(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월13일
(11) 등록번호 10-2165204
(24) 등록일자 2020년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2020.05)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0038667
(22) 출원일자 2019년04월02일
심사청구일자 2019년04월02일

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
박윤배
경상남도 진주시 신안들말길 17, 111동 1403호(신안동, 주공1차아파트)
권하영
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교(가좌동)
장동환
경상남도 창원시 마산합포구 중앙동3길 16, 110동 604호(중앙동2가, 경동메르빌2차)
(74) 대리인
최규환

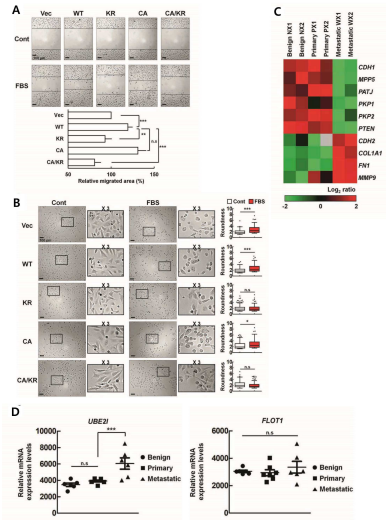
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 **플로틸린-1 단백질 변이체를 유효성분으로 포함하는 전립선암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 플로틸린-1 단백질 변이체를 유효성분으로 포함하는 전립선암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 플로틸린-1 단백질 변이체는 전이성 암세포의 전이 및 상피간엽이행을 억제하는 효과가 있으므로 암 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2018R1D1A1B07045995
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구
연구과제명 Caveolin-2에 의한 지방전구세포의 유사분열 클론성 확장 세포주기 조절 및 지방세포의 인슐린 지질 대사 신호전달계 조절을 통한 비만 제어 기전 연구
기 여 율 1/4
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2023.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2018R1C1B6006816
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 신진연구
연구과제명 소포체 스트레스에 의한 인슐린 저항성에서 Caveolin-2β-PTP1B 조절 인슐린 수용체 분해 기전 제어를 통한 인슐린 감수성 정상화 연구
기 여 율 1/4
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1631090
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 국립암센터
연구사업명 암정복추진연구개발사업
연구과제명 Flotillin-1의 팔미토일화 효소 기반 tumorigenesis 제어 연구
기 여 율 2/4
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2019.04.30

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신(lysine)을 아르기닌(arginine)으로 치환하여 수모화(sumoylation)를 억제시킨 플로틸린(flotillin)-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 전립선암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 플로틸린-1 단백질 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 재조합 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터 또는 박테리오파지 벡터인 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 재조합 바이러스는 아데노바이러스, 아데노부속바이러스(adeno-associated virus), 레트로바이러스, 헤르페스심플렉스바이러스 및 렌티바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 플로틸린-1 단백질 변이체는 전립선암의 전이(metastasis) 및 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition)을 억제하는 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신(lysine)을 아르기닌(arginine)으로 치환하여 수모화(sumoylation)를 억제시킨 플로틸린(flotillin)-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 조성물.

청구항 6

제5항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 플로틸린-1 단백질 변이체를 유효성분으로 포함하는 전립선암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선암은 남성의 전립선에서 발생하는 악성 종양으로, 대부분 전립선 속의 선세포(gland cell)가 암화되어 림프절과 뼈에 전이되며, 전립선암의 약 90%는 자신의 몸에서 만들어지는 남성호르몬에 의해 증식된다. 서양에서는 전립선암이 남성암 중 가장 흔한 암으로 높은 발생 빈도를 보이며, 우리나라에서도 서구식 식습관, 평균 수명의 증가 등의 영향으로 전립선암의 빈도가 급격히 증가하고 있다. 전립선암의 경우 70대 환자가 주를 잇던 과거와는 달리 요즘은 40대에 전립선암 수술을 받는 환자가 급증하고 있다.

[0003] 전립선암 치료 방법에는 근치적 전립선 적출술, 방사선 조사, 화학용법, 호르몬치료 등이 있다. 가장 널리 이용되는 치료방법은 호르몬 치료로서, 전립선암 세포의 상당 부분이 남성호르몬-의존적으로 증식하므로 남성호르몬 분비를 억제하거나 수술을 통해 호르몬 생성을 차단하는 이른바 안드로겐(androgen) 제거방법이다. 이 방법은 80% 이상의 환자에서 암 증식 억제 혹은 병변 축소 등 일시적인 치료 효과를 보인다. 하지만 일시적 호르몬 치료법에 좋은 반응을 보인 환자일지라도 일정 시간이 지나면 대부분 호르몬 저항성 전립선암(hormone-refractory

