

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 3월 9일 (09.03.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/033481 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07H 19/207 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/012886
- (22) 국제출원일: 2022년 8월 29일 (29.08.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0117046 2021년 9월 2일 (02.09.2021) KR
- (72) 발명자; 겸
- (71) 출원인: 정근영 (JEONG, Keun-Yeong) [KR/KR]; 03690 서울특별시 서대문구 거북골로 120, 204동 705호, Seoul (KR). 박민희 (PARK, Min Hee) [KR/KR]; 14914 경기도 시흥시 은행로 243-17, 101동 302호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 김경교 등 (KIM, Kyeongkyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 702호, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

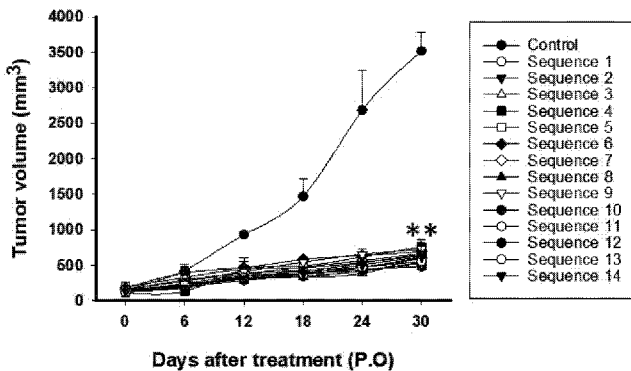
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ADP-RIBOSE BINDING PEPTIDE HAVING ANTICANCER ACTIVITY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항암 활성을 가지는 ADP-리보오스 결합 펩티드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an adenosine diphosphate-ribose (ADP-ribose) binding peptide having anticancer activity and, more particularly, to an ADP-ribose binding peptide of a specific amino acid sequence, a modified product thereof, and a cancer preventing or treating pharmaceutical composition comprising same as an active ingredient. The ADP-ribose binding peptide of the present invention induces cancer cell death by accumulating ADP-ribose in cancer cells and destroying the balance of cells while having an excellent anticancer effect without toxicity to normal cells, and, when concomitantly administered with other anticancer drugs or an anticancer radiotherapy, has an excellent effect as an anticancer adjuvant by increasing the reactivity to the anticancer drugs and the anticancer radiotherapy.

(57) 요약서: 본 발명은 항암 활성을 갖는 ADP (adenosine diphosphate)- 리보오스 결합 펩티드에 관한 것으로, 구체적으로 특정 아미노산 서열의 ADP- 리보오스 결합 펩티드 및 이의 변형물, 그리고 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 항암 보조용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 암 세포 내 ADP- 리보오스를 축적시킴으로써 세포의 균형을 망가뜨려 암 세포를 사멸에 이르게 하면서도 정상 세포에는 독성을 나타내지 않는 우수한 항암 효과를 가지며, 다른 항암제의 투여나 방사선 항암 치료시 병용 투여될 경우 항암제 및 방사선 치료에 대한 반응성을 증진시켜 항암 보조제로서도 매우 우수한 효과를 가진다.



WO 2023/033481 A1

명세서

발명의 명칭: 항암 활성을 가지는 ADP-리보오스 결합 펩티드 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 항암 활성을 갖는 ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 결합 펩티드에 관한 것으로, 구체적으로 특정 아미노산 서열의 ADP-리보오스 결합 펩티드 및 이의 변형물, 그리고 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 항암 보조용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] PARylation (poly ADP-ribosylation)은 번역 후 변형 (post-translation modification) 과정의 하나로, PAR 중합효소에 의해 ADP-리보오스 폴리머 (poly(adenosine diphosphate-ribose))가 단백질에 공유 결합으로 부착되는 과정을 말한다. PARylation을 통해 고분자 ADP-리보오스 체인을 생성하게 되는데, 아세틸화 또는 메틸화와 같은 작은 분자적 차원의 변형이 아니고 유비퀴틴화 (ubiquitination) 또는 수모화 (SUMOylation)와 같은 형태를 나타내지 않는 독특한 세포 내 생화학적 작용을 유도할 수 있다. PARylation의 균형은 DNA 손상 복구, 전사의 조절, 염색질 구조 변경, 산화/환원 항상성, 세포내 다양한 신호 전달, 비-막 (non-membrane) 구조 형성, 숙주-병원체 상호 작용 및 RNA 대사 조절에 중요한 부분을 담당하고 있다 (Juan et al., *Cancers*, 2020, 12(3): 739).
- [4] PARylation은 암, 바이러스 감염 및 신경 퇴행을 포함한 전신 질환의 발병에 연루되어있으며, 특히 PARylation은 PARP-1의 활성화로부터 유래되기 때문에 PARP-1의 활성을 억제하는 방법으로 난소암, 전립선암, 유방암 및 기타 암을 표적으로 하는 항암 효능은 이미 잘 알려져 있다 (J Mateo et al., *Ann Oncol.*, 2019, 30(9): 1437).
- [5] PARylation 매개 세포 사멸과 관련한 생화학적 기전 정보는 비교적 최근에 알려지게 되었으며 PARylation의 활성화는 대표적으로 세 가지 주요 경로를 통해 세포의 사멸을 유발할 수 있다. (Rebecca Gupte et al., *Genes Dev.* 2017, 31(2): 101).
- [6] NAD⁺의 고갈은 세포 에너지 위기 (ATP 고갈)에서 발생하는 세포 대사, 특히 산화적 인산화 과정을 손상시킬 수 있다. 광범위한 DNA 손상에 의해 유도된 PARylation 활성화가 NAD⁺를 소비하며 이 작용의 후속 효과로 인해 세포를 사멸시킬 수 있다고 제안되었다.
- [7] 또한, DNA 복구 후 핵에서 방출된 PAR 폴리머가 세포질 내 미토콘드리아 막에 묶여 있는 세포 사멸 유도 인자를 해방시켜 핵 내부로 세포 사멸 유도 인자를 동원시키는 경로를 활성화시킬 수 있다. 세포 사멸 인자가 핵으로 이동하면

대규모 DNA 단편화를 매개시켜 세포의 사멸을 유도한다. PARylation에 의한 에너지 고갈 및 세포 사멸 유도 인자는 PI3K-Akt 경로 또는 MAP 키나아제 경로와 같은 단백질 키나아제-포스파타아제 경로를 제어하는 PAR의 신호 전달과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 PAR 의존성 세포 사멸 과정은 상당한 수준으로 사멸 기전의 복잡성에 기여하고 있다.

- [8] 그리고 아직 명확한 생화학적 기전이 밝혀지지 않았지만 PARP-1의 autoPARylation을 통해 PARP-1 자체를 분해시키고 세포 사멸을 유도할 수 있는 것으로 보고되어 있다. 하지만 암은 이 사멸 과정을 막기 위해 여러 단백질 분해 효소를 활성화하여 암의 생존에 필요한 다양한 생화학적 작용에 관여했던 잉여의 PAR 폴리머를 분해하는 것으로 이 사멸작용을 영리하게 회피할 수 있다.
- [9] 따라서, 기존의 PARP-1 억제제와 같은 PARylation 억제를 위한 시도와는 반대로 PARylation을 활성화시키거나 PAR 폴리머의 분해를 억제하는 것 역시 효과적인 항암 치료법 발굴을 위한 하나의 전략이 될 수 있다. 특히, PARylation 활성화 또는 PAR 폴리머의 분해 억제는 정상 세포와는 다른 방식의 대사 과정을 거치는 암 세포 특이적인 영역에서 매우 유망한 표적이라고 볼 수 있다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 신규 항암제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 본 발명의 신규 아미노산 서열을 갖는 펩티드들이 ADP-리보오스와의 결합을 통해 궁극적으로 세포 내 다양한 분해 효소나 신호전달 단백질들의 작용으로부터 ADP-리보오스 또는 PAR 폴리머를 활용하지 못하게 하여 PARylation을 과활성화하고 PAR 중합효소의 분해 과정을 교란시킬 수 있으며, 이 교란의 결과로 암 세포의 사멸을 유도하여 획기적인 항암 효능을 낼 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 하나의 목적은, 서열번호 1 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 결합 펩티드를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 상기 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 상기 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 제2항암제에 대한 반응성을 증진시키는 항암 보조용 약학적 조성물 및 방사선

항암 치료에 대한 반응성을 증진시키는 항암 보조용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도, 및 상기 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 암 세포 내 ADP-리보오스를 축적시킴으로써 세포의 균형을 망가뜨려 암 세포를 사멸에 이르게 하면서도 정상 세포에는 독성을 나타내지 않는 우수한 항암 효과를 가지며, 다른 항암제의 투여나 방사선 항암 치료 시 병용 투여될 경우 항암제 및 방사선 치료에 대한 반응성을 증진시켜 항암 보조제로서도 매우 우수한 효과를 가진다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 서열번호 1 내지 4의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 농도별로 처리한 뒤 세포 내 폴리 ADP-리보오스의 수준을 나타낸 것이다.
- [22] 도 2는 서열번호 5 내지 8의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 농도별로 처리한 뒤 세포 내 폴리 ADP-리보오스의 수준을 나타낸 것이다.
- [23] 도 3은 서열번호 9 내지 12의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 농도별로 처리한 뒤 세포 내 폴리 ADP-리보오스의 수준을 나타낸 것이다.
- [24] 도 4는 서열번호 13 및 14의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 농도별로 처리한 뒤 세포 내 폴리 ADP-리보오스의 수준을 나타낸 것이다.
- [25] 도 5는 서열번호 1, 서열번호 15, 서열번호 2 및 서열번호 16의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [26] 도 6은 서열번호 3, 서열번호 17, 서열번호 4 및 서열번호 18의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [27] 도 7은 서열번호 5, 서열번호 19, 서열번호 6 및 서열번호 20의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [28] 도 8은 서열번호 7, 서열번호 21, 서열번호 8 및 서열번호 22의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단

- 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [29] 도 9는 서열번호 9, 서열번호 23, 서열번호 10 및 서열번호 24의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [30] 도 10은 서열번호 11, 서열번호 25, 서열번호 12 및 서열번호 26의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [31] 도 11은 서열번호 13, 서열번호 27, 서열번호 14 및 서열번호 28의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 상단 도면은 세포 사진을 나타낸 것이고, 하단 그래프는 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [32] 도 12는 서열번호 15 내지 서열번호 28의 펩티드를 각기 다른 암 세포에 처리한 뒤 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 13은 서로 다른 암 세포에 베바시주맙 (bevacizumab, 좌측) 또는 오시메르티닙 (Osimertinib, 우측) 단독, 또는 서열번호 1 내지 서열번호 14의 펩티드와 병용 처리한 뒤 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [34] 도 14는 서로 다른 암 세포에 겐시타빈 (gemcitabine, 좌측) 또는 도시탁셀 (docetaxel, 우측) 단독, 또는 서열번호 15 내지 서열번호 28의 펩티드와 병용 처리한 뒤 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [35] 도 15는 서로 다른 암 세포에 2 Gy의 방사선 조사 단독, 또는 서열번호 1 내지 서열번호 14의 펩티드와 병용 처리한 뒤 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [36] 도 16은 서로 다른 암 세포에 2 Gy의 방사선 조사 단독, 또는 서열번호 15 내지 서열번호 28의 펩티드와 병용 처리한 뒤 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [37] 도 17은 종양 이식 동물 모델에서 서열번호 15 내지 서열번호 28의 펩티드를 피하에 투여한 뒤 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타낸 것이다.
- [38] 도 18은 종양 이식 동물 모델에서 서열번호 15 내지 서열번호 28의 펩티드를 피하에 투여한 뒤 확인한 종양 조직의 사진이다.
- [39] 도 19는 종양 이식 동물 모델에서 서열번호 1 내지 서열번호 14의 펩티드를 경구로 투여한 뒤 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타낸 것이다.
- [40] 도 20은 종양 이식 동물 모델에서 서열번호 1 내지 서열번호 14의 펩티드를 경구로 투여한 뒤 확인한 종양 조직의 사진이다.
- [41] 도 21은 대표적으로 서열번호 7의 펩티드의 정상세포 (CCD-18Co)에 대한 독성을 평가한 결과이다.
- [42] 도 22는 대표적으로 서열번호 7의 펩티드의 정상세포 (HDPC)에 대한 독성을 평가한 결과이다.

[43] 도 23은 서열번호 7의 펩티드의 구조를 나타낸 것이다.

[44]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[45] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[46]

[47] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 서열번호 1 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 결합 펩티드다.

[48] 본 발명에서 용어 "ADP-리보오스"는 분리된 ADP-리보오스 자체 및 ADP-리보오스 중합체 (poly ADP-ribose)를 모두 포함하는 개념으로 사용되었으며, "ADP-리보오스 결합 펩티드"는 ADP-리보오스 또는 ADP-리보오스 중합체에 결합하여 분해를 억제하는 활성을 갖는 모든 펩티드를 의미한다. 본 발명에서 상기 펩티드는 단순히 이를 구성하는 아미노산 간의 펩티드 결합에 의해 형성된 것뿐만 아니라, 단백질 의약품의 관점에서 안정성, 효능 등의 특성을 개선시키기 위해 일부 변형된 형태를 갖는 모든 형태의 펩티드 유사체, 유도체 등의 변형물도 포함한다.

[49] 본 발명자들은 종래 PARP-1 억제제에 의해 PARylation (poly ADP-ribosylation)이 억제되는 측면에서 항암 효능이 다수 보고된 것과는 전혀 다른 측면에서, PARylation의 활성화 또는 PAR 폴리머의 분해 억제를 통해서도 항암 효과를 기대할 수 있다는 점에 주목하였다. 특히, 암 세포는 정상 세포에 비해 빠른 속도로 계속 분열하고 활발히 대사 활동을 하므로, PARylation을 과활성화시키거나 PAR 폴리머의 분해를 억제함으로써 PARylation을 과활성화 하지 않는 정상 세포에는 특별한 영향 없이 암 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있을 것으로 기대하였다.

