

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/57
A61K 38/48
C12N 9/68
G01N 33/68

(45) 공고일자 2002년12월26일
(11) 등록번호 10-0336452
(24) 등록일자 2002년04월30일

(21) 출원번호	10-1996-0705979	(65) 공개번호	특1997-0702371
(22) 출원일자	1996년10월24일	(43) 공개일자	1997년05월13일
번역문제출일자	1996년10월24일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/05107	(87) 국제공개번호	WO 1995/29242
(86) 국제출원일자	1995년04월26일	(87) 국제공개일자	1995년11월02일
(81) 지정국	국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 대한민국 AP ARIPO특허 : 케냐 말라위 수단 스와질랜드 우간다 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 벨라루스 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국		

(30) 우선권주장	248,629	1994년04월26일	미국(US)
	326,785	1994년10월20일	미국(US)
(73) 특허권자	더 칠드런스 메디칼 센터 코포레이션		
(72) 발명자	미국 매사추세츠 02115 보스턴 롱우드 애버뉴 300 오레일리, 마이클, 에스. 미국 매사추세츠 01890 윈체스터 메인 스트리트 336 포크맨, 엠. 주다 미국 매사추세츠 02115 브록클린 샬럿 서클 18 심, 킴, 리 미국 메릴랜드 20878 게더버그 아고시 드라이브 308 카오, 이하이 스웨덴 스톡홀름 에스-116= 32 아소가탄 184 4 티아 차순영, 차윤근, 차윤근		
(74) 대리인			

심사관 : 이치영

(54) 엔지오스타틴및맥관형성억제를위한의사용방법

명세서

기술분야

- <1> 관련 출원에 대한 전후 참조
- <2> 본 출원은 1994년 4월 26일자로 출원된 U.S.S.N.의 일부 연속 출원인 1994년 10월 20일자로 출원된 U.S.S.N. 08/326,785의 일부 연속 출원이다.
- <3> 발명의 분야
- <4> 본 발명은 내피 세포의 증식을 가역적으로 억제하는, 엔지오스타틴으로 불리는 내피 세포 억제제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 혈액이나 뇨(尿)와 같은 체액으로부터 분리될 수 있거나 재조합, 효소학적 또는 화학적 방법에 의해 합성될 수 있는 엔지오스타틴 단백질에 관한 것이다. 엔지오스타틴은 맥관형성과 관련된 질환을 억제하고 맥관형성 과정을 조정할 수 있다. 또한, 본 발명은 엔지오스타틴 측정을 위한 진단 검정법 및 키트, 엔지오스타틴의 위치 추정을 위한 조직화학적 키트, 엔지오스타틴-암호화 DNA 서열 및 엔지오스타틴 생합성을 모니터링하기 위한 분자 탐침, 엔지오스타틴에 특이적인 항체, 엔지오스타틴 수용체에 대한 펩티드 효능제 및 길항제의 개발, 안티-엔지오스타틴 수용체-특이성 항체 효능제 및 길항제, 및 엔지오스타틴 펩티드에 연결된 세포독성제에 관한 것이다.

배경기술

- <5> 발명의 배경
- <6> 본원에서 사용되는 용어 "맥관형성"은 조직 또는 기관내로의 신혈관생성을 의미한다. 정상적인

생리학적인 상태에서 사람이나 동물은 매우 특이적인 제한된 상황에서만 맥관형성을 겪게된다. 예를 들면, 맥관형성은 일반적으로 상처 부위의 아픍, 태아 및 배(胚) 발생 및 황체, 자궁 내막 및 태반의 형성시에 관찰된다. "자궁 내막"이란 용어는 장강, 림프관, 및 혈관을 일원화하는 편평 내피 세포의 박층을 의미한다.

- <7> 통제된 및 통제되지 않은 맥관형성 모두 유사한 방법으로 진행되는 것으로 추측되고 있다. 기저막에 의하여 에워싸인 내피 세포 및 혈관 주위 세포는 모세혈관을 형성한다. 맥관형성은 내피 세포 및 백혈구에 의하여 방출된 효소에 의해 기저막이 침식됨에 따라 개시된다. 혈관의 관강을 일원화하는 내피 세포는 이어서 기저막을 통해 돌출한다. 맥관형성 자극제는 내피 세포가 침식된 기저막을 통해 이동하도록 유도한다. 이동 세포는 내피 세포가 유사 분열을 거치고 증식하게 되는 모혈관에서 "스프라웃(sprout)"을 형성한다. 내피 세포 스프라웃은 상호 합체되어 모세관 루프를 형성하여 신혈관을 생성한다.
- <8> 지속적으로 조절되지 않은 맥관형성은 다수의 질병 상태, 종양 전이 및 내피세포에 의한 비정상적인 성장에서 발생하고 이는 이러한 증상에서 보이는 병리학적 손상을 뒷받침한다. 조절되지 않은 맥관형성이 존재하는 다양한 병리학적 질환상태는 맥관형성-의존성 또는 맥관형성-수반 질환으로서 함께 한 그룹으로 분류되어 왔다.
- <9> 종양 성장이 맥관형성-의존성이라는 가설이 1971년에 최초로 제안되었다[참조문헌: Folkman J., Tumor angiogenesis: Therapeutic implications., N. Engl. Jour. Med. 285 : 1182-1186, 1971]. 가장 간단히 말해서, "일단 종양 '발생(take)'이 일어나면, 종양 세포 집단에 있어서의 모든 증가는 종양상에 집중하는 신모세혈관의 증가에 의하여 선행되어야 한다"고 진술하고 있다. 종양 "발생"은 수 mm³의 용적을 점유하고 수백만 세포를 초과하지 않는 종양 세포 집단이 현존 속주 미세혈관에서 생존할 수 있는 종양 성장의 전(前)혈관기(prevascular phase)를 지시하는 것으로 이해되고 있다. 이러한 시기를 넘는 종양 용적의 확대는 신모세혈관의 유도를 요한다. 예를 들면, 마우스에서 초기 전혈관기에서의 폐 미세전이는 조직학적 단편상에서 고 배율 현미경에 의한 경우를 제외하고는 검출될 수 없을 것이다.
- <10> 이러한 개념을 뒷받침하는 간접 증거에는 예를 들면 다음과 같은 사실들이 포함된다:
- <11> (1) 마우스에서 피하 투명 챔버에 이식된 종양의 성장 속도가 신혈관신생 전에는 느리고 직선형이며, 신혈관신생 후에는 신속하고 거의 대수적이다[참조 문헌: Algire GH, et al. Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6 : 73-85, 1945].
- <12> (2) 혈관이 증식하지 않는 분리해낸 관류시킨 기관에서의 종양 성장은 1 내지 2 mm³으로 제한되지만 이들이 마우스에 이식되고 신혈관신생이 개시될 때 이러한 용적은 >1000배로 신속하게 확대된다[참조 문헌: Folkman J, et al., Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segments, Annals of Surgery 164 :491-502, 1966].
- <13> (3) 무혈관 각막에서의 종양 성장은 서서히 직선 속도로 진행하지만, 신혈관 신생 후에는 대수적 성장으로 스위칭된다[참조문헌: Gimbrone, M.A., Jr. et al., Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. J. Natl. Cancer Institute 52:41-427, 1974].
- <14> (4) 토끼눈의 전실 수성 유체에 현탁시킨 종양은 생존성이고 무혈관성인 채로 잔존하며 <1mm³ 크기로 제한된다. 일단 이들이 홍채 혈관상(床)에 이식되면, 이들은 신혈관신생을 개시하여 신속히 성장하며, 2주 내에 최초 용적의 16,000배에 도달한다[참조문헌: Gimbrone MA Jr., et al., Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J. Exp. Med. 136:261-276].
- <15> (5) 종양이 닭의 배 융모요막상에 이식되는 경우, 이들은 >72 시간의 무혈관기 동안 서서히 성장하지만, 평균 직경 0.93±0.29 mm를 초과하지 않는다. 신속한 종양 확대는 신혈관신생 개시 후 24 시간 내에 일어나고, 7일 쯤 되는 날 까지는 이들 맥관형성된 종양은 평균 직경 8.0±2.5 mm에 도달한다[참조문헌: Knighton D., Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. British J. Cancer, 35:347-356, 1977].
- <16> (6) 토끼 간에서 전이의 혈관 원주는 전이 크기의 이종성을 보이지만, 혈관신생이 존재하는 크기에 대한 비교적 균일한 컷-오프 포인트를 보인다. 종양은 일반적으로 직경 1mm 이하의 무혈관성이지만, 그러한 직경을 넘어서서는 신혈관생성된다[참조문헌: Lien W., et al., The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber. Surgery 68:334-340, 1970].
- <17> (7) 체장 아일릿(islet)의 β 세포에서 암종을 일으키는 트랜스제닉(transgenic) 마우스에 있어서, 전(前)-혈관 이상증식 아일릿은 <1mm로 크기가 제한된다. 6 내지 7주에 가서, 아일릿의 4 내지 10%가 신혈관신생을 개시하고, 이들 아일릿으로부터-혈관 아일릿 용적의 1000배 이상인 거대한 혈관신생된 종양이 생겨난다[참조문헌: Folkman J, et al., Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339: 58-61, 1989].
- <18> (8) VEGF(혈관 내피 성장 인자)에 대한 특이적 항체는 미세혈관 밀도를 감소시키고 맥관형성의 유일한 중개자로서 VEGF에 의존하는(누드 마우스의 경우) 3종의 사람 종양의 "유의할 만한 또는 현저한" 성장 억제를 촉발한다. 항체는 시험관 내에서 종양 세포의 성장을 억제하지 않는다[참조문헌: Kim K J, et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor- induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 362:841-844, 1993].
- <19> (9) 안티-bFGF 모노클로날 항체는 맥관형성의 유일한 중개자로서 bFGF의 분비에 의존하는 마우스 종양의 성장을 70% 억제한다. 항체는 시험관 내에서 종양 세포의 성장을 억제하지 않는다[참조문헌: Hori A. et al., Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. Cancer Research, 51:6180-6184, 1991].

- <20> (10) bFGF의 복강내 주사는 종양내 모세관 내피 세포의 성장을 자극함으로써 1차 종양 및 이의 전이를 증진시킨다. 종양 세포 자체는 bFGF에 대한 수용체가 결여되어 있으며, bFGF는 시험관 내에서 종양에 대한 유사분열원이 아니다[참조문헌: Gross J.L., et al. Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF. Proc. Amer. Assoc. Canc. Res. 31:79, 1990].
- <21> (11) 특이적 맥관형성 억제제(AGM-1470)는 생체내에서 종양 성장 및 전이를 억제하지만, 시험관 내에서는 종양 세포 증식을 억제함에 있어서 한층 덜 활성이다. 이는 이가 종양 세포 증식을 억제하는 것보다 4 대수(對數)만큼 더 낮은 농도에서 혈관 내피 세포 증식을 최대 절반 억제한다[참조문헌: Ingber D, et al., Angiogenesis: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature, 48:555-557, 1990]. 종양 성장이 맥관형성 의존성이라는 간접 증거 또한 존재한다.
- <22> (12) 안구의 유리체로 전이하는 사람의 망막아종은 이들이 생존성이고 ³H-티미딘을 혼입한다는 사실에도 불구하고(적출된 안구로부터 제거되어 시험관 내에서 분석될 때), 1mm³ 이하로 제한되는 무혈관성 구형체로 발생한다.
- <23> (13) 난소암은 미세한 무혈관 백색 시드로서(1 내지 3 mm³) 복막으로 전이한다. 이들 이식물은 이들 중 하나 이상이 신혈관신생을 개시할 때 까지 좀처럼 더 크게 성장하지 않는다.
- <24> (14) 유방암[참조문헌: Weidner N, et al., Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. 324:1-8, 1991, and Weidner N, et al., Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma, J Natl. Cancer Inst. 84: 1875-1887, 1992] 및 전립선암[참조문헌: Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. American Journal of Pathology, 143(2):401-409, 1993]에 있어서의 신혈관신생의 강도는 장래에 전이될 위험성과 매우 높은 관계가 있다.
- <25> (15) 사람의 피부 흑색종으로부터의 전이는 신혈관신생에 앞서 좀처럼 보이지 않는다. 신혈관신생의 개시는 병변 두께의 증가 및 전이 위험의 증가를 초래한다[참조문헌:Srivastava A, et al., The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness(0.76-4.0mm thick) skin melanoma. Amer. J. pathol. 133:419-423, 1988].
- <26> (16) 방광암에 있어서, 맥관형성 펩티드 bFGF의 뇨중 수준은 질환의 상태 및 정도의 세포학에서 보다는 더욱 민감한 지시자이다[참조문헌: Nguyen M, et al., Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 85:241-242, 1993].
- <27> 즉, 맥관형성이 암의 전이에 있어서, 주된 역할을 함이 자명하다. 이러한 맥관형성 활성이 억제되거나 일소될 수 있다면 이에 따라 종양은 비록 존재한다손치더라도 성장하지는 않을 것이다. 질환 상태에 있어서, 맥관형성의 예방은 새로운 미세혈관 시스템의 침입에 의해 야기된 손상을 피할 수 있다. 맥관형성 과정의 제어에 지향된 치료는 이들 질환의 제거 또는 완화를 유도할 수 있다.
- <28> 따라서, 특히 종양내로의 혈관의 원치않는 성장을 억제할 수 있는 조성물 및 방법이 요구된다. 또한, 조성물의 검출, 측정, 및 위치 추정 방법이 필요하다. 조성물은 전이 단계전의 종양내 내생적 성장 인자의 활성을 극복하고 종양내 모세관 형성을 방지함으로써 종양 성장을 억제할 수 있어야 한다. 조성물, 조성물의 단편, 및 조성물에 특이적인 항체 또한 상처부위가 아물고 재생되는 것과 같은 기타 맥관형성 과정에서 모세관의 형성을 조정할 수 있어야 한다. 맥관형성 억제 조성물 및 방법은 바람직하게는 무독해야 하고 부작용이 적어야 한다. 또한, 조성물에 대한 결합 부위 및 조성물의 생합성 부위의 검출, 측정, 및 위치 추정 방법도 필요하다. 조성물 및 이의 단편은 방사성 및 비-방사성 표지 목적을 위한 기타 분자에 접합될 수 있어야 한다.

발명의 상세한 설명

- <29> 본 발명에 따라, 맥관형성의 조정, 및 원치 않는 맥관형성, 특히 종양 성장에 관련된 맥관형성의 억제에 효과적인 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명은 시험관내에서, bFGF와 같은 내생적 성장 인자의 맥관형성 활성 극복능, 및 대략 플라스미노겐 아미노산 98에서 개시되는 플라스미노겐의 내부 부분과의 아미노산 서열 상동성 및 구조적 유사성에 의하여 정의된 "앤지오스타틴"이라 명명된 단백질을 포함한다. 앤지오스타틴은 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정하여 분자량이 대략 38 내지 45 kD이고, 온전한 쥐 플라스미노겐 분자(서열 동정 번호:2)의 98번 아미노산에서 개시되는 쥐 플라스미노겐 단편의 것과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 앤지오스타틴의 아미노산 서열은 종간에 경미하게 서로 다르다. 예를 들면, 사람 앤지오스타틴의 경우에, 비록 활성 사람 앤지오스타틴 서열이 온전한 사람 플라스미노겐 아미노산 서열의 97번 또는 99번 아미노산에서 개시될 수 있지만, 아미노산 서열은 전술한 쥐 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사하다. 더욱이, 사람 플라스미노겐의 단편은 마우스 종양 모델에서 예시된 바와 같이 유사한 안티-맥관형성 활성을 갖는다. 활성 앤지오스타틴 분자내 아미노산의 수는 다양할 수 있음이 숙지되며 내피 세포 억제활성을 갖는 모든 아미노산 서열이 본 발명내에 포함되는 것으로 고려된다.
- <30> 본 발명은 실질적으로 정제된 앤지오스타틴 또는 이의 유도체를 포함하는 조성물을 맥관형성 억제에 충분한 용량으로 사람이나 동물에 투여함으로써 원치 않고 통제되지 않는 맥관형성에 의해 증개된 질환 및 과정의 치료 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 종양의 치료 또는 억제에 특히 유용하다. 혈관신생 전 전이된 종양에 걸린 사람이나 동물에 앤지오스타틴을 투여함으로써 이들 종양의 성장 또는 확대가 예방될 것이다.
- <31> 본 발명은 또한 앤지오스타틴-암호화 DNA 서열, 이를 함유하는 발현 벡터, 및 하나 이상의 이러한 발현 벡터를 함유하는 세포를 포함한다. 본 발명은 또한 앤지오스타틴-암호화 DNA 서열을 환자에 도입

하여 생체내 엔지오스타틴 수준을 변화시키는 유전자 치료법도 포함한다.

- <32> 본 발명은 또한 생물학적 유체 및 조직내 엔지오스타틴 검출 및 측정, 및 조직 및 세포내 엔지오스타틴 위치 추정 진단방법 및 키트를 포함한다. 진단 방법 및 키트는 당해 분야의 통상의 기술을 가진자에게 익히 공지된 여타의 형태일 수 있다. 본 발명은 또한 엔지오스타틴 분자 및 이의 부분에 대한 특이적 항체, 및 엔지오스타틴에 특이적인 항체의 결합을 억제하는 항체도 포함한다. 이들 항체는 플리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 엔지오스타틴에 특이적인 항체는 맥관형성에 의해 증가된 암이나 기타 질환의 발발이나 재발에 대해 진단에 도움이되거나 예후를 나타내는 엔지오스타틴의 존재 여부 및 양을 검출하기 위한 진단 키트에 사용될 수 있다. 엔지오스타틴에 특이적인 항체 또한 엔지오스타틴에 대해 사람 또는 동물을 수동 면역시켜, 맥관형성 억제를 감소시키기 위해 사람이나 동물에 투여될 수 있다.
- <33> 본 발명은 또한 체액중의 엔지오스타틴과 결합하는 항체의 존재 여부 및 양을 검출하기 위한 진단 방법 및 키트를 포함한다. 진단 방법 및 키트는 당해 분야의 통상의 기술을 가진자에게 익히 공지되어 있는 여타의 형태일 수 있다.
- <34> 본 발명은 또한 엔지오스타틴 수용체에 결합하여 적절한 시그널을 세포에 전달하며 효능제 또는 길항제로서 작용하는 안티-엔지오스타틴 수용체-특이적 항체를 포함한다.
- <35> 본 발명은 또한 양전자 방출 단층 촬영술, 방사선 사진술, 플로우 사이토메트리(flow cytometry), 방사능수용체 결합 검정, 및 면역조직화학을 포함한(이로써 제한되지 않는다) 기술을 사용하는 엔지오스타틴 결합 부위의 검출 및 가시화에 사용하기 위해 동위 원소로 또는 기타 분자 또는 단백질로 표지될 수 있는 엔지오스타틴 펩티드 단편 및 동족체를 포함한다.
- <36> 이들 엔지오스타틴 펩티드 및 동족체 또한 엔지오스타틴 수용체에서 효능제 및 길항제로서 작용하고, 이에 따라 엔지오스타틴의 생물학적 활성을 증진시키거나 차단한다. 이러한 펩티드는 엔지오스타틴 수용체의 분리에 사용된다.
- <37> 본 발명은 또한 엔지오스타틴, 이의 단편, 엔지오스타틴 항혈청, 또는 치료와 연구를 위해 세포 독성제에 결합시킨 엔지오스타틴 수용체 효능제 및 엔지오스타틴 수용체 길항제를 포함한다. 또한, 엔지오스타틴, 이의 단편, 엔지오스타틴 항혈청, 엔지오스타틴 수용체 효능제 및 엔지오스타틴 수용체 길항제는 치료 조성물을 형성하기 위하여 약학적으로 허용되는 부형제, 및 임의로는 생분해성 중합체와 같은 서방성 화합물 또는 조성물과 배합된다.
- <38> 본 발명은 엔지오스타틴의 전사 및 해독에 관여된 RNA 또는 DNA에 대한 분자 탐침을 포함한다. 이들 분자 탐침은 조직 및 세포내 엔지오스타틴 생합성 검출 및 측정 수단을 제공한다.
- <39> 따라서, 본 발명의 목적은 엔지오스타틴을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- <40> 본 발명의 다른 목적은 맥관형성에 의해 증가되는 질환 또는 진행과정의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- <41> 본 발명의 또 다른 목적은 체액 또는 조직내 엔지오스타틴의 존재 여부 및 양을 검출하기 위한 진단 또는 예측 방법 및 키트를 제공하는 것이다.
- <42> 본 발명의 다른 또 하나의 목적은 혈관종, 충실성 종양, 혈액 매개성 종양, 백혈병, 전이, 모세관 확장증, 건선, 공피증, 화농성 육아종, 심근 맥관형성, 크론(Crohn)병, 플라크 신혈관신생, 관상 축축색, 뇌 축축색, 동정맥 기능부전, 허혈성 지(肢) 맥관형성, 가막 질환, 피부조충, 신혈관성 녹내장, 당뇨병 망막증, 수정체 뒤의 섬유증식증, 관절염, 당뇨병 신혈관신생, 퇴행성 반점, 상처부위의 아물, 소화성 궤양, 헬리코박터(Helicobacter) 관련 질환, 골절, 해죽증, 혈관신생, 조혈, 배란, 월경, 태반 형성, 및 캣 스크래치 휘버(cat scratch fever)를 포함한(이로써 제한되지 않는다), 맥관형성에 의해 증가되는 질환 및 진행과정의 치료 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.
- <43> 본 발명의 다른 목적은 암 성장 억제 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- <44> 본 발명의 다른 목적은 생체내에서 또는 시험관내에서 엔지오스타틴을 생성하는 효소의 활성 또는 생성을 조정하거나 모사하는 화합물을 제공하는 것이다.
- <45> 본 발명의 추가의 목적은 엔지오스타틴 또는 안티-엔지오스타틴 항체를 요하는 사람이나 동물에 엔지오스타틴 DNA를 직접 주입함으로써 엔지오스타틴 또는 안티-엔지오스타틴 항체를 제공하는 것이다.
- <46> 본 발명의 다른 목적은 체액내 엔지오스타틴에 대해 특이적인 항체의 존재 여부 검출 및 정량 방법을 제공하는 것이다.
- <47> 본 발명의 또 다른 목적은 플라스미노겐을 인지하지 않는 엔지오스타틴 분자의 특정 영역에 선택성을 보이는 엔지오스타틴에 대한 항체로 이루어진 조성물을 제공하는 것이다.
- <48> 본 발명의 추가 목적은 암의 검출 또는 예측 방법을 제공하는 것이다.
- <49> 본 발명의 다른 목적은 생체내 및 시험관내 엔지오스타틴 결합 부위의 가시화 및 정량에 사용하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- <50> 본 발명의 다른 목적을 엔지오스타틴 생합성의 검출 및 정량에 사용하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- <51> 본 발명의 다른 목적은 최소한의 부작용을 갖는 암 치료법을 제공하는 것이다.
- <52> 본 발명의 다른 목적은 암의 성장을 억제하거나 치료하기 위한 세포독성제와 결합된 엔지오스타틴 또는 엔지오스타틴 펩티드를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- <53> 본 발명의 다른 목적은 엔지오스타틴-관련 조성물을 특정 위치로 표적 수송하는 방법을 제공하는

것이다.

- <54> 본 발명의 다른 목적은 맥관형성 과정의 조절을 위한 유전자 치료에 유용한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.
- <55> 본 발명의 이들 목적 및 기타 목적, 특징 및 장점은 기술된 양태의 하기 상세하 설명 및 첨부된 청구의 범위를 고찰함으로써 자명해진다.

도면의 간단한 설명

- <56> 도 1은 서열 동정 번호:1, 전체 쥐 플라스미노겐의 아미노산 서열을 보인다.
- <57> 도 2는 쥐에 대한 엔지오스타틴의 개시 서열(서열 동정 번호:2)을 보이고, 이 쥐 서열을 상응하는 사람(서열 동정 번호:3), 붉은털(Rhesus) 원숭이(서열 동정 번호:4), 돼지(서열 동정 번호:5) 및 소(서열 동정 번호:6) 플라스미노겐 펩티드 단편과 비교한다. 마우스 서열이 먼저 수록되고, 이어서 사람, 붉은털, 돼지 및 소의 순서로 수록된다.
- <58> 도 3은 1차 종양의 존재 또는 부재 상태에서 폐내 종양 세포의 BrdU 라벨링 지수를 보인다.
- <59> 도 4는 생체내 맥관형성을 일으키는 bRGF상 Lewis 폐 1차 종양의 영향의 Matrigel 분석을 보인다.
- <60> 도 5는 Lewis 폐 암(LLC-Low)에 걸린 마우스로 부터 유래된 혈청 대 정상 마우스로 부터 유래된 혈청에 대한 투여양 반응 곡선을 보인다. 소 모세관 내피 세포는 bFGF-구동된 72-시간 증식 검증으로 검증되었다.
- <61> 도 6은 낮고 높은 전이 종양이 그들의 복수중에서 내피 유사분열 활성을 함유하나, 단지 낮은 전이 종양계는 혈청에서 내피 억제 활성을 갖는다는 것을 보인다.
- <62> 도 7은 종양을 가진 동물로 부터 부분적으로 정제된 혈청 또는 뇨의 C4 역상 크로마토그래피(Reverse Phase Chromatographic) 프로필을 보인다.
- <63> 도 8은 손상되지 않은 플라스미노겐 분자, 사람 플라스미노겐의 리신 결합 자리 I 제조로 부터의 활성 분획, 종양을 가진 마우스로 부터의 진한 뇨 및 정상 마우스로 부터의 진한 뇨로 마우스를 처리한 13일 후의 표면 폐 전이를 보인다.
- <64> 도 9는 사람 플라스미노겐의 손상되지 않은 플라스미노겐 분자, 리신 결합 자리 I 제조로 부터의 활성 분획, 종양을 가진 마우스로 부터의 진한 뇨 및 정상 마우스로 부터의 진한 뇨로 마우스를 처리한 13일 후의 폐 중량을 보인다.
- <65> 도 10은 pTrcHis 벡터의 도식적 표면이다.
- <66> 도 11은 사람 플라스미노겐 크링글(kringle) 영역 1-3에 대한 모노클로날 항체로 탐침된 10L 규모 발효로 부터 이. 콜리 발현된 사람 엔지오스타틴의 면역블롯을 묘사한다. 화살표는 재조합 사람 엔지오스타틴을 보인다. A)는 0.2M 아미노 카프론산으로 용리된 재조합 엔지오스타틴을 보이고; B)는 리신 결합의 1X PBS로의 최종 세척을 보이고; C)는 분열된 세포로 부터 정화된 용해질을 보인다.
- <67> 도 12는 스펙의 희석의 함수로서 성장하는 소 모세관 내피 세포의 % 억제를 묘사하는 그래프이고; A1, A2, B1, B2 및 E는 사람 엔지오스타틴 항-맥관형성 활성을 발현하는 재조합 클론이고; C1, C2, D1 및 D2 대조군은 엔지오스타틴을 코딩하는 사람 DNA 서열없이 단지 벡터를 함유하는 음의 대조군 클론이다.
- <68> 도 13은 시험관내 소 모세관 내피 세포상 재조합 사람 엔지오스타틴의 증식에 대한 억제 효과를 보인다.
- <69> 도 14는 1차 종양의 제거 및 항-맥관형성 활성을 가진 살린 또는 푸마길린 유사체로 처리한후에 성장 증식 지수 및 아포토시스(apoptosis) 지수를 보인다.
- <70> 도 15는 40 mg/kg/일의 단일 주사로 생체내 사람 엔지오스타틴으로 처리함으로써 마우스내 T241 1차 종양의 성장을 억제하는 것을 보인다.
- <71> 도 16은 투여당 40 mg/kg의 두 투여량(80 mg/kg/일)에서 생체내 사람 엔지오스타틴으로의 처리에 의한 마우스내 LLC-LM 1차 종양 성장의 억제를 보인다.
- <72> 도 17는 종양의 폐 전이의 성장에 대한 Lewis 폐 암 1차 종양의 제거의 효과를 보인다.
- <73> 도 18은 종양 절제후의 성장 증식 및 아포프토틱 지수를 보인다.
- <74> 도 19는 시간의 함수로서 전체 종양 부피에 대한 이식된 T241 섬유육종 세포를 갖는 마우스에 엔지오스타틴 단백질을 투여하는 효과를 보인다.
- <75> 도 20은 시간의 함수로서 전체 종양 부피에 대한 이식된 Lewis 폐 암(LM) 세포를 갖는 마우스에 엔지오스타틴 단백질을 투여하는 효과를 보인다.
- <76> 도 21은 시간의 함수로서 전체 종양 부피에 대한 이식된 세망세포 육종 세포를 갖는 마우스에 엔지오스타틴 단백질을 투여하는 효과를 보인다.
- <77> 도 22는 24일 기간에 걸쳐 시간의 함수로서 전체 종양 부피에 대한 이식된 사람 전립선 암 PC-3 세포를 갖는 면역결핍 SCID 마우스에 엔지오스타틴 단백질을 투여하는 효과를 보인다.
- <78> 도 23은 24일 기간에 걸쳐 시간의 함수로서 전체 종양 부피에 대한 이식된 사람 유방 암 MDA-MB

세포를 갖는 면역결핍 SCID 마우스에 엔지오스타틴 단백질을 투여하는 효과를 보인다.

<79> 도 24는 마우스 플라스미노겐 cDNA로 부터 유래된 마우스 엔지오스타틴 단백질을 코딩하는 마우스 DNA 서열의 클로닝의 도식적 표현이다. 마우스 엔지오스타틴은 마우스 플라스미노겐 크링글 영역 1-4를 포함한다. PCR은 폴리머라제 사슬 반응을 의미하고; P1은 PCR을 위한 5'-말단 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고; P2는 PCR을 위한 3'-말단 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고; SS는 신호 서열을 나타내고; ATG는 해독 개시 코돈이고; TAA는 해독 정지 코돈이고; HA는 헤마글루티닌 에피토프 태그(YPYDVPDYASL)을 나타내고; K1, K2, K3 및 K4는 각각 마우스 플라스미노겐 크링글 영역 1,2,3 및 4를 나타낸다. CMV는 시토크로마바이러스 프로모터이고; T7은 박테리아 파지 프로모터이고; PA는 예비-활성 펩티드를 나타내고; SP6은 Sp 6 프로모터이다.

<80> 도 25는 비-형질감염된 세포(mock)에 대한 날의 함수로서 세포의 수; 엔지오스타틴을 코딩하는 DNA 서열없이 벡터(Vector 5) 단독으로 및 두 엔지오스타틴 발현 클론(AST 31 및 AST 37)으로 형질감염된 세포의 수를 묘사한다. 패널 (a)는 T241 세포의 형질감염의 결과를 나타낸다. 패널(b)는 LL2 세포의 결과를 나타낸다.

<81> 도 26는 세포 수에 대한 엔지오스타틴 클론을 함유하는 이.콜리 세포로 부터 유래된 배양 매질의 결과를 보인다. 비-형질감염된 세포(mock); 엔지오스타틴을 코딩하는 DNA 서열없이 벡터(Vector 5) 단독으로 형질감염된 세포 및 세 엔지오스타틴 발현 클론(AST 25, AST 31 및 AST 37). 패널 (a)은 세포 수에 대한 모든 엔지오스타틴 클론(발현 및 비-발현) 및 대조군(mock)으로 부터 배양 매질의 항온 처리의 결과를 나타낸다. 패널(b)는 세포 수에 대한 대조군(mock), 벡터 단독(vector 6) 및 마우스 엔지오스타틴을 발현하는 엔지오스타틴 클론으로 부터 배양 매질의 항온 처리의 결과를 나타낸다. 패널(c)는 배양 매질 이리신 결합 성분을 생성하기 위해 리신-세파로즈 컬럼상에서 정제되는, 세포 수에 대한 마우스 엔지오스타틴을 발현하는 엔지오스타틴 클론 및 대조군(mock)으로 부터 정제된 배양 매질의 항온 처리의 결과를 나타낸다.

