



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0054076
(43) 공개일자 2012년05월29일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-7007164</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2010년08월20일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2012년03월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2010/046248</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2011/022710
국제공개일자 2011년02월24일</p> <p>(30) 우선권주장
61/235,852 2009년08월21일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
길리아드 바이오로지스, 인크.
미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333</p> <p>(72) 발명자
스미스, 빅토리아
미국 94010 캘리포니아 벌링게임 드와이트 로드 19
벤 블라셀레어, 피터
미국 94028 캘리포니아 포틀라 밸리 크레센트 애비뉴 108</p> <p>(74) 대리인
김영, 양영준</p> |
|---|--|

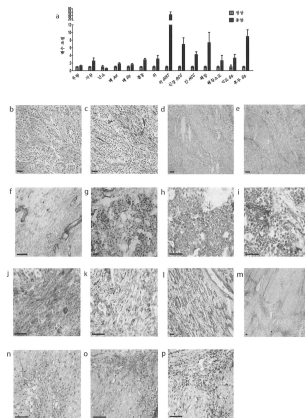
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **치료적 방법 및 조성물**

(57) 요약

세포의 효소 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제함으로써 종양의 환경을 조정하는 방법이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 방법은 종양 성장의 감소, 종양으로의 세포의 동원의 감소, 섬유모세포 활성화의 감소, 결합조직형성의 감소, 혈관형성의 감소, TAF의 수의 감소, 성장 인자 생성의 감소, 콜라겐 침전의 억제 및 종양에서의 괴사 및 핵농축의 증가에 효과적이다. LOXL2 활성의 예시적인 억제제는 항체 및 siRNA이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 섬유모세포 활성화를 억제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 섬유모세포 활성화가 전환 성장 인자-베타 (TGF- β) 신호전달에 의해 매개되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, LOXL2 활성의 억제가 세포의 매트릭스의 해체를 야기하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포의 매트릭스의 해체가 종양 기질에서의 세포의 세포골격의 파괴를 야기하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 섬유모세포가 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 섬유모세포가 근육섬유모세포인 방법.

청구항 7

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 결합조직형성을 억제하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 종양이 전이성 종양인 방법.

청구항 9

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 혈관형성을 억제하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 혈관형성이 종양 환경으로의 혈관 세포 또는 혈관 세포 전구 세포의 동원을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 혈관형성이 혈관 분지형성을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 혈관형성이 혈관 길이의 증가를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 혈관형성이 혈관 수의 증가를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 기질에서 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수를 감소시키는 방법.

청구항 15

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 콜라겐 침전을 억제하는 방법.

청구항 16

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경을 조정하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 조정이 결합조직형성의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 조정이 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 조정이 근육섬유모세포의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 조정이 세포의 세포골격의 재형성을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 세포가 섬유모세포인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 세포가 내피세포인 방법.

청구항 24

제16항에 있어서, 조정이 종양 혈관계의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제16항에 있어서, 조정이 콜라겐 생성의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제16항에 있어서, 조정이 섬유모세포 활성화의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제16항에 있어서, 조정이 종양 환경으로의 섬유모세포의 동원의 억제를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제16항에 있어서, 조정이 기질 성분을 코딩하는 유전자의 발현의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 기질 성분이 알파-평활근 액틴, 제1형 콜라겐, 비멘틴, 매트릭스 메탈로프로테아제 9 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 30

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 성장 인자의 생성을 조정하

는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 성장 인자가 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및 기질 세포-유도된 인자-1 (SDF-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 32

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양에서 괴사를 증가시키는 방법.

청구항 33

리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양에서 핵농축을 증가시키는 방법.

청구항 34

제1항, 제7항, 제9항, 제14항, 제15항, 제16항, 제30항, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 항-LOXL2 항체를 사용하여 LOXL2의 활성을 억제하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 항체가 서열 1에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 2에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 항체가 서열 3에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 4에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제1항, 제7항, 제9항, 제14항, 제15항, 제16항, 제30항, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산을 사용하여 LOXL2의 활성을 억제하는 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 핵산이 siRNA인 방법.

청구항 40

종양 환경을 조정하는 능력에 대해 시험 분자를 검정하는 것을 포함하는, LOXL2의 억제제를 확인하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 조정이 결합조직형성의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 조정이 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, 조정이 근육섬유모세포의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제40항에 있어서, 조정이 세포의 세포골격의 재형성을 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.

청구항 46

제44항에 있어서, 세포가 섬유모세포인 방법.

청구항 47

제44항에 있어서, 세포가 내피세포인 방법.

청구항 48

제40항에 있어서, 조정이 종양 혈관계의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 종양 혈관계의 감소가 CD31 및/또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 수준의 감소에 의해 입증되는 것인 방법.

청구항 50

제40항에 있어서, 조정이 콜라겐 생성의 감소 및/또는 콜라겐 가교의 정도의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제40항에 있어서, 조정이 섬유모세포 활성화의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제40항에 있어서, 조정이 종양 환경으로의 섬유모세포의 동원의 억제를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제40항에 있어서, 조정이 기질 성분을 코딩하는 유전자의 발현의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 기질 성분이 알파-평활근 액틴, 제1형 콜라겐, 비멘틴, 매트릭스 메탈로프로테아제 9 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 55

제40항에 있어서, 조정이 종양 환경에서의 기질 세포-유도된 인자-1 (SDF-1)의 수준의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제40항에 있어서, 조정이 종양의 세포에서의 괴사 및/또는 핵농축의 발생의 증가를 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제40항에 있어서, 시험 분자가 1 kD 미만의 분자량을 갖는 소 유기 분자인 방법.

청구항 58

제40항에 있어서, 시험 분자가 폴리펩티드인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.

청구항 60

제40항에 있어서, 시험 분자가 핵산인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 핵산이 siRNA인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2009년 8월 21일 출원된 미국 가 특허 출원 제61/235,852호의 이점을 주장하며, 개시된 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본원은 미국 가 특허 출원 제61/235,846호 (2009년 8월 21일 출원됨) 및 미국 가 특허 출원 제61/235,796호 (2009년 8월 21일 출원됨)에 관련되며, 개시된 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0004] 본원은 또한 "생체내 스크리닝 검정"으로 명명된 공동-소유의 미국 특허 출원, 사건 번호 ARBS-012, 고객 번호 A12-US1; 및 발명의 명칭 "시험관내 스크리닝 검정 {In Vivo Screening Assays}"인 공동-소유의 미국 특허 출원, 사건 번호 ARBS-013, 고객 번호 A13-US1에 관련되며; 각각은 본원과 동일자로 출원되었으며; 개시된 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 연방 정부 지원에 관한 진술

[0006] 적용 가능하지 않음

[0007] 본 발명의 분야

[0008] 본원은 암, 종양학 및 섬유증 질환의 분야 내에 있다.

[0009] 본 발명의 배경

[0010] 종양형성의 광범위한 임상적 증거 및 마우스 모델은 종양 성장 및 전이를 촉진하는데 있어서 미세환경의 중요한 역할을 지지한다. 종양 세포에 의한 섬유모세포, 혈관 세포 및 염증성 세포의 동원 및 활성화는 전이 잠재력을 촉진하는 것으로 나타났으며, 요법의 결과에 영향을 줄 수 있다. 췌장, 유방, 전립선, 결장, 폐 및 자궁의 상피성 악성종양은 종종 종양-연관된 섬유모세포 (TAF) 및 축적된 세포의 매트릭스로 구성된 결합조직 형성 기질을 함유하며, 더 안 좋은 예후와 연관되어왔다. 이들 TAF는 부분적으로는 종양 혈관신생의 자극에 의해 종양형성에 기여한다고 여겨진다. TAF는 섬유증으로 이어지는 기관의 병리학적 재형성에서 의미있는 역할을 하는 근육섬유모세포의 평활근-유사 수축 특성을 나타낸다. 질환 진행에서 미세환경을 변형시키는 인자가 하는 역할의 추가의 증거를 제공하는 최근 연구는 세포외 매트릭스의 기계적 장력에서의 변화는 세포 형태, 신호전달 경로의 활성화, 조직 재형성 및 발생기전에서의 의미있는 변화로 이어질 수 있다는 것을 나타냈다. 이들 발견은 종양학 및 섬유증, 조성물을 조절하는 표적 단백질 및 세포외 매트릭스의 기계적 특성에서의 신규한 치료적 전략에 대한 잠재력을 강조한다.

[0011] 리실 옥시다제-유형 효소 (LOX/L)는 확산 N-말단을 갖는 보존된 C-말단 효소 도메인을 공유하는 5개 효소의 족을 포함한다. LOX/L은 결합조직형성 기질의 주요 성분인 단백질, 예를 들면 섬유원성 콜라겐 I의 공유결합 가교를 촉진하기 위해 엡실론-아민 기, 특히 라이신 잔류물의 산화 탈아미노화를 촉매하는 구리-함유 효소이다. 특정 LOX/L은 종양학적 및 섬유증 질환 모두의 개시 및 진행에서 역할을 한다는 몇몇 증거가 있으며, 리실 옥시다제 (LOX)는 전이 및 전이성 오목 형성의 발달에서 역할을 하는 것으로 나타났다. 예를 들면, "섬유증, 종양 침입, 혈관신생 & 전이의 치료 및 진단을 위한 방법 및 조성물"의 명칭의 공동-소유의 미국 특허 출원 공개 번호 US 2009/0104201 (2009년 4월 23일)을 참조하며, 개시된 그 전문이 리실 옥시다제-유형 효소의 생물학의 다양한 측면을 기재하는 목적을 위해 참조로 포함된다.

[0012] 리실-옥시다제 유사 2 (LOXL2) mRNA는 수많은 여러 고형 종양 및 종양 세포주에서 많이 발현된다. LOXL2는 LOXL2-발현 암 세포에 의해 형성된 유방 종양 및 교종에서의 콜라겐의 생체내 축적 및 침전을 향상시키는 것으로 보고되었다. LOXL2 단백질의 발현은 유방 및 식도 종양, 및 주로 세포내 국소화를 갖는 편평 암종에서 이전에 기재되었으며, 최근 보고는 위암에서의 종양 세포 침입을 촉진하는 분비된 LOXL2에 대한 역할을 지지한다. 증가된 LOXL2 수준은 또한 예를 들면, 윌슨병 또는 1차 담도성 경변증이 있는 환자로부터의 간세포 및 신장 세뇨관간질 섬유증에서의 퇴행성 및 섬유증 질환과 연관되어왔다.

- [0013] 본 발명의 요약
- [0014] 본원에서, 발명자들은 (1) 종양 미세환경의 생성 및 (2) 섬유모세포 활성화에서의 LOXL2에 대한 역할을 확인하였다.
- [0015] 따라서, 본원은 종양 및 섬유증 질환에서 결합조직형성 및 섬유모세포 활성화를 감소시키는 방법 및 조성물을 제공하며, 이는 다음 실시양태를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다:
- [0016] 1. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 섬유모세포 활성화를 억제하는 방법.
- [0017] 2. 제1 실시양태에 있어서, 섬유모세포 활성화가 전환 성장 인자-베타 (TGF- β) 신호전달에 의해 매개되는 것인 방법.
- [0018] 3. 제1 실시양태에 있어서, LOXL2 활성의 억제가 세포외 매트릭스의 해체를 야기하는 것인 방법.
- [0019] 4. 제3 실시양태에 있어서, 세포외 매트릭스의 해체가 종양 기질에서의 세포의 세포골격의 파괴를 야기하는 것인 방법.
- [0020] 5. 제1 실시양태에 있어서, 섬유모세포가 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)인 방법.
- [0021] 6. 제1 실시양태에 있어서, 섬유모세포가 근육섬유모세포인 방법.
- [0022] 7. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 결합조직형성을 억제하는 방법.
- [0023] 8. 제7 실시양태에 있어서, 종양이 전이성 종양인 방법.
- [0024] 9. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 혈관형성을 억제하는 방법.
- [0025] 10. 제9 실시양태에 있어서, 혈관형성이 종양 환경으로의 혈관 세포 또는 혈관 세포 전구 세포의 동원을 포함하는 것인 방법.
- [0026] 11. 제9 실시양태에 있어서, 혈관형성이 혈관 분지형성을 포함하는 것인 방법.
- [0027] 12. 제9 실시양태에 있어서, 혈관형성이 혈관 길이의 증가를 포함하는 것인 방법.
- [0028] 13. 제9 실시양태에 있어서, 혈관형성이 혈관 수의 증가를 포함하는 것인 방법.
- [0029] 14. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 기질에서 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수를 감소시키는 방법.
- [0030] 15. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 콜라겐 침전을 억제하는 방법.
- [0031] 16. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경을 조정하는 방법.
- [0032] 17. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 결합조직형성의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0033] 18. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0034] 19. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 근육섬유모세포의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0035] 20. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 세포의 세포골격의 재형성을 포함하는 것인 방법.
- [0036] 21. 제20 실시양태에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.
- [0037] 22. 제20 실시양태에 있어서, 세포가 섬유모세포인 방법.
- [0038] 23. 제20 실시양태에 있어서, 세포가 내피세포인 방법.
- [0039] 24. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 종양 혈관계의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0040] 25. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 콜라겐 생성의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0041] 26. 제16 실시양태에 있어서, 조정이 섬유모세포 활성화의 감소를 포함하는 것인 방법.

- [0042] 27. 제16 실시양태에 있어서, 조절이 종양 환경으로의 섬유모세포의 동원의 억제를 포함하는 것인 방법.
- [0043] 28. 제16 실시양태에 있어서, 조절이 기질 성분을 코딩하는 유전자의 발현의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0044] 29. 제28 실시양태에 있어서, 기질 성분이 알파-평활근 액틴, 제1형 콜라겐, 비멘틴, 매트릭스 메탈로프로테아제 9 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0045] 30. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양 환경에서 성장 인자의 생성을 조정하는 방법.
- [0046] 31. 제30 실시양태에 있어서, 성장 인자가 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및 기질 세포-유도된 인자-1 (SDF-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0047] 32. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양에서 괴사를 증가시키는 방법.
- [0048] 33. 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)의 활성을 억제하는 것을 포함하는, 종양에서 핵농축을 증가시키는 방법.
- [0049] 34. 제1 실시양태, 제7 실시양태, 제9 실시양태, 제14 실시양태, 제15 실시양태, 제16 실시양태, 제30 실시양태, 제32 실시양태 및 제33 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항-LOXL2 항체를 사용하여 LOXL2의 활성을 억제하는 것인 방법.
- [0050] 35. 제34 실시양태에 있어서, 항체가 서열 1에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 2에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0051] 36. 제34 실시양태에 있어서, 항체가 인간화 항체인 방법.
- [0052] 37. 제36 실시양태에 있어서, 항체가 서열 3에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 4에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0053] 38. 제1 실시양태, 제7 실시양태, 제9 실시양태, 제14 실시양태, 제15 실시양태, 제16 실시양태, 제30 실시양태, 제32 실시양태 및 제33 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 핵산을 사용하여 LOXL2의 활성을 억제하는 것인 방법.
- [0054] 39. 제38 실시양태에 있어서, 핵산이 siRNA인 방법.
- [0055] 40. 종양 환경을 조정하는 능력에 대해 시험 분자를 검정하는 것을 포함하는, LOXL2의 억제제를 확인하는 방법.
- [0056] 41. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 결합조직형성의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0057] 42. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0058] 43. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 근육섬유모세포의 수의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0059] 44. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 세포의 세포골격의 재형성을 포함하는 것인 방법.
- [0060] 45. 제44 실시양태에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.
- [0061] 46. 제44 실시양태에 있어서, 세포가 섬유모세포인 방법.
- [0062] 47. 제44 실시양태에 있어서, 세포가 내피세포인 방법.
- [0063] 48. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 종양 혈관계의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0064] 49. 제48 실시양태에 있어서, 종양 혈관계의 감소가 CD31 및/또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 수준의 감소에 의해 입증되는 것인 방법.
- [0065] 50. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 콜라겐 생성의 감소 및/또는 콜라겐 가교의 정도의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0066] 51. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 섬유모세포 활성화의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0067] 52. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 종양 환경으로의 섬유모세포의 동원의 억제를 포함하는 것인 방법.
- [0068] 53. 제40 실시양태에 있어서, 조절이 기질 성분을 코딩하는 유전자의 발현의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0069] 54. 제53 실시양태에 있어서, 기질 성분이 알파-평활근 액틴, 제1형 콜라겐, 비멘틴, 매트릭스 메탈로프로테

아제 9 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

- [0070] 55. 제40 실시양태에 있어서, 조정이 종양 환경에서의 기질 세포-유도된 인자-1 (SDF-1)의 수준의 감소를 포함하는 것인 방법.
- [0071] 56. 제40 실시양태에 있어서, 조정이 종양의 세포에서의 괴사 및/또는 핵농축의 발생의 증가를 포함하는 것인 방법.
- [0072] 57. 제40 실시양태에 있어서, 시험 분자가 1 kD 미만의 분자량을 갖는 소 유기 분자인 방법.
- [0073] 58. 제40 실시양태에 있어서, 시험 분자가 폴리펩티드인 방법.
- [0074] 59. 제58 실시양태에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.
- [0075] 60. 제40 실시양태에 있어서, 시험 분자가 핵산인 방법.
- [0076] 61. 제60 실시양태에 있어서, 핵산이 siRNA인 방법.
- [0077] 62. 종양 환경에서 섬유모세포 활성화를 억제하는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0078] 63. 종양 환경에서 결합조직형성을 억제하는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0079] 64. 종양 환경에서 혈관형성을 억제하는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0080] 65. 종양 기질에서 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수를 감소시키는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0081] 66. 종양 환경에서 콜라겐 침전을 억제하는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0082] 67. 종양 환경을 조정하는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0083] 68. 종양 환경에서 성장 인자의 생성을 조정하는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0084] 69. 종양에서 괴사를 증가시키는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0085] 70. 종양에서 핵농축을 증가시키는데 사용하기 위한 LOXL2의 억제제.
- [0086] 71. 제62 실시양태 내지 제70 실시양태 중 임의의 실시양태에 있어서, LOXL2의 억제제가 항-LOXL2 항체인 억제제.
- [0087] 72. 제71 실시양태에 있어서, 항체가 서열 1에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 2에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 억제제.
- [0088] 73. 제71 실시양태에 있어서, 항체가 인간화 항체인 억제제.
- [0089] 74. 제73 실시양태에 있어서, 항체가 서열 3에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 4에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 억제제.
- [0090] 75. 제62 실시양태 내지 제70 실시양태 중 임의의 실시양태에 있어서, 핵산인 억제제.
- [0091] 76. 제75 실시양태에 있어서, 핵산이 siRNA인 억제제.
- [0092] 77. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 환경에서 섬유모세포 활성화를 억제하는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0093] 78. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 환경에서 결합조직형성을 억제하는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0094] 79. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 환경에서 혈관형성을 억제하는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0095] 80. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 기질에서 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)의 수를 감소시키는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0096] 81. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 환경에서 콜라겐 침전을 억제하는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0097] 82. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 환경을 조정하는데 사용하기 위한 제약 조

성물.

- [0098] 83. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 환경에서 성장 인자의 생성을 조정하는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0099] 84. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양에서 괴사를 증가시키는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0100] 85. LOXL2의 억제제 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는, 종양에서 핵농축을 증가시키는데 사용하기 위한 제약 조성물.
- [0101] 86. 제77 실시양태 내지 제85 실시양태 중 임의의 실시양태에 있어서, LOXL2의 억제제가 항-LOXL2 항체인 조성물.
- [0102] 87. 제86 실시양태에 있어서, 항체가 서열 1에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 2에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0103] 88. 제86 실시양태에 있어서, 항체가 인간화 항체인 조성물.
- [0104] 89. 제88 실시양태에 있어서, 항체가 서열 3에 제시된 바와 같은 중쇄 서열 및 서열 4에 제시된 바와 같은 경쇄 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0105] 90. 제77 실시양태 내지 제85 실시양태 중 임의의 실시양태에 있어서, 억제제가 핵산인 조성물.
- [0106] 91. 제90 실시양태에 있어서, 핵산이 siRNA인 조성물.

도면의 간단한 설명

- [0108] 도 1, 패널 a-p는 LOXL2는 고형 종양 및 간 섬유증에서 많이 발현되고 분비된다는 것을 나타낸다. 도 1, 패널 a는 비-신생물 조직에 비교하여 고형 종양에서의 LOXL2 전사체의 qRT-PCR 분석을 나타낸다. 도 1, 패널 b 및 1, 패널 c는 콜라겐 I (도 1b)에 대한 후두 편평 세포 암종 및 짝지어진 종양 절편에서의 LOXL2 (도 1c) 발현의 면역조직화학 (IHC)을 나타낸다. 도 1, 패널 d 및 1, 패널 e는 콜라겐 I (도 1, 패널 d) 및 LOXL2 (도 1, 패널 e)의 발현에 대해 시험하는 폐 편평 세포 암종 (등급 2)으로부터의 절편의 IHC 분석을 나타낸다. 도 1, 패널 f 및 1, 패널 g는 췌장 선암종 (등급 3)으로부터의 절편에서의 LOXL2 발현의 IHC 분석을 나타낸다. 도 1, 패널 f는 매트릭스 및 종양-기질 경계에서의 LOXL2 발현을 나타내며; 글로메루로이드 (glomeruloid) 구조 상에서의 LOXL2 발현이 도 1, 패널 f 및 도 1, 패널 g에서 또한 나타난다. 도 1, 패널 h 및 1, 패널 i는 난소 암종의 그물막 전이에서의 LOXL2 발현의 IHC 분석을 나타낸다. 도 1, 패널 h는 종양 세포 발현을 나타내고, 도 1, 패널 i는 글로메루로이드 구조에서의 LOXL2 발현을 나타낸다. 도 1, 패널 j 및 1, 패널 k는 췌장 선암종으로부터의 절편의 IHC를 나타낸다. 도 1, 패널 j는 LOXL2 발현을 나타내고, 도 1, 패널 k는 LOX 발현을 나타낸다. 도 1, 패널 l은 신장 세포 투명 세포 암종으로부터의 절편에서의 LOXL2 발현을 나타낸다. 도 1, 패널 m 및 1n은 활성 C형 간염-유도된 간 섬유증 (도 1, 패널 m: 5X 확대; 도 1, 패널 n: 40X 확대)에서의 LOXL2 발현에 대한 IHC를 나타낸다. 도 1, 패널 o 및 1, 패널 p는 지방간염성 간 (40X 확대)으로부터의 절편에서의 LOXL2 및 LOX 발현에 대한 IHC를 각각 나타낸다.
- [0109] 도 2, 패널 a-f는 분비된 LOXL2는 시험관내에서 종양 세포의 침입을 촉진한다는 것을 나타낸다. 도 2, 패널 a 및 b는 LOXL2 (도 2, 패널 a) 및 콜라겐 I (도 2, 패널 b)에 대해 동시-염색된 Hs578t 종양 세포의 배양물의 면역형광 분석을 나타낸다. 콜라겐 I 및 LOXL2의 발현은 이들 배양물에서의 세포외 매트릭스에서 동시-국소화된다. 도 2, 패널 c-f는 MCF7 조건화 배지 (도 2, 패널 c), MDA-MB231 조건화 배지 (도 2, 패널 d), 4ug 항-IgG 항체와 함께 예비-인큐베이션된 MDA-MB231 조건화 배지 (도 2, 패널 e) 또는 4ug의 항-LOXL2 항체 AB0023와 함께 예비-인큐베이션된 MDA-MB231 조건화 배지 (도 2, 패널 f)로 배양된 MCF-7 세포를 처리한 후의 MCF-7 세포의 배양물의 로다민-팔로이딘 염색을 나타낸다.
- [0110] 도 3, 패널 a-k는 LOXL2는 시험관내 및 생체내에서 섬유모세포 활성화를 촉진한다는 것을 나타낸다. 도 3, 패널 a는 인간 포피 섬유모세포 (HFF)에서 LOXL2의 발현 수준에 대한 장력의 효과에 대해 시험하는 단백질 ("웨스턴") 블롯 분석을 나타낸다. 세포를 조직 배양 플레이트 (1로 표지된 라인), 0.2% 비스-아크릴아미드 가교된 콜라겐 코팅된 겔 (2로 표지된 라인), 또는 0.8% 비스-아크릴아미드 가교된 콜라겐 코팅된 겔 (3으로 표지된 라인)에서 성장시켰다. 도 3, 패널 b 및 3, 패널 c는 비-표적 siRNA (도 3, 패널 b) 또는 LOXL2 siRNA (도 3, 패널 c)로 형질감염되고, 콜라겐 I에 대해 염색된 형질감염 10일 후의 HFF 세포의 사진을 나타낸다. 도 3, 패널 d 및 e는 비-표적 siRNA (도 3, 패널 d) 또는 LOXL2 siRNA (도 3, 패널 e)로

형질감염되고, 로다민 팔로이딘으로 염색된 형질감염 10일 후의 HFF 세포의 사진을 나타낸다. 도 3, 패널 f 및 g는 저장력 (도 3f, 패널) 또는 고장력 (도 3, 패널 g)하에 성장하고, 이어서 로다민-팔로이딘으로 염색된 HFF 세포의 사진을 나타낸다. 도 3, 패널 h는 MDA-MD-231 또는 MCF7-LOXL2 세포와의 트랜스웰 (transwell) 배양물로부터의 HFF 세포로부터의 용해물의 단백질 ("웨스턴") 블롯을 나타낸다. 도 3, 패널 i는 도 3, 패널 h에 나타난 결과의 밀도측정에 의한 정량화를 나타내며, 이는 pSMAD2 및 VEGF 발현에 대해 AB0023-특이적인 효과를 나타낸다. 도 3, 패널 j는 LOXL2 발현 벡터 (MCF7-LOXL2)로 안정하게 형질감염된 MCF7 세포 (MCF7-대조군) 또는 MCF7 세포로 이식된 nu/nu 마우스의 아래-신장 캡슐에서 발생된 이종이식편의 크기의 비교를 나타낸다. 도 3, 패널 k는 LOXL2-발현 종양에서의 다양한 기질 성분의 상대적 유도를 검사하기 위한 정량 RT-PCR에 의한 이종이식편의 분석을 나타낸다. 기질 발현을 이식된 (인간) 세포에서의 발현과 구별하기 위해 마우스-특이적인 프라이머를 사용하였다. α SMA = 알파 평활근 액틴; COL1A1 = 제1형 콜라겐; MMP9 = 매트릭스 메탈로프로테아제 9; FN1 = 제1형 피브로넥틴; VIM = 비멘틴이다. MCF7-유도된 종양에 비교하여 MCF7-LOXL2-유도된 종양의 기질에서의 배수 활성화는, 각각의 유전자를 나타내는 막대 위의 숫자에 의해 나타낸다.

[0111]

도 4, 패널 a-o는 시험관내 및 생체내에서 항-LOXL2 항체 AB0023에 의한 억제에 예를 나타낸다. 도 4, 패널 a 및 b는 비-표적 siRNA (도 4, 패널 a) 또는 LOXL2에 표적된 siRNA (도 4, 패널 b) 중 하나에 의해 형질감염되고, 이어서 10일 동안 배양된 HUVEC 세포의 로다민-팔로이딘 염색을 나타낸다. 도 4, 패널 c-i는 시험관내에서의 관 형성 검정의 결과를 나타내며, 여기서 배양된 인간 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)는 AB0023의 증가하는 농도로 처리된 후, 내피 마커 CD31에 대해 염색되었다. 4개 패널은 항체 없이 (도 4, 패널 c) 또는 1ug/ml (도 4, 패널 d), 10ug/ml (도 4, 패널 e) 또는 50ug/ml (도 4, 패널 f)의 AB0023의 존재 하에 배양된 HUVEC를 나타낸다. 분지점의 평균 수 (도 4, 패널 g), 혈관의 평균 수 (도 4, 패널 h) 및 평균 총 세관 길이 (도 4, 패널 i)의 정량화를 또한 수행하였다. 도 4, 패널 j-m은 매트릭셀 (Matrigel)(상표명) 플러그 (plug) 검정에서의 혈관형성에 대한 항-LOXL2 항체 AB0023의 효과를 나타낸다. Balb/C 마우스를 bFGF를 함유하는 매트릭셀(상표명) 플러그로 옆구리에 이식하고, 이어서 AB0023 또는 비히클 (PBST) 중 하나로 처리하였다. 이식 후 10일 차에, 비히클 단독으로 처리된 동물에서의 플러그의 조직학 (H&E 염색)은 분지형성 및 침입하는 혈관계 (도 4, 패널 j)의 증거를 나타냈으며, 이는 AB0023-처리된 동물 (도 4, 패널 k)로부터의 플러그에는 실질적으로 없다. 비히클 단독 (도 4, 패널 l) 및 AB0023 (도 4, 패널 m)으로 처리된 동물로부터의 플러그의 CD31 염색은 유사한 결과, 즉 AB0023-처리된 동물로부터의 플러그에서의 혈관형성의 결핍을 제공하였다. 도 4, 패널 n은 비히클-처리된 및 AB0023-처리된 동물로부터의 플러그에서의 혈관의 평균 수의 정량 분석을 제공하며, 이는 AB0023-처리된 마우스에서의 혈관형성의 ~7배 감소 ($p=0.0319$)를 나타낸다. 도 4, 패널 o는 비히클-처리된 및 AB0023-처리된 마우스로부터의 플러그에서의 CD31-양성 세포의 정량화를 나타내며, 혈관형성의 감소 ($p=0.0168$)를 확증한다.

[0112]

도 5, 패널 a-u는 항-LOXL2 항체 AB0023은 기질 활성화의 감소 및 생체내 1차 종양 및 전이성 암의 이종이식편 모델 모두에서의 종양 환경의 발생의 억제에 효과적이라는 것을 나타낸다. 도 5, 패널 a 및 b에 나타난 결과에 대해, 대략 10⁶ 개 MDA-MB231 세포를 파종 골 전이 모델을 생성하기 위해 마우스에 (좌심실로) 주사하고, 주사 28일 후, 종양 존재량을 평가하였다. 주사된 동물을 항-LOX 항체 M64, 항-LOXL2 항체 AB0023, 탁소텔 또는 비히클 대조군으로 처리하였다. 도 5, 패널 a는 대퇴골에서의 28일차 종양 세포 존재량 (AB0023 $p=0.0021$, M64 $p=0.5262$)을 나타내고; 도 5, 패널 b는 종 복측 골에서의 28일차 종양 세포 존재량 (AB0023 $p=0.0197$, M64 $p=0.5153$)을 나타낸다.

[0113]

도 5, 패널 c-m에 나타난 결과에 대해, 1차 종양은 MDA-MB-435 세포주를 사용하여 생성되었고, 기재된 바와 같이 처리하였다. 숙주 동물이 비히클 단독으로 처리된 이 모델 시스템에서 생성된 종양으로부터의 절편을 LOXL2 (도 5, 패널 c)의 발현 및 LOX (도 5, 패널 d)의 발현에 대해 염색하였다. 도 5, 패널 e는 비히클 단독, 탁소텔 (종양 부피의 감소에 대한 양성 대조군), 항-LOXL2 항체 AB0023 및 항-LOX 항체 M64로 처리된 마우스에서의 종양 부피의 측정치를 나타낸다. AB0023-처리된 마우스는 종양 부피 (3주차에서 45%, $p=0.001$; 5주차에서 33%, $p=0.0240$)의 의미있는 감소를 유지하였으며, M64 처리된 마우스는 (3주차에서 27%, $p=0.040$; 5주차에서는 의미없음) 의미있는 감소를 유지하지 않았다. 도 5, 패널 f-i는 비히클-처리된 (도 5, 패널 f), AB0023-처리된 (도 5, 패널 g), M64-처리된 (도 5, 패널 h) 및 탁소텔-처리된 (도 5, 패널 i) 동물로부터의 종양의 시리우스 레드 (Sirius Red) 염색의 예를 나타낸다. 도 5, 패널 j-m은 비히클 단독 (도 5, 패널 j), AB0023 (도 5, 패널 k), M64 (도 5, 패널 l) 및 탁소텔 (도 5, 패널 m)로 처리된 동물로부터 수득된 종양으로부터의 절편에서의 알파-평활근 액틴 (α -SMA) 발현의 IHC 분석을 나타낸다. 도 5n은 MDA-MB-435-유도된 종양의 종양 환경에서의 시리우스 레드 염색, α -SMA 발현 및 CD31 발현의 정량화를 나타낸다. 결과는 시리우스 레드 염색에 의해 결정 바와 같이 AB0023 처리된 마우스 ($p=0.0027$)에서의 가교결합된 콜라겐의 61% 감소,

α -SMA 발현에 의해 평가된 TAF ($p=0.011$)의 존재 하에서의 88% 감소, 및 CD31 발현 ($p=0.0002$)에 의해 평가된 바와 같이 중앙 혈관계에서의 74% 감소를 나타낸다.

