



등록특허 10-2427844



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월29일
(11) 등록번호 10-2427844
(24) 등록일자 2022년07월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
A61K 47/66 (2017.01) *A61P 15/02* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A01K 67/027 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7004917
- (22) 출원일자(국제) 2018년08월23일
심사청구일자 2020년02월20일
- (85) 번역문제출일자 2020년02월20일
- (65) 공개번호 10-2020-0031670
- (43) 공개일자 2020년03월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2018/031136
- (87) 국제공개번호 WO 2019/039540
국제공개일자 2019년02월28일

(30) 우선권주장

JP-P-2017-161556 2017년08월24일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현

WO2011079304 A1*

WO2014201118 A2*

WO2011027312 A1

WO2007076501 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 5 항

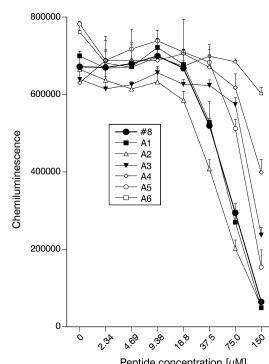
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 세포 살상제

(57) 요약

본 발명은 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웹타이드, 및 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위를 가지는, 세포 살상제, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웹타이드가 모두 L-아미노산으로 이루어지는 웹타이드, 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3

가 D-아미노산으로 이루어지고, 15~19번째 아미노산까지가 L-아미노산으로 이루어지는 펩타이드, 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지가 L-아미노산으로 이루어지고, 15~19번째 아미노산까지가 D-아미노산으로 이루어지는 펩타이드, 또는 모두 D-아미노산으로 이루어지는 펩타이드인, 상기 기재의 세포 살상제이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/66 (2017.08)

A61P 15/02 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2800/364 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

오노데라, 유이치로

일본 431-3192 시즈오카 하마마츠시 히가시쿠 한다
야마 1-20-1 고쿠리츠다이가쿠호진 하마마츠이카다
이가쿠 나이

시바타, 토시아키

일본 431-3192 시즈오카 하마마츠시 히가시쿠 한다
야마 1-20-1 고쿠리츠다이가쿠호진 하마마츠이카다
이가쿠 나이

후쿠다, 미치코

일본 305-8560 이바라키 츠쿠바시 우메조노 1-1-1
츠쿠바 센트럴 1 고쿠리츠켄큐카이하츠호진 상교기
쥬츠 소고켄큐쇼 나이

노나카, 모토히로

일본 305-8560 이바라키 츠쿠바시 우메조노 1-1-1
츠쿠바 센트럴 1 고쿠리츠켄큐카이하츠호진 상교기
쥬츠 소고켄큐쇼 나이

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드, 및 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가, 직접적 또는 아미노산 서열 RR로 이루어진 링커를 통하여 간접적으로 연결되어 있는(단, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드의 C말단에 알라닌이 연결되어 있는 경우를 제외함), 세포 살상제로 사용하기 위한 펩타이드로서,

여기서, 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 서열 번호 3 또는 서열 번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드이고,

상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 서열 번호 3으로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드인 경우에는, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드의 하류에 직접적으로 연결되고,

상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 서열 번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드인 경우에는, 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위의 하류에, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드가 상기 아미노산 서열 RR로 이루어지는 링커를 통하여 간접적으로 연결되어 있는 것인, 세포 살상제로 사용하기 위한 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 표적 분자가 세포 또는 조직 표면에 존재하는 분자인, 세포 살상제로 사용하기 위한 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드가,

모두 L-아미노산으로 이루어지는 펩타이드,

상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지가 D-아미노산으로 이루어지고, 15~19번째 아미노산까지가 L-아미노산으로 이루어지는 펩타이드,

상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지가 L-아미노산으로 이루어지고, 15~19번째 아미노산까지가 D-아미노산으로 이루어지는 펩타이드, 또는

모두 D-아미노산으로 이루어지는 펩타이드인, 세포 살상제로 사용하기 위한 펩타이드.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 표적 분자가 CNGB3 또는 아넥신 I인, 세포 살상제로 사용하기 위한 펩타이드.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 내지 제3항 및 제5항 중 어느 한 항에 기재된 세포 살상제로 사용하기 위한 웹타이드를 유효 성분으로서 포함하는, 세포의 이상 증식에 기인하는 질환의 치료제로서 사용하기 위한 조성물로서,

상기 질환이, 자궁 내막증, 자궁 내막선암, 자궁 내막암, 자궁체암 및 난소암에서 선택되는 어느 하나인, 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 표적 세포에 대하여 선택적으로 아포토시스를 유도할 수 있는 웹타이드 약제에 관한 것이다.

[0002] 본원은, 2017년 8월 24일에 일본에 출원된 특원2017-161556호에 근거하여 우선권을 주장하고, 그 내용을 여기에 원용한다.

배경 기술

[0003] 아포토시스는 다세포 생물의 세포사 중 증식 제어 기구로서 관리·조절된 세포사이다. 다세포 생물에서는, 발생이나 재생 과정에서 생긴 불필요한 세포나 유해한 세포의 배제를, 이를 세포에 아포토시스를 유도함으로써 행하고 있다. 또한, 아포토시스를 질환의 원인이 되는 세포로 유도시켜 배제함으로써 병태의 개선을 기대할 수 있다. 이로부터, 아포토시스를 유도하는 활성을 가지는 물질을 의약 용도로 이용하는 경우도 있다. 예를 들면,

암 세포에 대해서 아포토시스를 유도시킴으로써 암을 관해 또는 치유하는 것을 기대할 수 있다.

[0004] 아포토시스 유도를 질환의 치료에 이용하는 경우에는 아포토시스를 유도하는 표적 세포에 대한 선택성이 매우 중요하다. 표적 선택성이 낮고, 표적 세포 이외의 세포에 대해서 아포토시스를 유도하는 경우에는, 부작용이, 기대되는 치료 효과를 상회하여 안전성 면에서 치료약으로서는 부적합하다. 표적 세포에 대해서만 특이적으로 아포토시스를 유도할 수 있으면, 부작용이 충분히 억제된 효과적인 치료약이 될 수 있다.

[0005] 자궁 내막증은 자궁 내막 세포가 자궁 내강 이외의 부위에서 증식하는 질환이다. 대부분의 케이스에서 골반의 복막이나 난소 내에서 자궁 내막 세포가 증식한다. 대표적인 증상은 월경통(월경 곤란증)이나 불임증이며, 심한 경우에는 격렬한 통증이 일어나 실신하는 경우도 있다. 또한, 자궁 내막증을 발생 모체로 하여 암이 발병하는 경우도 있다. 자궁 내막 세포는 여성호르몬(에스트로겐)의 자극을 받아 증식 한다. 이 때문에, 자궁 내막증의 치료약으로서는 에스트로겐의 분비를 억제하는 것 같은 호르몬제, 예를 들면, 저용량 필, 프로게스테론 수용체에 대한 선택적인 아고니스트(난소 기능 및 자궁 내막 세포 증식에 대한 억제제), GnRH 아고니스트(난포 자극 호르몬의 분비 억제제)가 사용되고 있다. 단, 근치 요법은 자궁과 난소를 적출하는 수술 밖에 없으며, 자궁 내막증의 근치를 기대할 수 있는 치료약의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 예를 들면, 특허문현 1에는 CNGB3(cyclic nucleotide-gated channel beta 3)에 특이적으로 결합하는 Z13 웨타이드와 엔도좀 탈출 웨타이드의 융합 웨타이드 및 Z13 웨타이드와 아포토시스 유도 웨타이드의 융합 웨타이드를 포함하는 웨타이드 조성물이 개시되어 있다. CNGB3는 자궁 내막증 세포(자궁 내막 이외에 존재하는 자궁 내막 세포)의 세포 표면에 특이적으로 높게 발현되어 있고, 복막 표면에는 발현되어 있지 않은 분자이다. 두 웨타이드를 Z13 웨타이드 부분에 의해 자궁 내막증 세포에 모두 넣음으로써, 자궁 내막증 세포에 대하여 선택적으로 아포토시스를 유도시킬 수 있다. 실제로, 자궁 내막증이 발병된 비비 원숭이에게 Z13 웨타이드와 엔도좀 탈출 웨타이드의 융합 웨타이드 및 Z13 웨타이드와 아포토시스 유도 웨타이드의 융합 웨타이드를 포함하는 웨타이드 조성물을 복강경을 통하여 복막에 투여한 결과, 자궁 내막증의 병변의 세포만 선택적으로 아포토시스가 유도되고, 인접하는 그 외의 세포에서는 아포토시스는 유도되지 않았다(비특허문현 1 참조).

선행기술문현

특허문현

[0007] (특허문현 0001) 미국 특허 출원 공개 제2016/145308호 명세서

비특허문현

[0008] (비특허문현 0001) Sugihara, et al., NATURE COMMUNICATIONS, 2014년, 제5권, 기사 번호 4478.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 표적 세포에 대해서 선택적으로 아포토시스를 유도할 수 있는 웨타이드 양체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위한 예의 연구 결과, Z13 웨타이드와 엔도좀 탈출 웨타이드의 융합 웨타이드 및 Z13 웨타이드와 아포토시스 유도 웨타이드의 융합 웨타이드를 포함하는 웨타이드 조성물보다, 특정 웨타이드 서열로 이루어지는 엔도좀 탈출 웨타이드, 특정 웨타이드 서열로 이루어지는 아포토시스 유도 웨타이드 및 Z13 웨타이드의 융합 웨타이드가, 보다 높은 선택성으로 효율적으로 CNGB3가 발현되어 있는 자궁 내막 세포에 대하여 아포토시스를 유도할 수 있음을 발견하였다. 또한, CNGB3이 자궁 내막 및 망막뿐만 아니라, 다수의 암 세포에서도 발현되어 있는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 즉, 본 발명은 이하의 세포 실상제 및 자궁 내막증 모델 동물 등을 제공하는 것이다.

- [0012] [1] 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드, 및 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위를 가지는, 세포 살상제.
- [0013] [2] 상기 표적 분자가 세포 또는 조직 표면에 존재하는 문자인, 상기 [1]의 세포 살상제.
- [0014] [3] 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드가,
- [0015] 모두 L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드,
- [0016] 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지가 D-아미노산으로 이루어지고, 15~19번째 아미노산까지가 L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드,
- [0017] 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지가 L-아미노산으로 이루어지고, 15~19번째 아미노산까지가 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드, 또는
- [0018] 모두 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드인, 상기 [1] 또는 [2]의 세포 살상제.
- [0019] [4] 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 웨타이드 또는 단백질이며, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드와 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 직접적 또는 간접적 으로 연결되어 있는 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드의 C말단에 알라닌이 연결되어 있는 경우를 제외함), [1] 내지 [3] 중 어느 하나의 세포 살상제. (바람직하게는, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드의 C말단에 알라닌이 연결되어 있는 경우를 제외함.)
- [0020] [5] 상기 표적 분자가 CNGB3 또는 아넥신 I인, [1] 내지 [4] 중 어느 하나의 세포 살상제.
- [0021] [6] 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 서열 번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드이며,
- [0022] 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드의 하류에, 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 직접적 또는 간접적으로 연결되어 있는, 상기 [1]의 세포 살상제.
- [0023] [7] 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 서열 번호 3으로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드이며,
- [0024] 상기 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위의 하류에, 상기 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드가 직접적 또는 간접적으로 연결되어 있는, 상기 [1]의 세포 살상제.
- [0025] [8] 세포의 이상 증식에 기인하는 질환의 치료제인, 상기 [1] 내지 [7] 중 어느 하나의 세포 살상제.
- [0026] [9] 상기 질환이 자궁 내막증 또는 암인, 상기 [8]의 세포 살상제.
- [0027] [10] CNGB3를 코딩하는 유전자를 도입한 CNGB3 과잉 발현 세포가 복강 내에 이식되어 있는, 자궁 내막증 모델 동물.
- [0028] [11] 발증의 원인이 되는 세포가 CNGB3를 발현하고 있는 질환의 발증 가능성을 평가하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,
- [0029] 피검 동물로부터 채취된 액소좀 중의 CNGB3를 측정하고,
- [0030] 얻어진 측정값을 미리 설정된 기준값과 비교하여 상기 피검 동물에 상기 질환이 발병되어 있을 가능성을 평가하는, 질환 발증 가능성의 평가를 위한 정보를 제공하는 방법(이하 평가 방법).
- [0031] [12] 상기 측정값이 상기 기준값 초과인 경우, 상기 피검 동물에 상기 질환이 발병되어 있을 가능성이 높다고 평가하는, 상기 [11]의 질환 발증 가능성의 평가 방법.
- [0032] [13] 상기 액소좀이 상기 피검 동물로부터 채취된 혈액으로부터 분리된 것인, 상기 [11] 또는 [12]의 질환 발증 가능성의 평가 방법.
- [0033] [14] CNGB3의 측정을 서열 번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드를 이용하여 행하는, 상기 [11] 내지 [13] 중 어느 하나의 질환 발증 가능성의 평가 방법.
- [0034] [15] 상기 피검 동물이 사람인, 상기 [11] 내지 [14] 중 어느 하나의 질환 발증 가능성의 평가 방법.
- [0035] [16] 상기 질환이 자궁 내막증 또는 암인, 상기 [11] 내지 [15] 중 어느 하나의 질환 발증 가능성의 평가 방법.

[0036] [17] 엑소좀 중의 CNGB3의 양으로 이루어지고,

[0037] 자궁 내막증 또는 암의 발증 유무를 평가하기 위해서 이용되는, 바이오 마커.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따른 세포 살상제는 매우 효율적으로 표적 세포에 대해서 아포토시스를 유도할 수 있다. 이 때문에, 상기 세포 살상제는, 특히 자궁 내막증이나 암 등의 세포의 이상 증식에 기인하는 질환의 치료제로서 유효하다.

[0039] 또한, 본 발명에 따른 자궁 내막증 모델 동물은 자궁 내막증의 치료제 후보 물질에 대한 약효 시험 등에 유용하다.

[0040] 또한, 본 발명에 따른 질환 발증의 평가 방법 및 바이오 마커에 의해, 자궁 내막증이나 암 등의 CNGB3가 특이적으로 발현되고 있는 질환의 발증 가능성을 간편하고 효율적으로 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 참고예 1에서, 각 펫타이드로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 실시예 1에서, 각 펫타이드로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 실시예 2에서, 펫타이드 8과 펫타이드 A1~A6의 각 펫타이드로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 실시예 2에서, 펫타이드 8과 펫타이드 B1~B7의 각 펫타이드로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 실시예 3에서, 각 펫타이드로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 실시예 4에서, 펫타이드 A2로 처리한 A431-CNGB3-myc 세포의 생존 세포수의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 실시예 4에서, 펫타이드 A2로 처리한 A431-CNGB3-myc 세포에 대하여 Apop-Tag assay와 핵염색을 행한 염색상이다.

도 8은 실시예 5에서, 펫타이드 A2를 복강 내에 단회 투여한 자궁 내막증 모델 마우스의 복막의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 실시예 5에서, 펫타이드 A2를 복강 내에 여러 차례 투여한 자궁 내막증 모델 마우스의 복막의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 실시예 6에서, 각 펫타이드로 처리한 A431-CNGB3-myc 세포의 상태 ATP 양(%)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 실시예 6에서, 각 펫타이드로 처리한 SNG-II 세포의 상태 ATP 양(%)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 실시예 6에서, 각 펫타이드로 처리한 Hec-1A 세포의 상태 ATP 양(%)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 실시예 6에서, 각 펫타이드로 처리한 RL95-2 세포의 상태 ATP 양(%)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 15는 실시예 8에서, IF7(RR)-(K+H) 펫타이드를 투여한 담암 마우스의 photon 수의 증대율(%)을 경시적으로 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 16은 실시예 8에서, IF7(RR)-(K+H) 펫타이드를 투여한 담암 마우스의 종양 체적의 증대율(%)을 경시적으로 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] <세포 살상제>

- [0043] 본 발명에 따른 세포 살상체는 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열(KLAALKLAKLAKHLAHL)로 이루어지는 웨타이드(이하, 「이펙터 웨타이드」라고 할 수 있다.), 및 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위를 갖는다. 이펙터 웨타이드는 아포토시스 유도 활성을 가지는 웨타이드와 엔도좀 탈출 활성을 가지는 웨타이드가 텐덤으로 연결된 웨타이드이다. 본 발명에 따른 세포 살상체는 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위를 통하여 표적 분자와 결합하고, 엔드사이토시스에 의해 표적 세포 내로 들어간다. 이어서, 표적 세포 내에 들어간 엔도좀에 내포된 세포 살상체는 엔도좀 탈출 활성을 가지는 웨타이드 부위의 작용에 의해 엔도좀막이 파괴되는 결과, 표적 세포의 세포질로 방출된다. 세포질로 방출된 세포 살상체는 아포토시스 유도 활성을 가지는 웨타이드 부위의 작용에 의해 미토콘드리아막을 장애하여 상기 표적 세포의 아포토시스를 유도한다.
- [0044] 본 발명에 따른 세포 살상체는, 1분자중에 아포토시스 유도 활성을 가지는 웨타이드 부분, 엔도좀 탈출 활성을 가지는 웨타이드 부분, 및 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위 모두를 포함한다. 이 때문에, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 웨타이드 및 아포토시스 유도 활성을 가지는 웨타이드를 연결시킨 웨타이드와, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 웨타이드 및 엔도좀 탈출 활성을 가지는 웨타이드를 연결시킨 웨타이드를 각각 독립적으로 포함하는 웨타이드 조성물과 비교하여, 매우 효율적으로 표적 세포에 아포토시스를 유도할 수 있다.
- [0045] 한편, 본 발명 및 본원 명세서에서, 「표적 세포」는 아포토시스를 유도하고자 하는 대상의 세포이다. 「표적 분자」는 아포토시스를 유도하고자 하는 대상의 세포의 표면 또는 상기 세포가 존재하는 조직 표면에 존재하는 분자이며, 본 발명에 따른 세포 살상체가 선택적으로 결합하는 분자이다.
- [0046] 특허문헌 1에 개시되어 있는 바와 같이, KLA의 4 아미노산의 반복으로 이루어지는 아미노산 서열(이하, 「KLAK 서열」이라고 할 수 있다.)로 이루어지는 웨타이드(이하, 「KLAK 웨타이드」라고 할 수 있다.)는 미토콘드리아막을 장애하여 아포토시스를 유도하는 작용(아포토시스 유도 활성)을 갖는다. 또한, HLAH의 4 아미노산의 반복으로 이루어지는 아미노산 서열(이하, 「HLAH 서열」이라고 할 수 있다.)로 이루어지는 웨타이드(이하, 「HLAH 웨타이드」라고 할 수 있다.)는 엔도좀의 막을 파괴하는 작용(엔도좀 탈출 활성)을 갖는다. KLAK 웨타이드와 HLAH 웨타이드를 연결한 웨타이드는 엔도좀 탈출 활성과 아포토시스 유도 활성을 갖는다. 그러나, 그 활성의 강도는 각각의 웨타이드의 아미노산의 길이 및 연결 순서에 영향을 받는다. KLAK 웨타이드의 하류(C말단)에 HLAH 웨타이드를 연결한 웨타이드 및 HLAH 웨타이드의 하류(C말단)에 KLAK 웨타이드를 연결한 웨타이드는 모두 엔도좀 탈출 활성과 아포토시스 유도 활성을 가지지만, KLAK 웨타이드의 하류(C말단)에 HLAH 웨타이드를 연결한 웨타이드가 아포토시스 유도 활성이 높다.
- [0047] 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 이펙터 웨타이드는, 14 아미노산으로 이루어지는 KLAK 서열의 하류에, 5 아미노산으로 이루어지는 HLAH 서열이 연결된 웨타이드이다. 즉, 서열 번호 1의 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산까지가 아포토시스 유도 활성을 가지는 부위이며, 15~19번째 아미노산까지가 엔도좀 탈출 활성을 가지는 부위이다. 이 이펙터 웨타이드는, 표적 세포에 엔드사이토시스로 들어간 경우에 가장 높은 아포토시스 유도 활성이 얻어지도록, KLAK 서열의 길이, HLAH 서열의 길이, 및 KLAK 서열과 HLAH 서열의 연결 순서가 최적화된 웨타이드이다. 이 이펙터 웨타이드를 가지고 있기 때문에, 본 발명에 따른 세포 살상체는 매우 높은 아포토시스 유도 활성을 갖는다.
- [0048] 본 발명에 따른 세포 살상체가 가지는 이펙터 웨타이드는, 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드이면 특별히 한정되지 않으며, L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드일 수 있고, D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드일 수 있으며, L-아미노산과 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드일 수도 있다. 엔도좀 내에서의 안정성이 높고, 보다 높은 아포토시스 유도 활성이 얻어지는 점에서, 이펙터 웨타이드는 적어도 일부에 D-아미노산을 포함하는 웨타이드인 것이 바람직하고, KLAK 서열(서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 1~14번째 아미노산)과 HLAH 서열의(서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열 중 15~19번째 아미노산)의 적어도 하나가 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드인 것이 보다 바람직하고, 모두 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드인 것이 특히 바람직하다.
- [0049] 본 발명에 따른 세포 살상체에서, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위와 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 이펙터 웨타이드는, 직접 결합하고 있을 수 있으며, 링커를 통하여 간접적으로 결합하고 있을 수도 있다. 상기 링커로서는 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 1~20개의 아미노산 정도의 웨타이드, 당쇄, 폴리에틸렌글리콜, 폴리올레핀 등을 들 수 있다. 합성이 비교적 용이한 점에서, 본 발명에 따른 세포 살상체로서는, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위가 웨타이드 또는 단백질이며, 이펙터 웨타이드와 직접 또는 1~20개의 아미노산 정도의 웨타이드를 통하여 결합하고 있는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 세포 살상체에서, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위는, 표적 분자와의 결합성이 저해되지 않는 한, 서열 번호 1

로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 이펙터 펩타이드의 N말단 측에 연결되어 있을 수 있고, C말단 측에 연결되고 있을 수도 있다.

