(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0108138
(43) 공개일자 2021년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01) *A61K 38/44* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 41/0057 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0022983
(22) 출원일자 2020년02월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김영필
서울특별시 강동구 동남로79길 26, 103동 303호(고덕동, 고덕아이파크)
이경진
경기도 성남시 중원구 자혜로17번길 16, 104동 1204호(은행동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 11 항

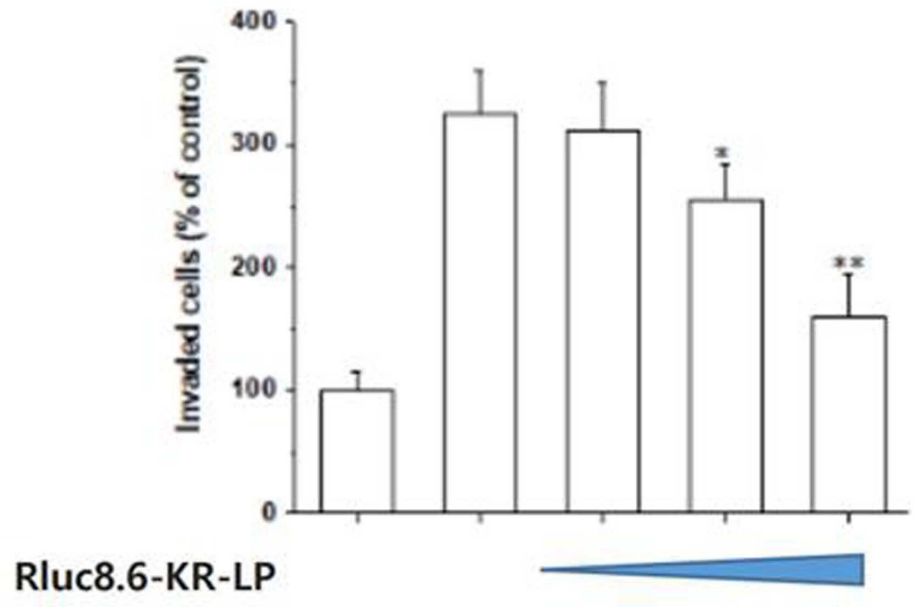
(54) 발명의 명칭 **생물발광기반 활성산소 유도 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 생물발광기반 활성산소 유도 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 활성산소를 생성하는 제1단백질; 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1c



이다. 본 발명에 따른 생물발광에 기반하여 활성산소를 생성하는 융합단백질은 암세포에 특이적으로 결합하는 단백질 구성을 포함하므로 정상세포에는 영향을 미치지 않고 암세포만을 특이적으로 표적하여 이의 전이를 억제할 수 있고, 기질에 반응하여 빛을 생성하는 루시퍼라아제를 통한 생물발광에 기반하여 활성산소를 생산하므로 체내 깊은 곳에 존재하는 암세포에까지 영향을 미쳐 이의 전이를 억제할 수 있다. 또한 구체적인 실시예를 통해서도 암전이 억제효과가 있음을 확인하였으며, 구체적인 암전이 억제기전 또한 새롭게 규명하였는바, 본 발명에 따른 기술은 암전이 특히 뇌암세포, 더욱 바람직하게 뇌신경 암세포의 전이를 효과적으로 억제하고 예방하기 위한 용도로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 38/08 (2021.08)
A61K 38/44 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 활성산소를 생성하는 제1단백질; (ii) 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 (iii) 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 뇌암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1단백질은 KillerRed, MiniSOG, SOPP, FPFB, SuperNova, mKate2 및 KillerOrange로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제2단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제2단백질은 신경아세포종 세포의 세포막에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제3단백질은 루시퍼라아제(luciferase)의 일부 또는 전부를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 루시퍼라아제는 광세균 루시퍼라아제(Photobacteria luciferase), 파이어플라이 루시퍼라아제(Firefly luciferase), 애벌레 루시퍼라아제(Railroad worm luciferase), 레닐라 루시퍼라아제(Renilla luciferase), 가우시아 루시퍼라아제(Gaussia luciferase), 메트리디아 루시퍼라아제(Metridia luciferase), 사이프리디나 루시퍼라아제(Cypridiana luciferase) 및 오플로포러스 루시퍼라아제(Oplophorus luciferase)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 융합단백질은 각각의 단백질이 링커로 연결된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 제3단백질로부터 발광을 유도하기 위한 기질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 기질은 루시페린(luciferin), 코엘렌테라진(coelentrazine), cp-코엘렌테라진, f-코엘렌테라진, 코엘렌테라진-fcp 및 코엘렌테라진-h로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 암세포에서 c-JUN 및 NF-κB의 경로 억제를 통해 MMP-9의 발현 및 활성을 저해시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생물발광기반 활성산소 유도 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 활성산소를 생성하는 제1단백질; 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암(Cancer)은 비정상적인 세포 성장으로 인해 유발되는 질병으로 양성 종양과 악성 종양으로 구분된다. 흔히 암이라고 부르는 질병은 악성 종양을 말하는데, 양성 종양에 비해 성장 속도가 빠르며 신체의 다른 장기로 전이될 수 있다. 암은 스스로 성장인자를 공급하여 성장할 수 있는 능력, 성장 억제 신호에 대한 저항성을 가짐으로써 지속적인 성장과 분열하는 능력, 세포사멸에 대한 저항 및 회피 능력, 제한 없는 세포 분열능력, 혈관 생성 촉진 능력 및 조직 침윤과 전이 능력을 갖는다. 특히, 암세포가 어느 정도 이상 성장하게 되면 공간적인 문제와 영양적인 문제로 더 이상 성장이 힘든 환경을 만나게 되는데, 이때 다른 조직 세포로 침윤(invasion)을 하거나 상피중간엽이행(epithelial mesenchymal transition; EMT) 과정을 통해 혈관을 타고 다른 장기로 전이(metastasis)하는 능력을 갖는다.

[0003] 암 치료를 위한 암세포사멸 방법에는 수술적 절개를 통한 외과적 방법, 방사선을 이용하는 방법, 항암제를 복용하는 방법 등이 있다. 이러한 방법들은 대부분 암세포사멸뿐만 아니라 정상세포의 사멸도 유도하는 문제점이 있으며, 또한 체내 깊은 곳에 존재하는 암세포의 사멸을 유도하는 것은 어렵다는 한계가 있다.

[0004] 이러한 한계점과 관련하여, 최근 암세포사멸 방법으로 광역학 치료법(Photodynamic Therap; PDT)이 주목받고 있다. 광역학 치료는 빛과 산소에 의해 화학적 반응을 일으켜 활성산소를 생성하는 광감각제를 체내에 주입하여

상기 활성산소를 이용하여 암세포를 사멸시키는 방법이다. 그러나 종래 광역학 방법에 이용되는 광감각제는 화학적 광감작제로써 인체 내 대사가 느려 분해 및 배출시간이 오래 걸리고, 정상세포에도 저농도로 축적되어 빛에 노출 시 광독성의 부작용 등이 발견되고 있다. 특히 외부 광원을 필요로하므로 빛의 투과능에 대한 한계점 때문에 부피가 큰 종양이나 체내 안쪽에 존재하는 암세포에는 적용되지 못하고 있다.

