(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0032882
(43) 공개일자 2024년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7003121
(22) 출원일자(국제) 2022년07월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월26일
(86) 국제출원번호 PCT/CU2022/050007
(87) 국제공개번호 WO 2023/280330
국제공개일자 2023년01월12일
(30) 우선권주장
2021-0058 2021년07월09일 쿠바(CU)

(71) 출원인
센트로 데 인제니에리아 제네티카 와이 바이오테크놀로지아
쿠바, 라 하바나 11600, 플라야, 아베니다 31 엔트레 158 와이 190
(72) 발명자
마스포롤 곤잘레즈, 율단카
쿠바, 엔트레 산토 톰스 와이 생 살바도르 쎄로 라 하바나 10600, 아프토 7, 세페로 넘버 159
가라이 페레즈, 힐다, 엘리사
쿠바, 엔트레 182 와이 184 플라야 라 하바나 11600, 아프토 20, 아베 31 넘버 18207
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

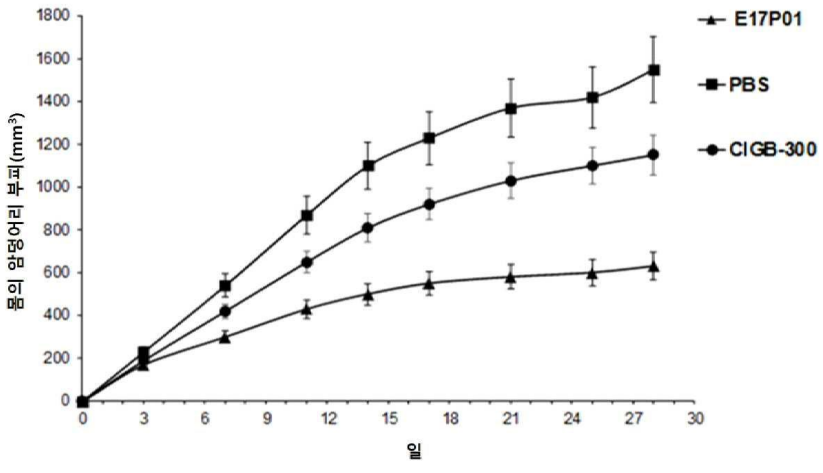
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **CK2-매개 인산화를 억제하는 선형 펩타이드 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요 약

효소 카세인 키나아제 2(CK2)에 의해 매개되는 인산화를 억제하는 선형 펩타이드로서, 서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 - 서열번호: 62로 확인되는 서열로 구성된 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지며, 또한 상기 펩타이드 및 세포 내 침투 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드. 이 선형 펩타이드 또는 폴리펩타이드 중 적어도 하나 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물. 본 발명은 또한 상기 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 약물의 제조를 위한 용도 및 상기 약물이 투여되는 고형 또는 액상 종양의 치료 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 9/12 (2013.01)
C12Y 207/11001 (2013.01)
C07K 2319/10 (2013.01)
(72) 발명자
레예스 아코스타, 오스발도
쿠바, 엔트레 182 와이 184 플라야 라 하바나 11600, 아프토 20, 아베 31 넘버 18207
페레라 네그린, 야세르
쿠바, 플라야 라 하바나 11600, 아프토 12제이 쿠바나칸, 칼레 186 이/ 31 와이 33 넘버 3117
카발레로 메넨데즈, 에벨린
쿠바, 플라야 라 하바나 11600, 엔트레 186 와이 188, 아베니다 31에이 에디리씨오 씨-17 아프토 5
곤자레스 로페즈, 루이스, 자비에르
쿠바, 피소 8 플라야 라 하바나 11600, 아프토 씨, 칼레 186 넘버 3115 엔트레 31 와이 33
베사다 페레즈, 블라디미르, 아르만도
쿠바, 플라야 라 하바나 11600, 아프토 3 쿠바나칸, 에디피시오 씨-15, 칼레 33 엔트레 186 와이 188
페레아 로드리게즈, 실비오, 에르네스토
쿠바, 엔트레 182 와이 184 플라야 라 하바나 11600, 아베 31 샵18207 아프토 32
귈렌 니에토, 게랄도, 엔리퀘
쿠바, 엔트레 182 와이 184 플라야 라 하바나 11600, 아베니다 31 에디프 18207 아프토 34
곤자레즈 플란코, 소니아
쿠바, 엔트레 아베니다 31 와이 아베니다 33 플라야 라 하바나 11600, 에디피씨오 3112 아프토 42, 칼레 186

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 - 서열번호: 62으로 확인되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 특징으로 하는, 카세인 키나아제 2(CK2) 효소에 의해 매개되는 인산화를 억제하는 선형 펩타이드.

청구항 2

카세인 키나아제 2(CK2) 효소에 의해 매개되는 인산화를 억제하는 제 1 항의 선형 펩타이드 및 세포 내 침투 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 세포 내 침투 펩타이드는 인간 면역 결핍 바이러스의 Tat1 단백질로부터의 펩타이드인 것인 폴리펩타이드.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 세포 내 침투 펩타이드는 서열번호: 65 또는 서열번호: 66으로 확인되는 아미노산 서열을 가지는 것인 폴리펩타이드.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 서열번호: 35, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 및 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 확인되는 서열로 구성된 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 것인 폴리펩타이드.

청구항 6

카세인 키나아제 2(CK2)에 의해 매개되는 인산화를 억제하는 제 1 항의 선형 펩타이드 또는 제 2 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 중 적어도 하나 및, 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 전신, 종양내, 경구 또는 점막내 경로로 투여되도록 조제되는 약학적 조성물.

청구항 8

고형 또는 액상 종양의 치료에 쓰이는 제 6 항의 약학적 조성물.

청구항 9

카세인 키나아제 2(CK2)에 의해 매개되는 인산화를 억제하는 제 1 항의 선형 펩타이드 또는 제 2 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드의 약물 제조를 위한 용도.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 약물은 고형 또는 액상 종양의 치료에 쓰이는 것인 용도.

청구항 11

필요로 하는 개체의 고형 또는 액상 종양의 치료 방법으로서, 치료적 유효량의 제 6 항의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 것인 치료 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 고형 종양은 폐, 자궁경부, 후두, 췌장 또는 방광의 종양인 것인 치료 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 액상 종양은 만성 림프구성 백혈병, T-형 급성 림프아구성 백혈병 또는 급성 골수성 백혈병인 것인 치료 방법,

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 분자 약학 및 인체 의약에 대한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 효소 카세인 키나아제 2 (Casein Kinase 2, CK2)에 의해 매개되는 인산화 사건을 기질 상의 인산수용(phosphoacceptor) 부위와 직접 상호작용함으로써 억제하는 선형 펩타이드를 얻는 것과 관련된다. 그것의 생물학적 활성 덕분에, 본 발명의 펩타이드 및 폴리펩타이드는 서로 다른 기원의 다양한 유형의 고형 종양의 치료에 유용하다.

배 경 기 술

[0002] CK2는 세포 증식을 증가시키는 데 관여하는 세린/트레오닌 효소이고, 그것의 세포 내 위치는 악성화 변화 동안 근본적으로 핵이다(Tawfic S., et al., 2001, Histol. Histopathol. 16:573-582). 따라서, 이 효소는 매력적인 치료 표적을 구성한다(Duncan J.S., et al., 2008, Biochim. Biophys. Acta, 1784: 33-47).

[0003] CK2 효소 매개 인산화 사건은 4,5,6,7-테트라브로모벤조트리아졸(4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, TBB)에서 유래된 화학적 화합물(Pagano M.A., et al., 2004, J. Med. Chem., 47: 6239-6247), 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Slaton J.W., et al., 2004, Mol. Cancer Res. 2:712-720) 및 이 효소의 촉매 및 조절 서브유닛 사이의 상호작용을 차단하는 펩타이드(Laudet B., et al., 2007, Biochem. J., 408: 363-373)를 사용한 실험적 종양학에서 다뤄져 왔다. 화학적 화합물 CX-4945은 효소 CK2의 두 개의 촉매 서브유닛을 억제하고(Siddiqui-Jain A., et al., 2010, Cancer Res. 70: 10288-10298), 시험관 내 세포 증식의 강력한 억제자로 평균 최대 억제 농도(IC50)가 5.5 μM이다. 오직 이 CK2 효소 억제제만 인간에서 만족스럽게 평가되었고, 임상시험 1상에서 우호적인 약물동력학 및 안전성 변수가 기록되었다(Lim J.K.C., et al., 2010, Cancer Res. 70: 2763-2766). 기질에서의 CK2 효소의 인산수용 부위와 분자의 직접 상호작용에 의한 인산화 사건의 억제는 CIGB-300이라 불리는 펩타이드에 대해 처음으로 기록되었다(국제 특허 공개 WO03/054002; Perea S.E., et al., 2004, Cancer Res., 64: 7127-7129).

