



- (51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005256
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 18일 (18.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0069073 2015년 5월 18일 (18.05.2015) KR
- (71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR).
- (72) 발명자: 이병현 (LEE, Byung-Heon); 42038 대구시 수성구 동원로 135, 103동 1106호 (만촌동, 메트로폴레스 1단지아파트), Daegu (KR). 정현경 (JUNG, Hy-

un-Kyung); 42634 대구시 달서구 용산로 160, 106동 503호 (용산동, 우방죽전타운), Daegu (KR).

- (74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06141 서울시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

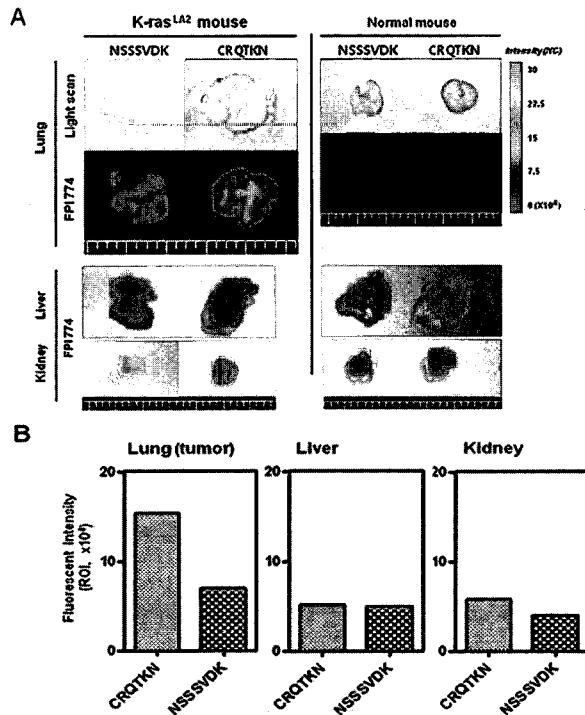
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CANCER CELL-TARGETING PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 암 세포 표적용 펩타이드 및 이의 용도

[도 6]



(57) Abstract: The present invention relates to a cancer cell-targeting peptide and a use thereof and, more specifically, to a peptide specifically binding to cancer cells and composed of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 4, a composition for cancer cell detection containing the same as an active ingredient, a composition for drug delivery containing the same as an active ingredient, and a composition for imaging containing the same as an active ingredient. The peptide of the present invention is effective in that the peptide specifically binds to cancer cells to detect or image cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

(57) 요약서: 본 발명은 암세포 표적용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 명세서에서는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어지는 암세포와 특이적으로 결합하는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 암세포 검출용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 영상화용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 펩타이드는 암세포에 특이적으로 결합하여, *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 암세포를 검출하거나 영상화 할 수 있어 효과적이다.



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, **공개:**

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).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】**【발명의 명칭】**

암 세포 표적용 펩타이드 및 이의 용도

【기술분야】

본 출원은 2015년 5월 18일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2015-0069073 호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 암세포 표적용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 명세서에서는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어지는 암세포와 특이적으로 결합하는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 암세포 검출용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 영상화용 조성물 등에 관한 것이다.

【배경기술】

전세계적으로 암은 가장 일반적인 질환 중에 하나이며, 현재 일반적으로 수행되어지고 있는 치료법으로는 수술요법, 방사선요법, 화학요법이 있으며, 암의 분자적인 메커니즘이 연구가 활발히 진행되어지고 있지만, 현재 개발된 치료법들의 상당수가 외과적인 수술에 의존하고 있다. 하지만 최근에는 소분자 저해제(small molecule inhibitor), 단일항체(monoclonal antibody), 암세포를 표적으로 하는 짧은 펩타이드(short targeting peptide) 등과 같은 다양한 표적치료제(targeted therapeutic agents)가 개발되어 치료제로서 활용되어지고 있다(Corti A et al., Blood. 2008;112:2628-35). 특히 짧은 표적 펩타이드(short targeting peptide)는 조직 투과성이 높으며, 독성과 면역반응이 작아 효과적인 항암제로서 높은 가능성을 가지고 있다(Yang W et al., Clin Cancer Res. 2008;14:5494-02).

펩타이드 및 단백질의 파지 디스플레이(phage display)는 타겟 세포에 대한 특이적인 리간드(ligand)를 확인하는데 매우 유용한 방법이며, 인비트로(in vitro) 및 인비보(in vivo)상에서 암세포를 표적으로 하는 펩타이드 및 단백질을 발굴하는데 널리 사용되어지고 있다. 대표적으로 쥐모델의 파지 라이브러리(phage library)에서 인비보 파지 스크리닝(in vivo phage screening)을 이용하여 RGD, GSL 및 NGR 모티프가 혈관신생이 활성화된 상피세포 종양에서 활성화되는 인테그린(integrin), VGF 수용체, MMP 등에 특이적으로 결합하며(Pasqualini R et al., Ann Hematol.

2002;81: S66-S67), 전립선 혈관의 IL11 수용체 및 유방암의 미소혈관에서 발견되는 것을 확인하였다(Arap W et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;1527-31). 하지만 이러한 연구결과들은 초기 종양이 악성종양으로 진행되는 단계에서 일시적으로 나타나는 패턴들을 선택적으로 확인 가능한 파지를 제공하지 못하였다. 따라서 암세포의 각 단계에서 특이적으로 발견되는 표적을 타겟으로 하는 펩타이드 및 단백질의 개발이 필요한 상황이다.

한편, 약물을 종양에 선택적으로 전달하는 약물체계 또는 표적 치료는 많은 관심을 받아온 기술이다. 왜냐하면 동일 양의 항암제를 사용하더라도 약의 효력을 증가시킬 수 있고 동시에 정상조직에 미치는 부작용을 크게 줄일 수 있기 때문이다. 또한 유전자 치료에 적용할 경우 바이러스를 암 세포에 선택적으로 전달시킴으로써 치료 효율을 올리고 심각한 부작용을 줄일 수 있다. 이를 위해 지금까지는 주로 종양세포에 특이한 항원 및 이를 표적하는 항체를 개발하여 왔다. 그러나 항체의 경우 면역반응의 우려 및 조직 내 침투의 낮은 효율성 등의 문제가 존재한다. 반면 펩타이드의 경우는 분자량이 작아 면역반응의 우려가 적고 조직내 침투가 용이한 것이 장점이다. 따라서, 암 표적 펩타이드를 기존의 항암제와 연결하게 되면 종양에 선택적으로 약물을 전달하는 지능형 약물전달체로 활용될 수 있으므로, 암 표적 펩타이드의 개발이 요구되고 있다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에 본 발명의 발명자들은 in-vitro(및 ex-vivo)를 비롯하여 in vivo상에서도 적용 가능한 암세포를 특이적으로 표적할 수 있는 펩타이드를 발굴하였고, 상기 펩타이드가 in vitro 및 in vivo 상에서 암세포 검출 및 영상화에 효과적인 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 서열로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는, 암 세포(tumor cell)와 특이적으로 결합하는 펩타이드와 이의 용도 그리고 이용 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell)

표적용 펩타이드를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 펩타이드를 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 검출용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 상기 펩타이드를 시료와 혼합하는 단계; (b) 미결합되거나 비특이적으로 결합된 상기 펩타이드를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 펩타이드의 결합 여부 및 위치를 확인하는 단계를 포함하는 암 세포(tumor cell)의 검출 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 특이적 약물 전달용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 영상화용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 펩타이드 및 이와 결합된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드 및 이와 결합된 항암제를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드의 항암제 제조를 위한 용도를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 명세서에서 용어 "펩타이드(peptide)"는 "단백질" 또는 폴리펩타이드(polypeptide)"와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

본 발명에서 "폴리뉴클레오티드" 또는 핵산은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다.

본 명세서에서 용어 "발현(expression)"이라 함은 세포에서 단백질 또는 핵산의 생성을 의미한다.

본 명세서에서 용어 암(tumor)이란 대개 조절되지 않은 세포 성장/증식의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내며, 종양으로 대체되어 사용될 수 있다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 직장결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 질환, 및 다양한 종류의 두경부암을 포함한다. 본 명세서에서 암이란 바람직하게는 폐암, 췌장암, 대장암, 담도암, 담낭암, 혈액암일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 폐암, 혈액암일 수 있다.

본 명세서에서 용어 이라 함은 Kirsten주 마우스육종바이러스(Ki-MSV)에 있

는 래트 유래의 암 유전자로, 사람의 고형 암의 몇 가지에서는 K-ras 유전자에 변이가 발생하면, 세포의 암화와 깊은 관계가 있는 것으로 연구되어 있다.

본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다:

A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp):아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신; M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라긴; O(Ply)피롤라이신; P(Pro): 프롤린; Q(Gln): 글루타민; R(Arg): 아르기닌; S(Ser): 세린; T(Thr): 트레오닌; U(Sec):셀레노시스테인, V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 티로신.

본 발명은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드를 제공한다.

서열번호 1 내지 4로 표시되는 각각의 펩타이드는 암 세포와 특이적으로 결합하며, 바람직하게 본 발명의 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드일 수 있다.

상기한 바와 같이 특수 조합의 아미노산 서열로 구성되는 본 발명의 펩타이드는 암세포를 특이적으로 표적하며, 암세포의 세포막(cell membrane)에 결합하는 것이 특징이다.

본 발명의 암세포 특이적 펩타이드는 in vitro 및 in vivo에서 다양한 종류의 조직 및 세포에 대하여 적용 가능하며, 암에 대한 정확한 정보를 제공할 수 있다.

본 발명에서 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암세포일 수 있으며, 더욱 자세하게는 폐암 세포, 췌장암 세포, 대장암 세포, 담도암 세포 또는 담낭암 세포일 수 있다. 또한, 더욱 바람직하게는 폐암 세포일 수 있다.

이와 같은 본 펩타이드의 효과는, 본 명세서의 실시예에 잘 나타나있다.

본 발명의 일 실시예에서는 파지 라이브러리의 스크리닝을 통하여 암 세포에

특이적으로 결합는 CKSRKDGAC(4R-3, 서열번호 1), CMPKRPSSC(4R-16, 서열번호 2), CRGTAEG(4R-21, 서열번호 3), CRQTKN(5R-7, 서열번호 4)의 4종류의 펩타이드를 발굴하고(실시예 2 참조), 상기 펩타이드들의 암 세포에 대한 결합 특이성을 확인하였다(실시예 3 참조). 그 결과 본 발명의 펩타이드들은 암세포가 존재하지 않는 간, 비장 등의 기관에서는 발견되지 않았으며, 암세포가 존재하는 폐 기관에서 발견되었다. 즉, 암 세포에 특이적으로 결합하였다. 또한 *in vitro* 뿐만 아니라 IR(허혈-재관류) 동물 모델에 대한 *in vivo* 실험에서도 암 세포의 이미징이 가능하였다(실시예 4 참조).

