

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 10일 (10.09.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/180144 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 14/705 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)
C07K 14/79 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01) A61K 38/19 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/003166

(22) 국제출원일: 2020년 3월 6일 (06.03.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0026274 2019년 3월 7일 (07.03.2019) KR
10-2020-0027787 2020년 3월 5일 (05.03.2020) KR

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR).

(72) 발명자: 김소연 (KIM, Soyoun); 42093 대구시 수성구 청호로 411-3, 101동 504호, Daegu (KR). 유재도 (YOO, Jae Do); 41525 대구시 북구 복현로 105, 105동 1203호, Daegu (KR). 이병현 (LEE, Byung-Hoon); 42038 대구시

수성구 동원로 135, 103동 1106호, Daegu (KR). 전인선 (JEON, In Seon); 57905 전라남도 순천시 서면 입석길 115, Jeollanam-do (KR). 김인산 (KIM, In-San); 02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5, Seoul (KR).

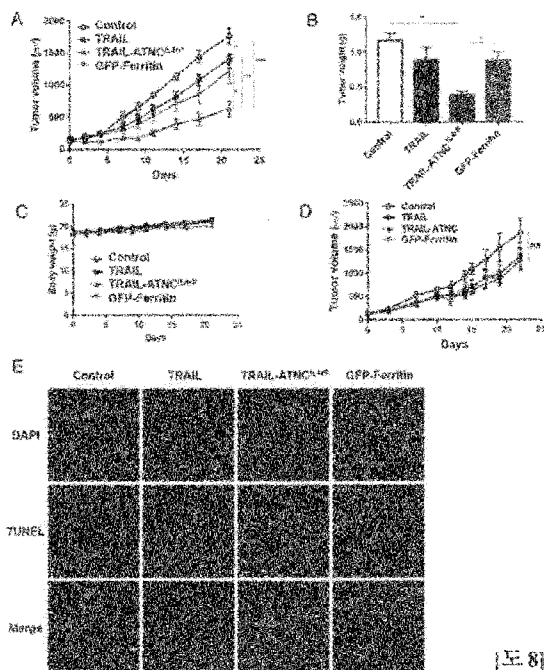
(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: FERRITIN NANOCAGE FOR MULTI-DISPLAYING TRAIL TRIMER AND CANCER-TARGETING PEPTIDE AND USE THEREOF AS ANTICANCER AGENT

(54) 발명의 명칭: 트레일 트라이머와 암표적 펩타이드를 멀티디스플레이하는 페리틴 나노케이징 및 이의 항암제로서의 용도



[도 8]

(57) Abstract: The present invention relates to a ferritin nanocage for multi-displaying a TRAIL trimer and a cancer-targeting peptide, and use thereof as an anticancer agent, and relates to the development of a TRAIL fusion nanoprotein, in which TRAIL with a trimer structure is conjugated to a human ferritin monomer fragment, and which exhibits enhanced cancer targeting using a cancer-targeting peptide. When injected into a blood vessel, the fusion protein according to the present invention effectively targets cancer and thus effectively leads to cancer death caused by TRAIL. The fusion nanoprotein of the present invention, which addresses the instability and off-targeting problems of TRAIL proteins, stably delivers a TRAIL trimer to cancer tissue, and thus there is a high possibility of developing an anticancer agent using same.

(57) 요약서: 본 발명은 트레일 트라이머와 암표적 펩타이드를 멀티디스플레이하는 페리틴 나노케이징 및 이의 항암제로서의 용도에 관한 것으로서, 인간 페리틴 모노머 단편에 트라이머 구조로 트레일을 접합하고, 암표적 펩타이드로 암 표적성을 높인 트레일 융합 나노 단백질 개발에 대한 것이다. 본 발명에 따른 융합 단백질을 혈관으로 주사시 효과적으로 암에 타겟팅되어 트레일에 의한 암사멸이 효과적으로 이루어지고, 트레일 단백질의 불안전성과 오프타겟팅의 문제를 해결한 본 발명의 나노 융합 단백질은 안정적으로 트레일 트라이머를 암조직에 수송하므로, 이를 이용한 항암제 개발 가능성이 높다고 할 수 있다.

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 트레일 트라이머와 암표적 펩타이드를 멀티디스플레이하는 페리틴 나노케이지 및 이의 항암제로서의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 트레일 트라이머와 암표적 펩타이드를 멀티디스플레이하는 페리틴 나노케이지 및 이의 항암제로서의 용도에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 케이지(cage) 단백질은 저분자량 단일체들의 정밀한 자가조립 성질에 의하여 단일체 분자량의 수십에서 수백 배의 거대분자를 형성할 수 있는 단백질이다. 자연계에서 바이러스 캡시드(capsid) 단백질, 페리틴, 열 충격 단백질(heat shock protein), Dps 단백질이 이에 해당되며, 케이지(cage)를 구성하는 각각의 단일체들은 인접 단일체들과 매우 규칙적이고 정밀한 상호작용을 이루고 있고 케이지(cage)의 내부는 비어있는 구조이다. 상기와 같은 케이지 단백질의 용기(container)와 같은 성질에 의해 내부와 외부가 격리되는 특징을 가지고 있어, 약물 전달체로 의학분야에서 활용 빈도가 높다.
- [3] 케이지 단백질 응용 물질 수송 분야는 바이러스성 수송체 (viral vector)와 비 바이러스성 수송체 (non-viral vector)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재까지 바이러스성 수송체로는 아데노바이러스 (adenovirus) 등이 많이 연구되고 있고, 비 바이러스성 수송체로는 페리틴, 열 충격 단백질(heat shock protein) 등에 관하여 연구되고 있다. 그러나 기존의 바이러스성 수송체일 경우에는 바이러스 자체가 소유하는 유전자에 의한 체내 안전성 문제가 제기되어 왔다.
- [4] 페리틴 단백질은 세포내 단백질의 일종으로 철을 저장하고, 방출하는 역할을 한다. 페리틴은 일반적으로 생체 내에서 속이 빈 구형의 케이지(cage) 형태를 하고 있으며, 상기 케이지는 24개의 subunit으로 구성되며, subunit은 그 구조에 따라 중쇄(heavy chain)와 경쇄(light chain)로 구분된다.
- [5] 한편, 트레일(TNF-related apoptosis inducing ligand; TRAIL)은 트레일 수용체와 결합하여 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 단백질이다. 트레일은 항암제로서 우수성이 입증되었지만, 트레일 트라이머로서 사멸 수용체와 결합하여 암세포를 특이적으로 사멸하고, 트레일 모노머로서는 불안정하고 사멸 수용체와 결합하는 활성이 거의 없는 것으로 알려졌으며, 임상실험에서 혈액 내의 불안정성과 빠른 소진이 문제점으로 드러났다.
- [6] 이에, 항암효과 단백질로서 개발된 트레일 단백질 자체의 불안정성과 오프타겟팅 문제를 해결하고, 트레일을 활성 트라이머 구조로 안정화시켜 암조직에 효과적으로 수송할 수 있는 약물전달 플랫폼의 개발이 필요한

상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커 및 인간 페리틴 중쇄 단편을 포함하는 융합 폴리펩타이드 및 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage)를 제공하고자 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커, 인간 페리틴 중쇄 단편 및 암 표적 펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드 및 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage)를 제공하고자 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체(단, 인간을 제외함)를 제공하고자 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편을 포함하는 융합 폴리펩타이드 및 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage)를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편 및 암 표적 펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드 및 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage)를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체(단, 인간을 제외함)를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명은 트레일 트라이머와 암표적 펩타이드를 멀티디스플레이하는 페리틴 나노케이지 및 이의 항암제로서의 용도에 관한 것으로서, 인간 페리틴 모노머

단편에 트라이머 구조로 트레일을 접합하고, 암표적 펩타이드로 암 표적성을 높인 트레일 융합 나노 단백질 개발에 대한 것이다. 본 발명에 따른 융합 단백질을 혈관으로 주사시 효과적으로 암에 타겟팅되어 트레일에 의한 암사멸이 효과적으로 이루어지고, 트레일 단백질의 불안전성과 오프타겟팅의 문제를 해결한 본 발명의 나노 융합 단백질은 안정적으로 트레일 트라이머를 암조직에 수송하므로, 이를 이용한 항암제 개발 가능성이 높다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 암 표적 페리틴 나노케이지 상에 발현되는 트레일 트라이머 융합단백질에 대해 나타낸다. A) 본 발명에서 제작한 암 표적 페리틴 나노케이지 상에 발현되는 트레일 트라이머 융합단백질(TRAIL-ATNC^{IL4rP})의 모식도를 나타낸다. B) 예상되는 TRAIL-ATNC^{IL4rP} 구조 모식도를 나타낸다. C) TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 3차구조를 컴퓨터로 시뮬레이션한 결과를 나타낸다. D) TRAIL, TRAIL-ATNC, TRAIL-ATNC^{IL4rP} 단백질의 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 수행한 결과를 나타낸다. E) TRAIL-ATNC^{IL4rP} 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다.
- [19] 도 2는 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 정제 및 분석한 결과를 나타낸다. A) 정제된 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 투과전자현미경(TEM) 분석 결과를 나타낸다. B) 정제된 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 동적 광 산란(DLS) 분석 결과를 나타낸다.
- [20] 도 3은 TRAIL-ATNC에 대한 TRAIL 수용체 결합능 분석 결과를 나타낸다.
- [21] 도 4는 TRAIL-ATNC의 세포 사멸 효과에 대한 분석 결과를 나타낸다. A) MDA-MB-231 세포에 TRAIL 또는 TRAIL-ATNC를 처리한 후, 세포 개수 측정 키트(KLD-001, Rockland)를 이용하여 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸다. B) TRAIL-ATNC 처리에 따른 세포사멸을 세포유속분석기로 측정한 결과를 나타낸다.
- [22] 도 5는 DR4 항체 또는 DR5 항체 처리 유무에 따른 TRAIL 및 TRAIL-ATNC의 세포 사멸 분석 결과를 나타낸다.
- [23] 도 6은 생쥐의 혈액 내에서 TRAIL, TRAIL-ATNC와 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 반감기 분석 결과를 나타낸다. Protein: 투여한 동일량의 단백질 밴드, control serum: 단백질을 투여하지 않는 혈청 단독, albumin (coomassie): 내부 대조군(internal control)으로서 알부민(albumin)을 쿠마시 블루 염색(coomassie blue staining)을 통해 확인하여 혈청 내의 단백질 존재를 확인하였다.
- [24] 도 7은 TRAIL, TRAIL-ATNC 및 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 종양 표적 능력 분석 결과를 나타낸다.
- [25] 도 8 및 도 9는 TRAIL, TRAIL-ATNC 및 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 종양 억제 효과 분석 결과를 나타낸다.
- [26] 도 10은 표적 펩타이드를 디스플레이하는 TRAIL-ATNC의 세포사멸성 분석 결과를 나타낸다.

