(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0021546
(43) 공개일자 2013년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0083863
(22) 출원일자 2011년08월23일
심사청구일자 2011년08월23일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121, 건양대학교 산학협력단 (내동)
(72) 발명자
이형근
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 삼성아파트 107동 1503호 (대치동)
이준행
서울특별시 강남구 삼성로 649, 상아아파트 2동 408호 (삼성동)
(74) 대리인
김문재, 이종승, 권형중

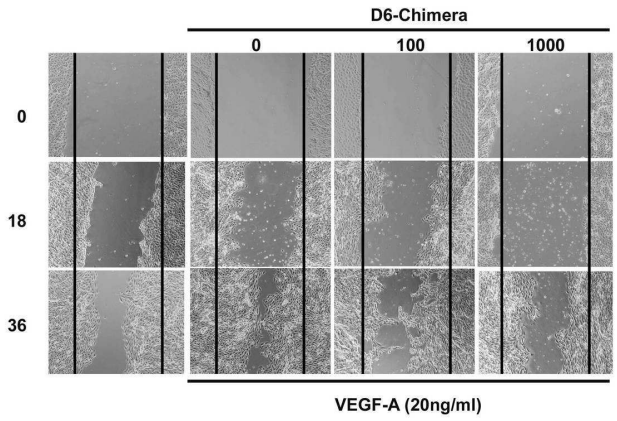
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 항암용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 혈관 형성 억제용 조성물 및 항암용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 펩타이드는 혈관 형성 및 세포 침윤을 억제시키는 효과가 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A2A02009081

부처명 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-중견연구-핵심공동

연구과제명 Decoy receptor D6를 응용한 multi-chemokine trap의 제작과 동종이식 거부 (allograft rejection) 억제연구

주관기관 연세대학교 의과대학

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 혈관형성에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 질환은 혈관형성-의존성 암, 양성 종양, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막병증, 건선, 안구혈관형성 질환, 오슬러-웨버 증후군, 심근 혈관형성, 플라크 신혈관화, 모세혈관확장증, 혈우병 관절증, 혈관섬유종, 외상 과립화, 장 유착증, 동맥경화증, 경피증, 비후성 반흔, 캣 스크래치 질환, 헬리코박터 필로리(Helicobacter pylori) 궤양, 투석 이식 혈관 통로 협착증 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 7

D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 11

D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 14

제 11항에 있어서,

상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 15

제 11항에 있어서,

상기 약학 조성물은 세포의 이동을 억제시키는 것을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 16

제 11항에 있어서,

상기 약학 조성물은 세포의 침윤을 억제시키는 것을 특징으로 하는 암 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 17

D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 19

제 17항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 20

제 17항에 있어서,

상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 혈관 형성 억제용 조성물 및 항암용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 케모카인(chemokine)은 크기가 10Kd 미만의 비교적 작은 분비성 단백으로 임파구, 중성구 등의 혈액세포와 혈관 내피세포의 증식, 이동, 활성화를 일으키는 물질들을 통칭한다. 케모카인은 현재 약 30 여종이 발견되어 있으며 이들은 각각의 수용체를 통해 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 케모카인은 여러 자가면역질환 (e.g., RA, SLE, Sjogren), 자가 염증성질환 (ulcerative colitis, Crohn's Ds)과 같은 많은 질병의 발생과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 외에도 당뇨나 동맥경화의 발생에도 관련된 것으로 알려져 있다. 또한, 장기나 조직의 이식에 있어서 치명적인 거부반응도 케모카인에 의해 매개된다.

[0003] 한편, 우리의 몸은 케모카인의 과도한 활성을 조절하는 디코이 수용체(natural decoy receptor)들을 가지고 있으며, D6 역시 이러한 디코이 수용체의 일종으로 주로 면역세포의 활성을 조절하는 케모카인을 조절하는 것으로 알려져 있다. D6 디코이 수용체는 주로 면역과 관계하는 중요 케모카인인 CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL5/RANTES, CCL17/TARC 등을 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 본 발명자들은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 펩타이드의 세포 침윤 및 혈관 형성 억제 효과를 확인하고 이에 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 펩타이드를 포함하는 혈관 형성 억제용 조성물 및 항암용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 혈관 형성 억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명에 있어서, 상기 혈관 형성 억제용 약학 조성물은 혈관형성에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 질환은 혈관형성-의존성 암, 양성 종양, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막병증, 건선, 안구혈관형성 질환, 오슬러-웨버 증후군, 심근 혈관형성, 플라크 신혈관화, 모세혈관확장증, 혈우병 관절증, 혈관섬유종, 외상 과립화, 장 유착증, 동맥경화증, 경피증, 비후성 반흔, 캣 스크래치 질환, 헬리코박터 필로리(Helicobacter pylori) 궤양, 투석 이식 혈관 통로 협착증 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0008] 본 발명은 다른 구체예에서, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또 다른 구체예에서, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 암 전이 억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 암 전이 억제용 약학 조성물은 세포의 이동을 억제시키는 것을 특징으로 할 수 있고, 세포의 침윤을 억제시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0011] 본 발명은 또 다른 구체예에서, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0014] 본 발명의 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, hgksdir, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0015] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활

