



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0123311
(43) 공개일자 2014년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0040493
(22) 출원일자 2013년04월12일
심사청구일자 2013년04월12일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
최은경
서울 송파구 올림픽로35길 93, 102동 2504호 (신천동, 더샵스타리버)
정성윤
경기 용인시 수지구 포은대로 231, 206동 1102호 (상현동, 서원마을현대홈타운아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

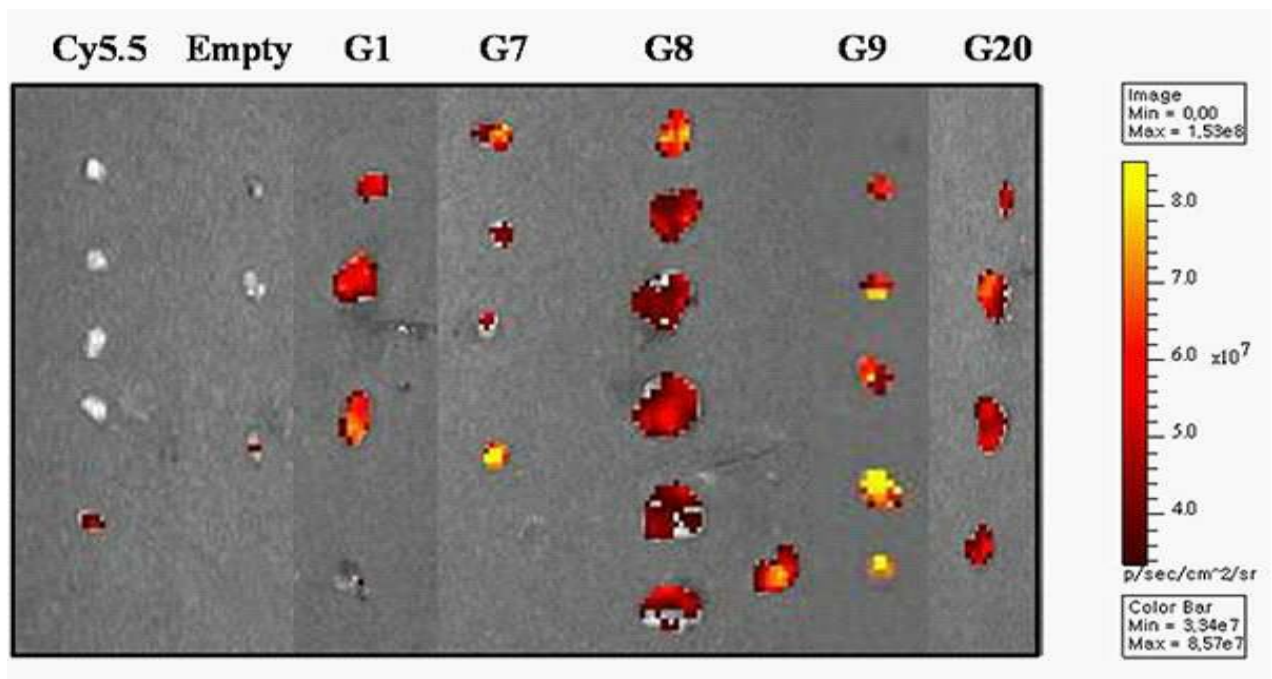
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **암 표적용 펩타이드 및 이의 의학적 용도**

(57) 요약

본 발명은 암 표적용 펩타이드 및 이를 이용한 암 진단용 키트 및 약물 전달용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 펩타이드는 다양한 암 조직을 우수한 효율로 표적하는 바, 암 발현 여부를 진단할 수 있는 저분자 진단 탐침 및 암의 치료 및 예방을 위한 약물 전달 물질로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

송시열

서울 송파구 중대로 24, 214동 104호 (문정동, 올림픽훼밀리타운)

이경진

서울 성북구 보문로29길 11, 503A호 (보문동2가, 닥터빌)

정혜경

서울 송파구 풍성로 14, 3동 105호 (풍납동, 미성맨션)

최진향

서울 송파구 한가람로 478, 103동 104호 (풍납동, 씨티극동아파트)

박재숙

서울 동작구 현충로 151, 106동 804호 (흑석동, 한강현대아파트)

박석순

서울 강동구 암사1가길 22-1, 301호 (암사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0487

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심연구지원사업

연구과제명 방사선 반응성 암세포 표면단백질마커 및 리간드 발굴 위한 환자 암조직 이식 마우스에서 in vivo 웹타이드 스크리닝

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암 표적용 펩타이드.

청구항 2

제1항의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 펩타이드는 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군에서 선택된 하나로 표지되는 것인 암 진단용 키트.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 진단은 펩타이드를 혈액, 소변이나 바이옵시(biopsy)에 의해 직접 얻은 해당 조직 또는 세포에 반응시켜 이들의 결합을 검출함으로써 수행되는 것인 암 진단용 키트.

청구항 6

서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 약물 전달용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 암에 특이적인 것인 약물 전달용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 약물은 항암제인 것인 약물 전달용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 암 표적용 펩타이드 및 이의 암 진단, 약물전달 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간의 몸을 구성하고 있는 가장 작은 단위인 세포는 정상적인 때 세포 내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하면서 세포 수 균형을 유지한다. 어떤 원인으로 세포가 손상을 받는 경우, 치료를 받아 회복하여 정상적인 세포로 역할을 하게 되지만, 회복이 안 된 경우는 스스로 죽게 된다. 그러나 여러 가지 이유로 인해 이러한 증식과 억제가 조절되지 않는 비정상적인 세포들이 과다하게 증식할 뿐만 아니라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴 형성 및 정상 조직의 파괴를 초래하는 상태를 암(cancer)이라 정의한다. 암은 이렇듯 억제

가 안 되는 세포의 증식으로, 정상적인 세포와 장기의 구조와 기능을 파괴하기에 그 진단과 치료의 중요성은 매우 크다.

