



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0076660
(43) 공개일자 2020년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0073776(분할)
(22) 출원일자 2020년06월17일
심사청구일자 2020년06월17일
(62) 원출원 특허 10-2013-0076350
원출원일자 2013년07월01일
심사청구일자 2018년05월29일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
박정우
울산광역시 남구 신북로71번길 12, 101동 703호(무거동, 무거현대아파트)
윤날애
울산광역시 북구 동해안로 1540(정자동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

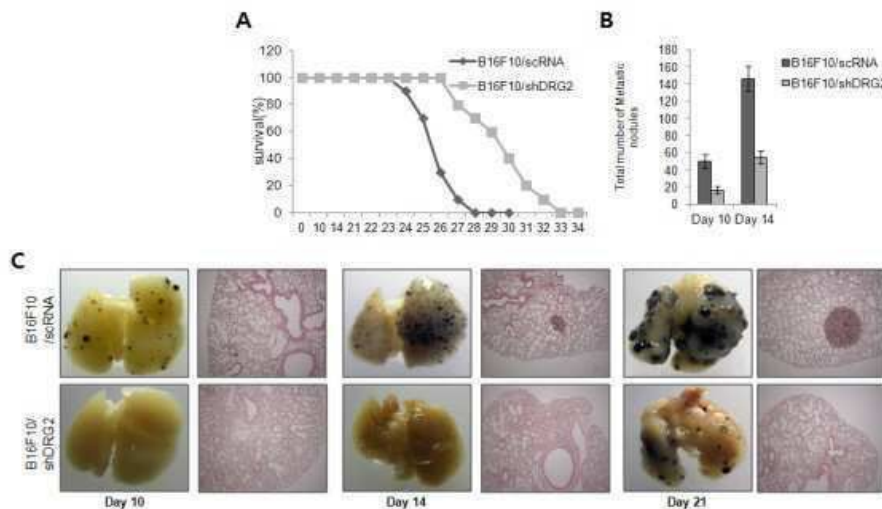
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 DRG 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 DRG2 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현 억제제 또는 DRG2 단백질의 활성 억제제는 세포의 이동을 억제하고, Rac 1 활성을 저해하며, VE-cadherin 단백질 발현을 저해하는 기전에 의해 암 세포의 전이를 효과적으로 억제할 수 있으므로, DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현 억제제 또는 DRG2 단백질의 활성 억제제는 암의 전이를 차단할 수 있는 항암용 조성물로 유용하게 활용 가능할 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61P 35/04 (2018.01)
G01N 33/57415 (2019.01)
G01N 33/5743 (2019.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

마니 무라리다란

울산광역시 남구 대학로21번길 30(무거동)

이언화

울산광역시 울주군 범서읍 대리로 46, 203동 160
 3호(구영지구푸르지오2단지)

조화자

울산광역시 남구 대학로145번길 70, 805호(무거동,
 아성홈토피아)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0977
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기초연구과제지원(공동연구)사업
연구과제명	DRG2에 의한 세포분화 조절 연구(3차년도)
기 여 율	1/1
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30

고명석

제주특별자치도 제주시 구좌읍 행원리

김효정

울산광역시 울주군 범서읍 대리로 15-12, 107동
 303호(호반베르디움)

정대균

서울특별시 강남구 삼성로147길 18(청담동)

명세서

청구범위

청구항 1

DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자에 특이적인 안티센스 뉴클레오티드, siRNA, sh RNA 또는 리보자임(ribozyme), 또는 DRG2 단백질에 특이적인 앵타머 또는 항체를 유효성분으로 포함하는 암전이 억제용 약학 조성물로서, 상기 조성물은 암 세포의 전이를 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하며, 상기 암은 유방암 또는 흑색종이며, 상기 조성물은 Rac1의 활성을 저해하거나 암세포의 VE-cadherin 단백질 발현을 저해하여 암 세포의 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는 암전이 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 암전이 억제용 약학 조성물.

청구항 3

DRG2 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

상기 세포주에서 DRG2 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

상기 DRG2 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군 세포주에 비해 감소한 경우, 상기 피검물질을 암전이 억제용 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법으로 상기 암은 유방암 또는 흑색종인 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 DRG2 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법으로, 상기 암은 유방암 또는 흑색종인 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 5

DRG2 단백질에 피검물질을 처리하는 단계;

상기 DRG2 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및

상기 DRG2 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군 세포주에 비해 감소한 경우, 상기 피검물질을 암전이 억제용 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법으로 상기 암은 유방암 또는 흑색종인 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 DRG2 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법으로 상기 암은 유방암 또는 흑색종인 암전이 억제용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 7

피검체 유래 시료에서 DRG2 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

DRG2 단백질의 발현 수준이 대조군보다 증가된 피검체를 암 전이 위험이 있는 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 암 전이에 필요한 정보를 제공하는 방법으로 상기 암은 유방암 또는 흑색종인 암 전이에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DRG2 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 암의 전이를 억제하여 암 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 DRG2 억제제를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류의 생명에 위협을 주는 주된 질병 중 하나로, 한국에서는 지난 수 년과 암이 사망원인 1위에 해당하고, 미국에서도 암은 심장혈관질환에 이어 사망원인 2위에 해당한다고 보고되고 있다. 따라서, 암을 정복하기 위한 수많은 연구가 진행되고 있는 실정이지만 현재까지도 매년 수백만 명이 암으로 사망하고 있고, 이로 인한 경제적 손실 또한 천문학적이다.

[0003] 암은 발암유전자(oncogene) 및 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)와 같은 유전자에 변이(mutation)가 일어나서 발생하는 유전적 질환으로 알려져 있으며, 특히 세포 차원에 원인이 있는 질환이다. 현재 암의 치료법으로는 외과적 수술요법, 약물요법, 방사선 요법 및 면역요법 등이 이용되고 있으나, 악성 종양의 억제 및 재발은 여전히 해결되지 않고 있다.

[0004] 암의 가장 중요한 생물학적 특성의 하나는 전이를 일으킬 수 있다는 것이며, 이는 암을 치료하는데 가장 큰 장애물로 여겨지고 있다. 실제로 모든 고형 종양 환자의 약 60%는 이미 원발종양 진단시 미세하게나마 임상적으로 전이된 암을 가지고 있으며, 대부분의 암환자들의 중요한 사망 원인이 암 전이임은 이미 잘 알려져 있다.

