



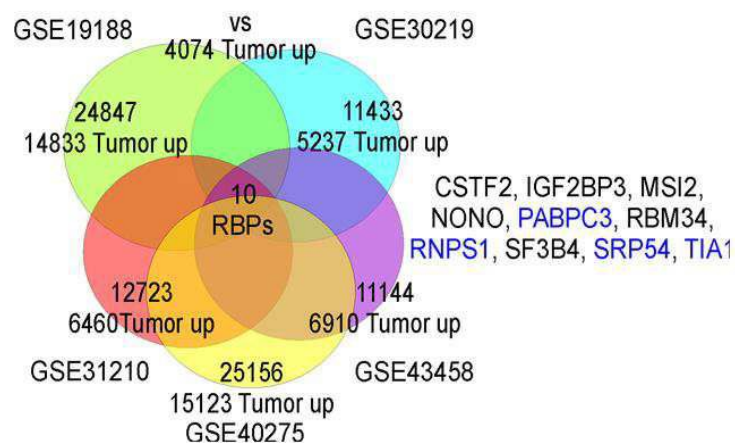
(11) 공개번호 10-2020-0022187
(43) 공개일자 2020년03월03일

- 전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 NONO의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물

본 발명은 NONO의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 유방암, 간암, 폐암 등 여러 암종에서 NONO 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 특이적으로 증가되어 있으며, 이는 암 환자의 생존율, 항암제 반응성 및 방사선 민감성과 높은 연관성을 나타내는 바, NONO를 표적하는 발현 또는 활성 억제제는 종양을 억제하고, 항암제 반응성 및 방사선 민감성을 증진시키는 새로운 암 치료법으로 유용하게 활용될 수 있다.

Normal vs Lung Cancer



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

G01N 33/5011 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

김성진

대전광역시 동구 동서대로1678번길 32-22, A동 20
2호 (성남동, 유락주택)

정성윤

경기도 용인시 수지구 상현동 85-6 서원마을 현대
홈타운아파트 206동 1102호

박석순

경기도 부천시 소사로247번길 19, 1010호 (소사본
동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C0380

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질활극복기술개발사업

연구과제명 NONO 유전자 표적을 통한 삼중음성유방암 환자 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

NONO 유전자의 발현 억제제, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 NONO 유전자의 발현 억제제는 NONO 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 안티센스 뉴클레오타이드 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 이루어지는 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 NONO 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 NONO 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어지는 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 암세포에서 방사선에 대한 민감도를 증진시키는 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 암은 유방암, 간암, 폐암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 조성물.

청구항 6

암 환자에서 분리된 시료에 시험물질을 처리하는 제 1단계;

상기 시험물질을 처리한 시료에서 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제 2단계; 및

대조구 시료와 비교하여 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는, 암 환자에 대한 방사선 민감성 증진제 스크리닝 방법.

청구항 7

NONO 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 유효성분으로 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 8

NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 제제는 상기 NONO 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이거나, 또는 상기 NONO 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 펩타이드 미메틱스, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 10

제 8항 또는 제 9항에 따른 조성물을 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 키트는 NONO 유전자의 센스 또는 안티센스 프라이머를 포함하거나, NONO 유전자에 상보적인 프로브를 포함하거나, 또는 NONO 유전자에 의해 코딩되는 발현 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트.

청구항 12

암 환자에서 분리된 시료부터 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제 1단계;

상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및

상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준이 대조구 시료보다 높을 경우 방사선 치료 예후가 나쁘다고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NONO의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 통계청 자료에 따르면, 한국인의 사망 원인 중 암으로 인한 사망이 1위를 차지하고 있다. 암이란 일반적으로 인체 조직을 이루고 있는 세포 주기에 이상이 생겨 세포가 정상적으로 분화하지 않고 세포분열을 계속하는 질병으로, 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생한다. 암의 원인은 환경이나 음식물 속에 포함된 발암 물질에 의해 정상적인 세포의 유전자나 암 억제 유전자에 돌연변이가 일어나고 이러한 세포들이 발암 물질의 지속적인 자극을 받으면서 비정상적으로 증식하여 암 조직을 형성하는 것으로 알려져 있으나, 암의 발생 원인에 대해서는 현재까지 명확하게 밝혀진 바가 없다.

[0003] 암은 양성 종양(benign tumor)과 악성 종양(malignant tumor)로 구분되어지는데, 양성 종양은 비교적 성장 속도가 느리고 종양의 원발생 부위에서 다른 조직으로 이동되어지는 전이(metastasis)가 되지 않는 것에 반해 악성 종양은 원발부를 떠나 다른 조직으로 침윤되어 빠르게 성장하는 특징을 가짐으로써 생명을 위협하며 사망에 이르는 아주 중요한 원인이 된다.

