



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월09일  
(11) 등록번호 10-0888022  
(24) 등록일자 2009년03월03일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0131777

(22) 출원일자 2006년12월21일

심사청구일자 2006년12월21일

(65) 공개번호 10-2008-0057901

(43) 공개일자 2008년06월25일

(56) 선행기술조사문헌

US6107473 A\*

KR1020050074306 A\*

KR1020040075270 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

재단법인 목암생명공학연구소

경기도 용인시 기흥구 보정동 341

(72) 발명자

유현경

경기도 용인시 상현동 풍산 APT 103동 506호

윤엽

경기도 과천시 중앙동 주공 APT 104동 103호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김기연

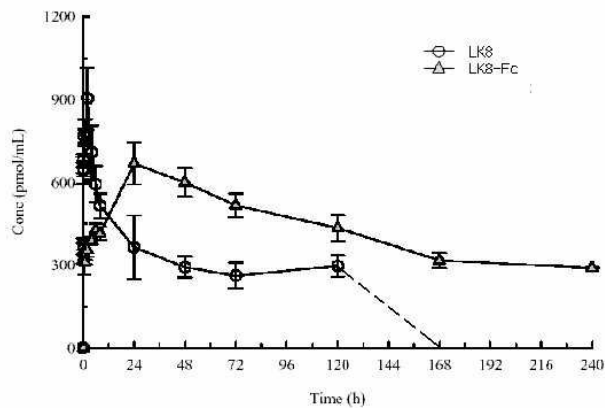
(54) 면역글로불린 Fc와 인간 아포리포단백질(a) 크링글절편의 융합단백질 LK8-Fc

(57) 요약

본 발명은 혈관생성 억제효능 및 체내 안정성이 증가된 Fc와 LK8 단백질의 융합단백질에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 혈관신생억제 효과를 가지는 LK8단백질과 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 부분이 접합된 LK8-Fc 융합단백질 및 상기 융합단백질을 포함하는 암치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 Fc가 접합된 LK8 융합단백질은 혈관생성 억제 효능과 그에 따른 항암 및 암전이 억제 효능을 가지면서도 체내 반감기가 매우 길어, 보다 효율적이고, 경제적인 암치료제 또는 암억제제로 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

**안진형**

경기도 용인시 기흥구 동백동 호수마을 서해그랑블  
아파트 1104동101호

**임인환**

경기도 용인시 상현동 풍산 APT 103동 506호

**이호정**

경기도 용인시 동천동 동천마을 현대2차 홈타운  
202동 1602호

**김장성**

경기 수원시 영통구 망포동 망포마을 동수원 LG빌  
리지 201동103호

**박두홍**

서울시 서초구 방배2동 2754-3

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

서열번호 1에 의해 코딩되는, 아포리포단백질(a)의 크링글(kringle) KV38 영역인 LK8 단백질과; 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 영역이 접합된 LK8-Fc 융합단백질.

**청구항 2**

제1항에 있어서, LK8-Fc 융합단백질을 세포 밖으로 분비시키는 면역글로불린 경사슬 리더 서열[immunoglobulin light chain (Igκ) leader sequence]을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 3**

서열번호 1에 의해 코딩되는 LK8 단백질과 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 영역이 접합된 LK8-Fc 융합단백질을 코딩하는 유전자.

**청구항 4**

제3항의 유전자를 함유하는 재조합 벡터.

**청구항 5**

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 재조합세포.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 세포는 동물세포인 것을 특징으로 하는 재조합세포.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

제5항의 재조합세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 LK8-Fc 융합단백질의 제조방법.

**청구항 9**

제1항 또는 제2항의 LK8-Fc 융합단백질을 함유하는 암치료용 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 암은 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암 및 난소암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 11**

제1항 또는 제2항의 LK8-Fc 융합단백질을 함유하는 혈관신생 억제용 조성물.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

<11> 본 발명은 혈관생성 억제효능 및 체내 안정성이 증가된 Fc와 LK8 단백질의 융합단백질에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 혈관신생억제 효과를 가지는 LK8단백질과 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 부분이 접합된 융합단백질 LK8-Fc 및 상기 융합단백질을 포함하는 암치료용 조성물에 관한 것이다.

- <12> 신생혈관형성(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하는데, 정상적인 생리조건에서는 혈관 내피세포가 분열을 거의 하지 않는 상태로 유지되며 예외적으로 여성의 생리 주기를 포함하는 극히 제한적인 경우에만 일어나는 것으로 알려져 있다. 신생혈관형성의 조절이상은 암, 당뇨병성 망막증, 류마티스성 관절염, 건선 등을 포함한 수많은 병리학적 장애를 유발할 수 있다. 종양의 경우, 암의 크기가 수 mm<sup>3</sup> 부피까지는 혈관의 도움 없이도 성장이 가능하지만 그 이상의 부피로 성장하거나 원격 전이가 일어나기 위해서는 신생혈관형성이 필수적인 것으로 알려져 있다 (Folkman, J., *N. Eng. J. Med.* 333:1757, 1995; Folkman, J., *New Engl. J. Med.* 285:1182, 1971).
- <13> 종양의 신생혈관형성 개시를 위해서는 혈관형성 촉진인자의 증가와 억제인자의 감소라는 두 가지 조건이 모두 만족되어야 한다. 내인성 혈관형성 억제인자의 대표적인 예는 안지오스타틴이며, 안지오스타틴은 혈액응고와 관련된 효소인 플라스미노젠의 일부분으로, 크링글(kringle)이라는 구조로 구성되어 있으며, 시험관내 조건 및 생체내 조건에서 신생혈관형성 억제능을 가지고 있는 것으로 보고되었다 (O'Reilly, M.S. *et al.*, *Cell*, 79:315, 1994). 상기 크링글은 약 80개의 아미노산과 세 개의 분자내 이황화결합(disulfide bond)으로 형성된 단백질의 구조영역으로서 독립적인 접힘 단위(folding unit)를 구성한다. 크링글 구조는 프로트롬빈, 유로키나제, 간세포 성장인자, 아포리포단백질(a)와 같은 다수의 단백질에서 발견되는데 특이하게도 프로트롬빈의 크링글, 유로키나제의 크링글 등 다수 크링글들이 신생혈관형성 억제능을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Lee, T.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273: 28805, 1998; Kim *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:11449, 2003)
- <14> 당단백질인 아포리포단백질(a)는 저밀도 리포단백질(LDL)의 주요 단백질 성분인 아포 B-10과 공유결합하여 리포단백질(a)[lipoprotein(a)]를 형성한다 (Fless, G.M., *J. Biol. Chem.*, 261:8712, 1986). 리포단백질(a)는 생체 내에서 콜레스테롤 운반을 담당하며, 혈장에서의 리포단백질(a)의 농도증가는 동맥경화(atherosclerosis) 및 심장질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Armstrong, V.W. *et al.*, *Artherosclerosis*, 62:249, 1986; Assmann, G., *Am. J. Cardiol.*, 77: 1179, 1996). 아포리포단백질(a)는 플라스미노젠 크링글IV 및 크링글V와 유사성을 보이는 두 종류의 크링글 영역과 비활성의 프로테아제 유사(protease-like)영역을 포함하고 있다. 아포리포단백질(a) 크링글IV-유사 영역은 아미노산 서열의 상동성에 의해 다시 10종의 아형(subtype; IV1 내지 IV10)으로 나누어지며, 각각은 하나씩 존재하지만 IV2 크링글은 아포리포(a) 유전자의 다양한 인간 대립유전자에 3 내지 42개의 복제수(copy number)로 존재한다. 그리고, 마지막 크링글 V은 플라스미노젠 크링글-V와 83.5%의 아미노산 서열 상동성을 가진다.
- <15> 본 발명자들은 아포리포단백질(a)를 구성하는 크링글 중 일부분 (크링글 KV38, 이하 'LK8' 단백질이라 함)이 시험관내 조건 및 생체 내 조건에서 신생혈관형성 억제능을 보유하고 있음을 관찰하였고, 이러한 효능에 의해 항암 및 전이 억제 작용을 나타냄을 확인하였다 (WO 2001/019868; LK6, LK7, LK8 및 LK68를 포함하는 혈관신생 억제제, WO 2004/073730; LK8을 함유하는 항암제). 하지만 기 발명된 LK8 단백질은 체내 반감기가 monkey에서 불과 7 내지 11시간으로 확인되어, 항암 효능을 나타내기 위해서는 짧은 주기로 반복 투여가 필요한 단점이 있고, 또한 혈관신생 억제제는 세포살상보다는 세포성장 억제 효능을 보유하고 있으며 항암제로 사용하기 위해서는 장기간 동안 지속적인 투여가 불가피한 단점이 있다 (Jain, RK. *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3:24, 2006).
- <16> 그러므로, 장기간 동안 지속적인 투여를 위해서는 많은 양의 LK8 재조합 단백질의 생산과 이에 따른 생산 단가의 상승이 요구되어지며 환자에게 있어서는 고가의 치료비 및 치료를 위한 장시간의 투자가 부담스러운 요소로 작용되어 LK8 단백질을 항암제로서 개발하는데 기술적 어려움이 있었다.
- <17> 한편, 면역글로불린 또는 그 단편과 활성단백질과의 융합단백질 제조가 항원성 증가, 정제의 용이성, 혈중 반감기 증가 등을 목적으로 이루어지고 있다. 그 예로, 면역글로불린 단편 자체의 기능을 가지면서, 유용단백질의 기능을 동시에 가지는 단백질 약물과 면역글로불린 Fc를 융합시킨 융합단백질인 인터루킨 수용체(대한민국 특허 등록 제249572호), INF- $\alpha$ 와 Fc를 결합시켜 INF- $\alpha$ 의 혈중 반감기를 증가시킨 융합단백질 등이 있다. 그러나, INF- $\alpha$ 와 Fc의 융합단백질은 반감기는 매우 증가하였으나, INF- $\alpha$ 활성이 떨어지는 단점이 있다 (US 5,723,125).
- <18> 이에, 본 발명자들은 LK8 단백질을 체내에 투여하였을 때, 혈관신생억제 효능이 감소되지 않으면서도, 높은 반감기를 유지하기 위한 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, LK8 단백질의 C말단에 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 부분을 접합시켜 LK8-Fc 융합단백질을 제작하고, 그 효과를 조사한 결과, Fc 접합에 의해 LK8 단백질의 자체 효능에 영향을 미치지 않으면서도, LK8 단백질에 비해 반감기가 약 40 내지 50배 이상 증가된다는 전혀 예기치 못한 효과가 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- <19> 본 발명의 목적은 항암 및 전이 억제 효능을 보유하고 있는 인간 아포리포 단백질(a) 크링글 절편인 LK8 단백질의 C 말단에 유전자 융합 기술을 이용하여 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 단백질을 접합하여, 생체 내 유용성이 증가된 형태의 융합단백질 LK8-Fc를 제공하는데 있다.
- <20> 본 발명의 다른 목적은 상기 융합단백질 LK8-Fc를 함유하는 암치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- <21> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질 LK8-Fc를 함유하는 혈관신생 억제용 조성물을 제공하는데 있다.

