

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 4월 23일 (23.04.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/080656 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/009975
- (22) 국제출원일: 2019년 8월 8일 (08.08.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0122498 2018년 10월 15일 (15.10.2018) KR
- (71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER) [KR/KR]; 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동), Gyeonggi-do (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이병일 (LEE, Byung Il); 10360 경기도 고양시 일산서구 일산로 487, 1808동 1401호 (일산동, 후곡

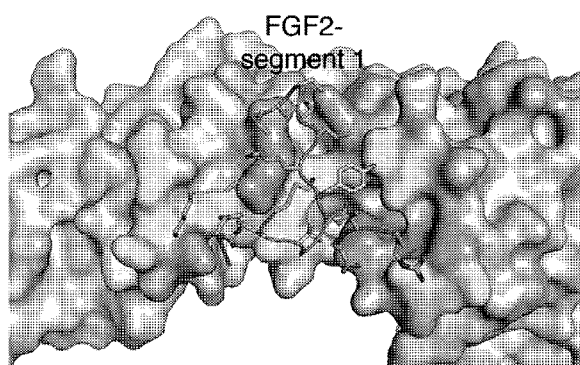
마을18단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 장현철 (JANG, Hyon Chol); 07982 서울시 양천구 목동서로 100, 310동 107호 (목동, 목동신시가지아파트3단지), Seoul (KR). 김태우 (KIM, Tae Woo); 02566 서울시 동대문구 정릉천동로 58, 102동 402호 (용두동, 롯데캐슬피렌체), Seoul (KR). 봉승민 (BONG, Seung Min); 08600 서울시 금천구 금하로1다길 34 (독산동), Seoul (KR). 송보민 (SONG, Bo Min); 10562 경기도 고양시 덕양구 원흥1로 25, 1101동 1215호 (원흥동, 고양삼송엘에이치원흥마을 11단지), Gyeonggi-do (KR). 곽혜란 (GWAK, Hye Ran); 05748 서울시 송파구 성내천로37길 37, 112동 905호 (마천동, 송파파크데일1단지), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: FGF2 OR API5 DERIVED PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: FGF2 또는 API5 유래 펩타이드 및 그의 용도



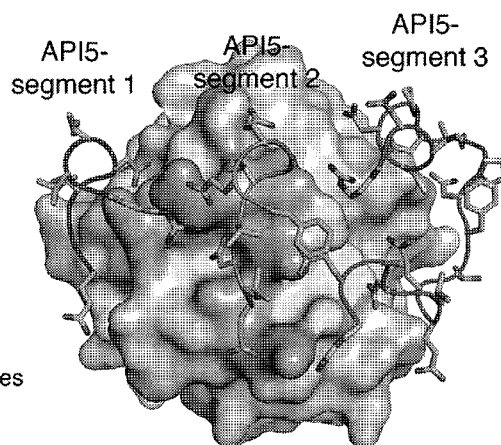
■ Hydrogen bond/salt bridge ■ Other buried interface residues

FGF2-segment 1: ²⁶¹KRTGQYKLGSKT²⁷²

API5-segment 1: ¹⁴²QGDIVR¹⁴⁸

API5-segment 2: ¹⁸³LEDVTGEEF¹⁹¹

API5-segment 3: ²¹⁹EQADLEQTFNPSDPDCVDR²³⁷



(57) Abstract: The present invention relates to a synthetic peptide comprising an amino acid sequence derived from apoptosis inhibitor 5 (API5) and fibroblast growth factor-2 (FGF2) and, more specifically, to the synthetic peptide and a method for screening a substance that alleviates anticancer drug resistance using same. The present invention confirmed that anticancer drug resistance can be alleviated, by revealing the three-dimensional structure of an API5-FGF2 conjugate, accurately identifying binding sites of the two proteins, and blocking the binding of FGF2 and API5. Therefore, the FGF2 or API5 derived peptide of the present invention can be utilized as a peptide for use in anticancer treatment or in inhibiting anticancer drug resistance, and the FGF2 or API5 derived peptide of the present invention can be effectively used for a method for screening a substance that alleviates anticancer drug resistance, as a composition for use in inhibiting anticancer drug resistance, and as a pharmaceutical composition or an anticancer adjuvant for use in the prevention or treatment of cancer.

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 API5(apoptosis inhibitor 5) 및 FGF2(fibroblast growth factor-2) 유래의 아미노산 서열을 포함하는 합성 펩타이드 등에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 상기 합성 펩타이드와 이를 이용하여 항암제 내성을 완화하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 API5-FGF2 결합체의 3차원 구조를 규명하고, 두 단백질의 결합자리를 정확하게 동정하였으며 FGF2와 API5의 결합을 차단함으로써, 항암제에 대한 내성을 완화시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 API5 또는 FGF2 유래 펩타이드는 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드로 활용할 수 있으며 이를 이용하는 경우 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법, 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물, 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물 내지 항암 보조제로서 효과적으로 활용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: FGF2 또는 API5 유래 펩타이드 및 그의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 2018년 10월 15일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2018-0122498호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 본 발명은 API5(apoptosis inhibitor 5) 및 FGF2(fibroblast growth factor-2) 유래의 아미노산 서열을 포함하는 합성 펩타이드 등에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 상기 합성 펩타이드와 이를 이용하여 항암제 내성을 완화하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 전 세계적으로 새로이 진단되는 암환자는 연평균 현재 1,000만 명에서 2020년에는 1,500만 명으로 급증할 것으로 예상되고 있고, 이는 사람의 평균 수명 증가 및 모든 암의 약 60%가 60세 이후 발병한다는 사실에 근거한 것이다. 현재 우리나라의 경우 2002년부터 고령화 사회에 진입하여 2019년에는 전체 인구 중 65세 이상 인구의 비율이 14.4%까지 높아질 전망이다. 우리나라는 다른 나라에 비해 고령화가 빠르게 진행되고, 이에 따라 암 발생 빈도가 함께 높아지며 이로 인한 사망자도 빠르게 증가하는 추세이다.
- [4] 한편, 암의 치료를 위해 사용되는 항암제는 DNA damage를 일으켜 세포를 죽이는 방식의 화학 항암제와 암세포에만 존재하는 특정 표적 단백질을 공격하는 표적 항암제가 있으나, 항암제 내성의 발생으로 암의 치료 및 재발의 문제가 있다. 항암제의 내성은 약물의 표적 단백질의 발현 변화 및 변성, 유전자 손상 회복 시스템의 증가, 세포 사멸 신호 전달 유도의 실패 등으로 진행되며, 화학 항암제와 표적 항암제 내성이 세포사멸 억제 기전의 영향에 의함이 알려져 있다.
- [5] API5은 세포사멸 억제 단백질로서, 암세포의 이동과 침윤에 관여하여 암의 전이와 관련이 깊고, 최근 암세포의 면역 회피에도 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 이에, 암 치료제 내성에 관여하는 세포사멸 억제 단백질의 기전을 규명하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 구체적으로, API5를 발현하는 암환자의 경우 예후가 좋지 못하며, API5가 사람의 암세포에서 FGFR 시그널링을 통해 항암제 내성을 유도하는 것이 보고되었다.
- [6] 그 중에서도 API5는 암세포에서 FGF2/FGFR1 경로를 통해 ERK를 활성화 시킴으로써 그 증식에 기여함이 알려졌으나, API5 및 FGF2 구조로부터 단백질-단백질 상호작용을 표적으로 한 약물의 개발은 아직 완성되지 않는 등 관련 연구가 미흡한실정이다.

[7]

[8] [선행기술문헌]

[9] (특허문헌 1) 대한민국특허등록공보 10-1816593

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 항암제 내성을 유도하는 API5의 기전을 연구하던 중, API5가 FGF2와 결합함으로써 항암제에 대한 내성을 증가시킴을 확인하고, X-선 결정학을 이용한 단백질 삼차원 구조 규명을 통하여 API5와 FGF2의 결합부위를 확인하고 결합에 관여하는 특정 부위 펩타이드를 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[12]

[13] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은, 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 준비하는 단계;

[15] 상기 펩타이드에 특이적으로 결합하는 후보물질을 상기 펩타이드에 처리하는 단계; 및

[16] 상기 펩타이드와 후보물질의 결합을 측정하는 단계;

[17] 를 포함하는 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드를 포함하는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물, 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물 내지 항암 보조제를 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[20]

[21] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[22] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드를 제공한다.

[23] 본 발명의 바람직한 일실시에 따르면, 상기 펩타이드는 API5(apoptosis inhibitor 5)와 FGF2(fibroblast growth factor-2)의 결합을 억제하는 것일 수 있다.

[24] 본 발명의 바람직한 일실시에 따르면, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은

- 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열로 암호화 되는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열로 암호화 되는 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 앞 또는 뒤에 서열번호 8의 아미노산 서열이 위치하는 것일 수 있다.
- [27] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 항암제는 독소루비신, 5-플루오로우라실, 카르보플라틴, 시스플라틴, 카르무스틴, 다카바진, 에토포사이드, 비노렐빈, 토포테칸, 이리노테칸 및 에스트라무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [28] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 항암제는 위암, 폐암, 자궁경부암, 대장암, 유방암, 전립선암, 흑색종, 간암, 췌장암, 난소암, 갑상선암 및 방광암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암을 대상으로 하는 것일 수 있다.
- [29] 본 발명은 또한, 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 준비하는 단계;
- [30] 상기 펩타이드에 특이적으로 결합하는 후보물질을 상기 펩타이드에 처리하는 단계; 및
- [31] 상기 펩타이드와 후보물질의 결합을 측정하는 단계;
- [32] 를 포함하는 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [33] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 방법은 상기 펩타이드와 후보물질이 결합을 형성한 경우 항암제 내성 완화물질로 판정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [34] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 포함하는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물, 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물 내지 항암 보조제를 제공한다.
- [35]
- [36] 상기 기재한 바와 같이, 본 발명자들은 항암제 내성을 유도하는 API5의 기전을 연구하던 중 API5가 FGF2와 결합함으로써 항암제에 대한 내성을 증가시킴을 확인하고, X-선 결정학을 이용한 단백질 삼차원 구조 규명을 통하여 API5와 FGF2의 결합부위를 확인하고 결합에 관여하는 특정 부위 펩타이드를 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [37]
- [38] 본 발명에서 사용하는 용어 “항암제 내성 억제”는 암세포의 항암제에 대한 저항 내지 내성을 감소 내지 완화시켜 항암제의 암세포에 대한 항암 효과가 완전히 나타날 수 있도록 하는 모든 효과를 의미한다.
- [39] 본 발명에서 사용하는 용어 "API5(Apoptosis inhibitor 5)"는 1997년 성장인자 없이도 세포사멸이 이루어 지지 않은 세포의 cDNA 분석을 통해 증가된

유전자로 발견되어 AAC-11이라고 명명되었다. API5는 여러 암세포에서 암의 생존 증가에 관여한다고 보고되었는데, Acinus(ACIN1)와 물리적인 결합을 통해 Acinus 매개성 DNA 절편을 통한 세포사멸 유도를 억제하고 세포사멸 단백질인 Caspase-3의 활성을 막는다. 뿐만 아니라 E2F1에 유도되는 세포사멸을 효과적으로 억제하며 API5 발현을 저하하면 항암제의 세포독성이 증가되는 것이 확인되었다. 또한, 암세포의 이동과 침윤에 관여하여 암의 전이와 관련이 깊고, 최근 암세포의 면역 회피에도 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다.

- [40] 본 발명에서 사용하는 용어 "FGF2(fibroblast growth factor 2)"는 23개의 FGF 구성원으로 이루어진 커다란 섬유아세포 성장 인자들 패밀리의 하나로서, 중추신경계 내의 FGF 구성원 중 가장 풍부하다. 이는 다양한 세포 형태에 있어서, 증식, 분화, 발달 및 생존의 조절 매개체로서 중요한 역할을 하고 신경계에서 분열 촉진 활성(mitogenic activity)을 가진다. 또한, FGF2는 잠재적인 혈관형성(angiogenic) 효과, 평활근 세포(smooth muscle cells)의 성장 촉진, 상처 치유 및 조직 회복과 더불어, 인간 및 마우스 배아줄기(embryonic stem; ES) 세포의 다분화능(pluripotent) 상태를 유지하는 것으로 보고되었다. FGF2는 고분자량(high molecular weight; 22, 22.5, 24 또는 34 kDa) 및 저분자량(low molecular weight; 18 kDa) 두 종류가 존재한다. 고분자량 FGF2는 N 말단에 핵 위치 신호(nuclear localization signal; NLS)가 존재하여 고분자량 FGF2가 핵에 위치하도록 하는 반면, 저분자량 FGF2는 N 말단에 NLS는 존재하지 않는 반면 C 말단의 비전형적인 이분 NLS로 인해 저분자량 FGF2가 핵에 위치하도록 조절한다.

[41]

- [42] 본 발명의 일실시예에서는, API5 및 FGF2 복합체의 3차원 구조 및 결합을 검증하였으며 상기 결합에 직접적으로 관여하는 결합 부위를 확인하였다(실시예 1).

- [43] 본 발명의 다른 실시예에서는, API5와 FGF2 복합체의 기능을 실험한 결과, API5-FGF2 복합체는 mRNA 핵 수출(nuclear export)에 작용함을 확인하였다(실시예 2).

- [44] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, API5 고갈(depletion)시 시스플라틴에 대한 내성이 감소하고 과발현시 시스플라틴에 대한 내성이 증가하고 API5 돌연변이체의 과발현에서는 내성 증가 현상이 사라짐을 확인하였다(실시예 3).

- [45] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 단백질 3차원 구조를 기반으로 하여 API5에 결합하는 FGF 유래 펩타이드 및 FGF2에 결합하는 API5 유래 펩타이드의 서열을 도출하였다(실시예 4).

- [46] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, API5 또는 FGF2 유래 펩타이드에 의해 시스플라틴 내성 감소 효과가 나타남을 확인하였다(실시예 5).

- [47] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, CPP 와 API5 유래 펩타이드를 융합하는 경우 HeLa 암 세포의 생존률이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(실시예 6).

[48]

[49] 따라서, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드 내지 상기 펩타이드를 포함하는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물, 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공할 수 있다.

[50] 상기 서열번호 1은 API5 유래의 펩타이드이며, 상기 서열번호 2는 FGF2 유래의 펩타이드이다. 따라서 상기 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드는 API5 및/또는 FGF2와 결합하여 API5-FGF2 복합체 형성을 억제하는 것 일 수 있다.

[51] 본 발명은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열 내지 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열을 제공할 수 있다.

[52] 또한, 본 발명의 상기 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 앞 또는 뒤에 서열번호 8의 아미노산 서열이 위치할 수 있는데, 바람직하게는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 앞에 서열번호 8의 아미노산 서열이 위치할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 1의 앞에 서열번호 8의 아미노산 서열이 위치할 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 1 과 서열번호 8이 링커(linker)인 GGG로 연결된 서열번호 9의 아미노산 서열 형태로 포함되는 것이 바람직하다.

