(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0114131
(43) 공개일자 2011년10월19일

(51) Int. Cl.
A61K 38/39 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0033606
(22) 출원일자 2010년04월13일
심사청구일자 2010년04월13일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
정인식
서울특별시 강남구 도곡동 삼성레미안 아파트 109동 1102호
유기현
인천광역시 부평구 부개1동 251-2 동원아파트 905동 403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

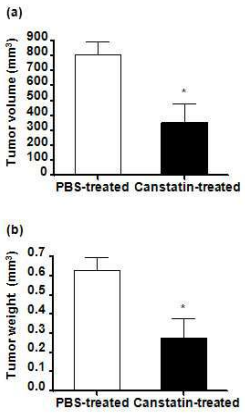
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물

(57) 요 약

본 발명은 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 항-신생혈관능(anti-angiogenic action)뿐만 아니라 항-림프관신생능(anti-lymphangiogenic action)을 통하여 구강암을 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

황보전

서울특별시 종로구 창신2동 595-4호 102호

박종화

서울특별시 송파구 오금동 70-4, 302호

김경일

부산광역시 서구 충무동 충무아파트 B동 405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A080360
부처명	보건복지가족부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	혈관신생 억제제 canstatin을 이용한 편평세포암종 표적치료 연구
기여율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2008.05.01 ~ 2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 칸스타틴은 항-림프관신생능을 가지는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 구강암은 구강 편평상피세포암(oral squamous cell calcinoma), 선양낭성암, 점액표피양암 및 선암으로 구성된 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 함유하는 구강암 예방용 기능성 식품.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 재조합 칸스타틴은 항-림프관신생능을 가지는 것을 특징으로 하는 구강암 예방용 기능성 식품.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 구강암은 구강 편평상피세포암(oral squamous cell calcinoma), 선양낭성암, 점액표피양암 및 선암으로 구성된 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 하는 구강암 예방용 기능성 식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신생혈관형성(angiogenesis)은 이미 존재하는 맥관구조(vasculature)로부터 새로운 혈관의 성장 및 종양의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 내피세포 증식(endothelial cell proliferation), 이동(migration) 및 미세관 형성(capillary tube formation)을 유도하는 몇몇 신생혈관 성자 인자는 종양 미세환경(tumor microenvironment)에 분비된다. 이러한 과정을 간섭하는 것은 신생혈관생성에 영향을 미칠 수 있으며, 종양 성장을 저해할 수 있는 것으로 알려졌다(Angiogenesis Annu. Rev. Med., 57:1-18, 2006). 엔도스타틴(endostatin), 툼스타틴(tumstatin), 및 칸스타틴

(canstatin)을 포함하는 어떤 인자는 생체내에서 신생혈관생성의 내재적 저해자로 작용하는 것으로 보고되었다(Cell, 88:277~285, 1997; J. Biol. Chem., 275:21340~21348, 2000; J. Biol. Chem., 275:1209~1215, 2000).

[0004] 타입 IV 콜라겐의 α2 사슬의 NC1 도메인(24 kDa)인 칸스타틴은 내피세포 이동(endothelial cell migration) 및 관 형성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 칸스타틴은 또한 내피세포에서 Akt 활성화 저해와 Fas-의존 세포사(apoptosis)를 유도하며(J. Biol. Chem., 278:37632~37636, 2003), 명백한 항종양 활성과 함께 신생혈관생성의 잠재적 저해능을 가지는 것으로 알려졌다(Cancer Res., 65:4353-4361, 2005).

[0005] 칸스타틴은 두경부 암(head and neck cancer), 전립선 암(prostate cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer) 및 폐암(lung caner)에 대한 종양성장 저해능을 가지는 것으로 알려졌으나(J. Biol. Chem., 275:1209~1215, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 318:354~360, 2004; Breast Cancer Res Treat., 110:283~295, 2008; Cancer J., 12:136~46, 2006), 구강암(oral cancer)에 대한 종양성장 저해능은 아직까지 보고되지 않았다.

[0006] 한편, 본 발명자들은 안정하게 형질전환된 Drosophila S2 세포에서 인간 칸스타틴 cDNA의 발현을 유도하고, 금속 킬레이트 친화도 분류법(metal chelate affinity fractionation)을 이용하여 재조합 칸스타틴을 정제하였고(Protein Expr Purif., 52:258~264, 2007), 최근에는 orthotopic AT-84 oral squmamous cell carcinoma animal (C3H/He) model을 수립하고, 툼스타틴의 종양 성장 저해활성을 세포내에서 확인한 바 있다(Oral Oncology, 44:1118~1126, 2008).

