

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0000647
(43) 공개일자 2020년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0072710
(22) 출원일자 2018년06월25일
심사청구일자 2018년06월25일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이승욱
대구광역시 달성군 다사읍 대실역북로 26, 207동
102호 (대실역청아람2단지아파트)
조혜린
대구광역시 수성구 달구벌대로 3280, 104동 505호
(신매동, 시지 효성 백년가약 1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

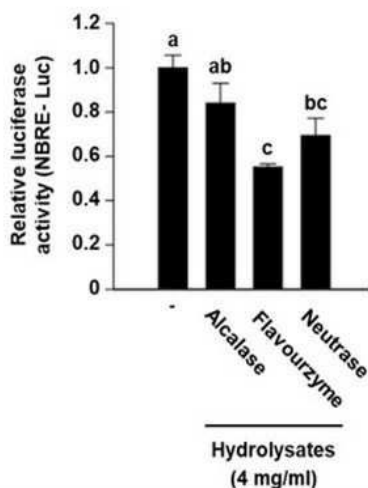
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 갈색겨저리 유충의 가수분해물로부터 분리된 항암 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 상기 펩타이드가 다양한 암 세포에 대하여 독성을 나타내며, 특히 세포 내 핵 수용체로 알려진 NR4A1의 전사 활성을 억제하는 효과를 나타낸 바, 상기 펩타이드는 다양한 종류의 암을 치료하기 위한 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

이효선

경상북도 포항시 남구 송림로56번길 17-7 (송도동)

정연섭

대구광역시 달성군 다사읍 다사로109길 39-9 (박곡리)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ012284012018

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 공동연구사업

연구과제명 곤충 단백질로부터 비소세포폐암에 대한 표적 항암 펩타이드 개발

기 여 율 50/100

주관기관 계명대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1B03933985

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 천연물 유래 NR4A1 저해제로부터 종양유전자인 β -catenin 및 Kras를 이중표적하는 대장암 치료용 식의약 소재 개발

기 여 율 50/100

주관기관 계명대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm) 유충을 단백질 가수분해효소인 플라보르자임, 알칼라아제, 뉴트라아제, 브로멜라인 또는 파파인 중 어느 하나 이상으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 암세포에 독성을 나타내어 암세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 펩타이드는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm) 유충을 단백질 가수분해효소인 플라보르자임, 알칼라아제, 뉴트라아제, 브로멜라인 또는 파파인 중 어느 하나 이상으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 펩타이드는 암세포에 독성을 나타내어 암세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 유방암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항암용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 펩타이드는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm) 유충을 단백질 가수분해효소인 플라보르자임, 알칼라아제, 뉴트라아제, 브로멜라인 또는 파파인 중 어느 하나 이상으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 항암용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 펩타이드는 암세포에 독성을 나타내어 암세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 유방암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 어

는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈색거저리 유충의 가수분해물로부터 분리된 항암 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경 성장 요소 IB(Nerve growth factor IB, NR4A1)는 내인성 리간드(ligand)가 아직 밝혀지지 않아 고아 핵수용체로 분류되는 수용체로, PC12 세포에서 신경성장 요인(nerve growth factor)에 활성화되는 유전자로 처음 알려진 이후, T-세포 수용체에 의해 유도되는 흉선세포의 자살사(apoptosis)에 핵심적인 역할을 하며, 전사조절인자로서 작용하여 동물의 성장, 발생, 분화 및 항상성 유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

[0003] 특히, NR4A1은 비소세포성폐암, 췌장암을 비롯한 많은 종류의 종양 조직에서 과발현하고 있으며, 다양한 경로를 통하여 암세포의 성장과 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 이에 따라, 핵전사 인자인 NR4A1의 활성을 저해하여 암세포의 사멸을 유도시키는 방법은 다양한 암 치료의 새로운 전략이 될 수 있다.

[0004] 한편, 갈색거저리(Tenebrio molitor, mealworm)는 딱정벌레목 거저리과의 곤충으로 "갈색쌀거저리"라고도 불리며 현재 한국을 비롯한 전 세계에 분포되어 있고, 강한 적응력을 가지고 있으며 변태 기간이 짧아 쉬운 사육기술로도 연중 사육이 가능하여 산업화에 용이하다. 또한, 갈색거저리의 영양성분은 수분이 2.90%, 조단백질이 50.32%, 조지방 33.70%, 조회분 3.76%, 조섬유 4.81%로, 매우 높은 영양성분들을 가지고 있다. 이와 관련하여, 갈색거저리가 단백질 함량이 매우 높은 고단백질 소재로 2016년 식용곤충원료로 식품공전에 등록됨으로써 갈색거저리의 활용에 대한 관심이 높아지고 있다. 갈색거저리 유충은 대두보다 필수 아미노산을 많이 함유하고 있고, 육류에 비해 불포화 지방산 함량이 높으며, 비타민 A와 철, 식이섬유 등이 비교적 풍부한 편으로 영양적인 장점이 많다. 더욱이, 가축 사육과는 달리 곤충 사육에 필요한 땅을 개선할 필요가 없고, 적은 사료만으로도 간편하게 많은 양의 곤충을 사육하여 보급할 수 있으므로 경제적 부담이 적은 장점도 있다.