[0114] 도 5, 패널 o는 AB0023- 및 BAPN-처리된 마우스에서의 MDA-MB-435-유도된 1차 종양에서의 중앙 부피의 별도의 연구의 결과를 나타내며; 항-LOXL2 항체로의 처리 후 중앙 부피의 통계학적으로 의미있는 감소를 나타낸다. 도 5, 패널 p는 AB0023- 및 BAPN-처리된 마우스로부터의 MDA-MB-435-유도된 종양에서의 시리우스 레드 염색 (콜라겐 생성), CD-31 발현 (혈관형성) 및 α -SMA 발현 (섬유모세포 활성화)의 정량 분석을 나타내며; AB0023-처리된 마우스에서의 모든 3개 마커의 감소를 나타낸다. 도 5, 패널 q는 AB0023-처리된 및 대조군 (비히클-처리된) 마우스로부터의 MDA-MB-435-유도된 종양에서의 LOXL2, VEGF 및 SDF-1의 발현의 분석을 나타내며; AB0023-처리된 MDA-MB-435 종양에서의 VEGF 수준 ($p=0.0001$)의 76% 감소, SDF1 수준 ($p=0.0200$)의 80% 감소 및 LOXL2 수준 ($p=0.0005$)의 55% 감소를 나타낸다.

[0115] 도 5, 패널 r 및 s는 AB0023-처리된 MDA-MB-435 종양에서의 괴사의 증거를 제공한다. 도 5, 패널 r은 AB0023-처리된 MDA-MB-435 종양으로부터의 절편에서의 중앙 괴사 인자 알파 (TNF- α)에 대한 IHC 분석을 나타낸다. 도 5, 패널 s는 AB0023-처리된 MDA-MB-435 종양으로부터의 절편의 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색을 나타낸다. 도 5t 및 5u는 AB0023-처리된 MDA-MB-435 종양에서의 핵농축에 대한 증거를 제공한다. 비히클-처리된 종양의 절편에서의 핵은 잘 정의되었지만 (도 5, 패널 t), AB0023-처리된 종양의 절편에서의 핵은 농축된 것으로 나타났다 (도 5, 패널 u).

[0116] 도 6, 패널 a-e는 CCl_4 -유도된 간 섬유증 및 근육섬유모세포 활성화의 AB0023-매개된 억제를 나타낸다. 도 6, 패널 a는 또한 항-LOXL2 항체 AB0023, 항-LOX 항체 M64 또는 비히클로 처리된 CCl_4 -처리된 마우스의 카플란 마이어 (Kaplan Meier) 생존 분석을 나타낸다. 생존의 의미있는 증가는 AB0023 처리 군 (로그 순위법에서 $p=0.0029$, 또는 만텔-콕스 (Mantel-Cox) 시험에서 $p=0.0064$)에 나타났다. 도 6, 패널 b는 AB0023 처리된 마우스 ($p=0.0020$)의 간에서의 브리징 (bridging) 섬유증의 양의 의미있는 감소를 나타낸다. 도 6, 패널 c 및 d는 AB0023 처리된 마우스로부터의 간에 비교하여 (도 6, 패널 d), 비히클 처리된 마우스로부터의 간의 포토포탈 (porto-portal) 영역의 절편에서의 α -SMA에 대한 IHC 분석을 나타낸다 (도 6, 패널 c). 도 6, 패널 e는 α -SMA 신호의 정량 분석을 제공하며, AB0023-처리된 동물의 간에서의 브리징 섬유증의 부재는 알파-SMA 양성 근육섬유모세포 ($p=0.0260$)의 수의 의미있는 감소를 동반한다는 것을 입증한다.

[0117] 도 7, 패널 a-z는 다양한 인간 종양 및 정상 조직에서의 LOXL2 발현의 증거를 나타낸다. (패널 a-f) 인간 결장 선암종 (패널 a), 췌장 선암종 (패널 b), 자궁 선암종 (패널 c), 신장 세포 암종 (패널 d), 위 선암종 (패널 e) 및 후두 편평 세포 암종 (패널 f)에 대해 LOXL2 전사체의 정량 RT-PCR 분석을 수행하였으며; 증가하는 종양 등급과 함께 증가된 LOXL2 전사체에 대한 추세가 관찰하였다. (패널 g-y) 다양한 LOX/L 종의 웨스턴 블롯 분석은 인간 및 마우스 조직 절편의 IHC를 위해 사용된 폴리클로날 항체는 LOXL2에 대해 특이적이라는 것을 나타낸다 (패널 g, cLOX = 성숙 LOX, 프로펩티드 절단됨; MCD = 단백질 만의 촉매 도메인; FL = 전장 단백질; 이 특이성을 또한 ELISA에 의해 확인하였음 (데이터는 나타내지 않았음)). 유방 침윤성 유관 암종 (패널 h), 자궁 내막 암종 (패널 i), 결장 선암종 (패널 j), 간세포 암종 (패널 k, 또한 LOX 발현에 대해 염색됨 (패널 l)), 췌장의 신경내분비 암종 (패널 m, 또한 LOX 발현에 대해 염색됨 (패널 n)), 흑색종 (패널 o), 정상 심장 (패널 p, 또한 CD31에 대해 염색됨 (패널 q)), 정상 간 (패널 r), 정상 폐 (패널 s, 또한 CD31에 대해 염색됨 (패널 t)), 정상 난소 (패널 u), 정상 비장 (패널 v), 정상 평활근 (패널 x, 또한 LOX 발현에 대해 염색됨 (패널 w)) 및 정상 동맥 (z, 또한 LOX 발현에 대해 염색됨 (패널 y))에서의 LOXL2 발현의 추가의 예. 도 7에 제시된 표 1은 인간 건강한 조직에서의 LOXL2 발현을 요약한다. 인간 정상 조직을 항-LOXL2 폴리클로날 항체로 염색하고, 상대적 LOXL2 발현 수준의 정성 평가를 편집하였다.

[0118] 도 8, 패널 a-t는 분비된 LOXL2는 시험관내에서 종양 세포의 재형성 및 침입을 촉진한다는 것을 나타낸다 (패널 a) 다양한 종양 및 섬유모세포 세포주에서의 LOXL2 전사체의 qRT-PCR 분석 (Ct 값) (정상산소 조건, RPL19가 참조로 사용됨). (패널 b) 인간 종양 및 섬유모세포 세포주에서의 LOXL2 발현의 웨스턴 분석 (전세포 펠렛 = 세포; 조건화 배지 = CM). (패널 c) 정제된 재조합 인간 LOXL2를 사용한 암플렉스 레드 (Amplex Red) 검정은 LOXL2의 87kD 및 55kD 형태 모두가 활성이며, BAPN에 의해 억제된다는 것을 나타낸다 (혼합물 = 두 형태 모두의 ~50:50 혼합물). (패널 d) 정제된 재조합 인간 LOXL2의 BAPN 억제에 대한 용량 반응 곡선 (암플렉스 레드 검정; 데이터는 대조군에 대해 정규화됨). (패널 e-g) HS578t는 비-표적 siRNA (siNT) 또는 LOXL2 siRNA로 형질감염되었고, 이어서 LOXL2 또는 콜라겐 I의 발현에 대해 염색하였다. LOXL2 발현은 콜라겐 I (LOXL2에 대해 염색된 siNT (패널 e), LOXL2 (패널 f) 및 콜라겐 I (패널 g)에 대해 염색된 LOXL2 siRNA)과 함께 동시-국소화되었다. (패널 h) MC3T3E1에서의 LOX의 분비 (~20X 농축된 CM). (패널 i, j) 정상산소 (패

널 i) 또는 저산소 (패널 j) 조건하의 종양 또는 섬유모세포 세포주에서의 LOX 발현은 LOX의 검출가능한 분비를 나타내지 않았다 (~20X 농축된 CM). (k,l) 비-표적 shRNA (패널 k)로 형질감염되고, 로다민-팔로이딘으로 염색된 MDA-MB-231 세포는 그들의 간엽 표현형을 보유하였으며, LOXL2 shRNA (패널 l)로 형질감염된 것들은 더 상피성 표현형을 채택하였다. (패널 m,n) 웨스턴 블롯 분석 및 ELISA (패널 n)는 모두 AB0023은 LOXL2에 대해 특이적이라는 것을 나타낸다. (패널 o) LOXL2 효소적 활성의 AB0023 억제에 대한 용량 반응 곡선 (암플렉스 레드 검정). (패널 p) AB0023은 마우스 LOXL2와 교차 반응한다. (패널 q-t) SW620 세포의 성장 배지는 다음 조건화 배지로 보충되었다: MDA-MB-231 CM (패널 r) 또는 빈 벡터 (패널 q), LOXL2 (패널 s) 또는 LOXL2 Y689F (패널 t)로 형질감염된 HEK293 CM. 세포를 로다민-팔로이딘으로 염색하였다.

[0119] 도 9, 패널 a-b는 다양한 장력하의 HFF 세포에서의 LOXL2 발현 및 LOXL2 억다운 (knockdown)의 확인을 나타낸다. (패널 a) HFF 세포를 2 mg/ml (2) 또는 3 mg/ml (3) 콜라겐 I 함유 조직 배양 플레이트 (플라스틱) 또는 콜라겐 I 겔 중에서 성장시켰다. 겔을 분리시키거나 (떼다님) 또는 배양 접시에 앵커링하였다 (부착됨). 조건화 배지를 웨스턴 분석에 의해 분석하고, LOXL2 발현에 대해 조사하였다. (패널 b) HFF 세포를 LOXL2 siRNA (siLOXL2)의 비-표적 siRNA (siNT)로 형질감염시키고, 조건화 배지를 웨스턴 블롯 분석을 통해 LOXL2 발현에 대해 조사하였다.

[0120] 도 10, 패널 a-b는 생체내 매트릭셀 플러그에서의 침윤성 세포에서의 LOXL2 발현을 나타낸다 (패널 a,b) 매트릭셀 플러그에서의 내피세포 침윤물의 IHC 분석은 LOXL2 발현을 확인한다 (패널 a). 절편을 또한 CD31로 염색하여 (패널 b) 내피세포의 존재를 확인하였다.

[0121] 도 11, 패널 a-o는 생체내에서의 암의 1차 종양 및 전이성 이종이식편 모델에서의 AB0023 효능을 나타낸다 (패널 a) MDA-MB-231 세포의 qRT-PCR 분석은 모든 LOX/L 단백질의 전사를 확인한다 (RPL-19가 참조로 사용됨). (패널 b-e) 비히클 (패널 b), 항-LOXL2 항체 AB0023 (패널 c), 항-LOX 항체 M64 (패널 d) 또는 탁소텔 (패널 e)로 처리된 마우스로부터 수집된 MDA-MB-435 확립된 1차 종양의 CD31 염색은 비히클 (p=0.0002)에 비교하여 AB0023 처리에서의 CD31 염색의 74% 감소를 나타냈다. (패널 f, g) VEGF (패널 f) 및 LOXL2 (패널 g)의 발현에 대해 염색된 인간 유방 선암종은 TAF 발현의 유사성을 나타낸다. (패널 h-o) 비히클 및 AB0023 처리된 마우스로부터의 MDA-MB-435 확립된 1차 종양을 LOXL2 (패널 h, 비히클 처리됨; 패널 i, AB0023 처리됨), VEGF (패널 j, 비히클; 패널 k, AB0023) 및 SDF-1 (패널 l, 비히클; 패널 m, AB0023), 및 H&E (패널 n, 비히클, 패널 o, AB0023)의 발현에 대해 염색하였다.

[0122] 도 12, 패널 a-d는 CC14-유도된 섬유증 모델로부터의 무린 간에서의 섬유발생을 나타낸다. (패널 a-d) 무린 CC14-유도된 간 섬유증 모델은 건강한 간 (패널 b)에 비교하여 조사한 동물 (11일차)로부터의 간 (패널 a)의 콜라겐 I 염색 (시리우스 레드)에 의해 증명된 바와 같이 간 손상 및 섬유증의 초기 증거를 나타냈다. 브리징 섬유증의 분석에서 사용된 간의 예: AB0023 처리된 마우스 (패널 d)는 비히클 (패널 c)에 비교하여 의미있게 더 적은 완전한 브리징 섬유증 (p=0.002)을 가졌다.

[0123] 본 발명의 상세한 설명

[0124] 본 개시내용의 실시는, 달리 언급하지 않는 한, 당업계의 기술에 속하는 세포 생물학, 독성학, 분자 생물학, 생화학, 세포 배양, 면역학, 종양학, 제조함 DNA 분야 및 관련 분야에서의 표준 방법 및 통상의 기술을 이용한다. 이러한 기술은 문헌에 기재되어 있으므로 당업자에게 이용가능하다. 예를 들어, 문헌 [Alberts, B. et al., "Molecular Biology of the Cell," 5th edition, Garland Science, New York, NY, 2008]; [Voet, D. et al. "Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level," 3rd edition, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008]; [Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001]; [Ausubel, F. et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates]; [Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique," 4th edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000]; 및 [the series "Methods in Enzymology," Academic Press, San Diego, CA] 참조.

[0125] 본 발명자들은 종양학적 및 섬유증 질환의 병리학적 미세환경의 생성에서의 매트릭스 효소 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)에 대한 역할을 확인하였다. 인간 종양 및 간 섬유증의 분석은 활성화된 섬유모세포 및 신생혈관계에 의한 LOXL2의 광범위하고 보존된 발현을 밝혔다. 항-LOXL2 모노클로날 항체로의 LOXL2의 억제는 암의 1차 및 전이성 이종이식편 모델 및 CC14-유도된 간 섬유증 모두에서 효과적이었다. LOXL2의 억제는 섬유모세포

포 활성화, 섬유모세포 동원, 결합조직형성 및 혈관화의 실질적인 감소 만이 아니고, 또한 프로-혈관신생 성장 인자 및 사이토킨, 예를 들면 VEGF 및 SDF1의 의미있게 감소된 생성을 야기하였다. 리실 옥시다제 (LOX) 의 억제제는 이러한 효과가 거의 없었다.

[0126] 소 분자 베타-아미노프로프리오니트릴 (BAPN)은 시험관내 및 생체내에서 LOX/L 활성의 억제의 효과를 탐구하기 위해 사용되어 왔다. BAPN은 효소 도메인에서의 라이신-티로신 퀴논을 공유결합으로 변형시키고, 따라서 비가역성 억제제로서의 활성을 갖는다. BAPN은 상이한 LOX/L의 잠재적으로 다양한 활성 만이 아니고, 다른 야민 옥시다제에서의 유사한 도메인도 억제함으로써 특이성이 결핍된다. 항-LOXL2 항체는 소 분자 펜-리실 옥시다제 억제제 베타-아미노프로프리오니트릴 (BAPN)을 능가하였다. 항-LOXL2 항체는 특이적인 LOXL2의 억제제로서의 활성을 가지며, 중앙학적 및 섬유증 질환에서 넓은 이용을 갖는 신규한 치료적 접근법을 나타낸다.

[0127] 본 발명자들은 중앙 및 섬유증 질환의 병리학적 미세환경을 확립하는데 있어서의 LOXL2에 대한 역할을 밝혔고, 이는 요법을 위한 표적이라는 것을 입증하였다. TAF 및 중앙 혈관계에 의한 LOXL2 단백질 발현 및 분비는 고형 중앙 사이에서 광범위하고, 중앙-기질 경계에서 특히 명확하다. LOXL2 발현은 결합조직형성 및 글로메룰로이드 미세혈관 증식의 영역에서 또한 현저하고, 이들 모두는 많은 암에서의 안 좋은 결과와 연관된다. 활성 간 섬유증에서, LOXL2는 간세포-근육섬유모세포 경계 및 연관된 신생혈관계에서 유사하게 발현되었다.

[0128] 발명자들은 LOXL2의 발현은 상피성 기원의 중앙 세포, 내피세포 및 섬유모세포를 포함하는 다양한 세포 유형에서 액틴 세포골격의 재형성을 야기한다는 것을 추가로 결정하였다. LOXL2의 질환 진행에 대한 1개 기여는, 아마 섬유원성 콜라겐의 효소적으로-촉매된 가교 및 국소 매트릭스 장력에서의 상응하는 변화를 통한 질환-연관된 섬유모세포의 활성화 및 동원이다. 중앙 및 간 섬유증에서, 장력의 증가는 질환-연관된 세포 분화로 이어질 수 있다. 섬유원성 콜라겐의 생성 및 조직 내의 장력의 생성을 넘어서, TAF (및 잠재적으로 또한 근육 섬유모세포)는 많은 혈관신생, 혈관형성 및 화학주성 성장 인자, 및 진행되는 중앙형성 및 섬유증을 지지하는 사이토킨을 분비한다.

[0129] 암 및 섬유증 모두의 모델에서의 분비된 LOXL2의 활성의 특이적인 억제제는, 다양한 파라미터에 의해 평가된 바와 같이 질환의 의미있는 감소를 야기하였다는 것이 본원에 개시된다. LOXL2의 억제제는 혈관신생, 및 질환-연관된 상피의 침입 및 분화에 직접적으로 영향을 줄 수 있다. 그러나, LOXL2의 억제제와 같이 VEGFR 및 PIGF 경로에 지시된 효능있는 항혈관신생이 중앙에서의 αSMA 양성 세포의 수에 영향을 주지 않는 점을 고려하면, 혈관신생의 억제제는 LOXL2의 억제 후에 관찰되는 효과에 대해 단독으로 완전한 원인이 되는 것은 아니다.

[0130] 생체내에서의 LOXL2의 억제는 결합조직형성 및 프로-혈관신생 성장 인자 및 사이토킨의 발현의 실질적인 감소, 중앙 혈관계의 형성의 결핍, 및 중앙 세포의 증가된 괴사 및 자가포식현상의 결과를 포함하는 섬유모세포 활성화 및 동원의 억제를 야기하였다는 것이 또한 본원에 개시된다. 섬유증의 특징인 섬유원성 콜라겐의 생성은 콜라겐 발현의 직접적인 조절로 인한 것이 아니고, 오히려 활성화된 근육섬유모세포 (다수의 콜라겐 생성에 원인이 되는 세포 유형)의 수의 실질적인 감소로 인한 LOXL2의 억제에 의해 또한 많이 감소되었다.

[0131] 섬유세포 및 다른 골수 유도된 세포, 상주 섬유모세포 또는 다른 전구체, 및 상피 세포의 상피성-에서-간엽전이 (EMT)를 포함하는 질환-연관된 활성화된 섬유모세포의 많은 잠재적인 공급원이 제시되었다. 본원에 개시된 작업에서, 질환의 상이한 부위에 관여하는 3개 매우 상이한 마우스 모델에서 치료적 이점을 획득하였고, 추가의 분석을 위해 다루기 쉬운 2개 모델에서 메카니즘은 보존된 것으로 나타났으며, 여기서 섬유모세포 활성화는 실질적으로 감소되었다. 이들 결과는 LOXL2는 섬유모세포의 기원에 독립적으로, 섬유모세포의 최종적인 분화 및 활성화를 위해 중요하다는 것을 제시한다.

[0132] 발명자들은 LOX를 포함하는 다발성 리실 옥시다제-유형 효소를 제조하는 세포를 함유하는 모델 시스템의 사용에 불구하고, LOXL2의 억제는 단독으로 치료적 효능을 획득하는데 충분하다는 것을 본원에 나타낸다. 비교적으로, LOX 효소적 활성을 억제할 수 있는 폴리클로날 항혈청을 생성하는 것으로 이전에 확인된 펩티드를 표적하는 특정 LOX-특이적인 모노클로날 항체의 사용은 중앙학 및 섬유증의 모델에서 적은 치료적 이점을 제공하였다.

[0133] 질환을 앓는 조직 대 건강한 조직에서의 LOXL2의 감별 발현은 기능적 치료적 창문을 제공한다. 항-LOXL2 항체 AB0023의 안전성을 지지하여, 발명자들은 AB0023이 마우스에서 14주일 동안 2주일에 1회 50 mg/kg의 투여량에서 잘 견딜만하다는 것을 밝혔으며, 검시, 혈액학, 임상적 화학 및 조직병리학 후 약물-관련된 관찰 및 중량 또는 거동에 대한 영향이 없었다. 인간화 항-LOXL2 변이체 (AB0024)로의 게먹이 (cynomolgus) 원숭이에

서의 예비 연구는 항-LOXL2 항체 요법이 100 mg/kg에서의 반복 투여 후 잘 견딜만했다는 추가의 지지를 제공하였다.

[0134] 항체 치료제는 억제에 대한 매우 특이적인 메카니즘의 1개 예를 제공한다. 사실, 분비된 LOXL2의 효소적 활성을 억제하는 항체 (AB0023)로의 분비된 LOXL2의 특이적인 표적은 세포 기반의 검정 및 생체내에서의 덜-특이적인 세포-침투성 펜-억제제 BAPN을 능가하였다 (이전의 보고서와 반대로, 발견된 LOXL2는 시험관내에서 낮은 나노몰 IC50을 갖는 BAPN에 의해 쉽게 억제되는 것으로 밝혀졌고, LOX에 대해 관찰된 것과 유사하다는 것을 주목한다; 도 8, 패널 D 및 문헌 [Rodriguez et al. (2010) J. Biol. Chem. 285:20964-20974]). 특이성 외에, 이 치료적 방식은 LOXL2, AB0023 및 AB0024의 비-경쟁적 알로스테리 억제제는 기질 농도, 또는 LOXL2 및 그의 기질 사이의 연관성의 상태에 독립적으로 활성을 가지며, 비가역성 억제제 BAPN은 경쟁적 억제제로서의 거동을 가지고, 고 기질 농도에서 또는 LOXL2가 그의 기질에 결합된 조건 하에 덜 효과적이므로 추가의 이점을 제공한다. 이 억제의 대안 메카니즘은 활성 질환에서, 기질, 예를 들면 섬유원성 콜라겐의 국소적 고농도를 함유하는 활발한 착체 세포 환경 내에서 기능하는 매트릭스 효소에 대한 광범위한 이용을 갖는 신규한 치료적 접근법을 나타낸다.

[0135] 본원에 기재된 바와 같이, LOXL2의 알로스테리 억제는 표적 질환 진행의 기본적으로 공유된 특징, 예를 들면 기질 분획 또는 매트릭스 미세환경 또는 전이성 오목의 생성에 의해 종양 및 섬유증 질환의 성장 및 진행을 억제하기 위한 신규한 접근법을 나타낸다. 즉, 단일 표적 (LOXL2)의 억제는 결합조직형성의 수많은 상이한 유도자에 대한 다발성 효과를 가지며, LOXL2의 표적은 모노클로날 항체의 사용을 통해 매우 특이적이 될 수 있다. 또한, 종양 미세환경의 유전적으로 더 안정적인 기질 세포를 표적하는 것은 감소된 확률의 약물 내성에 대한 잠재력을 제공한다.

[0136] **정의**

[0137] "종양 환경"은 종양 및 그의 주변 조직을 가리킨다. 종양 환경의 부분집합은 종양-기질 경계, 즉 인접한 기질 조직과 함께 종양의 주변부 (예를 들면, 종양 캡슐)이다. 또다른 부분집합은 종양 그 자신이다; 하지만 또다른 부분집합은 종양 밖의 기질 조직이다.

[0138] "섬유모세포 활성화"는 종양 세포에 의해 방출된 신호 (예를 들면, 성장 인자, 사이토킨)에 대해 반응하여 정상 섬유모세포가 종양-연관된 섬유모세포 (TAF)로 변환되는 절차를 가리킨다. 이러한 성장 인자의 1개 예는 전환 성장 인자-베타 (TGF-β)이다. 섬유모세포 활성화의 예시적인 결과는 활성화된 섬유모세포에서의 알파-평활근 액틴 (α SMA)의 증가된 발현 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 증가된 발현이다.

[0139] "종양-연관된 섬유모세포 (TAF)"는 섬유모세포 활성화를 거친 섬유모세포이고, 특히 알파-평활근 액틴 (α SMA) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 증가된 발현에 의해 특징지어진다.

[0140] "근육섬유모세포"는 섬유모세포 및 평활근 세포 모두의 특징을 갖는 세포이다. 이들은 섬유증 조직 내에 존재할 수 있고, 특히 알파-평활근 액틴의 발현에 의해 특징지어진다.

[0141] "결합조직형성"은 섬유 또는 결합 조직의 성장을 가리킨다. 일부 종양은 결합조직형성 반응, 즉 종양 주변에의 고밀도의 섬유 조직의 만연한 성장을 야기한다.

[0142] "혈관신생"은 기존에-존재하는 혈관으로부터의 신규한 혈액 혈관의 형성을 가리킨다.

[0143] "혈관형성"은 기존에-존재하는 혈관의 부재에서의 신규한 혈액 혈관의 형성을 가리킨다.

[0144] **종양 기질**

[0145] 종양의 성장 및 발생은 종양 및 그의 주변 기질 조직 사이의 상호작용에 의존한다. 종양은 결합 조직, 섬유모세포, 근육섬유모세포, 백혈구, 내피세포, 혈관주위세포 및 평활근 세포를 함유하는 기질 프레임워크 내에서 성장한다. 성장하는 종양은, 특히 (기질 세포의 거동에 영향을 주는) 성장 인자의 분비 및 (기질 세포의 매트릭스를 재형성하는) 프로테아제의 분비에 의해 주변 기질에 영향을 준다. 기질 세포는, 대신에 종양 세포의 성장 및 분열을 자극하는 성장 인자를 분비하고; 매트릭스를 추가로 변형시키는 프로테아제를 분비한다. 이런 식으로, 종양 및 그의 주변 기질 조직은 종양의 추가의 성장을 지지하는 종양 환경을 형성한다. 예를 들면, 연구는 특정 암종은 지속적인 성장을 위해 종양-연관된 섬유모세포의 존재에 의존하며, 정상 섬유모세포의 존재하에 검출가능하거나 또는 주목할 만한 수준에서 성장하지 않을 것이라는 것을 나타냈다. 또한 특정 종양의 강한 성장은 세포외 매트릭스로부터 혈관신생 인자를 방출함으로써 활성을 갖는 비만 세포에 의해 보통 분비되는 특정 매트릭스 메탈로프로테아제를 요구한다는 것을 나타냈다.

(SRCR) 도메인의 4개 반복체를 함유한다. 이들 도메인은 LOX 또는 LOXL1에 존재하지 않는다. SRCR 도메인은 분비, 막횡단, 또는 세포의 매트릭스 단백질에서 발견되며, 수많은 분비 및 수용체 단백질에서 리간드 결합을 매개하는 것으로 알려져 있다. 문헌 [Hoheneste et al. (1999) Nat. Struct. Biol. 6:228-232]; [Sasaki et al. (1998) EMBO J. 17:1606-1613] 참조. LOXL3은 그의 SRCR 도메인 외에 그의 아미노-말단 영역에 핵 위치 신호를 함유한다. 프롤린-풍부 도메인은 LOXL1에 고유한 것처럼 보인다. 문헌 [Molnar et al. (2003) Biochim. Biophys. Acta 1647:220-224] 참조. 다양한 리실 옥시다제-유형 효소는 또한 그의 글리코실화 패턴에 있어서 상이하다.

[0156] 또한, 리실 옥시다제-유형 효소 사이에서 조직 분포가 상이하다. 인간 LOX mRNA는 심장, 태반, 고환, 폐, 신장 및 자궁에서 고도로 발현되지만, 뇌 및 간에서는 약간 발현된다. 인간 LOXL1에 대한 mRNA는 태반, 신장, 근육, 심장, 폐 및 췌장에서 발현되며, LOX와 유사하게 뇌 및 간에서 훨씬 낮은 수준으로 발현된다. 문헌 [Kim et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:7176-7182] 참조. 자궁, 태반 및 다른 기관에서는 높은 수준의 LOXL2 mRNA가 발현되지만, LOX 및 LOXL1과 마찬가지로 뇌 및 간에서는 낮은 수준이 발현된다. 문헌 [Jourdan Le-Saux et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:12939:12944] 참조. LOXL3 mRNA는 고환, 비장 및 전립선에서 고도로 발현되고, 태반에서 보통으로 발현되고, 간에서 발현되지 않는 반면, 높은 수준의 LOXL4 mRNA는 간에서 관찰된다. 문헌 [Huang et al. (2001) Matrix Biol. 20:153-157]; [Maki and Kivirikko (2001) Biochem. J. 355:381-387]; [Jourdan Le-Saux et al. (2001) Genomics 74:211-218]; [Asuncion et al. (2001) Matrix Biol. 20:487-491] 참조.

[0157] 또한, 질환에서 여러 리실 옥시다제-유형 효소의 발현 및/또는 연관은 다르다. 예를 들어, 문헌 [Kagen (1994) Pathol. Res. Pract. 190:910-919]; [Murawaki et al. (1991) Hepatology 14:1167-1173]; [Siegel et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2945-2949]; [Jourdan Le-Saux et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:587-592]; 및 [Kim et al. (1999) J. Cell Biochem. 72:181-188] 참조. 리실 옥시다제-유형 효소는 또한 두경부암, 방광암, 결장암, 식도암 및 유방암을 비롯한 수많은 암과 관련되었다. 예를 들어, 문헌 [Wu et al. (2007) Cancer Res. 67:4123-4129]; [Gorough et al. (2007) J. Pathol. 212:74-82]; [Csiszar (2001) Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32] 및 [Kirschmann et al. (2002) Cancer Res. 62:4478-4483] 참조.

[0158] 따라서, 비록 리실 옥시다제-유형 효소가 구조 및 기능에 있어서 일부 중복을 나타내더라도, 각각은 또한 구별되는 구조 및 기능을 갖는다. 구조와 관련하여, 예를 들어, 인간 LOX 단백질의 촉매 도메인에 대해 일어난 특정 항체는 인간 LOXL2에 결합하지 않는다. 기능과 관련하여, LOX의 표적화된 결실은 마우스에서 분만시 치명적인 것으로 나타난 반면, LOXL1 결핍은 심각한 발달 표현형을 유발하지 않는 것으로 보고되었다. 문헌 [Hornstra et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:14387-14393; Bronson et al. (2005) Neurosci. Lett. 390:118-122] 참조.

[0159] 리실 옥시다제-유형 효소의 가장 광범위하게 보고된 활성은 세포 외 콜라겐 및 엘라스틴에서 특정 리신 잔기의 산화이지만, 리실 옥시다제-유형 효소가 또한 수많은 세포내 과정에 참여한다는 증거가 있다. 예를 들어, 일부 리실 옥시다제-유형 효소는 유전자 발현을 조절한다는 보고가 있다. 문헌 [Li et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12817-12822]; [Giampuzzi et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:36341-36349] 참조. 또한, LOX는 히스톤 H1에서 리신 잔기를 산화시킨다고 보고되었다. LOX의 추가의 세포외 활성은 단핵세포, 섬유모세포 및 평활근 세포의 화학주성의 유도를 포함한다. 문헌 [Lazarus et al. (1995) Matrix Biol. 14:727-731]; [Nelson et al. (1988) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 188:346-352] 참조. LOX 그 자체의 발현은 수많은 성장 인자 및 스테로이드, 예컨대 TGF- β , TNF- α 및 인터페론에 의해 유도된다. 문헌 [Csiszar (2001) Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32] 참조. 최근의 연구는 다양한 생물학적 기능, 예컨대 발달 조절, 종양 억제, 세포 이동성 및 세포 노화에 있어서 LOX에 대한 다른 역할이 있다고 생각하였다.