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 재조합 칸스타틴은 구강암에서도 종양성장 저해능을 가진다는 사실을 확인하였고, 특히 지금까지 다른 암에서 알려진 항-신생혈관생성능 뿐만 아니라 항-림프관신생능을 통하여 구강암을 치료 및 예방할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 항-림프관신생능을 통하여 구강암을 치료하는 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 항-림프관신생능을 통하여 구강암을 완화 및 예방하는 기능성 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 함유하는 구강암 예방용 기능성 식품을 제공한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 칸스타틴은 항-림프관신생능을 가지는 것을 특징으로 하고, 상기 구강암은 구강 편평상피세포암(oral squamous cell calcinoma), 선양낭성암, 점액표피양암 및 선암으로 구성된 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴을 함유하는 약학 조성물은 구강함 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 구강암 모델에서 재조합 칸스타틴의 항종양 활성을 나타낸 그래프이다(a: 종양 부피, b: 종양 무게, 통계분석: mean ± S.E., Student's ttest(*p<0.05)).

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 CD31 또는 LYVE-1의 면역형광검출을 이용한 종양내 혈관 밀도 또는 림프관 밀도를 측정한 그래프이다(a: 혈관 밀도, b: 림프관 밀도, 통계분석: mean ± S.E., Student's t test (** p<0.01)).

도 3은 HUVEC 및 LEC에서의 재조합 칸스타틴의 관 형성 저해능을 측정한 사진 및 그래프이다.(a: x10 배율(bar = 100 μm), b: HUVEC, c: LEC, 통계분석: mean ± S.D., Student's t test (** p<0.01, *** p<0.001)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에서는 재조합 칸스타틴의 구강암에 대하여 항 종양 활성을 가지고 있는지를 확인하고자 하였다.

[0016] 본 발명에서는 재조합 칸스타틴을 제조한 후, 이를 구강암을 유발시킨 실험용 동물에 처리하였다. 그 결과, 재조합 칸스타틴이 구강암의 성장을 저해시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0017] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 재조합 칸스타틴으로 처리된 구강암 세포를 CD31과 LYVE-1을 이용하여 면역형광염색시킴으로써, 재조합 칸스타틴이 구강암 모델에서 항-림프관신생능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0019] 칸스타틴이라 불리는 콜라겐의 알파 2(IV) 사슬의 가용성 NC1 도메인은 종양 관련 신생혈관생성(tumor-associated angiogenesis)을 잠재적으로 저해하는 것으로 알려져 있다.

[0020] 본 발명에 따른 상기 재조합 칸스타틴은 Drosophila melanogaster S2 세포에 칸스타틴 cDNA를 함유하는 플라스미드를 lipofectamine 방법 (Protein Expr. Purif., 52:258~264, 2007)으로 형질전환시켜 획득할 수 있다.

[0021] 상기 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1)은 염증시의 창상 치유시에 많이 출현하는 세포외 기질의 글리코사미노글리칸 히알루로난에 대한 수용체이며, 상기 히알루로로난은 세포 유주, 창상 치유, 종양 전이 등에 관련된 중요한 인자이다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 칸스타틴은 항-림프관신생능을 가지는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명에 따른 재조합 칸스타틴은 신생혈관생성능 저해뿐만 아니라 림프관생성능 저해능을 통하여 구강암를 치료할 수 있다.

[0023] 구강암은 입술, 입 안의 점막 등에 발생하는 악성종양을 의미하며, 구강암의 90% 이상은 입 안의 점막을 구성하는 편평상피세포에서 발생하는 편평상피세포암이다. 본 발명에 있어서, 상기 구강암은 구강 편평상피세포암(oral squamous cell calcinoma), 선양낭성암, 점액표피양암 및 선암으로 구성된 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명에 따른 상기 구강암 치료용 약학 조성물은 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 구강암 치료용 약학 조성물에 0.001 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.1 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등

이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 상기 재조합 칸스타틴을 함유하는 구강암 치료용 약학조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 재조합 칸스타틴은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] 한편, 재조합 칸스타틴을 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제와 함께 사용할 경우, 구강암 예방을 위한 기능성 식품으로 사용가능 할것으로 예측하였다.

