(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0086578
(43) 공개일자 2014년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0157253
(22) 출원일자 2012년12월28일
심사청구일자 2012년12월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김태우
경기 군포시 산본천로 12, 611동 2301호 (산본동, 을지아파트)
이영호
경기 수원시 장안구 서부로2106번길 26-19, 105호 (율전동)
(74) 대리인
이처영, 장제환

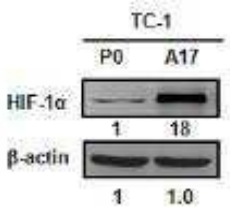
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **ＨＩＦ-１α ｓｉＲＮＡ 및 항산화제를 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 HIF-1α 유전자, 및 VEGF 유전자 중 하나의 유전자의 siRNA, 안티센스, 또는 shRNA를 및 항산화제를 유효성분으로 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 및 HIF-1α를 항암면역내성 표지자로 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 ATP5H-ROS-HIF-1α 신호 활성화로 매개되는 항암면역내성을 무력화하여 항암면역내성을 극복함으로써 항암면역세포치료뿐만 아니라, 항암제, 그리고 방사선 치료 등의 다양한 항암 치료법들의 항암효과를 증가시키는데 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20110027588
부처명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원_핵심연구
연구과제명	ATP synthase-ROS-HIF-1α 상호작용에 의한 항암면역내성 기전 연구 및 이를 이용한 항암면역치료 전략 수립
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

HIF-1α 유전자의 siRNA, 안티센스, shRNA, 또는 HIF-1α에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 siRNA은 표 1에 나타나 있는 것 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 4

VEGF 유전자의 siRNA, 안티센스, shRNA, VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, ErK 활성화 저해제 또는 AKT 활성화 저해제를 유효성분으로 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 5

(i) HIF-1α 유전자의 뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 뉴클레오타이드의 단편, (iii) 상기 뉴클레오타이드 서열 또는 그 단편에 상보적인 서열, (iv) HIF-1α 유전자로부터 발현되는 단백질, 또는 (v) 그 단백질에 특이적인 결합제를 포함하는 것을 특징으로 하는 재발암 또는 내성암 진단용 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 HIF-1α siRNA 및 항산화제를 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 화학요법, 방사선요법, 생물학적 요법, 면역요법 등의 항암치료 후 재발된 암이나 내성이 생긴 암을 치료하기 위한, ATP5H-ROS-HIF-1α 신호 활성화로 매개되는 항암면역내성을 무력화하기 위해서 HIF-1α 또는 VEGF 유전자를 표적화하는 작은간섭 RNA(siRNA), VEGF 중화항체, 그리고 AKT, ErK 단백질 기능 억제제 등과 항산화제(Antioxidant)를 포함하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암(cancer)은 매년 전 세계적으로 1,000만 명의 새로운 환자가 발생하고 있는 주요 질병 중에 하나로, 우리나라의 경우 암으로 인한 사망률은 1위로 전체 사망자의 약 25.5%를 차지하고 있다. 이러한 경향성은 계속 지속될 것으로 전망된다.

[0003] 암은 증식력 및 전이성이 강하며 생명을 위협하는 악성종양(malignant tumor)을 지칭한다. 지금까지의 암의 형성은 많은 유전자의 이상이 중첩되었을 경우에 세포는 증식과 사멸이 일정하게 유지되는 항상성(Homeostasis)을 상실하고 비정상적으로 증식을 계속함으로써 종양이 형성된다. 이들 암은 유전적 변이 세포의 사멸을 유도하는 면역기능의 항상성의 상실로 발생하는 '면역 질환'으로 설정할 수 있다.

[0004] 암의 치료는 1960년대 수술에 의한 치료를 시작으로 1970년대 방사선 치료 기술을 거쳐 1980년대부터 화학치료요법이 중요한 치료법으로 사용되고 있다. 그러나 이러한 치료법들은 심각한 부작용 발생이 일어남을 보고하고 있다. 이런 부작용은 환자의 삶의 질에 있어서 심각한 문제점을 유발할 수 있으므로 새로운 암 치료법의 개발에 대한 요구가 커지고 있다.

[0005] 새로운 암 치료법의 개발에 대한 요구로 인하여 새로운 대안으로서 항암면역요법이 주목받고 있으며, 특히 최근 분자생물학적 발전으로 면역학에서도 많은 획기적인 연구 성과가 얻어지면서 새로운 항암면역치료(cancer immunotherapy)가 암 치료에 사용되고 있다. 이러한 시도는 암을 면역질환으로 설정할 경우 매우 합리적인 항암치료요법으로 분류될 수 있다.

[0006] 항암면역치료란 암 특이 항원(tumor specific antigen) 또는 암 관련 항원(tumor associated antigen)에 대한 면역반응을 유도하여 암 특이성 독성 면역세포 (killer T cell)에 의해 암세포를 제거하는 모든 체계의 통합을 지칭한다. 항암면역제제들 중 DNA 백신과 수지상세포를 기반으로 하는 면역제제들이 현재 많은 주목을 받고 있으며 임상적 적용 또한 활발히 진행 중에 있다. 이들 백신 형태의 항암면역치료제 외에도 미국의 NCI의 Steven A. Rosenberg 그룹을 중심으로 암세포 특이적인 T 세포를 이용한 항암치료(T cell adoptive transfer)가 활발히 진행되고 있다. 그러나 일례로 자궁경부암 원인인 Human papillomavirus의 E6와 E7 및 간암의 원인이 되는 HBV (hepatitis B virus)의 X 단백질과 같은 암 특이 항원들 및 거의 모든 암종에서 발현되는 것으로 알려진 survivin과 Her2/neu 등의 암 관련 항원들이 잘 알려져 있음에도 불구하고 항암면역치료제의 효능이 낮은 것은 이들 종양항원들은 대부분 그 면역원성이 극히 낮기 때문이라고 보고되고 있는 실정이다. 따라서 추가적으로 항암면역치료요법의 효능 개선이 지속적으로 필요한 실정이다(Schreiber R. D. et al. *Nature Immunology*. 2002, 3, 991-998).

[0007] 가장 임상적용 가능성이 높다고 평가받는 수지상세포 면역제제의 경우, 다양한 시도에도 불구하고 여전히 임상적 실효성이 낮게 평가받는 원인 중 하나는 암세포들이 지니고 있는 면역회피(immune escape)기전 때문인 것으로 보고되고 있다. 암을 치료하기 위해서는 암세포의 대한 면역회피 기전에 대한 정확한 이해를 바탕으로 항암면역치료의 효능 개선을 도모하는 것이 무엇보다 중요하다고도 할 수 있을 것이다.

[0008] 항암면역치료의 임상적용 시 직면하게 되는 암의 재발은 면역치료제에 의해 유도된 세포독성림프구의 공격에 대해서 저항성을 획득하게 된 암세포들이 재증식을 통해 다시 암종을 형성하기 때문이다. 따라서, 재발된 암종을 구성하는 대부분의 암세포는 직접 또는 간접적으로 항암면역에 대한 내성을 획득하게 되는 것으로 알려져 있다. 이러한 내성 암세포들은 이후에는 항암면역의 제제를 받지 않은 채 계속적인 유전적 변이와 증식을 거치면서 암 전이 능력을 가진 악성 말기 암세포로 분화하여 종극에는 암환자의 생명을 위협하게 된다. 이러한 임상적 현실성을 고려하여 광의의 개념인 '면역회피' 현상을 세포독성림프구(cytotoxic T lymphocyte; CTL)에 대한 암세포의 '면역 내성(immunoresistance)'으로 간주할 수 있다. 이러한 세포독성림프구는 암세포의 아팝토시스(세포자멸; apoptosis)를 유도한다. 하지만 항세포자멸(anti apoptosis)을 유도하는 분자들은 세포독성림프구의 공격으로부터 암세포를 방어해주는 항암면역 내성인자이면서 동시에 새로운 면역회피인자가 될 가능성이 보고되고 있으며(Kang TH et al *Cancer Res*. 2010, 15;70(8), 3062-70 ; Kim SH et al *Cancer Lett*. 2010, 28;293(2), 181-8 ; Noh KH et al *Mol Ther*. 2009, 17(3), 439-47), 세포자멸조절 면역내성 인자들을 발굴하고 그 작용 기전을 연구함으로써 항암면역치료 효능 증진 및 재발 암에 대한 면역치료의 근거를 마련하고자하는 노력이 계속되고 있다.