<82> 도 27는 섬유육종 세포가 엔지오스타틴 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 함유하는 벡터로 형질감염되고, 벡터가 엔지오스타틴 단백질을 발현할 수 있는, 마우스 내 T241 섬유육종 세포를 이식하는 시간의 함수로서 전체 종양 부피에 대한 효과를 보인다. "비-형질감염된"은 마우스내 이식된 비변경된 T241 섬유육종 세포를 나타낸다. "벡터 6"은 마우스내 이식된 엔지오스타틴 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 함유하지 않는, 단지 벡터로 형질감염된 T241 섬유육종 세포를 나타낸다. "클론 25, 클론 31 및 클론 37"은 마우스내 이식된 엔지오스타틴 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 함유하는 벡터로 형질감염된 T241 섬유육종 세포의 엔지오스타틴-생성 클론을 나타낸다.

<83> **상세한 설명**

<84> 본 발명은 질환 및 맥관형성에 의해 매개되거나 그와 연관된 과정의 감지 및 치료를 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 조성물은 혈청, 뇨 및 복수를 포함하나, 그에 제한되지 않는 체액으로 부터 분리될 수 있거나, 화학적 또는 생물학적 방법(예컨대, 활성 엔지오스타틴을 생성하기 위한 플라스미노겐 또는 플라스민의 세포 배양, 재조합 유전자 발현, 펩티드 합성, 및 시험관내 효소 촉매작용)에 의해 합성될 수 있는 엔지오스타틴이다. 재조합 기술은 폴리머라제 사슬 반응(PCR)을 사용한 DNA 원으로 부터의 유전자 증식, 및 역 전사효소/PCR을 사용한 RNA 원으로 부터의 유전자 증식을 포함한다. 엔지오스타틴은 비혈관 신생 또는 혈관신생 종양같은 조직내로의 혈관의 성장을 억제한다.

<85> 본 발명은 또한 벡터가 벡터를 함유하는 세포로 구성되는 조성물이 세포내 존재할때 엔지오스타틴을 발현할 수 있고, 벡터가 DNA 서열 암호화 엔지오스타틴 또는 그의 단편 또는 동족체를 함유하고, 벡터가 세포내 존재할때 엔지오스타틴을 발현할 수 있는 DNA 서열 암호화 엔지오스타틴을 함유하는 벡터를 포함하는 조성물 및 벡터가 DNA 서열 암호화 엔지오스타틴을 함유하고, 벡터가 세포내 존재할때 엔지오스타틴을 발현할 수 있는 벡터를 함유하는 세포를 사람 또는 사람 아닌 동물내로 이식시키는 것으로 구성되는 방법을 망라한다.

<86> 또한, 본 발명은 치료학적 조성물을 형성하기 위해 엔지오스타틴, 이의 단편, 엔지오스타틴 항혈청, 또는 제약학적으로 허용가능한 기초첨가제와 결합된 엔지오스타틴 수용체 효능제 또는 엔지오스타틴 수용체 길항제, 및 임의로 서-방출 화합물 또는 조성물, 예컨대 생분해가능한 중합체를 포함한다.

<87> 보다 특별히, 본 발명은 시험관내 bFGF같은 내피 성장 인자의 맥관형성 활성을 극복할 수 있는 약 38 내지 45 kD의 분자량을 갖는 단백질 표시된 엔지오스타틴을 포함한다. 엔지오스타틴은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 행하므로써 결정되는 바와 같은 약 38 kD 내지 45 kD의 분자량을 갖고, 손상되지 않은 쥐 플라스미노겐 분자의 아미노산 번호 98에서 시작하는 쥐 플라스미노겐 단편의 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. 엔지오스타틴 아미노산 서열을 참고로 사용될때, 용어 "실질적으로 유사한"은 항-맥관형성 활성을 갖고, 약 38 kD 내지 45 kD의 분자량을 갖는 아미노산 서열을 의미하고, 이는 또한 마우스 플라스미노겐내 거의 아미노산 번호 98에서 시작하고 38 kD 내지 45 kD의 무게가 나가는 마우스 플라스미노겐의 펩티드 단편에 대해 고도의 서열 상동성을 갖는다. 고도의 상동성은 적어도 약 60% 아미노산 상동성, 바람직하게 적어도 약 70% 아미노산 상동성, 및 보다 바람직하게 적어도 약 80% 아미노산 상동성을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "내피 억제 활성"은 일반적으로 맥관형성을 억제하기 위해, 예컨대 섬유아세포 성장 인자의 존재하에 배지내 소 모세관 내피 세포의 성장을 억제하는 분자의 능력을 의미한다.

<88> 완전한 쥐 플라스미노겐 분자의 아미노산 서열은 도 1 및 서열 동정 번호:1에서 보여진다. 엔지오스타틴의 서열은 약 아미노산 98에서 시작한다. 활성 사람 엔지오스타틴은 손상되지 않은 사람 플라스미노겐 분자의 아미노산 97 또는 99에서 시작할 수 있다. 마우스로 부터 엔지오스타틴의 제 1 339 아미노산의 아미노산 서열은 도 2, (서열 동정 번호:2)에서 보여지고, 사람(서열 동정 번호:3), 붉은털 원숭이(서열 동정 번호:4), 돼지(서열 동정 번호:5), 및 소(서열 동정 번호:6) 플라스미노겐으로 부터의 상응하는 플라스미노겐 펩티드 단편의 서열과 비교된다. 이들 서열이 그들의 아미노산의 50% 이상 웰내에서 확인된다면, 엔지오스타틴의 아미노산 서열은 실질적으로 종들중에 유사하다는 것이 이해될것이다. 엔지오스타틴내 아미노산의 전체 수는 정확하게 공지되지 않으나, 활성 분자의 분자량에 의해 정의된다. 본 발

명의 엔지오스타틴의 아미노산 서열은 어떤 종으로부터 플라스미노겐 분자가 유래되는 지에 의존하여 변할 수 있다. 이리하여, 사람 플라스미노겐으로부터 유래된 본 발명의 엔지오스타틴이 마우스로부터 유래된 엔지오스타틴과 약간 다른 서열을 갖더라도, 그것은 마우스 종양 모델에서 보여지는 바와 같은 항-맥관형성 활성을 갖는다.

- <89> 엔지오스타틴은 시험관내 내피 세포의 성장을 억제할 수 있는 것으로 보였다. 엔지오스타틴은 다른 세포 유형으로 부터 유래된 세포주의 성장을 억제하지 않는다. 특별히, 엔지오스타틴은 Lewis 폐암 세포주, Mink 폐 상피, 3T3 섬유 아세포, 소 대동맥 평활근 세포, 소 망막 색소 상피, MOCk 세포(개 신장 상피), WI38 세포(사람 태아 폐 섬유아세포), EFN 세포(쥐 태 섬유아세포) 및 LM 세포(쥐 연결 조직)에 영향을 주지 않는다. 종양을 가진 마우스내 내생 엔지오스타틴은 약 10 mg 엔지오스타틴/kg 체중의 전신 농도에서 전이를 억제하는데 효과적이다.
- <90> 엔지오스타틴은 플라스미노겐 분자의 크링글 영역에 의해 한정된 특이한 3차원 구조를 갖는다 (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). 플라스미노겐 분자의 NH₂ 말단 부분에서 구조적으로 관련된 모티프이고 실질적인 서열 상동성을 갖는 5개의 상기 크링글 영역이 있다. 엔지오스타틴의 3차원 형상은 플라스미노겐 크링글 영역 1-3 및 크링글 영역 4의 일부를 포함한다. 플라스미노겐 분자의 각 크링글 영역은 약 80 아미노산을 함유하고, 3개의 이황화 결합을 함유한다. 이 시스테인 모티프는 다른 생물학적으로 활성인 단백질내 존재하는 것으로 공지되어 있다. 이들 단백질은 프로트롬빈, 간세포 성장 인자, 산란 인자 및 마크로파지 촉진 단백질을 포함하나, 이에 제한되지 않는다(Yoshimura, T, et al., "Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MST1) confirms MSP as a member of the family of kring proteins and locates the MSP gene on Chromosome 3" J. Biol. Chem., Vol. 268, No. 21, pp. 15461-15468, 1993). 생체내 항-맥관형성 활성을 갖는 시스테인 모티프 또는 3차원 크링글-형 구조를 갖는 펩티드 또는 임의 분리된 단백질은 본 발명의 일부인 것이 속고된다.
- <91> 본 발명은 또한 암같은 질환의 예후 또는 진단의 목적을 위해 체액 및 조직내 엔지오스타틴의 감지를 포함한다. 본 발명은 또한 세포 및 조직내 엔지오스타틴 결합 자리 및 수용체의 감지를 포함한다. 본 발명은 또한 엔지오스타틴의 생성을 촉진시키고/시키거나 실질적으로 정제된 엔지오스타틴, 또는 엔지오스타틴 효능제 또는 길항제 및/또는 엔지오스타틴 항혈청 또는 엔지오스타틴 항혈청에 대해 관련된 항혈청을 환자에 투여함으로써 관절염 및 종양을 포함하나 이에 제한되지 않는 맥관형성 질환 및 과정을 치료하거나 예방하는 방법을 포함한다. 부가의 치료 방법은 엔지오스타틴, 엔지오스타틴 단편, 엔지오스타틴 동족체, 엔지오스타틴 항혈청, 또는 세포독성체에 결합된 엔지오스타틴 수용체 효능제 및 길항제의 투여를 포함한다. 엔지오스타틴은 동물 또는 사람 기원일 수 있다는 것이 이해될 것이다. 엔지오스타틴은 또한 발현 시스템과 결합하여 화학적 반응 또는 재조합 기술에 의해 합성적으로 생성될 수 있다. 엔지오스타틴은 또한 맥관형성 활성을 갖는 펩티드를 생성하기 위해 분리된 플라스미노겐 또는 플라스민을 효소적으로 분할함으로써 생성될 수 있다. 엔지오스타틴은 또한 플라스미노겐을 엔지오스타틴으로 분할하는 내생 효소의 작용을 모사하는 화합물에 의해 생성될 수 있다. 엔지오스타틴 생성은 또한 플라스미노겐 분할 효소의 활성에 영향을 주는 화합물에 의해 조절될 수 있다.
- <92> 특히적으로 엔지오스타틴을 결합하는 항체를 사용한 수동적 항체 치료법은 재생, 개선, 및 상처의 아픔 및 조직 회복같은 맥관형성-의존 과정을 조절하는데 사용될 수 있다. 게다가, 엔지오스타틴 항체의 Fab 영역에 관련된 항혈청은 엔지오스타틴을 결합시키는 내생 엔지오스타틴 항혈청의 능력을 막기 위해 투여될 수 있다.
- <93> 본 발명은 또한 유전자 암호화 엔지오스타틴이 환자에서 조절되는 유전자 치료법을 포함한다. 달리 유전자 치료법으로 언급되는, 유전자 생성 단백질의 발현을 위한 DNA를 세포에 옮기거나 운반하는 여러가지 방법은 본원에서 참고 문헌으로서 병합되는 Gene Transfer into Mammalian Somatic Cells in vivo, N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12 (4): 335-356 (1992)에서 공개된다. 유전자 치료법은 생체외 또는 생체내 치료법으로 사용하기 위한 체세포 또는 생식계 세포내로의 DNA 서열의 혼입을 망라한다. 유전자 치료법은 유전자를 대체하고, 정상 또는 비정상 유전자 기능을 증대시키고, 전염병 및 다른 병변과 싸우는 기능을 한다.
- <94> 유전자 치료법으로 이들 의학적 문제를 치료하기 위한 범주는 치료학적 범주, 예컨대 결손 유전자를 확인하고나서, 결손 유전자의 기능을 대체시키거나 약간의 기능 유전자를 증대시키기 위해 기능 유전자를 첨가하는것; 또는 예방의 범주, 예컨대 상태를 치료하거나 조직 또는 기관을 치료 요법에 보다 더 영향을 받기 쉽게 만들 생성 단백질에 대한 유전자를 첨가하는 것을 포함한다. 예방 범주의 예로서, 엔지오스타틴같은 유전자는 환자에게 놓여질 수 있어서, 맥관형성의 발생을 예방하거나; 또는 종양 세포를 복사에 보다 영향을 받기 쉽게 만드는 유전자가 삽입될 수 있어서, 종양의 복사는 종양 세포의 사멸을 증가시킬것이다.
- <95> 엔지오스타틴 DNA 또는 엔지오스타틴 조절 서열의 전이를 위한 많은 프로토콜이 이 발명에서 상상된다. 엔지오스타틴으로 특별히 연관된 정상적으로 발견된 것과 다른, 프로모터 서열, 또는 엔지오스타틴 단백질의 생성을 증가시킬 다른 서열의 형질감염은 또한 유전자 치료법의 방법으로서 상상된다. 이 기술의 예는 세포내 에리트르포에틴 유전자를 작동시키는 "유전자 스위치"를 삽입하기 위해 동종 재조합을 사용하는 Transkaryotic Therapies, Inc., of Cambridge, Massachusetts에서 발견된다. Genetic Engineering News, April 15, 1994를 참고하라. 상기 "유전자 스위치"는 엔지오스타틴(또는 엔지오스타틴 수용체)를 정상적으로 발현시키지 않는 세포에서 엔지오스타틴(또는 엔지오스타틴 수용체)를 활성화시키기 위해 사용될 수 있었다.
- <96> 유전자 치료법을 위한 유전자 전이 방법은 3개의 넓은 범주-물리저(예컨대, 일렉트로포레이션, 직접 유전자 전이 및 입자 충격), 화학적(지질-기재 캐리어, 또는 다른 비-바이러스 벡터) 및 생물학적(바이러스-유래된 벡터 및 수용체 흡수)에 해당한다. 예컨대, DNA로 피복된 리포솜을 포함하는 비-바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 상기 리포솜/DNA 복합체는 환자내로 정맥내로 직접 주입될 수 있다. 리포솜

/DNA 복합체는 그들이 마크로파지 및 Kupffer 세포에 DNA를 운반하는 간에서 농축된다. 이들 세포는 오래 살아서, 운반된 DNA의 장 기간 발현을 제공한다. 게다가, 유전자의 벡터 또는 "네이키드" DNA는 치료학적 DNA의 목표된 운반을 위해 원하는 기관, 조직 또는 종양으로 직접 주입될 수 있다.

- <97> 유전자 치료 방법은 또한 운반 자리에 의해 서술될 수 있다. 유전자를 운반하기 위한 기본적인 방식은 생체외 유전자 전이, 생체내 유전자 전이, 및 시험관내 유전자 전이를 포함한다. 생체외 유전자 전이에서, 세포는 환자로 부터 취해지고, 세포 배지에서 성장된다. DNA는 세포내로 형질감염되고, 형질감염된 세포는 수에 있어서, 팽창하고나서, 환자에게 재이식된다. 시험관내 유전자 전이에서, 형질전환된 세포는 배지에서 성장하는 세포, 예컨대 조직 배양 세포, 및 특별한 환자로 부터 특별한 세포는 아닌 세포이다. 이들 "실험실 세포"는 형질감염되고, 형질감염된 세포는 선택되고, 환자내로 이식하거나, 다른 용도를 위해 팽창된다.
- <98> 생체내에서 유전자 전이는 세포가 환자내에 있을때 환자의 세포내로 DNA를 도입하는 것을 포함한다. 방법은 환자내 유전자를 운반하기 위해 비감염 바이러스를 사용한 바이러스 매개된 유전자 전이를 사용하거나, 환자내 자리내로 네이키드 DNA를 주입하는 것을 포함하고, DNA는 유전자 생성 단백질이 발현되는 세포의 백분율에 의해 취해진다. 게다가, "유전자 건"의 사용같은 본원에서 서술된 다른 방법은 엔지오스타틴 DNA 또는 엔지오스타틴 조절 서열의 시험관내 삽입을 위해 사용될 수 있다.
- <99> 유전자 치료법의 화학적 방법은 세포막을 가로질러 DNA를 수송하기 위해 필수적으로 리포솜은 아닌, 지질 기재 화합물을 포함할 수 있다. 리포펙틴 또는 시토펙틴, 음으로 하전된 DNA에 결합하는 지질-기재 양의 이온은 세포막을 가로지를 수 있고 세포의 내부내로 DNA를 제공할 수 있는 복합체를 제조한다. 다른 화학적 방법을 세포 표면 수용체에 특정 리간드를 결합시키고, 세포막을 가로질러 그것을 엔벨로핑하고 수송하는 수용체-기재 세포내분열을 사용한다. 리간드는 DNA에 결합하고, 전체 복합체는 세포내로 수송된다. 리간드 유전자 복합체는 혈액 스트림내로 주입되고나서, 수용체를 갖는 목표 세포는 리간드를 특이적으로 결합시키고, 리간드-DNA 복합체를 세포내로 수송할 것이다.
- <100> 많은 유전자 치료법은 세포내로 유전자를 삽입하기 위해 바이러스 벡터를 사용한다. 예컨대, 변경된 레트로바이러스 벡터는 말초 및 중앙-침윤 임파구, 간 세포, 표면 세포, 근세포, 또는 다른 체세포내로 유전자를 도입하는 생체외 방법에서 사용되었다. 그리고나서, 이들 변경된 세포는 환자내로 도입되어, 삽입된 DNA로 부터 유전자 생성물을 제공한다.
- <101> 바이러스 벡터는 또한 생체내 프로토콜을 사용하여 세포내로 유전자를 삽입하기 위해 사용되었다. 외래 유전자의 조직-특이적 발현을 지시하기 위해, 조직 특이적인것으로 공지된 시스-작용 조절 요소 또는 프로모터가 사용될 수 있다. 대안적으로, 이는 생체내 특이적 해부 자리에 바이러스 벡터 또는 DNA의 현상에서의 운반을 사용하여 성취될 수 있다. 예컨대, 생체내 혈관에 대한 유전자 전이는 동맥벽상에 선택된 자리에서 변환된 내피 세포를 시험관내에 이식시키므로써 성취되었다. 바이러스는 또는 유전자 생성물을 발현시킨 둘러싼 세포를 감염시켰다. 바이러스 벡터는 예컨대 카테테르에 의해 생체내 자리에 직접 운반될 수 있어서, 단지 특정 영역이 바이러스에 의해 감염되게하고, 장-기간, 자리 특이적 유전자 발현을 제공한다. 생체내에서, 레트로바이러스 벡터를 사용한 유전자 전이는 또한 기관으로 이끄는 혈관내로 변경된 바이러스를 주입시키므로써 유방 조직 및 간 조직에서 증명되었다.
- <102> 유전자 치료법 프로토콜을 위해 사용된 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 다른 RNA 바이러스, 예컨대 폴리오바이러스 또는 Sindbis 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스, SV 40, 종두 바이러스 및 다른 DNA 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 복제-결손 쥐 레트로바이러스 벡터는 가장 널리 이용된 유전자 전이 벡터이다. 쥐 백혈병 레트로바이러스는 단백질 코어(gag)에 의해 둘러싸이고, 숙주 범위를 결정하는 글리코단백질 엔벨로프(env)에 의해 둘러싸인, 핵 코어 단백질 및 폴리머라제(pol) 효소와 복합된 단일가닥 RNA로 구성된다. 레트로바이러스의 게놈 구조는 5' 및 3' 긴 말단 반복(LTR)에 의해 둘러싸인 gag, pol 및 env 유전자를 포함한다. 레트로바이러스 벡터 시스템은 5' 및 3' LTR를 함유하는 최소 벡터 및 패키징 신호가 목표 세포내로 벡터 패키징, 감염 및 통합을 허용하는데 충분하여, 바이러스 구조 단백질이 패키징 세포주에서 트랜스로 공급되는 것을 제공한다는 사실을 이용한다. 유전자 전이를 위한 레트로바이러스 벡터의 기본적인 이점은 대부분의 세포 유형에서 효율적인 감염 및 유전자 발현, 목표 세포 염색체 DNA내로의 정확한 단일 전사 벡터 통합, 및 레트로바이러스 게놈의 조작의 용이함을 포함한다.
- <103> 아데노바이러스는 코어 단백질과 복합되고 캡시드 단백질로 둘러싸인 선형, 이중 가닥 DNA로 구성된다. 분자 바이러스학에 있어서의 진보는 생체내 목표 세포내로 신규한 유전자 서열을 이전시킬 수 있는 벡터를 창조하기 위해 이들 유기체의 생물학을 이용하는 능력을 초래했다. 아데노바이러스-기재 벡터는 높은 수준에서 유전자 생성 펩티드를 발현할 것이다. 아데노바이러스 벡터는 낮은 적가의 바이러스로조차 높은 효율의 전염성을 갖는다. 게다가, 바이러스는 세포 자유 비리온으로서 충분히 감염성이므로, 생산자 세포주의 주입은 필요하지 않다. 또한 아데노바이러스 벡터에 대한 또다른 잠재적 이점은 생체내 이중 유전자의 장기간 발현을 성취하는 능력이다.
- <104> DNA 운반의 기계적 방법은 리포솜같은 퓨소제닉(fusogenic) 지질 소포 또는 막 융합을 위한 다른 소포, 리포펙틴같은 양이온성 지질을 혼입하는 DNA의 지질 입자, DNA의 폴리리신-매개된 전이, DNA의 직접 주입, 예컨대 DNA의 세균 또는 체세포내로의 미세주입, 공기 운반된 DNA-피복된 입자, 예컨대 "유전자 건"에서 사용된 금 입자, 및 인산칼슘 형질감염같은 무기 화학적 접근법을 포함한다. 또 다른 방법, 리간드-매개된 유전자 치료법은 특이 세포 또는 조직에 DNA를 이끌기 위해 특이 리간드와 DNA를 결합시켜 리간드-DNA 컨주게이트를 형성하는 것을 포함한다.
- <105> 근육 세포내로 플라스미드 DNA를 주입하는것은 형질감염되고 마커 유전자의 발현을 지속하는 높은 백분율의 세포를 생성한다는 것이 발견되었다. 플라스미드의 DNA는 세포의 게놈내로 혼입될 수 있거나, 될 수 없다. 형질감염된 DNA의 비-혼입은 세포 또는 미토콘드리아 게놈내 돌연변이 삽입, 결손 또는 변경의 두려움없이 장시간동안 최종적으로 구별된, 비-증식 조직내 유전자 생성 단백질의 형질감염 및 발현을 허용할 것이다. 장-기간, 그러나 필수적으로 영구적은 아닌, 특이 세포내로의 치료학적 유전자의 전이는 유전학적 질환 또는 예방학적 용도를 위한 치료를 제공할 수 있다. DNA는 수용체 세포의 게놈

내에서 일어나는 돌연변이없이 유전자 생성물 수준을 유지하기 위해 주기적으로 재주입될 것이다. 외생 DNA의 비-혼입은 여러가지 유전자 생성물을 발현하는 모든 구조물을 갖는 하나의 세포내에 여러가지 다른 외생 DNA 구조물의 존재를 허용할 수 있다.

- <106> 입자-매개된 유전자 전이 방법은 먼저 식물 조직을 변형시키는데 사용되었다. 입자 충격 장치, 또는 "유전자 건"으로 DNA-피복된 고밀도 입자(예컨대, 금 또는 텅스텐)를 목표 기관, 조직 또는 세포의 침투를 허용하는 고속으로 가속화시키기 위한 원동력이 생성된다. 입자 충격은 세포, 조직 또는 기관내로 DNA를 도입하기 위한 시험관내 시스템, 또는 생체외 또는 생체내 기술에서 사용될 수 있다.
- <107> 유전자 전이를 위한 일렉트로포레이션은 세포 또는 조직을 일렉트로포레이션-매개된 유전자 전이에 민감하도록 만들기 위해 전류를 사용한다. 제공된 장 강도를 갖는 간단한 전기 임펄스는 DNA 분자가 세포내로 침투할 수 있는 방식으로 막의 침투력을 증가시키기 위해 사용된다. 이 기술은 세포, 조직 또는 기관내로 DNA를 도입하기 위해 시험관내 시스템에서, 생체외 또는 생체내 기술로 사용될 수 있다.
- <108> 생체내 운반체 매개된 유전자 전이는 세포내로 외래 DNA를 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 운반체-DNA 복합체는 체액 또는 혈류내로 편리하게 도입될 수 있고나서, 신체내 목표 기관 또는 조직에 특별히 지시된 자리내로 도입될 수 있다. 양 리포솜 및 폴리양이온, 예컨대 폴리리신, 리포펙틴 또는 시토퍩틴이 사용될 수 있다. 세포 특이성 또는 기관 특이성인 리포솜이 개발될 수 있어서, 리포솜에 의해 운반된 외래 DNA는 목표 세포에 의해 흡수될 것이다. 특정 세포상에 특이적 수용체에 목표된 면역리포솜의 주입은 수용체를 갖는 세포내로 DNA를 삼입하는 편리한 방법으로서 사용될 수 있다. 사용된 또다른 운반 시스템은 생체내 유전자 전이를 위한 간세포에 DNA를 운반하기 위해 아시알로글리코프로테인/폴리리신 컨쥬게이트 시스템이다.
- <109> 형질감염된 DNA는 또한 DNA가 수용체 세포에 운반되고나서, 세포질 또는 핵내 존재하도록 다른 종류의 운반체와 결합될 수 있다. DNA는 특별히 처리된 소포 복합체내 핵 단백질을 운반하기 위해 결합될 수 있고, 핵내로 직접 운반될 수 있다.
- <110> 엔지오스타틴의 유전자 조절은 전사 또는 해독의 속도를 변경시키기 위해 엔지오스타틴 유전자에 결합하거나, 엔지오스타틴 유전자 또는 그의 상응하는 RNA 전사와 연관된 영역을 조절하는 화합물을 투여함으로써 성취될 수 있다. 게다가, DNA 서열을 암호화하는 엔지오스타틴으로 형질감염된 세포는 엔지오스타틴의 생체내 원을 제공하기 위해 환자에 투여될 수 있다. 예컨대, 세포는 핵산 서열을 암호화하는 엔지오스타틴을 함유하는 벡터로 형질감염될 수 있다.
- <111> 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 특정 핵산 서열을 함유할 수 있거나 그와 연관된 운반체를 의미하고, 이는 세포내로 특정 핵산 서열을 수송하는 기능을 한다. 벡터의 예는 플라스미드 및 감염성 미생물, 예컨대 바이러스, 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대 리간드-DNA 컨쥬게이트, 리포솜, 지질-DNA 복합체를 포함한다. 엔지오스타틴 DNA 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자는 엔지오스타틴을 발현시킬 수 있는 발현 벡터를 형성하기 위해 발현 조절 서열에 작업적으로 연결되는 것이 바람직할 수 있다. 형질감염된 세포는 환자의 정상 조직, 환자의 질병에 걸린 조직으로 부터 유래된 세포일 수 있거나, 비-환자의 세포일 수 있다.
- <112> 예컨대, 환자로 부터 제거된 종양 세포는 본 발명의 엔지오스타틴 단백질을 발현할 수 있는 벡터로 형질감염될 수 있고, 환자내로 재도입될 수 있다. 형질감염된 종양 세포는 종양의 성장을 막는 환자에 있어서 엔지오스타틴 수준을 생성한다. 환자는 사람 또는 사람 아닌 동물일 수 있다. 세포는 또한 일렉트로포레이션, 아이오노포레이션(ionoporation), 또는 "유전자 건"같은 이 분야에서 공지된 비-벡터, 또는 물리적 또는 화학적 방법에 의해 형질감염될 수 있다. 게다가, 엔지오스타틴 DNA는 환자내로 운반체의 도움없이 직접 주입될 수 있다. 특히, 엔지오스타틴 DNA는 피부, 근육 또는 혈액내로 주입될 수 있다.
- <113> 환자내로 엔지오스타틴을 형질감염시키기 위한 유전자 치료법 프로토콜은 세포의 계능내로, 미니 염색체내로, 또는 세포의 세포질 또는 핵내 분리된 복제 또는 비-복제 DNA 구조물로서 엔지오스타틴 DNA의 완전한 혼입일 수 있다. 엔지오스타틴 발현은 세포, 조직 또는 기관내 엔지오스타틴 단백질의 원하는 수준 또는 결정된 혈액 수준을 유지하기 위해 장 기간동안 계속될 수 있거나, 주기적으로 재주입될 수 있다.
- <114> 엔지오스타틴은 HPLC C4 컬럼상에서 분리될 수 있다(표 3 참고). 엔지오스타틴 단백질은 아세트 니트릴 구배로 30 내지 35%에서 용리된다. 환원 조건하에 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 겔상에서, 활성을 갖는 단백질 밴드는 약 38 kD에서 단일 피이크로서 용리되었다.
- <115> 발명자는 성장하는 1차 종양이 전이내에 맥관형성을 억압하므로써 전이의 성장을 억제할 수 있는 엔지오스타틴을 포함하는, 내피 세포 증식의 특이적 억제제의 혈류내로의 방출과 연관된다는 것을 보였다. 1차 종양과 연관된 엔지오스타틴의 원은 공지되어있지 않다. 이 화합물은 특이적 프로테아제에 의한 플라스미노겐의 분해에 의해 생성될 수 있거나, 엔지오스타틴은 엔지오스타틴을 코딩하는 특이적 유전자의 발현에 의해 생성될 수 있었다.
- <116> 1차 종양의 맥관형성 표현형대는 정상 세포에 의해 생산되는 내피세포 억제제에 비해 과량인 맥관형성 펩티드의 생산에 의존하나, 신형성으로의 형질전환 동안에 다운-조절되는 것으로 생각된다. 부모 세포 유형에 의해 생산되는 것에 비해 개별적인 종양 세포내에서 엔지오스타틴의 생산이 다운-조절되는 반면, 전체 종양에 의해 생산되는 억제제의 총량은 순환계로 들어가 마이크로전이의 원거리 위치에서 내피 성장을 억제하기에 충분하다. 엔지오스타틴은 1차 종양에 의해 분비되는 맥관형성 펩티드(들)보다 현저히 오랜 시간동안 순환계에 남아 있다. 따라서, 맥관형성 펩티드는 국소적으로 활동하는 것으로 보이며, 엔지오스타틴은 전체적으로 활동하고 비교적 긴 반감기로 혈액내에서 순환하는 것으로 보인다. 엔지오스타틴의 반감기는 대략 12 시간 내지 5일이다.
- <117> 하기의 가설에 얽매이기를 원치 않음에도 불구하고, 종양이 맥관형성을 할때 하나 이상의 맥관형성 펩티드(예를들면, aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GM-CSF등)를 분비하며, 이들은 국소적으로 활동하고, 맥관의 방향으로 부터 1차 종양의 주위에 있는 내피를 타겟팅하며 순환하지 않는다(또는 짧은 반감기로 순

환한다). 이 맥관형성 펩티드는 1차 종양이 그의 수를 늘리는것을 계속하기위해 내피세포 억제제(맥관 형성의 억제제)의 활동을 극복하기 위해 충분한 양으로 생산되어야 한다. 일단 이러한 1차 종양이 잘 성장하면 순환계로 내피세포 억제제를 연속적으로 방출한다. 이 가설에 따르면, 이 억제제는 1차 종양으로부터 먼 원거리에서 활동하고, 맥관내 방향으로 부터 모세혈관 내피전이를 타겟팅하며, 활동하며 연속적으로 순환한다. 따라서, 원거리 전이가 맥관 형성을 개시할 때, 주위의 모세혈관 내피는 들어오는 엔지오스타틴에 의해 억제될 수 있다.