prostate cancer, HRPC)으로 진전될 수 있으며 이러한 HRPC 환자의 경우 평균 진단 후 1년 이내에 사망하게 된다. HRPC의 경우 기존의 항암제, 화학용법 또는 방사선 요법도 큰 효과를 나타내지 못하므로 새로운 치료방법이 요구되고 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1777259호에는 'EN2 단백질을 특이적으로 인식하는 단클론 항체 또는 이를 함유하는 전립선암 진단용 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2018-0118830호에는 '데가렐릭스를 이용한 전이 단계의 전립선암의 치료 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 플로틸린-1 단백질 변이체를 유효성분으로 포함하는 전립선암 예방 또는 치료용 조성물에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 플로틸린(flotillin)-1 단백질의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신(lysine, K)을 아르기닌(arginine, R)으로 치환하여 수모화(sumoylation)를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체를 발현시킨 전립선암 세포가 야생형 플로틸린-1을 발현하는 전립선암 세포에 비해 세포의 이동능이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 플로틸린-1 단백질 변이체를 발현하는 전립선암 세포에서 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition, EMT)의 촉진인자인 Snail의 발현이 야생형 플로틸린-1을 발현하는 전립선암 세포에 비해 유의적으로 감소되는 것을 확인하였고, 이를 통해, 플로틸린-1 단백질의 아미노산 서열 51번째 및 195번째 잔기가 치환되어 수모화가 억제된 단백질 변이체가 전립선암 세포의 전이(metastasis)와 상피간엽이행을 억제할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신(lysine)을 아르기닌(arginine)으로 치환하여 수모화(sumoylation)를 억제시킨 플로틸린(flotillin)-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 전립선암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신을 아르기닌으로 치환하여 수모화를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 조성물을 개체에 투여하여 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 플로틸린-1 단백질 변이체는 전립선암 세포의 전이 및 상피간엽이행을 억제하는 효과가 우수하므로 전립선암의 치료제로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1A는 면역분석법인 De-IP(denatured immunoprecipitation)를 이용하여 전립선암 세포(PC3 cell)에서 UBC9(ubiquitin conjugating enzyme 9) 단백질이 플로틸린(flotillin)-1 단백질의 수모화(sumoylation)에 미치는 영향을 분석한 결과이다. WT; 야생형 플로틸린-1 단백질, K51R; 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 51번째 라이신(lysine, K)을 아르기닌(arginine, R)으로 치환하여 수모화를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체, K195R; 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 195번째 라이신을 아르기닌으로 치환하여 수모화를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체, KR; 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 51번째 및 195번째 라이신을 아르기닌으로 치환하여 수모화를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체.

도 2는 플로틸린-1 단백질 변이체의 Snail 단백질 분해 효과를 확인한 결과로, A는 Vec(벡터만 트랜스펙션시킨 Mock 벡터 대조군), 야생형 플로틸린-1 단백질(WT) 또는 플로틸린-1 단백질 변이체 KR을 발현하는 전립선암 세포에 FBS(fetal bovine serum)를 무처리하거나 처리한 후 세포 내 *SNAI1* 유전자의 발현 수준을 분석한 결과이고, B 및 C는 플로틸린-1의 siRNA(siFlot-1) 또는 UBC9의 siRNA(siUBC9)를 처리한 전립선암 세포에 단백질 생합성 억제제인 CHX(cycloheximide)을 전처리하고 FBS를 처리하여 Snail, UBC9 또는 플로틸린(Flot)-1 단백질의 발현을 분석한 결과이고, D는 Vec, 야생형 플로틸린-1 단백질 또는 플로틸린-1 단백질 변이체 KR을 발현

하는 전립선암 세포에 FBS를 처리한 후 Snail의 발현 수준 및 단백질 분해를 확인한 결과이며, E는 플로틸린-1 단백질 변이체 KR을 발현하는 전립선암 세포에 단백질 분해 억제제인 MG132 또는 DMSO(dimethyl sulfoxide; 대조군)를 처리한 후 Snail의 발현 수준 및 단백질 분해를 확인한 결과이다.

도 3은 플로틸린-1 단백질 변이체를 발현하는 전립선암 세포의 전이(metastasis) 및 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition, EMT) 억제 효과를 확인한 결과로, A는 Vec(벡터만 트랜스펙션시킨 Mock 벡터 대조군), 야생형 플로틸린-1 단백질(WT), 플로틸린-1 단백질 변이체 KR, CA 또는 CA/KR을 발현하는 전립선암 세포에 FBS를 처리하거나 무처리한 조건에서 세포 이동(migration) 정도를 측정한 결과이고, B는 Vec, 야생형 플로틸린-1 단백질, 플로틸린-1 단백질 변이체 KR, CA 또는 CA/KR을 발현하는 전립선암 세포의 형태학적(cell morphology) 분석을 통해 상피간엽이행 억제 효과를 분석한 결과이고, C는 인간 양성 전립선(human benign prostate), 전립선에서의 원발암(primary cancer) 및 전이성 전립선암(metastatic prostate cancer) 조직에서 상피간엽이행 관련 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling) 분석을 수행한 결과이며, D는 인간 양성 전립선, 전립선에서의 원발암 및 전이성 전립선암 조직에서 UBC9 코딩 유전자(*UBE2I*) 및 플로틸린(Flot)-1 코딩 유전자(*FLOT1*)의 발현 수준을 측정한 결과이다. *CDH1*(E-cadherin), *MPP5*(PALS1), *PATJ*(PATJ), *PKP1*(desmoplakin), *PKP2*(plakophilin) 및 *PTEN*(PTEN); Snail에 의해 하향 조절되는 유전자, *CDH2*(N-cadherin), *COL1A1*(collagen), *FN1*(fibronectin) 및 *MMP9*(MMP9); Snail에 의해 상향 조절되는 유전자, CA; 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 34번째 잔기에서 팔미토화(palmitoylation)를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체, CA/KR; 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 34번째 잔기에서 팔미토화를 억제시키고, 51번째 및 195번째 잔기에서 수모화를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신(lysine)을 아르기닌(arginine)으로 치환하여 수모화(sumoylation)가 억제된 플로틸린(flotillin)-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 전립선암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에 따른 플로틸린-1 단백질 변이체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 플로틸린-1에서 51번째 및 195번째 라이신 잔기가 각각 아르기닌으로 치환된 것으로, 상기 두 잔기의 치환으로 인해 UBC9 단백질에 의한 수모화가 억제된 단백질 변이체이다. 야생형의 플로틸린-1 단백질은 UBC9에 의해 수모화가 일어나면 핵 내로 이동하여 핵에 존재하는 Snail 단백질의 안정성을 유지시킨다.

