(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 6 월 20 일 (20.06.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/117691 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/016022

(22) 국제출원일: 2018 년 12 월 17 일 (17.12.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0173305 2017 년 12 월 15 일 (15.12.2017) KR
10-2018-0161981 2018 년 12 월 14 일 (14.12.2018) 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: 이병헌 (**LEE, Byung-Heon**); 42038 대구시 수성구 동원로 135, 103동 1106호., Daegu (KR). 칸파티마 (**KHAN, Fatima**); 41944 대구시 중구 국채보상로 680, 생화학교실, Daegu (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (**TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

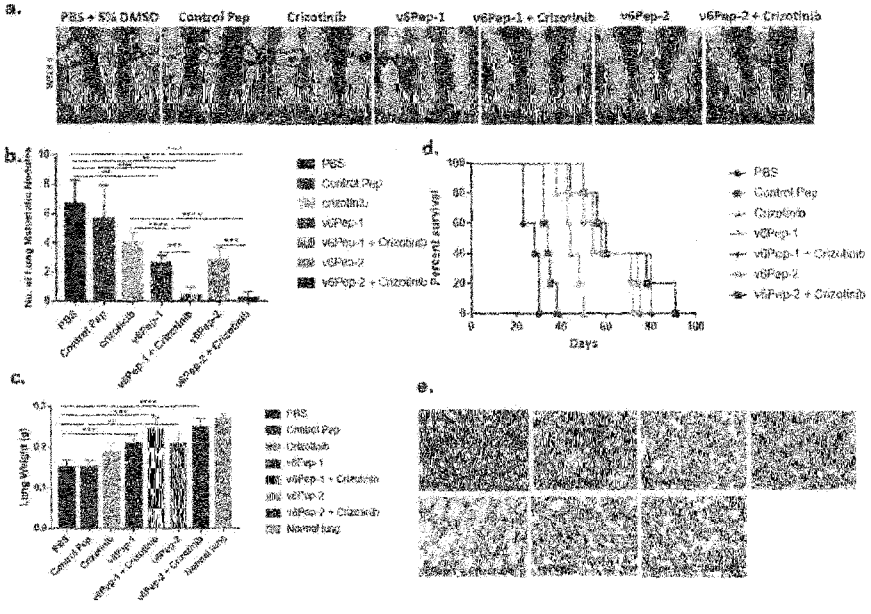
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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,

WO 2019/117691 A1

(54) **Title:** PEPTIDES BINDING TO CD44V6 AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** CD44v6에 결합하는 펩타이드 및 이의 용도

[도 7]



(57) **Abstract:** The present invention relates to peptides binding to CD44v6 and a use for inhibiting cancer metastasis by using the same. The peptides of the present invention specifically bind to and inhibit CD44v6, and thus exhibit the effect of inhibiting migration and metastasis of cancer cells. The peptides of the present invention have been obtained by selecting two types of peptides (v6Pep-1 and v6Pep-2) that bind well to cells in which human CD44v6 proteins are highly expressed by using phage peptide display technology, and it has been found that the peptides interfere with binding between c-Met and CD44v6 and inhibit migration of cancer cells. The peptides of the present invention are relatively stable in a serum and exhibit a high possibility as an anticancer therapeutic agent for inhibiting metastasis caused by progression and migration of cancer in the future.

[다음 쪽 계속]

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, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, 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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 CD44v6 에 결합하는 펩타이드 및 이를 이용한 암 전이 억제 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 펩타이드는 CD44v6 과 특이적 결합하여 이를 억제함으로써 암세포의 이동 및 전이를 억제하는 효과를 나타낸다. 본 발명의 펩타이드는 파지 펩타이드 디스플레이 기술을 이용하여 사람의 CD44v6 단백질을 높게 발현시킨 세포를 대상으로 이와 잘 결합하는 두 종의 펩타이드(v6Pep-1 및 v6Pep-2)를 선별한 것으로, c-Met 과 CD44v6 간의 결합을 방해하며 암세포의 이동을 억제하는 것을 확인하였다. 본 발명의 펩타이드는 혈청 내에서 비교적 안정하여 향후 암의 진행 및 이동에 따른 전이를 억제하는 항암치료제로서 높은 가능성을 나타내고 있다.

명세서

발명의 명칭: CD44v6에 결합하는 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 CD44v6에 결합하는 펩타이드 및 이를 이용한 암 전이 억제 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 높은 전이 가능성 및 줄기세포-유사 특성이 있는 암세포는 막관통 당단백질의 CD44 패밀리 멤버들을 발현하는데, 특히 여러 인간 암들의 공격적 단계에서 전이를 결정하는 인자로 알려진 CD44v6 이성질체(isoform)을 발현한다. CD44는 일반적으로 1차 리간드인 히알루론산(hyaluronic acid; HA)과 결합하고, 분자량은 80 내지 200 kDa 범위이다. CD44 단백질의 이질성(heterogeneity)은 10개 가변 엑손의 선택적 스플라이싱 및 추가적인 번역 후 변형에 기인한다. 인간 CD44 유전자는 염색체 11p13의 짧은 팔에 위치하고, 마우스에서는 염색체 2에 모든 CD44 단백질이 암호화된다. CD44 염색체는 20개의 엑손으로 구성되어 있으며, 그 중 10개는 CD44 변이체라 불리며, 스플라이싱에 있어 역할을 담당하고, "v"는 변이체의 약자로 CD44v (1v-10v)로 명명된다. 상기 이성질체는 세포 및 세포외 기질 사이의 접촉을 매개함으로써, 세포 분화, 세포 이동 및 세포 행동을 조절하고 참여하는데, 이는 조직 무결성(integrity)을 유지하는데 필수적이다. 이러한 중요한 기능들 때문에, 이들은 종양 진행 및 전이를 포함하는 병리학적 조건에 관련되는 경향이 있다. 특이적인 CD44 변이체들은 특정 암 전이 줄기세포에서 높게 발현되는 것으로 밝혀졌다.

[3] CD44v6은 많은 암에 관여하는 것으로 알려졌으며, 변이의 빈도가 높은 CD44v6-v10은 전이성 증식에 관여하는 것으로 보고되었는데, 예를 들면, 엑손 v6은 암세포의 전이를 촉진시키는 것으로 나타났다. 전이성 암에서의 CD44v6 펩타이드의 역할은 도 13에 나타냈다. 이전 보고에 따르면, 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)의 결합에 의한 상피세포의 c-Met 활성화에 있어, HGF는 이성질체를 포함하는 CD44 엑손 v6에 의존적인 점에서, 변이체 엑손 v6을 포함하는 CD44 이성질체는 전이 결정인자 역할을 한다. 즉, 전이에 있어 CD44v6의 역할은 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase; RTK)인 c-Met과 상호작용하여 HGF의 작용을 매개하는 것으로 알려져 있다. 상기 v6 펩타이드의 억제 작용은 CD44v6와 c-Met 간의 협동 수용체 작용을 차단시켜 종양세포의 침습 및 전이 확대를 억제시키므로 더 안정적이고 시스템적으로 사용가능한 화합물을 개발할 수 있는 가능성을 제시한다.

[4] 많은 암세포에서 c-Met 수용체를 통한 활성화 및 신호전달은 CD44v6-특이 항체, CD44v6 siRNAs 및 CD44 변이체 v6-특이 펩타이드 등을 통해 차단할 수 있다. CD44v6 이성질체는 c-Met 의존적 신호전달에 있어 이중 역할을 한다. 여러

보고에 따르면, 여러 인간 종양에서 CD44 이성질체의 증가는 나쁜 예후와 관련되어 있다. 고도 비호지킨 림프종에서 CD44v6 이성질체의 발현이 확인되었고, 나쁜 예후와 관련되어 있었다. 또한, 대장암 및 난소암에서의 CD44v6 및 CD44v8-v10의 발현도 나쁜 예후와 관련되어 있었는데, 이는 정밀한 진단 인자로 고려될 수도 있다. 자궁경부암에서도, CD44v6 및 CD44v7-v8의 높은 발현은 나쁜 예후와 관련되어 있었고, 위암에서도 CD44v6 및 CD44v5의 발현은 상향조절되었다. 한편, 인간화 단일클론 차단 항체들도 개발되었고, 임상에 적용되었으나, CD44v6에 결합하여 이를 차단할 수 있는 펩타이드에 대한 개발 필요성은 매우 높다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 CD44v6에 결합하는 펩타이드 및 이의 용도에 대한 것으로, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CD44v6에 특이적으로 결합하는 펩타이드 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물, 암 예방 또는 치료용 약학조성물, 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 약물 전달용 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[6] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CD44v6에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터 및 상기 재조합벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[8] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

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

[11] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[12] 본 발명은 CD44v6에 결합하는 펩타이드 및 이를 이용한 암 전이 억제 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 펩타이드는 CD44v6과 특이적 결합하여 이를 억제함으로써 암세포의 이동 및 전이를 억제하는 효과를 나타낸다. 본 발명의 펩타이드는 파지 펩타이드 디스플레이 기술을 이용하여 사람의 CD44v6 단백질을 높게 발현시킨 세포를 대상으로 이와 잘 결합하는 두 종의

펩타이드(v6Pep-1 및 v6Pep-2)를 선별한 것으로, c-Met과 CD44v6간의 결합을 방해하며 암세포의 이동을 억제하는 것을 확인하였다. 본 발명의 펩타이드는 혈청 내에서 비교적 안정하여 향후 암의 진행 및 이동에 따른 전이를 억제하는 항암치료제로서 높은 가능성을 나타내고 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 파지 디스플레이를 사용한 CD44v6 결합 펩타이드 선별 결과를 나타낸다. (a) CD44v6을 발현하는 DNA로 형질감염된 HEK-293 세포 및 형질감염되지 않은 세포의 면역형광 염색 결과이다. (b) 스크리닝 라운드 동안 파지 역가 집적 결과이다. (c) FACS 분석을 통한 MDA-MB-231, HELA, 4T1 및 MCF-7 세포에 대한 CD44v6 펩타이드의 상대 결합 결과이다. (d) CD44v6 발현 MDA-MB-231, HELA, 4T1 세포 및 CD44v6 비-발현 MCF-7 세포에서의 CD44v6 펩타이드 및 CD44v6 항체의 동시 위치화 결과이다. (e) CD44v6 펩타이드의 세포 결합 친화도 결과이다.

[14] 도 2는 v6Pep-1 및 v6Pep-2의 CD44v6 특이적 세포 결합 결과를 나타낸다. (a) MDA-MB-231 세포주에서 CD44v6 특이적 siRNA를 이용한 유전자 녹다운을 확인하기 위한 웨스턴 블랏 결과이다. (b) CD44v6 유전자 녹다운 후, FITC 표지된 CD44v6 펩타이드가 결합된 세포의 형광세기를 유세포 분석한 결과이다. (c) CD44v6 항체 반응 후, v6Pep-1 및 v6Pep-2로 염색된 MDA-MB-231 세포의 공초점 이미지 분석 결과이다. (d) MDA-MB-231 및 MCF-7 세포에서 CD44v6 항체 및 CD44v6 펩타이드의 경쟁 분석 결과이다. 세포와 펩타이드의 결합율을 3번의 독립적 실험 결과 평균±표준편차로 나타냈다. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ by Students t-test.

[15] 도 3은 v6Pep-1 및 v6Pep-2에 의한 c-Met 및 Erk의 HGF-유도 인산화 억제 결과를 나타낸다. (a) 및 (c) HGF 유도 MDA-MB-231 및 4T1 세포에서 RTKs 및 Erk의 활성화를 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다. (b) 및 (d) CD44v6 펩타이드 및 대조군 펩타이드 존재하에서의 세포 이동 분석 결과이다.

[16] 도 4는 v6Pep-1 및 v6Pep-2에 의한 HGF-유도 c-Met의 내재화 억제 및 CD44v6의 풀다운(pull-down)을 나타낸다. (a) 유방 종양 MDA-MB-231 세포에서, CD44v6 항체 반응 후, FITC-표지된 CD44v6 펩타이드의 공초점 현미경 분석 결과이다. (b) MDA-MB-231 세포에서 HGF 유도에 따른 CD44v6 펩타이드의 공초점 현미경 분석 결과이다. (c) 인산화-c-Met 및 c-Met에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과이다. (d) 스트렙타비딘 및 비오틴 표지된 펩타이드의 접합에 따른 풀다운 분석 결과이다.

[17] 도 5는 생체 내에서(in vivo) CD44v6-발현 인간 유방 종양 세포를 표적으로 하는 CD44v6 펩타이드에 대한 결과를 나타낸다. (a) v6Pep-1 및 v6Pep-2의 종양 호밍(homing) 활성을 생체 내에서(in vivo) 이미지화한 결과이다. (b) 여러 장기에서 CD44v6 펩타이드의 축적에 대한 생체 외(Ex-vivo) 이미지 결과이다. (c) 종양 위치에서의 생체 내(in vivo) 형광 세기를 정량한 결과이다. (d) 종양 및 대조

장기에서의 생체 외(Ex-vivo) 형광세기를 정량한 결과이다. (e) 종양 조직 절편을 공초점 현미경으로 분석한 결과이다.

[18] 도 6은 CD44v6 펩타이드에 의한 인간 유방암 모델의 전이 억제에 대한 결과를 나타낸다. (a) 약물치료 계획표를 나타낸다. (b) 종양 성장의 생물발광 이미지화 및 모니터링 결과이다. (c) 전체 프로톤 플럭스의 정량화 결과이다. (d) 치료 과정 중 체중을 나타낸다.

[19] 도 7은 CD44v6 펩타이드에 의한 인간 유방암 모델의 전이 억제에 대한 결과를 나타낸다. (a) 및 (b) 촬영된 전신 X- ray 및 생물발광 이미지화 결과이다. (c) 22일째 폐 무게를 나타낸다. (d) 생존율을 나타낸다. (e) 동결 폐 절편의 H & E 염색 분석 결과이다.

[20] 도 8은 생체 내에서(in vivo) CD44v6-발현 마우스 유방 종양 세포를 선택적으로 표적하는 CD44v6 펩타이드에 대한 결과를 나타낸다. (a) v6Pep-1 및 v6Pep-2의 종양 호밍(homing) 활성을 생체 내에서(in vivo) 이미지화한 결과이다. (b) 여러 장기에서 CD44v6 펩타이드의 축적에 대한 생체 외(Ex-vivo) 이미지 결과이다. (c) 종양 위치에서의 생체 내(in vivo) 형광 세기를 정량한 결과이다. (d) 종양 및 대조 장기에서의 생체 외(Ex-vivo) 형광세기를 정량한 결과이다. (e) 종양 조직 절편을 공초점 현미경으로 분석한 결과이다.

[21] 도 9는 생체 내(in vivo) 마우스 종양 세포의 전이를 차단하는 CD44v6 펩타이드에 대한 결과이다. (a) 실험 모식도를 나타낸다. (b) 종양 성장의 생물발광 이미지화 및 모니터링 결과이다. (c) 및 (d) 전신 및 폐 부위의 전체 프로톤 플럭스의 정량화 결과이다.

[22] 도 10은 생체 내(in vivo) 마우스 종양 세포의 전이를 차단하는 CD44v6 펩타이드에 대한 결과이다. (a) 종양 접종 후 종양 부피 변화 결과를 나타낸다. (b) 치료 과정 중 체중을 나타낸다. (c) 처리 마지막 단계에서 폐에서의 전이성 종양 종괴의 수를 나타낸다. (d) 종양 무게를 나타낸다.

[23] 도 11은 생체 내(in vivo) 마우스 종양 세포의 전이를 차단하는 CD44v6 펩타이드에 대한 결과이다. (a) 생존율을 나타낸다. (b) 동결 폐 절편의 H & E 염색 분석 결과이다.

[24] 도 12는 생체 내(in vivo) 마우스 종양 세포의 전이를 차단하는 CD44v6 펩타이드에 대한 결과이다. (a) 처리 후, 인산화된 c-Met(P-met) 및 c-Met 항체로 1차 종양 조직을 면역형광염색 분석한 결과이다. (b) 처리 후, 동결 종양 조직의 caspase-3 염색 분석 결과이다.

[25] 도 13은 전이성 암에서의 CD44v6 펩타이드의 역할을 나타낸 모식도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 이에, 본 발명자들은 CD44v6에 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드를 확인하기 위해서, CD44v6을 일시적으로 과발현하는 세포로 파지 디스플레이 펩타이드 라이브러리를 스크리닝하였다. 다수의 스크리닝 후, 선택된 파지

클론을 서열분석하였다. 이 중, 2개의 클론이 대조군 클론 대비 CD44v6 발현 세포와 가장 선택적으로 결합하는 것을 확인하였다. 펩타이드들은 RTK 활성화를 차단시켰고, MDA-MB-231 및 4T1 유방암 마우스에서 종양 성장 및 전이 확대를 억제시켰으며, 크리조티닙(crizotinib)과의 조합에서도 상당한 효과를 확인하였다. 결과적으로 본 발명자들은 CD44v6에 특이적으로 결합하고 이를 억제하는데 효과적으로 사용할 수 있는 펩타이드를 성공적으로 스크리닝하였으며, 상기 펩타이드의 항암 치료제로서의 가능성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[27]

[28] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CD44v6에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 제공한다. 상세하게는, 상기 펩타이드는 c-Met의 인산화를 억제하여 CD44v6 및 c-Met 간의 신호전달을 차단할 수 있다.

[29]

[30] 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 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함되지만(Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Athert on & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989), 이들로 한정되는 것은 아니다.

[31] 또한 본 발명의 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 합성한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 합성할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(예: Biosearch 또는 AppliedBiosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 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 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 이 기술분야에서 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩타이드'라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.

[32]

[33] 본 발명에서 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는

펩타이드는 이의 기능적 변이체를 포함하는 개념이다. "기능적 변이체"란 CD44v6에 특이적으로 결합하는 본 발명의 펩타이드의 성질에는 영향을 미치지 않는 아미노산 위치에서 일부 아미노산의 치환이 발생된 모든 유사한 서열을 의미한다.

[34]

[35] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[36]

[37] 상기 "폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.

[38] 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다.

[39] 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.

[40]

[41] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터를 제공한다.

[42] 또한, 본 발명은 상기 재조합벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[43]

[44] 본 발명에 있어서,"벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[45]

[46] 본 발명에서 있어서, "재조합벡터"는 숙주 세포 내에서 삽입된 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하는 것으로서, 당업계에 공지된 통상의 발현벡터에 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 재조합벡터는 일반적으로 숙주세포에서 증식할 수 있는 복제원점, 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(예. 프로모터, 인핸서 등), 선별 마커(selective marker) 및 발현 조절 서열과 작동가능하게 연결된 본 발명의

펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 형질전환체는 상기 재조합벡터에 의해 형질전환된 것일 수 있다.

[47] 바람직하게는 형질전환체는 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran- mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electropora tion), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포에 도입하여 수득할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

[48]

[49] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[50] 바람직하게는, 상기 암은 CD44v6이 과발현되는 암일 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 CD44v6이 과발현되는 암은 폐암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 또는 편평상피세포암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[51]

[52] 본 발명에서 "진단"이란 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 암의 존재 또는 특징을 확인하는 것이다.

