

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 12월 3일 (03.12.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/145489 A2

- (51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/001726
- (22) 국제출원일: 2009년 4월 3일 (03.04.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
61/042,312 2008년 4월 4일 (04.04.2008) US
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 프로셀제약 (PROCELL THERAPEUTICS INC.) [KR/KR]; 서울특별시 구로구 구로 3 동 212-30 에이스트원타워 2 차 1009 호, 152-779 Seoul (KR).
- (71) 출원인 겸
- (72) 발명자: 조대웅 (JO, Daewoong) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 도곡 1 동 삼익아파트 1-1209, 135-857 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이종민 (LEE, Jong Min) [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 곡반정동 533-5, 441-400 Gyeonggi-do (KR). 박경호 (PARK, Kyoung-ho) [KR/KR]; 광주광역시 북구 일곡동 청솔 4 차

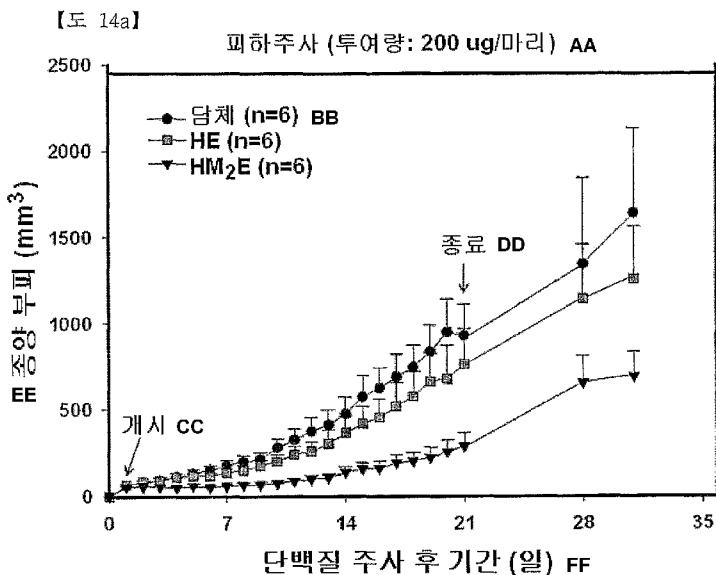
아파트 402-908, 500-794 Gwangju (KR). 동민탐 (DUONG, Minh Tam) [VN/KR]; 서울특별시 구로구 구로동 257-77 301 호, 152-849 Seoul (KR).

- (74) 대리인: 장수길 (CHANG, Soo Kil) 등; 서울특별시 종로구 내자동 223 세양빌딩 (김.장법률사무소), 110-720 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CELL-PERMEABLE ENDOSTATIN RECOMBINANT PROTEIN, A POLYNUCLEOTIDE COATED WITH THE SAME, AND AN ANTI-CANCER PREPARATION CONTAINING THE SAME AS AN ACTIVE COMPONENT

(54) 발명의 명칭: 세포투과성 엔도스타틴 제조할 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물



AA ... SC Injection (dose: 200 ug/head) DD ... Stop
BB ... Vehicle FF ... Days after injection of proteins
EE ... Tumor volume CC ... Start

(57) Abstract: The present invention relates to: a cell-permeable endostatin recombinant protein in which a macromolecule transduction domain (MTD) is fused to an angiogenesis inhibitor (angiogenic inhibitor) endostatin; a polynucleotide coated with the cell-permeable endostatin recombinant protein; an expression vector for the cell-permeable endostatin recombinant protein; and a pharmacological composition for an anti-cancer preparation with improved cancer angiogenesis inhibiting activity, which contains the cell-permeable endostatin recombinant protein as an active component. The cell-permeable endostatin recombinant protein according to the present invention can block the formation of microvessels and inhibit migration, proliferation, penetration, tube formation and the like of vascular endothelial cells present in tumor tissue by introducing angiogenesis inhibiting factor endostatin into the cell in a highly efficient fashion, and it exhibits outstanding anti-cancer activity and so can be used to good effect as an anti-cancer preparation used against various cancers.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2009/145489 A2



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서와 별도로 규칙 13의 2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 혈관형성 억제인자(angioinhibitor) 엔도스타틴(endostatin)에 거대분자 전달 도메인(macromolecule transduction domain, MTD)이 융합되어 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질, 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 발현벡터, 및 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 혈관형성 억제활성이 강화된 항암제용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질은 혈관형성 억제인자 엔도스타틴을 세포 내로 효율적으로 도입하여 종양 조직 내에 존재하는 혈관내피세포의 이동, 증식, 침투, 튜브 형성 등을 억제하고 신생 미세혈관의 형성을 차단함으로써 우수한 항암 활성을 나타내므로, 다양한 암에 대한 항암제로서 유용하게 사용될 수 있다.

세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드
및 이를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물

5 【기술분야】

본 발명은 혈관형성 억제인자(angioinhibitor) 엔도스타틴(endostatin)에 거대분자 전달 도메인(macromolecule transduction domain, MTD)이 융합되어 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질, 10 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 발현벡터 및 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 혈관형성 억제활성이 강화된 항암제용 약학 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

15 혈관형성(Angiogenesis)은 이미 존재하는 혈관으로부터 새로운 모세 혈관이 형성되는 과정으로, 고형 종양(solid tumor)의 성장과 전이에 필수적인 현상이다. 병원성의 혈관형성은 암, 당뇨병망막병증, 건선, 류마티스 관절염 등과 같은 질환의 진행에 중요한 역할을 한다. 일반적인 조건 하에서 혈관내피세포(vascular endothelial cells)는 상대적으로 느린 턴오버(turnover)를 20 유지한 채 정지상태로 존재한다. 이러한 정지상태의 혈관내피세포를 활성화된 전-혈관형성(pro-angiogenic) 상태로 전환시키기 위해서는 생체 내 혈관형성 자극인자의 분비량은 증가시키고 혈관형성 억제인자의 분비량은 감소시켜야 한다. 이러한 혈관형성 자극인자로는 bFGF, VEGF, 혈관 투과성 인자(vascular permeability factors) 등을 예로 들 수 있고, 혈관형성 억제인자로는 25 안지오스타틴(angiostatin), 엔도스타틴(endostatin), 텀스타틴(tumstatin), 칸스타틴(canstatin), 아레스텐(arresten), 트롬보스폰딘(thrombospondin) 등을 예로 들 수 있다.

이들 중 엔도스타틴은 혈관내피세포의 증식, 이동, 침투, 튜브형성 등을 저해하는 내생 단백질로서, 타입 18 콜라겐(collagen) 유래의 분자량

20 kDa의 폴리펩티드다. 엔도스타틴은 엘라스타제(elastase), 카텡신(cathepsin) 등과 같은 효소에 의해 콜라겐에 존재하는 프로테아제-민감성 경첩부위(protease-sensitive hinge region) 내에서 절단되어 콜라겐으로부터 방출되고 혈액 내에서 20~35 ng/ml의 농도로 순환한다. 엔도스타틴은 하나의
5 특정한 인테그린에 결합하여 FAK(focal adhesion kinase)의 인산화를 저해한다. 인테그린에 결합한 엔도스타틴에 의해 FAK 인산화가 저해되면 그 하류의 MAP 키나아제 경로가 차단되어 ERK1과 p38 MAP 키나아제 경로의 저해를 초래한다. 이러한 저해작용이 혈관내피세포의 이동을 차단한다.

최근 Wnt 신호전달 경로(Wnt signalling pathway)의 잠정적인 억제인
10 자로서 엔도스타틴의 기능을 설명하기 위해 또 다른 가설이 제기되고 있다(Hanai *et al.*, *JCB* 158:529, 2002). Wnt 신호전달은 세포의 증식, 분화, 운동성 및 형태형성(morphogenesis)의 조절에 중요하다. 엔도스타틴은 새로운 GSK3-비의존성 기작(GSK3-independent mechanism)을 경유하여 β -카테닌(β -catenin) 안정성을 조절함으로써 Wnt 신호전달 경로를 제어한다. Wnt 신호
15 전달 경로에서 엔도스타틴의 이러한 효과는 혈관내피세포의 이동을 억제하고 혈관형성 억제활성과 관련된 세포주기의 S기로의 진입을 초래한다. 이처럼 암조직에 직접적으로 영향을 미치지 보다는 새로운 혈관형성을 억제하여 암조직 내로의 혈액 공급을 차단함으로써 암조직에 간접적으로 영향을 미치는 엔도스타틴은 항암제 개발시장에 매력적인 표적이 되고 있다.

20 이에 인간을 대상으로 혈관형성 억제인자인 엔도스타틴을 이용하여 암을 치료하고자 하는 많은 임상적인 시도가 있었으나, 그 중 어떠한 경우도 유용한 긍정적인 결과를 달성하지 못하였다. 생체 내에서 엔도스타틴의 약물동태와 약효에 큰 영향을 미치는 약물투여 방법 등이 엔도스타틴을 이용한 임상실험의 성공을 방해하는 요인으로 간주되고 있다.

25 이전 연구결과에 따르면, 엔도스타틴이 생체 내에서 활성을 나타내기 위해서는: 1) 세균 발현시스템으로부터 수용성화된 형태로 발현되고; 2) 다량으로 정제될 수 있어야 하며; 3) 주입도구를 통해서 실험동물에 직접 주입될 수 있어야 하고; 4) 비연속 직접 주입법(non-continues direct injection)으로 생체 내에서 상당히 높은 농도로 유지될 수

있어야 한다. 이러한 요건들이 충족될 때 엔도스타틴은 암조직 내에서 혈관형성을 억제함으로써 암세포의 세포사멸을 유도하는데 결정적인 작용을 할 수 있다.

한편, 합성화합물 또는 천연물의 작은 분자들(*small molecules*)은 세포
 5 내로 전달될 수 있으나, 단백질, 펩티드, 핵산 같은 거대분자들(*macromolecules*)은 세포 내로 전달될 수 없다. 이들은 분자량 500 이상의 거대분자로 살아있는 세포의 원형질막(*plasma membrane*), 즉 이중 지질막 구조(*lipid bilayer structure*)를 통과할 수 없음이 널리 알려져 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로 "거대분자 세포 내
 10 전달기술(Macromolecule Intracellular Transduction Technology: MITT)"이 개발되었는데(*Jo et al., Nat. Biotech.* 19: 929-33, 2001), 이는 질병 치료성 거대분자의 생체 내 전달을 가능케 함으로써 기존의 의약품 개발 기술로는 불가능했던 펩티드, 단백질, 유전자 자체 등으로 바이오 신약물의 개발을 가능하게 한다. 이 기술에 따르면, 거대분자들은 "소수성 거대분자 전달
 15 도메인(Macromolecule Transduction Domain, MTD)"과 다른 여러 가지 세포 내 운반체들과 융합되어 재조합 단백질 형태로 합성 또는 발현, 정제되고 세포 내로 전달된 후, 특정 위치로 정확하고 빠르게 운반되어 필요한 여러 가지 역할을 효과적으로 발휘할 수 있다(*US Provisional Patent Application No.* 60/877,060, *PCT International Publication No.* WO 2008/093982). 이처럼
 20 거대분자 전달 도메인(MTD)은 펩티드, 단백질, DNA, RNA, 합성화합물 등과 융합되어 세포 내로 들어갈 수 없는 많은 불투과성 물질들의 전달을 가능케 한다.

이에 본 발명자들은 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 거대분자 전달 도메인을 융합시켜 세포투과성을 부여한 엔도스타틴 재조합 단백질(*CP-endostatin*)을 제조하고 이 재조합 단백질이 시험관 내 및 생체 내에서 모두
 25 세포 외부로부터 대량의 혈관형성 억제인자 엔도스타틴을 세포 내로 효과적으로 전달하여 미세혈관의 형성을 억제함으로써 인간의 다양한 암 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

따라서 본 발명의 목적은 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 세포투과성을 부여하여 이를 세포 내로 고효율로 도입함으로써 인간의 다양한 암을 치료할 수 있는 항암제로서 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 혈관형성 억제인자 엔도스타틴과 거대분자 전달 도메인(macromolecule transduction domain, MTD)의 융합으로 세포투과성이 부여되어 엔도스타틴을 세포 내로 고효율로 도입하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

아울러 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 및 이 발현벡터로 형질전환된 형질전환 세균을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 형질전환 세균을 배양하는 것을 포함하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 생산방법을 제공한다.

마지막으로 본 발명은 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 혈관형성 억제활성이 강화된 항암제용 약학 조성물을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명에 따른 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질은 혈관 형성 억제인자 엔도스타틴을 세포 내로 고효율로 도입하여 종양 조직 내에 존재하는 혈관내피세포 내외에서 엔도스타틴을 고농도로 유지시켜 혈관내피세포의 이동, 증식, 침투 및 튜브 형성을 효과적으로 억제하고 신생 미세혈관의 형성을 강력히 차단하여 우수한 항암 활성을 나타내므로, 다양한 암에 대한 항암제로서 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 는 본 발명에 따라 전장 형태로 고안된 JO-56 및 JO-73 MTDs 가 각각 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질의 구조를 나타낸 것이고,

5 도 1b 는 본 발명에 따라 전장 형태로 고안된 JO-66, JO-71, JO-85, JO-18, JO-41, JO-135 및 JO-159 MTDs 가 각각 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질의 구조를 나타낸 것이고,

 도 2a 는 본 발명에 따라 전장 형태로 고안된 JO-56 및 JO-73 MTDs 가 각각 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질을 PCR 로
10 증폭한 결과이고,

 도 2b 는 본 발명에 따라 전장 형태로 고안된 JO-66, JO-71, JO-85, JO-18, JO-41, JO-135 및 JO-159 MTDs 가 각각 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질을 PCR 로 증폭한 결과이고,

 도 3a 는 pGEM-T Easy 벡터에 PCR 증폭산물을 서브클로닝
15 (subcloning)하는 과정을 나타낸 모식도이고,

 도 3b 및 3c 는 각각 본 발명에 따라 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질의 PCR 증폭산물이 pGEM-T Easy 벡터에 서브클로닝되었음을 나타낸 것이고,

 도 4a 는 본 발명에 따라 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단편을
20 pET-28a(+) 벡터에 클로닝하여 재조합 발현벡터를 제작하는 과정을 나타낸 모식도이고,

 도 4b 및 4c 는 각각 본 발명에 따라 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단편이 pET-28a(+) 벡터에 클로닝되었음을 나타낸 것이고,

 도 5a 는 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의
25 발현을 다양한 숙주세포를 대상으로 조사한 결과이고,

 도 5b 는 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 발현을 단백질 발현 유도제인 IPTG 의 존재(+) 또는 부재(-) 하에서 조사한 결과이고,

도 6 은 각각 본 발명의 재조합 발현벡터가 형질전환된 세균으로부터 발현된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 정제한 결과이고,

도 7a 및 7b 는 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포투과성을 유세포 분석기(flow cytometry)로 분석한 결과이고,

도 8 은 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포투과성을 마우스 섬유아세포에서 동초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy)으로 관찰한 결과이고,

도 9 는 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포투과성을 다양한 마우스 조직에서 동초점 레이저 주사 현미경으로 관찰한 결과이고,

도 10 은 각각 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포 내 기능을 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 분석한 결과이고,

도 11 은 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 인간 혈관내피세포에 대한 이동 억제효과를 상처 치유(wound healing) 분석으로 조사한 결과이고,

도 12a 및 12b 는 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 인간 혈관내피세포에 대한 증식 억제효과를 일정시간 경과 후 세포수를 측정하여 조사한 결과이고,

도 13a 및 13b 는 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 인간 혈관내피세포에 대한 튜브 형성(tube formation) 억제효과를 조사한 결과이고,

도 14a 및 14b 는 각각 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 종양이 형성된 마우스에 피하 주사로 21 일간 처리하면서 매일 종양 크기와 몸무게의 변화를 측정한 결과이고,

도 15 는 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질이 피하 주사로 투여된 마우스의 종양 조직에서 혈관형성 억제정도를 면역조직화학적(Immunohistochemistry) 염색으로 관찰한 결과이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

본 발명은 혈관형성 억제인자 엔도스타틴과 거대분자 전달 도메인(MTD)의 융합으로 세포투과성이 부여되어 엔도스타틴을 세포 내로 고효율로 도입하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(CP-엔도스타틴) 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본 발명의 특징은 거대분자 세포 내 전달기술(MITT)을 이용하여 세포 내로의 도입이 용이하지 않은 거대분자인 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 특정한 거대분자 전달 도메인(이하, "MTD" 로 약칭함)을 융합시켜 세포투과성을 부여함으로써 엔도스타틴을 세포 내로 고효율로 전달하는 것이다. 이때 거대분자 전달 도메인은 엔도스타틴의 한쪽 말단에만 융합되거나, 또는 그의 양쪽 말단 모두에 융합될 수 있다. 분비 단백질(secreted protein) 유래 소수성 펩티드인 MTD 를 이용한 세포 내 전달기술은 생체 내 엔도스타틴 농도의 실시간 정량적 조절(real-time quantitative regulation)을 가능케 하여 엔도스타틴의 암조직으로의 전달을 매개하고 개개의 암세포 내로 분포될 수 있게 만든다. 이러한 효과는 암조직 내에 존재하는 혈관내피세포 내외에서 엔도스타틴을 고농도로 유지시켜 혈관내피세포 표면에 존재하는 특이적 수용체인 인테그린 $\alpha 5 \beta 1$ 에 대한 엔도스타틴의 결합을 효과적으로 유도할 수 있다. 이로 인해 종양 조직 내에서 혈관내피세포의 이동, 증식, 침투 및 튜브 형성이 효과적으로 억제되고 신생 미세혈관의 형성이 강력히 차단되어 암 치료에 유리한 환경을 제공할 있다.

본 발명에서는 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 융합될 수 있는 거대분자 전달 도메인(MTD)으로서 세포 내로 거대분자의 전달을 가능케 하는 펩티드 도메인에 상기 엔도스타틴을 융합하여 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질을 개발하였다.

본 발명에서 "세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질" 이란 거대분자 전달 도메인과 혈관형성 억제인자 엔도스타틴을 포함하며, 이들의 유전적 융합이나 화학적 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 여기서

"유전적 융합" 이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형의 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

혈관내피세포의 표면에 존재하는 특이 인테그린($\alpha 5\beta 1$)에 결합하여 혈관내피세포의 이동, 증식, 침투, 튜브 형성 등을 저해하는 엔도스타틴은
5 서열번호: 1 의 염기서열 및 서열번호: 2 의 아미노산 서열을 갖는 신생 혈관형성 억제 단백질로 작용한다.