- [27] 도 11은 TRAIL-ATNC에 디스플레이 된 표적 펩타이드의 표적성 분석 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [29] 바람직하게는, 상기 트리플 헬릭스(triple helix) 링커는 사람 체내에 존재하는 폐 표면활성제 연관 단백질 D(pulmonary surfactant-associate protein D; (human P35247)의 단백질 서열 중 자체적으로 트리플 헬릭스를 이룰 수 있는 아미노산 서열 (233-255)을 삽입하여 구성할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFP)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [30] 바람직하게는, 상기 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커는 통상적으로 나선(helical) 구조를 이루는 것으로 알려진 서열을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열(AEAAAKEAAK)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [31] 보다 바람직하게는, 상기 융합 폴리펩타이드는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [32]
- [33] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage)를 제공한다. 상세하게는, 상기 페리틴 나노케이지는 페리틴 외부 표면에 트레일이 트라이머(trimer) 형태로 융합될 수 있다.
- [34]
- [35] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편 및 암 표적 펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [36] 바람직하게는, 상기 융합 폴리펩타이드는 상기 인간 페리틴 중쇄 단편 및 상기 암 표적 펩타이드 사이에 MMP2 절단 사이트가 추가로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는, 상기 MMP2 절단 사이트는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열(GPLGLAG)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 바람직하게는, 상기 트리플 헬릭스(triple helix) 링커는 사람 체내에 존재하는 폐 표면활성제 연관 단백질 D(pulmonary surfactant-associate protein D; (human P35247)의 단백질 서열 중 자체적으로 트리플 헬릭스를 이룰 수 있는 아미노산 서열 (233-255)을 삽입하여 구성할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFP)로

이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[38] 바람직하게는, 상기 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커는 통상적으로 나선(helical) 구조를 이루는 것으로 알려진 서열을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열(AEAAAKEAAAK)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 바람직하게는, 상기 암 표적 펩타이드는 인터루킨 4 수용체 결합 펩타이드(IL4rP) 또는 CD44 결합 펩타이드(CD44v6P) 일 수 있고, 보다 바람직하게는, 상기 인터루킨 4 수용체 결합 펩타이드(IL4rP)는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열(CRKRLDRNC)로 이루어지고, 상기 CD44 결합 펩타이드(CD44v6P)는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열(CNLNTIDTC)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[40] 보다 바람직하게는, 상기 융합 폴리펩타이드는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[41]

[42] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage)를 제공한다. 상세하게는, 상기 페리틴 나노케이지는 페리틴 외부 표면에 트레일이 트라이머(trimer) 형태로 융합되고, 상기 페리틴 나노케이지의 외부로 암 표적 펩타이드가 돌출되어 있을 수 있다.

[43]

[44] 본 발명에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편(114-281)은 TRAIL 수용체 결합 도메인을 포함한다.

[45]

[46] 본 발명에 있어서, ‘페리틴(ferritin)’은 세포내 단백질의 일종으로 철을 저장하고, 방출하는 역할을 한다. 페리틴은 일반적으로 생체 내에서 속이 빈 구형의 케이지(cage) 형태를 하고 있으며, 상기 케이지는 24개의 페리틴 모노머(monomer)로 구성되며, 상기 페리틴 모노머는 그 구조에 따라 중쇄(heavy chain)와 경쇄(light chain)로 구분된다. 본 발명에서 상기 페리틴 단백질은 이들 각각이 단위체로써 케이지(cage) 형태의 복합 단백질을 형성할 수 있는 활성이 있는 단백질이라면 제한 없이 사용될 수 있다.

[47] 본 발명에서는, TRAIL의 삼중구조 유지를 돕기 위하여 페리틴 N 말단의 14개의 아미노산 서열을 삭제한, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편(15-161)을 사용하였다.

[48]

[49] 본 발명에 있어서, “나노케이지(nanocage)”는 저분자량 단일체들의 정밀한 자가조립 성질에 의하여 형성되며, 내부에 공간을 가지는 단백질로 된 케이지이다. 바이러스 캡시드(capsid) 단백질, 페리틴, 열 충격 단백질(heat shock protein), Dps 단백질이 이에 해당된다. 본 발명의 나노케이지(nanocage)는 본 발명의 융합 폴리펩타이드를 상기 나노케이지를 구성하는 단일체(모노머,

monomer)로 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 사용되는 용어인 “자가조립(self-assembly)”이란 어떤 분자들이 외부의 특별한 자극이나 인위적인 유도없이, 스스로 알아서 특정한 나노구조를 형성하는 성질을 의미한다.

[50] 본 발명의 나노케이지는 본 발명의 융합 폴리펩타이드가 단위체로서 규칙적으로 배열된 복합 단백질일 수 있으며, 더 바람직하게는 본 발명의 융합 폴리펩타이드 24개가 3차원적으로 규칙적으로 배열하여 형성된 것일 수 있다.

[51]

[52] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[53] 상기 “폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.

[54] 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다.

[55] 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.

[56]

[57] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[58]

[59] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체(단, 인간을 제외함)를 제공한다.

[60] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[61] 본 발명에서 있어서, “벡터”는 숙주 세포 내에서 삽입된 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하는 것으로서, 당업계에 공지된 통상의 발현벡터에 본 발명의 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 발현벡터는 일반적으로 숙주세포에서 증식할 수 있는 복제원점, 발현을

조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(예. 프로모터, 인핸서 등), 선택 마커(selective marker) 및 발현 조절 서열과 작동가능하게 연결된 본 발명의 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

형질전환체는 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 것일 수 있다.

- [62] 바람직하게는 형질전환체는 본 발명의 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포에 도입하여 수득할 수 있다.

- [63] 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

- [64] 바람직하게는, 상기 암은 폐암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 또는 편평상피세포암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [65] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

- [66] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을

의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg 용량으로 투여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[67] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[68]

[69] <실험예>

[70] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[71]

[72] 1. TRAIL-ATNC^{UL4rP} DNA 제작

[73] 인간 페리틴 중쇄(15-161) 유전자를 pET-28a 플라스미드에 인간 TRAIL(114-281), 트리플 헬릭스(Triple helix) 유전자, 리지드 헬릭스(rigid helix) 유전자, 인간 페리틴 중쇄(15-161) 유전자, MMP2 절단부위 유전자, 인터루킨4 수용체에 결합하는 펩타이드의 유전자 서열을 유전자 재조합 공법에 따라 삽입하였다. 자유도의 증가를 위해 TRAIL(114-281)과 트리플 헬릭스(Triple helix) 유전자 사이에 GGGSG를 인코딩하는 유전자를, 트리플 헬릭스(Triple helix)와 리지드 헬릭스(rigid helix) 유전자 사이에 GGGG를 인코딩하는 유전자를 삽입하였다. 인간 페리틴 중쇄 유전자와 인간 TRAIL 유전자는 인간의 mRNA로부터 역전사된 cDNA 라이브러리에서 각 유전자의 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하여 얻었다. 그 외의 유전자는 화학적으로 합성하여 사용하였다.

[74]

[75] 2. TRAIL-ATNC^{UL4rP} 와 TRAIL-ATNC 단백질 정제

[76] TRAIL-ATNC^{UL4rP} 서열이 삽입된 플라스미드로 형질전환 된 대장균(BL21)을 LB 배지에 접종하여 37°C 진탕배양기에서 길렀다. OD₆₀₀ 값이 0.5가 되었을 때, IPTG를 100uM이 되도록 배지에 첨가하여 단백질이 과발현되도록 유도하였다. IPTG가 첨가된 이후에는 18°C의 진탕배양기에서 하룻밤 기르고 원심분리하여 대장균만 모았다. Lysis buffer를 첨가한 대장균을 초음파로 분쇄하였다.

원심분리로 모은 상층액(용균액)을 Ni-NTA bead와 1시간 동안 섞었다. 크로마토그래피 컬럼으로 bead와 결합하지 않은 용균액은 버리고, 이미다졸이 30mM 포함된 wash buffer로 bead를 씻었다. 0.1% Triton X-114가 포함된 Wash buffer로 대장균의 엔도톡신(endotoxin)을 제거하고 wash buffer로 TritonX-114를 제거하였다. 이미다졸이 100mM, 200mM, 300mM 포함된 elution buffer를 사용하여 단백질을 용출, 정제하였다. SDS PAGE로 95% 이상의 균질한 정제 단백질을 회수하였다.

[77]

[78] <실시에 1> 암 표적 페리틴 나노케이지 상에 발현되는 트레일 트라이머

[79] 인간의 페리틴 중쇄(heavy chain) 단편 (15-161)의 N 말단에, TRAIL 수용체 결합 도메인을 가지는 인간 TRAIL (114-281)을 유전적으로 결합하였으며, TRAIL과 페리틴 사이에 링커(linker)를 달았다. 이때 TRAIL의 삼중구조 유지를 돕기 위하여 페리틴 N 말단의 14개의 아미노산 서열을 삭제함으로써 30 Å 정도의 거리가 있는 삼중 접합점에 리지드 헬릭스(rigid helix) 구조를 세우고 그 위에 자체적으로 트리플 헬릭스(Triple helix)를 이루는 성질을 가진 트리플 헬릭스(Triple helix)를 삽입한 후 TRAIL (114-281)을 삽입하였다. 헬릭스와 단백질 도메인 사이는 GGGSG와 같은 유연성 링커(flexible linker)를 삽입하여 자유도를 부과하였다. 이를 TRAIL-ATNC (Active Trimer Nanocage)라고 명명하였다.