[0005] 국내에서 이루어진 갈색거저리 유충에 관한 연구로는 갈색거저리 에탄올 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과 등 갈색거저리 추출물을 이용한 연구들을 들 수 있는데, 이와 달리 갈색거저리 유충의 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1535883호(2015.07.06 등록).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 갈색거저리 유충의 단백 가수분해물에서 분리한 신규한 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 우수한 항암 효과를 나타내는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 우수한 항암 효과를 나타내는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0011] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 항암용 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항암용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 갈색거저리 유충을 특정 단백 가수분해 효소로 가수분해하여 얻은 단백 가수분해물로부터 분리된 헵타머 펩타이드 및 이를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 상기 펩타이드는 NR4A1의 전사 활성을 효과적으로 억제하였으며, 다양한 암 세포주에서 세포 독성을 나타내었고, 특히, 상기 펩타이드 중 아미노산 하나라도 삭제 혹은 치환되는 경우, 항암 효과를 나타내지 못하거나 항암 효과가 감소하는 바, 본 발명에 따른 펩타이드는 효과적으로 항암 활성을 나타내는 조성물로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 다양한 가수분해 효소를 처리한 단백 가수분해물(3 kDa 이하)의 NR4A1 저해 활성을 확인한 결과이다.

도 2는 서로 다른 분자량의 펩타이드를 포함하는 갈색거저리 유충의 단백 가수분해물이 NR4A1 전사 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이다(루시페라아제 활성(β -갈락토시다아제에 상대적으로)을 확인하여, 평균 $\pm$ SE($n \geq 3$)로 나타내었고, 대조군과 비교 시 $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$, 및 $\#P < 0.001$ 임).

도 3은 갈색거저리 유충의 단백 가수분해물 분획물이 NR4A1의 전사 활성에 미치는 영향 및 H460 인간 비소세포성 폐암 세포주에서의 세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 결과이다(A: 루시페라아제 활성(β -갈락토시다아제에 상대적으로)을 확인하여, 평균 $\pm$ SE($n \geq 3$)로 나타내었고, 대조군과 비교 시 $^{***}P < 0.005$, 및 $\#P < 0.001$ 임).

도 4는 갈색거저리 유충의 단백 가수분해물 분획물의 역상 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 5는 갈색거저리 유충 단백 가수분해물의 물 분획물 중 특정 펩타이드가 포함된 분획물들이 NR4A1의 전사 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이다(루시페라아제 활성(β -갈락토시다아제에 상대적으로)을 확인하여, 평균 $\pm$ SE($n \geq 3$)로 나타내었고, 대조군과 비교 시 $^{*}P < 0.05$, 및 $\#P < 0.001$ 임).

도 6은 본 발명에 따른 펩타이드와 새롭게 합성된 변이 펩타이드들이 NR4A1의 전사 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이다(루시페라아제 활성(β -갈락토시다아제에 상대적으로)을 확인하여, 평균 $\pm$ SE($n \geq 3$)로 나타내었고, 각각의 어깨 글자들(a-e 또는 a-f 등)은 던칸의 다범위 검증으로 $P < 0.05$ 구간에서 현저히 차이가 있었음).

도 7a 내지 7c는 폐암 세포주, 췌장암 세포주, 대장암 세포주, 간암 세포주, 유방암 세포주, 혈액암 세포주에서 본 발명에 따른 펩타이드의 세포 독성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명의 발명자들은 국내에서 사육되고 있는 식약용 곤충으로부터 최근 비소세포폐암 치료의 새로운 표적으로 떠오른 핵 수용체 NR4A1에 대한 펩타이드 저해제를 발굴하여 항암활성을 규명하고자 연구를 수행하던 중, 갈색거저리 유충의 단백 가수분해물로부터 분리된, 특정 서열을 갖는 펩타이드가 우수한 항암 효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0017] 따라서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0018] 상기 펩타이드는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm) 유충을 단백질 가수분해효소인 플라보르자임, 알칼라아제, 뉴트라아제, 브로멜라인 또는 파파인 중 어느 하나 이상으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것일 수 있고, 바람직하게는 플라보르자임으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것일 수 있는 바, 이러한 가수분해효소로 갈색거저리 유충을 가수분해했을 때 상기 펩타이드를 얻을 수 있으므로 바람직하다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 펩타이드는 암세포에 독성을 나타내어 암세포의 성장을 억제할 수 있는 바, 암을 치료하기 위해 활용될 수 있다.

[0021] 이에, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 펩타이드는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm) 유충을 단백질 가수분해효소인 플라보르자임, 알칼라

아제, 뉴트라아제, 브로멜라인 또는 파파인 중 어느 하나 이상으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것일 수 있고, 바람직하게는 플라보르자임으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것일 수 있는 바, 이러한 가수분해효소로 갈색거저리 유충을 가수분해했을 때 상기 펩타이드를 얻을 수 있으므로 바람직하다.

[0023] 즉, 상기 펩타이드는 암세포에 독성을 나타내어 암세포의 성장을 억제할 수 있는 바, 이를 포함하는 조성물은 효과적으로 암을 예방 내지 치료할 수 있다.

