(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0036289
(43) 공개일자 2023년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 14/435* (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
*A61K 38/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 14/43563* (2013.01)
*A23L 33/18* (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0118968
(22) 출원일자 2021년09월07일
심사청구일자 2021년09월07일

(71) 출원인
**경희대학교 산학협력단**
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
**주식회사 쓰리빅스**
부산광역시 서구 구덕로 187, 융합의학연구동 3층 유알피 3-3호 (아미동1가)
(72) 발명자
**박준형**
경기도 화성시 동탄지성로 42, 224동 404호(반송동, 동탄시범한빛마을 동탄아이파크)
**김연주**
경기도 성남시 분당구 동판교로 275, 107동 801호(삼평동, 봇들마을1단지)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**김순웅**

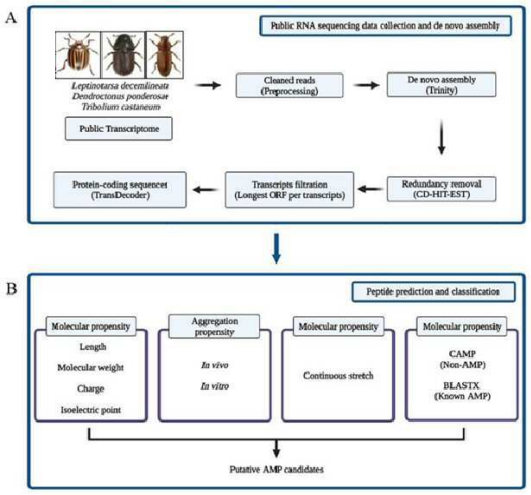
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **신규 항암 펩타이드 및 이의 용도**

## (57) 요 약

본 발명은 신규 항암 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 펩타이드를 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 항암 펩타이드는 비암세포에 대한 독성은 나타내지 않으면서, 암세포의 세포 자살을 효과적으로 유도한다는 것을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 신규 항암 펩타이드가 현저한 암 억제 효과가 있다는 것을 의미하는바, 암의 예방, 개선 또는 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61K 38/00*** (2013.01)
***A61P 35/00*** (2018.01)
*A23V 2002/00* (2013.01)
*A23V 2200/308* (2013.01)
(72) 발명자
**정호용**
경기도 화성시 동탄산척로2가길 10-9, 202호(산척동)

**최한솔**
인천광역시 남동구 논고개로68번길 49(논현동, 인천 논현 힐스테이트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1711110161 |
| 과제번호 | 2019R1A2C1010428 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 개인기초연구(과기정통부)(R&D) |
| 연구과제명 | 신장 및 간세포에서 uric acid 축적을 억제하는 신규 희귀사포닌 금나노 곤충 펩타이드 결합체 대량생산 및 작용메카니즘 규명 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 경희대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2019.03.01 ~ 2022.02.28 |

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 *Leptinotarsa decemlineata*, *Dendroctonus ponderosae* 및 *Tribolium castaneum*로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 전사체로부터 합성된 것인, 펩타이드.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 ITGA1, PIK3CA 및 AKT1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 발현을 억제하는 것인, 펩타이드.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 PTEN, FOXO3 및 BCL2L11로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 발현을 촉진하는 것인, 펩타이드.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 항암용인, 펩타이드.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 암 특이적 세포 자살(apoptosis) 유도용인, 펩타이드.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 조성물.

### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 유방암은 삼중 음성 유방암(Triple-negative breast cancer)인, 조성물.

**청구항 10**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 암세포 세포 자살 유도용 시약 조성물.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 항암 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 펩타이드를 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 유방암은 전 세계 여성의 암 관련 사망 중 두 번째로 흔한 원인이다. 일반적으로 비침습적 유형의 유방암은 주변 조직을 위협하지 않으나, 침윤성 유방암은 주변 조직에 공격적으로 작용하여 이들의 침윤 및 파괴를 유발하며, 전이를 유발하는 것으로 알려져 있다. 삼중 음성 유방암(Triple-negative breast cancer)은 에스트로겐과 프로게스테론 수용체의 발현이 높거나 성장인자 수용체 2의 과발현이 있는 루미날(luminal)유방암과 다르다. 삼중 음성 유방암은 예후가 불량하고 이질적인 유형으로, 항암화학요법으로 치료하기가 매우 어렵다. 또한 항암치료를 받았다 할지라도 재발 위험이 매우 높다. 그럼에도 불구하고 시판되고 있는 수많은 암 치료제는 정상 건강한 세포에 독성을 나타내었고 이로 인해 체내에 축적되는 독성 물질에 대한 표적 특이성이 부족하다. 따라서 이러한 유형의 암을 치료하기 위한 새로운 치료 전략의 개발이 시급한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0003] 이에 본 발명자들은 일반 세포에 독성을 나타내지 않으면서 암세포에만 독성을 나타내는 치료제를 개발하던 중 데노보 어셈블리를 통해 신규한 항암 펩타이드를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0004] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은, 상기 펩타이드를 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 펩타이드를 포함하는 암세포 세포 자살 유도용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 암세포 세포 자살 유도용 시약 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 신규 항암 펩타이드는 비암세포에 대한 독성은 나타내지 않으면서, 암세포의 세포 자살을 효과적으로 유도한다는 것을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 신규 항암 펩타이드가 현저한 암 억제 효과가 있다는 것을 의미하는바, 암의 예방, 개선 또는 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1A는 public RNA 시퀀싱 데이터 수집 및 새로운 조립 방법을 나타낸 도이다.

도 1B는 신규한 펩타이드 예측 및 분류 방법을 나타낸 도이다.

도 2A는 본 발명에 따른 Beetlesin의 서열 및 구조를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2B는 본 발명에 따른 Beetlesin의 triple letter code 및 이론적인 등전점(pI)을 예측한 결과를 나타낸 도이다.

도 2C는 HPLC 분석을 통해 본 발명에 따른 Beetlesin의 순도를 분석한 걸과를 나타낸 도이다.

도 2D는 MALDI-TOF 분석을 통해 본 발명에 따른 Beetlesin의 질량을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3A는 MTT assay를 통해 각 세포주(MDA-MB-231, MCF-7, Raw 264.7 및 HEK-293)에 대한 Beetlesin의 세포 독성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3B는 MDA-MB-231 세포에 대한 본 발명에 따른 Beetlesin의 세포 자살 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3C는 본 발명에 따른 Beetlesin이 MDA-MB-231 세포의 콜로니 형성에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3D는 면역 염색을 통해 본 발명에 따른 Beetlesin에 의한 MDA-MB-231 세포의 세포 자살을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3E는 웨스턴 블롯팅을 통해 본 발명에 따른 Beetlesin 처리에 따른 세포 자살 관련 단백질의 발현 수준을 특정한 결과를 나타낸 도이다.

도 4A는 Transcriptome 분석을 통해 대조군과 Beetlesin 처리 그룹 사이의 변경된 발현을 갖는 유전자 분포를 시각화한 결과를 나타낸 도이다.

도 4B 내지 E는 KEGG 및 GO 데이터베이스를 기반으로 주석 처리한 결과를 기반으로 작성한 버블차트를 나타낸 도이다.

도 5A 및 B는 PI3K-Akt 신호 전달 KEGG 경로의 DEG를 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 5C는 qRT-PCR을 통해 Beeltesin 처리 하에 가장 유의하게 조절된 6개 유전자(ITGA1, PIK3CA, PTEN, AKT1, FOXO3, BCL2L11)의 mRNA 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5D는 웨스턴 블롯팅을 통해 MDA-MB-231 세포에서 Beetlesin 처리에 대한 반응으로 PI3k-Akt/FOXO3a 신호전달 경로와 관련된 단백질의 발현을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성방법에 따라 제조될 수 있으며, 바람직하게는 고체상 합성기술에 따라 제조될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0016] 본 발명의 펩타이드의 범위에는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 연속되는 다수개의 아미노산을 포함하는 펩타이드의 기능적 동등물, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 기능적 동등물 및 그들의 염을 포함한다. 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 서열번호 1의 펩타이드와 적어도 80% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 서열번호 1의 펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 본 명세서에서 서열 상동성 및 동질성은 서열번호 1의 아미노산 서열과 후보 서열을 정렬하고 갭(gaps)을 도입한 후 서열번호 1의 아미노산 서열에 대한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동질성을 수득하기 위하여 서

열 동질성의 부분으로서 보존적 치환은 고려하지 않는다. 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 신장, 결손 또는 삽입은 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 주는 서열로서 해석되지 않는다.

