ESM1은 또한 종양 세포에서 간헐적으로 발현될 수 있기 때문에, 본 발명자들은 생체내에서 FDA 승인된 VEGF/VEGFR-2 억제제에 대한 반응으로서의 VEGF 하류 신호전달 생물활성을 측정하기 위한 집합적이고 보다 특이적인 수단으로서의 추가의 proxVDV 유전자 후보를 검증하기를 원하였다. 따라서, 본 실험에서는 확립된 MDA-MB-231 종양을 보유하는 마우스를 대조군 mAb, 항-VEGF mAb (베바시주맙에 대한 대용물로서의 것), 수니티닙 (수텐트(Sutent)®; 문헌 [Escudier. Expert Rev. Anticancer Ther. 10(3): 305-317, 2010]), RTK 중에서도 특히 VEGFR-2를 표적화하는 소분자 TKI, 또는 보다 특이적인 VEGFR-2 억제제인 악시티닙 (문헌 [Kindler et al. Lancet Oncol. 12(3): 256-262, 2011; Grunwald et al. Onco. Targets Ther. 5:111-117, 2012])으로 치료하였다. 후속적으로, 분석을 위해 종양을 치료 8, 16 또는 72시간 후에 수집하였다 (도 5a, 상부 패널). 이전 관찰과 일치하게, 모든 3종의 억제제는 치료 72시간 후에 수집된 종양에서 MVD의 유의한 감소를 유도하였다 (도 4d). 유전자 발현 수준에서, 본 발명자들은 모든 경우에 proxVDV 유전자가 범-혈관 마커 Cd31 및 Plvap에 대해 보인 것보다 큰 하향조절을 보여주었음을 밝혀내었다 (도 5a). 중요하게는, Vegfa 및 비-혈관 마커 E-cad (상피) 및 Cd45 (조혈)의 발현은 시험된 어떠한 VEGF 경로 억제제에 의해서도 현저하게 영향받지 않았고 (도 4e), 이는 proxVDV 유전자의 변화가 "표적화에 성공하였고", 내피 특이적임을 시사한다. 제72시간에, 수니티닙이 가장 강력한 VEGF 경로 억제제인 것으로 보인다 (도 5a).

[0323] 전사 반응의 역학은 소분자 억제제와 항-VEGF 항체 치료 사이에 상이하였다. 유전자 발현의 어떠한 유의한 변화도 치료 8시간 후에 수니티닙 또는 악시티닙에 의해 유도되지 않았다. 단지 치료후 16시간에 proxVDV 유전자가 발현의 하향조절에 대한 2종의 SMI의 효과가 분명하였고, 이 효과는 치료 72시간 후에 증가하였다 (도 5a). 대조적으로, 항-VEGF mAb (복강내 투여)에 의한 proxVDV (distVDV는 그러하지 않음) 유전자의 하향조절은 투여 8시간 후에 명백하였고, 치료후 16시간까지 그의 피크에 도달하였다.

[0324] 이 proxVDV 유전자 세트가 실제로 종양-연관 내피 세포 (TAEC)에서의 VEGF 신호전달에 의해 조절되었는지의 여부를 확인하기 위해, 본 발명자들은 MDA-MB-231-GFP 종양-보유 동물을 항-VEGF 또는 대조군 항체로 치료한 다음, 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 TAEC (Cd31+, Cd45-, GFP-)를 단리하고, 2개의 상이한 치료군 사이의 생체외 유전자 발현을 비교하였다. 본 발명자들은 시험된 모든 범-혈관 마커 및 proxVDV 유전자가 다른 분류된 세포 집단과 비교시 내피 세포 상에서 고도로 농축되었다는 것을 밝혀내었다 (도 6). proxVDV 유전자 Prnd, Esm1, Nid2, Kcne3, Apj, Ap1n 및 Mest는 항-VEGF 치료된 동물로부터 단리된 TAEC 세포에서 대조군에 대해 일관성 있게 하향조절되었고, 반면에 다른 VDV 유전자, 예컨대 Cd31, Plvap, Ets-1 및 H1x는 그렇지 않았다 (도 5b). 이 데이터는 Prnd, Esm1, Nid2, Kcne3, Ap1n, Apj 및 Mest가 VEGF 생물활성의 근위 및 감수성 바이오마커이며, 생체내에서 종양-연관 내피 세포에서의 경로의 직접적인 억제에 대한 후보 리포터임을 확인시켜준다.

[0325] 실시예 5. VEGF 신호전달 차단에 대한 혈관 전사 반응은 마우스와 인간 종양 사이에 보존된다

[0326] 본 발명자들이 뮤린 모델에서 확인한 VEGF 중화에 대한 반응이 인간 종양 혈관계에서 보존되는지의 여부를 시험하기 위해, 본 발명자들은 베바시주맙 (아바스틴®) 치료된 환자로부터의 종양 생검에서 VDV 서명 벨현에 대한 VEGF 차단의 효과를 연구하였다. 여기서, 본 발명자들은 단일 작용제로서 베바시주맙의 1회 용량으로 치료된 19명의 염증성 유방암 환자로부터의 매칭되는 치료전 및 치료후-21일 생검 쌍으로부터의 공개된 마이크로-어레이 데이터를 이용하였다 (문헌 [Wedam et al. Journal of Clin. Oncology. 24: 769-777, 2006]). 통상의 생물정보학 분석이 선형적으로 이를 생검에서 베바시주맙 치료에 대한 반응으로서의 대부분의 특이적 혈관 유전자 발현을 구별하는데 실패했을지라도 (문헌 [Yang et al. Clin Cancer Res. 14: 5893-5899, 2008]), VDV 유전자 세트의 인간 오르토로그의 집중 발현 분석은 베바시주맙 치료후 임상 샘플에서 치료전 생검과 비교하여 VDV 전사체의 명백한 하향 조절을 보여주었다 (도 7). 뮤린 종양 모델에서와 같이, 본 발명자

들은 몇몇 proxVDV 유전자, 예컨대 ESM1, NID2, PRND, KCNE3 및 MEST의 발현이 VEGF 치료시 보다 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다. 본 발명자들이 전임상 모델에서 확인한 VDV 유전자 세트는 따라서 임상 종양 샘플에서의 VEGF 신호전달 억제에 대한 진화적으로 보존된 혈관 반응의 검출을 가능하게 한다.

[0327] 실시예 6. 인간 결장직장암에서의 VDV 유전자의 치료전 발현 수준은 베바시주맙에 대한 임상 반응과 상호연관된다

[0328] 본 발명자들의 데이터는 VDV 유전자가 농축된 인간 종양 혈관이 VEGF 신호전달 억제에 대해 독보적으로 반응 성임을 나타낸다. 본 발명자들은 다음으로 치료전 종양 샘플에서의 이들 마커의 상대적 농축이 실제로 항-VEGF 요법에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 가설을 시험하였다.

