



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년07월26일
(11) 등록번호 10-1051785
(24) 등록일자 2011년07월19일

(51) Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7025210
(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년06월30일
심사청구일자 2009년03월19일
(85) 번역문제출일자 2005년12월29일
(65) 공개번호 10-2006-0030486
(43) 공개일자 2006년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2004/002165
(87) 국제공개번호 WO 2005/000887
국제공개일자 2005년01월06일
(30) 우선권주장
60/483,691 2003년06월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W0199965947 A1
전체 청구항 수 : 총 24 항

(73) 특허권자
유니베르시떼 드 로잔느
스위스, 씨에이치-1005 로잔느, 뤼 드 버그농 21
(72) 발명자
위드만, 크리스찬
스위스, 씨에이치-1010 로잔느, 그랑계뜨 5디
양, 지양-양
스위스, 씨에이치-1012 로잔느, 빅터-러피 30비스
애비뉴
믹커드, 데이비드
스위스, 씨에이치-1005 로잔느, 웨민 드 몽메일랑
12
(74) 대리인
특허법인이지

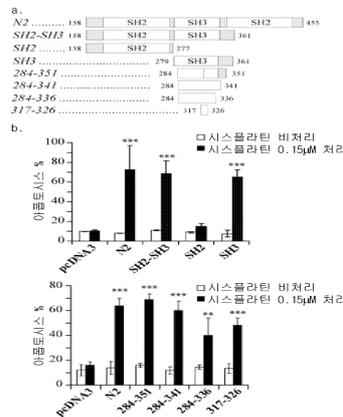
심사관 : 조정한

(54) 암세포를 선택적으로 사멸시키기 위한 RasGAP 유래펩티드

(57) 요약

본 발명은 선택적으로 세포를 사멸시키는 약물의 능력을 증가시키는 RasGAP 단백질의 N2 서열, 이의 단편 또는 이의 변이체로 구성되는 펩티드에 관한 것이다. 나아가, 상기 펩티드의 약학적 유효량을 활성 성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

i) 일반 아미노산 서열 WXWVTXXRTX (여기서 X는 아미노산을 나타냄)을 포함하는, RasGAP 단백질의 N2 서열의 적어도 하나의 단편, ii) 및 제노톡신 (genotoxin)의 조합을 포함하는 약학적 조성물로서, 상기 적어도 하나의 펩티드는 선택적으로 암세포를 사멸시키는 상기 제노톡신의 능력을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RasGAP 단백질의 N2 서열의 적어도 하나의 단편은, **서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3** 또는 **서열번호 4**의 DNA 서열에 의해 코딩되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 RasGAP 단백질의 N2 서열의 적어도 하나의 단편은 아미노산 서열 WWVITNLRITD를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 RasGAP 단백질의 N2 서열의 적어도 하나의 단편은 D-형태 및/또는 retro-inverso 이성질체 형태인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 RasGAP 단백질의 N2 서열의 적어도 하나의 단편은 상기 적어도 하나의 펩티드의 세포 축적을 증가시키는 물질과 컨쥬게이션 된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 물질은 세포막 투과성 캐리어(cell membrane permeable carrier)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세포막 투과성 캐리어는 펩티드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포막 투과성 캐리어 펩티드는 D-형태 및/또는 retro-inverso 이성질체 형태인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 세포막 투과성 캐리어 펩티드는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드, FHV-coat₃₅₋₄₉ 펩티드, HTLV-II Rex₄₋₁₆ 펩티드 및 BMV gag₇₋₂₅ 펩티드를 포함하는 군으로부터 선택되는 아르기닌 풍부 펩티드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 아르기닌 풍부 펩티드는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 제노톡신(genotoxin)은 알킬화제(alkylating agents), 항-대사제(antimetabolites), DNA 절단제(DNA cutters), DNA 결합제(DNA binders), 토포이소머라아제 독소(topoisomerase poisons) 및 방추 독소(spindle poisons)를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 알킬화제는 로무스틴 (lomustine), 카무스틴 (carmustine), 스트렙토조신 (streptozocin), 메클로레타민 (mechlorethamine), 멜파란 (melphalan), 우라실 질소 머스타드 (uracil nitrogen mustard), 클로람부실 (chlorambucil), 시클로스파미드 (cyclophamide), 이포스파미드 (iphosphamide), 시스플라틴 (cisplatin), 카르보플라틴 (carboplatin), 미토마이신 (mitomycin), 티오테파 (thiotepa), 다카르바진 (dacarbazine), 프로카르바진 (procarbazine), 헥사메틸 멜라민 (hexamethyl melamine), 트리에틸렌 멜라민 (triethylene melamine), 부설판 (busulfan), 피포브로만 (pipobroman), 미토탄 (mitotane) 및 다른 플라틴 (platine) 유도체를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 알킬화제는 시스플라틴 및 다른 플라틴 유도체를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 DNA 절단제는 블레오마이신인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 토포이소머라아제 독소는 토포테칸 (topotecan), 이리노테칸 (irinotecan), 캄프토테신 나트륨 염 (camptothecin sodium salt), 다오루비신 (daorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 미톡산트론 (mitoxantrone), 테니포시드 (teniposide), 아드리아마이신 (adriamycin) 및 에토포시드 (etoposide)를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 토포이소머라아제 독소는 미톡산트론 및 아드리아마이신을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 DNA 결합제는 닥티노마이신(dactinomycin) 및 미트라마이신(mithramycin)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 방추 독소는 빈블라스틴 (vinblastin), 빈크리스틴 (vincristin), 나벨빈 (navelbin), 파클리탁셀 (paclitaxel) 및 도세탁셀 (docetaxel)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 19

제11항에 있어서, 상기 항대사제(antimetabolites)는 메토티렉세이트 (methotrexate), 트리메트렉세이트 (trimetrexate), 펜토스테틴 (pentostatin), 시타라빈 (cytarabin), ara-CMP, 플루다라빈 인산 (fludarabine phosphate), 히드록시우레아 (hydroxyurea), 플루오로우라실 (fluorouracyl), 플록스우리딘 (floxuridine), 클로로디옥시아데노신 (chlorodeoxyadenosine), 겐시타빈 (gemcitabine), 티오구아닌 (thioguanine) 및 6-머캅토피린 (mercaptopurine)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 20

제11항에 있어서, 상기 제노톡신은 시스플라틴, 미톡산트론 및 아드리아마이신을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 암은 암종 (carcinoma), 림프종 (lymphoma), 모세포종 (blastoma), 육종 (sarcoma), 지방육종 (liposarcoma), 신경내분비종 (neuroendocrine tumor), 중피종 (mesothelioma), 신경초종 (schwannoma), 수막종 (meningioma), 샘암종 (adenocarcinoma), 흑색종 (melanoma), 백혈병 (leukemia), 악성 림프종 (lymphoid malignancy), 편평세포암종 (squamous cell cancer), 편평상피세포암 (epithelial squamous cell cancer), 폐암 (lung cancer), 소세포폐암 (small-cell lung cancer), 비소세포폐암 (non-small cell lung cancer), 폐샘암종 (adenocarcinoma of the lung), 폐편평암종 (squamous carcinoma of the lung), 복막종 (cancer of the peritoneum), 간세포성종 (hepatocellular cancer), 위암종 (gastric or stomach cancer), 위장관종 (gastrointestinal cancer), 췌장암 (pancreatic cancer), 아교모세포종 (glioblastoma), 자궁경부암 (cervical cancer), 난소암 (ovarian cancer), 간암 (liver cancer), 방광암 (bladder cancer), 간암 (hepatoma), 유방암 (breast cancer), 결장암 (colon cancer), 직장암 (rectal cancer), 결장직장암 (colorectal cancer), 자궁내막 또는 자궁암 (endometrial or uterine carcinoma), 침샘암 (salivary gland carcinoma), 신장암 (kidney or renal cancer), 전립선암 (prostate cancer), 외음암 (vulval cancer), 갑상선암 (thyroid cancer), 간암종 (hepatic carcinoma), 항문암종 (anal carcinoma), 음경암종 (penile carcinoma), 고환암 (testicular cancer), 식도정맥류암 (esophageal cancer), 담도암 (tumor of biliary tract) 및 두경부암 (head and neck cancer)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 암은 중피종, 고환암 또는 췌장암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 약학적 조성물과 함께 시약 (reagent) 및/또는 사용 지침을 포함하는, 대상자의 암 치료 또는 예방을 위한 키트.

청구항 30

제29항에 있어서, 약물(drugs), 항-상피세포 성장인자 수용체 항체 (anti-epidermal growth factor receptors antibody), 방사능면역요법제 (radioimmunotherapeutic agent) 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부가적인 항암제 (anti-cancer agent)를 포함하는 별개의 약학적 용량 형태 (pharmaceutical dosage form)를 추가적으로 포함하는 키트.

청구항 31

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포, 특히 암세포를 선택적으로 사멸시키는 약물의 효능을 증강시키는 펩티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 활성 성분으로서, 적어도 하나의 상기 펩티드의 약학적 유효량을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종양은 다양하고 이질적 (heterogeneous)이나, 통제되지 않고 증식하는 능력을 가지는 점에서는 모든 종양이 공통적이다. 아포토시스 민감성 (apoptotic sensitivity)이 억제된 것과 연관되어, 조절되지 않는 세포 증식은, 종양 발달이 일어나는 것에 대한 최소한의 조건을 구성한다.

[0003] 아포토시스는, 이에 의하여 세포가 프로그램화된 세포사에 이르게 하는 과정으로서, 발생 (development) 과정 동안 일어나는 생명 현상이며, 항상성 (homeostasis)의 유지에 필수적이다. 세포가 비가역적으로 아포토시스를 수행하게 만드는 것으로 믿어지는 생화학적 사건들은 카스파아제 (아스파르트산 잔기 다음을 절단하는 시스템인 프로테아제)의 활성화이다. 아포토시스를 수행하는 세포들은 멤브레인 블레빙 (membrane blebbing), 세포 구형화 (cell rounding), 크로마틴 응축, DNA 절단, 세포 표면의 아포토시스 마커의 발현 및 항 아포토시스 신호 전달 경로의 억제를 포함하여, 특징적인 형태학적 및 생화학적 변화들을 나타낸다. 그러므로, 아포토시스 동안 관찰되는 특징적인 변화의 대부분-모두는 아니더라도-은 카스파아제의 기질이 절단되는 것에 기인한다.

[0004] 아포토시스가 실행되는 단계는, 세포 내 카스파아제 기질이 절단되는 때가 발단이 된다. 수십 가지 카스파아제의 기질이 확인되었고, 그 리스트가 꾸준히 증가하고 있다 (Earnshaw W.C. *et al.*, "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis" *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383, 1999). 일단, 절단되면 카스파아제 기질은 아포토시스 동안 관찰되는, 상기한 생화학적 및 형태학적 사건들-카스파아제의 활성화의 증폭, DNA 단편화, 핵 붕괴 (nuclear breakdown) 등과 같은-을 매개한다.

[0005] 나아가, MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 경로가 양성적 혹은 음성적 양상 (positive or negative manner)으로 아포토시스를 조절한다는 것이 알려져 있다 (Jarpe M.B. *et al.*, "Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death" *Oncogene*, **17**, 1475, 1998; Widmann C. *et al.*, "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human" *Physiol. Rev.* **79**, 143, 1999). 이것은 아포토시스 카스파아제가 왜 몇몇 시그널링 단백질-MAPK를 조절하고/또는 MAPK 경로의 구성요소가 되는-을 타겟으로 하는지를 설명해 준다(Widmann C. *et al.*, "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals" *J. Biol. Chem.*, **273**, 7141, 1998). 이들 단백질은 MEKK1, PAK2, Mst1 및 RasGAP를 포함한다.

[0006] 최근, Yang 및 Widmann (Yang J.-Y. and Widmann C., "Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP" *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5346, 2001; "A subset of caspase substrates functions as the Jekyll and Hyde of apoptosis" *Eur. Cytokine Netw.*, **13**, 387, 2002a; "The RasGAP N-terminal fragment generated by caspase cleavage protects cells in a Ras/PI3K/Akt-dependent manner that does not rely on NFkappa B" *J. Biol. Chem.*, **277**, 14641, 2002b)는 Ras 및 Rho GTP-결합 단백질의 조절자인 RasGAP가 카스파아제에 의한 절단 정도에 따라, 항- 아포토시스 및 프로- 아포토시스 시그널을 유도할 수 있기 때문에 비일반적인 카스파아제 기질임을 증명하였다. 이들은 카스파아제 활성 수준이 낮을 때는 RasGAP가 455 위치에서 절단되어, N 말단 서열(서열 N) 및 C 말단 서열 (서열 C)을 생성한다는 것을 보여주었다.

[0007] 서열 C-전체 길이의 RasGAP이 아니라-는 HeLa 세포에서, 농축핵 (pycnotic nuclei)의 출현, 카스파아제 3의 활성화 및 PARP의 절단을 유도하는 능력으로부터 평가해 볼 때, 강한 아포토시스 반응을 유도하였다.

[0008] 같은 연구에서, 저자들은 서열 N이 세포사를 촉진하기보다 카스파아제 활성화의 하류에서 일반적으로 아포토시스 억제자로 나타난다는 사실도 보여주었다. 카스파아제 활성이 높은 수준일 경우에는, 157 위치에서 절단되면서 아포토시스에 반대로 작용하는 서열 N의 능력이 억제되었다. 상기 후자의 절단 반응은 서열 N1 및 N2 두

서열을 만들어냈고, 이는 서열 N 과 반대로, 시스플라틴 (cisplatin)-암 치료를 위해 화학요법에 사용되는 약물-에 의해 유도된 아포토시스 진행 방향으로, 카스파아제 활성을 높이 발전시킬 수 있는 세포를 민감화시킨다 (sensitize)는 것이 나타났다.