[0050] 본 발명에 따른 세포 살상제의 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위는 특별히 한정되지 않으며, 표적 분자에 맞추어 결정된다. 상기 부위는, 펩타이드나 단백질일 수 있고, 울리고 뉴클레오티드나 핵산일 수 있으며, 당쇄일 수 있고, 지방질일 수 있으며, 서분자 화합물일 수도 있다.

[0051] 한편, 본 발명에 따른 세포 살상제가 선택적으로 결합하는 표적 분자로서는, 아포토시스를 유도하는 표적 세포 또는 조직의 표면에 존재하고 있는 분자이면 특별히 한정되지 않으며, 단백질일 수 있고 당쇄일 수 있으며, 지방질일 수도 있다.

[0052] 본 발명에 따른 세포 살상제의 선택성이 높아지고, 각종 질환의 치료제로서 사용한 경우 부작용을 저감시킬 수 있다. 이로부터, 본 발명에 따른 세포 살상제가 선택적으로 결합하는 표적 분자로서는, 표적 세포의 표면 또는 상기 표적 세포를 포함하는 조직 표면에서의 발현량이, 그 외의 많은 세포 및 조직에서의 발현량과 비교하여 현저하게 많은 분자인 것이 바람직하고, 표적 세포의 표면 또는 상기 표적 세포를 포함하는 조직의 표면에 특이적으로 발현하고 있는 분자가 보다 바람직하다.

[0053] 예를 들면, CNGB3는 정상 조직에서는 자궁 내막과 망막에서만 높게 발현하는 막 단백질이다. 정상 조직에서의 CNGB3의 국재(局在)는 매우 치우쳐 있으며, 송파체에서 중간 정도의 발현이, 골수, 맥락총, 수란관, 눈, 난소 및 정소에서 약한 발현이 확인되고 있을 뿐이다. 이 때문에, 본 발명에 따른 세포 살상제 중 표적 분자를 CNGB3로 한 것은, 자궁 내막이나 망막의 세포에 대해서 특이적으로 아포토시스를 유도할 수 있는 세포 살상제이며, 자궁 내막이나 망막의 질환에 대한 치료약으로서 유용하다. 특히, 복강이나 골반에서의 정상 세포에는 아포토시스를 유도하지 않고, 자궁 내막증 세포에 대해서 선택적으로 아포토시스를 유도할 수 있기 때문에, 자궁 내막증의 치료약으로서 매우 바람직하다.

[0054] 또한, CNGB3는 여러가지 암 세포에서도 비교적 강하게 발현되어 있다. 이 때문에, 본 발명에 따른 세포 살상제 중 표적 분자를 CNGB3로 한 것은, CNGB3가 발현되어 있는 암 세포에 대한 선택성이 높고, 부작용이 억제된 항암제로서 유용하다. CNGB3가 발현되어 있는 암으로서는, 예를 들면, 자궁암, 자궁경암, 골반강암, 난소암, 유방암, 복벽 종양, 대량막 종양, 식도암, 위암, 소장암, 결장암, 직장암, 맹장암, 담낭암, 흐장암, 간암, 비장암, 신장암, 설암, 인두암, 비암, 이하선암, 갑상선암, 악성 임파종, 골종양, 피부암, 폐암, 종격암, 정소암, 전립선암, 방광암, 뇌종양 등을 들 수 있다. 동종의 조직에 유래하는 암 세포라도 CNGB3가 발현되어 있는 암 세포와 발현되어 있지 않은 암 세포가 있다. 이 때문에, 본 발명에 따른 세포 살상제 중 표적 분자를 CNGB3로 한 것을 항암제로서 사용하는 경우에는, 미리 생검 등에 의해, 표적으로 하는 암 세포가 CNGB3를 발현하고 있는 세포임을 확인하는 것이 바람직하다.

[0055] CNGB3를 표적 분자로 하는 경우, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위로서는, 예를 들면, 서열 번호 2(VRAXNXPG ; X는 임의의 천연으로 존재하는 아미노산을 나타낸다.)로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드, 및 서열 번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열의 일부를 개변한 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드(이하, 이러한 펩타이드를 「CNGB3 결합성 펩타이드」라고 할 수 있다.)를 들 수 있다(특허문현 1). 서열 번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열의 일부를 개변한 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드로서는, 서열 번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개의 아미노산이 결실(deletion), 치환 혹은 부가되어 있으며, CNGB3에 대한 결합능을 유지하고 있는 펩타이드 ; 서열 번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열과 적어도 75% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 동일성을 가지고 있으며, CNGB3에 대한 결합능을 유지하고 있는 펩타이드 ; 를 들 수 있다. CNGB3 결합성 펩타이드로서는, 구체적으로는, 서열 번호 3(VRRADNRPG)으로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드(이하, 「Z13 펩타이드」라고 할 수 있다.), 서열 번호 4(VRRAENRPG)로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드, 서열 번호 5(VRRANNLPG)로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드, 서열 번호 6(VRRANNRPG)으로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 들 수 있다.

[0056] CNGB3를 발현하고 있는 세포에 대하여 보다 강한 아포토시스 유도 활성을 가지기 위해, 표적 분자를 CNGB3로 한 세포 살상제로서는, Z13 펩타이드와 상기 이펙터 펩타이드가 직접 또는 링커를 통하여 간접적으로 연결된 것이 바람직하고, Z13 펩타이드와 상기 이펙터 펩타이드가 직접 또는 1~20개의 아미노산으로 이루어지는 펩타이드를 통하여 연결된 펩타이드인 것이 보다 바람직하고, 상기 이펙터 펩타이드의 C말단에 Z13 펩타이드가 직접 또는 1~20개의 아미노산으로 이루어지는 펩타이드를 통하여 연결된 펩타이드인 것이 더 바람직하고, 상기 이펙터 펩타이드의 C말단이 Z13 펩타이드의 N말단과 직접 연결된 펩타이드(서열 번호 26 :

KLAKLAKKLAKLAKHLAHLVRRADNRPG)인 것이 더 바람직하고, 모두 D-아미노산으로 이루어지는 상기 이펙터 웨타이드의 C말단이 모두 L-아미노산으로 이루어지는 Z13 웨타이드의 N말단과 직접 연결된 웨타이드인 것이 특히 바람직하다.

[0057] 또한, 아넥신 I는, 정상 혈관 내피 세포에서는 세포질로 발현되지만, 악성 종양 조직에서는 신생 혈관(종양 신생 혈관)의 혈관 내피 세포의 혈류측에 특이적으로 발현되는 막 단백질이다. 생체 내에 투여된 아넥신 I와 선택적으로 결합하는 분자는, 악성 종양 조직에서는 종양 신생 혈관의 혈류측에 발현되어 있는 아넥신 I와의 결합을 통하여 종양 신생 혈관의 혈관 내피 세포에 들어간다. 혈관 내피 세포에 들어간 분자는 소포 수송에 의해 apical측으로부터 basal측으로 운반되어 간질로 배출된다. 배출된 분자는 간질 안에 확산되어 종양 세포 내로 들어갈 수 있다. 이 때문에, 본 발명에 따른 세포 살상제 중 표적 분자를 아넥신 I로 한 것은, 암 세포에 대하여 아포토시스를 유도할 수 있는 세포 살상제이며 항암제로서 유용하다. 표적 분자를 아넥신 I로 한 세포 살상제는, 종양 신생 혈관의 혈관 내피 세포에 특이적으로 들어가고, 혈관 내피 세포 내에서의 소포 수송 과정에서, 혹은 들어간 종양 세포 내에서의 소포 수송의 과정에서, HLAH 웨타이드 부분의 기능에 의해 엔도좀의 막을 과파하여 세포질로 방출된다. 그 후 KLAK 웨타이드 웨타이드 부분의 기능에 의해, 상기 세포 살상제를 받아들인 세포는 살상된다. 표적 분자를 아넥신 I로 한 세포 살상제를 항암제로서 사용하는 경우, 치료 대상으로 하는 암종은 특별히 한정되지 않으며, 상기 서술한 바와 같은 암에 대하여 사용할 수 있다.

[0058] 아넥신 I를 표적 분자로 하는 경우, 표적 분자와 선택적으로 결합하는 부위로서는, 예를 들면, 서열 번호 7(IFLLWQR)으로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드(이하, 「IF7 웨타이드」라고 할 수 있다.) 및 서열 번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열의 일부를 개변한 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드(이하, 이러한 웨타이드를 「아넥신 I결합성 웨타이드」라고 할 수 있다.)를 들 수 있다. 서열 번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열의 일부를 개변한 아미노산 서열로 이루어지는 웨타이드로서는, 서열 번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열의 1개, 2개 또는 3개의 아미노산이 결실, 치환 혹은 부가되어 있으며, 아넥신 I에 대한 결합능을 유지하고 있는 웨타이드나, 서열 번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열과 적어도 70%이상, 바람직하게는 85% 이상의 서열 동일성을 가지고 있고, 아넥신 I에 대한 결합능을 유지하고 있는 웨타이드를 들 수 있다.

[0059] 암 세포에 대하여 보다 강한 아포토시스 유도 활성을 가지기 위해, 표적 분자를 아넥신 I로 한 세포 살상제로서는, IF7 웨타이드와 상기 이펙터 웨타이드가 직접 또는 링커를 통하여 간접적으로 연결된 것이 바람직하고, IF7 웨타이드와 상기 이펙터 웨타이드가 직접 또는 1~20개의 아미노산으로 이루어지는 웨타이드를 통하여 연결된 웨타이드인 것이 보다 바람직하고, IF7 웨타이드의 C말단에 상기 이펙터 웨타이드가 직접 또는 1~20개의 아미노산으로 이루어지는 웨타이드를 통하여 연결된 웨타이드인 것이 더 바람직하고, IF7 웨타이드의 C말단에 상기 이펙터 웨타이드가 1~5개의 아미노산으로 이루어지는 웨타이드를 통하여 연결된 웨타이드인 것이 더 바람직하며, 모두 L-아미노산으로 이루어지는 IF7 웨타이드의 C말단이 모두 D-아미노산으로 이루어지는 상기 이펙터 웨타이드의 N말단과 1~5개의 L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드를 통하여 연결된 웨타이드인 것이 특히 바람직하다. IF7 웨타이드의 C말단이 상기 이펙터 웨타이드의 N말단과 1~5개의 아미노산으로 이루어지는 웨타이드를 통하여 연결된 웨타이드로서는, 예를 들면, 서열 번호 40으로 나타내어지는 아미노산 서열(IFLLWQRRRKLAKLAKKLAKHLAHL)로 이루어지는 웨타이드를 들 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 세포 살상제를 의약으로서 사용하는 경우, 투여 경로는 특별히 한정되지 않으며, 표적 세포 및 그것을 포함하는 조직에 따라 적절하게 결정된다. 예를 들면, 본 발명에 따른 세포 살상제의 투여 경로로서는, 경구 투여, 경정맥 투여, 복강 내 투여, 관장 투여 등을 들 수 있다.

[0061] 본 발명에 따른 세포 살상제는, 통상의 방법에 따라, 산제, 과립제, 카بس제, 정제, 츄어블제, 서방제 등의 경구 용 고형제, 용액제, 시럽제 등의 경구용 물약, 주사제, 관장제, 스프레이제, 첨부제, 연고제 등으로 제제화할 수 있다.

[0062] 본 발명에 따른 세포 살상제는, 제제 상의 필요에 따라, 부형제, 결합제, 활력제, 봉고제, 유동화제, 용제, 용해 보조제, 완충제, 혼탁화제, 유화제, 등장화제, 안정화제, 방부제, 항산화제, 교미교취제, 착색제 등을 배합하여 제제화된다.

[0063] 부형제로서는, 유당, 포도당, D-만니톨 등의 당류, 전분, 결정 셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 에리트리톨, 소르비톨, 자일리톨 등의 당 알코올류, 인산이칼슘, 탄산칼슘, 카올린 등을 들 수 있다. 결합제로서는, α화 전분, 젤라틴, 아라비아검, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 결정 셀룰로오스, D-만니톨, 트레할로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올 등을 들 수 있다. 활력제로서는, 스테아린산, 스테아린산칼슘, 탈크, 수크로오스 지방산에

스테르, 폴리에틸렌글리콜 등을 들 수 있다. 붕괴제로서는, 크로스포비돈(가교 폴리비닐피롤리돈), 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 전분, 알긴산, 알긴산 나트륨 등을 들 수 있다. 유동화제로서는, 규산, 무수 규산, 규산 알루미늄, 규산 칼슘, 메타규산 알루민산마그네슘 화합물, 산화알루미늄, 수산화알루미늄, 산화마그네슘, 수산화마그네슘 등을 들 수 있다. 용제로서는, 정제수, 생리 식염수 등을 들 수 있다. 용해 보조제로서는, 텍스트란, 폴리비닐피롤리돈, 벤조산 나트륨, 에틸렌디아민, 살리실산 아미드, 니코틴산 아미드, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 유도체 등을 들 수 있다. 완충제로서는, 예를 들면, 구연산 나트륨 수화물, 아세트산 나트륨 수화물, 탄산수소 나트륨, 트로메타몰, 봉산, 봉사, 인산 수소 나트륨 수화물, 인산 이수소나트륨 등을 들 수 있다. 혼탁화제 혹은 유화제로서는, 라우릴 황산나트륨, 아라비아검, 젤라틴, 레시틴, 모노스테아린산 글리세린, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 등의 셀룰로오스류, 폴리솔베이트류, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 등을 들 수 있다. 등장화제로서는, 유당, 포도당, D-만니톨 등의 당류, 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 요소 등을 들 수 있다. 안정화제로서는, 폴리에틸렌글리콜, 텍스트란 황산나트륨, 아황산 나트륨 등을 들 수 있다. 방부제로서는, 파라옥시벤조산 에스테르류, 클로로부탄올, 벤질알코올, 페네틸알코올, 클로로크레졸, 디히드로아세트산, 소르빈산 등을 들 수 있다. 항산화제로서는, 아황산염, 아스코르빈산 등을 들 수 있다. 교미교취제로서는, 의약 및 식품 분야에서 통상 사용되는 감미료, 향료 등을 들 수 있다. 착색제로서는, 의약 및 식품 분야에서 통상 사용되는 착색료를 들 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 세포 살상제는 그대로 사용할 수 있으며, 그 외의 성분을 포함하는 의약용 조성물로서 사용할 수도 있다. 상기 의약용 조성물에 포함되는 그 외의 성분으로서는, 예를 들면, 상기의 부형제, 결합제, 활택제, 붕괴제, 유동화제, 용제, 용해 보조제, 완충제, 혼탁화제, 유화제, 등장화제, 안정화제, 방부제, 항산화제, 교미교취제, 착색제 등을 들 수 있다. 또한, 상기 의약용 조성물은 본 발명에 따른 세포 살상제 이외의 다른 유효성분을 함유하고 있을 수 있다.

[0065] 본 발명에 따른 세포 살상제는 포유 동물에 투여되는 것인 것이 바람직하고, 사람이나, 마우스, 쥐, 토끼, 모르모트, 햄스터, 원숭이, 양, 말, 소, 돼지, 당나귀, 개, 고양이 등의 가축이나 실험 동물에 투여되는 것인 것이 보다 바람직하며, 사람에 투여되는 것인 것이 더욱 바람직하다.

[0066] <자궁 내막증 모델 동물>

[0067] 자궁 내막증 세포는 CNGB3를 발현하고 있다. 또한, 대부분의 자궁 내막증에서는 자궁 내막증 세포는 복강 내에서 증식한다. 이 때문에, CNGB3를 과잉 발현시킨 세포가 복강 내에 이식되어 있는 동물을 자궁 내막증 모델 동물로 할 수 있다.

[0068] 과잉 발현시키는 CNGB3로서는, 자궁 내막 세포에서 발현하고 있는 야생형 인간 CNGB3(NCBI의 Gene ID : 54714)와 동일한 기능을 가지는 단백질이면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 인간 CNGB3일 수 있고, 사람 이외의 동물에 유래하는 인간 CNGB3의 호모로그 단백질일 수 있으며, 인간 CNGB3 또는 그 호모로그의 개변체로서, 인간 CNGB3와 동일한 기능을 유지하는 단백질일 수도 있다.

[0069] 상기 개변체로서는, 예를 들면, 인간 CNGB3 또는 그 호모로그의 아미노산 서열의 하나 또는 복수 개의 아미노산이 결실, 치환 혹은 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어지며, CNGB3로서의 기능을 유지하고 있는 단백질을 들 수 있다. 결실되는 등의 아미노산의 수는 1~50개가 바람직하고, 1~30개가 보다 바람직하고, 1~20개가 더 바람직하고, 1~10개가 더 바람직하다. 인간 CNGB3 또는 그 호모로그의 N말단 또는 C말단에 부가하는 아미노산으로서는, His 태그, Myc 태그, Flag 태그 등의 태그 웹타이드를 들 수 있다. 또한, 상기 개변체로서는, 예를 들면, 인간 CNGB3 또는 그 호모로그의 아미노산 서열과의 서열 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 아미노산 서열로 이루어지며, CNGB3로서의 기능을 유지하고 있는 단백질도 들 수 있다.

[0070] 한편, 본 발명 및 본원 명세서에서, 「단백질에서 아미노산이 결실된다」라는 것은, 단백질을 구성하고 있는 아미노산의 일부가 없어지는(제거되는) 것을 의미한다.

[0071] 본 발명 및 본원 명세서에서, 「단백질에서 아미노산이 치환된다」라는 것은, 단백질을 구성하고 있는 아미노산이 다른 아미노산으로 바뀌는 것을 의미한다.

[0072] 본 발명 및 본원 명세서에서, 「단백질에서 아미노산이 부가된다」라는 것은, 단백질 안에 새로운 아미노산이 삽입되는 것을 의미한다. CNGB3 과잉 발현 세포를 조제하기 위해, CNGB3를 코딩하는 유전자(CNGB3 유전자)를 도입하는 세포(숙주 세포)로서는 특별히 한정되지 않으며, 자궁 내피 세포일 수 있고, 동물의 조직으로부터 채취된 자궁 내피 세포 이외의 세포의 초대 배양 세포일 수도 있고, 배양 세포주일 수도 있다. 또한, CNGB3 유전자

를 도입하는 숙주 세포는 인간 유래의 세포일 수 있고, 인간 이외의 동물 유래의 세포일 수도 있다.

