



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0101968
(43) 공개일자 2018년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2872 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0028590
(22) 출원일자 2017년03월06일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
파로스젠 주식회사
서울특별시 강남구 강남대로 636 (신사동, 두원빌딩6층)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
변영로
서울특별시 도봉구 마들로 859-19, 116동 1305호
(도봉동, 도봉한신아파트)
김인산
대구광역시 수성구 동대구로 59, B1005 (두산동, 대우트림프월드수성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다래

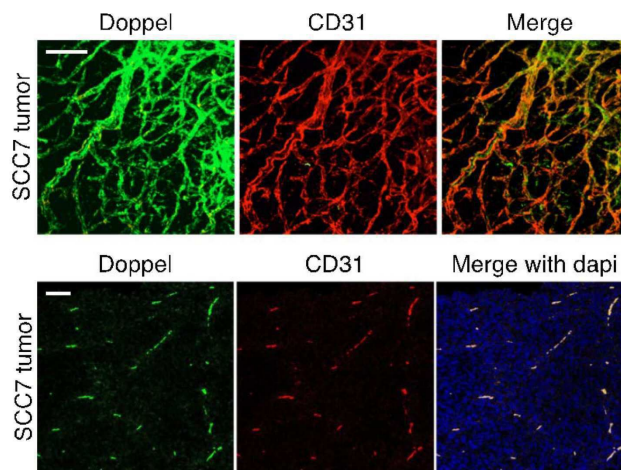
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 도펠-타겟팅 분자를 이용한 병리학적 신생혈관 생성을 억제하는 방법

(57) 요약

본 명세서에 기재된 발명은 병리학적 신생혈관 생성을 억제하고, 종양, 암, 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 결핵(tuberculosis), 천식(asthma), 폐동맥고혈압(pulmonary arterial hypertension, PAH), 신생물(neoplasms) 및 신생물-관련 질환(neoplasm-related conditions)과 같은 병리학적 신생혈관 생성과 관련성이 있는 질환을 치료하는데 유용하거나, 환자내에서의 도펠 발현을 탐지하는데 유용한 도펠-타겟팅 분자에 대한 것이다. 관련된 조성물 및 방법은 모두 본 명세서에 기재되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

Y10S 514/826 (2013.01)

Y10S 514/924 (2013.01)

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

타슬림 아흐메드알-힐랄

서울특별시 관악구 신림로31길 11, 301호 (신림동)

김상윤

서울특별시 송파구 올림픽로 212, B-2701 (잠실동, 갤러리아팰리스)

장예지

서울특별시 강남구 삼성로61길 45, 101호 (대치동)

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 도펠에 결합하는 항체 또는 이의 도펠 결합 단편으로서, 여기서

(a) 중쇄 가변 영역은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하거나;

(b) 중쇄 가변 영역은 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하거나;

(c) 중쇄 가변 영역은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하거나;

(d) 중쇄 가변 영역은 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하거나;

(e) 중쇄 가변 영역은 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하거나; 또는

(f) 중쇄 가변 영역은 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하는 것인, 도펠에 결합하는 항체 또는 이의 도펠 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 서열번호 11에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 서열번호 12에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 글리코실화된 도펠보다 더 큰 친화성으로 비글리코실화된 도펠에 결합하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 도펠의 이량체 형태에 결합하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60에서 선택되는 아미노산 서열 또는 이

와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54에서 선택되는 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 단일클론 항체인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 8

병적 혈관생성의 억제를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는 방법으로서, 피험체에게 제1항에 따른 항도펠 항체 또는 이의 도펠 결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 유효량은 도펠과 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및 PDGFR에서 선택된 티로신 키나제 수용체의 상호작용을 방해하는 데 효과적인 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 유효량은 혈관신생을 억제하는 데 효과적인 것인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 항도펠 항체 또는 이의 도펠 결합 단편은 피하 주사, 정맥내 주사, 안구내 주사, 피내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 또는 기관내 투여에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 피험체는 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 폐동맥 고혈압(PAH), 신생물 또는 신생물-관련 병태에서 선택되는 질환 또는 병태를 앓거나 또는 발병될 위험성이 있고, 유효량은 각각 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 폐동맥 고혈압(PAH), 신생물 또는 신생물-관련 병태와 연관된 병적 혈관구조를 감소시키는 데 효과적인 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 신생물 또는 신생물-관련 병태는 유방 암종, 폐 암종, 위 암종, 식도 암종, 직결장 암종, 간 암종, 난소 암종, 남성배세포종, 자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 자궁내막 과형성증, 자궁내막증, 섬유육종, 융모막암종, 두경부암, 비인두 암종, 후두 암종, 간아세포종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장 암종, 망막아세포종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 핍지교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 빌름 종양, 신장 세포 암종, 전립선 암종, 모반증 연관 이상 혈관 증식증, 뇌종양 연관 부종, 및 메이그스 증후군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제8항에 있어서, 피험체는 인간인 방법.

청구항 15

제1항에 따른 항도펠 항체 또는 이의 도펠 결합 단편, 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 16

서열번호 11의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하고, 도펠-티로신 키나제 수용체 신호전달을 억제하는 항도펠 항체 또는 이의 도펠 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 이의 결합 단편은 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 13 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 14 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 15, 18, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항도펠 항체 또는 이의 도펠 결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 31, 34, 37, 또는 40의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 32, 35, 38, 또는 41의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 33, 36, 39, 또는 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 18

제16항에 있어서, 경쇄 가변 서열은 서열번호 49, 50, 51, 또는 52에서 선택되는 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고; 중쇄 가변 서열은 서열번호 55, 56, 57, 또는 58에서 선택되는 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 19

병적 혈관생성의 억제를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는 방법으로서, 피험체에게 제16항에 따른 항도펩 항체 또는 이의 도펩 결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

서열번호 12 또는 서열번호 61의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하고, 도펩-티로신 키나제 수용체 신호전달을 억제하는 항도펩 항체 또는 이의 도펩 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 이의 결합 단편은 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항도펩 항체 또는 이의 도펩 결합 단편.

청구항 21

제20항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 22

제20항에 있어서, 경쇄 가변 서열은 서열번호 53의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하고; 중쇄 가변 서열은 서열번호 59의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 23

병적 혈관생성의 억제를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는 방법으로서, 피험체에게 제20항에 따른 항도펩 항체 또는 이의 도펩 결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 명세서에 기재된 발명은 병적 혈관생성을 억제하고, 종양, 암, 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 결핵(tuberculosis), 천식(asthma), 폐동맥고혈압(pulmonary arterial hypertension, PAH), 신생물(neoplasms) 및 신생물-관련 질환(neoplasm-related conditions)과 같은 병적 혈관생성과 관련성이 있는 질환을 치료하는데 유용하거나, 환자내에서의 도펩 발현을 탐지하는데 유용한 도펩-타겟팅 분자에 대한 것이다. 관련 조성물 및 방법도 또한 기술한다.

배경 기술

[0002]

암은 유전형 및 표현형이 대단히 상이한 다양한 세트의 질환이다. 그림에도 불구하고, 혈관생성(새로운 혈관의 형성)은 암 유형 전반에서 암 세포의 증식에 있어 중요한 역할을 한다. 실제로, 신생 혈관 성장에 대한 고품 종양의 독립성은 종양 혈관을 암 표적의 매력적인 표적으로 만들었다. 따라서, 혈관생성을 방해하는 암 요법이 개발되고 있다. 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 대항하는 인간화 단일클론 항체인, 베바시주맙은 상이한 활성 화학요법제 계획의 효과를 강력하게 하는데 사용되어 왔다.

[0003] 지금까지, 혈관생성을 억제하는 다양한 작용제(예를 들어, 엔도스타틴, 안지오테닌, 및 트롬보스폰딘)이 기술되었다. 그러나, 혈관생성은 정상적인 생리적 프로세스, 예컨대 성장 및 발생 또는 상처 치유에 중요하다. 병적 혈관생성과 정상 혈관생성을 구별하지 않는, 현행 항-혈관생성 요법제, 예컨대 항-VEGF 단일클론 항체 및 티로신 키나제 수용체(TKR, 수용 티로신 키나제(TKR)라고도 알려짐) 억제제는 세포 신호전달의 전신 기능 저하를 유도하여, 병적 혈관생성뿐만 아니라 유익한 혈관생성도 억제한다. 예를 들어, 갑상선 기능, 골수 기능, 면역조정, 신장 기능, 혈관 항상성, 응집 개시, 및 생리적 혈관생성에서 VEGF의 방대한 생물학적 역할을 고려하면, VEGF의 전신 억제는 이들 필수 기능 전부를 방해할 수 있다.

[0004] 따라서, 정상 혈관생성과 병적 혈관생성을 구별하는 항혈관생성 요법이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본원은 병적 혈관생성의 억제를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는데 사용하거나, 또는 종양 치료를 필요로 하는 피험체에서 종양을 치료하는데 사용하거나, 종양발생의 억제를 필요로 하는 피험체에서 종양 발생을 억제하거나, 종양의 혈관구조 감소를 필요로 하는 피험체에서 종양의 혈관구조를 감소시키거나, 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 및 폐동맥 고혈압(PAH)에서 선택된 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 피험체에서 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 및 폐동맥 고혈압에서 선택된 질환 또는 병태를 치료하거나, 또는 신생물 또는 신생물-관련 병태, 예컨대 유방 암종, 폐 암종, 위 암종, 식도 암종, 직결장 암종, 간 암종, 난소 암종, 남성배세포종, 자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 자궁내막 과형성증, 자궁내막증, 섬유육종, 육포막암종, 두경부암, 비인두 암종, 후두 암종, 간아세포종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장 암종, 망막아세포종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 췌지교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 빌름 종양, 신장 세포 암종, 전립선 암종, 모반증 연관 이상 혈관 증식증, 뇌종양 연관 부종, 및/또는 메이그스 증후군을 치료하거나, 또는 피험체에서 도켈 발현을 검출하는데 사용하기 위한 도켈-표적화 분자를 기술한다.

과제의 해결 수단

[0006] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 도켈에 결합하여 도켈-티로신 키나제 수용체 신호전달을 억제하고, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및 PDGFR에서 선택된 티로신 키나제 수용체와 도켈 간 상호작용을 억제 또는 방해한다.

[0007] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 항도켈 항체, 항도켈 항체의 도켈-결합 단편, 및 헤파린-함유 접합체에서 선택된다.

[0008] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는

[0009] (i) 하이브리도마 세포주 클론 4D6에 의해 생산된 항체 또는 이의 도켈-결합 단편 또는 유도체;

[0010] (ii) 하이브리도마 세포주 클론 5C7에 의해 생산된 항체 또는 이의 도켈-결합 단편 또는 유도체

[0011] (iii) 하이브리도마 세포주 클론 7D9에 의해 생산된 항체 또는 이의 도켈-결합 단편 또는 유도체;

[0012] (iv) 하이브리도마 세포주 클론 1B12에 의해 생산된 또는 이의 도켈-결합 단편 또는 유도체;

[0013] (v) 하이브리도마 세포주 클론 1C8에 의해 생산된 항체 또는 이의 도켈-결합 단편 또는 유도체; 및

[0014] (vi) 하이브리도마 세포주 클론 6F11에 의해 생산된 항체 또는 이의 도켈-결합 단편 또는 유도체

[0015] 에서 선택된 항도켈 항체이다.

[0016] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 담즙산 모이어티 또는 스테롤 모이어티에 접합된 헤파린 모이어티를 포함하는 헤파린-함유 접합체이다. 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 LMWH-올리도카 접합체이다. 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 LH비스D4, LH모노D1, LH모노D2, LH모노D4, LH비스D1, LH비스D2, LH트리D1, LH트리D3, 및 LH테트라D1에서 선택된 LMWH-올리도카 접합체이다.

[0017] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 정맥내 주사, 경구 투여, 피하 주사, 안구내 주사, 피내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 기관내 투여, 흡입, 비내 투여, 설하 투여, 구강 투여, 직장 투여, 질 투여, 또는 국소 투

여를 위해 제제화된다.

- [0018] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 정맥내 투여를 위한 조성물로 제제화된다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 경구 투여를 위한 조성물로 제제화된다. 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 경구 투여 및 장 또는 회장에서 선택적 흡수를 위한 조성물로 제제화된다.
- [0020] 본원은 또한 이를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는 방법, 이를 필요로 하는 피험체에서 종양을 치료하는 방법, 이를 필요로 하는 피험체에서 종양발생을 억제하는 방법, 이를 필요로 하는 피험체에서 종양의 혈관구조를 감소시키는 방법, 이를 필요로 하는 피험체에서 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 및 폐동맥 고혈압(PAH)에서 선택된 질환 또는 병태를 치료하는 방법, 이를 필요로 하는 피험체에서 신생물 또는 신생물-관련 병태, 예컨대 유방 암종, 폐 암종, 위 암종, 식도 암종, 직결장 암종, 간 암종, 난소 암종, 남성배세포종, 자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 자궁내막 과형성증, 자궁내막증, 섬유육종, 육포막암종, 두경부암, 비인두 암종, 후두 암종, 간아세포종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장 암종, 망막아세포종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 췌지교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 빌름 종양, 신장 세포 암종, 전립선 암종, 모반증 연관 이상 혈관 증식증, 뇌종양 연관 부종, 및/또는 메이그스 증후군을 치료하는 방법, 및/또는 피험체에서 도펠 발현을 검출하는 방법을 기술하며, 여기서 상기 방법은 본원에 기술된 바와 같은 도펠-표적화 분자의 유효량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 경구 투여, 정맥내 주사, 피하 주사, 안구내 주사, 피내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 기관내 투여, 흡입, 비내 투여, 설하 투여, 구강 투여, 직장 투여, 질 투여, 또는 국소 투여에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 도펠-표적화 분자를 경구로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 정맥내 주사에 의해 도펠-표적화 분자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 항-도펠 항체 또는 이의 도펠-결합 단편은 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:12, 또는 SEQ ID NO: 61에 특이적으로 결합한다.
- [0023] 임의의 실시형태에 따라서, 피험체는 인간일 수 있다. 임의의 실시형태에 따라서, 피험체는 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 및 폐동맥 고혈압(PAH), 또는 신생물 또는 신생물-관련 병태, 예컨대 유방 암종, 폐 암종, 위 암종, 식도 암종, 직결장 암종, 간 암종, 난소 암종, 남성배세포종, 자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 자궁내막 과형성증, 자궁내막증, 섬유육종, 육포막암종, 두경부암, 비인두 암종, 후두 암종, 간아세포종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장 암종, 망막아세포종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 췌지교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 빌름 종양, 신장 세포 암종, 전립선 암종, 모반증 연관 이상 혈관 증식증, 뇌종양 연관 부종, 및/또는 메이그스 증후군에서 선택된 질환 또는 병태, 종양을 앓거나 또는 발병 위험성이 있을 수 있다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 도펠과 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및/또는 PDGFR의 상호작용을 방해하는데 효과적인 유효량으로 사용되거나 또는 투여된다. 일부 실시형태에서, 유효량은 혈관생성을 억제하는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 종양발생을 억제하는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 종양의 혈관구조를 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 각각 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 또는 폐동맥 고혈압(PAH)과 연관된 병적 혈관구조를 감소시키는데 효과적이다.
- [0025] 피험체에서 도펠 발현을 검출하기 위한 방법 및 용도와 관련하여, 도펠-표적화 분자는 피험체에게 또는 피험체로부터 얻는 생리학적 샘플에 투여될 수 있다. 피험체는 임의의 상기에 기술한 바와 같으며, 상기에 기술한 바와 같이, 예컨대 종양이 발생될 위험성이 있고/있거나, 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 및 폐동맥 고혈압(PAH)에서 선택된 질환 또는 병태가 발병될 위험성이 있고/있거나 신생물 또는 신생물-관련 병태가 발병될 위험성이 있을 수 있다.
- [0026] 또한, 하기 (i) 내지 (vi)를 포함하는, 본원에 기술된 바와 같은 도펠-결합 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다:
- [0027] (i) 수탁 번호 KCLRE-BP-00384 하에 한국세포주연구재단에 mPrnd# 4D6로서 2016년 11월 23일자로 기탁된 하이브리도마 세포주 클론 4D6;
- [0028] (ii) 수탁 번호 KCLRE-BP-00385 하에 한국세포주연구재단에 mPrnd# 5C7로서 2016년 11월 23일자로 기탁된 하이

브리도마 세포주 클론 5C7;

[0029] (iii) 수탁 번호 KCLRE-BP-00387 하에 한국세포주연구재단에 mPrnd# 7D9로서 2016년 11월 23일자로 기탁된 하 이브리도마 세포주 클론 7D9;

[0030] (iv) 수탁 번호 KCLRE-BP-00383 하에 한국세포주연구재단에 mPrnd# 1B12로서 2016년 11월 23일자로 기탁된 하 이브리도마 세포주 클론 1B12;

[0031] (v) 수탁 번호 KCLRE-BP-00382 하에 한국세포주연구재단에 mPrnd# 1C8로서 2016년 11월 23일자로 기탁된 하 이브리도마 세포주 클론 1C8; 및

[0032] (vi) 수탁 번호 KCLRE-BP-00386 하에 한국세포주연구재단에 mPrnd# 6F11로서 2016년 11월 23일자로 기탁된 하 이브리도마 세포주 클론 6F11.

[0033] 또한, 이들 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체, 및 그들과 함께 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본원은 병적 혈관생성을 억제하고, 병적 혈관생성과 연관된 질환 및 병태, 예컨대 종양, 암, 아테롬성 동맥경화 증, 결핵, 천식, 폐동맥 고혈압(PAH), 신생물 및 신생물-관련 병태를 치료하고, 피험체에서 도펠 발현을 검출하 는데 유용한 도펠-표적화 분자를 기술한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 온조직 고정(위) 및 면역형광발광(아래) 염색에 의한 마우스 이종이식 종양 조직의 혈관에서 도펠의 발 현을 보여준다.

도 2는 마우스 정상 내피 세포(EC) 및 종양 EC에서 도펠의 상대적 mRNA 발현을 보여준다(평균 $\pm$ s.e.m.).

도 3은 10% 태아 소 혈청, 또는 마우스 VEGF로 자극시 항도펠 항체에 의한 TEC 출아의 용량 의존적 억제를 도시 한다. 결과는 평균 $\pm$ s.e.m.이고, 스케일 바는 50 μ m를 나타낸다.

도 4는 도펠에 대한 결합 친화성을 강화시키기 위해 합성된 LMWH-기반 접합체의 개략적 구조를 도시한다. 구조 들은 모노DOCA, 비스DOCA, 트리DOCA, 및 테트라DOCA로 지정된, 테옥시콜산의 상이한 올리고머(올리고DOCA)를 도 시한다. 사카라이드 유닛의 -COOH 기와 접합된 LMWH-올리고DOCA 접합체의 구조, 접합 비율은 LMWH의 분자 당 1 내지 4개 분자로 다양하다.

도 5는 SPR을 사용한 LMWH-올리고DOCA 접합체의 시험관 내 도펠 결합을 도시한다. 이량체 테옥시콜산의 4개 분 자가 LMWH의 한 분자에 접합된, LH비스D4는 스크리닝된 모든 접합체 중에서 도펠과의 결합 후 최고 반응 유닛을 나타내었다.

도 6은 *Prnp*-LH비스D4 및 *Prnd*-LH비스D4 간 SPR 분석을 나타낸다. 해리 속도 상수는 반응 곡선으로부터 계산한 다.

도 7은 TEC 및 TEC^{-/-dp1}에 결합한 LH비스D4를 보여준다.

도 8은 도펠의 구형 도메인 및 LH비스D4 단편간 분자 역학적 모의실험을 보여준다. 컴퓨터 모의실험을 사용한 단편-기반 구조 연구는 도펠의 구형 도메인이 LH비스D4의 거대 소수성 측쇄를 수용하기 위한 소수성 그루브를 함유하므로, 도펠의 구형 도메인이 LH비스D4의 결합에서 핵심적인 역할을 한다는 것을 보여주었다.

도 9는 래트에 경구 전달 후 LMWH 및 LH비스D4의 혈장 농도를 보여준다. 결과는 평균 $\pm$ s.e.m.이다. LH비스D4 는 경구적으로 흡수된다.

도 10은 그의 경구 전달 후 생체 내 및 생체 외에서, TEC 및 TEC^{-/-dp1} 플러그에서의 Cy5.5-표지된 LH비스D4의 분 포를 보여준다.

도 11은 TEC 및 TEC^{-/-dp1} 플러그에서 경구 투여된 LH비스D4 및 정맥내 주사된 LMWH의 총 형광발광 계측치이다(평 균 $\pm$ s.e.m.).

도 12는 2.5, 5, 및 10 mg/kg 용량으로 1일 1회 또는 5 및 10 mg/kg 용량으로 1일 2회 MDA-MB-231 종양에 경구

투여된 LH비SD4의 종양 성장 억제 실험을 도시한다. 결과는 평균 $\pm$ s.e.m.이다. 각각의 군 및 대조군 사이에서 *** $p < 0.001$. 10 mg/kg 1일 1회 및 10 mg/kg 1일 2회군 사이에서 $p < 0.01$.

도 13은 실험된 LH비SD4의 상이한 용량으로 처리시 MDA-MB-231 종양 무게의 차이를 도시한다(평균 $\pm$ s.e.m., * $p < 0.05$).

도 14는 4일간 1회 1 mg/kg의 용량으로 정맥내 주사된 항도넬 항체의 SCC7 종양에서 종양 성장 억제 실험을 도시한다. 결과는 평균 $\pm$ s.e.m.이다.

도 15A-15D는 마우스에서 도넬의 부재는 야생형(WT), 및 도넬 이형접합체(Dp1^{+/-}), 및 동형접합체(Dp1^{-/-}) 넉아웃 C57BL/6 마우스(n = 3-4)에서 종양 성장 및 흑색종(B16f10)의 혈관생성을 지연시킴을 보여준다. 종양 부피는 접종 후 21일 동안 모니터링하였다(도 15A). 실험 종료시 단리된 종양의 사진을 도시한다(도 15B). 평균 종양 무게를 또한 평가하였다(도 15C). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.이고; WT에 대해 *** $P < 0.001$ 및 Dp1^{+/-} 및 Dp1^{-/-} 사이에 ** $P < 0.01$. 도 15D는 WT, Dp1^{+/-}, 및 Dp1^{-/-} 마우스에서 단리된 B16f10 종양 절개부에서 도넬(녹색), CD31(적색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 보여준다.

도 16A-16D는 야생형(WT), 도넬 이형접합체(Dp1^{+/-}), 및 도넬 동형접합체(Dp1^{-/-}) 넉아웃 C57BL/6 마우스(n = 3)에서 흉선종(EL4)의 부피를 도시한다. 종양 부피는 접종 후 11일 동안 모니터링하였다(도 16A). 실험 종료시 단리된 종양의 사진(도 16B) 및 평균 종양 무게(도 16C)를 또한 도시하였다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.으로 나타냈고, WT에 대해 *** $P < 0.001$ 이고, Dp1^{+/-} 및 Dp1^{-/-} 사이는 ** $P < 0.01$ 이다. 도 16D는 WT, Dp1^{+/-}, 및 Dp1^{-/-} 마우스에서 단리된 EL4 종양 절개부에서 도넬(녹색), CD31(적색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다.

도 17A-17D는 야생형(WT) 및 도넬 이형접합체(Dp1^{+/-}) 넉아웃 C57BL/6 마우스(n = 3)에서 결장암(CT26)의 부피를 도시한다. 종양 부피는 접종 후 21일 동안 모니터링하였다(도 17A). 실험 종료시 단리된 종양의 사진(도 17B) 및 평균 종양 무게(도 17C)를 도시한다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.로 나타낸다. 도 17D는 WT, 및 Dp1^{+/-} 마우스에서 단리된 EL4 종양 절개부에서 도넬(녹색), CD31(적색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다.

도 18A-18D는 야생형(WT), 도넬 이형접합체(Dp1^{+/-}) 및 동형접합체(Dp1^{-/-}) 넉아웃 C57BL/6 마우스에서 상처-치유 혈관의 CD31 면역형광발광 영상(도 18A) 및 상처-치유 속도(도 18B)를 보여준다(n = 3, 평균 $\pm$ s.e.m.). 상처는 종양-보유 마우스에 생성시켰다. Matrigel[®]-피브린 매트릭스를 WT, Dp1^{+/-}, 및 Dp1^{-/-} 넉아웃 C57BL/6 마우스에 VEGF 존재 하에서 피하 이식하였다(n = 3). 도 18C는 이식 후 1주일에 Matrigel[®]-피브린 플러그에서 헤모글로빈 수준을 보여주며 도 18D는 H&E 염색을 보여준다.

도 19A-19G는 항-도넬 mAb가 종양 성장 및 혈관생성을 억제시키는 것을 보여준다. 도 19A 및 도 19B는 정맥내 IgG(10 mg/kg, 주 1회), 5C7 항도넬 mAb(5 및 10 mg/kg, 주 1회), 및 4D6 항도넬 mAb(5 및 10 mg/kg 주 1회 및 10 mg/kg 주 2회)를 처리한 마우스(n = 5)의 결장암(CT26)의 부피 및 무게 변화를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.이고, 대조군 대비 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 이다. 10 mg/kg 주 1회 및 10 mg/kg 주 2회 군 간에 *** $p < 0.001$. 도 19C 및 도 19D는 염수(대조군) 및 정맥내 4D6 항도넬 mAb(5 및 10 mg/kg 주 1회 및 10 mg/kg 주 2회)를 처리한 인간 결장암(HCT116)의 부피 및 무게 변화를 도시한다(n = 5). 도 19E는 염수 및 시험 항체를 처리한 HCT116 종양-보유 마우스에서 단리된 종양 절개부의 도넬(적색), CD31(녹색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다. 도 19F는 CD31에 대한 면역조직화학 염색을 도시하고 도 19G는 염수 및 시험 항체를 처리한 HCT116 종양-보유 마우스에서 단리한 종양 절개부의 평균 혈관 밀도의 양을 도시한다.

