

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07K 14/71 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년10월17일 10-0634926 2006년10월10일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2001-7013112	(65) 공개번호	10-2002-0008151
(22) 출원일자	2001년10월15일	(43) 공개일자	2002년01월29일
번역문 제출일자	2001년10월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/009483	(87) 국제공개번호	WO 2000/63380
국제출원일자	2000년04월10일	국제공개일자	2000년10월26일

(81) 지정국      국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨, 안티구와바부다, 알제리,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장	60/129,788	1999년04월16일	미국(US)
	60/184,235	2000년02월23일	미국(US)

(73) 특허권자      제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자      커닝햄, 브라이언  
미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 힐크레스트 로드 410

    데보스, 아브라함  
미국 94610 캘리포니아주 오클랜드 이스트 33번 스트리트 10 35

    리, 빙  
미국 94044 캘리포니아주 포스터 시티 돌핀 아이슬 316

(74) 대리인                      주성민  
   김영

심사관 : 김지윤

## (54) 혈관 내피 세포 성장 인자 변이체 및 그의 용도

### 요약

본 발명은 본래의 VEGF 서열에 적어도 단일 아미노산 돌연변이를 포함하며 KDR 수용체 또는 FLT-1 수용체에 대해 선택적인 결합 친화성을 갖는 VEGF 변이체를 제공한다. VEGF 변이체의 제조 방법 및 VEGF 변이체의 이용 방법도 또한 제공된다.

### 색인어

VEGF 변이체, KDR 수용체, FLT-1 수용체, 제조 방법, 이용 방법

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 혈관 내피 세포 성장 인자 (VEGF) 변이체, 이러한 변이체의 제조 방법, 및 상기 변이체를 이용하는 방법, 조성물 및 검정에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 VEGF 수용체 KDR 및 FLT-1에 대해, 본래의 VEGF와는 다른 결합 친화성을 나타내는 VEGF 변이체에 관한 것이다.

#### 배경기술

혈관계의 두 가지 중요한 세포 성분은 내피 세포와 평활근 세포이다. 내피 세포는 모든 혈관의 내부 표면의 내층을 형성하고, 혈액과 조직 간의 비-혈전형성 계면을 구성한다. 또한, 내피 세포는 새로운 모세혈관과 혈관이 발생하는데 중요한 성분이다. 따라서, 내피 세포는 종양 성장 및 전이 뿐만 아니라 각종 비-신생물성 질병 또는 장애와 연관된 혈관신생 또는 신혈관신생 과정 동안에 증식된다.

천연의 각종 폴리펩티드가 내피 세포의 증식을 유도하는 것으로 보고되었다. 이들 폴리펩티드로는 염기성 및 산성 섬유아 세포 성장 인자 (FGF) [Burgess and Maciag, *Annual Rev. Biochem.*, 58:575 (1989)], 혈소판 유도된 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF) [Ishikawa et al., *Nature*, 338:557 (1989)], 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) [Leung et al., *Science*, 246:1306 (1989); Ferrara and Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161:851 (1989); Tischer et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161:1198 (1989); Ferrara et al., 국제 공개 특허 공보 WO 90/13649 (1990. 11. 15.자로 공개됨)]가 있다.

VEGF는 소의 뇌하수체 포상 또는 포상 성상 세포로써 조정된 배지에서 처음으로 동정되었다. 생화학적 분석 결과는 소의 VEGF가, 대략 45,000 달톤의 가시 분자량을 지니고 있고 혈관 내피 세포에 대한 외견상 분열촉진 특이성을 나타내는 다 이며 단백질이라는 것을 지시해준다. 소의 VEGF를 코딩하는 DNA는 하이브리드화 프로브로서 해당 단백질의 아미노-말단 아미노산 서열을 기준으로 한 올리고뉴클레오티드를 사용하여 상기 세포로부터 제조된 cDNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 분리되었다.

사람 VEGF는 하이브리드화 프로브로서 소의 VEGF cDNA를 사용하여, 사람 세포로부터 제조된 cDNA 라이브러리를 먼저 스크리닝함으로써 획득하였다. 이로써 동정된 하나의 cDNA는 소의 VEGF와 95% 초과 상동성을 나타내는 165-아미노산 단백질을 코딩하고; 이러한 165-아미노산 단백질은 전형적으로 사람 VEGF (hVEGF) 또는 VEGF<sub>165</sub>로서 지칭된

다. 사람 VEGF의 분열촉진 활성은 사람 VEGF cDNA를 포유류 숙주 세포에서 발현시킴으로써 확인하였다. 사람 VEGF cDNA로 형질감염된 세포로써 조정된 배지는 모세관 내피 세포의 증식을 증진시킨 반면, 대조군 세포는 그렇지 못하였다 [Leung et al., *Science*, 246:1306 (1989) 참조].

혈관 내피 세포 성장 인자가 후속 치료 용도를 위해 천연 공급원으로부터 분리 및 정제될 수 있긴 하지만, 포상 세포 내에 단백질이 비교적 저농도로 존재하고 노력과 비용 측면에서 높은 VEGF 회수 비용으로 인해, 상업적으로 무익한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 재조합 DNA 기술을 통하여 VEGF를 클로닝 및 발현하기 위한 추가의 노력이 진행되었다 [Laboratory Investigation, 71:615 (1995), 및 본원에 인용된 참조 문헌 참조].

VEGF는 과도한 조직 성장의 부재하에서 혈관 내피 세포에 대한 선택된 작용이 중요한 질환, 예를 들면 피하 상처와 같은 손상으로 인한 혈관성 상해 및 당뇨병성 궤양을 치료하는데 유용한 것으로 보고된 바 있다. 혈관성 (동맥 및 정맥) 내피 세포 성장 인자인 VEGF는 손상된 세포를 복구할 수 있고 (혈관형성 (vasculogenesis)으로서 지칭되는 과정), 새로운 혈관의 형성을 자극할 수 있다 (혈관신생 (angiogenesis)로서 지칭되는 과정) [Ferrara et al., *Endocrinol. Rev.*, 18:4-25 (1997)].

VEGF는 각종 조직에서, 대체 RNA 스플라이싱으로부터 비롯되는 다중의 호모다имер 형태 (단량체 당 121개, 165개, 189개 및 206개 아미노산)로서 발현된다. VEGF<sub>121</sub>는 헤파린과 결합되지 않는 가용성 분열촉진 인자이고; 보다 긴 형태의 VEGF는 점진적으로 보다 높은 친화도를 갖고 헤파린과 결합된다. 이러한 헤파린 결합 형태의 VEGF를 플라스민에 의해 카르복시 말단에서 절단하여 확산 가능한 형태(들)의 VEGF를 방출시킨다. 플라스민 절단 후에 동정된 카르복시 말단 펩티드의 아미노산 서열 분석 결과, 이는 Arg<sub>110</sub>-Ala<sub>111</sub>이다. 호모다имер로서 분리된 VEGF (1-110)인 아미노 말단 "코어" 단백질은 중화 모노클로날 항체 (예: 4.6.1 및 3.2E3.1.1로서 지칭된 항체) 및 본래의 VEGF<sub>165</sub> 호모다имер과 비교해서 유사한 친화도를 나타내는 가용성 형태의 FLT-1 및 KDR 수용체와 결합된다.

VEGF는 KDR (키나제 도메인 영역) 및 FLT-1 (FMS-유사 티로신 키나제) 수용체에 대한 결합에 각각 관여하는 2개의 부위를 함유한다. 이들 수용체는 내피 (혈관) 세포 상에만 존재하는 것으로 여겨진다. VEGF 생성은, 예를 들면 손상 등으로 인해 산소가 결핍된 세포에서 증가하는데, 이로써 VEGF가 각각의 수용체와 결합되어 생물학적 반응을 유발시키는 시그널링 경로를 촉발시킨다. 예를 들면, 이러한 수용체에 대한 VEGF의 결합으로 인해 혈관 투과성이 증가하여, 세포를 분화 및 팽창시켜 새로운 혈관 경로 (즉, 혈관형성 및 혈관신생 과정)를 형성시킬 수 있다 [Malavaud et al., *Cardiovascular Research*, 36:276-281 (1997)]. KDR 수용체를 통한 VEGF-유도된 시그널링이 VEGF의 분열촉진 효과에 관여하고, 가능하게는 상당한 정도로 VEGF의 혈관신생 활성에 관여하는 것으로 보고되어 있다 [Waltenberger et al., *J. Biol. Chem.*, 269:26988-26995 (1994)]. 그러나, FLT-1의 생물학적 역할(들)은 훨씬 덜 이해되고 있다.

수용체 결합과 관련된 VEGF 단백질의 부위 또는 영역이 동정되었으며 근접하게 위치하는 것으로 밝혀졌다 [Weismann et al., *Cell*, 28:695-704 (1997); Muller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:7192-7197 (1997); Muller et al., *Structure*, 5:1325-1338 (1997); Fuh et al., *J. Biol. Chem.*, 273:11197-11204 (1998)]. 이러한 KDR 수용체는 VEGF의 82번 위치에 아르기닌 (Arg 또는 R)을 함유하고, 84번 위치에 리신 (Lys 또는 K)을 함유하며 86번 위치에 히스티딘 (His 또는 H)을 함유하는 루프 상에서의 부위를 통하여 VEGF와 주로 결합되는 것으로 밝혀졌다. FLT-1 수용체는 VEGF의 63번 위치에 아스파르트산 (Asp 또는 D)을 함유하고, 64번 위치에 글루탐산 (Glu 또는 E)을 함유하며 67번 위치에 글루탐산 (Glu 또는 E)을 함유하는 루프 상에서의 부위를 통하여 VEGF와 주로 결합되는 것으로 밝혀졌다 [Keyt et al., *J. Biol. Chem.*, 271:5638-5646 (1996)]. VEGF의 결정 구조와 VEGF의 KDR 결합 부위의 기능적 지도화를 근거로 하여, VEGF가 상기 분자의 반대편 말단에 위치한 2개의 대칭적 결합 부위를 사용하여 KDR 수용체를 수용한다는 사실이 추가로 밝혀졌다. 각 부위는 VEGF 호모다имер의 양 아단위로부터의 잔기로 이루어진, 2개의 결합용 "핫 스팟 (hot spot)"으로 구성된다 [Muller et al., 상기 참조]. 이들 결합 결정자 2개는 형질전환성 성장 인자  $\beta 2$  (TGF- $\beta$ )와 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF)에 보존되는 짧은 3-가닥  $\beta$ -시트 상의 우성 핫 스팟 내에 위치한다.

다른 수용체에 대해 하나의 수용체와 선택적으로 결합하는 특성의 VEGF-관련 분자가 동정되었다. 분자 PIGF는 VEGF의 PDGF-유사 도메인과 53% 동일성을 나타낸다. PIGF는 Flt-1과는 고 친화도로 결합되는 것으로 보이지만, KDR과는 반응할 수 없다. 다음 문헌에 기재된 바와 같이, PIGF는 내피 세포에 대한 분열촉진 활성에 있어서 상당한 변이성을 나타내었다 [Maglione et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:9267-9271 (1991); Park et al., *J. Biol. Chem.*, 269:25646-25654 (1994); Sawano et al., *Cell Growth & Differentiation*, 7:213-221 (1996); Landgren et al., *Oncogene*, 16:359-367 (1998)].

최근에, 오가와 (Ogawa) 등은 포유류 VEGF와 약 25% 아미노산 동일성을 나타내는 폴리펩티드 (소위 VEGF-E)를 코딩하는 유전자를 기재하였다. 이러한 VEGF-E는 양과 염소에게 침범하고 종종 사람에게도 침범하여 혈관신생 과정을 수반하는 병변을 발생시키는 파라폭스바이러스인 Orf 바이러스 (NZ-7 균주)의 게놈에서 동정되었다. 연구자들은 세포 증식 검정을 수행한 결과, VEGF-E가 사람 제대 정맥 내피 세포의 성장 뿐만 아니라 쥐 간 정현 (sinusoidal) 내피 세포의 성장을 사람 VEGF와 거의 동일한 정도로 자극하였다고 보고하였다. 결합 연구가 또한 보고되었다. KDR 수용체 또는 FLT-1 수용체를 과발현하는 세포를 고정량의  $^{125}\text{I}$ -표지된 사람 VEGF 또는 VEGF-E와 함께 인큐베이션시킨 다음, 증가량의 비-표지된 사람 VEGF 또는 VEGF-E를 가함으로써 경쟁 실험을 수행하였다. 이 연구자들은 VEGF-E가 FLT-1 수용체에 비해 KDR 수용체에 선택적으로 결합되었다고 보고하였다 [Ogawa et al., *J. Biological Chem.*, 273:31273-31281 (1998)].

문헌 [Meyer et al., *EMBO J.*, 18:363-374 (1999)]에서, VEGF-E로서 지칭되는 VEGF 계열의 구성원이 동정되었다. 상기 문헌에 보고된 VEGF-E 분자는 Orf 바이러스 균주 D1701의 게놈에서 동정되었다. 시험관 내에서, VEGF-E는 조직 인자의 방출을 자극하고 혈관 내피 세포의 증식을 자극하는 것으로 밝혀졌다. 토끼 생체 내 모델에서는, VEGF-E가 토끼 각막에서 혈관신생 과정을 자극하였다. 특정 검정에서 메이어 (Meyer) 등에 의해 보고된 VEGF-E 분자의 결합 특성을 분석한 결과, 이러한 분자가 FLT-1 수용체와 비교해서 KDR 수용체에 선택적으로 결합된 것으로 나타났다 [Wise et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:3071-3076 (1999)].

문헌 [Olofsson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:11709-11714 (1998)]에는 "VEGF-B"로서 지칭된 단백질이 FLT-1과 선택적으로 결합한다고 보고되어 있다. 이 연구자들은 VEGF-B 내의 Asp63, Asp64 및 Glu67 잔기가 알라닌 잔기로 돌연변이되는 돌연변이 실험을 기술하고 있다. 이와 같이 돌연변이된 형태의 VEGF-B의 결합 특성을 분석한 결과, 돌연변이 단백질이 FLT-1에 대한 감소된 친화도를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

#### 발명의 요약

본 출원인은 (본래의 VEGF 아미노산 서열과 비교해서) 하나 이상의 아미노산 돌연변이, 특히 17 내지 25번 위치 및/또는 63 내지 65번 위치에서 또는 이들 위치 사이에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 VEGF 변이체를 동정하였다. 본 출원인은 또한, (본래의 VEGF 아미노산 서열과 비교해서) 43, 46, 79 또는 83번 위치에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 VEGF 변이체, 특히 43, 46, 79 및 83번 각각의 위치에서 알라닌으로의 아미노산 치환을 포함하는 VEGF 변이체를 동정하였다. 본 출원인은 놀랍게도, 각종 VEGF 변이체가 (본래의 VEGF와 비교해서) KDR 및 FLT-1 수용체에 대한 변화된 결합 친화성을 나타내고, 추가로 KDR 수용체 또는 FLT-1 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타낸다는 사실을 밝혀내었다.

본 발명은 (본래의 VEGF 아미노산 서열과 비교해서) 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고 KDR 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타내는 VEGF 변이체를 제공한다. 임의로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 본래의 VEGF 폴리펩티드에서의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

한 양태에 있어서, 본 발명은 VEGF의 17 내지 25번 위치에서 또는 이들 위치 사이에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 VEGF 변이체를 제공한다. 임의로, 이러한 VEGF 변이체는 17 내지 25번 위치에서 또는 이들 위치 사이에서의 아미노산 치환을 포함할 것이다. 특정한 아미노산 치환에는 F17I, M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25S 또는 Y25I가 포함된다. 바람직한 양태에서는, 상기 VEGF 변이체가 VEGF의 18번 및/또는 21번 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 것이며, 여기서는 18번 위치에서의 메티오닌 아미노산 잔기가 글루탐산으로 치환되고/되거나 21번 위치에서의 티로신 아미노산 잔기가 루이신으로 치환된다.

또 다른 양태에 있어서, 본 발명은 VEGF의 63 내지 66번 위치에서 또는 이들 위치 사이에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 VEGF 변이체를 제공한다. 임의로, 이러한 VEGF 변이체는 63 내지 66번 위치에서 또는 이들 위치 사이에서의 아미노산 치환을 포함할 것이다. 특정한 아미노산 치환에는 D63S, G65M, G65A, L66R 또는 L66T가 포함된다. 바람직한 VEGF 변이체는 VEGF의 63, 65 및/또는 66번 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서는 63번 위치에서의 아스파르트산 아미노산 잔기가 세린으로 치환되고, 65번 위치에서의 글리신 아미노산 잔기가 메티오닌으로 치환되고/되거나 66번 위치에서의 루이신 아미노산 잔기가 아르기닌으로 치환된다.

추가로 바람직한 VEGF 변이체는 VEGF의 63, 65 및/또는 66번 위치에서 다중의 (즉, 하나보다 많은) 아미노산 돌연변이 및/또는 VEGF의 17, 18, 21, 22 및/또는 25번 위치 중의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함할

것이다. 보다 바람직하게는, 당해 VEGF 변이체는 VEGF의 18번 및/또는 21번 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환 (여기서, 18번 위치는 글루탐산으로 치환되고/되거나 21번 위치는 루이신으로 치환된다)과, VEGF의 63, 65 및/또는 66번 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환 (여기서, 63번 위치는 세린으로 치환되고, 65번 위치는 메티오닌으로 치환되고/되거나 66번 위치는 아르기닌으로 치환된다)을 포함한다. 가장 바람직하게는, 당해 VEGF 변이체는 다음 그룹의 아미노산 치환 중의 하나를 포함할 수 있다: M18E, Y21L, Q22R, Y25S; D63S, G65M, L66R; M18E, D63S, G65M, L66R; 또는 Y21L, D63S, G65M, L66R.

바람직한 양태에서는, VEGF 변이체가 본원에 기재된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 VEGF165 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

VEGF 서열 내의 상기 위치에서 다중의 아미노산 치환을 포함하는 또 다른 바람직한 VEGF 변이체가 표 2에 기재되어 있다.

추가적 양태에 있어서, 본 발명은 FLT-1 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타내는 VEGF 변이체를 제공하고, 바람직하게는 이러한 VEGF 변이체는 43, 46, 79 또는 83번 위치 중의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함할 것이다. 바람직하게는, 이러한 FLT-1 선택적 VEGF 변이체는 VEGF의 43, 46, 79 및/또는 83번 위치에서 다중의 (즉, 하나보다 많은) 아미노산 돌연변이를 포함할 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 FLT-1 선택적 VEGF 변이체가 VEGF의 43, 46, 79 및/또는 83번 위치에서 알라닌으로의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 것이다. 가장 바람직하게는, FLT-1 선택적 VEGF 변이체가 다음 세트의 아미노산 치환을 포함할 것이다: I43A, I46A, Q79A 및 I83A.

또 다른 면에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 VEGF 변이체를 코딩하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명의 VEGF 변이체를 발현할 수 있는 발현 벡터, 이러한 벡터를 함유하는 숙주 세포, 및 VEGF 변이체를 생성시키는 조건 하에서 숙주 세포를 배양함으로써 VEGF 변이체를 생성시키는 방법이 또한 제공된다.

부가의 양태에 있어서, 본 발명은 VEGF 변이체와 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 임의로 이러한 담체는 제약학적으로 허용되는 담체일 수 있다.

본 발명은 추가로, 혈관형성 또는 혈관신생 과정이 요망되는 질환, 예를 들면 외과적 절개, 상처, 열상, 혈관 침투 및 표면 궤양으로부터의 혈관망 손상을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법에서는, 상기 질환이 있는 포유류에게 유효량의 VEGF 변이체를 투여할 수 있다.

본 발명은 또한, 시험관 내에서 VEGF 변이체를 사용하는 진단 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 이 방법이 VEGF 변이체 (들)을 사용하여 세포 또는 조직을 검정하여 KDR 및/또는 FLT-1 수용체의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함한다.

최종적으로, 본 발명은 본원에 기재된 VEGF 변이체를 함유하는 키트 및 제품을 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 165개 아미노산 본래의 ("야생형") VEGF의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 3) 및 추정 아미노산 서열 (서열 번호 4)을 도시한 것이다.

도 2는 본래의 VEGF (8-109)에 대한 ELISA 검정 적정 곡선을 도시한 것이다.

도 3은 본래의 VEGF (8-109)에 대한 KIRA 검정 적정 곡선을 도시한 것이다.

도 4는 본래의 VEGF (8-109)에 대한 HUVEC 증식 검정 적정 곡선을 도시한 것이다.

도 5는 각종 농도의 리간드를 사용하여, KDR 발현성 NIH3T3 세포로부터 <sup>125</sup>I-VEGF (1-165)을 경쟁적 전위시켜 측정된 바와 같은, 본래의 VEGF ("WT VEGF"), LK-VRB-2s\* (KDR 선택적 변이체) 및 Flt-1-sel (Flt-1 선택적 변이체)에 의한 KDR에 대한 결합 친화도를 도시한 것이다. 이 검정은 실시예 7에 상세히 기재되어 있다. 각 지점은 이중 결정치의 평균을 나타내고, 오차는 해당 값의 15% 미만인 것으로 평가된다.

도 6은 각종 농도의 리간드를 사용하여, FLT-1 발현성 NIH3T3 세포로부터  $^{125}\text{I}$ -VEGF (1-165)을 경쟁적 전위시켜 측정한 바와 같은, 본래의 VEGF ("WT VEGF"), LK-VRB-2s\* (KDR 선택적 변이체) 및 Flt-1-sel (Flt-1 선택적 변이체)에 의한 Flt-1에 대한 결합 친화도를 도시한 것이다. 이 검정은 실시예 7에 상세히 기재되어 있다. 각 지점은 이중 결정치의 평균을 나타내고, 오차는 해당 값의 15% 미만인 것으로 평가된다.

도 7은 각종 VEGF 알라닌 치환 변이체의 결합 감소율을 확인해 주는 표를 도시한 것이다. 실시예 8에 기재된 바와 같이, 각종 알라닌 변이체를 사용하여 단백질 ELISA를 수행하였다. 각 잔기에 대해 열거된 것은 본래의 VEGF (1-109)의  $\text{IC}_{50}$ 에 대한 당해 변이체의  $\text{IC}_{50}$ 의 비이며, 이는 본래의 VEGF와 비교하여 당해 변이체의 결합의 폴드 감소를 나타낸다. 본래의 VEGF (1-109)에 대한  $\text{IC}_{50}$  값이 괄호 안에 제시되어 있다. 진하게 표시된 잔기를 사용하여 Flt-1 선택적 변이체를 생성시켰다. KDR 선택적 변이체를 생성시키기 위해, 돌연변이된 영역을 도시된 바와 같이 5개 그룹으로 나누고, 처음 4개를 사용하여 후속 파아지 디스플레이 선별용 라이브러리를 작제하였다. 별표 (\*)가 표시된 잔기는 야생형 쪽으로 50% 치우치도록 가볍게 무작위화한 것이고, 별표 2개가 표시된 잔기는 엄격히 무작위화한 것이다.

