



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0096951
(43) 공개일자 2025년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 38/08 (2019.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43572 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0187176
(22) 출원일자 2023년12월20일
심사청구일자 2023년12월20일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김기영
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호 (죽전동, 도담마을7단지프리에체아파트)
김예은
경기도 수원시 영통구 매영로398번길 14, 302호 (영통동)
(74) 대리인
특허법인태백

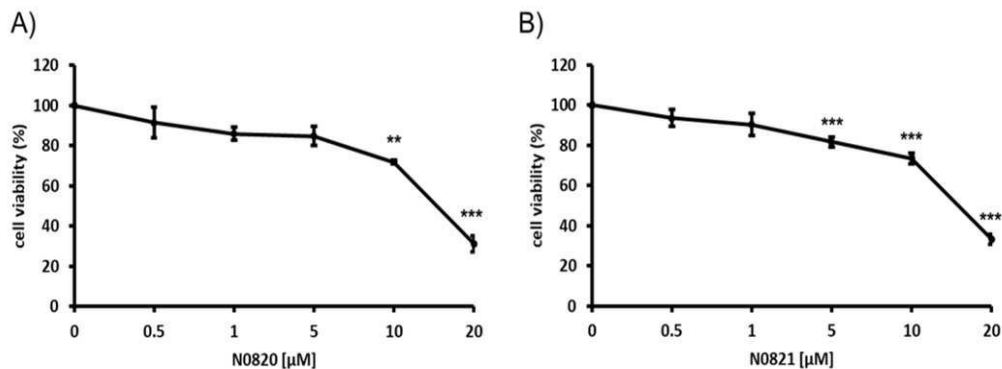
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 꿀벌 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 꿀벌 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 여러 종류의 꿀벌의 trp(트립토판)-arg(아르기닌) 밀집 부위에서 공통적으로 나타나는 특정 서열의 펩타이드가 항암 활성을 나타내는 것을 확인함으로써, 암 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/08 (2021.08)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395073463
과제번호	PJ015763022022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농업정책지원기술개발사업
연구과제명	꿀벌 유전체 기반 병해충 방제 기법 개발(2공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 꿀벌에서 유래한 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 꿀벌은 아피스 캐라나(*Apis cerana*), 아피스 돌사타(*Apis dorsata*), 아피스 멜리페라(*Apis mellifera*) 및 아피스 플로레아(*Apis florea*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제1항의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암 질환은 전립선암, 방광암, 간암 및 자궁경부암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꿀벌 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나인 암은 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 1위의 질병으로서 연간 약 10만명 이상이 진단되고, 약 6만명 이상을 사망에 이르게 한다. 암은 진행 초기 단계에서는 세포의 DNA 손상으로 돌연변이가 발생하고, 증식 단계에서는 돌연변이로 인한 비정상적인 유전자발현이 유도되거나 세포간의 신호전달과정 변화 등을 통하여 세포 증식이 증가, 세포사멸이 억제되며, 전이 단계에서는 이러한 이상 유전자 발현이 더욱 증가되어 암세포의 전이가 유도된다.

[0003] 현재 사용되고 있는 항암제들 중 효소, 백신 등의 생물학적 제제는 실용 단계에 있는 상태는 아니며, 화학 합성 의약품의 경우 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고 독성에 의해 많은 부작용의 위험이 있다. 이러한 이유로 아직 완전한 치료법은 개발된 것이 없으며, 비교적 효과적인 기존의 암 치료법인 외과적 수술 요법, 방사선 치료 요법을 병행하고 있으며, 따라서 화학 합성 의약품의 부작용이 없는 식물 유래 천연 항암제의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 KR 10-1990437(2018.10.05. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 항암 활성을 나타내는 신규 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 여러 종류의 꿀벌의 trp(트립토판)-arg(아르기닌) 밀집 부위에서 공통적으로 나타나는 특정 서열의 펩타이드가 항암 활성을 나타내는 것을 확인함으로써, 암 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물으로써 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 하기 실험예 1-1에서 제조한 2종의 펩타이드(이하 샘플이라 함)가 암(전립선암) 생장에 미치는 영향을 분석한 결과이다. $**P<0.01$, $***P<0.001$.