본 발명의 펩타이드는 천연으로부터 유래될 수도 있으며, 공지의 펩타이드 합성 방법(유전공학적 방법, 화학적 합성)을 이용하여 합성될 수 있다. 유전공학적 방법에 의한 작제는, 예를들어, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드 또는 이의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산(예를 들어, 서열번호 5내지 8의 폴리뉴클레오티드)을 작제한다. 상기 핵산은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems 사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 작제된 핵산은 이에 작동가능하게 연결되어 (operatively linked) 핵산의 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 핵산이 발현되기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 핵산에 의해 발현된, 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 "실질적으로 순수한 펩타이드(substantially pure peptide)"라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주세포로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 펩타이드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., *Molecular Cloning; A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; *Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology*, Guthrie Fink(eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*,

255:12073-12080, 1990.

또한, 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성(Creighton, Proteins; Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다 (Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Atherton Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

또한, 본 발명의 펩타이드는 천연형 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명의 펩타이드의 변이체란 본 발명의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환, 아미노산 유사체의 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 펩타이드를 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).

경우에 따라서, 본 발명의 펩타이드는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

본 발명은 상기 펩타이드를 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

상기 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 펩타이드를 암호화할 수 있는 한 폴리뉴클레오타이드의 염기 조합이 특별히 제한되지 않는다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함하여 단쇄 또는 이중쇄의 형태의 핵산분자로서 제공될 수 있다.

바람직하게 본 발명의 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있으며, 예를 들어 서열번호 5 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클

레오티드는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 것 일 수 있으며, 서열번호 2의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 것 일 수 있고, 서열번호 3의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 것 일 수 있으며, 서열번호 4의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 8의 염기서열을 가지는 것 일 수 있으나, 이에 제한 되지 않는다.

본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 벡터는 통상의 클로닝 벡터 또는 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(촉진유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제기원을 포함한다.

본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

상기 벡터로 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격

유전자전달법(electroporation), 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection) 및 리포솜 매개법(liposome-mediated method)을 이용할 수 있다.

상기 용어형질전환체는숙주세포등과 호환성 있게 사용될 수 있으며, 임의의 수단(예: 전기충격법, 칼슘 포스파타제 침전법, 미세주입법, 형질전환법, 바이러스 감염 등)에 의해 세포 내로 도입된 이중성 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다.

본 발명에서 상기 형질전환체는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 종류의 단세포 유기체, 예컨대 각종 박테리아 (예컨대, Clostridia속, 대장균, 등) 등의 원핵세포 미생물, 효모 등의 하등 진핵세포 미생물과 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 당업자가 목적하는 바에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용할 수 있다. 일례로 본 발명에서 형질전환체로 이용되는 미생물은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속 미생물(*Streptomyces* spp.), 슈도모나스 속 미생물(*Pseudomonas* spp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스 속 미생물(*Staphylococcus* spp.), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 등 일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 검출용 조성물을 제공한다.

바람직하게 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 검출용 조성물을 제공한다.

본 발명에서 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암세포일 수 있으며, 더욱 자세하게는 폐암 세포, 췌장암 세포, 대장암 세포, 담도암 세포 또는 담낭암 세포일 수 있다. 또한, 더욱 바람직하게는 폐암 세포일 수 있다.

본 발명의 상기 펩타이드의 암 세포(tumor cell) 결합 여부 확인, 검출 및

정량을 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 펩타이드는 표지된 상태로 제공될 수 있다. 즉, 검출가능한 표지에 링크(예: 공유 결합 또는 가교)되어 제공될 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 발색효소(예: 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제), 방사성 동위원소(예: ^{18}F , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{67}Ga), 크로모포어(chromophore), 발광물질 또는 형광물질(예: FITC, RITC, 형광단백질(GFP(Green Fluorescent Protein); EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein); DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein); CFP(Cyan Fluorescent Protein), CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein), YFP(Yellow Fluorescent Protein), Cy3, Cy5 및 Cy7.5), 자기공명 영상물질(예: Gadolinium(Gd, 가도리늄), 상자성입자(super paramagnetic particles) 또는 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles))일 수 있다.

표지에 따른 검출 방법은 당업계에 널리 알려져 있으나, 예를 들어 다음과 같은 방법에 의해 수행될 수 있다. 만약 검출가능한 표지로 형광물질을 이용하는 경우에는 면역형광염색법을 이용할 수 있다. 예컨대, 형광물질로 표지된 본 발명의 펩타이드를 시료와 반응시키고 미결합 또는 비특이적인 결합 산물을 제거한 다음 형광현미경 하에서 펩타이드에 의한 형광을 관찰할 수 있다. 또한 검출가능한 표지로 효소를 이용하는 경우에는 효소반응을 통한 기질의 발색반응에 의해 흡광도를 측정하고, 방사선 물질인 경우에는 방사선 방출량을 측정함으로써 수행할 수 있다. 아울러, 검출된 결과는 검출표지에 따른 공지된 영상화 방법에 따라 영상화될 수도 있다.

본 발명은 (a) 상기 펩타이드를 시료와 혼합하는 단계; (b) 미결합되거나 비특이적으로 결합된 상기 펩타이드를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 펩타이드의 결합 여부 및 위치를 확인하는 단계를 포함하는 암 세포(tumor cell)의 검출 방법을 제공한다.

이 때, 상기 (c) 단계에서 본 발명의 펩타이드의 암 세포(tumor cell)와 결합 여부 및 위치를 확인하기 위하여 수행되는 펩타이드의 검출 방법은 상기에서 기재한 바 또는 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.

본 발명에서 상기 용어시료는 생물학적 시료를 의미하는 것으로서, 혈액 및

생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직 배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물로부터 수득될 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.

또한 본 발명의 펩타이드는 암세포(tumor cell)와 특이적으로 결합하는 효과가 뛰어나므로, 약물을 상기 암 세포에(궁극적으로 *in vivo* 상에서 상기 K-ras 암 세포가 존재하는 질환성 부위에) 선택적으로 전달하는 지능형 약물 전달체로서 사용할 수 있다.

본 발명에서 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암세포일 수 있으며, 더욱 자세하게는 폐암 세포, 췌장암 세포, 대장암 세포, 담도암 세포 또는 담낭암 세포일 수 있다. 또한, 더욱 바람직하게는 폐암 세포일 수 있다.

본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 특이적 약물 전달용 조성물을 제공한다.

본 발명의 상기 약물 전달용 조성물은, 암 세포에 특이적으로 약물을 전달하는 것이 가능하며, 상기 암은 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 K-ras의 돌연변이에 의한 암일 수 있으며, 구체적으로 폐암, 췌장암, 대장암, 담도암, 담낭암 또는 백혈병일 수 있다.

좀 더 구체적으로, 상기 약물 전달용 조성물에 포함되는 본 발명의 펩타이드를 종래 항-종양성(항암성) 질환 제제 등의 약제와 연결하여 치료에 이용한다면 본 발명의 펩타이드에 의해 상기 제제가 암세포에만 선택적으로 전달되기 때문에 약의 효력을 증가시킬 수 있고 동시에 정상조직에 미치는 부작용을 현저히 줄일 수 있다.

본 발명의 펩타이드에 연결 될 수 있는 항-종양성 질환 제제는 공지된 종양 치료물질이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 파클리탁셀, 독소루비신, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포

사이드(teniposide), 비산트렌(bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴(cisplatin), 5-플로오우라실(5-fluorouracil), 아드리아마이신(adriamycin), 메토트렉세이트(methotrexate), 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 니트로젠 무스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase), 알테플라제(alteplase), 안지오텐신(angiotensin) II 억제제, 알도스테론(aldosterone) 수용체 억제제, 에리트로포이에틴(erythropoietin), NMDA (N-methyl-d-aspartate) 수용체 억제제, 로바스타틴(Lovastatin), 라파마이신(Rapamycin), 셀레브렉스(Celebrex), 티클로핀(Ticlopin) 마리마스타트(Marimastat) 및 트로케이드(Trocade) 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것 일 수 있다.

상기 제제와 본 발명의 펩타이드의 연결은 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 공유 결합, 가교 등을 통해 수행될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 펩타이드는 필요하다면 그 활성이 소실되지 않는 범위에서 화학적으로 수식(modification)될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 펩타이드의 양은 결합되는 상기 치료제의 종류 및 양에 따라 달라질 수 있다.

상기 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 펩타이드는 표적 기관에 결합하였는지 여부 확인, 검출 및 정량을 용이하기 하기 위하여 표지된 상태로 제공될 수 있으며, 이에 대해서는 상기에서 기술한 바와 같다.

한편, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 펩타이드의 순수한 형태 또는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화함으로써 제공될 수 있다. 약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀전, 수성 조성물, 리포솜, 마이크로비드 및 마이크로솜, 생분해성 나노입자 등이 포함된다.

한편, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 투여 경로에 따라 적합한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로로는 이에

한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적 투여 경로로는 예를 들면, 경피, 비강, 복강, 근육, 피하 또는 정맥 등의 여러 경로가 포함된다.

본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 경구 투여용 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 형태로 제형화될 수 있다. 적합한 담체의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 상기 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

또한, 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용 할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다. 이들 제형은 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania)에 기술되어 있다.

흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.

그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이드레이트(예를 들어, 글루코스, 만노즈, 슈크로즈 또는 덱스트란), 안정화제(아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산) 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아주반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 및/또는 보존제(벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올)를 추가로 포함할 수 있다.

또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 진단 또는 치료 효과의 추적을 가능하게 하는 물질량(amount of substance)을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 대상 질환 및 이의 중증정도, 연령, 성별 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 성인을 기준으로 할 때 1회 투여시 1 mg 내지 1000 mg의 유효용량으로 하루에 수 차례 반복 투여될 수 있다.

아울러, 본 발명의 펩타이드는 암 세포(tumor cell)와 특이적으로 결합하므

로, 임의의 표지수단(영상화용 수단)과 함께 암화가 진행되고 있는 환부를 in vivo 상에서 영상화 할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 영상화용 조성물을 제공한다.

본 발명에서 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암세포일 수 있으며, 더욱 자세하게는 폐암 세포, 췌장암 세포, 대장암 세포, 담도암 세포, 혈액암 세포 또는 담낭암 세포일 수 있다. 또한, 더욱 바람직하게는 폐암 세포일 수 있다.