[0009] 따라서 본 발명자는 항암면역 암세포주에서 HIF-1α 유전자가 과발현되어 있는 것을 발견하고 HIF-1α 유전자가 유발하는 암세포의 면역회피 현상에 대하여 탐색하고자 하였다. HIF-1α은 저산소 상태에서 외부의 산소 농도의 변화에 적절하게 반응하기 위해 해당과정, 혈관신생 등을 유도함으로써 세포내 항상성을 유지시켜주는 전사인자이다(Semenza G. L. et al *Nature Reviews Cancer* 2003, 3, 721-732). 그 중 HIF-1α는 basix helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM(bHLH-PAS)구조의 전사인자로 저산소 상태 또는 유전적 결함에 의한 암세포 내 HIF-1α발현 증가 및 활성 증가는 HIF-1α 의존적 신호전달을 활성화시켜 종양 세포의 증식을 유도하고 종양세포의 혈관 생성을 촉진할 뿐만 아니라 다양한 항암제에 대한 내성, 암세포의 전이를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Taylor C. T. et al. *Biochemistry Journal,* 2008, 266, 12-20).

[0010] HIF-1α는 ODD 도메인에 2개의 proline 잔기의 하이드록실레이션에 의해서 안정성이 유지된다. 즉 정상 산소분압상태에서 PHD에 의해 HIF-1α의 P402, P584 잔기들이 하이드록실레이션됨으로써 E3 ubiquitin ligase인 VHL와 결합하여 프로테오좀에 의해 분해된다(Sandaltzopoulos R. et al. *Cancer Letter*, 2008, 266, 12-20).

[0011] HIF-1α의 안정화 기전들 중 하나로는 세포 내 호흡과정에서 만들어진 활성산소 reactive oxygen species(ROS)가 PDH의 활성 유지에 필요한 Fe 2가 이온을 3가 이온으로 산화시킴으로써 PDH의 불활성화를 유도하고 이로 인해 HIF-1α의 프로테오좀 분해가 억제된다 (Taylor C. T. *Biochemistry*, 2008, 409, 19-26). 이러한 활성산소는 미토콘드리아에서 생성된다. 특히 이러한 활성산소는 암세포에서 많이 생성된다 (Chandel N. S. et al. *Molecular and Cellular Biology,* 2007, 27, 5737-5745). 활성산소는 일반적으로 미토콘드리아에서 ATP를 형성

하는 산화적인산화(oxidative phosphorylation)와 관련된 단백질의 발현저하로 인해서 전자전달체계의 이상이 초래되어 잉여전자 및 수소 이온의 유출로 인해서 발생한다. 본 산화적 인산화 과정에 관여하는 단백질 중 ADP를 인산화시켜 ATP를 형성하는 ATP 생성효소 복합체(ATP synthase complex)가 있다. 이러한 ATP synthase의 발현저하 및 기능저하는 대장암의 항암제 5-FU에 대한 내성획득 및 간암의 악성화에 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다 (Shin YK et al *Cancer Res*. 2005, 15;65(8), 3162-70).

[0012] 하지만 ATP synthase의 발현저하에 따른 항암면역내성 획득에 관련되어서는 대해서는 보고된 바가 없다. 또한 ATP synthase의 발현 감소로 유도된 ROS의 생성 증가가 HIF-1α 분해를 억제하여 항암면역내성을 획득한다는 보고 역시 전무하다.

[0013] 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 공개특허 제10-2012-0081936호(2012.07.20)에 Hif1a의 발현을 저해하는 siRNA 및 이를 포함하는 항암 조성물에 대해 기재되어 있고, 대한민국 공개특허 제10-2011-0081715(2011.07.14)에는 파골 세포내에서 HIF-1a에 특이적으로 유전자 발현을 감소시키는 siRNA를 포함하는 파골세포의 분화 및 활성화로 야기되는 질환 또는 질병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 대해 기재되어 있다. 그러나, ATP5H-ROS-HIF-1α의 신호 활성화로 인하여 매개되는 항암면역내성의 획득에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0014] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0081936호(2012.07.20)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2011-0081715(2011.07.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점 등을 해결하기 위한 것으로, 본 발명자는 항암면역내성 암세포에서 HIF-1α 유전자가 과발현되어 있는 것을 발견하고, 이러한 HIF-1α 유전자의 과발현은 항암면역내성 암세포에서 ATP synthase subunit d(ATP5H)의 발현의 감소로 인한 ROS 형성이 증가가 HIF-1α의 안정화를 유도하여 발현이 증가하기 때문임을 확인하였고 ATP5H-ROS-HIF-1α의 신호 활성화로 인하여 매개되는 항암면역내성의 획득은 HIF-1α의 발현증가로 인해 VEGF 발현을 유도하여 AKT, Erk의 활성화로 인해 항암면역내성이 획득되는 새로운 신호경로를 발굴하였다.

[0017] 따라서, 본 발명은 새로운 항암면역 내성인자로서 HIF-1α를 선별하였고, HIF-1α의 발현 증가를 계측함으로써 재발암 또는 내성암 진단에 이용되는 조성물, 및 이를 포함하는 키트, DNA 칩, 단백질 칩 등을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 ATP5H-ROS-HIF-1α의 신호 활성화로 인하여 매개되는 항암면역내성의 획득을 무력화할 수 있는 HIF-1α의 발현을 저해하는 siRNA, 항체, 및/또는 항산화제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 신호전달 활성화로 인해 유도되는 VEGF 발현의 증가가 AKT, ERK 신호 활성화를 유도하여 항암면역내성이 획득되는 것을 억제하기 위하여 VEGF를 표적화하는 siRNA 및 VEGF 중화항체, 그리고 AKT, ERK의 활성화를 억제하는 특이적 저해제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 HIF-1α 유전자의 siRNA, 안티센스, shRNA, 또는 HIF-1α에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 구체적인 양태에 의하면, 상기 조성물은 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 VEGF 유전자의 siRNA, 안티센스, shRNA, VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, ErK 활성화 저해제 또는 AKT 활성화 저해제를 유효성분으로 함유하는 재발암 또는 내성암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 (i) HIF-1α 유전자의 뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 뉴클레오타이드의 단편, (iii) 상기 뉴클레오타이드 서열 또는 그 단편에 상보적인 서열, (iv) HIF-1α 유전자로부터 발현되는 단백질, 또는 (v) 그 단백질에 특이적인 결합제를 포함하는 것을 특징으로 하는 재발암 또는 내성암 진단용 키트를 제공한다.

[0025] 이하, 본 발명에 대해서 상세하게 설명한다.