[0017] 또한 상기 서열 동질성은 두개의 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두개의 폴리펩타이드를 각각의 아미노산이 최적으로 매칭(matching) 되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디폴트 오프닝 패널티(default opening penalty) 및 디폴트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코링 매트릭스)와 같은 스코링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율 동질성은 다음과 같이 계산할 수 있다: 일치하는 서열(identical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스팬(machted span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.

[0018] 상기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항암 활성을 말한다. 본 발명의 "기능적 동등물"의 범위에는 서열번호 1의 펩타이드의 기본골격과 항암 활성을 유지하면서 펩타이드의 일부 화학 구조가 변형된 유도체가 포함된다. 예를 들어 펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

[0019] 본 발명의 구체예에서, 상기 펩타이드는 *Leptinotarsa decemlineata*, *Dendroctonus ponderosae* 및 *Tribolium castaneum*로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 전사체로부터 합성된 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 상기 전사체의 데노보 어셈블리를 통해 예측 및 합성된 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 구체예에서, 상기 펩타이드는 ITGA1, PIK3CA 및 AKT1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 발현을 억제하는 것이 바람직하다.

[0021] 본 발명의 구체예에서, 상기 펩타이드는 PTEN, FOXO3 및 BCL2L11로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 발현을 촉진하는 것이 바람직하다.

[0022] 다시 말해, 본 발명의 펩타이드는 PI3K-Akt/FOXO3a 신호 전달 경로 조절을 통해 암세포의 세포 자살을 유도한다.

[0023] 본 발명의 구체예에서, 상기 펩타이드는 암세포의 세포 자살을 유도하는바, 항암용; 또는 암 특이적 세포 자살(apoptosis) 유도용;인 것이 바람직하다.

[0024] 종합적으로, 본 발명의 펩타이드는 PI3K-Akt/FOXO3a 신호 전달 경로 조절을 통해 암세포의 세포 자살을 유도하며, 비암세포에 대한 독성을 나타내지 않는다. 이는 본 발명의 펩타이드가 부작용이 적으면서도 현저한 항암 효과를 나타낸다는 것을 의미하는바, 암의 예방, 개선 또는 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 또는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.

[0027] 본 발명의 구체예에서, 상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 유방암은 삼중 음성 유방암(Triple-negative breast cancer)인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에 있어서, “삼중 음성 유방암”은 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 사람 표피성장인자 수용체 2가 없는 유방암의 유형이다. 삼중 음성 유방암은 항호르몬제 및 표적치료제에 잘 반응하지 않아 예후가

좋지 않다고 알려져 있다.

[0030] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물인 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드와 함께 암 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여 시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0035] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 0.05 내지 5 mg/kg의 농도로 투여되는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 0.1 내지 0.4 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.2 내지 0.35 mg/kg, 더더욱 바람직하게는 0.25 mg/kg일 수 있으나, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[0039] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 상기 비경구 투여 방식으로는 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등이 포함된다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0041] 또한 본 발명의 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선 효과를 가지는 식품을 의미하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.

[0042] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 식품 조성물은 식품 첨가물일 수 있다. 상기 식품 첨가물은 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0044] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 식품 조성물은 건강음료 조성물일 수 있다. 상기 건강음료 조성물은 펩타이드 외에 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0045] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0047] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함하는 암세포 세포 자살 유도용 시약 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드는 ITGA1, PIK3CA 및 AKT1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 발현을 억제하고, PTEN, FOXO3 및 BCL2L11로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 발현을 촉진한다. 즉, 본 발명의 펩타이드는 PI3K-Akt/FOXO3a 신호 전달 경로 조절을 통해 암세포의 세포 자살을 유도한다. 이는 본 발명의 펩타이드가 암 억제 관련 연구 분야에서 다양하게 활용될 수 있음을 의미한다.

[0049] 본 발명의 구체예에서, 본 발명의 시약 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드 외에, 세포 자살을 유도하거나 항암 효과를 갖는 공지의 유효성분을 더 포함할 수도 있다.

[0051] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055] **[실험예]**

[0056] **[재료]**

[0057] The Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Roswell Park Memorial Institute culture medium(RPMI 1640), fetal bovine serum(FBS) 및 페니실린-스트렙토마이신 용액은 모두 GenDEPOT(Katy, TX, USA)에서 입수하였다. Raw 264.7, HEK-293, MCF-7 및 MDA-MB-231과 같은 세포주는 한국 세포주 은행(대한민국 서울)에서 입수하였다. dimethyl sulfoxide(DMSO), soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 및 cisplatin은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 모든 프라이머는 Macrogen(서울, 대한민국)

에서 구매하였다. Bax, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Cytochrome c, Cleaved-Caspase-9, Caspase-9, Cleaved-Caspase-3, Caspase-3, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, FOXO3a, p-FOXO3a, PTEN 및 β-actin에 대한 1차 항체는 Cell signaling Technology(MA, USA)에서 얻었다. 본 실험에 사용된 다른 모든 화학물질과 시약은 시약 등급의 품질을 가지고 있으며 상업적으로 이용 가능하다.

[0059] **실험예 1. Public RNA sequencing data 수집 및 데노보 어셈블리(de novo assembly)**

[0060] public RNAseq 로우 데이터는 각 액세스를 사용하여 NCBI에서 다운로드하였다. 이 샘플은 샘플 유형(단계 발달, 성인, 치료 없음) 및 시퀀싱 유형(paired-end)에 따라 선택되었다. 또한 FastQC(https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)를 사용하여 모든 개별 페어드 엔드 시퀀스 품질을 평가하였다. *Leptinotarsa decemlineata*, *Dendroctonus ponderosae* 및 *Tribolium castaneum*의 다운로드된 전사체 데이터는 65.7GB 크기의 5억 8600만 리드를 포함하는 Illumina 페어드 엔드 시퀀싱 플랫폼에 의해 시퀀싱되었다. Trimmomatic을 사용하여 어댑터 내용과 저품질 리드를 제거하였다. 각 샘플의 품질은 전처리(저품질 리드 제거 및 트리밍)를 통해 액세스하여 고품질의 깨끗한 리드를 얻은 다음 다운스트림 분석을 거쳤다. 총 57.2GB의 시퀀스에 해당하는 5억 4,500만 리드를 확보하였다. 그런 다음 필터링된 고품질 리드에 기본 매개변수를 사용하여 트리니티 데노보 어셈블리 방법(Trinity *de novo* assembly method)을 적용했다. 우리는 트리니티 어셈블러(Trinity assembler)를 사용하여 3개 종의 16개 샘플 시퀀스의 데노보 어셈블리를 수행했다. 초기 어셈블리는 2,022bp의 N50을 갖는 211,207개의 전사체를 생성하였다. 게다가, 전사체 서열의 중복성은 CD-HIT-EST28을 사용하여 95% 서열 유사성 컷오프로 제거되었으며 전사체당 가장 긴 ORF는 추가 분석을 고려하였다.

[0061] 데이터 프로세싱 결과는 표 1에 나타내었다.

*표 1*

[0062]

| Sequencing | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Description | *Leptinotarsa decemlineata* | *Tribolium castaneum* | *Dendroctonus ponderosae* | Total Reads | Percentage % |
| Input reads | 51,895,266 | 154,786,305 | 379,934,392 | 586,615,963 | 100 |
| Preprocessed reads | 51,740,751 | 152,637,949 | 341,185,480 | 545,564,180 | 93 |

| Assembly | | |
|---|---|---|
| Description | Transcripts | Bases |
| *Trinity* | 211,207 | 196,127,009 |
| *CD-HIT-EST* | 184,484 | 145,808,349 |
| *Longest ORF per transcripts* | 46,920 | 71,372,925 |
| *BUSCO validation* | *Complete: 99.25%, Arthropoda reference gene set selection* | |

[0064] TransDecoder tool은 전사체당 가장 긴 ORF를 식별하는 데 사용되었으며, 전사체 완전성은 생물정보학 도구 BUSCO(Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) 절지동물 참조 라이브러리를 사용하여 액세스되었다. 마지막으로, 다운스트림 분석을 위해 최종 필터링된 전사체를 선택하였다. 2,303bp의 N50을 갖는 46,920개의 전사체를 단백질 코딩 유전자 식별과 치료학적 펩타이드 후보의 발견에 사용하였다. 단백질 코딩 유전자를 식별하기 위해 조립된 최종 전사체 서열을 Trans Decoder을 사용하여 단백질 단편으로 번역하였다. 초기 치료학적 펩타이드 예측을 위해 길이가 50개 미만인 아미노산 잔기와 시작 및 중지 위치의 모든 아미노산이 추론된 아미노산을 고려하였다. public RNA 시퀀싱 데이터 수집 및 새로운 조립 방법은 도 1A과 같다.