도 20A-20D는 항도넬 mAb의 발생을 도시한다. 도 20A는 마우스 VEGF의 존재 또는 부재 하에서 도넬-차단 mAb, 및 도넬-차단 mAb의 상이한 클론(7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 6F11)의 세포 상등액과 항온반응 후 TEC 출아 억제제를 보여준다. 도 20B는 각각의 TEC 구상체로부터의 총 출아수를 보여준다(n = 50, 평균 $\pm$ s.e.m.). 도 20C는 VEGF(50 ng/mL)로 자극시, 상이한 농도의 정제된 항-도넬 mAb 클론(5C7 및 4D6)으로 처리된 TEC에서 인산화-VEGFR2, 전체 VEGFR2, 및 액틴의 면역블롯을 도시한다. 도 20D는 정제된 4D6 항-도넬 mAb의 상이한 농도와 항온반응 후 TEC 출아의 억제제를 보여준다.

도 21A-21D는 대조군 및 시험 항체로 처리된 CT26 종양-보유 마우스에 관한 것이다. 도 21A는 실험 종료시 단리

된 CT26 종양의 사진을 도시한다. 도 21B는 대조군 및 시험 항체로 처리된 CT26 종양-보유 마우스에서 단리된 종양 절개부에서 도펠(적색), CD31(녹색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다. 도 21C는 CD31에 대한 면역조직화학 염색을 도시하고 도 21D는 염수 및 시험 항체로 처리된 CT26 종양-보유 마우스에서 단리된 종양 절개부에서 평균 혈관 밀도의 양을 도시한다.

도 22A-22I는 도펠이 세포 표면 상에서 VEGFR2를 유지시키고 VEGF-신호전달을 촉진함을 보여준다. 도 22A는 염수 및 4D6 항도펠 mAb(10 mg/kg 주 2회)로 처리된 HCT116 종양 절개부 및 WT, Dpl^{+/+}, 및 Dpl^{-/-} 마우스 유래의 B16f10 종양 절개부에서 VEGFR2(녹색), CD31(적색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다. 도 22B는 B16f10 종양-보유 WT, Dpl^{+/+}, 및 Dpl^{-/-} 마우스 유래 및 염수 및 4D6 항도펠 mAb(10 mg/kg 주 2회)를 처리한 HCT116 종양-보유 마우스 유래의 전체 폐 및 종양에 존재하는 총 VEGFR2, 도펠, 및 액틴의 면역블롯을 도시한다. 도 22C-도 22E는 편평(TEC-SCC7) 및 결장(TEC-CT26) 암에서 단리된 TEC에서 스크램블 siRNA 및 도펠 siRNA로 처리한 후 VEGFR2 및 도펠의 단백질 및 mRNA 수준의 블롯을 도시한다. 도 22F는 미자극 및 VEGF-자극(5분; 100 ng/mL) HUVEC 및 Hu.dpl에서 표면 및 전체 VEGFR2 및 도펠 수준을 나타내는 블롯을 보여준다. 비투과성 HUVEC 및 Hu.dpl에서 VEGF(25 ng/mL)와 항온반응 후 VEGFR2의 속도를 도 22G에 도시하였으며, 여기서는 각각 HUVEC 및 Hu.dpl의 경우에 시간에 따른 세포막 상의 VEGFR2의 양을 보여준다. 도 22H는 상이한 농도의 VEGF로 처리시, HUVEC 및 Hu.dpl에서 인산화-VEGFR2, 전체 VEGFR2, 전체 도펠, 및 GAPDH의 면역블롯을 보여준다. 도 22I는 제안된 작용 기전을 예시하며, 여기서 건강한 내피 세포는 VEGFR2를 발현하지만, 도펠은 발현하지 않으며, 종양 내피 세포는 VEGFR에 대한 지지 기둥으로서 작용하는, 도펠과 함께 VEGFR2가 발현되고, 제안된 작용 기전에서, 도펠 단일클론 항체(도펠 mAb)는 도펠을 표적화하여, 도펠-VEGFR2 복합체를 분해시키고, VEGF 신호전달을 억제하며, 종양 혈관생성을 중지시키게 된다.

도 23A-23B는 WT, Dpl^{+/+}, 및 Dpl^{-/-} 마우스에서 단리된 EL4 종양 절개부(도 23A) 및 WT 및 Dpl^{+/+} 마우스에서 단리된 CT26 종양 절개부(도 23B)에서 VEGFR2(녹색), CD31(적색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다.

도 24A-24B는 염수 및 시험 화합물을 처리한 마우스에서 단리된 마우스 CT26 결장암(도 24A) 및 인간 HCT116 결장 종양 절개부(도 24B)에서 VEGFR2(녹색), CD31(적색), 및 DAPI(청색)의 면역형광발광 영상을 도시한다.

도 25A는 도펠 형질감염된 HUVEC(Hu.dpl)에서 도펠 siRNA에 의한 도펠 발현의 억제를 보여준다. 도 25B 및 도 25C는 스크램블 및 도펠 esiRNA 또는 siRNA로 Hu.dpl을 처리한 후 도펠(도 25B) 및 VEGFR2(도 25C)에서 mRNA 수준을 보여준다.

도 26A-26C는 비투과성 HUVEC 및 Hu.dpl(도 26A)에서 VEGF(25 ng/mL)와 항온반응 후 VEGFR2의 유세포측정 분석; 미자극 및 VEGF-자극(5분; 100 ng/mL) HUVEC 및 Hu.dpl에서 막 및 세포질 VEGFR2 및 도펠 수준을 나타내는 블롯(도 26B); 및 미자극 및 상이한 농도의 VEGF-자극(5분) HUVEC 및 Hu.dpl에서 총 VEGFR2 및 도펠 수준을 나타내는 블롯(도 26C)을 보여준다.

도 27A-27G는 제조합 도펠이 혈관생성을 촉진함을 보여준다. 도 27A는 VEGF 존재 또는 부재 하에서 상이한 농도의 제조합 도펠(rDPI)과 항온반응 후 HUVEC 구상체에서의 출아 유도를 도시하고, 도 27B는 각각의 HUVEC 구상체에서의 총 출아수를 도시한다(n = 50, 평균 ± s.e.m.). 도펠 형질감염된 HUVEC(Hu.dpl) 구상체가 VEGF의 존재 하에서 비교에 사용되었다. 매트릭스-피브린 매트릭스에 분산된, HUVEC 및 Hu.dpl 구상체는 VEGF 존재 또는 부재 하에서 10 μg의 rDPI로 암컷 SCID 마우스에 피하 이식하였다. 이식 후 1주에 염색하였다. 도 27C는 항-인간 CD34(적색)로 염색하고 공초점 현미경으로 염색된, HUVEC 및 Hu.dpl 구상체에서 형성된 혈관 네트워크의 3D 구조를 도시하며, 도 27D는 HUVEC 및 Hu.dpl 구상체 플러그에서 헤모글로빈 수준을 도시한다. 도 27E-도 27G는 정맥내 rDPI(1 mg/kg, 암세포 접종 4일 후 2일 당 1회)로 처리하거나 또는 도펠 이형접합체(Dpl^{+/+}) 녹아웃 C57BL/6 마우스(n = 5)에서 1 및 10 μg의 rDPI를 접종한 흉선종 암(EL4)의 부피 및 무게 변화를 도시한다. 종양 부피는 접종 후 10일 동안 모니터링하였다(도 27E). 외식된 종양의 영상을 찍고(도 27F), 종양 무게를 측정하였다(도 27G). 데이터는 평균 ± s.e.m.이다.

도 28A-28E는 도펠 cDNA로 형질감염 후 1일에 인간 피부 미세혈관 내피 세포(HDMEC)에서 도펠의 발현을 도시한다(도 28A). 도 28B는 VEGF로 처리시, 일시적으로 도펠-형질감염된 HDMEC에서 인산화-VEGFR2, 전체 VEGFR2, 전체 도펠, 및 GAPDH의 면역블롯을 도시한다. 도 28C는 세포 증식을 도시하고 도 28D 및 도 28E는 일시적으로 도펠-형질감염된 HDMEC의 출아를 도시한다.

도 29A-29B는 도펠이 VEGFR2와 상호작용함을 보여준다. 도 29A는 재조합 도펠(rDpI) 및 도펠 cDNA(DpI cDNA) 형질감염된 세포에서 VEGFR2 및 도펠의 면역침전(IP)에 의한 블롯을 보여준다. 도 29B는 rDpI(1 μ g/mL)의 존재 또는 부재 하에서 상이한 농도의 VEGF로 처리시, HUVEC에서 인산화-VEGFR2, 전체 VEGFR2, 전체 도펠, 및 GAPDH의 면역블롯을 보여준다.

도 30은 종양 절개부에서 주사된 rDpI-Alexa 488과 혈관(도 30A) 및 주사된 rDpI-Alexa 488 및 VEGFR2(도 30B) 사이의 공동국채를 보여준다.

도 31A-C는 도펠에 대한 주석된 아미노산 서열을 보여준다. 도 31A는 N- 말단에 시그널 펩티드 및 C- 말단에 폴리-His 테일을 포함하는 아미노산 서열을 보여준다(서열 번호 9). 도 31B는 C- 말단에 폴리-His 테일을 갖는 아미노산 서열을 보여준다(서열 번호 10). 도 31C는 도 31A에서와 같이 시그널 펩티드 및 폴리-His 테일로 나타낸 도펠의 도메인 맵을 보여준다.

도 32는 4D6이 에피토프 YWQFPD (서열 번호 11)와 결합한다는 것을 나타내는, 마우스 항체 4D6에 대한 에피토프 맵핑 실험의 결과를 보여준다.(마우스와 인간의 도펠에 동일한 서열이 나타난다.)

도 33은 5C7이 도펠의 에피토프 FPDGIY (서열 번호 12)와 결합한다는 것을 나타내는, 마우스 항체 5C7에 대한 에피토프 맵핑 실험의 결과를 보여준다.(인간 도펠에서의 상응하는 서열은 FPDGIH(서열 번호 61)이다.)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본원에 기술된 용도, 조성물, 및 방법은 프라이온-유사 단백질인, 도펠이 종양 내피 세포(TEC)에 특이적이며, 다시 말해서 종양 내피 세포(TEC) 표면 마커라는 발견에 기인한다. 본 발명자들은 TEC 상에서 도펠의 높은 발현이 높은 혈관 형성과 상관있음을 발견하였다. 이론에 한정되기를 원치 않지만, 도펠은 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2와의 상호작용에 의해 혈관생성에서 역할을 하는 것으로 여겨진다. 이러한 점에서, 본 발명자들은 도펠이 티로신 키나제 수용체와 공동국채하여 복합체를 형성하고, 도펠의 억제자 막 티로신 키나제 수용체를 고갈시킴을 확인하였다.
- [0037] 따라서, 일부 실시형태에 따라서, 이를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는데 사용하는 도펠-표적화 분자, 및 예컨대 도펠에 결합하여, 도펠의 활성을 억제하는 발견을 기반으로 하는 방법은 선택적으로 병적 도펠-티로신 키나제 수용체 신호전달을 억제하여, 천식, 결핵, 아테롬성 동맥경화증, 폐동맥 고혈압 (PAH), 및 신생물 및 신생물-관련 병태와 연관된 병적 혈관생성 및 종양 혈관생성을 포함하는, 병적 혈관생성의 선택적 억제를 제공할 수 있다.
- [0038] 따라서, 일부 실시형태에서, 이를 필요로 하는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는데 사용, 예컨대 도펠 활성을 억제하는 분자, 예컨대 도펠 발현을 방해(예를 들어, 도펠 안티센스 핵산) 또는 도펠과 티로신 키나제 수용체의 상호작용을 억제(예를 들어, 도펠에 결합하거나, 또는 도펠-티로신 키나제 수용체 신호전달 경로의 결합 부위를 차단)하는 분자를 투여하는 단계를 포함하는 병적 혈관 생성을 억제하기 위한 방법에서 사용하기 위한 도펠-표적화 분자를 제공한다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 도펠에 결합하여, 도펠-티로신 키나제 수용체 신호전달을 억제하고, 혈관생성을 억제하는 도펠-표적화 분자를 투여하여 병적 혈관생성을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 본원은 또한 도펠-표적화 분자(예를 들어, 도펠에 결합하는 분자) 및 그들을 포함하는 약학 조성물을 기술한다.
- [0040] 혈관을 따라 늘어선 내피 세포(EC)는 암 요법을 위한 유리한 표적이는데, 그들이 순환하는 약학제에 보다 접근가능할 수 있기 때문이다. 따라서, 종양 내피 세포 표면 마커 예컨대 도펠을 표적화하는 것은 암 세포를 표적화하는 것보다 더욱 예측가능하고 더욱 효과적인 암 요법의 접근법을 제공한다.
- [0041] 혈관생성-기반 종양 요법은 전통적인 암 요법(예컨대 방사선 및 화학요법)보다 몇몇 이론적인 장점을 갖는다. 예를 들어, (1) EC는 암 세포보다 유전자적으로 더 안정하고 유전자 돌연변이를 나타내지 않고, (2) 종양 내피의 표현형적 발현이 정상 내피 세포와는 상이하며, (3) EC는 암 클론의 일부가 아니기 때문에 화학요법에 대한 내성이 발생될 경향이 낮으며, (4) 혈액과 종양 세포 사이 경계에서 내피의 위치는 고도로 발현하거나 또는 상향 조절되는 표면 수용체 또는 단백질의 표적화를 매력적하게 만든다.
- [0042] 정의
- [0043] 본원에서 사용하는 기술 및 과학 용어는 달리 정의하지 않으면, 본 발명이 속하는 분야의 당업자 중 한명이 통상적으로 이해하는 의미를 갖는다. 당업자들에게 공지된 다양한 방법론을 참조한다. 참조한 그러한 공지 방법론

을 기재하는 출판물 및 다른 문헌들은 완전히 기재된 대로 그들 전체로 참조로 본원에 편입된다. 당업자들에게 알려진 임의의 적합한 재료 및/또는 방법은 본 발명을 수행하는데 이용할 수 있다. 그러나, 특정한 재료 및 방법을 기술한다. 이하의 설명 및 실시예에서 참조하는 재료, 시약 등은 달리 언급하지 않으면, 상업적 공급원으로부터 입수할 수 있다.

[0044] 이하의 용어들은 전반에서 하기에 정의된 바와 같이 사용한다.

[0045] 본원 및 첨부된 청구항에서 사용시, 단수형 예컨대 "한" 및 "하나" 및 "그" 및 성분들을 설명하는 문맥(특히 이하 청구항)에서의 유사한 언급은 본원에서 달리 명시하거나 또는 명확하게 문맥에서 반박하지 않으면, 단수형과 복수형 둘 모두를 포괄하는 것으로 해석한다. 본원에서 수치 범위의 열거는 본원에서 달리 명시하지 않으면, 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개 값을 개별적으로 언급하는 속기법으로 제공하고자 하며, 각각의 별개 값은 그것이 본원에 개별적으로 인용된 만큼 본 명세서에 편입된다. 본원에 기술된 모든 방법은 본원에서 달리 명시하지 않았거나 또는 문맥에서 명확하게 반박하지 않으면 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에서 임의의 모든 예, 또는 예시적인 언어("예를 들어" 또는 "예컨대")의 사용은 달리 언급하지 않으면 단지 실시형태를 더욱 잘 예시하려는 것이고 청구항의 범주를 한정하려는 것이 아니다. 본 명세서의 언어는 필수적으로 임의의 비청구 성분을 지시하는 것으로 해석되서는 안된다.

[0046] 본원에서 사용시, "약"은 당업자가 이해하며 그것이 사용되는 문맥에 따라 어느 정도 가변적이다. 그것이 사용된 문맥에서 당업자에게 명확하지 않은 용어의 사용이 존재하면, "약"은 특정 용어의 최대 10%를 더하거나 또는 빼는 것을 의미한다.

[0047] 본원에서 사용시 "피험체"는 인간, 고양이, 쥐, 개, 말, 원숭이, 또는 다른 종을 포함한, 임의의 포유동물을 포함한다, 항종양 또는 항암 또는 항혈관화 요법을 필요로 하는 임의의 동물을 의미한다. 일부 실시형태에서, 피험체는 인간이다. 예를 들어, 피험체는 종양 또는 암을 앓거나 또는 발병 위험성이 있을 수 있다.

[0048] 본원에서 사용시, 어구 "유효량"은 분자, 작용제, 또는 조성물이 투여되는 특별한 효과를 제공하는 양을 의미한다. 유효량은 그러한 양이 당업자에게 유효량으로 여겨지더라도, 소정 피험체의 표적 병태를 치료하는데 항상 효과적인 것은 아님을 강조한다. 당업자는 특정 피험체 및/또는 병태를 치료하는데 필요한 표준 관행에 따라 그러한 양을 결정하고 조정할 수 있다.

[0049] 본원에서 사용시, 용어 "혈관생성"은 새로운 혈관의 생성을 의미한다. 본원에서 사용시, 용어 "종양발생"은 종양의 성장을 의미한다. 본원에서 사용시, 용어 "병적 혈관생성"은 암, 종양, 또는 다른 질환 또는 병태, 예컨대 증가된 혈관구조와 연관된 질환 또는 병태와 연관된 혈관생성을 의미하고, 생리적 혈관생성과 구별되며, 예컨대 성장, 상처 치유, 및 육아 조직의 형성 동안 발생한다.

[0050] 본원에서 사용시, 용어 "혈관생성 인자"는 혈관생성을 촉진하는 분자, 예컨대 VEGF, FGF, PDGFB, EGF, LPA, HGF, PD-ECF, IL-8, 혈관생성, TNF-알파, TGF-베타, TGF-알파, 프로리페린, 및 PLGF를 포함한다.

[0051] 본원에서 사용시, 용어 "티로신 키나제 수용체"는 리간드에 결합하는 세포외 도메인 및 티로신 아미노산을 인산화하는 세포내 도메인을 갖는 세포 표면 수용체 부류를 의미한다. 대부분의 티로신 키나제 수용체는 특정 성장 인자, 사이토카인, 또는 호르몬에 대한 높은 친화성을 갖는다. 티로신 키나제 수용체는 구조적 유사성을 기반으로 하는 패밀리를, 예컨대 EGF 수용체 패밀리를, 인슐린 수용체 패밀리를, PDGF 수용체(PDGFR) 패밀리를, FGF 수용체(FGFR) 패밀리를, VEGF 수용체(VEGFR) 패밀리를, HGF 수용체 패밀리를, Trk 수용체 패밀리를, Eph 수용체 패밀리를, LTK 수용체 패밀리를, TIE 수용체 패밀리를, ROR 수용체 패밀리를, DDR 수용체 패밀리를, RET 수용체 패밀리를, KLG 수용체 패밀리를, RYK 수용체 패밀리를, 및 MuSK 수용체 패밀리로 분류될 수 있다. 본원에 기술된 방법과 관련된 티로신 키나제 수용체의 비제한적인 예는 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및 PDGFR을 포함한다.

[0052] 본원에서 사용시 용어 "VEGF 수용체" 또는 "VEGFR"는 VEGF에 대한 세포 수용체, 대개는 혈관 내피 세포 상에 존재하는 세포-표면 수용체를 비롯하여, VEGF에 결합하는 능력을 보유한 임의의 변이체를 의미한다. VEGF 수용체의 일례는 티로신 키나제 패밀리의 경막 수용체인, fms-유사 티로신 키나제(flt)(VEGFR1이라고도 알려짐)가 있다.flt 수용체는 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 티로신 키나제 활성을 갖는 세포내 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 VEGF의 결합에 관여하는 한편 세포내 도메인은 신호 전달에 관여한다. VEGF 수용체의 다른 예에는 flk-1 수용체(KDR 또는 VEGFR2라고도 함)가 있다. VEGFR2는 강력한 티로신 키나제 수용체 활성을 나타내고 혈관 생성에서 주요한 역할을 한다.

[0053] 본원에서 사용시, 어구 "종양-연관 혈관생성을 억제하기 위한 조성물" 및 "종양-연관 종양 발생을 억제하기 위한 조성물"은 종양 혈관구조를 감소시켜 종양-연관 혈관생성 또는 종양발생을 억제하는 치료제(분자)를 포함하

는 조성물을 포함한다.

[0054] 다음의 내용에서, 한정이 아닌 설명의 목적으로, 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해 상세하고 특정한 실시 형태를 기재한다. 본 발명은 상세한 내용 및 특정 실시형태를 벗어난 다른 실시형태로 실행할 수 있음은 당업자에게 자명하다. 또한, 본 발명을 특정 실시형태, 및 특성의 특정 조합과 관련하여 설명하지만, 본 발명은 본원에 기술된 다양한 선택안이 모든 가능한 변형 및 조합, 예컨대 도펠-표적화 분자, 제제, 투여 경로, 표적 피험체, 유효량 등의 모든 가능한 변형 및 조합을 포함함을 이해해야 한다.

[0055] 본원에 기술된 모든 출판물 및 다른 참조물은 참조로 본원에 편입된다.

[0056] 본원에 기술된 본 발명의 특정 측면은 [Al-Hilal, *et. al.*, *J. Clin. Invest.* 126 (4): 1251- 66 (Apr. 2016)]에 기술되어 있고, 이 전체 내용을 참조로 본원에 편입시킨다.

[0057] 도펠

[0058] 도펠(Dpl)은 *PRNP*(prion protein coding gene; 프라이온 단백질 코딩 유전자) 유전자와 근처에 위치한 *PRNL* 명칭의 유전자에 의해, 코딩되는 프라이온-유사 단백질이다. 예를 들어, 문헌 [Golaniska *et al.*, *Folia Neuropathol.* 42 (Supp. A) 47-54 (2004)]을 참조한다. 도펠은 진화적으로 인간에서 양 및 소에서 쥐까지 보존되어, 필수적인 기능을 시사한다(Behrens *et al.*, *EMBO Reports* 2:347 (2001); Behrens *et al.*, *EMBO J.* 21:3652 (2002)). 인간 도펠은 분자량이 약 14 KDa(비글리코실화)인 179개 아미노산 잔기 단백질이다. 펩티드의 아미노산 서열은 도 31에서 보여준다. 밴드 크기가 ~42 KDa인 도펠의 글리코실화 형태가 문헌에 보고된 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Al-Hilal *et al.*, *J. Clinic. Invest.* 126:1251-1266 (2016)] 및 [Peoc'h *et al.*, *J Biol Chem.* 277(45):43071-43078 (2002)]를 참조한다. 도펠은 또한 이량체 형태(~28 KDa)로 존재한다고 보고되었다.

[0059] 본원에서 사용시, "도펠"은 임의의 도펠 단백질을 의미한다. 일부 실시형태에서, 도펠 단백질은 글리코실화된다. 일부 실시형태에서, 도펠 단백질은 글리코실화되지 않는다. 일부 실시형태에서, 도펠 단백질은 단량체 형태이다. 일부 실시형태에서, 도펠 단백질은 이량체 형태이다.

[0060] 상기에 언급한 바와 같이, 본원에 기술된 용도, 조성물 및 방법은 도펠이 병적 혈관생성에서 역할을 하고, 예컨대 티로신 키나제 수용체(예를 들어, VEGFR2)와의 상호작용을 억제하여, 예컨대 도펠에 결합하여 도펠 혈관생성을 억제하는 종양 내피 세포(TEC) 표면 마커이거나 또는 아니면, 종양 혈관생성 및 예컨대 천식, 결핵, 아테롬성 동맥경화증, 폐동맥 고혈압 (PAH), 신생물, 및 신생물-관련 병태와 연관된 병적 혈관생성을 포함하는, 병적 혈관 생성을 선택적으로 억제할 수 있다는 본 발명자의 발견에 기인한다.

[0061] 예를 들어, TEC 상에서 도펠 발현은 정상 또는 생리적 혈관생성 상태 동안 그 발현에 비해 병적 혈관생성 동안 증가하거나, 또는 TEC 상에서 도펠 발현은 병적 종양 연관 혈관생성 또는 종양 발생과 연관될 수 있다.

[0062] 도펠-표적화 분자

[0063] 따라서, 일부 실시형태에 따라, 병적 혈관생성을 억제하기 위한 분자 및 이들의 사용 방법을 제공하고, 여기서 상기 분자는 도펠 활성을 억제하고, 예컨대 분자는 도펠 발현을 방해하거나 또는 도펠과 티로신 키나제 수용체의 상호작용을 방해한다(예를 들어, 도펠-VEGFR2 신호전달을 억제). 그러한 분자를 본원에서 "도펠-표적화" 분자라고 한다.

[0064] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 도펠에 결합하여, 도펠과 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, PDGFR 중 1 이상과의 상호작용을 방해한다. 일부 실시형태에서, 상기 분자는 도펠에 결합하며, 우선적으로 도펠에 결합하고/하거나, 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및 PDGFR 중 1 이상과 상호작용을 억제하는 분자를 포함한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 이하에 기술하는 바와 같이, 항도펠 항체, 또는 이의 도펠-결합 단편이다.

[0066] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 이하에 상세하게 기술하는 바와 같이 헤페린 접합체이다.

[0067] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 도펠-VEGFR2 축을 표적으로 하고 그의 내재화 및 분해를 유도한다.

[0068] 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 TEC 표면 상에 발현된 도펠에 결합한다. 일부 실시형태에서, 도펠-표적화 분자는 도펠을 발현하는 종양 내피 세포를 표적으로 한다.

