

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 7월 21일 (21.07.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/087222 A2

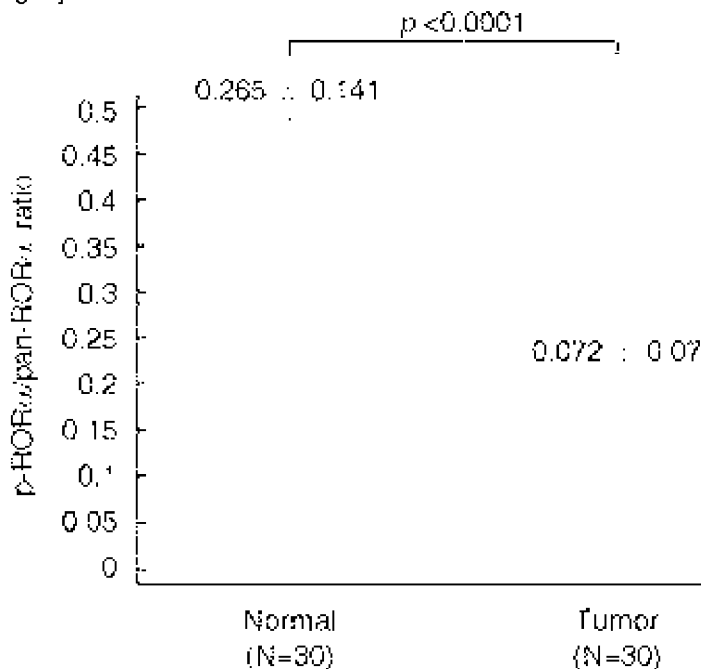
- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/009358
- (22) 국제출원일: 2010년 12월 27일 (27.12.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0002910 2010년 1월 12일 (12.01.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 서울대학교 산학협력단 (SNU R&D FOUNDATION) [KR/KR]; 서울시 관악구 봉천동 산 4-2, 151-818 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 백성희 (BAEK, Sung-Hee) [KR/KR]; 서울시 관악구 봉천 7 동 교수아파트 122E 동 302 호, 151-050 Seoul (KR). 김근일 (KIM, Keun Il) [KR/KR]; 서울시 관악구 봉천 7 동 교수아파트 122E 동 302 호, 151-050 Seoul (KR). 이지민 (LEE, Ji Min) [KR/KR]; 서울시 관악구 청룡동 866-5 성경오 피스텔 304 호, 151-058 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 윤여강 (YOON, Yuh Gang) 등; 서울시 관악구 낙성대동 856-5 디오슈페리움 1 단지 B 동 307 호, 151-848 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTICANCER PEPTIDE SEQUENCE

(54) 발명의 명칭 : 항암 펩타이드 서열

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to an anticancer peptide originating from a ROR α derivative, and relates to a gene encoding the anticancer peptide, a recombinant vector containing the gene, a host cell transformed with the recombinant vector, and a method for producing an anticancer drug using the host cell. The anticancer peptide can be used to treat and prevent cancer, particularly prostate cancer and colorectal cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 ROR α 유도체로부터 기원되는 항암 펩타이드에 관한 것으로서, 상기 항암 펩타이드를 암호화하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합벡터, 상기 재조합벡터로 형질전환된 숙주세포, 상기 숙주세포를 이용한 항암제 생산 방법에 관한 것이다. 상기 항암 펩타이드는 암 특히 전립선암과 대장암의 치료 및 예방에 이용될 수 있다.