[0066] **실험예 2. 펩타이드 예측 및 분류**

[0067] 물리화학적 특성(등전점, 펩타이드 길이, 전하, 알파 나선, 베타 시트, 회전 및 항균 반점), 응집 특성(in

vitro: AGG, HELIX, BETA 및 in vivo: Na4vSS)과 같은 펩타이드 특성을 계산했다. 추정되는 펩타이드 후보를 예측하기 위해 각각의 생물정보학 도구를 사용하였다. 또한, 확인된 추정 펩타이드 후보는 항미생물 펩타이드 수집(include Collection of Anti-Microbial Peptide, CAMP), 항미생물 펩타이드 데이터베이스(Database of Anti-Microbial peptide, ADAM), 항균 펩타이드 데이터베이스(Antimicrobial Peptide Database, APD)를 포함하는 3개의 펩타이드 데이터베이스를 사용하여 신규 및 알려진 펩타이드로 분류하기 위한 검증을 거쳤다. Basic Local Align Search Tool(BLASTP, 1E-05) 결과는 모든 데이터베이스에서 80점보다 높은 유사성 점수를 사용하여 필터링하였다. 80점 이상은 알려진 펩타이드로 간주하고 나머지는 새로운 추정 펩타이드로 간주하였다. 마지막으로 Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN), Discriminant Analysis (DA) 분류기 및 ADAM의 SVM 분류기를 구현하여 신규 펩타이드를 예측하고 추가 분석을 위한 신규 펩타이드를 결정하였고, 이를 Beetlesin으로 명명하였다. 펩타이드 예측 및 분류 방법은 도 1B에 나타내었다.

[0069] **실험예 3. 펩타이드 합성**

[0070] Rink amide AM resin(1g, 0.4mmol/g) 및 30mL의 N, N-Dimethylformamide(DMF)를 반응 용기에 첨가하고 30분 동안 용매로 팽윤시켰다. 진공 펌프로 용매를 제거한 후, 9-fluorenyl methoxycarbonyl(Fmoc)로 보호된 Rink amide AM resin를 20% 피페리딘(피페리딘 200mL/DMF 800mL)으로 30분 동안 진탕하고 fmoc를 제거한 후 DMF로 3회 세척하였다. Fmoc-A.A-OH의 결합을 위해 Fmoc-A.A-OH DMF를 녹이고 수지가 담긴 반응 용기에 넣었다. HBTU/N-Methylmorpholine/DMF를 첨가하고 진탕하였다. 반응 후 DMF로 3회 세척하고 20% Piperidine/DMF 용액으로 레진을 첨가하고 DMF로 3회 교반 세척하였다. Fmoc-A.A-OH 결합 과정은 각 아미노산마다 반복하였다. 반응물에 수지 및 Trifluoroacetic acid /1,2-ethandithiol/thioanisole/$H_2O$ 를 첨가하고 교반하였다. 차가운 에테르를 여과된 용액에 천천히 적용하여 결정화시켰다. 결정화된 펩타이드를 여과하고 진공 건조기에서 건조시켰다. HPLC(High-performance liquid chromatography) 분석은 라인 아세토니트릴 구배(5-65%)로 개발된 Dikma Inspire 5 μm C18 컬럼을 사용하여 Shimadzu HPLC LabSolution로 수행하였다. 유속 및 파장은 각각 1 ml/min 및 230nm였다. 그런 다음, MALDI-TOF(Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) 질량 분석기(AXIMA Assurance, Shimadzu Biotech, Duisburg, Germany)를 사용하여 질량 스펙트럼을 얻었다.

[0072] **실험예 4. MTT assay**

[0073] Beetlesin 및 Cisplatin의 세포독성은 MTT assay로 분석하였다. 세포를 $1x10^5$개 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하고 Beetlesin을 20 내지 100 μg/mL 농도로 처리하였다. 24시간 후, 각 웰에 0.05% MTT 시약 100 μL를 주입한 후 3시간 더 배양하였다. 100 μL의 DMSO를 첨가하여 포르마잔 결정을 용해시켰다. OD값(optical density)은 SpectraMax ABS Plus microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하였고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0075] **실험예 5. Live/dead fluorescent assay**

[0076] MDA-MB-231 세포에서 Beetlesin의 세포독성은 Live/dead fluorescent assay을 통해 조사하였다. 구체적으로, cisplatin(50 μM) 및 Beetlesin(40 μg/mL 및 60 μg/mL)을 처리한 후, 세포를 LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit(Thermo Fisher Scientific, USA)로 염색하였다. 암소에서 37℃에서 30분간 배양한 후 형광주사현미경(Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 세포를 조사하였다.

[0078] **실험예 6. Colony formation assay**

[0079] MDA-MB-231 세포를 300개 세포/웰의 밀도로 35 x 10 mm 세포 배양 코팅 접시에 시딩하였다. 밤새 배양한 후, 세포를 cisplatin(50 μM) 및 Beetlesin(40 μg/mL 및 60 μg/mL)을 처리한 다음, 콜로니가 형성되도록 10일 동안 배양하였다. 콜로니를 95% 에탄올로 10분간 고정한 후, 0.1% 크리스탈 바이올렛 용액으로 10분간 더 염색하였다. 그런 다음 PBS로 세척한 후 각 접시의 이미지를 얻었다.

[0081] **실험예 7. MDA-MB-231 세포에서 Fluorescence Microscopy analysis**

[0082] Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)에 따른 AnnexinV-FITC/PI 염색 분석을 통해 MDA-MB-231 세포주에 대한 Beetlesin의 초기 및 후기 세포 자살(apoptosis)를 검출하였다. MDA-MB-231 세포(2 x $10^5$/웰)를 6-웰 플레이트에 접종하고 밤새 다양한 농도의 Beetlesin으로 처리하였다. 세포를 PBS로 세척하고 Annexin V-FITC 및 PI 염색 용액 5㎕를 포함하는 결합 완충액 100㎕에 현탁시켰다. 암소에서 15분간 세포를 배양한 후, 400㎕의 결합 완충액을 첨가하였다. 분석은 BD Biosciences FACS Aria II 유세포 분석기(San Jose, CA, USA) 및 BD Biosciences FACSDiva 소프트웨어에 의해 수행되었다.

[0084] **실험예 8. Transcriptome analysis**

[0085] 세포주를 35 x 10 mm 세포 배양 코팅 접시에서 배양하고 24시간 동안 다양한 농도의 Beetlesin을 처리하였다. 대조군은 Beetlesin을 처리하지 않았다. 그 후 Truseq Stranded mRNA Prep Kit를 사용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. 분리된 RNA 순도는 NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA)과 Agilent 2100 bioanalyzer(Agilent Technologies, United States)로 측정하였으며, 분리된 RNA는 RNA sequencing 분석에 사용하였다. 대조군 및 Beetlesin 처리군의 RNA sequencing은 DNA link(한국 서울)에서 제조 프로토콜에 따라 Illumina sequencing(Novaseq6000) 플랫폼으로 준비되었다. Clustering algorithm 및 Hierarchical clustering은 클러스터 v3.0 소프트웨어로 운영되었다. 발현 히트맵은 Euclidean distance 및 average linkage method으로 계산되었으며 히트맵은 MeV 4.9.0 소프트웨어를 사용하여 구성하였다. 또한, 유전자 목록은 중요한 GO(Gene Ontology)를 식별하고, STRING v.11.0 (https://string-db.org), Cytoscape v.3.8.1 (https://cytoscape.org), DAVID Bioinformatics Resources 6.8. (https://david.ncifcrf.gov)를 활용하여 시각화하였다. 또한 DAVID Bioinformatics Resources 6.8을 사용하여 선택된 DEG(differentially expressed gene)(fold change ≥ 1)에 대해 GO 및 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes) 경로 분석을 포함한 functional enrichment analysis을 수행하였다.