[0013] 본 발명의 용어 '수모화(sumoylation)'는 수모단백질(small ubiquitin related modifier, SUMO)의 C-말단의 카르복실기와 기질인 라이신 잔기의 ε-아미노기 간에 이소펩티드 결합이 형성되는 것으로, 수모단백질의 결합에 의한 번역 후 변형(post-translational modification)을 통해 세포 내 단백질의 기능을 변화시키는 반응이다.

[0014] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 플로틸린-1 단백질 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 바람직하게는, 재조합 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터 또는 박테리오파지 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 재조합 바이러스는 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스(adeno-associated virus), 레트로 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 플로틸린-1 단백질 변이체는 전립선암 세포의 이동능을 감소시키고, Snail 단백질의 안정성을 감소시켜 전립선암 전이(metastasis) 및 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition)을 억제하는 효과가 있다.

[0016] 본 발명의 약학 조성물은 상기 플로틸린-1 단백질 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함

되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 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, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며, 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0019] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 51번째 및 195번째 라이신을 아르기닌으로 치환하여 수모화를 억제시킨 플로틸린-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 플로틸린-1 단백질 변이체 및 벡터는 전술한 것과 같다.

[0021] 본 발명의 명세서에서, 용어 '암'은 고체 종양 및 혈액 종양(blood born tumor)을 포함하는 일반적인 암 질환을 말하며, 바람직하게는 전립선암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있고, 더욱 바람직하게는 전립선암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 조성물을 개체에 투여하여 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 방법을 제공한다. 상기 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시키는 조성물을 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있고, 바람직하게는 인간을 제외한 동물에게 투여하여 암의 전이 및 상피간엽이행을 억제시킬 수 있다.

[0023] 본 발명의 명세서에서, 용어 '투여'는 상기 개체에 직접 또는 간접으로 투여되는 것을 포함한다. 본 발명에서 플로틸린-1 단백질 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 개체에 투여하는 경우 직접적으로 도구(예컨대, 주사기)를 이용하여 투여하거나 타 물질과 결합 또는 운반체(carrier)에 포함되어 투여하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] **재료 및 방법**

[0026] **1. 세포배양**

[0027] 인간 전립선암 세포(Human prostate adenocarcinoma PC3; KCLB No.21435)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하여 사용하였다. PC3 세포는 10mM D-glucose, 10% FBS(ATCC) 및 1% 항생제(penicillin/streptomycin)가 함유된 RPMI-1640(Thermo Fisher Scientific)에 분주하여 37℃의 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. PC3 세포는 Mycoplasma Detection 키트(Lonza)를 이용하여 음성 마이코플라즈마 오염(negative mycoplasma contamination) 여부를 정기적으로 검사하였다.

[0028] **2. 플라스미드**

[0029] Flot-1 cDNA(GeneBank accession number: NM_005803.2) 전장은 pDSX-Flag 및 pEGFP-N1 벡터(Clontech Laboratories)에 서브클로닝하였고, 플로틸린-1 단백질 변이체는 EZchange site-directed mutagenesis 키트(Enzynomics)를 통해 WT Flot-1-Flag 또는 Flot-1-GFP를 이용하여 생성하였다. 모든 발현 벡터는 시퀀싱을 통해 확인하였고 Flag-SUMO-2/3 및 Myc-UBC9 플라스미드는 서울대학교 정진하 교수님으로부터 제공받아 사용하였으며, 모든 플라스미드는 FuGene® HD(Promega)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하였다.

[0030] **3. 수모화 분석(Sumoylation assay)**

[0031] 면역분석법 중 하나인 De-IP(denatured immunoprecipitation)을 이용하여 수모화 분석을 수행하였다. 변성된 세포 전체 파쇄물(denatured whole cell lysates, De-WCL)을 1차 항체 혼합하여 16시간 동안 반응시키고 Protein G Plus-Agarose beads(Merck Millipore)를 이용하여 4℃에서 4시간 동안 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 TNESV 버퍼(1% NP40, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 2mM EDTA, 10mM $NaVO_4$)로 세척한 후 2X SDS-PAGE 샘플 버퍼를 넣어주었다.

[0032] **4. qRT-PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction)**

[0033] 총 RNA는 TRIzol reagent(SolGent)를 이용하여 추출하였고, cDNA는 Accupower RT PreMix 키트(Bioneer)를 이용하여 합성하였다. cDNA는 EvaGreen® Supermix(Bio-Rad) 및 Eco real-time PCR system(Illumina)을 이용하여 qRT-PCR 분석을 위한 주형으로 사용하였다. cDNA 샘플을 이용한 qRT-PCR은 하우스키핑 단백질인 GAPDH로 정량 분석하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0034] 프라이머 서열 정보

프라이머 명칭	염기서열 (5'→3') (서열번호)
SNAI1 F	CAGCTATTTCAGCCTCCTGTT (2)
SNAI1 R	CCGACAAGTGACAGCCATTA (3)
UBE2I F	GCCAGCCATCACAATCAAAC (4)
UBE2I R	CAGTAAATCGTGTAGGCCTCTG (5)
GAPDH F	GTCAAGGCTGAGAATGGGAA (6)
GAPDH R	ATACTCAGCACCAGCATCAC (7)

[0035] **5. 면역침강법(immunoprecipitation) 및 면역블롯팅(immunoblotting)**

[0036] 1차 항체 및 2차 항체 정보는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0037] 항체 정보