WO 2011/087222 A2

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 항암 펩타이드 서열

기술분야

- [1] 본 발명은 대장암 및 전립선암에 효과적인 신규한 펩타이드 및 이를 암호화하는 유전자, 그리고 상기 펩타이드를 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] Wnt 유전자들은 다양한 신호전달 과정을 매개하는 시스테인(cysteine)이 풍부한 분비 폴리펩티드들로 이루어진 하나의 큰 패밀리(family)를 암호화한다. Wnt 신호전달의 비정상적 활성화는 발달 결함 및 종양 형성으로 연결되는 주된 원동력으로 작용한다(Klaus, Birchmeier, 2008; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Willert et al., 2003). Wnt 신호전달 경로는 두 개의 카테고리로 나뉘어져 왔다; 하나는 정규적 Wnt/ β -카테닌(catenin) 신호전달 경로이고, 나머지 하나는 비정규적 Wnt/ Ca^{2+} 신호전달 경로이다(Kuhl et al., 2000; Liang et al., 2007; Liu et al., 2005). Wnt 활성화 없는 경우, 세포질내 β -카테닌의 수준은, 카제인 키나제 I(casein kinase I, CKI) 및 글리코젠 신타제 키나제-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)를 통한 짝지워진 인산화 후 26S 프로테아솜(proteasome)에 의한 β -카테닌의 분해 때문에, 낮은 상태로 유지된다(Orford et al., 1997; Salic et al., 2000). 정규적 Wnt들은 프리즐드(Frz) 패밀리 단백질들 및 저밀도 리포단백질 수용체 관련 단백질(LRP) 5 또는 6에 결합하며, 이 결합은 dishevelled (Dvl)를 활성화시키고 GSK-3 β 의 활성을 억제한다; 이 억제는 β -카테닌을 안정화시키며, TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor)와 함께 표적 유전자 발현 조절을 위해 뒤이어 일어나는 핵으로의 전좌(translocation)를 일으킨다(Behrens et al., 1996; Giles et al., 2003; Molenaar et al., 1996; Moon et al., 2002).
- [4] Wnt5a와 같은 Wnt 리간드들에 의해 영향 받는 비정규적(Noncanonical) Wnt 신호전달 경로는 다양하고 때때로 반대되는 역할들을 가진다(Slusarski et al., 1997; Torres et al., 1996). 비정규적 Wnt들은 그것들의 수용체에 따라 정규적 Wnt 신호전달 경로에 대해 길항적이거나 상승적(synergistic)이다. Wnt5a-결합 마우스들은 말단지(distal limb)에서 증가된 β -카테닌 신호전달을 보였으며, 이는 Wnt5a가 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로의 음성적 조절(negative regulation)과 관련이 있다는 것을 나타낸다(Nemeth et al., 2007). 반대로, Frz4 및 LRP5의 존재하에서 Wnt5a는 Wnt/ β -카테닌 신호전달을 증가시키는 것으로 나타났다(Mikels and Nusse, 2006). 비정규적 Wnt 신호전달 경로의 활성화는 세포내 Ca^{2+} 방출 및 Ca^{2+} /칼모듈린(calmodulin)-의존적 키나제(kinase) II (CaMKII)와 같은 Ca^{2+} 민감(sensitive) 효소들 및 단백질 키나제 C (PKC)의 활성을 가져온다는 점을 고려하면, 비정규적 Wnt 경로들은 정규적 Wnt 경로와는 명백히 다르다는

것을 알 수 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6]

본 발명은 신규의 항암 펩타이드를 제공하는 것이다.

[7]

본 발명은 신규의 항암 펩타이드를 암호화 하는 유전자를 제공하는 것이다.

[8]

본 발명은 신규의 항암 펩타이드를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[9]

[10]

본 발명자들은 세포배양, 결장암조직 및 마우스 모델 연구들을 기반으로, 대장암에서 인산화-의존적 방식으로 β -카테닌 전사활성을 약화시키는데 있어, 정규적 및 비정규적 Wnt 신호전달 경로 사이의 교차점에서 ROR α (서열번호 1)가 수행하는 중요한 역할을 밝혔다. ROR α -함유 복합체의 생화학적 정제는 β -카테닌이 하나의 구성요소라는 것을 나타내었고, 이는 ROR α 및 Wnt 신호전달 경로 사이의 새로운 연결고리를 제공한다. ROR α 의 β -카테닌과의 상호작용 분석은 Wnt/ β -카테닌 신호전달의 ROR α -매개 억제는 ROR α 의 세린 잔기 35에 Wnt5a/PKC α -유발 인산화를 필요로 한다는 것을 보여주었으며, ROR α 의 β -카테닌에 대한 결합은 ROR α 의 인산화에 의해 유발 및 증가된다. 흥미롭게도, PKC α 의 억제조절 (downregulation)과 함께 ROR α 인산화의 감소는 Wnt 표적 유전자들의 활성화 및 결장암 조직에서의 암 진전과 관련이 있다. 본 발명자들은 병태생리학적 모델에서 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로를 억제하고 그로 인해 세포증식 및 암 진전을 조절하는데 있어서, 그동안 밝혀지지 않았던 ROR α 의 역할을 밝히고 이를 이용한 항암제 스크리닝 방법을 10-2009-0001519호(2009.1.8)로 특허출원하였다. 상기 특허는 본 발명의 참고문헌으로 참조된다.