- [0073] CNGB3 과잉 발현 세포는, 숙주 세포에 CNGB3 유전자를 발현 가능한 상태로 도입함으로써 얻어진다. 구체적으로는, CNGB3를 발현시키기 위하여 필요한 DNA의 조합으로 이루어지는 발현 카세트를 넣은 발현 벡터를 숙주 세포에 도입한다. 발현 카세트는, 발현시키는 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자의 발현을 제어하는 프로모터를 구비한다. 또한, 발현 카세트는, 터미네이터, 5'-비번역 영역, 3'-비번역 영역의 어느 하나 이상이 포함되어 있을 수 있다. 바람직한 발현 카세트는 단백질을 코딩하는 유전자 서열, 프로모터, 터미네이터, 5'-비번역 영역, 3'-비번역 영역을 모두 포함하는 발현 카세트이다. 숙주 세포에 도입하는 CNGB3 유전자는, 목적의 아미노산 서열로 이루어지는 CNGB3를 코딩하는 염기 서열로 이루어지는 것일 수 있고, 숙주 세포의 코돈 빈도에 따라 개변될 수도 있다.
- [0074] 프로모터와 터미네이터는 숙주 세포 내에서 기능하는 것일 수 있다. 숙주 세포 내에서 기능하는 프로모터 및 터미네이터로서는, 숙주 세포가 본래 가지는 것일 수 있으며, 숙주 세포가 본래 가지고 있지 않은 것일 수도 있다.
- [0075] CNGB3 유전자의 발현 카세트를 넣어 발현 벡터를 제작하기 위한 벡터는, 숙주 세포로의 도입에 통상 이용되는 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 상기 벡터는, 링 형상의 핵외 유전자 벡터일 수 있고, 직쇄상의 벡터일 수 있으며, 아데노 바이러스 등의 바이러스 벡터일 수도 있다. 시판되고 있는 포유 세포 발현용 벡터의 클로닝 사이트에 CNGB3 유전자를 넣음으로써 발현 벡터를 제작할 수도 있다.
- [0076] CNGB3 과잉 발현 세포는 CNGB3 유전자의 발현 카세트가 숙주 세포의 세포 내에서 염색체 외 유전자로서 유지되는 형질 전환체일 수 있고, 숙주 세포의 염색체 안에 넣어진 형질 전환체일 수도 있다. 또한, 발현 벡터를 숙주가 되는 포유 세포에 도입하는 형질 전환 방법은, 리포렉션법, 인산 칼슘 침전법, 아세트산 리튬법, 일렉트로포레이션법 등의 공지된 형질 전환 방법 중에서 적절하게 선택하여 행할 수 있다. 얻어진 CNGB3 과잉 발현 세포는, 숙주로 한 포유 세포와 동일한 조건으로 배양할 수 있다.
- [0077] CNGB3 과잉 발현 세포를 복강 내에 이식하는 비인간 동물의 생물종은 특별히 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 자궁 내막증 모델 동물로서는, 예를 들면, 마우스, 쥐, 토끼, 모르모트, 햄스터, 원숭이, 양, 말, 소, 돼지, 당나귀, 개, 고양이 등의 가축이나 실험 동물이 바람직하다. CNGB3 과잉 발현 세포의 복강 내로의 이식은 통상의 방법에 의해 행할 수 있다.
- [0078] <바이오 마커>
- [0079] 엑소좀에는 상기 엑소좀이 방출된 원세포의 세포막에 발현되어 있는 생체 분자를 포함한다. 상술한 바와 같이, CNGB3는 자궁 내막증 세포의 세포막에 많이 발현되어 있으며, 자궁 내막증 세포로부터 방출된 엑소좀에는 CNGB3가 포함되어 있다. 마찬가지로, CNGB3는 여러 암 세포에서도 발현되고 있으며, 암 세포로부터 방출된 엑소좀에는 CNGB3가 포함되어 있다. 이 때문에, 엑소좀 중의 CNGB3 양은, 자궁 내막증 또는 암의 바이오 마커로서 유용하다.
- [0080] <질환 발증 가능성의 평가 방법>
- [0081] 본 발명에 따른 질환 발증 가능성의 평가 방법(이하, 「본 발명에 따른 평가 방법」이라고 할 수 있다.)은 엑소좀 중의 CNGB3를 바이오 마커로 하여, CNGB3를 발현하고 있는 질환의 발증 가능성을 평가하는 방법이다. 발증의 원인이 되는 세포가 CNGB3를 발현하고 있는 질환(이하, 「CNGB3 고(高)발현 질환」이라고 할 수 있다.)이 발병되어 있는 동물의 체내에서는 상기 질환의 원인 세포로부터 CNGB3를 많이 포함하는 엑소좀이 많이 분비되고 있다. 한편, CNGB3는 정상 세포에서는 한정된 조작으로 밖에 발현되어 있지 않으므로, CNGB3 고발현 질환이 발병되지 않은 동물의 체내에는 CNGB3를 많이 포함하는 엑소좀은 매우 적다. 이 때문에, 엑소좀 중의 CNGB3 양에 기초하여, CNGB3 고발현 질환의 발증자군과 비발증자군을 식별할 수 있다. 본 발명에 따른 평가 방법은 피검 동물로부터 채취된 엑소좀 중의 CNGB3를 측정하고, 얻어진 측정값을 미리 설정된 기준값과 비교하여, 상기 피검 동물에 CNGB3 고발현 질환이 발병되어 있을 가능성을 평가한다.
- [0082] CNGB3 고발현 질환으로서는, 자궁 내막증이나 CNGB3이 발현되어 있는 암을 들 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 평가 방법에 의해 평가되는 대상의 피검 동물로서는, 사람일 수 있으며, 비인간 동물일 수도 있다. 비인간 동물의 생물종은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 마우스, 쥐, 토끼, 모르모트, 햄스터, 원숭이, 양, 말, 소, 돼지, 당나귀, 개, 고양이 등의 가축이나 실험 동물을 들 수 있다. 본 발명에 따른 평가 방법에 의해 평가되는 대상의 피검 동물로서는, 사람, 가축, 실험 동물이 바람직하고, 사람이 보다 바람직하다.

- [0083] 구체적으로는, 엑소좀 중의 CNGB3의 측정값이, 미리 설정된 기준값 초과인 경우, 상기 엑소좀이 채취된 피검 동물은 CNGB3 고발현 질환이 발병되어 있을 가능성이 높다고 평가한다. 상기 기준값은, CNGB3 고발현 질환의 발증자와 비발증자를 식별하기 위한 기준값이다.
- [0084] 상기 기준값은, 예를 들면, CNGB3 고발현 질환의 환자군과 비환자군의 엑소좀 중의 CNGB3의 양을 측정하고, 양군을 구별할 수 있는 역치로서 실험적으로 구할 수 있다. 본 발명에서 엑소좀 중의 CNGB3 양의 기준값의 결정 방법은 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 일반적인 통계학적 수법에 따라 구할 수 있다.
- [0085] 기준값을 구하는 방법의 일례로서는, 예를 들면, 일반적으로 행해지고 있는 병리 검사 등의 다른 방법에 따라, 목적으로 하는 CNGB3 고발현 질환 환자라고 진단된 환자의 엑소좀을 채취하고 그 CNGB3의 양을 측정한다. 복수의 환자에 대하여 측정한 후, 그 평균값 또는 중앙값 등에 의해 이러한 엑소좀 중의 CNGB3 양을 산출하고, 이것이 포함되는 수치를 기준값으로 할 수 있다.
- [0086] 또한, 복수의 CNGB3 고발현 질환 환자와 복수의 CNGB3 고발현 질환의 비환자에 대하여, 각각 엑소좀 중의 CNGB3 양을 측정하고, 평균값 또는 중앙값 등에 의해 CNGB3 고발현 질환 환자군과 CNGB3 고발현 질환 비환자군의 엑소좀 중의 CNGB3 양과 편차를 각각 산출한 후, 편차도 고려하여 두 수치가 구별되는 역치를 구하고, 이를 기준값으로 할 수 있다.
- [0087] 평가 대상의 CNGB3 고발현 질환이 CNGB3가 발증의 원인 세포에서 특이적으로 발현되고 있는 경우, 상기 기준값은 CNGB3의 검출 한계값으로 할 수 있다. 피검 동물로부터 채취된 엑소좀 중에서 CNGB3가 검출된 경우에는, 상기 피검 동물은 상기 CNGB3 고발현 질환으로 발병되어 있을 가능성이 높다고 평가하고, CNGB3가 검출되지 않은 경우에는, 상기 피검 동물은 상기 CNGB3 고발현 질환으로 발병되어 있지 않을 가능성이 높다고 평가할 수 있다.
- [0088] 피검 동물로부터 채취된 엑소좀 중의 CNGB3의 양의 측정 방법은 특별히 한정되지 않으며, 단백질의 발현을 정량적 또는 반정량적으로 측정할 때, 일반적으로 사용되는 각종 방법으로 측정할 수 있다. 상기 방법으로서는, 예를 들면, ELISA법, 면역 조작 화학법, 웨스턴 블로트법 등의 면역 반응을 이용한 방법을 들 수 있다. 또한, 피검 동물로부터 채취된 엑소좀 중의 CNGB3 양은, CNGB3를 포함하는 엑소좀의 양으로서 구할 수도 있다. CNGB3는 주로 엑소좀의 지방질 이중막 표면에 존재하고 있다. 이 때문에, 특정의 표면 분자를 가지는 엑소좀을 측정하는 각종 방법을 적용함에 따라서도, 엑소좀 중의 CNGB3의 양을 측정할 수 있다. 특정 표면 분자를 가지는 엑소좀을 측정하는 장치로서는, 예를 들면, 「Exo Counter」(JVC KENWOOD사제), 「dNano」(MEIWAFOSIS사제), 「Nano Sight」(일본 퀸텀 · 디자인사제), 「SP6800」소니(주) 등의 엑소좀 계측 시스템을 들 수 있다.
- [0089] 면역 반응을 이용한 측정 방법에서는, 어떠한 항CNGB3 항체를 이용해도 무방하다. 또한, 항CNGB3 항체 대신, CNGB3와 결합하는 분자를 이용할 수 있다. 상기 분자로서는, 웨პ타이드, 단백질, 핵산, 저분자 등 중 어느 하나일 수도 있다. 또한, 상기 분자는 표식화물(CNGB3와 결합하는 부위에 직접적 또는 간접적으로 표식 물질이 결합된 것)인 것도 바람직하다. 상기 표식 물질은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 비오틴 등의 저분자일 수 있고, 형광 물질일 수도 있으며, 효소일 수 있고, His 태그, Myc 태그, Flag 태그 등의 태그 웨პ타이드일 수도 있다.
- [0090] 예를 들면, CNGB3와 결합하는 웨პ타이드로서는, 전술한 CNGB3 결합성 웨პ타이드 또는 그 표식 화물이 바람직하고, Z13 웨პ타이드 또는 그 표식 화물이 특히 바람직하다. 또한, 서열 번호 41(MQRTRATPG)로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨პ타이드(이하, 「Z24 웨პ타이드」라고 할 수 있다.), 서열 번호 42(VRSSRSTPQ)로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 웨პ타이드(이하, 「Z11 웨პ타이드」라고 할 수 있다.)(모두 비특허문현 1 참조) 등의 CNGB3와 결합 가능한 웨პ타이드를 이용할 수도 있다. CNGB3와 결합하는 웨პ타이드로서는, 웨პ타이드 부분이 모두 L-아미노산으로 이루어지는 것을 이용할 수 있고, D-아미노산으로 이루어지는 것을 이용할 수도 있다. 예를 들면, 비오틴화 Z13 웨პ타이드와 효소나 형광으로 표식된 아비딘이나 스트렙토아비딘 세트를 이용할 수 있다.
- [0091] CNGB3 양의 측정에 제공되는 엑소좀은, 피검 동물로부터 채취된 것이면 무방하며, 피검 동물로부터 채취된 생체 시료 그 자체여도 무방하나, 상기 생체 시료로부터 정제된 엑소좀인 것이 바람직하다. 생체 시료로부터의 엑소좀의 분리는, 예를 들면 시판의 엑소좀 분리용 키트를 이용하여 행할 수 있다.
- [0092] 엑소좀을 포함하는 생체 시료로서는 특별히 한정되는 것은 아니며, 혈액, 혈장, 혈청, 누액, 타액, 복강액, 오줌 등일 수 있고, 자궁 점막이나 소화관 점막과 같은 점막이나, 간장, 위, 소장, 대장 등의 조직으로부터 채취된 조직편일 수도 있다. 그 중에서, 혈액, 혈장, 혈청은 임상 검사 대상 물체로서 범용되고 있으며, 비교적 저

침습적으로 채취하는 것이 가능하다. 이 때문에, 본 발명에 따른 평가 방법에서 CNGB3 양의 측정에 제공되는 엑소좀으로서는, 피검 동물로부터 채취된 혈액, 특히 혈장 또는 혈청으로부터 분리된 엑소좀이 바람직하다. 본 발명에 따른 평가 방법은, 혈청 등으로부터 분리된 엑소좀을 샘플로서 실시할 수 있기 때문에, 건강 진단과 같은 CNGB3 고발현 질환의 퍼스트 스크리닝에도 유효하다.

[0093] 본 발명에 따른 평가 방법은, CNGB3 고발현 질환의 치료에서 치료 효과의 평가에 이용할 수 있다. 예를 들면, CNGB3 고발현 질환 환자에 대해서, CNGB3 고발현 질환의 치료의 개시 전과 종료 후, 본 발명에 따른 평가 방법을 행한다. 상기 치료에 의해, 환자의 체내에서 CNGB3 고발현 질환의 원인 세포가 감소한, 혹은 그 생리 활성이 저하된 경우, 해당 환자의 체내에서는 CNGB3 고발현 질환의 원인 세포로부터 분비되는 엑소좀의 양이 저하된다. 이 때문에, 엑소좀 중의 CNGB3 양이 치료전과 비교하여 치료 후에 유의미하게 감소한 경우에는, 해당 치료에 의해 치료 효과가 얻어졌다고 평가할 수 있다. 또한, 엑소좀 중의 CNGB3 양의 감소의 비율이 크면 클수록 높은 치료 효과가 얻어졌다고 평가할 수 있다. CNGB3 고발현 질환의 치료의 개시 전과 종료 후에 더하여, 치료 기간 중에도 경시적으로 본 발명에 따른 평가 방법을 행함으로써, 치료 효과를 모니터링 할 수 있다.

[0094] 또한, CNGB3 고발현 질환에 적어도 1번 이환된 동물에 대하여, 본 발명에 따른 평가 방법을 경시적으로 행함으로써, 해당 이환 동물의 CNGB3 고발현 질환의 발증 유무를 모니터링 할 수 있다. 예를 들면, CNGB3 고발현 질환이 암이나 자궁 내막증과 같이, 치유된 경우에도 재발 위험이 높은 질환의 경우, CNGB3 고발현 질환 환자에 대하여 본 발명에 따른 평가 방법을 경시적으로 행함으로써, 재발 유무를 모니터링 할 수 있다.

[0095] 실시예

[0096] 다음으로, 실시예를 나타내어 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0097] <자궁 내막증 모델 세포(A431-CNGB3-myc 세포)>

[0098] A431 세포(사람 표피 유사의 세포암 유래 세포주)에, C발단에 myc 태그를 융합시킨 인간 CNGB3를 코딩하는 유전자를 도입하여 강제 발현시킨 형질 전환 세포(A431-CNGB3-myc 세포)를 자궁 내막증 모델 세포로서 조제하였다.

[0099] A431-CNGB3-myc 세포의 배양은 DMEM High Glucose 배양지(GIBCO사제)에 10%의 비동화(非動化) FBS(소 태아 혈청, Corning사제)와 1%의 페니실린-스트렙토마이신(Invitrogen사제)를 함유시킨 배양지를 배양 배지로 하여 37°C, 5용량% 이산화탄소 환경하에서 행하였다. 계대는 2~3일마다 행하였다.

[0100] <자궁 내막증 모델 마우스>

[0101] 면역 부전 마우스(NOD/ShiJic-scid Jcl계통, 일본 CLEA사부터 공급)의 복강에 A431-CNGB3-myc 세포를 이식하여 자궁 내막증 모델 마우스를 준비하였다.

[0102] 구체적으로는, 동결 보존되어 있는 A431-CNGB3-myc 세포를 해동한 후, 10cm 디쉬(Thermo Fisher Scientific사제, Lot No. F3BAXQ103)를 이용하여 2회 계대한 세포를 1×10^7 cells/0.5mL/body가 되도록 배양 배지를 가하여 조제한 세포액을 투여액으로 하였다. 이 투여액을 조제 후 가급적 신속하게 7주령 암컷의 면역 부전 마우스의 복강 내에 투여함으로써, A431-CNGB3-myc 세포를 이식하였다.

[0103] 한편, 마우스는 폴리카보네이트 케이지(W×D×H=270×440×187(mm)) 내에서 5~10마리/케이지를, 19.8~27.1°C, 습도 32~75%, 12시간 조명의 환경 하에서 사육하였다. 사료(멸균제 CRF-1(고형), 오리엔탈 효모공업사제)로 음료수(멸균 수돗물)는 자유 섭취시켰다.

[0104] 모델 제작의 확인은 복막 종류(腫瘤)의 관찰 및 채취에 의해 행하였다. A431-CNGB3-myc 세포 이식으로부터 1~3주일 후, 각 주 2마리씩에 대하여 부검을 행하여 복막에 종류(1mm 정도의 입상)로 인정되는지 육안으로 확인하고, 사진 촬영을 행하였다. 그 후, 복막을 채취하여 4부분(복부·등의 각 좌우)를 잘라 각각 10% 중성 완충 포르말린에 침지하고 고정하여 냉장 보존하였다. 포르말린 고정 후의 복막에 대하여 항c-myc 항체를 이용하여 면역 조직 화학 염색하고 파종 상태를 조사하였다.

[0105] A431-CNGB3-myc 세포 이식 후의 마우스의 육안 확인 결과, 1회째의 실험에서는 이식으로부터 1주일 후에는 육안으로 종류가 확인되었지만 복막 파종은 볼 수 없었고, 이식으로부터 2주일 또는 3주일 후에는 육안으로 종류 및 복막 파종이 확인되었다. 2번째 실험에서는 이식으로부터 1주일 후에도 육안으로 복막 파종이 확인되었다. 또한, 이식 후 마우스의 복막 조직편의 c-myc 염색 결과, 이식으로부터 1주일 후에는 이미 복막 파종되어 있음

이 확인되었다.

[0106] [참고예 1]

[0107] KLAK 웨타이드와 HLAH 웨타이드와 CNGB3 결합성 웨타이드가 연결된 웨타이드에 대하여, CNGB3 결합성 웨타이드의 아미노산 서열의 종류와 자궁 내막증 세포에 대한 세포 장애성의 강도에 대한 영향을 조사하였다.

[0108] 구체적으로는, 표 2에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 2종류의 웨타이드를 합성하고, A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 장애성을 비교하였다. 이러한 2종류의 웨타이드는 KLAK 서열과 HLAH 서열 부분을 D-아미노산으로부터, CNGB3 결합성 웨타이드 부분을 L-아미노산으로 합성하였다.

표 1

| | KLAK-HLAH | Seq. | Seq. No. |
|-----|-----------|---|----------|
| WT | 14+14 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRADNRPG | 8 |
| D5E | 14+14 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRAENRPG | 9 |

[0109]

<세포 살상 활성의 평가>

[0111] 각 웨타이드의 세포 살상 활성의 평가는 CellTiter-Glo(등록상표) Assay 키트(프로메가사제)를 이용하여, 각 웨타이드로 처리한 A431-CNGB3-myc 세포의 ATP 양을 측정하여 행하였다.

[0112] 구체적으로는, 우선 2회 계대 후의 A431-CNGB3-myc 세포를, 96 웰 플레이트(Corning/Costar사제, Lot No. 00515003)에, 1×10^4 cells/well이 되도록 세포의 농도를 조제하여 과종하였다. 과종으로부터 2일간 배양한 후, 각 웰에 각 웨타이드를 각각 최종 농도가 35.5, 75 또는 150 μ M가 되도록 첨가하고, 24시간 배양하였다. 그 후, 각 웰로부터 배양 상등액을 제거하고, 남은 세포에 CellTiter-Glo buffer를 가하여 호모지나이즈한 후, 원심에 의해 상등액을 회수하고 이를 라이세이트로 하였다. 이 라이세이트에 2배 양의 PBS 및 라이세이트와 동량의 2× CellTiterGlo Reagent를 가하여 교반한 것을 반응 용액으로 하고, 이 반응 용액을 10분간 실온에서 방치하였다. 실온 방치 후의 반응 용액의 발광 강도(Luminescence)(RLU : RELATIVE LIGHT UNITS)를 Synergy H1 하이브리드(hybrid) 멀티 모드 마이크로 플레이트 리더(BioTek사제)를 이용하여 측정하였다. 반응 용액의 발광 강도는 ATP 양의 지표이다. 반응 용액의 발광 강도가 작을수록 ATP 양이 적고, 투여된 웨타이드의 세포 살상 활성이 강한 것을 나타낸다. 모든 시행은 트리플리케이트로 측정하고, 그 평균을 각 웨타이드의 농도의 세포 살상 활성으로서 평가하였다.

[0113] 각 웨타이드의 A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 살상 활성의 평가에서, 각 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 1에 나타낸다. 도 1중 「WT」가 표 1의 웨타이드 WT의 결과를, 「D5E」가 표 1의 웨타이드 D5E의 결과를 각각 나타낸다. 두 웨타이드는 모두 농도 의존적으로 세포 살상 활성 작용을 나타내었다. CNGB3 결합성 웨타이드가 Z13 웨타이드인 웨타이드 WT가, CNGB3 결합성 웨타이드가 서열 번호 4의 웨타이드인 웨타이드 D5E보다 강한 세포 살상 활성 작용을 나타내었다.

[0114] [실시예 1]

[0115] KLAK 웨타이드와 HLAH 웨타이드와 Z13 웨타이드가 연결된 웨타이드에 대하여, KLAK 서열과 HLAH 서열의 길이를 자궁 내막증 세포에 대한 세포 장애성의 강도가 최대가 되도록 최적화하였다.

[0116] 구체적으로는, 표 2에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 16종류의 웨타이드를 합성하고, A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 장애성을 비교하였다. 이러한 16 종류의 웨타이드는, KLAK 서열과 HLAH 서열 부분을 D-아미노산으로, Z13 웨타이드 부분을 L-아미노산으로 합성하였다.

표 2

| 펩티드 | KLAK-HLAH | Seq. | Seq. No. |
|-----|-----------|---|----------|
| 1 | 14+14 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRADNRPG | 8 |
| 2 | 14+13 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLA-VRRADNRPG | 10 |
| 3 | 14+12 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHL-VRRADNRPG | 11 |
| 4 | 14+11 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAH-VRRADNRPG | 12 |
| 5 | 14+10 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLA-VRRADNRPG | 13 |
| 6 | 14+9 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HL-VRRADNRPG | 14 |
| 7 | 14+8 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-H-VRRADNRPG | 15 |
| 8 | 14+7 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG | 16 |
| | HLAH-KLAK | | |
| 9 | 14+14 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKLAK-VRRADNRPG | 17 |
| 10 | 14+13 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKLA-VRRADNRPG | 18 |
| 11 | 14+12 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKL-VRRADNRPG | 19 |
| 12 | 14+11 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAK-VRRADNRPG | 20 |
| 13 | 14+10 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLA-VRRADNRPG | 21 |
| 14 | 14+9 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KL-VRRADNRPG | 22 |
| 15 | 14+8 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-K-VRRADNRPG | 23 |
| 16 | 14+7 | HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-VRRADNRPG | 24 |

[0117]

96 웰 플레이트에 뿐린 A431-CNGB3-myc 세포에 첨가하는 각 펩타이드의 최종 농도를, 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75 또는 150 μ M로 하고, 펩타이드 첨가 후의 배양 시간을 20시간으로 한 것 이외에는, 참고예 1과 마찬가지로 하여, 각 펩타이드의 세포 살상 활성을 평가하였다. 각 펩타이드의 A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 살상 활성의 평가에서, 각 반응 용액의 빛광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 2에 나타낸다. 도면 중 「1」~「16」은 각각, 표 2의 펩타이드 1~16을 첨가한 반응 용액의 결과를 나타낸다. 모두, 펩타이드 첨가로부터 20시간 후에는 농도 의존적으로 세포 살상 활성 작용을 나타내었다. KLAK 서열의 펩타이드의 하류에 HLAH 서열의 펩타이드가 연결된 펩타이드 1~8이, HLAH 서열의 펩타이드의 하류에 KLAK 서열의 펩타이드가 연결된 펩타이드 9~16보다 강한 세포 살상 활성 작용을 나타내었다. 또한, 펩타이드 1~8 중에서는 가장 짧은 펩타이드 8은 가장 긴 펩타이드 1보다 세포 살상 활성이 강하고, 펩타이드 9~16 중에서는 가장 짧은 펩타이드 16이 가장 긴 펩타이드 9보다 세포 살상 활성이 강했다.