[0005] 즉, 암 환자의 사망 원인은 초기 종양에 의한 것보다는 주로 암세포의 전이 (metastasis)에 의한다. 이러한 암세포의 전이는 먼저 초기 종양으로부터 전이성 암세포가 떨어져나와 정상 조직의 간질성 기질 (interstitial stroma)과 기저막 (basal membrane, BM)과 같은 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)을 침윤 (invasion)하여 혈관이나 림프관으로 들어간 다음 다른 목표 조직의 모세관 혈관벽에 부착되고 세포외 기질과 기저막을 통하여 모세관으로부터 침출하여 새로운 조직에서 증식하는 과정으로 2차 종양 (전이성 암)을 형성하게 된다.

[0006] 현재까지 이러한 암 전이 억제 작용을 가지는 물질의 개발에 대한 기대는 매우 크지만, 실제로 암 전이 억제를 목적으로 한 물질의 개발에는 극히 적다. 황산화 다당류, N-디아조아세틸글리신 유도체, 노이라미니타제 및 피브로넥틴 분해효소(FNS) 등이 이러한 억제 작용을 갖는다고 보고되어 있지만 아직 그 실용화의 보고는 없으며 그들 자체가 암 전이 억제 효과를 갖는다는 보고도 없다. 따라서, 암의 전이를 효과적으로 억제할 수 있는 치료제의 개발이 절실한 실정이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 암 전이를 효과적으로 억제할 수 있는 신규한 물질에 대해 관심을 가지고 연구를 진행한 결과, DRG2 발현을 억제하는 경우 암세포의 전이가 현저히 억제됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. Overexpression of DRG2 suppresses the growth of Jurkat T cells but does not induce apoptosis. Arch Biochem Biophys. 2004 Feb 15;422(2):137-44.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 암 전이를 효과적으로 억제할 수 있는 신규한 항암용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 암의 전이 억제제를 스크리닝하는 신규한 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 나아가, 본 발명의 또 다른 목적은, 개체 내 암을 진단하기 위한 신규한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현 억제제 또는 DRG2 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현 억제제는 서열번호 1로 표시되는 유전자에 대한 안티센스 뉴클레오티드, siRNA sh RNA 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DRG2 단백질의 활성 억제제는 DRG2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스(mimetics), 기질유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 암 세포의 전이를 억제하는 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 Rac1의 활성을 저해하여 암 세포의 전이를 억제하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 암세포의 VE-cadherin 단백질 발현을 저해하여 암 세포의 전이를 억제하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 폐암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 뇌하수체 선종으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 고형암인 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 DRG2 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; 상기 세포주에서 DRG2 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 상기 DRG2 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군 세포주에 비해 감소한 경우, 상기 피검물질을 항암 물질로 판단하는 단계를 포함하는 항암 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DRG2 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역 분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 DRG2 단백질에 피검물질을 처리하는 단계; 상기 DRG2 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 상기 DRG2 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군 세포주에 비해 감소한 경우, 상기 피검물질을 항암 물질로 판단하는 단계를 포함하는 항암 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DRG2 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 피검체 유래 시료에서 DRG2 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 DRG2 단백질의 발현 수준이 대조군보다 증가된 피검체를 암에 걸릴 위험이 있는 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현 억제제 또는 DRG2 단백질의 활성 억제제는 세포의 이동을 억제하고, Rac 1 활성을 저해하며, VE-cadherin 단백질 발현을 저해하는

기전에 의해 암 세포의 전이를 효과적으로 억제할 수 있으므로, DRG2(Developmentally regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현 억제제 또는 DRG2 단백질의 활성 억제제는 암의 전이를 차단할 수 있는 항암용 조성물로 유용하게 활용 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 Jurkat T 세포에 DRG2 과발현을 유도하고(A), 이에 따른 세포 성장(B), 세포 주기(C) 및 세포 사멸(D)을 관찰한 실험 결과이다.

도 2는 shDRG2를 형질주입한 MCF-7 세포주에서 DRG2 발현 억제(B) 및 세포 이동 억제(C)를 관찰한 결과이다.

도 3은 B16F10/scRNA 및 B16F10/shDRG2 세포주에서 Rac1 활성화 정도(A), VE-cadherin의 mRNA 발현 정도(B), VE-cadherin의 단백질 발현 정도(C, D)를 관찰한 실험 결과이다.

도 4는 마우스 동물 모델에 B16F10/scRNA 또는 B16F10/shDRG2 처리 후 마우스 생존률(A), 폐 전이된 종양의 수(B), 폐 전이 정도(C)를 관찰한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0029] "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다. 본 발명의 일 실시예에서는 마우스를 대상으로 하였다.

[0030] "조직 또는 세포 샘플"은 대상 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0031] 임의로, 조직 또는 세포 샘플은 원발성 또는 전이성 종양으로부터 얻는다. 조직 샘플은 특성상 조직과 서로 혼합되지 않는 화합물, 예를 들어 보존제, 항응고제, 버퍼, 고정액, 영양물질, 항생제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 하나의 일부 또는 조각, 예를 들어 조직 샘플로부터 절단한 조직 또는 세포의 얇은 슬라이스를 의미한다. 본 발명이 조직 샘플의 동일한 절편이 형태학적 및 분자적 수준 모두에 분석되거나 단백질 및 핵산 모두에 대해 분석되는 방법을 포함함을 이해한다면, 조직 샘플의 다수의 절편을 취하여 본 발명에 따른 분석에 적용할 수 있음이 이해된다.

[0032] 세포의 "성장(growth)"이라는 용어는 세포가 분열되어 동질의 것이 불어나는 것으로서 보통 다세포생물의 체내에서 세포수가 증가되어 가는 것을 말한다. 세포수가 증식(증폭)되어 어느 시기에 이르면, 형질이 변화(분화)되어 가는 것과 동시에 제어되고 있는 것이 보통이다. 체내에서 세포가 증가되어 가는 것과, 또 세포 내에서 세포질이 신생(新生)되어 가는 경우에는 성장으로 구별하는 경우가 많다. 그러나 생물학적으로 세포수가 증가된다는 점에서 보면, 다세포생물의 발생기에서 분화가 일어나지 않는 시기는 증식 또는 성장으로 보는 것이 정당하다. 본 발명에서는 상기 두 용어가 혼용되어 쓰이고 있다.

[0033] "암", "종양" 또는 "악성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 백혈병, 모세포종, 흑색종 및 육종을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 본 발명에서는 흑색종을 대표적으로 다룬다.