[11]

과제 해결 수단

[12]

본 발명은 서열번호 1의 항암 펩타이드 및 이를 암호화하는 유전자를 제공한다.

[13]

본 발명은 서열번호 1의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.

[14]

본 발명은 상기 서열번호 1의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 함유하는 재조합 벡터를 이용하여 항암 펩타이드를 대량 생산하는 방법을 제공한다.

[15]

발명의 효과

[16]

본 발명에 따른 항암 펩타이드는 암, 특히 전립선암 및 대장암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 ROR α , ROR α S35A, 또는 ROR α S35D를 발현하는 HCT116 세포에 대한 세포 이동성 분석 결과를 보인다.
- [19] 도 2는 Wnt5a 처리시 ROR α , ROR α S35A, 또는 ROR α S35D를 발현하는 HCT116 세포의 부착비의존성 성장을 보인다.
- [20] 도 3 30개의 인간 대장암 조직과, 정상 조직을 비교하여 Pan-ROR α 에 대한 인산화된 ROR α 의 비율을 보인다.
- [21] 도 4 30개의 인간 대장암 조직과, 정상 조직을 비교하여 pan-PKC α 에 대한 인산화된 PKC α 의 비율을 보인다.
- [22] 도 5은 PC 세포에 안정적으로 발현된 ROR α 의 항암 펩타이드에 의한 전립선 암 억제 효과를 보인다. (A) MOCK (B) ROR α 가 안정되게 발현된 PC 세포를 누두 마우스에 주입한 경우, (C) 왼쪽은 MOCK로 분리된 전립선, 오른쪽은 ROR α 가 안정되게 발현된 PC 세포가 주입된 누두 마우스부터 분리된 전립선.
- [23] 도 6은 LNCap 세포에 안정적으로 발현된 서열번호 3의 ROR α 및 서열번호 4의 ROR α 에 의한 항암효과를 보인다. (A) MOCK, (B) ROR α 1(서열번호 4)이 안정되게 발현된 LNCap 세포를 누두 마우스에 주입한 경우, (C) ROR α 4(서열번호 5)이 안정되게 발현된 LNCap 세포를 누두 마우스에 주입한 경우 (D), (E), (F)는 LNCap Mock, LNCaP/ ROR α 1 및 LNCaP/ROR α 4에서 세포주 주입 후 10주가 지나서 추출해 낸 암 덩어리의 모습이다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 본 발명은 전립선암에 효과적인 서열번호 1의 항암 펩타이드 및 이를 암호화하는 유전자를 제공한다. 또한 본 발명은 상기 항암 펩타이드 및 이를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 제조방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 유전공학적 방법에 의한 제조방법이다.
- [26]
- [27] 제 1 양태로, 본 발명은 서열번호 1의 31 내지 40의 아미노산 서열을 포함하고, 35번째 세린이 인산화된 항암 펩타이드 또는 이의 기능적 동등물을 제공한다.
- [28] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 1의 항암 펩타이드의 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 항암 펩타이드와 동일한 정도의 기능을 유지하는 것 모두를 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 항암 펩타이드의 활성화에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

- [29] 상기 항암 펩타이드는 서열번호 1의 전체 서열로된 펩타이드의 일부분일 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열 서열번호 1의 31 내지 40의 펩타이드 및 이를 포함하는 일부 서열로 된 펩타이드일 수 있다.
- [30] 상기 기능적 동등물로서 가장 바람직하는 것은 서열번호 1의 35번째 세린이 아스파르트산으로 치환된 서열번호 2의 펩타이드 또는 글루탐산으로 치환된 서열번호 3의 펩타이드이다. 치환된 아스파르트산과 글루탐산은 인산화된 세린과 유사한 성질을 가져 항암 효과에 효과적이다.
- [31] 상기 기능적 동등물은 서열번호 2의 전체 서열 또는 서열번호 3의 전체서열로된 펩타이드의 일부분일 수 있다. 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열 31 내지 40의 펩타이드 또는 이를 포함하는 서열번호 2의 일부 서열로 된 펩타이드; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열 31 내지 40의 펩타이드 또는 이를 포함하는 서열번호 3의 일부 서열로된 펩타이드이다.
- [32] 제 2 양태로 상기 항암 펩타이드를 암호화하는 핵산서열 및 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.
- [33] "등가의 핵산서열"에는 상기 항암 펩타이드 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.
- [34] "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 항암펩타이드와 동일한 서열의 펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.
- [35]
- [36] 본 발명은, 제 3 양태로는 서열 번호의 1 내지 3 또는 이의 기능적 동등물의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [37] 본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현벡터란 용어는 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다.
- [38]
- [39] 본 발명의 제 4 양태로는, 서열 번호의 1 내지 3 또는 이의 기능적 동등물의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.
- [41] 적합한 형질전환세포로는 원핵생물, 곰팡이, 식물, 동물세포 등이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [42]
- [43] 본 발명의 제 5 양태로는 서열 번호의 1 내지 3 또는 이의 기능적 동등물의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된