도 2는 상기 샘플이 전립선암의 종양 스페로이드(speroid) 생장에 미치는 영향을 분석한 결과이다. $**P<0.01$, $***P<0.001$.

도 3은 상기 샘플이 전립선암 내 세포사멸 관련 인자 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

도 4는 상기 샘플이 전립선암의 세포사멸에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 5는 상기 샘플의 전립선암 세포사멸 기전을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 제공한다.

[0016] 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열은 하기와 같다.

[0017] [서열번호 1]

[0018] WWWRWWRKI

[0019] [서열번호 2]

[0020] YWWWRWWRKI

[0021] 상기 펩타이드는 꿀벌에서 유래한 것일 수 있고, 상기 꿀벌은 아피스 캐라나(*Apis cerana*), 아피스 돌사타(*Apis*

dorsata), 아피스 멜리페라(*Apis mellifera*) 및 아피스 플로레아(*Apis florea*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 또한, 상기 펩타이드는 CCNE1(Cyclin E1) 또는 CCND1(Cyclin D1) 발현을 촉진하거나 CCNA2(Cyclin A2) 또는 CDKN1B(p27) 발현을 억제할 수 있다.

[0023] CCNE1 유전자가 코딩하는 단백질인 Cyclin E1은 세포주기 G1/S 단계 경계에 축적되고, 세포주기가 S단계로 가며 분해된다. CCNA2는 CDK2(Cyclin-dependent kinase 2)와 S 단계에서 binding하고, p53은 p21의 조절을 통해 CDK2의 발현을 조절한다. CCNA2 및 p53 발현이 감소함에 따라 세포주기가 G1에서 S phase로 갈 때 이상이 생기고 이와 같은 현상은 CCNE1의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 암 질환은 전립선암, 방광암, 간암 및 자궁경부암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0030] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0032] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범

위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

- [0036] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 “건강기능식품”이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0041] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 “식품 첨가물”로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0042] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0043] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전 하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0044] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.
- [0045] 본 발명에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0046] 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0047] 본 발명에서 용어 “개선”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 말한다.
- [0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다. 또한, 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략될 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0051] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0052] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0054] [실험예 1] 실험 준비

[0055] 1-1. 샘플 제조

[0056] 본 실험의 샘플로 사용한 2종의 펩타이드(N0820 및 N0821)를 하기와 같이 제조하였다. 꿀벌의 독(봉독)의 항암 활성이 보고된 바 있어, 항암 활성을 나타내는 꿀벌 유래 물질(아미노산)을 확인하기 위해, 꿀벌의 DNA로부터 trp(트립토판)-arg(아르기닌) 밀집 부위를 찾아, 여러 꿀벌에서 공통된 서열을 비교하였고, 이에 따라 BIOSTEM (경기도, 대한민국)에 의뢰하여 2종의 펩타이드(N0820 및 N0821)를 합성하였다. 상기 꿀벌 내 trp(트립토판)-arg(아르기닌) 밀집 부위의 서열은 하기 표 1과 같고, 상기 펩타이드 서열은 하기 표 2와 같다.

표 1

꿀벌 종류	꿀벌 내 Trp-Arg 밀집 부위 서열
<i>Apis cerana</i>	RRSWCCCWYWWWRRWKILGRARWKCRR
<i>Apis dorsata</i>	RRSWCCCWYWWWRRWKIFGRARWKCRR
<i>Apis mellifera</i>	RRSWCCCWYWWWRRWKMFGARWKCRR
<i>Apis florea</i>	RRSWCCCWYWWWRRWKMFGARWKCRR

표 2

펩타이드	서열
N0820	WWWRRWKI
N0821	YWWWRRWKI

[0060] 1-2. 세포 모델

[0061] 암 세포주인 DU145 세포(전립선암), LNCaP 세포(전립선암), PC3 세포(전립선암), Hela 세포(자궁경부암), HepG2 세포(간암) 및 T24 세포(방광암)는 한국 세포주 은행에서 구매하였다. 상기 세포를 RPMI 1640[10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% P/S(penicillin/streptomycin) 함유] 및 DMEM(10% FBS 및 1% P/S 함유) 배지를 사용하여 37℃ 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

[0063] [실험예 2] 통계 분석

[0064] 본 발명에서 수행한 실험 결과 데이터는 평균±표준편차(SD)로 나타냈다. 각 실험은 duplicate로 수행하였고, 최소 3번 이상 반복하였다. One-way ANOVA(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)를 유의성 확인에 사용하였다.