[0024] 상세하게는, 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 유방암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0025] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 펩타이드에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg 이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0029] 더욱이, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항암용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 펩타이드는 갈색거저리(Tenebrio molitor, mealworm) 유충을 단백질 가수분해효소인 플라보르자임, 알칼라아제, 뉴트라아제, 브로멜라인 또는 파파인 중 어느 하나 이상으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것일 수 있고, 바람직하게는 플라보르자임으로 가수분해한 단백 가수분해물로부터 분리된 것일 수 있는 바, 이러한 가수분해효소로 갈색거저리 유충을 가수분해했을 때 상기 펩타이드를 얻을 수 있으므로 바람직하다.

[0031] 즉, 상기 펩타이드는 암세포에 독성을 나타내어 암세포의 성장을 억제할 수 있는 바, 이를 포함하는 조성물은 효과적으로 암을 예방 내지 개선할 수 있다.

[0032] 상세하게는, 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 간암, 유방암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0033] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스포, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다

른 규정이 없는 한 식품의약품 안정청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0035] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0036] 이때, 건강기능식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 펩타이드는 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 0.1 중량부 내지 15 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에 있어 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] <준비예 1> 실험재료

[0041] 실험을 위해 사용한 갈색거저리 유충은 2016년 3월 18일에 농업법인회사 (주)MG내추럴(전남 담양군 소재)에서 생산, 판매된 것으로, 실험 직전 진공건조 된 갈색거저리 유충을 구입하여 동결고에 보관하며 실험에 사용하였다. 알칼라아제(Alcalase), 플라보르자임(flavourzyme), 뉴트라아제(neutrase), 브로멜라인(bromelain) 및 파파인(papain) 단백질을 분해효소는 Novo사 제품을 대종상사(서울)로부터 구입하여 사용하였다. 가수분해도 측정을 위해 사용된 2,4,6-트리나이트로벤젠 설펜산 피크릴설펜산(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid picrylsulfonic acid ; TNBS)은 GBiosciences사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 특별한 언급이 없는 한 그 밖의 분석용 시약 및 유기용매는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

[0043] <실시예 1> 갈색거저리 유충으로부터 항암 펩타이드 분리 및 항암 활성 확인

[0044] 1. 실험 방법

[0045] (1) 갈색거저리 유충의 단백질 가수 분해물 제조

[0046] 건조된 각 유충의 분말을 10 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 4%(w/v)의 기질용액을 제조한 후, 90℃에서 20분 동안 자가 효소를 불활성화시켰다. 기질 대비 단백질 가수분해 효소(알칼라아제, 플라보르자임, 뉴트라아제, 브로멜라인, 파파인)를 각 1%(w/v)가 되도록 첨가한 후에 55℃에서 24시간 반응시킨 후 90℃에서 20분간 가열시켜 효소를 불활성화시켰다. 그 후 반응액을 13,000 X g에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 얻었으며, 상등액은 추가적으로 한외여과막(centrifugal filter; Millipore, MA, USA)을 이용하여 2시간동안 원심분리(5,000 X g)함으로써 최종적으로 분자량이 각각 1-3 kDa과 1 kDa 이하인 단백질 가수 분해물을 얻었다. 단백질 가수 분해물을 대상으로 동결건조한 후 수율을 측정하였으며, -80℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0048] (2) 효소별 단백질 가수분해 특성 평가

[0049] 각 효소별 단백질 가수분해 특성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하여 각 가수분해물의 단백질(펩타이드) 패턴을 조사하였다. SDS-PAGE는 15% 겔을 사용하였으며, 각 가수분해물을 4℃, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였고, 원심분리 후 얻은 상등액 20 μL을 겔에 로딩하여 80 V에서 약 2시간 전기영동하여 분자량별로 분리하였다. 그 후, 쿠마시 브릴리언트 블루(coomassie brilliant blue)로 염색하고 10% 아세트산이 함유된 30% 메탄올을 이용하여 탈색시켰다. 단백질 패턴의 분석은 Gel Logic 2200 PR(Carestream, NY, USA)을 이용하여 겔을 스캐닝한 후 이미지로 영상화시킴으로써 수행하였다. 이때 분자량 마커는 BIO-RAD(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)의 제품을 이용하였다.

[0050] 또한 TNBS 어세이를 이용하여 효소제 처리 시간에 따른 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다. 10 mM 소듐 비카보네이트(sodium bicarbonate ; pH 8.5) 990 μL와 1% TNBS 10 μL를 혼합(v/v)하여 0.01% TNBS를 제조하고, TNBS 50 μL와 시간별로 취한 반응혼합액 100 μL를 섞어 37℃에서 2시간 반응시킨 후

반응을 정지시키기 위해 10% 소듐 도데실설페이트(sodium dodecylsulfate ; 10% SDS)와 1 N 염산(hydrogen chloride ; 1 N HCl)을 첨가하였다. 그 후 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 335 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 가수분해도는 타이로신을 표준물질로 사용하여 환산하였다.

[0052] (3) NR4A1 저해 활성 평가

[0053] NR4A1 저해 활성 평가는 선행 연구를 통해 기본(basal) NR4A1의 활성이 특히 높고 트랜스펙션 효율이 우수한 인간 유래의 췌장암 세포주인 MiaPaCa-2 세포를 이용하여 진행하였다.