- [0069] 일부 실시형태에서, 도펄-표적화 분자는 종양 내피 세포에서 치료 반응을 유발시킨다.
- [0070] 일부 실시형태에서, 도펄-표적화 분자는 예컨대 도펄-표적화 분자가 검출가능한 표지를 포함하거나 또는 그에 접합된 경우 종양 내피 세포를 검출하는데 유용하다.
- [0071] **헤파린-함유 접합체**
- [0072] 일부 실시형태에서, 도펄-표적화 분자는 헤파린-함유 접합체이다. 본원에서 사용시 "헤파린-함유 접합체"는 다른 모이어티, 예컨대 다른 기능적 모이어티에, 직접적으로 또는 링커를 통해 접합된 헤파린을 포함하는 접합체를 의미한다.
- [0073] 본원에서 사용시 "헤파린"은 제한없이, 비분획화 헤파린, 저분자량 헤파린, 극저분자량(vLMWH) 헤파린, 및 헤파린 설페이트를 포함한, 임의의 헤파린 종을 의미한다.
- [0074] 일부 실시형태에서, 헤파린-함유 접합체의 기능적 모이어티는 증가되거나 또는 감소된 도펄-표적화 효능을 제공하도록, 또는 특정 작용 부위, 예컨대 장 또는 회장으로의 전달을 표적화하도록 헤파린에 접합될 수 있는, 담즙산 또는 스테롤의 단량체, 이량체, 또는 올리고머이다.
- [0075] 적합한 담즙산의 예는 제한없이, 콜산, 데옥시콜산, 케노데옥시콜산, 리쑈콜산, 우르소콜산, 이소우르소데옥시콜산, 라고데옥시콜산, 글리코콜산, 타우로콜산, 글리코데옥시콜산, 글리코케노데옥시콜산, 디히드로콜산, 하이오콜산, 하이오데옥시콜산, 및 임의의 이의 2 이상의 혼합물을 포함한다.
- [0076] 적합한 스테롤의 예는 제한없이, 콜레스타놀, 코프로스타놀, 콜레스테롤, 에피콜레스테롤, 에르고스테롤, 에르고칼스테롤, 및 임의의 이의 2 이상의 혼합물을 포함한다.
- [0077] 도펄-표적화 분자로서 유용한 예시적인 헤파린 접합체는 데옥시콜산의 올리고머(올리고DOCA)를 형성하는, 1 이상의 데옥시콜산(DOCA)에 접합된 극저 분자량(vLMWH) 헤파린이다. 이러한 접합체를 LMWH-올리고DOCA 접합체라고 한다. 상이한 올리고DOCA 접합체는 모노DOCA, 비스DOCA, 트리DOCA, 및 테트라DOCA를 포함한다. LMWH-올리고DOCA 접합체는 사카라이드 유닛의 -COOH 기와 접합될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 접합 비율은 LMWH의 분자 당 1 내지 4개 분자로 다양할 수 있다. 특정 실시형태에서, 접합체는 비스DOCA의 4개 반복 유닛에 접합된 저분자량 헤파린을 포함하는 LMWH-올리고DOCA 접합체인 LH비스D4이다. 예를 들어, 도 4를 참조하며, 또한 문헌 [Al-Hilal *et al.*, *J. Clinic. Invest.* 126:1251-1266 (2016)]을 참조한다.
- [0078] 헤파린-함유 접합체는 경구로 투여시 도펄-표적화 분자로서 효과적이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 헤파린-접합체(예컨대 LMWH-올리고DOCA 접합체)는 경구 투여용으로 제제화되고, 병적 혈관생성을 억제하기 위한 도펄-표적화 분자로서 사용되며, 여기서 헤파린-함유 접합체는 도펄-표적화 분자로서 효능을 위해 경구 투여된다.
- [0079] **항-도펄 항체**
- [0080] 일부 실시형태에서, 도펄-표적화 분자는 항도펄 항체, 또는 관련 중, 예컨대 도펄에 결합하여 도펄과 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및 PDGFR의 상호작용을 억제하는 항체 단편 또는 펩티드를 포함하는, 도펄-결합 항체 단편이다. 특정 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 관련 중은 도펄에 결합하여 도펄과 VEGFR2의 상호작용을 억제한다.
- [0081] 임의의 이들 실시형태에 따라서, 항체는 임의의 항체 또는 다클론 항체 또는 단일클론 항체, 또는 항체의 유도체, 예컨대 단쇄 항체, 키메라 항체, 인간화 항체(또는 다른 표적 중에서 사용하도록 개질된 다른 종특이적 항체), 비니어드 항체 등을 포함하여, 항체-유사 분자일 수 있다. 항체는 다른 모이어티에 접합될 수 있다. 항체는 글리코실화되거나 또는 비글리코실화되거나, 또는 개질된 글리코실화 패턴을 가질 수 있다.
- [0082] 본원에 기술된 방법에 사용하기 적합한 항체 및 항체-유사 분자는 당분야에 공지된 방법론을 사용해 제조될 수 있다. 예시적인 방법을 이하 실시예에 예시한다.
- [0083] 예를 들어, 항체는 도펄 단백질 또는 이의 단편, 예컨대 이의 N-말단 또는 구형 도메인을 포함하는 항원을 사용해 숙주(예컨대, 포유동물 숙주)에서 생성시키고, 티로신 키나제 수용체(예를 들어, VEGFR2)와 그의 상호작용을 억제하는 그들 능력에 대해 스크리닝된다. 예를 들어, 도펄에 대한 다클론 항체는 도펄로 면역화된 포유동물로부터 혈액을 수집하고, 혈청 중 목적 항체의 증가에 대해 조사하고, 임의의 통상적인 방법으로 혈액에서 혈청을 분리하여 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 다클론 항체를 함유하는 혈청을 비롯하여 다클론 항체를 함유하는 분획을 분리할 수 있다.

- [0084] 항체의 일반 구조는 당분야에 공지이고 본원에서는 간략하게만 요약한다. 면역글로불린 단량체는 이황화 결합으로 연결된 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 이황화 결합을 통해 직접적으로 결합된 경쇄 중 하나와 쌍을 이룬다. 각각의 중쇄는 불변 영역(항체 이소타입에 따라 다양함) 및 가변 영역을 포함한다. 가변 영역은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3으로 지정되고 프레임워크 영역 내에서 지지되는 3개 초가변 영역(또는 상보성 결정 영역)을 포함한다. 각각의 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역을 포함하며, 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 유사한 방식으로 프레임워크에 의해 지지되는 3개의 초가변 영역(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이라고 지정함)을 포함한다.
- [0085] 중쇄 및 경쇄 각 쌍의 초가변 영역은 표적 항원에 결합할 수 있는 항원 결합 부위를 제공하도록 상호적으로 협력한다. 중쇄 및 경쇄 쌍의 결합 특이성은 그들 각각이 CDR 서열에 의해 정의된다. 따라서, 특정 결합 특이성에 대해 생성된 CDR 서열(즉, 중쇄 및 경쇄에 대한 3개 CDR의 서열) 세트가 정해지면, 그 CDR 서열 세트는 원칙적으로 동일한 항원 결합 특이성을 상이한 항체에 제공하기 위해 임의의 항체 불변 영역과 연결된 임의의 다른 항체 프레임워크 영역 내에 적절한 위치에 삽입될 수 있다.
- [0086] 본원에서 사용시 "단일클론 항체"는 B-림프구의 단일 클론에서 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염된 세포에서 얻은 항체를 의미한다. 단일클론 항체는 단일 항원 부위에 대해 유도되어, 고도로 특이적이다. 상이한 결정부(에피토프)에 대해 유도된, 상이한 항체를 전형적으로 포함하는, 통상의 (다클론) 항체 조제물과 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정부에 대해 유도된다. 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 단일클론 항체는, 예를 들어, 면역 세포를 항원-면역화 포유동물로부터 회수하고 혈청 내 목적 항체의 높은 수준을 검토하고 세포 융합을 수행하는, 당업자에게 공지된 방법으로 생산할 수 있다. 세포 융합에 사용되는 면역 세포는 전형적으로 비장에서 얻는다. 상기 면역세포와 융합되기 적합한 다른 부모 세포는 예를 들어, 포유동물의 골수종 세포, 예컨대 약물에 의해 융합된 세포의 선별을 위한 획득 특성을 갖는 골수종 세포를 포함한다. 상기 면역세포 및 골수종 세포는 공지 방법, 예를 들어, 문헌 [Milstein *et al.*, *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)]의 방법에 따라 융합될 수 있다. 세포 융합으로 얻은 최종 하이브리도마는 표준 선별 배지, 예컨대 HAT 배지(하이포잔틴, 아미놉테린 및 티미딘 함유 배지)에서 그들을 배양하여 선별할 수 있다. 세포 배양은 전형적으로 수 일 내지 수 주 동안 HAT 배지에서 연속하며, 그 시간은 원하는 하이브리도마(비융합 세포)를 제외하고, 모든 다른 세포들이 사멸되기에 충분하다. 다음으로, 표준 제한 희석을 수행하여 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 스크리닝하고 클로닝한다.
- [0087] 하이브리도마를 제조하기 위한 항체로 인간이외의 동물을 면역화하는, 상기 방법 이외에도, 인간 림프구, 예컨대 EB 바이러스가 감염된 것을 항원, 항원발현 세포, 또는 그들의 용해물로 시험관내에서 면역화할 수 있다. 그러면, 면역화된 림프구는 무한하게 분열할 수 있는 인간-유래 골수종 세포, 예컨대 U266과 융합되어, 항원에 결합할 수 있는 원하는 인간 항체를 생산하는 하이브리도마를 산출하여 얻을 수 있다. 예를 들어, 비심사청구된 일본 공개 특허 출원(JP-A) Sho 63-17688을 참조한다.
- [0088] 얻어진 하이브리도마를 마우스의 복강에 이식하고 복수를 추출할 수 있다. 얻어진 단일클론 항체를 예를 들어, 황산암모늄 침전법, 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼, DEAE 이온 교환 크로마토그래피, 또는 본 발명의 단백질이 커플링하는 친화성 컬럼에 의해 정제할 수 있다.
- [0089] 인간 이외(예를 들어, 쥐과동물) 항체의 "인간화" 형태는 인간이외의 면역글로불린에서 유도된 최소 서열을 함유하는, 키메라 항체로서 얻을 수 있다. 대체로, 인간화 항체는 가변 영역이 인간이외 면역글로불린에서 유도되고 프레임워크 영역(FR)은 인간 면역글로불린 서열에 상응하는 적어도 1 또는 2개의 가변 도메인을 포함하게 된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 항도펄 항체는 인간 항체 프레임워크 영역을 포함한다. 그러한 항체는 기지 방법으로 제조할 수 있다. 인간화 항체는 경우에 따라, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것인, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.
- [0090] 본원에 기술된 방법에서 유용한 항체를 얻기 위한 다른 방법으로서, 인간 항체 유전자의 유전자이식 동물을 도펄 단백질, 도펄 단백질-발현 세포, 또는 그들의 용해물로 면역화할 수 있다. 얻어진 항체-생산 세포를 모아서 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마를 얻고, 그로부터 도펄에 대항하는 인간 항체를 제조할 수 있다. 대안적으로, 항체를 생산하는 면역 세포, 예컨대 면역화 림프구는 중앙유전자로 불멸화되어서 단일클론 항체를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0091] 도펄에 대항한 단일클론 항체는 또한 재조합 유전자 조작 기술을 사용해 제조할 수 있다. 예를 들어, 문헌

[Borrebæck C. A. K. and Larrick J. W., Therapeutic Monoclonal Antibodies (MacMillan Publishers Ltd. (1990))]을 참조한다. 예를 들어, 도펠에 대한 항체를 코딩하는 DNA는 면역 세포, 예컨대 항체를 생산하는 하이드리도마 또는 면역화된 림프구에서 클로닝하고, 적절한 벡터에 삽입하여 숙주 세포로 도입시켜 재조합 도펠 항체를 제조한다.

[0092] 상기에 언급한 바와 같이, 임의의 이들 실시형태에 따라서, 도펠-표적화 분자는 도펠에 결합하는 항체 단편일 수 있다. 본원에서 사용시, 용어 "항체 단편" 또는 "도펠-결합 단편"은 제한없이, F_{ab} 단편, $F_{ab'}$ 단편, $F_{(ab)2}$ 단편, 및 보다 작은 단편, 다이아바디 등을 포함하는, 항체 또는 항체-유사 분자의 임의의 도펠-결합 단편을 포함한다. 항체 "단편"은 전체 길이 항체로부터 제조하거나, 또는 예를 들어 재조합 기술을 사용해 "단편"으로 합성할 수 있다.

[0093] 도펠-표적화 분자로서 유용한 항체 단편은 전체 길이 항체의 일부분, 예컨대 그의 항원-결합 도메인 또는 가변 영역 도메인을 포함할 수 있다. 적합한 항체 단편의 예는 F_{ab} , $F_{(ab')2}$, F_v , 또는 단쇄 $F_v(scF_v)$ 로서, 중쇄 및 경쇄 유래 F_v 단편은 적절한 링커에 의해 결합된 것인 단쇄 $F_v(scF_v)$ (예를 들어, 문헌 [Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883 (1988)]을 참조함); 다이아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0094] 도펠-결합 항체 단편은 효소, 예컨대 파파인 또는 펩신으로 도펠-결합 항체를 처리하여 생성시킬 수 있다. 대안적으로, 도펠 항체 단편을 코딩하는 유전자를 제작하고, 발현 벡터에 삽입하여, 적절한 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다(Co *et al.*, *J. Immunol.* 152:2968-2976 (1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol.* 178:476-496 (1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol.* 178:497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol.* 121:652-663 (1986); Rousseaux *et al.*, *Methods Enzymol.* 121:663-669 (1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol.* 9:132-137 (1991)).

[0095] 본원에서 사용시, 용어 "다이아바디"는 단편이 링커에 의해 동일한 폴리펩티드 사슬(VH-VL)에서 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 의미한다. 링커가 너무 짧으면 동일 사슬 상의 2개 도메인 사이에 쌍을 이루지 못해서, 도메인이 다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 강제되어 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 다이아바디는 보다 상세하게, 예를 들어, EP 404 097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)]에 설명되어 있다.

[0096] 실시예에서 예시하는 바와 같이, 항체 및 항체 단편은 통상의 기술을 사용해 도펠-결합 활성을 위해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 흡광도 측정, 효소-연결 면역흡착 검정법(ELISA), 효소 면역검정법(EIA), 방사성면역검정법(RIA), 웨스턴 블롯 검정법, 및/또는 면역형광광발광법을 사용해 도펠-결합 활성을 측정할 수 있다. 예를 들어, ELISA의 경우, 기지 항도펠 항체를 플레이트 상에 고정시키고, 도펠을 이 플레이트에 도포하여, 시험 항체를 함유하는 샘플, 예컨대 항체-생산 세포의 배양 상등액 또는 정제된 항체를 도포할 수 있다. 다음으로, 1차 항체를 인식하고 효소, 예컨대 알칼리 포스파타제로 표지된 2차 항체를 도포하여, 플레이트를 항온반응시킨다. 다음으로, 세척하고, 효소 기질, 예컨대 니트로페닐 포스페이트를 플레이트에 부가하고 흡광도를 측정하여 샘플의 항원 결합 활성을 평가한다. 도펠 단백질의 C-말단 또는 N-말단 단편을 항원으로 사용할 수 있다. 다른 예에서, 표면 플라즈몬 공명 분석법을 사용해 본 발명에 따라 항체의 활성을 평가할 수 있다.

[0097] 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 도펠의 1 이상의 형태, 예컨대 상기 기술된 단량체, 이량체, 글리코실화 및 비글리코실화 형태 중 1 이상에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 인간 도펠의 1 이상의 형태, 예컨대 상기 기술된 단량체, 이량체, 글리코실화 및 비글리코실화 형태 중 1 이상에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 도펠의 비인간 종의 1 이상의 형태, 예컨대 상기 기술된 단량체, 이량체, 글리코실화 및 비글리코실화 형태 중 1 이상에 결합한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 우선적으로 상기 기술된 도펠의 1 이상의 형태에 결합하고, 예컨대 1 이상의 다른 형태와 비교하여 상기 기술된 도펠의 1 이상의 형태에 우선적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 인간 도펠의 1 이상의 형태에 우선적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 도펠의 비인간 종의 1 이상의 형태에 우선적으로 결합한다.

[0099] 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 상기 기술된 도펠 형태 중 하나에 우선적으로 결합하고, 다른 형태와 비교하여 상기에 기술된 도펠 형태 중 하나에 우선적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 인간 도펠의 한 형태에 우선적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항도펠 항체는 도펠의 비인간 종의 한 형태에 우선적으로

결합한다.

- [0100] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체는 도펄의 비글리코실화 형태보다 큰 친화성으로 약 42 KDa의 분자량을 갖는 인간 도펄의 글리코실화 형태(상기 기술됨)에 결합한다. 하이브리도마 세포주 클론 4D6에 의해 생산된 항도펄 항체는 항체의 이러한 유형의 특정 실시형태이다.
- [0101] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체는 도펄의 글리코실화 형태(~42 KDa)보다 큰 친화성으로 인간 도펄의 비글리코실화 형태(~14 KDa)에 결합한다. 하이브리도마 세포주 클론 5C7, 7D9 및 1C8에 의해 생산된 항도펄 항체는 이러한 유형의 항체의 특정 실시형태이다.
- [0102] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체는 인간 도펄 단백질의 이량체 형태(~28 KDa)에 결합한다. 하이브리도마 세포주 클론 6F11 및 1B12에 의해 생산된 항도펄 항체는 이러한 유형의 항체의 특정 실시형태이다.
- [0103] 임의의 항체 실시형태에 따라서, 항도펄 항체는 도펄의 단리된 형태, 인간 도펄의 재조합 형태, 및/또는 도펄-형질감염된 Huvec 세포 용해물 유래 도펄 등에 결합할 수 있다.
- [0104] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체는 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에서 생산된 항체, 또는 이러한 항체의 유도체, 예컨대 상기 기술된 항체 유도체 유형 중 1 이상, 또는 도펄에 결합하는 이러한 항체의 단편 또는 이의 유도체, 예컨대 상기 기술된 항체 단편 유형 중 임의의 1 이상이다.
- [0105] 하이브리도마 세포주 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6 및 6F11은 하기 표에 열거된 수탁 번호 하에 2016년 11월 23일자로 부다페스트 조약의 조항 하에 한국세포주연구재단(Korean Cell Line Research Foundation, (110-744) 한국 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 암 연구소)에 기탁되었다.

표 1

[0106]

표 1		
클론	등록된 이름	수탁 번호
7D9	mPrnd# 7D9	KCLRF-BP-00387
1B12	mPrnd# 1B12	KCLRF-BP-00383
1C8	mPrnd# 1C8	KCLRF-BP-00382
5C7	mPrnd# 5C7	KCLRF-BP-00385
4D6	mPrnd# 4D6	KCLRF-BP-00384
6F11	mPrnd# 6F11	KCLRF-BP-00386

- [0107] 예시적인 항도펄 항체의 상보성 결정 영역(CDR) 및 가변 사슬의 서열은 하기 표 2 내지 표 5에서 제공한다.

표 2

[0108]

표 2 - 경쇄 CDR 서열			
항체	CDRL1	CDRL2	CDRL3
4D6	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 13)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 14)	FQGSHPVLT (SEQ ID NO: 15)
1B12	RASESVDSHGNSFMH (SEQ ID NO: 16)	LASSLES (SEQ ID NO: 17)	QQNNEDPLT (SEQ ID NO: 18)
1C8	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 19)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 20)	FQGSHPVWT (SEQ ID NO: 21)
7D9	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 22)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 23)	FQGSHPVLT (SEQ ID NO: 24)
5C7	RASQEISGYLS (SEQ ID NO: 25)	AASILDS (SEQ ID NO: 26)	LQYASYPFM (SEQ ID NO: 27)
6F11	RASQEISGYLS (SEQ ID NO: 28)	AASILDS (SEQ ID NO: 29)	LQYASYPFM (SEQ ID NO: 30)

표 3

[0109]

표 3 - 중쇄 CDR 서열			
항체	CDRH1	CDRH2	CDRH3
4D6	NYWMQ (SEQ ID NO: 31)	AIYPGDGNTRYSQKFKG (SEQ ID NO: 32)	RDYGSSYWFYFDV (SEQ ID NO: 33)
1B12	TSGMGVG (SEQ ID NO: 34)	HIWWDDDKYYNPSLKS (SEQ ID NO: 35)	RADGYGFAY (SEQ ID NO: 36)
1C8	NYGMS (SEQ ID NO: 37)	TISSGGRIYYPDSVKG (SEQ ID NO: 38)	DSSDYGFAY (SEQ ID NO: 39)
7D9	TSGMGVS (SEQ ID NO: 40)	HIYWDDDKRYNPSLKS (SEQ ID NO: 41)	TSMMVPPWFAY (SEQ ID NO: 42)
5C7	SHWMN (SEQ ID NO: 43)	QIYPRNGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 44)	STTIVTTGAY (SEQ ID NO: 45)
6F11	SHWMN (SEQ ID NO: 46)	QIYPRNGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 47)	STTIVTTGAY (SEQ ID NO: 48)

표 4

[0110]

표 4 - 경쇄 가변 영역 서열	
항체	가변 경쇄 서열
4D6	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 49)
1B12	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVSDSHGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASSLESGVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNEDPLTFGGGTKELELKR (SEQ ID NO: 50)
1C8	DVLMQTIPSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGGGTKELELKR (SEQ ID NO: 51)
7D9	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 52)
5C7	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEI SGYLSWLQKPDGTIKRLIYAASILDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISLSESEDFADYYCLOQYASYPFMFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 53)
6F11	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEI SGYLSWLQKPDGTIKRLIYAASILDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISLSESEDFADYYCLOQYASYPFMFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 54)

표 5

[0111]

표 5 - 중쇄 가변 영역 서열	
항체	가변 중쇄 서열
4D6	QVQLHQSGSELARPGASVKLSCKASGYTFNYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGNTRYSQKFKGKATLTDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARRDYGSSYWFYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 55)
1B12	QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSQTLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRADGYGFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 56)
1C8	EVQLVESGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGRIYYPDSVKGKGRFTVSRDIAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARDSSDYGFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 57)
7D9	QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARTSMVPPWFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 58)
5C7	QVQLQQSGTELVPRGSSVKISKASGYAFSSHWNNVVKQRPGQGLEWIGQIYPRNGDTNYNGKFKGKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCRSRTTIVTTGAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 59)
6F11	QVQLQQSGTELVPRGSSVKISKASGYAFSSHWNNVVKQRPGQGLEWIGQIYPRNGDTNYNGKFKGKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCRSRTTIVTTGAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 60)

[0112]

일부 실시형태에서, 항도펩 항체는 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리

도마 세포주에 의해 생산된 항체와 적어도 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

- [0113] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편의 상보성 결정 영역(CDR)은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 CDR과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0114] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 각각 항체 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11에 대해 표 2에 표시된 CDR 서열의 1 이상 또는 전부와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 예를 들어, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 4D6에 대한 CDR(서열번호 13, 14 및 15)과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 CDR을 포함할 수 있다.
- [0115] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 각각 항체 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11에 대해 표 3에 표시된 CDR 서열의 1 이상 또는 전부와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%가 동일한 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 예를 들어, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 4D6에 대한 CDR(서열번호 31, 32 및 33)과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 CDR을 포함할 수 있다.
- [0116] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편의 중쇄 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 중쇄 가변 도메인 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0117] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 표 5에 표시된 가변 도메인 서열 중 어느 하나와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0118] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편의 경쇄 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 경쇄 가변 도메인 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0119] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 표 4에 표시된 가변 도메인 서열의 어느 하나와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0120] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편의 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열 각각과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 표 4에 표시된 경쇄 가변 도메인 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 도메인 서열 및 표 5에 표시된 상응하는 중쇄 가변 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 상응하는 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 예를 들어, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 4D6에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열, 즉 서열번호 49 및 55와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편의 프레임워크 영역 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 프레임워크 영역 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 임의의 것에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체의 CDRH1과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함

하는 CDRH1을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 31, 34, 37, 40, 43, 또는 46과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1 서열을 포함한다.

[0124] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 임의의 것에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체의 CDRH2 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 32, 35, 38, 41, 44, 또는 47과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2 서열을 포함한다.

[0125] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 임의의 것에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체의 CDRH3 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 33, 36, 39, 42, 45, 또는 48과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3 서열을 포함한다.

[0126] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 경쇄 가변 영역은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 임의의 것에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체의 CDRL1 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13, 16, 19, 22, 25, 또는 28과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1 서열을 포함한다.

[0127] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 경쇄 가변 영역은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 임의의 것에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체의 CDRL2 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 14, 17, 20, 23, 26, 또는 29와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2 서열을 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 경쇄 가변 영역은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 임의의 것에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체의 CDRL3 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 15, 18, 21, 24, 27, 또는 30과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3 서열을 포함한다.

[0129] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편은 다음의 특징 중 1 이상을 포함한다:

[0130] (a) 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 경쇄 가변 도메인의 CDR과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 1 이상의 CDR을 포함하고/하거나(표 2에서 보여줌);

[0131] (b) 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 중쇄 가변 도메인의 CDR과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 1 이상의 CDR을 포함하고/하거나(표 3에서 보여줌);

[0132] (c) 경쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 경쇄 가변 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하고/하거나(표 4에서 보여줌);

[0133] (d) 중쇄 면역글로불린 가변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 중쇄 가변 도메인과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다(표 5에서 보여줌).

- [0134] 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 항체의 CDR의 1 이상의 아미노산 잔기는 다른 아미노산으로 치환된다. 치환은 다음의 패밀리 분류를 기반으로, 동일한 아미노산 패밀리 내 치환이라는 점에서 "보존성"일 수 있다:
- [0135] (1) 염기성 측쇄를 갖는 아미노산: 리신, 아르기닌, 히스티딘.
- [0136] (2) 산성 측쇄를 갖는 아미노산: 아스파르트산, 글루탐산.
- [0137] (3) 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산: 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신.
- [0138] (4) 비극성 측쇄를 갖는 아미노산: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판, 시스테인.
- [0139] 다른 실시형태에서, 1 이상의 아미노산 잔기는 항체의 1 이상의 CDR에 부가되거나 또는 그로부터 결실된다. 이러한 부가 또는 결실은 CDR의 N 말단 또는 C 말단 또는 CDR 내 위치 중 1 이상에서 일어날 수 있다.
- [0140] 아미노산의 부가, 결실 또는 치환에 의해 항도펄 항체의 CDR의 아미노산 서열을 다양화하여, 다양한 효과 예컨대 표적 항원에 대한 증가된 결합 친화성을 얻을 수 있다.
- [0141] 항-도펄 항체의 불변 영역이 또한 가변화될 수 있다. 예를 들어, 항체는 임의의 이소타입: IgA(IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 또는 IgM의 Fc 영역이 제공될 수 있다.
- [0142] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체의 중쇄 불변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 중쇄 불변 도메인 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체의 경쇄 불변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 경쇄 가변 도메인 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0144] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체의 중쇄 불변 도메인 서열 및 경쇄 불변 도메인 서열은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 각각 중쇄 불변 도메인 서열 및 경쇄 불변 도메인 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다.
- [0145] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편은 도펄에 결합하는 항원 결합 부위를 함께 형성하는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄-결합 단편은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11 중 어느 하나에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체가 결합하는 에피토프에 결합한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 도펄 결합 단편은 마우스 또는 인간 도펄의 아미노산 서열 YWQFPD(서열번호 11)에 결합할 수 있다(도 32 참조). 대안적으로, 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 도펄 결합 단편은 쥐과동물 도펄의 아미노산 서열 FPDGIY (서열번호 12) (도 33 참조) 또는 인간 도펄의 상응하는 서열인, FPDGIH (서열번호 61)에 결합할 수 있다.
- [0146] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 표 2 및 3에 개시된 CDR 서열 및 하이브리도마 세포주 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 또는 6F11에 의해 생성되는 항체의 에피토프 특이성과 같은, 본원에 개시되는 개시된 구조적 및/또는 기능적 특징 중 1 이상의 조합을 보유할 수 있다.
- [0147] 소정 항체의 에피토프 결합 부위를 결정하는 방법, 예컨대 면역검정법이 당분야에 공지되어 있고 이하 실시예에서 예시한다.
- [0148] 일부 실시형태에서, 항도펄 항체 또는 이의 도펄 결합 단편은 클론 7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 또는 6F11에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 항체 중 1 이상과 유사한 특이성 및 감응성 프로파일로 도펄에 결합한다.
- [0149] **조성물**
- [0150] 본원은 또한 1 이상의 도펄-표적화 분자를 포함하는 조성물을 기술한다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 예컨대 의도하는 투여 경로에 적합한 담체를 포함한다.
- [0151] 상기 조성물은 임의의 경구, 비경구, 또는 국소 투여 경로를 포함한, 임의의 투여 경로를 위해 제조될 수 있다.