[0034] "억제제 또는 저해제(inhibitor)"는 해당 물질의 활성 또는 발현을 억제, 차단 또는 감소시키는 물질을 의미한다. 억제제의 활성 메커니즘은 특별히 제한되지 않는다. 예로서는 유기 또는 무기 화합물, 단백질, 탄수화물, 지질과 같은 폴리머 화합물, 다양한 화합물의 콤포지트(composite)를 포함한다. 예를 들어, '림프절 전이 억제제'는 종양의 림프절 전이를 억제, 차단 또는 감소시키는 물질을 포함할 수 있다.

[0035] "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

- [0036] "치료"는 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제; (b) 질환 또는 질병의 경감; 및 (c) 질환 또는 질환의 제거를 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 치료학적 유효량은 상기한 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0039] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0041] 본 발명은 DRG2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] DRG2는 G protein의 일종으로, GTP 결합에 필요한 G1 내지 G5의 5개의 리전을 모두 가지고 있다. 크기는 trimeric G protein과 유사하나, 아미노산 서열이 기존의 G protein subfamily와 상이하여 새로운 subfamily로 구분되고 있다. DRG는 DRG1 및 DRG2가 있는 것으로 알려져 있고, 세균에서부터 인간에 이르기까지 거의 모든 종류의 세포에 존재한다. 한편, 세균에서부터 인간에서 발견되는 모든 DRG 단백질은 진화적으로 매우 보존되어 있는 것으로 밝혀졌으며, 사람의 DRG2 아미노산 서열은 생쥐 및 소의 DRG2와 98%, Xenopus의 DRG2와 95%, 그리고 zebrafish의 DRG2와 91%의 상동성을 보인다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 DRG2 유전자는 서열번호 1로 기재되는 핵산 서열을 가지고, 상기 DRG2 단백질은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 상기 암은 폐암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 뇌하수체 선종으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 고형암인 것이 바람직하고, 유방암 또는 흑색종인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0045] 상기 DRG2 단백질의 발현 억제제는 DRG2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(small hairpin RNA), siRNA(small interfering RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하고, 상기 DRG2 단백질의 활성 억제제는 DRG2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질 유사체, 앵커 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지는 않는다.
- [0047] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 왓슨-크릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다.
- [0049] 상기 shRNA는 RNA를 간접하여 유전자 발현을 억제하는 작은 헤어핀 구조의 RNA로, 상기 shRNA는 다양한 벡터를 이용하여 암 세포 내로 도입할 있으나, 본 발명에 따른 바람직한 일 예에 의하면 pLK0.1 벡터를 이용하여 암 세포 내로 도입할 수 있을 것이다. 이 때 상기 shRNA 서열은 특별히 제한되는 것은 아니나, 서열번호 3인 것이 바람직하다.
- [0051] 상기 siRNA는 인간 DRG2 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0053] 상기 상기 펩티드 미메틱스(Peptide Minetics)는 DRG2 단백질의 특정 도메인을 억제하여 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 펩티드 미메틱스는 펩티드 또는 비펩티드일 수 있고, psi 결합과 같은, 비펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, "구조적으로 강제된(conformationally constrained)" 펩티드, 사이클릭 미메틱스(cyclic mimetics), 적어도 하나의 엑소사이클릭 도메인(exocyclic domain), 결합 부분(결합 아미노산) 및 활성 부위를 포함하는 사이클릭 미메틱스일 수 있다. 펩티드 미메틱스는 DRG2 단백질의 이차구조 특성과 유사하게 구조화되고 항체 또는 수용성 수용체와 같은 거대한 분자의 억제 특성을 모방할 수 있으며, 천연의 길항제와 동등한 효과로 작용할 수 있는 신규한 소분자일 수 있다.
- [0054] 상기 상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다. 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적이 기능하는 능력을 차단할 수 있다.
- [0055] 상기 항체는 DRG2에 특이적이고 직접적으로 결합하여 DRG2의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 DRG2에 특이적으로 결합하는 항체는 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 모노클로날(monoclonal) 항체를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 DRG2에 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작하여도 무방하며, 상업적으로 알려진 DRG2 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 상기 항체는 당업자에게 알려진 종래 방법에 따라 면역원인 DRG2 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여할 수 있다. 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 형성된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하여 항체를 분리할 수 있다.
- [0057] 상기 조성물은 암의 증식, 이동, 침윤 또는 전이의 저해 활성을 가질 수 있다.
- [0059] 본 발명자들은 DRG2가 세포 성장, 세포 주기 및 세포 사멸에 밀접한 관계가 있다는 실험 결과(도 1 참조)를 토대로, DRG2의 항암 효과에 대해 실험해 보았다. 이를 위하여 유방암 세포주인 MCF-7 세포주에 DRG2의 발현을 저해할 수 있는 shRNA를 형질주입시키고 세포이동을 관찰해 본 결과, DRG2 발현을 억제한 세포주에서 세포 이동이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 2 참조).
- [0060] 한편, 흑색종 세포주인 B16F10 세포주에서 DRG2 발현을 억제시킨 결과, 세포 이동에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려진 Rac1의 활성을 저해하고, 암 세포 전이에 중요한 VE-cadherin 단백질 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조).
- [0061] 나아가, DRG2 발현을 억제시킨 흑색종 세포주를 주입한 마우스 동물 모델에서는 대조군에 비하여 마우스 생존률이 현저히 증가하고 흑색종 세포주의 폐 전이가 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조).
- [0062] 따라서, DRG2의 발현 또는 활성 억제는 암 세포의 증식을 저해하고, 암 전이를 억제하는 효과를 발휘하는 것을 알 수 있었다. 따라서, DRG2의 발현 또는 활성 억제제는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 활용 될 수 있을 것이다.
- [0063] 본 발명의 DRG2 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 본 발명의 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 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 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0065] 본 발명에서 사용되는 뉴클레오티드 또는 핵산은, 경구, 국소, 비경구, 비 내, 정맥 내, 근육 내, 피하, 안내, 경피 등의 투여를 목적으로 제조될 수 있다.
- [0066] 바람직하게는, 핵산 또는 벡터가 주사가능한 형태로 사용된다. 이에 따라서 특히 처리될 영역으로는 직접적인 주입을 위하여 주사 가능한 조성물을 위한 임의의 약학적으로 허용되는 매개체와 혼합될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 건조 특히 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라
- [0067] 주사 가능한 용액의 조성을 가능케 하는 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 환자의 종양으로의 핵산의 직접적인 주입은 치료 효율을 감염된 조직에 집중시키도록 하므로 유리하다. 사용되는 핵산의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 유전자, 벡터, 사용되는 투여 방식, 문제시되는 질병 또는 대안적으로 요구되는 치료기간에 의해 조절될 수 있다. 또한, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0068] 바람직하게는, 핵산 또는 벡터가 주사가능한 형태로 사용된다. 이에 따라서 특히 처리될 영역으로는 직접적인 주입을 위하여 주사 가능한 조성물을 위한 임의의 약학적으로 허용되는 매개체와 혼합될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 건조 특히 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라
- [0069] 주사 가능한 용액의 조성을 가능케 하는 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 환자의 종양으로의 핵산의 직접적인 주입은 치료 효율을 감염된 조직에 집중시키도록 하므로 유리하다. 사용되는 핵산의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 유전자, 벡터, 사용되는 투여 방식, 문제시되는 질병 또는 대안적으로 요구되는 치료기간에 의해 조절될 수 있다. 또한, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0070] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 약학적 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법 또는 암 전이 억제 방법을 제공한다.
- [0071] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 한정되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0072] 상기 약학적 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0074] 아울러, 본 발명은 DRG2 단백질을 이용한 암 치료 또는 암 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0075] 구체적으로, 상기 방법은 DRG2 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; 상기 세포주에서 DRG2 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 상기 DRG2 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0076] 상기 방법에 있어서, 상기 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 당업자에게 알려진 전사체 또는 그로부터 코딩된 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있다.
- [0077] 또 다른 방법은, DRG2 단백질에 피검물질을 처리하는 단계; 상기 DRG2 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 상기 DRG2 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0078] 상기 방법에 있어서, 상기 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0079] 아울러, 본 발명은 DRG2 단백질을 이용한 암의 모니터링 또는 진단 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 방법은 피검체 유래 시료에서 DRG2 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 DRG2 단백질의 발현 수준이 대조군보다 증가된 피검체를 암에 걸릴 위험이 있는 개체로 판정하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지

