



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월08일
 (11) 등록번호 10-1916396
 (24) 등록일자 2018년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/81 (2006.01) *A61K 38/56* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 14/8139 (2013.01)
A61K 38/56 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-0021995
 (22) 출원일자 2017년02월20일
 심사청구일자 2017년02월20일
 (65) 공개번호 10-2018-0095969
 (43) 공개일자 2018년08월29일
 (56) 선행기술조사문헌
 [비특허] PLOS ONE 10(3) E0119328*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 서울대학교 산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
장관식
 서울특별시 성동구 매봉길 15, 114동 1402호(옥수
 동, 래미안옥수리버젠)
박경민
 서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 가족생
 활동 932동 402호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 14 항

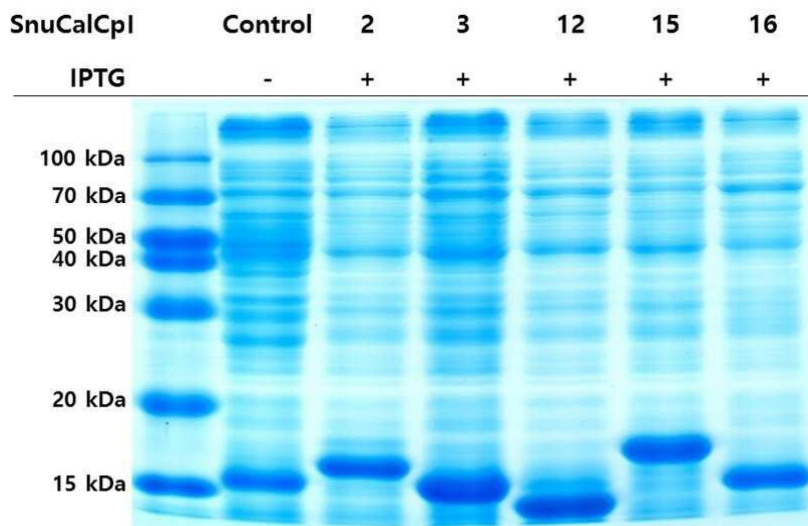
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **항암제 또는 항균제로 사용될 수 있는 단백질분해효소 저해제**

(57) 요약

본 발명은 항암제 또는 항균제로 사용될 수 있는 단백질분해효소 저해제에 관한 것으로, 본 발명의 단백질분해효소 저해제는 기존에 항암 효능이 있는 것으로 알려진 카텝신 L 활성저해제와 비슷한 특성을 보이는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 단백질분해효소 저해제는 넓은 범위의 온도 및 pH에서도 안정성을 유지하는 것으로 나타났다, 낮은 K_i 값을 보여 활성이 높은 것으로 확인되었다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

C12Y 304/22015 (2013.01)

(72) 발명자

권창우

서울특별시 송파구 잠실로 62, 327동 1203호(잠실동, 트리지움)

여수빈

서울특별시 강서구 등촌로51길 116

(56) 선행기술조사문헌

[비특허] ONCOGENE. 2010 29(11), P. 1611_1621

GENBANK: AAL14614.1

NCBI REFERENCE SEQUENCE: XP_006473275.1

KR1020000030917 A

[비특허] [MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY 156

[비특허] PHYTOCHEMISTRY 62 (2003)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열은,

서열번호 4에 기재된 핵산 서열로 암호화되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질분해효소 저해제.

청구항 3

서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열은,

서열번호 8에 기재된 핵산 서열로 암호화되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질분해효소 저해제.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 단백질분해효소는,

시스테인 단백질분해효소인 것을 특징으로 하는 단백질분해효소 저해제.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 시스테인 단백질분해효소는,

카텝신 L인 것을 특징으로 하는 단백질분해효소 저해제.

청구항 7

서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제.

청구항 8

서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,
상기 항암제는,
시스테인 단백질분해효소를 저해하는 것을 특징으로 하는 항암제.

청구항 10

제9항에 있어서,
상기 시스테인 단백질분해효소는,
카텝신 L인 것을 특징으로 하는 항암제.

청구항 11

서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항균제.

청구항 12

서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항균제.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,
상기 항균제는,
시스테인 단백질분해효소를 저해하는 것을 특징으로 하는 항균제.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 시스테인 단백질분해효소는,
카텝신 L인 것을 특징으로 하는 항균제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질분해효소 저해제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항암제또는 항균제로 사용될 수 있는 단백질분해효소 저해제에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 단백질분해효소 저해제 (protease inhibitor)는 단백질분해효소 분비 과정 중 효소의 활성을 조절하기 위한 수 단뿐만 아니라, 숙주 침입을 위해 병원성균이 분비하는 단백질분해효소의 활성을 저해하기 위해서도 생산된다. 따라서, 병원성균의 침입 시, 첫 번째 표적이 되는 영양소가 풍부한 괴경, 씨앗, 조류의 알과 같은 조직과 병원

성균이 수송되는 혈청(mammalian serum) 또는 체관부(plant phloem)에 단백질분해효소 저해제가 많이 존재한다.