[0004] 암의 치료를 위해서는 수술, 방사선 치료법 및 화학요법 등이 사용되고 있으나 많은 연구에도 불구하고 암 환자 전체의 50% 이상이 결국 치유되지 못하고 사망하는 것으로 보고된다. 그에 따른 이유는 외과적으로 절제를 하였다 하더라도 미세하게 전이된 암 세포를 제거하지 못하여 암이 재발하거나, 다양한 항암제의 개발에도 불구하고 항암제를 이용한 암 치료 시, 항암제에 대한 암세포 사멸이 유도되지 않거나 초기에는 반응을 보여 종양이 줄어드는 듯 보이지만 치료도중이나 치료가 끝난 후 항암제에 대한 내성이 생긴 암세포들이 급격히 증식하기 때문이다. 오늘날에는 약 60여 종의 다양한 항암제가 사용되고 있으며, 암 발생 및 암 세포의 특성에 관한 지식이 많이 알려짐에 따라, 새로운 항암제 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나, 항암제들은 반복적으로 장기간 투여 되거나 암이 재발된 경우에는 암세포가 항암제에 대한 내성을 획득함으로써 치료 효과를 상실하는 단점이 있다. 또한, 대부분의 항암제는 세포 내 핵산의 합성을 억제하거나 핵산에 직접 결합하여 그 기능을 손상시킴으로 효과를 나타내는데, 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직 세포에도 손상을 입히기 때문에 골수 기능 저하, 위장관 점막 손상, 탈모 등 여러 부작용이 나타나는 단점이 있다. 또한, 방사선 치료의 경우에도 암세포의 방사선 내성 획득, 고선량 방사선 치료 시, 정상 조직의 손상 등이 치료의 효율을 떨어뜨려 방사선 치료의 문제점으로 대두되고 있다.

[0005] 즉, 상기 암 치료법들은 여러 한계를 보여주고 있으며, 대부분의 표적 치료제는 기존에 규명되어져 있는 신호전달체계를 표적하는 한계를 가지고 있어 새로운 종양 생성 관련 신호전달체계를 규명하여 표적하는 새로운 대안

이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2018-0056796호 (2018.05.29. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 방사선 민감성 증진용 조성물, 또는 방사선 민감성 증진제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물, 또는 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 방사선 치료 예후 예측용 조성물, 또는 방사선 치료 예후 예측용 키트를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NONO 유전자의 발현 억제제, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 암 환자에서 분리된 시료에 시험물질을 처리하는 제 1단계; 상기 시험물질을 처리한 시료에서 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제 2단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는, 암 환자에 대한 방사선 민감성 증진제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 NONO 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 유효성분으로 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 조성물, 또는 상기 조성물을 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 암 환자에서 분리된 시료부터 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준이 대조구 시료보다 높을 경우 방사선 치료 예후가 나쁘다고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 유방암, 간암, 폐암 등 여러 암종에서 NONO 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 특이적으로 증가되어 있으며, 이는 암 환자의 생존율, 항암제 반응성 및 방사선 민감성과 높은 연관성을 나타내는 바, NONO를 표적하는 발현 또는 활성 억제제는 종양을 억제하고, 항암제 반응성 및 방사선 민감성을 증진시키는 새로운 암 치료법으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 폐암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 폐암 조직 및 정상 조직에서 발현되는 RNA 결합 단백질을 분석한 결과이다.

도 2는 폐암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자의 발현을 분석한 결과이다.

도 3은 간암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자의 발현을 분석한 것이다.

도 4는 폐암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자 발현에 의한 환자 생존율을 분석한 결과이다.

도 5는 간암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자 발현에 의한 환자 생존율을 분석한 결과이다.

도 6은 유방암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자 발현에 의한 환자 생존율을 분석한 결과이다.

도 7은 유방암 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자 발현에 의한 약물 반응성을 분석한 결과이다.

도 8은 폐암 세포주에서 NONO 발현 억제에 의한 암세포의 성장 억제 효과를 나타낸 결과이다.

도 9는 간암 세포주에서 NONO 발현 억제에 의한 암세포의 성장 억제 효과를 나타낸 결과이다.

도 10은 유방암 세포주에서 NONO 발현 억제에 의한 암세포의 성장 억제 효과를 나타낸 결과이다.

도 11은 NONO 발현 억제에 의한 종양 성장 억제 효과를 나타낸 결과이다.

도 12는 NONO 발현 억제에 의한 항암제 민감성 증진 효과를 나타낸 결과이다.

도 13은 NONO 발현 억제에 의한 방사선 민감성 증진 효과를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 발명자들은 여러 암종에서 NONO 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 특이적으로 증가되어 있는 것을 확인한 바, NONO를 표적하는 발현 또는 활성 억제제가 종양을 억제하고, 항암제 반응성 및 방사선 민감성을 증진시키는 새로운 암 치료법으로 활용될 수 있음을 확인하며 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 이에, 본 발명은 NONO(GenBank accession ID: NM_001145408.1) 유전자의 발현 억제제, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 NONO 유전자의 발현 억제제는 NONO 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 안티센스 뉴클레오타이드 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 이루어지는 군에서 선택될 수 있으며, 상기 NONO 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 NONO 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어지는 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0021] 상기 조성물은 암 세포에서 방사선에 대한 민감도를 증진시킬 수 있으며, 바람직하게 상기 암은 유방암, 간암, 폐암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "방사선 민감성 증진"이란 방사선을 이용한 질병 치료에 있어서, 방사선에 대한 세포의 민감성을 증진시키는 것을 의미한다. 이를 통해 방사선 치료 효율을 상승시킬 수 있는데, 특히, 암치료 시, 병행처리되면 암세포의 방사선 민감성이 증진되어 암세포의 살상 효과 및 증식 억제효과를 나타낼 수 있다.
- [0023] 본 발명의 방사선 민감성 증진용 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다.
- [0024] 상기 "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여하는 조성물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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.
- [0025] 본 발명에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 예를 들어 안티센스 핵산 분자의 바이러스성 또는 비바이러스성 기술에 의한 운반을 포함한다. 본 발명의 조성물이 암세포 내로 도입되면, 상기 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 낮추거나 활성을 저해함으로써, 방사선 민감성을

증진시키게 된다.

