

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0094807
(43) 공개일자 2025년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)*A61K 47/42* (2017.01) *A61P 35/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/162 (2013.01)*A23L 33/18* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0184610

(22) 출원일자 2023년12월18일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

조은경

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

서원형

대전광역시 서구 도산로 8, 820동 2401호 (도마동, 도마 e편한세상 포레나)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

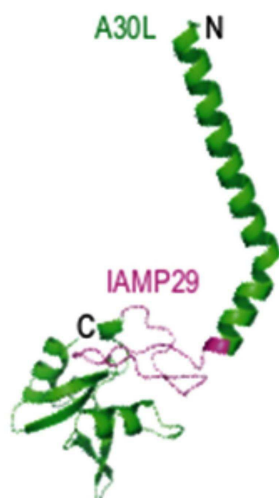
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 폭스 바이러스 유래 펩타이드를 함유하는 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 천연 유래로서 정상세포에 대한 독성은 매우 낮으면서, 암세포에 대해서만 선택적인 사멸효과를 나타내는 신규 펩타이드를 함유하는 항암 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드("IAMP29"라 칭함)를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



MNSLSIFFIVVATAAAVCLLFIQSYSIY
 ENYGNIKEFNATHAAFEYSKSIGGT
 PALDRRVQDVNDTISDVKQKWRCV
 VYPGNGFVSASIFGFQAEVGPNN
 RSIRKFNTMRQCIDFTFSDVINIDIYN
 PCIAPNINNTECQFLKSVL (146aa)

(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)

A61P 35/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

노테일러

대전광역시 유성구 계룡로88번길 41, 402호 (봉명동)

박은진

대전광역시 중구 과례로 48-12, 202호(문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711197670

과제번호 00255021

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 자가포식-면역대사 연결고리 해석을 통한 감염 제어 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2023.06.01 ~ 2032.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465039463

과제번호 HR20C0025040023

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원육성

연구과제명 암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축

기 여 율 1/2

과제수행기관명 충남대학교병원

연구기간 2020.07.16 ~ 2028.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드는 상기 펩타이드를 암호화하는 유전자의 형태로 제공되는 항암 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 유전자가 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 펩타이드는 암세포에 대해 세포 독성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암은 백혈병인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 백혈병은 항암제 내성 백혈병인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 백혈병은 급성 골수성 백혈병인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 9

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 보조제.

청구항 10

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 증상개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 천연 유래로서 정상세포에 대한 독성은 매우 낮으면서, 암세포에 대해서만 선택적인 사멸효과를 나타내는 신규 펩타이드를 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 정상적인 세포에서 세포 주기를 조절하는 유전자의 돌연변이로 인해 비정상적으로 증식되는 세포에 의한 질병이다. 암세포는 정상세포에 비해 증식 속도가 빠르고, 무한히 분열하여 주위 조직으로 침윤되거나 혹은 혈액이나 림프액을 통해 신체의 다른 조직으로 이동한다. 질병의 치료에 가장 효과적인 대응 체계는 면역력을 강화하는 것이나, 암세포는 외부 침입자가 아니기 때문에 인체의 면역반응을 유발하지 않고 회피한다. 이로 인해 무한 증식된 암세포는 정상세포를 파괴하며 신체 기능을 약화 또는 상실하게 하여 결국에는 생명을 위협한다.

[0003] 아직까지 다수의 암 유형에 대해 공통적으로 사용될 수 있는 효과적인 치료방법은 거의 없으며, 환자의 연령, 일반적인 건강상태, 질병의 중증도, 암의 유형 등에 따라 적절한 방법이 사용된다. 가장 일반적으로 사용되는 암 치료 방법으로는 외과적 절제술, 방사선 요법 및 화학요법을 들 수 있다.