[0009]

[0010] 그러나, 특이적으로 이 단백질을 억제하기 위해서 RasGAP의 N2 서열의 SH3 도메인에 대한 단일클론 항체를 주사하는 것이 암세포에서 아포토시스를 유도한다는 것이 Leblanc *et al* (Leblanc V. *et al.*, "Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells" *Oncogene*, **18**, 4884, 1999)에 의해 밝혀졌다. 또한, 특허출원 W099/65947 (Parker *et al.*) 에서는 RasGAP SH3-도메인 결합 단백질인 G3BP에 대한 단일 클론 항체가 G3BP를 특이적으로 과발현하는 암세포에서 아포토시스를 유도한다는 사실이 알려졌다.

[0011] 이러한 결과들은 RasGAP SH3 도메인을 통하여 성장을 조절하는 RasGAP 경로가 특정 암 세포가 생존하는데 필수적이라는 사실을 암시하는 것 같다. 이러한 발견은 Yang 및 Widmann에 의해 얻어진 결과와 대조적이며, 따라서, RasGAP SH3 도메인은 세포에서 아포토시스의 유도 및 조절에 꽤 양면적인 기능을 가진다는 결론에 이르게 한다.

[0012] 화학요법 (chemotherapy)은 독자적으로 또는 다른 치료법 (방사능요법 등)과 조합하여 현재 암을 치료하기 위한 가장 일반적이며 효율적인 치료 도구로 사용되고 있는 것 중의 하나이다. 화학요법에서 암을 치료하기 위하여 사용되는 약물의 효능은 암 세포를 죽일 수 있는 능력에 따른다. 그러나, 상기 약물의 사용에 있어서, 이들이 암세포뿐만 아니라 암세포가 아닌 일반 세포-특히, 빠르게 분열하는 세포-에도 강한 카스파아제 자극을 유도하기 때문에, 이들이 암세포가 아닌 일반적인 세포에도 역으로 작용할 수 있다는 사실에서 오는 제한이 있다.

[0013] 그러므로, 종양을 제거하는데 충분히 높은 용량, 그러나 탈모, 구역질 (nausea) 및 구토 (vomiting), 심장 독성 (cardiac toxicity) 및 2차 암과 같이 환자에게서 심각한 부작용을 유도할 만큼 높지 않은 용량을 선택하는 것은 임상학들의 도전이다.

[0014] 암세포에 대한 약물의 선별도 (selectivity)를 개선하는 것은 화학요법의 효능을 증가시킴으로써 약물을 더 낮은 용량으로 사용하게 하는 것을 분명히 가능하게 할 것이다. 이것은 또한, 상기 언급한 심각한 부작용을 가능한 한 감소시키는 결과를 가져올 것이다.

[0015] 그러므로, 본 발명의 목적은 암 치료 및 예방을 위하여 상기 언급된 결점을 가지지 않는 약물과 조합하여, 개선된 접근법을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

[0016] 발명의 요약

[0017] 본 발명의 목적은 암세포를 선택적으로 사멸시키는 약물의 능력을 증강시키는, RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 (consisting essentially of) 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 제공함에 의하여 달성된다.

[0018] 나아가, 본 발명은 상기 펩티드를 코딩하는 분리 정제된 핵산 서열, 분리 정제된 핵산 서열의 적어도 1 카피를 포함하는 발현벡터 및 상기 펩티드, 상기 분리 정제된 핵산 서열 및/또는 상기 발현벡터를 포함하는 진핵 혹은 원핵 숙주세포를 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 적어도 하나의 펩티드의 약학적 유효량을 활성성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드", "단백질", "폴리펩티드의" 및 "펩티드의"는 알파 아미노산 및 인접한 잔기의 카르복시 그룹 간 펩티드 결합에 의하여 다른 아미노산에 연결된 일련의 아미노산 잔기를 나타내기 위하여 상호변환적으로 사용된다.

- [0021] Ras 및 Rho GTP-결합 단백질의 조절자인 RasGAP은, 카스파아제에 의한 절단 정도에 따라 항- 및 프로-아포토시스 시그널 양자 모두를 유도하기 때문에 일반적으로 낮은 카스파아제 기질이다. 카스파아제가 낮은 레벨일 경우에는, RasGAP는 455 위치에서 절단되어 N 말단 단편 (단편 N, 약 56 kD) 및 C 말단 단편 (단편 C, 약 64 kD)을 생성한다. 단편 N은 카스파아제 활성화의 하류에 있는, 아포토시스의 일반적인 억제자인 것 같다 (Yang J.-Y. and Widmann C., Mol. Cell. Biol., **21**, 5346, 2001 and J. Biol. Chem., **277**, 14641, 2002b). 카스파아제 활성이 높은 레벨일 경우, 단편 N은 157 위치에서 더 절단되어 두 개의 단편인 N1 (아미노산 1 내지 157) 및 N2 (아미노산 158 내지 455)를 생성한다.
- [0022] "암세포"는 동물에서 생체 내 (*In vivo*) 발생하는 세포- 바람직하지 않으며 조절되지 않는 세포 성장 또는 비정상적인 지속 (abnormal persistence) 또는 비정상적인 조직 침투를 할 수 있는 세포-이다. 시험관 내 (*In vitro*)에서 이 용어는 또한, 영구적으로 죽지 않는 확립된 세포 배양으로서, 적절하게 신선한 배지와 공간이 주어지는 경우 무한하게 조절되지 않는 양상으로 증식할 수 있는 세포주를 가리킨다.
- [0023] 용어 "약물 (drug)"은 포유류 세포, 바람직하게는 인간 세포를 사멸시킬 수 있는 약을 가리킨다. 기원이 다양하고 작용 양상이 다른 몇 가지 부류의 약물이 있다.
- [0024] 본 발명의 약물은 숙주의 생물학적 과정으로부터 유래된 성분 혹은 숙주의 생물학적 과정을 이롭게 조절하는 성분에 관련된 것이다. 인터페론, 종양성장인자 (tumor growth factors), 종양괴사인자 (tumor necrosis factors), GM-CSF 및 G-CSF와 같은 성장인자 및 인터루킨-2, 인터루킨-6, 인터루킨-7 및 인터루킨-12와 같은 인터루킨은 암 치료에 현재 사용되는 생물학적 약물의 예이다.
- [0025] 본 발명의 약물은 DNA에 해를 입히고/또는 제노독신 (genotoxin)과 같이 세포 증식을 방해하는 물질과도 관련된 것이다. 제노독신은 알킬화제, 항대사제 (antimetabolites), DNA 절단제 (DNA cutters), DNA 결합제 (DNA binders), 토포이소머라아제 독소 (topoisomerase poisons) 및 방추 독소 (spindle poisons)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0026] 알킬화제의 예로는 로무스틴 (lomustine), 카무스틴 (carmustine), 스트렙토조신 (streptozocin), 메클로레타민 (mechlorethamine), 멜파란 (melphalan), 우라실 질소 머스타드 (uracil nitrogen mustard), 클로람부실 (chlorambucil), 시클로스파미드 (cyclophamide), 이포스파미드 (iphosphamide), 시스플라틴 (cisplatin), 카르보플라틴 (carboplatin), 미토마이신 (mitomycin), 티오테파 (thiotepa), 다카르바진 (dacarbazine), 프로카르바진 (procarbazine), 헥사메틸 멜라민 (hexamethyl melamine), 트리에틸렌 멜라민 (triethylene melamine), 부설판 (busulfan), 피포브로만 (pipobroman), 미토탄 (mitotane) 및 다른 플라틴 (platine) 유도체들이 있다.
- [0027] DNA 절단제의 예로는 블레오마이신 (bleomycin)이 있다.
- [0028] 토포이소머라아제 독소는 토포테칸 (topotecan), 이리노테칸 (irinotecan), 캄프토테신 나트륨 염 (camptothecin sodium salt), 다오루비신 (daorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 미톡산트론 (mitoxantrone), 테니포시드 (teniposide), 아드리아마이신 (adriamycin) 및 에토포시드 (etoposide)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0029] DNA 결합제 (DNA binders)의 예로는 닥티노마이신 (dactinomycin) 및 미트라마이신 (mithramycin)이 있으며 방추 독소 (spindle poisons)는 빈블라스틴 (vinblastin), 빈크리스틴 (vincristin), 나벨빈 (navelbin), 파클리탁셀 (paclitaxel) 및 도세탁셀 (docetaxel)을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0030] 항대사제 (antimetabolites)와 같은 약물은 다음의 화합물 메토티렉세이트 (methotrexate), 트리메트렉세이트 (trimetrexate), 펜토스테틴 (pentostatin), 시타라빈 (cytarabin), ara-CMP, 플루다라빈 인산 (fludarabine phosphate), 히드록시우레아 (hydroxyurea), 플루오로우라실 (fluorouracyl), 플록스우리딘 (floxuridine), 클로로디옥시아데노신 (chlorodeoxyadenosine), 겐시타빈 (gemcitabine), 티오구아닌 (thioguanine) 및 6-머캅토피린 (mercaptapurine)-에서 선택되는 것을 사용할 수 있다.
- [0031] 바람직하게는, 제노독신, 보다 바람직하게는 시스플라틴, 미톡산트론 및 아드리아마이신이 본 발명의 약물로서 사용된다.

- [0032] 이러한 약물들은 독자적으로 또는 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다. 하나 이상의 약물이 사용될 경우 약물의 유용한 조합을 결정하는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자의 능력 범위 내에서 가능하며, 사멸시키려는 암 세포 등에 따른다.
- [0033] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "증강시키는 (enhancing)" 이란, 세포를 사멸시키는 약물의 효능을 증가시키는 펩티드의 능력을 말한다. 이러한 능력은 예를 들어, 펩티드를 함유하고 있는 세포를 적어도 하나의 약물을 처리하여 농축핵 (아폽토시스 세포의 마커)을 보이는 세포의 수를 기록하여 세포의 아폽토시스 백분율을 측정함으로써 인 비트로에서 측정될 수 있다. 전형적으로, 상기 결과는 상기 펩티드를 가지지 않는 세포를 약물로 처리한 결과와 비교된다. 주어진 농도에서 세포의 아폽토시스를 두 배 이상 증가 또는, 주어진 아폽토시스 반응을 유도하는 약물의 용량을 최소한 두 배 이상 감소시키는 결과에 이르게 하는 펩티드는, 세포를 사멸하는 약물의 능력을 증가시키는 것으로 판단할 수 있다.
- [0034] 용어 "선택적으로"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 본 발명의 펩티드가 주어진 농도에서 세포-특히, 암세포-를 사멸하는, 그러나 놀랍게도 비-암세포는 사멸시키지 않는 약물의 능력을 증강시키는 것을 말한다.
- [0035] 인 비트로에서 상기 펩티드가 암세포에서 세포를 선택적으로 사멸시키는 능력을 증강시키는 약물의 농도 범위는 보통 사용된 약물에 따라 다르다. 예를 들어, 제노톡신이 사용될 경우, 인비트로에서 상기 약물의 농도는 0.1 내지 100 μM 보다 바람직하게는, 0.15 내지 30 μM 이다.
- [0036] RasGAP 단백질의 N2 서열은 바람직하게는, 인간으로부터 유래되는, 297 아미노산으로 구성되는 36 kD의 단백질-도 2a에 나타난 두 개의 SH2 및 하나의 SH3 도메인을 포함하는-을 가리킨다.
- [0037] 일반적으로, Src homology 2 (SH2) 도메인은 인산화된 티로신의 인식에 관여하는 반면, Src homology 3 (SH3) 도메인은 자주 세포골격의 조직화에 관련된 신호 전달(signal transduction)에 관여하는 단백질의 표시자이다.
- [0038] "단편 (fragment)"은 RasGAP 단백질의 N2 서열보다 짧은 길이의 아미노산을 가지는 서열을 말한다. 이 서열은 자신이 유래된 자연 서열 (native sequence)과 같은 특성을 나타내는 한 사용될 수 있다. 바람직하게는 RasGAP 단백질의 각 N2 서열보다 90% 이하, 보다 바람직하게는 60% 이하, 특히 바람직하게는 30% 이하 길이의 아미노산을 가진다.
- [0039] 본 발명은 또한, RasGAP 단백질의 N2 서열의 변이체를 포함한다.
- [0040] 용어 "변이체" 는 자연 서열 펩티드와 어느 정도 다른 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 의미하는 것으로, 하나 이상의 아미노산이 같은 성질과 구조적인 역할을 하는 또 다른 아미노산으로 치환되는 보존적 아미노산 치환에 의하여 자연 서열과 달라지게 되는 아미노산 서열이다. 아미노산 서열 변이체는 자연 아미노산 서열 내의 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 삽입되어 있다. 본 명세서 내에서 보존적 아미노산 치환은 다음의 다섯 군 중 하나 이내에서의 교환으로 정의된다.
- [0041] 1. 작은, 지방족, 비극성 또는 약한 극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- [0042] 2. 극성, 양으로 대전된 잔기: His, Arg, Lys
- [0043] 3. 극성, 음으로 대전된 잔기 및 이들의 아미드: Asp, Asn, Glu, Gln
- [0044] 4. 큰, 방향족 잔기: Phe, Tyr, Trp
- [0045] 5. 큰, 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- [0046] N2 서열은 그 단편 및 변이체를 포함하여, 당업계에 공지된 다양한 방법 및 기술- 예를 들어, 화학 합성 또는 Maniatis *et al.* 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory에 기재된 재조합 기술-에 의하여 제조될 수 있다.