[0004] CIGB-300 펩타이드는 기질 상에서 CK2 인산수용 부위와 상호작용하는 고리형 펩타이드 및, 세포로의 그것의 내재화(internalization)를 보장하기 위한 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)의 Tat1 단백질로부터의 “세포 내 침투” 펩타이드를 포함하는 키메라 분자이다. CIGB-300은 시험관 내 및 생체 내에서, 폐, 자궁경부, 후두와 같은

다양한 계열의 고형 종양에서(Perera Y., et al., 2014, Mol Clin Oncol, 2 (6): 935-944) 그리고 만성 림프구성 백혈병(Martins L., et al., 2013, Oncotarget, 5(1): 258-263) 및 T-형 급성 림프아구성 백혈병(Perera Y., et al., 2020, Cancers, 12, 1377)과 같은 액상 종양에서 항증식 및 사멸지향(proapoptotic) 특성을 나타냈다. 또한, 이 펩타이드는 임상 1/2상 연구에서 확인된 임상적 이익의 징후를 보였다(Perea S., et al., 2011, Mol Cell Biochem., 356 (1-2): 45-50) (Sarduy M., et al., 2015, Br. J. Cancer, 112: 1636-1643).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나, CIGB-300는 그것의 서열에 메티오닌 및 분자 내 이황화 결합을 가지는 25개 아미노산 펩타이드이다. 이것은 이 분자의 화학적 불안정성의 원천이고 제품 개발의 더 높은 단계에서, 액상 또는 동결건조화 제제에서 또는 안정성 실험에서의 불일치의 원인이 될 수 있다(Frokjaer S. et al., 2000, Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Taylor & Francis). 이 펩타이드에 존재하는 주요 불순물은 메티오닌의 산화 및 분자간 이황화 결합의 형성에 의한 응집체(이량체 또는 삼량체)의 생성에 기인한다(Garay H., et al., 2018, J Pept Sci. 24(6): e3081). 한편, 시스테인을 포함하는 펩타이드의 합성 과정은 더 번거롭고 (Albericio F., et al., 2000, Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach. Oxford University Press Inc, New York. Chapter 4, 77-114), 분자 내 이황화 결합의 형성은 제조 공정에 추가적인 단계를 도입하며, 그것이 생산 비용을 증가시킨다. 따라서, 다양한 유형의 종양에 대한 치료제의 개발을 위해 여전히, 선형 펩타이드 유형의, 더 작은 크기 및 구조적 복잡성을 가지며, 그것의 합성이 더 간단하고 더 싼, CK2 효소에 의해 매개되는 인산화 억제제를 마련할 이익이 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 CK2-매개 인산화를 억제하고, 서열번호 45, 서열번호 49, 서열번호 50, 및 서열번호 57 내지 62로 확인되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 선형 펩타이드를 제공함으로써 앞서 언급된 문제를 해결한다. 이 서열들은 아래에 나타냈다:

[0007] a) 서열번호: 45 RKRSRYWP

[0008] b) 서열번호: 49 RKRWRYWP

[0009] c) 서열번호: 50 RKRSWYWP

[0010] d) 서열번호: 57 R(D-Lys)RWRYWP

[0011] e) 서열번호: 58 RK(D-Arg)WRYWP

[0012] f) 서열번호: 59 RKRWR(NMe-Tyr)WP

[0013] g) 서열번호: 60 R(D-Lys)RSWYWP

[0014] h) 서열번호: 61 RK(D-Arg)SWYWP

[0015] i) 서열번호: 62 RKRSW(NMe-Tyr)WP.

[0016] 이 펩타이드들은 그것들이 선형이고, 크기가 작으며, 화학적으로 더 안정적이라는 면에서 CIGB-300와 다르다. 그것들은 그 서열에 메티오닌이나 시스테인을 갖지 않고, 그것이 장점이다. 또한, 생산의 관점에서 더 실행 가능하게 획득할 수 있다.

[0017] 서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 - 서열번호: 62로 표현되는 선형 펩타이드는, 인간 유두종 바이러스(Human Papillomavirus)(HPV)-16의 E7 기질 상의 CK2 효소와의 인산수용 부위(LNDSSEEEDEI)와 상호작용을 할 수 있는 그것의 효능 및, 또한 이 암단백질의 CK2-매개 인산화를 억제하는 효능으로 선택되었다. 본 발명의 실시예에서 보여지다시피, 이 선형 펩타이드는 펩타이드 CIGB-300와 유사한 방식으로 E7 단백질의 CK2-매개 인산화를 억제할 수 있다.

[0018] 내재 CK2 기질 상에서의 세포내 작용을 가능하게 하기 위해, 본 발명의 펩타이드는 HIV의 Tat1 단백질(Schwarze S.R., et al., 2000, Trends Pharmacol, 21: 45-48), 헤르페스 단순 포진 바이러스의 VP22 단백질(Lindgreen M., et al., 2000, Trends Pharmacol Sci, 21: 99-103), 페네트라틴(Penetratin) 및 트랜스포르탄(Transportan)(Gariepy J., et al., 2001, Trends Biotech 19: 21-28) 등과 같은 단백질에 속하는 “세포 내

침투" 펩타이드와 화학적으로 결합할 수 있다.

[0019] 이와 같이, 본 발명은 또한 서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 내지 서열번호: 62로 표현되는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 선형 펩타이드 및, 하나의 세포 침투 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에서, 이 폴리펩타이드의 세포 내 침투 펩타이드는 HIV의 Tat1 단백질로부터의 펩타이드이다. 그것의 일 구현예에서, 세포 내 침투 펩타이드는 서열번호: 65 또는 서열번호: 66으로 표현되는 아미노산 서열을 가진다.

[0021] 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열번호: 35, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 및 서열번호: 51 내지 서열번호: 56으로 표현되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진다. 이 서열을 아래에 나타냈다:

[0022] a) 서열번호: 35 GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYWP

[0023] b) 서열번호: 47 GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRWRYWP

[0024] c) 서열번호: 48 GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSWYWP

[0025] d) 서열번호: 51 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RWRYWP

[0026] e) 서열번호: 52 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)WRYWP

[0027] f) 서열번호: 53 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRWR(NMe-Tyr)WP

[0028] g) 서열번호: 54 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RSWYWP

[0029] h) 서열번호: 55 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)SWYWP

[0030] i) 서열번호: 56 Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRSW(NMe-Tyr)WP.

[0031] 이들 폴리펩타이드 대부분은, 다양한 암 세포주(폐, 방광, 후두, 췌장, 및 백혈병)에서 더 낮은 IC50을 가지기 때문에, 펩타이드 CIGB-300보다 더 활성이 있다. 본 폴리펩타이드는 암세포들의 증식에 용량 의존성 효과를 생성할 수 있었다. 그 외에, 서열번호: 35로 표현되는 폴리펩타이드는 이 세포주들에서 CIGB-300의 것과 유사한 IC50 값을 나타냈다. 그러나, 그것이 선형 아미노산 서열을 가지고, 크기가 더 작으며, 화학적으로 더 안정하고, 치료 제품의 개발을 가속화할 수 있는 생산적 장점을 가지기 때문에 그것이 더 우수한 것으로 여겨진다.

[0032] 본 발명에서 기술된 펩타이드의 동정을 위해, 천육백만 이상의 다양한 펩타이드 서열을 포함하는 선형 펩타이드의 조합 라이브러리가 "하나의-비드-하나의-화합물" 유형에 의해 합성되었고, 비오틴으로 변형된 E7 암단백질의 28-38 구역을 포함하는 합성 펩타이드로 스크리닝을 진행했다. 질량분석법을 이용해서, 스크리닝에 양성인 9개의 비드에 포함된 펩타이드의 서열을 부여했다. 서열번호: 1 내지 서열번호: 9로 표현되는 펩타이드가 화학적으로 합성되었고, 그것들이 HPV-16의 E7 암 단백질에서 CK2-매개 인산화를 억제할 수 있음을 확인했다. 내재 CK2 기질 상에서의 세포 내 작용을 가능하게 하기 위해, HIV Tat1 단백질에 해당하는 세포 내 침투 펩타이드(GRKKRRQRRRPPQ, 서열번호: 65로 표현됨)가 N-말단에 더해진 아홉 개의 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드가 설계되고 합성되었다. 그 다음, 이 아홉 개의 폴리펩타이드의 NCI-H125 세포주(비소세포폐암)의 세포 성장에 대한 영향을 평가했다. 평가한 농도 범위에서는, 이 폴리펩타이드들의 어느 것도 CIGB-300과 유사한 억제값에 도달하지 못했다. 그 중 서열번호: 18 내지 서열번호: 20으로 표현되는 오직 세 개가 실험한 가장 높은 농도에서 20% 내지 30% 사이로 세포 증식을 억제해서, 그것들의 생물학적 활성을 향상시키기 위해 그것들의 서열을 변형했다.

[0033] 서열번호: 18 내지 서열번호: 20로 확인되는 폴리펩타이드의 생물학적 활성에 대한 Trp 도입의 영향을 평가하기 위해 Trp 위치 스캐닝 라이브러리를 설계하고 획득했다. 다음으로, Trp 라이브러리에서 생성된 24개 폴리펩타이드(서열번호: 21 - 서열번호: 44)의 NCI-H125 세포주에서의 항증식 효과를 평가했다. 24개 폴리펩타이드 중 서열번호: 21, 서열번호: 25, 서열번호: 27, 서열번호: 32, 서열번호: 35 및 서열번호: 43으로 표현되는 6개가 평가한 가장 높은 농도에서 펩타이드 CIGB-300와 유사한 세포 증식 억제 퍼센티지를 나타냈다. NCI-H125 및 AsPC-1(췌장선암종) 세포주에서 서열번호: 35로 나타낸 폴리펩타이드와 CIGB-300의 IC50 값은 유사했다. 특히 서열번호: 35로 표현되는 폴리펩타이드는 CIGB-300보다 뛰어난 것으로 여겨지는데, 왜냐하면 그것이 더 작은 크기의 선형 서열로 화학적으로 더 안정하고 생산에서의 장점을 가지기 때문이다.

[0034] CIGB-300 펩타이드보다 더 활성인 본 발명의 서열번호: 47 및 서열번호: 48로 표현되는 다른 두 개의 선형 펩타이드는 서열번호: 35로 표현되는 폴리펩타이드에서 세 군데에 두 번째 Trp 잔기가 도입된 연구의 결과물이다. 서열번호: 47 및 서열번호: 48로 표현되는 폴리펩타이드는 췌장암(AsPC-1, PanC-1) 및 급성 골수성 백혈병(OCI-AML3) 세포주에서 세포 증식을 억제하는 그것들의 효능에서 펩타이드 CIGB-300보다 더 강력하고, 사용된 폐암 세포주(NCI-H125)에서는 CIGB-300와 유사하다.

[0035] 서열번호: 47 및 서열번호: 48로 표현되는 서열에 효소 분해에 취약한 부위에 비자연적인 아미노산을 도입한 결과로, CIGB-300보다 더 활성인 6개의 새로운 선형 폴리펩타이드가 얻어졌고, 그것들은 서열번호: 51 - 서열번호: 56로 표현된다. 항증식 분석을 NCI-H125, Hep2C(후두암종) 세포주 및 두 개의 방광암 세포주(MGH-U3 및 MGH-U4)에서 수행했다. NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 및 MGH-U4 세포주에서 얻어진 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 표현되는 펩타이드의 IC50 값은 CIGB-300에서 얻어진 값보다 낮고, 이는 그것들이 더 효능이 세다는 것을 나타낸다. 방광암 세포주(MGH-U3 및 MGH-U4)의 경우, IC50 값은 CIGB-300에 비해 한 자릿수 낮은데, 그것은 해결되지 않고 거의 개척되지 않은 틈새이고 건강에 높은 영향을 미치기 때문에 매우 매력적이다. 비자연적인 아미노산을 도입한 것은 프로테아제에 대한 안정성을 높였다. 놀랍게도, 그것을 통해 이 폴리펩타이드들의 CK2-매개 인산화를 억제하는 능력 또한 향상시키는 것이 가능했다.