상기 암 세포(tumor cell) 영상화라 함은 상기 암 질환의 환부(還付)의 영상화 및 진단으로서 당업자에게 이해될 수 있으며, 암 질환에 대해서는 전술한 바와 같다. 구체적으로 예를 들어, 본 발명의 영상화용 조성물은 상기 본 발명의 암세포 검출용 조성물로서 제공될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

이 때, 질환의 영상화 및 진단은, 이에 한정되지는 않으나, 질환의 초진 목적 뿐만아니라, 진행 경과, 치료에 대한 치료 경과, 치료제에 대한 반응 모니터링 등을 포괄하여 사용할 수 있다. 상기 본 발명의 펩타이드는 결합 여부의 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 표지된 상태로 제공될 수 있으며, 이에 대해서는 상기에서 기술한 바와 같다.

본 발명은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드 및 이와 결합된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 펩타이드에 연결 될 수 있는 항암제는 공지의 종양 치료물질이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 파클리탁셀, 독소루비신, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌(bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴(cisplatin), 5-플로오우라실(5-fluorouracil), 아드리아마이신(adriamycin), 메토틱렉세이트(methotrexate), 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 니트로젠 무스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase), 알테플라제(alteplase), 안지오텐신

(angiotensin) II 억제제, 알도스테론(aldosterone) 수용체 억제제, 에리트로포이에틴(erythropoietin), NMDA (N-methyl-d-aspartate) 수용체 억제제, 로바스타틴(Lovastatin), 라파마이신(Rapamycin), 셀레브렉스(Celebrex), 티클로핀(Ticlopin) 마리마스타트(Marimastat) 및 트로케이드(Trocade) 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것 일 수 있다.

상기 펩타이드는 암세포와 특이적으로 결합하며, 본 발명의 펩타이드에 의해 상기 항암제제가 질병 부위의 세포에만 선택적으로 전달되기 때문에 약의 효력을 증가시킬 수 있고, 동시에 정상조직에 미치는 부작용을 현저히 줄일 수 있다.

본 발명의 펩타이드와 항암제는 공유결합으로 연결될 수 있고, 특히, 링커(Linker)에 의해 연결될 수 있으나, 이에 제한을 두지 않는다.

본 발명은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드 및 이와 결합된 항암제를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드의 항암제 제조를 위한 용도를 제공한다.

본 발명의 상기 치료란 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 시술을 나타내고, 임상 병리학의 예방을 위해 또는 과정 동안 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발 억제, 증상의 완화, 질병의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 억제, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 호전, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시예에서 본 발명의 펩타이드는 질병 또는 질환의 발생을 지연시키거나 질병 또는 질환의 진행을 지연시키기 위해 사용된다.

본 발명의 상기 유효량이란 환자에게 투여하였을 때, 암의 치료 및 예방 효과 또는 암 전이 억제효과를 나타내는 양을 말하며, 상기개체란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자(patient)일 수 있다.

또한, 본 발명의 상기 조성물은 펩타이드 0.001 내지 99.999 중량% 및 담체 99.999 내지 0.001 중량%의 조성을 가질 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명은 암세포 표적용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 명세서에서는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어지는 암세포와 특이적으로 결합하는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 암세포 검출용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 영상화용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 펩타이드는 암세포에 특이적으로 결합하여, *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 암세포를 검출하거나 영상화 할 수 있어 효과적이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 K-ras 유전자변형 마우스 모델을 제작하는 방법에 대한 모식도이다.

도 2A는 K-ras^{LA2} 돌연변이 allele을 나타낸 모식도이며, 도 2B는 18주령 K-ras^{LA2} 모델의 폐 종양 병변과 대조군인 18주령 야생형 마우스의 폐 사진이다. 또한, 도 2C는 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스 모델과 야생형 마우스 모델을 genotyping 한 것이다.

도 3은 파지 디스플레이 방법을 나타낸 모식도이다.

도 4A는 파지 라이브러리 스크리닝 과정에서 라운드별 파지 역가를 나타낸 그래프이다. 도 4B는 각각의 종양표적 펩타이드와 종양이 결합된 파지 클론의 역가를 나타낸 그래프이다.

도 5는 K-ras^{LA2} 유전자변형 마우스 모델과 야생형 마우스 모델에서 각 종양 표적 펩타이드의 표적 전달 능력을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 6A는 K-ras^{LA2} 유전자변형 마우스에 Flamma-774가 표지된 합성된 펩타이드를 꼬리 정맥을 통해 체내 주사하고 4시간 후에 희생하여 각각 폐와 신장, 간을 분리하여 형광영상을 촬영한 것이다. 도 6B는 형광염색의 데이터를 양적으로 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 7A는 K-ras^{LA2} 유전자변형 마우스의 폐의 종양에 표적하는 펩타이드와

Flamma675 형광표지된 리포솜을 $K-ras^{LA2}$ 유전자변형 마우스의 꼬리 정맥을 통해 체내 주사하고 6시간 후에 희생하여 폐에서 형광영상을 촬영한 것이다. 도 7B는 심장, 간, 신장과 비장에서 형광영상을 촬영한 것이다. 도 7C는 형광영상의 데이터를 양적으로 정량화한 데이터를 그래프로 나타낸 것이다. 도 7D는 폐종양을 동결절편으로 만들어 공초점 현미경을 이용하여 조직학적 분석을 통해 형광을 관찰한 것이다.

도 8은 종양 표적 펩타이드를 표지하고 독소루비신을 내포한 리포솜(CRQTKN-L-D)의 투여효과 검증 실험을 한 것이다. 각 군당 마우스 수는 5마리이며, 3주동안 각각 같은 농도의 리포솜으로 투여한 후, 폐를 적출하여 치료효과를 평가한 것이다(도 8A). 적출된 폐의 무게를 비교한 것이며(도 8B), 각각의 폐에서 나타난 폐종양의 총개수와 3mm이상의 폐종양의 개수를 비교 분석한 그래프이다(도 8C). (L-D: 독소루비신 함유 리포솜; CRQTKN-L-D: 암 표적 펩타이드 표지된 독소루비신 함유 리포솜; PBS: 생리식염수 투여군)

도 9는 3주간의 리포솜 투여 후, 적출되어 동결절편으로 만들어진 폐조직에서 DAPI 시약으로 핵 염색(푸른색)을 하고 형광현미경으로 독소루비신의 자체 형광(붉은색)을 관찰한 것이다. 그리고 세포 내부로의 독소루비신 전달로 인한 세포사멸을 확인하기 위해 TUNEL 분석(초록색)을 실시한 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> $K-ras^{LA2}$ 유전자 변형 마우스 준비

MMHCC와 NCI/NIH로부터 얻은 $K-ras^{LA2}$ (유전적으로, $K-ras^{G12DLA2}$)를 T Jacks(MIT) 박사님으로부터 제공받았다(마우스모델 제작 방법은 도1 참조). $K-ras^{LA2}$ 유전자 변형 마우스는 야생형인 C57BL/6N 마우스와 교배하였으며, 그 유전자형 분석 정보는 <http://mouse.ncifcrf.gov>에서 얻을 수 있다(도2 참조). DNA는 마우스의 꼬리로부터 수득하였고, Qiagen 제품인 Qiaquick 컬럼으로 정제하고 PCR 증폭을 실시하였다. 야생형 C57BL/6N 마우스에서 염기서열 9 및 10으로 나타나는 프

라이머 K1와 K2를 사용하여 PCR 증폭하였으며, K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스에서 염기서열 9 및 11로 나타나는 프라이머 K1과 K3를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭의 조건은 어닐링 온도 60와 35사이클 증폭으로 하였다. 그 후 PCR산물은 1% 아가로스 젤에 로딩하여 야생형과 돌연변이에서 각각 220bp, 320bp를 확인한 후, 돌연변이 K-ras^{LA} 마우스로 확인된 마우스를 실험에 사용하였다.

면역 억제된 누드마우스(Charles river, BALB/c nu/nu, 5-6주령, 18-20g)는 오리엔트(주)(한국)에서 구입하였다. 종양 이종이식 모델을 만들기 위하여, 8주령 BALB/c nu/nu 수컷 마우스에 A549 인간 암 세포를 마우스의 오른쪽 측면에 주입하였다. 마우스는 무균 조건 및 온도와 습도 제어 조건에서 사육하였으며, 모든 동물 실험은 경북 대학교 동물 관리 위원회(IACUC)의 가이드라인에 의하여 수행하였다.

<실시예 2> K-ras 유전자 변형 암세포(K-ras transgenic tumor cell)에 결합 특이성을 가진 펩타이드 선발

<2-1> 파지 펩타이드 라이브러리의 제조

본 발명은 K-ras 유전자 변형 암세포 (K-ras transgenic tumor cell)에 특이적인 펩타이드를 찾아내기 위하여, 파지 펩타이드 디스플레이 기술을 이용하였다 (Smith, Science, 228:1315-1317, 1985). 파지 펩타이드 디스플레이는 수개 내지 수 십 개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 박테리오파지 표면에 디스플레이 하는 것이다. 최대 10^9 종류의 펩타이드를 가진 파지 라이브러리를 만들 수 있기 때문에 한꺼번에 많은 종류의 펩타이드를 탐색하여 원하는 조직 또는 종양에 표적되는 펩타이드를 찾는 데 유용한 기술이다(도3 참조).

K-ras 유전자 변형 암세포에 특이적인 펩타이드의 스크리닝을 위한 파지 펩타이드 라이브러리를 제조하기 위하여, 먼저 양 말단에 시스테인이 있고 그 사이에 임의의 7개 아미노산을 포함하는 CX₇C 펩타이드를 코딩(coding)하는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 무작위로 합성하였다. 상기 합성된 올리고뉴클레오타이드를 노바젠(Novagen)사의 T7Select 키트를 이용하여 T7 415-1b 파지의 표면을 구성하는 단백질 유전자 내로 클로닝하여 파지 펩타이드 라이브러리를 제조하였다.

<2-2> 파지 라이브러리 탐색

제조된 T7 CX₇C 파지 라이브러리(phage library)에서 K-ras 유전자 변형 암

세포에 대해 결합 특이성을 갖는 펩타이드를 스크리닝하기 위해 1×10^{11} pfu의 랜덤 펩타이드 파지라이브러리를 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스의 꼬리정맥에 주입하였다. 15분후 K-ras^{LA2} 유전자변형 마우스의 폐로부터 종양을 절제하고 잘게 갈아 DMEM 배지에 넣어 세포 현탁액을 만든 후 70- μ M 여과기(DAKO, Carpinteria, CA, USA)에 통과 시켰다. 종양에 결합된 파지는 1% NP-40에 10분간 반응시켜 분리시키고, 이후 배양된 BL21 호스트 박테리아에 처리하여 회복시켰다. BL21 호스트 박테리아로부터 회복되어 증폭된 파지의 역가는 1×10^{11} pfu로 측정되었으며, 이후 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스의 꼬리정맥에 주입되어 파지 상기 라이브러리 스크리닝 과정을 총 5라운드 반복하였다. 도 4A는 각 라운드에서의 파지 역가(titer)를 나타내는 것으로, 파지클론의 배수적 증가는 최종 5라운드에 도달하였을 때 최초 라운드보다 162배 증가하였다. 이후 4라운드 및 5라운드로부터 총 49 클론들을 무작위로 선택하여 서열분석이 수행되었다.

