



등록특허 10-2494803



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월06일
(11) 등록번호 10-2494803
(24) 등록일자 2023년01월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7003326(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년11월21일
심사청구일자 2022년01월27일

(85) 번역문제출일자 2022년01월27일

(65) 공개번호 10-2022-0020411

(43) 공개일자 2022년02월18일

(62) 원출원 특허 10-2016-7015069
원출원일자(국제) 2014년11월21일
심사청구일자 2019년11월12일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2014/011280

(87) 국제공개번호 WO 2015/076621
국제공개일자 2015년05월28일

(30) 우선권주장
1020130142897 2013년11월22일 대한민국(KR)
1020140020605 2014년02월21일 대한민국(KR)

(73) 특허권자
주식회사 챔백스앤카엘
대전광역시 유성구 테크노11로 58 (탑립동)
김상재
서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호(일원동, 상록수아파트)

(72) 발명자
김상재
서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호(일원동, 상록수아파트)

(74) 대리인
리애모틀허벌이

(74) 대리인 리애몬틀현법이

1020140020605 2014년02월21일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문현
KR1020090079938 A*
WO2000002581 A1*

WO2013167299 A1*

전체 청구항 수 : 총 6 항

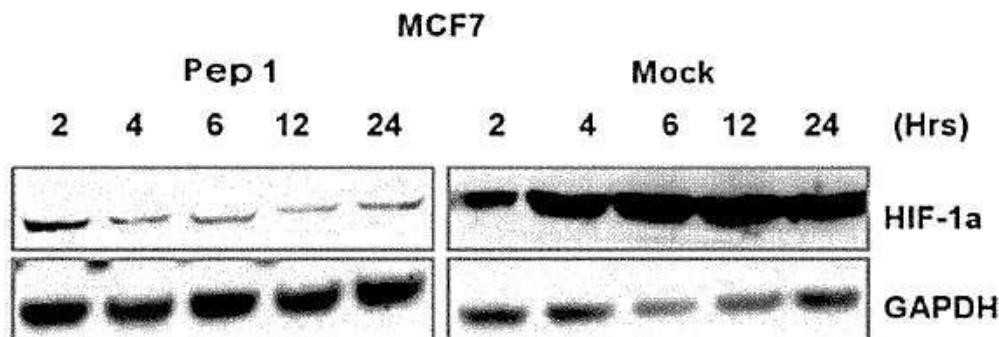
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 혈관 신생 억제 활성을 가지는 펩티드 및 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 혈관 신생 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 텔로머라제로부터 유래된 펩타이드를 포함하는 조성물로서 혈관신생 관련 질환의 치료 및 예방에 효과적인 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 서열번호의 서열을 갖는 펩티드 또는 상기 서열과 80%의 상동성을 갖는 서열을 갖는 펩티드 또는 단편인 펩티드는 혈관신생 억제에 우수한 효과를 가진다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 웹티드를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은 자궁내막증, 혈우병성 관절, 간경변증, 또는 당뇨병성 신장병증의 예방, 개선, 또는 치료용인 것인 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈관내피세포의 증식, VEGF(Vascular endothelial growth factor)-유도 관형성 또는 혈관내피세포의 침투를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 혈관내피세포의 증식 또는 관형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 VEGF-A(Vascular endothelial growth factor-A)에 의한 혈관내피세포의 증식, 관형성 또는 혈관 내피세포에 대한 침윤을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 신생 억제효능을 가지는 웹티드 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 텔로머라제로부터 유래된 웹티드로서, 혈관신생 억제효능을 가지는 웹티드 및 이를 포함하는 혈관 신생 억제용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 체내 항상성 유지를 위한 세포 및 조직의 증식, 분화 및 소멸은 세포 외기질에 존재하는 다양한 세포 자극 인자와 세포들 간의 상호작용의 균형에 의하여 조절된다. 이러한 조절에 불균형이 일어나면, 세포사멸 또는 증식억제 신호에 대한 무반응, 지속적인 혈관신생에 의한 영양공급, 주위 조직으로의 침윤 및 전이로 표현되는 악성종양 등 각종 질환이 발생한다.

[0003] 혈관신생(Angiogenesis)이란 세포 기저막 분해, 세포 이동 및 세포외기질의 침습, 세포 증식, 모세혈관 내강 형성 및 혈관 주변세포 형성 등의 전 과정을 포함한다. 이를 억제하는 방법으로는 혈관내피세포를 표적으로 하는 직접적인 방법과, 혈관 신생 유도인자를 생성하는 암세포 또는 주변세포를 표적으로 하는 간접적인 방법이 있다. 주로 혈관신생 유도인자의 활성을 저해하는 항체 단백질 개발 또는 그 수용체의 작용을 차단하는 저 분자 물질 개발 연구 위주로 진행되어 왔다.

[0004] 혈관 신생은 혈관벽을 형성하는 내피 세포의 이동 및 분열 단계를 포함하는 일련의 순차적인 단계를 통해 일어난다. 내피 세포의 성장 및 이동을 활성화하는 단백질로는 약 15종이 알려져 있어, 이와 같은 인자들에 의해 혈

관 신생이 조절될 수 있다. 그러므로, 신생 혈관의 형성은 안지오제닌(angiogenin), 표피 성장 인자, 에스트로겐, 섬유 모세포 성장 인자, 인터류킨(interleukin) 8, 프로스타글란딘 E1 및 E2, 종양 피사 인자, 혈관 내피 성장 인자 또는 G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor) 등과 같은 활성화 단백질을 억제하는 억제제에 의해 억제될 수 있다.

[0005] 열 충격 단백질(Heat Shock Protein, HSP)이란 단백질의 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하는 분자적 샤퀘론이다. HSP는 저산소증과 같은 스트레스 상황에서 세포의 생존에 있어 중요하다. HSP, 특히 HSP90과 HSP70는 광범위의 종양[Morano KA, Annals of the New York Academy of Sciences, 1113:1-14, 2007 ; Calderwood SK et al, Trends in biochemical sciences, 31:164-72, 2006]에서 많이 발현된다. 몇몇 HSP의 발현은 몇몇 암에서 종양 세포의 증식, 분화, 아폽토시스(apoptosis)와 상관관계가 있음이 밝혀져 있고, 이는 HSP가 그 자신이 가지는 세포 보호 역할 때문에 암세포 생존에 중요한 역할을 함을 보여준다. HSP70의 과다발현은 쥐 섬유육종 세포의 종양형성을 유발하고, 유전자 도입된 쥐의 T-세포내 HSP70이 과다 발현되면, 그 쥐의 T세포 림프종의 증가를 유발한다[Jaattela M, International journal of cancer Journal international du cancer, 60:689-93, 1995 ; Seo JS et al, Biochemical and biophysical research communications, 218:582-7, 1996 ; Volloch VZ et al, Oncogene, 18:3648-51, 1999 ; Murphy ME, Carcinogenesis, 34:1181-8, 2013]. 특히, HSP70는 아폽토시스로부터 세포를 보호하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, HSP의 발현이 증가하는 것은 혈관형성, 침습, 전이에 관련되어 있는 것으로 보인다[Calderwood SK et al, Trends in biochemical sciences, 31:164-72, 2006 ; Zhou J et al, The Journal of biological chemistry, 279: 13506-13, 2004 ; Bruns AF et al, PLoS one, 7:e48539, 2012 ; Sun J et al, Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 24:2238-44, 2004 ; Gong W, et al, Oncology reports, 2013 ; Eustace BK et al, Cell cycle, 3:1098-100, 2004 ; Eustace BK et al, Nature cell biology, 6:507-14, 2004].

[0006] 세포에 산소와 영양분을 공급하는 혈관의 생성을 차단하면, 암의 성장 및 전이가 억제되어 최종적으로 암을 치료할 수 있다는 이론을 기반으로 하는 혈관신생 억제 의약품의 개발은 항암제뿐 만 아니라 관절염, 당뇨병성 망막증 및 만성염증, 허혈성 심질환 등에 적용할 수 있는 표적 치료법으로 활발하게 연구 중이다. 혈관신생 억제 치료법은 직접적으로 종양의 성장 및 전이를 저해할 수 있을 뿐 만 아니라, 간접적으로 종양혈관 환경을 정상화하여 생물의약품 또는 화학요법제의 효율적 전달과 저 산소 환경을 개선함으로써 약물의 치료 효과를 증진시킬 수 있다.

[0007] 따라서, 악성종양 등 각종질환 (관절염, 당뇨병성 망막증 및 만성염증, 허혈성 심질환 등) 및 과도한 혈관 신생 관련 종양(암), 심장 혈관 질환(예를 들어, 죽상경화증(atherosclerosis)), 만성 염증(예를 들면, 류마티스 관절염 또는 크론병(Crohn's disease)), 당뇨병(예를 들면, 당뇨망막병증), 건선, 자궁내막증(endometriosis) 을 치료 또는 예방하기 위한 혈관신생 억제 의약품의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이러한 배경하에서 본 발명자들은 효과가 우수하고 독성이 적은 혈관신생 억제용 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0009] 본 발명의 일측면에 따른 목적은 효과적인 혈관 신생 억제 활성을 가지는 웨티드 및 이를 포함하는 혈관 신생 억제용 조성물과 이를 이용하여 혈관 신생관련 질환을 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 측면에 따른 목적은 효과적으로 종양의 성장 및 전이 억제가 가능한 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 측면에 따른 목적은 효과적으로 혈관 신생 관련 질환의 예방 및 치료가 가능한 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일측면에서는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드, 상기 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 웨티드 또는 그 단편인 웨티드를 포함하는 혈관 신생 억제용 조성물이 제공될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편일 수 있다.

- [0014] 본 발명의 일측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 조성물은 혈관내피세포의 증식 또는 관형성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 조성물은 VEGF-A(Vascular endothelial growth factor-A)에 의한 혈관내피세포의 증식, 관형성 또는 혈관 내피세포에 대한 침윤을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 조성물은 혈관신생과 관련된 질환의 예방 및 치료용 일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 단편은 3개 이상의 아미노산으로 구성된 단편 일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 종양의 성장 및 전이, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 황반 변성(macular degeneration), 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 만성 염증 (chronic inflammation), 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 비조절성 혈관신생-관련 질병 또는 질환의 예방 또는 치료에 이용되는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 종양의 성장 및 전이의 예방 또는 치료에 이용되는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 과도한 혈관 신생으로 인한 안과 질환의 예방 또는 치료에 이용되는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 안과 질환은 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선 또는 황반 변성(macular degeneration)일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 혈관내피세포의 증식, VEGF(Vascular endothelial growth factor)-유도 관 형성 및 혈관내피세포의 침투를 억제하는 것 일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일측면에 따른 혈관신생 억제용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 언급된 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 및 치료방법일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 혈관신생과 관련된 질환은 종양의 성장 및 전이, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 황반 변성 (macular degeneration), 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 만성 염증 (chronic inflammation), 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 비조절성 인 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 혈관신생 억제용 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 관련 질환을 치료 및 예방하는 방법이 제공될 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따르면 효과적으로 혈관 신생의 억제가 가능한 조성물이 제공될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 조성물은 혈관 신생과 관련된 질환의 치료 및 예방에 적용될 수 있고, 특히 종양의 성장 및 전이 억제, 과도한 혈관 신생으로 인한 안과 질환의 치료를 위하여 사용될 수 있다.
- [0029] 또한 본 발명에 따른 서열번호의 서열을 갖는 웨티드 또는 상기 서열과 80%의 상동성을 갖는 서열을 갖는 웨티드 또는 단편인 웨티드는 우수한 혈관 신생 억제 효능을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1 및 도 2는 저산소증이 유도된 세포들에서 PEP 1이 HIF-1 α 생산 억제 효과를 보인 결과를 나타내는 사진이다. MCF7과 HeLa 세포들은 PEP 1 (20 μM) 또는 비히클(vehicle)로 처리하고 지정된 시간 동안 저 산소 상태에서 배양하였다. 세포 용해물은 HIF-1 α 의 양을 분석하기 위해 면역블롯팅을 실시하였다.

도 3은 PEP 1에 의한 저산소증 유도된 VEGF 생산 억제를 나타낸 그라프이다. MCF7과 HeLa 세포들은 PEP 1 (20 μM) 또는 비히클로 처리하고 지정된 시간 동안 정상 산소 상태 및 저 산소 상태에서 배양하였다. 세포 배양 상 층액의 분비된 VEGF의 양은 ELISA를 통해 확인하였다(mock와 비교 하였을 때(versus mock) *는 $p < 0.05$ 를, **는 $p < 0.01$ 를, ***는 $p < 0.001$ 를 각각 나타냄).

도 4 및 도 5는 암세포에서 PEP 1 처리에 따른 HSP70과 HSP90의 하향 조절(down-regulation)을 나타낸 결과이다. Jurkat(도 4), MCF7(도 5) 세포들을 무혈청 배지에서, 증가하는 농도의 PEP 1 또는 스크램블된(scrambled) 웹티드로 2시간 처리하였다. HSP70 및 HSP90의 단백질의 양은 HSP70, HSP90 및 GAPDH에 대한 항체들을 사용해 면역블롯팅으로 분석하였다.

도 6 및 도 7은 PEP 1에 의한 저산소증 유도된 HSP 생산 억제를 나타낸 실험 결과이다. MCF7과 HeLa 세포들은 PEP 1 (20 μM) 또는 비히클과 처리하고 지정된 시간 동안 저 산소 상태에서 배양하였다. 세포 용해물은 HSP70, HSP90의 양을 분석하기 위해 면역블롯팅을 실시하였다.

도 8은 Jurkat 및 MCF7세포에 비히클, PEP 1, 17-AAG, KNK437을 처리한 결과이다. Jurkat 및 MCF7세포들은 무 혈청 배지에서 비히클, PEP 1 (5 μM for Jurkat and 20 μM for MCF7), 17-AAG (1 μM), KNK437 (1 μM) 와 2 시간 처리하였다. 도 4에 사용된 유사한 방법으로 세포 용해물은 면역블롯팅으로 분석하였다.

도 9는 MCF7세포들을 MG132 (5 μM) 포함한, 포함하지 않은 상태 모두에서 PEP 1 또는 PBS로 처리한 결과를 나타낸 것이다. 세포 내의 HSP 와 세포 표면의 HSP들은 표면 세포내 염색(surface intracellular staining)과 세포 표면(surface staining) 염색으로 염색하였고, 상기 실험물질 및 방법에 기재된 바와 같이, 유세포 분석을 이용해 분석하였다(붉은색: DMSO; 푸른색: PEP 1 + DMSO; 오렌지색: PEP 1 + MG132; 초록색: MG132).

도 10 및 도 11은 저 산소 상태에서 PEP 1에 의한 암세포 증식 억제를 나타낸 그라프이다. MCF7과 HeLa 세포들은 보통 산소 상태 (왼쪽 패널) 또는 저 산소 상태 (오른쪽 패널)에서 PEP 1을 포함한, 포함하지 않은 상태에서 배양 하였다. 배양일 2일, 4일, 6일 째, 세포들의 수를 측정하였다(데이터는 평균값± SD로 나타냄, mock와 비교 하였을 때 *는 $p < 0.05$ 를 나타냄, 1-way t-test를 사용).