[0066] [실시예 1] 항암 활성 분석

[0067] 1-1. 세포독성 분석

[0068] 상기 샘플이 암 생장에 미치는 영향을 확인하기 위해, MTT assay를 수행하였다. 상기 실험에 1-2의 세포를 각각 96 웰 플레이트에 5×10^3 cell/well로 분주(seeding)하고 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고, 샘플을 무혈청(serum free) 배지와 함께 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 그 후, MTT 용액 0.5mg/ml을 처리하고 37℃에서 3시간 동안 배양하고, DMSO(Dimethyl sulfoxide) 100 μl로 교체하여 포마잔 결정(formazan crystal)을 녹였다. 빛이 차단된 환경에서 15분 동안 약간의 교반을 해주고, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0069] 그 결과, 도 1과 같이, 2종의 샘플 처리군에서 모두 샘플의 농도 의존적으로 DU145 세포의 세포 생존율이 유의하게 감소하였고, 구체적으로 2종의 샘플 20 μM 처리군에서 세포 생존율은 각각 대조군의 약 74%(N0820) 및 68%(N0821)로 나타났다. 또한, 2종의 샘플 100 μM 처리군에서 암세포의 세포 생존율은 하기 표 3과 같이 나타났다. 상기 결과로부터, 상기 2종의 샘플은 다양한 암에 대한 항암 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 3

	세포 생존율(%)					
	HeLa	HepG2	DU145	LNCaP	PC3	T24
N0820(100 μM)	11	30	20	37	36.5	23
N0821(100 μM)	9	27	19.5	35	38	19

[0072] 1-2. 종양 스페로이드 성장 분석

[0073] 상기 샘플이 전립선암의 종양 스페로이드(spheroid) 생장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 3D culture assay를 수행하였다. 샘플은 10mM의 농도로 물에 녹인 후 사용하였다. DU145 세포를 96 웰 SPL3D™ Cell Floater에 5×10^3 cell/well로 분주하고 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 샘플 20 μM을 배지에 첨가하여 스페로이드 형성을 확인하였다. 3~4일 후 camera-attached microscope (EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 스페로이드 사진을 촬영하고, Image J software를 사용하여 면적을 계산하여 수치화하였다.

[0074] 그 결과, 도 2와 같이, 2종의 샘플 처리군 모두 대조군(샘플 대신 물 처리; Control) 대비 스페로이드 부피가 시간 경과에 따라 유의하게 감소하였고, 실험 4일 차에 2종의 샘플 처리군의 스페로이드 부피는 모두 대조군의 약 74%로 나타났다. 상기 2종의 샘플은 전립선암의 스페로이드 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

[0076] 1-3. 세포사멸 관련 인자 발현 분석

[0077] 상기 샘플이 전립선암 내 세포사멸 관련 인자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR을 수행하기 전, 먼저 세포를 배양(준비)하였다. DU145 세포를 96 웰 SPL3D™ Cell Floater에 5×10^3 cell/well로 분주하고 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고, 샘플을 무혈청(serum free) 배지와 함께 농도별로 처리하고, 24시간 동안 추가 배양하였다.

[0078] qRT-PCR은 다음과 같이 수행하였다. Trizol reagent(Life Technology, Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 제조업체의 프로토콜을 따라 RNA를 분리하고, total RNA 1 μg을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, QGreen 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe, Korea)를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 상기 qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 4와 같고, GAPDH를 정량적 대조군으로 사용하였다. 유전자 발현량은 fold change 값으로 계산하여 delta-delta Cq로 표현하였다.

