



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0068981
(43) 공개일자 2019년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0169281
(22) 출원일자 2017년12월11일
심사청구일자 2017년12월11일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김태형
광주광역시 서구 풍암동 동부센트레빌 104-602
박정희
광주광역시 광산구 월계동 대우아파트 108-102
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대용, 공병욱

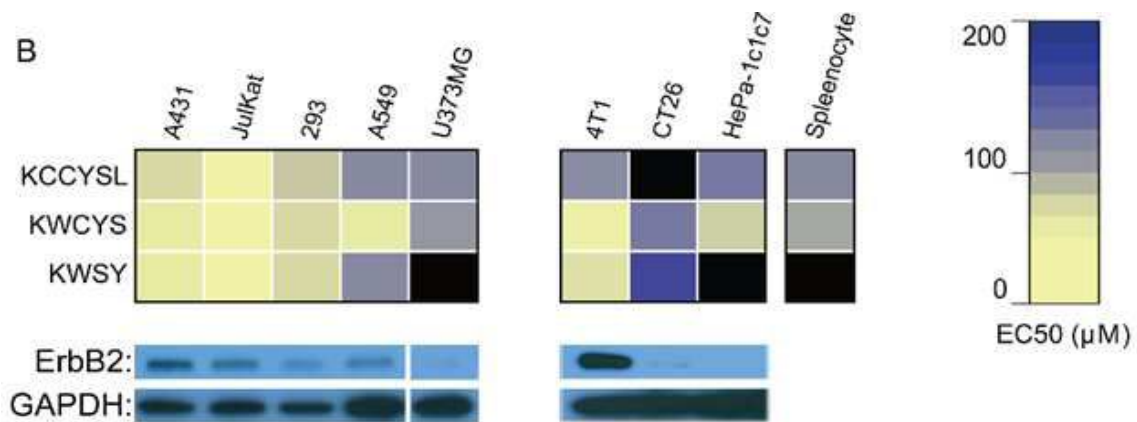
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 ErbB-2 표적화 암세포 특이적 세포괴사 유도 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 암세포를 특이적으로 죽이는 세포사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세포괴사를 일으키는 Noxa 단백질의 MTD 부분의 펩타이드와, 이를 암세포에 특이적으로 많이 발현되는 ErbB-2에 표적화시키는 펩타이드를 융합한 암세포 특이 세포괴사유도 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 ErbB-2를 표적화 하도록 디자인된 펩타이드 KWSY를 MTD 펩타이드의 N말단에 융합한 펩타이드가 ErbB-2를 발현하는 여러 암세포주들에서 빠르고 강한 세포괴사를 유도하였으며, 이는 암세포만을 특이적으로 제거하는 표적항암제로서 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

한지혜

광주광역시 남구 방림동 용대로 194 302호

명승현

광주광역시 북구 북문대로 242번길 50, 푸른마을
205-1103

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2025

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 세포괴사를 이용한 암 내성 세포 극복 전략

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드.

청구항 2

서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터.

청구항 4

서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 세포.

청구항 5

서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 간암, 피부 흑색종, 위암, 췌장암, 대장암, 난소암, 신장 세포암, 전립선암 또는 뇌종양인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암세포를 특이적으로 죽이는 세포괴사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세포괴사를 일으키는 Noxa 단백질의 MTD 부분의 펩타이드와 이를 암세포에 특이적으로 많이 발현되는 ErbB-2에 표적화시키는 펩타이드를 융합한 암세포 특이 세포괴사 유도 펩타이드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 상피 세포 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR) 계열 단백질들은 세포의 분열과 분화 및 종양 형성 과정에서 중요한 역할을 한다. 그 중에서도 ErbB-2(Her2/Neu)는 유방암, 위암, 비-소세포 폐암 및 난소암과 같은 다양한 암에서 과다 발현된다고 알려져 있다.

[0003] ErbB-2의 증폭은 ErbB-1과 ErbB-3의 결합을 통해 PI3K/AKT 등의 강력한 종양유발 신호를 일으킬 뿐 아니라, 5-FU와 같은 항암제를 통한 아포토시스(apoptosis) 신호에서 세포를 보호하는 역할도 한다. 특히, 암세포에서 ErbB-2의 증가는 악성종양으로의 분화를 촉진하여 암환자들에게서 보이는 나쁜 예후의 원인이 되기도 한다.

[0004] 티로신 인산화효소(Tyrosine kinase) 억제제인 아파티닙(Afatinib) 및 라파티닙(Lapatinib)은 이를 이용해 ErbB-2가 과다 발현된 암환자들을 치료하기 위해 만들어진 항암제이며, ErbB-2의 단일클론항체인 트라스투주맙(Trastuzumab)은 ErbB-2가 과다 발현된 유방암을 치료하기 위한 항암제이다. 이러한 항암제들은 실제 임상에서 환자들에게 좋은 결과를 나타내었으며, 이는 ErbB-2가 항암치료를 위한 좋은 표적이라는 것을 나타낸다.

- [0005] 하지만, 이러한 약물들은 ErbB-2의 돌연변이를 가지는 내성세포의 형성 또한 촉진하였으며, 더 악성의 종양을 형성하게 하는 부작용을 초래하기도 하였다. 이는 ErbB-2의 돌연변이에 영향을 받지 않는 새로운 항암제 개발의 필요성을 보여준다.
- [0006] 종양에 특이적으로 항암제를 도달시키기 위한 수단으로 여러 가지 종양 표적화 펩타이드도 이용되고 있다. KCCYSL(Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu)는 박테리오파지를 이용한 방법으로 선별된 ErbB-2 표적화 펩타이드로 항암제 또는 진단시약과의 결합을 통해 유방암과 난소암의 진단과 치료에 쓰이고 있다.
- [0007] Noxa 단백질의 C-말단 부위에 위치하는 미토콘드리아 표적화 도메인(mitochondrial targeting domain; MTD)는 10개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 세포 투과 펩타이드와 결합하여 세포 내로 들어가서 미토콘드리아에 직접 작용하여 세포괴사를 일으킨다. MTD 단독으로는 세포 내로 들어갈 능력이 없으므로 세포괴사를 일으키지 못하며, 세포 투과 펩타이드 외에도 NRP-1(neuropilin 1) 표적화 펩타이드(RPARPAR: Arg-Pro-Ala-Arg-Pro-Ala-Arg)와 융합시켜 세포사를 일으킬 수 있음을 본 발명자의 연구에서 밝혀낸 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에, 본 발명자들은 MTD 및 KCCYSL를 융합하여, ErbB2가 과발현된 세포의 괴사를 유도하는 융합 펩타이드(KWSY-MTD로 명명)를 개발하였으며, 상기 융합 펩타이드가 체외 및 생체 내에서 ErbB2 발현 종양 세포를 표적화함으로써 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 포함하는 신생혈관 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드의 암 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명은 암세포를 특이적으로 죽이는 세포괴사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세포괴사를 일으키는 Noxa 단백질의 MTD 부분의 펩타이드와 이를 암세포에 특이적으로 많이 발현되는 ErbB-2에 표적화시키는 펩타이드를 융합한 암세포 특이 세포괴사 유도 펩타이드에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명자들은 MTD 및 KCCYSL를 융합하여, ErbB2가 과발현된 세포의 괴사를 유도하는 융합 펩타이드(KWSY-MTD로 명명)를 개발하였으며, 상기 융합 펩타이드가 체외 및 생체 내에서 ErbB2 발현 종양 세포를 표적화함으로써 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.
- [0019] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0020] 본 발명의 일 예는 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드에 관한 것이다.
- [0021] 상기 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드는 서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서

열로 이루어진 융합 펩타이드일 수 있다.

