(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.^{7}
C07K 14/765
C07K 14/475
C07K 19/00
A61K 38/38

(11) 공개번호 10-2004-0095217
(43) 공개일자 2004년11월12일

(21) 출원번호 10-2004-7012255
(22) 출원일자 2004년08월06일
번역문 제출일자 2004년08월06일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2003/000433
(86) 국제출원출원일자 2003년02월07일
(87) 국제공개번호 WO 2003/066085
(87) 국제공개일자 2003년08월14일

(30) 우선권주장 60/355,547 2002년02월07일 미국(US)

(71) 출원인
델타 바이오테크놀로지 리미티드
영국 엔지7 1에프디 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬코어트

(72) 발명자
머틴스피터
독일, 마르부르크 35041, 도른부쉬 7

셀릭일한
독일, 엡스도르퍼그룬트 35085, 구텐베르크슈트라쎄 16

키스커올리버
독일, 로쓰도르프 64380, 오덴발트링 44

슬립다렐
영국, 노팅햄 엔쥐2 5디에스, 웨스트 브릿지포드, 레이디베이 로드 66

헤이조안나
영국, 데본 이엑스24 6알피, 콜리톤, 리지웨이 1

하우저한스-피터
독일, 마르부르크 35041, 포이에르도른베그 6

(74) 대리인
특허법인씨엔에스

심사청구 : 없음

(54) 알부민-융합 항-혈관신생 펩타이드

요약

본 발명은 알부민(이에 한정하는 것은 아니나, 알부민의 프레그먼트나 변이체를 포함)에 융합 혹은 접합된, 항-레트로바이러스 활성을 나타내는 엔도스태틴 펩타이드(이에 한정하는 것은 아니나, 이들의 프레그먼트 및 변이체를 포함)와 같은 혈관신생 억제 펩타이드를 포함하는 단백질에 관한 것이다. 이러한 융합 단백질은 본 명세서에서 집합적으로 '본 발명의 알부민 융합 단백질'로 칭하여 진다. 이러한 융합 단백질은 용액내에서 연장된 보존기간 및/또는 연장된 치료 활성을 나타낸다. 본 발명은 치료학적 알부민 융합 단백질, 조성물, 약학 조성물, 배합물 및 키트를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 핵산 분자 뿐만아니라 이러한 핵산을 함유하는 벡터, 이러한 핵

산 및 벡터로 형질변형된 숙주세포, 및 이러한 핵산, 벡터, 및/또는 숙주세포를 이용한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 제조방법을 포함한다. 본 발명은 또한 혈관내피세포 및 종양 혈관신생 유도된 세포 융합체의 증식을 억제하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 일차 종양 및 전이의 성장 억제 혹은 억제 촉진; 및 암; 당뇨성 망막증, 진전성 반점 퇴화 혹은 류마티성 관절염의 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

색인어

알부민, 엔도스태틴, 안지오스태틴, 혈관신생, 융합 단백질

명세서

기술분야

관련 출원

본 출원은 2002. 2. 7 일자로 제출된 미국 가출원 제 60/355,547에 대한 우선권을 주장한다. 상기 출원의 명세서는 본 명세서에 참고문헌으로 편입된다.

본 발명의 분야

본 발명은 항 혈관신생(anti-angiogenesis) 및 알부민 융합 단백질에 관한 것이다.

배경기술

네오안지오제네시스라고도 종종 불리우는 혈관신생(angiogenesis)은 새로운 모세혈관 및 혈관의 발생을 의미한다.

이 프로세스는 일반적으로 태아 발생; 성숙; 배란; 태반 발생; 및 질병이나 국소빈혈 구역에서 측부 혈관의 발생, 신경 재생, 골 성장, 및 상처 치유를 포함하는 다수의 생물학적 상황에서 일어난다. 모든 이러한 이벤트, 특히 태아 발생은 내피 세포의 매우 빠른 성장이 요구되고 이들이 혈관의 복합 네트워크내로 이동하고 분화하는 것이 요구된다.

그러나, 상술한 생물학적 이벤트(보통 시작하고 개시 1 내지 2주내에 끝남) 를 제외하고, 정상적인 성인에서는 혈관신생은 필요하지 않으며 내피 세포는 비활동적이다.

일반적으로, 내피 세포는 매우 천천히, 약 3 내지 4년에 한번에 걸쳐 재생된다. 내피세포는 분할 능력을 잃으며 이들은 혈관신생의 내생 자극제와 억제제 사이의 복잡한 균형에 의해 억제상태로 유지된다.

새로운 혈관은 종양 성장 및 전이에 필요하다는 개념은 1970년대에 Folman에 의해 제안되었다. 지난 7년내에, Folman의 실험실에서 혈관신생을 억제할 수 있는 여러가지 펩타이드 및 단백질, 특히 안지오스태틴, 엔도스테틴, 및 콜라겐 및 다른 기저막 단백질의 소 펩타이드 유도체를 발견하였다.

이러한 치료제는 종양 세포를 직접 공격하기보다는 종양 세포에 공급되는 혈관을 공격함으로써 암을 공격하는 새로운 방법을 제공한다.

통상적인 항종양 치료에서, 화학치료는 암세포의 높은 성장속도를 목표로하고 종종 암의 서브타입 혹은 기관-특이 암에 의해 발현되는 특정 발암유전자 혹은 수용체를 표적하기위해 맞추어진다. 종양 세포는 본래 유전학적으로 불안정하기때문에, 이들은 유전학적 구조를 바꾸거나 드럭 내성을 가짐으로써 종종 화학치료제를 교묘하게 회피한다. 마찬가지로, 한 특정 타입의 암에 대해 효과적인 제제는 다른 기관 부위에서의 암에 대해서는 실패한다.

표준 화학치료에 대한 두번째로 큰 결점은 높은 분할 속도를 갖는 일반적인 세포- 혈 및 골수 세포, 위장관 세포, 및 모낭 세포와 같은 세포에 심각한 독성을 갖는다는 것이다.

따라서, 현재 화학치료에 직면한 가장 큰 문제점은 높은 종양-세포 변이율에 기인한 특이성의 부재(그 결과 독성 부작용을 일으킴) 및 드럭 내성이다.

내피 세포 표적화는 이러한 문제를 피할 수 있으며 또한 전이적인 퍼짐에 대항하는 수단으로 제공될 수 있다. 내피 세포는 일반적으로 증식하지않기때문에, 이들은 빠르게 변이하는 적응 능력을 갖지않으며 드럭 내성으로 잘 발달되지 않는다.

다른 기관 부위에서의 내피 세포도 마찬가지인지 상당한 논쟁이 있지만 이들이 이들의 이동 및 증식을 유발하는 생화학적 신호 및 자극에 유사하게 반응한다는 것은 확실하다.

따라서, 연구자 및 임상의는 화학치료와 관련된 비특이적 독성을 피하는 잠재성을 갖는 종양 세포보다 내피 세포를 표적화함으로써 암 치료에 보다 완전한 접근을 이룰 수 있다.

유전학적으로 안정한 내피 세포를 공격하는 혈관신생 드럭은 또한 드럭 내성이 잘 일어나지 않는다.

최근에, 항-혈관신생 치료는 종양을 '굶주리게 하고(starve)', 전이적 퍼짐에 필요한 맥관을 제거하도록 고안된다. 특히, 종양을 표적화하는 현재의 암 치료와는 달리, 종양 혈관신생-성 엔도스태틴을 억제하는 제제는 종양의 생명-유지 시스템을 표적화할 수 있다. 혈관신생 억제를 이용한 효과적인 치료는 종양을 보다 크게 성장시키지 않도록 '굶주리게 하고' 전이를 막아 일차 종양이 임상학적으로 현저한 종양으로 성장하도록 하는 맥관 발달을 결렬시켜야한다. 또한, 이들은 종양 혈관에 고 특이적이기때문에, 이들의 사용은 정상 세포에 대한 손상과 이와 관련된 부작용을 피할 수 있다.

혈관신생은 여러가지 타입의 암에 다른 역할을 하는 경향이 있다.

항-혈관신생 치료로 가장 이득을 받는 환자는 초기-단계, 국소화된 질병을 갖는 자들이며; 이상적으로는, 의사가 치유적 수술을 시도하거나 호전적인 화학치료를 적용하기에 충분할 정도로 국소적으로 진전된 질병을 가진 환자에 주어진 암을 감소시킨다. 또한, 암에 유전학적으로 민감한 것으로 알려진 환자는 예방 수단으로서 혈관신생 억제제를 취할 수 있다.

대다수의 암은 발달 경로에 있어 늦게 진단된다. 결국, 대부분의 환자에서, 종양학은 그 기원 부위(일차 종양)에서 뿐만 아니라 떨어진 부위(전이)에서도 그 질병을 조절해야만 한다. 수술, 방사선 치료, 및 화학치료는 이러한 목적을 완수하는데 이용가능한 주요 수단이지만, 다수의 암과 관련된 높은 사망률은 이러한 치료의 부적합성을 말해준다.

모든 경우에, 이러한 치료는 다음과 같은 이유로 실패한다:

· 치료의 독성은 그 치료가 질병에 주는 영향을 능가한다.

· 악성 세포가 방사선 혹은 화학치료에 대한 저항성을 발달시키거나 방사선 혹은 수술에 의해 치료되기에는 너무 광범위하게 퍼지기때문에, 모든 암세포가 치료에 의해 근절되는 것은 아니다.

세포독성적 화학치료는 종종 그 질병률과 치료 효능의 발란스를 맞춰야하는 종양학을 요구한다. 약학은 이들의 전신적 영향으로부터 그 약의 효능을 유도함에도 불구하고, 세포독성적 화학치료(이들 대부분은 단독으로 활발하게 증식하는 세 포를 제거함)는 또한 빠르게 분할하는 정상 세포를 파괴한다.

정상 세포 및 암 세포의 두가지 모든 세포의 파괴는 여러가지 달갑지않은 부작용을 생성한다:

· 골수 파괴로 인한 빈혈 및 호중구감소증(면역세포의 상실[혈소판 감소증]).

· 위장관 라인의 손상으로 인한 매스꺼움 및 구토.

· 모낭의 사멸

· 신경계 손상

현재의 치료술- 수술, 방사선 및 세포독성적 화학치료- 은 이러한 방식을 이용하여 가능한한 많은 향상된 암 치료를 갖는다. 보다 나은 향상을 이루기위해 암의 분자 발병 경로의 지식을 개발할 필요가 있는 것으로 확실히 여겨진다.

J. Folkman의 1971 New England Journal of Medicine 논문(volume 285, p 1182-1186)에는 혈관신생은 암의 발병 경로에 중요하다는 아이디어가 도입되었으며 그리고 종양과 상호작용하는 정상 조직이 항암 치료를 위한 표적이 될 수 있다고 제시되었다.

일차 Lewis 폐 암종에서 임상적 효능 연구 및 전이 B16 이종이식 연구는 종양 정체후 엔도스태틴의 피하 투여를 나타내었다. 면역조직 화학법은 이러한 영향이 종양 혈관신생의 억제를 통해 매개되었음을 나타내었다. 엔도스태틴 치료가 계속된 경우, 휴지 상태로 잔류하는 종양이 보였으며 또한 중요하게도 드럭 저항성이나 독성 영향의 증거는 보이지 않았다. 결국, 독성의 부재는 공식적인 독성학 연구 에서 다시 나타났으며, 따라서 이는 현재 개발중인 다수의 항-혈관신생 화합물에 걸쳐 당면한 결점을 나타내었다.

NCI를 포함하는 다른 연구 그룹에 의해 생성된 데이타는 어떠한 항-종양 효과를 나타내는데 실패하였다. 그러나, 상충되는 결과에 대한 이유가 밝혀졌으며 NCI는 현재 엔도스태틴의 항-혈관신생 특성에 대하여 만족스러워한다.

1999, 7월에, FDA는 고형 종양을 가진 환자의 치료용으로 엔도스태틴에 대하여 인베스티게이셔널 뉴 드럭(IND) 적용을 승인하였으며, NCI 및 EntreMed는 재조합 단백질을 이용한 3가지의 계획된 Phase I 임상 연구를 시작할 수 있었다.

첫번째 연구는 여러가지 고형 종양을 가진 환자를 대상으로 Dana-Farber Cancer Institute(Boston)에서 1999년 9월에 시작하였다. NCI는 다른 Phase I 임상 연구를 지지하였으며, 이는 Anderson Cancer Centre(Houston) 및 위스콘신 대학에서 수행되었다. 환자들은 28일 주기동안 매일 엔도스태틴을 정맥주사받았다. 보스톤 및 위스콘신 센터의 환자에게는 매일 동일한 드럭 투여량이 유지되었으며 휴스턴의 환자에게는 그 질병이 안정적인 경우 8주 간격에 증가된 투여량을 받게하였다.

엔도스태틴이 투여된 61명 환자에서 실험한 이 연구로 부터 보고된 예비실험 결과, 20명 환자는 4 내지 12개월의 엔도스태틴 치료를 받은 것으로 나타났다. 20명 환자중 5명은 최소 4개월동안 안정적인 질병을 가졌으며 이들 환자중 2명은 12개월이상 치료받았다.

Anderson Centre에서 수행된 시험에서, PET 스캐닝은 엔도스태틴이 투여된 환자에서 종양 혈 흐름의 현저한 감소를 보여주었다. 이러한 관찰은 엔도스태틴 치료 56일후에 나타난 위스콘신 대학 연국에 의해 확증되었으며, 한편, 심장을 통과하는 혈 흐름은 변하지않았으며, 환자중 일부의 종양은 감소되었다. 소변 기초 섬유아세포 성장인자 및 혈관내피 성장인자(VEGF) 수준에 있어 투여량-관련 감소가 또한 관찰되었다.

중요하게도, 주 독성적 부작용은 어떤 여구에서도 보고되지않았으며 드럭 저항성은 문제가 될 정도로 나타나지 않았다.

세가지 모든 Phase I 임상 시험으로부터 얻어진 조합된 데이타는 엔도스태틴은 잘 받아들여짐에도 불구하고, 등록된 19명 환자중 단지 2명만 계속하여 치료를 받았으며 한편, 20명 환자는 질병 진행때문에 연구에서 제외되었으며 그리고 5명 환자는 이 연구로부터 자발적으로 철회하였다.

EntreMed는 유럽에서 엔도스태틴의 연속 주입 및 피하주사 투여를 평가하는 Phase I 임상시험을 진행중이다.

EntreMed는 사람에서 Phase II 임상 시험을 시작할 계획이며, 종양 진전에서 이와 반대되는 종양 감소에 이르는 시간에 대한 최종 시기도 함께 조사한다.

개발에 있어서 대다수의 항-혈관신생제와 관련되어 이들 사용의 가장 우수한 잠재성은 화학 혹은 방사치료와 결합되는 경우에 나타난다. 실제로, 일부 예비임상 연구는 엔도스태틴이 방사치료과 함께 이용하는 경우 상승효과를 나타내는 것을 보여주었으며 EntreMed는 여러가지 조합 치료를 연구하는 여러가지 진행중인 예비임상 연구를 하고 있다. 예비임상 연구는 프로그레시브 반점성 변성 및 류마티스 관 절염(RA) 모델에서 엔도스태틴의 효능을 평가하는 연구가 또한 진행중이다.

안지오스태틴 치료는 또한 VEGF 및 bFGF 모두에 대한 mRNA의 감소된 발현과 상관있는 것으로 나타났다. 사람 재조합 버전은 B16 악성 전이 모델에서 성공적으로 폐 악성을 억제하였다. 종양 세포 주입후 3일에, 동물들은 안지오스태틴으로 11동안 처리되었다. 이 처리는 폐 전이를 60-80% 감소시켰다.

EntreMed는 예비임상 독성학 및 약리학을 수행하였으며 1999년 12월에 IND 어플리케이션을 제출하였다. 이 어플리케이션은 FDA에 의해 2000년에 승인되었으며, 단일치료로서 안지오스태틴을 연구하는 첫번째 Phase I 임상연구는 Thomas Jefferson University Hospital(Philadelphia)에서 2000년 3월에 시작하였다.

EntreMed는 동일한 병원에서 2000년 7월에 두번째 시도를 시작하였지만 엔도스태넨과 달리 이 연구는 진전된 암을 가진 환자에서 방사선 치료와 함께 일부 조합하여 그 결과를 조사하는 것이다. 이들 연구 모두에서, 안지오스태틴은 정맥주사 투여된다.

안지오스태틴에 대한 유럽에서의 연구는 2000년 12월에 시작되었으며 피하주사로 투여되는 경우 안지오스태틴의 내성을 살펴본 바 있다.

본 발명의 요약

본 발명은 알부민 또는 이들의 프레그먼트나 변이체에 융합된 항-혈관신생 펩타이드 또는 이들의 프레그먼트나 변이체에 관한 것이다. 이러한 융합 단백질은 본 명세서에서 집합적으로 '본 발명의 알부민 융합 단백질'로 칭하여진다. 본 발명 의 이러한 융합 단백질은 확장된 생체내 반감기 및/또는 확장된 또는 치료 활성을 나타낸다.

본 발명은 치료적 알부민 융합 단백질, 조성물, 약학 조성물, 배합물 및 키트를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 핵산 분자 뿐만 아니라, 이러한 핵산을 함유하는 벡터, 이러한 핵산 및 벡터로 형질변형된 숙주세포, 및 이러한 핵산, 벡터, 및/또는 숙주세포를 이용하여 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는 방법을 포함한다.

본 발명은 또한 내피 세포의 증식 및/또는 이동을 억제하는 조성물 및 방법; 종양-유도된 혈관신생 억제; 일차 종양 및 전이의 성장억제, 또는 일차 종양 및 전이의 퇴하 촉진; 및 이의 암, 당뇨 망막증, 프로그레시브 반점성 퇴하 또는 류마티스 관절염 및 모든 혈관신생 관련 질병을 치료하는데 사용되는 용도에 관한 것이다.

본 발명은 또한 포유류에서 세포 혹은 세포 구조의 내부에 혈관신생 펩타이드를 표적하는 방법; 본 발명의 알부민 융합 단백질을 세포 타입, 표적 기관 또는 특정 세포학적이나 해부학적 위치에 표적화하는 방법; 포유류에서 항-혈관신생 관련 질병 혹은 병을 진단하는 방법; 및 혈관신생 펩타이드의 투약 스케쥴링을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1. N-말단 엔도스태틴-알부민 융합 오픈 리딩 프래임의 DNA 서열(이 DNA 서열은 일차 번역 생성물을 암호하며, 따라서 첫번째 72 뉴클레오타이드는 본 명세서 실시예에서 효모로부터 분비되는 도중 제거되는 24 아미노산 리더 서열을 암호한다).

도 2. N-말단 엔도스태틴-알부민 융합 단백질의 아미노산 서열(이 아미노산 서열은 도 1에 나타낸 DNA 서열의 일차 번역 생성물을 나타내며, 따라서 효모에서 분비되는 도중 제거되는 24 아미노산 리더 서열을 포함한다. 따라서, 이 단백질 서열은 본 명세서의 종양 억제 실시예에 사용된 단백질의 서열을 나타내지 않는다).

도 3. C-말단 알부민-엔도스태틴 융합 오픈 리딩 프래임의 DNA 서열(이 DNA 서열은 일차 번역 생성물을 암호하며, 따라서 첫번째 72 뉴클레오타이드는 본 명세서 실시예에서 효모로부터 분비도중 제거되는 24 아미노산 리더 서열을 암호한다).

도 4. C-말단 알부민-엔도스태틴 융합 단백질의 아미노산 서열(이 아미노산 서열은 도 3에 나타낸 DNA 서열의 일차 번역 생성물을 나타내며, 따라서 효모에서 분비도중 제거되는 24아미노산 리더 서열을 포함한다. 따라서, 이 단백질 서열은 본 명세서의 종양 억제 실시예에 사용된 단백질의 서열을 나타내지않는다).

도 5. N-말단 혈관신생(논-글리코실레이티드)-알부민 융합 오픈 리딩 프래임의 DNA 서열.

도 6. N-말단 혈관신생(논-글리코실레이티드)-알부민 융합 단백질의 아미노산 서열.

도 7. C-말단 알부민-혈관신생(논-글리코실레이티드)-융합 오픈 리딩 프래임의 DNA 서열.

도 8. C-말단 알부민-혈관신생(논-글리코실레이티드)-융합 단백질의 아미노산 서열.

도 9. N-말단 Kringle5-(GGS)4GG-알부민 융합 오픈 리딩 프래임의 DNA 서열.

도 10. N-말단 Kringle5-(GGS)4GG-알부민 융합 단백질의 아미노산 서열.

도 11. C-말단 알부민-(GGS)4GG-Kringle5 융합 오픈 리딩 프래임의 DNA 서열.

도 12. C-말단 알부민-(GGS)4GG-알부민 융합 단백질의 아미노산 서열.

도 13. 4-12% 그래디언트 SDS 겔 및 웨스턴 블롯: A. 콜로이드 블루 겔. B. 항-엔도스태틴 웨스턴 블롯. C. 항-HSA 웨스턴 블롯.

도 14. 평균 엔도스태틴 농도 +/- SD, 이후 s.c. 적용.

도 15. 평균 엔도스태틴 농도 +/- SD, 이후 i.v. 적용.

도 16. PK 데이타. 처리 = C 말단-엔도스태틴 72h, 경로 = s.c., 적재량 = 1.8, 유지량 = 1.2

도 17. PK 데이타. 처리 = C 말단-엔도스태틴 24h, 경로 = s.c., 적재량 = 1.5, 유지량 = 0.5

도 18. PK 데이타. 처리 = C 말단-엔도스태틴 72h, 경로 = s.c., 적재량 = 1, 유지량 = 0.9

도 19. PK 데이타. 처리 = N 말단-엔도스태틴 24h, 경로 = s.c., 적재량 = 0.8, 유지량 = 0.25

도 20. 이동성-평가(HUVEC)에서 알부민-융합-엔도스태틴 및 표준 엔도스태틴 의 효능. 융합체에 대한 모든 농도 및 투여량은 엔도스태틴 등가물에 관련된다.

도 21. 알부민-융합-C-말단 엔도스태틴 s.c. 처리후 종양 체적. 대조군=○---○; 1.2mg/kg/72h=□---□; 0.5mg/kg/24hr=●---●. 융합체에 대한 모든 농도 혹은 투여량은 엔도스태틴 등가물에 관련된다.

도 22. 알부민-융합-C 말단-엔도스태틴 s.c. 처리후 종양 체적. 대조군=○---○; 0.4mg/kg/72h=◆---◆; 1.2mg/kg/72h=□---□; 3.6mg/kg/72hr=■---■. 융합체에 대한 모든 농도 혹은 투여량은 엔도스태틴 등가물에 관련된다.

도 23. 알부민-융합-N 말단-엔도스태틴과 함께 Bx Pc-3 s.c. 처리후 종양 체적. 대조군=■---■; 0.8mg/kg/72h=□---□; 0.75mg/kg/48h=○---○; 0.4mg/kg/24hr=●---●. 융합체에 대한 모든 농도 혹은 투여량은 엔도스태틴 등가물에 관련된다.

도 24. 알부민-융합-N 말단-엔도스태틴과 함께 Bx Pc-3 s.c. 처리후 종양 체적. 대조군=○---○; 0.25mg/kg/48h=▲---▲; 0.75mg/kg/48h=■---■; 2.25mg/kg/48hr=△---△. 융합체에 대한 모든 농도 혹은 투여량은 엔도스태틴 등가물에 관련된다.

도 25. SP-FF에서 정제된 C-말단 rHA 안지오스태틴의 SDS PAGE.

도 26. C-말단 rHA 안지오스태틴의 웨스턴 블롯 분석.

도 27. 알부민 또는 안지오스태틴-알부민 융합 단백질을 발현하는 효모 세포 상층액의 SDS PAGE.

도 28(A-D). 성숙된 형태의 사람 알부민의 아미노산 서열(SEQ ID NO:18) 및 이를 암호하는 폴리뉴클레오타이드(SEQ ID NO:17).

발명의 상세한 설명

본 발명은 혈관신생을 억제하는 펩타이드가 결합된 알부민을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 명세서에 사용된 용어 '단백질' 및 '펩타이드'는 이에 한정하는 것은 아니나 단백질, 폴리펩타이드 뿐만 아니라 펩타이드를 포함한다. 이러한 펩타이드는 이에 한정하는 것은 아니나 엔도스태틴(레스틴, 어레스텐, 캔스태틴 및 텀스태틴 포함) 또는 혈관신생을 억제하는 특성을 갖는 이들의 프레그먼트나 변이체; 안지오스태틴 또는 혈관신생을 억제하는 특성을 갖는 이들의 프레그먼트나 변이체; 알파스태틴 또는 혈관신생을 억제하는 특성을 갖는 이들의 프레그먼트나 변이체; 크링글 5 또는 혈관신생을 억제하는 특성을 갖는 이들의 프레그먼트나 변이체; 항-트롬빈 III 또는 또는 혈관신생을 억제하는 특성을 갖는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함한다.

본 발명은 또한 알부민이 두개(또는 그 이상)의 혈관신생 억제 펩타이드, 임의로 이에 한정하는 것은 아니나 엔도스태틴/안지오스태틴 또는 엔도스테틴/안지오스태틴/크링글 5, 혈관신생 억제 특성을 갖는 이들의 융합체 또는 프레그먼트나 변이체이를 포함하는 다른 혈관신생 억제 펩타이드에 결합된 이작용성(또는 다작용성) 융합 단백질에 관한 것이다. 이러한 이작용성(또는 다작용성) 융합 단백질은 또한 단지 한 타입의 혈관신생 억제 펩타이드를 포함하는 알부민 융합 단백질과 비교하여 상승적인 항-혈관신생 효과를 나타낼 수 있다.

본 발명은 또한 하나(또는 그 이상)의 혈관신생 억제 펩타이드(들), 임의로 다른 혈관신생 억제 펩타이드가 두개의 알부민 분자 또는 동일하거나 다를 수 있는 알부민의 프레그먼트나 변이체에 결합된 융합 단백질에 관한 것이다.

또한, 생물학적 활성을 증강시키거나 생물학적 활성을 조절하기위해 화학적 엔터티(entities)가 본 발명의 융합 단백질에 공유결합되거나 또는 함께 사용될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 생체내에서 혈관신생 억제 펩타이드의 반감기를 연장시키는 것으로 예측된다. 시험관내 또는 생체내에서 상기 알부민-융합 펩타이드의 반감기는 연결된 알부민이 결여된 펩타이드의 반감기에 비해 2배, 5배 또는 그 이상으로 길어진다. 또한, 적어도 일부 상기 펩타이드의 증가된 반감기에 기인하여, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료 펩타이드의 투여 스케쥴의 빈도를 줄일 수 있는 것으로 예측된다. 투여 스케쥴 빈도는 연결된 알부민이 결여된 치료 펩타이드의 투여 스케쥴의 빈도에 비해 적어도 4분의 1로 혹은 적어도 2분의 1 또는 그 이상으로 감소된다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 시험관내 및/또는 생체내에서 펩타이드의 보존기간을 연장하며, 그리고/또는 용액내에서(또는 약학 조성물내에서) 상기 펩타이드 및/또는 그 활성을 안정화시킨다. 치료제가 될 수 있는 이러한 알부민-융합 단백질은 비특이적 결합과 같은 인자에 기인한 단백질의 손실을 억제하기위해 과량의 캐리어 단백질(융합되지 않은 알부민과 같은)을 갖는 단백질 용액을 배합해야하는 필요성을 줄일 수 있는 것으로 기대된다.

본 발명은 또한 상기 알부민 융합 단백질을 암호하는 핵산 분자 뿐만아니라 이러한 핵산을 함유하는 벡터, 이러한 핵산 벡터로 형질변형된 숙주세포, 및 이러한 핵산, 벡터, 및/또는 숙주세포를 이용하여 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자를 함유하는 것으로 변형된, 임의로 상기 핵산 분자에 의해 암호화된 알부민 융합 단백질을 발현하는 것으로 변형된 유전자도입된 기관을 포함한다.

본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 약학적으로 수용가능한 희석제 또는 캐리어를 포함하는 약학 배합물을 포함한다. 이러한 배합물은 키트나 용기내에 존재할 수 있다. 이러한 키트나 용기는 상기 단백질의 연장된 보존기간과 관련된 설명서가 함께 동봉될 수 있다. 이러한 배합물은 환자에게 약학 배합물을 투여하는 단계를 포함하는 포유류나 사람과 같은 환자에서 혈관신생-관련 질병, 질병 증상 또는 관련 질환을 억제, 치료 혹은 개선하는 방법에 사용될 수 있다.

본 발명은 또한 본 발명의 알부민-융합 혈관신생 억제 펩타이드를 포유류에 투여하는 것을 포함하는 적당히 높은 농도의 혈관신생 억제 펩타이드를 이용한 포유류의 치료와 관련된 부작용(예, 주입 부위 반응, 두통, 메스꺼움, 열, 증가된 에너지 수준, 발진 무력증, 설사, 현기증, 알러지 반응, 비정상적으로 낮은 호중구 수준)을 잠재적으로 최소화하는 방법을 포함한다.

본 발명은 혈관신생에 의해 야기된 혈관신생-관련 질병 또는 질환을 억제, 치료 혹은 개선할 필요가 있는 포유류에 상기 질병 또는 질환을 억제, 치료 혹은 개선하기위한 유효량으로 혈관신생 억제 펩타이드(또는 이들의 프레그먼트나 변이 체)를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 혈관신생에 의해 야기된 혈관신생-관련 질병 또는 질환을 억제, 치료 또는 개선하는 방법을 포함한다. 본 발명에서, 엔도스태틴과 같은 혈관신생 억제 펩타이드는 또한 '치료 단백질(Therapeutic protein)'로 칭하여진다.

본 발명은 알부민 또는 알부민의 다량 복사물(이들의 프레그먼트 및 변이체 포함)에 융합된 엔도스태틴 펩타이드 또는 엔도스태틴 단량체의 다량 복사물(이들의 프레그먼트 및 변이체 포함)을 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다.

본 발명은 또한 포유류에서 엔도스태틴 펩타이드의 반감기를 연장시키는 방법을 포함한다. 상기 방법은 알부민에 엔도스태틴 펩타이드를 연결하여 알부민-융합된 엔도스태틴 펩타이드를 형성하는 단계 및 상기 알부민-융합된 엔도스태틴 펩타이드를 포유류에 투여하는 것을 수반한다. 전형적으로, 알부민-융합 엔도스태틴의 반감기는 연결된 알부민이 결여된 엔도스태틴 펩타이드의 반감기에 비해 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배 또는 적어도 50-배로 길어질 수 있다.

항-종양 활성을 나타내는 엔도스태틴에 융합된 알부민을 포함하는 융합 단백질이 본 명세서에 예시된다. 이러한 항-종양 활성은 이에 한정하는 것은 아니나 일차 종양 혹은 전이의 성장 억제를 포함한다. 또한, 본 발명은 엔도스태틴에 융합된 알부민을 포함하는 이러한 융합 단백질을 암, 당뇨성 레티노플라스티, 프로그레시브 반점성 퇴화 또는 류마티스 관절염 치료용으로 사용하는 용도에 관한 것이다.

본 발명의 여러가지 견지는 하기에 보다 상세히 설명된다.

엔도스태틴

엔도스태틴은 1997년(M. O'Reilly, et al., Cell 88:277-285), 처음에 콜라겐 XVIII의 20kDa C-말단 프레그먼트로 기술되었으며, 이는 본래 1996년에 혈관내피종(heamangioendothelioma) 세포주로부터 분리되었다. 엔도스태틴의

항-혈관신생 영향을 나타내는 본래 연구는 배큘로바이러스 및 이. 콜라이(*E. coli*) 발현 시스템에서 생성된 재조합 뮤린 버전을 사용하였다. 이 분자는 시험관내에서 세포 부착 분자(CAM) 어세이로 내피세포 증식의 선택적인 억제를 나타내었다.

혈관 내피 세포(VECs)를 감싸는 기저층 성분인 콜라겐 XVIII는 엔도스태닌의 모 단백질(parent protein)이며 항-혈관신생 활성에 아연이 필요한 것으로 알려져 있다. VECs는 이들이 혈관신생 공급원을 향해 이동하기전에 기저층 분해를 시작하여야 한다. 세포 배양 연구에서, 엔도스태틴의 일차 기능은 VEC 증식의 억제인 것으로 여겨지며, 이는 아마도 단백질 가수분해 효소 콜라게나아제에 의해 내피세포 매트릭스(ECM) 리모델링을 억제함으로써 이루어지는 것으로 여겨진다.

엔도스태틴은 약 18,000 내지 20,000 달톤(18-20kDa)의 분자량을 가지며 배양된 내피세포에서 내피세포 증식을 억제할 수 있다. 상기 단백질의 한 버전은 U.S. 5,854,205에 기재된 바와 같은 N-말단 아미노산 서열 His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Thr Pro Leu Ser(SEQ ID NO: 1)로 특성화될 수 있으며 이는 뮤린 콜라겐 타입 XVIII의 C-말단 프레그먼트에 상응하는 것이다. 이에 상응하는 사람 콜라겐 타입 XVIII의 C-말단 프레그먼트의 N-말단 아미노산 서열(본 실시예에서 사용됨)은 His **Ser** His **Arg** Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn **Ser** Pro Leu Ser(SEQ ID NO: 2)이다.

본 발명에 유용한 엔도스태틴 펩타이드는 U.S. 5,854,205에 기술된 바와 같이 자연적으로 발생하는 엔도스태틴 펩타이드의 유사체, 동족체, 프레그먼트, 또는 유도체인 어느 분자와 같은 엔도스태틴의 프레그먼트나 변이체를 포함한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질에 유용한 이들의 활성 프레그먼트 및 변이체는 표 1에 열거된 특허 및 참고문헌에 기술된 것들을 포함하는 이 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 본 발명에 유용한 엔도스태틴 펩타이드는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2에 상응하는 엔도스태틴 펩타이드의 단일 생물학적 활성을 갖는 것만 요구된다.

본 발명에 유용한 엔도스태틴 펩타이드는 항-혈관신생 활성을 나타내며, 그리고 또한 예를들어, 증가된 생체이용률, 및/또는 안정성 또는 감소된 숙주 면역 인지와 같은 부가적인 잇점을 가질 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질에 유용한 이들의 활성 프레그먼트 및 변이체는 표 1에 열거된 특허 및 참고문헌에 기술된 것들을 포함하는 이 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

엔도스태틴(또는 이들의 프레그먼트나 변이체)은 O-글리코실화될 수 있는 효모에서 발현되는 경우, 어느 세린 혹은 트레오닌이 변형되거나 그렇지않으면 O-글리코실화의 영향 또는 엔도스태틴(또는 이들의 프레그먼트나 변이체)의 생물학적 활성을 최소화하는 수로 감소될 수 있다. 택일적으로, 또는 부가적으로 언더글리코실레이트화된 효모 균주(즉, O-글리코실화에 결함이 있는 것)의 사용이 가능하다.

안지오스태틴

안지오스태틴은 1994년에 처음으로 발견된 플라스미노겐의 프레그먼트이며 항-혈관신생 활성을 갖는 것으로 나타났다. 안지오스태틴은 ATP 생성효소를 내피세포(ECs)의 표면상에 결합시키고 EC 이동 및 세관 형성을 억제할 뿐만 아니라 ECs 및 종양 세포 모두에서 세포사멸을 유도한다.

'안지오스태틴'은 시험관내에서 bFGF와 같은 내생 성장인자의 혈관신생 활성을 극복하는 능력을 가지며 이는 미국 특허 제 5,885,795의 도 1A 및 1B에 나타낸 바와 같은 대체적으로 플라스미노겐 아미노산 98에서 시작하는 플라스미노겐의 본질 부와 아미노산 서열 상동성 및 구조 유사성을 갖는 것으로 정의된다. 안지오스태틴은 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 검출시 약 38kDa 내지 45kDa의 분자량을 가지며 본래의 뮤린 플라스미노겐 분자의 아미노산 수 98에서 시작하는 뮤린 플라스미노겐의 프레그먼트와 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다.

안지오스태틴의 아미노산 서열은 종 사이에 약간 다르다. 예를들어, 사람 안지오스태틴에서 아미노산 서열은 실질적으로 상기 뮤린 플라스미노겐 프레그먼트의 서열과 실질적으로 유사하지만 활성적인 사람 안지오스태틴 서열은 본래 사람 플라스미노겐 아미노산 서열의 아미노산 번호 97 또는 99에서 시작할 수 있다. 또한, 사람 플라스미노겐의 프레그먼트는 마우스 종양 모델에서 나타난 바와 같은 유사한 항-혈관신생 활성을 갖는다. 활성 안지오스태틴 분자에서 아미노산의 수는 다를 수 있으며 내피 억제 활성을 갖는 모든 아미노산 서열은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 참조 예, 미국 특허 5,885,795.

본 발명에 유용한 '안지오스태틴' 펩타이드는 미국 특허 5,885,795에 기술된 바와 같이, 자연적으로 발생하는 안지오스태틴의 유사체, 동족체, 프레그먼트 또는 유도체인 어느 분자와 같은 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함한다.

안지오스태틴은 플라스미노겐 분자의 크링글 리전으로 정의된다(Robbins, K. C., 'The plasminogen-plasmin enzyme system' Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Practice, 2nd Edition, ed. by Colman, R. W. et al. J. B. Lippincott Company, pp. 340-357, 1987). 5개의 이러한 크링글 리전이 있으며, 이는 플라스미노겐 분자의 NH_2 말단부와 형태적으로 관련된 모티프이며 실질적인 서열 상동성을 갖는다. 안지오스태틴의 삼차원 형태는 플라스미노겐 크링글 리전 1 내지 3 및 크링글 리전 4의 일부를 포함하는 것을 여겨진다. 플라스미노겐 분자의 각 크링글 리전은 약 80 아미노산을 함유하며 3개의 2황화 결합을 갖는다. 이 시스테인 모티프는 다른 생물학적으로 활성적인 단백질내에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 단백질은 이에 한정하는 것은 아니지만 프로트롬빈, 헤파토사이트 성장인자, 산란인자 및 대식세포 자극 단백질을 포함한다(Yoshimura, T, et al., 'Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein(MSP, MST1) confirms MSP as a member of the family of kringle proteins and locates the MSP gene on Chromosome 3' J. Biol. Chem. Vol. 268, No. 21, pp. 15461-15468, 1993). 생체내에서 항-혈관신생 활성을 갖는 삼차원 크링글-유사 형태 또는 시스테인 모티프를 갖는 분리 단백질이나 펩타이드가 본 발명의 일부가 되는 것으로 의도된다.