[0329] 화학요법과 조합된 베바시주맙은 전이성 결장직장 암종 (CRC)을 앓는 환자에서 무진행 생존 (PFS) 및 전체 생존 (OS)을 증가시키는 것으로 이전에 밝혀졌다 (문헌 [Hurwitz et al. N Engl J Med. 350: 2335-2342, 2004]). N016966은 환자가 옥살리플라틴-기반 화학요법 (XELOX 또는 FOLFOX-4)을 위약 또는 베바시주맙과 조합하여 투여받은 1차 전이성 CRC 시험이었고; 본 특정한 연구에서 화학요법에 대한 베바시주맙의 부가는 PFS의 1차 종점률을 유의하게 개선시켰지만, OS 차이 (2차 종점)는 통계적 유의성에 도달하지 못하였다 (문헌 [Saltz et al. Journal of Clin. Oncology. 26: 2013-2019, 2008]). VDV 유전자 발현을 임상 결과와 상관시킬 수 있는지를 시험하기 위해, 본 발명자들은 XELOX-함유 아암에 등록된 103명의 환자 (바이오마커 평가 가능한 하위집단)로부터의 이용가능한 치료전 보존용 종양 조직에서 VDV 유전자의 발현 수준을 분석하였다. 이들 임상 샘플로부터의 RNA의 제한된 품질 및 양으로 인해, 4종의 상이한 하우스키핑 유전자 (유전자 발현 정규화를 위해), VEGF (대조군으로서) 및 하기를 포함하는 22종의 대표적인 근위 및 원위 VDV 유전자를 포함하는 이전에 설계 및 검증된 "혈관신생" 플루이드 qRT-PCR 칩 (도 8b)에서 유전자 발현을 분석하였다: (i) 범-혈관 마커, 예컨대 CD31, CD34, 및 MVD의 지표로서의 VE-CADH; (ii) 핵심 VEGF 경로 성분 및 proxVDV 유전자, 예컨대 VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, EPHRINB2, NRPs, ESM1, NID2, COL4a2 및 LAMA4a; (iii) 내피 신호전달 경로의 성분 및 VDV 생물학의 잠재적 조절제인 추가의 VDV 유전자, 예컨대 DLL-4, NOTCH1, ALK1 및 EGFL7 (상기 간소화된 22 VDV 유전자 서명의 검증에 대해서는 도 9a 참조).

[0330] 도 8a는 본 연구에서 검사된 N016966 시험으로부터의 103명의 환자에서의 OS 및 PFS의 카플란-마이어 분석을 보여준다. 이들 환자에서, 화학요법에 대한 베바시주맙의 부가는 통계적으로 유의한 PFS (HR, 0.59; 95% CI, 0.37 내지 0.93; p=0.024) 및 OS 이익 (HR, 0.45; 95% CI, 0.23 내지 0.85; p=0.015)을 제공하였다. 결장암 유병률 샘플에서의 예비 실험은 이들 22개의 VDV 유전자의 발현이 고도로 상호연관되어 있음을 나타내었기 때문에 (도 8c), 본 발명자들은 개별 유전자 또는 22개의 VDV 유전자 하위세트에 대한 종양 발현 점수의 중앙 발현 수준을 이용하여 CRC 샘플을 각각의 경우에 "고" 또는 "저"로 분류하기로 결정하였다 (도 8b). 이어서, 본 발명자들은 임상 결과와 "고" 또는 "저" 치료전 유전자 발현 사이의 상관관계를 시험하였다. 이전에 보고된 바와 같이, 치료전 VEGF mRNA 수준 단독에 의한 치료 코호트의 계층화는 베바시주맙 치료된 환자에서 임상 결과에 대해 어떠한 차별적 효과도 보여주지 않았다 (도 9b). 또한, 단일 distVDV 유전자 (CD31)의 발현 수준에 의해 "고" 및 "저" 하위세트로 분류된 베바시주맙-치료된 환자는 PFS에서 차이를 보이지 않았고; OS 이익의 경향은 존재하였다 (도 9c). 각각의 경우에, VEGF 또는 CD31과 치료 사이의 상호작용은 어떠한 예측된 효과도 보여주지 않았다. 주목할 만한 것은, 동일한 환자 집단을 "VDV 고" 대 "VDV 저" 집단으로 계층화하였을 때 (도 8d), 효과 크기 및 유의성이 기준선 분석과 비교시 실질적으로 변경되었다는 점이다: "VDV 저" 환자 (도 8d의 점선)에서, 베바시주맙 및 화학요법의 조합은 PFS (HR, 0.88; 95% CI, 0.47 내지 1.62; p=0.67) 및 OS (HR, 0.58; 95% CI, 0.25 내지 1.33; p=0.2) 둘 다에서 화학요법 단독과 비교시 적당한 이익을 부여하였다. 대조적으로, "VDV 고" 환자 (도 8d, 실선)에서, 화학요법에 대한 베바시주맙의 부가 대 단독 화학요법은 현저하고 유의한 PFS (HR, 0.36; 95% CI, 0.17 내지 0.77; p=0.0079) 및 OS (HR, 0.31; 95% CI, 0.11 내지 0.93; p=0.036) 이익을 제공하였다. 치료와 마커 상태 사이의 상호작용은 PFS에 대해 유의한 예측 효과를 보여주었지만 (p=0.036), "VDV 고" 환자에서의 관련 위험의 관찰된 개선에도 불구하고 OS에 대해서는 통계적 유의성에 도달하지 못하였다 (p=0.37). 따라서, 이 상대적으로 작은 103-환자 샘플 세트에서, 집합적 VDV 유전자 하위세트의 보다 높은 발현은 화학요법에 대한 베바시주맙 부가에 의해 제공되는 개선된 임상 결과와 특이적으로 상호연관되며, PFS에 관하여 예측 효과를 갖는다.

[0331] 실시예 7. VEGF 길항제에 대한 환자 반응성 또는 감수성의 모니터링

[0332] 본 실시예는 환자가 VEGF 길항제에 대해 반응성 또는 감수성일지의 여부를 모니터링하기 위한 검정을 기재한다. 샘플 (예를 들어, 혈액 또는 조직 생검)을 VEGF 길항제 (예를 들어, 항-VEGF 항체)로의 치료 전에 1명 이상의 환자로부터 사전 동의를 받고 수득하였다. DNA 및 혈청/혈장을 널리 공지된 절차에 따라 단리하였다.

샘플은 풀링하거나 또는 개별 샘플로 유지할 수 있다.

[0333]

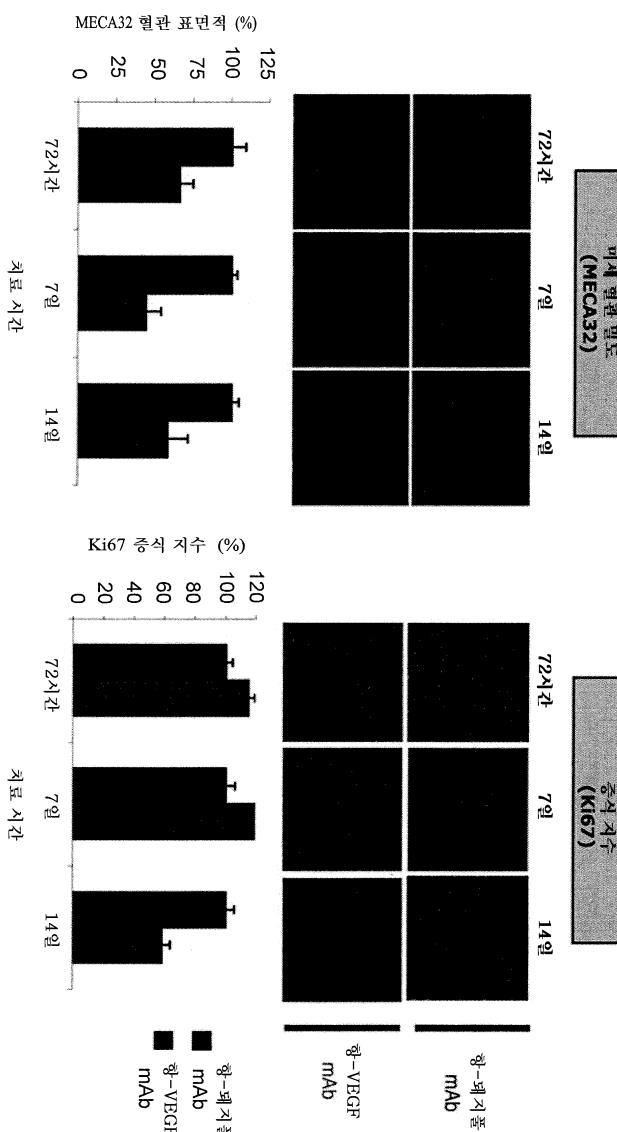
표 1 또는 2에 제시된 적어도 하나의 유전자의 발현을, 적어도 하나의 유전자에 대한 mRNA를 측정함으로써 또는 상기 기재된 바와 같이 ELISA를 이용하여 적어도 하나의 유전자에 의해 코딩된 단백질을 검출함으로써 하기 치환과 함께 평가하였다: (1) 뮤린 유전자 (예를 들어, Nid2) 표준물을 인간 유전자 (예를 들어, Nid2) 표준물로 치환; (2) 비오티닐화 염소 항-마우스 유전자 (예를 들어, Nid2) 폴리클로날 Ab를 비오티닐화 염소 항-인간 유전자 (예를 들어, Nid2) 폴리클로날 항체로 치환; 및 (3) 0.5% BSA를 10% FBS로 치환. 샘플이 본원에 기재된 바와 같은 대조군에 대해 적어도 하나의 유전자의 발현의 적어도 2배의 증가를 나타내는 환자를, VEGF 길항제로의 치료에 대해 반응성이거나 또는 감수성이 환자로서 확인하였다.