[0003] 한편, 약물을 암 세포 및 조직에 선택적으로 전달하는 약물전달체계 또는 표적 치료는 많은 관심을 받아온 기술이다. 왜냐하면 동일 양의 항암제를 사용하더라도 약의 효력을 증가시킬 수 있고 동시에 정상조직에 미치는 부작용을 크게 줄일 수 있기 때문이다. 또한 유전자 치료에 적용할 경우 바이러스를 암 세포에 선택적으로 전달시킴으로써 치료 효율을 올리고 심각한 부작용을 줄일 수 있다. 이를 위해 지금까지는 주로 종양세포에 특이한 항원 및 이를 표적하는 항체를 개발하여 왔다. 그러나 항체의 경우 면역반응의 우려 및 조직 내 침투의 낮은 효율성 등의 문제가 존재한다. 반면 펩타이드의 경우는 분자량이 작아 면역반응의 우려가 적고 조직 내 침투가 용이한 것이 장점이다. 따라서, 암 표적 펩타이드를 기존의 항암제와 연결하게 되면 종양에 선택적으로 약물을 전달하는 지능형 약물전달체로 활용될 수 있으므로, 암 표적 펩타이드의 개발이 요구되고 있으며, 관련하여 한국 공개특허 10-2012-0132455호에 암세포의 bc1-2 결합 펩타이드를 개시하고 있으나, *in vitro* 수준의 연구에 그치고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서 본 발명은 기존의 배양 세포 수준에서 연구되었던 스크리닝 방법과 달리 실제 사람 암 세포를 이식한 마우스 모델을 구축하여 생체 내에서 스크리닝을 진행하는 방법을 통해, 신규한 암 표적용 펩타이드 및 이의 의학적 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암 표적용 펩타이드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0006] 또한 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0007] 또한 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 약물 전달 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 펩타이드는 다양한 암 조직을 우수한 효율로 표적하는 바, 암 발현 여부를 진단할 수 있는 저분자 진단 탐침 및 암의 치료 및 예방을 위한 약물 전달 물질로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 다양한 암종이 형성된 동물 모델을 구축하는 방법 및 이의 확인 결과를 나타낸 사진이다.

도 2는 본 발명의 실시예 2에 따라 다양한 암 조직을 타겟팅 하는 펩타이드를 스크리닝하기 위한 M13 파아지 디스플레이 바이오패닝의 계획도이다.

도 3은 표 2에 나타난 20개 루프형 펩타이드 발현 파아지를 증폭한 뒤 농도를 측정하여 Cy5.5 형광 프로브를 라벨링 한 후 표적능력을 분석한 *in vivo* 이미징 결과이다.

도 4는 루프형 펩타이드 발현 파아지의 *in vivo* 이미징 실험 11일차에 종료하여, 암 조직만을 분리한 후 형광세기를 비교한 *ex vivo* 이미징 결과이다.

도 5는 표 2의 20개 펩타이드 중 우수한 표적능력을 가진 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20의 펩타이드가 표적된 암 조직을 균등 분할하여 형광의 위치를 확인한 *ex vivo* 이미징 결과이다.

도 6은 본 발명의 우수한 표적능력을 가진 5개 루프형 펩타이드가 발현된 파아지의 표적능력을 췌장암 유래 xenograft 모델에서 확인한 *in vivo* 및 *ex vivo* 이미징 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암 표적용 펩타이드를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 발명자들은, 실제 사람 암 세포를 이식한 마우스 모델을 구축하여 생체 내에서 스크리닝을 진행하는 방법을 통해, 사람 암종에서 특이적으로 암 조직에 결합하는 펩타이드 (Tumor-targeting peptides)를 동정하였고, 이러한 신규 펩타이드를 암 발생 부위 및 진행 정도, 더 나아가 암의 전이를 진단할 수 있는 이미징 탐침 및 효과적인 약물 전달 용도로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열은 AKATCPA, 서열번호 7의 서열은 TNANHVF, 서열번호 8의 서열은 GWSGLSV, 서열번호 9의 서열은 LYANSFF, 서열번호 20의 서열은 IKVGKVQ과 같다.
- [0013] 본 발명의 펩타이드는 아미노산 7개로 이루어진 저분자 펩타이드이다. 저분자 펩타이드는 그 크기가 작아서 3차원적으로 안정화되어 있고 점막을 쉽게 통과하며 조직 깊은 곳에서도 분자 목표물을 인지할 수 있는 장점이 있다. 또한 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 국소 주사를 통해 안정성이 확보되고 면역 반응성을 최소화 할 수 있기 때문에, 암을 조기 진단할 수 있는 장점이 있다. 그리고 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 대량 생산이 항체에 비해 상대적으로 간단하고, 독성이 약하다.
- [0014] 또한 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 항체보다 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리 시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 펩타이드는 당업계에서 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, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989), 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 또한 본 발명의 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에서 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. 본 발명의 펩타이드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., Molecular Cloning; A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Edition; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink (eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:12073-12080, 1990.
- [0017] 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}Tc , ^{32}P , ^{35}S), 크로모포어(chromophore), 발광물질 또는 형광물질(예: FITC, RITC, 로다민(rhodamine), 시아닌(cyanine), 텍사스레드(Texas Red), 플루레신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 퀀텀닷(quantum dots))등 일 수 있다.
- [0018] 유사하게, 상기 검출 가능한 표지는 항체 에피토프(epitope), 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또

는 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.