[0119]

[실시예 2]

[0120]

실시예 1에서 가장 강한 세포 살상 활성 작용을 나타낸 펩타이드 8을 더 짧게 하고, 자궁 내막증 세포에 대한 세포 장애성의 강도가 최대가 되도록 최적화하였다.

[0121]

구체적으로는, 표 3에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 14 종류의 펩타이드를 합성하고, A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 장애성을 비교하였다. 이러한 14 종류의 펩타이드는, KLAK 서열과 HLAH 서열 부분을 D-아미노산으로, Z13 펩타이드 부분을 L-아미노산으로 합성하였다.

표 3

| 펩티드 | KLAK-HLAH | Seq. | Seq. No. |
|-----|-----------|-----------------------------------|----------|
| 8 | 14+7 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG | 16 |
| A1 | 14+6 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLA-VRRADNRPG | 25 |
| A2 | 14+5 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL-VRRADNRPG | 26 |
| A3 | 14+4 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLAH-VRRADNRPG | 27 |
| A4 | 14+3 | KLAKLAK-KLAKLAK-HLA-VRRADNRPG | 28 |
| A5 | 14+2 | KLAKLAK-KLAKLAK-HL-VRRADNRPG | 29 |
| A6 | 14+1 | KLAKLAK-KLAKLAK-H-VRRADNRPG | 30 |
| B1 | 13+7 | KLAKLAK-KLAKLA-HLAHLAH-VRRADNRPG | 31 |
| B2 | 12+7 | KLAKLAK-KLAKL-HLAHLAH-VRRADNRPG | 32 |
| B3 | 11+7 | KLAKLAK-KLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG | 33 |
| B4 | 10+7 | KLAKLAK-KLA-HLAHLAH-VRRADNRPG | 34 |
| B5 | 9+7 | KLAKLAK-KL-HLAHLAH-VRRADNRPG | 35 |
| B6 | 8+7 | KLAKLAK-K-HLAHLAH-VRRADNRPG | 36 |
| B7 | 7+7 | KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG | 37 |

[0122]

- [0123] 실시예 1과 같이 하여, 각 웨타이드의 세포 살상 활성을 평가하였다. 각 웨타이드의 A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 살상 활성의 평가에서, 웨타이드 8과 웨타이드 A1~A6로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 3에, 웨타이드 8과 웨타이드 B1~B7로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 4에 나타낸다. 도면 중 「#8」은 표 3의 웨타이드 8을 첨가한 반응 용액의 결과를 나타내고, 「A1」~「A6」 및 「B1」~「B6」는 각각, 표 3의 웨타이드 A1~A6, B1~B6를 첨가한 반응 용액의 결과를 나타낸다. KLAK 서열이 14 아미노산으로 이루어지는 웨타이드 A1~A6 중 HLAH 서열이 4 아미노산 이하인 웨타이드 A3~6은, 웨타이드 최종 농도가 75 μ M이어도 세포 살상 활성을 거의 나타내지 않았다(도 3). 또한, HLAH 서열이 7 아미노산으로 이루어지는 웨타이드 B1~B7 중 KLAK 서열이 11 아미노산 이하인 웨타이드 B3~B7는, 웨타이드 최종 농도가 75 μ M이어도 세포 살상 활성을 거의 나타내지 않았다(도 4). 또한, 웨타이드 A2만이 웨타이드 8보다 강한 세포 살상 활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터, 이팩터 웨타이드로서는, KLAK 서열이 14 아미노산으로 이루어지는 웨타이드와 HLAH 서열이 5 아미노산으로 이루어지는 웨타이드를 연결시킨 웨타이드가, 가장 높은 세포 살상 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0124] [실시예 3]
- [0125] KLAK 웨타이드와 HLAH 웨타이드와 Z13 웨타이드를 연결한 웨타이드에서, 구성하는 아미노산을 D-아미노산으로 한 경우와 L-아미노산으로 한 경우의 세포 살상 활성의 강도를 조사하였다.
- [0126] 구체적으로는, 표 3에 기재의 웨타이드 A2(14 아미노산으로 이루어지는 KLAK 서열과 5 아미노산으로 이루어지는 HLAH 서열 모두 D-아미노산으로 이루어진다. 웨타이드(14D+5D)라고도 한다.)와 웨타이드 8의 아미노산 중 14 아미노산으로 이루어지는 KLAK 서열이 D-아미노산으로 이루어지고, 5 아미노산으로 이루어지는 HLAH 서열이 L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드(14D+5L), 웨타이드 8의 아미노산 중 14 아미노산으로 이루어지는 KLAK 서열이 L-아미노산으로 이루어지고, 5 아미노산으로 이루어지는 HLAH 서열이 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드(14L+5D), 웨타이드 8의 아미노산이 모두 L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드(14L+5L)의 세포 살상 활성의 강도를, 실시예 1과 같이 하여 조사하였다. 한편, 이를 웨타이드의 Z13 웨타이드 부분은 모두 L-아미노산만으로 이루어진다.
- [0127] 각 웨타이드의 A431-CNGB3-myc 세포에 대한 세포 살상 활성의 평가에서, 각 웨타이드로 처리한 반응 용액의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 5에 나타낸다. 탈출 웨타이드가 모두 L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드(14L+5L)의 세포 살상 활성이 가장 작고, 탈출 웨타이드가 모두 D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드 A2(웨타이드(14D+5D))의 세포 살상 활성이 가장 커다. 이는, D-아미노산으로 이루어지는 웨타이드가, L-아미노산으로 이루어지는 웨타이드보다 엔도좀 안이나 세포질 내에서 소화되기 어렵고, 엔도좀 탈출 활성과 아포토시스 유도 활성이 충분히 발휘되기 때문에 주측되었다.
- [0128] [실시예 4]
- [0129] 실시예 2 및 실시예 3에서 가장 세포 살상 활성이 높았던 웨타이드 A2의 세포 살상 활성에 대해 조사하였다.
- [0130] <생존 세포의 정량적 해석>
- [0131] 세포 배양용 멀티 디쉬에 둔 커버 클래스에 뿐린 A431-CNGB3-myc 세포에, 웨타이드 A2를 최종 농도가 0(대조군), 37.5, 75 또는 150 μ M가 되도록 첨가하여 배양하였다. 웨타이드 첨가로부터 24, 48 또는 72시간 후에, 커버 클래스에 접착하여 퍼져있는 세포(생존 세포) 수를 카운트하였다. 1 시야당 생존 세포수(Cells/view)의 측정 결과를 도 6에 나타낸다. 이 결과, A431-CNGB3-myc 세포의 생존 세포수는 첨가한 웨타이드 A2의 농도 의존적, 경시적으로 감소하는 것이 판명되었다.
- [0132] <아포토시스 유도 활성의 해석>
- [0133] 세포 배양용 멀티 디쉬에 둔 커버 클래스에 뿐린 A431-CNGB3-myc 세포에, 웨타이드 A2를 최종 농도가 0(대조군), 37.5, 75 또는 150 μ M가 되도록 첨가하여 배양하였다. 웨타이드 첨가로부터 24, 48 또는 72시간 후에 ApopTag(등록 상표) Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit를 이용하여 아포토시스를 검출하였다. 도 7에, 웨타이드 첨가로부터 48시간 경과 후의 세포에 대하여 Apop-Tag assay를 행한 결과를 나타낸다. 도면 중 「Hoechst」는, Hoechst 33342 solution에 의한 핵염색의 결과를 나타낸다. 이 결과, 첨가한 웨타이드 A2의 농도 의존적으로, Apop-Tag 염색된 세포수가 많아져, 웨타이드 A2에 의해 아포토시스가 유도되었음이 확인되었다.

[0134] [실시예 5]

자궁 내막증 모델 마우스에 실시예 2 및 실시예 3에서 가장 세포 살상 활성이 높았던 펫타이드 A2를 투여하여, 자궁 내막증에 대한 치료 효과를 조사하였다.

<펩타이드의 복강 내로 단회 투여>

A431-CNGB3-myc 세포를 복강 내에 이식하고 나서 7일 후의 자궁 내막증 모델 마우스에 대하여, 이소플루란 마취 하에서 복강 내에 37°C로 데운 생리적 식염액 0.5mL를 넣고 맷사지 한 직후에, 펫타이드 A2를 생리 식염수에 용해시킨 용액을 복강 내에 투여하였다. 펫타이드 A2는 마우스의 체중당 투여량이 0mg/10mL/kg(대조군), 5 mg/10mL/kg 또는 10mg/10mL/kg가 되도록 투여하였다(n=3).

<펩타이드의 복강 내로 여러 차례 투여>

A431-CNGB3-myc 세포를 복강 내에 이식하고 나서 7일 후의 자궁 내막증 모델 마우스에 대하여, 이소플루란 마취 하에서 복강 내에 37°C로 데운 생리적 식염액 0.5mL를 넣고 맷사지한 직후에, 펫타이드 A2를 생리 식염수에 용해시킨 용액을 복강 내에 투여하였다(1회째 투여). 그 후, A431-CNGB3-myc 세포를 복강 내에 이식하고 나서 8일 후와 9일 후에 마찬가지로 하여 펫타이드 A2용액을 투여하였다. 즉, 펫타이드 A2용액을 1일 1회, 합계 3회 투여하였다. 펫타이드 A2는 마우스의 체중당 투여량이 0mg/10mL/kg(대조군), 2.5mg/10mL/kg, 5.0mg/10mL/kg 또는 7.5mg/10mL/kg가 되도록 투여하였다(n=3).

<복막의 채취>

펩타이드 A2를 투여한 자궁 내막증 모델 마우스는 최종 투여로부터 24시간 후 또는 48시간 후에 이소플루란 마취 하에서 방혈사시키고, 복막을 채취하였다. ATP 측정용 복막은 액체 질소로 동결 후, 측정까지 딥 프리저에서 보관하였다. 병리 표본 제작용 복막은 10% 중성 완충 포르말린에 침지하여 고정한 후, 냉장 보관하였다.

한편, 각 마우스는 방혈사시키기 전에 체중을 측정하였다. 펫타이드 A2의 투여량이나 투여 횟수에 관계 없이, 각 마우스의 체중에 특별한 변화는 없었다.

<ATP 양 측정>

ATP 양 측정은, CellTiter-Glo(등록 상표) Assay 키트(프로메가사제)를 이용하여 행하였다. 동결한 복막의 중량을 측정하고, 동결 조직의 10배 양의 CellTiter-Glo buffer를 가하여 호모지나이즈 한 후, 원심에 의해 상등액을 회수하고, 이를 라이세이트로 하였다. 이 라이세이트에 2배 양의 PBS 및 라이세이트와 동량의 2× CellTiterGlo Reagent를 가하여 교반한 것을 반응 용액으로 하고, 이 반응 용액을 10분간 실온에서 방치하였다. 실온 정지 후의 반응 용액의 발광 강도(RLU)를, Synergy H1 하이브리드 멀티 모드 마이크로 플레이트 리더(BioTek사제)를 이용하여 측정하였다. 반응 용액의 발광 강도는 ATP 양의 지표이며, 발광 강도가 작을수록 ATP 양이 적고, 투여된 펫타이드의 세포 살상 활성이 강한 것을 나타낸다. 모든 시행은 triplicate(n=3)로 측정하고, 그 평균을 각 펫타이드의 세포 살상 활성으로서 평가하였다.

펩타이드 A2를 단회 투여한 자궁 내막증 모델 마우스의 복막의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 8에 나타낸다. 또한, 펫타이드 A2를 3회 반복 투여한 자궁 내막증 모델 마우스의 복막의 발광 강도(RLU)의 측정 결과를 도 9에 나타낸다. 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 단회 투여와 여러 차례 투여의 어느 마우스에서도, 투여한 펫타이드 A2의 양에 의존적으로 복막의 발광 강도(RLU)가 저하되어 있어, 복막의 ATP 양이 저하되었음이 확인되었다. 복막의 ATP 양의 저하는, 복막에 이식된 A431-CNGB3-myc 세포의 생존 세포수의 감소를 의미한다. 이러한 결과로부터, 펫타이드 A2에 의해, 복강 내의 A431-CNGB3-myc 세포가 살상되는 것, 즉, 펫타이드 A2는 생체 내 환경에서 세포 살상 효과를 발휘할 수 있으며, 특히 자궁 내막증에 대한 치료약으로서 유용한 것이라고 할 수 있다.

<TUNEL 염색>

10% 중성 완충 포르말린으로 고정한 병리 표본 제작용 복막에 대하여, HE 염색 및 TUNEL 염색을 행하였다. 이 결과, 펫타이드 A2 투여군에서는, TUNEL법(TdT-mediated dUTP nick end labeling) 양성이며(도시 생략), 펫타이드 A2는 아포토시스를 유도하고, 세포 살상 효과를 나타내는 것이 확인되었다.

[0148] [실시예 6]

A431-CNGB3-myc 세포 및 각종 자궁암 세포에 유래하는 세포주에 대한, 펫타이드 A2(펩타이드(14D+5D))의 세포

살상 활성 작용을 조사하였다.

[0150] 암 세포 유래 세포주로서는, 사람 자궁 내막선암 유래의 ishikawa 세포, 사람 자궁 내막암 유래의 SNG-II 세포, 사람 자궁체암 유래의 Hec-1 A세포, 사람 자궁 내막암 유래의 RL95-2 세포를 이용하였다. 이들 세포는 A431-CNGB3-myc 세포와 마찬가지로 하여 배양하였다.

[0151] 각 세포를 처리하는 펩타이드로서는, 표 4에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 3 종류의 펩타이드를 이용하였다. 이러한 3 종류의 펩타이드는 KLAk 서열과 HLAH 서열 부분을 D-아미노산으로, Z13 펩타이드 부분을 L-아미노산으로 합성하였다.

표 4

| | KLAk-HLAH-Z13 | Seq. | Seq. No. |
|-------|---------------|---------------------------------|----------|
| A 2 | 14D+5D+Z13 | KLAkLAK-KLAkLAK-HLAHL-VRRADNRPG | 26 |
| A 2-1 | 14D+Z13 | KLAkLAK-KLAkLAK- VRRADNRPG | 38 |
| A 2-2 | 5D+Z13 | HLAHL-VRRADNRPG | 39 |

[0152]

[0153] 96 웰 플레이트에 뿐린 각 세포에 첨가하는 각 펩타이드의 최종 농도를 0(펩타이드 무첨가), 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150.0 또는 300.0 μ M로 한 것 이외에는 실시예 1과 동일하게 하여, 각 펩타이드의 세포 살상 활성을 평가하였다. 펩타이드 무첨가 반응 용액의 발광 강도(RLU)를 100%로 한 경우의 각 반응 용액의 상대 발광 강도(%)를 상대 ATP 양(%)으로서 산출하였다. 산출 결과를 도 10~도 14에 나타낸다. 도면 중 「14D-Z13+5D-Z13」는 펩타이드 A2-1과 펩타이드 A2-2를 모두 첨가한 반응 용액의 상대 ATP 양을, 「14D-Z13」는 펩타이드 A2-1만을 첨가한 반응 용액의 상대 ATP 양을, 「5D-Z13」는 펩타이드 A2-2만을 첨가한 반응 용액의 상대 ATP 양을, 「14D-5D-Z13」는 펩타이드 A2만을 첨가한 반응 용액의 상대 ATP 양(%)을 각각 나타낸다. 도 10~도 14에 나타낸 바와 같이, 펩타이드 A2는 A431-CNGB3-myc 세포 뿐만 아니라, 자궁암 세포에 유래하는 여러 세포주에 대해서도 세포 살상 활성 작용을 가지고 있음이 확인되었다. 또한, KLAk 펩타이드와 Z13 펩타이드의 연결 펩타이드 및 HLAH 펩타이드와 Z13 펩타이드의 연결 펩타이드로 모두 처리한 세포에서는, KLAk 펩타이드와 Z13 펩타이드의 연결 펩타이드만으로 처리한 세포 및 HLAH 펩타이드와 Z13 펩타이드의 연결 펩타이드만으로 처리한 세포와 마찬가지로 세포 살상 활성 작용은 거의 관찰되지 않지만, 매우 약했다.

[0154] [실시예 7]

[0155] A431 세포는 사람 표피 유사의 세포암 유래 세포주인 것으로부터, A431-CNGB3-myc 세포가 복강에 이식된 자궁 내막증 모델 마우스는 담암 마우스이기도 하다. 따라서, 자궁 내막증 모델 마우스의 복강에, 서열 번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 이펙터 펩타이드와 IF7 펩타이드를 연결한 펩타이드(IFLLWQR-RR-KLAkLAK-KLAkLAK-HLAHL, 서열 번호 40)(이하, 「IF7(RR)-(K+H) 펩타이드」라고 할 수 있다.)를 투여하고, 암 세포에 대한 세포 살상 활성 작용을 조사하였다. IF7(RR)-(K+H) 펩타이드는 KLAk 서열과 HLAH 서열 부분을 D-아미노산으로, 그 외의 펩타이드 부분을 L-아미노산으로 합성하였다.

[0156] <펩타이드의 미정맥 투여>

[0157] A431-CNGB3-myc 세포를 복강 내에 이식하고 나서 14일 후의 자궁 내막증 모델 마우스에 대하여, 1일 1회, 6일간 연속하여 IF7(RR)-(K+H) 펩타이드를 생리 식염수에 용해시킨 용액 50 μ L를 미정맥으로부터 투여하였다. IF7(RR)-(K+H) 펩타이드는, 마우스의 체중당 투여량이 0 μ g/body(대조군), 10 μ g/body 또는 50 μ g/body가 되도록 투여하였다.

[0158] 이 결과, 펩타이드를 투여하고 있지 않는 대조군(n=8)에서는, A431-CNGB3-myc 세포를 복강 내에 이식하고 나서 24일 후까지의 사망 개체수는 1이며, 생존률은 88.9%였다. 이에 대하여, IF7(RR)-(K+H) 펩타이드를 10 μ g/body/day 또는 50 μ g/body가 되도록 투여한 군(n=6)에서는 생존률은 100%였다. 또한, 시험 종료 시점에서 모든 마우스의 복강의 암 세포(A431-CNGB3-myc 세포)의 확대를 조사한 결과, 대조군에서는 암 세포는 복막 전체에 퍼져 있었지만, IF7(RR)-(K+H) 펩타이드를 투여한 군에서는 대부분의 마우스에서 암 세포의 확대는 비교적 국한적이었다. 한편, 각 마우스의 체중은 IF7(RR)-(K+H) 펩타이드의 투여량이나 투여 횟수에 관계 없이, 특별한 변화는 없었다. 이러한 결과로부터, 경정맥 투여된 IF7(RR)-(K+H) 펩타이드는 암 세포에 대한 세포 살상 활성

작용을 가지며, 항암제로서 유용하다는 것을 알았다.

[0159] [실시예 8]

[0160] 등 속에 종류를 형성시킨 담암 마우스에 대하여, 실시예 7에서 이용한 IF7(RR)-(K+H) 웨타이드를 경경맥 투여하고, 암 세포에 대한 세포 살상 활성을 조사하였다.

[0161] <루시페라아제 유전자 도입 난소암 담암 피하 종양 마우스(OVCAR3-Luc 마우스)>

[0162] 마우스에 이식하는 종양 조직은 루시페라아제 유전자를 도입한 난소 암세포주(OVCAR3-Luc 세포, 타시설로부터 이양)를 배양한 것을 이용하였다. OVCAR3-Luc 세포의 배양은, RPMI medium 1640(11875-093, gibe by life technologies)을 배양 배지로 하고, 37°C, 5용량% 이산화탄소 환경 하에서 행하였다.

[0163] 8주령 수컷 SCID 마우스(C.B-17/Icr-scid/scid Jcl 계통, 일본 CLEA사로부터 공급)의 등 부위에 OVCAR3-Luc 세포 약 1×10^6 개를 이식하여 OVCAR3-Luc 마우스를 준비하였다.

[0164] <웨타이드의 미경맥 투여>

[0165] 실시예 7과 같이 하여, OVCAR3-Luc 마우스에, 1일 1회, 6일간 연속하여 IF7(RR)-(K+H) 웨타이드를 생리 식염수에 용해시킨 용액 50 μL를 꼬리 정맥으로부터 투여하였다. IF7(RR)-(K+H) 웨타이드는 마우스의 체중당 투여량이 0 μg/body(대조) 또는 10 μg/body가 되도록 투여하였다.

[0166] <종양 조직의 크기의 측정>

[0167] 각 마우스에 대하여 발광 이미징 검사를 행하여, 등 속 종류의 photon수와 종양 조직의 크기를 경시적으로 측정하였다.

[0168] (1) Photon수의 측정

[0169] 루시페린-루시페라아제 발광 기구를 이용하여, in vivo 발광 이미징 장치(Xenogen IVIS-200, Caliper Corporation제)를 이용하여 측정하였다. 우선, OVCAR3-Luc 마우스의 복강 내에 30mg/mL의 D-루시페린칼륨(126-05116, 와코 순약 공업사제) 용액 100 μL를 투여하였다. 투여 15분 후, 해당 마우스를 in vivo 발광 이미징 장치로 측정하여 Photon수를 계측하였다.

