



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0055421
(43) 공개일자 2025년04월24일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/7088</i> (2006.01) <i>A23L 33/13</i> (2016.01)
 <i>A61K 31/7105</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>C12Q 1/6886</i> (2018.01) <i>G01N 33/50</i> (2017.01)
 <i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/7088</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/13</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0140201
 (22) 출원일자 2024년10월15일
 심사청구일자 2024년10월15일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020230137922 2023년10월16일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 홍성희
 서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 305동 1401호</p> <p>박지호
 경상북도 안동시 육사로 333, 101동 306호</p> <p>신건섭
 경기도 남양주시 수레로 1168화 3층 가정집</p> <p>(74) 대리인
 파도특허법인유한회사</p> |
|--|--|

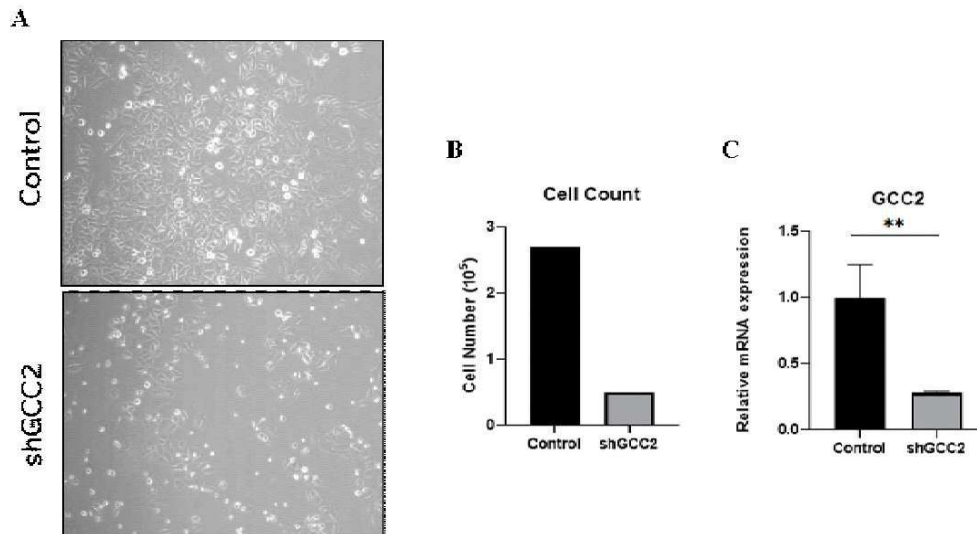
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 GCC2 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 GCC2 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 본 발명은 다양한 암 세포주로부터 분비되는 GCC2의 발현을 억제함으로써, 암의 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있는 다양한 억제제 및 이의 스크리닝 방법에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/7105 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/57407 (2013.01)
G01N 33/57411 (2013.01)
G01N 33/57415 (2019.01)
G01N 33/57438 (2019.01)
A23V 2002/00 (2023.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711183820
과제번호 2020R1A2C1101294
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 헌팅톤병의 병리기전 규명 및 치료 인자 발굴 연구
과제수행기관명 고려대학교산학협력단
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465038418
과제번호 00060247
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 (재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명 범부처재생의료기술개발사업
연구과제명 난치성 시신경척수염범주질환의 신경재생 및 재발억제를 위한 유도신경줄기세포 치

료제 개발

과제수행기관명 고려대학교산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711153758
과제번호 2019M3E5D5065399
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 환자세포-유래 유도신경줄기세포의 안전성과 유효성 검증을 통한 실용화 연구
과제수행기관명 고려대학교산학협력단
연구기간 2022.01.01 ~ 2023.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 GCC2의 발현 억제제는 GCC2 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), 작은 간섭RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀RNA(short hairpin RNA; shRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 GCC2 단백질의 활성 억제제는 GCC2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 GCC2 mRNA에 포함되는 서열번호 27 내지 서열번호 52 중 선택되는 하나 이상의 염기 서열과 특이적으로 결합하는 서열을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 서열번호 1 내지 서열번호 26의 서열 중 선택되는 하나 이상의 염기서열을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O-메톡시에틸화(2'-O-Methoxyethyl; 2'-MOE) 되거나, 또는 상기 하나 이상의 각 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids) 이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학 결합 중 하나 이상은 포스포로티오에이트(Phosphorothioate; PS)인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 shRNA는 서열번호 53 내지 서열번호 56의 서열 중 선택되는 하나 이상의 염기 서열을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 GCC2의 발현 억제제는 GCC2 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), 작은 간섭RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀RNA(short hairpin RNA; shRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 GCC2 단백질의 활성 억제제는 GCC2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 GCC2 mRNA에 포함되는 서열번호 27 내지 서열번호 52중 선택되는 하나 이상의 염기 서열과 특이적으로 결합하는 서열을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 서열번호 1 내지 서열번호 26의 서열 중 선택되는 하나 이상의 염기서열을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O-메톡시에틸화(2'-O-Methoxyethyl; 2'-MOE) 되거나, 또는 상기 하나 이상의 각 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids) 이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학 결합 중 하나 이상은 포스포로티오에이트(Phosphorothioate; PS)인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 shRNA는 서열번호 53 내지 서열번호 56의 서열 중 선택되는 하나 이상의 염기 서열을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 암의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 17

1) GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;

- 2) 상기 1)의 세포에서의 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 2)에서 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험 물질을 암 예방 또는 치료용 후보 물질로 선발하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 시험 물질은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, DNase, PNA, 항체, 앵타머, 천연 추출물 및 합성 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction: real-time PCR), 웨스턴 블롯(western blot), 노던 블롯(northern blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis) 및 유세포 분석법(Fluorescence-activated cell sorting: FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 GCC2 단백질 활성 수준을 측정하는 방법은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 다양한 암(자궁경부암, 교모세포종, 유방암, 췌장암)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 종양(tumor)은 세포가 세포 성장과 사멸에 관한 조절 능력을 잃고 비정상적인 세포성장의 결과이며, 종양이 침윤 및 전이성, 과도한 증식성을 가지면 악성종양(malignant tumor), 즉 암으로 분류한다. 암을 치료하기 위해서 전통적인 치료법 외에 면역 치료법, 표적 치료법 등이 있다. 표적 치료법은 분자 치료제를 이용하여 암의 성장과 발생을 특이적으로 억제할 수 있는 치료법을 의미한다.

[0004] 표적 치료법을 위해 사용되는 물질은 단클론항체, 소분자물질 등이 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide)는 10-20bp 길이로 이루어져 있으며 핵과 세포질에 있는 RNA에 상보적으로 결합하여 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 프리-mRNA는 번역 전 단계로 스플라이싱 되어 mRNA를 형성한다. 엑손은 mRNA에 속하며 인트론은 mRNA에 포함되지 않는 프리-mRNA에 속한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 스플라이스 부위에 결합하여 mRNA형성을 방해한다. 이외에도 유전자 발현을 조절할 수 있는 다양한 화합물이 있으며 shRNA, siRNA 등이 대표적으로 사용되고 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한 shRNA, siRNA 등의 유전자 발현 조절 기술은 mRNA에 상보적으로 결합하여 번역 과정을 막는다.

[0005] 암 치료를 위해, 보다 효과적인 표적 치료법의 개발이 요구되는 실정이나, 현재까지 암 치료에 있어서, 종양 억제 효과를 유도하고, 생체 내에서도 치료 효과가 우수한 표적 치료제의 개발은 아직 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 GCC2의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 다양한 암(자궁경부암, 교모세포종, 유방암, 췌장암)의 예방, 개선 또는 CAR T 세포, 지질 나노입자 (lipid nanoparticle), 항체-약물 복합체(antibody-drug conjugate)를 포함하는 치료용 조성물의 새로운 표적을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 하기의 단계를 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 1) GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0012] 2) 상기 1)의 세포에서의 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0013] 3) 상기 2)에서 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험 물질을 암 예방 또는 치료용 후보 물질로 선발하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0018] 1) GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0019] 2) 상기 1)의 세포에서의 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0020] 3) 상기 2)에서 GCC2 단백질의 활성 또는 GCC2 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험 물질을 암 예방 또는 치료용 후보 물질로 선발하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.
- [0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0023] 일 양태로서, 본 발명은 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.
- [0024] 본 발명에서 상기 GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2)는 세포의 트랜스-골지 네트워크(TGN)에 위치하는 주변 막 단백질로, 주로 소포 이동과 골지체의 구조 유지에 중요한 역할을 하며 다른 골지 단백질들과 상호작용하여 다양한 세포 과정에 필수적인 기능을 수행하는 단백질이다.
- [0025] 본 발명에서는, GCC2가 암 세포에서 특이적으로 많이 분비되는 것을 확인하고, 상기 GCC2의 발현 또는 활성을 억제할 경우, in vitro에서 종양 세포의 사멸, 침습, 전이, 중간엽세포의 성질 상실 등을 유도하여 다양한 암의 치료제로서의 가능성을 가짐을 확인하였다.

- [0026] 상기 GCC2 억제제는 GCC2를 코딩하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드(ASO), 작은 간섭RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀RNA(short hairpin RNA; shRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, GCC2 단백질의 활성 억제제는 상기 GCC2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명에서 제시되는 유전자 또는 단백질 서열은 예시적인 것이며, 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열이 본 발명의 범주에 포함될 수 있다. 여기서 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 의미함은 당업자에게 자명한 것이다.
- [0027] 일 예로서, 본 발명에서 GCC2 억제제는 상기 GCC2를 코딩하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)이며, 이는 서열번호 1 내지 26의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1 내지 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 GCC2를 코딩하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는, 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O-메톡시에틸화(2'-O-Methoxyethyl; 2'-MOE)되거나, 또는 상기 하나 이상의 각 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids)이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학결합 중 하나 이상은 포스포로티오에이트(Phosphorothioate; PS)일 수 있다.
- [0029] 보다 바람직하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 26로 표시되는 염기서열에서 5' 말단 및 3' 말단의 각 3개의 뉴클레오타이드는 LNA(Locked nucleic acids)로 치환되고, 중앙의 뉴클레오타이드는 2'-MOE로 치환되고, 각 뉴클레오타이드의 연결은 PS로 결합되어 변형된 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예로서, 상기 서열번호 1로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 27로 표시되는 표적 부위에 결합하고, 상기 서열번호 8로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 GCC2 mRNA 내에 존재하는 서열번호 34로 표시되는 표적 부위에 결합하는 것임을 확인하였다.
- [0031] 상기 서열번호 1로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 다양한 암 세포주(자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암)에서 GCC2 유전자의 발현을 억제한 결과, GCC2 단백질의 양이 감소됨에 따라 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition)이 감소, 세포의 침습(invasion)과 전이(migration) 및 세포 이동이 줄어드는 효과를 확인하였으며, 각 종양 세포의 군체(colony) 형성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0032] 다른 예로서, 본 발명에서 상기 GCC2 억제제는 GCC2를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하기 위한 shRNA(short hairpin RNA) 또는 siRNA(small interference RNA)일 수 있다.
- [0033] 일 실시예로서, 상기 shRNA는 서열번호 53 내지 서열번호 56으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 GCC2를 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 서열번호 53 내지 서열번호 56로 표시되는 뉴클레오타이드 중에서 선택된 shRNA를 이용하여 다양한 암 세포주(자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암)에서 GCC2 유전자의 발현을 억제한 결과, 세포 수 및 생존률(viability)이 줄어들며, 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition)이 감소, 세포의 침습(invasion)과 전이(migration) 및 세포 이동이 줄어들었으며, 각 종양 세포의 군체(colony) 형성이 감소하는 것을 확인하였다.
- [0035] 상기 결과로부터 상기 GCC2에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO), shRNA 또는 siRNA와 같은 억제 물질을 자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암에 대한 예방, 개선 또는 치료 용도로 사용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암과 같은 다양한 암에 대한 증상을 억제하거나, 발병을 지연시킬 수 있는 모든 행위를 의미한다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암과 관련된 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상

포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 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.