[0004] 외과적 절제술은 암세포를 체내에서 물리적으로 제거한다는 측면에서 가장 확실하고 효과적인 치료방법이다. 그러나 암이 전이되었거나, 널리 퍼져있거나, 환자가 수술에 적합하지 않은 건강상태이거나, 혹은 암의 부위가 수술이 불가능하거나 위험도가 너무 높은 경우 등에서는 적용할 수 없다는 한계가 있다. 방사선요법은 고 에너지 방사선을 조사하여 암세포를 파괴하는 것으로, 방사선은 정상세포와 외과적 수술을 통하지 않고도 암세포를 제거할 수 있다는 장점이 있다. 방사선을 조사하면 세포 내에 직·간접적인 전리현상을 일으켜 세포의 생존에 필수적인 DNA 또는 세포막의 변성을 초래한다. 이러한 변성은 정상세포와 암세포 모두에 발생하고, 시간이 지남에 따라 자연적으로 회복될 수 있으나, 암세포는 정상세포에 비해 회복 속도가 느리다. 따라서 이러한 속도의 차이를 이용하면 암세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 그러나 정상세포의 회복 속도가 암세포에 비해 빠르다고 할 지라도 정상세포 역시 방사선에 의해 손상을 받기 때문에 그로 인한 부작용이 발생할 수 있다. 최근에는 방사선의 조사 범위를 정확하게 조절하고 해상도를 높이는 것에 의해 주변 정상 조직에 대한 영향을 줄일 수 있게 됨에 따라 과거에 비해 치료 효과를 향상시키면서 부작용은 감소하고 있다. 그러나 외과적 절제술과 마찬가지로 국소화된 고형암에만 적용이 가능하다는 한계가 있다.

[0005] 화학요법은 소위 "항암제"를 사용한 치료방법으로 국소화된 고형 종양에 국한되지 않고 적용될 수 있다는 장점이 있다. 화학요법에서 통상 특정 항암제는 특정 암에만 작용하기 때문에, 각종 암 종류와 전이 여부에 따라 효과적인 항암제의 선택이 중요하다. 예를 들어, 혈액암인 백혈병은 그 특성 상 외과적 수술이 불가능하고, 방사선 치료 역시 그 적용이 제한적이기 때문에 치료에는 화학요법이 근간이 되며, 백혈병의 종류와 진행 경과, 진단 시 환자의 신체 상태 등에 따라 항암화학요법이 달라질 수 있다. 또한 항암제는 암세포에 대해서만 영향을 미치는 것이 아니라 정상세포에도 영향을 미치며, 구토, 탈모, 감염, 설사, 메스꺼움 등 다양한 부작용을 초래하여 환자에게 상당한 부담을 준다. 따라서 고령의 환자에게 발병되는 암의 치료에서, 치료를 통한 생명 연장과 여생 동안의 삶의 질의 보장은 화학요법에서 특히 중요한 고려변수가 된다.

[0006] 생물체 유래의 생리활성 물질들은 생물체의 항상성(homeostasis) 유지에 중요한 역할을 담당한다. 특히 항균

펩타이드는 생물체의 방어 시스템의 필수 구성요소로, 생명과학 및 의학 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다.

