



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월23일
(11) 등록번호 10-1287280
(24) 등록일자 2013년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7009357
(22) 출원일자(국제) 2006년10월16일
심사청구일자 2011년04월01일
(85) 번역문제출일자 2008년04월18일
(65) 공개번호 10-2008-0055932
(43) 공개일자 2008년06월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/040431
(87) 국제공개번호 WO 2007/047609
국제공개일자 2007년04월26일
(30) 우선권주장
60/728,292 2005년10월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050047032 A*
US20030180286 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이뮤노메딕스, 인코오포레이티드
미국뉴저지주 07950 모리스플레인즈 어메리칸로
오드300
센터 포 몰레큘러 메디신 앤드 이뮤놀로지
미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인즈 아메리칸
로드 300
(72) 발명자
폴든버그 데이비드 엠
미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인즈 아메리칸
로드 300
창 시옌 싱
미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인즈 아메리칸
로드 300
테일러 엘리스 피
미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인즈 아메리칸
로드 300
(74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 21 항

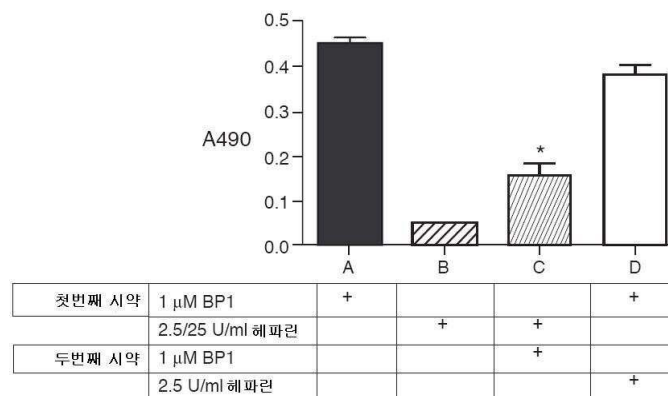
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 태반 성장 인자 매개된 전이 및/또는 혈관신생의 억제

(57) 요약

본 발명은 혈관신생 및/또는 종양 성장, 생존 및/또는 전이를 억제하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 특정한 실시예에서, 상기 방법 및 조성물은 BP-1, BP-2, BP-3 또는 BP-4와 같은 태반 성장 인자(PIGF)에 대한 리간드에 관한 것일 수 있다. 몇몇 방법은 하나 이상의 PIGF 리간드를 단독으로 또는 화학치료제, 다른 항-혈관신생제, 면역치료제 또는 방사성면역치료제와 같은 하나 이상의 다른 제제와 조합하여 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 PIGF 리간드는 혈관신생, 종양 세포의 운동성, 종양의 전이, 종양의 성장 및/또는 종양의 생존을 억제하는데 효과적이다. 특정한 실시예에서, PIGF 리간드는 근위축증과 같은 다른 혈관신생 관련 증상을 감소시키기 위해 대상에게 투여될 수 있다. 몇몇 실시예에서, PIGF 발현 레벨은 PIGF 표적화된 치료에 가장 반응하기 쉬운 대상을 선별하기 위한 임의의 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 BP-1, 서열번호 3으로 기재되는 BP-3 및 서열번호 4로 기재되는 BP-4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 태반 성장 인자(PIGF) 펩티드 리간드를 포함하는 조성물로서, 상기 펩티드 리간드가 혈관신생, 유방암의 성장 및 유방암의 전이로 이루어진 군으로부터 선택되는 증상을 억제하는 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 PIGF에 대한 파지 디스플레이에 의해 확인되는 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 서열번호 1로 기재되는 BP-1의 서열로부터 선택되는 적어도 12개의 연속적인 아미노산 잔기를 포함하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 선상 또는 환상 구조인 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 PIGF 및 Flt-1(Fms-유사 티로신 키나제 수용체) 모두에 결합하는 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 PIGF-2 및 Flt-1 상의 헤파린 결합 부위에 결합하는 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 PIGF 및 Flt-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 양쪽 모두에 대한 헤페린 결합을 억제하는 조성물.

청구항 14

청구항 12에 있어서,

헤페린은 상기 펩티드 리간드가 PIGF 및 Flt-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 양쪽 모두에 결합하는 것을 억제하는 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

청구항 1에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 항체, 이중특이적 항체, 항체 절편, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 인간 항체 절편, 항체 유사체, Fc 절편, Fc-결합 단백질, 항체-결합 융합 단백질, 약물, 전구약물, 독소, 효소, 올리고뉴클레오타이드, 방사성 동위원소, 면역조절자, 사이토카인, 호르몬, 결합 분자, 지질, 폴리머, 미셀, 리포솜, 나노입자 및 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 부착되는 조성물.

청구항 17

청구항 1에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 종양 항원에 결합하는 분자에 부착되는 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

청구항 17에 있어서,

상기 분자는 종양-관련 항원에 대한 한 결합 부위 및 PIGF 리간드에 대한 제2 결합 부위를 갖는 이중 특이적 항체 또는 그의 절편인 조성물.

청구항 20

청구항 16에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 질병 표적에 대한 결합 부위를 갖는 단일클론 항체 또는 그의 절편에 공유결합으로 부착되는 조성물.

청구항 21

청구항 19에 있어서,

상기 이중 특이적 항체는 CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD45, CD74, CD79a, CD80, HLA-DR, NCA95, NCA90, HCG 및 그의 서브유닛, CEA(CEACAM5), CEACAM6, CSAP, EGFR, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Ba 733, HER2/neu, 저산소증 유도 인자(HIF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, PAM-4, PSA, PSMA, RS5, S100, TAG-72, p53, 테나신, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), Tn 항원, 톰슨-프리드리히 항원, 종양 괴사 항원, VEGF, ED-B 피브로넥틴, 17-1A-항원, 혈관신생 마커, 종양 유전자 마커 및 종양 유전자 산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 종양 관련 항원에 대한 결합 부위를 갖는 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

청구항 16에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 항체의 Fc 절편, Fc-결합 단백질 및 항체-결합 융합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 공유결합으로 부착되는 조성물.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

상기 펩티드 리간드는 IgG1 항체의 Fc 절편에 부착되는 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

- a) 서열번호 1로 기재되는 BP-1, 서열번호 3으로 기재되는 BP-3 및 서열번호 4로 기재되는 BP-4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 태반 성장 인자(PIGF)에 결합하는 펩티드 리간드를 얻는 단계; 및
- b) 상기 펩티드 리간드를 제제에 부착하는 단계를 포함하는 유방암이나 혈관 내피 세포에 제제를 표적화하는 방법으로서, 상기 펩티드 리간드는 유방암 세포 및 혈관 내피 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 양쪽 모두에 결합하는 방법.

청구항 42

삭제

청구항 43

청구항 41에 있어서,

상기 펩티드 리간드에 대한 한 결합 부위 및 종양 항원에 대한 제2 결합 부위를 갖는 이중 특이적 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서,

리간드-항체 복합체는 경구로 또는 흡입으로 투여되고, 상기 리간드-항체 복합체는 신생아의 Fc 수용체 전달 시스템과의 상호작용을 통해 흡수되는 방법.

청구항 45

청구항 1에 따른 PIGF 펩티드 리간드 및 용기를 포함하는 키트.

청구항 46

삭제

청구항 47

서열번호 1로 기재되는 BP-1, 서열번호 3으로 기재되는 BP-3 및 서열번호 4로 기재되는 BP-4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 PIGF 펩티드 리간드 서열을 포함하는 융합 단백질.

청구항 48

청구항 47에 있어서,

상기 PIGF 펩티드 리간드 서열은 서열번호 1로 기재되는 BP-1의 서열로부터 선택되는 적어도 12개의 연속적인 아미노산을 포함하는 융합 단백질.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 혈관신생, 특히 병리학적 혈관신생 및/또는 종양의 성장 및 전이 억제용 방법 및 조성물에 관한 것이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 및 방법은 태반 성장 인자-2(PIGF) 및/또는 그 수용체인 Flt-1을 표적으로 하는 억제자에 관한 것으로, PIGF-매개성 혈관신생 및/또는 전이를 억제하기 위해 사용될 수 있는 당업계에 알려진 펩티드, 항체, 항체 절편, 인간화된 항체, 키메라(chimera) 항체, 항체 유사물, 앵타머(aptamer), 유기 화합물 및/또는 임의의 다른 분자 또는 화합물을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 억제자는 PIGF에 대한 파지 디스플레이에 의해 분리된 펩타이드일 수 있다.

배경 기술

- [0002] 혈관신생 성장 인자의 높은 발현은 다양한 암의 성장 및 발달에 필요하다(Cao et al., 1998, *J Clin Invest* 101:1055-1063). 그러한 혈관신생 성장 인자 가운데, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 높은 발현은 증가된 종양 및 전이와 관련된 것에 대해 가장 많은 관심을 받아왔다(Abdulrauf et al., 1998, *J Neurosurg* 88:513-52; Ahmed et al., 2000, *Placenta* 21 Suppl A, S16-24). 그러나 종양의 재발이나 전이 성장에서 성장 인자 중 VEGF 및 VEGF 패밀리의 다른 멤버의 역할은 분명히 확립되어 있지 않았다. 방사선, 사이토카인 및 세포독성 제제를 포함한 많은 치료제는 그 치료 활성 중 일부가 항-혈관신생 기작에 기인하고, 이 중 하나는 VEGF의 하향-조절이다(Taylor et al., 2002a, *Clin Cancer Res* 8:1213-1222; Jiang et al., 1999, *Mol Carcinog* 26:213-225; Machein et al., 1999, *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:104-112). 그러나, VEGF의 현저한 억제가 항상 내구성 있는 반응 또는 동일한 치료를 가져오지는 않는다. 이는 VEGF 이외의 인자가 종양 세포를 살리기 위해 혈액 공급을 회복할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0003] 다른 질병과 관련된 혈관신생 뿐 아니라 종양 혈관신생 및/또는 성장 및 전이의 효과적인 억제를 위한 방법 및 조성물 분야에서 필요성이 존재한다.

[0004] 본 발명의 요약

- [0005] 본 발명은 혈관신생 및/또는 종양 전이를 억제, 방지, 차단 및/또는 제거하기 위한 방법 및 조성물을 제공함으로써 당업계에서 해결되지 않은 요구를 충족시킨다. 특정 구현예에서, 조성물 및/또는 방법은 태반 성장 인자-2(PIGF-2) 용 리간드 및/또는 Flt-1 및 PIGF에 결합하는 리간드에 관한 것일 수 있다. 그러한 리간드는 펩티드, 항체, 항체 절편, 인간화된 항체, 키메라 항체, 항체 유사물, 앵타머, 유기 화합물 및/또는 PIGF 용 리간드로 당업계에 알려진 임의의 다른 분자 또는 화합물을 포함할 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.
- [0006] 다양한 구현예에서, PIGF 리간드는 펩티드일 수 있다. 특정 표적에 결합하는 펩티드를 확인하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 후술하는 파지 디스플레이 기술을 포함한다. 파지 디스플레이에서, 섬유향 박테리오파지(filamentous bacteriophage)와 같은 파지의 표면에 발현된 펩티드의 라이브러리가 만들어져서, 관심있는 표적에 대해 선별에 의해 스크리닝될 수 있다. 표적에 대한 1회 이상의 스크리닝(패닝) 후에, 표적에 결합하는 디스플레이 펩티드를 포함하는 파지는 분리되고, 예를 들어 파지 핵산 내의 펩티드-암호화 DNA 삽입물의 서열분석에 의해 펩티드 서열이 결정될 수 있다.
- [0007] 다른 구현예는 암 및/또는 혈관신생과 관련된 질병(예, 황반 변성) 등을 갖는 대상과 같은 대상 치료용 방법 및/또는 조성물에 관한 것이다. 대상은 인간, 동물, 고양이, 개, 소, 양, 염소, 말, 알파카 및 포유류를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 상기 방법 및 조성물은 대상에 투여될 하나 이상의 PIGF 리간드를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, PIGF에 대한 파지 디스플레이에 의해 리간드로서 동정된 펩티드가 투여될 수 있다. 투여는 경구, 코, 구강, 흡입, 직장, 질 또는 국소와 같이 당업계에 알려진 임의의 경로일 수 있다. 대안적으로, 투여는 정위(orthotopic), 피내, 피하, 근육내, 복강내, 동맥내, 수막강내 또는 정맥내 주사에 의한 것일 수 있다. 바람직한 구현예에서, PIGF 리간드(억제자)는 경구 투여된다. 보다 바람직한 구현예에서, PIGF 리간드는 하기 실시예에 기재된 바와 같이, (결합 단백질) BP-1, BP-2, BP-3 또는 BP-4의 서열을 포함할 수 있다.
- [0008] PIGF 리간드의 투여는 종양 전이, 고형 종양에서의 혈관신생, 종양 세포 생존 및/또는 종양 세포 운동성을 억제하거나 제거하는데 효과적일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 PIGF 리간드의 투여는 종양 전이를 억제하거나, 존재하는 종양의 퇴화나 성장 억제를 가져올 수 있다. 당업자는 하나 이상의 PIGF 리간드가 단독으로 또는 대안적으로, 화학 치료, 방사선 치료, 면역 치료, 항-VEGF 제제 및/또는 다른 알려진 항-혈관신생 제제 등과 같은 종양 및/또는 혈관신생용의 다른 알려진 치료제와 조합하여 투여될 수 있음을 인식할 수 있을 것

이다. 몇몇 구현예에서, PIGF 리간드는 PIGF 리간드용 한 결합 부위 및 종양 항원 또는 다른 표적용의 제 2 결합 부위를 갖는 이중특이적 항체와 함께 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, PIGF 리간드는 항체, 항체 절편, 단일클론 항체, Fc 절편, Fc-결합 단백질 또는 항체 결합 단백질에 공유 결합으로 부착되거나 융합 단백질로 제공될 수 있다.

[0009] 대안적인 구현예에서, PIGF 리간드는 암 외에 혈관신생 관련 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 혈관신생과 관련된 질환의 예는 류머티즘성 관절염, 염증성 장 질환, 크론씨병, 궤양성 대장염, 유육종증, 천식, 부종, 폐 고혈압, 종양 형성 및 발달, 건선, 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 각막 이식 거부반응, 혈관신생 녹내장, 심근 혈관신생, 플라크 신생혈관증식, 재협착, 신내막 혈관 손상 후 신생 내막 형성, 모세관 확장증, 혈우병 관절, 혈관섬유증, 만성염증과 관련된 섬유증, 폐 섬유증, 깊은 정맥 혈전증 및 상처 과립(wound granulation)을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0010] 다른 대안적인 구현예에서, 본 명세서에 기재된 PIGF 리간드는 예를 들어, 복합체나 치료제와의 결합에 의해 표적 펩티드로 사용될 수 있다. BP-1, BP-2, BP-3 및/또는 BP-4와 같은 PIGF 리간드는 공유 교차-결합 시약의 사용과 같은 당업계 잘 알려진 방법에 의해 다양한 모이어티(moiety)에 공유 또는 비공유 결합으로 부착될 수 있다. 카르보디이미드, 비스이미데이트, 수베르산의 N-히드록시숙신이미드 에스테르, 디메틸-3,3'-디티오-비스프로피온이미데이트, 아지도글리옥살, 1,5-디플루오로-2,4-(디니트로벤젠) 및 당업계에 알려진 단백질 및/또는 펩티드 용 다른 교차-결합자가 알려져 있고 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, PIGF 리간드는 항체, 항체 절편, 화학 치료제, 항-혈관신생제, 전구-아포토시스제, 그러한 제제나 임의의 다른 알려진 치료 화합물을 포함하는 리포솜에 부착될 수 있다.

[0011] 또 다른 구현예에서, PIGF 리간드는 진단 및/또는 이미징화를 목적으로 부가물(adjunct)로 사용될 수 있다. 예를 들어, PIGF 리간드는 임의의 알려진 대비 또는 검출 제제로 표지되거나 ELISA 등과 같은 임의의 알려진 방법을 사용하여 검출될 수 있다. PIGF 리간드는 PIGF를 발현하는 종양 또는 다른 조직을 검출하기 위해, 예를 들어 조직 절편의 면역조직화학법에 의해 생체 외(ex vivo)에서 사용될 수 있다. 대안적으로, PIGF 리간드는 PIGF를 발현하는 조직의 생체 내(in vivo) 검출을 위해 대상에 투여될 수 있다. 그러한 조성물 및 방법은 예를 들어, PIGF-발현 종양의 존재를 검출 또는 진단하거나 및/또는 PIGF를 표적으로 한 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 혈관신생 또는 세포 운동성 관련 질환을 갖는 대상들을 동정하기 위해 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

[0012] 특허, 특허 출원, 기사, 책 및 논문을 포함하나 이에 한정되지는 않는, 본 발명에 인용된 모든 문서 또는 문서의 일부는 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 확실하게 포함되어 있다.

정의

[0014] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "하나" 또는 "한"은 하나 이상의 아이템(item)을 의미할 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및" 및 "또는"은 결합하는 또는 분리하는 중 어느 하나를 의미하는데 사용될 수 있다. 즉, 두 용어 모두 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"과 등가로 이해되어야 한다.

[0016] "리간드"는 표적에 결합할 수 있는 임의의 분자, 화합물 또는 조성물을 일컫는다. 예를 들어, PIGF 리간드는 PIGF에 결합할 수 있는 리간드이다. 결합 능력은 표지된 리간드나 표적을 사용한 방사성분석, 친화도 크로마토그래피, 면역침강, 닷 블롯, 슬롯 블롯, 웨스턴 블롯, ELISA, 마이크로어레이 결합 등과 같이 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 직접적으로 측정될 수 있다. 대안적으로, 결합은 파지 디스플레이 기술을 사용하여 표적에 대한 펩티드-포함 파지의 패닝(panning)과 같은 간접적인 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0017] 사용되는 약자는 다음과 같다.

[0018] BSA, bovine serum albumin;

[0019] ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay;

[0020] FGF, fibroblast growth factor;

[0021] FGFR, fibroblast growth factor receptor;

[0022] FITC, fluorescein iso-thiocyanate;

- [0023] **flk-1**, VEGF receptor II;
- [0024] **Flt-1**, *fms*-like tyrosine kinase-1, VEGF receptor I;
- [0025] **FLAG**, epitope-tagging system for detection of target proteins or peptides;
- [0026] **HEC**, human microvessel endothelial cells;
- [0027] **HRP**, horseradish peroxidase;
- [0028] **IHC**, immunohistochemistry;
- [0029] **MTT**, 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide-based viability assay;
- [0030] **PBS**, phosphate-buffered saline;
- [0031] **PlGF**, placental growth factor;
- [0032] **RT**, room temperature;
- [0033] **RTK**, receptor tyrosine kinases;
- [0034] **UT**, untreated controls;
- [0035] **VEGF**, vascular endothelial growth factor.
- [0036] **중양 혈관신생 및 전이에서의 태반 성장 인자(PIGF)**
- [0037] 본 발명의 다양한 구현예는 성장 인자의 VEGF 패밀리의 멤버인 태반 성장 인자(PIGF)에 대한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, PIGF를 표적으로 하거나 PIGF 및 Flt-1을 표적으로 하는 억제자(리간드)는 중양 혈관신생 및/또는 전이를 억제하는데 사용된다.
- [0038] PIGF는 VEGF의 혈소판-유래 성장 인자-유사 부위와 53% 동일성을 갖는다(Maglione et al., 1991, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9267-9271). 이것은 두 가지 주요 이소폼(isoform)인 PIGF-1 및 -2로 생산된다. 이들은 전체 분자량 46-50 kD인, 이황화 결합에 의해 헤드-투-테일(head-to-tail) 방식으로 결합된 132 또는 153 아미노산 단량체로 구성된 이량체로 분비된다(Maglione et al., 1991). 세 가지 이소폼이 mRNA 스플라이스 변이체로부터 유래하나, PIGF-1 및 -2만이 잘 동정되어 있다(Ahmed et al., 2000; Cao et al., 1997, *Biochem Biophys Acta* 235, 493-498).
- [0039] 태반으로부터 제일 먼저 클로닝된 PIGF(Maglione et al., 1991)는 영양포(trophoblast), 정상 갑상선에서 및 상처 치료 중에 정상적으로 발현된다(Viglietto et al., 1995, *Oncogene* 11:1569-1579; Failla et al., 2000, *J Invest Dermatol* 115:388-395). 영양포에서, PIGF 발현은 저산소 스트레스에 의해 일어나지 않게 되나(Gleadle et al., *Am. J. Physiol.* 268:C1362-8, 1995), 저산소증-유도성 발현은 적어도 하나의 원발성(primary) 중양(Yonekura et al., *J. Biol. Chem.* 274:35172-8, 1999), 중양 이종이식(Taylor et al., *Clin. Cancer Res.* 61:2696-703, 2001) 및 섬유아세포(Green et al., *Cancer Res.* 61:2696-703, 2001)에서 발견되었다. 많은 중양은 PIGF 수용체인 Flt-1을 발현한다(Luttun et al., *Nat. Med.* 8:831-40, 2002).
- [0040] PIGF는 정상 혈청에서 낮은 레벨로 발현되나, 임신 후기에는 전-자간(pre-eclampsia)이 없는 여성의 혈청에서 9-10배 증가한다(Helske et al., 2001, *Mol Hum Reprod* 7:205-210; Reuvekamp et al., 1999, *Br J Obstet Gynaecol* 106:1019-1022; Vuorela-Vepsalainen et al., 1999, *Hum Reprod* 14:1346-1351). PIGF는 정상 뇌 조직에서는 발현되지 않지만, 아교모세포종 및 수막종에서 검출되었다(Gleadle et al., 1995, *Am J Physiol* 268:C1362-1368; Donnini et al., 1999, *J Pathol* 189:66-71). 이것은 또한 다양한 다른 원발성 중양에서 검출되었다(Nomura et al., 1998, *J. Neurooncol.* 40:123-30; Taylor et al., 2003a, *Proc Am Assoc Cancer Res* 44:4-5 [abstr R22]; Matsumoto et al., 2003, *Anticancer Res* 23:3767-3773; Chen et al., 2004, *Cancer Lett* 213:73-82; Wei et al., 2005, *Gut* 54, 666-672; Lacal et al., 2000, *J Invest Dermatol* 115, 1000-1007). PIGF 발현은 또한 신생혈관성 증식을 갖는 당뇨병 망막증과 관련된 것으로 관찰되었다(Khaliq et al., 1998, *Lab Invest.* 78:109-16). PIGF의 결실 실험은 동물 모델에서 중양 성장 억제 및 신장 신혈관 형성의 감소를 나타내었다(Carmeliet et al., 2001, *Nat. Med.* 7:575-83).
- [0041] 헤파린-결합 도메인이 없는 PIGF-1은 Flt-1(또 다른 용어로 VEGFR1)에만 결합하는 반면에, COOH 말단에 21 아미노산의 헤파린-결합 도메인을 갖는 PIGF-2는 뉴로필린-1 및 Flt-1에 모두 결합한다(Migdala et al., 1998, *J*

Biol Chem 273:22272-22278; Hauser and Weich, 1993, *Growth Factors* 9:259-268). Flt-1에 결합할 때, PlGF-2는 내피세포의 분화, 증식 및 이동을 유도할 수 있다(Landgren et al., 1998, *Oncogene* 16:359-367). 영양포에서, PlGF의 발현은 저산소 스트레스에 의해 일어나지 않게 되나(Gleadle et al., 1995), 저산소증-유도성 발현은 적어도 하나의 원발성 종양(Yonekura et al., 1999, *J Biol Chem* 274:35172-35178), 종양 이종이식(Taylor et al., 2004, *Proc Am Assoc Cancer Res* 45:981 [abstr 4255]) 및 섬유아세포(그린 et al., 2001, *Cancer Res* 61:2696-2703)에서 발견되었다. PlGF-1 및 -2 모두 자연적으로 VEGF와 이형이량체를 형성한다. 이형이량체의 상대적인 활성은 VEGF에 결합되는 PlGF의 형성에 달려있다. PlGF-1 아이소머 및 VEGF로 이루어진 이형이량체는 시험관 내 또는 생체 내에서 활성이 거의 없거나 아예 없다(Eriksson et al., 2002, *Cancer Cell* 1:99-108). 한편, PlGF-2/VEGF 이형이량체는 거의 VEGF 동형이량체만큼 강력하다(Clauss et al., 1996, *J Biol Chem* 271:17629-17634; Cao et al., 1996, *J Biol Chem* 271:3154-3162; DiSalvo et al., 1995, *J Biol Chem* 270:7717-7723).

[0042] PlGF(및 VEGF)에 대한 수용체인, Flt-1은 수용체의 티로신 키나제 패밀리를(RTK) 수용체의 멤버이다. 이들은 활성화 리간드에 의해 결합될 때 그들의 세포질 도메인에 있는 티로신 잔기의 자동인산화에 의해 특징지어진다. Flt-1은 7개의 세포외 Ig-유사 도메인 및 분리된 세포내 티로신 키나제 도메인을 가지고 있다. Flt-1과 PlGF의 상호작용은 주로 두번째 세포외 도메인에서 일어난다. Flt-1의 네번째 도메인은 이량체화와 관련되어 있고, 잠재적으로 Flt-1 및 그 리간드를 더 가깝게 결합하게 하는 헤파린-결합 부위를 포함한다(Park and Lee, 1999, *Biochem Biophys Res Commun* 264:730-734). 반대-병렬(anti-parallel) PlGF 이량체는 결합 도메인이 이량체의 반대쪽 끝에 있고, 그러므로 결합할 때, Flt-1이 가장 두 개의 수용체를 가깝게 결합하기 쉽게 하여 활성화하도록 그들을 연결하게 한다(Fuh et al., 1998, *J Biol Chem* 273:11197-11204; Wiesmann et al., 1997, *Cell* 91:695-704).

[0043] PlGF 및 Flt-1의 헤파린-결합 도메인과 헤파린의 상호작용은 PlGF에 의한 Flt-1 완전한 활성화를 위해 필수적일 수 있다. 헤파린 결합의 역할은 섬유아세포 성장 인자(FGF)-섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR) 리간드-티로신 키나제 수용체 쌍에서 잘 특징지어져 있다(Schlessinger et al., 2000, *Molecular Cell* 6:743-750). 이 구현예에서, 헤파린은 리간드 및 수용체 모두와 다중의 접촉을 하고, 이는 각각에 FGF-FGFR 결합 및 활성화에 필요한 단계인 수용체의 이량체화를 증가시킨다. PlGF의 보다 활성 형태인 PlGF-2에 헤파린-결합 도메인이 존재하는 것은 헤파린이 PlGF에 의한 Flt-1의 활성화에 역할을 가질 수 있다는 것을 나타낸다.

[0044] 종양 재발에 대한 본 발명자들의 연구에서, 본 발명자들은 처리 전에 PlGF 발현이 검출되지 않았을지라도, 방사성 표지된 항체로 세포 독성 처리를 한 후에 살아있는 종양 세포에 의한 PlGF의 생산을 검출하였다(Taylor et al., 2002a; Taylor et al., 2003; Taylor et al., 2002b, *Proc Am Assoc Cancer Res* 43:10-11 [abstr 51]). PlGF가 내피세포에 대한 생존 인자라는 것은 이미 알려져 있지만(Adini et al., 2002, *Cancer Res* 62:2749-2752), 종양세포에서의 PlGF 처리-유도성 발현은 예상치 못한 발견이었다(Taylor et al., 2002a; Taylor et al., 2003b, *Int J Cancer* 105:158-169). 추가 연구는 PlGF 발현과 세포독성으로부터의 회복 증진을 서로 연관시켰다(Taylor et al., 2003b). 처리-유도성 발현 뿐 아니라 몇몇 종양 세포주에 의한 지속적인 발현 또한 발견되었다.

[0045] 대사 활성이나 처리로 인해 종양에서 편재하는(ubiquitous) 증상인 저산소증은 각질세포 및 종양 세포에 의한 증가된 PlGF 발현을 가져온다(Ahmed et al., 2000; Taylor et al., 2002a; Taylor et al., 2003b). 몇몇 종양 세포는 그 표면에 낮은 레벨의 Flt-1을 발현하나, 리간드-수용체를 통한 신호전달의 직접적인 효과는 잘 특징지어져있지 않다. 이러한 발견은 PlGF가 종양 세포 및 종양 주위에서 효과를 발휘할 수 있다는 것을 나타내었다. 본 명세서는 인간 유방암 세포 및 이종이식에서 PlGF 및 Flt-1의 직접적인 효과를 조사하였다.