[0040] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥 내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0042] 다른 양태로서 본 발명은 GCC2 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 다양한 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 대한 것이다.

[0043] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0044] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효 성분의 유효 용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0045] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0046] 또 다른 양태로서, 본 발명은 암 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법으로서, 하기의 과정을 포함하는 방법에 대한 것이다.

[0047] 1) GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;

[0048] 2) 상기 1)의 세포에서의 GCC2 단백질의 활성 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0049] 3) 상기 2)에서 GCC2 단백질의 활성 또는 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험 물질을 암 예방 또는 치료용 후보 물질로 선발하는 단계.

[0050] 상기 시험 물질은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, DNase, PNA, 항체, 앵타머, 천연 추출물 및 합성 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0051] 또한, 상기 GCC2 단백질 또는 GCC2 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction: real-time PCR), 웨스턴 블롯(western blot), 노던 블롯(northern blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis) 및 유세포 분석법(Fluorescence-activated cell sorting: FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것이 바람직하나, 당업자에게 알려진 유전자 발현 정도 또는 단백질 발현 정도를 측정하는 방법이면 제한

없이 적용될 수 있다.

[0052]

또한, GCC2 단백질 활성 수준을 측정하는 방법은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것이 바람직하나, 당업자에게 알려진 단백질 활성 정도를 측정하는 방법이면 제한 없이 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0054]

본 발명은 GCC2 억제제를 유효 성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 특히 GCC2 억제제의 투여를 통해 자궁경부암, 교모세포종, 유방암 및 췌장암 세포에서 특이적으로 많이 분비되는 GCC2의 발현을 억제하여 종양 세포의 생존, 분열, 침습 및 전이, 세포 이동을 감소시킴으로써, 암의 진행을 막고 전이를 방지하는 등의 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0056]

도 1은 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 사진과 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸다. 24시간 뒤 대조군과 달리 shRNA로 GCC2의 발현을 억제한 실험군에서 세포의 수가 감소한 것을 보여준다.

도 2는 도 1과 같은 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 사진과 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸다. 24시간 뒤 대조군과 달리 shRNA로 GCC2의 발현을 억제한 실험군에서 세포의 수가 감소한 것을 보여준다.

도 3은 도 1과 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 사진과 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸다. 24시간 뒤 대조군과 달리 shRNA로 GCC2의 발현을 억제한 실험군에서 세포의 수가 감소한 것을 보여준다.

도 4는 도 1과 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 사진과 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸다. 24시간 뒤 대조군과 달리 shRNA로 GCC2의 발현을 억제한 실험군에서 세포의 수가 감소한 것을 보여준다.

도 5는 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 생존력(Viability)을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 비교하여 GCC2 유전자가 억제된 세포의 생존력이 감소하는 것을 보여준다.

도 6은 도 5와 같은 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 생존력(Viability)을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 비교하여 교모세포종 세포에서도 GCC2 유전자가 억제된 경우 생존력이 감소하는 것을 보여준다.

도 7은 도 5와 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 생존력(Viability)을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 비교하여 유방암 세포에서도 GCC2 유전자가 억제된 경우 생존력이 감소하는 것을 보여준다.

도 8은 도 5와 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자 발현을 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 생존력(Viability)을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 비교하여 췌장암 세포에서도 GCC2 유전자가 억제된 경우 생존력이 감소하는 것을 보여준다.

도 9는 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 측정한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Snail의 발현 수준이 줄어들었으며 이는 세포의 전이가 감소한다는 것을 나타낸다.

도 10는 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 측정한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Slug의 발현 수준이 줄어들었으며, 세포 연접에 관여하는 단백

질인 E-cadherin의 발현 수준은 줄어들지 않았다. 이는 세포의 전이가 감소한다는 것을 나타낸다.

도 11은 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 측정된 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Slug의 발현 수준이 줄어들었으며, 이는 세포의 전이가 감소한다는 것을 나타낸다.

도 12은 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 유전자 발현을 억제한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 측정된 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2의 발현 수준이 줄어들었으며, 세포 연접에 관여하는 단백질인 E-cadherin의 발현 수준은 줄어들지 않았다. 이는 세포의 전이가 감소한다는 것을 나타낸다.

도 13는 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)의 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 막을 통과한 세포의 수가 줄어드는 경향을 확인하였다.

도 14은 도 9와 같은 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)의 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 막을 통과한 세포의 수가 줄어드는 경향을 확인하였다.

도 15은 도 9와 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)의 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 막을 통과한 세포의 수가 줄어드는 경향을 확인하였다.

도 16은 도 9와 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 shRNA를 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)의 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 막을 통과한 세포의 수가 줄어드는 경향을 확인하였다.

도 17은 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 이동을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 달리 GCC2 유전자의 발현을 억제한 실험군에서 자궁경부암 세포의 이동이 감소한 것을 보여준다.

도 18은 도 17과 같은 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 이동을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 달리 GCC2 유전자의 발현을 억제한 실험군에서 교모세포종 세포의 이동이 감소한 것을 보여준다.

도 19는 도 17과 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 이동을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 달리 GCC2 유전자의 발현을 억제한 실험군에서 유방암 세포의 이동이 감소한 것을 보여준다.

도 20은 도 17과 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 이동을 분석한 결과를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 대조군과 달리 GCC2 유전자의 발현을 억제한 실험군에서 췌장암 세포의 이동이 감소한 것을 보여준다.

도 21은 자궁경부암 세포주인 HeLa에서 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 군체(colony) 형성의 정도를 비교한 결과이다. shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 현저하게 군체(colony) 형성이 감소한 것을 보여준다.

도 22은 도 21과 같은 방법으로 교모세포종 세포주인 U87에서 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 군체(colony) 형성의 정도를 비교한 결과이다. shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 현저하게 군체(colony) 형성이 감소한 것을 보여준다.

도 23은 도 21과 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 군체(colony) 형성의 정도를 비교한 결과이다. shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 현저하게 군체(colony) 형성이 감소한 것을 보여준다.

도 24는 도 21과 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포와 그렇지 않은 세포의 군체(colony) 형성의 정도를 비교한 결과이다. shRNA를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 현저하게 군체(colony) 형성이 감소한 것을 보여준다.

도 25는 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입 하였을 때의 GCC2 유전자 발현량의 결과를 나타낸다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 1과 서열번호 8을 이용하여 유전자 발현을 억제하였을 때 GCC2의 발현량이 억제됨을 확인하였다.

도 26은 도 13과 같은 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입 하였을 때의 GCC2 유전자 발현량의 결과를 나타낸다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 1과 서열번호 8을 이용하여 유전자 발현을 억제하였을 때 GCC2의 발현량이 억제됨을 확인하였다.

도 27은 도 13과 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입 하였을 때의 GCC2 유전자 발현량의 결과를 나타낸다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 1과 서열번호 8을 이용하여 유전자 발현을 억제하였을 때 GCC2의 발현량이 억제됨을 확인하였다.

도 28은 도 13과 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입 하였을 때의 GCC2 유전자 발현량의 결과를 나타낸다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 1과 서열번호 8을 이용하여 유전자 발현을 억제하였을 때 GCC2의 발현량이 억제됨을 확인하였다.

도 29는 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Slug, Snail의 발현 수준이 줄어들었으며, 도 13과 같이 대조군에 비해 실험군에서 발현량 차이를 보였다.

도 30은 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Zeb1, Zeb2, Slug, Snail의 발현 수준이 줄어들었으며, 도 14와 같이 대조군에 비해 실험군에서 발현량 차이를 보였다.

도 31는 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Slug의 발현 수준이 줄어들었으며, 세포 연접에 관여하는 단백질인 E-cadherin의 발현 수준은 증가하였다. 이는 도 15와 같이 대조군에 비해 실험군에서 발현량 차이를 나타낸다.

도 32는 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질주입한 세포의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량을 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb2의 발현 수준이 줄어들었으며, 세포 연접에 관여하는 단백질인 E-cadherin의 발현 수준은 증가하였다. 이는 도 16과 같이 대조군에 비해 실험군에서 발현량 차이를 나타낸다.

도 33은 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 1을 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)를 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 막을 통과한 세포의 수가 줄어들었음을 확인하였고, 이는 세포의 침습과 전이 능력이 감소한 것을 나타낸다.

도 34는 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 1을 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)를 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 막을 통과한 세포의 수가 줄어들었음을 확인하였고, 이는 세포의 침습과 전이 능력이 감소한 것을 나타낸다.

도 35는 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 8을 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)를 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 막을 통과한 세포의 수가 줄어들었음을 확인하였고, 이는 세포의 침습과 전이 능력이 감소한 것을 나타낸다.

도 36는 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열번호 8을 형질주입한 세포의 침습(invasion)과 전이(migration)를 확인한 결과를 나타낸다. 대조군에 비해 실험군에서 막을 통과한 세포의 수가 줄어들었음을 확인하였고, 이는 세포의 침습과 전이 능력이 감소한 것을 나타낸다.

도 37은 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 세포의 이동을 분석한 결과이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제시킨 세포의 경우 대조군과 비교하여 세포의 이동이 감소한 것을 나타낸다.

도 38은 도 37과 같은 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 이동을 분석한 결과이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포의

경우 대조군과 비교하여 세포의 이동이 감소한 것을 나타낸다.

도 39는 도 37과 같은 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 이동을 분석한 결과이다. 안티센스올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포의 경우 대조군과 비교하여 세포의 이동이 감소한 것을 나타낸다.

도 40은 도 37과 같은 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 이동을 분석한 결과이다. 안티센스올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제한 세포의 경우 대조군과 비교하여 세포의 이동이 감소한 것을 나타낸다.

도 41은 자궁경부암 세포주 HeLa에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 군체(colony) 형성을 대조군과 비교한 결과이다. 안티센스올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제시킨 경우 대조군과 비교하여 군체(Colony) 형성이 감소한 것을 나타낸다.

도 42는 도 41과 동일한 방법으로 교모세포종 세포주 U87에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 군체(colony) 형성을 대조군과 비교한 결과이다. 안티센스올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제시킨 경우 대조군과 비교하여 교모세포종 세포에서 군체(Colony) 형성이 감소한 것을 나타낸다.

도 43은 도 41과 동일한 방법으로 유방암 세포주 MDA-MB-231에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 군체(colony) 형성을 대조군과 비교한 결과이다. 안티센스올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제시킨 경우 대조군과 비교하여 교모세포종 세포에서 군체(Colony) 형성이 감소한 것을 나타낸다.