[0087] **실험예 9. Relative mRNA expression analysis**

[0088] TriZol 시약(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 MDA-MB-231 세포로부터 total RNA 500 ng를 추출하였다. amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Enzyme Mix(GenDEPOT, Katy, TX, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 반응은 SYBR PremixExTaqTM II(TaKaRa)가 있는 CFX96TM Real-Time RT-PCR 시스템을 사용하여 수행하였다. qRT-PCR은 amfiSure qGreen Q-PCR Master Mix(GenDEOT, TX, USA)의 프로토콜에 따라 cDNA 50 ng을 사용하여 수행하였다. qRT-PCR에 사용된 관련 유전자 특이적 프라이머 서열은 표 2와 같으며, GAPDH는 상대 유전자 발현을 정규화하는 데 사용하였다.

*표 2*

[0089]

| Gene name | Forward (5'-3') | Reverse (5'-3') |
|---|---|---|
| ITGA1 | 5'-CCTCTCAATGAAAGGCAGATGTCCCTT-3' | 5'-ATGATTCACCTCTCCCAACTGGACACT-3' |
| PIK3CA | 5'-AGCTGTGGATCTTAGGGACCTCA-3' | 5'-ACCATGACTGTGTACCAGAACAA-3' |
| AKT1 | 5'-TACTACGCCATGAAGATCCTCAA-3' | 5'-TCTGGAAAGAGTACTTCAGGGCT-3' |
| FOXO3 | 5'-TACTTCAAGGATAAGGGCGACA-3' | 5'-GCTCTTGGTATACTTGTTGCTA-3' |
| PTEN | 5'-CTTACAGTTGGGCCCTGTACCATCC-3' | 5'-TTTGATGCTGCCGGTAAACTCCACT-3' |
| BIM | 5'-AGTACTGATTTGATGATGCTTAAC-3' | 5'-GACCAAGGTCTGAGAATTTATTAA-3' |

[0091] **실험예 10. 웨스턴 블롯팅**

[0092] 5 x $10^5$/웰의 MDA-MB-231 세포를 24시간 동안 100 mm 코팅 접시에 시딩한 후, Beetlesin(40 및 60 μg/mL) 및 Cisplatin(50 μM)을 처리하였다. 세포 펠렛을 Pierce™ RIPA 완충액(Thermo Fisher Scientific, USA)으로 1시간 동안 용해시켰다. 총 단백질은 세포 용해물을 20분(12,000 rpm, 4° C) 동안 원심분리한 후 얻은 상층액으로부터 수득하였다. 동일한 양(50 μg)의 총 단백질을 10% SDS-PAGE 겔에 로딩하고 Protein Gel Electrophoresis

Chamber System(Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 PVDF 멤브레인(Thermo Fisher Scientific, USA)으로 옮겼다. 멤브레인은 실온에서 2시간 동안 5% 스킴밀크로 블로킹한 후 1차 항체와 함께 밤새도록 배양하였다. 다음으로, 막을 적절한 HRP-접합 2차 항체와 함께 1시간 동안 배양하였다. 면역 반응성 밴드는 West-Q Pico ECL Solution(GenDEPOT, Katy, TX, USA)으로 현상하였다. 결과는 Alliance MINI HD9 AUTO Immunoblot Imaging System(UVItec Limited, England, UK)으로 시각화하고 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0094] **[실시예]**

[0095] **실시예 1. Beetlesin의 구조 및 특성**

[0096] Beetlesin의 서열 및 구조를 분석하였으며, 그 결과는 도 2A에 나타내었다.

[0097] 도 2A에 나타낸 바와 같이, Beetlesin은 서열번호 1의 아미노산 서열(KVTATANIKVELVAPVYRPKCSKCHRSKCKRRQQCRCCK-$NH_4$)로 표시되며, α-나선 및 랜덤 코일 구조인 것을 확인하였다.

[0099] Innovagen의 Peptide Property Calculator(https://pepcalc.com/;Innovagen, Lund, Sweden)를 사용하여 triple letter code 및 이론적인 등전점(pI)을 예측하였으며, 그 결과는 도 2B에 나타내었다.

[0100] 도 2B에 나타낸 바와 같이, Beetlesin의 triple letter code 및 아미노산 조성은 다음과 같다. 또한, Beetlesin의 pI는 pH 10.58로 예측되었다.

[0102] <triple letter code>

[0103] $NH_2$- Lys - Val - Thr - Ala - Thr - Ala - Asn - Ile - Lys - Val - Glu - Leu - Val - Ala - Pro - Val - Tyr - Arg - Pro - Lys - Cys - Ser - Lys - Cys - His - Arg - Ser - Lys - Cys - Lys - Arg - Arg - Gln - Gln - Cys - Arg - Cys - Cys - Lys - COOH

[0105] <아미노산 조성>

[0106] Ala (A), 7.7%; Arg (R), 12.8%; Asn (N), 2.6%; Cys (C), 15.4%; Gln (Q), 5.1%; Glu (E), 2.6%; His (H), 2.6%; Ile (I), 2.6%; Leu (L), 2.6%; Lys (K),17.9%; Pro (P), 5.1%; Ser(S), 5.1%; Thr (T), 5.1%; Tyr (Y), 2.6%; and Val (V), 10.3%

[0108] Beetlesin이 합성된 후, Beetlesin의 순도 및 질량은 HPLC 분석과 MALDI-TOF 질량 스펙트럼으로 분석하였다. Beetlesin의 순도 및 질량을 분석한 결과는 각각 도 2C 및 2D에 나타내었다.

[0109] 도 2C 및 2D에 나타낸 바와 같이, Beetlesin의 순도 및 질량은 각각 96.7%와 4521.7 Da임을 확인하였다.

[0111] **실시예 2. Beetlesin의 세포독성**

[0112] Beetlesin이 유방암 세포에 대한 항암 효과를 나타내는지 알아보기 위해 고순도의 Beetlesin을 합성(95% 이상)하고 MTT assay를 수행하여 각 세포주(MDA-MB-231, MCF-7, Raw 264.7 및 HEK-293)에서 Beetlesin 처리에 따른 세포 독성을 관찰하였다. 세포 독성을 확인한 결과는 도 3A에 나타내었다.

[0113] 도 3A에 나타낸 바와 같이, MDA-MB-231 및 MCF-7 세포는 Beetlesin에 대해 $IC_{50}$ 값이 각각 36.02 μg/mL 및 51.19 μg/mL로 높은 세포 독성을 나타내었다. 그러나 Raw 264.7 및 HEK-293 세포는 Beeltesin 100 μg/mL 농도까지 세포독성을 나타내지 않아 세포독성이 낮은 것을 확인하였다.

[0115] 삼중 음성 유방암(Triple-negative breast cancer)은 높은 이질성, 공격적인 성격 및 치료 옵션의 부족으로 인

해 유방암의 가장 치명적인 하위 유형으로 알려져 있다. MDA-MB-231 세포는 주로 삼중 음성 유방암의 시험관 내 모델에 사용되는 프로게스테론 수용체, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 에스트로겐 수용체가 없는 것이 특징이다. MDA-MB-231 세포는 세포 자살(apoptosis)에 내성이 있으며, 전이성이 높다. 이에, Beetlesin 처리(40 또는 60 μg/mL)에 따른 MDA-MB-231 세포 자살 효과를 추가 분석하였다. 본 실험의 양성 대조군은 잘 알려진 항암제인 cisplatin을 처리하였다. Beetlesin의 MDA-MB-231 세포 자살 효과를 분석한 결과는 도 3B에 나타내었다.

[0116] 도 3B에 나타낸 바와 같이, MDA-MB-231 세포에서 Beetlesin 처리(40 또는 60 μg/mL)에 대한 반응으로 살아있는 세포(적색) 및 죽은 세포(녹색)가 염색되었고, Beetlesin은 용량 의존적으로 대조군에 비해 MDA-MB-231 세포에서 유의한 세포 자살을 유도하였다.