[0004] 단백질분해효소의 가수분해능을 저해할 수 있는 천연추출물이 일부 보고되고 있지만, 분리·정제 과정을 수반하므로 경제성이 낮아 적극적으로 실용화되지 못하는 한계가 있다. 천연 단백질분해효소 저해제는 주로 보리, 대두, 옥수수, 토마토, 파인애플, 쌀, 우유(초유), 소와 돼지의 혈장, 염소, 달걀흰자, 말미잘, 넙치, 송어알, 연어알, 잉어, 제브라피시 등의 농·축·수산물에서 생산되며, 세균 및 원생동물 등에서도 분리·정제되어 이용되고 있다.

[0005] 한편, 시스테인 카텝신 (cysteine cathepsin) B, L, S, Z는 단백질분해효소로서, 암 조직 및 암전이 환자의 세포외 기질(extracellular matrix) 및 기저막(basement membrane)에서 발현 증가가 확인되어 암화 및 암 전이에 관여하는 것으로 보고되었다. 또한, 시스테인 단백질분해효소의 발현 유전자를 제거(knock out)한 마우스 모델에서 종양성장이 지연되는 것을 확인했다.

[0006] 따라서, 항암제로써, 단백질분해효소 저해제만 발현할 수 있는 분자생물학적 생산이 필수적이며, 시스테인 카텝신에 대해 효소특이적으로 저해할 수 있는 신규 저해제의 발굴이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2004-0095262호 (공개일자 2004. 11. 12)에는, 카텝신 의존성 질병 또는 질환 상태의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 포유동물에서 이를 치료 및/또는 예방할 수 있는 화합물이 기재되어 있다.

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Purification and characterization of cysteine proteinase inhibitors from crucian carp Carassius auratus eggs. Fisheries Science 75:1453-1460 (2009)에서는, 붕어 알로부터 두 개의 시스타틴 계열 저해제(cst-I 및 cst-II)를 분리·정제하였으며, 파파인 및 카텝신에 대한 활성저해능을 평가하고 온도 및 pH에 대한 저해 안정성을 평가하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명에서는 항암제 또는 항균제로 사용될 수 있는 새로운 단백질분해효소 저해제를 발굴하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 제공한다.

[0013] 본 발명의 단백질분해효소 저해제에 있어서, 상기 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열은, 바람직하게 서열번호 4에 기재된 핵산 서열로 암호화되어 있는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 제공한다.

[0015] 본 발명의 단백질분해효소 저해제에 있어서, 상기 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열은, 바람직하게 서열번호 8에 기재된 핵산 서열로 암호화되어 있는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 단백질분해효소 저해제에 있어서, 상기 단백질분해효소는, 일 예로 시스테인 단백질분해효소인 것일 수 있고, 상기 시스테인 단백질분해효소는, 일 예로 카텝신 L일 수 있다.

[0017] 본 발명은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제를 제공한다.

[0018] 본 발명은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하

는 항암제를 제공한다.

[0019] 본 발명의 항암제에 있어서, 상기 항암제는 일 예로 시스테인 단백질분해효소를 저해하는 것일 수 있고, 상기 시스테인 단백질분해효소는, 일 예로 카텝신 L일 수 있다.

[0020] 본 발명은 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제를 제공한다.

[0021] 본 발명은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제를 제공한다.

[0022] 본 발명의 항암제에 있어서, 상기 항암제는, 일 예로 시스테인 단백질분해효소를 저해하는 것일 수 있고, 상기 시스테인 단백질분해효소는, 일 예로 카텝신 L인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 단백질분해효소 저해제는 기존에 항암 효능이 있는 것으로 알려진 카텝신 L 저해제와 비슷한 특성을 보이는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 단백질분해효소 저해제는 넓은 범위의 온도 및 pH에서도 안정성을 유지하는 것으로 나타났고, 낮은 K_i 값을 보여 활성이 높은 것으로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에서 발현시킨 단백질분해효소 저해제의 전기영동 사진이다.

도 2는 본 발명의 단백질분해효소 저해제의 파파인에 대한 저해능력 평가 결과이다.

도 3은 본 발명 단백질분해효소 저해제의 열에 대한 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 4는 본 발명 단백질분해효소 저해제의 pH에 대한 안정성을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 생리적으로 시스테인 단백질분해효소는 여러 신호에 의해 발현되고, 생체 내의 저해 단백질에 의해 그 활성이 선택적으로 조절되고 있다. 하지만, 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 시스테인 단백질분해효소는 바이러스 감염, 염증, 암의 침윤 및 전이 등 다양한 병발과정에 관여하고, 이러한 질병상태에서는 시스테인 단백질분해효소와 단백질분해효소 저해제 간의 균형이 깨지게 되므로, 생체 내 저해제에 의한 조절의 한계를 야기한다.