본 발명에 유용한 안지오스태틴 펩타이드는 항-혈관신생 활성을 나타내며, 그리고 또한 예를들어, 증가된 생체이용률, 및/또는 안정성이나 감소된 숙주 면역 인지와 같은 부가적인 잇점을 가질 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질에 유용한 활성 프레그먼트 및 이들의 변이체는 표 1에 열거된 특허 및 참고문헌에 기술된 것들을 포함하는 이 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

크링글 5

크링글 5는 안지오스태틴 구조의 외면이지만 플라스미노겐에 존재하는 플라스미노겐의 내부 프레그먼트이다. 크링글 5는 플라스미노겐의 처음 4개의 크링글 도메인과 약 50% 서열 동일성 및 구조 유사성을 나타낸다(Cao, Y et al, 'Kringle domains of human Angiostatin' J. Biol. Chem. Vol. 271, No 46, pp 29461-29467, 1996; Cao, Y et al, 'Kringle 5 of Plasminogen is a novel Inhibitor of Endothelial Cell Growth' J. Biol. Chem. Vol. 272, No 36, pp 22924-22928, 1997 and Lu, H, et al; 'Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells' Biochem. Biophysical Research Cummunications, Vol. 258, pp 668-673, 1999).

본 발명에 유용한 크링글 5 펩타이드는 항-혈관신생 활성을 나타내며, 그리고 또한 예를들어, 증가된 생체이용률, 및/또는 안정성이나 감소된 숙주 면역 인지와 같은 부가적인 잇점을 가질 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질에 유용한 활성 프레그먼트 및 이들의 변이체는 표 1에 열거된 특허 및 참고문헌에 기술된 것들을 포함하는 이 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

알부민

용어, 사람 혈청 알부민(HSA) 및 사람 알부민(HA)은 본 명세서에 상호교환적으로 사용된다. 용어, '알부민' 및 '혈청 알부민'은 보다 광범위하며, 사람 혈청 알부민(및 이들의 프레그먼트 및 변이체) 뿐만아니라 다른 종(및 이들의 프레그먼트 및 변이체)의 알부민을 포함한다.

본 명세서에 사용된, '알부민'은 집합적으로 알부민의 하나 또는 그 이상의 작용 활성(예, 생물학적 활성)을 갖는 알부민 단백질 또는 아미노산 서열, 또는 알부민 프레그먼트나 변이체를 칭한다. 특히, '알부민'은 사람 알부민 또는 이들의 프레그먼트(참조예 EP 201 239, EP 322 094 WO 97/24445, WO 95/23857), 특히, 본 명세서의 도 27 및 SEQ ID NO:18 및 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480에 나타낸 바와 같은 성숙 형태의 사람 알부민 또는 다른 척추동물의 알부민 또는 이들의 프레그먼트, 또는 이러한 분자의 유사체 또는 변이체 또는 이들의 프레그먼트를 칭한다.

본 발명의 알부민 융합 단백질에 사용되는 사람 혈청 알부민 단백질은 SEQ ID NO:18을 참고로 하기 세트의 점 돌연변이중 하나 또는 모두를 함유한다: Leu-407 → Ala, Leu-408 → Val, Val-409 → Ala, 및 Arg-410 → Ala; 또는 Arg-410 → Ala, Lys-413 →, 및 Lys-414 → Gln(참조 예, WO 95/23857). 다른 구체화로, 상기 세트의 점 돌연변이중 하나 또는 모두를 함유하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 효모 Yap3p 단백질가수분해성 분할에 대하여 향상된 안정성/저항성을 가져, 효모 숙주세포에서 발현되는 재조합 알부민 융합 단백질 생산을 증가시킨다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 치료 단백질의 반감기, 치료 활성 또는 보존기간을 생체내에서 늘이거나 연장시키기에 충분한 알부민 부분은 길이 또는 구조가 생체내에서 비-융합 상태에 있는 치료 단백질의 반감기, 치료 활성, 또는 보존기간에 비하여 알부민 융합 단백질의 치료 단백질의 반감기, 치료 활성 또는 보존기간을 생체내에서 안정화하고, 늘이거나 연장하기에 충분한 알부민 부분을 칭한다. 상기 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 상기한 바와 같은 HA 서열 전체 길이를 포함할 수 있으며 또는 상기 치료 활성을 안정화하거나 연장할 수 있는 이들의 프레그먼트를 하나

또는 그 이상으로 포함할 수 있다. 이러한 프레그먼트는 길이가 10 또는 그 이상인 아미노산일 수 있으며 HA 서열의 약 15, 20, 25, 30, 50 또는 그 이상의 인접 아미노산을 포함하거나 HA의 특정 도메인 일부나 전체를 포함할 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 일반 HA의 변이체일 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 또한 본 명세서에 기술된 치료 단백질의 변이체일 수 있다. 용어 '변이체'는 삽입, 결실 및 치환을 포함하며, 보존적이거나 비보존적일 수 있으며, 이러한 변화는 알부민 또는 치료 단백질의 치료 활성을 나타내는 활성 부위나 활성 도메인의 온코틱(oncotic) 유용 리간드-바인딩 및 면역반응을 일으키는 특성중 하나 또는 그 이상을 실질적으로 변화시키지않는다.

특히, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 자연적으로 발생하는 사람 알부민의 다형 변이체 및 예를들어, EP 322 094에 개시된 프레그먼트들(즉, HA(Pn), n은 369-419임)과 같은 사람 알부민의 프레그먼트를 포함할 수 있다. 상기 알부민은 어느 척추동물, 특히 예를들어 사람, 소, 양 또는 돼지와 같은 어느 포유류로부터 유래될 수 있다. 비-포유류성 알부민은 이에 한정하는 것은 아니나, 닭 및 연어를 포함한다. 상기 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 치료 단백질 부분이 얻어진 동물과는 다른 동물로부터 얻어질 수 있다.

일반적으로, HA 프레그먼트 또는 변이체는 적어도 100 아미노산 길이이며, 임의로 적어도 150 아미노산 길이이다. HA 변이체는 예를들어 도메인 1(SEQ ID No:18의 아미노산 1-194), 2(SEQ ID No:18의 아미노산 195-387), 3(아미노산 388-585), 1 + 2(SEQ ID No:18의 1-387), 2 + 3(SEQ ID No:18의 195-585) 또는 1 + 3(SEQ ID No:18의 아미노산 1-194 + SEQ ID No:18의 아미노산 388-585)와 같은 적어도 HA 전체 도메인으로 구성되거나 택일적으로 이를 포함할 수 있다. 각 도메인자체는 두개의 상동성 서브도메인 즉, 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 및 512-585와 잔기 Lys106 - Glu119, Glu292 - Val315 및 Glu492 - Ala511을 포함 하는 플렉시블 인터-서브도메인 연결기 리전으로 형성된다.

본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 적어도 하나의 HA의 서브도메인 또는 도메인 또는 이들의 보존성 변형체를 포함할 수 있다. 만일 상기 융합이 서브도메인에 기초한 경우, 그 인접 연결기의 일부 또는 전체는 임의로 치료 단백질부에 연결하기위해 사용될 수 있다.

알부민 융합 단백질

본 발명은 일반적으로 알부민 융합 단백질 및 질병 혹은 질환을 치료, 억제 또는 개선하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 사용된 '알부민 융합 단백질'은 적어도 하나의 알부민 분자(또는 이들의 프레그먼트나 변이체)를 적어도 하나의 치료 단백질 분자(또는 이들의 프레그먼트나 변이체)에 융합시킴으로써 형성된 단백질을 칭한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 적어도 하나의 치료 단백질의 프레그먼트나 변이체 및 적어도 하나의 사람 혈청 알부민의 프레그먼트나 변이체를 포함하며, 이는 서로 유전학적 융합(즉, 알부민 융합 단백질이 치표 단백질의 전체 혹은 일부를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 알부민의 전체 혹은 일부를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 인-프래임으로 연결된 핵산의 번역에 의해 생성된다)과 같이 서로 연결된다. 치료 단백질 및 알부민 단백질, 알부민 융합 단백질의 일부는 알부민 융합 단백질의 '부분', '리전' 혹은 '부'로 칭하여질 수 있다.

일 구체화로, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질을 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체화로, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질의 생물학적으로 활성적인 그리고/또는 치료학적으로 활성적인 프레그먼트를 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체화로, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질의 생물학적으로 활성적인 그리고/또는 치료학적으로 활성적인 변이체를 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체화로, 상기 알부민 융합 단백질의 혈청 알부민 단백질 성분은 혈청 알부민의 성숙 부분이다.

다른 구체화로, 본 발명은 치료 단백질, 및 생물학적으로 활성적이며 그리고/또는 치료학적으로 활성적인 혈청 알부민 프레그먼트를 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체화로, 본 발명은 치료 단백질, 및 생물학적으로 활성적이며 그리고/또는 치료학적으로 활성적인 혈청 알부민 변이체를 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 일부 구체화로, 상기 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 치료 단백질이 성숙 부분이다.

다른 구체화로, 본 발명은 생물학적으로 활성적이며 그리고/또는 치료학적으로 활성적인 치료 단백질의 프레그먼트나 변이체 및 생물학적으로 활성적이며 그리고/또는 치료학적으로 활성적인 혈청 알부민의 프레그먼트나 변이체를 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 일부 구체화로, 본 발명은 치료 단백질의 성숙 부분과 혈청 알부민의 성숙 부분을 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다.

일 구체화로, 상기 알부민 융합 단백질은 N-말단 부로서 HA를 포함하며, 그리고 C-말단부로서 치료 단백질을 포함한다. 택일적으로, C-말단 부로서 HA를 포함하는 알부민 융합 단백질 및 N-말단 부로서 치료 단백질이 또한 사용될

수 있다.

다른 구체화로, 상기 알부민 융합 단백질은 알부민의 N-말단 및 C-말단 모두에 융합된 치료 단백질을 갖는다. 일 구체화로, N- 및 C- 말단에 융합된 치료 단백질은 동일한 치료 단백질이다. 다른 구체화로, N- 및 C- 말단에 융합된 치료 단백질은 다른 치료 단백질이다. 다른 구체화로, N- 및 C- 말단에 융합된 치료 단백질은 동일한 질병, 질환 또는 조건을 치료 혹은 억제하는데 사용될 수 있는 다른 치료 단백질이다. 다른 구체화로, N- 및 C- 말단에 융합된 치료 단백질은 환자에서 동시에 공통적으로 발생하는 것으로 이 기술분야에 알려진 질병 또는 질환을 치료 혹은 억제하는데 사용될 수 있는 다른 치료 단백질이다.

알부민 부분이 치료 단백질 부분의 융합된 N-말단 및/또는 C-말단인 알부민 융합 단백질에 부가적으로, 관심있는 치료 단백질 또는 펩타이드를 HA의 내부 리전에 삽입시킴으로써 본 발명의 알부민 융합 단백질이 또한 생성될 수 있다. 예를들어, HA 분자의 단백질 서열내에 다수의 루프 혹은 턴이 이황화 결합에 의해 안정화된 α-헬리스의 말단과 시작부사이에 존재한다. 연장된 대부분의 부분에 대한 HA(PDB 인식자 1AO6, 1BJ5, 1BKE, 1BM0, 1E7E 내지 1E7I 및 1UOR)의 크리스탈 구조로부터 검출되는 바와 같이, 그 루프는 분자체로부터 떨어져 있다. 이러한 루프는 특정 생물학적 활성을 갖는 알부민 분자를 필수적으로 생성하기위해 치료학적으로 활성적인 펩타이드, 특히 작용적인 제2 구조를 필요로하는 것들, 또는 치료 단백질 을 삽입하거나 또는 내부 융합하는데 유용하다.

본 발명의 알부민 융합 단백질을 생성하기위해 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 삽입될 수 있는 사람 알부민 구조의 루프는 Val54-Asn61, Thr76-Asp89, Ala92-Glu100, Gln170-Ala176, His247-Glu252, Glu266-Glu277, Glu280-His288, Ala362-Glu368, Lys439-Pro447, Val462-Lys475, Thr478-Pro486, 및 Lys560-Thr566을 포함한다. 다른 구체화로, 펩타이드나 폴리펩타이드는 성숙 사람 알부민(SEQ ID NO: 18)의 Val54-Asn61, Gln170-Ala176, 및/또는 Lys560-Thr566 루프내로 삽입된다.

삽입되어지는 펩타이드는 특정 생물학적 활성에 대해 스크리닝되는 파지 디스플레이 또는 합성 펩타이드라이브러리로부터 유래되거나 또는 원하는 기능을 갖는 분자의 활성 부분으로부터 유래될 수 있다. 또한, 랜덤 펩타이드 라이브러리는 특정 루프내에 생성되거나 랜덤화된 펩타이드를 HA 분자의 특정 루프내 삽입하여 생성될 수 있으며 이는 모든 가능한 아미노산 조합을 나타낸다.

이러한 라이브러리(들)는 하기 방법중 하나에 의해 HA 혹은 HA의 도메인 프레그먼트에서 생성된다:

(a) HA 혹은 HA의 도메인 프레그먼트의 하나 또는 그 이상의 펩타이드 루프내에 아미노산의 랜덤화 변이. 루프내의 하나 또는 그 이상 또는 모든 잔기가 이 방식으로 변이될 수 있다;

(b) HA 혹은 HA 도메인 프레그먼트의 하나 또는 그 이상의 루프내로 길이 Xn(X는 아미노산이며 n은 잔기의 수임)의 랜덤화 펩타이드(들)의 치환 혹은 삽입(즉, 내부 융합);

(c) (a) 및/또는 (b)에 부가적으로 N-, C- 또는 N- 및 C- 말단 펩타이드/단백질 융합.

HA 혹은 HA 도메인 프레그먼트는 또한 동일한 HA 혹은 HA 도메인 프레그먼트내로 다른 타겟에 대한 다른 루프의 다른 스크린으로부터 유래된 펩타이드를 그라프팅하여 다작용성이 되도록 형성될 수 있다.

사람 혈청 알부민의 루프내에 삽입된 펩타이드는 치료 단백질 펩타이드 또는 이들의 펩타이드 프레그먼트나 펩타이드 변이체이다. 보다 상세하게, 본 발명은 사람 혈청 알부민의 루프내로 삽입되는 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 아미노산 길이의 펩타이드 프레그먼트나 펩타이드 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 본 발명은 또한 사람 혈청 알부민의 N-말단에 융합된 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 아미노산의 펩타이드 프레그먼트나 펩타이드 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 본 발명은 또한 사람 혈청 알부민의 C-말단에 융합된 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 아미노산의 펩타이드 프레그먼트나 펩타이드 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다.

일반적으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 하나의 HA-유래 리전 및 하나 의 치료 단백질-유래 리전을 가질 수 있다. 그러나, 각 단백질의 다중 리전은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 하나 이상의 치료 단백질이 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다. 예를들어, 치료 단백질은 HA의 N- 및 C-말단 모두에 융합될 수 있다. 이러한 형태에서, 상기 치료 단백질 부분은 동일하거나 다른 치료 단백질 분자일 수 있다. 이작용성 알부민 융합 단백질의 구조는 다음과 같이 나타낼 수 있다: X-HA-Y 또는 Y-HA-X 또는 X-Y-HA 또는 HA-X-Y 또는 HA-X-Y-HA 또는 HA-Y-X-HA 또는 HA-X-X-HA 또는 HA-Y-Y-HA 또는 HA-X-HA-Y

또는 X-HA-Y-HA 또는 다중 조합 또는 어느 위치에서 HA-서열내에 X 및/또는 Y 삽입된 구조.

이- 또는 다-작용성 알부민 융합 단백질은 작용, 반감기 등에 따라 여러가지 비율로 제조될 수 있다.

이- 또는 다-작용성 알부민 융합 단백질은 또한 HA의 반대되는 말단에서 단백질 또는 펩타이드를 통해 표적 기관이나 세포 타입에 대한 융합체의 치료 단백질 부분을 표적하기위해 제조될 수 있다.

공지된 치료 분자의 융합체에 대한 해결책으로, 상기 펩타이드는 전형적으로 6, 8, 12, 20 또는 25 또는 Xn(X는 아미노산(aa)이며 n은 잔기수임) 랜덤화된 아미노산의 HA의 N-, C- 또는 N- 및 C- 말단 또는 HA의 도메인 프레그먼트에 대한 융합체로서 제조되며 아미노산의 모든 가능한 조합이 나타내어지는 라이브러리를 스크리닝하여 획득될 수 있다. 이 방법의 특별한 잇점은 펩타이드는 HA 분자상에서 원위치로 선택될 수 있으며 펩타이드의 특성은 따라서 어느 다른 방법에 의해 유도된 펩타이드 경우와 같이 잠재적으로 변형되기보다는 선택되는 것일 수 있으며 이는 그 다음 HA에 결합될 수 있다.

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 부(moieties) 사이에 보다 큰 물리적 분리를 제공하여 예를들어, 동족 수용체에 결합하는 치료 단백질 부분의 이용도를 최대화하기위하여 융합된 부분사이의 연결 펩타이드를 포함할 수 있다. 상기 연결 펩타이드는 플렉시블하거나 보다 단단한 아미노산으로 구성될 수 있다.

따라서, 상기한 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 하기 화학식을 가질 수 있다: R2-R1; R1-R2; R2-R1-R2; R2-L-R1-L-R2; R1-L-R2; R2-L-R1; 또는 R1-L-R2-L-R1(R1은 적어도 하나의 치료 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열(이들의 프레그먼트나 변이체 포함)이며 반드시 동일한 치료 단백질은 아니며, L은 연결기이며 R2는 혈청 알부민 서열(이들의 프레그먼트나 변이체 포함)이며, 예시적인 연결기는 $(GGGGS)_N$ (SEQ ID NO:3) 또는 $(GGGS)_N$ (SEQ ID NO:4) 또는 $(GGS)_N$ 이며, 여기서 N은 1이상의 정수이며 G는 글리신이며 S는 세린을 나타낸다. R1이 둘 또는 그 이상의 치료 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열인 경우, 이러한 서열은 임의로 연결기에 의해 연결될 수 있다.

다른 구체화로, 치료 단백질을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 알부민에 융합되지않은 경우의 동일한 치료 단백질의 보존기간 또는 생체내 반감기 또는 치료 활성에 비해 연장된 보존기간 또는 생체내 반감기 또는 치료 활성을 갖는다. 보존기간은 전형적으로 용액이나 혹은 일부 다른 저장 배합물내 치료 단백질 의 치료 활성이 치료 활성의 과도한 손실없이 안정한 기간을 칭한다. 다수의 치료 단백질은 이들의 비융합 상태에서 매우 불안정하다. 하기에 기술한 바와 같이, 이러한 치료 단백질의 전형적인 보존기간은 본 발명의 알부민 융합 단백질내로 편입시 현저히 길어진다.

'길어진' 혹은 '연장된' 보존기간을 갖는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 동일한 저장 및 취급 조건에 주어지는 스탠다드에 비해 우수한 치료 활성을 나타낸다. 상기 스탠다드는 비융합된 전장 치료 단백질일 수 있다. 상기 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분이 유사체, 변이체이거나, 혹은 그렇지않으면 개조되거나 상기 단백질에 대한 완전한 서열을 포함하지않는 경우에, 치료 활성의 연장은 택일적으로 그 유사체, 변이체, 개조된 펩타이드나 불완전한 서열을 갖는 비융합 등가물과 비교될 수 있다. 예를들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 스탠다드와 동일한 저장 및 취급 조건에 주어지는 경우 주어진 시기에 비교하여 스탠다드 치료활성의 약 100%이상의 치료 활성, 혹은 약 105%, 110%, 120%, 130%, 150% 혹은 200%이상의 치료활성을 보유할 수 있다. 그러나, 치료활성은 치료 단백질이 안정성에 따라 달라지며 100%이하가 될 수도 있다는 것이 주목된다.

보존기간은 또한 저장후 남아있는 치료 활성면에서 평가되고 저장이 시작되는 경우 치료 활성에 대하여 표준화될 수 있다. 길어진 혹은 연장된 치료 활성으로 나타낸 바와 같이 길어진 혹은 연장된 보존기간을 갖는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 동일한 조건에 주어지는 경우 비융합 치료 단백질 등가물의 치료활성의 약 50%이상의 치료활성, 약 60%, 70%, 80%, 혹은 90%이상의 치료활성을 보유할 수 있 다.

치료 단백질

상기한 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 적어도 하나의 치료 단백질의 프레그먼트나 변이체 및 유전학적 융합에 의해 서로 연결되는 적어도 하나의 사람 혈청 알부민의 프레그먼트나 변이체를 포함한다.

본 명세서에 사용된, '치료 단백질'은 하나 또는 그 이상의 치료 및/또는 생물학적 활성을 갖는 엔도스태틴(레스틴, 어레스텐, 캔스태틴 및 텀스태틴 포함) 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체; 하나 또는 그 이상의 치료 및/또는 생물학적 활성을 갖는 안지오스태틴 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체, 하나 또는 그 이상의 치료 및/또는 생물학적 활성을 갖는 알파스태틴 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체, 하나 또는 그 이상의 치료 및/또는 생물학적 활성을 갖는 크링글 5 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체, 하나 또는 그 이상의 치료 및/또는 생물학적 활성을 갖는 항-트롬빈 III 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체와 같은 혈관신생 억제 펩타이드를 칭한다. 따라서 본 발명의 알부민 융합 단백질은 적어도

하나의 치료 단백질의 프레그먼트나 변이체를 함유할 수 있다. 또한, 상기 용어 '치료 단백질'은 내생적 혹은 자연적으로 발생하는 치료 단백질의 관련물을 칭할 수 있다. 변이체는 돌연변이체, 유사체 및 미메틱스 뿐만아니라 내생적 혹은 자연적으로 발생하는 치료 단백질의 관련물을 포함하는 동족체를 포함한다.

'치료 활성' 혹은 '치료학적으로 활성'이 있는 단백질을 나타내는 폴리펩타 이드는 본 명세서에 기술된 또는 이 기술분야에 알려진 하나 또는 그 이상의 치료 단백질과 같은 치료 단백질과 관련된 하나 또는 그 이상의 알려진 생물학적 및/또는 치료 활성을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 비-제한적인 예로, '치료 단백질'은 질병, 조건 혹은 질환의 치료, 억제(예방) 혹은 개선에 유용한 단백질이다.

본 명세서에 사용된, '치료 활성' 또는 '활성'은 그 영향이 사람에서 원하는 치료 성과 혹은 비-인간 포유류 또는 다른 종이나 유기체에서 원하는 영향과 일치하는 활성을 칭할 수 있다. 치료 활성은 생체내 혹은 시험관내에서 측정될 수 있다. 예를들어, 원하는 영향은 세포배양에서 평가될 수 있다. 이러한 시험관내 혹은 세포배양 평가는 일반적으로 이 기술분야에 기술된 다수의 치료 단백질에 이용가능하다.

유용한 평가의 예는이에 한정하는 것은 아니나, 표 1의 참고문헌 및 간행물에 나타낸 것들 및 본 명세서의 실시예에 나타낸 것들을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질에 의해 나타나는 항-혈관신생 또는 항-종양 활성은 예를들어, 본 명세서에 기술된 것들과 같은 시험관내 평가로 쉽게 수행됨으로써 측정될 수 있으며, 이는 혈관신생을 억제하는 융합단백질의 능력, 혹은 종양 성장이나 증식을 억제하는 융합 단백질의 능력을 시험할 수 있다. 이러한 평가를 사용하여, 주어진 종양에 대하여 융합 단백질이 나타내는 상대적인 항-혈관신생 혹은 항-종양 활성과 같은 파라미터가 검출될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질은 하나 또는 그 이상의 올리고사카라이드기의 결합에 의해 변형될 수 있다. 글리 코실화로 칭하여지는 상기 변형은 단백질의 물리적 특성에 극적으로 영향을 주며 단백질 안정성, 분비 및 국지화에 중요할 수 있다. 이러한 변형은 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480에 상세히 기술되어 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질 뿐만 아니라 이들의 유사체 및 변이체는 이들이 발현되는 숙주세포에 의해 이들 핵산 서열의 복제결과로서 또는 이들 발현의 다른 조건에 기인하여 하나 또는 그 이상의 부위에서 글리코실화가 변환되도록 변형될 수 있다. 예를들어, 글리코실화 이성체는 예를들어, 아스파라긴을 글루타민으로 치환하는 것과 같은 아미노산 잔기의 치환 혹은 삭제에 의해 글리코실화 부위를 파기하거나 도입함으로써 생성될 수 있으며, 또는 예를들어, 이. 콜라이(*E. coli*)나 글리코실화-결핍 효모와 같이 이들을 글리코실화하지않는 숙주세포에서 그 단백질을 발현시킴으로서 글리코실화되지않은 재조합 단백질이 생성될 수 있다. 이러한 접근의 예는 미국가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480에 보다 상세히 기술되어 있다.

표 1은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질의 비-제한적 리스트를 제공한다. '치료 단백질 X' 컬럼은 치료 단백질 분자를 나타내며, 뒷따르는 괄호에는 치료 단백질 분자 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하거나 혹은 택일적으로 이로 구성되는 학술적 명칭 및 브랜드명을 표시하였다. 본 명세서에 사용된 '치료 단백질 X'는 각 치료 단백질 분자(CAS 및 Genbank 등록번호로 얻을 수 있는 아미노산 서열로 정의됨)를 칭하거나 혹은 이 컬럼에 개시된 주어진 치료 단백질 분자와 관련된 치료 단백질의 전체 그룹을 칭할 수 있다. 이들 각각에 관련된 정보는 참고문헌으로 각각 편입되고, 특히 그 안에 기술된 아미노산 서열에 대하여 참고문헌으로 편입된다. 'PCT/특허 문헌' 컬럼은 치료 단백질 분자를 기술하는 특허 및/또는 공개된 특허출원에 상응하는 미국 특허 번호, 혹은 PCT 국제공개 번호를 제공한다. 'PCT/특허 문헌' 컬럼에 인용된 각 특허 및/또는 공개된 특허출원은 본 명세서에 참고문헌으로 편입된다. 특히, 각 인용된 'PCT/특허 문헌'의 서열목록에 나타낸 특정화된 폴리펩타이드의 아미노산 서열, 예를들어, 각 인용된 'PCT/특허 문헌'의 상세한 설명에 나타낸 바와 같은 이들 아미노산 서열의 변이체(돌연변이, 프레그먼트 등), 예를들어, 각 인용된 'PCT/특허 문헌'의 상세한 설명에 나타낸 치료 징후, 및 예를들어, 상기 상세한 설명에 나타낸 바와 같은 특정화된 폴리펩타이드 세트에 대한 활성 평가, 그리고 더욱 특히 각 인용된 'PCT/특허 문헌'의 실시예가 본 명세서에 참고문헌으로 편입된다. '생물학적 활성' 컬럼은 치료 단백질 분자와 관련된 생물학적 활성을 나타낸다. '관련 정보' 컬럼에 인용된 각 참고문헌은 본 명세서에 참고문헌으로 편입되며, 특히 이에 상응하는 생물학적 활성을 평가하기위한 참고문헌(참조 예, 방법 부분)에 기술된 각 활성 평가의 설명과 관련된 사항이 참고문헌으로 편입된다. '우선 징후 Y' 컬럼은 치료 단백질 X 또는 치료 단백질 X 부분을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 치료, 억제, 진단 혹은 개선될 수 있는 질병, 질환 및/또는 조건을 나타낸다.

표 1

치료 단백질 X	PCT/특허 문헌	생물학적 활성	관련 간행물	우선 징후 Y
엔도스태틴	US5854205,	종양의 성장을 억제하는 항혈관신	Sim et al.(2000) Cancer and Metastasis Reviews 19: 181-190, Dhanabal(1999) Cancer Research 59:189-	고형 종양 및

	WO9715666	생 펩타이드	197	암
안지오스태틴	US5885795, US5792845	종양의 성장을 억제하는 항혈관신생 펩타이드	Sim et al.(2000) Cancer and Metastasis Reviews 19: 181-190	고형 종양 및 암
크링글 5	US5854221	종양의 성장을 억제하는 항혈관신생 펩타이드	Cao et al.(1996) J. Biological Chemistry 271, 46:29461-29467; Cao et al.(1997) J. Biological Chemistry 272, 36:22924-22928; Lu et al.(1999) Biochem. Biophysical Research Communications, 258, 668-673	고형 종양 및 암

여러가지 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 표 1의 열거된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질에 상응하는 치료 단백질의 치료 활성 및/또는 생물학적 활성(참조 예, 표 1의 '생물학적 활성' 및 '치료 단백질 X' 컬럼)에 상응하는 치료 활성 및/또는 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료학적으로 활성적인 단백질 부분은 상기 참고문헌 서열의 프레그먼트나 변이체이며 표 1의 '생물학적 활성' 컬럼에 개시된 치료 단백질에 상응하는 치료 활성 및/또는 생물학적 활성을 나타낼 수 있다.

폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 프레그먼트 및 변이체

프레그먼트

본 발명은 또한 표 1에 나타낸 치료 단백질, 알부민 단백질, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 프레그먼트에 관한 것이다.

단백질의 N-말단으로부터 하나 또는 그 이상의 아미노산의 제거는 치료 단백질, 알부민 단백질, 및/또는 알부민 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 생물학적 기능의 변형이나 손실을 야기하나, 다른 치료 활성 및/또는 기능 활성(예, 생물학적 활성, 다중결합 능력, 리간드 결합능)은 여전히 남을 수 있다. 예를들어, N-말단 제거된 폴리펩타이드는 N-말단으로부터 완전한 폴리펩타이드의 주요 잔기미만으로 제거되는 경우에 그 폴리펩타이드의 완전한 또는 성숙 형태를 인지하는 항체에 유도 및/또는 결합하는 능력이 일반적으로 유지된다. 완전한 폴리펩타이드의 N-말단 잔기가 결여된 특정 폴리펩타이드가 이러한 면역 활성을 보유하는지는 본 명세서에 기술된 방법 및 이 기술분야에 알려진 통상의 방법에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 다수의 제거된 N-말단 아미노산 잔기를 갖는 뮤테인(mutein)은 일부 생물학적 혹은 면역학적 활성을 보유할 수 있다. 실제로, 6개정도의 적은 수의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드는 종종 면역 반응을 일으킬 수 있다.

따라서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질의 프레그먼트는 전장 단백질 뿐만아니라 레퍼런스 폴리펩타이드(예, 표 1에 기술된 치료 단백질)의 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 상응하는 혈청 알부민 폴리펩타이드의 프레그먼트는 전장 단백질 뿐만아니라 레퍼런스 폴리펩타이드(즉, 혈청 알부민)의 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 프레그먼트는 전장 알부민 융합 단백질 뿐만아니라 상기 알부민 융합 단백질의 아미노 말단으로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

또한 상술한 바와 같이 레퍼런스 폴리펩타이드(예, 치료 단백질 및/또는 혈청 알부민 단백질)의 N-말단이나 C-말단으로부터 하나 또는 그 이상의 아미노산 제거는 그 단백질의 하나 또는 그 이상의 생물학적 기능의 변형이나 손실을 야기하나, 다른 기능 활성(예, 생물학적 활성, 다중결합 능력, 리간드 결합능) 및/또는 치료 활성은 여전히 유지될 수 있다. 예를들어, C-말단 제거된 폴리펩타이드는 C-말단으로부터 완전한 폴리펩타이드의 주요 잔기 혹은 성숙 폴리펩타이드미만으로 제거되는 경우에 그 폴리펩타이드의 완전한 또는 성숙 형태를 인지하는 항체에 유도 및/또는 결합하는 능력이 일반적으로 유지된다. 레퍼런스 폴리펩타이드의 N-말단 및/또는 C-말단 잔기가 결여된 특정 폴리펩타이드가 치료 활성을 보유하는지는 본 명세서에 기술된 방법 및 이 기술분야에 알려진 통상의 방법에 의해 쉽게 측정될 수 있다.

본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질(표 1에 나타낸 치료 단백질)에 상응하는 치료 단백질의 아미노산 서열의 카르복시 말단으로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

또한, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분(예, 혈청 알부민)에 상응하는 알부민 단백질의 아미노산 서열의 카르복시 말단으로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 제공한다.

더욱이, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 카르복시 말단으로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

또한, 상기 어느 N- 또는 C- 말단 제거는 N- 및 C- 말단 제거된 레퍼런스 폴리펩타이드(예, 표 1에 나타낸 치료 단백질 또는 혈청 알부민(예, SEQ ID NO:18), 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질)를 생성할 수 있다. 본 발명은 또한 아미노 및 카르복실 말단 모두로부터 제거된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

본 출원은 또한 본 명세서에 나타낸 레퍼런스 서열(예, 치료 단백질, 혈청 알부민 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질)과 적어도 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 폴리펩타이드를 함유하는 단백질 및 이들의 프레그먼트에 관한 것이다. 일부 구체화로, 본 출원은 상기한 바와 같은 N- 및 C- 말단 제거된 아미노산 서열을 갖는 레퍼런스 폴리펩타이드와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 단백질에 관한 것이다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함된다.

본 발명의 다른 폴리펩타이드 프레그먼트는 아미노산 서열이 프레그먼트인 치료 단백질 또는 혈청 알부민 단백질의 폴리펩타이드 서열의 치료 활성 및/또는 기능 활성(예, 생물학적 활성)을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된 프레그먼트이다.

다른 폴리펩타이드 프레그먼트는 생물학적으로 활성적인 프레그먼트이다. 생물학적으로 활성적인 프레그먼트는 본 발명의 폴리펩타이드의 활성과 유사한 활성을 나타내는 것들이나, 반드시 동일할 필요는 없다. 상기 프레그먼트의 생물학적 활성은 향상된 원하는 특성 혹은 감소된 원하지않는 특성을 포함할 수 있다.

변이체

'변이체'는 레퍼런스 핵산 또는 폴리펩타이드와는 다르지만 이들의 본질적 특성을 보유한 폴리뉴클레오타이드나 핵산을 칭한다. 일반적으로, 변이체는 전반적으로 근접하게 유사하며, 다수 리전에서 레퍼런스 핵산 또는 폴리펩타이드와 동일하다.

본 명세서에 사용된, '변이체'는 본 명세서 다른 곳에서도 기술된 바와 같이 또는 이 기술분야에 알려진 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분, 또는 치료 단백질과 서열이 다른 알부민 융합 단백질(예, 참조 표 1의 '치료' 컬럼), 알부민 단백질, 및/또 는 본 발명의 알부민 융합 단백질이지만, 적어도 하나의 이들의 기능 및/또는 치료 특성(예, 표 1의 '생물학적 활성' 컬럼에 개시된 치료 활성 및/또는 생물학적 활성)을 보유하는 것을 칭한다. 일반적으로, 변이체는 전반적으로 매우 유사하며 다수 리전에서 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 상응하는 알부민 단백질, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 아미노산 서열과 동일하다. 이러한 변이체를 암호하는 핵산이 또한 본 발명에 포함된다.

본 발명은 또한 예를들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분과 상응하는 치료 단백질(예, 표 1에 레퍼런스로 나타낸 아미노산 서열, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체), 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분과 상응하는 알부민 단백질(예, SEQ ID NO:18 또는 이들의 프레그먼트나 변이체), 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 아미노산 서열과 적어도 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 택일적으로 이로 구성된 단백질에 관한 것이다. 이러한 폴리펩타이드의 프레그먼트가 또한 제공된다(예, 본 명세서에 기술된 프레그먼트). 또한 본 발명에 포함되는 폴리펩타이드는 엄격 혼성화 조건(예, 약 45℃에서 6X 소디움 클로라이드/소디움 시트레이트(SSC)에서 필터 결합된 DNA와의 혼성화후 약 50-65℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS로 한번 혹은 두번 세척)하에서, 고 엄격 혼성화 조건(예, 약 45℃에서 6X 소디움 클로라이드/소디움 시트레이트(SSC)에서 필터 결합된 DNA와의 혼성화후 약 68℃에서 0.1X SSC, 0.2% SDS로 한번 혹은 두번 세척)하에서, 또는 이 기술 분야의 숙련자에게 알려진 다른 엄격 혼성화 조건(참조 예, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989 Current protocol in Molecular Biology, Green publishing associate, Inc., and John Wiley amp; Sons Inc., New York, pp. 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3)하에서 본 발명의 아미노산 서열을 암호하는 핵산 분자의 상보체와 혼성화되는 폴리뉴클레오타이드로 암호화된 폴리펩타이드이다. 이러한 폴리펩타이드를 암호하는 폴리뉴클레오타이드가 또

한 본 발명에 포함된다.

적어도 예를들어, 본 발명의 쿼리 아미노산 서열과 95% '동일'한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드란, 대상 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 상기 쿼리 아미노산 서열의 각 100 아미노산마다 최고 5 아미노산 변환을 포함하는 것을 제외하고 상기 쿼리 서열과 동일한 것으로 의도된다. 즉, 쿼리 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 얻기위해, 그 대상 서열내에 최고 5%의 아미노산 잔기가 삽입, 제거 혹은 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 레퍼런스 서열의 이러한 변환은 레퍼런스 아미노산 서열의 아미노- 혹은 카르복시-말단 위치에서 혹은 레퍼런스 서열내 잔기중에 각각 산재된 말단 위치사이 어느 곳에서 혹은 레퍼런스 서열내 하나 또는 그이상의 인접 그룹에서 일어날 수 있다.

실질적인 문제로 어느 특정 폴리펩타이드가 예를들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 아미노산 서열 혹은 이들의 프레그먼트(알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분 또는 알부민 융합 단백질의 알부민 부분과 같은)와 적어도 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지 여부는 알려진 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 검출될 수 있다. 이러한 프로그램 및 이를 사용하는 방법 은 예를들어, 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480 (pp. 41-43)에 기술되어 있으며 이는 본 명세서에 참고문헌으로 편입되며 이 기술분야에 잘 알려져 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오타이드 변이체는 코딩 리전, 논-코딩 리전 혹은 모두에 변환이 있을 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 사일런트 치환, 부가 혹은 결실을 생성하는 변환을 함유하나 암호화된 폴리펩타이드의 특성 혹은 활성을 변화시키지않는 것들을 포함한다. 이러한 뉴클레오타이드 변이체는 유전학적 코드의 퇴화에 기인한 사일런트 치환에 의해 생성될 수 있다. 폴리펩타이드 변이체는 50미만, 40미만, 30미만, 20미만, 10미만, 혹은 5-50, 5-25, 5-10, 1-5 혹은 1-2 아미노산이 치환, 제거 혹은 어느 조합으로 부가되는 것들을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 예를들어, 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화(사람 mRNA내 코돈을 효모 혹은 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 미생물 숙주에 의해 바람직한 것으로 변화)하기위한 여러가지 이유로 생성될 수 있다.