[0005] 이러한 문제점을 해결하기 위한 대안으로는 화학적 광감작제 대신 빛에 반응하여 활성산소를 발생하는 단백질을 코딩하는 유전자를 벡터를 이용하여 직접 체내에 주입하는 방법이 있다. 하지만 벡터의 대부분은 바이러스성 벡터이기 때문에 안전성 및 독성에 대한 문제점이 발생할 수 있다. 또한, 암세포에 대한 특이성이 없기 때문에 벡터가 정상세포 내로 들어갈 가능성이 있어 암세포사멸뿐만 아니라, 정상세포의 사멸도 유발하는 문제점이 있다. 특히, 유전자를 포함하는 벡터는 암세포를 인지하는 단계에서부터 작용하는 것이 아니라 세포 내부에 유입된 이후 단백질로 발현되는 과정을 거쳐야하므로 이를 위한 시간이 소요되고 세포 마다 발현비율에 큰 차이가 나며, 발현 이후에도 활성산소 방출효과가 세포 내 발현 위치, 세포 내 단백질 분해기작을 포함한 다양한 원인에 의해 제한될 수 있다.

[0006] 따라서, 지금까지의 활성산소 방출에 의한 암세포사멸 방법들의 문제점들을 해소하기 위해, 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서 암세포 특이적으로 사멸 효율을 높이고, 체내 깊은 곳에 존재하는 암세포까지 효과적으로 사멸시킬 수 있는 방법의 개발이 요구되어진다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Biomed Pharmacother. 2018 Oct;106:1098-1107.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래의 한계점을 극복하기 위해 안출된 것으로, 본원발명에 따른 (i) 활성산소를 생성하는 제1단백질; (ii) 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 (iii) 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합단백질의 암전이 억제 효과를 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이에, 본 발명은 상기 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) 활성산소를 생성하는 제1단백질; (ii) 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 (iii) 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일구현예로, 상기 암은 뇌암 또는 유방암일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제1단백질은 KillerRed, MiniSOG, SOPP, FPFB, SuperNova, mKate2 및 KillerOrange로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제2단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제2단백질은 신경아세포종 세포의 세포막에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제3단백질은 루시퍼라아제(luciferase)의 일부 또는 전부를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 루시퍼라아제는 광세균 루시퍼라아제(Photobacteria luciferase), 파이어플라이 루시퍼라아제(Firefly luciferase), 애벌레 루시퍼라아제(Railroad worm luciferase), 레닐라 루시퍼라아제(Renilla luciferase), 가우시아 루시퍼라아제(Gaussia luciferase), 메트리디아 루시퍼라아제(Metridia luciferase), 사이프리디나 루시퍼라아제(Cypridiana luciferase) 및 오플로포러스 루시퍼라아제(Oplophorus luciferase)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 융합단백질은 각각의 단백질이 링커로 연결된 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 제3단백질의 생물발광을 유도하기 위한 기질을 더 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 기질은 루시페린(luciferin), 코엘렌테라진(coelentrazine), cp-코엘렌테라진, f-코엘렌테라진, 코엘렌테라진-fcp 및 코엘렌테라진-h로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 암세포에서 c-JUN 및 NF-κB의 경로 억제를 통해 MMP-9의 발현 및 활성을 저해시키는 것일 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 (i) 활성산소를 생성하는 제1단백질; (ii) 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 (iii) 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암전이 억제방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 암전이 억제용도를 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 생물발광에 기반하여 활성산소를 생성하는 융합단백질은 암세포에 특이적으로 결합하는 단백질 구성을 포함하므로 정상세포에는 영향을 미치지 않고 암세포만을 특이적으로 표적하여 이의 전이를 억제할 수 있고, 기질에 반응하여 빛을 생성하는 루시퍼라아제를 통한 생물발광에 기반하여 활성산소를 생산하므로 체내 깊은 곳에 존재하는 암세포에까지 영향을 미쳐 전이를 억제할 수 있다. 또한 구체적인 실시예를 통해서도 암전이 억제효과가 있음을 확인하였으며, 구체적인 암전이 억제기전을 새롭게 규명하였는바, 본 발명에 따른 기술은 암전이 특히 뇌암세포, 더욱 바람직하게 뇌신경 암세포의 전이를 효과적으로 억제하고 예방하기 위한 용도로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 EGF로 자극된 신경아세포종의 침윤 및 이동에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 영향을 분석한 결과로서, 도 1a 및 도 1b는 신경아세포종 세포에 Rluc8.6 KR-LP를 다양한 농도로 처리한 후 각각 세포생존능(도 1a) 및 세포독성(도 1b)을 측정하여 분석한 결과이고, 도 1c 및 도 1d는 신경아세포종 세포에 다양한 농도의 Rluc8.6 KR-LP 및/또는 EGF를 처리하고 세포 침윤(도 1c) 및 세포 이동(도 1d)을 분석한 결과이다.

도 2는 EGF로 자극된 신경아세포종 세포에서 MMP-9, AKT, ERK, c-JUN 및 NK-κB의 서브유닛인 p65의 활성에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 영향을 분석한 결과로서, 도 2a는 신경아세포종 세포에 EGF 및 다양한 농도의 Rluc8.6 KR-LP를 처리한 후 MMP-9 단백질 발현수준을 분석한 웨스턴 블롯 및 이의 정량결과이고, 도 2b는 신경아세포종 세포에 EGF 및 다양한 농도의 Rluc8.6 KR-LP를 처리한 후 AKT, ERK, c-JUN 및 p65의 인산화된 형태 및 총 단백질의 발현 수준을 분석한 결과이다.

도 3은 MMP-9 프로모터 활성에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 영향을 분석한 결과로서, 도 3a 및 도 3b는 Rluc8.6 KR-LP가 처리되거나 처리되지 않은 신경아세포종 세포에서 NF-κB 프로모터(도 3a) 및 AP-1 프로모터(도 3b)의 활성을 루시퍼라아제 리포터 어세이를 통해 측정한 결과이고, 도 3c는 Rluc8.6 KR-LP가 처리되거나 처리되지 않은 신경아세포종 세포에서 야생형 MMP-9 프로모터 및 돌연변이 프로모터의 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명자들은 본 발명에 따른 생물발광기반 활성산소를 유도하는 융합단백질의 암전이 억제 효과를 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0028] 이에, 본 발명은 (i) 활성산소를 생성하는 제1단백질; (ii) 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 (iii)

빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어, “암 전이(Cancer metastasis)”란 암의 진행의 결과로 나타나는 현상으로써 암에 기인하는 사인의 대부분은 원발소가 아니고, 전이에 의한 생존에 필수적인 장기의 기능장애에 기인하는 것으로 되어 있다. 암의 전이는 암세포의 조직 내로의 이동, 동맥 및 정맥 등의 혈관, 또는 림프관 등의 맥관 내로의 이동, 다른 장기에서의 착상, 증식과 종양조직 형성의 복수의 과정을 거쳐서 발생한다. 이러한 과정에서 중요한 세포의 동작에는 동종의 세포간의 접착을 저하시켜 특정한 다른 세포와의 접착성이 생기는, 운동성을 높이는 세포외의 구조 외에 기저막 등의 조직의 일체성을 유지하는 구조의 파괴성을 유도하는 효소를 세포 표면에 발현하는 등의 특징이 있다.