[0118] 추가적으로, Beetlesin이 MDA-MB-231 세포의 콜로니 형성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 도 3C에 나타내었다.

[0119] 도 3C에 나타낸 바와 같이, Beetlesin 처리에 따라 MDA-MB-231 세포의 콜로니 형성이 억제된 것을 확인하였다.

[0121] 상기 결과들은 Beetlesin이 시험관 내에서 MDA-MB-231 세포에 대한 항암 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[0123] **실시예 3. Beetlesin에 의한 MDA-MB-231 세포의 세포 자살(apoptosis) 기전 확인**

[0124] Beetlesin의 세포 독성 효과가 MDA-MB-231 세포의 세포 자살과 관련이 있는지 여부를 조사하기 위해 Annexin V (Annexin V-FITC) / propidium iodide (PI)로 표지된 fluorescein isothiocyanate 염색을 수행하였다. 염색 결과는 도 3D에 나타내었다.

[0125] 도 3D에 나타낸 바와 같이, Beetlesin 처리에 따라 MDA-MB-231 세포에서 세포 자살이 관찰되었다. Beetlesin을 처리하지 않은 세포는 건강한 세포 집단(97%)이었다. 그러나 40 μg/mL 농도에서는 초기(21.5%)와 후기(21.4%) apoptotic 세포가 유사하게 발견된 반면, 60 μg/mL에서는 초기(40.2%) apoptotic 세포 비율이 후기에 비해 증가했다. 초기 세포 자살 세포는 세포 표면에 포스파티딜세린이 노출될 때 식세포에 의해 매개된 인식을 하고 원형질막을 온전하게 유지하는 경향이 있다. 원형질막이 투과되면 초기 세포 자살 세포는 2차 괴사 세포로도 알려진 후기 세포 자살 세포가 될 수 있다. Annexin V-positive 단계를 특징으로 하는 초기 세포 자살은 Beetlesin이 고농도(60 μg/mL)로 처리된 세포에서 세포 자살의 주요 단계에서 관찰되었다.

[0127] 또한, 세포 자살 관련 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 측정하였으며, 그 결과는 도 3E에 나타내었다.

[0128] 도 3E에 나타낸 바와 같이, Beetlesin 처리에 따라 pro-apoptotic protein인 Bax의 발현량은 유의하게 증가하였고, anti-apoptotic protein인 Bcl-2는 용량 의존적으로 유의하게 감소하였다. Beetlesin 처리는 용량 의존적 방식으로 Cytochrom-C, caspase-9 및 caspase-3의 발현량을 현저히 증가시켰다.

[0130] 상기 결과는 Beetlesin이 MDA-MB-231 세포에서 세포 자살을 촉진한다는 것을 의미한다.

[0132] **실시예 4. Beetlesin이 처리된 MDA-MB-231 세포의 Transcriptome 분석**

[0133] MDA-MB-231 세포에서 Beetlesin의 세포 자살 메커니즘을 더 조사하기 위해 Transcriptome 분석을 수행하였다. 전사체 분석은 항암제의 기본 메커니즘을 탐색하는 효율적인 방법으로 알려져 있다. volcano plot은 대조군과 Beetlesin 처리 그룹 사이의 변경된 발현을 갖는 유전자 분포를 시각화하였으며, 이를 도 4A에 나타내었다.

[0134] 도 4A에 나타낸 바와 같이, Beetlesin 처리 세포에서 36,708개의 유전자가 대조군과 다른 발현을 보였다. 이 중 232개의 유전자가 상향 조절되었고 285개의 유전자가 하향 조절되었다[$\log_2$(fold change) ≥ |1.0|, p-value ≤ 0.05].

[0136] Beetlesin 처리가 MDA-MB-231 세포를 어떻게 조절하는지 조사하기 위해 KEGG 및 GO 데이터베이스를 기반으로 각각 517 DEG의 KEGG 및 GO 분석을 수행했다. KEGG는 유전자 기능 및 게놈 정보의 체계적인 분석을 위한 데이터베이스이다. DEG와 관련된 주요 생화학적 대사 경로 및 신호 전달 경로는 경로 농축을 통해 결정할 수 있다. 517개 DEG의 분석을 통해 58개의 유전자를 KEGG 데이터베이스에 주석 처리하였다. 그 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3

[0137]

| KEGG pathway | Count | P _Value | Genes | Fold Enrichment | FDR |
|---|---|---|---|---|---|
| Phenylalanine metabolism | 5 | 0.048654 | GOT1, MAOA, AOC2, ALDH3B1, AOC3 | 3.494361 | 48.32639 |
| Galactose metabolism | 7 | 0.035773 | PGM2, GALM, PFKL, GCK, HKDC1, GAA, LCT | 2.772193 | 38.25766 |
| Fructose and mannose metabolism | 7 | 0.0474 | KHK, PFKL, PFKFB4, HKDC1, PFKFB1, GMPPA, FUK | 2.598931 | 47.41714 |
| Hematopoietic cell lineage | 16 | 0.00546 | CSF1, ITGA1, KITLG, ITGA2, IL6R, ITGB3, KIT, IL7R, IL11RA, CD37, ITGA5, IL1B, HLA-DRB5, EPOR, CD24, CSF2RA | 2.18498 | 6.991029 |
| Insulin resistance | 16 | 0.035663 | SLC27A1, SOCS3, TRIB3, NFKB1, CREB5, ACACB, PRKCE, PPP1CC, PPP1R3E, PYGM, SLC2A4, GYS1, CREB3L4, INSR, SLC27A4, NR1H3 | 1.760123 | 38.16471 |
| Oocyte meiosis | 16 | 0.043962 | CDK1, CPEB4, ADCY6, AURKA, CDC20, PTTG1, PPP1CC, CCNB1, IGF1R, CCNB2, MAD2L1, PLK1, BUB1, FBXO5, STAG3, SMC1B | 1.712552 | 44.84892 |
| ECM-receptor interaction | 18 | 7.72E-04 | TNC, ITGA1, DAG1, ITGA10, ITGA2, ITGB3, CHAD, HMMR, LAMA1, SDC1, LAMA3, ITGA5, LAMA5, COL1A2, COL6A1, RELN, COL1A1, THBS3 | 2.458103 | 1.017367 |
| AMPK signaling pathway | 19 | 0.013914 | PFKL, PFKFB4, SCD, PFKFB1, PPARG, ACACA, ADIPOR2, CREB5, ACACB, FOXO3, SIRT1, IGF1R, SLC2A4, GYS1, CREB3L4, SCD5, CCNA1, PPP2R2C, INSR | 1.83525 | 16.9284 |
| Axon guidance | 20 | 0.00931 | PLXNA1, EFNB3, PLXNB1, PLXNB3, EFNA3, NTNG2, FES, EPHB4, NTN3, SEMA6C, SEMA3G, NCK1, SRGAP3, SEMA4B, SEMA3B, EFNA5, NFATC2, RASA1, SRGAP1, SEMA4A | 1.870997 | 11.6454 |
| Hippo signaling pathway | 20 | 0.048253 | PARD6A, FZD8, TCF7, NF2, TP53BP2, FZD1, TEAD2, SNAI2, PPP1CC, GLI2, STK3, LATS2, LLGL2, FRMD6, ID1, TEAD4, AREG, WNT9A, FGF1, PPP2R2C | 1.57362 | 48.03705 |
| PI3K-Akt signaling pathway | 42 | 0.013753 | PHLPP1, FGFR4, TNC, CSF1, EFNA3, FGF16, KITLG, LPAR3, ITGA10, NFKB1, ITGB3, FOXO3, KIT, IL7R, CHAD, IGF1R, GYS1, COL6A1, CREB3L4, PDGFD, FGF1, PPP2R2C, INSR, THBS3, GNG7, EGFR, RXRA, ITGA1, ITGA2, CREB5, CDK6, IL6R, LAMA1, LAMA3, LAMA5, ITGA5, COL1A2, EFNA5, EPOR, RELN, COL1A1, NGF | 1.446362 | 16.74894 |

[0139] 또한 주석 처리 결과를 기반으로 작성한 버블차트는 도 4B 내지 E에 나타내었다.