않는다.

[0080] 상기 방법에 있어서, 상기 DRG2는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0082] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 상기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0084] <실시예 1>

[0085] DRG2 과발현이 T 세포의 세포주기에 미치는 영향 확인

[0086] 상기 선행문헌 1에 개시된 바와 같이, DRG2의 과발현은 T 세포의 성장을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다. 본 발명자들은 DRG2가 T 세포의 세포주기에 미치는 영향을 보다 명확히 확인해 보고자 DRG2가 과발현에 의한 인간 T 세포주인 Jurkat 세포주의 세포성장곡선 및 유세포분석기를 이용한 세포주기를 분석해 보았다.

[0088] 1-1. DRG2 클로닝 및 DRG2 과발현 세포주 수립

[0089] 본 발명자들은 DRG2가 T 세포의 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위하여 우선, 인간 DRG2 유전자를 pLNCX2 벡터에 클로닝하고자 하였다. 이를 위하여 인간 DRG2 유전자는 HT1080 세포주로부터 RNA를 추출한 후, 하기와 같은 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통하여 증폭하였다.

[0090] 포워드 프라이머: 5'-CTCGAGCTGCTGCTACCATGGGGATCTTA-3'

[0091] 리버스 프라이머: 5'-GTCGACTTACTTCTTCACGATCTGGATGA-3'

[0092] 증폭된 DNA는 pLNCX2 벡터에 클로닝하였으며, 클로닝된 pLNCX2-DRG2는 제조자 방식(Clontech)에 따라 RetroPact PT67 세포주로 형질주입하여 레트로 바이러스를 수득하였고, Jurkat 세포주를 pLNCX2-DRG2 레트로바이러스로 감염시킨 후, 제조자 방식(Clontech)에 따라 DRG2를 안정적으로 발현하는 Jurkat-LNCX2-DRG2 세포주를 수립하였다. 한편, 대조군인 Jurkat-LNCX2는 Jurkat 세포주에 pLNCX2 레트로 바이러스를 감염시켜 제조하였다. 상기 Jurkat 세포주는 RPMI 1640 배지에 10% FBS, 100 μ g/ml의 스트렙토마이신, 100U/ml의 페니실린을 보충한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂를 유지하는 습윤 배양기 내에서 배양하였다.

[0093] 그 결과, 도 1A에서 볼 수 있는 바와 같이, Jurkat-LNCX2-DRG2 세포주에서 특이적으로 DRG2가 과발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] 1-2. DRG2 발현에 따른 세포 성장 곡선

[0096] 상기 실시예 1-1에 의해 제조된 Jurkat-LNCX2 및 Jurkat-LNCX2-DRG2의 세포성장을 확인해 보고자, 세포 성장 곡선을 2일 간격으로 측정하였다. 세포 성장 곡선은 세포 부피의 측정 및 hemacytometer를 이용한 세포 수를 카운팅하여 측정하였다.

[0097] 그 결과, 도 1B에서 볼 수 있는 바와 같이, DRG2가 과발현되는 T 세포에서의 성장이 대조군에 비하여 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0099] 1-3. DRG2 발현에 따른 세포 주기 변화

[0100] 상기 실시예 1-2를 통하여 DRG2가 과발현되는 경우 T 세포의 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있는바, 본 발명자들은 DRG2 발현이 T 세포의 세포 주기에 어떠한 영향을 미치는지 추가적으로 확인해 보았다.

[0101] 이를 위하여 상기 실시예 1에서 제조된 Jurkat-LNCX2 및 Jurkat-LNCX2-DRG2 세포를 포집하고 PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ 7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.2)로 상온에서 2번 세척한 후, PBS에 2 $\times$ 10⁶ cells/ml로 재현탁시켰다. 프로피디움 이오다이드(propidium iodide) 염색을 위하여 세포를 순수 에탄올을 이용하여 -20 $^{\circ}$ C

에서 밤새도록 고정시킨 후, 제조자 방식(Molecular Probes)에 따라 염색하였다. 이후 세포를 PBS로 2번 세척하고, FACS buffer(PBS, 0.2% BSA and 1% sodium azide)로 재현탁시킨 후, FACS 유세포 분석기(Becton Dickinson, Inc., San Jose, CA)를 이용하여 분석하였다.