[53] 상기 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함되며, 구체적으로, 상기 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[54] 본 발명의 상기 항암제는 독소루비신, 5-플루오로우라실, 카르보플라틴, 시스플라틴, 카르무스틴, 다카바진, 에토포사이드, 비노렐빈, 토포테칸, 이리노테칸 및 에스트라무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[55] 본 발명의 상기 항암제는 위암, 폐암, 자궁경부암, 대장암, 유방암, 전립선암, 흑색종, 간암, 췌장암, 난소암, 갑상선암 및 방광암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암을 대상으로 하는 것일 수 있다.

[56] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 봉해제

또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

- [57] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.
- [59] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [61] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드를

기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[62] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[63] 본 발명의 항암보조제는 항암제의 항암효과를 증대시키거나 항암제의 부작용을 억제 또는 개선시키기 위한 모든 형태를 의미한다. 본 발명의 항암보조제는 다양한 종류의 항암제 또는 항암보조제와 병용투여될 수 있으며, 병용투여시 통상적인 항암제의 투여량보다 낮은 수준으로 항암제를 투여하더라도 동등한 수준의 항암치료효과를 나타낼 수 있으므로 보다 안전한 항암치료를 수행할 수 있다.

[64] 상기 항암보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[65] 본 발명의 항암보조제는 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 항암보조제로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 항암치료 보조제에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[66] 본 발명의 항암보조제는 비경구 투여를 위한 제제일 수 있으며, 제제에 대한 설명은 상기 약학적 조성물의 제제에 대한 기재로 대신한다.

[67]

[68] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 준비하는 단계;

[69] 상기 펩타이드에 특이적으로 결합하는 후보물질을 상기 펩타이드에 처리하는 단계; 및

[70] 상기 펩타이드와 후보물질의 결합을 측정하는 단계;

[71] 를 포함하는 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[72] 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 내지 항암제는 상기 항암제 내성 완화에 사용하기 위한 펩타이드에서 기재된 것과 동일한 것이므로 설명은 상기 기재로 대신한다.

- [73] 본 발명의 상기 방법은 상기 펩타이드와 후보물질이 결합을 형성한 경우 항암제 내성 완화물질로 판정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [74] 본 발명은 상기 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다.
- [75] 상기 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드는 상기에서 기재된 것과 동일한 것이므로 설명은 상기 기재로 대신한다.

[76]

발명의 효과

- [77] 본 발명은 API5-FGF2 결합체의 3차원 구조를 규명하고, 두 단백질의 결합자리를 정확하게 동정하였으며 FGF2와 API5의 결합을 차단함으로써, 항암제에 대한 내성을 완화시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 API5 또는 FGF2 유래 펩타이드는 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드로 활용할 수 있으며 이를 이용하는 경우 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법, 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물, 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물, 암 예방 또는 치료 방법 내지 항암 보조제로서 효과적일 수 있다.

[78]

도면의 간단한 설명

- [79] 도 1은 API5-FGF2 복합체 크리스탈의 형태를 현미경으로 관찰한 결과이다.
- [80] 도 2는 API5-FGF2 복합체의 전체적인 구조(overall structure)를 도시한 것이다.
- [81] 도 3은 API5-FGF2의 결합 부위(interaction interface)를 구체적으로 도시한 것이다.
- [82] 도 4는 API5 또는 FGF2의 야생형(WT) 또는 돌연변이(3Mut)를 이용하여 GST-풀다운 어세이(pull down assay)를 수행한 결과이다. API5 또는 FGF2의 야생형(WT) 사이의 강한 친화도를 확인할 수 있었다.
- [83] 도 5는 API5 또는 FGF2의 야생형(WT) 또는 돌연변이(3Mut)를 이용하여 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)을 수행한 결과이다. API5 또는 FGF2의 야생형(WT) 사이의 강한 친화도를 확인할 수 있었다.
- [84] 도 6은 도 5의 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [85] 도 7은 API5-FGF2 복합체의 기능 및 기전을 알아내기 위한 실험과정을 개략적으로 나타낸 것이다.
- [86] 도 8 내지 도 11은 API5-FGF2 복합체와 결합하는 단백질들(interactome)의 분석 및 이들 단백질들의 경로 분석 결과이다.
- [87] 도 12는 UAP56, API5, 및 FGF2를 이용하여 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)을 수행한 결과이다. UAP56과 API5-FGF2 복합체와의 강한 친화도를 확인할 수 있었다.
- [88] 도 13은 UAP56, API5, 및 FGF2를 이용하여 GST-풀다운 어세이(pull down

assay)를 수행한 결과이다. UAP56과 API5-FGF2 복합체와의 강한 친화도를 확인할 수 있었다.

- [89] 도 14는 API5-FGF2 결합은 벌크(bulk) mRNA의 핵 수출(nuclear export)에 관여함을 poly(A) 꼬리(tail)를 갖는 벌크 mRNA에 대한 RNA-FISH(RNA Fluorescence In Situ Hybridization) 방법을 이용하여 확인한 결과이다.
- [90] 도 15는 4E-SE 엘리먼트를 포함하는 MYC, CCND1, CCNE1 또는 MALAT1의 mRNA 수출을 RT-qPCR을 통해 분석한 결과이다. API5가 하향 조절된 경우와 API5 3Mut로 치환된 경우에 핵에서 세포질로 RNA가 이동하지 못하고 핵에 정체됨을 확인할 수 있었다.
- [91] 도 16은 유전자 mRNA 4E-SE 엘리먼트를 갖는 MYC 또는 CCND1의 단백질 발현양과 API5의 발현 내지 돌연변이 여부와의 관계를 나타낸다. RNA가 핵에서 세포질로 이동하지 못하여 리보솜에 의해 단백질이 합성되지 못하기 때문에 c-MYC 또는 CCND1 단백질 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다.
- [92] 도 17은 API5 고갈(depletion)에 의한 시스플라틴(cisplatin)에 대한 내성 감소 효과를 나타낸 것이다.
- [93] 도 18은 API5 과발현에 의한 시스플라틴에 대한 내성 증가 효과를 나타낸 것이다.
- [94] 도 19는 삼차원 구조 분석을 통한 API5 결합 펩타이드와 FGF2 결합 펩타이드의 결합위치 및 펩타이드 서열을 나타낸 것이다.
- [95] 도 20는 HeLa 세포를 이용하여 IC₂₀ 측정 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [96] 도 21는 API5 또는 FGF2 유래 펩타이드의 항암제 내성 세포에 항암제 내성 감소효과 실험방법을 나타낸 것이다.
- [97] 도 22는 API5 또는 FGF2 유래 펩타이드에 의한 시스플라틴 내성감소효과를 그래프로 나타낸 것이다. API5 또는 FGF2 유래 펩타이드의 농도 의존적으로 세포생존률이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [98] 도 23은 CPP-API5 가 CPP-Scramble 에 비하여 Hela 세포의 생존률을 유의적으로 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

[99]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[100] [실시예 1]

[101] **API5와 FGF2 결합체의 3차원 구조 및 결합 검증**

[102] **<1-1> API5-FGF2 복합체의 삼차원 구조 분석 방법**

[103] API5 전장(1-504) 및 저분자량(low molecular weight; LMW) FGF2(135-288)를 pET 28b 벡터에 각각 클로닝 하여 대장균에서 발현하였다. FGF2는 대장균에 코돈 최적화(codon optimize)한 합성 유전자를 사용하였으며 대장균 발현을 용이하게 하기 위하여 이황화물(disulfide) 결합을 이루는 시스테인(cysteine)은 세린(serine)으로 치환하였다(C211S/C229S, Uniport P09038-4 기준, 해당

아미노산 치환은 FGF2의 기능 및 구조에 영향을 미치지 않아 본 발명에서 FGF2라 명명하였다). API5-FGF2 복합체 구조를 규명하기 위하여 API5와 FGF2 제조합 단백질을 Ni-NTA resin(Qiagen, Germany)과 HiLoad 16/600 Superdex 200 또는 75 prepgrade(GE Healthcare, USA) 컬럼을 이용하여 대량 발현 정제하였으며 최종 정제된 API5는 15.5 mg/ml 100 μ l 및 FGF2 5.3 mg/ml 300 μ l를 섞어서 4°C에서 하루동안 인큐베이션한 후 결정화를 시도하였다.

폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol; PEG) 6000을 침전제로 결정화하였을 경우 API5-FGF2 복합체 결정을 얻을 수 있었으며 최적의 결정화는 100 mM Na-HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 10%(v/v) 폴리에틸렌글리콜 6000 조건이었으며, 그 결과 [도 1]과 같은 결정을 얻을 수 있었다.

[104] 상기 결정을 포항 방사광 가속기의 BL-7A 빔라인을 이용하여 API5-FGF2 복합체 회절 데이터를 획득하였으며 이를 이용하여 삼차원 구조를 2.6 Å 해상도로 규명하였으며 결정 공간군은 P2₁2₁2₁으로 셀 파라미터(cell parameter)는 a=46.862, b=76.523, c=208.158 Å 이었다. 기존에 본 발명자 그룹에서 규명한 API5 구조와 이미 알려진 FGF2 구조를 이용하여 분자 치환법으로 CCP4 프로그램 패키지의 MOLREP 프로그램을 이용하여 위상문제를 해결하였다. 사용된 구조 모델의 PDB code는 3U0R (API5) 와 1BAS(FGF2)이며 모델빌딩(Model building)은 COOT 프로그램을 이용하였고, 구조모델 정밀화는 REFMAC5와 PHENIX 프로그램을 이용하였다.

[105] 그 결과, [도 2] 및 [도 3]에 나타난 바와 같이 구조를 규명하였다. 구체적으로, API5 및 FGF2의 결합에 직접적으로 관여하는 결합부위는 API5의 경우 D145, E184, D185, E190, E219, R237 및 N228 이며; FGF2의 경우 K277, K267, R262, T263, K261, K271 및 R181 인 것을 확인할 수 있었다.

[106]

[107] <1-2> GST 풀다운 어세이 및 표면 플라즈몬 공명을 이용한 단백질 결합 검증

[108] 풀다운 어세이(Pulldown assay)를 위하여 GST-API5 야생형(GST-API5 WT) 및 돌연변이(GST-API5 3Mut(E184A/D185A/E190A))를 이용하였고, 대조군으로 GST(Glutathione-S-Transferase) 단백질을 준비하였다. 상기 3개의 단백질을 각 2개씩, 총 6개의 글루타티온-아가로스 레진(glutathione-agarose resin)이 50 μ l씩 담겨진 튜브에 10 μ g씩 넣고 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음 PBS(phosphatebuffered saline) 버퍼를 500 μ l씩 6개의 튜브에 넣고 섞어준 다음 10000rpm으로 1분간 원심분리하고 상청액을 버리는 워싱 스텝(washing step)을 2회 수행하였다. GST 단백질이 담긴 2개의 튜브에 FGF2 WT(C211S/C229S) 및 FGF2 돌연변이(FGF2 3Mut, C211S/C229S/R262A/T263A/K271A)를 각각 10 μ g 넣고 나머지 API5 WT 가 담긴 2개의 튜브와 API5 3Mut가 담긴 2개의 튜브에 FGF2를 동일하게 넣은 다음 1시간 더 4°C에서 인큐베이션 하였다.

[109] 그 다음, 각 튜브에 PBS 버퍼를 500 μ l씩 넣어서 2회 워싱을 한 다음, 상청액을 버리고 5X 샘플버퍼(sample buffer, 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.05%

- 브로모페놀 블루(bromophenol blue), 10% 글리세롤(glycerol), 5% 베타-머캅토에탄올(β -mercaptoethanol)을 50 μ l씩 넣고 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel)을 이용하여 분석하였다.
- [110] 그 결과, [도 4]에 나타난 바와 같이 API5-FGF2 결합 부위(Interaction interface) 돌연변이의 경우 API5-FGF2간 결합 감소를 확인할 수 있었다.
- [111] 또한, 표면 플라스몬 공명(Surface plasmon resonance; SPR) 분광광도법(SR7000DC, Reichert Analytical Instrument, USA)을 이용하여 API5와 FGF2의 결합력을 분석하였다. 우선, 두개의 카복시메틸 덱스트란 하이드로겔 서페이스 센서칩(carboxymethyl dextran hydrogel surface sensor Chip)에 각각 단백질을 고정하기 위해서 API5 WT 40 μ g 및 API5 3Mut 10 μ g를 부동화 버퍼(immobilization buffer, 20 mM sodium acetate pH 5.5)와 함께 20 μ l/min로 포화(saturation)될 때까지 흘렸으며, 그 다음 PBS 버퍼를 30분 동안 흘리면서 평형(equilibration) 시켰다.
- [112] 모든 실험은 25°C에서 실행하였으며, API5 WT 칩에 다양한 농도의 FGF2(C211S/C229S) 및 FGF2 Mut(C211S/C229S/R262A/T263A/K271A)를 3분 동안 30 μ l/min으로 흘렸으며 API5 3 돌연변이(API5 3Mut) 칩에도 동일한 방법으로 흘려주었다. 칩의 리제너레이션(regeneration)은 10-50 mM 소듐 하이드록사이드(sodium hydroxide) 용액을 이용하였으며 상기 실험은 두 번 반복하였다. 결합력은 칩 표면에 리프랙티브 인덱스(refractive index)의 변화를 통해 측정하였고, 리스폰스 유닛(response units, μ RIU)값으로 표시하였으며 SPR 데이터는 Scrubber2 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.
- [113] 그 결과, [도 5] 및 [도 6]에 나타난 바와 같이 상기 풀다운 어세이와 마찬가지로 동정된 결합자리의 돌연변이에서는 API5-FGF2간 결합력이 줄어든 것을 확인하였다.
- [114]
- [115] [실시예 2]
- [116] API5와 FGF2 결합체의 기능 및 작용기전 분석
- [117] <2-1> API5-FGF2 복합체에 존재하는 단백질 동정
- [118] ① CRISPR/Cas9 시스템으로 내재된 API5를 제거하고 외인성 API5 야생형 및 돌연변이를 발현하는 세포주 제작
- [119] API5-FGF2 결합체의 기능을 확인하기 위해서, 세포에 내재된 API5를 API5 야생형 및 돌연변이로 치환하는 세포를 제작하였다. 이를 위해 우선, CRISPR/Cas9 시스템으로 내재된 API5의 발현을 억제할 수 있는 벡터를 CRISPR V2 벡터(Plasmid #52961, Addgene)에 가이드(guided) RNA(5'-CACCGTGTGTTTGCAGGGACTTTAGG-3', 서열번호 5)를 도입하여 제작하였다. 그 다음, 야생형 및 돌연변이 API5를 발현시키기 위해 pCAG-Flag-IRES-Blasticidin 벡터에 API5 WT 및 FGF2와 결합할 수 없는 돌연변이 3Mut(E184A/D185A/E190A) 및 4Mut(D145A/E184A/D185A/E190A)를

각각 삽입하였다.