일부 실시형태에서, 상기 조성물은 주사 또는 주입, 예컨대 정맥내 주사 또는 주입에 적합하고, 예컨대 주사 또는 주입을 위한 멸균 조성물로서 제조될 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 조성물은 경구 투여에 적합하고, 예컨대 액상 또는 고상 경구 제형(예컨대, 용액, 시럽, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 현탁액, 에멀션, 또는 경구 스프레이)로 제조될 수 있다. 다른 실시형태에서, 약학 조성물은 흡입에 적합하고, 예컨대 코 또는 경구 흡입에 적합한 용액 또는 분말 형태일 수 있다. 다른 실시형태에서, 약학 조성물은 직장 또는 질 투여에 적합하고, 예컨대 좌제 제제이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 국소 또는 경피 투여에 적합하고, 예컨대 용액, 에멀션, 겔, 또는 패치이다. 이러한 조성물의 적절한 성분 및 부형제는 당분야에 공지되어 있다.

[0152] 따라서, 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 경구 투여, 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입, 안구내 주사, 피내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 기관내 투여, 흡입, 비내 투여, 설하 투여, 구강 투여, 직장 투여, 질 투여, 또는 국소 투여를 위해 제제화된다.

[0153] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 경구 투여용으로 제제화된다. 상기에 언급한 바와 같이, LMHW-올리고 DOCA 접합체는 경구 투여에 특히 적합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 경구 투여 및 장 또는 회장에서 선택적 흡수를 위해 제제화된다. 예를 들어, LMHW-올리고DOCA 접합체 도켈-표적화 분자는 장 또는 회장에 국재할 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 제제는 예컨대 당분야에 공지된 pH-제어 및/또는 지연 방출 제제를 사용하여, 장 또는 회장에서 도켈-표적화 분자의 표적화 방출을 제공할 수 있다.

[0154] 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 정맥내 주사를 위해 제제화된다. 항체 및 항체 단편은 전형적으로 소화 관 내 분해를 피하기 위해 정맥내 주사에 의해 투여되지만, 예를 들어 예컨대 당분야에 공지된 제제화 기술을 사용해, 소화 효소로부터 그들을 보호하는 방식으로 항체/단편을 제제화하여, 경구 전달을 위해 제제화될 수 있다.

[0155] 비경구 투여를 위한 제제의 예에는 멸균된 수용액, 수불용성 용액, 현탁물, 에멀션, 동결건조 제제, 및 좌제가 포함된다. 비수성 용액 및 현탁액은 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물 오일 예컨대 올리브 오일, 또는 주사용 에스테르 예컨대 에틸올레이트를 포함한다. 좌제 제제용 베이스는 예를 들어, 위텔솔, 마크로겔, Tween 61, 카카오 버터, 라우린 버터, 글리세로젤라틴 등을 포함한다.

[0156] 경구 전달용 제제는 폴록사머, 라브라솔, 폴리에틸렌 글리콜, 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0157] 일부 실시형태에서, 조성물은 도켈과 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 및 PDGFR의 상호작용을 방해하기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 병적 혈관생성을 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 종양 혈관생성을 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 병적 혈관구조를 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 종양 혈관구조를 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 종양 혈관생성을 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다.

[0158] 일부 실시형태에서, 조성물은 천식과 연관된 혈관생성을 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 결핵과 연관된 혈관생성을 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 아테롬성 동맥경화증과 연관된 혈관생성을 증가시키기 위해 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 폐동맥 고혈압(PAH)과 연관된 혈관생성을 감소시키기 위해 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 신생물 또는 신생물-관련 병태와 연관된 혈관생성을 감소시키기 위한 도켈-표적화 분자의 유효량을 포함한다.

[0159] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 종양 내피 세포에서의 치료적 반응을 유발시키는데 효과적이다.

[0160] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 예컨대 도켈-표적화 분자가 검출가능한 표지를 포함하거나 또는 그에 접합되는 경우, 종양 내피 세포를 검출하는데 효과적이다.

[0161] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 신생물 또는 신생물-관련 병태, 예컨대 유방 암종, 폐 암종, 위 암종, 식도 암종, 직결장 암종, 간 암종, 난소 암종, 남성배세포종, 자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 자궁내막 과형성증, 자궁내막증, 섬유육종, 육모막암종, 두경부암, 비인두 암종, 후두 암종, 간아세포종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장 암종, 망막아세포종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 핍지교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 빌름 종양, 신장 세포 암종, 전립선 암종, 모반증 연관 이상 혈관 증식증, 부종(예컨대 뇌종양과 연관), 및/또는 메

이그스 증후군에 대한 치료 반응을 유발하는데 효과적이다

- [0162] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 조성물은 이를 필요로 하는 피험체에서 혈관생성을 억제하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 피험체는 도펠-티로신 키나제 수용체 신호전달(예컨대 도펠-VEGFR2 신호전달)이 관여하는 질환 또는 병태, 예컨대 종양 또는 암 또는 증가된 혈관구조와 연관된 질환 또는 병태, 예컨대 천식, 결핵, 아테롬성 동맥경화증, 폐동맥 고혈압(PAH), 또는 신생물 또는 신생물-관련 병태를 앓거나 또는 그의 발병 위험성이 있다.
- [0163] **도펠-표적화 분자를 동정하는 방법**
- [0164] 예시적인 도펠-표적화 분자를 상기에 기술하였다. 추가적인 도펠-표적화 분자는 스크리닝 방법, 예컨대 이하에 기술하고 이하 실시예에 예시한 것들에 의해 동정할 수 있다.
- [0165] 적합한 방법은 이하의 실시예에서 예시하는 바와 같이 도펠 단백질(또는 티로신 키나제 억제제(예를 들어, VEGFR2)와 복합체를 형성하는 이의 단편)과 시험 분자의 결합을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 부가적으로 또는 대안적으로 도펠 및 티로신 키나제 억제제가 항상적으로 도펠 단백질 또는 이의 단편과 결합하는 시험 작용제의 존재 또는 부재하에서 서로 상호작용하는 경우 내피 세포를 배양하는 단계 및 티로신 키나제 억제제의 내재화 및/또는 티로신 키나제 억제제의 분해 중 1 이상을 검출하는 단계, 및 시험 분자의 부재하에서 검출되는 내재화 및/또는 분해와 비교하여 티로신 키나제 억제제의 내재화를 억제하고/하거나 티로신 키나제 억제제의 분해를 촉진하는 시험 분자를 선택하는 단계를 포함한다. 부가적으로 또는 대안적으로, 도펠-차단 활성은 예를 들어, 인산화의 억제 및 티로신 키나제 억제제의 분해를 검정하여 검출할 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 도펠-차단 활성은 예를 들어, 내피 세포 구상체에서 형성된 출아수를 검정하는 단계 및 대조군에서 발생한 출아수를 비교하여 검출할 수 있는, 내피세포 출아 억제를 검정하여 검출할 수 있다.
- [0166] 임의의 도펠 단백질은 시험 분자의 결합을 평가하여 사용할 수 있다. 특정 실시형태에서, 도펠 단백질 또는 이의 단편은 표적 티로신 키나제 억제제, 예컨대 VEGFR2 단백질과의 복합체를 형성한다.
- [0167] 도펠 및 티로신 키나제 억제제가 시험 작용제의 존재 또는 부재하에서 항상적으로 서로 상호작용하는 경우에 임의의 배지를 내피 세포를 배양하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, 세포 추출물, 세포 배양 상등액, 미생물 발효배양 생성물, 해양 유기체의 추출물, 식물 추출물 등이 사용될 수 있다.
- [0168] **병적 혈관생성의 억제**
- [0169] 상기에 기술한 바와 같이, 본원에 기술된 도펠-표적화 분자 및 조성물은 이를 필요로 하는 피험체에서, 병적 혈관생성을 억제하고 관련 질환 또는 병태를 치료하는데 유용하다. 따라서, 이러한 용도 및 방법을 본원에서 제공한다.
- [0170] 상기에 언급한 바와 같이, 본원에서 사용시 용어 "피험체"는 인간, 고양이, 쥐, 개, 말, 원숭이, 또는 다른 종을 포함한, 임의의 포유동물을 의미한다. 일부 실시형태에서, 피험체는 인간이다.
- [0171] 본원에서 사용시, "치료하는"은 일부 병적 혈관생성(또는 종양발생)이 여전히 발생하더라도, 병적 혈관생성(또는 종양발생)을 감소, 지체, 또는 지연시키는 것, 및/또는 일부 병적인 증가된 혈관구조가 여전히 발생하더라도 증가된 혈관구조를 감소, 지체, 또는 지연시키는 것을 포함한다.
- [0172] 본원에서 기술된 도펠-표적화 분자 및 조성물은 도펠 또는 도펠-티로신 키나제 수용체 신호전달이 관여하는 질환 또는 병태, 또는 증가된 혈관구조를 암시하는 질환 또는 병태가 있는 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는데 유용하다. 이러한 질환 또는 병태의 비제한적인 예는 종양, 암, 예컨대, 제한없이, 혈관생성암; 아테롬성 동맥경화증; 결핵; 천식, 및 폐동맥 고혈압(PAH)을 포함한다. 따라서, 개시된 방법 및 도펠-표적화 분자 및/또는 조성물은 다양한 신생물 및 비신생물 질환 및 질병을 치료하는데 유용할 수 있다.
- [0173] 본원에 개시된 도펠-표적화 분자 및 조성물은 종양 내피 세포(TEC)에 대항하여 치료 반응을 생성시켜서, 이들 세포의 존재를 특징으로 하는 질환 또는 병태의 치료에서 유용하다.
- [0174] 본원에 기술된 도펠-표적화 분자 및 조성물은 신생물 및 신생물-관련 병태를 치료하는데 유용하다.
- [0175] 본원에서 사용시 용어 "신생물"은 덩어리의 형성시 종양으로 알려진, 조직의 비정상적인 성장을 의미한다. 신생물은 양성이거나 또는 악성일 수 있다. 악성 신생물은 대체로 암이라고 한다.
- [0176] 치료를 할 수 있는 신생물 및 신생물-관련 병태는 유방 암종, 폐 암종, 위 암종, 식도 암종, 직결장 암종, 간

암종, 난소 암종, 남성배세포종, 자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 자궁내막 과형성증, 자궁내막증, 섬유육종, 육모막암종, 두경부암, 비인두 암종, 후두 암종, 간아세포종, 카포시 육종, 흑색종, 피부 암종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장 암종, 망막아세포종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 핍지교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골원성 육종, 평활근육종, 요로 암종, 갑상선 암종, 빌름 종양, 신장 세포 암종, 전립선 암종, 모반증 연관 이상 혈관 증식증, 부종(예컨대 뇌종양과 연관), 및 메이그스 증후군을 포함한다.

[0177] 따라서, 본원은 도켈-표적화 분자 및 이를 필요로 하는 피험체, 예컨대 상기 언급된 병태 중 임의의 1 이상을 앓거나 또는 발병할 위험성이 있는, 피험체에서 병적 혈관생성을 억제하는 방법에서 사용하기 위해 그들을 포함하는 조성물을 비롯하여, 그러한 방법을 제공한다. 상기 용도 및 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 본원에 기술된 도켈-표적화 분자 또는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 유효량은 도켈 및 티로신 키나제 수용체, 예컨대 VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, bFGFR, 또는 PDGFR의 상호작용을 방해하는데 효과적이다. 특정 실시형태에서, 유효량은 도켈 및 VEGFR2의 상호작용을 방해하는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 종양의 혈관구조를 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 종양 내피 세포에서 치료적 반응을 유발시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 병적 혈관생성 또는 종양발생을 감소, 지체, 또는 지연시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 천식과 연관된 혈관생성을 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 결핵과 연관된 혈관생성을 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 아테롬성 동맥경화증과 연관된 혈관생성을 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 폐동맥 고혈압(PAH)과 연관된 혈관생성을 감소시키는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 유효량은 신생물 또는 신생물-관련 질병과 연관된 혈관생성을 감소시키는데 효과적이다.

[0178] 도켈-표적화 분자는 임의의 비경구 또는 국소 투여 경로를 포함하여, 임의의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 경구 투여, 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입, 안구내 주사, 피내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 기관내 투여, 흡입, 비내 투여, 설하 투여, 구강 투여, 직장 투여, 질 투여, 또는 국소 투여에 의해 도켈-표적화 분자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0179] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 경구 투여에 의해 도켈-표적화 분자를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 정맥내 주사에 의해 도켈-표적화 분자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0180] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가의 요법으로 피험체를 치료하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 치료 방법은 화학요법제를 피험체에게 투여하는 단계, 또는 방사선 요법을 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 본원에서 사용시, 용어 "화학요법제"는 암을 치료하는데 유용한 분자, 예컨대 암을 치료하는데 사용되는 소형 화학 화합물을 의미한다. 화학요법제의 비제한적인 예는 제한없이, 알킬화제, 항대사산물, 항종양 항생제, 식물 알칼로이드/마이크로튜블 억제제, DNA 연결제, 생물제제, 비스포스포네이트, 호르몬, 및 암을 치료하는데 유용한 것으로 알려진 다른 약물을 포함한다. 화학요법제의 비제한적인 예는 아미노글루테티미드, 암사크린, 아나스트로졸, 아스파라기나제, 베그, 비칼루타미드, 블레오마이신, 부셀렐린, 부셀판, 캄토테신, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로드로네이트, 콜키신, 시클로포스파미드, 시프로테론, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 디에네스트롤, 디에틸stil베스트롤, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에스트라디올, 에스트라무스틴, 에토포시드, 엑세메스탄, 필그라스탐, 플루다라빈, 플루드로코르티손, 플루오로우라실, 플루옥시메스테론, 플루타미드, 켈시타빈, 제니스테인, 고세렐린, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙, 인터페론, 이리노테칸, 이리노테칸, 레트로졸, 류코보린, 류프롤리드, 레바미솔, 로무스틴, 메클로레타민, 메드록시프로게스테론, 메게스트롤, 멜팔란, 머캅토프린, 메스나, 메토타렉세이트, 미토마이신, 미토탄, 미톡산트론, 닐루타미드, 노코다졸, 옥트레오티드, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파미드로네이트, 펜토스타틴, 폴리카마이신, 폴피머, 프로카르바진, 칼리트렉세드, 리톡시맙, 스트렙토조신, 수라민, 타목시펜, 테모졸로미드, 테니포시드, 테스토스테론, 티오구아닌, 티오테파, 티타노센 디클로라이드, 토포테칸, 트라스투주맙, 트레티노인, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 및 비노렐빈을 포함한다.

[0181] **도켈을 검출하는 방법**

[0182] 본원에 기술된 도켈-표적화 분자 및 조성물은 또한 도켈의 존재를 검출, 예컨대 도켈이 특정 질환 또는 병태와 연관되었는지 여부, 또는 피험체에서 발현되는지 여부, 또는 피험체의 TEC에 의해 발현되는지 여부를 결정하기 위한 작용제로서 유용하다.

[0183] 이러한 용도를 위해, 도켈-표적화 분자는 피험체 및/또는 피험체로부터 얻은 생물학적 샘플에 투여된 후, 도켈-표적화 분자와 피험체 또는 샘플에 존재하는 임의의 도켈 간 임의 결합을 검출한다. 일부 실시형태에서, 도켈-표적화 분자는 검출가능한 표지를 포함하거나 또는 그에 접합된다. 다른 실시형태에서, 도켈-표적화 분자와 피

험체 또는 샘플에 존재하는 임의의 도펠 간 결합을 도펠-표적화 분자 및/또는 도펠-표적화 분자/도펠 복합체에 특이적인 항체를 사용해 검출한다.

[0184] 도펠은 질환 또는 병태와 연관되어 있다고 결정되거나, 또는 피험체의 TEC에 의해 발현된다고 결정되면, 피험체는 본원에 기술된 방법에 의해 치료될 수 있다.

[0185] 특정 실시형태에서, 피험체는 임의의 상기 기술된 바와 같으며, 예컨대 상기 기술된 바와 같이, 종양이 발병할 위험성이 있고/있거나, 암, 아테롬성 동맥경화증, 결핵, 천식, 및 폐동맥 고혈압(PAH)에서 선택된 질환 또는 병태가 발병될 위험성이 있고/있거나, 신생물 또는 신생물-관련 병태가 발병될 위험성이 있다.

[0186] 실시예

[0187] 이하의 실시예는 특정 실시형태를 예시하나, 단지 예시적인 것이다.

[0188] 실시예 1: 도펠 발현을 평가하기 위한 종양 내피 세포(TEC)의 분류

[0189] 이 실시예는 상이한 종양 조직 유형으로부터 내피 세포를 정제하는 방법을 기술한다.

[0190] 종양 내피 세포는 일부 변형된 공개 절차에 따라서 이중 마커를 사용해 분리하였다. 간략하게, 종양은 C₃H/HeN 마우스의 옆구리에서 피하로 성장시키고 절개하였으며, 2개의 수술칼을 사용해 다지고, 조직 1 그램 당 9 mL 콜라게나제 및 1 mL 디스파제 용액에서 분해하였다. 조직을 30분간 37°C 수조에서, 연속 교반 하에 항온반응시켰다. 후속하여, 10 mL 세포 현탁물 당 75 μ L의 DNaseI 용액을 부가하고 연속 교반하면서 37°C에서 추가 30분간 항온반응시켰다. 분해된 조직을 100 μ m 세포 스트레이터를 통해 체질하고 단일 세포를 분리하였다. 세포를 실온에서 7분간 400 $\times$ g로 원심분리하여 수집하였다. 적혈 세포, 과립구, 신피 세포 및 세포 찌꺼기를 제거하기 위해, 세포를 10 mL 피콜 분리 매질(출발 물질 그램 당)에 재현탁시키고 7.5 mL 피콜-플라크(실온으로 예비승온됨) 상에서 현탁물로 조심스럽게 층이 되게하였다. 층간-함유 생존 세포를 새로운 튜브로 옮겼다. 세포들을 FACS 튜브에 수집하고, 항-마우스 CD31-PE 및 항-마우스 CD34-FITC 항체(2 μ g/mL의 최종 농도)와 항온반응시켰다. FACS 기계는 29.9 psi의 시트 유체압, 44 kHz의 분류 주파수, 및 3,500 V의 플레이트 전압으로 조건을 조정하여 제조하였다. 수집된 세포를 10% FBS를 함유하는 10 mL ECGM에 현탁시키고 원심분리하였다. 다음으로 세포를 0.2% 젤라틴-코팅된 100 mm 디쉬 상에 플레이팅하고 정상 ECGM을 보충하여 밤새 배양하였다. 다음 날, 배지를 10% FBS를 함유하는 보충된 ECGM으로 교체하였다. 세포를 융합점까지 성장시켰다.

[0191] 실시예 2: 도펠 발현에 대한 면역형광 및 온조직 고정 염색

[0192] 종양을 절개하고 메스를 사용해 대략 2 mm x 2 mm의 조직(플러그)으로 잘랐다. 플러그는 50 mL 반응 튜브 중에 4°C에서 24시간 동안 25% DMSO를 함유하는 메탄올에 고정시켰다. 플러그는 부드럽게 교반하면서 4°C에서 멸균 PBS를 사용해 3회(각회차에 적어도 30분) 세척하였다. 플러그를 3시간 동안 5% BSA를 사용해 약한 교반 하에 4°C에서 차단하였다. 종양 플러그는 약한 교반 하에 4°C에서 밤새 1차 항체를 함유하는 차단 완충액에서 항온반응시켰다. 다음 날에, 플러그를 3회 TBST를 사용해 3시간 동안 4°C에서 약한 교반 하에 세척하였다. 플러그를 형광발광-표지된 2차 항체를 함유하는 차단 완충액(TBST 중 5% BSA) 중에 4°C에서 약한 교반 하에 항온반응시켰다. 3시간 동안 4°C에서 약하게 교반하여 세척한 후, 플러그를 희스트 염료로 염색하였다. 플러그를 고정 매질에 삽입하고 건조를 방지하기 위해 슬라이드를 퍼텍스로 밀봉하였다. 모세관 네트워크의 3차원 구조를 공조점 현미경(Carl Zeiss LSM710, Leica DM IRB/E; Leica Co., Germany)으로 분석하였다. 도펠 및 CD31 검출을 위해, 절개부를 동시에 염소 항-마우스 도펠로 염색한 후 Alexa488-연결 당나귀 항-염소 및 PE-연결 래트 항-마우스 CD31로 염색하였다.

[0193] 분자 수준에서 도펠 발현을 평가하기 위해, TEC를 마우스에서 성장시킨 고도의 혈관생성 편평세포 암종(SCC7)에서 분리하였다. 온조직-고정 및 면역형광발광 염색은 대부분의 혈관구조가 원발성 종양에서 높은 수준으로 도펠을 발현함을 밝혀주었다(도 1).

[0194] 실시예 3: 도펠 발현에 대한 정량적 PCR

[0195] mRNA를 Quick Prep Micro mRNA 정제 키트(Amersham, Piscataway, NJ)를 사용해 정제하였다. 단일 가닥 cDNA는 제조사의 지시에 따라서 Superscript III 1차 가닥 합성 시스템(Invitrogen)을 사용해 생성시켰다. 정량적 PCR은 Brilliant SYBR Green QPCR 마스터 믹스를 사용하고 MX4000을 이용해 수행하였고, 한계 사이클 수는 MX4000 소프트웨어 v.4.20(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용해 얻었다. 증폭 조건은 10분간 95°C에서 1사이클 후 각각 20초간 95°C에서 40사이클; 56°C, 30초 및 72°C, 30초. 정량적 PCR은 삼중으로 수행하였고, 한계 사이클 수

는 평균내었다. 유전자 발현은 SAGE에 의해 평가시 모든 EC에서 균일하게 발현되는 유전자인, 70 Kd U1 소형 핵 리보뉴클레오타이드 폴리펩티드 A(*Snrnp70*)에 대해 정규화하였다. 상대적 발현은 $2^{(Rt-Et)}/2^{(Rn-En)}$ 의 식을 사용해 계산하였고, 상기 식에서 Rt는 *Snrnp70*에 대한 실험 샘플에서 관찰된 한계 사이클 수이고, Et는 관심 유전자(GOI)에 대한 실험 샘플에서 관찰된 한계 사이클 수이며, Rn은 B.End.3 또는 HUVEC 샘플 중 *Snrnp70*에 대해 관찰된 평균 한계 사이클 수이고, En은 B.End.3 또는 HUVEC 샘플의 GOI에 대해 관찰된 평균 한계 사이클 수이다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:

- [0196] 마우스 도펠:
- [0197] 전방향: GGACATCGACTTTGGAGCAGAG (SEQ ID NO: 1);
- [0198] 후방향: CAGCATCTCCTTGGTCACGTTG (SEQ ID NO: 2),
- [0199] 인간 도펠:
- [0200] 전방향: GATGGCATCCACTACAACGGCT (SEQ ID NO: 3);
- [0201] 후방향: GTTGTCTGGCTTCTGGAAGTCC (SEQ ID NO: 4),
- [0202] 마우스 *Snrnp70*:
- [0203] 전방향: GCCTTCAAGACTCTGTTTCGTGG (SEQ ID NO: 5);
- [0204] 후방향: CTCGATGAAGGCATAACCACGG (SEQ ID NO: 6),
- [0205] 인간 *Snrnp70*:
- [0206] 전방향: TCAAGACTCTCTTCGTGGCGAG (SEQ ID NO: 7),
- [0207] 후방향: GGCTTTCCTGACCGCTTACTGT (SEQ ID NO: 8).
- [0208] 정량적 RT-PCR 분석은 전사 수준이 정상 마우스 내피에서 보다 SCC7에서 정제된 TEC에서 대략 38배 높은 것을 밝혀주었다(도 2). 취합하여, 이들 데이터는 전사체 및 단백질 수준 둘 모두에서, 도펠 발현이 종양 형성 동안 이소적으로 증가하고 종양 내 TEC에 특이적임을 시사한다.
- [0209] **실시예 4: TEC 구상체의 생성 및 마우스에서 피하 이식**
- [0210] 구상체-기반 생체 내 혈관생성 검정법을 공개된 절차에 따라 수행하였다. 간략하게, 8×10^6 TEC 또는 TEC^{-/-dp1}를 20% 메탄올 용액 및 80% 배양 배지를 함유하는 200 mL 배지에 현탁하였다. 세포는 각 구상체에 대해 25 μ l로, 비부착 플라스틱 사각 페트리디쉬에 분배하였다. TEC 또는 TEC^{-/-dp1}에 의해 형성된 구상체를 수확하였고 마우스 VEGF 및 bFGF를 함유하는 매트릭스/피브린 혼합물에서 혼합하였다. TEC 또는 TEC^{-/-dp1} 구상체(플러그 당 1000 구상체)는 각각의 암컷 SCID 마우스(5-6주령, Jungang Animal Lab, Korea) 또는 암컷 Balb/c 누드 마우스(Orinet bio, Seongnam, Korea)의 옆구리에 피하 접종하였다. 구상체는 3주 동안 성장시켰다. 2.5 kg/kg의 용량으로, Cy5.5-표지된 LMWH를 정맥내 주사하였고, 주사 후 2시간 후에, TEC 이식 부위에서 그 축적을 Optimax-MX3(GE Medical Systems, Milwaukee, WI)을 사용해 검토하였다. 다른 실험에서, 10 mg/kg의 용량으로, Cy5.5-표지된 LH비스D4를 경구 투여하였고, 그 분포를 또한 이전에 기술된 바와 같이 검토하였다. 매트릭스 플러그를 제거하였고 플러그의 일부분은 면역형광 염색을 통해 미세혈관 밀도 및 약물 축적에 대해 분석하였다.
- [0211] 항도펠은 용량 의존적으로 TEC 구상체의 FBS 또는 mVEGF-유도된 출아를 제거하였다(도 3). 이들 데이터는 도펠이 내피 세포에서 VEGFR2 신호전달을 조절함을 시사한다.
- [0212] **실시예 5: 도펠-결합 LMWH-DOCA 접합체의 합성**
- [0213] 이 실시예는 본원에 기술된 바와 같이, 도펠-표적화 분자로서 유용한 몇몇 담즙산(데옥시콜산)-기반 헤파린 접합체의 합성을 기술한다.
- [0214] 데옥시콜산(DOCA) 유도체는 빌딩 블록 방법을 사용해 데옥시콜산 및 리신, 또는 2-4 아민 기를 함유하는, 리신 치환체의 화학적 접합에 의해 합성되었다. 그들을 각각 단량체, 이량체, 삼량체, 및 사량체 데옥시콜산(각각 노DOCA, 비스DOCA, 트리DOCA, 테트라DOCA)이라고 하였다(도 4). LMWH와 접합 전에, DOCA 유도체를 에틸렌디아민(EDA)과 반응시켜 각각의 DOCA 유도체에 중심 1차 아민을 도입시켰다. LMWH-DOCA 접합체는 친수성 LMWH 골격을

아민 접합된 DOCA 유도체와 화학 커플링하여 합성시켰다(모노DOCA-NH₂, 비스DOCA-NH₂, 트리DOCA-NH₂, 및 테트라DOCA-NH₂). LMWH(100 mg)를 가속 온도에서 3.125 mL FA에 용해시켰다. DOCA 유도체는 또한 DMF/FA의 공용매계에 용해시켰다. LMWH의 카르복실산은 EDAC/NHS를 사용해 활성화시켰고 12시간 동안 4℃에서 1:12 범위의 상이한 공급 모델 비율로 DOCA 유도체와 반응시켰다. 반응된 물질들을 이어 과량의 냉 에탄올 중에서 침전시킨 후 원심분리 전에 진공 건조시켰다. 건조된 헤파린 접합체는 동결건조 전에 물에 용해시켰다. LMWH-DOCA 접합체의 합성은 ¹H NMR을 사용해 확인하였는데, 특정 ppm 범위에서 특이적 아마이드 결합 및 담즙산 피크가 확인되었다. LMWH-DOCA 접합체의 상대적 항응고 활성은 항-인자 Xa(항-FXa) 발생성 분석 키트 및 FXa에 감응성인 발색성 기질(S2222)을 사용하는 동역학적 방법으로 결정하였다. 접합 비율은 일부 변형하여 문헌 [Fini et al.]에 기술된 대로 결정하였다.