[0019] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 암은 고형암일 수 있으며, 더욱 구체적으로 본 발명에 따른 암 표적용 펩타이드는 뇌종양(Brain tumor), 양성성상세포종 (Low-grade astrocytoma), 악성성상세포종 (High-grade astrocytoma), 뇌하수체 선종 (Pituitary adenoma), 뇌수막종 (Meningioma), 뇌림프종 (CNS lymphoma), 핍지교종 (Oligodendroglioma), 두개내인종 (Craniopharyngioma), 상의세포종 (Ependymoma), 뇌간종양 (Brain stem tumor), 두경부 종양(Head & Neck tumor), 후두암 (Laryngeal cancer), 구인두암 (Oropharyngeal cancer), 비강/부비동암 (Nasal cavity/PNS tumor), 비인두암 (Nasopharyngeal tumor), 침샘암 (Salivary gland tumor), 하인두암 (Hypopharyngeal cancer), 갑상선암 (Thyroid cancer), 구강암 (Oral cavity tumor), 흉부종양(Chest Tumor), 소세포성 폐암 (Small cell lung cancer), 비소세포성 폐암 (Non small cell lung cancer), 흉선암 (Thymoma), 종격동 종양 (Mediastinal tumor), 식도암 (Esophageal cancer), 유방암 (Breast cancer), 남성유방암 (Male breast cancer), 복부종양 (Abdomen-pelvis tumor), 위암 (Stomach cancer), 간암 (Hepatoma), 담낭암 (Gall bladder cancer), 담도암 (Biliary tract tumor), 췌장암 (pancreatic cancer), 소장암 (Small intestinal tumor), 대장(직장)암 (Large intestinal tumor), 항문암 (Anal cancer), 방광암 (Bladder cancer), 신장암 (Renal cell carcinoma), 남성생식기종양 (Male genital cancer), 음경(요도)암 (Penile cancer), 전립선암 (Prostatic cancer), 여성생식기종양 (Female genital cancer), 자궁경부암 (Cervix cancer), 자궁내막암 (Endometrial cancer), 난소암 (Ovarian cancer), 자궁육종 (Uterine sarcoma), 질암 (Vaginal cancer), 여성외부생식기암 (Vulva cancer), 여성요도암 (Urethral cancer) 또는 피부암 (Skin cancer)을 표적하는데 사용함이 바람직하다. 보다 더 바람직하게는 폐암 또는 췌장암을 표적하여, 이의 진단 및 약물전달에 사용될 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 상기에서 기재한 바와 같이 수득할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암 표적용 펩타이드를 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다. 상기 펩타이드는 앞서 기재한 바와 같이 화학적 또는 유전공학적 방법에 의해 수득된 것일 수 있다. 본 발명의 진단용 키트에는 펩타이드의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 안정성을 유지하기 위해, 분말 상태 또는 적절한 완충액에 용해된 상태 또는 4℃ 유지된 상태로 제공될 수 있다.

[0022] 이 때, 본 발명에서 "진단"이란 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 암의 존재 또는 특징을 확인하는 것이다.

[0023] 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.

[0024] 또한 암 조직에 결합한 본 발명의 펩타이드의 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 펩타이드는 상기에서 기재한 바와 같이 표지된 상태로 제공될 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명의 펩타이드가 표지되지 않은 채로 제공되는 경우에는, 본 발명의 암 진단용 키트는 본 발명의 펩타이드의 시험관 내 또는 생체 내에서 암 유발 부위, 특히 암조직과 결합여부 또는 그 위치를 탐색하기 위한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분은 본 발명의 펩타이드의 표지를 위한 공지의 화합물이거나, 항원-항체 반응을 통한 탐색을 위하여 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 펩타이드와 결합하는 특정 수용체에 대한 항체 또는 이들에 대한 2차 항체 및 이의 검출을 위한 시약일 수 있다.

[0026] 또한 본 발명의 펩타이드는 플레이트의 표면에 코팅된 형태로 제공될 수도 있다. 이 경우에는 상기 플레이트에 직접 대상 암 조직이나 암 세포를 접종하여 적당한 조건에서 반응시킨 후, 플레이트의 표면상에서의 암과 펩타이드의 결합을 관찰하여 암을 진단할 수 있다.

[0027] 또한 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.