- [120] 그 다음, API5 guided RNA, Cas9, 및 퓨로마이신 내성유전자를 동시에 포함하는 렌티바이러스(Lentivirus)를 제작하여 HeLa 세포에 형질감염시키고, 퓨로마이신을 처리하여 형질감염된 세포만 살아남게 하였다. 이후 Flag-API5 정상 및 돌연변이와 블라스티시딘(blasticidine) 내성 유전자를 동시에 발현시킬 수 있는 재조합 벡터를 리포펙타민(Lipofectamine) 3000(Thermefisher)을 이용하여 삽입하고, 블라스티시딘을 처리하여 2차 형질전환된 세포를 선택했다.
- [121] 상기 선택된 세포를 PBS를 이용하여 세척하고, 세포용해 완충용액(lysis buffer; 20mM Tris-Cl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%(v/v) Triton X-100 및 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitors)를 이용하여 세포를 용해시킨 후에 API5 항체(Abcam) 및 Flag 항체(Cell Signaling)를 이용하여 SDS-page 및 웨스턴 블롯팅으로 확인하였으며 대조군으로는 액틴(Actin) 항체(Abcam)를 사용하였다(도 7).
- [122]
- [123] ② API5 정상 및 돌연변이에 결합하는 단백질 동정
- [124] 상기 실시예 <2-1>의 ①에서 제작한, 내제된 API5 대신 Flag-tagged API5 WT 및 FGF2 4Mut을 발현하는 HeLa 세포에서 anti-Flag 항체를 이용하여 API5 WT 및 4Mut 복합체를 각각 정제한 후 LC-MS/MS를 이용하여 복합체에 포함된 단백질들을 확인하였다. 복합체 정제를 위해 헬라 세포를 단일 세포로 분리 후 IP150 버퍼(150 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 8.0), 0.1% NP-40, 10% 글리세롤, 1 mM EDTA)로 현탁(suspension)한 후 음파처리(sonication, SONICS vibra cell)을 통해 세포를 용해(lysis)하고, 15,000rpm으로 10분간 원심분리 하여 상청액을 얻었다.
- [125] 상기 얻어진 상청액에 anti-Flag 항체가 결합된 플래그 컨쥬게이티드 아가로스 비드(Flag conjugated agarose bead; Sigma-Aldrich, USA)를 각 샘플당 20 μ l 넣고 4°C에서 4시간 반응 후, 스피ندا운(spin-down) 하여 상청액을 제거했다. 그 다음, BC150 버퍼(20 mM Tris (pH 7.9), 15% 글리세롤, 1 mM EDTA, 0.05% NP-40, 150 mM KCl)로 2회, BC300 버퍼(20 mM Tris pH 7.9, 15% 글리세롤, 1 mM EDTA, 0.05% NP-40, 300 mM KCl)로 2회 세정 후, 3X Flag-펩타이드(Sigma, F4799)를 0.1 μ g/ μ l 를 포함한 TBS(150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4) 버퍼로 용리(Elution) 하였다.
- [126] 상기 용리된 복합체의 단백질들을 트립신(Trypsin)으로 자른 후, 액체크로마토그래피(Ultimate 3000 RSLCnano system, Thermo Fisher Scientific) 및 질량분석기(Q Exactive TM hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 분석하고, Proteome Discoverer 2.1 소프트웨어(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 단백질을 확인하였다.
- [127] 그 결과, [도 7] 및 [도 11]에 나타난 바와 같이 237개의 단백질이 API5 WT과 결합하였고, 그 중 112개의 단백질은 API5 4Mut와는 결합하지 않음을 확인할 수 있었다.

[128]

[129] ③ API5 정상 및 돌연변이에 결합하는 단백질들의 인터랙툼 분석

[130] API5 WT 및 4Mut의 인터랙툼(interactome)을 인제뉴어티 패스웨이 분석(Ingenuity Pathways Analysis(IPA); Ingenuity System)을 통해 분석하였다. 코어 분석에서 질병 및 기능에 따른 분류 결과 [도 8] 및 [도 9]에 나타난 바와 같이 mRNA 수송(export)와 관련된 기능에 가장 많은 단백질들이 분류되었다.

[131] 또한, mRNA 수송 머시너리(machinery) 단백질들 중 API5 WT에 FGF2 결합 의존적 혹은 비의존적으로 결합하는 단백질들을 확인하여 [도 10]에 나타내었다.

[132]

[133] <2-2> API5 및/또는 FGF2와 UAP56의 직접적인 결합 확인

[134] 표면 플라즈몬 공명 분광광도법(SR7000DC, Reichert Analytical Instrument, USA)을 이용하여 UAP56 과 API5, FGF2 또는 API5-FGF2 복합체의 결합력을 분석하였다. 하나의 폴리에틸렌글리콜(PEG)-베이스드 센서 서페이스 센서칩(Polyethylene glycol(PEG)-based sensor surface sensor Chip)에 UAP56 단백질을 고정하기 위해서 42 μg 의 부동화 버퍼(20 mM 소듐 아세테이트(sodium acetate, pH 5.5)와 함께 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 로 포화(saturation) 될 때 까지 흘린 다음 PBST 버퍼(1X PBS, 0.005% tween 20)로 30분 동안 흘리면서 평형(equilibration)시켰다.

[135] 모든 실험은 25°C에서 실행하였으며 UAP56 칩에 다양한 농도의 API5, FGF2 또는 API5-FGF2 복합체를 각각 3분 동안 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 흘렸으며 칩의 리제너레이션(regeneration)은 10 mM 글리신(Glycine) pH 1.5을 이용하였다. 상기 실험은 두번 반복하였으며 결합력은 상기 실시예 <1-2>와 동일한 방법으로 확인하였다.

[136] 그 결과, [도 12]와 같이 UAP56은 API5 단독 또는 FGF2 단독에 비하여 API5-FGF2 복합체와 보다 강한 친화력을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[137] 또한, 풀다운 어세이(Pulldown assay)를 위하여 GST-UAP56을 이용하였고, 대조군으로 GST 단백질을 준비하였다. 준비된 단백질은 3개의 튜브에 GST-UAP56 10 μg 과 HIS-API5, HIS-FGF2 또는 HIS-API5+HIS-FGF2 를 각각 10 μg 씩 넣고 4°C에서 16시간 동안 인큐베이션 하였다. 나머지 3개의 튜브에 GST 단백질을 넣고 위와 동일하게 섞어주고 다음날 총 6개의 튜브에 글루타티온-아가로스 레진(glutathione-agarose resin)을 50 μl 씩 담고 버퍼로 워싱하여 준비하였다. 6개의 튜브에 미리 준비한 샘플(GST-UAP56+HIS-API5, GST-UAP56+HIS-FGF2, GST-UAP56+HIS-API5+HIS-FGF2, GST+HIS-API5, GST+HIS-FGF2, GST+HIS-API5+HIS-FGF2)을 각각 넣고, 4°C에서 2시간 보관 후 10,000 rpm으로 1분간 원심분리하고 상청액을 버리고 남은 레진을 PBS 버퍼로 500 μl 씩 6개의 튜브에 넣고 섞어준 후 10,000 rpm으로 1분간 원심분리 후 상청액을 버렸으며 상기 워싱 방법을 두 번 반복하였다. 그 후, 일루션(Elution) 버퍼(1X PBS, 20 mM 글루타티온) 150 μl 를 첨가하고 5분간 얼음에 넣고 인큐베이션 한 후 10,000 rpm으로 2분간 원심분리 하였다. 그 다음, 상청액을

새로운 튜브에 옮기고 50 μ l씩 5X 샘플 버퍼(250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.05% 브로모페놀블루, 10% 글리세롤, 5% 베타-머캅토에탄올)를 넣어서 웨스턴 블롯팅(Western blotting)으로 분석 하였으며 이때 Anti-His 마우스(Abm, G020, Canada) 및 Anti-GST 마우스(Abm, G018, Canada)을 이용하였다.

[138] 그 결과, [도 13]과 같이 UAP56은 API5 단독 또는 FGF2 단독에 비하여 API5-FGF2 복합체와 보다 강한 친화력을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[139] 상기 [도 12] 및 [도 13]의 결과를 통하여 API5-FGF이 mRNA 수송에 중요한 단백질인 UAP56(DDX39)와 직접 결합함을 확인하였다.

[140]

[141] **<2-3> API5-FGF2 복합체가 mRNA 수송에 미치는 영향 확인**

[142] ① 컨디셔널 shRNA 발현을 통해 내제된 API5를 제거하고 외인성 API5 정상 및 돌연변이를 발현하는 세포주 제작

[143] API5를 표적하는 짧은 헤어핀 RNA(shAPI5 #1, 5'-CCACAAGGTTTGTGACATATT-3', 서열번호 6)를 Tet-pLKO-puro 벡터(Plasmid #21915, Addgene)에 넣어 독시사이클린(doxycycline) 의존적으로 shRNA(short hairpin RNA) #1이 발현되고 항상 퓨로마이신(puromycin) 내성 유전자를 발현시키는 렌티바이러스 생산용 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 실시예 <2-1>의 ①에서 제작한 pCAG-Flag-IRES-Blasticidin API5 WT 및 3Mut에 부위 특이적 변이(site-directed mutagenesis)를 통해 shAPI5에 의해 저해되지 않는 침묵 돌연변이(silent mutation)로서 API5 WT-R 및 API5 3Mut-R을 제작하였다. 두 벡터는 모두 API5의 939-944번째 뉴클레오타이드 acaagg가 acGCgg로 치환되어 shAPI5가 결합하지 못하지만, 번역되는 아미노산의 서열 변화는 없다.

[144] 우선, HeLa 세포에 Tet-PLKO-puro-shAPI5에서 생산된 렌티바이러스를 감염 시키고, 퓨로마이신으로 형질전환된 세포를 고른 후, 추가로 API5 WT-R 및 API5 3Mut-R을 리포펙타민(Lipofectamine) 3000(Thermefisher)을 이용하여 상기 형질감염된 세포주에 2차적으로 형질주입하였다. 배지에 추가로 블라스티시딘을 처리하여 형질감염 및 주입된 세포주를 제작하였으며 상기 제작된 세포주에 독시사이클린을 처리하면 내인성 API5의 발현이 저해되고 외인성 API5 WT 혹은 3Mut는 계속 발현되는 것을 웨스턴 블롯팅을 통하여 확인하였다.

[145]

[146] ② API5-FGF2 복합체가 전반적인 mRNA 수송에 미치는 영향 확인

[147] API5 단백질과 FGF2 단백질 결합체와 mRNA 수송(export)와의 연관관계를 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-3>의 ① 방법으로 제작된 세포주를 이용하여 형광동소혼성화(Fluorescence in situ hybridization; FISH) 실험을 통해 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동 정도를 조사하였다.

[148] FISH는 Cy3-labeled Oligo(dT)50(FISH probe, Genelink, USA)을 사용하고 Stellaris RNA-FISH kit(LGC Bioresarch Technologies)을 이용하여 실험을

진행하였으며 세포(shAPI5, shAPI5/API5 WT, shAPI5/API5 3Mut)는 MEM/EBSS(Hyclone, USA)배지에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)과 1% 페니실린 스트렙토마이신(penicillin streptomycin; Gibco, USA)을 첨가하여 배양하였고, 배양시 독시사이클린(doxycycline)을 처리한 것과 처리하지 않은 것을 각각 배양하여, 3일 후 10 μ M 악티노마이신 D(Actinomycin D)를 2시간 동안 처리하였다. Mock는 shRNA를 발현하는 Tet-pLKO-puro empty 벡터를 형질전환한 것으로서 대조군으로 사용하였다.

- [149] 그 다음, 상온에서 24 웰 커버 글라스 위의 세포들을 PBS 버퍼로 워싱한 후에, 픽스(Fix) 버퍼(1X PBS, 4% 포름알데히드)로 고정한 다음 PBS 버퍼로 두 번 워싱하고 70% 에탄올을 넣고 4°C에서 16시간 보관하였다. 그 다음 RNA-FISH 키트에 1X워시 버퍼 A에 10% 포름아미드(formamide)를 넣고 24웰 플렛에 1 ml씩 분주하여 워싱 하였다. 혼성화(Hybridization)를 위하여 12.5 μ M FISH 프로브(probe)를 10% 포름아미드가 함유된 혼성화 버퍼로 125 nM이 되게 희석한 다음, 24웰 플레이트에 200 μ l씩 분주하고 37°C의 어두운 곳에서 4시간 보관하였다. 그 후 혼성화 버퍼를 버리고 각 웰에 10% 포름아미드가 함유된 1X 워시 버퍼 A를 1 ml 씩 넣고 37°C에서 30분 동안 보관하였다.

- [150] 그 후, 10% 포름아미드가 함유된 1X 워시 버퍼 A에 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)을 5 ng/ml이 되게 녹였으며 상기 DAPI 솔루션을 1 ml씩 각 웰에 넣고 37°C에서 30분 동안 보관하였다. 30분 후 DAPI 솔루션을 버리고, RNA-FISH 키트에 있는 1X 워시 버퍼 B를 각 웰에 1 ml씩 넣고 상온에서 5분 동안 처리하였다.

- [151] 마지막으로, 워시 버퍼 B를 버리고 마이크로스코프 슬라이드(microscope slide) 위에 벡타쉴드 마운팅 배지(Vectashield Mounting Medium; Invitrogen, USA)를 4 μ l씩 분주하고, 24웰 플레이트에서 떼어 낸 커버 글라스를 올려놓았다. Poly(A)+RNA 측정하기 위한 이미지는 confocal-II LSM780(Carl Zeiss, Germany)에 의해 기록되었고, Zen 23 lite 프로그램을 이용하여 처리하였다.

- [152] 그 결과, [도 14]에 나타난 바와 같이 API5-FGF2 결합은 벌크 mRNA(polyA tail을 갖는 일반적인 mRNA)의 핵 수출(nuclear export)에 관여함을 확인할 수 있었다.

[153]

- [154] ③ API5-FGF2 복합체가 4E-SE 엘리먼트를 포함하는 mRNA의 수출에 미치는 영향 확인

- [155] API5-FGF2 복합체는 eIF4E/LRPPRC 복합체와 상호작용할 수 있기 때문에, 4E-SE 엘리먼트(element)를 포함하는MYC, CCND1 또는 CCNE1 의 mRNA의 수준을 분석하여 API5-FGF2 복합체가 mRNA 수출(export)에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. MALAT1은 항상 핵에 존재하는 ncRNA(noncoding RNA)로 mRNA 수출에 영향을 받지 않아 대조군으로 사용하였다.

- [156] 상기 실시예 <2-3>의 ① 방법으로 제작된 세포주에 4일 이상 독시사이클린을

처리하여 내인성 API5의 발현을 저해한 후 트립신 처리를 통하여 단일 세포로 분리한 후에 각 1×10^6 개의 세포를 준비하고 세포 전체에 존재하는 RNA, 핵 내 RNA(N) 또는 세포질 내 RNA(C)를 RNA subcellular isolation kit(Active motif, cat104694)을 이용하여 추출하였다. 각 실험군 별로 상기 키트를 2개씩 준비하여 하나는 전체 RNA를 추출하였고, 다른 하나는 핵 RNA와 세포질 RNA를 분리하여 추출하였다. 추출한 RNA는 역전사 효소(AMV)를 이용하여 DNA로 합성하였으며 합성한 DNA는 실시간 PCR을 통해 RNA 발현을 확인하였다.