- [0007] 항균 펩타이드는 서열 및 2차 구조가 매우 다양하지만, 공통적으로 15~40개의 아미노산으로 이루어져 있으며, +2~+9의 정전하를 갖는 양이온성이고, 소수성 영역과 친수성 영역을 갖는 양친매성 특징을 갖는다. 항균 펩타이드의 이러한 특징으로 인하여, 음이온을 갖는 세포막 또는 인지질막에 상호작용하기 쉬우며 더 나아가 막 안으로 들어가기 쉽다. 따라서 막의 완전성을 손상시키는 것에 의해 박테리아 및 진균에 대한 항균활성을 나타낸다.
- [0008] 종종 항균 펩타이드들은 항균활성과 함께, 면역활성과 항암활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 정상세포막은 주로 중성 인지질과 스테롤로 이루어진 반면, 암세포막은 음전하를 띤 강글리오시드(ganglioside)를 많이 포함하고 있어 양이온성을 나타내는 항균 펩타이드는 정상세포에 비해 암세포와 선택적으로 결합할 것으로 예상된다. 따라서 항균 펩타이드가 항암활성을 나타내는 경우, 정상세포에 대한 영향을 줄일 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 항균 펩타이드의 독성과 고비용 문제 등 그 응용성을 확대하기 위한 문제의 해결이 필요하다.
- [0009] 폭스 바이러스(pox virus)는 비교적 대형의 이중 가닥 DNA 게놈을 갖는 벽돌형 또는 타원형 바이러스로, 인간과 여러 유형의 동물에게 질병을 유발하는 병원성 바이러스이다. 폭스 바이러스의 감염에 의하면, 일반적으로 피부 병변, 결절 또는 파종성 발진을 형성한다. 폭스 바이러스는 NP 항원에 공통항원을 갖는 오르토폭스(Orthopox) 바이러스, 아비폭스(Avipox) 바이러스, 레포리폭스(Leporipox) 바이러스, 카프리폭스(Capripox) 바이러스, 파라폭스(Parapox) 바이러스, 엔토모폭스(Entomopox) 바이러스 등 6가지의 바이러스속으로 이루어진다. 지금은 더 이상 자연계에 존재하지 않는 천연두 바이러스, 원숭이두창 바이러스 등이 폭스 바이러스에 속한다. 등록특허 제10-1170653호에 약독화된 돌연변이 폭스 바이러스를 이용한 항암 조성물이 보고된 바 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-2139741호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1170653호
(특허문헌 0003) 공개특허 제10-2022-0022021호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 인체에 대한 독성이 낮아 안전하게 사용될 수 있으면서도, 우수한 항암활성을 나타내는 신규한 펩타이드를 이용한 항암 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다. 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(이하, "IAMP29"라 칭함)를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 서열번호 1: HAAFEYSKSI GGTPALDRRVQDVNDTISD (29 aa)
- [0015] 상기 항암 펩타이드는 원숭이두창 바이러스(Monkeypox virus)의 막단백질 A30L에서 유래하는 펩타이드이며, 서열 분석 결과 대부분의 폭스 바이러스(pox virus) 계열에서 공통적으로 발현되고 있는 것으로 확인된다.
- [0016] 원숭이두창 바이러스(strain Zaire-96-I-16) 유래의 A30L 단백질의 면역 염증반응을 확인하고, 알파폴드2(AlphaFold2) 단백질 구조 예측 프로그램으로 코어 부분의 29개 아미노산으로 이루어진 서열을 확인한 후 이를 IAMP29로 명명하였다. 도 1은 상기 예측 결과의 3차원 구조와 A30L의 서열을 보여주는 이미지로, 이 중 IAMP29

로 명명한 부분을 붉은 색으로 나타내었다. 해당 서열의 펩타이드를 단디큐어 주식회사에 의뢰하여 합성한 후, 항암활성을 평가한 결과 종래 항암 펩타이드에 비해 매우 낮은 농도에서 항암활성이 우수하였다. 이에 반해, 건강한 인간 단핵구에 대한 세포 독성 평가를 통해 정상세포에 대해서는 영향을 미치지 않아 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다. 이제까지 해당 펩타이드에 대해 진행된 선행연구들은 아직 보고된 바 없다.

[0017] 본 발명에서 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드'라고 기재되어 있더라도, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 변이체 역시 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 본 발명의 항암 펩타이드로 사용될 수 있음은 당연하다. 예를 들어, 상기 펩타이드 변이체는 펩타이드 서열의 N-말단 및/또는 C-말단의 수식화나 서열 추가에 의한 연장, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환에 의한 것으로, 펩타이드의 기능이 변경되지 않은 것일 수 있다. 본 발명에서 "보존적 치환(conservative substitution)"이라 함은 하나 이상의 아미노산을 구조적 및/또는 화학적 성질이 유사한 다른 천연 또는 비-천연 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 통상적으로, 보존적 치환은 펩타이드의 활성에 전혀 영향을 미치지 않거나 또는 거의 영향을 미치지 않는다.

[0018] 또한 상기 펩타이드는 염 또는 금속 착화합물의 형태로 존재할 수도 있다.