- [0028] 본 발명에 따른 펩타이드는 약물을 암조직에 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.
- [0029] 상기 약물은 항암제로서, 본 발명의 펩타이드에 연결될 수 있는 항암제로는 종래 암의 치료에 사용되는 것이라면 제한없이 사용될 수 있다. 예컨대, 시스플라틴, 5-플로오우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 빈블라스틴, 부설판, 클로람부실, 시클로포스파미드, 멜팔란, 니트로젠 무스타드, 니트로소우레아, 탁솔, 파클리탁셀, 도세탁셀, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 블레오마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토마이신-C, 하이드록시우레아 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.
- [0030] 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.
- [0031] <실시예 1> 다양한 사람 암종 형성 동물 모델 구축
- [0032] *in vivo* 펩타이드 스크리닝을 진행하기 위한 사람 폐암 유래 암을 형성한 동물 모델을 구축하였다. 상기 동물 모델을 구축하기 위해 Balb/c 누드마우스를 사용하였으며, 사람 폐암 세포인 A549 세포를 계대 배양하여 세포수를 측정한 후, 이종이소 이식한 xenograft 모델을 구축하기 위해 A549 세포를 마우스 한 마리 당 5×10^5 cells/50 μ l 를 오른쪽 넓적다리 피하조직에 주사하였다. 약 1개월 (4주) 까지 암 조직의 크기를 측정하고, 암 조직의 크기가 200 mm³ 정도 성장하였을 때, *in vivo* 펩타이드 스크리닝을 진행하였다.
- [0033] 이외에도 사람 폐암 세포인 A549뿐 아니라, 사람 췌장암 세포인 BxPC3를 사용하여 동일한 방법을 통해 동물 모델을 구축하였다.
- [0034] 또한 각각의 이종동소 이식한 orthotopic xenograft 모델을 구축하기 위하여, A549/Fluc 세포와 BxPC3/Fluc 세포를 계대배양 한 후, 마우스의 폐와 췌장에 상기의 암세포를 각각 주입하였다. 상기 모델은 마우스 장기에 직접 암세포를 주입하였으므로, 마우스 외형 관찰로 암의 성장이 확인되지 않기 때문에, 7일 간격으로 D-Luciferin을 복강으로 주사하여 발광 정도를 IVIS 스펙트럼 이미징 시스템(Xenogen) 장비를 이용한 luminescence 이미징 측정으로 암의 성장 포화도를 확인하였다. 약 4주 후, 발광의 세기가 10⁷ photons/s/cm²/sr 정도 확인 되었을 때, *in vivo* 이미징에 사용하였다. 상기의 동물 모델 구축 과정 및 이미징 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0035] 도 1의 A는 이종이소 이식한 마우스 모델(A549세포 및 BxPC3세포)의 모델 구축 과정이며, B는 폐에 이종동소 이식한 마우스 모델(A549/Fluc 세포), C는 췌장에 이종동소 이식한 마우스 모델(BxPC3/Fluc 세포)의 구축 과정이다.
- [0036] 또한, 도 1의 (1)은 이종이소 이식 4주 후 암이 형성된 마우스 모델 (A549세포 및 BxPC3세포)의 암 조직 형성 결과 사진이고, 도 1의 (2)는 폐에 이종동소 이식 4주 후 암이 형성된 마우스 모델의 이미징 결과(A549/Fluc 세포), (3)은 췌장에 이종동소 이식 4주 후 암이 형성된 마우스 모델의 이미징 결과 (BxPC3/Fluc 세포) 사진이다.
- [0037] <실시예 2> M13 파아지 펩타이드 라이브러리 *in vivo* 스크리닝 - *in vivo* 파아지 디스플레이
- [0038] 상기 실시예 1에서 구축된 동물 모델인 사람 폐암 유래 xenograft tumor가 오른쪽 뒷다리에 형성된 마우스 모델에 랜덤 루프형 펩타이드 라이브러리(7개의 아미노산으로 구성된 무작위 배열을 통하여 약 27 억 개의 다양한 아미노산 서열을 가지도록 제작된 루프형태의 펩타이드 라이브러리-Ph.DTM phage display peptide library kit, New England Biolabs(NEB)를 구입하여 사용함)를 이용하여, *in vivo* 상에서의 스크리닝 과정에서 보다 높은 특이성을 가지는 펩타이드를 선별 가능하도록 디자인하였다. 구축한 마우스 모델에서 형성된 암 조직을 타겟팅하는 펩타이드를 스크리닝 하기 위하여, 마우스의 꼬리 정맥을 통하여 M13 파아지 펩타이드 라이브러리(약 27억

개의 서로 다른 아미노산 서열을 지닌 7개 아미노산으로 구성된 루프형 펩타이드가 M13 파아지 gp3 minor coat 단백질에 융합된 라이브러리를 주사하여 생체 내에서 순환시킨 후(생체 암조직과 M13 파아지 펩타이드 라이브러리의 결합 방법), 다양한 세척조건을 통해 암 조직에 특이적으로 타겟팅 할 수 있는 펩타이드 발현 파아지를 선별하였다. 이와 관련한 스크리닝 계획 및 반응조건들을 각각 도 2 및 표 1에 나타내었다.

[표 1]

단계	세척조건	용출
1	50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl ,1X protease inhibitor cocktail , 1 % BSA	암 조직 균질화 및 화학적 용출 (0.2 M glycine, pH2.2)
2	50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl ,1X protease inhibitor cocktail , 1 % BSA , 0.1 % Tween-20	
3	50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl ,1X protease inhibitor cocktail, 1 % BSA, 0.3 % Tween-20	
4	50 mM Tris, pH7.5, 500 mM NaCl ,1X protease inhibitor cocktail , 1 % BSA, 0.5 % Tween-20	

구체적으로, 도 2는 암 조직에 타겟팅하는 펩타이드 스크리닝을 위한 M13 파아지 스크리닝의 계획도로서, (1) 오른쪽 뒷다리에 암 조직이 형성된 마우스 모델을 구축하고, (2) M13 파아지 표면에 7개 아미노산으로 구성된 루프형 펩타이드 라이브러리가 발현된 파아지 라이브러리를 꼬리정맥을 통해 주사하여 순환시킨 뒤에, (3) 이를 다양한 조건으로 세척한 후, (4) 최종적으로 타겟팅 된 파아지를 용출하여 파아지를 얻었다. 상기와 같이 얻은 파아지를 대장균에 감염시켜 증폭시키고, 이를 다시 마우스 꼬리정맥을 통해 주사하여 순환시킨 후, 보다 높은 강도의 세척 조건으로 반복시킴으로써, 보다 특이적이고 강한 결합력을 갖는 파아지를 찾는 과정을 반복하였다 (이를 바이오 패닝(biopanning)이라 함). 또한, 표 1은 생체 내 순환과정에서 암 조직에 높은 타겟팅 능력과 특이성을 가진 펩타이드가 발현된 파아지를 검출하기 위한 4 단계 바이오 패닝 세척 조건을 도표화한 것으로, 각 단계마다 보다 강한 세척조건으로 다양하게 변화시켜, 이에 따라 각 4회의 바이오 패닝을 실시하여 in vivo 상에서 형성된 암 조직에 타겟팅하는 펩타이드를 가진 파아지를 확보하였다. 상기에 의하여 얻어진 파아지를 숙주 세포인 대장균 ER2738 세포에 감염시켜 LB 배지 상에서 증폭시킨 후, 100여 개의 파아지 플라그를 무작위로 선택하여 M13 파아지 게놈성 DNA(단일 스트랜드화 원형 DNA)를 분리 정제하고 유전자 염기서열을 확인하여, 파아지 표면 단백질(gp3 minor coat 단백질)에 발현되어 암 조직에 타겟팅하는 펩타이드 부분의 아미노산 염기서열을 규명하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 표 2에는 Clustal X 서열 분석 프로그램을 통하여 총 20개의 아미노산 서열(서열번호 1 내지 서열번호 20)을 나타내었으며, 이 중에서 명확하게 특이성을 가지는 5개의 서열을 선택하였다.