[0036] 본 발명은 또한 서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 - 서열번호: 62로 표현되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 선형 폴리펩타이드 또는 서열번호: 35, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 및 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 표현되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물의 일부를 이룰 수 있는 부형제는 당업자에게 알려져 있다. 본 발명의 일 구현예에서 약학적 조성물은 전신, 종양내, 경구, 또는 점막 경로로 투여되도록 제제화된다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 필요로 하는 개체의 고형 또는 액상 종양의 치료에 유용하다.

[0038] 본 발명의 목적은 서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 - 서열번호: 62로 표현되는 서열로 구성된 모둠으로부터 선택되는 서열을 가지는 선형 펩타이드, 또는 서열번호: 35, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 및 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 표현되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드의 의약 제조를 위한 사용이다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 약제는 고형 또는 액상 종양의 치료를 위해 쓰인다.

[0040] 다른 관점에서, 본 발명은 서열번호: 45, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 및 서열번호: 57 - 서열번호: 62로 표현되는 서열로 구성된 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 선형 펩타이드 또는 서열번호: 35, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 및 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 표현되는 서열로 구성되는 모둠으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 필요로 하는 개체에서 고형 또는 액상 종양을 치료하는 방법을 개시한다. 본 발명의 일 구현예에서, 치료될 고형 종양은 폐, 자궁경부, 후두, 췌장 또는 방광의 종양이다. 본 발명의 다른 구현예에서, 치료되는 액상 종양은 만성 림프구성 백혈병, T-형 급성 림프아구성 백혈병, 또는 급성 골수성 백혈병이다.

도면의 간단한 설명

[0041] **도 1**. 합성 펩타이드 서열번호: 1 - 서열번호: 9의 HPV-16E7 암단백질의 CK2-매개 인산화에 대한 효과. 두 개의 펩타이드는 CK2 효소의 인산수용 부위와 상호작용하지 않음(서열번호: 10 및 서열번호: 11로 표현됨). 분 당 갯수(cpm)를 Y 축 상에 그렸다.

도 2. 서열번호: 12 - 서열번호: 20로 확인되는 9개의 폴리펩타이드의 NCI-H125 세포주에서의 세포 증식 억제 퍼센티지(%I). 펩타이드 CIGB-300 및 Tat를 분석의 양성 대조 및 음성 대조로 각각 사용했다. ≥ 20% 의 세포 증식 억제 퍼센티지를 나타내는 폴리펩타이드를 선택했다.

도 3. 폴리펩타이드 F11P19, F11P20 및 F11P21(서열번호: 18 - 서열번호: 20)의 NCI-H125 세포주에서의 용량-효과 곡선. 분석의 양성 대조로서 사용한 CIGB-300 펩타이드의 용량-효과 곡선을 포함시켰다. % I: 세포 증식 억제 퍼센티지. C: 농도.

도 4. NCI-H125 세포주에서의 서열번호: 18 - 서열번호: 20로 확인되는 서열로부터 담당 부위의 Trp 잔기의 위치 스윕으로 생성된 폴리펩타이드(서열번호: 21 - 서열번호: 44)의 세포 증식 억제 퍼센티지(% I). **A**: 두 농도

에서 서열번호: 21 - 서열번호: 44로 확인되는 폴리펩타이드에 의해 얻은 억제 퍼센티지. 서열번호: 18 - 서열번호: 20로 표현되는 전구체 펩타이드 및 CIGB-300는 양성 대조. 점선 상자는 200 μM에서 60%를 초과하는 세포 증식 억제를 보이는 6개의 폴리펩타이드 및 CIGB-300를 개략적으로 보여준다. B. 12.5 μM 내지 200 μM 사이의 여러 농도에서 6개의 가장 활성인 폴리펩타이드에 의해 얻어진 억제 퍼센티지.

도 5. NCI-H125 세포주에서의 폴리펩타이드 A14P27(서열번호: 21), A14P31 (서열번호: 25), A14P33(서열번호: 27), A14P43(서열번호: 32), A14P46(서열번호: 35), A14P59(서열번호: 43)의 용량-효과 곡선. 대조 펩타이드로서 사용한 CIGB-300 펩타이드의 용량-효과 곡선이 포함되었다. % I: 세포 증식 억제 퍼센티지. C: 농도.

도 6. 폴리펩타이드 A14P46(서열번호: 35) 및 CIGB-300 펩타이드의 AsPC-1 세포주에서의 용량-효과 곡선. % I: 세포 증식 억제 퍼센티지. C: 농도.

도 7. 폴리펩타이드 A15P35, A15P36 및 A15P37(서열번호: 46 - 서열번호: 48)의 NCI-H125 세포주에서의 용량-효과 곡선. 대조군으로 사용된 전구체 폴리펩타이드 A14P46(서열번호: 35) 및 CIGB-300 펩타이드의 용량-효과 곡선이 포함되었다. %I: 세포 증식 억제 퍼센티지. C: 농도.

도 8. 폴리펩타이드 E17P01, E17P02 및 E17P03(서열번호: 51 - 서열번호: 53)의 NCI-H125 세포주에서의 용량-효과 곡선. 대조군으로서 사용된 전구체 폴리펩타이드 A15P36 (서열번호: 47) 및 CIGB-300의 용량-효과 곡선이 포함되었다. % I: 세포 증식 억제 퍼센티지. C: 농도.

도 9. 폴리펩타이드 D17P78, D17P79 및 D17P80 (서열번호: 54 - 서열번호: 56)의 NCI-H125 세포주에서의 용량-효과 곡선. 대조군으로서 사용된 전구체 폴리펩타이드 A15P37(서열번호: 48) 및 CIGB-300의 용량-효과 곡선이 포함되었다. % I: 세포 증식 억제 퍼센티지. C: 농도.

도 10. CK2 인산화 폴리펩타이드 억제제 E17P01(서열번호: 51)의 무흉선 마우스에 이식된 인간 방광 종양 모델에서의 항 종양 효과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] **실시예 1. HPV-16의 E7 단백질에서 CK2 효소 인산수용 부위와 상호작용하는 선형 펩타이드의 선택**

[0043] CK2 효소의 인산수용 부위와 상호작용하는 생물학적으로 활성인 선형 펩타이드를 동정하기 위해, "하나의-비드-하나의-화합물" 유형에 의해 서로 다른 1600만개 이상의 펩타이드 서열을 포함하는 BCP-1이라 이름 붙여진 합성 선형 펩타이드의 조합 라이브러리를 스크리닝했다. 이 라이브러리는 전기분사 이온화 분광 질량 분석법(ESI-MS) 서열 분석과 호환되도록 설계되었다(Masforrol Y., et al., 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9). HPV-16의 E7 기질 CK2 효소 인산수용 부위(LNDSSEEEDEI, 서열번호: 63로 표현됨)를 포함하는 BIOT라 불리는 비오틴화 합성 펩타이드로 스크리닝을 수행했다. 스트렙타비딘-알칼라인 포스파타제 결합체를 인식 분자로서 사용했고, 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트(BCIP)의 p-톨루이딘염을 전개를 위한 기질로 사용했다. 파란색은, BCP-1 라이브러리에서 TentaGel 수지의 밝은 연노랑색에 대비되어 BIOT 펩타이드에 의해 인식되는 생물활성인 서열을 포함하는 비드의 시각적 구분을 용이하게 한다. BIOT 펩타이드는 4-메틸벤즈히드릴아민(MBHA) 수지 상에서 Fmoc/tBu 화학을 사용하여 합성되었다(Field GB and Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214). 역상 크로마토 그래피(RP-HPLC)로 정제했고 그것의 정체를 ESI-MS로 확인했다. 95%가 넘는 순도로 얻어졌으며, ESI-MS 분석으로 그것이 1574.6 Da의 분자량(MM)임을 확인했다.

[0044] BCP-1 라이브러리를 진공 여과 시스템 및 기계적 교반기가 구비된 폴리프로필렌 반응기에 놓았다. 정제수 및 pH 7.4의 인산염 완충 식염수(PBS)로 그것을 씻고, pH 7.4 PBS 내 1% 우혈청 알부민(BSA)으로 1시간 동안 차단했다. 진공 여과로 용매 및 시약을 제거했다. 라이브러리를 pH 7.4 PBS 내 1% BSA 용액 안의 150 μg/mL 농도의 80 mL의 BIOT 펩타이드 용액과 함께 4°C에서 16시간 동안 배양했다. 그것을 pH 7.4 Tween-PBS(T-PBS)로 씻고; pH 7.4 PBS 안의 1% BSA 용액 내 스트렙타비딘-알칼라인 포스파타제 결합체(0.4 μg/mL)와 함께 배양했다. 두 시간 후에, 그것을 pH 7.4 T-PBS로 씻고 기질 용액 안의 BCIP (0.5 mg/mL)와 함께 30분간 배양했다. 파란색이 나타났을 때 여과하여 반응을 중단시키고 pH 7.4 PBS로 충분하게 세척했다.

[0045] 접안렌즈를 이용하여 시각적인 검사로 양성 비즈를 나머지로부터 분리하고 프릿(frit)이 있는 반응기로 옮겨 재생했다. 이어서, 스트렙타비딘-알칼라인 포스파타제 결합체 및 BCIP에 의한 비특이적 인식을 배제하기 위한 시험을 수행했다. 더 큰 친화도의 서열을 선택하고 양성 비즈의 수를 줄이기 위해 더 심한 가혹(astringency) 조건 하에서 스크리닝을 수행했는데, 이를 통해 BIOT 펩타이드의 농도가 120 μg/mL로 줄었다. 양성 비즈를 재생하고 서술된 공정에 따라 나노 ESI-MS/MS로 서열 확인을 했다(Masforrol Y., et al, 2012, ACS Combinatorial

Science, 14(3): 145-9).