[0046] 혈관신생에서 PlGF 및 VEGF의 상대적인 역할

[0047] PlGF 및 VEGF는 모두 Flt-1 수용체에 결합하고, 모두 종양 및 정상 조직에서 혈관신생을 자극하는 것으로 보고되었다. 혈관신생에서 VEGF가 Flt-1에 결합하는 효과를 시험했다(EI-Mousawi et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278:46681-91; 미국특허출원 공개번호 20040266694). EI-Mousawi 등(2003)은 몇 개의 분명한 VEGF-결합 펩티드를 분리하기 위해 제조한 Flt-1에 대해 패닝한 랜덤(random) 16-머(mer) 파지 디스플레이 시스템을 사용하였다. 가장 강력한 상호작용은 V5.2로 명명된 펩티드에서 관찰되었다. VEGF 또는 PlGF로 자극된 HUVEC 및 HCEC 내피 세포에 V5.2를 첨가하면 내피 세포 증식을 억제하는 것으로 보고되었고, 또한 VEGF-매개성 HCEC의 이동 및 MatrigelTM에서 VEGF-유도성 모세혈관 형성을 억제하는 것으로 보고되었다(EI-Mousawi et al., 2003). 이는 V5.2의 이러한 효과는 Flt-1 수용체에 대한 결합을 통해 매개된다는 것을 나타낸다(*Id.*). 그러나, V5.2에 결합

하는 Flt-1의 도메인은 이들 저자에 의해 동정되지 않았고, V5.2 효과가 Flt-1의 세포린 활성화와 길항적인지 여부도 결정되지 않았다. 다양한 구현예에서, 항-VEGF 제제와 같은 또 다른 항-혈관신생 제제와 조합하여 PIGF 리간드를 투여하는 것을 고려하는 경우, 펩티드 V5.2 및 유사한 VEGF 억제자가 사용될 수 있다.

[0048] 혈관신생에서 VEGF-A, VEGF-B 및 PIGF의 역할은 Malik 등에 의해 조사되었다(Malik et al., "redundant roles of VEGF-B and PIGF during selective VEGF-A blockade in mice"). 이 저자들은 VEGF-B 또는 PIGF가 없는 마우스는 미미한 발달 장애만을 나타낸다고 보고하였다. VEGF-A, VEGF-B 및 PIGF의 억제와 비교하여 VEGF-A 활성화의 억제는 혈관신생의 감소를 포함하여 신생 마우스의 성장 및 생존에 유사한 영향을 가져왔다. 결과적으로, PIGF 및 VEGF-B는 VEGF-A의 차단을 보상하지 않았는데, 이는 VEGFR-1 수용체의 VEGF-B 및 PIGF 활성화가 VEGFR-2의 VEGF-A 활성화에 비해 신생아 후 발달 및 성인 혈관 항상성에서 상대적으로 미미한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 이중이식 종양 성장 및 혈관신생을 억제하는 데 있어서, VEGFR-1에 대한 항체가 거의 항-VEGFR-2 항체만큼 효과적이라는 다른 보고와 상충된다(Carmeliet et al., 2001, *Nat. Med.* 7:575-83; Stefanik et al., 2001, *J. Neurooncol.* 55:91-100). VEGF-B 및 PIGF가 성인에서 병리학적 혈관신생 동안 염증 조절에 관여할 수 있다는 것이 제시되어 있다(Malik et al., 2005).

[0049] 당업자는 본 명세서에 기재된 PIGF 리간드가 하나 이상의 VEGF 억제자와 조합하여 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 잠재적으로 사용가능한 VEGF 억제자는 Neovastat[®](Falardeau et al., 2001, *Semin. Oncol.* 28:620-25), IM862(Tupule et al., 2000, *J. Clin. Oncol.* 18:716-23), Angiozyme[®](RPI-4610)(Weng and Usman, 2001, *Curr. Oncol. Rep.* 3:141-46), Bevacizumab(Gordon et al., 2001, *J. Clin Oncol.* 19:843-50), Semaxanib(SU-5416)(Fong et al., 1999, *Cancer Res.* 59:99) 및 TNP-470(Figg et al., 1997, *Pharmacotherapy* 17:91-97)을 포함한다.

[0050] 혈관신생 억제에 의한 대상의 치료 처리

[0051] 다양한 구현예에서, PIGF-매개성 혈관신생을 막거나 억제할 수 있는 PIGF 리간드에 관련되는 방법 및 조성물은 병리학적 혈관신생으로 특징지어지는 질환의 치료에 응용된다. 이러한 질환의 예는 류머티즘성 관절염, 염증성 장 질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유육종증, 천식, 부종, 폐 고혈압, 종양 형성 및 발달, 건선, 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 각막 변성 거부반응, 혈관신생 녹내장, 심근 혈관신생, 플라크 신생혈관증식, 재협착, 신내막 혈관 손상 후 신생 내막 형성, 모세관 확장증, 혈우병 관절, 혈관섬유증, 만성염증과 관련된 섬유증, 폐 섬유증, 깊은 정맥 혈전증, 상처 과립 및 종양 혈관신생, 성장 및 생존을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 혈관신생 또는 세포 운동성-관련된 질병 상태의 대상 모두가 질환 조직에서 PIGF를 발현하는 것은 아니며, 당업자는 특정 구현예에서 생체 외 및/또는 생체 내 PIGF 발현 분석이 PIGF-표적 치료 개입으로부터 가장 혜택을 얻을 대상을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0052] 당업자는 항-혈관신생 치료가 본 명세서에 기재된 하나 이상의 PIGF 리간드를 사용할 수 있고, 특정 대안적인 구현예에서 엔도스타틴TM, 안지오스타틴, 라미닌 펩티드, 피브로넥틴 펩티드(ED-B 피브로넥틴을 포함), 플라스틱미노겐 활성화 억제자, 조직 메탈로프로테이나제 억제자, 인터페론, 인터루킨 12, IP-10, Gro- β 트롬보스판딘, 2-메톡시시오프로테아제, 프로피리페린-관련 단백질, 카르복시아미도트리아졸, CM101, 마리마스타트(Marimastat), 펜토산 폴리설페이트, 안지오포이에틴 2, 인터페론-알파, 허비마이신 A, PNU145156E, 16K 프롤락틴 절편, 리노마이드(Linomide), 탈리도마이드, 펜톡시필린, 제니스테인, TNP-470, 파클리탁셀, 아쿠틴, 안지오스타틴, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM-1470, 혈소판 인자 4 또는 미노사이클린과 같이 당업계에 알려진 다른 항-혈관신생 제제의 투여를 포함할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0053] 당업자는 또한 종양 대상 치료의 콘텍스트(context) 내에서 본 명세서에 기재된 PIGF 리간드가 아래에 보다 상세히 기재된대로 임의의 알려진 암 치료법과 조합하여 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 알려진 암 치료법은 화학치료제 투여, 방사선 치료, 수술적 절제, 국소 고열요법, 항종양 항체 및 다른 항-혈관신생제를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0054] 펩티드 투여

[0055] 특허청구된 방법 및/또는 조성물의 다양한 구현예는 대상에 투여되기 위한 하나 이상의 치료용 펩티드에 관한 것일 수 있다. 투여는 경구, 코, 구강, 흡입, 직장, 질, 국소, 국소를, 피내, 피하, 근육내, 복강내, 동맥내, 수막강내 또는 정맥내 주사를 포함하나 이에 한정되지는 않고 당업계에 알려진 임의의 경로에 의해 일어날 수 있다.

- [0056] 대상에게 경구 투여된 미변형 펩티드는 소화관에서 분해될 수 있고 서열 및 구조에 따라 소화관을 따라 흡수가 잘 되지 않을 수 있다. 그러나, 내부 프로테아제에 의한 분해에 덜 민감하게 하거나 소화관을 통해 더 흡수될 수 있도록 위해 펩티드를 화학적으로 변형하는 방법이 잘 알려져 있다(예를 들어, Blondelle et al., 1995, *Biophys. J.* 69:604-11; Ecker and Crooke, 1995, *Biotechnology* 13:351-69; Goodman and Ro, 1995, *BURGER'S MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG DISCOVERY*, VOL. I, ed. Wolff, John Wiley & Sons; Goodman and Shao, 1996, *Pure & Appl. Chem.* 68:1303-08 참조). 그러한 방법은 PIGF와 같이 선택된 표적에 결합하는 펩티드에 대해 수행될 수 있다. D-아미노산; 펩티드의 구조를 모방한 유기 분자로 이루어진 펩티도미메틱스(peptidomimetics); 또는 비닐성 펩티드(vinylogous peptoid)와 같은 펩티드를 포함하는 펩티드와 같은 펩티드 유사체의 라이브러리를 제작하는 방법 또한 기재되어 있고, 대상에게 경구 투여하기에 적합한 PIGF 결합 펩티드를 제작하기 위해 사용될 수 있다.
- [0057] 특정 구현예에서, BP-1, BP-2, BP-3 또는 BP-4와 같이 알려진 PIGF 리간드의 구조를 모방하는 펩티드 미메틱스의 제조 및 투여는 특허청구된 방법 및 조성물의 범위 내에서 사용될 수 있다. 그러한 화합물에서, 표준 펩티드 결합 연결은 $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, CH=CH , CO-CH_2 , CHOH-CH_2 등과 같은 하나 이상의 대안적인 연결군에 의해 치환될 수 있다. 펩티드 미메틱스를 제조하는 방법은 잘 알려져 있다(예를 들어, Hruby, 1982, *Life Sci* 31:189-99; Holladay et al., 1983, *Tetrahedron Lett.* 24:4401-04; Jennings-White et al., 1982, *Tetrahedron Lett.* 23:2533; Almquist et al., 1980, *J. Med. Chem.* 23:1392-98; Hudson et al., 1979, *Int. J. Pept. Res.* 14:177-185; Spatola et al., 1986, *Life Sci* 38:1243-49; 미국특허 제5,169,862; 5,539,085; 5,576,423, 5,051,448, 5,559,103, 각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 펩티드 미메틱스는 그들의 펩티드 유사체와 비교하여 생체 내에서 증진된 안정성 및/또는 흡수를 나타낼 수 있다.
- [0058] 대안적으로, 치료용 펩티드는 엑소펩티다제 활성을 방지하기 위해 N-말단 또는 C-말단 캡핑을 사용하여 경구 전달에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, C-말단은 아마이드 펩티드를 사용하여 캡핑될 수 있고, N-말단은 펩티드의 아세틸화에 의해 캡핑될 수 있다. 펩티드는 또한 예를 들어, 환상 아마이드, 이황화물, 에테르, 황화물 등의 형성에 의해 엑소펩티다제를 방지하도록 환산화될 수 있다.
- [0059] 펩티드 안정화는 또한 특히 엔도펩티다제가 작용하는 것으로 알려진 위치에서, 자연적으로 존재하는 L-아미노산을 D-아미노산으로 치환함으로써 일어날 수 있다. 엔도펩티다제 결합 및 절단 서열은 당업계에 알려져 있고, D-아미노산을 삽입하여 펩티드를 만들고 사용하는 방법이 개시되어 있다(예, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있는 미국특허출원 공개번호 20050025709, McBride et al., 2/305로 출원됨). 또 다른 대안으로 시스테인 잔기 옆에 있고 모두 D-아미노산으로 이루어진 BP-1, BP-2, BP-3 또는 BP-4 서열을 포함하는 환상 펩티드를 사용할 수 있다. 그러한 D-아미노산 환상 유사체는 L-형과 동일한 접힘 구조를 가질 수 있고, 이는 당업계에 알려진 기술을 사용한 컴퓨터 모델링 연구에 의해 평가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 변형된 펩티드는 nM 또는 더 낮은 범위에서 PIGF 결합을 나타낼 것이다. 변형된 펩티드는 ELISA 같은 표준 분석법에 의해서 PIGF 결합을 분석할 수 있다. 당업자는 펩티드 변형에 이어 펩티드 변형 과정을 지시하기 위해 표적 결합 활성에 대한 테스트가 이어져야 한다는 것을 인식할 것이다. 특정 구현예에서, 펩티드 및/또는 단백질은 단백질 분해효소 억제자 및/또는 펩티다제 억제자와 동시-제형에 의해 경구 투여될 수 있다.
- [0060] 치료용 펩티드의 경구 전달을 위한 다른 방법은 Mehta("oral delivery and recombinant production of peptide hormones", "June 2004, *BioPharm International*)에 기재되어 있다. 펩티드는 장의 단백질 분해 활성을 조절하고 장벽을 지나 펩티드 전달을 증진시키는 부형제와 특수코팅된 고형제제 형태(enteric-coated solid dosage form)로 투여된다. 이 기술을 사용한 온전한 펩티드의 상대적인 생물학적 이용가능성은 투여된 용량의 1% 내지 10% 범위였다. 본 명세서에 기재된 PIGF 결합 펩티드보다 훨씬 큰 단백질인 인슐린은 나트륨 콜레이트 및 프로테아제 억제자와 특수 코팅된 마이크로캡슐을 사용하여 개에게 성공적으로 투여되었다(Ziv et al., 1994, *J. Bone Miner. Res.* 18(Suppl. 2):792-94). 펩티드의 경구투여는 투과 증진자로서 아실카르니틴 및 특수 코팅을 사용하여 수행되었다(Eudragit L30D-55, Rohm Pharma Polymers, Mehta, 2004 참조). 경구 투여 펩티드용 부형제는 일반적으로 펩티드의 용해도 또는 흡수를 향상시키는 계면활성제 또는 다른 제제와 함께 하나 이상의 장 프로테아제/펩티다제 억제자를 포함할 수 있고, 이는 특수 코팅 캡슐 또는 정제 내에 포장될 수 있다(Mehta, 2004). 특수 코팅은 산에 저항성이 있어서, 펩티드가 흡수를 위해 위를 통과하여 장으로 가게 한다. 유기산은 캡슐이 장에서 용해할 때 장을 산성화하고 장 프로테아제 활성을 억제하기 위해 캡슐에 포함될 수 있다(Mehta, 2004). 펩티드의 경구 전달을 위한 또 다른 대안은 흡수 및 효소 분해에 대한 저항성을 증가시키는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-기반의 양쪽성 올리고머에 대한 접합을 포함하는 것이다(Soltero and Ekwuribe, 2001, *Pharm.*

Technol. 6:110).

- [0061] 또 다른 구현예에서, PIGF 결합 펩티드와 같은 펩티드는 IgG1의 Fc 부위와 같은 특정 단백질에 대한 접합에 의해 경구 또는 흡입 투여를 위해 변형될 수 있다(실시예 3-7 참조). 펩티드-Fc 콘주게이트의 제조 및 사용 방법은 예를 들어 Low et al.(2005, *Hum. Reprod.* 20:1805-13) 및 Dumont et al.(2005, *J. Aerosol. Med.* 18:294-303)에 기재되어 있고, 각각은 인용에 의해 본 명세서에 삽입된다. Low 등(2005)은 CHO 세포에서 재조합 발현을 사용하여 단쇄 또는 이형이량체 형태로 IgG1의 Fc 부위에 FSH의 알파 및 베타 서브유니트를 접합한 것을 기재한다. Fc 접합된 펩티드는 신생 Fc 수용체 매개성 전달 시스템에 의해 폐 또는 장에서 상피세포를 통해 흡수되었다. Fc 접합된 펩티드는 본래 펩티드에 비해 생체 내에서 향상된 안전성 및 흡수성을 나타내었다. 또한 이형이량체 콘주게이트가 단쇄 형태보다 더 활성이 있음이 관찰되었다. 에리트로포이에틴과 같은 더 큰 단백질 또한 Fc 접합을 사용함으로써 흡입에 의해 효과적으로 전달될 수 있다(Dumont et al., 2005).
- [0062] 대안적인 구현예에서, 치료용 펩티드는 흡입 경로에 의해 투여될 수 있다(예, Sievers et al., 2001, *Pure Appl. Chem.* 73:1299-1303). 초임계 이산화탄소 분무주입법은 단백질 및 펩티드를 포함하는 다양한 약학적 제제 중에서 나노 또는 마이크로-단위 입자를 생산하는데 사용되어 왔다(*Id.*). 초임계 이산화탄소를 수성 단백질 또는 펩티드 용액과 혼합하여 형성된 미세기포는 치료용 펩티드의 구조 및 활성을 유지하면서 대안적인 방법인 약학적 분말 제형보다 더 낮은 온도(25 내지 65°C)에서 건조될 수 있다. 몇몇 경우에서, 트레할로스, 수크로스, 다른 당, 완충용액 또는 계면활성제와 같은 안정화 화합물이 기능적 활성을 더 보존하기 위해 용액에 첨가될 수 있다. 생성된 입자는 장내 프로테아제/펩티다제 및 소화관 흡수성의 몇몇 문제를 피하여 흡입에 의해 투여될 정도로 충분히 작다.
- [0063] 대상에 투여될 치료용 펩티드의 용량은 약력학적(pharmacokinetic) 특성, 투여 방법 및 경로, 대상의 나이 체중 및 건강, 증상의 성격 및 정도, 함께하는 치료법 및 치료의 횟수에 따라 다양할 수 있다. 펩티드의 용량은 50 kg 체중당 약 1 내지 3000 mg, 바람직하게는 10 내지 1000 mg/50 kg, 보다 바람직하게는 25 내지 800 mg/50 kg 범위일 수 있다. 8 내지 800 mg/50 kg의 용량은 1 내지 6회 용량으로 나뉘어 투여되거나, 서방형으로 투여될 수 있다. 한 연구에서 인간 대상에게 투여된 한번의 500 µg 용량의 펩티드는 90 내지 180 분 내에 150 내지 600 pg/mL 범위의 피크 혈장 농도를 가져왔다(Mehta, 2004).
- [0064] **파지 디스플레이**
- [0065] 특허청구된 조성물 및/또는 방법의 특정 구현예는 PIGF와 같은 다양한 단백질 표적의 결합 펩티드 및/또는 펩티드 미메틱스에 관한 것이다. PIGF 결합 펩티드(BP)는 파지 디스플레이 기술을 포함하나 이에 한정되지 않는 당 업계에 알려진 임의의 방법에 의해 확인될 수 있다. 다양한 군집의 펩티드를 생산하는 다양한 파지 디스플레이 방법 및 기술이 당 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국특허 번호 5,223,409; 5,622,699 및 6,068,829(각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함됨)는 파지 라이브러리를 제작하는 방법을 기재한다. 파지 디스플레이 기술은 작은 펩티드가 그 표면에서 발현될 수 있도록 박테리오파지를 유전적으로 조작하는 것을 포함한다(Smith and Scott, 1985, *Science* 228:1315-1317; Smith and Scott, 1993, *Meth. Enzymol.* 21:228-257).
- [0066] 지난 10년은 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리의 제작 및 펩티드 리간드를 분리하기 위해 라이브러리가 사용되는 스크리닝 방법의 개발에 상당한 진전을 이루었다. 예를 들어, 펩티드 라이브러리의 사용은 염증 반응에 관련있는 항체 또는 세포 부착을 매개하는 인테그린과 같은 많은 단백질 내의 상호작용 부위 및 수용체-리간드 결합 모티프를 동정하는 것을 가능하게 하였다. 이 방법은 또한 펩티도미메틱 약물이나 이미징제 제제의 개발로 이끄는 데 역할을 할 수 있는 새로운 펩티드 리간드를 확인하는데 사용되어 왔다(Arap et al., 1998a, *Science* 279:377-380). 펩티드에 덧붙여, 단쇄 항체와 같은 더 큰 단백질 도메인 또한 파지 입자의 표면에 디스플레이될 수 있다(Arap et al., 1998a).
- [0067] 주어진 기관, 조직, 세포 타입 또는 표적 분자를 선별하는 표적 아미노산 서열은 패닝에 의해 분리될 수 있다(Pasqualini and Ruoslahti, 1996, *Nature* 380:364-366; Pasqualini, 1999, *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162). 간단히, 추정되는(putative) 표적 펩티드를 포함하는 파지의 라이브러리를 온전한 개체 또는 분리된 기관, 조직, 세포 타입 또는 표적 분자에 투여하고, 결합된 파지를 포함하는 시료를 수집한다. 표적에 결합하는 파지는 표적 기관, 조직, 세포 타입 또는 표적 분자로부터 용리되어 숙주 박테리아에서 그들을 성장시켜 증폭할 수 있다.
- [0068] 특정 구현예에서, 파지는 패닝 횟수 사이에 숙주 박테리아에서 증식될 수 있다. 파지에 의해 용해되는 것보다, 박테리아는 대신에 특정 삽입물을 디스플레이하는 다수 카피의 파지를 분비할 수 있다. 원한다면, 증폭된 파지

는 표적 기관, 조직, 세포 타입 또는 표적 분자에 다시 노출될 수 있고, 패닝 횟수를 추가하기 위해 수집될 수 있다. 선별적인 또는 특이적인 결합자의 군집이 얻어질 때까지 여러 번의 패닝이 수행될 수 있다. 펩티드의 아미노산 서열은 파지 게놈에서 표적 펩티드 삽입물에 해당하는 DNA를 시퀀싱함으로써 결정될 수 있다. 그리고 나서 확인된 표적 펩티드는 표준 단백질 화학 기술에 의해 합성 펩티드로 생산될 수 있다(Arap *et al.*, 1998a, Smith *et al.*, 1985).

[0069] 몇몇 구현예에서, 배경 파지 결합을 더 감소시키기 위해 차감(subtraction) 프로토콜이 사용될 수 있다. 차감의 목적은 관심있는 표적 이외의 표적에 결합하는 파지를 라이브러리로부터 제거하기 위한 것이다. 선택적인 구현예에서, 파지 라이브러리는 대조군 세포, 조직 또는 기관에 대해 먼저 선별될 수 있다. 예를 들어, 종양 결합 펩티드는 대조군 정상 세포주에 대한 라이브러리를 먼저 스크리닝한 후에 확인될 수 있다. 차감 후에 라이브러리는 관심있는 분자, 세포, 조직 또는 기관에 대해 스크리닝될 수 있다. 차감 프로토콜의 다른 방법이 알려져 있고, 예를 들어 미국특허 5,840,841, 5,705,610, 5,670,312 및 5,492,807(본 명세서에 인용에 의해 포함)에 기재된대로 특허청구된 방법을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0070] 단백질 및 펩티드

[0071] 다양한 폴리펩티드 또는 단백질이 특허청구된 방법 및 조성물의 범주 내에서 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 단백질은 항체 또는 항원-결합 부위를 포함하는 항체의 절편을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, PIGF와 같은 짧은 표적의 펩티드 리간드는 세포, 조직 또는 기관에서 PIGF 수용체의 존재를 검출하거나, PIGF가 그 수용체에 결합하는 것을 억제 또는 차단하거나, PIGF가 그 수용체에 결합하는 것을 촉진 또는 활성화하거나, 또는 PIGF 분자 또는 그 수용체의 일부를 모방하는 것과 같은 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

[0072] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드는 일반적으로 유전자로부터 번역된 전체 길이 서열까지 약 200 아미노산보다 더 큰 단백질; 약 100 아미노산보다 더 큰 폴리펩티드; 및/또는 약 3 내지 100 아미노산의 펩티드를 일컫지만 이에 한정되는 것은 아니다. 편의상, "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"라는 용어는 본 명세서에서 교환가능하게 사용된다. 따라서, "단백질 또는 펩티드"라는 용어는 자연적으로 존재하는 단백질에서 발견되는 20개의 일반적인 아미노산, 또는 적어도 하나의 변형 또는 비정상 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포괄한다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아미노산 잔기"는 당업계에 알려진 임의의 자연적으로 존재하는 아미노산, 임의의 아미노산 유도체 또는 임의의 아미노산 모방물을 일컫는다. 특정 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 잔기는 아미노산 잔기 서열을 중단하는 임의의 비-아미노산 없이 연속적이다. 다른 구현예에서, 상기 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티에 의해 중단될 수 있다.

[0074] 따라서, "단백질 또는 펩티드"라는 용어는 하기 표 1에 나타난 것들을 포함하나 이에 한정되지는 않는, 자연적으로 존재하는 단백질에서 발견되는 20개의 일반적인 아미노산 중 적어도 하나 또는 적어도 하나의 변형 또는 비정상적 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포괄한다.

[0075] [표 1]

[0076]

표 1			
변형되고 비정상적인 아미노산			
약자	아미노산	약자	아미노산
Aad	2-Aminoadipic acid	EtAsn	N-Ethylasparagine
Baad	3- Amino adipic acid	Hyl	Hydroxylysine
Bala	b-alanine, b-Amino-propionic acid	AHyl	allo-Hydroxylysine
Abu	2-Aminobutyric acid	3Hyp	3-Hydroxyproline
4Abu	4-Aminobutyric acid, piperidinic acid	4Hyp	4-Hydroxyproline
Acp	6-Aminocaproic acid	Ide	iosdesmosine
Ahe	2-Aminoheptanoic acid	AIle	allo-isoleucine
Aib	2-Aminoisobutyric acid	MeGly	N-Methylglycine, sarcosine
Baib	3-Aminoisobutyric acid	MeIle	N-Methylisoleucine
Apm	2-Aminopimelic acid	MeLys	6-N-Methyllysine
Dbu	2,4-Diaminobutyric acid	MeVal	N-Methylvaline
Des	Desmosine	Nva	Norvaline
Dpm	2,2'-Diaminopimelic acid	Nle	Norleucine

Dpr	2,3-Diaminopropionic acid	Orn	Ornithine
EtGly	N-Ethylglycine		

[0077] 단백질 또는 펩티드는 표준 분자 생물학적 기술을 통한 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현, 천연 공급원로부터 단백질 또는 펩티드의 분리 또는 단백질 또는 펩티드의 화학적 합성을 포함하는 당업자에게 알려진 임의의 기술에 의해 만들어질 수 있다. *PIGF* 유전자와 같은 다양한 유전자에 해당하는 뉴클레오티드와 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 서열은 이미 개시되어 있고, 당업자에게 알려진 컴퓨터화된 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 그러한 데이터베이스 중 하나는 National Center for Biotechnology Information's Genbank 및 GenPept databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/)이다. 알려진 유전자의 암호화 부위는 본 명세서에 기재되거나 당업자에게 알려진 기술을 사용하여 증폭 및/또는 발현될 수 있다. 대안적으로, 다양한 상업적 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 제조물이 당업계에 알려져 있다.

[0078] 펩티드 미메틱스

[0079] 폴리펩티드 제조의 또 다른 구현에는 펩티드 미메틱스를 사용하는 것이다. 미메틱스는 단백질 2차 구조의 요소를 모방하는 펩티드-포함 분자이다. 예를 들어, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있는 Johnson *et al.*, "peptide Turn Mimetics" in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, New York(1993) 참조. 펩티드 미메틱스를 사용하는 것의 이론적 해석은 단백질의 펩티드 골격(backbone)이 항체 및 항원의 경우와 같은 분자 상호작용을 용이하게 하기 위해 주로 아미노산 측쇄를 향해 존재한다는 것이다. 펩티드 미메틱스는 천연의 분자와 유사한 분자 상호작용을 허용할 것으로 기대된다. 이러한 원리는 본 명세서에 기재된 결합 펩티드의 자연적 특성 중 많은 것을 갖지만 위나 장을 지나 흡습성을 증가시키거나 및/또는 생체 내에서 안정성이나 활성을 향상시키는 것과 같이 변경되거나 향상된 특징을 갖는 2차 생산 분자를 가공하는데 사용될 수 있다.

[0080] 융합 단백질

[0081] 다양한 구현에는 융합 단백질과 관련이 있을 수 있다. 이 분자들은 일반적으로 2차 폴리펩티드 또는 단백질의 전체 또는 일부에 N- 또는 C-말단이 연결된 펩티드의 전체 또는 상당한 부위를 갖는다. 예를 들어, 융합은 이형 숙주에서 단백질의 재조합 발현을 허용하도록 다른 종 유래의 선두 서열(leader sequence)을 사용할 수 있다. 다른 유용한 융합은 항체 에피토프와 같이 면역학적으로 활성인 도메인을 첨가하는 것을 포함한다. 또 다른 유용한 융합 형태는 FLAG 에피토프와 같은 정제용 모이어티를 부착하는 것을 포함할 수 있다(Prickett *et al.*, 1989, *Biotechniques* 7:580-589; Castrucci *et al.*, 1992, *J Virol* 66:4647-4653). 융합 단백질을 생산하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 그러한 단백질은 예를 들어 이중기능적 교차-결합 시약을 사용한 화학적 부착이나, 완전한 융합 단백질의 드 노보(*de novo*) 합성이나, 또는 2차 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 1차 단백질 또는 펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 부착한 후 온전한 융합 단백질을 발현함으로써 생산될 수 있다.

[0082] 단백질 정제

[0083] 몇몇 구현예에서, 단백질 또는 펩티드는 분리되거나 정제될 수 있다. 단백질 정제 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 이러한 기술은 한 레벨에서 세포, 조직 또는 기관을 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 분획으로 균질화 및 조 분획하는 것을 포함한다. 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드는 부분적인 또는 완전한 정제(또는 균질하게 정제)를 달성하기 위하여 크로마토그래피 및 전기영동 기술을 사용하여 추가로 정제될 수 있다. 정제된 펩티드 제작에 특히 적합한 분석방법은 이온-교환 크로마토그래피, 겔 배체 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 친화도 크로마토그래피, 면역친화도 크로마토그래피 및 IEF(isoelectric focusing)이다. 펩티드를 정제하는 특히 효율적인 방법은 빠른 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC) 또는 그에 준하는 HPLC이다.