세포를 이용하여 항암 펩타이드를 생산하는 방법을 제공한다.

[44]

발명의 실시를 위한 형태

[45] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] < 실시예 1 > **ROR α S35D**(서열번호 2)에 의한 세포 이동의 감소

[48] **ROR α** (서열번호 1), **ROR α S35A** 또는 **ROR α S35D**(서열번호 2)를 안정적으로 발현하는 HCT116 세포가 세포이동성 검사(transwell cell migration assay)에 사용되었다. 세포 이동성 검사는 김 등("Roles of SUMOylation of a reptin chromatin remodeling complex in cancer metastasis," Nat. Cell Biol. 8, 631-639)의 방법을 따라서 수행되었다. 배양된 세포는 Wnt5a 단백질(100 ng/ml)로 2시간 동안 전처리 되었고, 2.5×10^4 HCT 116 세포가 24-웰 트랜스웰 챔버 분석 플레이트(BD Biocoat, BD Biosciences) 위에 올려졌다. 15%의 우태혈청을 포함하는 조정된 맥코이스 5A 배지가 화학주구성물질(chemoattractant)로 챔버의 아래에 첨가되었다. 22시간의 항온반응후에, 필터의 아래 챔버로 이동된 상기 세포를 100% 메탄올로 고정하고, DAPI로 염색하고, 4개의 다른 필드에서 전체 세포 수를 세어서 정량하였다. 모든 실험은 제조자의 프로토콜에 따라 수행되었다. 수치는 적어도 3번의 독립적 시험에 대하여 평균 \pm 표준편차로서 나타내었다. 세포이동성 검사에서 Wnt5a의 처리는 비처리 세포에 비하여 HCT116 대장암 세포의 이동을 감소시켰고, **ROR α S35** 발현 HCT116 대장암 세포는 상당한 정도의 세포 이동성 감소를 보였다(도 1).

[49]

[50] < 실시예 2 > **ROR α S35D**(서열번호 2)에 의한 콜로니 형성 능력의 감소

[51] 부착비의존성 성장(anchorage independent growth)을 측정하기 위하여, **ROR α** (서열번호 1), **ROR α S35A** 또는 **ROR α S35D**(서열번호 2)를 안정적으로 발현하는 HCT116 세포를 반고체 배지에서 세포 성장을 분석하였다. 10^5 세포를 0.4% 노블 아가(noble agar) 및 10% FCS를 포함하는 맥코이스 5A 배지에 놓았다. 상기 세포는 5%의 CO₂에서 3주간 배양되고, 50세포보다 많은 콜로니가 형성되는 것을 분석하였다. **ROR α S35D**를 발현하는 세포는 대조구에 비하여 부착비의존성 성장의 억제 효과도 컸다(도 2)

[52]

[53] < 실시예 3 > 인간의 대장암에서 **ROR α** 인산화의 감소

[54] **ROR α** 의 임상적인 의미를 발견하기 위하여 30개의 인간 대장암 조직에서 인산화된 **ROR α** 의 발현을 조사하여, 정상점막 시료와 대비하였다. 항-인산-**ROR α S35D** IgG에 대한 면역분석에서 대장암 경우에 30개에서 22개(>70%)

ROR α 인산화가 감소되었다. 반면에 pan-ROR α 의 발현은 거의 변화가 없었다(표 1).