혈관형성 억제인자 엔도스타틴은 서열번호: 2 의 아미노산 서열을 갖는 분자량 20 kDa 의 폴리펩티드로서, 엘라스타제, 카텡신 등의 효소 처리에 의해 절단된 타입 18 콜라겐의 C-말단 도메인이다(도 1a 참조).

10 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 융합될 수 있는 거대분자 전달 도메인으로는 서열번호: 3 내지 11 로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 세포투과성을 갖는 폴리펩티드가 사용될 수 있다. 상기 서열번호: 3 내지 11 로 기재되는
15 아미노산 서열 중의 어느 하나를 포함하는 거대분자 전달 도메인은 세포막을 관통하여 폴리펩티드, 단백질 도메인, 또는 전장 단백질을 포함하는 생물학적 활성 분자의 세포 내로의 유입을 매개할 수 있는 세포투과성 폴리펩티드다. 본 발명에 따른 거대분자 전달 도메인은 N-말단 영역, 소수성 영역 및 C-말단의 분비 단백질 전달 부위(secreted protein cleavage site)의 3 부분으로 이루어진 시그널 펩티드(signal peptides)에서
20 헬릭스(helix)를 형성해 세포막 표적(targeting) 활성을 부여하는 소수성 영역을 갖도록 고안된 것이다. 이러한 거대분자 전달 도메인은 세포에 손상을 주지 않으면서 직접 세포막을 관통함으로써 표적 단백질을 세포 내로 이동시켜 목적하는 기능을 발휘하게 할 수 있다.

본 발명에 따라 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 융합될 수 있는
25 서열번호: 3 내지 11 로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 거대분자 전달 도메인을 하기 표 1 에 나타내었다.

【표 1】

MTD	기원	아미노산 서열	서열목록
-----	----	---------	------

JO-18	CAB38593 putative secreted protein [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	Ala Ala Leu Ala Leu Gly Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala	3
JO-41	NP_626993 secreted protein [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	Ala Ala Ala Leu Leu Ala Val Ala	4
JO-56	P23284 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin B)	Val Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ile Ala	5
JO-66	NP_626568 secreted protein [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ile Ala Val Ile	6
JO-71	P97300 Neuroplastin precursor (Stromal cell-derived receptor 1) (SDR-1)	Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Pro	7
JO-73	AAA17887 <i>Drosophila melanogaster</i> spatzle (spz) gene	Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Pro	8
JO-85	NP_629842 peptide transport system secreted peptide binding protein [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ala	9
JO-135	NP_733682 secreted ATP/GTP binding protein [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Ala Ala Pro	10
JO-159	P24327 Foldase protein prsA precursor.	Ile Ala Ile Ala Ala Ile Pro Ala Ile Leu Ala Leu	11

본 발명의 바람직한 실시양태에서는, 혈관형성 억제인자 엔도스타틴에 융합될 수 있는 거대분자 전달 도메인으로서

사이클로필린 B(Cyclophilin B) 단백질 유래 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 B 전구체(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor)인
5 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 JO-56 MTD(이하, "MTD₁"로 약칭함);

드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) 유래 스파츨 유전자(spatzle (spz) gene)인 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 JO-73 MTD(이하, "MTD₂"로 약칭함);

10 스트렙토마이세스 코엘리콜러(*Streptomyces coelicolor*) A3(2) 유래 분비 단백질(secreted protein)인 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 JO-66 MTD(이하, "MTD₃"으로 약칭함);

뉴로플라스틴 전구체(Neuroplastin precursor) 유래 서열번호: 7 의
아미노산 서열을 갖는 JO-71 MTD(이하, "MTD₄"로 약칭함);

스트렙토마이세스 코엘리콜러 유래 펩티드 전달 시스템 분비
펩티드 결합 단백질(peptide transport system secreted peptide binding protein)인
5 서열번호: 9 의 아미노산 서열을 갖는 JO-85 MTD(이하, "MTD₅"으로 약칭함);

스트렙토마이세스 코엘리콜러 A3(2) 유래 추정 분비 단백질(putative
secreted protein)인 서열번호: 3 의 아미노산 서열을 갖는 JO-18 MTD(이하,
"MTD₆"으로 약칭함);

스트렙토마이세스 코엘리콜러 유래 A3(2) 분비 단백질인 서열번호:
10 4 의 아미노산 서열을 갖는 JO-41 MTD(이하, "MTD₇"으로 약칭함);

스트렙토마이세스 코엘리콜러 A3(2) 유래 분비 ATP/GTP 결합
단백질(secreted ATP/GTP binding protein)인 서열번호: 10 의 아미노산 서열을
갖는 JO-135 MTD(이하, "MTD₈"으로 약칭함); 및

폴데이즈 단백질 prsA 전구체(Foldase protein prsA precursor)인
15 서열번호: 11 의 아미노산 서열을 갖는 JO-159 MTD(이하, "MTD₉"로 약칭함)
중의 어느 하나를 사용한다.

본 발명의 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질은
거대분자 전달 도메인으로 상기 9 종의 MTD(JO-56: MTD₁, JO-73: MTD₂, JO-
66: MTD₃, JO-71: MTD₄, JO-85: MTD₅, JO-18: MTD₆, JO-41: MTD₇, JO-135: MTD₈,
20 JO-159: MTD₉) 중의 어느 하나가 혈관형성 억제인자 엔도스타틴의 한쪽
또는 양쪽 말단에 융합되고, 이 융합 컨스트럭트의 한쪽 말단에 용이한
정제를 위해 히스티딘-표지(histidine-tag, His-Tag) 친화성 도메인이 융합되어
있는 구조를 가질 수 있다.

본 발명의 일 실시양태에서는, JO-56 MTD 를 이용한 엔도스타틴
25 재조합 단백질로서 3 개의 전장 형태(full-length forms)와 JO-73 MTD 를
이용한 엔도스타틴 재조합 단백질로서 3 개의 전장 형태를 고안한다. 또한
나머지 7 종의 MTDs 에 대해서도 각각 1 개의 전장 형태를 고안한다.

본 발명에서 용어 "전장 형태"는 타입 18 콜라겐의 C-말단 도메인으로서 서열번호: 2 로 기재되는 아미노산 서열 1 번부터 184 번까지의 아미노산 모두를 포함하는 형태를 의미한다.

도 1a 를 참고로 하면, JO-56 MTD 가 융합된 본 발명에 따른 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질은

- 1) 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HM₁E,
- 2) 그의 C-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HEM₁, 및
- 3) 그의 양 말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HM₁EM₁ 으로,

상기 모든 재조합 컨스트럭트의 N-말단에는 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있다.

상기 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질에서, HM₁E 는 서열번호: 15 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 14 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HEM₁ 은 서열번호: 17 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 16 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₁EM₁ 은 서열번호: 19 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 18 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다.

또한, JO-73 MTD 가 융합된 본 발명에 따른 다른 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질은

- 1) 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-73 MTD 가 융합된 HM₂E,
- 2) 그의 C-말단에 JO-73 MTD 가 융합된 HEM₂, 및
- 3) 그의 양 말단에 JO-73 MTD 가 융합된 HM₂EM₂ 으로,

상기 모든 재조합 컨스트럭트의 N-말단에는 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있다.

상기 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질에서, HM₂E 는 서열번호: 21 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 20 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HEM₂ 은 서열번호: 23 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 22 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₂EM₂은 서열번호: 25의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 24의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다.

본 발명의 다른 실시양태에서는, 거대분자 전달 도메인으로 JO-66 MTD, JO-71 MTD, JO-85 MTD, JO-18 MTD, JO-41 MTD, JO-135 MTD 및 JO-159 MTD를 각각 이용한 엔도스타틴 재조합 단백질로서 7개의 전장 형태를 고안한다.

도 1b를 참고로 하면, JO-66, JO-71, JO-85, JO-18, JO-41, JO-135 및 JO-159 MTDs 중의 어느 하나가 융합된 본 발명에 따른 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질은

- 1) 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-66 MTD가 융합된 HM₃E,
- 2) 그의 N-말단에 JO-71 MTD가 융합된 HM₄E,
- 3) 그의 N-말단에 JO-85 MTD가 융합된 HM₅E,
- 4) 그의 N-말단에 JO-18 MTD가 융합된 HM₆E,
- 5) 그의 N-말단에 JO-41 MTD가 융합된 HM₇E,
- 6) 그의 N-말단에 JO-135 MTD가 융합된 HM₈E, 및
- 7) 그의 N-말단에 JO-159 MTD가 융합된 HM₉E로서,

상기 모든 재조합 컨스트럭트의 N-말단에는 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있다.

상기 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질에서, HM₃E는 서열번호: 27의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 26의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₄E는 서열번호: 29의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 28의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₅E는 서열번호: 31의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 30의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₆E는 서열번호: 33의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 32의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₇E는 서열번호: 35의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 34의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₈E 는 서열번호: 37 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 36 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₉E 는 서열번호: 39 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 38 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다.

5 본 발명에서는 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 대조군으로 MTD 가 융합되지 않고 히스티틴 표지만이 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질 HE 를 제조한다. 이 대조군 단백질은 서열번호: 13 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 12 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다.

10 또한 본 발명은 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터 및 이 재조합 발현벡터로 형질전환된 형질전환 세균을 제공한다.

 본 발명에서 "재조합 발현벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA 를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 구조물을 말한다.

 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절서열과 목적하는 단백질 또는 RNA 를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA 를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 발현벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 달성될 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

25 본 발명에 사용가능한 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드(cosmid) 벡터, 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터(promoter), 오퍼레이터(operator), 개시코돈(initiation codon), 종결코돈(termination codon), 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal), 인핸서(enhancer)와 같은 발현

조절서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열(signal sequence) 또는 리더서열(leader sequence)을 포함하여 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현벡터의 프로모터는 구성적(constitutive) 또는 유도성(inducible)일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 5 선택마커(selective marker)를 포함하고, 복제가 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원(replication origin)을 포함한다.

이와 같이 제조된 본 발명의 재조합 발현벡터는 예를 들면, pHM₁E 일 수 있다. 상기 재조합 발현벡터 pHM₁E 는 pET-28a(+) 벡터(Novagen, Germany)의 다중 클로닝 부위(multi cloning site, MCS) 중 *Nde*I 10 제한효소 부위에, 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질로서 전장의 엔도스타틴의 N-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 재조합 단백질 HM₁E 를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 벡터를 의미한다.

본 발명의 일 실시양태에서는, 단백질의 정제를 용이하게 할 목적으로 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 N-말단 부위에 15 인위적으로 6 개의 히스티딘-표지(histidine-tag)를 포함시켜 발현시키기 위하여, His-Tag 서열을 가지고 있는 pET-28a(+) 벡터(Novagen, Germany)에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 클로닝한다.

상기 재조합 발현벡터로부터 발현되는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질은 전장 형태의 엔도스타틴의 한쪽 또는 양쪽 말단에 JO-56 20 MTD, JO-73 MTD, JO-66 MTD, JO-71 MTD, JO-85 MTD, JO-18 MTD, JO-41 MTD, JO-135 MTD 및 JO-159 MTD 중의 어느 하나가 융합되고 그의 N-말단 부위에 히스티딘-표지가 연결된 구조를 갖는다.

본 발명은 또한, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 형질전환 세균을 제공한다. 본 발명의 형질전환 세균은 바람직하게는 대장균일 수 25 있으며, 대장균을 본 발명의 재조합 발현벡터, 예를 들면 본 발명에 따른 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 세포투과성 재조합 단백질 HM₁E 를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 재조합 발현벡터 pHM₁E 가 형질전환된 세균을 이용함으로써 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 대량으로 발현시킬 수 있다. 형질전환은 핵산을 숙주세포에

도입하는 어떠한 방법에 의해서도 가능하며, 당업자에게 공지된 형질전환 기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격 유전자 전달법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion),
 5 미세주입법(microinjection) 및 리포솜 매개법(liposome-mediated method) 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

본 발명의 바람직한 실시양태에서는, 상기의 방법으로 제조된 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HM_1E , JO-73 MTD 가 융합된 HM_2E , JO-66 MTD 가 융합된 HM_3E 및 JO-135 MTD 가 융합된 HM_8E
 10 각각을 포함하는 재조합 발현벡터 각각으로 대장균 $\text{DH5}\alpha$ 를 형질전환시켜 수득된 대장균 형질전환체 $\text{DH5}\alpha/\text{pET-28a}(+):\text{HM}_1\text{E}$, $\text{DH5}\alpha/\text{pET-28a}(+):\text{HM}_2\text{E}$, $\text{DH5}\alpha/\text{pET-28a}(+):\text{HM}_3\text{E}$ 및 $\text{DH5}\alpha/\text{pET-28a}(+):\text{HM}_8\text{E}$ 를 2009 년 3 월 20 일자로 한국생명공학연구원 내 생물자원센터에 기탁번호 KCTC 11485BP, KCTC 11486BP, KCTC 11487BP 및 KCTC 11488BP 로 기탁하였다.

본 발명은 또한, 상기 형질전환 세균을 적절한 조건 하에서 배양하여 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 발현시키고, 발현된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 생산방법을 제공한다.

상기 생산방법은 본 발명의 형질전환 세균에 도입된 재조합
 20 발현벡터에서 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 발현되도록 형질전환 세균을 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하는 것에 의해 수행된다. 상기 형질전환 세균을 배양하여 재조합 단백질을 발현시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 형질전환 세균이 성장할 수 있는 적합한 배지에 접종하여
 25 종배양한 후, 이를 본 배양용 배지에 접종하고 적합한 조건, 예컨대 유전자 발현 유도제인 아이소프로필- β -D-티오갈락토사이드(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)의 존재 하에서 배양함으로써 단백질의 발현을 유도할 수 있다. 배양이 완료되면, 상기 배양물로부터 실질적으로 순수한 재조합 단백질을 회수할 수 있다. 본 발명에서 용어 "실질적으로 순수한"은 본

발명의 재조합 단백질 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열이 숙주세포로부터 유래된 다른 단백질을 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.

상기 형질전환 세균에서 발현된 재조합 단백질의 회수는 당업계에
 5 공지된 다양한 분리 및 정제 방법을 통해 수행할 수 있으며, 통상적으로 세포 조각(cell debris), 배양 불순물 등을 제거하기 위하여 세포 용해물을 원심분리한 후, 침전, 예를 들어, 염석(황산암모늄 침전 및 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전) 등을 수행할 수 있고, 투석, 전기영동 및 각종 칼럼 크로마토그래피 등을 수행할
 10 수 있다. 상기 크로마토그래피로는 이온교환 크로마토그래피, 젤-침투 크로마토그래피, HPLC, 역상-HPLC, 친화성 칼럼 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 병용하여 이용할 수 있다(Maniatis 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,
 15 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology* vol. 182. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990).

한편, 재조합 발현벡터로 형질전환된 세균에서 발현된 재조합 단백질은 단백질 분리 시 단백질의 특성에 따라 용해성 분획(soluble
 20 fraction)과 불용해성 분획(insoluble fraction)으로 구분될 수 있다. 발현된 단백질의 대부분이 용해성 분획에 있을 경우에는 상기에 기술된 방법에 따라 별다른 어려움 없이 단백질을 분리 및 정제할 수 있다. 그러나 발현된 단백질의 대부분이 불용해성 분획, 즉, 봉입체(inclusion body) 형태로 존재하는 경우에는, 우레아, 계면활성제 등의 단백질 변성제가 포함된
 25 용액으로 최대한 단백질을 용해시킨 후 원심분리하여 투석, 전기영동 및 각종 칼럼 크로마토그래피 등을 수행함으로써 정제할 수 있다. 이때, 단백질 변성제가 포함된 용액에 의해 단백질의 구조가 변형되어 그 활성을 잃을 수 있으므로 불용해성 분획으로부터 단백질을 정제하는 과정 중에는 탈염 및 재중첩(refolding) 단계가 필요하다. 즉, 상기 탈염 및 재중첩

단계는 단백질 변성제가 포함되지 않은 용액을 이용하여 투석 및 회석을 수행하거나 또는 필터를 이용하여 원심분리를 할 수 있다. 또한, 상기 용해성 분획으로부터 단백질을 정제하는 과정 중에도 정제 시 사용하는 용액 내의 염 농도가 높을 경우에는 이러한 탈염 및 재중첩 단계를 수행할 수 있다.

본 발명의 일 실시양태에서는, 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질이 봉입체 형태로서 불용해성 분획에 존재함을 확인하고, 불용해성 분획으로부터 이를 정제하기 위하여 불용해성 분획을 트리톤 X-100 과 같은 비이온성 계면활성제를 함유하는 완충액에 용해시킨 다음 초음파로 처리하고 원심분리하여 침전물을 수득한다. 상기 수득한 침전물을 변성제인 우레아가 포함되어 있는 용액에 용해시킨 후 원심분리하여 상층액을 수득한다. 우레아를 이용하여 불용해성 분획으로부터 최대한 용해된 본 발명의 재조합 단백질은 히스티딘-결합 정제 키트를 사용하여 정제하고, 이후 정제된 단백질은 아미콘 필터 등을 이용한 원심분리에 의해 염분의 제거 및 단백질 구조의 재중첩 과정을 수행함으로써 본 발명의 재조합 단백질을 수득할 수 있다.

아울러 본 발명은 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 혈관형성 억제활성이 강화된 항암제용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 세포투과성을 갖는 엔도스타틴 재조합 단백질의 투여는 종양 조직 내에 존재하는 혈관내피세포 내외에서 엔도스타틴의 농도를 고농도로 유지시켜 혈관내피세포의 표면에 존재하는 특이적 수용체 인테그린 $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 엔도스타틴의 결합을 효과적으로 유도하고, 그로 인해 종양 조직 내에서 미세혈관의 형성을 억제할 수 있으므로, 다양한 암에 대한 항암제로서 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 예컨대 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함한다.

경구 투여용의 경우, 본 발명에 따른 재조합 단백질은 부형제와 혼합되어
 섭취형 정제, 협축 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽 및 웨이퍼
 등의 형태로 사용될 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한
 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함하며, 안정화제 및
 5 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨,
 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한
 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및
 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의
 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 사용할 수 있다(*Remington's*
 10 *Pharmaceutical Sciences*, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

본 발명에 따른 조성물은 다양한 비경구 또는 경구 투여 형태로
 제형화될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로
 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제
 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에서 공지된 기술에 따라 제조할
 15 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜
 주사용으로 제형화할 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면
 정제, 캡셀제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토스,
 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신)와
 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염
 20 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘
 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로스,
 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를
 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과
 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수
 25 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될
 수 있다.

