



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025373
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0102600
(22) 출원일자 2018년08월30일
심사청구일자 2018년08월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종선
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(둔산동, 국화아파트)
박지수
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(둔산동, 국화아파트)
(74) 대리인
김순웅

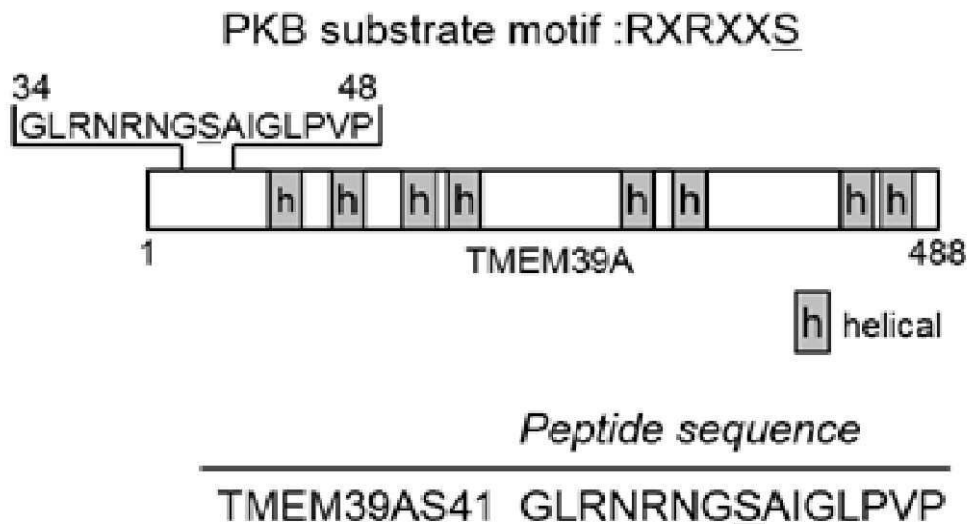
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 암 예방 또는 치료용 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 암 예방 또는 치료용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 암 예방 또는 치료용 펩타이드, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 시약 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드는 PKB 기질 모티프를 포함하고 있어 여러 가지 암에 대한 예방 및 치료용 펩타이드로 유용하게 사용할 수 있다. 또한 안전성이 증대되고 높은 세포 투과성을 갖는 펩타이드이며 이를 이용하면 효과적으로 종양의 진행을 억제시킬 수 있는 바, 암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품 등 다양하게 활용할 수 있다. 또한 암의 발생에 관여하는 경로를 조절하므로 해당 경로에 관련된 암 진행 억제 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

김선환

대전광역시 서구 둔산남로 127, 105동 1306호(둔산동, 목련아파트)

이현지

대전광역시 서구 정림서로 162-18, 104동 104호(정림동, 강변들보람아파트)

박성진

대전광역시 서구 도안동로 177, 109동 1001호(도안동, 도안신도시 수목토 APT)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9B6055302

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구

기 여 율 10/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A01003597

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심개인연구사업

연구과제명 두경부암에서 Warburg effect의 새로운 조절자로서 CTMP와 LETM1의 분자적 제어 기술 발굴

기 여 율 50/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01015694

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 뇌종양 환자에서 GLEA2에 의한 TFAM 조절의 분자적 기전에 관한 연구

기 여 율 20/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016K1A3A1A08953546

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외협력기반조성-국가간협력기반조성사업

연구과제명 지방세포와 지방조직에서 신규 지방합성 매개 단백질 PHF20의 기능 연구

기 여 율 20/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.04.01 ~ 2020.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 암 예방 또는 치료용 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 RXXXS의 아미노산 서열로 표시되는 모티프를 포함하며, 상기 X는 A, K, N, D, C, H, I, M, S, V, G, L, P, T, F, R, Y, W, E 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 모티프는 PKB(protein kinase B), ROCK(rho-associated protein kinase), RSK(ribosomal protein kinase), S6K(S6 kinase) 및 SGK(serum glucocorticoid kinase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 키나아제에 의해 인산화되는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 N-말단이 미리스토일화(myristoylation)된 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화(amidation)된 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 암은 폐암, 안구암, 피부암, 자궁암, 갑상선암, 흉선종, 고환암, 위암, 육종, 전립선암, 췌장암, 부신암, 중피종, 악성 흑색종, 포도막 흑색종, 간암, 두경부암, 뇌암, 신경교종, 교모세포종, 식도암, 악성림프종, 담관암, 자궁경부암, 유방암, 방광암, 백혈병, 구강암, 후두암, 소장암 및 대장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 펩타이드.

청구항 7

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 생체 외(in vitro) NF κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) p65, LC3B(light chain 3 B), 또는 이들의 혼합 단백질의 발현 억제용 시약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 예방 또는 치료용 펩타이드 및 그의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 암 예방 또는 치료용 펩타이드, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 시약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] The Cancer Genome Atlas (TCGA) 연구 네트워크에 의한 분자 프로파일링은 230개의 폐 선암종 종양에서 암유전자 KRAS(33 %)에 대한 매우 빈번한 돌연변이를 확인했다. 그러나 이러한 KRAS 단백질은 수년간 조절할 수 없는 것으로 여겨졌다. 또한 KRAS 단백질은 GDP/GTP 결합 부위를 제외하고 약물을 결합시키기에 적합한 포켓을 가지고 있지 않았다. 이러한 KRAS 단백질에 대한 직접 표적을 피하기 위해 KRAS의 하위 경로에 대한 대안적인 연구들이 수행되고 있다. PI3K/PKB 및 RAF/MEK/ERK 경로를 통한 KRAS 신호 전달은 생존 및 세포 성장과 같은 과정을 조절한다.