[0026] 본 발명자들은 항암면역내성 암세포에서 HIF-1α 유전자가 과발현되어 있는 것을 발견하여, HIF-1α의 발현 증가를 계측함으로써 암의 악성화 및 항암면역내성 진단에 이용될 수 있는 조성물, 및 이를 포함하는 키트, DNA 칩, 단백질 칩 등을 제공할 수 있게 되었다. 나아가, 본 발명자들은 ATP5H-ROS-HIF-1α의 신호 활성화로 인하여 매개되는 항암면역내성이 획득되는 새로운 신호경로를 발굴하여, HIF-1α의 발현 억제 및 항산화제 처리에 의해 항암면역내성이 무력화되고, HIF-1α에 의해서 발현이 증가된 VEGF의 기능 및 발현을 억제하거나, VEGF 의존적 AKT, Erk 활성화를 특이적으로 억제하여 항암면역내성이 무력화되는 것을 확인하여 항암면역, 항암제, 그리고 방사선 치료 등의 다양한 항암 치료법들의 항암효과를 증진 유도할 수 있는 본 발명을 완성하였다.

[0027] 따라서, 본 발명은 HIF-1α 유전자의 작은간섭 RNA(siRNA), 안티센스, shRNA, 또는 HIF-1α siRNA 염기서열을 포함하는 발현벡터를 함유하는 재발암 또는 내성암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 VEGF 유전자의 작은간섭 RNA(siRNA), 안티센스, 또는 shRNA를 함유하는 재발암 또는 내성암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(Degot S, et al. 2002; Degot S, et al. 2004; Ballut L, et al. 2005).

[0030] 본 발명에서 제시하는 siRNA는 표적 유전자의 mRNA 절단을 통해 RNA 간섭 현상을 유도하는 이중사슬 RNA를 의미하며, 표적 유전자의 mRNA와 같은 서열을 가지는 센스서열의 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 서열의 RNA 가닥으로 구성될 수 있다.

[0031] 바람직하게, 본 발명에서 제공하는 HIF-1α 작은간섭 RNA(siRNA)는 이중가닥 siRNA로서 HIF-1α의 상보적인 mRNA에 결합하여 발현을 억제하는 것이다. HIF-1α 유전자는 재발암, 내성암에서 관찰되는 항암면역내성의 획득에 관여하는 유전자로서 HIF-1α 작은간섭 RNA(siRNA)에 의해 재발암 또는 내성암의 치료효과 증진시키는 화학적 조성물로서 제공된다.

[0032] 본 발명의 siRNA의 경우 생체내 핵산 분해효소에 의한 기능상실을 막기 위해 화학적으로 변형된 siRNA를 포함하는 것으로 해석된다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 HIF-1α 유전자는 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 진 뱅

크 등록번호 NM_001530(서열번호 1 및 서열번호 2)를 이용하였다.

[0034] 또한, 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 18 내지 70 염기, 그리고 가장 바람직하게는 18 내지 30 염기이다.

[0035] siRNA 말단 구조는 HIF-1α 유전자 등의 발현을 RNAi(RNA interference) 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0036] 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명은 상기 siRNA은 표 1 또는 표 3에 나타나 있는 것 중 하나 이상을 갖는다. 본 발명에 따르면, 항암면역내성 세포주에서 HIF-1α-siRNA를 처리함에 따라 항암면역내성이 무력화됨을 확인하였다 (도 4 및 도 18 참조).

[0038] 또한, 본 발명의 siRNA는 생체내 혈관신생 영역 또는 그 근처에서 재조합 바이러스 벡터로부터 세포내에서 발현될 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 본 발명의 siRNA을 암호화하는 서열 및 siRNA 서열을 발현하는데 적합한 임의의프로모터를 포함한다. 적합한 프로모터에는, 예를 들어 U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 사이토메갈로바이러스프로모터가 포함된다. 당 분야의 숙련가라면 다른 적합한 프로모터를 선택할 수 있을 것이다. 또한 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서 siRNA를 발현시키기 위한 유도성 또는 조절성 프로모터를 포함할 수 있다.

[0039] 발현될 siRNA 분자에 대한 암호화 서열을 수용할 수 있는 어떠한 바이러스 벡터도 사용할 수 있는데, 예를 들어 아데노바이러스(AV), 아데노바이러스-수반 바이러스(AAV), 레트로바이러스(예: 렌티바이러스(LV), 라브도바이러스, 쥐 백혈병바이러스), 헤르페스 바이러스 등으로부터 유래된 벡터가 있다. 또한, 바이러스 벡터의 친화성은, 다른 바이러스의 외피 단백질 또는 기타 표면 항원으로 벡터를 가성형태화시킴으로써 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 AAV 벡터는 소수포구내염 바이러스(VSV), 광견병 바이러스, 에볼라 바이러스, 모콜라 바이러스 등의 표면 단백질로 가성형태화시킬 수 있다.

[0040] 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 바이러스 벡터, siRNA을 발현시키기 위해 핵산 서열을 벡터에 삽입하는 방법 및 목적하는 세포에 바이러스 벡터를 전달하는 방법의 선택은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어, 전문이 본원에서 참조문헌으로 인용되는 다음 문헌들을 참조한다[참조문헌: Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis MA(1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller AD (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; and Anderson WF (1998Nature 392: 25-30] .

[0041] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 이용하여 제조된 암세포 특이적 항원(Antigen) 및 에피토프(Epitope)를 이용한 항암면역세포 치료제를 제공할 수 있다. 상기 항암면역세포치료제는 수지상세포, T 세포, B 세포, NK 세포를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적

합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0043] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 국소 주입, 근육 주입 등으로 투여할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.

[0045] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에 의한 상기 약제학적 조성물은 항산화제를 더 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명은 재발암, 내성암에서 관찰되는 항암면역내성의 획득에 관여하는 ATP5H- ROS- HIF-1α 신호경로를 차단하기 위해서 항산화제를 포함하는 재발암 또는 내성암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다(도 10 및 도 11 참조).

[0048] 본 발명에서 제공하는 항산화제(antioxidant)는 재발암, 내성암에서 생성된 활성산소의 제거를 통해 HIF-1α 분해 촉진을 유도하여 항암면역내성을 무력화시켜 재발암, 내성암의 치료의 효능증가를 위한 보조제(Adjuvant)로서의 기능도 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 ATP5H- ROS- HIF-1α 신호경로를 차단하기 위해 사용되는 항산화제는, 이에 한정되는 것은 아니나 Ascorbate(Vit C), N-acetylcysteine(NAC), catalase, Tocopherol(Vit E), recombinant superoxide dismutase(rSOD), glutathione(GSH) 등의 화학적 조성물을 포함할 수 있다.

[0050] 따라서, 본 발명은 N-acetylcysteine (NAC), ascorbate(Vit C), Catalase를 포함하는 항산화제의 정맥주사와 동시에 T세포의 adoptive transfer와 같은 항암면역세포를 사용하는 재발암, 항암면역내성암 치료 방법을 제공할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 ROS저해제인 N-acetylcysteine, ascorbate, Catalase 와 상응하는 항산화능을 보유한 치료용 조성물을 정맥주사와 동시에 T 세포의 adoptive transfer와 같은 항암면역세포를 사용하는 재발암, 항암면역내성암 치료 방법을 제공할 수 있다.

[0052] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 HIF-1α 또는 VEGF와 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 재발암 또는 내성암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명에서 ATP5H- ROS- HIF-1α 신호경로를 통한 VEGF의 기능을 차단하기 위해 사용되는 HIF-1α 또는 VEGF 중화항체를 함유하는 조성물을 포함할 수 있다(도 14, 도 15 및 도 16 참조). 본 발명에 있어, 항체는 본원발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술을 이용하여 당업자가 용이하게 제조하거나 구입하여 이용할 수 있다(항체이름: Bevacizumab 제품명: Avastin 제조회사 :Genentech/Roche). 본 발명의 항체는, 본 발명의 상기 단백질에 결합하는 한 특별히 제한은 없으며, 폴리클론 항체, 단일클론항체 외에 인간 항체, 유전자 재조합에 의한 인간화 항체, 또한 그 항체 단편이나 변형된 항체도 포함된다.

