

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 7월 21일 (21.07.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/087343 A2

- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/000365
- (22) 국제출원일: 2011년 1월 18일 (18.01.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0004311 2010년 1월 18일 (18.01.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주)이젠바이오텍 (EGENBIOTECH. INC.) [KR/KR]; 경기도 파주시 백금동 599-1, 413-060 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 신영기 (SHIN, Young Kee) [KR/KR]; 서울시 강남구 대치동 1041-3 삼성대치아파트 114-1301, 135-968 Seoul (KR). 정현순 (JUNG, Hun Soon) [KR/KR]; 서울시 강서구 화곡4동 823-16 영화주택 B04, 157-900 Seoul (KR). 김영덕 (KIM, Young-Deug) [KR/KR]; 인천시 남구 관교동 쌍용아파트 5-907, 402-715 Incheon (KR).

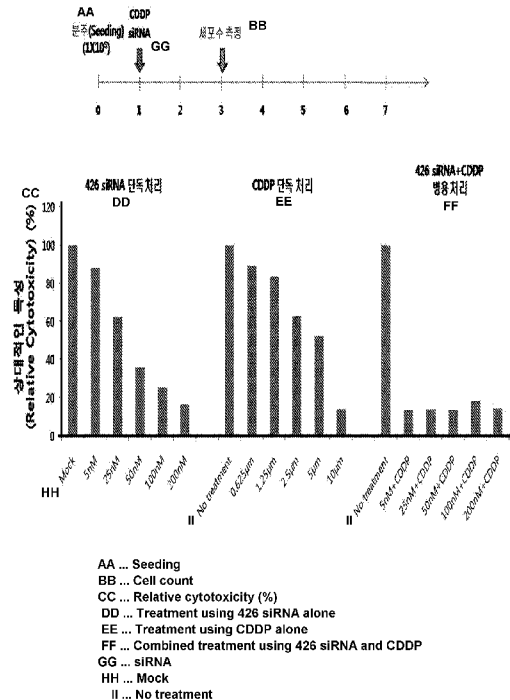
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won-Hee); 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING CANCER RELATED TO AN HPV INFECTION

(54) 발명의 명칭: HPV 감염과 관련된 암의 치료용 조성물

[Fig. 6a]



(57) Abstract: The present invention relates to a chemosensitizer or radiosensitizer for the treatment of cancer caused by a human papillomavirus (hereinafter referred to as HPV) infection. More particularly, the present invention relates to a chemosensitizer or radiosensitizer for treating cancer caused by a HPV infection, which contains, as an active ingredient, small interfering RNA, short hairpin RNA (shRNA) or antisense oligonucleotide (ASO) selected from a group consisting of nucleotide sequence numbers 1 to 10. The siRNA of the present invention has superior effects in treating cervical cancer when compared to cases in which therapy using HPV-specific siRNA, chemotherapy, or radiotherapy is performed alone, and increases the sensitivity of cervical cancer cells to radiation or anticancer agents to thereby achieve maximized apoptotic effects.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus: 이하, HPV) 감염에 의해 유발된 암의 항암 치료시 화학 또는 방사선 감작제에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Antisense oligonucleotide, ASO)를 유효성분으로 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암의 치료시 화학 또는 방사선 감작제에 관한 것이다. 본 발명의 siRNA는 단독으로 HPV 특이적인 siRNA 또는 화학요법 또는 방사선 요법을 수행하는 것보다 뛰어난 자궁경부암 치료 효과를 가지며, 방사선 또는 항암제에 대한 자궁경부암세포의 민감도를 증진시켜 세포사멸 효과를 극대화할 수 있다.



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: H P V 감염과 관련된 암의 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus: 이하, HPV) 감염에 의해 유발된 암의 항암 치료시 화학 또는 방사선 감작제에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 고위험성(High-risk) 인간 유두종 바이러스(Human Papilloma Virus: 이하, HPV) 16, 18 타입은 자궁경부암 및 자궁경부이형화의 주된 원인이 되는 요인이며 다른 생식기 암과 머리와 목 편평상피세포 암을 일으키는 원인이 된다. 자궁경부암은 여성에게 악성종양의 가장 일반적인 타입 중의 하나이다. 침윤성 자궁경부암의 발병률은 서서히 감소하고 있지만, 개발도상국의 모든 여성에게는 가장 빈번한 암으로 여성암의 25%를 차지한다. HPV는 대략 8,000개의 염기서열을 가진 양성 악성 종양을 일으키는 작은 DNA 바이러스이다. 현재까지 계놈의 차이에 따라 100여개 이상의 HPV 아류형이 확인되었으며, 대략 90개 정도의 HPV는 유전자형이 완전하게 분석되어있다. 이러한 타입 중에서 고위험성 HPV 타입(예를 들면, HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56)은 자궁경부암의 거의 90%에 관계하고 있다. HPV에 감염된 자궁경부암의 50% 이상은 HPV-16 타입이 관련이 있으며 다음으로 HPV-18(12%), HPV-45(8%), HPV-31(5%) 타입이 관련이 있다. 이러한 HPV는 2개의 발암성(oncogenic) 단백질 E6와 E7을 코드화한다. 이 단백질들은 모두 HPV를 매개로 한 세포의 불멸화 및 세포 형질 전환에 관계한다. 발암성 E6 단백질은 야생형의 p53 종양 억제 단백질에 결합하여 유비퀴틴 경로를 통하여 p53을 분해시킨다. 한편, E7 단백질은 직접 Rb에 결합하여 과-인산화를 시킨다. 먼저 E6는 E3 유비퀴틴-단백질 리가아제(ubiquitin-protein ligase)인 E6-AP(E6-associated protein)와 복합체를 형성한다. 그 후, E6/E6-AP 복합체는 야생형의 p53과 결합하여 유비퀴틴화 시킴으로 DNA 손상에 대한 p53을 매개로 하는 세포의 반응을 방해한다. 주로, p53 종양억제 단백질은 Mdm2를 매개로 하는 유비퀴틴화에 의해서 조절되지만, HPV에 감염된 자궁경부암 세포에서는 p53의 분해는 Mdm2에서 E6를 매개로 하는 유비퀴틴화로 완전하게 교체된다. 따라서 다른 많은 암과 달리, HPV에 감염된 자궁경부암은 거의 모두 야생형의 p53 유전자를 가진다. 그러나 일관적으로 E6 단백질에 의해서 분해되므로, p53 단백질의 발현 레벨은 매우 낮다. 특히, HPV E6단백질은 오로지 자궁경부암 세포만을 죽일 수 있는 특정 타깃이기에 상당한 주목을 받고 있다. E6 혹은 E6/E6-AP복합체를 타깃으로 하는 이러한 전략들은 여러 가지 치료를 포함하고 있다.
- [4] 세포 독소 약의 사용, 바이러스의 E6 발암성 단백질의 아연을 방출하는 억제제,

E6-AP의 모방의 에피토프펩티드(mimotope), 항-E6 리보자임, 바이러스의 E6 발암성 단백질을 타겟으로 하는 펩티드 압타머, 바이러스의 E6 발암 유전자를 타겟으로 하는 siRNA 및 이들의 병용처리 등이 있다. 최근, siRNA는 동물 세포에서 선택적으로 내부 유전자를 침묵시키는 것뿐만이 아니라, 바이러스에 의해 발생된 질병 중에서도 바이러스의 유전자를 선택적으로 침묵시킬 수 있음이 증명되었다. siRNA의 형질감염에 의해서 일어난 RNA 간섭(RNAi)은 인간의 바이러스 감염을 치료하기 위한 새로운 치료법으로서 등장했다. HPV에 감염된 자궁경부암 세포에서 E6와 E7의 유전자를 타겟으로 하는 siRNA는 p53과 pRb의 축적을 일으켜 아포토시스(apoptosis) 또는 세포노화를 일으킨다. HPV-16에 감염된 자궁경부암 세포주와 HPV-18에 감염된 세포주의 경우에는 바이러스의 E6 및 E7 유전자를 타겟으로 하는 RNAi가 선택적으로 이들 단백질의 발현을 침묵시키는 것이 밝혀졌다.

- [5] 1999년에 시스플라틴(cisplatin)에 근거한 화학요법과 방사선 치료를 병용치료한 결과, 현저하게 로컬에 중증의 자궁경부암을 가진 여성의 생존률을 개선했다. 현재 시스플라틴은 난소, 경부, 머리 및 목, 비소세포 폐암 등을 포함하는 암을 치료하기 위해서 넓게 사용되는 DAN 손상 약물이다. 보다 최근, 플라티늄(Platinum)에 근거한 약제의 작용 메커니즘이 조사되었다. 그러나 세포 상에서 시스플라틴의 치료에 의한 약물의 흡수 및 배출 조절, DNA 손상의 시그널링, 세포 주기 추적, DNA 복구 및 세포 사멸을 포함하는 과정은 아직 완전하게는 이해되지 않았다. HPV-18 헬라(HeLa) 세포에서 시스플라틴 치료 후에 p53 단백질은 E6를 매개로 한 분해로부터 빠져나와 핵인에 우선적으로 축적되었다. 또한 HPV-16 SiHa 세포는 동시적인 방사선 요법과 시스플라틴 치료에 의해 p53 기능을 회복해 방사선 감수성이 증가되었다.

[6]

- [7] 이에, 본 발명자들은 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시, 함께 처리됨으로써 상승 효과를 낼 수 있는 E6/E7에 특이적인 siRNA를 찾고자 예의 노력한 결과, 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 센스 올리고뉴클레오타이드 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하여 구성된 siRNA가 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시 병용 치료됨으로써, 단일 치료에 비해 유의하게 높은 상승 효과를 내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 HPV(human papilloma virus) 감염에 의해 유발된 암의 치료를 위한 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시, 병용 처리됨으로써 상승 효과를 낼 수 있는 화학 또는 방사선 감작제를 제공하는 것이다.

- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암의 치료를 위한 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시, HPV 감염과 관련된 암의 화학요법 또는 방사선요법에 대한 민감도 증진 방법을 제공하는 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는, HPV(human papilloma virus) 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현벡터를 유효성분으로 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 HPV 감염에 의해 유발된 암의 치료를 위한 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시, 상기 감작제를 HPV 감염에 의해 유발된 암세포에 병용투여하는 단계를 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암의 화학요법 또는 방사선요법에 대한 민감도 증진 방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.
- [16] 아울러, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현벡터를 HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

[17]

발명의 효과

- [18] 본 발명의 siRNA는 단독으로 HPV 특이적인 siRNA 또는 화학요법 또는 방사선 요법을 수행하는 것보다 뛰어난 자궁경부암 치료 효과를 가지며, 방사선 또는 항암제에 대한 자궁경부암세포의 민감도를 증진시켜 세포사멸 효과를 극대화할 수 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 HPV 18 E6/E7을 표적으로 하여 제작된 siRNA 처리에 의한 자궁경부암 세포주의 세포 증식 억제 효과를 확인한 도이다:
- [21] a: HPV 18번 형태의 바이러스에 감염된 HeLa 자궁경부암 세포주에서의 효과; 및
- [22] b: HPV 16번 형태의 바이러스에 감염된 CaSki 자궁경부암 세포주에서의 효과.

- [23] 도 2는 자궁경부암세포와 HPV 18번 형태의 바이러스에 감염된 HeLa 자궁경부암 세포주에서, 426 siRNA와 화학요법 병용처리에 의한 상승 효과를 확인한 도이다:
- [24] a: 세포 증식 억제 효과;
- [25] b: 세포 노화 유도 효과; 및,
- [26] c: 세포 노화 유도 효과의 현미경 관찰.
- [27] 도 3은 HPV 16번 형태의 바이러스에 감염된 SiHa 자궁경부암세포주에서, 497 siRNA와 화학요법 병용처리에 의한 상승 효과를 확인한 도이다.:
- [28] a: 세포 증식 억제 효과;
- [29] b: 세포 노화 유도 효과; 및,
- [30] c: 세포 노화 유도 효과의 현미경 관찰.
- [31] 도 4는 HeLa 세포주에서, 426 siRNA 또는 450 siRNA와 방사선요법 병용처리에 의한 상승 효과를 확인한 도이다:
- [32] a: 세포 증식 억제 효과;
- [33] b: 세포 노화 유도 효과;
- [34] c: 세포 노화 유도 효과의 현미경 관찰; 및,
- [35] d: 세포의 형태적 변화의 현미경 관찰.
- [36] 도 5는 SiHa 세포주에서, 497 siRNA와 방사선요법 병용처리에 의한 세포 증식 억제에 대한 상승 효과를 확인한 도이다.
- [37] 도 6은 siRNA 및 시스플라틴 또는 방사선 조사의 병용처리에 의한 상승효과를 Chou-Talalay 분석으로 확인한 도이다:
- [38] a: 426 siRNA-HeLa 세포주;
- [39] b: 497 siRNA-SiHa 세포주;
- [40] c: 366 siRNA+시스플라틴-CaSki 세포주; 및
- [41] d: 497 siRNA+방사선-SiHa 세포주.
- [42]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [44]
- [45] 본 발명에서 사용되는 용어, "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNA 간섭(RNAi: RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 이중사슬 RNA를 의미하고, 표적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [46] 본 발명에서 사용되는 문구 "유전자 발현 억제"는 본 발명의 siRNA의 HPV18 또는 HPV16의 E6/E7 유전자에 대한 유전자 침묵(silencing) 능력을 지칭한다.

E6/E7 유전자의 발현 억제는 대조군에 기준한 시험 값이 약 90%, 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 25 ~ 0%인 경우 달성된다. 적합한 분석시험은 예를 들면, 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면 도트 블롯, 노던 블롯, 인 시튜(*in situ*) 하이브리드화, ELISA, 면역 침전, 효소 기능뿐만 아니라 당업자에게 공지된 표현형 분석시험을 사용한 단백질 또는 mRNA 수준의 조사를 포함한다.