[0028] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 림프관 내피 히알루로난 수용체-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; LYVE-1) 저해능을 가지는 재조합 칸스타틴 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 함유하는 구강암 예방용 기능성 식품에 관한 것이다.

[0029] 본 명세서에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 재조합 칸스타틴을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다.

[0030] 상기 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 예시할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 재조합 칸스타틴 100중량부 당 0.01~20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0031] [실시예]

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] AT-84 편평상피세포암 세포주(State University of New York, Upstate Medical University의 Dr. EJ Shillitoe로부터 제공받음)는 RPMI-1640 배양액에10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-gutamine, 0.1 mM nonessential amino acids, 10 mM N-2-HEPES buffer, 100 units penicillin/ml, 및 100 μg streptomycin/ml(Oral Oncology, 44:1118~1126, 2008)을 첨가한 뒤 5% CO_2가 유지되는 37℃ 배양기에서 습식으로 배양시켰다.

[0034] 모든 세포 배양 배지 및 시약은 Thermo Scientific HyClone (MA, USA)에서 구입하였다.

[0035] 인간태반 혈관내피세포(HUVEC, Modern Tissue Technology, Korea)는 10% (v/v) heat-inactivated FBS가 포함된 EGM-2 Bulletkit (Lonza, Basel, Switzerland)에서 5% CO_2, 37℃로 습식 배양시켜 사용하였다.

[0036] **실시예 1: 정제된 재조합 칸스타틴(canstatin)의 제조**

[0037] 재조합 인간 칸스타틴 단백질을 Drosophila melanogaster S2 세포에 칸스타틴 cDNA를 함유하는 플라스미드를 lipofectamine 방법 (Protein Expr Purif, 52:258~264, 2007)으로 형질전환시켜 획득하였다. 안정하게 형질전환된 Drosophila S2 세포에서 획득한 재조합 칸스타틴은 간단한 one-step Ni-NTA affinity fractionation

(Protein Expr Purif, 52:258-264, 2007) 방법으로 균일하게 정제하였다.

[0038] 칸스타틴 단백질의 정제는 SDS-PAGE 후 웨스턴 블랏 및 실버 스테이닝(silver staining)을 통해 확인하였다.

[0039] **실시예 2: 재조합 칸스타틴의 구강암에 대한 항종양 활성 평가**

[0040] **2-1: 생체내 종양실험**

[0041] 경희대학교 동물관리 사육위원회의 실험 동물 사육 및 이용에 대한 지침을 준수하여, 실험에 사용된 5주령의 수컷 C3H/HeN mouse(SLC, Shizuoka, Japan)는 자유롭게 물 및 사료를 섭취하도록 하였고, 특정 병원체가 존재하지 않는 공간에 격리시켜 12시간 간격으로 빛을 조사하며 사육하였다.

[0042] 정위 구강 편평세포암종(orthotopic oral squamous cell carcinoma) 동물 모델을 구축하기 위하여(Oral Oncology, 44:1118~1126, 2008), 50㎕의 5 × 10^5 AT-84 세포를 C3H/HeN 쥐의 전측 볼 점막(anterior buccal mucosa)에 주입하였다. 8마리씩 그룹을 나눈 후, 육안으로 확인할 수 있는 크기로 종양을 8일간 성장시켰다. 그런 후, 각각의 그룹에 대하여 매일 재조합 칸스타틴(5mg/kg· day in PBS) 또는 PBS(control)를 종양주위에 13일동안 주입하였다. 5 mg/kg의 재조합 칸스타틴의 처리는 3~5 mg/kg의 칸스타틴이 종양성장 저해를 할 수 있다는 보고(J. Biol. Chem., 275:1209~1215, 2006; Biochem Biophys Res Commun., 318:354~360, 2004)에 근거한 것이다.

[0043] 종양 접종 4주 후, 모든 쥐를 희생시켜 종양을 절제하고 무게를 측정하였다. 종양의 길이와 넓이는 캘리퍼(caliper)로 측정하였고, 종양의 양은 표준공식[length × width squared × 0.5] (Cancer Res 47:4243~4247, 1987)에 의하여 측정하였다. 본 실시예의 측정값은 mean ± S.D. 또는 S.E로 나타내었고, Student's t test을 이용하여 유의성(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)을 검증하였다.