[0054] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 ErK 활성화 저해제 또는 AKT 활성화 저해제를 함유하는 재발암 또는 내성암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 ErK 활성화 저해제는 이에 한정되는 것은 아니나, PD-98059이고, AKT 활성화 저해제는 API2 또는 LY294002이다.

[0055] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 HIF-1α와 반응하는 하나 이상의 물질 및 반응 생성물 검출용 시

약을 포함하는 재발암 또는 내성암 진단을 위한 키트 및 진단방법을 제공한다.

[0056] 본 발명은 악성 종양 및 재발암에서 관찰되는 항암면역치료를 포함한 다양한 항암치료에 대한 내성 인자로서 HIF-1α를 발굴하고, 이를 근거로 HIF-1α의 발현 증가를 암의 악성화 및 항암면역내성 진단에 이용되는 재발암 또는 내성암 진단용 키트 내지 DNA 칩, 단백질 칩 등에서의 소재로 이용될 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, 예를 들어, HIF-1α와 반응하는 하나 이상의 물질은 HIF-1α의 RNA 또는 DNA에 상보적인 RNA 또는 DNA 및 HIF-1α 단백질에 결합하는 항체일 수 있고, 반응 생성물 검출용 시약은 핵산 또는 단백질 표지 및 발색시약일 수 있다.

[0058] 보다 구체적으로, 본 발명에 의한 진단용 키트 또는 암 진단 마커를 검출하는 방법은 HIF-1α 유전자나 그의 단편 또는 그의 상보적인 서열과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 암을 진단하는 원리를 이용한다. 상기 HIF-1α 유전자 등과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응의 확인은 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이(in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 즉 상기 유전자의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산과 하이브리드화한 후 당 분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction), 써던블로팅(Southern blotting), 노던 블롯팅(Northern blooting) 등으로 이를 검출함으로써 대상자에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지 또는 저발현된 상태인지 조사하면 재발암 또는 내성암의 발생 여부를 판단할 수 있다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 HIF-1α 유전자를 포함하는 재발암 또는 내성암 치료제 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명은 악성 종양 및 재발암에서 관찰되는 항암면역치료를 포함한 다양한 항암치료에 대한 내성 인자로서 HIF-1α를 발굴하고, 이를 근거로 HIF-1α의 발현 증가를 확인하여 재발암 또는 내성암 치료제 스크리닝에 이용할 수 있다.

[0061] 보다 스크리닝 방법은 구체적으로, 1) HIF-1α의 전사 조절에 관여하는 전사인자를 찾는 단계; 2) 상기 전사인자를 조절하는 물질을 선발(screening)하는 단계; 및 3) 상기 물질이 HIF-1α 유전자의 발현을 조절하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계로 구성된 HIF-1α 활성 조절제(활성 억제제 혹은 증가제)를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 스크리닝 방법에서 HIF-1α 활성 조절 후보물질이 HIF-1α 유전자의 발현 또는 단백질 활성을 억제 혹은 증가하는지를 결정하는 단계에서 RNA-RNA, DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-단백질, RNA-화합물, DNA-단백질, DNA-화합물, 단백질-단백질 또는 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어, 치료 가능한 암은 뇌종양, 척수종양, 망막 세포종, 구강암, 비강암, 부비동암, 인두암, 후두암, 경부암을 포함하는 두경부암, 피부암, 유방암, 갑상선암, 악성부신종양을 포함하는 유방암, 내분비암, 폐암, 흉막종양, 악성부신종양을 포함하는 호흡기암, 식도암, 위암, 소장의 악성종양, 대장암, 항문암, 간암, 담도암 또는 췌장암을 포함하는 소화기암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암 또는 음경암을 포함하는 비뇨기암, 자궁경부암, 자궁체부암, 융모상피암 또는 난소암을 포함하는 부인암, 급성 또는 만성 백혈병, 악성 림프종 또는 다발성 골수증을 포함하는 혈액암, 골종양 또는 연부종양을 포함하는 골 또는 연부 종양, 및 소아 백혈병 또는 소아 고형종양을 포함하는 소아암 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0063] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 ATP5H의 발현 감소로 인해 나타나는 ROS 생성과 HIF-1a의 발현증가 그리고 이로 인한 VEGF 증가와 AKT, ERK의 활성화를 유도하여 항암면역내성을 획득하는 새로운 신호경로인 ATP5H- ROS- HIF-1α를 차단하여 효과적으로 재발암 또는 내성암을 치료 또는 예방할 수 있다.

[0064] 또한 HIF-1α의 발현 억제 및 항산화제를 이용한 활성산소의 제거 및 VEGF의 발현 억제와 중화항체를 이용한 기능 억제를 통하여 ATP5H- ROS- HIF-1α 신호경로를 통한 항암면역내성의 획득을 차단시키는 항암면역치료의 보

조제로 사용함으로써 재발암과 항암면역내성암을 치료하는 항암면역세포치료뿐만 아니라, 항암제, 그리고 방사선 치료 등의 다양한 항암 치료법들의 항암효과를 증가시키는데 이용될 수 있다.

[0065] 나아가, 본 발명에 의하면, 항암면역, 항암제, 방사선 치료에 내성을 지니는 내성암과 재발암의 진단에 상기 신호 전달에 중심에 있는 HIF-1a를 진단마커로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 항암면역내성 암세포주에서 HIF-1α 발현을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 2는 생쥐 자궁경부암 모델에서 HIF-1α 과발현에 의한 항암면역회피 능력 획득을 시험관내에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 3은 생쥐 자궁경부암 모델에서 HIF-1α 과발현에 의한 항암면역회피 능력 획득을 생체내에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 4는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 이용한 HIF-1α 발현 저해로 인한 항암면역내성 암세포의 무력화를 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 5는 항암면역내성 세포주에서의 ATP5H의 발현 감소를 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 6은 항암면역내성 세포주에서의 ROS의 생성을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 7은 항암면역내성 세포주에서 ATP5H의 발현저하로 인한 ROS의 생성을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 8은 생쥐 자궁경부암 세포주에서 ATP5H의 발현저하를 통한 항암면역내성의 획득을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 9는 항산화제를 이용한 ROS의 제거로 인한 HIF-1α 분해 촉진을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 10은 항산화제를 이용한 항암면역내성의 무력화를 시험관내에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 11은 항산화제를 이용한 항암면역내성의 무력화를 생체내에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 12는 항암면역내성 암 세포주에서 VEGF의 발현을 시험관내에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 13은 항암면역내성 암 세포주(A17)에서 작은 간섭 RNA(siRNA)를 이용한 HIF-1α의 발현 억제로 인한 VEGF의 발현 변화를 보여주는 도면이다.

도 14는 VEGF 의존적 AKT, ERk의 활성화를 VEGF 중화항체를 이용하여 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 15는 HIF-1α 과발현 자궁경부암 모델에서 AKT 저해제(LY)와 ERK 저해제(PD) 처리 시 항 세포자멸 유전자의 발현의 변화를 보여주는 도면이다.