[0030] 본 발명에 있어서 상기 암은 뇌암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관암종, 결장직장암, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 비인두암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 전립선암, 갑상선암, 골육종, 횡문근육종, 윤활막 육종, 카포시(Kaposi) 육종, 평활근육종, 악성 섬유성 조직구종, 섬유육종, 급성 골수성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 교모세포종, 성상세포종, 흑색종, 중피종, 윌름 종양, 및 투명 세포 육종(CCS), 포상 연부 육종(ASPS) 및 전위-연관 신세포 암종을 포함하는 MiT 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 뇌암 또는 유방암이며, 더욱 바람직하게는 뇌신경에 발생하는 암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 있어서, 암 전이란 바람직하게는 뇌암세포 또는 유방암세포가 다른 조직 또는 장기로 전이되는 것을 포함하며, 더욱 바람직하게는 뇌신경에 발생한 암, 가장 바람직하게는 신경아세포종이 다른 조직 또는 장기로 전이되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 활성산소를 생성하는 제1단백질은 빛을 제공하는 생물발광 단백질에서 발생하는 빛에 의해 활성산소를 생성하며, 생성된 활성산소의 강한 화학적 반응이 주변 세포분자에 작용하여 미토콘드리아나 세포막 시스템 등의 고유작용을 물리화학적으로 손상시켜 암세포의 사멸을 유도할 수 있고, 목표 부위의 혈관폐색을 유도하여 산소결핍에 의해 암세포의 사멸을 유도할 수 있다. 또한 치료 후 사이토크롬 C, 미토콘드리아 인자, 미토콘드리아 투과성 증가 등이 미토콘드리아의 손상을 초래하여 세포자멸사를 유도해 암세포 사멸을 유도할 수 있다.

[0033] 상기 활성산소를 생성하는 제1단백질은 KillerRed, MiniSOG, SOPP, FPFB, SuperNova, mKate2 및 KillerOrange로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 KillerRed일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 KillerRed는 약 27kDa 크기를 가진 Aequorea Victoria 유래 녹색형광단백질(green fluorescent protein) 변이체로서 녹색 빛을 받게 되면 초과산화물을 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0035] 상기 제1단백질이 생성하는 활성산소는 초과산화물(O^{2-}, superoxide), 수산화라디칼(hydroxyl radical, HO), 일중항산소(singlet oxygen, $1O_2$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 하이포아염소산(hypochlorous acid, HOCl) 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 예컨대 제1단백질이 KillerRed일 경우, 초과산화물을 생성할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질은 신경아세포종 세포의 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 것으로 알려져 있으며, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 표적하는 암종, 암세포의 막단백질의 종류에 따라 당업자가 변경하여 이용할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 빛을 제공하는 제3단백질은 형광 공명 에너지 전이(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)에 의해 빛을 제공할 수 있는 단백질 또는 생물발광 공명 에너지 전이(Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET)에 의해 빛을 제공할 수 있는 단백질이다. 상기 공명 에너지 전이는 도너(donor) 분자와 어셉터(acceptor) 분자 사이에서 발생하는 공명 에너지가 전달되는 현상을 말한다. 상기 형광 공명 에너지 전이는 도너로써 형광물질을 이용하는 것이고, 상기 생물발광 공명 에너지 전이는 도너로써 생물발광 물질을 이용하는 것이다.

[0038] 상기 형광 공명 에너지 전이에 의한 제3단백질은 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP), 노랑형광단백질(Yellow Fluorescent Protein, YFP), 적색형광단백질(Red Fluorescent Protein, RFP), 파랑형광단백질(Blue fluorescent protein, BFP), 청록색형광단백질(Cyan Fluorescent Protein, CFP) 등일 수 있으나, 이에

제한하지는 않는다.

[0039] 상기 생물발광 공명 에너지 전이를 이용하는 제3단백질은 루시퍼라아제(luciferase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 루시퍼라아제는 기질을 산화시켜 생물발광을 일으키는 산화효소이며, 본 발명의 제3단백질은 야생형(wild-type) 또는 돌연변이형(mutant)의 루시퍼라아제를 일부 또는 전부 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로 광세균 루시퍼라아제(Photobacteria luciferase), 파이어플라이 루시퍼라아제(Firefly luciferase), 애벌레 루시퍼라아제(Railroad worm luciferase), 레닐라 루시퍼라아제(Renilla luciferase), 가우시아 루시퍼라아제(Gaussia luciferase), 메트리디아 루시퍼라아제(Metridia luciferase), 사이프리디나 루시퍼라아제(Cypridiana luciferase) 및 오플로포러스 루시퍼라아제(Oplophorus luciferase)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 융합단백질은 제1단백질, 제2단백질 및 제3단백질 간에 링커를 포함할 수 있다. 상기 링커들은 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 각 단백질의 간섭을 최소화하여 상기 융합단백질의 암세포 전이 억제 기능을 더욱 증가시킬 수 있으며 상기 융합단백질의 구조적인 유연성을 증가시킬 수 있다.

[0042] 상기 링커는 핵산, 아미노산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 화합물의 작용기 등일 수 있으나, 상기 제1단백질 내지 제3단백질 사이를 연결할 수 있는 기능을 가진 것이라면 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 글리신 아미노산이 3개 연결된 GGG를 이용할 수 있으나, 상기와 같은 링커의 효과를 달성할 수 있는 것이라면 형태 및 종류가 제한되지 않고 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 제3단백질로부터 발광을 유도하기 위한 기질을 더 포함할 수 있다.

[0044] 상기 기질은 바람직하게는 루시퍼라아제로부터 생물발광을 유도할 수 있는 기질을 포함하며, 구체적으로 루시페린(luciferin), 코엘렌테라진(coelentrazine), cp-코엘렌테라진, f-코엘렌테라진, 코엘렌테라진-fcp 및 코엘렌테라진-h로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 융합단백질의 암전이 억제 효과를 확인하였다.

[0046] 본 발명의 일실시예에서는, 상기 융합단백질이 신경아세포종 세포의 침윤 및 이동에 대하여 미치는 영향을 분석한 결과, 높은 농도에서는 세포생존능을 감소시키며 세포 독성을 유발하지 않는 농도에서는 세포의 침윤 및 이동을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0047] 본 발명의 다른 실시예에서는, EGF로 자극된 신경아세포종에서 상기 융합단백질에 의한 세포 침윤 및 이동 억제 효과가 AP-1 및 NF-κB 경로의 억제를 통한 MMP-9 단백질의 발현 또는 활성 저해에 의한 것임을 분자적 수준에서 규명하였다(실시예 3 및 4 참조).

[0048] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 상기 융합단백질을 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모

두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0051] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 ㎏ 당 0.001 내지 150 ㎎, 바람직하게는 0.01 내지 100 ㎎을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (i) 활성산소 생성 제1단백질; (ii) 암세포에 특이적으로 결합하는 제2단백질; 및 (iii) 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암전이 억제방법을 제공한다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 "개체"란 암전이 억제를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0054] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 암전이 억제용도를 제공한다.

[0055]

[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0058] **[실시예]**

[0059] **실시예 1. 실험재료 및 실험방법**

[0060] **1-1. 생물발광기반 활성산소 유도 융합단백질의 제조**

[0061] 본 발명의 실시예에서는, i) 활성산소 생성 제1단백질, ii) 암세포의 세포막과 특이적으로 결합하는 제2단백질, 및 iii) 빛을 제공하는 제3단백질로 구성된 생물발광기반 활성산소 유도 융합단백질을 제조하고자 하였다.

[0062] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 활성산소를 생성하는 제1단백질로 KillerRed(이하, KR)를 이용하였고, 제2단백질로는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 리드 펩타이드(Lead peptide; LP), 및 제3단백질로는 레닐라 루시퍼라아제 8.6(이하, RLuc8.6)을 이용하였다. 상기 제2단백질의 펩타이드는 신경아세포종 세포주인 WAC-2, SH-EP, TET21N의 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 것으로 알려져 있다. 상기 융합단백질은 구체적으로 RLuc8.6-KR-LP 순서로 배열되며, RLuc8.6와 KR, 및 KR과 LP 사이에는 링커로 3개의 글리신 아미노산이 연결된 GGG를 사용함으로써 융합단백질의 구조적인 유연성과 안정적인 움직임이 가능하도록 하였다. 이후 상기 각 단백질을 pRET 플라스미드 벡터(Addgene, USA)에 클로닝하였으며, 하기 실시예 1-2의 과정을 통해 발현 및 정제하였다.