[0028] 따라서, 생리적 또는 병발과정에 중요한 시스테인 단백질분해효소의 발현 조절 및 활성 억제를 위한 다양한 종류의 시스테인 단백질분해효소 저해제 개발이 요구되고 있으며, 최근에 개발된 몇 개의 시스테인 단백질분해효소 저해제는 임상학적 효능이 검증되어 항암제, 고혈압, 진통, 염증, 면역증강 치료제로 사용되고 있다.

[0029] 한편, 암환자가 사망하게 되는 결정적 요인 중 하나는 다른 조직으로의 암세포 전이(metastasis)에 의한 것이다. 전이는 초기종양이 형성된 원발 부위로부터 암세포가 신체의 주위 조직 및 장기로 이동하여 성장하는 과정으로써, 악성 암의 가장 큰 특징이다.

[0030] 암세포의 침윤과 전이에서 중요한 부분은 암세포가 정상적으로 통과할 수 없는 지지구조체(세포 외 기질과 기저막에 있는 단백질 중합체)의 단백질분해이다. 암세포는 이러한 지지구조체를 분해하기 위하여 많은 종류의 단백질분해효소를 분비하는데, 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator), 플라스민(plasmin), 엘라스테이스(elastase)와 같은 세린 단백질분해효소, 카텝신 B와 카텝신 L 등의 시스테인 단백질분해효소, 카텝신 D와 같은 아스파틱 단백질분해효소 그리고 콜라게네이스(collagenase), 젤라티네이스(gelatinase), 스트로멜리신(stromelysin)과 같은 메탈로 단백질분해효소 등이다.

[0031] 이러한 단백질분해효소의 활성은 암의 악성화와 밀접한 상관관계를 보여주고 있다. 특히, 세포 외 기질과 기저막의 주성분을 분해하는 시스테인 단백질분해효소가 중요한 역할을 하며, 시스테인 단백질분해효소 중 카텝신 B, L, S, Z의 발현이 증가하는 것으로 알려 있기 때문에, 시스테인 카텝신 저해제 개발을 통한 암전이 억제는 새로운 암치료 방법으로 주목받고 있다.

[0032] 기존 연구는 콜라게네이스(collagenase), 젤라티네이스(gelatinase), 스트로멜리신(stromelysin)와 같은 메탈로 단백질분해효소의 저해에 치중되어 있으며, 중앙세포 증식에 대한 시스테인 단백질분해효소의 역할이 새롭게 알려지면서 새로운 저해제 발굴의 중요성이 커지고 있다.

- [0033] 시스템인 카텝신 저해제를 탐색하고 자원을 확보함으로써 다양한 증양치료의 신약성분으로 개발할 수 있다. 또한, 시스템인 카텝신은 미생물의 생육에 필수적인 효소이므로, 시스템인 카텝신에 대해 특이적 저해제는 다양한 병원성균의 항균 소재로 활용할 수 있다.
- [0034] 3차 구조를 가지는 저해제인 시스템인(cystatin) 및 세핀(serpin)과는 다르게 본 발명의 저해제는 2차 구조로만 구성되어 있기 때문에, 열과 pH에 대한 안정성 높은 구조적 유연성을 나타내며, 고온을 수반하는 식품가공분야로의 활용이 용이하다. 또한, 활성부위를 표적으로 결합하는 것이 아니라, 활성부위 단백질 표면과 상호작용하기 때문에, 유사한 표면을 갖는 단백질분해효소에도 결합할 수 있으며, 이로 말미암아 카텝신 L과 S의 활성을 동시에 저해할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서는 서열번호 3 또는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명에서는 본 발명은 서열번호 3 또는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 단백질분해효소 저해제를 함유하는 약학 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0038] 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 사용될 수 있다. 더욱 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어, 본 발명 단백질분해효소 저해제의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.0001 µg/kg 내지 500 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 이때, 본 발명 단백질분해효소 저해제의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 서열번호 3 또는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질분해효소 저해제를 함유하는 것을 특징으로 하는 항균제를 제공한다.
- [0042]
- [0043] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 하기 실시예 및 실험예에서는 칼로트로피스 프로세라 (*Calotropis procera* R. br.)로부터 높은 저해활성 및 안정성을 가지는 신규 단백질분해효소 저해제의 발현을 위해, PCR을 이용하여 저해제 유전자를 증폭시켰다. 또한, 이 유전자를 플라스미드에 재조합하여 대장균에 형질전환 후 발현시키고, 그 특성을 규명하

였다.