[0084] 단백질 정제에 사용하기에 알맞은 다양한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 이들은 예를 들어, 암모늄 설페이트, PEG, 항체 등에 의한 또는 열 변성에 의한 침강과, 이후의 원심분리; 이온 교환, 겔 여과, 역상, 히드록실아파타이트 및 친화도 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 단계; IEF; 겔 전기영동 및 이들과 다른 기술의 조합을 포함한다. 당업계에 일반적으로 알려진 것과 같이, 다양한 정제 단계를 실시하는 순서가 바뀌거나, 특정 단계가 생략될 수 있고, 여전히 실질적으로 정제된 단백질 또는 펩티드 제작에 알맞은 방법인 것으로 믿어진다.

- [0085] 일반적으로 단백질 또는 펩티드가 항상 그들의 가장 정제된 상태로 제공될 필요는 없다. 실제로, 실질적으로 덜 정제된 산물이 특정 구현예에서는 유용성을 가질 것이라고 생각된다. 부분적인 정제는 더 적은 정제 단계를 조합하여 사용하거나, 또는 다른 형태의 동일한 일반 정제 계획(scheme)을 사용함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, HPLC 기구를 사용하여 수행되는 양이온-교환 컬럼 크로마토그래피는 일반적으로 저-압 크로마토그래피 시스템을 사용하는 동일한 기술보다 더 큰 "배(fold)"의 정제를 가져올 것이다. 상대적으로 더 낮은 정도의 정제를 나타내는 방법은 단백질 산물의 전체 회수 또는 발현된 단백질의 활성 유지에 있어 잇점을 가질 수 있다.
- [0086] 친화도 크로마토그래피는 분리될 기질과 여기에 특이적으로 결합할 수 있는 분자 사이의 특이적 친화도에 의존하는 크로마토그래피 방법이다. 이는 수용체-리간드 형 상호작용이다. 컬럼 물질은 자성 비드(Dynal) 또는 세파로즈 또는 세파텍스 비드(Pharmacia)와 같은 불용성 매트릭스에 결합 파트너 중 하나를 공유 커플링시킴으로써 합성된다. 그리고 나서 상기 컬럼 물질은 용액으로부터 특이적으로 기질을 흡착할 수 있다. 용리는 조건을 결합이 일어나지 않는 조건(예, 변경된 pH, 이온 강도, 온도 등)으로 변화시킴으로써 일어난다. 매트릭스는 그 자체로는 유의미한 정도로 분자를 흡착하지 않고 넓은 범위의 화학적, 물리적 및 열적 안정성을 갖는 기질이어야 한다. 리간드는 그 결합 특성에 영향을 미치지 않는 방식으로 커플링되어야 한다. 리간드는 또한 상대적으로 강한 결합을 제공해야 한다. 그리고 시료나 리간드를 파괴하지 않고 기질을 용리할 수 있어야 한다.
- [0087] 합성 펩티드
- [0088] 단백질 또는 펩티드는 종래기술에 따라 용액 또는 고체 지지물에서 전체 또는 부분으로 합성될 수 있다. 다양한 자동 합성기가 상업적으로 이용가능하고, 알려진 프로토콜에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어 Stewart and Young, (1984, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co.); Tam *et al.*, (1983, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442); Merrifield, (1986, *Science*, 232: 341-347); 및 Barany 및 Merrifield (1979, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284) 참조. 일반적으로 약 6에서 약 35 내지 50 아미노산의 짧은 펩티드 서열은 그러한 방법으로 쉽게 합성될 수 있다. 대안적으로, 관심있는 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 발현 벡터 내에 삽입되고, 적당한 숙주 세포로 형질변환 또는 형질전환되고, 발현에 적합한 조건하에 배양되는 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다.
- [0089] 항체
- [0090] 다양한 구현예가 항-PIGF 항체와 같은 표적에 대한 항체 리간드에 관한 것일 수 있다. "항체"라는 용어는 본 명세서에서 항원 결합 부위를 갖는 임의의 항체-유사 분자를 나타내기 위해 사용되며, Fab', Fab, F(ab')₂, 단일 도메인 항체(DAB), Fv, scFv(단쇄 Fv), 등과 같은 항체 절편을 포함한다. 다양한 항체-기반 컨스트럭트 및 절편을 제작하고 사용하는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 항체를 제작하고 동정하는 방법 또한 당업계에 잘 알려져 있다(예, Harlowe and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 참조). 사용할 항체는 또한 매우 다양한 알려진 공급원으로부터 상업적으로 얻어질 수 있다. 예를 들어, 항체를 분비하는 다양한 하이브리도마 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)로부터 이용가능하다.
- [0091] 폴리클론 항체
- [0092] 폴리클론 항체는 면역원으로 동물을 면역화하고, 면역화된 동물로부터 항혈청을 수집함으로써 제조될 수 있다. 광범위한 동물 종이 항혈청 생산에 사용될 수 있다. 일반적으로 항혈청 생산에 사용되는 동물은 비-인간 동물, 예를 들어 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 돼지 또는 말이다. 토끼의 혈액량이 상대적으로 크기 때문에, 토끼는 폴리클론 항체 생산을 위한 바람직한 선택이다.
- [0093] 폴리클론 및 모노클론 항체 모두는 종래의 면역화 기술을 사용하여 제작될 수 있다. 항원성 에피토프를 포함하는 조성물은 토끼나 마우스와 같은 하나 이상의 실험 동물을 면역화하는데 사용될 수 있으며, 이후 특이적 항체를 생산하기 위해 진행된다. 폴리클론 항혈청은 항체 생산을 위해 필요한 시간이 경과한 후에 단순히 동물을 출혈시켜 전혈로부터 혈청 시료를 준비함으로써 얻어질 수 있다.
- [0094] 주어진 조성물은 그 면역원성이 다양할 수 있다. 그러므로 숙주 면역 시스템을 촉진(boost)하는 것이 종종 필요하며 이것은 면역원을 담체에 커플링함으로써 달성될 수 있다. 예시적인 및 바람직한 담체는 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 및 우혈청 알부민(BSA)이다. 오발부민, 마우스 혈청 알부민 또는 토끼 혈청 알부민 같은 다른 알부민 또한 담체로 사용될 수 있다. 항원을 담체 단백질에 공유결합시키는 방법은 잘 알려져 있고, 글루타르알데히드, *m*-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르, 카르보디이미드 및 비스-디아조타이즈화된 벤지딘

(bis-diazotized benzdine)과 같은 교차-결합자를 포함한다.

- [0095] 특정 면역원 조성물의 면역원성은 아쥘반트(adjuvant)로 알려진 면역 반응의 비-특이적인 자극제를 사용함으로써 증진될 수 있다. 구현예 및 바람직한 아쥘반트는 완전한 프로인드 아쥘반트(즉, *Mycobacterium tuberculosis*를 포함하는 면역 반응의 비-특이적인 자극제), 불완전한 프로인드 아쥘반트(Freund's adjuvant) 및 알루미늄 히드록시드 아쥘반트를 포함한다.
- [0096] 폴리클론 항체의 생산에 사용되는 면역원성 조성물의 양은 면역화에 사용되는 동물 뿐 아니라 면역원의 성질에 따라 다양하다. 면역원을 투여하는데 다양한 경로가 사용될 수 있다(피하, 근육내, 피내, 정맥내 및 복강내). 폴리클론 항체의 생산은 면역화 후 다양한 시점에서 면역화된 동물의 피를 샘플링함으로써 모니터링 될 수 있다. 두번째인 촉진(booster) 주사 또한 주어질 수 있다. 촉진과 적정 과정은 적당한 적정이 달성될 때까지 반복된다. 원하는 수준의 면역원성이 얻어지면, 면역화된 동물은 출혈시켜 혈청을 분리 및 저장하거나 및/또는 동물은 모노클론 항체를 생산하는데 사용될 수 있다.
- [0097] 모노클론 항체
- [0098] 모노클론 항체는 미국특허 4,196,265에 예시된 것들과 같은 잘 알려진 기술을 사용하여 쉽게 제작될 수 있다. 일반적으로, 이 기술은 적당한 동물을 선별된 면역원 조성물로 면역화하는 것을 포함한다. 면역화하는 조성물은 항체 생산 세포를 자극하는데 효과적인 방식으로 투여된다. 마우스 및 래트 같은 설치류의 세포가 바람직하다. 마우스가 보다 바람직하고, BALB/c 마우스가 가장 바람직한데, 이는 가장 통상적으로 사용되고 일반적으로 더 높은 퍼센트의 안정한 융합을 제공하기 때문이다.
- [0099] 면역화에 이어서, 항체를 생산할 잠재력을 갖는 체세포, 특히 B-림프구(B-세포)가 mAb 생산 프로토콜에 사용되기 위해 선별된다. 이 세포들은 생검된 췌장, 편도선 또는 림프절로부터 얻어지거나, 또는 말초 혈액 시료로부터 얻어질 수 있다. 췌장 세포 및 말초 혈액 세포가 바람직한데, 전자는 분열하는 형질아세포 단계에 있는 항체-생산 세포의 풍부한 공급원이고, 후자는 말초 혈액이 쉽게 접근가능하기 때문이다. 종종, 한 패널의 동물을 면역화하고, 가장 높은 항체 역가를 갖는 동물의 췌장을 제거하여, 췌장을 주사기로 균질화함으로써 췌장 림프구를 얻을 것이다. 일반적으로 면역화된 마우스의 췌장은 약 5×10^7 내지 2×10^8 림프구를 포함한다.
- [0100] 그리고나서 면역화된 동물로부터 얻은 항체-생산 B-림프구는 일반적으로 면역화된 동물과 같은 종인 불멸의 골수종 세포와 융합된다. 하이브리도마-생산 융합 과정에서 사용하기에 적당한 골수종 세포주는 바람직하게는 항체를 생산하기 쉽고, 높은 융합 효율을 가지며, 원하는 융합된 세포(하이브리도마)만 성장하도록 하는 특정 선별 배지에서 자랄 수 없도록 하는 효소 결핍을 갖는다.
- [0101] 수많은 골수종 세포 중 어느 하나는 당업자에게 알려진대로 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역화된 동물이 마우스일 때, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 41, Sp210-Ag14, F0, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XX0을 사용할 수 있다: 래트일 때, R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210을 사용할 수 있다. U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6은 모두 세포 융합과 관련하여 유용하다.
- [0102] 항체-생산 췌장 또는 림프절 세포 및 골수종 세포의 하이브리드를 생산하는 방법은 일반적으로 세포막의 융합을 촉진하는 제제 또는 제제들(화학적 또는 전기적)의 존재하에 체세포를 골수종 세포와 2:1 비율로 혼합하는 단계를 포함하고, 상기 비율은 각각 약 20:1로부터 약 1:1까지 다양할 수 있다. 센다이 바이러스를 사용한 융합 방법 및 37%(v/v) PEG와 같이 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 사용한 방법이 개시되어 왔다. 전기적으로 유도된 융합 방법을 사용하는 것 또한 적당하다.
- [0103] 융합 과정은 일반적으로 약 1×10^{-6} 내지 1×10^{-8} 의 낮은 빈도로 살아있는 하이브리드를 생산한다. 그러나, 선택배지에서 배양함으로써 살아있는 융합된 하이브리드가 융합되지 않은 모세포(특히 정상적으로 무한하게 분열을 계속하는 융합되지 않은 골수종 세포)로부터 분화하기 때문에 이는 문제가 되지 않는다. 상기 선택 배지는 일반적으로 조직 배양 배지에서 뉴클레오티드의 드 노보 합성을 막는 제제를 포함하는 것이다. 예시적인 및 바람직한 제제는 아미노프테린, 메소트렉세이트 및 아자세린이다. 아미노프테린 및 메소트렉세이트는 퓨린 및 피리미딘 모두의 드 노보 합성을 막는 반면에 아자세린은 퓨린 합성만을 막는다. 아미노프테린 또는 메소트렉세이트가 사용될 때, 배지는 뉴클레오티드의 공급원으로서 하이폭산틴 및 티미딘이 보충된다(HAT 배지). 아자세린이 사용될 때, 배지는 하이폭산틴이 보충된다.
- [0104] 바람직한 선별 배지는 HAT이다. 뉴클레오티드 회수 경로(salvage pathway)를 작동시킬 수 있는 세포만이 HAT 배지에서 생존할 수 있다. 상기 골수종 세포는 회수 경로의 주요 효소(예, 하이폭산틴 포스포리보실 트랜스퍼

라제, HPRT)가 결핍되어 있어 생존할 수 없다. B-세포는 이 경로를 작동시킬 수 있으나 그들은 배양시 제한된 생존기간을 갖고 일반적으로 약 2주 내에 죽는다. 그러므로, 선별 배지에서 생존할 수 있는 세포는 골수종 및 B-세포에서 형성된 하이브리드 뿐이다.

[0105] 이러한 배양은 특이적인 하이브리도마가 선별되는 하이브리도마 군집을 제공한다. 일반적으로 하이브리도마의 선별은 마이크로타이터 플레이트에서 단일클론 희석에 의해 세포를 배양하고, 이어서 원하는 활성을 위해 각각의 클론 상등액을 테스트(약 2 내지 3 주 후에)하여 수행된다. 상기 분석은 방사성면역분석, 효소 면역분석, 세포독성 분석, 플라크 분석, 닷 면역결합 분석 등과 같이 민감하고, 단순하고 빨라야한다.

[0106] 그리고나서 선별된 하이브리도마는 연속적으로 희석되어 각각의 항체-생산 세포주로 클로닝되며, 그리고나서 상기 클론은 mAb를 무한하게 생산하도록 증식될 수 있다. 상기 세포주는 두 가지 기본적인 방법으로 mAb 생산을 위해 이용될 수 있다. 하이브리도마 시료는 처음에 융합을 위해 체세포 및 골수종 세포를 제공하는데 사용된 타입의 조직적합성 동물 내로 주입된다(종종 복강으로). 주입된 동물은 융합된 세포 하이브리드에 의해 생산된 특이적인 단일클론 항체를 분비하는 종양을 발달시킨다. 그리고나서 혈청이나 복강액과 같은 동물의 체액을 보다 높은 농도로 mAb를 제공할 수 있다. 각각의 세포주는 또한 시험관 내에서 배양되거나, mAb가 자연적으로 선별배지로 분비되고, 이로부터 고농도로 쉽게 얻어질 수 있다. 어느 한 쪽의 방법에 의해 생산된 mAb는 원한다면 여과, 원심분리 및 HPLC나 친화도 크로마토그래피와 같은 다양한 크로마토그래피 방법을 사용하여 더 정제될 수 있다.

[0107] 항체 절편의 생산

[0108] 특허청구된 방법 및/또는 조성물의 몇몇 구현예는 항체 절편에 관한 것일 수 있다. 그러한 항체 절편은 종래 방법에 의해 전체 항체의 펩신 또는 파파인(papain) 절단에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, 항체 절편은 펩신으로 항체를 효소적으로 절단시켜 생산될 수 있으며, F(ab')₂로 표시되는 5S 절편을 제공한다. 이 절편은 티올 환원제 및 선택적으로, 이황화 결합의 절단으로 생기는 설피드릴 기에 대한 차단기를 사용하여 더 절단되어 3.5S Fab' 1가 절편을 생산할 수 있다. 대안적으로, 펩신을 사용한 효소적 절단은 2개의 1가 Fab 절편 및 Fc 절편을 생산한다. 항체 절편을 생산하는 예시적인 방법이 미국특허 제4,036,945; 미국특허 제4,331,647; Nisnooff et al., 1960, Arch. Biochem. Biophys., 89:230; Porter, 1959, Biochem. J., 73:119; Edelman et al., 1967, METHODS IN ENZYMOLOGY, 페이지 422(Academic Press) 및 Coligan et al.(eds.), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,(John Wiley & Sons)에 기재되어 있다.

[0109] 1가 경-중쇄 절편을 형성하도록 중쇄를 분리하는 것, 추가적인 절편 절단 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기술과 같이 항체를 절단하는 다른 방법 또한 절편이 온전한 항체에 의해 인식되는 항원에 결합하는 한 사용될 수 있다. 예를 들어 Fv 절편은 V_H 및 V_L 쇠의 결합을 포함한다. 이 결합은 Inbar et al., 1972, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 69:2659에 기재된대로 비공유결합일 수 있다. 대안적으로, 상기 가변쇄(variable chain)는 분자간 이황화 결합으로 연결되거나, 또는 글루타르알데히드와 같은 화합물에 의해 교차결합될 수 있다. Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437 참조.

[0110] 바람직하게는, 상기 Fv 절편은 펩티드 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 쇠를 포함한다. 이 단일쇄 항원 결합 단백질(sFv)은 올리고뉴클레오타이드 링커 서열에 의해 연결된 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 구조 유전자를 제작함으로써 준비된다. 상기 구조 유전자는 발현 벡터 내로 삽입되고, 이어서 대장균 같은 숙주 세포로 도입된다. 재조합 숙주 세포는 두 개의 V 도메인을 잇는 링커 펩티드를 갖는 단일 폴리펩티드쇄를 합성한다. sFv를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Whitlow et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird et al., 1988, Science, 242:423; 미국특허 제4,946,778; Pack et al., 1993, Bio/Technology, 11:1271, and Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437 참조).

[0111] 항체 절편의 또 다른 형태는 하나의 상보성-결정 부위(CDR)를 암호화하는 펩티드이다. CDR 펩티드("최소 인식 단위")는 관심있는 항체의 CDR을 암호화하는 유전자를 제작함으로써 얻을 수 있다. 그러한 유전자는 예를 들어, 항체-생산 세포의 RNA로부터 가변 부위를 합성하기 위해 PCR를 사용하여 제작될 수 있다(Larrick et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter et al.(eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, 페이지 166-179(Cambridge University Press); Birch et al.(eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, 페이지 137-185(Wiley-Liss, Inc.)참조).

[0112] 키메라 및 인간화된 항체

[0113] 키메라 항체는 인간 항체의 가변 부위가 예를 들어, 마우스 항체의 상보성-결정 부위(CDR)를 포함하는 항-PIGF 마우스 항체의 가변 부위로 치환된 재조합 단백질이다. 키메라 항체는 대상에게 투여될 때 감소된 면역원성 및 증가된 안정성을 나타낸다. 키메라 항체를 제작하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예, Leung et al., 1994, *Hybridoma* 13:469).

[0114] 키메라 단일클론 항체는 마우스 면역글로불린의 중 및 경 가변쇄 유래의 마우스 CDR을 인간 항체의 상응하는 가변 도메인 내로 전달시킴으로써 인간화될 수 있다. 상기 키메라 단일클론 항체 내의 마우스 골격 부위(FR)는 또한 인간 FR 서열로 치환된다. 인간화된 단일클론의 안정성 및 항원 특이성을 보존하기 위해, 하나 이상의 인간 FR 잔기가 마우스 대응 잔기로 치환될 수 있다. 인간화된 단일클론 항체는 대상의 치료용 처치를 위해 사용될 수 있다. 표적에 대한 인간화된 항체의 친화도는 또한 CDR 서열의 선별적인 변형에 의해 증가될 수 있다(WO0029584A1). 인간화된 단일클론 항체의 생산 기술은 당업계에 알려져 있다(예, Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534; Carter et al., 1992, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:4285; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9:266; Singer et al., *J. Immun.*, 1993, 150:2844 참조).

[0115] 다른 구현에는 비-인간 영장류 항체에 관한 것일 수 있다. 비비원숭이(baboon)에서 치료적으로 유용한 항체를 유발하는 일반적인 기술은 예를 들어 Goldenberg et al., WO 91/11465(1991) 및 Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310(1990)에서 발견될 수 있다.

[0116] 또 다른 구현예에서, 항체는 인간 단일클론 항체일 수 있다. 그러한 항체는 항원 자극에 대한 반응으로 특이적인 인간 항체를 생산하기 위해 유전공학적으로 조작된 형질전환 마우스로부터 얻어진다. 이 기술에서, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자좌 요소는 내부 중쇄 및 경쇄 유전자좌를 표적으로 한 붕괴를 포함하는 배아 줄기세포주로부터 유도된 마우스의 종 내로 도입된다. 상기 형질전환 마우스는 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있고, 상기 마우스는 인간 항체-분비 하이브리도마를 생산하는데 사용될 수 있다. 형질전환 마우스로부터 인간 항체를 얻는 방법은 Green et al., *Nature Genet.* 7:13(1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856(1994) 및 Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579(1994)에 기재되어 있다.

[0117] 인간 항체

[0118] 조합적인 접근방법 또는 인간 면역글로불린좌로 형질전환된 형질전환 동물 중 어느 하나를 사용하여 완전한 인간 항체를 생산하는 방법은 당업계에 알려져 있다(예, Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke and Loiset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50; 각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 그러한 완전한 인간 항체는 키메라 또는 인간화된 항체보다 훨씬 더 적은 부작용을 나타내고, 근본적으로 내부 인간 항체와 같이 생체 내에서 작용할 것으로 기대된다. 특정 구현예에서, 특허청구된 방법 및 과정은 그러한 기술에 의해 생산된 인간 항체를 사용할 수 있다.

[0119] 한 대안에서, 전술한 파지 디스플레이 기술은 인간 항체를 생산하는데 사용될 수 있다(예, Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 인간 항체는 정상적인 인간 또는 암과 같은 특정 질병 상태를 나타내는 인간으로부터 생성될 수 있다(Dantas-Barbosa et al., 2005). 질병에 걸린 개체로부터 인간 항체를 제작하는 잇점은 순환하는 항체 레파토리가 질병-관련 항원에 대한 항체로 향해 있을 수 있기 때문이다.

[0120] 이 방법의 한 비-제한적인 실시예에서, Dantas-Barbosa 등(2005)은 골육종 대상로부터 인간 Fab 항체 절편의 파지 디스플레이 라이브러리를 제작했다. 일반적으로 전체 RNA는 순환하는 혈액 림프구로부터 얻어졌다(*Id.*). 재조합 Fab는 μ , γ 및 k 쇄 항체 레파토리로부터 클로닝되어 파지 디스플레이 라이브러리로 삽입되었다(*Id.*). RNA는 cDNA로 전환되었고, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 서열에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 Fab cDNA 라이브러리를 만드는데 사용되었다(Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 라이브러리 제작은 Andris-Widhopf 등(2000, In: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al.(eds), 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 to 9.22, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)에 따라 수행되었다. 최종 Fab 절편은 제한효소로 절단되어, 파지 디스플레이 라이브러리를 만들기 위해 박테리오파지 게놈으로 삽입되었다. 그러한 라이브러리는 전술한 바와 같은 표준 파지 디스플레이에 의해 스크리닝될 수 있다. 당업자는 이 기술이 단지 예시일 뿐이고, 파지 디스플레이에

의해 인간 항체 또는 항체 절편을 만들고 스크리닝하는 임의의 알려진 방법이 사용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0121] 또 다른 대안에서, 인간 항체를 생산하도록 유전공학적으로 조작된 형질전환 동물은 전술한 바와 같은 표준 면역화 프로토콜을 사용하여 근본적으로 임의의 면역원성 표적에 대한 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 시스템의 비-제한적인 실시예는 Abgenix(Fremont, CA)의 XenoMouse[®](예, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)이다. XenoMouse[®] 및 유사한 동물에서, 마우스 항체 유전자는 불활성화되고 기능적인 인간 항체 유전자에 의해 치환되며, 나머지 마우스 면역 시스템은 온전하게 남아있다.

[0122] XenoMouse[®]은 보조 유전자 및 조절 서열과 함께 가변 부위 서열의 대부분을 포함하는 인간 IgH 및 Igkappa 유전자 좌의 일부를 포함하는 생식세포-한정된 YAC(효모 인공 염색체)으로 형질전환되었다. 인간 가변 부위 레파토리는 B 세포를 생산하는 항체를 생산하는데 사용될 수 있는데, 이는 알려진 기술에 의해 하이브리도마로 가공될 수 있다. 표적 항원으로 면역화된 XenoMouse[®]은 정상적인 면역 반응에 의해 인간 항체를 생산할 것이고, 이는 상기 표준 기술에 의해 회수 및/또는 생산될 수 있다. 다양한 종의 XenoMouse[®]이 이용가능하고, 그 각각은 서로 다른 클래스의 항체를 생산할 수 있다. 그러한 인간 항체는 화학적 교차 결합 또는 다른 알려진 방법에 의해 예를 들어, PIGF 리간드에 커플링될 수 있다. 형질전환적으로 생산된 인간 항체는 정상적인 인간 항체의 약력학적 특성을 갖고 있으면서 치료적 잠재력을 가진 것으로 나타났다(Green et al., 1999). 당업자는 특허청구된 조성물 및 방법이 XenoMouse[®] 시스템의 사용에 한정되지는 않고, 인간 항체를 생산하기 위해 유전공학적으로 조작된 임의의 형질전환 동물을 사용할 수 있음을 인식할 것이다.

[0123] 이중-특이적 항체 및 콘주게이트

[0124] 특정한 구현예에서, 본 명세서에 기재된 PIGF 리간드는 상기 리간드에 부착된 또 다른 분자와 함께 사용될 수 있다. 부착은 공유결합 또는 비-공유결합일 수 있다. 몇몇 구현예에서, PIGF 리간드는 이중-특이적 항체, 즉 하나는 PIGF 리간드에 결합하고 또 다른 것은 질병-관련된 표적 항원에 결합하는 두 가지 서로 다른 결합 부위를 갖는 항체에 부착될 수 있다. 혈관신생, 암, 전이 또는 세포 운동성에 관계된 임의의 질병 또는 상태가 표적이 될 수 있고, 원발성 암, 전이성 암, 과형성(hyperplasia), 류머티즘성 관절염, 염증성 장 질환, 크론씨병, 궤양성 대장염, 유육종증, 천식, 부종, 폐 고혈압, 중앙 조직의 형성 및 발달, 건선, 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 각막 변성 거부반응, 혈관신생 녹내장, 심근 혈관신생, 플라크 신생혈관증식, 재협착, 신내막 혈관 손상 후 신생 내막 형성, 모세관 확장증, 혈우병 관절, 혈관섬유증, 만성염증과 관련된 섬유증, 폐 섬유증, 깊은 정맥 혈전증 및 상처 과립을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 이중-특이적이고 다중-특이적인 항체의 제작 및 사용 방법은 예를 들어, 미국특허출원 공개 제20050002945(2/11/2004 출원)에 기재되어 있고, 그 전문은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다.

[0125] 이중-특이적 항체가 부분적으로 종양-관련 항원에 대한 표적이 될 때, 임의의 타입의 종양 및 임의의 타입의 종양 항원 또한 표적이 될 수 있을 것으로 예상된다. 표적이 될 수 있는 종양의 타입의 예시로는 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 담도암, 유방암, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 자궁내막암, 식도, 위장, 두경부암, 호지킨스씨 임파종, 폐암, 수질암, 비-호지킨스씨 임파종, 난소암, 췌장암, 신경교종, 흑색종, 간암, 전립선암 및 방광암을 포함한다. PIGF를 지속적으로 발현하거나 PIGF를 생산하도록 자극받을 수 있는 종양이 바람직하다.

[0126] 표적이 될 수 있는 종양-관련 항원은 A3, A33 항체에 특이적인 항원, BrE3-항원, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD45, CD74, CD79a, CD80, HLA-DR, NCA 95, NCA90, HCG 및 그의 서브유닛, CEA(CEACAM-5), CEACAM-6, CSAP, EGFR, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Ba 733, HER2/neu, 저산소증 유도 인자(HIF), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, PAM-4-항원, PSA, PSMA, RS5, S100, TAG-72, p53, 테나신, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), Tn 항원, 톰슨-프리드리히 항원, 종양 괴사 항원, VEGF, 17-1A-항원, 혈관신생 마커(예, ED-B 피브로넥틴), 종양 유전자 마커, 종양 유전자 산물 및 다른 종양-관련 항원을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 종양 관련 항원에 대한 최근 보고는 Mizukami 등(2005, *Nature Med.* 11:992-97); Hatfield 등(2005, *Curr. Cancer Drug Targets* 5:229-48); Vallbohmer 등(2005, *J. Clin. Oncol.* 23:3536-44) 및 Ren 등(2005, *Ann. Surg.* 242:55-63)을 포함하고, 각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다.

[0127] 다양한 재조합 방법이 이중-특이적 항체 및 항체 절편을 생산하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이중-특이적

항체 및 항체 절편은 형질전환된 가축의 우유에서 생산될 수 있다(예, Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63: 141-147, 1998; 미국특허 제5,827,690 참조, 각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 쌍으로 된 면역 글로불린 중쇄 및 경쇄를 각각 암호화하는 DNA 절편을 포함하는 두 개의 DNA 컨스트럭트가 제작된다. 상기 절편은 포유류의 상피 세포에서 바람직하게 발현되는 프로모터 서열을 포함하는 발현 벡터 내로 클로닝된다. 실시예는 토끼, 소 및 양 카세인 유전자, 소 알파-락토글로불린 유전자, 양 베타-락토글로불린 유전자 및 마우스 유청산(whey acid) 단백질 유전자의 프로모터를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게는, 삽입된 절편은 포유류 특이적 유전자의 동족의 게놈 서열이 3' 쪽에 연결된다. 이는 폴리아데닐화 부위와 전사 안정화 서열을 제공한다. 상기 발현 카세트는 수정된 포유류 난자의 전핵 내로 함께 주입되고, 그리고나서 대리모의 자궁으로 이식되고 잉태된다. 탄생 후, 자손은 서던 분석에 의해 형질전환 유전자 모두가 존재하는지를 스크리닝한다. 항체가 존재하기 위해서는 중쇄 및 경쇄 유전자 모두 동일한 세포에서 동시에 발현되어야 한다. 형질전환된 암컷의 우유는 당업계에 알려진 표준 면역학적 방법을 사용하여 항체 또는 항체 절편의 존재 및 기능이 분석된다. 상기 항체는 당업계에 알려진 표준 방법을 사용하여 우유로부터 정제될 수 있다.