[157] 그 결과, [도 15]에 나타난 바와 같이, 독시사이클린(Dox) 처리로 인해 API5가 억제되는 경우 RNA가 세포질(C)로 이동하지 못하고 핵(N)에 정체되어 있었다. 이에 API5 WT를 처리하는 경우(WT rescue) RNA가 다시 세포질로 이동하였으나, API5 3Mut를 처리하는 경우(Mut rescue)에는 여전히 RNA가 핵에 정체되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[158] 또한 RNA 정체로 인한 단백질 발현량 감소를 웨스턴 블롯팅을 통하여 확인하였다. 상기 실시예 <2-1> 방법을 이용하여 세포를 용해시킨 후에 MYC 항체 및 CCND1 항체를 이용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅으로 확인하였으며 대조군으로는 ACTB(beta-Actin) 항체(Abcam)를 사용하였다.

[159] 그 결과, [도 16]에 나타난 바와 같이 독시사이클린(Dox) 처리로 인해 API5가 억제되는 경우 c-MYC 또는 CCND1 단백질 발현량이 감소하였으며, 이에 API5 WT를 처리하는 경우 상기 단백질들의 발현량이 증가하였으나 API5 3Mut를 처리하는 경우에는 여전히 상기 단백질들의 발현량이 감소된 상태인 것을 확인할 수 있었다.

[160]

[161] [실시예 3]

[162] **API5와 FGF2 결합과 관련한 암세포 항암제 내성 증감 확인**

[163] 상기 실시예 <2-3>의 ① 방법과 유사한 방법으로 제작된 컨디셔널(Conditional) shRNA 발현을 통해 내재된 API5가 제거되는 세포주 및 외인성 API5 정상 및 돌연변이를 발현하는 세포주를 HeLa와 Caski-p3의 두 종류의 세포주를 이용하여 제작하였다. 짧은 헤어핀 RNA의 오프-타겟(off-target) 효과를 배제하기 위해 API5를 표적하는 짧은 헤어핀 RNA를 한개 더 추가로 제작하여 실시예 <2-3>의 ① 방법에 제시된 shAPI5는 #1으로, 추가 제작된 shAPI5는 #2로 명명하였다 (shAPI5 #2, 5'-GCAGCAATTTGGGCAACTTTA-3', 서열번호 7) API5 발현저해가 항암제 내성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 4일 이상 독시사이클린을 처리하고 트립신 처리를 통하여 단일 세포로 분리한 후에 96-웰 플레이트에 각 웰 당 2×10^3 개의 세포를 분주하였다. 다음날 시스플라틴(Cisplatin)을 $10 \mu\text{M}$ 로 처리한 후 48-72시간 후에 세포 생존도를 MTT 어세이를 통해 확인하였다.

[164] 그 결과, [도 17]에 나타난 바와 같이 API5 단백질의 하향 조절로 인해 시스플라틴에 대한 내성이 감소하였다.

[165] 또한 API5 단백질의 과발현을 통해 유사하게 시스플라틴에 대한 내성을

특정하였다. 구체적으로, API5 단백질 과발현은 HeLa와 Caski-p3의 두 종류의 세포주에 상기 실시예 <2-1>의 ①에서 사용한 pCAG-Flag-IRES-Blasticidin 벡터에 API5 WT 및 FGF2와 결합할 수 없는 돌연변이 3Mut(E184A/D185A/E190A) 또는 4Mut(D145A/E184A/D185A/E190A) 벡터를 이용한 형질 전환을 통하여 API5 단백질을 과 발현 한 후 시스플라틴 내성 변화를 확인 하였다.

[166] 그 결과, [도 18]에 나타난 바와 같이 정상 API5 과발현에 의해서는 시스플라틴 내성이 증가하였나, FGF2 결합불능 API5 돌연변이체의 과발현에서는 내성 증가가 없음을 확인하였다.

[167]

[168] [실시예 4]

[169] 3차원 구조를 기반으로 한 API5에 결합하는 FGF 유래 펩타이드 및 FGF2에 결합하는 API5 유래 펩타이드 도출

[170] 상기 <실시예 1>에서 밝혀진 API5-FGF2 복합체 구조 좌표(PDB)를 Pymol 또는 COOT 과 같은 삼차원 구조 시각화 프로그램을 이용하여 발명자가 직접 시각적 분석을 통하여 두 단백질이 결합하는 부위를 확인하였다.

[171] 그 결과, [도 19]에 나타난 바와 같이 결합 부위 중 API5와 FGF2 단백질의 결합에 직접적으로 관여하는 아미노산 잔기 5개 이상을 포함하는 펩타이드를 도출하였다. 상기 펩타이드 중 API5-segment 2는 본 발명의 서열번호 1 아미노산 서열에 해당하며, FGF2-segment 1은 본 발명의 서열번호 2 아미노산 서열에 해당한다.

[172]

[173] [실시예 5]

[174] API5 또는 FGF2 유래 펩타이드의 항암제 내성 세포에 대한 효과

[175] API5 발현이 높은 HeLa 세포주의 시스플라틴(Cisplatin)에 대한 세포생존도를 측정하기 위해 96웰 플레이트에 각 웰당 1×10^4 개의 HeLa 세포를 분주하였다. 다음날 시스플라틴(Cisplatin)을 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 또는 1000 μM 으로 각각 처리하고 48시간 후에 세포생존도를 MTT 분석을 통해 확인하였다.

[176] 그 결과, [도 20]에서 나타나는 바와 같이 시스플라틴의 HeLa 세포에 대한 IC_{20} 은 $7.36 \pm 0.98 \mu\text{M}$ 인 것을 확인할 수 있었다.

[177] API5-FGF2 결합을 차단하는 펩타이드 2종의 항암제 내성극복 효과를 확인하기 위해, [도 21]에 명시된 실험군으로 96웰 플레이트에 각 웰당 1×10^4 개의 세포를 분주하였다. 다음날 PBS로 워싱 후 0.1% 소태아혈청(fetal bovine serum; Gibco, USA)이 첨가된 DEME(Hyclone, USA)배지에 Pierce protein transfection reagent kit(Thermo, USA)를 이용하여 펩타이드 2종을 각각 처리하였다. 24시간 이후 기존 배지를 제거하고 0.1% 소태아혈청을 첨가한 DEME(Hyclone, USA)배지에 시스플라틴을 8 μM 처리하여 48시간 후 세포생존도를 MTT 분석으로 측정하였다.

[178] 추가적으로, 시스플라틴을 처리하는 48시간 동안 2회에 걸쳐 24시간 마다 상기

설명된 방법으로 펩타이드를 처리하였다.

[179] 그 결과, [도 22]에 나타난 바와 같이 상기 펩타이드 처리로 인해 시스플라틴에 대한 내성이 사라졌으며, 해당결과는 펩타이드 농도 의존적임을 확인하였다.

[180]

[181] **[실시예 6]**

[182] **CPP** 서열과 API5 유래 펩타이드의 항암제 내성 세포에 대한 효과

[183] CPP(cell penetrating peptide)와 본 발명의 API5 유래 펩타이드를 혼합하는 경우 암 세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[184] 구체적으로, 펩타이드를 처리하기 하루 전에 96-웰 플레이트에 8 웰 씩 1×10^4 개의 HeLa 세포를 분주하고 5% 이산화탄소의 37 °C 인큐베이터에서 배양한다. 이때 배양액은 10% FBS, 1×Cellmaxin(5 µg/ml), 1 %

페니실린/스트렙토마이신(Penicillin/Streptomycin)이 들어있는 base media(MEM/EBSS)를 사용한다. 24시간 후 base media를 제거하고 base media로 1 µM로 희석한 CPP-API5 와 CPP-Scramble 펩티드를 200 µl씩 각 웰에 분주한다. 그 다음 48시간 후 PBS(Phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄)로 희석한 12 mM MTT 용액(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 20 µl를 각 웰에 넣고, 37 °C에서 4시간 반응 시킨다. 그 후 MTT 및 배지를 제거하고, 200 µl DMSO로 살아있는 세포에 의해 형성된 formazan crystal을 녹여내고 Infinte M200 PRO(TECAN Group Ltd, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한다. CPP는 Tat 펩타이드로서 그 아미노산 서열은 5'-GRKKRRQRRRPQ-3'(서열번호 8)이며, CPP-API5의 아미노산 서열은 5'-GRKKRRQRRRPQGGGLEDVTGEEF-3'(서열번호 9)이고, CPP-Scramble의 아미노산 서열은 5'-GRKKRRQRRRPQGGGDRQLQLSTLQRML-3'이다.

[185] 그 결과, [도 23]에서 나타나는 바와 같이 CPP-API5 펩타이드는 항암제 내성 세포의 생존률을 CPP-Scramble 펩타이드에 비하여 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[186]

[187] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[188]

[189]

산업상 이용가능성

[190] 본 발명에서 제공하는 API5 또는 FGF2 유래 펩타이드는 API5 및 FGF2 사이의

결합을 억제하여 이의 복합체 형성을 방해함으로써 항암제 내성의 발생을 저해할 수 있으므로, 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드 내지 이를 이용한 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법, 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물, 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물 내지 항암 보조제로서 활용될 수 있어 산업상 이용가능성이 크다.

[191]

서열목록 Free Text

[192] 서열번호 1은 API5 유래 펩타이드의 아미노산 서열이다.

[193] 서열번호 2는 FGF2 유래 펩타이드의 아미노산 서열이다.

[194] 서열번호 3은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리펩타이드 서열이다.

[195] 서열번호 4는 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리펩타이드 서열이다.

[196] 서열번호 5는 가이드드(guided) RNA 서열이다.

[197] 서열번호 6은 shAPI5 #1의 서열이다.

[198] 서열번호 7은 shAPI5 #2의 서열이다.

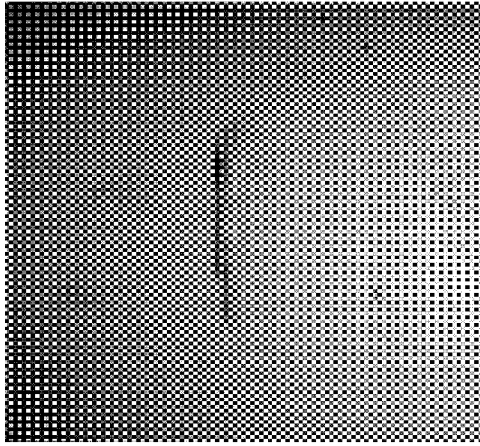
[199] 서열번호 8은 CPP의 아미노산 서열이다.

[200] 서열번호 9는 CPP-API5 의 아미노산 서열이다.

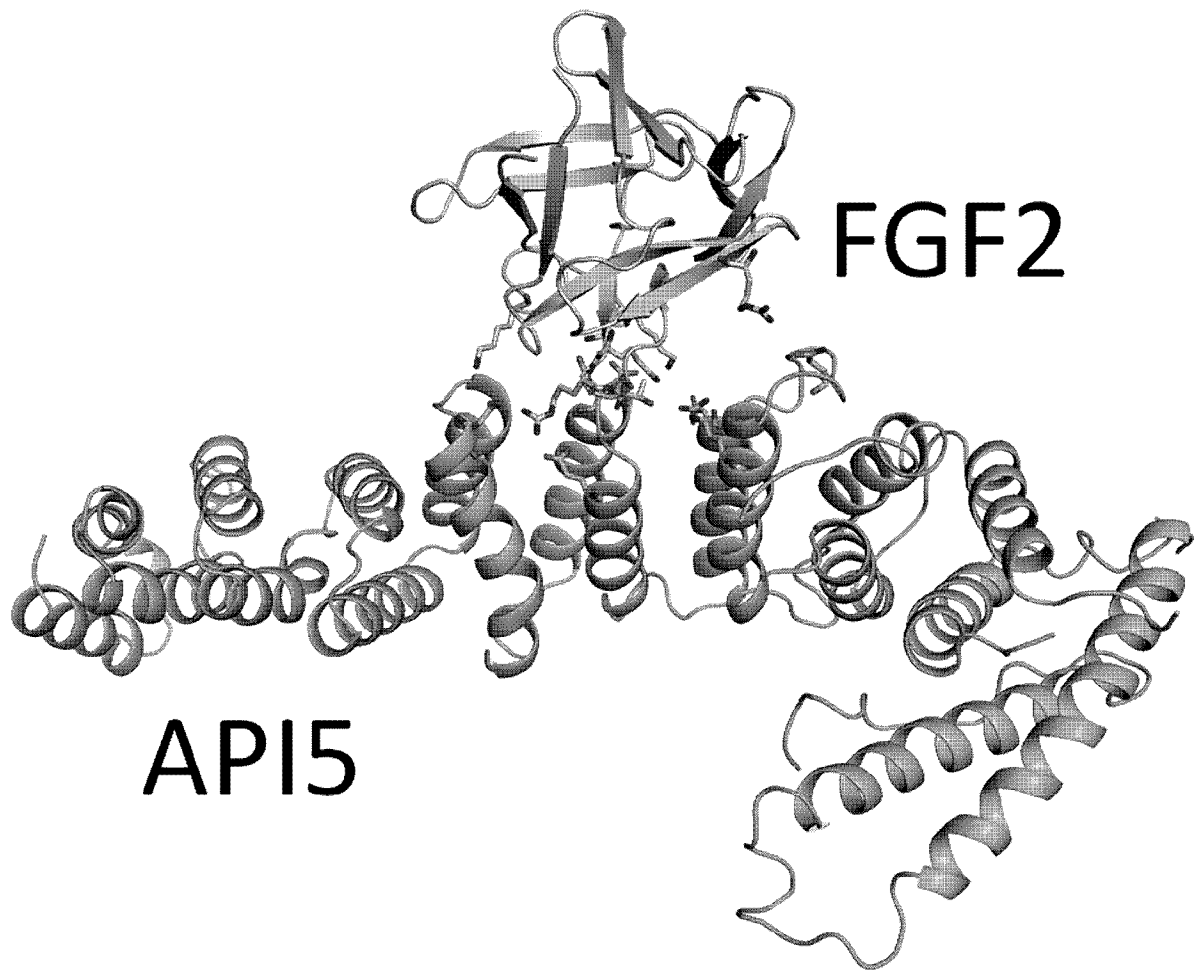
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항암 또는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 API5(apoptosis inhibitor 5)와 FGF2(fibroblast growth factor-2)의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드 서열로 암호화 되는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열로 암호화 되는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 앞 또는 뒤에 서열번호 8의 아미노산 서열이 위치하는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신, 5-플루오로우라실, 카르보플라틴, 시스플라틴, 카르무스틴, 다카바진, 에토포사이드, 비노렐빈, 토포테칸, 이리노테칸 및 에스트라무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 항암제는 위암, 폐암, 자궁경부암, 대장암, 유방암, 전립선암, 흑색종, 간암, 췌장암, 난소암, 갑상선암 및 방광암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 8] 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 준비하는 단계; 상기 펩타이드에 특이적으로 결합하는 후보물질을 상기 펩타이드에 처리하는 단계; 및
상기 펩타이드와 후보물질의 결합을 측정하는 단계;
를 포함하는 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 방법은 상기 펩타이드와 후보물질이 결합을 형성한 경우 항암제 내성 완화물질로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을
특징으로 하는 항암제 내성 완화물질 스크리닝 방법.
- [청구항 10] 상기 제1항의 펩타이드를 포함하는 항암제 내성 억제에 사용하기 위한 조성물.
- [청구항 11] 상기 제1항의 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물.
- [청구항 12] 상기 제1항의 펩타이드를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법.
- [청구항 13] 상기 제1항의 펩타이드를 포함하는 항암보조제.