[0054] MiaPaCa-2 세포는 한국세포주은행(KCLB, 서울)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포는 10% FBS와 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신)를 함유하는 DMEM 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. MiaPaCa-2 세포를 2.5×10^4 cells/well로 48-웰 플레이트에 분주하여 하루 동안 배양한 후, 제조사(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 설명서에 따라 OPTI-MEM과 리포펙타민 2000를 이용하여 NBRE(NR4A-반응요소)-루시페라아제 리포터 구조(luciferase reporter construct ; pGL3-NBRE-luc) 그리고 pCMV-β-갈락토시다아제 리포터 플라스미드(galactosidase reporter plasmid)를 함께 5시간 동안 트랜스펙션시켰다. 그 후, 배지를 제거하고 트랜스펙션된 세포에 18시간 동안 각 단백 가수 분해물을 처리한 후, 제조사의 지침에 따라 루시페라아제 어세이 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 루시페라아제 활성을 측정하였다. 이때 루시페라아제 활성은 각 웰 별로 β-갈락토시다아제 활성으로 정규화(normalization)하였다.

[0056] (4) 단백질가수분해물로부터 활성 펩타이드 분리 및 정제

[0057] 갈색거저리 유충 플라보르자임 단백질가수분해물(MW<1 kDa)은 Sep-pak C18 카트리지와 메탄올(MeOH)을 이용하여 극성차에 따라 부분적으로 분리하였다. 즉, 하기에 기재한 바와 같은 조건에서 역상 HPLC 분석을 수행하였는데, 카트리지에 단백질가수분해물을 주입한 후 물(SFM0), 10% MeOH(SFM10), 60% MeOH(SFM60) 및 100% MeOH(SFM100)로 각각 용출시켜 각 분획물을 제조하였다.

[0058] <역상 HPLC 분석 조건>

[0059] - 칼럼: AKZO NOBEL KR100-5C18 (4.6 x 250 mm), 30°C

[0060] - 분석기: UV 220 nm

[0061] - 용매: A, 0.1% 트리플루오로 아세트산(TFA) 수용액

[0062] B, 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(ACN)

[0063] - 용매 농도구배: B 용매 농도를 5%에서 65%까지 60분간 농도경사를 줌

[0064] - 유속: 1 mL/min

[0065] - 주입 부피: 100 μl (40 mg/mL).

[0067] 이후, 상기 (3)에서 개시된 방법대로 각 분획물의 NR4A1 저해 활성을 확인하였고, 이 중 가장 높은 NR4A1 저해 활성을 보인 SFM0를 역상 HPLC로 분리한 후 머무름 시간별로 총 4종의 분획물(fr. 1-4)을 제조하였다. 이 4종의 분획물로 NR4A1 저해활성을 재차 평가한 결과, fr. 1이 가장 우수한 활성을 보였다.

[0068] 이후, Fr. 1을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 분획물 내에 400-1000 Da 크기의 14종의 펩타이드가 포함되어 있음을 확인하였으며, 펩타이드 맵핑 및 de-novo 시퀀싱을 통해 이들 펩타이드들의 아미노산 서열을 확인하였고, 이들을 대상으로 NR4A1 저해활성을 테스트하여 최종적으로 고효성 펩타이드인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 선별하였다.

[0070] (5) 암 세포에 대한 세포독성 평가

[0071] 인간 유래 비소세포폐암 세포주인 A549와 H460 세포, 췌장암 세포주(MiaPaCa-2와 Panc-1), 대장암 세포주(RKO와

SW480), 간암 세포주(HepG2), 유방암 세포주(MCF7), 혈액암 세포주(HL60와 Jurkat)와 마우스 유래 섬유아세포인 3T3-L1 세포는 한국세포주은행(KCLB, 서울 또는 ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포는 10% FBS와 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신)를 함유하는 DMEM 배지를 사용하여 5% CO₂, 37℃ 조건에서 배양하였다. 단백 가수 분해물에 의한 세포독성은 3-(3,4-디메틸-티아졸릴-2-)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT) 어세이를 이용하여 측정하였다. 즉, 각 세포를 3.0×10^4 cells/well로 48-웰 플레이트에 분주하여 하루 동안 배양한 후, 각 단백 가수 분해물을 다양한 농도로 24시간 처리하였다. 그 후 MTT 시약(Amresco, Columbus, Ohio, USA)을 0.25 mg/mL 농도로 각 웰에 처리하고 4시간 동안 배양하였으며, 배양 종료 후에는 상등액을 제거하고 각 웰에 200 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정을 용해시켰다. 용해된 포르마잔을 대상으로 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

(6) 통계 분석

모든 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준오차(mean $\pm$ SE)로 나타내었으며, 통계 분석에는 SPSS Statistics 23(Version 23.0, Inc, Chicago, IL, USA)가 사용되었다. 또한, 그룹 간의 유의성 차이 검증에는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 사용하였으며, 던칸의 다범위검증(Duncan multiple range test) 방법을 통한 사후 검증을 시행하였다. 두 그룹 사이의 비교에는 *t*-test를 사용하였으며, 유의확률(*P*-value)이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

2. 실험결과

(1) 갈색거저리 유충 저분자(MW<1 kDa) 단백 가수 분해물의 제조 및 활성 펩타이드 분리

전술한 바와 같이, 갈색거저리 유충 분말을 4%(w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 단백질 가수분해 효소들을 1%(w/v)로 첨가하여 8시간 가수분해시켜 갈색거저리 유충 단백가수분해물을 제조하였고, 각 가수분해 효소를 처리한 단백 가수분해물(3 kDa 이하)의 NR4A1 저해 활성을 확인한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 플라보르자임을 처리한 단백 가수분해물의 저해 활성이 가장 우수하였다. 따라서, NR4A1 저해 펩타이드 개발을 위한 최적 시료로 갈색거저리 유충의 단백 가수분해 효소로서 플라보르자임을 선발하였다.