<2-3> 파지 클론의 DNA 및 아미노산 서열 분석

상기 실시예 2-2에서 수집한 49개의 각 파지 클론들의 DNA 삽입물(DNA inserts)은 96 pIII primer(New England Biolabs)를 이용한 자동화된 DNA sequencer (Genotech Inc., Daegwon 및 SolGent Inc. Daegu)에 의하여 염기서열이 분석되었다. 공통서열 또는 펩타이드들 간에 공유되어있는 아미노산 모티프(motif)를 찾기 위하여, 상기 염기서열로부터 추론된 아미노산 서열은 Clustal W program을 이용하여 정렬하였다. 높은 상동성(significant homology)이 있는 단백질들을 찾기 위하여 펩타이드 서열에 대한 NCBI BLAST search가 수행되었다. 펩타이드 서열 분석결과 K-ras 유전자 변형 암세포와 결합성이 높은 4개의 파지 클론들이 확인되었다. 상기 4개 파지 클론의 펩타이드 서열은 다음과 같다; CKSRKDGAC(4R-3, 서열번호 1), CMPKRPSSC(4R-16, 서열번호 2), CRGTAEG(4R-21, 서열번호 3), CRQTKN(5R-7, 서열번호 4).

<2-4> 파지 클론의 종양 특이적 결합능 확인

도 4B는 상기 실시예 2-3에서 확인된 서열번호 1 내지 서열번호 4의 펩타이드를 발현하는 파지클론들의 암세포에 대한 선택적 결합능력을 나타내는 것으로, 각각의 펩타이드들을 발현하는 파지클론이 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스에 투여되어

종양에 결합한 역가를 측정하였다. 그 결과 CKSRKDGAC(4R-3, 서열번호 1)를 표지하는 파지클론이 종양과 가장 높은 결합능력을 보여 주었다(도 4B 참조).

<2-5> 펩타이드 합성

(주) 펩트론(Peptron Co, Daejeon, Korea)에 의뢰하여, N-말단에 FITC(fluorescein isothiocyanate)(Peptron) 또는 FPI774 근적외선 형광(BioActs Inc, inchon, Korea)이 접합된 본 발명의 서열번호 1 내지 서열번호4의 서열로 구성된 펩타이드들을 제작하였다. 또한 본 발명의 대조군으로서 파지 표면단백질 서열인 NSSSVDK 서열로 구성된 펩타이드를 동일하게 제작 및 형광 표지하였다. 간략하게, 각 펩타이드들은 표준 Fmoc 방법에 의하여 합성되었고, 각 펩타이드의 N-말단에 FITC 또는 FPI-774 근적외선형광이 접합되었으며, HPLC에 의하여 정제되었다.

<실시에 3> K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스 종양을 표적으로 하는 펩타이드의 표적전달 능력 분석

<3-1> 종양 표적 펩타이드의 근적외선 형광 이미지 분석

상기 실시예 <2-5>에서 합성된 본 발명의 펩타이드들이 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스의 종양 세포에 특이적으로 전달되는지 검증하기 위해 FPI774가 표지된 서열번호 1 내지 서열번호 4로 구성된 펩타이드 및 대조군 펩타이드가 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스 및 일반 정상 마우스의 꼬리 정맥을 통해 체내 주사되었다. 4시간 후 마우스를 희생시키고 각 장기를 적출하여 eXplore Optix system(ART Inc, Montreal, Canada)을 이용하여 근적외선 형광 이미지를 촬영하였다.

도 5에서 보는바와 같이 본 발명의 펩타이드들 중 CRQTKN(서열번호4)로 구성된 펩타이드가 가장 강력하게 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스의 종양에 전달되었다.

<3-2> K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스 종양에 대한 FPI774-CRQTKN 펩타이드의 표적전달능력 분석

K-ras 종양에 대한 CRQTKN(서열번호4) 펩타이드의 결합능력을 확인하기 위해 FPI774 근적외선형광이 표지된 FPI774-CRQTKN 펩타이드를 대조군 펩타이드와 함께 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스 및 정상 마우스의 꼬리 정맥을 통해 체내 주사하였다. 4시간 후에 마우스를 희생하여 각 장기를 분리하고 eXplore Optix system(ART Inc,

Montreal, Canada)를 이용하여 형광이미지를 촬영하였다.

도 6A에서 보는 바와 같이 K-ras^{LA2} 유전자 변형 마우스의 폐에서 FPI774의 형광이 강하게 발현되는 것을 관찰하였다. 반면, 정상마우스에서는 형광이 발현되지 않는 것으로 관찰되어 종양에 표적하는 것임을 확인할 수 있다. 폐가 아닌 다른 장기에서, 신장과 간으로의 전달을 비교해 보았을 때(도 6B 참조), 전반적으로 형광을 관찰할 수 없는 것으로 나타났다. 또한 도 6C는 상기 도 6A 및 도 6B의 결과를 정량화한 데이터이다.

<실시예 4> 종양에 표적하는 펩타이드 표지된 리포솜의 생체 내 종양 표적에 전달능력 분석

<4-1> FPR675-CRQTKN 펩타이드가 표지된 리포솜 및 독소루비신 함유 리포솜의 제조

L--포스파티딜콜린(L--phosphatidylcholine; PC), 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에타놀라민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] (1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]; mPEG2000-DSPE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에타놀라민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000] (1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)2000]; maleimide-PEG2000-DSPE), 1,2 등의 시약은 아벤티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids)사로부터 구입하였다.

리포솜은 용매-주입 및 분출(solvent-injection and extrusion) 법을 이용하여 제조하였다. 먼저, 모든 지질 (PC, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE)을 6 : 4 : 0.5의 몰비로 60°C의 에탄올에 녹인 다음, 60°C의 물에 1 : 10의 부피비로 섞어 1 시간 동안 수화(hydration) 시켰다. 본 혼합물을 폴리카보네이트 멤브레인 필터(polycarbonate membrane filters; 구멍 크기: 0.2 μ m)를 6 회 통과시킨 다음, 0.05 μ m 구멍 크기의 필터에 6 회 추가 통과시켜 리포솜의 크기를 균질화 하였다. 리포솜의 크기는 dynamic light scattering 법으로 측정하였으며 지름 80 -120 nm의 크기였다.

독소루비신은 암모늄 황산염(ammonium sulfate)을 사용하는 전통적인 remote-loading 법으로 리포솜 내 함유 시켰다. 리포솜 용액 내 물 성분은 250 mM (NH₄)₂SO₄ 이었다. 리포솜 성분을 분출한 후, 5 mM NaCl을 포함하고 있는 충분한 양의 10% sucrose 용액 내 담긴 투석 막(dialysis membrane, 분자량 3k) 안으로 리포

숨을 넣어 리포솜 표면의 암모늄 황산염을 제거 하였다. 다음으로 독소루비신 HCl 용액을 리포솜 용액에 첨가하여 1.5 - 2 mg/ml의 농도가 되게 하였다. 약물의 함유 과정은 60°C에서 1 시간 동안 수행하였고 이후 신속한 냉각을 통해 이루어졌다.

FPI774와 FPR675를 리포솜에 표지하기 위해, 이들 시약을 에탄올 속에서 모든 지질 성분과 섞어 준 다음, 인산 완충액 속으로 주입하였다. 이들 형광시약의 소수성 성질 때문에, 각 시약은 리포솜의 지질 이중층 부위에 내포 되었다.

본 발명의 펩타이드가 표지된 리포솜은 후 삽입(post-insertion) 법으로 제조하였다. 먼저 CRQTKN(서열번호 4) 펩타이드를 maleimide가 수식된 PEG2000-DSPE(maleimide-PEG2000-DSPE)에 1 : 2의 비율로 연결하였다. 다음으로 mPEG2000-DSPE-CRQTKN을 60°C에서 1 시간 동안 리포솜과 반응하여 리포솜에 삽입 하였다. 표지된 펩타이드의 양은 전체 지질의 0 - 3 mol%가 되게 하였다.

<4-2> FPR675-CRQTKN 펩타이드가 표지된 리포솜의 생체 내 종양 표적에 대한 전달능력 분석

$K-ras^{LA2}$ 유전자변형 마우스의 종양에 표적하는 FPR675-CRQTKN 펩타이드가 표지된 리포솜을 먼저 상기 실시예 <3-1>에서 서술한 방법으로 제조하였다. 종양에 표적하는 펩타이드의 효과검증을 위해 근적외선 형광시약인 FPR675가 표지된 리포솜을 $K-ras^{LA2}$ 유전자변형 마우스의 꼬리 정맥을 통해 체내 주사하고 6시간 후에 희생하여 폐를 포함한 각 장기를 분리하여 형광영상을 촬영하였다.

도 7A와 같이 FPR675-CRQTKN 펩타이드가 표지된 리포솜을 주사한 $K-ras^{LA2}$ 유전자변형 마우스의 종양에서 FPR675의 형광이 강하게 발현되는 것을 관찰하였다. 반면, FPR675-CRQTKN 펩타이드가 표지되지 않은 리포솜을 주사한 마우스에서는 형광이 발현되지 않는 것으로 관찰되어 펩타이드의 종양 표적을 확인할 수 있었다.

도 7B는 폐가 아닌 다른 장기에서 나타나는 형광을 관찰하여 본 실험에서는 심장, 간, 신장과 비장에서 전반적으로 형광을 관찰할 수 없는 것으로 나타났다. 또한 도 7C에서 이 형광영상의 데이터를 양적으로 정량화한 데이터에서도 동일한 결과를 나타내었다.

도 7D에서는 형광관찰 후, 폐종양을 동결절편으로 만들어 공초점 현미경을 이용하여 조직학적 분석을 통해 형광을 관찰한 실험에서 또한, 펩타이드를 표지한 리포솜을 주입한 마우스의 폐종양 조직에서 형광신호가 강하게 나타난 동일한 결과

를 보여 조직학적인 검증도 보였다(도 7D).

<실시에 5> 펩타이드 매개에 의한 독소루비신 내포 리포솜의 종양에 대한 선택적 약물전달 및 표적치료

종양 표적용 펩타이드 매개에 의한 약물전달 촉진효과를 평가하기 위해 표면에 종양을 표적하는 CRQTKN 펩타이드를 표지하며 항암제인 독소루비신을 내포하는 리포솜을 상기 실시예 <4-1>에서 서술한 방법으로 제조하였다. 18주에서 20주 사이의 K-ras^{LA2} 유전자변형 마우스에 독소루비신의 양이 마우스 체중(kg) 당 4 mg(4 mg/kg) 되게끔 리포솜 용액을 정맥 주사하였다. 치료기간은 일주일에 2회로 3주 동안 총6회 투여로 하였다.