도 12 및 도 13은 PEP 1이 종양세포에서의 Tie2+ 단핵구 집합에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. Tie2 $^+$ CD11b $^+$ 단핵구 집합은 Tie2 (Green, AlexaFlour 488)와 CD11b (Red, AlexaFlour633) 감지를 위해 면역형광 염색(immunofluorescence staining)을 이용해 분석하였다. DAPI 염색을 이용해 세포 핵들을 시각화 하였다. 스케일 바는 50 μm 를 나타낸다. 확대된 이미지에 나타난 화살표는 Tie2 $^+$ CD11b $^+$ 를 나타낸다. 대식세포는 hpf 당 나타내었다. 5개의 필드는 정량화 하기 위해, 각 종양 조직 치료 그룹의 2개의 슬라이드로부터 임의적으로 선택되었다 (*는 $p < 0.05$, **는 $p < 0.01$, ***는 $p < 0.001$ 를 나타냄, 2-way t-test를 사용).

도 14 내지 도 16은 PEP 1 처리에 의한 종양의 HSP70과 HSP90 단백질 레벨의 감소를 나타낸 결과이다. HSP70과 HSP90에 대한 항체를 이용한 면역히스토케미칼 염색(immunohistochemical staining)을 통해 종양 섹션의 HSP70과 HSP90 단백질 레벨을 시각화 하였고(도 14), Leica Qwin 소프트웨어를 이용해 정량화 하였다(도 15). 각각의 치료그룹의 6개의 슬라이드로부터 10개의 필드를 정량화 하기 위해 임의적으로 선택 하였다(데이터는 평균값± SD로 나타냄, control와 비교 하였을 때 *는 $p < 0.05$ 를 나타냄, 2-way T-test를 사용). 종양에서 추출한 단백질 추출물은 HSP70, HSP90, GRP78, and GAPDH에 대한 항체를 이용해 면역블롯팅을 실시하였다(도 16).

도 17 및 도 18은 PEP 1의 혈액 내 분비되는 HSP70 레벨에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. 도 17에서는 HSP70 레벨 (왼쪽 패널)과 HSP90 (오른쪽 패널)은 PEP 1 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 또는 PBS (10 mice per group; n=20)를 처리한 마우스 모델로부터 획득한 혈청을 이용해 ELISA 실시해 확인하였다. 도 18에서는 혈액의 HSP70 레벨과 종양 무게 (왼쪽 패널) 또는 종양 크기 (오른쪽 패널)의 연관성을 분석하였다($R^2 = 1$, 종양무게와 비교 하였을 때 HSP70에서 $P = 0.037$, 종양 크기와 비교하였을 때 HSP70에서 $p = 0.039$ 를 나타냄, 2-way t-test를 사용)

도 19 내지 도 21은 PEP 1에 의한 생체 내 종양 성장 억제를 나타낸 것이다. MC38 세포들을 BALB/c 아스믹(athymic) (Nu/Nu) 쥐 (10 마리당 1 그룹 ; n=20) 모델에 피하로 주사하였다. 종양을 가진 마우스 모델에게 2틀

에 한번 PEP 1 또는 PBS 를 복강 내 주사하였다. 종양의 지름이 10mm에 다 달았을 때, PEP 1 또는 PBS를 종양 내 주사하였다. 도 19의 실험에서는 종양의 부피는 이를에 한번 측정하였다. 도 20의 실험에서는 종양의 무게는 14일 째, 마우스를 희생한 후 측정하였다. 제거된 종양을 도 21에 나타내었다(비히클과 비교 하였을 때^{*}는 $p < 0.05$ 를, **는 $p < 0.01$ 를 나타냄, 2-way t-test 사용).

도 22 내지 도 24는 PEP 1 투여 마우스 종양의 조직학적 검사 결과를 나타낸 것이다. PEP 1 또는 비히클 처리된 종양을 가진 마우스 모델에서 획득한 종양 세포는 면역히스토케미스트리를 위해 준비하였다. 도 22의 실험에서는 파라핀 고정된 섹션은 H&E 염색법으로 염색하였고, 현미경으로 관찰 하였다. 도 23의 실험에서는 세포 사멸은 섹션을 이용하여 TUNEL 어세이를 통해 분석하였다. 도 24의 실험에서는 증식하는 세포들은 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)에 대한 항체들과 immunohistochemical으로 분석하였다. 10개의 필드는 각각의 처리 그룹의 6개의 슬라이드로부터 임의적으로 선택되었고, 정량화 하기 위해, Leica Qwin 소프트웨어로 분석하였다.

도 25a 및 도 25b는 PEP 1의 혈관신생 억제효능을 평가하기 위한 실험으로서 혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell)에 PEP 1을 농도별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리한 후, 세포 증식(도 1a)과 세포 생존률(도 1b)을 각 측정하여 혈관내피세포 증식 억제 효과를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 26a 및 도 26b는 PEP 1의 혈관신생 억제효능을 평가하기 위한 실험으로서 혈관내피세포에 PEP 1을 농도별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리한 후 관찰한 결과(도 2a) 및 이를 그래프화(도 2b)하여 혈관내피세포 관형성 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 27a 및 도 27b는 PEP 1의 혈관신생 억제효능을 평가하기 위한 시험으로서 혈관신생 유도인자인 VEGF-A(Vascular endothelial growth factor-A)로 유도된 혈관내피세포에 PEP 1을 농도별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리한 후, 세포 증식(도 3a)과 세포 생존률(도 3b)을 측정하여 혈관내피세포 증식 억제 효과를 관찰한 결과를 나타낸다.

도 28a 및 도 28b는 PEP 1의 혈관신생 억제효능을 평가하기 위한 시험으로서 혈관신생 유도인자인 VEGF-A(Vascular endothelial growth factor-A)로 유도된 혈관내피세포에 PEP 1을 농도 별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리한 후, 관찰한 결과(도 4a) 및 이를 그래프화(도 4b)하여 혈관내피세포 관형성 억제 효과를 나타낸 것이다

도 29는 트랜스웰 인서트(Transwell insert)를 설치한 대략적인 모식도이다.

도 30a 및 도 30b는 PEP 1의 혈관신생 억제효능을 평가하기 위한 시험으로서 혈관신생 유도인자인 VEGF-A(Vascular endothelial growth factor-A)로 유도된 혈관내피세포에 PEP 1을 농도별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리한 후, 인서트를 메탄올로 고정시키고 인서트 윗부분의 침윤하지 않은 세포를 제거한 결과(도 6a) 및 이를 그래프화(도 6b)하여 혈관내피세포 침윤 억제 효과를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[0032]

본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0033]

텔로미어(telomere)는 염색체의 말단에 반복적으로 존재하는 유전 물질로서, 해당 염색체의 손상이나 다른 염색체와의 결합을 방지한다고 알려져 있다. 세포가 분열할 때마다 텔로미어의 길이는 조금씩 짧아지는데, 일정한 횟수 이상의 세포 분열이 있게 되면 텔로미어는 매우 짧아지고, 그 세포는 분열을 멈추고 죽게 된다. 반면 텔로미어를 길게 하면 세포의 수명이 연장된다고 알려져 있으며, 그 예로 암세포에서는 텔로머라제(telomerase)라는 효소가 분비되어 텔로미어가 짧아지는 것을 막기 때문에, 암세포가 죽지 않고 계속 증식할 수 있다고 알려져 있다. 본 발명자들은 텔로머라제로부터 유래되는 캡티드가 혈관신생 억제에 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0034]

과도한 신생 혈관의 성장은 암(cancer), 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 건선(psoriasis)과 같은 질환과 연관된다. 이 같은 질환이 있는 경우, 과도한

혈관 성장으로 인해 질환이 있는 조직에 신생 혈관이 공급되어 정상 조직들이 파괴된다. 암의 경우에는 신생 혈관들이 종양 세포를 순환시켜 다른 조직에 기생하게 할 수도 있다.

[0035] 이와 같은 혈관 신생 관련 질환으로는 위에서 언급한 종양의 성장 및 전이를 비롯하여 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 중식성 망막증, 건선, 황반 변성(macular degeneration), 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 만성 염증 (chronic inflammation), 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 케양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 비조절성 혈관신생-관련 질병 또는 질환을 예로 들 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[0036] 이와 같이, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 황반변성증, 혈관 신생 녹내장, 망막 정맥 폐색증, 망막 동맥 폐색증, 익상편, 루베오시스, 각막 신생 혈관증, 고형 종양, 혈관종, 종양의 성장 및 전이 등의 치료제로서 유용한 혈관 신생 억제 활성을 갖는 화합물을 탐색하는 것은 넓은 범위의 질병의 치료에 적용이 가능한 약물을 탐색하는 의미가 있다고 할 수 있다.

[0037] HSP90는 세포 생존과 종양 성장에 있어 중요한 클라이언트 단백질들을 조절함으로서 종양형성과 매우 밀접한 관련을 가진다[Calderwood SK, Trends in biochemical sciences. 31, 164-72, 2006 ; Garcia-Carbonero R et al, The lancet oncology, 14, e358-69, 2013]. 이러한 클라이언트 단백질들의 목록에는 키로신 키나아제 수용체, 신호전달 단백질, 세포주기 단백질, 항세포소멸 단백질 등이 포함되어있다[Garcia-Carbonero R et al., The lancet oncology. 14, e358-69, 2013]. 이 단백질들 중에서, HIF-1 α (alpha)는 저산소 조건하에서 혈관형성을 유도하는데 중심이 되는 역할을 수행한다. 즉, HSP90의 과다발현은 종양 혈관형성이 증가하도록 유발한다[Sun J et al , Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology., 24:2238-44, 2004 ; Pfosser A et al, Cardiovascular research. 65:728-36. 2005]. HSP70과 HSP90 모두 세포외 틈과 원형질막 내에서 국소적으로 발견되는데[Ferrarini M et al, International journal of cancer Journal international du cancer. 51:613-9. 1992 ; Vanbuskirk A et al, The Journal of experimental medicine. 170:1799-809, 1989], 특히 종양들로부터 방출된 HSP70는 몇몇 종류의 종양 진행과 나쁜 예후에 매우 밀접하게 관련되어 있고[Yeh CH et al, Leukemia research, 34:605-9, 2010 ; Kocsis J et al, Cell stress & chaperones , 15:143-51, 2010], HSP70 혈청 수치는 HSP70의 내부 수치와 관련이 있음이 밝혀졌다[Dempsey NC et al, Journal of leukocyte biology, 87:467-76, 2010]. 또한, HSP90의 억제는 혈관형성의 감소와 암세포에 대한 직접적인 세포변성효과를 이끈다[Ganji PN et al, Angiogenesis, 16:903-17, 2013 ; Bohonowych JE et al, BMC cancer, 11:520, 2011]. HSP70 역시 약학적 치료의 목표가 되어 왔고, 몇몇 후보들이 개발된 바 있다[Evans CG et al, Journal of medicinal chemistry, 53:4585-602, 2010 ; Powers MV et al, Cell cycle, 9:1542-50, 2010].

[0038] 본 발명에서는 암 세포 성장과 정상 산소 및 저산소 상태의 조건 하에서의 HIF-1 α 및 VEGF 수치에 대한 PEP 1의 효과를 발견하고, PEP 1의 생체내(*in vivo*) 효능을 이종이식 쥐 모델을 이용하여 평가하는 실험을 진행하였다.

[0039] 본 발명에서는, 암세포에 PEP 1을 처리하면 저산소 상태에서 HIF1- α 와 VEGF의 생산을 감소시키는 것을 확인하고, 암세포에 PEP 1의 처리를 하면 HSP70과 HSP90 단백질의 레벨을 낮추는 사실을 확인하였다.

[0040] 본 발명의 일측면에서, 서열 번호 1의 웨პ티드, 서열번호 1의 단편인 웨პ티드 또는 상기 웨პ티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 웨პ티드는 텔로머라제, 구체적으로 인간(*Homo sapiens*) 텔로머라제에서 유래한 웨პ티드를 포함한다.

[0041] 본 명세서에 개시된 웨პ티드는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 웨პ티드를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 웨პ티드는, 서열번호 1을 포함하는 웨პ티드 또는 그 단편들과 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산이 변화된 웨პ티드를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일측면에서, 아미노산 변화는 웨პ티드의 물리화학적 특성이 변경되도록 하는 성질에 속한다. 예를 들어, 웨პ티드의 열안정성을 향상시키고, 기질 특이성을 변경시키고, 최적의 pH를 변화시키는 등의 아미노산 변화가 수행될 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 "아미노산"이라 함은 자연적으로 웨პ티드로 통합되는 22개의 표준 아미노산들 뿐만 아니라 D-아이

소며 및 변형된 아미노산들을 포함한다. 이에 따라, 본 발명의 일측면에서 펩티드는 D-아미노산을 포함하는 펩티드일 수 있다. 한편, 본 발명의 다른 측면에서 펩티드는 번역 후 변형(post-translational modification)된 비표준 아미노산 등을 포함할 수 있다. 번역 후 변형의 예는 인산화(phosphorylation), 당화(glycosylation), 아실화(acylation) (예컨대, 아세틸화(acetylation), 미리스토일화(myristoylation) 및 팔미토일화(palmitoylation)를 포함), 알킬화(alkylation), 카르복실화(carboxylation), 히드록실화(hydroxylation), 당화반응(glycation), 비오티닐화(biotinylation), 유비퀴티닐화(ubiquitinylation), 화학적 성질의 변화(예컨대, 베타-제거 탈이미드화, 탈아미드화) 및 구조적 변화(예컨대, 이황화물 브릿지의 형성)를 포함한다. 또한, 펩티드 컨쥬게이트를 형성하기 위한 가교제(crosslinker)들과의 결합과정에서 일어나는 화학 반응들에 의해 생기는 아미노산의 변화, 예컨대 아미노기, 카르복시기 또는 사이드 체인에서의 변화와 같은 아미노산의 변화를 포함한다.

[0044] 본 명세서에 개시된 펩티드는 자연 그대로의 공급원으로부터 동정 및 분리된 야생형 펩티드일 수 있다. 한편, 본 명세서에 개시된 펩티드는 서열번호 1의 단편들인 펩티드와 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 및 /또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는, 인공 변이체일 수 있다. 인공 변이체에서뿐만 아니라 야생형 폴리펩티드에서의 아미노산 변화는 단백질의 폴딩(folding) 및/또는 활성에 유의한 영향을 미치지 않는 보존성 아미노산 치환을 포함한다. 보존성 치환의 예들은 염기성 아미노산(아르기닌, 리신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(루신, 이소로이신, 발린 및 메티오닌), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린 및 트레오닌)의 군의 범위 내에 있다. 일반적으로 특이적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 치환이 본 분야에 공지되어 있다. 가장 흔하게 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, 및 Asp/Gly, 그리고 이들과 반대인 것들이다. 보존적 치환의 다른 예는 다음 표와 같다.

표 1

원래 아미노산	예시적인 잔기 치환	바람직한 잔기 치환
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine; ile ; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe ; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	Leu

[0046] 펩티드의 생물학적 특성에 있어서의 실재적인 변형은 (a) 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면 시트 또는 나선 입체 구조를 유지하는데 있어서의 이들의 효과, (b) 표적 부위에서의 상기 분자의 전하 또는 소수성을 유지하는데 있어서의 이들의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 있어서의 이들의 효과가 상당히 상이한 치환부를 선택함으로써 수행된다. 천연 잔기는 통상의 측쇄 특성에 기준하여 다음 그룹으로 구분된다:

[0047] (1) 소수성: 노르루이신, met, ala, val, leu, ile;

[0048] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0049] (3) 산성: asp, glu;

[0050] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0051] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0052] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0053] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환함으로써 이루어질 것이다. 웨이드의 적당한 입체 구조를 유지하는 것과 관련이 없는 어떠한 시스테인 잔기도 일반적으로 세린으로 치환되어 상기 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 이상한 가교결합을 방지할 수 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결합(들)을 상기 웨이드에 대하여 그의 안정성을 향상시킬 수 있다

[0054] 웨이드의 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 글리코실화 패턴이 변화된 것이다. 변화란 의미는 웨이드에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실 및(또는) 웨이드 내에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 나타낸다.