[0128] 전-표적화

[0129] 이중-특이적 항체를 사용하기 위한 한 가지 전략은 미리 표적화하는 방법을 포함하는데, 여기서 항-혈관신생 또는 항종양 PIGF 리간드와 같은 이펙터(effector) 분자는 이중-특이적 항체가 투여된 후에 대상에게 투여된다. PIGF 리간드 및 질병 조직에 대한 결합 부위를 포함하는 이중-특이적 항체는 질병 조직에 위치하여 상기 질병 조직에 이펙터 PIGF 리간드의 위치의 특이성을 증가시킨다(미국특허 출원 제20050002945). 상기 이펙터 분자는 이중-특이적 항체보다 훨씬 더 빨리 순환계로부터 제거될 수 있기 때문에, 정상 조직은 이펙터 분자가 직접 질병 표적화 항체에 연결될 때보다 전-표적화 전략이 사용될 때 이펙터 분자에 노출되는 것이 감소할 수 있다.

[0130] 전-표적화 방법은 검출 또는 치료제의 표적: 배경(background) 비를 증가시키기 위해 개발되었다. 전-표적화 및 바이오틴/아비딘 접근 방법의 예는 예를 들어 Goodwin et al., 미국특허 제4,863,713; Goodwin et al., J. Nucl. Med. 29:226, 1988; Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28:1294, 1987; Oehr et al., J. Nucl. Med. 29:728, 1988; Klivanov et al., J. Nucl. Med. 29:1951, 1988; Sinitsyn et al., J. Nucl. Med. 30:66, 1989; Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31:1791, 1990; Schechter et al., Int. J. Cancer 48:167, 1991; Paganelli et al., Cancer Res. 51:5960, 1991; Paganelli et al., Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991; 미국특허 제5,256,395; Stickney et al., Cancer Res. 51:6650, 1991; Yuan et al., Cancer Res. 51:3119, 1991; 미국특허 제6,077,499; 미국특허 출원 제09/597,580; 미국특허 출원 제10/361,026; 미국특허 출원 제09/337,756; 미국특허 출원 제09/823,746; 미국특허 출원 제10/116,116; 미국특허 출원 제09/382,186; 미국특허 출원 제10/150,654; 미국특허 제6,090,381; 미국특허 제6,472,511; 미국특허 출원 제10/114,315; 미국 가출원 제60/386,411; 미국 가출원 제60/345,641; 미국 가출원 제60/3328,835; 미국 가출원 제60/426,379; 미국특허 출원 제09/823,746; 미국특허 출원 제09/337,756; 및 미국 가출원 제60/342,103에 기재되어 있고, 이들 모두는 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다.

[0131] 특정 구현예에서, 이중특이적 항체 및 표적가능한 컨스트럭트는 예를 들어 미국특허 제6,126,916; 6,077,499; 6,010,680; 5,776,095; 5,776,094; 5,776,093; 5,772,981; 5,753,206; 5,746,996; 5,697,902; 5,328,679; 5,128,119; 5,101,827; 및 4,735,210(각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)에 기재된 방법을 사용하여 정상 또는 질병 조직 및 기관을 치료 및/또는 이미징화하는데 이용될 수 있다. 추가적인 방법은 미국출원 제09/337,756(1999년 6월 22일 출원) 및 미국출원 제09/823,746(2001년 4월 3일 출원)에 기재되어 있다.

[0132] 표적화 펩티드

[0133] 다른 구현예에서, BP-1, BP-2, BP-3 또는 BP-4와 같은 펩티드 PIGF 리간드는 질병 조직에 하나 이상의 제제를 전달하기 위해 펩티드를 표적화하는데 사용될 수 있다. 그러한 경우에, 상기 제제는 PIGF 결합 펩티드에 공유결합 또는 비-공유결합으로 부착될 수 있다. 잠재적으로 사용되는 제제는 약물, 전구약물, 독소, 효소, 올리고뉴클레오타이드, 방사성 동위원소, 면역조절제, 사이토카인, 호르몬, 결합 분자, 리피드, 폴리머, 미셀(micelle), 리포솜, 나노입자 또는 그들의 조합을 포함한다. 사용되는 치료제 및 방법의 예시로는 미국특허 공개 제20050002945, 20040018557, 20030148409 및 20050014207(각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)에 기재되어 있다.

[0134] 예시적인 구현예에서, 사용하는 제제는 하나 이상의 아플리딘, 아자리빈, 아나스트로졸, 아자티딘, 블레오마이신, 보르테조미드, 브리오타틴-1, 부설판, 칼리케마이신(calicheamycin), 캠포테신, 10-히드록시캠포테신, 카무스틴, 셀레브렉스, 클로람부실, 시스플라틴, 이리노테칸(CPT-11), SN-38, 카르보플라틴, 클라드리빈, 시클로

포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 도세탁셀, 닥티노마이신, 다우노마이신 글루쿠로니드, 다우노루비신, 텍사메티손, 디에틸스틸베스트롤, 독소루비신, 2-피롤리도독소루비신(2P-DOX), 시아노-모르폴리노 독소루비신, 독소루비신 글루쿠로니드, 에피루비신 글루쿠로니드, 에티닐 에스트라디올, 에스트라무스틴, 에토포시드, 에토포시드 글루쿠로니드, 에토포시드 포스페이트, 플록스유리딘(FUdR), 3',5'-O-디올레오일-FUdR(FUdR-dO), 플루다라빈, 플루타미드, 플루오로우라실, 플루옥시메스테론, 쟈시타빈, 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, L-아스파라기나제, 루코보린, 로무스틴, 메클로레타민, 메드로프로게스테론 아세테이트, 메게스트롤 아세테이트, 멜팔란, 머캅토피린, 6-머캅토피린, 메소트렉세이트, 미토산트론, 미트라마이신, 미토마이신, 미토탄, 페닐 부티레이트, 프레드니손, 프로카르바진, 파클리탁셀, 펜토스타틴, PSI-341, 세무스틴 스트렙토조신, 타목시펜, 탁산, 탁술, 테스토스테론 프로피오네이트, 탈리도마이드, 티오구아닌, 티오테파, 테니포사이드, 토포테칸, 우라실 머스터드, 벨케이드, 빈블라стин, 비노렐빈, 빈크리스틴, 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, 옹코나제, rapLR1, DNase I, 스타펠로코커스 엔테로톡신-A, 포크위드(pokeweed) 항 바이러스 단백질, 젤로닌, 디프테리아 독소, 수도모나스 외독소, 수도모나스 내독소, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간접 RNA 또는 그들의 조합을 포함할 수 있다.

[0135] **엡타머**

[0136] 특정 구현예에서, 사용하는 PIGF 리간드는 엡타머일 수 있다. 엡타머를 제작하고 결합 특성을 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 그러한 기술은 미국특허 제5,582,981, 5,595,877 및 5,637,459(각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)에 기재되어 있다.

[0137] 엡타머는 합성, 제조 및 정제 방법을 포함하는 임의의 알려진 방법에 의해 제작될 수 있고, 단독으로 또는 동일한 표적에 특이적인 다른 리간드와 조합하여 사용될 수 있다. 일반적으로, 최소 약 3 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 5 뉴클레오티드가 특이적인 결합에 영향을 미치기 위해 필요하다. 10, 20, 30 또는 40 뉴클레오티드의 엡타머가 바람직할지라도, 10개의 염기보다 더 짧은 서열의 엡타머도 사용할 수 있다.

[0138] 엡타머는 결합 특이성을 부여하는 서열을 포함할 필요가 있으나, 인접한 부위로 확장되거나 달리 유도될 수도 있다. 바람직한 구현예에서, 엡타머의 PIGF-결합 서열은 프라이머-결합 서열에 인접하여, PCR 또는 다른 증폭 기술에 의한 엡타머의 증폭을 촉진할 수 있다. 추가 구현예에서, 인접한 서열은 엡타머가 기질에 고정되는 것을 증진시키는 모이어티를 우선적으로 인식하거나 모이어티에 결합하는 특이적인 서열을 포함할 수 있다.

[0139] 엡타머는 종래의 DNA나 RNA 분자와 같이 분리되고, 시퀀싱되고 및/또는 증폭되거나 합성될 수 있다. 대안적으로, 관심있는 엡타머는 변형된 올리고머를 포함할 수 있다. 보통 엡타머에 존재하는 임의의 하이드록실기는 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 치환되거나, 표준 보호기에 의해 보호되거나, 다른 뉴클레오티드에 추가적인 결합을 준비하기 위해 활성화되거나, 고정 지지물에 접합될 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 결합은 P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR', CO, 또는 CNR₂(이 때, R은 H 또는 알킬(1-20C)이고 R'은 알킬(1-20C)이다) 치환된 P(O)O와 같은 대안적인 결합기에 의해 치환될 수 있다. 추가로, 이 기는 O 또는 S를 통해 인접한 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 올리고머에서의 모든 결합이 동일할 필요는 없다.

[0140] 특이적인 결합 서열을 결정하기 위해 본 발명의 방법에서 출발 물질로 사용되는 엡타머는 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA 또는 RNA일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 서열은 단일-가닥 DNA이고, 이는 RNA 보다 뉴클레아제에 분해되기가 어렵다. 바람직한 구현예에서, 출발 물질은 일반적으로 10 내지 400 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 20 내지 100 뉴클레오티드를 포함하는 랜덤화된 서열 부분을 포함할 것이다. 상기 랜덤화된 서열은 표적에 결합하는 것으로 알려진 엡타머를 증폭하게 하는 프라이머 서열에 인접한다. 상기 랜덤화된 부위의 합성을 위해, 랜덤화가 요구되는 부위에 뉴클레오티드 혼합물이 합성 중에 첨가될 수 있다.

[0141] 관심있는 특정 표적에 결합하는 엡타머의 제작 및 스크리닝 방법은 예를 들어, 미국특허 제5,475,096 및 미국특허 제5,270,163(각각은 인용에 의해 포함되어 있다)에 잘 알려져 있다. 상기 기술은 일반적으로 후보 엡타머 혼합물로부터의 선별과 단계적인 결합 반복, 결합되지 않은 엡타머로부터 결합된 엡타머의 분리 및 증폭을 포함한다. 가장 높은 친화도의 엡타머에 해당하는 적은 수의 서열만이(가능하게는 한 분자의 엡타머만) 혼합물 내에 존재하기 때문에, 혼합물에 상당한 양의 엡타머(약 5-50%)가 분리 중에 남아있도록 분배 전략을 세우는 것이 일반적으로 바람직하다. 각 사이클은 표적에 대해 높은 친화도를 갖는 엡타머를 풍부하게 한다. 3 내지 6번의 선별 및 증폭 사이클을 반복함으로써 PIGF와 같은 표적에 대해 높은 친화도와 특이성으로 결합하는 엡타머를 생성할 수 있다.

[0142] **질병 조직 검출, 진단 및 이미징 방법**

- [0143] 단백질 기반의 시험관 내 진단
- [0144] 본 발명은 PIGF 항원의 존재에 대해 시험관 내 및/또는 생체 내에서 생물학적 시료를 스크리닝하기 위해 PIGF 결합 펩티드, PIGF 융합 단백질, PIGF 항체 또는 절편, 이중-특이적 항체 및 항체 절편을 포함하는 PIGF 리간드를 사용하는 것에 관한 것이다. 예시적인 면역분석에서, 상기 PIGF 항체, 융합 단백질 또는 그의 절편은 후술하는 바와 같이 액상으로 또는 고체상 담체에 결합되어 사용될 수 있다. 특히 생체 내 투여를 포함하는 바람직한 구현예에서, 상기 PIGF 항체 또는 그의 절편은 인간화된다. 또한, 바람직하게는 상기 PIGF 항체 또는 그의 절편은 완전한 인간의 것이다. 더 바람직하게는, 상기 PIGF 융합 단백질은 인간화된 또는 완전한 인간 PIGF 항체를 포함한다. 당업자는 매우 다양한 기술이 특정 유전자의 발현 레벨을 측정하기 위해 알려져 있고, 면역분석, RT-PCR, mRNA 정제 및/또는 cDNA 제작에 이은 유전자 발현 분석 칩에 대한 혼성화와 같은 임의의 그러한 알려진 방법이 각 대상 및/또는 조직에서 발현되는 PIGF의 레벨을 측정하는데 사용될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0145] 생물학적 시료가 PIGF 항원을 포함하는지 여부를 측정하는 스크리닝 방법의 한 예는 방사성 면역분석(RIA)이다. 예를 들어, RIA의 한 형태로, 테스트되는 기질은 방사성 표지된 PIGF 항원의 존재하에 PIGF MAb와 혼합된다. 이 방법에서, 테스트 기질의 농도는 MAb에 결합하는 표지된 PIGF 항원의 양에 반비례하고, 표지된 유리 PIGF 항원의 양에 정비례한다. 다른 적당한 스크리닝 방법이 당업자에게 매우 자명할 것이다.
- [0146] 대안적으로, 시험관내 분석은 PIGF 리간드, 항-PIGF 항체, 융합 단백질 또는 그의 절편이 고체상 담체에 결합하는지로 수행될 수 있다. 예를 들어, MAb를 폴리머-코팅된 비드, 플레이트 또는 튜브와 같은 불용성 지지물에 연결하기 위해, MAb는 아미노텍스트란과 같은 폴리머에 부착될 수 있다.
- [0147] 생물학적 시료에서 PIGF 항원의 존재는 효소면역분석법(ELISA)을 사용하여 측정될 수 있다. 직접적인 경쟁적 ELISA에서, 정제하거나 반정제된 항원 준비물은 용액 또는 테스트될 세포 추출물에 불용성인 고체 지지물에 결합되고, 검출가능하게 표지된 용해성 항체, 항체 절편 또는 PIGF 리간드의 양은 고체상 항원 및 표지된 PIGF 결합 분자 간에 형성된 이중 복합체를 검출 및/또는 정량하기 위해 첨가된다.
- [0148] 샌드위치 ELISA는 적은 양의 항원을 필요로 하고, 분석은 항원의 광범위한 정제를 필요로 하지 않는다. 그러므로, 샌드위치 ELISA는 임상 시료에서 항원의 검출에 직접적인 경쟁적 ELISA 보다 바람직하다. 예를 들어, Field et al., *Oncogene* 4:1463(1989); Spandidos et al., *AntiCancer Res.* 9: 821(1989) 참조.
- [0149] 샌드위치 ELISA에서, 표지되지 않은 MAb 또는 항체 절편("캡처 항체")의 양은 고체 지지물에 결합되고, 테스트 시료는 캡처 항체와 접촉하게 되고, 검출가능하게 표지된 용해성 항체(또는 항체 절편)의 양이 캡처 항체, 항원 및 표지된 항체 사이에 형성된 삼성분 복합체(ternary complex)의 검출 및/또는 정량을 위해 첨가된다. 항체 절편은 F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab 등과 같은 항체의 일부이다. 본 명세서에서, 항체 절편은 PIGF 항원의 에피토프에 결합하는 PIGF MAb의 일부이다. "항체 절편"이라는 용어는 또한 특이적인 항원에 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체처럼 작용하는 임의의 합성 또는 유전공학적으로 조작된 단백질을 포함한다. 예를 들어, 항체 절편은 경쇄 가변 부위로 이루어진 분리된 절편, 중쇄 및 경쇄 가변 부위로 이루어진 "Fv" 절편, 및 중쇄 및 경쇄 가변 부위가 펩티드 링커에 의해 연결된 재조합 단일쇄 폴리펩티드 분자를 포함한다. 항체 융합 단백질은 동일하거나 서로 다른 특이성을 갖는 두 개 이상의 동일하거나 서로 다른 단일쇄 항체 또는 항체 절편 조각이 연결된 재조합적으로 생산된 항원-결합 분자이다. 융합 단백질은 단일 항체 성분, 서로 다른 항체 성분이나 동일한 항체 성분의 다중 카피의 다중특이적 조합을 포함할 수 있다. 융합 단백질은 추가적으로 진단/검출 및/또는 치료제에 콘주게이션된 항체 또는 항체 절편을 포함할 수 있다. PIGF 항체라는 용어는 인간화된, 인간 및 설치류의 항체, 그의 항체 절편, 면역결합자 및 그의 절편 및 항체 융합 단백질 및 그의 절편을 포함한다.
- [0150] 샌드위치 ELISA를 수행하는 방법은 잘 알려져 있다. 예를 들어 Field et al., supra, Spandidos et al., supra, and Moore et al., "Twin-Site ELISAs for fos and myc Oncoproteins Using the AMPAK System," in *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, 페이지 273-281(The Humana Press, Inc. 1992) 참조. 당업자는 샌드위치 ELISA와 유사한 분석이 첫번째 표지되지 않은 항체 또는 두번째 표지된 항체 중 어느 하나에 대해 PIGF 리간드를 치환함으로써 수행될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0151] 샌드위치 ELISA에서, 용해성 항체 또는 항체 절편은 캡처 항체에 의해 인식되는 에피토프로부터 멀리 있는 PIGF 에피토프에 결합해야 한다. 샌드위치 ELISA는 PIGF 항원이 생검 시료에 존재하는지 확인하기 위해 수행될 수 있다. 대안적으로, 분석은 체액의 임상 시료에 존재하는 PIGF 항원의 양을 정량하기 위해 수행될 수 있다. 상기 정량 분석은 정제된 PIGF 항원의 회석을 포함하여 수행될 수 있다.
- [0152] 다른 구현예에서, 웨스턴 블롯 분석은 시료에서 PIGF의 존재를 검출하고 정량하기 위해 사용될 수 있다. 상기

기술은 일반적으로 분자량에 기반하여 겔 전기영동에 의해 시료 단백질을 분리하는 단계, 분리된 단백질을 적당한 고체 지지물(니트로셀룰로스 필터, 나일론 필터, 또는 유도된 나일론 필터 등)에 전달하는 단계, 및 시료를 PIGF에 특이적으로 결합하는 항체 또는 리간드와 배양하는 단계를 포함한다. 상기 항-PIGF 항체 또는 리간드는 고체 지지체 상의 PIGF에 특이적으로 결합한다. 이러한 항체 또는 리간드는 직접적으로 표지될 수 있거나 대안적으로, PIGF 항체 또는 리간드에 특이적으로 결합하는 표지된 이차 항체를 사용하여 연속해서 검출될 수 있다.

[0153] PIGF 리간드, MAb, 융합 단백질 및 그의 절편은 또한 분석 키트 제작에 적당하다. 그러한 키트는 바이알, 튜브 등과 같은 하나 이상의 용기 수단을 가깝게 수용하기 위해 구분한 운송 수단을 포함할 수 있고, 상기 용기 수단 각각은 면역 분석의 별개의 요소를 포함한다. 예를 들어, 고체상 지지물에 고정된 캡처 항체를 포함하는 용기 수단 및 용액에서 검출 표지된 항체를 포함하는 추가 용기 수단이 있을 수 있다. 추가 용기 수단은 PIGF 항원의 연속적인 희석을 포함하는 표준 용액을 포함할 수 있다. PIGF 항원의 표준 용액은 횡좌표에 플롯팅된 PIGF 항원의 농도와 종좌표에 플롯팅된 검출신호를 갖는 표준 커브를 제작하는데 사용될 수 있다. PIGF 항원을 포함하는 시료로부터 얻어진 결과는 생물학적 시료에서 PIGF 항원의 농도를 결정하기 위해 그러한 플롯으로부터 내삽될 수 있다.

[0154] PIGF 리간드, 항-PIGF 항체, 융합 단백질 및 그의 절편은 또한 조직학적 검체로부터 제작된 조직 섹션에서 PIGF 항원의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 그러한 제 위치(in situ) 검출은 검사한 조직에서 PIGF 항원의 존재를 측정하고 PIGF 항원의 분포를 측정하는데 사용될 수 있다. 제 위치 검출은 검출가능하게 표지된 PIGF 리간드 또는 항체를 동결되거나 파라핀으로 굳혀진 조직 섹션에 적용하여 달성될 수 있다. 제 위치 검출의 일반적인 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어 Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application," MAMMALIAN DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH 113-38 Monk(ed.)(IRL Press 1987), 및 Coligan 페이지 5.8.1-5.8.8 참조.

[0155] PIGF 리간드, 항-PIGF 항체, 융합 단백질 및 그의 절편은 임의의 적합한 마커 모이어티, 예를 들어, 방사성 동위원소, 효소, 형광 표지, 염료, 크로마젠, 화학형광 표지, 바이오형광 표지 또는 상자성 표지로 검출가능하게 표지될 수 있다. 그러한 검출-가능하게 표지된 PIGF 항체를 만들고 검출하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 아래에 보다 자세하게 기재되어 있다.

[0156] 상기 마커 모이어티는 감마 계수기 또는 베타-신틸레이션 계수기의 사용과 같은 수단에 의해 또는 방사능 사진 촬영에 의해 검출되는 방사성 동위원소일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 진단 콘주게이트는 감마-, 베타- 또는 양전자-방출 동위원소이다. 마커 모이어티는 소정의 조건하에서 신호를 생성할 분자를 나타낸다. 마커 모이어티의 예는 방사성 동위원소, 효소, 형광 표지, 화학발광 표지, 바이오발광 표지 및 상자성 표지를 포함한다. PIGF 항체에 마커 모이어티를 결합하는 것은 당업계에 알려진 표준 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 이에 관한 일반적인 방법은 Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70: 1(1976), Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81: 1(1977), Shih et al., Int'l J. Cancer 46: 1101(1990)에 의해 기재된다.

[0157] **핵산 기반 시험관 내 진단**

[0158] 특정 구현예에서, 핵산은 PIGF 발현 레벨을 측정하기 위해 특히 핵산 증폭 방법을 사용하여 분석될 수 있다. 증폭용 주형으로 사용되는 핵산 서열(mRNA 및/또는 cDNA)은 표준 방법에 따라 생물학적 시료에 포함된 세포로부터 분리될 수 있다. 핵산은 분획되거나 전체 세포 RNA일 수 있다. RNA가 사용된다면, RNA를 상보적 cDNA로 전환하는 것이 바람직하다. 한 구현예에서, RNA는 전체 세포 RNA이고, 증폭용 주형으로 직접 사용된다.

[0159] 한 실시예에서, PIGF 발현의 측정은 PIGF mRNA 또는 cDNA 서열을 증폭하고(예, PCR), TaqMan 분석(Applied Biosystems, Foster City, CA), 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 에티듐 브로마이드 염색, PIGF 특이적 탐침을 포함하는 마이크로어레이에 대한 혼성화, 노던 블롯, 닛-블롯, 슬롯-블롯 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 증폭 산물을 검출 및/또는 정량함으로써 수행된다.

[0160] 다양한 형태의 증폭이 당업계에 잘 알려져 있고, 임의의 그러한 알려진 방법이 사용될 수 있다. 일반적으로 증폭은 증폭될 표적 핵산 서열에 선별적으로 또는 특이적으로 혼성화하는 하나 이상의 프라이머를 사용하는 것을 포함한다.

[0161] **프라이머:** 프라이머라는 용어는 본 명세서에 정의된대로 주형-의존적인 과정에서 새로 만들어진 핵산의 합성을 프라이밍할 수 있는 임의의 핵산을 포괄하는 것을 의미한다. 일반적으로 프라이머는 길이가 10 내지 20개의 염기쌍의 올리고뉴클레오타이드이나, 더 긴 서열이 사용될 수도 있다. 프라이머는 이중-가닥 또는 단일-가닥 형태로 제공될 수 있고, 단일-가닥 형태가 바람직하다. 프라이머 디자인 방법은 표준 왓슨-크릭 염기-쌍(즉, 아데

닌은 티민 또는 우라실과 결합하고 구아닌은 시토신과 결합하는 것)으로부터 얻은 상보적 서열의 디자인에 기초하며, 당업계에 잘 알려져 있다. 증폭 프라이머의 선별 및 디자인용 컴퓨터 프로그램은 당업자에게 잘 알려진 상업적 및/또는 공개적 공급원으로부터 이용가능하다. PIGF 발현을 검출하는데 사용되는 특정 프라이머 서열은 알려져 있다(예, Regnault et al., 2003, *J. Physiol.* 550:641-56). 당업자는 그 문헌에 기재되는 특정 서열은 단지 예시일 뿐이고, 대안적인 프라이머 및/또는 탐침 서열이 특허청구된 방법의 실시예에 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0162] 증폭: 수많은 주형 의존적인 과정이 주어진 시료에 존재하는 마커 서열을 증폭하는데 사용될 수 있다. 가장 잘 알려진 증폭 방법 중의 하나는 미국특허 제4,683,195, 4,683,202 및 4,800,159에 상세히 기재된 폴리머라제 연쇄 반응(PCR로 일컬어짐)이다.

[0163] 본 발명의 한 구현예는 개체로부터 적당한 시료를 얻고 PIGF 메신저 RNA를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 조직 시료가 얻어지면, 상기 시료는 표준 기술에 의해 핵산의 분리를 위해 준비될 수 있다(예, 세포 분리, 외부막의 절단, mRNA의 Oligo dT 분리 등). mRNA의 분리는 또한 당업계에 알려진 키트를 사용하여 수행될 수 있다(Pierce, AP Biotech, 등). 역전사효소 PCR 증폭 과정이 증폭된 mRNA 양을 정량하기 위해 수행될 수 있다. RNA를 cDNA로 역전사하는 방법은 잘 알려져 있고 Sambrook et al., 1989에 기재되어 있다. 역전사의 대안적인 방법은 열 안정성 DNA 폴리머라제를 사용한다.

[0164] 전술한 시험관내 및 제 위치 검출 방법은 병리학적 증상의 진단 또는 병기구분을 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 그러한 방법은 전이 종양과 같이 PIGF 항원을 발현하는 암을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0165] 생체 내 진단

[0166] PIGF 리간드 및/또는 항체는 생체 내 진단에 사용된다. 표지된 펩티드 또는 MAb로 진단 이미지화하는 방법은 잘 알려져 있다. 예를 들어, 면역신티그래피(immunoscintigraphy) 기술에서, PIGF 리간드 또는 항체는 감마-방출 방사성 동위원소로 표지되고 대상에게 도입된다. 감마 카메라가 감마-방출 방사성 동위원소의 위치 및 분포를 검출하는데 사용된다. 예를 들어 Srivastava(ed.), *RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY*(Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, Gennaro et al.(eds.), pp. 624-652(Mack Publishing Co., 1990) 및 Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY 227-49, Pezzuto et al.(eds.)(Chapman & Hall 1993) 참조. 불소-18(¹⁸F), 갈륨-68(⁶⁸Ga) 및 요오드-124(¹²⁴I)과 같이, 511 keV 에너지를 갖는 양전자-방출 방사성 핵종(PET 동위원소)을 사용하는 것 또한 바람직하다. 그러한 이미지화는 Goldenberg et al., "Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radiotherapy,(submitted MS) 및 미국특허 공개 제20050002945, 20040018557, 20030148409 및 20050014207(각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)에 기재된대로 PIGF 리간드의 직접적인 표지나 전-표적화된 영상화 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0167] 진단 이미지화를 위해, 방사성 동위원소는 PIGF 리간드 또는 항체 중 어느 하나에 직접 결합되거나, 또는 중간 기능기를 사용하여 간접 결합될 수 있다. 유용한 중간 기능기는 에틸렌디아민테트라아세트산 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산과 같은 킬레이터를 포함한다. 예, Shih et al., supra 및 미국특허 제5,057,313 참조.

[0168] 대상에게 전달된 방사선량은 검출과 정확한 측정을 가능하게 하는 최소 반감기, 체내 최소 체류시간 및 최소량의 동위원소의 최적의 조합을 선택하여 가능한 한 낮은 레벨로 유지된다. PIGF 항체에 결합될 수 있고 진단 이미지화에 적합한 방사성 동위원소의 예는 ^{99m}Tc 및 ¹¹¹In을 포함한다.

[0169] PIGF 리간드, 항체, 융합 단백질 및 그의 절편은 또한 생체 내 진단의 목적으로 상자성 이온 및 다양한 방사성 조영제로 표지될 수 있다. 특히 자기 공명 이미지화(MRI)에 유용한 조영제는 가돌리늄, 망간, 디스프로슘, 란탄 또는 철 이온을 포함한다. 추가적인 제제는 크롬, 구리, 코발트, 니켈, 레늄, 유로퓸, 테르븀, 홀름 또는 네오뮴을 포함한다. PIGF 리간드, 항체 및 그의 절편은 또한 초음파 대비/증진제에 콘쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, 한 초음파 조영제는 인간화된 PIGF IgG 또는 그의 절편을 포함하는 리포솜이다. 또한, 바람직하게는 상기 초음파 조영제는 가스가 채워진 리포솜이다.