본 발명의 조성물은 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을
 위한 염 및/또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을
 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 조성물의 투여 경로로는 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등과 같은 비경구적으로 인간과 동물에게 투여될 수 있다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내 주사, 정맥 주사, 종양 직접 주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.

본 발명의 조성물에 있어서, 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수도 있다. 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 성인을 기준으로 1 회 투여 시 5 내지 20 mg의 유효 투여량으로 하루에 수차례 반복 투여될 수 있다. 그러나 상기 재조합 단백질의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정될 수 있다. 따라서 이러한 점을 고려할 때 당해 기술 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 재조합 단백질의 항암제로서의 특정한 용도에 따른 유효 투여량을 적절히 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

실시예 1: 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(CP-엔도스타틴)의 제조
 <1-1> JO-56 및 JO-73 MTDs 를 이용한 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 제조

JO-56 MTD(MTD₁) 및 JO-73 MTD(MTD₂)를 이용하여 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 제조하기 위하여 하기와 같이 6 개의 전장 형태를 고안하였다(도 1a).

구체적으로, JO-56 MTD(MTD₁)가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서,

- 1) 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HM₁E;
- 2) 그의 C-말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HEM₁; 및
- 3) 그의 양 말단에 JO-56 MTD 가 융합된 HM₁EM₁으로,

상기 모든 재조합 컨스트럭트의 N-말단에는 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있는 재조합 컨스트럭트를 제조하였다.

또한, JO-73 MTD(MTD₂)가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서,

- 1) 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-73 MTD 가 융합된 HM₂E;
- 2) 그의 C-말단에 JO-73 MTD 가 융합된 HEM₂; 및
- 3) 그의 양 말단에 JO-73 MTD 가 융합된 HM₂EM₂으로,

상기 모든 재조합 컨스트럭트의 N-말단에는 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있는 재조합 컨스트럭트를 제조하였다.

상기 재조합 컨스트럭트의 제조를 위해, 이들 각각에 특이적으로 고안된 프라이머 쌍과 인간 엔도스타틴 cDNA 를 주형으로 사용하는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 수행하였다. 이때 HM₁E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 42 및 41 의 염기서열을 가지고; HEM₁ 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 40 및 43 의 염기서열을 가지며; HM₁EM₁ 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 42 및 43 의 염기서열을 갖는다.

또한, HM₂E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 44 및 41 의 염기서열을 가지고; HEM₂ 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 40 및 45 의 염기서열을 가지며;

HM₂EM₂ 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 44 및 45 의 염기서열을 갖는다.

상기 PCR 반응은 주형으로 인간 엔도스타틴 cDNA 가 클로닝된 플라스미드 DNA 100 ng, 각 0.2 mM 의 최종 농도 dNTP 혼합물, 1 μM 의 각
5 프라이머, 10× Taq 완충액 5 μl, 및 Taq 중합효소(Novagen, Germany) 1 μl 를 포함하는 용액을 최종 부피 50 μl 반응액으로 하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 먼저 94°C에서 5 분간 열 변성(denaturing)시킨 후 94°C에서 30 초, 63°C에서 30 초 및 72°C에서 30 초의 반응을 30 회 반복하였고, 최종적으로 72°C에서 5 분간 증폭하였다. 반응이 끝난 후 1.0% 아가로스 겔에
10 전기영동(electrophoresis)을 수행하여 증폭된 생성물을 확인하였다.

도 2a 에 나타난 바와 같이, 각각의 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단편이 목적하는 크기로 증폭되었음을 확인하였다.

아가로스 겔에서 증폭된 재조합 단편을 회수한 후 이들 각각을 상용의 키트(QIAquick Gel extraction kit; Qiagen, USA)를 이용하여 추출,
15 정제하였다. 추출한 단편을 pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)에 삽입한 후(도 3a), 이 벡터를 대장균 DH5α 감응세포(supercompetent cell)에 형질전환시켰다. 이를 100 μg/ml 암피실린(ampicillin)이 포함된 평판 LB 배지 상에서 배양하여 형질전환된 대장균을 선별하고, 이를 다시 액체 LB 배지에서 배양한 후, 이로부터 각각의 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합
20 단편이 삽입된 pGEM-T Easy 벡터를 다량으로 수득하였다.

도 3b 는 pGEM-T Easy 벡터에 삽입된 재조합 단편을 *NdeI* 제한효소(Enzymomics, Korea)로 분리하여 아가로스 겔에 전기영동한 것으로, 이로부터 각각의 재조합 단편이 상기 벡터에 올바르게 삽입되었음을 확인하였다.

25 상기에서 각각의 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단편이 삽입된 pGEM-T Easy 벡터를 제한효소 *NdeI* 을 사용해 37°C에서 1 시간 동안 절단(digestion)하여 각각의 재조합 단편을 얻었다. 한편, 히스티딘-표지(histidine-tag)와 T7 프로모터를 가진 발현벡터 pET-28(+)*a* 벡터(Novagen, Germany)를 제한효소 *NdeI* 을 사용해 상기와 동일한 조건으로 절단하였다.

상기 재조합 단편과 절단된 pET-28a(+) 벡터를 전기영동으로 분리하여 상용의 키트(QIAquick Gel extraction kit; Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였다. 이들의 혼합물에 T4 DNA 연결효소(ligase; Takara, Japan)를 첨가하고 16°C 에서 12 시간 동안 라이게이션(ligation) 시킨 후, DH5 α 감응세포에
5 형질전환시켜 재조합 단백질 발현벡터를 수득하였다(도 4a).

도 4b 는 pET-28a(+) 벡터에 삽입된 재조합 단편을 *Nde*I 제한효소(Enzymomics, Korea)로 분리하여 아가로스 겔에 전기영동한 것으로, 이로부터 각각의 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단편이 pET-28(+)_a 벡터에 올바르게 삽입되었음을 확인하였다.

10 이렇게 수득된 재조합 단백질 발현벡터를 각각 pHM₁E, pHEM₁, pHM₁EM₁, pHM₂E, pHEM₂, 및 pHM₁EM₁ 로 명명하였고, 이들 중에서 재조합 발현벡터 pHM₁E 및 pHM₂E 로 대장균 DH5 α 를 형질전환시켜 수득된 형질전환 세균 DH5 α /pET-28a(+):HM₁E 및 DH5 α /pET-28a(+):HM₂E 를 2009 년 3 월 20 일자로 한국생명공학연구원 내 생물자원센터에 기탁번호 KCTC
15 11485BP 및 KCTC 11486BP 로 기탁하였다.

염기서열 분석 결과, 상기 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₁E 는 서열번호: 15 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 14 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HEM₁ 은 서열번호: 17 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호:
20 16 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₁EM₁ 은 서열번호: 19 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호:
18 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₂E 는 서열번호: 21 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호:
20 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

25 HEM₂ 은 서열번호: 23 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호:
22 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

HM₂EM₂ 은 서열번호: 25 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호:
24 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩됨을 확인하였다.

본 발명에서는 상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 대조군으로 MTD 가 융합되지 않고 히스티딘 표지만이 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질 HE 를 제조하였다. 이 대조군 단백질은 서열번호: 13 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 12 의 염기서열을 갖는
5 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다.

<1-2> JO-66, JO-71, JO-85, JO-18, JO-41, JO-135 및 JO-159 MTDs 를 이용한 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 제조

JO-66 (MTD₃), JO-71 (MTD₄), JO-85 (MTD₅), JO-18 (MTD₆), JO-41 (MTD₇), JO-135 (MTD₈), 및 JO-159 (MTD₉) MTD 를 이용하여 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 제조하기 위하여 각각의 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질로서,
10

- 1) 전장의 엔도스타틴 N-말단에 JO-66 MTD 가 융합된 HM₃E,
- 2) 그의 N-말단에 JO-71 MTD 가 융합된 HM₄E,
- 15 3) 그의 N-말단에 JO-85 MTD 가 융합된 HM₅E,
- 4) 그의 N-말단에 JO-18 MTD 가 융합된 HM₆E,
- 5) 그의 N-말단에 JO-41 MTD 가 융합된 HM₇E,
- 6) 그의 N-말단에 JO-135 MTD 가 융합된 HM₈E, 및
- 7) 그의 N-말단에 JO-159 MTD 가 융합된 HM₉E 로서,

20 상기 모든 재조합 컨스트럭트의 N-말단에는 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있는 재조합 컨스트럭트를 제조하였다.

상기 재조합 컨스트럭트의 제조를 위해 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 PCR 을 수행하였다. 이때 HM₃E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 46 및 41 의 염기서열을 가지고;
25 HM₄E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 47 및 41 의 염기서열을 가지고; HM₅E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 48 및 41 의 염기서열을 가지고; HM₆E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 49 및 41 의 염기서열을 가지고; HM₇E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호:

50 및 41 의 염기서열을 가지고; HM₈E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 51 및 41 염기서열을 가지며; HM₉E 의 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 서열번호: 52 및 41 의 염기서열을 가진다.

5 이로부터 증폭된 각각의 재조합 단편을 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 pGEM-T Easy 벡터에 삽입하여 서브클론(subclone)을 확보한 후, 이를 다시 pET-28(+)_a 벡터에 삽입하여 각각의 재조합 단백질 발현벡터를 획득하였다. pGEM-T Easy 벡터 및 pET-28(+)_a 벡터로의 각각의 재조합 단편의 삽입은 도 3c 및 4c 에서 확인하였다.

10 이렇게 획득된 재조합 단백질 발현벡터를 각각 pHM₃E, pHM₄E, pHM₅E, pHM₆E, pHM₇E, pHM₈E 및 pHM₉E 로 명명하였고, 이들 중에서 재조합 발현벡터 pHM₃E 및 pHM₈E 로 대장균 DH5 α 를 형질전환시켜
 15 획득된 형질전환 세균 DH5 α /pET-28a(+):HM₃E 및 DH5 α /pET-28a(+):HM₈E 를 각각 2009 년 3 월 20 일자로 한국생명공학연구원 내 생물자원센터에
 15 기탁번호 KCTC 11487BP 및 KCTC 11488BP 로 기탁하였다.

염기서열 분석 결과, 상기 JO-66 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₃E 는 서열번호: 27 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 26 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

20 상기 JO-71 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₄E 는 서열번호: 29 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 28 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

상기 JO-85 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₅E 는 서열번호: 31 의 아미노산 서열을 가지며, 이는
 25 서열번호: 30 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

상기 JO-18 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₆E 는 서열번호: 33 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 32 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

상기 JO-41 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₇E 는 서열번호: 35 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 34 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

5 상기 JO-135 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₈E 는 서열번호: 37 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 36 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되고;

10 상기 JO-159 MTD 가 융합된 전장 형태의 엔도스타틴 재조합 단백질로서, HM₉E 는 서열번호: 39 의 아미노산 서열을 가지며, 이는 서열번호: 38 의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩됨을 확인하였다.

상기 실시예 <1-1> 및 <1-2>에서 각각의 MTD 가 융합된 엔도스타틴 재조합 단편의 증폭을 위해 사용된 정방향 및 역방향 프라이머 쌍을 하기 표 2 에 정리하였다.

【표 2】

프라이머	서열번호	서열
HE-5' (36nts)	40	CCG CAT ATG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HE-3' (36nts)	41	CCG CAT ATG CTA CTT GGA GGC AGT CAT GAA GCT GTT
HM ₁ E-5' (63nts)	42	CCG CAT ATG GTG CTG CTG GCG GCG GCG CTG ATT GCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HEM ₁ -3' (63nts)	43	CCG CAT ATG CTA CGC AAT CAG CGC CGC CGC CAG CAG CAC CTT GGA GGC AGT CAT GAA GCT GTT
HM ₂ E-5' (60nts)	44	CCG CAT ATG CCG GTG CTG CTG CTG CTG GCG CCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HEM ₂ -3' (60nts)	45	CCG CAT ATG CTA CGG CGC CAG CAG CAG CAG CAC CGG CTT GGA GGC AGT CAT GAA GCT GTT
HM ₃ E-5' (66nts)	46	CCG CAT ATG GCG GCG GCG CTG GCG GCG ATT GCG GTG ATT CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HM ₄ E-5' (63nts)	47	CCG CAT ATG GCG CTG GCG CTG CTG CTG CTG GTG CCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG

HM ₅ E-5' (69nts)	48	CCG CAT ATG CTG CTG GCG GCG GCG GCG GCG CTG CTG CTG GCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HM ₆ E-5' (84nts)	49	CCG CAT ATG GCG GCG CTG GCG CTG GGC GTG GCG GCG GCG CCG GCG GCG GCG CCG GCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCGGTG
HM ₇ E-5' (60nts)	50	CCG CAT ATG GCG GCG GCG CTG CTG GCG GTG GCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HM ₈ E-5' (66nts)	51	CCG CAT ATG GCG GCG GTG GCG CTG CCG GCG GCG GCG CCG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG
HM ₉ E-5' (72nts)	52	CCG CAT ATG ATT GCG ATT GCG GCG ATT CCG GCG ATT CTG GCG CTG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG

실시에 2: 재조합 단백질의 발현

<2-1> 최적의 숙주균주 선발

세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 발현유도에 가장 적합한
 5 숙주균주를 선발하기 위하여, *LacI* 프로모터를 갖는 대장균 BL21(DE3),
 BL21 Gold(DE3), BL21 CodonPlus(DE3) 및 BL21 Gold(DE3) pLysS(Stratagene,
 USA)를 대상으로 하기 실험을 수행하였다.

먼저, 상기 실시예 <1-1>에서 제조된 재조합 발현벡터 pHM₁E,
 pHEM₁, pHM₁EM₁, pHM₂E, pHEM₂ 및 pHE(대조군) 각각을 상기 대장균 균주
 10 BL21(DE3), BL21 Gold(DE3), BL21 CodonPlus(DE3) 및 BL21 Gold(DE3) pLysS
 각각에 열 충격(heat shock) 방법으로 형질전환시킨 후 50 µg/ml의
 카나마이신이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. 이후 재조합 단백질
 유전자가 도입된 대장균을 1 ml LB 배지에 접종하고 37°C에서 밤새도록
 배양한 후, 이를 다시 100 ml LB 배지에 접종하고 37°C에서 OD₆₀₀이 0.6에
 15 도달할 때까지 배양하였다. 상기 배양액에 단백질 발현의 유도체로서 0.7
 mM 의 아이소프로필-β-D-티오갈락토사이드(isopropyl-β-D-thiogalactoside,
 IPTG)를 첨가하고 37°C 에서 3 시간 동안 추가로 배양하였다. 이로부터
 배양액 1 ml을 채취하여 상온에서 분당 회전수 13,000 rpm 으로 1 분간
 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 시료
 20 로우딩 완충액(2× sample loading buffer: 125 mM Tris-HCl, 20 % 글리세롤, 2 %

β-머캅토에탄올, 0.04% 브로모페놀 블루, 4% SDS, pH 6.8)에 현탁한 후 100℃에서 5 분간 끓여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄물을 분당 회전수 13,000 rpm 으로 1 분간 원심분리하여 용해성 분획과 불용해성 분획을 분리, 회수하였다. 이로부터 분리된 용해성 분획과 불용해성 분획 각각을 SDS-PAGE 에 걸어 단백질 발현 특성과 발현량 정도를 분석하였다.

도 5a 에 나타난 바와 같이, 다양한 숙주균주를 대상으로 본 발명의 재조합 단백질의 발현을 조사한 결과, BL21 CodonPlus(DE3) 균주에서 가장 높은 발현량이 확인되어 이를 재조합 단백질의 발현을 위한 최적의 균주로 선택하였다.

10

<2-2> 재조합 단백질의 발현 유도

상기 실시예 <2-1>에서 최적의 균주로 확인된 대장균 BL21 CodonPlus(DE3)에 상기 실시예 <1-2>에서 제조된 재조합 발현벡터 pHM₃E, pHM₄E, pHM₅E, pHM₆E, pHM₇E, pHM₈E 및 pHM₉E 각각을 열 충격 방법으로 형질전환시킨 후 50 μg/ml의 카나마이신이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. 이후 재조합 단백질 유전자가 도입된 대장균을 1 ml LB 배지에 접종하고 37℃에서 밤새도록 배양한 후, 이를 다시 100 ml LB 배지에 접종하고 37℃에서 OD₆₀₀ 이 0.6 에 도달할 때까지 배양하였다. 상기 배양액에 단백질 발현의 유도제로서 0.7 mM 의 IPTG 를 첨가하거나(+) 첨가하지 않고(-) 37℃에서 3 시간 동안 추가로 배양하였다. 이로부터 배양액 1 ml을 채취하여 상온에서 분당 회전수 13,000 rpm 으로 1 분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 2× 시료 로우딩 완충액(125 mM Tris-HCl, 20 % 글리세롤, 2 % β-머캅토에탄올, 0.04% 브로모페놀 블루, 4% SDS, pH 6.8)에 현탁한 후 100℃에서 5 분간 끓여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄물을 분당 회전수 13,000 rpm 으로 1 분간 원심분리하여 용해성 분획과 불용해성 분획을 분리, 회수하였다. 이로부터 분리된 용해성 분획과 불용해성 분획 각각을 SDS-PAGE 에 걸어 단백질 발현 특성과 발현량 정도를 분석하였다.

25

도 5b 에 나타난 바와 같이, 약 21 kDa 의 크기를 갖는 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질은 봉입체 형태로 대부분 불용해성 분획에 포함되어 있으며, IPTG 무처리 배양액(-)에 비해 IPTG 처리 배양액(+)에서 목적 단백질의 발현이 현저히 증가됨을 확인하였다.

5

실시예 3: 재조합 단백질의 정제

본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질은 봉입체 형태로 불용해성 분획에 존재하므로 이를 정제하기 위하여 강력한 변성제로서 8 M 우레아(urea)를 이용하였다.