- [0022] 상기 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.
- [0023] 본 발명의 펩타이드는 당업계에서 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).
- [0024] 본 발명의 다른 일 예는 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0025] 상기 폴리뉴클레오타이드는 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 암호화하는 코돈을 기초로 자동합성 기에서 화학합성하여 제조 또는 합성된 유전자의 PCR 증폭 또는 전사를 통해 제조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 예는 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터에 관한 것이다.
- [0028] 상기 용어 "백터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 백터, 코즈미드 백터 및 박테리오파아지 백터, 아데노바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 및 아데노연관 바이러스 백터와 같은 바이러스 백터를 포함한다. 상기 재조합 백터로 사용될 수 있는 백터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCR79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 재조합 백터는, 전형적으로 클로닝을 위한 백터 또는 발현을 위한 백터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 백터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 백터는 당업계에서 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0030] 상기 재조합 백터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 백터가 발현 백터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL^A 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 백터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 예는 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 세포에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포, 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으며, 원핵세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 백터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법

또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

- [0034] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 일 예는 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 상기 암은 폐암, 유방암, 간암, 피부 흑색종, 위암, 췌장암, 대장암, 난소암, 신장 세포암, 전립선암 또는 뇌종양인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에 따른 조성물 내의 유효성분으로서의 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드의 함량은 사용 형태 및 목적, 환자 상태, 증상의 종류 및 경중 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 또는 0.1 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%, 또는 0.1 내지 40 중량% 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 이 외에도 비강에 투여하는 국소 분무의 형태를 띌 수도 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연고제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 스프레이제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 암세포 특이적 세포괴사 유도 융합 펩타이드 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0042] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0043] 경구를 위한 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 연고제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0044] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제, 경피제 등이 포함된다.
- [0045] 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0046] 좌제의 제제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물을 인간에게 적용하는 구체적 예에 있어서, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행(standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다.
- [0048] 예를 들면, 본 발명의 약학적 조성물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로

경구, 구강 내 또는 허 밑 투여될 수 있다.

- [0049] 이러한 액체 제제는 현탁제(예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위텡솔(witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유(apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제형화 될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0051] 예컨대, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 0.1 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 0.5 내지 300 mg/kg일 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량이 상기 투여 용량 미만이면 유의성 있는 효과를 얻을 수 없으며, 그 이상을 초과하는 경우 비경제적일 뿐만 아니라 상용량의 범위를 벗어나므로 바람직하지 않은 부작용이 나타날 우려가 발생할 수 있으므로, 상기 범위로 하는 것이 좋다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명은 암세포를 특이적으로 죽이는 세포사 유도 펩타이드에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세포괴사를 일으키는 Noxa 단백질의 MTD 부분의 펩타이드와, 이를 암세포에 특이적으로 많이 발현되는 ErbB-2에 표적화시키는 펩타이드를 융합한 암세포 특이 세포괴사유도 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 ErbB-2를 표적화 하도록 디자인된 펩타이드 SWSY를 MTD 펩타이드의 N말단에 융합한 펩타이드가 ErbB-2를 발현하는 여러 암세포주들에서 빠르고 강한 세포괴사를 유도하였으며, 이는 암세포만을 특이적으로 제거하는 표적항암제로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 ErbB2 표적 펩타이드와 MTD의 융합 펩타이드를 보여주는 다이어그램이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 A431 세포에 각각 KCCYSL 단독, MTD 단독 및 융합 펩타이드를 2시간 동안 처리하고 MTS 분석법으로 측정된 세포 생존율 측정 결과 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 FaDu 및 MCF7 세포를 표시된 펩타이드로 처리하고 상대 세포 생존력을 색농도로 나타낸 그래프이다.
- 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따라 각각의 세포주를 KWSY:MTD, KWYA:MTD, KWT:MTD, KWTW:MTD, KWTY:MTD, RWYS:MTD, WYS:MTD, MTD:KWYS, KWPS:MTD를 처리하여 상대적인 세포 생존력을 색농도로 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 각각의 세포주를 KCCYSL:MTD, KWCYS:MTD 또는 KWSY-MTD로 처리하여 상대적인 세포 생존력을 색농도로 나타낸 그래프이다.
- 도 6는 본 발명의 일 실시예에 따라 표시된 세포사 정도는 색 농도로 표시됩니다. 파란색은 세포사가 일어나지 않고 밝은 노란색일수록 세포사가 많이 일어남을 나타낸다(Top panel). 상부 패널 상에 표시된 세포주로부터의 용해물을 항-ErbB2 및 항-GAPDH 항체를 사용하여 웨스턴 블랏 분석한 결과이다(하부 패널).
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 FaDu 세포를 항-ErbB2 항체, EGF, 대조군 단백질 또는 대조군 항체로 1 시간 동안 전 처리한 후 KWSY-MTD(20 μ M)를 1시간 동안 추가적으로 처리한 후 세포 생존력을 MTS 분석을 통해 측정한 결과 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 FaDu 세포를 항-ErbB2 항체, EGF, 대조군 단백질 또는 대조군 항체로 1 시간 동안 전 처리한 후 KWSY-MTD(20 μ M)를 1시간 동안 추가적으로 처리한 후 역상 광학 현미경을 이용하여 세포 이미지를 촬영한 결과이다.
- 도 9은 본 발명의 일 실시예에 따라 4T1 세포를 표시된 펩타이드(20 μ M)로 2 시간 동안 처리하여, PI 양성 세포 수를 측정한 결과 그래프 및 펩타이드로 처리된 세포의 조건화된 배지에서 HMGB1은 TCA 및 아세톤으로 침전시킨 후 항-HMGB1 항체(1:1000)를 사용하여 웨스턴 블랏한 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 10는 본 발명의 일 실시예에 따른 4T1 세포를 표시된 펩타이드(20 μ M)로 2 시간 동안 처리하여 관찰한 PI 형

광 이미지 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 마우스 간으로부터의 분리된 미토콘드리아를 각각의 펩타이드(20 μ M), 칼슘 이온(200 μ M) 또는 CsA(20 μ M)로 처리하고, 540 nm에서의 광학 밀도를 10 분마다 모니터링한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 KWSY-MTD(200 μ l of 0.2 mM per mouse) 또는 PBS를 CT26-보유 쥐의 꼬리 정맥 내로 2 일마다 4 회 투여하여 종양 성장 억제를 관찰한 그래프이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 KWSY-MTD(200 μ l of 0.2 mM per mouse) 또는 PBS를 4T1-보유 쥐의 꼬리 정맥 내로 2 일마다 4 회 투여하여 종양 성장 억제를 관찰한 그래프이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 융합 펩타이드(200 μ l of 0.2 mM per mouse) 또는 PBS를 FaDu를 함유한 SCID 마우스(n = 6)의 꼬리 정맥 내로 투여하여 종양 성장 억제를 관찰한 그래프이다.