표 4

[0079]

유전자	방향	프라이머 서열 (5' → 3')	Annealing 온 도(℃)	NCBI gene ID
GAPDH	Forward	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	57.1	2597
	Reverse	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	55.3	
CDKN2A(p14)	Forward	GGTTCTTGGTGACCCCTC	59.5	1029
	Reverse	CTAGACGCTGGCTCCTCAGT	58.4	
CDKN1B(p27)	Forward	AAGGTTTGGAGAGCGGCTG	53.0	1027
	Reverse	GATCAAATGGACTGGCGAGC	52.8	
CCNA2(Cyclin A2)	Forward	AGTAAACAGCCTGCGTTCACC	59.1	890
	Reverse	GAGGGACCAATGGTTTCTGG	57.1	
CCNB1(Cyclin B1)	Forward	TAAGGCGAAGATCAACATGG	53.0	891
	Reverse	GCTTCCTTCTTCATAGGCAT	52.8	
CCND1(Cyclin D1)	Forward	CTGTGCTGCGAAGTGGAACC	60.6	595
	Reverse	GACGATCTTCCGCATGGAC	57.3	
CCNE1(Cyclin E1)	Forward	ACACCATGAAGGAGGACG	55.6	898
	Reverse	CACAGACTGCATTATTGTCCC	54.5	

[0080]

그 결과, 도 3과 같이, 2종의 샘플 처리군 모두 대조군(샘플 0 μ M 처리군; 샘플 미처리군) 대비 CCNE1 및 CCND1의 상대적 mRNA 발현이 증가하고, CCNA2 및 CDKN1B의 상대적 mRNA 발현을 감소하였다(CCNE1에 의해 암호화 되는 단백질인 cyclin E1은 G1/S 단계 전이에서 축적되고 이후 세포 주기가 S단계로 진행됨에 따라 분해되고, CCNA2는 S단계에서 CDK2와 결합한다. CCNA2와 p53이 감소하면 세포주기의 S에서 G2로의 전이가 교란되어 G1에서 S 단계로의 전이에 영향을 주는 CCNE1, CCND1의 발현이 증가, CDKN1B의 감소한 것을 확인할 수 있다). 상기 결과로부터, 상기 2종의 샘플은 전립선암의 세포사멸 관련 인자 발현 조절을 통해 G1/S 세포주기 정지를 유도하여 항암 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0082]

1-4. 세포사멸 분석

[0083]

상기 샘플이 전립선암의 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다. 상기 실시예 1-3과 동일하게 DU145 세포를 배양(준비)하고, BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis detection kit의 프로토콜에 따라 Annexin V/PI 염색을 수행하였다. 그 후, BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer를 사용하여 탐지(detection)하였다.

[0084]

그 결과, 도 4와 같이, 2종의 샘플 처리군 모두 대조군 대비 세포사멸이 증가하였다. 구체적으로, N0820 펩타이드의 경우, 10 μ M 및 20 μ M 처리군에서 대조군 대비 late apoptosis가 각각 17.8% 및 20.7% 증가하였다. 또한, N0821 펩타이드의 경우, 10 μ M 및 20 μ M 처리군에서 대조군 대비 late apoptosis가 각각 25.5% 및 32.8% 증가하였다. 상기 결과로부터, 상기 2종의 샘플은 전립선암의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[0086]

1-5. 세포사멸 기전 분석

[0087]

상기 실시예 1-3 및 1-4에서 확인한 샘플의 전립선암 세포사멸 활성의 세포사멸 기전을 확인하기 위해, JC-1 염색 및 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다.

[0088]

JC-1 염색은 다음과 같이 수행하였다. 상기 실시예 1-3과 동일하게 DU145 세포를 배양(준비)하고, JC-1 염색을 수행하여 세포 내 미토콘드리아 활성을 분석하였다. 그 후, BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer를 사용하여 탐지(detection)하여 FlowJo_v10.9.0 software를 이용하여 정량하였다.