다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 효모 혹은 포유류 세포에서 발현되도록 최적화된다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 효모 혹은 포유류 세포에서 발현되도록 최적화된다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 효모 혹은 포유류 세포에서 발현되도록 최적화된다.

택일적인 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 암호하는 코돈 최적화 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기술된바와 같은 엄격 혼성 화 조건하에서 치료 단백질을 암호하는 와일드 타입 폴리뉴클레오타이드와 혼성화되지않는다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분을 암호하는 코돈 최적화 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기술된 바와 같은 엄격 혼성화 조건하에서 알부민 단백질을 암호하는 와일드 타입 폴리뉴클레오타이드와 혼성호되지 않는다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 코돈 최적화 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기술된 바와 같은 엄격 혼성화 조건하에서 치료 단백질 부분 혹은 알부민 단백질 부분을 암호하는 와일드 타입 폴리뉴클레오타이드와 혼성화되지않는다.

다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 자연적으로 발생하는 치료 단백질의 서열을 포함하지않거나 혹은 택일적으로 이로 구성되지않는다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 자연적으로 발생하는 알부민 단백질의 서열을 포함하지않거나 혹은 택일적으로 이로 구성되지않는다. 다른 구체화호, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 자연적으로 발생하는 치료 단백질 부분 혹은 알부민 단백질 부분의 서열을 포함하지않거나 혹은 택일적으로 이로 구성되지않는다.

다른 구체화로, 상기 치료 단백질은 바이오패닝에 의해 랜덤 펩타이드 라이브러리로부터 선택될 수 있으며, 이에 따라 자연적으로 발생하는 와일드 타입 폴리뉴클레오타이드가 없을 것이다.

자연적으로 발생하는 변이체는 '대립 유전자 변이체'로 불리우며, 유기체의 한 염색체상의 주어진 위치를 차지하는 유전자의 여러가지 교대 형태중 하나를 칭한다(Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley amp; Sons, New York(1985)). 이러한 대립 유전자 변이체는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드 수준이 다를 수 있으며 본 발명에 포함된다. 택일적으로, 비-자연적으로 발생하는 변이체는 변이발생 기술에 의해 또는 직접 합성에 의해 생성될 수 있다.

알려진 단백질 공학 및 재조합 DNA 기술을 이용하여 변이체는 본 발명의 특성을 향상시키거나 변화시키도록 생성될 수 있다. 예를들어, 하나 또는 그 이상의 아미노산은 생물학적 기능의 실질적인 손실없이 본 발명의 폴리펩타이드의 N-말단 혹은 C-말단으로부터 제거될 수 있다. 참조 예, Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988(1993)(KGF 변이체) 및 Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216(1988)(인터페론 감마 변이체).

더욱이, 변이체는 종종 자연적으로 발생하는 단백질과 유사한 생물학적 활성을 보유하는 것으로 많은 증거가 알려져

있다(예, Gayle et al., J. Biol. Chem. 268:22105-22111(1993)(IL-1a 변이체)). 또한 하나 또는 그 이상의 아미노산을 폴리펩타이드의 N-말단이나 C-말단으로부터 제거하는 경우 하나 또는 그 이상의 생물학적 기능의 변형이나 손실이 일어나지만 다른 생물학적 활성은 여전히 남을 수 있다. 예를들어, N-말단 혹은 C- 말단으로부터 분비 형태의 주요 잔기미만으로 제거되는 경우에는 분비형태를 인지하는 항체를 유도 및/또는 결합하는 결실 변이체의 능력은 남아있기 쉽다. 단백질의 N- 혹은 C- 말단 잔기가 결여된 특정 폴리펩타이드가 이러한 면역유발 활성을 보유하는지 여부는 본 명세서에 기술된 통상적인 방 법 및 이 기술분야에 알려진 다른 방법에 의해 쉽게 검출될 수 있다.

따라서, 본 발명은 나아가 기능 활성(예, 생물학적 활성 및/또는 치료 활성)을 갖는 폴리펩타이드 변이체를 포함한다. 다른 구체화로, 본 발명은 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질의 하나 또는 그이상의 생물학적 및/또는 치료학적 활성에 상응하는 기능 활성(예, 표 1의 '생물학적 활성'에 개시된 것과 같은 생물학적 활성 및/또는 치료 활성)을 갖는 알부민 융합 단백질의 변이체를 제공한다. 이러한 변이체는 활성에 거의 영향을 주지않도록 이 기술분야에 알려진 일반적인 규칙에 따라 선택된 결실, 삽입, 역위, 반복 및 치환을 포함한다.

다른 구체화로, 본 발명의 변이체는 보존성 치환을 갖는다. '보존성 치환'이란 지방성 혹은 소수성 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile의 치환; 히드록실 잔기 Ser 및 Thr의 치환; 산성 잔기 Asp 및 Glu의 치환; 아미드 잔기 Asn 및 Gln의 치환, 염기성 잔기 Lys, Arg, 및 His의 치환; 방향족 잔기 Phe, Tyr, 및 Trp의 치환, 및 소 사이즈 아미노산 Ala, Ser, Thr, Met, 및 Gly의 치환과 같은 기내에서의 계획된 교환을 의미한다.

표현형적으로 잠복성인 아미노산 치환을 생성하는 방법과 관련된 가이던스가 예를들어, Bowie et al., 'Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitution,' Science 247:1306-1310(1990)에 제공되며, 여기서 저자는 아미노산 서열의 변화에 대한 내성을 연구하는 주요 2가지 전략을 나타낸다.

상기 저자가 언급한 바와 같이, 단백질은 예기치않게 아미노산 치환에 내성을 갖는다. 상기 저자는 또한 아미노산 변화가 단백질내 특정 아미노산 위치에서 관용적인 경향이 있음을 나타낸다. 예를들어, (단백질의 삼차구조내에) 가장 묻혀진 아미노산 잔기는 비극성 측쇄를 요구하는 반면, 표면 측쇄의 특성은 일반적으로 거의 보존되지않는다. 게다가, 내성화된 보존성 아미노산 치환은 지방성 혹은 소수성 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile의 치환; 히드록실 잔기 Ser 및 Thr의 치환; 산성 잔기 Asp 및 Glu의 치환; 아미드 잔기 Asn 및 Gln의 치환, 염기성 잔기 Lys, Arg, 및 His의 치환; 방향족 잔기 Phe, Tyr, 및 Trp의 치환, 및 소 사이즈 아미노산 Ala, Ser, Thr, Met, 및 Gly의 치환을 포함한다.

보존성 아미노산 치환에 비해서, 본 발명의 변이체는 (i) 하나 또는 그 이상의 비-보존 아미노산 잔기의 치환을 함유하는 폴리펩타이드(여기서 치환된 아미노산 잔기는 유전학적 코드에 의해 암호화되거나 그렇지않은 것일 수 있다), 혹은 (ii) 치환기를 갖는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 치환을 함유하는 폴리펩타이드, 혹은 (iii) 폴리펩타이드의 안정성 및/또는 용해도를 증가시키기위한 화합물(예, 폴리에틸렌 글리콜)과 같은 또 다른 화합물과 융합 혹은 화학적으로 접합된 폴리펩타이드, (iv) 예를들어, IgG Fc 융합 리전 펩타이드와 같은 추가의 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 변이체 폴리펩타이드는 본 명세서에 가르침으로 이 기술분야의 숙련자의 견지내에 포함되는 것으로 간주된다.

예를들어, 장입된 아미노산과 다른 장입된 혹은 천연 아미노산의 아미노산 치환을 함유하는 폴리펩타이드 변이체는 적은 응집과 같은 개선된 특성을 갖는 단 백질을 생성할 수 있다. 약학 배합물의 응집은 응집물의 면역유발 활성때문에 활성을 감소시키며 클리어런스를 증가시킨다. 참조 Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340(1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845(1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377(1993).

특정 구체화로, 본 발명의 폴리펩타이드는 본 명세서에 기술된 치료 단백질 및/또는 사람 혈청 알부민, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 아미노산 서열의 프레그먼트나 변이체를 포함하거나 혹은 택일적으로 이로 구성되며, 여기서 상기 프레그먼트나 변이체는 레퍼런스 아미노산 서열과 비교하여 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 또는 50-150 아미노산 잔기 첨가, 치환 및/또는 결실을 갖는다. 특정 구체화로, 상기 아미노산 치환은 보존성이다. 이들 폴리펩타이드를 암호하는 핵산이 또한 본 발명에 포함된다.

본 발명의 폴리펩타이드는 펩타이드 결합 혹은 변형 펩타이드 결합, 즉, 펩타이드 등가근(isosteres)에 의해 서로 연결된 아미노산으로 구성될 수 있으며, 그리고 20 유전자-암호화된 아미노산과 다른 아미노산을 함유할 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 포스트-번역 공정과 같은 자연적인 공정에 의해 또는 이 기술분야에 잘알려진 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기본적인 교과서에 잘 설명되어 있으며 전공논문에 보다 상세히 설명되어있을 뿐만아니라 방대한 연구저서에 상세히 설명되어있다. 변형은 펩타이드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 혹은 카르복실 말단을 포함하는 폴리펩타이드 어느 곳에서 일어날 수 있다. 동일한 타입의 변형이 주어진 폴리펩타이드내 여러 자리에서 동일한 혹은 다른 정도로 존 재할 수 있는 것으로 여겨진다. 또한, 주어진 폴리펩타이드는 다수 타입의 변형을 함유할 수 있다. 폴리펩타이드는 예를들어, 유비퀴티네이션의 결과로 분지될 수 있으며 이들은 가지가 달린 혹은 달리지않은 원형일 수 있다. 원형, 분지형, 및 분지된 원형 폴리펩타이드는 포스트번역 자연 공정으로 생길 수있으며 또는

합성 방법에 의해 만들어질 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리포실화, 아미드화, 플라빈 공유 부착, 헴 부의 공유 부착, 뉴클레오타이드 혹은 뉴클레오타이드 유도체의 공유 부착, 리피드 혹은 리피드 유도체의 공유 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유 부착, 교차-결합, 고리화, 이황화 결합 형성, 디메틸화, 공유 교차-결합의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스틸화, 산화, 페길레이션(pegylation), 단백질 가수분해 공정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 설페이션, 아르기닐화와 같은 단백질에 아미노산의 운반-RNA 매개 첨가, 및 유비퀴티네이션을 포함한다.

또한, Current Opinions in Biotechnology, 10:324(1999)에 기술된 방법에 의해서와 같이 특정 기능이나 생물학적 활성을 증진 혹은 조절하기위하여 화학적 엔티티가 본 발명의 알부민 융합 단백질에 공유 결합될 수 있다.

또한, 특정 세포 혹은 단계 특이 타입, 조직 타입 혹은 해부학적 구조에 특정 기능이나 생물학적 활성을 표적하기위하여 본 발명의 알부민 융합 단백질에 표적 엔티티가 공유 결합될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질을 관리함으로써 제제의 활성이 국소화될 수 있다. 또한, 이러한 표적은 본 발명의 알부민 융합 단 백질을 필요한 자리에 축적시킴으로써 보다 높게 국소화된 농도가 달성될 수 있기때문에 본 발명의 알부민 융합 단백질의 투여량을 감소시킬 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 교차결합제의 사용에 의해서 뿐만아니라 재조합 DNA 기술에 의해서 표적 부분내에 접합될 수 있으며, 이에 따라 리간드가 단백질인 경우 본 발명의 알부민 융합 단백질 혹은 그 기능 부분을 암호하는 뉴클레오타이드 서열은 리간드의 뉴클레오타이드 서열에 인접하게 클로닝되고 그 접합체는 융합 단백질로 발현된다. 표적제는 어느 모노클로날 항체 또는 예를들어 Fab 또는 F(ab') $_2$ 프레그먼트와 같이 이들의 활성 부분, 내피 세포 표면 수용체에 의해 인지되는 리간드(천연 혹은 합성) 혹은 이들의 기능 부분, 또는 상기 내피 세포의 단백질 또는 구조물과 상호작용하는 어느 다른 제제일 수 있다.

예를들어, 항체의 Fab 또는 F(ab') $_2$ 프레그먼트와 같은 활성 항체 부분은 항원/표적 바인딩을 유지하지만 낮은 비-특이 바인딩을 갖는다. Fab 또는 F(ab') $_2$ 프레그먼트는 예를들어 비결집화된 단백질 A를 이용한 프로테아제 분해 및 ImmunoPure Fab and ImmunoPure F(ab')2 제조 키트(Pierce)를 이용한 펩신/파패인 분해에 의해 얻어질 수 있다. 항체의 다른 활성 부분은 항체 혹은 항체 프레그먼트의 세퍼레이트 헤비 및 라이트 체인으로의 환원에 의해 얻어질 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질/항체 접합체 혹은 유전자 융합체에 의해 표적화되는 분자는 예를들어, 콜라겐, 피브로넥틴 또는 라미닌이나 다른 혈관벽 구조물과 같은 내피 세포 표면 분자, 세포외 매트릭스 성분일 수 있다. 내피 표면 항원에 대해 모집되는 모노클로날 항체의 예는 글리코실화된 내피세포 표면 트랜스멤브레인 단백질인 CD34를 인지하는 Tuk3(Dako) 및 QBend10(Serotec)이다. 내피세포 표면 항원에 모집되는 다른 모노클로날 항체는 9G11, JC70, 및 CD31(PECAM-1으로도 알려짐)에 모집되는 By126(British bio-technology) 및 트롬보스폰딘 수용체인 CD36 항원에 모집되는 ESIVC7(Kuzu et al(1992) J. Clin. Pathol. 45, 143-148)을 포함한다. QBend20, QBend30 및 QBend40(Serotec)은 내피세포 표면 항원을 인지하는 다른 모노클로날 항체의 예이다.

표적 항체가 모집되는 내피세포 표면 분자는 비-특이적이며 다른 조직의 다수의 다른 내피세포 타입을 인지할 수 있으며 또는 특정 내피세포 타입에 특이적일 수 있다. 항체 A10-33/1(Serotec)은 전이성 흑색종에서 내피세포를 인지하며, H4-7/33(Serotec)은 작은 모세관의 내피세포 및 광범위한 종양 세포를 인지하며, HM15/3(Serotec)은 유동 내피세포를 인지하며, 그리고 1F/10(Serotec)은 연속성 내피상의 250 kD 표면 단백질에 결합한다. 헤모스태시스 및 염증에 관련된 항원에 모집되는 항체가 또한 사용될 수 있다. 항체 4D10(Serotec) 및 BB11(Benjamin et al(1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 348-353)은 급성 염증 조직내 내피세포상에 존재하는 ELAM-1을 인지한다. 항체 4B9(Carlo, T. and Harlan, J.(1990) Immunol. Rev. 114, 1-24)는 VCAM 부착 단백질을 인지한다. 항체 84H10(Makgabo, M. et al(1988) Nature 331, 86-88)은 ICAMI 부착 단백질을 인지한다. 항체 EN7/58(Serotec)은 염증 내피 및 내피 세포에 부착하는 세포상에 존재하는 항원을 인지한다. 항체 KG7/30은 염증 조직 및 종양의 내피 표면상의 FVIII 관련 단백질을 인지한다.

사이토카인 IL-1 및 TNF는 시험관내에서 여러가지 말초 혈관 백혈구에 대한 부착 특성을 취득하도록 배양된 내피세포를 자극한다(Bevilaqua, M. et al(1985) J. Clin. Invest. 76, 2003; Schleimer, R. et al(1986) J. Immunol. 136, 649; Lamas, A. et al(1988) J. Immunol. 140, 1500; Bochner, B. et al(1988) J. Clin. Invest. 81, 1355). 이러한 부착성은 ICAM-1, ELAM-1, GMP-140(PADGEM 또는 CD62로도 알려짐) 및 VCAM-1을 포함하는 다수의 부착 분자의 내피 세포상에서의 유도와 관련된다. 이러한 부착 분자는 표적 세포의 표면상에 있는 역 수용체(counter receptors)를 인지한다. VCAM-1은 VLA-4(또한 CD49d/CD29로도 알려져 있으며 인테그린과의 멤버임)로 알려진 항원을 인지한다(Elices, M. et al(1990) Cell 60, 577; Schwartz, B. et al(1990) J. Clin. Invest. 85, 2019). ICAM-1은 LFA-1(또한 CD11a/CD18로도 알려져 있으며 인테그린과의 또 다른 멤버임)로 알려진 항원을 인지한다(Martin, S. et al(1987) Cell 51, 813-819 fujita, H. et al(1991) Biochem. Biophs. Res. Comm. 177, 664-672). ELAM-1 및 GMP-140(GMP-140은 CD62 혹은 PADGEM으로도 알려져 있다)은 LewisX(CD15로도 알려짐)로 알려진 항원, 또는 시알릴-LewisX를 인지한다(Larsen, E. et al(1990) Cell 63, 467-474; McEver, R. (1991) J. Cell. Biochem. 45, 156-161; Shimizu, Y. et al(1991) Nature 349, 799; Picker, L. et al(1991) Nature 349, 796-798; Polley, M. et al(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 6224-6228; Lowe, J. et al(1990) Cell 63, 475-484; Tiemeyer, M. et al(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 1138-1142).

내피 세포의 표면상에 발현되는 수용체 혹은 이에 반응하는 세포의 표면상에 역 수용체에 대한 모노클로날 항체는 세포-세포 인지에 필요한 성분의 상호작용을 차단하는 것으로 나타났으며 인지 방식을 확립하는데 도움이 되었다(상기 참고문헌 참조).

따라서, 본 발명의 일 견지는 본 발명의 융합 단백질을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 세포의 내부에 혹은 세포 구조에 혈관신생 펩타이드를 표적화하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 견지는 본 발명의 알부민 융합 단백질과 내피세포를 특이적으로 결합하는 부(moiety)의 접합체를 제공하는 것이다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 교차결합이나 재조합 DNA 기술에 의해 내피세포 표면상의 수용체와 상호작용하는 천연 혹은 합성 리간드에 접합될 수 있다. 이러한 리간드는 예를들어 혈관 투과성 인자(Gitay-Goren, H. et al(1992) J. Biol. Chem. 267, 6093-6098; Bikfalin, A. et al(1991) J. Cell. Phys. 149, 50-59; Tischer, E. et al(1991) 266, 11947-11954; Conn, G. et al(1990) PNAS 87, 2628-2632; Keck, P. et al(1989) Science 246, 1309-1312; Leung, D.W. et al(1989) Science 246, 1306-1309); 혈소판 유래 성장 인자(Beitz, J. et al(1991) PNAS 88, 2021-2025)과 같은 성장 인자; 및 트랜스페린 및 유로키나아제(Haddock, R. et al(1991) J. Biol. Chem. 266, 21466-21473)와 같은 다른 생체분자를 포함한다. 상기 접합체의 리간드 도메인은 리간드에 대한 내피 세포 표면 수용체에 의해 인지되며 본 발명의 알부민 융합 단백질을 그 내피에 표적화 할 것이다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 부착 분자에 대한 역 수용체에 제제를 교차결합시킴으로써 특정 부착 분자에 대하여 지시될 수 있다. ELAM-1 매개 부착의 예로, 역 수용체는 Lewis-X 또는 시알릴레이티드 Lewis-X로 알려진 탄수화물 결정인자이다. 이러한 말단 구조를 갖는 합성 탄수화물(Kameyama, A. et al(1991) Carbohydrate. Res. 209, C1-C4) 또는 LNFIII(Calbiochem)과 같이 천연 공급원으로부터 정제된 것이 이용가능하다. 말단 Lewis-X 혹은 시알릴 Lewis-X 결정인자는 본 발명의 알부민 융합 단백질내에 설피드릴기가 없도록 교차결합될 수 있다. 이는 그 제제가 ELAM-1 부착 분자가 존재하는 내피 세포에 특이적으로 표적화되는 것을 가능케 한다.

이러한 부는 ICAM-1, ELAM-1, GMP-140 또는 VCAM-1과 같은 내피 세포 표면 수용체에 대한 모노클로날 항체일 수 있다. 택일적으로, 이러한 부는 역 수용체 자체일 수 있으며 또는 이들의 작용 부분일 수 있다. 융합은 i) 이 기술분야에 알려진 기술에 의한 상기 부의 화학적 교차결합에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 부는 모노클로날 항체 혹은 그 역 수용체이며, 또는 ii) 재조합 DNA 기술에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 부는 단일 폴리펩타이드 사슬이며 적절한 숙주에서 그 제제와 함께 유전자 융합체로서 발현된다.

다수의 세포- 혹은 단계-특이적 항체가 기술되어 있다. 이들은 예를들어 항체 BB11(항-ELAM, Benjamin, C. et al(1990), Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 348-353), 항체 4B9(항-VCAM, Carlo, T. and Harlan, J. (1990) Immunol. Rev. 114, 1-24) 및 항체 84H10(항-ICAM1, Makgobo, M. et al(1988) Nature 331, 86-88)를 포함하는 내피 세포 부착 분자에 대한 항체를 포함한다. 이들 항체 혹은 이와 유사한 항체는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 공유적으로 연결될 수 있다. 이는 유전자 융합에 의해 이루어질 수 있으며, 이에 따라 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 뉴클레오타이드 서열은 항체의 헤비 혹은 라이트 체인이나 scFv로서 암호하는 유전자내에 스플라이싱된다. 택일적으로 상기 제제는 예를들어, 디숙시니미딜 서베레이트(DSS); 비스 (설포숙신이미딜) 서베레이트 (BS ^{3}); 디메틸 아디프이미데이트-2 HCl (DMA); 디메틸 피멜리미데이트-2 HCl (DMP); 디메틸 서베리미데이트-2 HCl (DMS); 비스말레이미도헥산(BMH); m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (MBS); m-말레이미도-벤조일-N-히드록시설포숙신이미드 에스테르(설포-MBS); 숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 (SMPB); 설포숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(설포-SMPB); N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(SIAB); 설포숙신이미딜(4-요오도아세틸) 아미노벤조에이트 (설포-SIAB); 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC); 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (설포-SMCC) 또는 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠(DFDNB)(Pierce)와 같은 다수의 이-작용성 교차결합제를 통해 항체에 공유적으로 교차결합될 수있다.

악성 형질변형 및 혈관신생에 관련된 항원을 인지하는 항체가 또한 사용될 수 있다: 예를들어, EN2/3(Serotec)은 악성 형질변형 내피 세포의 항원 특성을 인지하며; EN7/44(Serotec)는 내피 세포의 증식, 이동 및 버딩시 존재하는 혈관신생 관련 항원을 인지하며; 그리고 H3-5/47은 건선 및 관절염 조직내의 안지오블라스트, 안지오마스, 안지오사코마스 및 혈관주위 세포내에 있는 내피 세포를 인지한다.

택일적으로, 표적화 부분에 의해 인지되는 엔티티는 종양 세포에 의해 특이적으로 발현되는 적절한 엔티티일 수 있으며, 이 엔티티는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 표적하기를 바라지않는 경우의 세포에서 발현되지 않거나, 혹은 적어도 그러한 빈도로 발현되지 않는다. 인지되는 엔티티는 종종 항원일 것이다. 항원의 예는 하기 표 X에 열거된 것들

을 포함한다. 다수의 이러한 항원에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체는 이미 알려져 있지만, 어느 경우에 있어서 모노클로날 항체 기술과 관련된 현재의 기술을 이용하여 항체는 대부분의 항원에 대하여 제조될 수 있다. 항원-특이 부분은 완전한 항체(일반적으로 편의상 그리고 특이적으로 모노클로날 항체), 이들의 일부 혹은 부분(예를들어, Fab 프레그먼트, F(ab')2, 또는 '최소 인지 유니트') 또는 합성 항체나 이들의 일부일 수 있다. 단지 항체의 일부를 포함하는 화합물은 Fc 부분에 기인하여 비-특이적 바인딩을 덜 겪게되는 덕택으로 유리할 수 있다. 선택된 항원에 적절한 모노클로날 항체는 예를들어 'Monoclonal Antibodies: A manual of techniques', H zola(CRC Press, 1988) 및 'Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications', J.G.R. Hurrell(CTC Press, 1982)에 기술된 바와 같은 공지 기술에 의해 제조될 수 있다. 세포-특이 항원에 지시되는 이중특이적 항체의 일부와 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대한 이중특이적 항체의 나머지 일부를 가지고 세포융합에 의해, 1가 프레그먼트의 재조합에 의 해 혹은 전체 항체의 화학적 교차-결합에 의해 이중특이적 항체가 제조될 수 있다. 이중특이적 항체는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합된 채로 투여될 수 있으며 또는 우선 투여된 다음 본 발명의 알부민 융합 단백질이 투여될 수 있다. 전자가 바람직하다. 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 Corvalan et al(1987) Cancer Immunol. Immunother. 24, 127-132 및 133-137 및 138-143에 기술되어 있다. 이중특이적 항체, 키메릭 항체 및 단일 사슬 항체는 일반적으로 Williams in Tibtech, February 1988, Vol. 6, 36-42, Neuberger et al(8th International Biotechnology Symposium, 1988, Part 2, 792-799) and Tan and Morrison(Adv. Drug Delivery Reviews 2, (1988), 129-142)에 논의되어 있다. 적절히 제조된 비-인간 항체는 예를들어, 사람 항체의 프래임워크내에 마우스 항체의 CDR 리전을 삽입시키는 것과 같은 공지 방법으로 '인간화'될 수 있다.

표 2

1. 종양 관련 항원

항원	항체	현존하는 용도
카시노-엠브리오닉 항원 85A12(Unipath)	C46(Amersham)	결장/직장 종양의 영상 및 치료
태반 알칼린 포스파타아제	H17E2(ICRF, Travers amp; Bodmer)	고환 및 난소 암의 영상 및 치료
췌장암	NR-LU-10(NeoRx Corporation)	소 세포 폐암을 포함하는 여러가지 암종의 영상 및 치료
다형 상피 뮤신(인유 지방 글로불)	HMFG1(Taylor-Papadimitriou, ICRF)	난소암, 흉막 유출의 영상 및 치료
β-인간 장막 고나도트로핀	W14	누드 마우스에서 인간 이종이식 장막암종에 대한 효소(CPG2)의 표적화
인산 암종에 존재하는 탄수화물	L6(IgG2a) [1]	알칼린 포스파타아제의 표적(Senter et al(1988) P.N.A.S. 85, 4842-4846.)
B 임파종에 존재하는 CD20 항원(노말 및 네오플라스틱)	IF5(IgG2a) [2]	알칼린 포스파타아제의 표적(Senter et al(1988) P.N.A.S. 85, 4842-4846.)

[1] Hellstrom et al(1986) Cancer Res. 46, 3917-3923

[2] Clarke et al(1985) P.N.A.s. 82, 1766-1770

2. 면역 세포 항원

팬 T 임파구 표면 항원(CD3)	OKT-3(Ortho)	신장 이식용 거부반응 치료
B-임파구 표면 항원(CD22)	RFB4(Janossy, Royal Free Hospital)	B 세포 임파구의 면역독소 치료
팬 T 임파수 표면 항원(CD5)	H65(Bodmer, Knowles ICRF, Xoma Corp., USA)	숙주 질병, 류마티성 관절염에 대한 급성 이식의 면역독소 치료

만일 CML 혹은 ALL의 치료에 적용되는 경우, 리간드 결합 분자는 루케미아-관련 항원에 대한 모노클로날 항체일 수 있다. 이들의 예는 항-CALLA(일반 급성 림프성 백혈병-관련 항원), J5, BA-3, RFB-1,BA-2, SJ-9A4 du-ALL-1, 항-3-3, 항-3-40, SNI 및 CALL2(Foon, K.A. et al 1986 Blood 68(1), 1-31, 'Review: Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma')이다. 상기 리간드 결합 분자는 또한 골수 세포 표면 항원을 확인하는 항체, 또는 각각 B 혹은 T 임파구와 반응적인 항체일 수 있다. 이러한 항체의 예는 사람 골수 세포 표면 항원을 확인하는 것들 혹은 Foon, K.A. Id에 기술된 바와 같은 인간 B 혹은 T 임파구와 반응적인 것들이다. 부가적인 예는 B 임파구와 반응적인 항체 B43, CD22 및 CD19이다.

택일적으로, 인지되는 엔티티는 항원성이거나 아닐 수 있지만 일부 다른 방법으로 인지되고 선택적으로 결합될 수 있다. 예를들어, 이는 멜라노마 세포에서 다수 발현되는 멜라노사이트-자극 호르몬(MSH)에 대한 수용체와 같은 특정 세포 표면 수용체일 수 있다. 표적 부분은 예를들어, 세포-표면 효소 또는 메신저에 대한 기질이나 이들의 유사체와 같은 비-면역 센스에서 상기 엔티티와 특이적으로 결합하는 화합물이나 그 일부일 수 있다. 멜라노마 세포의 경우, 표적 부분은 MSH 그 자체이거나 MSH 수용체에 결합하는 이들의 일부일 수 있다. 이러한 MSH 펩타이드는 예를들어, Al-Obeidi et al(1980) J. Med. Chem. 32, 174에 기술되어 있다. 그 특이성은 간접적일 수 있다: 제1 세포-특이 항체가 투여된 다음 상기 제1 항체에 대한 본 발명의 접합체가 투여될 수 있다. 바람직하게, 인지되어지는 엔티티는 체액내로 어떠한 상당량으로 분비되지않아야 하며, 그 이유는 만일 그렇지않으면 필요한 특이성이 얻어질 수 없기때문이다.

본 발명의 이러한 구체화의 접합체의 표적 부분은 Goodchild(위에서 언급됨) 또는 Connolly(1985) Nucl. Acids Res. 13(12), 4485-4502 또는 PCT/US85/03312에 일반적으로 기술된 바와 같은 이황화, 아미드 혹은 티오에테르에 의한 것과 같은 어느 통상 방식의 결합 화합물에 의해 본 발명의 알부민 융합 단백질에 연결될 수 있다.

본 발명에 의해 포함되는 부가적인 포스트-번역 변형은 예를들어, N-결합 혹은 O-결합 탄수화물 사슬, N-말단 혹은 C-말단의 공정, 아미노산 백본에 화학 부의 결합, N-결합 혹은 O-결합 탄수화물 사슬의 화학적 변형, 및 원핵성 숙주세포 발현의 결과로서 N-말단 메티오닌 잔기의 부가 혹은 결실을 포함한다. 상기 알부민 융합 단백질은 또한 이에 한정하는 것은 아니나, 예를들어 드럭과 같은 화학치료제 및/또는 단백질의 검출 및 분리를 가능케하는 효소성, 형광성, 동위원소성 및/또는 친화성 표지와 같은 검출가능한 표지로 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예는 예를들어 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(pp. 105-106)에 주어진다.

기능 활성

'기능 활성을 갖는 폴리펩타이드'는 치료 단백질의 전-장, 단백질, 및/또는 성숙 형태와 관련되어 하나 또는 그 이상의 알려진 기능 활성을 나타낼 수 있는 폴리펩타이드를 칭한다. 이러한 기능 활성은 이에 한정하는 것은 아니나, 생물학적 활성, 항원성[항-폴리펩타이드 항체에 결합하는 (또는 결합을 위해 폴리펩타이드와 경쟁하는) 능력], 면역원성(본 발명의 특이 폴리펩타이드와 결합하는 항체를 생성하는 능력), 본 발명의 폴리펩타이드와 멀티머를 형성하는 능력, 및 폴리펩타이드에 대한 수용체나 리간드에 결합하는 능력을 포함한다.

'생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드'는 투여량 의존성을 갖거나 혹은 그렇지않은 특정 생물학적 어세이로 측정시, 성숙 형태를 포함하는 본 발명의 치료 단 백질의 활성과 유사한 활성을 나타내나 반드시 동일한 활성을 가질 필요는 없는 폴리펩타이드를 칭한다. 투여량 의존성이 존재하는 경우, 폴리펩타이드의 활성이 동일할 필요는 없으나 본 발명의 폴리펩타이드와 비교하여 주어진 활성에 있어서 투여량-의존성이 실질적으로 유사하다.

다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 알부민과 융합되지않는 경우 치료 단백질(혹은 이들의 프레그먼트나 변이체)와 관련된 적어도 하나의 생물학적 및/또는 치료학적 활성을 갖는다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 이 기술 분야에 알려진 어세이 뿐만아니라 본 명세서에 기술된 어세이를 이용하거나 혹은 통상적으로 이를 변형하여 기능 활성(예, 생물학적 활성)에 대해 평가될 수 있다. 특히, 알부민 융합 단백질은 표 1의 '관련 간행물' 컬럼에 기재된 어세이를 이용하여 기능 활성(예, 생물학적 활성이나 치료학적 활성)에 대해 평가될 수 있다. 또한, 이 기술분야의 숙련자는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 치료 단백질의 프레그먼트를 표 1에 참고적으로 기술된 어세이를 이용하여 활성에 대하여 통상적으로 평가한다. 또한, 이 기술분야의 숙련자는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 상응하는 알부민 단백질의 프레그먼트를 이 기술분야에 알려진 어세이 및 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480에 기술된 바와 같은 어세이를 이용하여 활성에 대하여 통상적으로 평가한다.

또한, 치료 단백질 부분 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분과 관련된 생물학적 활성 및/또는 치료 활성(시험관내 혹은 생체내에서)을 밝히 기위해 본 명세서에 기술된 어세이(참조 실시예 및 표 1) 및 이 기술분야에

알려진 다른 어세이가 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 이들의 프레그먼트, 변이체 및 유도체의 능력을 측정하는데 통상적으로 적용될 수 있다. 다른 방법은 숙련자에게 알려져 있을 것이며 본 발명의 견지내에 포함된다.

항-혈관신생 활성

혈관신생의 내생 자극제 및 억제제 사이의 자연적으로 일어나는 균형은 억제 작용이 지배적이다(Rastinejad et al., Cell 56:345-355(1989)). 창상치유, 기관 재생, 배아 발생 및 여성 재생성 프로세스와 같은 일반적인 생리학적 조건하에서 신혈관형성이 발생하는 드문 경우에, 혈관신생은 엄격히 조절되며 공간 및 시간적으로 한정된다. 고형 종양 성장으로 특징지워지는 것과 같은 병리학적 혈관신생의 조건하에서, 이러한 관리적 조절은 실패된다. 조절되지않은 혈관신생은 병리적으로 되며 많은 네오플라스틱 및 비-네오플라스틱 질병의 진행을 갖는다. 고형 종양 성장 및 전이, 관절염, 눈 질환의 일부 타입 및 건선을 포함하는 다수의 심각한 질병이 비정상적 신혈관형성에 의해 지배된다. 참조 예, Moses et al., Biotech. 9:630-634(1991)(리뷰); Folkman et al., N. Engl. J. Med., 333:1757-1763(1995); Auebach et al., J. Microvasc. Res. 29:401-411(1985); Folkman, Advances in Cancer Research, eds. Klein and Weinhouse, Academic Press, New York, pp. 175-203(1985); Patz, Am. J. Opthalmol. 94:715-743(1982); 및 Fokman et al., Science 221:719-725(1983). 다수의 병리학적 조건에서, 혈관신생 프로세스는 질병 상태에 기여한다. 예를들어, 공형 종양의 성장이 혈관신생에 의존함을 제시하는 축적된 현저한 자료가 있다(Folkman and Klagsbrun, Science 235:442-447(1987)).

본 발명은 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드의 투여에 의해 신혈관형성과 관련된 질병 혹은 질환의 치료용으로 제공된다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드, 또는 작용물질 혹은 길항제로 치료가능한 악성 및 전이 조건은 이에 한정하는 것은 아니나, 악성종양, 고형 종양 및 본 명세서에 기술되거나 그렇지않으면 이 기술분야에 알려진 암(참조, Fishman et al., Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia(1985))을 포함한다. 따라서, 본 발명은 필요로하는 개체에 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드를 치료 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 혈관신생-관련 질병 및/또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 예를들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 암 또는 종양을 치료학적으로 치료하기위한 여러가지의 부가적인 방법으로 활용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드로 치료될 수 있는 암은 이에 한정하는 것은 아니나, 전립선, 폐, 유방, 난소, 위, 췌장, 후두, 식도, 정소, 간, 이하선, 담관, 결장, 직장, 경부, 자궁, 자궁내막, 신장, 방광, 갑상선 암; 일차 종양 및 전이; 악성종양; 신경교아 세포종; 카포시 육종; 평활근육종; 비- 소세포 폐암; 결장직장암; 진전된 악성종양; 및 백혈병과 같은 혈 종양을 포함한다. 예를들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 피부암, 뇌 및 목 종양, 유방 종양, 및 카포시 육종과 같은 암을 치료하기위해 국소적으로 운반될 수 있다.

다른 견지로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 예를들어, 방광내 투여에 의해 외면 형태의 방광암을 치료하는데 활용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 주입 혹은 도뇨관을 통해 직접 종양내로 혹은 종양자리 근처에 운반될 수 있다. 물론, 숙련자에게는 적절한 투여 방식은 치료받는 암환자에 따라 달라질 것임을 알 수 있을 것이다. 다른 운반 방식은 본 명세서에 논의된다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 암을 제외한 혈관신생과 관련된 다른 질병을 치료하는데 도움이 될 수 있다. 이러한 질병은 이에 한정하는 것은 아니나 예를들어, 혈관종, 청각 신경증, 신경섬유종, 과립성 결막염, 및 화농성 육아종과 같은 양성 종양; 아테롬성 반; 예를들어, 당뇨성 망막병증, 조숙 망막병증, 반점성 퇴화, 각막 이식 거부, 신혈관 녹내장과 같은 눈 혈관신생 질환, 미숙아망막증, 루베오시스, 망막 모세포종, 눈의 포도막염 및 익상편(비정상적 혈관 성장); 류마티성 관절염; 건선; 지연된 창상치유; 자궁내막증식증; 혈관생성; 육아; 비대성 반흔(켈로이드); 가관절증; 경피증; 트라코마; 혈관 부착; 심근 혈관신생; 관상동맥 측부; 대뇌 측부; 동정맥 기형; 허혈성 수족 혈관신생; 오슬러-웨버 증후군; 플래이크 신혈관생성; 모세혈관 확장증; 호혈액형 관절; 혈관섬유종; 섬유근 이형성증; 창상 육아; 크론 질병; 및 아테롬 경화증을 포함한다.