도 8A와 같이 암 표적 펩타이드를 표지한 리포솜(CRQTKN-L-D)을 투여한 경우 같은 농도의 표지하지 않은 리포솜(L-D)을 투여한 경우와 비교하였을 때 유의적인 치료 효과가 나타났다. 또한 도 8B에서는 펩타이드를 표지하지 않은 리포솜 투여군과 생리식염수 투여군에서 종양의 수와 크기 증가로 인한 총 폐의 무게가 증가한 반면 CRQTKN-L-D가 표지된 독소루비신을 함유하는 리포솜을 이용하여 표적 치료를 한 군에서는 폐의 무게가 유의하게 감소된 차이를 보였다. 도 8C는 실험군들 사이에서 종양의 총 개수에서는 유의한 차이가 없었으나, 그 크기의 비교에서는 종양의 크기가 3mm이상 되는 종양의 개수를 비교하였을 때 암표적 펩타이드를 표지한 리포솜 투여군에서 유의한 감소가 나타나, 표적화 된 치료가 이루어졌음을 보였다. 이들 수치는 통계학적으로 유의한 결과였다.

도 9는 3주간의 리포솜 투여 후, 적출된 폐는 동결절편으로 제작되었다. 각 군에서 적출된 폐의 동결절편은 DAPI 시약으로 핵 염색(푸른색)을 하고 형광현미경으로 독소루비신의 자체 형광(붉은색)을 관찰하여 세포 내부로의 약물전달 수준을 조사하였다. 그리고 세포 내부로의 약물전달로 인한 세포사멸을 확인하기 위해 TUNEL 분석을 실시하였다.

그 결과, 도 9A와 같이 대조군 리포솜 투여군에 비해 암 표적 펩타이드가 표지된 리포솜 투여군의 조직에서 독소루비신에 의한 붉은색 형광이 훨씬 더 많이 관찰되었다. 반면 대조군 리포솜군의 조직에서는 형광이 약하게 관찰되었다. 또한 도 9B에서는 관찰된 독소루비신의 전달로 인한 결과로 세포 사멸을 분석한 TUNEL의 결과에서도 펩타이드가 표지된 리포솜 투여군의 조직에서 세포사멸이 증가한 것을

알 수 있다(초록형광).

【산업상 이용가능성】

본 발명은 암세포 표적용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 명세서에서는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어지는 암세포와 특이적으로 결합하는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 암세포 검출용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 영상화용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 펩타이드는 암세포에 특이적으로 결합하여, *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 암세포를 검출하거나 영상화 할 수 있어 산업상 이용 가능성이 높다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암 세포인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 암 세포는 폐암 세포, 췌장암 세포, 대장암 세포, 담도암 세포, 담낭암 세포, 백혈병 세포로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 4】

제1항의 펩타이드를 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 5내지 8로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 6】

제4항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

【청구항 7】

제6항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 8】

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 검출용 조성물.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제8항에 있어서, 상기 펩타이드는 발색효소, 방사성동원소, 크로모포어(chromophore), 발광물질, 형광물질(fluorescer), 상자성 입자(superparamagnetic particles) 및 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles)로 이루어진 군에서 선택되는 하나로 표지된 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 11】

(a) 제1항의 펩타이드를 시료와 혼합하는 단계;
(b) 미결합되거나 비특이적으로 결합된 상기 펩타이드를 제거하는 단계; 및
(c) 상기 펩타이드의 결합 여부 및 위치를 확인하는 단계를 포함하는 암 세포(tumor cell)의 검출 방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 암 세포는 K-ras 돌연변이에 의한 암 세포인 것을 특징으로 하는 암 세포의 검출 방법.

【청구항 13】

제11항에 있어서, 상기 암 세포는 폐암 세포, 췌장암 세포, 대장암 세포, 담도암 세포, 담낭암 세포, 백혈병 세포로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암세포의 검출 방법.

【청구항 14】

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 특이적 약물 전달용 조성물.

【청구항 15】

제14항에 있어서, 상기 약물은 파클리탁셀, 독소루비신, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D),

도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌(bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴(cisplatin), 5-플로오우라실(5-fluouracil), 아드리아마이신(adriamycin), 메토틱렉세이트(methotrexate), 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 니트로겐 무스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 스트렙토키나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase), 알테플라제(alteplase), 안지오텐신(angiotensin) II 억제제, 알도스테론(aldosterone) 수용체 억제제, 에리트로포이에틴(erythropoietin), NMDA (N-methyl-d-aspartate) 수용체 억제제, 로바스타틴(Lovastatin), 라파마이신(Rapamycin), 셀레브렉스(Celebrex), 티클로핀(Ticlopin) 마리마스타트(Marimastat) 및 트로케이드(Trocade) 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 16】

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 세포(tumor cell) 영상화용 조성물.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 발색효소, 방사성동위원소, 크로모포어(chromophore), 발광물질, 형광물질(fluorescer), 상자성입자(superparamagnetic particles) 및 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles)로 이루어진 군에서 선택되는 하나로 표지된 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 18】

제1항의 펩타이드 및 이와 결합된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

【청구항 19】

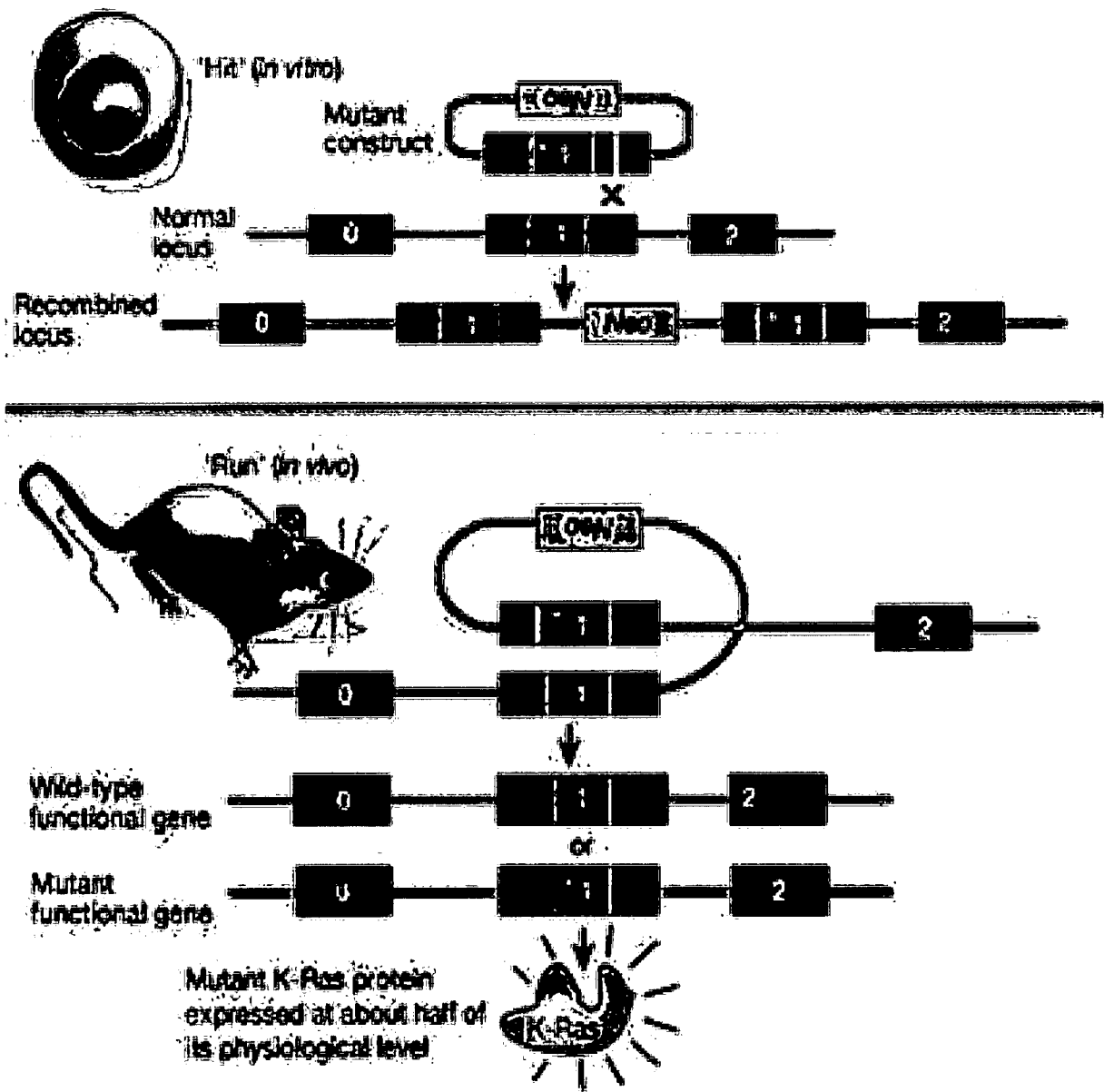
서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드 및 이와 결합된 항암제를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하여 암을 치료하는 방법.