[53] 본 발명의 펩타이드를 이용한 암의 진단은 혈액, 소변이나 바이옵시(biopsy)에 의해 직접 얻은 해당 조직 또는 세포에 본 발명의 펩타이드를 반응시켜 이들의 결합을 검출함으로써 진단할 수 있다.

[54]

[55] 또한, 본 발명의 펩타이드가 암 조직에 결합하였는지 여부를 용이하게 확인, 검출 및 정량하기 위하여, 본 발명의 펩타이드는 표지된 상태로 제공될 수 있다. 즉, 검출가능한 표지에 링크(예: 공유 결합 또는 가교)되어 제공될 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 발색효소(예: 퍼옥시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)), 방사성 동위원소(예: ^{124}I, ^{125}I, ^{111}In, ^{99}mTc, ^{32}P, ^{35}S), 크로모포어(chromophore), 발광물질 또는 형광물질(예: FITC, RITC, 로다민(rhodamine), 시아닌(cyanine), 텍사스레드(Texas Red), 플로레신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 퀀텀닷(quantum dots))등 일 수 있다.

[56] 유사하게, 상기 검출 가능한 표지는 항체 에피토프(epitope), 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또는 친화 리간드일 수 있다. 이러한 표지는 본 발명의

펩타이드를 합성하는 과정 중에 수행할 수도 있고, 이미 합성된 펩타이드에 추가로 수행될 수도 있다. 만약 검출가능한 표지로 형광물질을 이용하는 경우에는 형광단층촬영(Fluorescence mediated tomography:FMT)으로 암을 진단할 수 있다. 예컨대, 형광물질로 표지된 본 발명의 펩타이드를 혈액 내로 순환시키고 형광단층촬영으로 펩타이드에 의한 형광을 관찰할 수 있다. 형광이 관찰된다면, 암으로 진단된다.

[57]

[58] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[59]

[60] 또한, 본 발명은 펩타이드 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[61] 바람직하게는, 상기 항암제는 크리조티닙(crizotinib), 독소루비신, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀, 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌 (bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴, 5-플로오로우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란 (melphalan), 니트로겐 무스타드(nitrogen mustard) 또는 니트로소우레아 (nitrosourea)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[62] 바람직하게는, 상기 암은 CD44v6이 과발현되는 암일 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 CD44v6이 과발현되는 암은 폐암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 또는 편평상피세포암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[63] 바람직하게는, 상기 약학조성물은 암의 전이를 억제시킬 수 있다.

[64]

[65] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의

첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[66] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 본 발명의 조성물은 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.1ng/kg~10g/kg 용량으로 투여할 수 있다.

[67]

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

[69]

[70] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[71] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[72] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[73]

[74] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.

[75]

[76] 본 발명에 따른 펩타이드는 약물을 암 조직에 선택적으로 전달하는 지능형

약물 전달체로서 사용될 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 종래 공지의 약물과 연결하여 암 치료에 이용한다면 본 발명의 펩타이드에 의해 약물이 암 조직 및 암 세포에만 선택적으로 전달되기 때문에 약물의 효력을 증가시킬 수 있고 동시에 정상조직에 미치는 약물의 부작용을 현저히 줄일 수 있다.

[77] 상기 약물은 항암제로서, 본 발명의 펩타이드에 연결될 수 있는 항암제로는 종래 암의 치료에 사용되는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 예컨대, 크리조티닙(crizotinib), 독소루비신, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀, 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌 (bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴, 5-플로오로우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란 (melphalan), 니트로겐 무스타드(nitrogen mustard) 및 니트로소우레아 (nitrosourea) 등이 있다. 항암제와 본 발명의 펩타이드 간의 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.

발명의 실시를 위한 형태

[78] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[79]

[80] **<실험예>**

[81] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[82]

[83] **1. 세포배양**

[84] 인간 배아신장세포 HEK293 (ATCC), 인간 유방암세포 MDA-MB231 (ATCC), 인간 전립선암세포 PANC-1 (KCLB) 및 인간 자궁경부암세포 HELA (ATCC)는 Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen)에서 배양하였다. MDA-MB-231-Red-Fluc-GFP (Bioware) 및 4T1-Red-Fluc-GFP (Bioware)는 10% 우아혈청(fetal calf serum; FCS, PAA Laboratories)이 첨가된 DMEM에서 배양하였다. MCF-7는 10% FCS가 첨가된 RMPI (Invitrogen)에서 배양하였다. 세포들은 습윤 배양기(85%)에서 멸균 조건으로 5% CO_2, 37℃에서 배양되었다. 모든 실험은 멸균된 클린 벤치에서 수행하였다. 80% 컨플루언시(confluency)가

되면, 접착 세포를 계대하였다.

[85]

[86] **2. 항체 및 기타 시약**

[87] CD44v6에 대한 인간 단일클론항체 (VFF-7)는 Santa Cruz로부터 구입하였고, 마우스 단일클론 CD44v6 (VFF-18)는 Abcam으로부터 구입하였고, 토끼 단일클론항체 (AB51037)는 Abcam으로부터 구입하였고, CD44에 대한 인간 단일클론항체 (sc-7297)는 Santa Cruz로부터 구입하였다. Erk 1에 대한 항체 (K-23)는 Santa Cruz로부터 구입하였고, phospho-Erk phospho-p44/42 및 phospho-c-Met (D26), c-Met (25H2) 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, UK)로부터 구입하였다. 재조합 인간 HGF (R&D Systems, Wiesbaden, Germany)는 5% FCS로 밤새도록 활성화시켰다.

[88]

[89] **3. 구조체 및 단백질 생산**

[90] Origene으로부터 구입한 CD44v6 발현 플라스미드 pCMV6-AC-GFP에서 GFP reading frame 21를 제거하기 위해서, PCR 서브클로닝 방법을 이용하여 인간 CD44V6을 코딩하는 서열을 도입하였다. Forward primer는 GGACTTTCCAAAATGTCG이며 Reverse primer는 ATTAGGACAAGGCTGGTGGG를 사용하였다. 발현벡터는 E.coli DH5α로 형질전환시켰고, Mini-Prep Kit (Dokdo-Preparation)를 사용하여 DNA를 분리하여, 일시적인 형질감염을 위한 높은 농도의 DNA를 얻었다.

[91]

[92] **4. 형질감염**

[93] HEK293 세포는 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)으로 6-웰 플레이트에서 제조사의 프로토콜에 따라 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 전, 세포들을 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포 농도로 24시간 동안 접종하였다. 한 웰을 형질감염시키기 위해, 10 $\mu\ell$ Lipofectamine 2000 시약을 250 $\mu\ell$ DMEM에 희석하였고, 상온에서 5분동안 반응시켰다. 혈청 없이, 4 μg의 벡터 DNA를 250 $\mu\ell$ DMEM으로 채우고, Lipofectamine 2000 용액으로 혼합하였다. 혼합물은 상온에서 20분 동안 반응시켰다(웰 당 총 500 $\mu\ell$). 세포의 오래된 배지는 즉시 제거하고, 혈청 없는 새로운 1.5 ml DMEM 배지로 대체하였다. 배양기로 옮기기 전, 500 $\mu\ell$ DNA-형질감염 시약-혼합물을 세포에 첨가하였다. 6시간 배양 후, 배지를 다시 혈청을 함유한 미리 데워진 성장 배지로 대체하였다. 실험을 시작하기 전, 새롭게 삽입된 단백질을 세포에서 발현시켰다.

[94]

[95] **5.** CD44v6 펩타이드 스크리닝을 위한 T7 소수성 라이브러리의 바이오-패닝 (Bio-panning)

[96] CX7C(C, 시스테인; X, 임의의 아미노산 잔기)로 표시되는 T7 415-1b 파지 벡터에 기반한 파지 펩타이드 라이브러리는 제조사의 지침(Novagen, Madison,

WI)에 따라 설계되었다. 상기 파지 라이브러리는 대략 1×10^9 플라크-형성 유닛(plaque-forming unit; pfu)를 가진다. 즉, 형질감염된 HEK-293 세포(GFP)를 35 mm 접시에 분주하였고, 60-70%로 컨플루언트(confluent) 하게 배양하였다. HEK-293 세포의 일시적인 형질감염을 위해, 세포들은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)으로 처리하였다. 실험을 시작하기 전에 상기 세포들은 24-48 시간 동안 CD44v6를 발현하는 새로운 삽입 단백질(GFP)을 발현하도록 하였다. 1×10^9 플라크-형성 유닛(pfu)의 파지 라이브러리를 형질감염된 HEK 293 세포에서 1시간 동안 4℃로 배양하였고, 상기 세포에 결합한 파지를 실온에서 10분 동안 500 μL의 BL21 박테리아 (OD: 1) 배양액으로 용출시켰다. 상기 용출물은 적정에 사용하였고, 잔여 용출 파지는 4℃에서 30분 동안 형질감염되지 않은 세포에서 배양하였다.

[97] 그 후, 비결합 파지는 10 mg/ml 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 함유하는 DMEM으로 씻어냈다. 세포에 결합한 파지는 500 μL의 BL21 박테리아 (OD: 1) 배양액으로 상온에서 10분 동안 용출시켰다. 용출물은 적정에 사용하였고, 잔여 용출 파지 클론은 다음 주기의 증폭을 위해 10 ml의 LB 배지에서 용해시켰고, 상기 과정을 5회 반복하였다. 용출물의 단계별 희석물은 37℃에서 2시간 동안 LB 배지에서 배양된 E. coli로 접종한 후, 파지의 역가는 콜로니의 수를 계수하여 측정하였다.

[98] CD44v6 발현 세포에 특이적인 파지 클론의 선택성을 향상시키기 위해, 파지를 먼저 형질감염된 세포로 배양하여 선별하였다. 본 발명에서는 다음 라운드에서 모든 파지 클론을 증폭 및 파지 농축 방법으로 사용하기 위해 직접 스크리닝 방법을 사용하였다. 파지 클론의 배수적 감소는 5 회 라운드에서 각각 1.9×10^1 배 감소하였다.

[99] 세 번째, 네 번째 및 다섯 번째 라운드의 형질감염된 배양접시로부터 유래한 총 70개의 클론(세 번째 라운드의 20개의 파지 클론, 네 번째 라운드의 20개의 파지 클론, 다섯 번째 라운드의 20개의 파지 클론) 및 비결합 파지 클론을 제외하기 위해 형질감염되지 않은 배양접시로부터 유래한 10개의 클론에 대해 서열 분석을 수행하였다.

[100] 상기에서 수집한 70개의 각 파지 클론들의 DNA 삽입물(DNA inserts)의 DNA 및 아미노산 서열 분석은 각각의 프라이머(Macrogen)를 이용한 자동화된 DNA sequencer (Genotech Inc., Daegeon, Korea)에 의하여 수행하였다. 뉴클레오타이드 서열로부터 유추된 아미노산 서열을 Clustal W 프로그램을 사용하여 정렬하여 컨센서스 서열 또는 펩티드 간에 공유되는 아미노산 모티프를 찾았다. 이들 중 일부 펩타이드를 무작위로 뽑은 다음, 각 펩타이드 서열과 높은 상동성을 갖는 단백질들을 조사하기 위하여 NCBI protein database에 대한 BLAST search가 수행되었다.

[101]

[102] **6. RTKs 및 Erk의 활성화**

[103] 혈청 결핍을 한 (24시간) 세포는 37℃에서 10분 동안 성장인자 HGF (25-50 ng/mL)로 배양하였다. 표시된 경우, 세포를 유도하기 전에 CD44v6 특이 펩타이드 또는 대조 펩타이드 (50㎍/ml)로 37℃에서 10분 동안 처리하고, 세포를 ice-cold PBS로 세정하였다. 활성화된 Erk와 활성화된 c-Met을 검출하기 위해 세포를 100 mM 디티오트레이톨 (DTT)을 함유하는 비등 소듐도데실설페이트 (SDS) 샘플 완충액에서 용해시키고, 인산화된 Erk 및 인산화된 c-Met에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 로딩 대조군을 동일한 블롯에서 수행하고, 스트리핑 (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2 % SDS, 0.8 % DTT)하고 Erk 및 c-Met 항체로 탐침하였다. 블롯은 향상된 화학 발광 시스템 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 염색되었다. 웨스턴 블롯 분석에서 밴드는 ImageJ (National Institutes of Health) 프로그램으로 정량화되었다.

[104]

[105] **7. 풀다운(pull down) 분석**

[106] 비오틴화 된 CD44v6 펩타이드는 세포 용해물과의 배양에 앞서 펩타이드 풀다운을 위해 완만하게 회전시키면서 실온에서 30-60분 동안 단량체 아비딘 자석 비즈 (Bioclone Inc.)와 함께 배양하였다. 단백질 분해 효소 저해제가 함유된 세포 용해 시약 (Thermo scientific)을 사용하여 세포를 용해시켰다. 비오틴화 된 펩타이드 + 아비딘 비드 (복합체 1)의 최초 배양 후 PBS로 세척하고 복합체를 실온에서 완만하게 회전시키면서 30-60 분 동안 세포 용해물과 함께 배양시켰다. 결합된 바이오틴화 된 펩타이드 + 아비딘 비드 + 세포 용해물 (복합체 2)을 용출 후 5 내지 10분 동안 1X 블로킹 완충액 / 용출 완충액에 의해 용리하고, 특정 단백질의 풀다운 분석을 위해 용출액을 CD44v6 항체 (Millipore)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[107]

[108] **8. 이동(migration) 분석**

[109] MDA-MB-231을 웰당 2.5×10^5 세포의 농도로 12-웰 플레이트 상에 분주하였다. 24시간 후, 멸균 피펫 팁을 사용하여 컨플루언트 세포층에 스크래치를 만들었다. 배지를 성장인자 HGF 배지를 HGF를 포함한 신선한 배지로 교체하고, 성장인자로 유도하기 위해 25 ng/ml의 HGF를 37℃에서 10분간 처리하였다. HGF 유도 후 5㎍/ml CD44v6 펩타이드 (각각) 및 두 펩타이드의 조합 (v6Pep-1+v6Pep-2) 또는 5㎍/ml의 대조군 펩타이드를 37℃에서 10분 동안 처리한 후, 0시간, 24시간, 48시간, 60시간에서 시간 간격으로 세포의 사진(원본 배율, ×100)을 찍었다. 컴퓨터 프로그램 ImageJ는 정량적인 평가에 사용되었고, 스크래치에서 세포가 덮는 영역을 정량화하였다.

[110]

[111] **9. siRNA 저해**

[112] 세포는 CD44v6-특이적 siRNA 2가지의 혼합물로 형질감염 시켰다: v6-1: 5'-AGU AGU ACA ACG GAA ATT-39; v62: 59-GGA UAU CGC CAAACA CCC

ATT-3' 또는 비특이적 대조군 siRNA의 풀. 대조군 siRNA (50-CUACGCCAAUUUCGU (dTdT) 30) 및 glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) siRNA (50-UGUGAACCAUGAGAAGUA (dTdT) -30)는 Bioneer에서 구매하였다. 형질감염은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 사용하여 수행하였다. 24 시간 간격으로 2회의 형질감염을 실시하였다. 첫 번째 형질 감염 후 48 시간 동안 세포를 24 시간 동안 혈청-결핍 상태로 배양한 후 추가적 처리를 하였다.

[113]

[114] **10. 동물 실험**

[115] 동물 실험을 위해, 6주에서 8주 된 Balb/c 암컷 마우스를 Orient Bio에서 구입하였다. 경북대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 가이드라인 하에서, 마우스는 사육되고 유지시켰다. Balb/c 암컷 누드 마우스에서 폐전이 모델을 개발하기 위해 꼬리 정맥을 통해 1×10^6 MDA-MB-231 세포를 주사하여 종양을 준비하였고, Balb/c 야생형 암컷 마우스의 좌하 유방 지방 패드에 1×10^6 4T1 세포를 주사하였다.

[116]

[117] **11. 공초점 주사 현미경 분석**

[118] 내재화 된 FITC 표지화 된 펩타이드 v6Pep-1 및 v6Pep-2의 분포를 시각화하기 위해, MDA-MB-231 세포 (1×10^5 세포)를 4 웰 챔버 슬라이드 상에 분주하였다. 완전한 접착 후 세포 배양 배지를 FITC가 표지된 펩타이드 (10 μM)가 함유 된 신선한 배지로 변경하고 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 세포를 PBS로 3 ~ 5 분간 3회 세척한 후 CD44v6 항체 (Santa cruz)로 염색하고, 이어서 Alexa 594-표지된 염소 항-마우스 IgG 2차 항체를 사용하였다. 핵을 DAPI로 염색하고 퇴색 시약으로 유리 슬라이드 상에 장착한 후, 공초점 현미경 하에서 FITC로 표지된 v6Pep-1 및 v6Pep-2 축적을 관찰하였다. 공초점 현미경 (Zeiss, Jena, Germany) 하에서 세포에서 FITC- 표지된 펩티드의 국소화를 관찰하였다.

[119]

[120] **12. in vivo 생체 분포 이미징 분석**

[121] v6Pep1 및 v6Pep-2 또는 대조군 펩타이드의 CD44v6 특이적 종양 표적화 활성을 특정 병원체가 없는 환경에서 자란 6주령의 암컷 BALB/c 누드 마우스 (체중 ≥20 ± 3g)를 사용하여 조사하였다. 종양은 MDA-MB231 세포 (5×10^6 세포)를 오른쪽 측면으로 피하 주사하여 유도하였다. 종양 세포를 2 내지 3주 동안 방치하였다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달한 후, 꼬리 정맥을 통해 v6Pep-1, v6Pep-2 및 NIRF로 표지된 대조군 펩타이드를 마우스 (각 그룹에 대해 n = 3)에 정맥 내 주사하였다. 생체 내 NIRF 이미징은 흡입 마취 하에서 IVIS 루미나 III 이미징 시스템 (Perkin Elmer, Waltham, MA)을 사용하여 수행되었다. v6Pep-1, v6Pep-2 및 대조군 펩타이드의 생체 분포를 조사하기 위해, 생체 내 형광 이미지를 다양한 시점 (각각 1, 2, 4 및 4)에서 주사 전후에 촬영하였다. 생체 내 이미징 후 마우스를

희생시키고 IVIS Lumina III 이미징 시스템을 사용하여 추가 이미징을 하기 위해 종양 및 대조군 기관을 분리하였다.

[122]

[123] **13. ex vivo 이미징 및 면역조직화학 분석**

[124] ex vivo 장기 분포를 분석하기 위해, 동물을 CO_2 주입 6 시간 후 안락사 시켰다. 종양 조직과 함께 모든 주요 장기 (간, 신장, 비장, 심장 및 폐)를 분리하고 PBS로 세척하고 IVIS Lumina III 영상 시스템을 사용하여 ex vivo 형광 이미지를 촬영하였다. 각 장기의 관심 영역 (ROI) 내 형광 강도를 분석하였다. 종양 조직을 4% 파라포름알데히드로 추가로 밤새 고정시키고 급속 동결시켰다. 조직 절편 (8 μm 두께)은 cryo-microtome으로 준비하고 CD44v6 항체 (Santa Cruz)로 염색한 후 Alexa 594로 표지한 염소 항-마우스 IgG 2차 항체를 사용하여 염색하였다. 대조군 펩타이드와 v6Pep-1 및 v6Pep-2 종양 축적은 핵이 DAPI로 염색된 후 공초점 현미경으로 관찰되었다.