- [0047] 바람직하게는, RasGAP 단백질의 N2 서열의 단편은 N2 서열의 SH3 도메인의 아미노산 서열, 이의 부분 또는 이의 변이체를 포함한다.
- [0048] 본 출원인은 놀랍게도, RasGAP 단백질의 N2 서열의 더 짧은 서열-암세포를 선택적으로 사멸하는 약물의 능력을 여전히 증강시켜 보다 용이하게 합성될 수 있는 이점을 또한 가지는 서열-을 특징화 하였다. 이의 부분이 분리될 수 있는지를 평가하기 위하여, 본 출원인은 도 2a에 나타난 바와 같이, 단편 N의 여러 결실 형태(truncated versions)를 생성하고 암 세포주 (도 2b)에서 약물 유도된 아포토시스에 힘을 더하는 이들의 능력을 측정하였다. N2 서열의 이러한 부분은 벡터에 클로닝되고, 암 세포주 (HeLa)에 트랜스펙션 되었다.
- [0049] 본 출원인은 공 (empty) 컨스트럭트 또는 단지 N2의 SH2 도메인을 코딩하는 컨스트럭트로 트랜스펙션된 HeLa 세포는 시스플라틴-유도된 세포 사멸을 증강시킬 수 없음을 보였다. 대조적으로, SH3 도메인을 가지는 컨스트럭트를 발현하는 세포는 도 2b에 나타난 바와 같이, 시스플라틴-유도된 아포토시스의 증강을 더 증가시켰다.
- [0050] 본 출원인은 그 후, 최소한의 증강 서열을 확인하고자, SH3 도메인에서 점진적인 결실체 (progressive truncations)를 생성하였다. 상기한 모든 컨스트럭트 또는 N2 서열의 일부 (도 2a)는 10 아미노산 길이의 펩티드를 코딩하는 가장 짧은 서열 (317-326)을 포함하여, 시스플라틴이 HeLa 세포를 사멸하는 능력을 증강시켰다 (도 2b). 이 결과는 N2 단편의 세포 사멸을 증강시키는 특성이 완전한 SH3 도메인을 필요로 하는 것이 아니라 짧은 펩티드 서열과 같은 SH3 도메인의 일부에 의해서 매개될 수 있음을 나타낸다.
- [0051] SH3 도메인의 일부 또는 이의 변이체는 SH3 도메인의 아미노산 서열의, 바람직하게는 70 이하, 보다 바람직하게는 30 이하, 가장 바람직하게는 10 이하의 아미노산을 가진다.
- [0052] 특히, 본 발명은 표 1의 DNA 서열에 의하여 코딩되는 아미노산 서열로 구성되는 SH3 도메인의 일부를 포함한다.

표 1

서열	명칭	DNA 서열	아미노산 서열
서열번호 1	RasGAP ₂₈₄₋₃₅₁	gaagatagaagggcgtgtacgagctatttctacctta cacaaaagtaccagacactgatgaaataagtttct taaaaggagatatgttcattgttcataatgaatta gaagatggatggatgtgggttacaaatttaagaac agatgaacaagggccttattgttgaagacctagtag aagaggtgggcccgggaagaagatccacatgaagga aaaatatggttccatgggaagatttccaaacagga agct	EDRRRVRAILPYTKV PDTDEISFLKGDPMFI VHNELEDGWMWVTNL RTDEQGLIVEDLVVEE VGREEDPHEGKIWFH GKISKQEA
서열번호 2	RasGAP ₂₈₄₋₃₄₁	gtacgagctatttctacottacacaaaagtaccaga cactgatgaaataagtttcttaaaaggagatatgt tcattgttcataatgaattagaagatggatggatg tgggttacaaatttaagaacagatgaacaagggcct tattgttgaagacctagtagaagaggtgggcccggg aagaagatccacatgaaggaaaaatatgg	RVRAILPYTKVPDPTD EISFLKGDPMFIVHNE LEDGWMWVTNLRTDE QGLIVEDLVVEEVGRE EDPHEGKIW
서열번호 3	RasGAP ₂₈₄₋₃₃₆	gtacgagctatttctacottacacaaaagtaccaga cactgatgaaataagtttcttaaaaggagatatgt tcattgttcataatgaattagaagatggatggatg tgggttacaaatttaagaacagatgaacaagggcct tattgttgaagacctagtagaagaggtgggcccggg	RVRAILPYTKVPDPTD EISFLKGDPMFIVHNE LEDGWMWVTNLRTDE QGLIVEDLVVEEVGR
서열번호 4	RasGAP ₃₁₇₋₃₂₆	tggatgtgggttacaaatttaagaacagat	WMWVTNLRTD

- [0053]
- [0054] N2 서열의 SH3 도메인 일부가 서열번호 4(RasGAP₃₁₇₋₃₂₆)인 경우, 상기 서열번호 4에 의하여 코딩되는 아미노산 서열은 인간에서 WMWVTNLRTD이다. 다른 종 간의 비교는 표 2에 나타난 바와 같이, 종 사이에서 보존된 다른 아미노산이 있음을 알려준다.

표 2

종	RasGAP ₃₁₇₋₃₂₆ 의 아미노산 서열
인간	WMWVTNLRTD
소(Bos taurus)	WMWVTNLRTD
생쥐(Mouse)	WMWVTNLRTD
갈색쥐(Rattus norvegicus)	WMWVTNLRTD
모기(Anopheles)	WLWVTAHRTG
초파리(Drosophila)	WLWVTAHRTG

정렬	<u>WxWVTxxRTx</u>
----	--------------------------

[0055]

[0056]

N2의 SH3 도메인의 상기 10 아미노산 부분의 발명적 특성을 훼손하지 않고, 중간 보존된 아미노산은 굵게 밑줄 친 형태의 잔기를, X는 보존적 혹은 비보존적 아미노산 치환에 의해 변화될 수 있는 아미노산 잔기를 나타낸다.

[0057]

이러한 N2의 인간 SH3 도메인의 10 아미노산 부분의 펩티드 변이체- 특히, 정렬된 서열이 WXWVTXXRTX- 도 본 발명에 포함되며, 이들은 어느 정도 자연 서열 펩티드와 다른 아미노산 서열을 가지는 펩티드, 즉, 자연 서열 WMWVTNLRTD와 보존적 혹은 비보존적 아미노산 치환-이에 의하여 하나 이상의 아미노산 잔기가 같은 특성 및 구조적 역할을 가지는 다른 아미노산으로 치환됨-에 의하여 달라지게 되는 아미노산 서열을 말한다.

[0058]

본 발명에 개시된 바와 같이 보통, RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 혹은 이의 변이체는 세포 내에서 상기 펩티드의 축적을 증가시키는 물질과 컨쥬게이션 되어 있다.

[0059]

상기 물질은, 의약과 컨쥬게이션 된 트랜스페린의 막 트랜스페린 수용체 매개 세포내 이입 (Qian Z. M. *et al.*, " Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway" Pharmacological Reviews, **54**, 561, 2002)등과 같이 수용체가 매개된 세포내 이입을 유도하는 화합물일 수 있고, 또는 단백질 키나아제 C (Ioannides C.G. *et al.*, "Inhibition of IL-2 receptor induction and IL-2 production in the human leukemic cell line Jurkat by a novel peptide inhibitor of protein kinase C" Cell Immunol., **131**, 242, 1990) 및 단백질 티로신 포스파타아제 (Kole H.K. *et al.*, "A peptide-based protein-tyrosine phosphatase inhibitor specifically enhances insulin receptor function in intact cells" J. Biol. Chem. **271**, 14302, 1996)의 펩티드 억제자의 세포내 전달에 이미 사용되고 있는 디카노익산, 미리스틱산 및 스테아릭산과 같은 지방산 그룹 또는 펩티드 등으로부터 선택될 수 있는 세포막 투과성 캐리어 (cell membrane permeable carrier)일 수 있다. 바람직하게는, 세포막 투과성 캐리어가 사용될 수 있으며, 보다 바람직하게는, 세포막 투과성 캐리어 펩티드가 사용된다.

[0060]

세포막 투과성 캐리어가 펩티드인 경우, 아르기닌이 풍부한 펩티드인 것이 바람직하다. Futaki *et al.* (Futaki S. *et al.*, "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery" J. Biol. Chem., **276**, 5836, 2001)은 최근, 세포막 투과성 캐리어 펩티드 내 아르기닌 잔기가 내재화 (internalization)방법에 중요한 영향을 미친다는 것과, 내재화를 위한 최적 아르기닌 잔기 수가 있으며, 바람직하게는 6 개 이상의 아르기닌을 포함한다는 것을 밝혀내었다.

[0061]

본 발명의 펩티드는 보통 스페이서 (spacer)에 의하여 세포막 투과성 캐리어와 컨쥬게이션되어 있다. 이 경우, 세포막 투과성 캐리어는 바람직하게는, 펩티드이다.

- [0062] 보통 아르기닌 풍부 펩티드는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드, FHV-coat₃₅₋₄₉ 펩티드, HTLV-II Rex₄₋₁₆ 펩티드 및 BMV gag₇₋₂₅ 펩티드를 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 아르기닌 풍부 펩티드는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드이다.
- [0063] 예를 들어, RasGAP₃₁₇₋₃₂₆과 같이 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드가 RasGAP 서열에 컨주게이션 될 경우, 스페이서가 유동성을 부여하도록 두 개의 글리신 잔기는 TAT와 RasGAP 서열 사이에 삽입된다.
- [0064] 자연 (natural) 펩티드 (L-형태)에 내재하는 문제는 자연 프로테아제에 의해 분해된다는 것이므로, 본 발명의 펩티드는 D-형태 및/또는 펩티드의 "retro-inverso 이성질체"를 포함하도록 제조될 수 있다.
- [0065] 이 경우, 본 발명의 펩티드의 짧은 단편 retro-inverso 이성질체 및 변이체가 제조된다.
- [0066] 그러므로, 자연적인 단백질 분해로부터 펩티드를 보호하는 것은 특이적 헤테로2가 (heterobivalent) 또는 헤테로다가 (heteromultivalent) 화합물의 효능을 증가시킬 것이다. 자연 단백질 분해효소 (proteinase)에 의한 분해로부터의 보호때문에 아날로그를 포함하는 비 retro-inverso와 비교되었을 때 펩티드를 포함하는 retro-inverso의 생물학적 활성이 더 높다고 예측된다. 나아가, 이들은 증가된 안정성 및 더 낮은 면역원성 (immunogenicity)을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (Sela M. and Zisman E., "Different roles of D-amino acids in immune phenomena" FASEB J. **11**, 449, 1997).
- [0067] Retro-inverso 펩티드는 예를 들어, Sela 및 Zisman (1997)에 기재된 바와 같이 공지 서열의 펩티드에 대하여 제조된다.
- [0068] "retro-inverso 이성질체" 는 서열의 방향이 역전되고 각 아미노산 잔기의 키랄성이 역위되어 있어, 말단 그룹 상보성 (end-group complementarity)이 없는 선형 펩티드 이성질체를 말한다.
- [0069] 또한, 본 발명은 아세틸화 또는 카르복실화 등과 같은 인비보 또는 인비트로에서의 펩티드의 화학적 유도체화를 포함하는, 펩티드의 변형(보통 1차 서열을 바꾸지 않는다)을 포함한다. 또한, 합성 및 프로세싱 과정 동안 또는 추가적인 프로세싱 단계에서 상기 펩티드를 당화에 영향을 미치는 포유류 당화 혹은 탈당화 효소 등과 같은 효소에 노출시킴 등에 의해 펩티드의 당화 패턴의 변형에 의해 만들어지는 것과 같은 당화 변형도 본 발명에 포함된다. 또한, 포스포티로신 (phosphotyrosine), 포스포세린 (phosphoserine) 또는 포스포트레오닌 (phosphothreonine)과 같은 인산화된 아미노산 잔기를 가지는 서열을 포함한다.
- [0070] 본 발명은 또한, 하나 이상의 펩티드 결합이 또 다른 형태의 공유결합으로 대체되어 있는, 펩티다아제에 의해 잘 절단되지 않는 아날로그 (유사 펩티드, peptide mimetic)를 포함한다. 대상자 (subject)에 주사한 후 상기 펩티드의 단백질 분해가 문제가 되는 경우, 절단되지 않는 유사 펩티드를 특별히 민감한 펩티드 결합으로 대체하는 것은 결과적으로 생성되는 펩티드를 더 안정하게 만들기 때문에 활성 물질 (active substance)로 더 유용하다. 그러한, 유사 (물) 및 이들을 펩티드에 삽입하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0071] 또한, t-부틸옥시카보닐, 아세틸, 테일 (theyl), 석시닐 (succinyl), 메톡시석시닐(methoxysuccinyl), 수베릴 (suberyl), 아디필 (adipyl), 아제라일 (azelayl), 단실 (dansyl), 벤질옥시카보닐 (benzyloxycarbonyl), 플루오레닐메톡시카보닐 (fluorenylmethoxycarbonyl), 메톡시아제라일 (methoxyazelayl), 메톡시아디필 (methoxyadipyl), 메톡시수베릴 (methoxysuberyl) 및 2,4,-디니트로페닐 (2,4,- dinitrophenyl)과 같은 아미노 말단 블로킹 그룹이 유용하다.
- [0072] 펩티드의, 대전된 아미노 말단 및 카르복시 말단을 블로킹하는 것은 소수성 세포막을 통하여 세포 내로 펩티드를 통과시키는 것을 도와주는 부가적인 이점이 있을 것이다.
- [0073] 재조합 기술이 RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 제조하

는데 적용되면, 본 발명에 따라 상기 펩티드를 코딩하는 핵산 서열이 바람직하게 사용된다. 재조합 기술을 실행하는 방법에 관해서는, 예를 들어 Maniatis *et al.* 1982, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 및 상업적으로 이용가능한 방법을 참조할 것.