[0102] 그 결과, 도 1C에서 볼 수 있듯이, DRG2가 과발현된 T 세포의 세포 주기가 G2/M phase에서 중단시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 1-4. DRG2 발현에 따른 세포사멸 관찰

[0105] 본 발명자들은 DRG2가 세포 주기에 영향을 미치는 것을 확인한 바, DRG2의 과발현이 세포사멸에는 어떠한 영향을 미치는지 추가적으로 확인해 보고자 Annexin V 염색을 실시하였다.

[0106] Annexin V 염색은 Annexin-V-FLUOS 염색 키트를 이용하여 제조자 방식(Roche Molecular Biochemicals)에 따라 수행하였다. 즉, 세포를 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ 7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.2)로 2번 세척하고, Annexin V 및 propidium iodide를 포함하는 binding buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl₂)로 현탁시킨 후, FACS 유세포 분석기(Becton Dickinson)를 이용하여 세포의 형광 강도를 분석하였다.

[0107] 그 결과, 도 1D에서 볼 수 있는 바와 같이, Jurkat-LNCX2의 세포 사멸은 52.13%이었으나, Jurkat-LNCX2-DRG2의 세포 사멸은 17.92%로 세포 사멸이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0109] 상기와 같은 결과는 DRG2가 세포 주기 및 세포 사멸을 조절하는 중요한 단백질을 시사하고 있다. 따라서, 본 발명자들은 세포주기 조절에 이상이 생겨 세포가 비정상적으로 분열을 거듭하여 발생하는 암세포 조절에서도 상기 DRG2 단백질이 중요한 역할을 수행할 수 있다고 가정하고, 이에 대한 추가 실험을 실시하기로 하였다.

[0111] <실시예 2>

[0112] DRG2가 세포이동에 미치는 영향

[0113] 세포 이동은 다양한 생리학적 반응 뿐 아니라 암 세포의 침습과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 DRG2가 세포 주기 및 세포 사멸을 조절하는 역할 이외에 세포 이동을 억제하는 효과를 발휘해보는지 확인해 보고자 하였다.

[0114]

[0115] 2-1. shRNA가 처리된 MCF-7 세포주 수렴

[0116] DRG2가 세포 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 본 발명자들은 인간 유방암 세포주인 MCF-7 세포주에서 DRG2의 발현이 안정적으로 억제되도록 DRG2에 대한 shRNA(small hairpin RNA)를 형질주입하였다. 즉, 인간 DRG2의 shRNA(이하 'shDRG2'라 한다.)가 클로닝된 pLK0.1 벡터인 pLK0.1-shDRG2(Sigma, TRCN0000047195)를 MCF-7 세포로 형질주입하여 DRG2의 발현이 안정적으로 억제된 세포주를 제작하였다(이하, 상기 세포주를 'MCF-7/shDRG2'라 한다). 한편, 이에 대한 대조군으로 shRNA control 벡터가 도입된 MCF-7 세포주도 제작하였다(이하 'MCF-7/scRNA'이라 한다).

표 1

[0117] shRNA 염기서열

	염기서열	서열번호
shDRG2	5'-CCGGGCCCTGCCTGTATGTTTATAACTCGAGTTATAAACATACAGGCAGGGCTTTTG-3'	3
shRNA control	5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGTCTTTCATCTTGTGTTT-3'	4

[0118] 상기 MCF-7/shDRG2 및 MCF-7/shRNA-control 세포주에서 DRG2 발현 억제 효과는 웨스턴 블라팅을 통하여 확인하였으며, 도 2A에서 볼 수 있듯이, MCF-7/shDRG2 세포주에서만 효과적으로 DRG2의 발현이 억제되는 것으로 나타

났다.

[0120] **2-2. Wound Healing Assay를 통한 DRG2 발현 억제가 세포 이동에 미치는 영향 관찰**

[0121] DRG2의 발현 억제가 세포 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 wound healing assay를 실시하였다. 이를 위하여 야생형 MCF-7 세포주, MCF-7/shRNA-control 세포주 및 MCF-7/shDRG2 세포주를 6 웰 플레이트에 10% FBS가 첨가된 배지를 이용하여 5×10^5 cells/well의 농도로 12 시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 200 μ l 파이펫 팁(pipet tip)을 이용하여 플레이트 상에 한 줄을 그어 주었다. 이후 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 혈청이 없는 배지로 교체한 다음 24시간 동안 추가 배양하였으며, 세포가 이동하는 정도를 현미경으로 관찰하였다.

[0122] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 야생형 MCF-7 세포주, MCF-7/scRNA 세포주에 비하여 MCF-7/shDRG2 세포주에서 세포의 이동이 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

[0124] 상기와 같은 결과를 통하여 본 발명자들은 DRG2가 세포의 이동에 중요한 역할을 수행하고, 유방암 세포주에서 DRG2를 녹다운(Knock-down) 시킴으로써 세포의 이동을 억제할 수 있으며, 따라서 DRG2의 억제는 암세포 전이를 억제하는 효과를 발휘한다는 것을 알 수 있었다.

[0126] **<실시예 3>**

[0127] **DRG2 발현 억제가 Rac1 활성화에 미치는 영향**

[0128] Rac1은 Rho family small GTPase의 일종으로, GDP와 결합한 불활성 상태에서 각종 시그널에 의해 GTP와 결합하여 활성화되며, 세포 주기, 세포 이동 및 흑색종, 소세포폐암 등의 다양한 암 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 DRG2 발현 억제에 의한 세포 이동 저해 효과가 Rac 1 활성화와 관련있는지 확인해 보고자 하였다.

[0129] 이를 위하여 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 세포주에 shDRG2를 형질주입하여 DRG2의 발현을 안정적으로 억제시킨 세포주를 제작하였다(이하 'B16F10/shDRG2'라 한다). 한편, 이에 대한 대조군으로 shRNA control 벡터가 도입된 세포주도 제작하였다(이하 'B16F10/scRNA'이라 한다).

[0130] 상기 각 세포주에서 DRG2 발현 억제에 따른 Rac1의 활성화 정도를 웨스턴 블라팅으로 확인해 보았는데, 대조군에 비하여 DRG2의 발현을 억제시킨 B16F10/shDRG2에서 Rac1-GTP 양이 현저히 감소되는 것으로 확인된바, DRG2는 Rac1의 활성을 억제함으로써 세포이동 저해 효과를 발휘하는 것을 알 수 있었다. 따라서, DRG2의 발현 억제가 암 세포 전이를 억제하는 효과는 Rac1 활성화와 밀접한 관계가 있는 것으로 판단되었다(도 3A 참조).