[50] 본 발명의 서열번호 1 내지 서열번호 14 (표 1)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 결합 펩티드들은 모두 WWE 도메인으로부터 유래되었다. WWE 도메인은 deltex, Trip12, 폴리-ADP-리보오스 중합효소 동족체 (homolog) 등 다수의 단백질에서 보존된 구형 도메인 (globular domain)으로, 도메인 내 가장 많이 보존된 잔기의 이름을 따서 명명되었다 (L. Aravind, TRENDS in Biochemical Sciences, 2001, 26(5): 273). WWE 도메인을 갖는 일부 단백질들에서 상기 도메인 내 ADP-리보오스 결합 모티프가 존재하는 것으로 알려진 바 있다. 세포 내 효소들의 WWE 도메인은 주로 ADP-리보오스에 결합하여 분해를 유도하는 것으로 보고되었다. 즉, WWE 도메인을 통해 특정 효소가 PAR 또는 ADPR에

결합하는 것은 암 세포 생존을 위한 목적이 크다고 볼 수 있다 (PNAS August 23, 2011 108 (34) 14103-14108).

- [51] 그러나 본 발명에서와 같이 WWE 도메인의 일 부분을 분리된 펩티드로 제조하여 세포에 처리하였을 때 반대로 ADP-리보오스 분해가 억제되고, 세포 내 ADP-리보오스가 축적되며, 결과적으로 우수한 항암 효과를 가진다는 것은 전혀 보고된 바 없다.
- [52] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 여러 종류의 단백질 내에 존재하는 WWE 도메인들로부터 그 단편들을 합성하고 이들의 항암 활성을 조사하였다. 그 결과, 실시예 1 내지 14의 ADP-리보오스 결합 펩티드들 (서열번호 1 내지 14)을 다양한 종류의 암 세포에 처리했을 때 암 세포 내 ADP-리보오스의 수준이 현저히 증가하는 것을 확인하였다 (도 1 내지 도 4). 나아가 상기 펩티드들의 처리로 인해 세포 내 ADP-리보오스의 균형이 망가져 암 세포의 성장이 억제되고 대부분 사멸하는 것을 시험관 내 (*in vitro*) 실험을 통해 확인하였으며 (도 5 내지 도 11), 종양 이식 동물 모델에서도 실시예 1 내지 14의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 피하 또는 경구로 투여했을 때 생체 내 (*in vivo*) 종양 조직의 성장이 급격히 감소하는 것을 확인하였다 (도 19 및 도 20).
- [53] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 대표적으로 서열번호 7의 펩티드를 정상 세포에 처리하여 정상 세포에 대한 세포 독성을 평가하였다. 그 결과, 정상 세포에는 아무런 독성도 나타내지 않은 것을 확인하였다 (도 21 및 도 22).
- [54] 따라서 본 발명의 서열번호 1 내지 14의 ADP-리보오스 결합 펩티드들은 암 종에 관계없이 매우 우수한 항암 효과를 가지고, 정상 세포에는 세포 독성을 전혀 나타내지 않으므로, 암의 예방 또는 치료용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [55]
- [56] 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드는 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩티드들뿐만 아니라 이들 서열로부터 하나 이상의 아미노산이 부가, 치환 또는 결실된 서열도 균등 범위에 해당하는 경우라면 모두 본 발명의 범주에 속한다.
- [57] 예를 들어, 본 발명의 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩티드와 적어도 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 또는 99% 이상 상동성을 가지며, 상기 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드와 상응하는 효능, 즉 ADP-리보오스 결합 활성 및 항암 활성을 나타내는 펩티드라면, 서열번호 1 내지 14의 아미노산 서열로부터 일부 서열이 부가, 치환 또는 결실된 아미노산 서열을 가지더라도 본 발명의 범위 내에 포함되는 자명하다.
- [58] 또한, 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드와 상응하는 활성을 가지는 경우라면 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가

또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)도 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다.

- [59] 본 발명에서 용어, "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열은 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수 (score), 동일성 (identity) 및 유사도 (similarity) 등의 매개 변수 (parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건 하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법 (예컨대, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.
- [60] 또한, 본 발명의 펩티드는 추가적으로 원하는 특성을 개선시키기 위해 펩티드를 구성하는 하나 이상의 아미노산에서 화학적 유도체화 등의 변형을 포함할 수 있으며, 이러한 변형에도 불구하고 본 발명의 펩티드와 동등한 항암 활성을 갖는 한 모두 본 발명의 범주에 해당됨은 당업자에게 자명한 것이다. 상기 유도체화는 아세틸화, 하이드록실화, 메틸화, 아미드화, 페길화, 및 탄수화물 또는 지질 성분, 보인자 등의 부가를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 본 발명의 구체적인 하나의 양태로서, 상기 펩티드는 세포 투과성을 높이기 위하여 추가적으로 세포 투과성 펩티드 (cell-penetrating peptide)와 융합한 형태로 이용될 수 있다. 즉, 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드는 N-말단, C-말단 또는 양 말단에 세포 투과성 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 이 때, ADP-리보오스 결합 펩티드 및 세포 투과성 펩티드 사이에 링커를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 적절히 수행될 수 있다.
- [62] 본 발명에서, 용어 "세포 투과성 펩티드"는 나노입자, 화합물, DNA, 단백질 등 다양한 물질들의 세포 내 섭취/흡수를 촉진시킬 수 있는 특성을 가진 펩티드를 말한다. 구체적으로, 상기 세포 투과성 펩티드는 TAT, 마우로칼신 (maurocalcine), 페네트라틴 (penetratin), 폴리-알지닌 (Poly-arginine) 유래 펩티드, 안테나페디아 (Antennapedia), 트랜스포탄 (Transportan), VP22, Hph-1, 폴리-알지닌 (Poly-arginine), R11(R9), Pep-1, HP4, LAH4, Vetofusing-1, 시그널 서열 기반 펩티드, 또는 양친매성 (Amphipathic) 펩티드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드의 세포 내 이동을 촉진시킬 수 있는 것이라면 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [63] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 본 발명의 서열번호 1 내지 14의 ADP-리보오스 결합 펩티드의 N-말단에 세포 투과성 펩티드인 TAT를 융합하여

그 항암 활성을 평가하였다(서열번호 15 내지 서열번호 24, 표 2). 그 결과, ADP-리보오스 결합 펩티드 단독으로 사용한 경우 보다도 더 뛰어난 항암 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다(도 5 내지 도 12, 도 17 및 도 18). 따라서 본 발명의 서열번호 1 내지 14의 ADP-리보오스 결합 펩티드뿐만 아니라 상기 펩티드에 세포 투과성 단백질이 융합된 형태 역시 암의 예방 또는 치료용 조성물로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [64] 나아가, 당업자는 사용되는 세포 투과성 펩티드의 종류에 따라서 이를 적용하기 위해 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 적절하게 변형하여 사용할 수 있다. 즉, 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 이를 세포 투과성 펩티드에 융합하여 사용할 경우에도 본 발명에서 제시하는 아미노산 서열에만 한정되는 것이 아니며, 당업자에게 자명한 범위, 즉 균등 범위 내에서 세포 투과성 펩티드의 적용에 적절한 형태로 아미노산 서열을 부가/치환/제거하여 사용할 수 있다.
- [65] 또한, 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 세포 투과성을 높이기 위해, 세포에 단백질을 전달시키거나 전달 효율을 증진시킬 수 있는 당업계에 공지된 시약과 함께 사용될 수 있다. 상기 시약은 예컨대, Chariot™ (Active motif, Cat. 30025), Xfect™ (Takara, Cat. 631324), Pierce™ (ThermoFisher Scientific, Cat. 89850), ProteoJuice™ (Merck, Cat. 71281), PULSin™ (Poylplus transfection) 등의 상업적으로 판매되는 시약뿐만 아니라 기타 비상업적 시약을 모두 포함하며, 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 세포에 전달시킬 수 있는 한 상기 예에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [66]
- [67] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [68] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터이다.
- [69] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 형질전환체이다.
- [70] ADP-리보오스 결합 펩티드는 상기 설명한 바와 같다.
- [71] 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이와 적어도 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 또는 99% 이상 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 가지는 것일 수 있으며, 이로부터 번역된 폴리펩티드가 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드와 상응하는 효능을 나타내는 것이라면, 뉴클레오티드 서열의 5'- 및/또는 3'- 말단에 무의미한 서열의 부가, 혹은 일부 서열의 결실, 변형, 치환된 경우 모두 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 공지된 프로모터 서열과 작동 가능하게 연결된 발현 카세트, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 형태로 사용될 수 있으며, 폴리뉴클레오티드, 발현 카세트 또는 벡터의 제조는

당업자가 공지된 방법을 통해 적절히 수행할 수 있다. 프로모터 및 벡터의 종류는 특별히 제한되지 않고 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드, 발현 카세트 또는 벡터를 숙주 세포에 형질전환시켜 형질전환체를 제조하여 사용할 수 있으며, 이 때의 형질전환 방법 역시 당업자가 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 형질전환체는 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 발현시키고자 하는 대상체로서, 미생물, 식물 또는 동물일 수 있고, 인간을 제외한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[72] 당업자는 다양한 목적으로 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드를 적용/생산하기 위하여 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터, 혹은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제조하여 사용할 수 있다. 예컨대, 상기 폴리뉴클레오티드 혹은 상기 벡터를 이용하여 직접적으로 암에 대한 치료 용도로 사용할 수 있고, 이를 포함하여 ADP-리보오스 결합 펩티드를 발현하는 형질전환체를 이용하여 상기 펩티드를 생산하거나 치료 목적으로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[73]

[74] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[75] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도, 및 상기 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법이다.

[76] 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드가 암의 예방 및/또는 치료에 우수한 효과를 가진다는 것은 상술한 바와 같다.

[77] 본 발명에서 용어 "암"은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 세포 사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 말한다. 본 발명에서 상기 암은 악성 종양 (malignant tumor) 및 양성 종양 (benign tumor)을 모두 포함하며, 예를 들어 뇌암, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 식도암, 대장암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 대장암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 또는 피부암일 수 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 암의 종류가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 조성물은 세포 내 ADP-리보오스가 축적됨으로써 세포 사멸이 일어날 수 있는 모든 암에 치료 효과를 가진다.

[78] 일례로, 상기 암은 뇌암, 폐암, 췌장암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 위암 또는 난소암과 같은 고형암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79] 본 발명에서 용어, "치료"는 질병을 갖는 개개인 또는 세포의 천연 과정을

변경시키기 위해 개입하는 것을 지칭하고, 이는 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행될 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 특히, 본 발명에서는 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 암의 경과를 호전시키는 모든 행위를 포함한다. 또한, 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여로 암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

- [80] 상기 약학적 조성물에 포함되는 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 중량%는 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 90 중량%, 구체적으로 0.001 내지 50 중량%, 보다 구체적으로 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [81] 상기 약학 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하여 제조될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경구패치 등의 경구형 제형, 외용제, 외용패치제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [82] 상기 약학 조성물이 경구 투여용으로 사용될 경우, 적절한 캡슐화(encapsulation), 장용 코팅(enteric coating), 폴리머의 배합 등을 통해 서방성 제제로 제조될 수 있다.
- [83] 일 실시양태에서 상기 서방성 제제는 장기 작용성(long acting) 제제로 제조될 수 있다.
- [84] 일 실시양태에서, 장기 작용성 제제에는 폴리머와 지질이 적절한 비율로 혼합될 수 있다.
- [85]
- [86] 본 발명의 약학적 조성물은 암이 발병했거나 발병할 위험을 가지는 개체에 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어, "개체"는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.
- [87] 본 발명의 약학적 조성물은 대상 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 근육, 정맥, 동맥, 피하, 복강, 폐, 및 비강이 포함되며, 예컨대 피하 또는 경구로 투여되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [88] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 암을 예방 및/또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될

수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령, 체중 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

- [89] 본 발명에서, 약학적으로 허용 가능한 염은 제약업계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 리튬, 구리, 망간, 아연, 철 등을 비롯한 무기이온의 염과 염산, 인산, 황산과 같은 무기산의 염이 있으며, 그 외에 아스코르브산, 시트르산, 타르타르산, 락트산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 글리콜산, 숙신산, 프로피온산, 아세트산, 오로테이트산, 아세틸살리실산과 같은 유기산의 염 등과 라이신, 아르기닌, 구아니딘 등의 아미노산 염이 있다. 또한 약학적인 반응, 정제 및 분리과정에서 사용될 수 있는 테트라메틸 암모늄, 테트라에틸 암모늄, 테트라프로필 암모늄, 테트라부틸 암모늄, 벤질 트리메틸 암모늄, 벤제토늄 등의 유기이온의 염이 있다. 다만, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.
- [90] 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 우수한 항암 활성을 가지므로 약학적 조성물 뿐만 아니라 기능성을 가진 식품 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [91] 본 발명의 조성물이 식품 조성물의 형태로 제조될 경우, 상기 식품 조성물은 식품에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.
- [92] 상기 식품 조성물은 건강기능성 식품으로 제조될 수 있으며, 여기서 건강기능성 식품(functional food)이란 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 상기 건강기능성 식품은 암의 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [93]
- [94] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 제2항암제에 대한 반응성을 증진시키는 항암 보조용 약학적 조성물이다.
- [95] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, (i) 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) 제2항암제를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [96] ADP-리보오스 결합 펩티드 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [97] 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 단독으로 항암 효과를 가지는 것에서 더 나아가, 제2항암제에 대한 반응성을 증진시키기 위한 목적으로 항암 보조용 약학적 조성물로서도 매우 우수한 효과를 갖는다. 따라서 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 함께 제2항암제를 유효성분으로