[0215] 실시예 6: 도펠과 LMWH-DOCA 접합체 간 결합 친화성의 측정

[0216] 이 실시예는 도펠과 LMWH-DOCA 접합체 사이의 해리 속도 상수를 평가하는 방법을 기술한다.

[0217] LMWH 및 LMWH-DOCA 접합체와 *Prnp* 및 *Prnd*(도펠)의 친화성 측정은 BIAcore T100(GE Healthcare) 상의 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. 표준 EDAC-NHS 커플링 방법을 사용하여, 재조합 단백질을 센서 칩(GE Healthcare) 상에서 4000-7000의 밀도로 고정시켰다. 측정은 20 μ l/분의 유속에서 수행하였고, 50 mM NaOH를 사용해 각 분석 사이클 후에 칩 표면을 재생하였다. 각 농도는 이중으로 분석하였다. 얻어진 데이터의 동역학적 분석은 BIAcore T100 평가 소프트웨어(GE Healthcare)를 사용해 수행하였다.

[0218] 신규한 헤파린-기반 화합물(데옥시콜산과 헤파린의 접합체)을 디자인하였다. 한 개 LMWH 분자에 대한 4개의 이량체 DOCA 분자의 화학 접합체인, LH비스D4를 후속 실험에 선택하였다. LH비스D4는 LMWH 또는 다른 담즙산-기반 접합체보다 도펠에 대해 높은 결합 친화성($K_D = 7.8$ nM)을 나타내었다(도 5). 또한, LMWH와 달리, LH비스D4는 LMWH와 비교시, 항응고 활성을 보이거나, 또는 세포 프라이온 단백질, *Prnp*에 대한 결합 친화성 변화를 보이지 않았다(도 6). LH비스D4 결합은 또한 TEC에서 보다 TEC^{-/-dp1}에서 두드러지게 감소하였다(도 7). 컴퓨터 모의실험을 사용한 단편-기반 구조 연구는 도펠의 구형 도메인이 LH비스D4와의 결합에서 결정적인 역할을 수행함을 보여 주었는데, 이 영역은 LH비스D4의 거대 소수성 측쇄를 포획하기 위한 소수성 그루브를 함유하기 때문이다(도 8).

[0219] 실시예 7: LMWH-DOCA 접합체, LH비스D4의 약동학 및 생체분포 연구

[0220] 이 실시예는 도펠-표적화 분자 LH비스D4를 종양-특이적 혈관 표적화를 위해 경구적으로 투여할 수 있음을 설명한다.

[0221] 동역학적 실험을 위해, 스프라그 다우리(SD) 래트(숫컷, 체중 250-260 g)를 LMWH 및 LH비스D4에 대해 2개군(각 군에서 n = 4-5마리)으로 임의 분류하였다. 10 mg/kg의 용량으로 처리된 샘플은 라브라솔 및 폴록사머 188(BASF Aktiengesellschaft, Germany)과 혼합하여 경구적으로 투여하였다. 혈액은 약물 투여 후 15분, 30분, 및 1, 2, 3, 4, 6, 및 8시간에 회수하였다. 혈장은 4,000×g에서 20분간 원심분리에 의해 분리하였다. 혈장 내 약물의 양은 헤파린-오렌지 케모센서 키트로 측정하였다. 싱가포르 국립 대학의 루미노 지노믹스 실험실의 정양태 교수로부터 얻은, 헤파린 오렌지 케모센스 키트(Heparin Orange G26; MW 675.57)를 사용해 이전에 기술된 방법에 의해 샘플의 혈장 농도를 검출하는데 사용하였다. 간략하게, 헤파린 접합체와 반응하는 케모 센서 물질인, 헤파린 오렌지는 대개 전하-전하 상호작용인 반응 패턴을 가지며, 최종 복합체가 발광성을 방출한다.

[0222] 종양 조직에서 LH비스D4의 생체분포는 이전에 기술된 방법에 의해 SCC7-종양-보유 마우스의 개별 군(각 시점에서 n = 3-4마리)에서 수행하였다. 모든 생체분포 실험에서, 우리는 LH비스D4를 추적하기 위한 형광발광 마커를 사용하였다. 마우스는 경구 위관영양법으로 LH비스D4-Cy5.5를 투여하였다(10 mg/kg). 마우스는 사전 지정한 시점(0.5, 2, 4, 8 및 24시)에 PBS 완충액(30 mL)으로 관류하였다. 형광발광 Cy5.5는 25℃에서 48시간 동안 포름아미드와 항온반응시켜 조직에서 추출하였다. 샘플을 원심분리하고 상등액의 형광발광성의 신호 강도는 Wallac 1420 VICTOR 플레이트 판독기(Perkin-Elmer Life Sciences)를 사용하여 670 nm/720 nm의 여기/흡광으로 검출하였다. 결과는 상응하는 조직에서 단백질 수준에 정규화시켰다. 조직 자가 형광발광성은 처리된 마우스에서 개별 판독치로부터 비처리된 종양의 형광발광 신호를 빼서 교정하였다. LH비스D4의 양은 조직 그램 당으로 계산하였다. 유사하게, 마우스 혈청에서 형광발광 신호 수준은 670 nm/720 nm에서 여기/발광 판독을 사용해 상이한 시점(15분, 30분, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 및 24시간)에서 추출하였다.

[0223] 경구적으로 투여된 LH비스D4는 래트에서 9.3 ± 1.4 μ g/mL의 최대 혈장 농도를 보였다(도 9). 경구적으로 투여

시, LH비스D4의 표적화 능력은 먼저, 생체 내, 구상체-기반 혈관생성 모델에서, TEC 및 $TEC^{-/-dp1}$ 를 사용해 평가하였다. TEC 플러그에서 형광발광 신호는 경구적으로 투여된 Cy5.5-표지된 LH비스D4에 대한 $TEC^{-/-dp1}$ 플러그보다 유의하게 높았다 $TEC/TEC^{-/-dp1}$ 비율 6.5 ± 0.8 배, $p < 0.001$; 도 10 및 11).

[0224] **실시예 8: 종양을 치료하기 위한 도펠의 억제**

[0225] 이 실시예는 도펠 및 도펠-VEGFR2 축을 표적화하여 병적 혈관생성을 억제함으로써 종양을 치료하는 방법을 예시한다.

[0226] SCC7(1×10^6 세포) 세포를 C3H/HeN 마우스(숫컷, 6-7주령, $n = 6-8$, Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)의 등쪽 옆구리에 피하 접종하였다. 종양이 50-70 mm³에 도달하면, 마우스를 3주 동안 날마다 경구적으로 LH비스D4(10 mg/kg)를 처리하였다. 마우스는 종양이 2.5 cm³ 보다 큰 부피에 도달했을 때 희생시켰다.

[0227] MDA-MB-231 세포는 Balb/c 누드 마우스(숫컷, 6-7주령, $n = 6-8$, Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)에 주사하였다. LH비스D4(2.5, 5, 및 10 mg/kg)를 경구 위관 영양법으로 날마다 투여하였다.

[0228] 다른 마우스군의 경우, LH비스D4를 5 및 10 mg/kg의 용량으로 1일 2회 투여하였다. 마우스는 종양이 1.8 cm³ 보다 큰 부피에 도달할 때 희생하였다.

[0229] 다른 마우스군의 경우, 항도펠 항체를 1 mg/kg의 용량으로 4일 당 1회 투여하였다. 마우스는 종양이 3.0 cm³ 보다 큰 부피에 도달했을 때 희생시켰다.

[0230] LH비스D4의 항종양 효과가 또한 MDAMB-231 인간 유방 암종 이종이식 모델에서 관찰되었다(도 12 및 13). 결과는 LH비스D4가 10 mg/kg까지 용량-의존적 효과를 보여주었음을 시사하며, 다시 말해서, 종양 성장은 LH비스D4의 용량이 증가되는 경우에 상당한 정도로 억제되었다.

[0231] 항도펠 항체의 항종양 효과는 또한 SCC7 이종이식 모델에서 관찰되었고 종양 부피는 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다(도 14). 이들 결과는 선택적 혈관생성 억제를 얻는, 도펠 표적화의 성공을 강조한다.

[0232] **실시예 9: 항-도펠 mAb의 발생은 종양 혈관생성을 선택적으로 중지시키고, 항-혈관생성 요법의 오프-종양 효과를 제거한다.**

[0233] 면역원성 C57BL/6 마우스로부터 완전한 도펠 녹아웃(KO) 마우스 모델을 생성시켰다(Behrens A, Brandner S, Genoud N, Aguzzi A. Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. EMBO Rep. 2001;2:347-352). 마우스의 종양 성장에 대한 도펠 결실의 영향을 실험하였다. 양쪽 성별의 야행성(WT), 이형접합체($Dpl^{+/-}$) 및 동형접합체($Dpl^{-/-}$) 도펠 KO 마우스를 낳고 임의의 발생 문제없이 성장시켜서, 도펠의 부재가 임의의 선천적 손상을 일으키지 않음을 시사한다. 동계 B16F10 흑색종, EL4 흉선종, 및 CT26 결장암 세포를 WT, $Dpl^{+/-}$, 및 $Dpl^{-/-}$ KO 한배 새끼($n = 3-4$)에 접종하고, 접종 후 3주 동안 종양을 측정하였으며, 종양 부피를 계산하였다. 종양 부피 및 질량은 WT 한배 새끼와 비교하여 도펠 KO 마우스에서 유의하게 더 작았다(도 15 A-C 및 도 16 A-C 및 도 17 A-C). 유전자 용량 효과가 또한 종양 발생에서 관찰되었다: 이종접합체 $Dpl^{+/-}$ 마우스는 동형접합체 $Dpl^{-/-}$ 마우스보다 약간 큰 종양을 가졌다. 온조직-고정 면역형광발광성(IF) 염색은 WT 마우스의 종양이 대규모 혈관층을 가지지만, $Dpl^{+/-}$ 및 $Dpl^{-/-}$ KO 마우스의 종양은 혈관 네트워크가 드문 소수의 혈관을 가짐을 밝혀주었다(도 15D 및 도 16D 및 도 17D). 도펠은 $Dpl^{-/-}$ KO 마우스의 종양 혈관에서 발견되지 않았고, $Dpl^{+/-}$ KO 마우스는 WT보다 소수의 도펠-양성 종양 혈관을 나타내었다. 그러나, 마우스의 도펠 결실은 생리적 혈관생성이 관여하는 신체의 정상 상처의 치유 속도를 방해하지 않았다(도 18A, B). 6-mm-직경 상처가 종양-보유 도펠 WT 및 KO 마우스의 반대쪽 옆구리에서 생성되었다. $Dpl^{+/-}$ 및 $Dpl^{-/-}$ KO 마우스의 상처 치유 속도는 WT 한배 새끼와 다르지 않았다. WT 마우스의 상처 조직 치유에서 혈관구조의 밀도는 KO 마우스와 동일하였다. 매트릭셀-유도된 혈관구조는 WT 및 KO 마우스에서 역시 정상이었다(도 18C, D). CD31-염색은 WT 및 KO 마우스로부터 외식시킨 매트릭셀 플러그에서 균등한 혈관 네트워크 및 헤모글로빈 함량을 보였다. 따라서, 도펠의 부재는 생리적 혈관생성을 방해하지 않고 마우스의 종양 성장을 지체시킨다.

[0234] 주문 제작된 항-도펠 mAb를 얻어서 종양의 숙주-유도된 혈관에 존재하는 마우스 도펠의 인식, 시험관 내에서 도펠 기능을 차단하는 능력, 종양 성장을 중지시키는 능력에 대해 시험하였다. 선별 전략은 ELISA를 사용한 마우스

스 도펠과의 결합에 대한 스크리닝 및 웨스턴 블롯을 사용한 TEC 용해물에서 도펠 단백질을 검출하는 능력에 대한 시험을 포함한다. 6종의 독립적인 클론(7D9, 1B12, 1C8, 5C7, 4D6, 및 6F11)을 동정하였다. 6개 클론 중에서, 5C7 및 4D6은 TEC 구상체의 마우스 VEGF (mVEGF)-유도된 출아를 제거시켰다(도 20A, B). 2종의 가장 강력한 클론(5C7 및 4D6)은 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였고, 도펠/VEGFR2 신호전달에 대한 그들의 억제성 효과를 시험하였다. 정제된 5C7 및 4D6 클론은 용량 의존적으로 TEC에서 mVEGF-유도된 VEGFR2 인산화 및 TEC 구상체의 출아를 예방하였다(도 20C, D).

[0235] 이들 초기 실험은 항-도펠 mAb 클론이 도펠-매개된 혈관생성 활성을 길항함을 입증하였다.

[0236] 시험관 내 데이터를 기반으로 우리는 쥐과동물-유래된 CT26 결장암 모델에서 항종양 및 항혈관생성 효과를 연구하기 위해 클론 4D6 및 5C7을 선택하였다. 종양이 50 mm³의 평균 크기에 도달하면, 우리는 5 및 10 mg/kg의 4D6 및 5C7 mAb 클론의 정맥내 용량으로 마우스를 처리하였다. 5C7 및 4D6 mAb는 염수 및 대조군 IgG 처리군과 비교하여 종양 부피와 체중이 현저하게 퇴행하였고, 4D6은 우수한 활성을 보였다(도 19A, B 및 도 21A). 10 mg/kg의 용량을 주 1회 또는 2회 투여시, 4D6 mAb는 각각 71.1 ± 4.2% 또는 87.9 ± 3.9% 만큼 종양 성장을 감소시켰다. mAb-처리된 종양에서, 도펠-(적색) 및 CD31-양성 혈관(녹색)의 수는 염수 처리 또는 IgG-처리 종양과 비교하여 유의하게 낮아졌고(도 21B); 평균 혈관 밀도도 또한 종양 부피와 함께 감소하였다(도 21C).

[0237] 4D6 및 5C7-처리된 종양-보유 마우스를 사용한 예비 실험은 검토 및 조직학적 분석시, 체중 변화, 분명한 장기 병변이 보이지 않았고, 임상적 화학 또는 혈액학적 혈액 프로파일이 변경되지 않았다.

[0238] 4D6 mAb의 항종양 효과가 또한 HCT116 인간 결장암 마우스 이종이식에서 관찰되었다. 4D6 mAb는 종양 성장(도 19C, D), 도펠- 및 CD31-양성 종양 혈관(도 19E), 및 평균 종양 혈관 밀도를 용량 및 투약 빈도에 비례하여 억제하였다(도 19F, G).

[0239] 요약하여, 치료적 환경에서, 항-도펠 mAb 치료는 종양 진행을 제한한다.

[0240] 혈관생성 및 VEGF2 발현에 대한 도펠의 영향은 WT, Dpl^{+/-} 및 Dpl^{-/-} KO 마우스 및 4D6 항-도펠 mAb 처리된 마우스 유래의 외식된 종양 및 정상 폐에서 혈관 네트워크를 가시화하고 VEGFR2 수준을 측정하여 연구하였다. 도펠의 유전자 결실은 WT 마우스와 비교하여 Dpl^{+/-} 및 Dpl^{-/-} KO 마우스의 종양에서 VEGFR2 발현을 감소시켰지만, VEGFR2 발현은 종양-보유 마우스의 폐에서 변화되지 않았다(도 22A, B 및 도 23 및 도 24).

[0241] VEGFR2 신호전달에서 도펠의 역할을 조사하기 위해서, 도펠 유전자를 편평암(TEC-SCC7) 및 결장암(TEC-CT26) 및 도펠-형질감염된 HUVEC(Hu.dpl)에서 단리된 2종의 상이한 TEC에서 도펠 siRNA를 사용해 침묵시켰고; 스크램블드 siRNA로 형질감염된 세포를 대조군으로 사용하였다. 도펠 침묵화는 TEC-SCC7, TEC-CT26(도 22C) 및 Hu.dpl(도 25A)에서 도펠과 VEGFR2 둘 모두의 단백질 수준을 감소시켰다. 대조적으로, 도펠 침묵화는 도펠의 mRNA 수준을 감소시켰지만(도 22D 및 도 25B), 이들 세포에서 VEGFR2 mRNA 수준을 변화시키지 않았다(도 22E 및 도 25C). VEGFR2의 mRNA 수준이 아닌 단백질 수준이 도펠-침묵화 EC에서 변화하였다는 관찰을 기반으로, 도펠이 VEGFR2의 세포 표면 체류를 확대 및 안정화시키고 VEGF에 대해 보다 반응성있게 만든다고 가정하였다.

[0242] VEGF는 VEGFR2 내재화를 촉발하고 EC 표면 상에서 신호전달 클러스터를 재배열시킨다. 따라서, HUVEC 및 Hu.dpl 세포에서 VEGFR2의 막분포는 VEGF로 세포를 자극하여 평가하였다. 세포의 표면 수용체를 설포-NHS-바이오틴으로 표지화하고, 세포를 용해시키고, 스트렙타비딘-접합된 자성 비드로 용해물을 침전시키고, 항-VEGFR2 및 항-도펠 항체를 사용한 면역블롯으로 침전물을 분석하였다. VEGF-자극된 HUVEC은 VEGF-자극된 Hu.dpl 세포에서 보다 VEGFR2를 더 내재화시켰고(도 22F); 수용체 내재화는 표면 도펠 양에 비례하였다. FACS 분석으로 결정시, Hu.dpl 세포에서 보다 더 빠른 속도로, HUVEC 내재화된 VEGFR2는 VEGF 자극에 기인하였다(도 22G 및 도 26A). VEGF의 짧은 노출은 막으로부터 VEGFR2를 고갈시켰고 HUVEC의 세포내 수용체 풀을 증가시켰지만, VEGFR2의 막 함량은 VEGF 존재 또는 부재 하에서 Hu.dpl과 유사하였다(도 26B). 총 VEGFR2는 VEGF 농도 증가에 의해 Hu.dpl에서 변경되지 않았다(도 26C).

[0243] VEGF 부재 하에서 VEGFR2 이량체화에 대한 도펠의 효과를 조사하였다. 동소발생 근위 결찰 검정법(PLA)을 사용해 온전한 세포에서 VEGFR2 동종이량체/클러스터를 확인하였다(도 22G, H). Hu.dpl 세포는 HUVEC 보다 더 높은 VEGFR2 동종이량체를 가졌고, VEGFR2 이량체화/클러스터링은 도펠 siRNA 또는 5C7 항-도펠 mAb 처리 후에 심각하게 약화되었다(도 22G, H). 웨스턴 블롯을 사용하여 VEGFR2 단량체-이량체 간 역학을 관찰하였다(도 28A). HUVEC에서, 두드러진 125 kDa 및 상대적으로 더 약한 250 kDa 밴드가 각각 VEGFR2 단량체 및 이량체로서 나타났다. Hu.dpl 세포에서, VEGFR2는 면역블롯시 250 kDa 밴드에서 검출되었다. 그러나, 도펠 siRNA 또는 5C7 항-도

펠 mAb를 처리한 Hu.dp1 세포에서 밴드는 125 kDa에서 나타나서(도 28B), VEGFR2가 도펠 존재 하에 이량체화/클러스터링을 촉진함을 시사한다.

[0244] 부응하여, 동일한 VEGF 농도는 HUVEC에서 VEGFR2의 총 수준을 용량 의존적으로 감소시켰다. VEGF의 상승 농도로 자극시, Hu.dp1 세포에서 VEGFR2의 인산화는 HUVEC에서 훨씬 컸다(도 28C). 따라서, 도펠은 VEGFR2 분포를 제어하고, 세포 표면 상에서 VEGFR2의 높은 수준을 유지하며, VEGFR2 신호전달을 촉진시키고 지속시킨다.

[0245] 종양 혈관생성에서 도펠의 역할을 cDNA 형질감염을 사용해 도펠을 재발현시키거나 또는 재조합 도펠(rDP1) 단백질을 처리하는 것을 포함하는 구체 모델에서 평가하였다. 인간 피부 미세혈관 내피 세포(HDMEC)는 이들 실험을 위해 형질감염시켰다. VEGF-매개된 VEGFR2 인산화, 세포의 증식, 및 HDMEC 구상체의 출아가 모의 실험군 또는 대조군 세포와 비교하여 도펠 cDNA-형질감염된 세포에서 상당히 증가되었다(도 29A-D). 도펠 cDNA-형질감염 및 rDP1-처리된 세포를 사용한 공동-면역침전 실험은 VEGFR2 및 도펠 또는 VEGFR2 및 rDP1 간 물리적 상호작용을 보여주었다(도 30A). rDP1의 존재 하에서, VEGF는 강건하고 용량 의존적으로 VEGFR2 인산화를 증가시켰다(도 30B). 유사한 현상이 도펠 형질감염된 HDMEC 및 Hu.dp1에서 관찰되었다. 이들 시험관 내 실험은 가용성 rDP1이 막 결합된 도펠로서 작용하고 혈관생성을 유도하는데 도움을 줄을 시사한다.

[0246] 이러한 가설을 시험하기 위해서, HUVEC 구상체를 rDP1 존재 또는 부재 하에 VEGF로 처리하였다. VEGF는 HUVEC 구상체 출아를 촉진하였고, 출아는 상이한 농도의 rDP1로 공동처리시에 그리고 Hu.dp1 구상체에서 증가하였다(도 27A).

[0247] 입증된 프로토콜에 따라서 생체 내에서 HUVEC 구상체를 도펠 및 VEGF 존재 하에 매트릭셀-피브린 겔에서 이식시켰고(Alajati *et al.*, *Nat Methods*. 5:439-445 (2008) and Laib *et al.*, *Nat Protoc*. 4:1202-1215 (2009)), Hu.dp1 구상체를 사용해 비교하였다. HUVEC 구상체는 VEGF 및 rDP1 부재 하에서 이식 1주 후에 임의의 혈관 네트워크를 성장시키는데 실패하였고, VEGF의 존재는 혈관 형성을 자극하였다(도 27B). 대조적으로, VEGF 및 rDP1의 존재는 매트릭셀-피브린 겔에서 완전하게 살포된 혈관층을 생성시켰다. 살포된 혈관의 지시자인, VEGF 및 rDP1-처리된 HUVEC 구상체의 헤모글로빈 함량은 대조군 및 VEGF-처리된 구상체보다 더 높았고 Hu.dp1 구상체와 유사하였다(도 27C). 이들 발견은 rDP1이 종양에서 혈관생성을 강화시킴을 뒷받침한다.