**발명의 구성 및 작용**

- <22> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LK8 단백질과 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 부분이 접합된 융합단백질 LK8-Fc를 제공한다.
- <23> 본 발명에 있어서, LK8-Fc 융합단백질을 세포밖으로 분비시키는 Igκ 리더부위를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <24> 본 발명은 또한, 상기 LK8-Fc 융합단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 함유하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- <25> 본 발명에 있어서, 상기 세포는 동물세포인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 동물세포는 CHO/LK8-Fc인 것을 특징으로 할 수 있다.
- <26> 본 발명은 또한, 상기 융합단백질 LK8-Fc를 함유하는 암치료용 조성물 및 혈관신생 억제용 조성물을 제공한다.
- <27> 본 발명에 있어서, 상기 암은 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암 및 난소암으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 할 수 있다.
- <28> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <29> 본 발명에서는 LK8-Fc 융합단백질을 암호화하는 유전자 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 pMSG/LK8-Fc를 제작하고, 이 유전자가 형질도입되어 재조합 LK8-Fc 융합단백질을 생산하는 CHO/LK8-Fc 세포주를 확립하였으며, 상기 확립된 CHO/LK8-Fc 세포주로부터 생산되어진 LK8-Fc 융합단백질을 마우스의 암조직에 처리한 결과 암조직의 성장 및 전이를 억제시킨다는 것을 확인하였다.
- <30> 또한, 본 발명에 따른 LK8-Fc 융합단백질은 Fc 접합이 LK8 단백질의 자체 효능에 영향을 주지 않으면서, LK8 단백질에 비해 반감기가 약 40 내지 50배 이상 증가되어 총 투여 단백질량 및 투여 빈도의 절감 효과가 있다는 것을 확인하였다.
- <31> 이러한 사실은 통상적으로 유용단백질에 Fc가 결합된 융합단백질이 모단백질보다 효능이 낮게 나타나거나, 반감기 증가효과가 미비한 데 비하여, 본 발명의 LK8-Fc 융합단백질은 기존의 LK8 단백질과 동일한 효능을 가지면서도, 훨씬 높은 반감기 증가율이 높아, 당업자가 전혀 예측할 수 없는 효과라고 할 수 있다.
- <32> 본 발명에 있어서 LK8-Fc 융합단백질은 시험관 내 조건에서 bFGF에 의해 유도된 인간 내피세포의 이동을 저해하였으며 생체 내 조건에서 혈관 생성을 억제하는 기능을 보유하고 있음을 확인하였다. 한편 LK8-Fc 단백질을 SD Rat (6w, male, Charles River, Japan)의 근육으로 단회 투여 시 접합된 Fc 단편으로 인하여, 생체 내 반감기가 기존의 LK8 단백질에 비해 약 40 내지 50배 정도 증가함에 따라 약물의 투여 빈도 및 투여 용량을 감소시켜도 높은 효능을 나타낼 수 있다는 것을 확인하였다. 이에, LK8-Fc 융합단백질의 유효량은 LK8 단백질에 비해 최소 10분의 1 이하의 용량, 투여 기간은 최소 7일에 한 번 투여하여도 항암 및 전이 효능을 기대할 수 있다. 그러나 상기와 같은 조건은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 연령 및 성별, 건강상태, 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 조절될 수 있다.
- <33> 본 발명에 따른 LK8-Fc 융합단백질은 기존에 사용하던 항암화학요법이나 방사선 요법과 병용하였을 경우 상승효과를 발휘할 것으로 기대되며 다른 종류의 혈관신생 억제효과를 갖는 제제와도 복합제제로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 종양을 표적으로 하는 항암화학요법이나 방사선 요법과 종양 주변 또는 종양 내로 유입되는 혈관을 표적으로 하는 LK8-Fc 융합단백질 투여를 병용하면 종양의 성장 및 전이가 보다 효과적으로 억제될 수 있다. 또한 LK8-Fc 융합단백질과 본 발명의 단백질과는 상이한 기작을 갖는 또 다른 혈관신생 억제제와도 병용 투여가 가능하며 이러한 경우에도 효과적인 항암 또는 전이 억제 효능을 기대할 수 있다.