[0334]

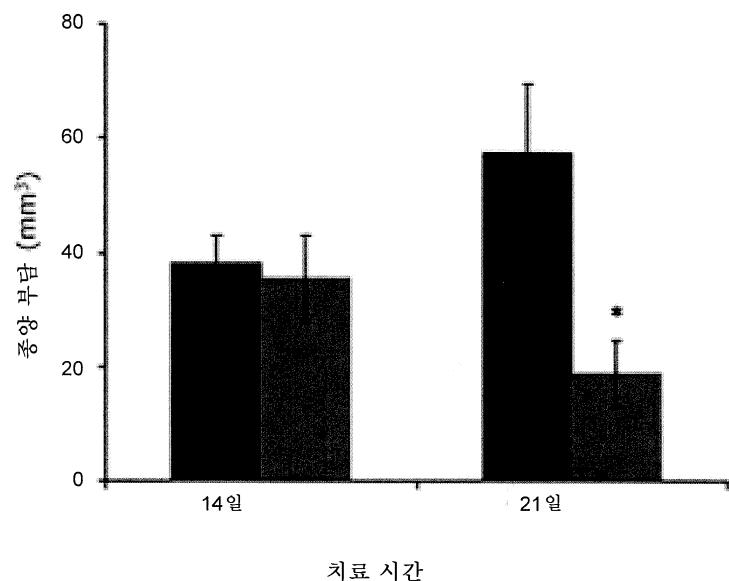
상기 발명은 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 예시 및 실시예로서 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 과학 참고문헌, 및 전뱅크 등록 번호의 개시내용은 각 특허, 특허 출원, 과학 참고문헌, 및 전뱅크 등록 번호가 구체적이고도 개별적으로 본원에 포함된 것과 같이 전체 목적상 그 전문이 본원에 명백하게 참조로 포함된다. 이러한 특허 출원은 구체적으로 2012년 1월 13일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/586,660을 포함하며, 그로부터 본원이 이익을 청구한다.