[0170] 바람직한 구현예에서, 이중특이적 항체가 조영제에 콘쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, 상기 이중특이적 항체는 초음파 이미지화에 사용하기 위한 하나 이상의 이미지-증진제를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 조영제는 리포솜이다. 바람직하게는, 상기 리포솜은 리포솜의 외부 표면에 공유결합으로 부착된 2가 DTPA-펩티드를

포함한다. 보다 더 바람직하게는, 상기 리포솜은 가스로 채워져 있다.

[0171] 이미지화제 및 방사성 동위원소

[0172] 특정 구현예에서, 특허청구된 펩티드 또는 단백질은 다양한 질병 기관, 조직 또는 세포 타입의 이미지화 및 진단을 위해 사용되는 이미지화제에 부착될 수 있다. 많은 적당한 이미지화제가 당업계에 알려져 있고, 이들을 단백질 또는 펩티드에 부착하는 방법 또한 알려져 있다(예, 미국특허 5,021,236 및 4,472,509 참조. 모두 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 특정 부착 방법은 예를 들어, 단백질 또는 펩티드에 부착되는 DTPA와 같은 유기 킬레이트제를 사용하는 금속 킬레이트 복합체를 사용하는 것을 포함한다(미국특허 4,472,509). 단백질 또는 펩티드는 또한 글루타르알데히드나 과요오드산염과 같은 커플링제의 존재하에 효소와 반응할 수 있다. 형광 마커와의 접합자는 이러한 커플링제의 존재하에 또는 이소티오네이트와의 반응에 의해 제작된다.

[0173] 이미지화제로 잠재적으로 사용가능한 상자성 이온의 비-제한적인 예로는 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오뮴(III), 사마륨(III), 이테븀(III), 가돌리늄(III), 바나뮴(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 및 에르븀(III)을 포함하고, 가돌리늄이 특히 바람직하다. X-선 이미지화와 같은 다른 문맥에서 사용되는 이온은 란탄(III), 금(III), 납(II) 및 특히 비스무트(III)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0174] 이미지화제 또는 치료제로서 잠재적으로 사용가능한 방사성 동위원소는 아스타틴²¹¹, ¹⁴탄소, ⁵¹크롬, ³⁶염소, ⁵⁷코발트, ⁵⁸코발트, 구리⁶², 구리⁶⁴, 구리⁶⁷, ¹⁵²Eu, 불소¹⁸, 갈륨⁶⁷, 갈륨⁶⁸, ³수소, 요오드¹²³, 요오드¹²⁴, 요오드¹²⁵, 요오드¹³¹, 인듐¹¹¹, ⁵²철, ⁵⁹철, ³²인, ³³인, 레늄¹⁸⁶, 레늄¹⁸⁸, 스칸디움⁴⁷, ⁷⁵셀레늄, 은¹¹¹, ³⁵황, 테크네튬^{94m}, 테크네튬^{99m}, 이트륨⁸⁶ 및 이트륨⁹⁰을 포함한다. ¹²⁵I은 종종 특정 구현예에서 사용하기에 바람직하고, 테크네튬^{99m} 및 인듐¹¹¹ 또한 이들의 낮은 에너지와 긴 범위 검출에 대한 적합성으로 인해 종종 바람직하다. 방사활성 표지된 단백질 또는 펩티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 생산될 수 있다. 예를 들어, 이들은 요오드화 나트륨 또는 칼륨과 나트륨 히포클로라이드와 같은 화학적 산화제 또는 락토퍼옥시다제와 같은 효소 산화제를 접촉함으로써 요오드화될 수 있다. 단백질 또는 펩티드는 예를 들어, 퍼테크네이트(pertechnate)를 주석 용액으로 환원하고, 환원된 테크네튬을 세파텍스 컬럼으로 킬레이팅하고, 펩티드를 이 컬럼에 적용하는 리간드 교환 과정에 의하거나, 또는 예를 들어, 퍼테크네이트, SNCI₂와 같은 환원제, 나트륨-칼륨 프탈레이트 용액 및 펩티드를 배양하는 직접 표지 기술에 의해 테크네튬^{99m}로 표지될 수 있다. 금속 이온으로 존재하는 방사성 동위원소를 펩티드에 결합시키는데 종종 사용되는 중간 기능기는 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA), DOTA, NOTA, 포르피린 킬레이터 및 에틸렌 디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함한다. 또한, 로다민, 형광 이소시아네이트 및 레노그라핀을 포함하는 형광 표지를 사용하는 것이 고려된다.

[0175] 특정 구현예에서, 특허청구된 단백질 또는 펩티드는 발색성 기질과 결합하여 유색 산물을 생성하는 2차 결합 리간드 또는 효소(효소 태그)에 결합될 수 있다. 적당한 효소의 예는 우레아제, 알칼린 포스파타제, (양고추냉이)수소 퍼옥시다제 및 글루코스 옥시다제를 포함한다. 바람직한 2차 결합 리간드는 비오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘 화합물이다. 그러한 표지를 사용하는 것은 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 미국특허 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241(각각은 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다)에 기재되어 있다. 이들 형광 표지는 시험관 내 용도로 바람직하지만, 또한 생체 내 적용하여 사용될 수 있고, 특히 내시경 또는 혈관내 검출 과정에서 사용될 수 있다.

[0176] 대안적인 구현예에서, PIGF 리간드, 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드는 형광 마커로 태그될 수 있다. 광감지 가능한 표지의 비-제한적 실시예로는 알렉사 350, 알렉사 430, AMCA, 아미노아크리딘, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 5-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인, 5-카르복시-2',4',5',7'-테트라클로로플루오레세인, 5-카르복시플루오레세인, 5-카르복시로다민, 6-카르복시로다민, 6-카르복시테트라메틸 아미노, 케스케이드 블루, Cy2, Cy3, Cy5, 6-FAM, 댄실 클로라이드(dansyl chloride), 플루오레세인, HEX, 6-JOE, NBD(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸), 오레곤 그린 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루, 프탈산, 테레프탈산, 이소프탈산, 크레실 패스트 바이올렛, 크레실 블루 바이올렛, 브릴리언트 크레실 블루, 파라-아미노벤조산, 에리스로신, 프탈로시아닌, 아조메틴, 시아닌, 크산틴, 숙시닐플루오레세인, 히토티 금속 크립테이트, 유로퓸 트리스비피리딘 디아민, 유로퓸 크립테이트 또는 킬레이트, 디아민, 디시아닌, 라 졸라(La Jolla)블루 염료, 알로피코시아닌, 알로코시아닌 B, 피코시아닌 C, 피코시아닌 R, 티아민, 피코에리스로시아닌, 피코에리스린 R, REG, 로다민 그린, 로다민 이소시아네이트, 로다민

레드, ROX, TAMRA, TET, TRIT(테트라메틸 로다민 이소티올), 테트라메틸로다민 및 텍사스 레드를 포함한다. 이들 및 다른 발광 표지는 Molecular Probes(Eugene, OR)와 같은 상업적 공급원으로부터 얻어질 수 있다.

[0177] 사용되는 화학발광표지 화합물은 루미놀, 이소루미놀, 방향족 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르 또는 루시페린, 루시페라제 및 에퀴린과 같은 바이오발광화합물을 포함할 수 있다. 진단용 면역공유체는 예를 들어, 수술, 내시경 또는 혈관내 종양 또는 질병 진단에 사용될 수 있다.

[0178] 다양한 구현예에서, 사용되는 표지는 금속 나노입자를 포함할 수 있다. 나노입자를 제작하는 방법은 알려져 있다(예, 미국특허 제6,054,495; 6,127,120; 6,149,868; Lee 및 Meisel, *J. Phys. Chem.* 86:3391-3395, 1982 참조). 나노입자는 또한 상업적 공급원으로부터 얻어질 수 있다(예, Nanoprobes Inc., Yaphank, NY; Polysciences, Inc., Warrington, PA). 변형된 나노입자는 Nanoprobes, Inc.(Yaphank, NY)의 Nanogold[®] 나노입자와 같이 상업적으로 이용가능하다. 단백질 또는 펩티드에 접합하기 위해 사용되는 기능화된 나노입자는 상업적으로 얻어질 수 있다.

[0179] 교차 결합자

[0180] 몇몇 구현예에서, 단백질 또는 펩티드는 동형-이중기능, 이형-이중기능 및/또는 광활성 가능한(photoactivatable) 교차 결합 시약과 같이 당업계에 알려진 다양한 교차 결합 시약으로 표지될 수 있다. 그러한 시약의 비-제한적인 예로는 비스이미네이트; 1,5-디플루오로-2,4-(디니트로벤젠); 수베르산의 N-히드록시숙신이미드 에스테르; 디숙신이미드 타르타레이트; 디메틸-3,3'-디티오-비스프로피온이미네이트; N-숙신이미드-3-(2-피리딜디티오)프로피온네이트; 4-(브로모아미노에틸)-2-니트로페닐아자이드; 및 4-아지도글리옥살을 포함한다. 예시적인 구현예에서, DCCD 또는 EDC와 같은 카르보디이미드 교차-결합자는 산성 잔기를 아미노기 또는 다른 기에 교차결합하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 시약은 형광 표지와 같이 다양한 타입의 표지를 부착하기 위해 변형될 수 있다.

[0181] 이중기능적인 교차-결합 시약은 다양한 목적으로 광범위하게 사용되어 왔다. 두 개의 동일한 기능기를 갖는 동형이중기능적인 시약은 동일하고 서로 다른 거대 분자 또는 거대 분자의 서브유닛 간의 교차-결합과, 폴리펩티드 리간드의 그들의 특이적인 결합 부위로의 결합을 유도하는데 매우 효율적으로 입증되었다. 이형이중기능 시약은 두 개의 서로 다른 기능기를 포함한다. 두 개의 서로 다른 기능기의 서로 다른 반응성의 잇점을 취함으로써, 교차-결합은 선별적이고 연속적으로 조절될 수 있다. 이중기능적인 교차-결합 시약은 그들의 기능기(예, 아미노, 설프하이드릴, 구아니디노, 인돌, 카르복시 특이적인 기)의 특이성에 따라 나눌 수 있다. 이들 중, 자유 아미노기에 대한 시약이 그들의 상업적 이용가능성, 합성의 용이성 및 그들이 적용될 수 있는 마일드한 반응 조건 때문에 특히 보편적이다. 대다수의 이형이중기능 교차-결합 시약은 1차 아민-반응성기 및 티올-반응성기를 포함한다.

[0182] 또 다른 실시예에서, 이형이중기능성 교차-결합 시약 및 상기 교차-결합 시약을 사용하는 방법이 기재되어 있다(미국특허 5,889,155, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다). 교차-결합 시약은 친핵성 하이드라자이드 잔기를 친전자성 말레이미드 잔기와 결합시켜, 한 구현예에서 알데히드가 자유 티올기와 커플링되도록 한다. 교차-결합 시약은 다양한 기능기를 교차-결합하기 위해 변형될 수 있다.

[0183] 클로닝, 유전자 전달 및 발현용 벡터

[0184] 특정 구현예에서, 발현 벡터는 펩티드 또는 융합 단백질과 같은 단백질을 발현하기 위해 사용될 수 있고, 그리고 나서 이는 정제되고 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 발현 벡터는 예를 들어 유전자 치료에 사용될 수 있다. 발현은 벡터에서 제공되는 적당한 신호를 필요로 하는데, 이는 숙주 세포에서 관심있는 유전자가 발현되게 하는 바이러스 또는 포유류 공급원 중 어느 하나 유래의 증진자/프로모터와 같은 다양한 조절 인자를 포함한다. 숙주세포에서 메신저 RNA 안정성과 번역성을 최적화하기 위해 디자인된 요소가 알려져 있다.

[0185] 조절 인자

[0186] "발현 컨스트럭트" 또는 "발현 벡터"라는 용어는 핵산 암호화 서열의 일부 또는 전부가 전사될 수 있는 유전자 산물을 암호화하는 핵산을 포함하는 유전적 컨스트럭트의 임의의 타입을 포함하는 것을 의미한다. 바람직한 구현예에서, 유전자 산물을 암호화하는 핵산은 프로모터의 전사 조절하에 있다. "프로모터"는 세포의 합성 기구에 의해 인식되거나, 합성 기구에 의해 도입되고, 유전자의 특이적인 전사를 개시하는데 필요한 DNA 서열을 나타낸다. "전사 조절하에서"라는 표현은 상기 프로모터가 RNA 폴리머라제의 개시 및 유전자의 발현을 조절하기 위해 프로모터가 핵산에 대해 올바른 위치 및 방향에 있다는 것을 의미한다.

- [0187] 관심있는 핵산 서열의 발현을 조절하기 위해 사용되는 특정 프로모터는 표적 세포에서 핵산의 발현을 지시할 수 있는 한 중요하다고 여겨지지 않는다. 그러므로, 인간 세포가 표적이라면, 핵산 암호화 부위를 인간 세포에서 발현될 수 있는 프로모터의 근처 및 조절하에 두는 것이 바람직하다. 일반적으로, 그러한 프로모터는 인간 또는 바이러스 프로모터 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0188] 다양한 구현예에서, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV)의 즉시 초기 유전자 프로모터, SV40 초기 프로모터, 루 육종 바이러스 긴 말단 반복(Rous sarcoma virus long terminal repeat), 래트 인슐린 프로모터 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제 프로모터가 관심있는 암호화 서열의 고-수준 발현을 얻기 위해 사용될 수 있다. 발현 레벨이 주어진 목적에 충분하다면, 관심있는 암호화 서열의 발현을 달성하기 위해 당업계에 잘 알려진 다른 바이러스 또는 포유류 세포 또는 박테리아 파지 프로모터를 사용하는 것이 고려된다.
- [0189] cDNA 삽입물이 사용되면, 일반적으로 당업자는 유전자 전사체의 적당한 폴리아데닐레이션에 영향을 미치는 폴리아데닐레이션 서열을 포함할 것이다. 폴리아데닐레이션 서열의 특성은 본 발명의 성공적인 수행에 중요하다고 여겨지지는 않으며, 인간 성장 호르몬 및 SV40 폴리아데닐레이션 서열과 같은 임의의 서열이 사용될 수 있다. 또한 발현 컨스트럭트의 요소로서 종결자가 고려된다. 이들 요소는 메세지 레벨을 증진하고 컨스트럭트에서 다른 서열로의 리딩을 최소화하도록 작용할 수 있다.
- [0190] **선별 마커**
- [0191] 특정 구현예에서, 핵산 컨스트럭트를 포함하는 세포는 발현 컨스트럭트에 마커를 포함함으로써 시험관 내 또는 생체 내에서 확인될 수 있다. 그러한 마커는 세포에 확인가능한 변화를 부여하여 발현 컨스트럭트를 포함하는 세포의 용이한 확인을 가능하게 할 것이다. 보통 약물 선별 마커를 함유하는 것은 클로닝 및 형질전환체의 선별을 돕는다. 예를 들어, 네오마이신, 퓨로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀이 저항성을 부여하는 유전자는 유용한 선별 마커이다. 대안적으로, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(tk) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)와 같은 효소가 사용될 수 있다. 면역학적 마커 또한 사용될 수 있다. 사용된 선별 마커는 유전자 산물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 한 중요하다고 여겨지지 않는다. 선별 마커의 추가 예는 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0192] **발현 벡터의 전달**
- [0193] 발현 벡터가 세포 내로 도입될 수 있는 많은 방법이 있다. 특정 구현예에서, 발현 컨스트럭트는 바이러스 또는 바이러스 게놈으로부터 유도된 조작된 컨스트럭트를 포함한다. 특정 바이러스가 수용체-매개성 식세포 작용을 통해 세포로 들어가고, 숙주 세포 게놈 내로 삽입되고, 바이러스 유전자를 안정적이고 효율적으로 발현하는 능력은, 바이러스를 외부 유전자를 포유류 세포로 전달하는 매력적인 후보자로 만들었다(Ridgeway, *In: Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.*, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988; Nicolas and Rubenstein, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Baichwal and Sugden, 1986, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148; Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986). 바람직한 유전자 치료 벡터는 일반적으로 바이러스 벡터이다.
- [0194] 외부 유전 물질을 받아들일 수 있는 몇몇 바이러스가 그들이 수용할 수 있는 뉴클레오타이드의 수와 그들이 감염시킬 수 있는 세포의 범위에 제한이 있지만, 이 바이러스들은 성공적으로 유전자 발현에 영향을 미치는 것이 입증되었다. 그러나 아데노바이러스는 그들의 유전 물질을 숙주 게놈으로 삽입시키지 않고, 따라서 유전자 발현을 위한 숙주 복제를 필요로 하지 않아, 빠르고, 효율적이고 이중 유전자 발현에 이상적으로 적합하다. 복제 감염 바이러스를 제작하는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0195] 바이러스 전달 시스템을 사용하는데 있어, 결합있는 감염성 바이러스 입자 또는 내독소와 같은 원치않는 오염물 및 다른 발열원 없이 충분히 바이러스를 정제하여 상기 벡터 컨스트럭트를 수용하는 세포, 동물 또는 개체에서 임의의 부적당한 반응을 일으키지 않기를 원할 것이다. 벡터를 정제하는 바람직한 방법은 세슘 클로라이드 구배 원심분리와 같은 부력있는 밀도 구배를 사용하는 것을 포함한다.
- [0196] 유전자 벡터로서 사용되는 DNA 바이러스는 파포바바이러스(예, 시미안 바이러스 40, 소 파필로마 바이러스 및 폴리오마)(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986) 및 아데노바이러스(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986)를 포함한다. 생체 내 전달을 위한 바람직한 방법 중 하나는 아데노바이러스 발현 벡터의 사용하는 것을 포함한다. 아데노바이러스 벡터가 게놈 DNA 삽입되는 능력이 낮은 것으로 알려져 있지만, 이 특징은

이러한 벡터에 의해 주어지는 유전자 전달의 높은 효율에 의해 상쇄된다. "아데노바이러스 발현 벡터"는 (a) 컨스트럭트의 패키징을 지지하고 (b) 그 내부에 클로닝된 안티센스 또는 센스 폴리뉴클레오타이드를 발현하기에 충분한 아데노바이러스 서열을 포함하는 컨스트럭트를 포함하는 것을 의미하나 이에 한정되지는 않는다.

[0197] 복제 결핍된 아데노바이러스 벡터의 생성 및 증식은, Ad5 DNA 절편에 의해 인간 배아 신장 세포로부터 형질전환되고 지속적으로 E1 단백질을 발현하는, 293으로 명명된 헬퍼 세포주에 달려 있다(Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977). E3 부위는 아데노바이러스 게놈으로부터 없어도 되기 때문에(Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978), 현재의 아데노바이러스 벡터는, 293 세포의 도움을 받아, E1, E3 또는 이들 모두 중 어느 하나에 외부 DNA를 운반한다(Graham and Prevec, *In: Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991).

[0198] 헬퍼 세포주는 인간 배아 신장 세포, 근육 세포, 조혈 세포 또는 다른 인간 배아 증배엽 또는 상피 세포와 같이 인간 세포로부터 유래할 수 있다. 대안적으로, 헬퍼 세포는 인간 아데노바이러스를 허용하는 다른 포유류 종의 세포로부터 유래할 수 있다. 그러한 세포는 예를 들어, 배로 세포 또는 다른 원숭이 배아 증배엽 또는 상피 세포를 포함한다. 전술한 바와 같이, 바람직한 헬퍼 세포는 293이다.

[0199] Racher 등(*Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995)은 293 세포를 배양하고 아데노바이러스를 증식하는 향상된 방법을 기재하고 있다. 한 포맷에서, 자연적인 세포 응집체는 100-200 ml 배지를 포함하는 1 리터 실리콘 처리된 스피너 플라스크(Technique, Cambridge, UK)에 개별 세포를 접종하여 자란다. 40 rpm에서 저은 후, 세포 생존율을 트립판 블루로 측정한다. 또 다른 포맷에서, Fibra-Cel microcarrier(Bibby Sterlin, Stone, UK)(5 g/l)는 다음과 같이 사용된다. 5 ml의 배지에 현탁된 세포 접종물을 250 ml Erlenmeyer 플라스크의 담체(50 ml)에 첨가하고 가끔 저어주며 1 내지 4 시간 동안 정지상태로 놓아둔다. 그리고나서 배지는 50 ml의 신선한 배지로 교환하고 교반을 시작한다. 바이러스 생산을 위해 세포는 약 80% 채워질 때까지 자라도록 하고, 그 시간 후에 배지를 교환하고(최종 부피의 25%까지), MOI 0.05로 아데노바이러스를 첨가한다. 배양액은 밤새 정지 상태로 두고 이어서 부피가 100%까지 증가하면 교반은 다시 72 시간 동안 실시한다.

[0200] 다른 유전자 전달 벡터는 레트로바이러스로부터 제작될 수 있다. 레트로바이러스는 감염된 세포에서 역-전사 과정에 의해 그들의 RNA를 이중-가닥 DNA로 전환하는 능력에 특징이 있는 단일-가닥 RNA 바이러스 군이다(Coffin, *In: Virology*, Fields et al., eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990). 결과물인 DNA는 프로바이러스로서 세포 염색체 내로 안정적으로 삽입되어 바이러스 단백질의 합성을 지시한다. 삽입은 수혜 세포 및 그 자손에서 바이러스 유전자 서열이 보유되도록 한다. 레트로바이러스 게놈은 캡시드 단백질, 폴리머라제 효소 및 외피 성분을 각각 암호화하는 세 가지 유전자인 gag, pol 및 env를 포함한다. gag 유전자의 상류(upstream)에서 발견되는 서열은 게놈을 바이러스 내로 패키징하기 위한 서열을 포함한다. 두 개의 긴 말단 반복(LTR) 서열이 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단에 존재한다. 이들은 강력한 프로모터 및 증진자 서열을 포함하고, 또한 숙주 세포 게놈에 삽입되기 위해 필요하다(Coffin, 1990).

[0201] 레트로바이러스 벡터를 제작하기 위해, 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산은 복제-결합있는 바이러스를 생산하기 위한 특정 바이러스 서열의 자리에서 바이러스 게놈 내로 삽입된다. 바이러스를 생산하기 위해, LTR 및 패키징 성분은 없고 gag, pol 및 env 유전자는 포함하는 패키지 세포주가 제작된다(Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열과 함께 cDNA를 포함하는 재조합 플라스미드가 상기 세포주 내로 도입될 때(예를 들어 칼슘 포스페이트 침전에 의해), 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자 내로 패키징되게 하고, 그리고나서 배양 배지로 분비된다(Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). 그리고나서 재조합 레트로바이러스를 포함하는 배지는 수집되고, 선택적으로는 농축되어, 유전자 전달을 위해 사용된다. 레트로바이러스 벡터는 매우 다양한 세포 타입을 감염시킬 수 있다. 그러나 삽입과 안정한 발현을 위해서는 숙주 세포의 분열을 필요로 한다(Paskind et al., *Virology*, 67:242-248, 1975).

[0202] 다른 바이러스 벡터가 발현 컨스트럭트로 사용될 수 있다. 백시니아 바이러스(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., *Gene*, 68:1-10, 1988), 아데노-관련된 바이러스(AAV)(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Hermonat and Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984) 및 헤르페스 바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 벡터가 사용될 수 있다. 그들은 다양한 포유류 세포를 위한 몇 가지 매력적인 특징을 제공한다(Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., *Gene*, 68:1-10, 1988; Horwich et al., *J. Virol.*, 64:642-650, 1990).

[0203] **약학적 조성물**

- [0204] 몇몇 구현예에서, PIGF 리간드 및/또는 하나 이상의 다른 치료제가 암 환자와 같은 대상에 투여될 수 있다. 그러한 제제는 약학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 일반적으로 이는 필수적으로 인간이나 동물에게 해로울 수 있는 불순물 없는 조성물을 제작하게 할 것이다.
- [0205] 일반적으로 치료제를 안정하게 하고 표적 세포에 의해 흡수가능하게 하는 적당한 염 및 완충용액을 사용할 것이다. 수성 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 수성 배지에 용해되거나 분산되는 유효량의 PIGF 결합 단백질 또는 펩티드를 포함할 수 있다. "약학적 또는 약리학적으로 허용가능한"이란 표현은 동물이나 인간에 투여되었을 때 부작용, 알러지 또는 다른 원치 않는 반응을 만들지 않는 분자 엔티티(entity) 및 조성물을 일컫는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 모든 용제, 분산매, 코팅제, 항박테리아 및 항진균제, 등장 및 흡수 지체제 등을 포함한다. 약학적으로 활성인 기질을 위한 그러한 배지 및 체제를 사용하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 종래 배지나 체제가 본 명세서에 기재된 PIGF 리간드와 양립이 불가능한 것을 제외하고, 치료 조성물에서 이를 사용하는 것이 고려된다. 보충 활성 성분이 또한 조성물 내에 삽입될 수 있다.
- [0206] 본 명세서에 특허청구된 방법 및 조성물은 고전적인 약학적 체제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물의 투여는 표적 조직이 이용가능한 경로인 한 임의의 일반 경로를 통해 일어날 수 있다. 이는 경구, 코, 구강, 직장, 질 또는 국소를 포함한다. 대안적으로, 투여는 정위, 피내, 피하, 근육내, 복강내, 수막강내, 동맥내 또는 정맥내 주사에 의할 수 있다. 그러한 조성물은 정상적으로 약학적으로 허용가능한 조성물로 투여될 것이다.
- [0207] 사용에 적당한 약학적 형태는 멸균 수용액 또는 현탁액 및 멸균 수용액 또는 현탁액 제제용 멸균 분말을 포함한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하고, 세균이나 진균과 같은 미생물의 오염에 대해 보호되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 그들의 적당한 혼합물 및 식물성 오일을 포함하는 용매나 분산매일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제를 사용하거나, 분산의 경우 필요한 입자 크기를 유지하거나, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물 작용 방지는 다양한 항박테리아 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에 등장제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 조성물의 흡수 연장은 흡수를 지체시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 이루어질 수 있다.
- [0208] 당업자는 약학적 조성물이 예를 들어, 경구 또는 정맥 내와 같이 비경구를 포함하는 다양한 경로에 의해 대상에게 투여될 수 있음을 알 것이다. 몇몇 경우에, PIGF 리간드는 리포솜의 표면에 디스플레이 되거나 리포솜에 삽입될 수 있다. 리포솜은 인지질이나 다른 지질로 이루어져 있고, 일반적으로 비독성이고, 생리학적으로 허용가능하고 대사될 수 있는 담체로 이루어져 있고, 상대적으로 만들고 투여하기 간편하다.
- [0209] 특정 구현예에서, PIGF 리간드와 같은 치료제의 유효량이 대상에게 투여되어야만 한다. "유효량"은 원하는 효과를 나타내는 제제의 양이다. 유효량은 예를 들어, 제제의 효율 및 의도하는 효과에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 고형 종양을 감소시키거나 제거하기 위해 또는 전이를 방지하거나 감소시키기 위해 암 치료에 필요한 양에 비해 더 적은 양의 항혈관신생제가 황반 변성 또는 자궁내막증과 같은 증식성 질병 치료에 필요할 수 있다. 특정 목적을 위한 특정 제제의 유효량은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0210] **치료제**
- [0211] **화학치료제**
- [0212] 특정 구현예에서, 화학치료제는 PIGF 리간드 같은 하나 이상의 항혈관신생제와 함께 투여될 수 있다. 화학치료제는 5-플루오로우라실, 블레오마이신, 부선판, 캄프토테신, 카르보플라틴, 클로람부실, 시스플라틴(CDDP), 시클로포스파미드, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에스트로젠 수용체 결합제, 에토포시드(VP16), 파르네실-단백질 트랜스퍼라제 억제자, 켈시타빈, 이포스파미드, 메클로레타민, 멜팔란, 마이토신, 나벨빈, 니트로스우레아, 플리코마이신, 프로카르바진, 랄록시펜, 타목시펜, 탁솔, 테마졸로마이드(DTIC의 수용성 형태), 트랜스플라티늄, 빈블라스틴 및 메소트렉세이트, 빈크리스틴 또는 상기의 임의의 유사체나 유도 변형체(derivative variant)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.
- [0213] 화학치료제 및 투여방법, 용량 등은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있는 "Physicians Desk Reference", Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" 및 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 참조. 치료받는 대상의 상태에 따라 반드시 용량에 있어 약간의 변화가 있을 수 있다. 투여를 하는 자는 어떠한 경우든 개별 대상에 적당한 용량을 결정할 수 있을 것이다.