도 44는 도 41과 동일한 방법으로 췌장암 세포주 AsPC-1에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 형질 주입한 뒤 세포의 군체(colony) 형성을 대조군과 비교한 결과이다. 안티센스올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCC2 유전자를 억제시킨 경우 대조군과 비교하여 교모세포종 세포에서 군체(Colony) 형성이 감소한 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0059] 실시예 1. shRNA를 이용한 GCC2 억제 효과

[0060] GCC2의 mRNA에 특이적으로 결합하는 서열번호 53으로 표시되는 염기서열로 이루어진 shRNA(short hairpin RNA)를 제작하였다. 상기 shRNA가 도입된 플라스미드 벡터를 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231), 췌장암 세포주(AsPC-1)에 각각 형질 전환하고, 아래와 같이 그 결과를 확인하였다. 각 실험에서 대조군은 shRNA가 처리되지 않은 각각의 암 세포주를 의미한다.

[0061] 1-1) 세포의 수 변화

[0062] 상기와 같이 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 각 세포주에 대하여, 세포 수의 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 1 내지 도 4에서 보듯이, 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1)에서 모두 세포 수가 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0063] 1-2) 세포 생존율 변화

[0064] 상기와 같이 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각의 시간에 따른 상대적 생존율의 변화를 도 5 내지 8과 같이 확인하였다. 0시간(기준)에서의 생존율을 100으로 볼 때, 6시간, 12시간, 24시간 시점에서 측정된 생존율은 모든 세포주에서 감소되는 추세에 있는 것을 확인하였으며, 24시간 경과 후에는 모든 세포주에서 50% 미만의 생존율을 보였음을 확인하였다. 데이터는 $p < 0.001$ 수준에서의 유의미성을 가진다.

[0065] 1-3) 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 관련 유전자 발현 변화

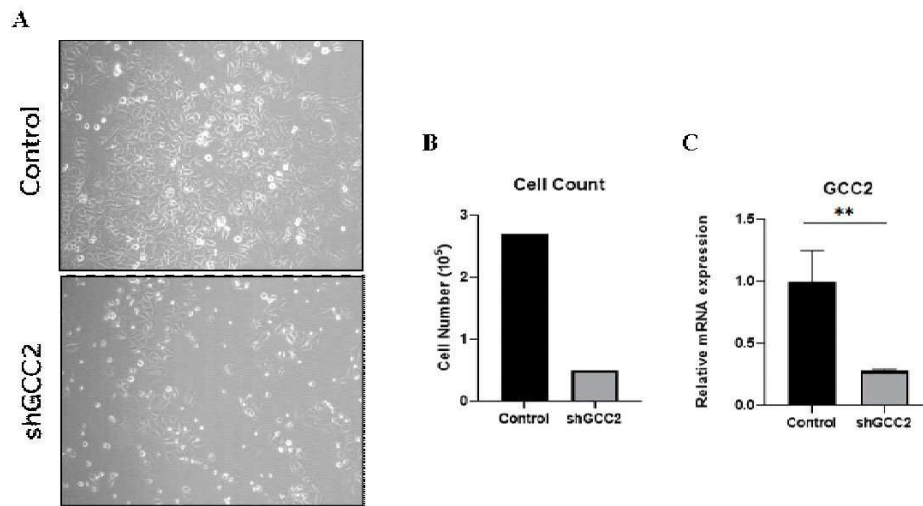
- [0066] 상기 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량 변화를 측정하여 확인하였다.
- [0067] 그 결과, 도 9와 같이 자궁경부암 세포주(HeLa)에서는 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Snail의 발현 수준이 감소하였으며, 도 10 및 도 11과 같이 교모세포종 세포주(U87) 및 유방암 세포주(MDA-MB-231)에서는 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Slug의 발현 수준이 감소하였다. 한편, 도 12에서 보듯이, 췌장암 세포주(AsPC-1)에서 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2의 발현 수준이 감소하였는 바, 상기 결과로부터 암 세포주에 대한 전이 감소 효과를 확인할 수 있었다.
- [0068] **1-4) 침습(invasion) 및 전이(migration)변화**
- [0069] 상기 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각에 대하여, 침습 및 전이 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0070] 트랜스웰 인서트와 같은 막을 사용하여, 세포주의 침습 및 전이여부를 확인하였으며, 침습여부는 매트릭셀(Matrigel)로 코팅한 막을 통해 확인하였다. 막 상부에 세포를 접종한 후, 하부에 화학적 유인물질을 포함한 배지를 통해 세포 이동을 유도하였다.
- [0071] 그 결과, 도 13 내지 16과 같이, 모든 세포주에서 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 경우, 침습 및 전이가 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0072] **1-5) 세포 이동 변화**
- [0073] 상기 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각의 이동성 변화를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0074] 세포 배양 접시에 일정한 밀도로 상기 세포주들을 접종하고, 세포가 접촉할 정도로 증식시킨 후, 세포가 밀집되면 세포층에 상처(scratch)를 유도하여 24시간 경과 후 상처의 닫힘 정도(scratch closure)를 비교하는 방법으로 세포의 이동 여부를 확인하였다.
- [0075] 그 결과, 도 17 내지 20과 같이, 상기 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1)는 모두 대조군에 비해 세포 이동의 정도가 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다.
- [0076] **1-6) 군체(colony) 형성 정도의 비교**
- [0077] 상기 shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1)에 대하여 이를 각각 배양 접시에 일정하게 접종하고, 1~2주간 배양하여, 단일 세포 콜로니 형성을 유도하였다. 배양 후, 염색을 통해 생성된 콜로니를 대조군과 비교하였다.
- [0078] 그 결과, 도 21 내지 24에서 확인되듯이, shRNA(shGCC2)를 통해 GCC2 발현이 억제된 각각의 암 세포주는 대조군에 비하여 콜로니의 형성이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
- [0080] **실시예 2. 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)를 이용한 GCC2 억제 효과**
- [0081] GCC2의 mRNA에 상보적으로 결합하는 서열번호 1 내지 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 합성하였다. 이 중, 서열번호 27의 GCC2 mRNA 표적 부위에 상보적인 서열번호 1의 ASO 및 서열번호 34의 GCC2 mRNA 표적 부위에 상보적인 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 ASO를 각각 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231), 췌장암 세포주(AsPC-1) 내에 전달하고, 아래와 같이 그 결과를 확인하였다. 각 실험에서 대조군은 ASO를 처리하지 않은 각각의 암 세포주를 의미한다.
- [0082] **2-1) GCC2 유전자의 상대적 발현량 비교**
- [0083] 상기 합성한 서열번호 1(ASO1) 및 서열번호 8(ASO8)의 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 주입한 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1)에 대하여, 실제 GCC2 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 상대적 mRNA 발현량을 비교하였다.

- [0084] 그 결과, 도 25 내지 28에서 보듯이, 서열번호 1 또는 서열번호 8의 ASO를 주입한 경우, GCC2의 발현량이 대조군에 비해 감소된 것을 확인할 수 있으며, 자궁경부암 세포주에서는 서열번호 1의 ASO의 GCC2 억제 효과가 더 높았으며, 나머지 암 세포주들은 서열번호 8의 ASO에 의한 GCC2 억제 효과가 더 높은 것을 확인하였다.
- [0085] **2-2) 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 관련 유전자 발현 변화**
- [0086] 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각의 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition) 표지 인자의 발현량 변화를 측정하여 확인하였다.
- [0087] 그 결과, 도 29와 같이 자궁경부암 세포주(HeLa)에서는 ASO1의 처리에 의하여 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2, Slug, Snail의 발현 수준이 감소하였으며, 도 30과 같이, 교모세포종 세포주(U87)는 ASO8의 처리에 의해 N-cadherin, Zeb1, Zeb2, Slug, Snail의 발현 수준이 감소하였다. 또한 도 31과 같이, 유방암 세포주(MDA-MB-231)에서는 ASO8을 처리한 경우, N-cadherin, Twist1, Twist2, Slug의 발현이 감소되었다. 한편, 도 32와 같이, 췌장암 세포주(AsPC-1)에서도 ASO8의 처리로 인하여 N-cadherin, Twist1, Twist2, Zeb2의 발현 수준이 감소하였는 바, 상기 결과로부터 ASO의 처리에 따른 암 세포주에 대한 전이 감소 효과를 확인할 수 있었다.
- [0088] **2-3) 침습(invasion) 및 전이(migration)변화**
- [0089] 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각에 대하여, 침습 및 전이 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0090] 트랜스웰 인서트와 같은 막을 사용하여, 세포주의 침습 및 전이여부를 확인하였으며, 침습여부는 매트릭스 젤(Matrigel)로 코팅한 막을 통해 확인하였다. 막 상부에 세포를 접종한 후, 하부에 화학적 유인물질을 포함한 배지를 통해 세포 이동을 유도하였다.
- [0091] 그 결과, 도 33 내지 36과 같이, 모든 세포주에서 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 통해 GCC2 발현이 억제된 경우, 침습 및 전이가 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0092] **2-4) 세포 이동 변화**
- [0093] 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1) 각각의 이동성 변화를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0094] 세포 배양 접시에 일정한 밀도로 상기 세포주들을 접종하고, 세포가 접촉할 정도로 증식시킨 후, 세포가 밀집되면 세포층에 상처(scratch)를 유도하여 24시간 내지 48시간 경과 후 상처의 닫힘 정도(scratch closure)를 비교하는 방법으로 세포의 이동 여부를 확인하였다.
- [0095] 그 결과, 도 37 내지 40과 같이, 상기 ASO를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1)는 모두 대조군에 비해 세포 이동의 정도가 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다.
- [0096] **2-5) 군체(colony) 형성 정도의 비교**
- [0097] 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 통해 GCC2 발현이 억제된 자궁경부암 세포주(HeLa), 교모세포종 세포주(U87), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(AsPC-1)에 대하여 이를 각각 배양 접시에 일정하게 접종하고, 1~2주간 배양하여, 단일 세포 콜로니 형성을 유도하였다. 배양 후, 염색을 통해 생성된 콜로니를 대조군과 비교하였다.
- [0098] 그 결과, 도 41 내지 44에서 확인되듯이, 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드(ASO)를 통해 GCC2 발현이 억제된 각각의 암 세포주는 대조군에 비하여 콜로니의 형성이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
- [0100] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고

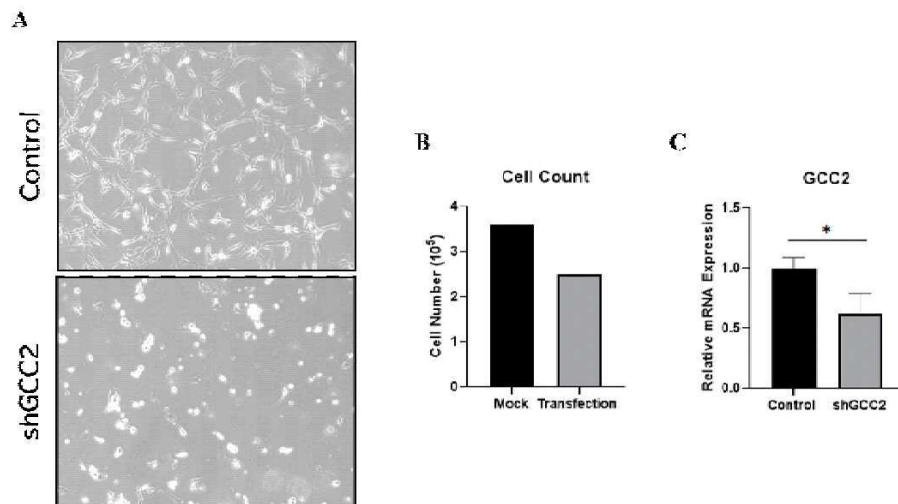
려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