[55]

[56] <표 1> 대장암 조직과 정상 점막 시료에서 항-인산-ROR 면역학적 분석

[57]

No.	phospho-ROR α S35		pan-ROR α		phospho/pan-ROR α	
	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor
1	13.57	14.74	82.27	83.43	0.1649	0.1767
2	7.37	8.75	66.72	78.45	0.1121	0.1115
3	4.06	3.02	68.22	49.42	0.0612	0.0611
4	69.22	7.66	128.94	100.10	0.4593	0.0767
5	20.86	2.93	56.03	70.64	0.3723	0.0415
6	38.53	1.38	83.76	86.27	0.4600	0.0160
7	19.97	1.30	74.14	84.14	0.2694	0.0155
8	8.83	8.52	85.51	83.76	0.1031	0.1017
9	11.66	0.69	58.82	84.46	0.1981	0.0082
10	12.59	0.32	83.98	74.36	0.1499	0.0043
11	29.65	0.09	76.82	102.68	0.3860	0.0009
12	5.21	4.19	90.59	73.12	0.0575	0.0573
13	33.98	15.34	89.36	93.76	0.3803	0.1636
14	43.75	7.74	99.04	99.81	0.4417	0.0775
15	5.12	6.07	86.61	84.67	0.0591	0.0599
16	24.74	4.37	84.46	69.23	0.2929	0.0631
17	12.05	1.51	94.36	98.01	0.1277	0.0154
18	38.84	9.03	85.65	87.52	0.4535	0.1032
19	10.72	3.56	77.58	66.82	0.1390	0.0533
20	26.59	24.88	98.26	89.21	0.2706	0.2789
21	10.41	17.38	81.78	86.73	0.1273	0.2027
22	45.71	12.38	92.06	68.92	0.4965	0.1796
23	30.08	3.69	93.84	84.05	0.3205	0.0439
24	35.70	1.69	79.64	88.45	0.4463	0.0191
25	33.39	10.17	93.99	94.16	0.3563	0.1080
26	35.33	9.86	96.75	96.96	0.3652	0.1017
27	30.92	0.94	95.62	100.75	0.3234	0.0093
28	20.46	0.48	90.98	97.66	0.2248	0.0049
29	12.42	0.08	86.30	94.22	0.1456	0.0006
30	16.03	1.21	89.73	98.67	0.1786	0.0123

[58]

[59] 통계학적 분석에서 정상세포에 비하여 암 조직 시료에서 인산화된 ROR α 및 인산화된 PKC α 의 의미 있는 감소를 보였다(도 3 및 도 4). 이 데이터는 인간의 대장암에서 ROR α 의 인산화 감소가 빈번한 것임을 보인다.

[60]

[61] <실시예 4> ROR α 를 안정적으로 발현하는 PC3 세포주를 이용한 전립선 암세포 성장 억제

[62] PC3는 전립선 조직 세포로 암이 전이과정으로까지 활성화되어 있는 세포주이다. PC3 세포는 ATCC회사에서 구입(ATCC® Number: CRL-1435™)이 가능하다. 이 세포주에 ROR α 의 단백질을 안정적으로 발현할 수 있도록 안정적인 세포주를 제작하였다. p3XFlag-CMV10 벡터(Sigma-Aldrich 회사에서 생산)를 이용하여 ROR α 단백질로 발현될 수 있는 DNA 서열을 가진 발현 플라스미드를 제작한 후 이를 세포에 주입(transfection)하였다. 이 후에 ROR α DNA 서열이 세포 내 염색체에 안정적으로 삽입 된 세포만을 플라스미드 내에 존재하는 항생제로 골라내어 항상 ROR α 를 발현하는 세포주를 구축하였다. PC3는 암 활성이 높아 누드 마우스(쫀 오리엔트 바이오 에서 구입)에 피부 밑으로 세포주를 주입할 경우 (subcutaneous injecton) PC3 Mock(도 5의 (A) 및 (C))에서 보는 것과 같이 암 형성이 잘 일어난다. 그러나 ROR α 를 안정적으로 발현하는 안정적인 세포주(도 5의 (B), 및 (C))의 경우는 발현된 ROR α 단백질의 기능에 의해 암 형성이 거의 일어나지 않게 된다. 도 5의 (C)는 세포주 주입 후 4주가 지나서 추출해 낸 암 덩어리의 모습이다(왼쪽 MOCK, 오른쪽 ROR α 세포내에서 안정적으로 발현된 세포주).