KWSY-MTD (200 μ l of 0.4 mM) or PBS was i.v. injected into the tail vein of FaDu-bearing SCID mice (n=6).

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 FaDu를 함유한 SCID 마우스의 분리된 종양을 H&E로 염색하여 관찰한 사진이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 융단 펩타이드 또는 PBS가 주입된 BalB/C 마우스로부터 분리된 신장의 사진 및 신장을 H&E로 염색하여 광학 현미경을 사용하여 400 배 확대하여 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055]

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0057]

실시예 1. 펩타이드 합성

[0058]

펩타이드 합성은 Genescript(Piscataway, NJ, USA)에 의뢰하여 자동화된 대규모 고체상 합성법 (Large-Scale Solid Phase Peptide Synthesis)으로 이루어졌다. 이는 신속 역상 HPLC법(Rapid reverse phase HPLC)에 의해 정제되었으며 DMSO (Dimethyl sulfoxide)의 50% 수용액에 1mM의 농도로 녹여서 -20℃에서 보관하였다. 본 발명에서 사용된 펩타이드 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

[0059]

서열번호	N-말단	MTD	C-말단	서열목록
1	KWCYS	KLLNLISKLF		KWCYSKLLNLISKLF
2	KCWY	KLLNLISKLF		KCWYKLLNLISKLF
3	KWSY	KLLNLISKLF		KWSYKLLNLISKLF
4	KSWY	KLLNLISKLF		KSWYKLLNLISKLF
5	KSSYSL	KLLNLISKLF		KSSYSLKLLNLISKLF
6	KSSYS	LLNLISKLF		KSSYSKLLNLISKLF
7	KWYS	KLLNLISKLF		KWYSKLLNLISKLF
8	KWYA	KLLNLISKLF		KWYAKLLNLISKLF
9	KWY	KLLNLISKLF		KWYKLLNLISKLF
10	KWYW	KLLNLISKLF		KWYWKLLNLISKLF
11	KWYT	KLLNLISKLF		KWYTKLLNLISKLF
12	RWYS	KLLNLISKLF		RWYSKLLNLISKLF
13	WYS	KLLNLISKLF		WYSKLLNLISKLF
14		KLLNLISKLF	KWYS	KLLNLISKLFKWYS
15	KWPS	KLLNLISKLF		KWPSKLLNLISKLF

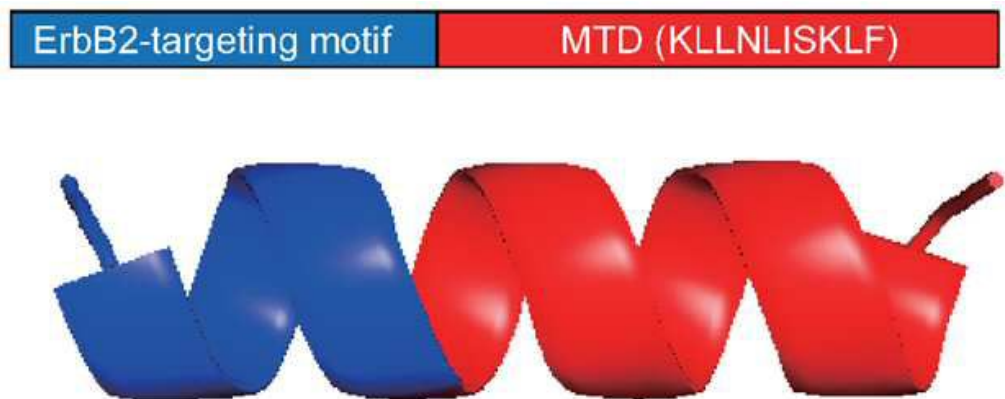
[0061]