도 8a는 Flt-1 선택적 변이체 ("Flt-1-sel")가 470배 이상 감소된 KDR 결합 친화도를 나타내는 것을 밝혀진 방사성-면역 수용체 결합 검정 (RIA) 결과를 도시한 것이다. 본래의 VEGF ("WT VEGF")에 대한 결합 친화도가 또한 도시되어 있다. 각 지점은 이중 결정치의 평균을 나타내고, 오차는 해당 값의 15% 미만인 것으로 평가된다.

도 8b는 Flt-1 선택적 변이체 ("Flt-1-sel")가 본래의 VEGF ("WT VEGF")에 의해 나타낸 것과 유사한 FLT-1에 대한 결합 친화도를 나타내는 것을 밝혀진 방사성-면역 수용체 결합 검정 (RIA) 결과를 도시한 것이다. 각 지점은 이중 결정치의 평균을 나타내고, 오차는 해당 값의 15% 미만인 것으로 평가된다.

도 9는 KDR 인산화를 유도하는 본래의 VEGF ("WT VEGF") 및 Flt-1 선택적 변이체 ("Flt-1-sel")의 능력을 측정하는 KIRA 검정 결과를 도시한 것이다.

도 10은 HUVEC 세포 증식을 유도하는 본래의 VEGF ("WT VEGF") 및 Flt-1 선택적 변이체 ("Flt-1-sel")의 능력을 측정하는 HUVEC 증식 검정 결과를 도시한 것이다. 각 데이터 점은 3회 실험치의 평균이고 평가된 오차는 10 내지 20%이다.

도 11은 사람 ASMC 세포에 의한 MMP-9 분비를 자극시키는 본래의 VEGF, LK-VRB-2\* (KDR 선택적 변이체), Flt-sel (Flt 선택적 변이체) 및 PIGF의 능력을 결정해주는 젤라틴 자이모그래피 (zymography) 분석 결과를 도시한 것이다. 도시된 자이모그램은 2가지 독립적인 실험 중의 하나이다. 폴드 변화는 상대적인 밴드 밀도를 나타낸다.

도 12a 및 12b는 본래의 VEGF ("WT-VEGF"), Flt-sel (Flt 선택적 변이체) 및 KDR 선택적 변이체 ("KDR-sel")에 의한 MAP 키나제의 활성화를 결정하기 위해 수행된 웨스턴 (Western) 블롯 분석을 도시한 것이다. 이 검정이 실시예 10에 상세히 기재되어 있다.

도 13a 및 13b는 PLC-감마 및 PI3'-키나제 인산화에 있어서 본래의 VEGF ("wt" 또는 "VEGF"), KDR 선택적 변이체 ("KDR-sel"), 및 Flt 선택적 변이체 ("Flt-sel") 및 KDR의 역할을 결정하기 위해 수행된 웨스턴 블롯 분석을 도시한 것이다. 이 검정은 실시예 11에 상세히 기재되어 있다.

도 14a 및 14b는 변형된 보이덴 (Boyden) 챔버에서 수행된 HUVEC 이동 검정 결과를 도시하는 막대 다이어그램이다. 도 14a는 본래의 VEGF ("wt"), Flt-선택적 변이체 ("Flt-sel") 및 KDR 선택적 변이체 ("KDR-sel")의 지시된 농도에 의해 달성된 HUVEC 이동을 도시한 것이다. 도 14b는 PI3'-키나제 억제제 ("LY")의 첨가가 본래의 VEGF ("VEGF")에 반응하여 HUVEC 이동을 손상시킨 실험 결과를 도시한 것이다. 실험은 3회 실시하였고, 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다.

도 15a 및 15b는 생체 내 각막 포켓 혈관신생 과정 검정 결과를 도시한 것이다. 도 15a에서의 슬라이드는 대조군 치료, 본래의 VEGF ("VEGF"), KDR 선택적 변이체 및 Flt-선택적 변이체에 반응하는 각막 혈관신생 정도의 대표적인 예를 도시한 것이다. 도 15b는 대조군 치료, 본래의 VEGF ("VEGF"), KDR 선택적 변이체 ("KDR-sel"), Flt 선택적 변이체 ("Flt-sel") 및 PIGF로부터 비롯되는 각막 혈관신생의 표면적을 정량적으로 분석한 것을 도시한 것이다.

## 발명의 상세한 설명



## A. 정의

본원에 사용된 바와 같은 용어 "VEGF" 및 "본래의 VEGF"는 이의 천연의 대립유전자성 및 프로세싱된 형태와 함께, 문헌 [Leung et al., *Science*, 246:1306 (1989); and Houck et al., *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)]에 기재된 (또한 도 1a 및 1b에 제공된) 바와 같이, 165개 아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자 및 이와 관련된 121개, 189개 및 206개 아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자를 지칭한다. 용어 "VEGF" 및 "본래의 VEGF"는 또한, 165개 아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 절단된 형태를 지칭하는데 사용된다. 상기 어떠한 형태의 VEGF에 대한 참조도, 예를 들면 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF165 또는 VEGF (1-165)"로써 본원에서 명명될 수 있다. "절단된" 본래의 VEGF에 대한 아미노산 위치는 본래의 VEGF 서열에 지시된 바와 같이 번호가 매겨진다. 예를 들면, 절단된 본래의 VEGF에서 아미노산 17번 위치 (메티오닌)는 또한 본래의 VEGF에서도 17번 위치 (메티오닌)이다. 상기 절단된 본래의 VEGF는 바람직하게는, 본래의 VEGF에 필적하는 KDR 및 FLT-1 수용체에 대한 결합 친화도를 나타낸다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "VEGF 변이체"는 본래의 VEGF 서열에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고 KDR 수용체 또는 FLT-1 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타내는 VEGF 폴리펩티드를 지칭한다. 한 양태에서는, KDR 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타내는 VEGF 변이체는 본래의 VEGF 서열의 17 내지 25번 위치 및/또는 63 내지 66번 위치 중의 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 임의로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이에는 아미노산 치환(들)이 포함된다. 바람직한 KDR 선택적 VEGF 변이체에는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 포함되고, 이는 KDR 수용체에 대한 본래의 VEGF의 결합 친화도와 동일하거나 이 보다 큰 ( $\geq$ ), KDR 수용체에 대한 결합 친화도를 나타내며, 더욱 바람직하게는, VEGF 변이체는 본래의 VEGF에 의해 나타난 FLT-1에 대한 결합 친화도 보다 덜한 ( $<$ ), FLT-1 수용체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. KDR 수용체에 대한 상기 VEGF 변이체의 결합 친화도가 본래의 VEGF와 비교해서 대략 동일하거나 (변하지 않음) 보다 크고 (증가됨), FLT-1 수용체에 대한 상기 VEGF 변이체의 결합 친화도가 본래의 VEGF와 비교해서 덜하거나 거의 제거된 것으로 평가된 경우에는, VEGF 변이체의 결합 친화도가 본원의 목적상, KDR 수용체에 "선택적"인 것으로 간주된다. 본 발명의 바람직한 KDR 선택적 VEGF 변이체는 (본래의 VEGF와 비교해서) FLT-1 수용체에 대한 결합 친화도가 10배 이상 덜 할 것이며, 더욱 바람직하게는, (본래의 VEGF와 비교해서) FLT-1 수용체에 대한 결합 친화도가 100배 이상 덜 할 것이다. 이러한 VEGF 변이체의 각각의 결합 친화도는 당 업계에 공지되어 있고 다음의 실시예에 추가로 기재되는, ELISA, RIA 및/또는 BIAcore 검정에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 바람직한 KDR 선택적 VEGF 변이체는 또한 KDR 수용체의 인산화를 유도시키는 능력을 반영하는 KIRA 검정 (본 실시예에 기재된 바와 같음)에서 활성을 나타낼 것이다. 본 발명의 바람직한 KDR 선택적 VEGF 변이체는 내피 세포 증식 (이는 본 실시예에서의 HUVEC 증식 검정과 같이 당 업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다)을 부가적으로 또는 대체적으로 유도시킬 것이다. 내피 세포 증식 유도는 현재 KDR 수용체에 의한 시그널 전달의 결과인 것으로 여겨진다.

한 양태에서, FLT-1 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타내는 VEGF 변이체는 본래의 VEGF 서열의 43, 46, 79 또는 83번 위치 중의 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 임의로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이에는 아미노산 치환(들), 바람직하게는 알라닌으로의 아미노산 치환이 포함된다. 바람직한 FLT-1 선택적 VEGF 변이체에는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 포함되고, 이는 FLT-1 수용체에 대한 본래의 VEGF의 결합 친화도와 동일하거나 이 보다 큰 ( $\geq$ ), FLT-1 수용체에 대한 결합 친화도를 나타내며, 더욱 바람직하게는, 이러한 VEGF 변이체는 본래의 VEGF에 의해 나타난 KDR에 대한 결합 친화도 보다 덜한 ( $<$ ), KDR 수용체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. FLT-1 수용체에 대한 상기 VEGF 변이체의 결합 친화도가 본래의 VEGF와 비교해서 대략 동일하거나 (변하지 않음) 보다 크고 (증가됨), KDR 수용체에 대한 상기 VEGF 변이체의 결합 친화도가 본래의 VEGF와 비교해서 덜하거나 거의 제거된 것으로 평가된 경우에는, VEGF 변이체의 결합 친화도가 본원의 목적상, FLT-1 수용체에 "선택적"인 것으로 간주된다. 본 발명의 바람직한 FLT-1 선택적 VEGF 변이체는 (본래의 VEGF와 비교해서) KDR 수용체에 대한 결합 친화도가 10배 이상 덜 할 것이며, 더욱 바람직하게는, (본래의 VEGF와 비교해서) KDR 수용체에 대한 결합 친화도가 100배 이상 덜 할 것이다. 이러한 VEGF 변이체의 각각의 결합 친화도는 당 업계에 공지되어 있고 다음의 실시예에 추가로 기재되는, ELISA, RIA 및/또는 BIAcore 검정에 의해 결정될 수 있다.

본원에 기재된 VEGF 변이체를 속기 명명할 목적으로, 숫자는 추정상의 본래의 VEGF의 아미노산 서열 (Leung et al. and Houck et al.의 상기 문헌에 제공됨)을 따른 아미노산 잔기 위치를 지칭한다는 것을 인지해야 한다. 아미노산 확인은 아미노산의 단일 문자 알파벳을 이용한다:

Asp D 아스파르트산 Ile I 이소루이신

Thr T 트레오닌 Leu L 루이신

Ser S 세린 Tyr Y 티로신

Glu E 글루탐산 Phe F 페닐알라닌

Pro P 프롤린 His H 히스티딘

Gly G 글리신 Lys K 리신

Ala A 알라닌 Arg R 아르기닌

Cys C 시스테인 Trp W 트립토판

Val V 발린 Gln Q 글루타민

Met M 메티오닌 Asn N 아스파라긴

"작동적으로 연결된"이란 해당 성분의 정상적인 기능이 수행될 수 있도록 하는 나란한 위치를 지칭한다. 따라서, 제어 서열에 "작동적으로 연결된" 코딩 서열은, 이러한 코딩 서열이 이들 서열의 제어 하에 발현될 수 있고 연결되는 DNA 서열이 연속되고, 분비 리더의 경우에는 관독 상에 연속되는 입체 배치를 지칭한다. 예를 들면, 프레스어열 (presequence) 또는 분비 리더에 대한 DNA는 이것이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 프레단백질로서 발현되는 경우에는 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 이것이 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우에는 상기 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 이것이 해독을 촉진시키도록 위치되는 경우에는 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 연결은 통상적인 제한 부위에서 연결시킴으로써 수행한다. 이러한 부위가 존재하지 않는다면, 통상적인 실시예에 따라서 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 사용한다.

"제어 서열"은 작동적으로 연결된 코딩 서열을 특정한 숙주 유기체에서 발현시키는데 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열에는, 예를 들면 프로모터, 임의의 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위가 포함된다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

"발현 시스템"은 목적하는 코딩 서열과 제어 서열을 작동적 연결로 함유함으로써, 이들 서열로 형질전환된 숙주가 이로써 코딩된 단백질을 생성할 수 있도록 한 DNA 서열을 지칭한다. 형질전환시키기 위해, 발현 시스템이 벡터 상에 포함될 수 있지만, 관련 DNA가 숙주 염색체 내로 통합될 수도 있다.

본원에 사용된 바와 같은 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호 교환적으로 사용되고, 모든 명칭에는 후대가 포함된다. 따라서, "형질전환체" 또는 "형질전환된 세포"에는 전이 수에 상관없이 이로부터 유도된 1차 대상 세포 및 배양물이 포함된다. 계획적이거나 우연한 돌연변이가 발생할 수 있기 때문에, 모든 자손은 DNA 내용에 있어서 정확하게 동일할 수 없다는 것을 인지해야 한다. 최초 형질전환된 세포에 대해 스크리닝된 바와 동일한 기능을 지닌 돌연변이체 후대가 포함된다. 별도의 명칭을 사용하고자 하는 경우, 이는 본 명세서로부터 명백할 것이다.

"플라스미드"는 소문자 p 다음에 대문자 및/또는 숫자로써 명명된다. 본원에서의 출발 플라스미드는 시판중이거나, 무제한적으로 입수 가능하거나, 또는 공개된 과정에 따라서 상기 입수 가능한 플라스미드로부터 작제할 수 있다. 또한, 기타 등가의 플라스미드가 당 업계에 공지되어 있고, 당업계의 숙련인에게 명백할 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "VEGF 수용체"는 최초에는 혈관 내피 세포 상에서 발견된 세포-표면 수용체인, VEGF에 대한 세포 수용체 뿐만 아니라 VEGF와 결합하는 능력을 보존하고 있는 이의 단편 및 변이체 (예를 들면, 수용체 세포의 도메인의 절단된 형태 또는 단편)를 지칭한다. VEGF 수용체의 한 예는 티로신 키나제 계열의 트랜스멤브레인 수용체인 fms-유사 티로신 키나제 (FLT 또는 FLT-1)이다. 본원에서 사용된 용어 "FLT-1 수용체"는, 예를 들면 문헌 [DeVries et al., *Science*, 255:989 (1992); and Shibuya et al., *Oncogene*, 5:519 (1990)]에 기재된 VEGF 수용체를 지칭한다. 완전한 길이의 FLT-1 수용체는 티로신 키나제 활성을 지니고 있는 세포내 도메인, 트랜스멤브레인 도메인 및 세포외 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 VEGF의 결합과 관련되는 반면, 세포내 도메인은 시그널 형질도입과 관련된다. VEGF 수용체의 또 다른 예는 KDR 수용체 (FLK-1로서 지칭되기도 함)이다. 본원에 사용된 용어 "KDR 수용체"는, 예를 들면 문헌 [Matthews et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88:9026 (1991); and Terman et al., *Oncogene*, 6:1677 (1991); Terman et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187:1579 (1992)]에 기재된 VEGF 수용체를 칭한다.



"치료"는 표적된 병원성 질환 또는 장애를 예방하거나 서서히 경감(완화)시키는 것이 목적인, 치료학적 처치와 예방적 처치 모두를 지칭한다. 치료가 필요한 대상에는 이미 질환이 있는 대상 뿐만 아니라 질환에 걸리기 쉽거나 이러한 질환을 예방시켜야 하는 대상이 포함된다.

"만성" 투여는 초기 치료학적 효과(활성)가 장기간에 걸쳐 유지되도록, 급성 양상과는 반대로 지속적인 양상으로 제제(들)를 투여하는 것을 포함한다. 간헐적인 투여는 중단없이 연속적으로 수행되지 않지는 않지만, 사실상 주기적인 치료이다.

치료 목적을 위한 "포유류"는 사람, 가축 및 농장용 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예를 들면 개, 고양이, 소, 말, 양 또는 돼지를 포함한 포유류로서 분류된 모든 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유류는 사람이다.

하나 이상의 추가의 치료학적 제제와 "함께" 투여하는 것에는 동시에 투여하는 것과 어떠한 순서로든 연속해서 투여하는 것이 포함된다.

## B. 방법 및 조성물

### 1. VEGF 변이체의 제조

VEGF의 아미노산 서열 변이체는 VEGF DNA에서 돌연변이시킴으로써 제조할 수 있다. 이러한 변이체에는, 예를 들면 문헌 [Leung et al. 상기 참조 및 Houck et al., 상기 참조]에 제시된 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 이로의 삽입 및 치환이 포함된다. 목적하는 활성을 지닌 최종 작제물에 도달하는 어떠한 조합의 결실, 삽입 및 치환도 이루어질 수 있다. 명백하게, 해당 변이체를 코딩하는 DNA에서 이루어질 돌연변이는 관독 프레임을 벗어나서 서열을 배열하지 말아야 하고, 바람직하게는, 2차 mRNA 구조를 생성시킬 수 있는 상보적 영역을 생성시키지 않을 것이다 [EP 75,444A 참조].

VEGF 변이체는 임의로 본래의 VEGF를 코딩하는 DNA 내의 뉴클레오타이드의 부위-지시된 돌연변이에 의해 또는 파아지 디스플레이 기술에 의해 이러한 변이체를 코딩하는 DNA를 생성시킨 후, 이 DNA를 재조합 세포 배양물에서 발현시킴으로써 제조한다.

아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 예정되긴 하지만, 돌연변이 자체가 예정될 필요는 없다. 예를 들면, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 최적화하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 무작위 돌연변이를 수행할 수 있으며, 발현된 VEGF 변이체를 대상으로 하여 목적하는 활성의 최적 조합에 대해 스크리닝하였다. 공지된 서열을 갖는 DNA 내의 예정된 부위에서 치환 돌연변이를 만들기 위한 기술, 예를 들면 부위 특이적 돌연변이가 널리 공지되어 있다.

본원에 기재된 VEGF 변이체의 제조는 실시예 1에 기재된 바와 같은 파아지 디스플레이 기술에 의해 달성하는 것이 바람직하다.

이러한 클론을 선별한 후, 돌연변이된 단백질 영역을 제거하고, 이를 단백질 생성에 적당한 벡터, 일반적으로 적당한 숙주의 형질전환에 이용될 수 있는 유형의 발현 벡터에 놓아둘 수 있다.

아미노산 서열 결실은 일반적으로, 약 1 내지 30개 잔기, 보다 바람직하게는 1 내지 10개 잔기의 범위이며, 전형적으로는 연속된다.

아미노산 서열 삽입에는 1개 잔기에서부터 거의 무제한 길이의 폴리펩티드까지의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 서열내 삽입 (즉, 본래의 VEGF 서열 내의 삽입)은 일반적으로 약 1 내지 10개 잔기, 보다 바람직하게는 1 내지 5개 잔기의 범위일 수 있다. 말단 삽입의 예에는 재조합 숙주로부터의 분비를 촉진시키기 위한, N-말단에 대한 시그널 서열 (숙주 세포에 대해 이중이든 동종이든지 간에)의 융합이 포함된다.

부가의 VEGF 변이체는 본래의 VEGF 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되었고 그 자리에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 이러한 치환은 표 1에 제시된 바와 같이 이루어질 수 있다.

**[표 1]**

본래의 잔기	예시 치환물
Ala (A)	gly; ser
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn
Glu (E)	asp
Gly (G)	ala; pro
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val
Leu (L)	ile; val
Lys (K)	arg; gln; glu
Met (M)	leu; tyr; ile
Phe (F)	met; leu; tyr
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu

기능 또는 면역학적 실체의 변화는, 표 1에서의 것 보다는 덜 보존적인 치환을 선택함으로써, 즉 (a) 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면 시트 또는 나선형 형태로서의 구조, (b) 표적 부위에서의 해당 분자의 전하 또는 소수성 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 것에 대한 이들의 효과가 더욱 많이 다른 잔기를 선택함으로써 이루어질 수 있다. 일반적으로 VEGF 변이체 특성에 있어서 가장 큰 변화를 가져다 주는 것으로 예상되는 치환은 (a) 글리신 및/또는 프롤린 (P)을 또 다른 아미노산으로 치환시키거나 또는 이것을 결실 또는 삽입시킨 것; (b) 친수성 잔기, 예를 들면 세틸 또는 트레오닐을 소수성 잔기, 예를 들면 루이실, 이소루이실, 페닐알라닐, 발릴 또는 알라닐로 치환시킨 것; (c) 시스테인 잔기를 기타 잔기로 치환시킨 것; (d) 양전기를 띤 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면 리실, 아르기닐 또는 히스티딜을 음전하를 갖는 잔기, 예를 들면 글루타미드 또는 아스파르틸로 치환시킨 것; (e) 음전기를 띤 측쇄를 갖는 잔기를 양전하를 갖는 잔기로 치환시킨 것; 또는 (f) 벌키 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면 페닐알라닌을 이러한 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들면 글리신으로 치환시킨 것일 것이다.

치환, 결실, 또는 삽입 효과는 통상적인 스크리닝 검정을 사용하여 당 업계의 숙련인에 의해 용이하게 평가될 수 있다. 예를 들면, 파아지 디스플레이-선택된 VEGF 변이체를 재조합 세포 배양물에서 발현시키고, 임의로 상기 세포 배양물로부터 정제할 수 있다. 이어서, 상기 VEGF 변이체를 대상으로 하여, KDR 또는 FLT-1 수용체 결합 친화도, 및 본원에 기재된 바와 같은 기타 생물학적 활성에 대해 평가할 수 있다. 세포 용해질 또는 정제된 VEGF 변이체의 결합 특성 또는 활성은 목적하는 특징에 적합한 스크리닝 검정으로 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, 소정의 항체에 대한 친화도와 같이, 본래의 VEGF와 비교해서 VEGF 변이체의 면역학적 형질 변화가 요망될 수 있다. 이러한 변화는 당 업계에 공지된 기술에 따라서 수행될 수 있는 경쟁적 유형의 면역검정으로 측정할 수 있다. VEGF 변이체의 각각의 수용체 결합 친화도는 당 업계에 공지되어 있고 다음 실시예에 추가로 기재되는 ELISA, RIA, 및/또는 BIAcore 검정으로 결정할 수 있다. 본 발명의 바람직한 VEGF 변이체는 또한 KDR 수용체의 인산화를 유도시키는 능력을 반영하는 KIRA 검정 (본 실시예에 기재된 바와 같음)에서 활성을 나타낼 것이다. 본 발명의 바람직한 VEGF 변이체는 내피 세포 증식 (이는 본 실시예에서의 HUVEC 증식 검정과 같이 당 업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다)을 부가적으로 또는 대체적으로 유도시킬 것이다.