[0004] AKT라고도 알려진 단백질 키나아제 B(PKB)는 여러 가지 암 중에서도 폐암에서 가장 많이 활성화된다. 이러한 PKB는 다른 단백질을 인산화시켜 신호를 활성화시키는 신호단백질이다. 또한 PKB의 downstream effector인 nuclear factor-kappa B(NF- κ B)는 세포 증식, 세포 사멸, 발병 및 전이를 예방하는 암 발달에 중요한 전사인자이다. Transmembrane Protein 39A(TMEM39A)는 헬리컬 도메인을 포함하는 TMEM 단백질 계열 중 하나이다.

[0005] 최근에는 40개 이하의 아미노산으로 정의된 펩타이드가 암을 치료할 수 있는 신약으로 주목받고 있다. 2010 년 Sipuleucel-T는 암 치료제로서 전립선 암에 대한 최초의 상업적으로 이용 가능한 펩타이드 기반 백신이 된 바 있다. 또한 최근의 연구는 낮은 생물학적 안정성과 빠르게 분해되는 펩타이드의 문제점을 극복하기 위해 펩타이드의 생물학적 안정성을 향상시키는 데 초점을 맞추고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 N-말단에 미리스트산을 결합시킨 인간 TMEM39A PKB 기질 모티프 유래 펩타이드 TMEM39AS41가 약제로써 사용되기 위한 중요한 요소인 세포 투과성이 높고 효과적인 종양 진행 억제 효과를 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 암 예방 또는 치료용 펩타이드, 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 시약 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 암 예방 또는 치료용 펩타이드를 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 생체 외(in vitro) NF κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) p65, LC3B(light chain 3 B), 또는 이들의 혼합 단백질의 발현 억제용 시약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드는 PKB 기질 모티프를 포함하고 있어 여러 가지 암에 대한 예방 및 치료용 펩타이드로 유용하게 사용할 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드는 안전성이 증대되고 높은 세포 투과성을 갖는 펩타이드이며 이를 이용하면 효과적으로 종양의 진행을 억제시킬 수 있는 바, 암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품 등으로 다양하게 활용할 수 있다. 또한 암의 발생에 관여하는 경로를 조절하므로 해당 경로에 관련된 암 진행 억제 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 TCGA RNA 시퀀싱 데이터를 통해 *TMEM39A* mRNA 발현이 폐 선암종을 포함한 대부분의 암 유형에서 증가함을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 *TMEM39AS41* 펩타이드에 대한 개략도를 나타낸 도이다. 밑줄 쳐져 있는 S는 인산화된 부위를 나타내며, h는 나선형 영역을 나타낸다.

도 3은 ELISA 기반 *in vitro* 키나아제 분석 결과 본 발명 *TMEM39AS41* 펩타이드의 세린 41에서 유의하게 인산화가 증가함을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 세포 투과성 확인 결과 대조군인 비오틴-표지된 *TMEM39AS41* 펩타이드의 형광 신호가 검출되지 않음을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 세포 투과성 확인 결과 본 발명의 Myristic acid-*TMEM39AS41* 펩타이드가 우수한 세포 투과성을 나타냄을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 실시간 세포 분석 결과 본 발명의 Myristic acid-*TMEM39AS41* 펩타이드가 대조군 대비 세포 증식을 억제 시킴을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 펩타이드 처리 167시간 후에 배양 배지의 색깔을 확인한 결과 본 발명의 Myristic acid-*TMEM39AS41* 펩타이드 처리시 세포 성장이 억제됨을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 펩타이드 처리 후 180시간 동안 JuLI™ 분석 결과 본 발명의 Myristic acid-*TMEM39AS41* 펩타이드 처리시 급격한 세포 사멸이 일어남을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 면역블롯 분석 결과 본 발명의 Myristic acid-*TMEM39AS41* 펩타이드는 A549 세포에서 NF κ B p65 및 LC3B 수준을 유의하게 감소시킴을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 도 9에서의 결과를 수치화하여 상대적 단백질 함량을 그래프로 나타낸 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 DPBS로 희석된 본 발명의 Myristic acid-*TMEM39AS41* 펩타이드를 KRAS-돌연변이 NSCLC 마우스 모델(KRAS^{LA1} 마우스)에 투여하는 투여 프로토콜을 도식화하여 나타낸 도이다.

도 12는 KRAS^{LA1} 마우스를 희생시킨 당일에 수득한 폐 종양을 실제 촬영한 이미지를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 암 예방 또는 치료용 펩타이드를 제공한다.