[0046] 본 발명에서는 1) 프라이머를 이용하여 칼로트로피스 프로세라의 단백질분해효소 저해제 유전자를 PCR로 증폭하는 단계; 2) 상기 증폭한 저해제 유전자를 벡터 pET-29b에 삽입하고, *E. coli* BL21 star 균주에 도입하여 형질 전환시킨 후 이 형질 전환체로부터 저해제를 발현 및 정제하는 단계; 3) 생물정보분석으로 시스템인 단백질분해효소 저해 가능성이 있는 저해제를 예측하고 과파인을 이용하여 스크리닝하는 단계; 4) 카뎁신 L을 이용하여 정제된 저해제의 저해활성 및 특성을 확인하는 단계로 구성된다.

[0048] [실시예 1: 프라이머를 이용하여 칼로트로피스 프로세라의 단백질분해효소 저해제 유전자를 PCR로 증폭]

[0049] NCBI에 등재된 칼로트로피스 프로세라 유전자 중 카뎁신 L 저해제와 상동성이 높은 유전자 8개 (SnuCalCpI02, SnuCalCpI03, SnuCalCpI08, SnuCalCpI12, SnuCalCpI14, SnuCalCpI15, SnuCalCpI16 및 SnuCalCpI17)를 PCR로 증폭하기 위해 아래와 같이 프라이머를 제작하였다.

표 1

프라이머 서열

[0050]

유전자 명칭	프라이머 명칭	시퀀스 (5'→3')
SnuCalCpI02	SnuCalCpI02F	AAGGAGATATACATATGTTAGACATGTCCATTATCAGT
	SnuCalCpI02R	GGTGGTGGTCTCGAGATCATCACCAGCATTAAAAGA
SnuCalCpI03	SnuCalCpI03F	AAGGAGATATACATATGAAAATCATATCCATTGCCGAT
	SnuCalCpI03R	GGTGGTGGTCTCGAGGTTAAGGTCAACTTCAGAAAA
SnuCalCpI12	SnuCalCpI12F	AAGGAGATATACATATGATTGCCGATGAATTAGTCCG
	SnuCalCpI12R	GGTGGTGGTCTCGAGAGAAAGTTATAGTTAACTTGG
SnuCalCpI15	SnuCalCpI15F	AAGGAGATATACATATGATCATCACTACTAGCCTCC
	SnuCalCpI15R	GGTGGTGGTCTCGAGGCTTTCAGATCCAACCTTGT
SnuCalCpI16	SnuCalCpI16F	AAGGAGATATACATATGGACCGTTCATCATTCTCCG
	SnuCalCpI16R	GGTGGTGGTCTCGAGAGCAACGTTGTTGAGCTTTA

[0052] 각각의 프라이머는 pET-29b 벡터의 NdeI과 XhoI 부위에 삽입될 수 있도록 NdeI/XhoI 인식 부위를 인위적으로 부가하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분간 변성(denaturation)시킨 다음 30 사이클(cycle)의 PCR 증폭을 실시하였다. 변성은 95℃에서 30초간, 어닐링(annealing)은 58℃에서 30초, 신장(extension)은 72℃에서 120초간 그리고 마지막 사이클(cycle)에서 마지막 신장(last extension)은 72℃에서 5분간 실시하였다.

[0053] PCR을 통해 증폭된 DNA는 아가로스 겔 전기영동과 유전자 염기서열을 결정하여 확인하였다. 확인된 유전자 염기서열과 아미노산 서열은 서열목록에 기재한 바와 같았다.

[0054] 서열번호 1은 SnuCalCpI02의 아미노산 서열이고, 서열번호 2는 SnuCalCpI02의 핵산 서열이며, 서열번호 3은 SnuCalCpI03의 아미노산 서열이고, 서열번호 4는 SnuCalCpI03의 핵산서열이며, 서열번호 5은 SnuCalCpI12의 아미노산 서열이고, 서열번호 6은 SnuCalCpI12의 핵산서열이며, 서열번호 7는 SnuCalCpI15의 아미노산 서열이고, 서열번호 8은 SnuCalCpI15의 핵산서열이며, 서열번호 9는 SnuCalCpI16의 아미노산 서열이고, 서열번호 10은 SnuCalCpI16의 핵산 서열이다.