- <118> 일단 1차 종양이 엔지오스타틴의 순환계로의 연속적 분비를 유발시키기에 충분한 크기로 도달하면, 제 2 종양 이식부(또는 마이크로전이)가 자신의 맥관형성을 개시하거나 증가시키기 어렵다. 만약 제 2 종양 이식부(예를 들면 피하공간 또는 각막 또는 정맥을 통한 폐)가 1차 종양이 이식한 직후에 출현한다면 1차 종양은 제 2 종양을 억제할 수 없을 것이다(제 2 종양의 맥관 형성이 이미 잘 진행되는 중일 것이기 때문에). 만약 2개의 종양이 동시에 이식된다면(예를들면 반대측면에)억제제는 서로에 대해 동등한 억제 효과를 가질 것이다.
- <119> 본 발명의 엔지오스타틴은
- <120> (i) 항-맥관형성 치료제로서 종양을 가진 사람 또는 동물에 투여될 수 있으며;
- <121> (ii) 예후 표지로서 사람 또는 동물의 혈청, 뇨 또는 조직에서 감지될 수 있고;
- <122> (iii) 유사한 맥관형성 분자에 대한 암환자의 혈청 및 뇨 분석의 근간으로서 사용될 수 있다.
- <123> 엔지오스타틴이 환자의 혈액이나 뇨와 같은 체액으로 부터 분리될 수 있거나 또는 엔지오스타틴이 당 분야의 일반적인 기술을 가진 사람들에게 공지되어 있는 재조합 DNA 방법 또는 합성 펩티드 화학적 방법에 의해 생산될 수 있다는 것은 본 발명의 일부로서 생각된다. 단백질 정제 방법은 당 분야에 잘 알려져 있으며 엔지오스타틴 정제 및 억제제 활성 분석의 특별한 예는 하기의 실시예에서 제공된다. 사람의 내재하는 엔지오스타틴 분리는 유사한 방법을 사용하여 달성된다.
- <124> 재조합 DNA 기술을 사용하는 엔지오스타틴 생산 방법의 한 예는 하기의 단계를 수반한다. (1) 앞서 토의되었고 하기에서 보다 완전히 기술되는 바와같이 엔지오스타틴을 확인하고 정제하며, (2) 정제된 억제제의 N-말단 아미노산 서열을 결정하고, (3) 엔지오스타틴 서열에 대한 5'과 3' DNA 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 합성적으로 생산하며, (4) 중합효소를 이용하여 엔지오스타틴 유전자 서열을 증폭하고, (5) 증폭된 서열을 발현 벡터와 같은 적절한 벡터로 삽입시키며, (6) 유전자를 포함한 벡터를 미생물이나 또는 억제제 유전자를 발현시킬 수 있는 다른 발현 시스템내로 삽입시키고, (7) 재조합적으로 생산된 억제제를 분리한다. 적절한 벡터에는 바이러스성, 세균성 및 진핵생물성(이스트와 같은) 발현 벡터가 포함된다. 상기의 기술은 "Molecular Cloning:A Laboratory Manual"(Sambrook 일동, 2판, Cold Spring Harbor Press, 1989)와 같은 실험방법서에 보다 완전히 기술되어있다. 사람 플라스미노겐의 DNA 서열이 발표되었으며(Browne, M.J.일동, "Expression of recombinant human plasminogen and aglycoplasminogen in HeLa cells" Fibrinolysis Vol.5(4). 257-260. 1991) 본원에서 참고사항으로서 기재되었다.
- <125> 상기 재조합 발현 시스템의 일예는 1996년 10월 23일자 ATCC 수탁 번호 제 98231호로 미합중국 매릴랜드 20852 록빌 파크론 드라이브 12301에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션으로부터의 승인시 입수가능한 *Escherichia coli* 균주 xL-1B pTrcHisA/Hash4이다.
- <126> 엔지오스타틴에 대한 유전자는 또한 (1)조직으로 부터 메신저 RNA를 분리하고 (2) 역전사 효소를 사용하여 상응하는 DNA 서열을 생산하며 (3) 적절한 프라이머를 사용하는 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 활성 엔지오스타틴 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열을 증폭함에 의해 높은 수준의 엔지오스타틴을 발현하는 세포 또는 조직(종양 세포와 같은)으로 부터 분리될 수 있다.
- <127> 엔지오스타틴 또는 이들의 생물학적으로 활성이 있는 단편을 생산하는 또다른 방법은 펩티드 합성에 의한 것이다. 일단 생물학적으로 활성이 있는 엔지오스타틴의 단편이 하기에 보다 완전히 설명되는 분석 시스템에 의해 발견되면, 예를들면 자동 펩티드 서열결정 방법에 의해 서열이 결정된다. 대안적으로, 일단 엔지오스타틴을 암호화하는 유전자 또는 DNA 서열이 예를들면 상기에 기술한 바에 의해 분리되면, 당 분야에 공지되어 있는 수동적 또는 자동 서열결정 방법에 의해 DNA 서열이 결정된다. 핵산 서열은 차례차례 아미노산 서열에 대한 정보를 제공한다. 따라서, 만약 생물학적으로 활성이 있는 단편이 트립신 분해와 같은 특정 방법에 의해 생성되었거나, 단편이 N-말단 서열결정이 되었다면, 나머지 아미노산 서열은 상응하는 DNA 서열로 부터 결정될 수 있다.
- <128> 일단 펩티드의 아미노산 서열이 알려지면, 단편은 "Solid Phase Peptide Synthesis : A Practical Approach"(E. Atherton 및 R.C. Sheppard, IRL Press, Oxford, England)에 의해 예시될 수 있는 당분야의 공지된 기술에 의해 합성될 수 있다. 이와 유사하게, 차후에 서로 연결되어 보다 큰 단편을 형성하는 여러개 단편이 합성될 수 있다. 이러한 합성 펩티드 단편은 또한 시험관내 또는 생체내 효능 및 길항 활성을 시험하기위해 특정 위치에 아미노산 치환을 갖는 것이 생산될 수 있다. 조직에 대한 높은 친화결합을 갖는 펩티드 단편은 친화성 컬럼상에서 엔지오스타틴 수용체를 분리하기 위해 사용될 수 있다. 엔지오스타틴 수용체의 분리 및 정제는 엔지오스타틴의 활동기작을 밝히는 근본적인 단계이다. 엔지오스타틴 수용체의 분리 및 엔지오스타틴 효능제 및 길항제의 확인은 생물학적 활성의 최종 경로인 엔지오스타틴 수용체의 활성을 조절할 수 있는 약물개발을 용이하게 할 것이다. 수용체의 분리는 현장 및 용액 하 이브리드화 기술을 이용하여 수용체의 위치 및 합성을 감지할 수 있는 뉴클레오타이드 탐침의 제작을 가능하게 한다. 더구나, 엔지오스타틴 수용체에 대한 유전자가 분리되고, 발현 벡터에 삽입되며 환자 종양 세포 같은 세포내로 형질감염되어 세포유형, 조직 또는 종양의 엔지오스타틴 결합 능력을 증가시키며 국소적인 맥관형성을 억제할 수 있게한다.
- <129> 엔지오스타틴은 맥관형성예의해 매개되거나 관계된 질병 또는 과정의 치료에 효과적이다. 본 발명은 엔지오스타틴 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 집합적으로 항-맥관형성 활성을 갖는 엔지오스타틴 단편의 조합 또는 엔지오스타틴 효능제 및 길항제의 유효량을 사용하는 맥관형성 매개된 질병 치료의 방법을 포함한다. 맥관형성 매개된 질병에서 충실성 종양; 백혈병과 같은 혈액성 종양; 종양 전이; 예를

들면 혈관종, 청신경종, 신경성유종, 트라코마, 화농성 육아종과 같은 양성 종양; 류마티스성 관절염; 건선; 예를 들면 당뇨병성 망막증, 조발성초기 망막증, 반점성 변성, 각막 이식거부, 신혈관 녹내장, 후수정체 섬유증식증, 피부초종과 같은 안맥관형성 질환; 오슬러 웨버 증후군; 심근증 맥관형성; 반점성 신혈관형성; 모세관 확장증; 혈우병자 관절; 맥관 섬유증; 및 상처 과립형성 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 엔지오스타틴은 내피세포의 과도한 또는 비정상적 자극으로 인한 질환의 치료에 유용하다. 이러한 질환에는 장유착증, 크론 질환, 동맥경화, 공포증 및 반흔 비대증 즉, 해축증이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

- <130> 엔지오스타틴은 태아 착상에 요구되는 혈관형성을 억제함으로써 출산 조절제로서 사용될 수 있다. 엔지오스타틴은 묘조병(*Rocheleminalia quintosa*) 및 궤양(*Helicobacter pylori*)과 같이 병리학적 결과로서 맥관형성이 되는 질병의 치료에 유용하다.
- <131> 엔지오스타틴의 합성 펩티드 단편은 여러 용도를 갖는다. 높은 특이성과 친화성을 가지고 엔지오스타틴 수용체에 결합하는 펩티드는 방사성표지되어 오토라디오그램 및 막 결합 기술을 이용하여 결합 위치의 가시화 및 정량을 위해 사용될 수 있다. 이 적용은 중요한 진단 및 연구의 수단을 제공한다. 엔지오스타틴 수용체의 결합 특성에 대한 지식은 수용체와 연결된 신호전달 기작의 연구를 용이하게 한다.
- <132> 또한, 반감기가 짧은 동위원소를 이용한 엔지오스타틴 펩티드의 표지는 포지트론 방출 토모그래피 또는 다른 현대 라디오그래피 기술을 이용하여 엔지오스타틴 결합 위치를 갖는 종양의 위치를 밝히기 위해 생체내에서 수용체의 결합 위치를 가시화할 수 있다.
- <133> 이 합성 펩티드내 아미노산의 전체적 치환은 엔지오스타틴 수용체에 대한 친화력이 높은 펩티드 효능제 및 길항제를 생산하여 수용체에 대한 엔지오스타틴의 결합을 증가시키거나 감소시킨다. 이러한 효능제는 마이크로전이의 성장을 억제함으로써 암의 확산을 제한시키는데 사용될 수 있다. 엔지오스타틴에 대한 길항제는 불충분한 혈관형성 상황에 적용되어 엔지오스타틴의 억제효과를 억제하고 맥관형성을 촉진한다. 예를들면, 이 치료는 당뇨병에 있어 상처 치료를 촉진하기 위한 치료 효과를 가질 수 있다.
- <134> 엔지오스타틴 펩티드는 배양된 종양 세포로부터 엔지오스타틴 수용체의 분리를 위한 친화성 결합을 개발하는데 사용될 수 있다. 엔지오스타틴 수용체의 분리 및 정제후 아미노산 서열이 결정된다. 이 정보를 이용하여 엔지오스타틴 수용체를 암호화하는 유전자 또는 유전자들이 확인되고 분리될 수 있다. 다음에는, 클로닝된 핵산서열이 수용체를 발현할 수 있는 벡터로 삽입되기 위해 개발된다. 이 기술은 당 분야의 숙련인에게 공지되어 있다. 엔지오스타틴 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 종양 세포로의 형질감염 및 형질감염된 종양 세포에 의한 수용체의 발현은 내인성 또는 외인성의 엔지오스타틴에 대한 이 세포의 반응성을 증가시켜 전이성 성장의 속도를 감소시킨다.
- <135> 리신과 같은 세포독성제는 엔지오스타틴 및 고친화성 엔지오스타틴 펩티드 단편과 연결되며 엔지오스타틴과 결합한 세포를 파괴하는 도구를 제공한다. 이러한 세포는 마이크로전이 및 1차 종양을 포함하는 여러 지역에서 발견되나 이에 제한되지는 않는다. 세포독성제와 연결된 펩티드는 원하는 장소로의 전달을 최대화 하기위한 방식으로 주입된다. 예를들면, 리신-연결된 고친화성 엔지오스타틴 단편은 타겟 위치를 제공하거나 타겟으로 향하는 도관으로 카놀라를 통해 전달된다. 이러한 제제는 또한 주입 카놀라과 커플링된 삼투 펌프를 통해 조절된 방식으로 전달될 수 있다. 엔지오스타틴 길항제의 배합물은 조직의 혈관형성을 증가시키기위한 맥관형성 자극제와 함께 공급될 수 있다. 이 치료 요법은 전이성 암을 파괴하는 효과적인 수단을 제공한다.
- <136> 엔지오스타틴은 다른 조성물 및 질환의 치료과정과 함께 사용될 수 있다. 예를들면, 종양은 엔지오스타틴과 함께 전형적으로 외과수술, 방사선 또는 약물치료에 의해 치료될 수 있으며 그후 엔지오스타틴은 차후에 마이크로전이의 휴지기를 연장시키고 잔여 1차 종양의 성장을 안정 및 억제하기 위해 환자에 세 투여될 수 있다. 부가적으로, 엔지오스타틴, 엔지오스타틴 단편, 항엔지오스타틴 혈청, 엔지오스타틴 수용체 효능제, 엔지오스타틴 수용체 길항제 또는 이들의 배합물은 약물학적으로 허용되는 부형제 및 임의적으로 생분해가능한 중합체와 같은 서방형 매트릭스와 함께 치료 조성물을 형성할 수 있다.
- <137> 본원에서 사용된 서방형 매트릭스는 일반적으로 효소 또는 산/염기 가수분해 또는 용해에 의해 분해가능한 중합체 물질로 제조된 매트릭스이다. 일단 체내로 삽입되면, 매트릭스는 효소 및 체액에 의해 작용을 받는다. 서방형 매트릭스는 바람직하게 리포솜, 폴리락타이드(폴리락트산), 폴리글리콜라이드(글리콜산의 중합체), 폴리락타이드 co-글리콜라이드(락트산과 글리콜산의 공중합체) 다가무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩티드, 하이아루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 설페이트, 카르복시산, 지방산, 인지질, 폴리사카라이드, 핵산, 폴리아미노산, 페닐알라닌, 티로신, 이소루신과 같은 아미노산, 폴리뉴클레오타이드, 폴리비닐 프로피렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘과 같은 생물학적으로 상용가능한 물질로부터 선택될 수 있다. 바람직한 생분해 가능한 매트릭스는 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드 중 하나 또는 폴리락타이드 co-글리콜라이드(락트산 및 글리콜산의 공중합체)의 매트릭스이다.
- <138> 본 발명의 맥관형성-조절 치료조성물은 고체, 액체 또는 에어로졸 일 수 있으며 공지된 여타의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 고체 치료 조성물의 예에는 알약, 크림 및 이식가능한 투여단위를 포함한다. 알약은 경구적으로 투여될 수 있으며, 치료 크림은 국소적으로 투여될 수 있다. 이식가능한 투여단위는 예를 들면 종양 부위와 같이 국소적으로 투여되거나 또는 치료적 맥관형성-조절 조성물을 전신으로 방출하기위해 예를 들면 피하적으로 이식될 수 있다. 액체 조성물의 예에는 피하, 정맥, 동맥 주사용으로 적합한 배합물 및 국소 및 안구 투여를 위한 배합물이 포함된다. 에어로졸 배합물의 예에는 폐 투여용의 흡입 배합물이 포함된다.
- <139> 본 발명의 엔지오스타틴은 또한 억제제 및 그의 수용체에 특이적인 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 항체는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 엔지오스타틴 또는 엔지오스타틴 수용체에 특이적으로 결합하는 항체는 체액 또는 조직내의 엔지오스타틴 또는 엔지오스타틴 수용체를 감지 또는 정량하기위해 당 분야의 일반적인 기술을 가진 사람들에게 잘 공지되어있는 진단방법 및 키트에 사용될 수 있다. 이 시험 결과는 암 및 다른 맥관형성을 매개로 하는 질환의 발생 및 재발을 진단 또는 예측하는데 사용될 수 있다.

- <140> 엔지오스타틴은 또한 엔지오스타틴에 결합할 수 있는 항체의 감지 및 정량을 위한 진단 방법 및 키트에 사용될 수 있다. 이 키트는 현장에서 1차 종양에 의해 분비되는 엔지오스타틴 존재하에서 마이크로전이의 확산을 의미하는 순환하는 엔지오스타틴 항체를 감지할 수 있게 한다. 이러한 순환하는 항-엔지오스타틴 항체를 가진 환자는 다수의 종양 및 암을 발생시킬 가능성이 높으며 치료 또는 완화가 이후에 이미 재발될 가능성이 높다. 이러한 항-엔지오스타틴 항체의 Fab 단편은 항-엔지오스타틴 항체를 중화하기 위해 사용되는 항-엔지오스타틴 Fab-단편항혈청을 제조하기 위한 항원으로 사용될 수 있다. 이러한 방법은 항-엔지오스타틴 항체에 의한 순환하는 엔지오스타틴의 제거를 감소시킴으로써 순환하는 엔지오스타틴 수준을 효과적으로 증가시킬 것이다.
- <141> 본 발명의 또다른 관점은 과도한 내부 엔지오스타틴의 활동을 차단하는 것이다. 이것은 시스템내의 바람직하지 않은 엔지오스타틴에 특이적인 항체로 사람 또는 동물을 수동적으로 면역시킴에 의해 수행된다. 이 치료는 비정상적인 배란, 월경 및 태반형성 및 혈관형성을 치료하는데 중요할 수 있다. 이것은 전이과정에서 엔지오스타틴 제거의 영향을 연구하는 유용한 도구를 제공한다. 엔지오스타틴 항체의 Fab 단편은 엔지오스타틴에 대한 결합위치를 포함한다. 이 단편은 당 분야의 숙련인에게 공지된 기술을 사용하여 엔지오스타틴 항체로 부터 분리된다. 엔지오스타틴 항혈청이 Fab 단편은 항-Fab 단편 혈청을 생산하기 위한 항원으로 사용된다. 엔지오스타틴 Fab 단편에 대한 항혈청의 주입은 엔지오스타틴이 엔지오스타틴 항체와 결합하지 못하도록한다. 엔지오스타틴이 항-엔지오스타틴의 Fab 단편에 결합하는 것을 차단함으로써 내인성 항-엔지오스타틴 항체를 중화함에 의해 치료적 잇점이 얻어진다. 이 치료의 순효과는 내부의 순환하는 엔지오스타틴이 타겟 세포에 도달하는 능력을 도와주어 전이의 확산을 감소시키는 것이다.
- <142> 본 발명은 내피적 억제 활성을 가진 엔지오스타틴의 여타의 유도체를 포함하는 것으로 간주됨이 이해되어야 한다. 본 발명은 엔지오스타틴 전체 단백질, 엔지오스타틴 단백질의 유도체 및 엔지오스타틴 단백질의 생물학적 활성 단편을 포함한다. 이것은 아미노산 치환을 갖거나 또는 아미노산 관능기에 부착된 당 또는 다른 분자를 갖는 엔지오스타틴 활성을 갖는 단백질이 포함된다. 본 발명은 또한 엔지오스타틴 및 엔지오스타틴 수용체를 암호화하는 유전자 및 이 유전자에 의해 발현되는 단백질을 포함한다.
- <143> 앞서 기술한 단백질 및 엔지오스타틴 활성을 가진 단백질 단편은 당 분야의 일반인에게 공지된 처방을 사용하여 약물학적으로 허용되는 배합물내의 분리되고 실질적으로 정제된 단백질 및 단백질 단편으로서 제공될 수 있다. 이 처방은 표준 경로를 통해 투여될 수 있다. 일반적으로, 배합물은 국소적, 경피, 복강, 두개, 뇌실, 대뇌, 질, 자궁, 경구, 직장 또는 비경구(예를들면 정맥, 척추, 피하 또는 근육) 경로를 통해 투여될 수 있다. 또한 엔지오스타틴은 화합물의 서방을 가능하게 하는 생분해 가능한 중합체 내에 삽입될 수 있으며, 중합체는 예를들면 종양부위와 같이 약물 전달이 요구되는곳 주변에 이식되거나 또는 엔지오스타틴이 전신적으로 서서히 방출되도록 이식될 수 있다. 삼투 미니 펌프가 카놀라를 통해 전이성 성장에 직접 또는 종양으로 혈관공급과 같이 원하는 위치로 고농도 엔지오스타틴의 조절된 전달을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 생분해 가능한 중합체 및 이들의 사용은 예를 들면 Brem 일종의 J. Neurosurg. (74:441-446(1991))에 상세히 기술되어 있으며 본원에 전문이 참조사항으로서 기재되어있다.
- <144> 본 발명의 엔지오스타틴의 투여량은 질병상태 또는 치료된 상태 및 사람 또는 동물의 체중과 상태 및 화합물의 투여경로와 같은 다른 치료 요인에 의존할 것이다. 사람 또는 동물을 치료함에 있어서, 대략 0.5mg/kg 내지 500mg/kg의 엔지오스타틴이 투여될 수 있다. 특정 동물 또는 사람내에서의 엔지오스타틴의 반감기에 따라, 엔지오스타틴은 수회/일 내지 1회/주 사이로 투여될 수 있다. 본 발명은 사람과 가축 모두에 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 본 발명의 방법은 다중 투여 뿐 아니라 단일 투여가 동시 또는 연장기간 동안에 걸쳐 주어지는 것으로 생각된다.
- <145> 엔지오스타틴 배합물은 경우, 직장, 눈(유리체 또는 카메라 포함), 코, 국소(구강 및 설하 포함), 자궁, 질 또는 비경구(피하, 복강, 근육, 정맥, 경피, 두개, 기관 및 경막 포함) 투여에 적절한 것이 포함된다. 엔지오스타틴 배합물은 편리하게 단위 투여량 형태로 제공되며 일반적인 약물학적 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 기술은 활성 성분 및 약물학적 담체(들) 또는 부형제(들)를 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 배합물은 활성 성분과 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 이들 모두와의 결합을 균일하고 밀접하게 한 후 만약 필요하다면 산물을 성형함으로써 제조된다.
- <146> 비경구 투여에 적합한 배합물에는 항산화제, 완충액, 살균제 및 투여자의 혈액과 배합물이 등장이도록 하는 용질을 포함하는 수용성 및 비수용성 멸균 주사용액 및 현탁재와 증점제를 포함하는 수용성 및 비-수용성 멸균 현탁액이 포함된다.
- <147> 배합물은 단위 투여량 또는 예를들면, 밀봉된 앰플 및 바이알과 같은 다중-투여용기로 제공될 수 있으며 사용하기 직전에 예를들면 주사용물과 같은 멸균된 액체담체의 첨가만을 요구하는 동결-건조(동결 건조) 조건에서 보관될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁물이 앞서 언급된 종류의 멸균된 분말, 과립 및 알약으로 부터 제조될 수 있다.
- <148> 바람직한 단위 투여량 배합물은 일 투여량 또는 단위, 일, 서브-투여량 또는 이들의 적절한 분획의 투여된 성분을 포함하는 것이다. 앞서 특별히 언급된 성분 뿐 아니라 본 발명의 배합물은 요구되는 배합물의 유형에 따라 업계에서 일반적인 다른 제제가 포함될 수 있음이 이해되어야한다. 임의적으로, 세포독성제가 투입되거나 또는 환자에게 이중 치료를 제공하기 위해 엔지오스타틴 단백질 또는 이들의 생물학적으로 활성 있는 펩티드 단편과 함께 투여될 수 있다.
- <149> 본 발명의 맥관형성 억제 펩티드는 표준 미세화학 용구 및 HPLC 및 질량 분광분석기를 이용한 순도 측정으로 합성될 수 있다. 펩티드 합성, HPLC 정제 및 질량 분광분석 방법은 당 분야의 숙련인에게 보편적으로 공지되어 있다. 엔지오스타틴 펩티드 및 엔지오스타틴 수용체 펩티드는 또한 재조합 *E. coli* 또는 이스트 발현 시스템내에서 생산되어 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제된다.
- <150> 완전한 엔지오스타틴 분자의 다른 펩티드 단편은 ; 특이적 항혈청을 개발하기 위한 항원으로, 엔지오스타틴 결합 위치에서 활성이 있는 아소니스트 및 안타고니스터로서, 연결된 펩티드로서 또는 엔지오스타틴이 결합한 세포의 타겟팅된 죽임을 위한 세포독성제와의 배합사용의 몇가지 적용이 포함되나 이에 제한되지는 않는 용도를 위해 합성될 수 있다. 이 펩티드를 이루는 아미노산 서열은 분자 외 부상의

위치에 기본하여 선택되며 항혈청에 결합하도록 접근가능하다. 분자의 중앙부 뿐 아니라 엔지오스타틴의 아미노 및 카르복시 말단은 합성될 단편중에 분리되어 제공된다.

- <151> 이 펩티드 서열은 GenBank Brookhaven Protein, SWISS-PROT 및 PIR과 같은 단백질 서열 데이터베이스를 이용하여 알려진 서열과 비교되어 단백질 서열 상동성을 결정한다. 이 정보는 다른 분자와 고도의 서열 상동성을 가진 서열을 배제시킴으로써 엔지오스타틴에 대한 항혈청, 효능제 및 길항제 개발에 있어 고특이성의 가능성을 증가시킨다.
- <152> 엔지오스타틴 및 엔지오스타틴으로 부터 유도된 펩티드들은 표준적인 방법을 사용하여 다른 분자에 커플링 될 수 있다. 엔지오스타틴의 아미노 및 카르복시 말단 모두는 티로신 및 라이신 잔기를 포함하며 예를들면 전형적인 기술들을 이용한 방사성 표지(티로신 잔기-클로라민 T, 요도겐, 락토포옥시다제 ; 라이신 잔기-Bolton-Hunter 시약)와 같은 많은 기술을 이용하여 방사성 및 비방사성으로 표지된다. 이러한 커플링 기술은 당 분야의 숙련인에게 잘 공지되어 있다. 대안적으로, 티로신 또는 라이신은 이 잔기를 포함하지 않는 단편에 첨가되어 펩티드상의 반응성 아미노 및 히드록시기를 표지하기 쉽게한다. 커플링 기술은 아미노, 설피드릴, 카르복실, 아마이드, 페놀 및 이미다졸을 포함하나 이에 제한되지는 않는 아미노산 상의 이용가능한 관능기에 기본하여 선택된다. 이러한 커플링에 사용되는 여러 시약에는 이외에도 글루탈알데하이드, 디아조화된 벤지딘, 카보디이미드 및 p-벤조퀴논을 포함한다.
- <153> 엔지오스타틴 펩티드는 방사성 동위원소, 효소, 담체 단백질, 세포 독성제, 형광 분자, 화학형광, 생물형광 및 여러 적용을 위한 다른 화합물과 화학적으로 커플링 된다. 커플링 반응의 효율은 특정 반응에 적절한 여러 기술을 사용하여 결정된다. 예를들면, ¹²⁵I를 이용한 엔지오스타틴 펩티드의 표지는 높은 비방사능을 가진 클로라민 T 와 Na¹²⁵I를 사용하여 이를 수 있다. 반응은 나트륨 메타바이셀 페이트를 이용하여 종결되며 혼합물은 일회용 컬럼을 사용하여 염분이 제거된다. 표지된 펩티드는 컬럼으로부터 용리되고 분획이 모아진다. 분취량이 각 분획으로부터 제거되어 감마 카운터에서 방사성을 측정한다. 이러한 방식에 있어서, 반응하지 않은 Na¹²⁵I는 표지된 엔지오스타틴 펩티드로 부터 분리된다. 가장 높은 비방사능을 가진 펩티드 분획이 엔지오스타틴 항혈청에 대한 결합능력 분석과 같은 차후의 사용을 위해 보관된다.
- <154> 펩티드 연결의 또다른 적용은 폴리클로날 항혈청을 생산하기 위한 것이다. 예를들면, 라이신 잔기를 포함하는 엔지오스타틴 펩티드는 글루탈알데하이드를 이용하여 정제된 소 혈청 알부민에 연결된다. 반응의 효율은 방사성 표지된 펩티드의 삼입을 측정함으로써 결정된다. 반응하지 않은 글루탈알데하이드 및 펩티드는 투석에 의해 분리된다. 연결체는 차후의 사용을 위해 보관된다.
- <155> 엔지오스타틴, 엔지오스타틴 유사체, 엔지오스타틴의 펩티드 단편 및 엔지오스타틴 수용체에 대한 항 혈청이 생산될 수 있다. 펩티드가 합성되고 정제된 후 모노클로날 및 폴리클로날 항혈청 모두가 당 분야의 숙련인에게 공지된 확립된 기술에 의해 생산된다. 예를들면, 폴리클로날 항혈청은 토끼, 양, 염소 또는 다른 동물에서 생산될 수 있다. 소 혈청 알부민과 같은 담체 분자에 연결된 엔지오스타틴 펩티드 또는 엔지오스타틴 단독은 어쥬번트(adjuvant) 혼합물과 합해지고, 에멀전화된 후 등, 목, 옆구리 및 때때로 발바닥의 여러 위치에 피하적으로 주사된다. 부스터 주사는 2 내지 4주마다와 같이 규칙적인 간격으로 수행된다. 혈액 샘플은 각 주사후 대략 7 내지 10일에 예를들면 확장시킨후 컷바퀴 정맥을 이용한 정맥천자에 의해 수득된다. 혈액 샘플은 4°C에서 방새 응집되도록 한후 4°C, 대략 2400 Xg에서 30분간 원심분리한다. 혈청을 수거하여 분취한후 즉시 사용하기 위해서는 4°C에 또는 차후의 분석을 위해서는 -20 내지 -90°C에 보관한다.
- <156> 폴리클로날 항혈청의 생산으로 부터의 모든 혈청 샘플 또는 모노클로날 항혈청 생산으로 부터의 미디어 샘플은 항체 역가를 결정하기위해 분석된다. 역가는 예를들면 도트 블로팅 및 밀도 분석 및 단백질 A, 2차 항혈청, 찬 에탄올 또는 차콜-텍스트라를 이용한 방사성 표지된 펩티드-항체 착물의 침전후 감마 카운터를 이용한 방사성의 측정과 같은 수개의 방법을 통해 평가된다. 가장 역가가 높은 항 혈청은 또한 시판되는 친화성 컬럼상에서 정제된다. 엔지오스타틴 펩티드는 친화성 컬럼의 겔에 커플링된다. 항혈청 샘플이 컬럼을 통과하며 항-엔지오스타틴 항체는 컬럼에 결합한채로 남아있다. 이 항체는 차후에 용리되어 수집되고 역가와 특이성을 결정하기 위해 평가된다.
- <157> 역가가 가장 높은 엔지오스타틴 항혈청은 하기의 것을 평가하기위해 시험된다 : a) 항원의 가장 높은 특이적 결합 및 가장 낮은 비특이적 결합을 위한 최적 항혈청 희석도, b) 표준 치환 곡선내에서 엔지오스타틴 펩티드의 증가되는 양에 결합하는 능력, c) 플라스미노겐을 포함하는 관계된 펩티드 및 단백질 및 관계된 종의 엔지오스타틴과의 잠재적인 교차-반응성, d) 혈장, 뇨, 조직 및 세포배양액의 추출물내 엔지오스타틴 펩티드를 감지하는 능력.
- <158> 엔지오스타틴 및 엔지오스타틴 수용체의 측정을 위한 키트는 또한 본 발명의 일부로 간주된다. 가장 높은 역가와 특이성을 가지며 혈장, 뇨, 조직 및 세포배양액의 추출물내 엔지오스타틴 펩티드를 감지할 수 있는 항혈청을 빠르고, 신빙성있고, 민감하며 특이적 측정과 엔지오스타틴의 위치 결정을 위한 사용이 용이한 키트를 만들기위해 부가로 연구된다. 이러한 분석 키트는 하기의 기술을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 : 경쟁적 및 비경쟁적 분석, 방사면역분석, 생물형광 및 화학형광 분석, 형광측정 분석 샌드위치 분석 면역방사성 측정 분석, 도트 블로팅, ELISA를 포함한 효소연결 분석, 마이크로 역가 평판, 항체 코팅된 스트립 또는 노이나 혈액의 빠른 감지를 위한 디프스틱(deepstick) 및 면역세포화학. 각 키트에 대한 분석의 범위, 민감성, 정확성, 신빙성, 특이성 및 반복성이 평가된다. 인트라 분석 및 인터 분석 변이는 치환 또는 활성의 표준 곡선상의 20%, 50% 및 80% 포인트에서 평가되었다.
- <159> 연구 및 임상 분야에서 보편적으로 사용되는 분석 키트의 한예는 방사면역분석(RIA) 키트이다. 엔지오스타틴 RIA는 하기에 예시하였다. 엔지오스타틴 또는 엔지오스타틴 펩티드의 성공적인 방사성요오드화 및 정제후에, 가장 높은 역가를 지닌 항혈청이 몇개의 희석도에서 적절한 완충시스템내에 10,000 cpm과 같이 비교적 일정한 양의 방사성을 갖는 튜브에 첨가된다. 다른 튜브는 비-특이적 결합을 결정하기 위해 완충액 또는 면역전 혈청을 포함한다. 4°C에서 24시간 동안 항온시킨후, 단백질 A를 첨가하고 튜브를 볼텍싱(vortex) 한다음 실온에서 90분간 항온시키고 4°C, 대략 2000 내지 2500Xg에서 원심분리하여 표

지된 항원에 결합한 항체의 착물을 침전시킨다. 상층액을 흡인함으로써 제거하고 펠레트내의 방사성을 감마 카운터에서 측정한다. 비-특이적 결합을 제외한 대략 10 내지 40%의 표지된 펩티드와 결합하는 항혈청 희석물은 부가적으로 연구된다.