[0170] (2) 종양 체적의 측정

[0171] 각 OVCAR3-Luc 마우스의 등 부위의 추정 종양 체적(mm^3)은 종양의 장경과 단경으로부터, 하기 식에 의해 구하였다. 한편, 종양의 장경(mm)과 단경(mm)은 버니어 캘리퍼스를 이용하여 측정하였다.

$$[\text{추정 종양 체적}(\text{mm}^3)] = [\text{장경}(\text{mm})] \times [\text{단경}(\text{mm})] \times [\text{단경}(\text{mm})] \times 1/2$$

[0173] 도 15에 각 마우스의 등 속 종류의 photon수의 증대율(%)의 경시적 변화를 나타내고, 도 16에 각 마우스의 등 속 종양 체적(mm^3)의 증대율(%)의 경시적 변화를 나타낸다. photon수의 증대율 및 종양 체적의 증대율은 모두, 웨타이드 용액 투여 개시일의 전날의 값을 기준(100%)으로 하였다. 도면 중에서 「treatment」는, 웨타이드 용액을 거쳐 정맥 투여한 처리 기간을 나타낸다. 도 15에 나타낸 바와 같이, IF7(RR)-(K+H) 웨타이드를 투여한 마우스에서는, 웨타이드 처리 기간에는 photon수가 거의 증대하지 않고, 웨타이드 처리 기간 후의 증대율도 대조군(Saline)보다 작았다. 또한, 종양 체적은, 웨타이드 처리 기간에는 대조군과 IF7(RR)-(K+H) 웨타이드 투여군에 차이는 없지만, 해당 처리 기간 경과후의 증대율은 IF7(RR)-(K+H) 웨타이드 투여군이 확실하게 작았다. 이러한 결과로부터, IF7(RR)-(K+H) 웨타이드의 투여에 의해 생체 내의 종양 조직을 살상할 수 있으며, 상기 웨타이드는 항암제로서 유용하다고 할 수 있다.

[0174] [참고예 2]

[0175] 각종 장기의 암조직의 파라핀 포매 절편을 항CNGB3 항체로 면역 염색하고, CNGB3의 발현의 유무를 조사하였다.

[0176] 조직 절편은 시판되고 있는 사람의 난소암 티슈 어레이(Ovary cancer tissue array)(US Biomax사제) 4종 중 2종류(OV20811 및 OV2088)와, 각종 장기의 암조직 어레이(Multiple organ tumor tissue array) 중 2종류(FDA800a 및 MC964a)를 이용하였다. 또한, 항CNGB3 항체는, 시판되고 있는 항체 중 Biorbyt(Catalog No.orb156415BRT 100 UG)(이하, 「항체 orb」라고 할 수 있다.) 및 Osenses(Code: OSC00253W)(이하, 「항체

253W」라고 할 수 있다.)의 2종류를 이용하였다.

[0177] 조직 절편의 면역 염색은 이하와 같이 행하였다. 우선, 파라핀 포매 조직 절편을, 액상 면역 실험용 블로킹제 (immunoblot, DS파마바이오메디칼사제)로 30분간 반응시켜 비특이적 반응을 블로킹한 후, TBST(Tween 20 함유 트리스 완충 생리 식염수)에 의한 5분간의 세정 처리를 2회 행하였다. 계속해서, 해당 조직 절편을 0.3%의 과산화수소수에 침지하여 5분간 반응시켜, 내재성 페록시다이아제 활성의 블로킹 처리를 행한 후, TBST에 의한 5분간의 세정 처리를 2회 행하였다. 계속해서, 해당 조직 절편을, 항CNGB3 항체를 REAL Antibody Diluent (Code S2022, Dako사제)과 100배로 희석한 1차 항체 용액에 침지시켜 실온에서 30분간 반응시킨 후, TBST에 의한 5분간의 세정 처리를 2회 행하였다. 또한, 해당 조직 절편을 표식 2차 항체(EnVision+System-HRP 표식 Polymer 항토끼 항체, Dako사제)와 실온에서 30분간 반응시킨 후, TBST에 의한 5분간의 세정 처리를 2회 행하였다. 그 후, 해당 조직 절편을 DAB 발색 시약 [DAB+Liquid(라지 사이즈), RUO(K3468), Dako사제]으로 5분간 처리하여 발색 시켰다. DAB 발색 후의 조직 절편은 수세한 후, 메이어 혜마톡실린으로 2분간 처리하고 핵을 염색한 후, 봉입하였다.

[0178] 사람의 난소암 조직 어레이 중 OV20811의 염색 결과를 표 5~표 10에, OV2088의 염색 결과를 표 11~표 16에 각각 나타낸다. 각종 장기의 암조직 어레이 중 FDA800a의 염색 결과를 표 17 및 표 18에, MC964a의 염색 결과를 표 19~21에 각각 나타낸다. 표 중 각 항CNGB3 항체 란이 「+」인 것은 해당 항체로 면역 염색된 결과를, 「-」은 해당 항체로 면역 염색되지 않은 결과를 각각 의미한다. 대부분의 조직 절편이 항CNGB3 항체에 의해 면역 염색되어 있어, CNGB3가 발현되어 있음을 알 수 있었다.

표 5

| OV20811 | | Grade | Stage | orb | 253W | |
|---------|---|-------|-------|-----|------|--|
| 1 | Serous adenocarcinoma | 1 | Ia | + | + | |
| 2 | Serous adenocarcinoma | | I | - | - | |
| 3 | Adenocarcinoma (sparse) | - | Ia | + | + | |
| 4 | Serous papillary adenocarcinoma | 2 | II | + | + | |
| 5 | Serous papillary adenocarcinoma | | Ia | - | + | |
| 6 | Mucinous papillary adenocarcinoma | 1 | Ic | - | + | |
| 7 | Mucinous papillary adenocarcinoma (fibrous tissue and blood vessel) | - | Ia | + | - | |
| 8 | Mucinous papillary adenocarcinoma | | | + | - | |
| 9 | | | | - | - | |
| 10 | | | | + | + | |
| 11 | Serous papillary adenocarcinoma | 2 | IIa | + | + | |
| 12 | | | Ic | + | + | |
| 13 | | | Ib | + | - | |
| 14 | | | IIIC | + | + | |
| 15 | | | | + | - | |
| 16 | | | IV | + | - | |
| 17 | | 3 | Ic | + | + | |
| 18 | Serous papillary adenocarcinoma (carcinoma sparse necrosis) | - | IIIA | + | + | |
| 19 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | Ic | + | + | |
| 20 | | | Ib | + | + | |
| 21 | | | | - | + | |
| 22 | | 2 | IIb | + | + | |
| 23 | | | Ia | + | + | |
| 24 | | 3 | IIb | + | + | |
| 25 | | | Ib | + | + | |
| 26 | | | | + | - | |
| 27 | Mucinous papillary adenocarcinoma | | Ia | + | + | |
| 28 | | | IIa | + | + | |
| 29 | | | Ib | + | + | |
| 30 | 2 | Ia | + | + | | |
| 31 | | IIa | + | + | | |
| 32 | Serous papillary adenocarcinoma | - | Ib | + | + | |
| 33 | | 3 | Ia | + | + | |
| 34 | | 2 | IIIC | + | + | |
| 35 | | 2-3 | | + | + | |
| 36 | Mucinous papillary adenocarcinoma | 2 | I | + | + | |
| 37 | Mucinous papillary adenocarcinoma (tumoral necrosis) | - | Ib | - | - | |

표 6

| OV20811 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|---------|--|-------|-------|-----|------|
| 38 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | IIa | + | + |
| 39 | | | IV | + | + |
| 40 | | | IV | + | + |
| 41 | | 2 | Ib | + | + |
| 42 | | 2-3 | Ia | - | + |
| 43 | | - | IIIC | + | + |
| 44 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | IV | + | + |
| 45 | Mucinous papillary adenocarcinoma | | IIIC | + | + |
| 46 | Ia | | + | + | |
| 47 | Ia | | + | + | |
| 48 | - | | + | + | |
| 49 | 1 | | IIIB | + | |
| 50 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | Ia | + | + |
| 51 | | | IIb | + | + |
| 52 | | | 2 | II | + |
| 53 | | 3 | Ia | + | + |
| 54 | | | Ia | + | + |
| 55 | | | IIa | + | + |
| 56 | Mucinous papillary adenocarcinoma | 3 | Ia | + | + |
| 57 | Serous papillary adenocarcinoma | | II | + | + |
| 58 | Serous adenocarcinoma | | IIIC | + | + |
| 59 | Serous papillary adenocarcinoma | | Ib | + | + |
| 60 | Serous papillary adenocarcinoma | | IIIC | + | + |
| 61 | Mucinous papillary adenocarcinoma with necrosis | | Ia | + | + |
| 62 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | IIa | + | + |
| 63 | | | Ia | + | + |
| 64 | | | - | IIa | + |
| 65 | Serous adenocarcinoma | 3 | Ia | + | + |
| 66 | Ia | | + | + | |
| 67 | II | | + | + | |
| 68 | Ib | | + | + | |
| 69 | Ic | | + | + | |
| 70 | Mucinous papillary adenocarcinoma | 2 | Ia | + | + |
| 71 | | 3 | Ia | + | + |
| 72 | Mucinous papillary adenocarcinoma (corpus albicans tissue) | - | Ib | + | + |
| 73 | Serous papillary adenocarcinoma (fibrous tissue) | - | Ia | + | + |
| 74 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | III | + | + |

[0180]

표 7

| OV20811 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|---------|---|-------|-------|-----|------|
| 75 | Serous papillary adenocarcinoma (ovary tissue) | - | Ic | - | + |
| 76 | | | | IIa | + |
| 77 | Serous papillary adenocarcinoma | | | IIa | + |
| 78 | | | | IIb | + |
| 79 | Mucinous papillary adenocarcinoma with necrosis | | | II | + |
| 80 | | | | Ib | + |
| 81 | Serous papillary adenocarcinoma | | | Ib | + |
| 82 | Serous papillary adenocarcinoma (ovary tissue) | - | II | + | + |
| 83 | Serous papillary adenocarcinoma | 3 | | | + |
| 84 | Serous papillary adenocarcinoma (chronic inflammation of fibrous tissue and blood vessel) | - | Ia | + | + |
| 85 | | | | Ib | + |
| 86 | Serous papillary adenocarcinoma | | | I | + |
| 87 | | | | Ia | + |
| 88 | Serous papillary adenocarcinoma with necrosis | | | I | + |
| 89 | | | | II | + |
| 90 | Serous papillary adenocarcinoma | | | Ic | - |
| 91 | | | | Ib | + |
| 92 | Mucinous papillary adenocarcinoma with necrosis | | | | + |
| 93 | Adenocarcinoma (sparse) | - | III | - | + |
| 94 | | | | I | + |
| 95 | Serous papillary adenocarcinoma | | | Ia | + |
| 96 | Mucinous papillary adenocarcinoma | | | Ib | + |
| 97 | | | | IIa | - |
| 89 | Mucinous adenocarcinoma | | | Ib | + |
| 99 | | | | Ia | + |
| 100 | Adenocarcinoma | | | II | + |
| 101 | | | | Ia | + |
| 102 | Endometrioid adenocarcinoma | 1 | Ib | + | + |
| 103 | Endometrioid adenocarcinoma (tumoral necrosis) | - | | II | - |
| 104 | Endometrioid adenocarcinoma | 1 | | | + |
| 105 | Endometrioid adenocarcinoma (tumoral necrosis) | - | Ic | - | - |

[0181]

표 8

| OV20811 | | Grade | Stage | orb | 253W | |
|---------|---|-------|---|-----|------|--|
| 106 | Endometrioid adenocarcinoma | 1 | Ia | + | + | |
| 107 | Endometrioid adenocarcinoma (sparse) | | IIa | - | + | |
| 108 | | | Ia | + | + | |
| 109 | | | I | - | + | |
| 110 | | | | + | + | |
| 111 | | | Ib | + | + | |
| 112 | | | Ia | + | + | |
| 113 | | | IIa | + | + | |
| 114 | | | I | + | + | |
| 115 | | | | Ia | + | |
| 116 | | | 3 | I | + | |
| 117 | Endometrioid adenocarcinoma | | 2 | Ia | + | |
| 118 | | | I | + | + | |
| 119 | | 3 | IIa | + | + | |
| 120 | | | IV | + | + | |
| 121 | | | 2 | Ic | + | |
| 122 | | | | IIc | + | |
| 123 | | 3 | Ia | + | + | |
| 124 | | | Ic | + | + | |
| 125 | | | Ib | + | + | |
| 126 | | | IIa | + | + | |
| 127 | Clear cell carcinoma | - | I | - | - | |
| 128 | | | | + | + | |
| 129 | Clear cell carcinoma (sparse) with massive necrosis | | IIIC | - | + | |
| 130 | Clear cell carcinoma (sparse) with necrosis | | I | + | + | |
| 131 | Clear cell carcinoma | | | + | + | |
| 132 | II | | - | - | | |
| 133 | | | Clear cell carcinoma (tumoral necrosis) | Ic | + | |
| 134 | Clear cell carcinoma | | I | + | + | |
| 135 | | | | + | + | |
| 136 | | | II | + | + | |
| 137 | Undifferentiated carcinoma | | | + | + | |
| 138 | Ia | | + | + | | |
| 139 | Squamous cell carcinoma from malignant transformation of teratoma | 1 | I | + | + | |
| 140 | | 2 | Ia | + | + | |
| 141 | | | IIa | + | + | |
| 142 | | | IIIC | + | + | |
| 143 | | 3 | Ia | + | + | |
| 144 | | | | + | + | |

[0182]

표 9

| OV20811 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|---------|----------------------------|-------|-------|-----|------|
| 145 | Squamous cell carcinoma | | Ib | + | + |
| 146 | | | | + | + |
| 147 | | | IIIC | + | + |
| 148 | | | | - | + |
| 149 | | | Ia | + | + |
| 150 | | | | - | + |
| 151 | | | IV | - | + |
| 152 | | | | - | - |
| 153 | | | Ic | - | + |
| 154 | | | Ib | - | + |
| 155 | | | I | - | + |
| 156 | Endodermal sinus carcinoma | | | - | + |
| 157 | | | II | + | + |
| 158 | | | Ib | - | + |
| 159 | | | II | - | + |
| 160 | | | Ib | - | + |
| 161 | | | IV | - | - |
| 162 | | | | + | - |
| 163 | | | Ia | + | - |
| 164 | | | I | - | + |
| 165 | | | Ic | - | + |
| 166 | | | Ib | - | - |
| 167 | | | I | - | + |
| 168 | | | Ia | - | + |
| 169 | | | Ib | - | - |
| 170 | | | Ia | - | + |
| 171 | Granular cell tumor | | IIb | + | - |
| 172 | | | Ic | - | - |
| 173 | | | I | - | + |
| 174 | | | | - | - |
| 175 | | | | - | - |
| 176 | | | Ia | - | + |
| 177 | | | | + | + |
| 178 | | | | - | - |

[0183]

표 10

| OV20811 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|---------|--|-------|-------|-----|------|
| 179 | Granular cell tumor | Ib | + | - | |
| 180 | | | - | - | |
| 181 | | Ia | - | - | |
| 182 | | II | - | + | |
| 183 | | Ib | N.T. | + | |
| 184 | | Ia | + | + | |
| 185 | | Ib | + | + | |
| 186 | | Ia | + | + | |
| 187 | | | + | + | |
| 188 | | | + | - | |
| 189 | Dysgerminoma | IIb | + | - | |
| 190 | | Ia | - | - | |
| 191 | | I | - | + | |
| 192 | | Ia | - | - | |
| 193 | | | + | + | |
| 194 | | | - | - | |
| 195 | | | + | + | |
| 196 | Sertoli cell tumor | Ic | - | - | |
| 197 | | I | - | - | |
| 198 | | Ia | - | - | |
| 199 | Theca cell tumor | | - | - | |
| 200 | Ib | - | + | | |
| 201 | Malignant theca cell tumor | III | - | - | |
| 202 | | Ia | - | + | |
| 203 | Malignant teratoma | Ib | - | - | |
| 204 | | | - | - | |
| 205 | | I | - | - | |
| 206 | Gynandroblastoma | Ia | - | - | |
| 207 | Malignant fibroepithelioma | | - | - | |
| 208 | Malignant non-specificity steroid cell tumor | | - | - | |

[0184]

표 11

| OV2088 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|--------|---|-------|-------|-----|------|
| 1 | Serous papillary adenocarcinoma | 1 | Ia | + | + |
| 2 | | | | + | + |
| 3 | | 2 | Ib | + | + |
| 4 | | | | - | - |
| 5 | | 1 | Ia | - | + |
| 6 | | | | - | + |
| 7 | | 2 | Ib | + | + |
| 8 | | | | + | + |
| 9 | | 1 | Ia | - | - |
| 10 | | | | - | - |
| 11 | | | | - | + |
| 12 | | | | - | + |
| 13 | | | | - | - |
| 14 | Serous papillary adenocarcinoma (fibrous tissue and blood vessel) | - | | - | - |
| 15 | Serous papillary adenocarcinoma | 1 | Ic | - | - |
| 16 | | | | - | - |
| 17 | Serous adenocarcinoma | 2 | I | + | + |
| 18 | | | | + | + |
| 19 | Serous papillary adenocarcinoma | 1 | Ia | + | + |
| 20 | | | | - | + |
| 21 | | | Ia | - | + |
| 22 | | | | + | - |
| 23 | | 2 | Ic | - | + |
| 24 | | | | + | + |
| 25 | | | III | - | - |
| 26 | | | | - | - |
| 27 | | | Ia | - | + |
| 28 | | | | - | + |
| 29 | | | | - | + |
| 30 | | | | - | - |
| 31 | | | | - | - |
| 32 | | | | - | - |
| 33 | Serous papillary adenocarcinoma | Ib | IIIa | + | + |
| 34 | | | | + | + |
| 35 | Serous adenocarcinoma with necrosis | | IIIa | - | - |
| 36 | Serous adenocarcinoma (sparse) | | | + | - |
| 37 | Serous papillary adenocarcinoma | I | I | + | + |
| 38 | | | | + | + |
| 39 | | Ib | Ib | + | + |
| 40 | | | | + | - |

[0185]

표 12

| OV2088 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|--------|---|-------|-------|-----|------|
| 41 | Serous adenocarcinoma (sparse) | 2 | Ib | - | - |
| 42 | Serous adenocarcinoma (fibrous tissue and blood vessel) | - | | - | - |
| 43 | Serous adenocarcinoma | 3 | Ia | - | - |
| 44 | | 2 | | - | - |
| 45 | | - | | - | + |
| 46 | | - | | - | + |
| 47 | | - | | - | - |
| 48 | | - | | - | - |
| 49 | Serous adenocarcinoma | 3 | Ib | + | + |
| 50 | | - | | + | + |
| 51 | | - | | + | + |
| 52 | Serous papillary adenocarcinoma | - | - | - | + |
| 53 | | 3 | Ia | - | + |
| 54 | | - | - | - | + |
| 55 | | 2 | II | + | + |
| 56 | | - | - | + | + |
| 57 | | 3 | Ib | - | + |
| 58 | | - | | - | + |
| 59 | | - | | + | + |
| 60 | | - | | + | - |
| 61 | 2 | - | III | - | - |
| 62 | | - | | - | - |
| 63 | | - | I | + | + |
| 64 | | - | | - | + |
| 65 | | - | | - | - |
| 66 | Serous adenocarcinoma (necrotic tissue) | - | Ib | - | + |
| 67 | | - | | + | + |
| 68 | | 3 | | + | + |
| 69 | | - | | + | + |
| 70 | Serous papillary adenocarcinoma (fibrous tissue and blood vessel) | - | Ic | + | + |
| 71 | Serous adenocarcinoma (necrotic tissue) | - | - | - | + |
| 72 | Serous adenocarcinoma | 3 | III | - | + |
| 73 | | | | - | + |
| 74 | | | | - | - |
| 75 | | | II | + | + |
| 76 | | | - | + | + |
| 77 | | Ic | - | - | + |
| 78 | | | - | - | + |
| 79 | | Ia | - | - | + |
| 80 | | | - | - | + |

[0186]

표 13

| OV2088 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|--------|---|-------|-------|-----|------|
| 81 | Serous adenocarcinoma | 3 | IIc | + | + |
| 82 | | | | + | + |
| 83 | | | Ia | + | + |
| 84 | | | | - | + |
| 85 | | | Ib | + | + |
| 86 | Serous adenocarcinoma (ovarian tissue) | - | | - | + |
| 87 | II | + | + | | |
| 88 | | + | + | | |
| 89 | I | - | + | | |
| 90 | | - | + | | |
| 91 | Serous adenocarcinoma | 3 | II | - | + |
| 92 | | | | - | + |
| 93 | | | IV | + | - |
| 94 | | | | + | - |
| 95 | | | II | - | + |
| 96 | | | | - | + |
| 97 | | | IIa | - | + |
| 89 | | | | - | + |
| 99 | | | Ia | - | - |
| 100 | | | | + | + |
| 101 | Serous adenocarcinoma (chronic inflammation of fibrous tissue and blood vessel) | - | Ia | + | + |
| 102 | Serous adenocarcinoma | 3 | | + | + |
| 103 | Serous adenocarcinoma (fibrous tissue and blood vessel) | 3 | Ic | + | + |
| 104 | - | | | + | |
| 105 | Serous adenocarcinoma | | Ic | + | + |
| 106 | - | | | - | |
| 107 | Serous papillary adenocarcinoma | | Ib | - | - |
| 108 | - | | | - | |
| 109 | Serous adenocarcinoma | 3 | Ia | - | - |
| 110 | | | | - | - |
| 111 | | | Ib | - | + |
| 112 | Serous adenocarcinoma (ovarian tissue) | - | | - | + |
| 113 | Ia | + | - | | |
| 114 | | + | - | | |
| 115 | Serous adenocarcinoma | 3 | I | - | - |
| 116 | | | | - | + |
| 117 | | | I | - | - |
| 118 | | | | - | + |
| 119 | | | I | - | + |
| 120 | | | | - | - |