Antigen	Supplier	Catalog#	Application
Flotillin-1	BD Transduction Laboratories	610820	IB (1:500) IP (1:50)
Snail	Cell Signaling	#3879	IB (1:1000)
Myc	Cell Signaling	#2276	IB (1:5000)
UBC9	Santa Cruz Biotechnology	sc-271057	IB (1:500)
SUMO-2/3	Santa Cruz Biotechnology	sc-26969	IB (1:200)
Actin	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616	IB (1:500)
GFP	Santa Cruz Biotechnology	sc-9996	IB (1:200) IP (1:50)
Flag	Sigma-Aldrich	F1804	IB (1:1000)
HRP-anti-goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020	IB (1:10000)
HRP-anti-mouse	Sigma-Aldrich	A4416	IB (1:10000)
HRP-anti-rabbit	Sigma-Aldrich	A6154	IB (1:10000)

[0038] **6. 플로틸린(Flot)-1 및 UBC9 단백질의 넉다운(knock-down)**

[0039] Flot-1 단백질을 넉다운시키기 위한 siRNA인 siFlot-1(M-010636-00-0005)과 UBC9(ubiquitin conjugating enzyme 9) 단백질을 넉다운시키기 위한 siRNA인 siUBC9(M-004910-00-0005), 그리고 대조군인 scRNA(scramble RNA control)는 Dharmacon에서 구입하여 사용하였다. siRNA 이중체(duplex)의 트랜스펙션은 DharmaFECT3 Transfection Reagent(Dharmacon)를 이용하여 수행되었다.

[0040] **7. 세포 이동 분석(cell migration assay)**

[0041] 전립선암 세포(PC3)를 24-웰 배양기(ibid® cell culture insert chamber)에 1×10^4 cells/chamber 세포수로 분주한 후 세포가 부착될 수 있도록 12시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 ibid® cell culture insert를 제거하고 24시간 동안 세포의 이동을 현미경(Optika XDS-3FL, 대물렌즈 10배)으로 관찰하였으며, 상기 현미경으로 관찰된 세포의 이동 면적은 ImageJ(NIH) 프로그램으로 정량하였다.

[0042] **8. 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition, EMT)의 분석**

[0043] 상피간엽이행의 형태학적 변화는 현미경으로 관찰된 세포들의 원형도를 계산하여 정량적으로 분석하였다. 실험군당 3개의 사진을 대상으로 Image Pro 10.0 소프트웨어(Media Cybernetics)로 형태학적 파라미터(roundness=$\text{Perimeter}^2/(4\times\pi\times\text{area})$)로 계산하였다.

[0044] 실험군별 총 세포수는 다음과 같다.; GFP-벡터 과발현 그룹(FBS-무처리 세포수=356, FBS-처리 세포수=375), 야생형(WT) Flot-1-GFP-발현 그룹(FBS-무처리 세포수=441, FBS-처리 세포수=406), Flot-1-KR-GFP-발현 그룹(FBS-무처리 세포수=476, FBS-처리 세포수=347), Flot-1-CA-GFP-발현 그룹(FBS-무처리 세포수=348, FBS-처리 세포수=304), 및 Flot-1-CA/KR-GFP-발현 그룹(FBS-무처리 세포수=423, FBS-처리 세포수=447).

[0045] **9. 유전자 발현 프로파일 및 데이터 분석**

[0046] 인간 양성 전립선(human benign prostate), 전립선에서의 원발암(primary cancer) 및 전이성 전립선암(metastatic prostate cancer) 조직에서 상피간엽이행 관련 유전자들, *FLOT1* 및 *UBE2I*의 발현을 측정하기 위해 사용된 데이터는 GEO(Gene Expression Omnibus) 데이터베이스(accession number: GSE3325)로부터 다운로드하였다. 총 19개의 양성 전립선(n=6), 전립선에서의 원발암(n=7) 및 전이성 전립선암(n=6) 샘플이 GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software)을 이용한 산점도(scatter plot)에 의해 분석되었다. 양성 전립선(n=2; NX1, NX2), 전립선에서의 원발암(n=2; PX1, PX2) 및 전이성 전립선암(n=2; WX1, WX2)의 총 6개 혼주 검체(pooled sample)는 Morpheus 소프트웨어 (https://software.broadinstitute.org/morpheus/)를 이용하여 Snail에 의해 유도되는 상피간엽이행 관련 유전자에 대한 $\log_2$ 유전자 발현의 히트맵을 통해 분석되었다.

[0047] **10. 통계분석(statistical analysis)**

[0048] 데이터는 평균±표준편차로 나타내었고, GraphPad Prism 5.0로 분석되었다. 2개 이상의 그룹에 대한 통계 분석은 one-way(도 3D)와 two-way ANOVA(도 1, 도 2A~E 및 도 3A)로 수행되었으며, 이후 Bonferroni post-hoc 테스트를 수행하였다. 2개 그룹을 비교하는 분석은 Student's *t*-test(도 3B)를 통해 수행되었다. $P<0.05$인 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다($^{*}P<0.05$, $^{*}P<0.01$, $^{***}P<0.001$).

[0049] **실시예 1. 플로틸린(flotillin)-1 단백질 변이체의 제조**

[0050] 수모화(sumoylation)는 수모 단백질(small ubiquitin related modifier, SUMO)의 결합에 의한 번역 후 변형(post-translational modification)을 통해 세포 내 단백질의 기능을 변화시키는 반응이다. 수모 단백질은 SUMO-1, -2, -3 및 -4의 4종이 알려져 있으며, 이 중 SUMO-2 및 3은 96%의 서열 유사성을 보여 기능도 유사하다. SUMO-2/3과 표적 단백질의 결합은 표적 단백질의 ΨKXE일 때 라이신(K)에 SUMO가 결합하는 것으로, Ψ란 큰 소수성 아미노산 잔기(hydrophobic amino acid residue)를 의미한다. 수모 단백질의 결합은 하기 3단계로 구분할 수 있다. 1) E1(SUMO activation enzyme)이 SUMO의 C-말단을 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 이용하여 활성화; 2) E2(SUMO conjugating enzyme 또는 UBC9이라고도 함)로 전달; 3) E3(SUMO-protein ligase)의 도움을 받거나 혹은 독립적으로 표적 단백질에 연결. SUMO-1은 세포 내에 다른 단백질에 결합 상태로 존재하는 반면, SUMO-2/3은 유리형태(free form)로 존재하다가 세포가 어떤 스트레스를 받으면 바로 표적 단백질에 결합하여 conjugation이 되며, SUMO-2/3 conjugating enzyme는 UBC9이다.