- [0214] 호르몬
- [0215] 코르티코스테로이드 호르몬은 다른 화학치료제의 효과를 증가시킬 수 있으며, 그 결과, 이들을 병용 요법에 자주 사용된다. 프레드니손 및 텍사메타손은 코르티코스테로이드 호르몬의 예이다. 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트 및 메게스트롤 아세테이트와 같은 프로게스틴은 자궁내막 및 유방암에 사용되어 왔다. 디에틸stil베스트롤 및 에티닐 에스트라디올과 같은 에스트로겐은 유방암 및 전립선암 등에 사용되어 왔다. 타목시노펜과 같은 항에스트로겐은 유방암 등에 사용되어 왔다. 테스토스테론 프로피오네이트 및 플루옥시메스테론과 같은 안드로겐 또한 유방암을 치료하는데 사용되어 왔다.
- [0216] 혈관신생 억제자
- [0217] 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 PIGF 리간드는 안지오테닌, 바쿨로스테틴, 칸스타틴, 마스핀, 항-VEGF 항체, 항-혈관 성장 인자 항체, 항-Flk-1 항체, 항-Flt-1 항체, 라미닌 펩티드, 피브로넥틴 펩티드, 플라스미노겐 활성화 억제자, 조직 메탈로프로테이나제 억제자, 인터페론, 인터루킨 12, IP-10, Gro- β 트롬보스판딘, 2-메톡시오에스트라디올, 프롤리페린-관련 단백질, 카복시아미도트리아졸, CM101, 마리마스타트(Marimastat), 펜토산 폴리설페이트, 안지오펜이테틴 2, 인터페론-알파, 허비마이신 A, PNU145156E, 16K 프롤락틴 절편, 리노마이드(Linomide), 탈리도마이드, 펜톡시필린, 제니스테인, TNP-470, 엔도스타틴, 파클리탁셀, 아쿠틴, 안지오테닌, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM-1470, 혈소판 인자 4 또는 미노사이클린과 같은 하나 이상의 다른 항-혈관신생제와 함께 투여될 수 있다.
- [0218] 면역조절자
- [0219] 본 명세서에 사용된 바와 같이, “면역조절자”라는 용어는 인터루킨, 콜로니 자극 인자, 인터페론(예, 인터페론- α , - β 및 - γ) 및 “S1 인자”로 명명된 줄기 세포 성장 인자와 같은 사이토카인, 줄기 세포 성장 인자, 림포톡신 및 조혈 인자를 포함한다. 적당한 면역조절자 모이어티의 예는 IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론-감마, TNF-알파 등을 포함한다.
- [0220] “사이토카인”이라는 용어는 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 작용하는 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질 또는 펩티드에 대한 총칭이다. 본 명세서에서 널리 사용되는 바와 같이, 사이토카인의 예는 림포카인, 모노카인, 성장 인자 및 전통적인 펩티드 호르몬을 포함한다. 사이토카인에 포함되는 것으로는 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 파라티로이드 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 폴리클 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 프로스타글랜딘, 섬유아세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반 락토젠, OB 단백질; 중앙 괴사 인자- α 및 - β ; 물러-억제 물질; 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); NGF- β 와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-성장 인자; TGF- α 및 TGF- β 와 같은 전이 성장 인자(TGFs); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골 유도 인자; 인터페론- α , β 및 γ 와 같은 인터페론; 대식세포-CSF(M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자(CSF); 과립구-대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, 키트-리간드 또는 FLT-3, 안지오테닌, 트롬보스판딘, 엔도스타틴, 중앙 괴사 인자 및 LT와 같은 인터루킨(IL)이 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 사이토카인이라는 용어는 자연적인 공급원 또는 재조합 세포 배양 유래의 단백질 및 본래 서열 사이토카인과의 생물학적 활성 증가물을 포함한다.
- [0221] 케모카인은 일반적으로 면역 이펙터 세포를 케모카인 발현 부위로 모으는 화학유인물질로 작용한다. 치료 부위로 다른 면역 시스템 성분에 모이는 것을 증진하기 위해서는 예를 들어, 사이토카인 유전자와 함께 특정 케모카인 유전자를 발현하는 것이 유리할 수 있다. 케모카인은 RANTES, MCAF, MIP1-알파, MIP1-베타 및 IP-10을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 당업자는 특정 사이토카인이 또한 화학유인물질 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있고, 또한 케모카인이라는 용어로 분류될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 유사하게, 면역조절자와 사이토카인이라는 용어는 그들의 각각의 멤버에 있어서 중복된다.
- [0222] 방사성 동위원소 치료 및 방사성 면역치료
- [0223] 몇몇 구현예에서, 본 명세서에 기재되고 특허청구된 펩티드 및/또는 단백질은 방사성핵종 치료 또는 방사성면역 치료 방법에 사용될 수 있다(예, 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있는 Govindan et al., 2005, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4:375-91; Sharkey and goldenberg, 2005, *J. Nucl. Med.* 46:115S-127S; goldenberg et al.(submitted MS), "antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and

Radioimmunotherapy"). 특정 구현예에서, PIGF 리간드는, 후술하는 바와 같이, 사용하는 방사성 동위원소로 직접 태그되어 대상에 투여될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 방사성 동위원소는 방사성 표지된 합텐(hapten) 펩티드 또는 PIGF 리간드를 사용하여 전술한 바와 같은 전표적화 방법으로 투여되고, 질병 조직에서 증가된 PIGF 발현 부위에 위치하는 이중특이적 항체의 투여 후에 주입될 수 있다.

[0224] 질병 조직의 치료에 유용한 방사성 동위원소는 ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au 및 ^{211}Pb 를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 치료 방사성 핵종은 오제 방출자(Auger emitter)에 대해 20 내지 6,000 keV 범위, 바람직하게는 60 내지 200 keV 범위이고, 베타 방출자에 대해 100-2,500 keV 및 알파 방출자에 대해 4,000-6,000 keV의 붕괴 에너지를 갖는다. 유용한 베타-입자-방출 핵종의 최대 붕괴 에너지는 바람직하게는 20-5,000 keV, 보다 바람직하게는 100-4,000 keV, 가장 바람직하게는 500-2,500 keV이다. 또한 오제-방출 입자로 실질적으로 붕괴하는 방사성 핵종이 바람직하다. 예를 들어, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m 및 Ir-192. 유용한 베타-입자-방출 핵종의 붕괴 에너지는 바람직하게는 <1,000 keV, 보다 바람직하게는 <100 keV, 및 가장 바람직하게는 <70 keV이다. 또한 알파-입자의 생성과 함께 실질적으로 붕괴하는 방사성 핵종이 바람직하다. 그러한 방사성 핵종은 Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 및 Fm-255를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 유용한 알파-입자-방출 방사성 핵종의 붕괴 에너지는 바람직하게는 2,000-10,000 keV, 보다 바람직하게는 3,000-8,000 keV, 가장 바람직하게는 4,000-7,000 keV이다.

[0225] 예를 들어, 61.5 시간의 반감기 및 베타 입자 및 감마선의 풍부한 공급 때문에 방사성면역치료를 위한 보다 유망한 방사성동위원소 중 하나로 여겨지는 ^{67}Cu 는 킬레이트제인 p-브로모아세트아미도-벤질-테트라에틸아민테트라아세트산(TETA)을 사용하여 항-PIGF 항체와 같은 PIGF 리간드와 접합될 수 있다. 대안적으로, 에너지성 베타 입자를 방출하는 ^{90}Y 는 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)을 사용하여 펩티드, 항체, 용합 단백질 또는 그의 절편에 커플링될 수 있다.

[0226] 추가적인 잠재적 방사성 동위원소는 ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb 등을 포함한다.

[0227] 또 다른 구현예에서, 방사선 증감제는 단독 또는 콘쥬게이션된 PIGF 리간드, 항체 또는 항체 절편과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 방사선 증감제는 방사성 표지된 리간드, 항체 또는 항체 절편과 조합하여 사용될 수 있다. 방사선 증감제의 첨가는 방사성 표지된 리간드, 항체 또는 항체 절편 단독으로 치료할 때에 비해 효율을 증진시킬 수 있다. 방사선 증감제는 D. M. Goldenberg(ed.), CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODY, CRC Press(1995)에 기재되어 있고, 이는 그 전체가 본 명세서에 인용에 의해 포함되어 있다.

[0228] 열 중성자 활성화 치료용 보론 부가물-로딩된 담체(boron addend-loaded carrier)를 갖는 펩티드, 항체, 항체 절편 또는 용합 단백질은 유사한 방식으로 정상적으로 영향을 받을 것이다. 그러나, 중성자 방사가 수행되기 전에 비-표적화된 면역콘쥬게이트가 제거될 때까지 기다리는 것이 이로울 것이다. 제거는 PIGF 리간드에 결합하는 항체를 사용하여 가속화될 수 있다(이러한 일반적인 원칙에 대한 기재는 미국특허 제4,624,846 참조). 예를 들어, 카르보란과 같은 보론 부가물이 PIGF 리간드 항체에 부착될 수 있다. 당업계에 알려진대로 카르보란은, 부가된 측쇄(pendant side chain)에 카르복실기를 가지고 제작될 수 있다. 아미노텍스트란과 같이 담체에 카르보란을 부착하는 것은 카르보란의 카르복실기를 활성화하고 아민을 담체에 축합시킴으로써 달성될 수 있다. 그리고나서 중간 콘쥬게이트가 PIGF 항체에 켄쥬게이션된다. PIGF 항체 콘쥬게이트의 투여 후에, 보론 부가물은 열 중성자 방사에 의해 활성화되고, 매우 독성이 있고 짧은 범위에서 효과를 내는 알파-방출에 의해 붕괴하는 방사활성 원자로 전환된다.

[0229] 키트

[0230] 다양한 구현예는 대상에서 질병 조직을 치료하거나 진단하는데 적합한 성분을 포함하는 키트에 관한 것일 수 있다. 예시적인 키트는 적어도 하나의 PIGF 리간드를 포함할 수 있다. 선택적으로, 다른 키트 성분은 전술한 바와 같은 하나 이상의 다른 항-혈관신생제, 화학치료제, 이중-특이적 항체 또는 다른 성분을 포함할 수 있다.

- [0231] 만약 투여용 성분을 포함하는 조성물이 경구 전달에 의한 것과 같이 소화관을 통해 전달되기 위해 제형화되지 않는다면, 몇몇 다른 경로를 통해 키트 성분을 전달할 수 있는 장치가 포함될 수 있다. 비경구 전달 등에 적용하기 위한 장치의 한가지 타입은 조성물을 대상의 몸에 주입하는데 사용되는 주사기이다. 흡입 장치 또한 사용될 수 있다.
- [0232] 키트 성분은 함께 포장되거나, 두 개 이상의 개별 용기로 분리되어 포장될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 용기는 재구성하기에 적당한 조성물의 멸균, 감압동결건조된 제형을 포함하는 바이알일 수 있다. 키트는 또한 재구성 및/또는 다른 시약의 희석에 적당한 하나 이상의 완충용액을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 용기는 파우치, 트레이, 상자, 튜브 등을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 키트 성분은 포장되어 용기내에서 무균상태로 유지될 수 있다. 포함될 수 있는 또 다른 성분은 키트를 사용하기 위한 키트 사용자 대한 지시사항이다.

실시예

[0240] 실시예

- [0241] 다음의 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 설명하기 위해 포함된다. 다음의 실시예에 기재된 기술은 본 발명을 실시함에 있어 잘 작동하는 것으로 밝혀진 기술을 나타내고, 그러므로 실시를 위한 바람직한 방법으로 간주될 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 그러나, 당업자는 본 명세서의 관점에서, 기재된 특정 구현예에서 많은 변화가 이루어질 수 있고, 또한 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 비슷하거나 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있음을 인식할 것이다.

[0242] 실시예 1. 종양 세포 성장, 이동, 혈관신생 및 전이에 대한 PIGF의 효과

[0243] 방법 및 재료

[0244] 면역조직화학, 조직병리학 및 유세포 분석

- [0245] 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일차 항체 및 1:500으로 희석한 FITC-표지된 이차 항체(Biosource International, Camarillo, CA)를 사용하여 표준 방법에 의해 유세포 분석을 수행하였다. 데이터는 Cell Quest 소프트웨어를 사용하여 BD FACSCalibur 유세포 분석기(BD Biosciences)에서 수집했다.

- [0246] 표준 면역조직화학법(Taylor et al., 2002a)을 사용하여 US Biomax Inc.(Rockville, MD) 및 TARP, NCI(Bethesda, MD)로부터 도입한 파라핀에 굳힌 원발성 유방암 조직 배열을 PIGF 및 VEGF 발현에 대해 염색하였다. 조직 배열은 또한 Flt-1 또는 NRP-1(ABXIS, Seoul, Korea)에 대해 탐색하였다. 슬라이드는 탈파라핀화하고, 적당한 정상 혈청으로 블로킹하고, Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA)에서 구입한 항체로 배양하였다. 일차 항체와 배양한 후, 바이오틴화된 이차 항체를 적용하고, 이어서 3% H_2O_2 내의 내부 퍼옥시다제로 퀀칭(quenching)하였다. 아비딘-바이오틴-HRP 콘주게이트를 적용하여 슬라이드를 세척하였다. 슬라이드는 HRP 기질, 3,3'-디아미노벤지딘 테트라하이드로-클로라이드(DAB, Sigma, St. Louis, MO)와 10분 배양하고 헤마토크실린(Sigma)으로 반염색하였다. 염색된 슬라이드는 100X로 검사하였고, 염색 강도를 반영한 상대적인 값을 할당하여 염색 강도의 순위를 매겼다: 희미함(0.25-0.5), 중간(0.5-1.0), 진함(1.0-2.0) 및 강함(>2.0); 점수는 0.25 점 단위였다. 한 명의 연구자가 모든 슬라이드를 판독하였고(블라인드로), 다른 연구자가 스왑 체크하였다.

- [0247] 살아있는 것으로 나타나는 부위의 종양만을 평가하였고, 전체 강도 및 염색된 세포 %를 나타내는 값을 각 슬라이드에 매겼다. 세포외, 결합 조직 및 백혈구 세포의 염색은 점수에 포함시키지 않았다. 배경 염색(대조군 Ag8 항체에 의해 표시됨) 또한 평가하였고, 그리고나서 감산하였다. 염색 강도가 0.5 또는 그 이상이면 종양 검체를 양성으로 간주하였다. 헤마토크실린 및 에오신으로 인간 종양 이종이식 시료를 염색하였다.

[0248] 세포주

- [0249] 사용된 세포주를 추가로 동정하기 위해, MCF-7, MDA-MB-231 및 -468(American Type Culture collection, Manassas, VA)을 유세포 분석에 의해 PIGF 또는 VEGF 발현에 대해 분석하였다. MDA-MB-231 및 -468과 MCF-7은 또한 세포 단일층의 IHC에 의해 에스트라디올 수용체 알파(Santa Cruz Biotechnology)의 발현에 대해 테스트하였다. MCF-7은 에스트로겐 수용체에 대해 양성이었고 MDA-MB-231과 -468은 음성이었다. MDA-MB-231과 -468 이종이식 종양은 또한 IHC에 의해 Flt-1에 대해 탐침하였고, 양성으로 나타났다. MCF-7 종양은 Flt-1 테스트에 이용하지 않았다.

[0250] 파지의 분리 및 선별

[0251] 공급자의 방법에 따라, 파지 라이브러리(Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)를 재조합 인간 PIGF-2(PIGF) 또는 재조합 인간 VEGF165(VEGF)(R&D Systems, Flanders, NJ)에 대해 패닝하였다. 이어지는 패닝은 PIGF 분자에서 추정된 수용체-결합 부위에 해당하는 PIGF 또는 펩티드를 사용하여 수행하였다. 파지는 3회 패닝을 실시하였고, 적정을 위해 연속적인 10배 희석을 하여 아가 위에 플레이트팅하였다. 잘 분리된 플라크를 적정 플레이트로부터 집어내어 추가 연구를 위해 증폭하였다.

[0252] 시퀀싱

[0253] DNA는 증폭된 플라크로부터 분리하였고 Ph.D. 키트(M13 파지 특이적), Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle 시퀀싱 키트(USB, Swampscott, MA)에 의해 제시된 프라이머를 사용하여 시퀀싱하였다. 결합 펩티드 1(BP1)은 20개의 아미노산을 포함하였다. 대조군 펩티드인 CPA는 BP1에서 H, R 및 D 잔기를 A로 치환함으로써 유도되었다. BP1 및 CPA는 상업적으로 합성하였고(University of Georgia), 시험관 내 및 생체 내에서 연구하였다.

[0254] 펩티드 서열은 Flt-1 또는 PIGF 상의 추정되는 리간드-결합 부위에 대한 상동성에 대해 조사하였다. 한 펩티드인 결합 펩티드 1(BP1)은 Y199 및 L204에 대응하는 도메인 2 내의 Flt-1 결합 부위에 대해 일부 위치적인 상동성을 가졌고(Davis-Smyth et al., 1998, *J Biol Chem* 273:3216-3222; Iyer et al., 2001, *J Biol Chem* 276:12153-12161), 그 서열은 다른 것들보다 더 길었다. 다른 펩티드는 9-12개의 아미노산 길이였고, 패닝 간에 서열의 일관성에 기초하여 선별하였다. 분리된 파지 유래의 두 가지 플라크 서열은 동일하였다(결합 펩티드 3, BP3).

[0255] 펩티드 서열:

[0256] 펩티드 이름 서열

[0257] BP1 SHRYRLAIQLHASDSSSSCV(서열번호 1)

[0258] BP2 QDDHLTTGR(서열번호 2)

[0259] BP3 QEAFNRLTSRMH(서열번호 3)

[0260] BP4 RMPYSEHSAPLG(서열번호 4)

[0261] PIGF, VEGF 또는 Flt-1 결합에 대한 파지 또는 자유 펩티드 테스트

[0262] 패닝용 파지 디스플레이 시스템 공급자에 의해 제공되는 프로토콜을 사용하였다. 각각의 코팅된 웰에 대해, 또 다른 웰을 완충용액에서 배양하였다(완충용액 대조군으로). 코팅 용액을 제거한 후에, 플레이트는 실온에서 1.5 h 동안 2% BSA가 든 PBS로 블로킹하였다. 또 다른 코팅되지 않은 플레이트도 블로킹하고, 파지를 희석하기 위해 사용하였다. 블로킹 후에, 증폭된 파지($\sim 10^8$ 파지/ml)는 블로킹 완충용액에서 1:20으로 희석하였고, 50 μ l의 각 희석액을 PIGF-코팅/블로킹 웰 및 블로킹만 된 웰에 첨가하였다. 파지는 1-2 h 동안 상온에서 결합하도록 하였다. 플레이트를 비우고, 3회 담그고 비워서 세척하였다(세척: PBS에 든 0.05% Tween-20). 블로킹 완충용액에서 1:1000으로 희석되고 HRP에 콘쥬게이트된 항-M13-파지 항체(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)를 모든 웰에 첨가하고 상온에서 1 h 배양하였다. 플레이트는 상기와 같이 담가서 세척하였다. 기질을 첨가하고 30-60 분 후에, 410 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0263] 자유 펩티드 결합을 96-웰 플레이트를 코팅하여 측정하였고, 코팅은 10 μ g/ml PIGF, 10 μ g/ml 재조합 인간 Flt-1 융합 단백질(R & D Systems) 또는 10 μ g/ml VEGF로 하였다. 경쟁 분석은 2.5 또는 25 U/ml 헤파린(Sigma, St. Louis, MO)으로 수행하였다. BP1, 3, 4 및 뒤섞인 버전의 BP3(scrBP3)을 C-말단에서 FLAG 에피토프(DYKDDDDK 서열번호 5)가 이어지는 링커와 함께 합성하였다. 첫번째 시약을 첨가하고 30분 후에 두번째 시약을 첨가하였고, 이어서 또다시 30분 배양하였다. 펩티드 결합은 FLAG 에피토프에 대한 탐침으로 평가하였다(Prickett et al., *Biotechniques* 7:580-9, 1989; Castrucci et al., *J. Virol.* 66:4647-53, 1992). 490 nm에서 흡광도를 판독하였다. ELISA-기반의 결합 분석에서, CPA는 PIGF 및 VEGF와 결합하였으나, Flt-1에 대한 친화도는 감소되었다(50%). CPA 펩티드는 시험관 내 및 생체 내에서 지속적으로 불활성이었다.

[0264] 종양 세포 생존능

[0265] MTT(3-(4,5-디메틸티아졸릴-2)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드, Sigma) 분석을 세포 생존능, 펩티드의 독성에

대한 PIGF의 영향 및 PIGF-매개성 유방 종양 세포 증식에 대한 펩티드의 영향을 측정하기 위해 저혈청(1%) 조건 하에서 수행하였다(Mosmann, 1983, *J Immunol Meth* 65:55-63; Modrak et al., 2000, *Biochem Biophys Res Commun* 268:603-606). 펩티드 농도는 1-2 μM 였고, 외래 PIGF 농도는 2 nM였다. 테스트된 인간 유방 종양 세포주는 MDA-MB-231, MDA-MB-468 및 MCF-7(ATCC, Mannasses, VA)였다. 간단히 설명하면, 96-웰 플레이트를 1% 우태아 혈청(FBS)을 포함하는 배지에서 $5-10 \times 10^4$ 세포/ mL 로 접종하였다. 24 h 후에, 세포를 1-2 μM (4 가지 결합 펩티드) 농도의 각각의 펩티드로 4중 반복(quadruplicate)으로 처리하거나, 및/또는 2 nM 농도의 rhuPIGF로 처리하였다. 소정의 시점 이후에, 0.5 mg/mL MTT(무혈청의 RPMI 배지에서 1:10으로 희석된 5 mg/mL 스톱)를 웰에 첨가하였다(Mosmann, 1983). 세포 내에서 보라색 결정이 분명히 보이고, 플레이트가 완전히 현상된 것으로 나타나면, 산 알코올 (이소프로판올 내의 0.04M HCl)로 반응을 종결하였다. 570 nm에서 용해된 결정의 흡광도를 판독하였다. 시험관 내에서 종양 세포 이동에 대한 PIGF의 효과가 24 시간에 측정가능하므로, 24 시간을 선택했다(하기 상처-치료 분석 참조). 이 분석은 또한 10% FBS 배지를 사용하여 수행하였으며, 비슷한 결과를 나타내었다.

[0266] 상처-치료 분석

[0267] 유방 종양 및 정상 인간 내피 세포(HEC)에 대한 PIGF, VEGF 및 BP 펩티드의 작용 효과를 측정하기 위해서, 상처-치료 분석을 수행하였다(Verma et al., 2001, *Cell Microbiol* 3:169-180; Sung et al., 2003, *Exp Cell Res* 287:209-218; Itokawa et al., *Mol. Cancer Ther.* 1:295-302, 2002). MCF-7, MDA-MB-231 및 MDA-MB-468 유방 종양 세포주 또는 HEC를 페트리 디쉬 또는 6-웰 플레이트 내의 멸균 유리 커버 슬립상에 접종하였다. 세포가 70-80% 채워졌을 때, 단일층을 멸균 피펫 팁으로 긁었다. 커버 슬립을 멸균 PBS로 세척하였고, 그리고 나서 단독으로 또는 PIGF 또는 VEGF(2 nM), 펩티드(2 μM), 또는 항체(0.67 내지 1 $\mu\text{g/mL}$)와 조합하여 처리하였다.

[0268] 억제자 농도는 50 μM PD98059(PD98)(마이토젠 활성화된 단백질 키나제-키나제 1 [MEK1] 억제자), 5 nM 워트만닌(Wortmannin, 포스포티딜 이노시톨 3 키나제[PI3K] 억제자), 또는 인간 재조합 용해성 Flt-1(sFlt-1)(R&D Systems)였다. 펩티드 또는 Flt-1은 PIGF-, VEGF-포함 배지와 함께 세포 첨가 전에 10분 동안 배양하였다. 세포는 PIGF 첨가 전에 15-30 분 동안 PD98 및 워트만닌과 함께 전배양하였다. 염색하여(Wright-Giemsa) 올려놓은 커버 슬립을 현미경으로 검사하였다. 5 내지 10개의 100X 필드를 상처 가장자리로부터 분리되어 상처 중심으로 이동하는 것으로 나타나는 세포의 수를 세어 평가하였다. 결과는 상처 내로 이동하는 평균 세포수/100X 필드로 보고하였다. 몇몇 경우에서, 개별 실험의 데이터를 합하여 다양한 처리를 포함하도록 표에 나타내었다.

[0269] 세포 침습 분석

[0270] 세포 침습은 성장 인자-유도성 매트릭스 침습 챔버(BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA)에 5×10^4 세포를 첨가하여 측정하였다(Taylor et al., 2003b; Passaniti et al., 1992, *Lab Invest* 67, 519-528). 매트릭스 플러그에 첨가되는 것들은 상온에서 10분 동안 100 μL PBS의 전체 부피로 함께 전배양하였고, 그 후 각각의 첨가물을 매트릭스에 첨가하였다. 성장 인자(2.0 또는 0.2 nM), 펩티드(2 $\mu\text{g/mL}$), 또는 항체(1 $\mu\text{g/mL}$)를 저혈청(0.1% 우태아 혈청 [FBS]) 배지에서 세포로 첨가하였다. 기준선 및 화학유인물질-기반 침습(10% FBS)이 포함된다. 침습하는 세포의 수는 24 h(MDA-MB-231) 또는 48 h(MCF-7, MDA-MB-468) 후에 100X 배율에서 염색한 후에 침습 챔버막의 바닥 위의 세포수를 계수하여 측정하였다. 3 내지 5회의 개별 실험 결과를 나타내었다.

[0271] 생체 내 종양 성장에 대한 펩티드 처리 효과

[0272] 조직-배양-성장 인간 유방 종양 세포주인 MDA-MB-231를 누드 마우스의 옆구리 피하에 이식하였다. 종양이 보일 때, 마우스의 무게를 재고 종양을 측정하였다. 펩티드 처리는 종양의 부피가 평균 약 $0.06-0.12 \text{ cm}^3$ 일 때 시작했다. 마우스는 4 주 동안 3-4일 간격으로 복강내 주사에 의해 PBS에 든 200 μg 펩티드로 처리하였다. 각 처리시 동물의 무게를 재고 종양을 측정하였다. 두 번째 실험에서, 대조군 펩티드인 CPA를 포함시켰다. 최종 처리 3일 후에, 종양 및 폐를 수집하였다. 폐의 종양 적하중량(실험 1로부터)은 각 마우스에 대해 4개의 슬라이드 또는 구획 전체에서 모든 폐 조직에 나타난 콜로니(<20 세포), 클러스터(>20-100 세포) 및 혹(>100 세포)을 계수하여 측정하였다. 데이터는 각 처리군(3-4 마우스/군)에 대해 각 크기의 전이 수의 평균으로 나타내었다. 각각의 총 수는 각 처리군에 대해 합하였고, 그 군의 전체 마우스 수로 나누었다. 전이에 대한 억제 퍼센트는 다음 식으로 측정하였다: % 억제 = (# 목(mock)-처리 - # 처리 / # 목-처리) X 100.

[0273] 조직 배양으로 자란 MDA-MB-231 또한 SCID 마우스의 유방 지방 패드(mfp)에 이식하였다(3×10^6 세포, 4-5 마우스)

스/군). 이 모델에서, 큰 폐 전이는 진행되지 않는 경향이 있다(Richert et al., *Breast Cancer Res.* 7:R819-27, 2005). 작은 종양이 모든 마우스에서 손으로 만져지는(8회 처리), 이식 후 5일째에 펩티드 처리를 시작하였다. 최종 펩티드 처리 3일 후에, 종양을 제거하여 무게를 재었다. 폐를 수집하고 상기와 같이 현미경으로 전이를 검사하였다.

[0274] 통계 분석

[0275] 결합, 생존능, 이동성, 혈관신생, 종양 성장 및 전이성 종양 적하중량은 ANOVA로 평가하였다. $P < 0.05$ 를 유의하다고 간주하였다.

[0276] 결과

[0277] PIGF는 원발성 인간 유방암 및 유방 종양 세포주에서 지속적으로 발현된다

[0278] 원발성 유방암 및 유방 종양 세포주에 의한 지속적인 PIGF 및 PIGF-수용체 발현의 빈도를 하기와 같이 조직 배열의 면역조직화학적 염색에 의해 조사하였다. 표 1에 나타난 결과는 VEGF 보다 Flt-1-양성 시료의 비율이 더 높음을 나타낸다(43%-60%, PIGF; 13%-14%, VEGF). PIGF 수용체인 NRP-1의 발현은 유방암 실질에 한정되었고, 종양 내피에서는 없었다(parenchyma, 27%). 반면, 종양 실질 및 내피 모두 Flt-1에 대해 양성이었다(각각 65% 및 56%).

[0279] [표 1] 원발성 유방암에 의한 PIGF, VEGF, NRP-1 및 Flt-1의 발현

마커	배열 1(%)	배열 2(%)
PIGF	30/69(43%)	30/50(60%)
VEGF	9/70(13%)	7/50(14%)
NRP-1	ND	25/94(27%)
Flt-1-종양	ND	31/48(65%)
Flt-1-혈관	ND	27/48(56%)

[0281] 중간 내지 강하게 염색된 종양의 수/전체 시료 수/배열. 배열 1, TARP. 배열 2, 상업적 공급원. ND, 수행되지 않음

[0282] 폐종양 및 뇌종양(glioblastomas)은 또한 상대적으로 높은 발현 빈도를 갖는 것들이었다(각각 32% 및 20%, 데이터 미제시). 대장종양은 대장종양 세포주처럼(1/4)(데이터 미제시) 가장 낮게 지속적으로 발현하는 것 중 하나였다(8%).