제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다.투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0017] 혈관신생(angiogenesis)은 배아의 발생, 상처치료 및 조직 또는 기관의 재생과 같은 다양한 생리적 과정에서 필수적이다(Iwaguchi T., Gan To Kagaku Ryoho, 1993, 20, 1-9; Kuwano M. et al., Intern. Med., 2001, 40, 565-572; 및 Tobelem G. Blood Coagul. Fibrinolysis, 1990, 1, 703-705). 그러나, 지속적인 비조절성 혈관신생은 류마티스 관절염, 당뇨성 망막염, 고형 종양, 혈관종 및 건선과 같은 혈관신생성 질병을 유발시킨다고 알려져 있다(Andre T., et al., Rev. Med. Interne., 1998, 19, 904-9134; Battegay E.J., J. Mol. Med., 1995, 73, 333-346; Carmeliet P. and R.K. Jain, Nature, 2000, 407, 249-257; 및 Fidler I.J., Cancer J. Sci. Am., 2000, 2, 134-141). 이러한 혈관신생 과정은 종양 사이토카인, 혈관내피세포 성장인자(VEGF) 및 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)에 의하여 내피세포의 성장을 촉진시키는 단계, 메탈로프로테아제에 의하여 세포외 기질 단백질을 분해시티는 단계, 세포막 접착분자, 내피세포 분화 및 관 형성에 의하여 매개되는 내피세포의 이동단계와 같은 여러 단계로 구성되어 있다(Bussolino F. et al., Trends Biochem. Sci., 1997, 22, 251-256; Kuwano M. et al., Intern. Med., 2001, 40, 565-572; 및 Risau W., Arzneimittelforschung, 1994, 44, 416-417)(도 1 참조). 따라서, 상기 과정을 저해시키는 것은 혈관신생과 관련된 암 또는 다른 질환의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 포함하는 펩타이드는 혈관 형성 및 세포 침윤을 억제시키는 효과가 있다.

[0019]

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1(extracellular domain 1)의 클로닝 결과를 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

도 2 및 도 3은 본 발명의 펩타이드 D6NT 처리에 따른 혈관 내피세포의 이동이 억제되는 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 펩타이드 D6NT 처리에 따른 동물실험을 통한 혈관형성 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0022] **펩타이드 D6NT의 제조방법(D6 세포외 도메인 1의 클로닝 및 정제)**

[0023] D6 전체 유전자 벡터를 구입하여 D6 세포외 도메인 1에 해당하는 펩타이드 서열을 확인한 후, 이 펩타이드 서열을 코딩하는 DNA를 식별하여 프라이머를 제작하고 (TRENDS in Immunology Vol.22 No.6 June 2001), D6 전체길이 유전자를 주형으로 하여 Pfu DNA polymerase를 이용하여 PCR를 수행하였다. 1.5% 아가로스겔 전기영동(agarose electophoresis)을 통해 PCR 산물의 크기를 확인하고, 겔 추출(gel extracion)한 후 pGEM T easy vector에 넣고 DH5a에 형질전환하였다. 그 다음 화이트 콜로니를 선택하고 플라스미드를 준비하여 DNA 서열을 확인하고, 확인된 D6 세포외 도메인을 GST-His tag을 포함한 발현벡터(pET41a)에 삽입하여 확인 후 최종적으로

BL21에 형질전환하였다.