[63]

[64] < 실시예 5 > ROR α 를 안정적으로 발현하는 LNCaP 세포주를 이용한 전립선 암세포 성장 억제

[65] LNCaP 역시 PC3와 마찬가지로 전립선 조직 세포로 암이 전이과정으로까지 활성화되어 있는 세포주이다. LNCaP 세포는 ATCC회사에서 구입(ATCC® Number: CRL-1740™)이 가능하다. 이 세포주에 ROR α 1(서열번호 4) 및 ROR α 4(서열번호 5)의 단백질을 각각 안정적으로 발현할 수 있도록 안정적인 세포주를 제작하였다. ROR α 4는 ROR α 1과는 달리 암 억제과정에 기능하는 데 중요한 펩타이드 서열을 포함하고 있지 않는 ROR α 1의 다른 이소타입 패밀리 단백질이다. p3XFlag-CMV10 벡터(Sigma-Aldrich 회사에서 생산)을 이용하여 ROR α 1 및 ROR α 4 단백질로 각각 발현될 수 있는 DNA 서열을 가진 발현 플라스미드를 제작한 후 이를 세포에 주입(transfection)하였다. 이 후에 ROR α 1 및 ROR α 4 DNA 서열이 세포 내 염색체에 안정적으로 삽입 된 세포만을 플라스미드 내에 존재하는 항생제로 골라내어 항상 ROR α 를 발현하는 세포주를 구축하였다. LNCaP 역시 PC3와 마찬가지로 암 활성이 높아 누드 마우스(쫀 오리엔트 바이오 에서 6주령 누드 마우스를 구입하여 사용)에 피부 밑으로 세포주를 주입할 경우 (subcutaneous injecton) LNCaP Mock(도 6의 (A) 및 (C))에서 보는 것과 같이 암 형성이 잘 일어난다. 그러나 ROR α 1을 안정적으로 발현하는 안정적인 세포주 LNCaP/ROR α 1의 경우는 발현된 암 억제에 기능하는 펩타이드 서열을 가진 ROR α 1 단백질의 기능에 의해 암 형성이 거의 일어나지 않았다(도 6의 (B) 및 (E)). 그러나 이와는 달리 ROR α 1의 N-말단 부분이 다르고, 인산화되기 위한 35번째 세린이 없는 ROR α 4를 안정적으로 발현되는 안정적인 세포주 LNCaP/ROR α 4의 경우에는 이러한 억제가 잘 관찰되지 않는다(도 6의 (C))

및 (F)). 도 6의 (D), (E), (F)는 LNCap Mock, LNCaP/ ROR α 1 및 LNCaP/ROR α 4에서 세포주 주입 후 10주가 지나서 추출해 낸 암 덩어리의 모습이다.

[66]

산업상 이용가능성

[67]

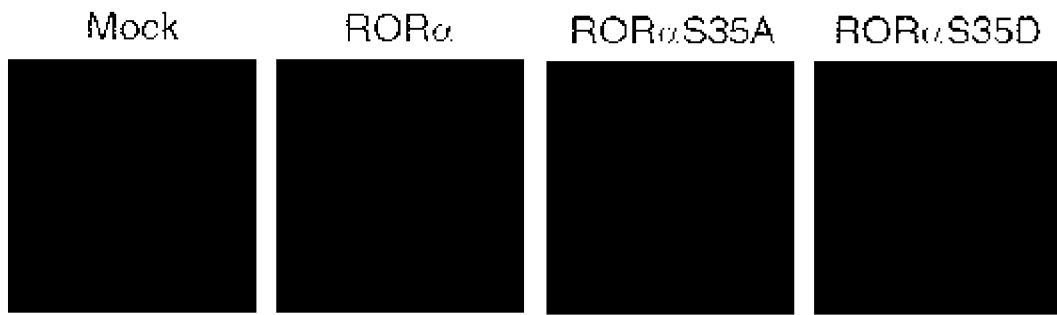
본 발명에 따른 항암 펩타이드는 서열번호 2의 35번째 세린이 인산화된 ROR α 또는 이의 기능적 동등물로서, β -카테닌 전사 활성을 특이적으로 방해한다. 따라서 Wnt/ β -카테닌 신호 경로를 중재하는 암의 예방 및 치료에 유용하며, 특히 대장암 및 전립선암의 치료 및 예방에 유용하게 사용이 가능하다.