## 도면

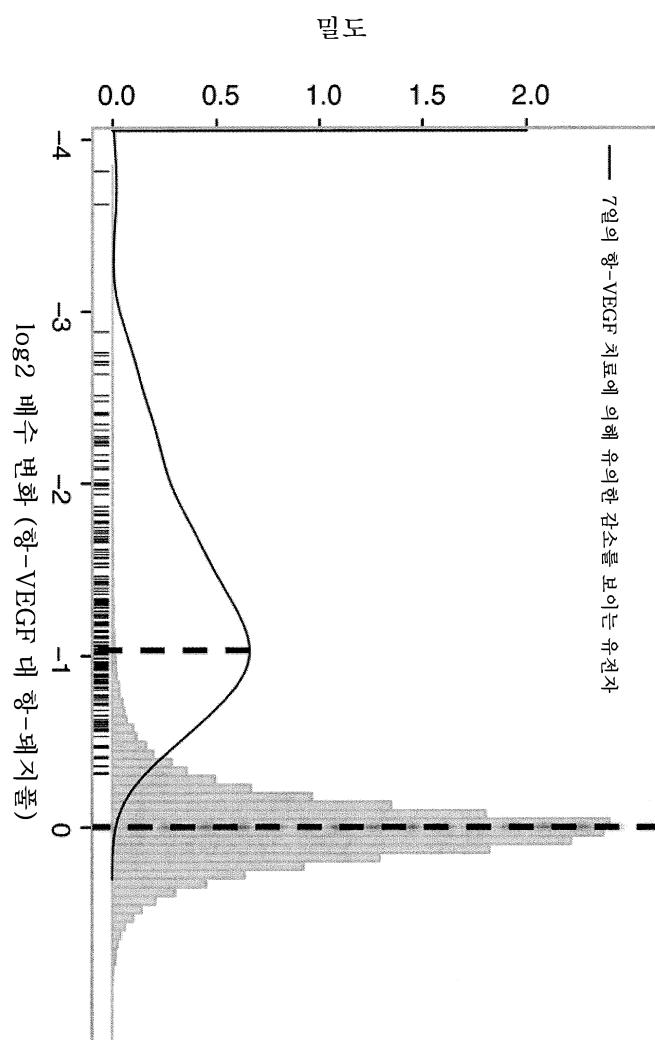
### 도면 1a



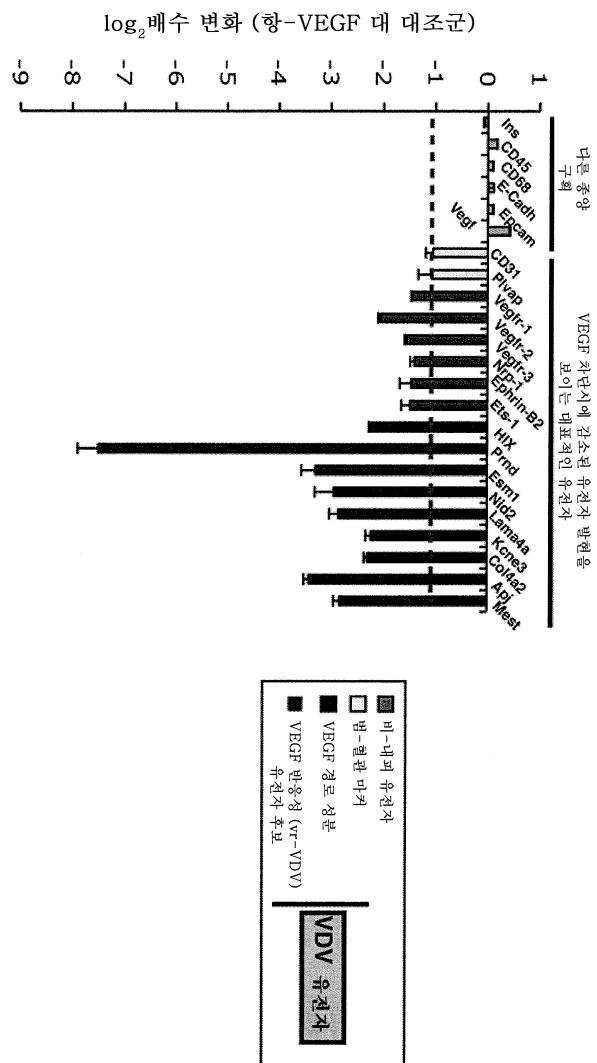
## 도면1b



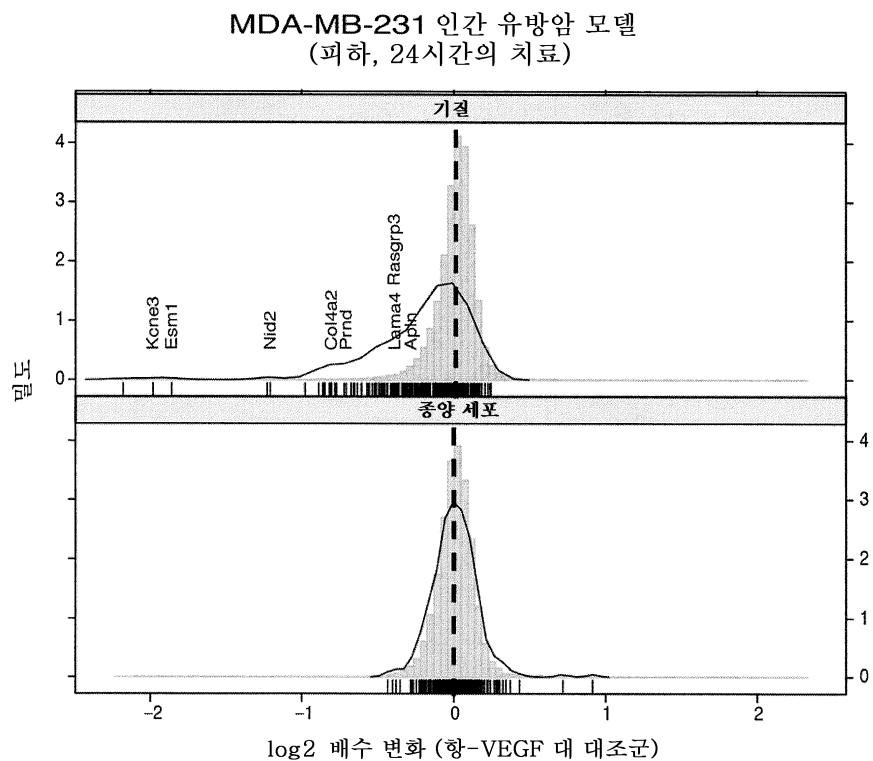
## 도면1c



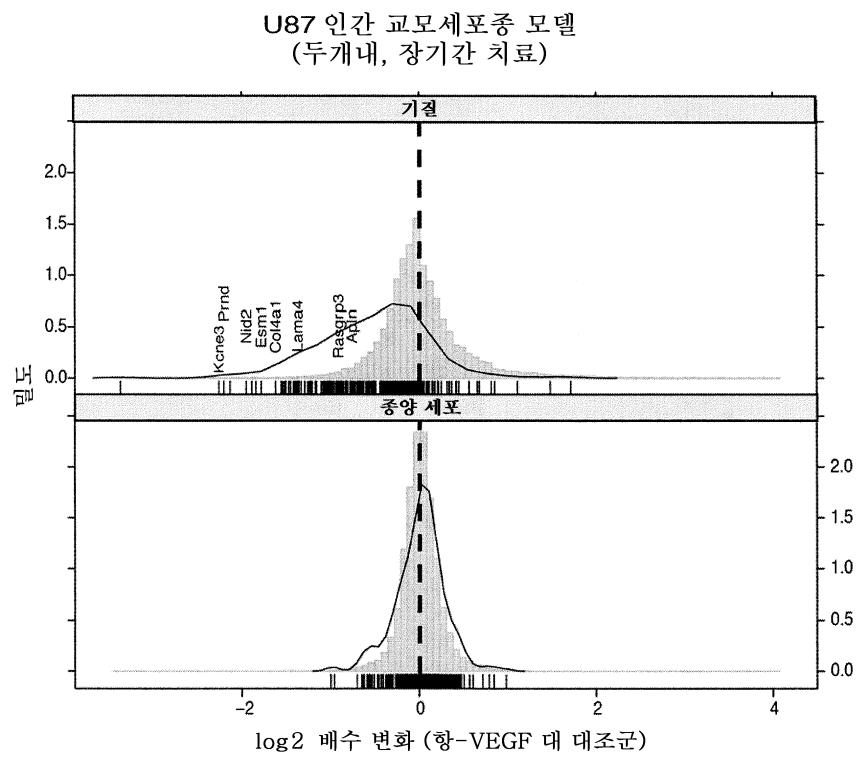
## 도면 1d



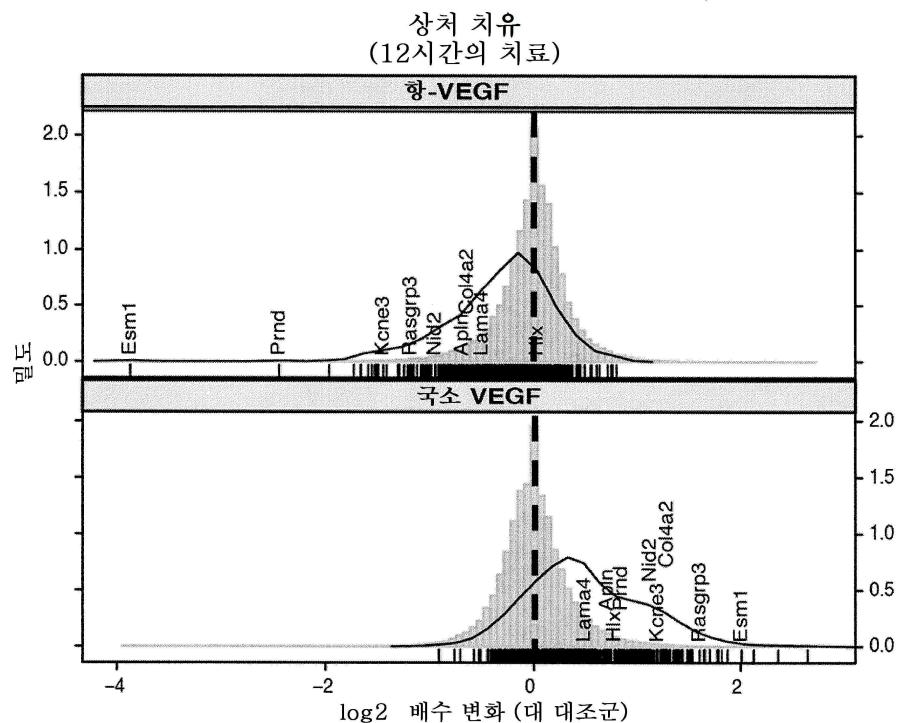
## 도면2a



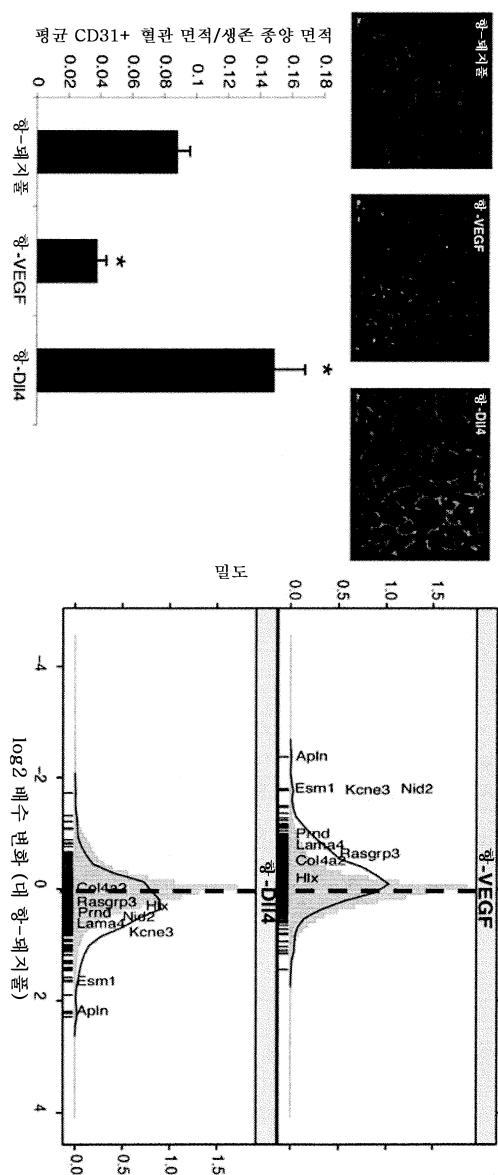