- <34> 면역글로블린 중쇄 불변 영역은 4개 또는 5개의 도메인을 포함하고, 상기 도메인은 CH1-힌지-CH2-CH3(-CH4)로 구성된다. 중쇄 도메인의 DNA 서열은 면역글로블린 부류 간에 교차 상동성을 지니는데, 예컨대 IgG의 CH2 도메인은 IgA 및 IgD의 CH2 도메인과 상동성을 가지고, IgM과 IgE의 CH3 도메인과 상동성을 가진다.
- <35> 본 발명에서 사용되는 "Fc 영역"이란 용어는 면역글로블린 연쇄 불변 영역의 카복실 말단 부분, 바람직하게는 면역글로블린 중쇄 불변 영역, 또는 이의 일부를 의미한다. 예를 들면, 면역글로블린 Fc 영역은 (1) CH1 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인, (2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, (3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, (4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 또는 (5) 2 이상의 도메인과 면역글로블린 힌지 영역의 조합을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 면역글로블린 Fc 영역은 적어도 면역글로블린 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, CH1 도메인이 결여되어 있는 것이 바람직하다.
- <36> 중쇄 불변 영역이 유래되는 바람직한 부류의 면역글로블린은 IgG(Ig  $\gamma$ )( $\gamma$  하위부류 1,2,3 또는 4)이다. 다른 부류의 면역글로블린 IgA(Ig  $\alpha$ ), IgD(Ig  $\delta$ ), IgE(Ig  $\epsilon$ ) 및 IgM(Ig  $\mu$ )를 이용할 수 있다. 적절한 면역글로블린 중쇄 불변 영역의 선택은 미국 특허 제5,541,087호 및 제5,726,044호에 상세히 설명되어 있다. 특정 결과를 얻기 위해 특정 면역글로블린 부류 및 하위부류 유래의 특정 면역글로블린 중쇄 불변 영역 서열을 선택하는 것은 당업계의 기술 수준에 속하는 것으로 생각된다. 면역글로블린 Fc 영역을 암호화하는 DNA 구성물의 부분은 적어도 힌지 도메인의 일부분을 포함하는 것이 바람직하고, 적어도 Fc  $\gamma$ 의 CH3 도메인의 일부분, 또는 IgA, IgD, IgE 또는 IgM 중 어느 것의 상동성 도메인을 포함하는 것이 바람직하다.
- <37> 용도에 따라서, 사람 외의 다른 종(예컨대, 마우스 또는 래트) 유래의 불변 영역 유전자를 사용할 수 있다. DNA 구성물에서 융합 파트너로 사용되는 면역글로블린 Fc 영역은 일반적으로 임의의 포유동물 종으로부터 얻을 수 있다. 숙주세포 또는 동물에서 Fc 영역에 대한 면역 반응을 유발시키는 것이 바람직하지 않을 경우, Fc 영역은 숙주 세포 또는 동물과 동일한 종에서 유래된 것일 수 있다. 예를 들면, 숙주 동물 또는 세포가 사람인 경우 사람 면역글로블린 Fc 영역을 사용할 수 있고, 마찬가지로 숙주 동물 또는 세포가 마우스인 경우, 쥐과 면역글로블린 Fc 영역을 사용할 수 있다.
- <38> 본 발명의 실시예에 유용한 사람 면역글로블린 Fc 영역을 암호화하는 핵산 서열 및 이를 한정하는 아미노산 서열은 서열번호 2에 기재되어 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대 Genbank 및/또는 EMBL 데이터베이스에 게시된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것들, 예컨대 AF045536.1(Macaca fuscicularis), AF045537.1(Macaca mulatta), AB016710(Felix catus), K00752(Oryctolagus cuniculus), U03780(Sus scrofa), Z48947(Camelus dromedarius), X62916(Bos taurus), L07789(Mustela vision), X69797(Ovis aries), U17166(Cricetulus migratorius), X07189(Rattus rattus), AF57619.1(Trichosurus vulpecula) 또는 AF035195(Monodelphis domestica) 등 다른 면역글로블린 Fc 영역 서열도 사용할 수 있다.
- <39> 또한, 면역글로블린 중쇄 불변 영역 내의 아미노산의 치환 또는 결실이 본 발명의 실시예에 유용할 수 있다. 일 예로는 Fc 수용체에 대한 친화력이 감소된 Fc 변이체를 생성하기 위해 상부 CH2 영역에 아미노산 치환을 도입하는 것을 들 수 있다 (Cole et al., J. Immunol., 159:3613, 1997). 당업자라면 잘 알려진 분자생물학 기술을 이용하여 이러한 구성물을 제조할 수 있다.
- <40> 본 발명에서는 본 발명의 실시예에 유용한 Fc 융합 단백질을 생성하기 위한 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용한다. Fc 융합구성물은 바람직하게 DNA 수준에서 생성되며, 이렇게 생성된 DNA를 발현 벡터로 삽입시키고, 이를 발현시켜서 본 발명의 융합단백질을 생산한다.
- <41> 본 발명에서 사용되는 "벡터"라는 용어는 숙주 세포에 삽입되어 숙주 세포 게놈과 재조합되고 이에 삽입되거나, 또는 에피솜으로서 자발적으로 복제하는 컴피턴트 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 핵산을 의미한다. 이러한 벡터로는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스가 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <42> 본 발명에서 사용되는 "유전자 발현" 또는 표적 단백질의 "발현"이란 용어는 DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 Fc 융합 단백질 생성물의 분비를 의미하는 것이다.
- <43> 적절한 숙주 세포를 본 발명이 DNA 서열로 형질전환 또는 형질감염시키고, 이를 표적 단백질을 발현 및/또는 분비시키는 데 이용할 수 있다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 숙주 세포로는 불멸화된 하이브리도마 세포, NS/O 골수종 세포, 293 세포, 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO), HELA 세포 및 COS 세포가 있다.