[47] 본 발명에서 사용되는 용어, "특이적" 또는 "특이적인"은 세포 내에서 다른 유전자에 영향을 미치지 않고 표적 유전자만 억제하는 능력을 의미하고, 본 발명에서는 E6/E7 특이적이다.

[48]

[49] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[50]

[51] 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제를 제공한다.

[52] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 고위험성(High-risk) 인간 유두종 바이러스(Human Papilloma Virus: 이하, HPV) 16, 18 타입의 2개의 발암성(oncogenic) 단백질인 E6와 E7에 특이적으로 결합할 수 있는 서열번호 1 내지 10으로 기재된 핵산 서열을 갖는 siRNA를 제작하였다. 제작한 siRNA의 자궁경부암세포에 대한 세포증식 억제 활성을 확인한 결과, HPV 18번 형태의 바이러스에 감염된 HeLa 세포주에서는 103, 426, 450, 456 또는 458 siRNA에서 뛰어난 세포증식 억제 효과를 나타냈고, HPV 16번 형태의 바이러스에 감염된 CaSki 세포주에서는 366, 448, 497, 573 또는 752 siRNA에서 뛰어난 세포증식 억제 효과를 나타냈다. 이는 이전 특허 문헌(대한민국 특허 공개번호 10-2008-0040412)에서 공개한 HPV siRNA인 18E6-1(본 명세서에서는 18E6/E7로 기재) 및 16E6-1(본 명세서에서는 16E6으로 기재)보다 세포주의 증식 억제 활성이 현저히 뛰어난 것으로 확인되었다(도 1 참조). 이후, 자궁경부암세포와 HPV 18번 형태의 바이러스에 감염된 HeLa 자궁경부암 세포주 또는 HPV 16번 형태의 바이러스에 감염된 SiHa 자궁경부암 세포주에 상기 siRNA를 단독처리 하거나; 상기 siRNA를 처리 후, 시스플라틴(CDDP) 또는 nutlin-3의 항암제를 병용처리 하거나; 방사선 조사 후, 상기 siRNA를 병용처리 하였다. 상기와 같이 처리된 세포주의 병용처리에 의한 세포 증식 억제 효과를 측정한 결과, HeLa 세포에서 화학요법과 426 siRNA의 병용처리에 의해, 단독처리 군 보다 세포 증식 억제 및 세포 노화 유도에 상승 효과를 나타낸 바와 같이, SiHa 세포주에서도 화학요법과 497 siRNA의 병용처리가 단독처리 군 보다 세포 증식 억제 및 세포 노화 유도에 상승 효과를 나타내었다(도 2 및 도 3 참조). 또한, 상기 siRNA와 방사선 요법의 병용처리 군에서도 유사한 결과를 나타내었는데, 특히, 450 siRNA 보다 426 siRNA가 더 좋은 병용처리 효과를 보여주었다(도 4 및 도 5 참조). 또한, 상기 병용처리의 보다 정확한 상승 효과를 Chou-Talalay 분석을 통해

확인한 결과, HPV-18 HeLa 세포주, HPV-16 SiHa 세포주 및 HPV-16 CaSki 세포주에서 siRNA의 낮은 농도와 CDDP의 병용처리 군에서 상승적 치료 효과를 나타냈고, HPV-16 SiHa 세포주에서 siRNA의 낮은 농도와 방사선 조사의 병용처리 군에서 상승적 치료 효과를 나타낸 것으로 분석되었다(도 6 참조). 이로써, 본 발명의 서열번호 1 내지 10으로 기재된 siRNA는 HPV 감염과 관련된 암의 치료를 위한 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시, 병용처리됨으로써 상승 효과를 낼 수 있는 화학 또는 방사선 감작제로 유용하게 사용될 수 있다.

[53] 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은, 이에 제한되는 것은 아니나 자궁경부암, 질암(vagina cancer), 외음부암(vulva cancer), 항문암(anal cancer), 음경암(penis cancer), 편도암(tonsil cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 머리와 목암(head & neck) 및 폐의 선암(lung adenocarcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 자궁경부암이다.

[54] 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 올리고뉴클레오티드 및 이에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 상보적으로 혼상화된 siRNA(small interfering RNA), 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 올리고뉴클레오티드가 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 shRNA(short hairpin RNA), 및 안티센스 올리고뉴클레오티드(Antisense oligonucleotide, ASO)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 siRNA는 Ambion([//www.ambion.com](http://www.ambion.com)), Dharmacon([//www.dharmacon.com](http://www.dharmacon.com)), SIGMA([//www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) 같은 siRNA 제조회사에 의뢰하여 손쉽게 제작할 수 있고, 21nt 내외의 짧은 올리고머이기 때문에 일반적인 세포주에 형질도입이 수월하다.

[55] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고, 스템-루프(stem-loop)의 구조를 이루는 헤어핀 구조를 가질 수 있는데, 이를 특히 shRNA(short hairpin RNA)라 지칭한다. 한편, 상기 이중사슬 또는 스템 부위는 미스매치(상응하는 염기가 상보적이지 않음), 별지(일방의 사슬에 상응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수도 있다. 전체 길이는 10 내지 80 염기, 바람직하게는 15 내지 60 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 염기이다. 또한, 상기 루프 영역은 서열에 특별한 의미가 없으며, 단지 센스 올리고뉴클레오티드와 안티센스 올리고뉴클레오티드를 적당한 간격으로 연결하기 위하여 3 ~ 10 정도의 염기가 있으면 가능하다. 종래에 siRNA의 루프 영역으로 많이 사용되어온 예들은 다음과 같다: AUG(Sui *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(8):5515-5520, 2002), CCC, CCACC 또는 CCACACC(Paul *et al.*, *Nature Biotechnology* 20:505-508, 2002), UUCG(Lee *et al.*, *Nature Biotechnology* 20:500-505), CTCGAG, AAGCUU(Editors of *Nature Cell Biology* Whither RNAi, *Nat Cell Biol.* 5:489-490, 2003), UUCAAGAGA(Yu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9):6047-6052, 2002) 및 TTGATATCCG(www.genscript.com의 default spacer). siRNA 말단 구조는

평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조(protruding structure)와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하고 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 발암성 E6/E7 단백질의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[56]

[57] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현백터를 유효성분으로 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제를 제공한다.

[58] 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은, 이에 제한되는 것은 아니나 자궁경부암, 질암, 외음부암, 항문암, 음경암, 편도암, 인두암, 후두암, 머리와 목암 및 폐의 선암으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 자궁경부암이다.

[59] 상기 올리고뉴클레오타이드는 센스 올리고뉴클레오타이드 및 이에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 상보적으로 혼상화된 siRNA(small interfering RNA), 올리고뉴클레오타이드 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 shRNA(short hairpin RNA), 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Antisense oligonucleotide, ASO)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[60] 상기 발현백터는 본 발명의 서열번호 1 내지 10으로 기재된 siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 발현할 수 있는 종래 알려진 어떠한 발현 백터도 사용할 수 있다. 예컨대, Promega 제품으로 GeneClip™ U1 Hairpin Cloning System(Cat.#'s C8750, C8760, C8770, C8780, C8790), siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System(Cat.# C7800), T7 RiboMAX™ Express RNAi System(Cat.# P1700), siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems(Cat.#'s C7890, C7900, C7910, C7920) 및 siLentGene™ -2 U6 Hairpin Cloning Systems(Cat.#'s C7860, C8060, C8070, C8080) 등을 사용할 수 있으며, Genscript 제품으로 pRNA-U6.1(Cat.#'s SD1201, SD1202, SD1207), pRNATin-H1.2(Cat.#'s SD1223, 1224) 및 pRNA-H1.1/Adeno(Cat.# SD12009) 등을 사용할 수 있다.

[61]

[62] 또한, 본 발명은 HPV 감염에 의해 유발된 암의 치료를 위한 화학요법 또는

방사선 요법의 수행 시, 상기 감작제를 HPV 감염과 관련된 암세포에 병용투여하는 단계를 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암의 화학요법 또는 방사선요법에 대한 민감도 증진 방법을 제공한다.

[63] 상기 "병용투여"는 화학요법의 경우, 화학요법을 수행하기 수 시간 전에, 바람직하게는 4시간 전에 감작제를 투여하는 단계를 먼저 수행하는 방법이다. 또한, 방사선요법의 경우, 방사선 조사 1일 후에, 2일에 걸쳐 두 차례 감작제를 투여하는 단계를 수행하는 방법이다.

[64] 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은, 이에 제한되는 것은 아니나 자궁경부암, 질암, 외음부암, 항문암, 음경암, 편도암, 인두암, 후두암, 머리와 목암 및 폐의 선암으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 자궁경부암이다.

[65] 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암세포는 E6/E7 유전자를 발현하는 분리된 세포이거나 배양된 세포일 수 있고, 분리되지 않은 체로 포유동물 중에 포함될 수 있다. 포유동물의 예로는 비인간 포유동물(예컨대, 개, 고양이, 말, 돼지, 양, 소, 염소, 설치류; 햄스터, 마우스, 래트, 및 영장류) 및 인간을 들 수 있다. 본 발명에서는 E6/E7 유전자를 발현하는 HPV 감염과 관련된 암으로 HeLa와 SiHa를 사용하였다.

[66] 상기 감작제에 유효성분으로 포함된 siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 발현벡터는 보통 약학적 조성물로서 투여된다. 상기 투여는 핵산이 원하는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 표적 세포로 도입되는, 통상적으로 사용되는 유전자 도입 기법에 의하여 수행될 수 있다. 이때, siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 세포 내로 도입은 특별히 이에 제한되지 않으나, 직접 합성한 뒤, 숙주세포 내로 직접 함입되거나, 또는 siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 세포 안에서 발현되도록 제조된 발현 벡터 또는 PCR-기반 발현카세트 등으로 세포를 형질전환 또는 감염(infection)시켜서 수행하는 것이 바람직하며, 발현벡터는 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[67] 한편, 통상적으로 사용되는 표적 세포로의 유전자 도입 기법에는 칼슘 포스페이트, DEAE-덱스트란, 전기천공 및 미세주입법 및 바이러스 법이 포함된다(Graham FL 및 van der Eb AJ *Virol.* 52:456, 1973; McCutchan JH & Pagano JS *J. Natl. Cancer Inst.* 41:351, 1968; Chu G *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:1311, 1987; Fraley R *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255:10431, 1980; Capecchi MR, *Cell* 22:479, 1980). 뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 이러한 기법들에 최근 추가된 것은 양이온성 리포솜을 사용하는 것이다(Felgner PL *et al.*, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 84:7413, 1987). 상업적으로 구입할 수 있는 양이온성 지질 제제는 예를 들면, Tfx 50(Promega) 또는 Lipofectamin 2000(Life Technologies)이 있다. 발암성 E6/E7 단백질의 유전자와 상보적으로 잡종 결합할 수 있는 siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 직접 세포에 함입시키는 방법은 특별히 이에

제한되지는 않으나, siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 1 μ g 당 양이온성 리포좀을 2 내지 6 μ g 혼합하여, 15 내지 40분간 리포펙션(lipofection)하여 수행함이 바람직하다.

- [68] 본 발명의 감작제는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 함유한다. 약학적으로 허용되는 부형제는 기술 분야에 알려져 있으며 약학적 활성 물질의 투여를 용이하게 해주는 비교적 불활성인 물질이다. 예컨대, 부형제는 형상이나 점도를 부여할 수 있고 또는 희석제 역할도 할 수 있다. 적절한 부형제로는 안정화제, 보습제, 및 유화제, 오스몰 농도를 변화시킬 수 있는 염류, 캡슐화제제, 완충액, 피부침투 촉진제를 들 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 경구 및 비경구용 약물 전달용 부형제 및 포물레이션은 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 제20판, Mack Publishing (2000)에 제시되어 있다. 또한, 상기 감작제는 적당한 담체와 함께 혼합되어, 임의의 적당한 방식, 예를 들면, 주사, 경구, 국부(topical), 코, 직장 적용 등과 같은 방식으로 투여될 수 있다. 상기 담체는 임의의 적당한 약제학적 담체일 수 있다. 바람직하게는, 상기 RNA 분자가 표적-세포로 도입되는 효율을 증가시킬 수 있는 담체가 사용된다. 그러한 담체의 적당한 예는 리포좀, 특히 양이온성 리포좀이다. 더욱 바람직한 투여 방법은 주사 (injection)이다.
- [69] 상기 감작제는 인간 의약 또는 수의 의약으로 치료학적 적용을 위하여 사용될 수 있으며, 상기 감작제는 주입가능한 용액과 같은 액제, 크림, 연고, 정, 현탁액 등과 같은 형태일 수 있다.
- [70] siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 유효농도는 원하는 효과, 예를 들면 siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 부재 하에서 검출되는 발현 수준에 비해 발암성 단백질인 E7/E7 유전자의 발현의 감소를 제공하기에 충분한 양이다. siRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 세포 하나 당 적어도 하나의 카피의 전달을 허용하는 양으로 도입될 수 있다. 이중 가닥 물질의 도입량이 많을수록(예컨대, 세포 하나 당 5개 이상, 10 개 이상, 100개 이상, 500개 이상 또는 1000개 이상의 카피), 억제 효율이 더 높아질 수 있고, 특이적인 응용에는 도입량이 적은 것이 유리할 수 있다.
- [71]
- [72] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.
- [73] 아울러, 본 발명은 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현벡터를 HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.
- [74] 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은, 이에 제한되는 것은 아니나 자궁경부암,

질암, 외음부암, 항문암, 음경암, 편도암, 인두암, 후두암, 머리와 목암 및 폐의 선암으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 자궁경부암이다.