[0051] 본 발명에서는 SUMOsp2.0(http://sumosp.biocuckoo.org/), SUMO plot(http://www.abgent.com/sumoplot) 및 PCI(parallel cascade identification)-SUMO 분석법을 통해 플로틸린-1 단백질(서열번호 1)의 아미노산 서열에

서 수모화(sumoylation)의 잠재성을 보이는 51번 및 195번 위치를 확인하였다(표 3).

표 3

플로틸린-1 단백질 아미노산 서열에서 수모화의 잠재성을 보이는 잔기 위치

[0052]

Putative sites / Algorithms	K51	K91	K184	K195	K293	K341	K360
SUMOsp2.0	O	X	O	O	X	X	X
SUMO plot	O	O	O	O	X	O	O
PCI-SUMO	X	X	X	O	O	X	X

[0053] 플로틸린-1 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 51번째 및 195번째 라이신(lysine, K)을 아르기닌(arginine, R)으로 치환시켜 제조하였다. 플로틸린-1 단백질 아미노산 서열의 51번째 잔기만 치환시킨 경우에는 K51R, 195번째 잔기만 치환시킨 경우에는 K195R, 51번째 및 195번째 잔기를 모두 치환시킨 경우에는 KR로 명명하였다.

[0054] 플로틸린(Flot)-1 단백질 변이체를 이용하여 De-IP를 수행한 결과, 수모화되지 않은 야생형(WT) Flot-1-GFP는 약 70kDa 크기에서 밴드가 관찰되었으나 WT Flot-1-GFP-expressing PC3 세포에서 Myc이 태그된 UBC9 및 Flag가 태그된 SUNO-2/3의 이소성 혈질전환(ectopic transfection)에 의해 수모화되어 130~170kDa 위치에서 밴드가 관찰되었다(도 1의 레인 1 및 2).

[0055] 또한, 플로틸린-1 단백질 변이체 K51R 및 K195R의 수모화는 야생형 Flot-1 단백질에 비해 각각 7.9배, 15.1배 감소하였고, KR의 수모화는 야생형 Flot-1 단백질에 비해 22.9배 감소하였다(도 1의 레인 2 vs 3, 4 및 5).

[0056] **실시예 2. 플로틸린(flotillin)-1 단백질 변이체의 Snail 단백질 분해 효과 분석**

[0057] 벡터(대조군), 야생형 플로틸린-1(Flot-1) 단백질 및 플로틸린-1 단백질 변이체 KR을 발현시킨 전립선암 세포(PC3)에 FBS를 처리하거나 무처리한 조건에서 Snail 코딩 유전자(*SNAI1*)의 발현을 확인한 결과, FBS 무처리군(무혈청 배지)에 비해 FBS 처리군에서 *SNAI1* 유전자의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하였으나, 야행성 플로틸린-1(WT) 및 플로틸린-1 단백질 변이체 KR의 발현은 *SNAI1* 유전자의 발현에는 유의적 차이를 주지 않았다(도 2A).

[0058] 또한, 플로틸린(Flot)-1 단백질을 넉다운시키기 위한 siRNA인 siFlot-1을 트랜스펙션한 전립선암 세포, UBC9 단백질을 넉다운시키기 위한 siRNA인 siUBC9을 트랜스펙션한 전립선암 세포 또는 scRNA를 트랜스펙션한 전립선암 세포(대조군)에 단백질 생합성 억제제인 CHX(cycloheximide)을 전처리하고 FBS를 처리한 후 Snail 단백질의 분해(degradation)를 분석한 결과, 대조군에서는 FBS를 처리한 지 0.5~1시간 동안에는 Snail 단백질 발현이 유지되었으나 약 1시간 이후부터는 Snail 단백질 발현이 감소하고 분해가 증가하였다. 반면, Flot-1이 넉다운된 전립선암 세포 또는 UBC9가 넉다운된 전립선암 세포의 경우 FBS를 처리한 지 약 30분 이내로 Snail 단백질의 발현이 현저한 수준으로 감소하였으며, 이를 통해 플로틸린-1 발현 및 UBC9 효소의 활성이 억제되면 Snail 단백질의 발현이 감소하고 분해가 빠르게 증가하는 것을 알 수 있었다(도 2B 및 C).