예를들어, 본 발명 방법의 일 견지로 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드를 비대성 반흔 또는 켈로이드에 투여하는 단계를 포함하는 비대성 반흔 및 켈로이드를 치료하는 방법이 제공된다.

본 발명의 일 구체화로 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 이들 병소의 진전을 억제하기위해 비대성 반흔 또는 켈로이드에 직접 주입된다. 이러한 치료는 비대성 반흔 또는 켈로이드의 발생 결과로 알려진 컨디션(예, 화상)을 예방하는 처리에 특히 유용하며, 임의로, 증식단계가 진전되는 시간을 가진 후(초기 상해후 약 14일) 그리고 비대성 반흔 또는 켈로이드 발생전에 이러한 치료가 시작된다. 상기한 바와 같이, 본 발명은 또한 예를들어, 각막 신혈관생성, 신혈관 녹내장, 증식성 당뇨 망막증, 미숙아망막증 및 반점성 퇴화를 포함하는 눈의 신혈관 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드로 치료될 수 있는 신혈관생성과 관련된 눈 질환은 이에 한정하는 것은 아니나, 신혈관 녹내장, 당뇨 망막증, 망막아종, 미숙아망막증, 포도막염, 미성숙 반점성 퇴화의 망막증, 각막 이식 신혈관생성 뿐만아니라 다른 눈 염증 질환, 눈 종양 및 맥락막 혹은 홍채 신혈관생성을 포함한다. 참조 예, revies by Waltman et al., Am. J. Ophtal. 85:704-710(1978) and Gartner et al., Surv. Ophhal. 22:291-312(1978).

따라서, 본 발명의 일견지로 치료 유효량의 화합물(예, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드)을 각막에서 혈관이 혈성이 억제되도록 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 각막 신혈관생성(각막 이식 신혈관생성 포함)과 같은 눈의 신혈관 질병을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 각막은 일반적으로 혈관이 결여된 조직이다. 그러나 특정 병리학적 상태에서 모세혈관이 주변의 각막주위혈관총 망상조직으로부터 각막안으로 확장될 수 있으며, 또한 흐려지게되며 그 결과 환자의 시력을 쇠퇴시킨다. 시각 손실은 각막이 완전히 불투명해지는 경우 종료된다. 예를들어, 각막 감염(예, 트라코마, 헤르페스 심플렉스 케라티티스, 레슈마니아증 및 회선사상충증), 면역학적 프로세스(예, 이식 거부 및 스티븐-존슨 증후군), 알칼리 화상, 트라우마, 염증(어느 원인의), 독성 및 영양 결핍 상태, 및 착용 콘택트 렌즈의 문제와 같은 다양한 질병이 각막 신혈관생성을 일으킬 수 있다.

본 발명의 다른 구체화로 (안구용 제조물에 일반적으로 사용되는 어떠한 보존제 및 항균제가 혼합된) 생리염수내 국소 투여용으로제조될 수 있으며 이는 눈물 형태로 투여된다. 이 용액 혹은 서스펜션은 순수 형태로 제조될 수 있으며 여러 회 매일 투여될 수 있다. 택일적으로, 상기한 바와 같이 제조된 항-혈관신생 조성물은 또한 각막에 직접 투여될 수 있다. 다른 구체화로, 항-혈관신생 조성물은 각막에 결합하는 점작-부착성 중합체와 함께 제조된다. 다른 구체화로, 항-혈관신생 인자 혹은 항-혈관신생 조성물은 통상의 스테로이드 치료에 대한 부가물로 활용될 수 있 다. 국소 치료는 혈관신생 반응(화학적 화상과 같은)을 유도하는 높은 가능성을 갖는 것으로 알려진 각막 상해를 예방하는데 또한 도움이 될 수 있다. 이러한 예에서 스테로이드와 병합된 치료는 후속적인 합병증을 예방하는데 즉시 시행될 수 있다.

다른 구체화로, 상기 화합물은 현미경적 가이던스하에 안과의사에 의해 각막 스트로마내로 직접 주입될 수 있다. 주입부는 각 상해의 형태에 따라 달라질 수 있으나, 투여 목적은 맥관구조의 전방에 조성물을 넣는 것이다(즉, 혈관과 정상 각막사이에 산재시킴). 대부분의 경우, 이는 전위 혈관으로부터 각막을 '보호'하기위한 변연주위 각막 주입을 포함한다. 이 방법은 또한 각막 신혈관생성을 예방적으로 억제하기위해 각막 손상후 짧게 이용될 수 있다. 이러한 상황에서 상기 물질은 각막 상해부와 원하는 잠재적 변연 혈 공급부사이에 산재된 변연주위 각막에 주입될 수 있다. 이러한 방법은 또한 이식된 각막의 모세혈관 칩입을 억제하기위하여 유사한 방식으로 이용될 수 있다. 지연-방출 형태로 주입은 1년에 2-3회만 요구될 수 있다. 스테로이드는 또한 주입 자체로인해 생기는 염증을 감소시키기위해 주입 용액에 첨가될 수 있다.

본 발명의 다른 견지로, 치료 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드를 눈에서 혈관의 형성이 억제되도록 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 신혈관 녹내장을 치료하는 방법이 제공된다. 일 구체화로, 상기 화합물은 신혈관 녹내장의 초기 형성을 치료하기위해 눈에 국소적으로 투여될 수 있다. 다른 구체화로, 상기 화합물은 전인방 앵글의 리전내로 주입하여 이식될 수 있다. 다른 구체화로, 상기 화합물은 또한 화 합물이 연속적으로 수양액내로 방출되도록 어느 위치에 넣어질 수 있다. 본 발명의 다른 견지로, 치료 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드를 눈에서 혈관의 형성이 억제되도록 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 증식성 당뇨 망막증을 치료하는 방법이 제공된다.

본 발명의 다른 구체화로, 증식성 당뇨 망막증은 망막에서 상기 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 길항제 및/또는 작용물질의 국소적 농도를 증가시키기위해 수양액 혹은 유리액내로 주입됨으로써 치료될 수 있다. 이러한 치료는 광응고를 필요로하는 여러 질병의 취득전에 시작될 수 있다.

본 발명의 다른 견지로, 치료 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드를 눈에서 혈관의 형성이 억제되도록 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 미숙아망막증을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 화합물은 유리액내 주입 및/또는 안구내 이식을 통해 국소적으로 투여될 수 있다.

또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드로 치료될 수 있는 질병은 이에 한정하는 것은 아니나, 혈관종, 관절염, 혈관섬유종, 죽상경화성 플래이크, 지연된 창상치유, 육아, 호혈액형 관절, 비대성 반흔, 기관절등, 오슬러-웨버 증후군, 화농성 육아, 공피증, 트라코마 및 혈관 부착을 포하한다.

또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호 하는 폴리뉴클레오타이드로 치료, 억제, 진단, 및/또는 예지될 수 있는 질병 및/또는 상태는 이에 한정하는 것은 아니나, 백혈병, 종양 전이, 카포시 육종, 혈관종, 청각 신경증, 신경섬유종, 트라코마 및 화농성 육아와 같은 양성 종양, 류마티성 관절염, 혈관섬유종, 당뇨 망막증, 미성숙 망막증, 반점성 퇴화, 각막 이식 거부, 신혈관 녹내장, 미숙아망막증, 루베오시스, 망막아세포종, 및 포도막염

과 같은 눈 혈관신생 질병, 지연된 창상치유, 자궁내막증식증, 혈관생성, 육아, 비대성 반흔(켈로이드), 가관절증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 심근 혈관신생, 관상동맥 측부, 대뇌 측부, 동정맥 기형, 허혈성 수족 혈관신생, 오슬러-웨버 증후군, 플래이크 신혈관생성, 모세혈관 확장증, 호혈액형 관절, 혈관섬유종, 섬유근 이형성증, 창상 육아, 크론 질병, 아테롬 경화증, 월경 조절 배아 이식에 필요한 혈관생성을 억제하는 출산 조절제, 캣 스크래치 질병(로첼 미날리아 퀸토사)과 같은 병리학적 결과로서 혈관신생을 갖는 질병들, 위궤양(헬리코박터 파일로리), 바르토넬라증 및 바실러리 혈관종증을 포함한다.

출산 조절 방법의 일 견지로, 배아 이식을 막기에 충분한 화합물의 양이 교류(intercourse)전 혹은 후에 투여되고 수정이 일어나며, 따라서 이는 아마도 '모닝 애프터' 방법으로 효과적인 출산 조절 방법을 제공한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 또한 월경 조절에 사용될 수 있으며 혹은 복막 세척 유체나 자궁내막증의 치료시 복막 이식에 투여될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암 호하는 폴리뉴클레오타이드는 스티치 육아종을 억제하는데 수술 봉합용 실에 편입될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 광범위한 여러가지 수술 공정에 활용될 수 있다. 예를들어, 본 발명의 일 견지로 (예를들어, 스프레이나 필름 형태의) 조성물이 악성 조직으로부터 정상 주변 조직을 분리하기위해 및/또는 주변 조직으로 질병의 퍼짐을 억제하기위해 종양을 제거하기전에 한 면적을 코팅하거나 스프레이하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 다른 견지로, 조성물(예, 스프레이 형태)은 종양을 코팅하기위해 혹은 원하는 위치에서 혈관신생을 억제하기위해 내시경 방법을 통해 운반될 수 있다. 본 발명의 다른 견지로, 수술 그물코가 이용될 수 있는 어느 공정에서 본 발명의 항-혈관신생 조성물로 코팅된 수술 그물코가 이용될 수 있다. 예를들어, 본 발명의 일 구체화로, 복부 암 절제술(결장 절제에 후속하는)도중에 그 구조물에 대한 지지체를 제공하기위해 그리고 항-혈관신생 인자의 양을 방출시키기위해 항-혈관신생 조성물이 실린 수술 그물코가 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 견지로, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드를 절제후 종양의 절제 가장자리에서 암의 국소적 재발 및 새로운 혈관의 형성이 억제되도록 투여하는 것을 포함하는 종양 절제부 치료 방법이 제공된다. 본 발명의 일 구체화로, 항-혈관신생 화합물은 종양 절제부에 직접 투여된다(예, 항-혈관신생 화합물을 가지고 종양의 절제 가장자리를 스와빙, 브러싱 혹은 코팅함으로써 적용됨). 택일적으로, 상기 혈관 신생 화합물은 투여전 알려진 수술 페이스트내로 편입될 수 있다. 본 발명의 특정 구체화로, 상기 항-혈관신생 화합물은 악성 간 절제후 및 신경수술후 적용된다.

본 발명의 일 견지로, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 예를들어, 유방, 결장, 뇌 및 간 종양을 포함하는 광범위한 종양의 절제 가장자리에 투여될 수 있다. 예를들어, 본 발명의 일 구체화로, 항-혈관신생 화합물은 절제후 신경학적 종양 자리에 투여되어 그 자리에서 새로운 혈관의 형성이 억제되도록 할 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 또한 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480에 기술된 바와 같은 다른 항-혈관신생 인자와 함께 투여될 수 있다.

융합 단백질의 발현

본 발명의 알부민 융합 단백질은 효모, 박테리아와 같은 미생물, 사람 혹은 동물세포주로부터 분비에 의해 재조합 분자로 생성될 수 있다. 임의로, 본 폴리펩타이드는 숙주세포로부터 분비된다.

본 명세서에 예시된 알부민 융합 단백질의 발현용으로, WO 95/33833에 예시된 HSP150 유전자가 분열된 효모 균주, 혹은 WO 00/44772[rHA 프로세스]에 예시된 PMT1 유전자가 분열된 효모 균주(알부민 융합체의 O-결합 글리코실화를 환원/제거함), 혹은 WO 95/23857에 예시된 YAP3 유전자가 분열된 효모 균주가 효모 PRB1 프로모터, WO 90/01063에 예시된 HSA/MFα-1 융합 리더 서열, LEU2 선별 마커 및 US 5,637,504에 예시된 디스인테그레이션 벡터 pSAC35와 함께 성공적으로 사용되었다.

본 발명에 유용한 것으로 여겨지는 다른 효모 균주, 프로모터, 리더 서열, 종결자, 마커 및 벡터는 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/74980(pp. 94-99)에 기술되어 있으며 이는 이 기술분야에 잘 알려져 있다.

본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키기위한 형질변형된 세포, 임의로 형질변형된 효모 세포를 포함한다. 형질변형된 숙주 세포 자체에 부가적으로, 본 발명은 또한 배지에서 이러한 세포의 배양, 임의로 모노클로날(동종적으로 클로닝된) 배양, 혹은 모노클로날 배양으로부터 유도된 배양을 의도한다. 만일 폴리펩타이드가 분비되는 경우, 배지는 세포와 함께 폴리펩타이드를 함유하거나 혹은 만일 이들이 여과되거나 원심분리되는 경우 세포없이

폴리펩타이드를 함유할 것이다. 박테리아(예, 이. 콜라이(*E. coli*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예, 사카로미세스 세레비지아에(*Saccaromyces cerevisiae*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 필라멘트성 균류(예, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함하는 다수의 발현 시스템이 알려져 있으며 사용될 수 있다.

상기 원하는 단백질은 예를들어, 숙주 염색체내에 삽입된 혹은 프리 플라스미드상의 암호 서열로부터 생성된다. 효모는 예를들어, 일렉트로포레이션과 같은 어느 통상 방법으로 원하는 단백질에 대해 암호하는 서열로 형질변형된다. 일렉트로포레이션에 의한 효모의 형질변형 방법은 Becker amp; Guarente(1990) Methods Enzymol. 194, 182에 기술되어 있다.

성공적으로 형질변형된 세포, 즉, 본 발명의 DNA 구조물을 함유하는 세포는 잘 알려진 기술에 의해 확인될 수 있다. 예를들어, 발현 구조물의 도입으로부터 얻어진 세포는 성장하여 원하는 폴리펩타이드를 생산한다. 세포는 수확되고 용혈되어 이들의 DNA 내용물을 Southern(1975) J. Mol. Biol. 98, 503 혹은 Berent et al.(1985) Biotech. 3, 208에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 DNA 존재를 조사한다. 택일적으로, 상층액내 단백질의 존재가 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

유용한 효모 플라스미드 벡터는 pRS403-406 및 pRS413-416을 포함하며 일반적으로 Stratagene Cloning Systems. La Jolla, CA 92037, USA로 부터 이용가능하다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효모 통합 플라스미드(YIps)이며 효모 선별가능한 마커 HIS3, TRP1, LEU2 및 URA3를 포함한다. 플라스미드 pRS413-416은 효모 중심립 플라스미드(YCps)이다.

효모 발현용 알부민 융합 단백질을 제조하기위한 벡터는 pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA 및 pC4:HSA를 포함하며, 이들은 American Type Culture Collection(2001, 4, 11), 10802 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209에서 발표되었으며 그리고 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480에 기술되어 있다.

알부민 융합 단백질을 발현하기에 유용한 것으로 예측되는 다른 벡터는 pSAC35 벡터이며 이는 Sleep et al., BioTechnology 8:42(1990)에 기술되어 있다. 플라스미드 pSAC35는 US 5,637,504에 기술된 벡터의 디스인테그레이션 부류이다.

상보적으로 부착성인 말단을 통해 벡터에 DNA를 작동적으로 연결하는 여러가 지 방법이 개발되어 왔다. 예를들어, 상보성 호모중합체 트랙은 벡터 DNA에 삽입되는 DNA 가닥에 부가될 수 있다. 상기 벡터 및 DNA 가닥은 그 다음 상보성 호모중합 테일사이의 수소결합에 의해 연결되어 재조합 DNA 분자를 형성한다.

하나 또는 그 이상의 제한부위를 함유하는 합성 연결기는 벡터에 DNA 가닥을 연결하는 택일적인 방법을 제공한다. 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 DNA 가닥은 3' 5'-엑소뉴클레오리틱 활성으로 돌출된 γ-단일-가닥 말단을 제거하고 오목한 3'-말단을 이들의 중합 활성으로 채우는 효소인 박테리오 파아지 T4 DNA 중합효소 혹은 이. 콜라이(*E. coli*) DNA 중합효소 I으로 처리된다. 따라서 이들 활성의 조합은 블런트-말단 DNA 가닥을 생성한다. 그 다음 블런트-말단 가닥은 박테리오파아지 T4 DNA 리가아제와 같이 블런트-말단 DNA 분자의 접합을 촉진할 수 있는 효소의 존재하에서 과량 몰의 연결기 분자와 함께 배양된다. 따라서, 반응 생성물은 이들의 말단에 중합 연결기 서열을 운반하는 DNA 가닥이다. 이러한 DNA 가닥은 그 다음 적절한 제한효소로 잘려져 상기 DNA 가닥과 혼화가능한 말단을 생성하는 효소로 잘려진 발현벡터에 접합된다.

여러가지 제한 엔도뉴클레아제를 함유하는 합성 연결기가 다수의 상업적 공급원으로부터 상업적으로 이용가능하다.

예를들어, HA 변이체가 제조되는 것과 같이, 본 발명에 따른 DNA를 변형시키는 바람직한 방법은 Saiki et al.(1988) Scinece 239, 487-491에 개시된 중합효소 연쇄 반응을 사용하는 것이다. 이러한 방법에서, 효소적으로 증폭되어지는 DNA는 증폭된 DNA내로 편입되는 두개의 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 의해 플랭 킹된다. 특정 프라이머는 이 기술분야의 알려진 방법을 사용하여 발현벡터내로 클로닝하는데 사용될 수 있는 제한 엔도뉴클레아제 인지부위를 함유할 수 있다.

알부민 융합 단백질을 발현하기위한 숙주로서 본 발명의 실시에 유용한 것으로 예측되는 효모의 예시적인 종류는 피치아(*Pichia*)(이전에 Hansenula로 분류됨), 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 캔디다(*Candida*), 토룰롭시스(*Torulopsis*), 토룰라스포라(*Torulaspora*), 쉬조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*), 시테로미세스(*Citeromyces*), 파치솔렌(*Pachysolen*), 지고사카로미세스(*Zygosaccharomyces*), 데브라미세스(*Debramyces*), 트리코더마(*Trichoderma*), 세팔로스포리움(*Cephalosporium*), 휴미콜라(*Humicola*), 뮤코르(*Mucor*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 야로위아(*Yarrowia*), 메츄니코위아(*Metschunikowia*), 로도스포리디움(*Rhodosporidium*), 루코스포리디움(*Leucosporidium*), 보트리오아스커스(*Botryoascus*), 스포리디오볼러스(*Sporidiobolus*), 엔도미콥시스(*Endomycopsis*) 등이다. 사카로미세스(*Sacchar* *omyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*) 및 토룰라스포라(*Torulaspora*)로 구성되는 그룹으로부터 선택된 것들이 속으로 포함된다. 사카로미세스 spp.(*Saccharomyces spp.*)의 예는 S. 세레비지아에(*S. cerevisiae*), S. 이탈리커스(*S. italicus*) 및 S. 로욱시(*S. rouxii*)이다. 다른 종의 예 및 이들을 형질변형하는 방법은 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(pp. 97-98)에 기술되어 있다.

S. 세레비지아에(*S. cerevisiae*) 의 형질변형 방법은 일반적으로 EP 251 744, EP 258 067 및 WO 90/01063에 가르쳐져 있다.

S. 세레비지아에(*S. cerevisiae*)에 대한 적절한 프로모터는 PGK1 유전자, GAL1 혹은 GAL10 유전자, CYCI, PHO 5, TRPI, ADHI, ADH2, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나아제, 헥소키나아제, 피루베이트 디카르복실라아제, 포스포프럭토키나아제, 트리오스 포르페이트 이소머라아제, 포스포글루코즈 이소머라아제, 글루코키나아제, 알파-매이팅 팩터 페로몬, [매이팅 팩터 페로몬], PRBI 프로모터, GUT2 프로모터, GPDI 프로모터, 및 5' 조절 리전 부분과 다른 프로모터의 5' 조절 리전 부분의 하이브리드와 관련된 하이브리드 프로모터 또는 업스트림 활성부(예, EP-A-258 067의 프로모터)와 관련된 것들을 포함한다.

쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)에 사용되는 편의적인 조절가능한 프로모터는 Maundrell(1990) J. Biol. Chem. 265, 10857-10864에 기술된 바와 같은 nmt 유전자의 티아민-리프레서블 프로모터 및 Hoffman amp; Winston(1990) Genetics 124, 807-816에 기술된 바와 같은 글루코스 리프레서블 jbpl 유전자 프로모터이다.

외부 유전자의 발현을 위한 피치아(*Pichia*) 형질변형 방법은 예를들어, Cregg et al.(1993), 및 여러가지 Phillips 특허(예, US 4 857 467)에 가르쳐져 있으며 그리고 피치아 발현 키트는 Invitrogen BV, Leek, Netherlands, 및 Invitrogen Corp., San Diego, California로 부터 상업적으로 이용가능하다. 적절한 프로모터는 AOXI 및 AOX2를 포함한다. Gleeson et al.(1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465는 Hansenula 벡터 및 형질변형, 적절한 프로모터인 MOX1 및 FMD1에 대한 정보를 포함한다. 한편, EP 361 991, Fleer et al.(1991) 및 Rhone-Poulenc Rorer의 다른 간행물은 클루이베로미세스 spp(*Kluyveromyces spp*)에서 외부 단백질을 발현시키는 방법을 가르치고 있다.

전사 종결 신호는 전사 종결 및 폴리아데닐화에 대한 적절한 신호를 갖는 진핵 유전자의 3' 측면 서열일 수 있다. 적절한 3' 측면 서열은 예를들어, 사용되는 발현 조절 서열에 자연적으로 연결된 유전자의 서열일 수 있으며, 즉 프로모터에 상응하는 것일 수 있다. 택일적으로, 이들은 S. 세레비지아에 ADHI 유전자의 종결 신호가 임의로 사용되는 경우에 다를 수 있다.

상기 원하는 알부민 융합 단백질은 분비 리더 서열로 초기에 발현될 수 있으며, 이는 선택된 효모에서 효과적인 어느 리더일 수 있다. S. 세레비지아에 유용한 리더는 매이팅 팩터 α 폴리펩타이드(MF α-1) 및 EP-A-387 319의 하이브리드 리더를 포함한다. 이러한 리더(또는 신호)는 성숙 알부민이 주위의 배지내로 방출되기전에 효모에 의해 분할된다. 또한 이러한 리더는 JP 62-096086(등록 911036516)에 개시된 S. 세레비지아에 인버타아제(SUC2), 산 포스파타아제(PH05), MFα-1의 프리-서열, O 글루카나아제(BGL2) 및 킬러 독소; S. 디아스타티커스(*S. diastaticus*) 글루코아밀라아제 II; S. 칼스버제네시스(*S. calsberensis*) α-갈락토시다아제(MEL1); K. 락티스(*K. lactis*) 킬러 독소; 및 칸디다 글루코아밀라아제를 포함한다.

알부민 융합 단백질의 재조합체 및 합성 제조의 부가적인 방법

본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드 뿐만아니라 이러한 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터, 숙주세포 및 유기체를 포함한다. 본 발명은 또한 합성 및 재조합 기술에 의해 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는 방법을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 숙주세포 및 유기체는 이 기술분야에 알려진 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다.

본 발명에 유용한 벡터는 예를들어, 파아지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스 혹은 레트로바이러스 벡터일 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 클로닝 및/또는 발현하는데 사용될 수 있는 벡터는 상기 폴리뉴클레오타이드가 복제 및/또는 발현되기를 바라는 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오타이드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터이다. 일반적으로, 상기 폴리뉴클레오타이드 및/또는 벡터는 포유류 세포(예, 사람(예, HeLa), 원숭이(예, Cos), 토끼(예, 토끼 망상 세포), 래트, 햄스터(예, CHO, NSO 및 베이비 햄스터 신장세포), 또는 마우스 세포(예, L 세포), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 혹은 박테리아 세포(예, E. coli)를 포함하는 진핵 또는 원핵의 어느 세포에서 사용될 수 있다. 참조 예, F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology , Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(1992) and Sambrook et al.(1989) for examples of appropriate vectors for various types of host cells. 그러나, 복제 결핍성 레트로바이러스 벡터가 사용되는 경우에는 바이러스 증식은 보완성 숙주세포에서만 일반적으

로 일어난다.

이러한 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주세포는 예를들어, 약학, 진단제, 백신 및 치료학에 유용한 다량의 단백질을 발현하는데 유용할 수 있다. 그 단백질은 이 기술분야에 알려진 방법이나 본 명세서에 기술된 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 숙주에서 증식용 선별가능한 마커를 함유하는 벡터에 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 칼슘 포스페이트 침전물과 같은 침전물 혹은 하전된 리피드와의 복합체에 도입될 수 있다. 만일 벡터가 바이러스인 경우, 이는 적절한 패키징 세포주를 사용하여 시험관내에서 패키징된 다음 숙주세포내로 도입될 수 있다.

상기 폴리뉴클레오타이드 삽입물은 폴리뉴클레오타이드가 발현되는 숙주세포와 혼화가능한 적절한 프로모터에 작동적으로 연결되어야 한다. 프로모터는 강한 프로모터이거나 그리고/또는 유도성 프로모터일 수 있다. 프로모터의 예는 파아지 람다 PL 프로모터, E. coli lac, trp, phoA 및 tac 프로모터, SV40 초기 및 말기 프로모터 및 레트로바이러스 LTRs의 프로모터를 포함한다. 다른 적절한 프로모터가 숙련자에게 알려져 있다. 발현 구성물은 또한 전사 개시, 종결을 위한 사이트 및 전사 리전에 번역을 위한 리보좀 바인딩 사이트를 함유한다. 상기 구성물에 의해 발현되는 전사물의 암호 부분은 번역되어지는 폴리펩타이드의 시작에서 번역 개시 코돈 및 끝에 적절히 위치한 종결 코돈(UAA, UGA 혹은 UAG)을 포함할 수 있다.

언급한 바와 같이, 발현 벡터는 적어도 하나의 선별 마커를 포함할 수 있다. 이러한 마커는 디하이드로폴레이트 환원효소, G418, 글루타민 합성효소, 혹은 진핵 세포 배양에 대한 네오마이신 내성, 및 E. coli 및 다른 박테리아 배양시 테트라사 이클린, 가나마이신 또는 앰피실린 내성 유전자를 포함한다. 적절한 숙주의 대표적인 예는 이에 한정하는 것은 아니나, E. coli, 스트렙토미세스 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhymurium*) 세포와 같은 박테리아 세포, 효모 세포(예, 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)(ATCC 등록 번호 201178))와 같은 균류 세포; 드로조필라 S2 및 스포도프테라 Sf9 세포와 같은 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 및 보우 멜라노마 세포와 같은 동물 세포; 및 식물 세포를 포함한다. 상기 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 이 기술분야에 알려져 있다.

일 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드는 원핵 혹은 진핵 세포의 특정 구획에 본 발명의 단백질의 국소화를 지시하는 및/또는 원핵 혹은 진핵 세포로부터 본 발명의 단백질의 분비를 지시하는 신호 서열에 융합될 수 있다. 예를들어, E. coli에서 본 발명의 발현을 페리플라즈믹 공간으로 지시할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질이 박테리아의 페리플라즈믹 공간으로 폴리펩타이드의 발현을 지시하기위해 융합될 수 있는 신호서열 혹은 단백질의 예는 이에 한정하는 것은 아니나, pelB 신호서열, 말토즈 바인딩 단백질(MBP) 신호서열, MBP, ompA 신호서열, 페리플라즈믹 E. coli 열-불안정성 엔테로톡신 B-서브유니트의 신호서열, 및 알칼린 포스파타아제의 신호서열을 포함한다. New England Biolabs로 부터 이용가능한 pMAL 시리즈 벡터(특히 pMAL-p 시리즈)와 같은 단백질의 국소화를 지시하는 융합 단백질의 구성용으로 여러가지 벡터가 상업적으로 이용가능하다. 특정정 구체화로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 알부민 융합 단백질은 그람-음성 박테리아의 폴리펩타이드와 같이 발현 및 정제를 증가시키기위해 pelB 펩테이트 리아제 신호 서열에 융합될 수 있다. 참조, 미국특허 제 5,576,195 및 5,846,818.

포유류 세포에서 그 분비를 지시하기위해 본 발명의 알부민 융합 단백질에 융합될 수 있는 신호 펩타이드의 예는 이에 한정하는 것은 아니나, MPIF-1 신호서열(예, GenBank 등록 번호 AAB51134의 아미노산 1-21), 스탄니오칼신 신호 서열(MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO:5), 및 교감 신호 서열(MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG, SEQ ID NO:6)을 포함한다. 배큐올바이러스 발현 시스템과 함께 사용될 수 있는 적절한 신호 서열은 gp67 신호서열(예, GenBank 등록 번호 AAA72759의 아미노산 1-19)이다.

선별 마커로서 글루카민 합성효소(GS) 혹은 DHFR을 사용하는 벡터는 각각 드럭 메티오닌 설폭시민 혹은 메톡트렉세이트의 존재하에 증폭될 수 있다. 글루타민 합성효소 기초 벡터의 잇점은 글루타민 합성효소 음성인 세포주(예, 뮤린 골수세포주, NSO)의 이용가능성이다. 글루타민 합성효소 발현 시스템은 또한 내성 유전자의 기능을 억제하기위해 추가 인히비터를 제공함으로써 글루타민 합성효소 발현 세포에서 기능을 할 수 있다. 글루타민 합성효소 발현 시스템 및 이들의 성분은 PCT 공보: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; 및 WO91/06657에 상세히 기술되어 있다. 또한, 글루타민 합성효소 발현 벡터는 Lonza Biologics, Inc(Portsmouth, NH)로 부터 얻을 수 있다. 뮤린 골수세포에서 GS 발현 시스템을 사용하는 모노클로날 항체의 발현 및 생성은 Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992) 및 Biblia, Robinson Biotechnol. Prog. 11:1(1995)에 기술되어 있다.

본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 벡터 구조를 함유하는 숙주세포에 관한 것이며, 그리고 또한 이 기술분야에 알려진 기술을 사용하여 하나 또는 그 이상의 이종 조절 리전(예, 프로모터 및/또는 인핸서)과 작동적으로 관련된 본 발명의 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 숙주세포를 포함한다. 상기 숙주세포는 포유류 세포(예, 사람 유래 세포)와 같은 보다 높은 진핵 세포, 또는 효모세포와 같은 보다 하등의 진핵 세포일 수 있으며, 또는 상기 숙주세포는 박

테리아세포와 같은 원핵 세포일 수 있다. 삽입된 유전자 서열의 발현을 조절하거나 또는 특정 원하는 형태로 유전자 생성물을 변형 및 프로세싱하는 숙주 균주가 선택될 수 있다. 특정 프로모터로부터의 발현은 특정 인듀서의 존재하에서 증강될 수 있어, 따라서 유전적으로 가공된 폴리펩타이드의 발현이 조절될 수 있다. 더욱이, 다른 숙주세포는 단백질의 번역 및 포스트-번역 공정 및 변형(예, 인산화, 분할)에 대한 특징 및 특이적 메카니즘을 갖는다. 적절한 세포주는 발현된 외부 단백질의 원하는 변형 및 공정을 확실히 하기위해 선택될 수 있다.

본 발명의 핵산 및 핵산 구조물의 숙주세포내로의 도입은 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, DEAE-덱스트린 매개 트랜스펙션, 양이온 리피드-매개 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 트랜스덕션, 감염 혹은 다른 방법에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 방법은 Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology(1986)과 같은 다수의 표준 실험 매뉴얼에 기술되어 있다. 특히 본 발명의 폴리펩타이드는 실제로 재 조합 벡터 결여 숙주 세포에 의해 발현될 수 있음이 예측된다.

본 명세서에 논의된 벡터 구조물을 함유하는 숙주세포를 포함하는 것에 부가적으로, 본 발명은 또한 내성 유전 물질을 제거 혹은 대체하도록 가공된(예, 치료 단백질에 상응하는 암호 서열은 치료 단백질에 상응하는 알부민 융합 단백질로 대체될 수 있다) 및/또는 유전 물질을 포함하도록 가공된(예, 치료 단백질에 상응하는 본 발명의 알부민 융합 단백질과 같은 이종 폴리뉴클레오타이드 서열이 포함될 수 있다) 척추동물 기원, 특히 포유류 기원의 일차, 이차, 및 불멸화된 숙주세포를 포함한다. 내생 폴리뉴클레오타이드와 작동적으로 관련된 유전 물질은 내생 폴리뉴클레오타이드를 활성화, 변환, 및/또는 증폭시킬 수 있다.

또한, 이종 폴리뉴클레오타이드(예, 알부민 단백질, 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체) 그리고/또는 이종 조절 리전(예, 프로모터 및/또는 인핸서)을 동종 재조합을 통해 치료 단백질을 암호하는 내생 폴리뉴클레오타이드 서열과 작동적으로 연결시키기위해 이 기술분야에 알려진 기술이 사용될 수 있다(참조 예, 미국 특허 제 5,641,670(1997, 6, 24); International Publication Number WO 96/29411; International Publication Number WO 94/12650; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438(1989)).

유용하게, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 암모늄 설페이트 혹은 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 혹은 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오즈 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 히드록실아파티 트 크로마토그래피, 소수성 전하 상호작용 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 재조합 세포배양으로부터 회수 및 정제될 수 있다. 일 구체화로, 고성능 액체 크로마토그래피('HPLC')가 정제용으로 사용될 수 있다.

일 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 상기 열거된 하나 또는 그 이상의 크로마토그래피 방법을 사용하여 정제된다. 다른 구체화로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 하기 크로마토그래피 컬럼중 하나 또는 그 이상을 사용하여 정제된다: Q 세파로즈 FF 컬럼, SP 세파로즈 FF 컬럼, Q 세파로즈 고성능 컬럼, 블루 세파로즈 FF 컬럼, 블루 컬럼, 페닐 세파로즈 FF 컬럼, DEAE 세파로즈 FF 또는 메틸 컬럼.

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 국제공개 제 WO 00/44772에 기술된 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 이 기술분야의 숙련자는 쉽게 본 발명의 알부민 융합 단백질의 정제용으로 상기 방법을 변형시킬 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 예를들어, 박테리아, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류를 포함하는 원핵 혹은 진핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생성물로부터 회수될 수 있다. 재조합 생성방법에 사용되는 숙주에 따라 달라지나, 본 발명의 폴리펩타이드는 글리코실화되거나 비-글리코실화될 수 있다. 또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 숙주-매개 공정의 결과로 일부 경우에 초기의 변형된 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 따라서, 번역 개시 코돈에 의해 암호화된 N-말단 메티오닌은 일반적으로 모든 진핵 세포에서 번역후 어느 단백질로부터 고효율로 제거된 다는 것은 이 기술분야에 잘 알려져 있다. 한편 대부분의 단백질상에 N-말단 메티오닌은 일부 단백질에 대해서 대부분의 원핵생물에서는 효율적으로 제거되나, 이러한 원핵성 제거 공정은 N-말단 메티오닌이 공유 결합된 아미노산의 특성에 따라 불충분할 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및 치료 단백질 혹은 이들의 프레그먼트나 변이체에 결합하는 항체는 정제를 촉진하기 위한 펩타이드와 같은 마커 서열에 융합될 수 있다. 일 구체화로, 상기 마커 아미노산 서열은 특히 대부분 상업적으로 이용가능한 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenus, Chatsworth, CA, 91311)내로 제공되는 태그와 같은 헥사-히스티딘 펩타이드이다. Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)에 기술된 바와 같이, 예를들어, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 위해 제공된다. 정제용으로 유용한 다른 펩타이드 태그는 이에 한정하는 것은 아니나, 인플루엔자 헤마글루티딘 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응하는 'HA' 태그(Wilson et al., Cell 37:767(1984) 및 'FLAG' 태그를 포함한다.

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 시토스태틱 혹은 시토시덜 에이전트와 같은 시토톡신과 같은 치료 부, 치료제 혹은 예를들어, 213Bi와 같은 알파-에미터와 같은 방사활성 금속이온에 접합될 수 있다. 이러한 제제의 예는 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(p.107)에 주어진다.

알부민 융합 단백질은 또한 고형 지지체에 결합될 수 있으며 이는 특히 본 발명의 알부민 융합 단백질과 결합 혹은 연결되는 것에 의해 바인딩되는 폴리펩타 이드의 면역어세이나 정제용으로 유용하다. 이러한 고형 지지체는 이에 한정하는 것은 아니나 유리, 셀룰로오즈, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드나 폴리프로필렌을 포함한다.

또한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 화학적으로 변형된 유도체가 본 발명에 의해 제공되며 이는 증가된 용해도, 안정성 및 폴리펩타이드의 순환시간, 혹은 감소된 면역유발성(참조 미국특허 제 4,179,337)과 같은 추가잇점을 제공할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜의 사용을 포함하는 예는 WO 01/79480(pp.109-111)에 주어진다.

본 발명의 알부민 융합 단백질의 존재 및 양은 이 기술분야에 잘 알려진 면역어세이, ELISA를 사용하여 검출될 수 있다.

<u>폴리펩타이드의 사용</u>

본 명세서에 밝힌 각 폴리펩타이드는 다수 방법에 사용될 수 있다. 하기 설명은 예시적이며 공지 기술을 사용하는 것으로 간주되어야 한다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 포유류에서, 바람직하게 사람에서 여러가지 질환의 치료, 예방 및/또는 개선에 유용하다. 이러한 질환은 이에 한정하는 것은 아니나, 표 1의 '생물학적 활성'으로 표시된 부분에 기술된 것들을 포함한다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 내피 세포 및 종양-유도 혈관신생의 증식 억제제로 사용될 수 있다.

더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 질병이나 컨디션을 치료 혹은 예방 하는데 사용될 수 있다. 예를들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 일차 종양 및 전이의 성장 억제나 퇴화 촉진을 위해 그리고 암, 당뇨 망막증, 프로그레시브 반점성 퇴화 혹은 류마티성 관절염 치료를 위한 예방 혹은 치료제로 사용될 수 있다.