- [75] 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 올리고뉴클레오티드 및 이에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 상보적으로 혼상화된 siRNA(small interfering RNA), 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 올리고뉴클레오티드가 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 shRNA(short hairpin RNA), 및 안티센스 올리고뉴클레오티드(Antisense oligonucleotide, ASO)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [76] 상기 올리고뉴클레오티드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현벡터는 본 발명의 서열번호 1 내지 10으로 기재된 siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 발현할 수 있는 종래 알려진 어떠한 발현 벡터도 사용할 수 있다.
- [77] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 이에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현벡터는 방사선 또는 항암제에 대한 HPV 감염과 관련된 암세포의 민감도를 증진시켜 세포사멸 효과를 극대화할 수 있으므로, HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 유용하게 이용할 수 있다.
- [78]
- [79] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [80] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [81]
- [82] <실시예 1> 재료 및 방법
- [83] <1-1> HPV18 E6/E7 siRNA의 제작
- [84] 하기 표 1의 siRNA를 Dharmacon(USA) Custom Service에 주문제작하여 수득하였다.
- [85] 표 1

[Table 1]

siRNA	서열번호	표적염기서열	표적 전사체
426	1	5'- CAACCGAGCACGACAGGAA -3'	HPV18 E6/E7
450	2	5'- CCAACGACGCAGAGAAACA -3'	HPV18 E6/E7
103	3	5'- GCAAGACAGUAUUGGAACU -3'	HPV18 E6/E7
456	4	5'- ACGCAGAGAAACACAAGU -3'	HPV18 E6/E7
458	5	5'- GCAGAGAAACACAAGUAUA -3'	HPV18 E6/E7
366	6	5'- GCAAAGACAUCUGGACAAA-3'	HPV16 E6/E7
497	7	5'- GACCGGUCGAUGUAUGUCUUG -3'	HPV16 E6/E7
573	8	5'- CACCUACAUUGCAUGAAUAUA -3'	HPV16 E6/E7
752	9	5'- CUUCGGUUGUGCGUACAAAGC -3'	HPV16 E6/E7
448	10	5'- UCAAGAACACGUAGAGAAA -3'	HPV16 E6/E7
GFP	11	5'- GGCUACGUCCAGGAGCGCACC -3'	

[86]

[87] <1-2> 세포배양 및 siRNA 형질도입

[88] 자궁경부암세포와 HPV 18번 형태의 바이러스에 감염된 HeLa 자궁경부암 세포주(HeLa; ATCC CCL-2), HPV 16번 형태의 바이러스에 감염된 SiHa(SiHa; ATCC HTB-35) 또는 CaSki(ATCC CRL-1550) 자궁경부암 세포주를 6-웰 플레이트에 5×10^4 또는 1×10^5 의 세포수로 분주한 후 37°C, 이산화탄소 5% 조건하에서 RPMI1640 또는 DMEM 배지에서 각각 24시간 동안 배양하였다. 24 시간 동안 배양하여 세포 배양용기 표면에 흡착되면, 대조군으로 GFP RNA 및 실험군으로 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 제조된 서열번호 1 내지 10의 siRNA

올리고뉴클레오티드 각각 100 nM을 oligofectamine(invitrogen, USA)을 사용하여 형질도입한 뒤, 1 ml의 배지에서 4시간 동안 배양하였다. 이후, 30%의 우혈청(Hyclone, USA)이 포함된 RPMI1640 또는 DMEM 배지 500 μ l를 넣어 준 뒤 3 ~ 4일간 배양하였다.

[89]

[90] <1-3> 항암제/방사선 처리

[91] 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 5×10^4 또는 1×10^5 세포로 분주하여 1일간 배양된 HeLa 또는 SiHa 세포주에 siRNA를 형질도입시켰다. 4시간 동안 배양한 후에 30%의 우혈청이 들어간 배지를 넣어 준 뒤에 시스플라틴(CDDP) 또는 nutlin-3을 최종 농도 각각 1.25 및 5 nM로 처리하였다. 대조군으로는 DMSO를 확인하였다.

[92] 또한, 세포주들을 T25 플라스크에 1×10^6 또는 5×10^5 세포의 농도로 분주한 뒤, 1일간 배양된 HeLa 또는 SiHa 세포주에 ^{60}Co source(Gamma cell 220)(AtomicLanergyLof Canada Limited, 캐나다)을 이용하여 ^{60}Co 를 선원으로 사용하고 총선량이 2 Gy(선량률 1.333 Gy/분)가 되도록 1시간 30분 동안 감마방사선을 조사하였다. 이후, 6 웰-플레이트에 5×10^4 또는 1×10^5 세포로 분주하여 하루 동안 배양한 후, 실시예 <1-2>의 방법으로 siRNA를 형질도입하였고, 추가로 하루 더 배양한 후, 다시 실시예 <1-2>의 방법으로 siRNA를 형질도입하였다.

[93]

[94] <1-4> 세포노화에 관련한 β 갈락토시다아제(SA- β -gal) 활성 측정

[95] 상기 실시예 <1-3>의 방법으로 HeLa 또는 SiHa 세포주에 siRNA의 형질도입과 항암제/방사선을 단독 또는 병용 처리한 후 7일 동안 배양하였다. 세포노화 측정 키트(BioVision, USA)를 이용하여 PBS로 세척하고 SA- β -gal 염색용액에 37°C에서 12시간 처리하였다. 일반광학현미경을 이용하여 100 ~ 200배의 배율로 파란색으로 염색된 세포들을 관찰하였다.

[96]

[97] <1-5> 세포형태 변화 측정

[98] 상기 실시예 <1-3>의 방법으로 HeLa 또는 SiHa 세포주에 siRNA의 형질도입과 항암제/방사선을 단독 또는 병용 처리한 후 7일 동안 배양하였다. 7일째에 위상차 현미경(AxioVision, Carl Zeiss, German)을 사용하여 세포 형태를 조사하였다.

[99]

[100] <실험예 1> siRNA의 세포 증식 억제 효과

[101] 상기 실시예 <1-1>의 HPV18 E6/E7을 표적으로 하는 siRNA를 상기 실시예 <1-2>의 방법으로, HPV 18번 형태의 바이러스에 감염된 HeLa 또는 HPV 16번 형태의 바이러스에 감염된 CaSki 자궁경부암 세포주에 형질도입하였고, 추가로 하루 더 배양한 후, 다시 실시예 <1-2>의 방법으로 siRNA를 형질도입하였다. 형질도입한 뒤 3일 동안 배양한 후 세포수를 측정하였다. 이때, 선행 특허

문헌(대한민국 특허 공개번호 10-2008-0040412)에서 공개한 HPV 특이적인 siRNA인 18E6-1(서열번호 12: 5'-UAACCUGUGUAUAUUGCAA-3')(본 명세서에서는 18E6/E7로 기재, HPV 18번 형태의 E6/E7 두 가지 유전자 모두를 표적으로 하는 siRNA) 및 16E6-1(서열번호 13:

5'-ACCGUUGUGUGAUUUGUUA-3')(본 명세서에서는 16E6으로 기재, HPV 16번 형태의 E6 유전자 하나를 표적으로 하는 siRNA)을 대조군으로 사용하였다.

- [102] 그 결과, 도 1a 및 1b에 나타난 바와 같이 HPV 18 HeLa 세포주에서는 103, 426, 450, 456 또는 458 siRNA에서 뛰어난 세포증식 억제 효과를 나타냈고, 103, 426, 448, 450, 456 또는 458 siRNA는 선행 문헌의 HPV 18번을 표적하는 siRNA인 18E6-1(본 명세서에서 18E6/E7로 기재)보다 현저하게 세포주의 증식을 억제하였다. 또한, HPV 16 CaSki 세포주에서는 366, 448, 497, 573 또는 752 siRNA에서 뛰어난 세포증식 억제 효과를 나타냈고, 모두 선행 문헌의 HPV 16번을 표적하는 siRNA인 16E6-1(본 명세서에서 16E6으로 기재)보다 현저하게 세포주의 증식을 억제하였다.

[103]

[104] <실험예 2> 426 siRNA와 화학요법 병용처리의 세포 상해 효과

[105] <2-1> 세포 증식 억제 효과

[106] 상기 실시예 1의 방법으로 HeLa 세포주에 대해 준비한 단독처리 군(426 siRNA, 시스플라틴, nutlin만 각각 처리하였음) 및 병용처리 군(426 siRNA와 시스플라틴 또는 nutlin을 병용처리하였음)을 6일간 추가로 배양한 후, 세포수를 측정하였다.

[107] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 화학요법과 426 siRNA를 병용처리한 군이 siRNA 단독처리 군 또는 항암제를 단독 또는 병용처리한 군보다 세포 증식이 급격하게 감소하였다. 특히, 426 siRNA와 nutlin-3을 병용처리한 군과 426 siRNA와 CDDP, nutlin-3을 병용처리한 군에서 현저하게 세포의 수가 감소하였다. 이러한 결과는, HeLa 세포에서 화학요법과 426 siRNA의 병용처리가 단독처리 군 보다 세포 상해 효과를 현저하게 증가시키는 것을 나타낸다.

[108]

[109] <2-2> 세포 노화 유도 효과

[110] 상기 실험예 <1-1>의 방법으로 처리된 세포주를 대상으로 6일째에 상기 실시예 <1-4>의 방법으로 SA β -Gal 활성을 측정하였다.

[111] 그 결과, 도 2b 및 도 2c에 나타난 바와 같이 화학요법처리 군에서는 활성을 띤 세포주가 검출되지 않았고, 426 siRNA와 화학요법의 병용처리 군에서는 거의 모든 세포가 진한 파란색으로 염색되어 강한 SA- β Gal의 활성을 보여주었다. 이러한 결과는, 매우 낮은 농도의 시스플라틴, nutlin-3 처리가 세포노화에 대한 426 siRNA의 영향을 상승적으로 증가시킨다는 것을 보여준다.

[112]

[113] <실험예 3> 497 siRNA와 화학요법 병용처리의 세포 상해 효과

[114] <3-1> 세포 증식 억제 효과

[115] 상기 실시예 1의 방법으로 SiHa 세포주에 대해 준비한 단독처리 군(497 siRNA, 시스플라틴, nutlin만 각각 처리하였음) 및 병용처리 군(497 siRNA와 시스플라틴 또는 nutlin을 병용처리 하였음)을 3일간 추가로 배양한 후, 세포수를 측정하였다.

[116] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이 화학요법과 497 siRNA를 병용처리한 군이 siRNA 단독처리 군 또는 항암제를 단독 또는 병용처리한 군보다 세포 증식이 급격하게 감소하였다. 특히, 497 siRNA+CDDP 처리군, 497 siRNA+nutlin-3 처리군, 426 siRNA+CDDP+nutlin-3의 병용처리 군에서 현저하게 세포의 수가 감소하였다. 이러한 결과는, SiHa 세포주에서도 화학요법과 497 siRNA의 병용처리가 단독처리 군 보다 세포 상해 효과를 현저하게 증가시키는 것을 나타낸다.

[117]

[118] <3-2> 세포 노화 유도 효과

[119] 상기 실험예 <3-1>의 방법으로 처리된 세포주를 대상으로 6일째에 상기 실시예 <1-4>의 방법으로 SA β -Gal 활성을 측정하였다.

[120] 그 결과, 도 3b 및 도 3c에서 나타난 바와 같이, 비록 시스플라틴, nutlin-3의 병용처리 군에서도 SA- β Gal의 활성이 강하게 나타났지만 497 siRNA와 병용처리 함으로써 유의하게 SA- β Gal의 활성이 증가한 것으로 나타났다.

[121]

[122] <실험예 4> siRNA와 방사선요법 병용처리의 세포 상해 효과

[123] <4-1> 세포 증식 억제 효과

[124] 상기 실시예 1의 방법으로 HeLa 세포주에 대해 준비한 단독처리 군(426 siRNA, 450 siRNA, 방사선 조사만 각각 처리하였음) 및 병용처리 군(426 siRNA 또는 450 siRNA와 방사선 조사를 병용처리 하였음); 또는 SiHa 세포주에 대해 준비한 단독처리 군(497 siRNA, 방사선 조사만 각각 처리하였음) 및 병용처리 군(497 siRNA와 방사선 조사를 병용처리 하였음)을 4일간 추가로 배양한 후, 세포수를 측정하였다.

[125] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이 방사선 요법과 426 siRNA 또는 450 siRNA를 병용처리한 군이 siRNA 단독처리 군 또는 방사선 요법을 단독 또는 병용처리한 군보다 세포 증식이 급격하게 감소하였다. 특히, 450 siRNA 보다 426 siRNA가 더 좋은 병용처리 효과를 보여주었다. 이러한 결과는, HeLa 세포에서 방사선 요법과 426 siRNA 또는 450 siRNA의 병용처리가 단독처리 군 보다 세포 상해 효과를 현저하게 증가시키는 것을 나타낸다.

[126] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이 HPV 16 타입인 SiHa 세포주에서도 497 siRNA와 방사선 병용처리의 결과가 HPV 18 타입인 HeLa 세포주의 결과와 동일하게 나타남을 알 수 있었다.