[80] 페리틴의 다섯번째 헬릭스가 제거된 페리틴의 탄소 말단은 외부로 노출되므로 이곳에 인터루킨4 수용체에 결합하는 펩타이드(IL4rP)를 결합시킴으로써 페리틴 나노케이지가 생체 내에서 종양 표적 능력을 지니도록 하였고, 그 사이에 MMP2 효소에 의해 절단되는 서열을 넣음으로써 종양의 근처에서는 페리틴 나노케이지가 인터루킨4 수용체에 결합한 후에, 그 부분이 잘림으로써 자유롭게 된 페리틴 나노케이지가 TRAIL 수용체에도 결합할 수 있도록 함으로써 타겟팅 펩타이드에 의해 페리틴의 작용이 저해 받지 않도록 디자인하였다. 펩타이드가 부착된 TRAIL-ATNC를 TRAIL-ATNC^{IL4rP}라고 명명하였다(도 1A). 한편, 예상되는 TRAIL-ATNC^{IL4rP} 구조 모식도는 도 1B에 나타냈다.

[81] 또한, TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 3차 구조를 컴퓨터로 시뮬레이션한 결과, TRAIL이 페리틴 외부에서 멀티머로 폴딩(folding) 할 수 있음을 예측하였다. 이때 모델링 프로그램으로 MODELLAR v12를 사용하였다(도 1C).

[82] SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 TRAIL, TRAIL-ATNC, TRAIL-ATNC^{IL4rP} 단백질의 전기영동을 수행하고, 쿠마시 브릴라이트 블루로 젤을 염색하여 단백질 밴드를 확인하였을 때, 각 단백질의 이론적인 단량체 크기와 같은 위치에서 단백질 밴드를 확인함으로써 대장균에서의 안정적인 발현 및 정제를 검증하였다. TRAIL-ATNC와 TRAIL-ATNC^{IL4rP} 경우, 대장균 1L를 배양하였을 때 약 1-2 mg 정도의 정제된 단백질을 안정적으로 회수하였다. 또한, In vitro에서 수행하는 TRAIL 수용체 (DR5)와의 결합력 실험이나 암세포 사멸

실험에서 TRAIL-ATNC와 TRAIL-ATNC^{IL4rP} 간의 의미 있는 차이는 없었다(도 1D).

[83]

[84] <실시예 2> TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 정제 및 분석

[85] Ni-NTA bead를 이용하여 TRAIL-ATNC가 과발현된 대장균에서 TRAIL-ATNC^{IL4rP}를 정제하였다. 정제한 단백질이 페리틴 나노케이지를 이루는지 확인하기 위하여 투과전자현미경(TEM) 분석을 수행하여서, TRAIL-ATNC^{IL4rP}가 나노케이지를 이루는 것을 확인하였다(도 2A). 그리고 동적 광 산란(DLS) 분석을 수행하여서 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 크기가 약 21nm인 것을 확인하였다(도 2B).

[86]

[87] <실시예 3> TRAIL-ATNC에 대한 TRAIL 수용체 결합능 분석

[88] TRAIL 수용체 단백질 Dr5를 NHS-EDC로 활성화된 표면공명플라스마(SPR)용 금센서칩 표면에 흘림으로써 결합시키고, 에탄올아민(Ethanolamine)으로 블락킹하였다. TBS에 녹아있는 TRAIL-ATNC를 8.33nM 부터 절반씩 0.52nM 까지, TRAIL을 400nM 부터 절반씩 25nM 까지 각각 TRAIL 수용체가 결합된 금센서칩에 흘려서 결합 kinetics를 분석하였다. Dr5가 코팅되어 있지 않은 오른쪽 채널을 대조군(reference)으로 사용하였다.

[89] TRAIL을 부착한 나노케이지 TRAIL-ATNC는 TRAIL 단독에 비해 약 10배 더 높은 k_{on} 값과 10배 더 낮은 k_{off} 값을 보였다. TRAIL-ATNC가 TRAIL에 비해 TRAIL 수용체에 더 빠르게 결합하며, 결합한 후 해리가 늦게 되는 stable complex를 이루는 것을 확인하였다. 총체적인 해리상수 (K_D) 값은 TRAIL-ATNC가 TRAIL에 비해 약 100배 더 낮았는데, 이것은 TRAIL 수용체에 대한 TRAIL-ATNC의 결합능력이 TRAIL에 비해 약 100배 증가하였음을 나타낸다(도 3 및 표 1).

[90] [표1]

	$k_{on} (M^{-1}S^{-1})$	$k_{off} (S^{-1})$	$K_D (M)$
TRAIL	2.57×10^4	1.50×10^{-3}	58.26×10^{-8}
TRAIL-ATNC	5.29×10^5	2.17×10^{-4}	41.07×10^{-11}

[91]

[92] <실시예 4> TRAIL 및 TRAIL-ATNC 처리에 따른 세포 사멸 분석

[93] MDA-MB-231 세포를 5×10^3 개씩 96 웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 심고 37°C에서 DMEM 배지(2% FBS)에서 배양하였다. 24시간 후에 modified PBS(500mM NaCl, 1mM DTT)에 녹아있는 TRAIL, TRAIL-ATNC 각각의 단백질을 5nM 부터 절반씩 0.04nM 까지 세포에 처리하고 다시 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 후에 세포 개수 측정 키트(KLD-001, Rockland)를 이용하여 세포 생존능(viability)을 측정하였다. 이때, 단백질을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 100%로 놓았을 때 상대적인 세포생존률을 측정하였다.

- [94] TRAIL에 비하여 페리틴 나노케이지 외부에 TRAIL이 전시되어 있는 TRAIL-ATNC(IC₅₀=0.05 nM)는 TRAIL(IC₅₀=0.4nM)에 비하여 10배 정도의 높은 세포독성을 보여주었다(도 4A).
- [95] 또한, 이러한 TRAIL-ATNC 세포사멸의 증대효과는 Annexin V-FITC와 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide)로 세포를 염색하여 세포의 사멸시 세포바깥막으로 노출된 포스파티딜세린을 세포유속분석기로 측정하는 방법으로 다시 검증하였다(도 4B).
- [96]
- [97] <실시에 5> DR4 항체 또는 DR5 항체 처리 유무에 따른 TRAIL 및 TRAIL-ATNC의 세포 사멸 분석
- [98] MDA-MB-231 세포를 1×10⁵개씩 6 웰 플레이트(well plate; 35 mm)의 각 웰에 심고 37°C 에서 배양하였다. 24시간 후에 DR4 항체(200 ng/ml)와 DR5 항체(5 μg/ml), 또는 대조군 항체를 각각, 혹은 동시에 세포에 처리하였다. 1시간 동안 37°C에서 배양 후, modified PBS(500 mM NaCl, 1 mM DTT)에 녹아있는 TRAIL, TRAIL-ATNC 각각의 단백질을 2.5 nM 혹은 0.3 nM로 세포에 처리하고 3시간 동안 37°C에서 배양하였다. 트립신으로 세포를 떼어내고 Annexin V-FITC와 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide)로 세포를 염색하고 세포유속분석기로 세포의 사멸 수준을 분석하였다.
- [99] TRAIL과 TRAIL-ATNC 처리에 의한 세포사멸은 DR4 항체나 DR5 항체를 각각 처리하였을 때에는 저해되지 않았으나, 두 항체를 동시에 처리한 그룹에서는 TRAIL 혹은 TRAIL-ATNC의 의한 세포 사멸이 저해되었다. 이 결과를 통해 TRAIL과 같이 TRAIL-ATNC도 DR4 및 DR5와의 특이적인 결합에 의해 세포사멸을 유도함을 확인하였다(도 5).
- [100]
- [101] <실시에 6> 생쥐의 혈액 내에서 TRAIL, TRAIL-ATNC 및 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 반감기 분석
- [102] 식염수(Saline)에 녹아있는 native TRAIL(10μg/ml), TRAIL-ATNC(1.0mg/ml), TRAIL-ATNC^{IL4rP}(1.0mg/ml) 단백질을 각각 200μl씩 각각의 BALB/c 야생형 생쥐에 안와정맥으로 주사하고 5분, 15분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 후에 혈액을 채취하였다. 식염수(Saline)만 동일한 양으로 안와정맥에 주사한 생쥐는 24시간 후에 혈액을 채취하였다. 혈액에서 혈청을 얻어서 SDS로 분획한 후 TRAIL 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [103] 식염수(Saline)만 투여한 군(serum only) 쥐에서는 TRAIL 항체에 반응하는 밴드가 검출되지 않았으므로 보여지는 단백질은 크기를 비교할 때 단백질(TRAIL, TRAIL-ATNC 또는 TRAIL-ATNC^{IL4rP}) 혹은 그 분해산물(degraded product)로 추정된다. 각 시간별 검출된 단백질 밴드의 굵기를 기준으로 TRAIL, TRAIL-ATNC와 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 반감기를 계산하였다.
- [104] 그 결과, 생쥐의 혈액 내에서 TRAIL의 반감기는 약 3.5분이었으나,

TRAIL-ATNC와 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 반감기는 각각 약 56분과 53분으로 15배 이상 증가한 안정성을 보여주었다. 문헌에 의하면 TRAIL 단독 단백질의 설치류(rodent)에서의 반감기는 3-5분, 사람에서의 반감기는 약 30분으로 조사되었다. 따라서 TRAIL-ATNC와 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 인체 내에서의 반감기도 증가할 것으로 예상된다. 24시간 이후에는 TRAIL, TRAIL-ATNC 그리고 TRAIL-ATNC^{IL4rP} 모두 완전히 혈액에서 사라졌다. Protein은 투여한 동일량의 단백질 밴드이고, control serum은 단백질을 투여하지 않는 혈청 단백을 나타낸다. albumin (coomassie)는 내부 대조군(internal control)으로서 알부민(albumin)을 쿠마시 블루 염색(coomassie blue staining)을 통해 확인하여 혈청 내의 단백질 존재를 확인하였다.