[0283] 인간 유방암 세포주인 MCF-7, MDA-MB-231 및 MDA-MB-468은 유세포 분석에 의해 PIGF 및 VEGF 발현을 분석하였다. PIGF-양성 세포의 퍼센트는 MCF-7, MDA-MB-231 및 MDA-MB-468에 대해 각각 29%, 49% 및 38%였다. 그러므로, 이들 세포주는 상대적으로 높은 PIGF 발현과 낮은 VEGF 발현을 나타내었다. MDA-MB-231 및 -468 이중이식 종양 모두 PIGF 수용체인 Flt-1를 발현한다. MDA-MB-468은 NRP-1에 대해 희미하게 염색되었고(데이터 미제시), MDA-MB-231에서의 NRP-1 발현은 이미 공지되어 있다(Soker et al., *J. Biol. Chem.* 271:5761-7, 1996). 이 세포주들은 이후의 연구를 위해 사용되었다.

[0284] PIGF-결합 펩티드의 유도

[0285] 유방암에서 상대적으로 높은 빈도의 PIGF, NRP-1 및 Flt-1가 발현되는 것은 PIGF가 이들 세포에 직접적인 영향을 미칠 수 있음을 제시한다. 유방암 세포에 대한 PIGF의 효과를 조사하기 위해, PIGF- 및 Flt-1-결합 펩티드(BP)를 파지 펩티드 라이브러리 패닝에 의해 얻었다. 결합 펩티드는 적어도 3회 패닝 후에 얻었다. 결합 펩티드 1 및 2(BP1, BP2)는 rhuPIGF에 대한 패닝으로 유도하였고, 결합 펩티드 3 및 4(BP3 및 BP4)는 PIGF에 대한 추정되는 수용체-결합 부위 서열에 해당하는 펩티드에 대해 2회 처음 패닝한 파지로부터 유도하였고, 그리고 나서 3회에 rhuPIGF에 대해 실시하였다. BP3은 두 개의 서로 다른 파지 플라크에 공통인 서열을 나타낸다.

[0286] 분리 후, 파지는 PIGF-코팅된 플레이트에 대해 ELISA-기반의 결합 분석을 실시했다. 파지 BP1에 대한 흡광도 판독(410 nm) 결과 0.024였다(파지 라이브러리 배경 0.003). 상기 결과는 PIGF-코팅된 웰에 대한 PIGF-패닝한 파지의 결합이 배경에 비해 10-20배 증가되었음을 나타낸다.

[0287] 펩티드 BP1(SHRYRLAIQLHASDSSSSCV, 서열번호 1)은 C-말단 FLAG 에피토프로 합성하였고, PIGF, Flt-1 및 VEGF에

대한 결합을 테스트하였다. BP1은 PIGF(A490 0.100 ± 0.058) 및 VEGF165(A490 0.299 ± 0.174)에 결합하였으며, Flt-1(A490, 0.886 ± 0.096)에 가장 강하게 결합하였다. Flt-1 결합은 Flt-1가 고정된 결합 분석에 결합되지 않은 Flt-1를 첨가하여 추가로 테스트하였다. 자유 Flt-1(2 nM)의 첨가는 고정된 Flt-1에 대한 BP1의 결합을 38% 감소시켰다(5 μ M BP1 단독에 대해 A490 0.527 ± 0.025 ; 자유 Flt-1 및 BP1 첨가에 대해 0.327 ± 0.127).

[0288] PIGF 존재가 BP1-Flt-1 상호작용을 방해하는지 여부를 측정하기 위해 추가적인 분석을 수행하였다. 1 및 100 nM 사이의 농도에서 PIGF는 BP1의 Flt-1에 대한 결합에 대해 현저한 효과를 나타내지는 않았다. 이러한 발견은 BP1이 Flt-1와 PIGF의 주요 상호작용이 위치하는 도메인 2 이외에 Flt-1 상의 부위와 상호작용한다는 것을 나타낸다. 이어서, Flt-1 및 PIGF-2 모두에 존재하는 헤파린-결합 부위와 BP1의 결합을 조사하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, BP1 첨가 전에 Flt-1 코팅된 플레이트에 헤파린을 첨가하면 BP1 결합을 64% 감소시켰다($P < 0.0002$). 그러나, 만약 BP1이 헤파린 첨가 전에 첨가되면, BP1의 결합은 13%만 억제되었다($P > 0.05$). 그러므로, BP1은 헤파린-결합 부위 또는 근처에서 Flt-1에 가장 결합하기 쉽다.

[0289] 비트로넥틴에서 발견되는 헤파린 결합 도메인의 처음 6개 잔기와 BP1의 처음 6개 잔기가 동일한 패턴(XBBXB)을 가지고 있어, BP1은 그 자체로 헤파린 결합 모티프를 포함한다. 이 도메인은 혈관신생, 종양 전이 및/또는 종양 세포 운동성의 억제에 대해 증가된 능력을 나타낼 수 있는 대안적인 결합 펩티드 서열의 중심으로서 작용할 수 있다. 당업자는 예를 들어, "X"로 표시된 위치에서 아미노산의 랜덤화가 잠재적으로 BP1의 유용한 유사체 생산을 가져올 수 있다는 점을 인식할 것이다. 전하 분포는 중요할 수 있는 반면에, "B"로 표시된 위치에서 다른 염기성 잔기(예, 히스티딘, 아르기닌, 리신)의 첨가 또한 BP1의 유용한 유사체의 생산을 가져올 수 있다.

[0290] VEGF에 대한 BP1의 측정가능한 결합은 검출되지 않았다. 예상치 못하게, BP1은 또한 배경에 대해 10배로 Flt-1에 결합했다. Flt-1 결합의 특이성은 ELISA-기반의 결합 분석에 결합되지 않은 Flt-1(2 nM)을 첨가하여 테스트하였고, 이는 고정된 Flt-1에 대한 5 μ M BP1의 결합에서 38% 감소를 가져왔다.

[0291] 펩티드 BP3 및 BP4 및 BP3의 뒤섞인 버전(BP3scr) 또한 PIGF 및 Flt-1로의 결합에 대해 자유 펩티드와 같이 분석하였고, 50 μ M까지의 농도에서 PIGF에 검출가능하게 결합하지 않았다. 이들 펩티드에 대해 Flt-1로의 측정가능한 결합은 검출되지 않았다.

[0292] PIGF 또는 펩티드에 노출되었을 때 유방 종양 세포의 생존능

[0293] PIGF 및 모든 4 가지 펩티드는 유방 종양 세포 생존능에 대한 그들의 효과에 대해 분석하였다. 세포주 MCF-7, MDA-MB-231 및 MDA-MB-468은 그들이 많은 원발성 및 전이 유방암을 타입화하기 때문에 선택하였다. MCF-7은 에스트로겐 수용체-양성이고, 중간 정도의 잘-분화된 조직을 갖는다. 원래 전이 늑막 삼출증으로부터 얻은 MDA-MB-231(Cailleau et al., 1974, *J Natl Cancer Inst* 53:661-674))은 에스트로겐 수용체-음성이고, 잘 분화되지 않는 III 등급 선암 이종이식을 형성한다. MDA-MB-468은 또한 에스트로겐 수용체-음성이고, 잘 분화되지 않았으며, 누드 마우스에서 종양을 생성한다. 세 가지 종양 모두 PIGF-음성 대장종양 세포주인 HT-29에 비해 3-4배의 PIGF를 지속적으로 생산하고(유세포 분석에 의해), 낮은 레벨의 PIGF 수용체 Flt-1를 발현한다(데이터 미제시). MDA-MB-231은 PIGF의 가장 많은 생산자이고, MDA-MB-468이 가장 낮은 생산자이다.

[0294] 종양 세포 배양액에 PIGF(2 nM)를 첨가하면 24 h 배양 후에 세포수가 증가되었다(MDA-MB-231 및 MDA-MB-468에 대해 $P < 0.04$)(도 4). PIGF-자극성 생존능 및 증식에 대한 펩티드의 효과를 측정하기 위해서, 펩티드(1-2 μ M)를 PIGF(2 nM)과 조합하였다. PIGF-포함하는 MTT 분석에 펩티드를 첨가한 결과는 도 4에 나타나 있다. PIGF-포함하는 MCF-7 배양액에 BP4를 첨가하면(도 4A) PIGF-포함하는 MDA-MB-468 배양액에 BP3을 첨가한 것과 마찬가지로 세포 생존능에 상당한 감소를 가져왔다($P < 0.03$). 세 가지 펩티드 모두는 PIGF-포함하는 MDA-MB-468 배양의 생존능을 감소시켰다(데이터 미제시)($P < 0.03$).

[0295] 펩티드 단독(2 μ M)으로 24 h 동안 종양 세포를 배양하면, 생존능이 21%($P < 0.005$)만큼 낮아진 BP1으로 배양한 MCF-7을 제외하고는 세포 생존능에 현저한 효과를 나타내지 않았다. BP3으로 48 h 배양한 후에, MCF-7 또한 비처리 대조군에 비교하여 생존능을 잃어버렸다($P > 0.05$).

[0296] PIGF는 종양 세포 이동을 자극하고 전이와 관련되어 있다

[0297] PIGF가 종양의 재발이나 전이 가능성을 증가시킬 수 있는지 측정하였다. 전이성 종양 세포는 증가된 운동성 및 침습 능력을 나타내기 때문에, 외래의 PIGF를 유방암 세포주인 MCF-7, MDA-MB-231 및 MDA-MB-468을 포함하는 운동성 및 침습 분석에 첨가하였다. PIGF는 MDA-MB-231 및 MCF-7의 운동성을 1.8-2.1배 증가시켰으나($P < 0.01$), MDA-MB-468의 운동성에 현저하게 영향을 미치지지는 않았다. 재조합 용해성 Flt-1(2 nM)을 첨가하면 PIGF의 자극 효과를 MDA-MB-231 및 MCF-7 각각에 대해 55% 및 67% 만큼 현저히 차단했다($P < 0.02$)(표 2). 항-

PIGF 항체($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 또한 MDA-MB-231 및 MCF-7의 PIGF-매개성 운동성을 차단했다($P < 0.02$)(표 2). BP1 또한 MDA-MB-231 및 MCF-7에서 PIGF-자극성 운동성을 현저히 억제했다($P < 0.02$). 대조군 펩티드인 CPA는 효과가 없었고, VEGF(2 nM)도 마찬가지였다(표 2). PIGF-포함 분석에 첨가된 항-VEGF 항체는 MDA-MB-231의 PIGF-자극성 이동에 영향을 미치지 않았는데, 이는 이 세포주에서 관찰된 증가된 운동성이 VEGF 활성화 때문이 아님을 제시한다(표 2).

[표 2] 펩티드 BP-1, Flt-1, 항-PIGF 항체, 항-VEGF 항체 및 PI3K/MEK 억제자에 의한 PIGF-자극성 종양 세포 운동성 억제

세포주	성장 인자 (2nM)	테스트 제제	이동하는 세포	상대적인 활성화
MDA-MB-231	0	0	23.8 ± 6.5	
	PIGF	0	$42.0 \pm 13.3 *$	100
	PIGF	Flt-1	$19.1 \pm 8.0 \dagger$	45
	PIGF	BP1	$13.6 \pm 6.1 \dagger$	32
	PIGF	CPA	39.8 ± 10.6	106
	PIGF	항-PIGF	$17.0 \pm 6 \dagger$	40
	PIGF	항-VEGF	34.4 ± 12.6	82
	PIGF	PD98059	$18.4 \pm 8.0 \ddagger$	43
	PIGF	워트마닌	$16.4 \pm 5.8 \ddagger$	39
	VEGF	0	11.1 ± 1.8	100
	VEGF	BP1	14.7 ± 2.1	132
	VEGF	CPA	13.4 ± 4.5	121
	VEGF	항-VEGF	11.5 ± 2.3	104
	VEGF	항-PIGF	13.8 ± 14.6	124
MDA-MB-468	0	0	13.4 ± 9.1	
	PIGF	0	14.7 ± 9.8	100
	PIGF	Flt-1	$7.8 \pm 5.9 \dagger$	53
	PIGF	BP1	14.3 ± 8.1	97
	PIGF	CPA	21.6 ± 6.1	147
	PIGF	항-PIGF	$7.6 \pm 5.7 \dagger$	52
	VEGF	0	14.0 ± 11.3	100
	VEGF	BP1	15.8 ± 9.5	113
	VEGF	CPA	14.6 ± 8.0	104
	VEGF	항-VEGF	14.2 ± 11.5	101
MCF-7	0	0	12.2 ± 11.4	
	PIGF	0	$22.1 \pm 13.4 *$	100
	PIGF	Flt-1	$10.4 \pm 8.2 \dagger$	47
	PIGF	BP1	$10.2 \pm 7.8 \dagger$	45
	PIGF	항-PIGF	$10.9 \pm 4.9 \dagger$	49
	VEGF	0	12.7 ± 4.1	100
	VEGF	BP1	12.9 ± 2.9	102
	VEGF	CPA	19.4 ± 8.9	111
	VEGF	항-VEGF	12.9 ± 4.3	102

PIGF, VEGF 및 Flt-1, 2 nM ; 펩티드 $2 \mu\text{M}$. 항체 농도는 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. MEK1 억제자인 PD98059(PD98), $50 \mu\text{M}$. PI3K 억제자인 워트마닌, 5 nM . 결과는 18-24 h에서 5-10개 100X 현미경 필드/처리/실험으로부터 '상처' 내로 이동하는 세포의 평균 수 $\pm$ SD로 나타났다. $n=2-4$ 회 실험. 항체 및 억제자 처리에 대한 값은 모든 관련 대조군을 포함하는 개별 실험으로부터 얻었다. 2회의 실험에서, 모든 값은 대부분 이전 실험값의 대략 절반이었고, 그래서 그들은 2를 곱해 표준화하였고, 그리고나서 다른 실험과 평균을 내었다. UT는 비처리 대조군을 나타낸다. UT와 비교하면 $*P < 0.01$ (ANOVA); PIGF 단독과 비교하면 $\dagger P < 0.02$ (ANOVA). PIGF 단독과 비교하면 $\ddagger P < 0.001$ (ANOVA). 상대적인 활성화는 처리시의 평균값을 PIGF- 또는 VEGF-단독으로 나누어 측정하였다.

PI3K 및 MEK1 활성화 모두 종종 티로신 키나제 수용체(RTK) 세포내 신호전달과 연결되어 있다. 추가로, 활성화 PI3K 및 MEK1은 종양 세포 이동과 관련되어 있다(Zeng et al., *J. Biol. Chem.* 276:26969-79, 2001; Hollande

et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280:G910-21, 2001). PIGF-자극성 이동성이 이들 키나제 중 어느 것의 활성화 때문인지 조사하기 위해서, MDA-MB-231을 PIGF 및 PI3K 억제자(워트마닌, 5 nM) 또는 MEK1(PD98059, 50 μ M [PD98])로 처리하였다. PD98 및 워트마닌은 PIGF-자극성 이동을 각각 68% 및 72% 만큼 현저히 억제했다($P < 0.001$)(표 2). 이러한 결과는 PIGF가 PI3K 및 MEK1 경로의 활성화를 통해, 가능하게는 Flt-1에 의한 PI3K의 활성화를 통해 세포 이동성을 자극한다는 것을 제시한다.

[0302] 기저막을 침습하는 능력은 전이의 기본이기 때문에, 첨가된 PIGF 또는 VEGF로 침습 분석을 수행하였다. 2.0 및 0.2 nM 모두에서 PIGF의 첨가는 24 h 후 MDA-MB-231의 침습을 거의 3배 증가시켰다(11 ± 8.1 비처리 vs. 30 ± 13.7 (2.0 nM) 또는 28 ± 12 (0.2 nM) PIGF-처리, $P < 0.05$)(도 2). VEGF(2.0 nM 또는 0.2 nM)는 MDA-MB-231의 침습 능력을 변경시키지 않았다(10 ± 8.0 세포). 펩티드 BP1의 첨가는 PIGF-자극성 침습을 50% 감소시켰다(15 ± 4.2 세포)($P < 0.02$ vs. PIGF-단독). 대조군 펩티드인 CPA는 PIGF의 활성을 억제하지 않았다(35 ± 17.3 세포). 0.2 nM PIGF 분석에 항-PIGF 항체를 첨가(0.6 μ g/ml)하면 침습 세포를 46% 감소시켰다(15 ± 2.3 세포, 1회 실험). 종합하면, 이들 결과는 PIGF가 공격적인 종양 세포주인 MDA-MB-231에서 침습성을 자극하고, PIGF 항체와 유사한 억제 펩티드인 BP1이 이러한 활성을 억제한다는 것을 제시한다. MDA-MB-468 및 MCF-7에 대해 서로 유사한 결과를 얻었으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(표 3).

[표 3] PIGF는 유방암 세포주의 침습 능력을 증가시킨다. BP1은 PIGF-매개성 침습 능력을 억제한다.

세포주	비처리	PIGF	PIGF + BP1	PIGF + CPA	BP1
MCF-7	1	2.1 ± 0.7	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.4
MDA-MB-231	1	$4.0 \pm 2.2^*$	$1.3 \pm 0.1^†$	4.9 ± 2.4	1.0 ± 0.6
MDA-MB-468	1	1.8 ± 0.3	0.6 ± 0.4	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.3

[0305] 24 h(MDA-MB-231) 또는 48 h(MDA-MB-468 및 MCF-7) 후 막에서의 세포수의 평균 배수 변화를 비처리 대조군 $\pm$ SD로 비교하였다. PIGF 농도, 0.2 nM; 펩티드, 2 μ g/ml. N= 2-4회 실험/세포주. * $P < 0.01$ vs. 비처리. $† P < 0.02$ vs. PIGF-단독

[0306] 펩티드 BP1의 치료 활성을 테스트하기 위해, 피하 종양으로 이식될 때 자발적으로 폐 전이를 일으키는 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231을 마우스에 이식했다. 종양이 부피가 평균 0.12 cm^3 일 때, 목-처리 또는 BP1 치료는 200 μ g에서 4주 동안 주당 2회로 시작했다. BP1을 받은 마우스는 목-처리 대조군에 비해 종양의 크기가 37% 감소하였다. 이어진 실험에서, 종양이 $0.07\text{-}0.08 \text{ cm}^3$ 일 때 치료를 시작하였다. 상기와 같이, 처리 4주 후에, 목- 및 CPA-처리된 종양의 평균 부피는 각각 0.25 및 0.33 cm^3 인 반면에, BP-처리된 종양은 평균 0.04 cm^3 였다($P < 0.05$ BP1 vs. 목- 또는 CPA-처리된 종양)(도 3).

[0307] 처리 3일 후에, 원발성 종양 및 폐를 현미경 실험을 위해 제거하였다. 일반적으로 목-처리한 동물은 주위 실질로 퍼져, 주로 폐 혈관 주위에 종양 성장의 많은 병소를 갖는 다수의 크고 작은 전이를 포함하였다(데이터 미제시). 목-처리된 대조군의 폐는 평균 78 ± 25 개 혹, 76 ± 19 개 클러스터 및 36 ± 6 개 콜로니/전체 폐 조직/마우스였다. 대조적으로, BP1-처리된 폐는 마우스당 각각 평균 5 ± 2 개 혹, 9 ± 2 개 클러스터 및 5 ± 2 개 콜로니였다. 이는 펩티드-처리된 동물에서 전이성 폐 혹의 수에서 94% 감소된 것을 나타낸다($P < 0.007$).

[0308] MDA-MB-231을 사용한 정위 지방 패드(mfp) 모델에서, BP1 처리는 종양 중량을 23% 만큼 감소시켰는데(목-처리, $0.423 \pm 0.089 \text{ g}$; CPA, $0.416 \pm 0.083 \text{ g}$; BP1, 0.345 ± 0.095), 이는 통계적으로 유의한 정도에 도달한 것은 아니었다. mfp-이식된 MDA-MB-231은 큰 폐 혹을 만들지는 않았는데, 이는 실험이 짧게 지속되었기 때문일 수 있다(4.5주). 그러나, 미세전이(20 내지 >100 세포)는 폐 정맥 근처에서는 분명했다(데이터 미제시). 미세전이 수는 목-처리, CPA 및 BP1 각각에 대해 마우스당 3.4 ± 1.9 , 2.8 ± 1.3 및 0.6 ± 0.5 였고($P < 0.02$ vs. 목 또는 CPA-처리), 전이는 82% 감소했다.

[0309] MDA-MB-468 이종이식(평균 종양 부피: 0.19 cm^3)를 갖는 마우스를 각 펩티드를 복강 주사하여 처리하였다(200 μ g/용량)(도 5). 주 2회 처리한 지 4주 후에, 각각 BP1(도 5A) 또는 BP3(도 5B) 처리한 마우스에서 종양 성장이 49% 및 58% 만큼 억제되었다. 종양 성장에 대한 BP3의 효과는 처리 2주 후에 분명했고(도 5B), 반면 BP1의 억제 효과는 1주 후에 분명했다(도 5A). BP1 처리 중에 개별 종양 부피의 평균 변화는 10, 14, 17 및 24일에 현저했다($P < 0.05$)(도 5A). BP2 처리는 효과가 없었다; 종양은 목-처리 대조군과 거의 동일한 속도로 계속해

서 자랐다(결과는 미세시). BP4 처리는 종양 성장을 20% 억제했다(결과는 미세시).

[0310] 혈관신생 억제

[0311] 내피 세포 이동 및 혈관신생에 대한 PlGF 결합 펩티드의 효과를 추가로 조사하기 위해서, PlGF, BP1, BP2, 또는 PBS를 포함하는 매트릭셀 기저막 플러그를 누드 마우스의 옆구리에 피하 이식했다. PBS 대조군에서의 내부 미세혈관의 수는 $16.2 \pm 11.4/\text{mm}^2$ 였다. PlGF-단독 이식은 $28.9 \pm 17.2/\text{mm}^2$ (1.8배 vs. mock-처리한 이식)를 포함했고, PlGF 및 BP1 동시 이식은 단지 12.3 ± 13.0 미세혈관/ mm^2 만 포함했다($P < 0.02$).

[0312] 논의

[0313] 몇몇 연구는 유방암을 포함하는 암에 의한 PlGF 발현이 재발, 전이 및 운동성과 관련이 있다는 것을 나타낸다(Wei et al., Gut 54:666-72, 2005; Chen et al., Cancer Lett. 213:73-82, 2004; Parr et al., Eur. J. Cancer 41:2819-27, 2005; Weidner et al., Am. J. Pathol. 143:401-9, 1993; Zhang et al., World J. Surg. Oncol. 3:68, 2005). PlGF는 또한 다수의 병리학적 상태(Carmeliet et al., Nat. Med. 7:575-83, 2001) 및 종양 혈관신생(Li et al., FASEB J. 20:1495-97, 2006; Taylor et al., Int. J. Cancer 1-5:158-69, 2003)과 관련되어 있다.

[0314] 인간 암에서 VEGF 및 Flt-1의 임상 연구는 서로 상충하고 있다. 예를 들어, 한 보고에서, VEGF 보다는 PlGF가 필라델피아 염색체-양성 급성 골수성 백혈병의 성장을 생체 외에서 자극했다(Ikai et al., Eur. J. Haematol. 75:273-9, 2005). 반면에, VEGF는 맥관질 및 정맥 침습 뿐 아니라 신장 세포 암 단계, 조직학적 등급과 관련되어 있다(Matsumoto et al. Anticancer Res. 23:4953-8, 2003). 이들 저자는 PlGF 또한 이 암에 대해 독립적인 예후 인자라고 보고했다.

[0315] 다수의 항-VEGF 제제가 개발되었고, 블로킹 항체를 포함하는, VEGF-수용체 결합을 방지하는 몇몇 저분자 및 항-센스 올리고뉴클레오타이드는 임상시험에서 테스트되었다(Whatmore et al., 2002, Angiogenesis 5:45-51; Mulligan-Kehoe et al., 2002, J Biol Chem 277:49077-49089; Shi and Siemann, 2002, Br J Cancer 87:119-126; Yang et al., 2003, NEJM 349, 427-434). 이들 연구 결과는 종양 혈관신생이 복잡하고 중복되었음을 나타낸다; 즉, VEGF가 처리에 의해 줄어들 때 또는 VEGF 발현이 낮은 종양 타입에서, 종양에 혈액을 공급하기 위한 '백-업' 기작이 있을 수 있다는 것이다. PlGF는 이러한 기능적 중복과 관련되어 있을 수 있다. PlGF는 또한 미리 존재하는 문합으로부터 동맥 형성을 일으키는 동맥발생원이다(Pipp et al., 2003).

[0316] 상기에서 제시된 데이터는 PlGF가 운동성과 침습성(이는 종양에서 전이를 특징짓는 상피에서 중간엽으로의 이동과 관련되어 있다)을 자극하기 때문에, 유방암 세포의 전이 능력을 증진시킨다는 것을 나타낸다. 반대로, 외부에서 첨가된 VEGF는 이들 분석에서 종양 세포의 운동성이나 침습성에 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는 Bachelder 등(Cancer Res. 62:7203-6, 2002)의 것과 다른데, 상기 문헌에서는 VEGF가 침습의 자극제로 밝혀졌다(MDA-MB-231). 그러나, 이 연구는 PlGF를 포함하지 않았다; 그러므로 성장 인자의 비교는 이루어질 수 없다. 본 발명자들의 결과는 종양 세포 근처에서 PlGF 또는 VEGF가 존재하는 것에 기반을 두는 반면, Bachelder 등(2002)은 세포에 의한 VEGF 생산을 억제하기 위해 RNAi를 사용하였고, 그 결과는 VEGF의 주변 분비(paracrine) 효과와 다를 수 있다.

[0317] 또 다른 보고는 정상적으로 낮은 PlGF 및 높은 VEGF를 발현하는 종양 세포주에 의해 PlGF가 과발현될 때 PlGF에 대한 억제 역할을 기재하였다(Xu et al., Cancer Res. 6:3971-7, 2006). 이러한 발현 패턴은 본 발명에서 사용된 유방 종양 세포주의 것과 다른데, 이는 높은 PlGF, 낮은 VEGF 발현자이고, 원발성 인간 유방 종양을 닮은 패턴이다. 적어도 하나의 다른 연구는 VEGF 및 PlGF가 병리학적 증상에서 혈관신생을 자극하기 위해 시너지 효과를 낸다는 것을 나타낸다(Carmeliet et al., 2001). 종양 병리학에 대한 PlGF 또는 VEGF의 기여는 가장 복잡하며, 부분적으로 종양 세포 및 내피에서 그들의 활성 수용체의 존재 뿐 아니라 종양의 미세환경에서 그들의 상대적인 풍부함 때문일 수 있다.

[0318] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 암 세포 운동성 및 침습성을 자극하기 위한 PlGF의 능력은 개발된 PlGF-2/Flt-1 혈관신생 펩티드인 BP1 뿐 아니라 항-PlGF 항체에 의해 억제되었다. 만약 PlGF가 억제적이라면, 이를 제거하는 것은 VEGF-매개성 활성이 진행되도록 할 것이라고 요약될 수 있으나, 이는 그렇지 않았다.

[0319] 외래의 PlGF의 자극 효과에 대한 잠재적인 세포내 기작을 조사하였고, 그 결과는 PI3K 및 MEK1 경로가 PlGF-자극성 이동에 관여하기 쉽다는 것을 나타내었다. 이러한 경로는 세포 이동에 관련되어 있다고 보고되었으나(Hollande et al., 2001), 이들 키나제 또한 단백질 번역, 유전자 조절, 증식, 침습 및 세포사멸에 대한 내성을

포함하는 암 진행을 촉진시키는 다른 과정에 관여한다(Zeng et al., J. Biol. Chem. 276:26969-79, 2001; Hollande et al., 2001; Belka et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58:542-54, 2004; Pommerly et al. Ann. Pharm. Fr. 63:69-75, 2005; Bancroft et al., Clin. Cancer Res. 7:435-42, 2001; Mekhail et al., Cell Cycle 3:1027-9, 2004; Pollheimer et al., Angiogenesis 3:159-66, 1999). PIGF-발현하는 종양 세포는 그들을 사멸 신호에 보다 저항성이 있게 하고 필요할 때 혈액이 공급되는 쪽으로 이동하도록 하는 자가 분비/주변 분비 경로를 통해 생존 혜택을 얻을 수 있을 것이다.