[0018] 본 발명의 펩타이드는 인간 *TMEM39A*의 유래 펩타이드이다. 또한 Ser 41 (세린 41, S41)이 포함된 RXRXXS의 아미노산 서열로 표시되는 모티프를 포함하는 펩타이드로서 “*TMEM39AS41*”로 명명하였다. 상기 X는 A, K, N, D, C, H, I, M, S, V, G, L, P, T, F, R, Y, W, E 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0019] 또한 상기 모티프는 PKB의 기질 모티프이며 이를 함유함으로써 PKB와 더 높은 결합 친화도를 가질 수 있으며 여

러 가지 암에 대한 예방 및 치료용 펩타이드로 사용할 수 있다. 또한 상기 모티프는 PKB(protein kinase B), ROCK(rho-associated protein kinase), RSK(ribosomal protein kinase), S6K(S6 kinase) 및 SGK(serum glucocorticoid kinase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 키나아제에 의해 인산화될 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 이러한 PKB 이외에도 여러 가지 암 관련 키나아제에 의해 인산화됨으로써 다양한 경로로 여러 가지 암에 대해 작용할 수 있다.

[0020] 상기 펩타이드는 N-말단이 미리스토일화(myristoylation)된 펩타이드일 수 있다. 상기 미리스토일화를 통해 N-말단을 미리스트산(Myristic acid)과 결합시킴으로써 세포 투과성 부여를 위한 펩타이드의 서열 변화 없이, 본원 발명 TMEM39AS41 펩타이드가 향후 약제로써 사용되기 위한 중요한 요소인 세포 투과성을 증대시킬 수 있다.

[0021] 또한 상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화(amidation)된 펩타이드일 수 있다. C-말단을 아미드화함으로써 본원 발명 TMEM39AS41 펩타이드의 분해를 방지하여 생물학적 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0022] 따라서 본 발명의 펩타이드는 바람직하게는 N-말단이 미리스토일화(myristoylation)되고 C-말단이 아미드화(amidation)된 펩타이드일 수 있다.

[0023] 본 발명의 암은 폐암, 안구암, 피부암, 자궁암, 갑상선암, 흉선종, 고환암, 위암, 육종, 전립선암, 췌장암, 부신암, 중피종, 악성 흑색종, 포도막 흑색종, 간암, 두경부암, 뇌암, 신경교종, 교모세포종, 식도암, 악성림프종, 담관암, 자궁경부암, 유방암, 방광암, 백혈병, 구강암, 후두암, 소장암 및 대장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다.

[0024] 본 발명에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드는 PKB 기질 모티프를 포함하고 있어 여러 가지 암에 대한 예방 및 치료용 펩타이드로 유용하게 사용할 수 있다. 또한 안전성이 증대되고 높은 세포 투과성을 갖는 펩타이드로서 효과적으로 약제로 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.

[0028] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분 (corn starch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘, 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스 (tragacanth), 젤라틴, 셀락 (shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린, 펙틴 (pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.

[0029] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며 (예: 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA], 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니나 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

[0030] 본 발명의 약학적 유효량은 환자의 상처 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 통상 본 발명의 약학 조성물의 일일 유효량을 환자에 적용시 0.00001 내지 10000 μ g일 수 있다. 상기 1 일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.

[0031] 그러나, 본 발명의 약학적 조성물의 상기 사용량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도, 상처 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 유효량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니된다.

[0032] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 암 예방 또는 치료용 펩타이드를 유효성분으로 포

합하는 약학적 조성물을 이용하면 효과적으로 종양의 진행을 억제시킬 수 있는 바, 암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 의약품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명에 있어서, "개체"란 인간, 소, 개, 돼지, 닭, 양, 말을 포함한 포유동물을 의미하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 개체는 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자로 암 치료 중인 환자, 암 치료를 받은 적이 있는 환자, 암 치료를 받을 필요가 있는 환자를 모두 포함하며, 암 치료를 위하여 외과적 수술을 시행한 환자 또한 포함될 수 있다.

[0036] 또한 본 발명의 펩타이드는 이 외 기존의 암 치료를 위한 약물 또는 치료방법과 병용하여 처리될 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 병용 처리하는 경우, 이는 암 치료를 위한 다른 약물 또는 치료방법과 동시에 또는 순차적으로 처리될 수 있다.

[0038] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 생체 외(in vitro) NF κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) p65, LC3B(light chain 3 B), 또는 이들의 혼합 단백질의 발현 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0039] 상기 NF κ B 및 LC3B는 세포 증식 및 세포 사멸과 관련된 암 발달에 중요한 인자이다. 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드는 NF κ B 및 LC3B의 발현을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 상기 시약 조성물을 사용하면 생체 외(in vitro) NF κ B p65, LC3B, 또는 이들의 혼합 단백질의 발현이 억제됨을 확인할 수 있어 암 진행 억제 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 처리하는 단계;를 포함하는, 생체 외(in vitro) NF κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) p65, LC3B(light chain 3 B), 또는 이들의 혼합 단백질의 발현 억제 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 “식품”은, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 시알릴락토오스를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일 통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 첨가하여 제조할 수 있다.

[0045] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0046] 상기 용어 “의약품”은 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니한 물질일 수 있으며, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물질 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 또는 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물질 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물질을 의미한다.