VEGF 변이체는 당 업계에 공지된 기술, 예를 들면 제조법 방법으로 제조할 수 있다. 이들 방법에 사용된 분리된 DNA는 화학적으로 합성된 DNA, cDNA, 염색체성 DNA, 또는 3'- 및/또는 5'-플래킹 영역을 함유하거나 함유하지 않는 염색체외성 DNA를 의미하는 것으로 본원에서 인지해야 한다. 바람직하게는, 본원의 VEGF 변이체는 재조합 세포 배양물에서 합성하여 만든다.

이러한 합성을 위해, 먼저 VEGF 또는 VEGF 변이체를 코딩하는 핵산을 획득할 필요가 있다. VEGF 분자를 코딩하는 DNA는 (a) 소의 뇌하수체 포상 세포로부터 cDNA 라이브러리를 제조하고; (b) VEGF 또는 이의 단편 (길이가 100개 염기쌍 이하 또는 이상이다)을 코딩하는 표지된 DNA로 하이브리드화 분석을 수행하여 상동 서열을 함유하는 라이브러리에서 클론을 검출하며; (c) 제한 효소 분석 및 핵산 서열화에 의해 상기 클론을 분석하여 완전한 길이의 클론을 동정함으로써, 상기

소의 뇌하수체 포상 세포로부터 수득될 수 있다. 완전한 길이의 클론이 cDNA 라이브러리에 존재하지 않을 경우에는, 처음 본원에 기재된 핵산 서열 정보를 이용하여 각종 클론으로부터 적당한 단편을 회수하고, 이러한 클론에 공통인 제한 부위에서 연결하여 VEGF를 코딩하는 완전한 길이의 클론을 어셈블리할 수 있다. 또 다른 한편, 게놈 라이브러리가 목적하는 DNA를 제공할 것이다.

이러한 DNA를 일단 동정하여 라이브러리로부터 분리시키면, 이를 추가의 클로닝 또는 발현을 위한 복제 가능한 벡터 내로 연결시킨다.

재조합 발현 시스템의 한 예에서는, VEGF를 코딩하는 DNA를 포함하는 발현 벡터로 형질전환시킴으로써 VEGF-코딩 유전자를 세포 시스템에서 발현시킨다. 숙주 세포의 배지 또는 외질에서 VEGF를 수득하도록, 즉 분비된 분자를 수득하도록 상기 프로세싱을 수행할 수 있는 숙주 세포를 형질전환시키는 것이 바람직하다.

"형질감염"은 코딩 서열이 사실상 발현되거나 발현되지 않든 간에 숙주 세포에 의한 발현 벡터의 도입을 지칭한다. 수 많은 형질감염 방법, 예를 들면  $\text{CaPO}_4$  및 전기천공법이 당 업계의 숙련인에게 공지되어 있다. 성공적인 형질감염은 상기 벡터의 작동 지시가 숙주 세포 내에서 일어날 때 일반적으로 인식된다.

"형질전환"은 DNA가 염색체의 요소로서 복제할 수 있거나 또는 염색체성 통합물에 의해 복제할 수 있도록 상기 DNA를 유기체 내로 도입하는 것을 지칭한다. 사용된 숙주 세포에 따라서, 이러한 세포에 적당한 표준 기술을 사용하여 형질전환을 수행한다. 문헌 [Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 69:2110 (1972); and Mandel et al., *J. Mol. Biol.*, 53:154 (1970)]에 기재된 바와 같이, 염화칼슘을 이용하는 칼슘 처리가, 실제적인 세포벽 장벽을 함유하는 원핵 생물 또는 기타 세포에 일반적으로 사용된다. 이러한 세포벽이 없는 포유류 세포의 경우에는, 문헌 [Graham and van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전법이 바람직하다. 포유류 세포 숙주 시스템 형질전환의 일반적인 면이 악셀 (Axel)의 미국 특허 제4,399,216호 (1983. 8. 16.자로 허여됨)에 기재되어 있다. 효모로의 형질전환은 전형적으로 문헌 [Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946 (1977); and Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979)]의 방법에 따라서 수행한다. 그러나, DNA를 세포 내로 도입하는 기타 방법, 예를 들면 핵 주입 또는 원형질체 융합에 의한 방법을 사용할 수도 있다.

본원에 기재된 벡터 및 방법은 광범위한 원핵성 유기체와 진핵성 유기체에 걸쳐 숙주 세포에서 사용하기에 적합하다.

일반적으로, 물론 원핵 생물이 본 발명에 유용한 벡터의 작제와 DNA 서열의 초기 클로닝에 바람직하다. 예를 들면, 이. 콜리 (*E. coli*) K12 균주 MM 294 (ATCC 31,446호)가 특히 유용하다. 사용될 수 있는 기타 미생물성 균주에는 이. 콜리 B 및 이. 콜리 X1776 (ATCC 31,537호)과 같은 이. 콜리 균주가 포함된다. 이들 예는 물론 예시하기 위한 것이며, 이로써 제한되지는 않는다.

원핵 생물을 발현에 사용할 수도 있다. 전술된 균주 뿐만 아니라 이. 콜리 균주 W3110 (F-, 람다-, 프로토포픽, ATCC 27,325호), K5772 (ATCC 53,635호) 및 SR101; 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 등의 바실러스; 살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르세산스 (*Serratia marcesans*) 등의 기타 엔테로박테리아세; 및 각종 슈도모나스 (*pseudomonas*) 종이 사용될 수 있다.

일반적으로, 숙주 세포와 화합성인 종으로부터 유도되는 제어 서열과 레플리콘을 함유하는 플라스미드 벡터가 이들 숙주와 연계해서 사용된다. 이 벡터는 통상적으로, 복제 부위 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마킹 (marking) 서열을 갖는다. 예를 들면, 이. 콜리는 전형적으로, 이. 콜리 종으로부터 유도된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다 [Bolivar et al., *Gene*, 2:95 (1977)]. pBR322는 앰피실린 및 테트라사이클린 내성에 대한 유전자를 함유하므로, 형질전환된 세포를 동정하기 위한 용이한 수단을 제공해준다. 이러한 pBR322 플라스미드, 또는 기타 미생물성 플라스미드 또는 파아지는 자신의 단백질을 발현하기 위해 미생물성 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유해야만 하거나, 또는 함유하도록 변형되어야 한다.

재조합 DNA 작제에 가장 통상적으로 사용되는 프로모터에는  $\beta$ -락타마제 (페니실리나제) 및 락토오스 프로모터 시스템 [Chang et al., *Nature*, 375:615 (1978); Itakura et al., *Science*, 198:1056 (1977); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], 및 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 [Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EPO Appl. Publ. No. 0036,776호]이 포함된다. 이들이 가장 통상적으로 사용되긴 하지만, 기타 미생물성 프로모터가 발견되어 사용되고 있으며, 이들의 뉴클레오티드 서열에 관한 내역이 공개되어 있어, 당 업계의 숙련인은 이들을 플라스미드 벡터와 기능적으로 연결할 수 있다 [Siebenlist et al., *Cell*, 20:269 (1980)].

원핵 생물 이외에도, 효모 배양물과 같은 진핵성 미생물을 사용할 수도 있다. 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상의 제빵용 효모가 진핵성 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용되긴 하지만, 수 많은 기타 균주가 시판되고 있다. 사카로마이세스에서의 발현을 위해, 예를 들면 플라스미드 YRp7 [예를 들면, Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]이 통상 사용된다. 이 플라스미드는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이 균주에 대한 선별 마커를 제공하는 *trp1* 유전자를 이미 함유하고 있으며, 예를 들면 ATCC 제44,076호 또는 PEP4-1이다 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)]. 효모 숙주 세포 계능의 특징으로서 *trp1* 장애가 존재하는 것은, 트립토판 부재하에서의 성장에 의한 형질전환을 검출하는데 효과적인 환경을 제공해준다.

효모 벡터에서 적합한 프로모팅 서열에는 3-포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터 [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)]; 또는 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코오스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코오스 이소머라제 및 글루코키나제 등의 기타 당분해성 효소 [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland et al., *Biochemistry*, 17:4900 (1978)]가 포함된다. 적합한 발현 플라스미드를 작제하는데 있어서, 이들 유전자와 연결된 종결 서열을, 발현시키고자 하는 서열의 발현 벡터 3'에 또한 연결하여 mRNA의 폴리아데닐화 및 종결을 제공한다. 성장 조건에 의해 제어된 전사의 부가 이점을 지니고 있는 기타 프로모터는 알코올 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해성 효소, 전술된 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토오스와 갈락토오스 활용에 관여된 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모-화합성 프로모터, 복제 기원 및 종결 서열을 함유하는 어떠한 플라스미드 벡터도 적합하다.

미생물 이외에도, 다세포 유기체로부터 유도된 세포 배양물이 숙주로서 사용될 수도 있다. 원칙상, 이러한 세포 배양물은 이것이 척추동물 배양물로부터 기원되거나 비척추동물 배양물로부터 기원되든지 간에 작용 가능하다. 그러나, 척추동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 최근 수 년간은 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식이 통상적인 과정이 되었다 [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)]. 이러한 유용한 숙주 세포주의 예는 VERO 및 HeLa 세포, 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포주, 및 W138, BHK, COS-7, 293 및 MDCK 세포주이다. 상기 세포용 발현 벡터에는 통상, (필요한 경우) 복제 기원; 필수 리보솜 결합 부위를 따라, 발현될 유전자의 전방에 위치한 프로모터; RNA 스플라이스 부위; 폴리아데닐화 부위; 및 전사 종결인자 서열이 포함된다.

포유류 세포에서 사용하는 경우, 발현 벡터에 대한 제어 기능이 종종 바이러스성 물질에 의해 제공된다. 예를 들면, 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스2 및 가장 빈번하게는 원숭이 바이러스 40 (SV40)으로부터 유도된다. SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터가 특히 유용한데, 이는 이들 둘 다 SV40 바이러스성 복제 기원을 함유하기도 하는 단편으로서 상기 바이러스로부터 용이하게 획득되기 때문이다 [Fiers et al., *Nature*, 273:113 (1978)]. 보다 작거나 큰 SV40 단편이 사용될 수도 있는데, 단 이에는 HindIII 부위로부터 상기 바이러스성 복제 기원에 위치한 BglII 부위 쪽으로 연장되는 대략 250-bp 서열이 포함된다. 추가로, 목적하는 유전자 서열과 통상 연합되는 프로모터 또는 제어 서열을 활용하는 것이 가능하거나 종종 바람직한데, 단 이러한 제어 서열은 숙주 세포 시스템과 화합성이어야 한다.

복제 기원은 SV40 또는 기타 바이러스성 (예: 폴리오마, 아데노, VSV, BPV) 공급원으로부터 유도될 수 있는 것과 같은 외인성 기원을 포함하도록 벡터를 작제함으로써 제공되거나, 또는 숙주 세포 염색체성 복제 기전에 의해 제공될 수 있다. 이 벡터가 숙주 세포 염색체 내로 통합되는 경우에는, 후자가 종종 충분하다.

만족할만한 양의 단백질이 세포 배양에 의해서 생성되지만, 2차 코딩 서열을 이용하는 정련 과정이 심지어 생성 수준을 추가로 증진시키는 작용을 한다. 하나의 2차 코딩 서열은, 메토타렉세이트 (MTX)와 같이 외적으로 제어된 파라미터에 의해 영향을 받음으로써 메토타렉세이트 농도 제어에 의해 발현을 제어시켜 주는, 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)를 포함한다.

VEGF와 DHFR 단백질 모두를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 본 발명의 벡터에 의해 형질감염시키는데 바람직한 숙주 세포를 선택하는데 있어서, 이용된 DHFR 단백질의 유형에 따라서 숙주를 선택하는 것이 적당하다. 야생형 DHFR 단백질이 이용된 경우에는, DHFR이 결여된 숙주 세포를 선택함으로써, 하이포크산틴, 글리신 및 티미딘이 결핍된 선택 배지에서 성공적인 형질감염을 위한 마커로서 DHFR 코딩 서열을 사용할 수 있는 것이 바람직하다. 이러한 경우에 적당한 숙주 세포는 문헌 [Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 77:4216 (1980)]에 기재된 바와 같이 제조되고 증식된, DHFR 활성이 결여된 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다.

한편, MTX에 대한 결합 친화도가 낮은 DHFR 단백질을 제어 서열로서 사용한 경우에는, DHFR-결여 세포를 사용할 필요가 없다. 돌연변이 DHFR은 메토틱렉세이트에 대해 내성을 지니고 있기 때문에, MTX 함유 배지가 선별 수단으로서 사용될 수 있는데, 단 숙주 세포 자체는 메토틱렉세이트 민감성이다. MTX를 흡수할 수 있는 대부분의 진핵 세포는 메토틱렉세이트 민감성인 것으로 보인다. 이러한 유용한 한 가지 세포주가 CHO 주인 CHO-K1 (ATCC CCL 61호)이다.

목적하는 코딩 및 제어 서열을 함유하는 적합한 벡터의 작제는 표준 연결 기술을 이용한다. 분리된 플라스미드 또는 DNA 단편을 절단하고, 맞게 조정된 다음, 목적하는 형태로 재연결하여 요구되는 플라스미드를 제조한다.

평활 말단이 요구되는 경우에는, 상기 제제를 10 단위의 폴리머라제 I (클레노우)와 함께 15°C에서 15분 동안 처리하고, 페놀-클로로포름 추출한 다음, 에탄올 침전시킬 수 있다.

절단된 단편을 크기 분리하는 것은, 예를 들면 문헌 [Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980)]에 기재된 6% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 수행할 수 있다.

정확한 서열이 플라스미드에서 작제되었는지를 확인하기 위하여, 연결 혼합물을 전형적으로 사용하여 이. 콜리 K12 균주 294 (ATCC 31,446) 또는 기타 적합한 이. 콜리 균주를 형질전환시키고, 성공적인 형질전환체를 경우에 따라 앰피실린 또는 테트라사이클린 내성으로써 선별하였다. 문헌 [Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981)]의 방법 또는 문헌 [Maxam et al., *Methods of Enzymology*, 65:499 (1980)]의 방법에 의해 제한 지도화 및/또는 DNA 서열화함으로써, 상기 형질전환체로부터 플라스미드를 제조 및 분석한다.

DNA를 포유류 세포 숙주 내로 도입하고 안정한 형질감염체를 배지에서 선별한 후, DHFR 활성의 경쟁적 억제제인 메토틱렉세이트 (MTX) 대략 20,000 내지 500,000 nM 농도의 존재 하에서 숙주 세포 배양물을 성장시킴으로써 DHFR-단백질 코딩 서열을 증폭시킨다. 유효한 농도 범위는 물론, DHFR 유전자의 종류와 숙주의 특징에 상당히 의존적이다. 명백하게, 일반적으로 규정된 상한치와 하한치는 확인할 수 없다. 기타 폴산 동족체, 또는 DHFR를 억제시키는 기타 화합물의 적합한 농도를 사용할 수도 있다. 그러나, MTX 그 자체는 편리하고, 용이하게 입수 가능하며 효과적이다.

## 2. VEGF 변이체의 공유적 변형

본 발명의 VEGF 변이체는 또한 추가의 변형을 포함할 수 있다. 이의 예로는 하나 이상의 아미노산 잔기에 대한 공유적 변형(들)이 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기를 할로아세테이트 (및 상응하는 아민), 예를 들면 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 반응시켜 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 획득할 수 있다. 시스테인 잔기는 또한, 브로모트리플루오로아세톤;  $\beta$ -브로모-(5-이미도조일)프로피온산; 클로로아세틸 포스페이트; N-알킬말레이미드; 3-니트로-2-피리딜 디설파이드; 메틸 2-피리딜 디설파이드; p-클로로머큐리벤조에이트; 2-클로로머큐리-4-니트로페놀; 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과 반응시킴으로써 유도체화할 수 있다.

또 다른 예에는, 히스티딘 잔기를 pH 5.5 내지 7.0에서 디에틸피로카르보네이트와 반응시킴으로써 상기 잔기를 유도체화하는 것이 포함된다. 파라-브로모페닐 브로마이드는 pH 6.0 하에 0.1M 나트륨 카코딜레이트에서 바람직하게 수행되는 반응이 유용할 수 있다.

리시닐 및 아미노 말단 잔기는 숙신산 또는 기타 카르복실산 무수물과 반응될 수 있다. 이들 제제로 유도체화하는 것은 리시닐 잔기의 전하를 반전시키는 효과를 지니고 있다.  $\beta$ -아미노 함유 잔기를 유도체화하는데 적합한 기타 시약에는 메틸 피콜린이미데이트 등의 이미도에스테르; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로히드라이드; 트리니트로벤젠설폰산; O-메틸이소우레아; 2,4-펜탄디온; 및 글리옥살레이트와의 트랜스아미나제-촉매된 반응물이 포함된다.

아르기닌 잔기는 1개 또는 수 개의 통상적인 시약, 예를 들면 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온 및 닌히드린과의 반응에 의해 변형될 수 있다. 이들 시약을 사용하여 리신의 엡실론-아미노기를 변형시킬 수도 있다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 알칼리성 조건 하에서 수행시켜야 하는데, 이는 구아니딘 작용기가 높은  $pK_a$ 를 지니고 있기 때문이다.

티로실 잔기 자체를 특정하게 변형시키는 것이 광범위하게 연구되었는데, 특히 관심있는 것은 스펙트랄 표지를 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과 반응시킴으로써 티로실 잔기 내로 도입하는 것이다. 가장 통상적으로, N-아세틸

이미디졸 및 테트라니트로메탄을 사용하여 각각 O-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 형성한다. 티로실 잔기는, 예를 들면 다음에 기재된 클로라민 T 방법을 사용함으로써  $^{125}\text{I}$  또는  $^{131}\text{I}$ 를 사용하여 요오드화하여, 이로써 방사선 면역검정에 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조할 수 있다.

카르복실 측쇄 기 (아스파르트산 또는 글루탐산)은 카르보다이미드 ( $\text{R}'\text{-N-C-N-R}'$ ), 예를 들면 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-(4-에틸)) 카르보다이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카르보다이미드와 반응시킴으로써 선택적으로 변형시킬 수 있다. 추가로, 아스파르트산 및 글루탐산 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환될 수 있다.

이작용성 제제로 유도체화하는 것이 당해 VEGF 변이체를 수용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 가교결합시키는데 유용하다. 통상적으로 사용되는 가교결합제에는 1,1-비스 (디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신 이미드 에스테르, 예를 들면 4-아지도살리실산과의 에스테르, 호모 이작용성 이미도에스테르 [3,3'-디티오비스 (숙신이미드프로피오네이트) 등의 디숙신이미드 에스테르를 포함함], 및 이작용성 말레이미드, 예를 들면 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄이 포함된다. 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 유도체화제는 빛의 존재하에서 가교결합을 형성할 수 있는 광활성 가능한 중간체를 생성시킨다. 또 다른 한편, 시아노젠 브로마이드-활성화 탄수화물과 같은 반응성 수용성 매트릭스, 및 미국 특허 제3,969,287호; 제3,691,016호; 제4,195,128호; 제4,247,642호; 제4,229,537호; 및 제4,330,440호에 기재된 반응성 기질이 단백질 고정화에 이용될 수 있다.

글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기를 종종 탈아미드화하여 상응하는 글루탐산 및 아스파르트산 잔기를 수득한다. 또 다른 한편, 이들 잔기를 적당히 산성인 조건 하에서 탈아미드화할 수 있다. 이들 잔기 중의 어느 한 형태가 본 발명의 범위 내에 속한다.

기타 변형에는 프롤린 및 리신의 히드록실화; 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실기의 인산화; 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의  $\alpha$ -아미노기의 메틸화 [Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86 (W.H. Freeman & Co., San Francisco (1983)); N-말단 아민의 아세틸화; 및 몇몇 경우에는 C-말단 카르복실기의 아미드화가 포함된다.

추가 변형에는 상기 VEGF 또는 VEGF 변이체 (또는 VEGF 효능제)를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 중합체에 연결하거나 융합시키는 것이 포함된다. 이러한 단백질의 폐결화 방법은 당 업계에 공지되어 있다.

VEGF 변이체 아미노산 서열은 N-연결을 통하여 글리코실화될 가능성을 갖고 있으며 본래의 VEGF에서는 정상적으로 글리코실화되지 않는 하나 이상의 아미노산 서열을 함유할 수 있다.

상기 변이체에 N-연결된 글리코실화 부위를 도입하기 위해서는, 다음 식의 트리펩티드 서열이 필요하다: 아스파라긴-X-세린 또는 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, 아스파라긴은 수용체이고, X는 글리코실화를 방지해주는, 프롤린을 제외한 20개의 유전적으로 코딩된 아미노산이다) [Struck and Lennarz, in *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* 35 (Lennarz, ed., Plenum Press (1980)), Marshall, *Biochem. Soc. Symp.*, 40:17 (1974); and Winzler, in *Hormonal Proteins and Peptides* 1-15 (Li, ed., Academic Press, New York (1973))]. 본원에서의 아미노산 서열 변이체는 적당한 부위(들)에서의 아미노산(들)을 글리코실화를 수행하는데 적당한 아미노산으로 치환함으로써 변형시킨다.

O-연결된 글리코실화가 이용되어야 하는 경우에는, O-글리코시드 연결은 동물 세포에서 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 크실로오스와, 몇몇 히드록시아미노산 중의 하나, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌 뿐만 아니라 몇몇 경우에는 분자의 적당한 영역에 놓여진 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 잔기 사이에서 일어난다.

포유류에 의해 생성된 단백질에 대한 글리코실화 패턴이 문헌 [*The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control* 271-315 (Putnam, ed., 2nd edition, Academic Press, New York (1984))]에 상세히 기재되어 있다. 이 장에서는, 복합체, 고 만노오스 및 하이브리드 구조로서 지칭된 3가지 이상 그룹으로 이들을 아분류하는 것을 포함한, 아스파라긴-연결된 올리고사카라이드 뿐만 아니라 O-글루코시드적으로 연결된 올리고사카라이드가 논의된다.