- [0074] 그러므로, 또한 본 발명은 상기 기재된 바와 같이 RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 (consisting essentially of) 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 코딩하는 분리 정제된 핵산 서열에 관한 것이다.
- [0075] "분리 정제된 핵산 혹은 핵산 서열"은 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산 서열 또는 RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산이 본 발명에 합당한 상태를 말한다.
- [0076] 본 발명의 범주 내에 있는 분리 정제된 핵산 혹은 핵산 서열은 DNA, RNA, 또는 DNA/RNA 혼성체 (hybrid)일 수 있다.
- [0077] 본 명세서에서 사용된 DNA는, 이중 사슬 DNA, 단일사슬 DNA, 하나 혹은 두 사슬이 두 개 이상의 단편으로 구성되는 이중사슬 DNA, 하나 혹은 두 사슬이 방해되지 않은 (uninterrupted) 포스포디에스테르 골격을 가지는 이중 사슬 DNA, 하나 이상의 단일 사슬 부분 및 하나 이상의 이중 사슬 부분을 포함하는 DNA, DNA 사슬이 완전히 상보적인 이중 사슬 DNA, DNA 사슬이 부분적으로만 상보적인 이중 사슬 DNA, 환형 DNA, 공유결합되어 닫힌 DNA (covalently-closed DNA), 선형 DNA, 상호 공유결합으로 연결된 DNA (covalently cross-linked DNA), cDNA, 화학적으로 합성된 DNA, 반합성된 DNA (semi-synthetic DNA), 생합성된 DNA, 자연적으로 분리된 DNA, 효소 처리된 DNA, 잘라낸 DNA (sheared DNA), 방사능 표지된 DNA 및 형광 크롬 (fluorochrome) 표지된 DNA와 같이 표지된 DNA, 하나 이상의 비자연적으로 생성된 핵산 종을 포함하는 DNA를 포함하여 어떠한 폴리디옥시뉴클레오티드도 사용될 수 있다.
- [0078] RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 코딩하는 DNA 서열은 일반적인 화학 기법-예를 들어, 포스포트리에스테르 방법- 또는 자동합성방법 및 PCR 방법을 통하여 합성될 수 있다.
- [0079] RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체는 본 발명에 따라 효소 기법에 의해서도 생산될 수 있다. 그러므로, 미리 정의된 인식 서열에서 핵산분자를 절단하는 제한 효소는, RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 코딩하는 DNA (또는 RNA)와 같은 핵산 서열을 포함하는 더 큰 핵산 분자로부터 핵산 서열을 분리하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0080]
- [0081] 본 발명은 또한, 단일사슬 RNA, cRNA, 이중 사슬 RNA, 하나 혹은 두 사슬이 두 개 이상의 단편으로 구성되는 이중 사슬 RNA, 하나 혹은 두 사슬이 방해되지 않은 (uninterrupted) 포스포디에스테르 골격을 가지는 이중 사슬 RNA, 하나 이상의 단일 사슬 부분 및 하나 이상의 이중 사슬 부분을 포함하는 RNA, RNA 사슬이 완전히 상보적인 이중 사슬 RNA, RNA 사슬이 부분적으로만 상보적인 이중 사슬 RNA, 상호 공유결합으로 연결된 RNA (covalently cross-linked RNA), 효소 처리 (enzyme-digested)된 RNA, 잘라낸 RNA (sheared RNA), mRNA, 화학적으로 합성된 RNA, 반합성된 RNA (semi-synthetic RNA), 생합성된 RNA, 자연적으로 분리된 RNA, 방사능 표지된 RNA 및 형광 크롬 (fluorochrome) 표지된 RNA와 같이 표지된 RNA, 하나 이상의 비자연적으로 생성된 핵산 종을 포함하는 RNA를 포함하여 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 형태의 핵산을 또한, 포함한다.
- [0082] 바람직하게 사용되는 핵산은 **서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4**를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 분리 정제된 DNA 서열이다.
- [0083] 본 발명은 또한, 상기 언급된 서열의 변이체-즉, 하나 이상의 뉴클레오티드가 같은 특성을 가지는 다른 뉴클레오티드로 치환되는 보존적 뉴클레오티드 치환에 의하여 참조 서열 (reference sequence)과 달라지게 되는 핵산 서열-를 포함한다.
- [0084] 본 발명은 또한, 개시된 분리 정제된 핵산 서열의 대립유전자 변이체 (allelic variants)-즉, 동일한

(identical), 상동성 (homologous)의 펩티드를 또 코딩하는, 또는 분리 정제된 핵산 서열에 의해 코딩되는 것과 관련된, 분리 정제된 핵산의 자연적으로 일어나는 또 다른 형태-를 포함한다. 또는, 비자연적으로 일어나는 변이체를 돌연변이 기술 또는 직접 합성에 의하여 생산할 수 있다.

- [0085] RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 코딩하는 상기 언급된 분리 정제된 핵산 서열은 추가적으로 세포막 투과성 캐리어를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0086] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 언급된 RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편 또는 이의 변이체를 코딩하는 분리 정제된 핵산 서열의 적어도 1 카피를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 펩티드를 코딩하는 상기 분리 정제된 핵산 서열은 DNA이다.
- [0087] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "벡터", "플라스미드" 및 "발현벡터"는 상호변환적으로 사용되며, 플라스미드는 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이다.
- [0088] 벡터는 본 발명에 합당하게 세포막 투과성 캐리어를 코딩하는 핵산 서열을 더 포함할 수 있다. 발현벡터의 선택은 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 원하는 기능적 특성-예를 들어, 펩티드 발현 및 형질전환 또는 트랜스펙션 되는 숙주세포-에 따라 직접적으로 달라진다.
- [0089] 덧붙여, 발현벡터는 상기 분리 정제된 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 더 포함할 수 있다. 이것은 본 발명의 분리된 펩티드를 코딩하는, 상기 연결된 분리되고 정제된 DNA 서열이, 발현-즉, 삽입된 분리 정제된 DNA 서열의 전사 및 번역-을 허락하는 적절한 조절 서열의 통제를 받고 있음을 의미한다.
- [0090] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터"는 당업계에 알려진 부가적인 조절 서열-예를 들어, 폴리펩티드의 발현을 위하여 보통 채용되는 프로모터 및/또는 인핸서, 폴리아데닐화 부위 및 스플라이스 접합 (splice junction) 등-을 나타내고 또한, 하나 이상의 분리된 타겟 서열을 부가적으로 포함할 수 있으며, 선별 마커 (selectable marker)를 선택적으로 코딩할 수 있다. 프로모터가 숙주 세포와 화합 (compatible)할 수 있다면 사용될 수 있는 프로모터로는 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스 (아데노바이러스 2 등), 파필로마 바이러스 (소 파필로마 바이러스 등), 조류육아종 바이러스 (avian sarcoma virus), 사이토메갈로 바이러스 (생쥐 또는 인간 사이토메갈로바이러스의 즉발 초기 프로모터 등), 레트로 바이러스, B형 간염 바이러스 및 SV40 바이러스 (SV40 초기 및 후기 프로모터 등) 등의 바이러스 계통으로부터 얻어지는 프로모터 또는 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터와 같이 이종 유래 (heterologous) 포유류 프로모터로부터 얻어지는 프로모터 또는 열충격 프로모터 등이 있다.
- [0091] 사용될 수 있는 인핸서에는 포유류 유전자 (글로빈, 엘라스타아제, 알부민, α-페토프로테인 및 인슐린)로부터 알려진 인핸서 서열 또는 SV40 인핸서, 사이토메갈로 바이러스의 초기 프로모터의 인핸서, 폴리오마 및 아데노 바이러스의 인핸서 등 진핵 세포 바이러스로부터 유래하는 인핸서 등이 있다.
- [0092] 매우 다양한 숙주/발현벡터 조합이 본 발명의 DNA 서열 발현에 채택될 수 있다. 유용한 발현벡터는 예를 들어, 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열의 부분으로 구성될 수 있다. 적절한 벡터는 SV40 유도체 및 대장균 플라스미드 col E1, pCR1, pBR322, pcDNA3, pMB9 및 이들의 유도체 등의 알려진 박테리아 플라스미드, RP4와 같은 플라스미드, NM989 등의 수많은 파지 X의 유도체와 같은 파지 DNA, M13 및 실 모양 (filamentous)의 단일 사슬 파지 DNA 등의 다른 파지 DNA, 2μ 플라스미드 또는 이의 유도체와 같은 이스트 플라스미드, 곤충 또는 포유류 세포에 유용한 벡터와 같이 진핵 세포에 유용한 벡터, 파지 DNA 또는 다른 발현 조절 서열을 채택하기 위해 변형되는 플라스미드와 같이 플라스미드 및 파지 DNA의 조합으로부터 유도되는 벡터 등을 포함한다.
- [0093] 가장 바람직하게는 상기 발현벡터는 pcDNA3 이다.
- [0094] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 펩티드, 본 발명의 분리 정제된 핵산 서열 또는 및/또는 본 명세서에 기재된 발현벡터를 포함하는 진핵 또는 원핵의 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [0095] 본 발명에 따른 분리 정제된 DNA 서열을 포함하는 발현벡터로, 적절한 진핵 또는 원핵 숙주세포를 형질전환 혹은 트랜스펙션 하는 것은, 사용되는 벡터 타입에 따라 전형적으로 달라지는 공지의 방법에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 방법에 대해서는 예를 들어, Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Laboratory 및 상업적으로 이용가능한 방법 등을 찾아볼 것.

- [0096] 용어 "트랜스펙션된 세포" 또는 "형질전환된 세포" 또는 "트랜스펙션된/형질전환된 세포"는 세포 외부 DNA가 세포 내로 도입되어 세포 외부 DNA를 가지고 있는 세포를 가리킨다. DNA는 세포로 도입되어 핵산이 염색체에 삽입되거나 혹은 염색체 외 요소 (extrachromosomal element)로 복제될 수 있다.
- [0097] 세포 내에서 상기 펩티드의 축적을 증가시키는 물질에 선택적으로 컨쥬게이션 된 RasGAP 단백질의 N2 서열로 본질적으로 구성되는 펩티드, 이의 단편, 혹은 이의 변이체는 본 명세서에 기재된 바와 같이, 재조합적으로 세포 발현계에서 바람직하게 생산될 수 있다.
- [0098] 매우 다양한 단세포 숙주세포가 본 발명의 DNA 서열 발현에 유용하다. 이러한 숙주는 잘 알려진 진핵 및 원핵 숙주를 포함하며, 이에는 대장균 스트레인, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 이스트와 같은 곰팡이 및 CHO, YB/20, NS0, SP2/0, R1. 1, B-W 및 L-M 세포, 아프리카 그린 원숭이 신장 세포 (예, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, 및 BMT10)와 같은 동물세포, 곤충세포 (Sf9 등) 및 조직 배양 중의 인간 세포 및 식물세포가 있다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 박테리아 세포, 보다 바람직하게는 대장균 세포이다.
- [0099] 본 발명은 또한, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 항원보강제 (adjuvant)와 선택적으로 조합하여, 적어도 하나의 상기 기재된 펩티드의 약학적 유효량을 활성성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0100] "약학적 유효량"은 인간 또는 동물 유기체에 투여되었을 때 탐지될 수 있는 약리학적 및/또는 생리적인 효과를 유도하는 화학 물질 또는 화합물을 가리킨다.
- [0101] 각각의 약학적 유효량은 치료받는 특정 환자, 치료 대상 질환, 투여방법에 따라 달라질 수 있다. 나아가, 상기 약학적 유효량은 사용된 특정 펩티드, 특히 상기 펩티드가 부가적으로 상기 기재된 약물을 포함하고 있는지 여부에 따라 달라진다. 치료는 일반적으로 상기 약학적 조성물을 보통 몇 시간, 며칠 혹은 몇 주 간격을 두어 여러 번 투여하는 것을 포함한다. 상기 폴리펩티드의 약학적 유효량의 용량 단위는 치료받는 환자의 체중 kg 당 0.001 ng에서 100 µg 범위 내에 대개 있다.
- [0102] 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은, 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 펩티드에 부가하여, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 항원보강제를 포함할 수 있다.
- [0103] 활성 화합물을 약학적으로 사용될 수 있는 제제 (preparation)로 프로세싱하는 것을 촉진하는, 허용되는 담체, 희석제 및 항원보강제는 채택되는 용량과 농도에서 수용자 (recipient)에게 독성이 없으며, 완충용액으로 인산, 시트르산 및 다른 유기산 등을; 항산화제로 아스코르브산 및 메티오닌 등을; 보존제 (옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드 (octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride); 헥사메토늄 클로라이드 (hexamethonium chloride); benzalkonium chloride, 벤젠토늄 클로라이드 (benzethonium chloride); 페놀 (phenol), 부틸 오르벤질 알콜 (butyl orbenzyl alcohol); 메틸 또는 프로필 파라벤 (methyl or propyl paraben)과 같은 알킬 파라벤 (alkyl parabens); 카테콜 (catechol); 레소시놀 (resorcinol); 시클로헥산올 (cyclohexanol); 3-펜탄올 (3-pentanol); 및 m-크레졸 (m-cresol) 등); 저분자량 (10 잔기 이하) 폴리펩티드; 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 당류; 이당류 및 포도당, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염 형성 카운터 이온; Zn-단백질 착물 (Zn-protein complexes)과 같은 금속 착물; 및/또는 TWEEN®, PLURONICS® 또는 폴리에틸렌글리콜 (PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0104] 상기 약학적 조성물의 투여 형태는 전신 (systemic) 혹은 국소적 (topical)일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물의 투여는 피하 (subcutaneous), 정맥 내 (intravenous), 진피 내 (intradermal), 근육 내 (intramuscular), 복막 내 (intraperitoneal), 비 내 (intranasal), 경피 (transdermal), 협측 (buccal) 경로 등의 다양한 비경구 투여 경로 또는 이식된 장치 (implanted device)에 의하여 가능할 수 있고, 연동 수단에 의해 또한 전달될 수 있다.
- [0105] 본 명세서에 기재된 바의 펩티드를 활성 성분으로 포함하는 약학적 조성물은 생흡수될 수 있는 기질

(bioabsorbable matrix)-상기 기질은 기질의 현탁액, 젤 또는 고체 지지체 형태이다-에 섞일 수 있거나 이에 주입될 수 있다. 부가적으로, 상기 기질은 생체고분자로 구성될 수 있다.