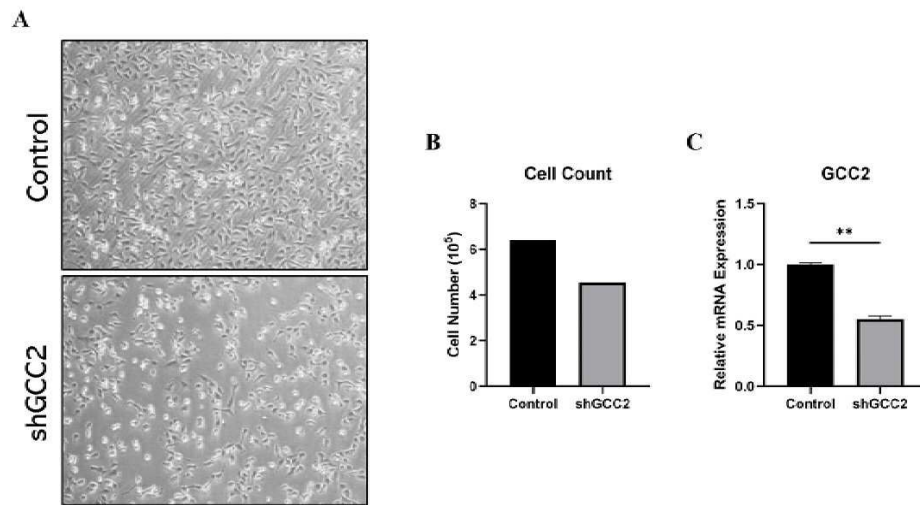
도면1



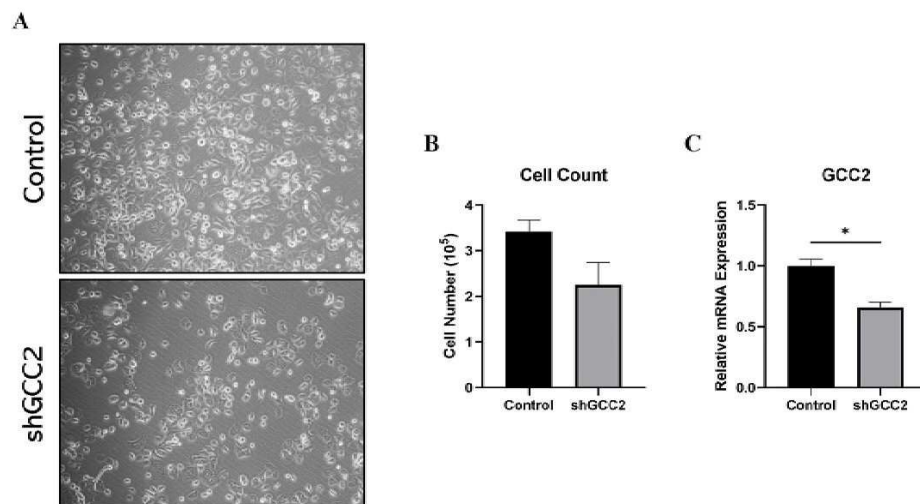
도면2



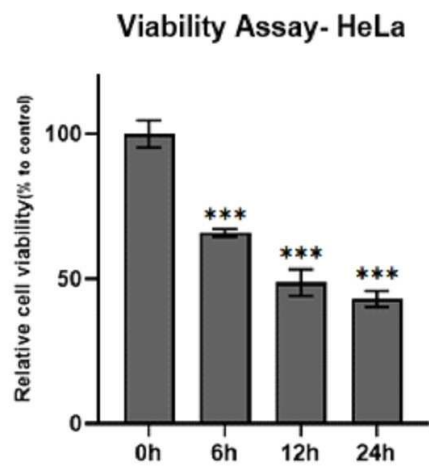
도면3



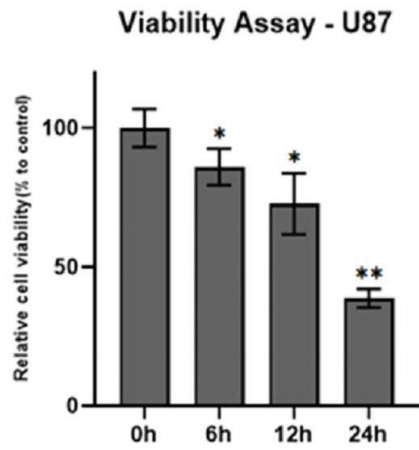
도면4



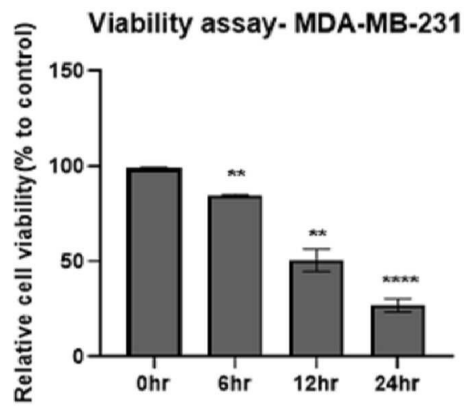
도면5



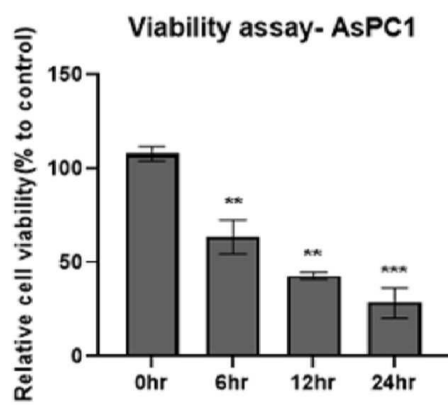
도면6



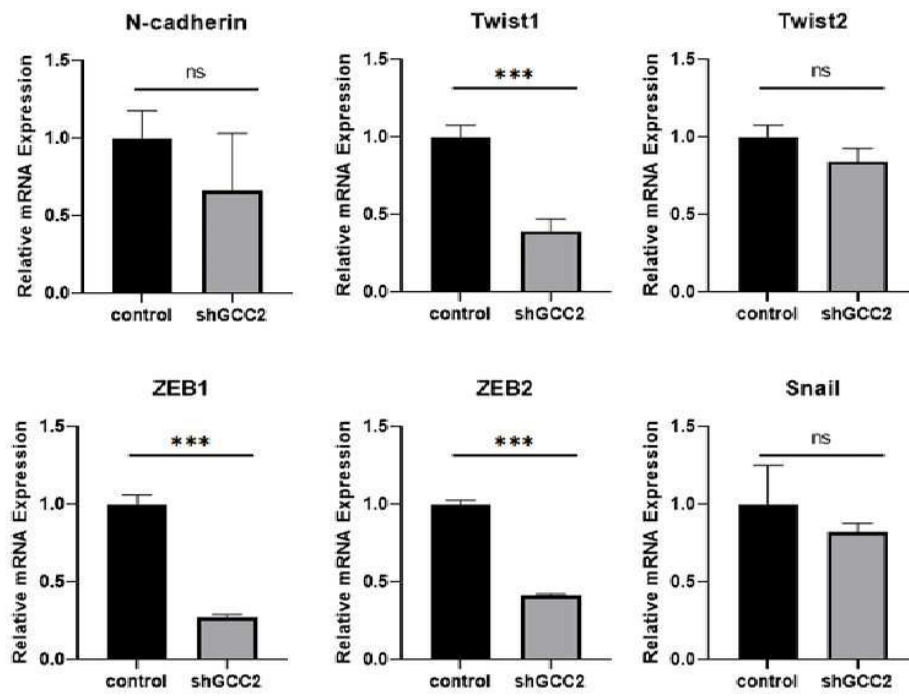
도면7



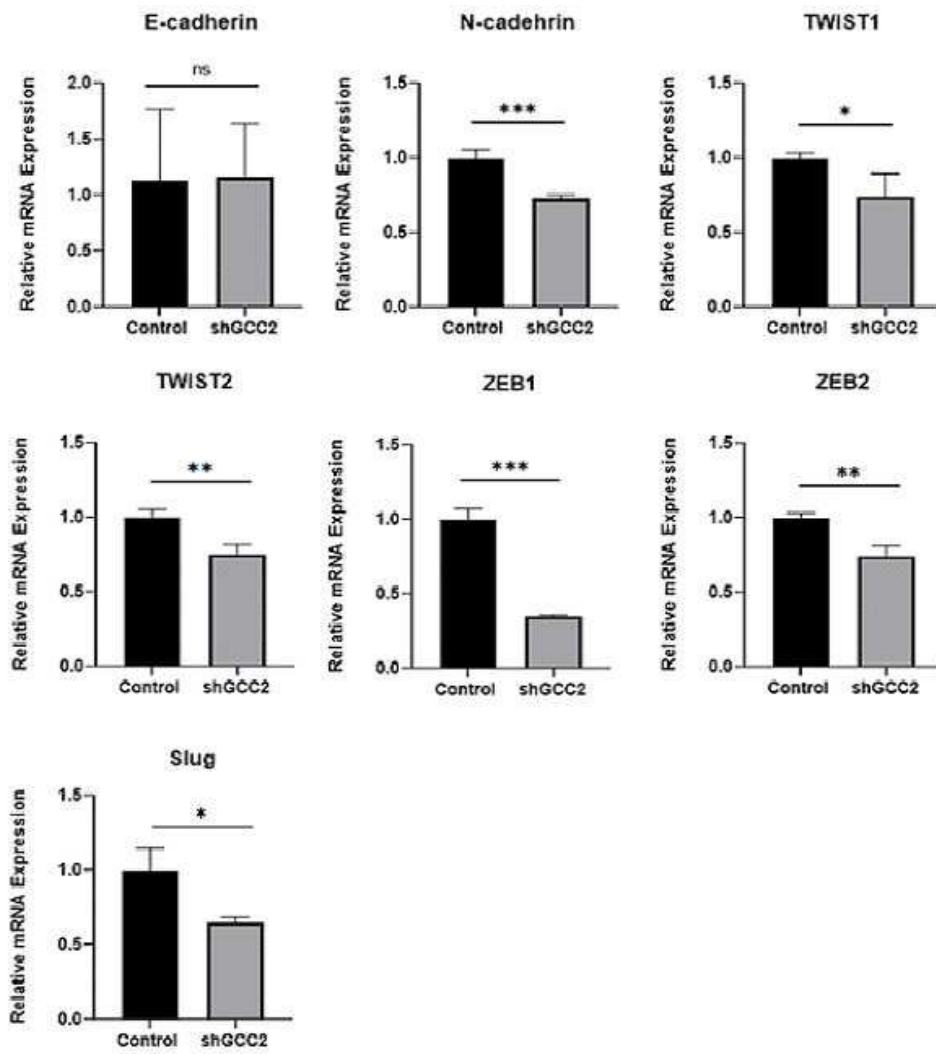
도면8



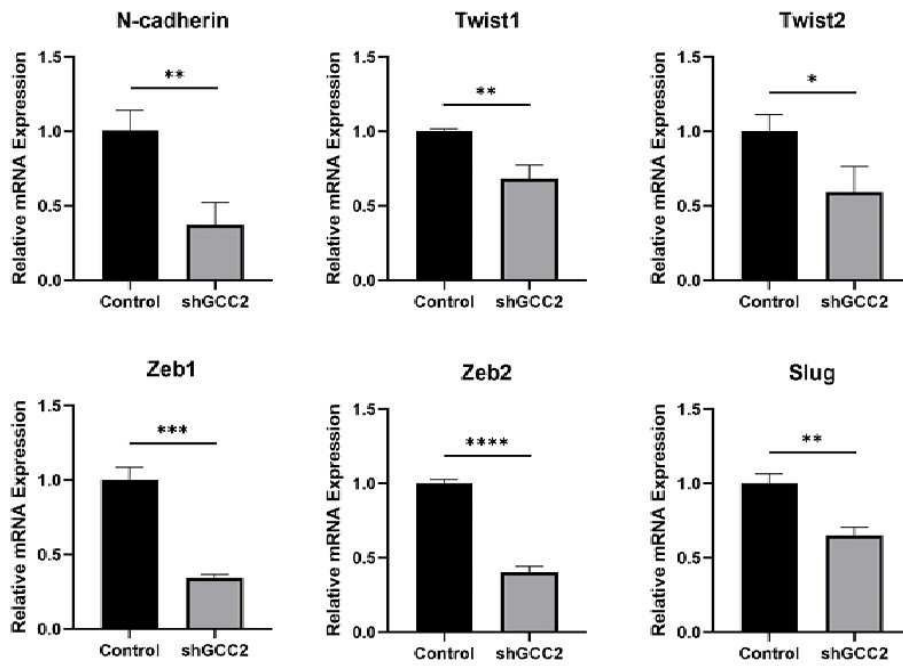