[0044] 구강암 모델에서 재조합 칸스타틴의 항종양 활성을 측정한 결과, 대조군에서는 AT-84 세포 주입 28일후에 종양은 급격하게 성장하여 평균 부피 806.1 ± 90.1 mm^3 (mean ± S.E.)를 나타내었으며(도 1a). 칸스타틴이 처리된 쥐에서의 원발성 종양(351.5 ± 128.8 mm^3)의 부피는 대조구(AT-84 세포 주입 28일)에 비하여 43.6% 감소되었음을 알 수 있었다.

[0045] 또한, 칸스타틴이 처리된 쥐에서의 원발성 종양(351.5 ± 128.8 mm^3)의 무게는 대조구(AT-84 세포 주입 28일)에 비하여 44.1% 감소되었음을 알 수 있었다(도 1b). 참고로, 췌장암 쥐 모델에서는 재조합 칸스타틴을 5 mg/kg· day 주입시킨 경우 대조구에 비하여 31%의 종양 무게를 감소시켰다는 보고가 있다(Biochem Biophys Res Commun., 318:354~360, 2004).

[0046] **2-2: 종양내 혈관 또는 림프관 밀도 측정**

[0047] 2-1의 쥐 볼 점막(anterior buccal mucosa)에서 획득한 원발성 종양 표본(primary tumor specimens)으로 혈관 밀도 또는 림프관 밀도를 분석하였다. 종양 표본은 희생된 쥐로부터 즉시 회수하고, 조직학적 검사를 수행하였다.

[0048] 종양을 10% 포르말린으로 밤새 고정화시키고, 파라핀으로 싸서, 5㎛ 두께로 잘라내었다. 종양 절편을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀시키고, 에탄올(100%, 95%, 70%)로 탈수시키고, 증류수로 세척하였다. 그런 후, 세척된 종양 절편을 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 10분간 가열한 후, 상온에서 냉각시켰다.

[0049] endogenous peroxidase 활성을 저해하기 위하여, 종양 절편을 1% hydrogen peroxide를 함유하는 메탄올로 10분간 처리하고, 10% normal goat serum (Dako, Glostrup, Denmark)이 포함된 용액에서 1시간동안 배양시켰다.

[0050] 배양된 조직을 CD31 및 LYVE-1 (1:50 dilutions, Abcam, Cambridge, UK)으로 처리하고, AlexaFluor488 (Invitrogen, CA, USA)로 라벨링된 2차 항체로 처리하는 면역형광염색(Immunofluorescence stains)을 수행하였다.

[0051] CD31은 PECAM-1(platelet endothelial cell adhesion molecule 1)으로 알려졌고, LYVE-1(lymphatic vessel hyaluronan receptor-1)은 lymphatic endothelial cell 마커로 알려져 있다. 세포 핵(cell nuclei)은

propidium iodide (1:1000 dilutions, Sigma)으로 대조염색하였다.

[0052] 종양 절편은 488 nm line의 아르곤 빔(Aragon laser)을 이용하는 공초점주사현미경((LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

[0053] 종양 표본내 혈관 및 림판관 밀도를 분석하기 위하여, 모든 종양 절편은 ×40 배율로 관찰하였고, mm^2당 혈관 또는 림프관의 수는 혈관 또는 림프관 밀도로 기록하였다. 각 그룹의 림프관 밀도는 각 그룹의 종양 절편을 측정하고, 평균 값을 계산하고, 대표 값으로 이용하였다. 이때 비교를 위하여 대조구(PBS-처리) 그룹의 림프관 밀도를 100%로 하였다.

[0054] 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군(PBS 처리)의 종양 표본은 평균 혈관 밀도가 8.8 ± 2.2/mm^2 (mean ± S.E.)로 나타난 반면, 칸스타틴 처리 그룹의 평균 혈관 밀도는 6.3 ± 2.2/mm^2로써, 대조군 밀도에 비하여 72% 감소되었음을 확인할 수 있었다(도 2a).

[0055] 또한, 대조군(PBS 처리)의 종양 표본은 평균 림프관 밀도가 2.7 ± 0.3/mm^2 (mean ± S.E.)인 반면, 칸스타틴이 처리 그룹의 평균 림프관 밀도는 1.2 ± 0.3/mm^2로써, 대조군 밀도에 비하여 44% 감소되었음을 확인할 수 있었다(도 2b).

[0056] 림프 내피(lymphatic endothelium)에 특이적인 LYVE-1 항체를 처리하고 4주동안 성장시킨 동위 종양(orthotopic tumors)의 면역형광은 종양 주변에서 주로 관찰되었다.