## 도면2b



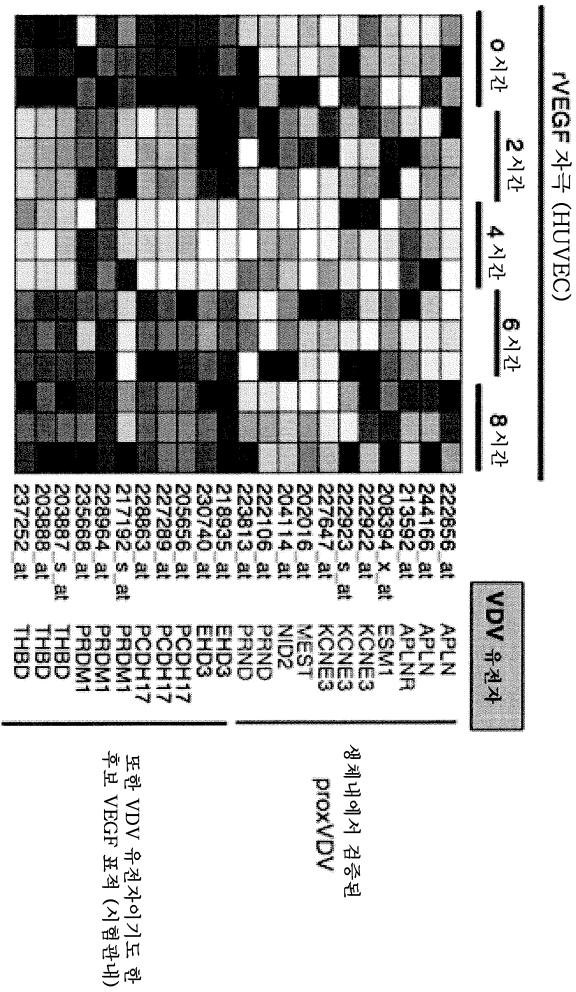
## 도면2c



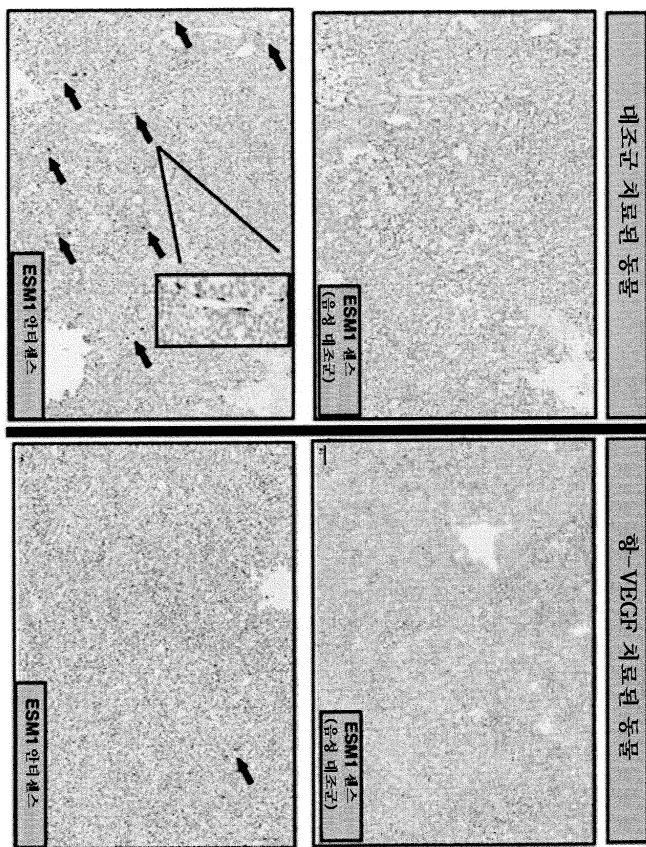
## 도면2d



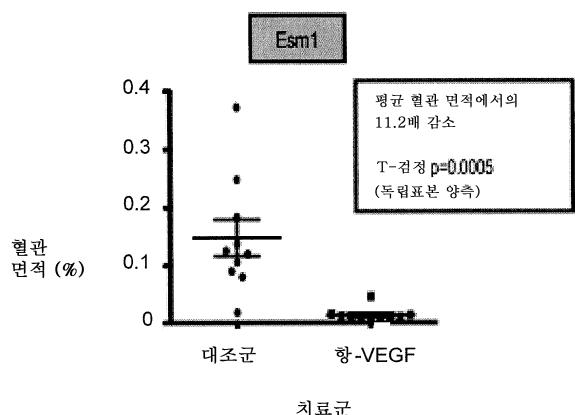
## 도면3



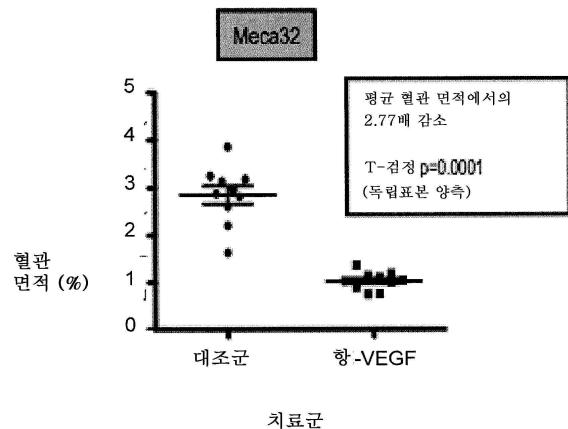
도면4a



도면4b

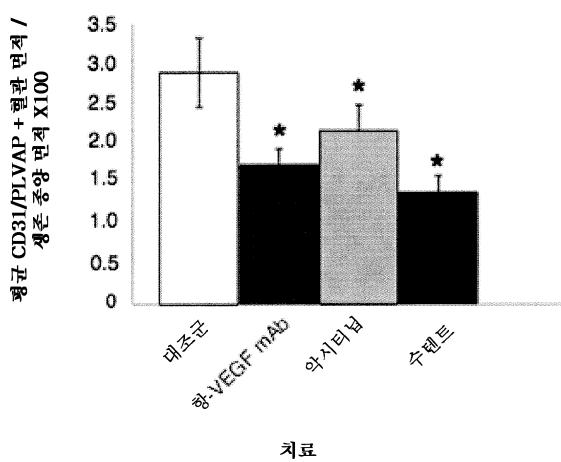
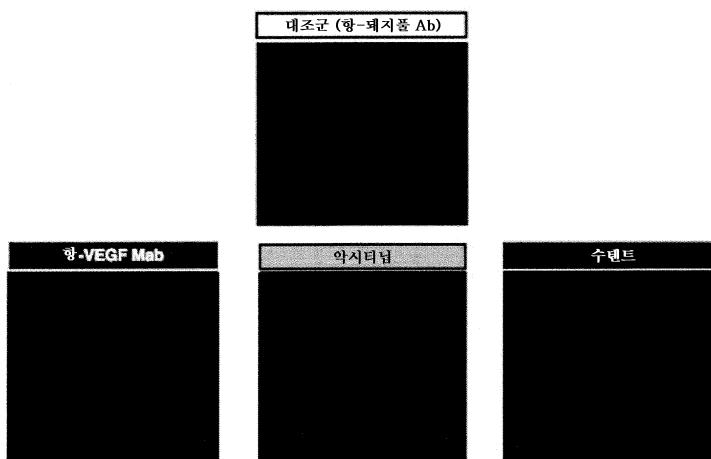