하여 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

- [98] 본 발명에서 용어, "제2항암제"는 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 제외한 임의의 항암 활성을 갖는 약물을 말한다. 본 발명에서 상기 제2항암제의 범위는 특별히 제한되지 않고, 암의 종류와 진행 정도에 따라 암의 완치, 조절, 증상 완화 등의 목적에 따라 당업자가 적절한 종류를 선택하여 사용할 수 있다. 제2항암제는 예컨대 세포독성 항암제, 표적 항암제, 면역 항암제 또는 대사 항암제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [99] 본 발명에서, 세포독성 항암제는 정상 세포에 비해 빠른 속도로 무분별하게 분열하는 암 세포를 공격하여 항암 효과를 나타내는 약물로, 그 의미는 본 발명이 속한 기술분야에서 통상적으로 사용되는 것과 같다. 상기 세포독성 항암제는 알킬화제, 항대사제 (antimetabolite), 천연물 항암제를 포함한다.
- [100] 상기 알킬화제는 질소 머스타드 (예컨대, 시클로포스파미드, 클로르메틴, 우라머스틴, 멜팔란, 클로람부실, 이포스파미드, 벤다머스틴 등), 알킬 설포네이트 (예컨대, 부설판, 프로카바진 등), 니트로소우레아 (예컨대, 카르무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신 등), 백금 기반 알킬화제 (예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴, 디시클로플라틴, 엡타플라틴, 로바플라틴, 미리플라틴, 네다플라틴, 옥살리플라틴, 피코플라틴, 사트라플라틴, 트리플라틴 테트라니트레이트 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 알킬화제는 암 세포 내 DNA에 결합하여 DNA 구조를 손상시킴으로써 암 세포의 파괴를 유발할 수 있다.
- [101] 상기 항대사제는 피리미딘 유도체 (예컨대, 5-플루오로우라실, 카페시타빈, 시스타라빈, 젬시타빈, 플루다라빈 등), 폴레이트 유도체 (예컨대, 메토트렉세이트, 페메트렉시드 등), 퓨린 유도체 (예컨대, 머캅토피린 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 항대사제는 DNA 복제 및 세포 생존에 필요한 대사를 억제함으로써 암 세포 사멸을 유도할 수 있다.
- [102] 상기 천연물 항암제로는 토포이소머라제 억제제 (예컨대, 캄프토테신, 에피포도필로톡신, 탁산 계열 약물 (도시탁셀, 파클리탁셀)), 항생제 (예컨대, 닥티노마이신, 독소루비신, 다우노루비신, 마이토마이신, 플레오마이신, 이다루비신, 미톡산트론 HCl 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [103] 본 발명에서 표적 항암제는 암의 성장에 관여하는 타겟 단백질 (수용체 또는 효소)을 억제함으로써 암 세포의 사멸을 유도하는 항암제로, 그 의미는 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것과 같다. 상기 세포독성 항암제는 표적 단백질 (티로신 키나아제 등) 억제 저분자 화합물 및 단클론항체를 포함한다.
- [104] 일례로, 상기 표적 항암제는 VEGF-A 및 EGFR로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 타겟을 표적하는 수용체 티로신 키나아제 억제제일 수 있다.
- [105] 일 실시양태에서, ADP-리보오스 결합 펩티드와 병용 투여될 수 있는 표적 항암제는 VEGF-A 억제제이다. 본 발명에서, VEGF-A 억제제는 베바시주맙

(bevacizumab), 라니비주맙 (ranibizumab), 아플리베르셉트 (aflibercept), 라무시루맙 (ramucirumab)과 같은 단클론 항체, 수니티닙 (sunitinib), 파조파닙 (pazopanib), 소라페닙 (sorafenib), 악시티닙 (axitinib)과 같은 저분자 화합물을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [106] 일 실시양태에서, ADP-리보오스 결합 펩티드와 병용 투여될 수 있는 표적 항암제는 EGFR 억제제이다. 본 발명에서, EGFR 억제제는 오시메르티닙 (osimertinib), 제피티닙 (gefitinib), 엘로티닙 (erlotinib), 아파티닙 (afatinib), 브리가티닙 (brigatinib), 이코티닙 (icotinib), 반데타닙 (vandetanib)과 같은 저분자 화합물과 함께 세톡시맙 (cetuximab), 파니투무맙 (panitumumab), 잘루투무맙 (zalutumumab), 니모투주맙 (nimotuzumab), 마투주맙 (matuzumab)과 같은 단클론 항체를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [107] 이외에도 본 발명의 표적 항암제는 또한, 라파니팁 (lapatinib), 네라티닙 (neratinib), 아파티닙 (afatinib)과 같은 HER2 표적 항암제, 이메티닙 (imatinib), 다사티닙 (dasatinib), 닐로티닙 (nilotinib)과 같은 Bcr-Abl 표적 항암제; 보수티닙 (bosutinib)과 같은 Src 표적 항암제; 레스타우르티닙 (lestaurtinib), 룩소리티닙 (ruxolitinib), 파크리티닙 (pacritinib)과 같은 JAK 표적 항암제; 코비메티닙 (cobimethinib), 셀루메티닙 (selumetinib), 트라메티닙 (trametinib), 비니메티닙 (binimetinib)과 같은 MAP2 Kinase 표적 항암제; 세리티빈 (ceritinib), 크리조티닙 (crizotinib)과 같은 MEL4-ALK 표적 항암제 등을 포함하며, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다.
- [108] 또한, 본 발명의 제2항암제는 하나 이상의 세포 독성 항암제 및/또는 표적 항암제의 조합일 수 있으며, 이들은 동시에 또는 이시에 투여될 수 있다.
- [109] 본 발명에서, 면역항암제는 인체의 면역체계를 활성화시켜 암 세포와 싸우게 하는 약물을 말한다. 본 발명에서 면역항암제는 면역체크포인트 억제제, 면역세포치료제, 항암백신, 항체-약물접합체를 포함하며, 암의 종류와 진행 정도에 따라 암의 완치, 조절, 증상 완화를 위해 적절한 종류를 선택할 수 있다.
- [110] 일 실시양태에서, 면역항암제는 면역체크포인트 억제제일 수 있으며, PD-1 항체, PD-L1 항체, CTLA-4 항체, CD28 항체, KIR 항체, TCR 항체, LAG-3 항체, TIM-3 항체, TIGIT 항체, A2aR 항체, ICOS 항체, OX40 항체, 4-1BB 항체 및 GITR 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 예컨대, 상기 면역체크포인트 억제제는 니볼루맙 (nivolumab), 펌브롤리주맙 (pembrolizumab), 세미플리맙 (cemiplimab), 피딜리주맙 (pidilizumab), 토리팔리맙 (toripalimab)과 같은 PD-1 항체; 아테졸리주맙 (atezolizumab), 아벨루맙 (avelumab), 두랄루맙 (duralumab)과 같은 PD-L1 항체; 이필리무맙 (ipilimumab), 트레멜리무맙 (tremelimumab)과 같은 CTLA-4 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111] 일 실시양태에서, 면역항암제는 면역세포치료제일 수 있으며, 티사젠레클루셀 (tisagenlecleucel), 악시캡타젠 실로루셀 (axicabtagene ciloleucel)과 같은 CAR-T 치료제, 또는 CAR-NK 치료제일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [112] 본 발명에서, 대사항암제는 암 세포에 영양을 공급하는 등 암 세포의 성장 및 생존에 관여하거나 필수적인 여러 대사작용에 관여하여 암 세포를 사멸시키는 약물을 말한다. 상기 대사항암제는 예컨대 IM-156, 3-브로모피루브산 (3BP), NYH817100, WZB117, GNE-140, AZ93, AZD3965, CPI-613, MKT-077, CB-839, CB-1158, CPI-444, TVB-2640, NDI-010976, TCD-717, ADI-PEG20, 에파카도스탯 (Epacadostat), 인독시모드 (Indoximod), PX478, CPI-0610, RTA402, APO866, GMX1778, AG-221 또는 AG-120 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [113] 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 암 세포 내 ADP-리보오스의 균형을 망가뜨려 제2항암제에 대한 반응성을 증진시키는 효과를 가져 항암 보조제로서 사용될 수 있으므로, 사용되는 제2항암제의 종류나 암의 종류가 특별히 제한되지 않는다. 일례로, 상기 암은 뇌암, 폐암, 췌장암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 위암 또는 난소암과 같은 고형암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [114] 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 제2항암제와 독립적으로 존재하는 형태로 병용투여될 수 있을 뿐만 아니라, 목적에 따라 공지된 임의의 방법으로 제2항암제와 물리/화학적인 결합을 형성한 상태에서 투여될 수 있다. 예컨대, ADP-리보오스 결합 펩티드는 제2항암제와 직접 결합된 상태로 사용되거나, 또는 공지의 링커를 통해 제2항암제와 연결된 상태로 사용될 수 있으며, 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드가 제2항암제와 함께 작용하여 상승된 항암 효과를 나타내는 한 그 적용 방법에 특별히 제한되지 않는다.
- [115] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 저농도의 베바시주맙, 오시메르티닙, 켄시타빈, 도시탁셀과 함께 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 각기 다른 암 종에 처리한 경우, 모든 암 세포에서 항암제에 대한 반응성이 증진되는 것을 확인하였다 (도 13 및 도 14). 따라서 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 제2항암제의 반응을 증진시킬 수 있어 항암 보조 용도로서 매우 유용하게 사용될 수 있으며, 제2항암제를 저농도로 처리하더라도 우수한 항암 활성을 가지므로 제2항암제로 인해 발생할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있다.
- [116]
- [117] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 방사선 항암 치료에 대한 반응성을 증진시키는 항암 보조용 약학적 조성물이다.
- [118] ADP-리보오스 결합 펩티드 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상술한 바와 같다.
- [119] 본 발명에서 용어, "방사선 항암 치료"는 암 세포를 사멸시키기 위한 목적으로 암 세포 또는 종양 조직에 방사선을 조사하는 치료 행위를 말한다. 일반적으로 절개 불가능하거나 수술 불가능한 종양, 또는 종양 전이를 제어하기 위한 표준 치료법으로서 표적 부위로 전달된 방사선이 재생성 세포 (reproductive cell)의 사멸을 초래한다는 원리에 기초한다. 본 발명에서 방사선 항암 치료는 이온화

방사선 요법 (ionizing radiation therapy), 전자기 방사선 요법 (electromagnetic radiation), 근접 방사선 요법 (brachytherapy) 또는 외부 방사선 요법 (external beam radiation therapy)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [120] 본 발명에 따른 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물은 방사선 요법과 병용될 경우 상승적 항암 효과를 나타내므로 방사선 요법에 대한 항암 보조제 또는 방사선 민감도를 향상시키는 방사선 민감화제로 유용하게 활용될 수 있으며, 적용 가능한 암의 종류가 특별히 제한되지 않는다. 일례로, 상기 암은 뇌암, 폐암, 췌장암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 위암 및 난소암과 같은 고형암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [121] 일 실시 양태로서, 상기 고형암은 방사선 요법에 대해 내성을 나타내는 것일 수 있다. 방사선 치료의 항암 효과는 DNA 절단의 형성으로 나타나기 때문에 방사선 치료에 대한 내성은 일반적으로 방사선 치료에 의해 유도되는 DNA 손상을 복구할 수 있는 기전에 의해 결정된다. 방사선 치료의 항암 효능을 상승시키는 방법으로 DNA 복구 기전 억제를 위한 많은 시도가 있어 왔으며 파괴된 DNA 가닥의 수리가 차단되면 방사선 치료의 감도가 높아질 수 있다. DNA 손상의 두 가지 주요 형태는 SSB (Single Strand Breaks)와 DSB (Double Strand Breaks)다. 따라서, SSB 및 DSB를 대상으로 하는 두 가지 복구 경로의 범주로 설명할 수 있다. BER (Base Excision Repair)은 선택된 유형의 DNA SSB의 복구에 관여하는 여러 경로 중 하나다.
- [122] PARP1은 ADP-리보실화 (ribosylation)로 알려진 공정을 통해 DNA SSB의 BER에서 중요한 역할을 수행한다. 핵에서 PARP1은 SSB DNA의 손상을 감지하고 수리를 위해 SSB 부위에 ADP-리보실화를 통해 DNA 복구 복합체를 모집한다. PARP-1 활성화에 의한 ADP-리보실화를 통해 합성된 폴리-ADP-리보오스의 과축적은 최종적으로 세포의 사멸로 이어지기 때문에, 암 세포는 이 현상을 막기 위해 PARG나 ARH3 등과 같은 프로테아좀을 통해 폴리-ADP-리보오스의 분해를 활성화하여 생존 신호전달 활동을 활성화한다. 본 발명자들은 암 세포 내 ADP-리보오스나 ADP-리보오스 중합체의 축적이 암 세포의 이러한 생화학적 생존 기전을 교란시킬 수 있는 매개체로 작용할 수 있어 방사선 치료 내성을 극복하는 중요한 항암 보조제로 활용될 수 있음에 착안하였다.
- [123] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 각기 다른 암 중에서 저선량의 방사선 조사와 함께 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 병용 처리한 경우, 모든 암 중에서 방사선 치료에 대한 반응성이 증진되는 것을 확인하였다 (도 15 및 도 16). 따라서 본 발명의 ADP-리보오스 결합 펩티드는 방사선 치료의 반응을 증진시킬 수 있어 항암 보조 용도로서 매우 유용하게 사용될 수 있으며, 방사선을 내성 선량으로 조사하더라도 우수한 항암 활성을 가지므로 방사선으로 인해 발생할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있다.