[0055] 웨이드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된 것이다. N-연결된 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 말한다. 트리웨이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 잔기를 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리웨이드 서열 중의 하나가 폴리웨이드에 존재함으로써, 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈اكت오사민, 갈اكت오스 또는 크릴로스 중의 하나를 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.

[0056] 웨이드로의 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상기 언급된 트리웨이드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변화시킴으로써 편리하게 수행된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 이러한 변화는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 최초 항체의 서열에 부가하거나 이들 잔기로 치환함으로써 이루어질 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0057] 또한 본 발명의 일측면에 따른 서열 번호 1의 서열을 갖는 웨이드, 서열 번호 1의 서열의 단편인 웨이드 또는 상기 웨이드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 웨이드는 세포 내 독성이 낮고, 생체 내 안정성이 높다는 장점을 가진다. 본 발명에서의 서열번호 1은 텔로머라제 유래 웨이드로서 하기와 같이 16개의 아미노산으로 이루어진 웨이드이다.

[0058] 서열 번호 1에 기재된 웨이드는 아래 표 1과 같다. 아래 표 2의 "이름"은 웨이드를 구별하기 위해 명명한 것이다. 본 발명의 일측면에서, 서열 번호 1에 기재된 웨이드는 인간 텔로머라제의 전체 웨이드를 나타낸다. 본 발명의 다른 일측면에서, 서열 번호 1의 서열을 갖는 웨이드, 서열 번호 1의 서열의 단편인 웨이드 또는 상기 웨이드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 웨이드는 텔로머라제에 포함된 웨이드 중 해당 위치의 웨이드를 선별해 합성한 "합성 웨이드"를 포함한다. 서열번호 2는 전체 텔로머레이즈의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

표 2

서열 번호	이름	텔로머라 제 상 위 치	서열	길이
1	pep1	[611- 626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2		[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRRILGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLCVCPWDARPPAAPSFRQSVSCLKELVARVLQLRCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRLGCERAWNHSVREA GVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGSDRGFCVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPGSVGRQHHAGPPSTSRRPPRWDTCPVVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLCNHAQCPTYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRLLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHERRFLRNTKKFISLGKHAKLSQLTELWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPINVMDYVVGARTFRREKAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGGLGASVGLGDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPELEYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASI1KPQNTYCVRRYAVVQKAHGHVVKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHQETSPIRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKL FAGI RRDGLLLRVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGVVNLRKTVVNRPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLDTRTLEVQSDYSSYARTSI RASLT FNRGFKAGRNMRRKLFGVRLKCHSLFLDLQVNLSQT VCTNIYKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQQVWNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAGPLPSEAVQWLCHQAFLKLTRHRVTVPLLGLSLRTAQTKLSRKLPGTTLALEAAANPALPSDFKTILD	1132 aa

[0059]

본 발명의 일측면에서는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는(comprising) 웨티드, 상기 아미노산 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 웨티드 또는 그 단편인 혈관 신생 억제효능을 가지는 웨티드를 유효 성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0061]

본 발명의 일측면에 따른 혈관 신생 억제용 조성물은 일측면에서는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는(comprising) 웨티드, 상기 아미노산 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 웨티드 또는 그 단편인 웨티드를 0.01g/L 내지 1kg/L, 구체적으로 0.1g/L 내지 100g/L, 더 구체적으로 1g/L 내지 10g/L의 함량으로 포함할 수 있으나 용량에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다. 상기 범위 또는 그 이하의 범위로 포함하는 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다.

[0062]

본 발명의 일측면에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.

[0063]

본 발명의 일측면에서 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는(comprising) 웨티드, 상기 아미노산

서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 혈관신생 억제효능을 가지는 펩티드를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여될 수 있다.

[0064] 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡슐제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 젤, 크림, 혼탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활액제, 결합제, 봉해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0066] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 10ng/kg/일 내지 10mg/kg/일, 구체적으로는 0.1 μ g/kg/일 내지 1mg/kg/일, 더 구체적으로는 1 μ g/kg/일 내지 100 μ g/kg/일, 보다 더 구체적으로는 2 μ g/kg/일 내지 50 μ g/kg/일이 될 수 있으나, 용량에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본 발명의 일측면에서 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는(comprising) 펩티드, 상기 아미노산 서열과 80%이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 혈관 신생 억제 용 식품 조성물을 제공한다.

[0068] 본 발명의 일측면에 따른 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).

[0070] 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이다, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.

[0071] 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 실시에 필수적인 것으로 해석되어서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[0072] 본 발명의 바람직한 구체예들은 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 최적의 모드를 포함한다. 바람직한 구체예들의 변이들이 앞선 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 그러한 변이를 적절히 이용하기 기대하고, 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 다른 방식으로 본 발명이 실시 되기를 기대한다. 따라서, 본 발명은, 특허법에 의해 허용되는 것과 같이, 첨부된 특허청구범위에서 언급된 발명의 요지의 균등물 및 모든 변형들을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변이들 내에서 상기 언급된 구성요소들의 어떤 조합이라도 여기서 반대로 명시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 예시적인 구체예들을 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기술되었지만, 당업자들은 하기 청구범위에 의해 정의되는 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서도 형태 및 디테일에서 다양한 변화가 행해질 수 있음을 잘 이해할 것이다.

[0073] 하기의 실시예에서는 인간 제대정맥혈관 내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)를 통하여

펩티드 PEP 1의 혈관내피세포의 증식, 관형성 및 세포 침윤에 있어 직접적인 억제 효능을 확인하고자 하였다.

[0075] 발명의 실시를 위한 형태

[0076] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돋기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0077] 실시예 1: 펩티드의 합성

[0078] 서열번호 1의 펩티드(이하 "PEP 1"이라 함)를 종래에 알려진 고상 펩티드 합성법에 따라 제조하였다. 구체적으로, 펩티드들은 ASP48S(Peptron, Inc., 대한민국 대전)를 이용하여 Fmoc 고상 합성법(solid phase peptide synthesis, SPPS)을 통해 C-말단부터 아미노산 하나씩 커플링함으로써 합성하였다. 다음과 같이, 펩티드들의 C-말단의 첫번째 아미노산이 수지에 부착된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

[0079] NH₂-Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin

[0080] NH₂-Ala-2-chloro-Trityl Resin

[0081] NH₂-Arg(Pbf)-2-chloro-Trityl Resin

[0082] 펩티드 합성에 사용한 모든 아미노산 원료는 N-terminal Fmoc으로 보호(protection)되고, 잔기는 모두 산에서 제거되는 Trt, Boc, t-Bu (t-butylester), Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl dihydro-benzofuran-5-sulfonyl) 등으로 보호된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

[0083] Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Trt-Mercaptoacetic acid.

[0084] 커플링 시약(Coupling reagent)으로는 HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetamethylaminium hexafluorophosphate] / HOEt [N-Hydroxybenzotriazole] / NMM [4-Methylmorpholine] 를 사용하였다. Fmoc 제거는 20%의 DMF 중 피페리딘(piperidine in DMF)을 이용하였다. 합성된 펩티드를 Resin에서 분리 및 잔기의 보호기 제거에는 절단 칵테일(Cleavage Cocktail) [TFA (trifluoroacetic acid) /TIS (triisopropylsilane) / EDT (ethanedithiol) / H₂O=92.5/2.5/2.5/2.5] 를 사용하였다.

[0085] 아미노산 보호기가 결합된 출발 아미노산이 고상 지지체에 결합되어 있는 상태를 이용하여 여기에 해당 아미노산들을 각각 반응시키고 용매로 세척한 후 탈보호하는 과정을 반복함으로써 각 펩티드를 합성하였다. 합성된 펩티드를 수지로부터 끓어낸 후 HPLC로 정제하고, 합성 여부를 MS로 확인하고 동결 건조하였다.

[0086] 본 실시예에 사용된 펩티드에 대해 고성능 액체 크로마토그래피 결과, 모든 펩티드의 순도는 95% 이상이었다.

[0087] 펩티드 PEP 1 제조에 관한 구체적인 과정을 설명하면 다음과 같다.

[0088] 1) 커플링

[0089] NH₂-Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin 에 보호된 아미노산(8당량)와 커플링 시약 HBTU(8당량)/HOEt(8당량)/NMM(16당량) 을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다.

[0090] 2) Fmoc 탈보호

[0091] 20%의 DMF 중의 피페리딘(piperidine in DMF) 을 가하고 상온에서 5분 간 2회 반응하고 DMF, MeOH, DMF순으로 세척하였다.

[0092] 3) 1과 2의 반응을 반복적으로 하여 펩티드 기본 골격 NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-chloro-Trityl Resin)을 만들었다.

[0093] 4) 절단(Cleavage): 합성이 완료된 펩티드 Resin에 절단 칵테일(Cleavage Cocktail) 을 가하여 펩티드를 Resin에서 분리하였다.

[0094] 5) 얻어진 mixture에 Cooling diethyl ether를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 펩티드를 침전시킨다.

[0095] 6) Prep-HPLC로 정제 후, LC/MS로 분자량을 확인하고 동결하여 powder로 제조하였다.

실시예 2: 세포주 배양 및 분석방법

세포주 배양

[0098] 인간 유방암 세포주 MCF7 (Human breast adenocarcinoma cell line), 인간 T 림프구 세포주 (Jurkat) 및 MC38 (murine colon adenocarcinoma) 세포주들은 10% 우태아혈청 (Fetal bovine Serum)과 100 U/ml 페니실린 (penicillin) 및 스트렙토마이신 (streptomycin)을 첨가한 RPMI1460 배지에 유지하였다. HeLa (human cervical adenocarcinoma) 세포주는 10% 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum)과 100 U/ml 페니실린 (penicillin) 및 스트렙토마이신 (streptomycin)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 유지하였다.

저산소 상태에서의 단백질 발현 및 세포성장의 확인

[0100] 저 산소 상태에서 PEP 1이 HSP의 레벨에 미치는 영향을 시험하기 위하여, MCF7와 HeLa 세포들을 20 μM의 PEP 1과 처리 후, 저 산소 및 정상 산소 상태에서 배양하였다. 90분 안에 촉매반응을 일으켜 산소를 감지할 수 없는 레벨로 감소시키는 BBL GasPak (Becton Dickinson)을 사용해 무산소증을 유도하였다. 배양 시간은 2~24시간 범위였다. 상기 기재된 바와 같이 세포들은 수거 후, α-HSP70, α-HSP90, α-HIF-1α, or α-GAPDH 항체들을 사용하여 면역블로팅을 실시하였다. α-GAPDH는 단백질의 정량(Protein quantification)을 위하여, HSP70/90의 양을 GAPDH의 양으로 표준화(normalization) 하기 위하여 사용한 것이다.

[0101] PEP 1이 저 산소 상태에서 암세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, MCF7와 HeLa세포를 96웰 플레이트에 웰당 1×10^4 셀이 되도록 접종 후 10% FBS가 첨가된 완전 배지(complete media)에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 2시간 동안 혈청 기아처리 후, PEP 1 (20 μM)을 포함한, 포함하지 않은 완전 배지 모두에서 배양하였다. 상기 기재된 바와 같이 세포들을 1일에서 6일간 저 산소 상태 또는 정상 산소 상태에서 배양하였다. 생존 가능한 세포들의 수는 트리판 블루 제외 염색(tryphan blue exclusion) 방법을 사용해 매일 측정하였다. 모든 계산 실험은 중복으로 수행하였다.

면역블로팅을 통한 HSP70 및 HSP 90 단백질 레벨 분석방법

[0103] Jurkat 및 MCF7 세포들 (5×10^5)을 12시간 동안 접종하고 배양하였다. OPTI-MEM 배지를 넣어 2 시간 기아상태 처리 (starvation)를 한 후, 도에서 나타난 바와 같이, 세포들을 다른 농도의 PEP 1, 스크램블(스크램블된) 웨티드 및 17-AAG (1 μM) or KNK437 (1 μM)로 처리하였다. 2 시간 동안 배양 후, 세포들을 수거한 후 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer, Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하여 용해하였다. 브래트포드 단백질 어세이 (Bradford Protein Assay, Bio-Rad, USA)를 이용하여, 단백질 농도를 정량한 후, 샘플들을 α-HSP70 (sc-32239 and sc-66048, Santa Cruz, CA, USA), α-HSP90 (ab1429, abcam, USA), α-GRP78 (sc-13968), α-HIF-1α (sc-10790) or α-GAPDH (sc-25778) 항체들을 사용하여 SDS-PAGE와 면역블로팅을 실시하였다. 면역 반응성 밴드는 강화된 케미칼루미니센스 키트(chemiluminescence kit) (iNtRoN Biotechnology, INC, Korea)를 사용해 시각화하였으며, ImageQuantTM LAS-4000 (GE Healthcare Life Science, NJ, US)를 사용해 분석하였다.

유세포 분석을 통한 HSP70 및 HSP90 단백질 레벨 분석 방법

[0105] MCF7 세포들은 PEP 1 또는 대조군 처리하였다. 프로테아좀 억제 테스트 (Proteasome inhibition test)를 실시하기 위하여, 배양하는 동안, 세포들을 5 μM의 프로테아좀 억제제 MG132 (Calboicam)로 처리하였다. Trypsin을 사용해 세포를 분리하였고, 차가운 PBS (phosphate buffered saline)와 FACS 버퍼 (PBS containing 1% BSA and 0.1% Na₃O)로 세척하였다. 세포 내 염색을 위해 세포들을 제조 업체의 지침에 따라 투과 버퍼 (permeabilization buffer, eBioscience, CA, USA)로 처리하였다. 세포들은 4°C에서 30분간 α-HSP70-FITC (ab61907, Abcam) 또는 α-HSP90-PE (ab65171, Abcam)와 반응시켰다. FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Co., CA, USA)를 이용해 유세포 분석을 실시하였다. 데이터는 FlowjoTM 소프트웨어(version 10.0.5, Tree Star, Inc., OR, USA)를 사용해 분석하였다.

PEP 1이 생체 내 종양 성장에 미치는 영향 평가 방법

[0107] 7 주령 BALB/c 아스믹 (Nu/Nu) 마우스를 (10 mice per group; n=20, female, Orient Bio Co. Gyunggido, Korea) murine colon carcinoma MC38 (5×10^5 cells/ml in 200 μl PBS per site) 세포로 피하 접종한 후, 임의로 두 그룹으로 나누었다. 마우스들은 이틀에 한번 복강 내로 PEP 1 (50 μg/kg in 100 μl 0.9% NaCl

solution) 또는 PBS를 주사하였다. 종양의 크기가 10 mm에 다 달았을 때, PEP 1 또는 PBS를 종양 내 주사로 투여하였다. 종양의 크기는 이틀에 한번 측정하였으며, 종양의 부피는 다음과 같은 식을 이용해 계산하였다, volume (mm^3) = ((width² x length) / 2). 실험 14일 째, 마우스를 희생하고, 종양의 무게를 측정하였다. 모든 동물 실험은 The Institute for Experimental Animals, College of Medicine, Seoul National University at Seoul, Korea 에 의해 승인되었다.