[0024] 500ml LB/500KM에 셀을 키워 OD값이 0.5-0.6에 도달했을 때 0.1mM IPTG를 최종 농도로 맞추어 IPTG를 넣고 37℃ 진탕배양기(shaking incubator)에서 5시간 동안 키운 후 10000g-5분씩 원심분리를 실시하였다. 세포 재서스펜션 버퍼(cell resuspensin buffer, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.1% Triton X-100)의 적정량(4ml buffer per 1g cell)을 세포에 넣고 재서스펜션을 한 다음, 소니케이션(1ml 버퍼 당 30초 깨고 2분 쉬고를 2회 실시)을 실시하였다. 그 다음, 14000g-20분 동안 원심분리를 실시함하고, 상층액과 펠렛을 분리하고 상층액을 0.45μM 필터에 여과하였다.

[0025] His Bind kit(novagen, 미국)를 이용하여 설명 내용에 따라 정제를 실시하였다. bradford test로 500μl씩 받은 샘플의 대략적인 농도를 체크하고, 가장 색상이 많이 변한 부분을 선택하여 투석을 시행하였다. 그 다음, 투석한 샘플을 4℃, 14000rpm-10분을 돌린 후 상층액을 빼낸 다음, 200μl씩 분주하고 정량을 시행하였다. 10% SDS-PAGE에 샘플을 10μl씩 걸어 전기영동 실행하고, His-프로브 안티바디를 이용하여 웨스턴 블롯을 시행하여 예상된 단백질의 크기를 확인하였다(도 1).

실 시 예 2

[0026] **2-1: D6NT의 혈관형성 억제 능력 확인 (혈관내피세포)**

[0027] D6NT가 혈관내피세포(vascular endothelial cell)의 혈관형성을 억제시키는지를 확인하기 위하여, 상처 복원 분석(wound restitution assay)과 matrigel에 의한 인비트로 혈관형성(in vitro angiogenesis by matrigel) 실험을 수행하였다.

[0028] 혈관 내피세포의 융합 단분자막(confluent monolayer)에 pipette tip을 이용해 상처를 만들고 D6NT를 첨가시 VEGF-A 에 의한 혈관 내피세포의 이동이 억제되는 것을 용량-의존적 및 시간-의존적 방법으로 확인하였다(도 2).

[0029] 그 결과, D6NT 100ng 에 의해 세포의 이동이 대조군과 비교하여 약 47%, matrigel에서의 혈관형성이 약 33% 감소되는 것을 확인하였고, D6NT 1000ng에서는 세포의 이동이 76%, matrigel에서의 혈관형성이 62% 감소한 것을 확인하였다(도 2 및 도 3).

[0030] **2-2: D6NT의 혈관형성 억제 능력 확인 (동물실험)**

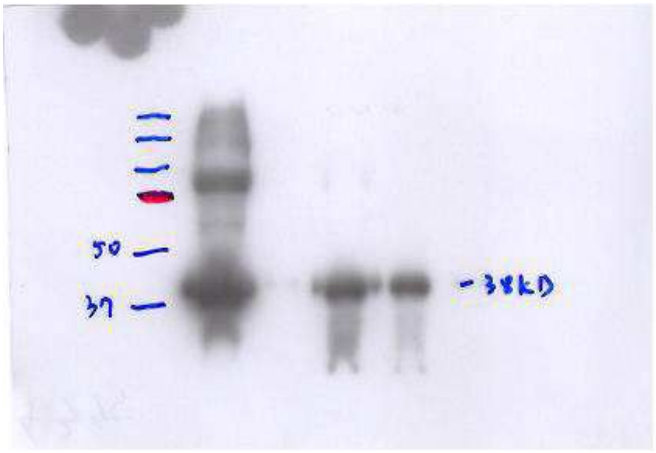
[0031] 동물실험을 통한 혈관형성 억제는 마우스 각막 봉합 모델(mouse corneal suture model)을 사용하였으며 마우스의 각막에 2개의 suture를 만들고 혈관이 형성되는 것을 약 5일 후 각막을 적출하여 각막에서의 혈관형성과 세포의 침윤을 관찰하였다.

[0032] 그 결과, 5일 후 D6NT 100ng에 의해 세포의 침윤은 대조군과 비교하여 약 58% 감소하였고 D6NT 1000ng 에서는 75% 감소효과를 확인하였다. 또한, 혈관형성은 대조군과 비교하여 각각 39%, 61% 의 감소한 것을 확인하였다(도 4).