[127]

[128] <4-2> 세포 노화 유도 효과

- [129] 상기 실험에 <4-1>의 방법으로 처리된 세포주를 대상으로 4일째에 상기 실시예 1-4의 방법으로 SA β -Gal 활성을 측정하였고, 상기 실시예 <1-5>의 방법으로 형태학적 변화를 관찰하였다.
- [130] 그 결과, 도 4b 및 도 4c에 나타난 바와 같이 단독처리 군에서는 활성을 띤 세포주가 검출되지 않았고 426 siRNA와 방사선 요법의 병용처리 군에서는 거의 모든 세포가 진한 파란색으로 염색되어 강한 SA- β Gal의 활성을 보여주었다. 또한, 도 4d에 나타난 바와 같이 세포형태학적으로도 siRNA와 방사선 요법의 병용처리 군에서 세포의 형태가 두드러지게 변화하였다. 이러한 결과는, 매우 낮은 농도의 방사선 조사가 세포노화에 대한 426 siRNA의 영향을 상승적으로 증가시킨다는 것을 보여준다.
- [131]
- [132] <실험예 5> Chou-Talalay 분석에 의한 병용처리의 상승적(synergistic) 세포상해 효과 분석
- [133] <5-1> 세포 처리
- [134] 상기 실시예 1의 방법에 따라 HeLa, SiHa 또는 Caski 세포주에 대해 하기의 설계로 실험군을 준비하였다. 이때, HeLa 세포주에는 426 siRNA를, SiHa 세포주에는 497 siRNA를, CaSki 세포주에는 336 siRNA를 각각 처리하였다:
- [135] 1) siRNA 단독처리 군: 0, 5, 25, 50, 100 또는 200 nM;
- [136] 2) CDDP(시스플라틴) 단독처리 군: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 또는 10 μ M; 및,
- [137] 3) siRNA+CDDP(시스플라틴) 병용처리 군: siRNA(0, 5, 25, 50, 100 또는 200 nM) + CDDP 5 μ M.
- [138] 4)방사선 단독처리 군: 0, 1, 2, 4 또는 6 Gy
- [139] 5)siRNA+방사선 병용처리 군: siRNA(0, 25 또는 50 nM)+ 방사선 (2 또는 4 Gy)
- [140]
- [141] <5-2> 항암제와의 병용요법에서 Chou-Talalay 분석
- [142] 병용처리의 보다 정확한 상승적 치료효과를 확인하기 위하여 Chou-Talalay 분석을 수행하였다. 이 분석법은 두 가지 이상의 병용처리법에서 상승적 치료효과를 증명하기 위하여 가장 일반적 사용되는 분석법이다.
- [143] <수학식 1>
- [144] $fa/fu = (D/Dm)^m$
- [145] D: 용량(the dose);
- [146] Dm: 50% 효과를 위한 용량(the dose required for 50% effect);
- [147] fa: the fraction affected by dose D; 및
- [148] fu: the unaffected fraction(따라서 $fa = 1 - fu$).
- [149] 이때, 상기 <수학식 1>을 하기 <수학식 2>와 같이 전환하였다.
- [150] <수학식 2>
- [151] $D = Dm [fa/(1 - fa)]^{1/m}$
- [152] 상기 <수학식 2>를 이용하여 하기 <수학식 3>을 작성하였다.

- [153] <수학식 3>
- [154] $\log(D) = 1/m \times \log[fa/(1 - fa)] + \log D_m$
- [155] 따라서, Median Effect plot에서 $x = \log(D)$, $y = \log(fa/f_u)$, m 은 기울기, $\log(D_m)$ 은 X축-intercept로 계산할 수 있다. 이러한 값은 하기의 <수학식 4>에 따라 치료효과를 나타내는 각각 약물의 농도와 병용처리 시 약물조합의 농도를 계산하는데 사용되었다.
- [156] <수학식 4>
- [157] Combination Index(CI) = $(D_{combi})_1 / (D_{alone})_1 + (D_{combi})_2 / (D_{alone})_2$
- [158] $(D_{combi})_1$ 및 $(D_{combi})_2$: 약물을 병용처리 시 사용한 치료효과(fa)를 나타내는 농도; 및
- [159] $(D_{alone})_1$ 및 $(D_{alone})_2$: 약제 1 또는 2의 단독 처리 시 치료 효과(fa)를 얻기 위한 약물의 농도, $D_{alone} = D_m [fa/(1 - fa)]^{1/m}$.
- [160] Chou-Talalay 분석에서 최종적으로 CI(Combination Index)값이 $CI < 1$ 이면 상승적(synergistic) 치료 효과 나타내고, $CI = 1$ 이면 병합치료(additive) 효과를 나타내며, $CI > 1$ 은 병합치료 효과보다 적을 경우(sub-additive)라고 분석하였다.
- [161] 상기 실험에 <5-1>의 방법으로 HeLa, SiHa 또는 CaSki 세포주에 대해 준비한 단독처리 군(siRNA, 시스플라틴만 각각 처리하였음) 및 병용처리 군(siRNA와 시스플라틴을 병용처리하였음)을 2일간 추가로 배양한 후, 세포수를 측정하였다.
- [162] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 HPV-18 HeLa 세포주에서 426 siRNA의 낮은 농도 5, 25 또는 50 nM과 5 μ M CDDP의 병용처리 군에서 각각 CI 값이 0.36, 0.47 및 0.56 으로 1보다 낮게 나옴으로 상승적 치료 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.
- [163] 또한, 도 6b에 나타난 바와 같이 HPV-16 SiHa 세포주에서도 497 siRNA의 낮은 농도 5, 25 또는 50 nM과 5 μ M CDDP의 병용처리 군에서 각각 CI 값이 0.60, 0.71 및 0.69 로 1보다 낮게 나옴으로 상승적 치료 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.
- [164] 아울러, HPV-16 CaSki 세포주에서도 도 6c에 나타난 바와 같이 336 siRNA 5 nM + CDDP 2.5 μ M, 336 siRNA 25nM + CDDP 1.25 μ M, 336 siRNA 50 nM + CDDP 5 μ M 또는 336 siRNA 100 nM + CDDP 5 μ M 병용처리 군에서 각각 CI 값이 0.9, 0.9, 0.86 및 0.73 로 1보다 낮게 나옴으로 상승적 치료 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.
- [165]
- [166] <5-3> 방사선 치료와의 병용요법에서 Chou-Talalay 분석
- [167] 상기 실험에 <5-1>의 방법으로 SiHa 세포주에 대해 준비한 단독처리 군(459 siRNA, 방사선 조사만 각각 처리하였음) 및 병용처리 군(siRNA와 방사선 요법을 병용처리하였음)을 3일간 추가로 배양한 후, 세포수를 측정하였다.
- [168] 그 결과, 도 6d에 나타난 바와 같이 HPV-16 SiHa 세포주에서 459 siRNA의 낮은

농도 25, 50 nM과 2 Gy 방사선 조사의 병용처리 군에서 각각 CI 값이 0.63 및 0.71이었고 또한, 459 siRNA의 낮은 농도 50 nM과 4 Gy 방사선 조사의 병용처리 군에서 CI 값이 0.8로 1보다 낮게 나옴으로 상승적 치료 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.

[169]

산업상 이용가능성

[170] 상기와 같이, 본 발명의 siRNA를 항암치료시 병용처리함으로써, 단독으로 HPV 특이적인 siRNA 또는 화학요법 또는 방사선 요법을 수행하는 것보다 뛰어난 자궁경부암 치료 효과를 가지며, 방사선 또는 항암제에 대한 자궁경부암세포의 민감도를 증진시켜 세포사멸 효과를 극대화하므로, HPV 감염에 의해 유발된 암의 항암 치료시 화학 또는 방사선 감작제의 개발 및 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

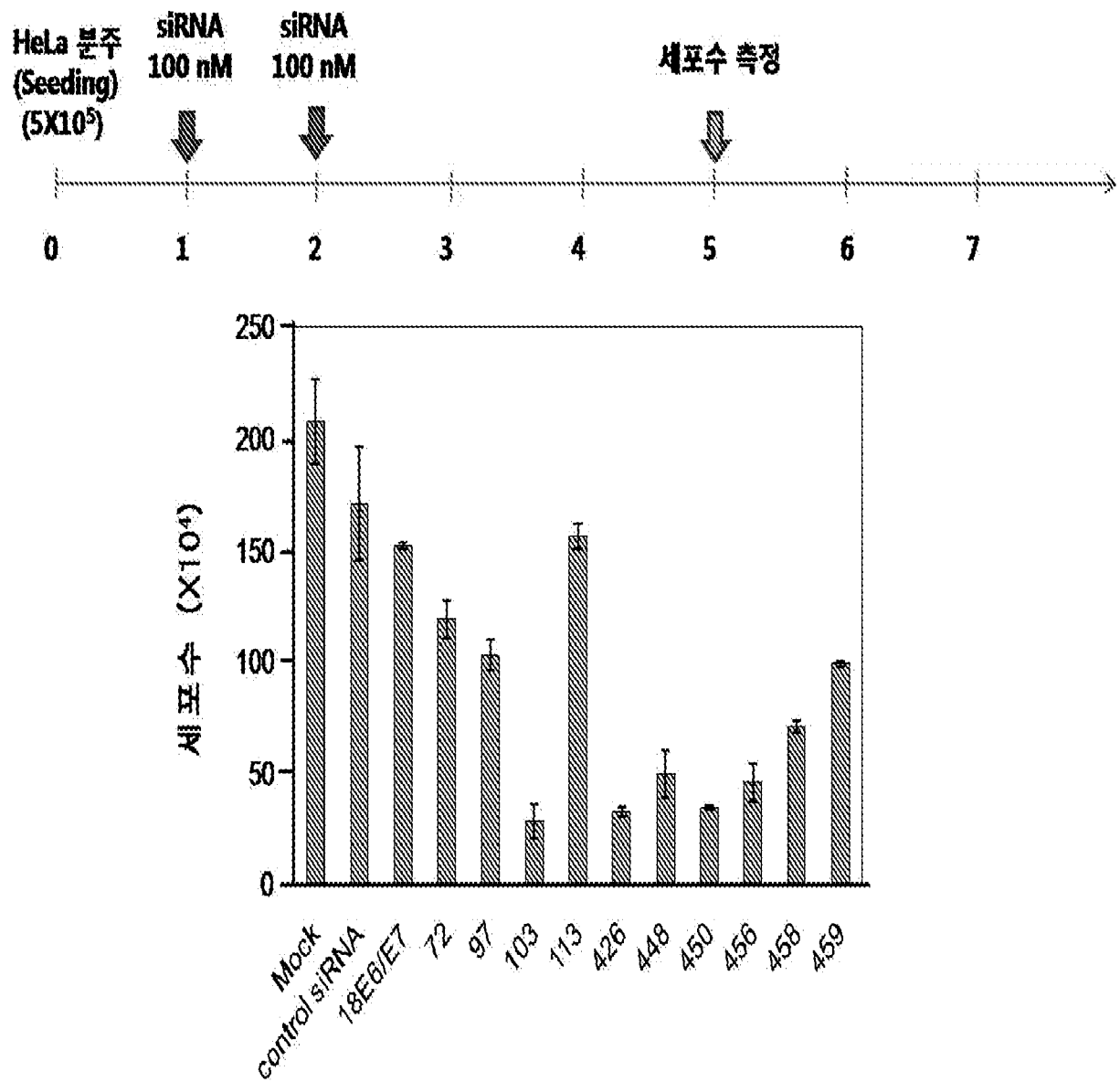
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는, HPV(human papilloma virus) 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 올리고뉴클레오티드 및 이에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 상보적으로 혼상화된 siRNA(small interfering RNA), 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 올리고뉴클레오티드가 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 shRNA(short hairpin RNA), 및 안티센스 올리고뉴클레오티드(Antisense oligonucleotide, ASO)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 감작제.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은 자궁경부암, 질암(vagina cancer), 외음부암(vulva cancer), 항문암(anal cancer), 음경암(penis cancer), 편도암(tonsil cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 머리와 목암(head & neck) 및 폐의 선암(lung adenocarcinoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 감작제.
- [청구항 4] 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현백터를 유효성분으로 포함하는, HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 센스 올리고뉴클레오티드 및 이에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 상보적으로 혼상화된 siRNA, 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 올리고뉴클레오티드가 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥인 shRNA, 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 감작제.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은 자궁경부암, 질암, 외음부암, 항문암, 음경암, 편도암, 인두암, 후두암, 머리와 목암 및 폐의 선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 감작제.
- [청구항 7] HPV 감염에 의해 유발된 암의 치료를 위한 화학요법 또는 방사선 요법의 수행 시, 제 1항 또는 제 4항의 감작제를 HPV 감염에 의해 유발된 암세포에 병용투여하는 단계를 포함하는, HPV 감염에

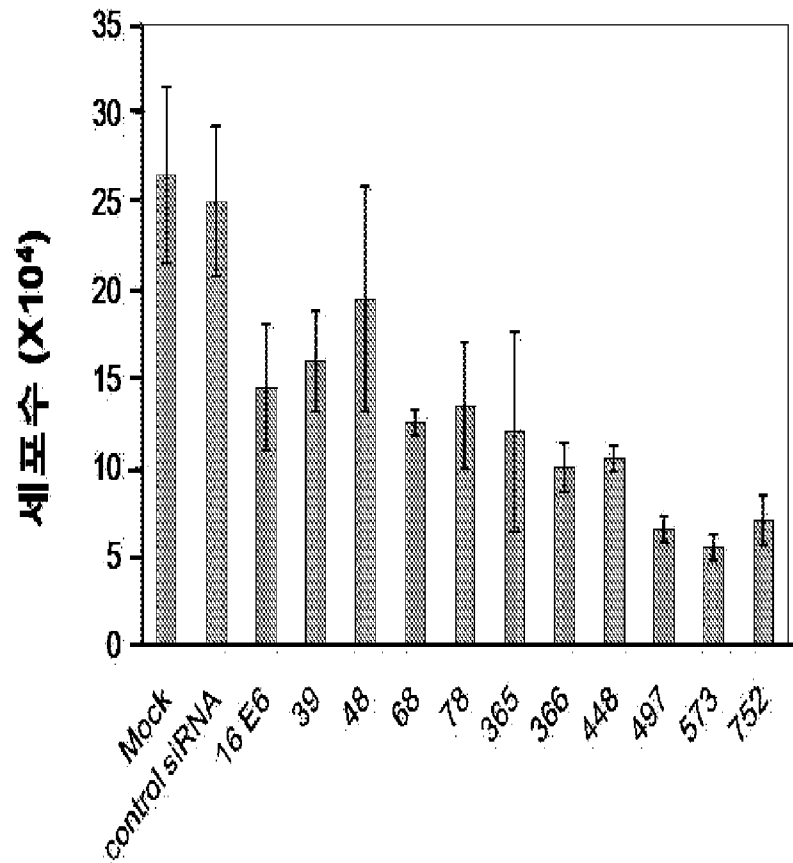
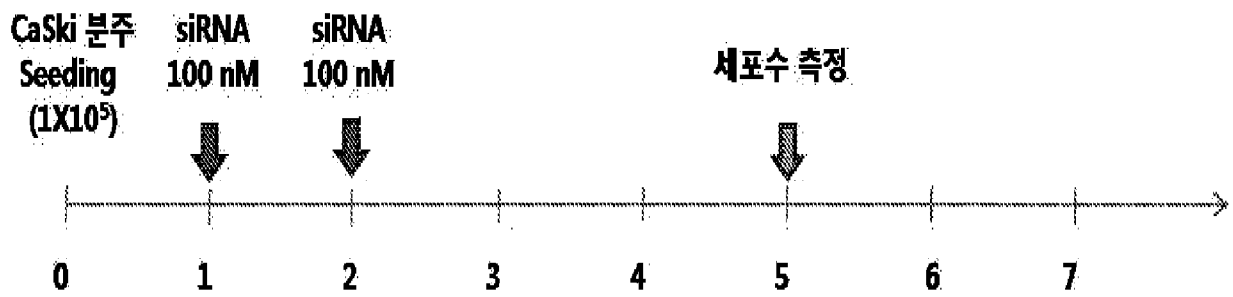
의해 유발된 암의 화학요법 또는 방사선치료에 대한 민감도 증진 방법.

- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 HPV 감염에 의해 유발된 암은 자궁경부암, 질암, 외음부암, 항문암, 음경암, 편도암, 인두암, 후두암, 머리와 목암 및 폐의 선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 민감도 증진 방법.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 병용투여는 화학요법의 경우, 화학요법을 수행하기 전에 감작제를 투여하는 단계를 수행하는 방법인 것을 특징으로 하는 민감도 증진 방법.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 병용투여는 방사선요법의 경우, 방사선 조사 1일 후에, 2일에 걸쳐 두 차례 감작제를 투여하는 단계를 수행하는 방법인 것을 특징으로 하는 민감도 증진 방법.
- [청구항 11] 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 이용하는 용도.
- [청구항 12] 서열번호 1 내지 10으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 상응하는 DNA 단편을 발현하는 재조합 발현벡터를 HPV 감염에 의해 유발된 암 치료용 화학 또는 방사선 감작제의 제조에 이용하는 용도.

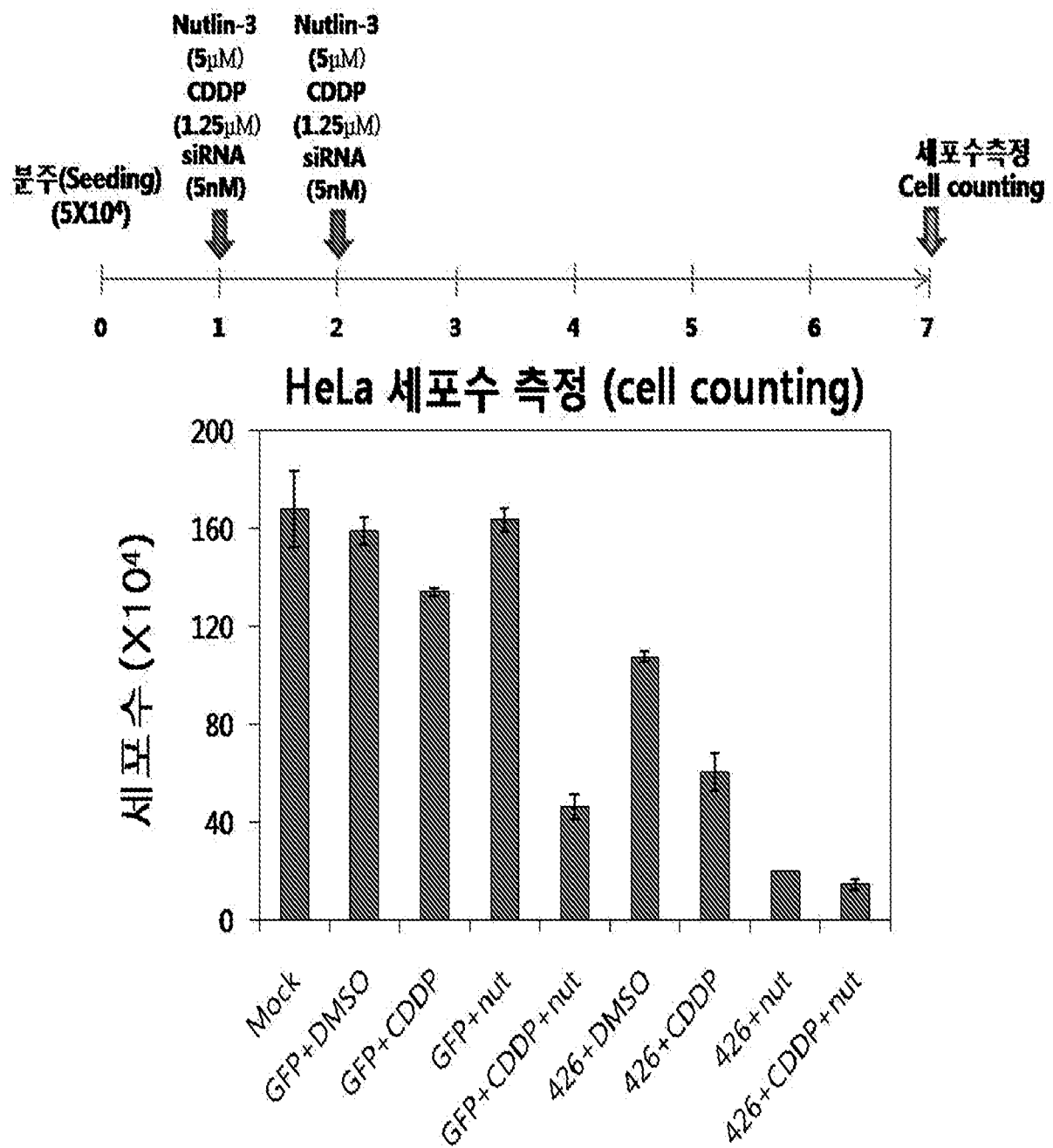
[Fig. 1a]



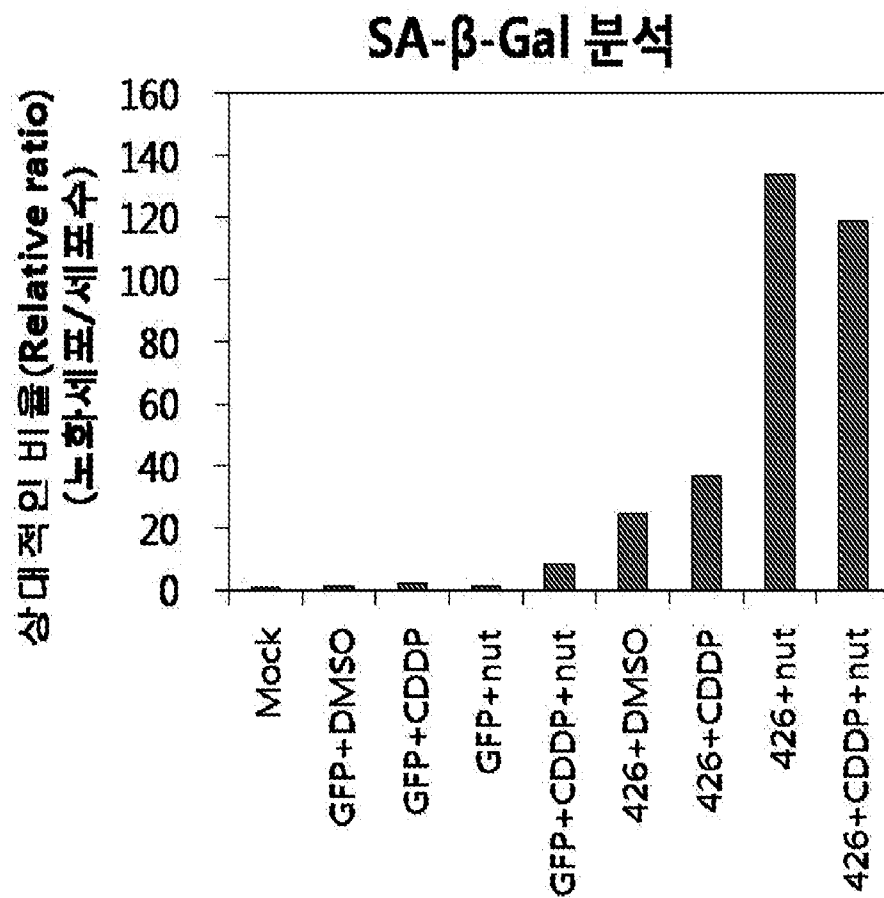
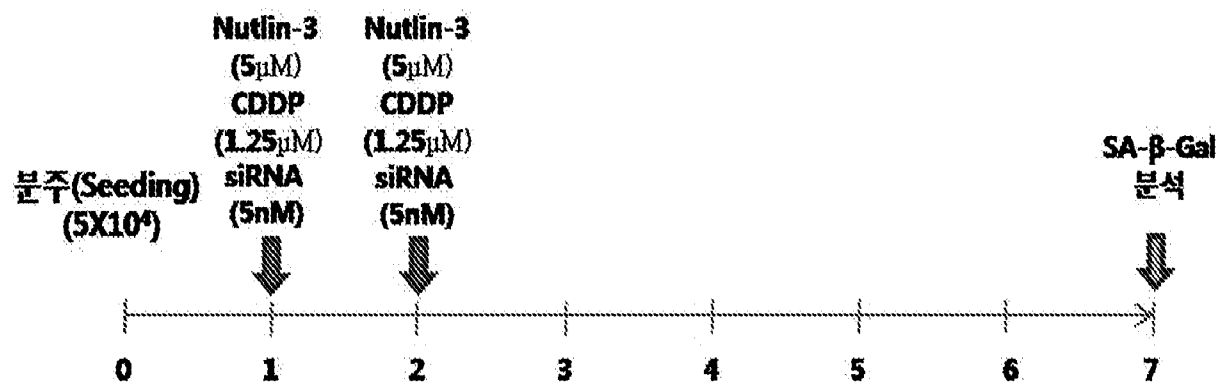
[Fig. 1b]



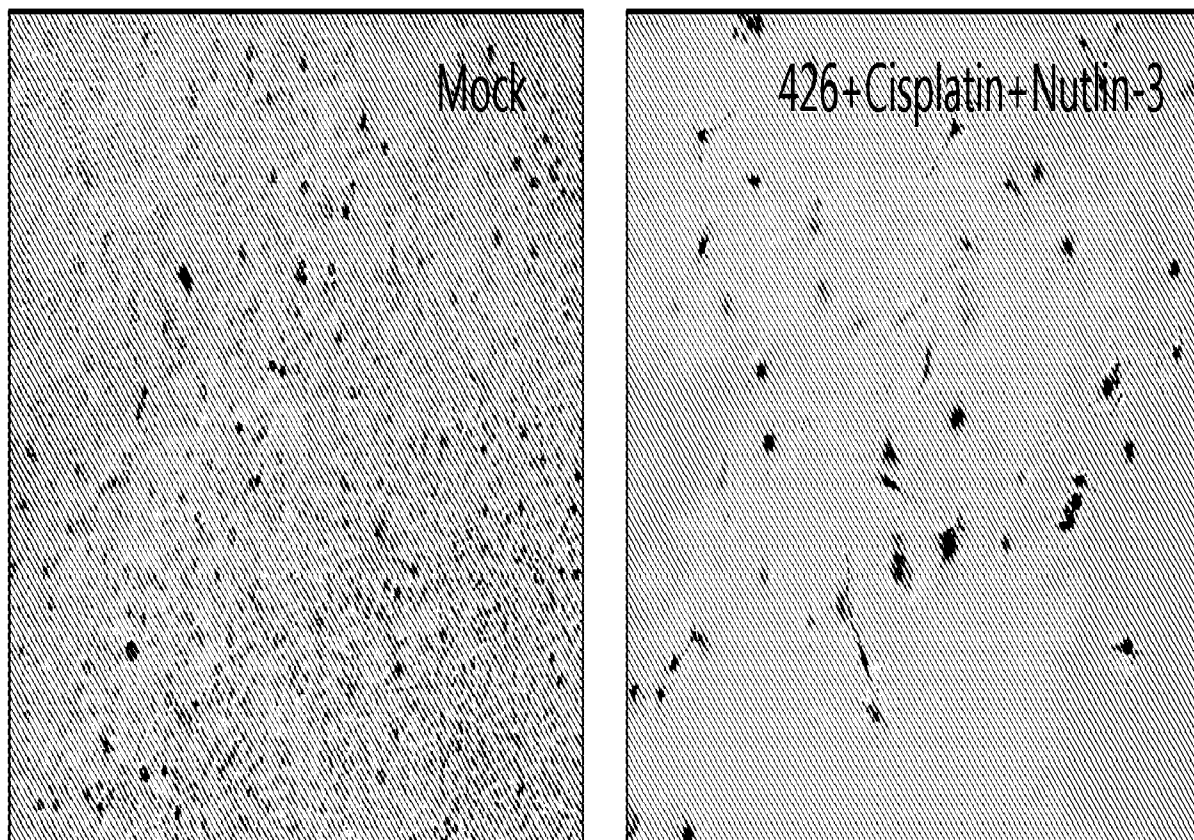
[Fig. 2a]