[124]

[125] 본 발명의 실시 형태는 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[126]

발명의 실시를 위한 형태

[127] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[128]

[129] 실시예 1-14. ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 결합 펩티드의 제조

[130] 여러 종류의 단백질 내에 존재하는 WWE 도메인들로부터 실시예 1 내지 실시예 14의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 합성하고, 이를 실험에 사용하였다. 사용된 펩티드의 구체적인 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

[131]

[132] [표1]

실시예	서열정보 (서열번호)	유래 단백질
1	VPYIIDLQSMHQFRQDTGTMRPVRR (서열번호 1)	DTX1
2	APYIIDLQSMNQFRQDTGTLRPVRR (서열번호 2)	DTX4
3	APYIIDLPSWTQFRQDTGTMRAVRR (서열번호 3)	DTX2
4	RVYTIDFNSMQQINEDTGTARAIQR (서열번호 4)	TRIP12
5	FCYLIYFNSMSQMNRQTRRRRLRR (서열번호 5)	PARP7
6	FSYVIDFNTMGQINRQTQRQRRVRR (서열번호 6)	PARP12
7	FSYKIDFAEMKQMNLTTGKQRLIKR (서열번호 7)	PARP11
8	YNYTVNYTTHTQTNKTSFRCRSVRR (서열번호 8)	PIK3C2G
9	RRYTVQFTTMVQVNEETGNRRPVM (서열번호 9)	HUWE1
10	WIWYWKNESGTWIQYGEEKDKRKN (서열번호 10)	ZC3HAV1
11	FLYVADLENMVQYRRNEHGRRRKIKR (서열번호 11)	RNF146
12	RHYTVNLNTYTATDTKGHSLSVQR (서열번호 12)	PARP14
13	GRYDVHLGERMRYAVYWDELAASEVRR (서열번호 13)	DDHD2
14	TAYEASVCDYLEQQVARGN (서열번호 14)	HNRNPA2B1

[133]

[134] 또한, 상기 실시예 1 내지 14의 펩티드들의 N-말단에 세포 투과성 펩티드 (cell-penetrating peptide)를 결합하여 실시예 15 내지 28의 펩티드들을 제조하였다. 실시예 15 내지 28의 펩티드 서열을 표 2에 나타내었다.

[135]

[136] [표2]

실시예	서열정보 (서열번호)
15	GRKKRRQRRRPQVPYIIDLQSMHQFRQDTGTMRPVRR (서열번호 15)
16	GRKKRRQRRRPQAPYIIDLQSMNQFRQDTGTLRPVRR (서열번호 16)
17	GRKKRRQRRRPQAPYIIDLPSWTQFRQDTGTMRAVRR (서열번호 17)
18	GRKKRRQRRRPQRVYTIDFNSMQQINEDTGTARAIQR (서열번호 18)
19	GRKKRRQRRRPQFCYLIYFNSMSQMNRQTRRRRRLRR (서열번호 19)
20	GRKKRRQRRRPQFSYVIDFNTMGQINRQTQRQRRVRR (서열번호 20)
21	GRKKRRQRRRPQFSYKIDFAEMKQMNLTTGKQRLIKR (서열번호 21)
22	GRKKRRQRRRPQYNYTVNYTTHTQTNKTSSFCRSVRR (서열번호 22)
23	GRKKRRQRRRPQRRYTVQFTTMVQVNEETGNRRPVM (서열번호 23)
24	GRKKRRQRRRPQWIWYWKNESGTWQYGEKDKRKN (서열번호 24)
25	GRKKRRQRRRPQFLYVADLENMVQYRRNEHGRRRRIKR (서열번호 25)
26	GRKKRRQRRRPQRHYTVNLNTYTATDTKGHSLSVQR (서열번호 26)
27	GRKKRRQRRRPQGRYDVHLGERMRYAVYWDELASEVRR (서열번호 27)
28	GRKKRRQRRRPQTAYEASVCDYLEQQVARGN (서열번호 28)

[137]

[138] 실험예 1: 암 세포 내 ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 수준 변화 확인

[139]

[140] 본 발명의 실시예 1 내지 28의 펩티드들은 폴리 ADP-리보오스의 분해 효소 작용을 억제할 수 있도록 설계된 것이다. 실험예 1에서는 세포 실험을 통해 각

펩티드들에 의해 폴리 ADP-리보오스의 분해가 억제되어 암 세포 내 축적되는지를 확인하였다.

[141]

[142] 1-1. U-87MG 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[143] 5 X 10⁵ 개의 U-87MG 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µM의 실시예 1 (서열번호 1) 또는 실시예 8 (서열번호 8)의 펩티드를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[144] 도 1의 좌측 상단 및 도 2의 우측 하단은 U-87MG 세포에서 실시예 1 또는 8의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로 나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드 2 종 모두 농도 의존적으로 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[145]

[146] 1-2. H1975 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[147] 5 X 10⁵ 개의 H1975 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µM의 실시예 2의 펩티드 (서열번호 2)를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[148] 도 1의 우측 상단 및 도 3의 좌측 상단은 H1975 세포에서 실시예 2 또는 실시예 9의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로 나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드의 농도 의존적으로 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[149]

[150] 1-3. Aspc-1 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[151] 5 X 10⁵ 개의 Aspc-1 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µM의 실시예 3의 펩티드 (서열번호 3)를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[152] 도 1의 좌측 하단 및 도 3의 우측 상단은 Aspc-1 세포에서 실시예 3 또는 실시예 10의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로

나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드의 농도 의존적으로 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[153]

[154] 1-4. Hep G2 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[155] 5×10^5 개의 Hep G2 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신을 함유하는 EMEM 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM 의 실시예 4의 펩티드 (서열번호 4)를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[156] 도 1의 우측 하단 및 도 3의 좌측 하단은 Hep G2 세포에서 실시예 4 또는 실시예 11의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로 나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드의 농도 의존적으로 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[157]

[158] 1-5. MDA-MB-231 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[159] 5×10^5 개의 MDA-MB-231 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신을 함유하는 Leibovitz's L-15 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM 의 실시예 5의 펩티드 (서열번호 5)를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[160] 도 2의 좌측 상단 및 도 3의 우측 하단은 MDA-MB-231 세포에서 실시예 5 또는 실시예 12의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로 나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드의 농도 의존적으로 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[161]

[162] 1-6. HCT116 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[163] 5×10^5 개의 HCT116 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5A 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM 의 실시예 6의 펩티드 (서열번호 6)를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[164] 도 2의 우측 상단 및 도 4의 좌측은 HCT116 세포에서 실시예 6 또는 실시예 13의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로 나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드의 농도 의존적으로

ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[165]

[166] 1-7. Caki-1 세포 내 ADP-리보오스 수준의 변화

[167] 5×10^5 개의 Caki-1 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 10 % FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5A 배지로 실시예 펩티드를 처리하지 않은 그룹 및 0.2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM 의 실시예 7의 펩티드 (서열번호 7)를 처리한 그룹으로 나누어 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 RIPA 버퍼 및 1 % SDS를 처리하였다. 준비된 상층액을 ELISA 분석에 활용하여 ADP-리보오스를 검출 분석하였다.

[168] 도 2의 좌측 하단 및 도 4의 우측은 Caki-1 세포에서 실시예 7 또는 실시예 14의 펩티드 처리에 따라 대조군 그룹 대비 ADP-리보오스 증가량을 배수 변화로 나타낸 것으로, 처리하지 않은 그룹에 비해 처리된 펩티드의 농도 의존적으로 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하고 있음을 보여주고 있다 (** $p < 0.001$).

[169]

[170] **실험예 2: 실시예의 펩티드 처리에 따른 암 세포 생존율의 변화**

[171]

[172] 세포는 생화학적 항상성을 유지하면서 ADP-리보오스의 생성 및 분해의 균형을 맞추고 있는데, 암 세포는 지속적으로 분열하며 급격히 성장하기 때문에 이와 같은 균형이 망가질 경우 정상 세포에 비해 생존에 크게 영향을 받을 수 있다.

[173] 상기 실험예 1의 결과에 따를 때, 본 발명의 실시예 펩티드들을 암 세포에 처리할 경우 세포 내 ADP-리보오스의 양이 현저히 증가하므로, 이를 통해 암 세포의 항상성 균형이 망가질 수 있다. 이에, 실험예 2에서는 실시예 1 내지 28의 펩티드 처리에 따른 암 세포의 생존율을 측정하였다.

[174]

[175] 2-1. U-87MG 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩티드 처리에 따른 생존율의 변화

[176] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 U-87MG 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 16 μM 농도의 실시예 1 내지 28의 펩티드를 각각 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, 10 μl 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, 200 μl 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[177] 도 5의 좌측 상단 및 도 8의 우측 상단은 U-87MG 세포에 실시예 1, 15, 8 및 22의 펩티드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩티드를 처리하지 않은 그룹에서는 U-87MG 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩티드를 처리한 그룹에서는 U-87MG 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를

관찰할 수 있다. 특히, 세포 투과성 펩티드 (cell-penetrating peptide, CPP)가 부착된 실시예 15 및 22의 펩티드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[178]

[179] 2-2. H1975 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩티드 처리에 따른 생존율의 변화

[180] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 H1975 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 $16 \mu\text{M}$ 농도의 실시예 1 내지 28의 펩티드를 각각 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[181] 도 5의 우측 상단 및 도 9의 좌측 상단은 H1975 세포에 실시예 2, 16, 9, 23의 펩티드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩티드를 처리하지 않은 그룹에서는 H1975 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩티드를 처리한 그룹에서는 H1975 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를 관찰할 수 있다. 특히, CPP가 부착된 실시예 16 및 23의 펩티드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[182]

[183] 2-3. Aspc-1 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩티드 처리에 따른 생존율의 변화

[184] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 Aspc-1 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 $16 \mu\text{M}$ 농도의 실시예 1 내지 28의 펩티드를 각각 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[185] 도 6의 좌측 상단 및 도 9의 우측 상단은 Aspc-1 세포에 실시예 3, 17, 10, 24의 펩티드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩티드를 처리하지 않은 그룹에서는 Aspc-1 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩티드를 처리한 그룹에서는 Aspc-1 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를 관찰할 수 있다. 특히, 세포 투과성 펩티드 CPP가 부착된 실시예 17 및 24의 펩티드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[186]

[187] 2-4. Hep G2 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩티드 처리에 따른 생존율의 변화

[188] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 Hep G2 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간

동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 16 μM 농도의 실시예 1 내지 28의 펩타이드를 각각 처리하였다. 그 다음 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, 10 μl 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, 200 μl 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[189] 도 6의 우측 상단 및 도 10의 좌측 상단은 Hep G2 세포에 실시예 4, 18, 11, 25의 펩타이드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩타이드를 처리하지 않은 그룹에서는 Hep G2 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩타이드를 처리한 그룹에서는 Hep G2 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를 관찰할 수 있다. 특히, 세포 투과성 펩타이드 CPP가 부착된 실시예 18 및 25의 펩타이드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[190]

[191] 2-5. MDA-MB-231 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩타이드 처리에 따른 생존율의 변화

[192] 96-웰 플레이트에 3 X 10³ 개의 MDA-MB-231 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 24 시간 동안 배양 후, 아무것도 처리하지 않거나 16 μM 농도의 실시예 1 내지 28의 펩타이드를 각각 처리하였다. 그 다음 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, 10 μl 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후 200 μl 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[193] 도 7의 좌측 상단 및 도 10의 우측 상단은 MDA-MB-231 세포에 실시예 5, 19, 12, 26의 펩타이드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩타이드를 처리하지 않은 그룹에서는 MDA-MB-231 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩타이드를 처리한 그룹에서는 MDA-MB-231 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를 관찰할 수 있다. 특히, CPP가 부착된 실시예 19 및 26의 펩타이드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[194]

[195] 2-6. HCT116 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩타이드 처리에 따른 생존율의 변화

[196] 96-웰 플레이트에 3 X 10³ 개의 HCT116 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 16 μM 농도의 실시예 1 내지 28의 펩타이드를 각각 처리하였다. 그 다음 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, 10 μl 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, 200 μl 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여

세포의 생존율을 확인하였다.

[197] 도 7의 우측 상단 및 도 11의 좌측 상단은 HCT116 세포에 실시예 6, 20, 13, 27의 펩티드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩티드를 처리하지 않은 그룹에서는 HCT116 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩티드를 처리한 그룹에서는 HCT116 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를 관찰할 수 있다. 특히, 세포 투과성 펩티드 CPP가 부착된 실시예 20 및 27의 펩티드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[198]

[199] 2-7. Caki-1 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩티드 처리에 따른 생존율의 변화

[200] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 Caki-1 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 $16 \mu\text{M}$ 농도의 실시예 1 내지 28의 펩티드를 각각 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[201] 도 8의 좌측 상단 및 도 11의 우측 상단은 Caki-1 세포에 실시예 7, 21, 14, 28의 펩티드를 각각 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 대표적인 현미경 사진이다. 공통적으로 펩티드를 처리하지 않은 그룹에서는 Caki-1 세포가 급격하게 성장하고 있는 형태를 관찰할 수 있는 반면에, 본 발명의 실시예 펩티드를 처리한 그룹에서는 Caki-1 세포의 성장이 억제되고 사멸하고 있는 형태를 관찰할 수 있다. 특히, CPP가 부착된 실시예 21 및 28의 펩티드들을 처리한 그룹에서는 암 세포가 완전히 사멸한 것을 확인하였다.

[202]

[203] 2-8. SNU-1 세포 및 OVCAR-3 세포에서 ADP-리보오스 결합 펩티드 처리에 따른 생존율의 변화

[204] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 SNU-1 세포 또는 OVCAR-3 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 아무것도 처리하지 않거나 $16 \mu\text{M}$ 농도의 실시예 15 내지 28의 펩티드를 각각 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 96 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[205] 그 결과, 실시예 15 내지 28의 펩티드를 각각 처리한 그룹은 SNU-1 세포 및 OVCAR-3 세포 모두에서 암 세포를 거의 대부분 사멸시키는 것을 확인하였다 (도 12).