10 먼저, 본 발명의 재조합 발현벡터 pHE(대조군), pHM₁E, pHEM₁, pHM₁EM₁, 및 pHM₂E 각각으로 형질전환된 BL21 CodonPlus(DE3) 균주를 상기 실시예 2 에서와 같이 1 L 의 LB 배지에 배양하였다. 각각의 배양액을 원심분리하여 수득한 균체를 20 ml의 용해 완충액(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 우레아, pH 8.0)에 기포가 생기지 않도록

15 주의하면서 현탁하고, 이를 마이크로팁(microtip)이 장착된 초음파 균질기를 이용하여 저온에서 균체를 파쇄하였다. 이때, 처리시간은 장치의 출력을 최대출력의 28%로 설정하고, 15 분간 30 초 처리 후 10 초 방치를 반복하였다. 충분히 용균된 봉입체를 4°C에서 분당 회전수 8,000 × g 로 10 분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 회수하였다.

20 회수된 상층액을 니트릴로트리아세트산 아가로스(nitrilotriacetic acid agarose)에 Ni 를 부여한 Ni-NTA 아가로스 레진에 로우딩하였다. 이때 Ni-NTA 아가로스는 미리 용해 완충액으로 여러 번 세척하여 평형화시킨 후 사용하였다. 상층액을 4°C에서 1 시간 이상 진탕기로 천천히 교반하면서 레진에 흡착시켰다. 재조합 단백질이 포함된 봉입체가 흡착된 레진을 4°C

25 의 분당 회전수 1,000 rpm 에서 5 분간 원심분리하여 반응액을 제거하였고, 비특이적 흡착 물질을 제거하기 위해 레진을 세척 완충액(washing buffer: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 우레아, pH 6.3)을 이용하여 5 회 세척하였다. 세척된 레진에 pH 4.0 의 산성 조건에서 레진 용적 2 배의 용출 완충액(elution buffer: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 우레아,

500 mM 이미다졸, pH 4.5)을 로우딩하고 진탕기에서 1 시간 동안 교반하여 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질의 순도를 검정하기 위하여 12% SDS-PAGE 겔에서 전기영동을 수행한 후 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루 R250(coomassie brilliant blue R250)으로 가볍게 진탕하면서 염색하고, 목적

5 단백질의 밴드가 명확해질 때까지 탈색액을 이용하여 탈색하였다.

그 결과, 도 6 에 나타난 바와 같이, 마커 단백질의 영동 위치와 비교하여 JO-56 MTD 및 JO-73 MTD 가 각각 융합된 모든 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질이 약 21 kDa 부위에서 단일 밴드로 검출되어 불용해성 분획으로부터 순수하게 정제되었음을 확인하였다.

10

실시예 4: 단백질의 활성 재생 및 형광 염색

상기 실시예 3 에서와 같이 불용해성 분획으로부터 정제된 본 발명의 재조합 단백질은 강력한 변성제인 8 M 우레아에 의해 변성되었기 때문에 이를 활성 형태로 전환시키기 위하여 하기와 같이 재중첩 과정을

15 수행하였다.

먼저, 정제된 재조합 단백질을 재중첩 완충액(refolding buffer: 0.55 M 구아니딘[Guanidine] HCl, 0.44 M L-아르기닌, 50 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM NDSB, 2 mM 산화형 글루타치온[glutathione oxidized] 및 0.2 mM 환원형 글루타치온[glutathione reduced])을 이용하여 4°C에서 48 시간

20 동안 투석하여 변성제를 제거함으로써 재조합 단백질이 재활성, 즉 재중첩되도록 하였다. 이후 활성화된 재조합 단백질을 세포 배양용 배지인 RPMI 1640(Invitrogen, USA)과 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)를 7:3 으로 혼합하고 여기에 엔도스타틴 단백질의 응집현상을 막기 위해서 5% 글리세롤(glycerol)과 0.1% CHAPS(Biosesang, Korea)를 혼합한 용액에서

25 투석막(Snakeskin pleated, PIERCE)을 사용하여 4°C에서 9 시간 동안 교반하였다. 이때 3 시간 마다 용기 내 혼합액을 새것으로 교환해 주었다.

이로부터 수득된 활성형의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질은 이후 세포투과성의 효과를 보다 뚜렷하게 확인하기 위하여 FITC(fluorescein -5-isothiocyanate, Molecular Probe)를 이용하여 형광을 표지하였다. 2 내지 20

mg의 재조합 단백질에 대해 333 mg/ml 농도의 FITC 1 μ l를 사용하며, 빛을 피해 상온에서 1 시간 동안 진탕하면서 결합시켰다. 형광으로 표지된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질은 4°C 에서 1 일간 DMEM 배지에 대해 투석하여 표지되지 않은 FITC 를 제거하였고, 이로부터 회수된 재조합 단백질은 브래드포드(Bradford) 단백질 정량법으로 그 농도를 분석하였다. 그 결과 각각의 재조합 단백질의 농도는 약 1 μ g/ μ l로 측정되었다.

실시예 5: 세포투과성 실험

10 <5-1> 유세포 분석(flow cytometry)

세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포투과성을 검증하기 위하여, 10 μ M 농도의 각 단백질을 마우스의 대식세포에서 유래된 RAW 264.7 세포(Korean Cell Line Bank, Korea)에 처리하고, 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 이때, RAW 264.7 세포는 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS) 및 5% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) 500 mg/ml을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양이 종결된 후, 단백질이 처리된 RAW 264.7 세포의 세포막에 노출되어 있는 유리 FITC 를 제거하기 위해 트립신/EDTA(T/E)를 처리하고, 저온의 PBS 로 3 회 세척한 후 FACS Calibur(Beckton-Dickinson)의 셀퀘스트 프로 소프트웨어(CellQuest Pro Software) 프로그램을 이용하여 유세포 분석을 수행하였다.

그 결과, 도 7a 및 7b 에 나타난 바와 같이, JO-56 MTD(MTD₁)가 N-말단 및 C-말단에 각각 융합된 엔도스타틴 재조합 단백질(HM₁E, HEM₁)의 경우에는, MTD 가 융합되지 않은 대조군에 비해 높은 세포투과성을 보였으며, N-말단과 C-말단 모두에 JO-56 MTD 가 융합된 HM₁EM₁ 은 대조군에 비해 거의 세포투과성을 보이지 않았다. JO-73 MTD(MTD₂)가 N-말단에 융합된 HM₂E 의 경우에는, MTD 가 융합되지 않은 대조군에 비해 보다 더 높은 수준으로 세포투과성을 나타내었다. 도 7a 및 7b 에서 회색의 곡면은 세포 단독, 검은색 곡선은 FITC 단독, 파랑색 곡선은 MTD 가 융합되지 않은 HE, 보라색 곡선은 MTD₁ 이 N-말단에 융합된

HM₁E, 초록색 곡선은 상기 MTD 가 C-말단에 융합된 HEM₁, 갈색 곡선은 상기 MTD 가 양 말단에 융합된 HM₁EM₁, 빨강색 곡선은 MTD₂ 가 N-말단에 융합된 HM₂E 를 나타낸다.

5 <5-2> 동초점 레이저 주사 현미경 관찰 I

상기 실시예 <5-1>에서 유세포 분석으로 1 차적으로 세포투과성이 확인된 본 발명의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 MTD 가 융합되지 않은 엔도스타틴 대조군 단백질과 함께 마우스의 섬유아세포에서 유래한 NIH3T3 세포(Korean Cell Line Bank, Korea)에 10 μ M 의 농도로
 10 처리하고 37°C에서 1 시간 동안 배양한 후 동초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy)으로 관찰하였다. 사용된 NIH3T3 세포는 배지 총량의 10% FBS 와 5% 페니실린/스트렙토마이신 500 mg/ml을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였으며, 재조합 단백질의 형광표지를 보존하기 위해 10 μ l의 증첩 배지(mounting medium)를 슬라이드 위에
 15 점적한 후 15 분 후에 관찰하였다. 상기 재조합 단백질이 처리된 세포는 MTD 의 세포 내 전달부위의 구별이 용이하도록 핵을 염색하는 PI(propidium iodide) 염색을 통해 핵으로의 전달 및 세포투과성 여부를 확인하였으며, 동초점 레이저 주사 현미경은 노르마스키 필터(normaski filter)를 이용하여 세포의 원형, FITC 형광 및 PI 형광을 관찰하였다.

20 그 결과, 도 8 에 나타난 바와 같이, 유세포 분석의 상대적 세포투과성 결과에 비례하여 뚜렷한 FITC 형광(연두색) 및 PI(붉은색)로 염색된 핵 내로의 단백질 전달이 관찰되었으며, 이와 같이 단백질의 세포 내 투과 여부를 직접 확인함으로써 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포투과성이 다시 입증되었다.

25

<5-3> 동초점 레이저 주사 현미경 관찰 II

상기 실시예 <5-2>에서 배양된 세포를 대상으로 세포투과성이 확인된 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질이 조직

상태에서도 세포투과성을 나타내는지 여부를 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

이를 위해 주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC)에 대한 돌연변이로 면역력이 결핍된 7 주령의 누드마우스(Balb/c nu/nu mice, Central Lab. Animal Inc., Korea)를 실험 동물로 사용하였다. 상기 마우스의 오른쪽 다리에 인간 결장암 세포주(human colon cancer cell line)인 HCT-116 세포(Korean Cell Line Bank, Korea)를 1×10^7 cells/ml의 농도로 주사기(omnican, Germany, B.BRAUN)를 사용하여 피하 주사(subcutaneous injection)하여 종양 형성을 유도하였다. 한편, JO-56 MTD(MTD₁)가 엔도스타틴의 N-말단에 융합된 HM₁E, 그의 C-말단에 융합된 HEM₁, 및 그의 양말단에 융합된 HM₁EM₁, 및 JO-73 MTD(MTD₂)가 엔도스타틴의 N-말단에 융합된 HM₂E, 및 MTD 가 융합되지 않은 HE(대조군)에 FITC 를 이용하여 형광을 표지하였다. 종양이 형성된 마우스에 FITC 로 표지된 상기 재조합 단백질 각각을 300 μ g씩 복강 주사(intraperitoneal injection)하였다. 2 시간 후 각 그룹 마우스를 희생시키고 이로부터 간, 신장, 비장, 폐, 심장, 뇌 및 종양 조직을 적출하였다. 적출된 조직을 OCT 화합물로 봉입하고 냉동시킨 후 마이크로톰(microtome)을 이용하여 두께 14 μ m로 박절하였다. 조직 절편을 슬라이드 위에 놓고 동초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였다. 이때, 재조합 단백질의 형광표지를 보존하기 위하여 10 μ l의 중첩 배지(mounting medium)를 슬라이드 위에 점적한 후 15 분 후에 관찰하였다.

그 결과, 도 9 에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 <5-1>에서 확인된 유세포의 상대적 세포투과성 결과에 비례하여 모든 조직에서 뚜렷한 FITC 형광(연두색)으로 염색된 핵 내로의 단백질 전달이 관찰되었다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질은 세포투과성이 우수하여 목적하는 엔도스타틴 단백질을 효과적으로 조직 내에 전달할 수 있음을 알 수 있다.

실시예 6: 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포 내 기능

<5-1> 웨스턴 블롯팅

세포투과성이 입증된 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포 내 기능을 확인하기 위하여 하기와 같이 웨스턴 블롯팅(western blotting) 분석을 수행하였다.

먼저 인간 혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)(Bio4You, Korea)를 M199 배지(L-글루타민 300 mg/L, 2.2 g/L NaHCO₃, 25 mM HEPES, 10 unit/ml 헤파린, 20 ng/ml bFGF, 열 불활성화 우태아 혈청 20%, 스트렙토마이신/페니실린 1%)에 접종하고, 2% 젤라틴이 도말된 배양 접시를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

6-웰 플레이트에 한 웰당 2 ml의 M199 배지를 첨가하고 여기에 상기에서 배양된 HUVEC를 접종하여 37°C에서 1일간 배양한 후, 세포주기를 동일하게 만들기 위해 다시 1일간 혈청이 없는 조건에서 배양하였다. 배지를 제거한 후 HUVEC를 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질 HM₁E, HEM₁, HM₁EM₁, HM₂E와 대조군 단백질 HE를 각각 10 μM과 15 μM 농도로 4시간 동안 처리하였다. 단백질을 제거한 후 HUVEC를 PBS로 세척하고 8시간 동안 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양된 HUVEC를 100 μl의 용해 완충액(20 mM HEPES, pH 7.2, 1% 트리톤-X100, 10% 글리세롤)을 이용하여 얼음에서 30분간 용해(lysis)시키고 이로부터 수득된 세포 용해물(cell lysate)을 4°C에서 분당 회전수 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 이로부터 상층액을 제거하고 브래드포드 단백질 정량법으로 용해물 용액에 들어있는 단백질을 정량하였으며, 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

웨스턴 블롯팅 분석을 위하여, 항-β-카데닌 항체(anti-β-catenin antibody, 92 kDa, Santa Cruze Biotechnology, Germany), 항-c-Myc 항체(anti-c-Myc antibody, 67 kDa, Santa Cruze Biotechnology, Germany), 항-사이클린 D1 항체(anti-cyclin D1 antibody, 37 kDa, Santa Cruze Biotechnology, Germany), 항-STAT3 항체(anti-STAT3 antibody, 79 kDa, Santa Cruze Biotechnology, Germany), 항-VEGF 항체(anti-VEGF antibody, 45 kDa, Santa Cruze Biotechnology, Germany), 항-포스포-ERK1/2 항체(anti-phospho-ERK1/2 antibody, Thr 185/202, 44.42 kDa,

Abcam Cambridge, USA), 및 항-포스포-MEK1/2 항체(anti-phospho-MEK1/2 antibody, Ser 217/221, 45 kDa, Cell Signaling, Boston, USA)를 일차항체로 사용하였고, 염소 항-마우스 IgG-HRP(goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Germany) 및 염소 항-토끼 IgG-HRP(goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Germany)를 이차항체로 사용하였다. 상기에서 정량된 세포 용해물을 SDS-PAGE 겔에서 100 V로 전기영동을 수행한 후, PVDF 막으로 100 V에서 1시간 동안 전사시켰다. 전사시킨 막은 항체와의 비특이적 흡착을 방지하기 위해 TBS-T 완충액(10 mM 트리스-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% 트윈 20)에 용해시킨 5%(w/v) 분유(powdered milk)로 1시간 동안 블로킹(blocking) 처리를 한 후, 상기 일차항체 각각을 첨가하고 4°C에서 1일간 반응시켰다. 이 후 PVDF 막을 TBS-T 완충액으로 3회 세척한 후 이차항체를 첨가하여 실온에서 1시간 정도 반응시켰다. 이후 PVDF 막을 TBS-T 완충액으로 3회 세척하였고, 화학발광 검출용 ECL(enhanced chemiluminescence, GE Healthcare Amersham UK) 시약을 이용하여 항원을 검출하고 분석하였다.

그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(HM₁E, HEM₁, HM₁EM₁, 및 HM₂E)로 처리된 인간 혈관내피세포에서는 기존의 재조합 엔도스타틴(HE) 보다 세포증식 억제(cell proliferation inhibition)를 유발하는 β -카테닌, c-Myc 및 STAT3의 발현과 신혈관 생성을 유도하는 VEGF의 발현은 증가하는 반면, 세포 이동을 유도하는 p-ERK와 p-MEK의 발현은 감소함을 확인하였다.

<5-2> 인간 혈관내피세포에 대한 이동 억제효과

세포투과성이 입증된 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포 내 기능을 확인하기 위하여, 하기와 같이 상처 치유 분석(wound healing assay)을 이용하여 재조합 단백질의 인간 혈관내피세포에 대한 이동 억제효과를 조사하였다.

인간 혈관내피세포(HUVEC)를 M199 배지(L-글루타민 300 mg/L, 2.2 g/L NaHCO₃, 25 mM HEPES, 10 unit/ml 헤파린, 20 ng/ml bFGF, 열 불활성화

우태아 혈청 20%, 스트렙토마이신/페니실린 1%)에 접종하고, 2% 젤라틴이
 도말된 배양접시를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서
 배양하였다. 6-웰 플레이트에 웰당 2 ml의 M199 배지를 첨가하고 여기에
 상기에서 배양된 세포를 접종한 후 37°C에서 1일간 배양하였다. 각 웰에
 5 본 발명에 따른 세포투과성 재조합 단백질 HM₂E와 대조군 단백질 HE를
 각각 10 μM 농도로 처리한 후, 1시간 동안 무혈청 배지에서 배양하였다.
 배양 후 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 10 μl 피펫 팁으로 웰의 중앙
 부위에 있는 세포들을 긁어서 제거하였다. 상기 웰 플레이트에 1 ml M199
 배지를 첨가하고 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 24시간 동안
 10 배양하였다. 배양 후, HUVEC의 이동(migration) 정도를 광학 현미경을
 이용하여 관찰하였다.

그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 세포투과성 엔도스타틴 재조합
 단백질(HM₂E) 처리군에서 무처리군 및 MTD가 융합되지 않은 대조군
 단백질(HE) 처리군에 비해 인간 혈관내피세포의 이동이 억제됨을
 15 확인하였다.

<5-3> 인간 혈관내피세포에 대한 증식 억제효과

세포투과성이 입증된 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포 내 기능을
 확인하기 위하여 하기와 같이 인간 혈관내피세포에 대한 세포 증식(cell
 20 proliferation) 억제효과를 조사하였다.

인간 혈관내피세포(HUVEC)를 M199 배지(L-글루타민 300 mg/L, 2.2
 g/L NaHCO₃, 25 mM HEPES, 10 unit/ml 헤파린, 20 ng/ml bFGF, 열 불활성화
 우태아 혈청 20%, 스트렙토마이신/페니실린 1%)에 접종하고, 2% 젤라틴이
 도말된 배양접시를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서
 25 배양하였다. 6-웰 플레이트에 웰당 2 ml의 M199 배지를 첨가하고 여기에
 상기에서 배양된 세포를 접종한 후 37°C 에서 1 일간 배양하였다. 각
 웰에 본 발명에 따른 세포투과성 재조합 단백질 HM₂E와 대조군 단백질
 HE를 각각 10 μM 농도로 처리한 후, 1시간 동안 무혈청 배지에서
 배양하였다. 상기 웰 플레이트에 1 ml M199 배지를 첨가하고 5% CO₂가

공급되는 37°C 배양기에서 0, 24 및 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, HUVEC의 증식(proliferation) 정도를 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

그 결과, 도 12a 및 12b에 나타난 바와 같이, 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(HM₂E) 처리군에서 무처리군 및 MTD가
 5 융합되지 않은 대조군 단백질(HE) 처리군에 비해 인간 혈관내피세포의 증식이 억제됨을 확인하였다.