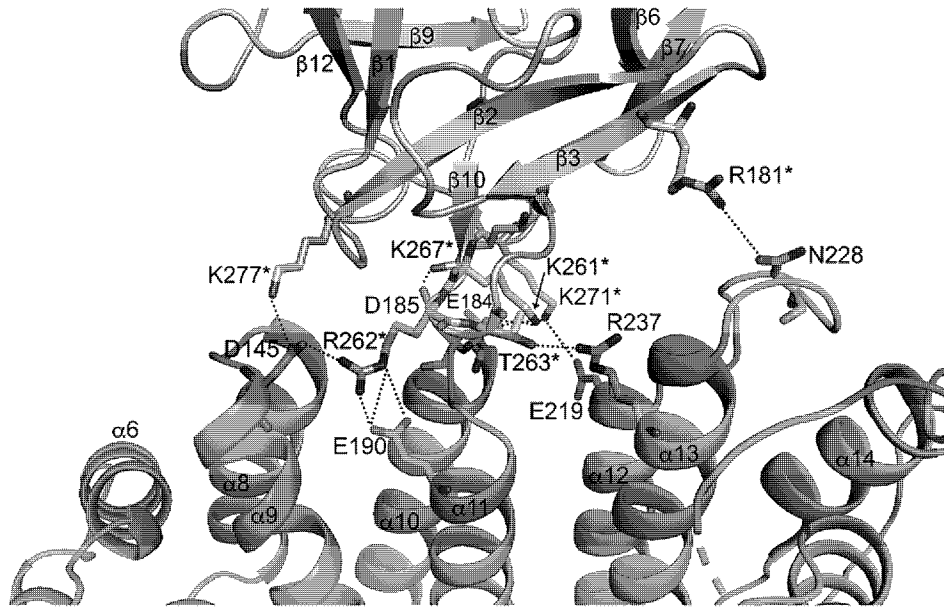
[도1]



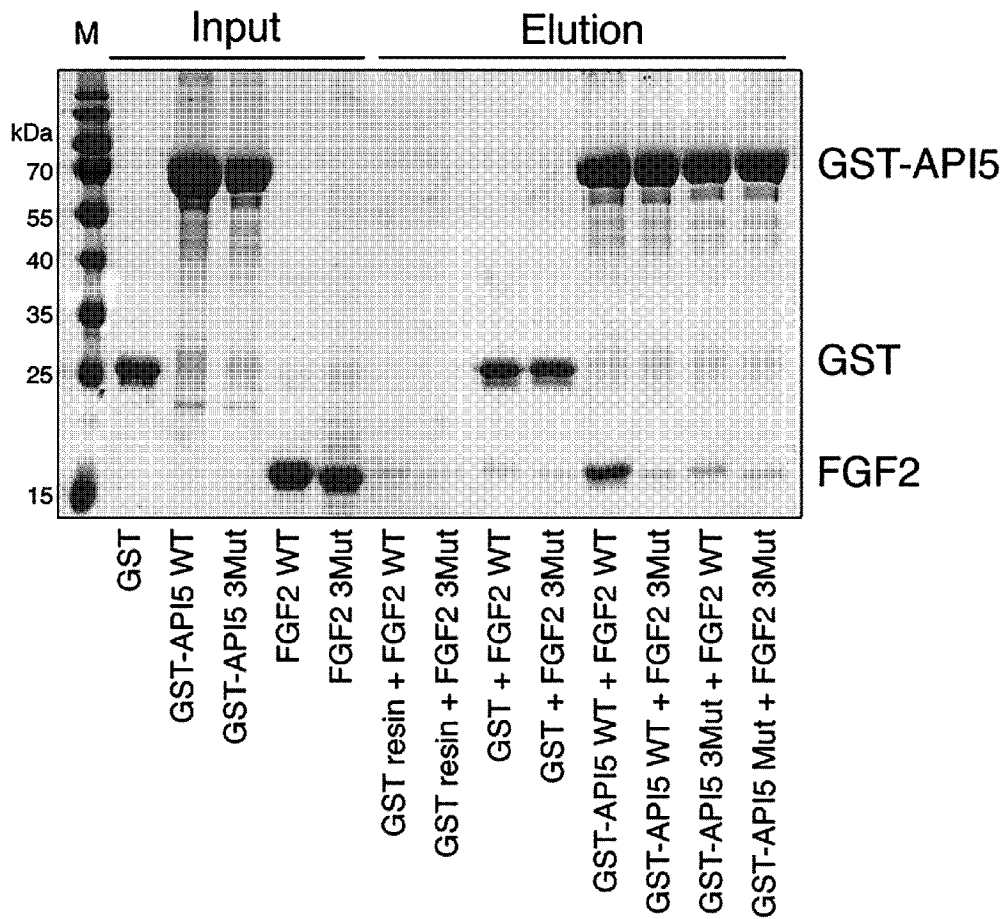
[도2]



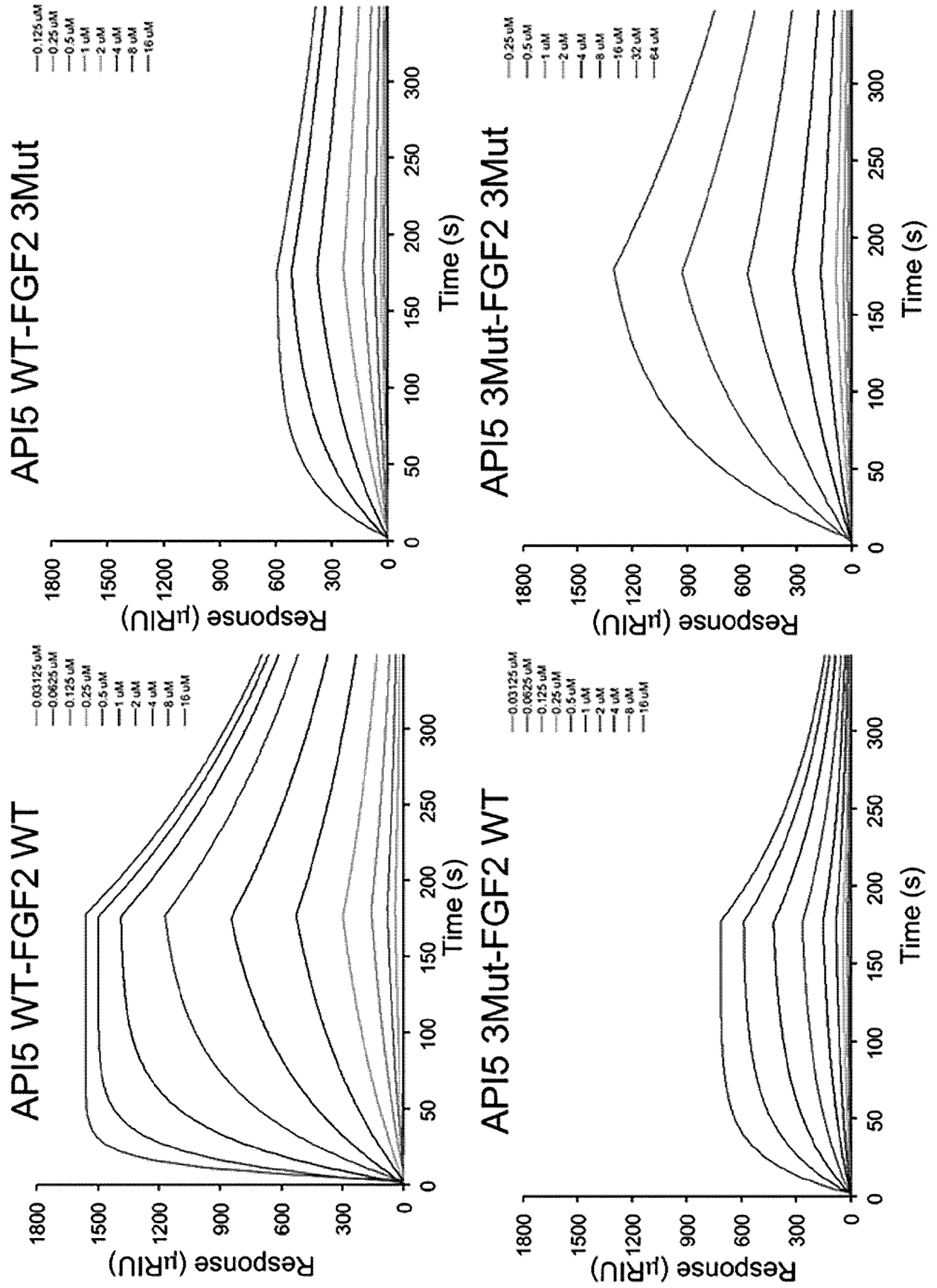
[도3]



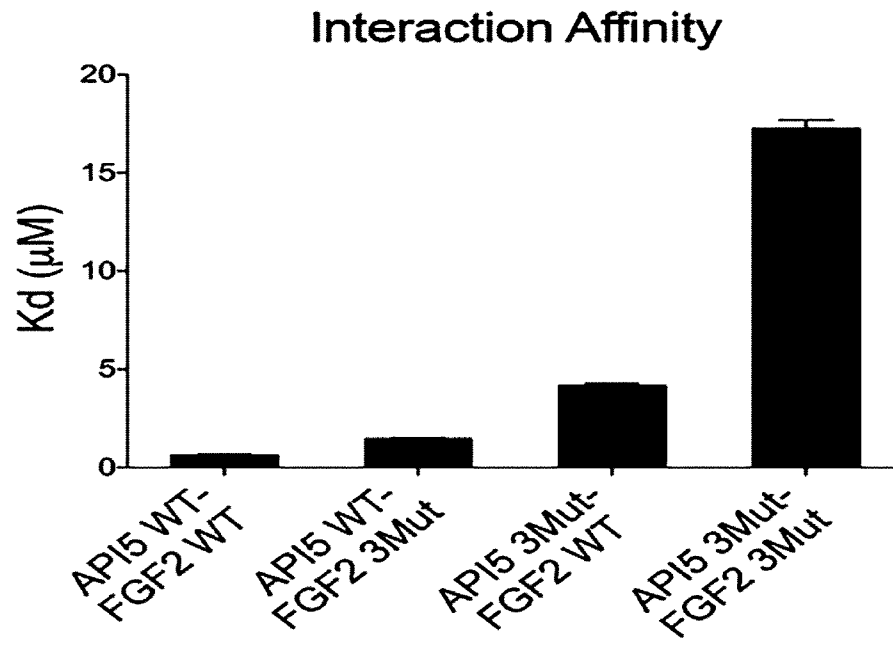
[도4]



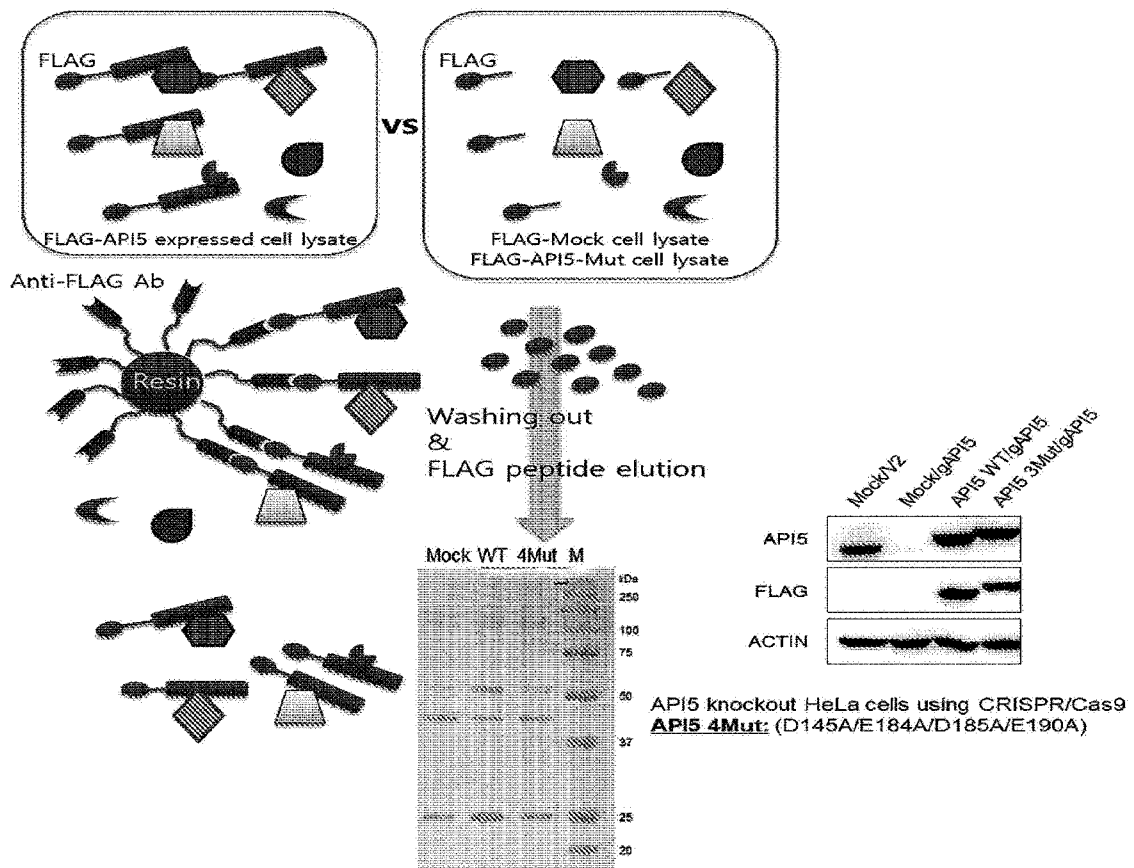
[도5]



[도6]

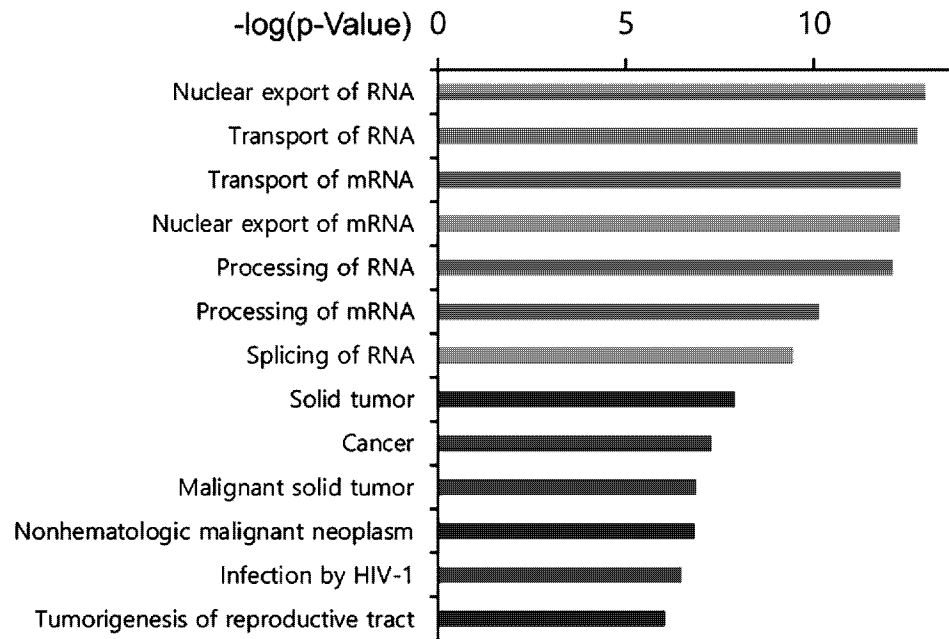


[도7]