표 14

| OV2088 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|--------|--|-------|-------|------|------|
| 121 | Serous adenocarcinoma with clear cell carcinoma | 3 | Ia | – | + |
| 122 | | | | – | – |
| 123 | | 1 | I | – | – |
| 124 | Mucinous papillary adenocarcinoma | | | – | – |
| 125 | | 2 | Ic | – | – |
| 126 | | | | – | + |
| 127 | Serous papillary adenocarcinoma | 1–2 | II | – | – |
| 128 | | | | – | – |
| 129 | | | I | + | + |
| 130 | | 1 | | + | + |
| 131 | Mucinous papillary adenocarcinoma | | | + | + |
| 132 | | | | + | + |
| 133 | | 1–2 | Ia | + | + |
| 134 | | | | + | + |
| 135 | | | | – | – |
| 136 | Mucinous adenocarcinoma | 2 | | – | – |
| 137 | | | | – | – |
| 138 | | | I | – | – |
| 139 | Adenocarcinoma | | | – | – |
| 140 | | | | – | – |
| 141 | Adenocarcinoma from malignant transformation of teratoma | 3 | Ia | – | – |
| 142 | | | | – | – |
| 143 | Adenocarcinoma | | | – | – |
| 144 | | | | – | – |
| 145 | Endometrioid carcinoma (sparse) | | Ib | + | + |
| 146 | | | | + | + |
| 147 | Squamous cell carcinoma from malignant transformation of teratoma (mature teratoma sparse) | – | IIIC | N.T. | N.T. |
| 148 | | | | + | + |
| 149 | Squamous cell carcinoma from malignant transformation of teratoma | 3 | Ib | + | – |
| 150 | | | | – | – |
| 151 | Squamous cell carcinoma | | | – | + |
| 152 | | | | – | + |
| 153 | Squamous cell carcinoma from malignant transformation of teratoma | | Ia | + | – |
| 154 | | | | + | – |
| 155 | | | | – | + |
| 156 | | | | – | + |
| 157 | Endodermal sinus carcinoma | – | Ib | – | + |
| 158 | | | | – | + |
| 159 | | | | – | – |
| 160 | | | | – | – |

[0188]

표 15

| OV2088 | | Grade | Stage | orb | 253W | |
|--------|------------------------------------|-------|-------|-----|------|--|
| 161 | Endometrioid carcinoma | 2 | Ia | + | + | |
| 162 | | | | + | + | |
| 163 | | | | - | - | |
| 164 | | | | - | + | |
| 165 | | | | + | + | |
| 166 | | | Ib | + | + | |
| 167 | | | | - | - | |
| 168 | | | | + | + | |
| 169 | | | | - | - | |
| 170 | | | | - | - | |
| 171 | Granulosa-theca cell tumor | - | Ia | - | - | |
| 172 | | | | - | - | |
| 173 | | | | - | - | |
| 174 | | | | - | - | |
| 175 | | | | - | + | |
| 176 | | | Ia | - | + | |
| 177 | | | | + | - | |
| 178 | | | | + | - | |
| 179 | Clear cell carcinoma | 2 | I | + | + | |
| 180 | | | | + | + | |
| 181 | | | | + | + | |
| 182 | | | | + | + | |
| 183 | Clear cell carcinoma with necrosis | 2 | IIIC | + | + | |
| 184 | | | | - | - | |
| 185 | | | I | - | + | |
| 186 | | | | - | + | |
| 187 | Dysgerminoma | - | Ia | + | + | |
| 188 | | | | + | + | |
| 189 | | | Ib | - | - | |
| 190 | | | | - | + | |
| 191 | | | Ia | - | - | |
| 192 | | | | - | + | |
| 193 | | | | - | - | |
| 194 | | | Ib | - | - | |
| 195 | Strumal carcinoid (sparse) | - | | + | + | |
| 196 | | | | + | + | |
| 197 | | | | + | - | |
| 198 | | | | + | - | |
| 199 | | | | + | + | |
| 200 | | | | + | N.T. | |

[0189]

표 16

| OV2088 | | Grade | Stage | orb | 253W |
|--------|-------------------------|-------|-------|------|------|
| 201 | Carcinosarcoma | - | Ia | - | - |
| 202 | | | | - | - |
| 203 | Cellular fibroma | - | Ia | - | - |
| 204 | | | | - | - |
| 205 | Embryonal carcinoma | - | Ia | - | - |
| 206 | | | | N.T. | N.T. |
| 207 | Diffuse B-cell lymphoma | - | Ia | - | - |
| 208 | | | | - | - |

[0190]

표 17

| FDA800a | | | orb | 253W |
|---------|-----|---|------|------|
| 1 | 피부 | Basal cell carcinoma of occipitalia skin | + | - |
| 2 | | Squamous cell carcinoma of left chest wall | + | - |
| 3 | 폐 | Small cell carcinoma | - | - |
| 4 | | Adenocarcinoma | + | - |
| 5 | | Squamous cell carcinoma | - | + |
| 6 | | Large cell carcinoma | + | + |
| 7 | | Bronchoalveolar carcinoma | - | - |
| 8 | 정소 | Spermatocytoma | + | - |
| 9 | | Spermatocytoma | - | - |
| 10 | | Embryonal carcinoma | + | + |
| 11 | 전립선 | Adenocarcinoma (Gleason grade:4; Gleason score:4+5) | + | + |
| 12 | | Rhabdomyosarcoma | - | - |
| 13 | 담낭 | Adenocarcinoma | + | + |
| 14 | | Adenosquamous carcinoma | + | - |
| 15 | 소장 | Adenocarcinoma | + | - |
| 16 | | Low grade malignant interstitialoma | - | + |
| 17 | 췌장 | Duct Adenocarcinoma | + | + |
| 18 | | Islet cell carcinoma | - | + |
| 19 | 결장 | Adenocarcinoma | + | + |
| 20 | | Low grade malignant interstitialoma | + | + |
| 21 | 직장 | Adenocarcinoma | + | + |
| 22 | | Low grade malignant interstitialoma | - | - |
| 23 | | Malignant melanoma | + | + |
| 24 | 식도 | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 25 | | Adenocarcinoma | + | - |
| 26 | 맹장 | Adenocarcinoma | + | + |
| 27 | 혀 | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 28 | 이하선 | Adenoid cystic carcinoma | + | + |
| 29 | 위 | Mucinous adenocarcinoma | + | + |
| 30 | 간장 | Hepatoblastoma | + | - |
| 31 | | Hepatocellular carcinoma | + | + |
| 32 | 유방 | Ductal carcinoma in situ | + | + |
| 33 | | Invasive ductal carcinoma | + | + |
| 34 | | Ductal carcinoma in situ | + | - |
| 35 | | Medullary carcinoma | N.T. | N.T. |
| 36 | 자궁 | Adenocarcinoma endometrium | + | + |
| 37 | | Clear cell carcinoma with necrosis (sparse) | + | + |
| 38 | | Leiomyoma | - | - |
| 39 | | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 40 | 자궁경 | Endocervical type adenocarcinoma | + | + |

[0191]

표 18

| FDA800a | | | orb | 253W |
|---------|------|--|------|------|
| 41 | 난소 | Mucinous adenocarcinoma | - | + |
| 42 | | Serous adenocarcinoma | + | + |
| 43 | 세로칸 | Thymoma (type B3) | + | + |
| 44 | 갑상선 | Medullary carcinoma | - | - |
| 45 | | Papillary carcinoma | + | + |
| 46 | | Atypical meningioma | - | + |
| 47 | | Malignant ependymoma of right occipital lobe | - | - |
| 48 | 뇌 | Anaplastic oligodendroglioma with calcification (sparse) | - | - |
| 49 | | Pantmorphic glioblastoma of right occipital lobe | + | - |
| 50 | | Medulloblastoma of cerebellum | + | - |
| 51 | 방광 | Transitional cell carcinoma | - | - |
| 52 | | Low grade malignant leiomyosarcoma | + | - |
| 53 | | Transitional cell carcinoma | - | + |
| 54 | 신장 | Papillary renal cell carcinoma | - | - |
| 55 | | Clear cell carcinoma | + | + |
| 56 | | Diffuse B-cell lymphoma | + | - |
| 57 | | Diffuse B-cell lymphoma of right thigh | - | - |
| 58 | 림프절 | Diffuse B-cell lymphoma of mandible | - | - |
| 59 | | Diffuse B-cell lymphoma of spleen | - | - |
| 60 | | Hodgkin's lymphoma of left clavicle | - | - |
| 61 | 연부조직 | Leiomyosarcoma of chest wall | - | - |
| 62 | | Embryonal rhabdomyosarcoma of left leg | - | - |
| 63 | 후복막 | Rhabdomyosarcoma | - | - |
| 64 | | Primitive neuroectodermal tumor | - | - |
| 65 | 복막 | Clear cell sarcoma | + | + |
| 66 | 후복막 | Neuroblastoma | - | - |
| 67 | 복강 | Mucinous liposarcoma | - | - |
| 68 | 골반강 | Chordoma | + | + |
| 69 | 연부조직 | Neurofibroma of right low back | N.T. | N.T. |
| 70 | 골반강 | Synovial sarcoma of right chest wall | - | - |
| 71 | 뼈 | Osteosarcoma of right femur | - | - |
| 72 | 복막 | Malignant mesothelioma | - | - |

[0192]

표 19

| MC964a | | | orb | 253W |
|--------|----|---------------------------------------|-----|------|
| 1 | 대뇌 | Astrocytoma | + | - |
| 2 | | Anaplastic oligogendroglioma | - | - |
| 3 | | Malignant ependymoma | + | - |
| 4 | | Astrocytoma | + | - |
| 5 | | Astrocytoma | + | - |
| 6 | | Glioblastoma | + | + |
| 7 | 식도 | Squamous cell carcinoma (sparse) | + | + |
| 8 | | Squamous cell carcinoma (sparse) | + | + |
| 9 | | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 10 | 위 | Adenocarcinoma | - | - |
| 11 | | Adenocarcinoma | + | + |
| 12 | | Interstitialoma | + | + |
| 13 | 간장 | Hepatocellular carcinoma | + | + |
| 14 | | Cholangioma | + | + |
| 15 | | Hepatoblastoma | + | + |
| 16 | 소장 | Adenocarcinoma | + | + |
| 17 | | Diffuse B-cell lymphoma | - | - |
| 18 | | Interstitialoma | + | + |
| 19 | 결장 | Adenocarcinoma | + | + |
| 20 | | Interstitialoma | - | + |
| 21 | | Diffuse B-cell lymphoma | - | - |
| 22 | 직장 | Adenocarcinoma | + | + |
| 23 | | Interstitialoma | + | + |
| 24 | | Interstitialoma | + | - |
| 25 | 췌장 | Islet cell carcinoma | + | + |
| 26 | | Adenocarcinoma | + | + |
| 27 | | Adenocarcinoma | + | + |
| 28 | 대장 | Metastatic adenocarcinoma | + | + |
| 29 | | Metastatic dysgerminoma | - | + |
| 30 | | Interstitialoma | - | - |
| 31 | 폐 | Small cell undifferentiated carcinoma | - | - |
| 32 | | Small cell undifferentiated carcinoma | - | - |
| 33 | | Atypical carcinoid | + | - |
| 34 | | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 35 | | Adenocarcinoma | + | + |
| 36 | | Squamous cell carcinoma | + | + |

[0193]

표 20

| MC964a | | | orb | 253W |
|--------|------|---|-----|------|
| 37 | 자궁경부 | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 38 | | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 39 | | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 40 | 자궁 | Endometrioid adenocarcinoma | + | + |
| 41 | | Endometrioid adenocarcinoma | + | + |
| 42 | | Clear cell carcinoma | - | + |
| 43 | 유방 | Invasive lobular carcinoma | + | - |
| 44 | | Invasive ductal carcinoma | - | + |
| 45 | | Cystosarcoma phyllodes | - | - |
| 46 | 난소 | Serous adenocarcinoma | - | - |
| 47 | | Serous adenocarcinoma | - | + |
| 48 | | Serous adenocarcinoma | + | + |
| 49 | 비장 | Diffuse B-cell lymphoma | + | - |
| 50 | | Diffuse non-Hodgkin's lymphoma | - | - |
| 51 | | Diffuse B-cell lymphoma | + | + |
| 52 | 전립선 | Adenocarcinoma (Gleason grade:3; Gleason score:3+4) | + | + |
| 53 | | Adenocarcinoma (Gleason grade:3; Gleason score:3+3) | + | + |
| 54 | | Adenocarcinoma (Gleason grade:3; Gleason score:2+3) | - | + |
| 55 | 정소 | Seminoma with necrosis | - | + |
| 56 | | Diffuse B-cell lymphoma | - | - |
| 57 | | Embryonal carcinoma | + | + |
| 58 | 신장 | Clear cell carcinoma | - | + |
| 59 | | Clear cell carcinoma | - | + |
| 60 | | Sarcomatoid carcinoma | - | - |
| 61 | 방광 | Transitional cell carcinoma | + | + |
| 62 | | Mucinous adenocarcinoma | + | + |
| 63 | | Leiomyosarcoma | + | + |

[0194]

표 21

| MC964a | | | orb | 253W |
|--------|------|---|-----|------|
| 64 | 림프절 | Hodgkin's lymphoma of neck | + | + |
| 65 | | Hodgkin's lymphoma of neck | - | + |
| 66 | | Diffuse B-cell lymphoma of left groin | - | - |
| 67 | | Diffuse B-cell lymphoma of left elbow joint | - | - |
| 68 | | Diffuse T-cell lymphoma of mediastinum | - | - |
| 69 | | Diffuse B-cell lymphoma of mesentery | + | - |
| 70 | 뼈 | Osteosarcoma of left leg | + | + |
| 71 | | Osteosarcoma of right femur | - | + |
| 72 | | Osteosarcoma of right femur | - | + |
| 73 | | Dedifferentiation chondrosarcoma of pars sacralis | - | - |
| 74 | | Well-differentiated chondrosarcoma of right femur | + | + |
| 75 | | Mesenchymal chondrosarcoma of pars sacralis | + | - |
| 76 | 피부 | Squamous cell carcinoma of cheek | + | + |
| 77 | 혀 | Squamous cell carcinoma of lip | + | + |
| 78 | 코 | Squamous cell carcinoma of nose | + | + |
| 79 | 혀 | Squamous cell carcinoma of pharynx | + | + |
| 80 | 후두 | Squamous cell carcinoma of larynx | + | + |
| 81 | | Squamous cell carcinoma of larynx | + | + |
| 82 | 인두 | Diffuse B-cell lymphoma of pharynx | - | - |
| 83 | 후두 | Squamous cell carcinoma of larynx | + | + |
| 84 | 코 | Squamous cell carcinoma of nasopharynx | - | - |
| 85 | 혀 | Squamous cell carcinoma | + | + |
| 86 | | Embryonal rhabdomyosarcoma | - | + |
| 87 | | Mucoepidermoid carcinoma | + | + |
| 88 | 지방조직 | Mucoid liposarcoma of left leg | + | + |
| 89 | 섬유조직 | Isolated fibroma of chest wall | - | - |
| 90 | | Fibrosarcoma of left forearm | + | + |
| 91 | 갑상선 | Medullary carcinoma | + | + |
| 92 | | Papillary carcinoma | + | + |
| 93 | | Diffuse B-cell lymphoma | - | - |
| 94 | 피부 | Malignant melanoma of anus margin | + | + |
| 95 | | Basal cell carcinoma of scalp | - | - |
| 96 | | Squamous cell carcinoma of left chest wall | + | + |

[0195]

[실시예 9]

[0197]

혈액으로부터 분리된 엑소좀 중의 CNGB3 양을 측정하여, CNGB3 고발현 질환 환자와 CNGB3 고발현 질환의 비발현자를 식별할 수 있는지 조사하였다. 한편, 이후의 실험은 하마마츠 의과대학 제도 심사 위원회의 승인을 받아 이루어졌다.

[0198]

<혈청 샘플>

[0199]

정상인(종류를 가지지 않고, 아무런 질환의 이환이 확인되지 않으며, 건강하다고 예상되는 사람) 2명 및 하마마츠 의과대학 대학병원의 환자(난소암 환자 3명, 자궁체암 환자 3명, 유방암 환자 3명, 자궁경 암환자 1명, 대장암 환자 2명, 자궁 내막증 환자 3명 및 자궁 선근증 환자 1명)으로부터 채취된 혈액을 원심 분리하고, 얻어진 혈청 앤리퀴트를 -80°C에서 보존하였다. 자궁 선근증 환자는 자궁 내막증과 자궁 근종이 모두 발병한 환자이다.

[0200]

<엑소좀 분리>

[0201] 엑소좀은 Exosome Isolation Kit(후지 필름·와코 순약사제)를 이용하여 제조자의 사용 설명서에 따라 혈청으로부터 단리하였다. 구체적으로는, 우선, 혈청을 $1,000 \times g$, 4°C 에서 20분간 원심 분리하고, 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 $10,000 \times g$, 4°C 에서 30분간 원심 분리하고, 상등액을 새로운 튜브에 옮겼다. 계속해서, 이 상등액 1.0mL 를 엑소좀 포획 비즈와 4°C 에서 180분간, 로테이터로 혼합하였다. 그 후, 해당 포획 비즈를 세정한 후, $100\text{ }\mu\text{L}$ 의 용출 버퍼로 엑소좀을 용출하고 -20°C 에서 보존하였다.

[0202] <펩타이드 합성>

[0203] Z13 펩타이드(VRRADNRPG : 서열 번호 3)에 비오틴을 결합시킨 비오틴화 Z13 펩타이드(L-아미노산으로 이루어지는 펩타이드)는 GenScript사에 의해 합성된 것을 이용하였다.

[0204] <아비딘 블로팅>

[0205] $800\text{ }\mu\text{L}$ 의 혈청으로부터 단리된 엑소좀을 농축 Laemmli 완충액과 혼합하여 측정 샘플을 조제하였다. 상기 측정 샘플을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 이어서 PVDF막으로 옮겼다. PVDF막을 실온에서 60분간, 5% BSA 함유 TBST($0.1\text{v/v}\text{ Tween-20}$) 안에서 블로킹하였다. 블로킹 후의 PVDF막은, 세정 후 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 의 비오틴화 Z13 펩타이드 함유 TBST 안에서 4°C 에서 하룻밤 인큐베이트하였다. 그 후, 상기 막을 TBST로 세정하고, 이어서 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ HRP(서양 고추냉이 폐록시다아제) 결합 아비딘(Thermo Fisher Scientific사제) 함유 TBST 안에서 실온에서 60분간 인큐베이트하였다. 상기 막 상의 CNGB3는 CCD 카메라 시스템(ATTO 사제) 및 ECL prime(GE Healthcare사제)를 이용하여 검출하였다. 덴시트메트리 분석은, 화상 해석 소프트웨어 「CS Analyzer 4」(ATTO 사제)을 이용하여 행하였다.

[0206] <통계 분석>

[0207] 모든 분석은 의학 통계 소프트웨어 「GraphPad Prism 6」(GraphPad Software 사제)을 이용하여 행하였다.

[0208] 각 측정 샘플의 아비딘 블로팅의 결과로 얻어진 CNGB3의 밴드의 시그널 강도 및 그 상대값(정상인 1의 시그널 강도를 1로 한 상대값)를 표 22에 나타낸다. 단, 유방암 환자 1 및 2는, 소량의 혈청 밖에 확보할 수 없었기 때문에, $100\text{ }\mu\text{L}$ 의 혈청으로부터 단리한 엑소좀을 이용하고, 유방암 환자 3은 $37.5\text{ }\mu\text{L}$ 의 혈청으로부터 단리한 엑소좀을 이용하였다. 그 때문에, 유방암 환자 샘플의 시그널 강도는 혈청 사용량의 역수를 곱함으로써 보정을 행하였다.