알부민 융합 단백질은 생체내 진단과 같은 생물학적 시료에서 폴리펩타이드의 수준을 평가하는데 사용될 수 있다. 예를들어, 방사표지된 본 발명의 알부민 융합 단백질은 체내 폴리펩타이드의 영상용으로 사용될 수 있다. 평가의 예는 예를들어, 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 0179480(pp.112-122)에 주어지며 이 기술분야에 잘 알려져 있다. 단백질의 생체내 영상용 표지 혹은 마커는 이에 한정하는 것은 아니나, X-선촬영, 핵자기공명(NMR), 전자스핀 리렉션(ESR), 포지트론 방출 토모그래피(PET) 또는 컴퓨터 토모그래피(CT)에 의해 검출가능한 것들을 포함한다. X-선촬영용으로 적절한 표지는 방사선을 방출하지만 대상에게는 크게 해롭지않은 바륨 혹은 세슘과 같은 방사성 동위 원소를 포함한다. NMR 및 ESR에 대한 적절한 마커는 중수소와 같은 검출가능한 특성을 갖는 것들을 포함하며, 이는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현하는 세포주에 주어진 배지의 표지에 의해 알부민 융합 단백질내로 편입될 수 있다.

방사성 동위 원소(예, ^{131}I, ^{112}In, ^{99m}Tc (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 트리튬(^{3}H), 인듐(^{115m}In, ^{113m}In, ^{112}In, ^{111}In), 및 테크네튬(^{99}Tc, ^{99m}Tc), 탤륨(^{201}Ti), 갈륨(^{68}Ga, ^{67}Ga), 팔라듐(^{103}Pd), 몰리브데늄(^{99}Mo), 제논(^{133}Xe), 플루오린 (^{18}F, ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru), 핵 자기 공명에 의해 검출가능한 방사성-불투명 기질 혹은 물질과 같은 적절한 검출가능한 영상 부로 표지되는 알부민 융합 단백질은 면역 시스템 질환에 대해 조사되는 포유류내로 도입(예, 비경구, 피하 혹은 복막내)된다. 사용되는 대상 및 영상 시스템의 크기는 진단 연상을 생성하는데 필요한 영상부의 양을 결정한다는 것이 이 기술분야에서는 이해될 것이다. 사람 대상에 대한 방사성 동위원소 부의 경우, 주입되는 방사능의 양은 일반적으로 약 5-20밀리큐어의 ^{99m}Tc범위일 것이다. 표지된 알부민 융합 단백질은 그 다음 바람직하게 하나 또는 그 이상의 (본 발명의 알부민 융합 단백질을 생성하는데 사용된 치료 단백질에 상응하는)수용체, 리간드 혹은 기질이 위치하는 체내 위치(예, 기관, 세포, 세포외 공간 혹은 매트릭스)에 축적될 것이다. 택일적으로, 알부민 융합 단백질이 적어도 하나의 치료 항체의 프레그먼트나 변이체를 포함하는 어느 경우에, 표지된 알부민 융합 단백질은 그 다음 바람직하게 (본 발명의 알부민 융합 단백질을 생성하는데 사용된)치료 항체에 의해 결합된 것들에 상응하는 폴리펩타이드/에피토프가 위치하는 체내 위치(예, 기관, 세포, 세포외 공간 혹은 매트릭스)에 축적될 것이다. 생체내 종양 영상은 S.W. Burchiel et al., 'Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Frangments'(Chapter 13 in Tumor Imaginf: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))에 기술되어 있다.

따라서, 본 발명의 일견지로 본 발명의 표지 융합 단백질을 표지 융합 단백질의 적어도 일부가 혈관신생 의존성 질병 혹은 질환의 사이트에 도달하도록 포유류에 투여하는 단계 및 상기 혈관신생 의존성 질병 혹은 질환의 사이트에서 상기 융합 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 포유류에서 항-혈관신생 관련 질병 혹은 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 예를들어, 혈관신생 관련 질병 혹은 질환이 치료에 반응하였는지 검출하는데 사용될 수있다. 이러한 방법은 예를들어, 포유류에서 우선 종양(들)의 수 및 크기를 검출하고 그 다음 종양의 수가 치료후 증가 혹은 감소하였는지 검출하는 것 및/또는 치료후 종양(들)이 성장 혹은 이동하였는지 검출하는 것을 포함한다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 항체를 증가시키는데 사용될 수 있으며, 그 다음 숙주세포 혹은 생물학적 시료에서의 형질변형을 평가하는 방법으로 치료 단백질의 단백질 발현, 알부민 단백질, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 재조합 세포로부터 측정하는데 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본 명세서에 기술된 생물학적 활성을 시험하는데 사용될 수 있다.

트랜스제닉 유기체

본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현하는 트랜스제닉 유기체가 또한 본 발명에 포함된다. 트랜스제닉 유기체는 재조합, 외생 혹은 클로닝된 유전 물질이 도입된 유전학적으로 변형된 유기체이다. 이러한 유전 물질은 종종 트랜스진으로 불리운다. 트랜스진의 핵산 서열은 하나 또는 그 이상의 전사 조절 서열 및 암호화된 단백질의 최적 발현 및 분리에 필요할 수있는 인트론과 같은 다른 핵산 서열을 포함한다. 트랜스진은 유기체로 혹은 예를들어, 그 유기체의 젖, 혈액, 소변, 알, 헤어, 또는 유기체의 시드와 같은 유기체에 의해 생성된 생성물로부터 회수를 촉진하는 방식으로 암호화된 단백질의 발현을 지시하도록 고안될 수 있다. 상기 트랜스진은 표적 동물의 종과 동일한 종 또는 다른 종의 지놈으로부터 유도된 핵산 서열로 구성될 수 있다. 상기 트랜스진은 특정 핵산 서열이 없는 지놈의 위치에 혹은 그렇지않으면 일반적으로 발견되거나 트랜스진에 대한 일반적인 위치에 통합될 수 있다.

용어 '생식 세포주 트랜스제닉 유기체'는 유전학적 변화 혹은 유전학적 정보가 생식세포내로 도입된 트랜스제닉 유기체를 칭하며, 따라서 이 트랜스제닉 유기체는 유전 정보를 자손에 전달시키는 능력을 갖는다. 만일 이러한 실제로 이러한 자손이 유전 변환 혹은 유전 정보의 일부나 전부를 갖는 경우 이들은 역시 트랜스제닉 유기체이다. 변환 혹은 유전 정보는 수용체가 차지하는 유기체의 종에 대하여 외부적이거나, 단지 특정 개체 수용체에 대해서만 외부적이거나, 또는 이미 그 수용체가 소유한 유전 정보일 수 있다. 마직막의 경우, 변환된 혹은 도입된 유전자는 본래 유전자와 다르게 발현될 수 있다.

트랜스제닉 유기체는 트랜스제닉 사람, 동물 또는 식물일 수 있다. 트랜스제닉은 배아 줄기 세포에 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 마이크로인젝션, 유전자 타겟팅, 및 재조합 바이러스 및 레트로바이러스 감염을 포함하는 여러가지 다른 방법에 의해 생성될 수 있다(참조 예, 미국 특허 제 4,736,866; 미국 특허 제 5,602,307; Mullins et al., (1993) Hypertension 22(4):630-633; Brenin et al. (1997) Surg. Oncol. 6(2)99-110; Tuan(ed), Recombinant Gene Expression Protocols, Methods in Molecular Biology No. 62, Humana Press(1997)). 핵산 프레그먼트의 재조합 컴피턴트 포유류 세포내 도입법은 다중 핵산 분자의 동시 형질변형을 촉진하는 어느 방법에 의한 것일 수 있다. 트랜스제닉 동물을 생성하는 상세한 방법은 미국특허 제 5,489,743 및 미국특허 제 5,602,307에 기술된 것을 포함하는 이 기술분야의 숙련자에게 쉽게 이용가능한 것이다.

유전자 치료

본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 구조물은 치료 유효량의 알부민 융합 단백질을 운반하기위해 유전자 치료 프로토콜의 일부로 사용될 수 있다. 생체내에서 핵산의 세포내 도입을 위한 한 방법은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 핵산을 함유하는 바이러스 벡터의 사용에 의한 것이다. 바이러스 벡터를 이용한 세포의 감염은 표적 세포의 큰 비율이 핵산을 받을 수 있다는 잇점을 갖는다. 또한, 예를들어, 바이러스 벡터내에 함유된 cDNA에 의해 바이러스 벡터내에 암호화된 분자는 바이러스 벡터 핵산을 수득하는 세포에서 효율적으로 발현된다. 상기 알부민 융합 단백질의 연장된 플라즈마 반감기는 잠재적으로 낮은 발현 수준에 대해 보상받을지 모른다.

레트로바이러스 벡터 및 아데노-어소시에이티드 바이러스 벡터가 생체내에서 알부민 융합 단백질을 암호하는 외생 핵산 분자의 전달용 재조합 유전자 운반 시스 템으로 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 세포내로 핵산의 효율적인 운반을 제공하며, 운반된 핵산은 안정하게 숙주의 염색체 DNA내로 통합된다. 이러한 벡터의 예, 이들을 사용하는 방법, 및 이들의 잇점 뿐만아니라 비-바이러스 운반 방법은 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(pp.151-153)에 상세히 기술되어 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 유전자를 위한 유전자 운반 시스템은 다수의 어느 방법에 의해 환자내로 도입될 수 있다. 예를들어, 유전자 운반 시스템의 약학 제조물은 예를들어, 정맥내 주입과 같이 시스템적으로 도입될 수 있으며, 표적 세포내 단백질의 특정 트랜스덕션은 수용체 유전자 또는 이들의 조합의 발현을 조절하는 전사 조절 서열에 기인하여 유전자 운반 매체, 세포-타입 혹은 조직=타입 발현에 의해 제공되는 트랜스펙션의 특이성으로부터 주로 일어난다. 다른 구체화로, 재조합 유전자의 초기 운반은 완전히 국소화되는 동물내로 도입을 이용하여 보다 제한된다. 예를들어, 상기 유전자 운반 매체는 캐세터(참조 미국 특허 5,328,470) 혹은 스테레오스태틱 주입(예, Chen et al.(1994) PNAS 91:3054-3057)에 의해 도입될 수 있다. 유전자 치료 구조물의 약학 제조물은 필수적으로 수용가능한 희석제내 유전자 운반 시스템으로 구성될 수 있으며 혹은 유전자 운반 매체가 담기 슬로우 릴리즈 매트릭스를 포함할 수 있다. 알부민 융합 단백질이 예를들어, 레트로바이러스 벡터와 같은 재조합 세포로부터 그대로 생성될 수 있는 경우, 그 약학 제조물은 알부민 융합 단백질을 생산하는 하나 또는 그 이상의 세포를 포함할 수 있다. 부가적인 유전자 치료법은 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(pp.153-162)에 기술되어 있다.

약학 혹은 치료 조성물

본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이들의 배합물은 비경우(예, 피하 혹은 근육내) 주입 혹은 정맥내 투여를 포함하는 어느 통상 방법에 의해 투여될 수 있다. 치료는 시간에 따른 단일 투여 혹은 복수 투여로 구성될 수 있다. 또한, 투여 혹은 복수 투여는 알부민에 융합되지않은 치료 단백질에 대해서보다 적은 빈도로 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 단독으로 투여될 수 있으나, 하나 또는 그 이상의 수용가능한 캐리어와 함께 약학 배합물로 존재하는 것이 바람직하다. 상기 캐리어(들)은 알부민 융합 단백질과 혼화성이 있으며 이들의 수용자에게 해롭지않아야 하는 '수용가능성'이 있어야 한다. 전형적으로, 상기 캐리어는 멸균된 그리고 발열원이 없는 물이나 염수일 것이다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 이들의 용액내에서 연장된 보존기간에 기인하여 특히 멸균 발열원 프리 워터, 염수 혹은 다른 등장 용액과 같은 수성 캐리어에서 잘 배합된다. 예를들어, 본 발명의 약학 조성물은 예를들어, 분산되기전에 수주 혹은 수개월 혹은 그 이상의 기간 수성 형태로 잘 배합될 수 있다.

알부민 융합 단백질을 함유하는 배합물은 수성 배합물내에서 알부민 융합 단백질의 연장된 보존기간을 나타내도록 제조될 수 있다. 상기한 바와 같이, 다수의 이러한 치료 단백질의 보존 기간은 HA에 융합후 현저히 증가 혹은 연장된다.

에어로졸 투여가 적절한 경우, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 표준 방법을 이용하여 에어로졸로 배합될 수 있다. 용어 '에어로졸'은 세기관지 혹은 코 경로로 흡입될 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 어느 가스-본 서스펜디드 형태를 포함한다. 특히, 에어로졸은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 드롭렉의 가스-본 서스펜션을 포함하며, 이는 측정 투여 흡입기 혹은 분무기 혹은 미스트 스프레이어내에 제조될 수 있다. 에어로졸은 또한 에어 혹은 흡입 장치로부터 인서플레이팅하여 운반될 수 있는 다른 캐리어 가스내에 서스펜딩된 본 발명의 화합물의 건조 분말 조성물을 포함한다.

상기 배합물은 편의상 단위 투여 형태로 존재할 수 있으며 제약 기술에 잘 알려진 어느 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 하나 또는 그 이상의 보조 성분으로 구성된 캐리어와 상기 알부민 융합 단백질을 결합하는 단계를 포함한다. 일반적으로 상기 배합물은 액체 캐리어 혹은 미세하게 나누어진 고형 캐리어 혹은 두가지 모두와 상기 활성 성분을 균일하게 그리고 친밀하게 결합시키고 그 다음 필요에 따라 그 생성물을 성형함으로써 제조된다.

비경구 투여에 적절한 배합물은 수성 및 비-수성 멸균 주입 용액을 포함하며, 이는 항산화제, 버퍼, 박테리아 발육 저지제 및 의도되는 수용자에 대해 적절한 배합물을 제공하는 용질을 함유할 수 있으며; 그리고 수성 및 비-수성 멸균 서스펜션을 포함하며, 이는 서스펜딩제 및 농후제를 포함할 수 있다. 상기 배합물은 예를들어 봉합된 앰플, 바이얼 혹은 주사와 같은 단위-투여 혹은 다중-투여 용기내에 존재할 수 있으며 예를들어 사용직전 주입용 물과 같은 멸균 액체 캐리어의 첨가만을 요구하는 경우 동결-건조(리오필라이즈드) 조건으로 보관될 수 있다. 즉석 주입 용액 및 서스펜션은 멸균 분말로 제조될 수 있다. 투여 배합물은 본 발명의 다수의 알부민 융합 단백질에 의해 나타나는 연장된 혈청 반감기를 갖는 치료 단백질에 대하여 비-융합 표준 배합물에 비하여 보다 낮은 몰 농도 혹은 보다 낮은 투여량으로 치료 단백질 부분을 함유할 수 있다.

예로서, 본 발명의 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 이상의 치료 단백질 리전을 포함하는 경우, 그 투여 형태는 치료 단백질의 효력에 상대적인 알부민 융합 단백질의 효력을 기초로 하여 계산되나 본래 치료 단백질에 비하여 알부민 융합 단백질의 연장된 혈청 반감기 및 보존기간을 갖는 것을 감안하여 계산될 수 있다. 전장 치료 단백질에 융합된 전장 HA로 구성된 알부민 융합 단백질에 있어서 단위면에서 동등한 투여량은 보다 높은 중량의 제제를 나타낼 수 있지만 투여 빈도는 감소될 수 있다.

본 발명의 배합물 혹은 조성물은 알부민 융합 단백질 성분의 연장된 보존기간을 나타내는 설명서나 포장 삽입물을 갖는 키트와 함께 혹은 키트내에 포함되어 포장될 수 있다. 예를들어, 이러한 설명서나 포장 삽입물은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 연장 혹은 길어진 보존기간을 고려하여 시간, 온도 및 빛과 같은 추천 보관 조건을 지시할 수 있다. 이러한 설명서나 포장 삽입물은 또한 관리되는 병원, 클리닉 혹은 사무실 조건의 필드, 외부에서 사용시 필요로할 수 있는 배합물에 대한 보관 편이성과 같은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 특정 잇점을 나타낼 수 있다. 상기한 바와 같이, 본 발명의 배합물은 수성 형태일 수 있으며 현저한 치료활성의 손실없이 이상적인 환경이하에서 보관될 수 있다.

본 발명은 또한 약학적으로 수용가능한 캐리어내에 용해된 유효량의 본 발명 의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드('알부민 융합 폴리뉴클레오타이드')를 대상자에게 투여함으로써 질병 혹은 질환(예, 본 명세서에 개시된 어느 하나 또는 그 이상의 질병 혹은 질환)의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.

투여되는 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 효과적인 투여량은 표 1에 참고문헌에 기술된 바와 같은 시험관내 및 생체내 연구에서 통상적으로 생물학적 반감기, 생체이용률, 및 독성을 나타내는 이 기술분야에 숙련자에게 잘 알려진 방법을 통해 검출될 수 있다.

상기 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 각 환자의 임상적 조건(특히 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드 단독으로 치료시 부작용), 운반 사이트, 투여방법, 투여 스케쥴, 및 시행자에게 알려진 다른 인자들을 고려하여 우수한 의학적 프랙틱스에 맞는 형태로 배합 및 투여될 것이다. 본 목적에 '효과적인 양'은 따라서 이러한 것들을 고려하여 결정된다.

예를들어, 운반되어지는 물질의 효과적인 양은 예를들어, 그 물질의 화학 구조 및 생물학적 활성, 환자의 나이 및 체중, 치료 및 그 심각성에 요구되는 조건 및 투여경로를 포함하는 다수 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료 빈도는 도즈당 투여되는 알부민 융합 단백질 혹은 폴리뉴클레오타이드 구성물의 양 뿐만아니라 대상자의 건강 및 병력과 같은 다수 인자에 따라 달라진다. 투여 양, 수, 및 투여 시기는 의사 혹은 수의사의 수행에 의해 정해질 것이다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및 폴리뉴클레오타이드는 어느 동물, 바람직 하게 포유류 및 조류에 투여될 수 있다. 바람직한 포유류는 사람, 개, 고양이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 말 및 돼지를 포함하며, 특히 사람이 바람직하다.

일반적 제안으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 낮게 투여되거나(비융합 치료 단백질의 몰 기초로) 혹은 비융합 치료 단백질에 비해 보다 낮은 빈도로 투여될 것이다. 치료 유효 투여량은 증상 혹은 질병 안정화의 개선 혹은 환자에서 생존의 연장이나 수명의 질 향상을 일으키기에 충분한 화합물의 양을 칭할 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 이들이 '클래식 드럭'의 연속적인 주입을 자극할 수 있는, 즉, 동등한 억제활성에 대하여 적은 단백질 등가물이 요구된다는 점에서 유리하다. 연장된 반감기로 인해, 예를들어, s.c. 매 3일 CT-Endo, 예를들어 매 2일 NT-Endo로 투여될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질은 하기의 추가 잇점을 갖는다: (i) 각 종양의 특정 성장(예, 빠른 그리고 느린 성장)에 알맞는 종양의 혈관신생 표현형의 기초한 투여 최적화 고안; (ii) 부반응 혹은 변경된 효능을 줄이거나 감소할 수 있는 보다 긴 적용시 드럭의 원하지않는 축적의 조절/회피. 또한, 펩타이드가 본래 소수성인 경우, 이들의 알부민과의 융합은 생체이용률을 증가시키고 보다 높은 농도의 배합을 이루도록 하는 이들의 용해도를 향상시킨다.

알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 경구, 직장, 비경구, 인트라시스터널, 질내, 복막내, (분말, 연고, 겔, 드롭 혹은 경피성 패치에 의해) 국소적으로, 버컬(bucally), 또는 경구나 비강 스프레이로 투여될 수 있다. '약학적으로 수용가능한 캐리어'는 비-독성 고형, 반고형 혹은 액체 필터, 희석제, 캡슐화 물질이나 어느 배합 조제를 칭한다. 용어 '비경구'는 정맥내, 근육내, 복막내, 흉골내, 피하 및 관절내 주입 및 취입 방식을 칭한다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 또한 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(pp.129-130)에 기술된 바와 같은 지연-방출 시스템에 의해 적절히 투여된다.

일 구체화로, 비경구 투여에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 유니트 투여 주입가능 형태(용액, 서스펜션 혹은 에멀션)로 약학적으로 수용가능한 캐리어, 즉, 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비-독성이며 배합물의 다른 성분과 혼화적인 것과 함께 원하는 정도의 순도로 혼합하여 배합된다. 예를들어, 상기 배합물은 임의로 산화제 및 치료제에 유해한 것으로 알려진 다른 화합물을 포함하지 않는다.

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 단독으로 혹은 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 함께 투여될 수 있는 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드 제제는 이에 한정하는 것은 아니나, 화학 치료제, 항생제, 스테로이드성 및 비-스테로이드성 항-염증제, 통상의 면역치료제, 및/또는 예를들어, 미국 가출원 제 60/355,547 및 WO 01/79480(pp.132-151)에 기술된 치료학적 처리물을 포함한다. 조합물은 동시에, 즉 혼합물로서, 혹은 개별적이지만 동시에; 혹은 연속적으로 투여될 수 있다. 이는 결합된 제제가 치료 혼합물로서 함께 투여되는 태위를 포함하며 그리고 또한 예를들어, 동일한 개체내에 별도의 정맥 라인을 통하여 결합된 제 제가 개별적이지만 동시에 투여되는 방법을 포함한다. '함께' 투여하는 것은 우선 주어진 화합물이나 제제중 하나를 별도로 투여하고 그 다음 두번째로 투여하는 것을 포함한다.

본 발명에 사용되기에 적절한 약학 조성물은 활성 성분이 의도되는 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 함유된 조성물을 포함한다.

본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물 성분중 하나 또는 그 이상으로 채워진 하나 또는 그 이상의 용기를 포함하는 약학 팩 혹은 키트를 제공한다. 임의로 이러한 용기(들)와 관련되어 제조, 약제 혹은 생물학적 생산품의 사용이나 판매를 관리하는 정부 대행사에 의해 기술된 형태의 설명이 있을 수 있으며, 이는 제조 대행사, 사람 투여용 사용이나 판매의 승인을 반영한다.

본 명세서에 기술된 사항은 하기 실시예를 참고로 보다 쉽게 이해될 것이며, 이는 예시하는 것으로 제공되며 이로서 한정하려는 것은 아니다.

다른 설명없이도, 이 기술분야의 숙련자는 앞선 설명 및 하기 실시예를 사용하여 본 발명에 나타내는 변형을 제조하고 활용할 수 있으며 청구된 방법을 실행할 수 있는 것으로 여겨진다. 하기 실시예는 따라서 본 발명의 특정 구체화를 강조하는 것이며 이로서 한정하려는 것은 아니다.

실시예

실시예 1

사람 엔도스태틴 cDNA의 클로닝

사람 태아 신장 5'-STRETCH Plus cDNA 라이브러리의 DNA(Clontech)를 페놀/클로로포름 추출에 의해 추출하고, 에탄올 침전시킨 다음 RNaseA로 다이제스팅하여 DNA 시료내 어느 RNA 존재를 제거하였다. 상기 DNA를 100ng 내지 10pg(10배 증분으로)으로 연속적으로 희석하였다. PCR 프라이머 JH005 및 JH018은 엔도스태틴의 5'말단내 BamHI 사이트, 및 엔도스태틴의 3'말단내 HindIII 사이트를 클로닝하도록 고안되었다. 각 프라이머의 DNA 서열은 다음과 같다:

JH005

***Bam*HI**

5'-TAGCGGATCCACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACC-3'

5' 엔도스태틴

(SEQ ID NO: 7)

JH018

***Hind*III**

5'-GCTAAAGCTTATTACTTGGAGGCAGTCATGAAGCTGTTCTCAATGCAGAGCACG-3'

3' 엔도스태틴

(SEQ ID NO:8)

마스터 믹스가 다음과 같이 제조되었다: 2mM MgCl2 PCR 버퍼, 10μM PCR dNTP's, 0.2μM JH005, 0.2μM JH018, 2U FastStart Taq. DNA 중합효소. 1μL의 주 형 DNA(10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng)을 49μL의 반응 혼합물에 첨가하였다. 총 반응 볼륨은 50μL이었다. Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600은 다음과 같이 프로그램화되었다: 변성 95℃, 4분[HOLD], 그 다음 [CYCLE] 변성 95℃, 30초, 어닐링 45℃, 30초, 익스텐딩 72℃, 60초, 40싸이클, 그 다음, [HOLD] 72℃, 600초, 그 다음 [HOLD] 4℃. PCR 증폭 산물은 겔 전기영동에 의해 분석되었으며 예측 사이즈의 단일 DNA 밴드(0.57kb)가 관찰되었다. 변형된 엔도스태틴 cDNA 프레그먼트는 1%(w/v) 아가로즈 TAE 겔로 부터 Gene Clean III Kit(BIO101 Inc.)를 이용하여 분리되었다.

상기 엔도스태틴 cDNA 프레그먼트는 BamHI/HindIII로 다이제스팅되고 BamHI/HindIII 다이제스팅된 pBST+(WO 99/00504에 기술됨)내로 라이게이션되어 플라스미드 pDB2446을 생성하였다.

실시예 2

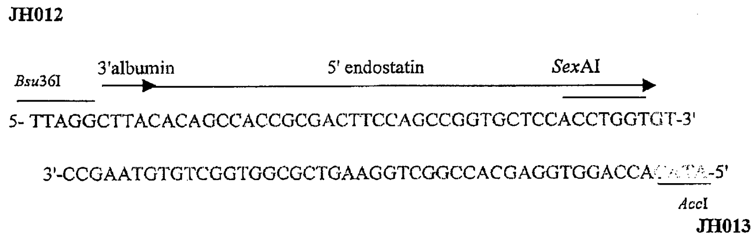
C-말단 및 N-말단 알부민-엔도스태틴 발현 플라스미드의 구성

C-말단 알부민-엔도스태틴 발현 플라스미드의 구성

C-말단 rHA-엔도스태틴 융합체는 알부민의 C-말단 아미노산이 사람 엔도스태틴의 첫번째 N-말단 아미노산에 뒷따르도록 구성되었다.

이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 연결기는 알부민과 엔도스태틴 암호 리전사 이의 접합부를 구성하도록 디자인되었다. 이 올리고뉴클레오타이드 쌍 JH012/JH013은 알부민 cDNA내 Bsu361 사이트로부터 엔도스태틴 cDNA의 5'리전내 SexAI 사이트로 연장되도록 디자인되었다. AccI 사이트는 상기 연결기가 pDB2243(WO 00/44772에 앞서 기술됨)내로 클로닝되도록 상기 연결기의 3'말단에 만들어졌다. 플라스미드 pDB2243은 적절한 전사 프로모터 및 전사 종

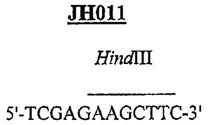
결 서열을 제공하는 효모 PRB1 프로모터 및 효모 ADH1 종결자를 함유하였다.



(각각, SEQ ID NO:9 및 SEQ ID NO:10)

상기 올리고뉴클레오타이드 연결기 JH012/JH013은 pDB2243의 6.13kb Bsu36I-AccI 프레그먼트내로 라이게이션되었다.

합성 셀프-컴플리멘터리 올리고뉴클레오타이드 JH011는 WO/44772에 이미 기술된 바와 같이, pDB2243의 XhoI 사이트내로 HindIII 클로닝 사이트가 삽입되도록 디자인되었다.



(SEQ ID NO:11)

플라스미드 pDB2243은 효모 ADH1 전사 종결자의 다운스트림으로 유일한 XhoI에 선형화되었다. 올리고뉴클레오타이드 JH011은 스스로 어닐링되어 이중 가닥 연결기를 생성하였다. 상기 연결기는 XhoI 선형 pDB2243내로 라이게이션되어 플라스미드 pDB2441을 생성하였으며, 이는 ADH1 종결자의 어느 한쪽에 HindIII를 소유하였다. 플라스미드 pDB2441은 HindIII로 완전 다이제스팅되고 0.37kb ADH1 종결 플레그먼트가 정제되고 HindIII 다이제스팅된 pDB2446내로 라이게이션되었으며, 이는 카프 인테스티널 포르파타아제로 처리되어 플라스미드 pDB2450을 생성하였다.

알부민-엔도스태틴 융합체의 제조시 다음 단계는 SexA1 제한 엔도뉴클라아제의 사용에 따라 달라진다. SexA1은 Dcm-센서티브 제한 효소이다. dcm-, dam- E. coli 균주 GM2163(New England Biolabs, 유전형: F-, ara-14, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx78, glnV44, galK2, galT22, mcrA, dcm-6, hisG4, rfbD1, rpsL136, dam13::Tn9, xylA5, mtl-1, rhi-1, mcrB1, hsdR2)는 독립적으로 플라스미드 pDB2450 및 pDB2442로 형정변형되었다. Dcm-dam- pDB2450 및 pDB2442 플라스미드 DNA는 정제되고 BamHI 및 SexAI으로 완전 다이제스팅되었다. pDB2450으로부터 얻어진 SexA1/BamHI 프레그먼트(0.87kb)는 pDB2442로 부터 얻어진 SexA1/BamHI(5.88kb) 프레그먼트내로 라이게이션되었다.

적절한 효모 벡터 서열은 EP-A-286 424에 일반적으로 기술되고 Sleep, D., et al.(1991) Bio/Technology 9, 183-187에 기술된 플라스미드 pSAC35를 '디스인테그레이션'하여 제공되었다. NotI C-말단 알부민-엔도스태틴 발현 카세트는 pDB2456으로부터 분리되고, 정제되고 NotI 다이제스팅된 pSAC35내로 라이게이션되었으며, 이는 카프 인테스티널 포스파타아제로 처리되어 LEU2 선별 마커로서 동일한 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2452를 생성하였다.

N-말단 엔도스태틴-알부민 융합체 발현 플라스미드의 구성

재조합 알부민 발현 벡터 pAYE645 및 pAYE646은 이미 영국 특허출원 0217033.0에 기술된 바 있다. HSA/MFα-1 융합 리더 서열 뿐만아니라 효모 PRB1 프로모터 및 적절한 사자 프로모터 및 전사 종결 서열을 제공하는 효모 ADH1 종결자를 함유하는 플라스미드 pAYE645는 영국 특허출원 0217033.0에 기술되어 있다. 플라스미드 pAYE645는 제한 효소 AflII로 완전 다이제스팅되고 제한효소 HindIII로 일부 다이제스팅되었으며 효모 PRB1 프로모터의 3'말단 및 알부민 암호 서열을 포함하는 DNA 프레그먼트가 분리되었다. WO 00/44772에 기술된 플라스미드 pDB2241은 AflII/HindIII로 다이제스팅되고 효모 PRBI 프로모터의 5'말단 및 효모 ADH1 종결자를 포함하는 DNA 프레그먼트가 분리되었다. pAYE645의 AflII/HindIII DNA 프레그먼트는 그 다음 AflII/HindIII pDB2241 벡터 DNA 프레그먼트내로 클로닝되어 플라스미드 pDB2302를 생성하였다. 플라스미드 pDB2302는 PacI/XhoI으로 완전 다이제스팅되고 6.19kb 프레그먼트가 분리되었으며, 우묵한 말단은 T4 DNA 중합효소 및 dNTPs로 블런트 엔딩되었으며 재접합되어 플라스미드 pDB2465를 생성하였다. 플라스미드 pDB2465는 ClaI으로 선형화되고, 우묵한 말단은 T4 DNA 중합효소 및 d

NTPs로 블런트 엔딩되었으며, 그리고 재접합되어 플라스미드 pDB2533을 생성하였다. 플라스미드 pDB2533은 BlnI로 선형화되고, 그 우묵한 말단은 T4 DNA 중합효소 및 dNTPs로 블런트 엔딩되었으며, 그리고 재접합되어 플라스미드 pDB2534를 생성하였다. 플라스미드 pDB2534는 BmgBI/BglII로 완전 다이제스팅되고, 6.96kb DNA 프레그먼트가 분리되고 두 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 연결기, VC053/VC054 및 VC057/VC057 중 하나에 라이게이션되어 플라스미드 pDB2540을 생성하였으며, 혹은 VC055/VC056 및 VC057/VC058중 하나에 라이게이션되어 플라스미드 pDB2541을 생성하였다.

VC053

5’-GATCTTTGGATAAGAGAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCACCGGT-3’

(SEQ ID NO:12)

VC054

5’-
pCCTTGAACCGGTGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTCTCTTATCCAAA-3’

(SEQ ID NO:13)

VC055

5’-GATCTTTGGATAAGAGAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCATCGAT-3’

(SEQ ID NO:14)

VC056

5’-pCCTTGAATCGATGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTCTCTTATCCAAA-
3’

(SEQ ID NO:15)

VC057

5’-
pTCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACTTCAAGGCTTTGGTCTTGATCGCTTTCG
CTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCGAAGATCAC-3’

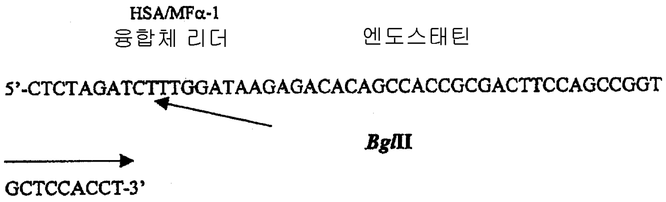
(SEQ ID NO:16)

VC058

5’-
GTGATCTTCGAATGGACATTGTTGCAAGTATTGAGCGAAAGCGATCAAGACC
AAAGCCTTGAAGTTTTCCTCACCTAGGT-3’

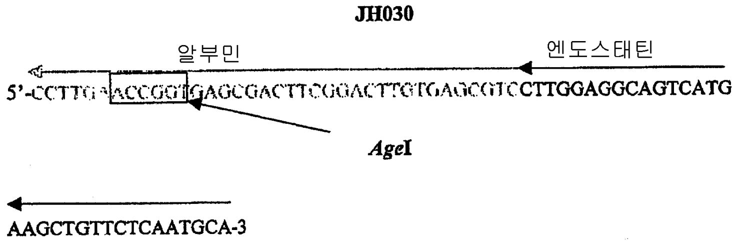
(SEQ ID NO:19)

PCR 프라이머 JH029 및 JH030은 엔도스태틴 cDNA가 N-말단 알부민 융합체로서 BglII 및 AgeI으로 선형화된 pDB2540내로 클로닝되도록 디자인되었다.



5'-CTCTAGATCTTTGGATAAGAGACACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGT
GCTCCACCT-3'

(SEQ ID NO:20)



5'-CCTTGAACCGGTGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCCTTGGAGGCAGTCATG
AAGCTGTTCTCAATGCA-3

(SEQ ID NO:21)

마스터 믹스가 다음과 같이 제조되었다: 2mM MgCl $_2$ PCR 버퍼, 10μM PCR dNTP's, 0.2μM JH009, 0.2μM JH030, 2U FastStart Taq. DNA 중합효소. 1μL의 pDB2446(10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng)을 49μL의 반응 혼합물에 첨가하였다. 총 반응 볼륨은 50μL이었다. Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600은 다음과 같이 프로그램화되었다: 변성 95℃, 4분[HOLD], 그 다음 [CYCLE] 변성 95℃, 30초, 어닐링 45℃, 30초, 익스텐딩 72℃, 60초, 20싸이클, 그 다음, [HOLD] 72℃, 600초, 그 다음 [HOLD] 4℃. PCR 증폭 산물은 겔 전기영동에 의해 분석되었으며 예측 사이즈의 단일 DNA 밴드(0.59kb)가 관찰되었다. 상기 0.59kb DNA 프레그먼트는 1%(w/v) 아가로즈 TAE 겔로부터 Gene Clean III Kit(BIO101 Inc.)를 이용하여 분리되었다.

상기 PCR DNA 프레그먼트는 제한 엔도뉴클라아제 BglII/AgeI으로 완전 다이제스팅되고 0.59kb 프레그먼트는6.15 kb pDB2540 BglII/AgeI 벡터 DNA 프레그먼트내로 라이게이션되어 플라스미드 pDB2556을 생성하였다.

적절한 효모 벡터 서열은 EP-A-286 424에 일반적으로 기술되고 Sleep, D., et al.(1991) Bio/Technology 9, 183-187에 기술된 플라스미드 pSAC35를 '디스인테그레이션'하여 제공되었다. 3.54kb NotI N-말단 엔도스태틴-알부민 발현 카세트는 pDB2556으로부터 분리되고, 정제되고 NotI 다이제스팅된 pSAC35내로 라이게이션되었으며, 이는 카프 인테스티널 포스파타아제로 처리되어 LEU2 선별 마커로서 반대방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2557을 생성하였다.

실시예 3

사람 안지오스태틴 cDNA의 클로닝

사람 간 5'-STRETCH Plus cDNA 라이브러리의 DNA(Clontech)가 간으로서 사람 안지오스태틴 cDNA의 공급원으로 선택되었다. 상기 DNA는 페놀/클로로포름 추출에 의해 추출되고, 에탄올 침전시킨 다음 RNaseA로 다이제스팅하여 DNA 시료내 어느 RNA 존재를 제거하였다. 상기 DNA를 100ng 내지 10pg(10배 증분으로)으로 연속적으로 희석하였다. 두개의 돌연변이유발 PCR 프라이머 JH003 및 JH004는 안지오스태틴의 5'말단내 BamHI 사이트(JH004), 및 안지오스태틴의 3'말단내 HindIII 사이트 (JH003)를 도입하도록 고안되었다.

JH003

5'-GGAGTACTGTAAGATACCGTCCTGTGACTCCTCCCCAGTATAATAAGCTTTTT-3'

앤지오스태틴'

(SEQ ID NO:22)

JH004

5'-TAGCGGATCCGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGGGAATGGAAAGAAC-3'

BamHI 앤지오스태틴'

(SEQ ID NO:23)

상기 안지오스태틴 cDNA는 프라이머 JH003 및 JH004를 이용하여 PCR에 의해 증폭되었다. 마스터 믹스가 다음과 같이 제조되었다: 2mM $MgCl_2$ PCR 버퍼, 10μM PCR dNTP's, 0.2μM JH003, 0.2μM JH004, 2U FastStart Taq. DNA 중합효소(Roche). 1μL의 DNA(10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng)을 49μL의 반응 혼합물에 첨가하였다. 총 반응 볼륨은 50μL이었다. Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600은 다음과 같이 프로그램화되었다: 변성 95℃, 4분[HOLD], 그 다음 [CYCLE] 변성 95℃, 30초, 어닐링 45℃, 30초, 익스텐딩 72℃, 60초, 40싸이클, 그 다음, [HOLD] 72℃, 600초, 그 다음 [HOLD] 4℃. PCR 증폭 산물은 겔 전기영동에 의해 분석되었으며 예측 사이즈의 단일 DNA 밴드(0.79kb)가 관찰되었다. 상기 변형된 안지오스태틴 cDNA 프레그먼트는 1%(w/v) 아가로즈 TAE 겔로 부터 Gene Clean III Kit(BIO101 Inc.)를 이용하여 분리되었다. 상기 안지오스태틴 프레그먼트는 BamHI, HindIII로 완전 다이제스팅되고(0.790kb) BamHI, HindIII로 다이제스팅된 pBST+(WO 99/00504에 기술됨)에 라이게이션되어 플라스미드 pDB2447을 생성하였다. 사람 안지오스태틴 cDNA의 DNA 서열은 NCBI(National Center For Biotechnology Information)로 부터 공개적으로 이용가능한 cDNA 서열을 이용하여 얻어지고 정렬되었다. 이 분석은 상기 DNA 서열이 사람 플라스미노겐(RID:998488083-23300-12247)과 100% 동일성을 가짐을 나타내었다.