[105]

[106] <실시예 7> TRAIL, TRAIL-ATNC 및 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 종양 표적 능력 분석

[107] PBS 100 μ l에 담긴 MDA-MB-231 세포 1 $\times$ 10⁶개를 6주령이 된 BALB/c 면역결핍 생쥐의 오른쪽 허벅지에 피하주사 하였다. 종양의 크기가 100mm³ 가량 되었을 때, FPI-774로 표지되어 식염수에 녹아 있는 TRAIL(0.5mg/ml), TRAIL-ATNC(1.0mg/ml), TRAIL-ATNC^{IL4rP}(1.0mg/ml) 단백질을 각각 200 μ l씩 각각의 생쥐에 꼬리정맥으로 주사하였다.

[108] IVIS 형광 이미징 시스템을 사용하여 주사 후 1시간, 6시간, 12시간, 24시간의 단백질의 생체 내 분포를 조사하였다. 그리고 24시간 후에 생쥐를 희생시키고 종양, 심장, 폐, 간, 신장, 비장을 꺼내어 기관 내 단백질이 얼마나 남아있는지를 조사하였다.

[109] TRAIL과 TRAIL-ATNC 단백질의 경우, 종양 표적 능력이 없었고 신장에서 축적됨을 관찰하였다. TRAIL-ATNC는 EPR 효과에 의해 TRAIL과 비교하여 생체 내 종양 표적 능력이 증가하였으나 큰 차이가 없었다. 그러나 표적 펩타이드(IL4R 결합 펩타이드: IL4rP)를 첨가한 TRAIL-ATNC^{IL4rP}은 생체 내 종양 표적 능력이 TRAIL, TRAIL-ATNC에 비하여 크게 증가하였음을 알 수 있었다(도 7).

[110]

[111] <실시예 8> TRAIL, TRAIL-ATNC 및 TRAIL-ATNC^{IL4rP}의 종양 억제 효과 분석

[112] PBS 100 μ l에 담긴 MDA-MB-231 세포 3 $\times$ 10⁶개를 6주령이 된 BALB/c 면역결핍 생쥐의 오른쪽 허벅지에 피하주사 하였다. 종양의 크기가 100mm³ 가량 되었을 때, 무작위로 4그룹으로 나누었다. 각각의 그룹에 식염수, 식염수에 녹아있는 TRAIL(0.5mg/ml), TRAIL-ATNC^{IL4rP}(1.0mg/ml), Ferritin(1.0mg/ml) 단백질을 각각 200 μ l씩 각각의 생쥐에 꼬리정맥으로 주사하였다. 일주일에 3회씩 총 8회 주사하면서 종양의 크기와 생쥐의 몸무게를 측정하였다. 상기와 같은 방법으로 항암효과를 측정하였을 때 무작위로 나눈 각각의 그룹에 식염수, 식염수에 녹아있는 TRAIL(0.5mg/ml), TRAIL-ATNC(1.0mg/ml), Ferritin(1.0mg/ml) 단백질을 각각 200 μ l씩 각각의 생쥐에 꼬리정맥으로 주사하였다. 3주가 지난 후 생쥐 중

일부를 희생하여 종양을 적출하고 종양의 무게를 측정하였다. 또한, 적출한 종양을 얇게 절편하여 박편 슬라이드를 만들고, TUNEL assay를 수행하였다.

[113] 그 결과, TRAIL 단독으로도 대조군에 비하여 종양의 유의하게 성장이 저해되었다($p < 0.05$). TRAIL-ATNC^{IL4rP}는 대조군 뿐만 아니라($p < 0.0001$), TRAIL에 비해서도($p < 0.001$) 유의하게 종양의 성장을 저해하였으며(도 8A), 종양의 무게도 훨씬 작았고(도 8B), 종양세포사멸도 TRAIL이나 대조군보다 더욱 효과적으로 유도하였다(도 8E). 반면 타겟팅 펩타이드가 없는 TRAIL-ATNC의 경우는 항암효과가 미미하였다(도 8D). TRAIL, TRAIL-ATNC, TRAIL-ATNC^{IL4rP} 모두 몸무게의 변화는 없었으며(도 8C), 신장에 당분간 축적됨에도 불구하고 신장 독성은 나타나지 않았다(BUN, Creatinine level 측정).

[114] 이 결과를 통하여 TRAIL-ATNC가 in vitro에서의 세포사멸효과에서는 TRAIL-ATNC^{IL4rP}와 차이가 없으나 동물실험에서는 TRAIL-ATNC에 타겟팅 펩타이드를 부착하는 것이 종양타겟팅에 중요하며, 이를 통해 항암효과를 결정지을 수 있다는 것을 확인하였다.

[115]

[116] 또한, BxPC3-Luc 세포(luminescence로 암세포 성장이 표지됨) 2×10^6 개를 6주령이 된 BALB/c 면역결핍 생쥐의 췌장에 심어서 동소이식모델(orthotopic model)을 만들었다. BLI(Bio-luminescence intensity)를 통해 종양의 크기가 적당히 자랐다고 생각되었을 때 무작위로 4그룹으로 나누고 각각의 그룹에 식염수(Saline), 식염수(Saline)에 녹아있는 TRAIL (0.5 mg/ml), TRAIL-ATNC^{IL4rP} (0.8 mg/ml), GFP-Ferritin (0.5 mg/ml) 단백질을 각각 200 μ l씩 각각의 생쥐에 꼬리정맥으로 주사하였다. 2일에 1회씩 총 8회 주사하였고, 3일에 한 번씩 BLI를 통해 종양의 상대적 크기를 비교하였다. 8회째 주사 후 2일 후에 마지막으로 종양의 BLI를 찍고, 생쥐들을 희생하여 종양을 적출하고 종양의 무게를 측정하였다.

[117] 그 결과, TRAIL-ATNC^{IL4rP}는 Control 뿐만 아니라($p < 0.01$), TRAIL에 비해서도($p < 0.05$) 유의하게 종양의 성장을 저해하였으며 종양의 무게도 감소하였다. 이 결과를 통하여 TRAIL-ATNC^{IL4rP}가 이종이식된 유방암 종양 모델 뿐만 아니라 실제 기관에 종양이 자란 췌장암 동소위(orthotopic) 모델에서도 항암 효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 9).

[118]

[119] <실시예 9> 표적 펩타이드를 디스플레이하는 TRAIL-ATNC의 세포사멸성 조사

[120] MDA-MB-231 세포를 5×10^3 개씩 96well plate의 각 well에 심고 37°C에서 DMEM 배지(2% FBS)에 배양하였다. 24시간 후에 modified PBS (500 mM NaCl, 1 mM DTT)에 녹아있는 TRAIL, TRAIL-ATNC, TRAIL-ATNC^{IL4rP}, TRAIL-ATNC^{CD44v6P} 각각의 단백질을 10 nM부터 절반씩 세포에 처리하고 다시 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 후에 세포 개수 측정 키트 (KLD-001, Rockland)를

이용하여 세포 생존능(viability)을 측정하였다. 이때, 단백질을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 100%로 놓았을 때 상대적인 세포생존률을 측정하였다.

- [121] 그 결과, TRAIL 에 비하여 페리틴 나노케이지 외부에 TRAIL이 전시되어 있는 TRAIL-ATNC ($IC_{50}=0.11$ nM)는 TRAIL ($IC_{50}=1.6$ nM) 에 비하여 10배 정도의 높은 세포독성을 보여주었다. 표적 펩타이드를 접합한 TRAIL-ATNC^{IL4rP} ($IC_{50}=0.48$ nM), TRAIL-ATNC^{CD44v6P} ($IC_{50}=0.36$ nM)는 표적 펩타이드 종류와 상관없이 TRAIL 보다 높은 세포독성을 보였다(도 10).

[122]

- [123] <실시예 10> TRAIL-ATNC에 디스플레이 된 표적 펩타이드의 표적성 조사

- [124] 인터루킨 4 수용체(IL4R) 단백질을 NHS-EDC로 활성화된 표면공명플라스마(SPR)용 금센서칩 표면에 결합시키고 TBS에 녹아있는 TRAIL-ATNC^{IL4rP}을 41.67 nM부터 절반씩 0.65 nM까지 IL4R이 결합된 금센서칩에 흘려서 결합 kinetics를 분석하였다. IL4R가 coating 되어 있지 않은 오른쪽 채널을 reference로 사용하였다.