[0160] 다양한 공급원으로부터의 리실 옥시다제 (LOX) 단백질의 예는 하기 서열 중 하나로부터 발현되거나 번역된 폴리펩티드에 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 효소를 포함한다: EMBL/진뱅크 등록번호(GenBank accessions): M94054; AAA59525.1-mRNA; S45875; AAB23549.1-mRNA; S78694; AAB21243.1-mRNA; AF039291; AAD02130.1-mRNA; BC074820; AAH74820.1-mRNA; BC074872; AAH74872.1-mRNA; M84150; AAA59541.1-게놈 DNA. LOX의 한 실시양태는 인간 리실 옥시다제 (hLOX) 프리프로단백질이다.

[0161] 리실 옥시다제-유사 효소를 코딩하는 서열의 예시적인 개시내용은 하기와 같다: LOXL1은 진뱅크/EMBL BC015090; AAH15090.1로 기탁된 mRNA에 의해 코딩되고; LOXL2는 진뱅크/EMBL U89942로 기탁된 mRNA에 의해 코딩되고; LOXL3은 진뱅크/EMBL AF282619; AAK51671.1로 기탁된 mRNA에 의해 코딩되고; LOXL4는 진뱅크/EMBL

AF338441; AAK71934.1로 기탁된 mRNA에 의해 코딩된다.

- [0162] 프리프로펩티드로 알려진 LOX 단백질의 1차 번역 생성물은 아미노산 1 내지 21로부터 연장된 신호 서열을 함유한다. 이 신호 서열은 마우스 및 인간 LOX 모두에서 Cys21과 Ala22 사이의 절단에 의해 세포내로 방출되어 LOX의 46 내지 48 kDa 프로펩티드를 생성된다 (본원에서 전장 형태라고도 지칭됨). 프로펩티드는 골지체를 통해 통과하는 동안 N-글리코실화되어 50 kDa 단백질을 생성한 다음, 세포의 환경으로 분비된다. 이 단계에서, 단백질은 촉매적으로 불활성이다. 마우스 LOX에서 Gly168과 Asp169 사이의 추가의 절단 및 인간 LOX에서 Gly174와 Asp175 사이의 추가의 절단은 성숙한, 촉매적으로 활성인 30 내지 32 kDa 효소를 생성하여 18 kDa 프로펩티드를 방출한다. 이러한 최종 절단 사건은 금속성 엔도프로테아제 프로콜라겐 C-프로테이나제 (또한 골 형태형성 단백질-1 (BMP-1)이라고도 알려짐)에 의해 촉매된다. 흥미롭게도, 이러한 효소는 또한 LOX의 기질인 콜라겐의 처리에 있어서 기능을 한다. 이후 N-글리코실 단위는 제거된다.
- [0163] 잠재적 신호 펩티드 절단 부위는 LOXL1, LOXL2, LOXL3 및 LOXL4의 아미노 말단에서 예상되었다. 예상된 신호 절단 부위는 LOXL1의 경우 Gly25와 Gln26 사이이고, LOXL2의 경우 Ala25와 Gln26 사이이고, LOXL3의 경우 Gly25와 Ser26 사이이고, LOXL4의 경우 Arg23과 Pro24 사이이다.
- [0164] LOXL1 단백질에서의 BMP-1 절단 부위는 Ser354와 Asp355 사이인 것으로 확인되었다. 문헌 [Borel et al. (2001) J. Biol. Chem.276:48944-48949] 참조. 다른 리실 옥시다제-유형 효소에서의 잠재적 BMP-1 절단 부위는 프로콜라겐 및 프로-LOX에서의 BMP-1 절단에 대한 공통(consensus) 서열을 기준으로 예상되며, Ala/Gly-Asp 서열이고, 종종 이어서 산성 또는 하전된 잔기가 존재한다. LOXL3에서의 예상된 BMP-1 절단 부위는 Gly447과 Asp448 사이에 위치하며; 이 부위에서의 처리는 성숙 LOX와 유사한 크기의 성숙 펩티드를 생성할 수 있다. BMP-1에 대한 잠재적 절단 부위는 또한 LOXL4 내에서 잔기 Ala569와 Asp570 사이인 것으로 확인되었다. 문헌 [Kim et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:52071-52074] 참조. LOXL2는 또한 LOXL 부류의 다른 구성원과 유사하게 단백질 가수분해에 의해 절단되고, 분비될 수 있다. 문헌 [Akiri et al.(2003) Cancer Res. 63:1657-1666] 참조.
- [0165] 리실 옥시다제-유형 효소에서의 통상적인 촉매 도메인의 존재로부터 예상되는 바와 같이, 활성 부위가 위치한 프로효소의 C-말단 30 kDa 영역의 서열은 고도로 (대략 95%) 보존되었다. 프로펩티드 도메인에서 보다 중간 정도의 보존률 (대략 60 내지 70%)이 관찰된다.
- [0166] 본 개시내용의 목적상, 용어 "리실 옥시다제-유형 효소"는 상기 논의된 리신 산화 효소 5개 모두 (LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 및 LOXL4)를 포함하며, 또한 효소 활성, 예를 들어 리실 잔기의 탈아미노화를 촉매하는 능력을 실질적으로 보유하는, LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 및 LOXL4의 기능적 단편 및/또는 유도체를 포함한다. 전형적으로, 기능적 단편 또는 유도체는 그의 리신 산화 활성의 50% 이상을 보유한다. 일부 실시양태에서, 기능적 단편 또는 유도체는 그의 리신 산화 활성의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상 또는 100%를 보유한다.
- [0167] 또한, 리실 옥시다제-유형 효소의 기능적 단편은 촉매 활성을 실질적으로 변경하지 않는 (천연 폴리펩티드 서열에 대하여) 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다고 의도된다. 용어 "보존적 아미노산 치환"은 특성의 공통적인 구조 및/또는 특성을 기준으로 하는 아미노산의 그룹화(grouping)를 지칭한다. 공통적인 구조와 관련하여, 아미노산은 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산 (글리신, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 메티오닌, 프롤린, 페닐알라닌 및 트립토판), 하전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (세린, 트레오닌, 아스파라진, 글루타민, 티로신 및 시스테인) 및 하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (리신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산 및 히스티딘)으로 그룹화될 수 있다. 방향족 측쇄를 함유하는 아미노산의 그룹은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다. 헤테로시클릭 측쇄는 프롤린, 트립토판 및 히스티딘에 존재한다. 비-극성 측쇄를 함유하는 아미노산의 그룹 내에서, 짧은 탄화수소 측쇄를 갖는 아미노산 (글리신, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신)은 보다 긴 비-탄화수소 측쇄를 갖는 아미노산 (메티오닌, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판)과 구별될 수 있다. 하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹 내에서, 산성 아미노산 (아스파르트산, 글루탐산)은 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (리신, 아르기닌 및 히스티딘)과 구별될 수 있다.
- [0168] 개별 아미노산의 공통적인 특성을 정의하는 기능적 방법은 동종 유기체의 상응하는 단백질 사이의 아미노산 변화의 표준화된 빈도를 분석하는 것이다 (문헌 [Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1979] 참조). 이러한 분석에 따라, 한 군 내의 아미노산이 동종 단백질에서 또 다른 아미노산에 대해 우선적으로 치환되어, 전체 단백질 구조에 대해 유사한 영향을 미치는 아미노산의 그룹이 정의될 수 있다 (문헌 [Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-

Verlag, 1979] 참조). 이러한 유형의 분석에 따라, 또다른 아미노산에 대해 보존적으로 치환될 수 있는 하기 아미노산의 그룹이 확인될 수 있다:

- [0169] (i) Glu, Asp, Lys, Arg 및 His로 이루어진, 하전된 기를 함유하는 아미노산,
- [0170] (ii) Lys, Arg 및 His로 이루어진, 양전하로 하전된 기를 함유하는 아미노산,
- [0171] (iii) Glu 및 Asp로 이루어진, 음전하로 하전된 기를 함유하는 아미노산,
- [0172] (iv) Phe, Tyr 및 Trp로 이루어진, 방향족 기를 함유하는 아미노산,
- [0173] (v) His 및 Trp로 이루어진, 질소 고리 기를 함유하는 아미노산,
- [0174] (vi) Val, Leu 및 Ile로 이루어진, 거대 지방족 비-극성 기를 함유하는 아미노산,
- [0175] (vii) Met 및 Cys로 이루어진, 약-극성 기를 함유하는 아미노산,
- [0176] (viii) Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln 및 Pro로 이루어진, 소형-잔기 기를 함유하는 아미노산,
- [0177] (ix) Val, Leu, Ile, Met 및 Cys로 이루어진, 지방족 기를 함유하는 아미노산, 및
- [0178] (x) Ser 및 Thr로 이루어진, 히드록실 기를 함유하는 아미노산.

[0179] 따라서, 상기 예시된 바와 같이, 아미노산의 보존적 치환은 당업자에게 공지되어 있으며, 생성된 분자의 생물학적 활성을 변경함 없이 일반적으로 이루어질 수 있다. 당업자는 또한, 일반적으로 폴리펩티드의 비-필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않음을 인식한다. 예를 들어, 문헌 [Watson, et al., "Molecular Biology of the Gene," 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA, p. 224] 참조.

[0180] 리실 옥시다제-유형 효소와 관련한 추가의 정보에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Rucker et al. (1998) Am. J. Clin. Nutr. 67:996S-1002S] 및 [Kagan et al. (2003) J. Cell. Biochem 88:660-672] 참조. 또한, 공동 소유의 미국 특허 출원 공보 제2009/0053224호 (2009.2.26) 및 제2009/0104201호 (2009.4.23) 참조 (이들 문헌의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨).

[0181] **리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제**

[0182] 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제는 활성화제 (효능제) 및 억제제 (길항제) 모두를 포함하며, 각종 스크리닝 검정을 사용함으로써 선택될 수 있다. 1개 실시양태에서, 조절제는 시험 화합물이 리실 옥시다제-유형 효소에 결합하는지를 결정함으로써 확인될 수 있으며, 여기서 만약 결합이 일어난다면, 화합물은 후보 조절제이다. 임의로, 추가의 시험이 상기 후보 조절제에 대해 수행될 수 있다. 별법으로, 후보 화합물은 리실 옥시다제-유형 효소와 접촉할 수 있고, 리실 옥시다제-유형 효소의 생물학적 활성이 검정될 수 있으며; 리실 옥시다제-유형 효소의 생물학적 활성을 변경시키는 화합물은 리실 옥시다제-유형 효소의 조절제이다. 일반적으로, 리실 옥시다제-유형 효소의 생물학적 활성을 감소시키는 화합물은 효소의 억제제이다.

[0183] 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제를 확인하는 다른 방법은 하나 이상의 리실 옥시다제-유형 효소를 함유하는 세포 배양에서 후보 화합물을 인큐베이션하고, 세포의 하나 이상의 생물학적 활성 또는 특성을 검정하는 것을 포함한다. 배양에서 세포의 생물학적 활성 또는 특성을 변경시키는 화합물은 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 잠재적 조절제이다. 검정될 수 있는 생물학적 활성은 예를 들어, 리신 산화, 과산화물 생성, 암모니아 생성, 리실 옥시다제-유형 효소의 수준, 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 mRNA의 수준, 및/또는 리실 옥시다제-유형 효소에 특이적인 하나 이상의 기능을 포함한다. 상기 검정의 추가의 실시양태에서, 후보 화합물과의 접촉 부재 하에, 하나 이상의 생물학적 활성 또는 세포 특성이 하나 이상의 리실 옥시다제-유형 효소의 수준 또는 활성과 상관된다. 예를 들어, 생물학적 활성은 세포 기능, 예컨대 이동, 화학주성, 상피에서 중간엽으로의 전이, 또는 중간엽에서 상피로의 전이일 수 있고, 변화는 하나 이상의 대조 또는 참조 샘플 (들)과의 비교에 의해 검출된다. 예를 들어, 음성 대조군 샘플은 후보 화합물이 첨가되는, 리실 옥시다제-유형 효소의 수준이 감소된 배양물을 포함할 수 있거나, 또는 시험 배양물과 동일한 양의 리실 옥시다제-유형 효소를 갖지만 후보 화합물이 첨가되지 않는 배양물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 수준의 리실 옥시다제-유형 효소를 함유하는 별개의 배양물이 후보 화합물과 접촉된다. 생물학적 활성의 변화가 관찰되는 경우 및 그 변화가 보다 높은 수준의 리실 옥시다제-유형 효소를 갖는 배양물에서보다 큰 경우, 화합물은 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제로서 확인된다. 화합물이 리실 옥시다제-유형 효소의 활성화제인지 억제제인지 결정하는 것은 화합물에 의해 유도된 표현형으로부터 분명할 수 있거나, 또는 추가의 검정,

예컨대 하나 이상의 리실 옥시다제-유형 효소의 효소 활성에 대한 화합물 효과의 시험을 필요로 할 수 있다.

- [0184] 리실 옥시다제-유형 효소를 생화학적으로 또는 재조합적으로 수득하는 방법, 및 상기 기재된 바와 같은 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제를 확인하기 위한 세포 배양 및 효소 검정의 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0185] 리실 옥시다제-유형 효소의 효소 활성은 수많은 상이한 방법에 의해 검정될 수 있다. 예를 들어, 리실 옥시다제 효소 활성은 과산화수소, 암모늄 이온 및/또는 알데히드의 생성을 검출하고/거나 정량하거나, 리신 산화 및/또는 콜라겐 가교결합을 검정하거나, 세포 침습력, 세포 부착, 세포 성장 또는 전이성 성장을 측정함으로써 평가될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Trackman et al. (1981) Anal. Biochem. 113:336-342]; [Kagan et al. (1982) Meth. Enzymol. 82A:637-649]; [Palamakumbura et al. (2002) Anal. Biochem. 300:245-251]; [Albini et al. (1987) Cancer Res. 47:3239-3245]; [Kamath et al. (2001) Cancer Res. 61:5933-5940]; 미국 특허 제 4,997,854호 및 미국 특허 출원 공보 제2004/0248871호 참조.
- [0186] 시험 화합물은 예를 들어 소형 유기 화합물 (예를 들어, 분자량이 약 50 내지 약 2,500 Da인 유기 분자), 핵산, 또는 단백질을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 화합물 또는 다수의 화합물은 화학적으로 합성될 수 있거나 미생물학적으로 생성될 수 있고/거나 예를 들어 샘플, 예를 들어 식물, 동물 또는 미생물로부터의 세포 추출물에 포함될 수 있다. 게다가, 화합물(들)은 당업계에 공지될 수 있지만, 지금까지는 리실 옥시다제-유형 효소의 활성을 조절할 수 있다고 공지되지는 않았다. 리실 옥시다제-유형 효소의 조절제를 검정하기 위한 반응 혼합물은 세포-무함유 추출물일 수 있거나, 세포 배양물 또는 조직 배양물을 포함할 수 있다. 다수의 화합물은 예를 들어 반응 혼합물에 첨가될 수 있거나, 배양 배지에 첨가될 수 있거나, 세포에 주입될 수 있거나, 트랜스제닉 동물에 투여될 수 있다. 검정에 이용된 세포 또는 조직은 예를 들어 박테리아 세포, 진균 세포, 곤충 세포, 척추동물 세포, 포유동물 세포, 영장류 세포, 인간 세포일 수 있거나, 비-인간 트랜스제닉 동물로 구성될 수 있거나 이들로부터 수득될 수 있다.
- [0187] 리실 옥시다제-유형 효소와 같은 표적에 대해 특정 친화도를 갖는 화합물을 확인하기 위한 거대 라이브러리를 생성 및 스크리닝하는 여러 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 이들 방법은 파지-디스플레이 방법을 포함하며, 이 방법에서 무작위추출된 펩티드는 파지로부터 디스플레이되고 고정된 수용체를 사용하여 친화도 크로마토그래피에 의해 스크리닝된다. 예를 들어, WO 91/17271, WO 92/01047 및 미국 특허 제5,223,409호 참조. 또다른 접근법에서, 고체 지지체 (예를 들어, "칩") 상에 고정된 중합체의 조합 라이브러리가 포토리쓰그래피 (photolithography)에 의해 합성된다. 예를 들어, 미국 특허 제5,143,854호, WO 90/15070 및 WO 92/10092 참조. 고정된 중합체는 표지된 수용체 (예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소)와 접촉하고, 지지체를 스캔하여 표지의 위치를 결정함으로써 수용체에 결합한 중합체를 확인한다.
- [0188] 관심 폴리펩티드 (예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소)의 결합 리간드를 확인하는데 사용될 수 있는 연속 셀룰로스 막 지지체에 대한 펩티드 라이브러리의 합성 및 스크리닝은 예를 들어 문헌 [Kramer (1998) Methods Mol. Biol. 87: 25-39]에 기재되어 있다. 이러한 검정에 의해 확인된 리간드는 관심 단백질의 후보 조절제이며, 추가의 시험을 위해 선택될 수 있다. 이러한 방법은 또한, 예를 들어 관심 단백질에서의 결합 부위 및 인식 모티프를 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Rudiger (1997) EMBO J. 16:1501-1507] 및 [Weiergraber (1996) FEBS Lett. 379:122-126] 참조.
- [0189] WO 98/25146에는 원하는 특성, 예를 들어, 폴리펩티드 또는 그의 세포 수용체를 효능있게 하거나 그에 결합하거나 길항작용하는 능력을 갖는 화합물에 대한 복합체의 라이브러리를 스크리닝하는 추가의 방법이 기재되어 있다. 이러한 라이브러리에서의 복합체는 시험 하의 화합물, 화합물 합성에서 하나 이상의 단계를 기록하는 태그, 및 리포터 분자에 의한 변형에 민감한 테더(tether)를 포함한다. 테더의 변형은 복합체가 원하는 특성을 갖는 화합물을 함유하는지 표시하는데 사용된다. 태그는 상기 화합물의 합성에서 하나 이상의 단계를 나타내기 위해 해독될 수 있다. 리실 옥시다제-유형 효소와 상호작용하는 화합물을 확인하기 위한 다른 방법으로는, 예를 들어 파지 디스플레이 시스템을 이용한 시험관내 스크리닝, 필터 결합 검정, 및 예를 들어 비아코어(BIAcore) 장치 (파마시아(Pharmacia))를 사용하는 상호작용의 "실제 시간" 측정이 있다.
- [0190] 이러한 모든 방법은 리실 옥시다제-유형 효소의 활성화제/효능제 및 억제제/길항제 또는 관련 폴리펩티드를 확인하기 위해 본 개시내용에 따라 사용될 수 있다.
- [0191] 리실 옥시다제-유형 효소의 조절제의 합성에 대한 또다른 접근법은 펩티드의 모방성 유사체를 사용하는 것이다. 모방성 펩티드 유사체는, 예를 들어 천연 발생 아미노산 대신 입체이성질체, 즉 D-아미노산을 사용함으로써 생성될 수 있다; 예를 들어, 문헌 [Tsukida (1997) J. Med. Chem. 40:3534-3541] 참조. 게다가, 원래

폴리펩티드의 일부를 제거할 때 상실될 수 있는 배열 특성을 재확립하기 위해 전-모방성 성분이 펩티드에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Nachman (1995) Regul. Pept. 57:359-370] 참조.

- [0192] 펩티드 모방체를 제작하기 위한 또다른 방법은 비키랄 α -아미노산 잔기를 펩티드에 혼입시켜 아미드 결합을 지방족 쇠의 폴리메틸렌 단위로 치환시키는 것이다. 문헌 [Banerjee (1996) Biopolymers 39:769-777] 참조. 다른 시스템에서의 소형 펩티드 호르몬의 과활성 펩티드 모방성 유사체가 기재되어 있다. 문헌 [Zhang (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 224:327-331] 참조.
- [0193] 리실 옥시다제-유형 효소의 조절제의 펩티드 모방체는 또한 연속 아미드 알킬화를 통한 펩티드 모방체 조합 라이브러리를 합성한 다음, 생성된 화합물을 예를 들어 그의 결합 및 면역 특성에 대해 시험함으로써 확인될 수 있다. 펩티드 모방체 조합 라이브러리의 생성 및 사용 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Ostresh, (1996) Methods in Enzymology 267:220-234] 및 [Dorner (1996) Bioorg. Med. Chem. 4:709-715] 참조. 게다가, 하나 이상의 리실 옥시다제-유형 효소의 3차원 구조 및/또는 결정학 구조가 하나 이상의 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 펩티드 모방성 억제제의 디자인에 사용될 수 있다. 문헌 [Rose (1996) Biochemistry 35:12933-12944]; [Rutenber (1996) Bioorg. Med. Chem. 4:1545-1558] 참조.
- [0194] 천연 생물학적 폴리펩티드의 활성을 모방하는 저분자량 합성 분자의 구조-기반 디자인 및 합성은 예를 들어 문헌 [Dowd (1998) Nature Biotechnol. 16:190-195]; [Kieber-Emmons (1997) Current Opinion Biotechnol. 8:435-441]; [Moore (1997) Proc. West Pharmacol. Soc. 40:115-119]; [Mathews (1997) Proc. West Pharmacol. Soc. 40:121-125]; 및 [Mukhija (1998) European J. Biochem. 254:433-438]에 추가로 기재되어 있다.
- [0195] 또한, 예를 들어 리실 옥시다제-유형 효소의 기질 또는 리간드로서 작용할 수 있는 소형 유기 화합물의 모방체를 디자인하고 합성하고 평가할 수 있다는 것은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 하파로신(hapalosin)의 D-글루코스 모방체는 다중약물 내성 보조-관련 단백질을 세포독성에 대해 길항작용하는데 있어서 하파로신과 유사한 효율을 나타내는 것으로 기재되어 있다. 문헌 [Dinh (1998) J. Med. Chem. 41:981-987] 참조.
- [0196] 리실 옥시다제-유형 효소의 구조는, 예를 들어 소형 분자, 펩티드, 펩티드 모방체 및 항체와 같은 조절제의 선택을 안내하기 위해 조사될 수 있다. 리실 옥시다제-유형 효소의 구조적 특징은, 리실 옥시다제-유형 효소의 리간드, 기질, 결합 파트너 또는 수용체에 결합하거나 또는 이들로서 기능하는 천연 또는 합성 분자를 확인하는데 도움을 줄 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Engleman (1997) J. Clin. Invest. 99:2284-2292] 참조. 예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소의 구조적 모티프의 폴딩(folding) 모의실험 및 컴퓨터 재디자인은 적절한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 문헌 [Olszewski (1996) Proteins 25:286-299]; [Hoffman (1995) Comput. Appl. Biosci. 11:675-679] 참조. 단백질 폴딩의 컴퓨터 모델형성은 상세한 펩티드 및 단백질 구조의 배열 및 에너지 분석을 위해 사용될 수 있다. 문헌 [Monge (1995) J. Mol. Biol. 247:995-1012]; [Renouf (1995) Adv. Exp. Med. Biol. 376:37-45] 참조. 상보적 펩티드 서열에 대한 컴퓨터 보조 조사를 사용하여 리간드 및 결합 파트너와 상호작용하는 리실 옥시다제-유형 효소 상의 부위를 확인하는데 적절한 프로그램이 사용될 수 있다. 문헌 [Fassina (1994) Immunomethods 5:114-120] 참조. 단백질 및 펩티드의 디자인을 위한 추가의 시스템은 예를 들어 문헌 [Berry (1994) Biochem. Soc. Trans. 22:1033-1036]; [Wodak (1987), Ann. N.Y. Acad. Sci. 501:1-13]; 및 [Pabo (1986) Biochemistry 25:5987-5991]에 기재되어 있다. 상기 기재된 구조적 분석으로부터 수득한 결과는, 예를 들어 하나 이상의 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제로서 기능하는 유기 분자, 펩티드 및 펩티드 모방체의 제조를 위해 사용될 수 있다.
- [0197] 리실 옥시다제-유형 효소의 억제제는 경쟁적 억제제, 반경쟁적(uncompetitive) 억제제, 혼합 억제제 또는 비-경쟁적(non-competitive) 억제제일 수 있다. 경쟁적 억제제는 종종 기질에 대한 구조적 유사성을 갖고, 통상적으로 활성 부위에 결합하며, 보다 낮은 기질 농도에서 보다 효과적이다. 경쟁적 억제제의 존재 하에서는 겉보기 K_M 이 증가한다. 반경쟁적 억제제는 일반적으로 효소-기질 복합체에 결합하거나, 기질이 활성 부위에 결합한 후 이용가능해지는 부위에 결합하며, 활성 부위를 왜곡시킬 수 있다. 반경쟁적 억제제의 존재 하에서는 겉보기 K_M 및 V_{max} 모두가 감소하고, 기질 농도는 억제에 대한 효과를 거의 갖지 않거나 전혀 갖지 않는다. 혼합 억제제는 유리 효소 및 효소-기질 복합체 모두에 결합할 수 있으며, 따라서 기질 결합 및 촉매 활성 모두에 영향을 미친다. 비-경쟁적 억제는 특별한 경우의 혼합 억제제이며, 여기서 억제제는 효소 및 효소-기질 복합체에 동일한 결합력(avidity)으로 결합하고 억제가 기질 농도에 의해 영향받지 않는다. 비-경쟁적 억제제는 일반적으로 활성 부위 외부의 영역에서 효소에 결합한다. 효소 억제에 대한 추가의 상세설명은, 예를

들어 상기 문헌 [Voet et al. (2008)]을 참조한다. 천연 기질 (예를 들어, 콜라겐, 엘라스틴)이 통상 (생체 내에서 달성될 수 있는 임의의 억제제의 농도와 비교하여) 생체내에서 매우 과량으로 존재하는 리실 옥시다제-유형 효소와 같은 효소의 경우, 비경쟁적 억제제는 억제제 기질 농도와 무관하기 때문에 유리하다.

[0198] **항체**

[0199] 특정 실시양태에서, 리실 옥시다제-유형 효소의 조절제는 항체이다. 추가의 실시양태에서, 항체는 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 억제제이다.

[0200] 본원에 사용된 용어 "항체"는 항원 에피토프에 특이적으로 결합하는 펩티드 서열 (예를 들어, 가변 영역 서열)을 포함하는 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 결합체를 의미한다. 이 용어는 그의 가장 넓은 의미로 사용되며, 특히 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 나노바디(nanobody), 디아바디(diabody), 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 Fv, scFv, Fab, Fab' F(ab')₂ 및 Fab₂를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 항체 단편을 포함한다. 용어 "인간 항체"는 가능한 비-인간 CDR 영역을 제외하고 인간 기원의 서열을 함유하는 항체를 지칭하고, 이뮤노글로불린 분자의 전체 구조가 존재함을 암시하는 것이 아니라 단지 항체가 인간에서 최소의 면역원성 효과를 가짐 (즉, 항체의 임상적으로 의미있는 생성이 그 자체를 유도하지 않음)을 암시한다.

[0201] "항체 단편"은 전장 항체의 한 부분, 예를 들어 전장 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (문헌 [Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062] 참조); 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다. 항체의 파파인 분해는 "Fab" 단편이라고 칭해지는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 용이하게 결정화되는 능력을 반영하는 칭호인, 나머지 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.

[0202] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소의 항체 단편이다. 이 영역은 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비-공유 결합으로 연결된 이량체로 이루어진다. 이 배열에서는 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 한정한다. 집합적으로, 6개의 CDR이 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 6개의 CDR 중 단지 3개만을 포함하는 단리된 V_H 또는 V_L 영역)은, 일반적으로 전체 Fv 단편의 경우보다는 낮은 친화도이지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0203] "Fab" 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 이외에, 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH₁)을 또한 함유한다. Fab 단편은 항체의 파파인 분해 후 최초로 관찰되었다. Fab' 단편은 F(ab') 단편이 중쇄 CH₁ 도메인의 카르복시 말단에서 여러개의 추가 잔기를 함유한다는 점 (항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함함)에 있어서 Fab 단편과 상이하다. F(ab')₂ 단편은 힌지 영역 근처에서 디숄피드 결합에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 함유하며, 항체의 펩신 분해 후 최초로 관찰되었다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올 기를 갖는 Fab' 단편에 대한 칭호이다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0204] 임의의 척추동물 종의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 및 람다라고 칭해지는, 명확히 구별되는 두 유형 중 하나를 지칭할 수 있다. 이뮤노글로불린은 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 5개의 주요 부류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 지칭될 수 있고, 이들 중 여러개는 하위부류 (이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가 분류될 수 있다.

[0205] "단일-쇄 Fv" 또는 "sFv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄로 존재한다. 일부 실시양태에서, Fv 폴리펩티드는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하여, sFv가 항원 결합에 대해 원하는 구조를 형성할 수 있도록 한다. sFv에 대한 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113 (Rosenburg and Moore eds.) Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0206] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭하며, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드

쇄에서 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H) (V_H-V_L)을 포함한다. 동일한 쇠에서 2개의 도메인 사이의 연결을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 쇠의 상보적 도메인과 연결되도록 강제되어 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바이는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161 및 문헌 [Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]에 추가로 기재되어 있다.

[0207] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인되어 분리되고/거나 회수된 항체이다. 그의 천연 환경의 성분은 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 결정된 항체 95 중량% 초과, 예를 들어 99 중량% 초과로 정제되거나, (2) 예를 들어, 회전 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 획득하기에 충분한 정도로 정제되거나, (3) 환원 또는 비환원 조건 하에서 겔 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE) 및 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색에 의한 검출에 의해 균질한 정도로 정제된다. 용어 "단리된 항체"는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하며, 이는 그 항체의 천연 환경의 1개 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 특정 실시양태에서, 단리된 항체는 1개 이상의 정제 단계에 의해 제조된다.

[0208] 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체이다. 인간화 항체는 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)을 포함하며, 여기서 수용자의 상보적 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기는 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트 또는 래빗과 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체되어 있다. 따라서, 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 인간화 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린이다. 비-인간 서열은 주로 가변 영역에, 특히 상보성-결정 영역 (CDR)에 위치한다. 일부 실시양태에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 인간화 항체는 또한 수용자 항체에서도 발견되지 않고 개입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 1개 이상의 가변 도메인 및 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하며, 여기서 CDR 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 이뮤노글로불린의 CDR에 상응하고, 프레임워크 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 이뮤노글로불린 공통 서열의 프레임워크 영역이다. 본 개시내용의 목적상, 인간화 항체는 또한 이뮤노글로불린 단편, 예컨대 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열을 포함할 수 있다.

[0209] 인간화 항체는 또한, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것인 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 한 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329]; 및 [Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596] 참조.

[0210] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "개입" 또는 "공여자" 잔기라고 칭해지며, 전형적으로 "개입" 또는 "공여자" 가변 도메인으로부터 획득된다. 예를 들어, 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 그의 동료의 방법에 따라 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Jones et al.; Riechmann et al.] 및 [Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534-1536] 참조. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 실질적으로 보다 덜 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제 4,816,567호)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 임의로 일부 프레임워크 영역 잔기가 설치류 항체 (예를 들어, 뮤린 모노클로날 항체)에서의 유사 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다.

[0211] 인간 항체는 또한, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리를 사용함으로써 생성될 수 있다. 문헌 [Hoogenboom et al. (1991) J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581] 참조. 인간 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 방법은 문헌 [Cole et al. (1985) "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, p. 77] 및 [Boerner et al. (1991) J. Immunol. 147:86-95]에 기재되어 있다.

[0212] 인간 항체는 내인성 이뮤노글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)에 인간 이뮤노글로불린 유전자좌를 도입함으로써 제조될 수 있다. 면역학적 접종시, 인간 항체 생성이 관찰되며, 이는 유전자 재정렬, 조립 및 항체 레퍼토리를 비롯한 모든 면에서 인간에서 보여지는 것과 밀접하게 닮아있다. 이러한 접근법은, 예를 들어 미국 특허 제5,545,807호; 동 제5,545,806호; 동 제5,569,825호; 동 제5,625,126호; 동 제5,633,425호; 동 제5,661,016호, 및 하기 과학 공개문헌 [Marks et al. (1992) Bio/Technology 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al. (1994) Nature 368: 856-859]; [Morrison

(1994) Nature 368:812-813]; [Fishwald et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851]; [Neuberger (1996) Nature Biotechnology 14:826]; 및 [Lonberg et al. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93]에 기재되어 있다.