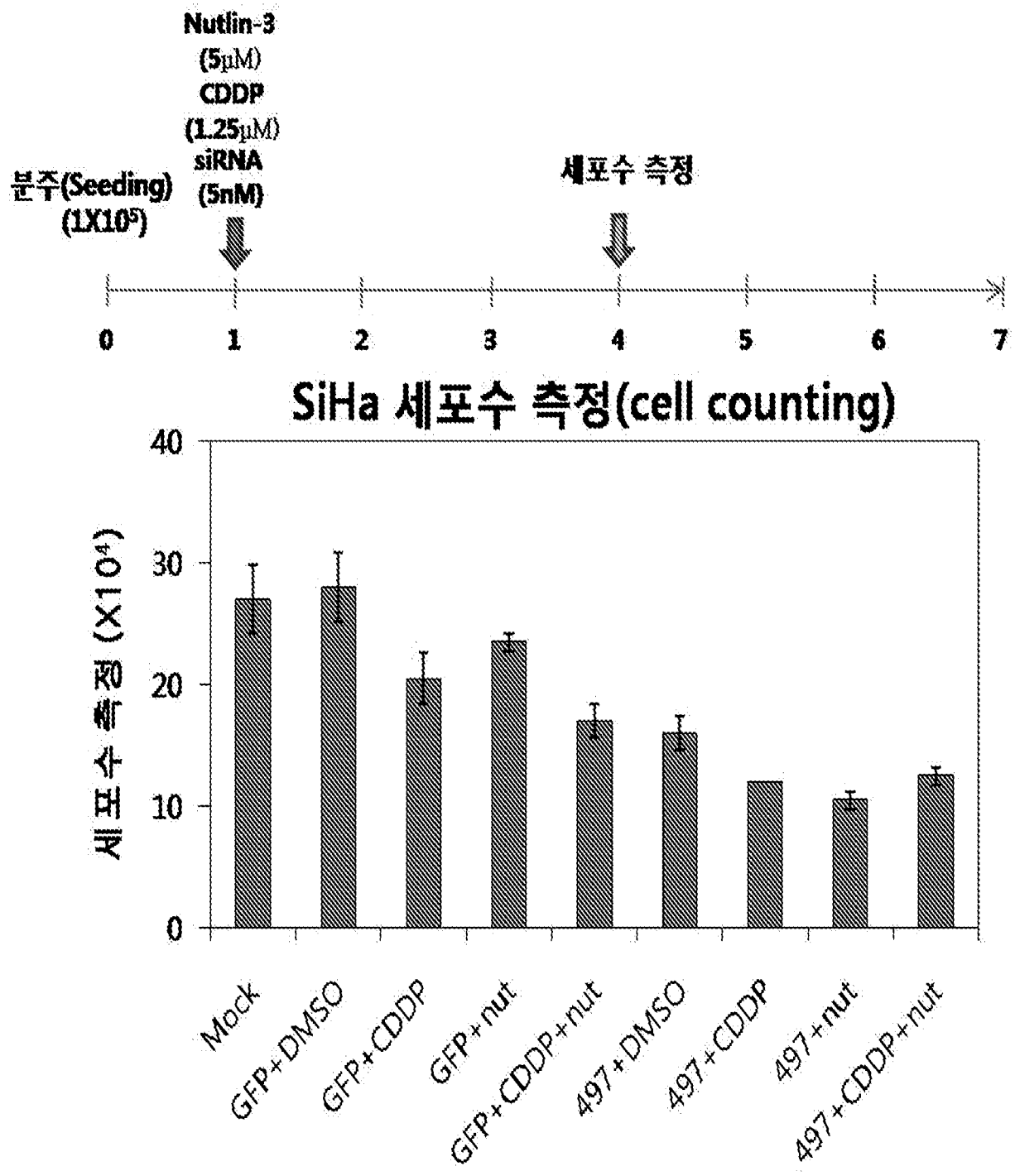
[Fig. 2b]



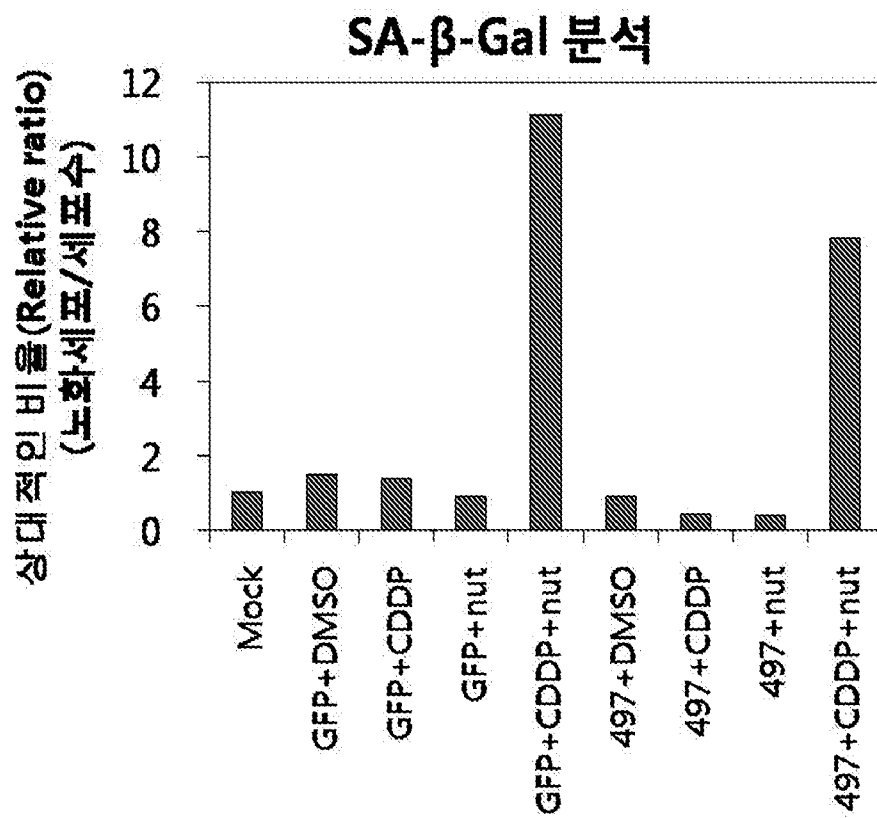
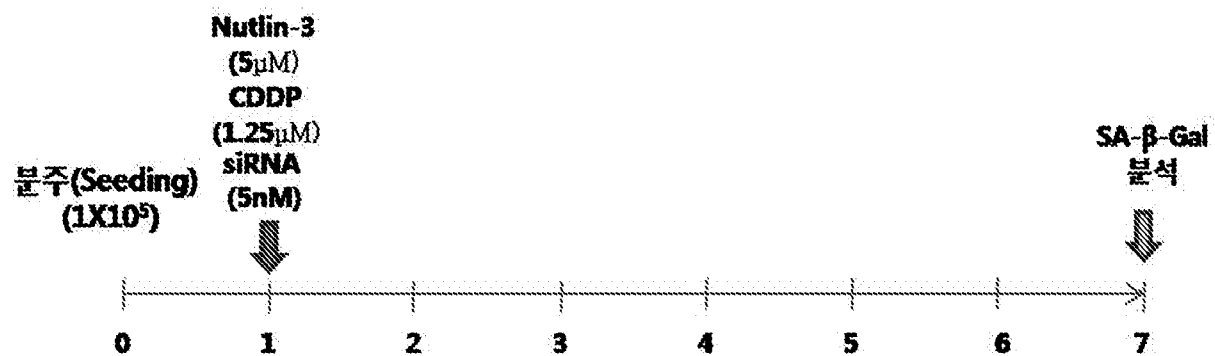
[Fig. 2c]



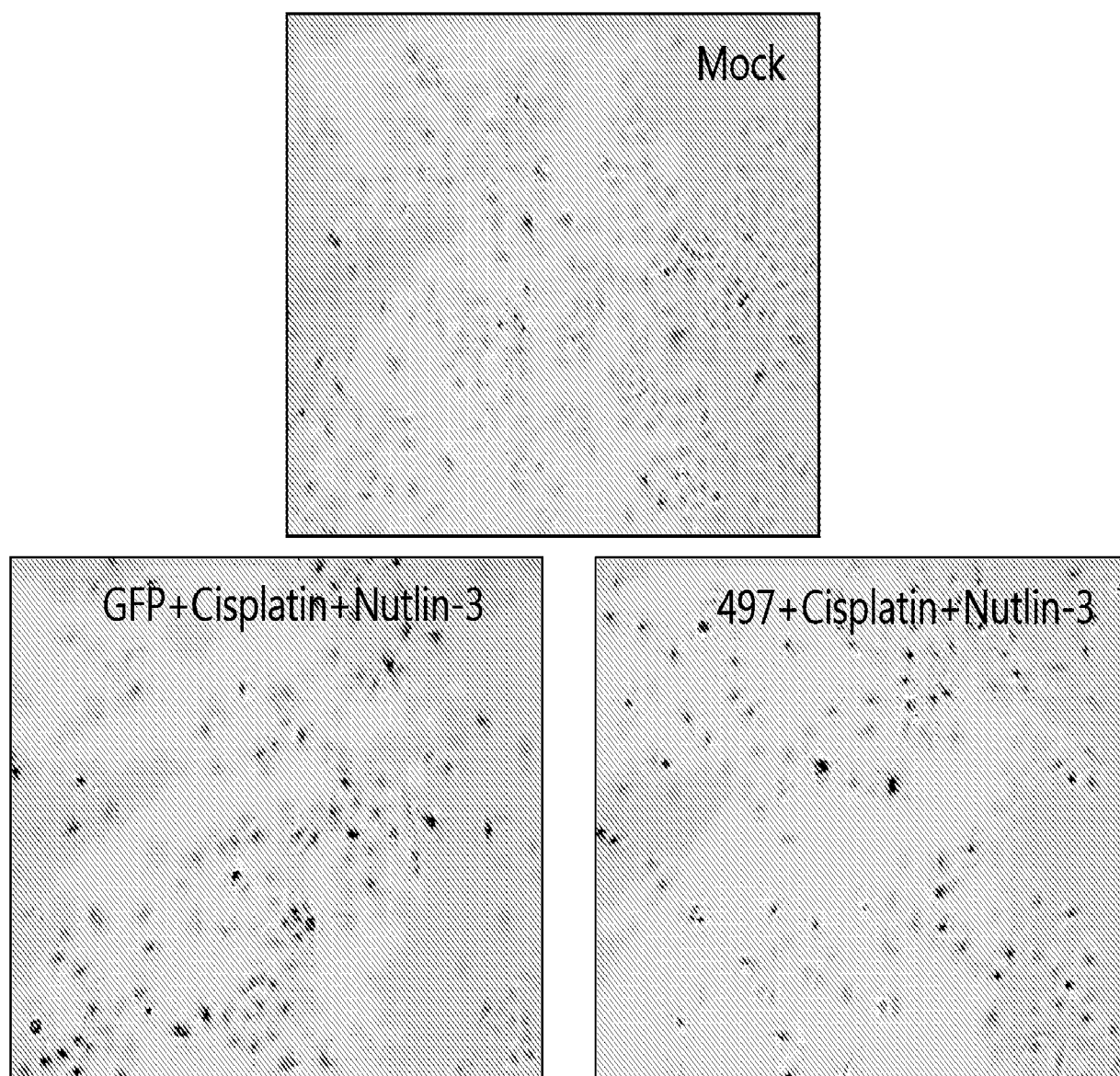
[Fig. 3a]



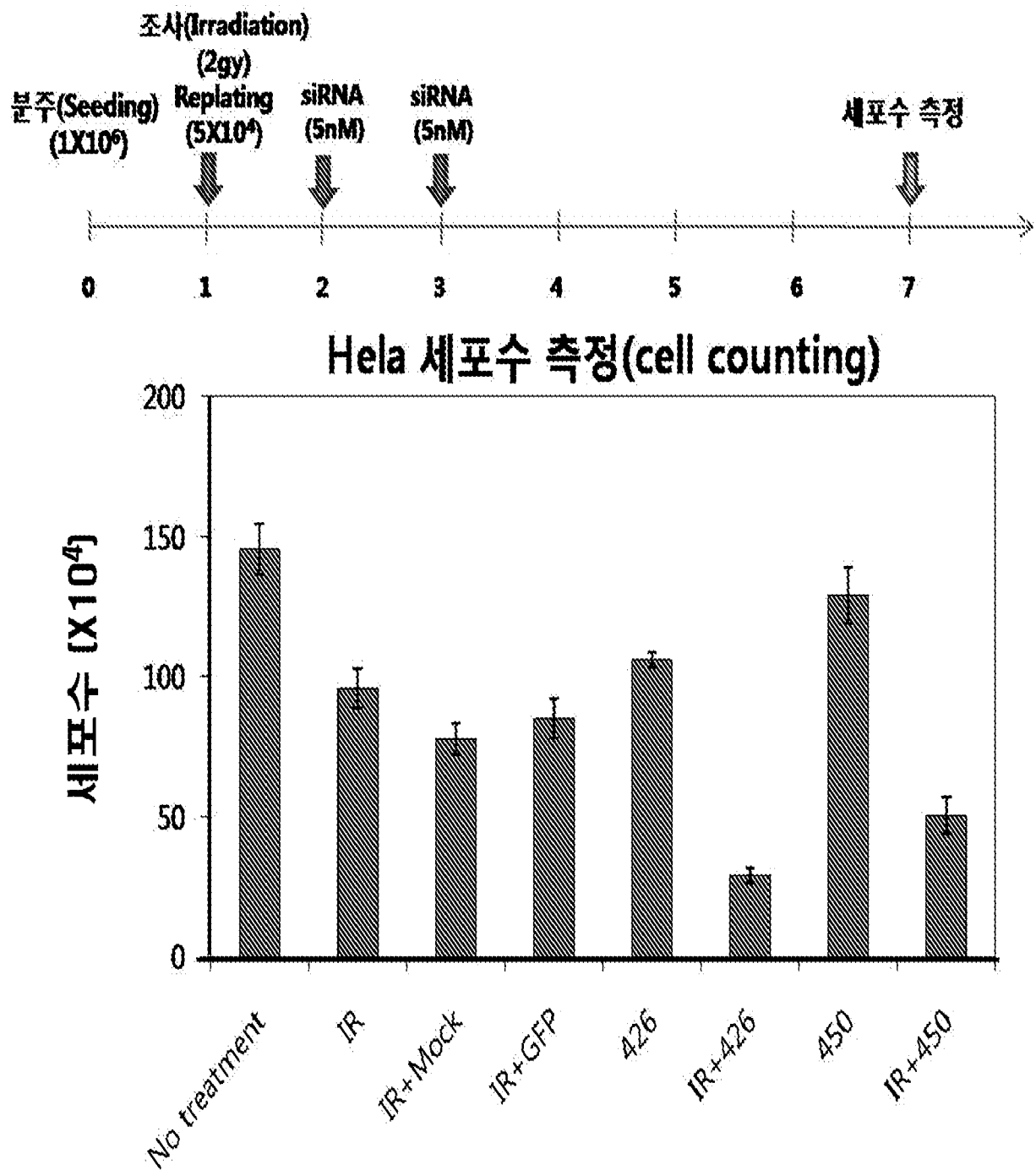
[Fig. 3b]