- [0106] 지효성 제제 (sustained-release preparations)가 제조될 수 있다. 지효성 제제의 적합한 예는 항체를 포함하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 기질 (semi permeable matrices of solid hydrophobic polymers)을 포함하며, 상기 기질은 필름 또는 마이크로캡슐 등의 모양으로 형성된 형태를 가진다. 지효성 기질의 예로서 폴리에스테르, 하이드로겔 (poly(2-hydroxyethyl-methacrylate 등), 또는 폴리비닐알콜, 폴리락타이드 (polylactides) (U.S. Pat. No. 3,773,919), L-글루탐산 및 [감마]에틸-L-글루탐산의 공중합체 (co-polymer), 비분해성 에틸렌비닐아세트산, LUPRON DEPOT(TM)과 같은 분해성 젯산-글리콜산 공중합체 (젯산-글리콜산 공중합체와 류프롤리드 (leuprolide) 아세트산으로 구성된 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티릭산을 포함한다.
- [0107] 인비보로 투여되는 제형은 멸균되어야 한다. 이는 살균 여과막을 이용한 여과 등에 의하여 쉽게 가능하다.
- [0108] 본 발명의 펩티드의 적정 투여 용량 (dosage)은 나이, 성별, 건강상태 및 수용자의 몸무게, 동시 치료의 유형-이것이 존재하고 상기 효과가 기대된다면-에 따라 달라질 것이다.
- [0109] 상기 적정한 투여량(용량)의 형태는 질환, 펩티드, 및 투여 양상; 알약, 캡슐, 정제 (lozenge), 치과용 연고 (dental pastes), 좌약 (suppositories), 흡입제(inhalants), 용액, 연고 및 비경구적 데포 (parenteral depot)를 포함할 가능성에 따라 달라질 것이다.
- [0110] 펩티드의 아미노산 변형이 본 발명에 또한, 포함되기 때문에, 이는 불용성 기질 (water-insoluble matrix) 또는 다른 매크로분자 캐리어에 본 발명의 펩티드를 교차결합 시키거나 용해도, 흡착도 및 너혈관 장벽을 가로지르는 투과성을 향상시키는데 유용할 수 있다. 이러한 변형은 당해 기술분야에 널리 알려진 것이고, 상기 펩티드와 그 유사물의 바람직하지 않은, 발생가능한 부작용을 제거하거나 또는(alternatively) 감퇴시킬 수 있다.
- [0111] 본 발명의 바람직한 약학적 조성물은 활성 성분 (active agent)으로서 펩티드를 포함하지만, 또 다른 약학적 조성물은 활성 성분으로서, 상기 기재된 펩티드를 코딩하는 분리 정제된 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이 약학적 조성물은 분리 정제된 DNA 서열 단독, 상기 분리 정제된 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터 또는 상기 기재된 발현 벡터로 이미 트랜스펙션되거나 형질전환된 숙주 세포를 포함할 수 있다.
- [0112] 마지막 예에서, 숙주 세포는 여하한 항원성 문제를 피하기 위하여 치료 대상 환자로부터 분리되는 것이 바람직할 것이다. 이러한 유전자 및 세포 요법적 접근은, 상기 분리 정제된 DNA 서열, 발현 벡터 또는 발현 벡터로 이미 트랜스펙션되거나 형질전환된 숙주 세포가 환자의 세포에 통합되어 단백질을 내부적으로 생산할 수 있기 때문에, 상기 약학적 조성물의 반복적인 투여를 요하는 환자들을 위하여 특히 더 적합하다.
- [0113] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 약학적 조성물은 암 치료 또는 예방을 위하여 사용된다.
- [0114] 본 발명은 또한 암 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조를 위하여 본 발명의 약학적 조성물을 사용하는 것을 포함한다.
- [0115] 용어 "암"이란, 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징 지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다.
- [0116] 치료 및 예방 대상이 되는 암은 암종 (carcinoma), 림프종 (lymphoma), 모세포종 (blastoma), 육종 (sarcoma), 지방육종 (liposarcoma), 신경내분비종 (neuroendocrine tumor), 중피종 (mesothelioma), 신경초종 (schwanoma), 수막종 (meningioma), 샘암종 (adenocarcinoma), 흑색종 (melanoma), 백혈병 (leukemia), 악성 림프종 (lymphoid malignancy), 편평세포암종 (squamous cell cancer), 편평상피세포암 (epithelial squamous cell cancer), 폐암 (lung cancer), 소세포폐암 (small-cell lung cancer), 비소세포폐암 (non-small cell lung cancer), 폐샘암종 (adenocarcinoma of the lung), 편평암종 (squamous carcinoma of the lung), 복막종 (cancer of the peritoneum), 간세포성종 (hepatocellular cancer), 위암종 (gastric or stomach cancer),

위장관종 (gastrointestinal cancer), 췌장암 (pancreatic cancer), 아교모세포종 (glioblastoma), 자궁경부암 (cervical cancer), 난소암 (ovarian cancer), 간암 (liver cancer), 방광암 (bladder cancer), 간암 (hepatoma), 유방암 (breast cancer), 결장암 (colon cancer), 직장암 (rectal cancer), 결장직장암 (colorectal cancer), 자궁내막 또는 자궁암 (endometrial or uterine carcinoma), 침샘암 (salivary gland carcinoma), 신장암 (kidney and renal cancer), 전립선암 (prostate cancer), 외음암 (vulval cancer), 갑상선암 (thyroid cancer), 간암종 (hepatic carcinoma), 항문암종 (anal carcinoma), 음경암종 (penile carcinoma), 고환암 (testicular cancer), 식도정맥류암 (esophageal cancer), 담도암 (biliary tract) 및 두경부암 (head and neck cancer)으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 암은 중피종 (mesothelioma), 고환암 (testicular cancer) 또는 췌장암 (pancreatic cancer)이다.

- [0117] 본 발명의 펩티드는 일반적으로 의도한 목적을 달성하기 위한 양으로 사용될 것이다. 암 치료 또는 예방에 사용하기 위하여, 펩티드 또는 이의 약학적 조성물은 치료학적 유효량 (therapeutically effective amount)이 투여 또는 적용된다. "치료학적 유효량"은 증상을 개선 또는 예방하거나, 치료 대상자의 생존을 연장시키는데 유효한 양이다. 치료학적 유효량의 결정은 특히 본 명세서에 제시되어 개시한 바의 견지에서 당업계의 통상의 지식을 가진자의 능력 범위 안에 있다.
- [0118] 전신 투여를 위하여 치료학적 유효량 또는 투여 용량 (dose)은 인비트로 분석으로부터 초기에 평가될 수 있다. 예를 들면, 투여 용량은 세포 배양에서 결정되는 것과 같이 IC50을 포함하는 순환 농도 (circulating concentration) 범위에 이르게 하기 위해서 동물 모델에서 공식화할 수 있다. 이러한 정보는 사람에게 대한 유효한 투여 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0119] 또한, 초기 투여 용량은 예를 들면 당해 기술분야에서 널리 알려진 기술을 사용하여 동물 실험 등의 인비보 데이터로부터 평가될 수 있다. 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 동물 데이터에 기초하여 사람에게 대한 투여를 용이하게 최적화할 수 있으며, 이것은 물론 치료받는 대상, 상기 대상의 체중, 질환의 중증도, 투여 양상 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.
- [0120] 본 발명은 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같이 상기 약학적 조성물의 치료학적 유효량을 대상자 (subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상자에서 그 필요에 따라 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0121] 치료되거나 예방될 수 있는 암의 예는 앞에 기재되어 있다. 바람직하게는, 상기 암은 중피종 (mesothelioma), 고환암 (testicular cancer) 또는 췌장암 (pancreatic cancer)이다.
- [0122] 바람직한 방법에서, 상기 대상자는 인간 환자이며, 암세포를 사멸시키는, 적어도 하나의 약물의 능력을 선택적으로 증강시키는, 투여되는 펩티드는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드이다.
- [0123] 본 발명의 범위에는 또한, 본 발명의 적어도 하나의 펩티드 및 약물을 암세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암세포에서 선택적으로 아포토시스를 증강시키는 방법이 포함된다.
- [0124] 또한, 본 발명의 적어도 하나의 펩티드 및 약물을, 암세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암세포를 선택적으로 사멸시키는 방법이 포함된다.
- [0125] 선택적으로 암세포를 사멸시키는 약물의 능력을 증강시키기 위하여 본 명세서에 개시된 펩티드의 용도가 또한 포함된다.
- [0126] 본 발명의 또 다른 목적은 대상자의 암을 치료 또는 예방하기 위한 키트를 제공하는 것으로서, 상기 키트는 본 명세서에 개시된 적어도 하나의 펩티드와, 선택적으로 시약 및/또는 사용지침을 포함한다.
- [0127] 일반적으로, 상기 키트는 용기 및 라벨 또는 용기 (container)와 관련된 포장 삽입물 (package insert on or associated with the container)을 포함한다. 적절한 용기로는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 상기 용기는 유리나 플라스틱과 같은 다양한 소재로부터 만들어질 수 있다. 상기 용기는 암을 치료

하는데 유효한 조성물을 담고 살균된 접근 포트 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 가지는 바이알 혹은 정맥내 용액 봉지일 수 있다)를 가질 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물 (package insert)은 상기 조성물이 선택되는 암을 치료하는데 사용되는 것임을 가리킨다.

[0128] 선택적으로, 상기 키트는 상기 기재된 약물로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 부가적인 항암제, 항-상피세포 성장인자 수용체 항체 (anti-epidermal growth factor receptors antibodies), 방사능면역요법제 및 이들의 조합을 포함하는 별개의 약학적 용량 형태를 더 포함할 수 있다.

실시예

[0142] **실시예 1:**

[0143] 세포 및 트랜스펙션

[0144] HeLa 및 MCF-7 세포를 37°C 및 5% CO₂ 에서 10%의 갓 태어난 송아지 혈청(Sigma; cat. n° N4637)을 함유하는 RPMI 1640 (Sigma; cat. n° 8758)에서 유지하였다. U2OS 세포는 37°C 및 5% CO₂ 에서 15%의 소태아혈청 (Sigma; cat. n° F7524)을 함유하는 DMEM (Sigma; cat. n° 5796)에서 유지하였다. H-Meso-1 세포는 37°C 및 5% CO₂ 에서 10%의 소태아혈청을 함유하는 RPMI 1640에서 유지하였다.

[0145] HUV-EC-C 세포는 37°C 및 5% CO₂ 에서, 10%의 소태아 혈청, 20 ng/ml의 기초적 섬유모세포 성장인자(Gibco; cat. n° 13256-029), 10 ng/ml의 상피세포성장인자(Gibco; cat. n° 13247-051), 10 µg/ml의 피브로넥틴 (Gibco; cat. n° 33016-015)으로 보강된 인간 내피 SFM 배지 (Gibco; cat. n° 11111-044)에서 유지하였다.

[0146] HaCat 세포는 37°C 및 5% CO₂ 에서, 상피세포성장인자 1-53 및 소 뇌하수체 선의 추출물(Gibco; cat. n° 17005-075)을 함유하는, 각질형성세포 (keratinocyte) SFM 배지에서 유지하였다. HeLa 세포는 이미 기술한 바와 같이 트랜스펙션 하였다 (Yang J.-Y. and Widmann C., Mol. Cell. Biol. , 21, 5346, 2001).

[0147] 제노톡신 처리는 6 웰-플레이트에서 수행되었다. 세포를 2.5x10⁵ 세포/웰 의 농도에서 처리 전일에 분리 (split)되었다. U2OS 세포는 칼슘/포스페이트 침전법 (Jordan M. et al., "Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation" Nucleic Acids Res., 24, 596, 1996) 을 이용하여 6 웰 플레이트에서 트랜스펙션 되었다.

[0148] 간단하게, 플라스미드를 90 µl H₂O의 물에 희석하고, 10 µl CaCl₂ 2.5 M과 혼합하여 실온에서 10 분 두었다. 그 후, 100 µl 의 HEP 용액 (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 12 mM D-glucose, 50 mM HEPES)을 상기 DNA 용액과 신속히 혼합하고 실온에서 정확히 1 분간 둔 후, 최종적으로 세포배양 배지에 첨가하였다. 37°C 및 5% CO₂ 에서 8 시간 경과 후, 상기 배지를 신선한 배양 배지로 교체하고 세포를 16-24 시간 더 배양하여 분석하였다.

[0149] 케미칼

[0150] 시스플라틴 및 미톡산트론은 Sigma사 (cat. n° P4394 및 n° M6545, respectively)로부터 구입하였다. 시스플라틴을 DMSO에서 최종 농도 100 mM가 되도록 희석하고 -20°C에 보관하였다. 미톡산트론을 100% 에탄올에서 최종 농도가 10 mM 이 되도록 희석하고 -80°C에 보관하였다. 아드리아마이신은 Calbiochem 사 (cat. n° 324380)에서 구입하였다. 이것은 물에서 최종 농도가 10 mM이 되도록 희석하고 -20°C에 보관하였다. Hoechst 33342는 Roche 사 (cat. n° H-1399)에서 구입하였다. 이것은 물에서 최종 농도가 10 mg/ml이 되도록 희석하고 어두운 장소에서 4°C에 보관하였다.