글리코시드를 단백질에 화학적 및/또는 효소적 커플링시키는 것은, 예를 들면 문헌 [Aplin and Wriston in *CRC Crit. Rev. Biochem.* 259-306 (1981)]에 기재된 바와 같이, 각종 활성화 기를 사용하여 달성할 수 있다. 화학적 커플링 기술의 이점은 이러한 기술이 비교적 단순하고 천연의 O- 및 N-연결된 글리코실화에 요구되는 복잡한 효소적 기계를 필요로 하지 않는다는 점이다. 사용된 커플링 방법에 따라서, 당(들)을 (a) 아르기닌 또는 히스티딘, (b) 유리 카르복실기, 예를 들면



글루탐산 또는 아스파르트산의 유리 카르복실기, (c) 유리 설프히드릴기, 예를 들면 시스테인의 유리 설프히드릴기, (d) 유리 히드록실기, 예를 들면 세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 유리 히드록실기, (e) 방향족 잔기, 예를 들면 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아마이드기에 부착시킬 수 있다. 이들 방법은 PCT WO 87/05330 (1987. 9. 11자 공개됨)에 보다 상세히 기재되어 있다.

효모에 의해 생성된 단백질에 대한 글리코실화 패턴은 문헌 [Tanner and Lehle, *Biochim. Biophys. Acta*, 906 (1):81-99 (1987) and Kukuruzinska et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 56:915-944 (1987)]에 상세히 기재되어 있다.

본래의 VEGF의 글리코실화가 생물학적 활성에 필수적이지는 않지만 [Walter et al., *Laboratory Investigation*, 74:546 (1996)], 전술한 방법을 이용하여 경우에 따라 VEGF 변이체의 글리코실화를 변화시킬 수 있다.

### 3. 치료 및 진단 방법

본 발명은 또한 기재된 VEGF 변이체를 사용하는 방법을 제공한다. 이 방법에는 혈관형성 또는 혈관신생 과정을 유도하는 방법과 같은 치료학적 방법이 포함된다. 이 방법은 또한, 혈관망 손상을 둘러싸고 있는 혈관 내피 세포의 증식 측면에서, 이러한 혈관망 손상을 치료하는 것에 관한 것일 수 있다. 그렇게 치료될 수 있는 손상의 예에는 외과적 절개, 특히 열상, 절개 및 혈관 침투를 포함한, 심장 상처와 연관된 손상, 및 당뇨병, 혈우병 및 정맥류 궤양 등의 혈관 내피와 연관된 표면 궤양이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. KDR 수용체 활성화는 성취하지만 FLT-1 수용체 활성화에 수반될 수 있는 잠재적인 부작용은 피하도록 요망되는, KDR 수용체에 대한 선택적인 결합 친화도를 나타내는 바람직한 VEGF 변이체가 이용될 수 있다는 것도 고려된다. 마찬가지로, Flt-1 수용체 활성화는 성취하지만 KDR 수용체 활성화에 수반될 수 있는 잠재적인 부작용은 피하도록 요망되는, Flt-1 수용체에 대한 선택적인 결합 친화도를 나타내는 바람직한 VEGF 변이체가 이용될 수 있다.

당해 VEGF 변이체는 치료받고자 하는 특정 질환, 개개 환자의 상태, VEGF 변이체의 전달 부위, 투여 방법, 및 전문의에게 공지된 기타 요인들을 고려하여 우수한 의학적 실시예에 부합되는 방식으로 제형화 및 투여할 수 있다. VEGF 변이체의 "유효량"에는 치료받는 질환 또는 이의 증상을 예방, 악화의 경감, 완화 또는 치료해주는 양이 포함된다.

VEGF 변이체는 목적하는 순도를 갖는 VEGF 변이체를 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 저장 또는 투여용으로 제조할 수 있다. 적합한 담체 비히클 및 이들의 제형 (예를 들면, 사람 혈청 알부민과 같은 기타 사람 단백질을 포함함)이, 예를 들면 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., edited by Oslo et al.]에 기재되어 있다. 전형적으로, 제약학적으로 허용되는 염의 적당량을 해당 제형에 사용하여 이 제형이 등장성이 되도록 한다. 상기 담체의 예에는 완충제, 예를 들면 식염수, 링거액 및 텍스트로오스 용액이 포함된다. 이 용액의 pH는 바람직하게는 약 5.0 내지 약 8.0이다. 예를 들면, VEGF 변이체가 수용성인 경우, 약 7.0 내지 8.0의 pH 하의 인산염 또는 기타 유기산과 같은 완충제에서 제형화할 수 있다. VEGF 변이체가 물에 단지 부분적으로만 가용성인 경우에는, 이의 용해도를 증가시키기 위해 비이온성 계면활성제, 예를 들면 트윈 (Tween), 플루로닉스 (Fluronic) 또는 PEG (예: 트윈 80)를 0.04 내지 0.05% (w/v)의 양으로 사용하여 상기 변이체를 제형화함으로써 이를 미소유제로서 제조할 수 있다.

추가된 담체에는 미소캡슐형 입자와 주입 가능한 제품의 형성을 포함하는 지속 방출형 제제가 포함된다. 지속 방출형 제제의 예에는, 예를 들면 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들면 필름, 리포솜 또는 미세입자 형태이다. 지속 방출형 VEGF 변이체 조성물을 제조하기 위해서는 VEGF 변이체를 생분해가능한 매트릭스 또는 미소캡슐에 혼입하는 것이 바람직하다. 이러한 목적에 적합한 물질은 폴리락티드이지만, 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988A)와 같은 폴리-(β-히드록시카르복실산)의 기타 중합체를 사용할 수 있다. 기타 생분해가능한 중합체, 예를 들면 폴리(락톤), 폴리(아세탈), 폴리(오르토에스테르) 또는 폴리(오르토카르보네이트)가 또한 적합하다.

지속 방출형 조성물의 예에 대해 다음 문헌을 참조할 수 있다 [미국 특허 제3,773,919호, EP 58,481A, 미국 특허 제3,887,699호, EP 158,277A, 캐나다 특허 제1176565호, Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547 (1983), and Langer et al., *Chem. Tech.*, 12:98 (1982)].

당 업계의 숙련인은, 예를 들면 투여 경로와 투여되는 VEGF 변이체의 농도에 따라서 특정의 담체가 보다 바람직할 수 있다는 것을 명백히 인지할 것이다.

임의의 기타 성분, 예를 들면 산화방지제, 예를 들면 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드, 예를 들면 폴리아르기닌 또는 트리펩티드; 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물 (셀룰로오스 또는 이의 유도체, 글루코오스, 만노오스 또는 덱스트린을 포함함); 킬레이트화제, 예를 들면 EDTA; 및 당 알코올, 예를 들면 만니톨 또는 소르비톨을 가할 수 있다. 부형제, 담체, 안정화제 또는 기타 첨가제를 사용하면, VEGF 변이체의 염이 형성될 수 있다.

담체, 부형제, 안정화제 또는 기타 첨가제를 선택할 때, 선택된 화합물(들) 및 상응하는 분해 생성물은 무독해야 하고 치료된 질환 및/또는 이의 증상을 악화시키는 것을 피해야 한다. 이는 표적 장애의 동물 모델, 또는 이러한 모델을 입수하지 못할 경우에는 정상적인 동물에서 통상적으로 스크리닝함으로써 결정할 수 있다.

치료학적 투여를 위해 사용될 VEGF 변이체는 멸균성이어야 한다. 멸균은 멸균 여과막 (예: 0.2 미크론 막)을 통하여 여과 시킴으로써 용이하게 수행된다. VEGF 변이체는 통상, 동결건조된 형태로 또는 수용액으로서 저장될 것이다. VEGF 변이체 조성물의 pH는 전형적으로 약 5.0 내지 8.0일 것이지만, 몇몇 경우에는 이보다 높거나 낮은 pH값이 적당할 수도 있다.

포유류에 대한 투여는 주사 (예: 정맥내, 복강내, 피하, 근육내)하거나, 또는 효과적인 형태로 혈류에 전달해 주는 흡입 또는 주입과 같은 기타 방법에 의해 수행할 수 있다. VEGF 변이체를 비경구적으로 사용할 경우에는, 이러한 VEGF 변이체를 함유하는 치료학적 조성물을 일반적으로, 멸균성 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들면 피하 주사 바늘에 의해 꿰뚫어질 수 있는 마개가 있는 정맥내 용제용 백 또는 바이알 내에 놓아둔다.

일반적으로, 조건이 허용하는 한, VEGF 변이체를 부위-특이적 전달용으로 제형화하여 투여할 수 있다. 이는 상처와 궤양의 경우에 편리하다.

국소적으로 적용되는 경우, 당해 VEGF 변이체는 담체, 보조액, 안정화제 또는 부형제 등의 첨가제와 조합하는 것이 적당하다. 상기 언급된 바와 같이, VEGF 변이체와 혼합하기 위한 첨가제를 선택할 때, 첨가제는 이들의 의도된 투여를 위해 제약학적으로 허용되어야 하고 효능이 있어야 한다. 추가로, 첨가제는 VEGF 변이체의 활성에 영향을 미치지 말아야 한다. 적합한 국소 제형의 예에는 정제된 콜라겐을 함유하거나 함유하지 않는 연고, 크림, 젤 또는 현탁제가 포함된다. 이 조성물은 바람직하게는 액체 또는 반-액체 형태로, 경피 패치, 플라스터 및 밴디지 내로 함침될 수도 있다.

목적하는 점도를 갖는 젤 제형은 VEGF 변이체를 셀룰로오스 유도체 등의 수용성 폴리사카라이드, 또는 폴리에틸렌 글리콜 등의 합성 중합체와 혼합함으로써 제조할 수 있다. 폴리사카라이드 및 폴리에틸렌 글리콜에 적용된 용어 "수용성"은 콜로이드성 용액 및 분산액을 포함하는 것을 의미한다. 일반적으로, 예를 들면 셀룰로오스 유도체의 용해도는 에테르기의 치환도에 의해 결정되고, 본원에 유용한 안정화 유도체는 셀룰로오스 사슬 내의 안히드로글루코오스 단위 당 충분한 양의 상기 에테르기를 함유하여 상기 유도체가 수용성이 되도록 한다. 안히드로글루코오스 단위 당 0.35 이상의 에테르기의 에테르 치환도가 일반적으로 충분하다. 부가적으로, 셀룰로오스 유도체는 알칼리 금속 염, 예를 들면 Li, Na, K, 또는 Cs 염의 형태일 수 있다.

적합한 폴리사카라이드의 예에는, 예를 들면 셀룰로오스 유도체, 예를 들면 알킬 셀룰로오스, 히드록시알킬 셀룰로오스 및 알킬히드록시알킬 셀룰로오스를 포함한 에테르화 셀룰로오스 유도체, 예를 들면 메틸셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 및 히드록시프로필 셀룰로오스; 전분 및 분별화 전분; 한천; 알긴산 및 알기네이트; 아라비아 검; 풀루란; 아가로오스; 카라기난; 덱스트란; 덱스트린; 프락탄; 이눌린; 만난; 크실란; 아라비난; 키토산; 글리코젠; 글루칸; 및 합성 생중합체 뿐만 아니라 크산탄 검, 구아 검, 로커스트 빈 검, 아라비아 검, 트라가칸트 검 및 카라야 검 등의 검; 및 이들의 유도체 및 혼합물이 포함된다. 본원에서 바람직한 겔화제는 생물학적 시스템에 대해 불활성이고, 무독성이며, 제조가 간단하고, 너무 유동성이거나 점성이 아니며, 이들 내에 수용된 VEGF 변이체를 탈안정화시키지 않을 것이다.

폴리사카라이드는 바람직하게는 에테르화 셀룰로오스 유도체이고, 더욱 바람직하게는 널리 규정되고 정제되며 USP에 열거된 것, 예를 들면 메틸셀룰로오스 및 히드록시알킬 셀룰로오스 유도체, 예를 들면 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스 및 히드록시프로필 메틸셀룰로오스이다. 메틸셀룰로오스가 본원에서 가장 바람직하다. 예를 들면, 메틸셀룰로오스를 포함하는 겔 제형은 바람직하게는 겔 밀리리터 당 VEGF 변이체 300 내지 1000 mg과 메틸셀룰로오스 약 2 내지 5%를 포함한다. 보다 바람직하게는, 이러한 겔 제형은 약 3% 메틸셀룰로오스를 포함한다.

겔 제형에 유용한 폴리에틸렌 글리콜은 전형적으로 적당한 점도를 획득하도록 하기 위해 저분자량 폴리에틸렌 글리콜과 고분자량 폴리에틸렌 글리콜의 혼합물이다. 예를 들면, 분자량이 400 내지 600인 폴리에틸렌 글리콜과 분자량이 1500인 것과의 혼합물은, 이들을 페이스트 수득에 적당한 비율로 혼합한 경우에는 상기 목적에 유효할 것이다.

이용된 투여량은 상기 언급된 요인들에 좌우된다. 일반적인 제안으로서, VEGF 변이체를 제형화하여, 효능을 나타내긴 하지만 과도한 독성을 나타내지는 않는 약 0.1 ng/cc를 초과하고 최대 용량 이하인 VEGF 변이체 수준을 표적 부위 또는 조직에서 달성할 수 있는 투여량으로 상기 표적 조직 또는 부위에 전달한다. 이러한 조직내 농도는 가능한 경우, 실험적으로 결정된 횟수의 연속 주입, 지속적 방출, 국소 투여 또는 주사에 의해 유지되어야 한다.

세포 증식과 수복을 증진시키는데 있어서 어떠한 성장 인자 (본래의 VEGF 포함)의 활성을 향상시키기 위하여, 신규하거나 통상적인 기타 요법 (예: 당 업계에 공지된 성장 인자, 예를 들면 aFGF, bFGF, HGF, PDGF, IGF, NGF, 단백 동화 스테로이드, EGF 또는 TGF- $\beta$ )을 당해 VEGF 변이체 요법과 조합하는 것이 본 발명의 영역 내에 속한다. 이러한 공동치료 약물 자체가 본 발명의 조성물 내에 포함될 필요는 없지만, 이러한 약물이 단백질을 함유하는 경우에는 본 발명의 조성물 내에 포함되는 것이 편리할 것이다. 상기 혼합물은, 예를 들면 단독으로 사용된 VEGF 변이체와 동일한 목적 및 방식으로 투여되는 것이 적합하다.

유효 투여량과 투여 스케줄은 실험적으로 결정될 수 있고, 이러한 결정 방법도 당 업계의 숙련인에게 공지되어 있다.

본 발명의 VEGF 변이체는 또한, 진단 방법과 검정에 활용된다. 예를 들면, 당해 VEGF 변이체는 세포 및 조직에서의 KDR 수용체의 발현 또는 존재 여부를 검출하기 위한 진단 검정에 이용될 수 있다. 당 업계에 공지된 각종 진단 검정 기술, 예를 들면 생체 내 영상화 검정, 시험관 내 경쟁적 결합 검정, 직접적 또는 간접적 샌드위치 검정, 및 이종 또는 동종 상으로 수행된 면역침전 검정을 사용할 수 있다. 이러한 검정에 사용된 VEGF 변이체는 검출 가능한 성분으로 표지할 수 있다. 상기 검출 가능한 성분은 검출 가능한 시그날을 직접적으로 또는 간접적으로 생성시킬 수 있어야 한다. 예를 들면, 검출 가능한 성분은  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  또는  $^{125}\text{I}$ 와 같은 방사성 동위원소; 플루오레세인 이소티오시아나이드, 로다민 또는 루시페린과 같은 형광성 또는 화학발광성 화합물; 또는 알칼린 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 양고추냉이 퍼옥시다제와 같은 효소일 수 있다. 당해 VEGF 변이체를 검출 가능한 성분에 접합시키는 것으로 당 업계에 공지된 어떠한 방법도 이용할 수 있다.

VEGF 변이체는 KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체를 재조합 세포 배양물 또는 천연 공급원으로부터 친화 정제하는데 사용될 수도 있다. 이러한 VEGF 변이체는 당 업계에 공지된 방법을 사용하여, 수지 또는 여과지와 같은 적합한 지지체 상에 고정시킬 수 있다. 이어서, 상기하고 같이 고정된 VEGF 변이체를 KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체를 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 이 지지체를, VEGF 변이체에 결합되는 KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체를 제외하고는 샘플 내의 거의 모든 물질을 제거시킬 적합한 용매로 세척한다. 경우에 따라, 상기 지지체를 VEGF 변이체로부터 KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체를 방출시킬 또 다른 적합한 용매로 세척할 수 있다.

#### 4. 제품

제품 및 키트가 본 발명에 의해 추가로 제공된다. 본원에 기재된 질환 치료 또는 진단 검정에 유용한 VEGF 변이체를 함유하는 키트와 같은 제품은 하나 이상의 용기와 표지를 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들면 병, 바이알, 주사기 및 시험관이 포함된다. 이 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 각종 재료로부터 성형될 수 있다. 이 용기는 상기 질환을 진단 또는 치료하는데 유용한 조성물을 보유하며, 멸균성 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 상기 용기는 피하 주사용 바늘에 의해 꿰뚫어질 수 있는 마개가 있는 정맥내 용제용 백 또는 바이알일 수 있다). 상기 조성물 내의 활성제는 VEGF 변이체이다. 용기 상의 또는 용기와 결합된 표지는 해당 조성물이 선택된 질환을 치료하거나 진단할 목적으로 사용된다는 것을 지시해 준다. 이러한 제품은 인산염 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로오스 용액과 같은 제약학적으로 허용되는 완충제를 포함하는 제2의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 그것은 상업적인 측면과 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료 (기타 완충제, 희석제, 충진제, 바늘, 주사기 및 사용 지시 사항이 적힌 포장재를 포함함)를 추가로 포함할 수 있다. 그 제품은 상기 언급된 바와 같은 또 다른 활성제를 갖는 제2 또는 제3의 용기를 포함할 수도 있다.

다음 실시예는 예시 목적으로만 제시된 것이며 어떠한 방식으로든 본 발명의 영역을 제한하지 않는다.

본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참조 문헌은 본원에 그의 전문이 참고로 인용된다.

## 실시예

## 실시예 1

KDR-특이적 VEGF 변이체의 선별

KDR-특이적 변이체를 발생시키기 위하여, Flt-1 결합에 대해서는 중요하지만 KDR 결합에 대해서는 그렇지 않은 것으로 밝혀진 VEGF (1-109)의 잔기가 무작위로 돌연변이된 두 파아지 라이브러리를 작성하였다.

파아지미드 작성

파아지 라이브러리를 작성하기 위하여, VEGF의 잔기 1-109를 코딩하는 cDNA를 갖는 파아지미드 벡터를 먼저 생산하였다. Nsi I/Xba I 제한 단편의 파아지미드 벡터 phGHam-g3 (Genentech, Inc.)에 연이어 연결하게 하는 프라이머를 사용하여 VEGF의 잔기 1-109를 코딩하는 cDNA의 PCR 증폭에 의해 파아지미드 벡터 pB2105 (Genentech, Inc.)를 제조하였다. 이것은 잔기 109 직후에 앰버 코돈을 도입하고 VEGF 1-109 cDNA를 잔기 249 내지 406을 포함하는 gIII의 C-말단 절반에 융합시켰다.

한 라이브러리에서는, VEGF 1-109에 대해 18, 21, 22 및 25번 위치에서 (표적 코돈을 NNS 서열 (여기서, N=G, A, T 또는 C이고, S=C 또는 G임)로 변화시킨 올리고뉴클레오타이드를 사용하여) 모든 가능한 잔기 배합이 허용되었고 17번 위치에 대해서는 40% 확률로 (표적 코돈에서 각 염기에 대해 3가지의 다른 염기형 각각의 10% 확률 및 야생형의 70% 확률을 집행시켜) 변화가 허용되었다.

다음 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 표적 코돈을 NNS 서열로 변화시켰다.

L-528: CAC GAA GTG AAG TTC NNS GAT GTC NNS NNS CGC AGC NNS TGC CAT CCA ATC GAG (서열 번호 1)

L-530: GGG GGC TGC TGC AAT NNS GAG NNS NNS GAG TGT GTG CCC ACT (서열 번호 2).

두번째 라이브러리에서는, VEGF 1-109에 대해 63, 65 및 66번 위치에서 모든 가능한 잔기 배합이 허용되었고 64번 위치에 대해서는 40% 확률로 변화가 허용되었다.

세번째 라이브러리에서는, VEGF (1-109)에 대해 47 및 48번 위치에서 모든 가능한 잔기 배합이 허용되었고 43 및 46번 위치에 대해서는 50% 확률로 변화가 허용되었다. 네번째 라이브러리에서는, VEGF (1-109)에 대해 63, 65 및 66번 위치에서 모든 가능한 잔기 배합이 허용되었고 64번 위치에 대해서는 50% 확률로 변화가 허용되었다.

KDR 선택적 변이체를 발생시키기 위하여, 돌연변이된 영역을 나타낸 바와 같이 5개의 그룹으로 나누고, 처음 4개를 다음의 파아지 디스플레이 선별을 위한 라이브러리를 작성하는데 사용하였다. 별표 (\*)가 표시된 잔기는 야생형 쪽으로 50% 치우치도록 "가볍게 무작위화"한 것이고, 별표 2개가 표시된 잔기는 "엄격히 무작위화"한 것이다 (아래 도 7 참조).

헤테로두가닥 사슬 DNA의 합성

헤테로두가닥 사슬 DNA를 문헌 [Kunkel et al., Meth. Enzym. 204:125-139 (1991)]으로부터 변형된 절차에 따라서 합성하였다. 이 방법을 통하여, 변이유발 올리고뉴클레오타이드를 생물학적으로 활성이 있는, 공유적으로 폐쇄된 환형 DNA (CCC-DNA) 분자에 혼입시켰다. 그 절차를 다음 단계에 따라서 수행하였다.

먼저, 상기한 올리고뉴클레오타이드는 5'-인산화되었다. 에펜도르프 관에서 2  $\mu$ g 올리고뉴클레오타이드, 2  $\mu$ l 10x TM 완충액 (500 mM 트리스-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5), 2  $\mu$ l 10 mM ATP 및 1  $\mu$ l 100 mM DTT를 배합시키고 총 부피가 20  $\mu$ l가 될 때 까지 물을 첨가하여 위의 반응을 수행하였다. T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 20 단위 (Weiss 단위)를 그 혼합물에 첨가하고 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다.