[0047] 본 발명의 의약품 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0048] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 암 예방 또는 치료용 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물 또는 의약품 조성물을 이용하면 안전하고 효과적으로 암의 진행을 억제시킬 수 있는 바, 암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 기능성 식품 및 의약품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

- [0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0051] **재료 - 펩타이드, 화합물 및 항체.**
- [0052] 모든 펩타이드는 GL Biochem (Shanghai) Ltd (Shanghai, China)에서 구입하였다. 각각의 펩타이드는 N-말단 바이오틴화(biotinylated), N-말단 미리스트산(myristic acid) 결합, 또는 C-말단 FITC 결합되고, C-말단 아마이드화(amidated)되었다. 펩타이드는 순도가 90 % 이상이며 10 mM 또는 100 mM의 DMSO(dimethylsulphoxide) 저장용액 하에서 영하 20 °C 조건으로 저장하였다. 100 mM DMSO 저장용액 내 정맥주사용 미리스트산 결합 펩타이드는 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 희석하고 100 °C에서 5분간 끓인 다음 불텍싱하여 용해시켰다. Alexafluor 488 결합 스트렙타비딘(s11223)은 Life Technologies에서 구입하였다.
- [0053] 사용한 항체의 출처는 다음과 같다. LC3B (L7543)는 Sigma-Aldrich로부터, NF- κ B p65 (sc8008)는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구매하였고, phospho-AKT substrate (RXRXXS/T-p) (#10001)는 Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA)로부터 구매하였다.
- [0055] **실험예 1. 세포 배양 및 형질도입(transfection)**
- [0056] A549 세포를 10 % 태아 소 혈청 (Biowest, Kansas City, MO, USA)과 1 % 항생제-항균제 (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA)가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium/high-glucose(WELGENE Inc., Daegu, South Korea) 내에서 37 °C, 5 % CO₂ 조건 하에 배양시켰다. 그 후 세포는 일렉트로포레이션(Electroporation)을 위해 Neon® 형질전환 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 형질도입시켰다.
- [0058] **실험예 2. 면역형광법(Immunofluorescence)**
- [0059] A549 세포를 8-웰 챔버 슬라이드(Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에서 배양하고, 펩타이드를 처리한 후, 실온에서 10분 동안 3 % 파라포름알데히드(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)에 고정시켰다. 5 분 동안 0.5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)으로 투과시킨 후 30 분 동안 블락킹하고 0.1 % 사포닌(Sigma-Aldrich) 및 3 % 소 혈청 알부민(Biosesang, 성남, 한국)이 PBS(phosphate-buffered saline)에 포함된 블락킹 용액 내에서 alexafluor 488 결합된 스트렙타비딘(s11223, Life Technologies)과 배양하였다. 그 후 상기 슬라이드를 PBS로 워싱하고 커버글라스로 덮었다.
- [0061] **실험예 3. 면역블랏(Immunoblot analysis) 분석**
- [0062] 면역블랏 분석을 위해, 세포를 50 mM Tris-HCl, 1 % v/v Nonidet P-40, 40 mM β -글리세롤 포스페이트, 120 mM NaCl, 25 mM 나트륨 플루오라이드, 0.1 mM 소듐 오르토 바나 데이트, 1 mM을 함유하는 pH 7.5 용해 완충액에서 용해시킨 후 2 mM microcystin-LR, 1 mM benzamidine을 4 °C에서 30 분간 처리하였다. 그 후 13,000 $\times$ g에서 30 분간 원심분리하였으며, 단백질 농도를 측정하고 동량의 용해물을 면역 블로킹에 사용하였다. 웨스턴 블라팅은 표지된 일차 항체 및 horseradish peroxidase(KOMA Biotechnology, Seoul, Korea)에 결합된 항-토끼 항체로 수행하고 X-선 필름노출(Agfa-Gevaert N.V, Morstel, Antwerp, Belgium)을 통해 화학 발광을 일으켜 시각적으로 확인하였다.
- [0064] **실험예 4. *in vitro* (생체 외) 키나아제 분석 기반 ELISA**
- [0065] 비오틴 결합된 TMEM39AS41 펩타이드를 스트렙타비딘 코팅된 플레이트 상에 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 펩타이드 코팅된 플레이트를 워싱용액 (0.05 % Tween20(Sigma-Aldrich) 포함된 PBS)으로 3 회 워싱하였다. 상기 코팅된 펩타이드를 A549 세포 용해물과 30 분간 30 °C에서 배양하였다. 플레이트를 3 번 세척하고 항-포스포-AKT 기질 항체 (3 : 1000)를 실온에서 30 분 동안 첨가하였다. 이어서 플레이트를 3 회 세척하고, HRP-결합된 2 차 항체 (3 : 1000)를 실온에서 30 분 동안 첨가하였다. 마지막 3회 세척 후, 100 μ l의 TMB 기질 용액

(Pierce, Rockford, IL, USA)을 30 °C에서 6분 동안 배양하고, 흡광도를 EZ Read 800 마이크로 플레이트 판독기(Biochrom, Berlin, Germany)를 이용하여 650 nm에서 측정하였다.