- [0213] 항체는 상기 기재된 바와 같은 공지의 선택 및/또는 돌연변이유발 방법을 사용하여 친화도 성숙될 수 있다. 일부 실시양태에서, 친화도 성숙된 항체는, 성숙된 항체가 제조되는 출발 항체 (일반적으로 무린, 래빗, 닭, 인간화 또는 인간 항체)의 친화도보다 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 또는 30배 이상인 친화도를 갖는다.
- [0214] 항체는 또한 이중특이적 항체일 수 있다. 이중특이적 항체는 모노클로날일 수 있으며, 2개 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 인간 또는 인간화 항체일 수 있다. 본 경우에서, 2개의 상이한 결합 특이성은 2개의 상이한 리실 옥시다제-유형 효소, 또는 단일 리실 옥시다제-유형 효소 상의 2개의 상이한 에피토프에 대한 것일 수 있다.
- [0215] 본원에 개시된 항체는 또한 면역접합체일 수 있다. 이러한 면역접합체는 리포터와 같은 제2 분자에 접합된 (예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소에 대한) 항체를 포함한다. 면역접합체는 또한 세포독성제, 예컨대 화학치료제, 독소 (예를 들어 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소 (예를 들어, 방사성접합체를 제공하기 위함)에 접합된 항체를 포함할 수 있다.
- [0216] 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인" 항체는 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 에피토프에만 결합하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 약 4°C, 25°C, 37°C 또는 42°C의 온도에서 측정시 모노클로날 항체, scFv, Fab의 형태 또는 항체의 다른 형태로, 해리 상수 (K_d) 100 nM 이하, 임의로 10 nM 미만, 임의로 1 nM 미만, 임의로 0.5 nM 미만, 임의로 0.1 nM 미만, 임의로 0.01 nM 미만, 또는 임의로 0.005 nM 미만으로 그의 표적에 특이적으로 결합한다.
- [0217] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 리실 옥시다제-유형 효소에서 하나 이상의 처리 부위 (예를 들어, 단백질 가수분해성 절단 부위)에 결합하여, 프로효소 또는 프리프로효소에서 촉매적으로 활성인 효소로의 처리를 효과적으로 차단함으로써, 리실 옥시다제-유형 효소의 활성을 감소시킨다.
- [0218] 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체는 인간 LOX 및/또는 인간 LOXL2에, 다른 리실 옥시다제-유형 효소, 예를 들어 LOXL1, LOXL3 및 LOXL4에 대한 그의 결합 친화도보다 더 큰 결합 친화도, 예를 들어 10배, 적어도 100배, 또는 심지어 적어도 1000배 초과로 결합한다.
- [0219] 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체는 리실 옥시다제-유형 효소의 촉매 활성의 비-경쟁적 억제제이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체는 리실 옥시다제-유형 효소의 촉매 도메인 외부에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체는 LOXL2의 SRCR4 도메인에 결합한다. 특정 실시양태에서, LOXL2의 SRCR4 도메인에 결합하며 비-경쟁적 억제제로서 기능하는 항-LOXL2 항체는, 본원 및 공동 소유의 미국 특허 출원 공보 제US 2009/0053224호 및 동 제US 2009/0104201호에 기재된 AB0023 항체이다. 특정 실시양태에서, LOXL2의 SRCR4 도메인에 결합하며 비-경쟁적 억제제로서 기능하는 항-LOXL2 항체는, 본원 및 공동 소유의 미국 특허 출원 공보 제US 2009/0053224호 및 동 제US 2009/0104201호에 기재된 AB0024 항체 (인간 버전의 AB0023 항체)이다.
- [0220] 임의로, 본 개시내용에 따른 항체는 리실 옥시다제-유형 효소에 결합할 뿐만 아니라, 예를 들어 인테그린 베타 1 또는 다른 세포 수용체 또는 단백질을 통해 리실 옥시다제-유형 효소의 흡수 또는 내재화를 감소 또는 억제시킨다. 이러한 항체는, 예를 들어 세포외 매트릭스 단백질, 세포 수용체, 및/또는 인테그린에 결합할 수 있다.
- [0221] 리실 옥시다제-유형 효소를 인식하는 예시적인 항체, 및 리실 옥시다제-유형 효소에 대한 항체와 관련된 추가의 개시내용은, 공동 소유의 미국 특허 출원 공보 제US 2009/0053224호 및 동 제US 2009/0104201호에 제공되어 있으며, 이들 문헌의 개시내용은 리실 옥시다제-유형 효소에 대한 항체, 그의 제조 및 그의 용도를 설명할 목적으로 참조로 포함된다.
- [0222] **리실 옥시다제-유형 효소의 발현을 조절하는 폴리뉴클레오티드**
- [0223] 안티센스
- [0224] 리실 옥시다제-유형 효소의 조절 (예를 들어, 억제)은 리실 옥시다제 효소의 발현을 전사 또는 번역 수준에서 하향-조절함으로써 수행될 수 있다. 이러한 한가지 조절 방법은 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 mRNA

전사체와 서열-특이적 결합할 수 있는 안티센스 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드의 사용을 포함한다.

- [0225] 표적 mRNA 분자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 (또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체)의 결합은 세포내 RNase H에 의한 혼성체의 효소적 절단을 유도할 수 있다. 특정 경우에서, 안티센스 RNA-mRNA 혼성체의 형성은 정확한 스플라이싱(splicing)을 방해할 수 있다. 두 경우에서, 번역에 적합한 무손상의 기능적 표적 mRNA의 수는 감소 또는 제거된다. 다른 경우에서, 표적 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유사체의 결합은 (예를 들어, 입체적 장애에 의해) 리보솜 결합을 방지하여, mRNA의 번역을 방지할 수 있다.
- [0226] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 DNA, RNA, 유사체, 예컨대 펩티드 핵산 (PNA) 또는 이들의 혼합물일 수 있는 임의의 유형의 뉴클레오티드 서브유닛을 포함할 수 있다. RNA 올리고뉴클레오티드는 표적 mRNA 분자와 함께 보다 안정적인 2사슬 분자 (duplex)를 형성하지만, 비혼성화 올리고뉴클레오티드는 다른 유형의 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 유사체보다 세포내에서 덜 안정적이다. 이는 이러한 목적을 위해 디자인된 벡터를 사용하여 세포 내로 RNA 올리고뉴클레오티드를 발현시킴으로써 대응될 수 있다. 이러한 접근법은 예를 들어, 풍부한 장수 단백질을 코딩하는 mRNA를 표적화하려 할 경우 사용될 수 있다.
- [0227] 안티센스 올리고뉴클레오티드를 디자인할 경우, (i) 표적 서열에 대한 결합에 있어서 충분한 특이성; (ii) 용해도; (iii) 세포내- 및 세포외 뉴클레아제에 대한 안정성; (iv) 세포 막의 관통력; 및 (v) 유기체를 처리하는데 사용될 경우 저 독성을 비롯한 추가의 사항이 고려될 수 있다.
- [0228] 표적 mRNA에 대해 가장 높게 예상되는 결합 친화도를 갖는 올리고뉴클레오티드 서열을, 표적 mRNA 및 올리고뉴클레오티드 둘 다에서의 구조적 변경의 에너지를 설명하는 열역학 주기를 기준으로 확인하기 위한 알고리즘이 이용가능하다. 예를 들어, 문헌 [Walton et al. (1999) Biotechnol. Bioeng. 65:1-9]은 래빗 β-글로빈 (RBG) 및 마우스 종양 괴사 인자-α (TNF α) 전사체에 대해 지시된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 디자인하기 위해 상기 방법을 사용하였다. 동일한 조사 그룹은 또한, 세포 배양물 중 3개의 모델 표적 mRNA (인간 락테이트 탈수소효소 A 및 B 및 래트 gp130)에 대해 합리적으로 선택된 올리고뉴클레오티드의 안티센스 활성이 거의 모든 경우에서 효과적임을 입증하였다고 보고하였다. 이는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 화학 둘 다에 의해 제조된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 2개의 세포 유형에서 3개의 상이한 표적에 대한 시험을 포함하였다.
- [0229] 또한, 시험관내 시스템을 사용하여 특정 올리고뉴클레오티드의 효율을 디자인 및 예상하기 위한 여러 접근법이 이용가능하다. 예를 들어, 문헌 [Matveeva et al. (1998) Nature Biotechnology 16:1374-1375] 참조.
- [0230] 본 개시내용에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드는 10개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어 10 내지 15개, 15 내지 20개, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 22개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 또는 심지어 40개 이상의 뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체는 리실 옥시다제-유형 효소, 예를 들어 LOX 또는 LOXL2를 코딩하는 mRNA와 생리학적 조건 하에 생체내에서 어닐링 또는 혼성화할 수 있다 (즉, 염기 상보성을 기초로 이중-가닥 구조를 형성할 수 있다).
- [0231] 본 개시내용에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드는 세포 또는 조직에 투여된 핵산 구조물로부터 발현될 수 있다. 임의로, 안티센스 서열의 발현은 유도성 프로모터에 의해 조절되어, 안티센스 서열의 발현이 세포 또는 조직에서 이행 및 불이행 (switched on and off)되도록 할 수 있다. 별법으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 화학적으로 합성되고, 예를 들어 제약 조성물의 일부로서 세포 또는 조직에 직접 투여될 수 있다.
- [0232] 안티센스 기술은 고도로 정확한 안티센스 디자인 알고리즘 및 다양한 올리고뉴클레오티드 전달 시스템의 생성을 유도하여, 당업자가 공지 서열의 발현을 하향조절하기에 적합한 안티센스 접근법을 디자인하고 수행할 수 있도록 한다. 안티센스 기술과 관련한 추가의 정보는, 예를 들어 문헌 [Lichtenstein et al., "Antisense Technology: A Practical Approach," Oxford University Press, 1998]을 참조한다.
- [0233] 짧은 RNA 및 RNAi
- [0234] 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 또다른 억제 방법은, 표적 mRNA에 상동성이며 그의 분해를 유도하는 이중-가닥의 짧은 간섭 RNA (siRNA) 분자를 이용한 접근법인 RNA 간섭 (RNAi)이다. 문헌 [Carthew (2001) Curr. Opin. Cell. Biol. 13:244-248] 참조.
- [0235] RNA 간섭은 전형적으로 2-단계 과정이다. 개시 단계라고 칭해지는 제1 단계에서, 투입 dsRNA는 아마도 이중-가닥 RNA를 ATP-의존성 방식으로 절단하는 이중-가닥-특이적 리보뉴클레아제의 RNase III 부류의 한 구성원인

다이서(Dicer)의 작용에 의해, 21 내지 23개 뉴클레오티드(nt)의 짧은 간섭 RNA(siRNA)로 분해된다. 투입 RNA는 예를 들어 직접 또는 트랜스젠이나 바이러스를 통해 전달될 수 있다. 연속 절단 사건은 RNA를, 각각 2-뉴클레오티드 3' 오버행(overhang)을 갖는 19 내지 21개 염기쌍의 2사슬 분자(siRNA)로 분해한다. 문헌 [Hutvagner et al. (2002) Curr. Opin. Genet. Dev. 12:225-232]; [Bernstein (2001) Nature 409:363-366] 참조.

[0236] 제2의 이펙터(effector) 단계에서, siRNA 2사슬 분자는 뉴클레아제 복합체에 결합하여 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC)를 형성한다. siRNA 2사슬 분자의 ATP-의존성 풀림(unwinding)은 RISC의 활성화에 요구된다. 이어서, 활성화된 RISC(단일 siRNA 및 RNase 함유)는 염기쌍 형성 상호작용에 의해 상동성 전사체를 표적화하고, 전형적으로 siRNA의 3' 말단에서 출발하여 mRNA를 대략 12개 뉴클레오티드의 단편으로 절단한다. 상기 문헌 [Hutvagner et al.]; 문헌 [Hammond et al. (2001) Nat. Rev. Gen. 2:110-119]; [Sharp (2001) Genes. Dev. 15:485-490] 참조.

[0237] RNAi 및 관련 방법은 또한 문헌 [Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2:239-245]; [Cullen (2002) Nat. Immunol. 3:597-599]; 및 [Brantl (2002) Biochem. Biophys. Acta. 1575:15-25]에 기재되어 있다.

[0238] 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 억제제로서, 본 개시내용에 사용하기 적합한 RNAi 분자의 합성에 대한 예시적인 전략은, AA 디뉴클레오티드 서열에 대한 개시 코돈 하류의 적절한 mRNA 서열을 스캔하는 것이다. 각각의 AA와 하류의(즉, 3' 인접한) 19개 뉴클레오티드는 잠재적인 siRNA 표적 부위로서 기록된다. 코딩 영역에서의 표적 부위가 바람직하는데, 이는 mRNA의 비번역 영역(UTR)에 결합하는 단백질 및/또는 번역 개시 복합체가 siRNA 엔도뉴클레아제 복합체의 결합을 방해할 수 있기 때문이다. 상기 문헌 [Tuschl (2001)] 참조. 비번역 영역에 지시된 siRNA가 또한 효과적일 수 있으며, GAPDH 유전자의 5' UTR에 지시된 siRNA가 세포 GAPDH mRNA의 약 90% 감소를 매개하고 단백질 수준을 완전히 파괴하였던 경우에서 입증되었음을 이해할 것이다(www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html). 상기 기재된 바와 같이 잠재적 표적 부위의 세트가 얻어지면, 잠재적 표적의 서열은 서열 정렬 소프트웨어(예컨대 NCBI로부터 입수가능한 BLAST 소프트웨어 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)를 사용하여 적절한 게놈 데이터베이스(예를 들어, 인간, 마우스, 래트 등)와 비교된다. 다른 코딩 서열에 대해 유의한 상동성을 나타내는 잠재적 표적 부위는 거부된다.

[0239] 적격 표적 서열은 siRNA 합성을 위한 주형으로서 선택된다. 선택된 서열은 낮은 G/C 함량을 갖는 서열을 포함할 수 있는데, 이들은 G/C 함량이 55% 초과인 서열과 비교하여 유전자 침묵을 매개하는데 있어서 보다 효과적인 것으로 나타났다. 평가를 위해 표적 유전자의 길이와 함께 여러 표적 부위가 선택될 수 있다. 선택된 siRNA의 보다 나은 평가를 위해, 음성 대조군이 함께 사용된다. 음성 대조군 siRNA는 시험 siRNA와 동일한 뉴클레오티드 조성을 갖지만 게놈에 대한 유의한 상동성이 결핍된 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, siRNA의 뒤섞인(scrambled) 뉴클레오티드 서열은 그것이 임의의 다른 유전자에 대해 임의의 유의한 상동성을 표시하지 않는 한 사용될 수 있다.

[0240] 본 개시내용의 siRNA 분자는, 숙주 세포에 도입시 siRNA 전사체의 안정적인 발현을 촉진할 수 있는 발현 벡터로부터 전사될 수 있다. 이들 벡터는, 유전자-특이적 침묵을 수행할 수 있는 siRNA 분자로 생체내 처리되는 스몰 헤어핀 RNA(shRNA)를 발현하도록 조작된다. 예를 들어, 문헌 [Brummelkamp et al. (2002) Science 296:550-553]; [Paddison et al (2002) Genes Dev. 16:948-958]; [Paul et al. (2002) Nature Biotech. 20:505-508]; [Yu et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6047-6052] 참조.

[0241] 스몰 헤어핀 RNA(shRNA)는 이중-가닥의 헤어핀 루프 구조를 형성하는 단일-가닥의 폴리뉴클레오티드이다. 이중-가닥 영역은 표적 서열, 예컨대 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, LOX 또는 LOXL2 mRNA)에 혼성화할 수 있는 제1 서열 및 제1 서열에 상보적인 제2 서열로부터 형성된다. 제1 서열 및 제2 서열은 이중-가닥 영역을 형성하며; 이때 제1 서열과 제2 서열 사이에 놓인 염기쌍 비형성 링커 뉴클레오티드는 헤어핀 루프 구조를 형성한다. shRNA의 이중-가닥 영역(스텝(stem))은 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위를 포함할 수 있다.

[0242] shRNA 분자는 임의의 뉴클레오티드 오버행, 예컨대 2-염기쌍 오버행, 예를 들어 3' UU-오버행을 가질 수 있다. 변이가 존재할 수 있지만, 스텝 길이는 전형적으로 대략 15 내지 49, 대략 15 내지 35, 대략 19 내지 35, 대략 21 내지 31 염기쌍, 또는 대략 21 내지 29 염기쌍의 범위이고, 루프의 크기는 대략 4 내지 30 염기쌍, 예를 들어 약 4 내지 23 염기쌍의 범위일 수 있다.

[0243] 세포 내에서 shRNA의 발현을 위해, 프로모터(예를 들어, RNA 폴리머라제 III H1-RNA 프로모터 또는 U6 RNA 프로모터), shRNA를 코딩하는 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위, 및 전사 종결 신호(예를 들어, 4 내지 5개의

아데닌-티미딘 염기쌍의 신장부)를 함유하는 플라스미드 벡터가 이용될 수 있다. 폴리머라제 III 프로모터는 일반적으로 널리-정의된 전사 개시 및 종결 부위를 갖고, 그의 전사체는 폴리(A) 테일이 결합되어 있다. 이들 프로모터에 대한 종결 신호는 폴리티미딘 다발(tract)에 의해 정의되고, 전사체는 전형적으로 제2의 코딩된 우리딘 뒤에서 절단된다. 이 위치에서의 절단은 발현된 shRNA에서 3' UU 오버행을 생성하는데, 이는 합성 siRNA의 3' 오버행과 유사하다. 포유동물 세포에서 shRNA를 발현하기 위한 추가의 방법은 상기 인용된 참고 문헌에 기재되어 있다.

[0244] 적합한 shRNA 발현 벡터의 예는 pSUPERTM (올리고엔진, 인크.(Oligoengine, Inc.), 미국 워싱턴주 시애틀 소재)이며, 이는 널리 정의된 전사 개시 부위 및 5개의 연속 아데닌-티미딘 쌍으로 이루어진 종결 신호를 갖는 폴리머라제-III H1-RNA 유전자 프로모터를 포함한다. 상기 문헌 [Brummelkamp et al.] 참조. 전사 생성물은 (종결 서열에 의해 코딩된 5개 중) 제2의 우리딘 뒤의 부위에서 절단되어, 뉴클레오티드 오버행을 또한 함유하는 합성 siRNA의 말단부와 유사한 전사체를 생성한다. shRNA로 전사될 서열은 상기 벡터에 클로닝되어, 그들이 mRNA 표적 (예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 mRNA)의 일부분에 상보적인 제1 서열을 포함하며 제1 서열의 역 상보체를 포함하는 제2 서열로부터 짧은 스페이서(spacer)에 의해 분리되는 전사체를 생성하도록 한다. 생성된 전사체는 스스로 다시 폴딩되어, RNA 간섭 (RNAi)을 매개하는 스템-루프 구조를 형성한다.

[0245] 또다른 적합한 siRNA 발현 벡터는 별개의 폴리머라제 III 프로모터의 조절 하에 센스 및 안티센스 siRNA를 코딩한다. 문헌 [Miyagishi et al. (2002) Nature Biotech. 20:497-500] 참조. 이러한 벡터에 의해 생성된 siRNA는 또한 5개의 티미딘 (T5) 종결 신호를 포함한다.

[0246] siRNA, shRNA 및/또는 이들을 코딩하는 벡터는 각종 방법, 예를 들어 지질도입(lipofection)에 의해 세포에 도입될 수 있다. 벡터-매개 방법이 또한 개발되었다. 예를 들어, siRNA 분자는 레트로바이러스를 사용하여 세포에 전달될 수 있다. 레트로바이러스를 사용한 siRNA의 전달은 특정 상황에서 이점을 제공할 수 있는데, 이는 레트로바이러스 전달이 효율적이고 균일할 수 있으며 안정적인 "넉다운" 세포를 즉시 선택할 수 있기 때문이다. 문헌 [Devroe et al. (2002) BMC Biotechnol. 2:15] 참조.

[0247] 최근의 과학 공개문헌은 표적 mRNA 발현을 억제하는데 있어서 상기 짧은 이중 가닥 RNA 분자의 효능을 입증하였으므로, 상기 분자의 치료학적 잠재력을 명확하게 증명하였다. 예를 들어, RNAi는 C형 간염 바이러스 감염된 세포 (문헌 [McCaffrey et al. (2002) Nature 418:38-39] 참조), HIV-1 감염된 세포 (문헌 [Jacque et al. (2002) Nature 418:435-438]) 참조), 자궁경부암 세포 (문헌 [Jiang et al. (2002) Oncogene 21:6041-6048] 참조) 및 백혈병 세포 (문헌 [Wilda et al. (2002) Oncogene 21:5716-5724] 참조)에서의 억제에 이용되었다.

[0248] **리실 옥시다제-유형 효소의 발현을 조절하는 방법**

[0249] 리실 옥시다제-유형 효소의 활성을 조절하기 위한 또다른 방법은 코딩 유전자의 발현을 조절하여, 유전자 발현이 억제될 경우 보다 낮은 수준의 활성을 유도하고 유전자 발현이 활성화될 경우 보다 높은 수준의 활성을 유도하는 것이다. 세포에서 유전자 발현의 조절은 수많은 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0250] 예를 들어, 가닥 치환 또는 삼중-나선 형성에 의해 게놈 DNA (예를 들어, 리실 옥시다제-유형 유전자의 조절 영역)에 결합하는 올리고뉴클레오티드는 전사를 차단하여, 리실 옥시다제-유형 효소의 발현을 방지할 수 있다. 이와 관련하여, 올리고뉴클레오티드가 그의 표적의 한 가닥에서 폴리퓨린 신장부를 인식하고 다른 가닥에서 호모퓨린 서열을 인식하는 소위 "스위치 백(switch back)" 화학 연결의 사용이 기재되었다. 또한, 삼중-나선 형성은 인공 염기를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여, 이온 농도 및 pH와 관련된 결합 조건을 확대함으로써 수득될 수 있다.

[0251] 또한, 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 유전자의 전사의 조절은, 예를 들어 기능적 도메인 및 DNA-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질, 또는 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 세포 내로 도입함으로써 달성될 수 있다. 기능적 도메인은 예를 들어 전사 활성화 도메인 또는 전사 억제 도메인일 수 있다. 예시적인 전사 활성화 도메인으로는 VP16, VP64 및 NF-κB의 p65 서브유닛이 포함되고; 예시적인 전사 억제 도메인으로는 KRAB, KOX 및 v-erbA가 포함된다.

[0252] 특정 실시양태에서, 상기 융합 단백질의 DNA-결합 도메인 부분은 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 유전자 또는 이 근처나 그러한 유전자의 조절 영역에 결합하는 서열-특이적 DNA-결합 도메인이다. DNA-결합 도메인은 유전자 또는 조절 영역 또는 이들 근처의 서열에 자연적으로 결합할 수 있거나, 또는 그렇게 결합되도록 조작될 수 있다. 예를 들어, DNA-결합 도메인은 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 조절

하는 천연-발생 단백질로부터 수득될 수 있다. 별법으로, DNA-결합 도메인은 리실 옥시다제-유형 효소를 코딩하는 유전자 또는 이 근처나 그러한 유전자의 조절 영역에서 선택된 서열에 결합하도록 조작될 수 있다.

[0253] 이와 관련하여, 아연 핑거(finger) DNA-결합 도메인은, 아연 핑거 단백질이 선택된 임의의 DNA 서열에 결합하도록 조작하는 것이 가능한 한 유용하다. 아연 핑거 결합 도메인은 하나 이상의 아연 핑거 구조를 포함한다. 문헌 [Miller et al. (1985) EMBO J 4:1609-1614]; [Rhodes (1993) Scientific American, February: 56-65]; 미국 특허 제6,453,242호 참조. 전형적으로, 단일 아연 핑거는 약 30개 아미노산의 길이이며, 4개의 아연-배위 아미노산 잔기를 함유한다. 구조 연구는 정규 (C_2H_2) 아연 핑거 모티프가 알파 나선 (일반적으로 2개의 아연-배위 히스티딘 잔기를 함유함)에 대해 껍질된 2개의 베타 쉬트 (일반적으로 2개의 아연-배위 시스테인 잔기를 함유하는 베타 턴으로 유지됨)를 함유함을 증명하였다.

[0254] 아연 핑거는 정규의 C_2H_2 아연 핑거 (즉, 아연 이온이 2개의 시스테인 잔기 및 2개의 히스티딘 잔기에 의해 배위된 것) 및 비-정규 아연 핑거, 예를 들어 C_3H 아연 핑거 (아연 이온이 3개의 시스테인 잔기 및 1개의 히스티딘 잔기에 의해 배위된 것) 및 C_4 아연 핑거 (아연 이온이 4개의 시스테인 잔기에 의해 배위된 것) 모두를 포함한다. 비-정규 아연 핑거는 또한 시스테인 또는 히스티딘 이외의 아미노산이 상기 아연-배위 잔기 중 하나를 대신하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 02/057293 (2002.7.25) 및 US 2003/0108880 (2003.6.12)을 참조한다.

[0255] 아연 핑거 결합 도메인은 천연-발생 아연 핑거 단백질에 비해 신규한 결합 특이성을 갖도록 조작되어, 아연 핑거 결합 도메인의 제작이 선택된 서열에 결합하도록 할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141]; [Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340]; [Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660]; [Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637]; [Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416] 참조. 조작 방법은 합리적 디자인 및 다양한 유형의 실험적 선택 방법을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0256] 합리적 디자인으로는, 예를 들어 삼중 (또는 사중) 뉴클레오티드 서열 및 개별 아연 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스의 사용을 포함하며, 여기서 각각의 삼중 또는 사중 뉴클레오티드 서열은 특정 삼중 또는 사중 서열에 결합하는 아연 핑거의 하나 이상의 아미노산 서열과 관련된다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,140,081호; 동 제6,453,242호; 동 제6,534,261호; 동 제6,610,512호; 동 제6,746,838호; 동 제6,866,997호; 동 제7,030,215호; 동 제7,067,617호; 미국 특허 출원 공보 제2002/0165356호; 동 제2004/0197892호; 동 제2007/0154989호; 동 제2007/0213269호; 및 국제 특허 출원 공보 제WO 98/53059호 및 제WO 2003/016496호를 참조한다.

[0257] 파지 디스플레이, 상호작용 트랩, 혼성체 선택 및 2-혼성체 시스템을 비롯한 예시적인 선택 방법이 미국 특허 제5,789,538호; 동 제5,925,523호; 동 제6,007,988호; 동 제6,013,453호; 동 제6,140,466호; 동 제6,200,759호; 동 제6,242,568호; 동 제6,410,248호; 동 제6,733,970호; 동 제6,790,941호; 동 제7,029,847호 및 동 제7,297,491호; 뿐만 아니라 미국 특허 출원 공보 제2007/0009948호 및 동 제2007/0009962호; WO 98/37186; WO 01/60970 및 GB 2,338,237에 개시되어 있다.

[0258] 아연 핑거 결합 도메인에 대한 결합 특이성의 증진은 예를 들어 미국 특허 제6,794,136호 (2004.9.21)에 기재되어 있다. 핑거 내 링커 서열과 관련한 아연 핑거 조작의 추가의 측면이 미국 특허 제6,479,626호 및 미국 특허 출원 공보 제2003/0119023호에 개시되어 있다. 또한, 문헌 [Moore et al. (2001a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1432-1436]; [Moore et al. (2001b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1437-1441] 및 WO 01/53480 참조.

[0259] 조작된 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질의 용도에 대한 추가의 상세설명은 예를 들어 미국 특허 제6,534,261호; 동 제6,607,882호; 동 제6,824,978호; 동 제6,933,113호; 동 제6,979,539호; 동 제7,013,219호; 동 제7,070,934호; 동 제7,163,824호 및 동 제7,220,719호에서 발견된다.

[0260] 리실 옥시다제-유형 효소의 발현을 조절하는 추가의 방법은 유전자 또는 유전자의 발현을 조절하는 조절 영역의 표적화된 돌연변이유발을 포함한다. 뉴클레아제 도메인 및 조작된 DNA-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 사용한 표적화된 돌연변이유발 방법의 예는 예를 들어 미국 특허 출원 공보 제2005/0064474호; 동 제2007/0134796호; 및 동 제2007/0218528호에 제공되어 있다.

[0261] **제제, 키트 및 투여 경로**

[0262] 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제 (예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소의 억제제 또는 활성화제)로서 확인된 화합물을 포함하는 치료학적 조성물이 또한 제공된다. 이러한 조성물은 전형적으로 조절제 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 보충적인 활성 화합물이 또한 조성물에 포함될 수 있다. 조절제, 특히 리실 옥시다제-유형 효소의 활성의 억제제는 예를 들면, 결합조직형성 및/또는 섬유모세포 활성화를 감소시키거나 또는 제거하기 위해 예를 들면, 화학요법제 또는 항신생물제와 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 바와 같은 치료적 조성물은 리실 옥시다제-유형 효소의 활성의 조절제 및 하나 이상의 화학요법제 또는 항신생물제 모두를 함유할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 치료적 조성물은 치료 유효량의 리실 옥시다제-유형 효소의 활성의 조절제를 포함하지만, 화학요법제 또는 항신생물제를 함유하지 않으며, 조성물은 화학요법제 또는 항신생물제로부터 별도로 투여된다.

[0263] 본원에 사용된 용어 "치료 유효량" 또는 "유효량"은 단독으로 또는 또다른 치료제와 조합되어 세포, 조직 또는 대상체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간, 또는 비-인간 동물, 예컨대 영장류, 설치류, 소, 말, 돼지, 양 등)에 투여되는 경우 질환 상태 또는 질환의 진행을 예방하거나 개선하는데 효과적인 치료제의 양을 지칭한다. 치료 유효량은 또한 증상의 전부 또는 일부의 개선, 예를 들어 관련 의학 상태의 치료, 치유, 예방 또는 개선, 또는 상기 증상의 치료, 치유, 예방 또는 개선 속도의 증가를 초래하는데 충분한 화합물의 양을 지칭한다. 예를 들어, 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 억제제의 치료 유효량은 질환 또는 장애의 유형, 질환 또는 장애의 광범위성, 및 질환 또는 장애에 걸린 유기체의 크기에 따라 변한다.

[0264] 본원에 개시된 치료학적 조성물은 특히, 종양 성장 및/또는 섬유증으로부터 생성되는 결합조직형성의 감소에 유용하다. 따라서, 리실 옥시다제-유형 효소 (예를 들면, LOXL2) 활성의 조절제 (예를 들어, 억제제)의 "치료 유효량"은 결합조직형성 및/또는 결합조직형성과 연관된 증상의 감소를 초래하는 양이다. 예를 들어, 리실 옥시다제 효소의 억제제가 항체이고 항체가 생체내 투여되는 경우, 정상적인 투여량은, 예를 들어 체중, 투여 경로, 질환의 중증도 등에 따라 1일에 포유동물 체중 kg 당 약 10 ng 내지 100 mg까지 또는 그 초과, 예를 들어 약 1 µg/kg/일 내지 50 mg/kg/일, 예를 들어 약 30 mg/kg/일, 임의로 약 100 µg/kg/일 내지 20 mg/kg/일, 500 µg/kg/일 내지 10 mg/kg/일, 또는 1 mg/kg/일 내지 10 mg/kg/일로 변할 수 있다. 투여량은 또한 매일 대신에 예를 들면, 1주일에 1회, 1주일에 2회, 1주일에 3회, 10일에 1회, 2주일에 1회 또는 1개월에 1회의 일정으로 투여될 수 있다. 투여량은 예를 들면, 포유동물 체중 1kg 당 약 10 ng 내지 100 mg 이하 또는 투여 당 그 초과, 예를 들면 약 1 µg/kg/투여 내지 50 mg/kg/투여, 예를 들면 약 30 mg/kg/투여, 임의로 약 100 µg/kg/투여 내지 20 mg/kg/투여, 500 µg/kg/투여 내지 10 mg/kg/투여, 또는 1 mg/kg/투여 내지 10 mg/kg/투여, 또는 약 15 mg/kg/투여의 양일 수 있다. 1개 예에서, 투여량은 1주일에 2회 투여되는 약 15/mg/kg이다. 치료의 기간은 예를 들면, 2주일, 3주일, 4주일, 5주일, 6주일, 7주일, 8주일, 9주일, 10주일, 11주일, 12주일, 13주일 또는 14주일, 또는 그 초과인 범위일 수 있다. 투여 요법은 2주에 1회 투여량 (예를 들면, 포유동물 체중 1 kg 당 약 10 ng/kg 내지 100 mg 이하 또는 투여 당 그 초과, 예를 들면 약 1 µg/kg/투여 내지 50 mg/kg/투여, 예를 들면 약 30 mg/kg/투여, 임의로 약 100 µg/kg/투여 내지 20 mg/kg/투여, 500 µg/kg/투여 내지 10 mg/kg/투여, 또는 1 mg/kg/투여 내지 10 mg/kg/투여, 또는 약 15 mg/kg/투여)의 투여를 포함할 수 있다.