도면9



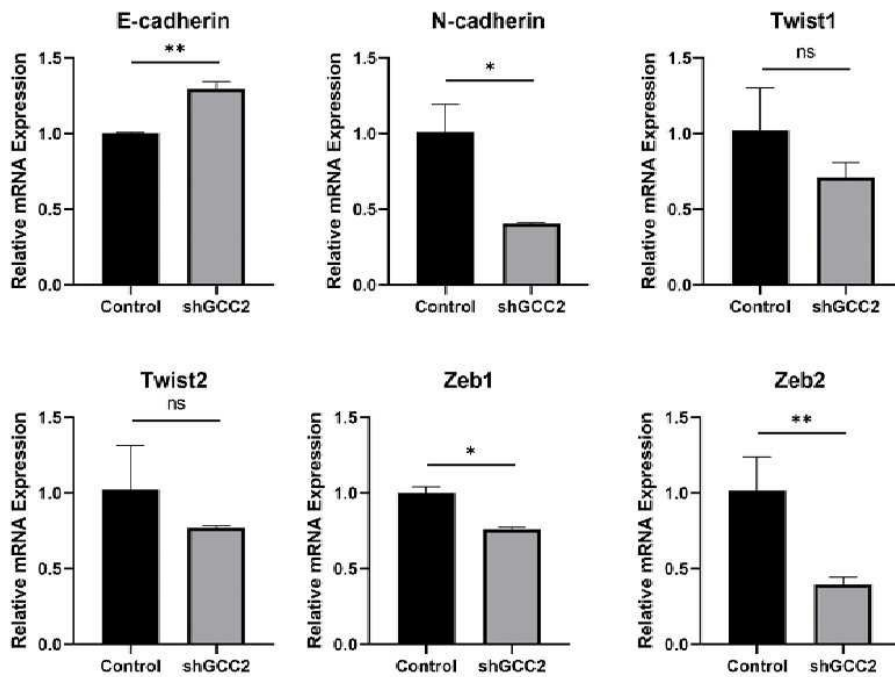
도면10



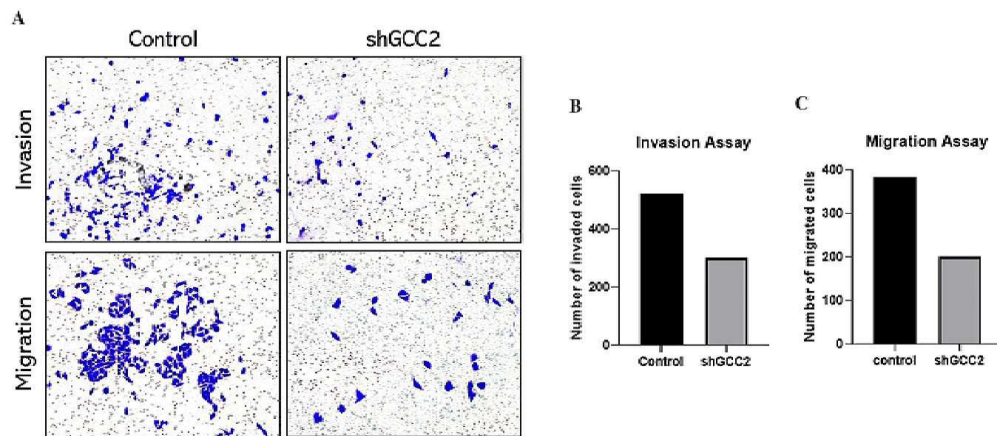
도면11



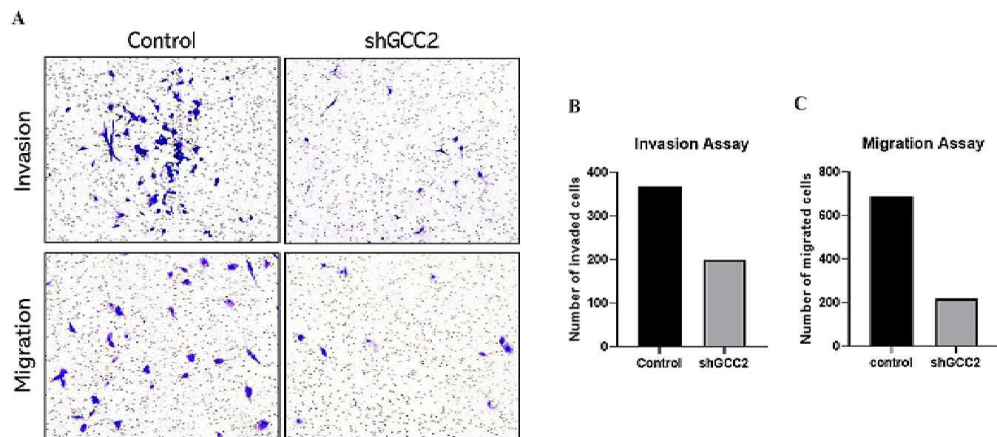
도면12



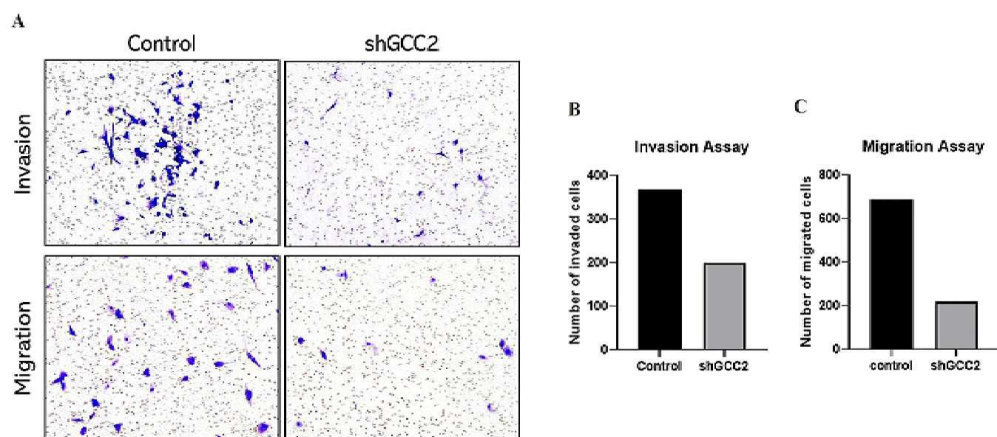
도면13



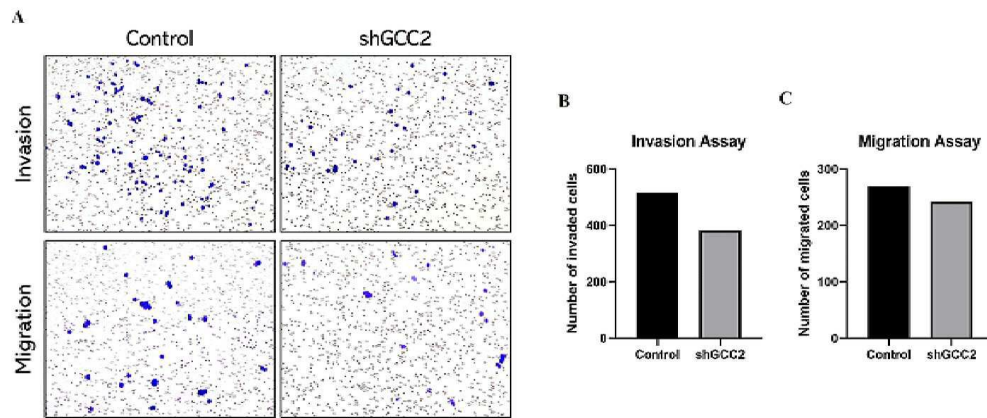
도면14



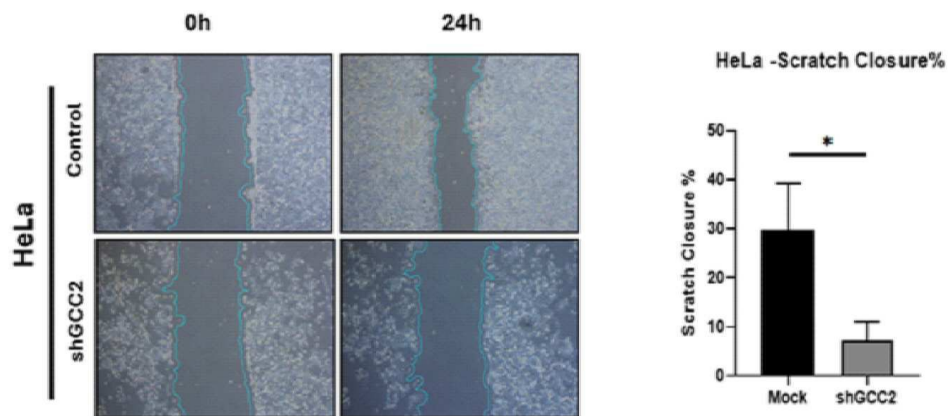
도면15



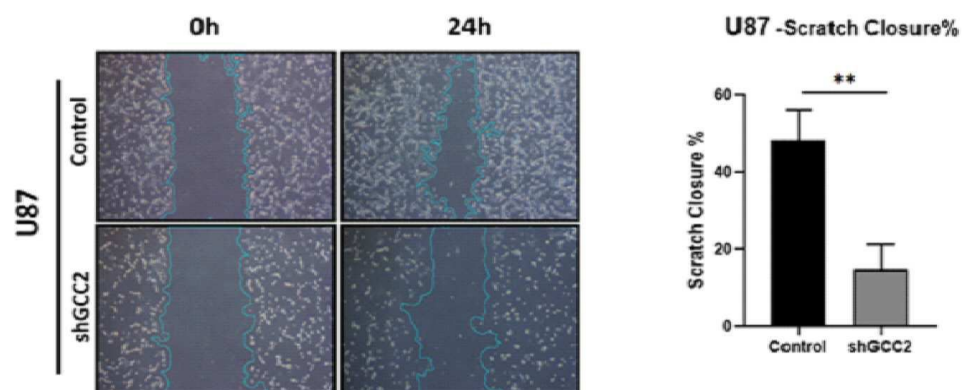
도면16



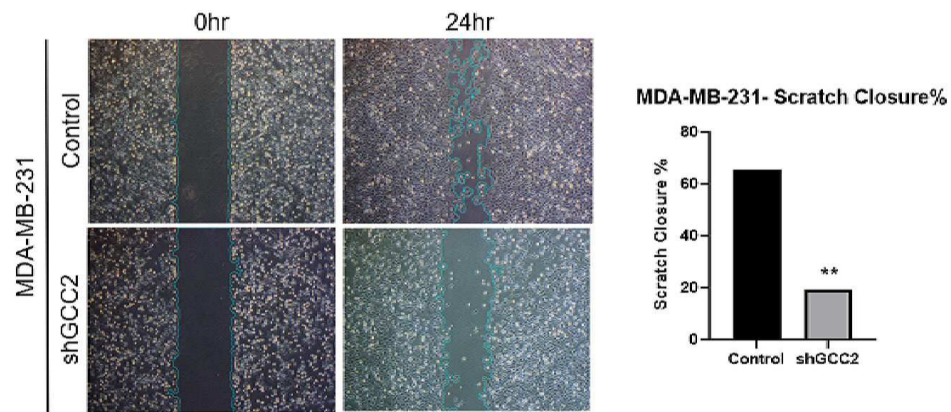