[0046] 150 μg/mL에서 펩타이드 BIOT로 1차 스크리닝한 결과, 56개의 양성 비즈가 선택되었다. 낮은 농도의 BIOT(120 μg/mL)로 한 2차 스크리닝 후에, 첫 스크리닝의 양성 비즈의 나머지보다 더 진한 파란색을 보이는 9개의 양성 비즈가 선택되었는데, 그것은 이 펩타이드들의 CK2 인산수용 부위에 대한 더 큰 친화도를 증명한다. 아홉 개의 양성 비즈로부터 얻은 나노 ESI-MS/MS 스펙트럼을 BCP-1 데이터베이스를 검색하기 위한 마스코트(Mascot) 프로그램을 사용하여 드노보(de novo) 수동 서열분석 및 자동 서열 분석으로 병행 분석했다. 표 1은 확인된 9개의 펩타이드의 서열을 나타낸다(서열번호: 1 - 서열번호: 9). 각 펩타이드에 부여된 서열의 분석에서 수동 동정 및 자동 서열분석 사이의 m/z 신호 부여의 완벽한 일치가 얻어졌는데, 이는 각 경우에 펩타이드 서열의 정확한 동정을 가능하게 했다.

표 1

[0047] BIOT 펩타이드로 BCP-1 라이브러리 스크리닝을 하여 분리된 9개의 양성 비즈에서 확인된 펩타이드의 아미노산 서열

비드	비드 안의 펩타이드 서열	서열번호
1	RLRRKADP	1
2	LRRRKADP	2
3	TYRYRRDP	3
4	VARRRYDP	4
5	AVRRRYDP	5
6	TFYRRYDP	6
7	RKRSRYDP	7
8	GYRYKRDP	8
9	VKKRRLDP	9

[0048] 표 1에 나타낸 9개의 펩타이드 아미노산 조성에서 유사성이 관찰되었다. 이것은 기본 아미노산(K, R)의 우세함과 소수성 아미노산(L, A, V, F, Y)의 존재를 특징으로 한다.

[0049] 나노 ESI-MS/MS에 의해 확인된, E7 단백질 안의 CK2 효소 인산수용 부위와 상호작용하는 아홉 개의 서열을 확증하기 위해, 펩타이드들을 Fmoc/tBu 화학(Field G.B. et al., 1990, Int. J. Peptide Protein Res., 35(3):161-214)을 이용하여 텐타겔(Tentagel) 수지 상에서 바로 합성하였다. 수지에 결합된 펩타이드 상에서, 120 μg/mL 농도의 BIOT 펩타이드를 가지고 효소 반응을 수행했다. 스트렙타비딘-알칼라인 포스파타제 결합체를 인식 분자로서 사용했고, BCIP를 전개를 위한 기질로 이용했다. 수지에 결합된 15 mg의 코딩된 펩타이드(P1-P9)를 함유하는 아홉 개의 반응기를 기계식 교반기를 가지는 진공 여과 시스템에 놓았다. E7 단백질의 CK2 인산수용 부위와 상호작용하지 않는, 수지에 결합된 두 개의 대조 펩타이드(서열번호: 10으로 표시되는 P10, 및 서열번호: 11로 표시되는 P11)를 사용했다. 각 반응기에 대해 500 μL 작업 용량에서 BCP-1 라이브러리 스크리닝 분석을 재연하도록 공정을 조절했다. 결과는 수지에 결합된 9개의 펩타이드(P1-P9)가 효소 분석 후에 진한 파란색을 발달시켰음을 보여줬고, 이는 9개의 동정된 선형 펩타이드가 E7 모델의 기질에서 CK2 효소 인산수용 부위와 상호작용할 수 있는 능력을 증명한다. 반면에, 수지-결합 대조 펩타이드(P10 및 P11)는 파란 발색을 발달시키지 않았다.

[0050] **실시예 2. 서열번호: 1 - 서열번호: 9 로 표현되는 펩타이드의 HPV-16 E7 암단백질의 CK2-매개 인산화에 미치는 영향**

[0051] Fmoc/tBu 화학을 이용하여(Field GB and Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214) MBHA 수지 상에서 펩타이드를 합성했다. RP-HPLC로 펩타이드를 정제하고 그것들의 정체를 ESI-MS로 확인했다. 합성에 대해, 그것들을 F11P04 - F11P12로, 그것들의 아미노산 서열을 서열번호: 1- 서열번호: 9에 대응하는 서열로 지명했다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 모두 95%를 넘는 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석으로 그것들의 정체를 확인했다.

표 2

[0052] BIOT로 BCP-1 라이브러리를 스크리닝한 후에 확인된 서열을 포함하는 합성 펩타이드의 특성 확인

서열번호:	합성코드	서열	순도(%)	MW (Da)
1	F11P04	RLRRKADP	99.1	1009.6

2	F11P05	LRRRKADP	99.1	1009.6
3	F11P06	TYRYRRDP	98.1	1124.6
4	F11P07	VARRRYDP	99.3	1030.6
5	F11P08	AVRRRYDP	98.6	1030.6
6	F11P09	TFYRRYDP	98.9	1115.5
7	F11P10	RKRSRYDP	98.8	1075.7
8	F11P11	GYRYKRDP	97.9	1052.5
9	F11P12	VKKRRLDP	99.6	1009.7
10	D10P94	EQPAFHDP	98.5	938.6
11	D10P95	VAGFFLDP	98.7	863.4

[0053] 이 펩타이드들의 HPV-16 E7 암단백질의 CK2-매개 인산화에 대한 영향을 측정하는 분석은 시험관 내 인산화 반응을 기반으로 하며, 여기서 대장균에서 발현된 HPV-16의 E7 단백질이 기질로 쓰였다. 이 암단백질은 글루타치온 S-트랜스퍼라제와의 융합 단백질로서 얻어졌다. 이전에 알려진 과정에 따라(Perea S.E., et al., 2004, Cancer Res., 64: 7127-7129) 분석이 수행되었다. 결과를 도 1에 나타냈고, 서열번호: 1- 서열번호: 9로 확인되는 펩타이드가 HPV-16의 E7 단백질의 CK2-매개 인산화를 억제할 수 있음을 보여준다.

[0054] **실시예 3. 서열번호: 12 - 서열번호: 20로 표현되는 합성 폴리펩타이드의 비소세포폐암 세포주 NCI-H125의 세포 성장에 미치는 영향**

[0055] 내재 CK2 기질에 대한 세포 내 작용을 얻기 위해, 서열번호: 1 - 서열번호: 9로 표현되는 서열에 HIV의 Tat1 단백질에 해당하는 세포 내 침투 펩타이드 Tat을 N-말단에 더했다(GRKKRRQRRRPPQ). 베타 알라닌(βA) 잔기를 관심 펩타이드와 Tat 펩타이드 사이에 스페이서로서 도입했다. 합성되는 폴리펩타이드에 표 3에 나타낸 바와 같이 F11P13- F11P21 합성코드를 붙였고, 서열번호: 12 - 서열번호: 20로 표시되는 서열에 해당한다. 펩타이드 CIGB-300는 서열번호: 64로 표시되고, Tat 펩타이드는 서열번호: 65로 표시된다. 펩타이드의 합성, 정제, 정체 분석은 실시예 2에 나타낸 것처럼 수행했다. 표 3에서 볼 수 있다시피, 전부 95% 이상의 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석으로 그것들의 정체를 확인했다.

표 3

[0056] 서열번호: 12 - 서열번호: 20으로 표현되는 합성 폴리펩타이드의 특성 확인

서열번호:	**합성코드**	**서열**	**순도 (%)**	**MW (Da)**
12	F11P13	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RLRRKADP	98.7	2780.8
13	F11P14	GRKKRRQRRRPPQ-βA-LRRRKADP	98.7	2780.7
14	F11P15	GRKKRRQRRRPPQ-βA-TYRYRRDP	96.6	2895.8
15	F11P16	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VARRRYDP	97.2	2801.7
16	F11P17	GRKKRRQRRRPPQ-βA-AVRRRYDP	98.2	2801.7
17	F11P18	GRKKRRQRRRPPQ-βA-TFYRRYDP	96.9	2886.8
18	F11P19	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYDP	96.6	2846.7
19	F11P20	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRDP	97.4	2823.7
20	F11P21	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRLDP	97.4	2780.7
64	CIGB-300	cycle (Cys_{15}-Cys_{25}) GRKKRRQRRRPPQ-βA-CWMSPRHLGTC	99.2	3057.6
65	Tat	GRKKRRQRRRPPQ	98.3	1717.1

[0057] 폴리펩타이드 F11P13-F11P21(서열번호: 12 - 서열번호: 20)의 항증식 활성 평가를 NCI-H125 세포주에서 수행했다. 이 세포주는 평가시에 낮은 농도의 약물에 매우 높은 감수성을 보였다(HU L.-Y., et al, 2018, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 22: 4551-4556). CIGB-300 펩타이드의 항증식 효과가 이 세포주에서 폭 넓게 확인되었고(Cirigliano S.M., et al., 2017, Cancer Cell International, 17, 42), 따라서 그것을 양성 대조로 선택했다. Tat 펩타이드를 음성 대조로 사용했다. 폴리펩타이드들을 25, 50, 100 및 200 μM의 농도에서 평가했다. 세포 증식 분석은 기존 알려진 공정에 따라 수행했다(Perera Y., et al., 2012, J. Pept. Sci, 18 (4):215-23).

[0058] 도 2는 NCI-H125 세포에서의 항증식 분석으로부터의 데이터를 보여준다. 각 막대는 평가된 폴리펩타이드의 농도(25, 50, 100 and 200 μM)에서 도달한 세포 증식 억제 퍼센티지 값(% I)에 해당한다. 20% 이상의 세포 증식 억제값을 보이는 폴리펩타이드를 선택했는데, 왜냐하면 이 퍼센티지값이 분석 변이계수(coefficient of variation) 내이기 때문이다. 폴리펩타이드 F11P19, F11P20 및 F11P21만이 200 μM 농도에서 세포 증식을 20% 내지 30% 사이로 억제했다. 대조로서 사용한 펩타이드 CIGB-300에서만 50%의 증식 억제가 일어났다.