[206]

[207] 실험예 3: 실시예의 펩티드 및 저농도의 항암제 병용 처리에 의한 암 세포 생존율의 변화

[208]

[209] 기존 항암제에 의한 암 세포 생존의 감소 등으로 대표되는 항암 효과는 ADP-리보오스의 신호에 의해 상승될 수 있으므로, 기존 항암제를 처리하며 ADP-리보오스의 축적을 유도하여 주면 암 세포에 기존 항암제를 필요 농도 이하로 처리하더라도 상승된 항암 효과를 나타낼 것으로 기대하였다. 상기 실험예 1에서 확인한 바와 같이 본발명의 실시예 펩티드들은 암 세포 내에서 ADP-리보오스의 양을 현저히 증가시키므로, 실험예 3에서는 실시예 펩티드와 저농도의 항암제를 병용 처리하였을 때 상승된 항암 효과가 나타나는지를 확인하고자 하였다.

[210]

[211] 3-1. U-87MG 세포에서 실시예 펩티드와 저농도 베바시주맙 (bevacizumab)의 병용 처리에 의한 생존율의 변화

[212] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 U-87MG 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 18 mM의 베바시주맙 단독, 또는 0.2, 1 또는 8 μM 농도의 실시예 1 내지 14의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, 10 μl의

3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, 200 μl의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[213] 그 결과, U-87MG 세포에 베바시주맙을 단독으로 처리하였을 때 전체 암 세포의 약 49 %가 생존하고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든 경우에 저농도의 베바시주맙으로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 13의 좌측).

[214]

[215] 3-2. H1975 세포에서 실시예 펩티드와 저농도 오시메르티닙 (osimertinib)의 병용 처리에 의한 생존율의 변화

[216]

[217] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 H1975 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 1 nM의 오시메르티닙 단독, 또는 0.2, 1 또는 8 μM 농도의 실시예 1 내지 14의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, 10 μl의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, 200 μl의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[218] 그 결과, H1975 세포에 1 nM의 오시메르티닙을 단독으로 처리하였을 때 전체 암 세포의 약 49 %가 생존하고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든

경우에 저농도의 오시메르티닙으로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 13의 우측).

[219]

[220] 3-3. Aspc-1 세포에서 실시예 펩티드와 저농도 겐시타빈 (gemcitabine)의 병용 처리에 의한 생존율의 변화

[221]

[222] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 aspc-1 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, $1 \mu\text{M}$ 의 겐시타빈 단독, 또는 0.2, 1 또는 $8 \mu\text{M}$ 농도의 실시예 15 내지 28의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[223] 그 결과, aspc-1 세포에 겐시타빈을 단독으로 처리하였을 때 전체 암 세포의 약 50 %가 생존하고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든 경우에 저농도의 겐시타빈으로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 14의 좌측).

[224]

[225] 3-4. MDA-MB-231 세포에서 실시예 펩티드와 저농도 도시탁셀 (docetaxel)의 병용 처리에 의한 생존율의 변화

[226]

[227] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 MDA-MB-231 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, $50 \mu\text{M}$ 의 도시탁셀 단독, 또는 0.2, 1 또는 $8 \mu\text{M}$ 농도의 실시예 15 내지 28의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24시간 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후, $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[228] 그 결과, MDA-MB-231 세포에 도시탁셀을 단독으로 처리하였을 때 전체 암 세포의 약 52 %가 생존하고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용처리한 모든 경우에 저농도의 도시탁셀로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 14의 우측).

[229]

[230] **실험예 4: 실시예의 펩티드 및 방사선 병용 처리에 의한 암 세포 생존율의 변화**

[231]

[232] 방사선 치료는 유전 물질의 손상에 의한 사멸 작용을 통해 항암 효과를 기대할 수 있으나, 암 세포는 이를 극복하기 위해 ADP-리보실화 (ribosylation)로 알려진 공정을 통해 DNA의 가닥을 지속적으로 복구한다. 그러나 방사선 조사에 의한

복구 작용으로 일시적으로만 증가하는 ADP-리보오스를 지속적으로 축적 되도록 보조하여 주면 내성 선량의 방사선을 조사하더라도 상승된 항암 효과가 있을 것으로 기대하였다. 상기 실험에 1에서 확인한 바와 같이 본 발명의 실시예 펩티드들은 암 세포 내에서 ADP-리보오스의 양을 현저히 증가시키므로, 실험에 4에서는 실시예 펩티드와 내성 선량의 방사선 조사를 병용하였을 때 상승된 항암 효과가 나타나는지를 확인하고자 하였다.

[233]

[234] 4-1. H1975 세포에서 실시예 펩티드와 내성 선량의 방사선 병용 처리에 의한 생존율의 변화

[235] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 H1975 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 2 Gy 선량의 방사선 단독, 또는 1.6 또는 $3.2 \mu\text{M}$ 의 서열번호 1 내지 14의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[236] 그 결과, H1975 세포에 2 Gy 선량의 방사선을 단독으로 처리하였을 때 처리하지 않은 그룹 대비 암 세포의 약 76 %가 생존하는 내성을 보이고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든 경우에 내성 선량의 방사선 조사로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 15의 좌측).

[237]

[238] 4-2. Aspc-1 세포에서 실시예 펩티드와 내성 선량의 방사선 병용 처리에 의한 생존율의 변화

[239] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 Aspc-1 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 2 Gy 선량의 방사선 단독, 또는 1.6 또는 $3.2 \mu\text{M}$ 의 서열번호 1 내지 14의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[240] 그 결과, Aspc-1 세포에 2 Gy 선량의 방사선을 단독으로 처리하였을 때 처리하지 않은 그룹 대비 암 세포의 약 86 %가 생존하는 내성을 보이고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든 경우에 내성 선량의 방사선 조사로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 15의 우측).

[241]

[242] 4-3. MDA-MB-231 세포에서 실시예 펩티드와 내성 선량의 방사선 병용 처리에

의한 생존율의 변화

- [243] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 MDA-MB-231 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 2 Gy 선량의 방사선 단독, 또는 1.6 또는 $3.2 \mu\text{M}$ 의 서열번호 15 내지 28의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.
- [244] 그 결과, MDA-MB-231 세포에 2 Gy 선량의 방사선을 단독으로 처리하였을 때 처리하지 않은 그룹 대비 암 세포의 약 86 %가 생존하는 내성을 보이고 있었으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든 경우에 내성 선량의 방사선 조사로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 16의 좌측).

[245]

[246] 4-4. Caki-1 세포에서 실시예 펩티드와 내성 선량의 방사선 병용 처리에 의한 생존율의 변화

- [247] 96-웰 플레이트에 3×10^3 개의 Caki-1 세포를 37°C , 5 % CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한 후, 2 Gy 선량의 방사선 단독, 또는 1.6 또는 $3.2 \mu\text{M}$ 의 서열번호 15 내지 28의 펩티드와 병용 처리하였다. 그 다음 37°C , 5 % CO_2 조건에서 다시 24 시간 동안 배양한 후, $10 \mu\text{l}$ 의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 시약을 각 웰에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 시약을 제거한 후 디메틸 설펝사이드를 각 웰에 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣은 뒤 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.
- [248] 그 결과, Caki-1 세포에 2 Gy 선량의 방사선을 단독으로 처리하였을 때 처리하지 않은 그룹 대비 암 세포의 약 96 %가 생존하는 내성을 보이고 있으나, 실시예 펩티드와 병용 처리한 모든 경우에 내성 선량의 방사선 조사로도 암 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; 도 16의 우측).

[249]

[250] **실험예 5: 동물모델을 이용한 실시예 펩티드의 투여 경로에 따른 항암 효능효과 비교 및 검증**

[251]

[252] 5-1. 실시예 펩티드를 피하 경로로 주사한 동물 모델에서 종양 부피의 변화

- [253] 5 주령의 balb/c 누드 마우스에 aspc-1 세포 (1×10^7)를 마우스의 옆구리 뒤쪽에 접종하고 무처리 대조군 (control)과 실시예 15 내지 28의 펩티드를 각각 피하 경로로 주사하는 15 가지 군으로 분류하였다. 종양의 부피가 약 150mm^3 까지 성장했을 때, 각 실시예 펩티드를 주 3 회 20mg/kg 의 용량으로 피하 주사했다.

디지털 캘리퍼로 종양 크기를 측정하여 종양 부피의 변화 결과를 군 별로 비교하였다.

[254] 그 결과, 최종 투약 후 대조군 종양의 최종 부피는 약 3136 mm³로 크게 성장하였으나, 실시예 15 내지 28의 펩티드를 각각 피하 경로로 주사한 모든 군에서는 종양의 성장이 현저히 억제되는 것을 확인하였다 (** $p < 0.001$; 도 17).

[255] 도 18은 모든 군에서 부검 후 획득한 대표적인 종양사진을 나타낸 것으로, 대조군과 대비하였을 때 본 발명의 실시예 펩티드를 피하 주사한 모든 군에서 종양 조직의 성장이 현저히 억제된 것이 관찰되었다.

[256]

[257] 5-2. 실시예 펩티드를 구강 투여 경로로 주사한 동물 모델에서 종양 부피의 변화

[258] 5 주령의 balb/c 누드 마우스에 aspc-1 세포 (1 X 10⁷)를 마우스의 옆구리 뒤쪽에 접종 하고 무처리 대조군 (Control)과 실시예 1 내지 14의 펩티드를 각각 구강 투여하는 15 가지 군으로 분류하였다. 종양의 부피가 약 150 mm³까지 성장 했을 때, 각 실시예 펩티드를 주 5 회 20 mg/kg의 용량으로 구강 투여했다. 디지털 캘리퍼로 종양 크기를 측정하여 종양 부피의 변화 결과를 군 별로 비교하였다.

[259] 그 결과, 최종 투약 후 대조군 종양의 최종 부피는 약 3517 mm³로 크게 성장하였으나, 실시예 1 내지 14의 펩티드를 각각 구강 투여한 모든 군에서는 종양의 성장이 현저히 억제되는 것을 확인하였다 (** $p < 0.001$; 도 19).

[260] 도 20은 모든 군에서 부검 후 획득한 대표적인 종양사진을 나타낸 것으로, 대조군과 대비하였을 때 본 발명의 실시예 펩티드를 구강 투여한 모든 군에서 종양 조직의 성장이 현저히 억제된 것이 관찰되었다.

[261]

[262] **실험예 6: 실시예 펩티드의 정상 세포에서의 세포 독성 확인**

[263] 다음으로, 본 발명의 펩티드들이 정상 세포에서도 세포 독성을 보이는지 여부를 추가적으로 확인하였다. 시험을 위하여 정상 세포로서 인간 대장 섬유아세포 (colon fibroblast)인 CCD-18Co 및 인간 피부 유두 세포 (dermal papilla cell)인 HDPC를 사용하였으며, 본 발명의 실시예 펩티드로서 대표적으로 서열번호 7의 펩티드를 사용하였다.

[264] 먼저, 96-웰 플레이트에 5 x 10³ 개의 각 정상 세포를 접종한 뒤 DMEM 배지에서 37 °C, 5 % CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 각 웰을 펩티드를 처리하지 않은 그룹 (untreated) 및 서열번호 7의 펩티드를 처리한 그룹 (각각 25, 50 및 100 μM)으로 구분하여 실험을 수행하였다.

[265] 실험 결과, 펩티드를 처리한 모든 그룹 (처리 후 24 시간, 48 시간 또는 72 시간)에서 미처리 대조군과 유의적인 차이를 전혀 발견할 수 없었다 (도 21 및 도 22). 따라서 본 발명의 실시예의 펩티드는 암 세포에서는 강력한 항암 활성을 보이는 반면에, 정상 세포에서는 전혀 세포 독성을 나타내지 않아 항암 용도로서 매우 우수한 효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[266]

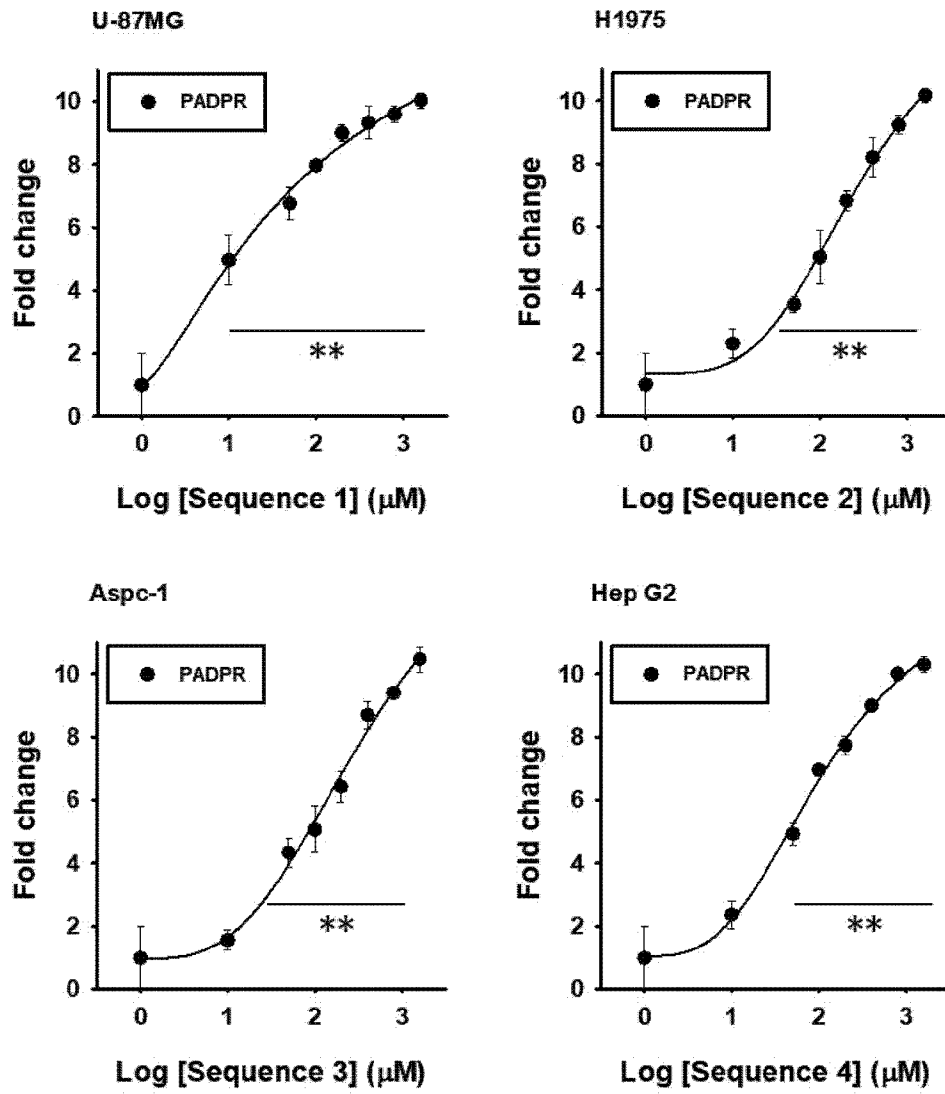
[267] 이상의 설명으로부터, 본 발명의 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