[0067] 실험예 5. *In vivo* (생체 내) KRAS 폐암 마우스 모델 실험

[0068] 본 실험에서 사용한 모든 동물은 충남대학교 가이드라인에 따른 동물 프로토콜로 유지되었으며, 본 실험은 충남대학교의 동물실험 및 사용위원회 (IACUC)의 승인을 받았다. 인간 비소세포폐암의 모델로 승인된 모델인 KRAS^{LA1} 마우스는 인간 암 컨소시엄-국립 암 연구소(Frederick, MD, USA)로부터 구입하였다. 그 후 동물을 실험실 동물 시설에서 온도와 상대 습도를 각각 12 ± 2 °C 및 40 ± 20 %로 유지하면서 12시간의 명암주기 하에 유지시켰다. 실험은 5주령의 수컷 KRAS^{LA1} 마우스(각각 n = 그룹당 적어도 4마리)로 수행하였다. 모든 마우스 그룹, DMSO 그룹과 펩타이드(30mg/kg 체중) 그룹에는 3주 동안 꼬리 정맥 주사에 의해 마우스당 1회 DMSO로 용해되고 DPBS 희석된 펩타이드 150 µl를 1 주일에 3회 주사했다. 최종 주입 약 24시간 후 마우스를 희생시키고, 개별 종양의 번호를 매겨 추가 연구를 위해 수집하였다.

[0070] 실험예 6. 통계분석

[0071] 데이터는 평균 ± SEM으로 표현하였다. 두 그룹 간의 비교를 위해 Student's *t*-test을 사용하였다. 모든 통계 분석은 GraphPad Software 버전 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0073] 실시예 1. *TMEM39A* 발현과 암 진행 관련성을 확인

[0074] 우선 *TMEM39A*이 인간 암에서 중추적인 역할을 하는지 여부를 확인하기 위해 다중 악성 종양에서 *TMEM39A* mRNA 발현을 모니터링하였으며 이를 도 1에 나타내었다.

[0075] 도 1에 나타낸 바와 같이 Cancer Genome Atlas(TCGA)의 RNA 시퀀싱 데이터(cBioPortal: <http://www.cbioportal.org/index.do>)를 통해 *TMEM39A* mRNA 발현이 정상 조직과 비교하여 폐 선암종을 포함한 대부분의 암 유형에서 증가함을 확인하였다.

[0077] 실시예 2. *TMEM39AS41* 펩타이드 설계 및 인산화 확인

[0078] 인간 *TMEM39A*의 Ser 41 (세린 41, S41)은 PKB 결합 모티프 (RXRXXS)에 포함된다. 또한 상기 모티프를 인식하고 인산화시키는 ROCK, RSK, S6K 및 SGK와 같은 많은 키나아제가 알려져 있다. 이에 본 발명에서는 *TMEM39A*에서 RXRXXS 모티프를 포함하며 GLRNRNGSAIGLPVP 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 설계하였으며 이를 *TMEM39AS41*로 명명하였다. 본 발명의 펩타이드 *TMEM39AS41*에 대한 개략도를 도 2에 나타내었다.

[0079] 또한 세린 41에서의 *TMEM39AS41* 펩타이드 인산화를 PKB, ROCK, RSK, S6K 및 SGK를 포함한 여러 가지 키나아제가 함유된 A549 세포 용해물로 수행하였으며 이에 대한 ELISA 기반 *in vitro* 키나아제 분석 결과를 도 3에 나타내었다.

[0080] 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명 *TMEM39AS41* 펩타이드의 세린 41에서의 인산화는 대조군과 비교하여 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0081] 이러한 결과는 본 발명의 *TMEM39AS41* 펩타이드가 RXRXXS 모티프를 인식하는 키나아제에 의해 인산화된다는 것을 나타낸다.

[0083] 실시예 3. *TMEM39AS41* 펩타이드의 미리스트산(Myristic acid) 결합이 세포내 흡수를 증가시킴을 확인

[0084] 본 실시예에서는 *TMEM39AS41* 펩타이드의 세포 투과성을 알아보기 위해, N-말단 비오틴-표지된 펩타이드를 A549 세포에서 90분 동안 배양하였다. 이에 대한 CLSM 분석 결과는 도 4에 나타내었다.

[0085] 도 4에 나타낸 바와 같이, 비오틴-표지된 *TMEM39AS41* 펩타이드의 형광 신호가 모든 농도에서 검출되지 않음을

확인하였다.

[0086] 이에 다음으로는 TMEM39AS41 펩타이드의 N-말단을 미리스트산과 결합시켰으며 이를 A549 세포에 15분 동안 처리하여 이에 대한 CLSM 분석 결과를 도 5에 나타내었다.

[0087] 도 5에 나타난 바와 같이, 미리스트산과 결합된 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드는 농도 의존적으로 세포내 흡수가 증대된 것을 확인하였다. 이러한 결과는 N-말단 미리스트산의 결합이 펩타이드의 세포 투과성을 증대시켰음을 나타낸다.

[0089] 실시예 4. TMEM39AS41 펩타이드가 A549 폐암 세포주에서 세포 성장을 억제시킴을 확인

[0090] TMEM39AS41 펩타이드가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해, 실시간 세포 분석기를 사용하여 A549 세포의 증식을 분석하였으며 이에 대한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0091] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드는 대조군 및 비오틴-TMEM39AS41 펩타이드에 비해 농도 의존적으로 세포 증식을 억제시킴을 확인하였다. 특히 본 발명의 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드를 30 μ M 용량으로 48시간 처리하였을 때 대조군 대비 세포성장 속도가 현저하게 감소하였고 120시간 후에는 세포 사멸이 관찰됨을 확인하였다.

[0092] 또한 펩타이드 처리 167시간 후에 배양 배지의 색깔을 확인하였으며 이에 대한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0093] 도 7에 나타난 바와 같이, Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드(30 μ M) 군에서는 대조군에 비해 높은 pH를 의미하는 붉은색을 나타내어 펩타이드가 세포 성장을 억제시켰음을 확인하였다.