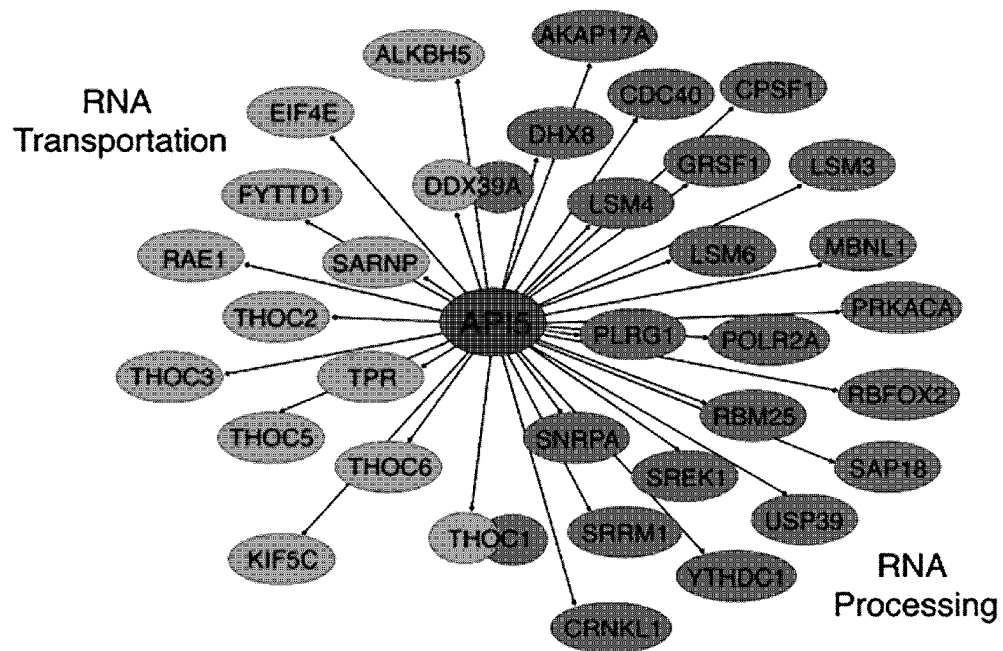


[도8]

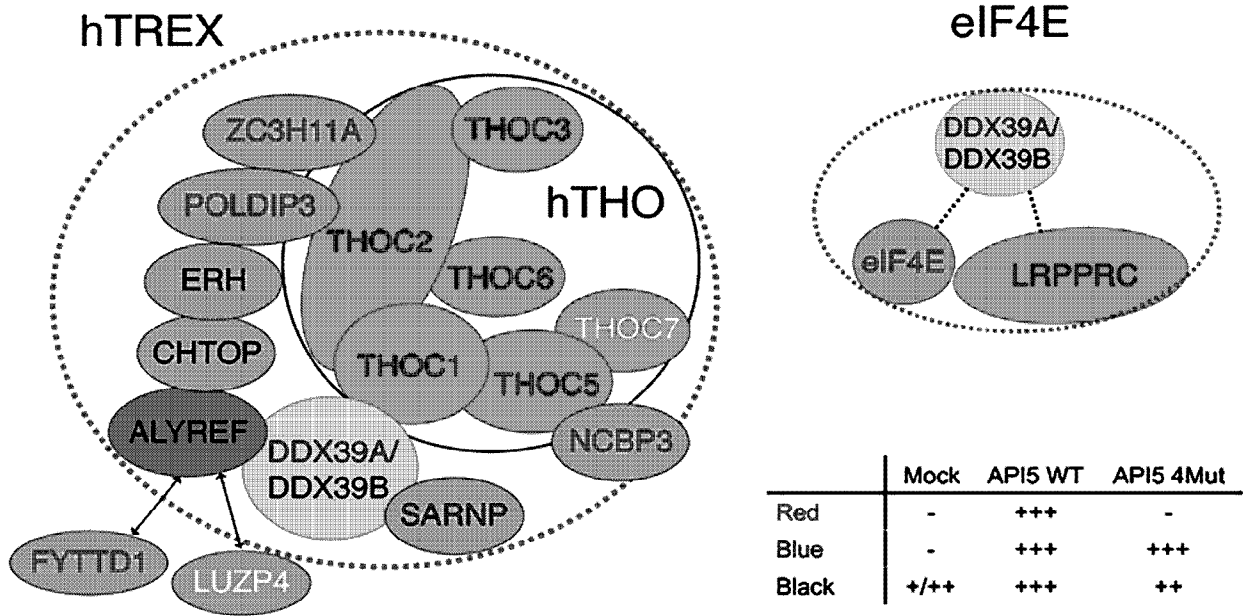
Diseases & Functions



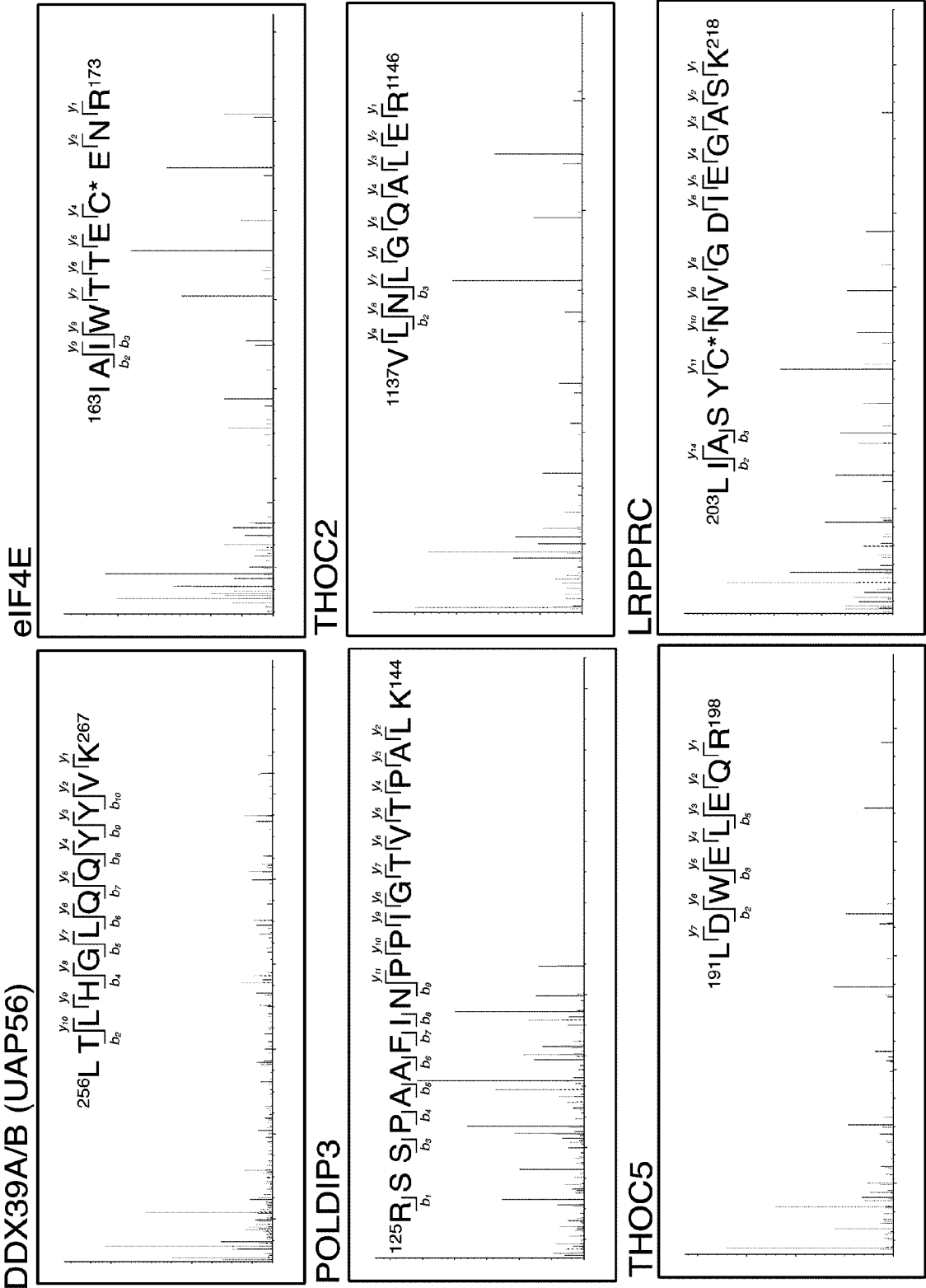
[도9]



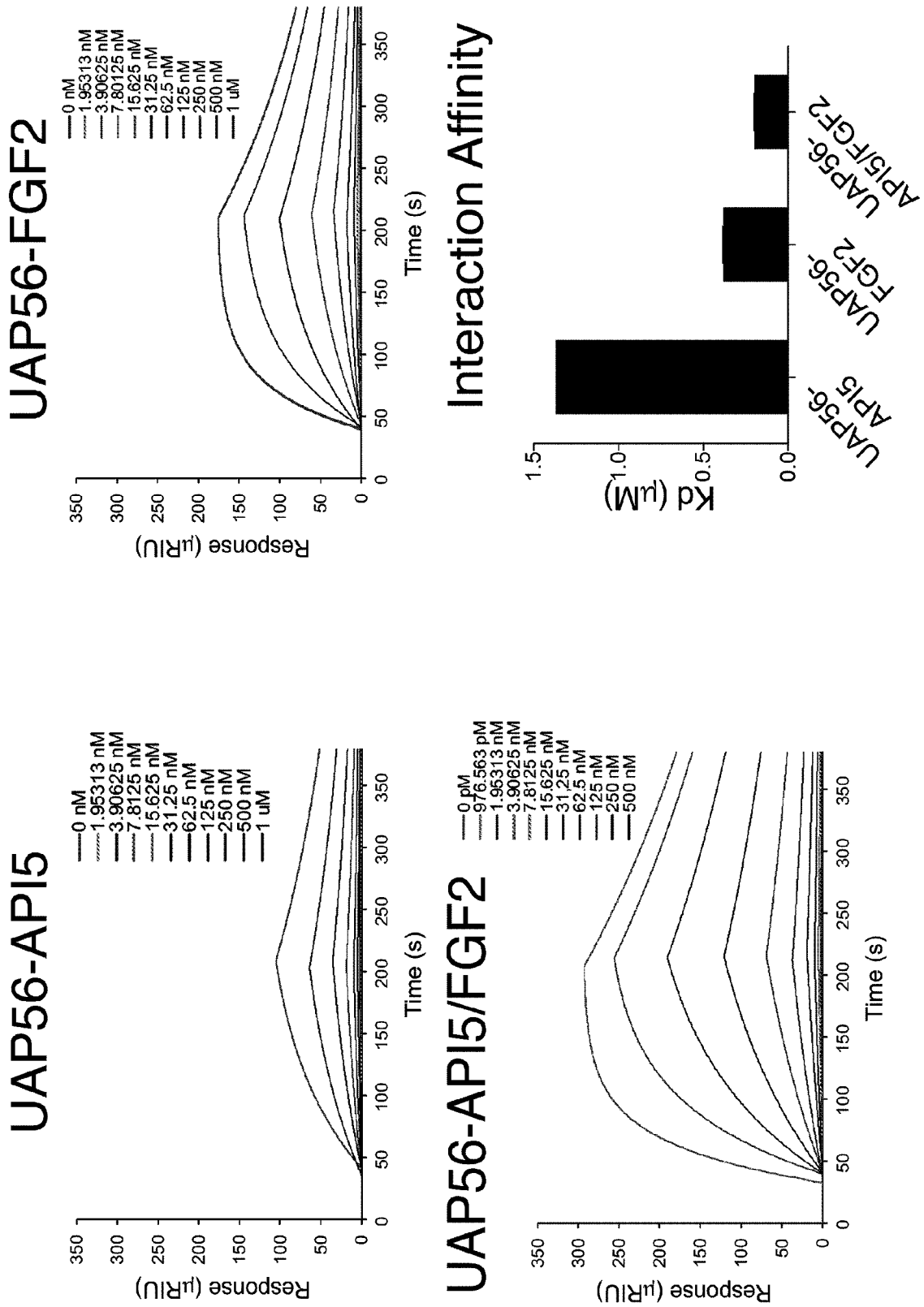
[도10]



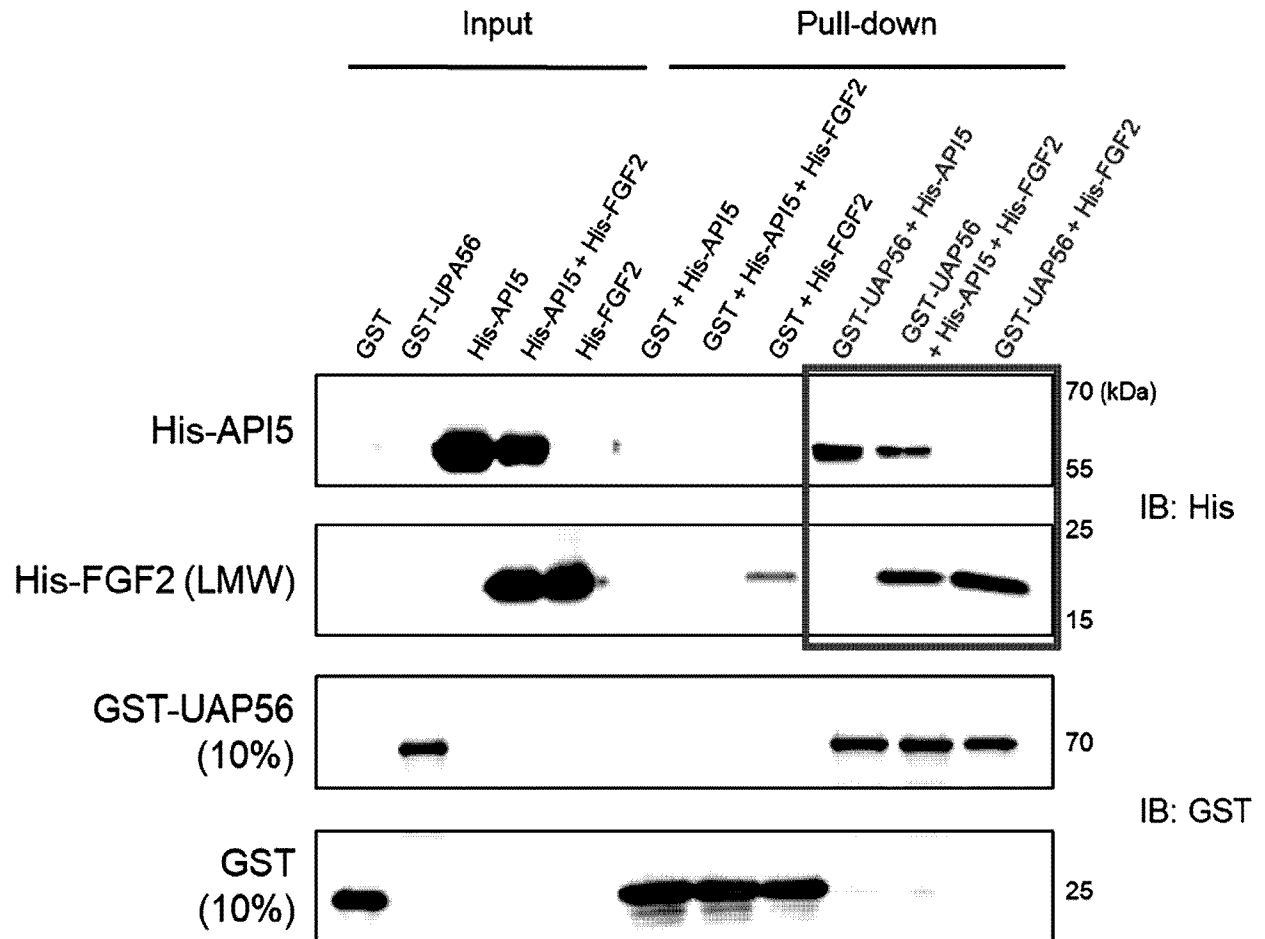
[도 11]