<5-4> 인간 혈관내피세포에 대한 튜브 형성 억제효과

세포투과성이 입증된 엔도스타틴 재조합 단백질의 세포 내 기능을
 10 확인하기 위하여 하기와 같이 인간 혈관내피세포에 대한 튜브 형성(tube formation) 억제효과를 조사하였다.

인간 혈관내피세포(HUVEC)를 M199 배지(L-글루타민 300 mg/L, 2.2 g/L NaHCO₃, 25 mM HEPES, 10 unit/ml 헤파린, 20 ng/ml bFGF, 열 불활성화 우태아 혈청 20%, 스트렙토마이신/페니실린 1%)에 접종하고, 2% 젤라틴이
 15 도달된 배양접시를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 0.1% BSA가 포함된 기존(M199?) 배지에 부유시키고, BD 매트릭젤 매트릭스(MatrigelTM Matrix) 12-웰 플레이트에 웰당 500 μ l의 M199 배지를 첨가한 후, 여기에 상기 세포 부유액을 접종하였다. 이어서 각 웰에 본 발명에 따른 세포투과성 재조합 단백질 HM₂E와 대조군
 20 단백질 HE를 각각 2.5 μ M 및 5 μ M의 농도로 처리한 후, 24시간 동안 무혈청 배지에서 배양하였다. 상기 웰 플레이트에 배양된 세포는 1% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 함유한 HBSS 배지에서 고정시킨 후 10 μ M 칼세인(calcein) AM 형광 염색시료로 30분간 반응시켰다. 배양 후 세포를 PBS로 세척한 다음 형광 현미경으로 관찰하였다.

25 그 결과, 도 13a 및 13b에 나타난 바와 같이, 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(HM₂E) 처리군에서 무처리군 및 MTD가 융합되지 않은 대조군 단백질(HE) 처리군에 비해 인간 혈관내피세포의 튜브 형성이 억제됨을 확인하였다.

실시예 6: 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 생체 내 기능

세포투과성이 입증된 엔도스타틴 재조합 단백질의 생체 내 기능을 확인하기 위하여, 하기와 같이 동물모델을 이용하여 혈관형성 억제를 통한 항암효과를 검증하였다.

- 5 본 실험에서는 면역력이 결핍된 5주령의 누드마우스(Balb/c nu/nu mice, Central Lab. Animal Inc., Korea)를 각 그룹당 6마리씩 총 3 그룹으로 나누어 실험하였다. 상기 마우스의 등 상좌측 부위에 인간 결장암 세포주인 HCT116 세포(Korean Cell Line Bank, Korea)를 1×10^7 cells/ml의 농도로 주사기(omnican, Germany, B.BRAUN)를 사용하여 피하
- 10 주사(subcutaneous injection)하였다. 버니어 캘리퍼(vernier caliper)를 이용하여 종양 크기(너비²×길이×0.52)가 50 내지 60 mm³으로 측정된 날부터 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질 HM₂E(그룹 3)을 각각 200 μg 씩 21일 간 피하 주사(subcutaneous injection)하였다. 대조군으로
- 15 담체(그룹 1)와 MTD가 용합되지 않은 엔도스타틴 단백질 HE(그룹 2)를 각각 400 μl 씩 21일간 동일하게 피하 주사하였다. 21일간 단백질을 처리하면서 매일 각 그룹 마우스의 종양 크기와 몸무게의 변화를 측정하였고, 그 결과를 도 14a 및 14b에 나타내었다.

- 도 14a 및 14b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질 HM₂E이 처리된 마우스(그룹 3)의 종양 크기는
- 20 대조군(그룹 1 및 2)에 비해 그 성장이 현저히 억제된 반면, 실험기간 동안 마우스의 몸무게는 대조군과 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질 처리군 모두에서 유의미한 변화를 나타내지 않았다.

- ### 실시예 7: 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 투여 후 면역조직학적
- 25 변화 분석

세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질의 투여 후 종양 조직 내에서의 조직학적 변화를 확인하기 위해 상기 실시예 6의 마우스 동물 모델을 이용하여 면역조직학적(immunohistochemistry) 염색을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 6에서와 같이 3 그룹(각 그룹당 6마리)의

마우스에 각각 피하 주사로 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(HM₂E)과, 대조군으로 담체 및 HE 단백질을 21일간 처리한 후 종양 조직을 분리, 적출하였다. 각각의 적출된 종양 조직을 포르말린으로 고정하고 세척한 후 포매 센터(embedding center)에서 62℃에 녹인 파라핀을 이용하여

5 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 마이크로톰(microtome)을 이용하여 두께 5 μm로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 자일렌(xylene)을 5분씩 3회 처리하여 파라핀을 제거하였다. 이어서 조직 슬라이드를 100%, 100%, 95%, 70% 및 50% 에탄올로 각각 3분씩 순차적으로 처리하여 흡수시키고 흐르는 물에서 5분간 세척하였다. 조직에서의 항원 표출을

10 유도하기 위하여 조직 슬라이드를 항원 표출 용액으로 처리한 후 37℃에서 20분간 보관하였다. 이어서 조직 슬라이드를 PBS로 5분간 세척하고 과산화수소 블록킹 용액(peroxide blocking solution)으로 10분간 처리한 후 다시 PBS로 5분간 3회 세척하고 파워 블록킹 용액(power blocking solution)으로 10분간 처리하였다. 이 후 PBS로 5분간 세척하였다. 상기

15 조직 슬라이드를 일차항체로 인간 혈관내피세포 특이적 표지인자 4A11(vescular endothelial cell specific marker, 4A11)과 25℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS 완충액으로 5분간 3회 세척하였다. 그 후 염소 항-마우스 IgG-HRP(goat anti-mouse IgG-HRP, Biogenex)를 이차항체로 하여 30분간 반응시킨 후 조직 슬라이드를 DAB(diaminobenzidine

20 tetrahydrochloride, Biogenex) 염색시약을 3 내지 5분간 도포하여 발색시켰다. 이어서 조직 슬라이드를 증류수로 세척하고 헤마톡실린(hematoxylin)으로 대조 염색하였다. 그 후 조직 슬라이드를 95%, 95%, 100% 및 100% 에탄올로 10초씩 순차적으로 처리하여 탈수시키고 자일렌으로 10초씩 2회의 투영 과정을 거친 후 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

25 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 담체와 대조군 단백질(HE)을 처리한 마우스의 종양 조직에 비교하여 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질(HM₂E)을 처리한 마우스의 종양 조직에서 미세혈관 형성이 억제됨을 확인하였다.

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시사항(PCT 규칙 13의 2) 우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	PCT-SAFE [EASY mode] 버전 3.51.036.211 MT/FOP 20090101/0.20.5.15
0-2	국제출원번호	
0-3	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	FC292834

1	아래와 같은 표시는 발명의 상세한 설명 중에 기재된 미생물 또는 생물학적 물질에 관련된 것이다.	
1-1	쪽	15
1-2	행	7
1-3	기탁표시	
1-3-1	기탁기관명	KCTC 한국 생물자원센터
1-3-2	기탁기관 주소	대한민국 대전광역시 305-806 유성구 과학로 111
1-3-3	기탁일자	2009년 03월 20일 (20.03.2009)
1-3-4	기탁 번호	KCTC 11485BP
1-5	표시 사항이 적용될 지정국	모든 지정국
2	아래와 같은 표시는 발명의 상세한 설명 중에 기재된 미생물 또는 생물학적 물질에 관련된 것이다.	
2-1	쪽	15
2-2	행	7
2-3	기탁표시	
2-3-1	기탁기관명	KCTC 한국 생물자원센터
2-3-2	기탁기관 주소	대한민국 대전광역시 305-806 유성구 과학로 111
2-3-3	기탁일자	2009년 03월 20일 (20.03.2009)
2-3-4	기탁 번호	KCTC 11486BP
2-5	표시 사항이 적용될 지정국	모든 지정국
3	아래와 같은 표시는 발명의 상세한 설명 중에 기재된 미생물 또는 생물학적 물질에 관련된 것이다.	
3-1	쪽	15
3-2	행	7
3-3	기탁표시	
3-3-1	기탁기관명	KCTC 한국 생물자원센터
3-3-2	기탁기관 주소	대한민국 대전광역시 305-806 유성구 과학로 111
3-3-3	기탁일자	2009년 03월 20일 (20.03.2009)
3-3-4	기탁 번호	KCTC 11487BP
3-5	표시 사항이 적용될 지정국	모든 지정국

4	아래와 같은 표시는 발명의 상세한 설명 중에 기재된 미생물 또는 생물학적 물질에 관련된 것이다.	
4-1	쪽	15
4-2	행	7
4-3	기탁표시	
4-3-1	기탁기관명	KCTC 한국 생물자원센터
4-3-2	기탁기관 주소	대한민국 대전광역시 305-806 유성구 과학로 111
4-3-3	기탁 일자	2009년 03월 20일 (20.03.2009)
4-3-4	기탁 번호	KCTC 11488BP
4-5	표시 사항이 적용될 지정국	모든 지정국

수리관청 전용

0-4	국제 출원서와 함께 이 서식을 수리하였다. 네 또는 아니오	
0-4-1	승인 사무관	

국제 사무국 전용

0-5	국제 사무국(IB)이 이 서식을 수리하였다.	
0-5-1	승인 사무관	

【청구의 범위】

【청구항 1】

혈관형성 억제인자(angigenic inhibitor) 엔도스타틴(endostatin) 단백질의 한쪽 또는 양쪽 말단에 거대분자 전달 도메인(macromolecule transduction domain, MTD)이 융합되어 있는, 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질.

【청구항 2】

제1항에 있어서,
상기 혈관형성 억제인자 엔도스타틴 단백질이 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장 형태(full-length form)인 것을 특징으로 하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질.

【청구항 3】

제1항에 있어서,
상기 거대분자 전달 도메인이 서열번호: 3 내지 11로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질.

【청구항 4】

제3항에 있어서,
상기 거대분자 전달 도메인이
서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 JO-56 MTD;
서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 JO-73 MTD;
서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 JO-66 MTD;
서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 JO-71 MTD;
서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 JO-85 MTD;
서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 JO-18 MTD;
서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 JO-41 MTD;
서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 JO-135 MTD; 및
서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 JO-159 MTD로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합

단백질.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 재조합 단백질의 한쪽 말단에 히스티딘-표지(histidine-tag)

5 친화성 도메인이 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질.

【청구항 6】

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 단백질이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것을

10 특징으로 하는 재조합 단백질:

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에
서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 JO-56 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 C-말단에
서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 JO-56 MTD가 융합된 재조합 단백질;

15 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 양 말단에
서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 JO-56 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에
서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 JO-73 MTD가 융합된 재조합 단백질;

20 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 C-말단에
서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 JO-73 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 양 말단에
서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 JO-73 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에
서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 JO-66 MTD가 융합된 재조합 단백질;

25 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에
서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 JO-71 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에
서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 JO-85 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에

서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 JO-18 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에

서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 JO-41 MTD가 융합된 재조합 단백질;

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에

5 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 JO-135 MTD가 융합된 재조합 단백질; 및

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 전장의 엔도스타틴 N-말단에

서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 JO-159 MTD가 융합된 재조합 단백질로서;

10 상기 모든 재조합 단백질의 N-말단에 히스티딘-표지가 공유적으로 결합되어 있는 재조합 단백질.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

15 상기 재조합 단백질이 서열번호: 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 및 39의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질.

【청구항 8】

제1항의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

20 **【청구항 9】**

제8항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 및 40의 염기서열로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

25 **【청구항 10】**

제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터.

【청구항 11】

제10항에 있어서,

상기 재조합 발현벡터가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것을

특징으로 하는 재조합 발현벡터:

JO-56 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 14의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₁E;

- 5 JO-56 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 16의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHEM₁;

- 10 JO-56 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 18의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₁EM₁;

JO-73 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 20의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₂E;

- 15 JO-73 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 22의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHEM₂;

JO-73 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 24의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₂EM₂;

- 20 JO-66 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 26의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₃E;

- 25 JO-71 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 28의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₄E;

JO-85 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 30의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현벡터 pHM₅E;

JO-18 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을

코딩하는 서열번호: 32의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현백터 pHM₆E;

JO-41 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 34의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된
5 발현백터 pHM₇E;

JO-135 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 코딩하는 서열번호: 36의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현백터 pHM₈E; 및

JO-159 MTD가 융합된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을
10 코딩하는 서열번호: 38의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현백터 pHM₉E.

【청구항 12】

제10항의 재조합 발현백터로 형질전환된 형질전환 세균.

【청구항 13】

15 제12항에 있어서,
상기 형질전환 세균이 대장균 DH5 α /pET-28a(+):HM₁E(KCTC 11485BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환 세균.

【청구항 14】

20 제12항에 있어서,
상기 형질전환 세균이 대장균 DH5 α /pET-28a(+):HM₂E(KCTC 11486BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환 세균.

【청구항 15】

25 제12항에 있어서,
상기 형질전환 세균이 대장균 DH5 α /pET-28a(+):HM₃E(KCTC 11487BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환 세균.

【청구항 16】

제12항에 있어서,
상기 형질전환 세균이 대장균 DH5 α /pET-28a(+):HM₈E(KCTC 11488BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환 세균.

【청구항 17】

하기 단계를 포함하는 제1항의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 생산하는 방법:

- 1) 제12항의 형질전환 세균을 배양하여 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및
- 2) 발현된 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 배양액으로부터 회수하는 단계.

【청구항 18】

제1항의 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 항암제용 약학 조성물.

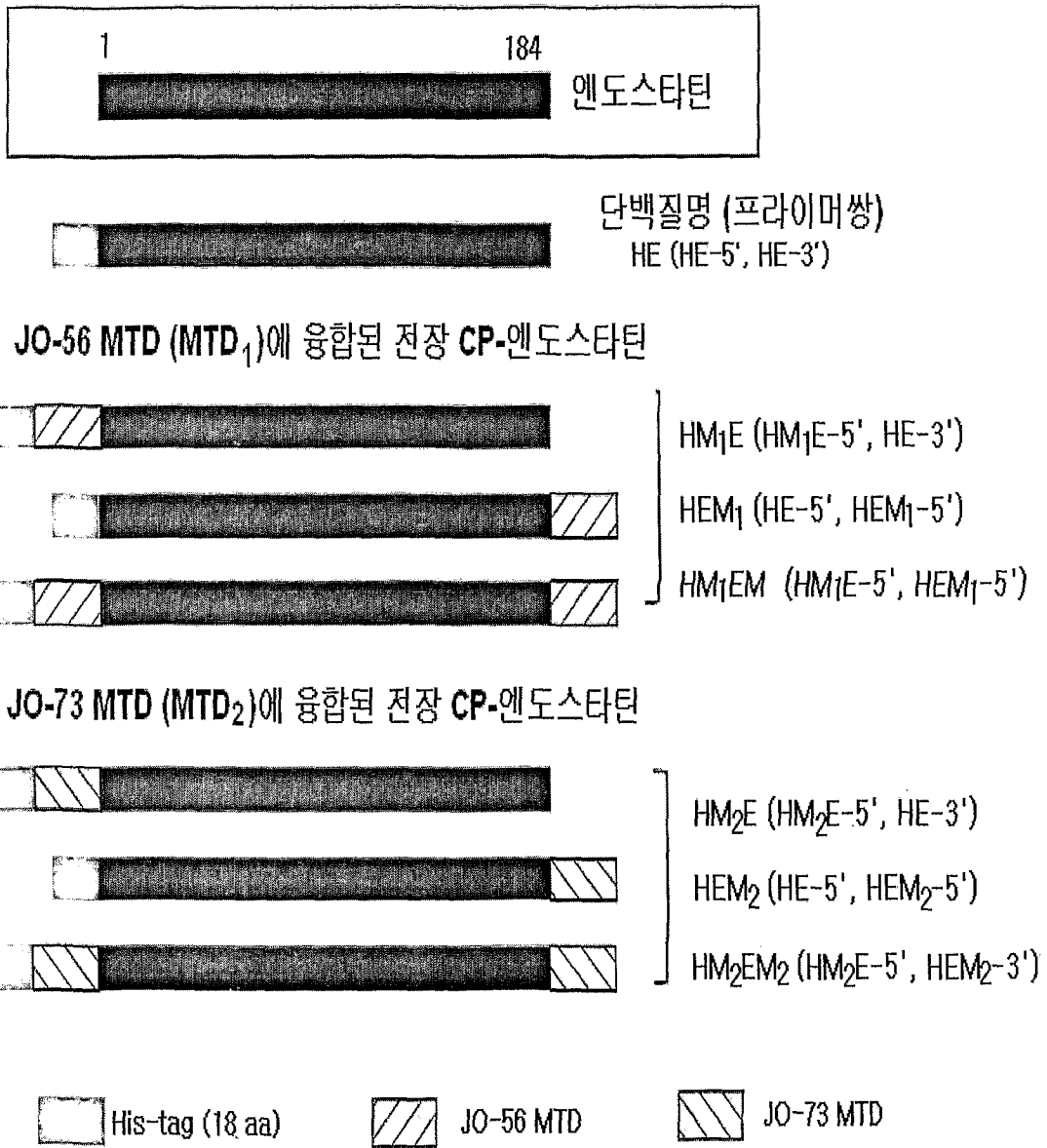
【청구항 19】

제18항에 있어서,

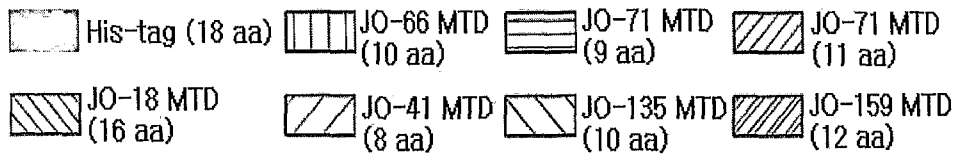
상기 세포투과성 엔도스타틴 재조합 단백질이 종양 조직 내에서 혈관내피세포의 이동, 증식, 침투 및 튜브 형성을 억제하고, 신생 미세혈관의 형성을 차단함으로써 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