[표 2]

번호	반복빈도	펩타이드서열	번호	반복빈도	펩타이드서열
1	26	AKATCPA	11	1	NWGDRIR
2	20	SWQIGGN	12	1	NWGDRIE
3	12	TVRTSAD	13	1	RSANIFT
4	10	IGNSNTL	14	1	FNMF SRF
5	2	IKVGK LQ	15	1	ISAWPTR
6	2	NWGDRIL	16	1	SISSLTH
7	2	TNANH YF	17	1	FLNPTTT
8	1	GW SGLSV	18	1	KNLTRLA
9	1	LYANSPF	19	1	MARYMSA
10	1	SISSLTD	20	1	IKVGK VQ

[0044] <실시예 3> *in vivo* 상에서 형성된 암조직에 타겟팅하는 펩타이드 형광 라벨링

[0045] *in vivo* 스크리닝에서 얻은 암 조직을 표적으로 하는 특이적인 펩타이드의 확인을 위하여 각각의 루프형 펩타이드가 발현된 파아지를 증폭한 뒤, 파아지 용액의 농도를 결정하기 위해 타이터링(titering)을 실시하였다. 상기에서 얻은 각각의 루프형 펩타이드가 발현된 파아지는 *in vivo* 이미징을 통해 생체 내 암 조직을 특이적으로 타겟팅하는 효율을 확인하고자, Cy5.5 형광 프로브를 붙이는 공정을 실시하였다.

[0046] 구체적으로, 1 mL의 bicarbonate 버퍼 (pH 8.3)에서 파아지 농도 10^{12} plaque forming units (pfu) 에 N-hydroxysuccinimide esters of Cy5.5 (Amersham) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 첨가하고, 어두운 환경에서 3 시간동안 상온에서 파아지 표면과 Cy5.5 형광 프로브를 연결하였다. 상기에서 Cy5.5 형광 프로브와 연결된 각각의 루프형 펩타이드가 발현된 파아지를 200 μl 의 20%(w/v) PEG 8000/ 2.5 M NaCl 용액으로 침전하는 방법으로 수득하였다. 최종적으로 얻은 각각의 파아지 샘플에 Cy5.5 형광 브로브가 연결된 비율을 확인하고자, IVIS 스펙트럼 이미징 시스템(Xenogen)을 통해 측정하고 해당 기기의 소프트웨어 프로그램을 사용하여 ROI 값을 결정하여 연결 비율을 비교하였다. 구체적으로, 첨가한 Cy5.5 형광 프로브의 농도 대비하여 연결 완료된 각각의 파아지 샘플을 비교한 결과, 평균 68 %의 연결 비율을 나타냄으로, 이로써 각각의 공정된 파아지 샘플의 형광 연결 비율은 거의 차이가 없이 균일하게 연결됨을 확인하였다.

[0047] <실시예 4> 루프형 펩타이드가 발현된 파아지의 실제 암조직 타겟팅 여부 확인을 위한 *in vivo* 이미징

[0048] 상기 실시예 3에서 얻은 각각의 루프형 펩타이드가 발현된 파아지를 실시 예 1에서 구축한 동일 마우스 모델 중 폐암 유래 xenograft 마우스 모델에 각각 꼬리정맥을 통해 주사한 후, 1일 간격으로 영상을 측정하여 생체 내에서 펩타이드의 순환 경로 및 다른 장기 및 조직 등에서 클리어런스되는 현상을 확인하였고, 이에 따라 암 조직에 완전한 타겟팅이 이루어짐을 확인하였다.

[0049] 상기 실시예 2 에서 바이오패닝 과정을 통해 동정된 총 20개 군의 펩타이드 서열 중 5개 군의 펩타이드 서열이 *in vivo* 상의 이미징에서 우수한 타겟팅 능력을 나타냄을 확인할 수 있었고, 이를 도 3 에 나타내었다(도 3의 G1, G7, G8, G9, G20 참조).

[0050] 또한 각각의 루프형 펩타이드가 발현된 파아지가 암 조직의 어느 부위를 표적하는지를 *ex vivo* 상에서 확인하고자, 암 조직만을 분리 적출하여 온전한 암 조직 자체와 해당 암 조직을 여러 조각으로 단면화하여 영상을 측정한 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0051] 구체적으로 도 3과 도 4 및 도 5 에서 보는 바와 같이, 공정 전의 Cy5.5와 펩타이드가 발현되지 않은 빈 파아지를 대상으로 비교하였을 때, 표 2의 총 20개 군의 펩타이드 서열 중에서 서열번호 1, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 20 의 5개 서열이 우수한 표적능력에 따라 선택되었고, 상기 5개 서열 펩타이드는 암 조직의 바깥쪽을 표적함은 물론, 암조직의 안쪽부분에도 형광이 측정되는 결과에 따라 상기 5개 펩타이드 서열이 특이적으로 정확하게 암 조직을 표적하는 것을 확인 할 수 있었다.