[0151] 퀵티드 합성 및 표지

- [0152] HIV-TAT₄₈₋₅₇ (GRKKRRQRRR) 및 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ (GRKKRRQRRRGGMWVTNLRTD) 펩티드는 Fmoc 기술을 이용하여 Institute of Biochemistry, University of Lausanne, Switzerland에서 합성되었고, HPLC로 정제하였으며 질량 분광기로 테스트 하였다.
- [0153] 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-표지 (fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeling)는, 부사슬 (side chain) Fmoc-보호된 아미노산이 Arg (bpf), Lys (Boc), Gln (Trt), Trp (Boc), Thr (tBu), Asn (Trt) 및 Asp (OtBu)인, β-알라닌-GRKKRRQRRRGGMWVTNLRTD 서열에서 수행되었다. 펩티드는 Fmoc 화학을 이용하여 0.2 mmol Rink Amide AM 수지상에서 단계적으로 합성되었다. 다크드린 테스트로 상기 합성을 모니터링 하였다. β-알라닌과 커플링 후에 Fmoc 그룹은 20%의 피페리딘을 함유하는 DMF (dimethylformamide)로 제거하였다. 이 단계에서, 플루오레세인 그룹이 FITC (4 ml DMF 및 1 ml N-에틸디이소프로필아민에서 상기 수지의 치환보다 5배 과량)와 함께 펩티드의 N 말단에 연결되어, 플루오레세인-유도 펩티드(fluorescein-derived peptide)를 형성하였다. 펩티드를 이온이 제거된 물에 최종 농도 1 mM로 녹이고 다음 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.
- [0154] *플라스미드*
- [0155] 플라스미드의 명칭에서 dn3 확장은 상기 플라스미드 골격이 발현벡터 pcDNA3 (Invitrogen)임을 나타낸다. 모든 컨스트럭트가 N 아미노 말단에서 HA 서열 (MGYPYDVPDYAS)과 태깅되었다. 플라스미드 N2.dn3는 인간 RasGAP 단편 N2를, 플라스미드 SH2-SH3.dn3는 인간 RasGAP 아미노산 158-361을, 플라스미드 SH2.dn3는 인간 RasGAP 아미노산 158-277을, 플라스미드 SH3.dn3는 인간 RasGAP 아미노산 279-361을 코딩한다. 플라스미드 IκBα ΔN2는 IκBα의 활성화를 블로킹하는 한 IκBα의 형태를 코딩한다 (Yang 및 Widmann, 2002b). GFP 단백질을 코딩하는 플라스미드 pEGFP-C1는 Clontech사로부터 구입하였다. *Renilla reniformis*의 루시페라아제를 코딩하는 벡터 pRL-TK는 Promega사로부터 구입하였다. prLUC는 NFκB-응답성 엘리먼트의 통제하에 있는, 개똥벌레 루시페라아제 cDNA를 가지는 리포터 플라스미드이다 (Yang J.-Y. and Widmann C., Mol. Cell. Biol. , 21, 5346, 2001).
- [0156] *아포토시스 측정*
- [0157] 아포토시스는 농축핵 (pycnotic nuclei)을 보이는 세포수를 기록함에 의해 측정하였다. 살아있는 세포의 핵을 Hoechst 33342 (최종 농도 10 μg/ml)로 약 5 분간 표지하고, 형광 및 전달 광 렌즈 (transmitted light optics)가 장착된, inverted Leica DMIRB 현미경을 이용하여 세포를 분석하였다 (조건 당 최소한 400 세포 이상). 세포를 트랜스펙션 또는 처리한 날 익일에 아포토시스를 평가하였다. 트랜스펙션된 세포가 관여하는 실험에서는 트랜스펙션된 세포를 GFP로 표지하기 위하여 트랜스펙션 용액에 pEGFP-C1가 포함된다. 이 경우, 아포토시스 정도를 트랜스펙션된 세포에서만 평가하였다.
- [0158] *루시페라아제 리포터 분석*
- [0159] 루시페라아제 분석은 Promega사의 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay (cat. n° E1910)을 이용하여 수행하였다. 세포를 100 μl의 PLB 용해 완충용액 (Promega사의 키트로부터 제공됨)을 이용하여 6 웰-플레이트로부터 용해 (lysis)하고, 얼음에 30 분간 두었다. 용해물 (lysate)을 16,000 g, 15 분간 원심분리하여 깨끗이 하였다. 개똥벌레 루시페라아제 활성을 20 μl의 용해물과 25 μl의 LARII Reagent를 혼합함으로써 기록하였고, 레닐라 루시페라아제 활성은 상기 이전 혼합액에 25 μl의 Stop & Glo Reagent를 첨가함으로써 기록하였다. 각 측정을 위하여, Lumat LB 9501 luminometer (Berthold Technologies, Zurich, Switzerland)를 이용하여 발광 (light emission)을 12초 동안 정량하였다.
- [0160] *웨스턴 블롯 분석*
- [0161] 세포를 용해 완충용액 (25 mM Hepes, 300 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM Na₃VO₄, 1% Triton X100, Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche; cat. n° 1873580))에서 용해하였다. 단백질을 SDS-PAGE 상에서 분리하고 니트로셀룰로오스 막 (BioRad; cat. n° 162-0115) 위에서 블롯팅 하였다.

그 후, 막을 TBS (18 mM HCl, 130 mM NaCl, 20 mM Tris), 5% 탈지 건조유로 30 분 동안 실온에서 블로킹하고, 적절한 1차 항체와 밤새 배양하였다. 이 항체를 Alexa Fluor 680이 컨쥬게이션 된, TBS, 5% 탈지건조유에서 1:2500으로 희석된 2차 항체 (Molecular Probes; cat. n° A21109)로 탐지하고 오딧세이 적외선 이미지 시스템 (Licor, Homburg, Germany)으로 이어, 가시화 하였다. phospho-p38에 대한 1차 항체 (Cell Signaling Technology; cat n° 9211L)는 5% BSA를 함유하는 TBS로 1:500으로 희석하였다. phospho-JNK에 대한 1차 항체 (Cell Signaling Technology; cat n° 9551L)는 5% BSA를 함유하는 TBS로 1:1000으로 희석하였다. 정량은 오딧세이 적외선 이미지 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0162] 통계분석

[0163] 모든 통계분석은 스튜던트 t- 테스트를 이용하여 Microsoft Excel (XP edition)로 수행되었다.

[0164] 실시예 2:

[0165] *RasGAP* 단편 N2는 다양한 제노톡신에 의해 유도되는 아포토시스 반응을 강화한다.

[0166] 본 출원인은 최근, 단편 N2가 HeLa 종양 세포주를 사멸시키는 시스플라틴의 능력을 증강시킨다는 것을 보여주었다 (Yang J.-Y. and Widmann C., Mol. Cell. Biol., 21, 5346, 2001). N2 단편이 다른 제노톡신에 의해 유도되는 아포토시스 반응을 강화할 수 있는지 평가하기 위하여, 단편 N2를 발현하거나 하지 않는 HeLa 세포에 아드리아마이신 및 미톡산트론 (시스플라틴은 대조구)을 농도를 높여가며 처리하였다. 도 1은 단편 N2의 존재가, 여러 약물에 대하여 HeLa 세포를 대조구 세포보다 최소한 10 배 이상 더 민감하게 만든다는 것을 보여준다. 이 결과는 단편 N2가 제노톡신 민감화제로 광범위하게 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0167] 암세포를 사멸시키는 약물의 능력을 증강시키는 단편 N 내 최소한의 서열 확인

[0168] 단편 N2는 36 kDa 단백질로서, 이것이 화학적으로 합성되는 것을 어렵게 만들 수 있다. 제노톡신-민감화 능력 (genotoxin-sensitizing ability)을 여전히 가지는, 더 짧은 서열을 특징화 하는 것은 단편 N2로부터 치료 수단을 개발하는 과정에서 중요한 단계이다. 상기 짧은 서열이 분리 (isolate)될 수 있는지 평가하기 위하여 본 발명자 등은 단편 N2의 일련의 결실 형태 (truncated version)를 제작 하여 (도 2a) HeLa 세포에서 시스플라틴-유도 아포토시스를 강화시킬 수 있는 능력을 측정하였다(도 2b). 단편 N2는 두 개의 SH2 도메인 및 하나의 SH3 도메인을 포함하고 있다(도 2a). 본 발명자 등은 이들 도메인 중 어느 것이 단편 N2의 프로-아포토시스 활성을 가지는 가를 처음으로 결정하였다. HeLa 세포를 0.15 μ M 시스플라틴-상기 농도에서 단편 N2를 발현 또는 발현하지 않는 세포 사이의 약물에 대한 민감도의 차이가 가장 크다 (도 1 참조)-의 존재 또는 부존재하에서, 다양한 SH 도메인을 코딩하는 플라스미드로 트랜스펙션 하였다. 공 (empty) 컨스트럭트 또는 SH2 도메인을 코딩하는 컨스트럭트는 이들 컨스트럭트로 트랜스펙션된 HeLa 세포를 사멸시키는 시스플라틴의 능력을 증강시키지 못했다. 대조적으로, SH3 도메인을 가지는 컨스트럭트는 아포토시스를 통하여 세포를 사멸시키는 시스플라틴의 능력을 증강시켰다 (도 2b). SH2 도메인 독자적으로 HeLa 세포에서 세포사를 강화하지 못하는 것은 단백질 발현이 감소된 탓이 아니라는 것이 웨스턴 블롯 분석-SH2 도메인은 다른 컨스트럭트 만큼 효율적으로 발현되었다 (데이타는 제시되지 않음)-에서 밝혀졌다. 본 출원인은 다음으로, 최소한의 제노톡신-민감화 서열을 확인하고자 SH3 도메인의 점진적인 결실 형태를 제작하였다. 이러한 모든 컨스트럭트 (도 2a 참조)는, 10 아미노산 길이의 펩티드를 코딩하는 가장 짧은 것(317-326)을 포함하여, HeLa 세포를 사멸시키는 시스플라틴의 능력을 강화하였다 (도 2b). 이러한 결과는 단편 N2의 세포사 민감화 특성 (cell-death sensitizing property)이 완전한 SH 도메인을 필요로 하는 것이 아니라 매우 짧은 펩티드 서열에 의해 매개된다는 것을 암시한다.

[0169]

[0170] 317-326 *RasGAP* 서열과 컨쥬게이션 된 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드는 세포 투과성 제노톡신-민감화 펩티드 (genotoxin-sensitizing peptide)로 작용한다.

[0171] *RasGAP*의 317-326 아미노산을 코딩하는 플라스미드가 암세포를 사멸시키는 약물의 능력을 증강시킬 수 있다면, 316-326에 상응하는 합성 펩티드도 세포를 통과할 수 있다면 그러한 활성을 가질 것이다. HIV TAT 단백질 (HIV-TAT₄₈₋₅₇)로부터 유래된 짧은 서열의 부가는 폴리펩티드가 세포 내에 효율적으로 축적될 수 있도록 허용한다

는 것이 증명되었다 (Schwarze S.R. et al., "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse" Science, 285, 1569, 1999). 본 발명자 등은 그러므로, 아미노산 캐리어 펩티드 HIV-TAT₄₈₋₅₇에 공유적으로 결합된 RasGAP 아미노산 317-326 을 포함하는 펩티드를 합성하였다. 유동성을 부여하기 위하여, 두 개의 글리신 잔기가 스페이서로서 TAT 및 RasGAP 서열 사이에 삽입되었다. 이 펩티드 (이후, TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드라 칭함)의 세포 내 흡수를 평가하기 위한 수단으로서, 본 발명자 등은 그것을 FITC fluorophore로 표지하였다. 표지된 펩티드를 4 종의 다른 종양 세포주와 배양하였다: 자궁 경부 유래 인간 샘암종 (adenocarcinoma) (HeLa cells), 인간 골육종(U2OS cells), 유방암 세포주 (MCF-7 cells) 및 인간 악성 중피종 (H-Meso-1 cells) 및 2 종의 비-암 세포주 (HaCat 인간 피부 각질형성세포주 및 HUV-EC-C 인간 탯줄 내피세포). 도 3에 나타난 바와 같이, TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드는 상기 모든 세포주로 효율적으로 도입되었다. 암 세포와 비 암세포 간에 상기 펩티드의 전위 (translocation) 차이는 알 수 없었다. 본 발명자 등은 첫 번째로, 세 가지 제노톡신의 증가하는 농도에 대한 암세포주의 민감도를 평가하였다 (데이터는 제시되지 않음). 이로써, 테스트 된 각 세포주에 대한 치사량에 가까운 제노톡신의 농도를 결정할 수 있었다. 놀랍게도, 본 출원인은 RasGAP 서열이 없는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 대조구가 아니라, TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드가 테스트 된 암 세포주를 사멸시키는, 시스플라틴, 아드리아마이신 및 미톡산트론의 능력을 증강시킨다는 것과 대조 상태에서는 아포토시스를 유도하지 못하거나 약간 유도한다는 것을 보여주었다. 이와 대조적으로, 2 종의 비-암세포주에서 시스플라틴, 아드리아마이신 및 미톡산트론에 의해 유도되는 아포토시스 반응은 상기 펩티드의 존재에 의하여 영향받지 않았다 (도 4b). 본 발명자 등은 그러므로, 암세포에 특이적으로 들어가서 암세포를 사멸시키는 약물의 능력을 증강시킬 수 있는 최소한의 합성 펩티드를 확인하였다.

[0172]

NF κB 및 *SAPK* 경로는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆의 특성과 관련이 없다.