[0248] 혈관생성 및 종양이 성장을 구체하기 위해서, Dp1^{+/-} KO 마우스를 EL4 종양 접종 후 4일째, rDP1의 1 mg/kg의 rDP1의 정맥내 주사로 3회 처리하였다. EL4 세포를 또한 Dp1^{+/-} KO 마우스에서 50 μ l의 매트릭셀과 혼합물로 1 내지 10 μ g의 rDP1을 접종하고, 10일간 성장시켰다. rDP1 혼합물은 Dp1^{+/-} KO 마우스에서 종양의 성장을 용량 의존적으로 구체하였고, 종양 크기 및 무게는 10 μ g의 rDP1-혼합 및 WT 대조군 한배 새끼 또는 1 μ g의 rDP1-혼합 및 정맥내 rDP1-처리된 마우스 간에 유사하였다(도 27D-F). 종양 조직에서, 정맥내 주사된 rDP1은 농축되어 VEGFR2- 및 CD31-양성 혈관과 공동국재하였다(도 30). 이들 데이터는 도펠의 프로혈관생성 효과가 생체내에서 명확하고 개선된 종양 성장과 상응함을 입증하였다.

[0249] 티로신 키나제 수용체의 공간 분포를 제어하는 대부분의 조절인자는 발생 및 종양 혈관생성, 전이 또는 치료 반응에 대한 내성 기전에서 균등하게 중요하다. 이 실험은 종양 혈관생성의 선택적인 제어를 위한 VEGFR2 트래피킹 및 신호전달의 핵심 공동자로서 도펠-VEGFR2 상호작용을 확인하였다. 이론에 한정되는 것을 원치 않지만, 우리는 도펠이 '온' 모드를 향해서 혈관생성 균형을 기울게 하고, VEGFR2의 세포 표면 체류를 지연시키며, VEGF-신호전달을 계속하도록 돕는다고 믿는다. 도펠의 유전자 삭제 및 약학적 억제는 종양에서 VEGF/VEGFR2-신호전달을 억제하고, TEC에서 VEGFR2 발현을 감소시키며, 종양 혈관 성장을 지체시키고, 종양을 수축시키지만, 정상 세포에서 VEGF-기능성은 보존한다. 이들 데이터는 도펠이 프로-혈관생성 인자이고 도펠-표적화 분자 예컨대 항-도펠 mAb가 실용적인 항혈관생성제라는 중심 가정을 뒷받침한다. 다시, 이론에 한정되지 않지만, 본원에 기술된 신규한 항-도펠 mAb를 포함하여, 도펠-표적화 분자는 정상(비병적) 생리적 혈관생성에서 역할이 알려지지 않은, 도펠을 차단하는 것으로 여겨진다.

[0250] **실시예 10: 에피토프 맵핑 및 항체 특성**

[0251] 소정 항체의 에피토프 결합 부위를 결정하는 방법은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 다음의 방법론을 적용하여 항도펠 항체를 특징규명할 수 있다:

[0252] 도펠의 다양한 펩티드 단편을 생성시켰다. 예를 들어, C 말단 또는 N 말단부터 도펠을 순차적으로 단축하여 획득된 적절한 길이를 갖는 일련의 폴리펩티드를 생성시켰다. 이후, 이들 폴리펩티드에 대항하는 항체의 결합 친화성을 조사하였고 인식 부위를 대략적으로 결정하였다. 다음으로, 일련의 보다 짧은 펩티드 단편을

생성시키고, 이들 펩티드에 대항하는 항체의 결합 친화성을 조사하여, 에피토프를 결정할 수 있었다.

[0253] 제2 항도펩 항체의 결합 친화성을 제1 항체와 비교할 수 있었다. 예를 들어, 제2 항체가 제1 항도펩 항체가 결합하는 도펩의 펩티드 단편에 결합하면, 제1 항체 및 제2 항체가 동일한 에피토프를 인식한다는 것을 결정할 수 있었다. 추가적으로 또는 대안적으로, 제2 항도펩 항체가 도펩과의 결합에 대해 제1 항도펩 항체와 경쟁하면(즉, 제2 항체가 도펩과 제1 항체 간 결합을 억제하면), 제1 항체 및 제2 항체는 특이적 에피토프 서열이 결정되지 않았더라도 제1 항체 및 제2 항체가 동일한 에피토프(또는 중복 에피토프)를 인식한다는 것을 결정할 수 있었다. 대체로, 제1 항체가 특별한 효과 예컨대 항원 중화 활성을 갖고, 제1 항체 및 제2 항체가 동일한 에피토프에 결합하면, 제2 항체는 동일한 활성을 가질 것으로 예측할 수 있었다.

[0255] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단

[0256] 수탁번호 : KCLRFBP00382

[0257] 수탁일자 : 20161123

[0259] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단

[0260] 수탁번호 : KCLRFBP00383

[0261] 수탁일자 : 20161123

[0263] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단

[0264] 수탁번호 : KCLRFBP00384

[0265] 수탁일자 : 20161123

[0267] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단

[0268] 수탁번호 : KCLRFBP00385

[0269] 수탁일자 : 20161123

[0271] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단

[0272] 수탁번호 : KCLRFBP00386

[0273] 수탁일자 : 20161123

[0275] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단

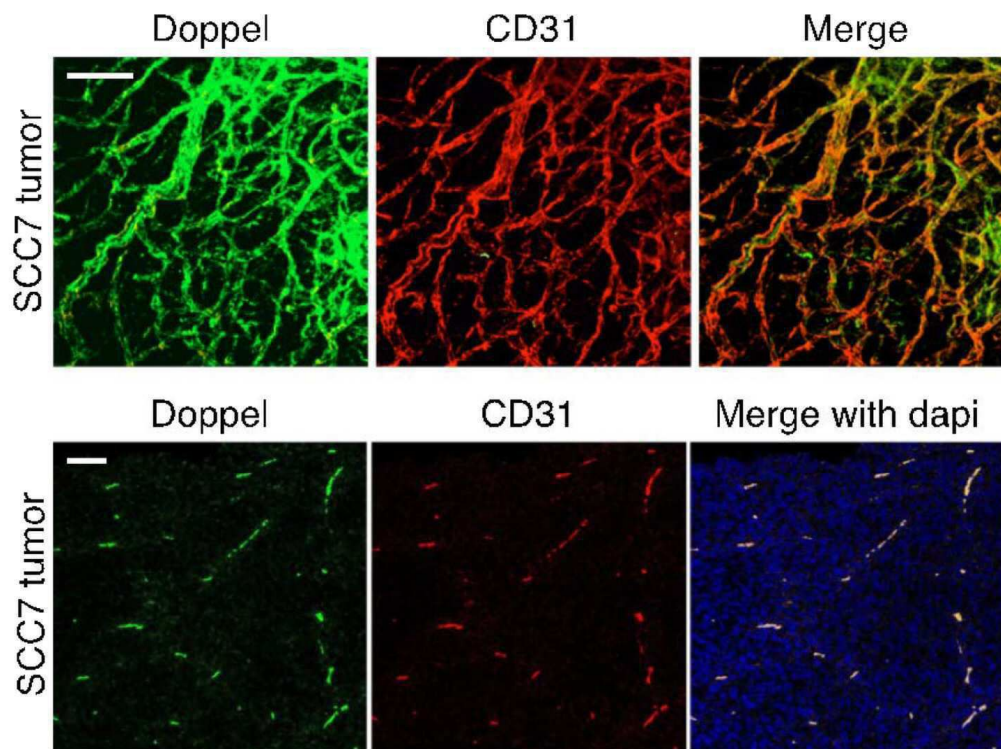
[0276] 수탁번호 : KCLRFBP00387

[0277] 수탁일자 : 20161123

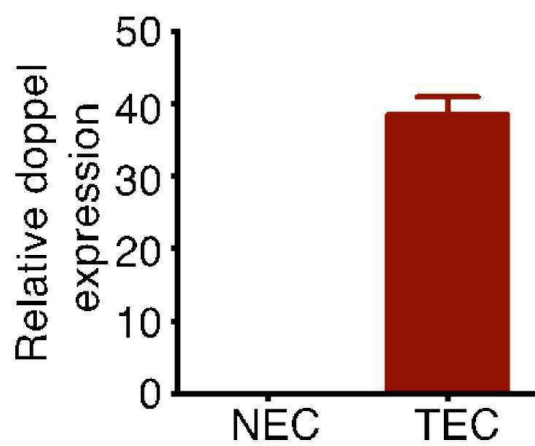
[0278]