【청구항 20】

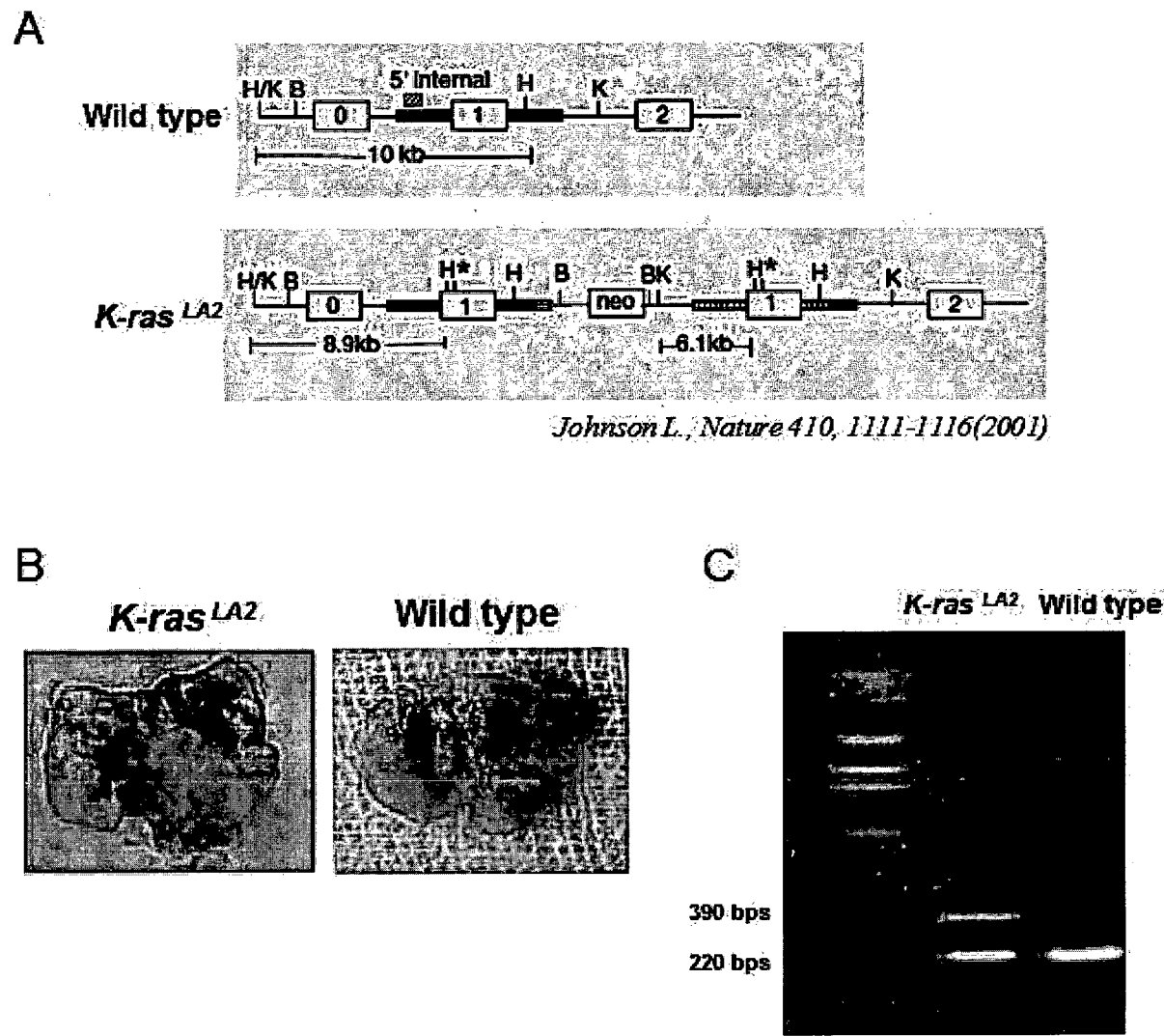
서열번호 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 암 세포(tumor cell) 표적용 펩타이드의 항암제 제조를 위한 용도.