[0019] 본 발명의 항암 조성물에서 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 IAMP29 자체로 함유될 수도 있으며, 혹은 상기 항암 펩타이드를 암호화하는 유전자의 형태로서 항암 펩타이드를 발현하도록 제공될 수도 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA, PNA 및 이들이 혼합물로 이루어질 수 있다. 상기 유전자는 전술한 펩타이드 변이체를 암호화하는 유전자일 수 있다. 이때 상기 유전자는 발현 벡터 내에 포함된 형태일 수 있다. "발현 벡터"는 적당한 숙주 세포에서 표적 펩타이드를 발현할 수 있도록 하는 재조합 벡터로, 상기 유전자의 발현에 필수적인 조절 요소를 포함함은 당연하다. 상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 이용하여 당업계에 공지된 일시적 형질감염, 형질도입, 미세주사, 세포융합, 포스포이트 침전법, 전기침공법, 유전자 건 등과 같은 다양한 방법에 의해 표적 세포에 도입될 수 있다.

[0020] 상기 IAMP29는 암세포 자체에 세포 독성을 나타내어 암세포의 성장 및 증식을 억제하고, 더 나아가 사멸시키는 것에 의해 항암활성을 나타낸다. IAMP29는 항균 펩타이드로서의 특성을 나타내며, 항암활성과 동시에 항균활성을 나타내었다. IAMP29의 항암활성은 종래 항균 펩타이드에서와 마찬가지로 양전하를 띤 IAMP29가 음전하를 띤 암세포 막에 융합되어 암세포 내로 침투하여 사멸효과를 나타내는 것으로 사료된다. 이로 인해 본 발명의 항암 조성물은 특정 암종에 한정되지 않고, 다양한 암종에 대해 공통적인 항암활성을 나타낼 수 있다.

[0021] 특히 본 발명의 항암 조성물은 백혈병의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 백혈병은 혈액암의 특성 상 외과적 절제술이나 방사선 치료가 어렵기 때문에 화학요법이 치료의 근간을 이루지만 백혈병 세포 뿐 아니라 정상 혈액세포 역시 종래 항암제에 의해 파괴되므로 화학요법 시 감염 예방을 위한 관리와 환경 조절이 필요하다. 본 발명의 IAMP29를 이용한 항암 조성물은 정상세포에는 세포 독성을 나타내지 않는 반면, 백혈병 세포에 대해서는 매우 낮은 농도에서도 우수한 항암활성을 나타내므로 백혈병의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 상기 백혈병은 골수성 백혈병을 예로 들 수 있으나, 림프구성 백혈병을 제외하는 것은 아니다. 또한 종래 항암제에 대해 내성을 나타내는 백혈병 세포에 대해서도 세포 독성을 나타내므로, 항암제 내성을 갖는 백혈병의 치료에 더욱 유용하다. 본 발명의 조성물은 백혈병 세포를 초기에 사멸시키는 경우 발병 자체를 방지할 수 있으므로, 치료 뿐 아니라 유전적 요인이나 환경 등 위험요소에 노출되어 있는 건강한 사람들에게 예방의 목적으로도 사용될 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물은 예방 또는 치료용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로서, 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있으며, 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 항암 펩타이드의 유효 용량은 0.01~10 mg/kg일 수 있다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 제제의 형태, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0023] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는

항암 보조제에 관한 것이다. 항암 보조제는 항암제와 병용 투여되어 항암 효능을 증대시키고/거나 부작용을 경감시키는 효능을 갖는 것을 의미한다. 상기 항암 보조제의 작용은 상기 항암제가 통상적으로 사용될 때와 동일한 용량을 사용하는 경우에도 항암 효과가 증대되도록 하고/하거나, 상기 항암제의 투여 용량을 낮출 수 있도록 하여 항암제의 부작용을 경감 또는 개선시킬 수 있도록 병용 투여된다. 병용 투여 시 본 발명의 항암 보조제는 상기 항암제와 동시에 투여되거나, 혹은 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적 투여 시에는 본 발명의 항암 보조제가 항암제보다 먼저 투여될 수도 있고, 나중에 투여될 수도 있다. 본 항암 보조제의 제제에 대한 설명은 상기 약학 조성물의 제제에 대한 기재로 대신한다.