도면17



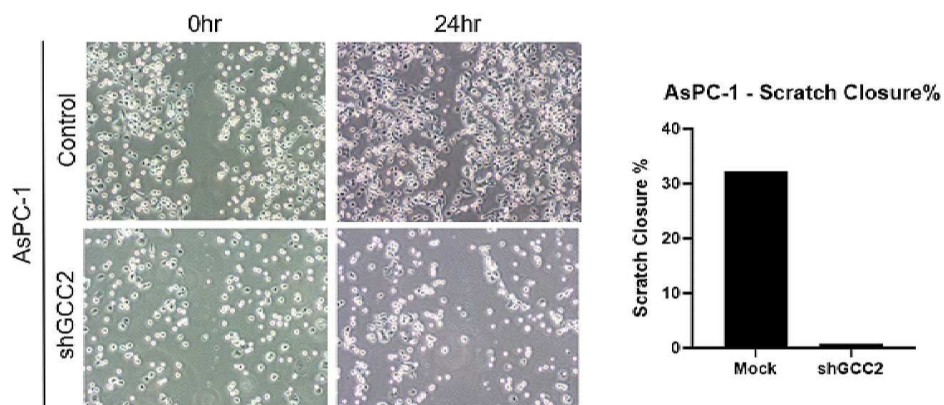
도면18



도면19



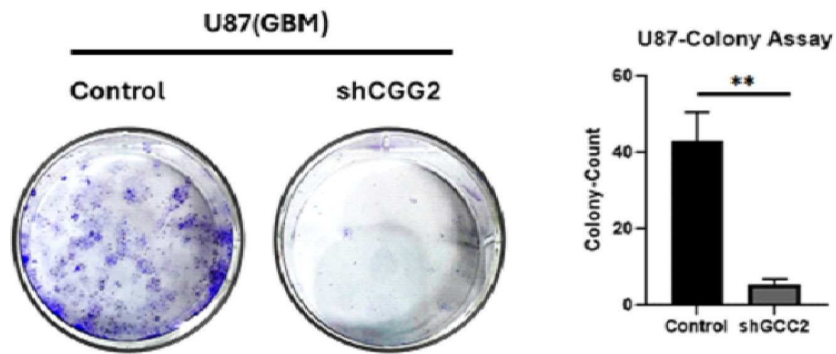
도면20



도면21



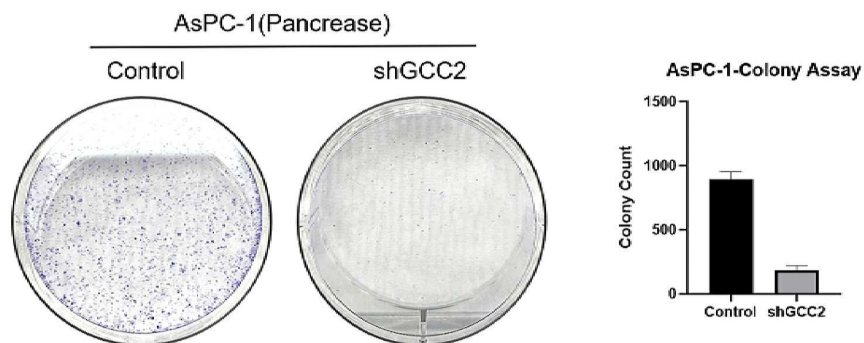
도면22



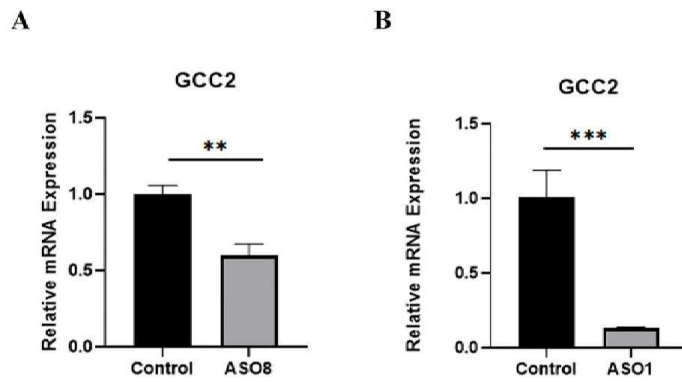
도면23



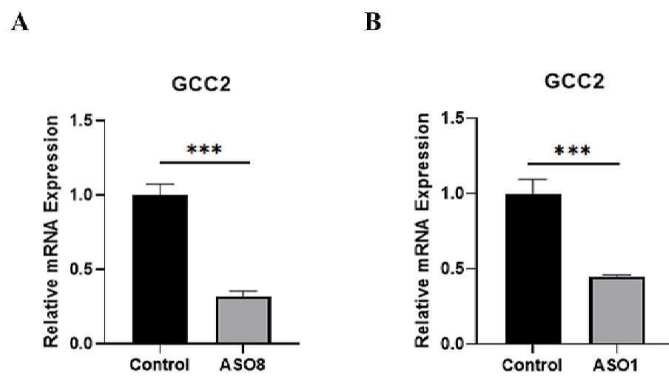
도면24



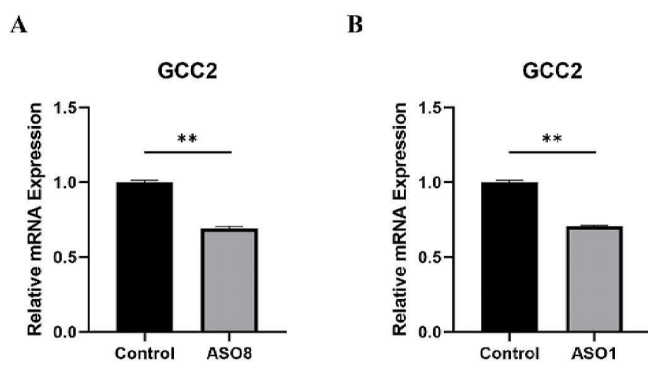
도면25



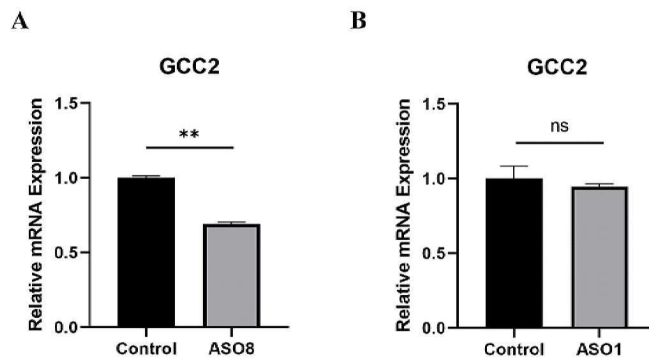
도면26



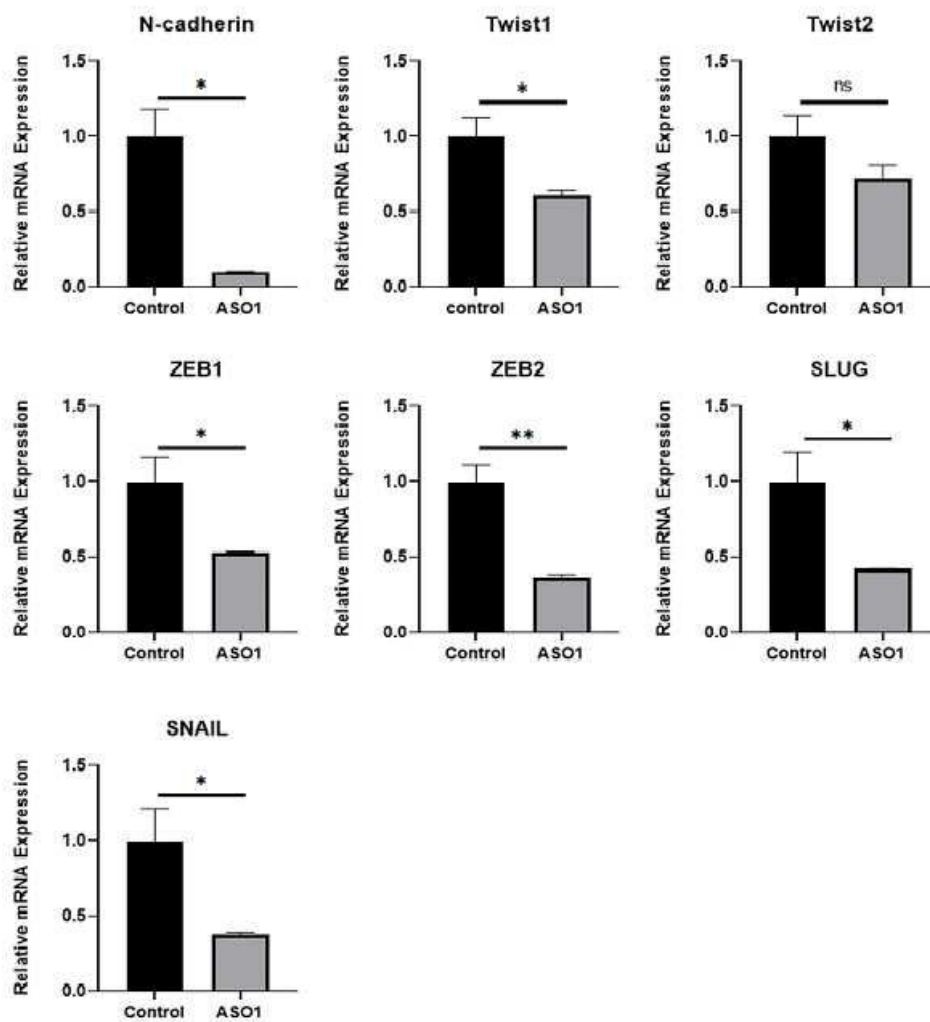