[125]

[126] **14. 항암 치료**

[127] 종양의 크기가 약 100 mm^3에 도달할 때 종양 보유 마우스를 무작위화 및 분류하였다. 각각의 펩타이드는 마우스의 꼬리 정맥 (14.2 mg/g 체중, 주 3 회 3 주)을 통해 정맥 내 주사되었다. 크리조티닙(crizotinib)은 이전 연구를 토대로 경구 투여 (25 mg/kg 체중, 3주 동안 1주 3회 투여)되었다. 종양 크기는 디지털 캘리퍼스를 사용하여 측정하였고, 종양 부피는 다음 공식을 사용하여 계산하였다 : 부피 = (L x W x H) / 2 (L : 길이, 가장 긴 치수, W : 폭, 짧은 치수, 마우스 몸체과 평형, H : 높이, 길이와 너비에 수직). 마우스에 종양 궤양이 있는지 검사하였다. 치료가 끝나면 마우스를 희생시키고 폐와 간을 분리하여 전이성 종괴가 있는지 검사하였다.

[128]

[129] **15. MDA-MB-231 폐 전이 모델**

[130] MDA-MB231-luc 세포 (0.1 ml PBS 중 1×10^6)를 암컷 누드 마우스의 외측 꼬리 정맥에 주입하였다. 그 후, 초기 IVIS 영상을 기준으로 마우스를 그룹별 (그룹당 n = 10)로 분리하였다. 0일째부터, 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 정맥 내 주사하여 CD44v6 펩타이드를 투여하였다 (14.2 mg/g 체중, 3주 동안 1주 3회). 마지막 IVIS 이미징 후, 마우스를 안락사시키고 전이성 종괴의 면역조직화학적 분석을 위해 각 마우스로부터 폐 조직을 제거하였다.

[131]

[132] **16. 세포 독성 분석**

[133] MDA-MB-231 세포 (96-웰 플레이트에서 5×10^3 세포/웰)를 무 혈청 배양액에서 다양한 농도를 갖는 v6Pep-1, v6Pep-2 및 두 펩타이드의 조합 (v6Pep-1 + v6Pep-2)으로 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 무 혈청 배지를 10% FBS 함유 배양 배지로 교체한 후, 세포를 24시간 및 48시간 동안 배양한 후 CCK-8 분석

(Dojindo, Kumamoto, Japan)을 사용하여 세포 독성을 평가하였다.

[134]

[135] **17. 혈청 내 펩타이드의 안정성**

[136] 혈청에서의 펩타이드 (v6Pep1 및 v6Pep-2)의 안정성을 조사하기 위해, 마우스로부터의 혈액을 수집하여 응고시킨 후, 4℃에서 2회 원심 분리하여 혈청을 수득한 다음 필터하였다 (0.22㎛ 공극). 펩타이드 (PBS 50 μl 중 100 μg)를 정해진 시간 주기 동안 37℃에서 필터된 혈청 50 μl와 함께 배양하였다. 배양된 샘플을 100배 희석하고 아세토니트릴 (Vydac 단백질 및 펩타이드 C18, 평형에 대해서는 물 중의 0.1% 트리플루오로아세테이트 및 용출에 대해서는 아세토니트릴 중의 0.1 % 트리플루오로아세테이트)의 선형 구배를 갖는 C18 역상 FPLC로 분획화 하였다. C18 역상 FPLC의 프로파일로부터 피크의 동일성을 확인하기 위해, 각 피크를 수집하고, 진공 건조시키고, MALDI-TOF 질량 분석기를 사용하여 질량 분석 (MS)에 의해 분석하였다.

[137]

[138] **18. 혈액학적 파라미터 분석**

[139] 처리 종료 시 마우스 혈액을 채취하여 DGMIF (Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation) (대구, 한국)에서 혈액학적 인자를 분석하였다.

[140]

[141] **<실시예 1> 파지 디스플레이를 이용한 CD44v6-결합 펩타이드의 선별**

[142] CD44v6-결합 펩타이드를 스크리닝하기 위해, 먼저 본 발명자들은 CD44v6-GFP 플라스미드로 일시적인 형질감염시킨 HEK-293 세포를 제조하였다. CD44v6-GFP 플라스미드의 동시 국소화를 확인하기 위해서, HEK-293 형질감염된 세포를 CD44 변이체 6 항체로 염색하였다(도 1a). 면역형광분석으로 확인 후, 일시적인 형질감염 효과는 24 h 및 48 h의 상이한 시간 간격에서 웨스턴 블랏팅으로도 확인하였는데, 형질감염되지 않은 HEK-293 세포와 비교시 각 시간 포인트에서 형질감염된 것을 확인하였다. CD44v6 특이적 펩타이드를 직접 스크리닝 방법으로 선별하기 위해서, 본 발명자들은 각 라운드의 모든 파지 클론들의 집적 역가를 확인하였고, 이는 형질감염되지 않은 역가에 비해 상당히 증가한 것으로, 파지 집적 역가가 5 라운드 동안 라운드당 3.11×10^1 배 증가하는 것을 확인하였다(도 1b). 3번째, 4번째 및 5번째 라운드에서, 20개의 파지 클론들을 무작위로 선별하였고, 파지 클론의 펩타이드-코딩 DNA 삽입체를 서열분석하였다. CD44v6 발현 세포와 높은 특이성으로 결합하는 파지 클론을 파지 결합 ELISA를 통해 선별하였는데, 몇몇 클론들은 여러 발현 및 비발현 세포주에서 결합하는 것으로 나타났다. 다른 파지 클론들과 비교하여, 클론-1 및 클론-2가 CD44v6과 높은 수준으로 결합하는 것을 파지 ELISA 및 파지 면역형광염색을 통해 확인하였는데, 이는 파지 클론의 결합 특이성 및 효과를 확인한 것이다. 2개의 파지 클론은 CD44v6 발현 세포에서 높은 결합 특이성을 나타냈다. 상기 2개 클론의 펩타이드 서열은 다음과 같다.

CNLNTIDTC (v6Pep-1, 서열번호 1), CNEWQLKSC (v6Pep-2, 서열번호 2). 펩타이드 결합은 유세포 분석 및 면역형광분석을 통해 확인하였고, v6Pep-1 및 v6Pep-2는 CD44 변이체 6을 발현하는 세포인 MDA-MB231, HELA, 4T1 및 PANC-1에서, 비발현 MCF-7 및 형질감염되지 않은 HEK-293에 비해 특이적으로 결합하는 것을 동시 국소화 분석을 통해 확인하였다(도 1c 및 도 1d). 이에, MDA-MB-231, 4T1, PANC-1 및 MCF-7 종양 세포에서 결합 친화도를 비교하여, 결합친화도가 향상(낮은 Kd 수치) 되었는지 확인하였다(도 1e). v6Pep-1 및 v6Pep-2 MCF-7과는 특이적인 결합을 보이지 않았고, MDA-MB-231, 4T1 및 PANC-1에서는 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다.

[143]

[144] **<실시예 2> v6Pep-1 및 v6Pep-2의 CD44v6-특이적 세포 결합**

[145] MDA-MB-231 세포는 혈청 결핍 조건으로 24시간 동안 배양한 후, 이후 실험에 적용하였다. CD44v6 발현 억제를 위해, SiRNAs v6-1 및 v6-2을 형질감염시켰고, 상이한 시간 간격으로 유지시켰다. CD44v6 유전자의 침묵을 확인하기 위해서, 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE로 분획화하였고, 멤브레인으로 옮겨 1μg/ml의 CD44v6 및 CD44 항체로 처리하여, 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. siRNA 억제를 확인하기 위해 웨스턴 블랏 분석 결과, CD44v6 특이적 siRNA 억제는 24 h, 48h 및 72 h에서 확실히 나타났으나, 야생형 CD44는 변화가 없었다(도 2a). 침묵된 MDA-MB-231 세포에서도 펩타이드들이 특이적으로 결합하는지 확인하기 위해서, v6Pep-1, v6Pep-2(FITC 표지)와 함께 세포를 배양시킨 후, 유세포 분석을 수행하였다(도 2b). 그 결과, 두 펩타이드 모두 MDA-MB-231에서 낮은 결합을 나타냈고, 수치는 펩타이드의 평균 형광 세기(mean fluorescence intensity; MFI)를 계산하여 나타냈다. CD44v6 유전자의 침묵 후, 2개의 펩타이드 모두 결합이 억제되었는데, 이는 2개의 펩타이드가 모두 CD44v6와 특이적으로 결합한다는 것을 나타낸다. 유사하게, siRNA (100nmol) 처리 후, MDA-MB-231를 FITC 표지된 v6Pep-1 및 v6Pep-2와 반응시켜, 형광면역염색을 통해 결합을 확인하면, 2개의 펩타이드는 세포와 약한 결합을 나타냈고, 이는 v6Pep-1 및 v6Pep-2가 CD44v6 유전자와 특이적으로 결합한다는 것을 뒷받침한다(도 2c).

[146] 또한, 도 2d에 나타낸 바와 같이, MDA-MB-231 세포를 anti-CD44v6 차단 항체로 전처리하면, 용량-의존적 방식으로 FITC 표지된 v6Pep-1 및 v6Pep-2의 결합이 상당히 감소하였고, MCF-7 세포에서는 최소 효과만이 확인되었다. 상기 결과는 MDA-MB-231 세포에 대해 v6Pep-1 및 v6Pep-2가 CD44v6과 특이적으로 결합한다는 것을 뒷받침한다.

[147]

[148] <실시예 3> v6Pep-1 및 v6Pep-2에 의한 c-Met 및 Erk의 HGF-유도 인산화 억제

[149] 다양한 암세포주 및 1차 세포에서, CD44v6 이성질체는 c-Met에 대한 공동 수용체로 작용한다. c-Met 활성화 및 신호전달은 CD44v6 항체 및 펩타이드에 의해 차단될 수 있다. 이에, 본 발명자들은 CD44v6 펩타이드들 (v6Pep-1 및

v6Pep-2) 및 2개 펩타이드의 조합(v6Pep1+2)의 c-Met 활성화에 대한 효과를 확인하여, 상기 펩타이드 그룹 및 조합이 CD44v6 및 c-Met 사이의 신호전달을 억제하거나 차단하는지 확인하였다. 본 발명에서, MDA-MB-231 및 4T1 세포를 혈청 결핍 조건(24시간)으로 배양하였고, 성장 인자 HGF (25-50 ng/mL)로 37℃에서 10분 동안 유도시켰다. 유도 전, 세포들을 CD44v6 특이 펩타이드 또는 대조 펩타이드 (100 ng/ml)로 37℃에서 10분 동안 처리하였다. 활성화된 Erk 및 활성화된 c-Met을 검출하기 위해서, 세포들을 용해시켰고, 인산화된 Erk 및 인산화된 c-Met에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블랏 분석에 적용하였다. 로딩 대조군으로도 동일한 블랏 분석을 수행하였고, 스트리핑 (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2 % SDS, 0.8 % DTT)하였고, Erk 및 c-Met 항체로 탐침하였다(도 3a 및 도 3c). v6Pep-1, v6Pep-2 각각 5ug/ml 및 두 펩타이드의 조합 (v6Pep-1+2) 10ug/ml (5ug/ml+5ug/ml)으로 처리한 MDA-MB-231 세포는 c-Met 및 이의 하류 표적 Erk의 인산화를 크게 감소시켰다. 또한, CD44v6 펩타이드로 처리한 HELA 세포의 전-반응도 c-Met 및 Erk의 인산화를 감소시켰다. 또한, CD44v6 및 c-Met의 공동 수용체 기능을 확인하기 위해서, MDA-MB-231을 웰 당 2.5×10^5 세포의 농도로 12-웰 플레이트 상에 분주하였다. 24시간 후, 멸균 피펫 팁을 사용하여 컨플루언트 세포층에 스크래치를 만들었다. 배지를 성장인자 HGF 배지를 HGF를 포함한 신선한 배지로 교체하고, 성장인자로 유도하기 위해 25 ng/ml의 HGF를 37℃에서 10분간 처리하였다. HGF 유도 후 5㎍/ml CD44v6 펩타이드 (각각) 및 두 펩타이드의 조합 (v6Pep-1+v6Pep-2) 또는 5㎍/ml의 대조군 펩타이드를 37℃에서 10분 동안 처리한 후, 0시간, 24시간, 60시간에서 시간 간격으로 세포의 사진(원본 배율, ×100)을 찍었다. HGF는 세포의 이동 및 증식을 유도하였고, 컨플루언트 단일층의 스크래치를 회복시켰으나, CD44v6 펩타이드의 존재 하에서는 상기 효과가 강하게 억제되었다(도 3b 및 도 3d). 대조군 펩타이드는 아무 효과가 없었다.

[150]

[151] **<실시예 4> v6Pep-1 및 v6Pep-2에 의한 HGF-유도 c-Met 내재화 억제**

[152] CD44v6 결합 펩타이드가 세포 내로 내재화될 수 있는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 FITC 표지 펩타이드의 내재화를 검증하였다. 상기 펩타이드의 내재화는 MDA-MB-231 세포에서 2개의 펩타이드를 37℃, 1시간 동안 반응시킨 후, 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 도 4a에 나타낸 바와 같이, FITC-v6Pep-1 및 FITC-v6Pep-2는 1-10μm 범위에서 세포 내로 내재화되었고, 세포질에 둘다 위치하였다. c-Met에 대한 CD44v6의 공동 수용체 기능이 c-Met의 내재화를 조절한다는 것을 나타내기 위해, 본 발명자들은 HGF 유도 전, MDA-MB-231 세포를 CD44v6 펩타이드 또는 대조군 펩타이드로 전-배양시켰고, 공초점 현미경을 사용하여 c-Met의 내재화 과정을 확인하였다(도 4b). 대조군 펩타이드 및 CD44v6 펩타이드 처리된 세포 모두, HGF 미존재 하에서는 c-Met가 멤브레인에 위치하였다(도 4b). 하지만, HGF 유도 30 분 및 60 분 후에는 염색

부분이 강하게 세포질에 위치하는 것을 확인하였다. 대부분의 세포들에서 멤브레인 염색이 사라지는 것을 정량적으로 확인하였다. 대조적으로, c-Met는 멤브레인 상에 존재하였고, CD44v6로 전-배양한 MDA-MB-231 세포 상에서 거의 내재화가 일어나지 않았다. 대조군 펩타이드를 처리한 세포에서, HGF 유도 후 c-Met는 내재화되었다. 대조군 펩타이드는 억제 효과가 없었다. 반대로, CD44v6 펩타이드는 c-Met 내재화를 강하게 감소시켰고, c-Met는 모든 시간 포인트에 멤브레인에서 검출되었다. CD44v6 펩타이드를 처리한 대부분의 세포들에서 c-Met가 멤브레인에 존재하는 것을 정량하여 명확히 확인하였다. 웨스턴 분석 결과, CD44v6 펩타이드들에 의한 c-Met 활성화 억제가 확인되었다(도 4c). CD44v6 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 위해, 바이오틴화된 펩타이드 + 아비딘 비드 + 세포 용해물 (복합체 2)을 용출하였고, 특정 단백질의 풀다운 분석을 수행하였다. v6Pep-1에 의해 CD44v6 및 c-MET이 모두 풀다운 되었고, v6Pep-2에 의해 CD44v6이 풀다운되었다(도 4d). 반면, 야생형 CD44는 두 펩타이드 중 어느 것에 의해서도 풀다운 되지 않았다. 이는 v6Pep-1 및 v6Pep-2가 CD44 변이체 6 단백질에 특이성을 갖고, v6Pep-1은 c-Met을 풀다운시킨다는 것을 나타낸다. 상기 결과는 CD44v6 펩타이드가 CD44v6 및 이의 공동 수용체인 c-MET과 높은 특이성을 갖는다는 것을 뒷받침한다. CD44v6 펩타이드의 세포독성을 확인하기 위해서, MDA-MB-231 및 4T1 세포를 상이한 농도의 v6Pep-1, v6Pep-2 및 상기 2개 펩타이드의 조합 (v6Pep-1+v6Pep-2)으로 24시간 동안 반응시켰다. v6Pep-1, v6Ppep-2 및 상기 2개 펩타이드의 조합은 세포 생존능에는 영향을 미치지 않았다.

[153]

[154] <실시예 5> 생체 내에서(in vivo) CD44v6-발현 인간 유방 종양 세포를 표적으로 하는 CD44v6 펩타이드

[155] 펩타이드 탐침을 사용한 모니터링 및 이미징 분석을 위해, MDA-MB-231 세포를 면역결핍 암컷 누드 마우스로 피하 이종이식(xenograft)하여 동물 모델을 제작하였다. MDA-MB231 세포 현탁액 (5×10^6 세포)을 5주령 BALB/c 암컷 마우스의 오른쪽 측면으로 PBS와 함께 피하 주사하여 이식함으로써, 종양 이종이식 마우스를 제작하였다. 종양 크기가 약 100-200 mm^3 부피에 도달하면, 마우스를 마취시켰고, FPR 675-표지된 v6Pep-1 (n = 3) 및 v6Pep-2 (n = 3), 대조군 (n = 3)을 정맥 내 주사하였다. 생체 내(in vivo) 형광 이미지는 여러 시간 포인트(각각 1, 2, 4 및 6 h)에서 주입 전 또는 주입 후에 촬영하였고, flamma 675는 동일한 농도 및 방법으로 주입하였다. NIRF 이미지 신호는 IVIS imaging system (Caliper Life Sciences, Massachusetts)을 이용하여 스캔하고 획득하였다. 생체 내(in vivo) 이미지 분석 결과, MDA-MB-231 이종이식 마우스에서 v6Pep-1 및 v6Pep-2는 상이한 시간 간격으로 종양 조직에 위치하였고, 6h 이상 지속되었다(도 5a 및 도 5c). 한편, 대조군 펩타이드는 높은 비-특이적 조직 국소화를 나타내어, 종양 위치에서는 아무런 축적을 확인할 수 없었다. 거의

유사한 약리동력학적 특성에도 불구하고, v6Pep-1 및 v6Pep-2는 대조군 펩타이드에 비해 우수한 종양 축적 효과를 나타냈다. 생체 외(Ex vivo) 형광 이미지는 주입 후 6시간 후에 절제된 종양 및 장기에서 수집하였다. 종양 조직을 가진 모든 주요 장기(간, 신장, 비장, 심장 및 폐)가 분리되었고, PBS로 씻어냈고, 675nm FPR-675 fluorophore 여기 파장 및 698 nm 방출 파장에서 생체 외(Ex vivo) 형광 이미지를 촬영하였다(n = 3). 각 장기의 관심 영역(region of interest; ROI) 내 형광 세기를 분석하였다. 표적 종양의 형광 세기는 대조군 펩타이드 대비 v6Pep-1 및 v6Pep-2 주입 마우스에서 높은 축적을 나타냈다(도 5b 및 도 5d). 대조군 펩타이드 주입 마우스는 v6Pep-1 및 v6Pep-2 대비 간 및 신장에서 높은 축적을 나타냈고, 폐 및 비장에서는 무시할 만한 수준이었다. 또한, 조직의 면역조직화학 분석 결과, v6Pep-1 및 v6Pep-2는 종양 조직에 CD44v6와 동시-위치하는 것을 확인하였는데, 이는 anti-CD44v6 항체로 염색하여 검출하였다. 생체 내(in vivo) 및 생체 외(ex vivo) 결과와 일관되게, 종양 조직의 면역조직화학 분석 결과는 대조군 펩타이드 대비 v6Pep-1 및 v6Pep-2가 CD44v6 과발현 종양 조직과 연관되어 있다는 것을 나타냈다(도 5e).