[0089]

웨스턴 블롯은 다음과 같이 수행하였다. 상기 배양(준비)한 DU145 세포를 prep하여 단백질 농도를 확인하기 위해 BCA assay를 수행하였다. 세포 용해물(cell lysate)로부터 나온 단백질을 30 μ g/well을 로딩하고, SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 이용하여 분리하였다. 그 후, PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane)으로 transfer하고, TBST buffer(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl 및 0.1% Tween 20 함유, pH 7.6)에 녹여진 5% BSA(bovine serum albumin)를 이용하여 블로킹(blocking)하

였다. 그 후, 멤브레인에 1차 항체 p-p53(sc-51690), GAPDH(sc-2577), JNK(sc-7345), p-JNK(sc-6254), p38(sc-535) 및 p-p38(sc-17852-R)(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)과 p53(#9282)(Cell Signaling Technology, MA, USA)을 4℃에서 밤새(overnight) 처리하였다. 2차 항체를 1시간 처리하고, ECL reagent(Bio-Rad, USA)를 처리하여 UVITEC imaging system equipment(UVITEC Cambridge, UK)로 탐지(detection)하였다. 웨스턴 블롯 band는 ImageJ software를 사용하여 수치화하였다.

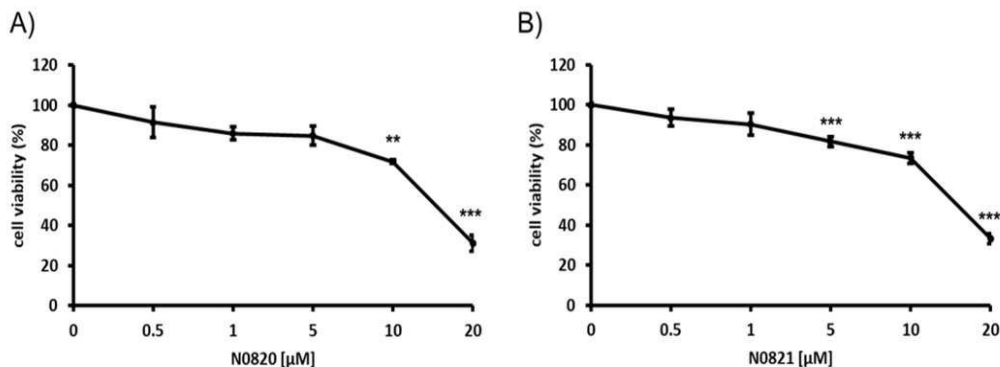
[0090] 그 결과, 도 5와 같이, JC-1 염색 분석에서 2종의 샘플 처리군 모두 대조군(샘플 미처리군; Only cell) 대비 미토콘드리아 활성(응집된 JC-1 형광)이 감소하는 것을 확인하였다. 구체적으로, N0820 처리군은 대조군 대비 미토콘드리아 활성이 20.18% 감소하였고, N0821 처리군은 대조군 대비 미토콘드리아 활성이 26.58% 감소하였다. 또한, 웨스턴 블롯 분석에서 2종의 샘플 처리군에서 모두 대조군(샘플 0 μ M 처리군; 샘플 미처리군) 대비 p53 및 p-p53 발현이 샘플의 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 상기 2종의 샘플은 p53 및 p-p53 발현을 감소시켜 SERCA(Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) 및 MCU(Mitochondrial Ca^{2+} uniporter) 발현 증가 및 미토콘드리아에서 Cytochrome C 방출 증가를 유도하고, 이를 통해 미토콘드리아 활성을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0092] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

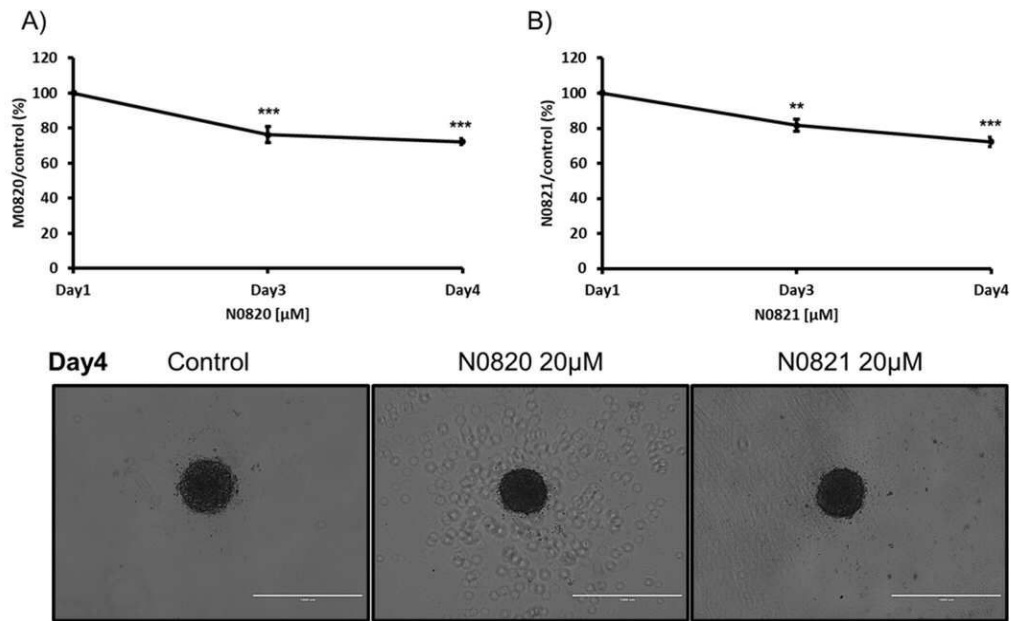
[0093] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