도 16은 VEGF 중화항체를 이용한 항암면역내성의 무력화를 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 17은 다양한 인간암 세포주에서의 HIF-1α와 ATP5H의 발현을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 18은 작은 간섭 RNA(siRNA)를 이용해 HIF-1α의 발현 저해를 통한 인간 암세포의 무력화를 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 19는 HIF-1α 발현이 낮은 인간암세포에 ATP5H의 발현저해를 통한 항암면역내성의 획득을 NAC을 처리하여 항암면역내성을 무력화한 결과를 보여주는 도면이다.

도 20은 ATP5H-ROS-HIF-1α 신호경로 활성화로 인해 유도되는 내성의 획득과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0068] **<실시예 1> 생쥐 HIF-1α 발현 벡터 제조**

[0069] 생쥐 HIF-1α의 발현벡터의 제조의 경우, 항암면역내성 세포주인 TC-1 P3 A17 를 주형으로 하고, BglⅡ-HIF-1α 프라이머 5‘-AGATCTCCATGGAGGGCGCCGGC-3’, HIF-1α-EcoRⅠ프라이머 5‘-AAGGATCCTCAGTTAACTTGATCCAAAGCGAATTC-3’ 프라이머를 이용하여 denaturation(95℃, 30초), annealing(62℃, 30초), extension(72℃, 3분) 그리고 35 싸이클 조건에서 PCR기법으로 증폭하였다.

[0070] pMSCV 벡터(Clontech, USA)를 BglⅡ, EcoRⅠ제한효소(NEB, USA)로 처리한 후, 상기 증폭된 후 BglⅡ, EcoRⅠ제한효소를 처리한 HIF-1α 주형을 라이게이즈(ligase, 바이오니아)로 ligation하여 HIF-1α를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 제조하였다.

[0071] **<실시예 2> 생쥐 HIF-1α를 발현하는 TC-1 P0 세포주 제조**

[0072] 실시예 1에서 제조한 각각의 벡터와 리포좀제제인 lipofectamin 2000(Invitrogen, MD, USA)을 부피비 1:2로 섞어 레트로바이러스 패키징(packaging) 세포주인 피닉스(phonenix)세포(clontech)에 3시간 처리 후 혈청이 포함된 배양액을 첨가해 주어 형질주입반응을 정지시켰다.

[0073] 그 후 24시간 배양 후 퓨로마이신(Invitrogen, MD, USA)이 포함된 배양액으로 형질주입된 피닉스세포를 선택배양하였다. 선택된 세포들을 3~4일간 배양하여 배양액에서 얻은 바이러스를 amicon ultra-15 (millipore)을 이용하여 12000rpm에서 30분간 원심 분리 하는 방법으로 농축한 500ul의 농축액과 4ug PEI(Polyethyleneimine; Sigma)를 혼합한 혼합액을 TC-1 P0에 처리후 형질도입시킴으로써, 생쥐 HIF-1α를 발현하는 TC-1/HIF-1α 세포주를 제조하였다(도 2 참조).

[0074] **<실시예 3> single chain trimer-E7(SCT-E7)을 발현하는 벡터 제조**

[0075] E7 aa49-57의 DNA 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 5'-CCGGAGAGCCCAT TACAATATTGTAACCTTT-3' 와 5'-CTAGTCTCGGGTAATGTTATAACATTGGAAA-3'를 annealing하여 E7 ologonucleotide를 준비하였다.

[0076] pIRES-E6-Kb (Huang et al. 2006 Gene Ther) 벡터에 제한효소 AgeI와 Nhe를 처리하여 E6 ologonucleotide를 제거한 후 합성된 E7 ologonucleotide를 동일 제한효소를 처리한 후 라이게이즈로 리게이션(ligation)하여 E7을 발현하는 pIRES-E7-2m-Kb를 제조했다.

[0077] E7-2m 유전자를 증폭하기 위해서, pIRES-E7-2m-Kb를 주형으로 하여 E7-2m를 5'-AGATCTAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTT-3' 와 5'-CTCGAGGGTGGTGGAGGTA GTGGCGGGGCGATGGCTCCGCGCACGCTGC-3' 프라이머를 이용하여 denaturation (95℃, 30초), annealing(62℃, 30초), extension(72℃, 3분) 그리고 35 싸이클 조건에서 PCR기법으로 증폭하였다.

[0078] 생쥐 수지상 세포주 DC2.4의 Db를 발현하는 pMSCV-Db 벡터를 BglⅡ, EcoRⅠ 제한효소(NEB, USA)로 처리한 후, 상기 증폭된 E7-2m을 BglⅡ, EcoRⅠ제한효소 처리하여 라이게이즈로 리게이션(ligation)하여 E7-2m-Db를 발현하는 레트로바이러스 벡터(pMSCV-SCT E7)를 제조하였다.

[0079] **<실시예 4> SCT-E7을 발현하는 인간암 세포주 제조**

[0080] 실시예 3에서 제조한 각각의 벡터와 리포좀제제인 lipofectamin 2000(Invitrogen, MD, USA)을 부피비 1:2로 섞어 레트로바이러스 패키징(packaging) 세포주인 피닉스(phonenix)세포(clontech)에 3시간 처리 후 혈청이 포함된 배양액을 첨가해 주어 형질주입반응을 정지시켰다.

[0081] 그 후 24시간 배양 후 퓨로마이신(Invitrogen, MD, USA)이 포함된 배양액으로 형질주입된 피닉스세포를 선택배양하였다. 선택된 세포들을 3~4일간 배양하여 배양액에서 얻은 바이러스를 amicon ultra-15 (millipore)을 이용하여 12000rpm에서 30분간 원심 분리하는 방법으로 농축한 500ul의 농축액과 4ug PEI(Polyethyleneimine; Sigma)를 혼합한 혼합액을 PC-3, MDA 321, HeLa, 그리고 CaSki 암세포주에 처리하여 형질도입시킴으로써, SCT-E7을 발현하는 PC-3/SCT-E7, MDA 321/SCT-E7, HeLa/SCT-E7, 그리고 CaSki/SCT-E7세포주를 제조하였다.

[0082] **<실시예 5> CD8+ 세포독성 T세포의 시험관내 항암면역내성에 대한 조사**

[0083] 본 발명은 API5 유전자의 항암면역 내성에 대해 조사하기 위해 상기 실시예 2 및 실시예 4에서 제조한 TC-1/HIF-1α, MDA321/SCT-E7, PC-3/SCT-E7, CaSki/SCT-E7, 그리고 HeLa/SCT-E7 세포주를 이용하여 항암면역 내성 실험을 수행하였다.

[0084] 먼저 CFSE(Carvoxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 SCT-E7을 발현하는 세포주에 표식한 후, E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 TC-1/no insert, TC-1/HIF-1α 세포주에서의 활성 카스파제-3(active-caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.

[0085] **<실시예 6> siRNA 처리한 후 항암면역내성에 대한 조사**

[0086] 표 1과 표 2에 표기된 siRNA HIF-1α 와 siRNA ATP5H를 처리한 후 항암면역내성획득을 확인하기 위해서, 100pmole siRNA를 리포좀제제인 lipofectamin 2000(Invitrogen, MD, USA)를 부피비 1:1.5로 섞은 후 세포에 이틀간 처리한 후 4일째 CFSE(Carvoxyfluorescein succinimidyl ester)로 표식한 후, E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 세포주에서의 활성 카스파제-3(active-caspase-3)를 염색하여 FACS를 통해 관찰하였다.

[0087] 도 4 및 도 12에서 나타난 바와 같이, TC-1 P3 A17, MDA231-SCT/E7, PC-3-SCT/E7에 siRNA HIF-1α를 처리하였을 때 항암면역내성이 무력화됨을 확인하였다.

[0088] 또한, 도 7 및 도 14에서 나타난 바와 같이, TC-1 P0, HeLa-SCT-E7, CaSki-SCT/E7에 siRNA ATP5H를 처리하였을 때 항암면역내성이 증가함을 확인하였다.