## 도면4c

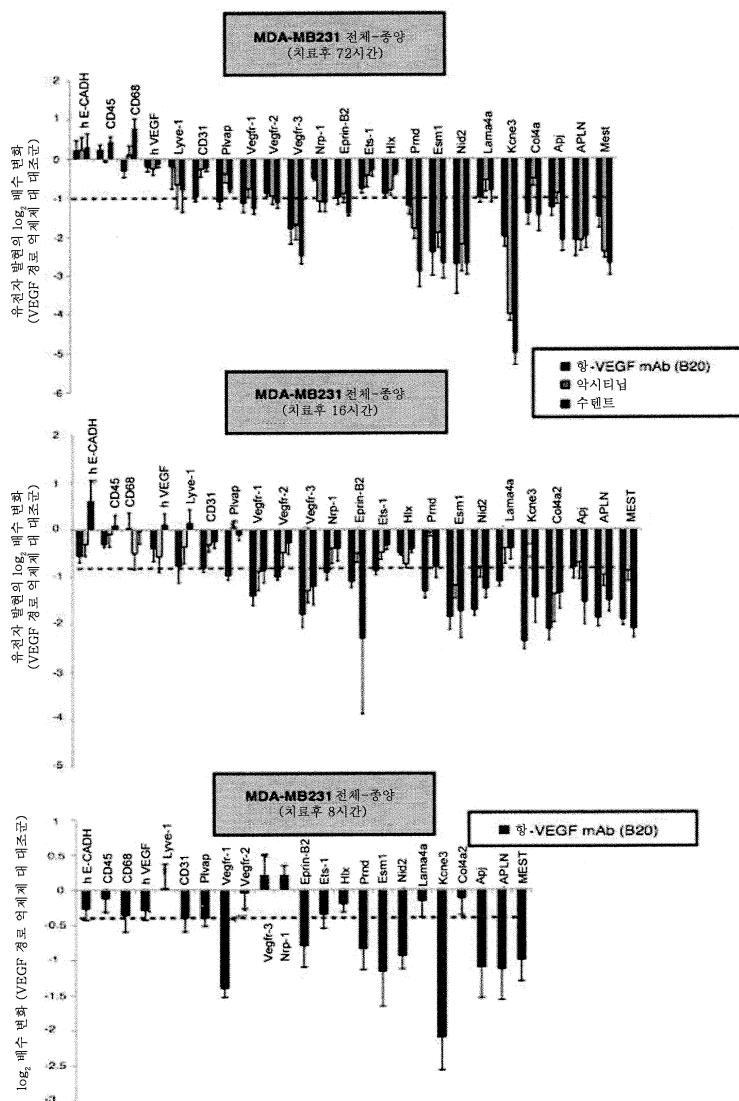


## 도면4d

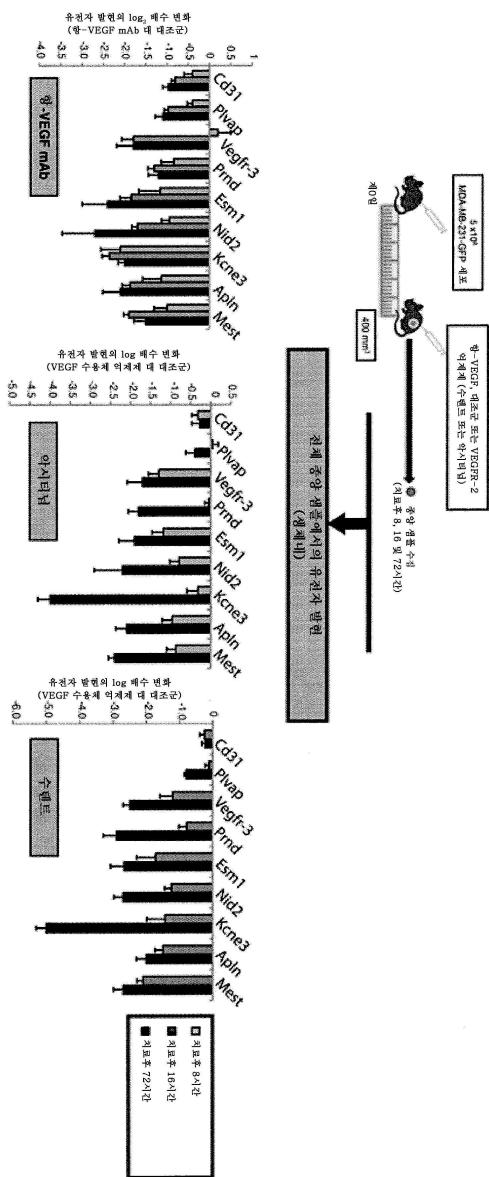
MDA-MB-231 종양 절편 (치료후 72시간)