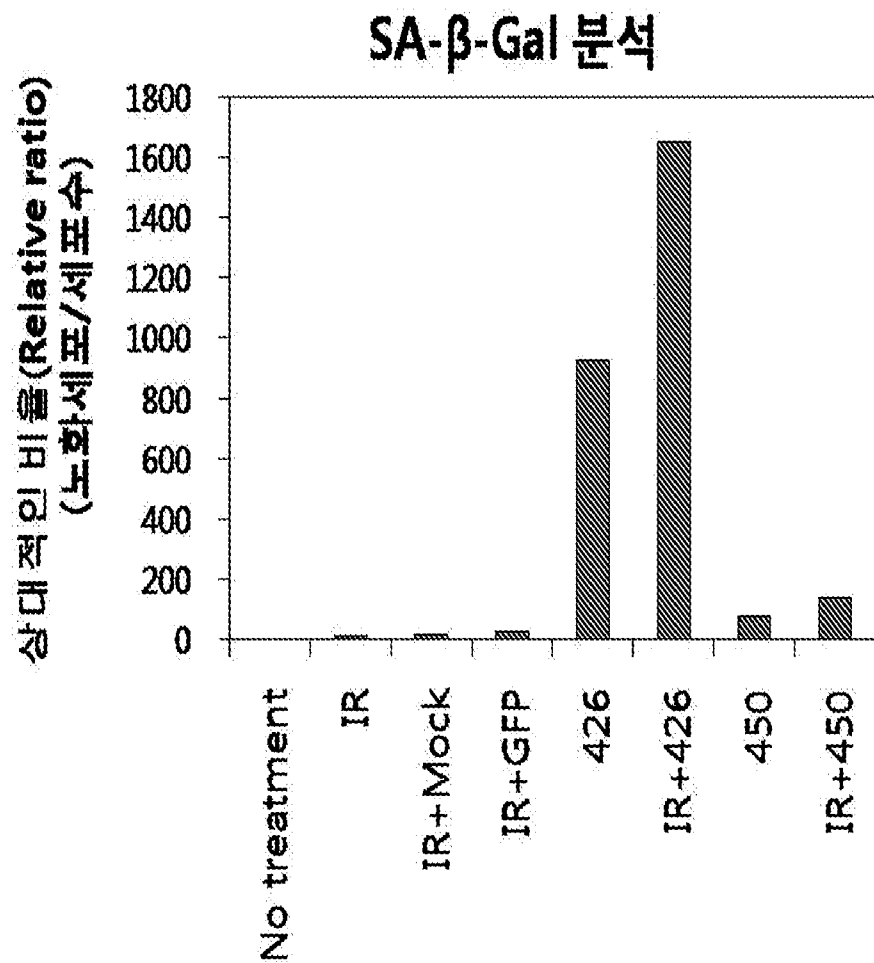
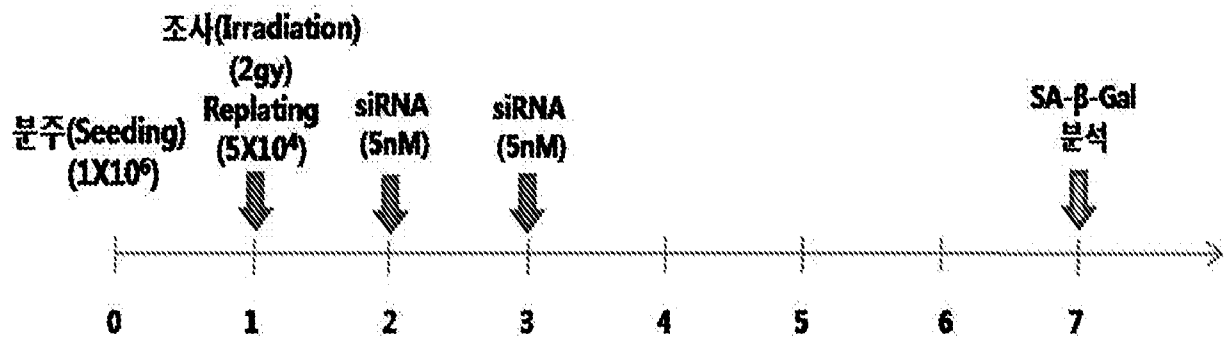
[Fig. 3c]



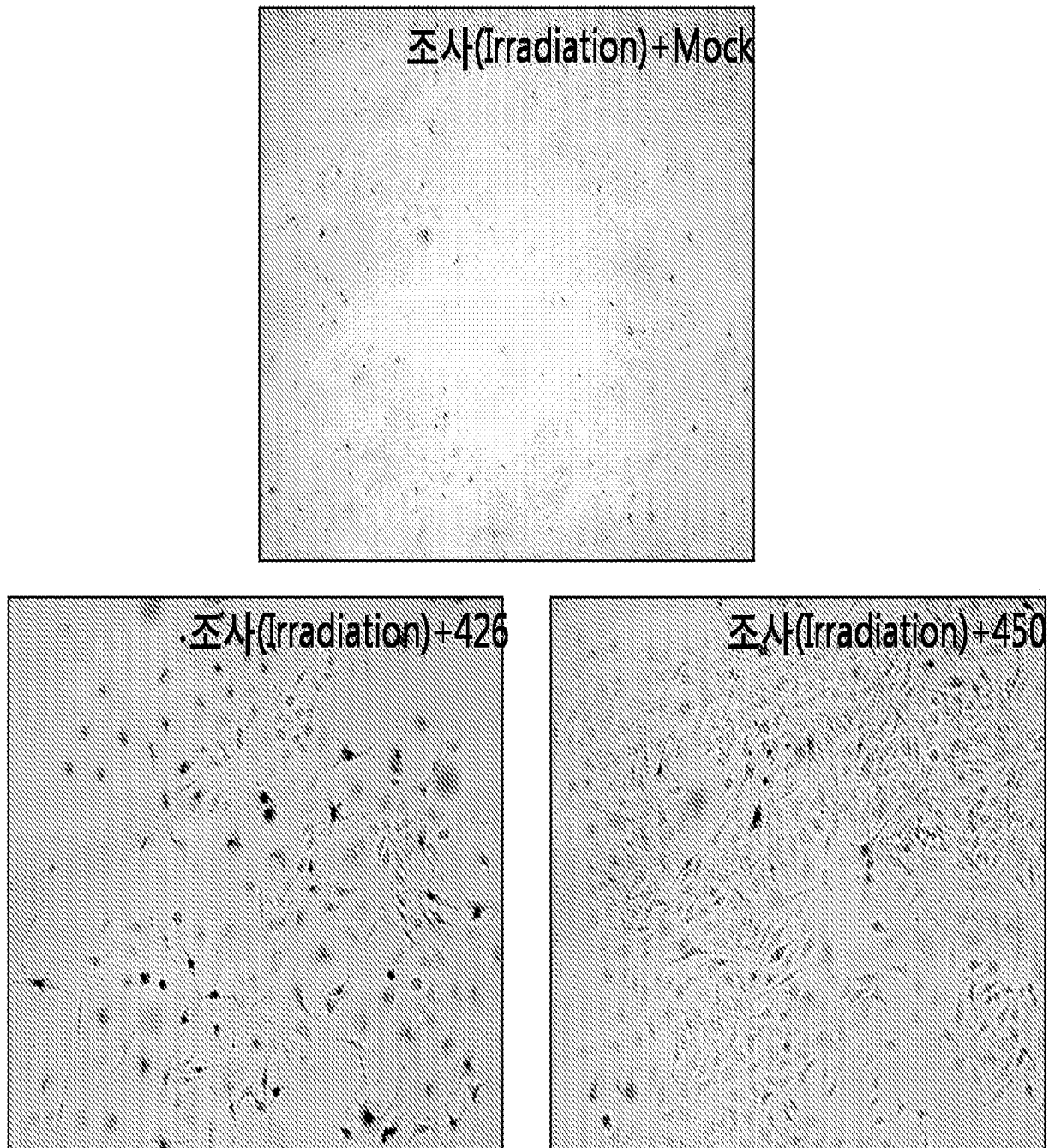
[Fig. 4a]



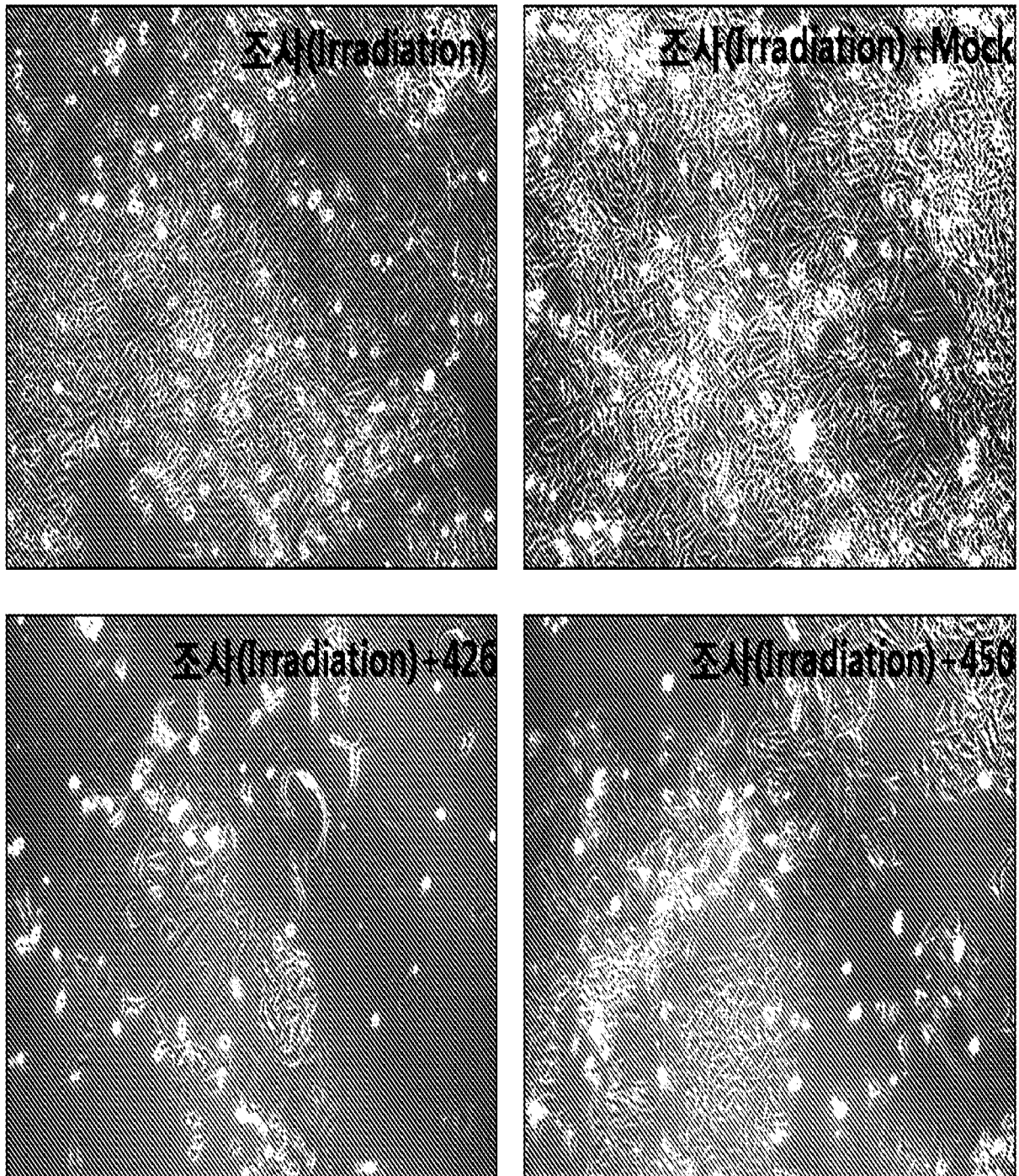
[Fig. 4b]