또한, 플라보르자임을 처리한 갈색거저리 유충의 단백가수분해물을 한외여과막을 이용하여 순차적으로 1-3 kDa 과 1 kDa 이하 크기의 펩타이드를 포함하는 단백 가수분해물로 분리한 후 각각의 NR4A1 저해활성을 확인한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 1 kDa 이하 펩타이드를 포함하는 단백 가수분해물이 우수한 활성을 보였다. 이때 1-3 kDa과 1 kDa 이하 펩타이드를 포함하는 단백 가수분해물의 수율은 각각 5.55%와 14.71%로 측정되었다(도시하지 않음).

이러한 결과를 바탕으로, 1 kDa 이하 단백 가수분해물을 극성차에 따라 부분적으로 분리하기 위해 Sep-Pak C18 카트리지에 주입하여 물(SFM0), 10% MeOH(SFM10), 60% MeOH(SFM60) 및 100% MeOH(SFM100)로 각각 용출시켜 각 분획물을 제조하고, 이들 분획물들의 NR4A1 저해활성을 비교한 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, SFM0가 가장 높은 저해활성(IC₅₀=5.68 mg/mL)을 나타내었다.

또한, SFM0의 세포 독성을 확인한 결과, 도 3B에 나타난 바와 같이, 비소세포폐암 세포인 H460에 대해 농도 의존적으로 유의적인 세포 독성을 보였다. 이 때 각 분획물의 HPLC 크로마토그램은 도 4에 나타내었다.

다음으로, 도 5A에 나타난 바와 같이, SFM0을 역상 HPLC로 분리한 후, 머무름 시간별로 4종의 분획물(fr. 1-4)을 제조한 뒤, 이들의 NR4A1 저해활성을 비교한 결과, 도 5B 및 5C에 나타난 바와 같이, fr. 1 (IC₅₀=4.31 mg/mL)이 가장 우수한 저해활성을 나타내었다.

이후, Fr. 1을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 400-1000 Da 크기의 14종의 펩타이드가 포함되어 있음을 확인하였으며, 펩타이드 맵핑 및 de-novo 시퀀싱을 통해 최종적으로 8종 펩타이드들의 아미노산 서열을 확인하였다. 최종 확인된 펩타이드는 트리머 1종(MPF1), 테트라머 6종(MPF2 내지 7) 및 헵타머 1종(MPF8)이었고, 각각의 아미노산 서

열은 하기 <표 1>에 나타난 바와 같았다.

표 1

[0085]

이름	아미노산 서열	서열번호
MPF8	EEVDDPK	1
MPF1	KNQ	2
MPF2	KGGQ	3
MPF3	EPEF	4
MPF4	FEED	5
MPF5	HDEL	6
MPF6	HDEI	7
MPF7	QNCP	8

[0087]

상기 펩타이드들을 대상으로 NR4A1 저해 활성을 확인하여 도 6A에 나타내었고, 암 세포주에 대한 세포 독성을 테스트하였다(도시하지 않음). 이후, 이러한 결과를 바탕으로 이들 중 헵타머인 MPF8(EEVDDPK)을 최적 후보 펩타이드로 선발하였다.

[0088]

또한, MPF8 구조를 기초로 7종의 아미노산 결실 변이체(MPF8-1~8-7)를 합성하여 NR4A1 저해활성을 비교하였다. 이때 각 결실 변이체의 아미노산 서열을 하기 <표 2>에 나타내었다.

표 2

[0089]

이름	아미노산 서열	서열번호
MPF8-1	EVDDPK	9
MPF8-2	VDDPK	10
MPF8-3	DDPK	11
MPF8-4	EEVDDP	12
MPF8-5	EEVDD	13
MPF8-6	EEVD	14
MPF8-7	EEV	15

[0091]

그 결과, 도 6B에 나타난 바와 같이, 7종의 변이체에 비해 MPF8이 유의적으로 가장 높은 활성을 보였다($P < 0.05$). 즉, 펩타이드가 반드시 "EEVDDPK"의 아미노산으로 이루어져야만 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0092]

따라서 MPF8을 NR4A1 저해 펩타이드로 최종 선발하고 이를 이용해 비소세포폐암에 대한 *in vitro* 항암 활성 확인 실험으로서 MTT 어세이를 수행하였다.