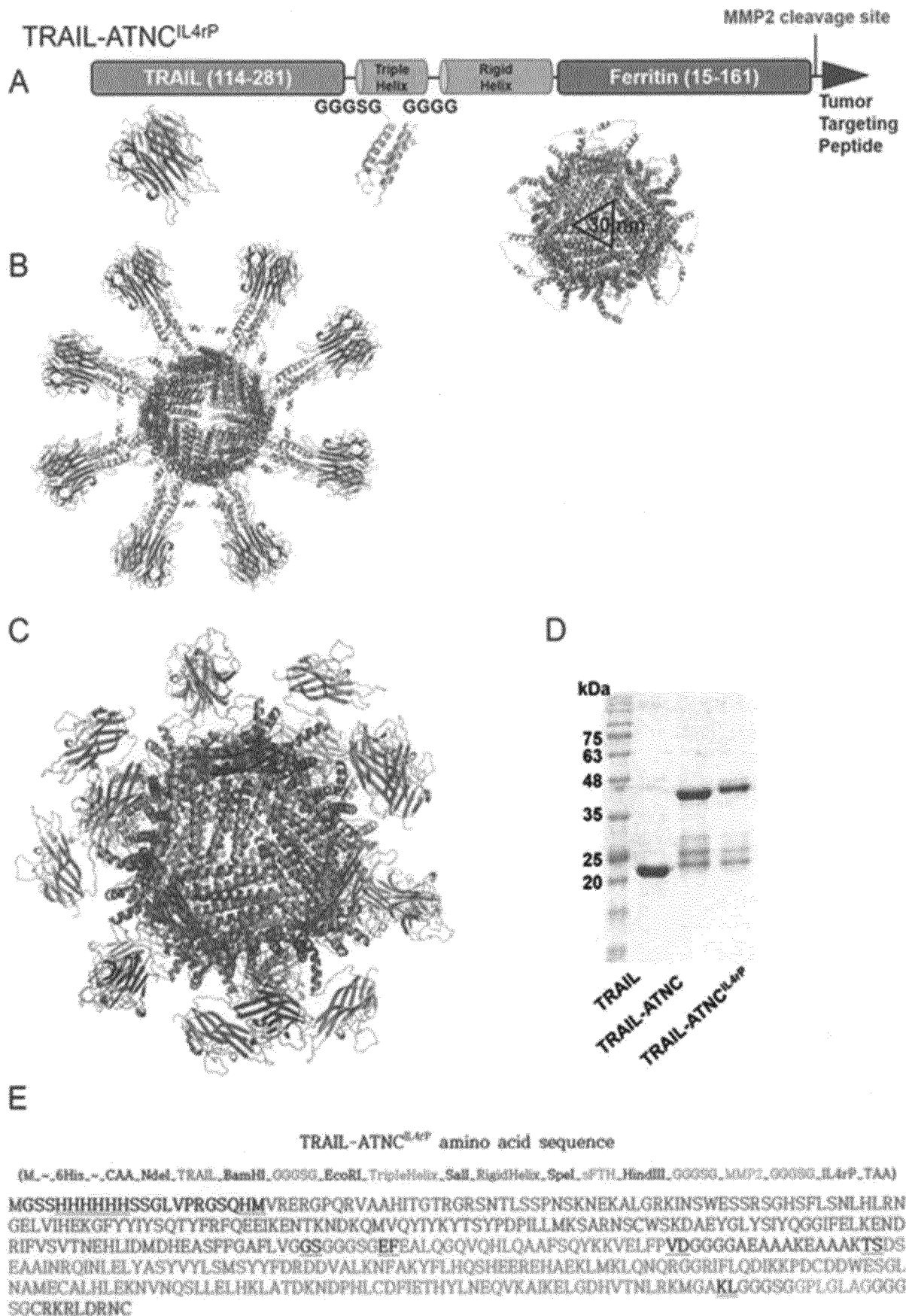
- [125] 그 결과, IL4R에 결합할 수 있는 펩타이드를 부착한 TRAIL-ATNC인 TRAIL-ATNC^{IL4rP}는 IL4R에 대해 해리상수 (K_D) 값 37.67 nM을 보였다. 이러한 결과는 TRAIL-ATNC^{IL4rP}에 부착된 표적 펩타이드 IL4rP가 TRAIL에 의해 방해받지 않고 IL4R에 특이적으로 결합할 수 있음을 나타낸다(도 11).

청구범위

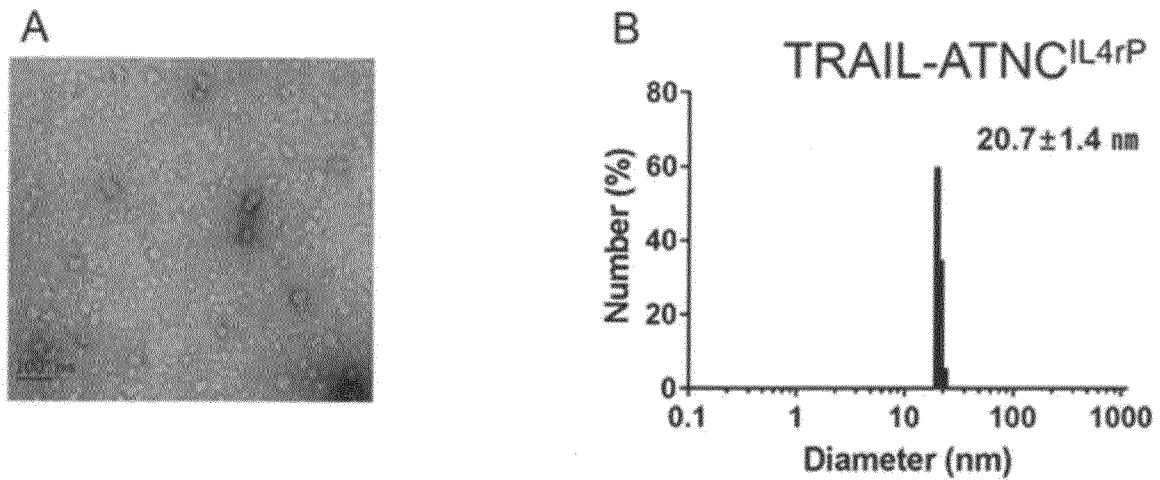
- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편을 포함하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 트리플 헬릭스(triple helix) 링커는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage).
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 페리틴 나노케이지는 페리틴 외부 표면에 트레일이 트라이머(trimer) 형태로 융합된 것을 특징으로 하는 페리틴 나노케이지(nanocage).
- [청구항 7] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 트레일(TRAIL) 단편, 트리플 헬릭스(triple helix) 링커, 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 인간 페리틴 중쇄 단편 및 암 표적 펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드는 상기 인간 페리틴 중쇄 단편 및 상기 암 표적 펩타이드 사이에 MMP2 절단 사이트가 추가로 포함되는 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 트리플 헬릭스(triple helix) 링커는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 리지드 헬릭스(rigid helix) 링커는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 암 표적 펩타이드는 인터루킨 4 수용체 결합 펩타이드(IL4rP) 또는 CD44 결합 펩타이드(CD44v6P) 인 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 인터루킨 4 수용체 결합 펩타이드(IL4rP)는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 CD44 결합 펩타이드(CD44v6P)는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로

- 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 MMP2 절단 사이트는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 14] 제7항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩타이드.
- [청구항 15] 제7항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 페리틴 나노케이지(nanocage).
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 페리틴 나노케이지는 페리틴 외부 표면에 트레일이 트라이머(trimer) 형태로 융합되고, 상기 페리틴 나노케이지의 외부로 암 표적 펩타이드가 돌출되어 있는 것을 특징으로 하는 페리틴 나노케이지(nanocage).
- [청구항 17] 제1항 내지 제4항 및 제7항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 18] 제17항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 19] 제18항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체(단, 인간을 제외함).
- [청구항 20] 제1항 내지 제4항 및 제7항 내지 제14항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 암은 폐암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 및 편평상피세포암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

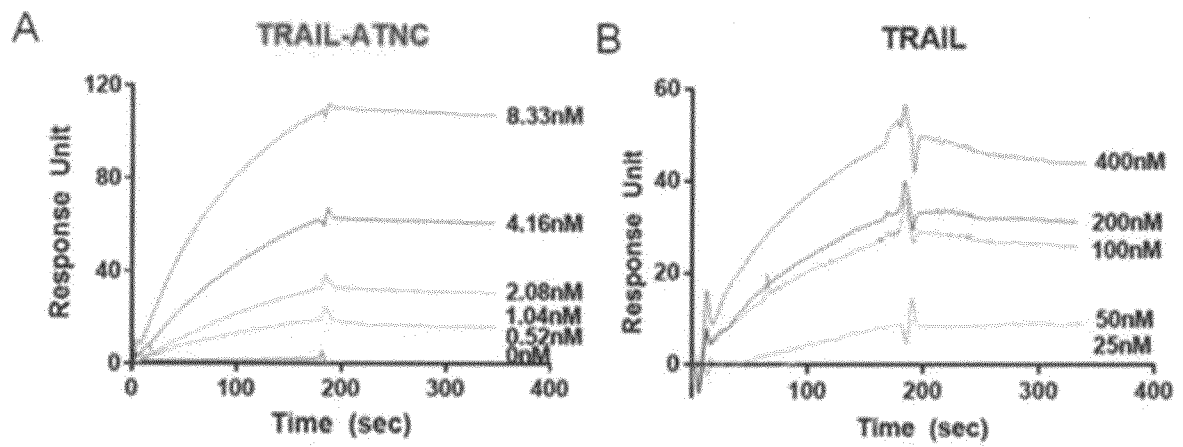
[도 1]