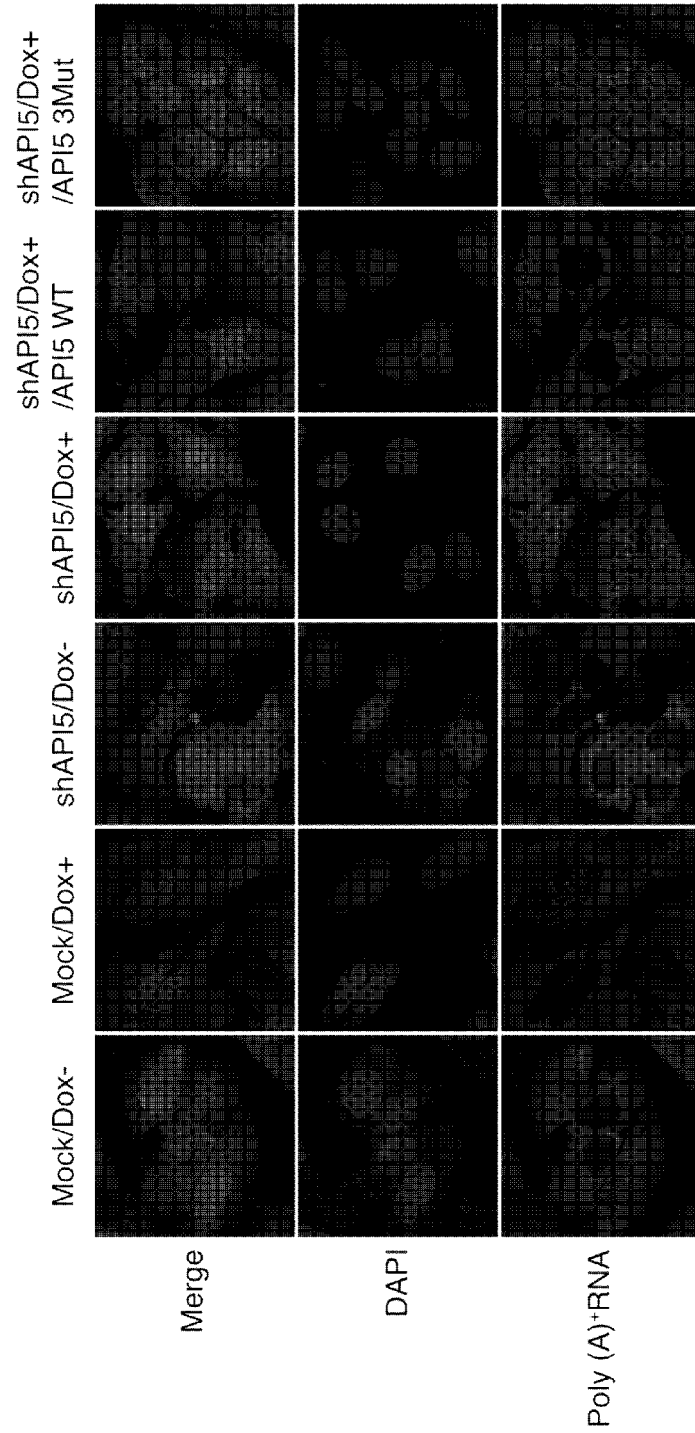
[도 12]



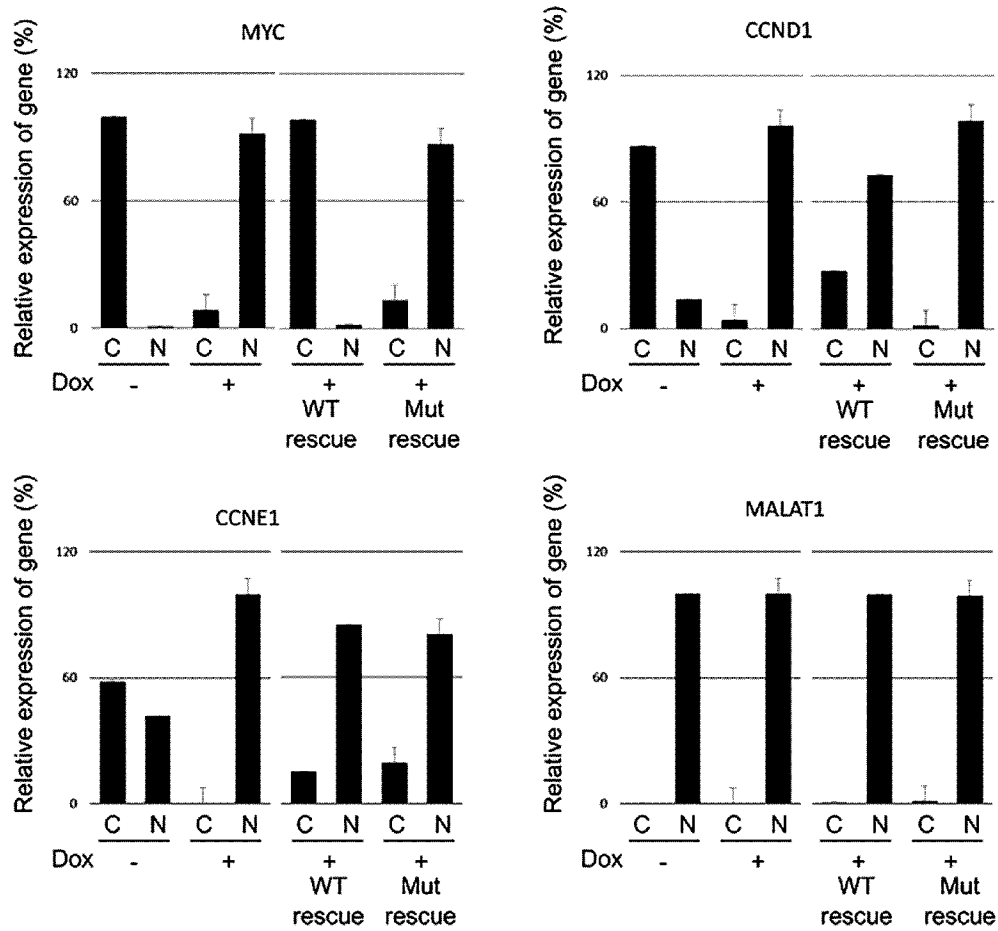
[도13]



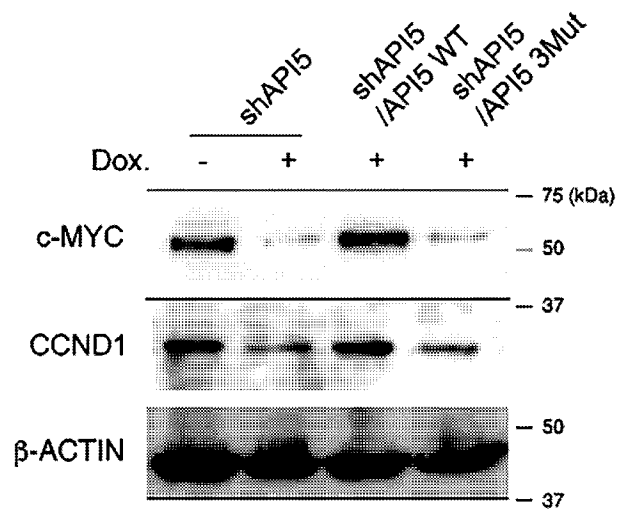
[도 14]



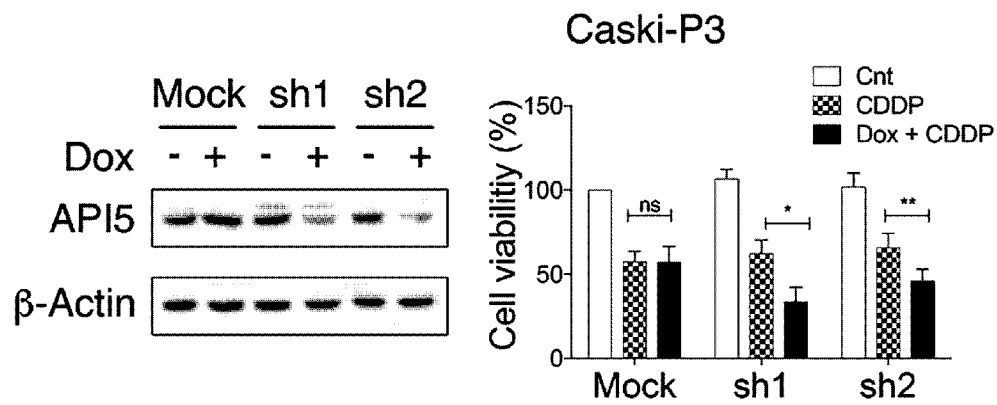
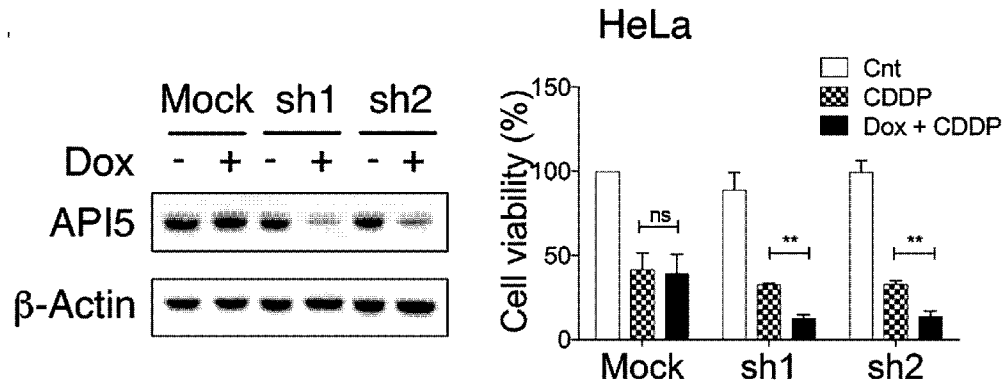
[도15]



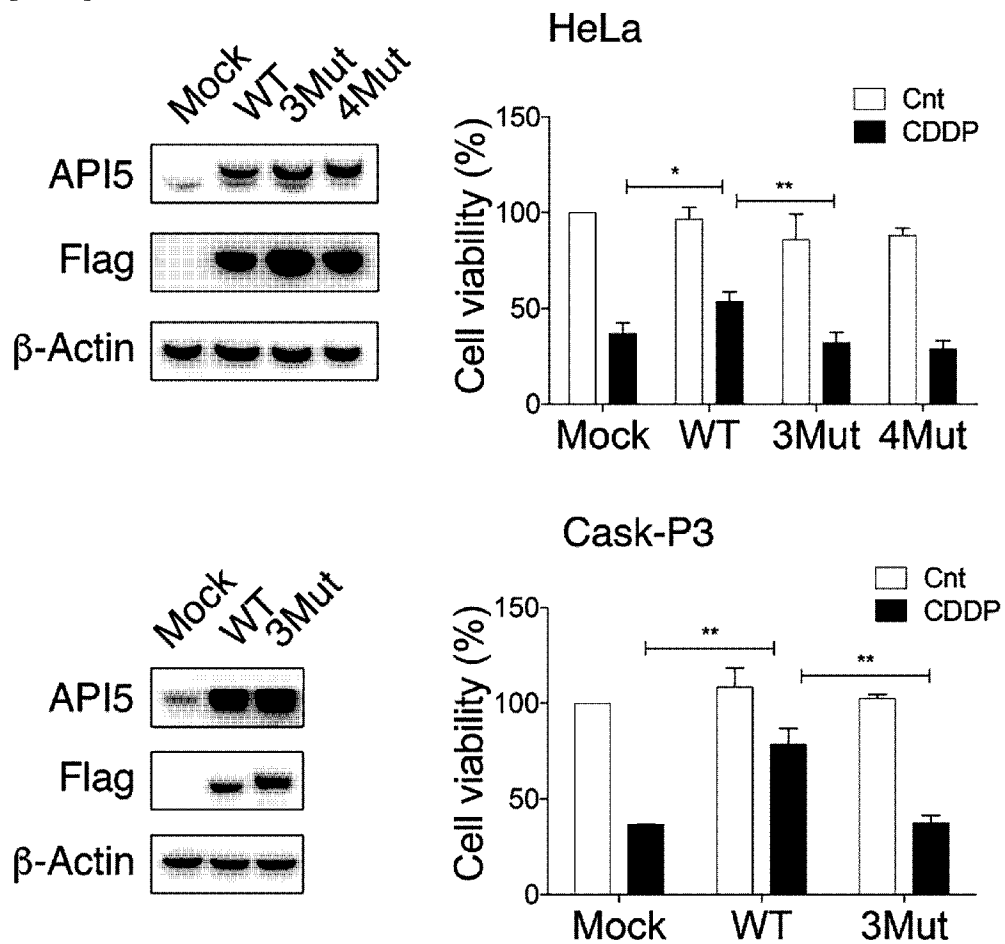
[도16]