【도면】

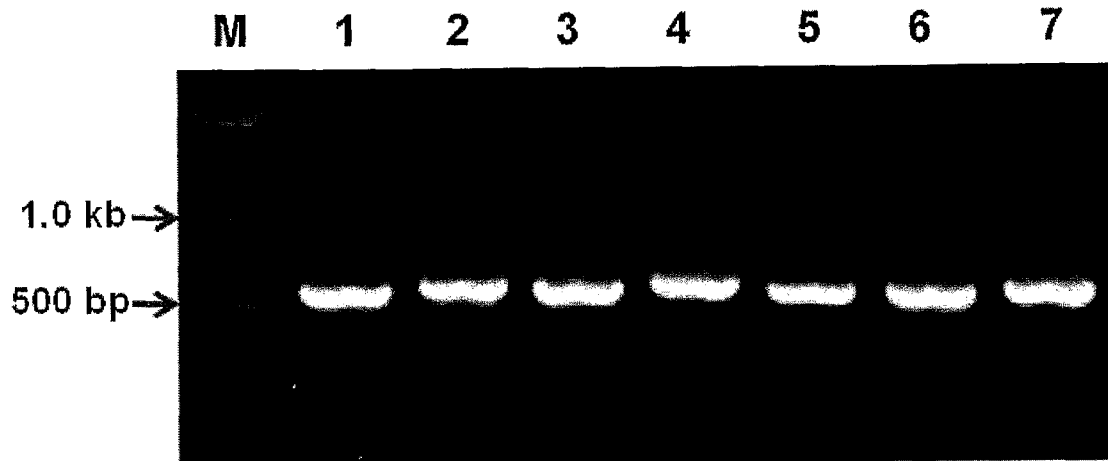
【도 1a】



【도 1b】



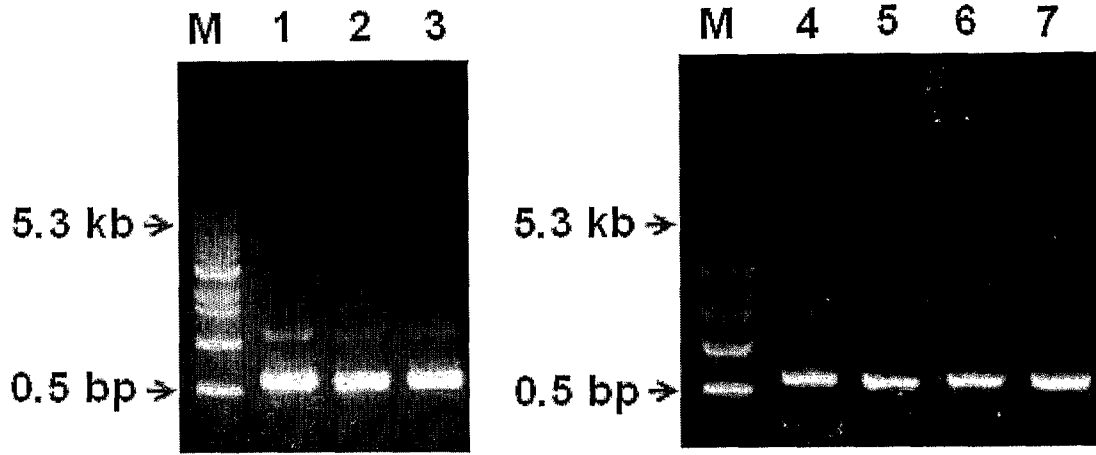
【도 2a】



M₁: JO-56 MTD
M₂: JO-73 MTD

M: 100 bp 마커
1: HE -612 bp
2: HM₁E -639 bp
3: HEM₁ -639 bp
4: HM₁EM₁ -666 bp
5: HM₂E -636 bp
6: HEM₂ -636 bp
7: HM₂EM₂ -660 bp

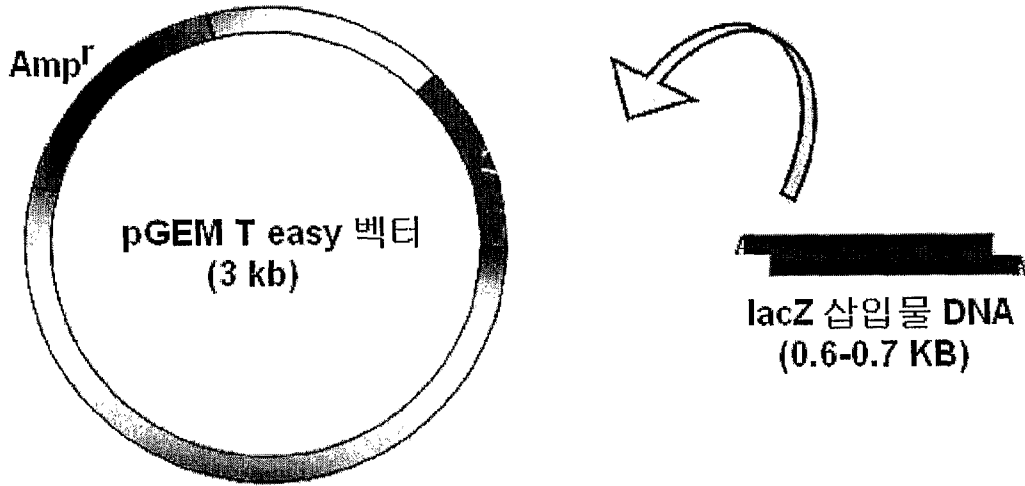
【도 2b】



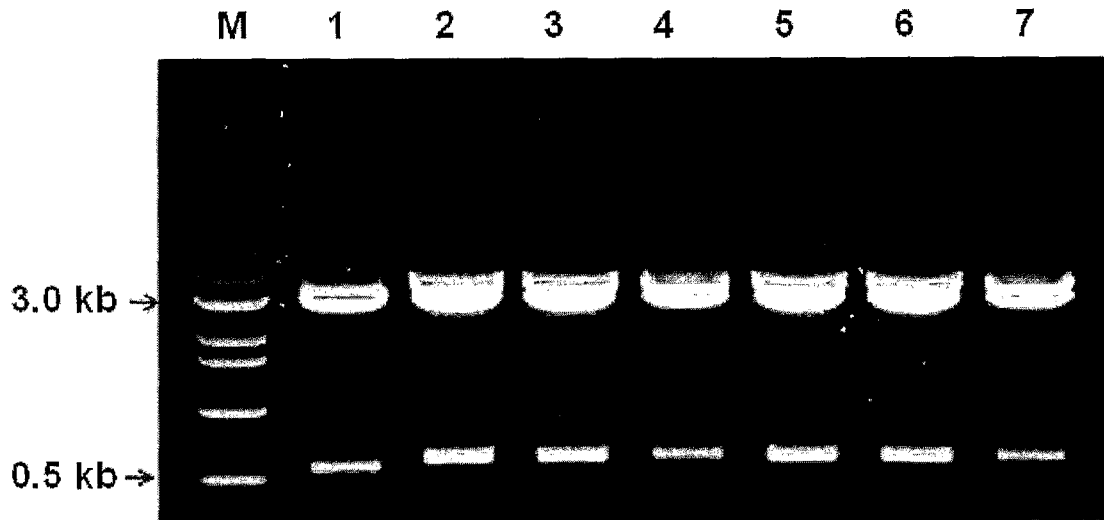
M₃: JO-66 MTD
 M₄: JO-71 MTD
 M₅: JO-85 MTD
 M₆: JO-18 MTD
 M₇: JO-41 MTD
 M₈: JO-135 MTD
 M₉: JO-159 MTD

M: 1 kb 마커
 1: HM₃E -642 bp
 2: HM₄E -639 bp
 3: HM₅E -645 bp
 4: HM₆E -660 bp
 5: HM₇E -636 bp
 6: HM₈E -632 bp
 7: HM₉E -648 bp

【도 3a】



【도 3b】

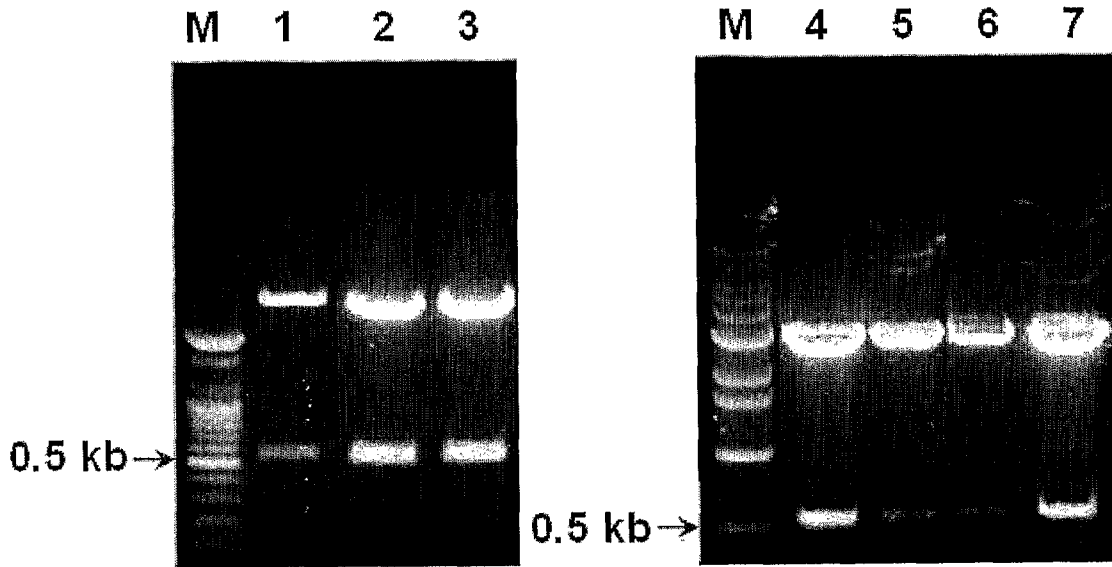


M₁: JO-56 MTD
M₂: JO-73 MTD

M: 1 kb 마커

1: HE -612 bp
2: HM₁E -639 bp
3: HEM₁ -639 bp
4: HM₁EM₁ -666 bp
5: HM₂E -636 bp
6: HEM₂ -636 bp
7: HM₂EM₂ -660 bp

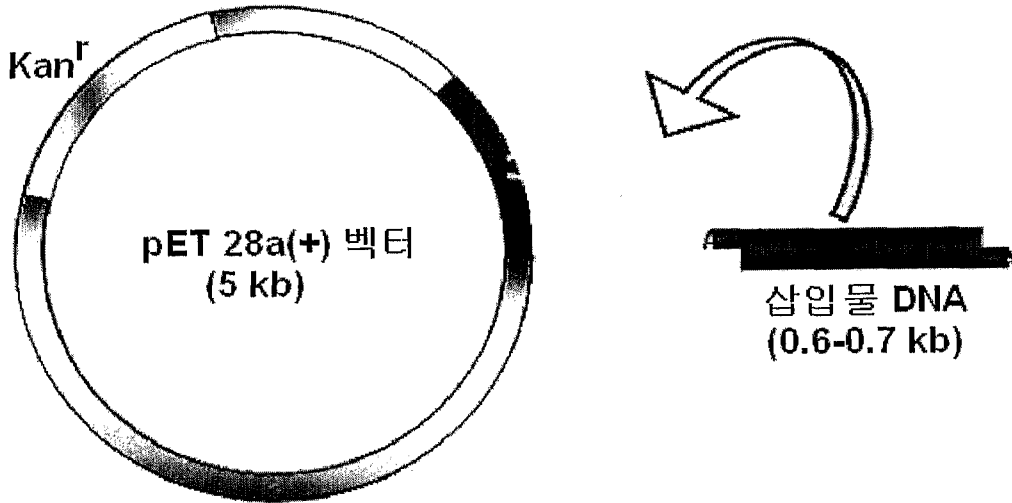
【도 3c】



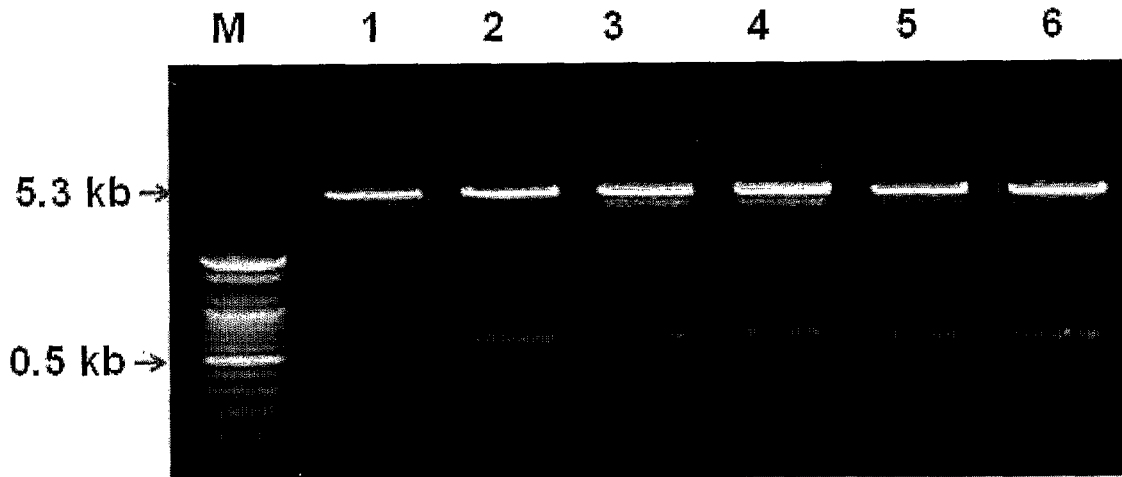
M₃: JO-66 MTD
 M₄: JO-71 MTD
 M₅: JO-85 MTD
 M₆: JO-18 MTD
 M₇: JO-41 MTD
 M₈: JO-135 MTD
 M₉: JO-159 MTD

M: 1 kb & 100 bp 마커
 1: HM₃E -642 bp
 2: HM₄E -639 bp
 3: HM₅E -645 bp
 4: HM₆E -660 bp
 5: HM₇E -636 bp
 6: HM₈E -632 bp
 7: HM₉E -648 bp

【도 4a】



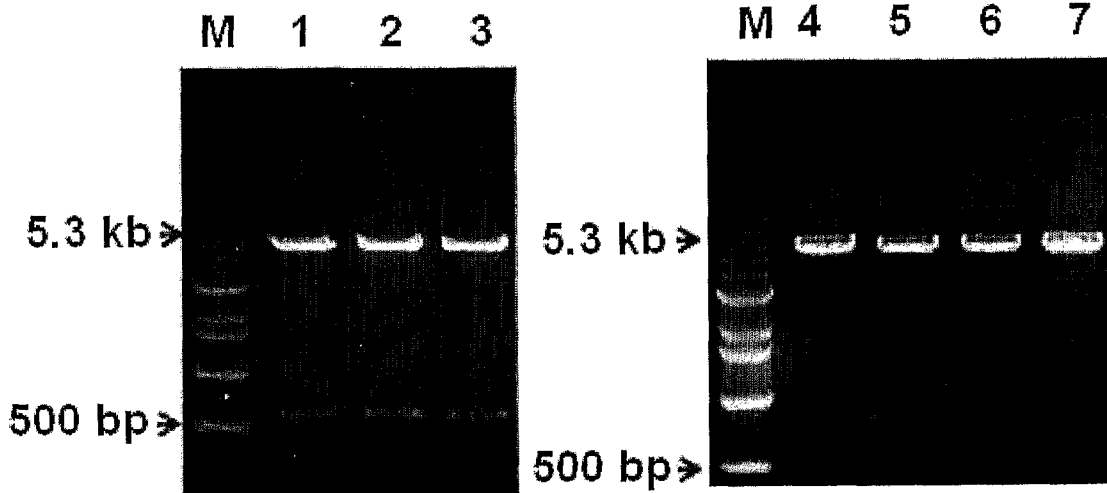
【도 4b】



M₁ : JO-56 MTD
M₂ : JO-73 MTD

M: 100 bp 마커
1: HE -612 bp
2: HM₁E -639 bp
3: HEM₁ -639 bp
4: HM₁EM₁ -666 bp
5: HM₂E -636 bp
6: HEM₂ -636 bp

【도 4c】

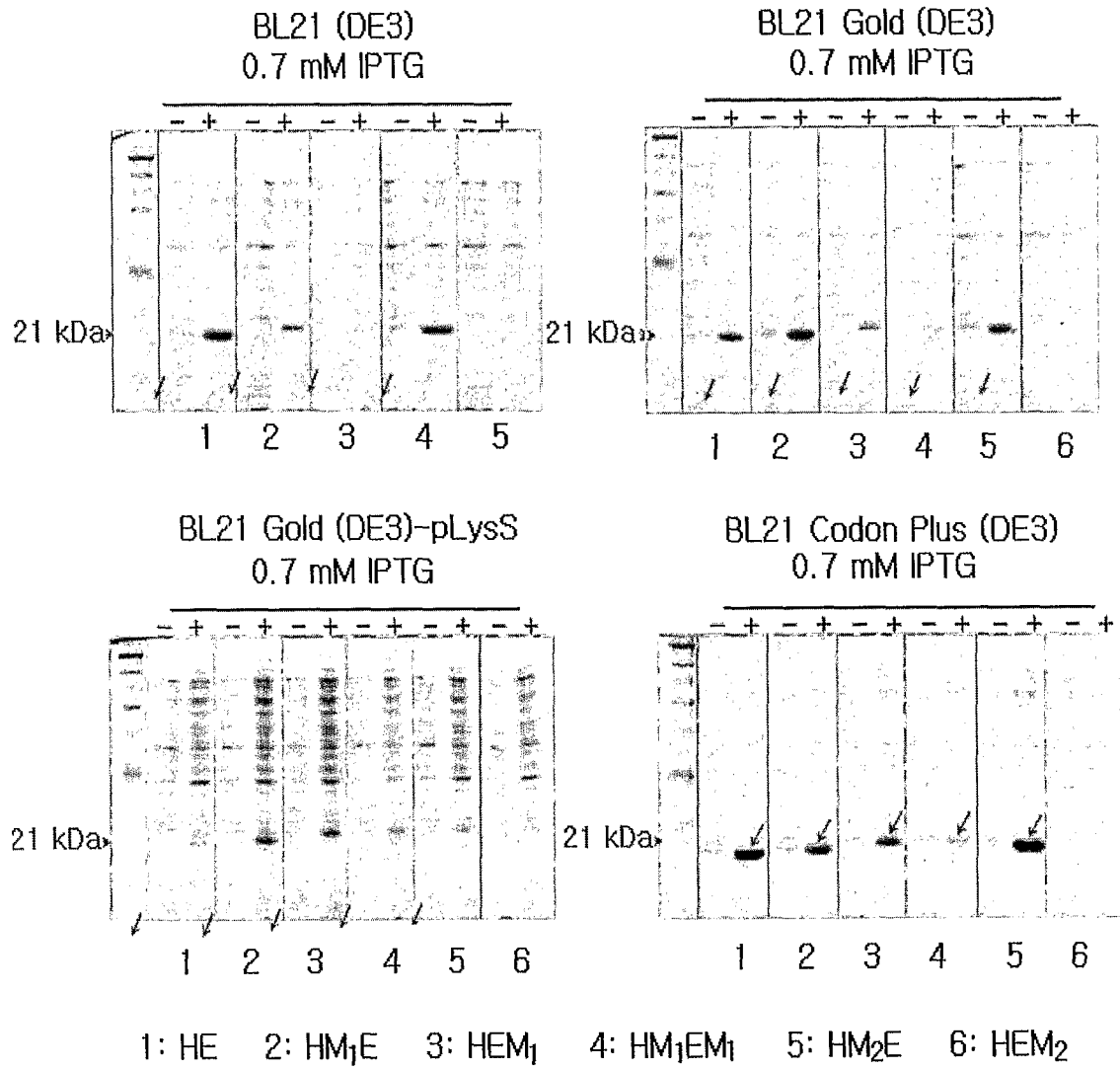


M₃: JO-66 MTD
 M₄: JO-71 MTD
 M₅: JO-85 MTD
 M₆: JO-18 MTD
 M₇: JO-41 MTD
 M₈: JO-135 MTD
 M₉: JO-159 MTD

M: 1 kb 마커
 1: HM₃E -642 bp
 2: HM₄E -639 bp
 3: HM₅E -645 bp
 4: HM₆E -660 bp
 5: HM₇E -636 bp
 6: HM₈E -632 bp
 7: HM₉E -648 bp