[0108] 종양 섹션의 증식 세포 및 세포 사멸에 대한 평가

종양의 아폽토시스 세포사멸을 평가하고자, 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 종양조직 섹션(Formalin-fixed and Paraffin-embedded tumor sections)을 사용한 Tunnel 어세이를 통해 DNA 단편화(DNA fragmentation)를 분석하였다. 제조업체의 지침에 따라, 종양 섹션은 ApopTag Peroxidase *In Situ* 아폽토시스 검출 키트 (Millipore)를 사용해 염색하였다. 종양 내 증식세포는 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)을 사용해 감지하였다. 항원 검색을 위해, 조직 섹션은 40분간 10 μM citrate (pH6.0) buffer에서 탈파라핀 하고, 수화하고, 가열하였다. 조직들은 항마우스 PCNA 모노클로날 항체(anti-mouse PCNA monoclonal antibody, ab29, Abcam)를 사용해 염색하였다. 2차 항체 처리 및 개발 후, H&E 염색 방법을 이용해 조직 섹션을 대조염색 하였다. 그런 다음, 필드는 각각의 처리 그룹의 6개의 슬라이드로부터 임의로 선택하였고, 필드는 정량을 위해 Leica Qwin 소프트로 분석하였다.

[0110] 종양에서의 HSP 발현 면역블롯팅 분석

PCNA 염색법과 유사한 방법으로 면역히스토케미칼 염색을 사용해 종양의 HSP70 및 HSP90 단백질의 발현을 평가하였다. 열 충격 단백질 (HSP70; sc-7298, HSP90; ab1429)에 대한 항체들을 1차 항체들로 사용하였다. 종양에 의한 HSP70과 HSP90 단백질의 발현은 종양 용해물(tumour lysate)를 이용하는 면역블롯팅을 통해 평가하였다. 액체 산소를 이용해 동결 후, 종양은 모르타르(mortar)를 사용해 갈았고, 추출 버퍼(extraction buffer, 20 mM HEPES, pH7.5, 100 mM NaCl, 0.05% Triton X-100, 1mM DTT, 0.5mM sodium orthovanadate, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin)에서 균질화 하였다. 반복 원심 분리 후, 상기 기재된 바와 같이 상층액은 SDS-PAGE 및 면역블롯팅을 실시하였다.

[0112] ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석

암세포의 VEGF 분비는 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 확인하였다. MCF7와 HeLa 세포들은 24시간 PEP 1 또는 비히클을 첨가한 후 저 산소 상태 또는 정상 산소 상태에서 배양하였다. 세포 상층액의 VEGF의 양은 제조업체의 지침에 따라 human VEGF 면역분석 키트 (R&D Systems, USA)을 사용해 확인하였다. 혈액 내 HSP70 및 HSP90의 농도를 분석하기 위해, 종양을 가지고 있는 마우스 모델로부터 혈액을 채취하였다. 혈청 준비 후, 혈액 내 HSP70과 HSP90의 농도는 면역분석 키트 for HSP70 (R&D systems, USA) and HSP90 (Cusabio Biotech co., Ltd, DE, USA.)를 사용해 확인하였다.

[0114] 공초점 현미경 분석

슬라이스한 종양 섹션은 상온에서 4% 파라포름알데하이드 (Paraformaldehyde)로 15분간 고정시켰다. PBS로 두 번 세척한 후, 10분간 0.25% Triton X-100을 포함한 PBS에 배양한 후, PBS로 다시 세 번 세척하였다. 1% BSA-PBST로 조직을 30분간 차단 한 후, 마우스 항-Tie2 (557039, BD Pharmigen)와 래트 항-CD11b 항체 (rat anti-CD11b antibodies, ab8878, abcam)의 혼합물과 함께 4 °C 습한 챔버에서 배양하였다. 세척 후, 조직들은 AlexaFlour 488 goat anti-mouse IgG 와 AlexaFlour633 goat anti-rat IgG의 혼합물과 함께 배양하였다. 세포 핵을 시각화 하기 위해 DAPI (Sigma Aldrich)와 1분간 배양 후, 공초점 현미경으로 분석하였다.

[0116] 통계 분석방법

컨트롤과 처리된 그룹간의 통계적 비교는 student's t-test 를 이용 하였다. P-value의 값이 0.05와 같거나 이 하일 때 ($p \leq 0.05$) 유의 하다고 간주하였다.

[0118] 실시예 3: 저산소증으로부터 유도된 HIF-1 α 및 VEGF의 생산의 억제 확인

HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 alpha)는 저산소 자극 및 여러 가지 성장 인자 및 사이토카인에 반응하여 활성화 되는 물질로 혀혈 조직 내 신생 혈관 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, VEGF(혈관 내피세포성장인자, Vascular Endothelial Growth Factor)는 HIF-1 α 의 조절을 받아 신생혈관 형성을 직접 자극 하는 인자이다.

- [0120] 본 실시예에서는 본 발명에서는 저산소 조건에서 HIF-1 α 의 단백질 수치에 대한 PEP 1의 효과를 조사하고, HIF-1 α 가 저산소 조건에서 VEGF(혈관내피세포성장인자, Vascular Endothelial Growth Factor)의 생산을 조절한다는 사실이 알려져왔기 때문에, PEP 1의 처리가 저산소 조건에 의해 유도된 VEGF의 합성에 영향을 주는지 여부를 확인하였다.
- [0121] HIF-1 α 의 발현 수준은 MCF7과 HeLa 세포 내에서 HIF-1 α 의 양이 저산소 조건에서 시간에 따라 감소하였다(도 1, 2 참조). 즉, 아무것도 처리하지 않은 대조군(mock treated control)에서는 HIF-1 α 의 발현이 저산소 중에 의해 증가하였지만, PEP 1의 처리를 한 세포에서는 매우 감소하였다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0122] 실험 결과, 분비된 VEGF의 양은 점차적으로 저산소 조건의 유도에 의해 증가하였다. 그러나 저산소 조건에서 MCF7과 HeLa로부터 분비된 VEGF의 양은 PEP 1 처리에 의해 상당히 감소한 것을 확인할 수 있었다. (도 3 참조).
- [0123] **실시예 4: PEP 1 처리에 의한 HSP70 및 HSP90의 발현 억제 확인**
- [0124] 신생혈관 형성에 영향을 미치는 HIF-1 α 는 HSP의 클라이언트 단백질로 알려져 있기 때문에, 본 실시예에서는 PEP 1이 HSP70과 HSP90의 단백질 수치에 영향을 미칠 수 있는지 여부에 대하여 확인하였다. 도 4와 도 5에서 볼 수 있듯이, PEP 1을 2시간 동안 처리하면 Jurkat T세포 림프종 세포와 MCF7 유방암 세포내의 HSP70과 HSP90 모두의 상당한 수준으로 감소시켰다. Jurkat 세포를 이용한 실험에서, 5 μ M의 PEP 1은 HSP70과 HSP90을 50% 이상 감소시켰다.
- [0125] MCF7 세포에서는 PEP 1을 5 μ M 처리한 군에서 HSP90이 대조군과 비교할 때 최대 20%까지 감소하였다. PEP 1을 20 μ M 처리한 군에서는 HSP70이 대조군에 비하여 약 50% 정도의 감소를 보였다. 그러나, PEP 1과 유사하지만 다른 서열을 가진 스크램블된 웨티드들을 처리한 경우에는 HSP70과 HSP90의 수치에 별다른 영향을 미치지 않았다. (도 4, 5 참조)
- [0126] 또한, 실시예 3에서 HIF-1 α 에 대해 실시한 저산소 조건에서 시간에 따른 PEP 1의 영향을 알아보는 실험과 동일한 실험을 HSP70 및 HSP90에 대해서도 실시하였다. 그 결과는 도 6 및 도 7에 나타내었다. 도 6 및 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 대조군(mock treated control)에서는 HSP70 및 HSP90의 발현이 시간에 따라 영향을 받지 않았지만, PEP 1의 처리를 한 세포에서는 매우 감소하였다는 것을 MCF7과 HeLa 세포 모두에서 확인할 수 있었다. 이는 PEP 1의 처리가 HSP의 분해를 야기하고, 그 후에 그들의 클라이언트 단백질들을 조절할 수 있음을 더욱 확실하게 확인시켜 준다(도 1, 2, 6, 7 참조). 이러한 결과들은 PEP 1이 저산소 조건과 관련된 다양한 세포의 반응에, HSP의 단백질 수치를 감소시킴으로써, 영향을 줄 수 있음을 시사한다.
- [0127] 다음으로 PEP 1이 HSP를 억제하는 활성과, HSP90과 HSP70의 각각의 억제제로 잘 알려진 17-AAG와 KNK437이 HSP를 억제하는 활성을 비교하였다. 17-AAG는 HSP90의 ATP아제(ATPase)의 활성을 억제함으로써 HSP90의 작용을 직접적으로 억제한다[Uehara Y, Current cancer drug targets, 3:325-30, 2003]; KNK437은 스트레스로부터 유도된 HSP의 합성을 억제한다. 실험 결과, PEP 1만이 Jurkat 및 MCF7세포에서 HSP90과 HSP70 모두의 수준을 감소시켰다(도 8 참조).
- [0128] Jurkat 세포에서는 PEP 1만이 HSP70과 HSP90의 단백질 수치를 감소시켰고, 17-AAG와 KNK437은 HSP90의 양은 감소시켰지만, HSP70의 수치를 감소시키지 못하였다. MCF7 세포의 경우에는, PEP 1과 KNK437이 HSP90과 HSP70 둘 모두의 양을 감소시킨 반면, 17-AAG는 HSP90과 HSP70의 수치에 매우 약한 영향만을 주었다.
- [0129] PEP 1에 의한 HSP90과 HSP70의 감소는 유세포 분석법(Flow Cytometric Analysis)에 의해 더 확실하게 확인할 수 있다. HSP90과 HSP70의 표면염색과 세포내 염색을 통해, PEP 1의 처리가 세포 표면의 HSP에 미치는 영향이 세포질의 HSP에 미치는 영향보다 작았지만, 세포내와 세포질의 HSP90과 HSP70을 감소시킬 수 있음을 보여주었다(도 9 참조). PEP 1과 프로테아좀 억제제인 MG132를 같이 처리한 경우, PEP 1에 의한 작용이 없어졌는데, 이는 PEP 1이 HSP90과 HSP70의 프로테아좀-의존적인 분해를 유발할 수 있음을 제시한다(도 9 참조).
- [0130] **실시예 5: 저산소조건(Hypoxia) 및 정상산소 조건(Normoxia)에서 종양세포 성장 확인**
- [0131] 상기 실시예 3 및 4와 같은 맥락에서 저산소 조건(Hypoxia)과 정상산소 조건(Normoxia)에서 종양 세포 성장에 대한 PEP 1의 효과에 대해 조사하였다. PEP 1은 보통 조건(Normoxia, 정상산소조건)에서 MCF7과 HeLa 세포 성장에 약한 억제 효과를 보였지만, PEP 1의 억제 효과는 저산소 조건에서 매우 증진되었다(도 10, 11 참조).
- [0132] **실시예 6: 종양내의 Tie2+ 모노사이트(Tie2+ monocytes) 유인(recruitment)에 있어 PEP 1의 효과**
- [0133] Tie2는 혈관 형성의 개시에 핵심적 역할을 수행한다[Du R et al, Cancer cell, 13:206-20, 2008]. PEP 1이 HSP

를 불안정화하여 HIF-1 α 와 VEGF의 종양세포 내 발현을 억제할 수 있음을 확인한 것을 근거로 PEP 1이 종양에 TEM(Tie2 발현 단핵 백혈구, Tie2 expressing monocytes)를 유인(recruitment)하는데 영향을 미칠 수 있는지 여부에 대한 실험을 수행하였다. 면역히스토케미칼 염색(immunohistochemical staining) 결과, PEP 1 처리한 쥐로부터 채취한 종양의 Tie2 $+$ CD11b $+$ 단핵백혈구의 수는 대조군 쥐로부터 채취한 종양보다 현저하게 낮았음을 확인할 수 있었다(도 12, 13 참조). 이는 PEP 1에 의한 HIF-1 α 와 VEGF 발현의 억제가 혈관형성에 중요한 TEM의 유인에 영향을 미쳐 현저히 억제하는 것을 나타낸다.

[0134] 실시예 7: PEP 1 처리에 의한 종양 내 HSP70과 HSP90의 감소

PEP 1이 생체 내(*in vivo*) 실험 조건에서 HSP70과 HSP90의 발현을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, α -HSP70 또는 α -HSP90 항체를 이용한 면역조직화학 염색을 실시하였다. 암세포주로부터 얻는 데이터와 일관되게, PEP 1이 처리된 군으로부터 채취된 종양 부분은 PBS 처리한 대조군과 비교할 때 약한 염색 패턴을 보였다(도 14 참조). PEP 1 처리된 샘플에서 양성으로 염색된 부분은 대조군 비교할 때 매우 작다(도 15 참조).

PEP 1 처리된 종양 샘플의 감소된 HSP70과 HSP90 단백질의 수치는 종양 용해물(tumor lysates)을 통한 면역블로팅 실험에 의해서도 확인된다. HSP70과 HSP90의 감소가 세 개의 모든 PEP 1 처리한 종양 샘플에서 관찰되었다(도 16 참조). 특히 HSP90은 PEP 1을 처리한 샘플 내에서 거의 찾아낼 수 없었다. HSP의 다른 패밀리 멤버(family member)로 볼 수 있는 GRP78도 역시 PEP 1 처리한 샘플에서 감소하였다. 종합적으로 이 같은 결과들은 PEP 1이 HSP를 생체 내 시스템 내에서 감소시키고, 종양의 성장을 억제하는 능력이 있음을 나타낸다.

[0137] 실시예 8: 혈액 내 분비된 HSP70의 레벨에 PEP 1이 미치는 영향

HSP70과 HSP90 모두 종양 세포로부터 분비될 수 있고, 최근의 연구들은 종양형성과 항 종양 반응에 몇몇 역할을 보여주고 있다. HSP90과 HSP70 분비에 있어 PEP 1의 역할을 더 자세히 설명하기 위해, 종양을 가진 쥐의 혈액으로부터 HSP70과 HSP90의 농도를 측정하였다. 비록, PEP 1 처리군과 대조군 간에 분비된 HSP90의 수치에 변화가 없었지만, PEP 1 처리한 쥐의 HSP70 수치가 대조군보다 낮게 나타났다(도 17 참조).

또한, 낮은 HSP70의 수치는 종양의 양과 종양 무게와 상관관계가 있다(도 18 참조).

[0140] 실시예 9: PEP 1에 의한 생체내 종양 성장의 억제

상기 실시예들의 결과는 PEP 1의 HSP90 및 HSP70 기능에 대한 억제 역할을 보여주고, 이를 통해 다른 HSP 억제제들과 같이 PEP 1이 잠재적인 종양 억제 기능도 가질 수 있음을 시사한다고 할 수 있다.

이에 본 실시예에서는 쥐 모델을 이용하여 PEP 1의 생체내 종양 억제 효과에 대하여 조사하였다. MC38 쥐 암 세포(MC38 murine cancer cell)에 PEP 1을 처리한 결과, 그렇지 않은 피하의 생체 내(*in vivo*) 종양 성장을 분석하였다. PEP 1처리를 한 그룹과 대조군 사이에 종양의 양의 상당한 차이가 관찰되었다(도 19 참조). 주입 후 18 일되는 시점에, 대조군의 평균 종양 양이 PEP 1 처리군의 양보다 약 3배 정도임이 관찰되었다. 일관되게, 대조군의 종양의 무게가 PEP 1 처리군의 종양 무게 보다 상당히 크고, 이는 PEP 1이 생체내 종양 성장을 억제하는 능력이 있음을 나타낸다(도 20, 21 참조).