[156]

[157] **<실시예 6> 인간 유방암 모델의 전이를 억제하는 CD44v6 펩타이드**

[158] 다음으로, 본 발명자들은 MDA-MB-231 종양 모델에서 c-Met 억제제 화합물인 크리조티닙(crizotinib)과 조합하여 v6Pep-1 및 v6Ppe-2의 항종양 효과를 확인하였다. CD44v6 펩타이드들은 혈청 내에서 24시간 이상 분해 없이 안정적이다. 식염수 및 대조군 펩타이드 처리군에 비해, v6Pep-1 + 크리조티닙(crizotinib) 및 v6Pep-2 + 크리조티닙(crizotinib)의 전신 투여는 전이를 상당히 억제하였고, v6Pep-1, v6 Pep-2 및 크리조티닙(crizotinib)의 각각 단독 투여도 전이성 성장을 억제하였다(도 6b). 전신 및 폐 부위에서 전체 프로톤 플럭스(프로톤 수/초, p/s)의 정량 결과, 플럭스는 처리군에서 상당히 감소하였다(도 6c). 또한, X- ray로 각 군의 전신 생물발광 이미지 분석 결과에서도 유사하게 나타났다(도 7a). 크리조티닙(crizotinib)과 함께 v6Pep-1 및 v6Ppe-2의 생물학적 안정성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 연속적인 주입 처리 과정 중 체중 변화를 관측하였다(도 6d). 치료 동안, 상기 CD44v6 펩타이드의 주입에 따른 마우스의 체중 변화는 거의 없었다. 또한, 치료 후 여러 혈액 생화학 분석 및 혈액학적 파라미터 분석도 진행하였으나, 큰 차이는 없었다. 또한, PBS (식염수) 또는 단일 처리군 대비 처리군에서 억제된 전이성 성장은 무시할 정도의 전이성 종괴 또는 미세 종괴를 나타냈다(도 7b). 정상 폐 무게와 비교하여 무게에 차이를 나타내는 PBS 처리군에서 폐 무게를 측정하였다. 이는 CD44v6 펩타이드 처리군 대비 전이성 종괴 증가 및 폐 무게의 감소가 생존율을 감소시킨다는 것을 나타냈다(도 7c 및 도 7d). 동결 폐 조직의 H & E 염색 결과, 대조군 또는 단독처리군 보다 조합 처리군에서 정상 폐 조직학적 소견을 나타냈다(도 7e).

[159]

[160] <실시예 7> 생체 내에서(in vivo) CD44v6-발현 마우스 유방 종양 세포를 선택적으로 표적하는 CD44v6 펩타이드

[161] 펩타이드 탐침을 사용한 모니터링 및 이미징 분석을 위해, 종양세포를 면역결핍 암컷 누드 마우스로 피하 이종이식(xenograft)하여 동물 모델을 제작하였다. 4T1 세포 현탁액 (5×10^6 세포)을 5주령 BALB/c 야생형 암컷 마우스의 유방 지방 패드로 PBS와 함께 피하 주사하여 이식함으로써, 종양 이종이식 마우스를 제작하였다. 종양 크기가 약 100-200 mm^3 부피에 도달하면, 마우스를 마취시켰고, FPR 675-표지된 v6Pep-1 (n = 3) 및 v6Pep-2 (n = 3), 대조군 (n = 3)을 정맥 내 주사하였다. 생체 내(in vivo) 형광 이미지는 여러 시간 포인트(각각 1, 2, 4 및 6 h)에서 주입 전 또는 주입 후에 촬영하였고, flamma 675는 동일한 농도 및 방법으로 주입하였다. NIRF 이미지 신호는 IVIS imaging system (Caliper Life Sciences, Massachusetts)을 이용하여 스캔하고 획득하였다. 생체 내(in vivo) 이미지 분석 결과, 4T1 동소이식(orthotopic) 마우스에서 v6Pep-1 및 v6Pep-2는 상이한 시간 간격으로 종양 조직에 위치하였고, 6h 이상 지속되었다(도 8a 및 도 8c). 한편, 대조군 펩타이드는 높은 비-특이적 조직 국소화를 나타내어, 종양 위치에서는 아무런 축적을 확인할 수 없었다. 거의 유사한 약리동력학적 특성에도 불구하고, v6Pep-1 및 v6Pep-2는 대조군 펩타이드에 비해 우수한 종양 축적 효과를 나타냈다. 이는 펩타이드의 종양 표적화 활성을 결정하는데 있어, 향상된 약리동력학적 특성이 중요한 인자가 아닐수도 있음을 명확히 나타낸다. 생체 외(Ex vivo) 형광 이미지는 주입 후 6시간 후에 절제된 종양 및 장기에서 수집하였다. 종양 조직을 가진 모든 주요 장기(간, 신장, 비장, 심장 및 폐)가 분리되었고, PBS로 씻어냈고, 675nm FPR-675 fluorophore 여기 파장 및 698 nm 방출 파장에서 생체 외(Ex vivo) 형광 이미지를 촬영하였다(n = 3). 각 장기의 관심 영역(region of interest; ROI) 내 형광 세기를 분석하였다. 표적 종양의 형광 세기는 대조군 펩타이드 대비 v6Pep-1 및 v6Pep-2 주입 마우스에서 높은 축적을 나타냈다(도 8b 및 도 8d). 대조군 펩타이드 주입 마우스는 v6Pep-1 및 v6Pep-2 대비 간 및 신장에서 높은 축적을 나타냈고, 폐 및 비장에서는 무시할 만한 수준이었다. 또한, 조직의 면역조직화학 분석 결과, v6Pep-1 및 v6Pep-2는 종양 조직에 CD44v6와 동시-위치하는 것을 확인하였는데, 이는 anti-CD44v6 항체로 염색하여 검출하였다. 생체 내(in vivo) 및 생체 외(ex vivo) 결과와 일관되게, 종양 조직의 면역조직화학 분석 결과는 대조군 펩타이드 대비 v6Pep-1 및 v6Pep-2가 CD44v6 과발현 종양 조직과 연관되어 있다는 것을 나타냈다(도 8e).

[162]

[163] <실시예 8> 생체 내(in vivo) 마우스 종양 세포의 전이를 차단하는 CD44v6 펩타이드

[164] 본 발명자들은 4T1 종양 모델에서 크리조티닙(crizotinib)과 조합하여 v6Pep-1

및 v6Ppe-2의 항종양 효과를 확인하였다. 식염수 처리군에 비해, v6Pep-1 + 크리조티닙(crizotinib) 및 v6Pep-2 + 크리조티닙(crizotinib)의 전신 투여는 전이를 상당히 억제하였고, v6Pep-1, v6 Pep-2 및 크리조티닙(crizotinib)의 각각 단독 투여도 종양 및 전이성 성장을 약간 억제하였다(도 9b). 전신 및 폐 부위에서 전체 프로톤 플럭스(프로톤 수/초, p/s)의 정량 결과, 플럭스는 처리군에서 상당히 감소하였다(도 9c 및 도 9d). 또한, 4T1 동소이식 마우스 모델에서 생체 내(in vivo) 항종양 활성을 측정하였다. 생분포 및 약리동력학적 결과와 유사하게, 생체 내(in vivo) 치료는 CD44v6 펩타이드 14.2 mg/kg을 주당 3번 정맥 주사하였고, 크리조티닙(crizotinib) 25 mg/kg을 주당 3번 경구투여하여 시작하였다. 4T1 마우스에서 v6Pep-1 + 크리조티닙(crizotinib) 및 v6Pep-2 + 크리조티닙(crizotinib)의 정맥 투여는 종양 성장을 크게 억제하였으나, 단독 처리군에서는 종양 성장에 있어 유의성 없는 약간의 감소가 검출되었다(도 10a). 반면, PBS 및 대조군 펩타이드로 처리군에서는 종양이 더 공격적으로 성장하였고, 28일 후에는 1,409 mm^3 정도의 크기에 도달하였다. 암세포 표면상에서 높게 발현되는 CD44v6에 종양 표적화가 향상된 결과로, CD44v6 펩타이드 또는 크리조티닙(crizotinib) 단독 처리 마우스에서는 종양 부피가 약간 감소하는 것으로 나타났다. 치료 마지막 단계의 절제된 종양 무게는 대조군 대비 상당히 감소하였다(도 10d). 또한, PBS (식염수) 또는 단일 처리군 대비 처리군에서 억제된 전이성 성장은 무시할 정도의 전이성 종괴 또는 미세 종괴를 나타냈다(도 10c). 크리조티닙(crizotinib)과 함께 v6Pep-1 및 v6Ppe-2의 생물학적 안정성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 처리 과정 중 체중 변화를 관측하였고, 치료 동안, 상기 CD44v6 펩타이드 및 약물의 연속적인 주입에 따른 마우스의 체중 변화는 거의 없었다(도 10b). 또한, 치료 후 여러 혈액 생화학 분석 및 혈액학적 파라미터 분석도 진행하였으나, 큰 차이는 없었다. PBS 및 대조군 펩타이드에서 측정된 생존율이 펩타이드 및 크리조티닙(crizotinib) 처리군 보다 낮게 나타났다(도 11a). 동결 폐 조직의 H & E 염색 결과, 대조군 또는 단독처리군 보다 조합 처리군에서 정상 폐 조직학적 소견을 나타냈다(도 11b). 인산화-c-Met 염색을 사용한 종양 내 c-Met 활성화는 CD44v6 펩타이드 및 크리조티닙(crizotinib) 조합 처리에 의해 완전히 억제되는 것으로 나타났고, 단독 처리군에서는 일부 억제되는 것으로 나타났다(도 12a). 또한, v6Pep-1 + 크리조티닙(crizotinib) 및 v6Pep-2 + 크리조티닙(crizotinib) 처리군의 종양 조직에서 caspase 3은 세포사멸성 세포를 더 검출하였으나, 대조군을 그렇지 않았다(도 12b). 상기 결과는 종양 위치에 특이적인 v6Pep-1 + 크리조티닙(crizotinib) 및 v6Pep-2 + 크리조티닙(crizotinib)이 여러 생물학적 장벽을 침투하고, 세포 내 진입을 촉진시키며, 이어서 대규모 세포사멸을 유도한다는 것을 뒷받침한다.

[165]

[166] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의

지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CD44v6에 특이적으로 결합하는 펩타이드.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 c-Met의 인산화를 억제하여 CD44v6 및 c-Met 간의 신호전달을 차단하는 것을 특징으로 하는 CD44v6에 특이적으로 결합하는 펩타이드.

[청구항 3] 제1항의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

[청구항 4] 제3항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합벡터.

[청구항 5] 제4항의 재조합벡터로 형질전환된 형질전환체.

[청구항 6] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 암은 CD44v6이 과발현되는 암인 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 CD44v6이 과발현되는 암은 폐암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 및 편평상피세포암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

[청구항 9] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 10] 제1항의 펩타이드 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 항암제는 크리조티닙(crizotinib), 독소루비신, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀, 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌 (bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴, 5-플로오로우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란 (melphalan), 니트로겐 무스타드(nitrogen mustard) 및 니트로소우레아 (nitrosourea)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 12] 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 암은 CD44v6이 과발현되는 암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 CD44v6이 과발현되는 암은 폐암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 및 편평상피세포암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나

이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 14] 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 약학조성물은 암의 전이를 억제시키는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

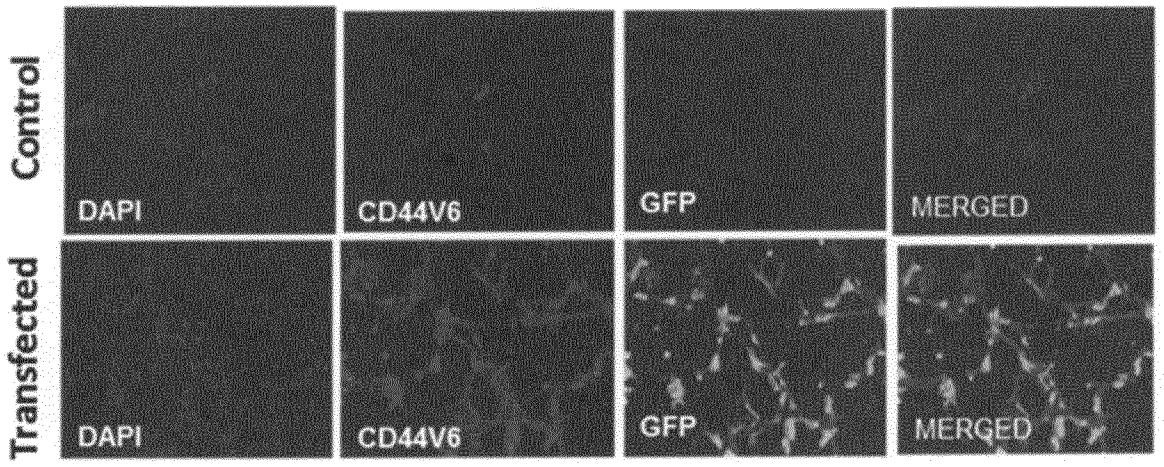
[청구항 15] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[청구항 16] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물.

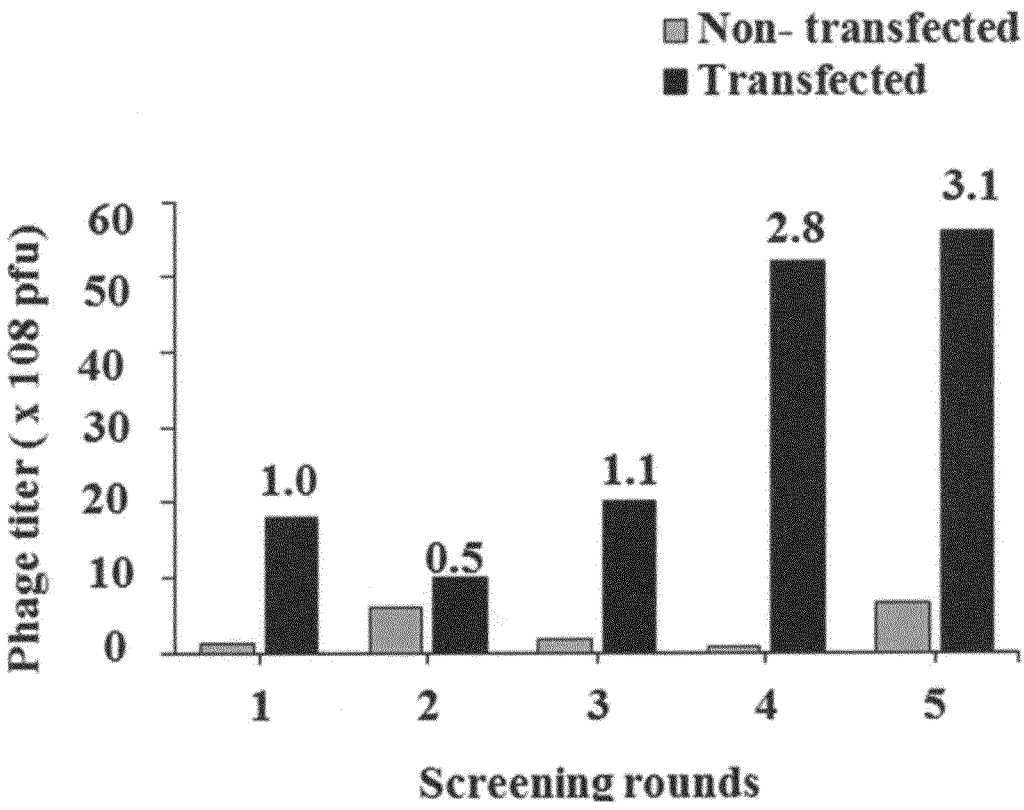
[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 약물은 항암제인 것을 특징으로 하는 약물 전달용 조성물.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 항암제는 크리조티닙(crizotinib), 독소루비신, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신(daunorubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 도세탁셀, 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 비산트렌 (bisantrene), 호모해링토닌(homoharringtonine), 글리벡(Gleevec; STI-571), 시스플라틴, 5-플로오로우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 부설판(busulfan), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란 (melphalan), 니트로겐 무스타드(nitrogen mustard) 및 니트로소우레아 (nitrosourea)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약물 전달용 조성물.