[0094] 또한 펩타이드 처리 후 180시간 동안 JuLI™ 분석을 수행하여 이에 대한 결과를 도 8에 나타내었다.

[0095] 도 8에 나타난 바와 같이, Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드(30 μ M) 군에서는 대조군과 비교하여 급격한 세포 사멸이 관찰되었다.

[0096] 이러한 결과들은 본 발명의 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 A549 세포에서 세포 사멸을 일으킴을 의미한다.

[0098] 실시예 5. Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 염증/자가소화(inflammation/autophagy) 경로를 억제시킴을 확인

[0099] 이전의 연구들에 의해 자가소화 작용이 염증 유도에 필수적임이 밝혀졌으며 이러한 자가소화는 암을 포함한 면역 질환의 발병 기전에 중추적인 역할을 한다. 이에 염증 및 자가소화 신호가 TMEM39AS41 펩타이드 처리에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하기 위해, Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드로 48시간 처리한 A549 세포의 용해물을 사용하여 면역 블롯 분석을 수행하였다. 이에 대한 결과를 도 9에, 이를 수치화하여 상대적 단백질 함량을 그래프로 나타낸 결과를 도 10에 나타내었다.

[0100] 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 A549 세포에서 NF κ B p65 및 LC3B 수준을 유의하게 감소시킴을 확인하였다.

[0101] 이러한 결과는 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 염증/자가소화 경로를 통한 암의 진행을 억제시킴을 의미한다.

[0103] 실시예 6. Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 KRAS^{LAI} 폐암 마우스의 종양 진행을 억제시킴을 확인

[0104] 본 실시예에서는 *in vivo* 상에서 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 종양의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, KRAS-돌연변이 NSCLC 마우스(murine) 모델을 사용하였다. Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드는 생체내 생물학적 안정성을 향상시키기 위해 C-말단 아미드화로 변형시켰다. 그 후 100 mM DMSO(dimethylsulphoxide) 저장용액 상의 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 완전히 희석시키고 3주 동안 종양에 주 3회 정맥 주사하였다. 상기 투여 프로토콜에 관하여 도식화하여 도 11에 나타내었다.

- [0105] 또한 KRAS^{LA1} 마우스를 희생시킨 당일에 수득한 폐 종양을 실제 촬영한 이미지를 도 12에 나타내었다.
- [0106] 도 12에 나타낸 바와 같이, Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 30 mg/kg를 처리하였을 때 절제된 종양의 크기가 대조군 대비 감소한 것을 확인하였다.
- [0107] 이러한 결과는 본 발명의 Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드가 종양의 진행을 억제시킴을 나타낸다.
- [0109] **제제예 1. 의약품의 제조**
- [0110] 1.1 산제의 제조
- [0111] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 200mg
- [0112] 유당 100mg
- [0113] 탈크 10mg
- [0114] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0116] 1.2 정제의 제조
- [0117] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 100mg
- [0118] 옥수수전분 100mg
- [0119] 유당 100mg
- [0120] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0121] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0123] 1.3 캡슐제의 제조
- [0124] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 100mg
- [0125] 옥수수전분 100mg
- [0126] 유당 100mg
- [0127] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0128] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.
- [0130] 1.4 주사제의 제조
- [0131] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 10 µg/ml
- [0132] 주사용 멸균 증류수 적량
- [0133] pH 조절제 적량
- [0134] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0136] 1.5 액제의 제조
- [0137] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 100mg
- [0138] 설탕 20g
- [0139] 이성화당 20g

- [0140] 레몬향 적량
- [0141] 정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0143] **제제예 2. 식품의 제조**
- [0144] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 100mg
- [0145] 비타민 혼합물 적량
- [0146] 비타민 A 아세테이트 70 μg
- [0147] 비타민 E 1.0 mg
- [0148] 비타민 B1 0.13 mg
- [0149] 비타민 B2 0.15 mg
- [0150] 비타민 B6 0.5 mg
- [0151] 비타민 B12 0.2 μg
- [0152] 비타민 C 10 mg
- [0153] 비오틴 10 μg
- [0154] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [0155] 엽산 50 μg
- [0156] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0157] 무기질 혼합물 적량
- [0158] 황산제1철 1.75 mg
- [0159] 산화아연 0.82 mg
- [0160] 탄제1인산칼륨 15 mg
- [0161] 제2인산칼슘 55 mg
- [0162] 구연산칼륨 90 mg
- [0163] 탄산칼슘 100 mg
- [0164] 염화마그네슘 24.8 mg
- [0165] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.
- [0167] **제제예 3. 음료의 제조**
- [0168] Myristic acid-TMEM39AS41 펩타이드 100mg
- [0169] 구연산 1000 mg
- [0170] 올리고당 100 g
- [0171] 매실농축액 2 g
- [0172] 타우린 1 g