실시예 2. 세포사 유도 활성의 측정

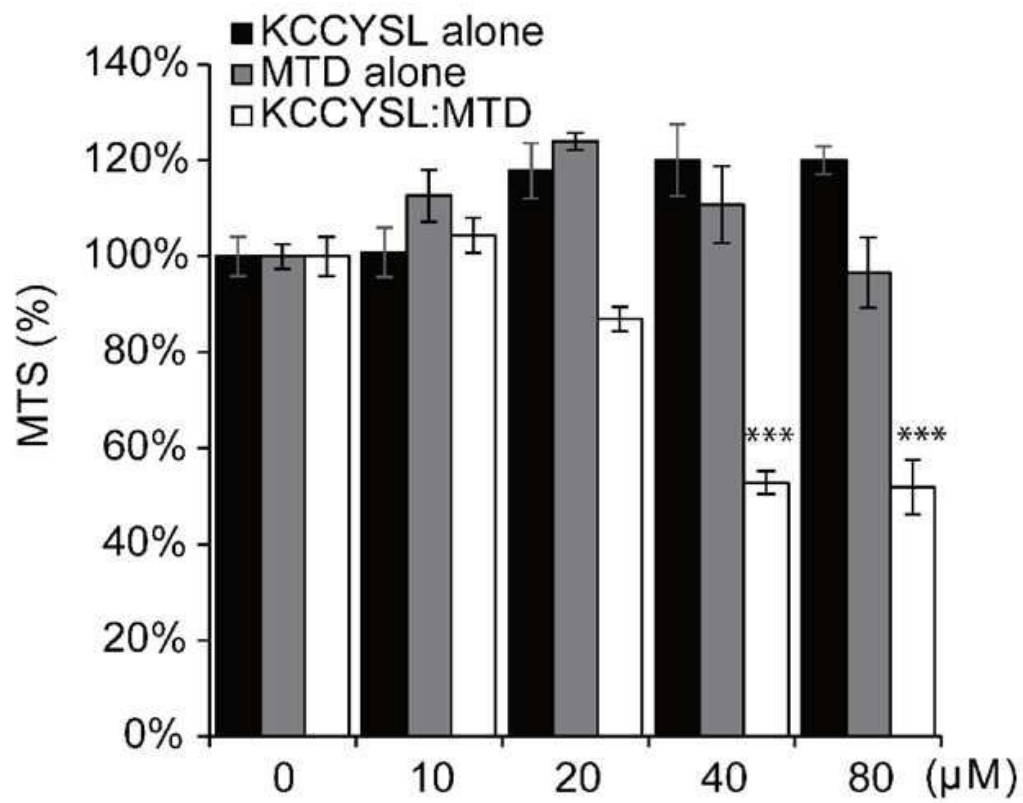
- [0062] 실시예 1에서 합성한 펩타이드들의 세포사 유도 활성을 알아보기 위하여, FaDu, MCF7, A432, Jurkat, 293, A549, U373MG, 4T1, CT26, HePa 등의 암세포주와 쥐(mouse)의 비장세포 (splenocyte)를 96-well plate에 well 당 2×10^4 개씩 배양하였다. 조건에 따라 펩타이드를 밤새 처리한 후 MTS 분석 키트(CellTiter 96 수용액, Promega, Madison, WI, USA, G3580)를 이용하여 세포의 생존율을 측정하여, 그 결과를 도 2 내지 도 6에 나타내었다.
- [0063] 도 2 내지 도 6을 통해 KWSY:MTD가 ErbB2의 발현 정도에 따라 세포괴사를 일으키고 있음을 확인할 수 있었다. 즉, KWSY:MTD가 A431, Jurkat 과 같은 ErbB2 발현이 높은 세포에서 세포괴사 정도가 높았고, CT26, U373MG, HePa-1c1c7과 같은 ErbB2 발현이 낮은 세포에서 세포괴사 정도가 낮음을 확인하였다.
- [0065] **실시예 3. 쥐(mouse)를 이용한 종양모델 시험**
- [0066] 동물 실험은 조선 대학교 기관 동물 관리 및 사용위원회의 지침에 따라 수행되었다. 융합 펩타이드 중 가장 뛰어난 암 세포 특이성을 보였던 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 실제 종양에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 쥐(mouse)를 이용한 종양모델 실험을 실시하였다. 암세포주의 유래가 쥐인 암세포주 4T1, CT26는 6주령의 BalB/C 마우스(OrientBio, 성남, 한국)에 접종 되었고, 암세포주의 유래가 사람인 암세포주 FaDu는 면역반응을 피하기 위하여 동일 주령의 SCID (Severe combined immunodeficiency) mouse에 접종 되었다. 4T1과 CT26 세포는 각각 2×10^5 개씩, FaDu 세포는 2×10^7 개씩 피하층(subcutaneous layer)에 접종 되었다.
- [0067] 조양이 생성된 후, KWSY:MTD는 꼬리의 정맥을 통해 0.2 mM의 농도로 200 μ L씩 주사되었으며 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다. 종양의 크기는 버니어캘리퍼스를 이용하여 측정되었고 하기의 계산식으로 계산하여, 그 결과를 도 12 내지 도 15에 나타내었다.
- [0068] [계산식]
- [0069] 종양의 크기(mm^3) = 길이(mm) $\times$ 폭(mm) $^2 \times 0.5$
- [0070] 도 12 및 도 13에서 확인할 수 있듯이, KWSY-MTD가 꼬리 정맥을 통해 마우스에 정맥 내 투여 된 경우 CT26 세포를 갖는 종양 조직에서 KWSY-MTD에 의한 종양 성장의 억제 는 보이지 않았지만, KWSY-MTD는 4T1 세포를 보유하는 종양 조직에서 킬링 활성을 나타내었다.
- [0071] 또한, 도 14에서 확인할 수 있듯이, FaDu 세포주는 인체의 인두 편평 세포 암종으로 ErbB2의 발현이 높고 FaDu 세포는 KWSY-MTD (10-20 μ M)에 민감하다. FaDu 세포를 이용한 이종 이식 모델에서 KWSY-MTD의 항암 효과를 확인 하기 위해, 성숙한 T 세포, B 세포 및 NK 세포가 없는 NOD-scidIL2Rgnull 마우스의 뒷면에 FaDu 세포의 종양 조직이 형성되었다.
- [0072] 도 14 및 도 15에서 확인할 수 있듯이, FaDu 세포를 보유한 종양 조직에서의 KWSY-MTD의 살상 활성은 유의 적이었도(도 14), H & E 염색에서 명백 하였다 (도 15). 또한, KWSY-MTD 처리 마우스 또는 비 처리 마우스의 신장 및 간 조직의 H & E 염색은 손상을 나타내지 않았다. 함께, 이 결과는 KWSY-MTD가 ErbB2를 발현하는 종양 세포를 표적으로 죽이고 간과 신장의 정상세포는 죽이지 않음을 나타낸다.
- [0074] **통계 분석**
- [0075] 통계 자료는 평균 $\pm$ 표준 편차로 나타내었다. 통계 분석은 ANOVA를 사용하여 두 그룹 간의 차이를 평가했다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 인정되었다.