[0059] 도 3은 펩타이드 CIGB-300와 비교한 폴리펩타이드 F11P19, F11P20 및 F11P21의 용량-효과 곡선을 보여준다. 폴리펩타이드 F11P19, F11P20, F11P21 및 CIGB-300의 IC50 값은 각각 336 μM, 305 μM, 668 μM 및 64 μM였다. 폴리펩타이드 F11P19, F11P20, F11P21의 IC50 값은 여전히 CIGB-300에서 얻어진 IC50 값과는 상당히 차이가 나서, 그것들의 생물학적 활성을 증진시키기 위해 상기 1차 구조를 최적화할 필요가 있다.

[0060] **실시예 4. 서열번호: 18- 서열번호: 20로 표현되는 서열의 담당 부위 트립토판 스캔을 통한 최적화**

[0061] Trp 아미노산은 설계시 BCP-1 라이브러리 합성에서 배제되었다(Masforrol Y., et al, 2012, ACS Combinatorial Science, 14(3): 145-9). 이런 이유로, 서열번호: 18 - 서열번호: 20로 표시되는 서열에 대해 Trp 위치 스캐닝 라이브러리를 설계했고, 거기서 담당 부위에서 각 아미노산 잔기의 Trp로의 점(punctual) 치환이 이루어졌다(표 4). 이를 통해 화물 서열(cargo sequence)의 각 위치에서의 Trp의 기여를 연구할 수 있었다.

[0062] Trp 위치-스캐닝 라이브러리 폴리펩타이드를 Fmoc/tBu 화학(Field GB y Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214)을 이용하여 MBHA 수지 상에서 합성했고, RP-HPLC 정제하고, 정체를 ESI-MS로 확인했다. 아미노산 서열을 보여주는 표 4에 나타낸 바와 같이, 그것들 전부 95%가 넘는 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석을 통해 설계된 분자의 정체성을 확인했다.

표 4

[0063] Trp 위치 스캐닝을 통해 생성된 서열번호: 21 - 서열번호: 44로 표시되는 폴리펩타이드의 특성 확인

서열번호	유래	코드	서열	순도 (%)	MW (Da)
21	서열번호 19 유래의 폴리펩타이드	A14P27	GRKKRRQRRRPPQ-βA-**W**YRYKRDP	96.5	2952.6
22		A14P28	GRKKRRQRRRPPQ-βA-G**W**RYKRDP	97.8	2846.6
23		A14P29	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GY**W**YKRDP	96.4	2853.5
24		A14P30	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYR**W**KRDP	97.8	2846.6
25		A14P31	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRY**W**RDP	97.8	2881.6
26		A14P32	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYK**W**DP	97.7	2853.6
27		A14P33	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKR**W**P	95.7	2894.6
28		A14P34	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKRD**W**	95.1	2912.6
29	서열번호 18 유래의 폴리펩타이드	A14P40	GRKKRRQRRRPPQ-βA-**W**KRSRYDP	96.7	2876.6
30		A14P41	GRKKRRQRRRPPQ-βA-R**W**RSRYDP	95.9	2904.6
31		A14P42	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RK**W**SRYDP	97.6	2876.6
32		A14P43	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKR**W**RYDP	98.7	2945.6
33		A14P44	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRS**W**YDP	95.7	2876.6
34		A14P45	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSR**W**DP	99.1	2869.6
35		A14P46	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRY**W**P	99.7	2917.6
36		A14P47	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRYD**W**	99.3	2935.7
37	서열번호 20 유래의 폴리펩타이드	A14P53	GRKKRRQRRRPPQ-βA-**W**KKRRLDP	98.1	2867.8
38		A14P54	GRKKRRQRRRPPQ-βA-V**W**KRRLDP	98.8	2838.7
39		A14P55	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VK**W**RRLDP	99.7	2838.7
40		A14P56	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKK**W**RLDP	99.0	2810.7
41		A14P57	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKR**W**LDP	99.3	2810.7
42		A14P58	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRR**W**DP	96.3	2853.8
43		A14P59	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRL**W**P	99.6	2851.8
44		A14P60	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRLD**W**	99.3	2869.8

[0064] 화물 아미노산 서열에 만들어진 변형은 굵은 글씨로 강조했다.

[0065] E7 단백질에서 CK2 효소의 인산수용 부위와 상호작용하는 폴리펩타이드의 능력에 Trp 변형이 영향을 미치지 않

는다는 것을 확인하기 위해, 실시예 1에 서술된 공정을 따랐다. 수지에 결합된 24개의 폴리펩타이드는 효소 분석 후에 강한 파란색을 발달시켰는데, E7 기질 모델에서 CK2 효소의 인산수용 부위와 상호작용함을 증명한다. 다른 한편, Trp 변형이 E7 단백질의 CK2에 의한 인산화에 대한 폴리펩타이드의 효과에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위해 실시예 2에 기술된 공정을 따랐다. 서열번호: 21- 서열번호: 44로 표시되는 24개의 폴리펩타이드들은 HPV-16의 E7 단백질의 CK2에 의해 매개되는 인산화를 억제하는 능력을 유지했는데, 60-85% 사이의 인산화 억제값이 얻어졌다. CIGB-300는 87%의 인산화 억제를 나타냈다.

[0066] Trp 위치 스캐닝으로 생성된 합성 폴리펩타이드(서열번호: 21- 서열번호: 44)의 항증식 활성 평가를 NCI-H125 세포주에서 수행했다. 기존에 알려진 공정에 따라 시험을 진행했다(Perera Y., et al., 2012, J. Pept. Sci, 18 (4): 215-23). 전구체 폴리펩타이드(F11P19, F11P20, F11P21) 및 펩타이드 CIGB-300를 양성 대조로서 포함시켰다. 12.5; 25; 50; 100 및 200 μM의 농도에서 폴리펩타이드들을 평가했다. 도 4A는 100 및 200 μM 농도의 폴리펩타이드의 세포 증식 억제 결과 퍼센티지를 보여준다. 결과는 평가한 24개의 폴리펩타이드 중 6개(A14P27(서열번호: 21), A14P31(서열번호: 25), A14P33(서열번호: 27), A14P43(서열번호: 32), A14P46(서열번호: 35), A14P59(서열번호: 43))가 200 μM에서 60%를 넘는 세포 증식 억제를 나타내서, 펩타이드 CIGB-300에서 보인 효과와 유사함을 보여준다. 도 4B는 평가된 농도에서 6개의 선택된 폴리펩타이드로부터 얻어진 세포 증식 억제 퍼센티지 값을 나타낸다. 보여지다시피, A14P46 폴리펩타이드는 100 초과 및 200 μM의 농도에서 세포 증식을 50% 이상 억제했는데, CIGB-300의 거동과 유사하다. 낮은 농도에서, A14P46 폴리펩타이드는 CIGB-300 펩타이드의 성능과 비교했을 때 더 나은 용량-효과 비례를 보인다.

[0067] 도 5는 폴리펩타이드 A14P27, A14P31, A14P33, A14P43, A14P46, A14P59 및 CIGB-300의 용량-효과 곡선을 나타낸다. 그것의 일부에서, 표 5는 이 여섯 개의 폴리펩타이드의 IC50 값이 그것의 전구체 폴리펩타이드 F11P19(336 μM), F11P20(305 μM) 및 F11P21(668 μM)에서 얻어진 것보다 낮음을 보여준다. A14P46 폴리펩타이드의 IC50(72 μM)은 참고 펩타이드인 CIGB-300의 IC50(64 μM)에 필적한다.

[0068] 펩타이드 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 상에서 수행된 구조 연구를 통해 X_7 위치에서 D를 W로 바꾸는 것이 생물학적 활성을 향상시키는 데 필수적이라는 결론을 내릴 수 있었고(A14P46 >> A14P33 > A14P59), 폴리펩타이드 A14P46에서 가장 좋은 반응이 있었다. 추가적으로, X_4 > X_5 > X_1 위치 또한 생물학적 활성에 대해 눈에 띄는 결과를 나타내는 결과를 나타낸다는 결론이 내려져, 상기 위치에서 치환되는 두 번째 아미노산 W를 도입할 것을 제안한다.

표 5

[0069] 서열번호: 21, 서열번호: 25, 서열번호: 27, 서열번호: 32, 서열번호: 35 및 서열번호: 43로 표현되는 폴리펩타이드의 NCI-H125 세포주에서의 세포 증식 분석에서의 IC50 값

서열번호:	코드	서열	IC_{50} (μM)
21	A14P27	GRKKRRQRRRPPQ-βA-**W**YRYKRDP	165
25	A14P31	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRY**W**RDP	135
27	A14P33	GRKKRRQRRRPPQ-βA-GYRYKR**W**P	124
32	A14P43	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKR**W**RYDP	107
35	A14P46	GRKKRRQRRRPPQ-βA-RKRSRY**W**P	72
43	A14P59	GRKKRRQRRRPPQ-βA-VKKRRL**W**P	140
64	CIGB-300	cycle (Cys15-Cys 25) GRKKRRQRRRPPQ-βA-CWMSPRHLGTC	64

[0070] 폴리펩타이드 A14P46(서열번호: 35)의 생물학적 활성이 오직 담당 부분(RKRSRYWP)에 기인하는지 확인하기 위해 Tat 및 βA 서열이 없는 유사한 펩타이드를 이 실시예에서 기술된 합성 공정을 사용하여 합성했다. 펩타이드 D14P165는 서열번호: 45로 표현되며, 95%의 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석을 통해 그것의 MW가 1146.7 Da임을 확인했다. 실시예 2에 서술된 인산화 억제 분석을 수행했고, 85%의 억제가 얻어져서, 이 펩타이드가 HPV-16 E7 단백질의 CK2-매개 인산화를 억제하는 능력을 확인했다.

[0071] 폴리펩타이드 A14P46가 NCI-H125 세포주에서 CIGB-300와 유사한 생물학적 활성 결과를 나타냈음을 고려하여, 이 폴리펩타이드의 췌장선암종 세포주(AsPC-1)에서의 거동을 CIGB-300와 비교하여 연구했다. 예전에 알려진 방법을 따라 세포 증식 분석을 수행했다(Perera Y, et al., 2012, J. Pept. Sci, 18 (4):215-23). 도 6에 나타낸 바와 같이, 양 분자는 AsPC-1 세포의 증식에 대해 용량의존적인 효과를 만들 수 있었다. IC50 값은 A14P46가 125 μM, CIGB-300가 102 μM로 나왔고, 이는 두 펩타이드가 이 세포주에서 유사한 효능을 가짐을 보여준다.