<160> 다음에는, 알고있는 양의 펩티드를 방사성 표지된 펩티드 및 항혈청을 포함한 튜브에 가함으로써 항혈청 생산에 사용된 엔지오스타틴 펩티드의 희석범위(대략 0.1 pg 내지 10ng)가 결정된다. 예를들면 24 내지 48 시간의 부가의 배양기간후에, 단백질 A를 가하고 튜브를 원심분리후 상층액을 제거하고 펠레트내의 방사성을 측정한다. 표지되지 않은 엔지오스타틴 펩티드(표준)에 의한 방사성 표지된 엔지오스타틴 펩티드의 결합의 치환은 표준 곡선을 제공한다. 몇몇 농도의 다른 엔지오스타틴 펩티드 단편, 플라스미노겐, 다른 종으로 부터의 엔지오스타틴 및 유사한 펩티드가 엔지오스타틴 항혈청의 특이성을 연구하기위해 분석 튜브에 가해진다.

<161> 1차 및 2차 종양, Lewis 폐 종양, 엔지오스타틴 생산 세포의 배양, 태반, 자궁 및 뇌, 간, 및 장과 같은 다른 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 조직의 추출물이 엔지오스타틴 추출에 성공적으로 사용되었던 추출 기술에 의해 제조된다. 조직 추출물의 동결건조 또는 Speed Vac 후에 분석 완충액이 가해지고 다른 분취량이 RIA 튜브에 놓여진다. 알려진 엔지오스타틴 생산 세포의 추출물은 표준 곡선과 평행한 치환 곡선을 나타내는 반면 엔지오스타틴을 생산하지 않는 조직의 추출물은 엔지오스타틴 항혈청으로 부터의 방사성 표지된 엔지오스타틴을 치환하지 않는다. 또한, Lewis 폐 종양을 가진 동물로 부터의 뇨, 태반 및 뇌척수액의 추출물이 양을 증가시키면서 분석 튜브에 가해진다. 평행한 치환 곡선은 조직 및 체액에서의 엔지오스타틴을 측정하기위한 엔지오스타틴 분석의 유용성을 나타낸다.

<162> 엔지오스타틴을 포함하는 조직 추출물은 역상 HPCL에 분취량을 주므로써 추가로 특정지워진다. 배출물 분류는 수집되고, 속도 Vac으로 건조되며, RIA 버퍼로 재구성되며 엔지오스타틴 RIA로 분석된다. 엔지오스타틴 면역반응성의 최대량은 엔지오스타틴의 용출 위치에 상응하는 분류에 놓인다.

<163> 분석 키트는 지시물, 항혈청, 엔지오스타틴 또는 엔지오스타틴 펩티드 및, 결합된 엔지오스타틴-엔지오스타틴 항체 복합체의 침전을 위한 가능하게 방사표시된 엔지오스타틴 및/또는 제공한다. 키트는 생물학적인 유체내에서 엔지오스타틴 및 종양이 있는 동물 및 사람 그리고 종양이 없는 동물 및 사람의 조직 추출물의 측정에 유용하다.

<164> 또 다른 키트는 조직 및 세포에서 엔지오스타틴의 편재에 사용된다. 이러한 엔지오스타틴 면역조직화학 키트는 지시물, 엔지오스타틴 항혈청, 및 가능하게는 형광 이소티오시아네이트같은 형광 분자, 또는 1차 항혈청을 가시화하기 위해 사용된 어떤 다른 시약에 결합된 블록킹 혈청 및 2차 항혈청을 제공한다. 면역조직화학 기술은 업계의 숙련공에게 공지되어 있다. 이러한 엔지오스타틴 면역조직화학 키트는 광 현미경 및 전자 현미경을 사용하여 조직 섹션 및 배양된 세포에서 엔지오스타틴의 편재를 가능하게 한다. 그것은 연구 및 임상 목적을 위해서 사용된다. 예를 들면, 종양을 생체검사하거나 수집하고 조직 섹션을 마이크로톰으로 절단하여 엔지오스타틴 생성 자리를 조사한다. 그러한 정보는 양의 검사 및 자료에서 진단 및 가능하게는 치료학적 목적에 유용하다. 엔지오스타틴 생합성의 자리를 가시화하는 다른 방법은 엔지오스타틴 메신저 RNA에 대한 프로브로 혈장 하이브리드화에 사용하기 위한 핵산을 라디오라벨링하는 것을 포함한다. 유사하게 엔지오스타틴 수용체는 편제되고, 가시화되며 면역조직화한 기술로 정량될 수 있다.

<165> 본 발명은 다음의 실시예에 의해 추가로 설명되어지고, 이의 범위를 제한하는 임의의 방식으로 설명되지 않는다. 반대로, 수단은, 본원의 기술을 판독한 후에, 본 발명의 취지 및/또는 첨부된 청구범위의 범위를 벗어나지 않고 업계의 숙련공에게 제안될 수 있는 다양한 다른 양태, 변형, 및 이의 등물을 가짐이 명확하게 이해되어진다.

실시예

<166> **실시예 1**

<167> **변성의 성장이 1차 종양에 의해 억제되고 1차 종양의 제거후에 가속되는 동물-종양 시스템의 선택.**

<168> 쥐 종양 전이를 억제할 수 있는 다양한 쥐 종양을 스크린하여, 1차 종양이 폐 전이를 가장 효과적으로 억제시키는 Lewis 폐암을 선택한다. 합성 C57B16/J 6주령 수컷마우스에게 1×10^6 종양 세포를 주입한다(피하의 배면). 가시화된 종양은 3 내지 4일후에 처음 나타난다. 종양이 대략 1500mm³의 크기일때, 마우스는 두 그룹으로 랜덤화된다. 1차 종양은 처음 그룹에서 완전히 절개되고 모의 작동후 두번째 그룹에서는 손상되지 않고 남는다. 500mm³ 내지 3000mm³의 종양은 전이성장을 억제하지만 1500mm³의 종양은 높은 생존력으로 한정된 재발없이 안전하게 절제될 수 있는 가장 큰 1차 종양이다.

<169> 21일후에, 모든 마우스는 희생되고 해부된다. 손상되지 않은 1차 종양을 가진 마우스에서, 종양이 제거되었던 마우스에서의 15 +5 전이(p<0.0001)와 비교하여, 4 +2 가시화된 전이를 한다. 이러한 데이터는 앞서 지시된 바와 같이, 종양 중량과 밀접하게 연관되는 폐중량으로 확인되었다. 종양이 손상되지 않고 남아있는 마우스(p<0.0001)와 비교하여 종양이 제거된 마우스에서의 젖은 폐중량은 400% 증가한다.

<170> 이러한 실험 모델은 재생가능한 데이터를 주고 기술된 실험은 재생가능하다. 이러한 종양을 "Lewis 폐암-낮은 전이"(LLC-Low)라고 표시한다. 종양은 또한 SCID 마우스에서 근접하게 정의된 패턴으로 전이를 억제하여, B 및 T 림프구 모두를 결손시킨다.

<171> **실시예 2**

<172> **종양이 제거되든 제거되지 않든, 높게 전이되는 Lewis 폐암의 변형 분리.**

<173> Lewis 폐암의 높게 전이되는 변형은 마우스의 한 그룹에서 실시예 1의 LLC-Low 세포주로부터 동시에 일어나고 실시예 1에서 기술된 방법에 따라 분리되어 반복적으로 이식된다. 이러한 종양(LLC-

High)은 1차 종양이 존재하든 존재하지 않든 30 이상의 가시화된 폐 전이를 형성한다.

<174> **실시에 3**

<175> **전이의 크기 및 그들내 종양 세포의 증식 속도, 전이를 억제하는 1차 종양(LLC-Low)효과.**

<176> C57B16/J 마우스가 모든 실험에 사용된다. 마우스는 LLC-Low세포로 동시에 접종되고 14일후 1차 종양이 반수의 마우스에서 제거된다. 종양 제거 5, 10 및 15일후에, 마우스가 희생된다. 폐전이의 조직 단편이 얻어진다. 손상되지 않은 1차 종양을 가진 마우스는 신혈관생성되지 않은 폐에서 마이크로전이를 갖는다. 이러한 전이는 직경 12 내지 15 인 세포층으로 제한되고 종양 제거 15일후 명확한 크기 증가를 보이지 않는다. 반대로, 1차 종양이 제거된 동물은 작용 5일후 일찍 크게 혈관생성된 전이를 드러낸다. 이러한 전이는 종양 제거 15일후에 부피가 4-배 증가한다(폐종양 및 조직학에 의해 일어난다). 1차 종양이 제거된 약 50%의 동물은 실험이 끝나기전에 폐 전이가 사라진다. 1차 종양이 손상되지 않은 모든 동물은 실험의 끝까지 살아남는다.

<177> 전이내 종양 세포의 복제 속도는 앞서 마우스에 주입된 BrdU로 착색된 핵을 계산하므로써 결정된다. BrdU를 작게 혼합한 종양 세포의 높은 %, 손상되지 않은 1차 종양을 갖는 동물의 무혈관생성의 전이는 1차 종양이 제거되어진 마우스의 크게 혈관생성된 전이(도 3)내 종양 세포의 BrdU 혼합에 상응한다. 이러한 발견은 1차 종양의 존재가 전이내 종양 세포의 복제 속도에 직접 효과를 갖지 않음을 제안한다.

<178> 도 3에서, 왼쪽 패널은 1차 종양의 존재 및 부재하에 폐에 종양 세포의 색인을 표시하는 BrdU를 보인다. 면역조직화학적 착색전에, 단편은 0.2M HCl로 10분동안 침투되고 37°C에서 15분동안 0.2M Tris-HCl, 2mM CaCl₂에서 1μg/ml의 프로테이나제 K(Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)로 분해된다. 표시된 색인은 250의 동력에서 양성핵의 %를 계산하므로써 평가된다. 도 3의 오른쪽 패널은 손상되지 않은 1차 종양을 갖거나 작용 5, 10 및 15일후 제거된 종양의 총 폐 종양의 분석을 서술한다. 동물은 BrdU(0.75mg/마우스)의 복막내 주입 6시간후 희생된다.

<179> **실시에 4**

<180> **손상되지 않은 1차 종양의 존재하에 폐암전이에 있어서 맥관형성의 억제.**

<181> 폐암전이내 혈관생성의 정도를 측정하기위해, 조직을 본 윌레브랜드(von Willebrand) 인자(Dako Inc., Carpinteria, CA에서 시판되는, 내피의 특정 표시)에 대한 항체로 착색시킨다. 손상되지 않은 종양을 가진 동물의 전이는 폐의 혈관이 존재하는 주위에 얇은 컵스(8-12 종양 세포층)을 형성한다. 라이닝된 혈관의 내피 세포를 제외하고, 세포는 본 윌레브랜드 인자에 대해 양성이 아니거나 거의 양성이 아니다. 반대로, 제 1 종양의 제거 5일후 동물의 폐암전이는 더 클뿐만 아니라 본 윌레브랜드 인자에 강하게 착색되는 내피 세포를 포함하는 모세관 모양의 싸으로 침투한다.

<182> 폐암전이에 있어서 내피 세포 존재하에 면역조직화학적 분석에서, 접속 19일후 손상되지 않은 1차 폐종양으로 폐암전이는 폐의 예비-존재하는 마이크로관 주위에 종양 세포의 컵스를 가진다. 전이는 8 내지 12개의 세포층으로 제한된다. 마이크로관 주위에 신혈관생성의 증거는 없고, 임의의 새로운 마이크로관을 포함하지 않는다. 이것은 예비-혈관생성 전이의 최대 크기의 전형이다.

<183> 1차 종양을 절제(제 1 종양의 접속 19일후)한후 5일동안 수집된 조직의 면역 조직화학적 분석에서, 전이는 폐의 예비-존재 관을 둘러싼다. 반대로, 1차 종양이 절제되지 않은 샘플에서, 종양은 신혈관생성된다. 따라서, 손상되지 않은 제 1 종양은 전이에서 신규 모세 혈관의 형성을 억제하지만, 전이내 종양 세포의 증식은 제 1 종양에 의해 영향받지 않는다.

<184> **실시에 5**

<185> **1차 종양은 마우스 각막에 이식된 2차 종양의 맥관형성을 억제한다. 이러한 2차 종양의 성장이 억제된다.**

<186> 0.25 내지 0.5mm²의 Lewis 폐종양(LLC-Low)은 0일에 마우스 각막에 이식된다.(Muthukkaruppan Vr., et al., Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205:1416-1418, 1979) 1차 종양은 각막 이식 4 또는 7일전; 또는 각막 이식날에; 또는 각막 이식 4 또는 7일후, 피하의 배면으로 1×10⁶의 LLC-Low를 접종시키므로써 형성된다. 대조군 마우스들은 각막 이식을 받지만, 피하 종양은 아니다. 다른 대조군 마우스들은 각막 이식 4일전에 배면으로 각막 이식 및 LLC-High 종양 세포의 접종을 받는다. 각막은 각막 종양의 성장(눈의 마이크로미터에 의해 측정) 및 각막 경계의 가장자리로부터 신모세관의 성장에 있어서 슬릿-램프 입체현미경사용에 의해 매일 평가된다.

<187> 1차 피하 종양이 위치하지 않은 대조군 마우스에서, 대다수의 각막(6/8)은 각막 이식 6 내지 7일 후에 출발하고 10일후까지 계속되는 신혈관생성을 개발한다. 10일을 단위로, 혈관생성된 각막 종양은 전체 눈의 대략 1/4의 부피에 도달한다. 1차 피하의 LLC-Low 종양의 존재하에, 만약 1차 종양이 각막 이식 적어도 4일전에 같은 자리에 있다면, 각막 이식은 혈관생성되지 않는다. 신혈관생성의 부재에서, 각막 종양은 각막내 얇고, 하얀 무혈관생성의 디스크처럼 서서히 성장한다.

<188> 그러나 1차 종양이 각막 이식 4일후 이식되지 않는다면, 각막은 혈관생성되고 3/3 각막 종양은 비-종양을 갖는 대조군과 유사한 속도로 성장한다. 1차 피하의 LLC-High 종양의 존재하에, 대다수의 각막(2/3)은 각막 이식 7일후에 출발하고 10일후까지 계속되는 신혈관생성을 진행한다. 10일까지, 혈관생성된 각막 종양은 다시 전체 눈의 대략 1/4부피에 도달한다.

[표 1]

1차 피하 종양에 의한 각막에서의 종양 혈관생성의 억제.[모든 1차 종양은 LLC-High인 것(*)을 제외하고는 LLC-Low이다].

안구 이식 일	0	0	0	0	0	0	0
제 1 종양 이식 일	-7	-4	-4*	0	없음	+4	+7
10일까지 신규 각막 관	2/10	0/9	2/3	2/3	6/8	3/3	2/3

<190> 0/10 각막은 제 1 LLC-Low 피하 종양이 안구 종양 이식 7일전(예를 들면 -7)에 이식될때 신혈관 생성을 보일 것이 예상된다. 그러나, 종양중에 2개(2/10)는 너무 크기때문에(>3cm²) 과사된다.

[실시예 6]

<192> 1차 손상되지 않은 종양은 기본적인 섬유아세포 성장 인자(bFGF)의 2차 피하 이식에 의해 유발된 맥관형성을 억제한다.

<193> 실시예 4 및 5에 기술된 실험은 1차 종양이 2차 전이에서의 맥관형성을 억제하는 것을 보이더라도, 이러한 연구는 1차 종양이 (i) 내피 증식(또는 맥관형성)을 직접 억제하는지, 또는 (ii) 전이의 종양 세포의 맥관형성의 활성을 저-조절함으로써 간접적으로 억제하는지 어떤지를 나타내지 않는다. 이러한 두 개의 가능성사이의 차이로, 피하 맥관형성의 포커스는 기본적인 섬유아세포 성장 인자(bFGF)를 포함하는 매트릭셀(matrigel)의 이식에 의해 유도된다.(Passaniti A, et al., A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. Lab. Invest. 67:519, 1992)

<194> 매트릭셀(기저 막단백질 추출물)은 헤파린의 존재하에 25 내지 50ng/ml의 bFGF를 포함하며, 정상적인 배면 및 종양을 가진 마우스(LLC-Low)의 피하에 주입된다. 마우스는 4일후에 희생되고 겔에서의 헤모글로빈 농도를 혈관 형성을 정량하기 위해 측정한다. 매트릭셀로 들어가는 새로운 관의 수를 헤모글로빈 농도와 연관하여 우선적으로 보인다.(Folkman J., Angiogenesis and its inhibitors in "Important Advances in Oncology 1985", VT DeVita, S. Hellman and S. Rosenberg, editors, J.B. Lippincott, Philadelphia 1985) 몇몇 겔은 또한 조직학적 조사로 준비된다. 정상 마우스에서, 50ng/ml의 bFGF를 포함하는 매트릭셀 펠릿은 완전히 적색이다. 그들은 신규 모세관에 의해 심하게 물러나고, 2.4g/dl의 헤모글로빈을 포함한다. bFGF가 부족한 매트릭셀은 반투명 그레이이고 단지 0.4g/dl의 헤모글로빈(6배 차이)을 포함한다. 반대로, 1차 종양을 가진 마우스의 매트릭셀은 단지 0.5g/dl의 헤모글로빈(도 4)을 포함한다.

<195> 이러한 실험에서 맥관형성의 거의 완전한 억제는 Lewis 폐 1차 종양의 존재가 bFGF-유도된 맥관형성을 직접 억제할 수 있음을 제안한다.

[실시예 7]

<197> 종양을 가진 동물로부터 1차 종양이 제거된 동물까지의 혈청의 이동이 전이를 억제한다.

<198> 마우스들은 상기 기술된 바와 같이 Lewis 폐암으로 이식된다. 15일후에, 종양이 약 1500mm³일때, 마우스를 네개의 그룹으로 랜덤화한다. 세개의 그룹은 1차 종양을 완전히 외과 절제한다; 한 그룹에서 종양은 같은 자리에 남아있다.(모의 외과 과정후) 이어서 세개의 절제 그룹에서의 마우스들은 살린, 정상적인 종양을 갖지 않은 마우스로부터의 혈청, 또는 1500mm³의 Lewis 폐암을 갖는 마우스로부터의 혈청의 복막내 주입을 매일 받는다. 손상되지 않고 남은 종양을 가진 마우스의 그룹은 복막내 살린 주입을 받는다. 모든 마우스를 21일동안 처리한후에 동물을 안락사시키고 폐 전이를 계산한다(표 2).

[표 2]

	제거된 제 1의 종양			손상되지 않은
처리	살린	정상쥐들의	종양을 가진	살린
폐 전이의 수:	55±5	50±4	7±2	3±1

<200> 이러한 결과는 두 그룹사이의 차이에 대해 폐 중량. $p < 0.0001$ 에 의해 확인된다[(55&50) vs. (7&3)]. 유사한 결과가 종양을 가진 동물의 뇨로부터의 엔지오스타틴을 사용하여 얻어진다.

[실시예 8]

<202> 소 모세관 내피(BCE) 세포 분석

<203> BCE 세포는 단락 9 및 14 사이에서만 사용된다. 0일에, BCE 세포는 12,500 세포/월의 농도에서 겔라틴화(37°C에서 PBS내 1.5%의 겔라틴, 24시간동안 10% CO₂ 및 이어서 0.5ml PBS로 헹굼.)된 24 웰 플레이트상에 씌운다. 세포 합계는 헤모시토크를 사용하여 수행된다. 세포는 10%의 열-비활성된(56°C에서 20분) 송아지 혈청 및 1%의 글루타민-펜-스트랩(GPC)로 500 μ l의 DMEM을 씌운다.

<204> BCE 세포는 다음과 같이 변화한다: 종막은 제거되고 250 μ l의 DMEM/5% BCS/1% GPS로 대체된다. 이어서 테스트된 샘플을 벽에 첨가한다(그 양은 테스트된 샘플에 의존하여 변화한다). 플레이트는 37°C/10% CO₂에 약 10분동안 놓인다. 2ng/ml bFGF와 함께 250 μ l의 DMEM/5% BCS/1% GPS를 각 벽에 첨가한다. 최종 종막은 1ng/ml bFGF를 갖는 500 μ l의 DMEM/5% BCS/1% GPS 이다. 플레이트는 72시간동안 37°C/10% CO₂ 배양기로 되돌아간다.

<205> 4일에, 세포는 매질을 제거하고 이어서 모든 웰(0.5ml 트립신/EDTA)을 2 내지 3분동안 트립신화하므로써 계산된다. 이어서 현탁된 세포를 9.5ml Hemetall로 신타레이션 약병으로 옮기고 Coulter 계산기를 사용하여 계산한다. 활성의 단위는 내피 세포가 bFGF 1ng/ml에서 72시간동안 배양될때, 모세관 내피 증식의 최대의 반이 억제되는 것이 가능한 엔지오스타틴을 포함하는 혈청의 양이다.

<206> 실시에 9

<207> 낮은 전이 Lewis 폐종양(LLC-Low)을 갖는 마우스들의 혈청은 시험관내 모세관 내피 세포 증식을 억제한다.

<208> 소 모세관 내피 세포는 72시간 증식 분석에서 기본적인 섬유아세포 성장 인자(bFGF 1ng/ml)에 의해 자극된다. 종양을 가진 마우스의 혈청을 투여량-의존 및 가역 방식으로 내피 세포 증식을 억제하는 이러한 배양액에 첨가한다. 정상 혈청은 억제되지 않는다(도 5). 내피 세포 증식은 종양을 가진 nu/nu 마우스 및 SCID 마우스로부터 수득된 혈청에 의해 유사한 방식(대조군에 비하여)으로 억제된다. 1차 종양이 제거된후에, 엔지오스타틴 활성은 3-5일 동안에 혈청으로부터 사라진다.

<209> 종양을 가진 혈청은 또한 소 대동맥 내피 세포 및 동시에 마우스의 헤만지오엔도테리오마로부터 유도된 내피 세포를 억제하지만(Obeso, et al., "Methods in Laboratory Investigation, A Hemangioendothelioma-derived cell line; Its use as a Model for the Study of Endothelial Cell Biology," Lab Invest., 63(2). pgs 259-269. 1990), Lewis 폐 종양, 3T3 섬유아세포, 대동맥의 평활근 세포, 링크 폐 상피, 또는 사람에 치명적인 W138 폐 섬유아세포를 억제하지 않는다.

<210> 실시에 10

<211> 전이를 억제하지 않는 Lewis 폐종양(LLC-Low)을 갖는 마우스들의 혈청은 시험관내 모세관 내피 세포 증식을 억제하지 않는다.

<212> LLC-High의 1차 종양을 가진 마우스들의 혈청은 대조군에 비하여 bFGF-자극된 소 모세관 내피 세포의 증식을 명확하게 억제 하지않는다. 또한, 이러한 혈청이 정제의 처음 두단계(헤파린-세파로스 크로마토그래피 및 겔여과)에 있을때, 엔지오스타틴 활성은 임의의 분류로 발견되지 않는다.

<213> 실시에 11

<214> Lewis 폐양(낮은 전이)으로부터의 복수는, 또한 엔지오스타틴 혈청을 유발시킨다.

<215> 마우스는 LLC-Low 또는 LLC-High 종양 세포(10⁶)의 복막내 주입을 받아들이고, 1주후, 1-2ml의 혈액 복수를 각각 10-20마리 마우스로부터 얻는다. 장종양의 씨가 보인다. 이어서 마우스들을 안락사시킨다. 혈청을 심장의 상처로부터 얻는다. 혈청을 또한 대조군처럼 정상, 종양을 갖지 않는 마우스들로부터 얻는다. 혈청 및 복수를 세포를 제거하기위해 원심분리 시키고 상등물을 bFGF(1ng/ml)에 의해 자극된 소 모세관 내피 세포상에서 분석한다(실시에 8 참조). 양종양 타입으로부터 기원된 복수는 72시간후에 대조군을 넘는 모세관 내피 세포의 명확한 증식(예를 들면, 100%의 증식)을 자극한다(도 6). 반대로, 낮은 전이 마우스들의 혈청은 내피 세포 증식을 억제한다(대조군에 비해 79% 억제). 높은 전이주의 혈청은 200%로 자극된다.

<216> 이러한 데이터는 낮은 전이주의 복수가 엔지오스타틴을 넘는 내피 성장 자극기의 우세를 포함함을 보인다. 이러한 조건은 고체 1차 종양과 유사하다. 더구나, 엔지오스타틴 활성은 자극기의 활성에 반대가 없는 것처럼, 혈청에서 나타난다. 이러한 패턴은 고체 1차 종양과 유사하다(LLC-Low). 높은 전이 종양(LLC-High)의 혈청은 또한 내피 세포 자극기의 우세를 포함함을 보이지만, 엔지오스타틴은 혈청에서 정의되지 않는다.

<217> 실시에 12

<218> 컬럼 크로마토그래피에 의한 혈청의 엔지오스타틴의 분류 및 SDS-PAGE에 의한 성장-억제 분류의 분석.

<219> 엔지오스타틴(들)을 정제하기 위해서, 혈청을 종양을 가진 마우스들로부터 공동으로 얻는다. 상기에서 정의된 시험관내 억제제 활성 분석에 따라 분석된 억제된 활성은 연속적으로 헤파린-세파로스, 비오겔 A0.5mm 아가로스 및 C4-역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)의 몇몇 사이클을 사용하여 크로마토그래피시킨다. 내피 억제 활성을 포함하는 HPLC 분류의 SDS-PAGE는 분명하게 감소된 38,000 달톤의 Mr의 불연속 밴드를 나타내며, 약 2 \times 10⁷의 특정 활성으로 약 백만-배 정제된다(표 3 참조). 정제의 다른 단계에서, 공동을 얻어진 분류는 공지된 내피 억제제의 존재하에 특정 항원으로 테스트된다. 혈소판 인자-4, 트롬보스포딘, 또는 변형성 성장 인자 베타는 부분 정제 또는 정제된 분류내에서 발견되지 않는다.

[표 3]

	특정한 활성 (단위*/mg)	정제 배수
혈청	1.69	1
헤파린 세포막로스	14.92	8.8
마이오-겔 A0.5m	69.96	41.4
HPLC/C4	2×10^7	1.2×10^6

<221> * 활성의 단위는 내피 세포가 bFGF 1ng/ml에서 72시간동안 배양될때, 모세관 내피 증식의 최대의 반이 억제되는 것이 가능한 엔지오스타틴을 포함하는 혈청의 양이다.

<222> **실시에 13**

<223> **컬럼 크로마토그래피에 의한 뇨의 엔지오스타틴 분류 및 SDS-PAGE에 의한 성장-억제 인자의 분석.**

<224> 혈청의 내피 세포 억제제(들)의 정제는 각 마우스로부터 수득할 수 있는 혈청의 작은 부피 및 혈청내 단백질의 많은 양에 의해 저지된다.

<225> 종양을 가진 마우스들의 뇨는 그것이 종양을 갖지 않는 마우스의 뇨 및 LLC-high 종양을 가진 마우스에 없는 내피 세포 증식의 억제제를 포함하는 것으로 분석되고 발견되었다. 내피 세포 억제제 활성의 정제는 혈청(상기에서 정의된)의 정제가 적용되는 동일한 전술로 수행된다(도 7).

<226> 도 7은 종양을 가진 동물로부터 부분 정제된 혈청 또는 뇨의 C4 역상 크로마토그래피를 보인다. 모든 분류는 실시에 1X에서 기술된 바와 같이 72-시간 증식 분석으로 bFGF를 갖는 소 모세관 내피 세포상에서 분석된다. 억제의 분리된 피크는 분류 23에서 30 내지 35%의 아세토니트릴로 배출되는 모든 경우에서 보여진다. 종양을 가진 동물의 혈청의 C4 역상 크로마토그래피의 세번째 사이클로부터 억제 분류의 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동은 약 38,000 달톤에서 단일 밴드를 보인다.

<227> **실시에 14**

<228> **순환되는 엔지오스타틴의 특징화**

<229> 내피 억제는 실시에 9에서 기술된 과정에 따라 분석된다. 엔지오스타틴은 Synchropak HPLC C4 컬럼에서 분리된다(Synchrom, Inc. Lafayette, IN). 억제제는 30 내지 35%의 아세토니트릴 성분으로 용출된다. 감소 조건(β -머캅토에탄올(5% v/v))하에 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)상에서, 활성 단백질 밴드는 38 킬로달톤으로 용출된다. 비-감소 조건하에서, 활성 단백질은 28 킬로달톤으로 용출된다. 활성은 초기 샘플이 뇨 및 혈청으로부터 분리된 동일한 지점에서 발견된다. 활성은 임의의 다른 밴드에서는 감지되지 않는다.

<230> 밴드와 결합한 활성은 가열(100°C에서 10시간)되거나 트립신으로 처리될때 잃어버린다. 활성있는 밴드를 물/글로로포름 혼합물(1:1)로 추출할때, 활성은 단지 수성상에서만 발견된다.

<231> **실시에 15**

<232> **사람 플라스미노겐으로부터 억제 단편의 정제:**

<233> 플라스미노겐 리신 결합 자리 I은 Sigma Chemical Company로부터 수득된다. 이 제조물은 엘라스티아제로 분해한후에 정제된 사람 플라스미노겐이다. 이러한 방식으로 수득한 리신 결합 자리 I은 플라스미드 A-사슬(크링글 1+2+3)내 적어도 처음 세개의 트리플-루프 구조(1 내지 3의 수)을 응집물내 포함하는 펩티드의 집합이다(Sottrup-Jensen, L., et al. in Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3, 191, Davidson, J.F., et al. eds. Raven Press, New York 1978 and Wiman, B., et al., Biochemica et Biophysica Acta, 579, 142 (1979)). 플라스미노겐 리신 결합 자리 I(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)을 물에서 재현탁하고 HPLC-그레이트 물/0.1%의 TFA로 평형이된 C4-역상 컬럼에 적용시킨다. 컬럼은 물/0.1% TFA의 성분으로 아세토니트릴/0.1% TFA로 배출하고 분류를 폴리프로필렌 관으로 수집한다. 각 분취량을 속도 vac으로 증발시키고, 물로 재현탁하고, 증식 분석에서 BCEs에 적용한다. 이 과정을 배출과 유사한 성분을 사용하여 억제 분류에 대해 두번 반복한다. 억제 활성은 C4 컬럼의 최종 실행에서 30-35% 아세토니트릴로 배출된다. 억제 분류의 SDS-PAGE는 40, 42.5, 및 45kd의 분명한 감소 분자량의 3개의 분리된 밴드를 나타낸다. 비-감소 조건하의 SDS-PAGE는 각각 30, 32.5, 및 35kd의 분자량의 세개의 밴드를 나타낸다.