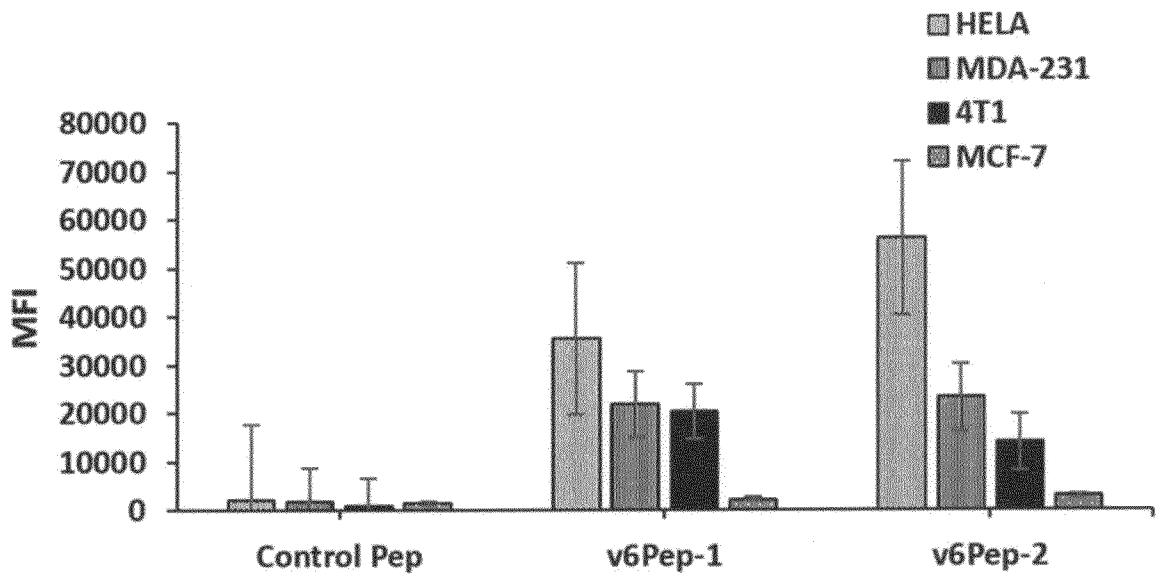
[도 1a]


Control
Transfected
DAPI
CD44V6
GFP
MERGED
DAPI
CD44V6
GFP
MERGED

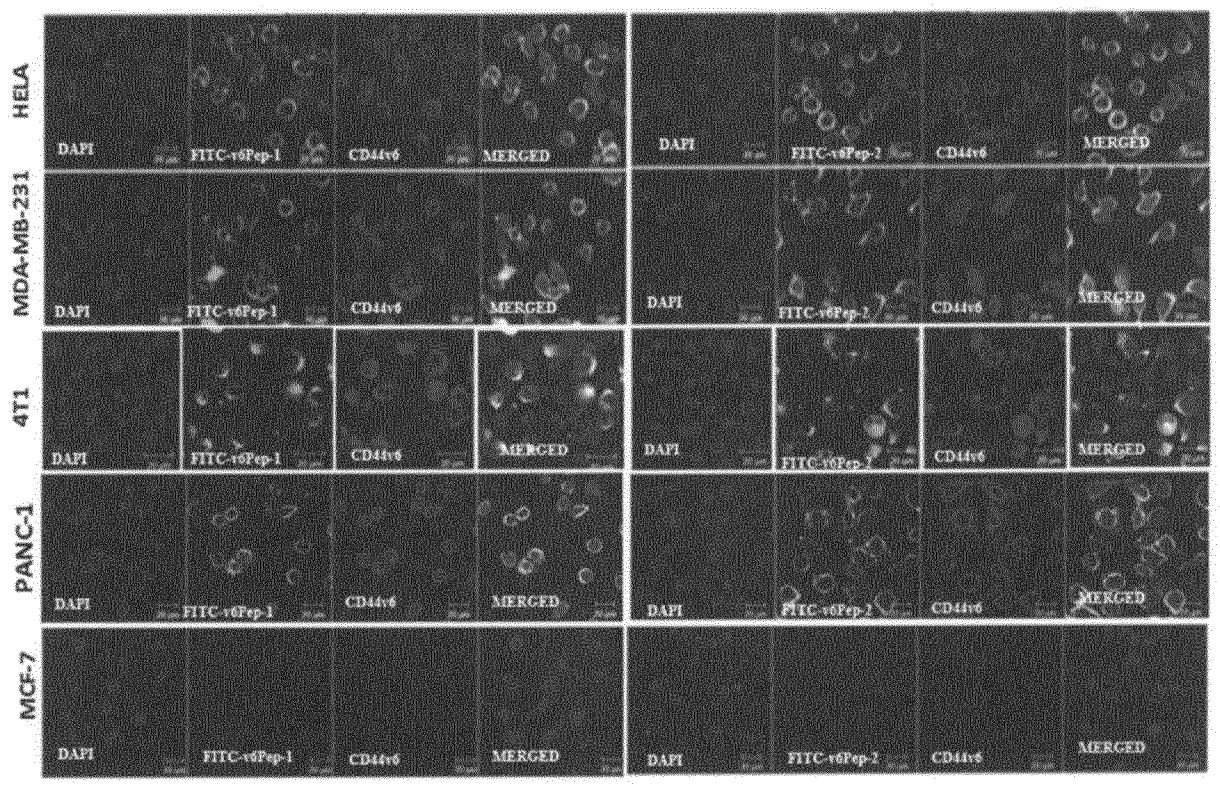
[도 1b]


Non- transfected
Transfected
Phage titer (x 108 pfu)
60
50
40
30
20
10
0
1.0
0.5
1.1
2.8
3.1
1
2
3
4
5
Screening rounds

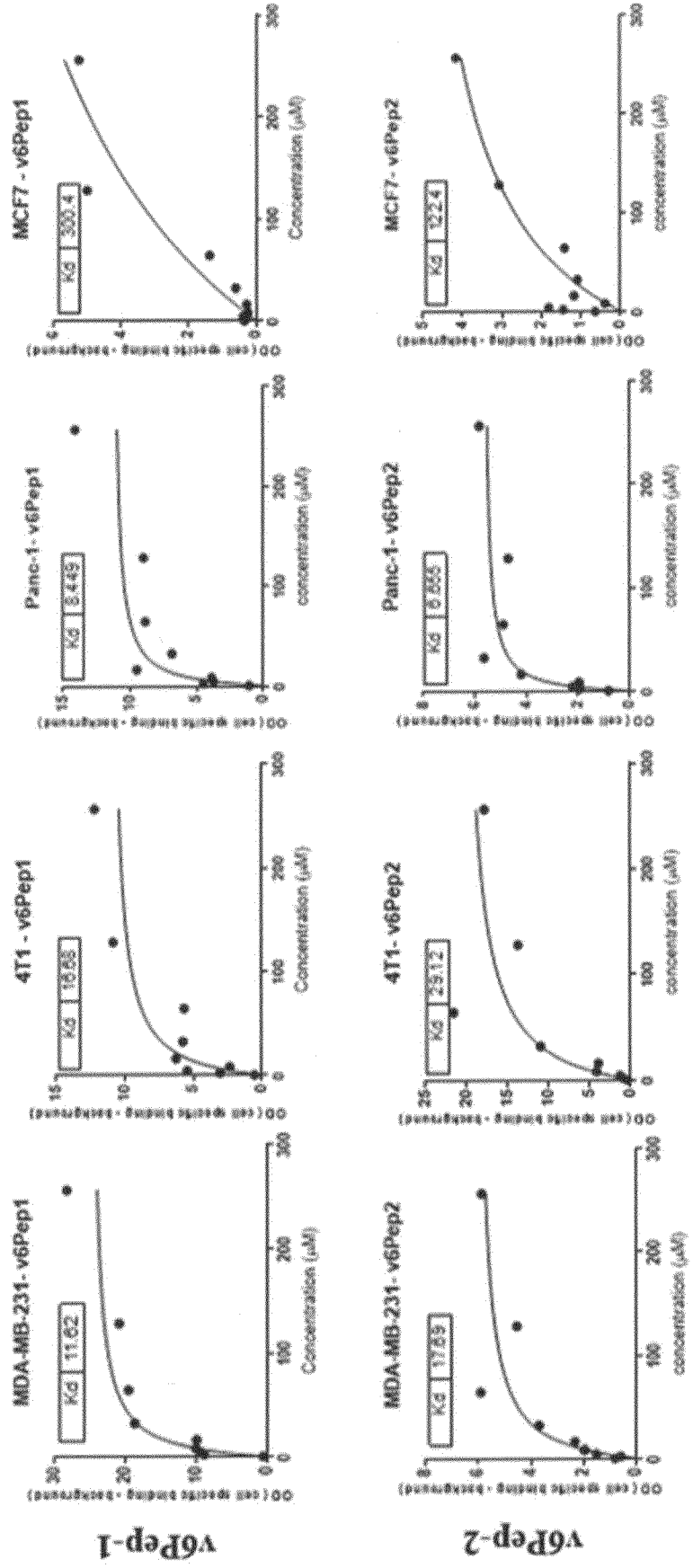
[도 1c]


HELA
MDA-231
4T1
MCF-7
MFI
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Control Pep
v6Pep-1
v6Pep-2

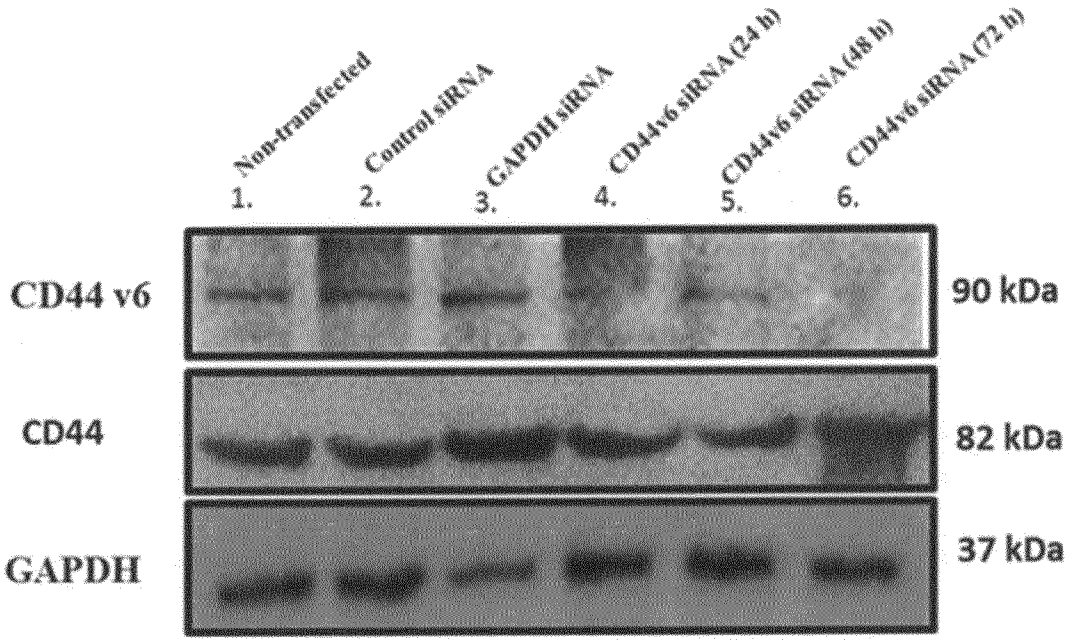
[도 1d]


HELA
MDA-MB-231
4T1
PANC-1
MCF-7
DAPI
FITC-v6Pep-1
FITC-v6Pep-2
CD44v6
MERGED

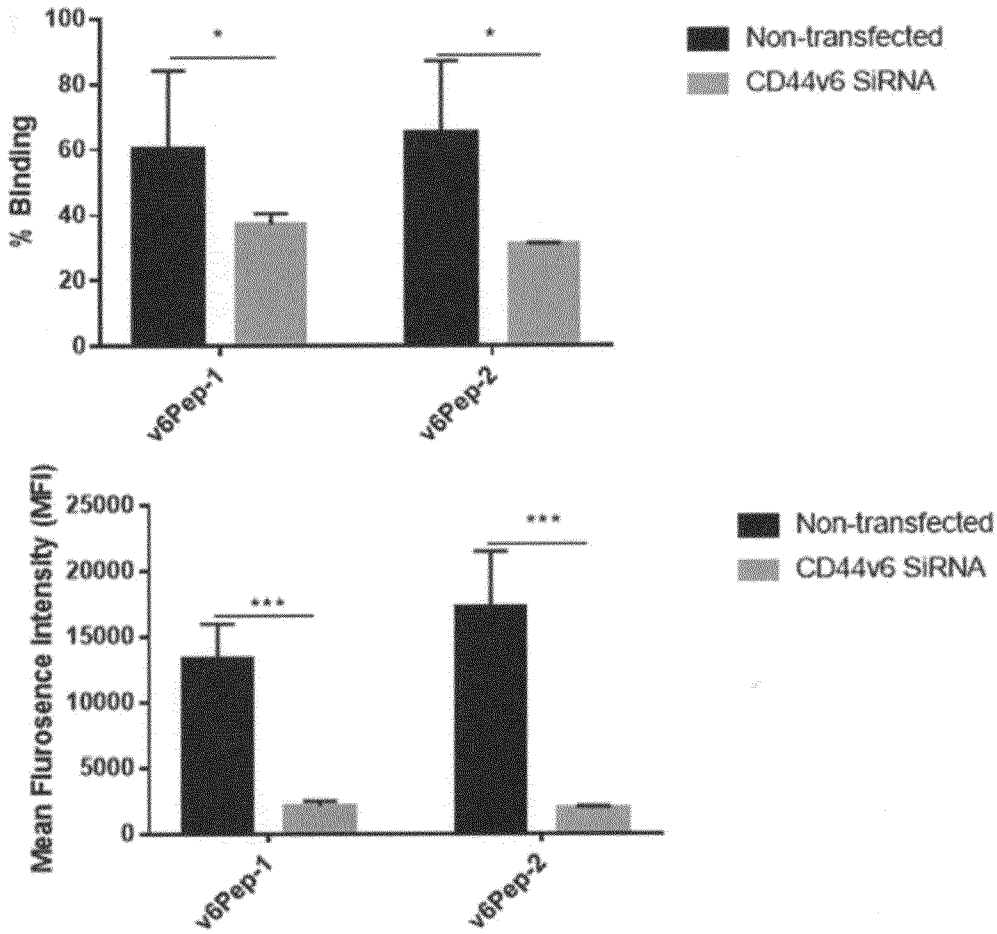
[도 1e]


MCF7 - v6Pep1
Kd 3904
Panc-1- v6Pep1
Kd 8449
4T1 - v6Pep1
Kd 1658
MDA-MB-231- v6Pep1
Kd 11.62
MCF7- v6Pep2
Kd 1224
Panc-1- v6Pep2
Kd 6.655
4T1- v6Pep2
Kd 2312
MDA-MB-231- v6Pep2
Kd 1789
Concentration (μM)
v6Pep-1
v6Pep-2

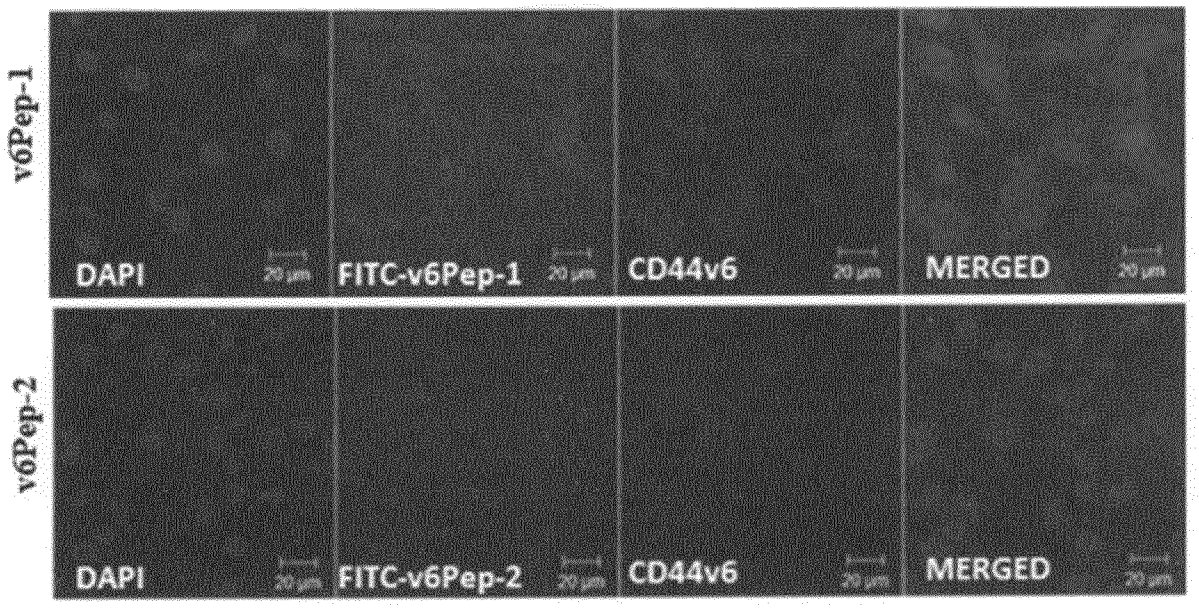
[도 2a]


Non-transfected
Control siRNA
GAPDH siRNA
CD44v6 siRNA (24 h)
CD44v6 siRNA (48 h)
CD44v6 siRNA (72 h)
1.
2.
3.
4.
5.
6.
CD44 v6
CD44
GAPDH
90 kDa
82 kDa
37 kDa

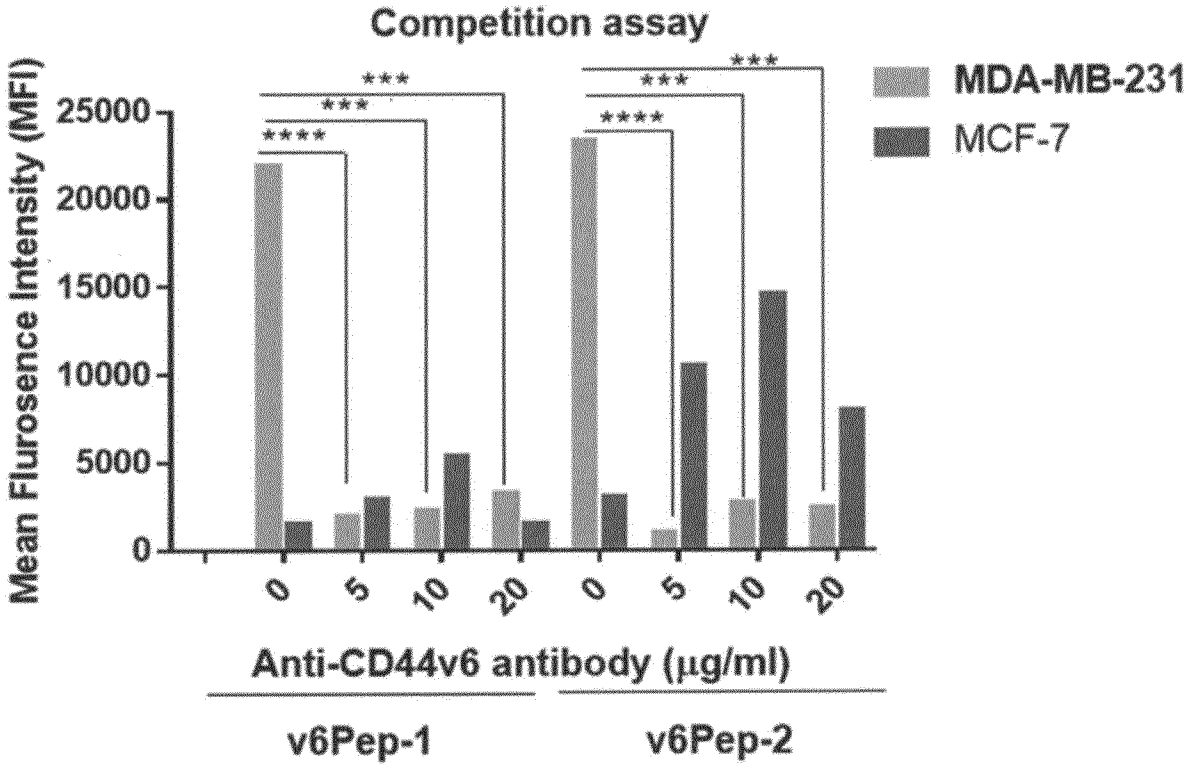
[도 2b]


% Binding
100
80
60
40
20
0
*
*
v6Pep-1
v6Pep-2
Non-transfected
CD44v6 SiRNA
Mean Flurosence Intensity (MFI)
25000
20000
15000
10000
5000
0
***
***
v6Pep-1
v6Pep-2
Non-transfected
CD44v6 SiRNA