도면27



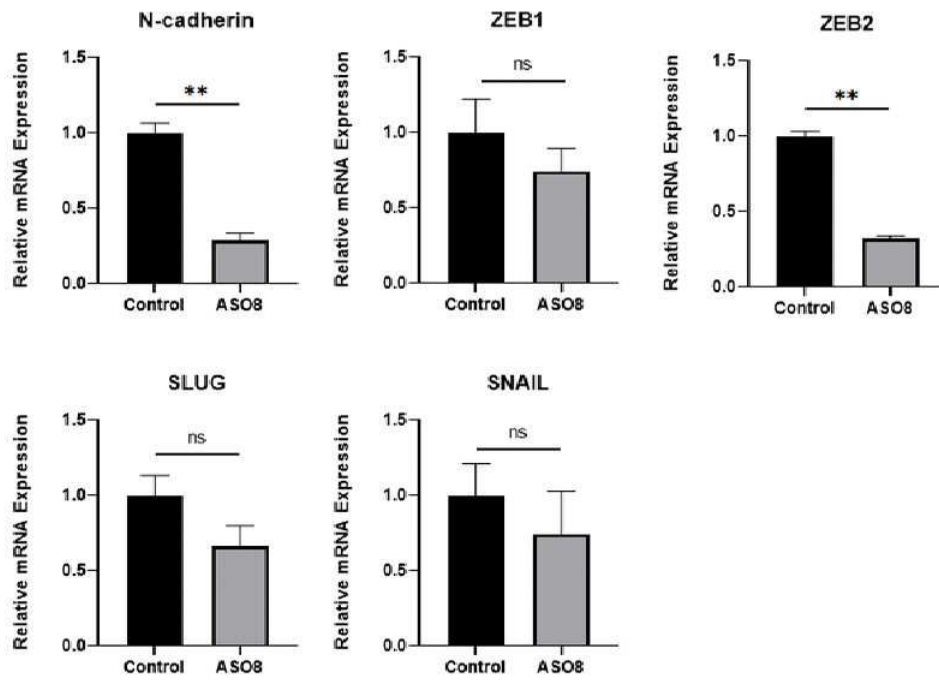
도면28



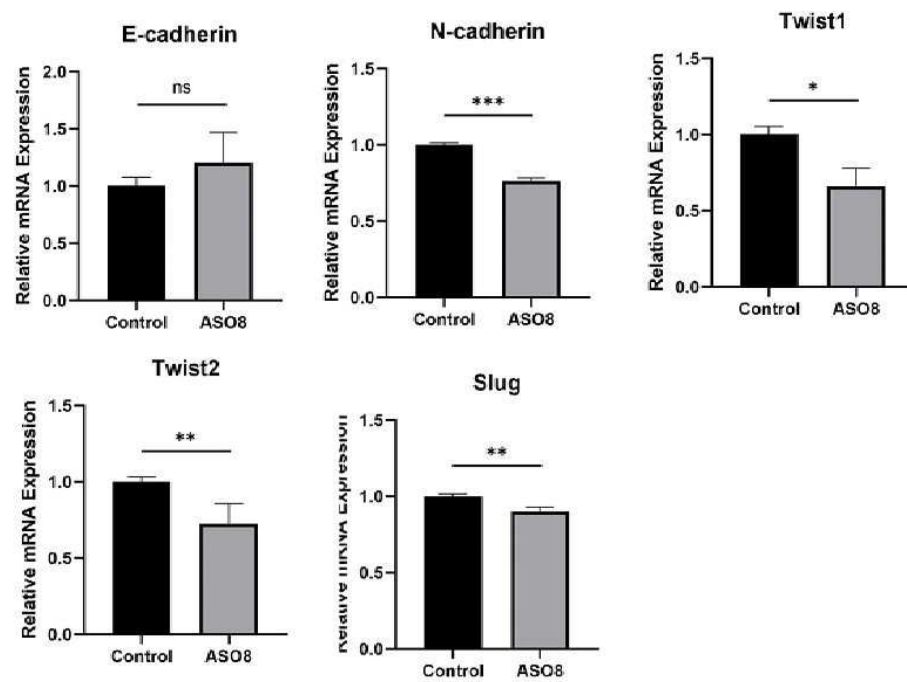
도면29



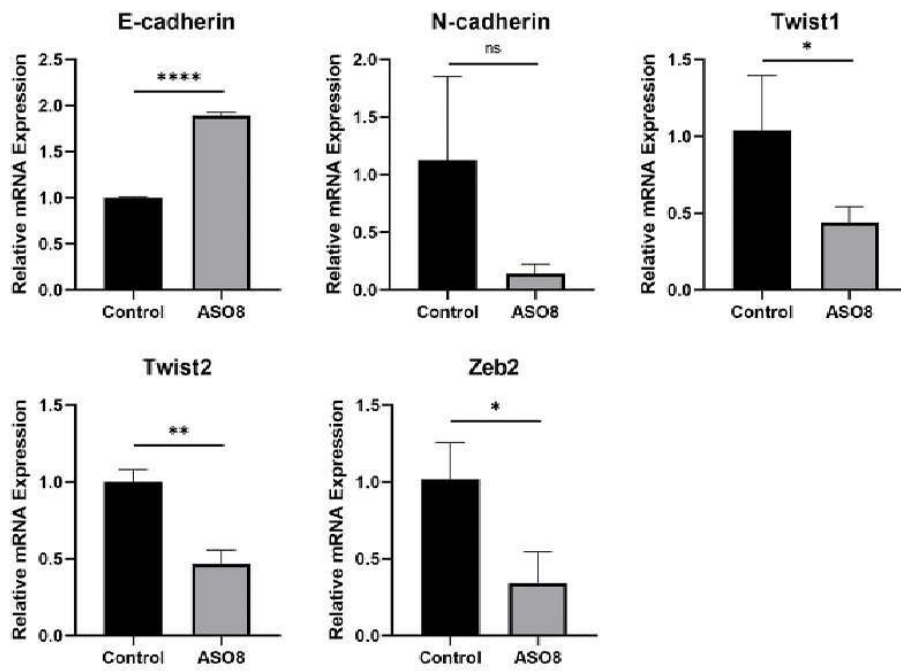
도면30



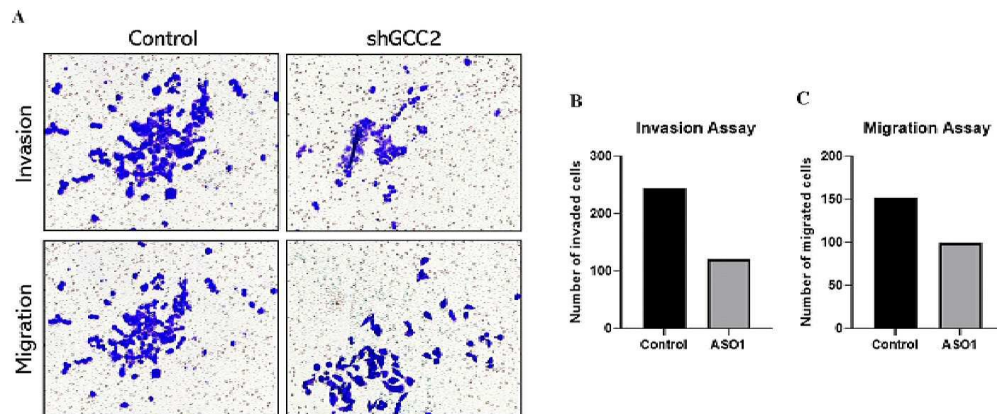
도면31



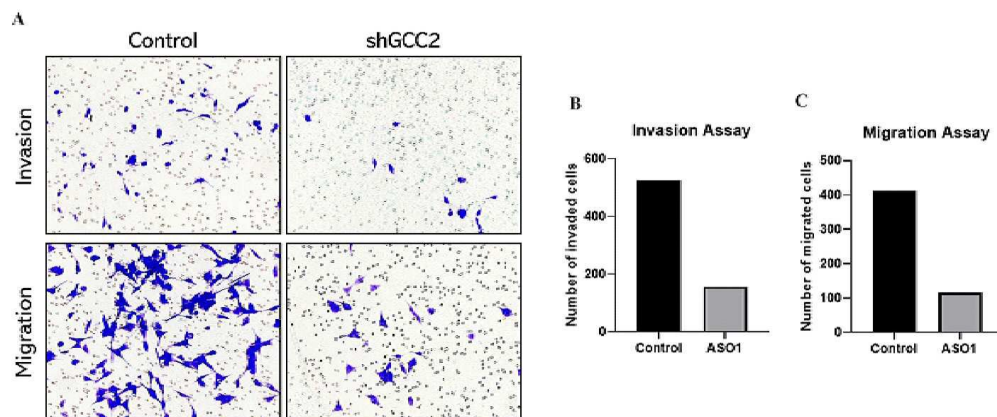
도면32



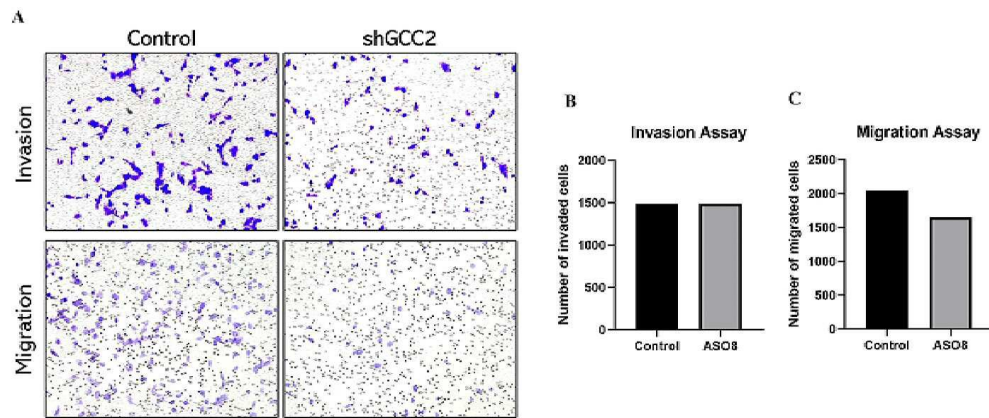
도면33



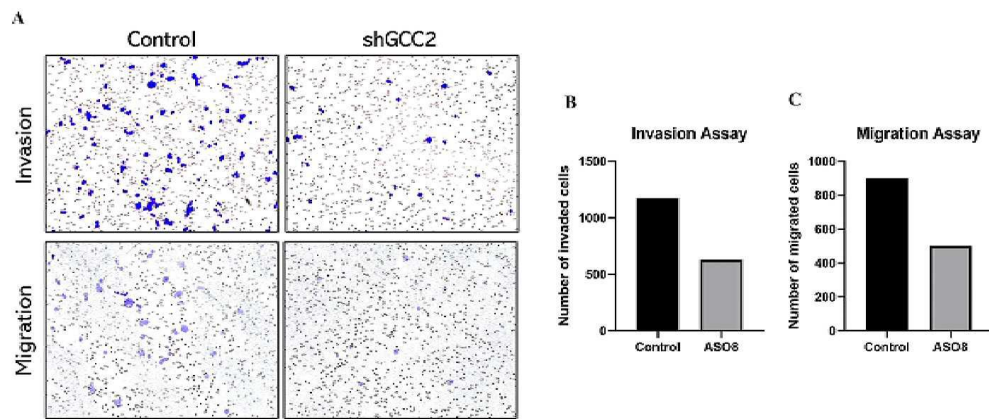
도면34



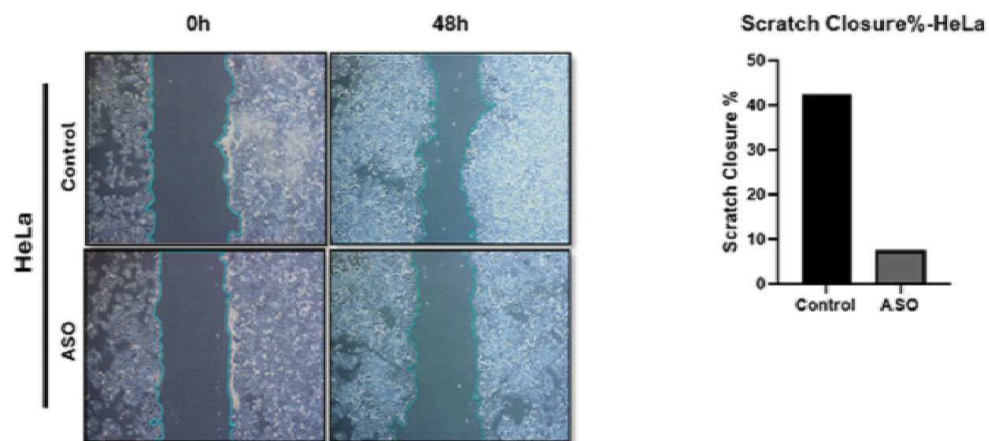
도면35