[0064] **1-2. 융합단백질의 발현 및 정제**

[0065] *E. coli* 균주(strain) BL21 세포로 상기 실시예 1-1에서 제조한 플라스미드를 형질전환(transformation) 시켰다, 100㎍/㎖의 암피실린(ampicillin)이 포함되어 있는 500㎖의 LB 배지(Luria-Bertani broth)를 이용하여 600nm에서 OD(optical density) 값이 0.9에 도달할 때까지 상기 형질전환시킨 균주(bacteria)를 37℃에서 배양하였다. 이후 1mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 20℃에서 24시간 더 배양한 다음, 7,800 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 수확(harvest)하였다.

[0066] 상기 수확된 세포 펠렛(pellet)은 20㎖의 용해 버퍼(lysis buffer; 50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 10mM 이미다졸, pH8.0), 2㎎/㎖ 라이소자임(lysozyme)으로 재현탁 시키고, 초음파처리(ultrasonication)하여 파쇄하였다. 상기 파쇄한 조세포 추출물(crude cell extract)을 14,000rpm에서 20분간 원심분리 하고, 상층액을 여과하여, 1㎖의 Ni-NTA 비드(bead) 와 4℃에서 24시간 동안 교반하면서 배양하였다. 다음으로 통과액(flow-through)을 제거하고 비드를 세척 완충액(wash buffer; 50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl 및 50mM 이미다졸, pH 8.0)으로 세척하였다. 이후 세척 완충액 내 이미다졸의 농도를 0.5M로 하여 결합된 단백질을 선형 구배(linear gradient)로 용출(elution) 시켰다. 발현된 단백질을 포함하는 분획(fraction)을 투석(dialysis)하고, PBS 1X로 농축(concentration)시켰

다. 상기 과정을 통해 서열번호 2의 아미노산으로 구성된 단백질을 수득하였으며, 본 실시예에서는 상기 수득된 융합단백질을 RLuc8.6 KR-LP로 명명하였다.

[0068] **1-3. 항체 및 시약**

[0069] 1차 신경아세포종 세포는 5% FBS(Hyclone), 하이드로코티솔(hydrocortisol) (10㎍/㎖, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 트랜스페린(transferrin) (10㎍/㎖, Sigma-Aldrich) 및 페니실린/스트렙토마이신(Hyclone)이 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하였다.

[0070] 억제제를 포함하는 모든 화학물질들은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 인산화된 형태 및 총 MAPKs(mitogen-activated protein kinases), Akt, c-Jun 및 p65에 각각 특이적인 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)에서 구입하였으며, 베타-액틴(β-actin) 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)에서 구매하였다.

[0072] 1-4. MTT 어세이 및 LDH 어세이

[0073] 세포생존능은 MTT 어세이로 분석하였다. 구체적으로, 1×10^4 세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 PBS에 용해시킨 다양한 농도의 Rluc8.6 KR-LP 및 100ng/㎖ EGF를 상기 배양된 세포의 배양 배지에 직접 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 상청액을 조심스럽게 제거한 후, MTT 분석을 실시하였다. 또한, 제조사의 프로토콜에 따라 LDH 세포 독성 분석 키트(Thermoscientific, Waltham, MA)를 사용하여 배양된 웰로부터 회수한 상청액에 대해 LDH 분석을 실시하여 세포독성을 분석하였다.

[0075] **1-5. 침윤(Invasion) 및 이동(migration) 분석**

[0076] 침윤 분석(Invasion assays)은 마트리겔(Matrigel)이 코팅된 침윤 챔버(Corning Inc., Corning, NY, USA)를 사용하여 수행하였다. 간략하게, 트립신을 이용해 세포를 떼어내고 세포 수를 계수한 후, 2×10^4 세포를 100 ㎕ 무혈청 배지에 현탁시키고 침윤 챔버의 상부 챔버에 분주하였다. 상부 챔버를 10% FBS가 보충된 DMEM 완전배지를 함유하는 하부 챔버와 조립하고 24시간 동안 배양하였다. 이어서 상부 챔버의 바닥면 쪽으로 이동된 세포를 100% 메탄올로 15분 동안 고정시킨 다음, 30분 동안 10% 에탄올에서 0.15% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하였다. 이후 삽입 멤브레인을 광학현미경으로 관찰하고 침윤된 세포를 계수하였다.

[0077] 한편, 세포 이동은 상처 치유 분석(wound healing assay)을 실시하여 평가하였다. 세포를 분주하고 16시간 동안 배양하여 증식된 세포로 이루어진 단층이 생성되도록 한 후, 미토마이신 C(mitomycin C)를 10㎍/㎖로 2시간 동안 처리하였다. 이어서 세포가 없는 갭을 만들기 위해 상기 세포 단층에 스크래치를 내었다. 이후 상기 세포에 다양한 농도의 Rluc8.6 KR-LP 및 EGF를 24시간 동안 처리하였고, 광학현미경으로 세포 이동을 관찰하였다. 세포의 이동 거리는 ImageJ 소프트웨어(v. 1.45)를 사용하여 계산하였다.

[0079] **1-6. Zymography**

[0080] MMP-9의 효소 활성을 젤라틴 자이모그래피(zymography)로 조사하였다. 구체적으로, Rluc8.6 KR-LP가 처리된 세포 및 대조군 세포의 배양 배지에 대하여 0.2% 젤라틴이 함유된 겔을 이용해 비-환원 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하였다. 전기영동 후, 겔을 2.5% Triton X-100으로 세척하여 SDS를 제거하고, 0.1% 쿠마시 블루(Coomassie blue) 용액으로 염색하였다.

[0082] **1-7. 웨스턴 블롯**

[0083] 단백질 용해물을 95℃에서 5분 동안 가열하고, SDS-PAGE를 수행한 다음 크기에 따라 분리된 단백질들을 Immune-Blot™ 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 전기적으로 이동시켰다. 이후 상기 멤브레인을 1차 항체와 함께 배양한 다음, 홀스레디쉬 퍼옥시다제(horse radish peroxidase; HRP)가 접합된 2차 항체와 함께 배양하였다. 블롯은 enhanced chemiluminescence(Pierce

Biotechnology, IL, Rockford, IL)를 이용해 가시화하고 ImageQuant ™ LAS 4000(WI Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI)을 이용하여 촬영한 다음 bundled Multi Gauge 3.0 소프트웨어를 이용해 단백질의 발현수준을 분석하였다.

[0085] **1-8. 형질감염 및 루시퍼라아제(luciferase) 분석**

[0086] 세포를 분주하고 16시간 동안 배양하여 세포가 배양 면적의 70%를 차지하였을 때 일시적 형질감염을 실시하였다. 보다 구체적으로, NF-κB 또는 AP-1 결합 부위를 포함하는 MMP-9 루시퍼라아제 구조체 또는 이의 변이체 및 pRL-SV40 플라스미드(Promega, Madison, WI)를 lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용해 공동 형질감염시켰다. 프로모터 구동 파이어플라이 루시퍼라아제(firefly luciferase) 활성을 레닐라 루시퍼라아제(renilla luciferase) 활성 수준으로 보정하였으며, 상대적인 프로모터 활성은 아무 처리도 하지 않은 대조군에 상대적인 것으로 얻었다.