[0132] **<실시예 4>**

[0133] **DRG2 발현 억제가 VE-cadherin 발현에 미치는 영향**

[0134] 한편, 암세포 전이 과정에서 암세포가 혈관의 내피세포를 통과하기 위해서는 내피세포 사이의 결합이 약화되어야 한다. 혈관 내피세포는 VE-cadherin을 이용하여 상호 결합되어 있는데, 암세포에 VE-cadherin이 발현되면 이들이 혈관 내피세포 사이의 VE-cadherin 결합을 약화시켜 암세포가 혈관 벽을 용이하게 통과할 수 있도록 한다. 종래 Rac1은 VE-cadherin의 세포 표면 발현에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다. 따라서, 본 발명자들은 DRG2 발현 억제에 의한 Rac1 활성화 저해 효과가 VE-cadherin의 발현에도 영향을 줄 수 있다는 가능성에 기인하여 이에 대한 실험을 진행하였다.

[0135] 우선 야생형 B16F10 세포주, 상기 실시예 3에서 제작한 B16F10/scDRG2 세포주 및 B16F10/shDRG2 세포주에서 각 VE-cadherin의 mRNA 및 단백질 양을 RT-PCR과 웨스턴 블라팅으로 관찰하였다.

[0137] **4-1. RT-PCR을 이용한 VE-cadherin mRNA 분석**

[0138] 각 세포주로부터 총 RNA는 WeprepTM 시약(Jeil Biotechservices Inc., Daegu, Korea)으로 분리하였으며, 역전

사반응은 ImProm IITM 역전사시약 (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 제조자 방식에 따라, 1 μ l의 cDNA를 주형으로 IQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 IQ5 (Bio-Rad)으로 RT-PCR을 실시하였다. 정량화는 efficiency-corrected Cq 방법에 의해 도출하였다. 상대적 발현량은 GAPDH를 이용하여 정규화하였다.

표 2

프라이머 명칭	염기서열
GAPDH forward	5'-agtccatgccatcactgccacc-3'
GAPDH reverse	5'-ccagtggagcttcccgttcagc -3'
VE-cadherin forward	5'-AACTTCCCCTTCTTCACCC-3'
VE-cadherin reverse	5'-AAAGGCTGCTGGAAATG-3'

그 결과, 도 3B 및 도C에서 볼 수 있듯이 DRG2 억제 여부와 관계없이 VE-cadherin의 양은 일정하게 유지되는 것으로 확인되었다.

4-2. 웨스턴 블라팅을 이용한 VE-cadherin 단백질 분석

또한, 각 세포주로부터 VE-cadherin 단백질 발현량을 분석하기 위하여 각 세포주를 포획하고, 원심분리하여 세포만을 수집하였다. 프로테아제 저해제(Sigma)를 포함하는 RIPA buffer(150mM NaCl, 50mM Tris-HCl(pH7.4), 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 1mM EDTA)를 이용하여 상기 각 세포주를 용해시키고, 단백질을 5X 환원용 샘플 버퍼로 분리한 후 SDS-PAGE로 전기영동하고 PVDF 멤브레인으로 단백질을 이동시켰다. PVDF 멤브레인을 블라킹 용액(5% 스킵 밀크)을 이용하여 상온에서 1시간 동안 블라킹 한 후, mouse anti-DRG2 항체(1:2000, Sigma) 및 mouse anti-VE-cadherin 항체(1:2000, Santacruz)와 상온에서 2시간 반응시켰다. 상기 PVDF 상기 PVDF 멤브레인을 TBS-T버퍼로 10분간 3번 세척한 후, anti-mouse HRP conjugated (1:4000, Sigma) 이차 항체로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다.

그 결과, 도 3C에서 볼 수 있듯이, DRG2 발현이 억제된 B16F10 세포주에서 VE-cadherin의 단백질 발현도 함께 억제되는 것으로 나타났다.

4-3. 형광 현미경을 이용한 VE-cadherin 단백질 발현 분석

본 발명자들은 DRG2 발현이 VE-cadherin 단백질 발현에 미치는 영향을 세포 상에서 확인하기 위하여 B16F10/scRNA 세포주 및 B16F10/shDRG2 세포주에서 VE-cadherin 단백질 발현 양상을 형광 현미경으로 관찰해 보았다.

이를 위하여 DAPI 염색과 FITC 염색 방법을 이용하였는데, 우선 상기 세포주에서 배지를 제거하고 PBS를 사용하여 3번 세척한 후, 세포를 3.7% formaldehyde 용액으로 20분 간 고정한 후, 고정된 세포를 다시 PBS로 5분씩 3번 세척하였다. 이이후 0.2% Triton X-100을 5분간 처리하고 PBS로 세척한 뒤, FITC-conjugated VE-cadherin(1:500, Santacruz)항체를 처리하였다. 이후 PBS로 3번 세척하고, 2 μ g/ml DAPI 용액을 첨가한 후 5분간 암조건에서 유지하였다. 염색된 세포는 위상차 현미경(Leica DC100, Wetzlar, Germany)의 형광램프를 이용하여 관찰하였다.

그 결과, 도 3D에서 볼 수 있듯이, DRG2 발현이 억제된 B16F10 세포주에서 VE-cadherin의 발현도 함께 억제되는 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 본 발명자들은 DRG 발현 억제는 암세포의 혈관 내피세포를 통과하는 능력을 억제함으로써 암의 전이를 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

<실시예 5>

DRG2 발현 억제가 흑색종 전이에 미치는 영향

상기 실시예들을 통하여 본 발명자들은 DRG2의 발현 억제가 Rac1의 활성 조절을 통해 암세포의 이동을

저해하고, VE-cadherin의 단백질 발현을 조절하여 암세포의 혈관 내피세포 통과 능력을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 본 발명자들은 상기와 같은 in vitro 실험 결과로부터 확인된 기전이 in vivo에서 실제로 암 전이 억제 효과를 발휘하는지 확인해 보고자 하였다.

[0154] 이를 확인하기 위하여 5주령 된 C57BL/6J 마우스(수컷)를 중앙실험동물(한국)에서 구입하여, 온도 23℃, 습도 55%, 조도 300-500 lux, 명암주기 12 시간의 사육환경이 유지된 사육장에서 사육하였다. 사료는 (주) 퓨리나의 실험동물 고형사료(Purina Rodent Laboratory Chow 5001, Purina Mills, USA)를 구입하여 자유로이 공급하였으며 음용수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 2 주간의 순화과정을 거친 후, 임의로 상기 마우스를 상기 마우스를 각 10마리씩 두 그룹으로 분류하였다. 각 그룹의 마우스 당 B16F10/scRNA 또는 B16F10/shDRG2 세포주를 PBS에 현탁시키고, 5×10^5 썬크 꼬리에 정맥주사하였다.