- <44> 포유동물 세포에서 높은 발현 수준으로 융합 단백질을 생산하기 위해 사용되어 온 한가지 발현 시스템은 5'에서 3' 방향으로, 시그널 서열, 번역글로블린 Fc 영역 및 표적 단백질을 비롯한 분비 카세트를 암호화하는 DNA 구성물이다.
- <45> 본 명세서에서 사용되는 "리더 서열" 이란 용어는 LK8-Fc 융합단백질의 분비를 지령하고, 그 후 숙주 세포에서 번역된 후 절단되는 분절을 의미한다. 본 발명의 리더서열은 소포체 망의 막을 가로지르는 단백질의 운송을 개시시키는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다. 본 발명에 유용한 리더 서열로는 항체 경쇄 리더 서열, 예컨대 항체 14.18(Gillies *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 125:191, 1989), Igk leader 서열, 항체 중쇄 시그널 서열, 예컨대 MOPC141 항체 중쇄 리더 서열(Sakano *et al.*, *Nature*, 286:5774, 1980), 그리고 당업계에 공지된 임의의 다른 리더 서열(Watson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12:5145, 1984)이 있다.
- <46> 본 발명은 각종 암, 바이러스 질환, 기타 질환, 관련 증상 및 이들의 원인을, 이러한 증상을 지닌 포유동물에게 본 발명의 LK8-Fc 융합단백질을 투여함으로써 치료하는 방법을 제공한다. 관련 증상으로는 혈관신생에 의하여 증식 및 전이되는 각종 고형암을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <47> 본 발명에서 암은 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암 또는 난소암일 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <48> 본 발명의 조성물은 특정 분자에 적합한 임의의 경로에 의해 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임의의 적절한 수단을 이용하여 동물에게 직접적으로(예컨대, 주사, 피하주입 또는 조직 위치에의 국소적 투여와 같이 국소적으로) 또는 전신적으로(예컨대, 비경구 또는 경구적으로) 제공될 수 있다. 조성물이 비경구, 예컨대 정맥, 피하, 눈, 복강, 근육내, 구강, 직장, 질, 안와내, 대뇌내, 척수내, 심실내, 초내, 조내, 낭내, 비강내, 또는 연무질 투여에 의해 제공될 경우, 조성물은 수성 또는 생리적 화합성인 유체 현탁액 또는 용액 부분을 포함하는 것이 바람직하다. 그러므로, 담체 또는 부형제는 생리적으로 허용가능한 것이어서, 원하는 조성물을 환자에게 전달하는 것 외에도, 환자의 전해질 및/또는 부피 균형에 불리한 영향을 미치지 않아야 한다. 따라서, 이러한 제제용 유체 매질은 표준 생리 염수를 포함할 수 있다.
- <49> 본 발명의 LK8-Fc 융합단백질의 바람직한 용량은  $0.03 \text{ mg/m}^2 \sim 300 \text{ mg/m}^2$  이고,  $0.3 \text{ mg/m}^2 \sim 30 \text{ mg/m}^2$  인 것이 보다 바람직하다. 그러나, 최적 투여량은 치료할 질환과 부작용의 존재에 따라 달라진다. 그러나, 최적 투여량은 통상적인 실험으로 결정할 수 있다. 퓨전 단백질의 투여는 주기적인 환약 주입, 또는 외부 저장기(예컨대, 정맥 백) 또는 내부 저장기(예컨대, 생체분해성 임플란트)로부터의 연속적인 정맥 또는 복강 주사로 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질은 다수의 상이한 생물학적 활성 분자와 함께 목적 수용체에 투여할 수 있다. 그러나, 융합 단백질 및 기타 분자의 최적 조합, 투여 방식, 투여량은 당업자의 기술 수준에 속하는 통상적인 실험에 의해 결정할 수 있다.
- <50> 본 발명에 따르는 혈관신생 억제제는 혈관생성과 관련 있는 다양한 병변, 즉 다양한 종양 및 종양의 전이, 류마티스성 관절염, 당뇨병 망막증, 건선 등의 치료제로서 적용이 가능하다. 이 경우에도 역시 본 발명에 따르는 LK8-Fc 융합단백질은 해당 질환과 관련된 다른 치료제와 병행 또는 혼합하여 사용할 수 있다.
- <51> 실시예
- <52> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <53> **실시예 1: LK8-Fc 융합단백질을 발현하는 재조합 벡터의 제조**
- <54> LK8와 Fc를 접합시킨 융합단백질을 암호화하는 벡터를 제조하기 위하여, 우선 LK8 유전자는 본 발명자들이 이미 제조하였던 LK8 유전자(서열번호 1)를 포함하는 벡터인 pET11B 벡터(WO2001/019868)를 주형으로 하여 PCR로 획득하였고, Fc를 암호화하는 유전자(서열번호 2)는 본 발명자들이 이미 제조하였던 pRC13-Hpa 벡터(대한민국 등록특허 제467706호)를 주형으로 하여 PCR로 획득하였다. 각각의 PCR 반응에 사용된 프라이머는 표 1에 기재하였다.
- <55> 구체적으로, 상기 PCR은 주형 DNA를 94℃에서 5분 동안 반응시킨 후, 94℃에서 30초, 56℃에서 30초 및 72℃에서 1분 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분 동안 신장시키는 과정으로 수행되었으며, 클로닝을 용이하게 수행하기 위해 각 프라이머에는 제한효소 절단부위를 삽입하여, 생성되는 PCR 산물이 제한효소 절단부위를 가지도록 하였다. 상기 PCR을 통하여 생성된 두 유전자단편을, 생산될 단백질이 세포 밖으로 원활히 분비되

는 것을 돕기 위해서 Igκ leader 서열을 함유하고 있는 pSecTag (Invitrogen, USA) 벡터에 삽입하였으며, 구체적으로는 LK8 유전자 단편 및 pSecTag 벡터를 *Sfi*I 및 *Bam*HI으로 절단한 후, LK8 유전자 단편을 pSecTag 벡터에 연결하여 pSecTag-LK8을 확보하고, Fc 유전자 단편을 *Bam*HI 및 *Xho*I으로 절단하고, pSecTag-LK8를 *Bam*HI 및 *Xho*I으로 절단한 후 라이게이션하여, pSecTag/LK8-Fc를 제작하였다.

<56> 상기 플라스미드 pSecTag/LK8-Fc 중 Igκ leader 서열, LK8 유전자 및 Fc 유전자를 제한효소로 절단하여, 동물 세포 발현용 벡터인 pMSG 벡터(KCCM 10202, 대한민국 공개번호 10-2002-0010327)에 삽입하였으며, 이를 위해서 pMSG 벡터 및 pSecTag-LK8-Fc 플라스미드를 제한효소 *Nhe*I 및 *Xho*I을 사용하여 절단한 후 절단된 Igκ-LK8-Fc 단편을 pMSG 벡터에 삽입하여 pMSG/LK8-Fc를 제조하였다 (도 1).

**표 1**

<57> pMSG/LK8-Fc 제조에 사용된 프라이머

염기서열*	종류
5'-GCGGCCAGCCGGCCGAACAAGACTGTATGTTTG-3'	LK8 센스 (서열번호 3)
5'-CGGGATCCAGAGGATGCACAGAGAGGGATATC-3	LK8 안티센스 (서열번호 4)
5'-CGGGATCCGAGCCCAATCTTGTGAC-3'	Fc 센스 (서열번호 5)
5'-TATACTCGAGTCATTTACCCGGAGACAGGG-3'	Fc 안티센스 (서열번호 6)

<58> \* 밑줄은 제한효소 인식부위

**실시예 2. LK8-Fc 융합단백질을 다량으로 발현하는 동물세포주 확립**

<60> LK8-Fc 융합단백질을 생산하는 동물 세포주를 확립하기 위하여, 실시예 1에서 제조된 pMSG/LK8-Fc를 DHFR(dihydrofolate reductase)유전자(Columbia university, USA)와 함께 Dosper (Roche, Switzerland)를 사용하여 DHFR 유전자가 결실된 세포주인 CHO DG44 세포(Columbia university, USA)에 트랜스팩션시켰다. 이어, 10% 혈청을 함유하고 있는 MEM-α 최소배지 (GIBCO, USA)에서 적응된 콜로니를 1차 선별한 후, 선별된 콜로니를 50nM 및 1μM 농도 등 단계적으로 증가된 MTX(methotrexate, 중외제약, Korea)의 농도에서 계대배양하면서 MTX에 대한 내성을 나타내는 콜로니 중 표적 단백질을 많이 분비하는 세포주를 2차 선별하였다. 선별된 세포주를 단백질의 대량 생산의 편의성을 도모하기 위해 무혈청 배지인 HyQ-SFM-CHO 배지(Promega, USA)함유 스피너플라스크에서 배양하였으며, 최종선별된 세포주를 CHO/LK8-Fc로 명명하였다.

**실시예 3. LK8-Fc 융합단백질의 정제**

<62> LK8-Fc 융합단백질을 정제하기 위하여, CHO/LK8-Fc 세포주를 실시예 2와 동일하게 HyQ-SFM-CHO 배지에서 스피너 배양을 수행하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 세포의 성장 및 생존률을 관찰하며 배양하다가, 배양 6일째에 원심분리를 통해 상층액을 수득한 후, 상층액에 포함된 LK8-Fc 융합단백질을 하기 방법으로 정제하였다. LK8-Fc 융합단백질 중 Fc 부분이 프로테인 G 세파로오스 (Amersham Pharmacia, USA)에 대한 친화성을 보유하고 있다는 점을 이용하여, 친화성 칼럼크로마토그래피를 수행하였다. 구체적으로 20~100mM 소듐포스페이트(sodium phosphate, pH 6~8)로 구성된 바인딩 버퍼조건에서 상층액에 포함되어 있는 LK8-Fc 융합단백질을 상기 프로테인 G 세파로오스 칼럼에 결합시킨 후, pH 2~5의 글리신버퍼(glycine buffer)를 사용하여 칼럼으로부터 용출시켰다 (도 3a).