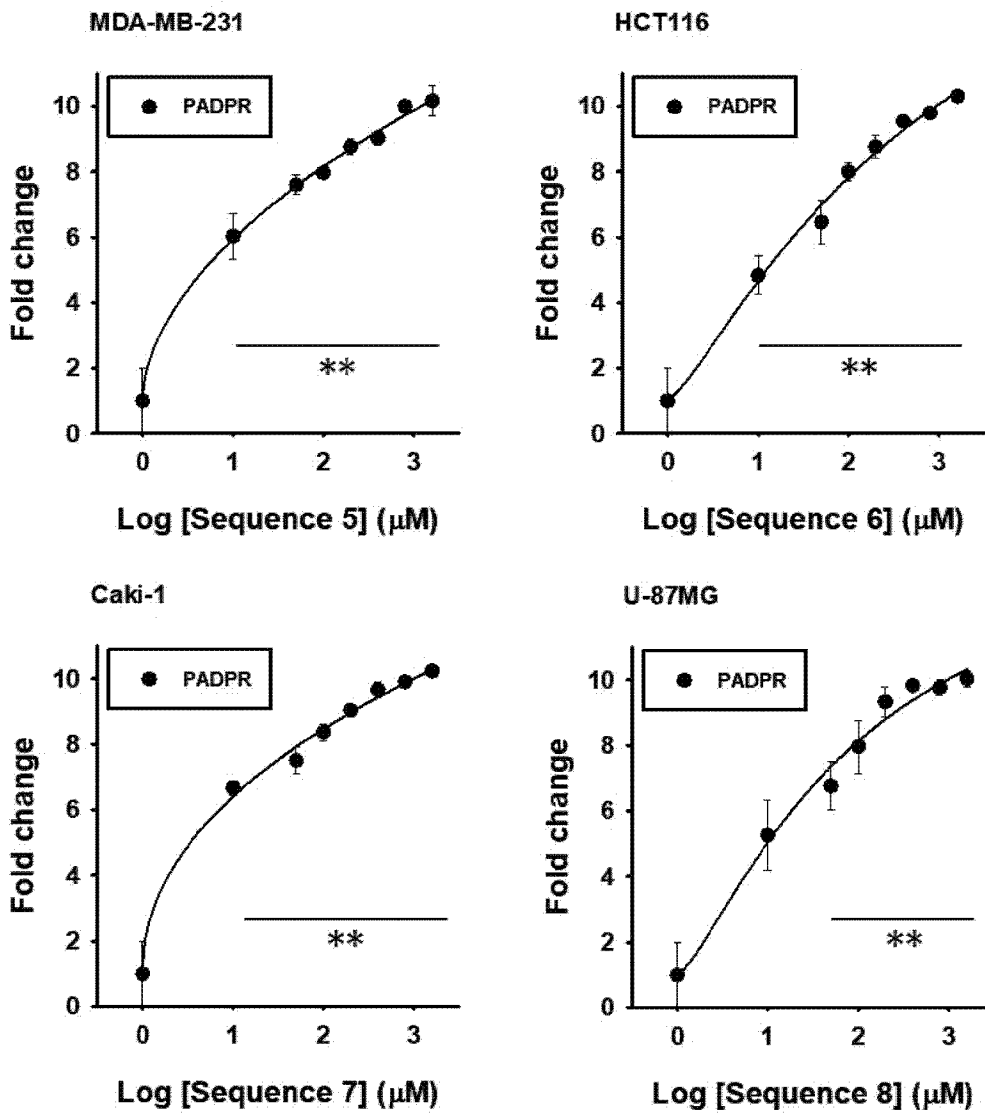
- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, ADP (adenosine diphosphate)-리보오스 결합 펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 펩티드는 N-말단, C-말단 또는 양 말단에 세포 투과성 펩티드 (cell-penetrating peptide)를 추가로 포함하는 것인, ADP-리보오스 결합 펩티드.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 세포 투과성 펩티드는 TAT, 마우로칼신 (maurocalcine), 페네트라틴 (penetratin), 폴리-알지닌 (Poly-arginine) 유래 펩티드, 안테나페디아 (Antennapedia), 트랜스포탄 (Transportan), VP22, Hph-1, 폴리-알지닌 (Poly-arginine), R11(R9), Pep-1, HP4, LAH4, Vetofusing-1, 시그널 서열 기반 펩티드, 및 양친매성 (Amphipathic) 펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, ADP-리보오스 결합 펩티드.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 펩티드는 서열번호 15 내지 24로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인, ADP-리보오스 결합 펩티드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 ADP-리보오스 결합 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제5항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 7] 제5항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 형질전환체.
- [청구항 8] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 암은 뇌암, 폐암, 췌장암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 위암 및 난소암으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 고형암인 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 조성물은 피하 또는 경구로 투여되는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 제2항암제에 대한 반응성을 증진시키는 항암 보조용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 항암제는 세포 독성 항암제, 표적 항암제 또는 이들의 조합인 것인,

- 항암 보조용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
 상기 제2항암제가 표적으로 하는 암은 뇌암, 폐암, 췌장암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 위암 및 난소암으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 고형암인 것인, 항암 보조용 약학적 조성물.
- [청구항 14] (i) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및
 (ii) 제2항암제를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 ADP-리보오스 결합 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 방사선 항암 치료에 대한 반응성을 증진시키는 항암 보조용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
 상기 방사선 항암 치료가 표적으로 하는 암은 뇌암, 폐암, 췌장암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 위암 및 난소암으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 고형암인 것인, 항암 보조용 약학적 조성물.

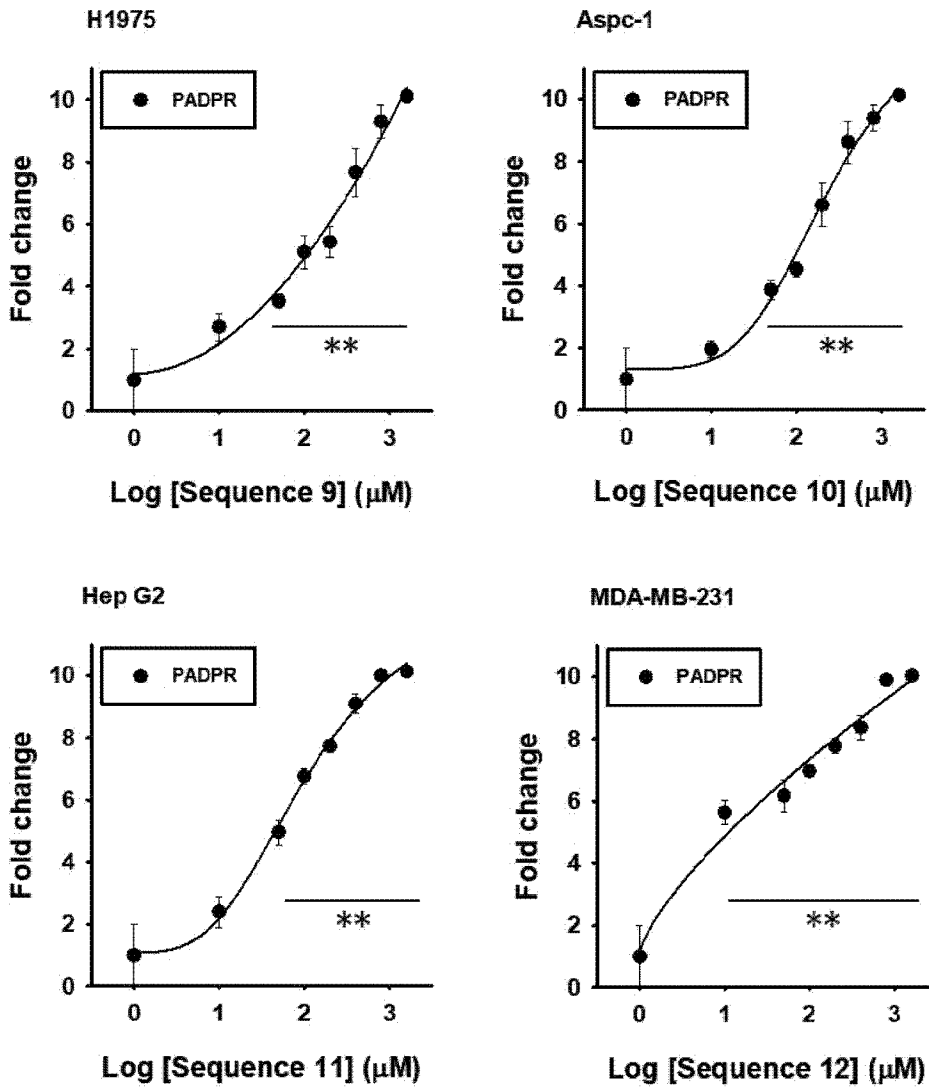
[도 1]



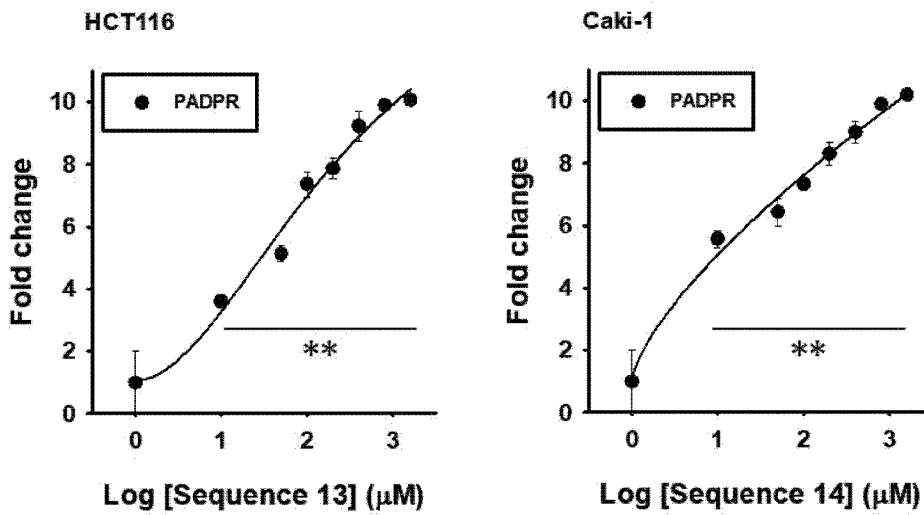
[도2]



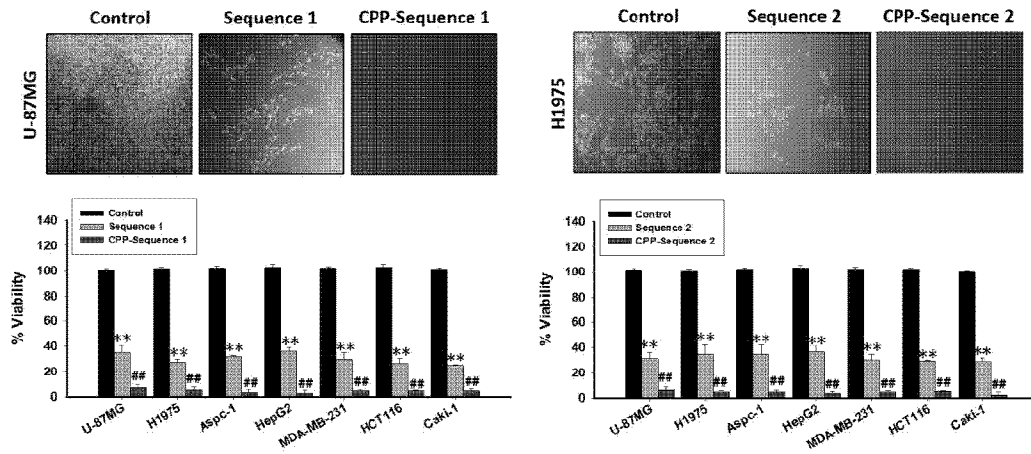
[도3]



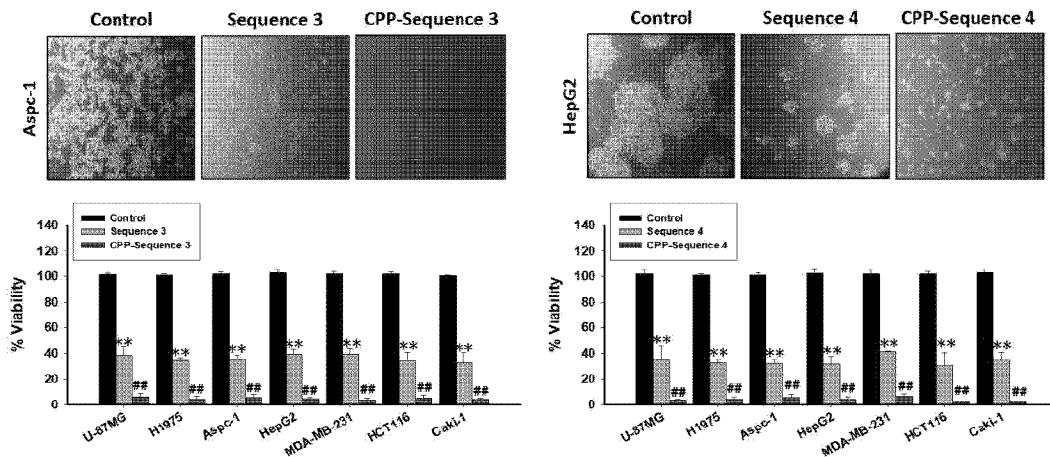
[도4]