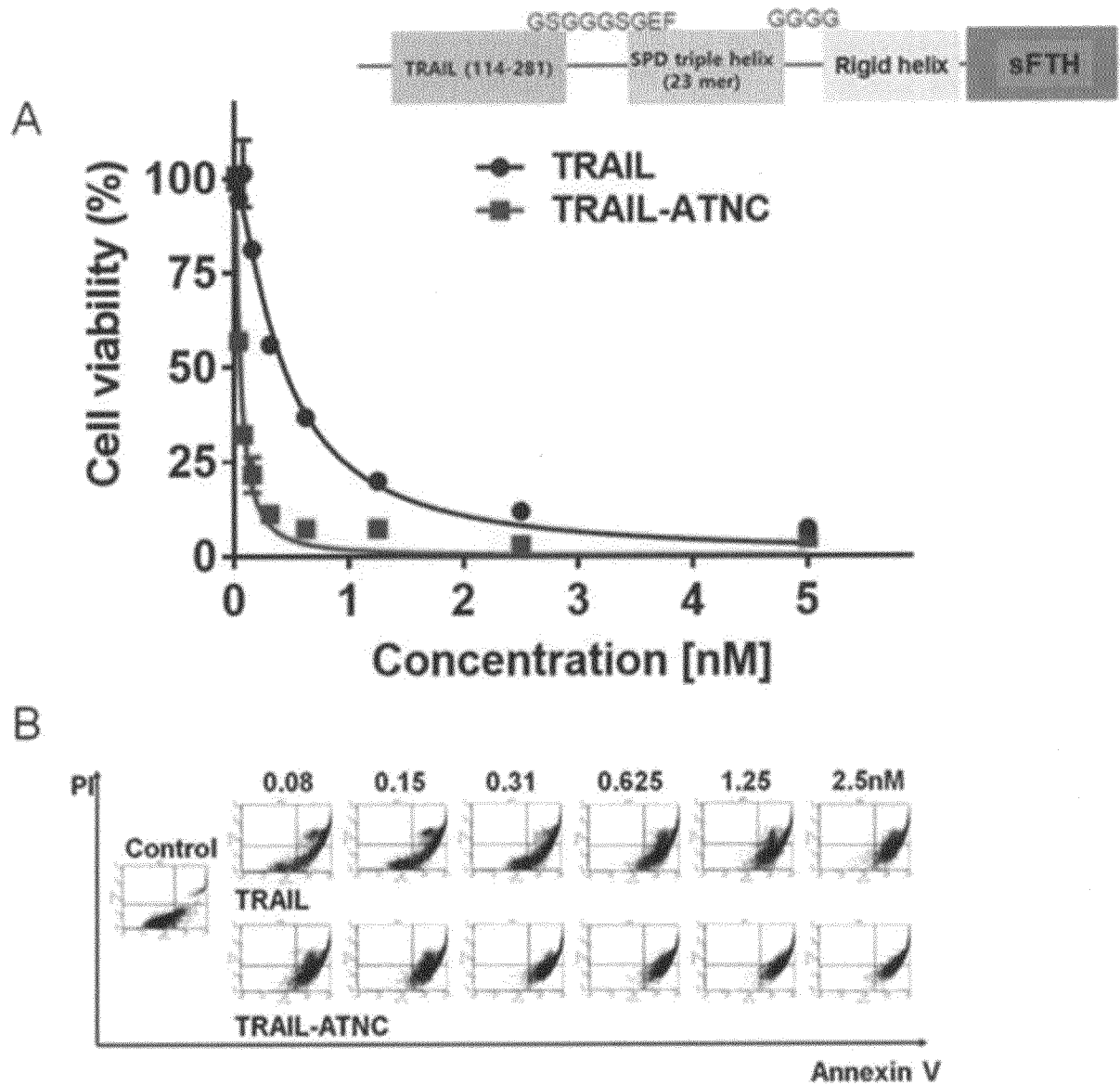
[도 2]



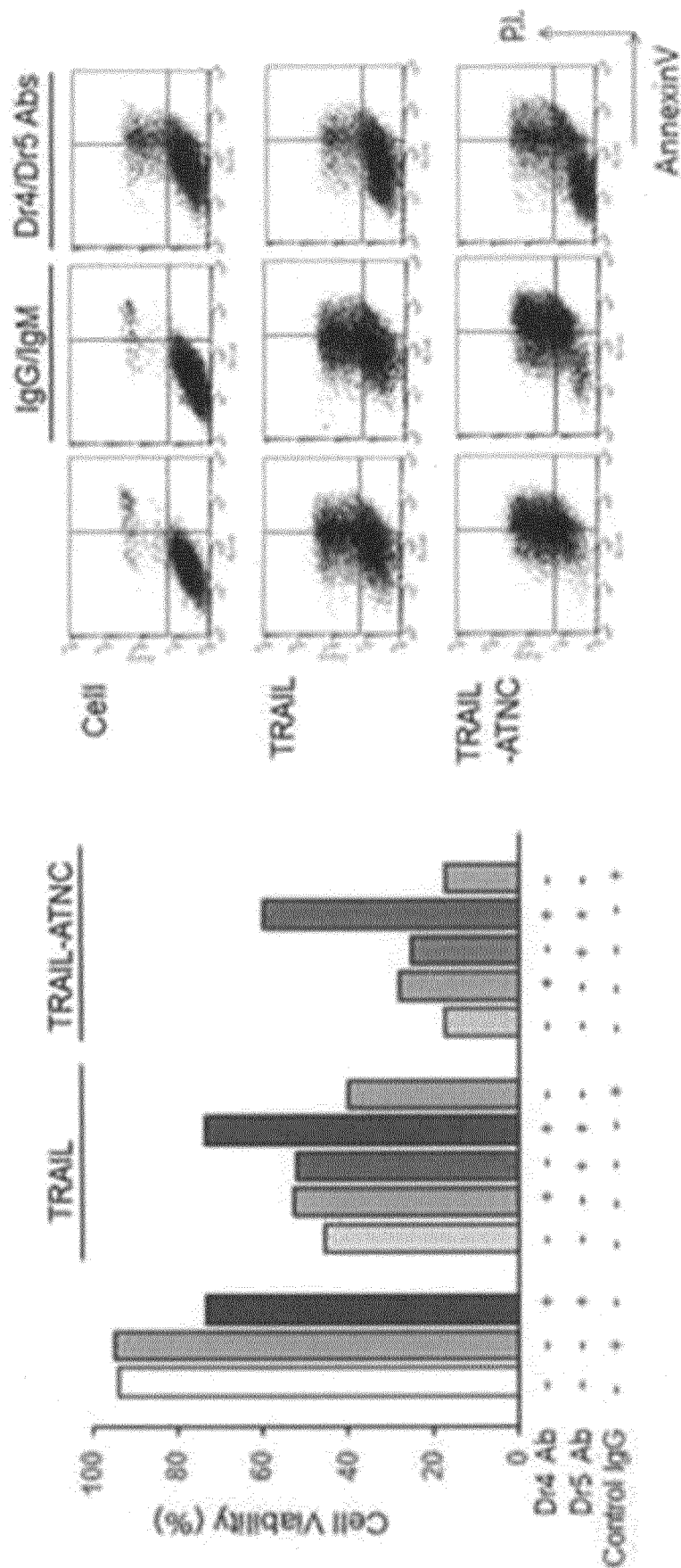
[도 3]



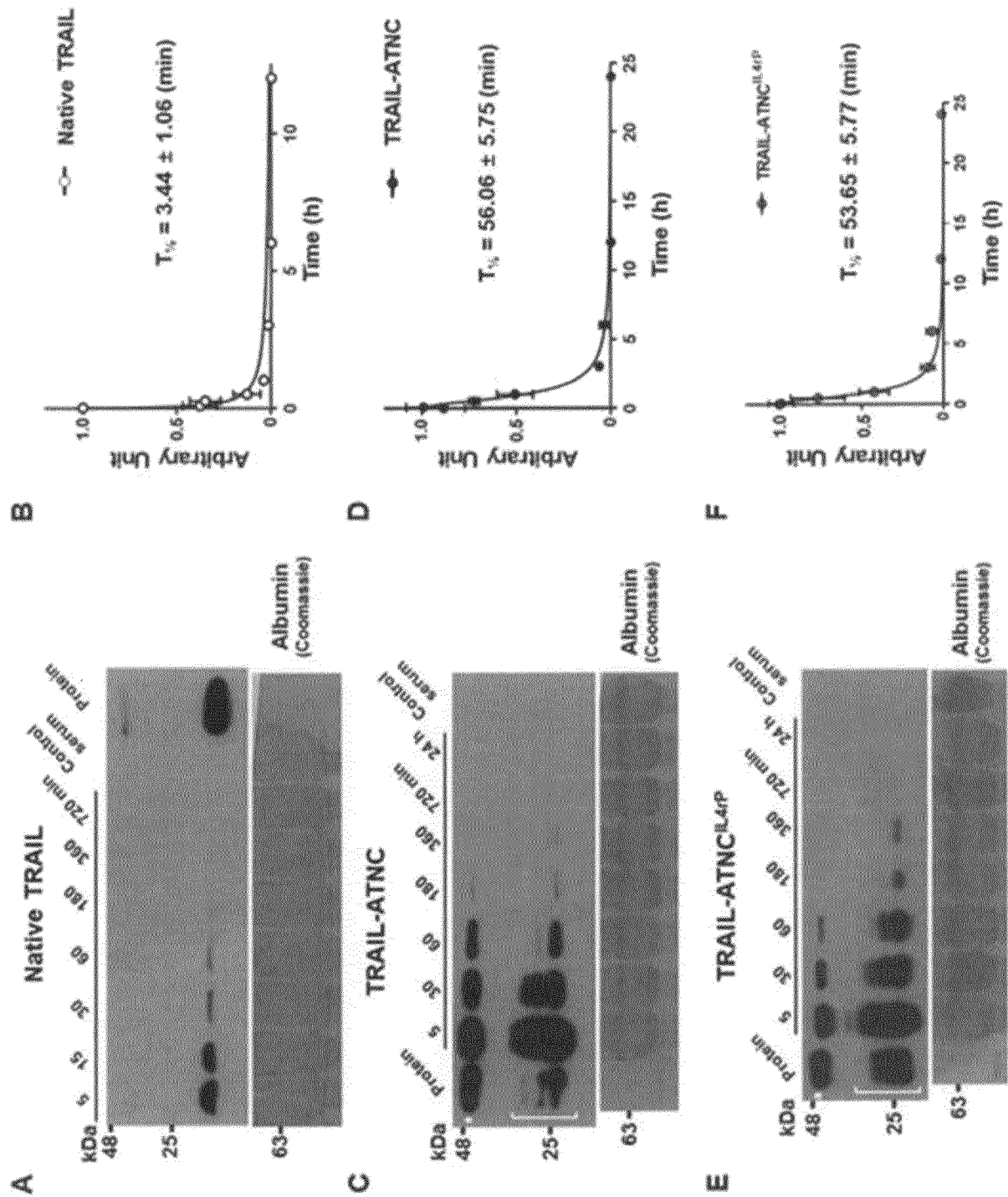
[도 4]