다음에, 각 5'-인산화된 올리고뉴클레오타이드를 파아지미드 주형 (dut-/ung- 이. 콜리 균주 CJ-236으로부터 정제된 단일 가닥 DNA)에 어닐링시켰다. 1  $\mu$ g 단일 가닥 DNA 주형, 0.12  $\mu$ g 인산화된 올리고뉴클레오타이드 및 2.5  $\mu$ l 10x TM 완충액 (500 mM 트리스-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5)을 배합시키고 총 부피가 25  $\mu$ l가 될 때 까지 물을 첨가하여 어닐링을 수행하였다. 그 DNA 양은 올리고뉴클레오타이드 대 주형의 길이 비가 1:100이라면 3:1의 올리고뉴클레오타이드 대 주형 몰비를 제공하였다. 그 혼합물을 90 °C에서 2분 동안 인큐베이션시키고, 그후에 50 °C에서 3분 동안 인큐베이션시키고 그후에 20 °C에서 5분 동안 인큐베이션시켰다.

그후에, 각각의 5'-인산화된 올리고뉴클레오타이드를 효소적으로 연장시키고 연결하여 다음 시약을 어닐링된 혼합물에 첨가하여 CCC-DNA 분자를 형성하였다: 1  $\mu$ l 10 mM ATP, 1  $\mu$ l 25 mM dNTPs, 1.5  $\mu$ l 100 mM DTT, 3 단위 T4 DNA 리가제 및 3 단위 T4 DNA 폴리머라제. 그후에, 혼합물을 20 °C에서 3시간 이상 동안 인큐베이션시켰다.

DNA를 에탄올 침전에 의해 정제하고 물 15  $\mu$ l에 재현탁시켰다.

#### 이. 콜리 전기천공법

이. 콜리 XL1-블루 (Stratagene, LaJolla, CA)로서 알려진 이. 콜리의 억제인자 균주에서 이. 콜리 전기천공법에 의해 라이브러리 파아지를 생산하였다. 전기천공을 위하여, 정제된 헤테로두가닥 사슬 DNA를 먼저 얼음 위의 0.2-cm 간격 전기천공 큐벳에서 냉각시키고, 전기경쟁 이. 콜리 XL1-블루의 100  $\mu$ l 등분량을 얼음 위에서 해동시켰다. 이. 콜리 세포를 DNA에 첨가하고 수회 피펫팅하여 혼합하였다.

혼합물을 큐벳에 옮기고 다음 셋팅: 2.5 kV 필드 강도, 200 ohms 저항 및 25 mF 용량으로 진 펄서 (Gene Pulser (Bio-rad, Hercules, CA))를 사용하여 전기천공시켰다. 직후에, SOC 배지 1 ml (5 g 박토-효모 추출물, 20 g 박토-트립톤, 0.5 g NaCl, 0.2 g KCl; 1 리터까지 물을 첨가하고 NaOH로 pH 7.0으로 조정함; 압열멸균됨; 그후에 압열멸균된 2 M MgCl<sub>2</sub> 5 mL 및 필터 멸균된 1 M 글루코오스를 첨가함)를 첨가하고 혼합물을 멸균 배양관에 옮기고 37 °C에서 진탕시키며 30분 동안 성장시켰다.

라이브러리 다양성을 확인하기 위하여, 계열 희석액을 2YT (10 g 박토-효모 추출물, 16 g 박토-트립톤, 5 g NaCl; 1 리터까지 물을 첨가하고 NaOH로 pH 7.0로 조정함; 압열멸균됨) 평판 (50  $\mu$ g/ml 암피실린으로 보충됨) 상에서 평판배양시켰다. 또한, 25 ml 2YT, 25 mg/ml 암피실린, M13-VCS (10<sup>10</sup> pfu/mL) (Stratagene, LaJolla, CA)를 함유하는 250 ml 배플 플라스크에 옮기고 37 °C에서 진탕시키며 밤새 성장시켰다.

그후에, 배양물을 소르발 (Sorvall) GSA 로터 (16000 g)에서 10 krpm, 2 °C에서 10분 동안 원심분리시켰다. 상등액을 새로운 관에 옮기고 1/5 부피의 PEG/NaCl 용액 (200 g/L PEG-8000, 146 g/L NaCl; 압열멸균됨)을 첨가하여 파아지를 침전시켰다. 상등액/PEG-NaCl 용액을 실온에서 5분 동안 인큐베이션시키고 다시 원심분리시켜 파아지 펠릿을 얻었다.

상등액을 따라내고 폐기시켰다. 파아지 펠릿을 간단하게 재원심분리시키고 남아있는 상등액을 제거하고 폐기시켰다. 파아지 펠릿을 PBT 완충액 (PBS, 0.2% BSA, 0.1% 트윈 20)의 1/20 부피에 재현탁시키고, SS-34 로터 (27000 g)에서 15 krpm, 2 °C로 5분 동안 재현탁된 펠릿을 원심분리시켜 불용물을 제거하고 폐기하였다. 남아있는 상등액은 파아지를 함유하였다.

상등액을 남겨두어 그의 결합 친화도에 의해 VEGF 변이체를 분류하는데 사용하였다. 이. 콜리의 억제 균주에서 파아지를 생산함으로써 VEGF (1-109) 변이체-gIII 융합 단백질을 파아지 표면 상에서 발현시키고 표시하여 그 결과 파아지가 KDR 및(또는) Flt-1 수용체에 결합하게 하였다.

#### 라이브러리의 친화성 분류

각 라이브러리를 수용체 선택적 변이체를 발생시키는데 유용한 것으로 밝혀진, 문헌 [H. Jin, J. Clin. Invest., 98: 969 (1996)]에 기재된 방법과 유사한 경쟁 결합 기술을 이용하여 KDR (1-3) 단량체에 대한 결합에 대해 분류하였다.

경쟁 결합 기술을 수행하기 위하여, 각 라이브러리를 용액 중의 고농도 (100 nM)의 경쟁 Flt-1 (1-3) 단량체 (Genentech, Inc.)의 존재하에 고정된 KDR (1-3) 단량체 (Genentech, South San Francisco, California)에 대한 결합에 대해 분류하였다. 먼저 맥시소프스 이뮤노플레이트 웰 (Nalge Nunc International, Rochester, New York)을 웰 당 80  $\mu$ l

의 코팅 완충액 (pH 9.6에서 50 mM 탄산 나트륨) 중의 KDR (1-3) 단량체 ( $2-5 \mu\text{g/ml}$ )로 코팅하고 4 °C에서 밤새 인큐베이션시켜 이를 수행하였다. 요구되는 웰의 수는 라이브러리의 다양성에 좌우된다. 코팅액을 제거하고 PBS 중의 0.2% BSA 200  $\mu\text{l}$ 로 1시간 동안 차단하였다. 동시에, 동일한 수의 비코팅된 웰을 음성 대조군으로서 차단하였다.

웰을 PT 완충액 (PBS, 0.05% 트윈 20)으로 8회 세척하여 차단 완충액을 제거하였다. 그후에, PBT 완충액 (PBS, 0.2% BSA, 0.1% 트윈 20) 중의 라이브러리 파아지 용액 ( $10^{12}$  파아지/ml) 100  $\mu\text{l}$ 의 등분량을 코팅 및 비코팅된 웰 각각에 첨가하였다. Flt (1-3) 단량체를 파아지 용액과 함께 첨가하였다. 웰을 실온에서 2시간 동안 서서히 진탕시키며 인큐베이션시켰다.

그후에, 웰을 PT 완충액 (PBS, 0.05% 트윈 20)으로 10회 세척하여 파아지 용액 및 임의의 Flt-1 결합 파아지를 제거하였다. 웰을 pH 2 및 실온에서 5분 동안 0.2 mM 글리신 100  $\mu\text{l}$ 와 함께 인큐베이션시켜 웰로부터 KDR-결합된 파아지를 용출시켰다. KDR 결합 파아지를 모으기 위하여, 글리신 용액을 에펜도르프 관에 옮기고 pH 8.0에서 1.0 M 트리스-HCl로 중화시켰다.

그후에, KDR-결합 파아지를 용출된 파아지 용액의 절반을 10 부피의 활발하게 성장하는 이. 콜리 XL1-블루 ( $\text{OD}_{600} < 10$ )에 첨가하고 37 °C에서 30분 동안 진탕시키며 인큐베이션시켜 재증식시켰다. 그후에, 배양액의 계열 희석액을 2YT/amp 평판 (2YT는 50 mg/ml 암피실린으로 보충됨) 상에서 평판배양시켜 용출된 파아지의 수를 확인하였다. KDR (1-3) 단량체로 코팅된 웰 및 비코팅된 대조군 웰 둘다에 대해 이를 확인하였다.

평판으로부터의 배양물을 10 부피의 2YT/amp/VCS (2YT는 50 mg/ml 암피실린 및  $10^{10}$  pfu/ml M13-VCS로 보충됨)에 옮기고 37 °C에서 진탕시키며 밤새 인큐베이션시켰다. 그후에, 파아지를 분리하였다.

재증식된 파아지를 고농도 (100 nM)의 경쟁 Flt-1 (1-3) 단량체의 존재하에 고정된 KDR (1-3) 단량체에 대한 결합에 대해 다시 분류하고, 이어서 Flt-1-결합 파아지를 세척해 내고 KDR 결합 파아지를 재증식시켰다. 친화성 분류 절차를 평균 비를 계산하여 모니터하고 평균 비가 최대 (약 5 내지 6 분류 사이클)에 도달할 때 까지 반복하였다.

평균 비는 KDR (1-3) 단량체로 코팅된 웰로부터 용출된 파아지의 수를 비코팅된 대조군 웰에 대한 파아지 결합 수로 나눈 것이다. 1 보다 큰 비는 일반적으로 KDR (1-3) 단백질에 특이적으로 결합하는 파아지의 지표이며, 따라서 그것은 첨가된 Flt-1 (1-3) 단량체로의 결합에 대한 저항성을 나타내는 것이다. 평균 비가 최대에 도달했을 때, 개개의 클론을 특이적 결합에 대해 분석하였다.

### 파아지 ELISA

표면 상에 VEGF 1-109 변이체-gIII 단백질을 갖는 파아지의 KDR (1-3) 단량체에 대한 특이적 결합을 문헌 [Muller et al., PNAS, 94: 7192 (1997)]에 따라 파아지 ELISA를 이용하여 측정하였다. 파아지 ELISA를 위해, 마이크로타이터 평판 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York)을 pH 9.6에서 50 mM 탄산 나트륨 중의 정제된 KDR (1-3) 단량체 또는 Flt-1 (1-3) 단량체 ( $5 \mu\text{g/ml}$ )로 코팅하고 4 °C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 평판을 0.5% BSA로 차단시켰다. 다음에, 경쟁 수용체 (KDR (1-3) 단량체 또는 Flt-1 (1-3) 단량체)의 부포화 농축액과 함께 VEGF 1-109 변이체의 계열 희석액을 결합 완충액 (PBS, 0.5% 트윈 20, 0.5% BSA) 100  $\mu\text{l}$  중의 웰에 첨가하였다. 제조업자의 지시에 따라서, 평형화 후에, 평판을 세척하고, 결합 파아지미드를 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 항-M13 항체 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)로 염색시켰다. 친화성 ( $\text{EC}_{50}$ )을 반-최대 파아지미드 결합에 이르게 하는 경쟁 수용체의 농도로서 계산하였다.

친화도 분류로부터 얻은 것이며 Flt-1 (1-3) 단량체에 대한 저항성을 나타내는 VEGF 1-109 변이체의 서열을 파아지미드 cDNA의 서열로부터 결정하였다.

### VEGF 1-109 변이체의 정제

VEGF 1-109 변이체 단백질을 이. 콜리 (27c7)의 진탕 플라스크 배양으로부터 퇴출체로서 분리하였다. 돌연변이 단백질의 재폴딩을 문헌 [Yihai et al., J. Biol. Chem., 271:3154-3162 (1996)]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 변이체를 혼합하고 pH 6에서 6 M 구아니딘 HCl + 1 mM 산화된 글루타티온으로 비폴딩시키고, pH 8에서 10시간 동안 20 mM 트리스-HCl 중의 2 mM 환원된 글루타티온 및 0.5 mM 산화된 글루타티온으로 2 M 우레아 10 부피에 대해 투석하였다. 4 °C에



서 밤새 20 mM 트리스-HCl (pH 8) 20 부피에 대해 서서히 투석하여 우레아를 제거하였다. 각 변이체를 음이온 교환 (Pharmacia HiTrap Q, 1 mL) (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 의해 더 정제하여 극미량의 미스폴딩된 단량체를 제거하였다. 결과의 순수한 변이체의 동일성을 SDS-PAGE 및 질량분광법에 의해 확인하였다.

표 2는 VEGF 변이체 식별명, 도입된 아미노산 치환 및 각각의 치환된 아미노산을 코딩하는 코돈을 나타낸다. 특정의 변이체 식별명 다음의 별표 (\*)는 특별하게 바람직한 결합 친화성 및(또는) 생물학적 활성을 나타내는 각종 VEGF 변이체를 나타낸다. "s" (예를 들면, LK-VRB-1s)를 포함하는 변이체 식별명은 VEGF의 1-109 절단 형태로 이루어지며 표에 제공된 인용된 돌연변이를 함유한 VEGF 변이체 폴리펩티드를 나타낸다. "f" (예를 들면, LK-VRB-1f)를 포함하는 변이체 식별명은 VEGF의 완전 길이 1-165 형태로 이루어지며 표에 제공된 인용된 돌연변이를 함유한 VEGF 변이체 폴리펩티드를 나타낸다. 변이체 서열 내의 돌연변이의 명명 및 동정은 명명 협약에 따른 것이다. 예를 들면, 표 2에서 첫번째 기입의 경우에, 돌연변이는 "M18E"로서 불리운다. 이것은 본래의 VEGF 서열의 18번 위치가 (문헌 (Leung et al., 상기 참조 및 Houck et al., 상기 참조)에 보고된 바와 같이 본래의 사람 VEGF에 대한 아미노산 서열에서의 번호매김을 이용함) 돌연변이되어 그 위치에 있는 본래의 메티오닌 (M)이 글루탐산 (E) 잔기로 치환되어 VEGF 변이체를 제조하게 되는 것을 의미한다. "뉴클레오타이드 서열"로서 불리우는 표 2에 있는 컬럼은 각각의 아미노산 돌연변이 각각을 코딩하는 각각의 코돈을 제공한다. 예를 들면, 표 2에서 첫번째 기입의 경우에, M18E 돌연변이는 코돈 "GAG"에 의해 코딩된다.

**[표 2]**  
VEGF 변이체 및 해당하는 돌연변이

변이체 식별명	아미노산 돌연변이	뉴클레오타이드 서열
LK-VRB-1s*	M18E/Y21L/Q22R/Y25S	GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-2s*	D63S/G65M/L66R	AGC/ATG/CGC
LK-VRB-3s	F17I/M18E/Y21F/Q22K/Y25S	ATT/GAG/TTC/AAG/AGC
LK-VRB-4s	F17I/M18E/Y21F/Q22E/Y25I	ATC/GAG/TTC/GAG/CAC
LK-VRB-5s	D63S/L66R	AAG/CAG
LK-VRB-6s	D63S/G65A/L66T	AAG/GGC/ATG
LK-VRB-7s*	M18E/D63S/G65M/L66R	GAG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-8s*	Y21L/D63S/G65M/L66R	CTC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-9s	Q22R/D63S/G65M/L66R	CGG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-10s	Y25S/D63S/G65M/L66R	AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-11s	M18E/Y21L/D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-12s	M18E/Q22R/D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-13s	M18E/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-14s	Y21L/Q22R/D63S/G65M/L66R	CTC/CGG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-15s	Y21L/Y25S/D63S/G65M/L66R	CTC/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-16s	Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-17s	M18E/Y21L/Q22R/D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/GAG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-18s	M18E/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-19s	M18E/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-20s	Y21L/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	CTC/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-21s	D63S/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-22s	G65M/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	ATG/GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-23s	L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	AGG/GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-24s	D63S/G65M/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/ATG/GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-25s	D63S/L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/AGG/GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-26s	G65M/L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	ATG/AGG/GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-27s	M18E/Y21L/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-1f	M18E/Y21L/Q22R/Y25S	GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-2f	D63S/G65M/L66R	AGC/ATG/CGC

KDR 수용체에 대한 VEGF 변이체의 결합

KDR 수용체에 대한 바이오티닐화된 본래의 VEGF (8-109)의 결합을 억제하는 변이체의 능력을 측정하여 KDR 수용체에 대한 VEGF (1-109) 변이체 및 VEGF 165 변이체 (실시예 1에 기재됨)의 결합을 평가하였다. 평가된 VEGF 변이체는 표 2에 나타난 돌연변이를 함유하였다.

수용체 결합 검정을 96-웰 면역평판 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York)에서 수행하였다. 각 웰을 pH 9.6에서 50 mM 탄산염 완충액 중에 MAKD5 (Genentech, South San Francisco, California)로서 알려진 KDR에 대한 모노클로날 항체  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 함유하는 용액  $100 \mu\text{L}$ 로 코팅하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 인큐베이션시켰다. 상등액을 폐기하고, 웰을 세척 완충액 (PBS 중의 0.5% 트윈 20)에서 3회 세척하고, 평판을 실온에서 1시간 동안 차단 완충액 (0.5% BSA, PBS 중의 0.01% 티메로살)으로 차단시켰다 (웰 당  $150 \mu\text{L}$ ). 상등액을 폐기하고 웰을 세척하였다.

계열 희석된 본래의 VEGF (8-109), 본래의 VEGF (1-165), 본래의 VEGF (1-109) 변이체 또는 VEGF 165 변이체 (단량체 중에서  $0.16\text{--}168 \text{ nM}$ )를 검정 완충액 (0.5% BSA, PBS 중의 0.05% 트윈 20)에서 실온에서 2시간 동안 바이오티닐화된 본래의 VEGF (8-109) ( $84 \text{ nM}$ ) 및 KDR (1-3) ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )과 함께 인큐베이션시켰다. 이 혼합물의 등분량 ( $100 \mu\text{L}$ )를 예비 코팅된 마이크로타이타 웰에 첨가하고 평판을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 퍼옥시다제 표지된 스트렙타비딘 ( $0.2 \text{ mg}/\text{mL}$ , Sigma, St. Louis, Missouri)과 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켜 마이크로타이타 평판에 결합된 KDR (1-3) 및 바이오티닐화된 본래의 VEGF의 복합체를 검출하였다. 그후에, 웰을 실온에서 약 10분 동안 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 ( $0.2 \text{ g}/\text{리터}$ ; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)과 함께 인큐베이션시켰다. Vmax 평판 리더 (Molecular Devices, Menlo Park, California) 상에서  $450 \text{ nm}$ 에서의 흡광도를 읽었다.

적정 곡선을 4-파라미터 비선형 회귀 곡선 적합 프로그램 (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania)과 맞추었다. 본래의 VEGF (8-109)의 적정 곡선의 중점 흡광도에 해당하는 VEGF 변이체의 농도를 계산하고 그후에 본래의 VEGF 적정 곡선의 중점 흡광도에 해당하는 본래의 VEGF의 농도로 나누었다 (도 2 참조).

VEGF (1-109) 변이체 및 VEGF 165 변이체에 대해 확인된 결합 친화도를 표 3에 나타내었다. 많은 VEGF 변이체는 본래의 VEGF (8-109)의 결합의 약 2배 안에 드는 KDR 수용체에 대한 결합을 나타내었다.

실시예 3Flt-1 수용체에 대한 VEGF 변이체의 결합

Flt-1 수용체에 대한 바이오티닐화된 본래의 VEGF (8-109)의 결합을 억제하는 변이체의 능력을 측정하여 Flt-1 수용체에 대한 VEGF (1-109) 변이체 및 VEGF 165 변이체 (실시예 1에 기재됨)의 결합을 평가하였다. 평가된 VEGF 변이체는 표 2에 나타난 돌연변이를 함유하였다.

수용체 결합 검정을 96-웰 면역평판 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York)에서 수행하였다. 각 웰을 pH 9.6에서 50 mM 탄산염 완충액 중에 사람 IgG Fc에 대한 토끼 F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania)  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 함유하는 용액  $100 \mu\text{L}$ 로 코팅하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 인큐베이션시켰다. 그후에, 상등액을 폐기하고, 웰을 세척 완충액 (PBS 중의 0.5% 트윈 20)에서 3회 세척하고, 평판을 실온에서 1시간 동안 차단 완충액 (0.5% BSA, PBS 중의 0.01% 티메로살)으로 차단시켰다 (웰 당  $150 \mu\text{L}$ ). 상등액을 폐기하고 웰을 세척하였다.

웰을 검정 완충액 (0.5% BSA, PBS 중의 0.05% 트윈 20) 중에  $50 \text{ ng}/\text{mL}$ 로 Flt-IgG (키메라 Flt-사람 Fc 분자)를 함유하는 용액  $100 \mu\text{L}$ 로 채웠다. 웰을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시키고 그후에 세척 완충액 (PBS 중의 0.05% 트윈 20)에서 3회 세척하였다.

계열 희석된 본래의 VEGF (8-109), 본래의 VEGF 165, 본래의 VEGF (1-109) 변이체 또는 VEGF 165 변이체 (단량체 중에서  $0.03\text{--}33 \text{ nM}$ )를 바이오티닐화된 본래의 VEGF (8-109) ( $0.21 \text{ nM}$ ) 또는 바이오티닐화된 본래의 VEGF 165 ( $0.66 \text{ nM}$ )와 혼합하였다. 이 혼합물의 등분량 ( $100 \mu\text{L}$ )를 예비 코팅된 마이크로타이타 웰에 첨가하고 평판을 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 퍼옥시다제 표지된 스트렙타비딘 ( $0.2 \text{ mg}/\text{mL}$ , Sigma, St. Louis, Missouri)과 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켜 마이크로타이타 평판에 결합된 Flt-IgG 및 바이오티닐화된 본래의 VEGF의 복합체를 검출하

였다. 그후에, 웰을 실온에서 약 10분 동안 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (0.2 g/리터; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)과 함께 인큐베이션시켰다. Vmax 평판 리더 (Molecular Devices, Menlo Park, California) 상에서 450 nm에서의 흡광도를 읽었다.

적정 곡선을 4-파라메터 비선형 회귀 곡선 적합 프로그램 (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania)과 맞추었다. 본래의 VEGF (8-109)의 적정 곡선의 중점 흡광도에 해당하는 VEGF 변이체의 농도를 계산하고 그후에 본래의 VEGF 적정 곡선의 중점 흡광도에 해당하는 본래의 VEGF의 농도로 나누었다.

VEGF (1-109) 변이체 및 VEGF 165 변이체에 대해 결정된 결합 친화도를 표 3에 나타내었다. 많은 VEGF 변이체는 본래의 VEGF (8-109)의 결합 보다 2,000배 이상 더 적은 Flt-1 수용체에 대한 결합을 나타내었다. 특정 VEGF 변이체 (예를 들어, LK-VRB-7s\* 및 LK-VRB-8s\*)에 대해 표 3에 보고된 Flt-1 수용체에 대한 상대 결합 친화도 데이터는 nM 값으로 보고되지 않았는데, 이는 검출 가능한 결합량이 ELISA 검정의 감도 이상이기 때문이다.