표 22

| 피험자 샘플 | 시그널 강도 | 상대 시그널 강도 |
|------------|----------|-----------|
| 건강인 1 | 1082305 | 1.00 |
| 건강인 2 | 1188517 | 1.10 |
| 난소암 환자 1 | 4377691 | 4.04 |
| 난소암 환자 2 | 3907260 | 3.61 |
| 난소암 환자 3 | 3620987 | 3.35 |
| 자궁경암 환자 1 | 2681313 | 2.48 |
| 자궁경암 환자 2 | 2939504 | 2.72 |
| 자궁경암 환자 3 | 14049406 | 12.98 |
| 유방암 환자 1 | 18864576 | 17.43 |
| 유방암 환자 2 | 41851784 | 38.67 |
| 유방암 환자 3 | 20114133 | 18.58 |
| 자궁경암 환자 1 | 3480924 | 3.22 |
| 대장암 환자 1 | 6057912 | 5.60 |
| 대장암 환자 2 | 2285673 | 2.11 |
| 자궁내막증 환자 1 | 13117100 | 12.75 |
| 자궁내막증 환자 2 | 4358049 | 4.24 |
| 자궁내막증 환자 3 | 3454806 | 3.36 |
| 자궁선근증 환자 1 | 5835780 | 5.67 |

[0209]

[0210] 이 결과, 모든 샘플에서 CNGB3의 밴드가 검출되고, 이러한 엑소좀에는 CNGB3가 포함되어 있는 것이 확인되었다. 암환자, 자궁내막증 환자 및 자궁선근증 환자로부터 분리된 엑소좀의 CNGB3 양은 정상인으로부터 분리된 엑소좀의 2배 이상이었다. 이러한 결과로부터, 종양 환자, 자궁내막증 환자 및 자궁선근증 환자와 같은, 질환의 원인 세포로 CNGB3가 고발현되고 있는 환자의 혈청으로부터 분리된 엑소좀에는, 정상인의 혈청으로부터 분리된

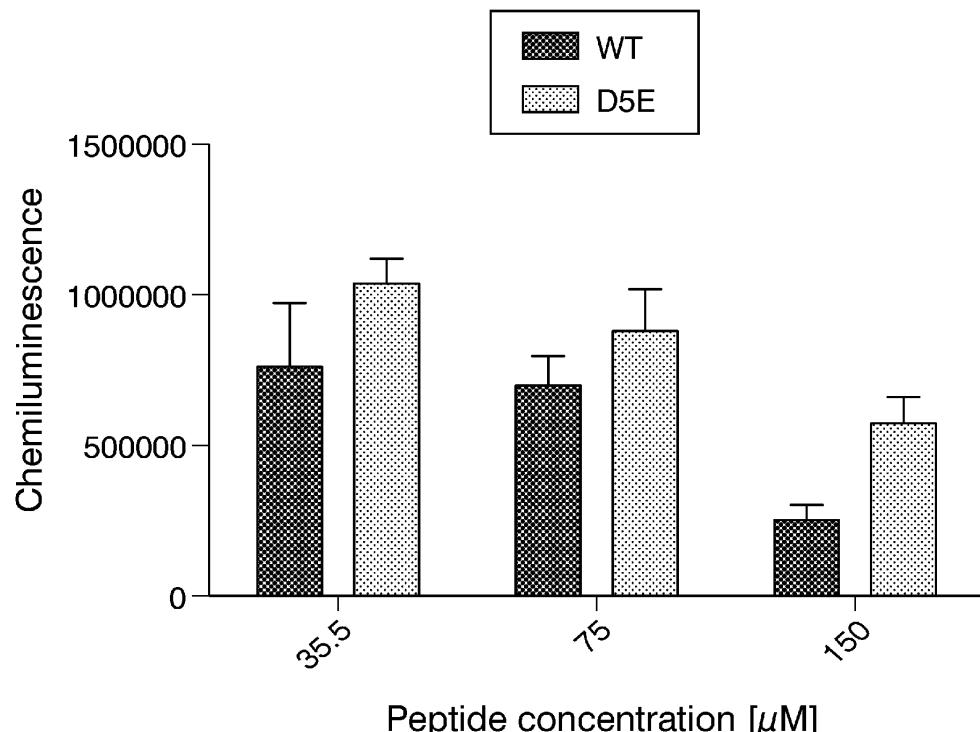
엑소좀보다 유의미한 CNGB3가 포함되어 있고, 따라서, 적절한 기준값(컷오프값)을 설정함으로써 엑소좀 중의 CNGB3의 양에 근거하여 CNGB3 고발현 질환의 발증 가능성을 평가할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0211]

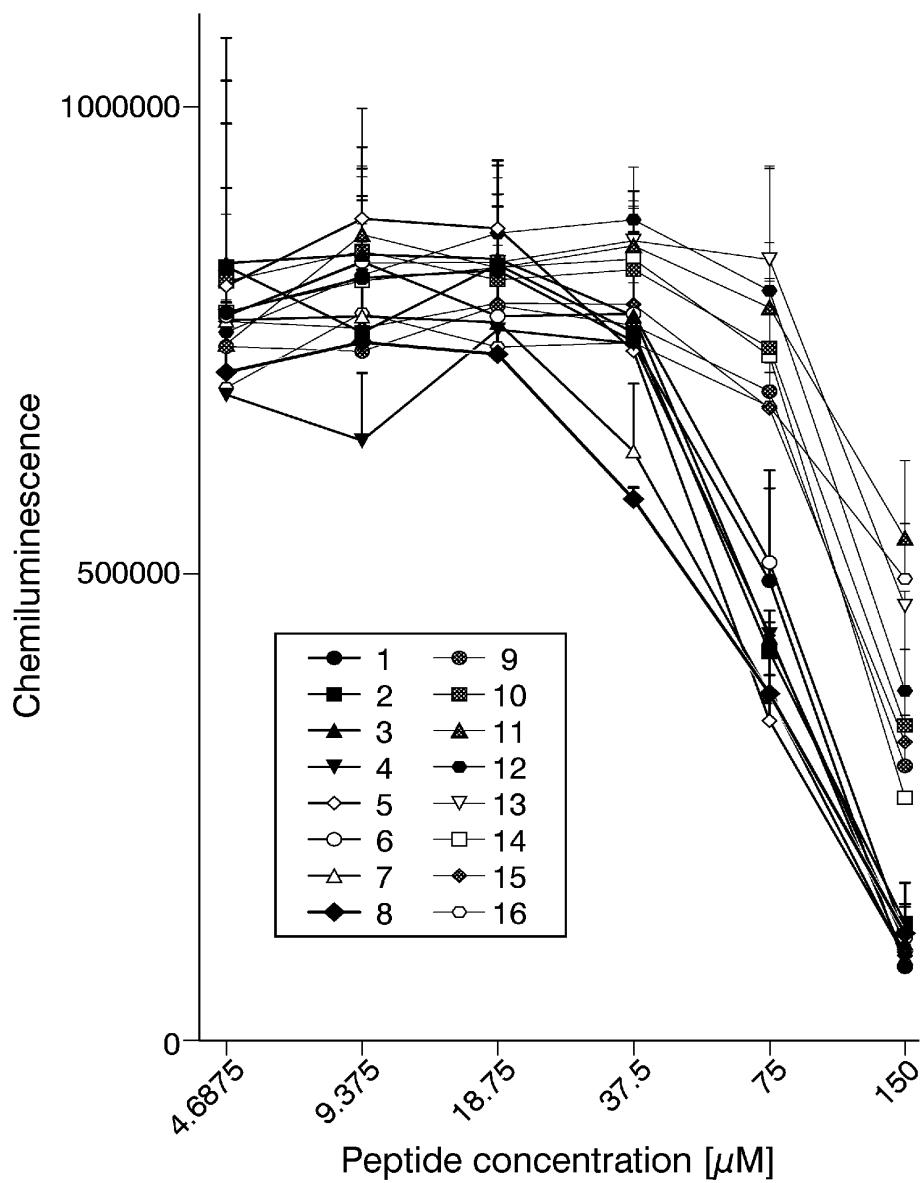
또한, 정상인의 엑소좀에도 매우 소량이지만 CNGB3가 존재하고 있는 것이 확인되었다. 이는, CNGB3 결합성 웨타이드와 같은 CNGB3와의 결합성이 높은 분자를 이용함으로써, 혈청 중의 엑소좀의 CNGB3를 매우 고감도로 검출할 수 있었기 때문으로 추측된다. 정상인의 체내에 있는 지극히 미량의 암 세포로부터 방출된 CNGB3를 포함하는 엑소좀을 검출할 수 있던 것으로부터, CNGB3 결합성 웨타이드를 이용함으로써 혈청 중의 엑소좀을 검사 대상 물체로 한 경우에도, 진행암이 검출 가능할 뿐만 아니라, 매우 조기의 암의 검출도 가능함을 기대할 수 있다.