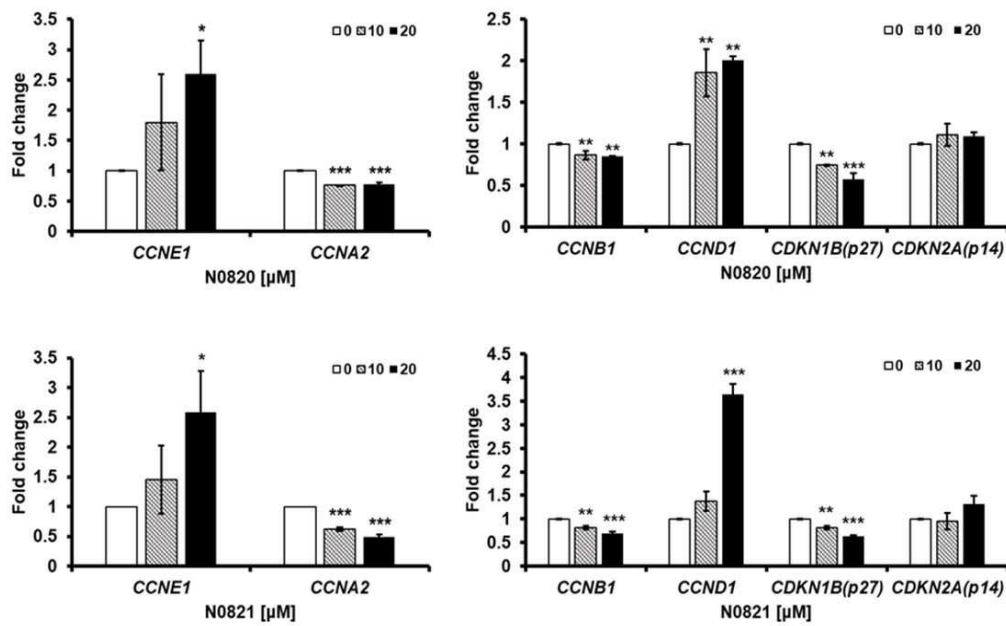
도면1



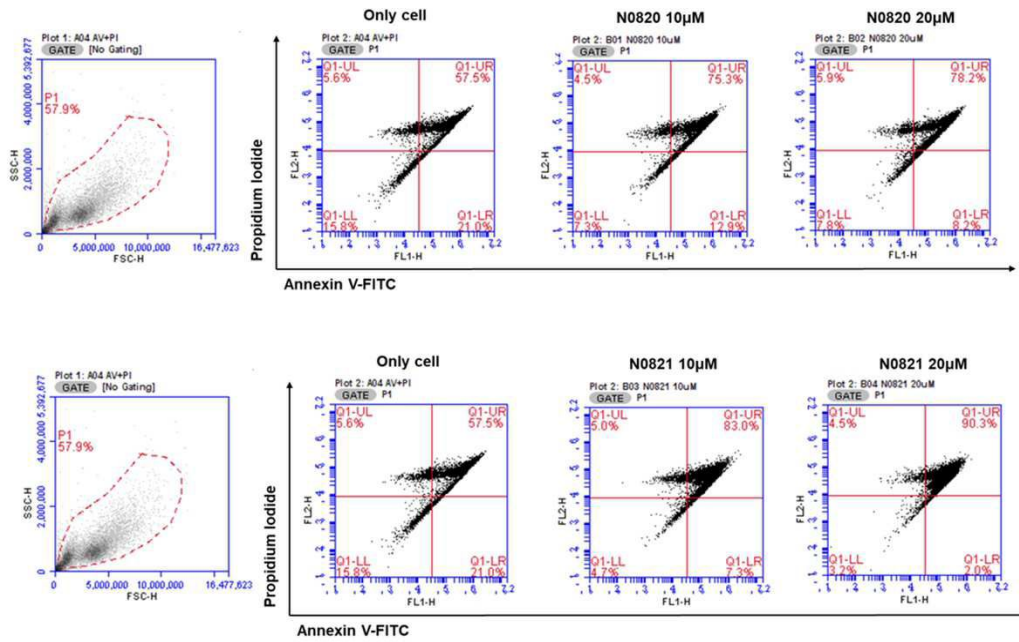
도면2