[0143] 실시예 10: PEP 1을 처리한 쥐에서 채취한 종양의 조직학적 검사

H&E(헤마토실린-에오신, Hematoxylin and Eosin) 염색을 통한 조직학적 검사는, PEP 1 처리한 쥐의 조직 섹션이 대조군 쥐에서보다 빈 공간이 더 많음을 보여준다. 이는 PEP 1 처리한 쥐의 종양에서 많은 세포 사멸이 발생하였음을 시사한다(도 22 참조). 또한 PEP 1 처리한 쥐에서 채취한 종양에서 더 적은 혈관이 발견되었는데, 이는 PEP 1이 다른 HSP 억제제들과 같이, 혈관형성을 억제하는 기능을 가질 수 있음을 보여준다고 할 수 있다(도 22 참조). 터널 염색(Tunel staining)에 의해 세포가 아폽토시스 세포 사멸을 진행하는 것을 볼 수 있는데, 이는 PEP 1의 항암 효과를 더 확실하게 확인하여 준다. 도 23에서 보여지듯이, 대조군 종양의 경우와 비교할 때, PEP 1을 처리한 종양 샘플에서 상당한 정도로 높은 수치의 세포 사멸이 관찰되었다. 또한, 세포 핵 항원(PCNA)의 증식을 측정하기 위한 종양 부분의 염색은 PEP 1을 처리한 군의 종양 부분에서 세포 증식의 감소를 분명하게 보여주고 있다(도 24 참조).

[0145] 실시예 11: 혈관내피세포를 통한 PEP 1의 세포 증식, 관형성 억제 효능 확인

[0146] 1) 세포 배양

본 실시예는 인간 제대정맥혈관 내피세포 (Human umbilical vein

[0148] endothelial cell)를 EGM-2 배지로 배양하였고, 2-5계대 사이의 혈관내피세포 만을 실험에 사용하였다.

2) 시험물질

[0150] 시험물질인 인간 제대정맥혈관 내피세포 (Human Umbilical vein endothelial cell는 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서, 혈관신생 유도인자 (vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)는 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)로부터 각각 구입하여 사용하였다. PEP 1은 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 용해하여 사용하였다.

3) 혈관내피세포의 증식과 생존률 분석 및 효과

[0152] 혈관내피세포를 6-well plate (BD Biosciences, Bedford, MA, USA)에 각각 1×10^5 cells/well로 plating 하였다. 혈청 및 혈관신생 유도 인자가 없는 기본 EBM-2 배지 (Lonza)로 세포들을 G1/G0 phase로 동기화한 후, PEP 1을 농도별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리하고 EGM-2 배지로 24시간 자극하여, 세포 증식 억제 효과를 관찰하였다.

[0153] 세포 증식의 검출은 trypan blue stain 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 현미경 (x100)으로 직접 계수하였고, 세포 생존률은 Muse™ analyzer를 이용하여 viability assay kit (Merck Millipore사)로 분석하였다.

[0154] PEP 1은 다양한 혈관신생 유도인자를 함유하는 EGM-2 배지로 자극된 혈관내피세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였으며(도 1a), 세포 생존률에는 아무런 영향을 미치지 않은 것을 확인할 수 있었다(도 1b). 이는 PEP 1이 혈관내피세포의 세포증식에 세포 독성 없이 증식을 억제하는 효과가 있음을 제시한다.

4) 혈관내피세포의 관형성 분석 및 효과

[0156] Matrigel® basement membrane matrix(10.4 mg/mL, BD Biosciences)를 24-well plate에 200 μl 씩 coating (37 °C에서 30 분)한 후, 혈관내피세포(4×10^4 cells/well)를 plating하고 기본 EBM-2 배지로 2시간 동안 serum-starvation하였다. PEP 1을 농도 별(0.05, 0.5, 5 μM)로 처리하고 EGM-2 배지로 6시간 동안 자극하였다. 관형성 변화는 Olympus CKX41 inverted microscope(CAChN 10/0.25php objective, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)와 ToupTek Toupview software(version x86, 3.5.563, Hangzhou ToupTek Photonics Co., Zhejiang, P. R. China)를 이용하여 관찰하였다(도 2a).

[0157] PEP 1은 다양한 혈관신생 유도인자를 함유하는 EGM-2 배지로 자극된 혈관내피세포의 관형성을 농도 의존적으로 억제함으로써(도 2b), 혈관내피세포 이동 및 분화에 의한 혈관형성을 억제할 수 있음을 제시한다.

실시예 12: VEGF-A에 의한 혈관내피세포를 통한 PEP 1의 세포 증식, 관형성 및 침윤 억제 효능 확인

1) VEGF-A에 의한 혈관내피세포의 증식과 생존률 분석 및 효과

[0160] 혈관내피세포를 6-well plate (BD Biosciences, Bedford, MA, USA)에 각각 1×10^5 cells/well로 plating 하였다. 혈청 및 혈관신생 유도 인자가 없는 기본 EBM-2 배지 (Lonza)로 세포들을 G1/G0 phase로 동기화한 후, PEP 1을 농도별 (0.05, 0.5, 5 μM)로 처리하고 VEGF-A(10 ng/mL)로 24시간 자극하여, 세포 증식 억제 효과를 관찰하였다.

[0161] 세포 증식의 검출은 trypan blue stain 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 현미경 (x100)으로 직접 계수하였고, 세포 생존률은 Muse™ analyzer를 이용하여 viability assay kit (Merck Millipore사)로 분석하였다.

[0162] PEP 1은 다양한 혈관신생 유도인자를 함유하는 EGM-2 조건에서와 유사하게 VEGF-A에 의한 혈관내피세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였으며(도 3a), 세포 생존률에는 영향을 미치지 않은 것(도 3b)을 확인하였다.

2) VEGF-A에 의한 혈관내피세포의 관형성 분석 및 효과

[0164] Matrigel® basement membrane matrix(10.4 mg/mL, BD Biosciences)를 24-well plate에 200 μl 씩 coating (37 °C에서 30 분)한 후, 혈관내피세포(4×10^4 cells/well)를 plating하고 기본 EBM-2 배지로 2시간 동안 serum-starvation하였다. PEP 1을 농도 별(0.05, 0.5, 5 μM)로 처리하고 VEGF-A(10 ng/mL)로 6시간 동안

자극하였다. 관형성 변화는 Olympus CKX41 inverted microscope(CAChN 10/0.25php objective, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)와 ToupTek Toupview software(version x86, 3.5.563, Hangzhou ToupTek Photonics Co., Zhejiang, P. R. China)를 이용하여 관찰하였다 (도 4a).

[0165] PEP 1이 VEGF-A에 의한 혈관내피세포의 관형성을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(도 4b).

[0166] 3) VEGF-A에 의한 혈관내피세포의 침윤 분석 및 효과

[0167] 기본 EBM-2 배지로 2시간 동안 serum-starvation한 혈관내피세포를 100 mL(4×10^5 cells/mL)씩 Matrigel[®](1 mg/mL, BD Biosciences)-coated transwell 인서트 (Costar, 6.5 mm diameter)에 plating 하고, 아래쪽 well에는 기본 EBM-2 배지를 600 μ L 넣어주었다. 도5에는 인서트를 설치한 대략적인 모식도가 도시되어 있다.

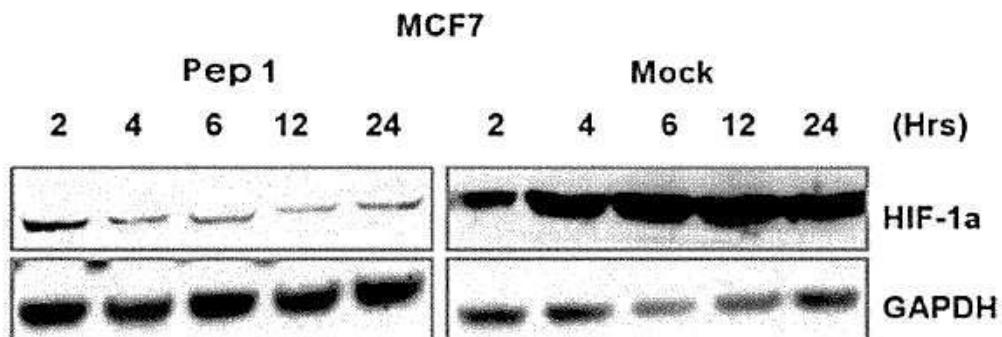
[0168] PEP 1을 농도 별(0.05, 0.5, 5 μ M)로 처리하고 VEGF-A(10 ng/mL)로 18시간 자극시킨 후, 인서트를 methanol로 고정시키고 cotton-tipped swab을 이용하여 인서트 윗부분의 침윤하지 않은 세포는 제거하였다. Giemsa stain 용액 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 염색 하고 현미경 (x200)으로 서로 다른 6군데를 관찰하여 침윤세포를 현미경으로 직접 계수하였다(도 6a).

[0169] PEP 1의 VEGF-A에 의한 세포 침윤을 강력하게 억제함을 확인하였다 (도6b).

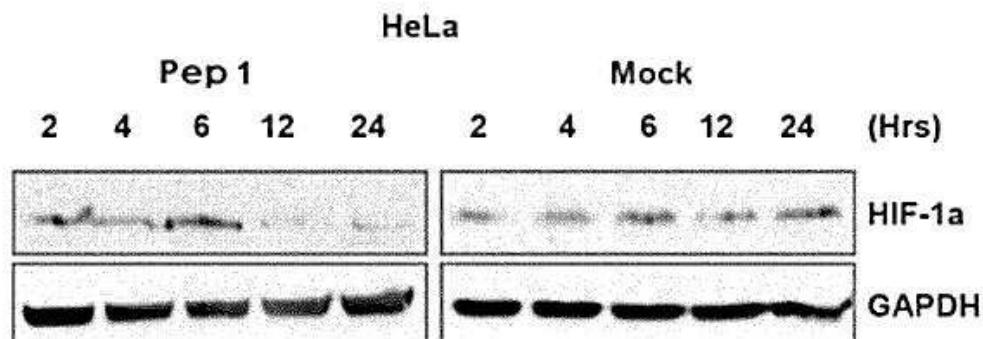
[0170] 실험 결과의 통계학적 유의성은 student's t test로 분석하였으며, p value가 0.05미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