[0057] 따라서, 칸스타틴 처리 쥐에서 종양 크기의 감소 효과는 LYVE-1-양성 모세관 밀도 감소에 의한 림프관신생 저해에 의한 것으로 확인되었으며, 이는 본 발명에서 최초로 밝힌 것이다.

[0058] 즉, 상기 실험결과를 통하여 재조합 칸스타틴은 항 신생혈관능(anti-angiogenic action) 및 항 림프관신생능(anti-lymphangiogenic action)을 통하여 종양성장을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 이전의 연구결과에서는 림프관신생이 림프절 전이(lymph node metastasis) (Nat. Med., 7:186-191, 2001; Int. J. Cancer., 98:946-951, 2002)와 관련이 있고, 확장된 림프관(lymph vessels) 또한 림프절 전이(Padera et al. 2002)와 관련이 있다고 보고 하였다.

[0060] **2-3: 관 형성법**

[0061] 재조합 칸스타틴의 사람 혈관내피세포의 관형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 관 형성법(Tube formation assay)을 수행하였다.

[0062] 먼저, EBM-2 medium (Lonza) 및 Matrigel (BD Biosciences, CA, USA)이 각각 300㎕씩 혼합된 액을 48-well plate 각각에 넣은 후, 37℃에서 중합시켰다.

[0063] HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial cell)(입수처 : Modern Tissue Technology, Korea)을 이용한 관 형성법을 위하여, 0.5 ml의 EGM-2 Bulletkit(10% (v/v) heat-inactivated FBS가 추가됨)에서 배양된 사람태반 혈관내피세포(HUVEC)(4 × 10^4 cells/well)를 각각의 웰에 첨가하였다. 이때 FBS에는 20㎍ canstatin/ml을 함유하는 것과 함유하지 않는 것을 사용하였다.

[0064] 또한, LEC(Lymphatic endothelial Cell)(입수처 : AngioBio, USA)을 이용한 관 형성법을 위하여, 0.5 ml의 EGM-2 MV Bulletkit(20% (v/v) human serum (Lonza)이 추가됨)에서 배양된 림프 내피 세포(LEC)(6 × 10^4 cells/well)를 각각의 웰에 첨가하였다. 이때 FBS에는 20㎍ canstatin/ml을 함유하는 것과 함유하지 않는 것을 사용하였다.

[0065] 18시간 후, HUVEC 및 LEC에 대한 관 형성 유무를 Nikon D80 digital camera를 이용하는 위상차 현미경(×10)으로 관찰하였고, Image J program (NIH, MD, USA)을 이용하여 형성된 관의 길이를 정량하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 샘플의 분석은 3회 반복 수행하였다.

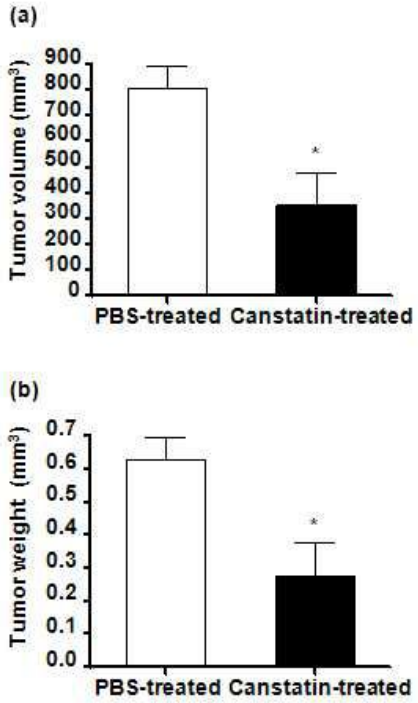
[0066] 도 3에 나타난 바와 같이, HUVEC 및 LEC에서 칸스타틴 처리군에서는 대조군에 비하여 관 형성이 적게 일어났으며(도 3a), 관의 길이 또한 칸스타틴 처리군이 대조군에 비하여 더 짧은 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 관 형성은 세포 이동, 증식, 생존 전체에 기여하는 것이기 때문에 재조합 칸스타틴에 의한 HUVEC 및 LEC에서의 관 형성의 저해는 생체외에서의 재조합 칸스타틴의 항 신생혈관능(anti-angiogenic action) 및 항 림프관신생능(anti-lymphangiogenic action)이 우수하다는 것을 알 수 있었다.