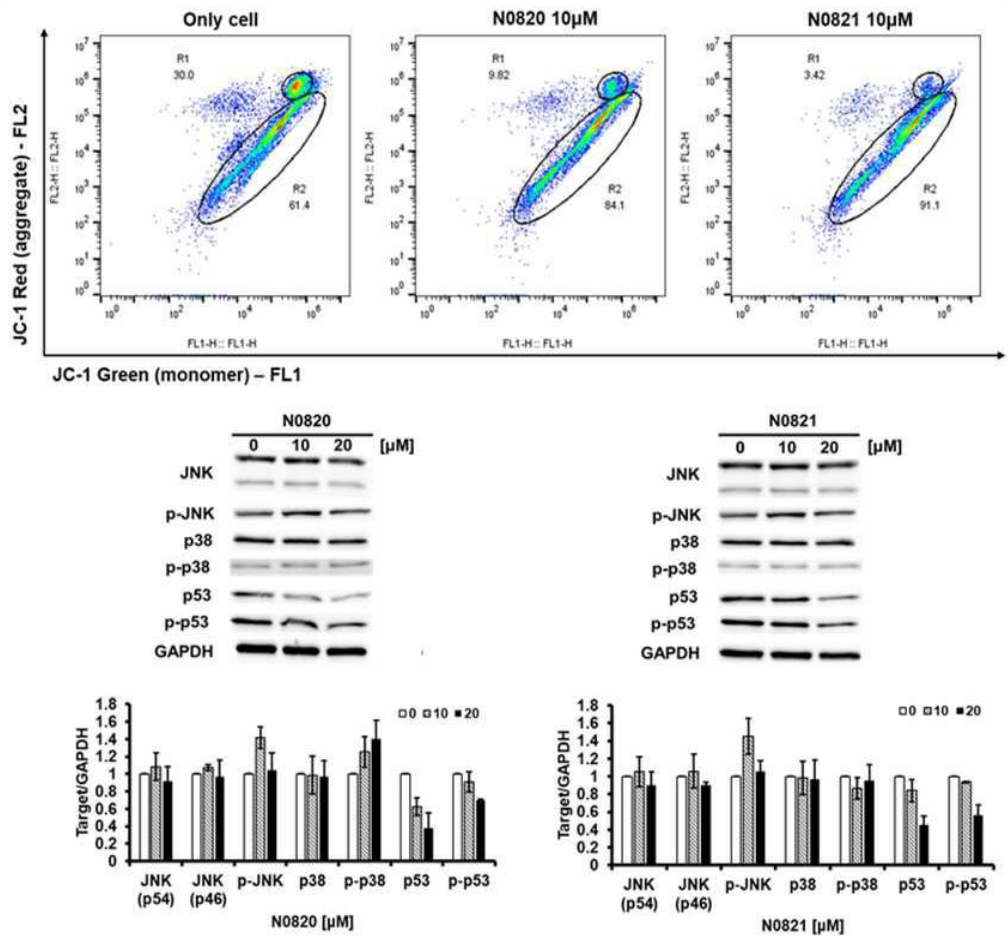
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.