[0056] [실시예 2: 상기 증폭한 저해제 유전자를 벡터 pET-29b에 삽입하고, *E. coli* BL21 star 균주에 도입하여 형질 전환시킨 후, 이 형질전환체로부터 저해제를 발현 및 정제]

[0057] PCR을 이용하여 상기에서 증폭한 저해제 유전자를 XhoI/NdeI 제한효소 처리를 하고, 마찬가지로 pET-29b 벡터도 동일한 효소인 XhoI/NdeI 제한효소로 처리한 다음 삽입시켰다. 삽입 산물(ligation product)을 100 μL의 콤펙턴트 세포(competent cell)에 섞은 후 42℃에서 1분간 배양하여 형질전환하였다. 형질전환 후, *E. coli* DH5 α의 배양은 low salt LB medium(10 g 트립톤(tryptone), 5 g NaCl, 5 g 효모추출물 per liter)을 10 N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 7.5로 조정하고, 항생제 카나마이신(kanamycin)을 1 mL당 50μg이 첨가되도록 하여 제조한 아가 배지에서 배양하였다.

[0058] 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 추출한 후, DNA 염기서열을 확인하여 저해제를 발현시킬 수 있는 재조합 플라스미드 pET-29-SnuCalCpI02, pET-29-SnuCalCpI03, pET-29-SnuCalCpI12, pET-29-SnuCalCpI15, pET-29-SnuCalCpI16 벡터를 최종 선발하였다.

- [0059] 정제한 재조합 플라스미드 8가지 DNA 100 ng을 사용하여 숙주로 사용할 *E. coli* DE3 star에 형질전환을 실시하였다. 100 μ L의 콤펜트 세포(competent cell)에 섞은 후, 42°C에서 1분간 배양하여 형질 전환하였다. 형질전환 후 *E. coli* DE3 star의 배양은 low salt LB medium(10 g 트립톤(tryptone), 5 g NaCl, 5 g 효모추출물 per liter)을 10 N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 7.5로 조정하고 항생제 카나마이신(kanamycin)을 1 mL당 50 μ g이 첨가되도록 하여 제조한 아가 배지에서 배양하였다.
- [0060] 아가 배지에서 자란 콜로니 한 개를 37°C에서 600 nm의 흡광도가 0.7이 될 때까지 진탕배양하였다. 배양온도를 온도를 20°C로 낮추고 최종농도 0.5 mM의 isopropyl B-D-thiogalactoside(IPTG)를 사용하여 저해제 발현을 유도하였다.
- [0061] 10,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 침전시키고 50 mM Tris/HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸(imidazole) 용액으로 재현탁 후, 소니케이션으로 세포막을 파괴하였다. 12,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 세포 용해물 중 수용성 물질을 분리하였으며, 수용성 물질은 Ni-NTA 친화크로마토그래피로 정제하였다.
- [0062] 50 mM Tris/HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 20 mM 이미다졸 용액으로 결합하지 않은 물질을 세척하고, 이미다졸 농도를 250 mM로 증가시켜 저해제만을 용출시켰다. 용출된 단백질은 단백질전기영동으로 확인하였다(도 1). 도 1은 본 발명에서 발현시킨 저해제 단백질, SnuCalCpI02, SnuCalCpI03, SnuCalCpI12, SnuCalCpI15, SnuCalCpI16의 전기영동 사진이다.
- [0064] **[실시예 3: 생물정보분석으로 시스테인 단백질분해효소 저해 가능성이 있는 저해제를 예측하고 파파인을 이용하여 스크리닝]**
- [0065] 상기에서 발현된 5가지 저해제 중 시스테인 단백질분해효소에 대한 저해능력을 가질 가능성이 있는 것을 스크리닝하기 위해 생물정보분석을 이용하였다.
- [0066] 먼저, 카텝신 L과 유사한 구조의 가장 대표적인 시스테인 단백질분해효소인 파파인과 저해제의 구조를 상동성 모델링(homology modeling) 하여 얻은 후, meta-PPISP 방법을 사용하여 파파인과 저해제의 아미노산 잔기들 중 다른 단백질과 상호작용을 할 수 있는 잔기와 그렇지 않은 잔기를 예측하였다. 그 결과를 토대로 조건을 설정하여 protein-protein docking simulation을 진행함으로써 파파인과 저해제가 결합하여 복합체를 형성할 때의 모델을 예측하였다.
- [0067] 예측 결과, SnuCalCpI03과 SnuCalCpI15는 저해제가 파파인의 활성 부위 근처의 아미노산과 결합하여 활성 부위에 기질이 접근하지 못하도록 막는 반면, SnuCalCpI02, SnuCalCpI12, SnuCalCpI16은 저해제가 파파인의 활성 부위를 가리지 못하고, 다른 부분과 결합하는 것으로 나타났다.
- [0068] 이를 토대로 SnuCalCpI03과 SnuCalCpI15는 시스테인 단백질분해효소에 대한 저해능력이 있을 가능성이 클 것으로 예상하였다.
- [0069] 생물정보분석을 통한 예측을 실제로 확인하기 위하여, 저해제의 파파인에 대한 저해능력을 평가하였다. 0.2 mL의 1 mM N- α -Benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide을 기질로 사용하였다. 기질에 다양한 농도의 저해제를 0.2 mL씩 첨가하고 25 μ g/mL의 파파인을 0.3 mL 첨가함으로써 저해활성을 평가하였다.
- [0070] 실험 결과, 시뮬레이션 예측 결과대로 SnuCalCpI03과 SnuCalCpI15만 파파인을 저해하였고, 나머지 3가지는 저해능이 없는 것으로 나타났다(도 2). 도 2는 저해제, SnuCalCpI02, SnuCalCpI03, SnuCalCpI12, SnuCalCpI15, SnuCalCpI16의 파파인에 대한 저해능력 평가 결과이다.
- [0072] **[실시예 4: 카텝신 L을 이용하여 정제된 저해제의 저해활성 및 특성 확인]**
- [0073] 상기에서 발굴한 저해제의 카텝신 L 활성 저해능을 평가하기 위해 0.1 mL의 Z-Phe-Arg-AMC을 기질로 사용하였다. 기질에 다양한 농도의 저해제를 20 μ L씩 첨가하고, 0.2 nM의 카텝신L을 80 μ L 마지막으로 첨가함으로써 저해활성을 평가하였다.
- [0074] 실험 결과, 본 발명의 칼로트로피스 프로세라 유래 저해제가 CTLA-2 β 보다 약 10배 Recombinant D/CTLA-2보다는 약 1.7배 저해활성이 높은 것으로 나타났다(표 2).