[0024] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 증상개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 건강기능식품에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 과자, 주류, 초콜릿, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다. 또는 본 발명의 건강기능식품은 그 자체로 혹은 다른 성분과 혼합하여 음식의 조리 시 사용할 수 있는 식품 첨가물의 형태로 사용될 수도 있다.

발명의 효과

[0025] 이상과 같이 본 발명의 항암 조성물에 의하면 인체에 대한 독성이 없어 안전하게 사용할 수 있으며, 낮은 용량으로도 우수한 항암활성을 나타내어 종래 항암 펩타이드의 고비용 문제를 해결할 수 있어 그 자체로 또는 보조제로서 의약 및 식품에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 원숭이두창 바이러스 막단백질인 A30L의 3차원 구조와 IAMP29의 위치를 보여주는 모식도.

도 2는 IAMP29의 세포 독성을 평가한 그래프.

도 3은 IAMP29의 백혈병에 대한 항암활성을 보여주는 그래프.

도 4는 IAMP29의 항암제 내성 백혈병에 대한 항암활성을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0028] [실시예]

[0029] 실시예 1 : 세포 독성 평가

[0030] 건강인 공혈자로부터 정맥혈을 제공받아 Histopaque-1077(Sigma-Aldrich)을 이용한 밀도구배 원심분리로 말초혈액세포(peripheral blood mononuclear cells)를 수집하였다. 수집한 말초혈액단핵세포는 배양액에 2×10^6 /ml의 농도로 부유시켜 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24-well culture plate에 부착시켰다. 1시간 후에 부착되지 않은 상층액은 제거하고 새 배지로 채워 plate에 부착된 단핵구만 실험에 사용하였다. 분리된 단핵구의 순도는 항 CD14 항체를 이용한 유세포 측정으로 95% 이상임을 확인하였다.

[0031] 단핵구에 IAMP29(단디큐어 주식회사에 의뢰하여 합성)를 0~25 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 72시간 처리 후 CCK-8(Cell Counting Kit-8)을 사용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 세포 생존율을 측정하고, 그 결과를 도 2에 도시하였다. 도 2에서 확인할 수 있는 것과 같이, 측정된 농도 범위에서 IAMP29는 건강인 유래 단핵구에 세포 독성을 나타내지 않았다.

[0032] 실시예 2 : IAMP29의 항암활성 평가

[0033] 1) AML환자에서 채취한 암세포에 대한 항암활성 평가

[0034] 충남대학교 병원에 등록된 급성 골수성 백혈병 환자의 골수 또는 말초혈액 시료를 환자의 서면 동의 하에 확보하였다.(IRB: CNUH2018-08-013-012). 확보된 시료로부터 암세포를 Ficoll-Paque 농도 구배법에 의해 분리하고, 5% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 배양된 세포를 1×10^5 cell/well의 농도로 96-웰 플레이트에 분주하고, IAMP29를 0~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 5% CO_2 , 37°C 인큐베이터에서 추가로 72시간 배양하였다. 이후, Cell Counting Kit-8(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 세포 생존율을 측정하고, 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3으로부터 계산된 IC_{50} 은 0.2374 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.075 μM)로 매우 낮은 용량의 처리에 의해 우수한 항암활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