<63> 정제된 LK8-Fc 융합단백질을 최종적으로 PBS로 투석한 후 4~20% 농도구배 겔을 이용한 SDS-PAGE와 웨스턴블롯팅으로 순도를 확인하였으며(도 3b), 전기영동 결과 환원성 상태에서는 분자량이 약 37kDa으로, 비환원성 상태에서는 약 75kDa으로 확인되었다. 이는 LK8-Fc 융합단백질 중 Fc 부분에 있는 이황화 결합에 의해 비환원성 상태에서는 이량체(dimer)로 존재하기 때문에 분자량이 환원성 상태보다 약 2배 증가된 형태로 나타나는 것이다 (도 3b).

**실시예 4. LK8-Fc 융합단백질의 내피세포이동(endothelial cell migration) 억제능 분석**

<65> 재조합 단백질 LK8-Fc이 혈관신생 억제효능을 가지는지 분석하기 위하여, 시험관내 조건 (*in vitro*)에서 인간 내피세포인 HUVEC 세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, Cambrex, USA)를 이용하여 창상이동분석(wounding migration assay)을 실시하였다 (Kim *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:29000, 2003). 1.5% 젤라틴이 코팅된 24웰 조직배양평판의 각 웰에 EGM-2(Cambrex, USA) 배지로 현탁시킨 HUVEC 세포를 넣고 세포가 90%이상으



로 자랄 때까지 배양한 후 0.1%의 FBS가 포함된 EBM-2(Cambrex, USA) 배지로 교환하였다. 상기 조건에서 약 15 시간동안 배양한 후, 마이크로피펫 팁을 사용해 세포를 긁어내고 배양평판에서 떨어진 세포를 PBS로 두 번 세척하여 제거하였다. 긁힌 부분은 사진 촬영을 해두고 표시선(reference line)을 그어두었다. 그 후 8시간동안 세포를 더 배양하고 세포의 이동억제정도를 관찰, 사진 촬영한 후, 표시선을 넘어 이동된 세포의 수를 계수하였다. 상기 실험은 세 번 반복하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4a에서 X축은 처리된 시료의 종류 및 농도이고, Y축은 표시선을 넘어 이동한 세포수를 나타낸 것이며, 도 4b는 도 4a의 데이터를 백분율(%)로 표시한 그래프로, 구체적으로 시료 처리 없이 PBS만 처리한 그룹에서의 세포 이동수를 각 데이터에서 모두 제한 후, bFGF만 처리한 그룹의 세포 이동수를 100%로 환산하여, LK8-Fc 단백질을 농도별로 처리시의 세포 이동의 상대적인 저해정도를 나타내었다. LK8 단백질을 양성 대조군으로 사용하였다.

<66> bFGF를 내피세포에 처리하면 세포의 이동이 크게 유도되는데, 도 4에 나타난 바와 같이, LK8단백질을 처리한 경우 bFGF에 의해 유도된 세포의 이동이 억제되었으며, 처리한 LK8단백질의 농도가 증가할수록 억제 효능이 증가되었다. 이때, LK8-Fc 융합단백질을 LK8 단백질과 동일한 몰 농도로 내피세포에 처리한 경우에도 LK8 단백질과 유사한 정도로 HUVEC의 이동이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났으며, 대표적으로 LK8 단백질과 LK8-Fc 퓨전 단백질을 각각 1 $\mu$ M의 농도로 처리했을 때, bFGF 단독 처리 그룹에 비해, LK8 단백질 처리군은 약 68% (bFGF 단독 처리군과 비교 시,  $p < 0.005$ ), LK8-Fc 융합단백질 처리군은 약 64% (bFGF 단독 처리군과 비교 시,  $p < 0.05$ )의 내피세포 이동억제능을 나타내었다. 상기 결과로부터 LK8-Fc 융합단백질이 시험관내 조건에서 LK8 단백질과 유사한 수준의 내피세포 이동 억제효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

<67> **실시예 5. LK8-Fc 융합단백질의 생체내 혈관형성 저해능 분석**

<68> LK8-Fc 융합단백질이 생체 내에서 혈관형성을 저해하는지 확인하기 위하여, 유정란의 용모요막(Chorioallantoic membrane; 이하 'CAM'이라 약칭함)에서 LK8-Fc 융합단백질의 혈관형성에 대한 영향을 관찰하였다 (Kim *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:29000, 2003). 유정란의 난백알부민(ovalbumin)의 일부를 제거한 후 단백질 처리 및 관찰을 위한 창을 만든 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. LK8-Fc 융합단백질 및 LK8 단백질을 써마녹스 커버슬립(Thermanox coverslip, Nunc, USA)에 올리고 건조시켜 준비한 후, 각각 배아 CAM에 주입, 48시간동안 추가 배양한 후에, 지방 유탁액 (fat emulsion)을 배아의 용모요막에 주입하여 써마녹스(theramanox) 주변의 혈관형성을 관찰하였으며 그룹 당 60개의 유정란을 사용하였다 (도 5).

<69> 그 결과, 음성 대조군인 써마녹스에 saline만 처리한 유정란에서 기본적으로 약 39.2  $\pm$  5.6 %의 모세혈관 형성 저해가 나타났으며, 이때 10  $\mu$ g의 LK8 단백질을 처리한 경우, 약 66.2 % (대조군과 비교 시,  $p < 0.05$ )의 혈관형성 저해가 나타났으며, 동량의 LK8-Fc 융합단백질을 처리한 경우, 약 63.2 % (대조군과 비교 시,  $p < 0.05$ )의 혈관형성 저해가 관찰되어 각각 두 시료의 처리가 통계적으로 유의하게 혈관형성을 억제하였음을 보여주었으며, 두 시료 간에는 효능의 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 실시예 3에서의 시험관내 조건뿐만 아니라, 생체 내 조건에서도 Fc가 접합되어진 LK8-Fc 융합단백질이 혈관 형성 억제 효능을 보유하고 있음을 확인하였다.

<70> **실시예 6. LK8-Fc 융합단백질의 약물동태(PK) 분석**

<71> LK8-Fc 융합단백질의 약물동태(PK)를 관찰하기 위해서 LK8-Fc 융합단백질 및 LK8 단백질을 SD 레트 (6주령, 수컷, 찰스리버, 일본)에 단회 투여 후, 시간별로 혈장에 포함된 LK8-Fc 융합단백질의 농도를 측정하였다. 구체적으로, 단백질의 탐지를 위한 목적으로 LK8-Fc 융합단백질 및 LK8 단백질에 FITC(Sigma, USA)를 표지하였으며, 표지된 단백질인 LK8-Fc-FITC와 LK8-FITC 단백질 180  $\mu$ g을 각각 SD 레트(1군당 3마리)에 단회에 걸쳐 근육 주사하였다. 단백질 투여 후, 0.017, 0.051, 0.085, 0.17, 0.51, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 120, 168 (hr)간격으로 eye bleeding을 통해 200  $\mu$ l의 혈액을 샘플링한 후 혈장을 확보하였다. 혈장에 포함된 단백질의 농도는 FITC의 여기(excitation) 파장인 490nm와 방사(emission) 파장인 535nm 조건에서 Fluorometer (PerkinElmer, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하고, 표준곡선을 사용하여 농도를 산출하였다 (표 2).

<72> 표 2에 기재된 데이터를 통해 약물동태(PK)를 분석한 결과, LK8-Fc 융합단백질을 투여한 군에서, LK8-Fc 융합단백질의 반감기( $t_{1/2}$ )는 약 177 (hr)로 나타났으며, 체내 노출 정도인 AUC (0-t)와 AUC (inf)는 103,001 h  $\cdot$  pmol/m과 176,759 h  $\cdot$  pmol/mL로 각각 관측되었다 (표 3 및 도 6). 따라서 종합적으로 분석했을 때, Fc 접합으로 인해 LK8-Fc 융합단백질의 반감기의 증가가 유도되었으며, 따라서 생체 내 이용률이 의미 있게 증가되었음을 확인하였다.