【도면】

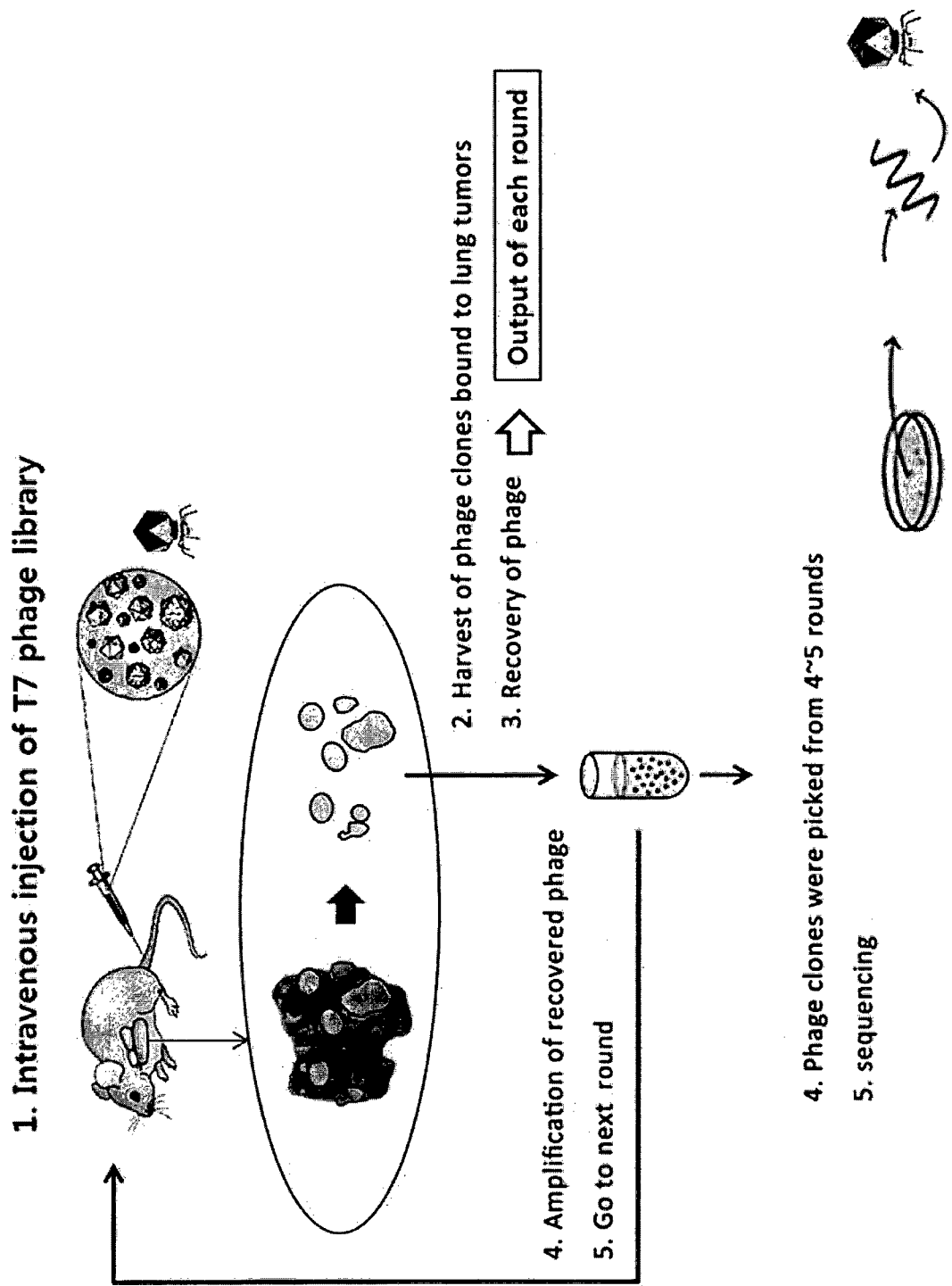
【도 1】



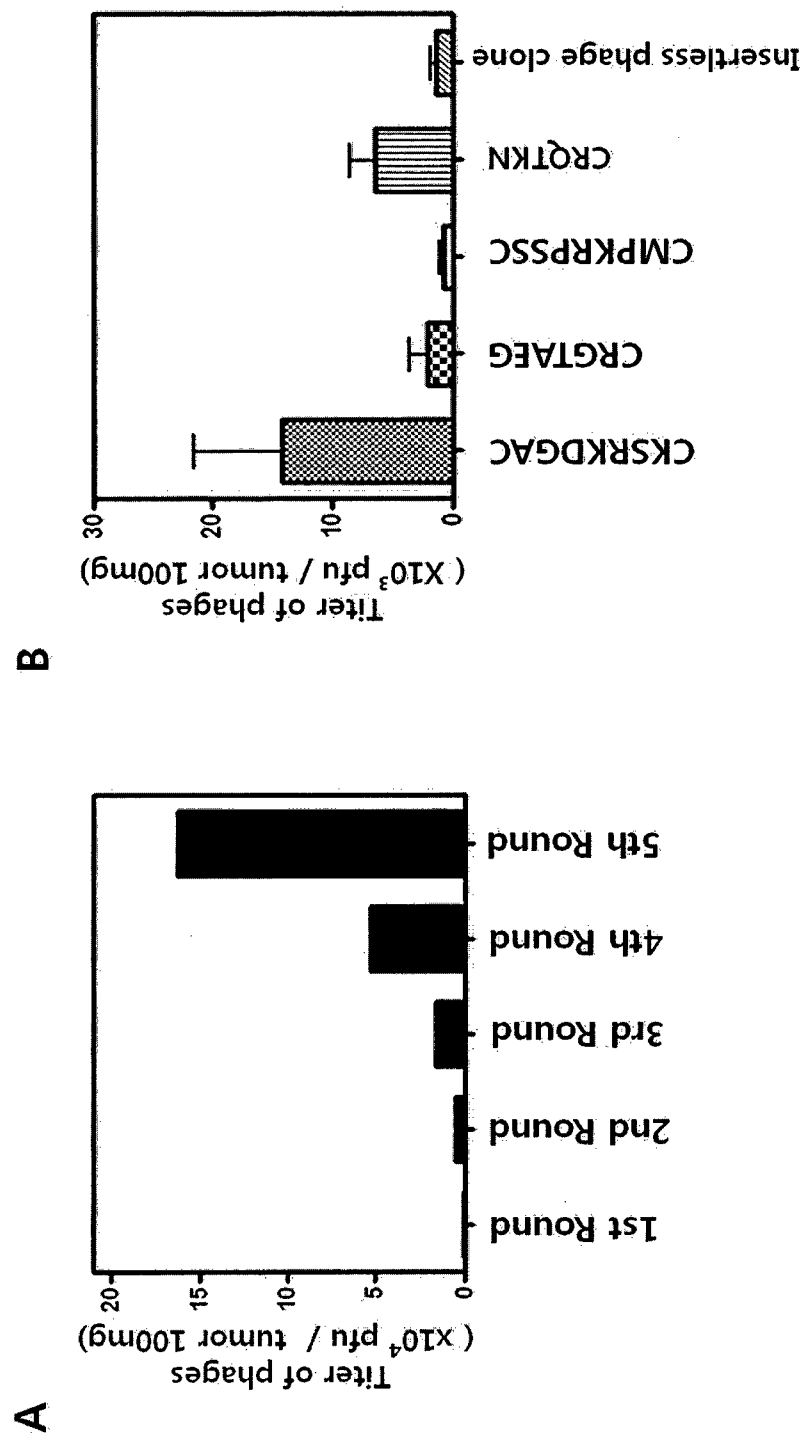
【도 2】



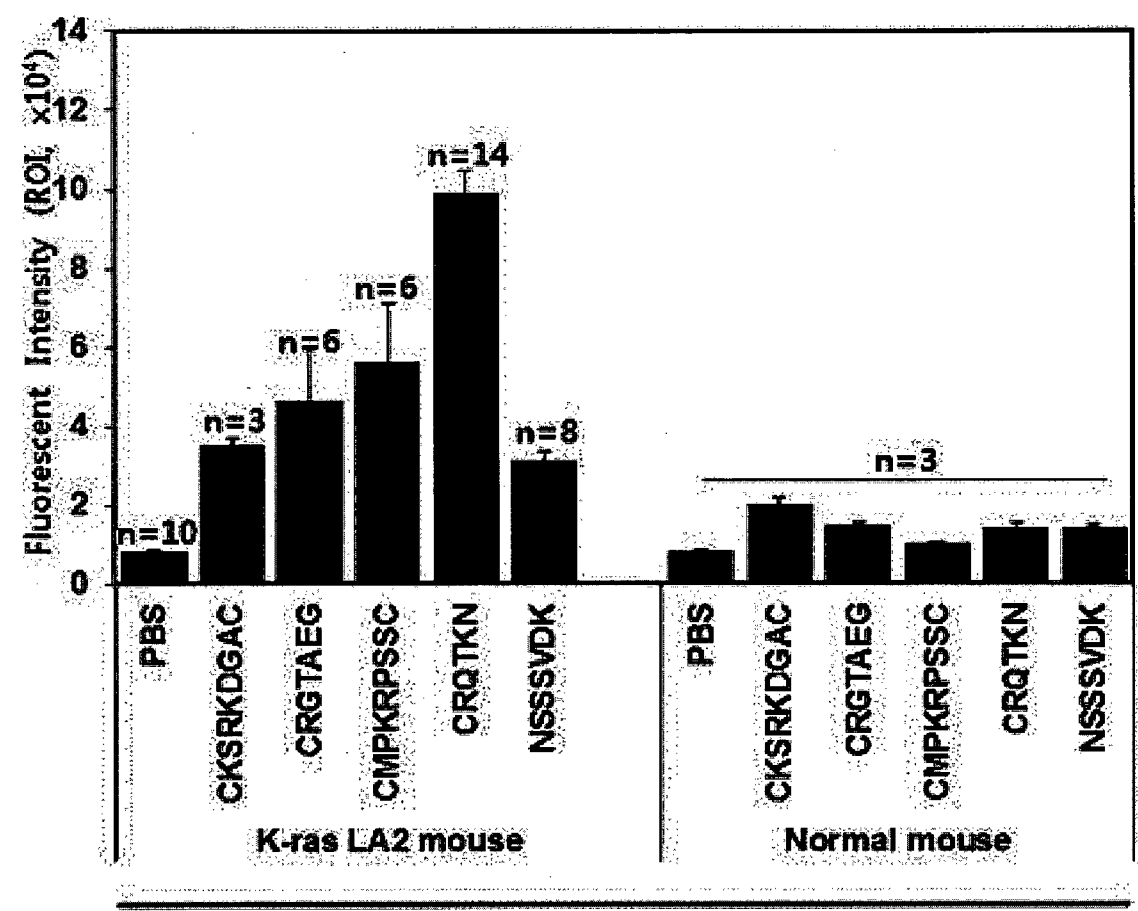
【도 3】



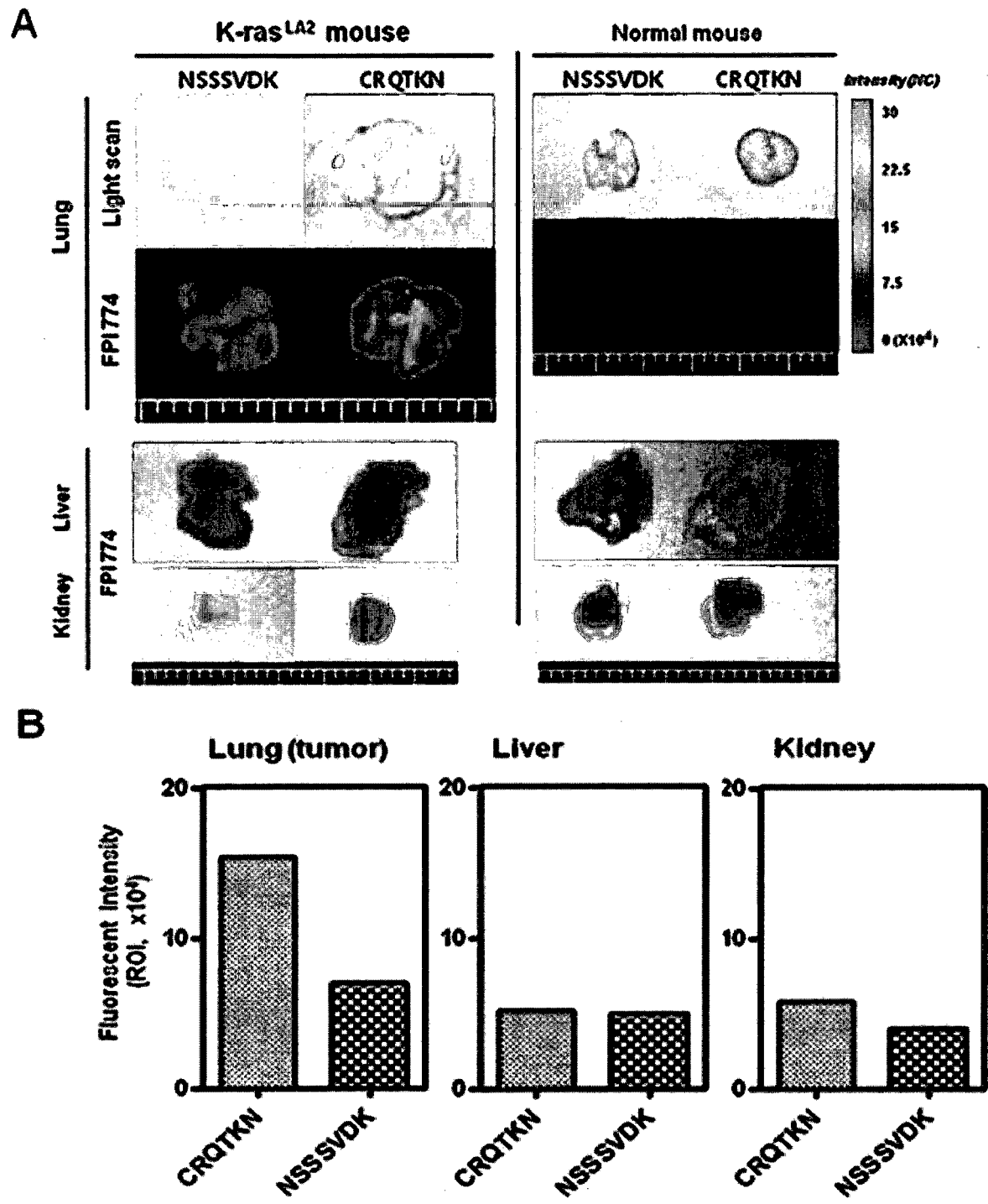
【도 4】



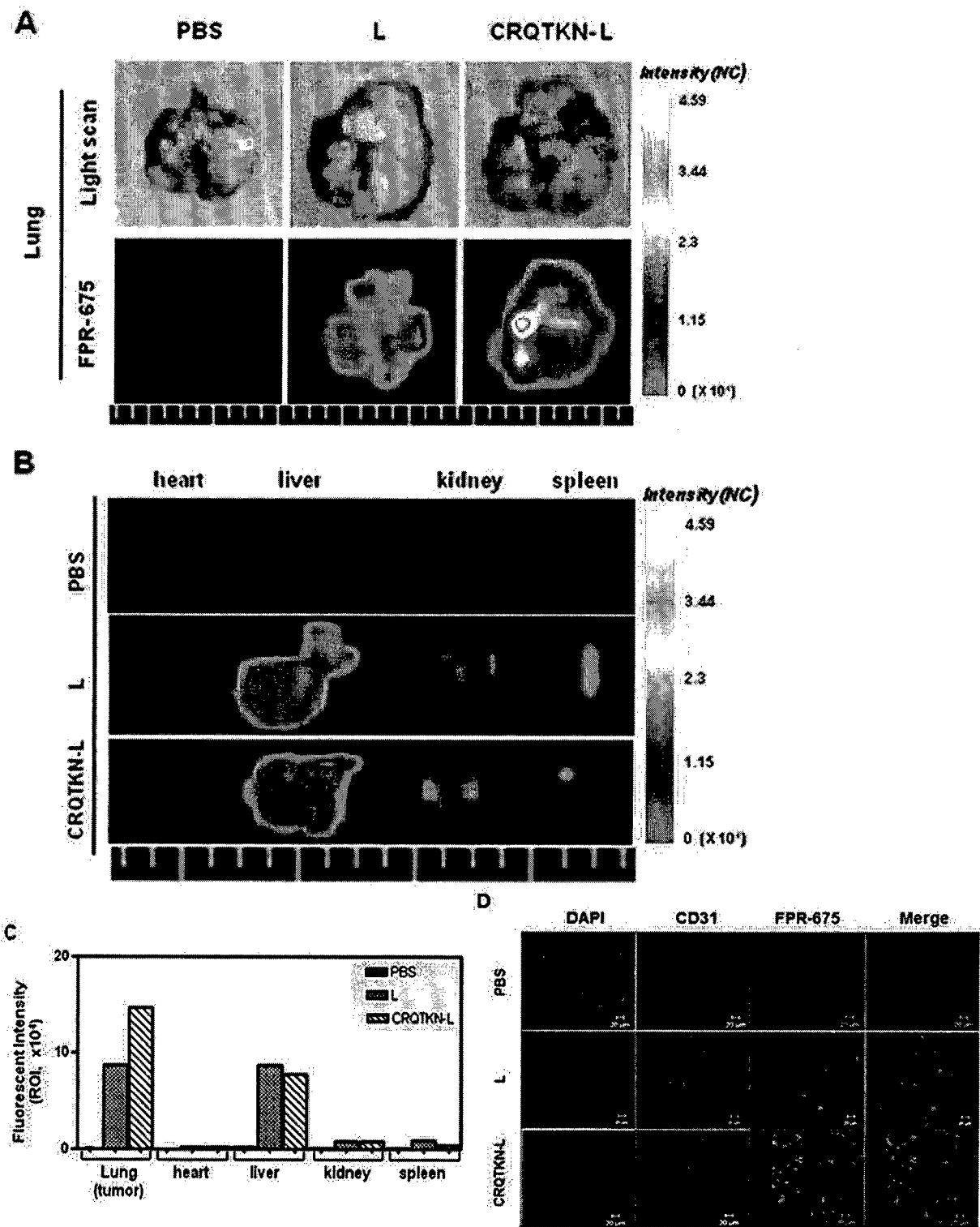
【도 5】



【도 6】

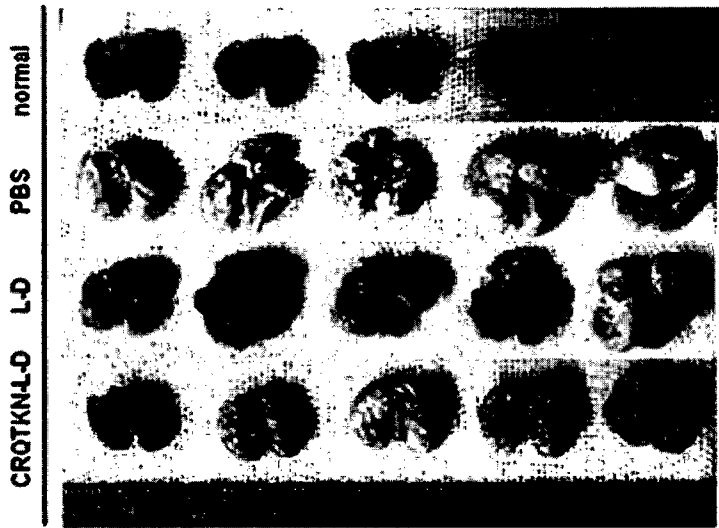


【도 7】

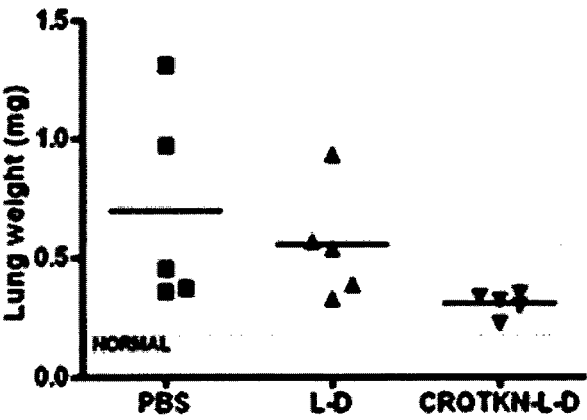


【도 8】

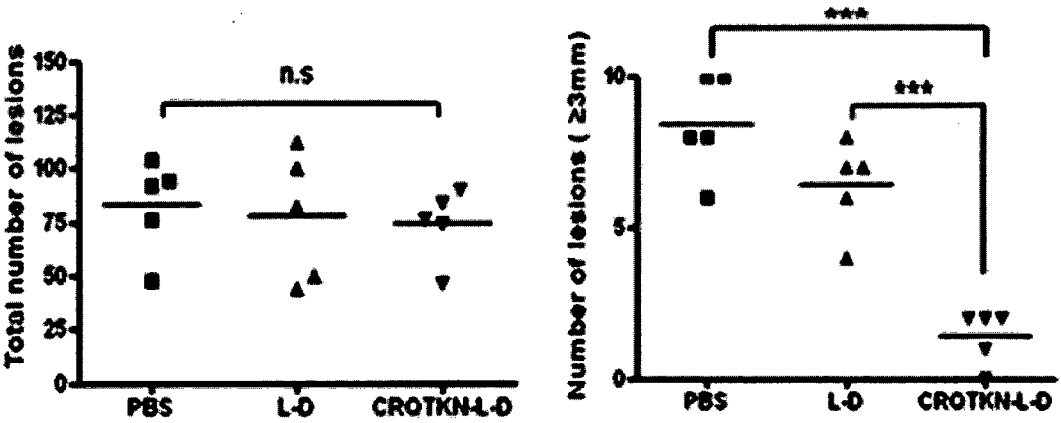
A



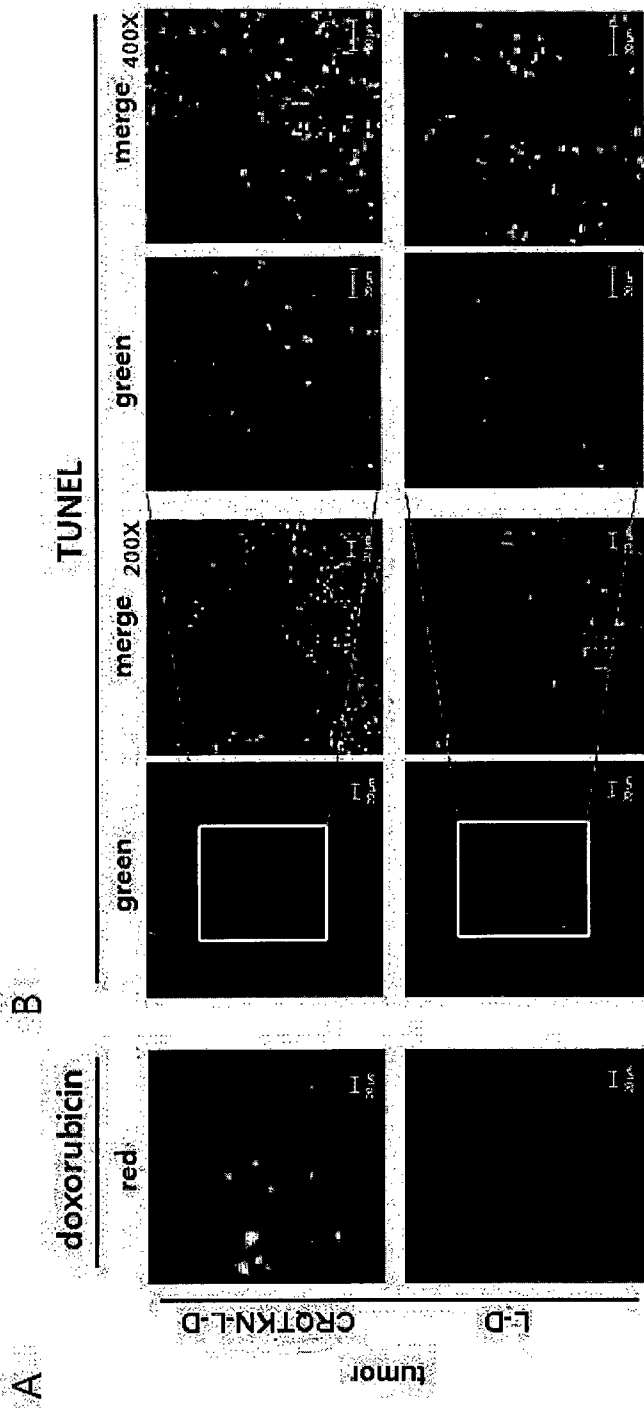
B



C



【도 9】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005256**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 7/06(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 51/08(2006.01)i**

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/06; A61K 39/395; C07K 14/47; C12N 15/12; A61K 38/17; C07K 16/30; C12N 15/63; G01N 33/574; G01N 33/58; A61K 47/48; A61K 51/08

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: tumor cell targeting peptide, drug delivery, imaging, antibiotics

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1467676 B1 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 04 December 2014 See claim 1 and table 2.	1-18,20
A	KR 10-2013-0091560 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 19 August 2013 See claims 1, 9-10.	1-18,20
A	KR 10-1471253 B1 (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 10 December 2014 See claims 1-4, 7, 9.	1-18,20
A	NCBI, GenBank accession no. WP_018087053.1 (28 June 2013) See the entire document.	1-18,20
A	NCBI, GenBank accession no. KKA25050.1 (03 April 2015) See the entire document.	1-18,20
A	NCBI, GenBank accession no. EZA56312.1 (08 April 2014) See the entire document.	1-18,20
A	NCBI, GenBank accession no. CDJ30333.1 (05 November 2013) See the entire document.	1-18,20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 AUGUST 2016 (26.08.2016)

Date of mailing of the international search report

26 AUGUST 2016 (26.08.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005256

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

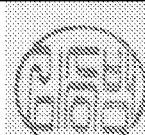
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1467676 B1	04/12/2014	KR 10-2014-0123311 A	22/10/2014
KR 10-2013-0091560 A	19/08/2013	KR 10-1450838 B1	15/10/2014
KR 10-1471253 B1	10/12/2014	KR 10-2014-0054724 A	09/05/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 7/06(2006.01)I, C12N 15/63(2006.01)I, G01N 33/574(2006.01)I, G01N 33/58(2006.01)I, A61K 47/48(2006.01)I, A61K 51/08(2006.01)I																										
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 7/06; A61K 39/395; C07K 14/47; C12N 15/12; A61K 38/17; C07K 16/30; C12N 15/63; G01N 33/574; G01N 33/58; A61K 47/48; A61K 51/08 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: 암세포 표적용 펩타이드, 약물 전달, 영상화, 항생제																										