[0089] **<실시예 7> 항산화제 처리한 후 항암면역내성에 대한 조사**

[0090] N-acetylcysteine (NAC ; Sigma, St. Louis, MO), ascorbate (Sigma, St. Louis, MO) 처리한 후 항암면역내성 획득을 확인하기 위해서, NAC(5 mmol/L) 와 ascorbate(5 mM)을 각각 HeLa-SCT-E7, CaSki-SCT/E7, TC-1 P3 A17에 처리하여 37도 CO_2 배양기에서 4시간 배양한 후 CFSE(Carvoxyfluorescein succinimidyl ester)로 표식하여 E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 세포주에서의 활성 카스파제-3(active-caspase-3)를 염색하여 FACS를 통해 관찰하였다.

[0091] 도 9와 도 15에서 나타난 바와 같이 N-acetylcysteine, ascorbate와 같은 항산화제를 처리하였을 때 항암면역내성이 약화됨을 확인하였다.

[0092] **<실시예 8> CD8+ 세포독성 T세포를 이용한 생체내 항암면역내성에 대한 조사**

[0093] TC-1/no insert와 TC-1/HIF-1α를 C57BL/6 생쥐군(암컷, 5주령, n=5, 오리엔트바이오) 각각의 복부 표피에 $1X10^5$개씩 주입하고, 주입 7일째에 E7특이적인 CD8+ T세포를 IL-2와 함께 정맥주사하여 면역하였다. 각각의 생쥐에 대하여 종양체적을 종양세포 주입 7일, 10일, 13일, 15일, 16일, 19일, 21일 그리고 25일째에 캘리버(caliber; Mitutoyo, Japan)로 측정하여, 종양체적은 (단축x장축^2)/2의 식으로 구하였다.

[0094] 도 3에 나타난 바와 같이 TC-1/HIF-1α 종양이 생체내 항암면역 내성을 획득함을 확인하였다.

[0095] **<실시예 9> 항산화제와 CD8+ 세포독성 T세포를 이용한 생체내 항암면역내성 무력화에 대한 조사**

[0096] TC-1 P3 A17을 C57BL/6 생쥐군(암컷, 5주령, n=5, 오리엔트바이오) 복부 표피에 $1X10^5$개씩 주입하고, 주입 7일째 E7특이적인 CD8+ T세포를 IL-2와 함께 정맥주사하여 면역하였다. 동시에 N-acetylcysteine을 매일 1g/kg을 매일 생쥐에 주입하여 종양체적을 종양세포 주입 7일, 10일, 13일, 15일, 16일, 19일, 21일 그리고 25일째에 캘리버(caliber; Mitutoyo, Japan)로 측정하여, 종양체적은 (단축x장축^2)/2의 식으로 구하였다.

[0097] 도 11에 나타난 바와 같이, NAC과 CTL을 동시에 처리한 생쥐에서 강력한 종양체적 감소를 확인하였다.

[0098] **<실시예 10> ROS의 형성에 대한 조사**

[0099] 미토콘드리아에서 생성된 ROS의 양을 분석하기 위해서, 5mM MitoSOX Red(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 TC-1 P0, TC-1 P3 A17, CaSki/SCT-E7, 그리고 HeLa/SCT-E7에 처리한 후 37도, 20분 배양하였다. 그리고 HBSS 용액으로 세척한 다음, 유세포 측정기를 이용하여서 세포내 생성된 ROS의 양을 측정하였다.

표 1

[0100] HIF-1α 특이적 siRNA

유전자	표적부위	siRNA 서열	
HIF-1a	410-236(생쥐)	센스	5`-CCAGATCTCGGCGAAGTAA-3`(서열번호 3)
		안티센스	3`-UUACUUCGCCGAGAUCUGG-5`(서열번호 4)
	2095-2115(인간)	센스	5`-CCUAUAUCCCAAUGGAUGAUG-3`(서열번호 5)
		안티센스	3`-CAUCAUCCAUUGGGAUAUAGG-5`(서열번호 6)

표 2

[0101] ATP5H 특이적 siRNA

유전자	표적부위	siRNA 서열	
ATP5H	252-274(생쥐)	센스	5`-AAUCUUCAGGGCAUUAUACUUCU-3`(서열번호 7)
		안티센스	3`-AAAGAAGUAUAAUGCCCUGAAGA-5`(서열번호 8)
	535-553(인간)	센스	5`-UAAUAAUUAUACAGUUAAA-3`(서열번호 9)
		안티센스	3`-UUUAACUGUAUAAUUAUUA-5`(서열번호 10)

표 3

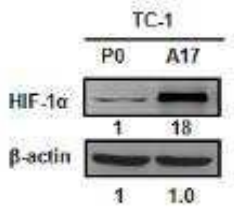
[0102] VEGF 특이적 siRNA

유전자	표적부위	siRNA 서열	
VEGF	1053-1072(생쥐)	센스	5`-CCCUGGCUUUACUGCUGUA-3`(서열번호 11)
		안티센스	5`-GGGACCGAAAUGACGUCAU-3`(서열번호 12)
	1028-1047(인간)	센스	5`-CCUCCGAAACCAUGAACUU-3`(서열번호 13)
		안티센스	5`-GGAGGCUUUGGUACUUCUU-3`(서열번호 14)

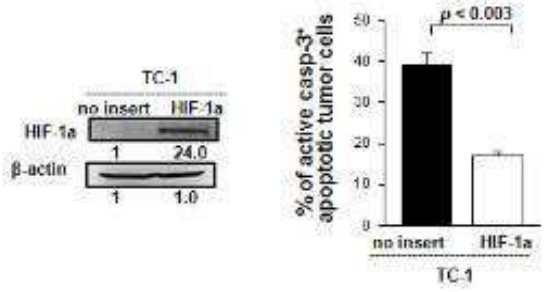
[0103] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

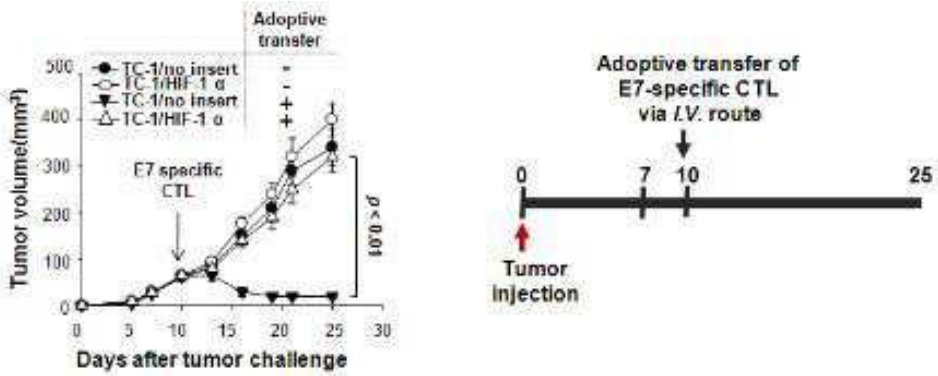
도면1



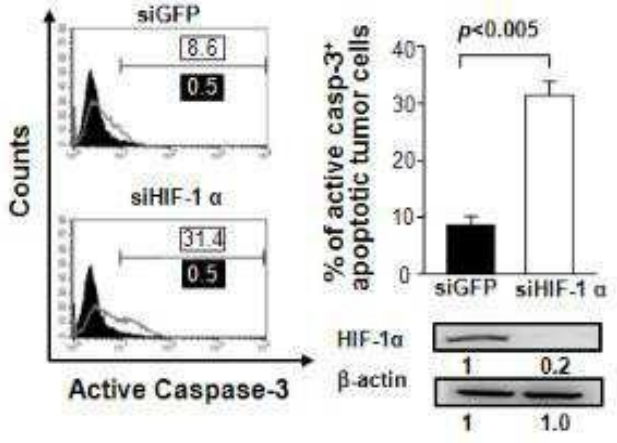
도면2


TC-1
no insert
HIF-1a
HIF-1a
1
24.0
β-actin
1
1.0
p < 0.003
% of active casp-3+ apoptotic tumor cells
no insert
HIF-1a
TC-1