[0140] 도 4B에 나타낸 바와 같이, PI3K-Akt 신호전달 경로(hsa04151)가 유전자 수 및 p-값에 따라 암에서의 경로(Hsa05200) 다음으로 가장 높은 순위를 차지하였다. 또한, 조절된 유전자는 19개의 GO term으로 풍부하였다(p-value<0.01). PI3K-Akt 신호 전달 경로는 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 구성요소에 의해 활성화될

수 있다.

[0141] 도 4C에서 보는 바와 같이, Cellular component(CC)의 GO는 IIntegral component of plasma membrane(GO:0005887), Proteinaceous extracellular matrix(GO:0005578), Extracellular space(GO:0005615) 및 Extracellular region(GO:0005576)와 같은 extracellular region 과 연관이 있다.

[0142] 도 4D 및 E에 나타낸 바와 같이, KEGG 결과에서와 같이, Molecular function(MF) 및 Biological process(BP)의 GO는 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity(GO:0046934), Phosphatidylinositol-mediated signaling(GO:0048015), 및 Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling(GO:0048015)와 같은 PI3k-Akt 신호 전달 경로와 관련이 있었다.

[0144] **실시예 5. Beetlesin에 의한 세포 자살과 유전자 발현의 연관성 분석**

[0145] Beetlesin이 MDA-MB-231 세포에서 PI3k-Akt 신호 전달 경로의 활성화에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, PI3K-Akt 신호 전달(hsa04151) KEGG 경로의 DEG를 관찰하였다. PI3K-Akt 신호 전달 KEGG 경로의 DEG를 관찰한 결과는 도 5A 및 B에 나타내었다.

[0146] 도 5A 및 B에 나타낸 바와 같이, Beetlesin이 처리된 MDA-MB-231 세포는 9개의 유전자(FGF16, FGF1, KITLG, KIT, NGF, FOXO3, BCL2L11, PTEN 및 LPAR3)가 상향 조절되고, 6개의 유전자(EPOR, AKT1, PIK3CA, COL1A2, ITGA1 및 CHAD)가 하향 조절되는 것을 확인하였다.

[0147] PI3k-Akt 신호 전달 경로는 phosphoinositide-3,4,5-triphosphate (PIP3)의 탈인산화를 통해 phosphatase 및 tensin homolog(PTEN)에 의해 부정적으로 조절된다. 또한 AKT 활성화 억제는 FOXO 계열(FOXO1, FOXO3a, FOXO4 및 FOXO6)을 부정적으로 조절하고, FOXO 전사 인자는 암 및 세포 자살과 관련이 있다고 알려져 있다. 활성화된 FOXO3a는 BCL2L11 및 p2154와 같은 세포자살에 관여하는 단백질의 발현을 촉진한다.

[0149] DEG 관찰 결과, Beeltesin 처리 하에 가장 유의하게 조절된 6개 유전자(ITGA1, PIK3CA, PTEN, AKT1, FOXO3, BCL2L11)의 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR 결과는 도 5C에 나타내었다.

[0150] 도 5C에 나타낸 바와 같이, ITGA1, PIK3CA, PTEN, AKT1, FOXO3 및 BCL2L11 유전자는 MDA-MB-231 세포에서 mRNA 발현이 유의하게 변화된 것을 확인하였다. 구체적으로, Beetlesin이 ITGA1의 mRNA 발현을 유의하게 억제한다는 것을 보여주었다. 일관되게, PI3CA가 억제되었고 PTEN이 자극되어 AKT1을 억제했다. 또한 FOXO3a와 BCL2L11의 mRNA 발현은 DEG의 발현과 마찬가지로 용량 의존적으로 유의하게 증가하였다.

[0152] MDA-MB-231 세포에서 Beetlesin 처리에 대한 반응으로 PI3k-Akt/FOXO3a 신호전달 경로와 관련된 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5D에 나타내었다.

[0153] 도 5D에 나타낸 바와 같이, p-PI3K/PI3K의 상대적 발현은 유의하게 감소하였으나 PTEN의 경우 유의하게 증가하였다. p-AKT/AKT의 상대적 발현은 유의하게 억제된 반면, p-FOXO3a/FOXO3a는 Beetlesin 치료에 대한 반응으로 용량 의존적으로 유의하게 유도되었다. 따라서 이러한 결과는 Beetlesin이 RNA 시퀀싱 분석 결과에서와 같이 PI3K-Akt/FOXO3a 신호 전달 경로 조절을 통해 MDA-MB-231 세포에서 세포 자살 유도를 촉진한다는 것을 시사한다.

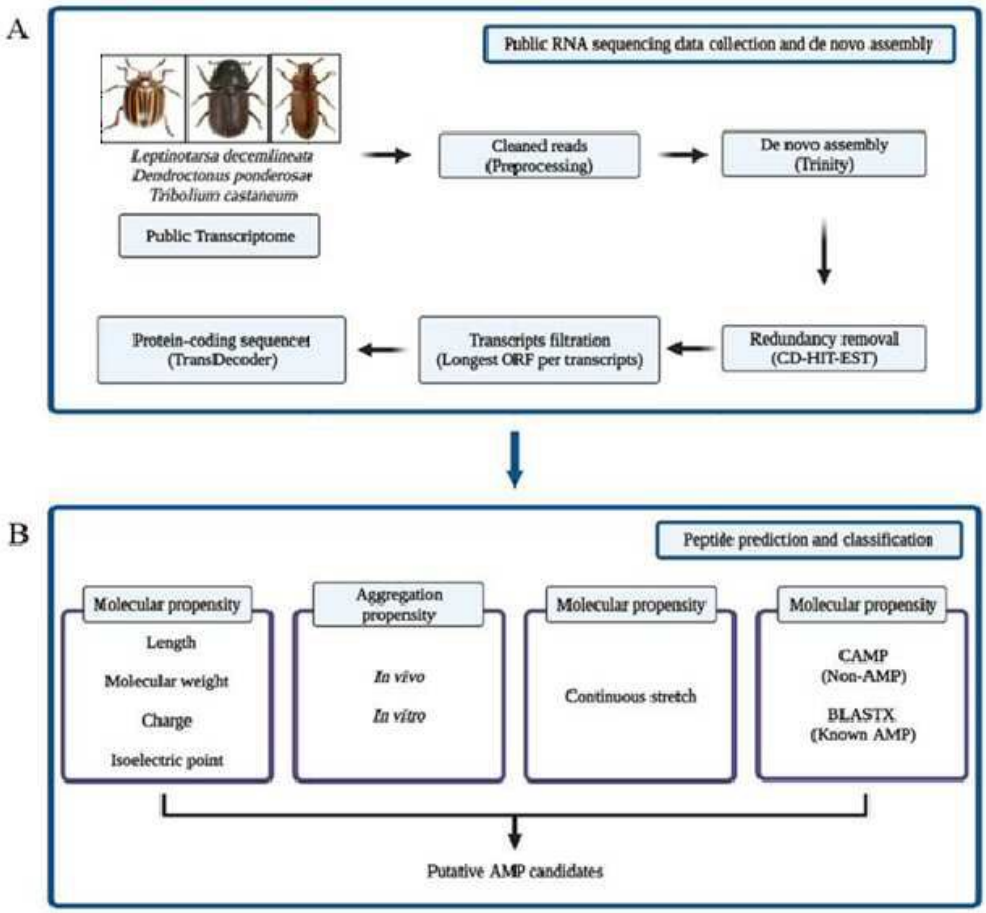
[0155] 종합적으로 본 발명자들은 데노보 어셈블리를 통해 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 Beetlesin을 개발하고, Beetlesin이 비암세포에 대한 독성은 나타내지 않으면서, 암세포의 세포 자살을 유도한다는 것을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 Beetlesin이 현저한 항암 효과가 있다는 것을 의미하는 바, 암의 예방 또는 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0157] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이

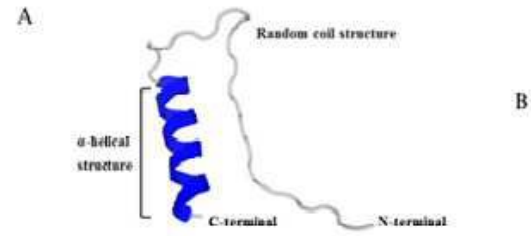
다.