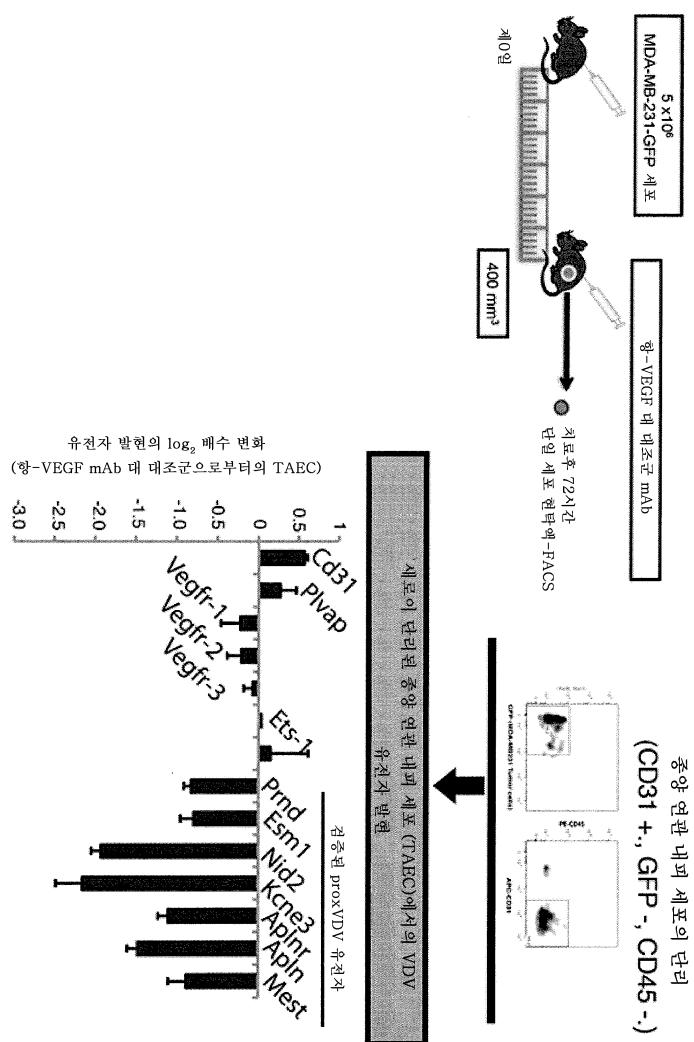
## 도면4e



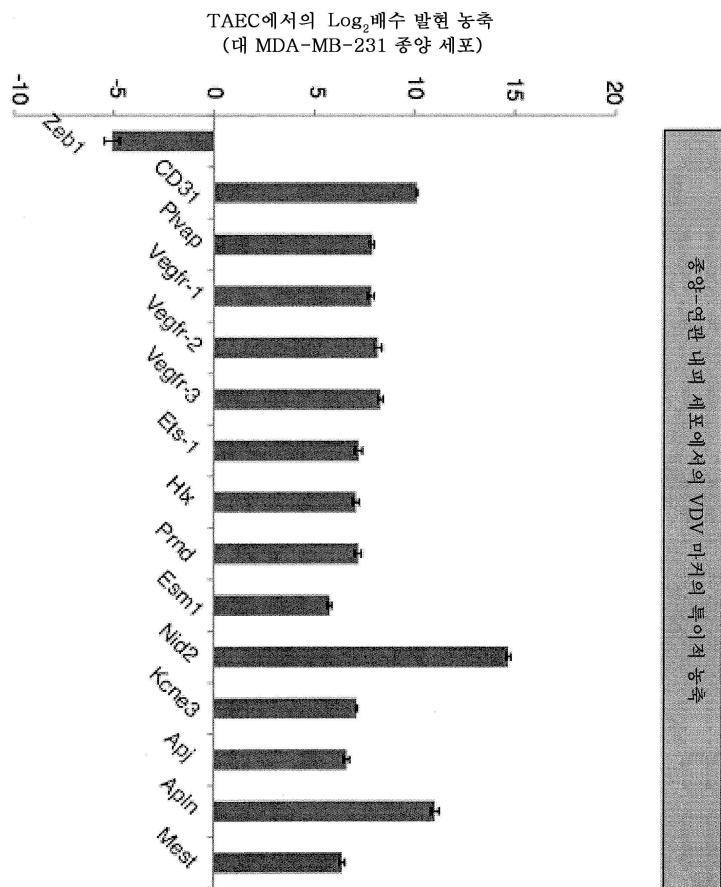
## 도면5a



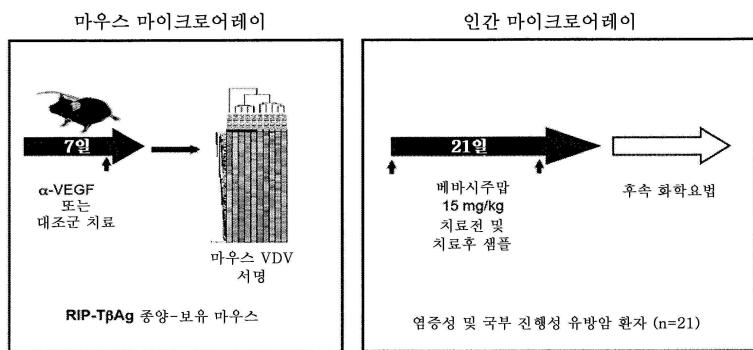
## 도면5b



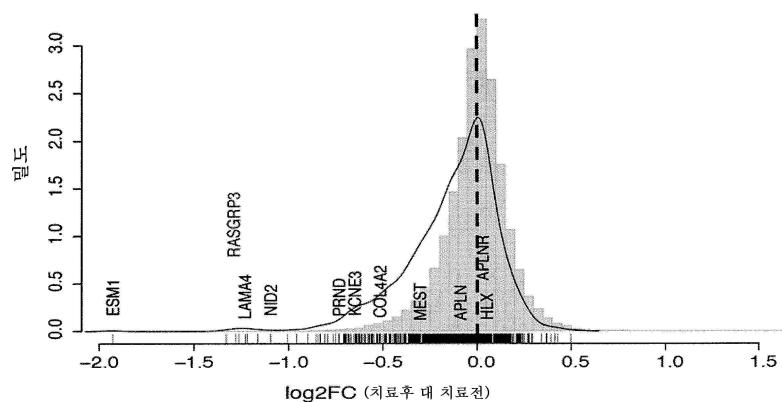
## 도면6



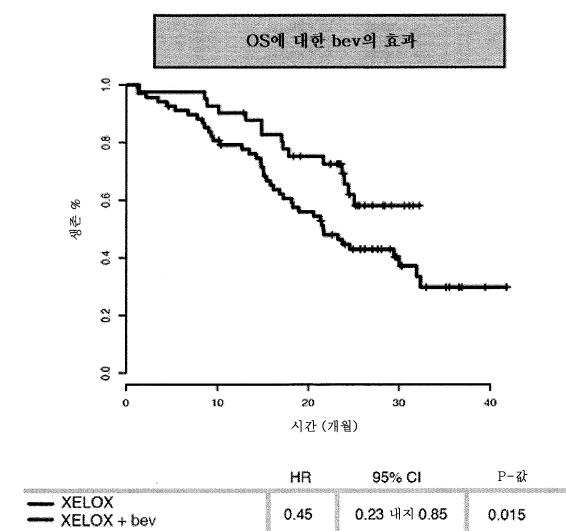
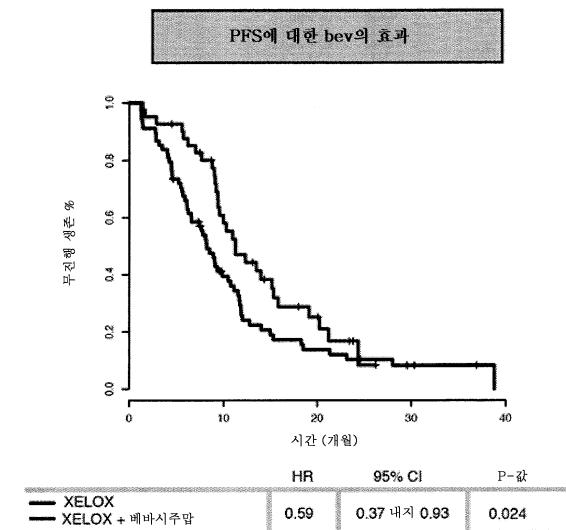
## 도면7