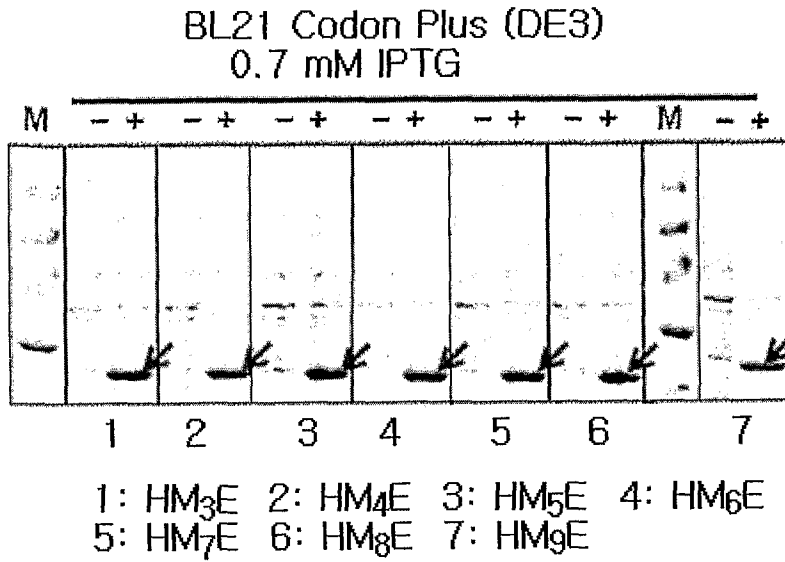
9/23

【도 5a】

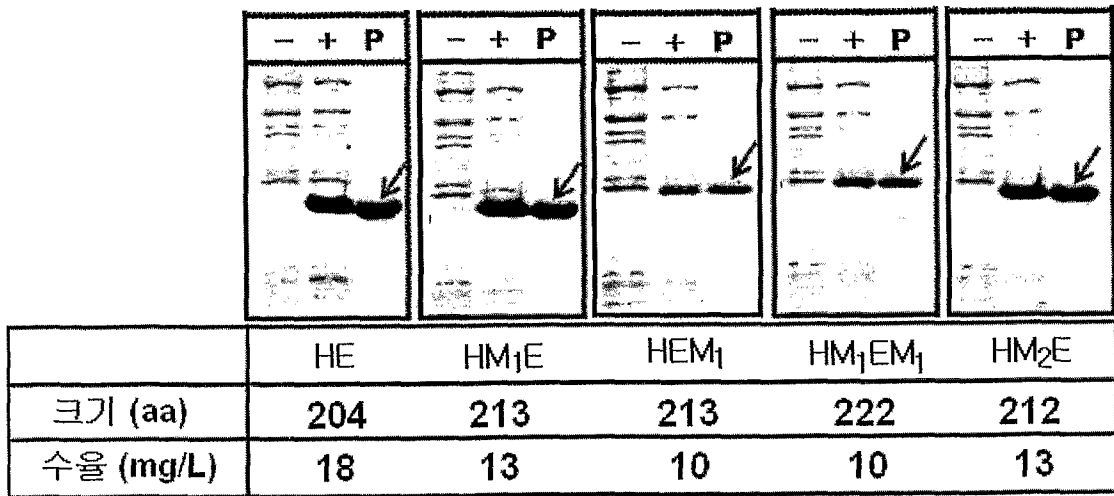


10/23

【도 5b】

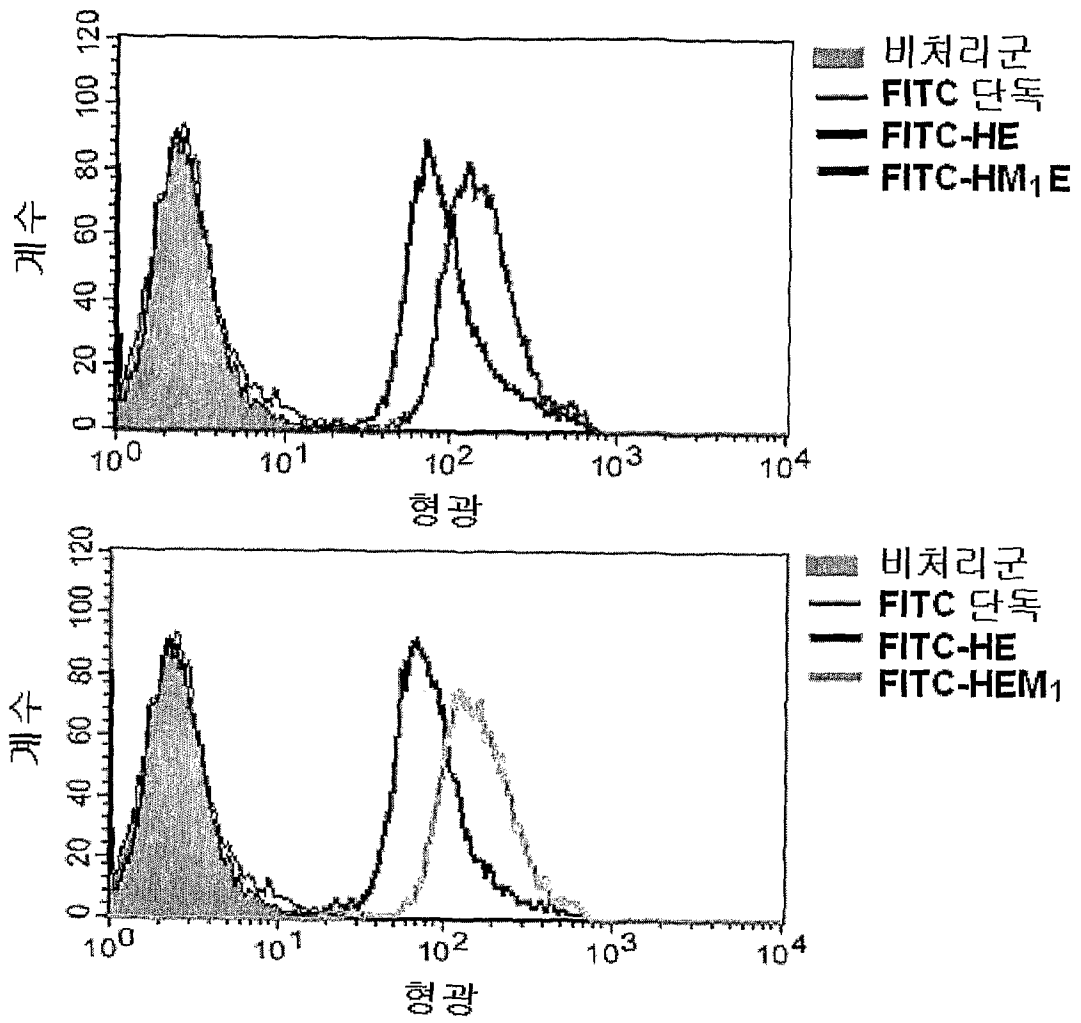


【도 6】



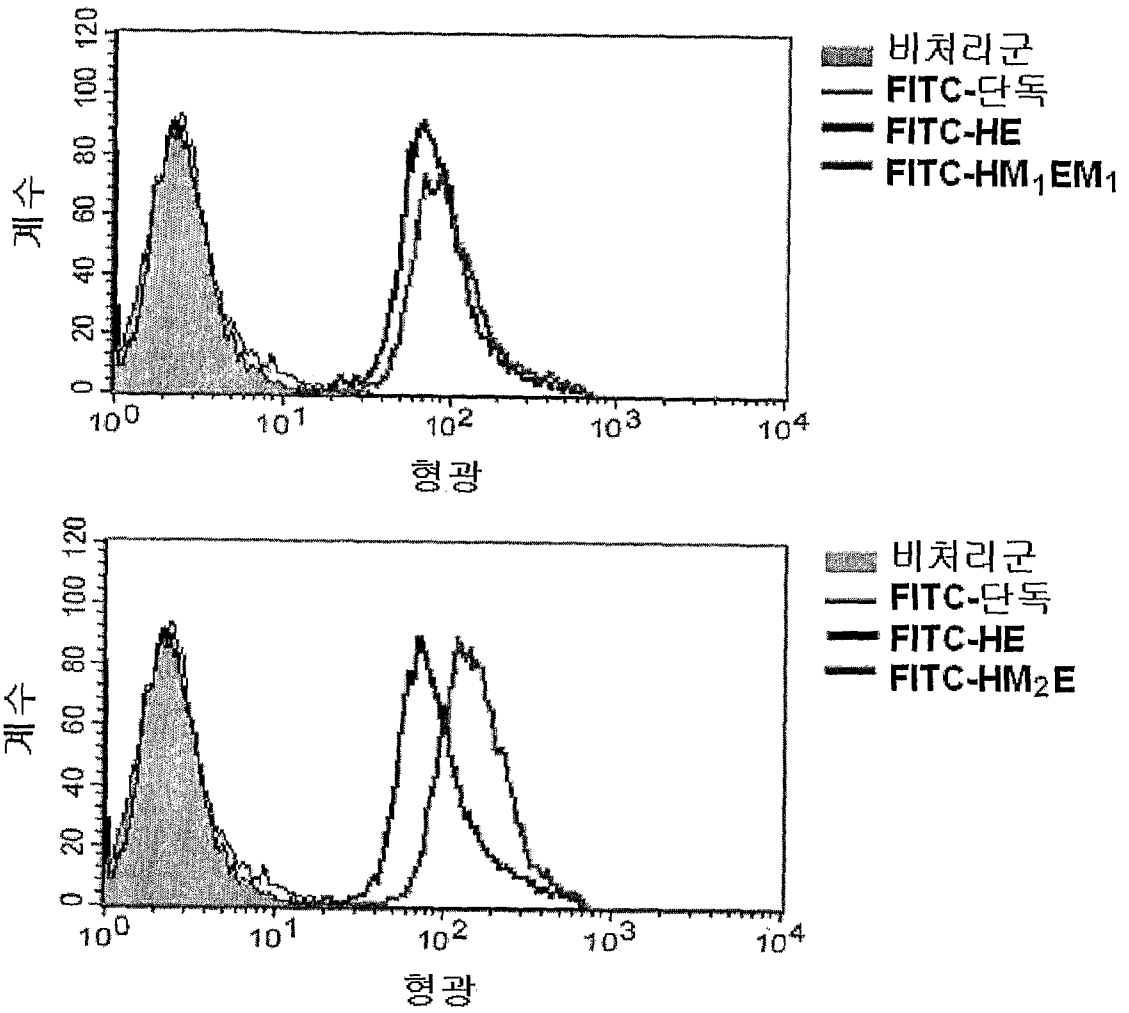
11/23

【도 7a】

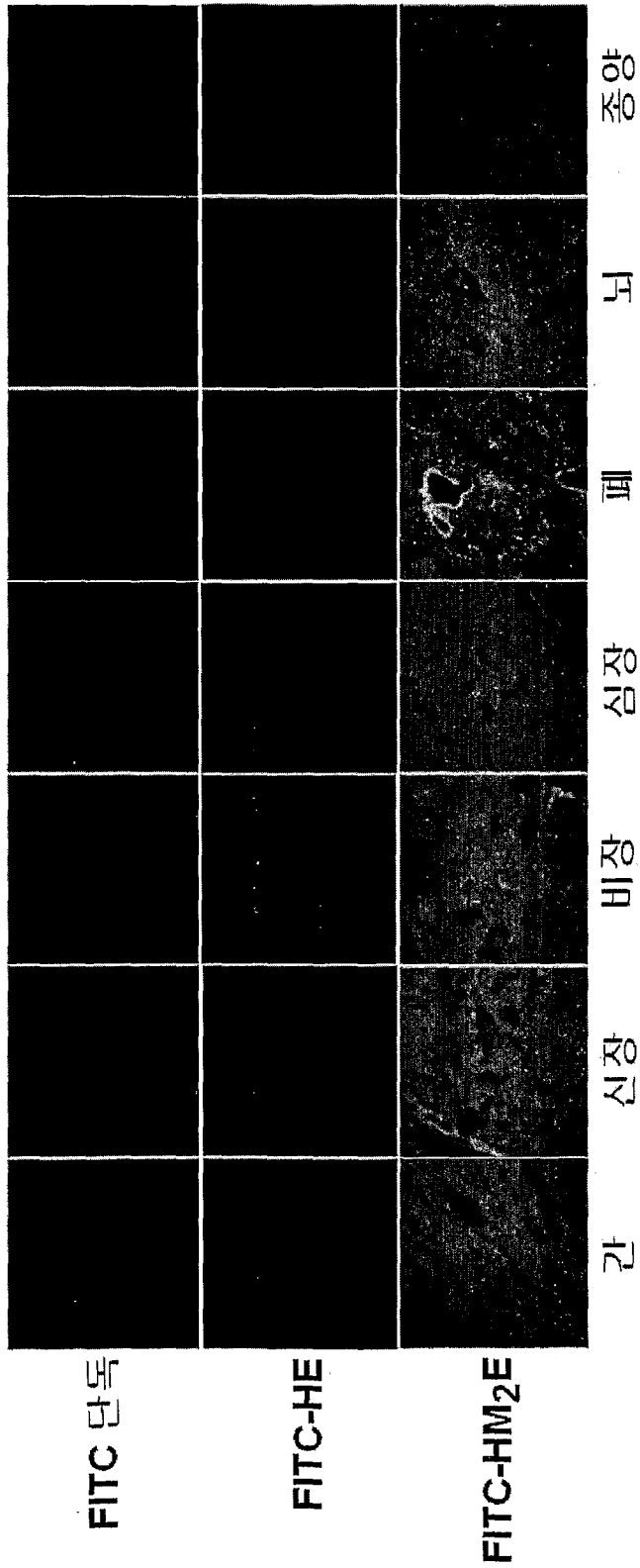


12/23

【도 7b】



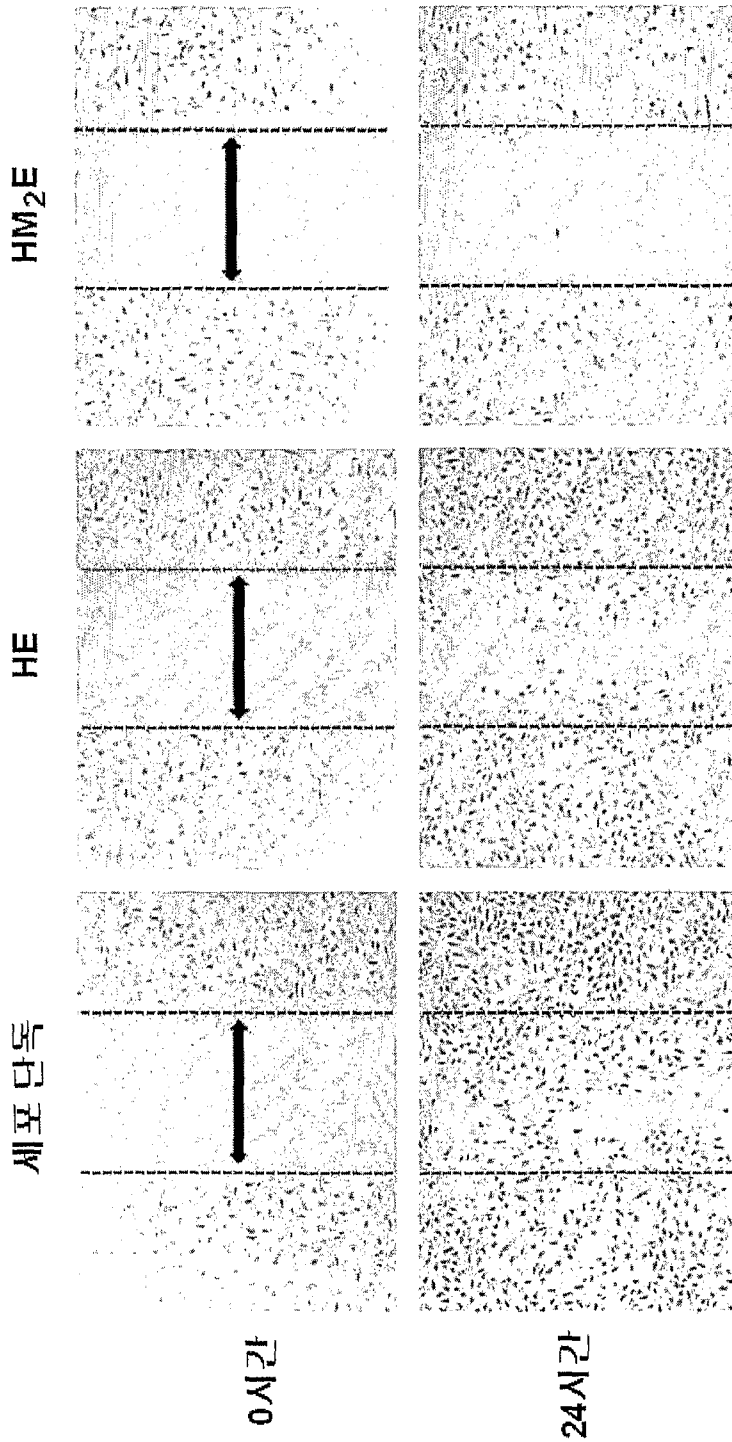
【도 9】



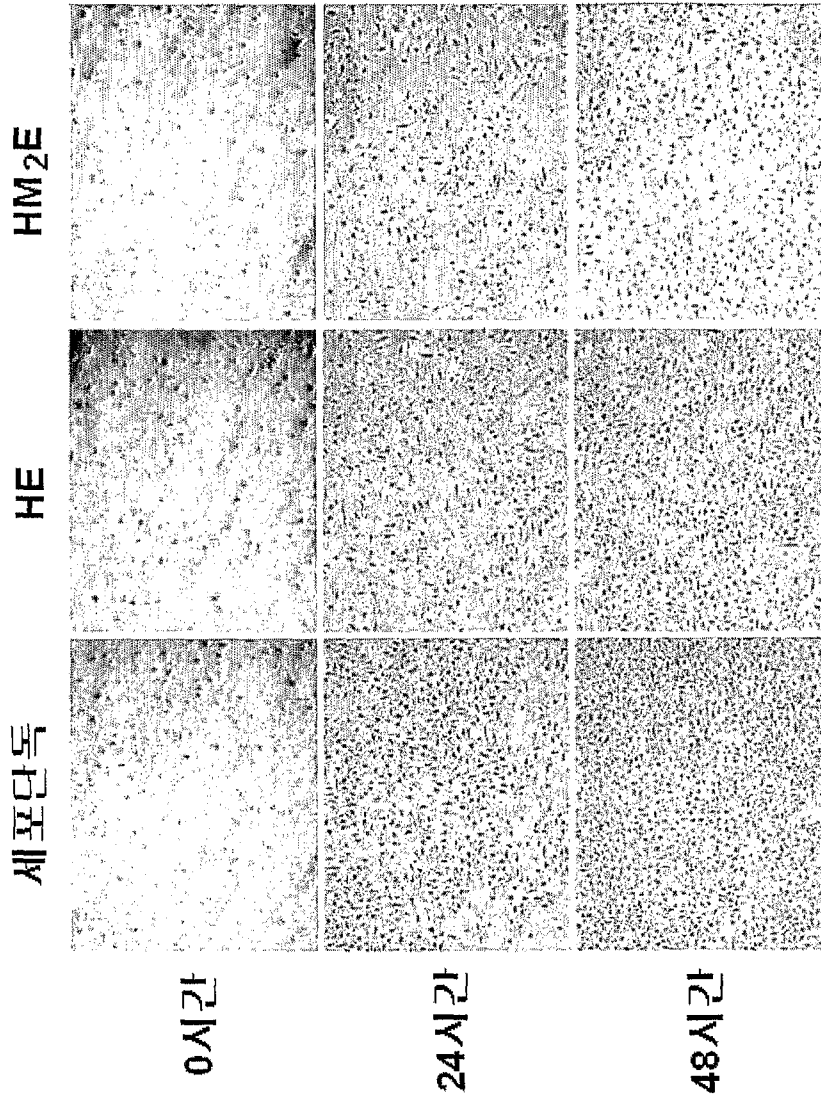
【표 10】

엔도스타틴 단백질	-	-			JO-56 MTD			JO-73 MTD
		HE	HM ₁ E	HEM ₁	HM ₁ EM ₁	HM ₂ E		
베타-카테닌								
비율	1	1.0	0.9	0.9	0.2	0.2	0.2	