**[표 3]**  
**KDR 수용체 및 FLT-1 수용체에 대한 VEGF 변이체의 결합**

변이체 식별명	상대 결합 친화도	
	KDR 수용체	FLT-1 수용체
LK-VRB-1s*	1 nM/1	2700 nM/6000
LK-VRB-2s*	1 nM/1	>400 nM/>1000
LK-VRB-3s	1 nM/1	170 nM/400
LK-VRB-4s	1 nM/1	100 nM/200
LK-VRB-5s	1 nM/1	233 nM/550
LK-VRB-6s	0.5 nM/0.5	4 nM/10
LK-VRB-7s*	1 nM/1	/>15000
LK-VRB-8s*	0.5 nM/0.5	/>21000
LK-VRB-9s	0.5 nM/0.5	/300
LK-VRB-10s	0.5 nM/0.5	/>2400
LK-VRB-11s	2 nM/2	/>14000
LK-VRB-12s	0.4 nM/0.4	/>5600
LK-VRB-13s	14 nM/14	/>14000
LK-VRB-14s	0.5 nM/0.5	/>2900
LK-VRB-15s	2 nM/2	/>21000
LK-VRB-16s	0.6 nM/0.6	/>1400
LK-VRB-17s	3 nM/3	/>1900
LK-VRB-18s	130 nM/130	/>3900
LK-VRB-19s	7 nM/7	/>35000
LK-VRB-20s	2 nM/2	/>10000
LK-VRB-21s	3 nM/3	/>5600
LK-VRB-22s	4 nM/4	/>30
LK-VRB-23s	11 nM/11	/>8500
LK-VRB-24s	10 nM/10	/>18000
LK-VRB-25s	4 nM/4	/>12000
LK-VRB-26s	23 nM/23	/>25000
LK-VRB-2f	1 nM/1	19 nM/70
비교용의 본래의 VEGF (8-109)	1 nM/1	0.42 nM/1

#### 실시예 4

#### VEGF (1-109) 변이체에 의한 KDR 수용체 인산화의 유도

VEGF 변이체의 활성을 결정하기 위하여, KDR 수용체의 인산화를 유도하는 변이체의 능력을 KIRA 검정법으로 측정하였다. 평가된 VEGF 변이체는 표 2에 있는 돌연변이를 함유하였다. 상세하게는, 다음 VEGF (1-109) 변이체를 연구하였다: LK-VRB-1s\*; LK-VRB-2s\*; LK-VRB-3s; LK-VRB-4s; LK-VRB-5s; 및 LK-VRB-6s.

계열 희석된 VEGF (1-109) 변이체 (0.01-10 nM)를 N-말단에서 gD 태그를 가진 KDR 수용체를 발현하는 CHO 세포에 첨가하였다. 세포를 pH 7.2에서 0.5% 트리톤-X100, 150 mM NaCl, 50 mM Hepes에 의해 용해시키고, 용해질 내의 인산화된 gD-KDR 수용체를 ELISA를 수행하여 정량화하였다.

ELISA를 위하여, 96-웰 면역평판 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York)을 사용하였다. 각 웰을 pH 9.6에서 50 mM 탄산염 완충액 중에 3C8 (Genentech, South San Francisco, California)로서 알려진 gD에 대한 마우스 모노클로날 항체 1 µg/ml를 함유하는 용액 100 µl로 코팅하고 4 °C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 상등액을 폐기하고, 웰을 세척 완충액 (PBS 중의 0.5% 트윈 20)에서 3회 세척하고, 평판을 실온에서 1시간 동안 차단 완충액 (0.5% BSA, PBS 중의 0.01% 티메로살)에서 차단시켰다 (웰 당 150 µl). 상등액을 폐기하고 웰을 세척하였다.

용해질의 등분량 (100 µl)를 예비 코팅된 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 4G10 (0.05 mg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York)으로서 알려진 포스포티로신에 대한 바이오티닐화 모노클로날 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서 그 웰을 폐색시다제 표지된 스트렙타비딘 (0.2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri)과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켜 인산화된 gD-KDR 수용체를 검출하였다. 그후에, 웰을 실온에서 약 15-20분 동안 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (0.2 g/리터; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)과 함께 인큐베이션시켰다. Vmax 평판 리더 (Molecular Devices, Menlo Park, California) 상에서 450 nm에서의 흡광도를 읽었다.

적정 곡선을 4-파라미터 비선형 회귀 곡선 적합 프로그램 (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania)과 맞추었다. 본래의 VEGF (8-109)의 적정 곡선의 중점 흡광도에 해당하는 VEGF 변이체의 농도를 계산하고 본래의 VEGF 적정 곡선의 중점 흡광도에 해당하는 본래의 VEGF의 농도로 나누었다 (도 3 참조).

VEGF 변이체의 인산화 유도 활성이 표 4에 제공되어 있다. VEGF 변이체는 일반적으로 본래의 VEGF (8-109)의 활성의 2배 안에 드는 인산화 유도 활성을 나타내었다.

**【표 4】**  
VEGF (1-109) 변이체에 의한 KDR 수용체 인산화의 유도

변이체 식별명	인산화 유도 활성
LK-VRB-1s*	1 nM/0.5
LK-VRB-2s*	2 nM/1
LK-VRB-3s	2 nM/1
LK-VRB-4s	1 nM/0.5
LK-VRB-5s	1 nM/0.5
LK-VRB-6s	1 nM/0.5
비교용의 본래의 VEGF (8-109)	2 nM/1

#### 실시예 5

##### 내피 세포 증식 검정법

VEGF (1-109) 또는 VEGF 165 변이체 (뿐만 아니라 한 VEGF 165 변이체인 LK-VRB-2f)의 분열촉진 활성을 표적 세포로서 사람 제대 정맥 내피 세포 (HUVEC) (Cell Systems, Kirkland, Washington)을 사용하여 확인하였다. 평가된 VEGF 변이체는 표 2에서의 돌연변이를 함유하였다. 상세하게는, 다음 VEGF (1-109) 변이체를 연구하였다: LK-VRB-1s\*; LK-VRB-2s\*; 및 LK-VRB-8s\*.

HUVEC는 CS-C 완전 성장 배지 (Cell Systems, Kirkland, Washington) 중의 산성 FGF와 같은 성장 인자와 함께 유지되어 성장되는 주요 세포주이다. 검정을 준비하기 위하여, 초기 계대 접종 (5 계대 접종 미만) 세포를 세척하고 96-웰 평판에 접종하고 (웰 당 100  $\mu$ l 중에 3000 세포) 임의의 성장 인자는 없지만 2% 디아필터드 태아 소 혈청 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD)으로 보충된 CS-C 배지에서 새로운 절식 배지로 대체하기 전에 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 의해 37 °C에서 24시간 동안 절식시켰다. 동일한 절식 배지에 희석된 여러가지 농도의 VEGF 변이체를 웰에 첨가하여 부피를 웰 당 150  $\mu$ l로 만들고 18시간 동안 인큐베이션시켰다.

VEGF 변이체에 의해 유도된 DNA 합성을 측정하기 위하여, <sup>3</sup>H-티미딘 (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)을 웰 당 0.5  $\mu$ Ci로 각 웰에 첨가하고, 24시간 더 인큐베이션시켜 세포가 방사성을 갖도록 하였다. 그후에, 세포를 다른 96-웰 필터 플레이트 상에 수거하고 탐카운트 (Topcount)(Packard, Meriden, Connecticut) 상에 평판을 부하하기 전에 과량의 표지를 씻어내었다.

세포를 탐카운트에 의해 계수하였다. 분 당 측정된 수 (CPM)를 개개의 변이체의 농도에 대해 플롯팅하여 그의 활성을 비교하였다 (도 4).

VEGF 변이체의 세포 증식 능력은 표 5에 나타내었다. VEGF 변이체는 일반적으로 본래의 VEGF (8-109)의 세포 증식 가능성의 2배 안에 드는 세포 증식 가능성을 나타내었다.

**【표 5】**  
VEGF (1-109) 변이체의 분열촉진 활성

변이체 식별명	내피 세포 증식 활성
LK-VRB-1s*	0.1 nM/0.2
LK-VRB-2s*	0.05 nM/0.1
LK-VRB-7s*	0.5 nM/1
LK-VRB-8s*	0.5 nM/1
LK-VRB-2f	0.05 nM/0.1
비교용의 본래의 VEGF (8-109)	0.5 nM/1

#### 실시예 6

##### KDR 및 FLT-1 수용체에 대한 VEGF 변이체의 결합을 확인하기 위한 RIA 검정

본질적으로 문헌 [Muller et al., PNAS, 94:7192-7197 (1997)]에 기재된 바와 같이 RIA 검정을 수행하여 본래의 VEGF 165 또는 본래의 VEGF (8-109)와 비교한, KDR 수용체 및 FLT-1 수용체에 대한 몇가지 VEGF 변이체 (표 2에 기재됨)의 상대 결합 친화도를 시험하였다.

**【표 6】**

상대 결합 친화도		
변이체 식별명	KDR 수용체	FLT-1 수용체
본래의 VEGF 165	1 (97 pM)	1 (37 pM)
본래의 VEGF (8-109)	12	29
LK-VRB-1f	8	1700
LK-VRB-1s*	20	14,000
LK-VRB-2f	1	2400
LK-VRB-2s*	2	27,000

실시예 7KDR- 또는 FLT-1- 형질감염된 세포에 대한 VEGF 변이체의 결합

LK-VRB-2s\* (실시예 1, 표 2 참조)의 결합 특성을 수용체-형질감염된 세포 결합 검정으로 더 시험하였다. KDR 또는 Flt-1 형질감염된 NIH3T3 세포를 문헌 [Fuh et al., J. Biol. Chem., 273:11187-11204 (1998)]에 기재된 바와 같이 제조하였다. 형질감염된 세포를 10% FBS 및 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 (GibcoBRL)로 보충된 F12 배지에서 유지하였다. 결합 검정을 위하여, 세포를 12-웰 평판에  $1 \times 10^6$ /웰로 평판 배양시킨 결과 다음날 전면 생장에 도달하였다. 그후에, 세포를 세척하고  $^{125}\text{I}$ -VEGF (1-109) (표준 클로라민-T 방법에 의해 제조됨)를 첨가하고 비표지된 VEGF 변이체의 농도를 증가시키기 전에 1시간 동안 1% BSA를 가진 헵스 완충 염수 (HBS)에서 차단시켰다. 50 pM 및 10 pM의 표지된 VEGF (1-109)를 각각 KDR 및 Flt-1 세포 결합에 사용하였다. 평판을 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 인큐베이션시키고 그후에 0.5% BSA를 가진 HBS로 2회 세척하였다. 세척된 세포를 1N NaOH로 가용화하여 결합, 표지된 VEGF를 모으고, 그후에 감마-카운터 (Isodata, ICN)로 계수하였다.

도 5에 나타난 바와 같이, LK-VRB-2s\*는 본래의 VEGF 결합과 유사한 KDR을 발현하는 형질감염된 세포에 대한 결합을 나타내었다. 그러나, LK-VRB-2s\*는 Flt-1로 형질감염된 세포에 대한 약 200배 감소된 결합을 나타내었다 (도 6 참조).

실시예 8Flt-1 특이적 VEGF 변이체의 발생 및 선별

알라닌 스캔 (Wells, Methods Enzymol., 202:390-411 (1991))을 이용하여 개개의 VEGF 잔기의 KDR 대 Flt-1 결합에 대한 상대적 중요성을 정의하였다. 변이유발을 위해 선택된 잔기는 VEGF의 수용체 결합 도메인 및 Flt-1의 도메인 2 사이의 복합체의 결정 구조에서 관찰된 22개의 접촉 잔기 뿐만 아니라 KDR 결합 결정자로서 이미 확인된 Phe 47 및 Glu 64를 포함하였다 [Muller et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:7192-7197 (1997)]. 부위 지시된 변이유발을 VEGF의 수용체 결합 도메인 (잔기 1 내지 109)의 배경에서 문헌 [Kunkel et al., Methods Enzymol., 204:125-139 (1991)]에 기재된 방법을 이용하여 수행하였다. 모든 돌연변이를 DNA 서열화에 의해 입증하였다. 다음 VEGF 잔기가 개별적으로 알라닌으로 돌연변이되었다: Lys 16, Phe 17, Met 18, Tyr 21, Gln 22, Tyr 25, Ile 43, Ile 46, Phe 47, Lys 48, Asp 63, Glu 64, Gly 65, Leu 66, Gln 79, Met 81, Ile 83, His 86, Gln 89, Ile 91, Lys 101, Glu 103, Arg 105, Pro 106. 이들 잔기는 VEGF의 수용체 결합 도메인의 배경 하에 개별적으로 알라닌으로 돌연변이되었다 [잔기 1 내지 109: Keyt et al., J. Biol. Chem., 271:7788-7795 (1996); Muller et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:7192-7197 (1997)].

각 돌연변이 단백질은 제조하여 균질성으로 정제하고, 효소 결합된 면역흡착 검정 (ELISA)을 이용하여 KDR 및 Flt-1의 도메인 1 내지 3에 대한 결합 친화도를 확인하였다 [이들 세 도메인은 전체 VEGF 결합 부위를 함유한다; Wiesmann et al., Cell, 91:695-704 (1997); Fuh et al., J. Biol. Chem., 273:11197-11204 (1998)]. ELISA를 위하여, 마이크로타이터 평판을 50 mM 탄산 나트륨 (pH 9.6) 중의 정제된 VEGF (8-109)로 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로) 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 코팅하였다. 평판을 0.5% BSA로 차단하고, 경쟁 VEGF 알라닌 돌연변이체 및 부포화 농도 (100 pM)의 비오틴-표지된 수용체 (KDR(1-3) 또는 Flt1(1-3))의 계열 희석액을 결합 완충액 (0.5% 트윈 20, PBS 중의 0.5% BSA) 100  $\mu\text{l}$  중의 웰에 첨가하였다. 1시간 후에, 평판을 세척하고, 결합 단백질을 스트렙타비딘 양고추냉이 퍼옥시다제 접합체 (Pharmacia)로 염색하고 검정하였다. 친화성을 단백질 결합의 50%를 차단한 KDR(1-3) 또는 Flt(1-3)의 농도인  $\text{IC}_{50}$  값으로서 평가하였다.

이 분석 결과를 도 7에 나타내었다. 각 잔기에 대하여, 야생형 단백질에 비해 돌연변이체의 결합의 폴드 감소를 나타내는, 야생형 VEGF (8-109)의  $\text{IC}_{50}$ 에 대한 돌연변이체의  $\text{IC}_{50}$ 의 비가 기록되어 있다. 야생형 VEGF (8-109)에 대한  $\text{IC}_{50}$ 은 괄호 안에 나타내었다. 굵게 나타난 잔기는 Flt-1 선택적 변이체를 발생시키는데 이용하였다.

Flt-1 결합에 대한 VEGF 돌연변이체의 동시 분석은 주로 20s 나선 및 60s 고리에 정위화된 유사하고 중첩되는 수용체 결합 영역을 나타내며, 이때 가장 중요한 Flt-1-결합 결정자는 Phe 17, Tyr 21, Gln 22 및 Leu 66이다 (도 7). 대조적으로, 중대한 Flt-1-결합 결정자의 돌연변이도 또한 KDR에 대한 친화성을 상당히 감소시키는 경향이 있었다 (도 7).

KDR에는 크게 영향을 미치지 않지만 Flt-1 결합에 대해서는 그렇지 않은 4개의 돌연변이를 결합시켜 Flt-1 수용체에 대해 고감도를 가진 VEGF 변이체를 발생시켰다. Ile 43, Ile 46, Gln 79 또는 Ile 83의 알라닌으로의 돌연변이는 이들 잔기의 측



쇄가 KDR에 대한 밀접한 결합에는 결정적이지만 Flt-1-결합에 대해서는 중요하지 않다는 것을 나타내었다. 변이체 ("Flt-sel"로서 본원에 언급됨)를 부위 지시된 변이유발 방법 [Kunkel et al., Methods Enzymol., 204:125-139 (1991)]을 이용하여 위치 Ile 43, Ile 46, Gln 79 및 Ile 83에서 알라닌 치환되도록 제작하였다. 이러한 특별한 Flt-sel 변이체는 상기 실시예 1에 기재된 (또한 표 2에 예시됨) 명명법에 따라 식별명, I43A/I46A/Q79A/I83A에 의해 표시될 수도 있다. 43, 46, 79 및 83번 위치에서의 이들 4개의 알라닌 치환에 대한 해당하는 코돈은 각각 (상기 실시예 1에 기재되고 표 2에 예시된 명명법에 따라) GCC/GCC/GCG/GCC이다.

I43A/I46A/Q79A/I83A Flt-sel 변이체의 특성 및 생물학적 활성을 시험하기 위해 각종 검정을 수행하였다. 예를 들면, 상기 실시예 6에 기재된 바와 같이 가용성 방사-면역 수용체 결합 검정 (RIA)을 이용하여 정량적 결합 측정을 수행하였다. 검정에서, 본래의 VEGF (8-109)는 각각 0.5 nM 및 0.4 nM의 KDR 및 Flt-1에 대한 친화도를 갖는다 (도 8a 및 8b). Flt-sel은 이 검정에서 470배 이상 감소된 KDR 결합 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌다 (도 8a). 약간 놀랍게도, Flt-1-결합의 약간의 감소가 ELISA (상기함)에서 개개의 점 돌연변이로부터 관찰되었기 때문에, Flt-1에 대한 Flt-sel 변이체의 친화도는 천연 단백질의 것과 거의 동일하였다 (도 8b).

Flt-sel 변이체의 활성도 실시예 7에 기재된 3T3 형질감염된 세포 결합 검정에서 시험하였다. RIA 데이터와 일치하게, Flt-sel은 KDR-형질감염된 3T3 세포에 대해서 검출 가능한 결합을 나타내지 않았으며 Flt-1-형질감염된 세포에 대해서는 약간 개선된 결합을 나타내었다 (도 5 및 6).

Flt-sel 변이체의 활성도 실시예 4에 기재된 KIRA 검정에서 시험하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

Flt-sel 변이체의 활성은 실시예 5에 기재된 HUVEC 증식 검정에서 더 시험하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

#### 실시예 9

##### 매트릭스 메탈로프로테아제 9 검정

사람 대동맥 평활근 세포 상에 발현되는 Flt-1의 활성화 이후에 매트릭스 메탈로프로테아제 9의 분비를 측정하는 검정을 수행하였다 [Wang and Keiser, Circ. Res., 83:832-840 (1998)]. 사람 대동맥 평활근 세포 (ASMC) (Clonetics)를 6-웰 폴리스티렌 평판 (Becton-Dickinson) 중의 10% 태아 소 혈청의 존재 하에 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 주위 공기 및 37 °C 하에 SM2 배지 (Clonetics)에서 유지하였다. 세포가 90% 전면 성장되었을 때, 그것은 0.2% 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 무혈청 배지에서 24시간 동안 성장-정지되었다. VEGF (1-109), PlGF (R & D Systems, Minneapolis, MN) 또는 VEGF (1-109) 변이체 (LK-VRB-2s\*) 및 Flt-sel (상기함)을 40 ng/ml의 최종 농도로 첨가하고 세포를 0.2% BSA를 함유하는 무혈청 배지에서 24시간 동안 더 배양하였다. 그후에, 조정 배지 내의 젤라티나제를 자이모그래피에 의해 분석하였다. 배지를 모으고 농축시키고 25 µl 등분량을 환원제 또는 가열 없이 2 x 샘플 완충액과 혼합하였다. 샘플을 전기 영동을 위하여 0.1% 젤라틴을 함유하는 10% 폴리아크릴아미드 겔 (Novex, San Diego, CA) 상에 부하시켰다. 정규 분자량 마커를 사용하는 것 이외에, MMP-2 및 -9 자이모그래프 기준물 (Chemicon, Temecula, CA)을 젤라티나제를 위한 기준물로서 사용하였다. 전기영동 후에, 재생 완충액에서 실온으로 30분 동안 및 발생 완충액 (Novex)에서 37 °C에서 밤새 겔을 인큐베이션시켜 단백질을 재생시켰다. 겔을 0.25% 쿠마시 브릴리언트 블루 (Sigma)로 염색하였다. 젤라티나제 활성화는 탈색 이후에 약하게 염색하거나 또는 투명 밴드로서 확인되었다.

그 결과를 도 11에 나타내었다. 두 독립적인 실험 중의 하나의 대표적인 자이모그램을 나타내었다. 폴드 변화는 VEGF (1-109)-, VEGF(1-109) 변이체- 또는 PlGF-처리된 군 대 비히클-처리된 (PBS) 대조군의 상대 밴드 밀도를 나타낸다. LK-VRB-2s\*와 대조적으로, Flt-sel은 본래의 VEGF (1-109) 또는 PlGF (도 11)의 활성화와 비교할 때 이 검정에서 충분히 활성이 있다.

#### 실시예 10

##### MAP 키나제의 활성화

본래의 VEGF, KDR-선택적 VEGF 변이체 또는 Flt-선택적 VEGF 변이체가 분열촉진성 시그널링을 매개할 수 있는지를 확인하기 위해 검정을 수행하였다.

계대 접종 4-7 HUVEC 세포 (Cell Systems, Kirkland, WA)를 젤라틴 코팅된 접쉬 상에 성장 인자 및 10% 태아 소 혈청을 가진 세포계의 완전 배지 (AZO-500)에서 성장시키고 14시간 동안 0.2% 혈청을 결핍시켜 정지하게 하였다. 정지 HUVEC 세포를 비처리된 채로 두거나 또는 본래의 VEGF (1-165) 또는 VEGF 변이체 (Flt-1 선택적 변이체는 완전 길이 165 서열을 포함하고 상기 실시예 8에서 "짧은 형태" (1-109) Flt-sel에 대해 기재된 알라닌 아미노 치환 I43A/I46A/Q79A/I83A를 함유함); 또는 LK-VRB-2f (실시예 1; 표 2 참조)로서 불리우는 KDR-선택적 변이체 (또한 완전 길이 165 서열을 포함함)로 (50 ng/ml 또는 10 ng/ml의 농도로) 5분 동안 자극시켰다. 본래의 VEGF (1-165) 및 VEGF 변이체는 둘 다 문헌 [Keyt et al., J. Biol. Chem., 271:5638-5646 (1996)]에 기재된 바와 같이 이. 콜리에서 발현되고 정제된다. 그 후에, HUVEC 세포를 0.1 mM 오르토바나듐산 나트륨, 5 mM 파라-니트로페닐포스페이트, 10 mM 플루오르화 나트륨, 0.5 마이크로몰 오카드산 및 프로테아제 억제제 각테일 (Roche MB 1836145)을 함유하는 0.5-1 ml RIPA 완충액에서 용해시켰다. 그후에, 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 항-포스포 ERK 항혈청 (Promega)을 이용하여 인산화된 ERK1 또는 ERK2를 프로빙하였다.