[0088] **1-9. 통계분석**

[0089] 모든 통계분석은 Origin Software V. 8.1(OriginLab Corporation, Northampton, MA)을 이용하여 실시하였다. 결과는 적어도 3회 이상의 반복 실험으로부터의 평균±표준 편차로 표현하였다. 실험군 간의 유의차는 일원 분산 분석과 Student 's t-test를 사용하여 결정되었다. P 값이 < 0.05인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0091] **실시예 2. Rluc8.6 KR-LP에 의한 신경아세포종 세포의 침윤 및 이동 저해효과 확인**

[0092] Rluc8.6 KR-LP는 배양 배지 내 5㎍/㎖(약 1μM)의 최종 농도에서 흑색종 세포주에 치명적인 것으로 보고된바 있다. 이에, 본 발명자들은 공격적인 일차 신경아세포종 세포에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 세포독성을 조사하고자 하였다. 이를 위해, 본 발명에 따른 Rluc8.6 KR-LP를 1 ~ 50 μM 범위의 다양한 농도로 처리하였다. 분석결과, 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이 Rluc8.6 KR-LP는 30, 40, 및 50 μM 최종 농도에서 세포 생존을 유의하게 감소시키고 세포 독성을 유도하였다. 그러나 20 μM 및 이보다 더욱 낮은 농도에서는 유의한 세포 독성이 관찰되지 않았다.

[0093] 나아가 신경아세포종에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 영향을 추가적으로 알아보기 위해, 본 발명자들은 EGF가 처리된 신경아세포종 세포의 침윤 및 이동에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 영향을 분석하였다. 그 결과, 도 1c 및 도 1d에 나타낸 바와 같이 세포독성을 유발하지 않은 농도(10μM 및 20μM)에서 EGF로 자극된 신경아세포종 세포의 침윤과 이동이 현저히 감소된 것으로 나타났다.

[0094] 종합하면, Rluc8.6 KR-LP가 30μM 이상의 농도에서는 신경아세포종 세포의 세포독성을 유발하여 생존능을 감소시키며, 치명적이지 않은 농도에서는 EGF로 자극된 신경아세포종 세포의 침윤 및 이동을 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0096] **실시예 3. EGF로 자극된 신경아세포종에서 Rluc8.6 KR-LP에 의한 신호전달 경로 억제 확인**

[0097] 신경아세포종 세포의 침윤 및 이동은 EGF와 같은 성장인자 자극에 의해 유도된 다중 신호전달 경로에 의해 조절된다. 본 발명자들은 EGF로 자극된 신경아세포종 세포의 신호전달에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 영향을 조사하였다.

[0098] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 신경아세포종 세포의 침윤 및 이동에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 억제 활성에 상응하여, 대부분의 고형 종양에서 침윤 및 이동에 결정적인 영향을 미친다고 알려진 MMP-9의 활성이 Rluc8.6 KR-LP 처리에 의해 억제된 것으로 나타났다. 구체적으로 웨스턴 블롯팅 및 이의 정량 결과를 통해 Rluc8.6 KR-LP 처리에 의해 MMP-9 단백질의 발현이 감소되었음을 확인하였다. 또한 도 2b에 나타낸 바와 같이 Rluc8.6 KR-LP를 각각 10μM 및 20μM로 처리한 경우에는 ERK 및 AKT의 총 단백질 수준은 변화 없이 인산화된 형태의 단백질 발현만이 억제되었으며, 더욱이 c-jun 및 NF-κB의 서브유닛인 전사인자 p65의 활성화 또한 억제된 것을 확인하였다.

[0099] 종합적으로, 이러한 결과들을 통해 Rluc8.6 KR-LP이 신경아세포종 세포에서 EGF 자극에 의해 활성화된 침윤 및

이동과 관련된 세포 신호전달을 억제시키는 것을 알 수 있었다.

[0101] **실시예 4. EGF로 자극된 신경아세포종 세포에서 Rluc8.6 KR-LP에 의한 AP-1 및 NF-κB 매개 MMP-9 억제 기전 확인**

[0102] 다음으로, 본 발명자들은 EGF로 자극된 신경아세포종 세포에서 Rluc8.6 KR-LP에 의한 MMP9 억제 기전에서 AP-1 및 NF-κB 경로의 역할을 조사하였다. 웨스턴 블롯팅 분석 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이 EGF로 자극된 신경아세포종 세포에서 활성화된 AP-1의 서브유닛 c-Jun 및 NF-κB의 서브유닛 p65의 발현이 Rluc8.6 KR-LP에 의해 감소된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 EGF로 자극된 신경아세포종 세포에서 Rluc8.6 KR-LP에 의해 AP-1 및 NF-κB 경로가 억제됨을 시사하는 것이다. 실제로, 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이 EGF 자극에 의해 NF-κB 및 AP-1 프로모터 활성이 증가되었으나, Rluc8.6 KR-LP가 처리된 경우에는 EGF 처리에 의해 유도된 NF-κB 및 AP-1의 전사활성이 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

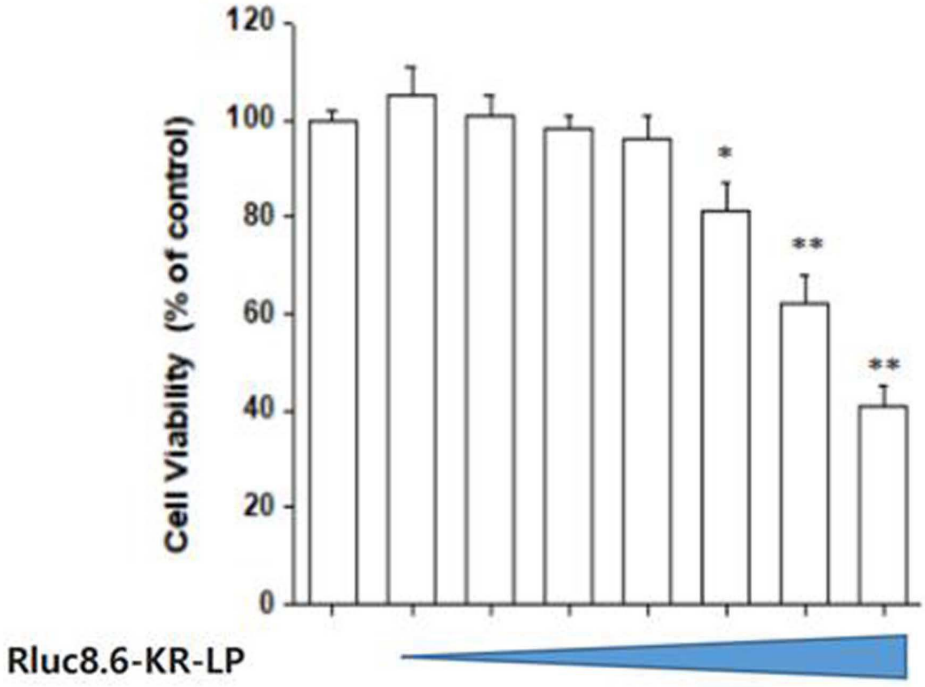
[0103] 세포에서 MMP-9의 발현은 MMP-9 프로모터의 전사 시작 부위에 근접하게 위치한 결합 부위를 통해 AP-1 및 NF-κB 경로 모두에 의해 조절된다. Rluc8.6 KR-LP에 의해 유도된 MMP-9 발현의 하향조절과 AP-1 및 NF-κB 경로의 억제가 관련이 있는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 MMP-9 유전자의 근위 프로모터를 분석하였다. MMP-9 프로모터 활성에서 AP-1 및 NF-κB 결합 부위의 관여 여부를 조사하기 위해 야생형의 MMP-9 프로모터와 함께, NF-κB 결합 부위 또는 AP-1 결합 부위에 점 돌연변이를 갖는 MMP-9 프로모터를 이용하였다.