[0059] 또한, 벡터 또는 야생형 플로틸린(Flot)-1을 발현시킨 전립선암 세포에 FBS를 6~24시간 처리한 경우에는 Snail 단백질이 계속 발현되어 유지되었지만, 이와 비교하여 플로틸린-1 단백질 변이체 KR을 발현시킨 전립선암 세포에서는 FBS 처리 6시간 이후부터 Snail 단백질의 발현 수준이 감소되었음을 확인하였다(도 2D). 플로틸린-1 단백질 변이체 KR을 발현시킨 전립선암 세포에 단백질 분해 억제제인 MG132를 처리하면 DMSO를 처리한 대조군에 비해 FBS 처리 시간이 증가할수록 Snail 단백질의 발현 수준이 증가되는 것이 관찰되었다(도 2E). 이를 통해, 수모화된 플로틸린-1 단백질이 핵에 존재하는 Snail 단백질의 분해를 억제하여 암 전이 촉진인자인 Snail 단백질의 안정성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0060] **실시예 3. 플로틸린-1 단백질 변이체의 전립선암 전이 및 상피간엽이행 억제 효과 분석**

[0061] UBC9에 의해 수모화가 조절되는 플로틸린(Flot)-1 단백질이 전이성 전립선암(metastatic prostate cancer)의 전이 및 상피간엽이행에 미치는 영향을 분석하였다. 본 발명에서 Flot-1 단백질 변이체 CA는 Flot-1 단백질 아미노산 서열의 34번째에서 팔미토화(palmitoylation)를 억제시킨 돌연변이체를 의미하며, 상기 돌연변이체는 Flot-1의 수모화를 촉진시키는 역할을 한다.

[0062] FBS를 처리한 경우 야생형(WT) Flot-1 또는 Flot-1 단백질 변이체 CA를 발현하는 전립선암 세포(PC3)의 이동(migration)은 벡터 대조군에 비해 각각 19.4±5.6%, 31.1±9.7%로 증가하였으나, Flot-1 단백질 변이체 KR 또는 CA/KR을 발현시킨 세포의 이동은 벡터 대조군에 비해 각각 7.1±7.8%, 19.3±7.4%; 로 감소하여 세포의 이동이 억제되는 것을 확인하였다(도 3A). Control은 FBS 무처리 대조군으로 사용되었다.

[0063] 또한, 세포 형태학적(cell morphology) 분석을 통해 상피간엽이행 억제 효과를 분석한 결과, 벡터, 야생형(WT) Flot-1 또는 Flot-1 단백질 변이체 CA를 발현시킨 세포에 FBS를 처리하지 않은 경우에는 전형적인 상피 세포의 형태(epithelial-like cells)를 나타내었으나 FBS를 처리하면 대부분의 세포가 간엽세포의 형태(mesenchymal-like morphology)로 변하는 것이 관찰되었고, Flot-1 단백질 변이체 KR 또는 CA/KR을 발현시킨 세포에 FBS를 처리한 경우에는 상피세포 형태와 간엽세포 형태가 모두 확인되었으며, 벡터, 야생형(WT) Flot-1 또는 Flot-1 단백질 변이체 CA를 발현시킨 세포에 비해 간엽세포 형태를 보이는 세포수가 적은 것을 알 수 있었다. Flot-1 단백질 변이체 KR 또는 CA/KR을 발현시킨 세포의 원형도를 계산하여 두 변이체 간의 상피간엽이행 정도에 유의적 차이가 없음을 알 수 있었다(도 3C).

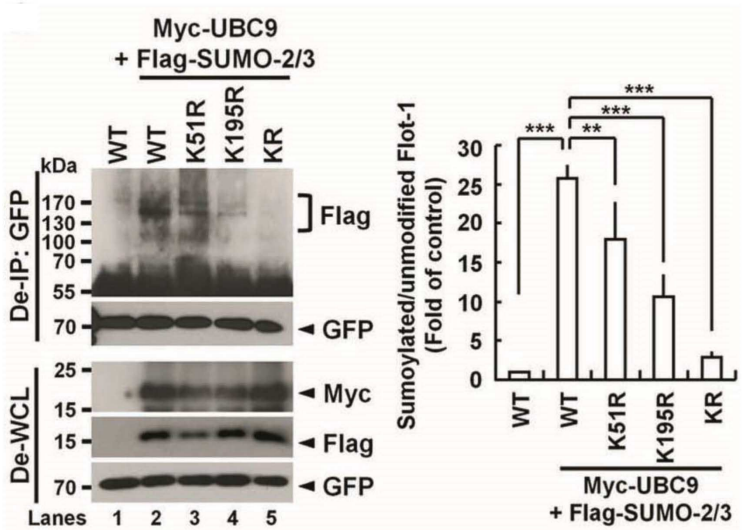
[0064] GEO(Gene Expression Omnibus) 데이터베이스(accession number: GSE3325)에서 다운로드한 mRNA 마이크로어레이 데이터를 이용하여 인간 양성 전립선(human benign prostate), 전립선에서의 원발암(primary cancer) 및 전이성 전립선암(metastatic prostate cancer) 조직에서 상피간엽이행 관련 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling) 분석을 수행한 결과, 전이성 전립선암 조직에서 Snail에 의해 하향 조절되는 것으로 알려진 *CDH1*(E-cadherin), *MPP5*(PALS1), *PATJ*(PATJ), *PKP1*(desmoplakin), *PKP2*(plakophilin) 및 *PTEN*(PTEN) 유전자의 발현은 억제된 반면, Snail에 의해 상향 조절되는 것으로 알려진 *CDH2*(N-cadherin), *COL1A1*(collagen), *FN1*(fibronectin) 및 *MMP9*(MMP9) 유전자의 발현은 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 3C).

[0065] 또한, *UBE2I*(UBC9) 유전자의 발현은 양성 전립선 및 전립선에서의 원발암 조직 보다 전이성 전립선암 조직에서 유의적으로 증가하였고, *FLOT1*(Flot-1) 유전자의 발현은 양성 전립선, 전립선에서의 원발암 및 전이성 전립선암 조직간에 유의적 차이가 없음을 확인하였으며(도 3D), 이를 통해 Snail 매개 상피간엽이행을 유도하는 유전자와 *UBE2I* 유전자가 전이성 전립선암에서 유사한 수준으로 과발현됨을 알 수 있었다.