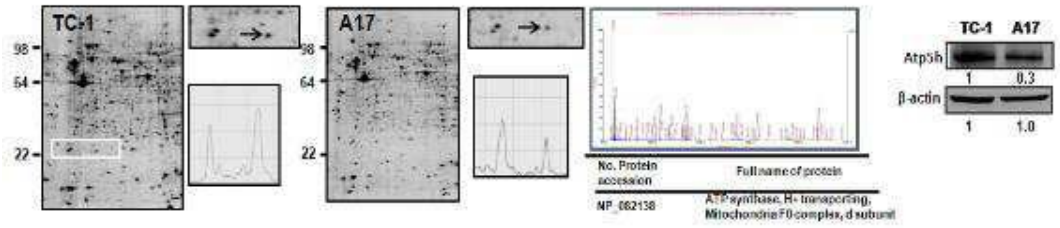
도면3


Adoptive transfer
TC-1/no insert
TC-1/HIF-1 α
TC-1/no insert
TC-1/HIF-1 α
E7 specific CTL
Tumor volume(mm³)
Days after tumor challenge
p < 0.01
Adoptive transfer of E7-specific CTL via I.V. route
0
7
10
25
Tumor injection

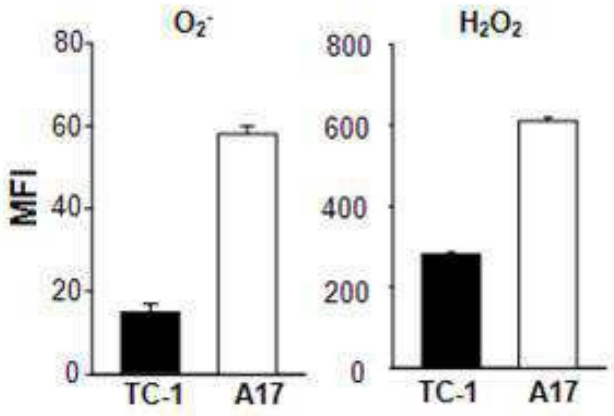
도면4


siGFP
8.6
0.5
siHIF-1 α
31.4
0.5
Counts
Active Caspase-3
p<0.005
% of active casp-3+ apoptotic tumor cells
siGFP
siHIF-1 α
HIF-1α
1
0.2
β-actin
1
1.0

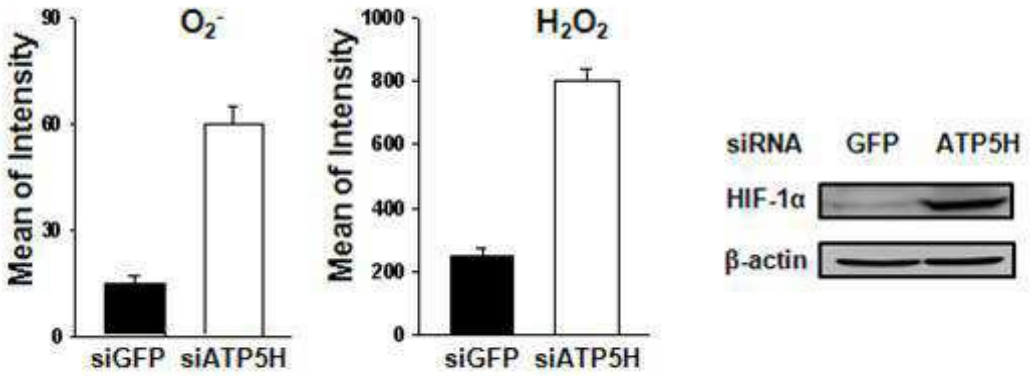
도면5


TC-1
A17
98
64
22
No. Protein accession
Full name of protein
NP_082138
ATP synthase, H+ transporting, Mitochondrial F0 complex, d subunit
TC-1 A17
Atp5h
1 0.3
β-actin
1 1.0

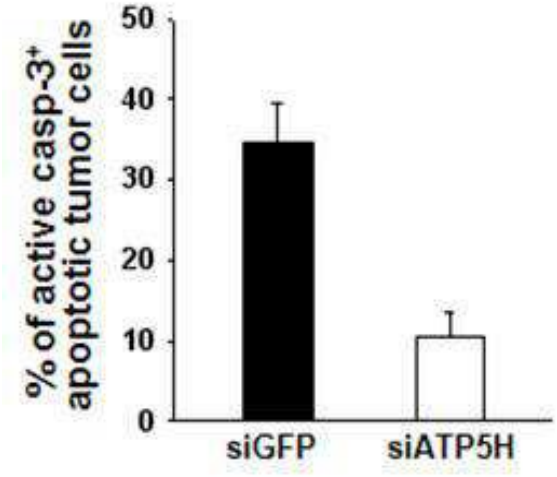
도면6


O2-
H2O2
MFI
80
60
40
20
0
800
600
400
200
0
TC-1
A17
TC-1
A17

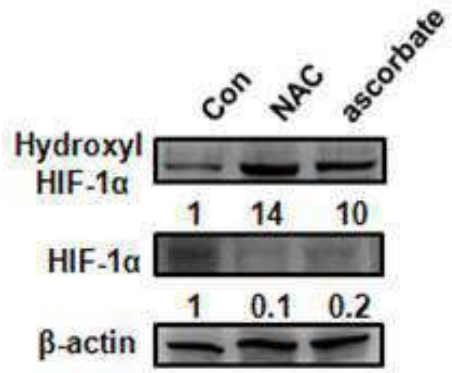
도면7


O2-
H2O2
Mean of Intensity
90
60
30
0
1000
800
600
400
200
0
siGFP
siATP5H
siGFP
siATP5H
siRNA
GFP
ATP5H
HIF-1α
β-actin