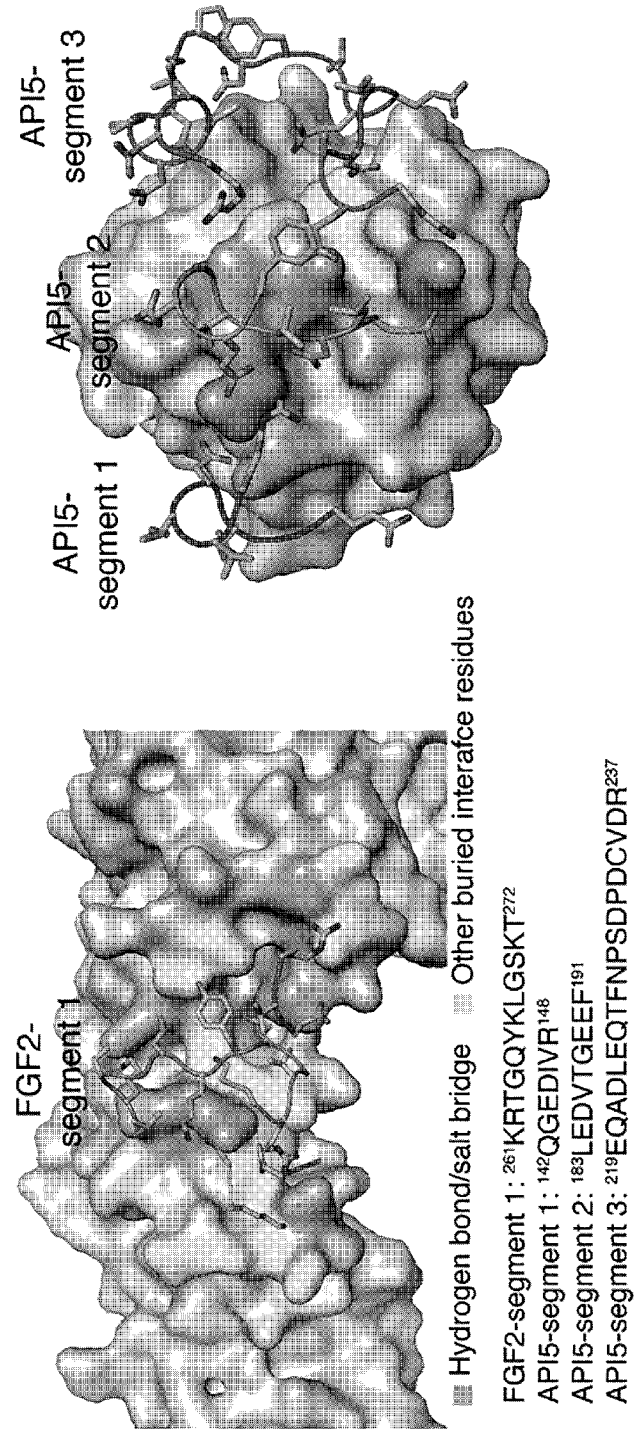
[도17]



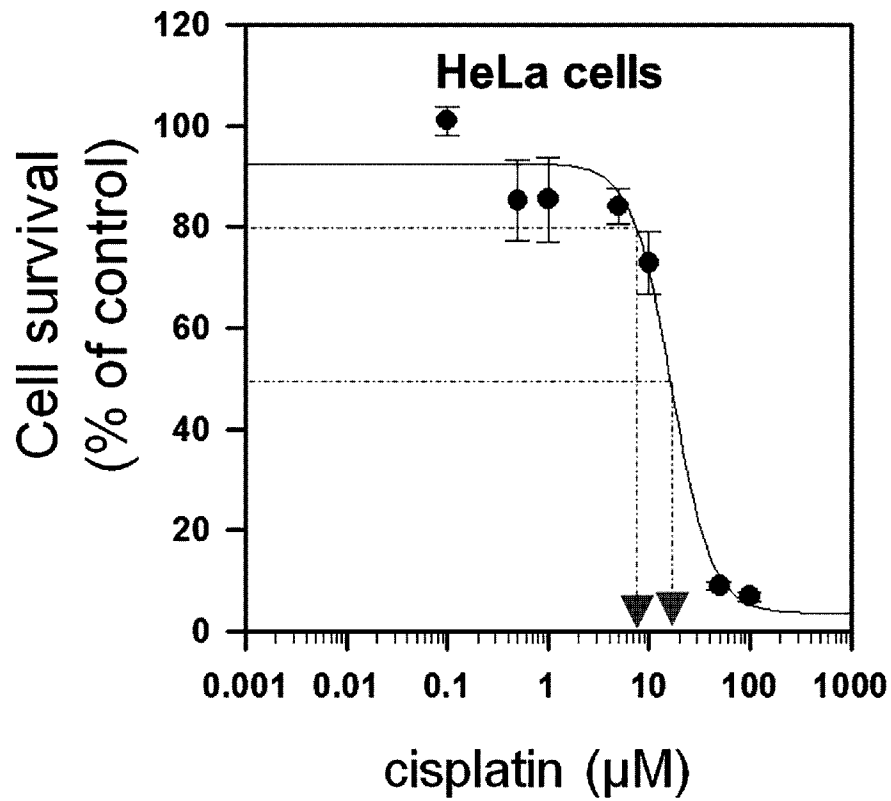
[도18]



[도 19]

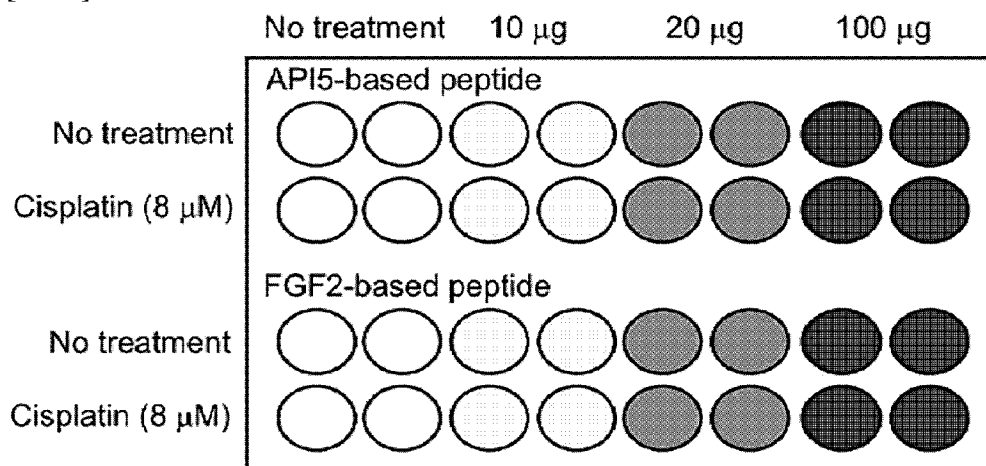


[도20]

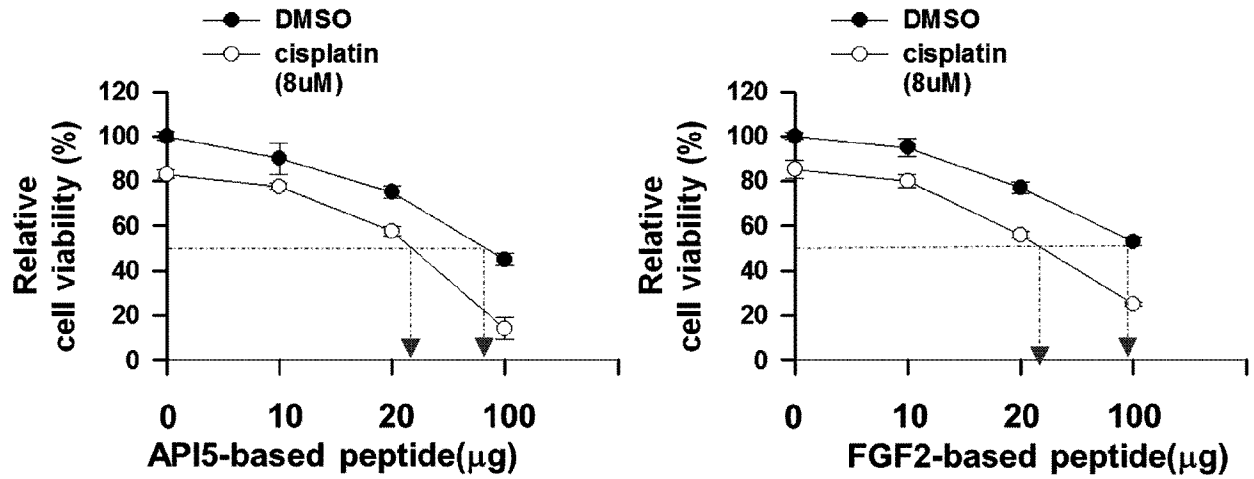
Cell viability assay (MTT assay)

$$IC_{20} (\mu M) = 7.36 \pm 0.98$$

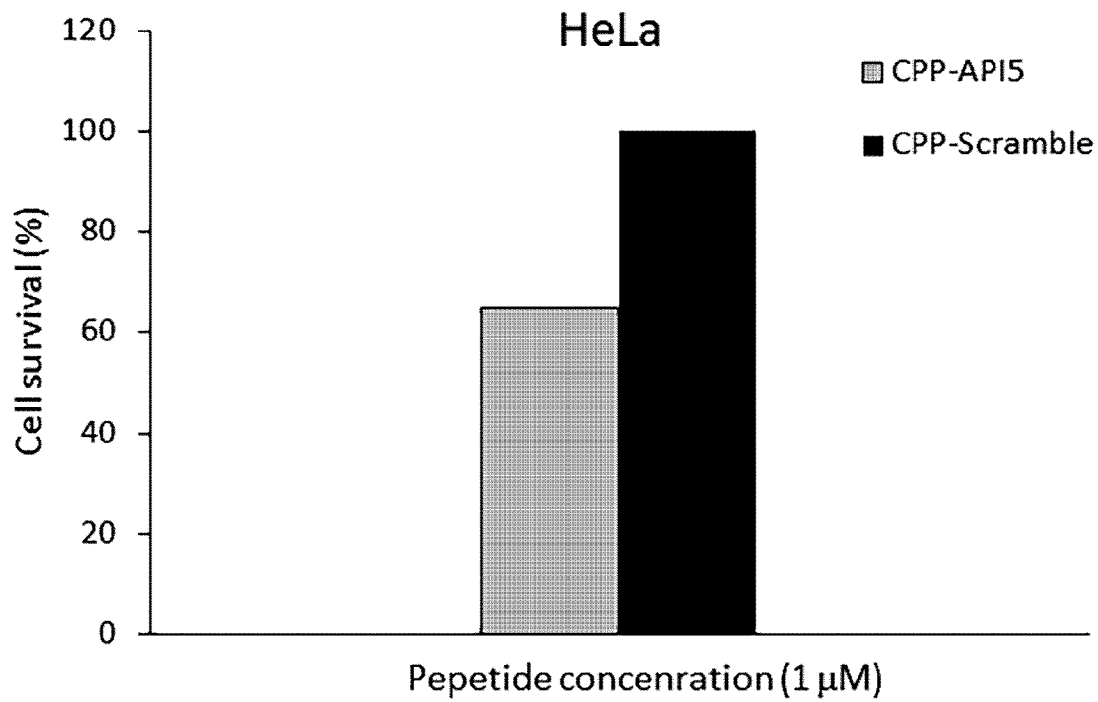
[도21]



[도22]



[도23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/009975**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/06; A61K 31/7105; A61K 45/06; A61K 48/00; A61P 35/00; C07K 14/50; C07K 7/08; G01N 33/68; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: anticancer drug, resistance, API5(apoptosis inhibitor 5), FGF2(fibroblast growth factor 2), inhibitor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JANG, H. S. et al. API5 induces cisplatin resistance through FGFR signaling in human cancer cells. <i>Experimental & Molecular Medicine</i> . 2017, vol. 49, thesis no: e374, pages 1-10 See abstract; figures 3-6.	1-11,13
A	KR 10-2013-0102990 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 23 September 2013 See abstract; claims 1-10.	1-11,13
A	NOH, K. H. et al. API5 confers tumoral immune escape through FGF2-dependent cell survival pathway. <i>Cancer Research</i> . 2014, vol. 74, no. 13, pages 3556-3566 See abstract; figures 1, 3-6.	1-11,13
A	WO 2017-216620 A1 (UNIWERSYTET WROCLAWSKI) 21 December 2017 See the entire document.	1-11,13
A	WO 2014-138364 A2 (GENENTECH, INC. et al.) 12 September 2014 See the entire document.	1-11,13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 NOVEMBER 2019 (21.11.2019)

Date of mailing of the international search report

21 NOVEMBER 2019 (21.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/009975

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body, including a step for direct treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/009975

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0102990 A	23/09/2013	None	
WO 2017-216620 A1	21/12/2017	EP 3468611 A1 PL 417544 A1	17/04/2019 18/12/2017
WO 2014-138364 A2	12/09/2014	BR 112015021423 A2 CA 2902263 A1 CN 105246511 A EP 2964260 A2 HK 1213180 A1 JP 2016-510751 A KR 10-2015-0123250 A MX 2015011428 A RU 2015137610 A RU 2015137610 A3 US 2016-0250287 A1 US 9925240 B2 WO 2014-138364 A3	18/07/2017 12/09/2014 13/01/2016 13/01/2016 30/06/2016 11/04/2016 03/11/2015 03/02/2016 10/04/2017 13/03/2018 01/09/2016 27/03/2018 30/10/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/06; A61K 31/7105; A61K 45/06; A61K 48/00; A61P 35/00; C07K 14/50; C07K 7/08; G01N 33/68; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항암제(anticancer drug), 내성(resistance), API5(apoptosis inhibitor 5)(아포토시스 억제제 5), FGF2(fibroblast growth factor 2)(섬유아세포 성장인자 2), 저해제(inhibitor)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JANG, H. S. 등, 'API5 induces cisplatin resistance through FGFR signaling in human cancer cells', Experimental & Molecular Medicine, 2017, 49권, 논문번호: e374, 페이지 1-10 초록; 도면 3-6 참조.	1-11,13
A	KR 10-2013-0102990 A (고려대학교 산학협력단) 2013.09.23 요약; 청구항 1-10 참조.	1-11,13
A	NOH, K. H. 등, 'API5 confers tumoral immune escape through FGF2-dependent cell survival pathway', Cancer Research, 2014, 74권, 13호, 페이지 3556-3566 초록; 도면 1, 3-6 참조.	1-11,13
A	WO 2017-216620 A1 (UNIWERSYTET WROCLAWSKI) 2017.12.21 전체 문헌 참조.	1-11,13
A	WO 2014-138364 A2 (GENENTECH, INC. 등) 2014.09.12 전체 문헌 참조.	1-11,13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 11월 21일 (21.11.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 11월 21일 (21.11.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



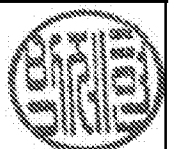
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박제현

전화번호 +82-42-481-3349



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12는 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a) (i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0102990 A	2013/09/23	없음	
WO 2017-216620 A1	2017/12/21	EP 3468611 A1 PL 417544 A1	2019/04/17 2017/12/18
WO 2014-138364 A2	2014/09/12	BR 112015021423 A2 CA 2902263 A1 CN 105246511 A EP 2964260 A2 HK 1213180 A1 JP 2016-510751 A KR 10-2015-0123250 A MX 2015011428 A RU 2015137610 A RU 2015137610 A3 US 2016-0250287 A1 US 9925240 B2 WO 2014-138364 A3	2017/07/18 2014/09/12 2016/01/13 2016/01/13 2016/06/30 2016/04/11 2015/11/03 2016/02/03 2017/04/10 2018/03/13 2016/09/01 2018/03/27 2014/10/30