[0072] 폴리펩타이드 A14P46(서열번호: 35)는 NCI-H125 및 AsPC-1 세포주에서의 세포 증식을 억제하는 능력이 CIGB-300에 필적하지만(도 5 및 도 6), 그것이 더 작은 크기를 가지는 선형 펩타이드이고, 화학적으로 더 안정하며 그것의 서열에 메티오닌이나 시스테인을 포함하지 않기 때문에 더 뛰어나고, 생산의 관점에서 그것을 더 매력적으로 만들어준다.

[0073] **실시예 5. 서열번호: 35로 표현되는 폴리펩타이드 서열로의 두 번째 Trp 잔기 도입을 통한 최적화**

[0074] 실시예 4에서 얻어진 결과를 바탕으로, 다른 Trp 잔기를 A14P46 폴리펩타이드의 X_1, X_4 및 X_5 위치에 도입하고 그것의 생물학적 활성에 대한 영향을 평가했다. Fmoc/tBu 화학으로 MBHA 수지 상에서 폴리펩타이드를 합성했고(Field GB y Noble RL. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35(3):161-214), RP-HPLC로 정제했으며, ESI-MS로 정체를 확인했다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 세 개의 펩타이드를 95% 이상의 순도로 얻었고, ESI-MS 분석을 통해 분자의 정체를 확인했다.

표 6

[0075] 서열번호: 35로 표시되는 펩타이드를 최적화하여 생성된 펩타이드의 특성확인

서열번호:	코드	서열	순도 (%)	MW (Da)
46	A15P35	GRKKRRQRRRPPQ-βA- **W**KRSRYWP	99.7	2947.7
47	A15P36	GRKKRRQRRRPPQ-βA- RKR**W**RYWP	95.1	3016.8
48	A15P37	GRKKRRQRRRPPQ-βA- RKRS**W**YWP	95.1	2947.7

[0076] 굵은 글씨로 서열번호: 35로 표시되는 펩타이드 서열에서의 두 번째 Trp 잔기의 도입을 강조했다.

[0077] 합성 폴리펩타이드 A15P35, A15P36 및 A15P37(서열번호: 46 - 서열번호: 48)의 항증식 활성을 NCI-H125, AsPC-1, PanC-1(췌장암) 및 OCI-AML3(급성 골수성 백혈병-3) 세포주에서 평가했다. 기존에 알려진 과정을 따라 시험을 진행했다(Perera Y, et al., 2012, J. Pept. Sci, 18 (4):215-23). 도 7은 NCI-H125 세포주에서 3개의 폴리펩타이드의, 그것의 전구체 A14P46 및 대조 펩타이드인 CIGB-300와 비교한 용량-효과 곡선을 나타낸다. 폴리펩타이드 A15P35, A15P36 및 A15P37은 NCI-H125 세포의 증식에 대해 용량의존적인 효과를 만들어낼 수 있었다. AsPC-1, PanC-1 및 OCI-AML3 세포주에서도 역시 이 세 개의 폴리펩타이드는 용량-반응 양상을 보였다.

[0078] 표 7은 NCI-H125, AsPC-1, PanC-1 및 OCI-AML3 세포주에서 얻어진 A15P35, A15P36 및 A15P37 폴리펩타이드의, 그것의 전구체 A14P46 및 대조 펩타이드인 CIGB-300와 비교한 IC50 값을 요약한다. 폴리펩타이드 A15P35의 IC50 값은 실험한 네 개의 세포주에서 그것의 전구체 A14P46 및 CIGB-300에서 얻어진 것과 유사했고, 그것은 서열의 X_1 위치로의 트립토판의 도입이 무의미함을 나타낸다. 반면에, 폴리펩타이드 A15P36 및 A15P37에서 얻어진 IC50 값은 폴리펩타이드 A14P46 및 펩타이드 CIGB-300에서 얻어진 것보다 낮았는데, 특히 췌장암 세포주(AsPC-1, PanC-1) 및 급성 골수성 백혈병 세포주(OCI-AML3)에서 그랬다.

표 7

[0079] NCI-H125, AsPC-1, PanC-1 및 OCI-AML3 세포주의 세포 증식 분석에서의 서열번호: 46 - 서열번호: 48로 표현되는 폴리펩타이드에 대한 IC50 값

서열번호:	코드	IC_{50} (μM)			
		NCI-H125	AsPC-1	PanC-1	OCI-AML3
46	A15P35	106	127	145	130
47	A15P36	42	26	54	9
48	A15P37	46	23	65	21
35	A14P46	72	125	166	70
64	CIGB-300	64	102	156	63

[0080] 대조 펩타이드인 A14P46 및 CIGB-300에서 얻어진 값도 포함되었다.

[0081] 폴리펩타이드 A15P36(서열번호: 47) 및 A15P37(서열번호: 48)의 생물학적 활성이 오직 담당 RKRWRYWP 및 RKRSWYWP 부분에 기인하는 것인지 확인하기 위해, 두 펩타이드를 Tat 또는 βA 서열 없이, 본 실시예에서 기술

된 합성 과정을 이용하여 합성했다. 펩타이드 D15P105(서열번호: 49) 및 D15P106(서열번호: 50)가 95% 이상의 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석을 통해 그것들의 분자량이 각각 1245.7 Da 및 1176.6 Da이라는 것을 확인했다, 실시예 2에 서술된 바와 같이 인산화 분석을 수행했고, 각각 87% 및 82%의 인산화 억제값이 얻어져서, 두 펩타이드가 HPV-16 E7 단백질에서의 CK2-매개 인산화를 억제할 수 있음을 확증했다.

[0082] 이 실시예의 결과는 폴리펩타이드 A14P46(서열번호: 35) 서열의 X_4 및 X_5 위치에 두 번째 트립토판을 도입하는 것이 펩타이드가 인산수용 부위와 상호작용하는 데 도움을 주고, 따라서 그것의 CK2에 의한 인산화를 억제하는 능력을 높인다는 것을 보여준다. A15P36 및 A15P37 폴리펩타이드는 췌장암 세포주(AsPC-1, PanC-1) 및 급성 골수성 백혈병 세포주(OCI-AML3)에서 세포 증식을 억제하는 능력에 있어서 CIGB-300보다 훨씬 강력함을 나타냈다. 두 펩타이드는 더 작은 크기의 선형 서열이고, 그것이 메티오닌 및 시스테인과 같은 예민한 잔기를 갖지 않기 때문에 화학적으로 더 안정하다는 추가적인 장점을 가진다. 게다가, 그것들은 생산의 관점에서 더욱 매력적이다.

[0083] **실시예 6. 비-자연적 아미노산(D- 및 L-N-메틸 아미노산)의 도입에 의한 서열번호: 47 및 서열번호: 48로 표시되는 폴리펩타이드의 최적화**

[0084] 폴리펩타이드 A15P36(서열번호: 47) 및 A15P37(서열번호: 48)를 체액 내의 엔도펩티다제의 작용으로부터 보호하기 위해, 그것의 서열에서 트립신 및 키모트립신에 의해 분해되기 쉬운 부분에 비-자연적 아미노산을 도입했다. 단백질 분해에 가장 예민한 부위는 Expasy 사이트(http://www.expasy.org)의 도움으로 예측했다 (Gasteiger E., et al., 2003, Nucleic Acids Research. 31(13): 3784-3788). D-Arg를 Tat의 R8에 도입했고, D-Lys, D-Arg 및 NMe-Tyr의 도입에 의한 K16, R17 및 Y20의 보호를 각각 평가했다. 각 폴리펩타이드의 N-말단을 N-펩티다제로부터 그것을 보호하기 위해 아세틸화했다. 폴리펩타이드 E17P01, E17P02 및 E17P03(서열번호: 51 - 서열번호: 53)은 A15P36의 유도체이고, 폴리펩타이드 D17P78, D17P79 및 D17P80(서열번호: 54 - 서열번호: 56)은 A15P37의 유도체이다. Fmoc/tBu 화학을 이용하여 MBHA 수지 상에서 폴리펩타이드를 합성하고, RP-HPLC로 정제했으며, ESI-MS로 동정했다. 표 8에 볼 수 있다시피 모두 95% 이상의 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석을 통해 그 분자의 정체를 확인했다.

표 8

[0085] 서열번호: 51- 서열번호: 56으로 표시되는 폴리펩타이드의 특성 확인

서열번호:	코드	서열	순도 (%)	MW (Da)
51	E17P01	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RWRYWP	98.4	3058.8
52	E17P02	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)WRYWP	96.3	3058.8
53	E17P03	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRWR(NMe-Tyr)WP	96.6	3072.8
54	D17P78	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-R(D-Lys)RSWYWP	97.3	2989.7
55	D17P79	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RK(D-Arg)SWYWP	98.2	2989.7
56	D17P80	Ac-GRKKRRQ(D-Arg)RRPPQ-βA-RKRSW(NMe-Tyr)WP	95.7	3003.7

[0086] 비-자연적 아미노산의 도입이 E7 단백질에서 CK2 효소의 인산수용 부위와 상호작용하는 본 발명의 폴리펩타이드들의 능력에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하기 위해, 실시예 1에 서술된 과정을 따랐다. 6개의 수지-결합 폴리펩타이드는 효소 분석 후에 진한 파랑색을 발달시켰는데, E7 기질 모델에서 CK2 효소의 인산수용 부위와 상호작용함을 증명한다. 한편, 이 변형이 펩타이드가 E7 단백질에서 CK2 효소에 의한 인산화에 미치는 효과에 영향을 미치지 않음을 증명하기 위해, 실시예 2에 기술된 과정을 따랐다. 서열번호: 51 - 서열번호: 56로 표현되는 폴리펩타이드 E17P01-E17P03 및 D17P78-D17P80은 HPV-16의 E7 단백질에서의 CK2-매개 인산화를 억제하는 능력을 유지했고, 83% 내지 90% 사이의 인산화 억제값이 얻어졌다.

[0087] NCI-H125, Hep2C(후두암) 세포주 및 두 개의 방광암 세포주(MGH-U3 및 MGH-U4)에서 항증식 분석을 수행했다. 기존에 알려진 공정을 따라 시험했다(Perera Y., et al, 2012, Pept. Sci, 18 (4):215-23).