[0104] 분석 결과, 도 3c 및 도 3d에 나타낸 바와 같이 야생형의 MMP-9 프로모터 및 AP-1 결합 부위 돌연변이를 갖는 돌연변이체의 활성은 EGF가 처리되지 않은 세포보다 처리된 세포에서 약 4배 더 높게 나타났다. 그러나 NF-κB 돌연변이를 갖는 프로모터의 활성은 EGF 처리에 의해 약 2.5배만 증가하였다. 이러한 결과는 AP-1보다는 NF-κB가 EGF로 자극된 MMP-9 프로모터 활성에 더욱 중요함을 시사하는 것이다. 그러나 20μM 농도로 Rluc8.6 KR-LP를 처리한 경우 야생형 및 돌연변이 프로모터의 활성이 모두 유의하게 감소하였으며, 이는 NF-κB 및 AP-1 결합 부위에 관계없이 MMP-9 프로모터에 대한 Rluc8.6 KR-LP의 억제 효과를 제시한다. 그러나 EGF 단독으로 자극된 샘플과 비교하여 야생형 프로모터의 활성은 2.5배 이상 감소된 반면에 돌연변이 구조체의 프로모터 활성은 2배 미만으로 감소되었다. 전반적으로, 이러한 결과는 Rluc8.6 KR-LP가 EGF로 자극된 신경아세포종 세포에서 AP-1 및 NF-κB 경로의 억제를 통해 MMP-9 근위 프로모터 활성을 조절한다는 것을 시사한다.

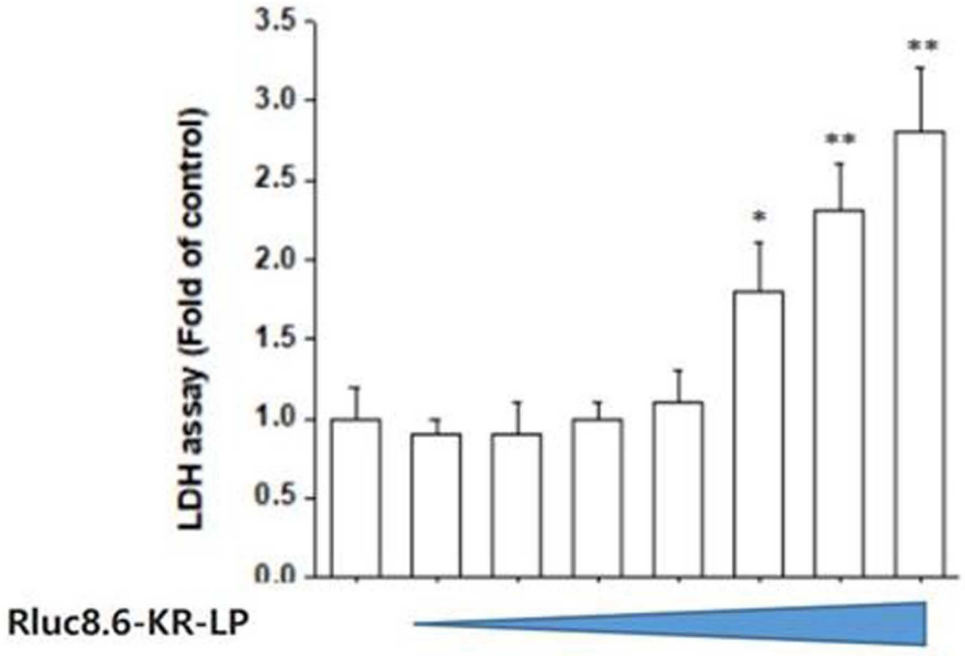
[0106] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

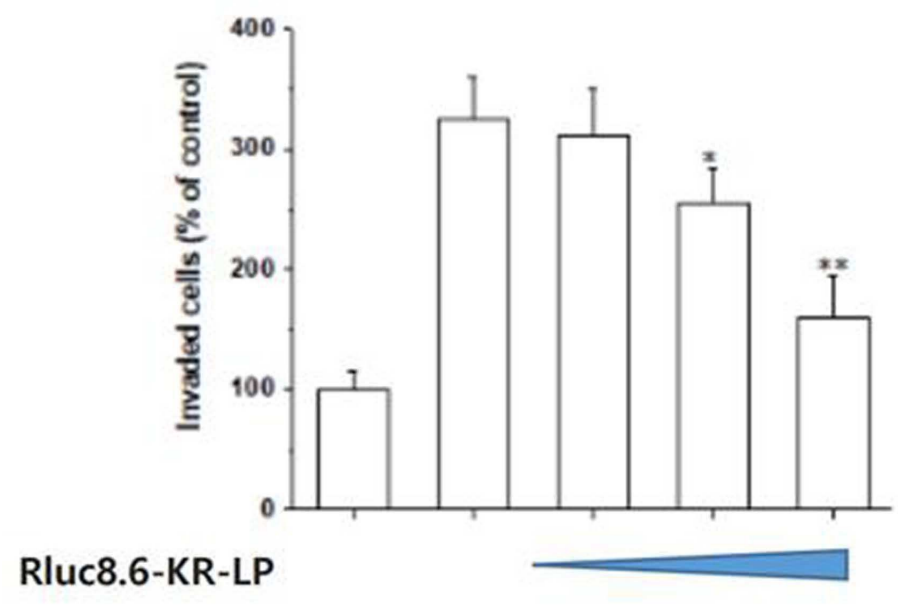
도면1a


120
100
80
60
40
20
0
Cell Viability (% of control)
*
**
**
Rluc8.6-KR-LP

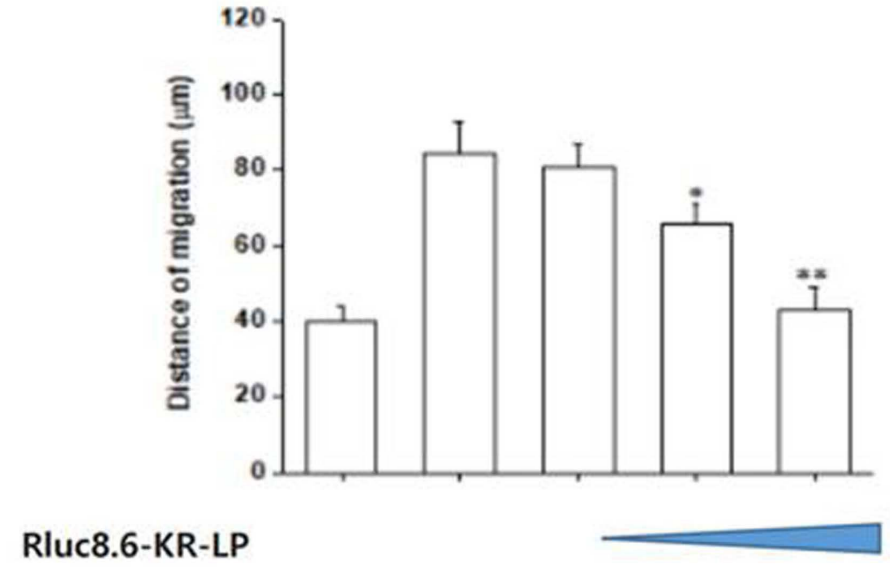
도면1b


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LDH assay (Fold of control)
*
**
**
Rluc8.6-KR-LP