[0173]

[0174]

Ras 조절자로서, RasGAP은 세포사를 조절하는, Ras-PI3K-Akt-NF κB 경로(Datta S.R. et al., "Cellular survival: a play in three Akts" Genes Dev., 13, 2905, 1999)와 같은 몇몇 Ras-의존적 경로에 영향을 미칠 수 있다. 그러므로, 본 발명자 등은 NF κB 활성을 조절하는 것이 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆에 의해 매개되는 능력을 증강시키는데 역할을 담당하는지를 평가하였다. 도 5a에 나타난 바와 같이, NF κB 는 U2OS 세포에서 시스플라틴 혹은 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆을 처리한 후 활성화되었으나 대조구 펩티드인 HIV-TAT₄₈₋₅₇을 처리한 경우에는 활성화되지 않았다. 시스플라틴 및 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 양자 모두를 세포와 배양하면 부가적인 NF κB 활성이 일어났다(도 5a). NF κB 경로는 여러 타입의 세포에서 세포 생존반응의 유도에 관여하지만 (Van Antwerp D.J. et al., "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB" Science, 274, 787, 1996; Beg A.A. and Baltimore D., "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death" Science, 274, 782, 1996), 어떤 상황에서는 아포토시스 반응의 유도에도 요구될 수 있다 (Ryan K.M. et al., "Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death" Nature, 404, 892, 2000). TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆에 의한 NF κB 활성화가 증강 능력 작용에 필요하지를 판단하기 위해서, 분해되지 않는 IκB 형태 (IκB α ΔN2)가 세포에서 발견되었다. 기대한 바와 같이, 이 컨스트럭트는 시스플라틴 및 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆에 의한 NF κB의 활성화를 효과적으로 예방하였다 (도 5b). IκB α ΔN2는 시스플라틴에 의해 매개되는 아포토시스 반응을 약간 증가시켰다 (도 5c). 그러나, 아포토시스를 통하여 U2OS 세포를 사멸시키는 시스플라틴의 능력을 증강시키는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆의 능력은 NF κB의 억제자에 의해서는 영향받지 않았다 (도 5c). 이러한 결과는 NF κB 경로의 활성화가 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆에 의해 매개되는 세포사 증강 능력 효과에 관여하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0175]

스트레스-활성화 단백질 키나아제 (SAPKs)-JNKs 및 p38 MAPKs-는 다양한 자극에 의해 유도되는 아포토시스 반응에 연루되어 있다 (Jarpe M.B. et al., Oncogene, 17, 1475, 1998). 도 6은 대조구인 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드도, TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드도 이러한 MAPK 경로를 활성화하지 못한다는 것을 나타낸다. 또한, 이 펩티드들은 JNK 또는 p38 MAPKs를 자극하는 시스플라틴의 능력을 증강시킬 수 없었다(도 6). 이 결과는 스트레스-활성화 MAPK 경로 (stress-activated MAPK pathways)가, 암세포를 사멸시키는 제노톡신의 능력을 증강시키는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆의 능력에 연루되어 있지 않다는 것을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0129] **도 1**은 단편 N2 또는 공 (empty) pcDNA 플라스미드로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 여러 약물에 의한 아포토시스 유도 백분율을 나타낸다. HeLa 세포 (2×10^6)를 10 cm 직경의 페트리 디쉬에 플레이팅 하여, 1 μ g의 GFP 발현 플라스미드 (트랜스펙션된 세포를 표지하기 위함)와 2 μ g의 공 pcDNA3 플라스미드 또는 2 μ g의 N2 단편을 코딩하는 pcDNA3 벡터를 트랜스펙션 하였다. 트랜스펙션 1일 후, 상기 세포를 지시된 농도의 시스플라틴 (cisplatin), 아드리마이신 (adriamycin) 또는 미톡산트론 (mitoxantrone)을 처리하여 24 시간 배양하였다. 그리고나서, 농축핵 (pycnotic nucleus)을 나타내는 GFP-양성 세포의 수를 세었다. 그 결과는, 세 독립적인 측정의 평균 \pm 표준편차에 상응한다. 별표는 대조구 세포 및 시스플라틴으로 처리된 세포 사이에 상당한 차이가 있음을 나타낸다 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).
- [0130] **도 2a**는 본 연구에 사용된 여러 컨스트럭트의 대표적인 개략도이다. SH는 Src 상동성 (homology) 도메인을 나타낸다.
- [0131] **도 2b**는 도 2a에 기재된 컨스트럭트를 코딩하는 플라스미드로 트랜스펙션된 HeLa 세포 내에서 시스플라틴에 의한 아포토시스 유도 백분율을 나타낸다.
- [0132] HeLa 세포는 도 1에 기재된 바와 같이, 도 2a에 기재된 컨스트럭트를 코딩하는 플라스미드로 트랜스펙션되었다. 그 후 HeLa 세포를 0.15 μ M의 시스플라틴으로 처리 혹은 비처리하여 20 시간 후에 아포토시스 정도를 결정하였다. 그 결과는 세 독립적인 측정의 평균 \pm 표준편차에 상응한다. 별표는 0.15 μ M의 시스플라틴으로 처리된 세포와 비처리된 세포 사이에 상당한 차이가 있음을 나타낸다 (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).
- [0133]
- [0134] **도 3**은 FITC-표지된 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드와 배양된, 살아있는 세포의 위상 대조 (phase contrast) 및 에피-형광 이미지 (epifluorescence image)를 나타낸다. 다음의 세포주 (HeLa, U2OS, H-Meso1, MCF-7, HaCat 및 HUV-EC-C)를 20 μ M의 FITC-표지된 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드를 함유하는 배양 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3 시간 배양하고, 배양 배지로 3 회 세척하였다.
- [0135] **도 4a**는 TAT-RASGAP₃₁₇₋₃₂₆으로 처리 또는 비처리된 2종의 비-암세포 (non-cancer cells)에서 여러 약물에 의한 아포토시스 유도 백분율을 나타낸다. 2 종의 비-암세포주 (HaCat 및 HUV-EC-C)를 20 μ M의 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 존재 또는 부존재하에서 시스플라틴 (cisplatin), 아드리마이신 (adriamycin) 및 미톡산트론 (mitoxanthrone)의 농도를 높여가며 배양하였다. 아포토시스 정도는 20 시간 후에 기록되었다.
- [0136] **도 4b**는 TAT-RASGAP₃₁₇₋₃₂₆로 처리 또는 비처리된 4 개의 암 세포주에서 여러 약물에 의한 아포토시스 유도 백분율을 나타낸다. 4 개 암 세포주 (HeLa, U2OS, MCF-7, 및 H-Meso1)를 6 웰-플레이트 상에 플레이팅 하고 지시된 농도의 시스플라틴, 아드리마이신 및 미톡산트론을 20 μ M의 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 혹은 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드 존재 또는 비 존재 하에서 20 시간 동안 처리하였다. 농축핵 (pycnotic nucleus)을 보이는 세포수를 기록하였다. 이 결과는 세 독립적인 측정의 평균 \pm 표준편차에 상응한다. 별표는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆과 배양되는 제노톡신 (genotoxin) 처리된 세포 및 비처리된 세포 또는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드와 배양된 세포 사이에 상당한 차이가 있음을 나타낸다 (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).
- [0137] **도 5a**는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 또는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드 존재 하에서, 시스플라틴으로 처리된 U2OS 세포에서 NF κ B의 활성을 나타낸다. U2OS 세포 (1×10^5)를 6 웰-플레이트에 플레이팅하고 NF κ B의 활성을 위하여 1 μ g의 개똥벌레 루시페라아제 리포터 플라스미드와 0.1 μ g의 레닐라 (Renilla) 루시페라아제를 코딩하는 플라스미드로 트랜스펙션 하였다. 세포를 1일 후에 20 μ M의 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 또는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드 존재 또는 부존재 하에서 지시된 농도의 시스플라틴으로 20 시간 동안 처리하였다. 데이터는 개똥벌레 루시페라아제 활성을 나타내는데, 이것은 레닐라 루시페라아제 활성으로 표준화 되었고, 대조구인 비처리 세포에서 얻어진 기초적인 NF κ B의 활성의 배 증가 (fold increase)로 나타났다. 이 결과는 세 독립적인 측정의 평균 \pm 표준편차에 상응한다. 별표는 지시된 조건 사이에 상당한 차이가 있음을 나타낸다 (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).
- [0138] **도 5b**는 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드 및 I κ B α Δ N2 또는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드 및 I κ B α Δ N2 존재하에서 시스플라틴

처리된 U2OS 세포에서 NF κ B의 활성을 나타낸다. U2OS 세포는 NF κ B의 활성을 위한 1 μ g의 개똥벌레 루시페라아제 리포터 플라스미드, 0.1 μ g의 레닐라 루시페라아제를 코딩하는 플라스미드, 0.5 μ g의 GFP-발현 플라스미드 (트랜스펙션된 세포를 표지하기 위함), 1 μ g의 I κ B α Δ N2 -NF κ B 경로를 억제함-를 코딩하는 플라스미드 또는 1 μ g의 공 pcDNA3 벡터로 트랜스펙션 하였다. 세포를 1일 후, 20 μ M HIV-TAT₄₈₋₅₇ 또는 20 μ M TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆의 존재 하에서 시스플라틴의 농도를 높여가면서 20 시간 더 배양하였다. 그 후 세포를 용해하고 NF κ B의 활성을 도 5a에 기재된 바와 같이 평가하였는데, 그 결과는 대조구인 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 펩티드와 배양된 세포에서 탐지되는 NF κ B의 활성의 배 증가로 나타난 것을 제외하고 도 5a에 기재된 바와 같이 평가되었다.

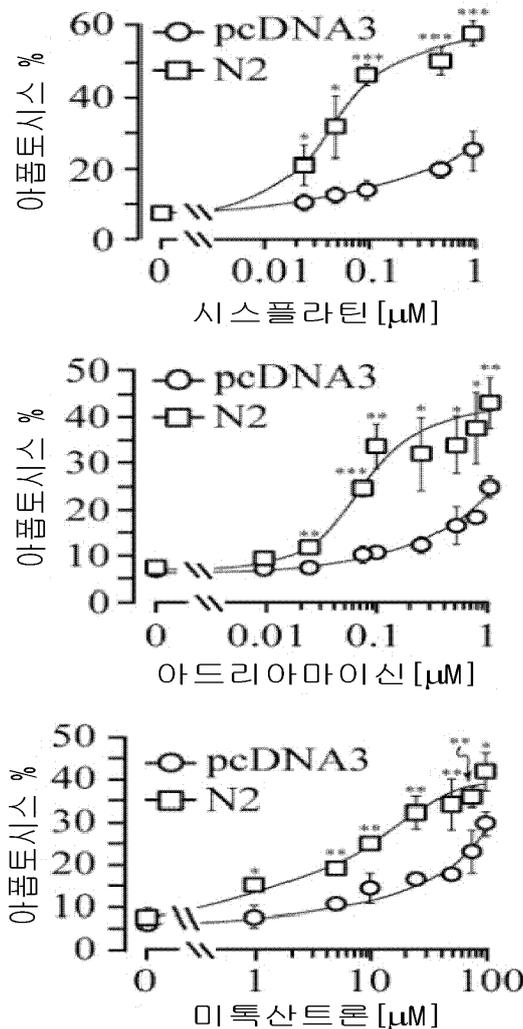
[0139] 도 5c는 도 5a 및 도 5b에서 트랜스펙션된 세포의 아포토시스 백분율을 나타낸다. 또는, 농축핵을 나타내는 GFP-양성 세포의 수가 측정되었다. 이 결과는 세 독립적인 측정의 평균 \pm 표준편차에 상응한다.

[0140] 도 6은 HIV-TAT₄₈₋₅₇ 또는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드로 트랜스펙션되고 시스플라틴으로 처리된 U2OS 세포에서 JNK 인산화 백분율과 웨스턴 블롯을 나타낸다.

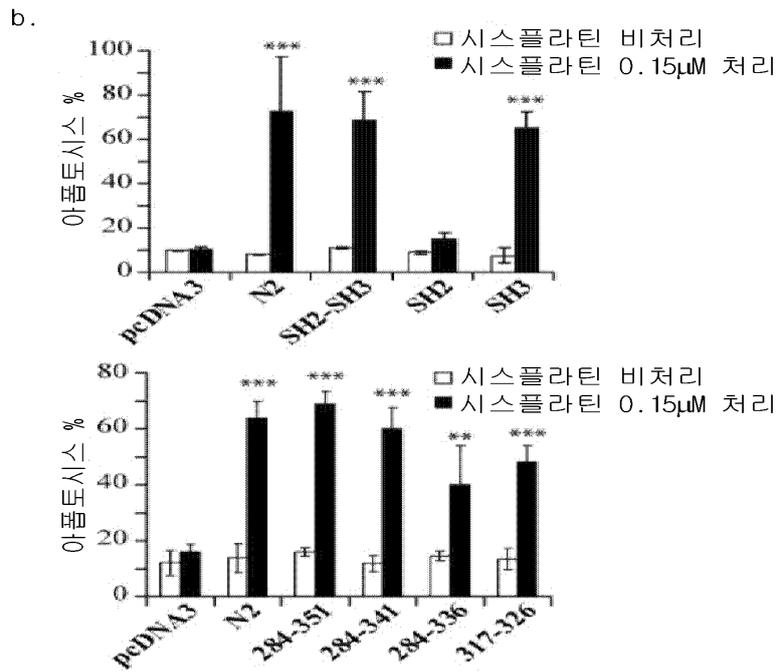
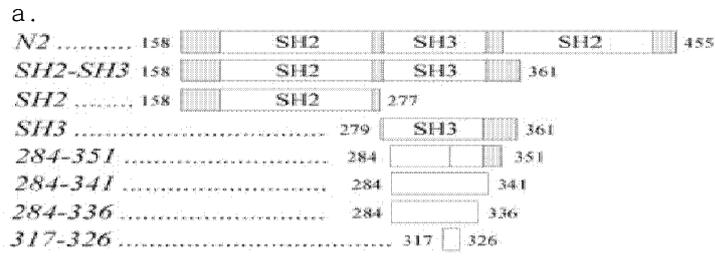
[0141] U2OS 세포 (2×10^5)를 6 웰-플레이트에 플레이팅하고, HIV-TAT₄₈₋₅₇ 또는 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ 펩티드 (20 μ M 농도) 및 시스플라틴 (30 μ M 농도)의 지시된 조합으로 지시된 기간 동안 처리하였다. JNK 및 p38 활성화를 위한 양성 대조구들은 상기 세포에 각각 1 μ g/ml의 애니소마이신 (anisomycin)을 3 시간 처리 및 0.5 M의 솔비톨을 30 분간 처리한 후 얻었다. 정량은, 웨스턴 블롯 하에서 12 시간 밴드 상에서 수행되었고, 양성 대조구에 대하여 표준화되었다. 이 결과는 독립적인 3회 실험의 평균 \pm 표준편차에 상응한다.