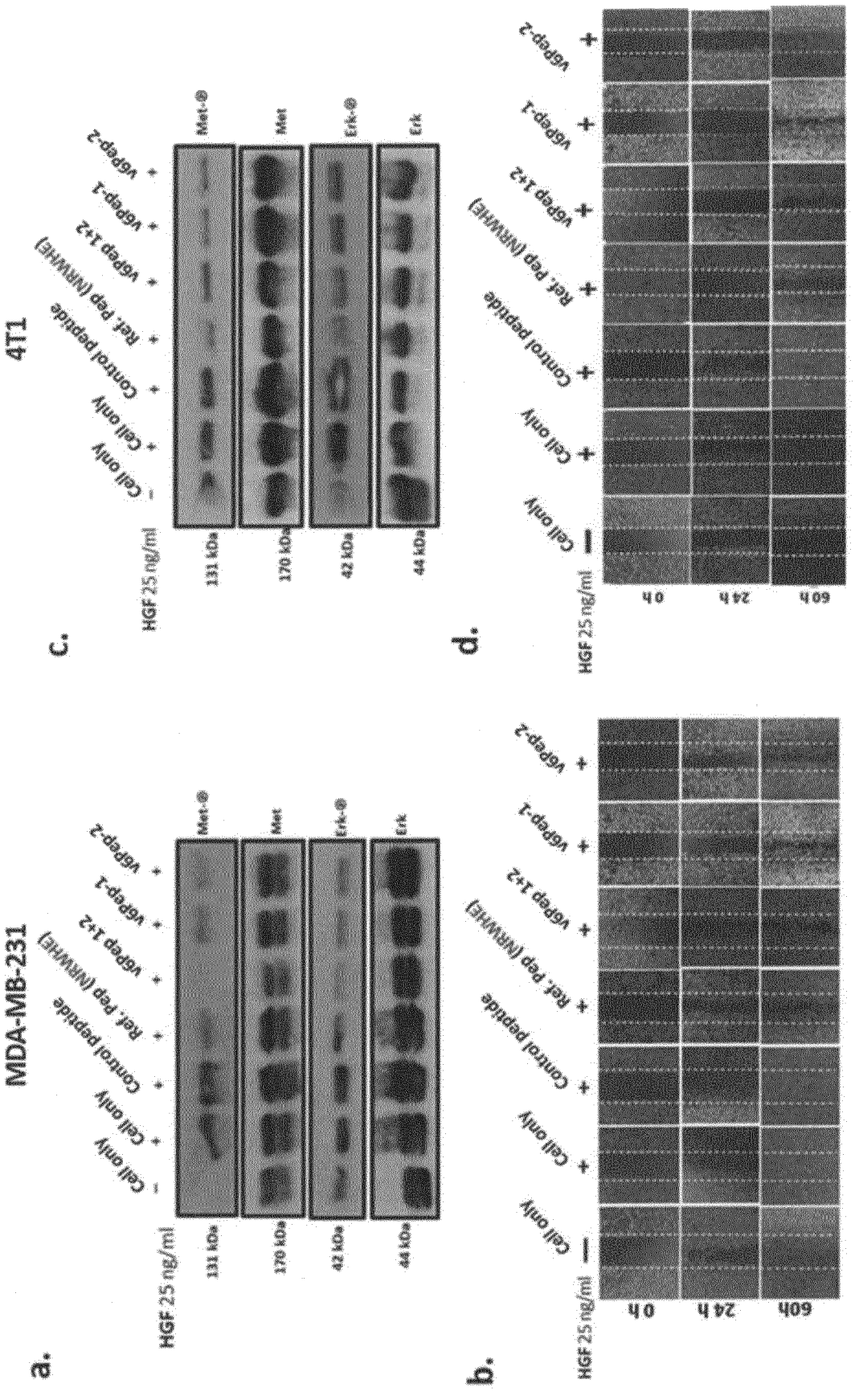
[도 2c]


v6Pep-1
DAPI
FITC-v6Pep-1
CD44v6
MERGED
v6Pep-2
DAPI
FITC-v6Pep-2
CD44v6
MERGED

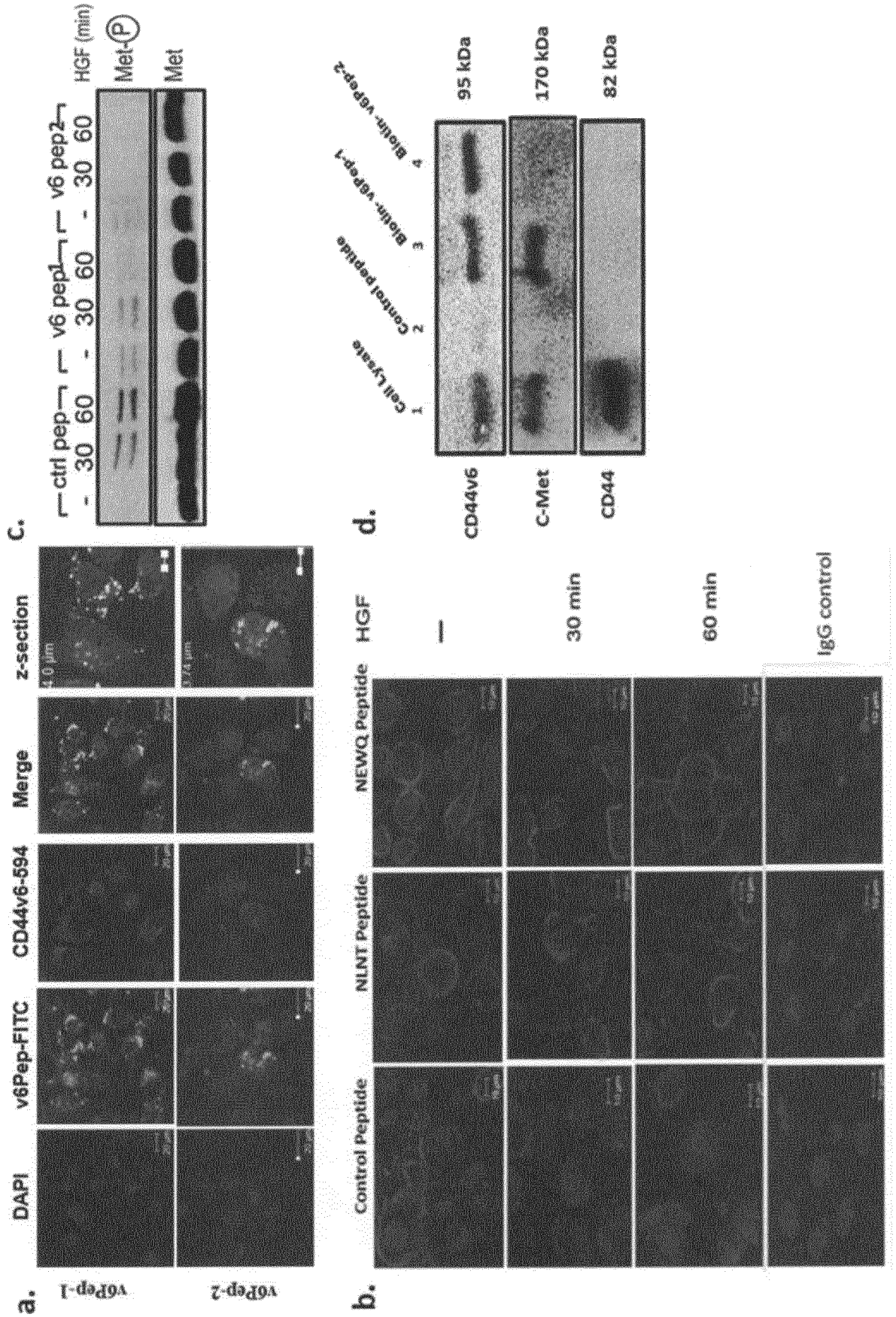
[도 2d]


Competition assay
Mean Flurosence Intensity (MFI)
25000
20000
15000
10000
5000
0
***
***
****
***
***
****
MDA-MB-231
MCF-7
0
5
10
20
0
5
10
20
Anti-CD44v6 antibody (μg/ml)
v6Pep-1
v6Pep-2

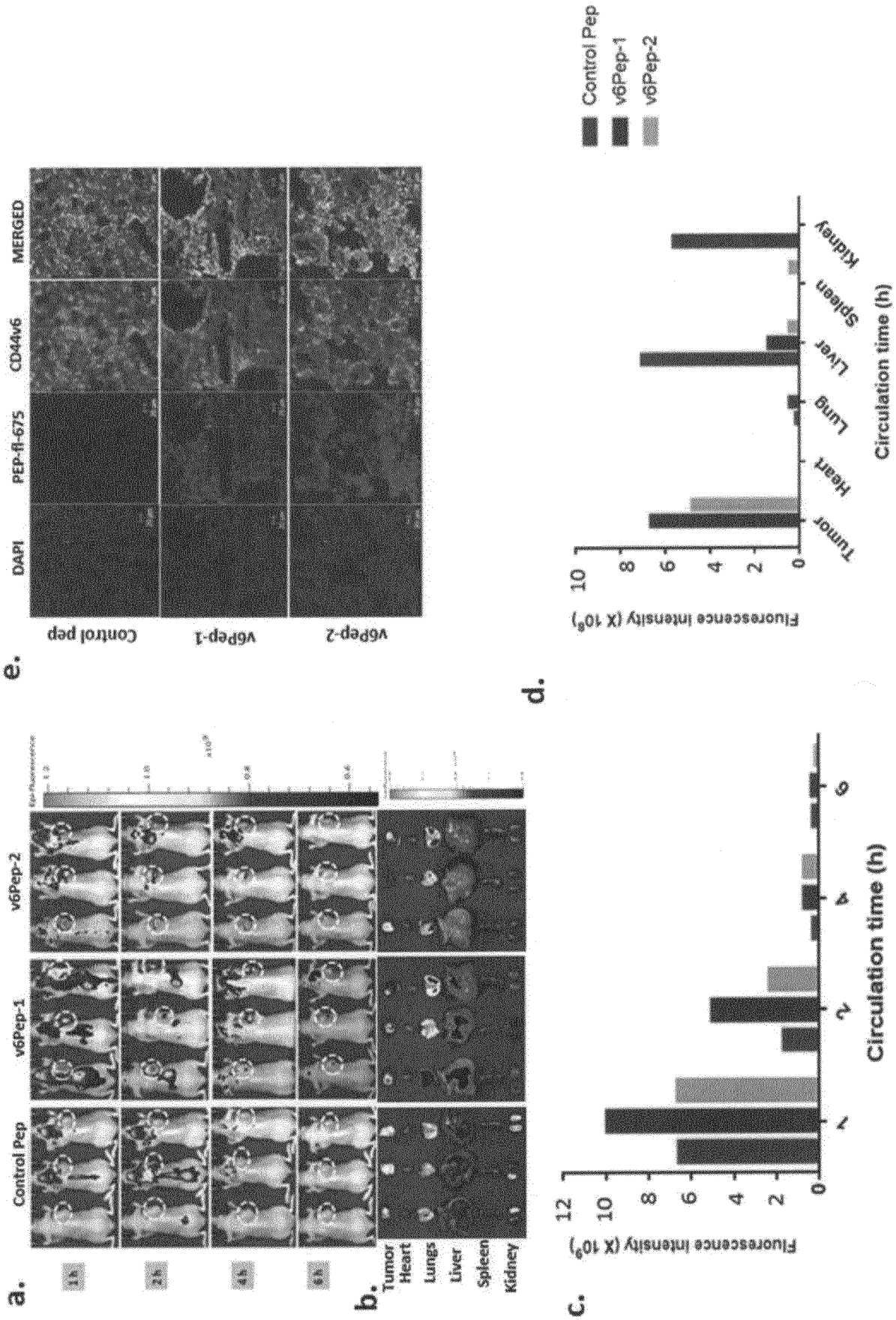
[도 3]


a.
MDA-MB-231
HGF 25 ng/ml
Cell only
Cell only
Control peptide
Ref. pep (NRWHE)
VGPep 1+2
VGPep-1
VGPep-2
Met-P
Met
Erk-P
Erk
131 kDa
170 kDa
42 kDa
44 kDa
b.
HGF 25 ng/ml
0 h
24 h
60h
c.
4T1
d.

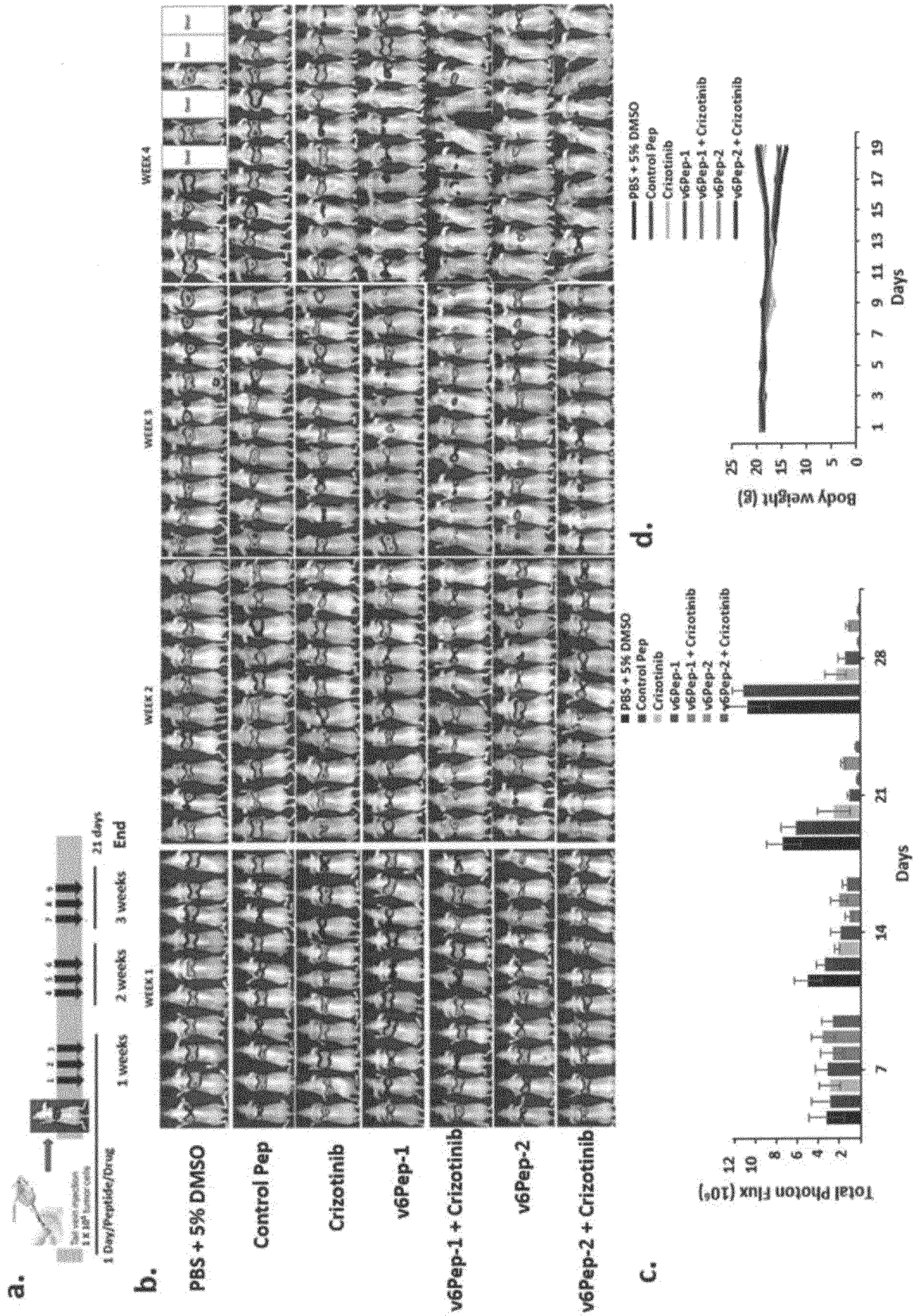
[도 4]


a.
v6Pep-1
v6Pep-2
DAPI
v6Pep-FITC
CD44v6-594
Merge
z-section
b.
Control Peptide
NLNT Peptide
NEWQ Peptide
HGF
—
30 min
60 min
IgG control
c.
ctrl pep
v6 pep1
v6 pep2
- 30 60 - 30 60 - 30 60
HGF (min)
Met-P
Met
d.
Cell Lysate
Control peptide
Biotin-v6Pep-1
Biotin-v6Pep-2
1 2 3 4
95 kDa
170 kDa
82 kDa
CD44v6
C-Met
CD44

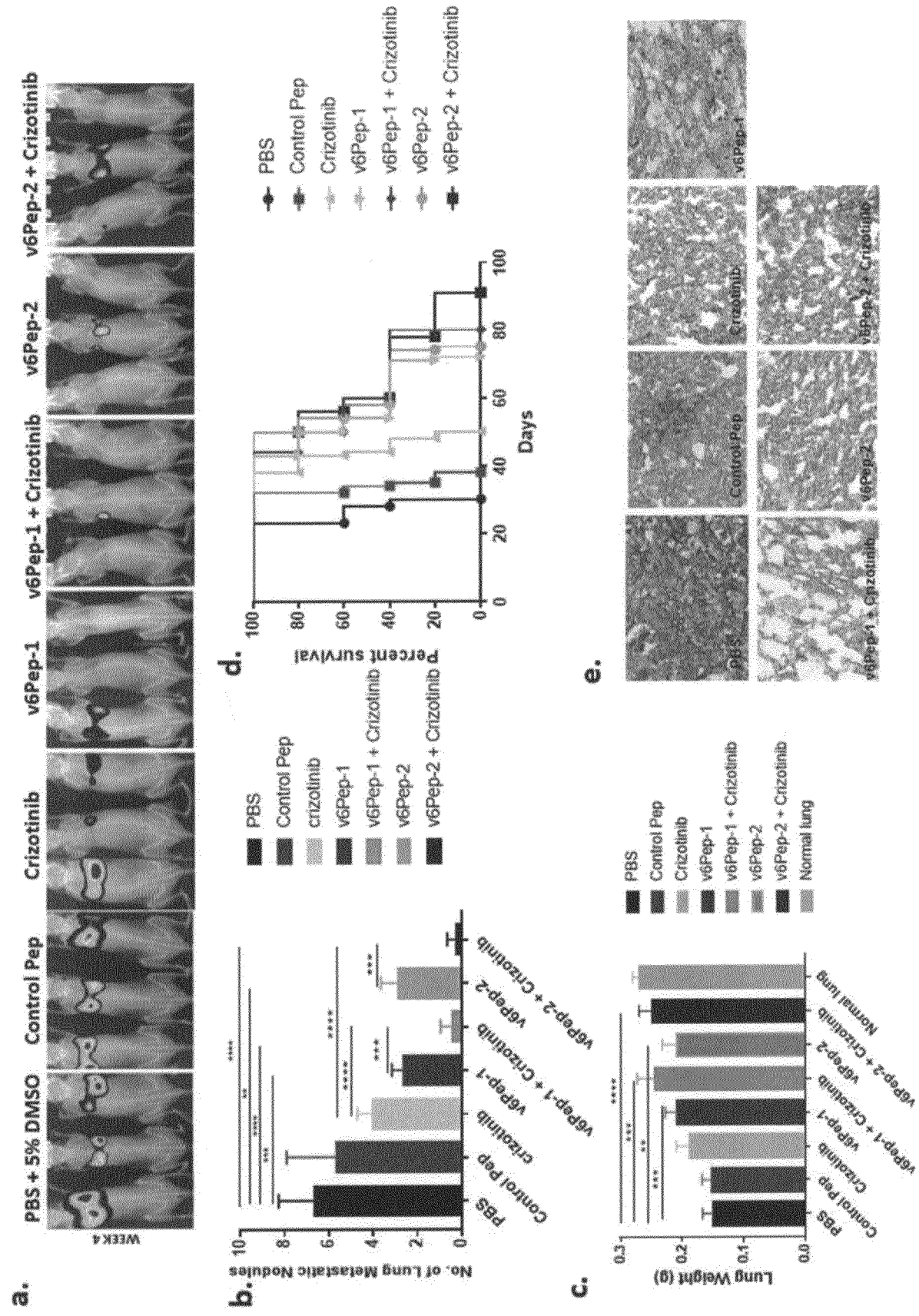
[도 5]


a.
Control Pep
v6Pep-1
v6Pep-2
1h
2h
4h
6h
b.
Tumor
Heart
Lungs
Liver
Spleen
Kidney
c.
Fluorescence intensity (X 10⁶)
Circulation time (h)
d.
Control Pep
v6Pep-1
v6Pep-2
Fluorescence intensity (X 10⁶)
Tumor
Heart
Lung
Liver
Spleen
Kidney
Circulation time (h)
e.
DAPI
PEP-fl-675
CD44v6
MERGED
Control pep
v6Pep-1
v6Pep-2