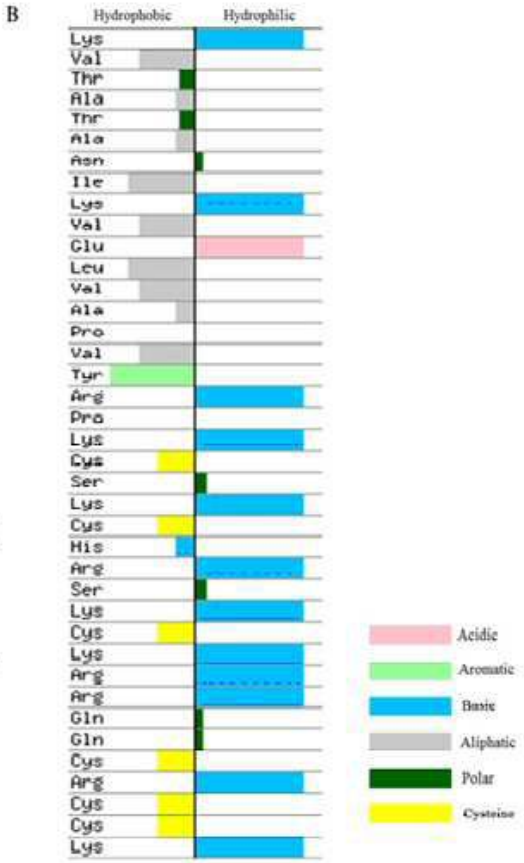
도면

도면1


A
Public RNA sequencing data collection and de novo assembly
Leptinotarsa decemlineata
Dendroctonus ponderosae
Tribolium castaneum
Public Transcriptome
Cleaned reads (Preprocessing)
De novo assembly (Trinity)
Redundancy removal (CD-HIT-EST)
Transcripts filtration (Longest ORF per transcripts)
Protein-coding sequences (TransDecoder)
B
Peptide prediction and classification
Molecular propensity
Length
Molecular weight
Charge
Isoelectric point
Aggregation propensity
In vivo
In vitro
Molecular propensity
Continuous stretch
Molecular propensity
CAMP (Non-AMP)
BLASTX (Known AMP)
Putative AMP candidates

도면2

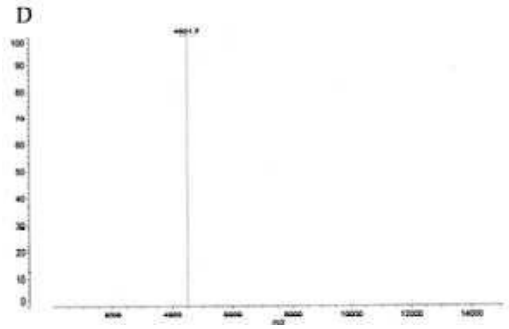


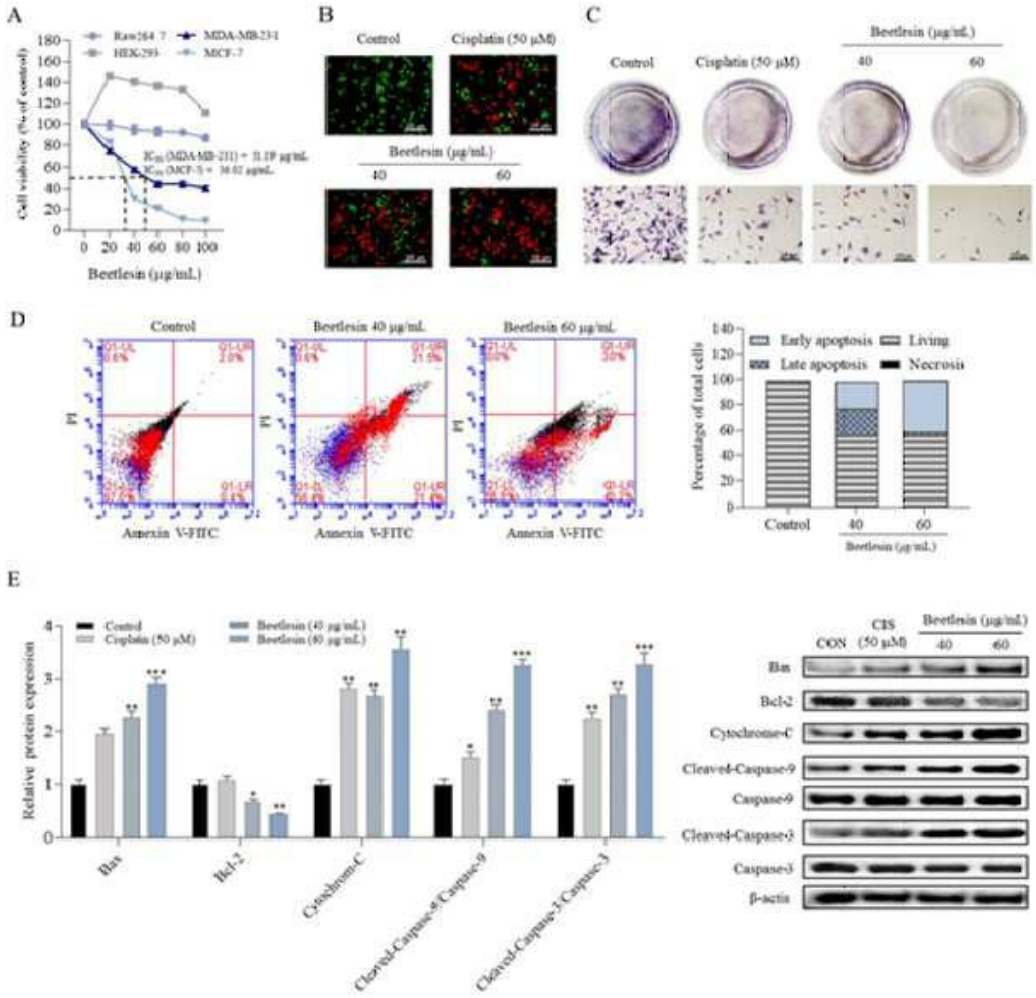




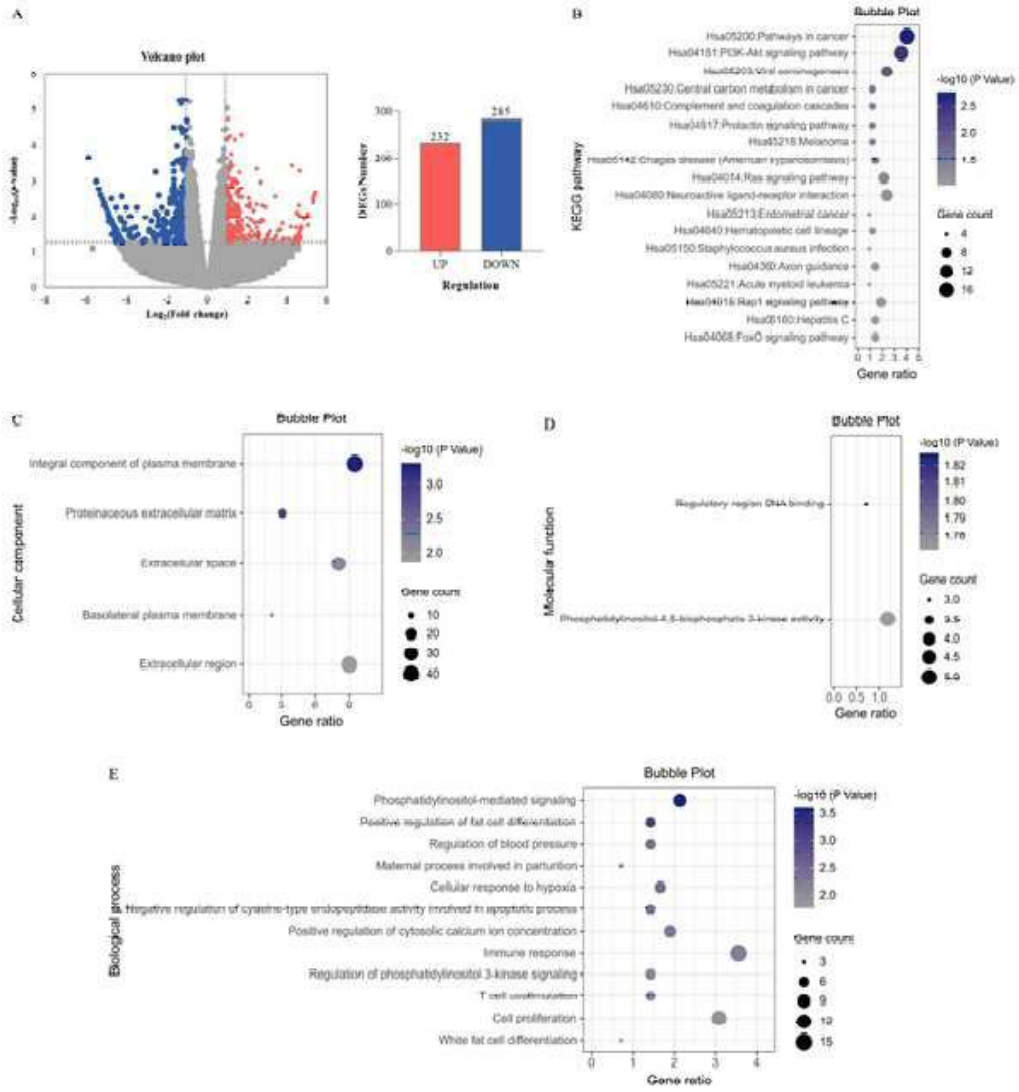
| Peak No. | Ret Time | Area | Area (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 14.781 | 5969 | 0.414 |
| 2 | 15.417 | 1395087 | 96.792 |
| 3 | 15.803 | 19858 | 1.378 |
| 4 | 31.137 | 2624 | 0.182 |
| 5 | 31.662 | 2633 | 0.183 |
| 6 | 33.431 | 15151 | 1.051 |
| Total | | 1441322 | 100 |