[0052] 이 후, 도 3, 도 4 및 도 5 의 결과를 토대로 보다 정확하게 표적 효율을 비교하기 위하여 적출한 암 조직들을 각각 모으고 타겟팅 된 파아지만을 용출하여 타이터링을 통해 각각의 파아지 농도를 측정하였으며, 각각의 암 조직의 크기 및 무게가 다르기 때문에, 각 암 조직의 무게를 측정하여, 암 조직 무게 대비 확인된 파아지 양을 계산하였다. 또한 각각의 이미징 결과를 보다 정확하게 수치화하기 위하여, *in vivo* 및 *ex vivo* 이미징을 IVIS 스펙트럼(Xenogen)의 프로그램인 ROI (Region Of Interest)를 측정하여 확인한 결과를 이하의 표 3에 나타내었다. 표 3을 참조하면, 상기 5개 펩타이드 서열이 기준이 되는 Cy5.5 와 empty 파아지와 비교하였을 때, 우수한 표적 능력을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0053] [표 3]

	Sequence	pfu/mg	<i>in vivo</i> ROI	<i>ex vivo</i> ROI
Cy5.5	-	-	1.00	1.00
Empty	-	-	0.31	0.89
G1	AKATCPA	54.6	1.43	2.34
G7	TNANHYYF	211.7	2.14	2.36
G8	GWSGLSV	12.7	1.07	2.65
G9	LYANSPF	91.4	1.93	2.77
G20	IKVGKVQ	100.0	1.62	2.52

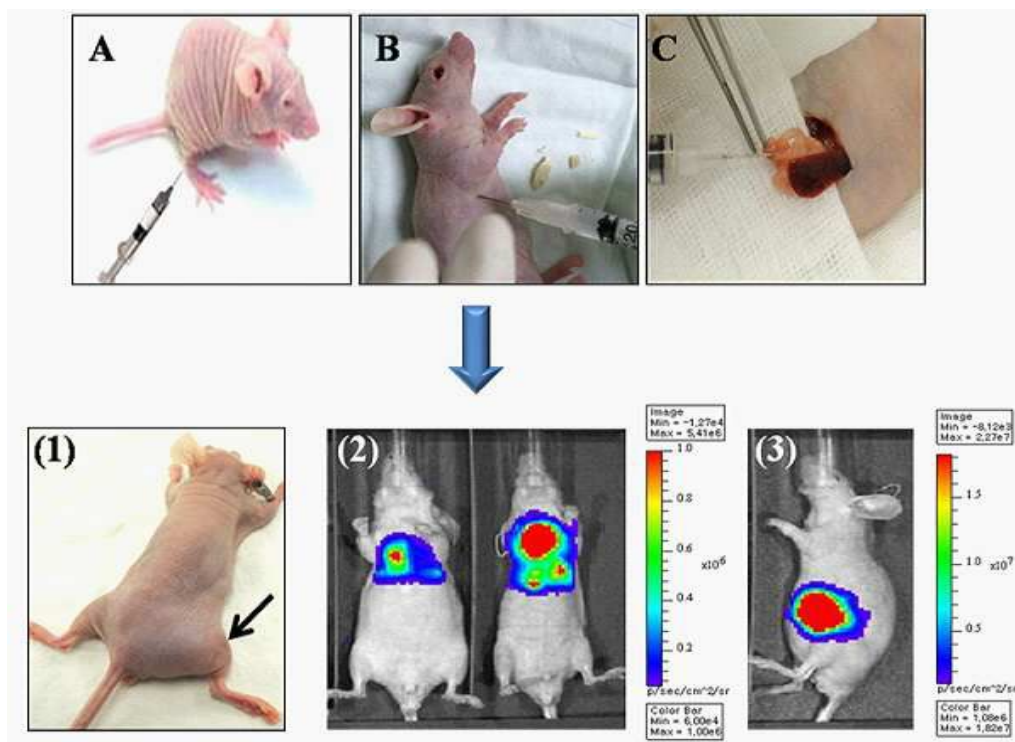
[0054]

[0055] 또한 실시예 1에서 구축한 마우스 모델 중 췌장암 유래 xenograft 모델에서도 상기 내용과 동일 조건으로 과정을 수행하고 관찰한 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 확인되는 바와 같이, 각각의 루프형 펩타이드가 발현된 파아지는 사람 폐암뿐만 아니라 췌장암 조직에서도 표적능력이 우수함을 보였다. 상기 결과는, 상기 펩타이드 서열이 특정 암만 표적하는 것이 아니라, 다양한 암 조직을 타겟팅 할 수 있다는 것을 의미하며, 궁극적으로 형성된 여러 암 조직 및 암화가 진행되는 상황도 본 발명의 펩타이드를 사용한 이미징 시스템을 통해 진단할 수 있음을 시사한다.