[0094]

(2) 다양한 인간유래 암 세포주에 대한 MPF8의 생육 억제 효과

[0095]

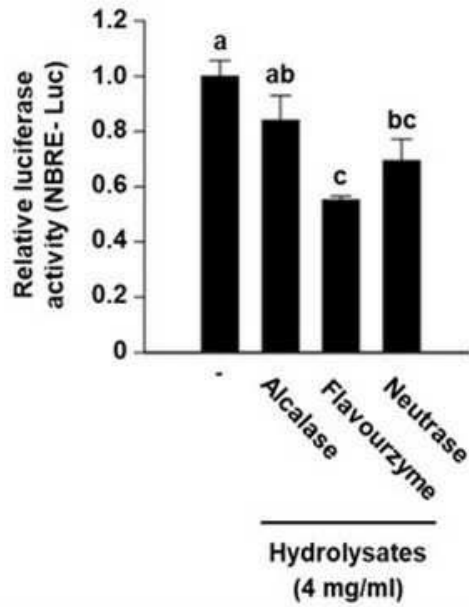
상기에서 준비한 폐암 세포주(H460과 A549), 췌장암 세포주(MiaPaCa-2와 Panc-1), 대장암 세포주(RKO와 SW480), 간암 세포주(HepG2), 유방암 세포주(MCF7), 혈액암 세포주(HL60와 Jurkat)를 대상으로 MPF8의 세포 독성을 측정된 결과, 도 7a 내지 7c에 나타난 바와 같이, 현저히 우수한 세포독성을 나타낸 바, 항암 효과를 나타냄을 확인하였다. 한편, 마우스 유래의 정상 세포주인 3T3-L1 섬유아세포에 대해서는 동일한 처리 농도 구간에서 독성을 보이지 않는 것으로 나타났다.

[0097]

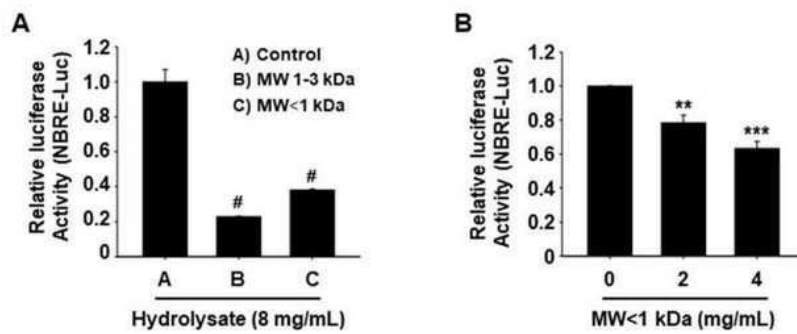
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