KDR 선택적 VEGF 변이체인 LK-VRB-2f에 의한 활성화는 HUVEC 세포에서의 ERK1 및 ERK2의 인산화를 촉발시켰다 (도 12a). 인산화의 정도는 본래의 VEGF (1-165)를 이용하여 관찰된 것과 구별할 수 없을 정도였다. Flt-1 선택적 VEGF 변이체는 (이용된 최고 농도에서) ERK2의 검출 가능한 인산화를 거의 나타내지 않았다. 이 연구에 이용된 호모다имер VEGF 변이체는 수용체 헤테로다имер 형성을 촉진시키는 것으로 예상되지 않는다. 따라서, Flt-1은 MAP 키나제 활성화에 기여하지 않는다.

VEGF는 응력-활성화된, p38 MAP 키나제를 자극하는 것으로 이미 보고되었다 [Rousseau et al., Oncogene, 15:2169-2177 (1997); Yu et al., J. Cell. Phys., 178:235-246 (1999)]. VEGF 수용체가 관련되어 있는지를 분석하기 위하여, 본래의 VEGF (1-165), Flt-1 선택적 변이체 또는 LK-VRB-2f (상기함)에 의한 자극 후에 p38의 인산화 상태를 검사하였다.

계대 접종 4-7 HUVEC 세포 (Cell Systems, Kirkland, WA)를 젤라틴 코팅된 접쉬 상에 성장 인자 및 10% 태아 소 혈청을 가진 세포계의 완전 배지 (AZO-500)에서 성장시키고 14시간 동안 0.2% 혈청을 결핍시켜 정지하게 하였다. 정지 HUVEC 세포를 비처리된 채로 두거나 또는 본래의 VEGF (1-165) 또는 VEGF 변이체 (Flt-sel (완전 길이 165 형태) 또는 LK-VRB-2f; 둘다 ERK1 및 ERK2 검정에 대해서 상기함)로 (50 ng/ml 또는 10 ng/ml의 농도로) 5분 동안 자극시켰다. 그후에, 세포를 0.1 mM 오르토바나듐산 나트륨, 5 mM 파라-니트로페닐포스페이트, 10 mM 플루오르화 나트륨, 0.5 마이크로몰 오카드산 및 프로테아제 억제제 각테일 (Roche MB 1836145)을 함유하는 0.5-1 ml RIPA 완충액에서 용해시켰다. p38 응력 활성화된 MAP 키나제의 인산화 상태를 항-포스포 p38 특이적 항혈청 (NEB)으로 평가하였다.

도 12b는 KDR-선택적 VEGF 변이체는 p38 인산화를 자극할 수 있음을 입증한다.

#### 실시예 11

##### KDR은 PI 3'-키나제 및 PLC-감마 인산화를 자극한다

PLC-감마 인산화 및 활성화는 VEGF 시그널링에 이미 관련되었다. KDR [Dougher et al., Oncogene, 18:1619-1627 (1999); Cunningham et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 240:635-639 (1997)] 및 Flt-1 [Seetharam et al., Oncogene, 10:135-147 (1995); Sawano et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 238:487-491 (1997); Ito et al., J. Biol. Chem., 273:23410-23418 (1998)] 둘다에 대한 PLC-감마 결합은 보고된 바 있다.

VEGF 수용체(들)이 1차 내피 세포에서의 PLC-감마 활성화에 관련되는지를 확인하기 위하여, HUVEC 세포를 본래의 VEGF 또는 VEGF 수용체-선택적 변이체로 처리하고 PLC-감마 인산화를 면역침전 후에 평가하였다.

계대 접종 4-7 HUVEC 세포 (Cell Systems, Kirkland, WA)를 젤라틴 코팅된 접쉬 상에 성장 인자 및 10% 태아 소 혈청을 가진 세포계의 완전 배지 (AZO-500)에서 성장시키고 14시간 동안 0.2% 혈청을 결핍시켜 정지하게 하였다. 정지 HUVEC 세포를 비처리된 채로 두거나 또는 본래의 VEGF (1-165) 또는 VEGF 변이체 (Flt-sel (완전 길이 165 형태) 또는 LK-VRB-2f; 실시예 10에 상기함)로 (20 ng/ml의 농도로) 5분 동안 자극시켰다. 그후에, 세포를 0.1 mM 오르토바나듐산 나트륨, 5 mM 파라-니트로페닐포스페이트, 10 mM 플루오르화 나트륨, 0.5 마이크로몰 오카드산 및 프로테아제 억제제 각테일 (Roche MB 1836145)을 함유하는 0.5-1 ml RIPA 완충액에서 용해시켰다. 그후에, PLC-감마를 모노클로날 항체 (Upstate Biotechnology)를 이용하는 전세포 용해질로부터 면역침전시키고 티로신 인산화에 대해 분석하거나 (도 13a) 또는 용해질을 p85 PI 3'-키나제에 대한 모노클로날 항체 (Transduction Labs (P13020) 및 Neomarkers (MS424-

P)로부터 구입함)로 면역침전시키고 포스포티로신 항체 PY20 또는 E120H (Transduction Labs)를 이용하여 포스포티로신에 대해 시험하였다 (도 13b). 면역침전을 다음과 같이 수행하였다. 단백질을 A/G 비드 (Pierce)를 50 mM HEPES pH 7.2, 0.1% TX-100, 150 mM NaCl 및 1 mg/ml 오발부민에서 30분 동안 비특이적 단백질을 결합을 차단하였다. 항체를 헤더 오버 말단 회전시키며 4 °C에서 1시간 동안 동일한 완충액에서 미리 결합시키고 비드를 용해 완충액에서 3회 세척하였다. 비드를 용해액에 첨가하고 밤새 회전시켰다. 비드를 50 mM 트리스 pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% TX-100, 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM 트리스 pH 7.6, 500 mM NaCl, 0.1% TX-100, 1 mM CaCl<sub>2</sub> 및 50 mM 트리스 pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% TX-100, 1 mM CaCl<sub>2</sub>에서 순차적으로 세척하였다. 비드를 2x 샘플 완충액에서 재현탁시키고 비등시켰다. 상등액을 4-12% 트리스-글리신 구배 겔 (Novex)에 직접 가하였다.

도 13a에 나타난 바와 같이, 본래의 VEGF 및 KDR-선택적 VEGF 변이체 둘다 PLC-감마 인산화를 비슷한 정도로 자극할 수가 있었다. Flt-1 선택적 VEGF 변이체는 PLC-감마 인산화를 배경 수준을 넘어 증가시키지 않았으며, 이는 HUVEC 세포에서 PLC-감마 활성화에 대한 Flt-1의 역할에 반대 결론을 나타내는 것이다.

PI 3'-키나제는 몇가지 세포 유형에서의 Akt의 활성화를 통해 생존 시그널을 전달하는 것으로 입증되었다 [Marte et al., Trends Biochem. Sci., 22:355-358 (1997)]. VEGF는 또한 내피 세포에 대한 생존 인자로서 작용하며 이 시그널은 PI-3' 키나제 및 Akt 키나제 활성을 필요로 한다 [Gerber et al., J. Biol. Chem., 273:30366-30343 (1998)]. 각종 세포 유형에서, PI-3' 키나제 활성은 성장 인자 자극 및 세포 이동 이후의 세포 골격 변화에 관련되는 것으로 입증되었다 [Wennstrom et al., Curr. Biol., 4:385-393 (1994)]. 그러므로, VEGF 단백질이 PI-3' 키나제의 p85 조절 서브유닛의 인산화를 야기시킬 가능성을 면역침전 후에 평가하였다. 도 13b에 나타난 바와 같이, 본래의 VEGF 및 KDR-선택적 VEGF 변이체 만이 PI-3' 키나제 조절 서브유닛의 인산화를 야기시킬 수 있었다.

## 실시예 12

### 내피 세포 이동에 대한 효과

내피 세포에 대한 VEGF 작용의 핵심적인 면 중의 하나는 화학유인체로서 작용하고 내피 세포의 이동을 자극하는 그의 능력이다. HUVEC 세포 이동은 다음과 같이 변형된 보이덴 챔버 검정으로 분석하였다.

팔콘 8.0 마이크론 필터 삽입물 (Falcon 3097)을 타입 1 콜라겐 (VITROGEN, COHESION)으로 코팅하였다. HUVEC (Cell Systems로부터 구입함, <계대접종 8>를 10% FCS를 가진 세포배양 배지 (4ZO-500)에서 성장시켰다. 세포를 트립신 처리하고 검정을 위해 0.1% BSA를 가진 EBM (내피 기본 배지, Clonetics)으로 옮겼다. 세포를 상부 챔버 당 5 x 10<sup>4</sup>으로 평판 배양하였다. 성장 인자 (VEGF (1-165); Flt-1 선택적 변이체; LK-VRB-2f; 실시예 10에서 상기함)를 하부 챔버에 (도 14a 및 14a에 나타난 농도로) 넣고 억제제를 상부 챔버에 놓았다. 검정은 통상적으로 37 °C에서 18시간 동안 이루어졌다. LY294002 억제제 실험을 위하여, 세포를 억제제 첨가 전에 30분 동안 유착되도록 두었다. 억제제를 첨가한지 20분 후에, VEGF를 바닥 웰에 첨가하고 이들 1차 세포를 LY294002 (Biomol로부터 구입함)로 처리하는 것과 관련된 아포토시스의 발생을 피하기 위하여 4시간 동안만 검정이 진행되도록 하였다.

세포를 폴리우레탄 봉으로 굽어서 막의 윗면으로부터 제거하고 막의 바닥 쪽에 남아있는 세포를 메탄올로 고정시켰다. 세포를 요-프로 요오다이드 (Yo-Pro Iodide) 핵 염료 (Molecular Probes)로 염색하고 이미지-프로 세포 인지 프로그램을 이용하여 저동력 형광 하에 계수하였다.

도 14a는 변형된 보이덴 챔버 검정에서 (나타낸 농도에서의) HUVEC 세포에 대한 수용체-선택적 VEGF 변이체의 효과를 나타낸다 (실험은 3번 반복되었고; 오차 바아는 표준 오차를 나타냄). 몇가지 독립적인 실험에서, 본래의 VEGF는 HUVEC 세포 이동의 4-5배 증가를 야기시켰다. KDR-선택적 VEGF 변이체는 HUVEC 세포 이동의 촉진에서 본래의 VEGF 만큼 효과적이었다. Flt-1 선택적 VEGF 변이체는 배경 수준 이상으로 세포 이동을 증가시킬 수가 없었다.

내피 세포 이동에 대한 PI 3-키나제의 기여를 확인하기 위하여, 세포가 막에 부착되도록 한 후에 다른 농도의 억제제 LY 294002를 검정에 추가시켰다. 내피 세포 생존에 대한 PI 3'-키나제 억제제의 해로운 효과로 인해, 단기간 검정을 수행하였다 (상기함). 도 14b는 LY 294002가 최고 농도에서 HUVEC 세포 이동의 56% 억제를 야기시킴을 나타낸다. 따라서, PI 3'-키나제 활성은 내피 세포 이동에 상당히 기여한다.

## 실시예 13

### 각막 포켓 혈관신생 검정

문헌 [Polverini et al., Methods Enzymol., 198:440-450 (1991)]에 기재된 바를 다음과 같이 변형시켜 검정을 수행하였다. 스프라그-다울리 쥐를 가스 (이소플루란)/주사용 케타민 (80 mg/kg)/크실라진 (15 mg/kg) 혼합물을 이용하여 마취시켰다. 눈을 서서히 돌출시키고 비손상성 검자를 이용하여 그 자리에 고정시켰다. #15 날을 이용하여, 각막 중심 약간 아래를 1.5 mm 절개하였다. 미세 스파툴라 (ST80017, ASSI)를 이용하여, 기질을 통해 눈의 외안각을 향해 조심스럽게 평활 절개하였다. 성장 인자 (200 ng) (VEGF (1-165); Flt-1 선택적 변이체; LK-VRB-2f; (상기 실시예 10에 기재함) 또는 PlGF (R & D Systems)), 또는 메틸셀룰로오스 및 알루미늄 수크랄레이트 (100 µg) (대조군)을 함유하는 히드론 코팅된 펠릿 (2 mm x 2 mm)을 포켓의 기저부로 삽입하였다. 수술 후에, 눈에 젠타마이신 연고를 발랐다. 6일 후에, 동물에 고분자량 FITC-텍스트란을 주입하고 안락사시켜 맥관구조의 가시화를 가능하게 하였다. 각막 전체 검경물은 세포핵 제거된 눈으로 이루어졌으며, 신혈관신생 면의 측정은 컴퓨터 영상 분석 (Image-Pro Plus)을 이용하여 완결하였다.

도 15a에 나타난 바와 같이, KDR-선택적 VEGF 변이체는 각막 혈관신생을 유도하는데 있어서 본래의 VEGF 만큼 효과적이었다. Flt-1 선택적 VEGF 변이체가 종종 최저한의 혈관신생을 유도하긴 하였지만 (도 15a), 몇몇 동물에서의 혈관신생 표면적의 분석은 Flt-1 선택적 VEGF 변이체가 대조군 수준 이상으로 혈관신생을 자극할 수가 없음을 나타내었다. PlGF는 최저한의 반응만을 나타내었다 (도 15b). 따라서, 현재는 Flt-1이 아니라 KDR이 생체 내의 혈관신생을 촉진시킬 수 있는 것으로 생각된다.

상기 설명은 당 업계의 숙련인이 본 발명을 실시하기에 충분한 것으로 간주된다. 본원에 나타내고 설명한 것 이외의 본 발명의 각종 변형은 상기 설명으로부터 당업계의 숙련인에게 자명하게 될 것이며 그것은 첨부된 청구 범위의 영역 내에 드는 것이다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

삭제

#### 청구항 2.

삭제

#### 청구항 3.

삭제

#### 청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

a) 본래의 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF)의 18번, 21번, 22번 또는 25번 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환되는, 본래의 VEGF의 17 내지 25번 위치에서 또는 이들 위치 사이에서의 다중 아미노산 치환; 또는

b) 본래의 VEGF의 18번, 21번, 22번 또는 25번 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환되는, 본래의 VEGF의 17 내지 25번 위치에서 또는 이들 위치 사이에서의 하나 이상의 아미노산 치환 및 본래의 VEGF의 63 내지 66번 위치에서 또는 이들 위치 사이에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 본래의 VEGF와 비교하여 키나제 도메인 영역(KDR) 수용체에 대해 선택적 결합 친화성을 나타내는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 21.

제20항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 F17I, M18E, Y21L, Y21F, Q22E, Q22R, Q22K, Y25S 또는 Y25I를 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 22.

제21항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 M18E, Y21L, Q22R 및 Y25S를 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 23.

제21항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 F17I, M18E, Y21F, Q22K 및 Y25S를 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 24.

제21항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 F17I, M18E, Y21F, Q22E 및 Y25I를 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 25.

제21항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 D63S, G65M 또는 L66R을 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 26.

제25항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 D63S, G65M 및 L66R을 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드.

#### 청구항 27.

제25항에 있어서, 하기 아미노산 치환의 조합 중 하나를 포함하는 VEGF 변이체 폴리펩티드:

(a) M18E, D63S, G65M 및 L66R;

(b) Y21L, D63S, G65M 및 L66R;

(c) Q22R, D63S, G65M 및 L66R;

(d) Y25S, D63S, G65M 및 L66R;



- (e) M18E, Y21L, D63S, G65M 및 L66R;
- (f) M18E, Q22R, D63S, G65M 및 L66R;
- (g) M18E, Y25S, D63S, G65M 및 L66R;
- (h) Y21L, Q22R, D63S, G65M 및 L66R;
- (i) Y21L, Y25S, D63S, G65M 및 L66R;
- (j) Q22R, Y25S, D63S, G65M 및 L66R;
- (k) M18E, Y21L, Q22R, D63S, G65M 및 L66R;
- (l) M18E, Q22R, Y25S, D63S, G65M 및 L66R;
- (m) Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M 및 L66R;
- (n) M18E, Y21L, Q22R, Y25S 및 D63S;
- (o) M18E, Y21L, Q22R, Y25S 및 G65M;
- (p) M18E, Y21L, Q22R, Y25S 및 L66R;
- (q) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S 및 G65M;
- (r) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S 및 L66R;
- (s) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, G65M 및 L66R; 또는
- (t) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M 및 L66R.

## 청구항 28.

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 VEGF 변이체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

## 청구항 29.

제28항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

## 청구항 30.

제29항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

## 청구항 31.

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 VEGF 변이체 폴리펩티드 및 담체를 포함하는, 혈관형성 또는 혈관신생 과정이 요망되는 질환을 치료하기 위한 조성물.

**청구항 32.**

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 VEGF 변이체 폴리펩티드 및 담체를 포함하는, 혈관형성 또는 혈관신생 과정을 자극하기 위한 조성물.

**청구항 33.**

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 VEGF 변이체 폴리펩티드 및 담체를 포함하는, KDR 수용체를 검출하기 위한 조성물.

**청구항 34.**

삭제

**청구항 35.**

삭제

**청구항 36.**

제31항에 있어서, 담체가 제약학적으로 허용되는 담체인 조성물.

**청구항 37.**

제32항에 있어서, 담체가 제약학적으로 허용되는 담체인 조성물.

**청구항 38.**

제33항에 있어서, 담체가 제약학적으로 허용되는 담체인 조성물.

**청구항 39.**

삭제

**청구항 40.**

삭제

**청구항 41.**

제31항의 조성물을 보유하는 용기 및 상기 조성물의 생체 내에서의 사용 지시 사항을 제공하는 상기 용기 상의 표지를 포함하는, 혈관형성 또는 혈관신생 과정이 요망되는 질환을 치료하기 위한 제품.

**청구항 42.**

제32항의 조성물을 보유하는 용기 및 상기 조성물의 시험관내 또는 생체 내에서의 사용 지시 사항을 제공하는 상기 용기 상의 표지를 포함하는, 혈관형성 또는 혈관신생 과정을 자극하기 위한 조성물.

청구항 43.

제33항의 조성물을 보유하는 용기 및 상기 조성물의 시험관내 또는 생체 내에서의 사용 지시 사항을 제공하는 상기 용기 상의 표지를 포함하는, KDR 수용체를 검출하기 위한 조성물.

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

도면

도면1a

```

1   CAGTGTGCTG GCGGCCCGGC GCGAGCCGGC CCGGCCCGG TCGGGCCTCC
-26

    GAAACC   ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC
           M  N  F  L  L  S  W  V  H  W  S
           -26                -20

90   CTC GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG
-15  L  A  L  L  L  Y  L  H  H  A  K  W  S  Q
           -10

    GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGG CAG AAT CAT CAC
    A  A  A  P  M  A  E  G  G  G  Q  N  H  H
    -1 +1                +5                +10

171  GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC
13   E  V  V  K  F  M  D  V  Y  Q  R  S  Y  C
           +15                +20                +25

    CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC
    H  P  I  E  T  L  V  D  I  F  Q  E  Y
           +30                +35

252  CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC
40   P  D  E  I  E  Y  I  F  K  P  S  C  V  P
           +40                +45                +50

    CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG
    L  M  R  C  G  G  C  C  N  D  E  G  L
           +55                +60                +65

333  GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT
67   E  C  V  P  T  E  E  S  N  I  T  M  Q  I
           +70                +75                +80

    ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG
    M  R  I  K  P  H  Q  G  Q  H  I  G  E
           +85                +90

414  ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG
94   M  S  F  L  Q  H  N  K  C  E  C  R  Y  K
           +95                +100                +105

    AAA GAT AGA CCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC
    K  D  R  A  R  Q  E  N  P  C  G  P  C
           +110                +115                +120

495  TCA GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG
121  S  E  R  R  K  H  L  F  V  Q  D  P  Q  T
           +125                +130

    TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG
    C  K  C  S  C  K  N  T  D  S  R  C  K
    +135                +140                +145

```

도면1b

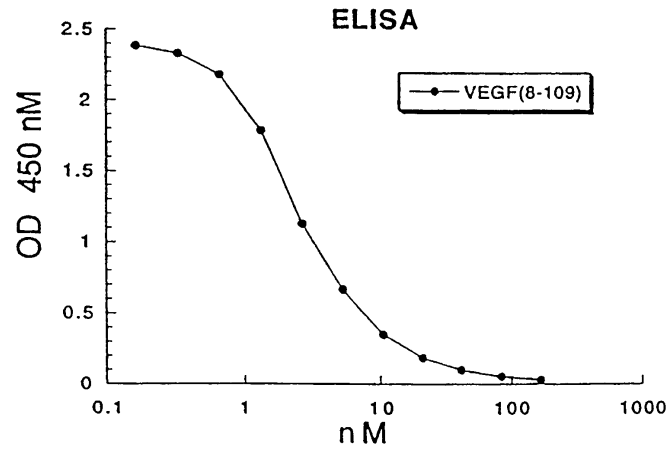
```

576 GCG AGG CAG CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC
148 A  R  Q  L  E  L  N  E  R  T  C  R  C  D
      +150                +155                +160

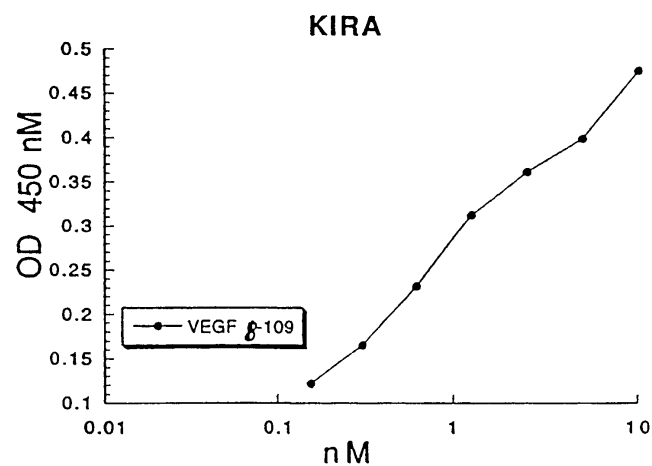
AAG CCG AGG CGG TGA GCCGGGCA GGAGGAAGGA GCCTCCCTCA
K  P  R  R  O
      +165

661 GGGTTTCGGG AACCAGATCT CTCACCAGGA AAGACTGATA CAGAACGATC
    GATACAGAAA CCACGCTGCC GCCACCACAC CATCACCATC GACAGAACAG
761 TCCTTAATCC AGAAACCTGA AATGAAGGAA GAGGAGACTC TGCGCAGAGC
    ACTTTGGGTC CQGAGGGCGA GACTCCGGCG GAAGCATTCC CGGGCGGGTG
861 ACCCAGCACG GTCCCTCTTG GAATTGGATT CGCCATTTTA TTTTCTTGC
    TGCTAAATCA CQGAGCCCGG AAGATTAGAG AGTTTTATTT CTGGGATTCC
961 TGTAGACACA CCGCGGCCGC CAGCACACTG
  