실시예 4

C-말단 및 N-말단 알부민-안지오스태틴 발현 플라스미드의 구성

C-말단 알부민-안지오스태틴 발현 플라스미드의 구성

올리고뉴클레오타이드 쌍은 rHA와 안지오스태틴 cDNA사이의 접합부를 구성하도록 디자인되었다. 상기 올리고뉴클레오타이드 쌍 JH021 및 JH022는 rHA내 Bsu36I 사이트가 안지오스태틴의 5'리전내 BmrI 사이트에 연결되도록 디자인되었다.

JH021

5' 엔지오스태틴

*Bam*HI *Bsu*36I rHA

5- GATCACCTTAGGCTTAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGGGAATGG-3'

3'TGGAATCCGAATCACATAGAGAGTCTCACGTTCTGACCCTTACC-5' **JH022**

(각각, SEQ ID NO:24 및 SEQ ID NO:25)

플라스미드 pDB2447은 부분적으로 BmrI으로 다이제스팅된 다음 BamHI으로 완전 다이제스팅되어 3.95kb 벡터를 생성하였다. 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 연결기 JH021/22가 BamHI BmrI 다이제스팅된 pDB2447로 라이게이션되어 플라스미드 pDB2458을 생성하였다. 플라스미드 pDB2458은 HindIII로 라이게이션되고 카프 인테스티날 포스파타아제로 처리되어 3'포스페이트가 제거되었다. 플라스미드 pDB2441은 HindIII로 완전 다이제스팅되고 0.37kb mADH1 종결 프레그먼트는 1%(w/v) 아가로즈 TAE 겔로부터 Gene Clean III Kit(BIO101 Inc.)를 이용하여 분리되었다. 0.37kb HindIII mADH1 종결 프레그먼트는 HindIII 선형화된 pDB2458로 라이게이션되어 플라스미드 pDB2459를 생성하였다.

사람 안지오스태틴 cDNA의 DNA 서열은 잠재성 N-연결 글리코실화 사이트를 암호한다. N-연결 글리코실화에 대한 사이트는 PCR 돌연변이유발에 의해 무효화되었다. PCR 프라이머 JH025 및 JH026은 아스파라긴 잔기(코돈 AAC)를 글루타민 잔기(코돈 CAA)로 치환하기위해 뉴클레오타이드 서열내 변화를 도입하도록 디자인되었다.

JH025

'엔지오스태틴'

5'-GAATGTATGCATTGCAGTGG-3'

JH026

'엔지오스태틴'

5'-GCACCATGGGGCCCTTTTTCCGTCAGGATTGCGGCAGTAGTTTTCATCCAAATTT

TTGCAGGGGAAGTTTTCTGGTGTCCTTTGATGTGTGTGAGGGG-3'

(SEQ ID NO:27)

N-연결된
글리코실화 사이트를
무효화 시키기 위해
AAC-CAA 변화가
도입됨.

마스터 믹스가 다음과 같이 제조되었다: 2mM MgCl $_2$ PCR 버퍼, 10μM PCR dNTP's, 0.2μM JH025, 0.2μM JH026, 2U FastStart Taq. DNA 중합효소(Roche). 1μL의 pDB2447(10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng)을 49μL의 반응 혼합물에 첨가하였다. 총 반응 볼륨은 50μL이었다. Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600은 다음과 같이 프로그램화되었다: 변성 95℃, 4분[HOLD], 그 다음 [CYCLE] 변성 95℃, 30초, 어닐링 45℃, 30초, 익스텐딩 72℃, 60초, 20싸이클, 그 다음, [HOLD] 72℃, 600초, 그 다음 [HOLD] 4℃. PCR 증폭 산물은 겔 전기영동에 의해 분석되었으며 예측 사이즈의 단일 DNA 밴드(0.46kb)가 관찰되었다. 변형된 안지오스태틴 cDNA 프레그먼트는 1%(w/v) 아가로즈 TAE 겔로 부터 Gene Clean III Kit(BIO101 Inc.)를 이용하여 분리되었다. 비-글리코실화 안지오스태틴 cDNA 프레그먼트는 NsiI, NcoI으로 완전 다이제스팅되고 분리된 0.44kb는 3.93kb NsiI, NcoI pDB2459에 라이게이션되어 플라스미드 pDB2480을 생성하였다.

플라스미드 pDB2243(WO 00/44772에 이미 기술됨)은 효모 PRB1 프로모터 및 효모 ADH1 종결자를 함유하였으며 이는 적절한 전사 프로모터 및 전사 종결 서열을 제공하였다. 플라스미드 pDB2244는 BamHI, Bsu361로 완전 다이제스팅되고 5.84kb 프레그먼트가 분리되고 pDB2480의 BamHI, Bsu361 안지오스태틴-mADH1 프레그먼트로 라이게이션되어 pDB2501을 생성하였다. 플라스미드 pDB2501은 제한 효소 NotI으로 다이제스팅되어 비-글리코실화 알부민-안지오스태틴 발현 카세트를 생성하였다.

적절한 효모 벡터 서열은 EP-A-286 424에 일반적으로 기술되고 Sleep, D., et al.(1991) Bio/Technology 9, 183-187에 기술된 플라스미드 pSAC35를 '디스인테그레이션'하여 제공되었다. NotI C-말단 비-글리코실화 알부민-안지오스태틴 발현 카세트는 pDB2501로부터 분리되고, 정제되고 NotI 다이제스팅된 pSAC35내로 라이게이션되었으며, 이는 카프 인테스티널 포스파타아제로 처리되어 LEU2 선별 마커로서 동일한 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2508 및 LEU2 선별 마커로서 반대 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2509를 생성하였다.

N-말단 안지오스태틴-알부민 발현 플라스미드의 구성

비-글리코실화 안지오스태틴 cDNA는 프라이머 CF96 및 CF97을 이용하여 돌연변이유발 PCR에 의해 변형되었다.

CF96

5'-CGATAGATCTTTGGATAAGAGAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGG

GAATGG-3'

(SEQ ID NO:28)

CF97

5'-

GGCCATCGATGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTACTGGGGAGGAGTCAC

AGGACGG-3'

(SEQ ID NO:29)

마스터 믹스가 다음과 같이 제조되었다: 2mM MgCl $_2$ PCR 버퍼, 10μM PCR dNTP's, 0.2μM CF96, 0.2μM CF9

7, 2U FastStart Taq. DNA 중합효소(Roche). 1μL의 pDB2501(10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng)을 49μL의 반응 혼합물에 첨가하였다. 총 반응 볼륨은 50μL이었다. Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600은 다음과 같이 프로그램화되었다: 변성 95℃, 4분[HOLD], 그 다음 [CYCLE] 변성 95℃, 30초, 어닐링 55℃, 30초, 익스텐딩 72℃, 90초, 25싸이클, 그 다음, [HOLD] 72℃, 600초, 그 다음 [HOLD] 4℃. PCR 증폭 산물은 겔 전기영동에 의해 분석되었으며 예측 사이즈의 단일 DNA 밴드(0.83kb)가 관찰되었다. 변형된 안지오스태틴 cDNA 프레그먼트는 1%(w/v) 아가로즈 TAE 겔로 부터 Gene Clean III Kit(BIO101 Inc.)를 이용하여 분리되었다. 비-글리코실화 안지오스태틴 cDNA 프레그먼트는 BglI, ClaI으로 완전 다이제스팅되고 분리된 0.83kb는 6.15kb BglI, ClaI pDB2541에 라이게이션되어 플라스미드 pDB2763을 생성하였다.

적절한 효모 벡터 서열은 EP-A-286 424에 일반적으로 기술되고 Sleep, D., et al.(1991) Bio/Technology 9, 183-187에 기술된 플라스미드 pSAC35를 '디스인테그레이션'하여 제공되었다. NotI N-말단 비-글리코실화 알부민-안지오스태틴 발현 카세트는 pDB2763으로부터 분리되고, 정제되고 NotI 다이제스팅된 pSAC35내로 라이게이션되었으며, 이는 카프 인테스티널 포스파타아제로 처리되어 LEU2 선별 마커로서 동일한 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2765 및 LEU2 선별 마커로서 반대 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2764를 생성하였다.

실시예 5

N-말단 및 C-말단 알부민-크링글5 융합체의 구성

C-말단 알부민-(GGS) $_4$ GG-크링글5 발현 플라스미드의 구성

C-말단 알부민 융합체에 대한 플라스미노겐 크링글5의 클로닝은 포워드 프라이머 5'-TGTATGTTTGGGAATGGGAAAG-3' 및 리버스 프라이머 5'-ACACTGAGGGACATCACAGTAG-3'을 이용하여 표준 조건하에서 사람 간 cDNA 라이브러리(Ambion)의 PCR 증폭으로 개시되었다. 포워드 프라이머 5'-GTGGGATCCGGTGGTTGTATGTTTGGGAATGGGAAAG-3 및 리버스 프라이머 5'- CACAAGCTTATTAACACTGAGGGACATCACAGTAG-3을 이용한 후속적인 네스티드 PCR로 DNA 프레그먼트를 생성하였으며 이는 후속적으로 제조자의 지시에 따라 pCR4-TA-TOPO(Invitrogen)내로 클로닝되었다. 그 결과물인 플라스미드는 pCR4-Kringle5-C라고 칭하였다. C-말단 크링글5 DNA 프레그먼트는 BamHI 및 HindIII로 다이제스팅하여 pCR4-Kringle5-C로부터 분리되었다. 플라스미드 pDB2575는 부분적으로 HindIII로 다이제스팅되고 BamHI으로 완전 다이제스팅되었다. 원하는 6.55kb DNA 프레그먼트가 분리되고 플라스미드 pCR4-Kringle5-C의 0.26kb BamHI/HindIII 프레그먼트에 라이게이션되어 플라스미드 pDB2717을 생성하였다.

적절한 효모 벡터 서열은 EP-A-286 424에 일반적으로 기술되고 Sleep, D., et al.(1991) Bio/Technology 9, 183-187에 기술된 플라스미드 pSAC35를 '디스인테그레이션'하여 제공되었다. 플라스미드 pDB2717은 NotI으로 완전 다이제스팅되고 3.27kb C-말단 알부민-(GGS) $_4$ GG-Kringle5 발현 카세트가 분리되고 후속적으로 NotI NotI 카프 인테스티날 포스파타아제 처리된 pSAC35내로 라이게이션되어 LEU2 선별 마커로서 동일한 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2748 및 LEU2 선별 마커로서 반대 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2749를 생성하였다.

N-말단 Kringle-(GGS) $_4$ GG-알부민 발현 플라스미드의 구성

N-말단 알부민 융합체에 대한 플라스미노겐 크링글5의 클로닝은 포워드 프라 이머 5'-GTGAGATCTTGTATGTTTGGGAATGGGAAAG-3' 및 리버스 프라이머 5'-CACGGATCCACCACACTGAGGGACATCACAGTAG-3'을 이용하여 표준 조건하에서 클론 pCR4-Kringle5-C에 함유된 크링글5 서열의 PCR 증폭에 의해 수행었다. 증폭된 DNA 프레그먼트는 제한 엔도뉴클레아제 BglII 및 BamHI으로 다이제스팅되어 pLITMUS29(New England BioLabs)내로 클로닝되었다. 그 결과물인 플라스미드는 pCR4-Kringle5-N이라고 칭하였다. 플라스미드 pCR4-Kringle5-N은 BamHI 및 BglII로 다이제스팅되었다. 0.26kb DNA 프레그먼트가 BamHI, BglII 다이제스팅된 pDB2573내로 라이게이션되어 플라스미드 pDB2771을 생성하였다. 적절한 효모 벡터 서열은 EP-A-286 424에 일반적으로 기술되고 Sleep, D., et al.(1991) Bio/Technology 9, 183-187에 기술된 플라스미드 pSAC35를 '디스인테그레이션'하여 제공되었다. 플라스미드 pDB2771은 NotI으로 완전 다이제스팅되고 3.27kb N-말단 Kringle5-(GGS) $_4$ GG-알부민 발현 카세트가 분리되고 후속적으로 NotI 카프 인테스티날 포스파타아제 처리된 pSAC35내로 라이게이션되어 LEU2 선별 마커로서 동일한 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2773 및 LEU2 선별 마커로서 반대 발현 방향으로 NotI 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 pDB2774를 생성하였다.

실시예 6

효모 형질변형 및 배양조건

WO 95/23857, WO 95/33833 및 WO 94/04687에 개시된 효모 균주를 Sleep D., et al.(2001) Yeast 18, 403-421에 기술된 바와 같이 루신 프로토트로피(prototrophy)로 형질변형시켰다. 형질변형체는 Buffered Minimal Medium(BMM, Kerry-Williams, S.M. et al.(1988) Yeast 14, 161-169)에 넣어져 다음 분석을 위해 충분히 성장될때까지 30℃에서 배양하였다.

실시예 7

알부민 엔도스태틴 융합 단백질의 발현

rHA 융합체는 쉐이크 플라스크에서 발현되었으며 배양 발현 수준이 측정되었다. rHA-엔도스태틴에 대한 배양 상층액내 발현수준은 상(high)이었다. 엔도스태틴에 대한 발현은 배양 상층액에서 중상(medium high)이었다.

실시예 8

알부민 엔도스태틴 융합체의 정제

<u>C-말단 엔도스태틴 정제</u> :

C-말단 엔도스태틴은 용출 버퍼에 별도의 250mM NaCl을 필요로 한 것을 제외하고는, WO 00/44772에 기술된 바와 같은 스탠다드 rHA SP-FF(Pharmacia) 조건을 이용하여 정제되었다. 그 다음 용출물은 용출 버퍼에 별도의 200mM NaCl이 포함된 것을 제외하고는(이 염 농도는 최적화되지않아 달라질 수 있음), WO 00/44772에 기술된 바와 같은 스탠다드 rHA DE-FF(Pharmacia) 조건을 이용하여 정제되었다. 그 다음 정제된 물질을 농축하고 PBS로 여과되었다.

<u>N-말단 엔도스태틴 정제:</u>

N-말단 엔도스태틴은 용출 버퍼에 별도의 250mM NaCl을 필요로 한 것을 제외하고는, 스탠다드 rHA SP-FF 조건을 이용하여 정제되었다. 그 다음 용출물은 pH 8및 2.5mS.cm $^{-1}$ 로 조절되고 15mM 포타슘 테트라보레이트에서 평형화된 스탠다드 rHA DE-FF를 사용하여 정제되었다. 상기 DE-FF는 스탠다드 rHA 용출 버퍼를 사용하여 용출되었다.

발효 타이터는 각각 C 및 N 말단 융합체에 대해 2.2 및 0.9mg.mL $^{-1}$ 이었으며 전체 정제 회수율은 높았다. 특히 N-말단 융합체에 대하여 요구 순도에 따라 달라지는 정제 회수율을 보다 향상시키는 것과 발효 타이터를 증가시키는 것이 가능하다.

실시예 9

알부민 엔도스태틴 융합체의 특성화

정제후 단백질은 시료를 4-12% 구배 SDS 비-환원 겔에 런닝하고 항-엔도스태틴 혹은 항-HSA 항체를 가지고 웨스턴 블롯을 수행하여 특성화되었다. 그 결과를 도 13에 나타낸다. 겔은 하기와 같이 로딩되었다:

레인	시료	로드
1.	-	-
2.	매직 마커	-
3.	-	-
4.	C 말단 엔도스태틴	1μg
5.	N 말단 엔도스태틴	1μg
6.	HSA	1μg
7.	엔도스태틴 스탠다드	1μg

특성화된 단백질은 하기 표에 나타내었다:

표 3. 정제후 단백질 특성화

	C-말단 융합	N-말단 융합
SDS-PAGE 및 콜로이덜 블루 염색에 의한 %순도	95	99
포스트 번역 변형의 ESMS 표시	합치되는 이론적 질량=86512의 어떤 종도 검출되지않음. 주종은 CT 리신 잔기가 손실된 것과 일치 [1]	합치되는 이론적 질량의 종이 검출됨. 일부 보다 높은 몰 중량 성분이 존재 [2]
N-말단 서열	rHA 에 대해 합치되는 NT 서열	엔도스태틴에 대해 합치되는 NT 서열
엔도톡신(EU.mL $^{-1}$)	4.3	5.7
융합체 농도(mg.mL $^{-1}$)	5	5

주:

1. 본질적 단일 피크. 3개의 다른 제조물에서 관찰된 CT 리신 잔기의 손실은 트립틱 펩타이드의 나노-MS에 의해 확인되었다.

2. 합치되는 미가공 일차 서열에 대한 우수한 증거. 아마도 각각 인산화 및 글리코실화된 추가 종이 +78 및 +165Da에서 관찰되었다. +78dms C-말단 제조물에서는 관찰되지않았다.

실시예 10

알부민 엔도스태틴 융합 단백질의 약물 동력학

안지오스태틴 항원 수준은 엔도스태틴, 엔도스태틴과 C-말단 알부민-융합체(CT-엔도스태틴), 또는 엔도스태틴과 N-말단 알부민-융합체(NT-엔도스태틴)의 i.v. 혹은 s.c. 주입후 마우스 혈청에서 측정되었다.

마우스는 시험 물질의 단일 주입을 받았다. 각 시료에서 그룹당 5마리 마우스에서 혈액을 추출하여 혈청은 ELISA 분석용으로 수집되었다.

PK 데이타:

s.c. 및 i.v. 적용후 '클래식' 엔도스태틴과 비교한 CT- 및 NT- 엔도스태틴에 대한 데이타는 다음과 같은 결과를 나타내었다:

엔도스태틴(클래식): 4.5 hrs

CT-엔도스태틴: 56 hrs

NT-엔도스태틴: 29 hrs

표 4는 s.c. 투여후 약물 동력학 결과를 나타낸다. s.c. 투여후 평균 엔도스태틴 농도, +/-S.D.를 도 14에 나타내었다.

표 4

s.c. 투여후 약물 동력학 결과

	엔도스태틴 10mg/kg	CT-엔도스태틴	NT-엔도스태틴	엔도스태틴 1.25mg/kg
흡수 반감기(hr)	0.09	1.91	8.84	0.05
말기 반감기(hr)	4.5	55.7	28.4	2.0 [a]

AUC(hr-ng/mL)	3,010	142,183	175,272	2,682 [b]
Cmax(ng/mL)	229	1,785	2,198	44

a 최고 24시간까지 값으로부터 계산됨

b 범위는 24시간후 증가수준을 포함함

표 5는 i.v. 투여후 약물 동력학 결과를 나타낸다. 도 15는 i.v. 적용후 평균 엔도스태틴 농도, +/-S.D.를 나타낸다.

표 5

i.v. 투여후 약물 동력학 결과

	엔도스태틴 1.25mg/kg	CT-엔도스태틴	NT-엔도스태틴
초기 반감기(hr)	--	6.39	2.40
말기 반감기(hr)	1.9	50.0	23.7
AUC(hr-ng/mL)	1,723	456,139	658,469
Cmax(ng/mL)	126	24,252	24,127

얻어진 데이타는 21일 효능 시험에 필요한만큼 반복된 투여를 자극하는데 사용되었다. 축적 연구는 4가지 투여 스케쥴이 150-400ng/ml의 호의성 치료 윈도우내에 지속되는 것으로 나타났다. AFP-엔도스태틴의 반복 투여를 시험하기위한 PK 연구는 이 문제를 명확히하기위해 수행되었다. 하기 표 6에 나타낸 바와 같은 4가지 투여 스케쥴이 시험되었다.

표 6

AFT-엔도스태틴의 반복 투여용 투여 스케쥴

번호	처리	적재 투여량/유지 투여의 스케쥴/경로
1	CT-엔도스태틴 72h	1.8mg/kg/ 1.2mg/kg 매일 72h/ s.c.
2	CT-엔도스태틴 24h	1.5mg/kg/ 0.5mg/kg 매일 24h/ s.c.
3	NT-엔도스태틴 72h	1.0mg/kg/ 0.9mg/kg 매일 72h/ s.c.
4	NT-엔도스태틴 25h	0.8mg/kg/ 0.25mg/kg 매일 24h/ s.c.

다중 s.c 투여후 약물 동력학 결과를 표 7 및 도 16-19에 나타내었다.

표 7

다중 s.c 투여후 약물 동력학 결과

	CT-엔도스태틴 72h	CT-엔도스태틴 24h	NT-엔도스태틴 72h	NT-엔도스태틴 24h
흡수 반감기(hr)	0.85	1.12	4.69	5.30
말기 반감기(hr)	29.1	25.5	13.7	10.7
Cmax(ng/mL) [a]	568	481	937	659

tmax(hr) [a]	12	12	12	12

a 1차 투여후

실시예 11

알부민 엔도스태틴 융합 단백질의 시험관내 효능

CT-엔도스태틴 및 NT-엔도스태틴은 시험관내에서 이동성-어세이(HUVEC)에 있어서 클래식 엔도스태틱과 비교하여 유사한 효능을 나타내었다. 이 결과는 도 20에 나타내었다.

실시예 12

알부민 엔도스태틴 융합 단백질의 생체내 효능

CT-엔도스태틴 및 NT-엔도스태틴은 생체내내에서 마우스의 췌장 종양 모델에 있어서 클래식 엔도스태틱과 비교하여 유사한 효능을 나타내었다.

CT-엔도스태틴은 투여 구성에 있어서 보다 나은 효능을 나타낸다:

- 7 캐이스중 2에서 투여 반응 및 종양 수축

- 현재까지의 가장 우수한 클래식 데이타인 100mg/kg 매일 24시간(Kisker et. al., Cancer Res. 61: 7669-7674(2001) 대신 3.6mg/kg 매일 72시간

CT-엔도스태틴을 이용한 Bx Pc3(사람 췌장암 세포주)의 치료 결과를 도 21-24에 나타내었다.

실시예 13

알부민 안지오스태틴 융합 단백질의 발현

rHA 융합체는 쉐이크 플라스크 배양에서 발현되었으며 발현 수준이 측정되었다. 배양 상층액에서의 발현 수준은 rHA-안지오스태틴; rHA-3xFLAG-안지오스태틴; rHA-안지오스태틴(N211Q); 및 rHA-3xFLAG-안지오스태틴(N211Q)에 대해 낮았다. 이러한 융합체의 SDS-PAGE 겔은 도 27에 나타내었다. 각 레인은 다음과 같이 적재되었다:

<u>레인 시료</u>

1 rHA-3xFLAG-안지오스태틴(N211Q)

2 rHA-안지오스태틴(N211Q)

3 rHA-안지오스태틴

4 rHA-안지오스태틴

5 rHA

실시예 14

알부민 안지오스태틴 융합 단백질의 정제

C-말단 안지오스태틴 정제

C-말단 안지오스태틴은 고 수준의 클리프드 물질을 함유하였다. 이는 세척제로서 일반 용출액을 이용하여 표준 rHA SP-FF 조건을 통해 정제되고 200mM NaCl을 함유하는 스탠다드 버퍼를 사용하여 용출되었다. SP-FF 컬럼의 용출

물은 도 25에 나타낸 바와 같이 SDS-PAGE로 분석되었다. 항=안지오스태틴 혹은 항-HSA 항체를 이용한 SP-FF 용출물의 웨스턴 블롯은 도 26에 나타내었다. 그 다음 상기 용출물은 용출 버퍼에 별도의 10mM NaCl을 필요로 한 것을 제외하고는, 스탠다드 rHA SP-FF 조건을 이용하여 정제되었다. 정제된 물질은 그 다음 농축되고 PBS로 여과되었다.

이 융합 단백질에 대해 수행된 정제는 제조 방법에 대한 우수한 기초를 형성하지만 효모 항원 클리어런스를 분석하고 회수를 최적화하기위해서는 추가 작업을 필요로 할 것이다. 생성된 최종 양은 적었지만, 이는 저조한 회수율 보다는 0.1mg.mL $^{-1}$ 미만의 발효 타이터에 주원인이 있었다. 회수는 일반적으로 우수하였지만 요구 순도에 따라 DE-FF가 향상될 수 있다. 그러나, 요구되는 전체 수율이 증가되는 경우, 가장 우수한 획득은 발현 수준을 증가시켜 이루어질 수 있다.

참고문헌

Cao et al, (1996) J. Bio. Chem. 271(46):29461-29467

Cao et al, (1997) J. Bio. Chem. 272(36):22924-22928

Dhanabal(1999) Cancer Research 59:189-197

Folkman, J.(1971) New England Journal of Medicine 285:1182-1186

Kerry-Williams, S.M. et al.(1998) Yeast 14, 161-169

Kisker et al., Cancer Res. 61: 7669-7674(2001)

Lu et al; (1999) Biochem. Biophysical Research Cummunications 258:668-673

O'Reilly, M. (1997) Cell. 88:277-285

Sim et al.(2000) Cancer and Metastasis Reviews 19:181-190

Sleep D., et al.(1991) Bio/Technology 9,183-187

Sleep D., et al.(2001) Yeast 18, 403-421

EP-A-286 424

UK 0217033.0

US 5792845

US 5854205

US 5854221

US 5885795

WO 94/04687

WO 95/23857

WO 95/33833

WO 97/15666

WO 00/44772

본 발명은 본 발명의 각 견지의 설명으로 의도되는 것으로 기술된 특정 구체화로 한정하려는 것은 아니며 기능적으로 동등한 방법 및 성분이 본 발명의 견지내에 포함되는 것으로 이해된다. 따라서, 본 발명의 다양한 변형이 이에 추가적으로 나타날 수 있으며 본 명세서는 앞선 설명 및 첨부된 도면으로부터 당 업자의 숙련자에게는 명확할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 견지내에 포함되는 것으로 의도된다. 모든 참고문헌은 본 명세서에 전부 참고문헌으로 편입된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체, 및 알부민, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하며, 여기서 상기 알부민, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 알부민 활성을 갖는 알부민 융합 단백질.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 엔도스태틴, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 안지오스태틴, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 크링글 5(Kringle 5), 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 적어도 두개의 혈관신생 억제 펩타이드 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 적어도 두개의 혈관신생 억제 펩타이드 또는 이들의 프레 그먼트나 변이체는 다른 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 7.

제 5항에 있어서, 제1 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체, 및 제2 혈관신생 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 포함하며, 여기서 상기 제1 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 상기 제2 혈관신생 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체와 다른 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 알부민, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 생체내에서 융합되지않은 상태의 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 반감기에 비해 생체내에서 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 반감기를 연장시키는 능력을 갖는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 9.

제 1항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 부가적인 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체, 또는 하나 또는 그 이상의 부가적인 알부민, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 10.

제 1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 화학 부(chemical moiety)를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 11.

제 1항에 있어서, 상기 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 알부민의 N-말단, 또는 알부민의 프레그먼트나 변이체의 N-말단에 융합되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 12.

제 1항에 있어서, 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 알부민의 C-말단, 또는 알부민의 프레그먼트나 변이체의 C-말단에 융합되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 13.

제 1항에 있어서, 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 알부민의 내부 리전(internal region), 또는 알부민의 프레그먼트나 변이체의 내부 리전에 융합되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 14.

제 1항에 있어서, 상기 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체는 알부민 또는 알부민의 프레그먼트나 변이체로부터 연결기에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 15.

제 1항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 하기 화학식을 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

R2-R1; R1-R2; R2-R1-R2; R2-L-R1-L-R2; R1-L-R2; R2-L-R1; 또는 R1-L-R2-L-R1(여기서, R1은 적어도 하나의 치료 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열(이들의 프레그먼트나 변이체 포함)이며 반드시 동일한 치료 단백질은 아니며, L은 연결기이며 R2는 혈청 알부민 서열(이들의 프레그먼트나 변이체 포함)임)

청구항 16.

제 1항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질의 생체내 반감기는 비융합 상태의 혈관신생 억제 펩타이드의 생체내 반감기보다 우수한 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 17.

제 1항에 있어서, 알부민, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체에 융합된 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 시험관내 생물학적 활성은 비융합 상태의 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 시험관내 생물학적 활성보다 우수한 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 18.

제 1항에 있어서, 알부민, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체에 융합된 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 생체내 생물학적 활성은 비융합 상태의 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 생체내 생물학적 활성보다 우수한 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 19.

제 1항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 효모에서 발현되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 20.

제 19항에 있어서, 상기 효모는 글리코실화 결핍성인 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 21.

제 19항에 있어서, 상기 효모는 글리코실화 및 프로테아제 결핍성인 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 22.

제 1항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 포유류에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 23.

제 1항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 배양시 포유류 세포에 의해 발현되는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 24.

제 1항 내지 23항중 어느 한 항의 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 25.

제 1항 내지 23항중 어느 한 항의 알부민 융합 단백질을 유효량으로 포함하며 그리고 약학적으로 수용가능한 캐리어 혹은 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 26.

유효량의 제 1항의 알부민 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 혈관신생-관련 질병 혹은 질환을 치료하는 방법.

청구항 27.

유효량의 제 1항의 알부민 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 억제 펩타이드에 의해 치료가능한 고형 종양 혹은 혈액암을 갖는 환자를 치료하는 방법.

청구항 28.

비융합 상태의 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 생체내 반감기에 비하여 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 생체내 반감기를 연장시키기에 충분하도록 알부민 또는 알부민의 프레그먼트나 변이체에 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체를 융합하는 단계를 포함하는, 혈관신생 억제 펩타이드, 또는 이들의 프레그먼트나 변이체의 생체내 반감기를 연장시키는 방법.

청구항 29.

알부민에 혈관신생 억제 펩타이드를 연결시켜 알부민-융합 혈관신생 억제 펩타이드를 형성하는 단계 및 상기 알부민-융합 혈관신생 억제 펩타이드를 포유류에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 알부민-융합 혈관신생 억제 펩타이드의 반감기는 상기 연결된 알부민이 결여된 혈관신생 억제 펩타이드의 반감기에 비해 적어도 2-배로 연장되는 것을 특징으로 하는 포유류에서 혈관신생 억제 펩타이드의 반감기를 연장시키는 방법.

청구항 30.

제 1항의 알부민 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 31.

제 30항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 32.

제 30항의 핵산 분자를 함유하는 숙주세포.

청구항 33.

알부민-융합 혈관신생 억제 펩타이드 또는 유효 농도의 제1 항의 상기 알부민 융합 단백질을 발현할 수 있는 핵산을 포유류에 투여하는 것을 포함하는 혈관신생 억제 펩타이드를 이용한 포유류의 치료와 관련된 부작용을 최소화하는 방법.

청구항 34.

(a) 세포 또는 유기체에서 발현가능한 알부민 융합 단백질을 암호하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공하는 단계; (b) 상기 핵산을 세포 또는 유기체에서 발현시켜 알부민 융합 단백질을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 알부민 융합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 제1 항의 알부민 융합 단백질 제조 방법.

청구항 35.

제 34항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 글리코실화 결핍성 효모 균주에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.

제 34항에 있어서, 펩타이드 알부민 융합체는 글리코실화 컴피턴트 효모 균주에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.

알부민 융합 단백질은 그 조성물이 혈관신생-의존성 종양을 갖는 환자에게 투여시 혈관신생-의존성 종양의 종양 매스를 효과적으로 퇴화시킬 수 있는 양으로 공급되는, 제 1항의 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 38.

제 1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 그 조성물이 혈관신생-의존성 종양의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 양으로 공급되는, 제 1항의 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 39.

제 26항에 있어서, 상기 혈관신생-관련 질병은 혈관신생-의존성 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.

제 26항에 있어서, 상기 혈관신생-관련 질병은 혈관신생-의존성 암; 양성 종양; 류마티성 관절염; 건선; 안구 혈관신생 질병; 오슬러-웨버 증후군; 심근 혈관신생; 플레이크 신혈관생성; 모세혈관 확장증; 호혈액형 관절; 혈관섬유종; 창상 육아; 장 결착, 아테롬 경화증, 경피증, 비대성 반흔, 캣 스크래치 질병 및 헬리코박터 파일로리 위궤양으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.

제 1항의 알부민 융합 단백질 또는 효과적인 농도의 제 1항의 상기 알부민 융합 단백질을 발현할 수 있는 핵산을 종양 퇴화를 일으키기에 충분한 양으로 치료가 요구되는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 혈관신생-의존성 종양을 갖는 환자의 치료방법.

청구항 42.

제 1항의 알부민 융합 단백질 또는 효과적인 농도의 제 1항의 상기 알부민 융합 단백질을 발현할 수 있는 핵산을 종양 정체를 일으키기에 충분한 양으로 치료가 요구되는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 혈관신생-의존성 종양을 갖는 환자의 치료방법.

청구항 43.

약학적으로 수용가능한 캐리어 및 치료 유효량의 제 1항의 알부민 융합 단백질 또는 효과적인 농도의 제 1항의 상기 알부민을 발현할 수 있는 핵산을 포함하는, 포유류에서 혈관신생-의존성 질병 또는 질환에 대한 면역성을 유도하는 백신 조성물.

청구항 44.

제 43항에 있어서, 상기 포유류는 사람인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 45.

치료 유효량의 제 43에 따른 백신 조성물을 포유류에 투여하는 것을 포함하는, 포유류에서 혈관신생-의존성 암에 대한 면역성을 유도하는 방법.

청구항 46.

제 45항에 있어서, 상기 포유류는 사람인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.

제 1항에 있어서, 세포 타입, 표적 기관, 또는 특정 세포학적이나 해부학적 위치에 알부민 융합 단백질을 표적화하기 위해 적응된 표적부를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 48.

(a) 표지된 제 1항의 융합 단백질을 투여하는 단계;

(b) 상기 표지 융합 단백질의 적어도 일부를 혈관신생 의존성 질병 또는 질환의 사이트에 이르게하는 단계; 및

(c) 상기 융합 단백질이 혈관신생 의존성 질병 또는 질환의 사이트에 존재하는지 검출하는 단계; 를 포함하는 포유류에서 항-혈관신생 관련 질병 또는 질환을 진단하는 방법.

청구항 49.

항혈관신생 펩타이드를 알부민 또는 이들의 프레그먼트나 변이체에 융합시켜 융합 단백질을 생성하는 단계 및 상기 융합 단백질을 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 세포의 내부 또는 세포 구조물에 항혈관신생 펩타이드를 표적화하는 방법.

청구항 50.

(a) 종양의 혈관신생성 표현형의 기초하여 각 종양의 특정 성장 특성에 적합 하도록 투여 최적화를 디자인하는 것; 및

(b) 장기간 적용시 원치않는 약물의 축적을 조절/회피하여 적거나 감소된 부반응 혹은 변경 효능을 일으킬 수 있는 것을 포함하며,

항혈관신생 펩타이드를 알부민 또는 이들의 프레그먼트나 변이체에 융합시켜 융합 단백질을 생성하는 단계 및 상기 융합 단백질을 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 항혈관신생 펩타이드의 투여 스케쥴링을 개선하는 방법.