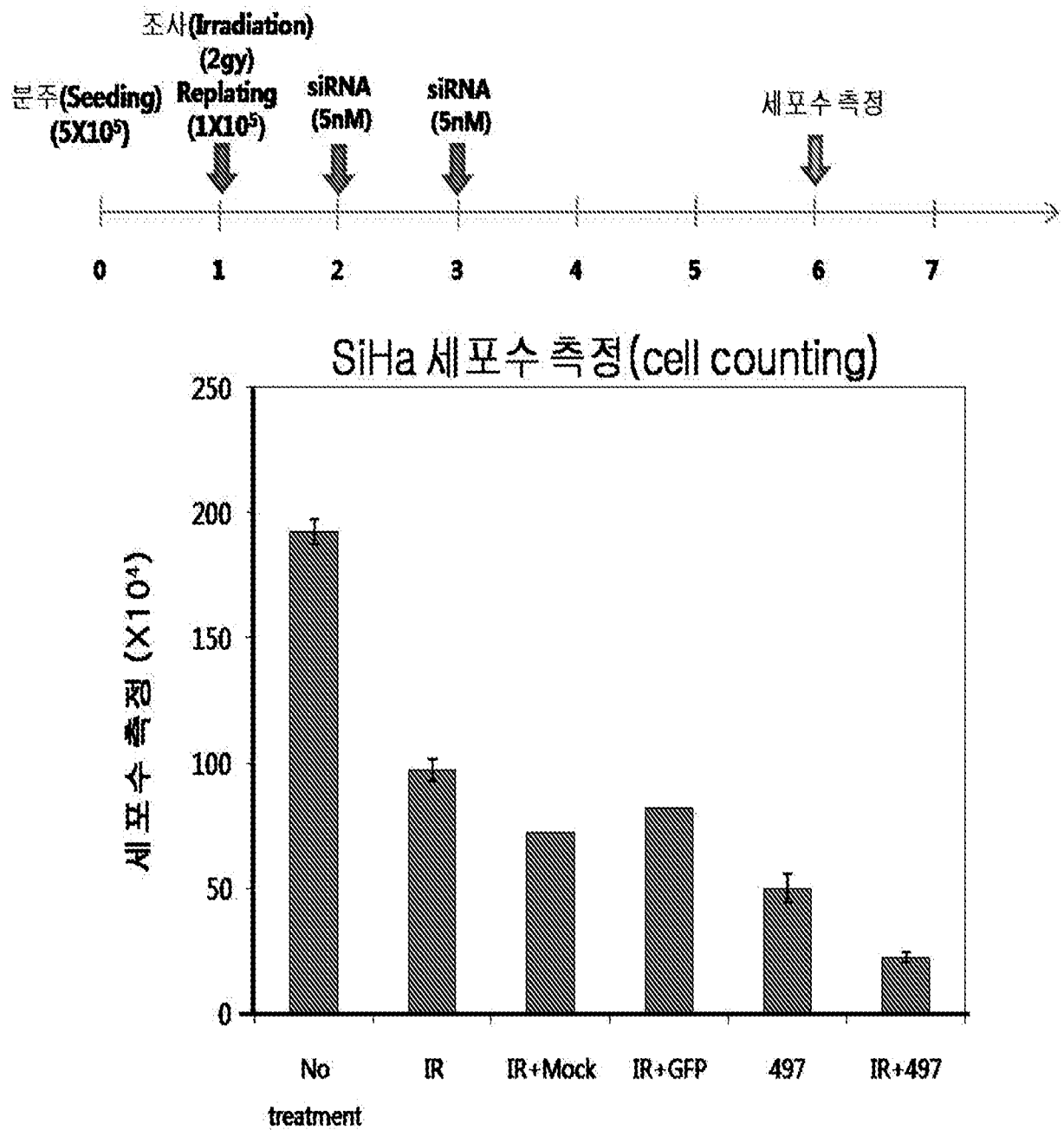
[Fig. 4c]



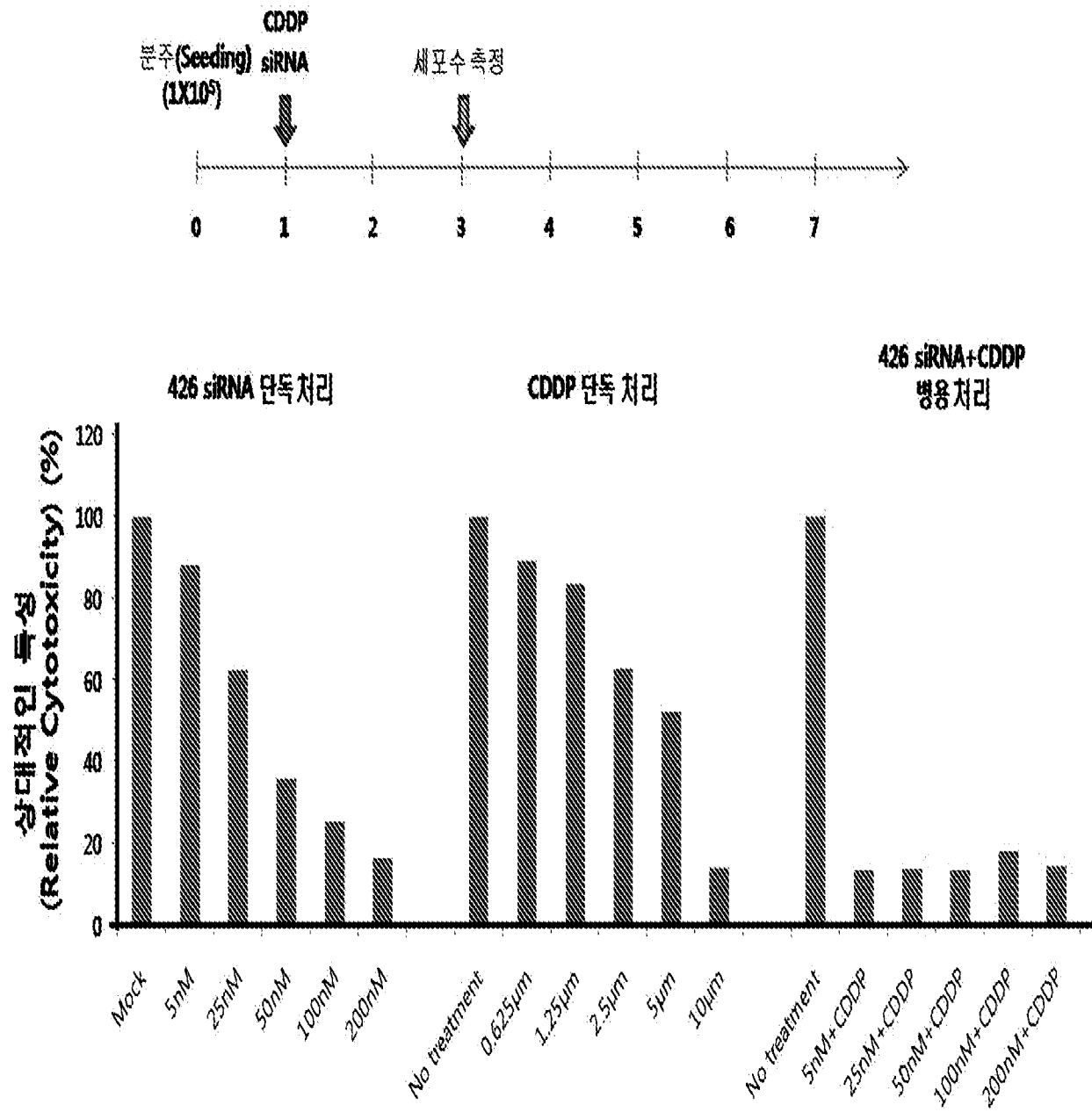
[Fig. 4d]



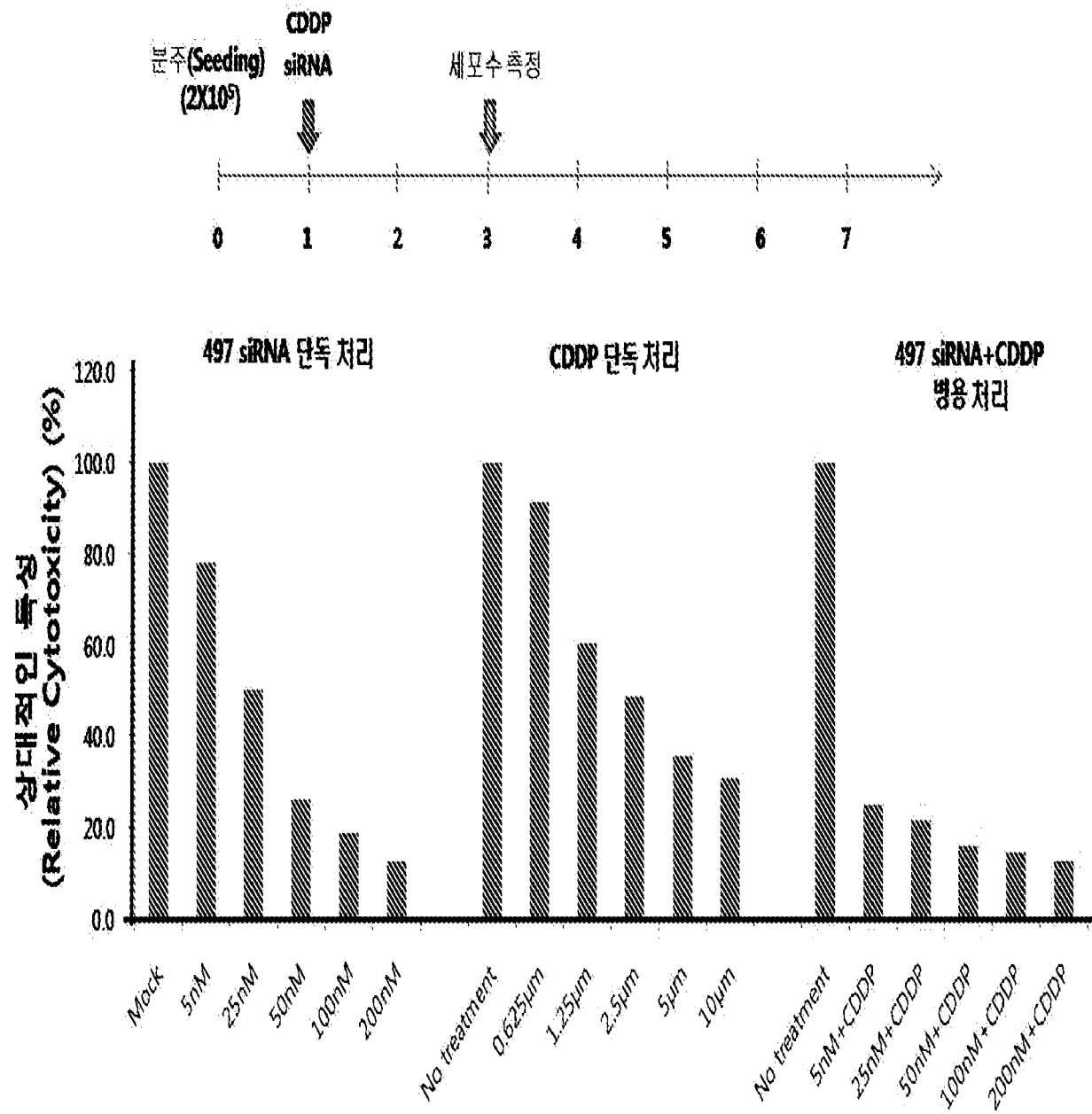
[Fig. 5]



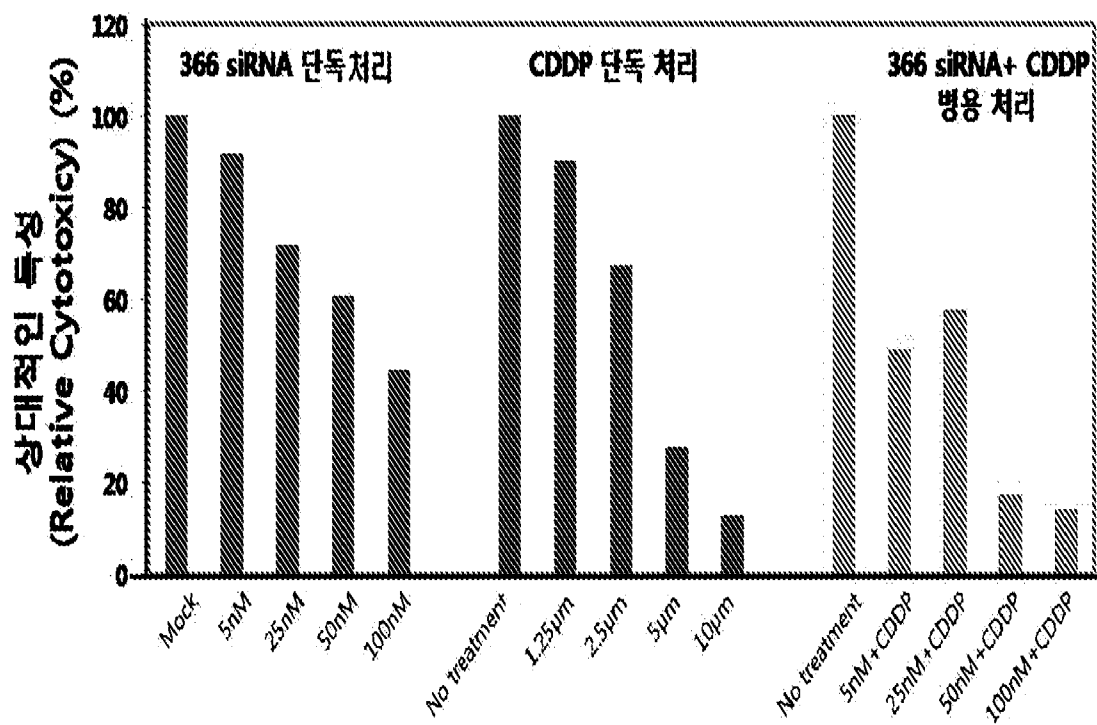
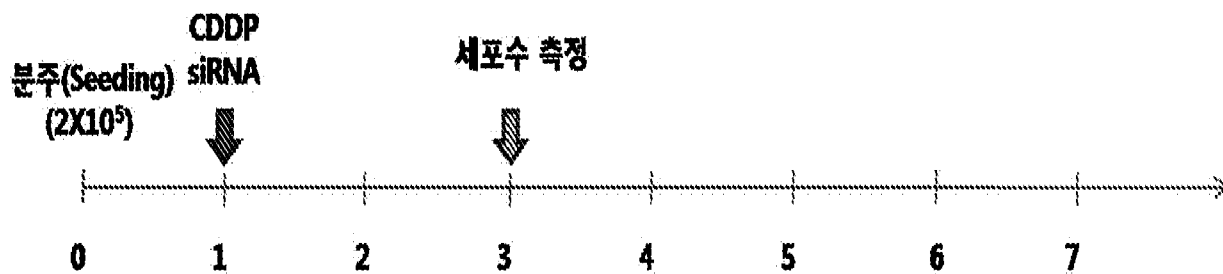
[Fig. 6a]



[Fig. 6b]



[Fig. 6c]



[Fig. 6d]