<234> **실시에 16**

<235>

SDS-PAGE로부터의 억제 활성의 추출

<236>

사람 플라스미노겐을 기본으로 하는 정제로부터의 정제된 억제 분량은 비-전이 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 결정된다. 은 착색에 의한 동일한 샘플로 하중된 이웃한 레인에서 보여진 밴드에 상응하는 겔의 면적은 겔로부터 잘리고 4°C에서 12시간동안 폴리프로필렌 관에서 1ml의 포스페이트 버퍼 살린으로 배양된다. 표면 물질을 제거하고 살린에 대해 6시간동안 두 번(MWCO=6-8000), 그리고 증류수에 대해 6시간 동안 두 번 투석시킨다. 투석물은 진공 원심분리기에 의해 증발된다. 생성물은 살린에서 재현탁되고 72시간의 분석에서 1ng/ml의 기본 섬유아세포 성장 인자에 의해 자극된 소 모세관 내피 세포에 적용된다. 각각 세계의 밴드로부터 추출된 단백질은 모세관 내피세포를 억제한다.

<237>

실시에 17

<238>

플라스미노겐 단편 처리 연구

<239>

마우스들은 Lewis 폐암으로 이식되고, 종양이 1500-2000mm³일때 절제된다. 작동하는 날중에서, 마우스들은 각각 6마리의 마우스들로 6 그룹으로 랜덤화된다. 마우스는 사람 플라스미노겐, 전체 사람 플라스미노겐, 종양을 가진 동물로부터의 뇨, 정상 마우스로부터의 뇨, 또는 살린의 세계의 정제된 억제 단편으로 매일 복막내 주입을 받아들인다. 모의절차를 갖는 종양을 가진 동물의 한 그룹은 살린 주입으로 처리된다. 1차 종양 제거후 즉시, 마우스는 적하 투여량으로서 24μg(1.2mg/kg/일/마우스)의 억제 플라스미노겐 단편의 복막내 주입을 받는다. 이어서 그들은 실험의 지속 기간동안 12μg의 억제 단편(0.6mg/kg/일/마우스)의 복막내 주입을 매일 받는다. 대조군 마우스들은 종양 제거후 전체 플라스미노겐 분자의 동일한 분량을 받는다. 뇨 처리동안, 정상 또는 종양을 가진 마우스들의 뇨는 여과되고, 날리 투석되고, 동결건조된 다음, 살균수에 재현탁되어 250-배 농도를 얻는다. 마우스들은 종양을 가진 마우스 또는 정상마우스로부터 적하 투여량으로서 1차 종양을 제거하는 날중에서 두개의 복막내 주입으로 0.8ml의 투석된 뇨 농도를 얻는다. 이어서 실험의 과정동안 투석되고 농축된 0.4ml의 뇨의 복막내 주입을 매일 받는다. 처리는 모든 마우스가 희생하고 해부된 지점에서 13일동안 계속된다.

<240>

실험의 결과는 도 8 및 9에서 보인다. 도 8은 13일 처리후에 표면 폐 전이를 보인다. 표면 폐 전이는 해부된 마우스의 폐에서 보여진 전이의 수를 언급한다. 입체 현미경은 전이를 계산하기 위해 사용된다. 도 8은 계산되어진 표면 폐 전이의 수단의 수 및 그 수단의 표준 에러를 보인다. 보여진 바와 같이, 제 1 종양이 존재하는 마우스들의 그룹은 전이를 보이지 않는다. 1차 종양이 절제되고 살린으로 처리된 마우스들은 광범위한 전이를 보인다. 사람 유도된 플라스미노겐 단편으로 처리된 마우스들은 전이를 보이지 않는다. 전체 플라스미노겐으로 처리된 마우스들은 전체 플라스미노겐 분자가 내피 억제 활성을 갖지 않음을 지시하는 넓은 전이를 보인다. 종양을 가진 마우스로부터 투석되고 농축된 뇨로 처리된 그러한 마우스들은 전이를 보이지 않는다. 정상마우스의 농축된 뇨로 처리된 마우스들은 넓은 전이를 보인다. 폐의 중량을 측정할때, 유사한 결과가 얻어진다(도 9).

<241>

실시에 18

<242>

쥐 및 사람 엔지오스타틴의 아미노산 서열

<243>

마우스 뇨로부터 분리된 엔지오스타틴 및 사람 라이신 결합 위치 I 단편 조제물로부터 분리된 엔지오스타틴의 아미노산 서열을 Applied Biosystem Model 477A 단백질 시퀀서에서 측정한다. 페닐티오하이 단도인 아미노산 단편을 온-라인 ABI Model 120A HPLC로 확인한다. 쥐 및 사람 엔지오스타틴의 N-말단 서열법 및 트립톤 소화법으로부터 측정된 아미노산 서열은 엔지오스타틴의 서열이 쥐 플라스미노겐의 아미노산 98번에서 시작하는 서열과 유사함을 나타낸다. 따라서, 엔지오스타틴의 아미노산 서열은 환원 폴리 아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 측정될때 약 38 킬로달톤 내지 45 킬로달톤의 분자량을 갖고, 손상되지 않은 쥐 플라스미노겐 분자의 아미노산 98번에서 시작하는 쥐 플라스미노겐 단편의 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질로 이루어지는 분자이다. 쥐 엔지오스타틴의 개시 아미노산 서열(서열 동정 번호:2)을 도 1에 도시한다. 아미노산 서열의 길이는 도 1에 도시된 것보다 약간 길거나 짧을 수 있다.

<244>

사람 라이신 결합 위치 I의 활성 분획의 N 말단 아미노산 분석법 및 트립톤 소화법(실시에 15 참고)은 분획의 서열이 사람 플라스미노겐의 아미노산 약 97 내지 99번에서 시작하고, 사람 엔지오스타틴은 쥐 엔지오스타틴과 동일하다는 것을 보여준다. 사람 엔지오스타틴의 개시 아미노산 서열(아미노산 98번에서 시작하는)을 도 2에 도시한다(서열 동정 번호:3). 도 2에서, 쥐 및 사람 엔지오스타틴의 아미노산 서열을 돼지, 소 및 붉은털 원숭이 플라스미노겐(이들 중에서 엔지오스타틴의 존재를 나타내는)을 포함하는 다른 종의 플라스미노겐으로부터의 상응하는 내부 아미노산 서열과 비교한다.

<245>

실시에 19

<246>

이. 콜리에서 사람 엔지오스타틴의 발현

<247>

이. 콜리에서 결핵세포 유전자의 강화된 해독 효율을 위한 trc 프로모터로부터 높은-레벨의 조절된 전사를 획득하기위해 pTrcHisA 벡터(인비트로겐)(도 10)를 사용한다. 엔지오스타틴은 금속 친화성 수지를 사용하는 1-단계 정제를 위한 N-말단 니켈-결합 폴리-히스티딘 미부에 융합되어 발현된다. 융합 펩티드내 엔테로키나제 절단 인식 위치는 정제된 재조합 단백질로부터 N-말단 히스티딘 융합 펩티드의 후속적인 제거를 허용한다. 재조합 사람 엔지오스타틴 단백질이 라이신과 결합하여 발견되고; 크링글부 1, 2 및 3에 대해 특이적인 모노클론 항체와 교차-반응성이며, 시험관내에서의 bFGF-유도된 내피 세포의 분화를 저해한다.

<248>

삼입물을 제작하기 위해, 사람 엔지오스타틴을 코딩하는 유전자 단편을 사람의 간 mRNA로부터 획득하여, 역전사하여 증폭효소 연쇄 반응(PCR) 및 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭한다. 1131개의 염기쌍의 생성물이 사람 플라스미노겐의 아미노산 93 내지 470번을 코딩한다. 증폭된 단편을 pTrcHisA의 XhoI/KpnI 위치로 클로닝하고, 생성된 구성물을 XL-1B(Stratagene)로부터 구입가능) 이. 콜리 숙주 세포로 형질전환한다. 플라스미드 벡터 pTrcHisA 만을 포함하는 대조 클론을 또한 XL-1B 이. 콜리 숙주 세포 내로 형질전환한다. 이 클론은 벡터 대조 클론으로 지칭된다. 두 클론을 하기에 설명된 것처럼 동일하게

정제한다.

<249> 발현 콜로니를 하기의 방식으로 선택한다. 엔지오스타틴을 코딩하는 유전자와 함께 형질전환된 이. 콜리의 콜로니 리프트를 IPTG 주입된 니트로셀룰로즈 필터상에서 배양하여, LB 아가 평판에 올려 놓는다. 발현의 IPTG 도입 후에, 콜로니를 니트로셀룰로즈 필터상에서 용해시킨다. 니트로셀룰로즈 리프트를 블로킹하고, 세척한 다음, 엔지오스타틴의 특이적 형상을 인지하는 2개의 개별적인 모노클론 항체 (mAbs Dcd 및 Vap; University of Notre Dame의 S.G. McCance 및 F.J. Castellino 제공)로 탐지한다. mAbs에 의해 인식된 강하게 발현하는 콜로니를 선택한다.

<250> 최대의 발현을 위한 최적 시가를 확인하기 위해, IPTG 도입 전후의 여러 시간에 세포를 수집하여, 반복된 냉동-해동 사이클에 노출한 다음, SDS-PAGE에 의한 분석, 면역블로팅 및 mAbs Dcd 및 Vap으로의 탐지를 수행한다.

<251> 이들 중에, 클론 pTrcHisA/HAsH4를 선택한다. IPTG 도입은 4시간 동안하고, 그후 세포 펠릿을 수집하여 50mM Tris pH 8.0, 2mM EDTA, 5% 글리세롤 및 200mg/ml 라이소자임 내에 재현탁하고, 4°C에서 30분 동안 교반한다. 슬러리를 14,000rpm에서 25분 동안 원심분리하고, 펠릿을 50mM Tris pH 8.0, 2mM EDTA, 5% 글리세롤 및 0.1% DCC 내에 재현탁한다. 이 현탁액을 4°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 14,000rpm에서 25분 동안 원심분리한다. 이 단계에서 상등액 분편은 발현된 엔지오스타틴을 포함한다. 이. 콜리 발현된 사람 엔지오스타틴이 천연 엔지오스타틴의 물리적 특성, 즉 라이신에 결합하는 능력을 갖는 것으로 발견되었다. 따라서, 이. 콜리 발현된 엔지오스타틴을 라이신-세파로즈(Pharmacia 또는 Sigma) 컬럼 상에서 단일 단계로 정제한다. 컬럼으로부터의 엔지오스타틴의 분취액을 0.2M ε-아미노-n-카프로익산 pH 7.5에 넣는다.

<252> 이들 실험에 후속하여, 클론 pTrcHisA/HAsH4의 스케일-업 10ℓ 발효 배치를 수행한다. 이러한 스케일-업 도입으로부터 수득된 세포를 펠릿화하고, 50mM Tris pH 7.5에 재현탁하고, 통과사이에 10°C에서 3회 냉각하며 10,000psi 에서 열분해한다. 획득된 라이세이트를 10,000rpm에서 4°C에서 30분 동안 원심분리하여 분류하고, 발현된 엔지오스타틴을 라이신-세파로즈 상에서 분리한다(도 11).

<253> 정제된 이. 콜리 발현된 사람 엔지오스타틴을 물에 대하여 완전하게 투석하고, 동결건조한다. 발현된 사람 엔지오스타틴을 매질(DMEM, 5% BCS, 1% 겐타마이신/페니실린/스트렙토마이신)에 재현탁하여 3 μg/ml의 예상 농도로 하고, 실시예 8, 39페이지에 설명된 것처럼 시험관내 소 모세관 내피(BCE) 세포 분석에서 사용한다. 유사하게, 백터만을 포함하는 대조 클론을 클론 pTrcHisA/HAsH4에서와 동일한 방식으로 처리한다. 동일하게 IPTG로 도입하고, 박테리아 라이세이트를 라이신에 결합하기 위해 사용하고, 0.2M 아미노 카프로익산으로 추출하고, 완전하게 투석한 다음 동결건조한다. 이러한 대조 조제품을 매질내에 재현탁하여 또한 3 μg/ml의 예상 농도로 한다. 재조합 엔지오스타틴의 샘플 및 대조물을 상이한 도입 및 발효 배치 뿐만 아니라, 분리된 정제 실행으로부터 획득하고, 이들을 모두 EntreMed, Maryland에서 코딩한다. Children's Hospital, Boston에서 맹검 방식으로 이러한 코딩된 샘플로 BCE 분석을 실행한다.

<254> 재조합 사람 엔지오스타틴의 BCE 분석의 결과는 이. 콜리에서 발현된 사람 엔지오스타틴이 bFGF(1ng/ml로 사용됨)로 인해 BCE 세포의 증식을 저해하는 것을 보여준다(도 12). 매질내 원료 재조합 엔지오스타틴(약 3 μg/ml)을 1:5, 1:10 및 1:20 희석액으로 사용한다. 저해%를 하기와 같이 계산한다 :

$$I = \frac{\text{엔지오스타틴을 갖는 세포 수} - 0일에서 세포 수}{\text{bFGF만을 갖는 세포 수} - 0일에서 세포 수}$$

<256> BCE 세포 증식의 저해 %는 유사한 농도에서 플라스미노겐 유도된 엔지오스타틴의 결과와 상응하거나 더 높다. BCE 분석의 반복 실행의 결과를 도 13에 도시하며, 원료의 1:5 희석액에서, 재조합 엔지오스타틴은 플라스미노겐 유도된 엔지오스타틴으로 획득된 것과 유사한 저해 %를 제공한다. 도 13은 사람 재조합 엔지오스타틴 단백질이 배양액에서 60% 이상 및 75% 이상까지 BCE 증식을 저해하는 놀라운 결과를 보여준다.

<257> **실시예 20**

<258> **엔지오스타틴은 아포토시스(apoptosis)의 속도를 증가시킴으로써 마이크로전이의 정지를 유지한다.**

<259> Lewis 폐암 세포(1×10^6)로 C57 BL6/J 마우스에 피하 접종한 후에, 약 1.5cm³의 1차 종양이 전개되었다. 동물을 1차 종양을 수술적으로 제거하거나 모의 수술한다. 수술 5, 10 및 15일 후에, 마우스를 죽이고, 그의 폐를 조직학적 검사를 위해 준비한다. 절제된 1차 종양을 갖는 동물은 모의 조작된 대조군에 비하여 마이크로전이의 질량적 증식을 보였다(도 14). 이러한 변화는 폐 중량에서 상당한 증가를 동반한다.

<260> 브로모-데옥시유리딘(BrdU)의 업테이크에 의해 측정되는 종양 세포 증식의 분석은 손상되지 않은 1차 종양을 갖는 동물 또는 절제된 종양을 갖는 동물 간에 제 5, 9 및 13일에서 차이가 없음을 보여주고, 종양 질량에서의 증가가 증가된 증식에 의해 설명되지 않는다는 것을 나타낸다(도 15). 따라서, 이들 동물에서 세포 사멸을 실험한다. 유전자 발현에서의 변화에 의존하고, 진화 동안 및 소장과 같이 빠르게 증식하는 조직에서의 세포의 제거를 설명하는 아포토시스(apoptosis), 즉 세포 사멸의 과정을 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제(TdT) 기술과 함께 면역조직화학적인 라벨링 분편된 DNA에 의해 검사한다. 아포토시스 지수는 희생의 각각의 시간에서 측정한다. 1차 종양의 제거는 검사된 모든 시간에서의 아포토시스 지수에서 통계학적으로 유의한 증가(약 3 내지 4 배)를 일으킨다(도 15).

<261> 제거된 1차 종양을 갖는 마우스를 맥관형성의 외인성 억제 유전자(suppressor)로 처리함으로써 지지 증거를 얻는다. 이 물질, TNP-1470 (O-클로로아세틸카바모일 푸마길롤, 앞서 지칭된 AGM-1470)은 기록된 항-맥관형성 활성을 갖는 푸마길린의 동족체이다. TNP-1470의 피하 주입(2일 마다 30mg/kg)은 손상되지 않은 1차 종양을 갖는 동물에 대해 진술된 것과 매우 유사한 결과를 생성한다. 이들 동물은 살린-주

입 대조군에 비해 더 낮은 폐 중량, 동등한 증식 지수 및 증가된 아픏토시스 지수를 보인다(도 16).

<262> 이들 데이타는 종양 세포 증식이 세포 사멸과 동일한 속도에 의해 균형을 이룰때, 전이가 휴지상태로 유지됨을 나타낸다. 1차 종양의 제거는, 아마도 종양세포에서 아픏토시스를 증가시킴으로써 전이 성장을 제어하는 맥관형성 억제제(앤지오스타틴)의 제거로 인해, 전이의 성장에서 급속한 증가를 일으킨다. 이러한 효과는 1차 종양의 제거 및 맥관형성의 외인성 억제제의 투여에서 보여지는 효과와 유사하다. 함께 취하면, 이들 데이타는 1차 종양이 마이크로전이의 휴지상태를 유지하는 앤지오스타틴을 방출하는 것을 제시한다.

<263> **실시에 21**

<264> **생체내에서의 1차 종양의 앤지오스타틴 처리.**

<265> 실시예 15에 설명된 것처럼, 앤지오스타틴을 제한 엘라스타제(elastase) 소화에 의해 사람 플라스미노겐으로부터 정제한다. 앤지오스타틴을 인산-완충된 살린에 재현탁하여 6주 연령의 수컷 C57B16/J 마우스에 투여한다. 동물에 Lewis 폐암 또는 T241 섬유육종의 1×10^6 개의 종양 세포를 피하 이식한다. 앤지오스타틴 처리는 종양이 80-160mm³ 크기가 된 4일 후에 시작한다. 마우스에 복강내(ip) 또는 피하(sc) 경로를 통해 40mg/kg의 단일 주입 또는 2회의 80mg/kg로 앤지오스타틴 주입을 투여한다. 19일까지 연장한 처리 이후에 여러 시간에서 동물을 희생시킨다.

<266> 매일 40mg/kg ip의 양으로 투여된 앤지오스타틴은 T241 1차 종양의 성장의 매우 심각한 저해를 일으킨다(도 17). 성장에서의 이러한 저해 효과는 2일 이내에 시각적으로 분명하고, 연구의 시간 경과를 걸쳐 크기에서 증가한다. 제 18일에, 앤지오스타틴-처리 마우스는 살린 주입된 대조군의 약 38% 체적의 종양을 갖는다. 이러한 차이는 통계학적으로 유의하다 ($p < 0.001$, Student t-test).

<267> 앤지오스타틴 처리 (총 투여량 80mg/kg/일, 하루 2회 40mg/kg ip 또는 sc로 투여)는 또한 LLC-LM 1차 종양의 성장 속도를 심각하게 감소시킨다(도 17). 이러한 저해 효과는 제 4일에 분명하고, 시험되는 모든 후속 시간에 크기에서 증가한다. 실험의 마지막 날에(제 19일), 앤지오스타틴-처리 마우스는 살린-주입 대조군의 단지 20%의 평균 종양 체적을 가지며, 이것은 유의한 차이이다 ($p < 0.001$ Student t-test).

<268> 다른 계열의 시험에서 앤지오스타틴을 T241 섬유육종, Lewis 폐암(LM) 또는 망상 세포 육종 세포가 이식된 마우스에 투여한다(12시간마다 50mg/kg). 각각의 종양 세포 유형에 대해, 앤지오스타틴을 투여한 마우스는 실질적으로 감소된 종양 크기를 갖는다. 도 19는 T241 섬유육종에 대해, 제 24일에 앤지오스타틴 처리 마우스는 비처리 마우스의 단지 15%의 평균 종양 체적을 갖는다는 것을 나타낸다. 도 20은 Lewis 폐암(LM)에 대해, 제 24일에 앤지오스타틴 처리 마우스는 비처리 마우스의 단지 13%의 평균 종양 체적을 갖는다는 것을 나타낸다. 도 21은 망상세포 육종에 대해, 제 24일에 앤지오스타틴 처리 마우스는 비처리 마우스의 단지 19%의 평균 종양 체적을 갖는다는 것을 나타낸다. 데이타는 각각의 시점에서 4마리의 마우스의 평균을 나타낸다.

<269> 이들 결과는 앤지오스타틴이 생체내 3종의 상이한 1차 종양의 성장의 매우 강력한 억제제임을 설명한다.

<270> **실시에 22**

<271> **생체내 마우스에서 사람 세포-유도된 1차 종양의 앤지오스타틴 처리**

<272> 2종의 사람 종양 세포주, 즉 사람 전립선암 PC-3 및 사람 유방암 MDA-MB에 대한 앤지오스타틴의 효과를 연구한다. 면역결핍 SCID 마우스에 사람 종양 세포를 이식하고, 마우스를 본질적으로 실시예 21에 설명된 것처럼 12시간 마다 앤지오스타틴 50mg/kg로 처리한다. 결과는 본 발명의 앤지오스타틴 단백질이 사람 종양 세포 성장의 강한 억제제임을 설명한다. 도 22는 사람 전립선암 PC-3에 대해, 제 24일에 앤지오스타틴 처리 마우스는 비처리 대조 마우스에 비해 단지 2%의 평균 종양 체적을 갖는다는 것을 보인다. 도 23은 사람 유방암 MDA-MB에 대해, 제 24일에 앤지오스타틴 처리 마우스는 비처리 대조 마우스에 비해 단지 8%의 평균 종양 체적을 갖는다는 것을 보인다.

<273> **실시에 23**

<274> **유전자 치료법 - 종양 체적에 대한 앤지오스타틴 유전자 형질감염의 효과**

<275> 마우스 플라스미노겐 아미노산 1 내지 460번을 코딩하는 마우스 플라스미노겐 cDNA (American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입함)로부터 유도된 앤지오스타틴에 대한 1380개의 염기쌍 DNA 서열을 PCR을 사용하여 제조하고, 발현 벡터내로 삽입한다. 발현 벡터를 T241 섬유육종 세포로 형질감염시켜, 형질감염된 세포를 마우스로 이식한다. 대조 마우스에 비-형질감염된 T241 세포 또는 벡터 만으로 형질감염된 T241 세포(즉, 비-앤지오스타틴 발현하는 형질감염된 세포)를 이식한다. 3종의 앤지오스타틴-발현하는 형질감염된 세포 클론을 실험에 사용한다. 시간에 걸쳐 평균 종양 체적을 측정한다. 결과는 비-형질감염된 및 비-발현하는 대조 세포에 비해 앤지오스타틴-발현하는 세포 클론에 대해 마우스내에서 평균 종양 체적에서 놀랍고 극적인 감소를 보인다.

<276> 마우스 앤지오스타틴 단백질을 코딩하는 마우스 DNA 서열을 마우스 플라스미노겐 cDNA로부터 유도한다. 마우스 앤지오스타틴은 마우스 플라스미노겐 크리글 1-4부분을 포함한다. 이러한 클론의 제작의 개략도를 도 24에 도시한다.

<277> 마우스 앤지오스타틴 단백질 클론을 LIPOFECTIN™형질감염 시스템(Life Technologies, Gaithersburg, MD로부터 구입가능)을 사용하여 T241 섬유육종 세포내로 형질감염시킨다. LIPOFECTIN™시액은 막 여과된 물내 양이온성 지질 N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-n,n,n-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA) 및 디올레코일 포스포티딜에탄올아민(DOPE)의 1:1(w/w) 리포좀 조성물이다.

<278> 세포의 일시적인 형질감염 절차는 하기와 같다 :

- <279> 1. T241 세포를 60cm² 조직 배양 접시에서 배양하고, 혈청을 보충한 적절한 성장 배지의 2ml내에 약 1 내지 2×10⁵개의 세포를 접종한다.
- <280> 2. 세포가 40 내지 70% 융합할 때까지(일반적으로 18 내지 24시간이 소요되지만, 시간은 세포 유형에 따라 다양하다), CO₂ 배양기내 37°C에서 세포를 배양한다. T241 종양 세포 융합도는 약 70%이다.
- <281> 3. 12×75mm 멸균관 내에 하기의 용액을 제조한다 :
- <282> 용액 A : 각각의 형질감염에 대해, DNA 5μg을 100μl의 혈청이 없는 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies로부터 구입가능)내에 희석하다(조직 배양 등급의 탈이온수도 또한 사용될 수 있다).
- <283> 용액 B : 각각의 형질감염에 대해, LIPOFECTIN 30μg을 100μl의 OPTI-MEM 배지내에 희석한다.
- <284> 4. 두 용액을 합하고, 부드럽게 혼합하여, 실온에서 10 내지 15분 동안 배양한다.
- <285> 5. 세포를 혈청이 없는 배지로 2회 세척한다.
- <286> 6. 각각의 형질감염에 대해, LIPOFECTIN™ 시액-DNA 복합물을 함유하는 각각의 관에 0.8ml의 혈청이 없는 배지를 가한다. 부드럽게 혼합하고 복합물을 세포 상으로 붓는다.
- <287> 7. CO₂ 배양기내 37°C에서 약 12시간 동안 세포를 배양한다.
- <288> 8. DNA 함유 배지를 혈청을 함유하는 1mg/ml 선택 배지로 교체하고, CO₂ 배양기내 37°C에서 총 48 내지 72시간 동안 세포를 배양한다.
- <289> 9. 세포 추출물을 형질감염 후 48 내지 72 시간에 유전자 활성화에 대해 분석한다.
- <290> 형질감염된 세포를 엔지오스타틴-특이성 항체를 사용하여 엔지오스타틴 단백질의 발현에 대하여 분석할 수 있다. 대안적으로, 약 10 내지 14일 후에, G418 내성 콜로니가 CMV-엔지오스타틴 형질감염된 T241 세포 내에서 나타난다. 또한, 벡터 자체만으로 형질감염된 클론내에서는 많은 클론을 볼 수 있지만, 비형질감염된 클론에서는 볼 수 없다. 면역형광법을 사용하여 엔지오스타틴의 발현에 대하여 G418 내성 클론을 선택한다.
- <291> 흥미롭게, 도 25 및 도 26에 도시된 것처럼 엔지오스타틴으로 형질감염된 시험관내 세포 성장 T241 세포 및 Lewis 폐 세포는 저해되지 않거나 그렇지 않으면 부작용을 받는다.
- <292> 도 27은 형질감염 실험의 결과를 나타낸다. 3종의 엔지오스타틴-발현하는 T241 형질감염된 클론 모두는 대조 마우스내 종양 체적에 비해 실질적으로 감소된 마우스내 평균 종양 체적을 생성한다. 클론 37이 이식된 마우스의 평균 종양 체적은 대조군의 단지 13%인 반면, 클론 31 및 클론 25 종양 체적은 각각 대조군 종양 체적의 단지 21% 및 34%이다. 이들 결과는 엔지오스타틴을 코딩하는 DNA 서열을 세포내로 형질감염시킬 수 있고, 형질감염된 DNA 서열은 이식된 세포에 의해 엔지오스타틴 단백질을 발현할 수 있고, 생체내 발현된 엔지오스타틴 기능은 종양 성장을 감소시키는 것임을 설명한다.
- <293> **실시에 24**
- <294> **엔지오스타틴 발현의 생체내 위치의 위치 측정**
- <295> 엔지오스타틴 단백질의 발현의 생체내 위치의 위치 측정을 위해, 다양한 세포 유형, Lewis 폐암 세포(마우스), T241 섬유육종(마우스) 및 Burkitt's 림포마 세포(사람)으로부터의 총 RNA(순수 종양으로부터의 또는 몇몇의 경과 후의 세포 배양으로부터의 둘 모두)을 엔지오스타틴 전사의 존재를 측정하기 위해 분석한다. 샘플의 Northern 분석은, 마우스 플라스미노겐에 상응하는 약 2.4kb의 단일 신호를 보이는 정상 마우스의 간 RNA의 것을 제외하고는 모든 샘플로부터의 서열과 하이브리드화하는 임의의 신호의 부재를 나타낸다. 사람 샘플의 Northern 분석은, 사람 플라스미노겐에 상응하는 약 2.4kb의 단일 신호를 보이는 정상 사람의 간 RNA의 것을 제외하고는 모든 샘플로부터의 사람 엔지오스타틴 서열과 하이브리드화하는 임의의 신호의 부재를 나타낸다.
- <296> 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR) 분석은 정상 마우스의 간의 것을 제외하고는 마우스 엔지오스타틴 서열로 탐지된 모든 샘플로부터 임의의 생성물의 부재를 나타낸다. RT-PCR 분석은 정상 사람 간의 것을 제외하고는 사람 엔지오스타틴 서열로 탐지된 모든 사람 샘플로부터 임의의 생성물의 부재를 나타낸다(마우스에 대하여 1050 bp 및 사람에게 대하여 1134 bp의 기대 크기).
- <297> 따라서, 마우스 엔지오스타틴 전사(마우스 플라스미노겐의 아미노산 97 내지 450번과 동일한 것으로 가정하면)는 모든 마우스 샘플에 의해 생성되지 않으며, 사람 엔지오스타틴 전사(사람 플라스미노겐 아미노산 93 내지 470번과 동일한 것으로 가정하면)는 사람 샘플에 의해 생성되지 않는다. 정상 마우스/사람의 간으로부터 획득된 포지티브 신호는 플라스미노겐과의 하이브리드화로 부터이다.
- <298> **실시에 25**
- <299> **효모에서의 엔지오스타틴의 발현**
- <300> 사람 플라스미노겐의 아미노산 93 내지 470번을 코딩하는 유전자 단편을, 효모 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 내에서 PH01 분비 신호를 사용하는 단백질의 분비된 발현을 허용하는 pHIL-SI(인비트로겐)의 XhoI/EcoRI 위치 내로 클로닝한다. 유사하게, 사람 플라스미노겐의 아미노산 93 내지 470을 코딩하는 유전자 단편을 효모 피치아 파스토리스 내에서 α-팩터 분비 신호를 사용하는 단백질의 분비된 발현을 허용하는 pPIC9(인비트로겐)의 SnaBI/EcoRI 위치 내로 클로닝한다. 이러한 시스템내 발현된 사람 엔지오스타틴 단백질은 단백질 프로세싱, 단백질 폴딩 및 글리코실화를 포함하는 후전사 수식과 같은 이. 콜리에서 발현된 것 이상의 많은 이점을 가질 것이다.

<301> 피치아 파스토리스 내의 유전자의 발현은 : Sreekrishna, K 등(1988), 메틸로트로픽 효모 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)내 이중 단백질의 높은 레벨의 발현. J. Basic Microbiol. 29 (4) : 265-278 및 Clare, J.J. 등(1991), 효모내의 외피 성장 인자의 생산 : 많은 유전자 카피를 함유하는 피치아 파스토리스 균주를 사용하는 높은-레벨의 분비, Gene 105 : 205-212(둘 모두 본원에 참고로서 인용한다)에 기술된다.

<302> **실시예 26**

<303> **트랜스제닉 동물 및 식물에서의 엔지오스타틴 단백질의 발현**

<304> 엔지오스타틴 유전자 전사를 발현하는, 소 또는 돼지 과에서와 같은 트랜스제닉 동물을 만든다. 트랜스제닉 동물은 예를 들어, 이러한 동물의 유액내에 엔지오스타틴 단백질을 발현한다. 부가적으로, 엔지오스타틴 유전자 전사를 발현하는 식용 트랜스제닉 식물을 제조한다.

<305> 외부 DNA를 발현하는 트랜스제닉 동물을 제조하는 것은 본원에 참고로 인용된 Smith H. Phytochrome transgenics : 기능적, 경제적 및 생물 공학적 적용, Semin. Cell. Biol. 1994 5(5) :315-325에 설명되어 있다.

<306> 하기는 본 발명의 바람직한 구체예에만 관련되고, 첨부된 청구범위에 설명된 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 많은 변경 또는 대안이 만들어질 수 있음을 이해해야 한다.