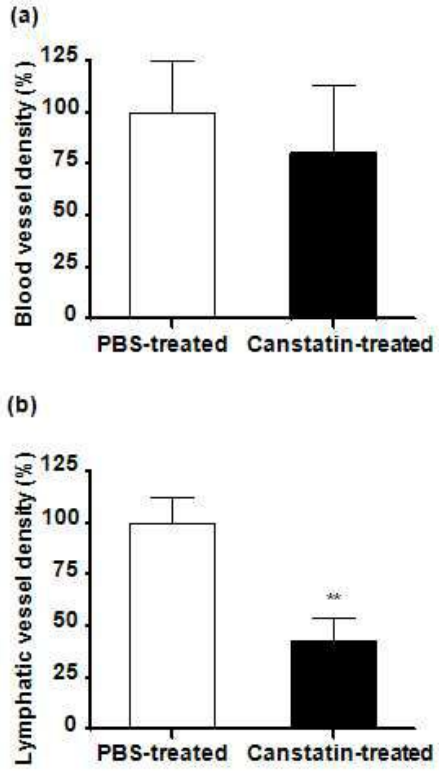
[0068] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

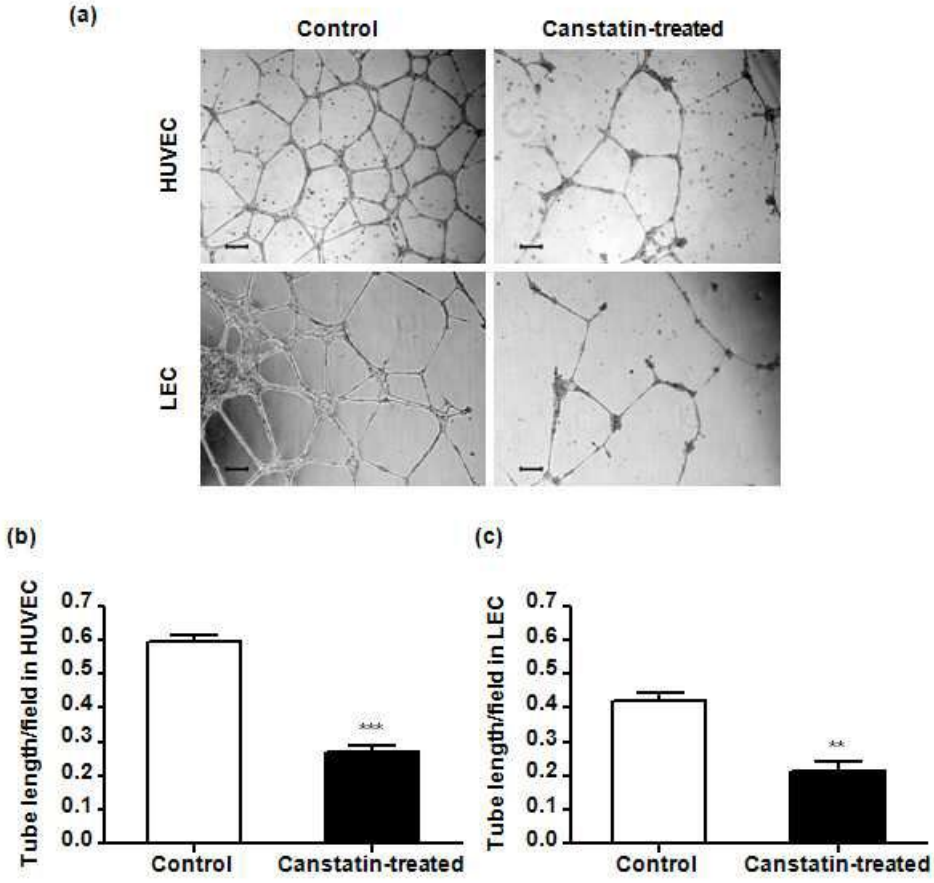
도면1



도면2


(a)
Blood vessel density (%)
125
100
75
50
25
0
PBS-treated
Canstatin-treated
(b)
Lymphatic vessel density (%)
125
100
75
50
25
0
**
PBS-treated
Canstatin-treated

도면3


(a)
Control
Canstatin-treated
HUVEC
LEC
(b)
Tube length/field in HUVEC
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
Control
Canstatin-treated
(c)
Tube length/field in LEC
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
Control
Canstatin-treated