표 2

Expressed recombinant inhibitor	K_i (nM)
SnuCalCpI03	2.256
SnuCalCpI15	2.766
CTLA-2 β	24
Recombinant D/CTLA-2	3.9

[0075]

[0077]

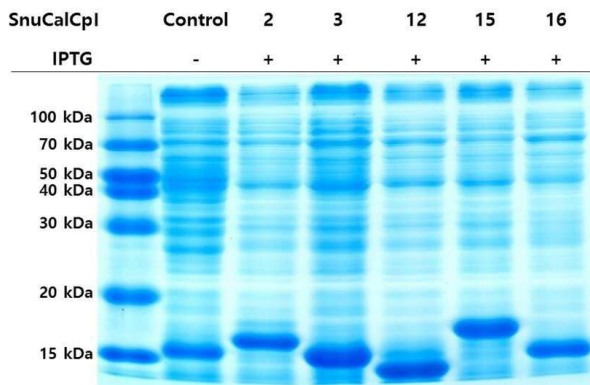
한편, 본 발명 저해제의 온도에 대한 안정성을 확인하기 위해, 저해제를 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 및 100°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 시료는 4°C에서 10분 동안 온도를 떨어뜨리고, 카텝신L에 대한 저해 활성을 측정하였다. 70°C 이하로는 80% 이상의 잔존 저해 활성을 나타내며, 기존의 시스타틴 계열의 저해제 보다 훨씬 안정하였다 (도 3). 도 3은 본 발명 저해제의 열에 대한 안정성을 보여주는 그래프이다.

[0078]

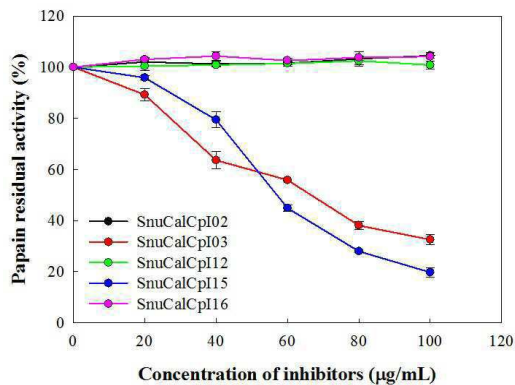
본 발명 저해제의 pH에 대한 안정성을 확인하기 위해, 저해제(1 μ g/ μ L)를 100 mM glycine-HCl (pH 2.0-3.0), 100 mM sodium acetate-acetic acid (pH 4.0-5.0), 100 mM sodium phosphate (pH 6.0-7.0), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM glycine-HCl (pH 9.0-10.0) 용매에 넣고 4°C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후, 시료는 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)으로 투석하였고, 카텝신L에 대한 저해 활성을 측정하였다. 저해제의 등전점 이외의 구간에서는 안정하였으며, 넓은 범위의 pH에서 안정함을 나타냈다(도 4). 도 4는 본 발명 저해제의 pH에 대한 안정성을 보여주는 그래프이다.