- [0026] 본 발명의 방사선 민감성 증진용 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있으며, 투여의 용이성과 투여량의 균일화를 위해 단위 투여 형태로 제형화할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥 내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.
- [0027] 상기 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 치료 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산 되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 암 치료를 위한 방사선 요법은 본 발명의 방사선 민감성 증진용 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료적 유효량은 방사선에 대해 암세포 내의 종양의 민감성을 효과적으로 증진시키는 양을 의미한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 및 조사되는 방사선량을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 방사선 민감성 증진용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 경우에 따라, 본 발명의 방사선 민감성 증진용 조성물과 함께 공지의 항암제를 병용 투여하여 방사선 치료 효과를 포함한 항암 효과를 증대시킬 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 상기 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산일 수 있고, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 한, 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 NONO에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체

길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

- [0035] 본 발명에서 용어 "펩티드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질을 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어 "애포타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 애포타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 암 환자에서 분리된 시료에 시험물질을 처리하는 제 1단계; 상기 시험물질을 처리한 시료에서 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제 2단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는, 암 환자에 대한 방사선 민감성 증진제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "암 환자에서 분리된 시료"란 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준에 있어서 대조구와 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0040] 상기 유전자의 발현 수준은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0041] 상기 단백질 발현 또는 활성 수준은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 NONO 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 유효성분으로 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명에서 용어 "예후 예측"은 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후 예측이란 질환의 치료 후 경과를 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 목적상 상기 예후 예측은 암 환자의 방사선 치료 후, 질환의 경과 및 완치 여부를 미리 예상하여 암 환자의 무병생존율 또는 생존율을 예측하는 행위로 해석될 수 있다. 예를 들어, "예후가 좋다"라고 예측하는 것은 방사선 치료 후 암 환자의 무병생존율 또는 생존율이 높은 수준을 나타내어, 암 환자가 치료될 가능성이 높다는 것을 의미하고, "예후가 나쁘다"라고 예측하는 것은 방사선 치료 후 암 환자의 무병생존율 또는 생존율이 낮은 수준을 나타내어, 암 환자로부터 암이 재발하거나 또는 암으로 인하여 사망할 가능성이 높다는 것을 의미한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0048] 상기 제제는 상기 NONO 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이거나, 또는 상기 NONO 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 펩타이드 미메스틱, 애포타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

- [0050] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0051] 상기 키트는 본 발명의 유전자의 센스 또는 안티센스 프라이머를 포함하거나, 상기 유전자에 상보적인 프로브를 포함하거나, 상기 유전자에 의해 코딩되는 그 발현 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 암 환자에서 분리된 시료로부터 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 NONO 유전자의 발현, 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 또는 활성 수준이 대조구 시료보다 높을 경우 방사선 치료 예후가 나쁘다고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0055] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0057] **실시예 1: 암세포에서 NONO 유전자 발현 증가 분석**
- [0058] RNA 결합 단백질(RNA binding protein; RBP)은 암 생성 및 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 바, 이를 표적으로 하는 암 치료 기술은 새로운 대안으로 모색되고 있다.
- [0059] 이에, 도 1과 같이, NCBI GEO 사이트에서 인체 유래 폐암 유전체 프로파일인 GSE19188, GSE30219, GSE43458, GSE31210, GSE40275 데이터를 획득한 후, BRB-Array tool을 이용하여 정규화(normalization)를 수행하였으며, 정상 조직과 폐암 조직에서 p 값이 0.001 이하인 유전자를 class comparison 분석법으로 선별하였다. 선별된 유전자들을 비교하여 공통적으로 발현의 차이를 나타내는 RNA 결합 단백질(NONO, CSTF2, IGF2BP3, MSI2, PABPC3, RBM34, RNPS1, SF3B4, SRP54, TIA1)을 최종 선별하였으며, 이중 NONO 유전자의 발현이 정상 조직에 비해 폐암 조직에서 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였다.
- [0061] 다음으로 폐암(GSE19188, GSE30219, GSE43458, GSE31210) 및 간암(TCGA LIHC, SKKU HCC, GSE39791, Korea Pool) 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자를 선별한 후, TTEST에 기초한 통계분석을 통해 암 조직 및 정상 조직의 NONO 유전자 발현의 차이를 분석하였다. 그 결과, 도 2 및 도 3과 같이, NONO의 유전자 발현이 정상 조직에 비해 폐암 조직 및 간암 조직에서 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$).
- [0063] **실시예 2: NONO 유전자 발현 및 환자 생존율과의 연관성 분석**
- [0064] 폐암(GSE8894, GSE29013, GSE14814, GSE31210) 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 NONO 유전자의 발현을 분석한 후, NONO 유전자의 발현이 높은 환자와 NONO 유전자의 발현이 낮은 환자를 구분하고, Log rank test를 수행 후, Kaplan meir plotting을 수행하여 환자의 생존율을 분석하였다. 그 결과, 도 4와 같이, NONO 유전자의 발현이 높은 폐암 환자에서 치료 예후가 불량하고 재발율이 높은 반면, NONO 유전자의 발현이 낮은 폐암 환자에서는 생존율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0066] 또한, 다른 암종인 간암(Fudan LIHC, Korea Pool, TCGA LIHC Updated) 및 유방암(UNC TNBC) 환자 유래 유전체 프로파일을 이용하여 상기와 동일한 방법으로 환자 생존율을 분석한 결과, 도 5 및 도 6과 같이, NONO 유전자의 발현이 높은 간암 또는 유방암 환자에서 치료 예후가 불량하고 재발율이 높은 반면, NONO 유전자의 발현이 낮은 간암 또는 유방암 환자에서는 생존율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0067] 또한, 도 7과 같이, 유방암 환자 유래 유전체 프로파일에서 NONO 유전자의 발현이 증가할수록 약물에 대한 반응성이 불량한 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 실시예 3: NONO 발현 억제에 의한 암세포 성장 억제 효과 분석