표 2

LK8 단백질			LK8-Fc 퓨전단백질				
시간(일)	Conc. (pmol/mL)	Mean	SD	시간(일)	Conc. (pmol/mL)	Mean	SD
0.017		643.6	11.6	0.017		366.3	28.5
0.051		647.7	53.2	0.051		368.4	31.2
0.085		881.0	10.9	0.085		342.1	37.4
0.17		649.6	27.6	0.17		347.4	46.1
0.51		767.4	25.3	0.51		327.9	62.7
1		779.7	48.6	1		311.0	8.2
2		903.3	113.0	2		353.5	23.4
4		708.7	97.3	4		388.9	13.3
6		592.5	64.9	6		429.4	20.5
8		514.7	44.1	8		414.1	23.6
24		364.5	116.1	24		667.4	75.7
48		292.1	38.6	48		599.3	52.6
72		261.4	47.7	72		516.4	42.9
120		296.5	38.6	120		434.5	47.7
				168		317.0	27.4

<73>

표 3

파라메타	LK8 단백질	LK8-Fc 융합단백질
Cmax (pmol/mL)	903	667
Tmax (h)	2	24
AUC (0-t) (h · pmol/mL)	40,536	103,001
AUC (inf) (h · pmol/mL)	<sup>1</sup> -	176,759
$\lambda z$ (h <sup>-1</sup> )	<sup>1</sup> -	0.00392
t1/2	<sup>1</sup> -	177

<74>

<75>

<sup>1</sup>은 혈청 농도-C120>C72에서의 로그선 기울기가 없어 측정을 할 수 없었음.

<76>

실시에 7. LK8-Fc 융합단백질 처리에 따른 고형암 성장 억제

<77>

인간 대장암 세포가 이종 이식된 종양 모델을 사용하여, LK8-Fc 융합단백질이 고형암의 성장에 억제 효능이 있는지를 관찰하였다. 구체적으로, 10% FBS (GIBCO, USA)가 첨가된 DMEM(GIBCO, USA) 배지에서 배양된 약  $5 \times 10^6$  개의 LS174T 인간 대장암 세포(ATCC LS174T, USA)를 BalB/C 누드마우스(찰스 리버, 일본)의 등쪽 근위 중앙부에 피하 접종하였다. 대장암 세포 이식 후 10일경과 시, LK8-Fc 융합단백질 및 LK8 단백질을 투여하였다. LK8-Fc 융합단백질과 LK8 단백질은 각각 35mg/kg/회, 10mg/kg/회로 처리함으로써 동일한 몰 농도로 투여하였으며, 투여 스케줄은 LK8-Fc 융합단백질의 경우, 실시에 6의 PK 실험결과에 근거해서 7일에 1회 투여하였으며, LK8-Fc 융합단백질과 LK8 단백질의 효능 비교를 위해서 LK8 단백질은 7일에 1회 투여하는 그룹과 이전 실험에서 효능이 확인되었던 스케줄인 1일 1회 투여하는 그룹을 양성 대조군으로 설정하여 투여하였다. 그룹 당 5 마리를 사용하였으며, 종양을 이식한 후 약 한 달 동안 암의 성장을 관찰하였다. 처리 과정은 20일간 계속되었으며, 그 이후에 종양의 크기를 3 내지 4일에 한 번씩 측정하였으며, 모든 실험은 2번 반복하였다.

<78>

그 결과, LK8 단백질 처리 및 LK8-Fc 융합단백질 처리에 의하여 종양의 성장이 저하되었으며, LK8 단백질 처리군 중 1일 1회 투여한 그룹과 LK8-Fc 융합단백질을 7일에 1회 투여한 그룹은 대조군에 비하여 종양성장 억제 효과가 관측되었다 (도 7). 그러나 LK8을 LK8-Fc 융합단백질 스케줄과 마찬가지로 7일에 1회 투여했을 경우 종양 성장 억제 효능이 관측되지 않았다. 구체적으로, 세포주를 이식한지 21일째에 관측한 결과, 대조군인 saline 투여 그룹의 종양 부피는 평균  $2409 \pm 591 \text{ mm}^3$  (± 표준편차)이었고, LK8 단백질을 1일 1회 투여한 그룹에서는

1188 ± 1022 mm<sup>3</sup> (± 표준편차)이었으며, LK8 단백질을 7일에 1회 투여 그룹은 3203 ± 3284 mm<sup>3</sup> (± 표준편차)이었고, LK8-Fc 융합단백질 7일에 1회 투여 그룹은 899 ± 773 mm<sup>3</sup> (± 표준편차)이었다. 즉 대조군인 saline 투여 그룹과 종양 성장물의 평균값과 비교 시, LK8 단백질의 1일 1회 투여 그룹은 약 50%의 종양생장억제 효과를 나타내었으며, LK8-Fc 융합단백질 7일에 1회 투여 그룹은 약 63%의 종양 성장 억제 효과가 관측되었다. LK8-Fc 융합단백질 단백질의 7일 1회 투여 그룹이 LK8 단백질을 1일 1회 투여한 그룹과 유사한 종양 성장 억제 효능이 관찰되었으며, 이는 LK8-Fc 융합단백질의 증가된 반감기에 기인한 것이다.

<79> **실시예 8. LK8-Fc 융합단백질의 전이 억제능 분석**

<80> LK8-Fc 융합단백질이 대장암 세포주의 간전이에 대하여 억제효능이 있는지를 관찰하기 위하여, BALB/c 누드 마우스(찰스리버, 일본)의 비장에 결장암을 이식시킨 동물모델을 사용하여 암의 간 전이(liver metastasis) 정도를 관측하였다. 구체적으로, BALB/c 누드 마우스를 케타민(Sigma, 미국)을 사용하여 마취한 후 비장에 3 x 10<sup>5</sup> 개의 LS174T 인간 대장암 세포를 이식, 하루 경과 후 각 LK8-Fc 융합단백질의 투여를 시작하였다. 단백질의 투여농도는 고형암 모델의 경우에서와 마찬가지로 35mg/kg/회의 농도로 실시예 6의 PK 실험결과에 근거해서 7일에 1회 투여하였다. 종양 이식 14일 후, 마우스를 해부하여 간을 적출한 후 암의 관찰 및 전이된 암의 nodule 수를 계수하여 전이의 정도를 측정하였다.

<81> 그 결과, 간 표면에 전이되어 생긴 nodule 수는 대조군인 saline을 처리한 그룹은 단일면적당 120.3±35.1 개 (± 표준편차)이고, LK8-Fc 융합단백질을 처리한 그룹은 56.8 ± 31.9 개 (± 표준편차)로, LK8-Fc 융합단백질이 투여된 그룹이 대조군에 비해 전이로 생성된 nodule 수가 현저하게 감소되었음을 확인할 수 있었다 (도 8).

**발명의 효과**

<82> 이상 상세히 살펴본 바와 같이, 본 발명은 LK8단백질과 인간 면역글로불린 IgG1의 Fc 부분이 접합된 융합단백질 LK8-Fc을 제공하는 효과가 있으며, 상기 융합단백질 LK8-Fc를 함유하는 것을 특징으로 하는 암치료용 조성물을 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따른 Fc가 접합된 LK8 융합단백질은 혈관생성 억제 효능과 그에 따른 항암 및 암전이 억제 효능을 가지면서도 체내 반감기가 매우 길어, 보다 효율적이고, 경제적인 암치료제 또는 암억제제로 사용될 수 있다.