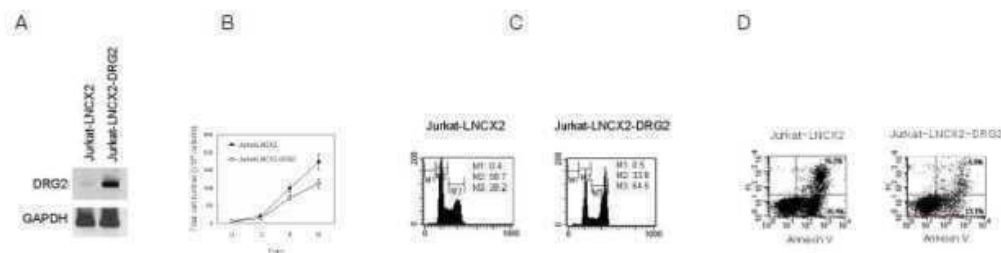
[0155] 이후 시간 경과에 따른 마우스 생존율을 조사하고, 폐조직으로부터 전이된 결절수를 카운팅 해 본 결과, DRG2 발현이 억제되지 않은 대조군에 비하여 DRG2 발현이 억제된 흑색종 세포주에서 마우스 생존율이 현저히 증가하였고(도 4A 참조), 폐조직에 전이된 흑색종의 수가 현저히 낮은 것으로 관찰되었다(도 4B, 4C 참조).

[0157] 상기와 같은 실험 결과를 통하여, 본 발명자들은 DRG2는 암 발생 및 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 단백질로, DRG2를 억제하면 암세포의 이동을 억제하여 유방암, 흑색종 등의 암 전이를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

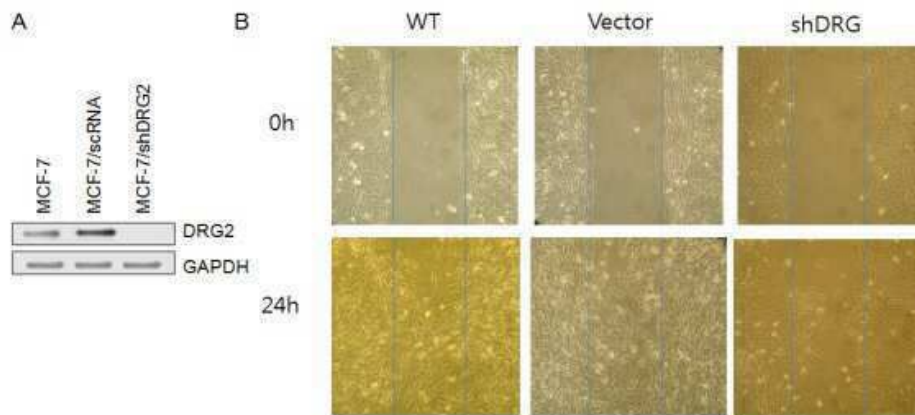
[0159] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

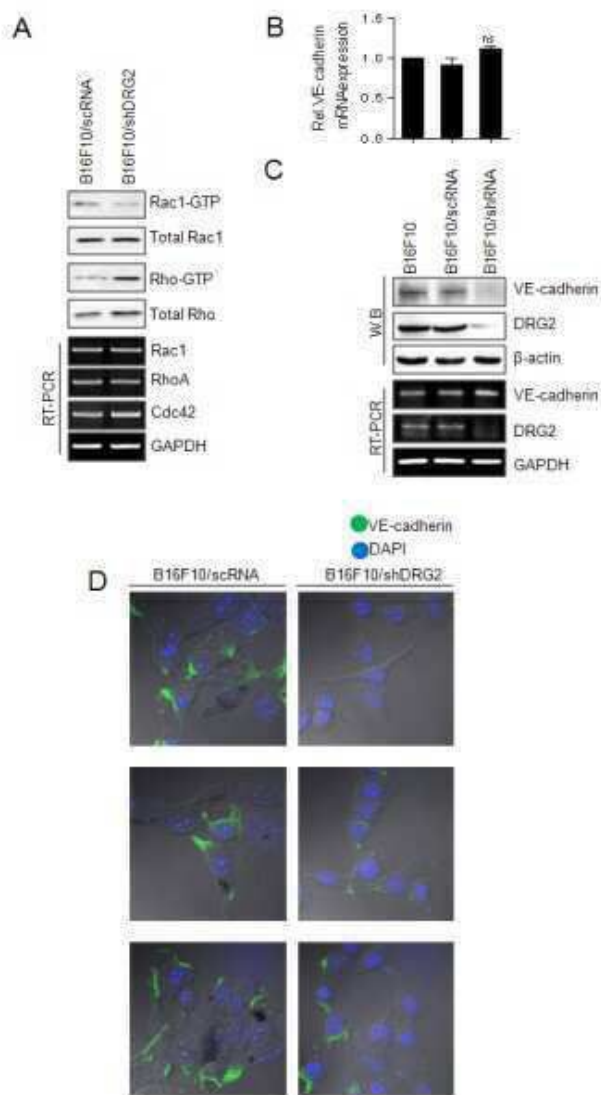
도면1



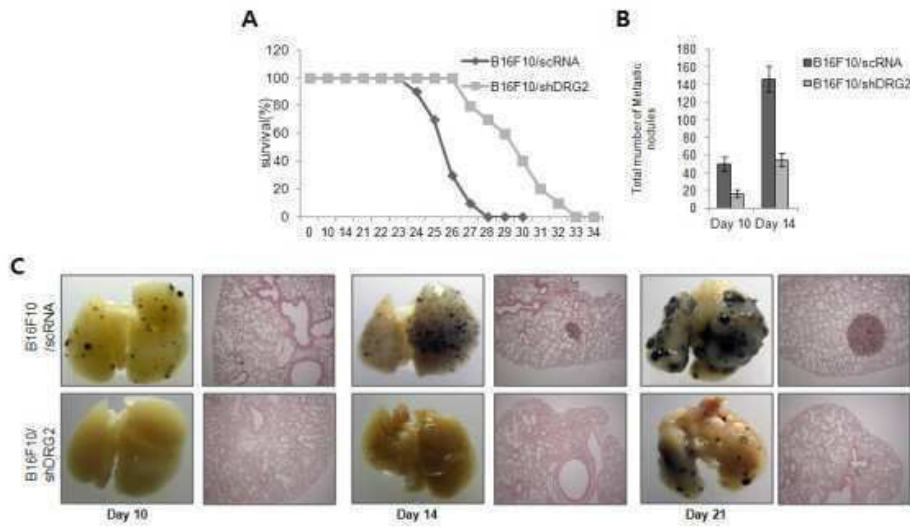
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Anticarcinogenic composition comprising an inhibitor of DRG2 as an active ingredient
- <130> PN2006-229
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 364
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> human drg2 amino acid seq.
- <400> 1