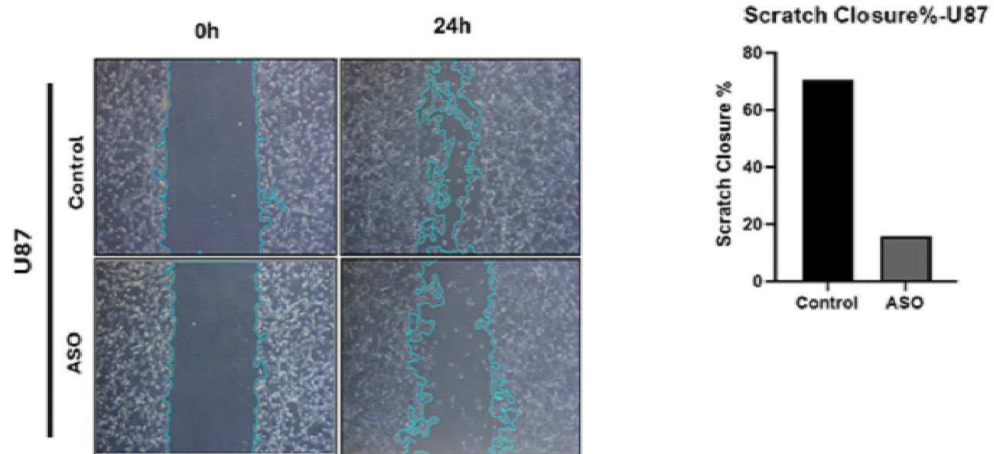
도면36



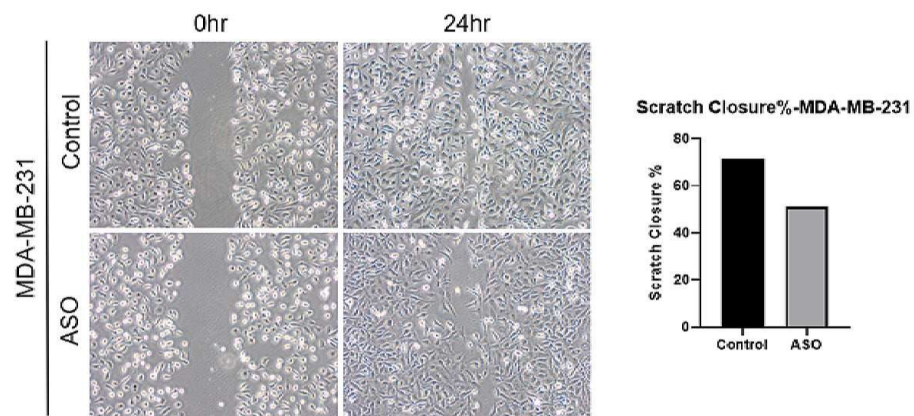
도면37



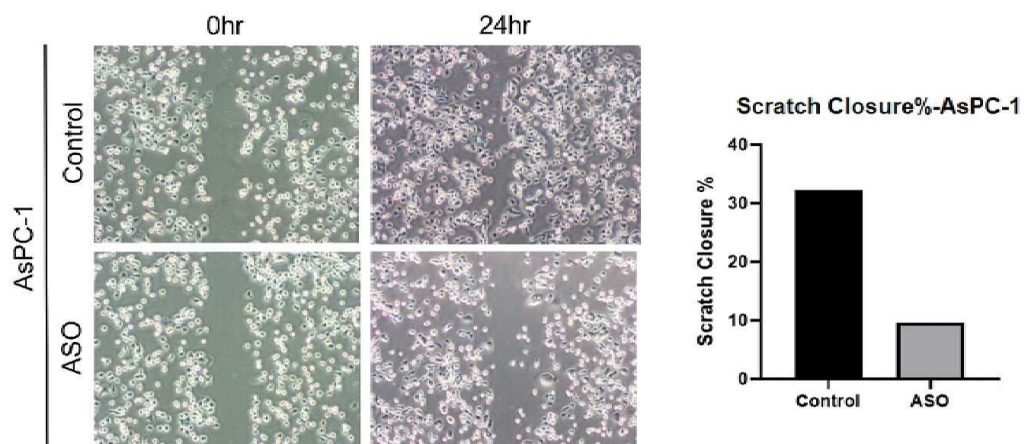
도면38



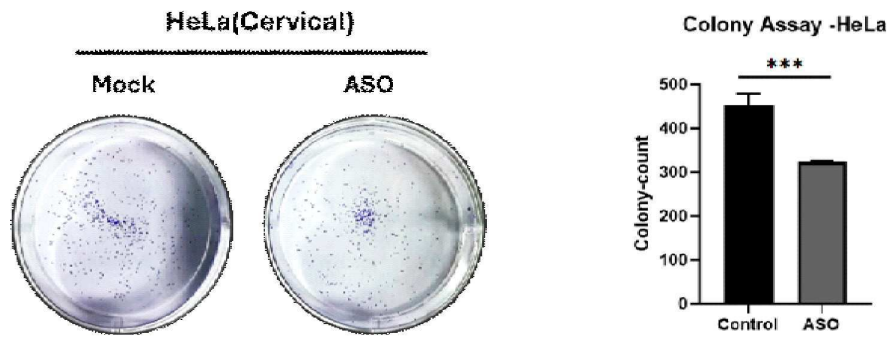
도면39



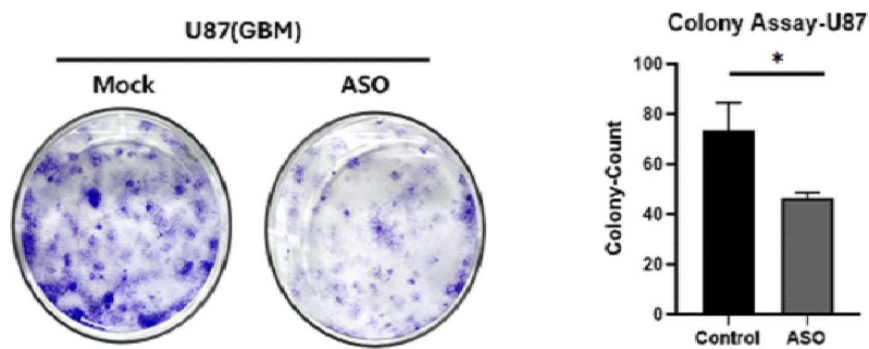
도면40



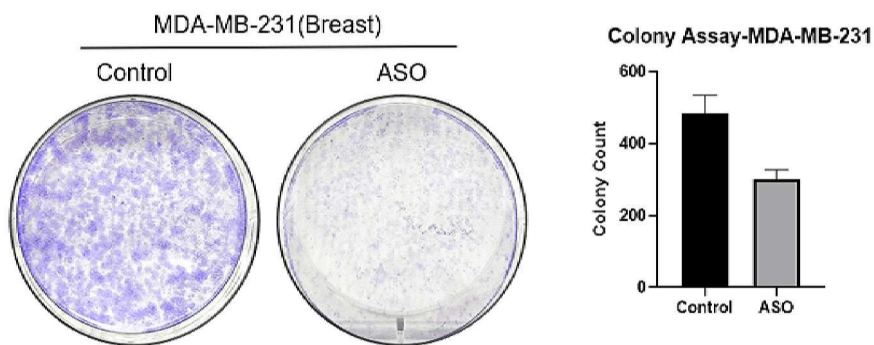
도면41



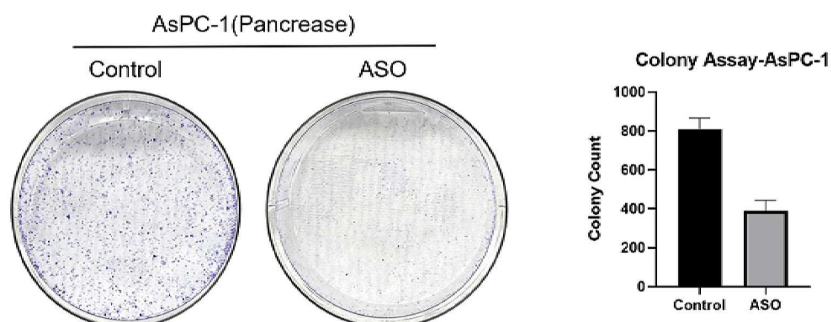
도면42



도면43



도면44



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.