[0088] 도 8 및 9는 NCI-H125 세포주에서의 폴리펩타이드 E17P01, E17P02 및 E17P03(서열번호: 51 - 서열번호: 53) 및

D17P78, D17P79 및 D17P80(서열번호: 54-서열번호: 56)의 용량-효과 곡선을 각각 나타낸다. 대조 펩타이드 CIGB-300 및 전구체 폴리펩타이드 A15P36 및 A15P37을 각각 포함시켰다. 6개의 펩타이드는 NCI-H125 세포주의 세포의 증식에 용량의존적인 효과를 만들 수 있었다. Hep2C, MGH-U3 및 MGH-U4 세포주에서도 역시 6개의 폴리펩타이드 모두 용량-반응 양상을 보였다.

[0089] 표 9는 NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 및 MGH-U4 세포주에서 얻어진 폴리펩타이드 E17P01, E17P02, E17P03, D17P78, D17P79 및 D17P80(서열번호: 51- 서열번호: 56)의, 그것들의 전구체 및 대조 펩타이드 CIGB-300와 비교한 IC50 값을 요약한다.

[0090] 표 9는 서열번호: 51 - 서열번호: 56로 확인되는 폴리펩타이드들의 NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 및 MGH-U4 세포주에서의 IC50 값이 CIGB-300 펩타이드에서 얻어진 것보다 낮음을 보여주는데, 이는 항증식 효과의 면에서 그것들이 더 강력하다는 것을 나타낸다. 놀랍게도, 방광암 세포주(MGH-U3 및 MGH-U4)에서 IC50값은 CIGB-300보다 한 자릿수 낮았는데, 이는 그것이 거의 개척되지 않고, 해결되지 않았으며 건강에 높은 영향을 주는 틈새이기 때문에 매우 매력적이다. 폴리펩타이드 A15P36 및 A15P37에 도입된 변형은 프로테아제에 대한 안정성을 증가시키기 위한 것이었다. 그러나 놀랍게도 CK2 인산화에 대한 억제 능력도 역시 향상되었다.

표 9

[0091] NCI-H125, Hep2C, MGH-U3 및 MGH-U4 세포주에서의 서열번호: 51 - 서열번호: 56로 표시되는 폴리펩타이드에 대한 IC50 값

서열번호:	코드	IC_{50} (μM)			
		NCI-H125	Hep2C	MGH-U3	MGH-U4
51	E17P01	20	11	65	53
52	E17P02	27	26	55	38
53	E17P03	47	11	29	33
54	D17P78	14	20	86	89
55	D17P79	21	18	77	69
56	D17P80	13	24	65	70
47	A15P36	42	44	-	-
48	A15P37	46	48	-	-
64	CIGB-300	64	61	327	335

[0092] 대조 폴리펩타이드 A15P36, A15P37 및 CIGB-300에서 얻어진 값도 포함되었다.

[0093] 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 확인되는 펩타이드의 생물학적 활성이 오직 그것의 담당 부위에 기인하는지를 증명하기 위해서, Tat 및 βA 서열이 없는 펩타이드를 이 동일한 실시예에서 설명된 바와 같은 합성 공정을 이용하여 합성했다. 펩타이드 D17P81-D17P86(서열번호: 57 - 서열번호: 62)가 95% 이상의 순도로 얻어졌고, ESI-MS 분석으로 이 분자가 설계된 것과 같다는 것을 확인했다(표 10).

표 10

[0094] 서열번호: 57- 서열번호: 62로 확인되는 펩타이드의 특성 확인

서열번호:	코드	서열	순도 (%)	MW (Da)
57	D17P81	R(D-Lys) RWRYWP	98.5	1245.7
58	D17P82	RK(D-Arg)WRYWP	97.6	1245.7
59	D17P83	RKRWR(NMe-Tyr)WP	95.8	1259.7
60	D17P84	R(D-Lys)RSWYWP	96.3	1176.7
61	D17P85	RK(D-Arg)SWYWP	97.8	1176.7
62	D17P86	RKRSW(NMe-Tyr)WP	95.5	1190.6

[0095] 실시예 2에 설명된 바와 같이 인산화 분석을 수행했고, 83% 내지 90% 사이의 인산화 억제값을 얻었는데, 이 펩타이드가 HPV-16 E7 단백질의 CK2-매개 인산화를 억제하는 능력을 확증한다.

[0096] 요약하면, 서열번호: 51 - 서열번호: 56으로 표현되는 폴리펩타이드가 세포 증식을 억제하는 그것들의 효능면에

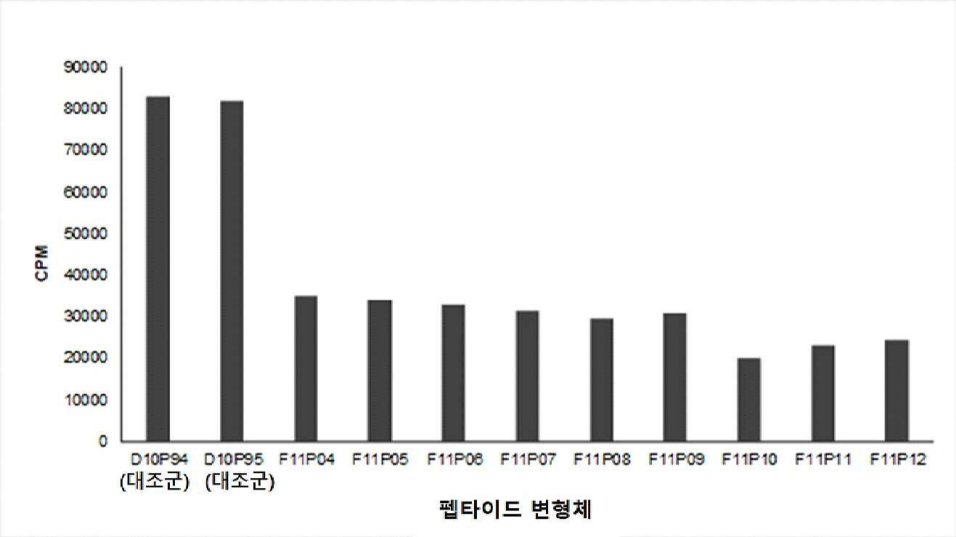
서, 특히 방광암 세포주(MGH-U3 및 MGH-U4)에서의 그것들의 억제 효능면에서 CIGB-300 펩타이드보다 훨씬 강력하다. 또한, 이 펩타이드들은 선형이고, 크기가 작으며, 화학적으로 더 안정하기 때문에, 그것이 생산의 관점에서 확실한 장점을 가진다.

[0097] **실시예 7. 인간 방광 종양 이식 모델인 무-흉선 마우스에서의 CK2 인산화 억제제 폴리펩타이드의 항종양 효과**

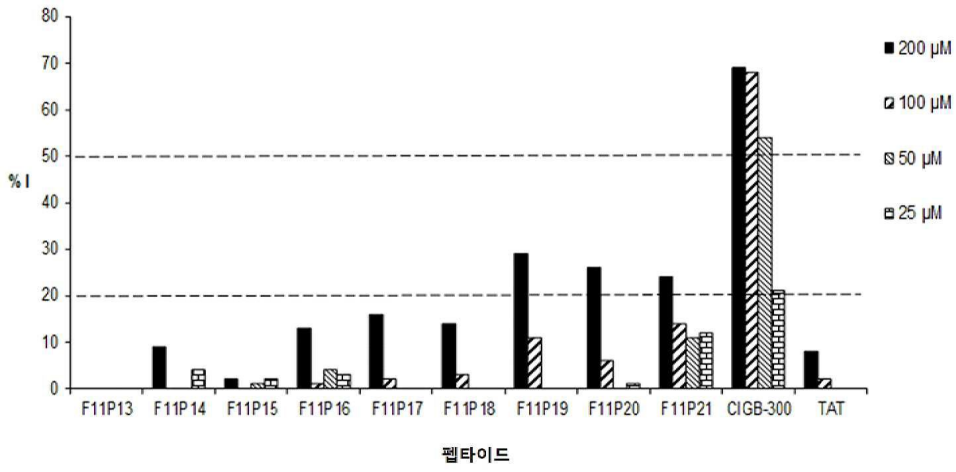
[0098] 이 실험을 위해 6-8주령 무흉선 암컷 BalbC 마우스를 사용했다. 방광 세포 암종으로부터의 MGH-U3 세포를 사용했다. 이 모델에 종양을 이식하기 위해, 밀리미터당 1,000,000개의 세포의 농도로 PBS에 세포를 현탁했다. 세포 현탁액을 상기 동물의 복강에 피하 접종했다. E17P01 폴리펩타이드(서열번호: 51) 또는 CIGB-300를 종양 세포를 접종한지 5일 뒤에 투여하기 시작해서 5일 연속 복강내 투여하였다. 폴리펩타이드와 펩타이드는 PBS에 녹였다. 투여 용량은 20 μg이었으며, 그것은 체중의 1 mg/kg에 해당한다. 여러 시점에 폴리펩타이드의 항종양 효과를 평가하기 위한 변수로서 종양 부피(mm^3)를 측정했다. 도 10에 나타낸 바와 같이, E17P01 폴리펩타이드는 종양 진행을 억제하는 능력을 나타냈는데, 그것은 CIGB-300에서 관찰된 것보다 더 컸다. 이 결과는 실험 동물에 이식된 인간 종양 모델에서의 서열번호: 51로 표현되는 폴리펩타이드의 항종양 효과를 증명한다.