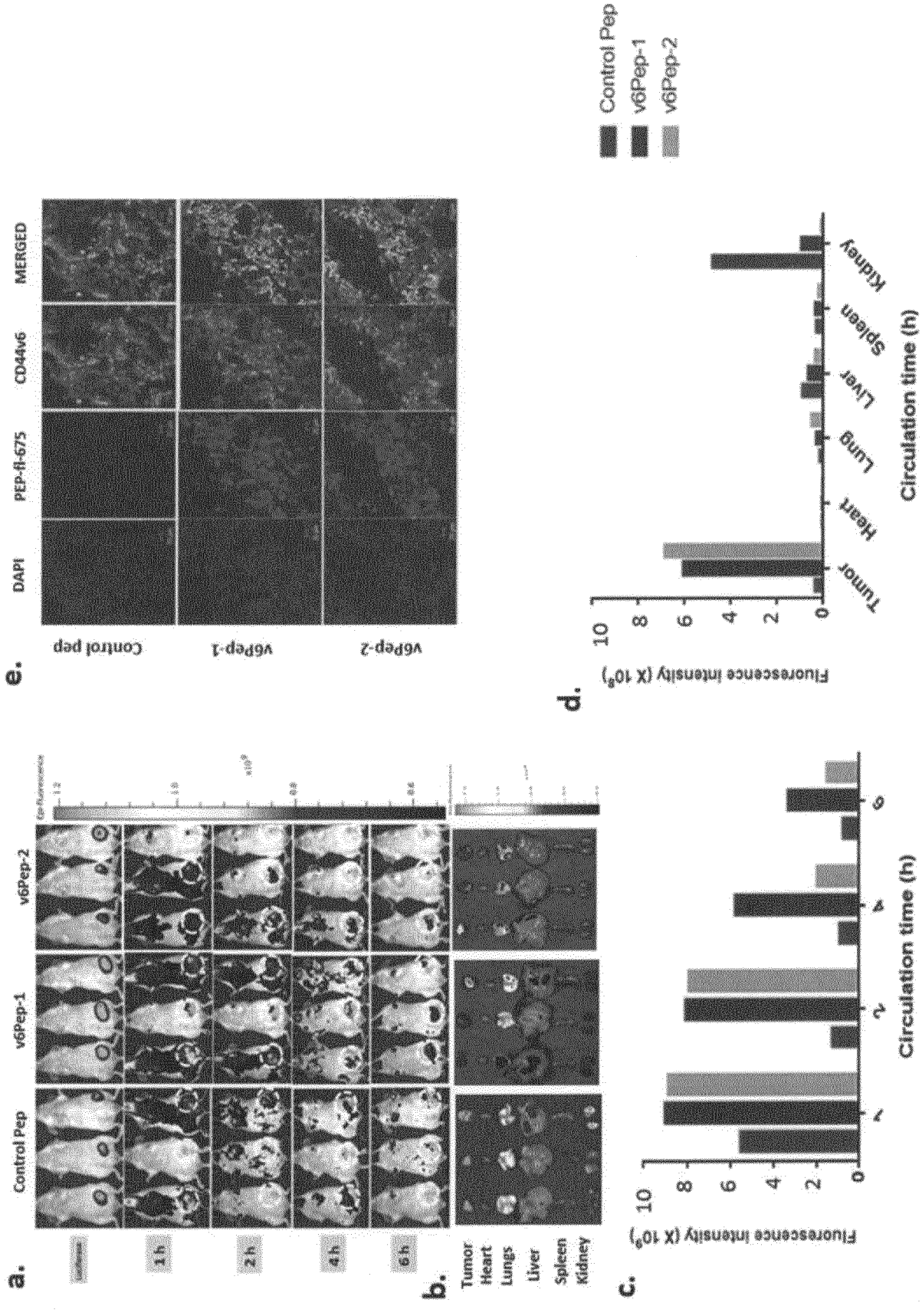
[도 6]


a.
1 Day/Peptide/Drug
1 weeks
2 weeks
3 weeks
End
21 days
b.
WEEK 1
WEEK 2
WEEK 3
WEEK 4
PBS + 5% DMSO
Control Pep
Crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
c.
Total Photon Flux (10⁶)
Days
d.
Body weight (g)
Days

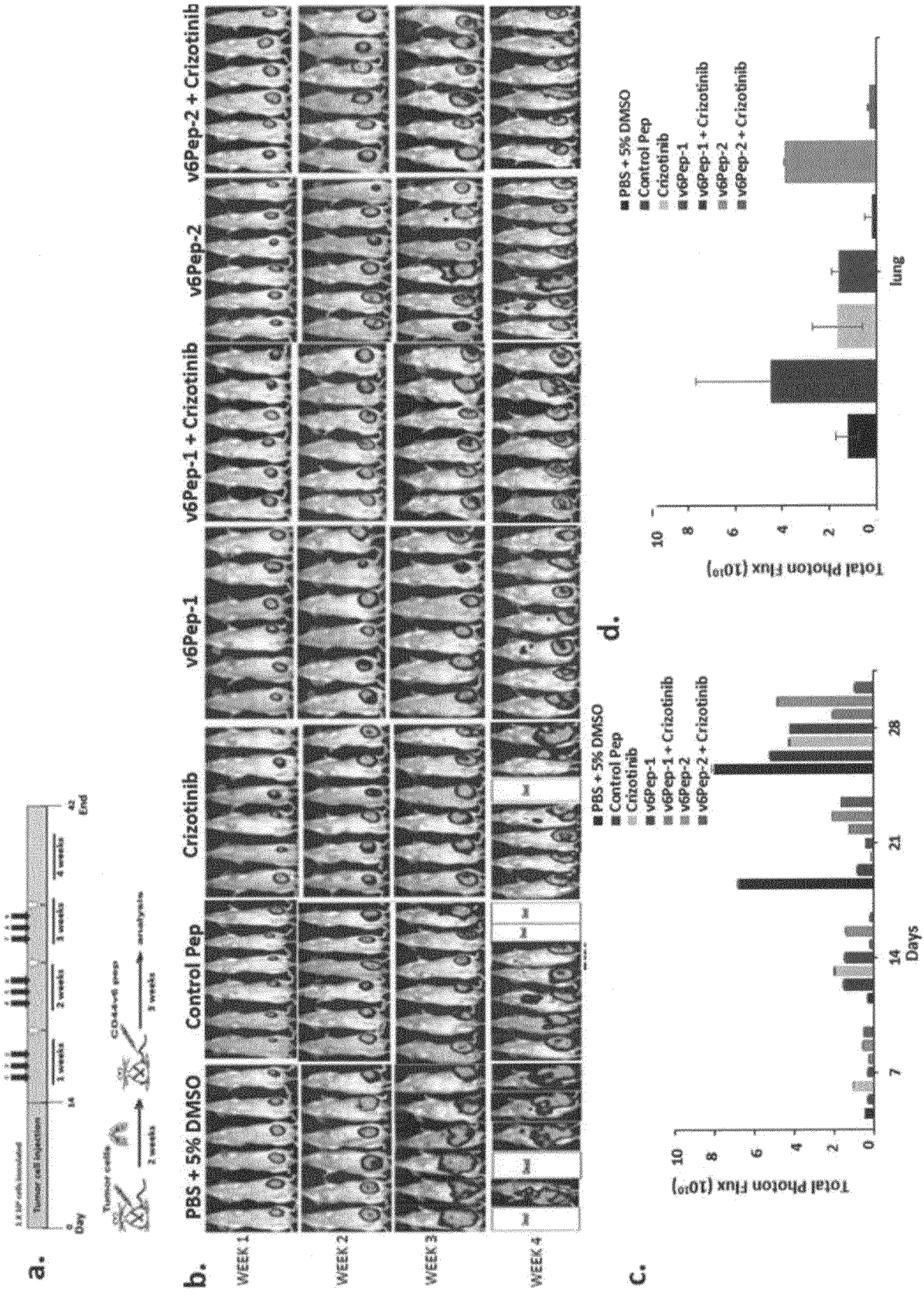
[도 7]


a.
PBS + 5% DMSO
Control Pep
Crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
WEEK 4
b.
No. of Lung Metastatic Nodules
PBS
Control Pep
crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
c.
Lung Weight (g)
Normal lung
d.
Percent Survival
Days
e.

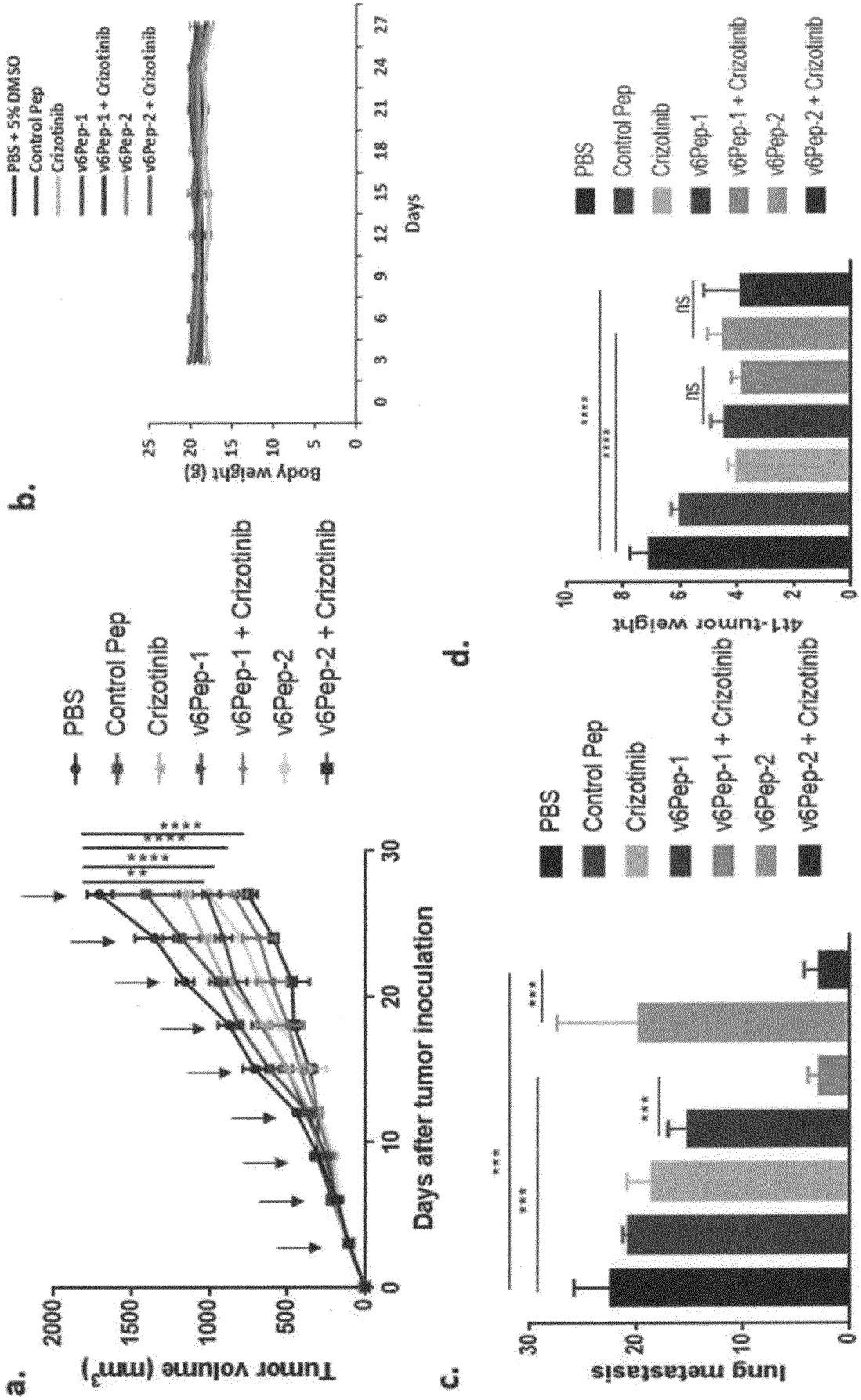
[도 8]


a.
Control Pep
v6Pep-1
v6Pep-2
1 h
2 h
4 h
6 h
b.
Tumor
Heart
Lungs
Liver
Spleen
Kidney
c.
Fluorescence intensity (X 10⁸)
Circulation time (h)
d.
Control Pep
v6Pep-1
v6Pep-2
Fluorescence intensity (X 10⁸)
Tumor
Heart
Lung
Liver
Spleen
Kidney
Circulation time (h)
e.
DAPI
PEP-ß-575
CD44v6
MERGED
Control pep
v6Pep-1
v6Pep-2

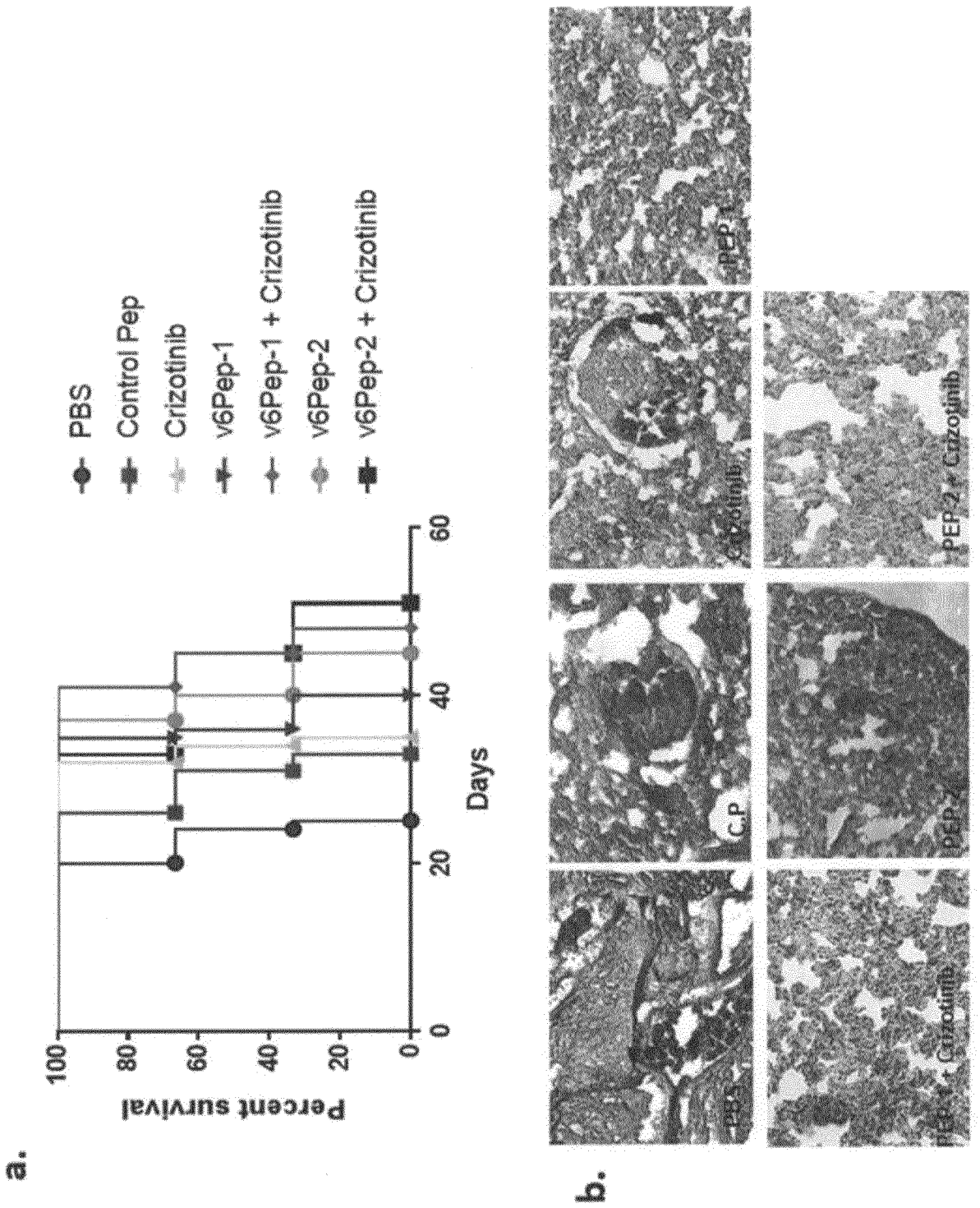
[도 9]


a.
b.
c.
d.
PBS + 5% DMSO
Control Pep
Crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
WEEK 1
WEEK 2
WEEK 3
WEEK 4
Total Photon Flux (10^{10})
Days
lung