도면

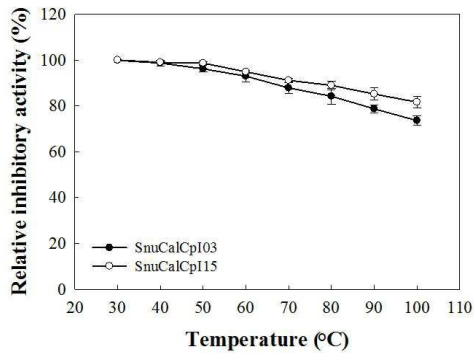
도면1



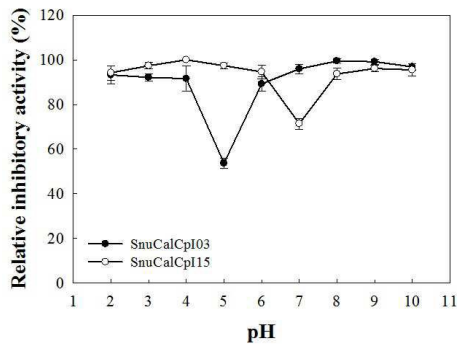
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> SNU R&DB FOUNDATION
- <120> Protease inhibitor being used as anti-tumor agent or anti-microbial agent
- <130> YP-16-290
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> SnuCalCpI02 is derived from Calotropis procera R. br.
- <400> 1

Leu Asp Met Ser Ile Ile Ser Tyr Asp Asn Asp His Gly Gln Met Val

1 5 10 15

Arg Ser Asp Asp Glu Val Arg Ser Leu Tyr Glu Ser Trp Leu Val Lys

20 25 30

His Gly Lys Ala Tyr Asn Ala Leu Gly Glu Lys Glu Lys Arg Phe Glu

35 40 45

Ile Phe Lys Asp Asn Leu Gln Phe Ile Asp Glu His Asn Ser Lys Asn

50 55 60

Leu Ser Tyr Lys Leu Gly Leu Asn Arg Phe Ser Asp Leu Ser His Glu

65 70 75 80

Glu Phe Arg Ser Ile Phe Val Ser Gly Arg Met Asp Arg Lys Ala Arg

85 90 95

Leu Met Lys Gly Lys Val Gly Asp Arg Tyr Ser Phe Asn Ala Gly Asp

100 105 110

Asp

<210> 2

<211> 339

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI02 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 2

ttagacatgt ccattatcag ttatgataat gaccatggtc agatggttag gctctgatgat 60
 gaggttaggt ctttgtatga atcttggcctt gttaagcatg ggaaagctta caatgcttta 120
 ggggagaaag agaaaaggtt tgaattttc aaagataatc ttcagttcat tgacgaacat 180

aactetaaga acctttctta caaacttggc cttaatcggt tctcggatct gagtcacgag 240
 gagtttcggt ccatttttgt gagggtcga atggatcgga aggctagggt gatgaagggt 300
 aaggttgggg atcgttattc ttttaatgct ggtgatgat 339

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI03 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 3

Ile Ser Ile Ala Asp Glu Ser Val Trp Arg Thr Glu Glu Glu Val Met
 1 5 10 15

Ala Ile Tyr Glu Glu Trp Ile Val Lys His Gly Lys Ser Tyr Asn Ala

20 25 30

Leu Gly Glu Glu Lys Phe Lys Arg Phe Glu Ile Phe Lys Asp Asn Leu

35 40 45

Lys Tyr Ile Glu Lys His Asn Ser Leu Pro Asn Gln Ile Tyr Lys Leu

50 55 60

Gly Leu Asn Gln Phe Ser Asp Leu Thr Phe Asp Glu Phe Lys Ser Ile

65 70 75 80

Tyr Leu Ser Ser Ile Pro Met Asp Thr Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ile

85 90 95

Asp Phe Ser Glu Val Asp Leu Asn Phe Pro

100 105

<210> 4

<211> 318

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI03 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 4

atatccattg ccgatgaatc cgtgtggcga accgaagaag aagtcattgc aatatacgag 60

gaatggatag tgaaacacgg gaaatcatac aacgcattag gagaggagaa atttaaaga 120

ttcgaatat ttaaggataa tcttaaatat atcgagaac acaacagtct tccaatcaa 180

atctacaac tcggtttgaa tcaattttcg gatcttacct ttgacgagtt taaatccatt 240

tatttaagta gcacccctat ggatacttcg ttaagtgagt ccaaaattga cttttctgaa 300

gttgacctta actttccc 318

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI12 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 5

Ile Ala Asp Glu Leu Val Arg Arg Thr Asp Glu Glu Val Met Ser Ile
 1 5 10 15
 Tyr Glu Glu Trp Met Val Glu Tyr Arg Lys Ser Tyr Asp Ala Leu Gly
 20 25 30
 Val Glu Lys Leu Lys Arg Phe Glu Ile Phe Lys Asp Asn Leu Lys Tyr
 35 40 45
 Met Glu Glu His Asn Ser Leu Pro Asn Gln Thr Tyr Lys Leu Gly Leu
 50 55 60
 Asn Gln Phe Ser Asp Leu Thr Leu Arg Glu Phe Lys Ser Ile Tyr Leu
 65 70 75 80
 Ser Ser Ser Pro Ile Asp Thr Leu Leu Asp Glu Ser Glu Ile Asp Phe
 85 90 95
 Ser Tyr Phe Pro Gln Val Asn Tyr Asn Leu Ser