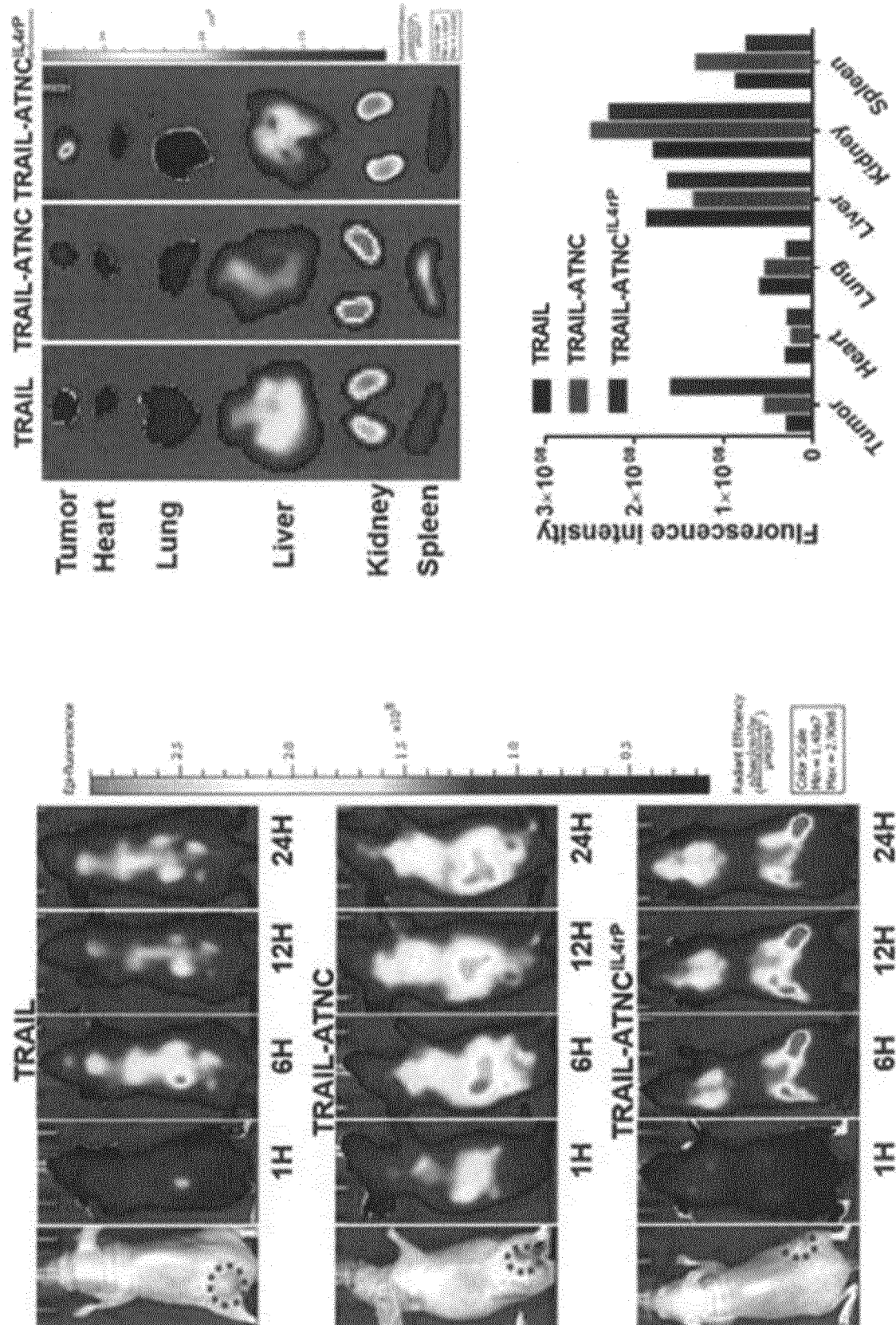
[도 5]



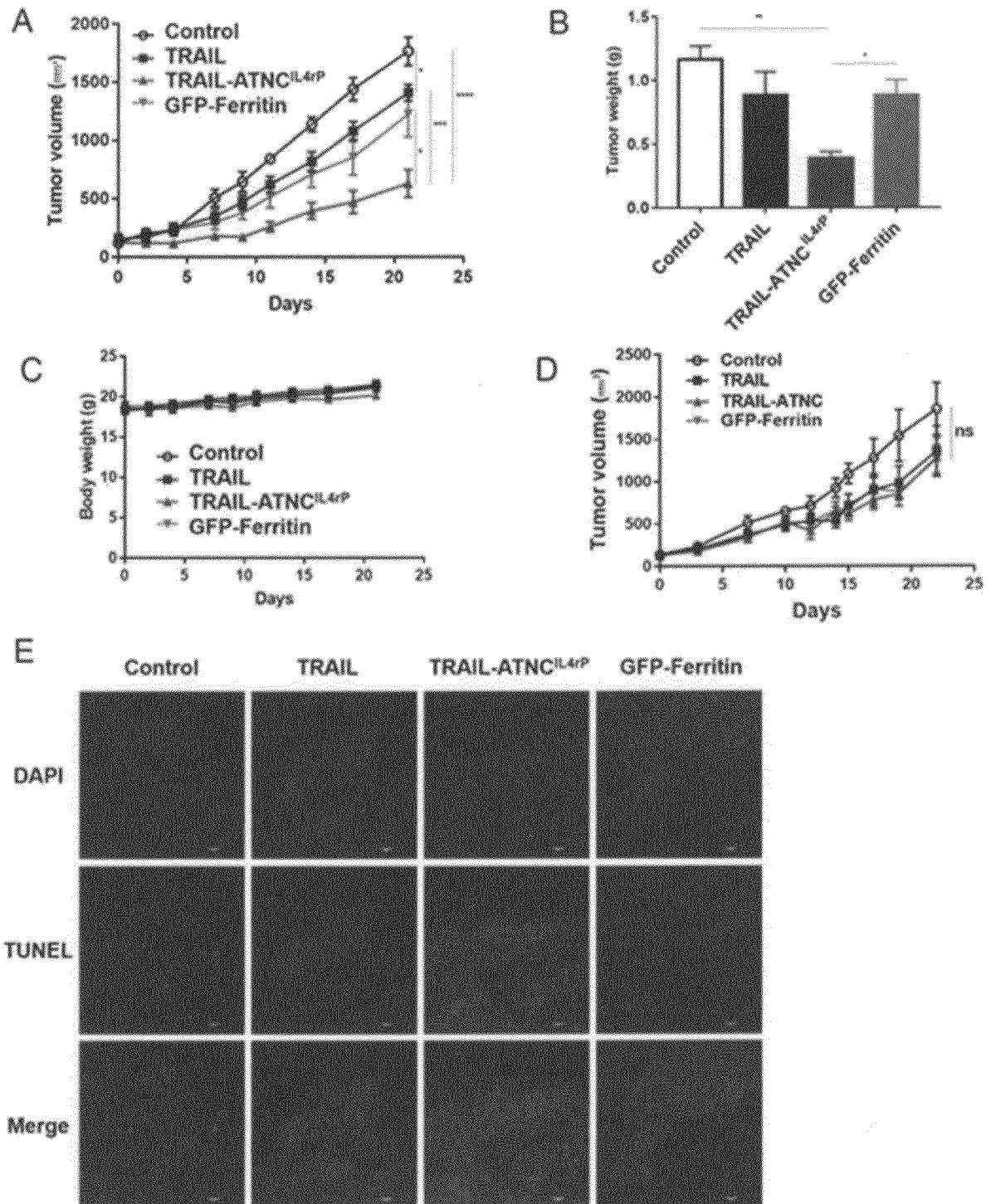
[도 6]



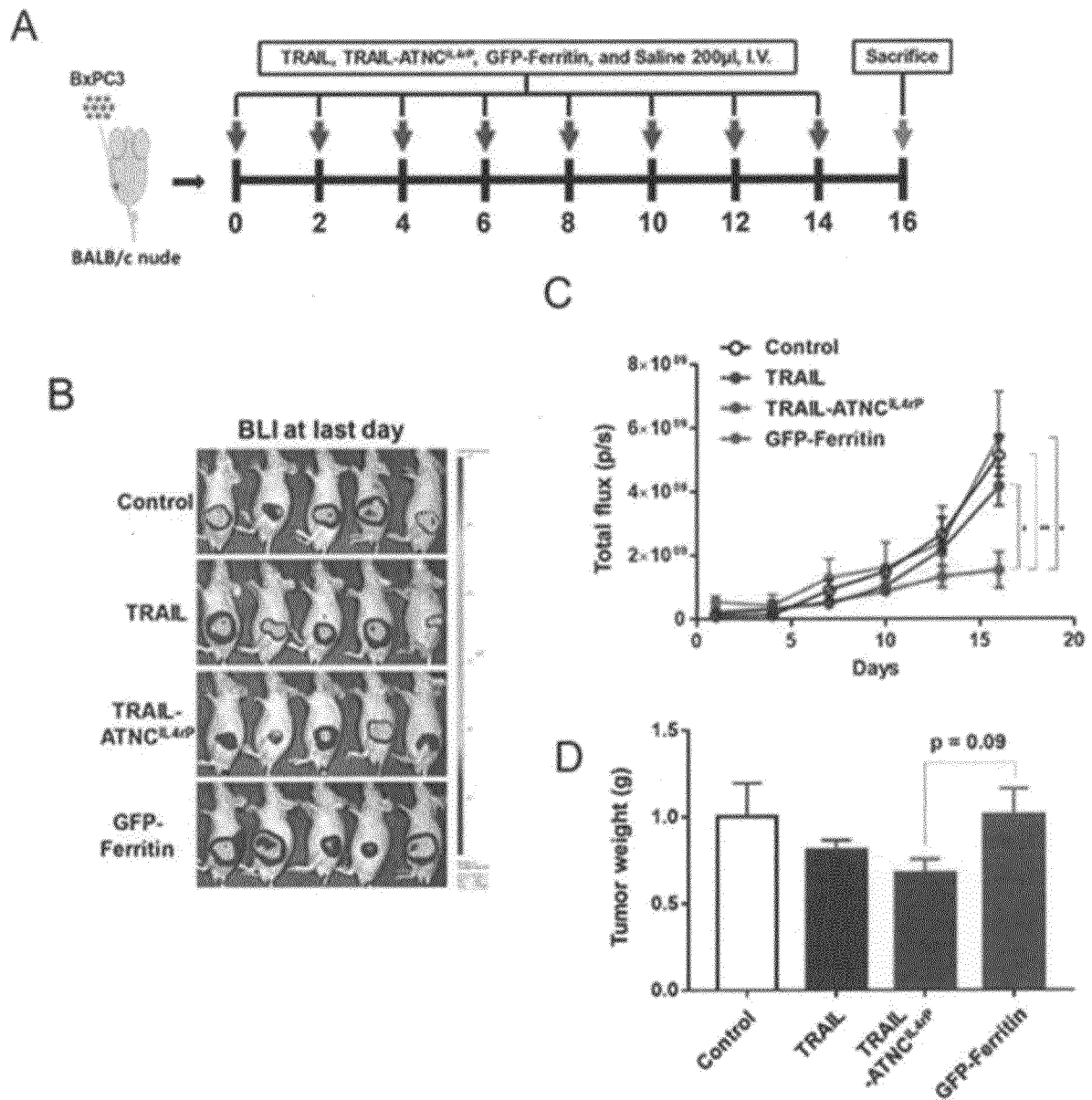
[도 7]