[0070] NONO 유전자 발현이 환자 생존율 및 다양한 임상적 매개변수(parameter)와 연관성이 높은 것을 확인한 바, NONO 유전자가 직접적으로 암세포 성장에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[0071] 폐암(A549, H1299), 간암(Hep3B, SNU449) 및 유방암 세포주(Hs578T, MDA-MB-231)는 ATCC 및 한국세포주은행에서 구매하였으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 1% 항생제가 포함된 RPMI1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 생존율을 측정하는 시약인 EZ-cytox는 Daeil Lab Service Co. Ltd에서 구매하였다.

[0072] 암세포주에 shCon 또는 shNONO(Sigma)를 72시간 동안 처리한 후 96 웰 플레이트에 1 X 10⁴ 세포/웰 농도로 접종하였다. 이후 시간(24, 48, 72시간)에 따라 배양하며, 각 배양 시간에 맞게 EZ-cytox를 10 μL씩 웰에 첨가하고 1시간 동안 추가 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0073] 그 결과, 도 8과 같이, 폐암 세포주(A549, H1299)는 shNONO에 의해 NONO의 발현이 억제되었을 때 암세포의 성장이 유의하게 감소하였다. 또한, 도 9 및 도 10과 같이, 간암(Hep3B, SNU449) 및 유방암(Hs578T, MDA-MB-231) 세포주에서도 shNONO에 의해 NONO의 발현이 억제되었을 때 암세포의 성장이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0074]

	서열(5'-3')
shCon	GCAAGCTGACCCCTGAAGTTCAT
shNONO #1/#562	CCGGCAGGCGAAGTCTTCATTCATACTCGAGTATGAATGAAGACTTCGCCTGTTTTTG
shNONO #2/#628	CCGGGCTGCTACAATGGAAGGAATTCCTCGAGAATTCCTCCATTGTAGCAGCTTTTTG
shNONO #558/#693	CCGGGCCAGAATTCTACCCCTGGAACTCGAGTTTCCAGGGTAGAATTCTGGCTTTTTG
shNONO #663	CCGGTGAGCACCAGGTCATGCTAATCTCGAGATTAGCATGACCTGGTGCTCATTTTTG
shNONO #1049	CCGGTCCAGAGAAGCTGGTTATAAACTCGAGTTTATAACCAGCTTCTCTGGATTTTTG

[0076] 실시예 4: NONO 발현 억제에 의한 종양 성장 억제 효과 분석

[0077] NONO 유전자 발현이 환자 생존율 및 치료 예후에 영향을 미치는 것을 확인한 바, in vivo에서 NONO를 표적하는 기술은 생존율 및 약물 치료 향상에 있어서 매우 중요하다.

[0078] 이에, 면역이 억제된 누드 마우스(nude mouse)에 폐암 환자 유래 암 조직을 이식한 후 siCon(UUCUCCGAACGUGUCACGU) 또는 siNONO(GAUGGAAGCUGCACGCCAU, Sigma)를 나노 키토산으로 코팅한 나노입자를 1주일에 2회씩 복강으로 주입하였으며, 5주 후 생성된 종양 크기와 무게를 측정하였다. 그 결과, 도 11과 같이, NONO를 표적하는 siRNA를 처리한 군에서 종양의 크기 및 무게가 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0080] 실시예 5: NONO 발현 및 항암제 민감성과의 연관성 분석

[0081] NONO 발현 및 항암제 민감성과의 연관성을 분석하기 위해, 유방암 세포주에 항암제로서 독소루비신(LC Laboratories) 및 NONO 발현 억제제로서 shNONO를 병용 처리한 후 24시간 내지 96시간 동안 배양하였으며, 각 배양 시간에 맞게 EZ-cytox를 10 μL씩 웰에 첨가하고 1시간 동안 추가 배양한 다음 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 분석하였다. 그 결과, 도 12와 같이, 유방암 세포의 성장이 항암제를 단독 처리하였을 때 보다 shNONO를 병용 처리하여 NONO의 발현이 억제되었을 때 훨씬 더 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0082]

[0083] 실시예 6: NONO 발현 및 방사선 민감성과의 연관성 분석

[0084] 간암 세포주(Hep3B)에 방사선을 10 Gy로 조사한 후 시간대 별로 세포를 획득하여 단백질을 추출하였다. 상기 단백질을 50 μg을 SDS-PAGE 방법(Bio-rad)로 분리하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 전기영동으로 분리된 단백질은 트랜스퍼 버퍼를 이용하여 PVDF(polyvinylidene fluoride, 폴리비닐리덴 플루오라이드) 멤브레인(Millipore)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인은 탈지유(skim milk)로 블로킹(blocking)시킨 후, 4℃에서 1차 항체

로 24시간 동안 반응시키고, 이후 HRP가 접합된 2차 항체로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 멤브레인은 ECL 검출 키트(Daeil Lab Service Co. Ltd) 발광 방법을 이용하여 X-선 필름에 노출하여 현상한 다음 필름 상에서 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. 웨스턴 블롯에 사용된 항체는 다음과 같다: NONO(Bethyl A300-582A), H2AX(Millipore 05-636), FOXM1(Cellsignaling 5436), Actin(Cellsignaling 3700).