도면

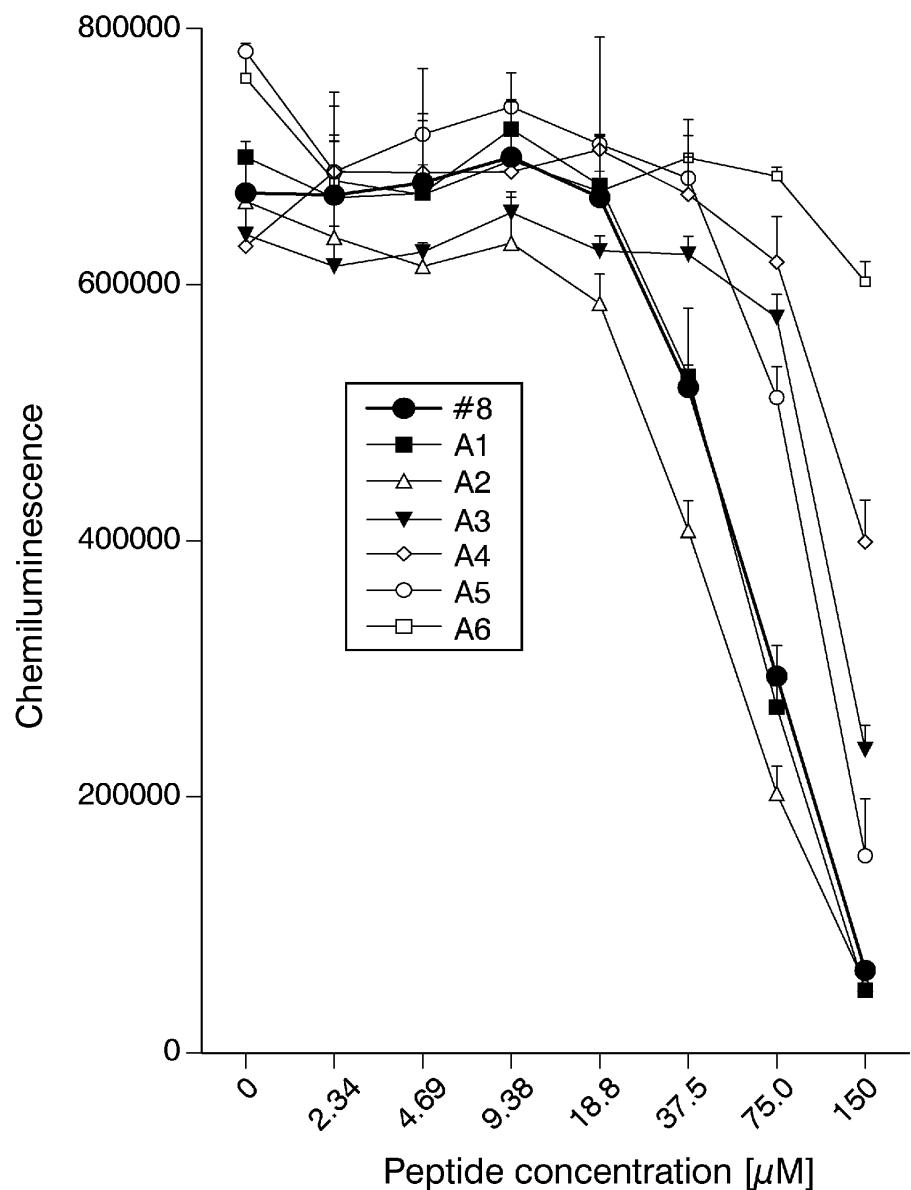
도면1



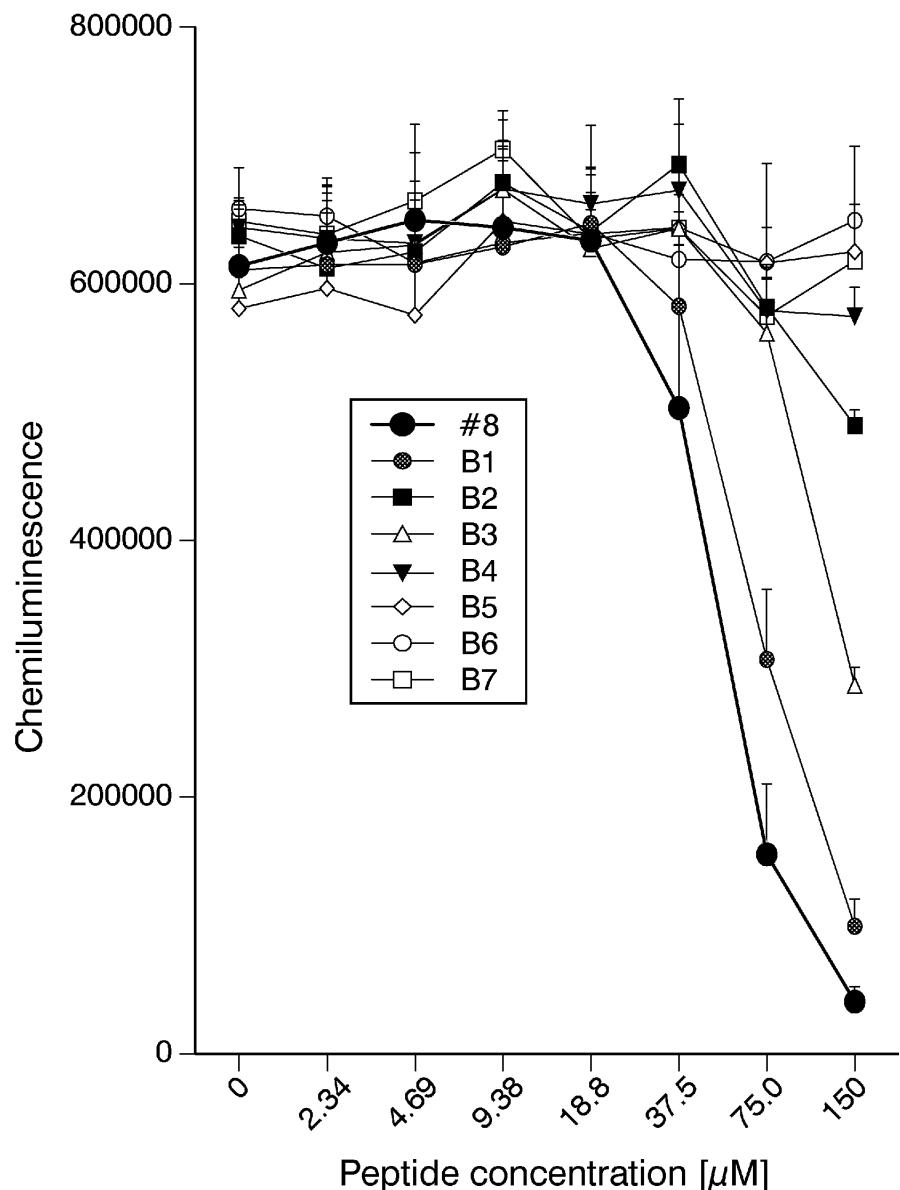
도면2



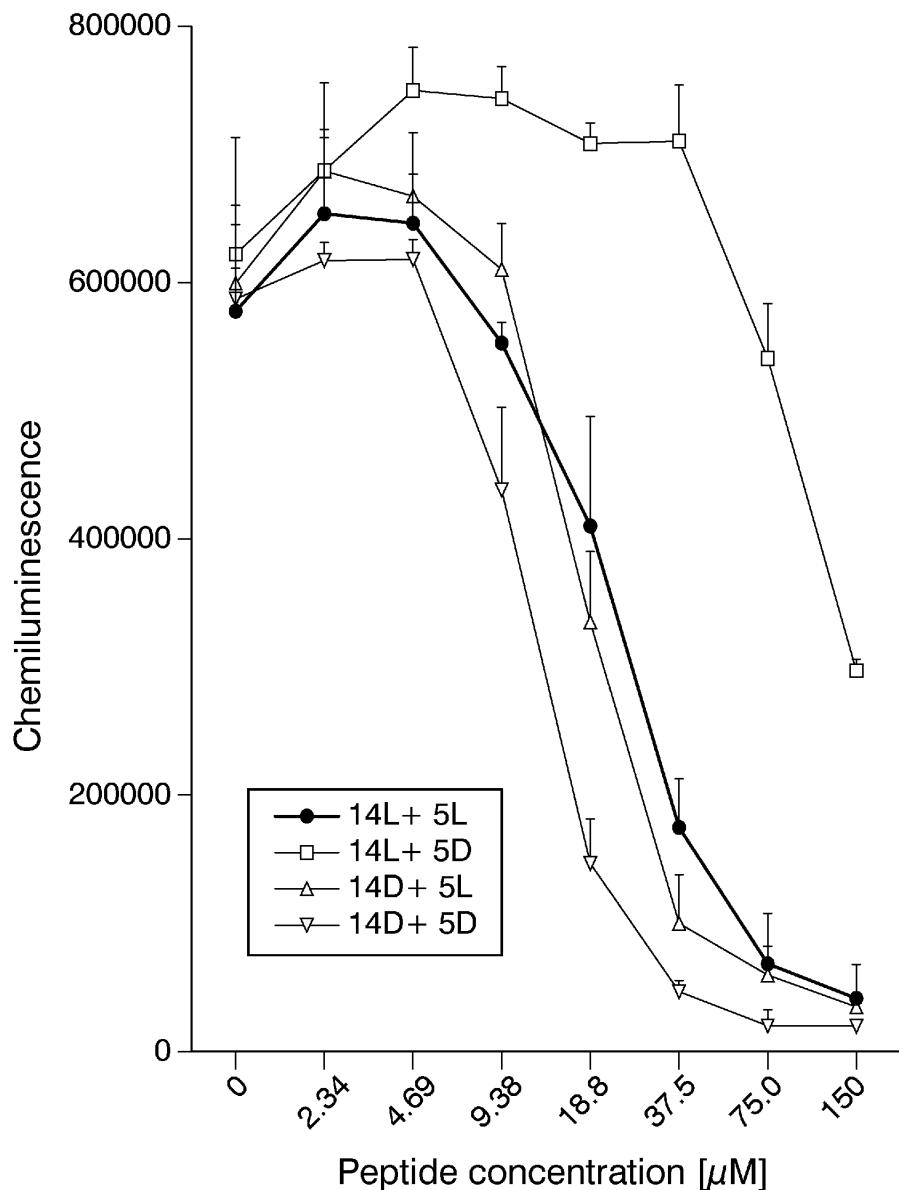
도면3



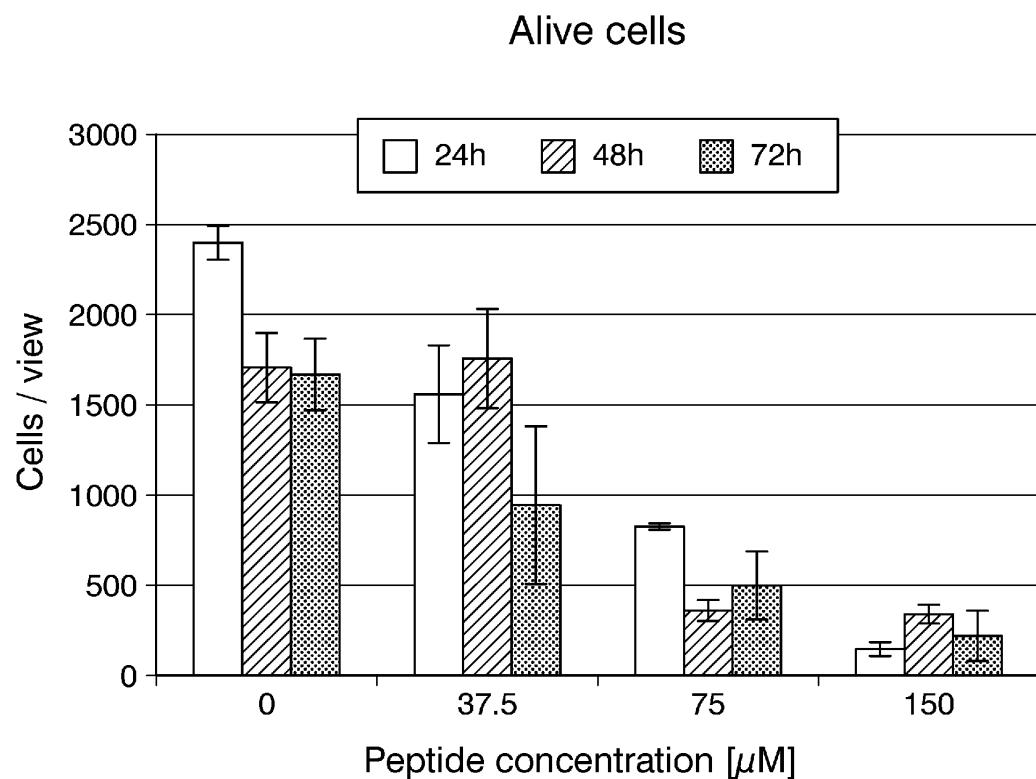
도면4



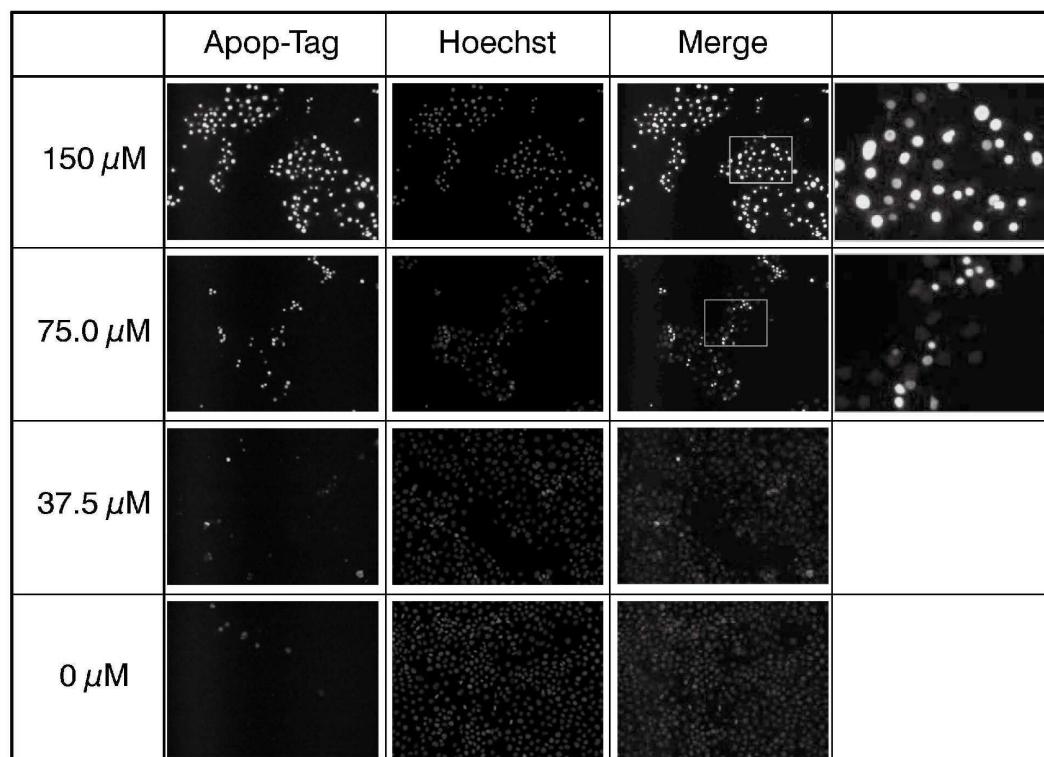
도면5



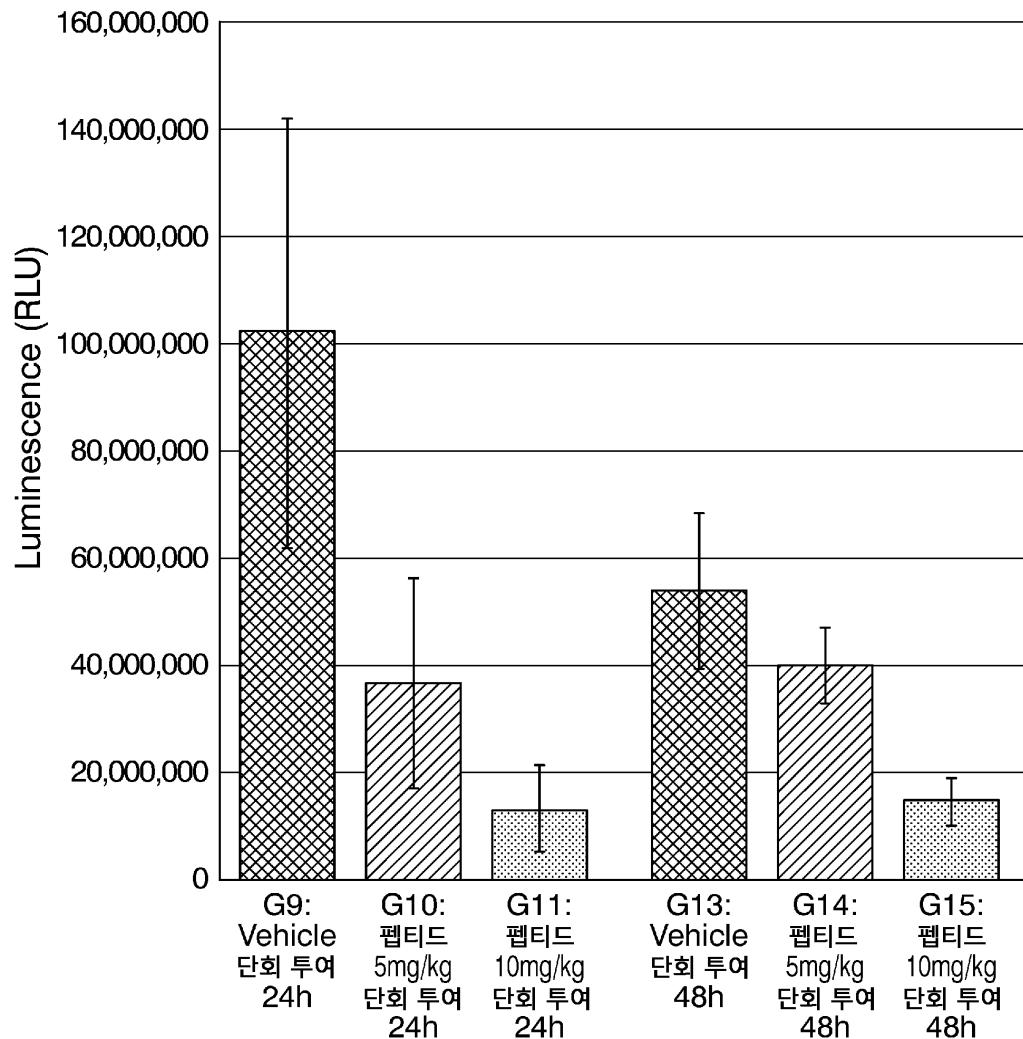
도면6



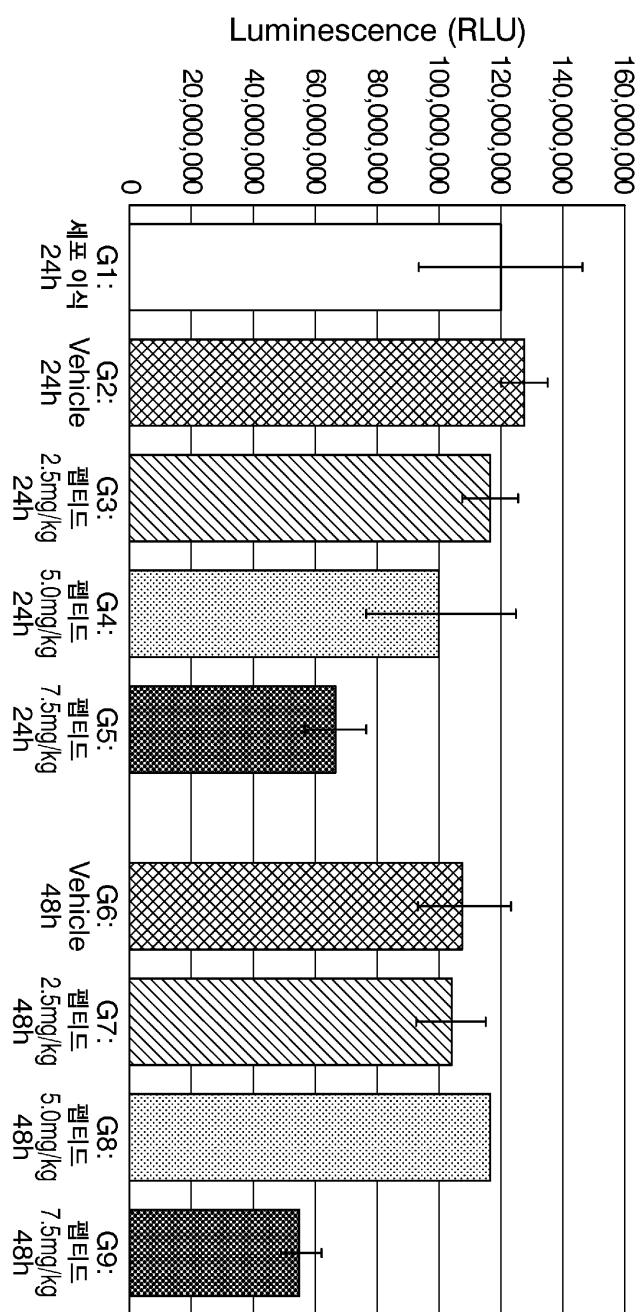
도면7



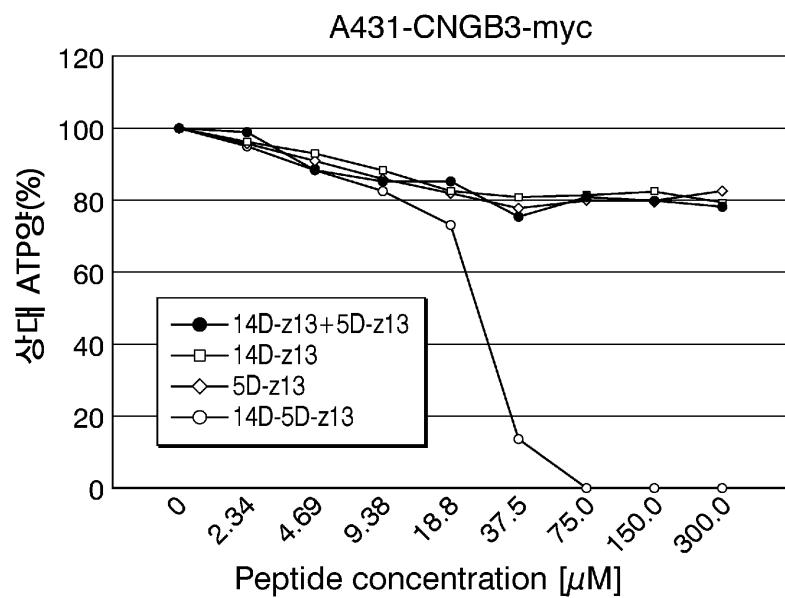
도면8



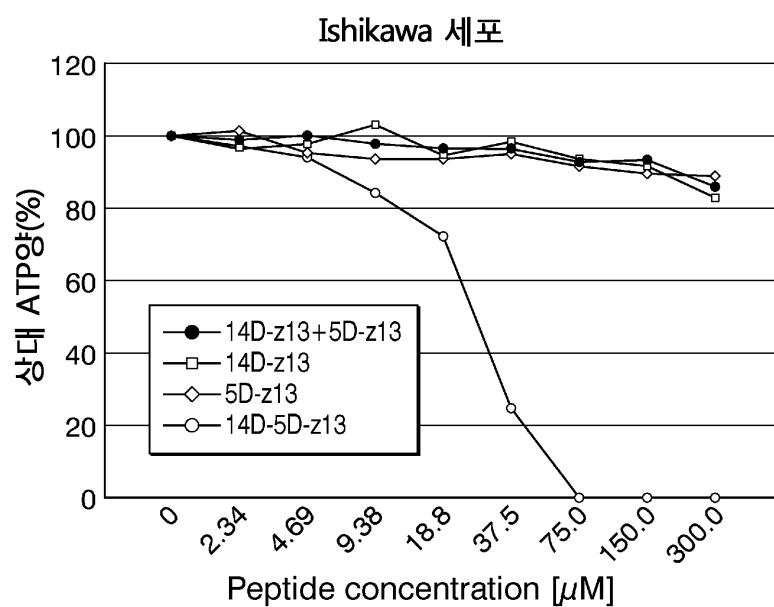
도면9



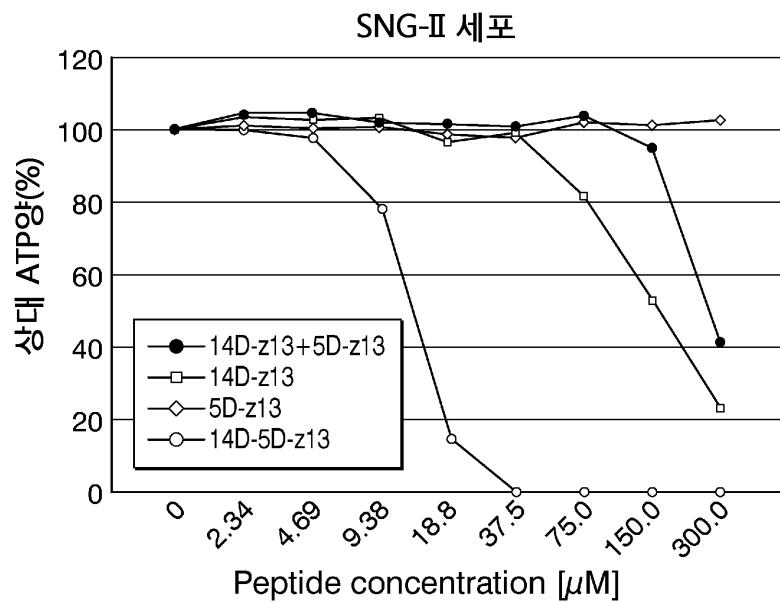
도면10



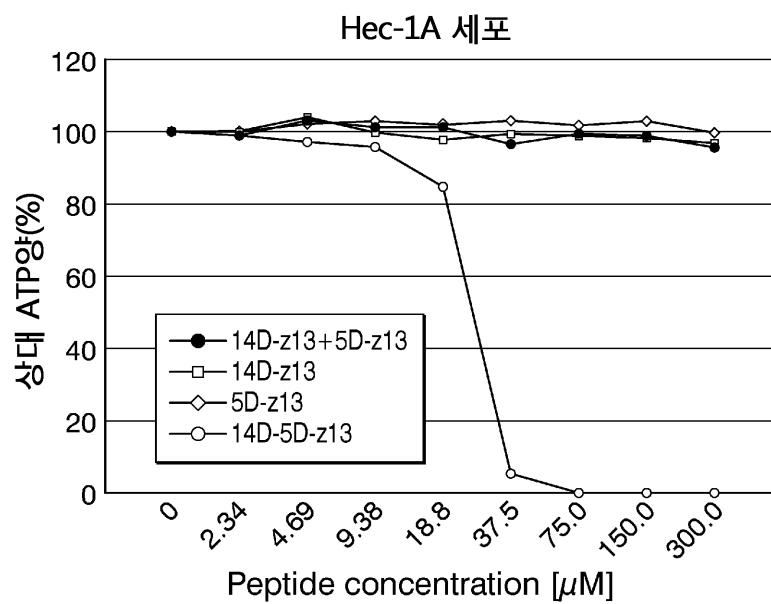
도면11



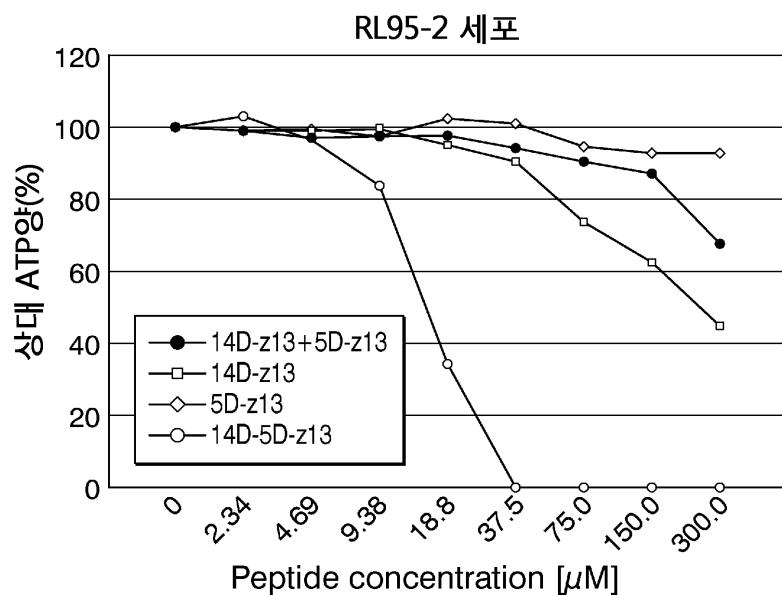
도면12



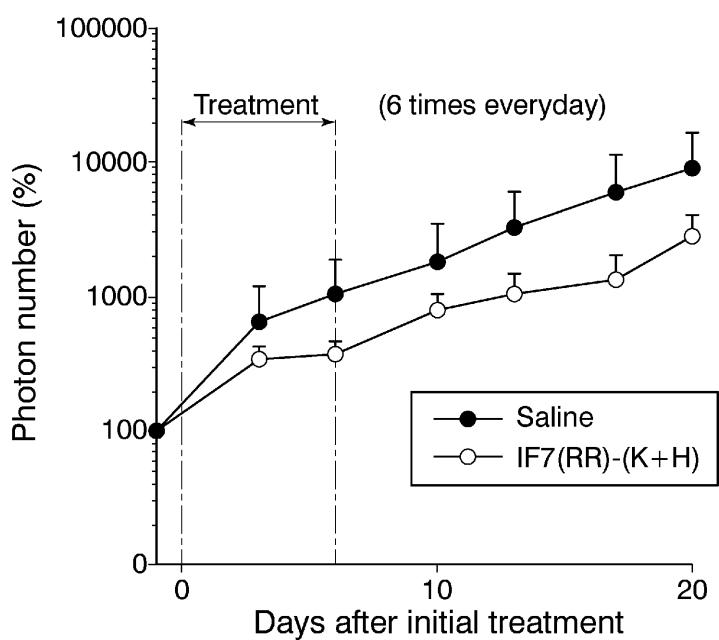
도면13



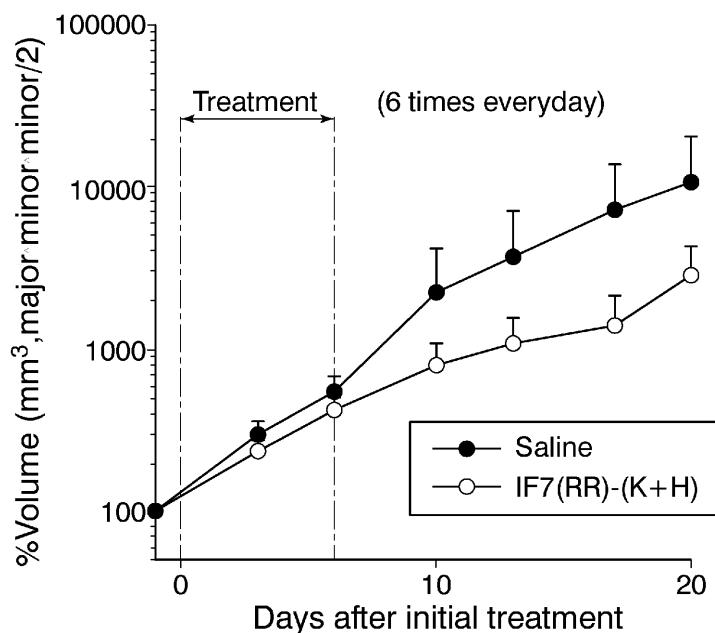
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Hamamatsu University School of Medicine
 <120> Cell Killing Agent
 <130> PC26227
 <160> 42
 <210> 1
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Effector peptide
 <400> 1
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: CNGB3 binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 2

Val Arg Arg Ala Xaa Asn Xaa Pro Gly

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Z13 peptide

<400> 3

Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: CNGB3 binding peptide

<400> 4

Val Arg Arg Ala Glu Asn Arg Pro Gly

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: CNGB3 binding peptide

<400> 5

Val Arg Arg Ala Asn Asn Leu Pro Gly

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: CNGB3 binding peptide

<400>

> 6

Val Arg Arg Ala Asn Asn Arg Pro Gly

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: IF7 peptide

<400> 7

Ile Phe Leu Leu Trp Gln Arg

1 5

<210> 8

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(14)-Z13 peptide

<400> 8

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Val Arg Arg Ala

20 25 30

Asp Asn Arg Pro Gly

35

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(14)-D5E peptide

<400> 9

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Val Arg Arg Ala

20 25 30

Glu Asn Arg Pro Gly

35

<210> 10

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(13)-Z13 peptide

<400> 10

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp

20 25 30

Asn Arg Pro Gly

35

<210> 11

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(12)-Z13 peptide

<400> 11

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn

20 25 30

Arg Pro Gly

35

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(11)-Z13 peptide

<400> 12

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg

20 25 30

Pro Gly

<210> 13

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(10)-Z13 peptide

<400> 13

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro

20 25 30

Gly

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(9)-Z13 peptide

<400> 14

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(8)-Z13 peptide

<400> 15

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 16

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25 30

<210> 17

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(14)-Z13 peptide

<400> 17

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Val Arg Arg Ala

20 25 30

Asp Asn Arg Pro Gly

35

<210> 18

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400> 18

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp

20 25 30

Asn Arg Pro Gly

35

<210> 19

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400> 19

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn

20 25 30

Arg Pro Gly

35

<210> 20

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400> 20

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg

20 25 30

Pro Gly

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400>

> 21

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro

20 25 30

Gly

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400> 22

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25 30

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400> 23

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25 30

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: HLAH(14)-KLAK(13)-Z13 peptide

<400> 24

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu

1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25 30

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(6)-Z13 peptide

<400> 25

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 26

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(5)-Z13 peptide

<400> 26

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(4)-Z13 peptide

<400> 27

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 28

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(3)-Z13 peptide

<400> 28

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(2)-Z13 peptide

<400> 29

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 30

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(1)-Z13 peptide

<400> 30

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Val

1 5 10 15

Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(13)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 31

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala His Leu Ala

1 5 10 15

His Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(12)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 32

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu His Leu Ala His

1 5 10 15

Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 33

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(11)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 33

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu

1 5 10 15

Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 34

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(10)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 34

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala His Leu Ala His

1 5 10 15

His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 35

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(9)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 35

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu His Leu Ala His Leu Ala His

1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 36

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(8)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 36

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys His Leu Ala His Leu Ala His Val

1 5 10 15

Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(7)-HLAH(7)-Z13 peptide

<400> 37

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu Ala His Val Arg

1 5 10 15

Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20

<210> 38

<211> 23

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14D)-Z13 peptide

<400> 38

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Val Arg

1 5 10 15

Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20

<210> 39

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: KLAK(14)-HLAH(5)-Z13 peptide

<400> 39

His Leu Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

1 5 10

<210> 40

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: IF7(RR)-(K+H) peptide

<400> 40

Ile Phe Leu Leu Trp Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys

1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu

20 25

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Z24 peptide

<400> 41

Met Gln Arg Thr Arg Ala Thr Pro Gly

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Z11 peptide

<400> 42

Val Arg Ser Ser Arg Ser Thr Pro Gln

1 5