[68]

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 31 내지 40의 아미노산 서열을 포함하고, 35번째 세린이 인산화된항암 펩타이드 또는 이의 기능적 동등물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 기능적 동등물은 서열번호 2 또는 서열번호 3인 것을 특징으로 하는 항암 펩타이드.
- [청구항 3] 서열 번호 2 또는 서열번호 3 중 어느 하나의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA 또는 RNA 유전자.
- [청구항 4] 서열 번호 2 또는 서열번호 3 중 어느 하나의 항암 펩타이드를 암호화하는 DNA를 포함하는 재조합백터.
- [청구항 5] 제 4 항에 따른 재조합백터로 형질전환된 세포.
- [청구항 6] 제 5 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 항암 펩타이드를 분리하는 것을 특징으로하는 항암 펩타이드 생산 방법.
- [청구항 7] 서열번호 1의 31 내지 40의 아미노산 서열을 가지고, 35번째 세린이 인산화된 항암 펩타이드.
- [청구항 8] 서열번호 2의 31 내지 40의 아미노산 서열을 가지는 항암 펩타이드.
- [청구항 9] 서열번호 3의 31 내지 40의 아미노산 서열을 가지는 항암 펩타이드.

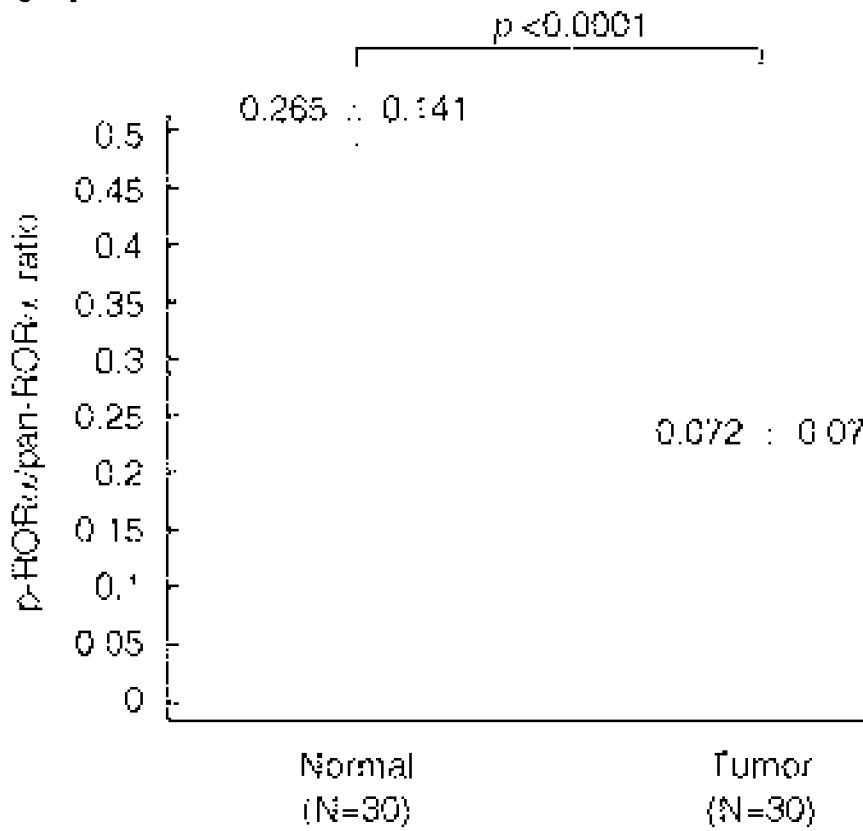
[Fig. 1]



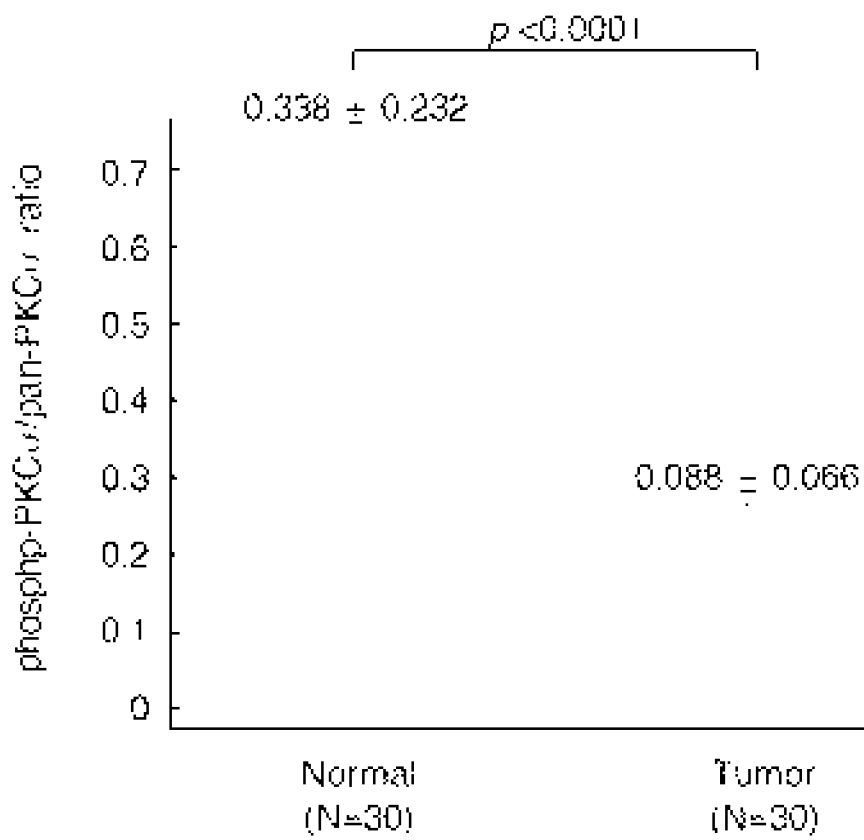
[Fig. 2]