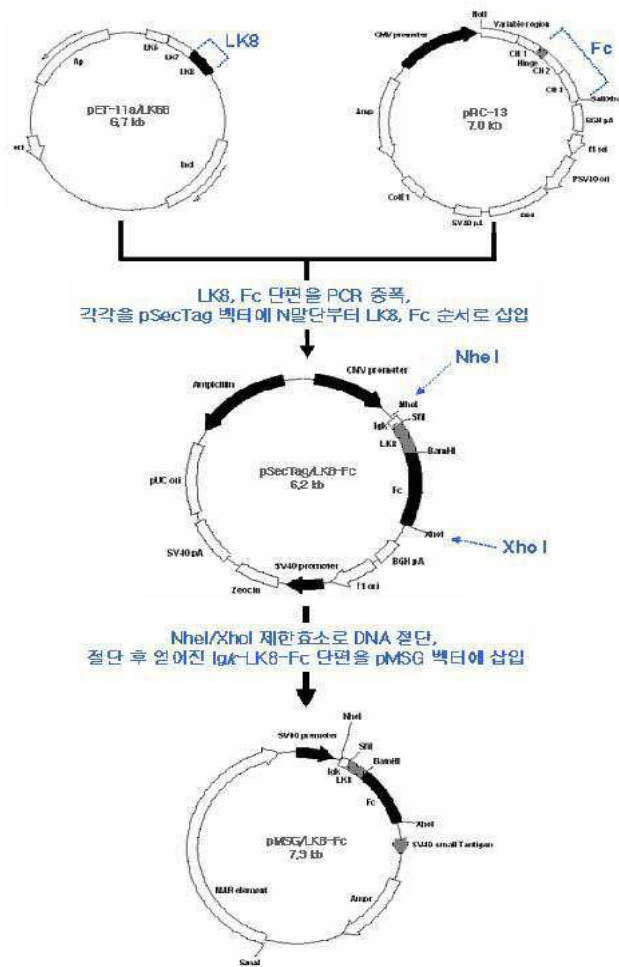
<83> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

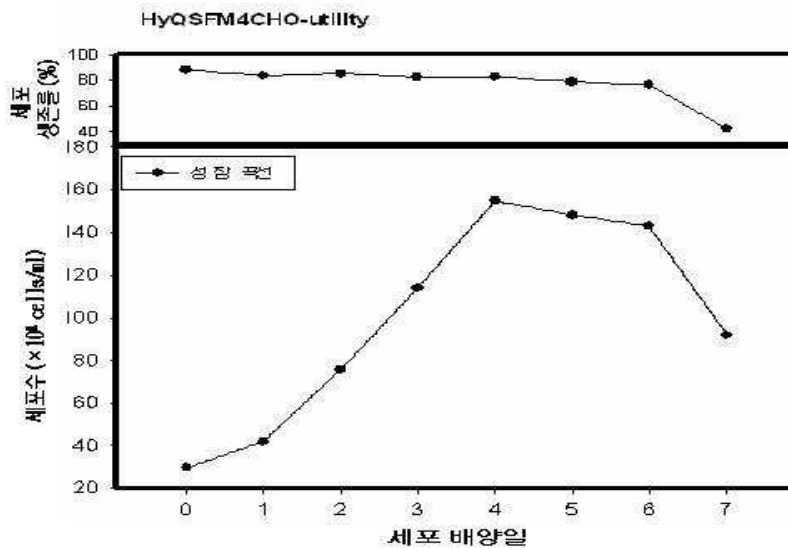
- <1> 도 1은 LK8-Fc 융합단백질을 암호화하는 유전자의 발현백터인 pMSG/LK8-Fc의 제조과정을 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 스피너 배양 시의 CHO/LK8-Fc 세포주의 성장곡선 및 생존률을 나타낸 그래프이다.
- <3> 도 3a는 친화성 크로마토그래피를 이용한 LK8-Fc 융합단백질의 정제과정에서 글리신 완충액의 농도와 시간에 따른 LK8-Fc 융합단백질 용출을 나타낸 그래프이다.
- <4> 도 3b는 웨스턴블러팅을 이용하여 정제된 LK8-Fc 융합단백질을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- <5> 도 4a는 LK8-Fc 융합단백질의 혈관내피 세포를 이용한 상처 이동실험(wound migration)에서, 시료 처리에 따른 면적당 이동한 세포수를 나타낸 그래프이다.
- <6> 도 4b는 LK8-Fc 융합단백질의 혈관내피 세포를 이용한 상처 이동실험(wound migration)에서, 시료처리에 따른 세포이동률(%)을 나타낸 그래프이다.
- <7> 도 5는 CAM 어세이를 통한 LK8-Fc 융합단백질의 생체내 역가를 나타낸 그래프이다.
- <8> 도 6은 LK8-Fc 융합단백질의 약물 동태(PK) 프로필을 나타낸 그래프이다.
- <9> 도 7은 LK8-Fc 융합단백질 처리에 의한 종양성장 억제능을 나타낸 그래프이다.
- <10> 도 8은 LK8-Fc 융합단백질 처리에 의한 전이 억제능을 나타낸 그래프이다.