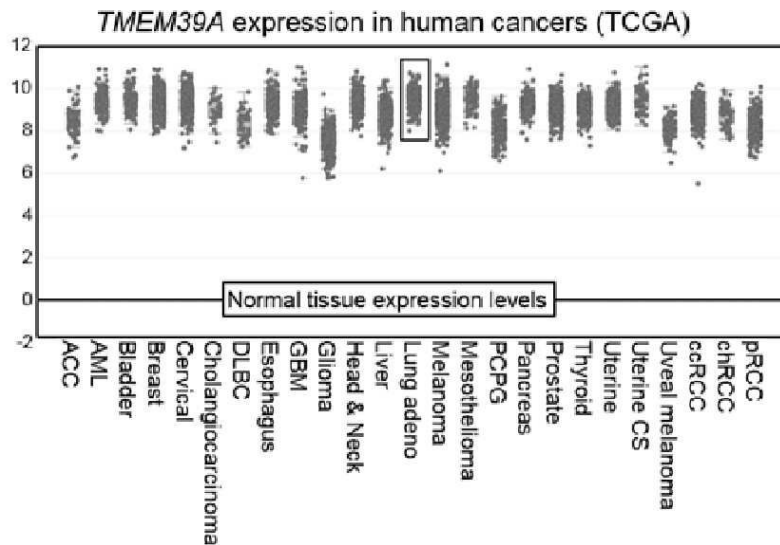
[0173] 정제수를 가하여 전체 900 ml

[0174] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

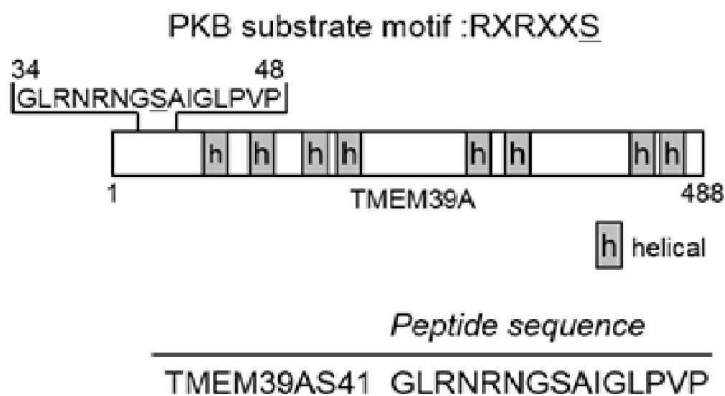
[0175] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