도면

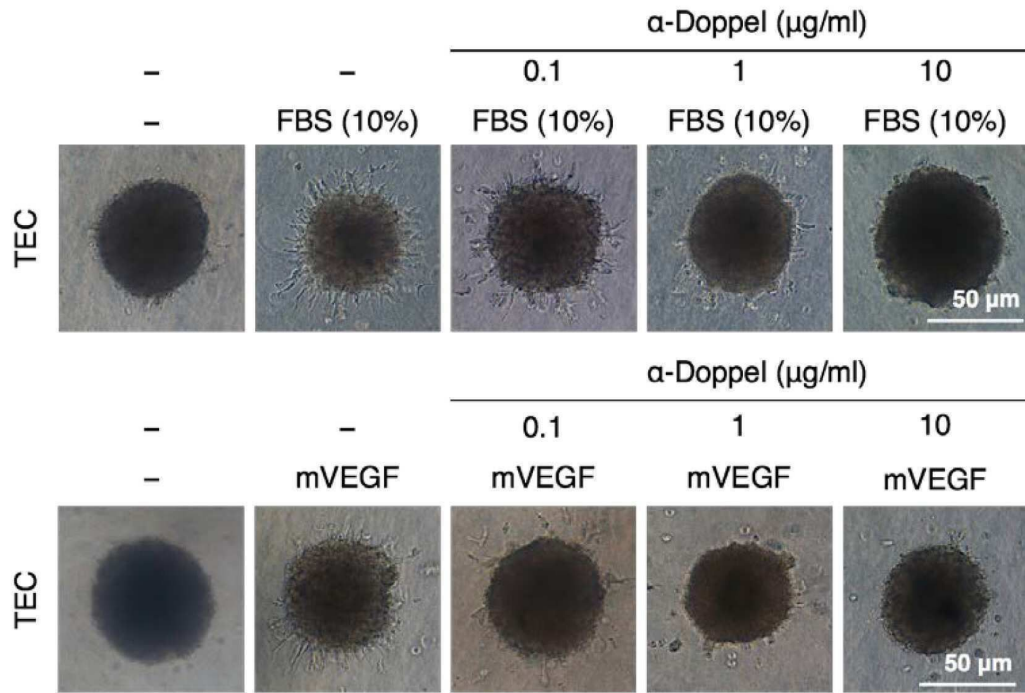
도면1



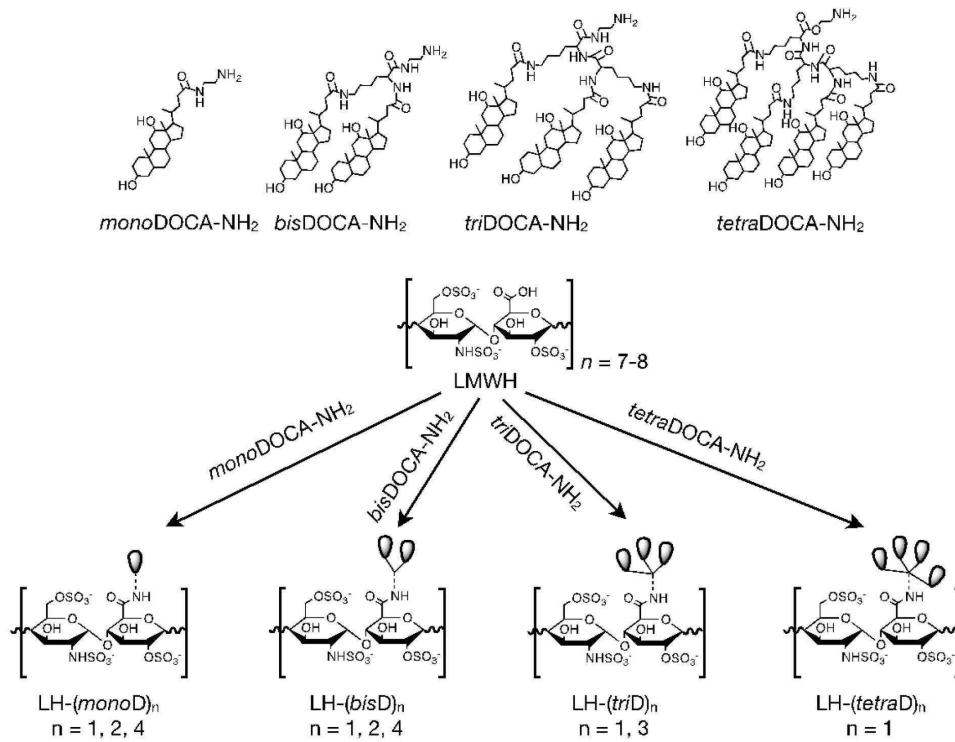
도면2



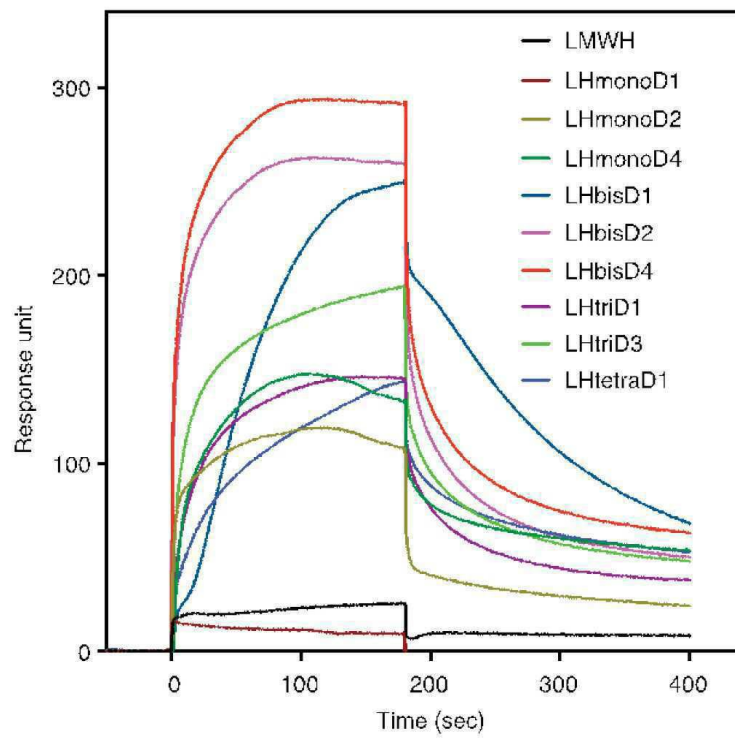
도면3



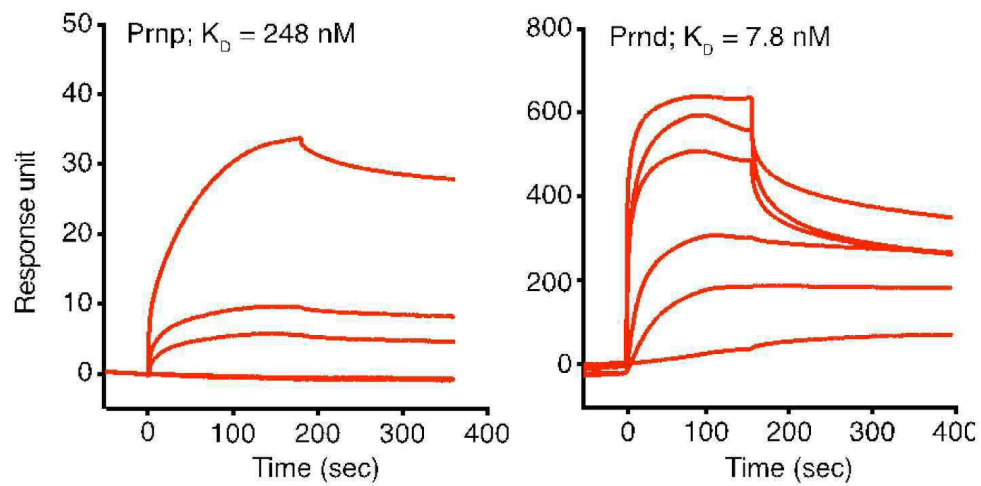
도면4



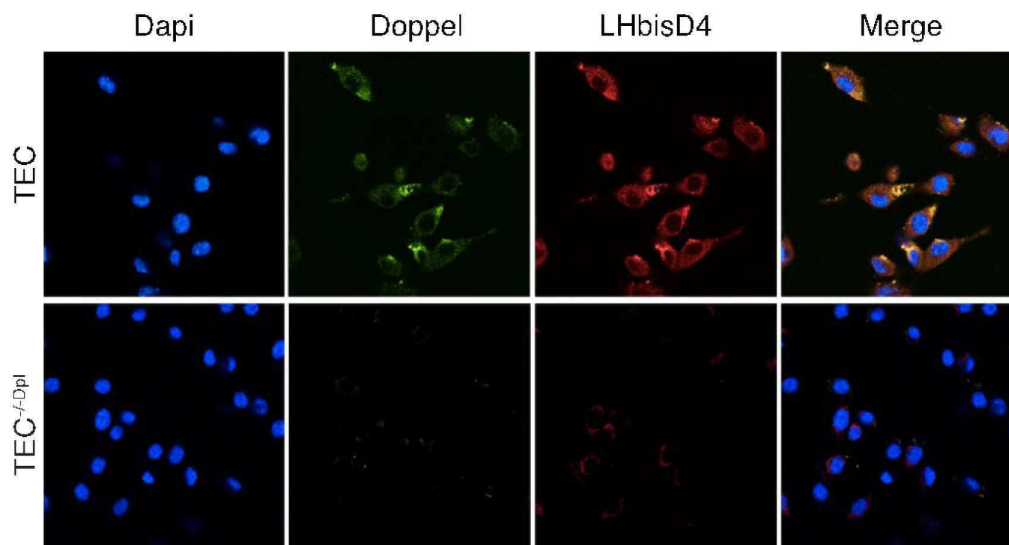
도면5



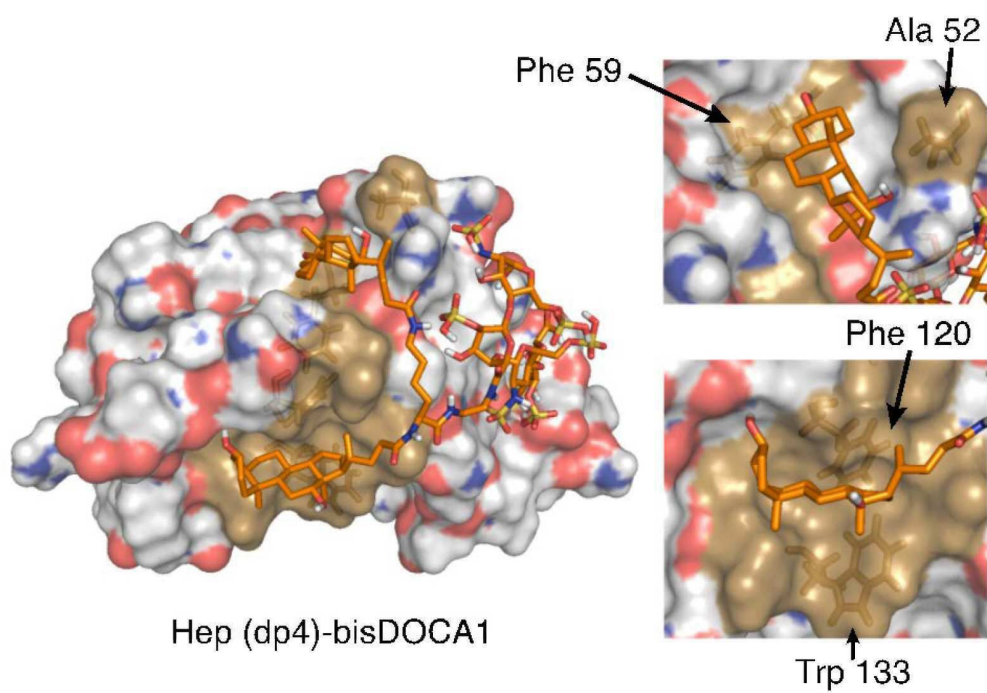
도면6



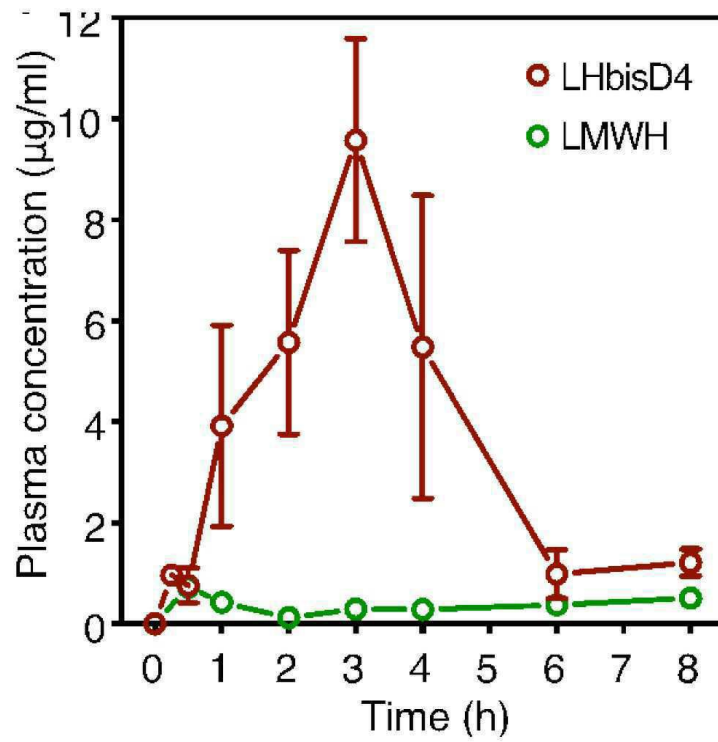
도면7



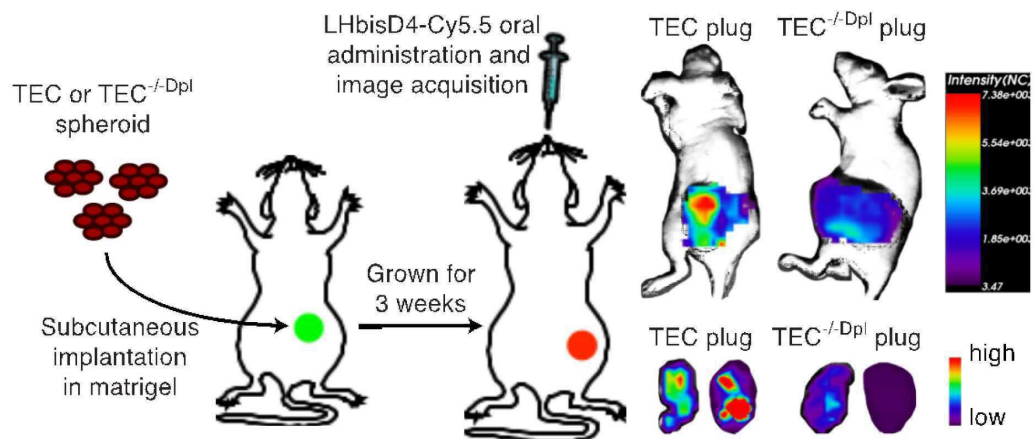
도면8



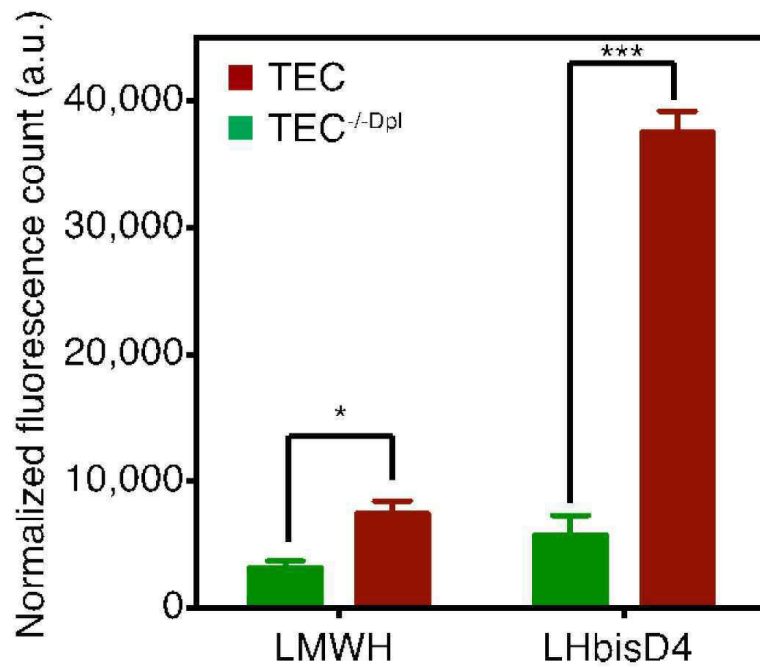
도면9



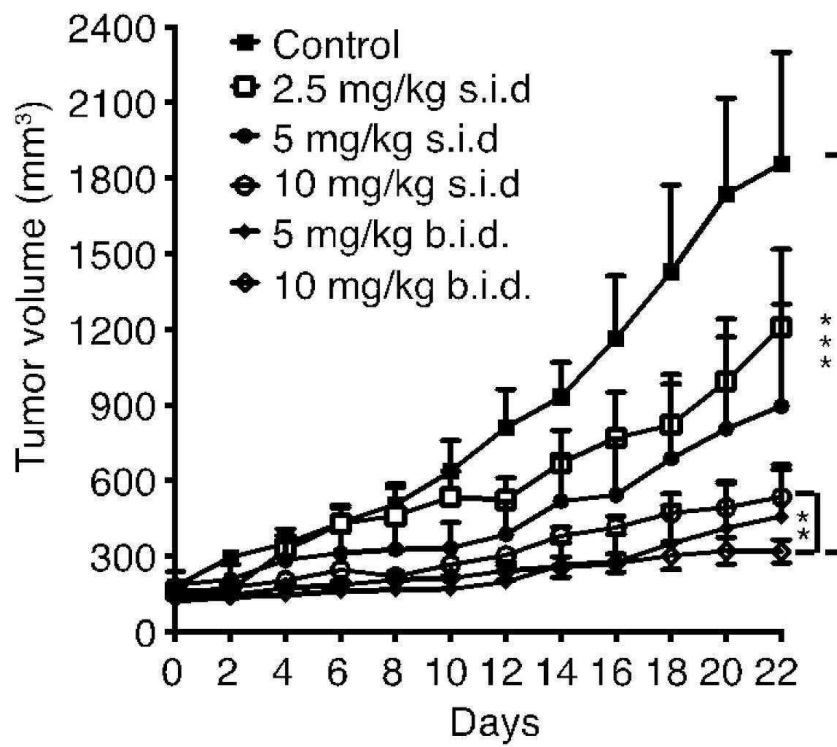
도면10



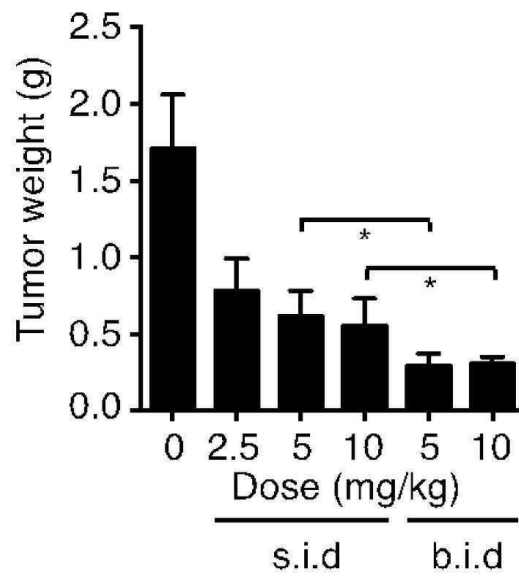
도면11



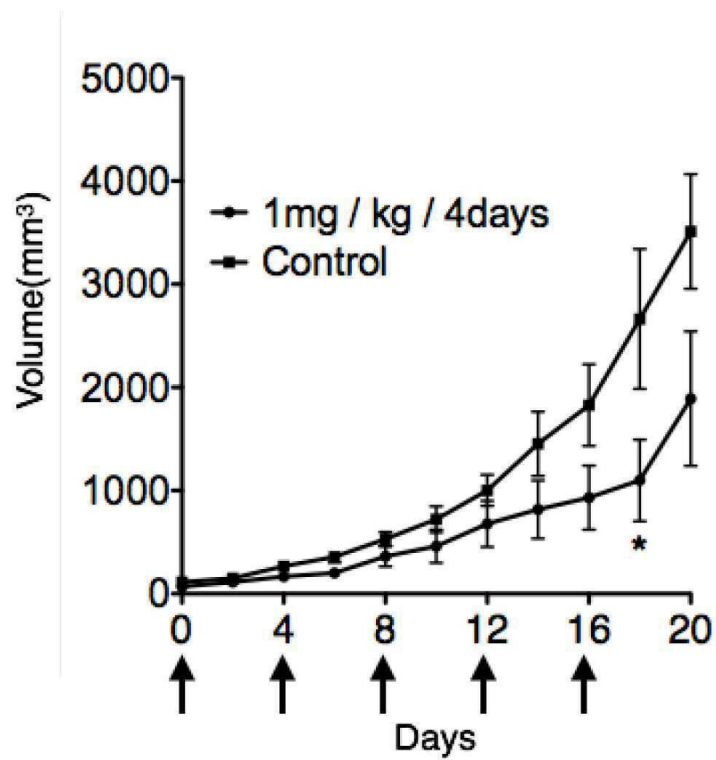
도면12



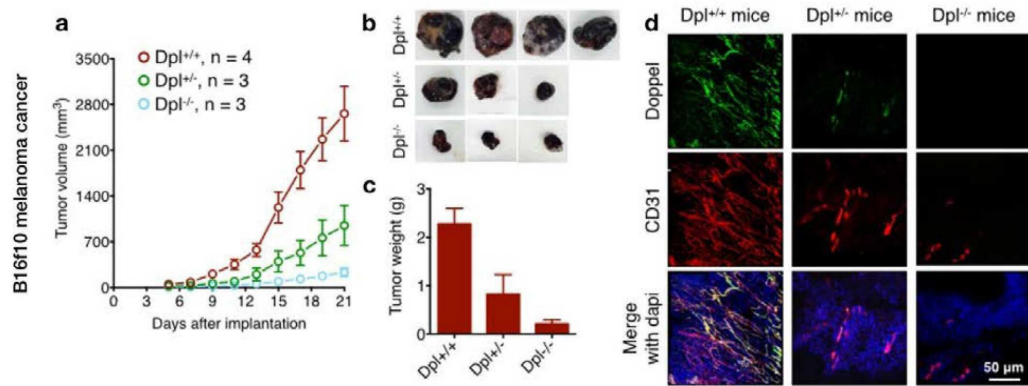
도면13



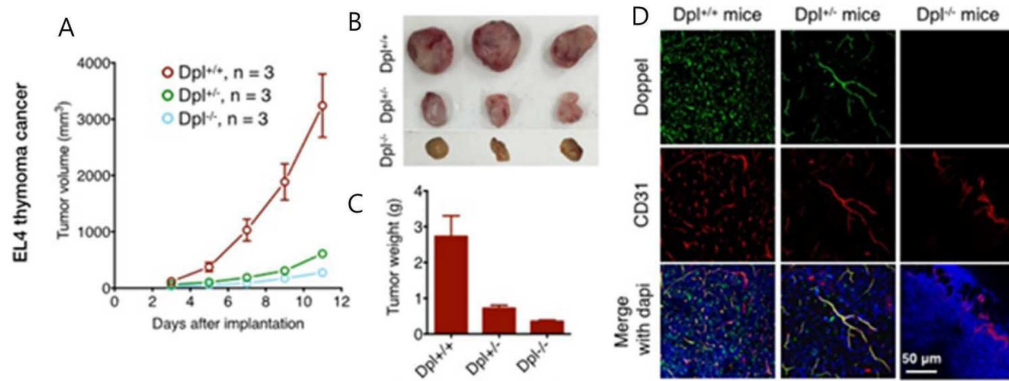
도면14



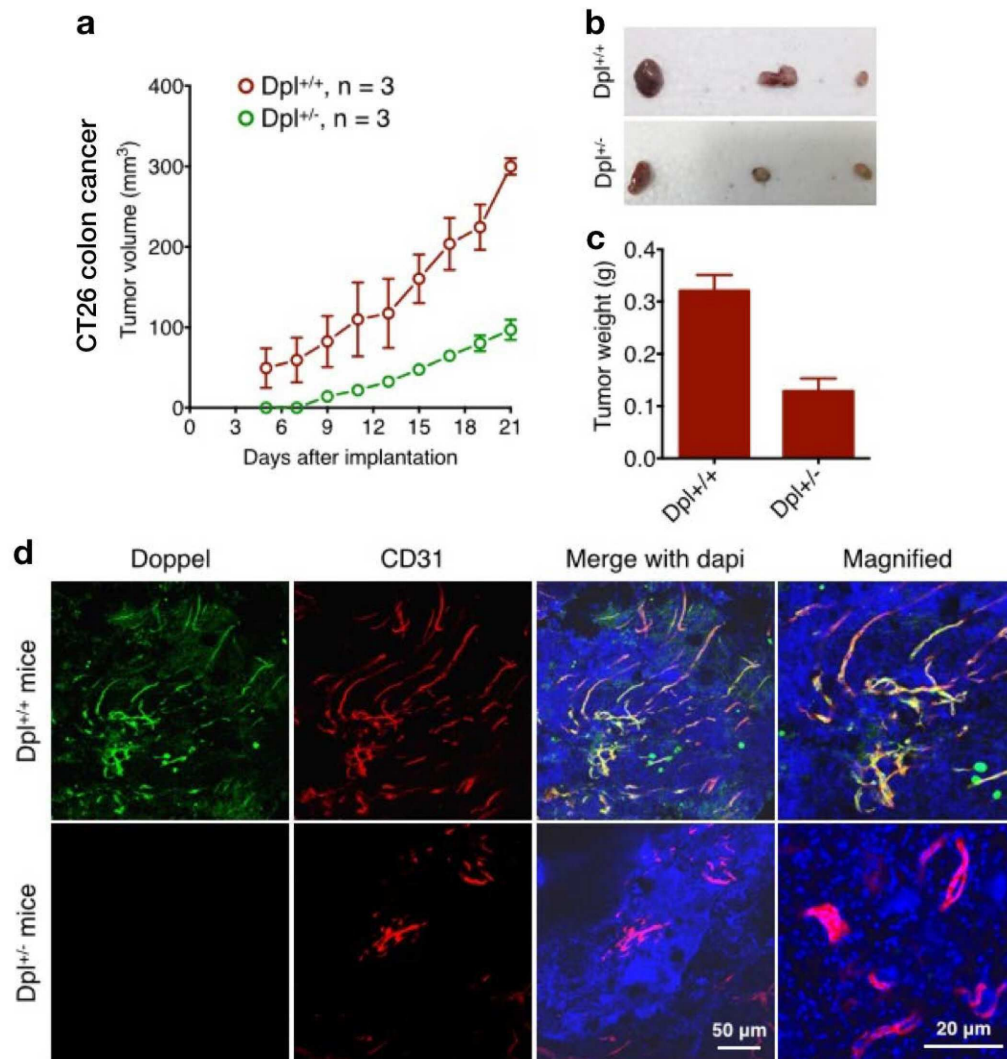
도면15



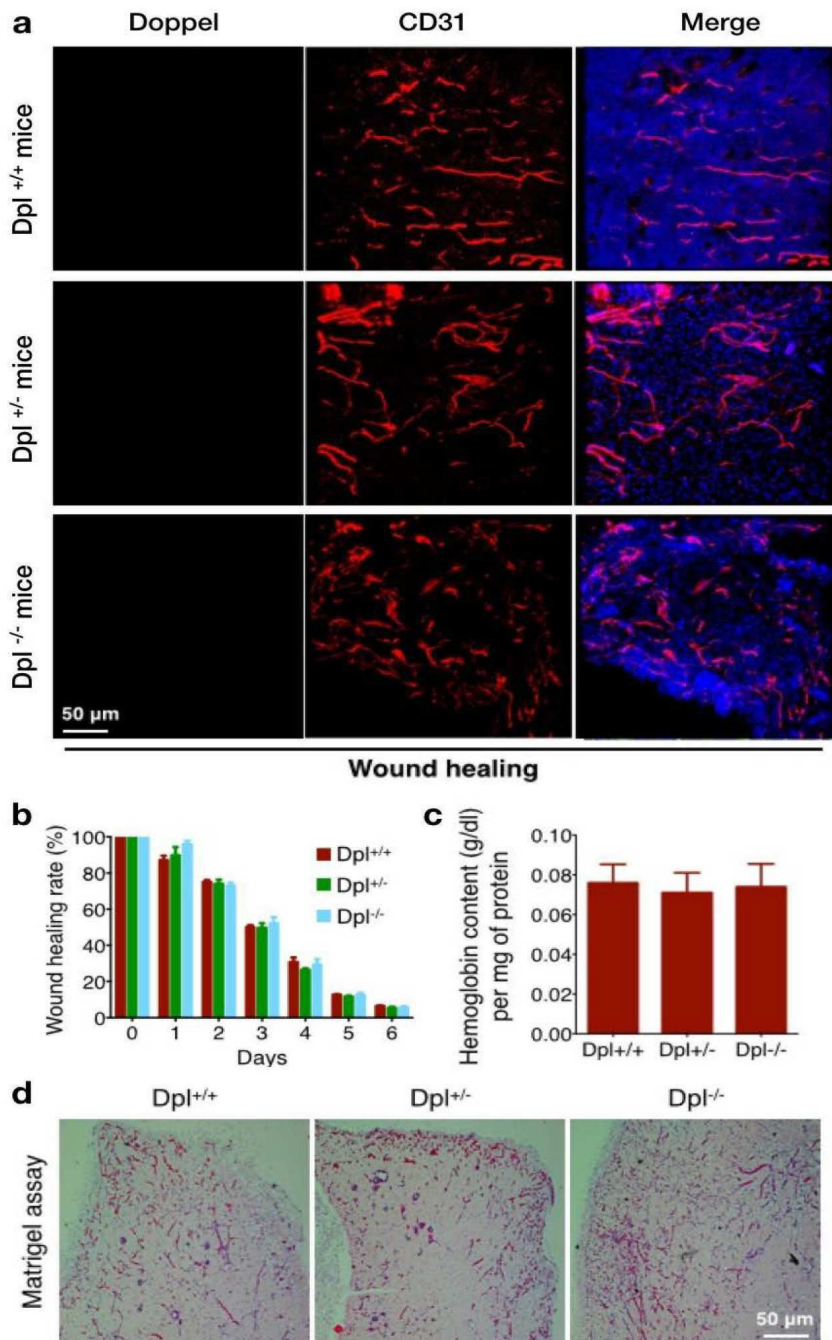
도면16



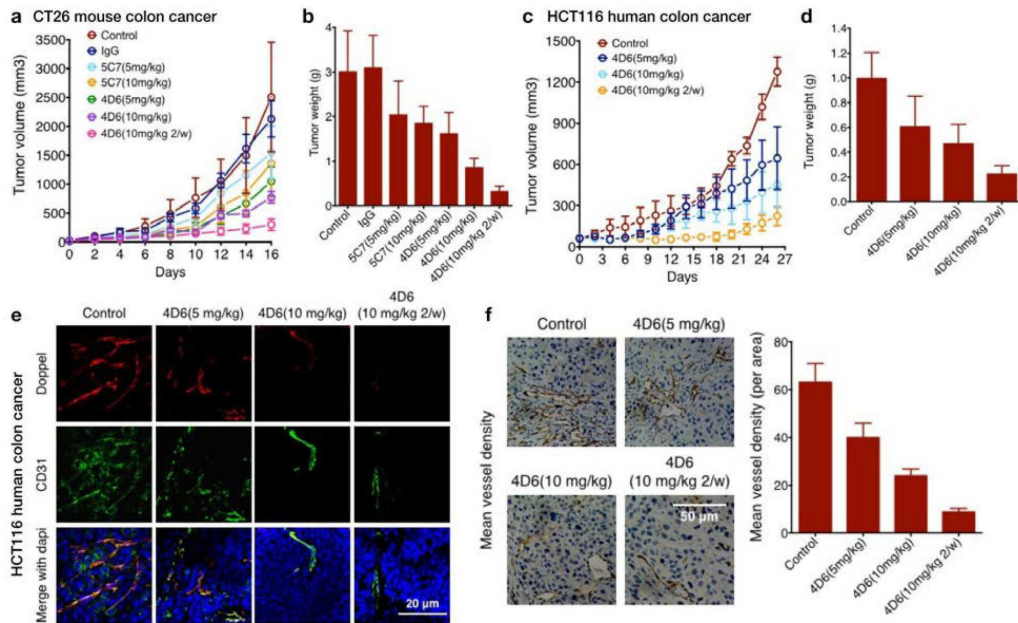
도면17



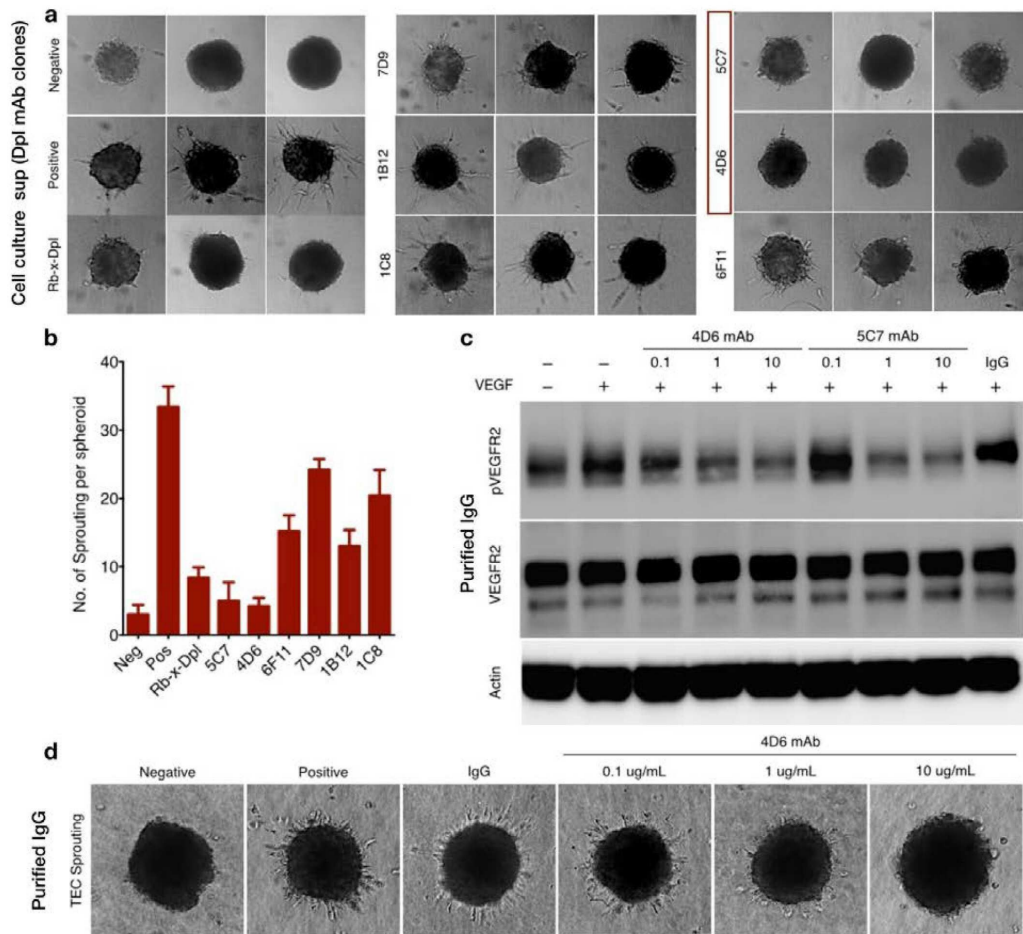
도면18



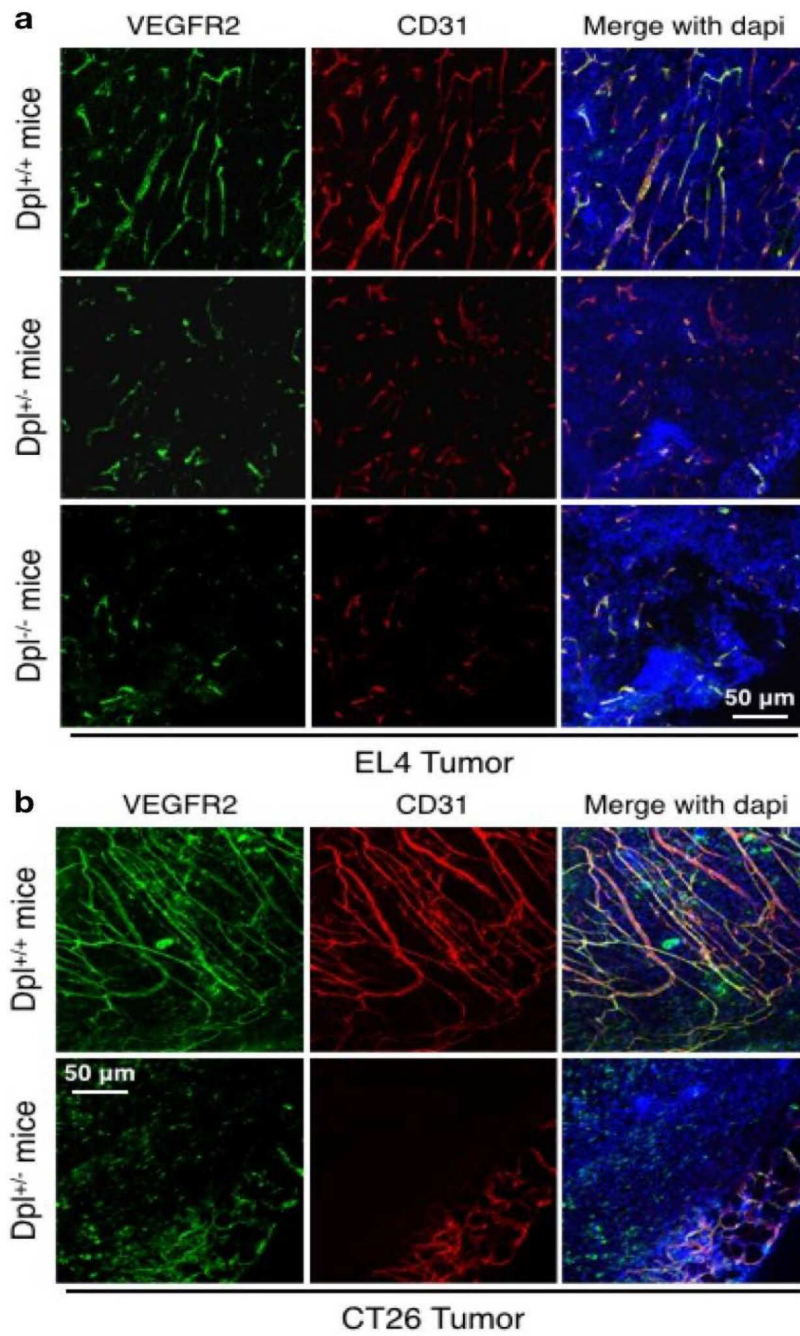
도면19



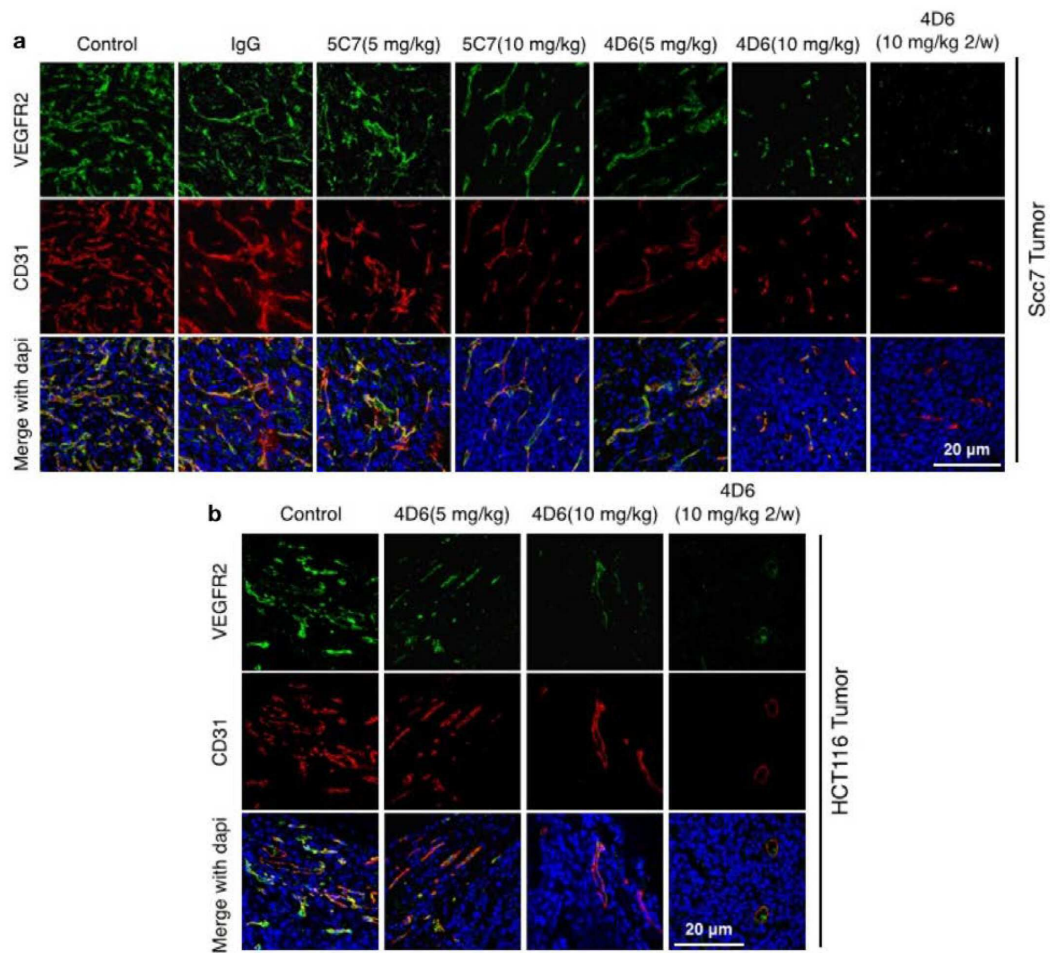
도면20



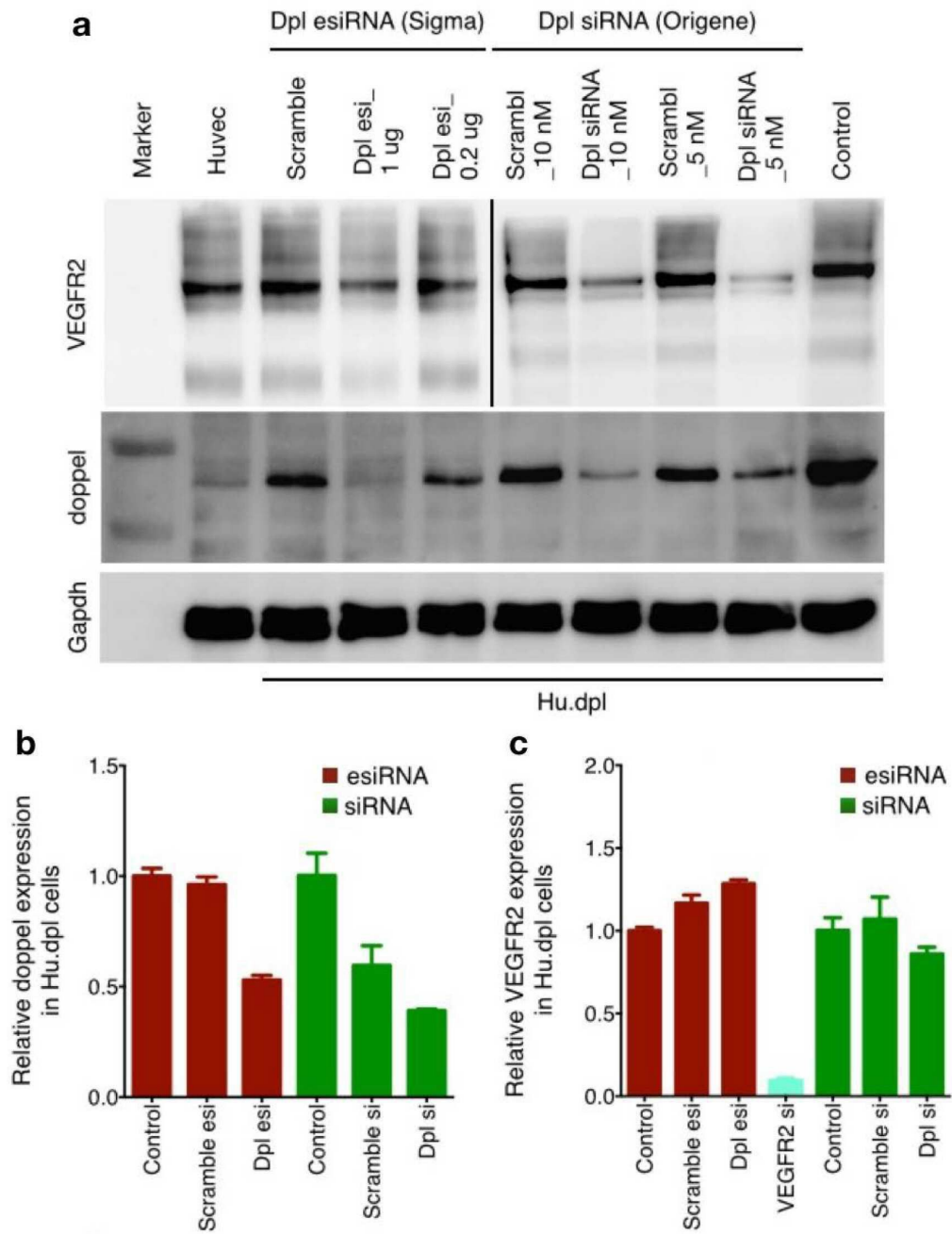
도면23



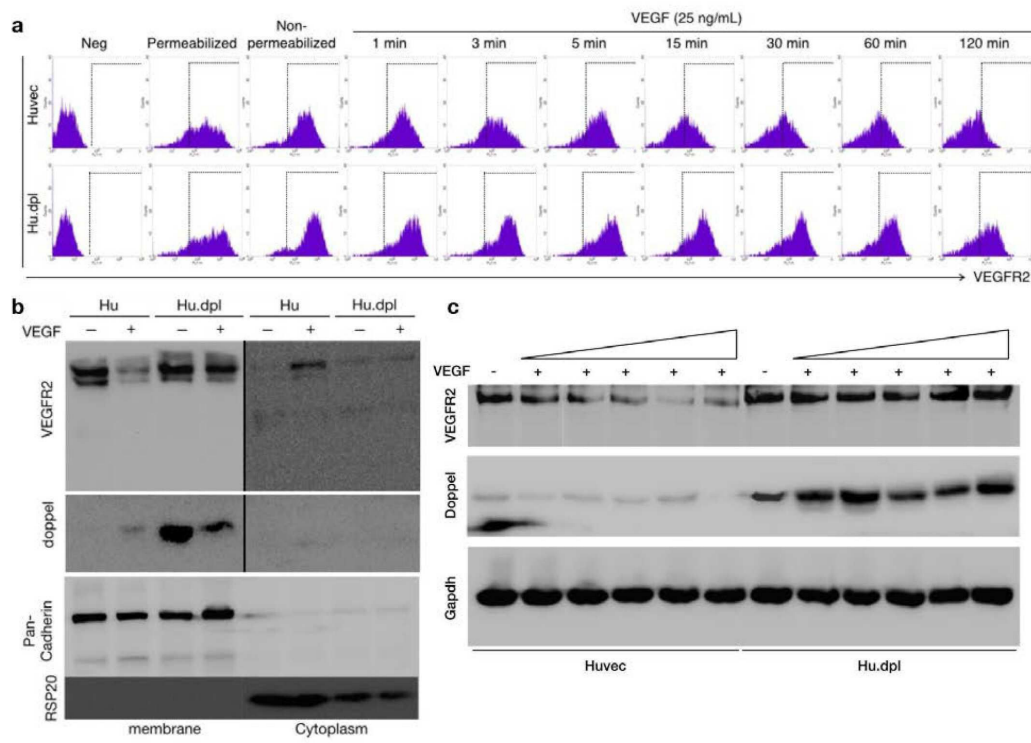
도면24



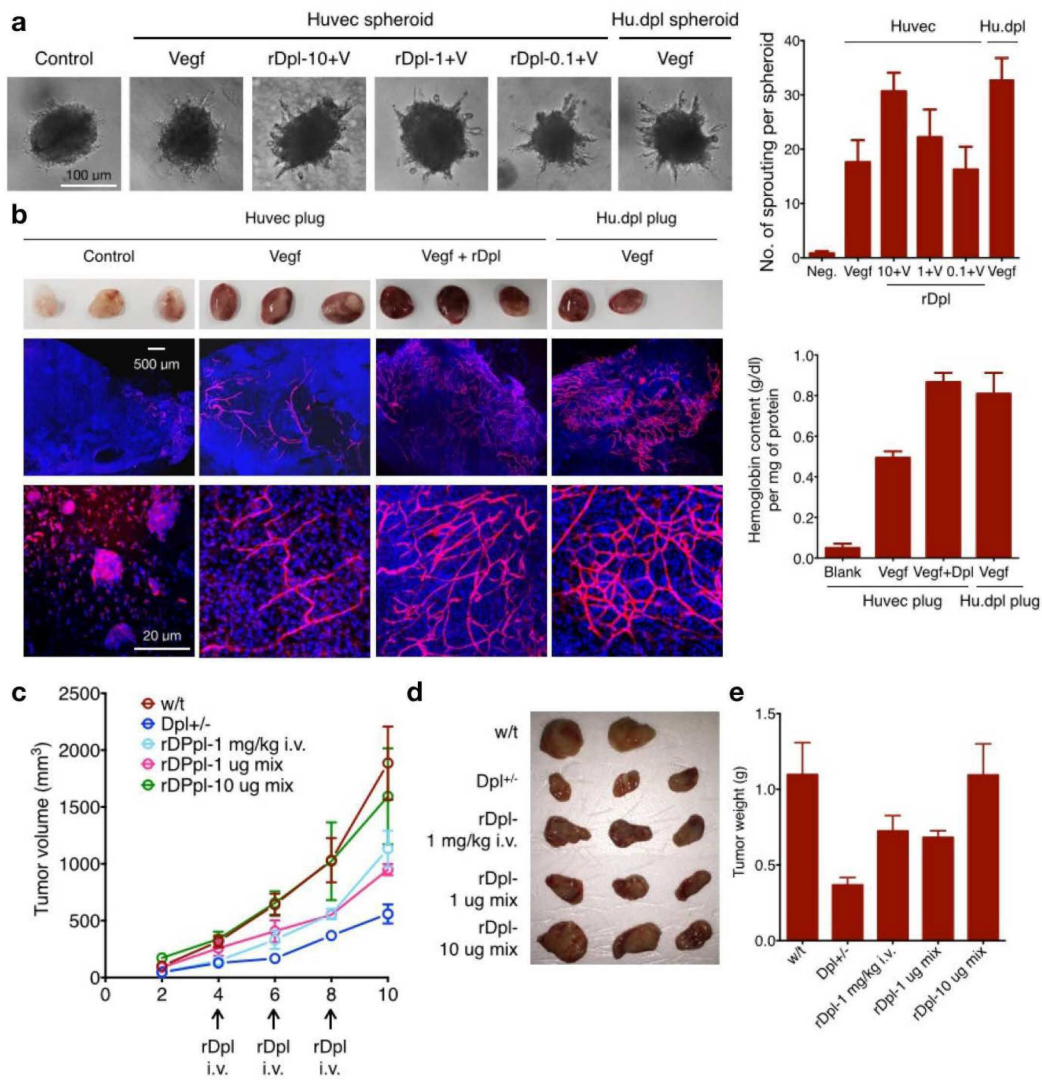
도면25



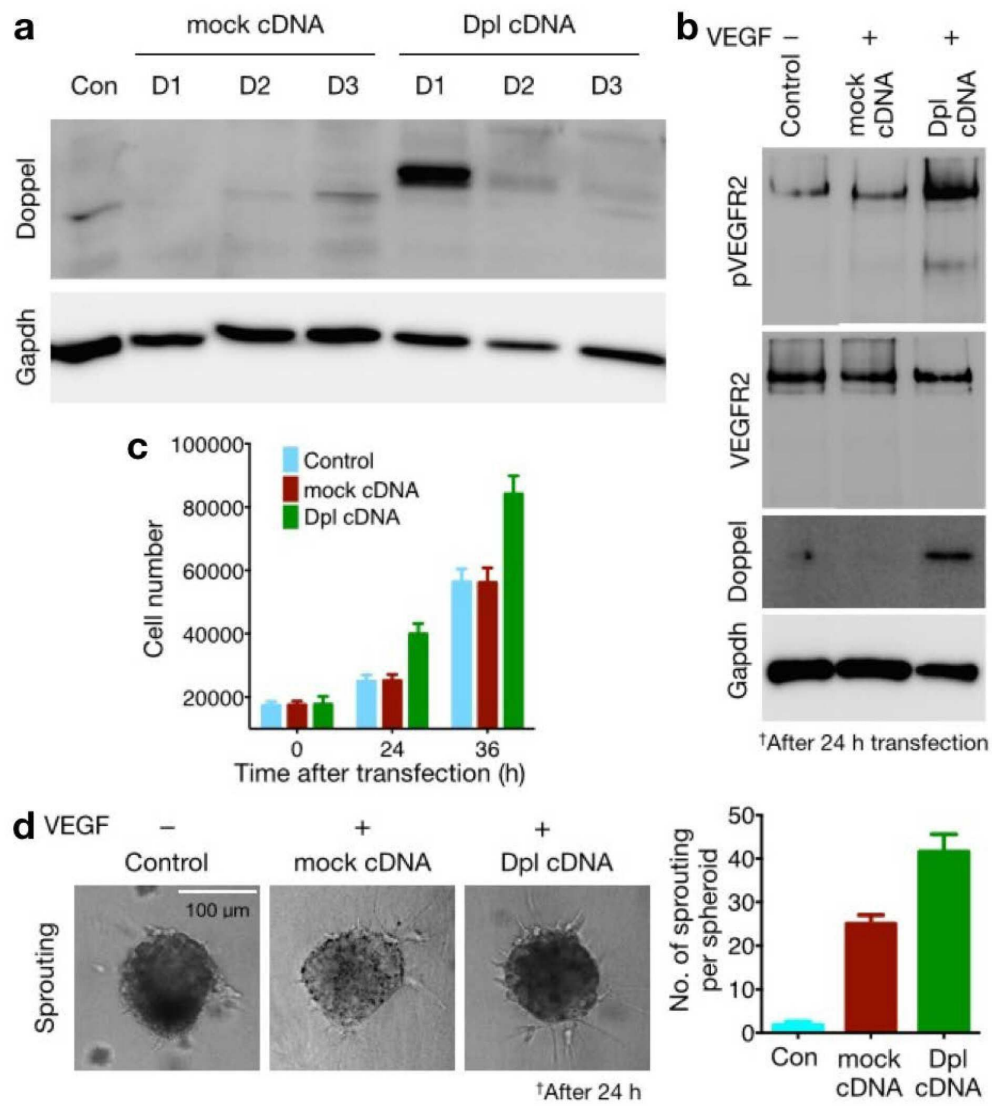
도면26



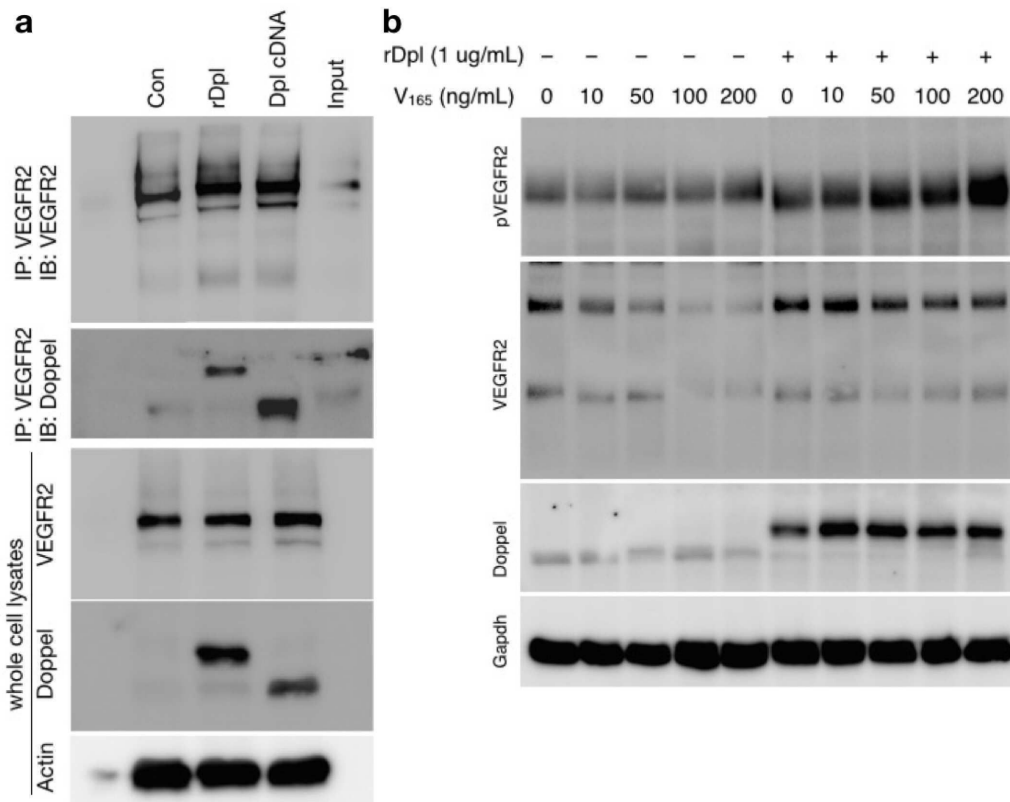
도면27



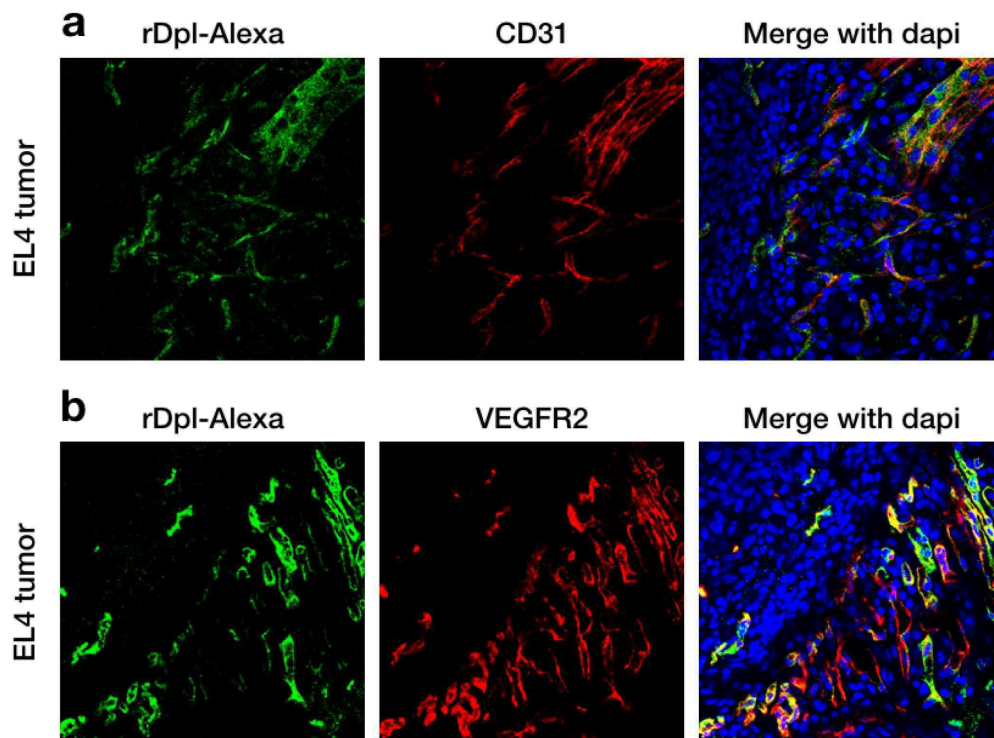
도면28



도면29



도면30



도면31

A)

MKNRLGTWWV AILCMLASH LSTVKARGIK HRFKWNKVL PSSGGQITEAR VAENRPGAF IKQGRKLDID
FGAEGNRYA ANYWQFPDGI YYEGCSEANV TKEMLVTSV NATQAANQAE FSREKQDSKL HQRVLWRLIK
EICSAKHCDL WLERGAALRV AVDQPMVCL LGFVWFIVKL EHHHHHH (SEQ ID NO: 9)

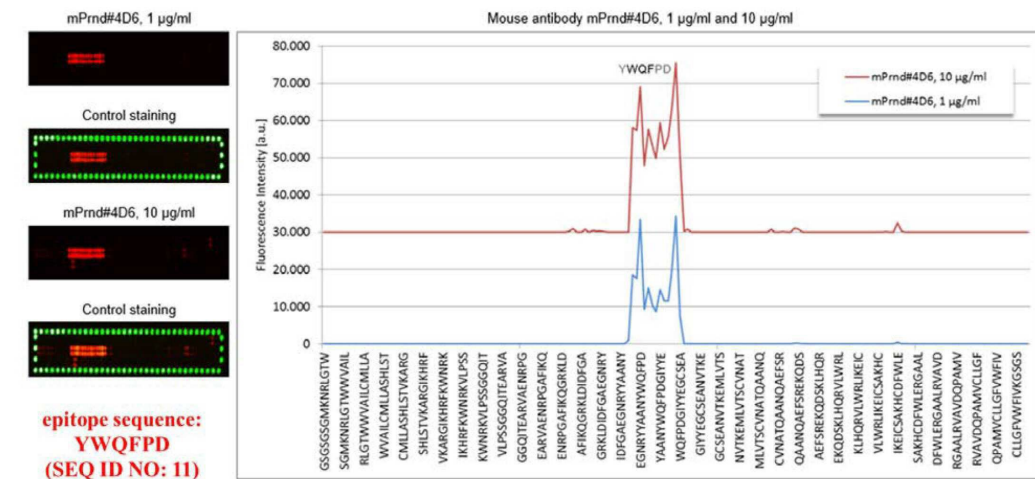
B)

RGIKHRFKWN RKVLPSSGGQ ITEARVAENR PGAFIKQGRK LDIDFGAEGN RYAAANYWQF PDGIYYEGCS
EANTVKEMLV TSCVNATQAA NQAEFSREKQ DSKLHQRVLW RLIEICSAK HCDFWLERGA ALRVAVDQPA
MVCLLGFWVF IVKLEHHHHH H (SEQ ID NO: 10)

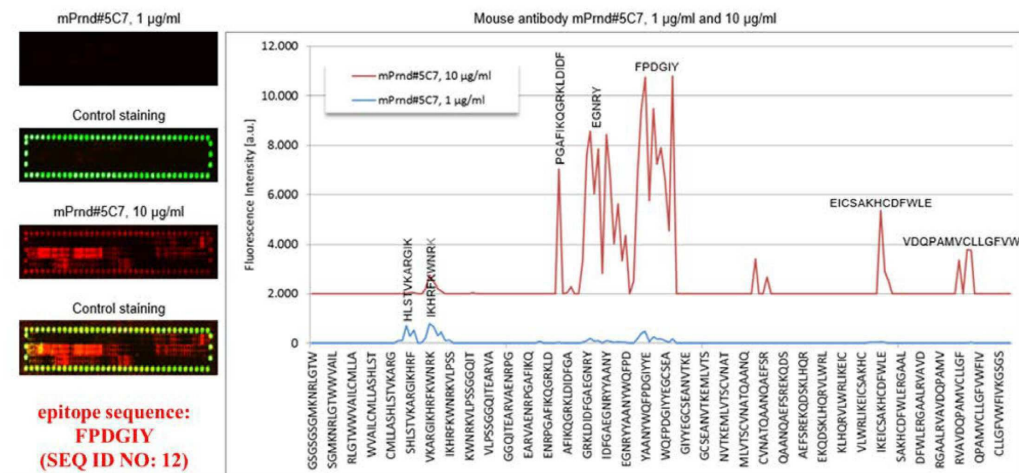
C)



도면32



도면33



서열 목록

<110> SNU R&DB Foundation

<120> METHODS OF INHIBITING PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS WITH
DOPPEL-TARGETING MOLECULES

<130> 17P1141

<160> 61

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

ggacatcgac tttggagcag ag 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 2

cagcatctcc ttggtcacgt tg 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 3

gatggcatcc actacaacgg ct 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

gttgtctggc ttctggaact cc 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 5
 gccttcaaga ctctgttcgt gg 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 6
 ctcgatgaag gcataaccac gg 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 7
 tcaagactct cttcgtggcg ag 22

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 8
 ggctttcctg accgcttact gt 22

<210> 9
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Included Signal peptide
 <400> 9
 Met Lys Asn Arg Leu Gly Thr Trp Trp Val Ala Ile Leu Cys Met Leu

1 5 10 15
 Leu Ala Ser His Leu Ser Thr Val Lys Ala Arg Gly Ile Lys His Arg
 20 25 30
 Phe Lys Trp Asn Arg Lys Val Leu Pro Ser Ser Gly Gly Gln Ile Thr
 35 40 45
 Glu Ala Arg Val Ala Glu Asn Arg Pro Gly Ala Phe Ile Lys Gln Gly

 50 55 60
 Arg Lys Leu Asp Ile Asp Phe Gly Ala Glu Gly Asn Arg Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Ala Asn Tyr Trp Gln Phe Pro Asp Gly Ile Tyr Tyr Glu Gly Cys Ser
 85 90 95
 Glu Ala Asn Val Thr Lys Glu Met Leu Val Thr Ser Cys Val Asn Ala
 100 105 110
 Thr Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Phe Ser Arg Glu Lys Gln Asp Ser
 115 120 125

 Lys Leu His Gln Arg Val Leu Trp Arg Leu Ile Lys Glu Ile Cys Ser
 130 135 140
 Ala Lys His Cys Asp Phe Trp Leu Glu Arg Gly Ala Ala Leu Arg Val
 145 150 155 160
 Ala Val Asp Gln Pro Ala Met Val Cys Leu Leu Gly Phe Val Trp Phe
 165 170 175
 Ile Val Lys Leu Glu His His His His His His
 180 185
 <210> 10
 <211> 161
 <212> PRT
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> Not included Signal peptide
 <400> 10
 Arg Gly Ile Lys His Arg Phe Lys Trp Asn Arg Lys Val Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gln Ile Thr Glu Ala Arg Val Ala Glu Asn Arg Pro Gly

20 25 30
 Ala Phe Ile Lys Gln Gly Arg Lys Leu Asp Ile Asp Phe Gly Ala Glu
 35 40 45
 Gly Asn Arg Tyr Tyr Ala Ala Asn Tyr Trp Gln Phe Pro Asp Gly Ile

 50 55 60
 Tyr Tyr Glu Gly Cys Ser Glu Ala Asn Val Thr Lys Glu Met Leu Val
 65 70 75 80
 Thr Ser Cys Val Asn Ala Thr Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Phe Ser
 85 90 95
 Arg Glu Lys Gln Asp Ser Lys Leu His Gln Arg Val Leu Trp Arg Leu
 100 105 110
 Ile Lys Glu Ile Cys Ser Ala Lys His Cys Asp Phe Trp Leu Glu Arg
 115 120 125

 Gly Ala Ala Leu Arg Val Ala Val Asp Gln Pro Ala Met Val Cys Leu
 130 135 140
 Leu Gly Phe Val Trp Phe Ile Val Lys Leu Glu His His His His His
 145 150 155 160
 His

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 11

Tyr Trp Gln Phe Pro Asp

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 12

Phe Pro Asp Gly Ile Tyr

1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 13

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 14

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 15

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 16

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser His Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 17

Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 18