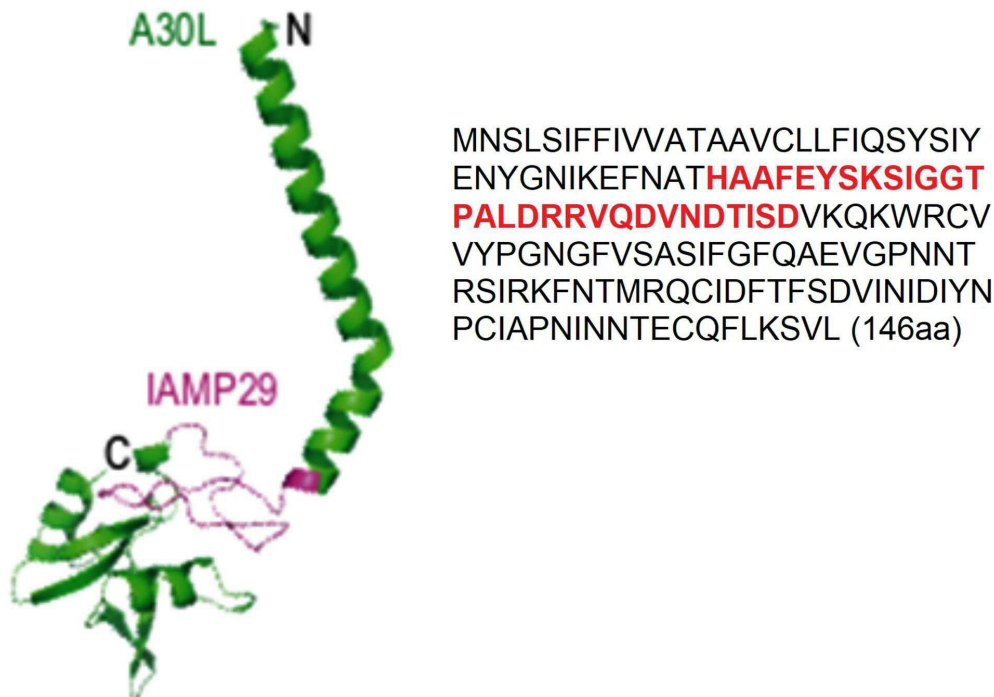
[0035] 2) 항암제 내성 백혈병 세포주에 대한 항암활성 평가

[0036] 급성 골수성 백혈병 치료에 일반적으로 사용되는 항암제인 Ara-C(Cytarabine)에 저항성을 나타내는 급성 골수성 백혈병(AML, Acute Myeloid Leukemia) 세포주인 KG1a 세포를 5% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하여 5×10^4 cell/well의 농도로 96-웰 플레이트에 분주하였다. IAMP29를 0~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고, 5% CO_2 , 37°C 인큐베이터에서 추가로 48시간 배양하였다. 이후, Cell Counting Kit-8(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 세포 생존율을 측정하고, 그 결과를 도 4에 도시하였다.

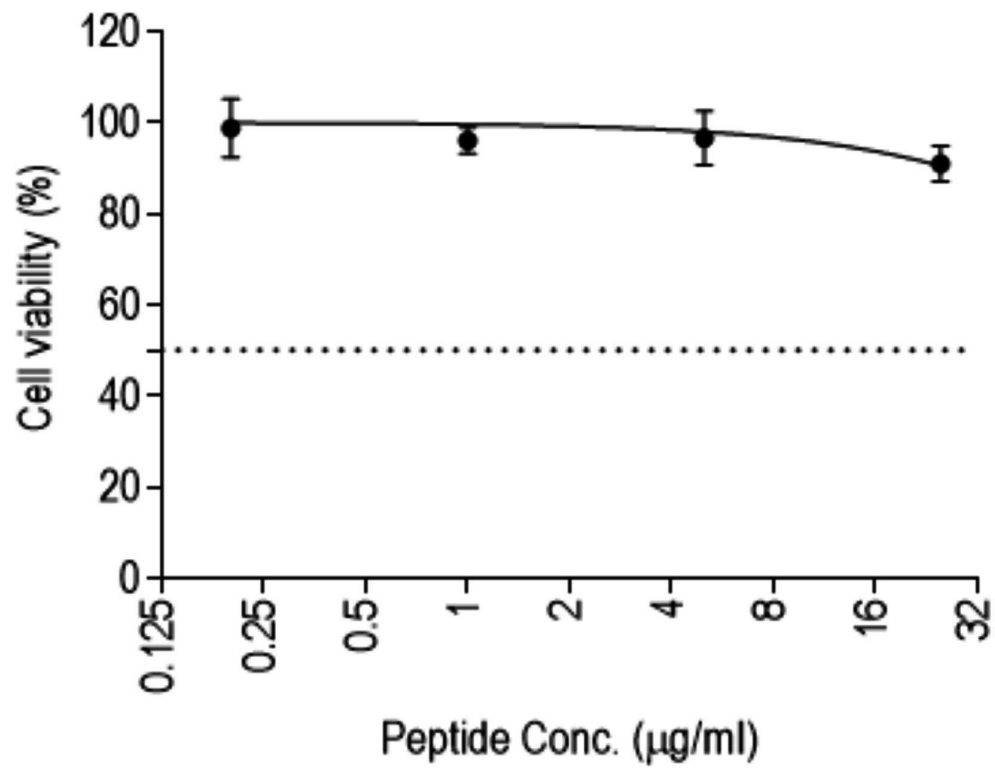
[0037] 도 4에서 IAMP29는 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.06 μM)의 매우 낮은 농도에서도 KG1a 세포에 대해 세포 독성을 나타내었으며, 정상세포에 대해서는 세포 독성을 나타내지 않는 농도인 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리 시 대부분의 세포가 사멸하여 항암제 내성 백혈병에 대해서도 현저한 항암활성을 보여주었다.