c-Myc								
비율	1	1.6	1.3	2.1	1.2	0.8	0.8	
STAT3								
비율	1	1.1	1.0	0.6	0.7	0.01	0.01	
VEGF								
비율	1	1.4	1.1	1.1	0.7	0.7	0.7	
p-ERK								
비율	1	1	0.9	1.7	1.4	0.1	0.1	
베타-액틴								

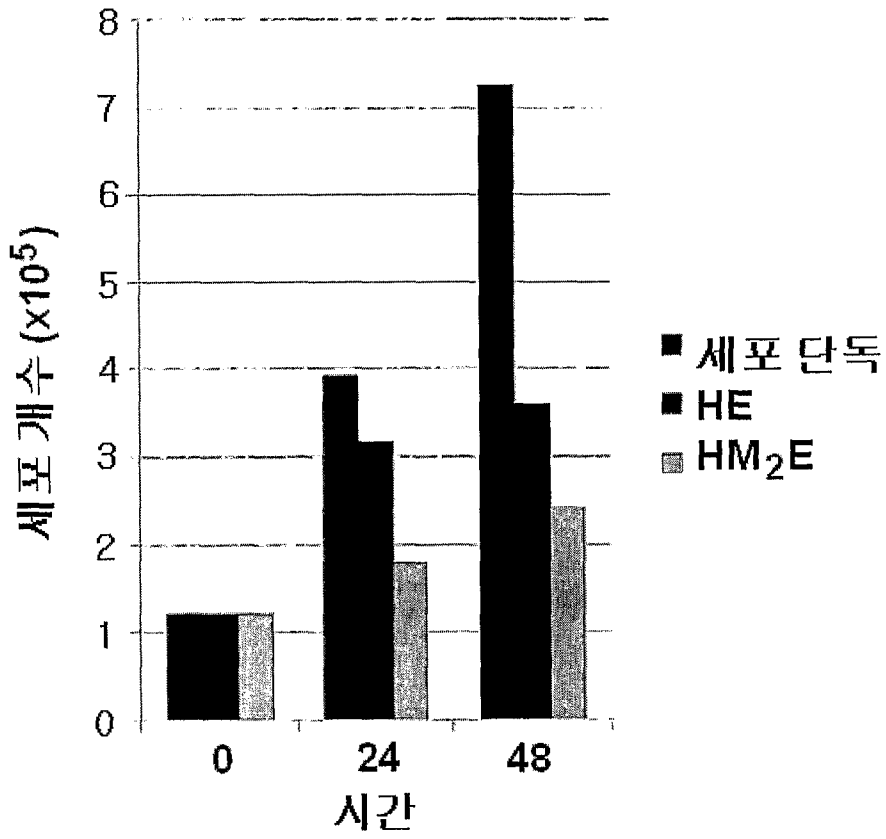
【도 11】



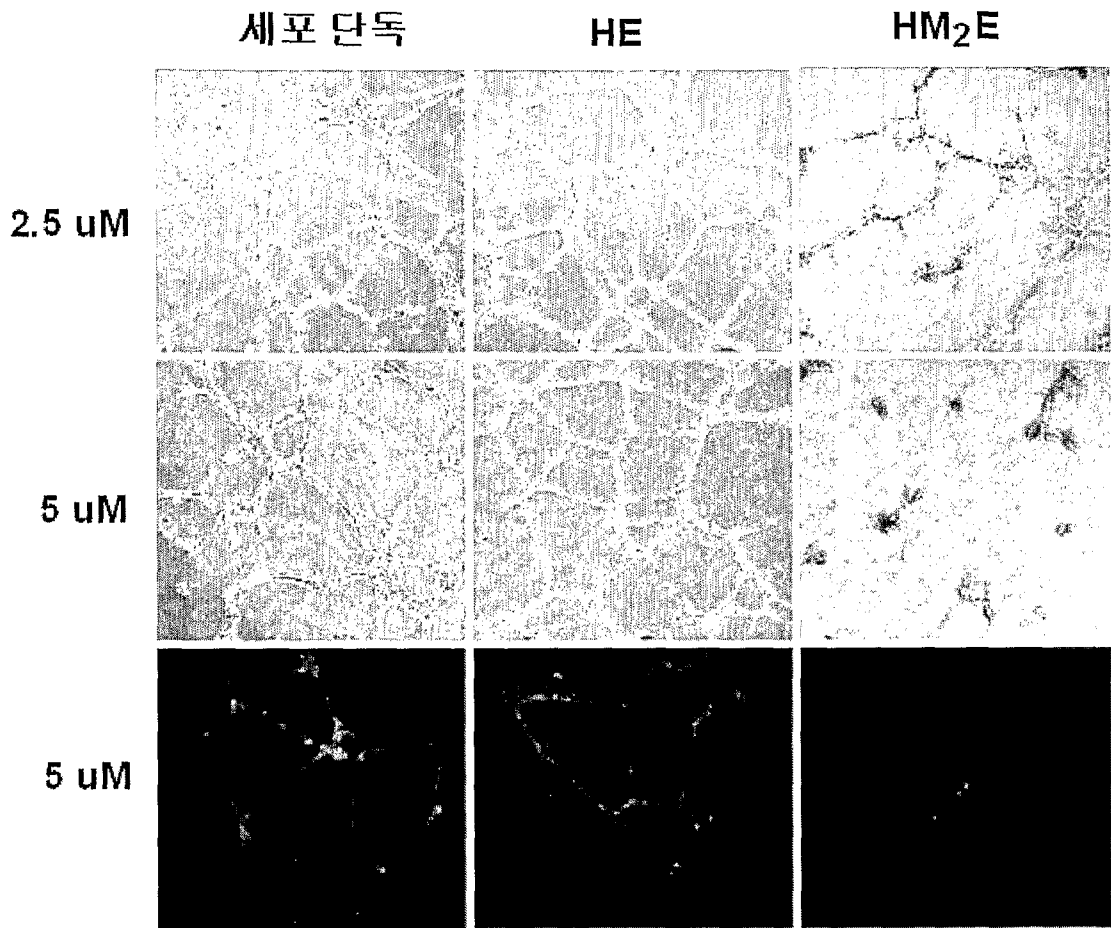
【图 12a】



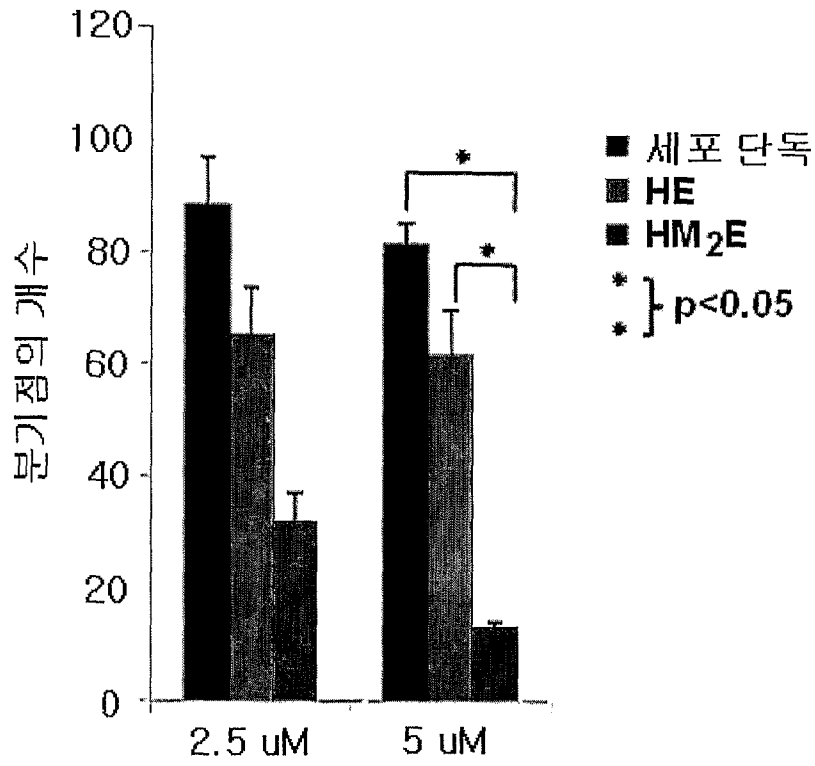
【도 12b】



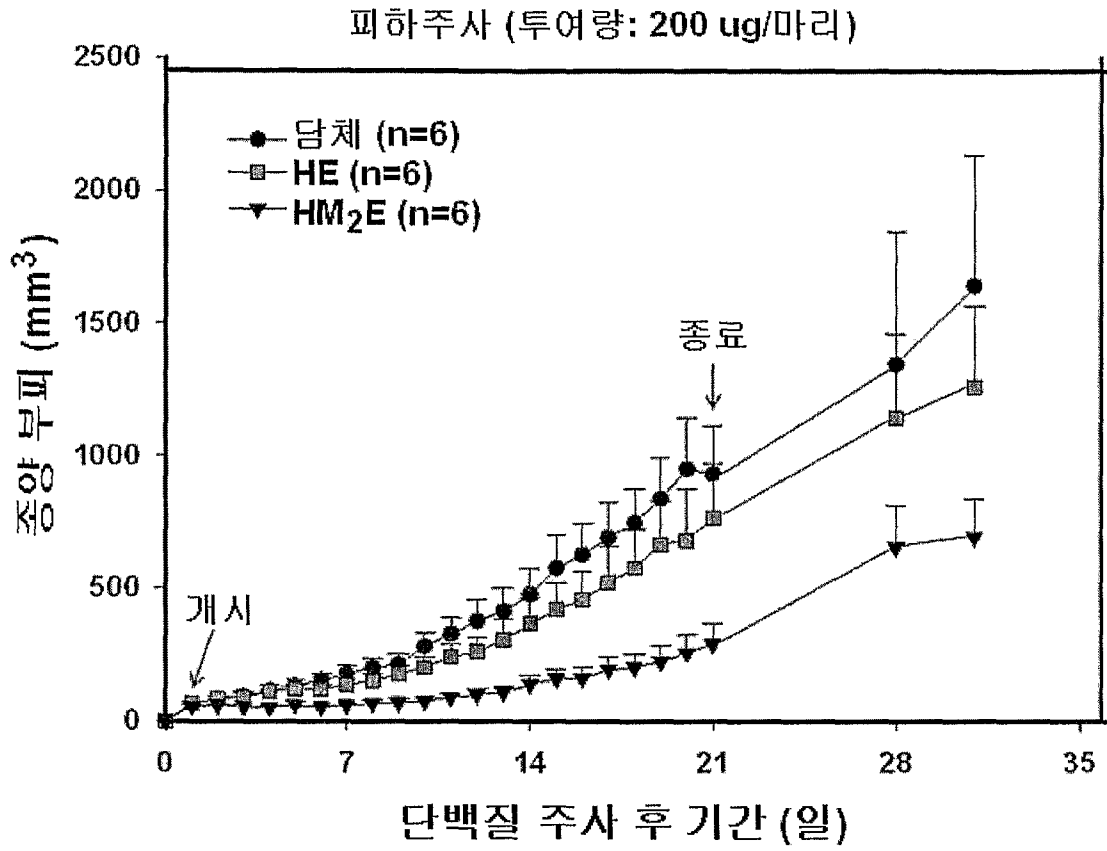
【도 13a】



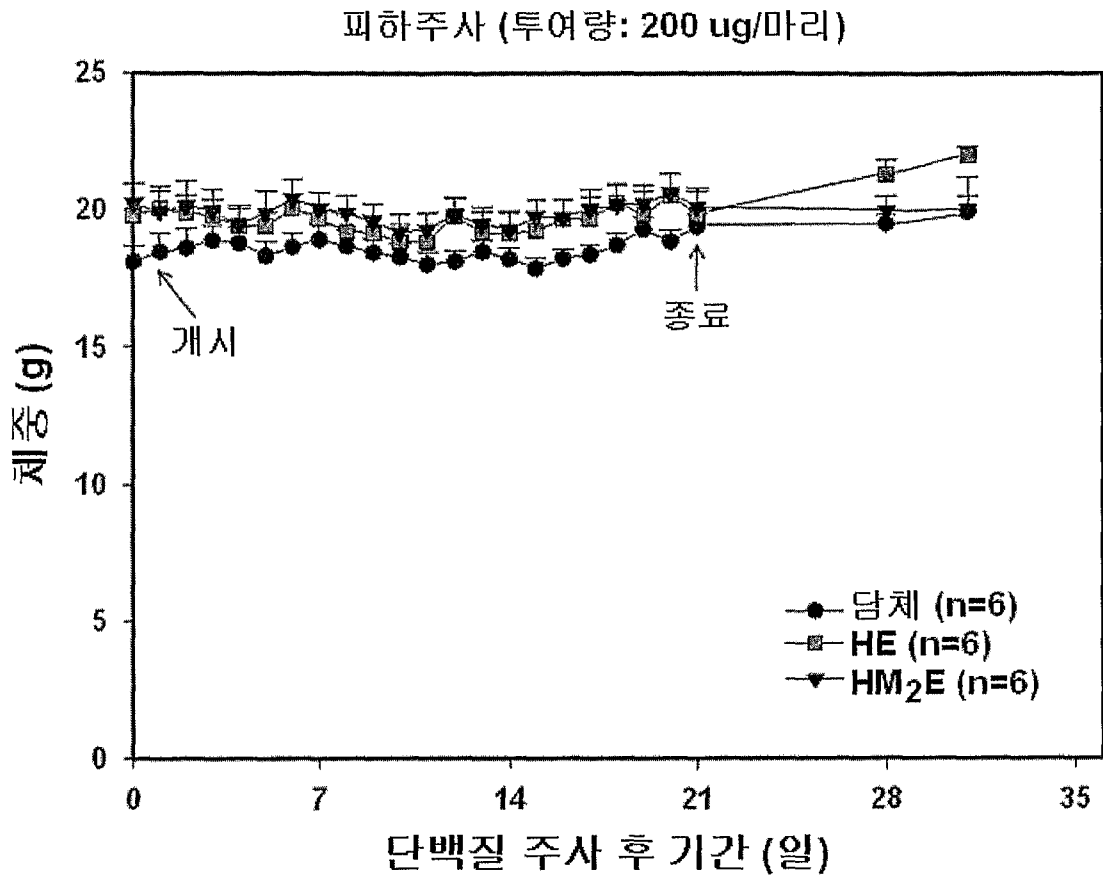
【도 13b】



【도 14a】



【도 14b】



【도 15】