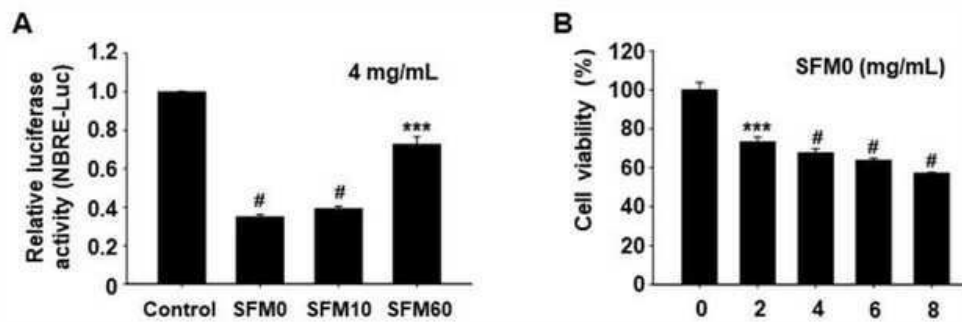
도면1



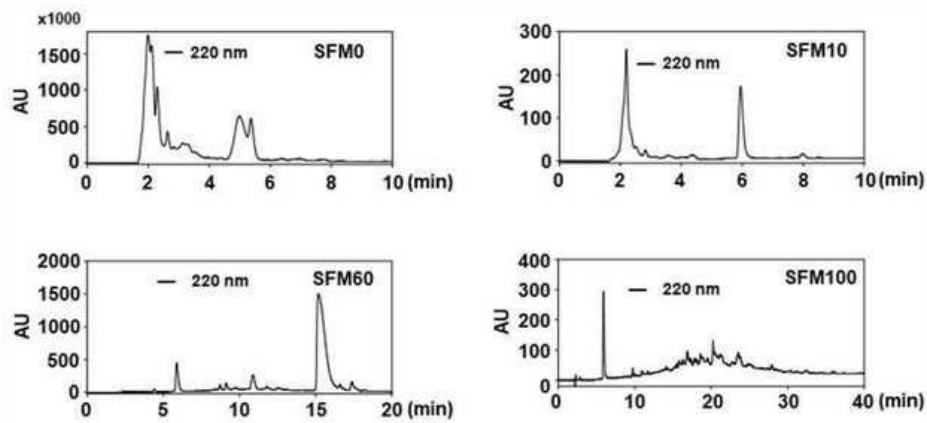
도면2



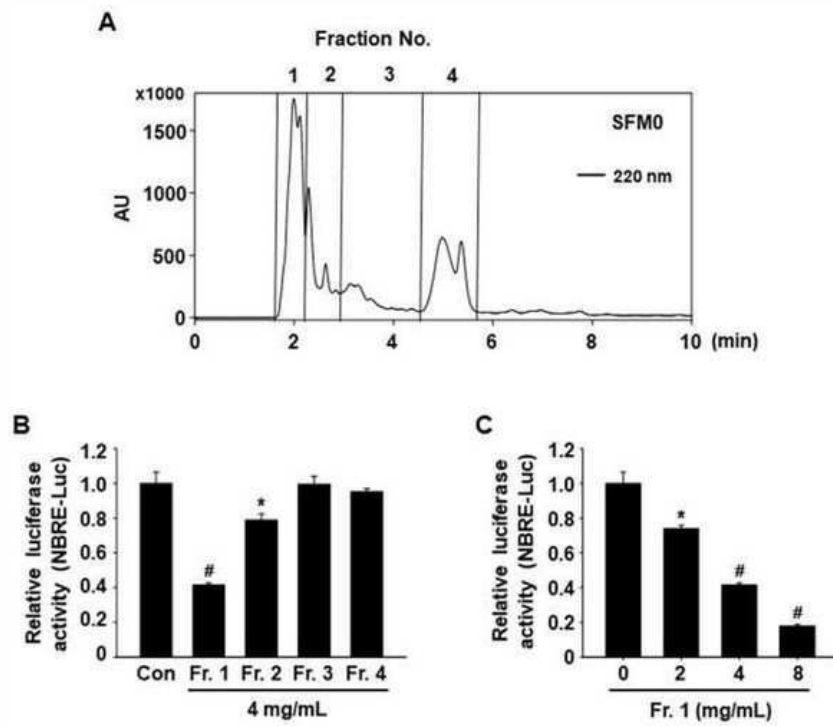
도면3



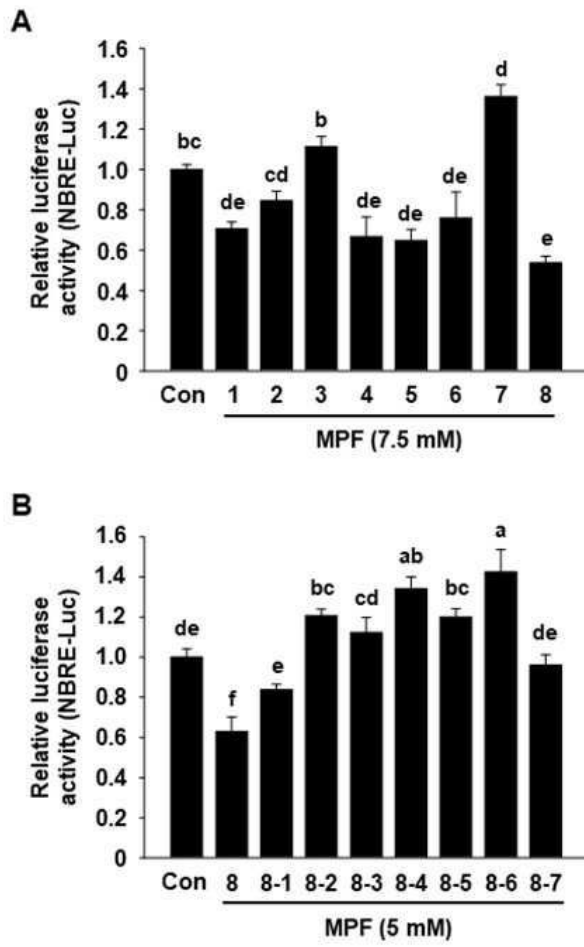
도면4



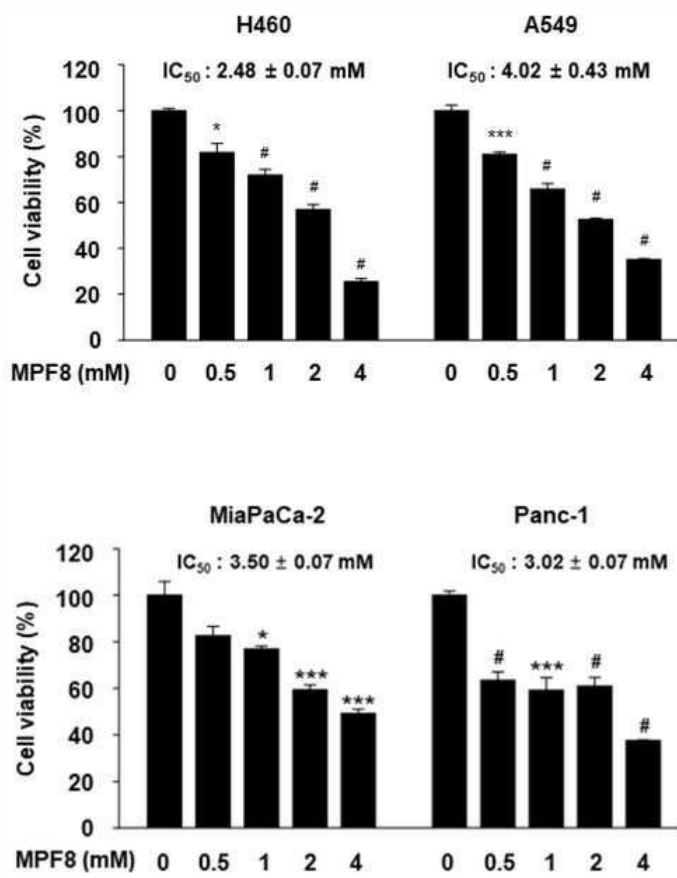
도면5



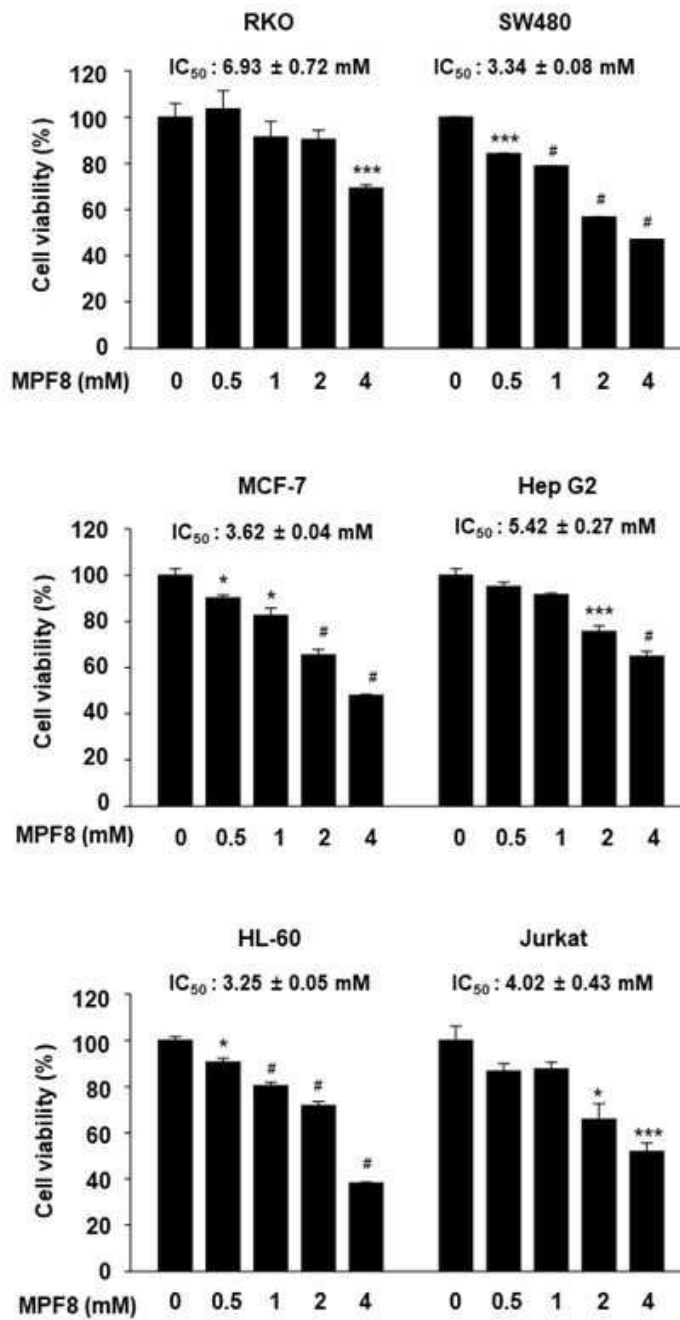
도면6



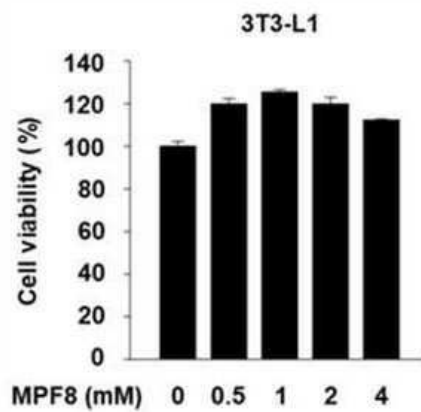
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Anticancer Peptide Isolated from Hydrolysates of larva of Tenebrio molitor, and Anticancer Composition Comprising the Same
- <130> ADP-2018-0144
- <160> 15
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MPF8
- <400> 1
- Glu Glu Val Asp Asp Pro Lys
- 1 5
- <210> 2
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MPF1
- <400> 2
- Lys Asn Gln
- 1
- <210> 3

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MPF2
 <400> 3

Lys Gly Gly Gln

1
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MPF3
 <400> 4

Glu Pro Glu Phe

1
 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MPF4
 <400> 5

Phe Glu Glu Pro

1
 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MPF5
 <400> 6

His Asp Glu Leu

1
 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF6

<400> 7

His Asp Glu Ile

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF7

<400> 8

Gln Asn Cys Pro

1

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-1

<400> 9

Glu Val Asp Asp Pro Lys

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-2

<400> 10

Val Asp Asp Pro Lys

1 5

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-3

<400> 11

Asp Asp Pro Lys

1

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-4

<400> 12

Glu Glu Val Asp Asp Pro

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-5

<400> 13

Glu Glu Val Asp Asp

1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-6

<400> 14

Glu Glu Val Asp

1

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MPF8-7

<400> 15

Glu Glu Val