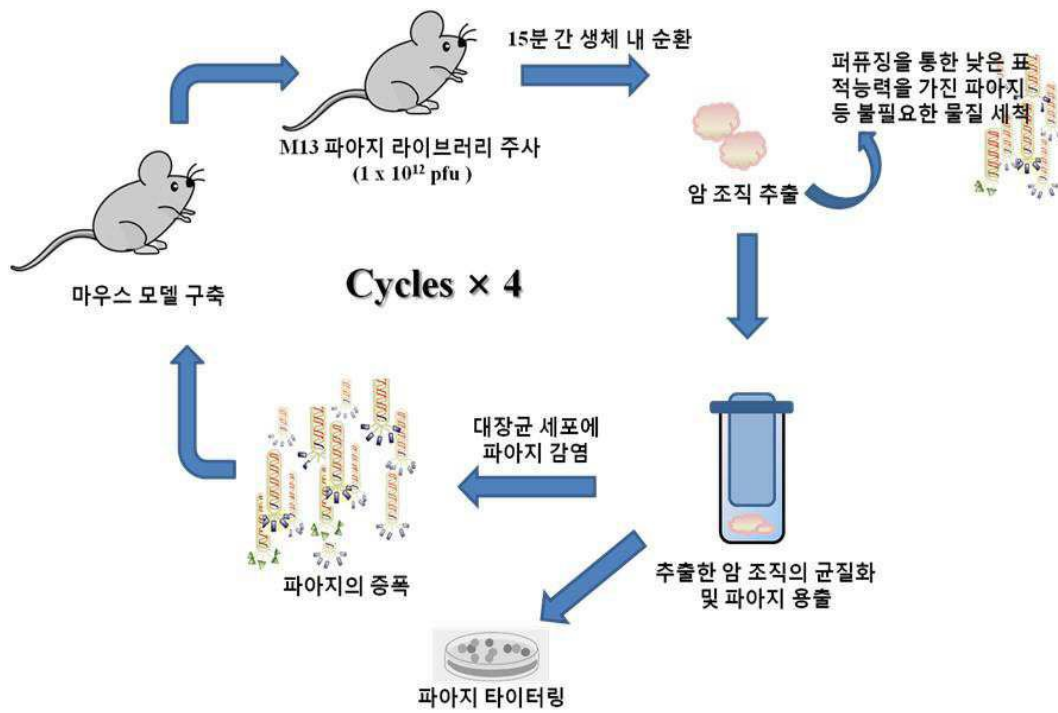
[0056] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