도면

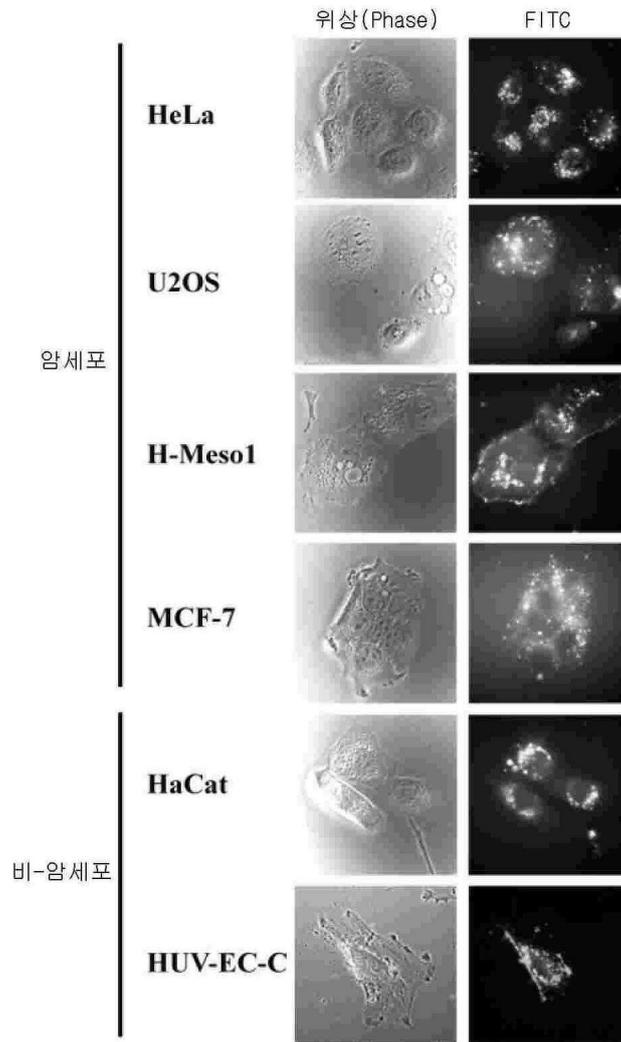
도면1



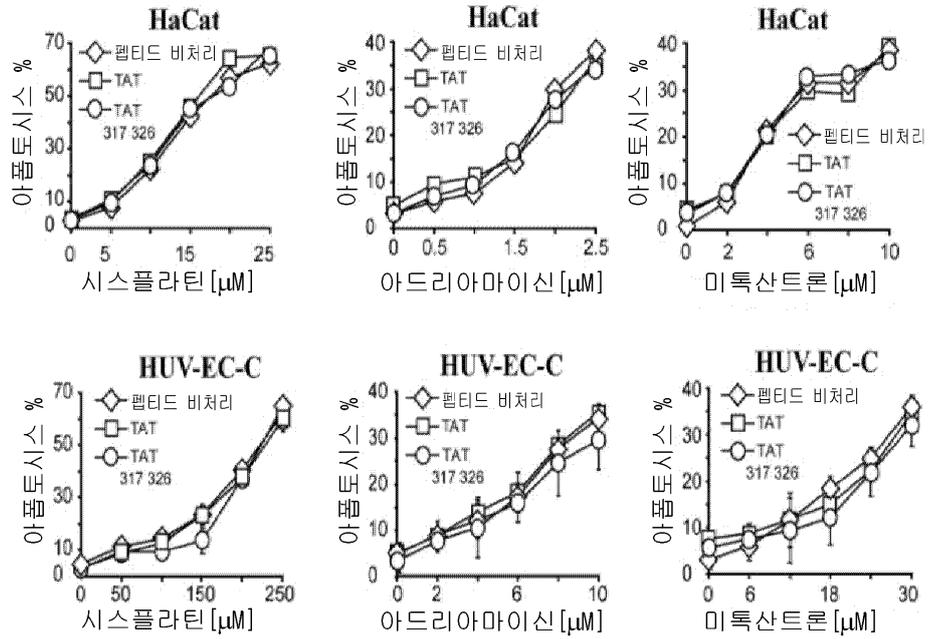
도면2



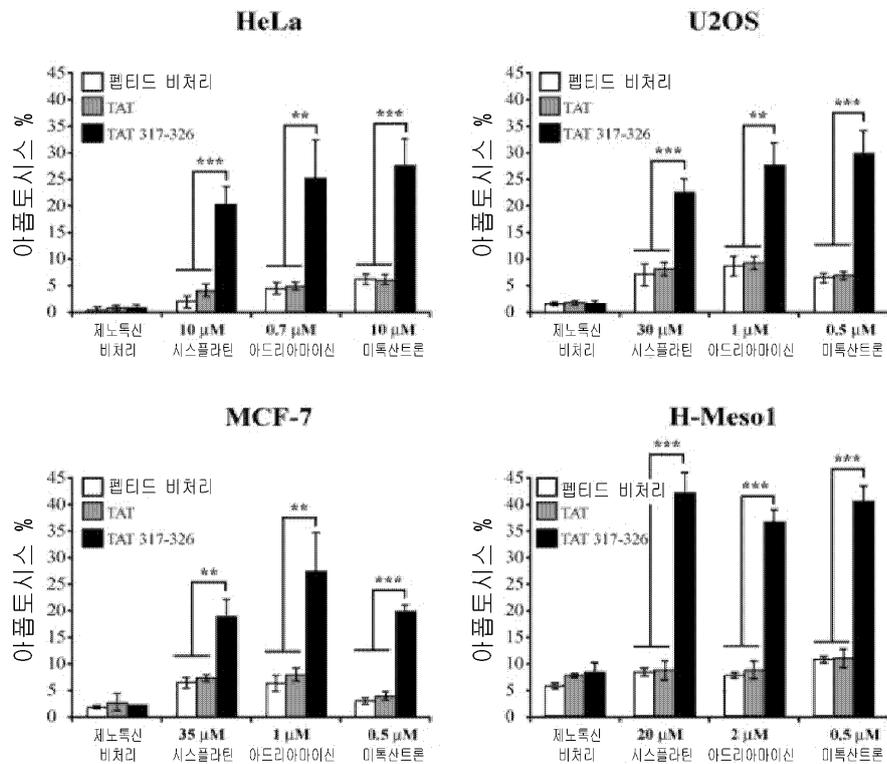
도면3



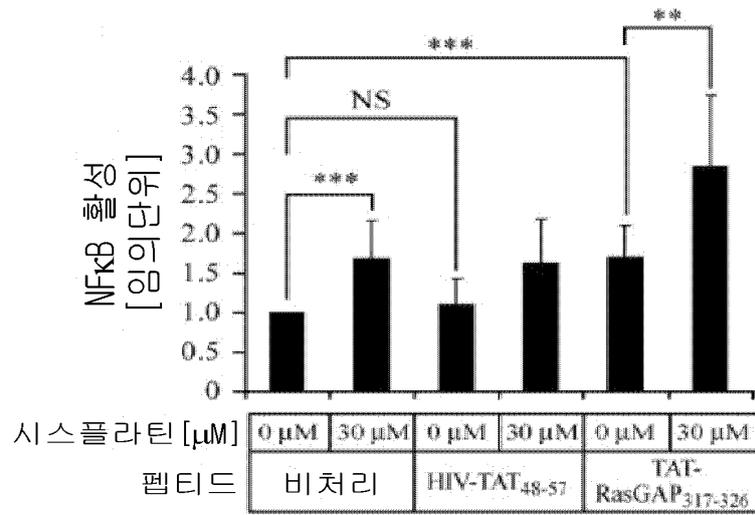
도면4a



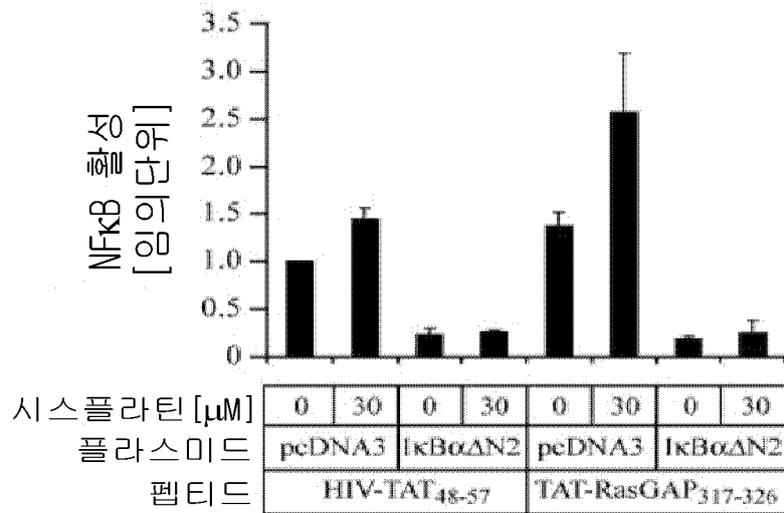
도면4b



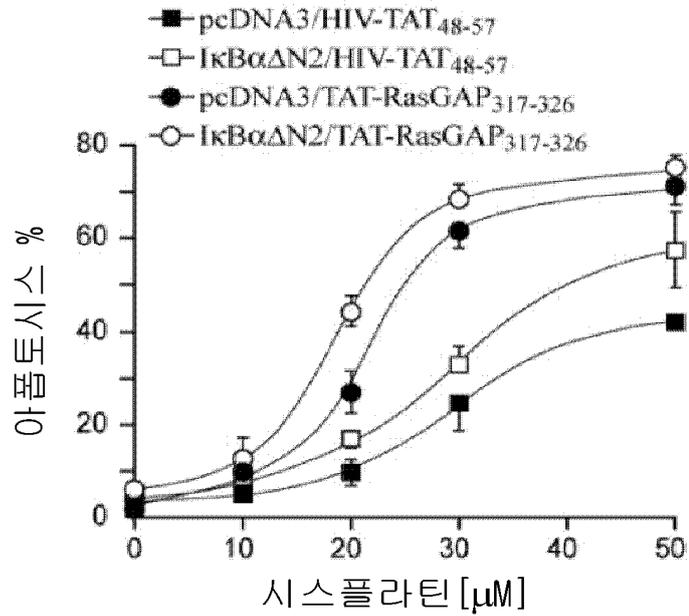
도면5a



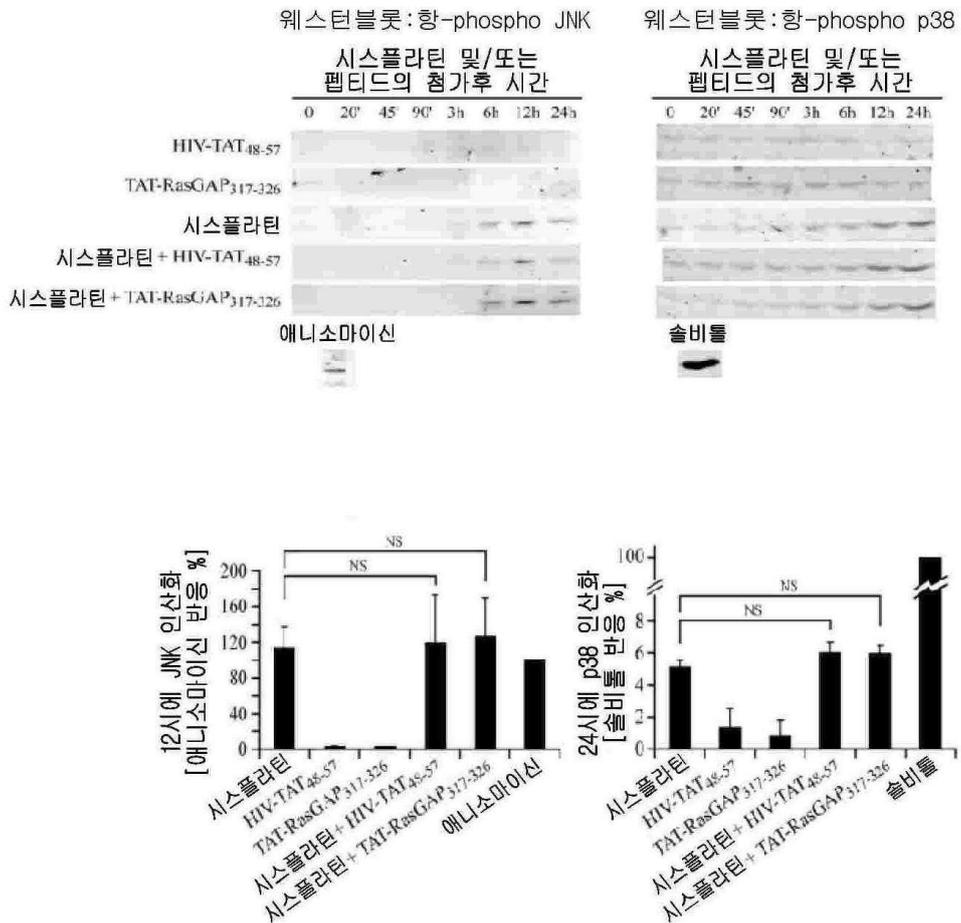
도면5b



도면5c



도면6



서열목록

<110> Universite de Lausanne
 <120> RasGAp derived peptide for selectively kill cancer cells

<130> IPF7527

<140> PCT/IB04/002165
 <141> 2004-06-30

<150> US 60/483,691
 <151> 2003-06-30

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 249
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 gaagatagaa ggcgtgtacg agctatttcta ccttacacaa aagtagcaga cactgatgaa 60
 ataagtttct taaaaggaga tatgttcatt gttcataatg aattagaaga tggatggatg 120
 tgggttacia atttaagaac agatgaacaa ggccttattg ttgaagacct agtagaagag 180
 gtgggccggg aagaagatcc acatgaagga aaaatatggt tccatgggaa gatttcaaaa 240
 caggaagct 249

<210> 2
 <211> 204
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2

gtacgagcta ttctacctta cacaaaagta ccagacactg atgaaataag tttcttaaaa 60
 ggagatatgt tcattgttca taatgaatta gaagatggat ggatgtgggt tacaaattta 120
 agaacagatg aacaaggcct tattgttgaa gacctagtag aagaggtggg ccgggaagaa 180
 gatccacatg aaggaaaaat atgg 204

<210> 3
 <211> 174
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gtacgagcta ttctacctta cacaaaagta ccagacactg atgaaataag tttcttaaaa 60
 ggagatatgt tcattgttca taatgaatta gaagatggat ggatgtgggt tacaaattta 120
 agaacagatg aacaaggcct tattgttgaa gacctagtag aagaggtggg ccgg 174

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 tggatgtggg ttacaaattt aagaacagat 30