도면

도면1

N-말단 엔도스태틴-알부민 융합 오픈 리딩 프레임의 DNA서열

ATGAAGTGGGTTTTCATCGTCTCCATTTTGTTCTTGTTCTCCTCTGCTTACTCTA
GATCTTTGGATAAGAGACACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACCTG
GTTGCGCTCAACAGCCCCCTGTCAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGGCCG
ACTTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCGTGGGGCTGGCGGGCACCTTCCGC
GCCTTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCATCGTGCGCCGTGCCGA
CCGCGCAGCCGTGCCCATCGTCAACCTCAAGGACGAGCTGCTGTTTCCCAGCT
GGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTCTGAGGGTCCGCTGAAGCCCGGGGCACGCATC
TTCTCCTTTGACGGCAAGGACGTCCTGAGGCACCCCACCTGGCCCCAGAAGAG
CGTGTGGCATGGCTCGGACCCCAACGGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTACTGT
GAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACGGGCCAGGCCTCCTCGCTGCT
GGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGAGCTGCCATCACGCCTACATC
GTGCTCTGCATTGAGAACAGCTTCATGACTGCCTCCAAGGACGCTCACAAGTC
CGAAGTCGCTCACCGGTTCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACTTCAAGGCTTTGG
TCTTGATCGCTTTCGCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCGAAGATCACGTCA
AGTTGGTCAACGAAGTTACCGAATTCGCTAAGACTTGTGTTGCTGACGAATCT
GCTGAAAACTGTGACAAGTCCTTGCACACCTTGTTCGGTGATAAGTTGTGTAC
TGTTGCTACCTTGAGAGAAACCTACGGTGAAATGGCTGACTGTTGTGCTAAGC
AAGAACCAGAAAGAAACGAATGTTTCTTGCAACACAAGGACGACAACCCAAA
CTTGCCAAGATTGGTTAGACCAGAAGTTGACGTCATGTGTACTGCTTTCCACG
ACAACGAAGAAACCTTCTTGAAGAAGTACTTGTACGAAATTGCTAGAAGACA
CCCATACTTCTACGCTCCAGAATTGTTGTTCTTCGCTAAGAGATACAAGGCTGC
TTTCACCGAATGTTGTCAAGCTGCTGATAAGGCTGCTTGTTTGTTGCCAAAGTT
GGATGAATTGAGAGACGAAGGTAAGGCTTCTTCCGCTAAGCAAAGATTGAAG
TGTGCTTCCTTGCAAAAGTTCGGTGAAAGAGCTTTCAAGGCTTGGGCTGTCGC
TAGATTGTCTCAAAGATTCCCAAAGGCTGAATTCGCTGAAGTTTCTAAGTTGG
TTACTGACTTGACTAAGGTTCACACTGAATGTTGTCACGGTGACTTGTTGGAAT
GTGCTGATGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTACATCTGTGAAAACCAAGACTCT
ATCTCTTCCAAGTTGAAGGAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTCTCA
CTGTATTGCTGAAGTTGAAAACGATGAAATGCCAGCTGACTTGCCATCTTTGG
CTGCTGACTTCGTTGAATCTAAGGACGTTTGTAAGAACTACGCTGAAGCTAAG
GACGTCTTCTTGGGTATGTTCTTGTACGAATACGCTAGAAGACACCCAGACTA
CTCCGTTGTCTTGTTGTTGAGATTGGCTAAGACCTACGAAACTACCTTGGAAA
AGTGTTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGTTACGCTAAGGTTTTCGATGAA
TTCAAGCCATTGGTCGAAGAACCACAAAACTTGATCAAGCAAAACTGTGAATT
GTTCGAACAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTTGTTGGTTAGATACA
CTAAGAAGGTCCCACAAGTCTCCACCCCAACTTTGGTTGAAGTCTCTAGAAAC
TTGGGTAAGGTCGGTTCTAAGTGTTGTAAGCACCCAGAAGCTAAGAGAATGCC
ATGTGCTGAAGATTACTTGTCCGTCGTTTTGAACCAATTGTGTGTTTTGCACGA
AAAGACCCCAGTCTCTGATAGAGTCACCAAGTGTTGTACTGAATCTTTGGTTA
ACAGAAGACCATGTTTCTCTGCTTTGGAAGTCGACGAAACTTACGTTCCAAAG
GAATTCAACGCTGAAACTTTCACCTTCCACGCTGATATCTGTACCTTGTCCGAA
AAGGAAAGACAAATTAAGAAGCAAACTGCTTTGGTTGAATTGGTCAAGCACA
AGCCAAAGGCTACTAAGGAACAATTGAAGGCTGTCATGGATGATTTCGCTGCT
TTCGTTGAAAAGTGTTGTAAGGCTGATGATAAGGAAACTTGTTTCGCTGAAGA
AGGTAAGAAGTTGGTCGCTGCTTCCCAAGCTGCTTTGGGTTTG (SEQ ID NO:30)

도면2

N-말단 엔도스태틴-알부민 융합 단백질의 아미노산 서열

MKWVFIVSILFLFSSAYSRSLDKRHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQ
CFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFS
GSEGPLKPGARIFSFDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNGRRLTESYCETWRTEAP
SATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASKDAHKSEVAHRFKDLG
EENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF
GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVM
CTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACL
LPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS
HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY
SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE
QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCK
ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:31)

도면3

C-말단 알부민-엔도스태틴 융합 오픈 리딩 프레임의 DNA 서열

ATGAAGTGGGTAAGCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCC
AGGAGCTTGGATAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTT
AAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTC
AGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGT
AACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGAC
AAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCG
TGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAG
AAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTG
GTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGA
CATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT
GCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATG
TTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTT
CGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGT
CTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGA
GCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGA
TCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCT
GATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCT
CCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTG
CATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCT
GCTGATTTTGTTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGG
ATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTAC
TCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGA
AGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGA
ATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAG
CTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTT
ACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAG
AAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAG
AATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTG
TTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAA
TCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACAT
ACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATG
CACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTTGA
GCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT
GGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAG
ACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCT
TAGGCTTACACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACCTGGTTGCGCT
CAACAGCCCCCTGTCAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGGCCGACTTCCA
GTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCGTGGGGCTGGCGGGCACCTTCCGCGCCTTC
CTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCATCGTGCGCCGTGCCGACCGCG
CAGCCGTGCCCATCGTCAACCTCAAGGACGAGCTGCTGTTTCCCAGCTGGGA
GGCTCTGTTCTCAGGCTCTGAGGGTCCGCTGAAGCCCGGGGCACGCATCTTC
TCCTTTGACGGCAAGGACGTCCTGAGGCACCCCACCTGGCCCCAGAAGAGCG
TGTGGCATGGCTCGGACCCCAACGGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTACTGTG
AGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACGGGCCAGGCCTCCTCGCTGCT
GGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGAGCTGCCATCACGCCTACAT
CGTGCTCTGCATTGAGAACAGCTTCATGACTGCCTCCAAG (SEQ ID NO:32)

도면4

C-말단 알부민-엔도스태틴 융합 단백질의 아미노산 서열

MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL
QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSA
KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLE
KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK
KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTF
RAFLSSRLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSF
DGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNGRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRL
LGQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK (SEQ ID NO:33)

도면5

N-말단 안지오스태틴(비-글리코실화)-알부민 융합 오프 리딩 프레임의 DNA서열

ATGAAGTGGGTTTTCATCGTCTCCATTTTGTTCTTGTTCTCCTCTGCTTACTCT
AGATCTTTGGATAAGAGAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGGGAATGGA
AAGAACTACAGAGGGACGATGTCCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAA
AAATGGAGTTCCACTTCTCCCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACACACC
CCTCAGAGGGACTGGAGGAGAACTACTGCAGGAATCCAGACAACGATCCGC
AGGGGCCCTGGTGCTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGA
CATTCTTGAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACTATGAC
GGCAAAATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGGACTCTC
AGAGCCCACACGCTCATGGATACATTCCTTCCAAATTTCCAAACAAGAACCT
GAAGAAGAATTACTGTCGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGTTTC
ACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGTGACATCCCCCGCTGCACAA
CACCTCCACCATCTTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGA
AAACTATCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCAC
TGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATCAAAGGACACCAGAAAACTTCCCCT
GCAAAAATTTGGATGAAAACTACTGCCGCAATCCTGACGGAAAAAGGGCCC
CATGGTGCCATACAACCAACAGCCAAGTGCGGTGGGAGTACTGTAAGATAC
CGTCCTGTGACTCCTCCCCAGTAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCATCG
ATTCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACTTCAAGGCTTTGGTCTTGATCGCTTTC
GCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCGAAGATCACGTCAAGTTGGTCAACG
AAGTTACCGAATTCGCTAAGACTTGTGTTGCTGACGAATCTGCTGAAAACTG
TGACAAGTCCTTGCACACCTTGTTCGGTGATAAGTTGTGTACTGTTGCTACCT
TGAGAGAAACCTACGGTGAAATGGCTGACTGTTGTGCTAAGCAAGAACCAG
AAAGAAACGAATGTTTCTTGCAACACAAGGACGACAACCCAAACTTGCCAA
GATTGGTTAGACCAGAAGTTGACGTCATGTGTACTGCTTTCCACGACAACGA
AGAAACCTTCTTGAAGAAGTACTTGTACGAAATTGCTAGAAGACACCCATAC
TTCTACGCTCCAGAATTGTTGTTCTTCGCTAAGAGATACAAGGCTGCTTTCAC
CGAATGTTGTCAAGCTGCTGATAAGGCTGCTTGTTTGTTGCCAAAGTTGGAT
GAATTGAGAGACGAAGGTAAGGCTTCTTCCGCTAAGCAAAGATTGAAGTGT
GCTTCCTTGCAAAAGTTCGGTGAAAGAGCTTTCAAGGCTTGGGCTGTCGCTA
GATTGTCTCAAAGATTCCCAAAGGCTGAATTCGCTGAAGTTTCTAAGTTGGT
TACTGACTTGACTAAGGTTCACACTGAATGTTGTCACGGTGACTTGTTGGAA
TGTGCTGATGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTACATCTGTGAAAACCAAGACT
CTATCTCTTCCAAGTTGAAGGAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTC
TCACTGTATTGCTGAAGTTGAAAACGATGAAATGCCAGCTGACTTGCCATCT
TTGGCTGCTGACTTCGTTGAATCTAAGGACGTTTGTAAGAACTACGCTGAAG
CTAAGGACGTCTTCTTGGGTATGTTCTTGTACGAATACGCTAGAAGACACCC
AGACTACTCCGTTGTCTTGTTGTTGAGATTGGCTAAGACCTACGAAACTACCT
TGGAAAAGTGTTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGTTACGCTAAGGTTTT
CGATGAATTCAAGCCATTGGTCGAAGAACCACAAAACTTGATCAAGCAAAA
CTGTGAATTGTTCGAACAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTTGTTG
GTTAGATACACTAAGAAGGTCCCACAAGTCTCCACCCCAACTTTGGTTGAAG
TCTCTAGAAACTTGGGTAAGGTCGGTTCTAAGTGTTGTAAGCACCCAGAAGC
TAAGAGAATGCCATGTGCTGAAGATTACTTGTCCGTCGTTTTGAACCAATTG
TGTGTTTTGCACGAAAAGACCCCAGTCTCTGATAGAGTCACCAAGTGTTGTA
CTGAATCTTTGGTTAACAGAAGACCATGTTTCTCTGCTTTGGAAGTCGACGA
AACTTACGTTCCAAAGGAATTCAACGCTGAAACTTTCACCTTCCACGCTGAT
ATCTGTACCTTGTCCGAAAAGGAAAGACAAATTAAGAAGCAAACTGCTTTGG
TTGAATTGGTCAAGCACAAGCCAAAGGCTACTAAGGAACAATTGAAGGCTG
TCATGGATGATTTCGCTGCTTTCGTTGAAAAGTGTTGTAAGGCTGATGATAA
GGAAACTTGTTTCGCTGAAGAAGGTAAGAAGTTGGTCGCTGCTTCCCAAGCT
GCTTTGGGTTTG (SEQ ID NO:34)

도면6

N-말단 안지오스태틴(비-글리코실화)-알부민 융합 단백질의 아미노산 서열

MKWVFIVSILFLFSSAYSRSLDKRVYLSECKTGNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWS
STSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPDNDPQGPWCYTTDPEKRYDYCDILECEEE
CMHCSGENYDGKISKTMSGLECQAWDSQSPHAHGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPD
RELRPWCFTTDPNKRWELCDIPRCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSG
HTCQHWSAQTPHTHQRTPENFPCKNLDENYCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEY
CKIPSCDSSPVDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVN
EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER
NECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPE
LLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFG
ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLA
KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA
KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS
RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP
KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ
ID NO:35)

도면7

C-말단 알부민-안지오스태틴(비-글리코실화)-융합 오프 리딩 프레임의 DNA서열

ATGAAGTGGGTAAGCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCC
AGGAGCTTGGATAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTT
AAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTC
AGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGT
AACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGAC
AAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCG
TGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAG
AAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTG
GTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGA
CATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT
GCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATG
TTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTT
CGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGT
CTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGA
GCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGA
TCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCT
GATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCT
CCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTG
CATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCT
GCTGATTTTGTTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGG
ATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTAC
TCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGA
AGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGA
ATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAG
CTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTT
ACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAG
AAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAG
AATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTG
TTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAA
TCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACAT
ACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATG
CACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTTGA
GCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT
GGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAG
ACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCT
TAGGCTTAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGGGAATGGAAAGAACTACA
GAGGGACGATGTCCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTT
CCACTTCTCCCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACACACCCCTCAGAGGG
ACTGGAGGAGAACTACTGCAGGAATCCAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTG
GTGCTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCTTGAG
TGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACTATGACGGCAAAATT
TCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCAC
ACGCTCATGGATACATTCCTTCCAAATTTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAA
TTACTGTCGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGTTTCACCACCGAC
CCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGTGACATCCCCCGCTGCACAACACCTCCAC
CATCTTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAACTATCG
CGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCACTGGAGTGCA
CAGACCCCTCACACACATCAAAGGACACCAGAAAACTTCCCCTGCAAAAATT
TGGATGAAAACTACTGCCGCAATCCTGACGGAAAAAGGGCCCCATGGTGCC
ATACAACCAACAGCCAAGTGCGGTGGGAGTACTGTAAGATACCGTCCTGTG
ACTCCTCCCCAGTA (SEQ ID NO:36)

도면8

C-말단 알부민-안지오스태틴(비-글리코실화)-융합 단백질의 아미노산 서열

MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL
QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSA
KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLE
KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK
KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLVYLSECKTGNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWSSTSPHRPRFSPATHPS
EGLEENYCRNPDNDPQGPWCYTTDPEKRYDYCDILECEEECMHCSGENYDGKIS
KTMSGLECQAWDSQSPHAHGYIPSKFPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNK
RWELCDIPRCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTH
QRTPENFPCKNLDENYCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPV (SEQ
ID NO:37)

도면9

N-말단 크링글5-$(GGS)_4$ GG-알부민 융합 오픈 리딩 프레임의 DNA 서열

ATGAAGTGGGTTTTCATCGTCTCCATTTTGTTCTTGTTCTCCTCTGCTTACTCTA
GATCTTTGGATAAGAGATGTATGTTTGGGAATGGGAAAGGATACCGAGGCAA
GAGGGCGACCACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGACTGGGCTGCCCAGGAG
CCCCATAGACACAGCATTTTCACTCCAGAGACAAATCCACGGGCGGGTCTGGA
AAAAAATTACTGCCGTAACCCTGATGGTGATGTAGGTGGTCCCTGGTGCTACA
CGACAAATCCAAGAAAACTTTACGACTACTGTGATGTCCCTCAGTGTGGTGGA
TCCGGTGGTTCCGGTGGTTCTGGTGGTTCCGGTGGTGACGCTCACAAGTCCGA
AGTCGCTCACCGGTTCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACTTCAAGGCTTTGGTCT
TGATCGCTTTCGCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCGAAGATCACGTCAAG
TTGGTCAACGAAGTTACCGAATTCGCTAAGACTTGTGTTGCTGACGAATCTGC
TGAAAACTGTGACAAGTCCTTGCACACCTTGTTCGGTGATAAGTTGTGTACTG
TTGCTACCTTGAGAGAAACCTACGGTGAAATGGCTGACTGTTGTGCTAAGCAA
GAACCAGAAAGAAACGAATGTTTCTTGCAACACAAGGACGACAACCCAAACT
TGCCAAGATTGGTTAGACCAGAAGTTGACGTCATGTGTACTGCTTTCCACGAC
AACGAAGAAACCTTCTTGAAGAAGTACTTGTACGAAATTGCTAGAAGACACC
CATACTTCTACGCTCCAGAATTGTTGTTCTTCGCTAAGAGATACAAGGCTGCTT
TCACCGAATGTTGTCAAGCTGCTGATAAGGCTGCTTGTTTGTTGCCAAAGTTG
GATGAATTGAGAGACGAAGGTAAGGCTTCTTCCGCTAAGCAAAGATTGAAGT
GTGCTTCCTTGCAAAAGTTCGGTGAAAGAGCTTTCAAGGCTTGGGCTGTCGCT
AGATTGTCTCAAAGATTCCCAAAGGCTGAATTCGCTGAAGTTTCTAAGTTGGT
TACTGACTTGACTAAGGTTCACACTGAATGTTGTCACGGTGACTTGTTGGAAT
GTGCTGATGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTACATCTGTGAAAACCAAGACTCT
ATCTCTTCCAAGTTGAAGGAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTCTCA
CTGTATTGCTGAAGTTGAAAACGATGAAATGCCAGCTGACTTGCCATCTTTGG
CTGCTGACTTCGTTGAATCTAAGGACGTTTGTAAGAACTACGCTGAAGCTAAG
GACGTCTTCTTGGGTATGTTCTTGTACGAATACGCTAGAAGACACCCAGACTA
CTCCGTTGTCTTGTTGTTGAGATTGGCTAAGACCTACGAAACTACCTTGGAAA
AGTGTTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGTTACGCTAAGGTTTTCGATGAA
TTCAAGCCATTGGTCGAAGAACCACAAAACTTGATCAAGCAAAACTGTGAATT
GTTCGAACAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTTGTTGGTTAGATACA
CTAAGAAGGTCCCACAAGTCTCCACCCCAACTTTGGTTGAAGTCTCTAGAAAC
TTGGGTAAGGTCGGTTCTAAGTGTTGTAAGCACCCAGAAGCTAAGAGAATGCC
ATGTGCTGAAGATTACTTGTCCGTCGTTTTGAACCAATTGTGTGTTTTGCACGA
AAAGACCCCAGTCTCTGATAGAGTCACCAAGTGTTGTACTGAATCTTTGGTTA
ACAGAAGACCATGTTTCTCTGCTTTGGAAGTCGACGAAACTTACGTTCCAAAG
GAATTCAACGCTGAAACTTTCACCTTCCACGCTGATATCTGTACCTTGTCCGAA
AAGGAAAGACAAATTAAGAAGCAAACTGCTTTGGTTGAATTGGTCAAGCACA
AGCCAAAGGCTACTAAGGAACAATTGAAGGCTGTCATGGATGATTTCGCTGCT
TTCGTTGAAAAGTGTTGTAAGGCTGATGATAAGGAAACTTGTTTCGCTGAAGA
AGGTAAGAAGTTGGTCGCTGCTTCCCAAGCTGCTTTGGGTTTG (SEQ ID NO:38)

도면10

N-말단 크링글5-$(GGS)_4$ GG-알부민 융합 단백질의 아미노산

MKWVFIVSILFLFSSAYSRSLDKRCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEP
HRHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPQCGGSG
GSGGSGGSGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVN
EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER
NECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPE
LLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFG
ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLA
KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA
KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS
RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP
KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ
ID NO:39)

도면11

C-말단 알부민-(GGS)$_4$ GG-크링글5 융합 오픈 리딩 트레일의 DNA 서열

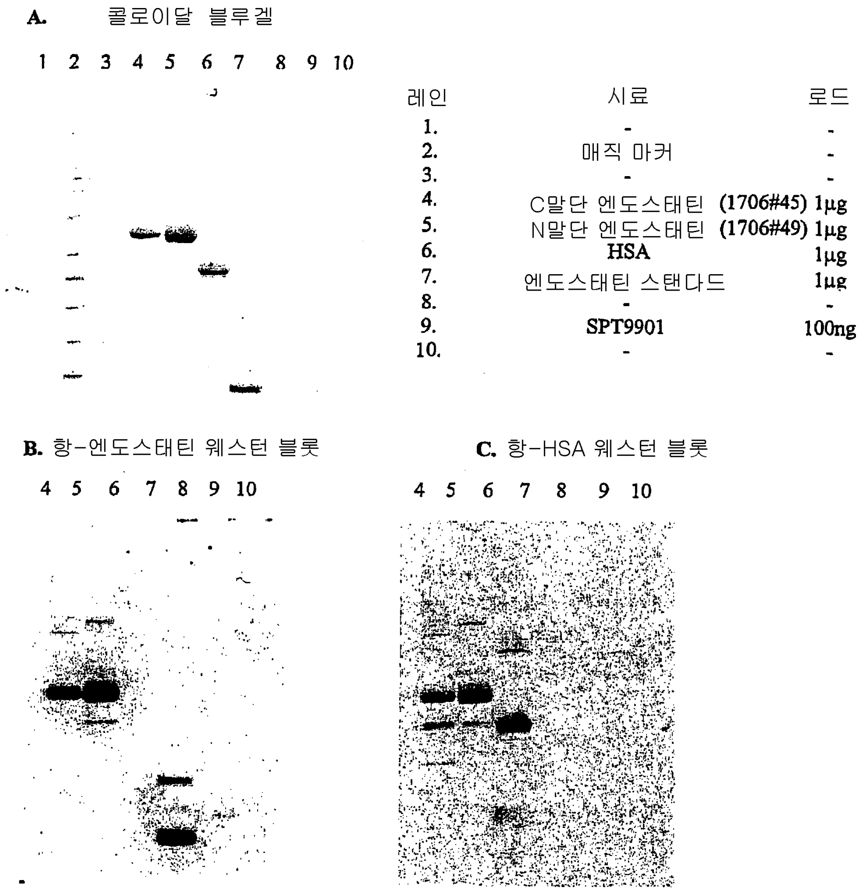
ATGAAGTGGGTAAGCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCA
GGAGCTTGGATAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAA
AGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGT
ATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACT
GAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATC
ACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAAC
CTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAA
TGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACC
AGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGA
AAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA
CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCT
GCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGG
GAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTG
GAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCC
CAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCC
ACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGA
CCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGG
AATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAA
AATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTTGAAAGT
AAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTT
TTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGA
GACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGAT
CCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGA
GCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGT
ACAAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTG
TCAACTCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCA
AATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTA
TCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGA
CAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTT
CAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACA
TTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAA
GAAACAAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAA
GAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTG
CAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTT
GCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTAGGTGGTTCTGGTGGTTCCGGTGGTTCT
GGTGGATCCGGTGGTTGTATGTTTGGGAATGGGAAAGGATACCGAGGCAAGA
GGGCGACCACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGACTGGGCTGCCCAGGAGCC
CCATAGACACAGCATTTTCACTCCAGAGACAAATCCACGGGCGGGTCTGGAA
AAAAATTACTGCCGTAACCCTGATGGTGATGTAGGTGGTCCCTGGTGCTACAC
GACAAATCCAAGAAAACTTTACGACTACTGTGATGTCCCTCAGTGT (SEQ ID
NO:40)

도면12

C-말단 알부민-(GGS)$_4$ GG-크링글5 융합 단백질의 아미노산

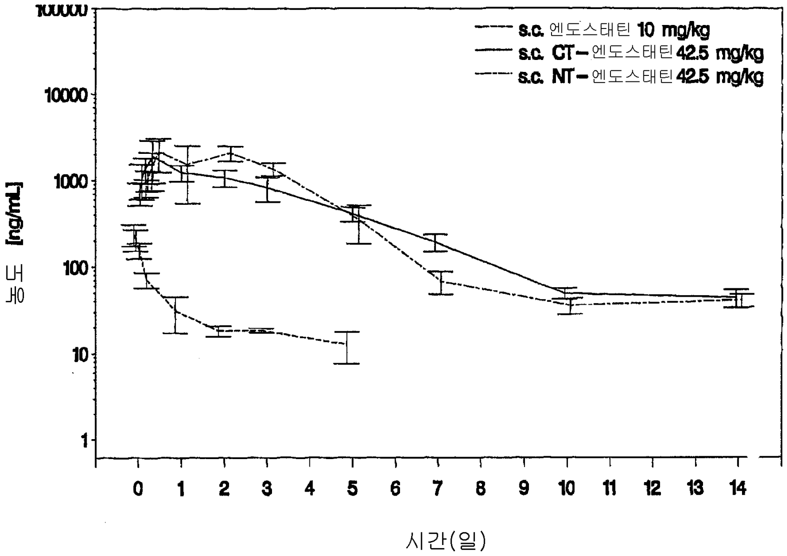
MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL
QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSA
KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLE
KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK
KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLGGSGGSGGSGGSGGCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPH
RHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPQC (SEQ
ID NO:41)

도면13



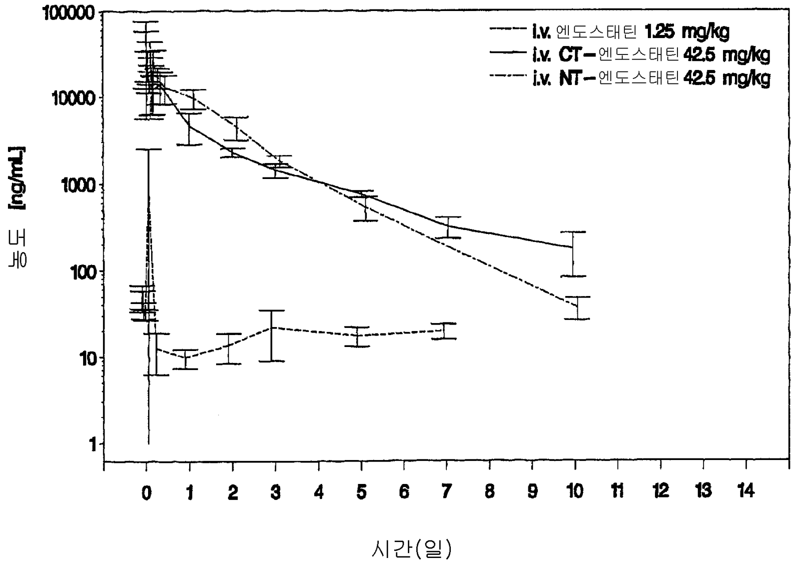
레인	시료	로드
1.	-	-
2.	매직 마커	-
3.	-	-
4.	C말단 엔도스태틴 (1706#45)	1μg
5.	N말단 엔도스태틴 (1706#49)	1μg
6.	HSA	1μg
7.	엔도스태틴 스탠다드	1μg
8.	-	-
9.	SPT9901	100ng
10.	-	-

도면14

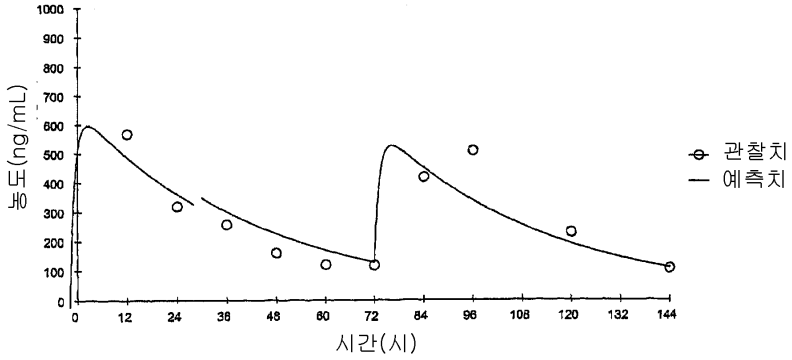


도면15

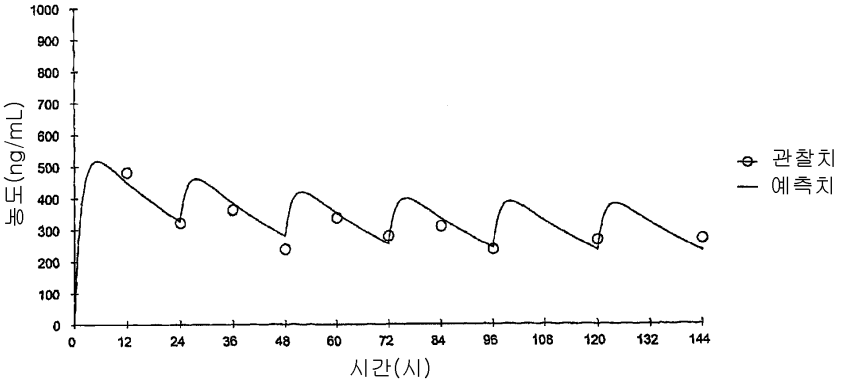
I.V. 적응 후 평균 엔도스태틴 농도 +/-SD



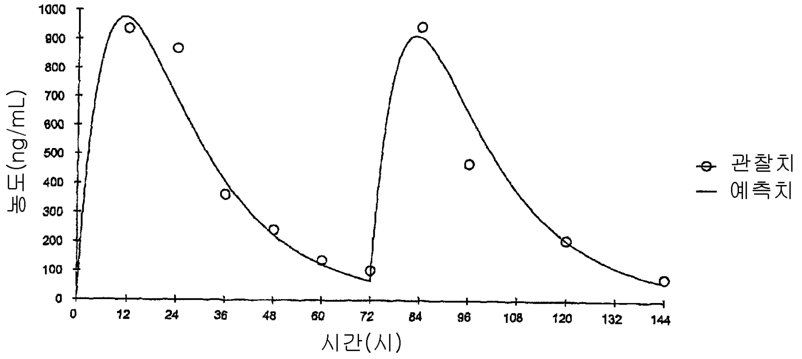
도면16



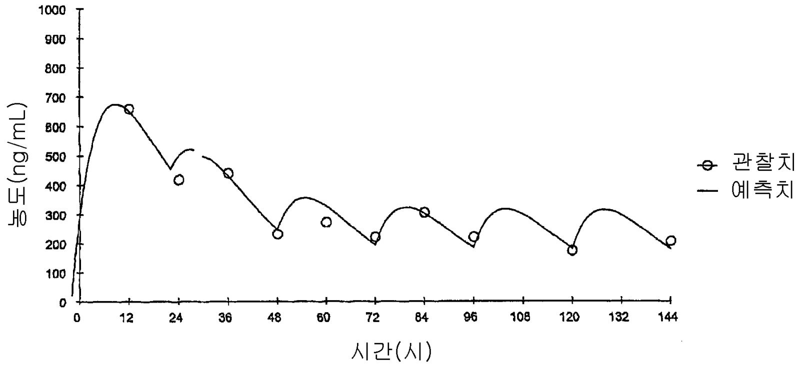
도면17



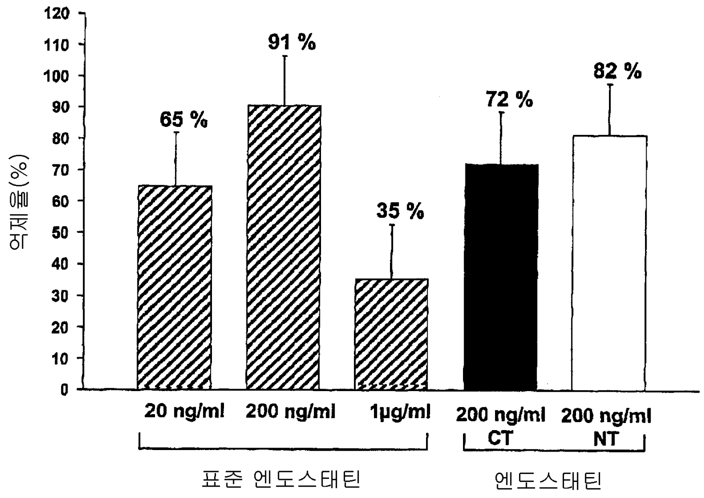
도면18



도면19

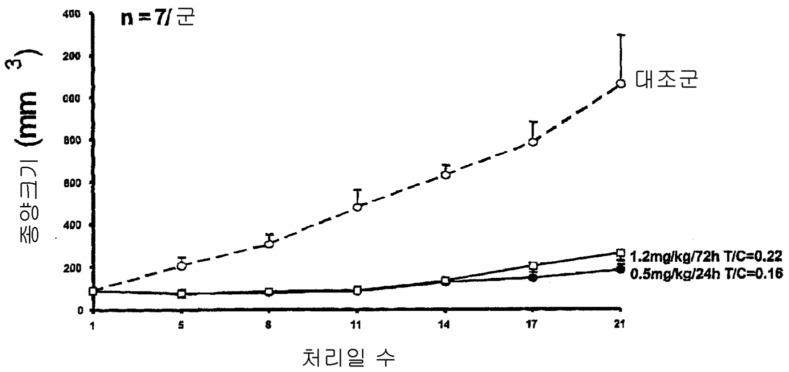


도면20

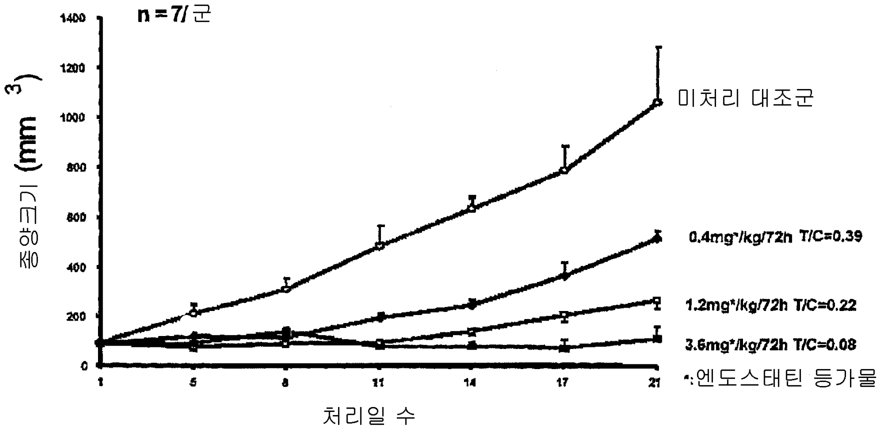


도면21

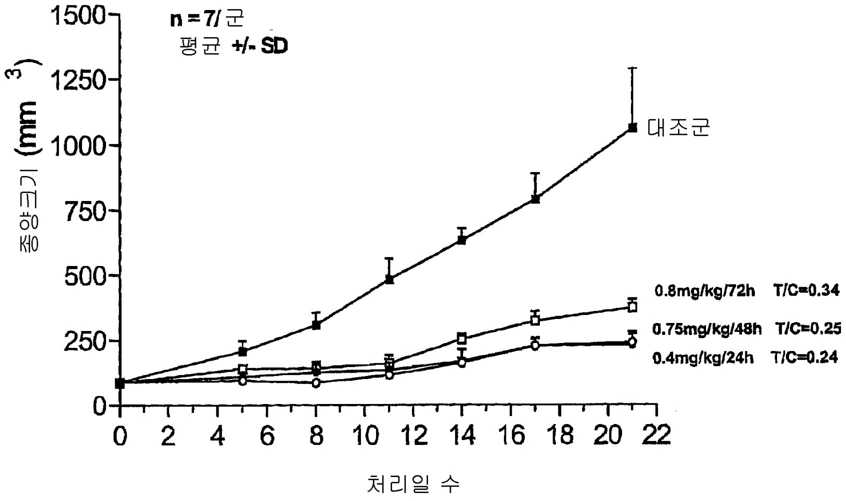
사람 AFP-CT-엔도스태틴 S.C를 통한 BxPc3(사람 췌장암 세포주)의 처리



도면22

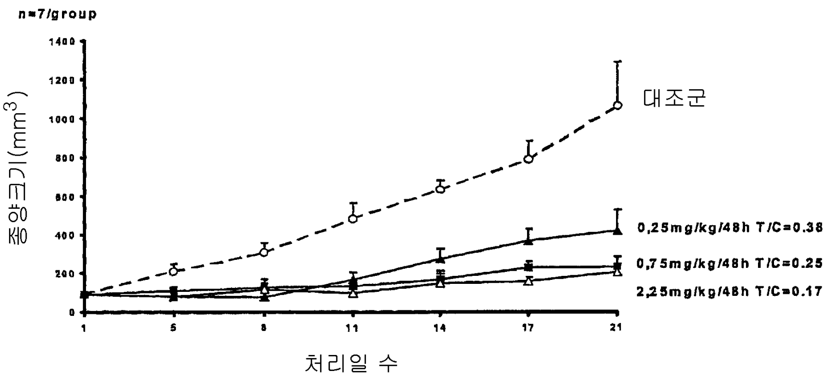


도면23

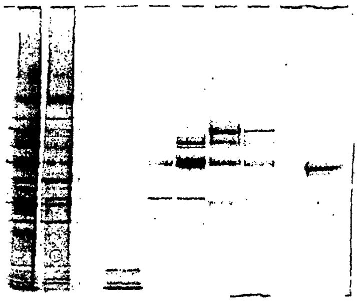


도면24

사람 AFP-NT-엔도스태틴 S.C.를 통한 BxPc3(사람 췌장암 세포주)의 처리



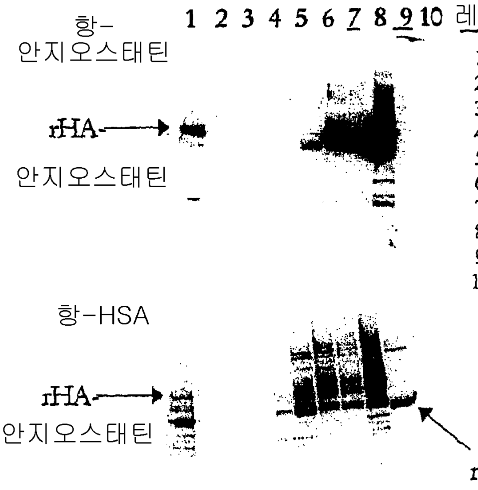
도면25



레인	시료	로드
1.	C말단 안지오스태틴 SP-로드	nt
2.	플로우 드로우	nt
3.	세척 1	nt
4.	세척 2	nt
5.	세척 3	nt
6.	용출액 (CS04 + 250mM NaCl)	1μg
7.	세척	1μg
8.	rHA std (0301_02)	1μg
9.	용출액 (CS04 + 250mM NaCl)	10μg

SP-FF상의 C-말단 rHA-안지오스태틴의 SDS-PAGE

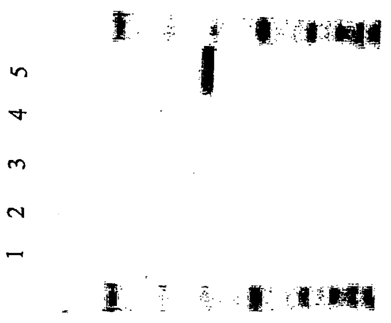
도면26



레인	시료	로드
1.	C말단 안지오스태틴 SP-로드	nt
2.	SP-FT	nt
3.	SP- 세척1	nt
4.	SP- 세척2	nt
5.	SP- 세척3	nt
6.	SP- 용출액(CS04)	nt
7.	SP- 용출액(CS04 + 200mM NaCl)	1μg
8.	SP- 열세척	nt
9.	SP- 용출액(CS04 + 200mM NaCl)	4μg
10.	안지오스태틴 std	10ng
	rHA std (0301_02)	1μg

C-말단 rHA-안지오스태틴의 웨스턴 블롯

도면27



도면28A

```
  1 GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA  60
  1 D   A   H   K   S   E   V   A   H   R   F   K   D   L   G   E   E   N   F   K    20

 61 GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 120
 21 A   L   V   L   I   A   F   A   Q   Y   L   Q   Q   C   P   F   E   D   H   V    40

121 AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA 180
 41 K   L   V   N   E   V   T   E   F   A   K   T   C   V   A   D   E   S   A   E    60

181 AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT 240
 61 N   C   D   K   S   L   H   T   L   F   G   D   K   L   C   T   V   A   T   L    80

241 CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA 300
 81 R   E   T   Y   G   E   M   A   D   C   C   A   K   Q   E   P   E   R   N   E   100

301 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 360
101 C   F   L   Q   H   K   D   D   N   P   N   L   P   R   L   V   R   P   E   V   120

361 GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT 420
121 D   V   M   C   T   A   F   H   D   N   E   E   T   F   L   K   K   Y   L   Y   140

421 GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG 480
141 E   I   A   R   R   H   P   Y   F   Y   A   P   E   L   L   F   F   A   K   R   160
```

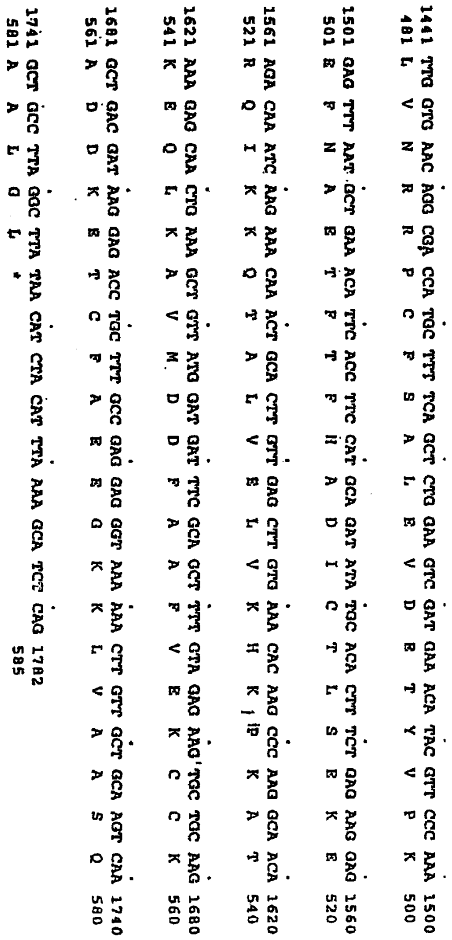
도면28B

```
481 TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA 540
161 Y   K   A   A   F   T   E   C   C   Q   A   A   D   K   A   A   C   L   L   P   180

541 AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT 600
181 K   L   D   E   L   R   D   E   G   K   A   S   S   A   K   Q   R   L   K   C   200

601 GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC 660
201 A   S   L   Q   K   F   G   E   R   A   F   K   A   W   A   V   A   R   L   S   220

661 CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA 720
221 Q   R   F   P   K   A   E   F   A   E   V   S   K   L   V   T   D   L   T   K   240

721 GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT 780
241 V   H   T   E   C   C   H   G   D   L   L   E   C   A   D   D   R   A   D   L   260

781 GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA 840
261 A   K   Y   I   C   E   N   Q   D   S   I   S   S   K   L   K   E   C   C   E   280

841 AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT 900
281 K   P   L   L   E   K   S   H   C   I   A   E   V   E   N   D   E   M   P   A   300

901 GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT 960
301 D   L   P   S   L   A   A   D   F   V   E   S   K   D   V   C   K   N   Y   A   320
```

도면28C

```
961 GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT 1020
321 E   A   K   D   V   F   L   G   M   F   L   Y   E   Y   A   R   R   H   P   D   340

1021 TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC 1080
 341 Y   S   V   V   L   L   L   R   L   A   K   T   Y   E   T   T   L   E   K   C   360

1081 TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT 1140
 361 C   A   A   A   D   P   H   E   C   Y   A   K   V   F   D   E   F   K   P   L   380

1141 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 1200
 381 V   E   E   P   Q   N   L   I   K   Q   N   C   E   L   F   E   Q   L   G   E   400

1201 TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT 1260
 401 Y   K   F   Q   N   A   L   L   V   R   Y   T   K   K   V   P   Q   V   S   T   420

1261 CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1320
 421 P   T   L   V   E   V   S   R   N   L   G   K   V   G   S   K   C   C   K   H   440

1321 CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA 1380
 441 P   E   A   K   R   M   P   C   A   E   D   Y   L   S   V   V   L   N   Q   L   460

1381 TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC 1440
 461 C   V   L   H   E   K   T   P   V   S   D   R   V   T   K   C   C   T   E   S   480
```

도면28D



```
1441 TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA 1500
 481 L   V   N   R   R   P   C   F   S   A   L   E   V   D   E   T   Y   V   P   K   500

1501 GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1560
 501 E   F   N   A   E   T   F   T   F   H   A   D   I   C   T   L   S   E   K   E   520

1561 AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA 1620
 521 R   Q   I   K   K   Q   T   A   L   V   E   L   V   K   H   K   P   K   A   T   540

1621 AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG 1680
 541 K   E   Q   L   K   A   V   M   D   D   F   A   A   F   V   E   K   C   C   K   560

1681 GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA 1740
 561 A   D   D   K   E   T   C   F   A   E   E   G   K   K   L   V   A   A   S   Q   580

1741 GCT GCC TTA GGC TTA TAA CAT CTA CAT TTA AAA GCA TCT CAG 1782
 581 A   A   L   G   L   *                                   585
```

<110> AVENTIS BEHRING GmbH DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED

<120> ALBUMIN-FUSED ANTI-ANGIOGENESIS PEPTIDES

<130> 2972-4028PC

<150> US60/355,547
<151> 2002-02-07

<160> 48

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> PRT

<213>   Mus sp.