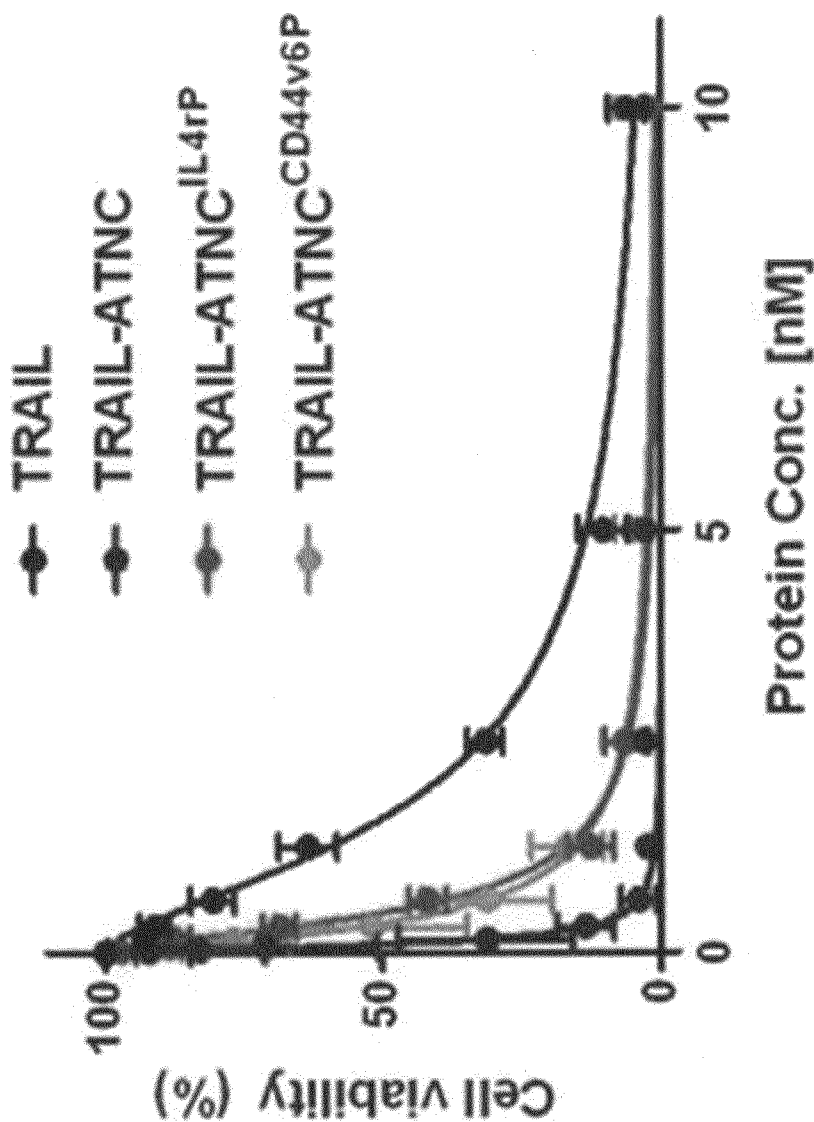
[도 8]



[도 9]

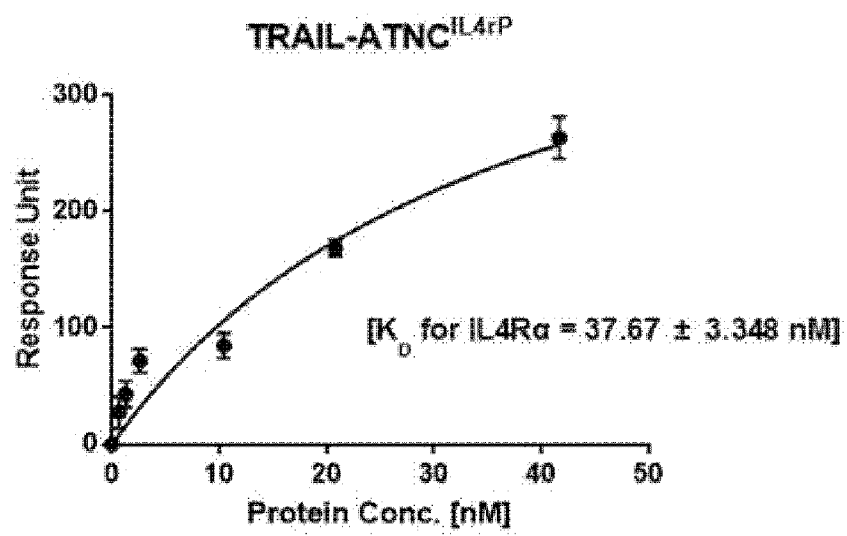


[도 10]



	TRAIL	TRAIL-ATNC	TRAIL-ATNC ^{IL4rP}	TRAIL-ATNC ^{CD44v6P}
IC ₅₀ (nM)	1.605 ± 0.08443	0.1099 ± 0.01176	0.486 ± 0.113	0.3578 ± 0.05045

[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/705(2006.01)i; **C07K 14/79**(2006.01)i; **C07K 7/06**(2006.01)i; **A61K 47/69**(2017.01)i; **A61K 47/64**(2017.01)i; **A61K 9/00**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61K 38/19**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/705; A61K 38/17; A61K 3819; C07K 14/47; C07K 14/52; C07K 1452; C12N 15/74; C07K 14/79; C07K 7/06; A61K 47/69; A61K 47/64; A61K 9/00; A61P 35/00; A61K 38/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand), 트리플 헬릭스(triple helix), 리지드 헬릭스(rigid helix), 페리틴(ferritin), 항암(anticancer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 9403892 B2 (MAGELLAN PHARMA CO., LTD.) 02 August 2016. See claims 1-14.	1-21
A	US 9476056 B2 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) et al.) 25 October 2016. See entire document.	1-21
A	US 8461311 B2 (HAWKINS, W. G. et al.) 11 June 2013. See entire document.	1-21
A	US 6284236 B1 (WILEY, S. R. et al.) 04 September 2001. See entire document.	1-21
A	QUIANG, P. L.. Engineering and refolding of a novel trimeric fusion protein TRAIL-collagne XVIII NC1. Applied Microbiology Biotechnology. 2013. vol. 97, pp. 7253-7264. See entire document.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 2020

Date of mailing of the international search report

30 July 2020

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
302-701**

Facsimile No. **+82-42-481-8578**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003166

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	9403892	B2	02 August 2016	CN	102898526	A	30 January 2013
				US	2014-0206843	A1	24 July 2014
				WO	2013-013639	A1	31 January 2013
US	9476056	B2	25 October 2016	US	2014-0154213	A1	05 June 2014
US	8461311	B2	11 June 2013	US	2011-0300629	A1	08 December 2011
US	6284236	B1	04 September 2001	US	2004-0052788	A1	18 March 2004
				US	2005-0158823	A1	21 July 2005
				US	2009-0118186	A1	07 May 2009
				US	2010-0323399	A1	23 December 2010
				US	5763223	A	09 June 1998
				US	6521228	B1	18 February 2003
				US	7736637	B2	15 June 2010
				US	7972812	B2	05 July 2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/705(2006.01)i, C07K 14/79(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, A61K 47/69(2017.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/705; A61K 38/17; A61K 3819; C07K 14/47; C07K 14/52; C07K 1452; C12N 15/74; C07K 14/79; C07K 7/06; A61K 47/69; A61K 47/64; A61K 9/00; A61P 35/00; A61K 38/19

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand), 트리플 헬릭스(triple helix), 리지드 헬릭스(rigid helix), 페리틴(ferritin), 항암(anticancer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 9403892 B2 (MAGELLAN PHARMA CO. LTD.) 2016.08.02 청구항 1-14	1-21
A	US 9476056 B2 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) 등) 2016.10.25 전문	1-21
A	US 8461311 B2 (HAWKINS, W. G. 등) 2013.06.11 전문	1-21
A	US 6284236 B1 (WILEY, S. R. 등) 2001.09.04 전문	1-21
A	QUIANG, P. L., "Enginerring and refolding of a novel trimeric fusion protein TRAIL-collagne XVIII NC1", Applied Microbiology Biotechnology, 97권, 페이지 7253-7264, 2013 전문	1-21

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 07월 29일 (29.07.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 07월 30일 (30.07.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 9403892 B2	2016/08/02	CN 102898526 A US 2014-0206843 A1 WO 2013-013639 A1	2013/01/30 2014/07/24 2013/01/31
US 9476056 B2	2016/10/25	US 2014-0154213 A1	2014/06/05
US 8461311 B2	2013/06/11	US 2011-0300629 A1	2011/12/08
US 6284236 B1	2001/09/04	US 2004-0052788 A1 US 2005-0158823 A1 US 2009-0118186 A1 US 2010-0323399 A1 US 5763223 A US 6521228 B1 US 7736637 B2 US 7972812 B2	2004/03/18 2005/07/21 2009/05/07 2010/12/23 1998/06/09 2003/02/18 2010/06/15 2011/07/05