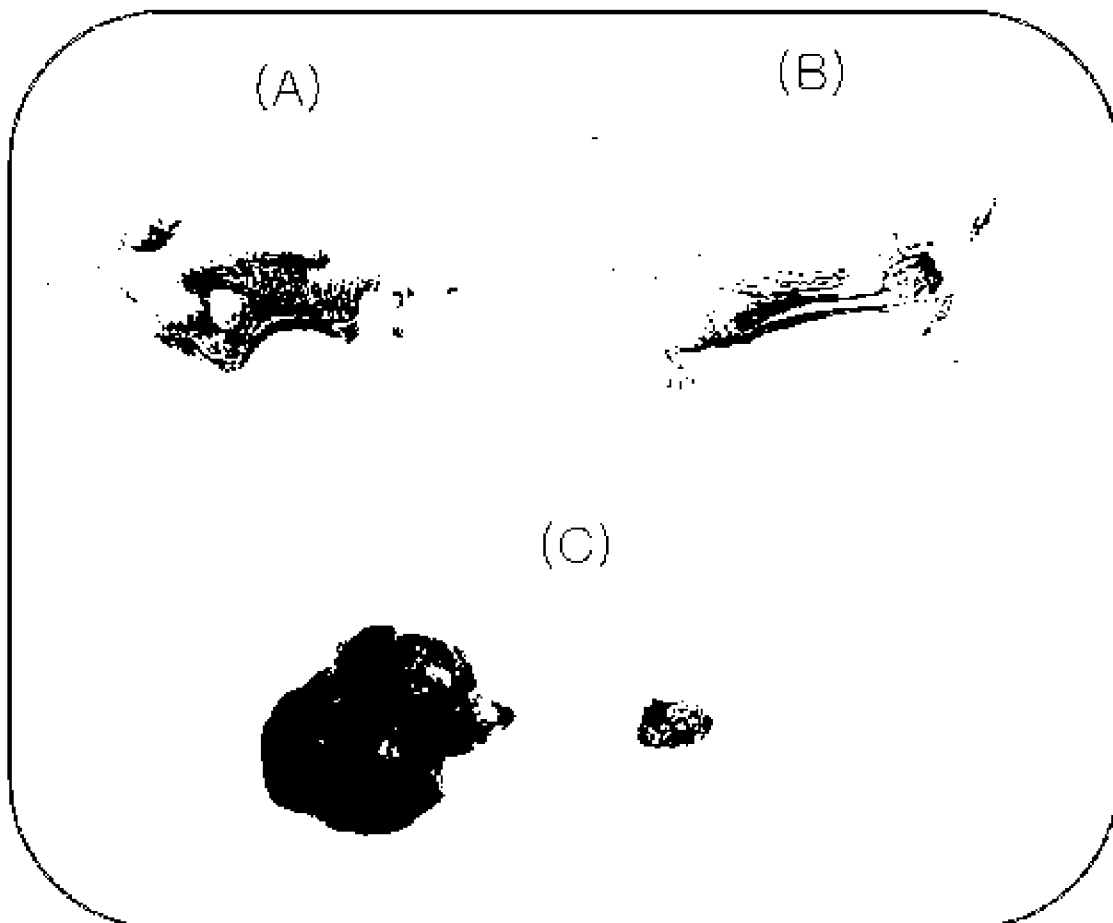
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