```

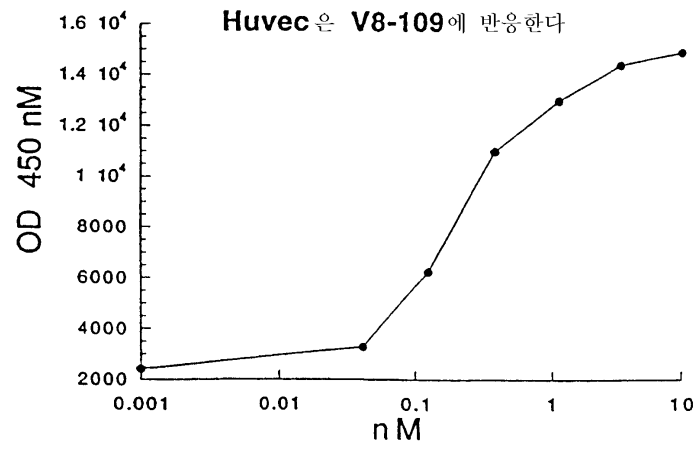
도면2



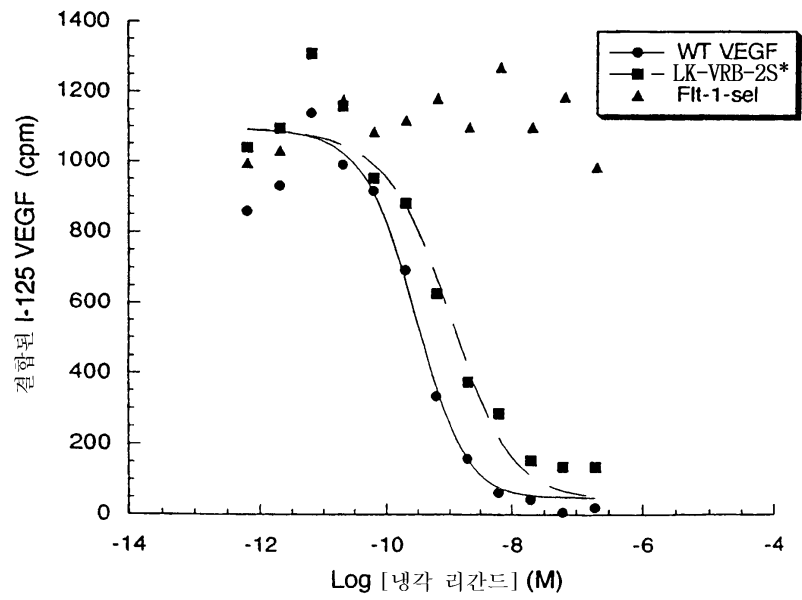
도면3



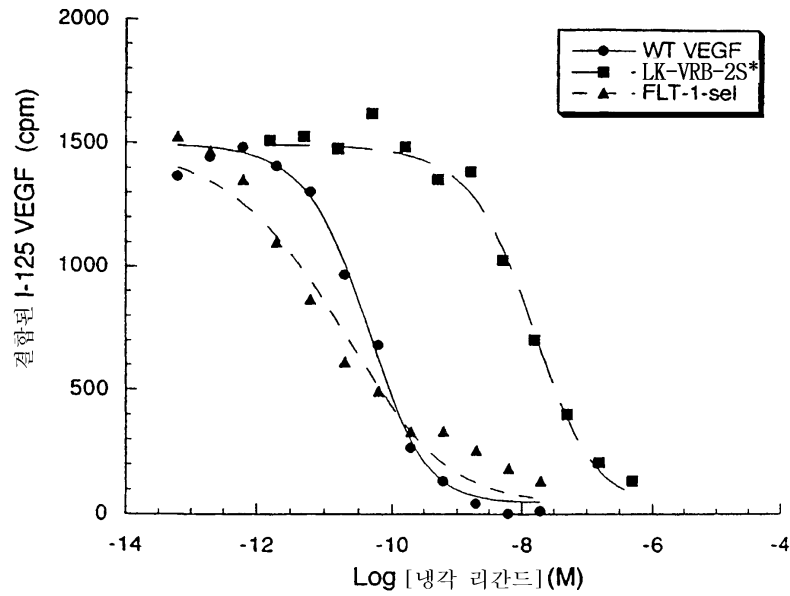
도면4



도면5



도면6

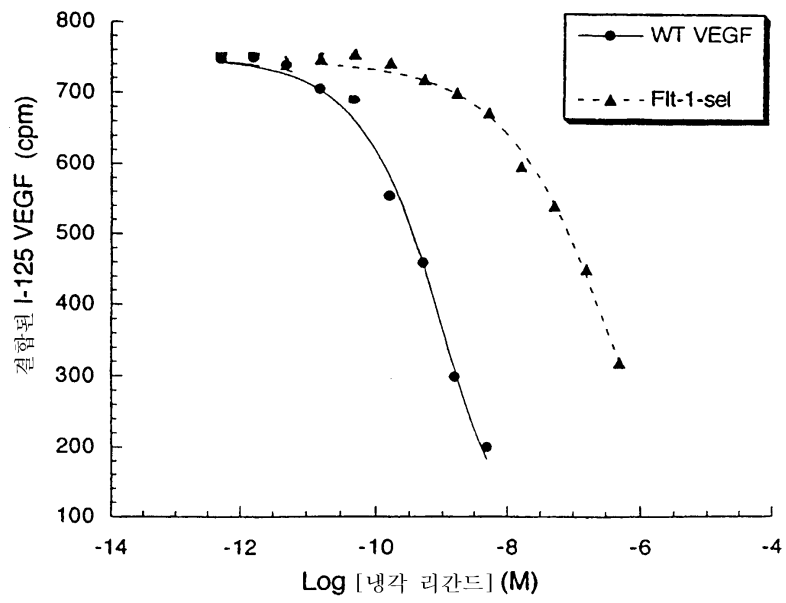


도면7

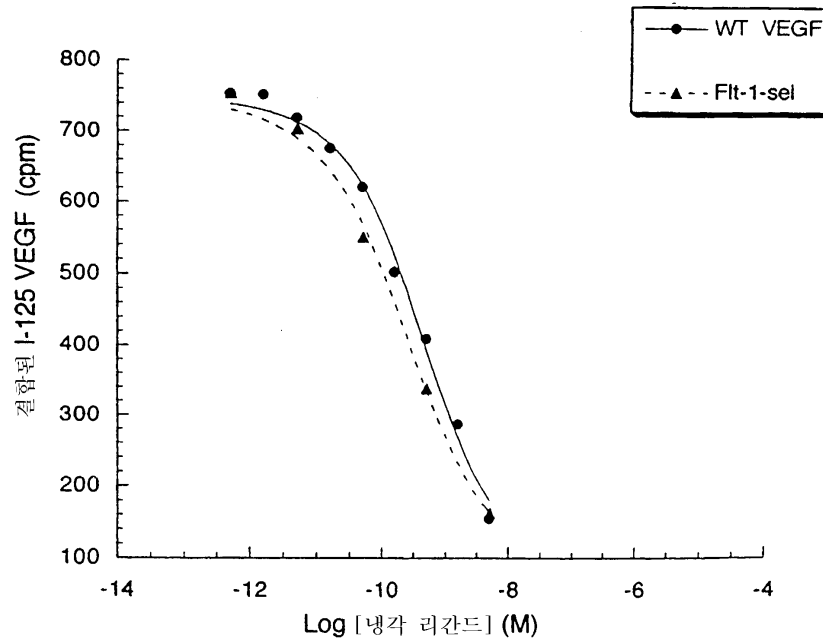
VEGF 알라닌 변이체 결합의 감소율

잔기	KDR(1-3)	Flt(1-3)
VEGF(1-109)	1 (10 nM)	1 (6 nM)
20s 나선형:		
Lys 16	1	1
Phe 17*	45	34
Met 18**	5	9
Tyr 21**	19	29
Gln 22**	6	15
Tyr 25**	6	7
40s 루프:		
Ile 43*	21	3
Ile 46*	96	4
Phe 47**	5	3
Lys 48**	1	1
60s 루프:		
Asp 63**	1	8
Glu 64*	10	5
Gly 65**	1	1
Leu 66**	1	10
80s 루프:		
Gln 79*	55	3
Met 81**	9	5
Ile 83*	89	7
His 86**	2	1
Gln 89	1	1
Ile 91	1	1
100s 루프:		
Lys 101	1	1
Glu 103	1	1
Arg 105	1	1
Pro 106	1	1

도면8a

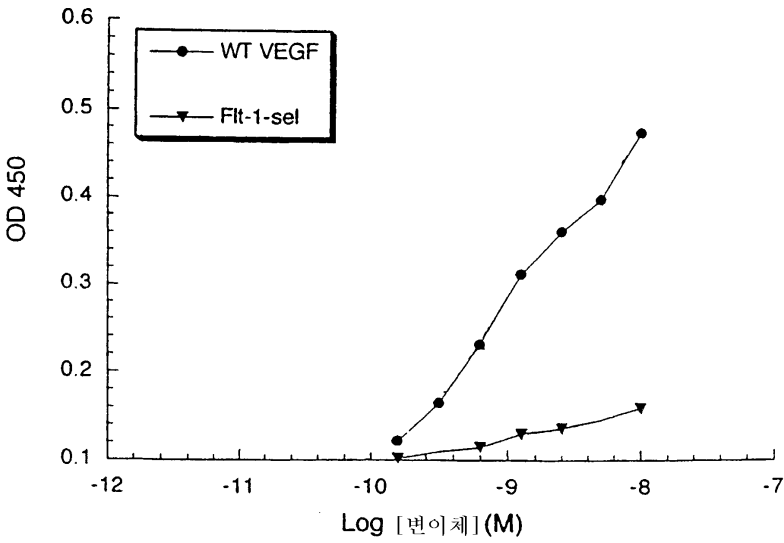


도면8b

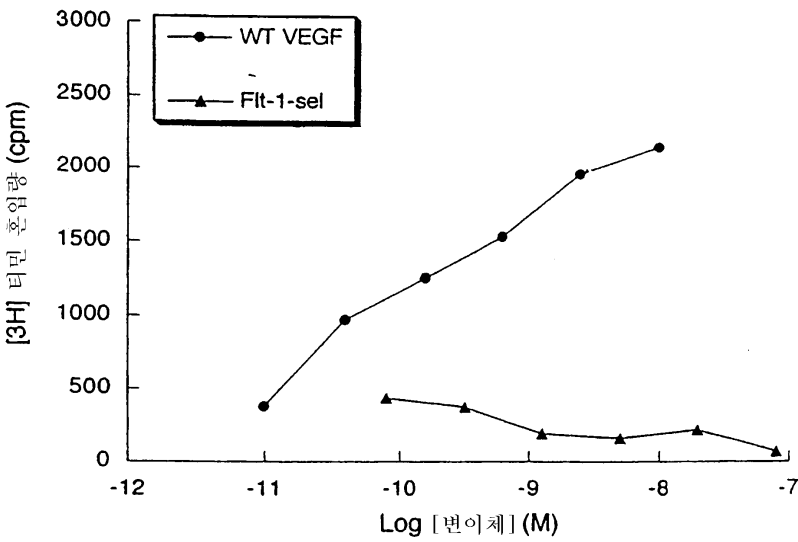




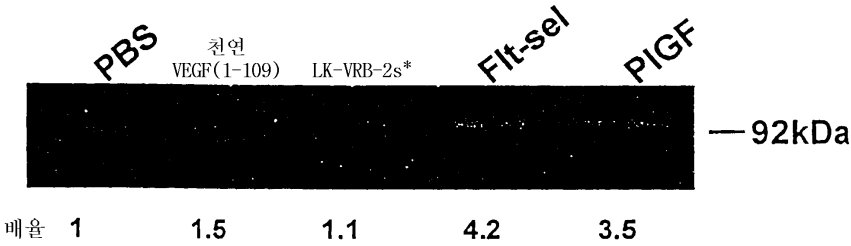
도면9



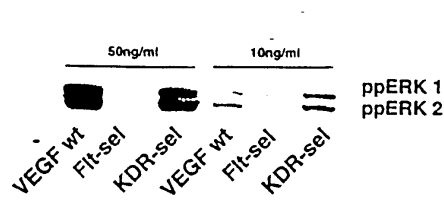
도면10



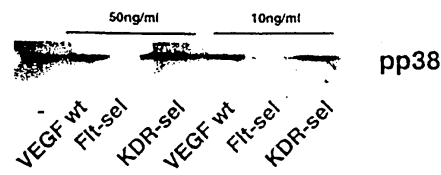
도면11



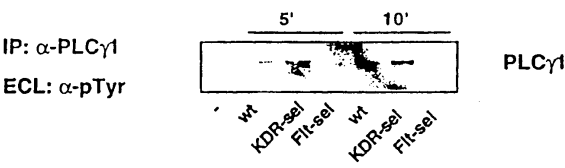
도면12a



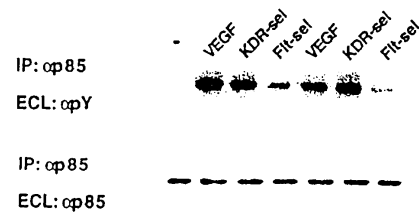
도면12b



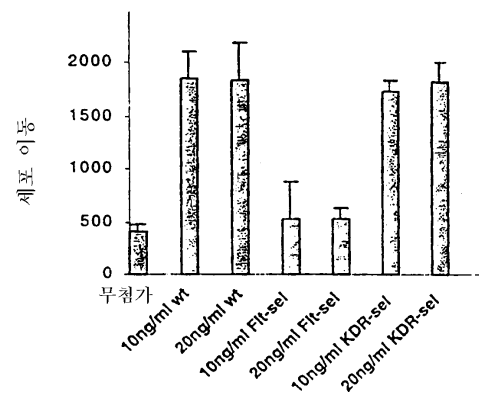
도면13a



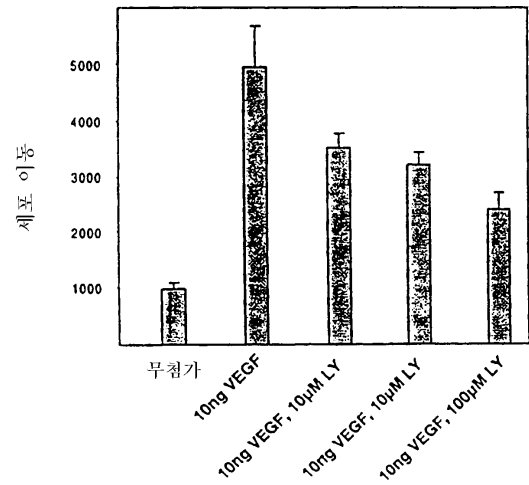
도면13b



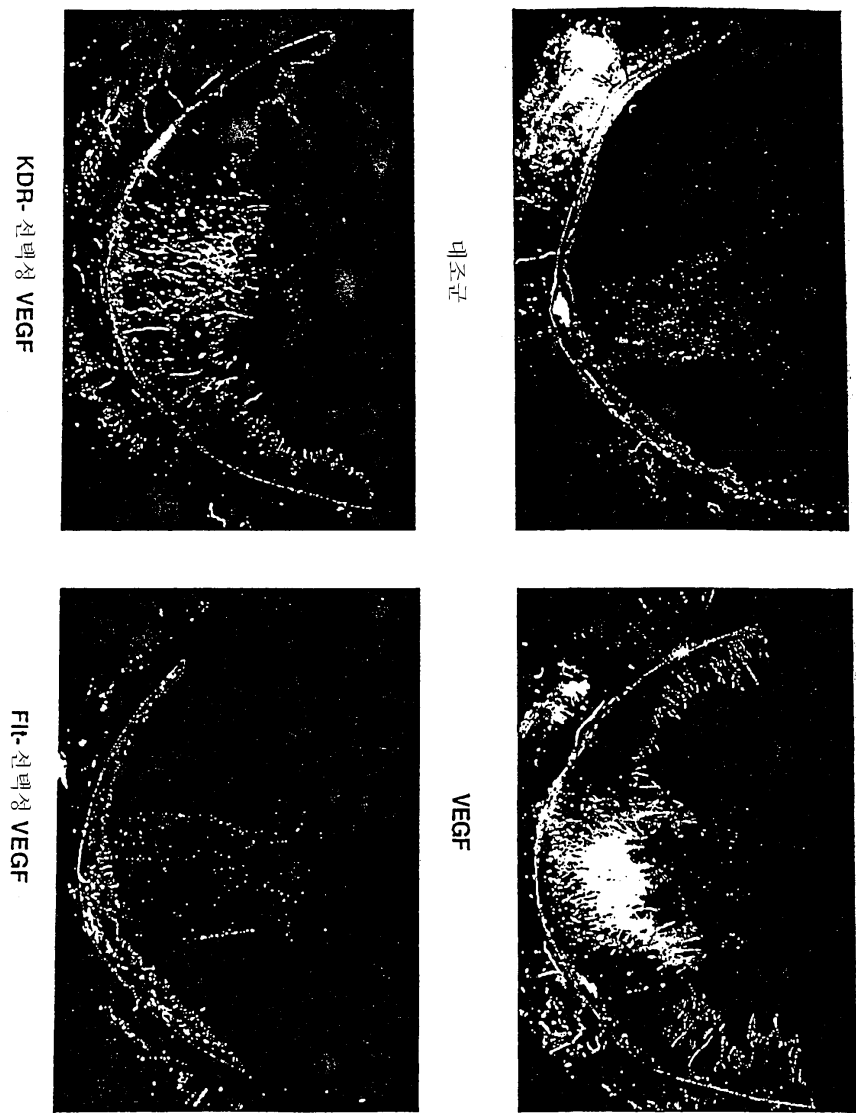
도면14a



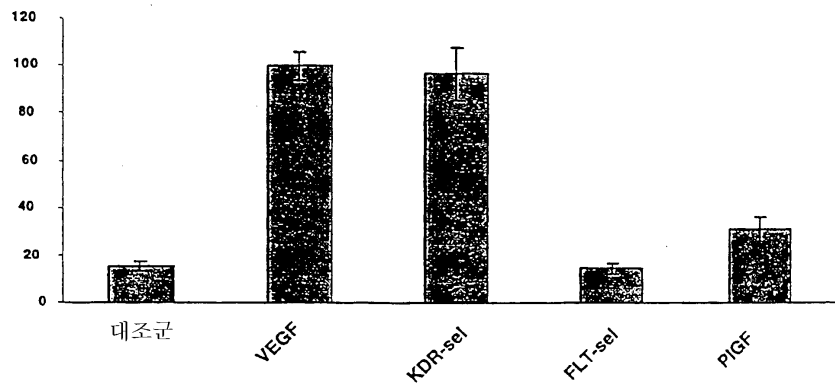
도면14b



도면15a



도면15b



서열목록

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.  
 <120> VASCULAR ENDOTHELIAL CELL GROWTH FACTOR VARIANTS AND  
 USES THEREOF  
 <130> P1734R1PCT  
 <140> PCT/US00/09483  
 <141> 2000-04-10  
 <150> US 60/129,788  
 <151> 1999-04-16  
 <150> US 60/184,235  
 <151> 2000-02-23  
 <160> 4  
 <210> 1  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <222> 1-57  
 <223> Sequence is synthesized.  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> 19, 20, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 42  
 <223> N at indicated positions may be G, A, T or C; S at indicated positions may be C or  
 G  
 <400> 1  
 cacgaagtgg tgaagtccnn sgatgtcnns nnsccgagcn nstgccatcc 50  
 aatcgag 57  
 <210> 2  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <222> 1-42  
 <223> Sequence is synthesized.  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27  
 <223> N at indicated positions may be G, A, T or C; S at indicated positions may be C or  
 G  
 <400> 2  
 gggggctgct gcaatnnsa gnnsnnsag tgtgtgccca ct 42  
 <210> 3  
 <211> 990  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 cagtgtgctg gcggcccggc gcgagccggc ccggccccgg tcgggcctcc 50  
 gaaaccatga actttctgct gtcttggtg cattggagcc tcgccttgct 100  
 gctctacctc caccatgcc aagtgtccca ggctgcaccc atggcagaag 150  
 gagggaggca gaatcatcac gaagtggatga agttcatgga tgtctatcag 200  
 cgcagctact gccatccaat cgagaccctg gtggacatct tccaggagta 250

```

ccctgatgag atcgagtaca tcttcaagcc atcctgtgtg cccctgatgc 300
gatgcggggg ctgctgcaat gacgagggcc tggagtgtgt gccactgag 350
gagtccaaca tcaccatgca gattatgcgg atcaaacctc accaaggcca 400
gcacatagga gagatgagct tcctacagca caacaaatgt gaatgcagac 450
caaagaaaaga tagagcaaga caagaaaatc cctgtggggc ttgctcagag 500
cggagaaaagc atttgtttgt acaagatccg cagacgtgta aatgttcctg 550
caaaaacaca gactcgcgtt gcaaggcgag gcagcttgag ttaaacgaac 600
gtacttgagc atgtgacaag ccgaggcggg gagccgggca ggaggaagga 650
gcctccctca gggtttcggg aaccagatct ctcaccagga aagactgata 700
cagaacgatc gatacagaaa ccacgtgcc gccaccacac catcaccatc 750
gacagaacag tccttaatatc agaaacctga aatgaaggaa gaggagactc 800
tgcgagagc actttgggtc cggaggcgga gactccggcg gaagcattcc 850
cgggcgggtg acccagcacg gtccctcttg gaattggatt cgccatttta 900
tttttcttgc tgctaaatca ccgagcccgg aagattagag agttttatatt 950
ctgggattcc tgtagacaca ccgcggccgc cagcacactg 990

```

<210> 4

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```