[0265] 리실 옥시다제-유형 효소의 활성의 조절제가 화학요법제 또는 항신생물제와 조합으로 사용된 경우, 당업자는 또한 조합되어, 연속적으로 또는 동시에 투여되는 것에 관계없이 결합조직형성의 감소를 야기하는 조절제 및 화학요법제 또는 항신생물제의 합한 양인 조합물의 치료적으로 효과적인 투여량을 참조할 수 있다. 하나 초과 농도의 조합은 치료적으로 효과적일 수 있다.

[0266] 다양한 제약 조성물 및 그의 제조 및 사용 기술은 본 개시내용에 비추어 당업자에게 공지되어 있다. 적합한 약리학적 조성물 및 그의 투여 기술의 상세한 나열에 대해서는, 본원의 상세한 교시를 참조할 수 있으며, 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985]; [Brunton et al., "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," McGraw-Hill, 2005]; [University of the Sciences in Philadelphia (eds.), "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," Lippincott Williams & Wilkins, 2005]; 및 [University of the Sciences in Philadelphia (eds.), "Remington: The Principles of Pharmacy Practice," Lippincott Williams & Wilkins, 2008]에 의해 추가로 보충될 수 있다.

[0267] 개시된 치료학적 조성물은 추가로 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체의 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질, 즉 담체를 포함한다. 이들 담체는 대상 조절제를 신체의 한 기관 또는 영역에서 신체의 또다른 기관 또는 영역으로 운반하는 것에 관여한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 상용되지만 환자에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용"되어야 한다. 제약상 허용되는 담체로서의 역

할을 할 수 있는 물질의 일부 예로는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그의 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 잇꽃유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 파이로젠-무함유 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알콜; 포스페이트 완충 용액; 및 제약 제제에 사용되는 다른 비독성 상용성 물질이 포함된다. 습윤제, 유화제 및 윤활제, 예컨대 나트륨 라우릴 술페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제, 보존제 및 항산화제가 또한 조성물에 존재할 수 있다.

[0268] 본 개시내용의 또다른 측면은 리실 옥시다제-유형 효소 활성의 조절제의 투여를 수행하기 위한 키트에 관한 것이다. 본원의 또다른 측면은 리실 옥시다제-유형 효소의 활성의 조절제 및 화학요법제 또는 항신생물제의 조합된 투여를 수행하기 위한 키트에 관련된다. 한 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 별도의 제약 제제로 적절하게 제제화된, 임의로 하나 이상의 화학요법제 또는 항신생물제를 함유하는 제약 담체로 제제화된 리실 옥시다제-유형 효소의 활성의 억제제 (예를 들면, LOXL2의 억제제, 예를 들면 항-LOXL2 항체)를 포함한다.

[0269] 제제 및 전달 방법은 결합조직형성의 부위(들) 및 정도에 따라 적용될 수 있다. 예시적인 제제로는, 비경구 투여, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 안구내 또는 피하 투여에 적합한 제제 (마이셀, 리포솜 또는 약물-방출 캡슐 (서방용으로 디자인된 생체적합성 코팅 내에 혼입된 활성제)에 캡슐화된 제제를 포함함); 섭취가능한 제제; 국소 사용을 위한 제제, 예컨대 점안액, 크림, 연고 및 겔; 및 다른 제제, 예컨대 흡입제, 에어로졸 및 스프레이가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 본 개시 화합물의 투여량은 치료를 위한 필요 정도 및 중증도, 투여된 조성물의 활성, 대상체의 일반 건강, 및 당업자에게 널리 공지된 다른 고려사항에 따라 변할 것이다.

[0270] 치료적 조성물은 중앙 성장으로부터 생성된 결합조직형성을 감소시키기 위해 인접한 기질 조직과 함께 중앙-기질 경계 (즉, 중앙의 주변부 (예를 들면, 중앙 캡슐))로 및/또는 중앙 밖의 기질 조직으로의 조성물의 전달을 가능하게 하는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0271] 추가의 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 국소 전달된다. 국소 전달은 비-전신적으로, 예를 들어 상처 또는 섬유증 영역으로의 조성물 전달을 가능하게 하여, 전신적 전달에 비해 조성물의 신체 부담을 감소시킨다. 이러한 국소 전달은 예를 들면, 스텐트 및 도관을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는 다양한 의학적으로 이식된 장치의 사용을 통해 달성될 수 있으며, 또는 주사 또는 수술에 의해 달성될 수 있다. 코팅, 이식, 문음 및 이와 달리 원하는 제제를 의학적 장치, 예를 들면 스텐트 및 도관에 부착시키는 방법은 당업계에 확립되었고, 본원에서 고려된다.

[0272] **항-LOXL2 항체**

[0273] LOXL2에 대해 지시된 모노클로날 항체는 공동-소유의 미국 특허 출원 공개 번호 US 2009/0053224 (2009년 2월 26일)에 기재되었다. 이 항체는 AB0023으로 지정되었다. AB0023의 CDR (CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는 중쇄 및 AB0023의 CDR (CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는 경쇄를 갖는 항체는 관심의 대상이다. CDR의 서열 및 그의 중쇄의 가변 영역의 개입하는 프레임워크 영역은 다음과 같다 (CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시된다):

```
MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSKASGYAFTYYLIEWVKQRPQGGL
EWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSSAVYFCARNWMMNFDYWGQG
TTLTVSS (서열 1)
```

[0275] 서열 1에 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 추가의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열이 또한 제공된다.

[0276] CDR의 서열 및 AB0023 항체의 경쇄의 가변 영역의 개입하는 프레임워크 영역은 다음과 같다 (CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시된다):

```
MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVVISCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQR
PGQSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVVYCMQHLEYPYTFGGGTK
LEIK (서열 2)
```

[0278] 서열 2에 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 추가의 경쇄 가변 영역 아

미노산 서열이 또한 제공된다.

[0279] 상기-언급된 항-LOXL2 모노클로날 항체의 인간화 버전은 공동-소유의 미국 특허 출원 공개 번호 US 2009/0053224 (2009년 2월 26일)에 기재되었다. 예시적인 인간화 항체는 AB0024로 지정되었다. AB0024의 CDR (CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는 중쇄 및 AB0024의 CDR (CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는 경쇄를 갖는 인간화 항체는 관심의 대상이다. CDR의 서열 및 그의 중쇄의 가변 영역의 개입하는 프레임워크 영역은 다음과 같다 (CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시된다):

QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKF
KGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFRCARNWMNFDYWGQTTVTVSS

(서열 3)

[0280]

[0281] 서열 3에 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 추가의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열이 또한 제공된다.

[0282] CDR의 서열 및 AB0024 항체의 경쇄의 가변 영역의 개입하는 프레임워크 영역은 다음과 같다 (CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 밑줄로 표시된다):

DIVMTQTPLSLSVTPGQFASISCRSSKSLHLSNGNTYLYWFLQKPGQSPQFLIYRMSNLAGVFP
DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGKVEIK

(서열 4)

[0283]

[0284] 서열 4에 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 추가의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열이 또한 제공된다.

[0285] 가변 영역, 프레임워크 영역 아미노산 서열 및 상보성-결정 영역의 아미노산 서열의 추가의 인간화 변이체를 포함하는 추가의 항-LOXL2 항체 서열은 공동-소유의 미국 특허 출원 공개 번호 US 2009/0053224 (2009년 2월 26일)에 개시되며, 다양한 항-LOXL2 항체의 아미노산 서열을 제공하는 목적을 위해 개시된 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0286] 실시예

[0287] 실시예 1: 조직 및 세포주

[0288] 세포주를 ATCC (마나사스, 버지니아 (Manassas, VA))로부터 취득하고, 실험에 따라 DMEM + 10% FBS 또는 혈청이 없는 DMEM 중에 유지하였다.

[0289] 실시예 2: 구축물 및 발현 벡터

[0290] 인간, 래트 및 게막이 원숭이 LOXL2 발현 벡터의 생성

[0291] 래트 LOXL2를 정상 래트 cDNA (심장, 신장, 골격근 및 결장 cDNA의 혼합물, 바이오체인 인스티튜트 (Biochain Institute))로부터 플라티늄 (Platinum) Pfx DNA 폴리머라제 (인비트로젠 (Invitrogen)) 및 프라이머 5' atggagatcccttttggctc 3' (서열 5) 및 5' ttactgcacagagagctgatta 3' (서열 6)을 사용하여 PCR에 의해 클로닝하였다. 94°C에서 4분 동안의 초기 인큐베이션 후 94°C에서 15초 동안, 55°C에서 30초 동안 및 68°C에서 2.5분 동안 30회 PCR 주기를 수행하였다. PCR 단편을 겔 정제하고 (겔 추출 키트 (Gel Extraction Kit), 퀴아젠 (Qiagen)), 서열을 확인하였다 (엠씨랩 (MCLab), 사우스 샌프란시스코, 캘리포니아 (South San Francisco, CA)). 맞는 클론을 프라이머 5' atagctagcgccaccatggagatcccttttggctc 3' (서열 7) 및 5' tatactcgagtctgcacagagagctgattatttag 3' (서열 8)을 사용하여 PCR에 의해 증폭시키고 (이전에 기재한 바와 같지만, 18회 주기로 수행함), pSecTag2hygro-B (인비트로젠)에 NheI 및 XhoI 부위에서 클로닝하고, 서열을 확인하였다. 게막이 원숭이 LOXL2를 정상 cDNA (위, 신장, 결장, 음경 및 골격근 cDNA의 혼합물, 바이오체인 인스티튜트)로부터 프라이머 5' cctgtccccctgagcctggcacag 3' (서열 9) 및 5' ttactgctgggagagctggttgttcaagag 3' (서열 10) (불완전한 신호 펩티드를 갖는 단편을 생성함)을 사용하여 PCR에 의해 (이전에 기재한 바와 같음) 클로닝하고, 다수의 PCR 반응의 비교에 의해 맞는 ORF 서열을 결정하였다. 이를 프라이머 5' tatagcccagccggcccagatgacagctggccc 3' (서열 11) 및 5' tatagcggccgcctgctgggagagctggttg 3' (서열 12)을 사용하여 SfiI 및 NotI 부위 (내인성 신호 펩티드를 절단함)에서 pSecTag2hygro 벡터에 클로닝하고, 서열을 확인하였다 (엠씨랩). 인간 LOXL2를 제네코포에이아 (유전자copoeia) (저먼타운, 매릴랜드 (Germantown, MD))에 의해 pReceiverM08 벡터에 조립하였으며, 이는 헤

마글루티닌 (HA) 및 his₆ 태그를 함유하였다. 라이신 티로실퀴논 (LTQ) 영역에서 Y689F 돌연변이가 있는 촉매적으로 불활성 LOXL2는 제라 뉴펠드 랩 (Gera Neufeld lab) (테크니온, 이스라엘 인스티튜트 오브 테크놀로지 (Technion, Israel Institute of Technology))으로부터의 선물이었다.

[0292] 실시예 3: 항체 생성 및 정제

[0293] 하이브리도마 세포를 페니실린/스트렙토마이신, 5% 하이브리도마 클로닝 인자 및 HT 배지 보충제를 함유하는 저 IgG DMEM, 10% 소 태아 혈청 중에 배양하였다. 복수 유체를 BALB/c 마우스에서 생성하고, 항체를 맵셀렉트 (MabSelect) 수지 (지이 헬스 (GE Health))를 갖는 충전층 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 배지 결합 후, 플로우-스루 (flow-through)를 수집하고, 수지를 10 컬럼 부피의 PBS, pH 7.4로 세척하였다. 항체를 0.1M 시트르산 pH 3으로 용출하였다. 용출액을 1:10 부피 0.1M 트리스 pH 8.0로 중성화하고, 밤새 4°C에서 0.01% 트윈 (Tween) 20/PBS 중에 투석하였다.

[0294] 마우스 항-인간 LOXL2 항체 (AB0023)를 완전한-길이의 LOXL2 단백질로의 면역화에 의해 획득하고, SEC-HPLC (토소 (Tosoh) TSKGEL G3000SWXL 7.8X300)에 의해 정제하였다. 분석적 크기 배제 크로마토그래피를 항체 안정성 및 순도를 평가하기 위해 사용하였다. 정제된 AB0023을 SDS-PAGE 쿠마시 (Coomassie) (인비트로젠 BT 4-12% 겔) 환원 및 비-환원 겔 상에서 순도를 평가하기 위해 내렸다. Kd를 결정하기 위해 ELISA에 의해 효능을 검사하고, 암플렉스 레드 검정 (Amplex Red Assay) (몰레큘러 프로브스 (Molecular Probes)/인비트로젠, 칼스바드, 캘리포니아 (Carlsbad, CA))을 사용하여 LOXL2 효소적 활성에 대한 효과를 결정하였다. 항체 농도를 1.4의 흡광 계수 Abs 0.1%를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다. 동일성을 등전 포커싱 (인비트로젠 pH 3-10 IEF 겔)에 의해 검정하였다. 안전성 분석을 위해, 내독소 수준을 0.01-1 EU/ml (찰스 리버 엔도세이프 (Charles River EndoSafe) PTS)의 민감도 범위에서 측정하였다.

[0295] 항-LOX 항체를 아미노산 서열 DTYERPRPGGRYPG (서열 13)를 갖는 펩티드로의 면역화에 의해 획득하였다.

[0296] 실시예 4: LOXL2 및 LOXL2 단편의 정제

[0297] 니켈-세파로스 (지이 헬스케어) 수지를 0.1M 트리스-HCL pH 8.0로 평형시켰다. 조건화 배지를 평형된 수지 상에 로딩하였다. 로딩 후, 니켈 친화도 컬럼을 0.1M 트리스-HCL pH 8.0, 0.25M NaCl, 0.02M 이미다졸로 세척하였다. 용출을 0.1M 트리스 pH 8.0, 0.150M NaCl, 0.3M 이미다졸로 수행하였다. SDS-PAGE를 순도를 결정하기 위해 환원된 샘플에 대해 4-12% 비스트리스 (BisTris) (인비트로젠) 겔로 수행하였다. 정제된 단백질을 이어서 밤새 4°C에서 0.05M 보레이트 pH 8.0 중에 투석하였다.

[0298] 실시예 5: 면역형광 검정

[0299] 로다민 팔로이딘 염색

[0300] 세포를 80% 융합도에서 염색 일 24시간 전에 8-방 슬라이드에서 시딩하였다. 24시간 후, 배지를 흡인하고 방을 PBS로 세척하였다. 세포를 이어서 20분 동안 실온에서 4% 파라포름알데히드 (PFA)로 고정하고, 이어서 0.5% 사포닌 (제이티 베이커 (JT Baker), 필립스버그, 뉴저지 (Phillipsburg, NJ))으로 5분 동안 실온에서 투과성화하였다. 세포를 이어서 15분 동안 실온에서 로다민 팔로이딘 (인비트로젠, 칼스바드, 캘리포니아)의 1:100 희석으로 염색하였다. 슬라이드를 벡타실드 (Vectashield) (벡터 라보라토리즈 (Vector Laboratories), 벌링게임, 캘리포니아 (Burlingame, CA))로 올려놓았다.

[0301] LOX, LOXL2 및 제1형 콜라겐의 동시-국소화: 면역형광

[0302] Hs578t 세포를 8 방 유리 슬라이드 (비디 팔콘 (BD Falcon), 프랭클린 레이크스, 뉴저지 (Franklin Lakes, NJ))에서 시딩하고, 밤새 인큐베이션하였다. 저 융합도를 위해, 세포를 슬라이드 당 30-40,000개 세포에서 시딩하였다. 저 융합도 조건을 시딩 24시간 후 세포액에서의 LOX의 검출을 위해 사용하였다. 고 융합도를 위해, 세포를 슬라이드 당 100,000개 세포에서 시딩하였다. 고 융합도 조건을 시딩 대략 48-72시간 후 매트릭스-연관된 LOX 및 콜라겐의 검출을 위해 사용하였다.

[0303] 세포를 24시간 동안 인큐베이션한 후, 항-LOX 또는 항-LOXL2 mAbs를 정규 성장 배지 중에 1ug/ml의 최종 농도로 슬라이드에 첨가하고, 슬라이드를 대략 24시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고, 세포를 1xPBS로 세정하였다. 세포를 이어서 4% 파라포름알데히드 (PFA) 중에 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 콜라겐 검출을 위해, 항-콜라겐 항체 (1:50 항-콜라겐 유형 I 토끼 폴리클로날, 칼바이오켄. (Calbiochem.) 깁스타운, 뉴저지 (Gibbstown, NJ))를 4% PFA로의 세포 고정 1시간 전에 첨가하고, 항-토끼 Cy3 (이뮤노잭슨 랩스 (ImmunoJackson Labs), 웨스트 그로브, 펜실베이니아 (West Grove, PA))을 2급 Ab로서 사용하여 검출하였

다.

[0304] 세포를 사포닌 완충제 (PBS 중 0.5% 사포닌/1% BSA)를 세포에 실온에서 첨가함으로써 투과성화하고, 20분 동안 인큐베이션하였다. 2급 항체 (알렉사 플루오르 (Alexa Fluor) 488 당나귀 항-마우스 IgG, 인비트로젠, 칼스바드, 캘리포니아)를 사포닌 완충제 중에 실온에서 첨가하고, 30-45분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 사포닌 완충제 중에 3회 세척하고, 이어서 벡타실드 (벡터 라보라토리즈, 벨링게임, 캘리포니아)로 올려놓았다.

[0305] 실시예 6: 세포-기반 검정

[0306] 단백질 블롯팅 분석을 위한 세포 용해물 및 조건화 배지 샘플의 제조

[0307] Hs578T, MDA-MB-231, MCF7, A549 및 HFF 세포주를 10% FBS (PAA, 에토비코크 (Etobicoke), 온타리오, 캐나다 (Ontario, Canada)) 및 L-글루타민 (미디아테크 (Mediatech), 마나사스, 버지니아)로 보충된 돌베코스 (Dulbecco's) 변형된 이글스 (Eagle's) 배지 (DMEM, 미디아테크, 마나사스, 버지니아) 중에 성장시켰다. 세포를 정상산소 (95% 공기, 5% CO₂) 또는 저산소 (2% O₂, 5% CO₂, N₂와 균형됨) 조건하에 37°C에서 배양하였다. 조건화 배지 (FBS가 없는 DMEM)를 수집하고, 아미콘 울트라-4 (Amicon Ultra-4) (밀리포어 (Millipore), 빌레리카, 매사추세츠 (Billerica, MA))를 사용하여 농축시켰다. 세포를 긁어내고, 볼텍싱하고, 8M 우레아 (16mM Na₂HPO₄ 중) 중에 초음파 처리하였다. 이어서 세포 용해물을 아미콘 울트라-15 (밀리포어, 빌레리카, 매사추세츠)를 사용하여 농축시켰다. 농축된 조건화 배지 및 세포 용해물을 SDS 샘플 완충제 (보스턴 바이오프로덕츠 (Boston Bioproducts), 우스터, 매사추세츠 (Worcester, MA))로 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 끓였다.

[0308] LOXL2-함유 배지에 의한 EMT-유사 표현형의 유도:

[0309] MCF7 또는 SW620 세포를 HGDMEM (4.5 g/l 글루코스 함유 고-글루코스 돌베코스 변형된 이글스 배지) + 10% FBS, 2mM L-글루타민 중의 8-방 배양 슬라이드의 웰 당 50,000개 세포에서, 조건화 배지 (CM)에의 노출 24시간 전에 시딩하였다. MDA MB 231 세포로부터의 500ul의 신선한 조건화 배지를 MCF7 세포를 함유하는 방에 첨가하였다. 세포를 CM으로 48-96시간 동안 인큐베이션하였다. MCF7 또는 SW620 세포로부터의 조건화 배지를 음성 대조군으로서 사용하였다. CM으로의 인큐베이션 48-96시간 후, 세포를 상기 기재된 바와 같이 로다민-팔로이딘으로 염색하였다.

[0310] LOXL2 촉매 활성이 LOXL2 CM으로 처리된 SW620 세포에서의 EMT-유사 변화를 위해 요구된다

[0311] 래트, 게릭이 원숭이 및 인간 LOXL2 (야생형 및 Y689F 돌연변이체)를 T175 플라스크 중에 HEK293 세포에 제조자의 지시사항에 따라 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000 (인비트로젠, 칼스바드, 캘리포니아)을 사용하여 개별적으로 형질감염시켰다. 형질감염 배지를 형질감염 4시간 후 흡인하고, 30ml DMEM + 0.5%FBS로 대체하고, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 성장시켰다. 조건화 배지를 수집하고 10,000MW 차단 컬럼 (밀리포어) 중에 ~10X 농축시키고, 0.2um 필터 (에어로디스크 (Aerodisk))를 통해 여과하였다.

[0312] 3-차원 콜라겐 I 겔

[0313] HFF 세포를 2 x 10⁵ 개 세포/웰의 밀도에서 6웰 플레이트에서 2mg/ml 또는 3mg/ml 콜라겐 I 겔 중에 성장시켰다. 문헌 [Wozniak MA & Keely PJ (2005) Biological Procedures Online 7(1):144-161]. 잠시 콜라겐 1 (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences))을 중성화 용액 (PBS 중 100mM HEPES, pH 7.3)과 혼합하고, 10% FBS 및 2mM L-글루타민 함유 1 mL의 RPMI (미디아테크) 중의 HFF 세포를 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 이어서 2ml/웰의 RPMI/10%FBS/2mM 글루타민 배지를 첨가하였다. 작은 파이펫 팁으로 겔을 제거함으로써 겔의 반은 웰에서 떠다녔고, 나머지 반은 부착된 상태로 남아있었다. 조건화 배지의 분취액을 4일차, 7일차 및 8일차에 수집하고, SDS-PAGE 겔 상에서 용해시키고, 겔의 단백질을 블롯팅에 의해 니트로셀룰로스 막으로 이동하였다. 막을 마우스 항-LOXL2 모노클로날 항체로 인큐베이션하고, 이어서 HRP-접합된 염소 항-마우스 항체 (지이-헬스케어)로 인큐베이션하였다. 신호를 화학발광 용액 (알파인노테크 (AlphaInnotech))으로 발달시키고, UVP 영상법을 사용하여 분석하였다.

[0314] 2-차원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

[0315] 폴리아크릴아미드 겔을 주조하고, 이전에 기재된 바와 같이 (문헌 [Schlunck et al 2007]) 6-웰 플레이트에 놓았다. 세포를 1x10⁵ 개 세포/웰에서 6-웰 플레이트에 시딩하고, 7-8일 동안 배지 변화없이 배양하였다. 후속적으로, 배지를 분석을 위해 제거하였다. 겔 상의 세포를 이어서 단백질 블롯 ("웨스턴") 분석을 위해 용해하거나 또는 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 제조자의 권고에 따라 로다민 팔로이딘 (인비트로젠, 칼스바

드, 캘리포니아)으로 검색하였다.

[0316] HFF 세포에서의 Lox 및 Lox12의 siRNA 억다운

[0317] LOXL2 발현의 억제를 위한 siRNA 서열은 다음과 같았다:

5'-UAA GCU UUC CGG AAU CUC GAG GGU C- 3' (서열 14) (이중-가닥 올리고)

5'-UGG AGU AAU CGG AUU CUG CAA CCU C- 3' (서열 15) (이중-가닥 올리고)

5'-UCA ACG AAU UGU CAA AUU UGA ACC C- 3' (서열 16) (이중-가닥 올리고)

[0318]

[0319] LOX 발현의 억제를 위한 siRNA 서열은 다음과 같았다:

5'-AUA ACA GCC AGG ACU CAA UCC CUG U- 3' (서열 17) (이중-가닥 올리고)

[0320]

[0321] 60 마이크로리터의 20 uM siRNA를 1 mL의 옵티멤 (OptiMEM)(등록상표)에 혼합하고 (최종 siRNA 농도는 100nM이었음); 30 ul의 다마팩트 (Dharmafect) 3 형질감염 시약 (써모 싸이언티픽 (Thermo Scientific), 시카고, 일리노이 (Chicago, IL))을 1 mL의 옵티멤(등록상표)에 혼합하였다. 2개 혼합물을 합하고 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0322]

HFF 세포를 대략 75% 융합도가 될 때까지 10 cm² 조직 배양 플레이트에서 배양하고, 이어서 이들을 트립신화하고, 10 mL의 완전한 배지 중에 재현탁하였다. 2 mL의 형질감염 혼합물 (이전 단락에 기재됨)을 세포에 첨가하고, 생성된 혼합물을 10 cm² 배양 접시에 플레이트하였다. 세포 배양물을 단백질 수준의 측정을 위해 5일 후에 수집하였다.

[0323]

시험관내 HUVEC 검정

[0324]

인간 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)를 섬유모세포의 피더 (feeder) 층 상에 플레이트하고, hEGF, 히드로코르티손, GA-1000 (겐타마이신, 암포테리신-B), FBS (소 태아 혈청) 10 ml (2% 최종), VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, 아스코르브산 및 헤파린으로 보충된 론자 (Lonza) EBM-2 배지 (저-혈청 환경에서의 정상 인간 내피세포를 위해 개발된 기초 배지) 중의 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 세포를 배양물이 세관 형성의 초기 단계를 입증할 때까지 성장시켰다. 이 시점에서 (1일차), 첨가물을 함유하지 않는 0.5 mL의 신선한 내피세포 성장 배지 (대조군), 항-LOXL2 항체 AB0023, 또는 수라민을 웰에 첨가하였다. 플레이트를 이어서 37°C 및 5% CO₂에서 배양하였다. 4, 7 및 9일차에 모든 웰로부터 배지를 제거하고, 상기 나열된 첨가물을 함유하는 0.5mL의 신선한 배지로 조심스럽게 대체하였다. 11일차에, 플레이트를 고정시키고, 세관을 CD31 발현에 대해 다음과 같이 검정하였다. 웰을 1 ml PBS로 세척하고, 1 ml의 아주 찬 70% 에탄올로 30분 동안 실온에서 고정하였다. 세포를 이어서 60분 동안 37°C에서 1% BSA 함유 PBS 중의 1:400으로 희석된 0.5 ml 마우스 항-인간 CD31 항체와 함께 인큐베이션하였다. 웰을 이어서 1 ml PBS로 3회 세척하고, 이어서 60분 동안 37°C에서 1% BSA 함유 PBS 중의 1:500으로 희석된 0.5 ml 알칼리성 포스파타제-접합된 염소 항-마우스 IgG 2급 항체와 함께 인큐베이션하였다. 웰을 10분 동안 0.5 ml의 신선하게 제조되고 여과된 BCIP/NBT 기질과 함께 37°C에서의 인큐베이션 전에 1 ml PBS로 추가로 3회 세척하였다. 웰을 이어서 1 ml 증류수로 조심스럽게 3회 세척하고, 밤새 공기 건조되도록 놓아두었다.

[0325]

각각의 웰의 디지털 영상을 니콘 쿨픽스 (Nikon Coolpix) 카메라를 사용하여 10x 확대에서의 레이카 (Leica) 도립 현미경 상에서 촬영하였다. 웰 당 4개의 무작위의 필드 (field)를 영상화하여, 총 96개 영상을 생성하였다. 영상을 이어서 BMP 파일로 변환하고, 혈관 분지의 수, 혈관의 수 및 총 혈관 길이를 측정하기 위해 영상 분석 패키지로 불러왔다. 이들 측정을 CD31-염색된 혈관 만이 검출되도록 영상을 스레시홀딩 (역치ing)함으로써 수행하였고, 여기서 소프트웨어는 이어서 단일 픽셀 너비 혈관을 생성하기 위해 골격화하여, 이로부터 소프트웨어는 개별 혈관 길이, 총 혈관 길이 및 혈관 분지점의 수를 측정할 수 있다. 데이터는 이어서 각각의 데이터 세트에 대한 평균 및 표준 편차를 계산하기 위해 엑셀로 내보내진다. 기본 통계를 원 웨이 (one way) ANOVA를 사용하여 수행하였다.

[0326]

실시예 7: 전이 및 1차 종양형성의 이중익편 모델

- [0327] 후속적인 동소 이식을 위한 성장하는 종양 조직 스톱을 제공하기 위해, 5- 내지 6-주된 누드 마우스 (NCR nu/nu)를 2×10^6 개 MDA-MB-435-GFP 세포 (안티캔서, 인크. (Anticancer, Inc.), 샌 디에고, 캘리포니아 (San Diego, CA))로 우측 옆구리에 피하 주사하였다. 이 목적을 위해, MDA-MB-435-GFP 세포의 배양물을 수집하고, 트립신화에 의해 해리하고, 찬 혈청-함유 배지로 3회 세척하고, 이어서 주사할 때까지 얼음에 놓아두었다. 세포를 0.1 ml의 총 부피로 수집 30분 내에 동물의 옆구리의 피하 공간에 주사하였다. 누드 마우스를 종양 단편의 수술 동소 이식 (SOI)을 위한 종양 세포 주사 4 내지 6주일 후의 종양 조직의 수집을 위해 희생하였다.
- [0328] 피하-성장하는 GFP-발현 유방 종양으로부터 추출한 종양 조각 ($\sim 1 \text{ mm}^3$)을 암컷 누드 마우스 (NCR nu/nu)의 유방에의 수술 동소 이식 (SOI)에 의해 이식하였다. AB0023 (항-LOXL2 모노클로날 항체), M64 (항-LOX 모노클로날 항체) 및 비히클 (모두 복막내 주사를 포함) 및 탁소텔 (정맥내 주사에 의함)로의 처리를 평균 1차 종양 부피가 75 mm^3 가 된 경우 개시하였다. 마우스를 30 mg/kg의 투여량으로 1주일에 2회 28일 동안 항체로 투여하고, 10 mg/kg의 탁소텔로 1주일에 1회 3주일 동안 투여하였다.
- [0329] 체중 및 종양 크기를 매주 기록하였다. 연구의 결말에, 마우스를 이산화탄소로 마취한 후 자궁목 탈구에 의해 희생하였다. 1차 유방 종양을 영상화하고, 수집하고, 대칭으로 반으로 절단하고, 조직학적 및 면역조직화학적 분석을 위해 스냅-냉동시켰다.
- [0330] 실시예 8: CCl_4 -유도된 간 섬유증
- [0331] 수컷 BALB/c 마우스 (10-12주일 됨)를 아라젠 바이오사이언시즈 (Aragen Biosciences) (모건 힐, 캘리포니아 (Morgan Hill, CA))로부터 수득하였다. 마우스를 4개 군으로 분배하였다. 3개 군의 마우스를 CCl_4 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 세인트 루이스, 몬타나 (St. Louis, MO))로 주사하고, 나머지 군의 마우스를 염수로 주사하였다.
- [0332] CCl_4 를 마우스에 체중 1 kg 당 1 ml로 4주일 동안 1주일에 2회 복막내 투여하였다 (1:1 (v/v) 비율의 CCl_4 :광유). 대조군에서, 0.9% 염수 (1:1 (v/v) 비율의 염수:광유)를 동일한 투여 요법을 사용하여 복막내 투여하였다.
- [0333] CCl_4 -처리된 군에서, 제1 군을 AB0023 (PBS/0.01% 트윈-20 중에 희석함)으로 처리하고, 제2 군을 pep4 M64 (10 ml-히스티딘 완충제 중에 희석함)로 처리하고, 제3 군을 비히클 (PBST)로 처리하였다. 항체 및 비히클을 30 mg/kg의 투여량으로 1주일에 2회 복강내 주사하였다. 치료를 CCl_4 의 제1 투여 1일 전에 개시하였고, 연구의 마지막까지 계속하였다. 연구는 4주일의 CCl_4 및 항체 투여 후 종결되었다. 마우스를 안락사시키고, 인간적으로 희생시키고, 투여 완료 96시간 후 간을 수집하였다. 간을 조직학적 및 면역조직화학적 분석을 위해 스냅-냉동시켰다.
- [0334] 실시예 9: 생체내 매트릭셀 플러그 혈관형성 검정
- [0335] 흉선없는 암컷 Ncr:Nu/Nu 마우스를 옆구리에 100 ng/ml FGF 및 60 U 헤파린으로 보충된 0.5 ml 고-농도 매트릭셀 (비디 바이오사이언시즈, 샌 호세, 캘리포니아)로 피하 주사하였다. 매트릭셀 주사를 항체로의 처리 개시 1주일 후 수행하였다. 항체 (또는 대조군으로서 PBST)를 1주일에 2회 30mg/kg의 복막내 주사에 의해 투여하였다. 이식 후 10일에 매트릭셀 플러그를 부착된 피부와 함께 절개하여 플러그를 수거하고, 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키고, 파라핀에 삽입하였다. 5 μm 절편을 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신, 항-CD31 또는 항-CD34 항체로 염색하여 혈관 형성 정도를 평가하였다.
- [0336] 실시예 10: 면역조직화학
- [0337] 면역조직화학 (IHC) 프로토콜을 위해 사용된 용액을 달리 언급하지 않는 한 바이오케어 메디칼 (Biocare Medical) (콘코드, 캘리포니아 (Concord, CA))로부터 수득하였다. 모든 절차를 실온에서 수행하였다. 슬라이드를 4% PFA로 10분 동안 고정시키고, 페록시다제화 (Peroxidized)-1 (바이오케어 메디칼, 콘코드, 캘리포니아)로 5분 동안 후속적으로 처리하였다. 이어서, 슬라이드를 SNIPER (바이오케어 메디칼, 콘코드, 캘리포니아)로 10분 동안 배경 블록하였다. 1급 항체 (2-5 $\mu\text{g/ml}$ 최종 농도)를 다 빈치 그린 유니버설 (Da Vinci Green Universal) 희석제 중에 희석하고, 슬라이드에 30분 동안 적용시켰다. 슬라이드를 이어서 PBS-트윈-20 중에 세정하였다. 마하2 (Mach2) 중합체 키트를 30분 동안 토끼 프로브를 첨가함으로써 항원 검출을 위해 사

용하였다. DAB 크로마젠을 3-5분 동안 슬라이드에 첨가하고, 이어서 슬라이드를 탈이온수로 1회 세정하였다. 슬라이드를 이어서 헤마톡실린으로 대조-염색하고, 이어서 등급이 분류된 알콜로 탈수하였다. 슬라이드를 엔텔란 마운팅 (entellan mounting) 매질 (엘렉트론 마이크로스코피 사이언시즈 (Electron Microscopy Sciences), 햇필드, 펜실베니아 (Hatfield, PA))로 올려놓았다.