도면

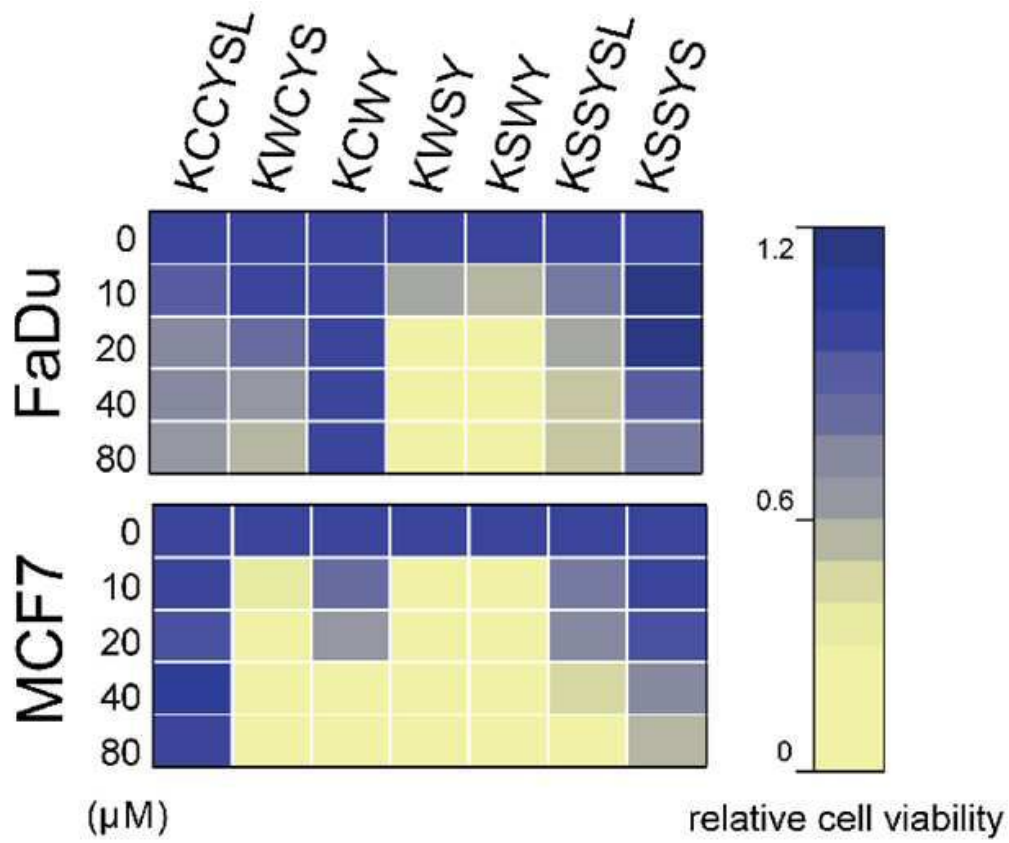
도면1



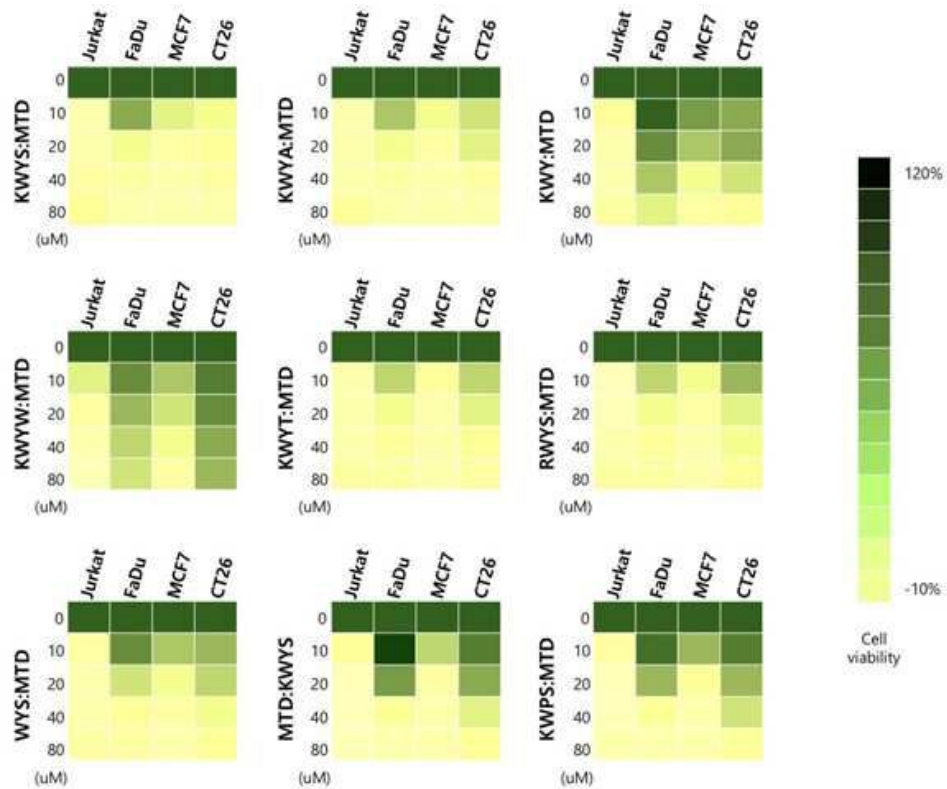
도면2



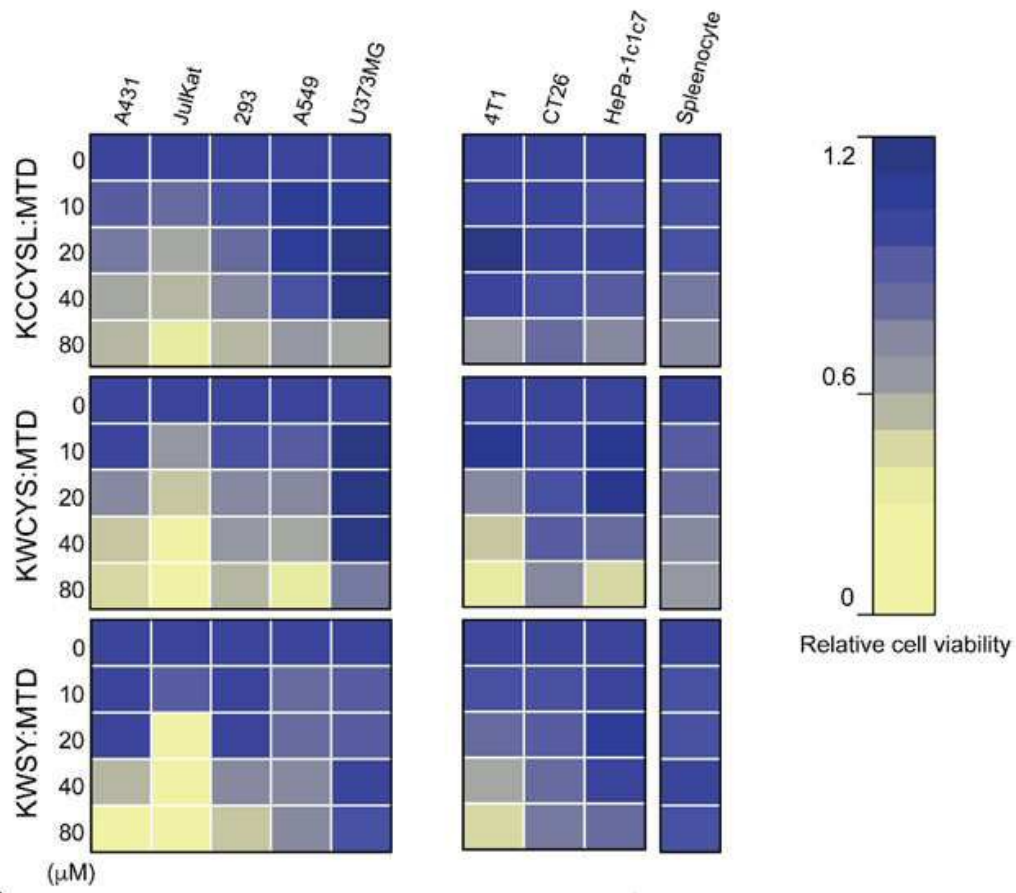
도면3



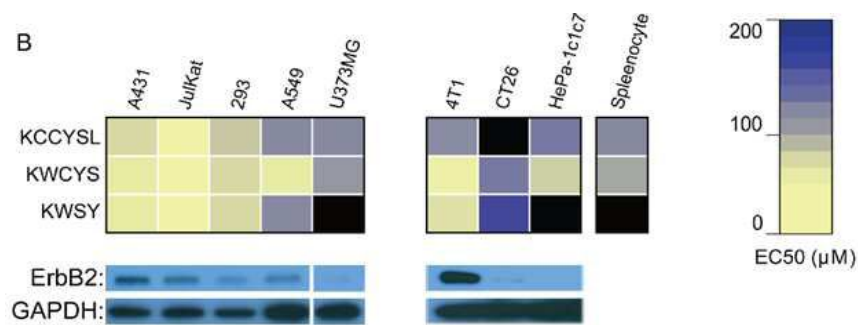
도면4



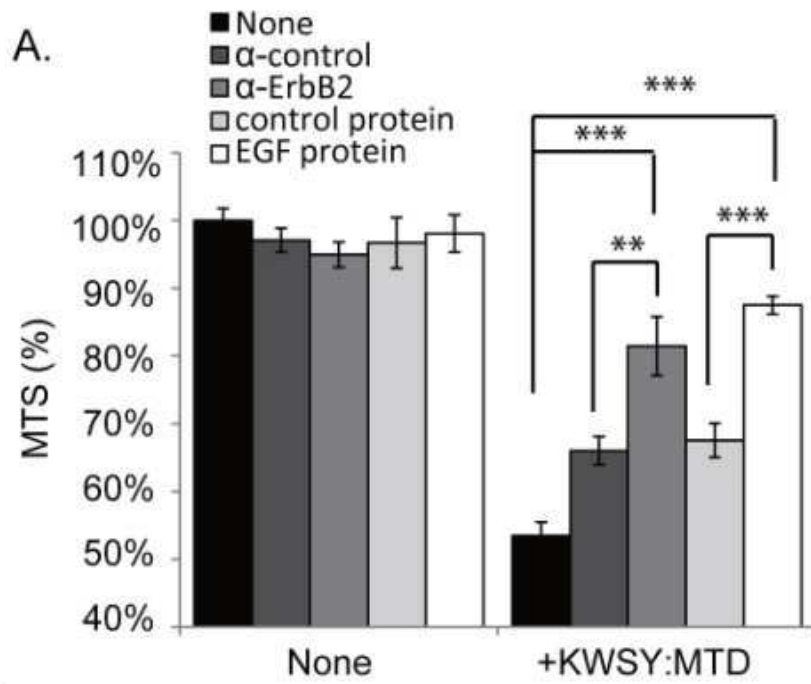
도면5



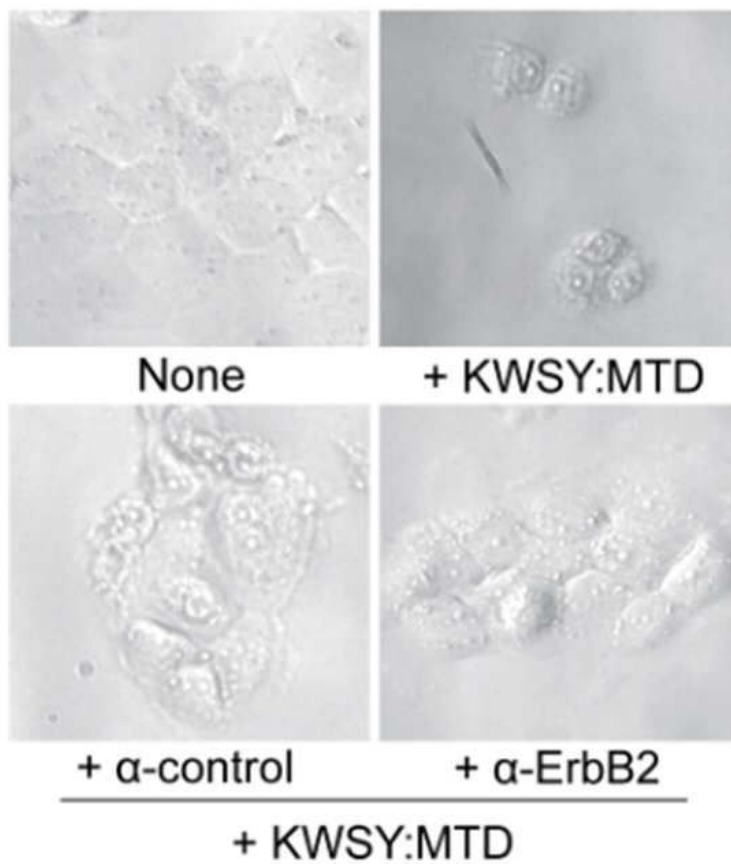
도면6



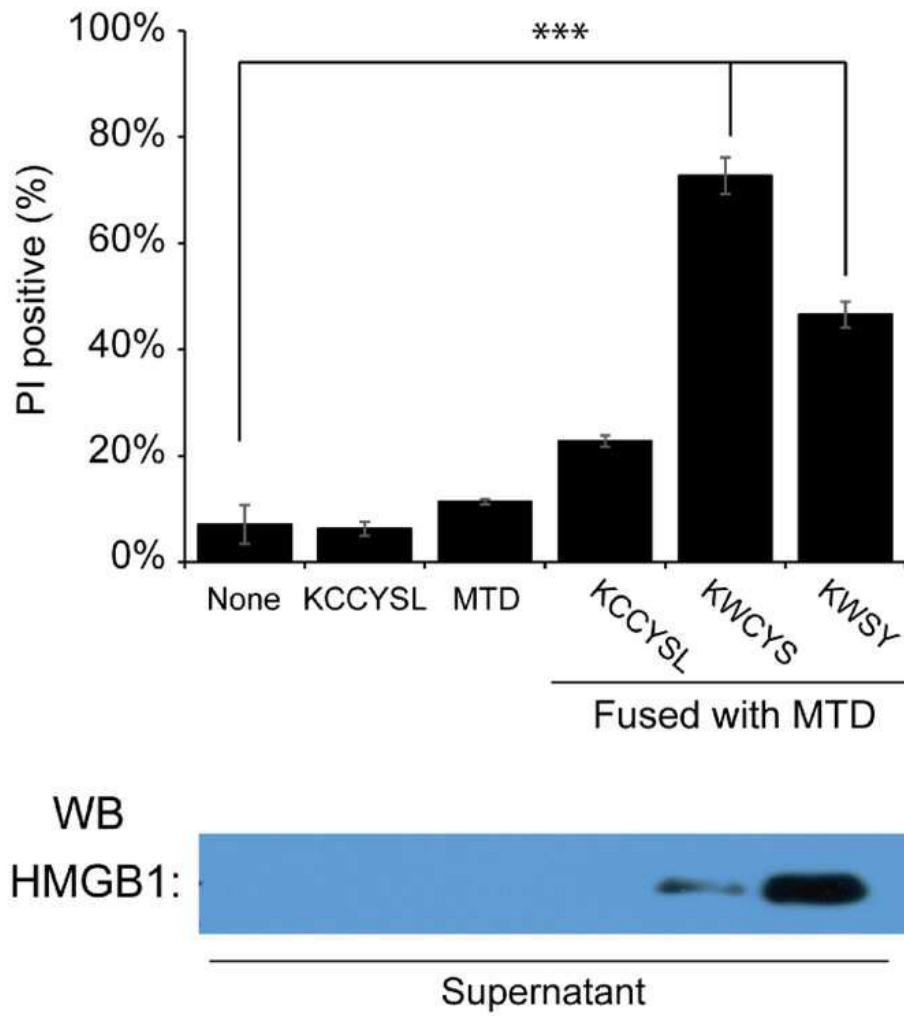
도면7



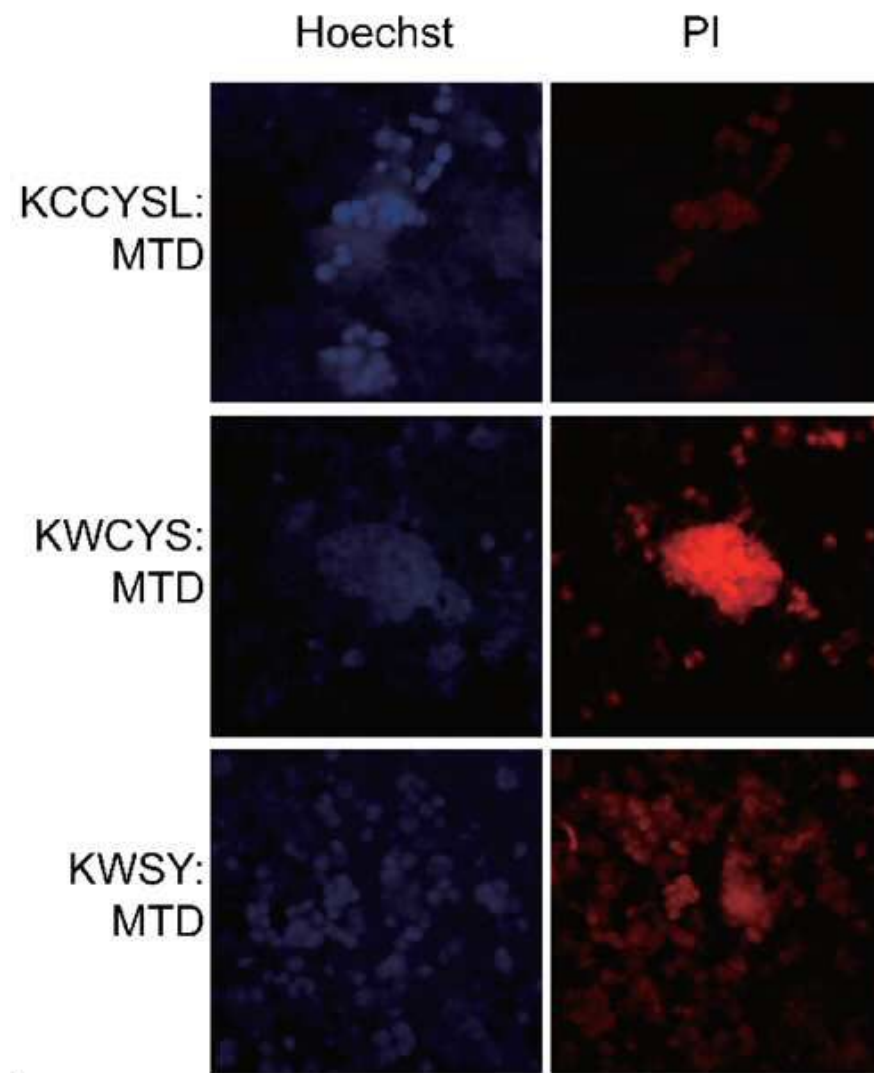
도면8



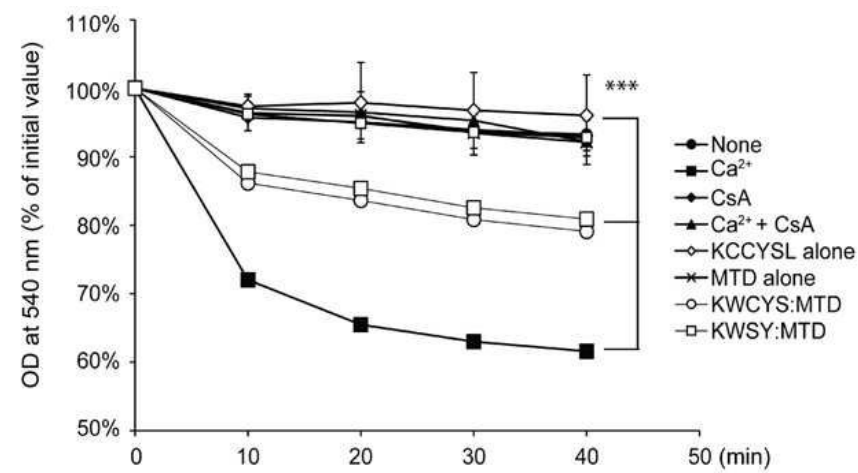
도면9



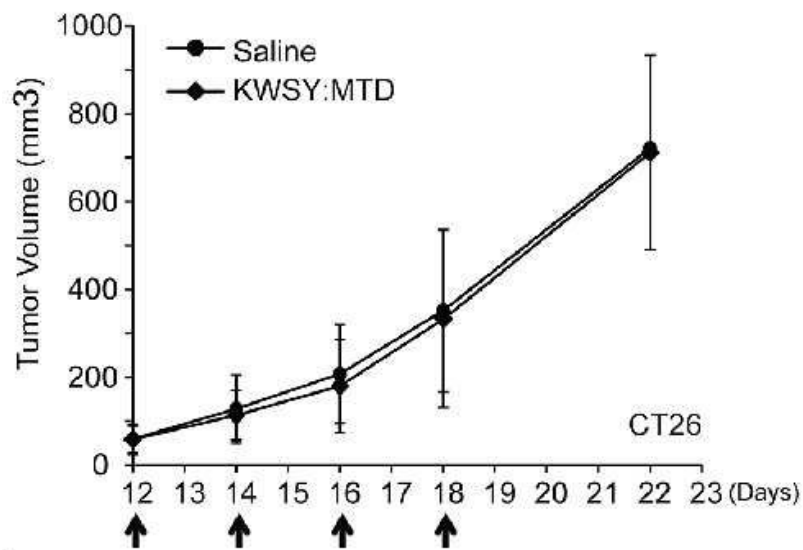
도면10



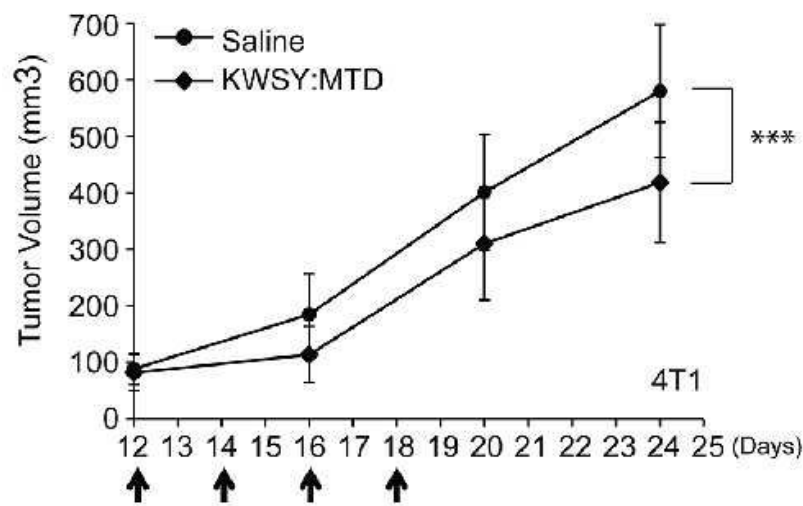
도면11



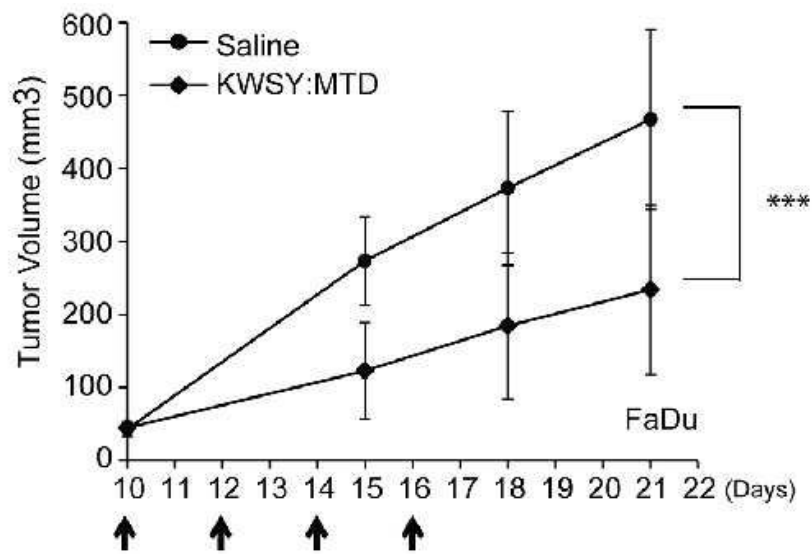
도면12



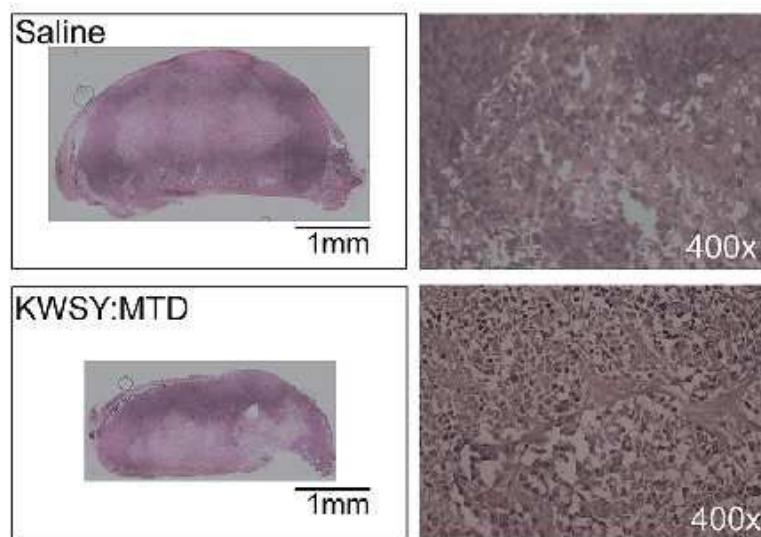
도면13



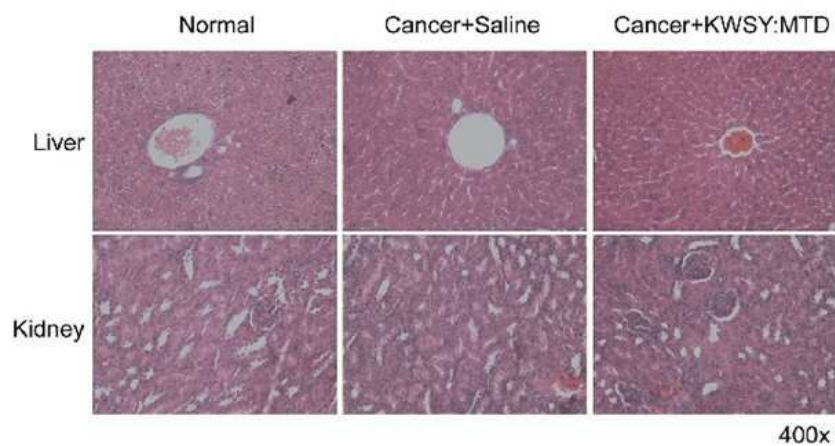