[0085] 또한, 방사선 민감성과 NONO 발현과의 연관성을 분석하기 위해, 간암 세포주(Hep3B)에 shNONO를 72시간 동안 처리한 후 6 웰 플레이트에 1×10^3 세포/웰 농도로 접종한 후 방사선 처리 2 주후에 콜로니 형성 분석을 수행하였다.

[0086] 그 결과, 도 13과 같이, 간암 세포주에 방사선 조사 시, NONO의 발현이 일시적으로 증가되었으며, 암세포 성장에 있어서 유의한 억제 효과가 관찰되지 않았으나, 방사선 조사와 함께 NONO의 발현이 억제되었을 때 방사선에 의한 암세포 성장이 훨씬 더 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

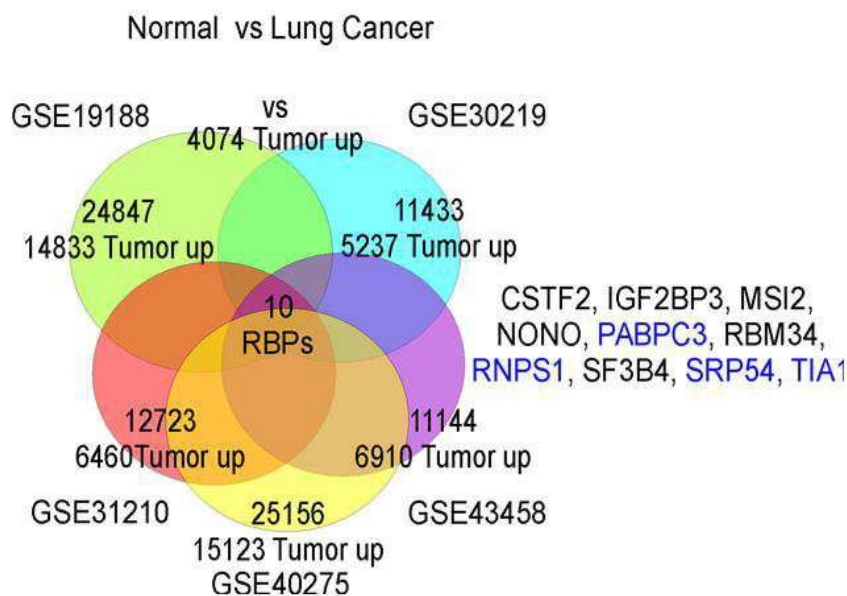
[0088] 즉, 본 발명은 기존의 신호전달경로와 다른 NONO를 표적하여 암세포를 표적함과 동시에 항암제 및 방사선 민감성을 증진시킬 수 있는 바, 향후 암 치료 기술의 새로운 패러다임을 유용하게 활용될 수 있다.

[0090] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

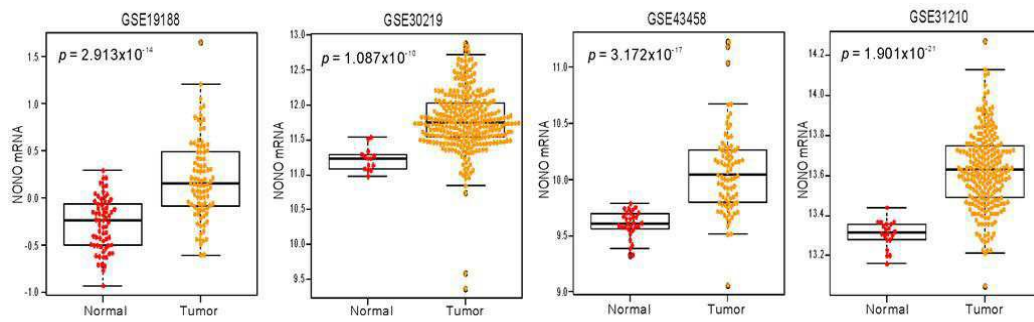
[0091] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