[0338] 실시예 11: IHC 영상의 정량 분석

[0339] 간 섬유증

[0340] 각각의 처리 요법을 위한 10개 필드 (또는 구역 또는 엽)를 무작위로 선택하고, 시리우스 레드로 염색하였다. 점수를 매기기 위해 사용된 구역은 1.7 mm x 1.3 mm이었고, 8개 이상의 간 세동이를 함유하였다.

[0341] 완전한 브리징 섬유증의 세동이 및 구역을 세었다. 완전한 브리징 섬유증의 구역의 수를 세동이 구역의 총 수로 나누고, 완전한 브리징 섬유증의 백분율을 각각의 필드로부터 획득하였다. 10개 필드로부터의 백분율 (처리 당)의 평균을 내고, 표준 오차를 계산하였다.

[0342] aSMA 발현에 대한 염색에 의한 섬유모세포 활성화

[0343] 각각의 처리에 대해, 5개 필드를 선택하고, 항알파-평활근 액틴 (aSMA) 항체로 염색하였다. 포토-포탈 영역 (역치 구역 %)의 aSMA-양성 신호를 메타모프 (Metamorph) (몰레큘러 디바이시즈 (Molecular Devices), 다운타운, 펜실베니아 (Downingtown, PA))에 의해 분석하였다. AB0023-처리를 받는 동물로부터의 절편에서의 aSMA-양성 신호를 비히클 (PBS)로 처리된 동물로부터의 절편에서 획득된 신호와 비교하였다.

[0344] 실시예 12: RT-PCR 분석

[0345] 총 RNA 단리 및 정량 실시간 PCR

[0346] RNA를 제조자의 지시사항에 따라 알엔이지 미니 키트 (RNeasy Mini Kit) (퀴아젠, 발렌시아, 캘리포니아)를 사용하여 냉동 조직의 조각으로부터 추출하였다. 잠시, 조직을 RLT 용해 완충제 중에 폴리트론 (Polytron) 휴대용 전기 균질화기로 균질화하고, 무-뉴클레아제 물 (암비온 (Ambion), 오스틴, 텍사스)로 용출하였다. 잔류 게놈 DNA 오염을 재조합 디엔아제 I (암비온, 오스틴, 텍사스)을 사용하여 제거하였다. 반응물 당 1백 나노그램의 총 RNA를 역 트랜스크립타제-매개된 cDNA 합성, 및 브릴리언트II (BrilliantII) qPCR 1-단계 핵심 시약 키트 (아질런트 (Agilent), 산타 클라라, 캘리포니아 (Santa Clara, CA))로의 후속적인 PCR을 위해 사용하였다. 반응을 Mx3000P 기구 (아질런트, 산타 클라라, 캘리포니아) 상에서 2별로 수행하였다. 유전자발현을 인간 (h) 및 마우스 (m)에 대한 비콘 디자이너 (Beacon Designer) 소프트웨어에 의해 설계된 종-특이적인 프라이머 및 프로브 세트를 사용하여 실시간 PCR (타크맨 (TaqMan)(등록상표))에 의해 분석하였다:

hLOX:

전방향 5' CTTGACTGGGGAAGGGTCTG 3' (서열 18),
 역방향 5' AAAACGGGGCTCAAATCACG 3' (서열 19),
 프로브 5' ATCCCACCCTTGGCATTGCTTGGT 3' (서열 20)

hLOXL1:

전방향 5' AGCAGACTTCCTCCCAACC 3' (서열 21),
 역방향 5' CAGTAGGTCGTAGTGGCTGAAC 3' (서열 22)
 프로브 5' CACGGCACACCTGGGAGTGGCAC 3' (서열 23)

hLOXL2:

전방향 5' GGGGTTTGTCCACAGAGCTG 3' (서열 24),
 역방향 5' ACGTGTCACTGGAGAAGAGC 3' (서열 25),
 프로브 5' TGGAGCAGCACCAAGAGCCAGTCT 3' (서열 26)

hLOXL3:

전방향 5' GTGTGCGACAAAGGCTGGAG 3' (서열 27),
 역방향 5' CCGCGTTGACCTCTTTTCG 3' (서열 28),
 프로브 5' AAGCCCAGCATCCCGCAGACCAC 3' (서열 29)

hLOXL4:

전방향 5' CTTACCACACACATGGGTGTTTC 3' (서열 30),
 역방향 5' TCAAGCACTCCGTAAGTGG 3' (서열 31),
 프로브 5' CCTTGAAGCACAGACCTCGGGCA 3' (서열 32)

hACTA2: (알파-평활근 액틴)

전방향 5' CTATCCAGGCGGTGCTGTC 3' (서열 33),
 역방향 5' ATGATGGCATGGGGCAAGG 3' (서열 34),
 프로브 5' CCTCTGGACGCACAAGTGGCATCG 3' (서열 35)

hFNI: (피브로넥틴)

전방향 5' TGGGAGTTTCCTGAGGGTTTTC 3' (서열 36),
 역방향 5' GCATCTTGGTTGGCTGCATATG 3' (서열 37),
 프로브 5' AGGGCTGCACATTGCCTGTTCTGC 3' (서열 38)

[0347]

hVIM: (비멘틴)

전방향 5' CAGGCAAAGCAGGAGTCCAC 3' (서열 39),
 역방향 5' CTTCAACGGCAAAGTTCTCTCC 3' (서열 40),
 프로브 5' ACCGGAGACAGGTGCAGTCCCTCA 3' (서열 41)

hSNAIL: (스네일)

전방향 5' TCAAGATGCACATCCGAAGCC 3' (서열 42),
 역방향 5' CAGTGGGGACAGGAGAAGGG 3' (서열 43),
 프로브 5' CCTGCGTCTGCGGAACCTGCGG 3' (서열 44)

hCOL1A1: (제1형 콜라겐)

전방향 5' ACAGAACGGCCTCAGGTACC 3' (서열 45),
 역방향 5' TTCTTGGTCTCGTCACAGATCAC 3' (서열 46),
 프로브 5' CGTGTGAAACCCGAGCCCTGCC 3' (서열 47)

hRPL19: (리보솜 단백질 L19)

전방향 5' CCGGCTGCTCAGAAGATAC 3' (서열 48),
 역방향 5' TTCAGGTACAGGCTGTGATACAT 3' (서열 49),
 프로브 5' TGGCGATCGATCTTCTTAGATTCACG 3' (서열 50)

mLOX:

전방향 5' CAAGAGGGAAGCAGAGCCTTC 3' (서열 51),
 역방향 5' GCACCTTCTGAATGTAAGAGTCTC 3' (서열 52),
 프로브 5' ACCAAGGAGCACGCACCAACGA 3' (서열 53)

mLOXL1:

전방향 5' GGCCTTCGCCACCACCTATC 3' (서열 54),
 역방향 5' GTAGTACACGTAGCCCTGTTCG 3' (서열 55),
 프로브 5' CCAGCCATCCTCCTACCCGCAGCA 3' (서열 56)

mLOXL2:

전방향 5' GCTATGTAGAGGCCAAGTCCTG 3' (서열 57),
 역방향 5' CAGTGACACCCAGCCATTG 3' (서열 58),
 프로브 5' TCCTCCTACGGTCCAGGCGAAGGC 3' (서열 59)

[0348]

mLOXL3:

전방향 5' AACGGCAAGCTGTCTGGAAG 3' (서열60),
 역방향 5' AGCCAACATTGACCTAGCACTG 3' (서열61),
 프로브 5' TCCCGCCCATTCCCACCCATCTCG 3' (서열62)

mLOXL4:

전방향 5' CAAGACAGGTCCAGTAGAGTTAGG 3' (서열63),
 역방향 5' AGGTCTTATACCACCTGAGCAAG 3' (서열64),
 프로브 5' ACAGAGCACAGCCGCTCACTGGA 3' (서열65)

mACTA2: : (알파-평활근 액틴)

전방향 5' TCTGCCTCTAGCACAACTG 3' (서열66),
 역방향 5' AAACCACGAGTAACAAATCAAAGC 3' (서열67),
 프로브 5' TGTGGATCAGCGCTCCAGTTCCT 3' (서열68)

mFNI: (피브로넥틴)

전방향 5' CACCTCTGCTTTCTTTTGCCATC 3' (서열69),
 역방향 5' CTGTGGGAGGGGTGTTGAAC 3' (서열70),
 프로브 5' TGCAGCACTGTCAGGACATGGCCT 3' (서열71)

mVIM: (비멘틴)

전방향 5' CGCCCTCATTCCCTTGTTC 3' (서열72),
 역방향 5' GGAGGACGAGGACACAGACC 3' (서열73),
 프로브 5' TTCCAGCCGAGCAAGCCAGCC 3' (서열74)

mCOL1A1: (제1형 콜라겐)

전방향 5' CGGCTGTGTGCGATGACG 3' (서열75),
 역방향 5' ACGTATTCTTCCGGCAGAAAG 3' (서열76),
 프로브 5' CAGCACTCGCCCTCCCGTCTTTGG 3' (서열77)

mRPL19: (리보솜 단백질 L19)

전방향 5' AGAAGGTGACCTGGATGAGAA 3' (서열78),
 역방향 5' TGATACATATGGCGGTCAATCT 3' (서열79),
 프로브 5' CTTCTCAGGAGATACCGGAATCCAAG 3' (서열80)

[0349]

[0350]

전사체 수준에서의 평균 배수-변화를 종양 및 정상 샘플 사이의 역치 주기 (C_t)의 차이에 의해 계산하였다. 발현 수준을 RPL19 유전자의 발현수준에 정규화하였다.

[0351]

실시예 13: LOXL2는 다양한 종양 유형의 기질 및 간 섬유증에서의 병원성 세포에 의해 강하게 발현된다

[0352]

종양에서의 LOXL2 전사체의 분석은 비-신생물 조직 (도 1, 패널 A에 요약되어 있음)에 비교하여 대부분의 주요 고형 종양에서의 상승된 발현을 밝혔다. 다수의 종양 유형에서, LOXL2 전사체는 증가하는 단계 또는 등급 (예를 들면, 결장, 췌장, 자궁, 신장 세포, 위 및 머리 및 목 암, 도 7, 패널 A, B, C, D, E, F; 또한 등급 III 폐 선암종에서의 상승된 전사체 (나타내지 않았음)과 함께 증가된 발현의 추세를 나타낸다. 종양에서의 LOXL2 단백질의 분포 및 국소화를 LOXL2-특이적인 폴리클로날 항체 (도 7, 패널 G) 및 최소한으로-처리된 신선-냉동 조직을 사용하여 면역조직화학에 의해 더 조사하였다. 몇몇 세포질 신호에 추가로, LOXL2는 종양에서 풍부하게 분비되었고, 콜라겐성 매트릭스의 영역 (도 1, 패널 B, C, D, E, F; 도 7, 패널 H, I, J, K, M, O)과 종종 연관되었다. 유사한 패턴의 발현을 기질 섬유모세포 및 혈관계, 및 종양 세포의 일부 영역 (도 1, 패널 C, E, F, G, H, I, J; 도 7, 패널 H-O)에 의한 LOXL2 발현과 함께 다양한 고형 종양 유형에 걸쳐 관찰하였다. 도 1, 패널 k는 LOX 발현을 나타낸다. LOXL2를 발현하는 기질 섬유모세포는 α SMA 양성이었다 (나타내지 않았음). 의미있게 분비된 LOXL2 신호를 활성 질환 경계, 예를 들면 종양-기질 경계 (도 1, 패널 E, F, G; 도 7, 패널 H)에서 검출하였고, 강한 LOXL2 신호는 종양-연관된 혈관신생 (도 1, 패널 F, I)을 나타내는 글로메룰로이드 미세혈관 구조와 연관되었다. LOXL2는 고 혈관신생 종양, 예를 들면 투명 세포 신장 세포 암종 (도 1, 패널 L)에서 또한 강하게 발현되었다. 이에 비교하여, 대부분의 비-신생물 조직 및 주요 기관, 예를 들면 심장, 간 및 폐 (도 7, 패널 P, R, S; 도 7의 표 1에 요약됨)에서 적은 LOXL2 단백질을 검출하였다. 생식 기관, 예를 들면 난소 및 자궁에서 몇몇 신호를 관찰하였으며, 이는 이전의 보고와 일관되었고, 비장에서의 망상 섬유 (도 7에서의 예, 패널 U, V) 및 비-신생물 신장의 일부 영역에서 몇몇 신호를 관찰하였다. 종양-연관된 혈관계에 대한 강한 발현에 불구하고, 건강한 조직의 혈관계 (도 7, 패널 P, Q, S, T)에서 적은 LOXL2 단백질을 검출하였다. 감별 발현, 분비 및 활성 질환과의 연관성은 종양학에서의 LOXL2의 표적을 지지

한다. LOXL2의 종양 세포 발현은 이전에 보고되었지만 (주로 세포질), 이 분석은 종양-연관된 기질 세포, 예를 들면 TAF 및 신생혈관계에 의한 광범위한 발현을 밝혔다. 이 LOXL2에 대한 국소화의 패턴은 상이한 기원의 고품 종양 사이에서 보존되었다.

[0353] 이와 비교하여, 신생물 조직에서의 LOX 단백질에 대해 검출된 국소화의 지배적인 패턴은 섬유모세포 및 내피 세포, 및 분비에 대한 더 적은 증거 및 종양에서의 콜라겐성 매트릭스와 더 적은 연관성을 갖는 일부 종양 세포의 세포질 염색이었다. 이 패턴의 발현은 또한 상이한 종양 유형 사이에서 보존되었다 (도 1, 패널 K, 도 7, 패널 L, N). LOXL2에 대조하여, LOX 단백질의 높은 수준을 정상 조직, 예를 들면 동맥 및 혈관 및 비-혈관 평활근에서 검출하였다 (도 7, 패널 W, X, Y, Z). 동맥에서의 의미있는 LOX 발현은 절단되고, 효소적으로 활성화된 LOX 단백질의 1차 공급원으로서 소의 대동맥을 기재하는 문헌과 일관된다.

[0354] LOXL2 및 LOX의 발현은 또한 섬유증 간에서 평가되었다. LOXL2는 섬유모세포, 간세포, 혈액 혈관 및 염증성 세포로 이루어진 질환 경계에서 많이 발현되고 분비되었다 (도 1, 패널 M, N, O). LOX 단백질은 또한 섬유모세포에서의 지배적인 세포질 세포 국소화로 검출되었다 (도 1, 패널 P). 이들 질환에 대한 여러 병인에 불구하고, LOX 및 LOXL2에 대한 발현 및 국소화의 유사한 패턴을 종양 및 활성화된 섬유증 간 모두에 대해 관찰하였다.

[0355] 실시예 14: 분비된 LOXL2는 시험관내에서 종양 세포의 재형성 및 침입을 촉진한다

[0356] LOXL2를 정상산소 조건하의 수많은 상이한 종양 세포주에 의해 발현하였다 (도 8, 패널 A, B). LOXL2 단백질을 전장 (~80 kDa) 및 절단된 단백질 (~ 55 kDa) 모두로서 조건화 배지에서 검출하였다. 정제된 LOXL2 단백질의 분석은 이전의 보고와는 반대로, LOXL2의 이들 형태 모두는 효소적으로 활성화되고, 시험관내에서 BAPN에 의해 억제되었다는 것을 밝혔다 (도 8, 패널 C, D). 면역형광 및 LOXL2-특이적인 모노클로날 항체 (AB0023)의 사용은 LOXL2는 종양 세포의 세포의 매트릭스에서 그의 기질 콜라겐 I과 함께 동시-국소화 되었다는 것을 나타내었으며, 이는 종양 조직에 대해 수득된 결과와 일관되었다 (도 2. 패널 A, B; 도 8, 패널 E, F, G). 이와 비교하여, 분비되고 처리된 LOX는 골모세포 세포주로부터의 조건화 배지에 존재하였지만 (도 8, 패널 H), LOX는 정상산소 또는 저산소 조건하의 종양 세포주 또는 섬유모세포로부터 단리된 조건화 배지에서는 재현적으로 검출되지 않았으며 (도 8, 패널 I, J), 그러나 대신에 세포 펠렛 분획에서 발견되었다.

[0357] LOXL2는 EMT-연관된 전사 인자 SNAIL과의 직접 상호작용을 통한 상피성-에서-간엽 전이 (EMT)에서 역할을 하는 것으로서 기재되었다. 모든 5개 리실 옥시다제-유형 효소를 발현하는 유방 종양 세포주 MDA-MB-231에서의 LOXL2의 shRNA 녹다운을 사용한 LOXL2의 고갈은 액틴 세포골격의 재형성을 야기하여 액틴 스트레스 섬유에서의 연관된 감소와 함께 더 상피성 표현형을 생성하였다 (팔로이딘 염색에 의해 시각화됨, 도 8, 패널 K, L). 그러나, 완전한 간엽-에서-상피성 전이 (MET)-유사 변화는 세포는 E-카테린에 대해 음성으로 남았기 때문에 LOXL2 억제의 결과로서 관찰되지 않았다.

[0358] 우리는 내인성으로 분비된 LOXL2를 함유하는 MDA-MB231 또는 Hs-578t 종양 세포로부터의 조건화 배지로의 MCF7 세포 (정상산소 조건하에 적은 LOXL2를 발현함)의 처리에 의한 종양 세포의 재형성에서의 세포의 LOXL2의 역할을 탐구하였다. 조건화 배지를 IgG 대조군 항체 또는 억제적 LOXL2 모노클로날 항체인 AB0023 중 하나로 처리하였다. AB0023은 LOXL2의 SRCR3-4 영역에 결합하고, 다른 리실 옥시다제-유형 효소와 교차-반응성이 없다는 것을 입증하며 (도 8, 패널 M, N), LOXL2의 리실 옥시다제 효소적 활성을 억제한다 (도 8, 패널 O). AB0023은 유사한 친화도를 갖는 인간 및 마우스 LOXL2에 결합한다 (도 8, 패널 P). 액틴 세포골격의 LOXL2-함유 조건화 배지 유도된 재형성은 연장 세포 형태 및 증가된 액틴 스트레스 섬유를 야기하며, 이 재형성은 AB0023의 첨가에 의해 파괴되었다 (도 2, 패널 C, D, E, F). 그러나, 표현형의 이 변화는 심지어 고농도 (2 mM, 데이터는 나타내지 않았음)에서도 BAPN으로의 조건화 배지의 예비-인큐베이션에 의해 억제되지 않았다. 정제되고, 효소적으로 활성화된 LOXL2는 단독으로 세포 재형성을 유도하지 못하였으며, 이는 세포에 의해 분비된 LOXL2는 다른 단백질/들과 협력하여 이들 변화를 유도한다는 것을 제시한다. 분비된 LOXL2에 의한 표현형 재형성을 위해 요구되는 도메인을 더 조사하기 위해, N-말단 SRCR 도메인 및 효소 도메인에서의 LTQ 형성을 위해 요구되는 라이신 잔류물의 돌연변이에 의해 생성된 LOXL2의 분비되었지만 효소적으로-불활성 변이체를 포함하는 단백질의 말단절단 및 돌연변이 버전을 발현하고, 이 변화를 유도하는 그들의 능력에 대해 평가하였다. 조건화 배지에서 발현된 경우, SRCR 도메인 단독 (데이터는 나타내지 않음) 및 효소적으로-불활성 LOXL2 모두는 재형성을 유도하지 못하였고 (도 8, 패널 Q, R, S, T), 이는 효소 도메인 및 효소적 활성 모두가 이 절차를 위해 요구된다는 것을 나타낸다. 전반적으로, 이들 데이터는 더 간엽 표현형을 향한 종양 세포의 액틴 세포골격을 재형성하는데 있어서, 분비되고, 효소적으로-활성 LOXL2에 대한 역할을 지지한다.

- [0359] 실시예 15: LOXL2는 시험관내 및 생체내에서 섬유모세포 활성화를 촉진한다
- [0360] 섬유모세포에 의한 LOXL2의 분비의 조절을 조사하기 위해, 가변적인 장력의 시험관내 모델을 콜라겐 매트릭스로 코팅된 비스-아크릴아미드 가교된 겔, 및 뜬 또는 부착된 콜라겐 겔을 사용하여 확립하였다. 저장력 (0.2% 비스, 및 뜬 콜라겐 겔)에서, LOXL2 단백질을 세포내에서 검출하였으며, 조건화 배지에 매우 제한된 분비된 단백질이 나타났다. 더 높은 장력 (0.8% 비스, 부착된 콜라겐 겔, 및 표준 조직-배양 플레이트)에서, LOXL2는 섬유모세포에 의해 풍부하게 분비되었다 (도 3, 패널 A, 도 9, 패널 A). 이들 데이터는 LOXL2 분비는 국소 장력 (예를 들면, 염증 또는 매트릭스 생성 또는 가교와 연관됨)의 변화에 의해 유도될 수 있다는 것을 제시한다. 분비된 LOX의 의미있는 수준은 0.2 또는 0.8% 비스-아크릴아미드 콜라겐 겔 중 하나 또는 뜬 또는 부착된 콜라겐 겔 상에서 성장된 HFF 세포로부터 검출되지 않았지만, 조직-배양 처리된 플라스틱 상에서 성장된 HFF 세포에 대해서만 검출되었다.
- [0361] 인간 종양에서의 TAF에 의한 LOXL2의 강한 발현 및 종양 세포 재형성에서의 LOXL2의 효과를 고려하여, 섬유모세포 형태에서의 LOXL2에 대한 역할을 siRNA 녹다운을 사용하여 검사하였다. HFF에서의 LOXL2의 고갈은 대조군-형질감염된 세포에 비교하여 감소된 세포간 조직화를 야기하였다. siLOXL2 세포는 여전히 콜라겐 I을 분비하였지만, 콜라겐은 조직이 흐트러졌으며, 대조군 형질감염된 세포에 나타난 섬유원성 구조적 조직화가 없었다 (도 3, 패널 B, C; 도 9, 패널 B). 팔로이딘을 사용한 siLOXL2 녹다운 세포의 염색은 액틴 세포골격에 대한 극적인 변경을 밝혔다: 세포는 중심 또는 말초 액틴 스트레스 섬유 중 하나에서의 감소와 함께 덜 연장되었고, 더 원형이 되었다 (도 3, 패널 D, E). 표현형의 이 변화와 일관되게, 적은 LOXL2를 분비하는 저-장력 조건 (0.2% 비스)하에 성장된 섬유모세포는, 더 원형의, 감소된 액틴 스트레스 섬유를 갖는 상피모양 구조를 입증하였으며, 반면 LOXL2를 의미있게 더 분비하는 더 높은 장력 (0.8% 비스)하에 성장된 세포는 더 연장된, 섬유모세포모양 표현형을 채택하였다 (도 3, 패널 F, G). 이들 결과는 콜라겐성 세포의 매트릭스를 통한 활성화된 섬유모세포성 형태의 유지 및 세포간 조직화에서의 LOXL2에 대한 역할을 지지한다.
- [0362] 섬유모세포 활성화, 섬유증 및 결합조직형성과 연관된 경로에의 LOXL2의 관여를 검사하였다. 10 - 60분의 시간에 걸쳐 AB0023의 존재 또는 부재하에 섬유모세포 또는 종양 세포주에서의 PDGF-BB로 세포를 처리한 후 AKT 인산화에 대한 의미있는 효과는 관찰되지 않았다 (나타내지 않았음). TGFb 신호전달의 조사는 10 - 60분의 시간 동안 AB0023에 의한 SMAD2 인산화의 조급의 억제 (약 10 - 20%)의 증거를 밝혔다. 그러나, 더 극적인 효과는 더 오랜 시간 동안 트랜스웰 공-배양에 의한 종양 세포주로부터의 LOXL2-함유 조건화 배지로 HFF 세포를 처리한 후 나타났다. 72시간 후, AB0023의 존재하의 공-배양은 pSMAD2 인산화의 56 - 94%의 상대적 감소를 야기하였다 (도 3< 패널 H, I). α -SMA 수준의 41%의 감소를 또한 관찰하였다. 종양-연관된 섬유모세포의 특징인 VEGF 단백질 발현의 평가는 AB0023의 존재하에 39 - 46% 감소를 밝혔다. 전반적으로, 이들 데이터는 짧은 인큐베이션 시간에 걸쳐 수행된 실험에서 더 심오한 효과가 예상될 수 있는 바와 같이 LOXL2는 성장 인자에 의한 신호전달 경로에 직접적으로 효력을 가함으로써 활성을 갖지 않는다는 것을 제시한다. 오히려, 이들 결과는 LOXL2는 세포의 매트릭스에 대한 그의 활성화에 의해 TGFb 신호전달 및 연관된 섬유모세포 활성화를 매개할 수 있는 것을 나타낼 수 있다. 세포의 매트릭스의 잠재 복합체로부터의 TGFb 신호전달의 활성화는 장력의 증가에 의해 유도되는 것으로 나타났다. 이들 결과는 따라서, 직접적으로 또는 가능하면 가교된 섬유원성 콜라겐의 인테그린-매개된 감지를 통한 세포의 매트릭스에서의 LOXL2-유도된 변화를 통한 신호전달의 조정과 연관된다.
- [0363] LOXL2 발현의 결과를 MCF7 대조군 세포와 LOXL2를 코딩하는 발현 벡터 (MCF7-LOXL2)로 안정하게 형질감염된 MCF7 세포의 종양 형성을 비교함으로써 생체내에서 평가하였다. 시험관내에서의 형질감염된 세포의 증식 속도는 MCF7-대조군 세포에 대해 관찰된 속도보다 느렸다. 그러나, nu/nu 마우스의 아래-신장 캡슐에서의 종양의 발생 후, MCF7-LOXL2 세포는 대조군 MCF7 세포에 비교하여 더 큰 종양 (3.5X 증가된 부피)을 수득하였다 (도 3, 패널 J). 마우스-특이적인 프라이머로 qRT-PCR을 사용한 이들 종양의 기질 성분의 분석은 대조군에 비교하여, MCF7-LOXL2 세포는 기질의 활성화를 유도하였다는 것을 나타냈으며, α SMA, 콜라겐 I, 비멘틴, MMP9 및 피브로블린 전사체가 증가하였다 (도 3, 패널 K). 이들 결과는 생체내에서의 종양-연관된 기질의 활성화 및 재형성에서의 LOXL2에 대한 역할을 지지한다.
- [0364] 전반적으로, 이들 결과는 LOXL2의 파괴는 아마 콜라겐/매트릭스 매개 신호전달의 파괴를 통해 세포 및 그들의 환경 사이의 상호작용의 교란으로 이어질 수 있다는 것을 제시하며, 액틴 세포골격의 세포내 조직화 및 섬유모세포의 세포간 조직화 모두의 파괴를 야기한다. 이들 데이터는 또한 LOXL2는 더 높은 활성화된 상태의 유지에서 자가-자극 역할을 할 수 있으며, 따라서 질환-연관된 섬유모세포, 예를 들면 TAF 및 근육섬유모세포의 진행되는 활성화를 위해 중요하다는 것을 나타냈다.