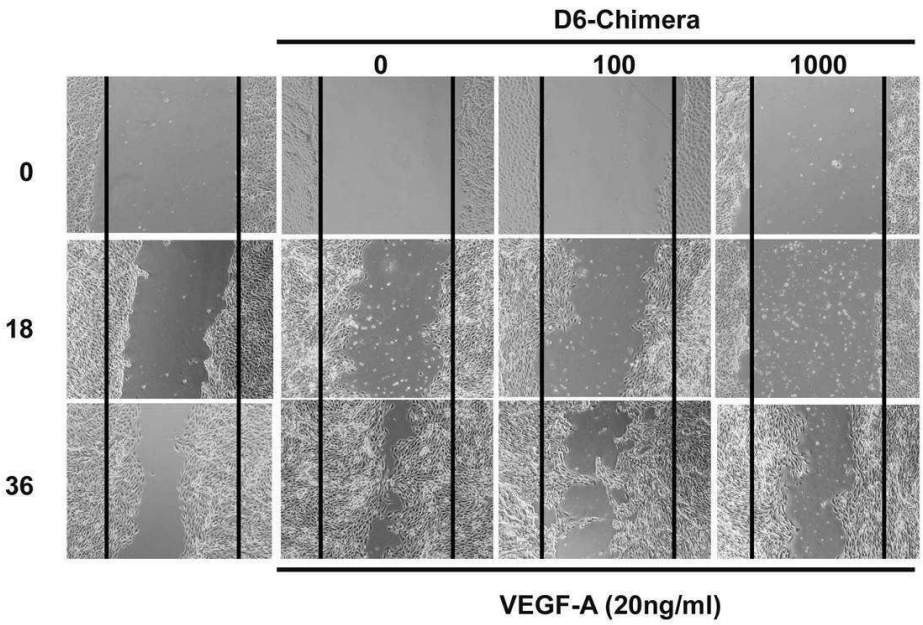
[0033] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

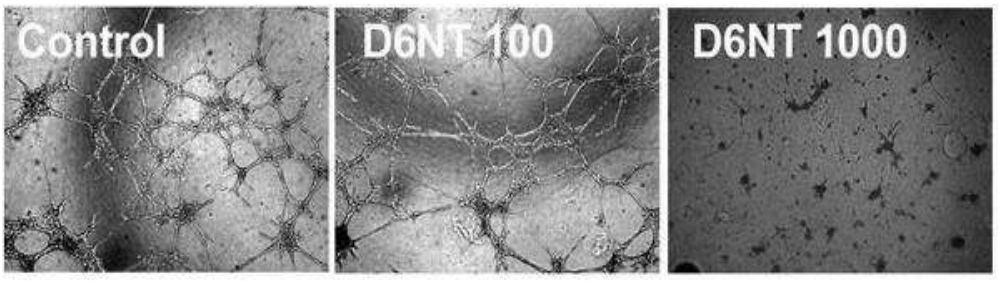
도면1



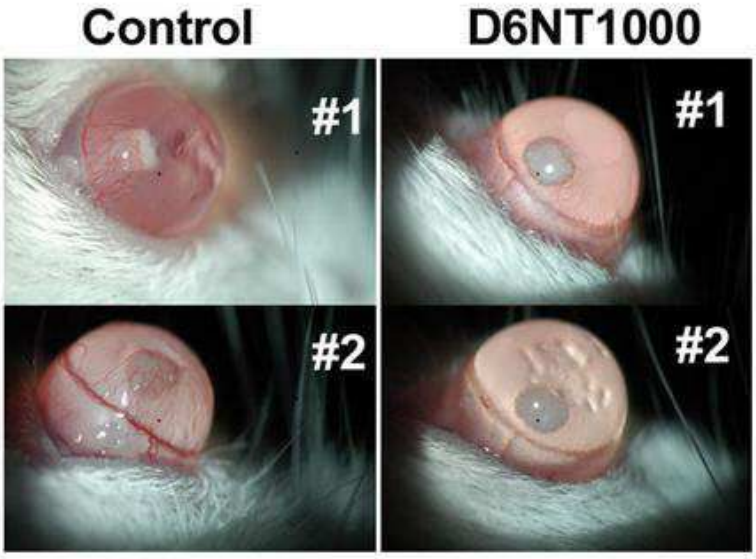
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Pharmaceutical composition for anticancer comprising extracellular domain 1 of D6 decoy receptor

<130> IPDB44504

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> D6 extracellular domain 1

<400> 1

Met Ala Ala Thr Ala Ser Pro Gln Leu Ala Thr Glu Asp Ala Asp Ser
1 5 10 15

Glu Asn Ser Ser Phe Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe
20 25 30

Met Leu Cys Arg Lys Asp Ala Val Val Ser Phe Gly Lys
35 40 45