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
 <120> rbB-2 targeted cancer cell specific necrosis-inducing peptide
 <130> PN170318
 <160> 15
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KWCYS:MTD
 <400> 1

Ile Asn Asp Ser Thr Arg Tyr Ala Cys Ala Asp Glu Met Ile Cys Cys
 1 5 10 15
 Pro Glu Arg Ala Thr Ile Asn Phe Asn Asp Ala Thr Ile Asn Cys His
 20 25 30

Ser Asn Ala Asn Ile Val Glu Arg Ser Ile Thr Tyr
 35 40

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KCWY:MTD
 <400> 2

Lys Cys Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KWSY:MTD
 <400> 3

Lys Trp Ser Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KSWY:MTD

<400> 4

Lys Ser Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KSSYSL:MTD

<400> 5

Lys Ser Ser Tyr Ser Leu Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> KSSYS:MTD

<400> 6

Lys Ser Ser Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe

1 5 10 15

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KWYS:MTD

<400> 7

Lys Trp Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe

1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KWA:MTD

<400> 8
 Lys Trp Tyr Ala Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KWY:MTD

<400> 9
 Lys Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KWW:MTD

<400> 10
 Lys Trp Tyr Trp Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe

1 5 10

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KWT:MTD

<400> 11
 Lys Trp Tyr Thr Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 12

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RWYS:MTD
 <400> 12
 Arg Trp Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> WYS:MTD
 <400> 13
 Trp Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MTD:KWYS
 <400> 14
 Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe Lys Trp Tyr Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> KWPS:MTD
 <400> 15
 Lys Trp Pro Ser Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe
 1 5 10