<307> **서열 리스팅**

- <308> (1) 일반적인 정보 :
- <309> (i) 출원인 : 더 칠드런스 메디컬 센터 코포레이션
- <310> (ii) 발명의 명칭 : 엔지오스타틴 및 이의 사용 방법
- <311> (iii) 서열의 수 : 6
- <312> (iv) 통신 주소 :
- <313> (A) 수신인 : 존스 & 에스큐
- <314> (B) 거리 : 191 피치트리 스트리트, 제 37 플로어
- <315> (C) 시 : 애틀란타
- <316> (D) 주 : 조지아
- <317> (E) 국가 : 미국
- <318> (F) 우편번호 : 30303-1769
- <319> (v) 컴퓨터 판독 형식 :
- <320> (A) 매체 유형 : 플로피 디스크
- <321> (B) 컴퓨터 : IBM PC 호환성
- <322> (C) 운영 체제 : PC-DOS/MS-DOS
- <323> (D) 소프트웨어 : Patent In Release #1.0, 버전 #1.30
- <324> (vi) 최근 출원 데이터 :
- <325> (A) 출원번호 : US
- <326> (B) 출원일 :
- <327> (C) 분류:
- <328> (vii) 우선권 출원 데이터 :
- <329> (A) 출원번호 : US 08/248,629
- <330> (B) 출원일 : 26-4-1994
- <331> (vii) 우선권 출원 데이터 :
- <332> (A) 출원번호 : US 08/326,785
- <333> (B) 출원일 : 20-10-1994
- <334> (viii) 대리인/회사 정보
- <335> (A) 명칭 : 존슨, 제임스 디.
- <336> (B) 등록 번호 : 31,771
- <337> (C) 참고/보관 번호 : 05213-0122
- <338> (ix) 전자통신 정보 :
- <339> (A) 전화 : 404-818-3700

- <340> (B) 팩스 : 404-818-3799
- <341> (2) 서열 동정 번호: 1에 대한 정보 :
- <342> (i) 서열 특성 :
- <343> (A) 길이 : 812 아미노산
- <344> (B) 유형 : 아미노산
- <345> (C) 스트랜드 :
- <346> (D) 형태 : 선형
- <347> (ii) 분자 유형 : 단백질
- <348> (iii) 가정 : 없음
- <349> (iv) 기원 :
- <350> (A) 유기체 : 쥐
- <351> (v) 서열 정의 : 서열 동정 번호: 1 :

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

Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe
 210 215 220
 Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu
 355 360 365
 Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400
 Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe
 405 410 415
 Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
 420 425 430
 Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445
 Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu
 450 455 460

Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
 465 470 475 480
 Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
 485 490 495
 Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510
 His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys
 515 520 525
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
 545 550 555 560
 Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
 565 570 575
 Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
 580 585 590
 Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe
 595 600 605
 Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His
 610 615 620
 Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
 625 630 635 640
 Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val
 645 650 655
 Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys
 660 665 670
 Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu
 675 680 685
 Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr
 690 695 700
 Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
 705 710 715 720
 Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr
 725 730 735
 Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala
 740 745 750
 Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 755 760 765
 Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
 770 775 780
 Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg
 785 790 795 800
 Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn
 805 810

<356>

(3) 서열 동정 번호: 2에 대한 정보 :

<357>

(i) 서열 특성 :

<358>

(A) 길이 : 339 아미노산

<359>

(B) 유형 : 아미노산

- <360> (C) 스트랜드 :
- <361> (D) 형태 : 선형
- <362> (ii) 분자 유형 : 단백질
- <363> (iii) 가정 : 없음
- <364> (iv) 기원 :
- <365> (A) 유기체 : 쥐
- <366> (v) 서열 정의 : 서열 동정 번호: 2 :

```

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly
1          5          10          15
Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala
          20          25          30
Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu
          35          40          45
Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln Gly
          50          55          60
Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn
65          70          75          80
Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr
          85          90          95
Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp
          100          105          110
Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro
          115          120          125
Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro
          130          135          140
Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys
145          150          155          160
Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr
          165          170          175
Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val
          180          185          190
Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
          195          200          205
Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
          210          215          220
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
225          230          235          240
Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu
          245          250          255
Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu Glu
          260          265          270
Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr
          275          280          285
Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
          290          295          300
Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
305          310          315          320
Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys
          325          330          335
Gly Pro Trp

```

- <368> (4) 서열 동정 번호: 3에 대한 정보 :
- <369> (i) 서열 특성 :
- <370> (A) 길이 : 339 아미노산
- <371> (B) 유형 : 아미노산
- <372> (C) 스트랜드 :
- <373> (D) 형태 : 선형
- <374> (ii) 분자 유형 : 단백질
- <375> (iii) 가정 : 없음
- <376> (iv) 기원 :
- <377> (A) 유기체 : 호모 사피엔스
- <378> (v) 서열 정의 : 서열 동정 번호: 3 :

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
 20 25 30
 Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly
 50 55 60
 Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
 65 70 75 80
 Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
 85 90 95
 Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
 115 120 125
 Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu
 130 135 140
 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys
 145 150 155 160
 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
 165 170 175
 Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val
 180 185 190
 Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His
 195 200 205
 Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu
 210 215 220
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr
 225 230 235 240
 Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp
 245 250 255
 Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu
 260 265 270
 Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
 275 280 285
 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335

Gly Pro Trp

<381> (5) 서열 동정 번호: 4에 대한 정보 :

<382> (i) 서열 특성 :

<383> (A) 길이 : 339 아미노산

<384> (B) 유형 : 아미노산

- <385> (C) 스트랜드 :
- <386> (D) 형태 : 선형
- <387> (ii) 분자 유형 : 단백질
- <388> (iii) 가정 : 없음
- <389> (iv) 기원 :
- <390> (A) 유기체 : 붉은털 원숭이
- <391> (v) 서열 정의 : 서열 동정 번호: 4 :

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Met Ser Lys Thr Arg Thr Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
 20 25 30
 Thr Ser Pro His Arg Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly
 50 55 60
 Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Glu Arg Phe Asp Tyr Cys Asp
 65 70 75 80
 Ile Pro Glu Cys Glu Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
 85 90 95
 Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
 115 120 125
 Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
 130 135 140
 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys
 145 150 155 160
 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
 165 170 175
 Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val
 180 185 190
 Thr Val Ser Gly His Thr Cys His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro His
 195 200 205
 Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu
 210 215 220
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
 225 230 235 240
 Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Glu
 245 250 255
 Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Pro Leu Asp Pro Thr Ala Pro Pro Glu
 260 265 270
 Leu Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
 275 280 285
 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Glu Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335
 Gly Pro Trp

<394>

(6) 서열 동정 번호: 5에 대한 정보 :

<395>

(i) 서열 특성 :

<396>

(A) 길이 : 339 아미노산

<397>

(B) 유형 : 아미노산

- <398> (C) 스트랜드 :
- <399> (D) 형태 : 선형
- <400> (ii) 분자 유형 : 단백질
- <401> (iii) 가정 : 없음
- <402> (iv) 기원 :
- <403> (A) 유기체 : 돼지
- <404> (v) 서열 정의 : 서열 동정 번호: 5 :

Ile Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Lys Thr Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val
 20 25 30
 Ser Ser Pro His Ile Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala
 35 40^p 45
 Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly
 50 55 60
 Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys Asp
 65 70 75 80
 Ile Pro Glu Cys Glu Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu His Tyr
 85 90 95
 Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp
 100 105 110
 Gly Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro
 115 120 125
 Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
 130 135 140
 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys
 145 150 155 160
 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Thr Ser Gly Pro Thr Tyr
 165 170 175
 Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val
 180 185 190
 Thr Ala Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro His
 195 200 205
 Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
 210 215 220
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
 225 230 235 240
 Thr Asp Ser, Glu Val Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Gly
 245 250 255
 Ser Ser Thr Thr Ser Thr Glu His Leu Asp Ala Pro Val Pro Pro Glu
 260 265 270
 Gln Thr Pro Val Ala Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Glu Ser Tyr
 275 280 285
 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 Val Ser Met Thr Pro His Arg His Glu Lys Thr Pro Gly Asn Phe Pro
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335
 Ser Pro Trp

<407>

(7) 서열 동정 번호: 6에 대한 정보 :

<408>

(i) 서열 특성 :

<409>

(A) 길이 : 339 아미노산

<410>

(B) 유형 : 아미노산

- <411> (C) 스트랜드 :
- <412> (D) 형태 : 선형
- <413> (ii) 분자 유형 : 단백질
- <414> (iii) 가정 : 없음
- <415> (iv) 기원 :
- <416> (A) 유기체 : 소
- <417> (v) 서열 정의 : 서열 동정 번호: 6 :

```

Ile Tyr Leu Leu Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly
1          5          10          15
Thr Thr Ala Glu Thr Lys Ser Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala
20          25          30
Thr Ser Pro His Val Pro Lys Phe Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala
35          40          45
Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly
50          55          60
Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
65          70          75          80
Ile Pro Glu Cys Glu Asp Lys Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
85          90          95
Glu Gly Lys Ile Ala Lys Thr Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp
100         105         110
Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
115         120         125
Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
130         135         140
Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys
145         150         155         160
Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Lys Tyr
165         170         175
Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Thr Val Ala Val
180         185         190
Thr Glu Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
195         200         205
Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
210         215         220
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
225         230         235         240
Thr Asn Ser Glu Val Arg Trp Glu Tyr Cys Thr Ile Pro Ser Cys Glu
245         250         255
Ser Ser Pro Leu Ser Thr Glu Arg Met Asp Val Pro Val Pro Pro Glu
260         265         270
Gln Thr Pro Val Pro Gln Asp Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr
275         280         285
Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp
290         295         300
Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Leu Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
305         310         315         320
Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
325         330         335
Ser Pro Trp

```

(57) 청구의 범위**청구항 1**

서열 동정 번호:2, 서열 동정 번호:3, 서열 동정 번호:4, 서열 동정 번호:5 및 서열 동정 번호:6으로 구성된 군으로부터 선택되는 개시 아미노산 서열을 갖는 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정시 38 내지 45 kD의 분자량을 가지고 플라스미노겐 분자의 98번 아미노산에서 개시되는 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질로 이루어진 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 1 내지 4의 아미노산 서열을 가지며 안티-맥관형성 활성을 갖는 단백질로 이루어진 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 사람 플라스미노겐, 쥐 플라스미노겐, 소 플라스미노겐, 붉은털 원숭이(Rhesus) 플라스미노겐 또는 돼지 플라스미노겐의 플라스미노겐 단편인 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 5

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미노겐 단편이 소의 내피 세포 검정에서 시험관 내(*in vitro*) 내피세포 증식 억제 활성을 갖는 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 6

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 암의 성장을 억제할 수 있는 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 암이 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암으로 구성된 그룹으로 선택되는 분리된 엔지오스타틴 단백질.

청구항 8

엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 뉴클레오티드 서열은 서열 동정 번호:2, 서열 동정 번호:3, 서열 동정 번호:4, 서열 동정 번호:5, 및 서열 동정 번호:6으로 구성된 군 중에서 선택된 개시 아미노산 서열을 갖는 분자를 추가로 암호화하는 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정시 38 내지 45 kD의 분자량을 가지며 플라스미노겐 분자의 98번 아미노산에서 개시되는 플라스미노겐 단편의 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 안티-맥관형성 활성을 갖는 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 서열을 갖는 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 안티-맥관형성 활성을 갖는 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 서열을 갖는 분리된 뉴클레오티드 분자를 포함하고, 상기 엔지오스타틴 단백질은 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 1 내지 4를 함유하는 조성물.

청구항 11

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 소의 내피세포 검정에서 시험관 내(*in vitro*) 내피세포 증식 억제 활성을 갖는 조성물.

청구항 12

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 암의 성장을 억제할 수 있는 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 암이 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 14

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 추가로 포함하며, 상기 벡터는 세포 내에 존재할 때 엔지오스타틴 단백질을 발현할 수 있는 조성물.

청구항 15

백터를 세포내로 형질전환하는 것을 포함하는 엔지오스타틴 단백질을 발현하는 방법으로서, 상기 백터는 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 서열을 가진 뉴클레오티드 분자를 포함하며 상기 서열은 서열 동정 번호:2, 서열 동정 번호:3, 서열 동정 번호:4, 서열 동정 번호:5 및 서열 동정 번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 개시 아미노산 서열을 가진 분자를 추가로 암호화하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 백터가 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정시 38 내지 45 kD의 분자량 및 플라스미노겐 분자의 98번 아미노산에서 개시되는 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가지며 안티-맥관형성 활성을 갖는 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 서열을 가진 분리된 뉴클레오티드 분자를 포함하고, 상기 백터는 세포 내에 존재할 때 엔지오스타틴 단백질을 발현할 수 있는 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 백터가 안티-맥관형성 활성을 가지며 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 1 내지 4를 함유하는 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 서열을 갖는 뉴클레오티드 분자를 함유하고, 상기 세포는 엔지오스타틴 단백질을 발현할 수 있는 방법.

청구항 18

청구항 15 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 발현이 시험관내(*in vitro*)에서인 방법.

청구항 19

청구항 15 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 암의 성장을 억제할 수 있는 엔지오스타틴 단백질을 암호화하는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 암이 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암으로 구성된 그룹으로 선택되는 방법.

청구항 21

엔지오스타틴 단백질에 선택적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체로서, 상기 엔지오스타틴 단백질은 서열 동정 번호:2, 서열 동정 번호:3, 서열 동정 번호:4, 서열 동정 번호:5 및 서열 동정 번호:6으로 구성된 군으로부터 선택된 개시 아미노산 서열을 갖는 폴리클로날 항체.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정시 38 내지 45 kD의 분자량 및 플라스미노겐 분자의 98번 아미노산에서 개시되는 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가지며 안티-맥관형성 활성을 갖는 엔지오스타틴 단백질에 선택적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체.

청구항 23

청구항 21에 있어서, 안티-맥관형성 활성을 가진 엔지오스타틴 단백질에 선택적으로 결합할 수 있으며 상기 엔지오스타틴 단백질은 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 1 내지 4를 함유하는 폴리클로날 항체.

청구항 24

청구항 21 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 소의 내피세포 검정에서 시험관내(*in vitro*) 내피세포 증식 억제 활성을 갖는 폴리클로날 항체.

청구항 25

청구항 21 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 암의 성장을 억제할 수 있는 폴리클로날 항체.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 암이 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 폴리클로날 항체.

청구항 27

하기의 단계를 포함하는, 서열 동정 번호:2, 서열 동정 번호:3, 서열 동정 번호:4, 서열 동정 번호:5 및 서열 동정 번호:6으로 구성된 군으로부터 선택되는 개시 아미노산 서열을 갖는 엔지오스타틴을 단백질을 샘플내에서 검출하는 방법:

- a. 엔지오스타틴 단백질을 함유하는 것으로 예상되는 샘플을 엔지오스타틴-특이 결합 항체와 배합하는 단계; 및
- b. 엔지오스타틴 단백질과 항체 사이의 결합의 존재를 검출하여, 상기 샘플 내 엔지오스타틴 단백질을 검출하는 단계.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 안티-맥관형성 활성을 가지며 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정시 38 내지 45 kD의 분자량 및 플라스미노겐 분자량 98번 아미노산에서 개시되는 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 29

청구항 27에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 1 내지 4를 함유하며 안티-맥관형성 활성을 갖는 방법.

청구항 30

청구항 27 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 소의 내피세포 검정에서 시험관내 내피세포 증식 억제 활성을 갖는 방법.

청구항 31

청구항 27 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 사람을 제외한 포유동물의 체액에서 취해지는 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 사람을 제외한 포유동물이 맥관형성에 의해 매개된 질환 또는 상태를 갖는 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 사람을 제외한 포유동물이 암을 갖는 방법.

청구항 34

서열 동정 번호:2, 서열 동정 번호:3, 서열 동정 번호:4, 서열 동정 번호: 5 및 서열 동정 번호:6으로 구성된 군으로부터 선택되는 개시 아미노산 서열을 갖는 엔지오스타틴 단백질의 유효량을 사람을 제외한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 사람을 제외한 포유동물내 맥관형성을 억제하는 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 1 내지 4를 함유하며 안티-맥관형성 활성을 갖는 방법.

청구항 36

청구항 34에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 안티-맥관형성 활성을 가지며 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정시 38 내지 45 kD의 분자량 및 플라스미노겐 분자량 98번 아미노산에서 개시되는 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 37

청구항 34 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 엔지오스타틴 단백질이 소의 내피세포검정에서 내피세포 증식 억제 활성을 갖는 방법.

청구항 38

청구항 34 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 사람을 제외한 포유동물이 맥관형성에 의해 매개된 질환 또는 상태를 갖는 방법.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 사람을 제외한 포유동물이 암을 갖는 방법.

청구항 40

서열 동정 번호:1과 실질적으로 유사한 서열을 가진 플라스미노겐 분자의 크링글 영역 단편을 포함하면, 상기 크링글 영역 단편은 안티-맥관형성 활성을 갖는, 맥관형성 억제용 제약학적 조성물.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 크링글 영역 단편이 크링글 1-5 영역인 제약학적 조성물.

청구항 42

청구항 40에 있어서, 크링글 영역 단편이 쥐 플라스미노겐, 사람 플라스미노겐, 붉은털 원숭이 플라스미노겐, 돼지 플라스미노겐 또는 소 플라스미노겐으로 유래된 제약학적 조성물.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 크링글 영역 단편이 사람 플라스미노겐으로부터 유래된 제약학적 조성물.

청구항 44

청구항 40에 있어서, 크링글 영역 단편이 생체내(*in vivo*) 안티-맥관형성 활성을 갖는 제약학적

조성물.

청구항 45

청구항 40에 있어서, 크링글 영역 단편이 시험관내(*in vitro*) 안티-맥관형성 활성을 갖는 제약학적 조성물.

청구항 46

청구항 40에 있어서, 크링글 영역 단편이 맥관형성-의존성 질병을 억제할 수 있는 제약학적 조성물.

청구항 47

청구항 40에 있어서, 크링글 영역 단편이 종양의 성장을 억제할 수 있는 제약학적 조성물.

청구항 48

청구항 40의 크링글 영역 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 맥관형성 억제용 제약학적 조성물.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 크링글 영역 단편이 크링글 1-5 영역인 제약학적 조성물.

청구항 50

청구항 48에 있어서, 핵산이 쥐 플라스미노겐, 사람 플라스미노겐, 붉은털원숭이 플라스미노겐, 돼지 플라스미노겐 또는 소 플라스미노겐으로부터 유래된 제약학적 조성물.

청구항 51

청구항 48에 있어서, 핵산이 사람 플라스미노겐으로부터 유래된 제약학적 조성물.

청구항 52

청구항 48에 있어서, 크링글 영역 단편이 생체내(*in vivo*) 안티-맥관형성 활성을 갖는 제약학적 조성물.

청구항 53

청구항 48에 있어서, 크링글 영역 단편이 시험관내(*in vitro*) 안티-맥관형성 활성을 갖는 제약학적 조성물.

청구항 54

청구항 48에 있어서, 크링글 영역 단편이 맥관형성-의존성 질병을 억제할 수 있는 제약학적 조성물.

청구항 55

청구항 48에 있어서, 크링글 영역 단편이 종양의 성장을 억제할 수 있는 제약학적 조성물.

청구항 56

청구항 48에 있어서, 숙주 세포 내에 존재할 때 크링글 영역 단편을 발현할 수 있는 벡터를 더 포함하는 제약학적 조성물.

요약

본 발명은 내피 세포 억제제 및 이에 대한 사용 방법을 포함한다. 내피 세포 억제제는 C4-역상 고성능 액체 크로마토그래피로부터 단일 피크로 용출되는, 혈액 또는 뇨로부터 분리된 단백질이다. 내피 세포 억제제는 환원성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 측정하여 분자량이 대략 38 내지 45 kD이고 쥐 플라스미노겐 분자의 98번 아미노산에서 개시되는 쥐 플라스미노겐 단편의 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함하는 분자이다.

도면

도면 1a

마우스 플라스미노젠 서열 :

```

met asp his lys glu val ile leu leu phe leu leu leu leu lys
pro gly gln gly asp ser leu asp gly tyr ile ser thr gln gly
ala ser leu phe ser leu thr lys lys gln leu ala ala gly gly
val ser asp cys leu ala lys cys glu gly glu thr asp phe val
cys arg ser phe gln tyr his ser lys glu gln gln cys val ile
met ala glu asn ser lys thr ser ser ile ile arg met arg asp
val ile leu phe glu lys arg val tyr leu ser glu cys lys thr
gly ile gly asn gly tyr arg gly thr met ser arg thr lys ser
gly val ala cys gln lys trp gly ala thr phe pro his val pro
asn tyr ser pro ser thr his pro asn glu gly leu glu glu asn
tyr cys arg asn pro asp asn asp glu gln gly pro trp cys tyr
thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asn ile pro glu
cys glu glu glu cys met tyr cys ser gly glu lys tyr glu gly
lys ile ser lys thr met ser gly leu asp cys gln ala trp asp
ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro
ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu
pro arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu
tyr cys asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro ser
pro thr tyr gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly
thr val ser val thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser
glu gln thr pro his arg his asn arg thr pro glu asn phe pro
cys lys asn leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp gly glu
thr ala pro trp cys tyr thr thr asp ser gln leu arg trp glu
tyr cys glu ile pro ser cys glu ser ser ala ser pro asp gln
ser asp ser ser val pro pro glu glu gln thr pro val val gln
glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr arg gly thr ser ser
thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp ala ala met phe
pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro asp ala gly
leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys gly pro
trp cys tyr thr thr asp pro ser val arg trp glu tyr cys asn
leu lys arg cys ser glu thr gly gly ser val val glu leu pro
thr val ser gln glu pro ser gly pro ser asp ser glu thr asp
cys met tyr gly asn gly lys asp tyr arg gly lys thr ala val
thr ala ala gly thr pro cys gln gly trp ala ala gln glu pro
his arg his ser ile phe thr pro gln thr asn pro arg ala asp
leu glu lys asn tyr cys arg asn pro asp gly asp val asn gly
pro trp cys tyr thr thr asn pro arg lys leu tyr asp tyr cys
asp ile pro leu cys ala ser ala ser ser phe glu cys gly lys
pro gln val glu pro lys lys cys pro gly arg val val gly gly
cys val ala asn pro his ser trp pro trp gln ile ser leu arg
thr arg phe thr gly gln his phe cys gly gly thr leu ile ala
pro glu trp val leu thr ala ala his cys leu glu lys ser ser
arg pro glu phe tyr lys val ile leu gly ala his glu gln tyr
ile arg gly leu asp val gln glu ile ser val ala lys leu ile
leu glu pro asn asn arg asp ile ala leu leu lys leu ser arg
pro ala thr ile thr asp lys val ile pro ala cys leu pro ser

```

도면 1b

```

pro asn tyr met val ala asp arg thr ile cys tyr ile thr gly
trp gly glu thr gln gly thr phe gly ala gly arg leu lys glu
ala gln leu pro val ile glu asn lys val cys asn arg val glu
tyr leu asn asn arg val lys ser thr glu leu cys ala gly gln
leu ala gly gly val asp ser cys gln gly asp ser gly gly pro
leu val cys phe glu lys asp lys tyr ile leu gln gly val thr
ser trp gly leu gly cys ala arg pro asn lys pro gly val tyr
val arg val ser arg phe val asp trp ile glu arg glu met arg
asn asn

```

도면2a

마우스

사람

붉은털 원숭이

돼지

소

```

val tyr leu ser glu cys lys thr gly ile gly asn gly tyr arg gly
val tyr leu ser glu cys lys thr gly asn gly lys asn tyr arg gly
val tyr leu ser glu cys lys thr gly asn gly lys asn tyr arg gly
ile tyr leu ser glu cys lys thr gly asn gly lys asn tyr arg gly
ile tyr leu leu glu cys lys thr gly asn gly gln thr tyr arg gly

thr met ser arg thr lys ser gly val ala cys gln lys trp gly ala
thr met ser lys thr lys asn gly ile thr cys gln lys trp ser ser
thr met ser lys thr arg thr gly ile thr cys gln lys trp ser ser
thr thr ser lys thr lys ser gly val ile cys gln lys trp ser val
thr thr ala glu thr lys ser gly val thr cys gln lys trp ser ala

thr phe pro his val pro asn tyr ser pro ser thr his pro asn glu
thr ser pro his arg pro arg phe ser pro ala thr his pro ser glu
thr ser pro his arg pro thr phe ser pro ala thr his pro ser glu
ser ser pro his ile pro lys tyr ser pro glu lys phe pro leu ala
thr ser pro his val pro lys phe ser pro glu lys phe pro leu ala

gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp glu gln gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp pro gln gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp gly gln gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp glu lys gly
gly leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp asn asp glu asn gly

pro trp cys tyr thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asn
pro trp cys tyr thr thr asp pro glu lys arg tyr asp tyr cys asp
pro trp cys tyr thr thr asp pro glu glu arg phe asp tyr cys asp
pro trp cys tyr thr thr asp pro glu thr arg phe asp tyr cys asp
pro trp cys tyr thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asp

ile pro glu cys glu glu glu cys met tyr cys ser gly glu lys tyr
ile leu glu cys glu glu glu cys met his cys ser gly glu asn tyr
ile pro glu cys glu asp glu cys met his cys ser gly glu asn tyr
ile pro glu cys glu asp glu cys met his cys ser gly glu his tyr
ile pro glu cys glu asp lys cys met his cys ser gly glu asn tyr

glu gly lys ile ser lys thr met ser gly leu asp cys gln ala trp
asp gly lys ile ser lys thr met ser gly leu glu cys gln ala trp
asp gly lys ile ser lys thr met ser gly leu glu cys gln ala trp
glu gly lys ile ser lys thr met ser gly ile glu cys gln ser trp
glu gly lys ile ala lys thr met ser gly arg asp cys gln ala trp

```

도면2b

asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro
 asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro
 asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro
 gly ser gln ser pro his ala his gly tyr leu pro ser lys phe pro
 asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro

ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu pro
 asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp arg glu leu
 asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro
 asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro
 asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro

arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu tyr cys
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu phe cys
 arg pro trp cys phe thr thr asp pro gln lys arg trp glu phe cys

asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro pro ser pro thr tyr
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro thr ser gly pro thr tyr
 asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro lys tyr

gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val
 gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asn val ala val
 gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asp val ala val
 gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val
 gln cys leu lys gly thr gly lys asn tyr gly gly thr val ala val

thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his
 thr val ser gly his thr cys gln his trp ser ala gln thr pro his
 thr val ser gly his thr cys his gly trp ser ala gln thr pro his
 thr ala ser gly his thr cys gln arg trp ser ala gln ser pro his
 thr glu ser gly his thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his

arg his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu
 thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu
 thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu
 lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu
 lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu

asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr
 asn tyr cys arg asn pro asp gly lys arg ala pro trp cys his thr
 asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr
 asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr
 asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr

도면2c

thr asp ser gln leu arg trp glu tyr cys glu ile pro ser cys glu
 thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys asp
 thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys glu
 thr asp ser glu val arg trp asp tyr cys lys ile pro ser cys gly
 thr asn ser glu val arg trp glu tyr cys thr ile pro ser cys glu

ser ser ala ser pro asp gln ser asp ser ser val pro pro glu glu
 ser ser pro val ser thr glu gln leu ala pro thr ala pro pro glu
 ser ser pro val ser thr glu pro leu asp pro thr ala pro pro glu
 ser ser thr thr ser thr glu his leu asp ala pro val pro pro glu
 ser ser pro leu ser thr glu arg met asp val pro val pro pro glu

gln thr pro val val gln glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr
 leu thr pro val val gln asp cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
 leu thr pro val val gln glu cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
 gln thr pro val ala gln asp cys tyr arg gly asn gly glu ser tyr
 gln thr pro val pro gln asp cys tyr his gly asn gly gln ser tyr

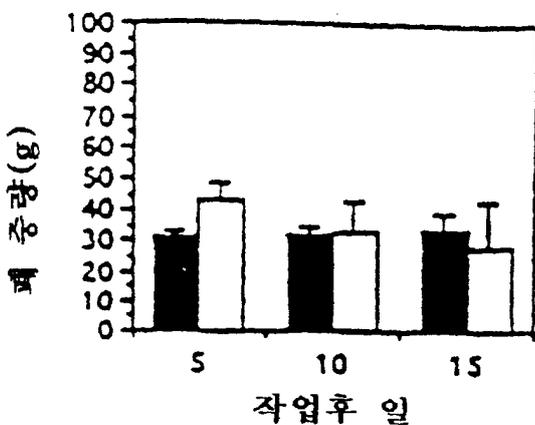
arg gly thr ser ser thr thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp

ala ala met phe pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro
 ser ser met thr pro his arg his gln lys thr pro glu asn tyr pro
 ser ser met thr pro his trp his glu lys thr pro glu asn phe pro
 val ser met thr pro his arg his glu lys thr pro gly asn phe pro
 ser ser met thr pro his arg his leu lys thr pro glu asn tyr pro