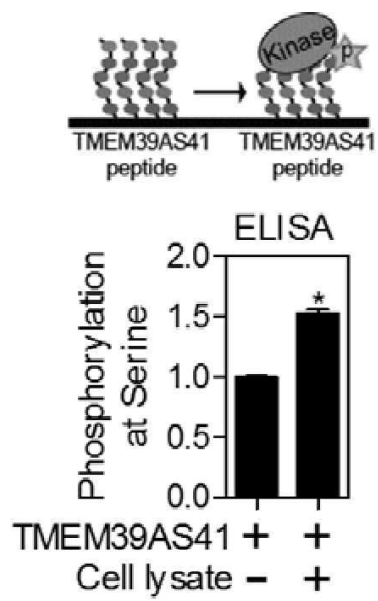
도면1



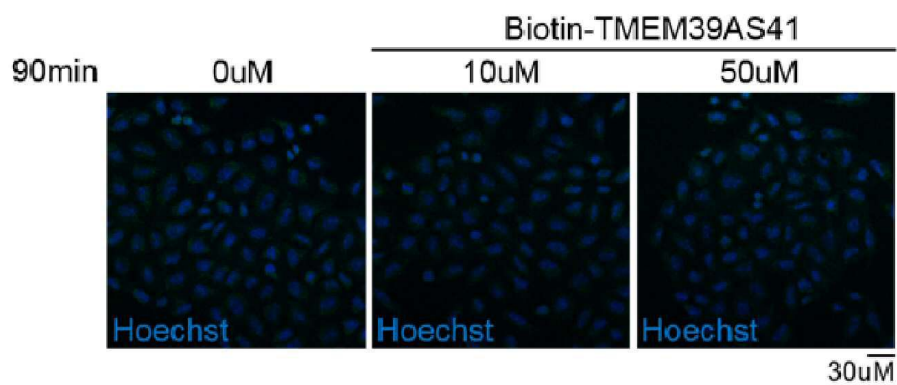
도면2



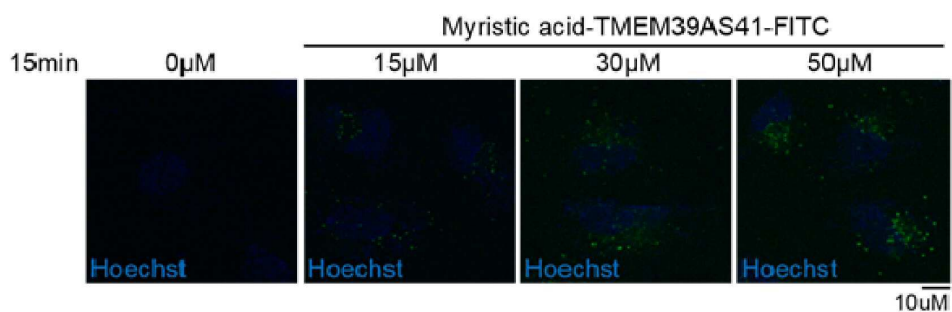
도면3



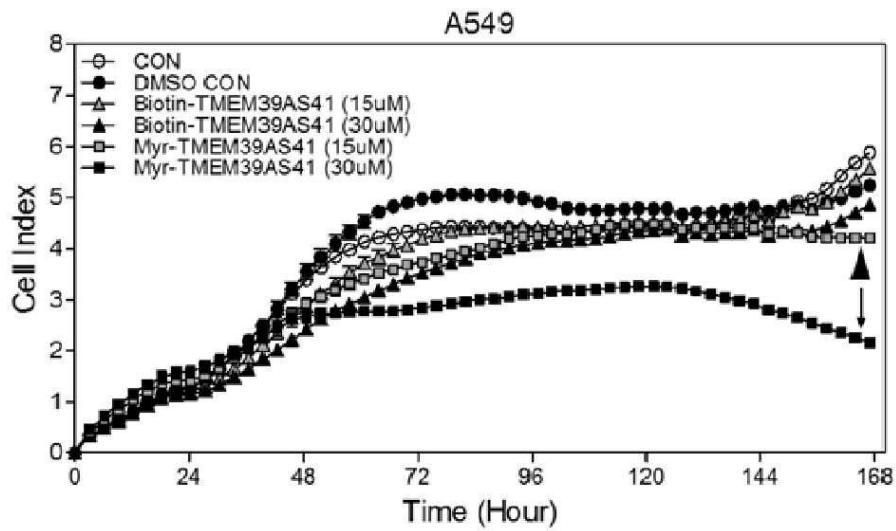
도면4



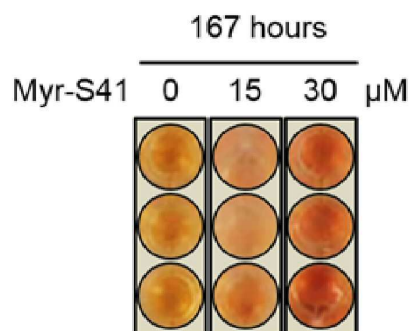
도면5



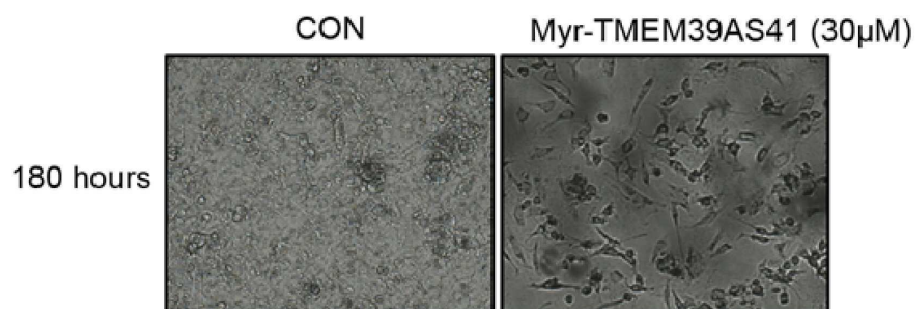
도면6



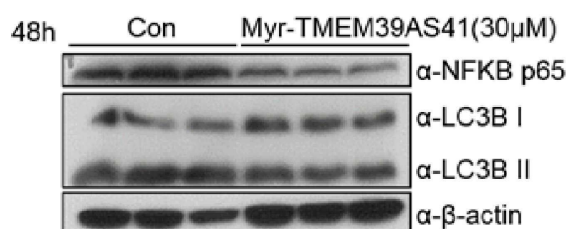
도면7



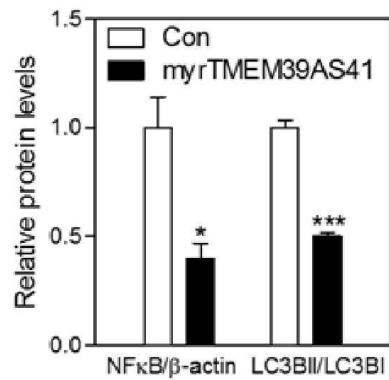
도면8



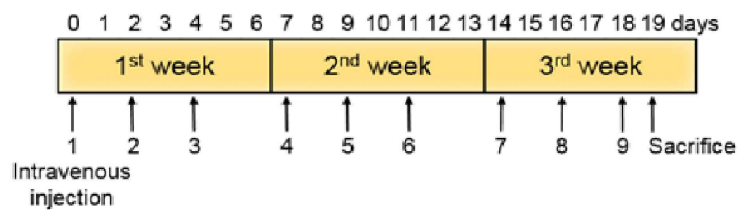
도면9



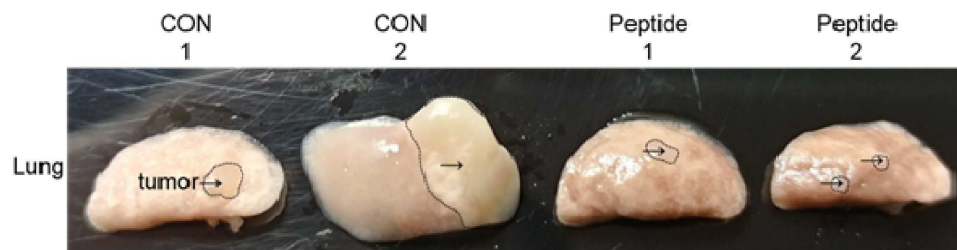
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Peptides for prevention and treatment for cancer and use thereof
- <130> CNU1.60P
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TMEM39AS41
- <400> 1

Gly Leu Arg Asn Arg Asn Gly Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Pro
1 5 10 15