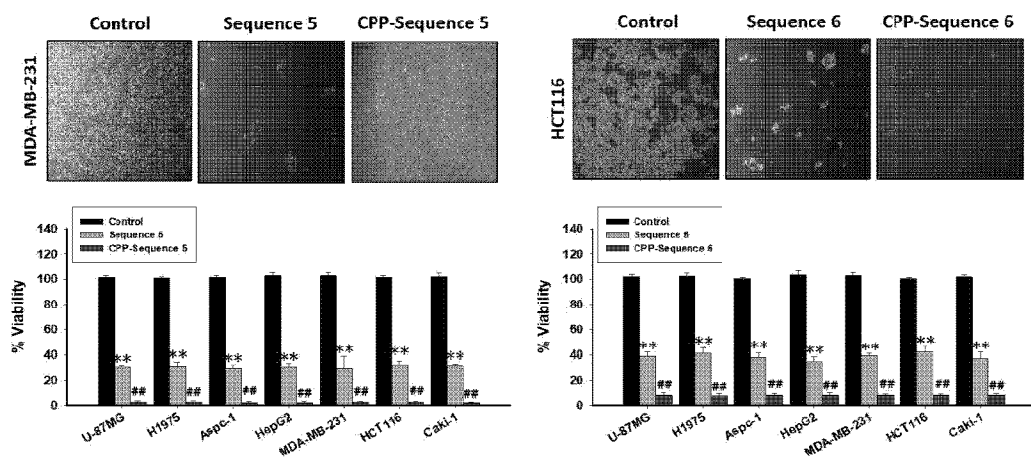
[도5]



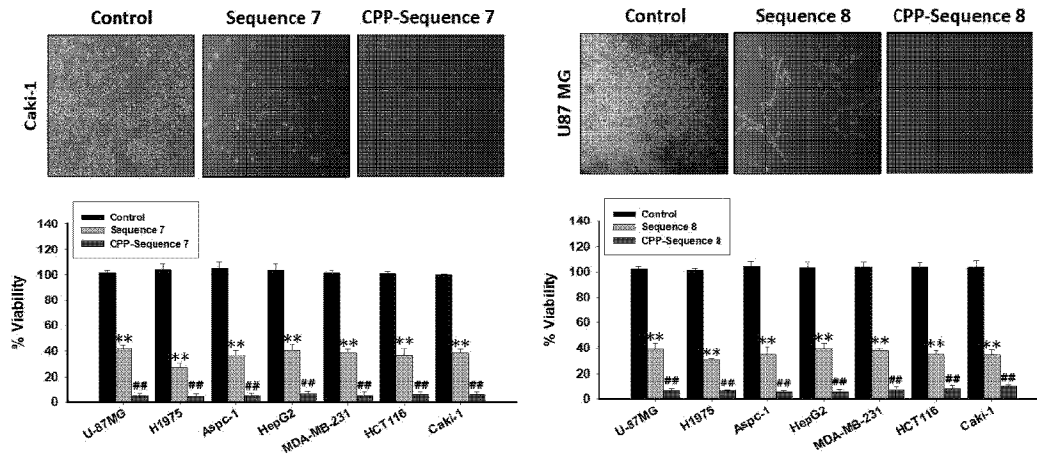
[도6]



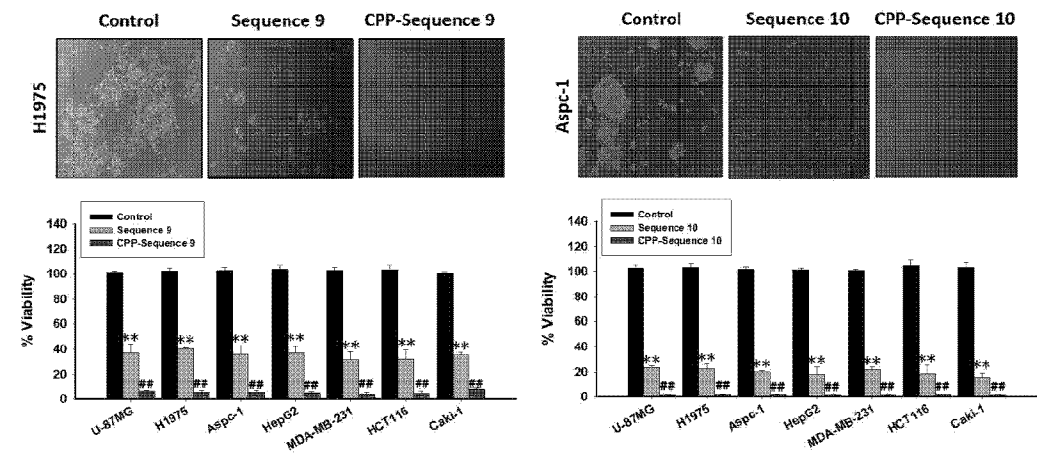
[도7]



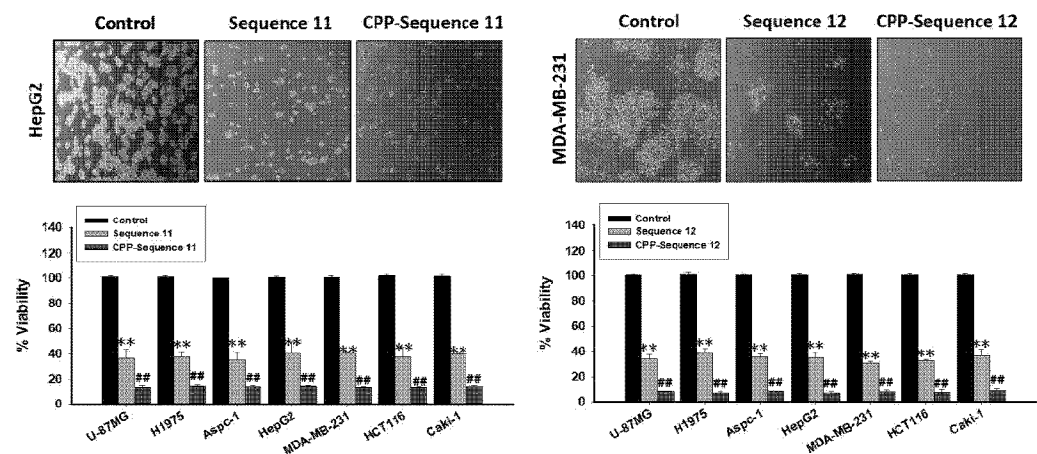
[도8]



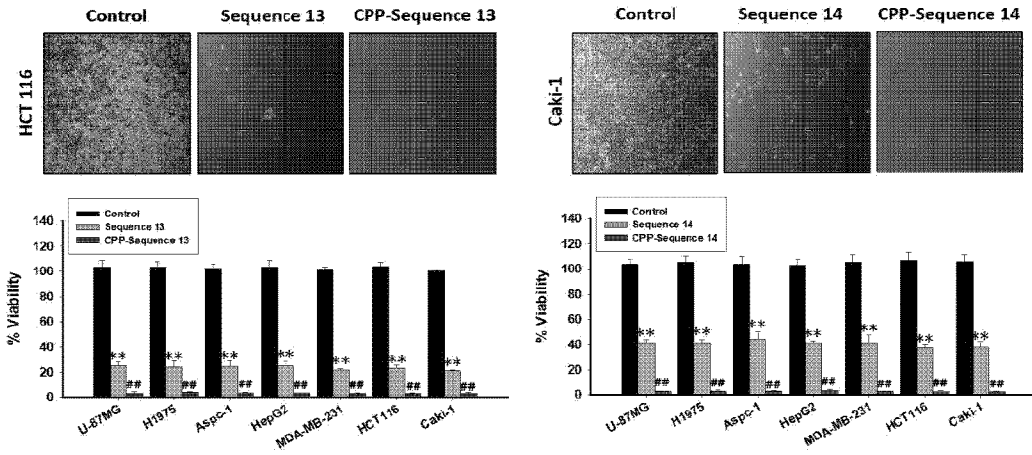
[도9]



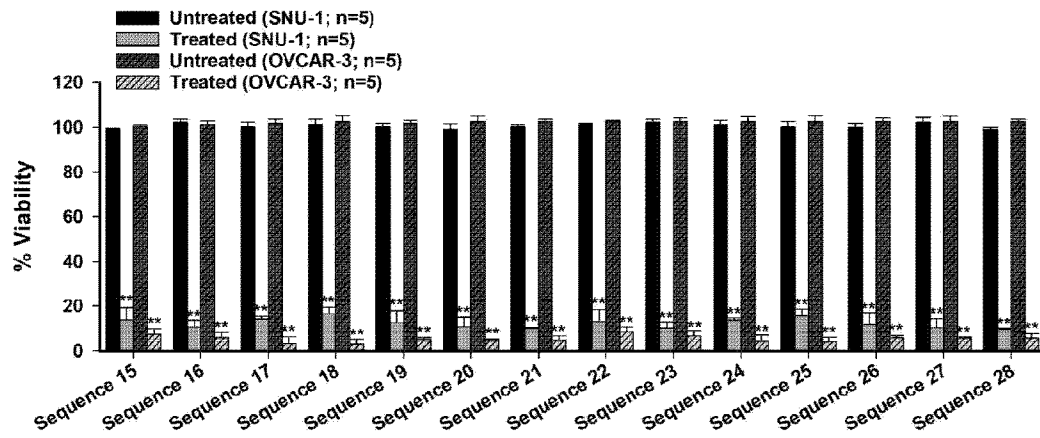
[도10]



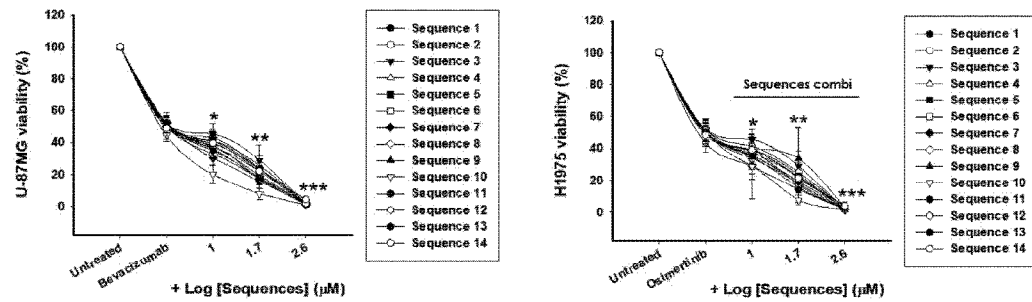
[도 11]



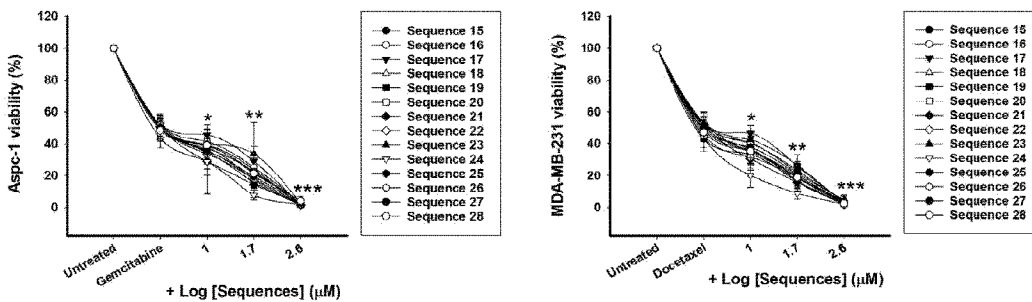
[도 12]



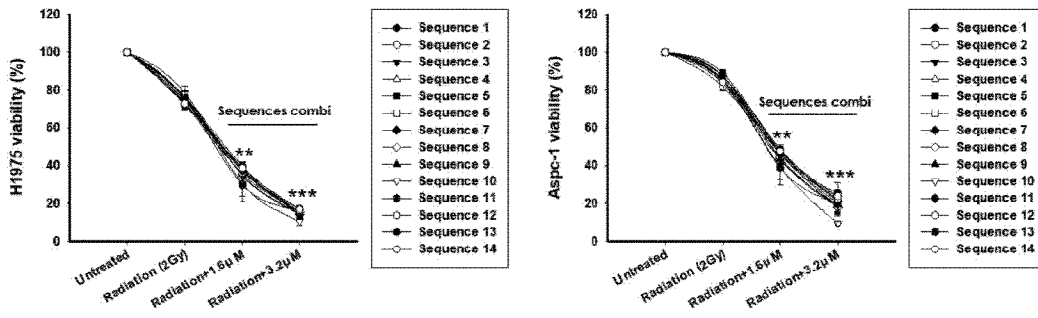
[도 13]



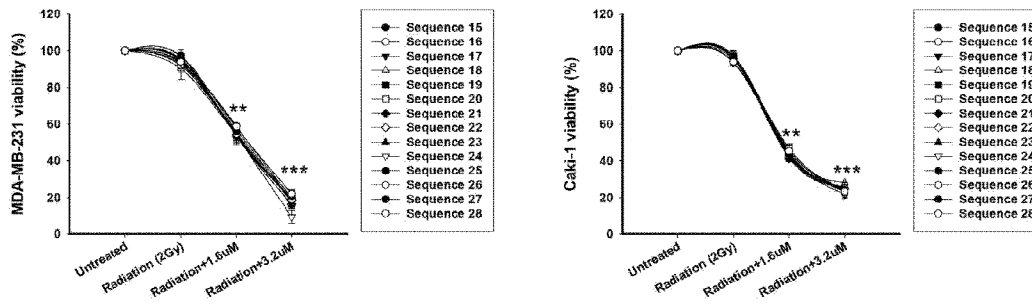
[도 14]