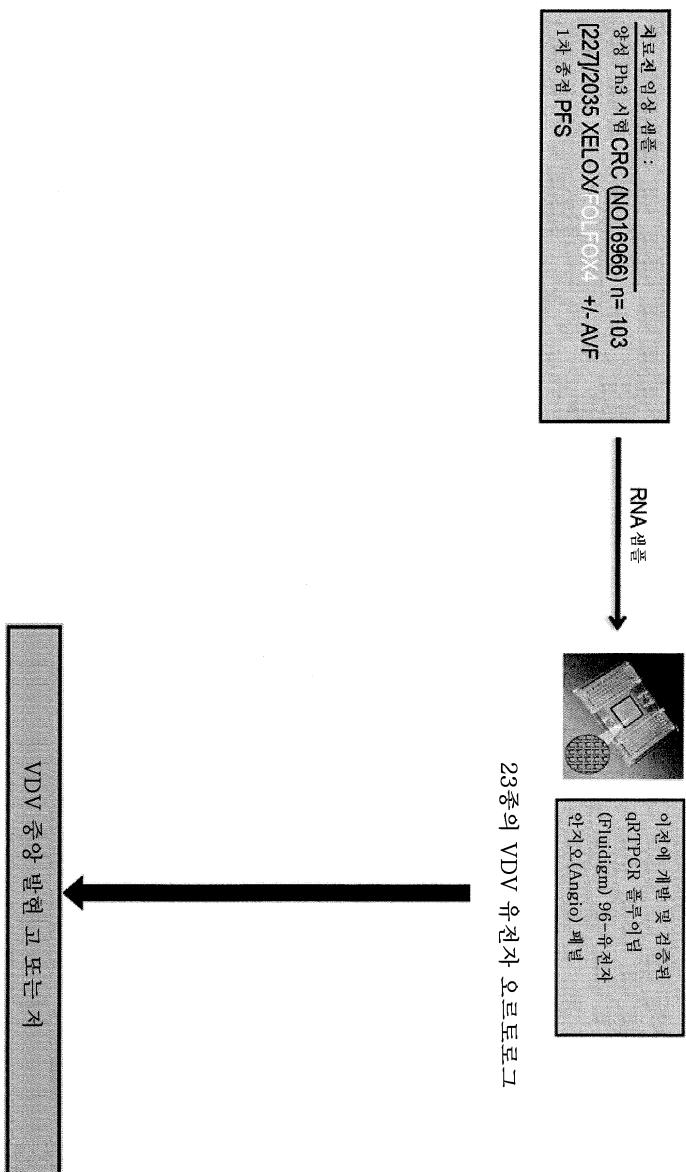
인간 종양 생검에서의 VDV 발현에 대한 베바시주맙의 효과



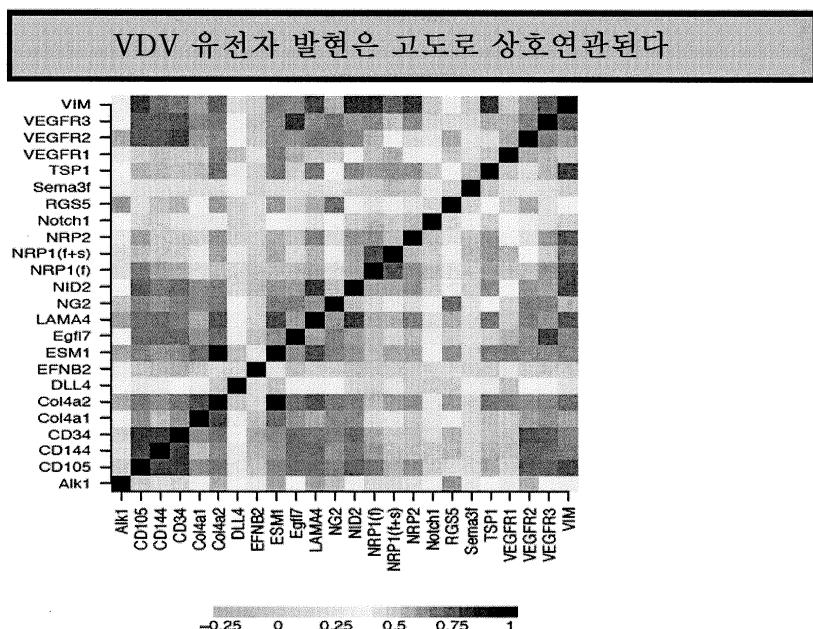
## 도면8a



### 도면8b

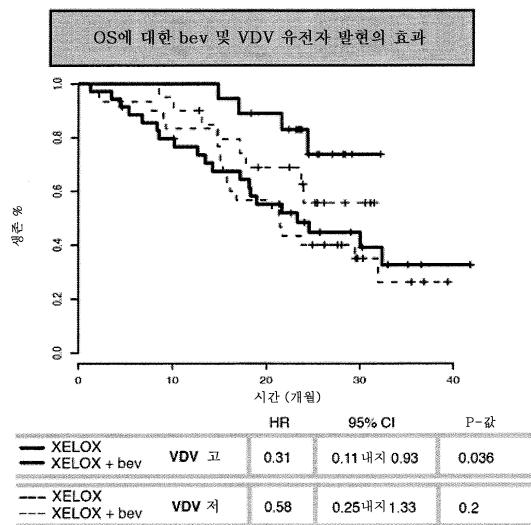
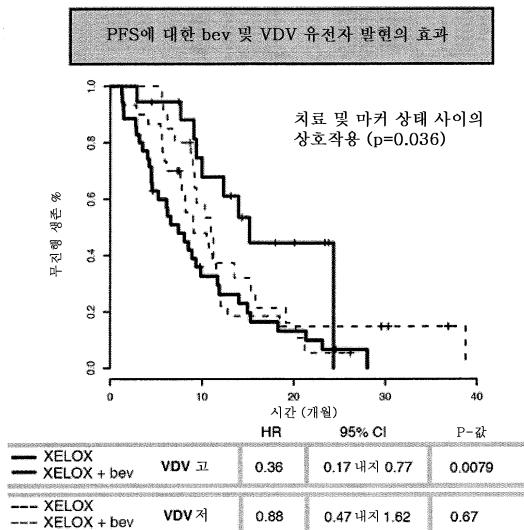


## 도면8c

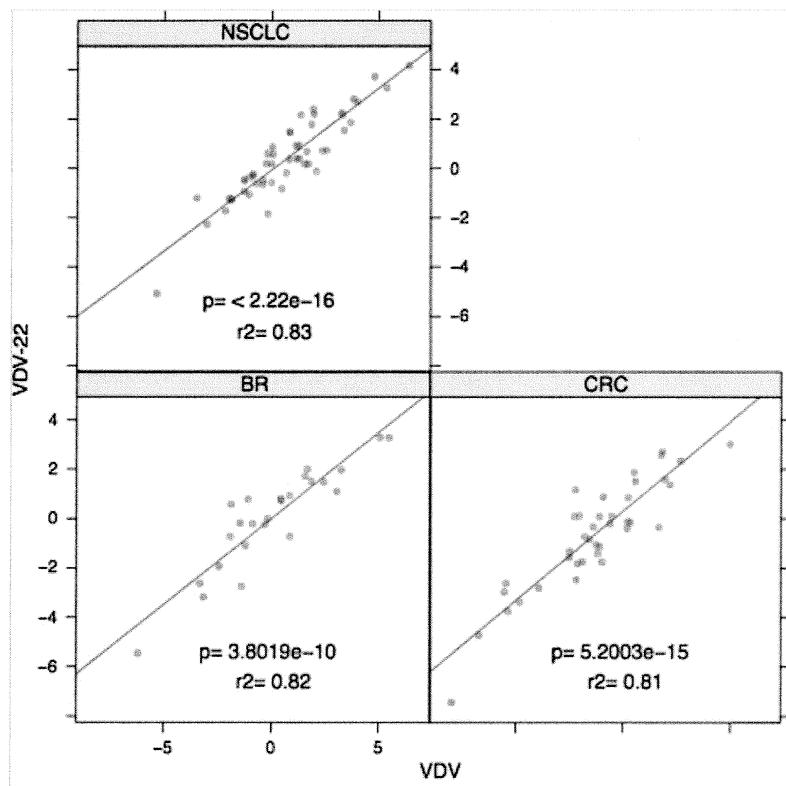


스피어만 상관 계수

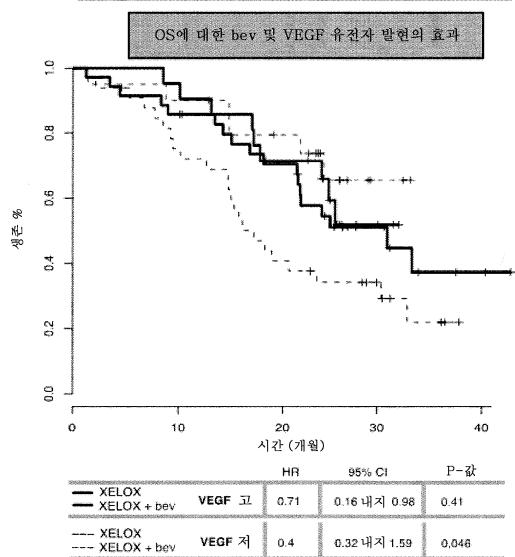
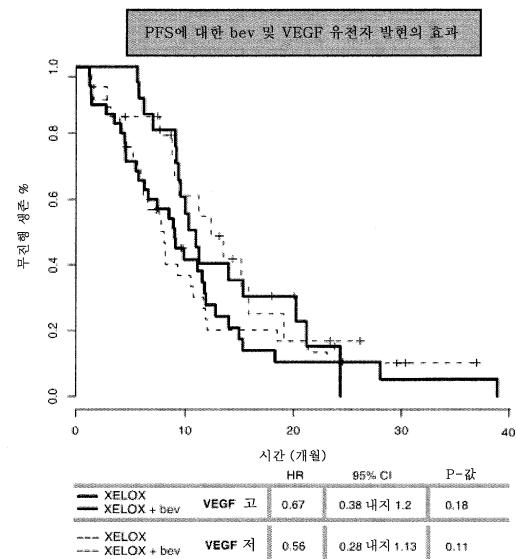
## 도면8d



## 도면9a



## 도면9b



## 도면9c