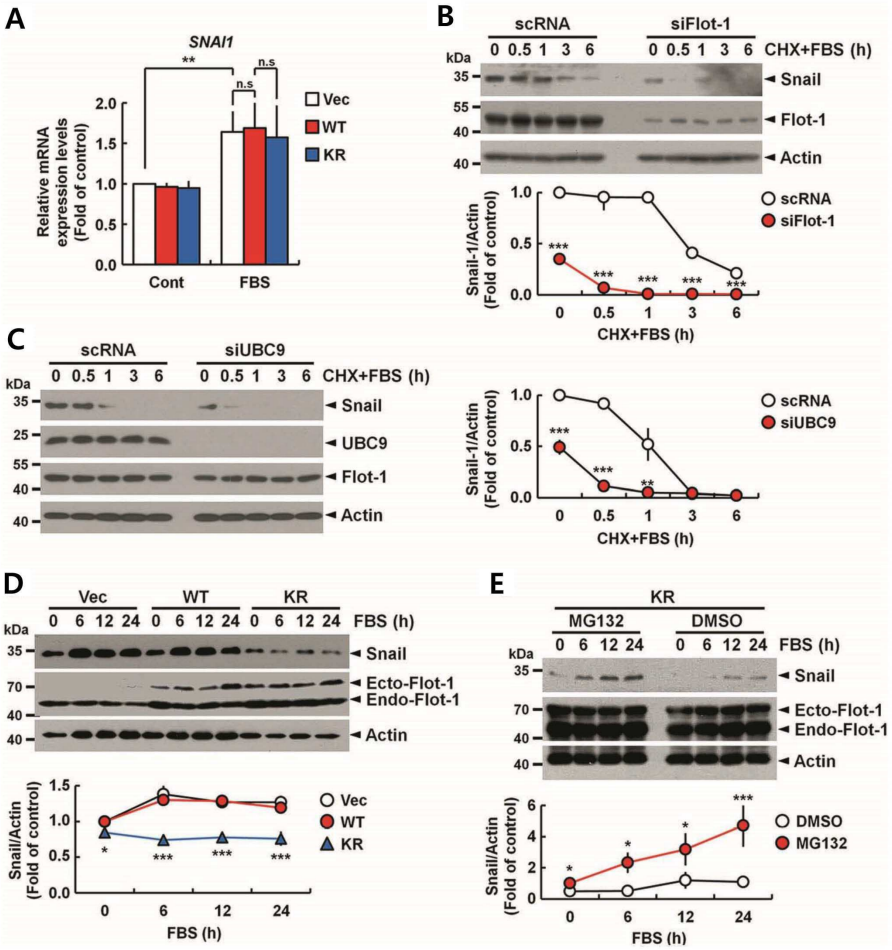
[0066] 상기 결과들을 종합하면, 전이성 전립선암 조직 또는 높은 전이 잠재성을 가진 전립선암 세포에서 UBC9에 의한 플로틸린-1 단백질의 수모화는 Snail 단백질의 안정화와 Snail 매개 상피간엽이행 유전자의 발현 유도와 관련이 있으므로, 플로틸린-1 단백질의 수모화 억제를 통해 Snail 단백질의 분해를 증가시켜 전립선암의 전이 및 상피간엽이행을 억제할 수 있을 것으로 사료되었다.