- [0365] 실시예 16: 항-LOXL2 항체 AB0023은 시험관내 및 생체내에서 혈관신생을 억제한다
- [0366] 인간 종양의 분석은 글로메룰로이드 혈관 및 다른 신생혈관계의 내피세포에 의한 LOXL2의 현저한 발현을 밝혔다. LOXL2는 배양된 1차 내피세포에 의해 발현되는 것으로 알려졌으며, 이 맥락에서 혈관 탄력섬유형성을 위해 중요한 것으로 기재되었다. HUVEC 세포는 siRNA 녹다운을 사용하여 LOXL2에 대해 고갈되었으며, 형태의 변화에 대해 검사되었다. 대조군-형질감염된 세포에 비교하여, siLOXL2 HUVEC 세포는 액틴 스트레스 섬유의 감소를 입증하였고 (도 4, 패널 A, B), 이는 상기 기재된 섬유모세포 및 종양 세포에 대한 LOXL2 억제의 효과와 유사하다.
- [0367] 분비된 LOXL2의 역할을 더 평가하기 위해, 혈관신생을 억제하는 항-LOXL2 항체 AB0023의 능력을 시험관내 HUVEC 관 형성 검정을 사용하여 조사하였다. AB0023은 혈관 분지형성, 혈관 길이 및 투여량-의존적 방식으로 형성된 혈관의 총 수를 50 ug/ml에서의 모든 절차의 완전한 억제로 억제하였다 (도 4, 패널 C, D, E, F, G, H, I). AB0023에 의한 이들 각각의 절차의 억제에 대해 계산된 IC50 (도 4, 패널 G, H, I; 각각 22.2 nM, 19.9 nM, 33.2 nM)은 시험관내에서 AB0023에 의한 정제된 LOXL2 효소적 활성의 억제에 대해 관찰된 나타난 IC50와 일관되었다 (~30 nM).
- [0368] 생체내에서 혈관신생을 억제하는 AB0023의 능력을 Balb/C 마우스의 옆구리에 삽입된 bFGF를 함유하는 매트릭스 플러그를 사용하여 평가하였다. 비히클-처리된 동물로부터 단리된 플러그는 CD31-양성 세포를 포함하는 침입성 및 분지성 혈관의 증거를 함유한 반면 (도 4, 패널 J, L), 복막내 주입에 의해 AB0023으로 처리된 동물로부터 단리된 플러그는 제한된 혈관 형성 및 훨씬 적은 CD31-양성 세포의 증거를 나타냈다 (도 4, 패널 K, M). 내피 세포의 침윤에 의한 LOXL2 발현은 IHC로 확인하였다 (도 10, 패널 A, B). 독립적인 플러그로부터의 혈관의 평균 수에 대한 정량적 분석은 AB0023 처리된 동물에 대해 약 7배 감소를 나타냈다 ($p = 0.0319$; 도 4, 패널 N). 또한, 매트릭스 플러그에서 CD31 양성 세포를 정량화하는 별도의 분석은 AB0023-처리된 동물에서 유의한 감소를 나타냈다 ($p = 0.0168$; 도 4, 패널 O). 이들 결과는 분비된 LOXL2가 혈관신생의 여러 측면에서 중요한 역할을 하며 혈관신생이 시험관내 및 생체내에서 AB0023에 의해 직접 억제됨을 나타낸다.
- [0369] 실시예 17: LOXL2의 억제는 생체내에서의 암의 1차 종양 및 전이성 이종이식편 모델 모두에서의 치료적 이점을 제공한다
- [0370] LOXL2 또는 LOX 중 하나를 억제하는 치료적 결과를 파종 골 전이의 모델에서 평가하였다. LOXL2 또는 LOX를 표적하는 특이적인 항체를 ~1백만개 표지된 MDA-MB-231 세포로 좌심실에 주사된 마우스를 치료하기 위해 사용하였다. 유방 종양 세포주 MDA-MB-231은 LOX의 연구를 위한 모델로서 널리 사용되어왔으며, 모든 5개 리실 옥시다제-유형 효소를 발현한다 (도 11, 패널 A). LOXL2 억제 항체 AB0023의 종양 존재량을 감소시키는 능력을 억제 폴리클로날 항혈청을 생성하는 것으로 이전에 기재된 LOX 효소 도메인에서의 동일한 펩티드 서열을 표적하는 모노클로날 항체인 LOX-특이적인 항체 M64에 비교하였다. 28일 후, 대퇴골 및 총 복측 골에서의 종양 세포 존재량의 의미있는 감소를 항-LOXL2 AB0023-처리된 종양에 대해 관찰하였지만 (대퇴골 중위값에 의해 127배, $p = 0.0021$; 총 복측 골 중위값에 의해 28배, $p = 0.0197$; 도 5, 패널 A, B), 항-LOX 항체 M64 처리된 종양에 대해서는 관찰되지 않았다 (각각 $p = 0.5262$ 및 0.5153 ; 도 5, 패널 A, B; 높은-투여량 탁소텔 (20 mg/kg)이 또한 양성 대조군으로서 사용됨). 별도의 연구에서, 1주일에 2회 30 mg/kg AB0023 및 1주일에 1회 5 mg/kg 파클리탁셀과 함께 처리된 동물에서 의미있는 생존 이점 ($p=0.025$)이 관찰되었다.
- [0371] 우리의 인간 종양의 분석은 여러 암 사이에서의 기질 세포에 의한 LOXL2의 아직까지 인식되지 않은 강한 발현을 밝혔다. 1차 종양형성의 이종이식편 모델은 종양 미세환경 및 인간 종양에서 나타나는 결합조직형성에 대해 전형적으로 불량한 모델이며, 따라서 인간 종양에서의 LOXL2 발현의 대표적인 종양 형성을 수득하는 모델을 확인하기 위해 수많은 상이한 세포주를 평가하였다. MDA-MB-435는 항-LOXL2 항체 AB0023의 분석을 위한 1차 종양 모델로서 선택되었으며, 이는 이들 세포에 의해 형성된 종양은 결합조직형성 반응을 생성하였고, LOXL2의 국소화에 대한 인간 종양, 종양-기질 경계 및 콜라겐성 매트릭스에서의 분비된 LOXL2 단백질과 유사성을 공유하기 때문이고; LOXL2가 섬유모세포, 혈액 혈관 및 몇몇 종양 세포에 의해 발현되는 점에서 유사하다 (도 5, 패널 C). MDA-MB-435-생성된 종양에서의 LOX 국소화는 또한 섬유모세포의 세포질 염색, 종양 세포 및 혈액 혈관의 부분집합 및 매트릭스와 연관된 분비된 LOX의 몇몇 증거가 있는 인간 종양에서 검출된 패턴과 일관되었다 (도 5, 패널 D).
- [0372] 종양을 초기에 nu/nu 마우스의 옆구리에서 번식하였으며, 이어서 유방 지방 패드에 이식하였고, 확립되도록 하였다. 확립된 1차 종양의 항-LOXL2 AB0023으로의 처리는 3주일의 시간에 걸쳐 종양 부피의 45% 감소를 야기하였다 ($p = 0.001$). 종양 부피의 27% 감소의 항-LOX M64에 대한 더 약한 억제가 또한 관찰되었다 ($p =$

0.04). 추가의 2주일 동안의 연구의 연장은 지속된 종양 성장을 야기하였다. 그러나, 종양 부피의 통계학적으로 의미있는 감소는 AB0023으로의 처리에 의해 유지되었지만 ($p = 0.024$; 부피의 33% 감소; 도 5, 패널 E), 항-LOX 항체 M64로의 처리에 의해서는 유지되지 않았다. 전반적으로, 이들 결과는 항-LOXL2 AB0023은 5주일의 시간에 걸쳐 확립된 1차 종양에 대한 종양 존재량을 감소시키는데 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0373] 실시예 18: LOXL2의 억제제는 기질 활성화를 의미있게 감소시키며 종양 미세환경의 발생을 억제한다

[0374] 항-LOXL2 AB0023이 1차 종양 부피를 감소시키는 메커니즘을 더 조사하기 위해, 상대적 크기의 짝지어진 범위를 포함하는 종양을 비히클-처리된 대조군으로부터, 그리고 항-LOXL2 AB0023-처리된, 항-LOX M64-처리된 및 탁소텔-처리된 군으로부터 MDA-MB-435 확립된 1차 종양 연구에서의 39일 차에 수집하였다. 종양을 조직학 및 면역조직화학에 대해 절단하고, 특이적인 세포 마커에 대한 다양한 항체를 사용하여 분석하였다. 놀랍게도, AB0023-처리된 종양의 조성은 높은-투여량 탁소텔-처리된 동물로부터 단리된 매우 작은 종양을 포함하는 모든 다른 군에 비교하여 상이하였으며 (양성 대조군), 그들의 작은 크기에 불구하고 훨씬 더 큰 비히클-처리된 종양의 조성과 유사하였다. AB0023 처리된 종양에는 종양 미세환경의 많은 의미있는 특징이 결핍되었다. 구체적으로, 시리우스 레드 염색의 61% 감소에 의해 입증된 바와 같이 콜라겐성 매트릭스 또는 결합조직형성의 의미있는 감소가 있었다 ($p = 0.0027$; 도 5, 패널 G, N). 이와 연관된 것은 α SMA 신호에 의해 평가된 바와 같은 활성화된 TAF의 존재하의 88% 감소 ($p = 0.011$) 이었다 (도 5, 패널 K, N). 항-LOX M64 또는 탁소텔 처리된 종양에서의 이들 마커 모두에 대해 의미있는 차이는 관찰되지 않았다 (도 5, 패널 F- N). 종양 혈관계는 또한 항-LOXL2 AB0023 처리된 종양에서 의미있게 감소하였다 (CD31 신호에서의 74% 감소, $p = 0.0002$; 도 5, 패널 N). 덜 효과적이지만, 탁소텔 처리가 또한 상대적 종양 혈관계를 감소시켰으며 (CD31 신호에서의 43% 감소, $p = 0.023$; 도 5, 패널 N) 이전의 보고와 연관되었다 (도 5, 패널 N; 도 11, 패널 B, C, D, E).

[0375] MDA-MB-435 1차 종양 모델을 사용한 독립적인 연구에서, AB0023 (5 mg/kg 1주일에 2회)을 BAPN (100 mg/kg 일일)과 직접 비교하였다. 46일 후 AB0023-처리된 동물에 대한 종양 부피의 유사한 감소가 관찰되었다 (38.4%; $p = 0.04$; 도 5, 패널 O). 이와 비교하여, 종양 부피의 19% 감소 (통계학적으로 의미는 없음)를 BAPN으로 매일 처리된 마우스에 대해 관찰하였다 (도 5, 패널 O). 중요하게, 이들 종양에서의 기질 및 매트릭스의 분석은 AB0023이 종양 구조의 기질 활성화 및 발생을 억제하는데 의미있게 더 효과적이라는 것을 밝혔다. AB0023으로의 또 한번의 처리는 시리우스 레드 염색에 의해 평가된 바와 같이 콜라겐 생성의 감소를 야기하였으며 (47% 감소, $p = 0.0193$), 제1 연구와 유사하게, α SMA 양성화에 의해 결정된 바와 같이 섬유모세포 활성화를 크게 감소시킨 반면 (>90% 감소, $p = 0.0161$), 비히클-처리된 대조군과 유사하게 (도 5, 패널 P), BAPN 처리된 종양은 결합조직형성 매트릭스 및 활성화된 섬유모세포를 함유하였다. 혈관계의 형성은 또 한번 AB0023 처리된 종양에서 의미있게 억제된 반면 (CD31 신호에서의 52% 감소, $p = 0.0307$), BAPN 처리로부터 생성된 종양 혈관계의 감소는 없었다 (도 5, 패널 P). 전반적으로, 이들 결과는 종양 미세환경의 LOXL2-매개된 발생의 억제에서의 AB0023의 효과를 확인한다. 이와 비교하여, 팰-LOX/L 억제제 BAPN은 섬유모세포 활성화, 결합조직형성 또는 혈관신생의 억제에 효과적이지 않았다.

[0376] 혈관신생, 혈관형성 및 다른 절차를 통한 종양 성장의 촉진, 및 항-LOXL2 AB0023 처리된 종양에서의 활성화된 섬유모세포의 실질적인 감소에서 활성화된, 종양-연관된 섬유모세포의 부각되는 중요한 역할을 고려하여, 종양형성과 연관된 다른 주요 인자의 발현에 대한 AB0023 처리의 효과를 조사하였다. TAF는 종양에서의 의미있는 VEGF 생성의 원인이며, 인간 종양에서의 LOXL2 및 VEGF 발현 패턴은 TAF-연관된 발현에서의 유사성을 공유한다 (도 11, 패널 F, G). MDA-MB-435 종양의 분석은 비히클-처리된 종양에 비교하여 AB0023-처리된 종양에서의 VEGF 신호의 76% 감소를 밝혔다 ($p = 0.0001$; 도 5, 패널 Q). TAF에 의해 발현되는 프로-혈관신생 및 프로-종양형성 사이토킨인 SDF-1/CXCL12의 분석은 신호의 유사한 감소를 밝혔다 (80%, $p = 0.0205$; 도 5, 패널 Q). 결합 조직 성장 인자 (CTGF)의 수준은 또한 AB0023-처리된 동물로부터의 조직에서 감소되었다. LOXL2 신호 그 자신은 AB0023-처리된 종양에서 55% ($p = 0.0005$) 감소하였다 (도 5, 패널 Q; 도 11, 패널 H, I, J, K, L, M). 이들 성장 인자의 수준 또는 LOXL2의 수준의 감소는 항-LOX 항체로 처리된 동물에서는 관찰되지 않았다.

[0377] 조직-기반 ELISA를 전환 성장 인자 베타1 (TGF- β 1) 및 TGF- β 신호전달의 하류 마커인 인산화된 SMAD2 (PSMAD2)의 수준을 측정하기 위해 사용하였다. 두 단백질 모두의 수준은 AB0023-처리된 동물로부터의 섬유모세포 및 종양 세포 모두에서 감소되었다. 비교할만한 감소는 항-LOX 처리된 동물 또는 항체를 투여받지 않은 대조군에서 관찰되지 않았다. 이들 결과는 LOXL2의 억제는 종양 조직에서의 TGF- β 신호전달 경로를 차단하는 것을 나타내며, 더 느린 종양 성장 및/또는 종양 세포의 사멸로 이어진다.

[0378] H&E 염색 및 다른 마커를 사용한 종양의 분석은 섬유모세포가, 비록 전반적으로 비히클-처리된 대조군에서보

다 덜 풍부하지만 AB0023 처리된 종양에 존재하였다는 것을 나타냈다 (도 11, 패널 N, O). 이는 진행되는 섬유모세포의 동원은 섬유모세포 활성화에 추가로 아마 또한 항-LOXL2 처리에 의해 영향받은 것을 나타낸다. 전체적으로, 이들 데이터는 AB0023에 의한 LOXL2의 억제는, 상응하는 주요 혈관신생, 혈관형성 및 종양-연관된 인자, 예를 들면 VEGF 및 SDF-1 및 LOXL2 그 자체의 수준의 의미있는 감소와 함께 TAF 활성화 및 섬유모세포 동원의 실질적인 감소를 야기한다는 것을 나타낸다.

[0379] AB0023-처리된 종양에서의 종양 세포는 또한 비히클-처리된 종양 세포와 비교한 차이를 나타냈다. AB0023-처리군에서의 다수의 종양은 괴사의 의미있는 영역을 함유한 반면 (도 5, 패널 R, S), 다른 처리군에서는 적은 괴사가 나타났다. 게다가, AB0023-처리된 종양은 감소된 생존율의 다른 증거를 나타냈으며, 비히클-처리된 종양의 뚜렷한 핵에 비교하여 핵의 핵농축 및 증가된 세포질 축합은 초기 종양 괴사와 연관되었다 (도 5, 패널 T, U). 자가포식현상과 연관된 단백질인 베클린-1 (Beclin-1)의 수준은 AB0023-처리된 동물 및 탁소텔-처리된 동물로부터의 종양 세포에서 증가되었지만, 항-LOX 항체로 처리된 동물로부터의 종양 세포 또는 비히클 대조군에서는 증가되지 않았다. 이들 결과는 AB0023-처리된 동물에서의 종양 세포는, 상기 기재된 바와 같이 AB0023-처리된 동물에서 수가 감소된 TAF에 의해 분비된 성장 인자의 부족으로부터 야기된 괴사성 및 제II형 자가포식 세포 사멸을 겪었다는 발상과 연관된다. 이들 분석은 AB0023에 의한 LOXL2의 억제는 항-LOX 항체 M64 또는 펜-LOX/L 억제제 BAPN으로의 처리보다 종양 존재량의 감소, 및 종양 미세환경의 확립에 의미있게 더 효과적이라는 것을 밝혔다. 특이적인 모노클로날 항체로의 LOXL2의 억제는 유전적으로 종양 세포보다 더 안정적인 기질 미세환경을 표적하는 신규한 치료적 전략의 예를 제공한다. 다수의 종양 유형 사이에서의 기질 LOXL2 발현 패턴의 보존은 암 요법에서의 LOXL2 억제제의 사용에 대한 폭넓은 이용을 제시한다. LOXL2 활성화의 억제의 결과는 종양 하부구조의 변경을 능가하여 확대되지만, 또한 성장 인자, 프로-혈관신생 단백질 및 TAF에 의한 프로-혈관형성 단백질의 생성에 대한 효과를 포함한다. 따라서, 항-LOXL2 요법은 매우 표적-특이적인 반면, 종양 발생에 부정적으로 영향을 주는 치료적 효과의 폭넓은 스펙트럼을 갖는다.

[0380] 실시예 19: 항-LOXL2 AB0023은 생체내에서 간 섬유증 및 근육섬유모세포 활성화를 억제한다

[0381] 항-LOXL2 및 항-LOX 항체 처리의 효과를 Balb/C 마우스에서의 CC1₄-유도된 간 섬유증의 맥락에서 평가하였다. 간 손상 및 섬유발생의 증거와 연관된 동물의 CC1₄로의 주사로부터 야기되는 사망률의 의미있는 정도 (도 12, 패널 A, B)는 항-LOXL2 항체 AB0023에 의해 예방되었지만, 항-LOX 특이적인 항체 M64에 의해서는 예방되지 않았다 (로그 순위법에 의한 AB0023 생존 이점 $p = 0.0029$ 및 만텔-콕스 시험에 의한 $p = 0.0064$, 도 6, 패널 A). 모든 군으로부터의 생존하는 동물의 간의 분석은 AB0023은 브리징 섬유증을 의미있게 억제한 반면 ($p = 0.002$, 도 6, 패널 B; 도 12, 패널 C, D), 항-LOX M64으로의 처리는 브리징 섬유증의 감소에 대한 추세를 나타냈지만, 통계학적인 유의함에는 미치지 못하였다는 것을 밝혔다 ($p = 0.127$). 비히클-처리된 동물 (도 6, 패널 C) 및 M64-처리된 동물의 포토-포탈 셉타 (septa)는 브리징 섬유증과 연관된 α SMA-양성 근육섬유모세포의 의미있는 집단을 함유하였다. AB0023-처리된 동물에서의 브리징 섬유증의 부재에 맞추어, AB0023-처리된 동물로부터의 간의 포토-포탈 셉타에서의 α SMA 양성 근육섬유모세포의 실질적인 감소가 있었으며 (도 6, 패널 C, D), AB0023이 질환-연관된 섬유모세포의 CC1₄-유도된 활성화를 억제하였다는 것을 나타냈다. 도 6, 패널 e는 α -SMA 신호의 정량 분석을 제공하며, AB0023-처리된 동물의 간에서의 브리징 섬유증의 부재는 알파-SMA 양성 근육섬유모세포의 수의 의미있는 감소를 동반하였다는 것을 입증한다 ($p=0.0260$). 이들 결과는 생체내에서의 근육섬유모세포의 활성화를 위한 LOXL2에 대한 요구사항과 연관되며, 기질 TAF에 대한 상기 제시된 관찰과 유사하다.

[0382]

참조 문헌

- Akagawa, H., A. Narita, et al. (2007). "Systematic screening of lysyl oxidase-like (LOXL) family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptibility gene to intracranial aneurysms." *Hum Genet* 121(3-4): 377-87.
- Akiri, G., E. Sabo, et al. (2003). "Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo." *Cancer Res* 63(7): 1657-66.
- Asuncion, L., B. Fogelgren, et al. (2001). "A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain." *Matrix Biol* 20(7): 487-91.
- Atsawasuwan, P., Y. Mochida, et al. (2008). "Lysyl oxidase binds transforming growth factor-beta and regulates its signaling via amine oxidase activity." *J Biol Chem* 283(49): 34229-40.
- Atsawasuwan, P., Y. Mochida, et al. (2005). "Expression of lysyl oxidase isoforms in MC3T3-E1 osteoblastic cells." *Biochem Biophys Res Commun* 327(4): 1042-6.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." *Nature* 432(7015): 332-7.
- Cardone, A., A. Tolino, et al. (1997). "Prognostic value of desmoplastic reaction and lymphocytic infiltration in the management of breast cancer." *Panminerva Med* 39(3): 174-7.
- Chang, Y. C., C. B. Liao, et al. (2008). "Expression of tumor suppressor p53 facilitates DNA repair but not UV-induced G2/M arrest or apoptosis in Chinese hamster ovary CHO-K1 cells." *J Cell Biochem* 103(2): 528-37.
- Chen, W., X. Wang, et al. (2008). "Blockage of NF-kappaB by IKKbeta- or RelA-siRNA rather than the NF-kappaB super-suppressor IkappaBalpha mutant potentiates adriamycin-induced cytotoxicity in lung cancer cells." *J Cell Biochem* 105(2): 554-61.
- Chichester, C. O., K. C. Palmer, et al. (1981). "Lung lysyl oxidase and prolyl hydroxylase: increases induced by cadmium chloride inhalation and the effect of beta-aminopropionitrile in rats." *Am Rev Respir Dis* 124(6): 709-13.
- Chioza, B. A., A. Ujfalusy, et al. (2001). "Mutations in the lysyl oxidase gene are not associated with amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2(2): 93-7.
- Chu, T. J. and D. G. Peters (2008). "Serial analysis of the vascular endothelial transcriptome under static and shear stress conditions." *Physiol Genomics* 34(2): 185-92.

[0383]

- Chu, W. K., P. M. Dai, et al. (2008). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates DeltaNp63 gene transcription through the beta-catenin signaling pathway." *J Cell Biochem* 105(2): 447-53.
- Conti, J. A., T. J. Kendall, et al. (2008). "The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via alphav integrin ligation." *Clin Cancer Res* 14(20): 6405-13.
- Copeland, R. A. (2005). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery : a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience.
- Csiszar, K. (2001). "Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 1-32.
- Csiszar, K., I. Entersz, et al. (1996). "Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene." *Mol Biol Rep* 23(2): 97-108.
- Csiszar, K., S. F. Fong, et al. (2002). "Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors." *Int J Cancer* 97(5): 636-42.
- Decitre, M., C. Gleyzal, et al. (1998). "Lysyl oxidase-like protein localizes to sites of de novo fibrinogenesis in fibrosis and in the early stromal reaction of ductal breast carcinomas." *Lab Invest* 78(2): 143-51.
- Di, L. J., L. Wang, et al. (2008). "Identification of long range regulatory elements of mouse alpha-globin gene cluster by quantitative associated chromatin trap (QACT)." *J Cell Biochem* 105(1): 301-12.
- El Mabrouk, M., H. Y. Qureshi, et al. (2008). "Interleukin-4 antagonizes oncostatin M and transforming growth factor beta-induced responses in articular chondrocytes." *J Cell Biochem* 103(2): 588-97.
- Erler, J. T., K. L. Bennewith, et al. (2009). "Hypoxia-induced lysyl oxidase is a Critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche." *Cancer Cell* 15(1): 35-44.
- Erler, J. T., K. L. Bennewith, et al. (2006). "Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis." *Nature* 440(7088): 1222-6.
- Erler, J. T. and A. J. Giaccia (2006). "Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis." *Cancer Res* 66(21): 10238-41.
- Fogelgren, B., N. Polgar, et al. (2005). "Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation." *J Biol Chem* 280(26): 24690-7.

[0384]

- Fong, S. F., E. Dietzsch, et al. (2007). "Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors." *Genes Chromosomes Cancer* 46(7): 644-55.
- Gacheru, S. N., K. M. Thomas, et al. (1997). "Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF-beta 1 and serum deprivation." *J Cell Biochem* 65(3): 395-407.
- Gorogh, T., C. Holtmeier, et al. (2008). "Functional analysis of the 5' flanking domain of the LOXL4 gene in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Int J Oncol* 33(5): 1091-8.
- Gorogh, T., J. B. Weise, et al. (2007). "Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma." *J Pathol* 212(1): 74-82.
- Han, C., K. Lim, et al. (2008). "Regulation of Wnt/beta-catenin pathway by cPLA2alpha and PPARdelta." *J Cell Biochem* 105(2): 534-45.
- Hayashi, K., K. S. Fong, et al. (2004). "Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues." *J Mol Histol* 35(8-9): 845-55.
- He, S., K. L. Dunn, et al. (2008). "Chromatin organization and nuclear microenvironments in cancer cells." *J Cell Biochem* 104(6): 2004-15.
- Hein, S., S. Y. Yamamoto, et al. (2001). "Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta." *Placenta* 22(1): 49-57.
- Ho, C. Y., C. H. Wong, et al. (2008). "Perturbation of the chromosomal binding of RCC1, Mad2 and survivin causes spindle assembly defects and mitotic catastrophe." *J Cell Biochem* 105(3): 835-46.
- Hollosi, P., J. K. Yakushiji, et al. (2009). "Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells." *Int J Cancer*.
- Jansen, M. K. and K. Csiszar (2007). "Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells." *Matrix Biol* 26(2): 136-9.
- Jeong, J. H., J. Y. An, et al. (2008). "Quercetin-induced ubiquitination and down-regulation of Her-2/neu." *J Cell Biochem* 105(2): 585-95.
- Jin, C. X., W. L. Li, et al. (2008). "Conversion of immortal liver progenitor cells into pancreatic endocrine progenitor cells by persistent expression of Pdx-1." *J Cell Biochem* 104(1): 224-36.

[0385]

- Jourdan-Le Saux, C., O. Le Saux, et al. (1998). "The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2) maps between markers D8S280 and D8S278 on chromosome 8p21.2-p21.3." *Genomics* 51(2): 305-7.
- Jourdan-Le Saux, C., O. Le Saux, et al. (2000). "The mouse lysyl oxidase-like 2 gene (mLOXL2) maps to chromosome 14 and is highly expressed in skin, lung and thymus." *Matrix Biol* 19(2): 179-83.
- Jourdan-Le Saux, C., H. Tronecker, et al. (1999). "The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues." *J Biol Chem* 274(18): 12939-44.
- Jung, S. T., M. S. Kim, et al. (2003). "Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from *Escherichia coli* inclusion bodies." *Protein Expr Purif* 31(2): 240-6.
- Kagan, H. M., V. B. Reddy, et al. (1995). "Catalytic properties and structural components of lysyl oxidase." *Ciba Found Symp* 192: 100-15; discussion 115-21.
- Kaku, M., Y. Mochida, et al. (2007). "Post-translational modifications of collagen upon BMP-induced osteoblast differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* 359(3): 463-8.
- Kim, M. S., S. S. Kim, et al. (2003). "Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4." *J Biol Chem* 278(52): 52071-4.
- Kim, Y., C. D. Boyd, et al. (1995). "A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase." *J Biol Chem* 270(13): 7176-82.
- Kim, Y., C. D. Boyd, et al. (1997). "A highly polymorphic (CA) repeat sequence in the human lysyl oxidase-like gene." *Clin Genet* 51(2): 131-2.
- Kim, Y., S. Peyrol, et al. (1999). "Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis." *J Cell Biochem* 72(2): 181-8.
- Kirschmann, D. A., E. A. Seftor, et al. (2002). "A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion." *Cancer Res* 62(15): 4478-83.
- Klutke, J., Q. Ji, et al. (2008). "Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse." *Acta Obstet Gynecol Scand* 87(1): 111-5.
- Kresse, S. H., M. Skarn, et al. (2008). "DNA copy number changes in high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors by array CGH." *Mol Cancer* 7: 48.

[0386]

- Laczko, R., K. M. Szauter, et al. (2007). "Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes." *Neuropathol Appl Neurobiol* 33(6): 631-43.
- Lalancette, C., D. Miller, et al. (2008). "Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA." *J Cell Biochem* 104(5): 1570-9.
- Lelievre, E., A. Hinek, et al. (2008). "VE-statin/egfl7 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases." *EMBO J* 27(12): 1658-70.
- Leskovac, V. (2003). *Comprehensive enzyme kinetics*. New York, Kluwer Academic/Plenum Pub.
- Li, H., X. Fan, et al. (2007). "Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer." *J Cell Biochem* 101(4): 805-15.
- Liang, S., B. Moghimi, et al. (2008). "Locus control region mediated regulation of adult beta-globin gene expression." *J Cell Biochem* 105(1): 9-16.
- Liao, P. C., S. K. Tan, et al. (2008). "Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis." *J Cell Biochem* 104(4): 1509-23.
- Liao, Q. C., Y. L. Li, et al. (2008). "Inhibition of adipocyte differentiation by phytoestrogen genistein through a potential downregulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 activity." *J Cell Biochem* 104(5): 1853-64.
- Liao, R., J. Sun, et al. (2008). "MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells." *J Cell Biochem* 104(3): 805-17.
- Liu, B. F. and J. J. Liang (2008). "Confocal fluorescence microscopy study of interaction between lens MIP26/AQP0 and crystallins in living cells." *J Cell Biochem* 104(1): 51-8.
- Lu, H. T., Y. C. Liang, et al. (2008). "Disease-modifying effects of glucosamine HCl involving regulation of metalloproteinases and chemokines activated by interleukin-1beta in human primary synovial fibroblasts." *J Cell Biochem* 104(1): 38-50.
- Lucero, H. A. and H. M. Kagan (2006). "Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function." *Cell Mol Life Sci* 63(19-20): 2304-16.
- Ma, J., F. Zeng, et al. (2008). "Characterization and functional studies of a FYVE domain-containing phosphatase in *C. elegans*." *J Cell Biochem* 104(5): 1843-52.

[0387]

- Macartney-Coxson, D. P., K. A. Hood, et al. (2008). "Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level." *BMC Cancer* 8: 187.
- Maeshima, A. M., T. Niki, et al. (2002). "Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma." *Cancer* 95(12): 2546-54.
- Maki, J. M. and K. I. Kivirikko (2001). "Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme." *Biochem J* 355(Pt 2): 381-7.
- Maki, J. M., H. Tikkanen, et al. (2001). "Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains." *Matrix Biol* 20(7): 493-6.
- McElroy, K. E., P. J. Bouchard, et al. (2000). "Implementation of a continuous, enzyme-coupled fluorescence assay for high-throughput analysis of glutamate-producing enzymes." *Anal Biochem* 284(2): 382-7.
- Molnar, J., K. S. Fong, et al. (2003). "Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins." *Biochim Biophys Acta* 1647(1-2): 220-4.
- Molnar, J., Z. Ujfaludi, et al. (2005). "Drosophila lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development." *J Biol Chem* 280(24): 22977-85.
- Monticone, M., Y. Liu, et al. (2004). "Gene expression profile of human bone marrow stromal cells determined by restriction fragment differential display analysis." *J Cell Biochem* 92(4): 733-44.
- Muller, K. C., L. Welker, et al. (2006). "Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro." *Respir Res* 7: 32.
- Nagaoka, H., Y. Mochida, et al. (2008). "1,25(OH)2D3 regulates collagen quality in an osteoblastic cell culture system." *Biochem Biophys Res Commun* 377(2): 674-8.
- Nakken, K. E., S. Nygard, et al. (2007). "Multiple inflammatory-, tissue remodelling- and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4 (-/-) mice harbouring chronic cholangitis." *Scand J Gastroenterol* 42(10): 1245-55.
- Orimo, A., Y. Tomioka, et al. (2001). "Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression." *Clin Cancer Res* 7(10): 3097-105.

[0388]

- Orimo, A. and R. A. Weinberg (2006). "Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type." *Cell Cycle* 5(15): 1597-601.
- Palamakumbura, A. H. and P. C. Trackman (2002). "A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples." *Anal Biochem* 300(2): 245-51.
- Pascal, T., F. Debacq-Chainiaux, et al. (2005). "Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays." *FEBS Lett* 579(17): 3651-9.
- Payne, S. L., B. Fogelgren, et al. (2005). "Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism." *Cancer Res* 65(24): 11429-36.
- Payne, S. L., M. J. Hendrix, et al. (2007). "Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect." *J Cell Biochem* 101(6): 1338-54.
- Peinado, H., M. Del Carmen Iglesias-de la Cruz, et al. (2005). "A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression." *EMBO J* 24(19): 3446-58.
- Peinado, H., G. Moreno-Bueno, et al. (2008). "Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas." *Cancer Res* 68(12): 4541-50.
- Peinado, H., F. Portillo, et al. (2005). "Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta." *Cell Cycle* 4(12): 1749-52.
- Pires Martins, R., R. E. Leach, et al. (2001). "Whole-body gene expression by data mining." *Genomics* 72(1): 34-42.
- Polgar, N., B. Fogelgren, et al. (2007). "Lysyl oxidase interacts with hormone placental lactogen and synergistically promotes breast epithelial cell proliferation and migration." *J Biol Chem* 282(5): 3262-72.
- Postovit, L. M., D. E. Abbott, et al. (2008). "Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration." *J Cell Biochem* 103(5): 1369-78.
- Qi, Y. J., Q. Y. He, et al. (2008). "Proteomic identification of malignant transformation-related proteins in esophageal squamous cell carcinoma." *J Cell Biochem* 104(5): 1625-35.
- Qiu, J., H. Q. Gao, et al. (2008). "Proteomics investigation of protein expression changes in ouabain induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells." *J Cell Biochem* 104(3): 1054-64.
- Rost, T., V. Pyritz, et al. (2003). "Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas." *Anticancer Res* 23(2B): 1565-73.