도면

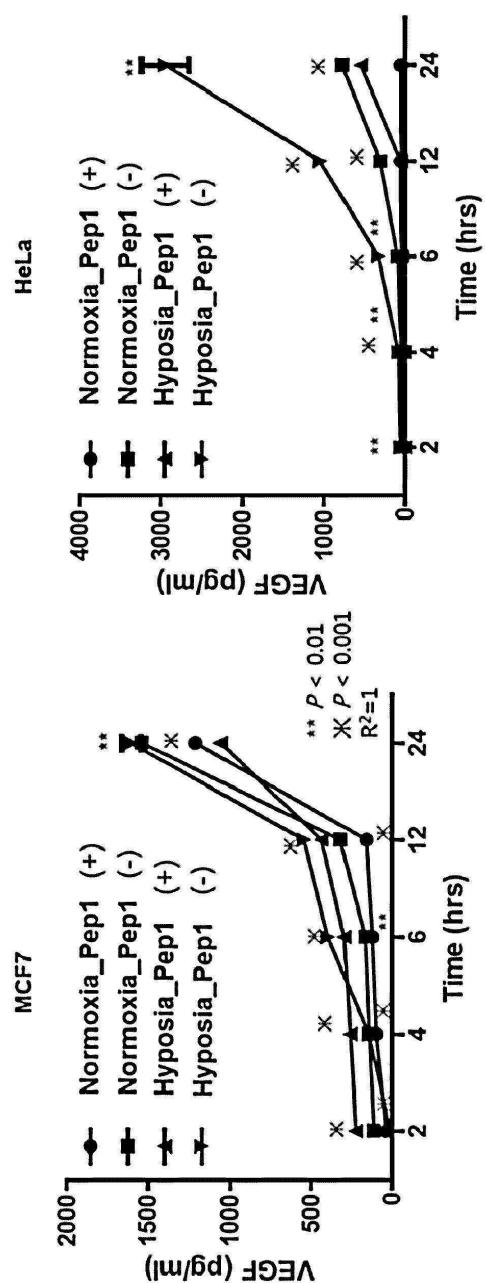
도면1



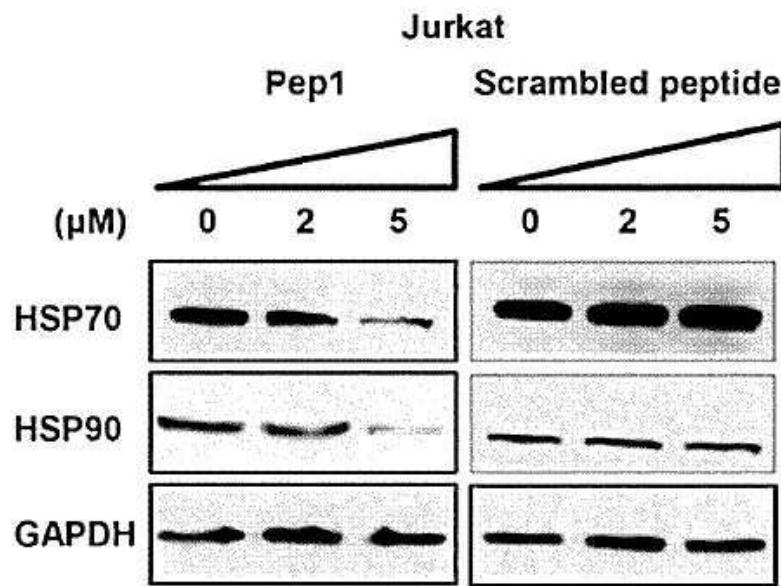
도면2



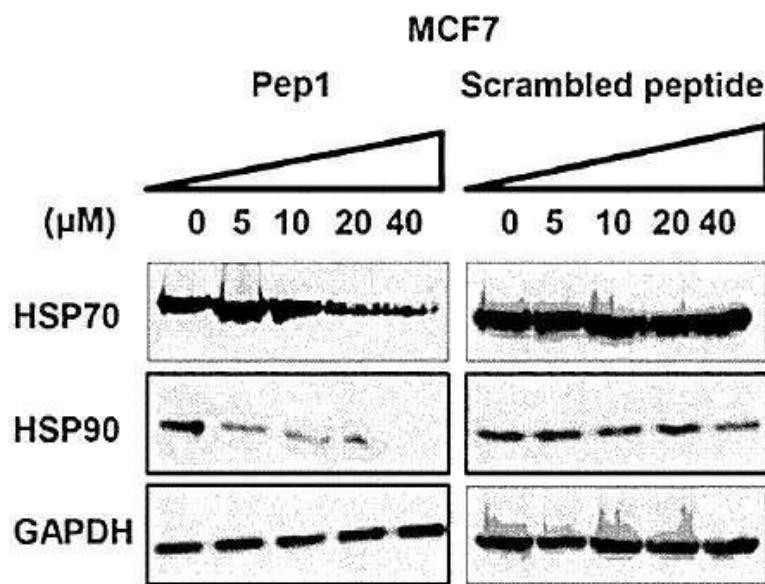
도면3



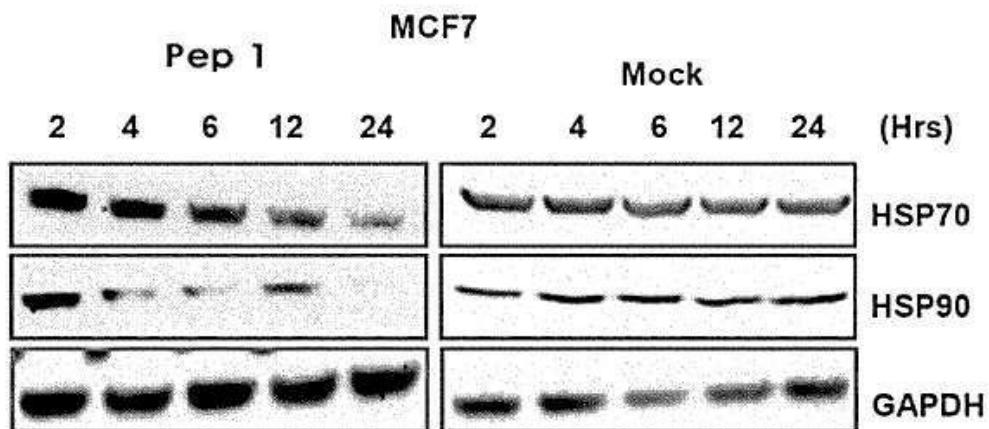
도면4



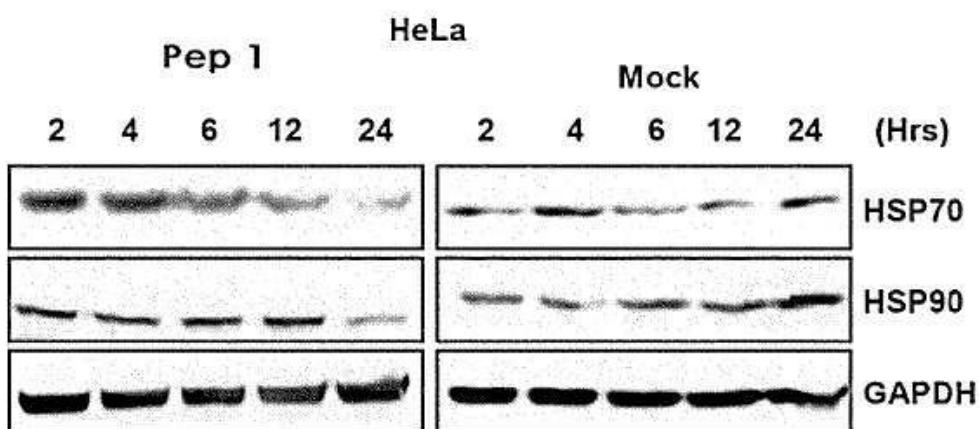
도면5



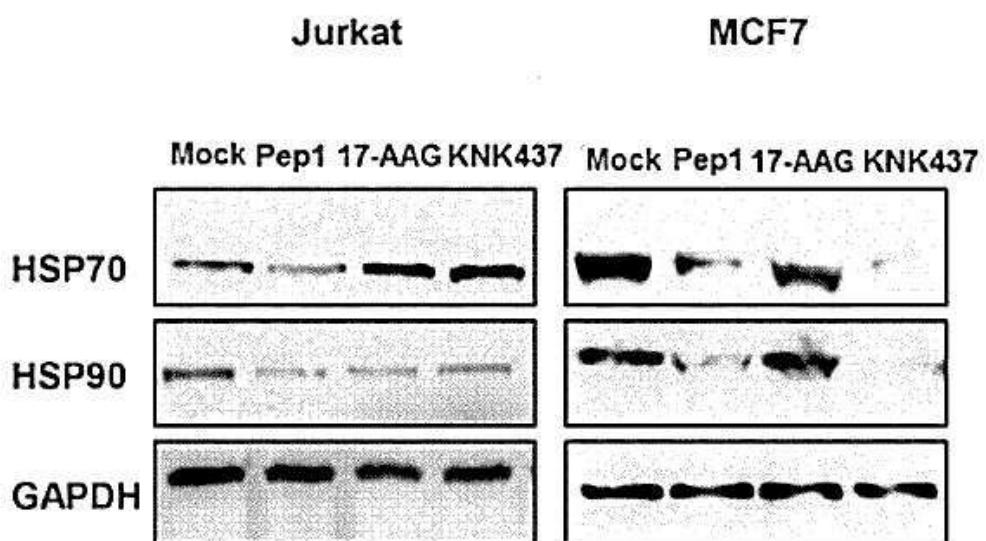
도면6



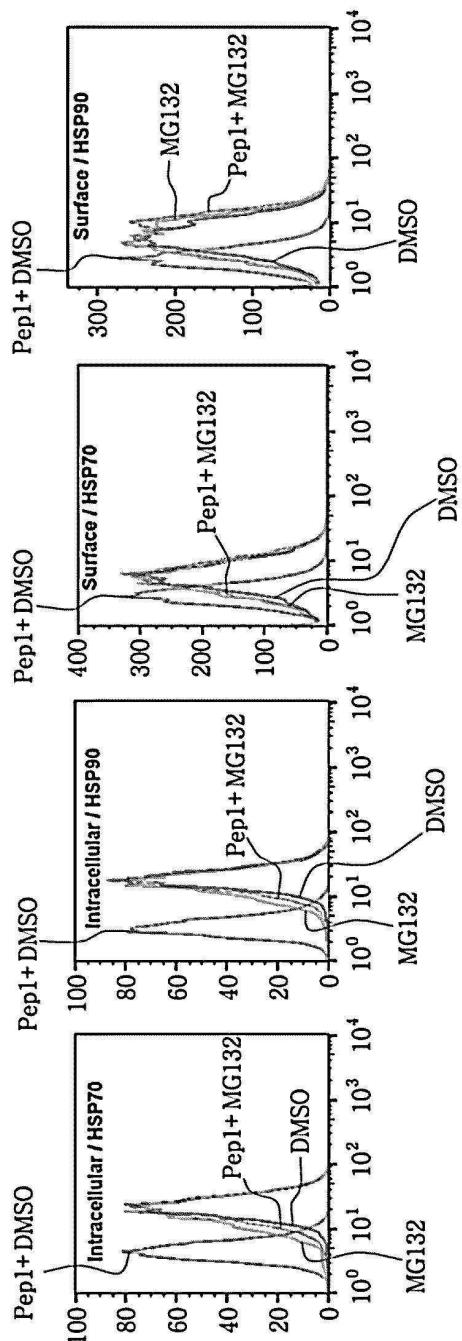
도면7



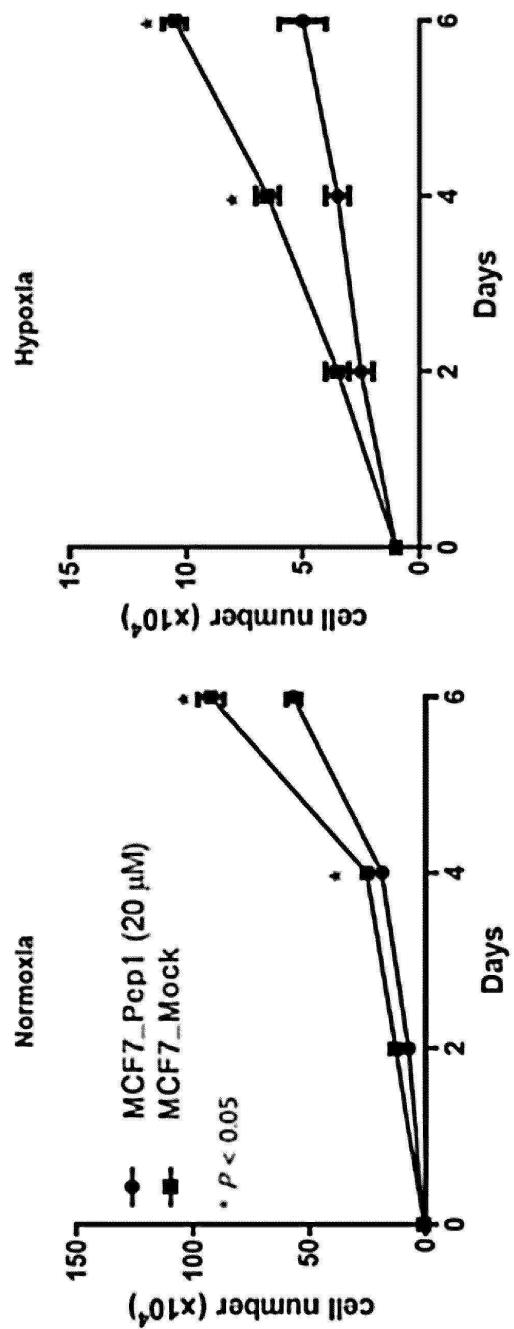
도면8



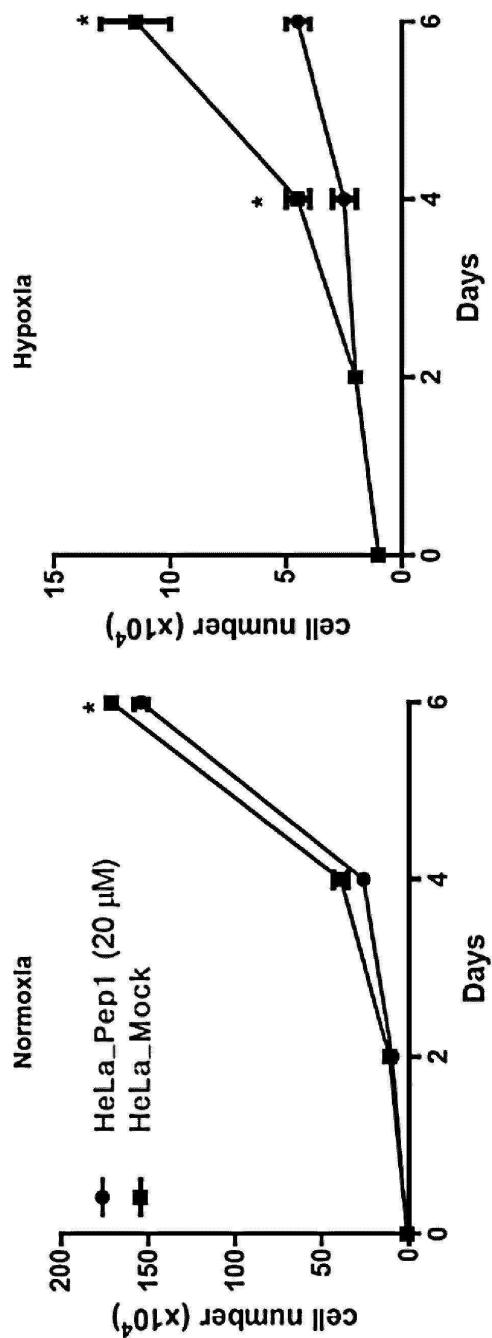
도면9



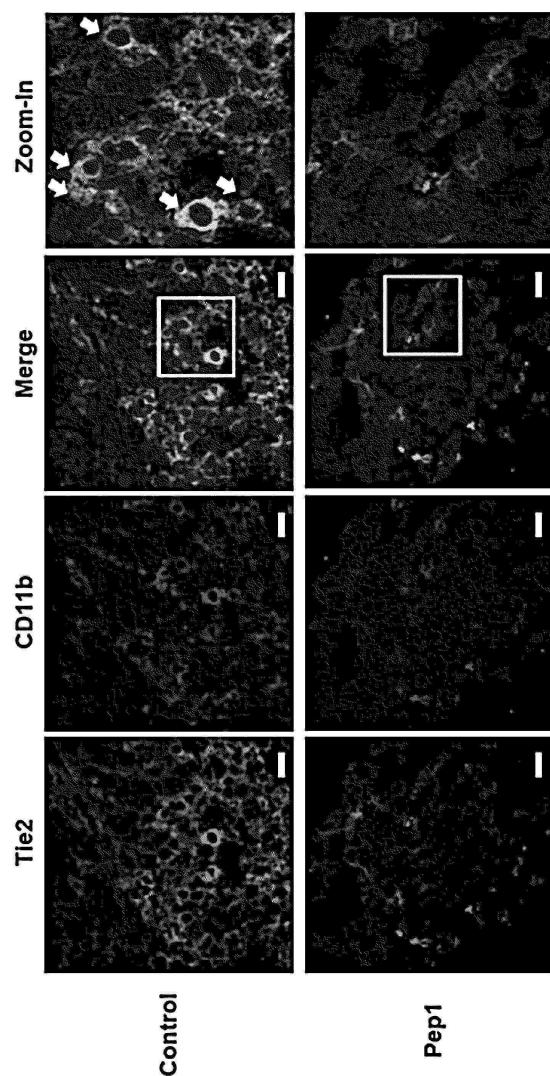
도면 10



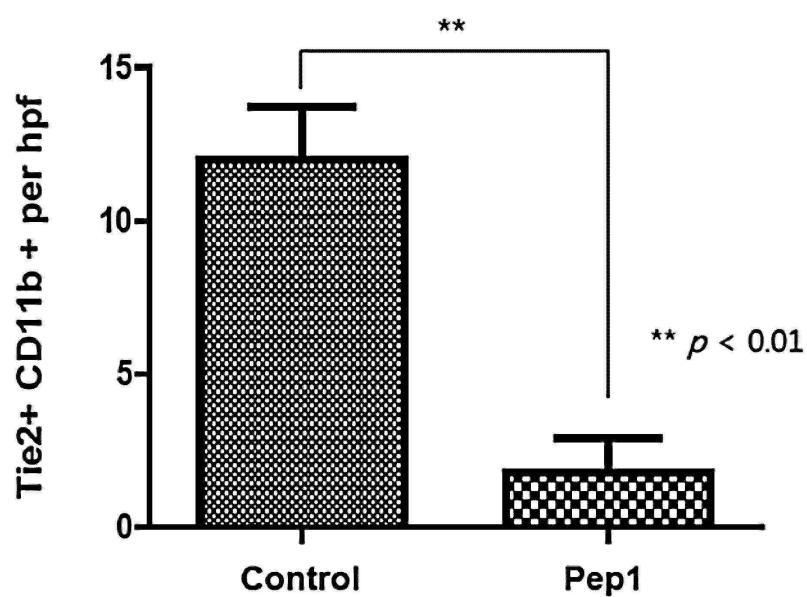
도면 11



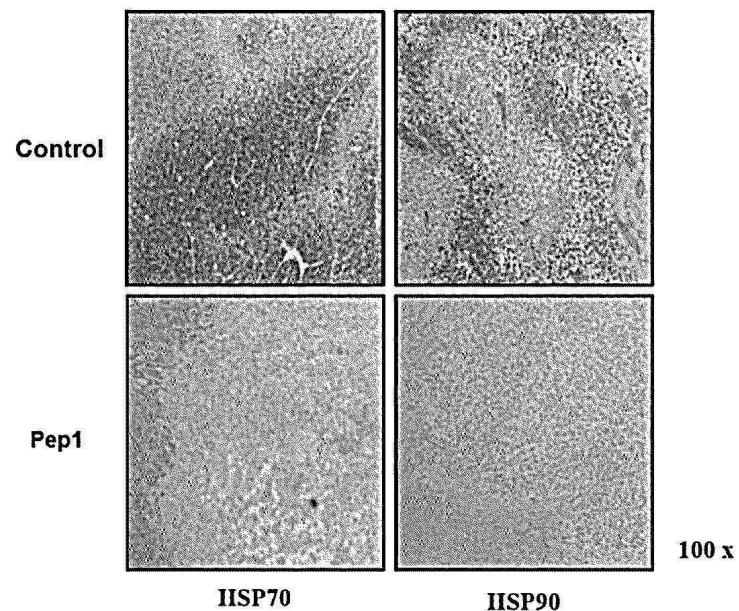
도면12



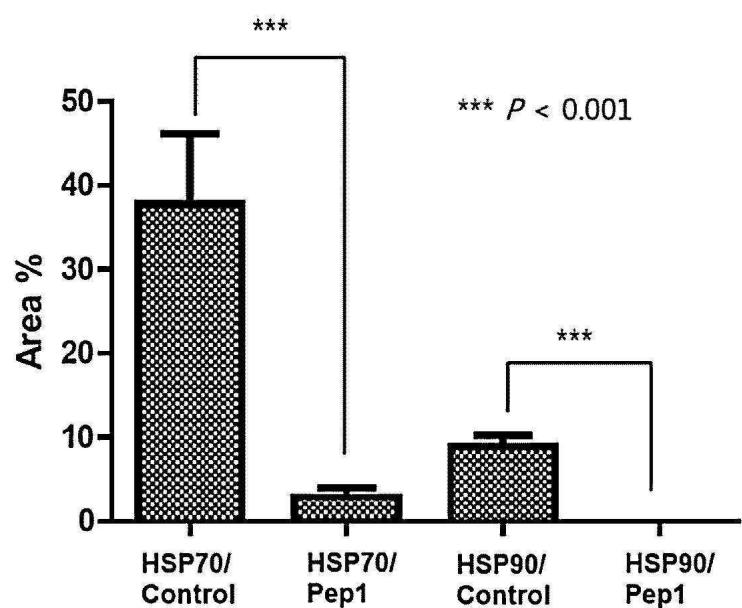
도면13



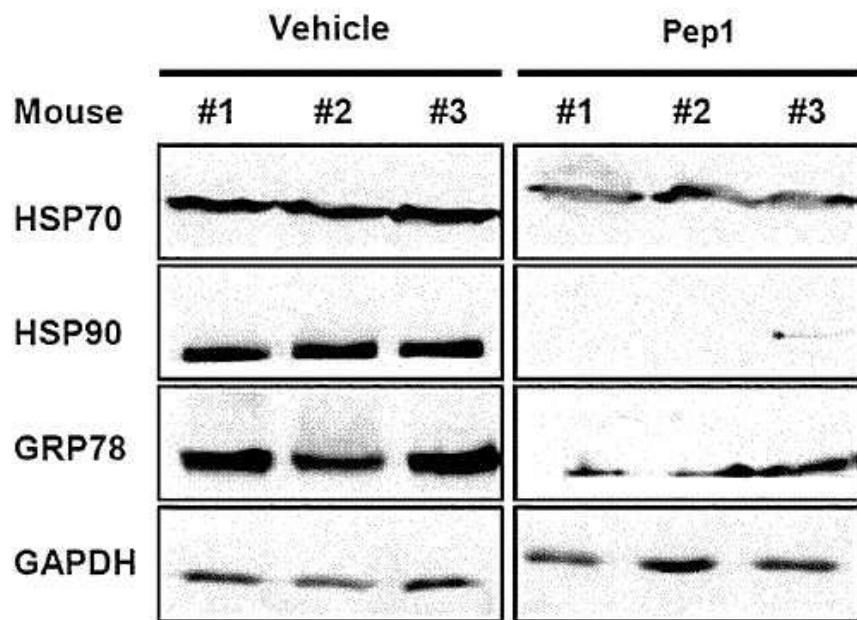
도면14



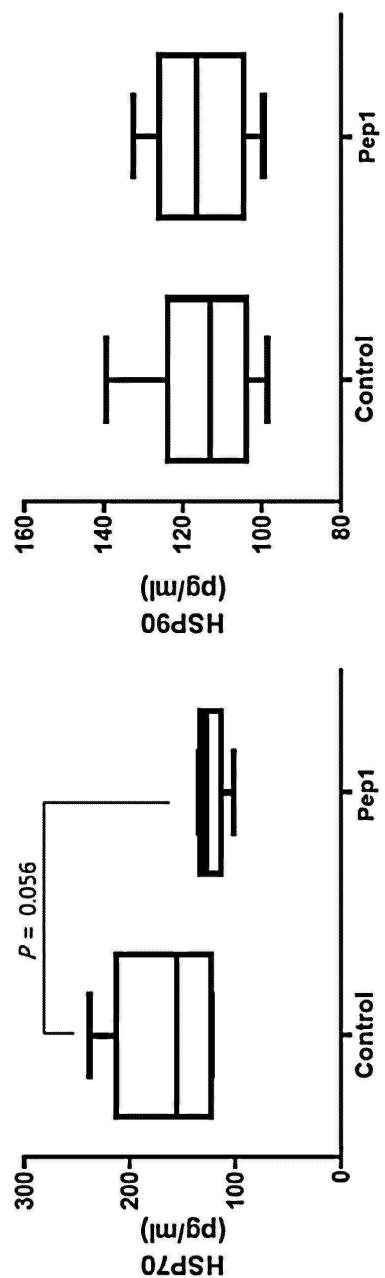
도면15



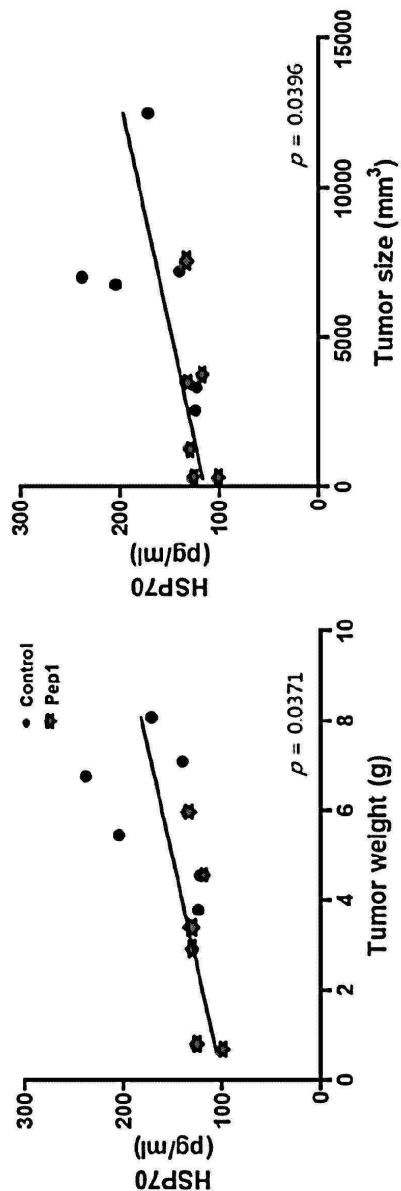
도면16



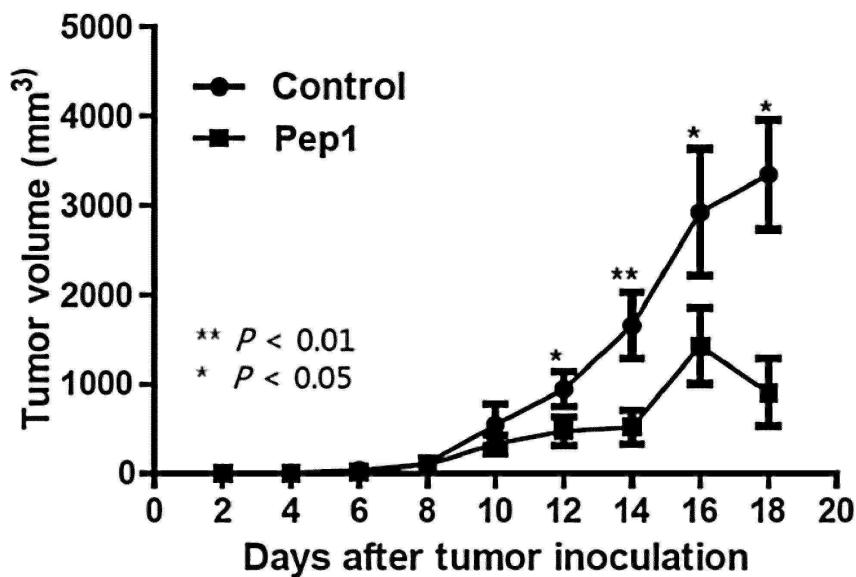
도면17



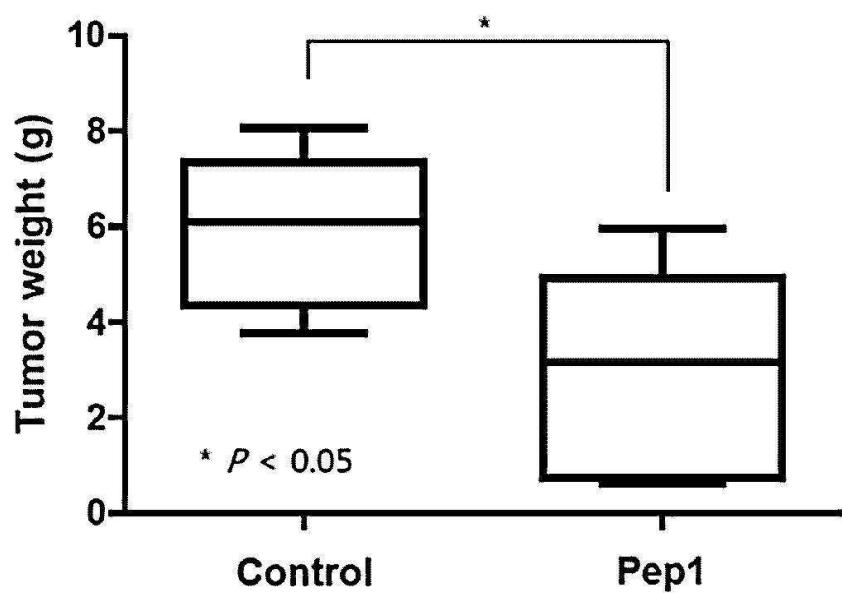
도면 18



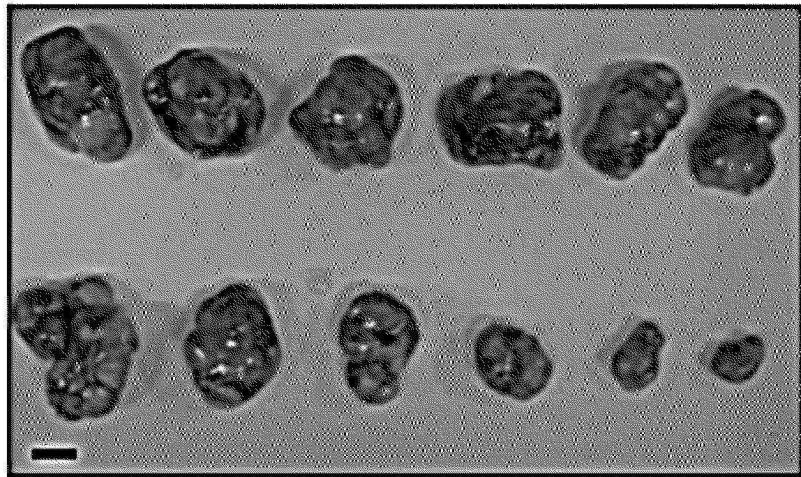
도면19



도면20



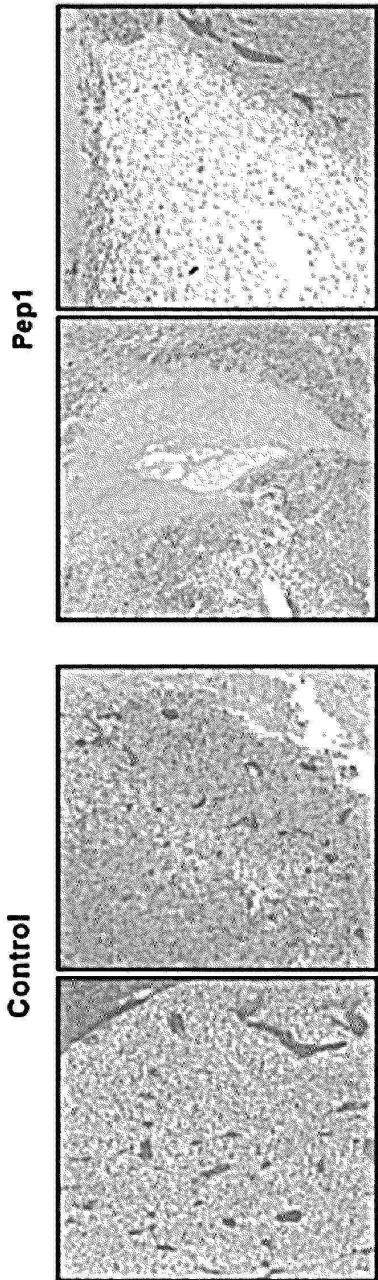
도면21



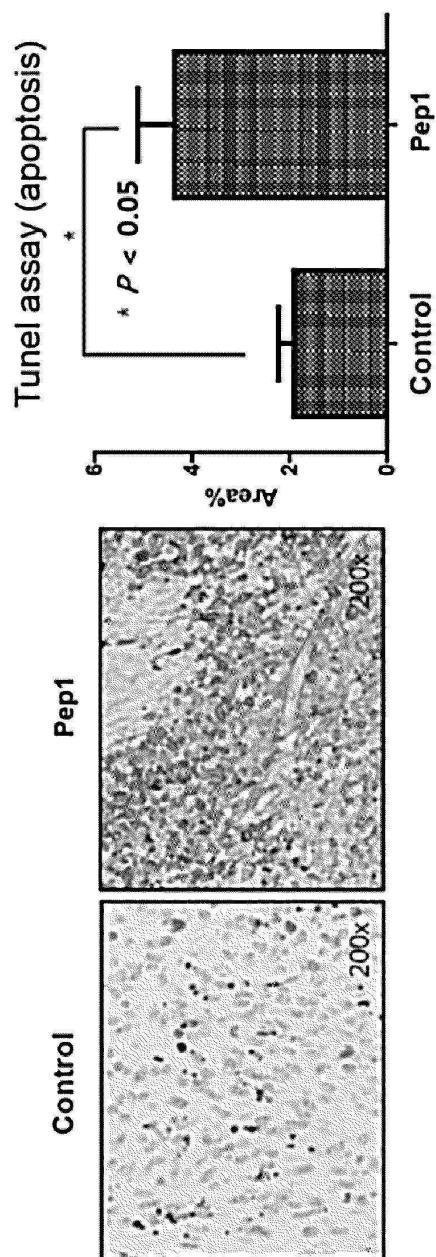
Vehicle

Pep1

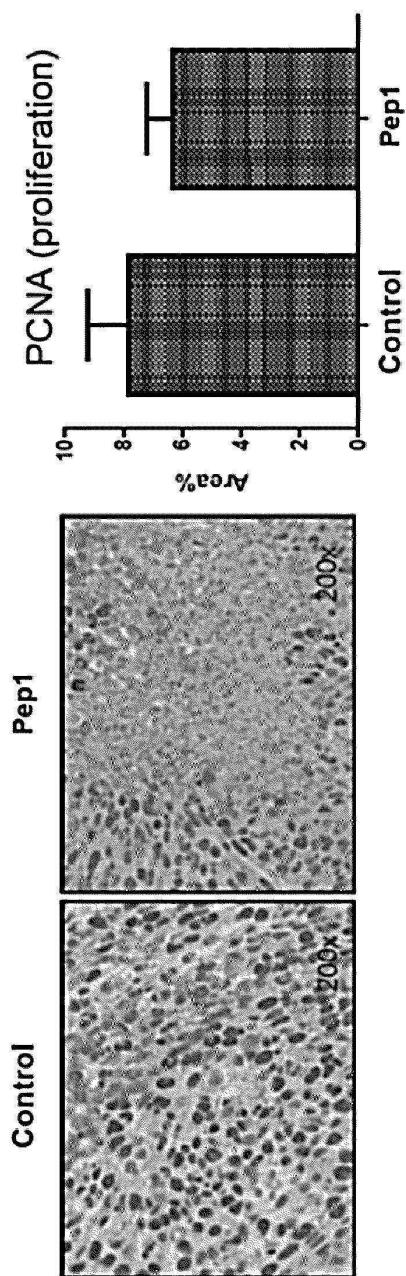
도면22



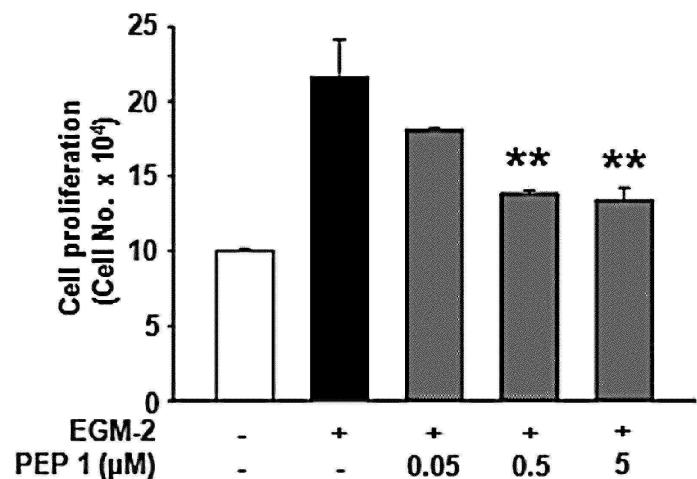
도면23



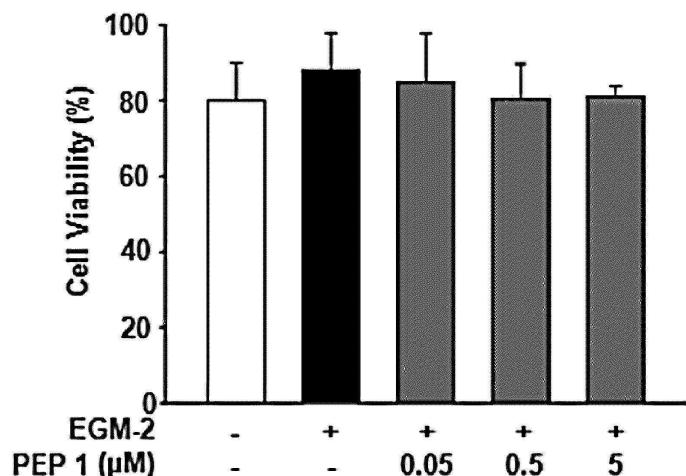
도면24



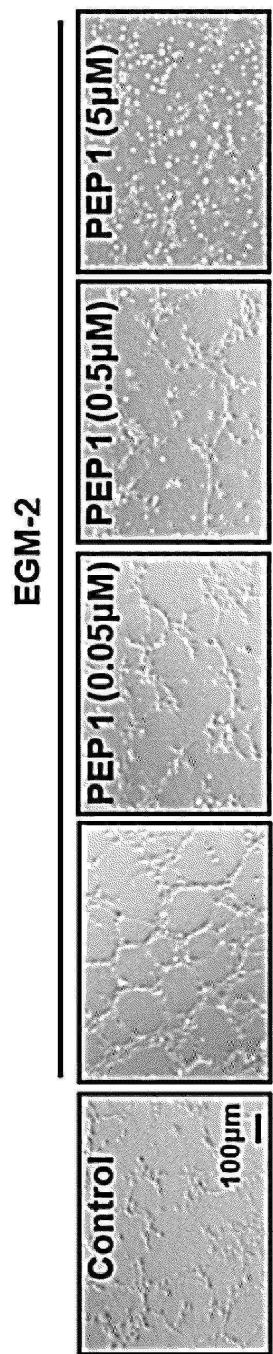
도면25a



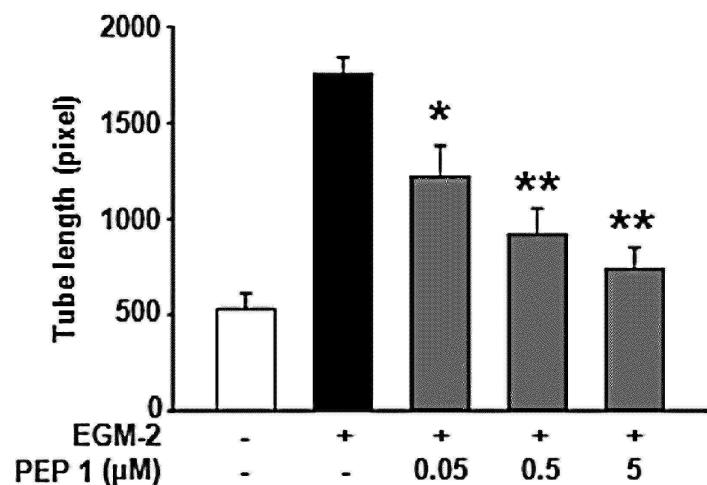
도면25b



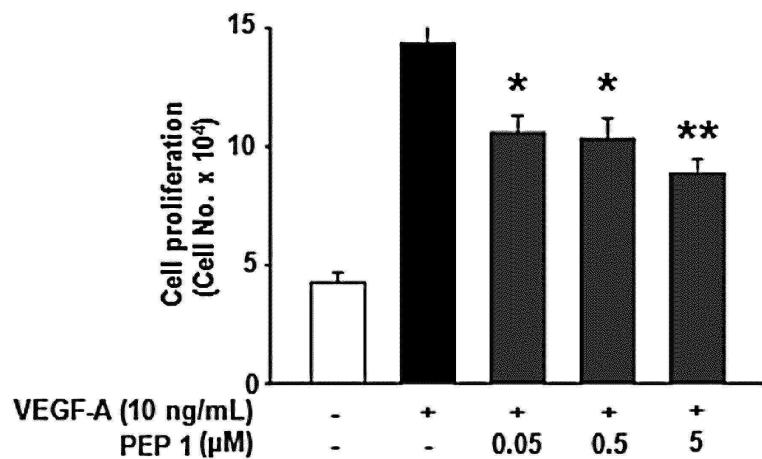
도면26a



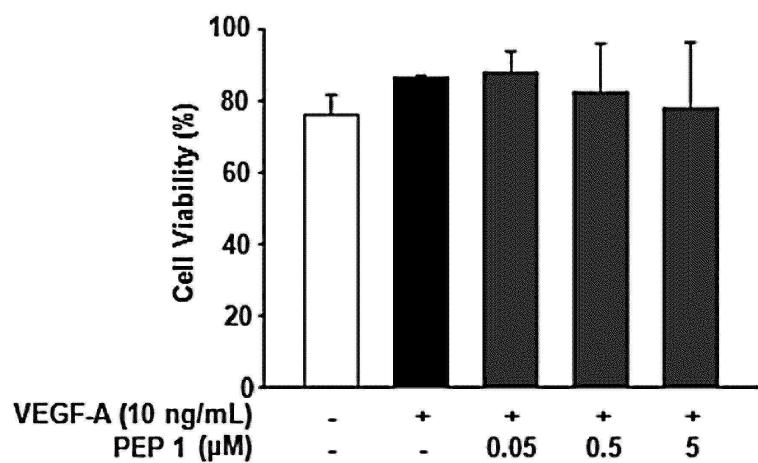
도면26b



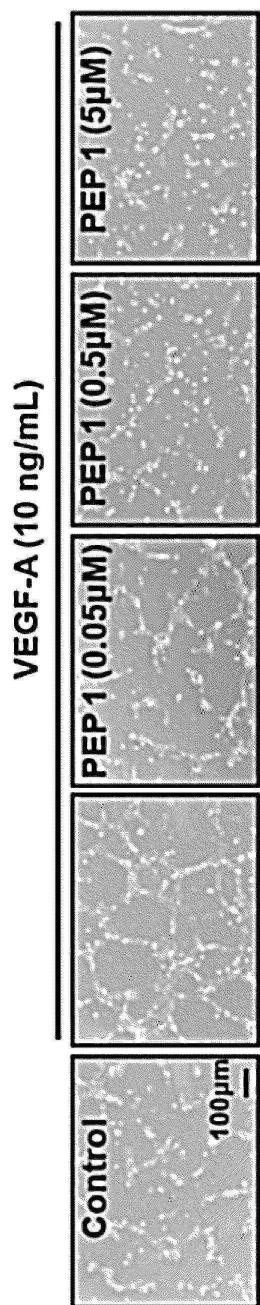
도면27a



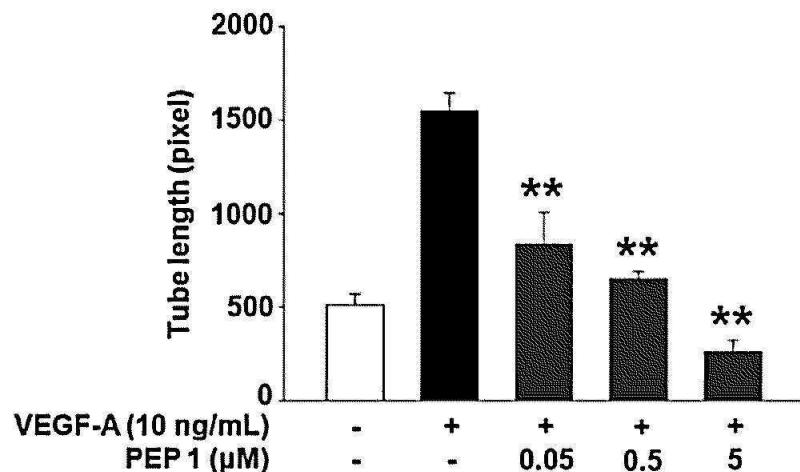
도면27b



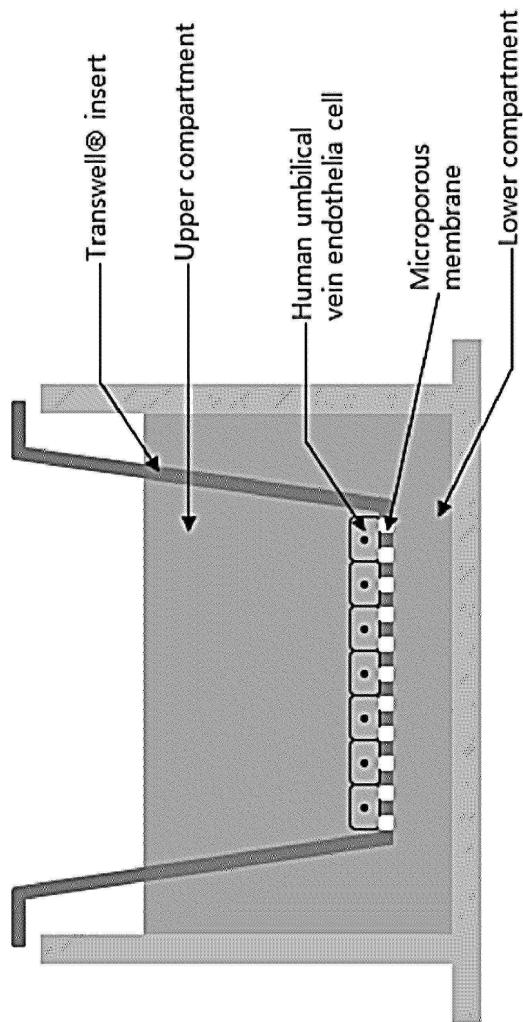
도면28a



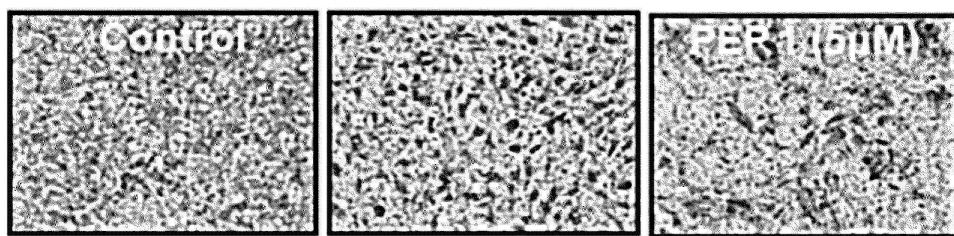
도면28b



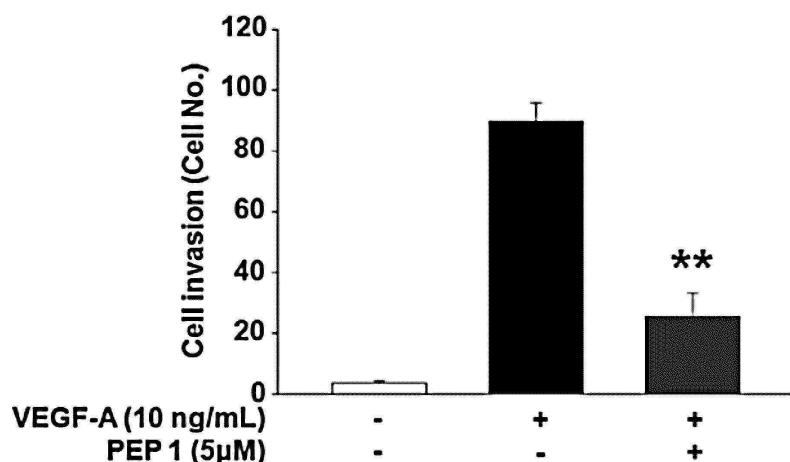
도면29



도면30a

VEGF-A (10 ng/mL)

도면30b

**서 열 목 록**

- <110> KAEL-GEMVAX CO., LTD.
KIM, Sangjae
- <120> A Peptide having Angiogenesis Inhibition Activity and the Composition Comprising the Same
- <130> OF14P183PCT
- <150> KR 10-2013-0142897
- <151> 2013-11-22
- <150> KR 10-2014-0020605
- <151> 2014-02-21
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10 15

<210> 2

<211> 1132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser

1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly

20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg

35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro

50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu

65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val

85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Pro Pro

100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr

115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Arg Arg Val

130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val

145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr

165 170 175

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly

180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg

195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg

210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg

225 230 235 240

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp

245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val

260 265 270

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala

275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His

290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro

305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly

325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro

340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser

355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln

370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His

385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg

405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln

420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu

435	440	445
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe		
450	455	460
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser		
465	470	475
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser		
485	490	495
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met		
500	505	510
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys		
515	520	525
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe		
530	535	540
Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe		
545	550	555
560		
Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr		
565	570	575
Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His		
580	585	590
Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln		
595	600	605
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile		
610	615	620
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val		
625	630	635
640		
Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser		
645	650	655
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg		
660	665	670
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg		
675	680	685
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro		

690	695	700
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile		
705	710	715
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln		
725	730	735
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His		
740	745	750
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp		
755	760	765
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser		
770	775	780
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu		
785	790	795
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His		
805	810	815
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro		
820	825	830
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp		
835	840	845
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu		
850	855	860
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala		
865	870	875
Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys		
885	890	895
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu		
900	905	910
Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe		
915	920	925
Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser		
930	935	940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
 945 950 955 960
 Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
 965 970 975
 Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
 980 985 990

 Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
 995 1000 1005
 Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln
 1010 1015 1020
 Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
 1025 1030 1035 1040
 Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
 1045 1050 1055
 Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp

 1060 1065 1070
 Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
 1075 1080 1085
 Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
 1090 1095 1100
 Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
 1105 1110 1115 1120
 Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
 1125 1130