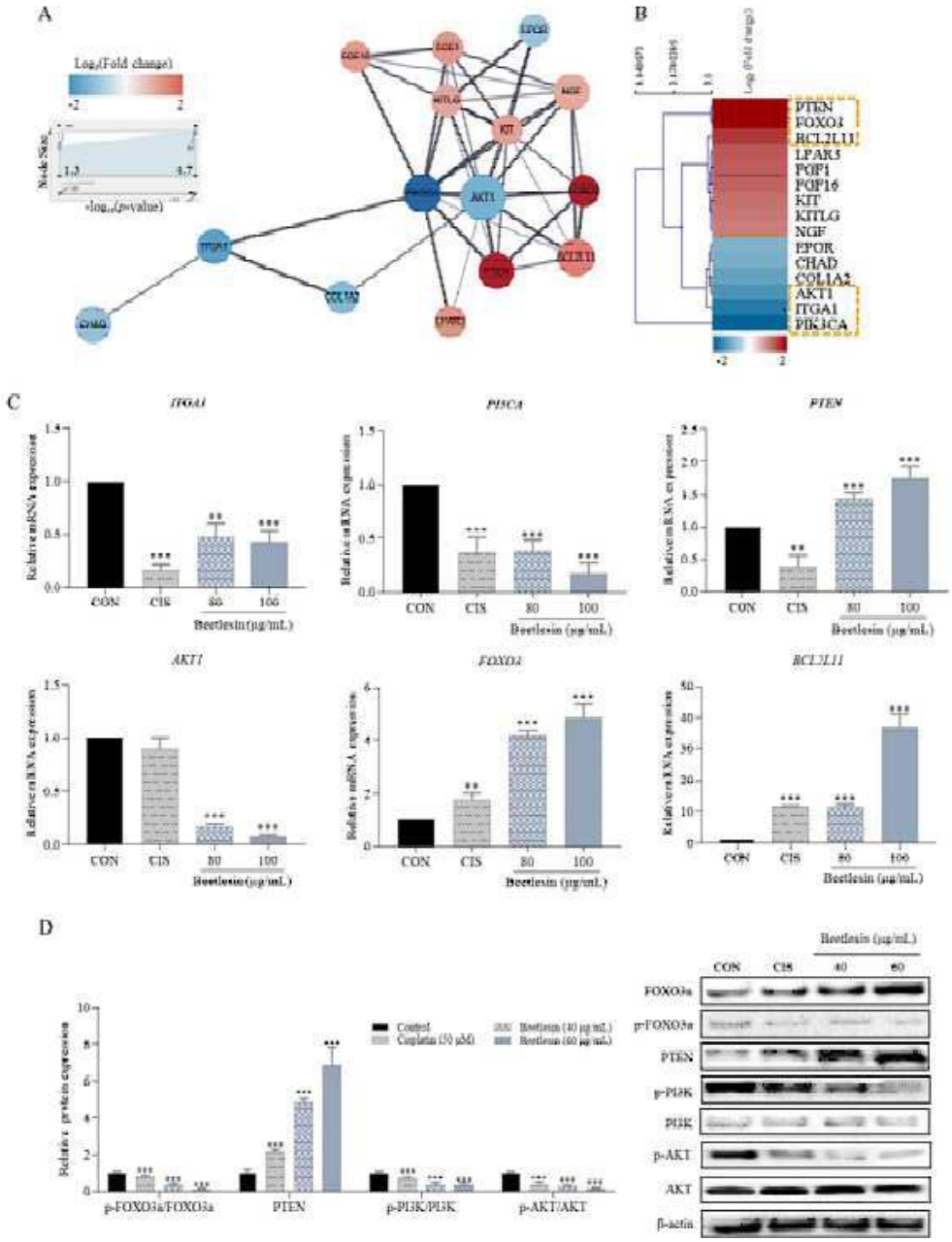
도면3


A
B
C
D
E
Control
Cisplatin (50 μM)
Beetlesin (μg/mL)
40
60
Cell viability (% of control)
Beetlesin (μg/mL)
Annexin V-FITC
PI
Early apoptosis
Living
Late apoptosis
Necrosis
Percentage of total cells
Relative protein expression
Bax
Bcl-2
Cytochrome-C
Cleaved-Caspase-9/Caspase-9
Cleaved-Caspase-3/Caspase-3
CON
CIS
β-actin

도면4


A
Volcano plot
DEGs Number
232
285
UP
DOWN
Regulation
B
Bubble Plot
Hsa05200:Pathways in cancer
Hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway
Hsa05230:Central carbon metabolism in cancer
Hsa04610:Complement and coagulation cascades
Hsa04917:Prolactin signaling pathway
Hsa05218:Melanoma
Hsa04014:Ras signaling pathway
Hsa04080:Neuroactive ligand-receptor interaction
Hsa05213:Endometrial cancer
Hsa04640:Hematopoietic cell lineage
Hsa05150:Staphylococcus aureus infection
Hsa04360:Axon guidance
Hsa05221:Acute myeloid leukemia
Hsa04015:Rap1 signaling pathway
Hsa05160:Hepatitis C
Hsa04068:FoxO signaling pathway
KEGG pathway
-log10 (P Value)
Gene count
Gene ratio
C
Bubble Plot
Integral component of plasma membrane
Proteinaceous extracellular matrix
Extracellular space
Basolateral plasma membrane
Extracellular region
Cellular component
-log10 (P Value)
Gene count
Gene ratio
D
Bubble Plot
Regulatory region DNA binding
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity
Molecular function
-log10 (P Value)
Gene count
Gene ratio
E
Bubble Plot
Phosphatidylinositol-mediated signaling
Positive regulation of fat cell differentiation
Regulation of blood pressure
Maternal process involved in parturition
Cellular response to hypoxia
Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process
Positive regulation of cytosolic calcium ion concentration
Immune response
Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling
Cell proliferation
White fat cell differentiation
Biological process
-log10 (P Value)
Gene count
Gene ratio

도면5




## 서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

3BIGS CO., LTD.

<120> Novel anti-cancer peptide and uses thereof

<130> 1.64P

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beetlesin

<400> 1

Lys Val Thr Ala Thr Ala Asn Ile Lys Val Glu Leu Val Ala Pro Val
1 5 10 15

Tyr Arg Pro Lys Cys Ser Lys Cys His Arg Ser Lys Cys Lys Arg Arg
20 25 30

Gln Gln Cys Arg Cys Cys Lys
35