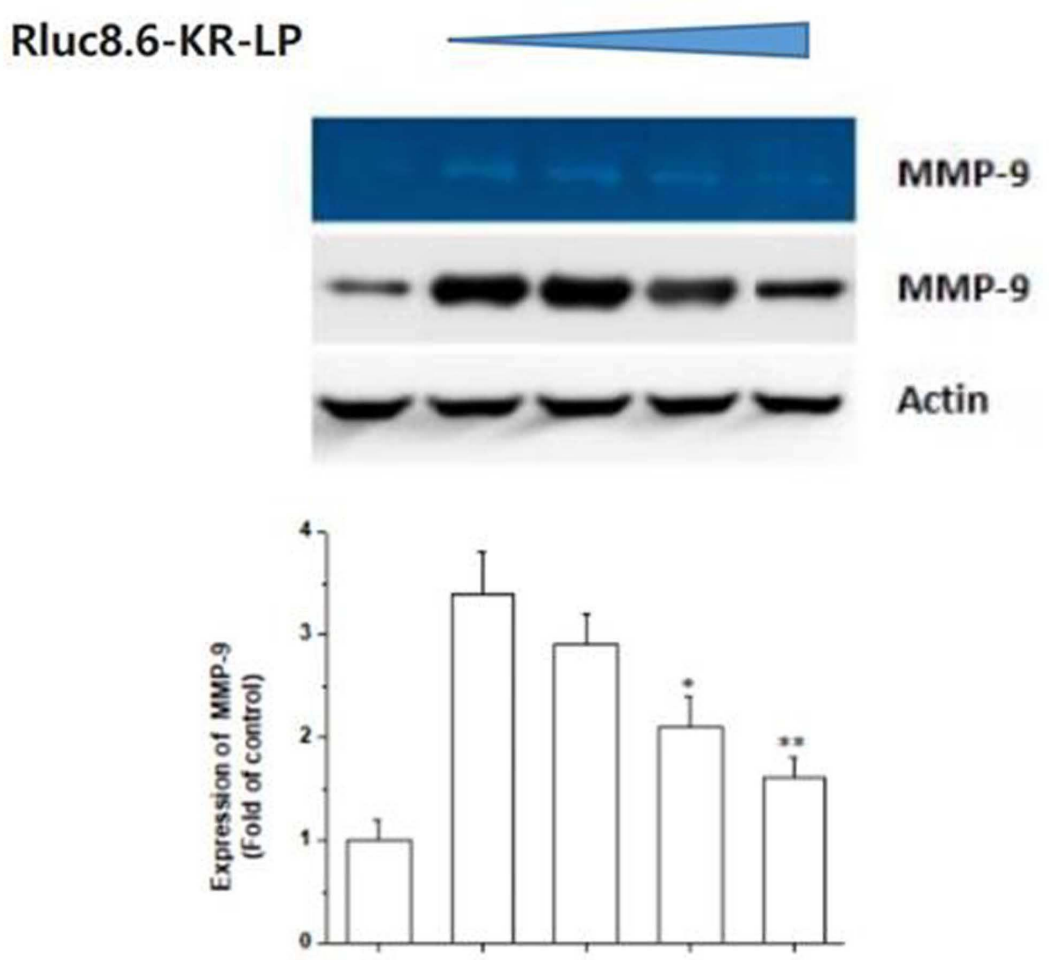
도면1c


Invaded cells (% of control)
400
300
200
100
0
*
**
Rluc8.6-KR-LP

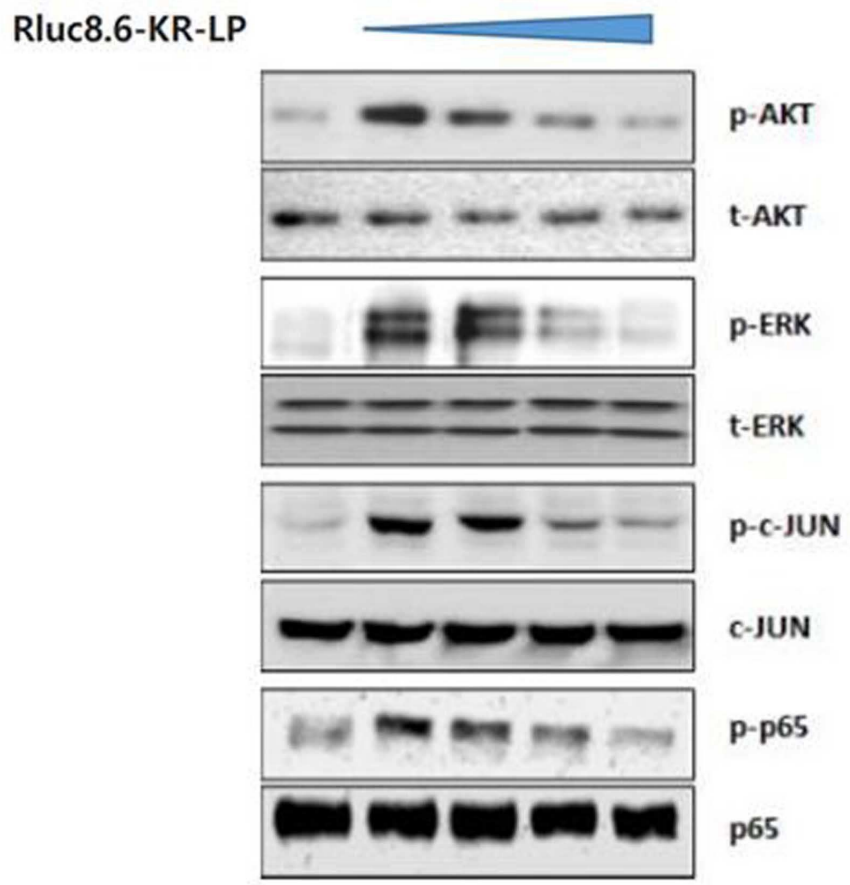
도면1d


Distance of migration (μm)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
Rluc8.6-KR-LP

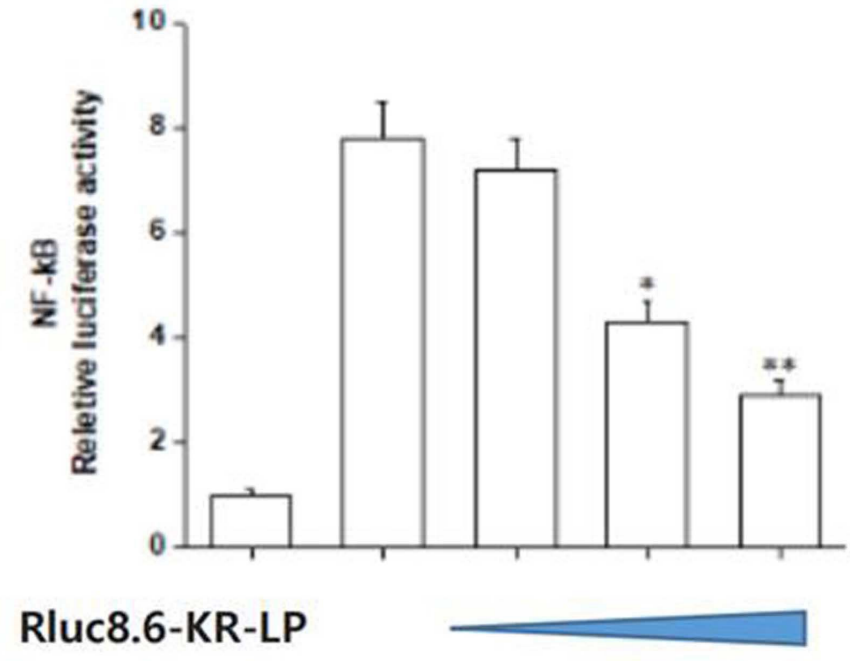
도면2a


Rluc8.6-KR-LP
MMP-9
MMP-9
Actin
Expression of MMP-9
(Fold of control)
0
1
2
3
4
*
**