도면

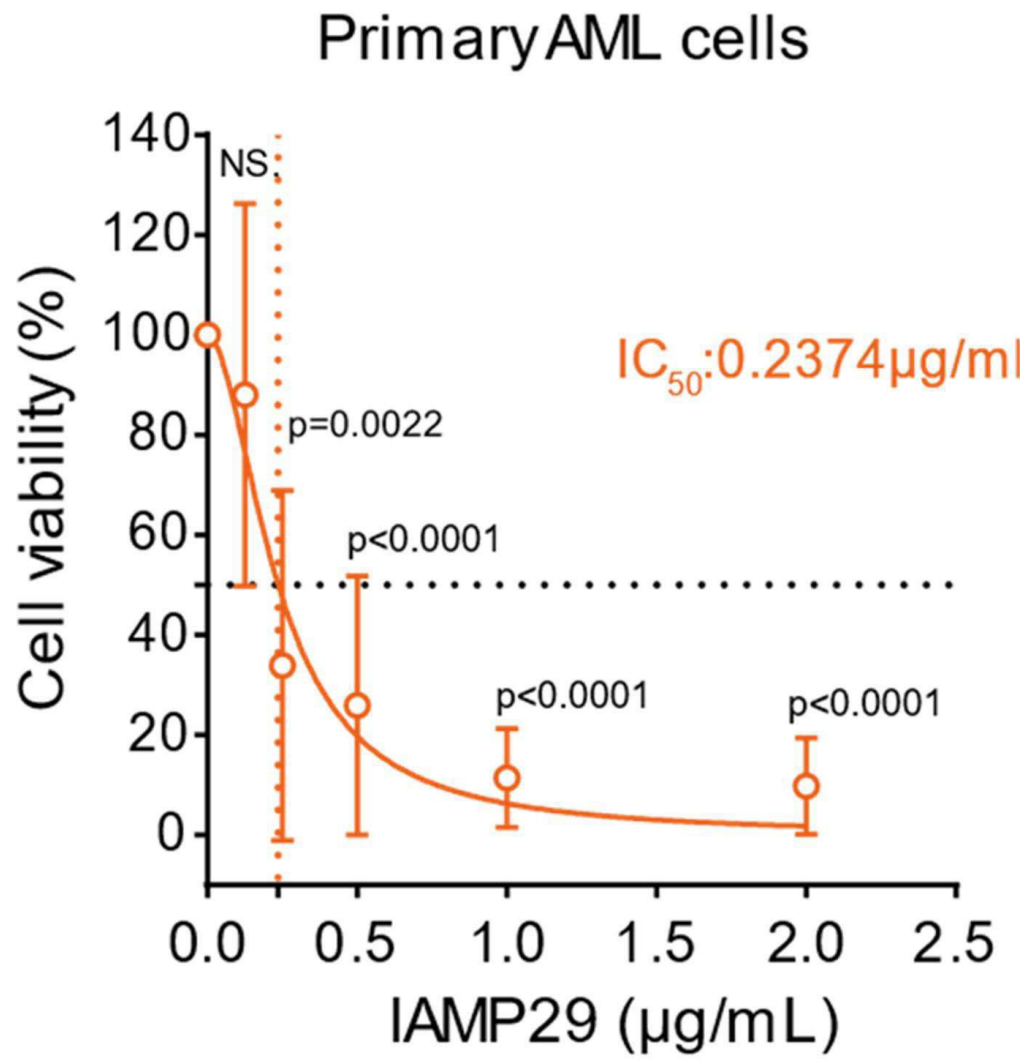
도면1



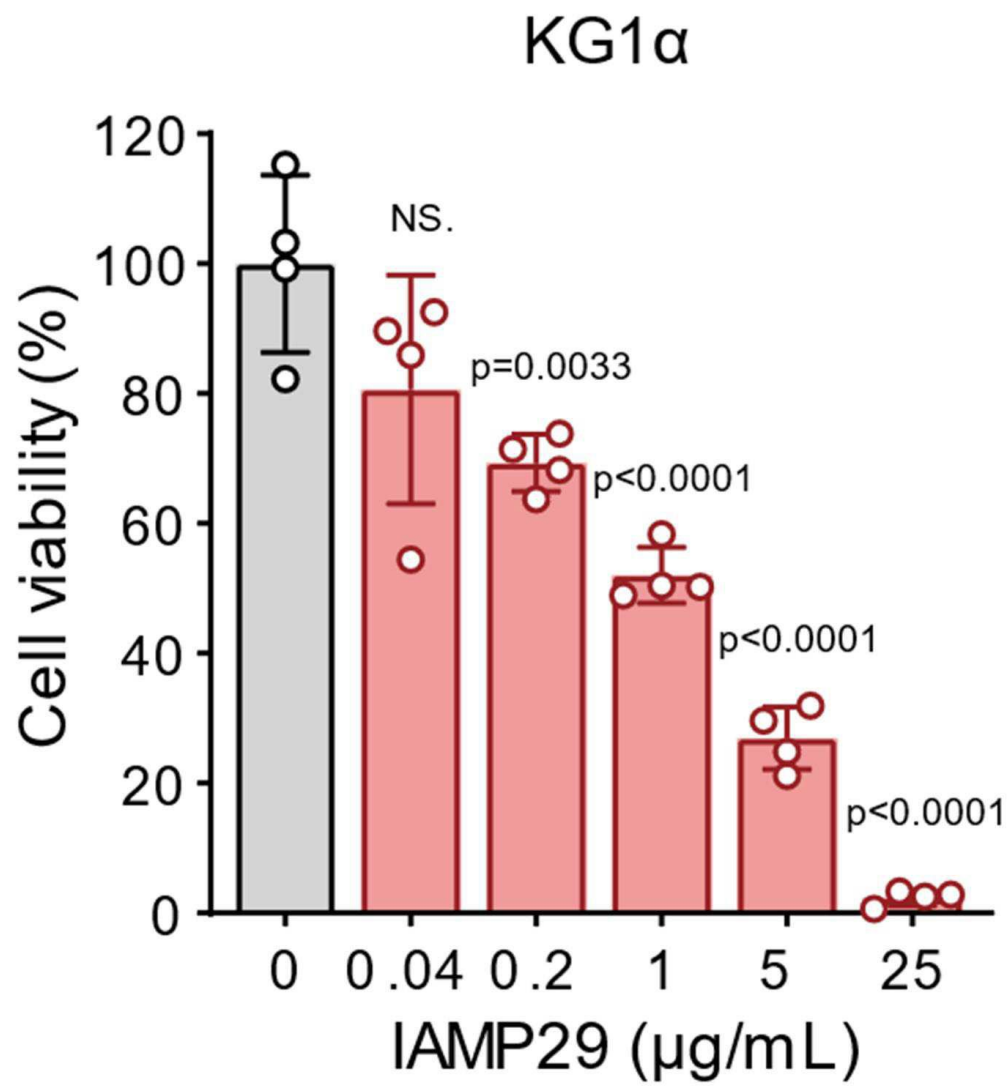
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.