도면

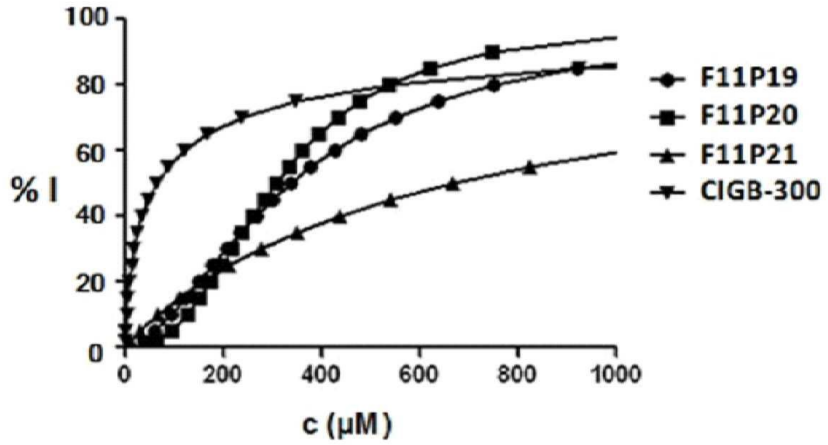
도면1



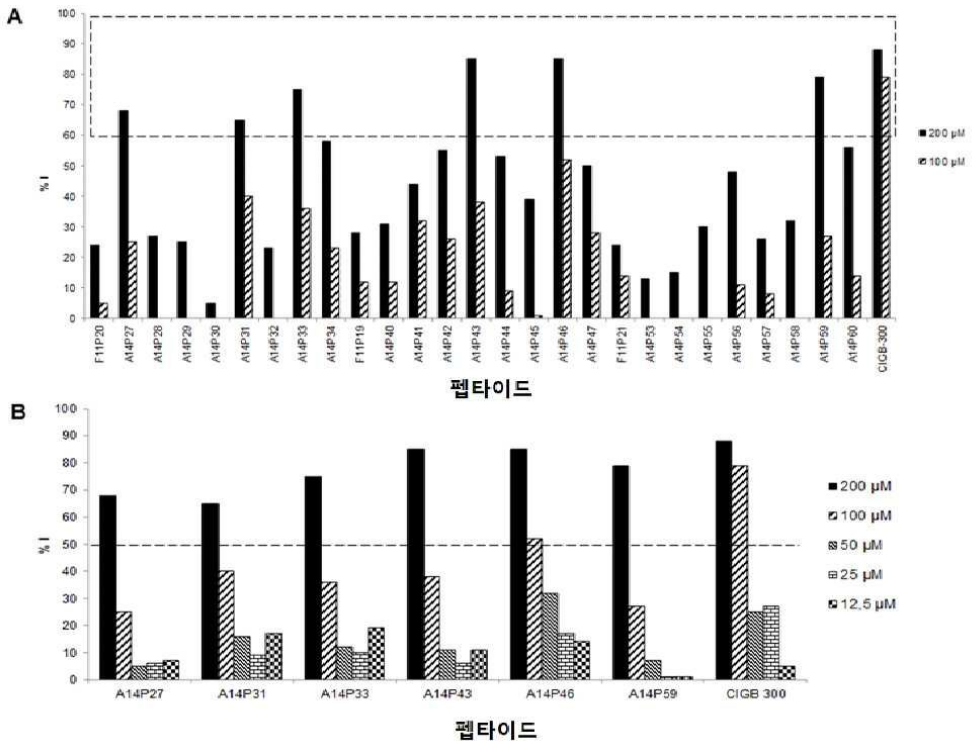
도면2



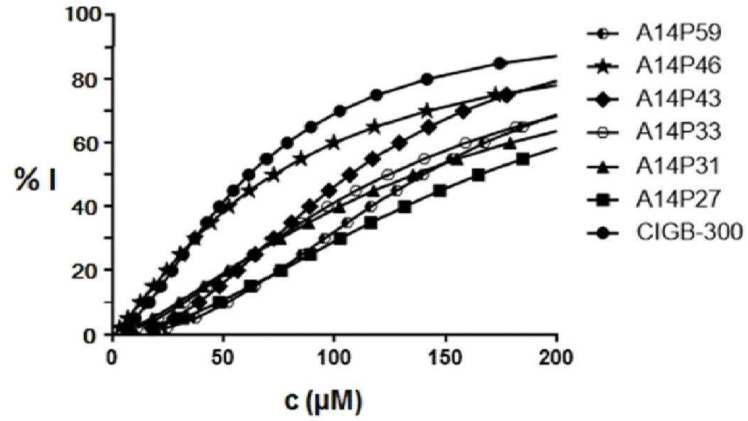
도면3


100
80
60
40
20
0
% I
0
200
400
600
800
1000
c (μM)
F11P19
F11P20
F11P21
CIGB-300

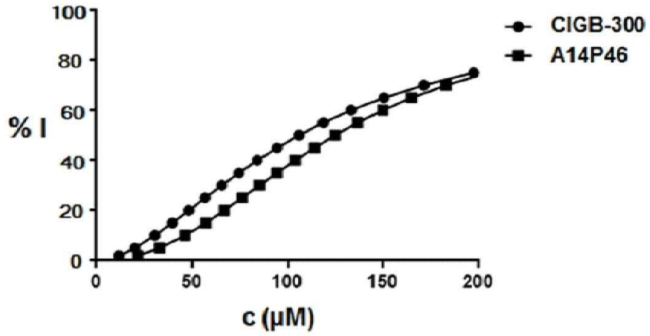
도면4


A
% I
200 μM
100 μM
펩타이드
B
% I
200 μM
100 μM
50 μM
25 μM
12,5 μM
A14P27
A14P31
A14P33
A14P43
A14P46
A14P59
CIGB 300
펩타이드

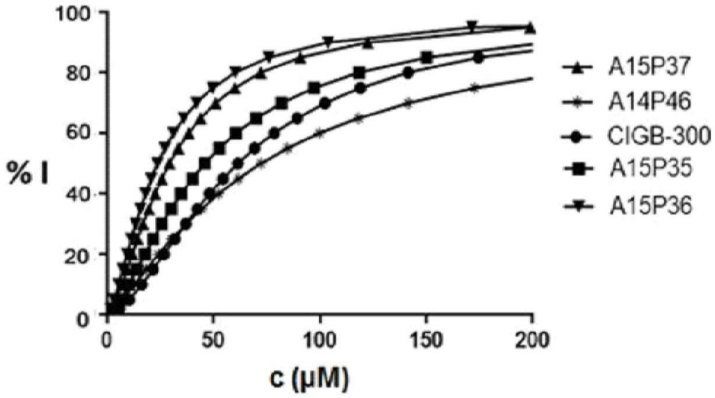
도면5


100
80
60
40
20
0
% I
0
50
100
150
200
c (μM)
A14P59
A14P46
A14P43
A14P33
A14P31
A14P27
CIGB-300

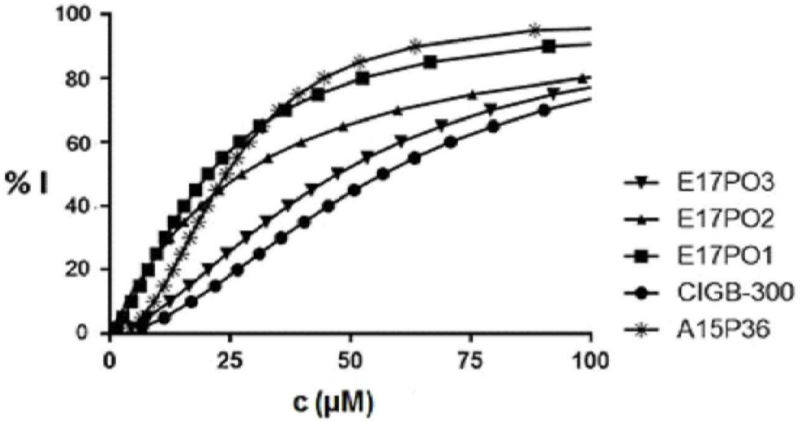
도면6


100
80
60
40
20
0
% I
0
50
100
150
200
c (μM)
CIGB-300
A14P46

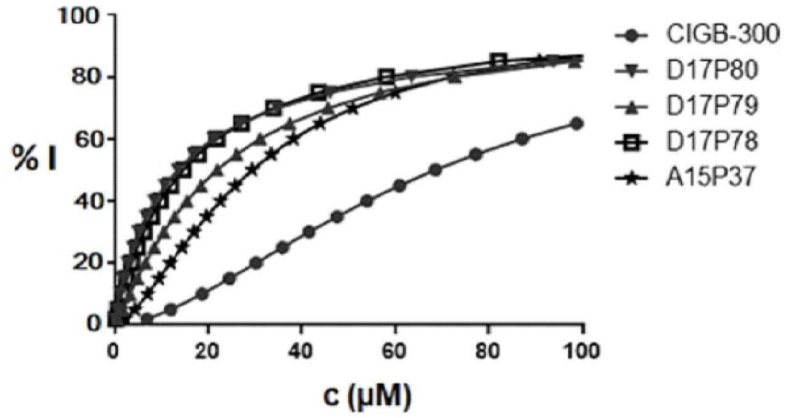
도면7


100
80
60
40
20
0
% I
0
50
100
150
200
c (μM)
A15P37
A14P46
CIGB-300
A15P35
A15P36

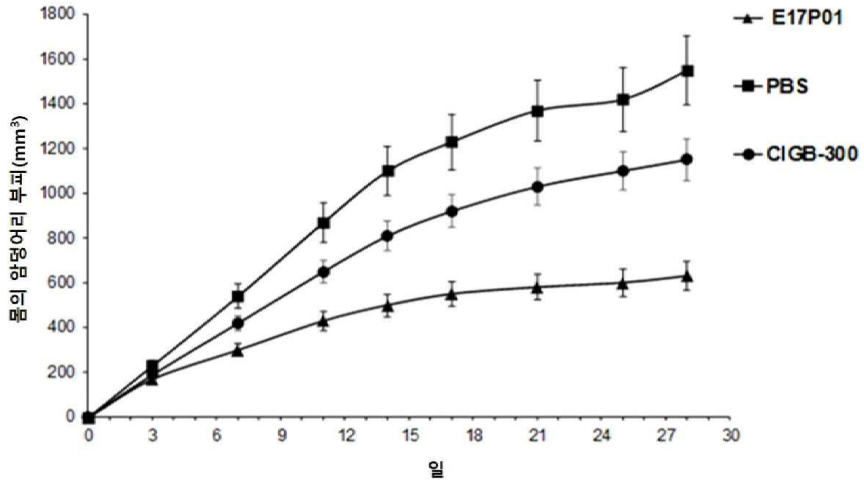
도면8


100
80
60
40
20
0
% I
0
25
50
75
100
c (μM)
E17PO3
E17PO2
E17PO1
CIGB-300
A15P36

도면9


100
80
60
40
20
0
% I
0
20
40
60
80
100
c (μM)
CIGB-300
D17P80
D17P79
D17P78
A15P37

도면10


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
몸의 암덩어리 부피(mm³)
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
일
E17P01
PBS
CIGB-300

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.