도면

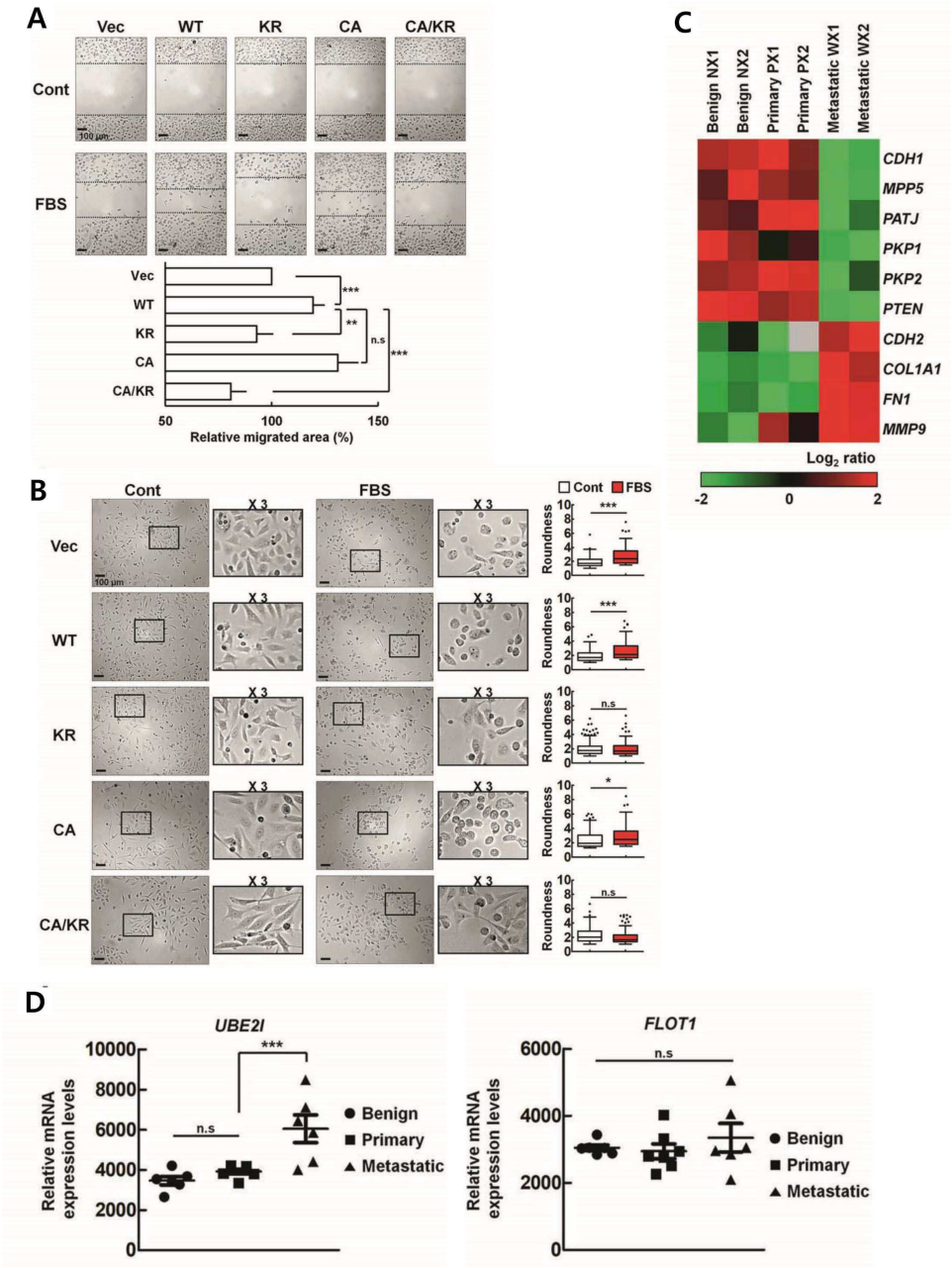
도면1



도면2


A
SNAI1
Relative mRNA expression levels (Fold of control)
Cont
FBS
Vec
WT
KR
B
scRNA
siFlot-1
CHX+FBS (h)
Snail
Flot-1
Actin
Snail-1/Actin (Fold of control)
C
siUBC9
UBC9
D
FBS (h)
Ecto-Flot-1
Endo-Flot-1
Snail/Actin (Fold of control)
E
MG132
DMSO

도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating prostate cancer comprising flotillin-1 protein mutant as effective component

<130> PN19078

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Phe Phe Thr Cys Gly Pro Asn Glu Ala Met Val Val Ser Gly Phe
1 5 10 15

Cys Arg Ser Pro Pro Val Met Val Ala Gly Gly Arg Val Phe Val Leu
20 25 30

Pro Cys Ile Gln Gln Ile Gln Arg Ile Ser Leu Asn Thr Leu Thr Leu
35 40 45

Asn Val Lys Ser Glu Lys Val Tyr Thr Arg His Gly Val Pro Ile Ser
50 55 60

Val Thr Gly Ile Ala Gln Val Lys Ile Gln Gly Gln Asn Lys Glu Met
65 70 75 80

Leu Ala Ala Ala Cys Gln Met Phe Leu Gly Lys Thr Glu Ala Glu Ile
85 90 95

Ala His Ile Ala Leu Glu Thr Leu Glu Gly His Gln Arg Ala Ile Met
100 105 110

Ala His Met Thr Val Glu Glu Ile Tyr Lys Asp Arg Gln Lys Phe Ser
115 120 125

Glu Gln Val Phe Lys Val Ala Ser Ser Asp Leu Val Asn Met Gly Ile
130 135 140

Ser Val Val Ser Tyr Thr Leu Lys Asp Ile His Asp Asp Gln Asp Tyr
145 150 155 160

Leu His Ser Leu Gly Lys Ala Arg Thr Ala Gln Val Gln Lys Asp Ala
165 170 175

Arg Ile Gly Glu Ala Glu Ala Lys Arg Asp Ala Gly Ile Arg Glu Ala
180 185 190

Lys Ala Lys Gln Glu Lys Val Ser Ala Gln Tyr Leu Ser Glu Ile Glu
195 200 205

Met Ala Lys Ala Gln Arg Asp Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Ala Tyr Asp
210 215 220

Ile Glu Val Asn Thr Arg Arg Ala Gln Ala Asp Leu Ala Tyr Gln Leu
225 230 235 240

Gln Val Ala Lys Thr Lys Gln Gln Ile Glu Glu Gln Arg Val Gln Val
245 250 255
Gln Val Val Glu Arg Ala Gln Gln Val Ala Val Gln Glu Gln Glu Ile
260 265 270
Ala Arg Arg Glu Lys Glu Leu Glu Ala Arg Val Arg Lys Pro Ala Glu
275 280 285
Ala Glu Arg Tyr Lys Leu Glu Arg Leu Ala Glu Ala Glu Lys Ser Gln
290 295 300
Leu Ile Met Gln Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ser Val Arg Met Arg Gly

305 310 315 320
Glu Ala Glu Ala Phe Ala Ile Gly Ala Arg Ala Arg Ala Glu Ala Glu
325 330 335
Gln Met Ala Lys Lys Ala Glu Ala Phe Gln Leu Tyr Gln Glu Ala Ala
340 345 350
Gln Leu Asp Met Leu Leu Glu Lys Leu Pro Gln Val Ala Glu Glu Ile
355 360 365
Ser Gly Pro Leu Thr Ser Ala Asn Lys Ile Thr Leu Val Ser Ser Gly
370 375 380

Ser Gly Thr Met Gly Ala Ala Lys Val Thr Gly Glu Val Leu Asp Ile
385 390 395 400
Leu Thr Arg Leu Pro Glu Ser Val Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Ile
405 410 415
Ser Gln Val Asn His Lys Pro Leu Arg Thr Ala
420 425

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 2

cagctatttc agcctcctgt t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ccgacaagtg acagccatta 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gccagccatc acaatcaaac 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

cagtaaatcg tgtaggcctc tg 22

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gtcaaggctg agaatgggaa 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

atactcagca ccagcatcac 20