도면

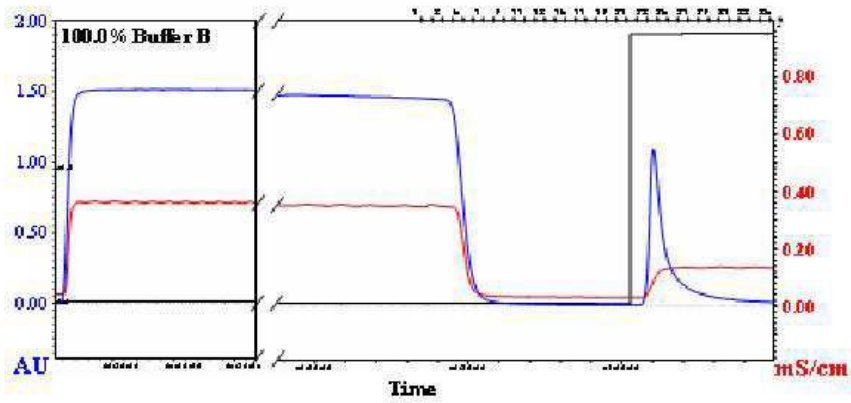
도면1



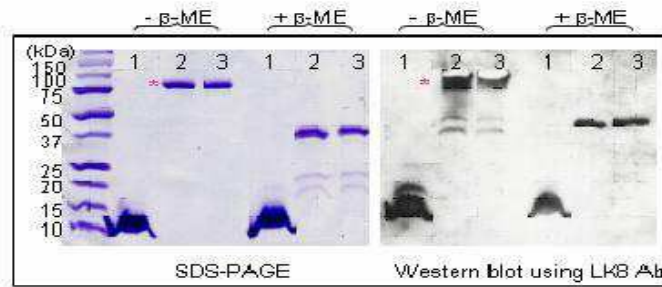
도면2



도면3a

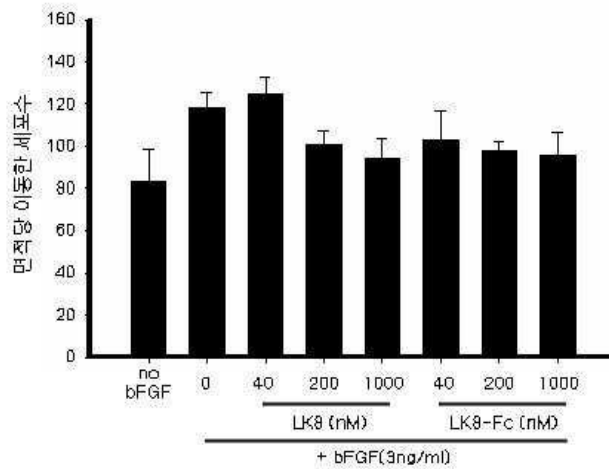


도면3b



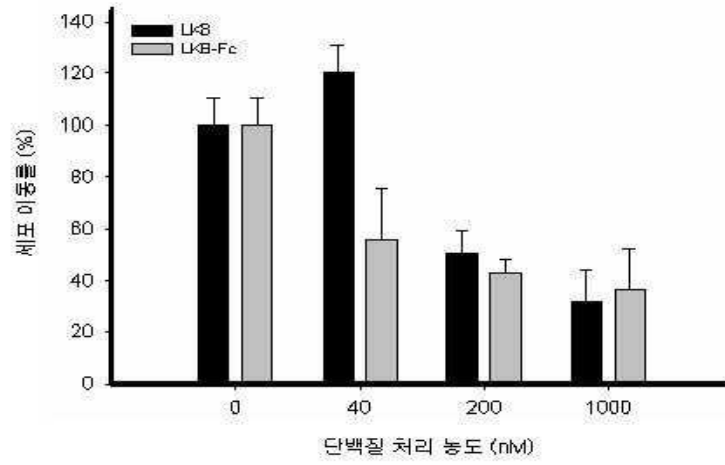
Lane 1: LK8  
 Lane 2: LK8-Fc 1st  
 Lane 3: LK8-Fc 2nd

도면4a

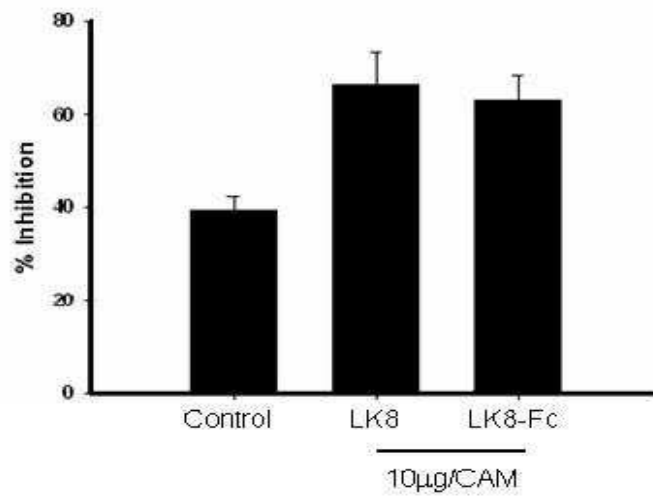




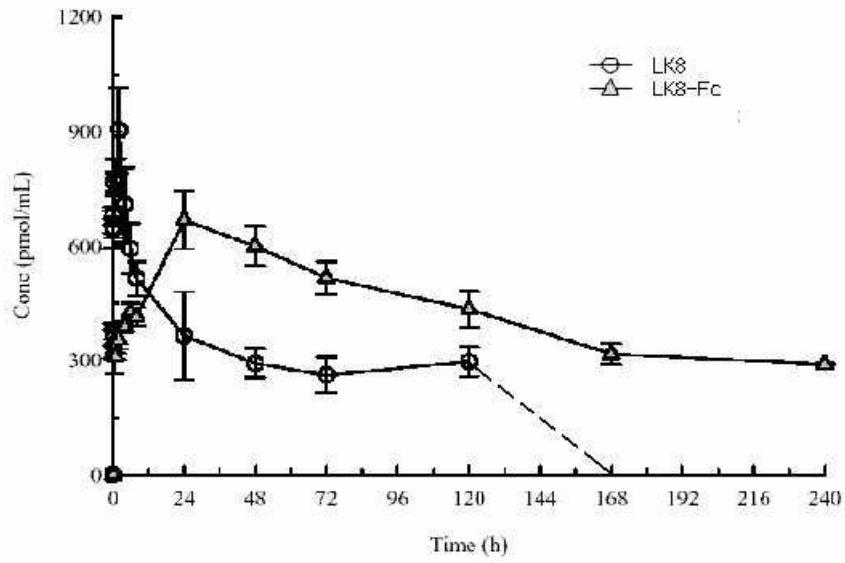
도면4b



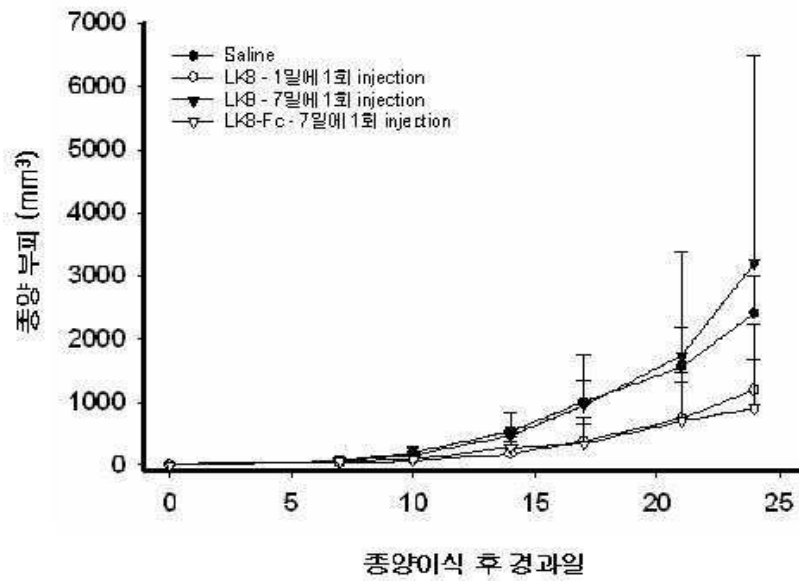
도면5



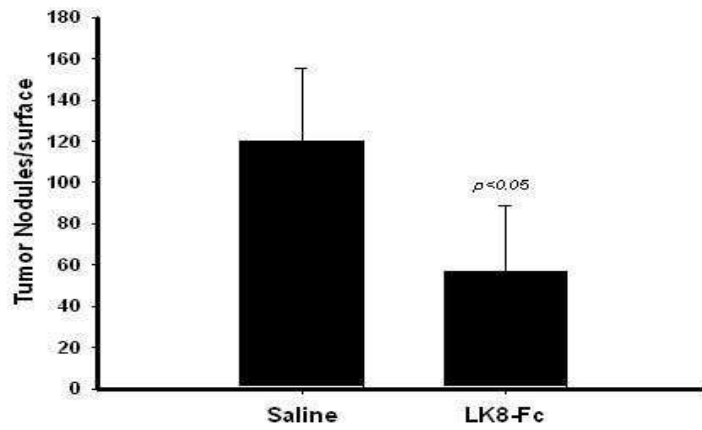
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Mogam Biotechnology Research Institute  
 <120> Fusion Proteion of Imunoglobulin Fc and Human Apolipoprotein(a) Kringle Fragment

<130> P06-B280

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 258

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaacaagact gtatgtttgg gaatgggaaa ggataccggg gcaagaagc aaccactgtt 60

actgggacgc catgccagga atgggctgcc caggagcccc atagacacag cacgttcatt 120

ccagggacaa ataatgggc aggtctggaa aaaaattact gccgtaacce tgatgtgac 180

atcaatggtc cctggtgcta cacaatgaat ccaagaaaac ttttgacta ctgtgatatc 240

cctctctgtg catcctct 258

<210> 2  
 <211> 699  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgeccaccgt gccccagcacc tgaactcctg 60  
 gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 120  
 acccctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180  
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 360  
 atctcaaag ccaaaggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420  
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480  
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct 540  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600  
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660  
 tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 699

<210> 3  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 3

gcggcccagc cggccgaaca agactgtatg tttg 34

<210> 4  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 4  
 cgggatccag aggatgcaca gagaggata tc 32

<210> 5  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 5  
 cgggatccga gcccaaatct tgtgac 26

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 6  
 tataactcgag tcatttacc ggagacaggg 30