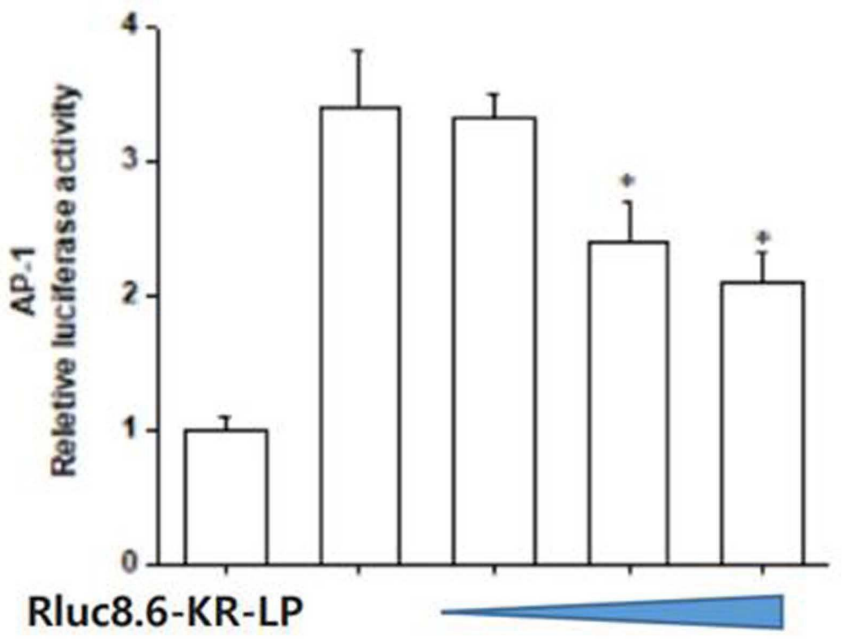
도면2b


Rluc8.6-KR-LP
p-AKT
t-AKT
p-ERK
t-ERK
p-c-JUN
c-JUN
p-p65
p65

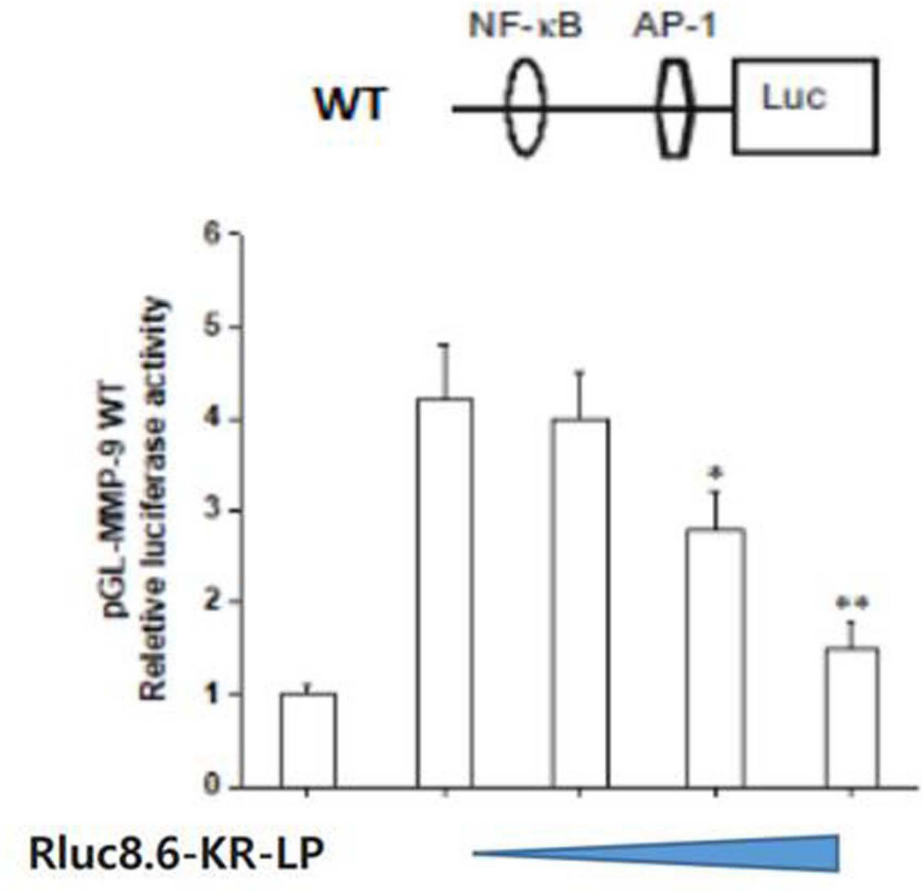
도면3a


NF-kB
Reletive luciferase activity
10
8
6
4
2
0
*
**
Rluc8.6-KR-LP

도면3b



도면3c



서 열 목 록

<110> IUCF-HYU (Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University)
THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Pharmaceutical composition for inhibiting cancer metastasis comprising bioluminescence based reactive oxygen species induced fusion protein as an active ingredient

<130> PD19-273

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lead peptide

<400> 1

Trp Leu Glu Ala Ala Tyr Gln Arg Phe Leu
1 5 10

<210> 2

<211> 586

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pRSET-RLuc8.6-KillerRed-Lead peptide

<400> 2

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly

65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp

85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys

100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ser Ala Leu Ala Phe His

115 120 125

Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu

130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Met Gly Trp Pro Asp Ile Glu

145 150 155 160

Glu Glu Leu Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu

165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Leu Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg

180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu

195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro

210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr

225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu

245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys

260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln

275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu

290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln Glu Phe Gly Gly Gly Met Leu Cys Cys

305 310 315 320

Met Arg Arg Thr Lys Gln Val Glu Lys Asn Asp Glu Asp Gln Lys Ile
325 330 335
Ser Glu Gly Gly Pro Ala Leu Phe Gln Ser Asp Met Thr Phe Lys Ile
340 345 350
Phe Ile Asp Gly Glu Val Asn Gly Gln Lys Phe Thr Ile Val Ala Asp
355 360 365
Gly Ser Ser Lys Phe Pro His Gly Asp Phe Asn Val His Ala Val Cys
370 375 380
Glu Thr Gly Lys Leu Pro Met Ser Trp Lys Pro Ile Cys His Leu Ile

385 390 395 400
Gln Tyr Gly Glu Pro Phe Phe Ala Arg Tyr Pro Asp Gly Ile Ser His
405 410 415
Phe Ala Gln Glu Cys Phe Pro Glu Gly Leu Ser Ile Asp Arg Thr Val
420 425 430
Arg Phe Glu Asn Asp Gly Thr Met Thr Ser His His Thr Tyr Glu Leu
435 440 445
Asp Asp Thr Cys Val Val Ser Arg Ile Thr Val Asn Cys Asp Gly Phe
450 455 460

Gln Pro Asp Gly Pro Ile Met Arg Asp Gln Leu Val Asp Ile Leu Pro
465 470 475 480
Asn Glu Thr His Met Phe Pro His Gly Pro Asn Ala Val Arg Gln Leu
485 490 495
Ala Phe Ile Gly Phe Thr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Met Met Gly His
500 505 510
Phe Asp Ser Lys Met Thr Phe Asn Gly Ser Arg Ala Ile Glu Ile Pro
515 520 525
Gly Pro His Phe Val Thr Ile Ile Thr Lys Gln Met Arg Asp Thr Ser

530 535 540
Asp Lys Arg Asp His Val Cys Gln Arg Glu Val Ala Tyr Ala His Ser
545 550 555 560
Val Pro Arg Ile Thr Ser Ala Ile Gly Ser Asp Glu Asp Gly Gly Gly
565 570 575

Trp Leu Glu Ala Ala Tyr Gln Arg Phe Leu

580 585