[0320] 종양 및 내피 세포 생물학에서 PIGF의 역할을 명확히 하기 위해, 본 발명자들은 혈관신생 펩티드인 BP1을 개발하였는데, 이는 종양 및 내피 세포 모두에서 PIGF의 활성을 억제하고 생체 내에서 자발적인 전이에 영향을 미쳤다. 본 명세서에서 상기 결과는 BP1이 PIGF-2/Flt-1-헤파린 결합에 길항작용을 한다는 것을 나타낸다. 헤파린-결합은 몇몇 수용체 티로신 키나제의 완전한 활성화에 필수적이고(Park et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 264:730-4, 1999; Schlessinger et al. Molec. Cell. 6:743-50, 2000; Ito et al., Angiogenesis 3:159-66, 1999), 이는 종종 Flt-1와 같은 수용체 티로신 키나제와 관련된 PI3K 및 MEK1를 억제하면 PIGF에 의해 자극된 세포 이동을 방지한다는 본 발명자들의 결과에 의해 지지된다. 헤파린과 PIGF-2 및 Flt-1의 밀접한 결합을 방지함으로써, BP1은 세포 내부로 활성 신호를 전달하는 것을 방지할 수 있다.

[0321] FGF-FGFR-헤파린 복합체의 결정화 연구는 헤파린이 상기 리간드 및 수용체 모두와 다수의 접촉을 만든다는 것을 공시한다. 이 결합은 활성화에 필요한 수용체의 이량체화를 증진시킨다(Park and Lee, 1999; Schlessinger et al., 2000; Ito and Claesson-Welsh, 1999, Angiogenesis 3:159-166). 이 복합체를 방해함으로써, BP1은 헤파린과 PIGF 및 Flt-1과의 이러한 긴밀한 결합을 방지할 수 있다. 본 발명자들은 혈관신생 분석에 포함된 외래의 헤파린이 VEGF 또는 PIGF와 같은 첨가된 성장 인자의 부재하에서조차 혈관 형성을 증가시킨다는 것을 발견하였다(미공개 데이터). 이 경우에, 증가된 혈관신생은 매트릭스에 내재하는 성장 인자 및 이식물로 이동하는 세포 상의 수용체 간의 상호작용으로 인한 헤파린-매개성 증진 때문일 가능성이 가장 높다.

[0322] PIGF-매개성 이동을 억제하는데 더하여, BP1은 PIGF-로딩된 기저막 이식물에서 미세혈관의 성장을 억제할 수 있었다. 이동 분석 데이터와 함께 취해진 내피세포 이동의 억제 및 종양에서의 혈관의 확립은 유방암 병리학에서의 PIGF의 기능이 내피 세포 이동 및 가능하게는 튜브 형성을 자극하고(데이터 미제시), 또한 혈액이 공급되는 쪽으로 종양세포 자신이 이동하게 하는 것임을 제시한다.

[0323] Bae 등(Clin. Cancer Res. 11:2651-61, 2005)은 최근에 VEGF-분비하는 대장종양 이종이식의 성장 및 전이 뿐만 아니라 Flt-1에 결합하는 VEGF를 억제하는 Flt-1 길항 펩티드의 항암 능력을 보고했다. 이 펩티드의 활성은 종양 세포보다는 이동 및 증식의 자극제로서 VEGF를 사용하여 내피 세포와의 상호작용에 의해 측정되었다. 이들 저자에 의해 사용된 펩티드는 또한 PIGF가 Flt-1에 결합하는 것을 억제하였고 그 효능의 일부는 이 상호작용으로부터 나올 수 있다는 것이 흥미롭다. 그러나 상기 문헌의 펩티드는 헤파린-결합 도메인과 상호작용한다는 증거 없이, Flt-1 도메인-2 성장 인자 결합 부위와 상호작용하기 때문에, BP1과 다른 것으로 보인다(Bae et al., 2005). 그러므로, 상기 Bae 등에 의해 제시된 펩티드는 BP1과 다르게 작용할 가능성이 아주 높다.

[0324] 암에서 Flt-1의 생체 내 역할은 BP1과 자발적으로 전이하는 인간 유방암 이종이식을 BP1으로 처리하여 연구하였다. BP1 펩티드 처리는 피하 MDA-MB-231 종양 성장을 중지시켰고, 정위(mfp) 모델에서 각각 94% 및 82% 만큼 폐 전이 발생을 감소시켰다. 이러한 결과는 BP1과 같은 항-Flt-1 펩티드의 성장 및 전이-억제 특성을 나타내며, 이는 이 수용체가 특정 암의 진행에 중요한 역할을 하여 항암 치료의 표적이 될 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0325] 요약하면, 본 발명자들은 몇몇 원발성 인간 암 및 세포주, 특히 유방암에서 PIGF의 발현이 증가된 것을 보였다. PIGF는 유방암 세포주인 MDA-MB-231 및 -468의 증식 및 MCF-7 및 MDA-MB-231의 운동성을 증가시켰다. 본 발명자들이 알기로는, 이는 PIGF에 의한 종양 세포의 직접적인 활성화를 보고한 최초의 문헌이다. 추가로 본 발명자들은 PIGF 및 Flt-1 모두에 결합하는 펩티드인 BP1을 분리하였고, 이는 시험관 내에서 PIGF-2/Flt-1 리간드 수용체 쌍의 활성을 방해하였다. BP1에 의해 차단된 활성으로는 기저막 이식물에서 미세혈관의 형성 뿐만 아니라 PIGF-자극성 종양 세포 생존능 및 이동성을 포함한다. 덧붙여, 종양-발생 마우스에 펩티드 BP1을 처리하면 유방 종양 이종이식인 MDA-MB-468의 피하 성장을 억제하였고, MDA-MB-231에 의한 폐 전이의 확립을 현저히 감소시켰다.

[0326] **실시예 2. 마우스 각막 분석에서 PIGF 매개성 혈관신생의 억제**

[0327] 생체 내에서 각막 조직의 PIGF-매개성 혈관신생을 차단하기 위한 PIGF 리간드의 능력을 조사하였다. 각막 미세

포켓은 수컷 5-6 주령 C57B16/J 마우스의 양쪽 눈에 변형된 von Graefe 각막 나이프를 사용하여 만들었다. 100 ng의 PIGF 또는 1 μ M BP-1, BP-2, BP-3 또는 BP-4와 PIGF를 포함하는 폴리글루쿠론산/폴리락트산의 서방형 제형으로 이루어진 미세펠렛을 각각의 각막 포켓에 이식하였다. 눈은 펠렛 이식 5일 후에 슬릿-램프 바이오현미경으로 검사한다. 혈관 길이 및 신혈관 형성을 측정한다.

[0328] PIGF는 고밀도의 미세혈관의 형성과 함께 강한 혈관신생 반응을 유도한다. BP-1, BP-3 또는 BP-4의 첨가는 각막 조직에서 PIGF 매개성 혈관신생을 억제한다. 당뇨병성 망막증 또는 황반 변성인 대상의 치료는 혈관 형성의 억제를 가져왔고 증상을 완화시켰다.

[0329] 실시예 3. BP1 융합 단백질 및 콘쥬게이트

[0330] 경구 투여 목적으로 또는 다른 구현예에서, BP1 및 그 유사체는 담체 단백질에 재조합적으로 또는 화학적으로 결합될 수 있다. 자연적으로 존재하는 단백질에서 발견되는 20개의 통상의 L-아미노산으로 이루어진 결합 펩티드의 경우, 재조합 DNA 방법이 바람직하다. D-아미노산, 변형된 아미노산 또는 비자연적 아미노산을 포함하는 결합 펩티드 미메틱스 또는 펩티드의 경우, 화학적 접합 방법만이 현재 가능하다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 인간 IgG1의 Fc(hFc)의 탄수화물에 결합된 BP1 콘쥬게이트를 제작하는 일반적인 방법이 제공된다. BP1 및 hFc로 이루어진 세 가지 예시적인 융합 단백질을 제작하는 방법은 아래에 기재되어 있다.

[0331] 골수종 세포에서 hFc를 발현하기 위한 벡터는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제작한다. 발현 벡터인 shCD20-Fc-pdHL2(도 6)는 PCR에 의해 Fc에 대한 암호화 서열(힌지, CH2 및 CH3 도메인)을 증폭하기 위한 DNA 주형으로 사용된다. PCR을 2회 수행한다. 첫번째 PCR은 하기 프라이머쌍을 사용하여 전체 선두 펩티드 서열(절편 A)을 증폭하기 위한 것이다.

[0332] 5' Xba I: tctagagcacacaggacctc(서열번호 6)

[0333] 3' Hind3: gaagcttggagtggacacct(서열번호 7)

[0334] 두번째 PCR은 하기 프라이머쌍을 사용하여 힌지 및 CH2(절편 B)를 증폭하기 위한 것이다:

[0335] 5' Hind3: aagcttccgacaaaactcac(서열번호 8)

[0336] 3' Sac2: ccgcggtttgtcttggcat(서열번호 9)

[0337] XbaI 및 Sac2로 shCD20-Fc-pdHL2를 절단한 후, 더 큰 DNA 절편을 절편 A 및 B로 라이게이션하여 Fc 융합 발현벡터(hFc-pdHL2)를 얻었다.

[0338] 실시예 4. BP1과 hFc의 접합

[0339] 골수종 세포를 hFc-pdHL2로 형질전환시켜 양성 클론을 스크리닝하였다. 가장 높은 생산자는 롤러 병에서 성장시켜 배양 상층액을 Protein A에서 정제하여 hFc를 얻는다. BP1과 hFc의 접합은 하기 두 가지 방법 중 하나를 사용하여 수행한다. 첫번째 방법에서, hFc는 탄수화물에서 알데히드기를 생성하기 위해 과요오드산나트륨염으로 산화시켰다. 탈염 단계에 이어서, 산화된 hFc는 알데히드와 하이드라지드의 반응을 통해 말레이미드기를 도입하기 위해 BMPH(Pierce, 제조 # 22297)와 같은 이중-교차결합자로 유도하였다. 과량의 시약을 제거한 후, 말레이미드-커플링된 hFc를 BP1 내의 시스테인 잔기의 반응을 통해 BP1에 접합시켰다. 대안적인 방법은 BMPH를 BP1에 커플링시키고 역상 HPLC를 사용하여 결과 산물을 분리하고, 산화된 hFc와 BMPH-BP1을 반응시키는 것이다.

[0340] 실시예 5. BP1-hFc용 발현 벡터

[0341] 대안적인 실시예에서, BP1-hFc를 (GGGS)₃과 같이 유동성 있는 링커를 통해 각각 힌지인 인간 IgG1의 CH2 및 CH3에 결합된 BP1으로 이루어진 두 개의 동일한 폴리펩티드로 이루어진 융합 단백질로서 제작하였다. 상기 두 개의 폴리펩티드는 힌지에 있는 시스테인 잔기로부터 형성된 두 개의 이황화 결합에 의해 공유결합으로 연결되어 있다. BP1-Fc는 다음의 잇점을 가질 것으로 기대된다: (1) VEGFR1의 헤파린 결합 도메인에 대한 BP1의 친화도가 2개의 BP1으로 인해 증진될 것이다; (2) 분자 크기의 증가(약 60 kDa)로 헤파린이 VEGFR1에 결합하는 것을 더 잘 배제할 수 있고, 그 결과 PIGF 및 VEGFR1간의 상호작용을 보다 효과적으로 억제할 것이다; 그리고 (3) Fc의 존재는 혈청에서의 반감기를 연장시키고 상피세포에서 발현되는 신생 Fc 수용체(FcRn)로의 결합에 의해 경구 또는 폐로 전달하는 것을 가능하게 할 것이다.

[0342] 골수종 세포에서 BP1-Fc를 발현하기 위한 벡터는 다음과 같이 제작된다. 간단히, 세 개의 긴 올리고뉴클레오타이드는 BP1 및(GGGS)₃ 링커를 암호화하는 114 bp 서열을 포함하도록 10-15 bp 중첩하여 합성하고, 말단에 HindIII

부위를 추가한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 어닐링되고 DNA 폴리머라제로 확장된다. 그 결과 생기는 BP1 및 상기 링커를 포함하는 DNA 절편을 정제하고, 중간 벡터 내로 클로닝하고, 이어서 시퀀싱으로 확인한다. 그리고 나서 중간 벡터를 HindIII로 절단하여 상기 절편을 분리하고, HindIII-cut Fc-pdHL2 내로 클로닝한다(실시예 3 참조). 2 가지 가능한 방향이 있기 때문에, 올바른 것을 이중 효소 절단으로 확인하고 분리한다(BP1-hFc-pdHL2).

[0343] 골수종 세포를 BP1-hFc-pdHL2로 형질전환하고, 고 생산 클론을 선별한다. 가장 많이 생산하는 것을 풀러 병에서 키우고, 배양 상층액을 Protein A 상에서 정제하여 BP1-hFc를 얻는다.

[0344] **실시예 6. 이량체 BP1-hFc(BP1-hFc-ddd2)**

[0345] 이량체 BP1-hFc로 이루어진 융합 단백질은 ddd2로 명명된 특이적인 펩티드 서열(서열번호 10)을 BP1-hFc의 C-말단에 부가하여 얻는다. 이량체 BP1-hFc는 이황화 결합으로 안정화되고 네 개의 BP1을 포함한다.

[0346] ddd2

[0347] MCGHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(서열번호 10)

[0348] **실시예 7. BP1-hFc x 항-VEGFR2 Fab(~ 160 kDa)**

[0349] BP1-Fc는 A2B 기술을 사용하여 이황화 결합에 의해 항-VEGFR2 Fab에 결합되어 VEGFR1 및 VEGFR2 모두를 표적화할 수 있는 ~160 kDa의 콘주게이트를 생성한다. 항-VEGFR2의 B-형은 먼저 ad2로 명명된 특정 펩티드 서열(서열번호 11)을 CH1의 C-말단에 부가함으로써 생성된다. BP1-hFc x 항-VEGFR1 Fab를 생성하기 위해, BP1-hFc-ddd2(실시예 6)을 항-VEGFR2의 B-형과 혼합하고 1 h 동안 TCEP로 환원한다. TCEP를 제거한 후, 두 개의 모 단백질 각각에 존재하는 ddd2 및 ad2 사이에 이황화 결합 형성을 유도하기 위해 DMSO를 최종 농도 10%로 첨가한다.

[0350] ad2 GCGGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(서열번호 11)

[0351] * * *

[0352] 본 명세서에 기재되고 특허청구된 모든 조성물 및 방법은 본 명세서의 관점에서 과도한 실험 없이 만들어지고 실시될 수 있다. 상기 조성물 및 방법이 바람직한 구현예에 의해 기재되었지만, 본 발명의 개념, 정신 및 범주에서 벗어나지 않으면서 본 명세서에 기재된 상기 조성물 및 방법 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변화가 적용될 수 있음은 당업자에게 자명하다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 연관있는 특정 제제는 동일하거나 유사한 결과가 얻어지는 한 본 명세서에 기재된 제제를 대체할 수 있다. 당업자에게 자명한 모든 유사한 대체 및 변경은 다음의 청구항에 정의된대로 본 발명의 정신, 범주 및 개념 내에 있는 것으로 여겨진다.

도면의 간단한 설명

[0233] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 구체적인 구현예의 한 측면을 추가로 설명하기 위해 포함된다. 상기 구현예는 본 명세서에서 제공된 상세한 설명과 함께 조합하여 하나 이상의 도면을 참조함으로써 보다 이해될 수 있다.

[0234] **도 1. BP1은 Flt-1의 헤파린-결합 부위와 상호작용한다.** 도면의 하단부에 표시된대로 Flt-1-코팅된 웰에 시약을 첨가하였다. 이 실험에 사용된 BP-1은 그의 C-말단에 링커 및 FLAG 에피토프를 포함한다. 상기 FLAG 에피토프를 탐침함으로써 펩티드 결합을 평가하였다. A: 1 μ M BP1 단독; B: 2.5/25 U/ml 헤파린 단독; C: 2.5 U/ml 헤파린에 이어 1 μ M BP1; D: 1 μ M BP-1에 이어서 2.5/25 U/ml 헤파린. 나타난 값은 2개의 개별 실험으로부터 2개 웰의 평균 $\pm$ SD이다. *: 헤파린에 이어서 1 μ M BP1(C) vs. BP1 단독(A)에 대해 $P < 0.0002$ (ANOVA).

[0235] **도 2. PlGF는 MDA-MB-231 세포의 시험관내 침습을 자극한다.** 그래프는 누적된 결과 $\pm$ SD(n = 3-5회 실험)를 나타낸다. 그래프에 사용된 약자: 'P1'는 PlGF; 'VE'는 VEGF. * $P < 0.05$ (ANOVA).

[0236] **도 3. BP1는 MDA-MB-231 이종이식 성장 및 전이를 억제한다.** 종양 부피 vs. 시간, 피하 모델. 결과는 2회의 실험 중 하나 $\pm$ SD(n = 3-4 마우스/처리)를 나타낸다. * $P < 0.05$ vs. 목-처리되거나 CPA(종양 부피의 변화(ANOVA)).

[0237] **도 4A-4C. 외래 PlGF는 종양 세포 생존능의 증가를 자극한다.** 유방 종양 세포주는 저 혈청농도 조건(1%)하에서 PlGF(2 nM) 또는 PlGF 및 지정된 펩티드(1-2 μ M)로 처리하였다. 24 시간 후 세포의 생존능은 MTT로 평가하였다. #는 비처리 대조군과 비교하여 PlGF-처리된 세포의 $P < 0.04$ 를 나타낸다. 별표(*)는 PlGF-단독에 비해

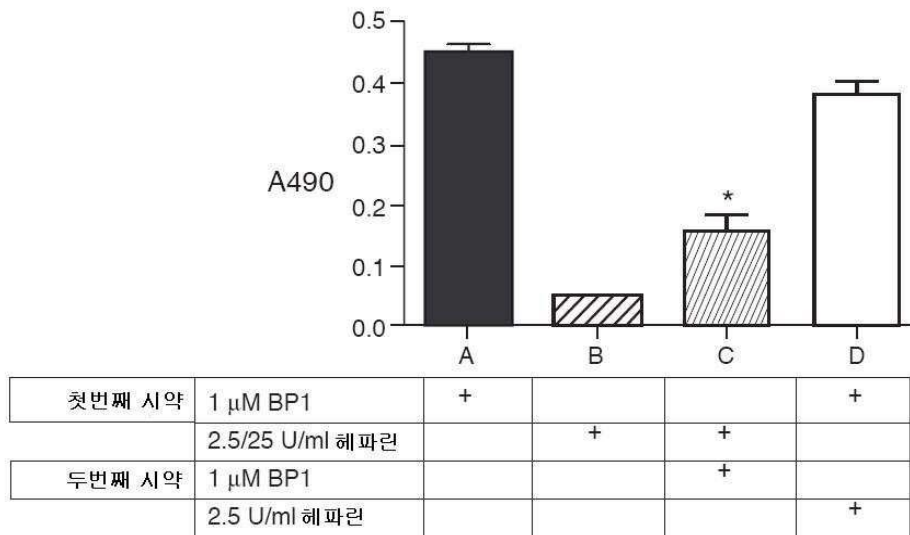
$P < 0.03$ 을 나타낸다(ANOVA). 도 4A- MCF-7 인간 유방암 세포. 도 4B- MDA-MB-468 인간 유방암 세포. 도 4C- MDA-MB-231 인간 유방암 세포.

[0238] 도 5A-5B. MDA-MB-468 이중이식을 갖는 마우스를 BP1 또는 BP3 펩티드를 처리. 마우스는 "방법"에 기재된대로 200 μg BP로 3-4일마다 처리했다. 종양 부피는 2x/주 측정했다. 10, 14, 17 및 24 일에 * $P < 0.05$ (종양 부피의 변화(ANOVA)). 도 5A- 결합 펩티드 1로 처리한 종양. 도 5B- 결합 펩티드 3으로 처리한 종양.

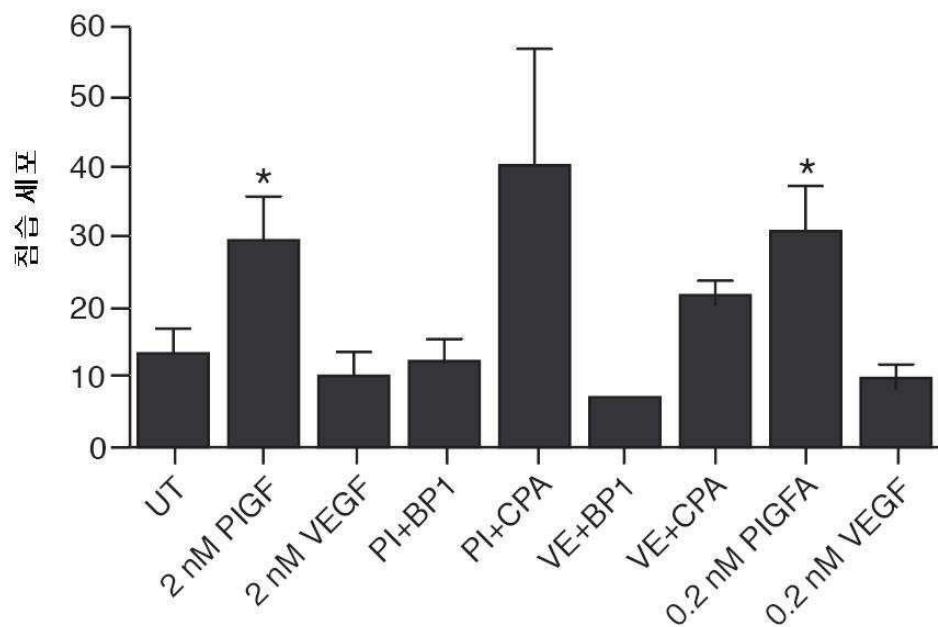
[0239] 도 6. hFc 용 발현벡터. 도면은 hFc 발현용 벡터(pdHL2-hFc)를 제작하기 위한 주형으로 작용하는 예시 벡터(pdHL2-sCD20-hFc)의 개략도를 나타낸다. 재조합 hFc는 구현예 4에 기재된대로 BP1에 화학적으로 콘주게이트되거나 실시예 5에 기재된대로 hFc에 융합될 수 있다.

도면

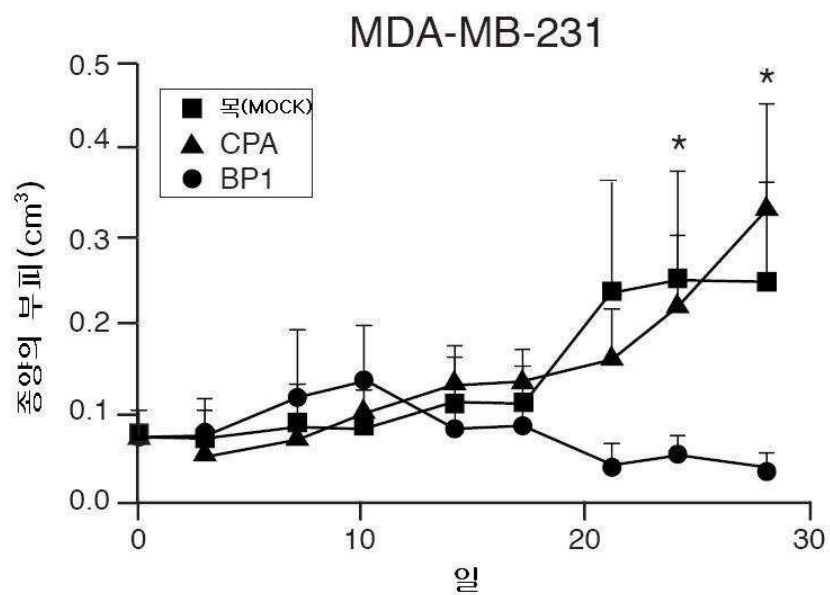
도면1



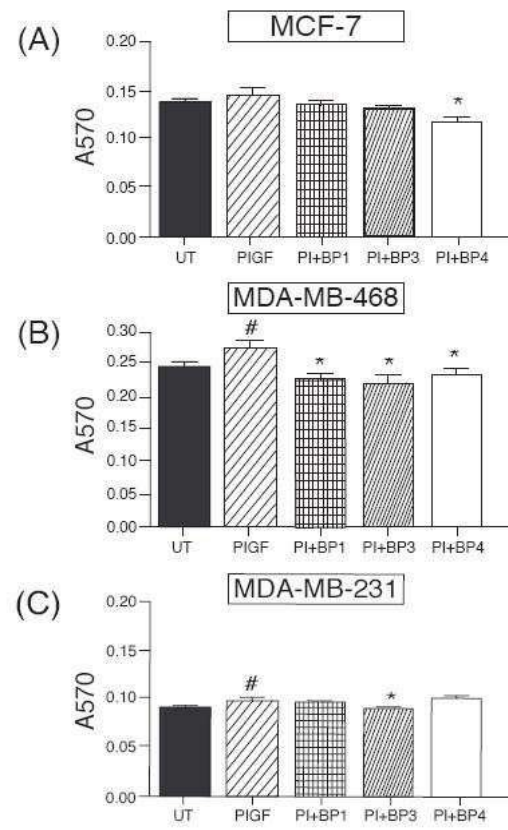
도면2



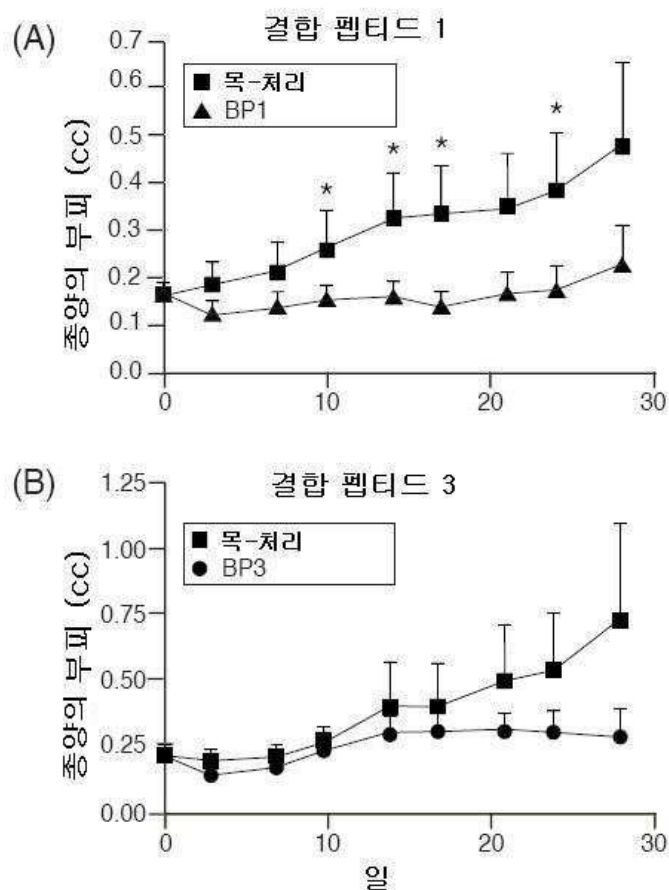
도면3



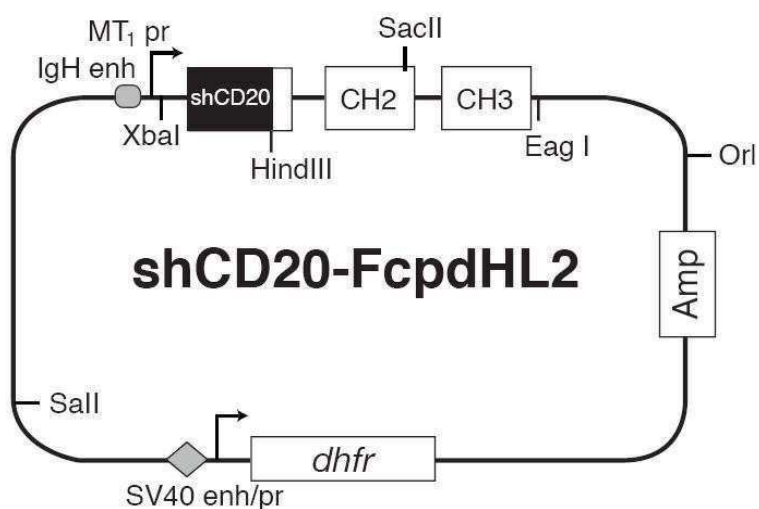
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> CENTER FOR MOLECULAR MEDICINE AND IMMUNOLOGY

IMMUNOMEDICS, INC.

<120> Inhibition of Placenta Growth Factor (PLGF) Mediated Metastasis
and/or Angiogenesis

<130> 2008-FPA-2824

<150> 60/728,292

<151> 2005-10-19

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser His Arg Tyr Arg Leu Ala Ile Gln Leu His Ala Ser Asp Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ser Cys Val
20

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Asp Asp His Leu Thr Thr Gly Arg
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Glu Ala Phe Asn Arg Leu Thr Ser Arg Met His

1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Arg Met Pro Tyr Ser Glu His Ser Ala Pro Leu Gly
 1 5 10

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial Peptide, Synthetic

<400> 5
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotides

<400> 6
 tctagagcac acaggacctc 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotides

<400> 7

gaagcttgga gtggacacct

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotides

<400> 8

aagcttcga caaaactcac

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotides

<400> 9

ccgcggcttt gtcttgcat

20

<210> 10

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 10

Met Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln

1

5

10

15

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

Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

Gly Gly Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gln Ala Gly Cys
20