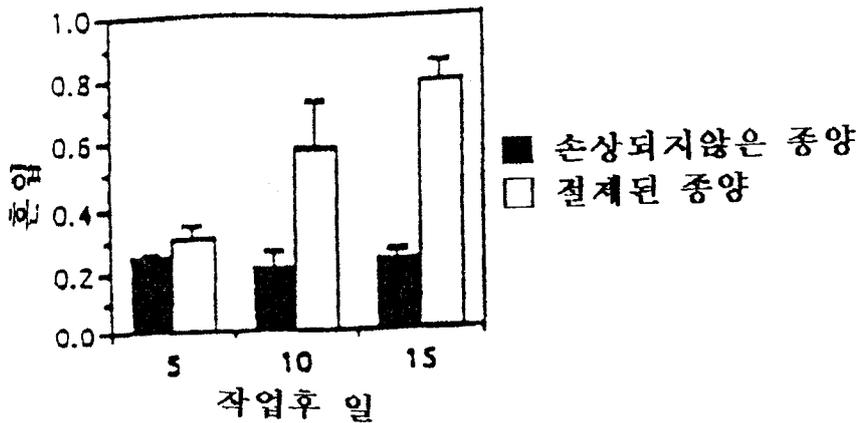
asp ala gly leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys

gly pro trp
 gly pro trp
 gly pro trp
 ser pro trp
 ser pro trp

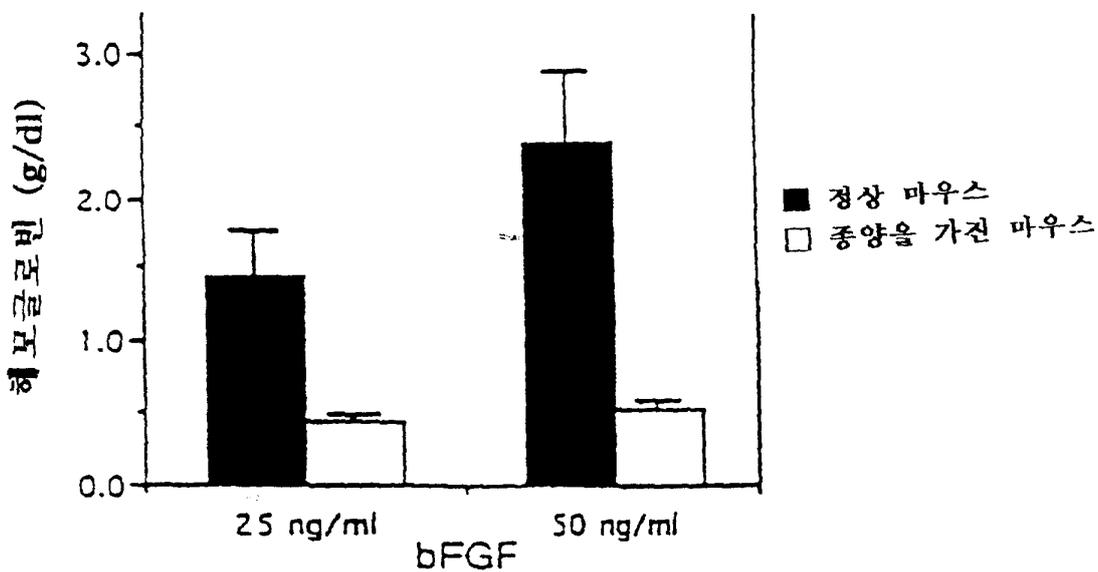
도면3a



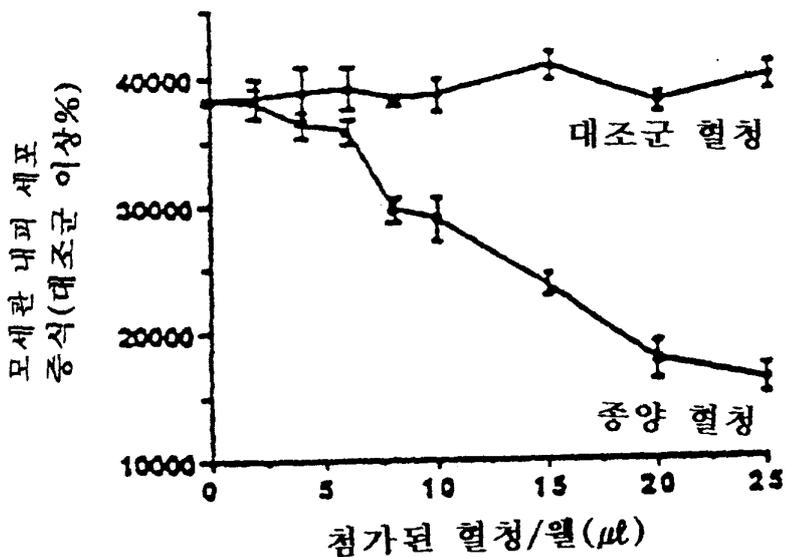
도면3b



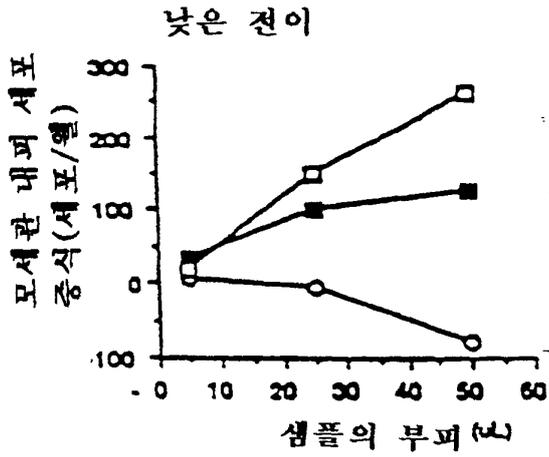
도면4



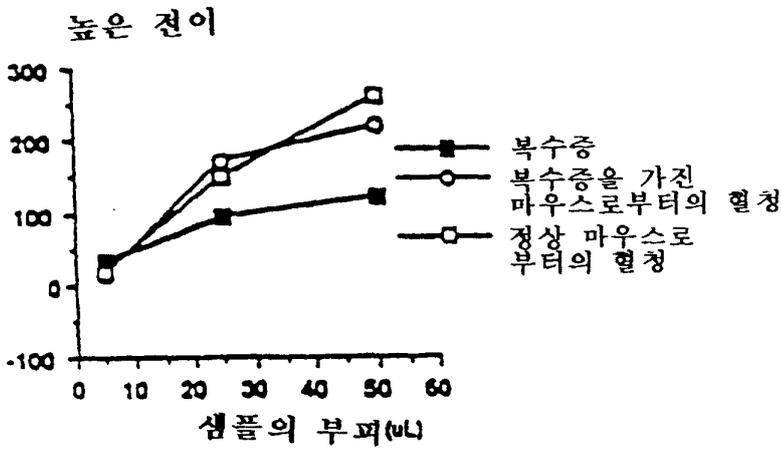
도면5



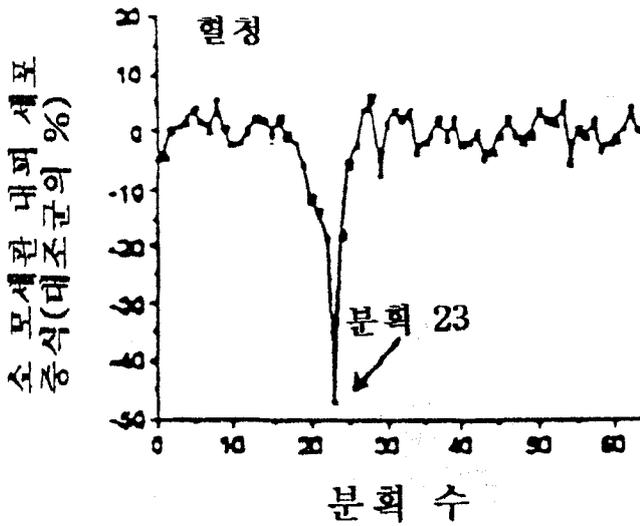
도면6a



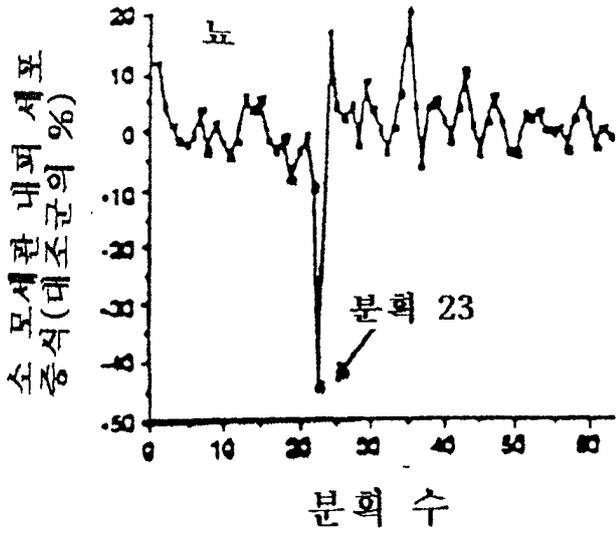
도면6b



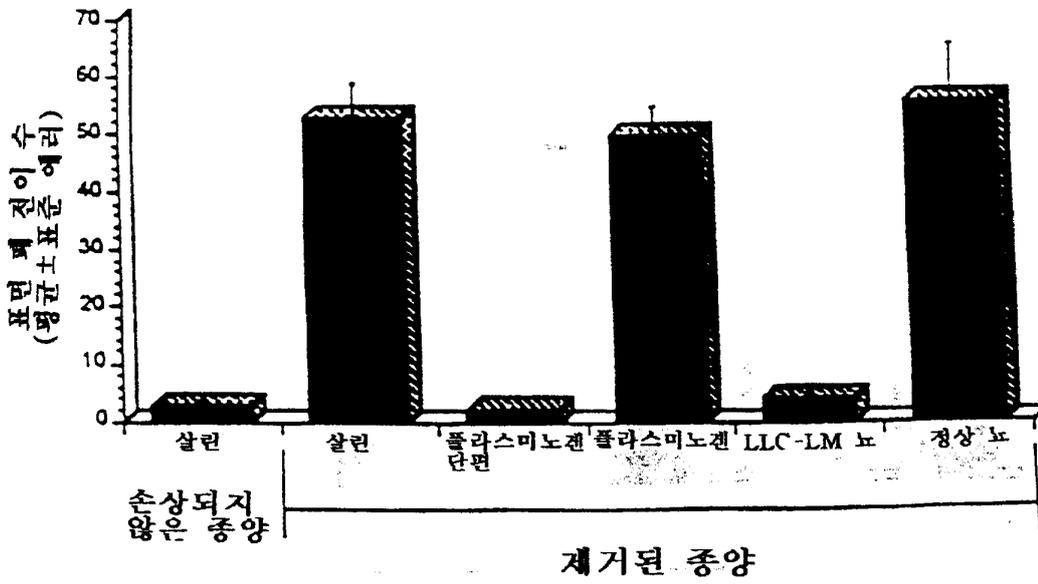
도면7a



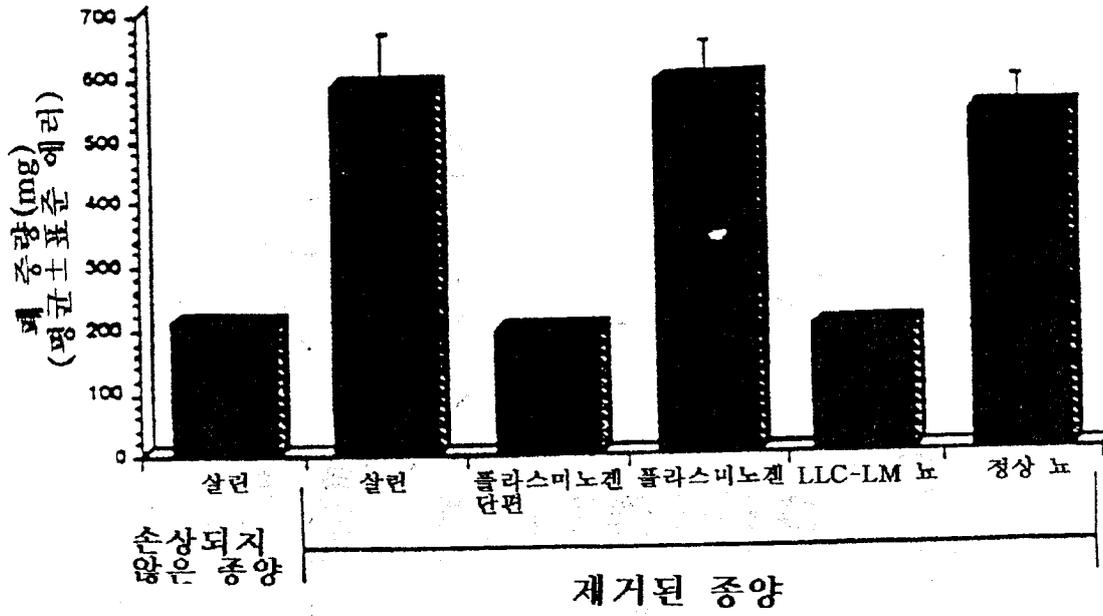
도면7b



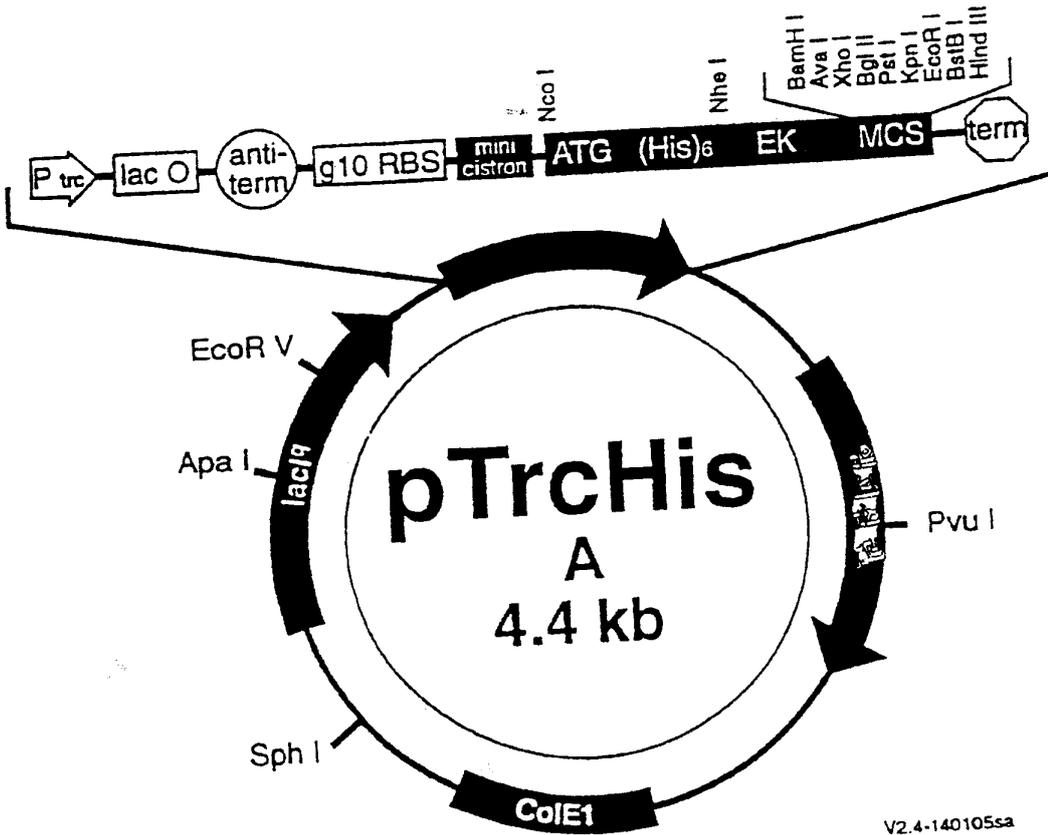
도면8



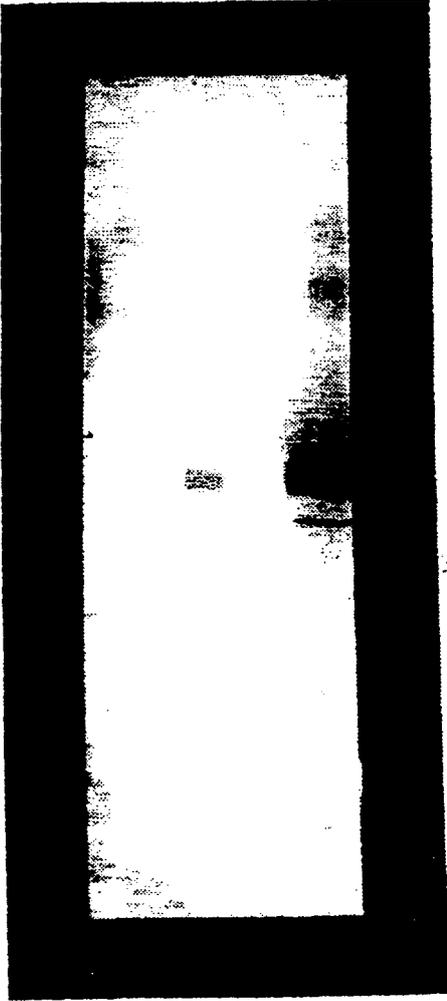
도면9



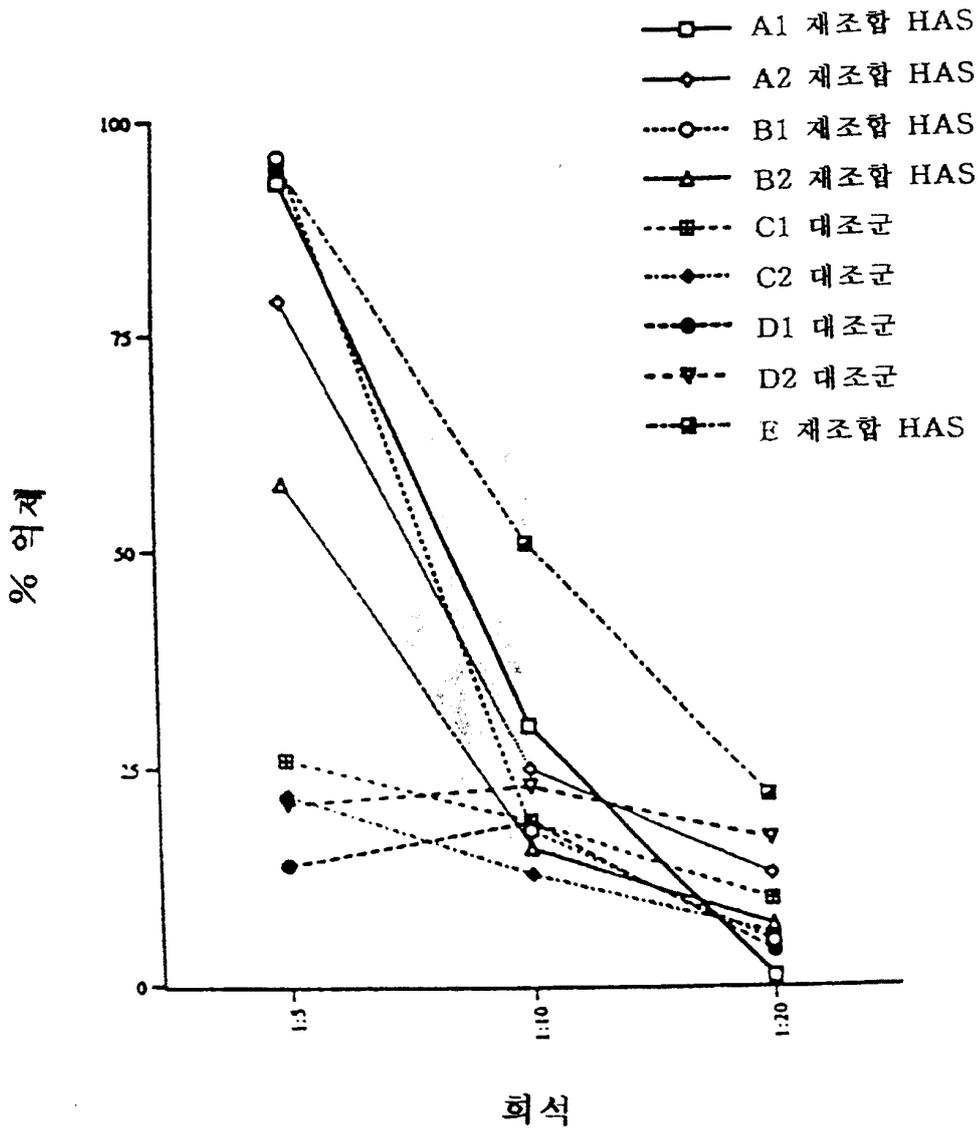
도면10



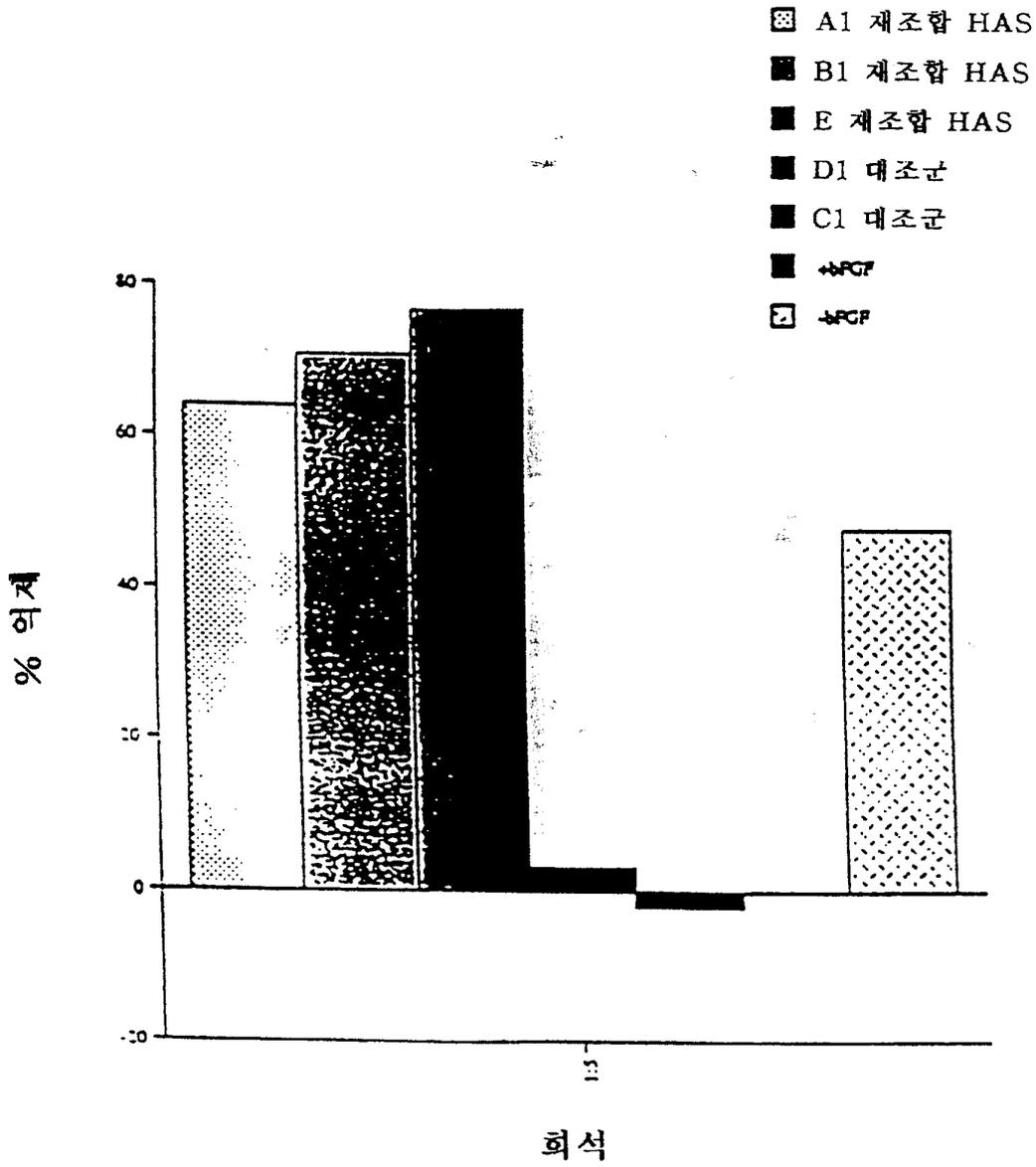
도면11



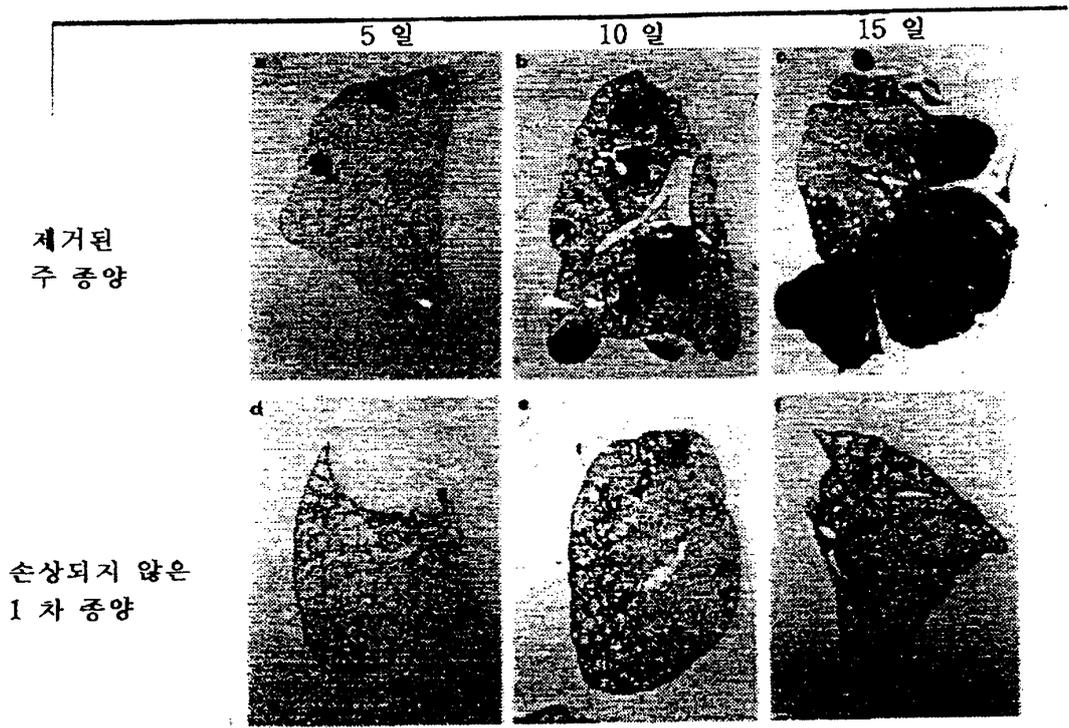
도면 12



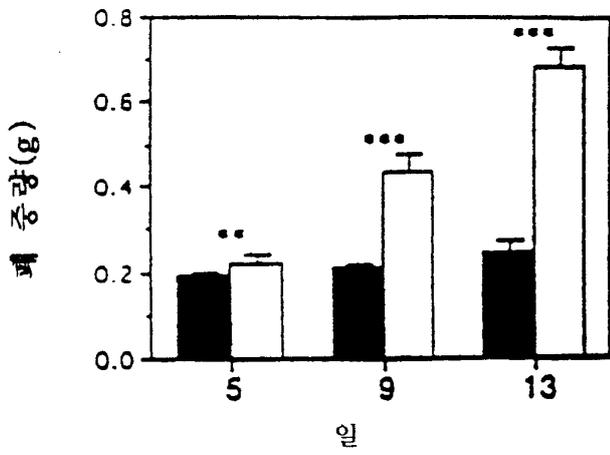
도면 13



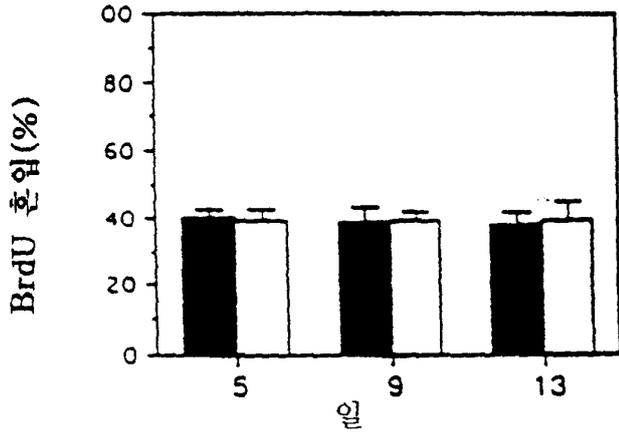