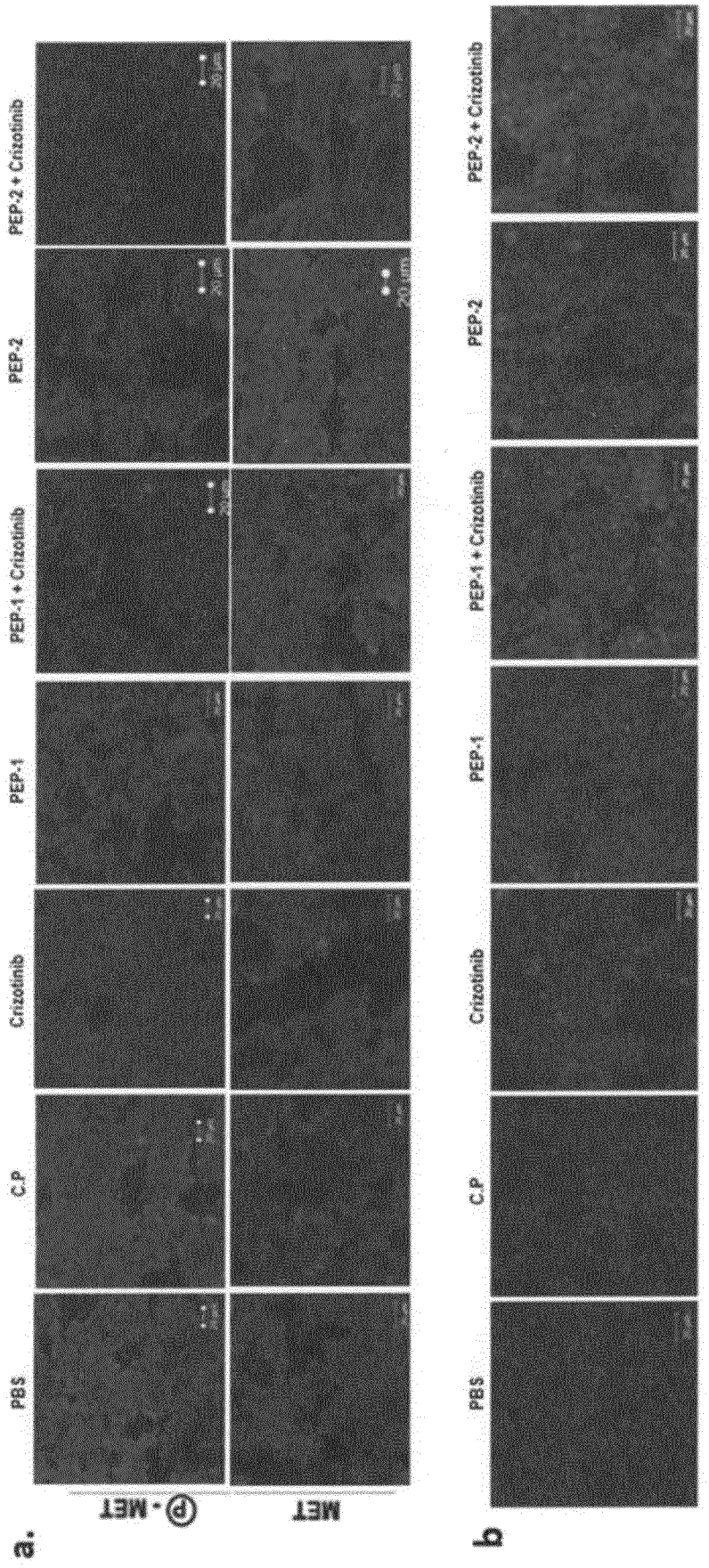
[도 10]


a.
Tumor volume (mm³)
Days after tumor inoculation
PBS
Control Pep
Crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
b.
Body weight (g)
Days
PBS + 5% DMSO
Control Pep
Crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
c.
lung metastasis
d.
4T1-tumor weight
ns

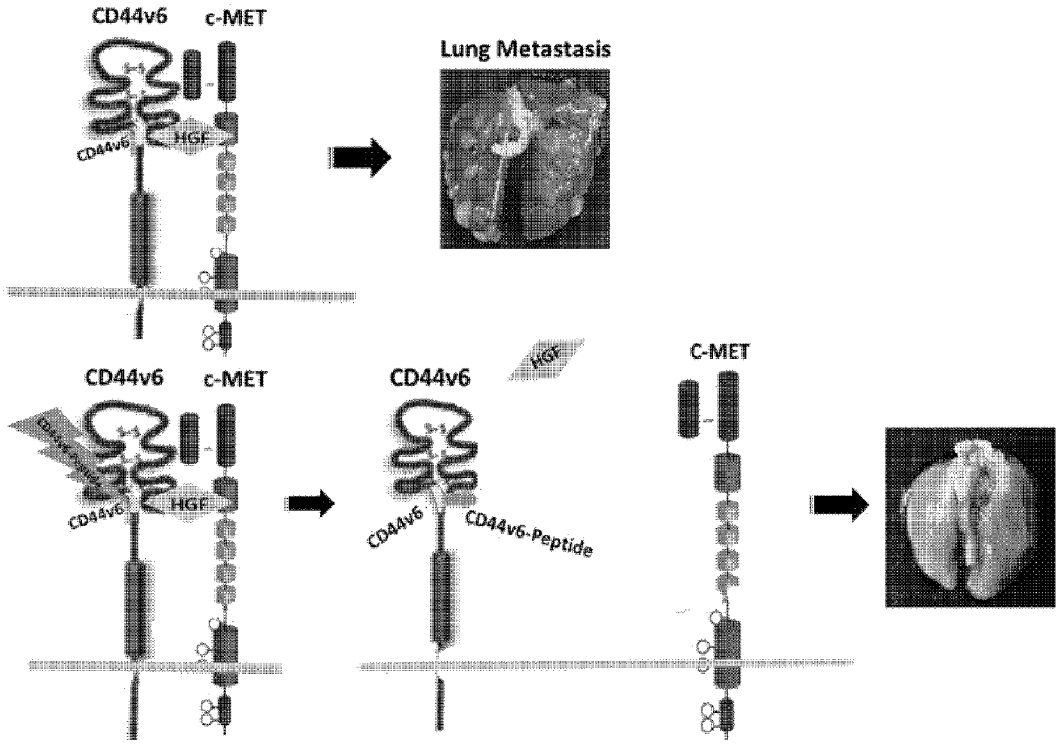
[도 11]


a.
PBS
Control Pep
Crizotinib
v6Pep-1
v6Pep-1 + Crizotinib
v6Pep-2
v6Pep-2 + Crizotinib
Percent survival
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
Days
b.
PBS
C.P
Crizotinib
PEP-1
PEP-1 + Crizotinib
PEP-2
PEP-2 + Crizotinib

[도 12]


a.
P-MET
MET
PBS
C.P
Crizotinib
PEP-1
PEP-1 + Crizotinib
PEP-2
PEP-2 + Crizotinib
20 μm
b.
PBS
C.P
Crizotinib
PEP-1
PEP-1 + Crizotinib
PEP-2
PEP-2 + Crizotinib

[도13]


CD44v6
c-MET
HGF
Lung Metastasis
CD44v6
c-MET
HGF
CD44v6
HGF
CD44v6
CD44v6-Peptide
C-MET

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06(2006.01)i, A61K 38/00(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 31/337; A61K 38/08; A61K 47/48; A61P 35/00; C07K 16/28; A61K 38/00

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: CD44v6, c-Met, phosphorylation, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATZKE-OGI, Alexandra et al., "Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling.", Gastroenterology, 2016, vol. 150, no. 2, pages 513-525 See abstract.	1-18
A	WO 2009-007427 A2 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 15 January 2009 See abstract; claim 1.	1-18
A	KR 10-1741594 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 30 May 2017 See abstract; claim 1.	1-18
A	KR 10-1750549 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 03 July 2017 See abstract; claim 1.	1-18
A	TODARO, Matilde et al., "CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis.", Cell Stem Cell, 2014, vol. 14, no. 3, pages 342-356 See abstract.	1-18
A	NCBI, GenBank accession no. KYK25351.1 (22 March 2016) See the entire document.	1-18

☒ 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	Date of mailing of the international search report
10 APRIL 2019 (10.04.2019)	**10 APRIL 2019 (10.04.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016022

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession no. KRY97216.1 (24 November 2015) See the entire document.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-007427 A2	15/01/2009	AR 067517 A1	14/10/2009
		AR 109535 A2	19/12/2018
		AR 109659 A2	09/01/2019
		AR 109660 A2	09/01/2019
		AU 2008-274171 A1	15/01/2009
		AU 2008-274171 B2	27/02/2014
		AU 2014-200629 A1	27/02/2014
		AU 2014-200629 B2	06/10/2016
		AU 2014-200630 A1	27/02/2014
		AU 2014-200630 B2	06/10/2016
		AU 2016-228280 A1	06/10/2016
		BR PI0815564 A2	18/02/2015
		CA 2694418 A1	15/01/2009
		CA 2694418 C	27/03/2018
		CA 2888691 A1	15/01/2009
		CA 2981821 A1	15/01/2009
		CA 2982484 A1	15/01/2009
		CL 2008002015 A1	21/11/2008
		CN 101981054 A	23/02/2011
		CN 101981054 B	15/04/2015
		CN 103183739 A	03/07/2013
		CN 103183739 B	17/08/2016
		CN 103509112 A	15/01/2014
		CN 103509112 B	21/10/2015
		CN 103509113 A	15/01/2014
		CN 103509113 B	21/10/2015
		CO 6170364 A2	18/06/2010
		CY 1116608 T1	15/03/2017
		DK 2188312 T3	03/08/2015
		EP 2014681 A1	14/01/2009
		EP 2188312 A2	26/05/2010
		EP 2188312 B1	27/05/2015
		EP 2415784 A1	08/02/2012
		EP 2415784 B1	13/06/2018
		EP 2415785 A1	08/02/2012
		EP 2415785 B1	25/04/2018
		EP 2535356 A1	19/12/2012
		EP 2535356 B1	13/06/2018
		EP 2535357 A1	19/12/2012
		EP 2535357 B1	08/08/2018
		ES 2542059 T3	30/07/2015
		ES 2678495 T3	13/08/2018
		ES 2686335 T3	17/10/2018
		ES 2686693 T3	19/10/2018
		ES 2693542 T3	12/12/2018
		HK 1149024 A1	04/12/2015
		HK 1193619 A1	15/07/2016
		HK 1193620 A1	15/07/2016
		HR P20150887 T1	25/09/2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		HU E026026 T2	30/05/2016
		IL 203114 A	31/10/2010
		IL 203114 B	31/03/2015
		IL 223105 A	31/12/2012
		IL 223106 A	31/12/2012
		IL 223108 A	31/12/2012
		IL 223109 A	31/12/2012
		JP 2010-532982 A	21/10/2010
		JP 2014-113153 A	26/06/2014
		JP 2014-113154 A	26/06/2014
		JP 2014-113155 A	26/06/2014
		JP 5562844 B2	30/07/2014
		JP 5889923 B2	22/03/2016
		JP 5889924 B2	22/03/2016
		JP 5889925 B2	22/03/2016
		KR 10-1625234 B1	30/05/2016
		KR 10-1701685 B1	01/02/2017
		KR 10-1701686 B1	01/02/2017
		KR 10-1719084 B1	22/03/2017
		KR 10-2010-0044212 A	29/04/2010
		KR 10-2015-0070451 A	24/06/2015
		KR 10-2016-0019974 A	22/02/2016
		KR 10-2016-0019975 A	22/02/2016
		MA 31977 B1	03/01/2011
		ME 02341 B	31/12/2015
		MX 341012 B	03/08/2016
		MX 345391 B	27/01/2017
		MX 353449 B	08/01/2018
		MY 158756 A	15/11/2016
		NZ 583041 A	29/06/2012
		NZ 599958 A	29/11/2013
		NZ 599959 A	29/11/2013
		NZ 613716 A	30/01/2015
		PA 8789201 A1	26/08/2009
		PT 2188312 E	05/10/2015
		RS 54197 B1	31/12/2015
		RU 2010104633 A	20/08/2011
		RU 2552161 C2	10/06/2015
		SG 183015 A1	30/08/2012
		SI 2188312 T1	30/09/2015
		SI EP2188312 T1	30/09/2015
		TN 2010000016 A1	26/09/2011
		TW 200911828 A	16/03/2009
		TW 201437231 A	01/10/2014
		TW 201605891 A	16/02/2016
		TW 201605892 A	16/02/2016
		TW I549965 B	21/09/2016
		TW I592427 B	21/07/2017
		TW I602829 B	21/10/2017
		TW I602830 B	21/10/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2010-0115639 A1	06/05/2010
		US 2013-0272957 A1	17/10/2013
		US 2013-0273060 A1	17/10/2013
		US 2013-0280257 A1	24/10/2013
		US 2014-0010818 A1	09/01/2014
		US 2015-0252114 A1	10/09/2015
		US 8329173 B2	11/12/2012
		US 8871909 B2	28/10/2014
		US 8871910 B2	28/10/2014
		US 8889832 B2	18/11/2014
		US 9107907 B2	18/08/2015
		WO 2009-007427 A3	09/04/2009
		ZA 201000966 B	23/02/2011
KR 10-1741594 B1	30/05/2017	JP 2018-521998 A	09/08/2018
		KR 10-2017-0003203 A	09/01/2017
		US 2018-201651 A1	19/07/2018
		WO 2017-003044 A1	05/01/2017
KR 10-1750549 B1	03/07/2017	KR 10-2016-0135571 A	28/11/2016
		US 2018-155394 A1	07/06/2018
		WO 2016-186445 A1	24/11/2016

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/016022

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/06(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/06; A61K 31/337; A61K 38/08; A61K 47/48; A61P 35/00; C07K 16/28; A61K 38/00

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: CD44v6, c-Met, phosphorylation, cancer

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MATZKE-OGI, ALEXANDRA 등, 'Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling.' Gastroenterology, 2016, 제150권, 2호, 페이지 513-525 초록 참조.	1-18
A	WO 2009-007427 A2 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 2009.01.15 요약; 청구항 1 참조.	1-18
A	KR 10-1741594 B1 (경북대학교 산학협력단) 2017.05.30 요약; 청구항 1 참조.	1-18
A	KR 10-1750549 B1 (경북대학교 산학협력단) 2017.07.03 요약; 청구항 1 참조.	1-18
A	TODARO, MATILDE 등, 'CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis.' Cell Stem Cell, 2014, 제14권, 3호, 페이지 342-356 초록 참조.	1-18
A	NCBI, GenBank accession no. KYK25351.1 (2016.03.22) 전문 참조.	1-18

☒ 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	국제조사보고서 발송일
2019년 04월 10일 (10.04.2019)	2019년 04월 10일 (10.04.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/016022

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no. KRY97216.1 (2015.11.24) 전문 참조.	1-18

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016022

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-007427 A2	2009/01/15	AR 067517 A1	2009/10/14
		AR 109535 A2	2018/12/19
		AR 109659 A2	2019/01/09
		AR 109660 A2	2019/01/09
		AU 2008-274171 A1	2009/01/15
		AU 2008-274171 B2	2014/02/27
		AU 2014-200629 A1	2014/02/27
		AU 2014-200629 B2	2016/10/06
		AU 2014-200630 A1	2014/02/27
		AU 2014-200630 B2	2016/10/06
		AU 2016-228280 A1	2016/10/06
		BR PI0815564 A2	2015/02/18
		CA 2694418 A1	2009/01/15
		CA 2694418 C	2018/03/27
		CA 2888691 A1	2009/01/15
		CA 2981821 A1	2009/01/15
		CA 2982484 A1	2009/01/15
		CL 2008002015 A1	2008/11/21
		CN 101981054 A	2011/02/23
		CN 101981054 B	2015/04/15
		CN 103183739 A	2013/07/03
		CN 103183739 B	2016/08/17
		CN 103509112 A	2014/01/15
		CN 103509112 B	2015/10/21
		CN 103509113 A	2014/01/15
		CN 103509113 B	2015/10/21
		CO 6170364 A2	2010/06/18
		CY 1116608 T1	2017/03/15
		DK 2188312 T3	2015/08/03
		EP 2014681 A1	2009/01/14
		EP 2188312 A2	2010/05/26
		EP 2188312 B1	2015/05/27
		EP 2415784 A1	2012/02/08
		EP 2415784 B1	2018/06/13
		EP 2415785 A1	2012/02/08
		EP 2415785 B1	2018/04/25
		EP 2535356 A1	2012/12/19
		EP 2535356 B1	2018/06/13
		EP 2535357 A1	2012/12/19
		EP 2535357 B1	2018/08/08
		ES 2542059 T3	2015/07/30
		ES 2678495 T3	2018/08/13
		ES 2686335 T3	2018/10/17
		ES 2686693 T3	2018/10/19
		ES 2693542 T3	2018/12/12
		HK 1149024 A1	2015/12/04
		HK 1193619 A1	2016/07/15
		HK 1193620 A1	2016/07/15
		HR P20150887 T1	2015/09/25

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016022

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		HU E026026 T2	2016/05/30
		IL 203114 A	2010/10/31
		IL 203114 B	2015/03/31
		IL 223105 A	2012/12/31
		IL 223106 A	2012/12/31
		IL 223108 A	2012/12/31
		IL 223109 A	2012/12/31
		JP 2010-532982 A	2010/10/21
		JP 2014-113153 A	2014/06/26
		JP 2014-113154 A	2014/06/26
		JP 2014-113155 A	2014/06/26
		JP 5562844 B2	2014/07/30
		JP 5889923 B2	2016/03/22
		JP 5889924 B2	2016/03/22
		JP 5889925 B2	2016/03/22
		KR 10-1625234 B1	2016/05/30
		KR 10-1701685 B1	2017/02/01
		KR 10-1701686 B1	2017/02/01
		KR 10-1719084 B1	2017/03/22
		KR 10-2010-0044212 A	2010/04/29
		KR 10-2015-0070451 A	2015/06/24
		KR 10-2016-0019974 A	2016/02/22
		KR 10-2016-0019975 A	2016/02/22
		MA 31977 B1	2011/01/03
		ME 02341 B	2015/12/31
		MX 341012 B	2016/08/03
		MX 345391 B	2017/01/27
		MX 353449 B	2018/01/08
		MY 158756 A	2016/11/15
		NZ 583041 A	2012/06/29
		NZ 599958 A	2013/11/29
		NZ 599959 A	2013/11/29
		NZ 613716 A	2015/01/30
		PA 8789201 A1	2009/08/26
		PT 2188312 E	2015/10/05
		RS 54197 B1	2015/12/31
		RU 2010104633 A	2011/08/20
		RU 2552161 C2	2015/06/10
		SG 183015 A1	2012/08/30
		SI 2188312 T1	2015/09/30
		SI EP2188312 T1	2015/09/30
		TN 2010000016 A1	2011/09/26
		TW 200911828 A	2009/03/16
		TW 201437231 A	2014/10/01
		TW 201605891 A	2016/02/16
		TW 201605892 A	2016/02/16
		TW I549965 B	2016/09/21
		TW I592427 B	2017/07/21
		TW I602829 B	2017/10/21
		TW I602830 B	2017/10/21

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016022

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2010-0115639 A1	2010/05/06
		US 2013-0272957 A1	2013/10/17
		US 2013-0273060 A1	2013/10/17
		US 2013-0280257 A1	2013/10/24
		US 2014-0010818 A1	2014/01/09
		US 2015-0252114 A1	2015/09/10
		US 8329173 B2	2012/12/11
		US 8871909 B2	2014/10/28
		US 8871910 B2	2014/10/28
		US 8889832 B2	2014/11/18
		US 9107907 B2	2015/08/18
		WO 2009-007427 A3	2009/04/09
		ZA 201000966 B	2011/02/23
KR 10-1741594 B1	2017/05/30	JP 2018-521998 A	2018/08/09
		KR 10-2017-0003203 A	2017/01/09
		US 2018-201651 A1	2018/07/19
		WO 2017-003044 A1	2017/01/05
KR 10-1750549 B1	2017/07/03	KR 10-2016-0135571 A	2016/11/28
		US 2018-155394 A1	2018/06/07
		WO 2016-186445 A1	2016/11/24