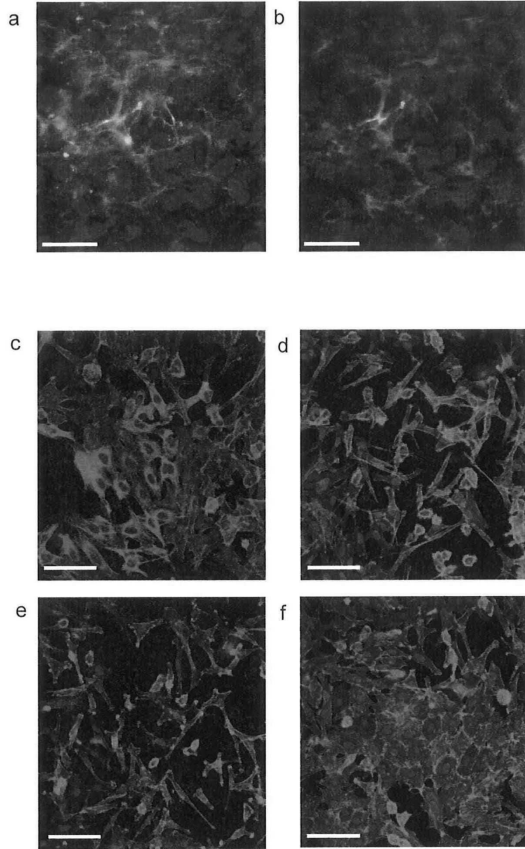
- Salnikow, K., O. Aprelikova, et al. (2008). "Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor." *Carcinogenesis* 29(8): 1493-9.
- Schlötzer-Schrehardt, U., F. Pasutto, et al. (2008). "Genotype-correlated expression of lysyl oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and normal patients." *Am J Pathol* 173(6): 1724-35.
- Schmidt, H., A. Semjonow, et al. (2007). "[Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR]." *Verh Dtsch Ges Pathol* 91: 302-7.
- Sebban, S., B. Davidson, et al. (2009). "Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities." *Virchows Arch* 454(1): 71-9.
- Shen, W., K. Liu, et al. (2008). "Protective effects of R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine in MIN6 and isolated rat islet cells chronically exposed to oleic acid." *J Cell Biochem* 104(4): 1232-43.
- Stein, G. S., S. K. Zaidi, et al. (2008). "Genetic and epigenetic regulation in nuclear microenvironments for biological control in cancer." *J Cell Biochem* 104(6): 2016-26.
- Sun, J., G. Watkins, et al. (2008). "Deregulation of cofactor of BRCA1 expression in breast cancer cells." *J Cell Biochem* 103(6): 1798-807.
- Szabo, Z., E. Light, et al. (1997). "The human lysyl oxidase-like gene maps between STS markers D15S215 and GHLC.GCT7C09 on chromosome 15." *Hum Genet* 101(2): 198-200.
- Szauter, K. M., T. Cao, et al. (2005). "Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin." *Pathol Biol (Paris)* 53(7): 448-56.
- Tang, S. S., D. E. Simpson, et al. (1984). "Beta-substituted ethylamine derivatives as suicide inhibitors of lysyl oxidase." *J Biol Chem* 259(2): 975-9.
- Tang, S. S., P. C. Trackman, et al. (1983). "Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile." *J Biol Chem* 258(7): 4331-8.
- Trackman, P. C. and H. M. Kagan (1979). "Nonpeptidyl amine inhibitors are substrates of lysyl oxidase." *J Biol Chem* 254(16): 7831-6.
- Trackman, P. C., C. G. Zoski, et al. (1981). "Development of a peroxidase-coupled fluorometric assay for lysyl oxidase." *Anal Biochem* 113(2): 336-42.

[0390]

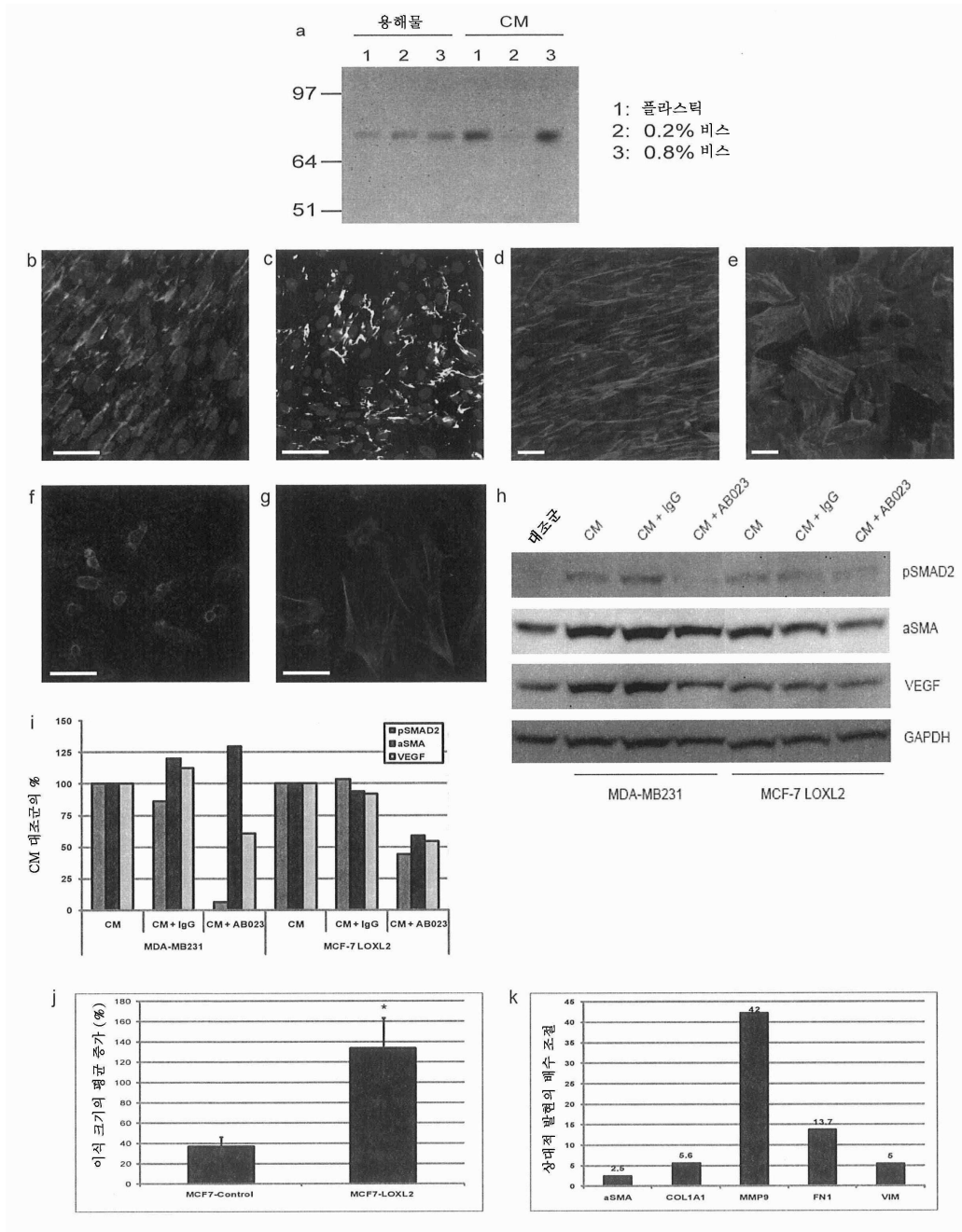
- Tsai, C. S., F. Y. Lin, et al. (2008). "Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells." *J Cell Biochem* 103(1): 54-66.
- Urban, Z., O. Agapova, et al. (2007). "Population differences in elastin maturation in optic nerve head tissue and astrocytes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(7): 3209-15.
- Vadasz, Z., O. Kessler, et al. (2005). "Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2." *J Hepatol* 43(3): 499-507.
- Wang, Q. R., B. H. Wang, et al. (2008). "Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells." *J Cell Biochem* 103(1): 21-9.
- Wang, X. M., J. Li, et al. (2008). "Involvement of the role of Chk1 in lithium-induced G2/M phase cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells." *J Cell Biochem* 104(4): 1181-91.
- Weise, J. B., P. Rudolph, et al. (2008). "LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer." *Eur J Cancer* 44(9): 1323-31.
- Wu, M., Q. Chen, et al. (2008). "LRRC4 inhibits human glioblastoma cells proliferation, invasion, and proMMP-2 activation by reducing SDF-1 alpha/CXCR4-mediated ERK1/2 and Akt signaling pathways." *J Cell Biochem* 103(1): 245-55.
- Yang, H., K. R. Landis-Piwowar, et al. (2008). "Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells." *J Cell Biochem* 103(1): 234-44.
- Yang, Y. L., S. Y. Chang, et al. (2008). "Safflower extract: a novel renal fibrosis antagonist that functions by suppressing autocrine TGF-beta." *J Cell Biochem* 104(3): 908-19.
- Yu, Z., W. Li, et al. (2008). "p21 is required for atRA-mediated growth inhibition of MEPM cells, which involves RAR." *J Cell Biochem* 104(6): 2185-92.
- Zhang, Y., M. Q. Hassan, et al. (2008). "Intricate gene regulatory networks of helix-loop-helix (HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation." *J Cell Biochem* 105(2): 487-96.
- Zhao, H., Y. Liang, et al. (2008). "N-glycosylation affects the adhesive function of E-Cadherin through modifying the composition of adherens junctions (AJs) in human breast carcinoma cell line MDA-MB-435." *J Cell Biochem* 104(1): 162-75.
- Zheng, M., X. Gu, et al. (2008). "UBE1DC1, an ubiquitin-activating enzyme, activates two different ubiquitin-like proteins." *J Cell Biochem* 104(6): 2324-34.

[0391]

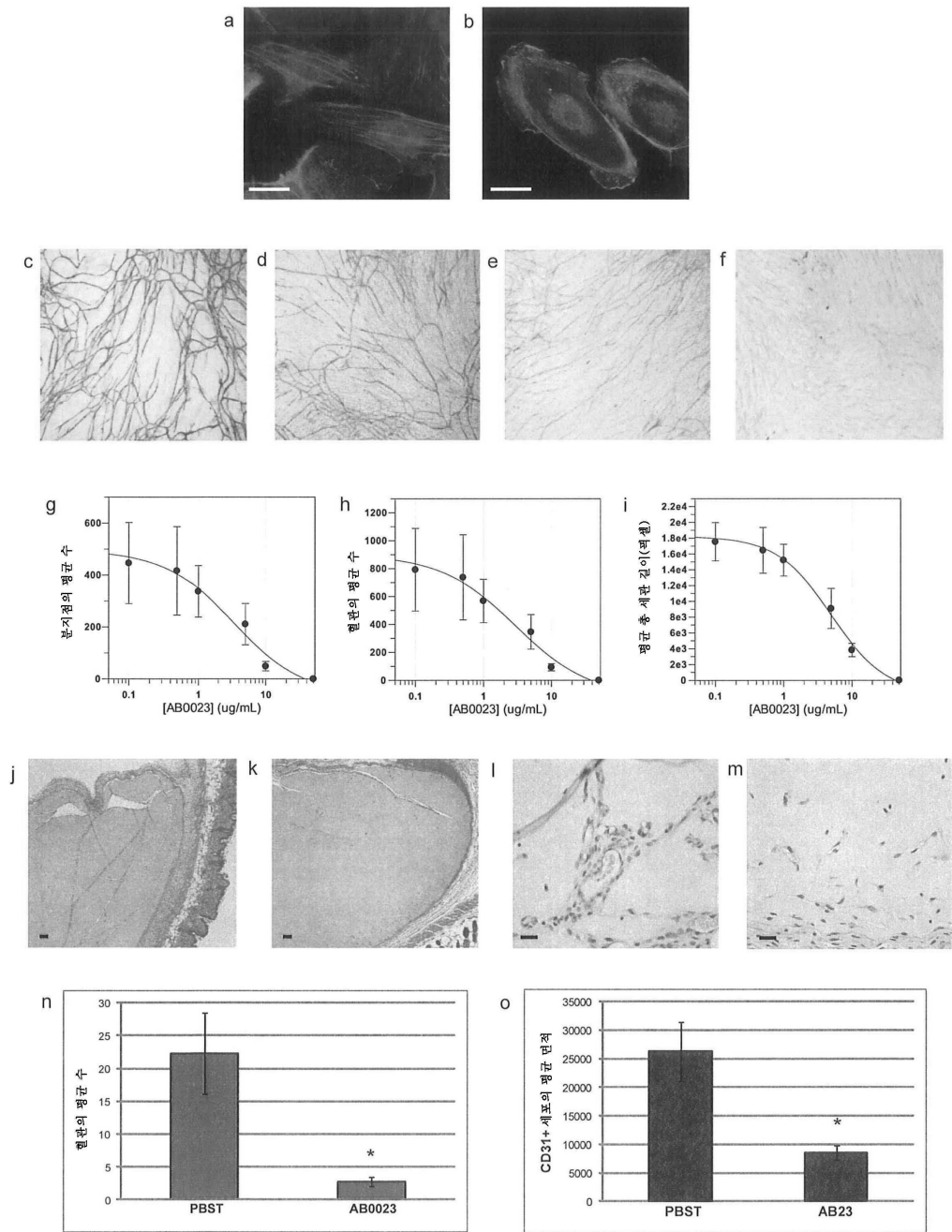
도면2



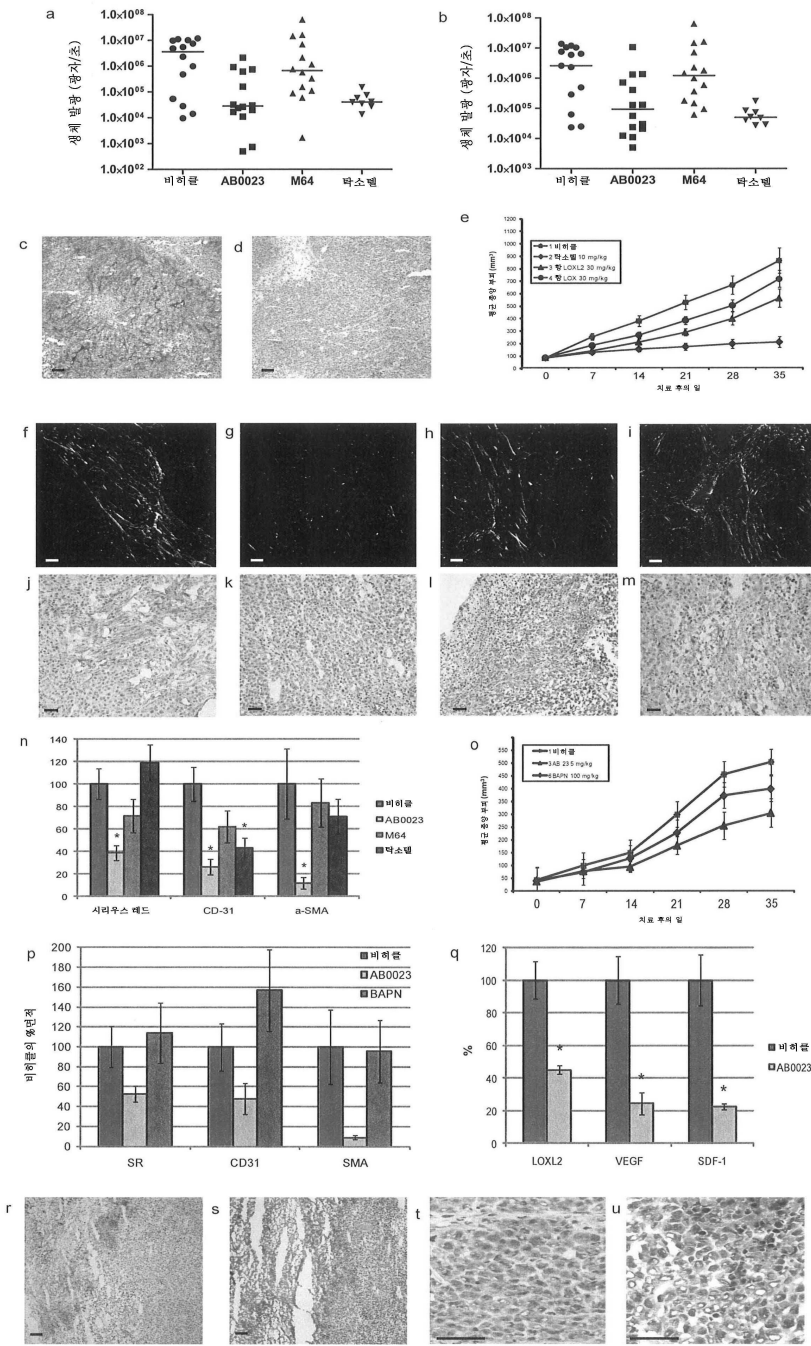
도면3



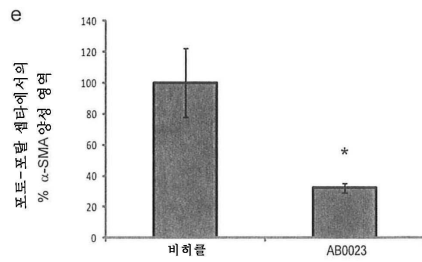
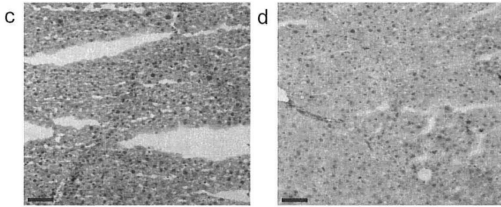
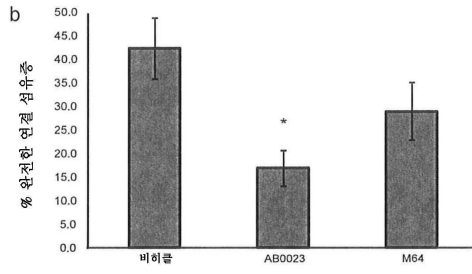
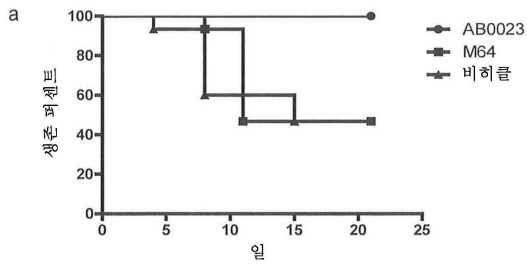
도면4



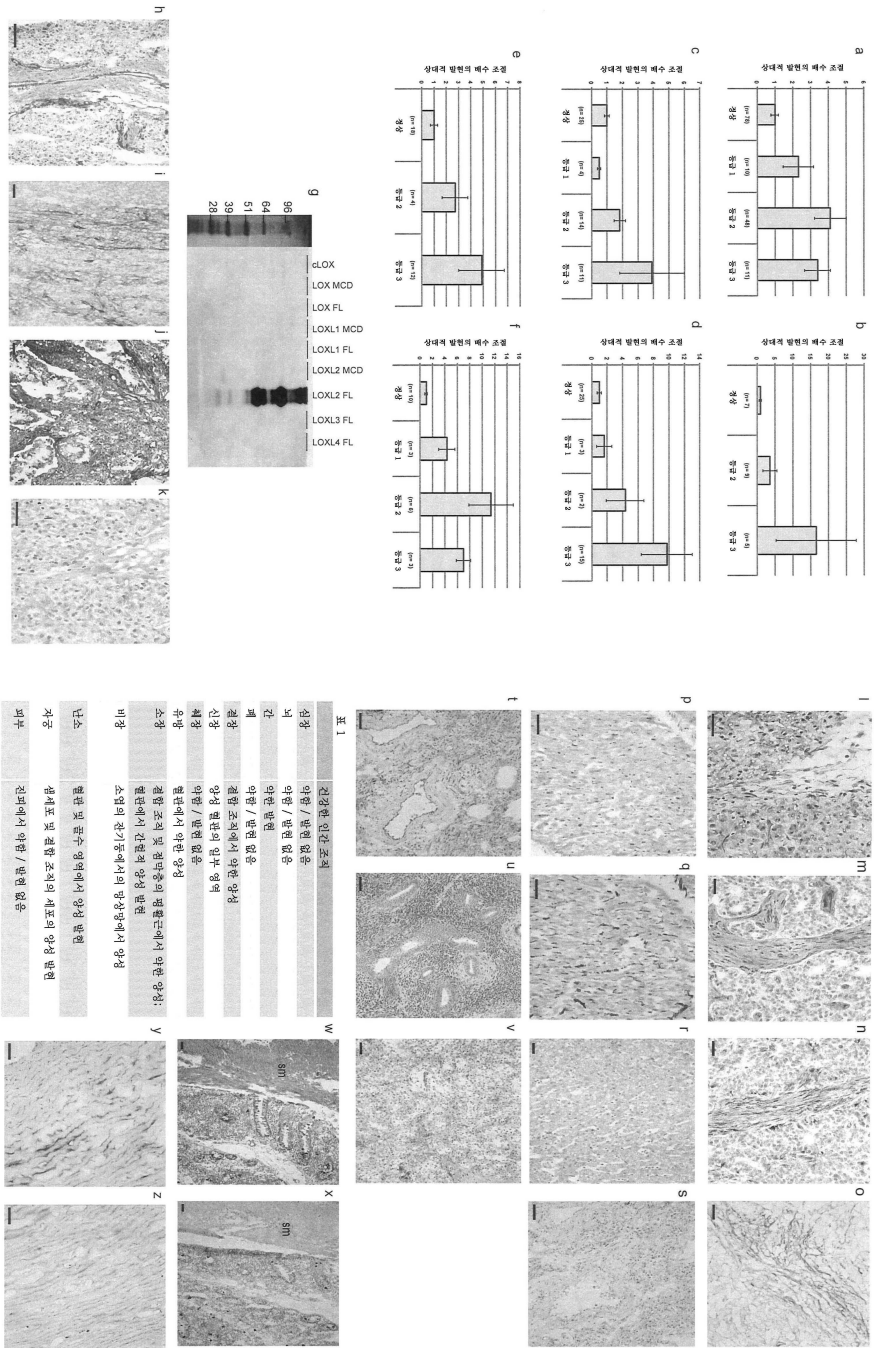
도면5



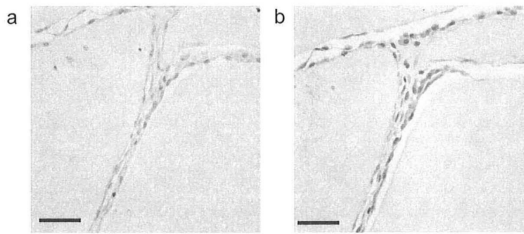
도면6



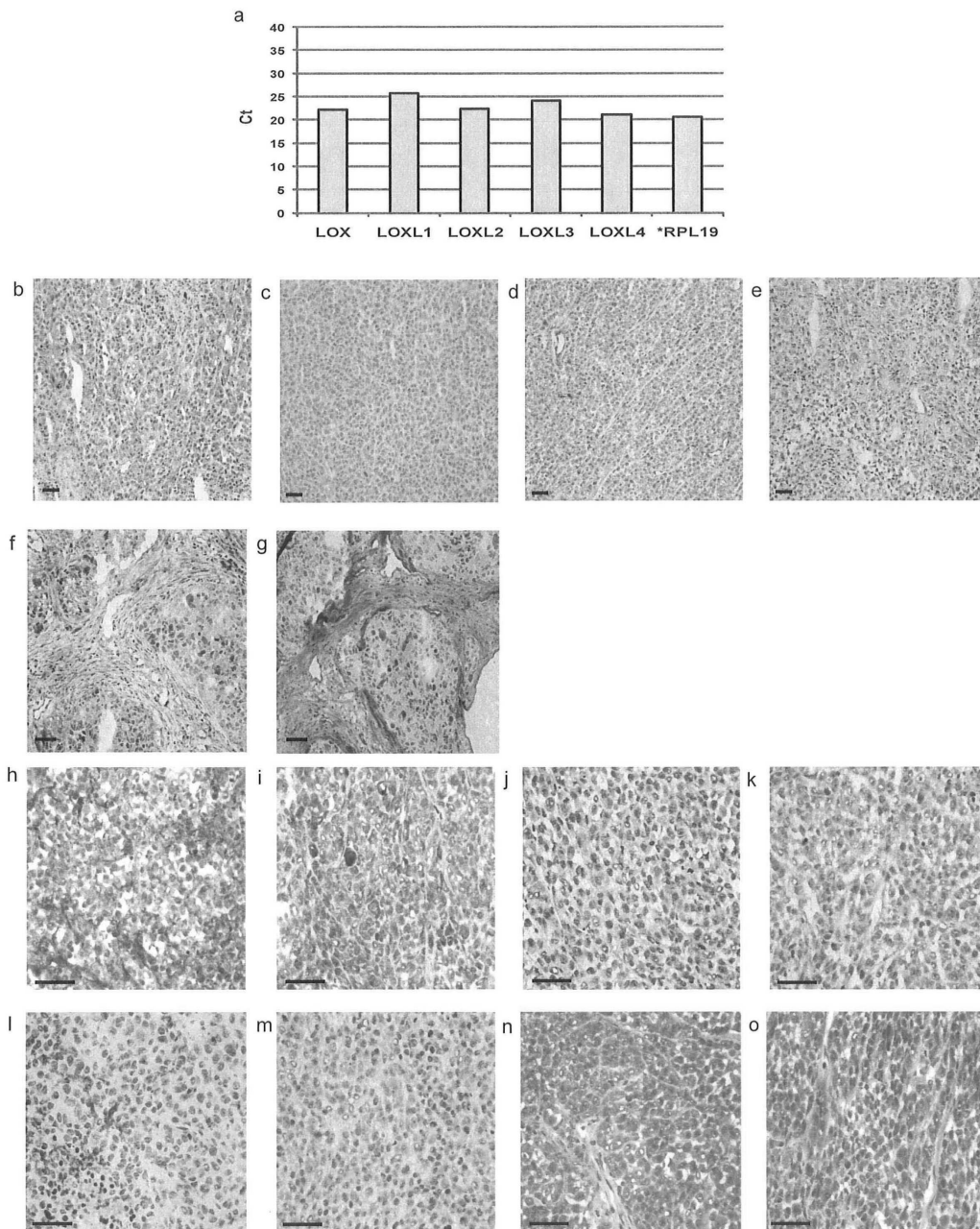
도면7



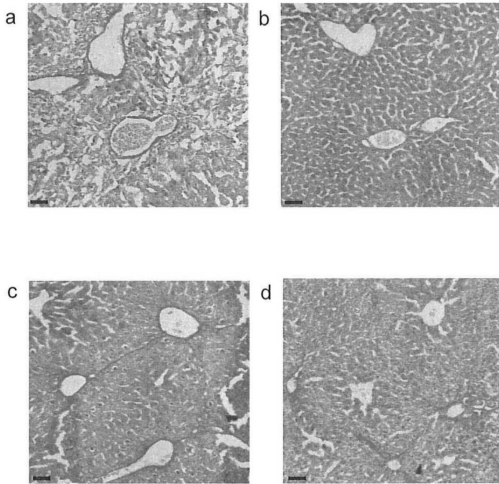
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Arresto BioSciences, Inc.

SMITH, VICTORIA

VAN VLASSELAER, PETER

<120> Therapeutic Methods and Compositions

<130> ARBS-011WO

<140> PCT/US2010/046248

<141> 2010-08-20

<150> US 61/235,852

<151> 2009-08-21

<160> 80

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 135

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Heavy chain

<400> 1

Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1

5

10

15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Thr Tyr Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 2

<211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Light chain

<400> 2

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45
 Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Humanized light chain

<400> 4

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 5

atggagatcc cttttggctc

20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer
 <400> 6
 ttactgcaca gagagctgat ta 22
 <210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 7
 atagctagcg ccaccatgga gatccctttt ggctc 35
 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 8
 tataactcgag tctgcacaga gagctgatta tttag 35
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 9
 cctgtcccc ctgagcctgg cacag 25
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 10

ttactgcggg gagagctggt tgttcaagag 30

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 11

tataggccca gccggcccag tatgacagct ggccc 35

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 12

tatagcggcc gcctgcgggg agagctggtt g 31

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Synthetic peptide

<400> 13

Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Cys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 14

uaugcuuucc ggaaucucga ggguc 25

<210> 15

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 15
 uggaguaauc ggauucugca accuc 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 16
 ucaacgaauu gucaaaauug aaccc 25

<210> 17
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 17
 auaacagcca ggacucaauc ccugu 25

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 18
 cttgactggg gaagggtctg 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 19
 aaaacggggc tcaatcag 20
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 20
 atcccacct tggcattgct tgg 24
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 21
 agcagacttc ctcccaacc 20
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 22
 cagtaggtcg tagtggctga ac 22
 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe

<400> 23	
cacggcacac ctgggagtgg cac	23
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 24	
ggggtttgtc cacagagctg	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 25	
acgtgtcact ggagaagagc	20
<210> 26	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic probe	
<400> 26	
tggagcagca ccaagagcca gtct	24
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 27	
gtgtgcgaca aaggctggag	20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 28
 ccgcgttgac cctcttttcg 20
 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 29
 aagcccagca tcccgcagac cac 23
 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 30
 cttaccacac acatgggtgt ttc 23

 <210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 31
 tcaagcactc cgtaactggt gg 22
 <210> 32
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 32
 ccttggaagc acagacctcg ggca 24
 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 33
 ctatccaggc ggtgctgtc 19

 <210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 34
 atgatggcat ggggcaagg 19
 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 35
 cctctggacg cacaactggc atcg 24
 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer

<400> 36	
tgggagtttc ctgagggttt tc	22
<210> 37	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 37	
gcatcttggg ttgctgcata tg	22
<210> 38	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic probe	
<400> 38	
agggctgcac attgctgtt ctgc	24
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 39	
caggcaaagc aggagtccac	20
<210> 40	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 40	
cttcaacggc aaagttctct tcc	23

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 41
 accggagaca ggtgcagtcc ctca 24
 <210> 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 42
 tcaagatgca catccgaagc c 21
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 43
 cagtggggac aggagaaggg 20
 <210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 44
 cctgcgtctg cggaacctgc gg 22
 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 45
 acagaacggc ctcaggtacc 20

<210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 46
 ttcttggctc cgtcacagat cac 23

<210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 47
 cgtgtggaaa cccgagcct gcc 23

<210> 48
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 48
 ccggctgctc agaagatac 19

<210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic primer	
<400> 49	
ttcaggtaca ggctgtgata cat	23
<210> 50	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic probe	
<400> 50	
tggcgatcga tcttcttaga ttcacg	26
<210> 51	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 51	
caagaggga gcagagcctt c	21
<210> 52	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic primer	
<400> 52	
gcaccttctg aatgtaagag tctc	24
<210> 53	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic probe	
<400> 53	
accaaggagc acgcaccaca acga	24

<210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 54
 ggcccttcgcc accacctatc 20

<210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 55
 gtagtacacg tagccctggt cg 22

<210> 56
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 56
 ccagccatcc tcctaccgc agca 24

<210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 57
 gctatgtaga ggccaagtcc tg 22

<210> 58
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 58
 cagtgcacacc ccagccattg 20
 <210> 59
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 59
 tcctcctacg gtccaggcga aggc 24
 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 60
 aacggcaagc tgtctggaag 20

 <210> 61
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 61
 agccaacatt gacctagcac tg 22
 <210> 62
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic probe
 <400> 62
 tcccgcccat tcccacccat ctcg 24
 <210> 63
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 63
 caagacaggt ccagtagagt tagg 24

 <210> 64
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 64
 aggtcttata ccacctgagc aag 23
 <210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 65
 acagagcaca gccgcctcac tgga 24
 <210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 66
 tctgcctcta gcacacaact g 21

<210> 67
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 67
 aaaccacgag taacaaatca aagc 24
 <210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 68
 tgtggatcag cgctccagt tcct 24
 <210> 69
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 69
 cacctctgct ttcttttgcc atc 23

 <210> 70
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 70
 ctgtgggagg ggtgtttgaa c 21
 <210> 71
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 71
 tgcagcactg tcaggacatg gcct 24
 <210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 72
 cgccctcatt cccttgttgc 20

 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 73
 ggaggacgag gacacagacc 20
 <210> 74
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 74
 ttccagccgc agcaagccag cc 22
 <210> 75
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic primer
 <400> 75
 cggctgtgtg cgatgacg 18

<210> 76
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 76
 acgtattctt ccggcagaa ag 22

<210> 77
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic probe
 <400> 77
 cagcactcgc cctcccgtct ttgg 24

<210> 78
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 78
 agaagtgac ctggatgaga a 21

<210> 79
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic primer
 <400> 79

tgatacatat ggcggtcaat ct 22

<210> 80

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic probe

<400> 80

cttctcagga gataccggga atccaag 27