100 105
 <210> 6
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> SnuCalCpI12 is derived from Calotropis procera R. br.
 <400> 6
 attgccgatg aattagtccg gcgaactgac gaagaagtca tgtcaatata cgaggaatgg 60
 atggtggaat acaggaaatc ctacgacgca ttaggagtgg agaaattaa gagattcgaa 120
 atatttaagg ataatcttaa gtatatggaa gagcacaaca gtcttcccaa tcaaacttac 180
 aagctcggtt tgaaccaatt ttccgatctt actcttcgcg agtttaaate catctattta 240
 agcagcagcc ctattgatac tttgtagat ggtccgaaa ttgacttttc ctattttccc 300
 caagttaact ataacctttc t 321

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> be derived from Calotropis procera R. br.
 <400> 7

Ile Ile Thr Thr Ser Leu His Asn Ser Gln Asn Lys Leu Val Trp Arg
 1 5 10 15
 Thr Asn Asp Glu Val Ile Ser Leu Phe Glu Glu Trp Leu Val Lys His
 20 25 30
 Arg Lys Val Tyr Asn Ala Ile Gly Glu Lys Glu Lys Arg Phe Glu Ile
 35 40 45
 Phe Lys Asn Asn Leu Lys Phe Ile Asp Glu His Asn Ile Arg Tyr Pro
 50 55 60
 Asn Lys Thr Tyr Thr Leu Gly Leu Asn Val Phe Ala Asp Leu Thr Asp
 65 70 75 80
 Asp Glu Tyr Gln Ser Lys Tyr Leu Gly Thr Arg Ile His Pro Lys Arg
 85 90 95
 Lys Tyr Phe Ala Ser His Ser Ser Asp Asp Asp Glu Tyr Leu His Lys
 100 105 110

Val Gly Ser Glu Ser
 115

<210> 8

<211> 351

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI15 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 8

atcatcacta ctagcctcca taattctcag aataaacttg tttggcgtac taatgatgaa 60
 gtcatttcat tatttgagga atggtagt aaacatagga aggtatataa tgctatagga 120
 gaaaaagaaa agagattcga gatctttaag aataatctta aatttattga tgagcacaat 180
 attagatadc caacaagac ttacacactt ggccataatg tgtttgctga tcttactgat 240
 gatgagtacc aatccaagta tttaggtacc cgtattcatc caaagagaaa gtattttgca 300

tctcacagta gtgatgatga tgagtatcctt cacaaagttg gatctgaaag c 351

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI16 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 9

Asp Arg Ser Ser Phe Ser Glu Glu Asn Pro Ile Arg Gln Val Val Ala

1 5 10 15

Asp Arg Leu Arg Glu Leu Glu Ala Ser Phe Leu Glu Val Val Gly Asp

20 25 30

Asn Arg His Val Leu Ser Phe Ala Ser Phe Ala Leu Lys Tyr Gly Lys

35 40 45

Lys Tyr Glu Thr Asp Gly Glu Ile Lys Lys Arg Phe Glu Ile Phe Arg

50 55 60

Glu Asn Leu Trp Lys Ile Glu Ser His Asn Lys Lys Gly Leu Ser Tyr

65 70 75 80

Thr Leu Gly Ile Asn Glu Phe Ser Asp Met Thr Trp Glu Glu Phe Ser

85 90 95

Lys Arg Arg Leu Gly Ala Pro Gln His Cys Ser Ala Thr Lys Tyr Ser

100 105 110

Thr Leu Lys Leu Asn Asn Val Ala

115 120

<210> 10

<211> 360

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> SnuCalCpI16 is derived from Calotropis procera R. br.

<400> 10

gaccgttcat cattctccga ggagaatccg atcagacaag tcgtagcgga cgcctgcgt 60

gaactagaag ctcttttct tgaagtcgtc ggagacaacc gccacgtcct ctctttgct 120

agctttgctc ttaagtacgg aaagaagtac gaaactgatg gggagattaa gaaaaggttc 180

gaaatattca gagagaactt atggaagatt gaatcccata acaagaaggg actctcatat 240

actctcggca ttaatgaatt ttctgatatg acatgggagg aattcagcaa gcgtaggttg 300

ggagcaccgc agcactgttc agcaacccaaa tattcgactc taaagctcaa caacgttgct 360

360