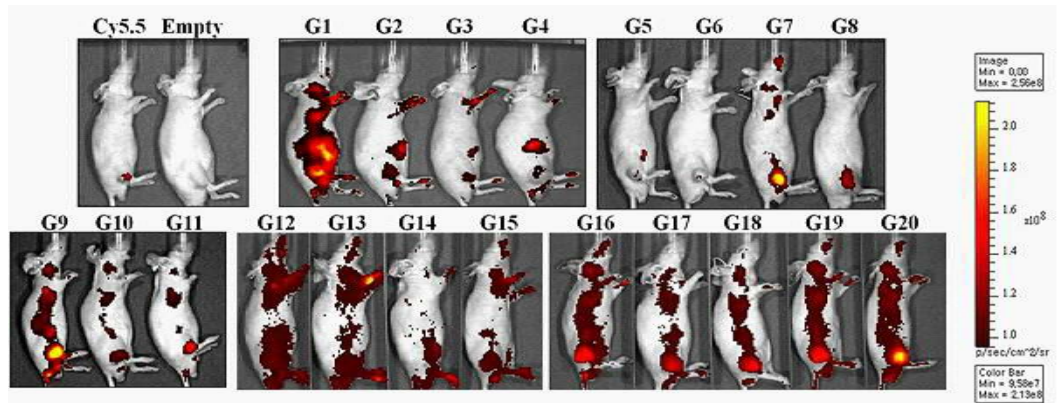
도면1



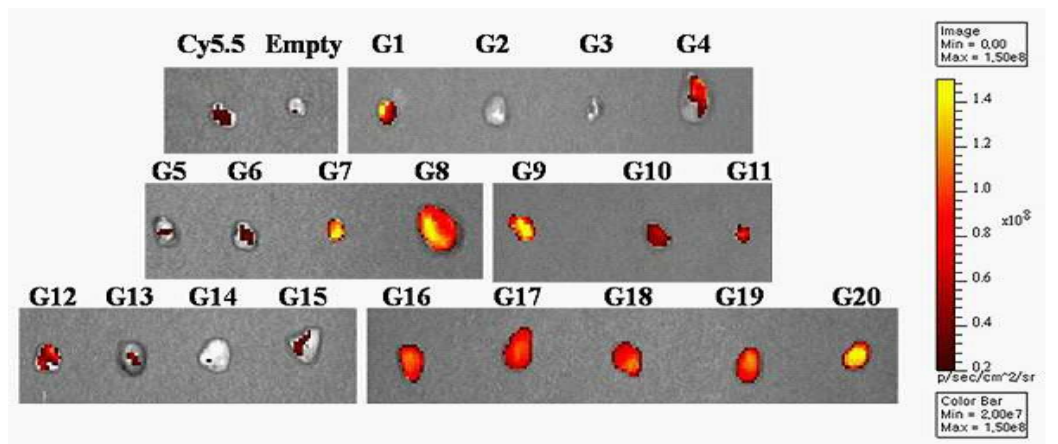
도면2



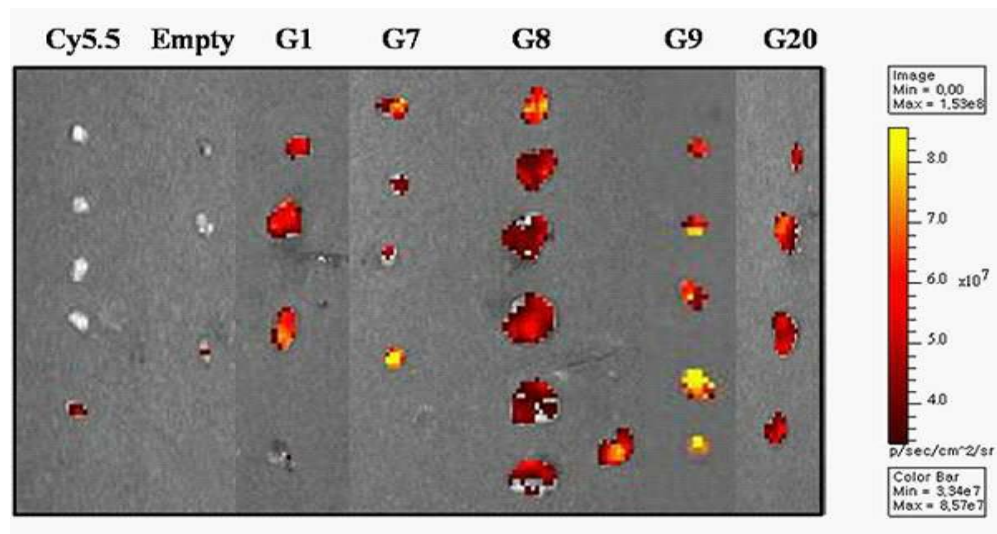
도면3



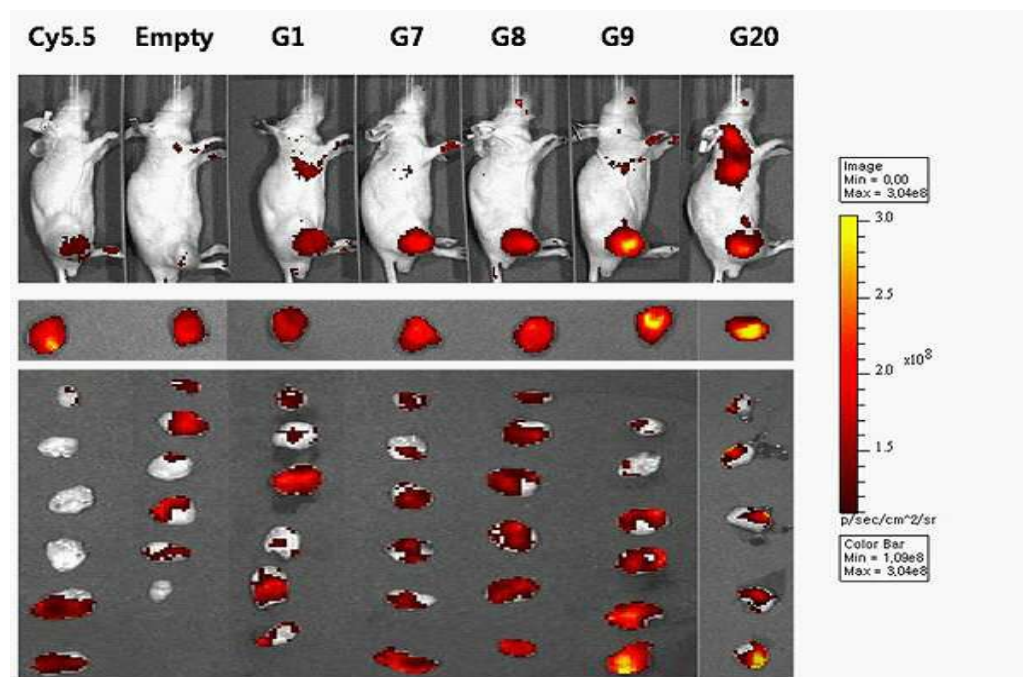
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Targeting Peptide for Cancer and Medical Use Thereof
- <130> ADP-2013-0098
- <160> 20
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide 1 targeting cancer cell
 <400> 1
 Ala Lys Ala Thr Cys Pro Ala
 1 5
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide 2 targeting cancer cell
 <400>
 > 2
 Ser Trp Gln Ile Gly Gly Asn
 1 5
 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide 3 targeting cancer cell
 <400> 3
 Thr Val Arg Thr Ser Ala Asp
 1 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide 4 targeting cancer cell
 <400> 4
 Ile Gly Asn Ser Asn Thr Leu
 1 5
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 5 targeting cancer cell

<400> 5

Ile Lys Val Gly Lys Leu Gln

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 6 targeting cancer cell

<400> 6

Asn Trp Gly Asp Arg Ile Leu

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 7 targeting cancer cell

<400> 7

Thr Asn Ala Asn His Tyr Phe

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 8 targeting cancer cell

<400> 8

Gly Trp Ser Gly Leu Ser Val

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 9 targeting cancer cell

<400> 9

Leu Tyr Ala Asn Ser Pro Phe

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 10 targeting cancer cell

<400> 10

Ser Ile Ser Ser Leu Thr Asp

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 11 targeting cancer cell

<400> 11

Asn Trp Gly Asp Arg Ile Arg

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 12 targeting cancer cell

<400> 12

Asn Trp Gly Asp Arg Ile Glu

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 13 targeting cancer cell

<400> 13

Arg Ser Ala Asn Ile Phe Thr

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 14 targeting cancer cell

<400> 14

Phe Asn Met Phe Ser Arg Phe

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 15 targeting cancer cell

<400> 15

Ile Ser Ala Trp Pro Thr Arg

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> peptide 16 targeting cancer cell

<400> 16

Ser Ile Ser Ser Leu Thr His

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 17 targeting cancer cell

<400> 17

Phe Leu Asn Pro Thr Thr Thr

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 18 targeting cancer cell

<400> 18

Lys Asn Leu Thr Arg Leu Ala

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 19 targeting cancer cell

<400> 19

Met Ala Arg Tyr Met Ser Ala

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 20 targeting cancer cell

<400> 20

Ile Lys Val Gly Lys Val Gln

1 5