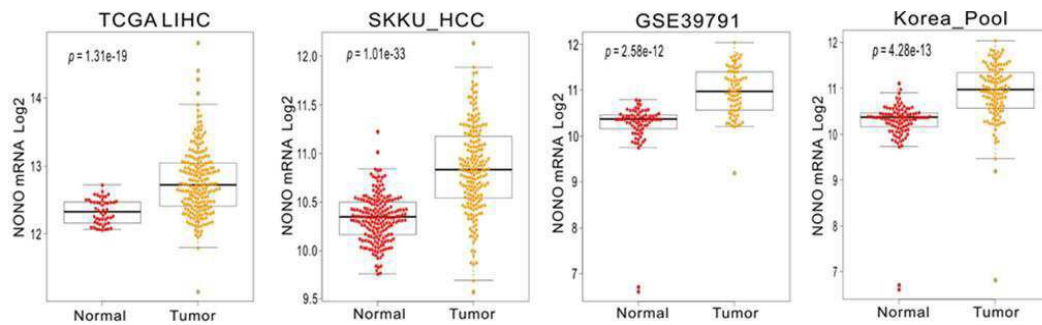
도면1



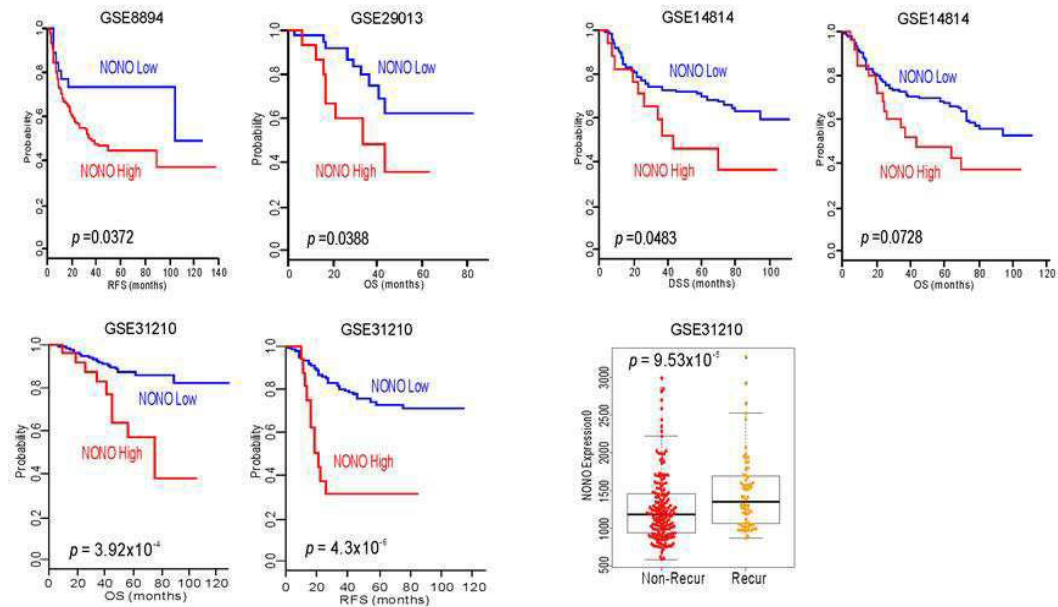
도면2



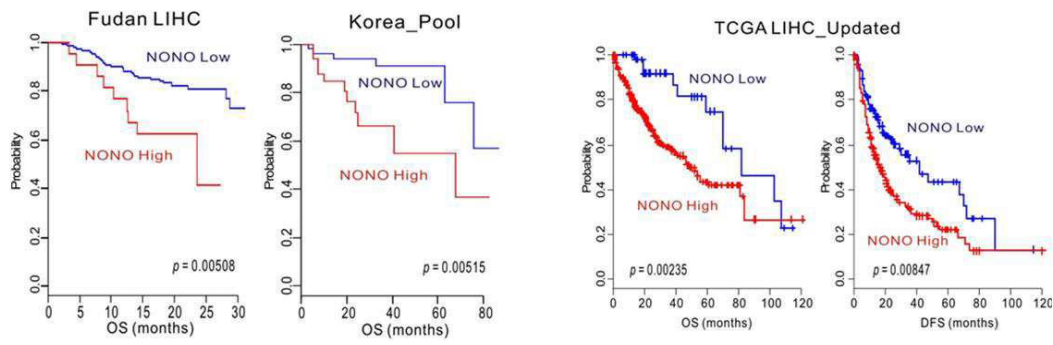
도면3



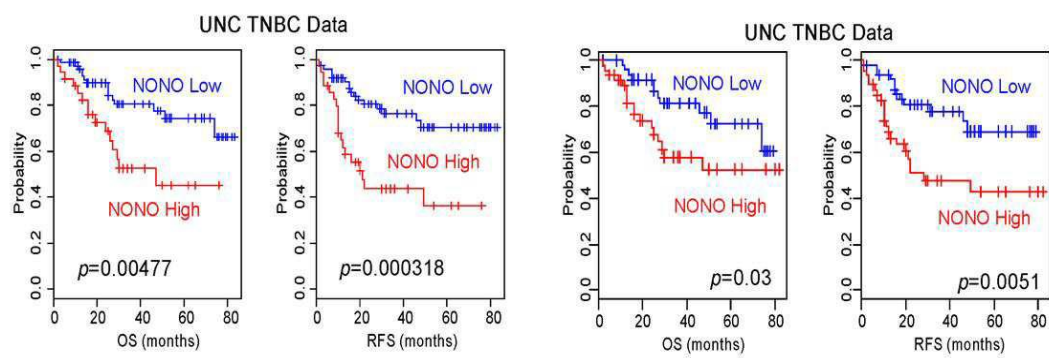
도면4



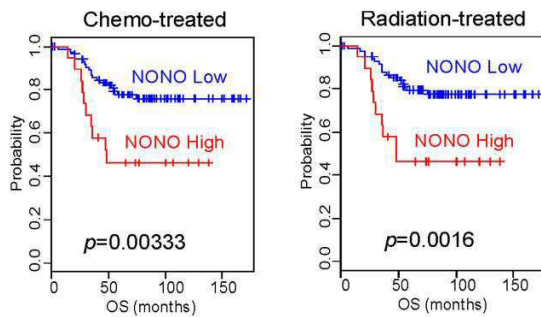
도면5



도면6

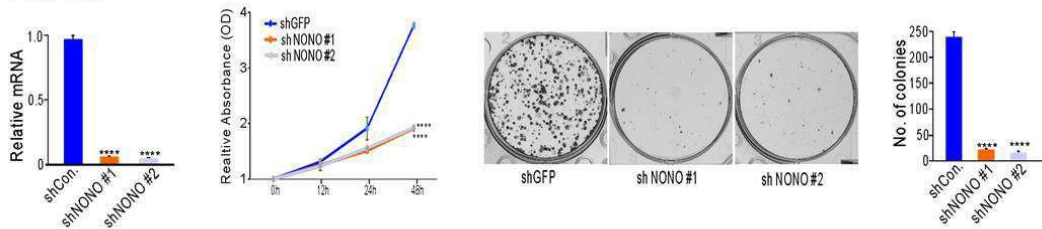


도면7

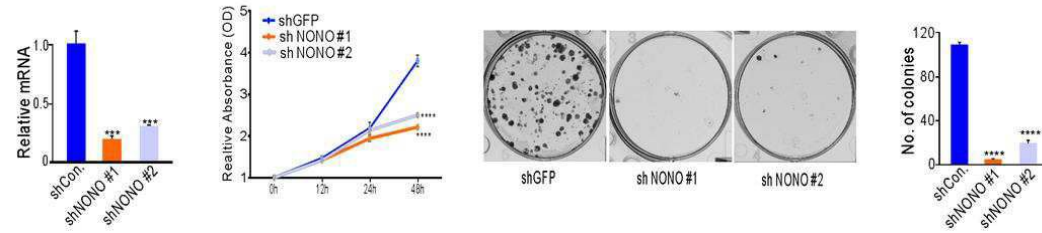


도면8

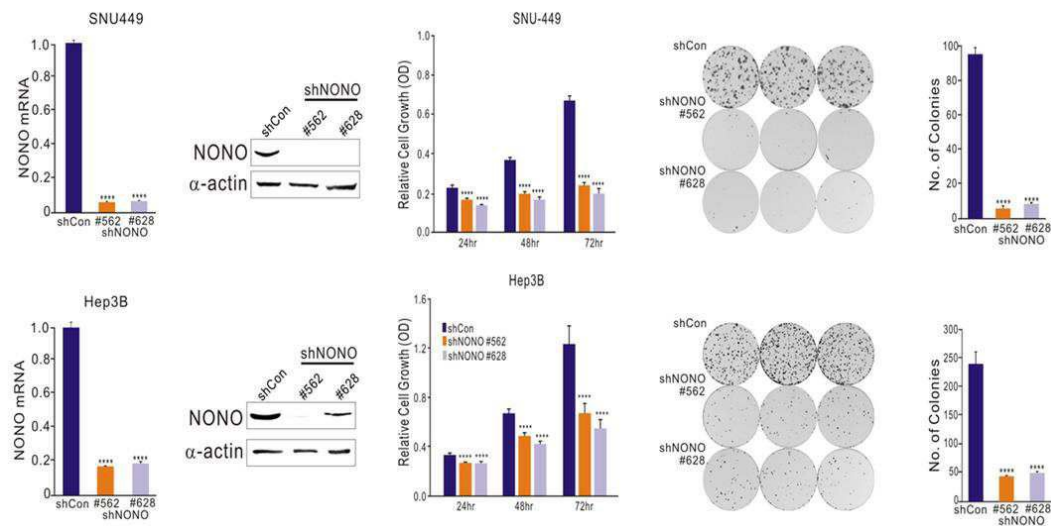
A549 cells



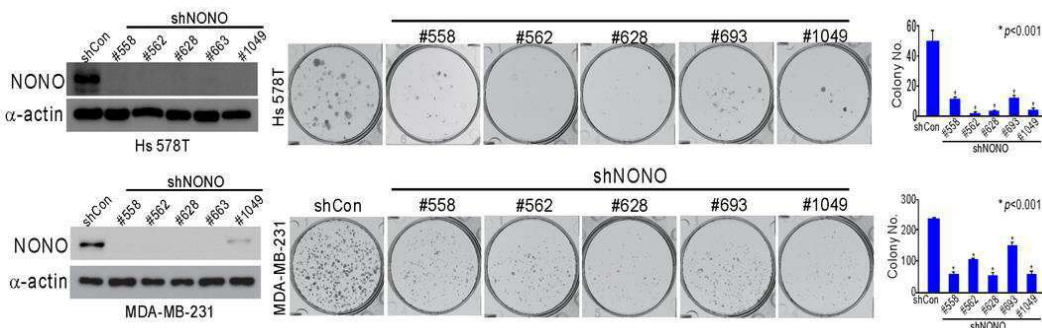
H1299 cells



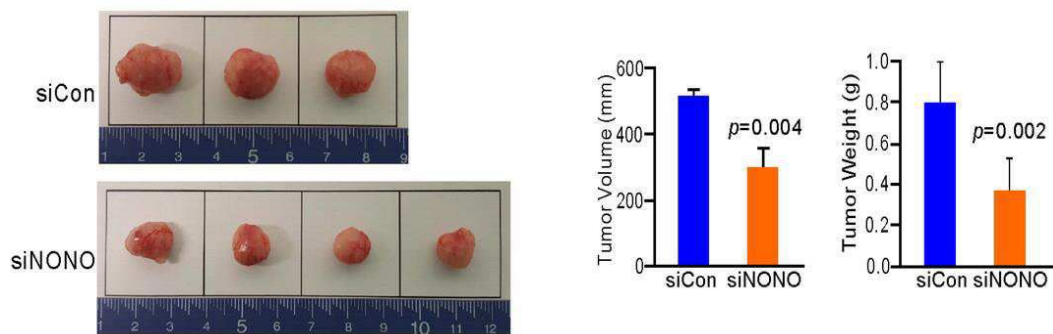
도면9



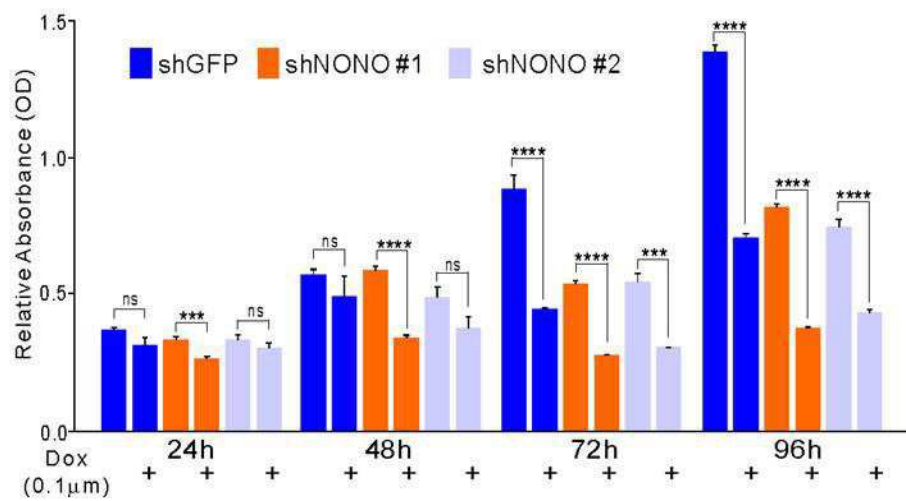
도면10



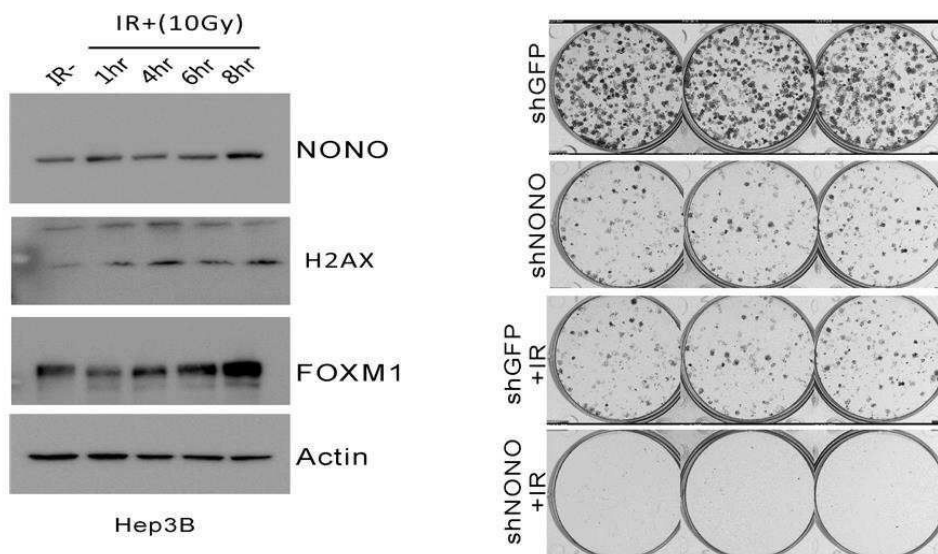
도면11



도면12



도면13



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION

<120> Composition for enhancing radiation sensitivity comprising
expression or activity inhibitor of NONO

<130> ADP-2018-0237

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shCon

<400> 1

gcaagctgac cctgaagttc at 22

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNONO #1/#562

<400> 2

ccggcaggcg aagtcttcat tcatactcga gtatgaatga agacttcgcc tgtttttg 58

<210> 3

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNONO #2/#628

<400> 3

ccgggctgct acaatggaag gaattctcga gaattccttc cattgtagca gctttttg 58

<210> 4

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shNONO #558/#693

<400> 4

ccgggccaga attctaccct ggaaactcga gtttcagggt tagaattctg gctttttg 58

<210> 5
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shNONO #663
 <400> 5
 ccggtgagca ccaggtcatg ctaatctcga gattagcatg acctggtgct catttttg 58
 <210> 6
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shNONO #1049
 <400> 6
 ccggtccaga gaagctggtt ataaactcga gtttataacc agcttctctg gatttttg 58
 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siCon
 <400> 7
 uucuccgaac gugucacgu 19
 <210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siNONO
 <400> 8
 gauggaagcu gcacgccau 19