도면14



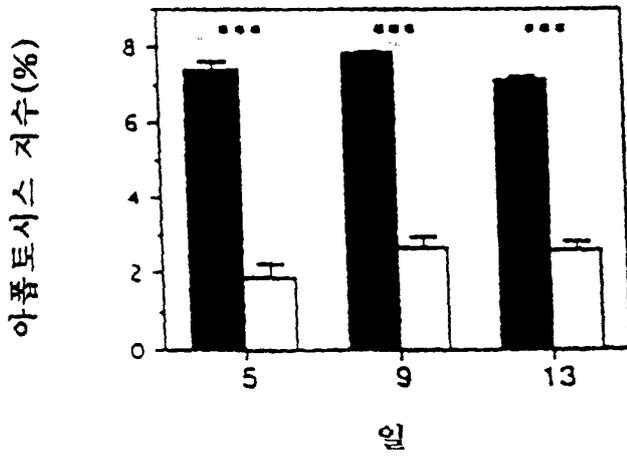
도면15a



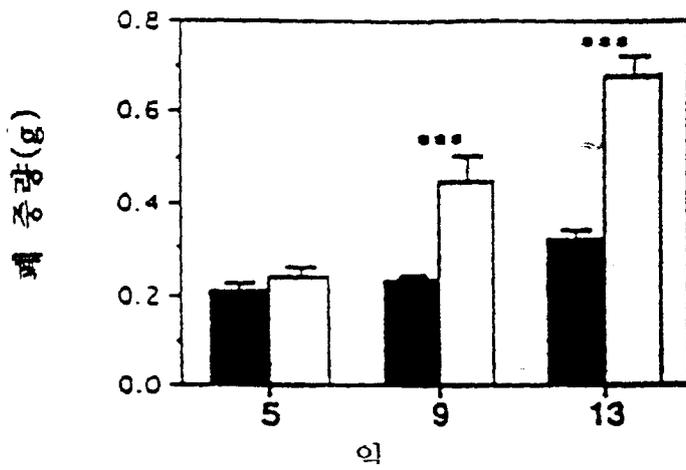
도면 15b



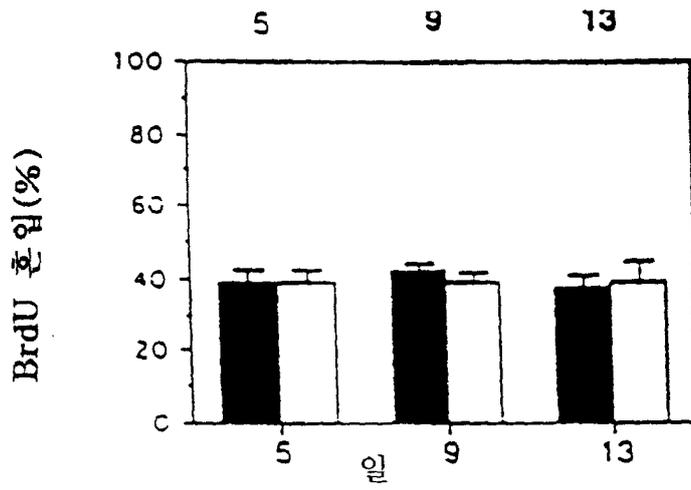
도면 15c



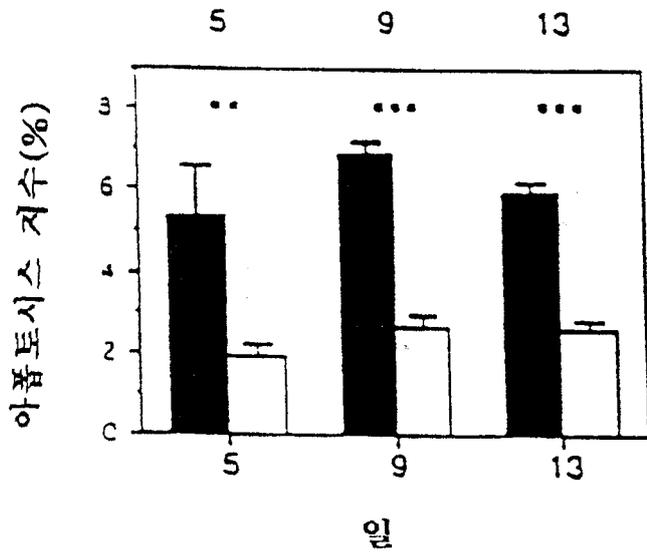
도면 16a



도면 16b

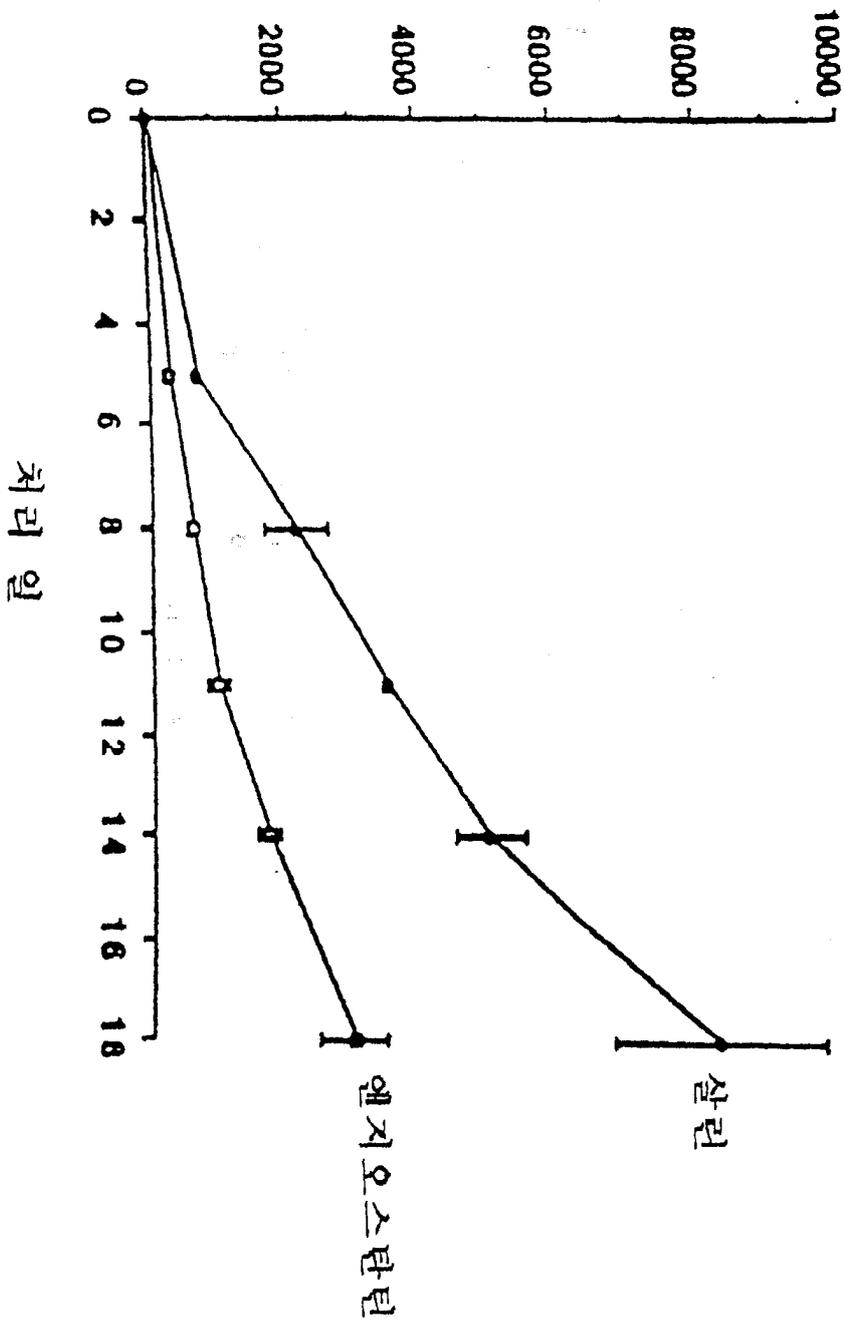


도면 16c

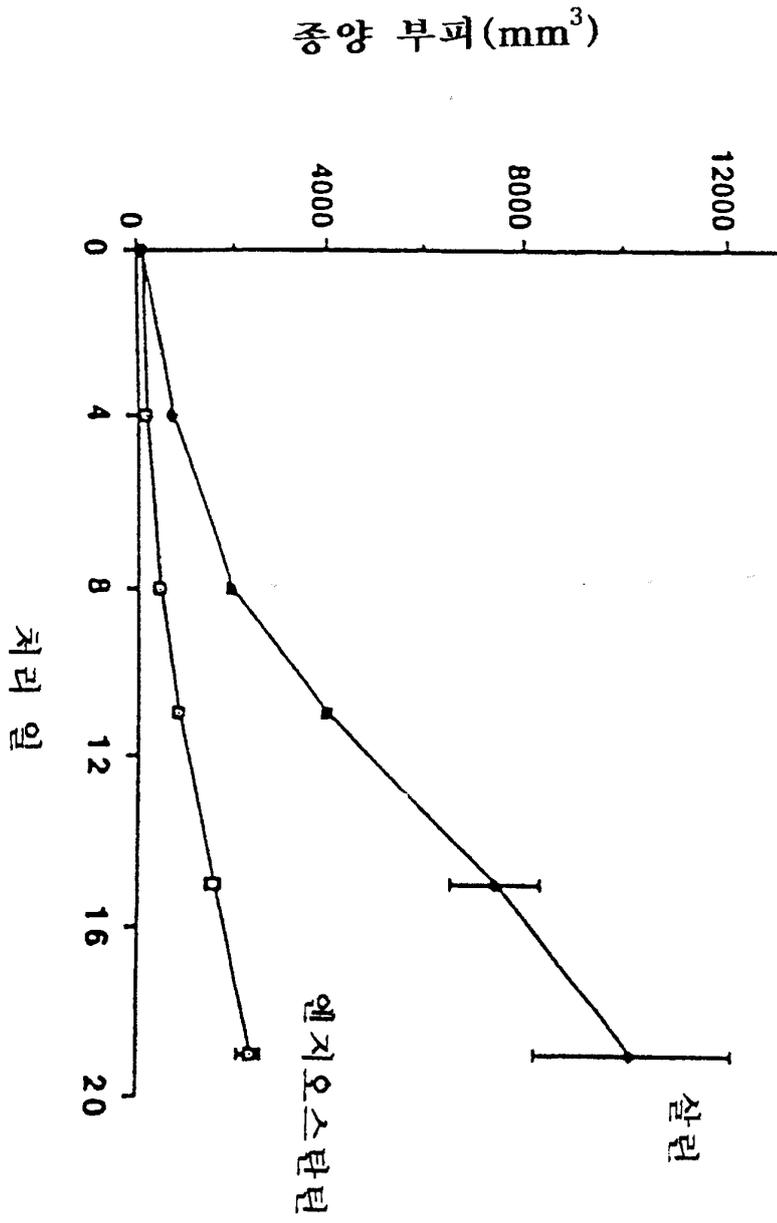


도면17

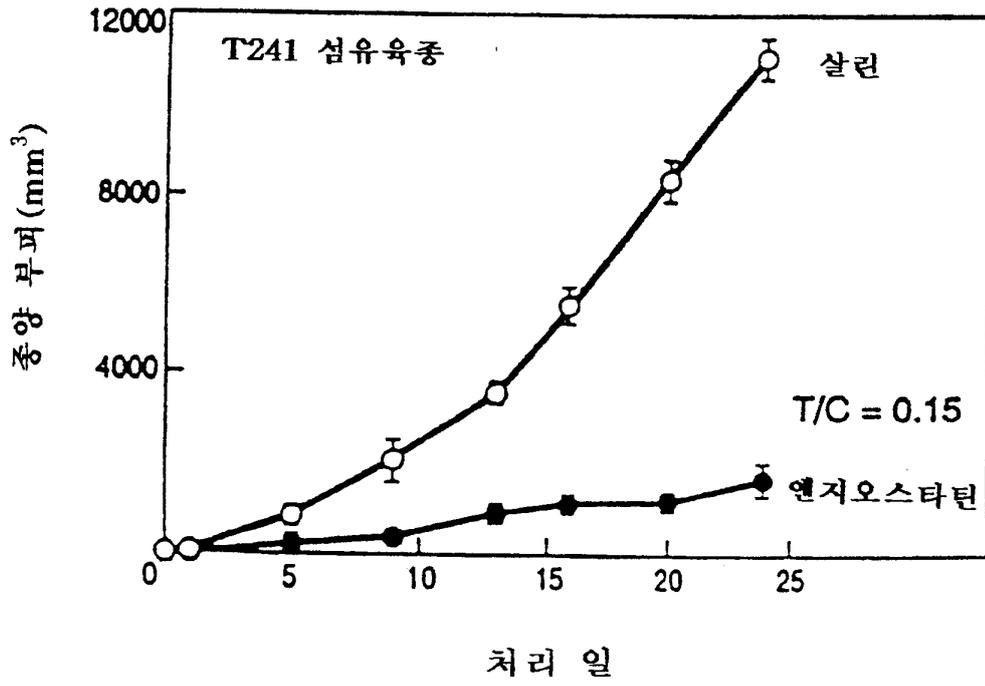
중양 부피 (mm³)



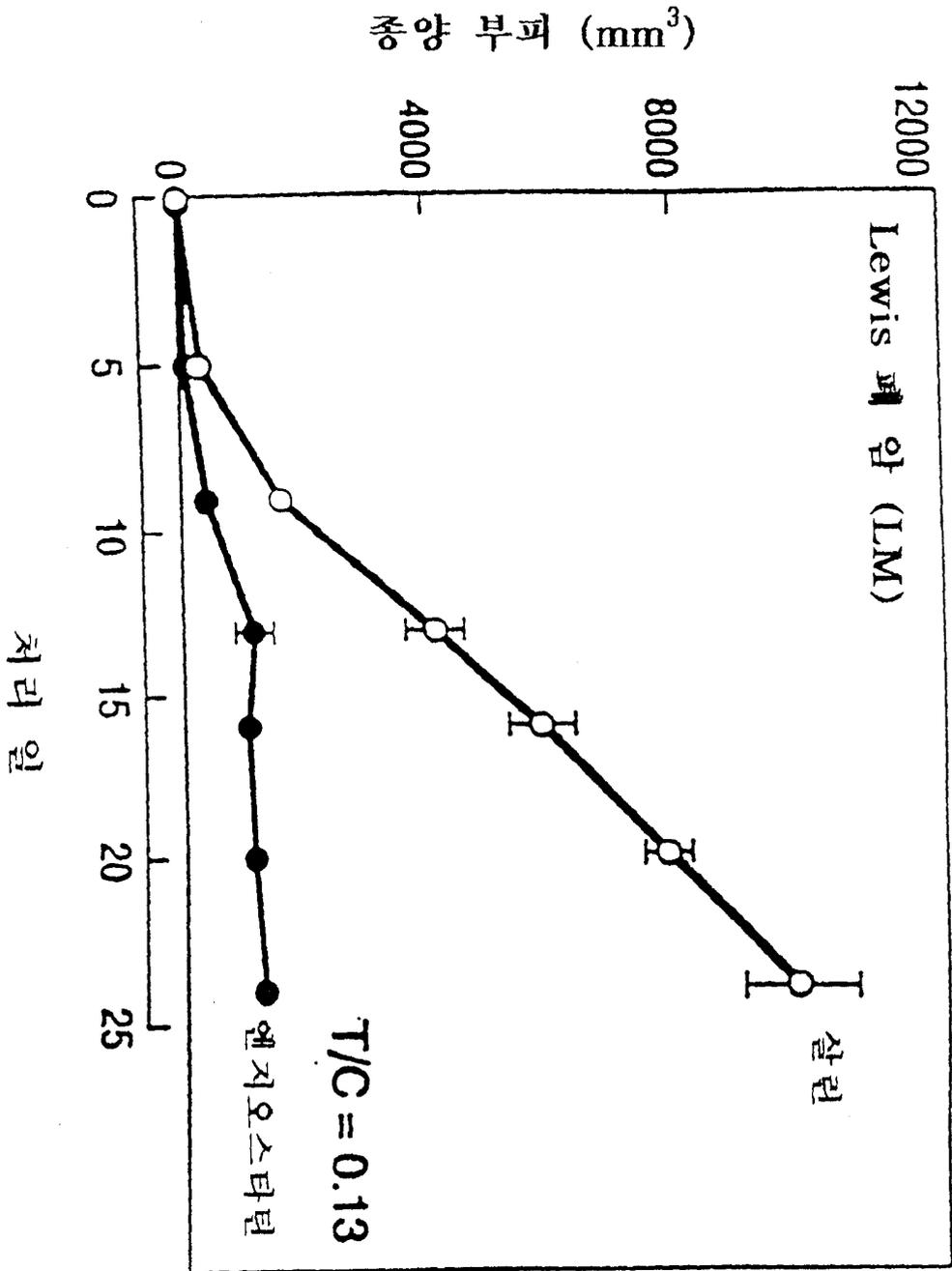
도면 18



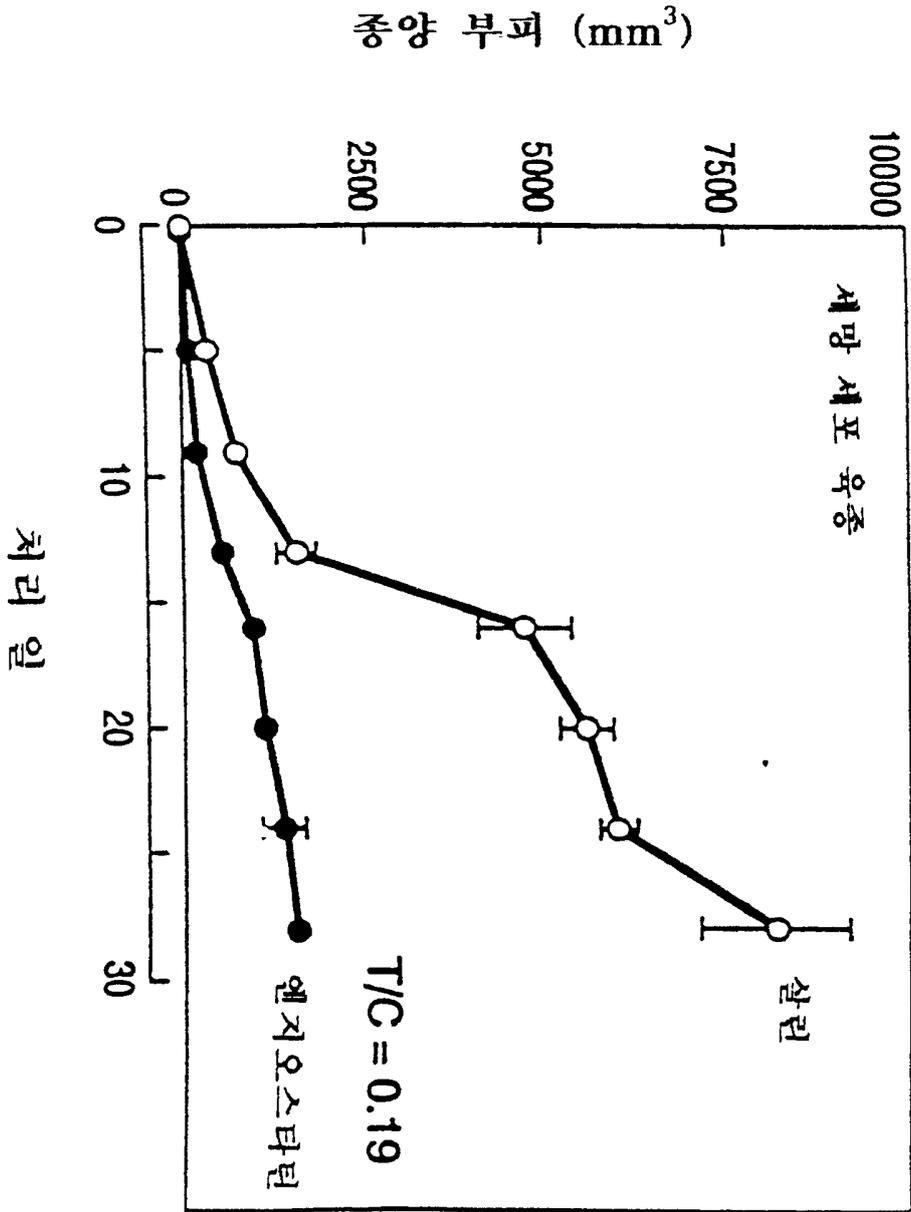
도면 19



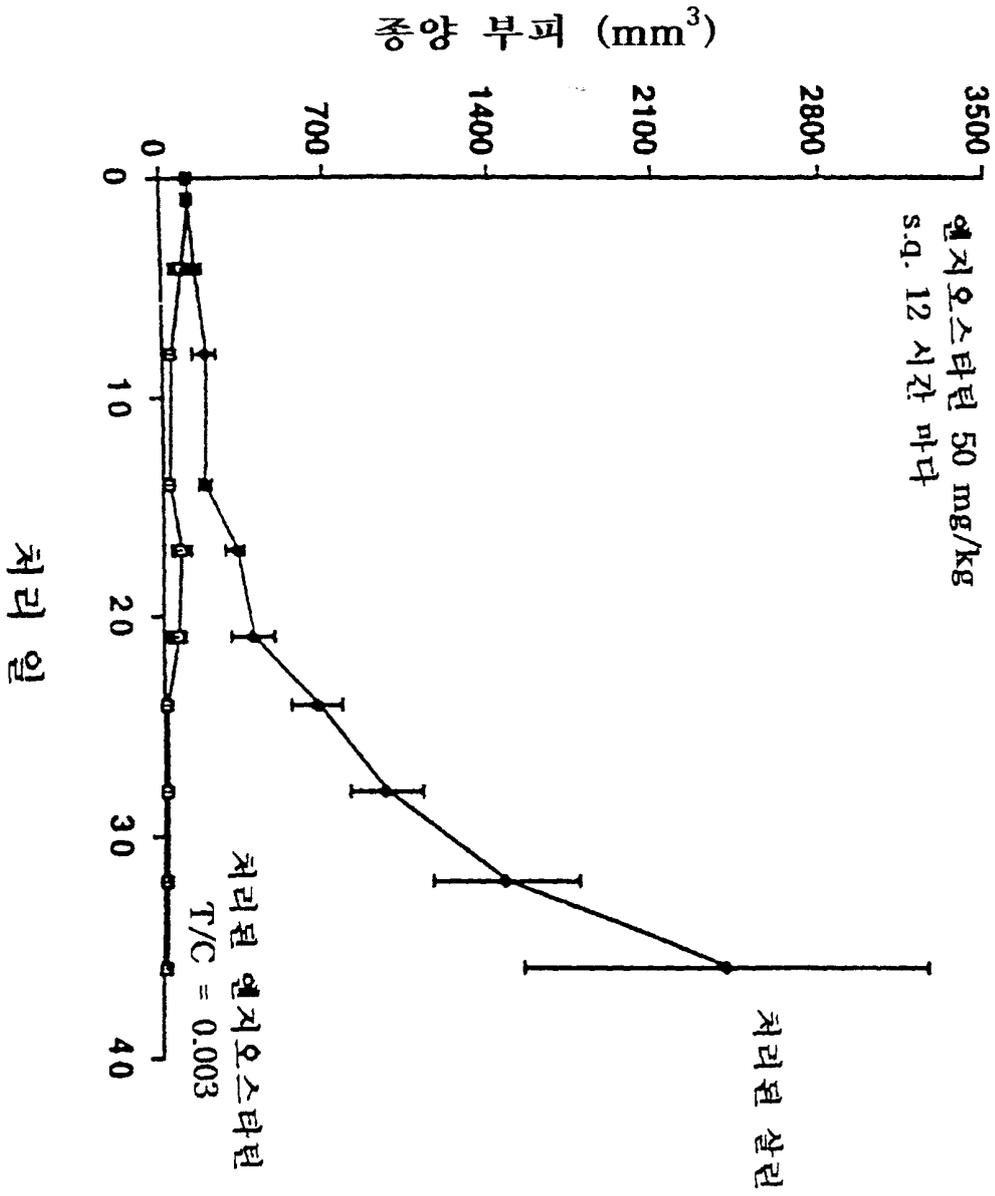
도면20



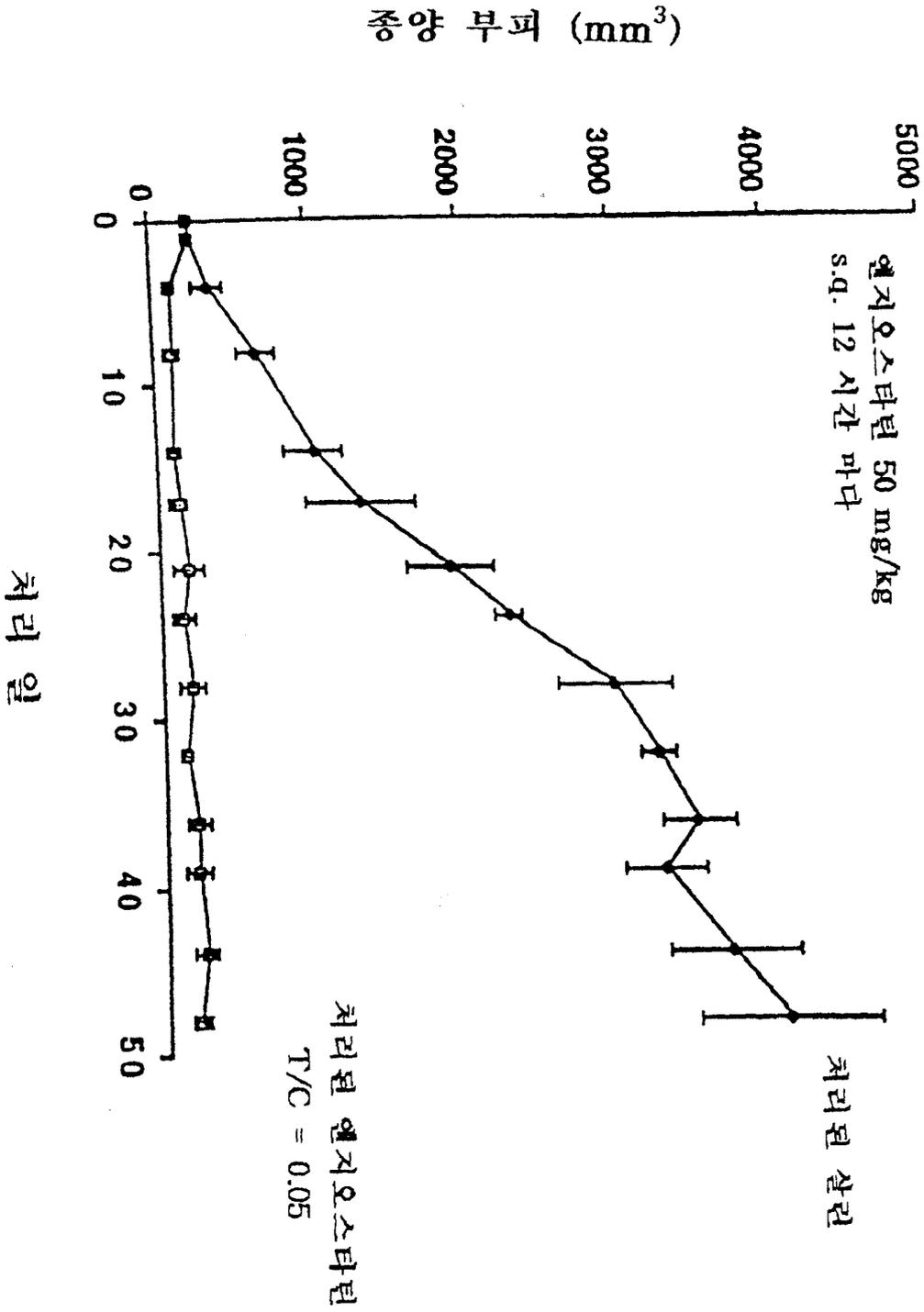
도면21



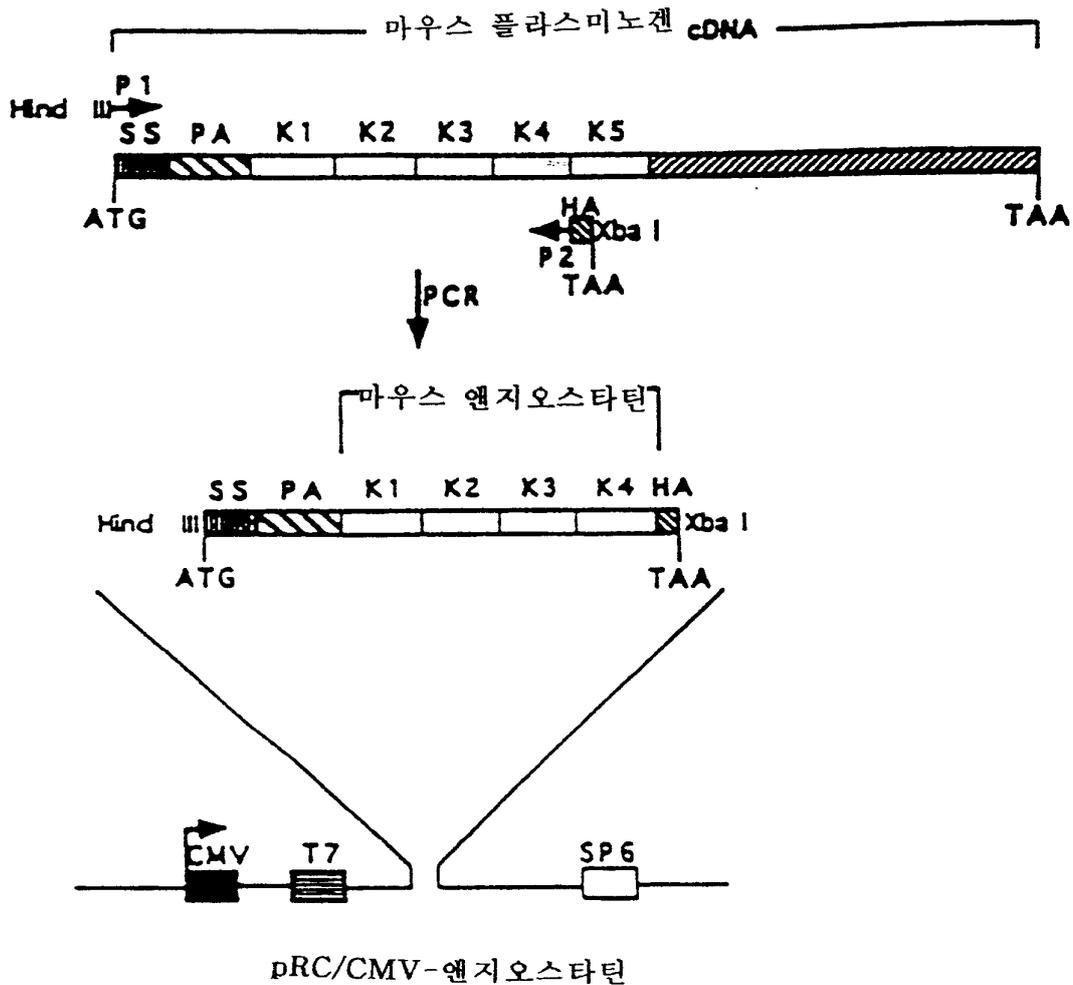
도면22



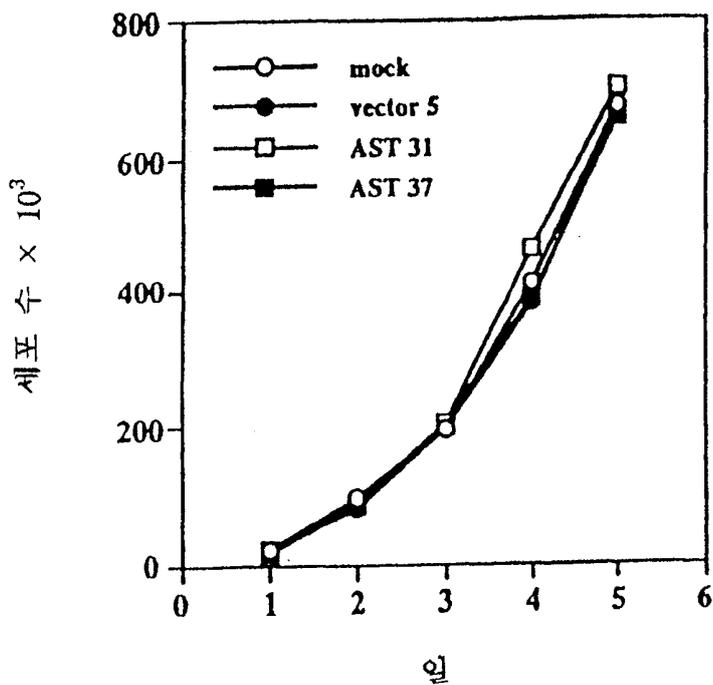
도면23



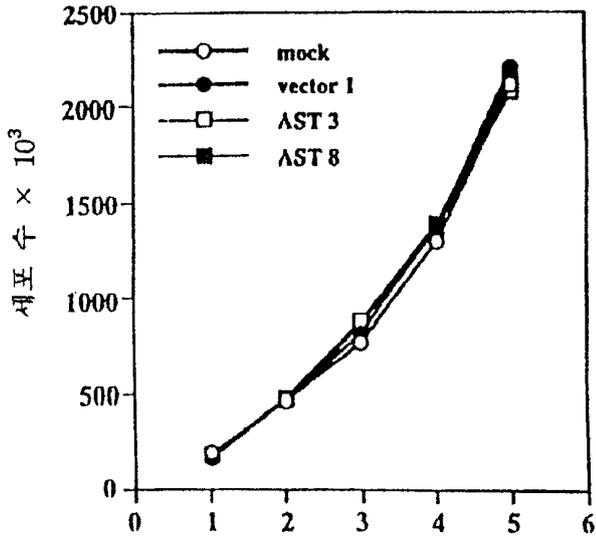
도면24



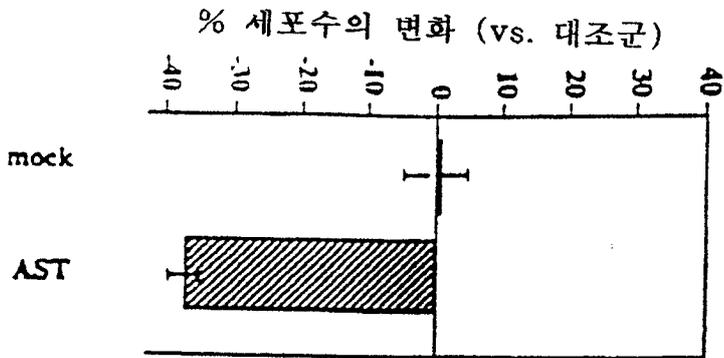
도면25a



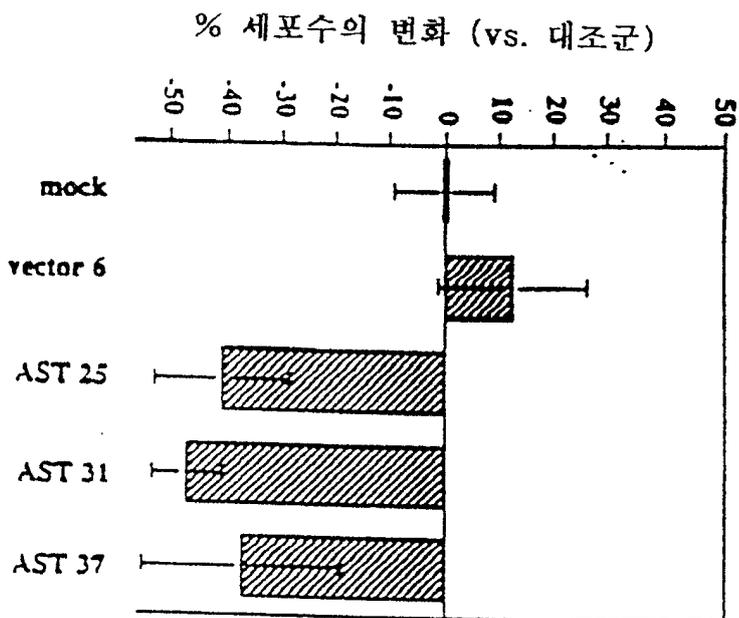
도면25b



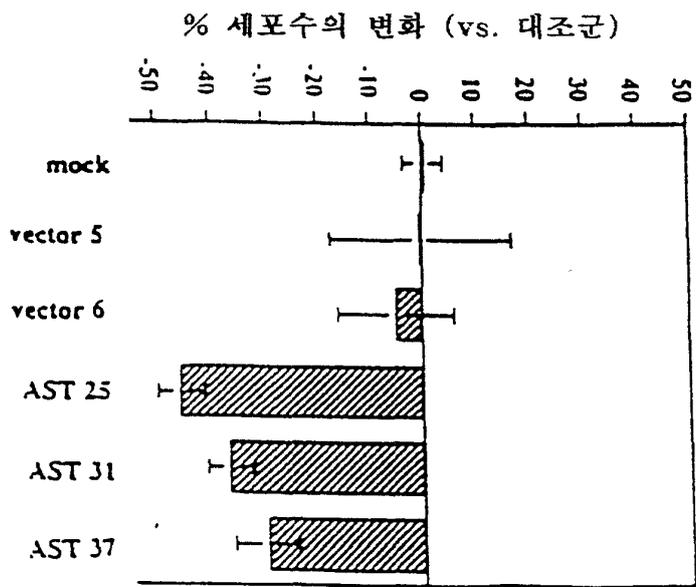
도면26a



도면26b



도면26c



도면27