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 19

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 20

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 21

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 22

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 23

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 24

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 25

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 25
 Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 26
 Ala Ala Ser Ile Leu Asp Ser
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 27
 Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Phe Met
 1 5
 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain CDR Sequences
 <400> 28
 Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 29

Ala Ala Ser Ile Leu Asp Ser

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR Sequences

<400> 30

Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Phe Met

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 31

Asn Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 32

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

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 33

Arg Asp Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 34

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly

1 5

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 35

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 36

Arg Ala Asp Gly Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 37

Asn Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 38

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

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 39

Asp Ser Ser Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 40

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

1 5

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 41

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 42

Thr Ser Met Met Val Pro Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 43

Ser His Trp Met Asn

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 44

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

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 45

Ser Thr Thr Ile Val Thr Thr Gly Ala Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 46

Ser His Trp Met Asn

1 5

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 47

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

1 5 10 15

Gly

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR Sequences

<400> 48

Ser Thr Thr Ile Val Thr Thr Gly Ala Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain Variable Region Sequences
 <400> 49
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg

<
 210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain Variable Region Sequences
 <400> 50
 Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser His
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110
 <210> 51

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain Variable Region Sequences
 <400> 51

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 52

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain Variable Region Sequences

<400> 52

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Arg

<210> 53

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain Variable Region Sequences

<400> 53

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

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

100 105
<210> 54
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light Chain Variable Region Sequences
<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Phe
85 90 95
Met Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105
<210> 55
<211> 121
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain Variable Region Sequences

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain Variable Region Sequences

<400> 56

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser

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

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115
 <210> 57
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy Chain Variable Region Sequences
 <400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Ala Arg Asp Ser Ser Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 58

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy Chain Variable Region Sequences
 <400> 58
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Ser Met Met Val Pro Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 59
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy Chain Variable Region Sequences
 <400> 59
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Arg Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Ser Thr Thr Ile Val Thr Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115
 <210> 60
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy Chain Variable Region Sequences
 <400> 60

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Arg Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Ser Thr Thr Ile Val Thr Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> the corresponding sequence of human doppel

<400> 61

Phe Pro Asp Gly Ile His

1

5