<400>   1

His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn
  1   5   10   15

Thr Pro Leu Ser
            20

<210>   2
<211>   20
<212>   PRT
<213>   Homo sapiens

<400>   2

His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn
  1   5   10   15

Ser Pro Leu Ser
            20

<210>   3
<211>   5
<212>   PRT
<213>   Artificial Sequence

<220>
<223>   Exemplary linker

<400>   3

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary linker

<400> 4

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Stanniocalcin signal sequence

<400> 5

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Leu Leu Val Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Ala

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus signal sequence

<400> 6

```
Met Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu
  1               5                  10                  15

Trp Ala Pro Ala Arg Gly
            20
```

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

```
tagcggatcc acagccaccg cgacttccag ccggtgctcc acc                          43
```

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>   Primer

<400>   8

gctaaagctt attacttgga ggcagtcatg aagctgttct caatgcagag cacg   54

<210>   9

<211>   49

<212>   DNA

<213>   Artificial Sequence

<220>

<223>   Synthetic oligonucleotide

<400>   9

ttaggcttac acagccaccg cgacttccag ccggtgctcc acctggtgt   49

<210>   10

<211>   48

<212>   DNA

<213>   Artificial Sequence

<220>

<223>   Synthetic oligonucleotide

<400>   10

atacaccagg tggagcaccg gctggaagtc gcggtggctg tgtaagcc   48

<210> 11
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 11
tcgagaagct tc 12

<210> 12
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 12
gatctttgga taagagagac gctcacaagt ccgaagtcgc tcaccggt 48

<210> 13
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 13
ccttgaaccg gtgagcgact tcggacttgt gagcgtctct cttatccaaa 50

<210> 14
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 14
gatctttgga taagagagac gctcacaagt ccgaagtcgc tcatcgat 48

<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 15
ccttgaatcg atgagcgact tcggacttgt gagcgtctct cttatccaaa 50

<210> 16
<211> 86

```
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence

<220>
<223>    Synthetic oligonucleotide



<400>    16
tcaaggacct aggtgaggaa aacttcaagg ctttggtctt gatcgctttc gctcaatact          60

tgcaacaatg tccattcgaa gatcac                                                86



<210>    17
<211>    1782
<212>    DNA
<213>    Homo sapiens

<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(1755)

<400>    17
gat gca cac aag agt gag gtt gct cat cgg ttt aaa gat ttg gga gaa            48
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
  1               5                  10                  15

gaa aat ttc aaa gcc ttg gtg ttg att gcc ttt gct cag tat ctt cag            96
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
             20                  25                  30

cag tgt cca ttt gaa gat cat gta aaa tta gtg aat gaa gta act gaa           144
Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
         35                  40                  45
```

ttt gca aaa aca tgt gtt gct gat gag tca gct gaa aat tgt gac aaa 192

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

tca ctt cat acc ctt ttt gga gac aaa tta tgc aca gtt gca act ctt 240

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

cgt gaa acc tat ggt gaa atg gct gac tgc tgt gca aaa caa gaa cct 288

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

gag aga aat gaa tgc ttc ttg caa cac aaa gat gac aac cca aac ctc 336

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

ccc cga ttg gtg aga cca gag gtt gat gtg atg tgc act gct ttt cat 384

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

gac aat gaa gag aca ttt ttg aaa aaa tac tta tat gaa att gcc aga 432

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

aga cat cct tac ttt tat gcc ccg gaa ctc ctt ttc ttt gct aaa agg 480

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

tat aaa gct gct ttt aca gaa tgt tgc caa gct gct gat aaa gct gcc 528

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

165 170 175

tgc ctg ttg cca aag ctc gat gaa ctt cgg gat gaa ggg aag gct tcg 576

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

180 185 190

tct gcc aaa cag aga ctc aag tgt gcc agt ctc caa aaa ttt gga gaa 624

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu

195 200 205

aga gct ttc aaa gca tgg gca gtg gct cgc ctg agc cag aga ttt ccc 672

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

210 215 220

aaa gct gag ttt gca gaa gtt tcc aag tta gtg aca gat ctt acc aaa 720

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys

225 230 235 240

gtc cac acg gaa tgc tgc cat gga gat ctg ctt gaa tgt gct gat gac 768

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp

245 250 255

agg gcg gac ctt gcc aag tat atc tgt gaa aat cag gat tcg atc tcc 816

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

260 265 270

agt aaa ctg aag gaa tgc tgt gaa aaa cct ctg ttg gaa aaa tcc cac 864

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285

tgc att gcc gaa gtg gaa aat gat gag atg cct gct gac ttg cct tca 912

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300

tta gct gct gat ttt gtt gaa agt aag gat gtt tgc aaa aac tat gct 960

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

305 310 315 320

gag gca aag gat gtc ttc ctg ggc atg ttt ttg tat gaa tat gca aga 1008
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

agg cat cct gat tac tct gtc gtg ctg ctg ctg aga ctt gcc aag aca 1056
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

tat gaa acc act cta gag aag tgc tgt gcc gct gca gat cct cat gaa 1104
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

tgc tat gcc aaa gtg ttc gat gaa ttt aaa cct ctt gtg gaa gag cct 1152
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

cag aat tta atc aaa caa aac tgt gag ctt ttt gag cag ctt gga gag 1200
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

tac aaa ttc cag aat gcg cta tta gtt cgt tac acc aag aaa gta ccc 1248
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

caa gtg tca act cca act ctt gta gag gtc tca aga aac cta gga aaa 1296
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

gtg ggc agc aaa tgt tgt aaa cat cct gaa gca aaa aga atg ccc tgt 1344
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

gca gaa gac tat cta tcc gtg gtc ctg aac cag tta tgt gtg ttg cat 1392

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

gag aaa acg cca gta agt gac aga gtc aca aaa tgc tgc aca gag tcc 1440
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

ttg gtg aac agg cga cca tgc ttt tca gct ctg gaa gtc gat gaa aca 1488
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

tac gtt ccc aaa gag ttt aat gct gaa aca ttc acc ttc cat gca gat 1536
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

ata tgc aca ctt tct gag aag gag aga caa atc aag aaa caa act gca 1584
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

ctt gtt gag ctt gtg aaa cac aag ccc aag gca aca aaa gag caa ctg 1632
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

aaa gct gtt atg gat gat ttc gca gct ttt gta gag aag tgc tgc aag 1680
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

gct gac gat aag gag acc tgc ttt gcc gag gag ggt aaa aaa ctt gtt 1728
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

gct gca agt caa gct gcc tta ggc tta taaca tctacattta aaagcatctc 1780
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

ag 1782

<210> 18

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
  1               5                  10                  15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
             20                  25                  30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
         35                  40                  45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
     50                  55                  60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65                  70                  75                  80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
                 85                  90                  95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
            100                 105                 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
        115                 120                 125
```

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu

195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys

225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp

245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr

340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro

370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser

465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 19
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

```
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
    50                  55                  60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65                  70                  75                  80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
                85                  90                  95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
            100                 105                 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
        115                 120                 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
    130                 135                 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
                165                 170                 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
            180                 185                 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
        195                 200                 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
    210                 215                 220
```

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser

465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu

530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val

565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

580 585

<210> 20

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 20

gtgatcttcg aatggacatt gttgcaagta ttgagcgaaa gcgatcaaga ccaaagcctt 60

gaagttttcc tcacctaggt 80

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

ctctagatct ttggataaga gacacagcca ccgcgacttc cagccggtgc tccacct 57

<210> 22

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>   Synthetic oligonucleotide

<400>   22

ccttgaaccg gtgagcgact tcggacttgt gagcgtcctt ggaggcagtc atgaagctgt   60

tctcaatgca   70

<210>   23

<211>   53

<212>   DNA

<213>   Artificial Sequence

<220>

<223>   Primer

<400>   23

ggagtactgt aagataccgt cctgtgactc ctccccagta taataagctt ttt   53

<210>   24

<211>   49

<212>   DNA

<213>   Artificial Sequence

<220>

<223>   Primer

<400>   24

tagcggatcc gtgtatctct cagagtgcaa gactgggaat ggaaagaac 49

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 25

gatcacctta ggcttagtgt atctctcaga gtgcaagact gggaatgg 48

<210> 26

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 26

ccattcccag tcttgcactc tgagagatac actaagccta aggt 44

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

gaatgtatgc attgcagtgg 20

<210> 28

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

gcaccatggg gcccttttc cgtcaggatt gcggcagtag ttttcatcca aatttttgca 60

ggggaagttt tctggtgtcc tttgatgtgt gtgagggg 98

<210> 29

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

cgatagatct ttggataaga gagtgtatct ctcagagtgc aagactggga atgg 54

<210> 30

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

ggccatcgat gagcgacttc ggacttgtga gcgtctactg gggaggagtc acaggacgg 59

<210> 31

<211> 2376

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence of the N-terminal endostatin-albumin fusion open reading frame

<400> 31

atgaagtggg ttttcatcgt ctccattttg ttcttgttct cctctgctta ctctagatct 60

ttggataaga gacacagcca ccgcgacttc cagccggtgc tccacctggt tgcgctcaac 120

agcccccctgt caggcggcat gcggggcatc cgcggggccg acttccagtg cttccagcag 180

gcgcgggccg tggggctggc gggcaccttc cgcgccttcc tgtcctcgcg cctgcaggac 240 ctgtacagca tcgtgcgccg tgccgaccgc gcagccgtgc ccatcgtcaa cctcaaggac 300

gagctgctgt ttcccagctg ggaggctctg ttctcaggct ctgagggtcc gctgaagccc 360

ggggcacgca tcttctcctt tgacggcaag gacgtcctga ggcaccccac ctggccccag 420

aagagcgtgt ggcatggctc ggaccccaac gggcgcaggc tgaccgagag ctactgtgag 480

acgtggcgga cggaggctcc ctcggccacg ggccaggcct cctcgctgct ggggggcagg 540

ctcctggggc agagtgccgc gagctgccat cacgcctaca tcgtgctctg cattgagaac 600

agcttcatga ctgcctccaa ggacgctcac aagtccgaag tcgctcaccg gttcaaggac 660

ctaggtgagg aaaacttcaa ggctttggtc ttgatcgctt tcgctcaata cttgcaacaa 720

tgtccattcg aagatcacgt caagttggtc aacgaagtta ccgaattcgc taagacttgt 780

gttgctgacg aatctgctga aaactgtgac aagtccttgc acaccttgtt cggtgataag 840

ttgtgtactg ttgctacctt gagagaaacc tacggtgaaa tggctgactg ttgtgctaag 900

caagaaccag aaagaaacga atgtttcttg caacacaagg acgacaaccc aaacttgcca 960

agattggtta gaccagaagt tgacgtcatg tgtactgctt tccacgacaa cgaagaaacc 1020

ttcttgaaga agtacttgta cgaaattgct agaagacacc catacttcta cgctccagaa 1080

ttgttgttct tcgctaagag atacaaggct gctttcaccg aatgttgtca agctgctgat 1140

aaggctgctt gtttgttgcc aaagttggat gaattgagag acgaaggtaa ggcttcttcc 1200

gctaagcaaa gattgaagtg tgcttccttg caaaagttcg gtgaaagagc tttcaaggct 1260 tgggctgtcg ctagattgtc tcaaagattc ccaaaggctg aattcgctga agtttctaag 1320

ttggttactg acttgactaa ggttcacact gaatgttgtc acggtgactt gttggaatgt 1380

gctgatgaca gagctgactt ggctaagtac atctgtgaaa accaagactc tatctcttcc 1440

aagttgaagg aatgttgtga aaagccattg ttggaaaagt ctcactgtat tgctgaagtt 1500

gaaaacgatg aaatgccagc tgacttgcca tctttggctg ctgacttcgt tgaatctaag 1560

gacgtttgta agaactacgc tgaagctaag gacgtcttct tgggtatgtt cttgtacgaa 1620

tacgctagaa gacacccaga ctactccgtt gtcttgttgt tgagattggc taagacctac 1680

gaaactacct tggaaaagtg ttgtgctgct gctgacccac acgaatgtta cgctaaggtt 1740

ttcgatgaat tcaagccatt ggtcgaagaa ccacaaaact tgatcaagca aaactgtgaa 1800

ttgttcgaac aattgggtga atacaagttc caaaacgctt tgttggttag atacactaag 1860

aaggtcccac aagtctccac cccaactttg gttgaagtct ctagaaactt gggtaaggtc 1920

ggttctaagt gttgtaagca cccagaagct aagagaatgc catgtgctga agattacttg 1980

tccgtcgttt tgaaccaatt gtgtgttttg cacgaaaaga ccccagtctc tgatagagtc 2040

accaagtgtt gtactgaatc tttggttaac agaagaccat gtttctctgc tttggaagtc 2100

gacgaaactt acgttccaaa ggaattcaac gctgaaactt tcaccttcca cgctgatatc 2160

tgtaccttgt ccgaaaagga aagacaaatt aagaagcaaa ctgctttggt tgaattggtc 2220

aagcacaagc caaaggctac taaggaacaa ttgaaggctg tcatggatga tttcgctgct 2280 ttcgttgaaa agtgttgtaa ggctgatgat aaggaaactt gtttcgctga agaaggtaag 2340

aagttggtcg ctgcttccca agctgctttg ggtttg 2376

<210> 32

<211> 792

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the N-terminal endostatin-albumin fusion protein

<400> 32

Met Lys Trp Val Phe Ile Val Ser Ile Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro
20 25 30

Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg
35 40 45

Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val
50 55 60

Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp
65 70 75 80

Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val
85 90 95

Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser

100 105 110

Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp

115 120 125

Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp

130 135 140

His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu

145 150 155 160

Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu

165 170 175

Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala

180 185 190

Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys Asp

195 200 205

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu

210 215 220

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln

225 230 235 240

Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe

245 250 255

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser

260 265 270

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg

275 280 285

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu

290 295 300

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro

305 310 315 320

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp

325 330 335

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg

340 345 350

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr

355 360 365

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys

370 375 380

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser

385 390 395 400

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg

405 410 415

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys

420 425 430

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val

435 440 445

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg

450 455 460

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser

465 470 475 480

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys

485 490 495

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu

500 505 510

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu

515 520 525

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg

530 535 540

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr

545 550 555 560

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys

565 570 575

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln

580 585 590

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr

595 600 605

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln

610 615 620

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val

625 630 635 640

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
645 650 655

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
660 665 670

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
675 680 685

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
690 695 700

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
705 710 715 720

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
725 730 735

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
740 745 750

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
755 760 765

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
770 775 780

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
785 790

<210> 33

<211> 2376

<212> DNA

<213>   Artificial Sequence

<220>

<223>   DNA sequence of the C-terminal albumin-endostatin fusion open reading frame

<400>   33

```
atgaagtggg taagctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggagc        60

ttggataaaa gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa       120

gaaaatttca aagccttggt gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt       180

gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat       240

gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca       300

gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct       360

gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg       420

agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa       480

aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc       540

tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc       600

tgcctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag       660

agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta       720

gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgcag aagtttccaa gttagtgaca       780
```

gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840

agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900

gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960

gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020

aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga 1080

aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact 1140

ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200

tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260

cagcttggag agtacaaatt ccagaatgcg ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc 1320

caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380

tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc 1440

ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500

tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560

tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620

tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680

cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc ttttgtagag 1740

aagtgctgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt 1800 gctgcaagtc aagctgcctt aggcttacac agccaccgcg acttccagcc ggtgctccac 1860

ctggttgcgc tcaacagccc cctgtcaggc ggcatgcggg gcatccgcgg ggccgacttc 1920

cagtgcttcc agcaggcgcg ggccgtgggg ctggcgggca ccttccgcgc cttcctgtcc 1980

tcgcgcctgc aggacctgta cagcatcgtg cgccgtgccg accgcgcagc cgtgcccatc 2040

gtcaacctca aggacgagct gctgtttccc agctgggagg ctctgttctc aggctctgag 2100

ggtccgctga agcccggggc acgcatcttc tcctttgacg gcaaggacgt cctgaggcac 2160

cccacctggc cccagaagag cgtgtggcat ggctcggacc ccaacgggcg caggctgacc 2220

gagagctact gtgagacgtg gcggacggag gctccctcgg ccacgggcca ggcctcctcg 2280

ctgctggggg gcaggctcct ggggcagagt gccgcgagct gccatcacgc ctacatcgtg 2340

ctctgcattg agaacagctt catgactgcc tccaag 2376

<210> 34
<211> 792
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of the C-terminal albumin-endostatin fusion protein

<400> 34
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1   5   10   15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala

20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val

50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp

65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp

85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln

115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val

130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys

145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro

165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys

    370   375   380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

385   390   395   400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

                405   410   415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu

            420   425   430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val

        435   440   445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His

    450   455   460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val

465   470   475   480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg

                485   490   495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe

            500   505   510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

        515   520   525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

    530   535   540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys

545   550   555   560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu
610 615 620

Asn Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe
625 630 635 640

Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg
645 650 655

Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg
660 665 670

Ala Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu
675 680 685

Phe Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys
690 695 700

Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His
705 710 715 720

Pro Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly
725 730 735

Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro

740 745 750

Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly

755 760 765

Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu

770 775 780

Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys

785 790

<210> 35

<211> 2607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence of the N-terminal
angiostatin(non-glycosylated)-albumin fusion open reading frame

<400> 35

atgaagtggg ttttcatcgt ctccattttg ttcttgttct cctctgctta ctctagatct 60

ttggataaga gagtgtatct ctcagagtgc aagactggga atggaaagaa ctacagaggg 120

acgatgtcca aaacaaaaaa tggcatcacc tgtcaaaaat ggagttccac ttctccccac 180

agacctagat tctcacctgc tacacacccc tcagagggac tggaggagaa ctactgcagg 240

aatccagaca acgatccgca ggggccctgg tgctatacta ctgatccaga aaagagatat 300 gactactgcg acattcttga gtgtgaagag gaatgtatgc attgcagtgg agaaaactat 360

gacggcaaaa tttccaagac catgtctgga ctggaatgcc aggcctggga ctctcagagc 420

ccacacgctc atggatacat tccttccaaa tttccaaaca agaacctgaa gaagaattac 480

tgtcgtaacc ccgataggga gctgcggcct tggtgtttca ccaccgaccc caacaagcgc 540

tgggaacttt gtgacatccc ccgctgcaca acacctccac catcttctgg tcccacctac 600

cagtgtctga agggaacagg tgaaaactat cgcgggaatg tggctgttac cgtgtccggg 660

cacacctgtc agcactggag tgcacagacc cctcacacac atcaaaggac accagaaaac 720

ttcccctgca aaaatttgga tgaaaactac tgccgcaatc ctgacggaaa aagggcccca 780

tggtgccata caaccaacag ccaagtgcgg tgggagtact gtaagatacc gtcctgtgac 840

tcctccccag tagacgctca caagtccgaa gtcgctcatc gattcaagga cctaggtgag 900

gaaaacttca aggctttggt cttgatcgct ttcgctcaat acttgcaaca atgtccattc 960

gaagatcacg tcaagttggt caacgaagtt accgaattcg ctaagacttg tgttgctgac 1020

gaatctgctg aaaactgtga caagtccttg cacaccttgt tcggtgataa gttgtgtact 1080

gttgctacct tgagagaaac ctacggtgaa atggctgact gttgtgctaa gcaagaacca 1140

gaaagaaacg aatgtttctt gcaacacaag gacgacaacc caaacttgcc aagattggtt 1200

agaccagaag ttgacgtcat gtgtactgct ttccacgaca acgaagaaac cttcttgaag 1260

aagtacttgt acgaaattgc tagaagacac ccatacttct acgctccaga attgttgttc 1320 ttcgctaaga gatacaaggc tgctttcacc gaatgttgtc aagctgctga taaggctgct 1380

tgtttgttgc caaagttgga tgaattgaga gacgaaggta aggcttcttc cgctaagcaa 1440

agattgaagt gtgcttcctt gcaaaagttc ggtgaaagag ctttcaaggc ttgggctgtc 1500

gctagattgt ctcaaagatt cccaaaggct gaattcgctg aagtttctaa gttggttact 1560

gacttgacta aggttcacac tgaatgttgt cacggtgact tgttggaatg tgctgatgac 1620

agagctgact tggctaagta catctgtgaa aaccaagact ctatctcttc caagttgaag 1680

gaatgttgtg aaaagccatt gttggaaaag tctcactgta ttgctgaagt tgaaaacgat 1740

gaaatgccag ctgacttgcc atctttggct gctgacttcg ttgaatctaa ggacgtttgt 1800

aagaactacg ctgaagctaa ggacgtcttc ttgggtatgt tcttgtacga atacgctaga 1860

agacacccag actactccgt tgtcttgttg ttgagattgg ctaagaccta cgaaactacc 1920

ttggaaaagt gttgtgctgc tgctgaccca cacgaatgtt acgctaaggt tttcgatgaa 1980

ttcaagccat tggtcgaaga accacaaaac ttgatcaagc aaaactgtga attgttcgaa 2040

caattgggtg aatacaagtt ccaaaacgct ttgttggtta gatacactaa gaaggtccca 2100

caagtctcca ccccaacttt ggttgaagtc tctagaaact tgggtaaggt cggttctaag 2160

tgttgtaagc acccagaagc taagagaatg ccatgtgctg aagattactt gtccgtcgtt 2220

ttgaaccaat tgtgtgtttt gcacgaaaag accccagtct ctgatagagt caccaagtgt 2280

tgtactgaat ctttggttaa cagaagacca tgtttctctg ctttggaagt cgacgaaact 2340 tacgttccaa aggaattcaa cgctgaaact ttcaccttcc acgctgatat ctgtaccttg 2400

tccgaaaagg aaagacaaat taagaagcaa actgctttgg ttgaattggt caagcacaag 2460

ccaaaggcta ctaaggaaca attgaaggct gtcatggatg atttcgctgc tttcgttgaa 2520

aagtgttgta aggctgatga taaggaaact tgtttcgctg aagaaggtaa gaagttggtc 2580

gctgcttccc aagctgcttt gggtttg 2607

<210> 36

<211> 869

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amio acid sequence of the N-terminal
angiostatin(non-glycosylated)-albumin fusion protein

<400> 36

Met Lys Trp Val Phe Ile Val Ser Ile Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly
35 40 45

Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe
50 55 60

Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg

65 70 75 80

Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro

85 90 95

Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys

100 105 110

Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met

115 120 125

Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His

130 135 140

Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr

145 150 155 160

Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp

165 170 175

Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro

180 185 190

Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu

195 200 205

Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln

210 215 220

His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Gln Arg Thr Pro Glu Asn

225 230 235 240

Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly

245 250 255

Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu

260 265 270

Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro Val Asp Ala His Lys

275 280 285

Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys

290 295 300

Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe

305 310 315 320

Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr

325 330 335

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr

340 345 350

Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr

355 360 365

Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu

370 375 380

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val

385 390 395 400

Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu

405 410 415

Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr

420 425 430

```
Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
        435                 440                 445

Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
    450                 455                 460

Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
465                 470                 475                 480

Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
                485                 490                 495

Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
            500                 505                 510

Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
        515                 520                 525

Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
    530                 535                 540

Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
545                 550                 555                 560

Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu
                565                 570                 575

Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
            580                 585                 590

Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
        595                 600                 605
```

Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp

610 615 620

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr

625 630 635 640

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys

645 650 655

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile

660 665 670

Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln

675 680 685

Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr

690 695 700

Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys

705 710 715 720

Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr

725 730 735

Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro

740 745 750

Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg

755 760 765

Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys

770 775 780

Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu

785 790 795 800

Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu

805 810 815

Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met

820 825 830

Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys

835 840 845

Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln

850 855 860

Ala Ala Leu Gly Leu

865

<210> 37

<211> 2607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence of the C-terminal
albumin-angiostatin(non-glycosylated)-fusion open reading frame

<400> 37

atgaagtggg taagctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggagc 60

ttggataaaa gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa 120

gaaaatttca aagccttggt gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180

```
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat        240

gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca        300

gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct        360

gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg        420

agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa        480

aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc        540

tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc        600

tgcctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag        660

agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta        720

gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgcag aagtttccaa gttagtgaca        780

gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac        840

agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag        900

gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat        960

gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc       1020

aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga       1080

aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact       1140

ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa       1200
```

tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260

cagcttggag agtacaaatt ccagaatgcg ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc 1320

caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380

tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc 1440

ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500

tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560

tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620

tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680

cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc ttttgtagag 1740

aagtgctgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt 1800

gctgcaagtc aagctgcctt aggcttagtg tatctctcag agtgcaagac tgggaatgga 1860

aagaactaca gagggacgat gtccaaaaca aaaaatggca tcacctgtca aaaatggagt 1920

tccacttctc cccacagacc tagattctca cctgctacac acccctcaga gggactggag 1980

gagaactact gcaggaatcc agacaacgat ccgcaggggc cctggtgcta tactactgat 2040

ccagaaaaga gatatgacta ctgcgacatt cttgagtgtg aagaggaatg tatgcattgc 2100

agtggagaaa actatgacgg caaaatttcc aagaccatgt ctggactgga atgccaggcc 2160

tgggactctc agagcccaca cgctcatgga tacattcctt ccaaatttcc aaacaagaac 2220 ctgaagaaga attactgtcg taaccccgat agggagctgc ggccttggtg tttcaccacc 2280

gaccccaaca agcgctggga actttgtgac atcccccgct gcacaacacc tccaccatct 2340

tctggtccca cctaccagtg tctgaaggga acaggtgaaa actatcgcgg gaatgtggct 2400

gttaccgtgt ccgggcacac ctgtcagcac tggagtgcac agacccctca cacacatcaa 2460

aggacaccag aaaacttccc ctgcaaaaat ttggatgaaa actactgccg caatcctgac 2520

ggaaaaaggg ccccatggtg ccatacaacc aacagccaag tgcggtggga gtactgtaag 2580

ataccgtcct gtgactcctc cccagta 2607

<210> 38
<211> 869
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of the C-terminal
albumin-angiostatin(non-glycosylated)-fusion protein

<400> 38
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val

50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp

65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp

85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln

115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val

130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys

145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro

165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu

195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys

210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu

420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val

435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His

450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val

465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg

485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe

500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys

545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala

565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

595 600 605

Leu Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg

610 615 620

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser

625 630 635 640

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser

645 650 655

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln

660 665 670

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

675 680 685

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn

690 695 700

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala

705 710 715 720

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe

725 730 735

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu

740 745 750

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu

755 760 765

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
    770   775   780

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
785   790   795   800

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
                805   810   815

His Thr His Gln Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
            820   825   830

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
        835   840   845

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
    850   855   860

Asp Ser Ser Pro Val
865

<210> 39
<211> 2109
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence of the N-terminal Kringle5-(GGS)4GG-albumin fusion
open reading frame

<400> 39

atgaagtggg ttttcatcgt ctccattttg ttcttgttct cctctgctta ctctagatct 60

ttggataaga gatgtatgtt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact 120

gttactggga cgccatgcca ggactgggct gcccaggagc cccatagaca cagcattttc 180

actccagaga caaatccacg ggcgggtctg gaaaaaaatt actgccgtaa ccctgatggt 240

gatgtaggtg gtccctggtg ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat 300

gtccctcagt gtggtggatc cggtggttcc ggtggttctg gtggttccgg tggtgacgct 360

cacaagtccg aagtcgctca ccggttcaag gacctaggtg aggaaaactt caaggctttg 420

gtcttgatcg ctttcgctca atacttgcaa caatgtccat tcgaagatca cgtcaagttg 480

gtcaacgaag ttaccgaatt cgctaagact tgtgttgctg acgaatctgc tgaaaactgt 540

gacaagtcct tgcacacctt gttcggtgat aagttgtgta ctgttgctac cttgagagaa 600

acctacggtg aaatggctga ctgttgtgct aagcaagaac cagaaagaaa cgaatgtttc 660

ttgcaacaca aggacgacaa cccaaacttg ccaagattgg ttagaccaga agttgacgtc 720

atgtgtactg ctttccacga caacgaagaa accttcttga agaagtactt gtacgaaatt 780

gctagaagac acccatactt ctacgctcca gaattgttgt tcttcgctaa gagatacaag 840

gctgctttca ccgaatgttg tcaagctgct gataaggctg cttgtttgtt gccaaagttg 900

gatgaattga gagacgaagg taaggcttct tccgctaagc aaagattgaa gtgtgcttcc 960

ttgcaaaagt tcggtgaaag agctttcaag gcttgggctg tcgctagatt gtctcaaaga 1020 ttcccaaagg ctgaattcgc tgaagtttct aagttggtta ctgacttgac taaggttcac 1080

actgaatgtt gtcacggtga cttgttggaa tgtgctgatg acagagctga cttggctaag 1140

tacatctgtg aaaaccaaga ctctatctct tccaagttga aggaatgttg tgaaaagcca 1200

ttgttggaaa agtctcactg tattgctgaa gttgaaaacg atgaaatgcc agctgacttg 1260

ccatctttgg ctgctgactt cgttgaatct aaggacgttt gtaagaacta cgctgaagct 1320

aaggacgtct tcttgggtat gttcttgtac gaatacgcta gaagacaccc agactactcc 1380

gttgtcttgt tgttgagatt ggctaagacc tacgaaacta ccttggaaaa gtgttgtgct 1440

gctgctgacc cacacgaatg ttacgctaag gttttcgatg aattcaagcc attggtcgaa 1500

gaaccacaaa acttgatcaa gcaaaactgt gaattgttcg aacaattggg tgaatacaag 1560

ttccaaaacg ctttgttggt tagatacact aagaaggtcc cacaagtctc caccccaact 1620

ttggttgaag tctctagaaa cttgggtaag gtcggttcta agtgttgtaa gcacccagaa 1680

gctaagagaa tgccatgtgc tgaagattac ttgtccgtcg ttttgaacca attgtgtgtt 1740

ttgcacgaaa agaccccagt ctctgataga gtcaccaagt gttgtactga atctttggtt 1800

aacagaagac catgtttctc tgctttggaa gtcgacgaaa cttacgttcc aaaggaattc 1860

aacgctgaaa ctttcacctt ccacgctgat atctgtacct tgtccgaaaa ggaaagacaa 1920

attaagaagc aaactgcttt ggttgaattg gtcaagcaca agccaaaggc tactaaggaa 1980

caattgaagg ctgtcatgga tgatttcgct gctttcgttg aaaagtgttg taaggctgat 2040 gataaggaaa cttgtttcgc tgaagaaggt aagaagttgg tcgctgcttc ccaagctgct 2100

ttgggtttg 2109

<210> 40

<211> 703

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the N-terminal Kringle5-(GGS)4GG-albumin fusion protein

<400> 40

```
Met Lys Trp Val Phe Ile Val Ser Ile Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
  1               5                  10                  15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly
             20                  25                  30

Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp
         35                  40                  45

Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr
     50                  55                  60

Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
 65                  70                  75                  80

Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr
                 85                  90                  95
```

Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg

115 120 125

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala

130 135 140

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu

145 150 155 160

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser

165 170 175

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu

180 185 190

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys

195 200 205

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys

210 215 220

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val

225 230 235 240

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr

245 250 255

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu

260 265 270

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln

```
        275                 280                 285

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
    290                 295                 300

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
305                 310                 315                 320

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
                325                 330                 335

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
            340                 345                 350

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
        355                 360                 365

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
    370                 375                 380

Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
385                 390                 395                 400

Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
                405                 410                 415

Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
            420                 425                 430

Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
        435                 440                 445

Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
    450                 455                 460
```

Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala

465 470 475 480

Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys

485 490 495

Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu

500 505 510

Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg

515 520 525

Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val

530 535 540

Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu

545 550 555 560

Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn

565 570 575

Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr

580 585 590

Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala

595 600 605

Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr

610 615 620

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln

625 630 635 640

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
645 650 655

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
660 665 670

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
675 680 685

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
690 695 700

<210> 41
<211> 2109
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence of the C-terminal albumin-(GGS)4GG-Kringle5 fusion open reading frame

<400> 41
atgaagtggg taagctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggagc 60

ttggataaaa gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa 120

gaaaatttca aagccttggt gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180

gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240 gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300

gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360

gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg 420

agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480

aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc 540

tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc 600

tgcctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660

agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta 720

gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgcag aagtttccaa gttagtgaca 780

gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840

agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900

gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960

gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020

aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga 1080

aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact 1140

ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200

tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260 cagcttggag agtacaaatt ccagaatgcg ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc 1320

caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380

tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc 1440

ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc 1500

tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560

tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt 1620

tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680

cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc ttttgtagag 1740

aagtgctgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt 1800

gctgcaagtc aagctgcctt aggcttaggt ggttctggtg gttccggtgg ttctggtgga 1860

tccggtggtt gtatgtttgg gaatgggaaa ggataccgag gcaagagggc gaccactgtt 1920

actgggacgc catgccagga ctgggctgcc caggagcccc atagacacag cattttcact 1980

ccagagacaa atccacgggc gggtctggaa aaaaattact gccgtaaccc tgatggtgat 2040

gtaggtggtc cctggtgcta cacgacaaat ccaagaaaac tttacgacta ctgtgatgtc 2100

cctcagtgt 2109

<210> 42

<211> 703

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the C-terminal albumin-(GGS)4GG-Kringle5
fusion protein

<400> 42

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

```
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145                 150                 155                 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
            180                 185                 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
        195                 200                 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
    210                 215                 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225                 230                 235                 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
                245                 250                 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
            260                 265                 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
        275                 280                 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
    290                 295                 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305                 310                 315                 320
```

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe

500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys

545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala

565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

595 600 605

Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Cys

610 615 620

Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val

625 630 635 640

Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His

645 650 655

Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn

660 665 670

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr

675 680 685

Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys

690 695 700

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

tgtatgtttg ggaatgggaa ag 22

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

acactgaggg acatcacagt ag 22

<210> 45

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

gtgggatccg gtggttgtat gtttgggaat gggaaag 37

<210> 46

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

cacaagctta ttaacactga gggacatcac agtag 35

<210> 47

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

gtgagatctt gtatgtttgg gaatgggaaa g 31

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48

cacggatcca ccacactgag ggacatcaca gtag 34