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-1467676 B1 (울산대학교 산학협력단) 2014.12.04 청구항 1 및 표 2 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2013-0091560 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2013.08.19 청구항 1, 9-10 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-1471253 B1 (인제대학교 산학협력단) 2014.12.10 청구항 1-4, 7, 9 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, GenBank accession no. WP_018087053.1 (2013.06.28) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, GenBank accession no. KKA25050.1 (2015.04.03) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, GenBank accession no. EZA56312.1 (2014.04.08) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, GenBank accession no. CDJ30333.1 (2013.11.05) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18, 20</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-1467676 B1 (울산대학교 산학협력단) 2014.12.04 청구항 1 및 표 2 참조.	1-18, 20	A	KR 10-2013-0091560 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2013.08.19 청구항 1, 9-10 참조.	1-18, 20	A	KR 10-1471253 B1 (인제대학교 산학협력단) 2014.12.10 청구항 1-4, 7, 9 참조.	1-18, 20	A	NCBI, GenBank accession no. WP_018087053.1 (2013.06.28) 전체 문헌 참조.	1-18, 20	A	NCBI, GenBank accession no. KKA25050.1 (2015.04.03) 전체 문헌 참조.	1-18, 20	A	NCBI, GenBank accession no. EZA56312.1 (2014.04.08) 전체 문헌 참조.	1-18, 20	A	NCBI, GenBank accession no. CDJ30333.1 (2013.11.05) 전체 문헌 참조.	1-18, 20
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																								
A	KR 10-1467676 B1 (울산대학교 산학협력단) 2014.12.04 청구항 1 및 표 2 참조.	1-18, 20																								
A	KR 10-2013-0091560 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2013.08.19 청구항 1, 9-10 참조.	1-18, 20																								
A	KR 10-1471253 B1 (인제대학교 산학협력단) 2014.12.10 청구항 1-4, 7, 9 참조.	1-18, 20																								
A	NCBI, GenBank accession no. WP_018087053.1 (2013.06.28) 전체 문헌 참조.	1-18, 20																								
A	NCBI, GenBank accession no. KKA25050.1 (2015.04.03) 전체 문헌 참조.	1-18, 20																								
A	NCBI, GenBank accession no. EZA56312.1 (2014.04.08) 전체 문헌 참조.	1-18, 20																								
A	NCBI, GenBank accession no. CDJ30333.1 (2013.11.05) 전체 문헌 참조.	1-18, 20																								
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																										
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “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 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																										
국제조사의 실제 완료일 2016년 08월 26일 (26.08.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 08월 26일 (26.08.2016)																								
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 																								

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

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

1. ☒ 청구항: 19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 19는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/005256

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1467676 B1	2014/12/04	KR 10-2014-0123311 A	2014/10/22
KR 10-2013-0091560 A	2013/08/19	KR 10-1450838 B1	2014/10/15
KR 10-1471253 B1	2014/12/10	KR 10-2014-0054724 A	2014/05/09