Met Gly Ile Leu Glu Lys Ile Ser Glu Ile Glu Lys Glu Ile Ala Arg
 1 5 10 15
 Thr Gln Lys Asn Lys Ala Thr Glu Tyr His Leu Gly Leu Leu Lys Ala
 20 25 30
 Lys Leu Ala Lys Tyr Arg Ala Gln Leu Leu Glu Pro Ser Lys Ser Ala
 35 40 45
 Ser Ser Lys Gly Glu Gly Phe Asp Val Met Lys Ser Gly Asp Ala Arg
 50 55 60

Val Ala Leu Ile Gly Phe Pro Ser Val Gly Lys Ser Thr Phe Leu Ser
65 70 75 80
Leu Met Thr Ser Thr Ala Ser Glu Ala Ala Ser Tyr Glu Phe Thr Thr
85 90 95
Leu Thr Cys Ile Pro Gly Val Ile Glu Tyr Lys Gly Ala Asn Ile Gln
100 105 110
Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ile Ile Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Gly
115 120 125
Arg Gly Arg Gln Val Ile Ala Val Ala Arg Thr Ala Asp Val Ile Ile
130 135 140
Met Met Leu Asp Ala Thr Lys Gly Glu Val Gln Arg Ser Leu Leu Glu
145 150 155 160
Lys Glu Leu Glu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asn Lys His Lys Pro Asn
165 170 175
Ile Tyr Phe Lys Pro Lys Lys Gly Gly Gly Ile Ser Phe Asn Ser Thr
180 185 190
Val Thr Leu Thr Gln Cys Ser Glu Lys Leu Val Gln Leu Ile Leu His
195 200 205
Glu Tyr Lys Ile Phe Asn Ala Glu Val Leu Phe Arg Glu Asp Cys Ser
210 215 220
Pro Asp Glu Phe Ile Asp Val Ile Val Gly Asn Arg Val Tyr Met Pro
225 230 235 240
Cys Leu Tyr Val Tyr Asn Lys Ile Asp Gln Ile Ser Met Glu Glu Val
245 250 255
Asp Arg Leu Ala Arg Lys Pro Asn Ser Val Val Ile Ser Cys Gly Met
260 265 270
Lys Leu Asn Leu Asp Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Glu Tyr Leu Ala
275 280 285
Leu Thr Cys Ile Tyr Thr Lys Lys Arg Gly Gln Arg Pro Asp Phe Thr
290 295 300
Asp Ala Ile Ile Leu Arg Lys Gly Ala Ser Val Glu His Val Cys His

305 310 315 320
Arg Ile His Arg Ser Leu Ala Ser Gln Phe Lys Tyr Ala Leu Val Trp

 325 330 335
Gly Thr Ser Thr Lys Tyr Ser Pro Gln Arg Val Gly Leu Thr His Thr

 340 345 350
Met Glu His Glu Asp Val Ile Gln Ile Val Lys Lys

	355	360
<210>	2	
<211>	1095	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human drg2 polynucleotide seq.	

<400>	2					
atgggggatct	tagagaagat	ctcggagatc	gagaaggaga	tcgctcggac	acagaagaac	60
aaggccactg	agtatcatct	gggcctgctg	aaagctaagc	tcgccaagta	tcgggcccag	120
ctcctggaac	cgtccaaatc	ggcctcgctc	aaaggagagg	gctttgatgt	catgaagtcg	180
ggtgatgccc	gtgtggcgct	gatttgattt	ccctctgtgg	gtaagtccac	attctttagt	240
ctgatgacct	ccacggccag	cgaggcagcg	tcctatgagt	tcaccactct	gacgtgtatt	300
cctgggggtca	ttgaatacaa	aggtgccaac	atccagctcc	tggaccttcc	tgggaatcatt	360
gaaggcgag	cccaaggaaa	aggccgtggc	cggcaggtga	tcgctgtggc	gcgcacggct	420
gacgtcatca	tcatgatgct	ggatgccacc	aagggagagg	tgcagaggtc	tctgctggag	480
aaggagctgg	agtcctgtggg	catccgcctc	aacaagcaca	agcctaacat	ctacttcaag	540
cccaagaaag	gtgttgcat	ctcctttaac	tcgacagtca	cgtgaccca	gtgctcgga	600
aagctggtgc	agctcatcct	gcacgaatac	aagatcttca	atgcagaagt	gcttttccga	660
gaagactgct	ccccggacga	gttcatcgat	gtgatcgtgg	gcaaccgggt	gtacatgcc	720
tgctgtatg	tttataacaa	aatcgaccag	atctccatgg	aagaggtgga	ccgcctggcc	780
cgaaaaccca	acagtgtggt	catcagctgc	ggcatgaagc	tgaacctgga	ctatctgctg	840
gagatgcttt	gggagtactt	ggccctgacc	tgcacttaca	ccaagaagag	aggacagagg	900
ccagacttca	cagacgccat	cattctccgg	aaaggggcct	cagtggagca	cgtgtgccac	960
cgcattccacc	ggctactcgc	cagccagttc	aagtacgccc	tggtgtgggg	caccagcacc	1020
aagtacagtc	cgcagcgggt	gggcctgacc	cacaccatgg	agcatgagga	cgtcatccag	1080
atcgtgaaga	agtaa					1095

<210> 3
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shDRG2 polynucleotide seq.
 <400>
 > 3
 ccgggccctg cctgtatgtt tataactcga gttataaaca tacaggcagg gctttttg 58
 <210> 4
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shRNA control polynucleotide seq.
 <400> 4
 ccggcaacaa gatgaagagc accaactcga gttggtgctc ttcattttgt tgttttt 57