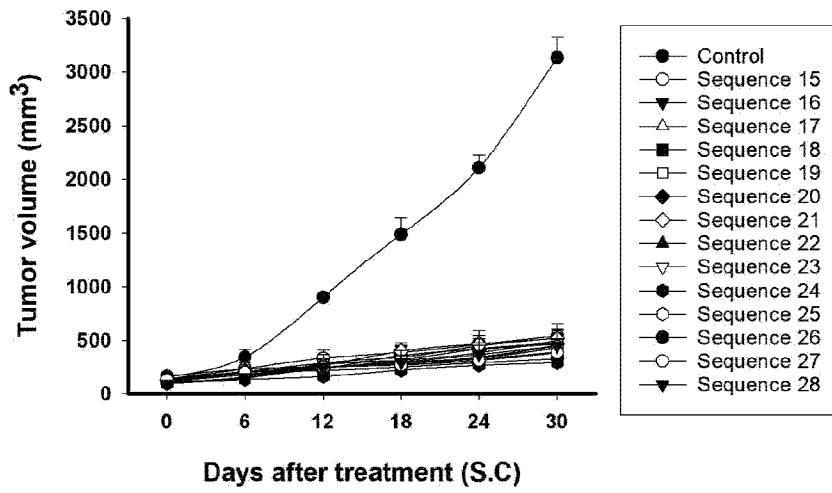
[도 15]



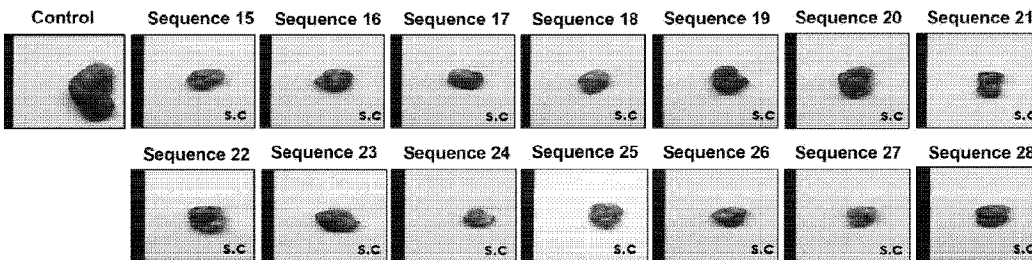
[도 16]



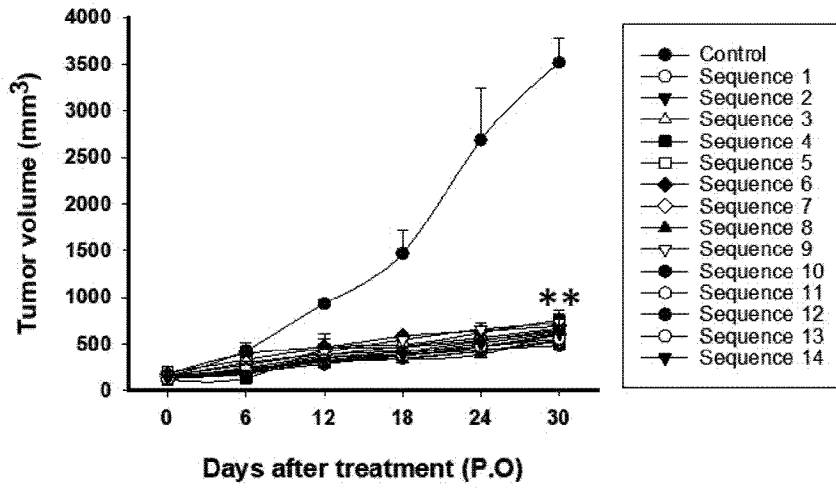
[도 17]



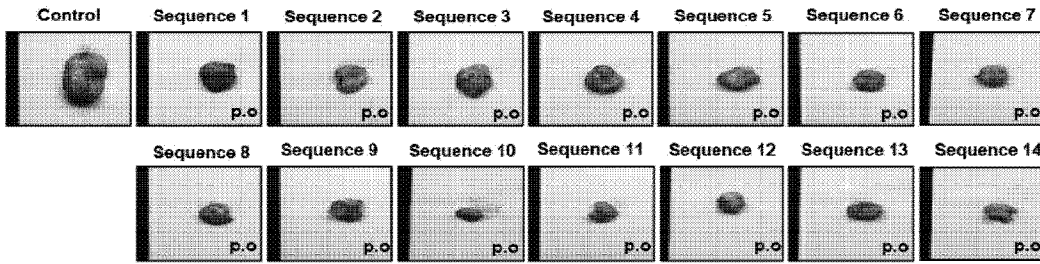
[도 18]



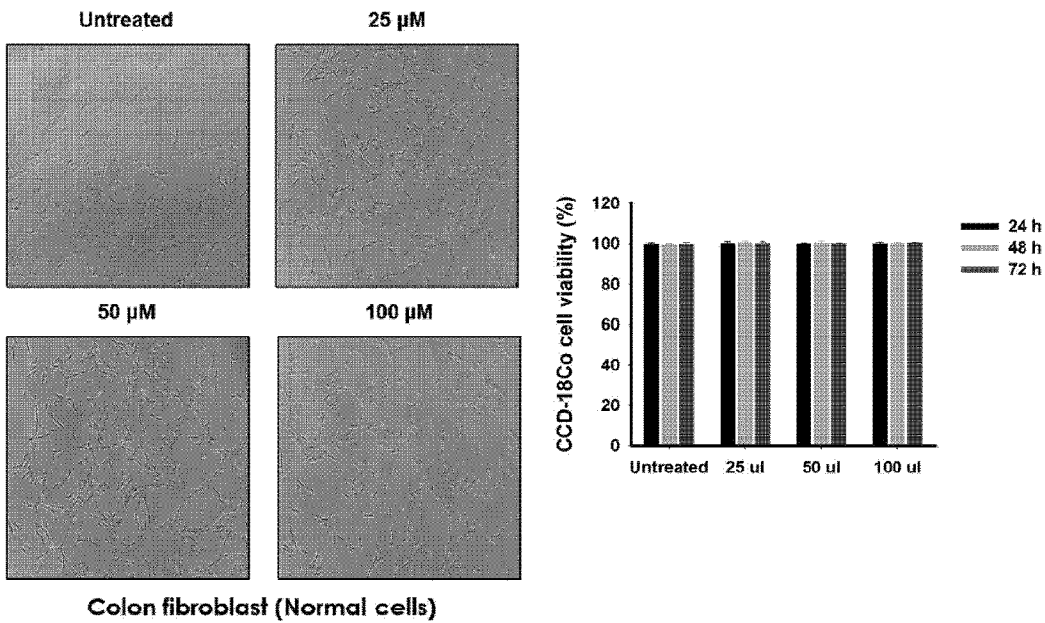
[도 19]



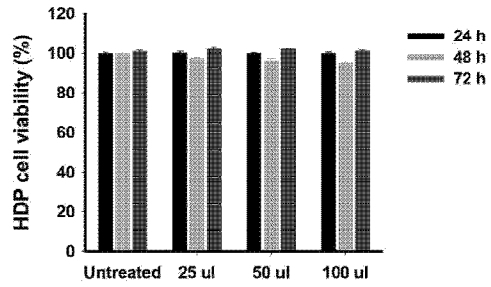
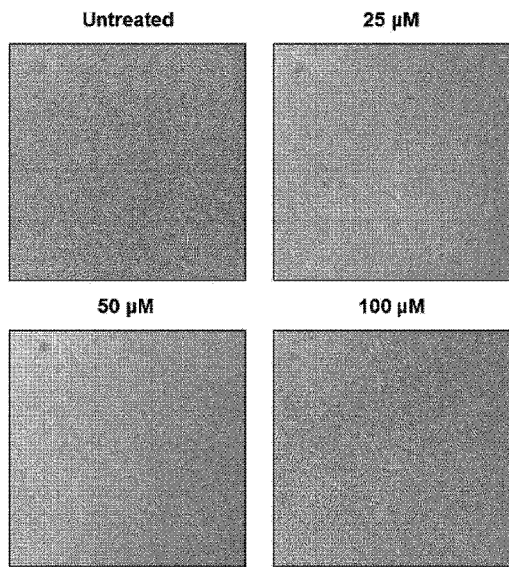
[도 20]



[도 21]

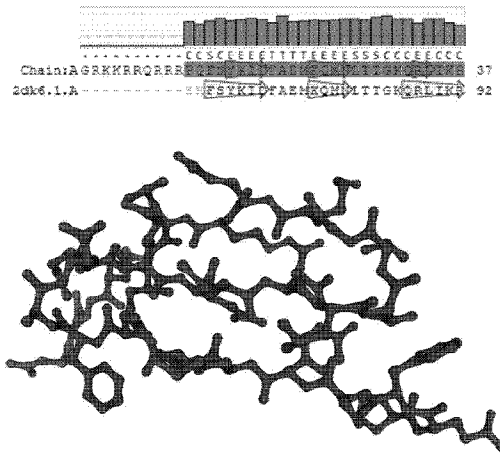
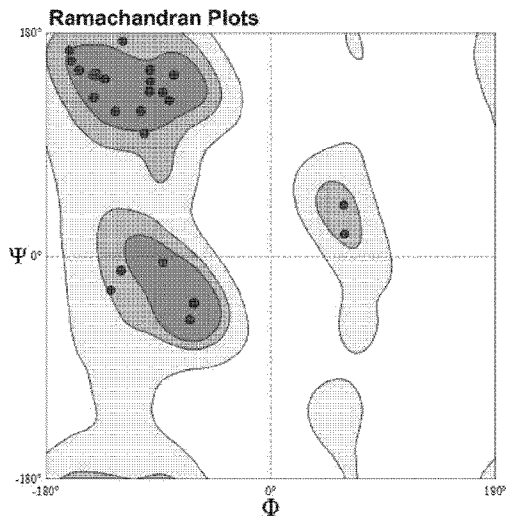


[도22]



Human hair dermal papilla cell (Normal cells)

[도23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/00(2006.01)i; C07H 19/207(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(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 14/00(2006.01); A61K 47/64(2017.01); C07K 16/28(2006.01)		
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: ADP-리보오스 결합 펩티드(ADP-ribose binding peptide), 세포 투과 펩티드(cell-penetrating peptide), 암 치료(cancer treatment), 방사선 치료 반응성(radiation therapy reactivity)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WANG, Zhizhi et al. Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly (ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly (ADP-ribosyl) ation-dependent ubiquitination. Genes & Development. 2012, vol. 26, pp. 235-240. See page 238; and figure 4.	1,5-7 2-4,8-14 15-16
Y	KOO, Ja-Hyun et al. Cell-penetrating function of the poly (ADP-ribose)(PAR)-binding motif derived from the PAR-dependent E3 ubiquitin ligase iduna. International Journal of Molecular Sciences. 2018, vol. 19, Article No. 779, pp. 1-13. See abstract; and page 1.	2-4
Y	KRIETSCH, Jana et al. Reprogramming cellular events by poly (ADP-ribose)-binding proteins. Molecular Aspects of Medicine. 2013, vol. 34, pp. 1066-1087. See page 1081; and table 2.	8-14
A	PALAZZO, Luca et al. PARPs in genome stability and signal transduction: implications for cancer therapy. Biochemical Society Transactions. 2018, vol. 46, pp. 1681-1695. See entire document.	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 22 December 2022		Date of mailing of the international search report 23 December 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012886

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2020-0384118 A1 (FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITAT ERLANGEN-NURNBERG) 10 December 2020 (2020-12-10) See entire document.	1-16

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/012886

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020-0384118	A1	10 December 2020	EP	3727459	A2	28 October 2020
				WO	2019-121687	A2	27 June 2019
				WO	2019-121687	A3	06 September 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/00(2006.01)i; C07H 19/207(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/00(2006.01); A61K 47/64(2017.01); C07K 16/28(2006.01)		
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: ADP-리보오스 결합 펩티드(ADP-ribose binding peptide), 세포 투과 펩티드(cell-penetrating peptide), 암 치료(cancer treatment), 방사선 치료 반응성(radiation therapy reactivity)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	WANG, ZHIZHI 등, 'Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly (ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly (ADP-ribosyl) ation-dependent ubiquitination', Genes & Development, 2012, 26권, 페이지 235-240 페이지 238; 및 도면 4 참조.	1,5-7 2-4,8-14 15-16
Y	KOO, JA-HYUN 등, 'Cell-penetrating function of the poly (ADP-ribose)(PAR)-binding motif derived from the PAR-dependent E3 ubiquitin ligase iduna', International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19 권, Article No. 779, 페이지 1-13 요약; 및 페이지 1 참조.	2-4
Y	KRIETSCH, JANA 등, 'Reprogramming cellular events by poly (ADP-ribose)-binding proteins', Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34권, 페이지 1066-1087 페이지 1081; 및 표 2 참조.	8-14
A	PALAZZO, LUCA 등, 'PARPs in genome stability and signal transduction: implications for cancer therapy', Biochemical Society Transactions, 2018, 46권, 페이지 1681-1695 전체 문헌 참조.	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 이후에 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		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년12월22일 (22.12.2022)	2022년12월23일 (23.12.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2020-0384118 A1 (FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITAT ERLANGEN-NURNBERG) 2020.12.10 전체 문헌 참조.	1-16

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2020-0384118 A1	2020/12/10	EP 3727459 A2	2020/10/28
		WO 2019-121687 A2	2019/06/27
		WO 2019-121687 A3	2019/09/06