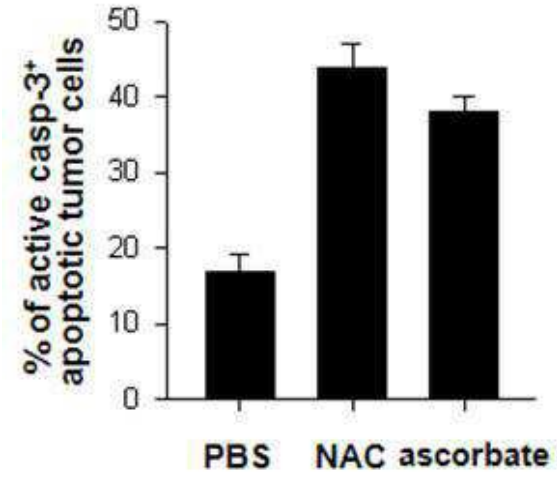
도면8


% of active casp-3+ apoptotic tumor cells
50
40
30
20
10
0
siGFP
siATP5H

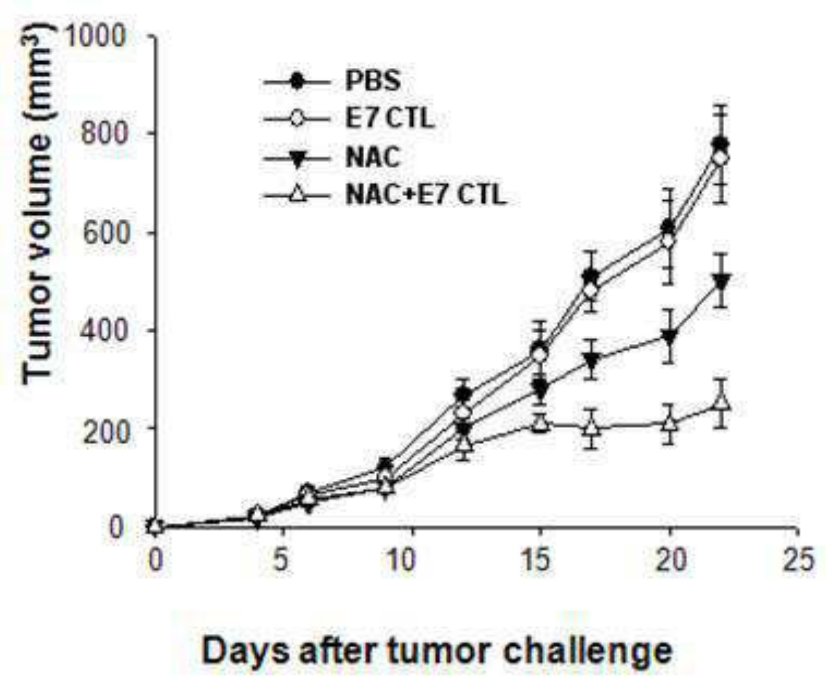
도면9


Con
NAC
ascorbate
Hydroxyl HIF-1α
1
14
10
HIF-1α
1
0.1
0.2
β-actin

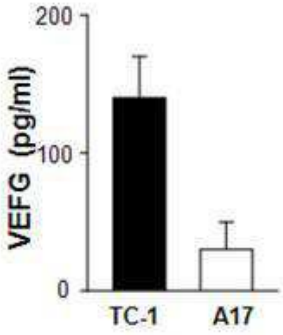
도면10


% of active casp-3+ apoptotic tumor cells
50
40
30
20
10
0
PBS
NAC
ascorbate

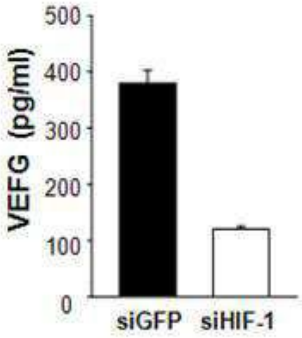
도면11



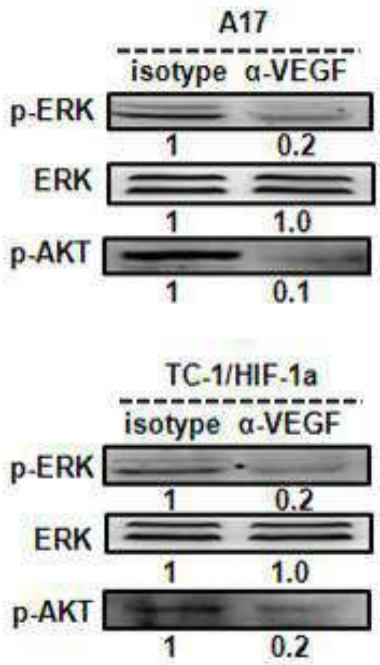
도면12



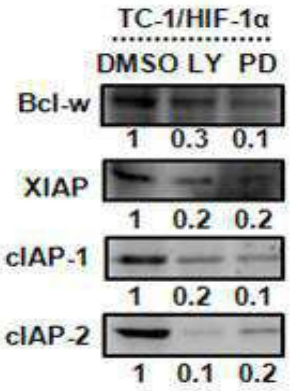
도면13



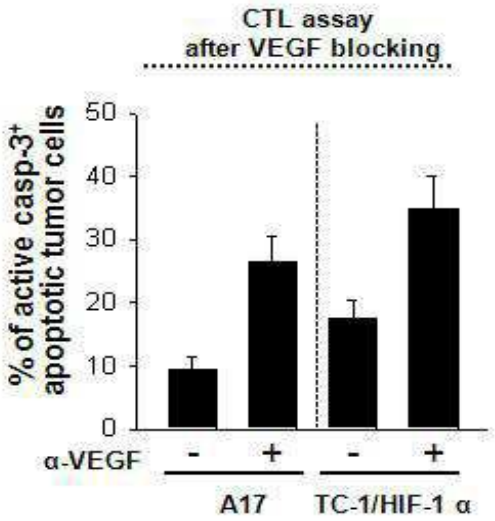
도면14


A17
isotype α-VEGF
p-ERK
1 0.2
ERK
1 1.0
p-AKT
1 0.1
TC-1/HIF-1a
isotype α-VEGF
p-ERK
1 0.2
ERK
1 1.0
p-AKT
1 0.2

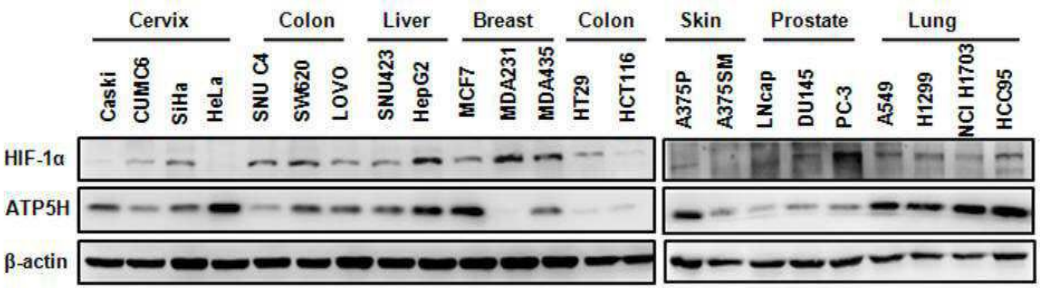
도면15


TC-1/HIF-1α
DMSO LY PD
Bcl-w
1 0.3 0.1
XIAP
1 0.2 0.2
cIAP-1
1 0.2 0.1
cIAP-2
1 0.1 0.2

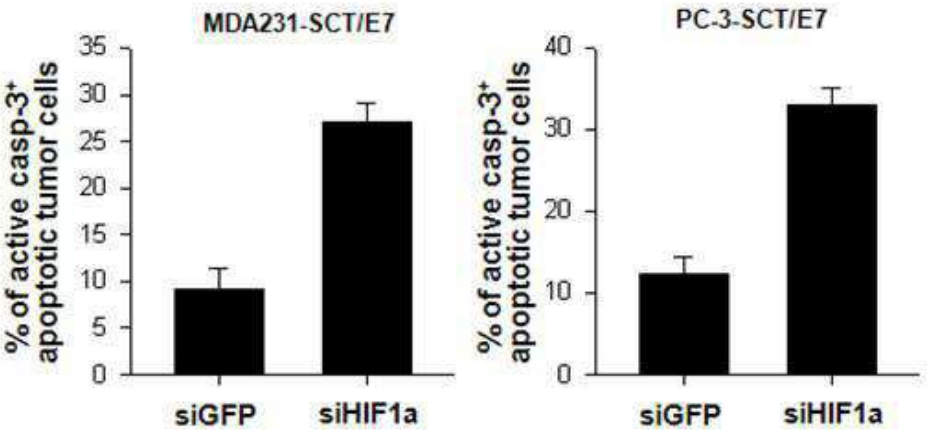
도면16



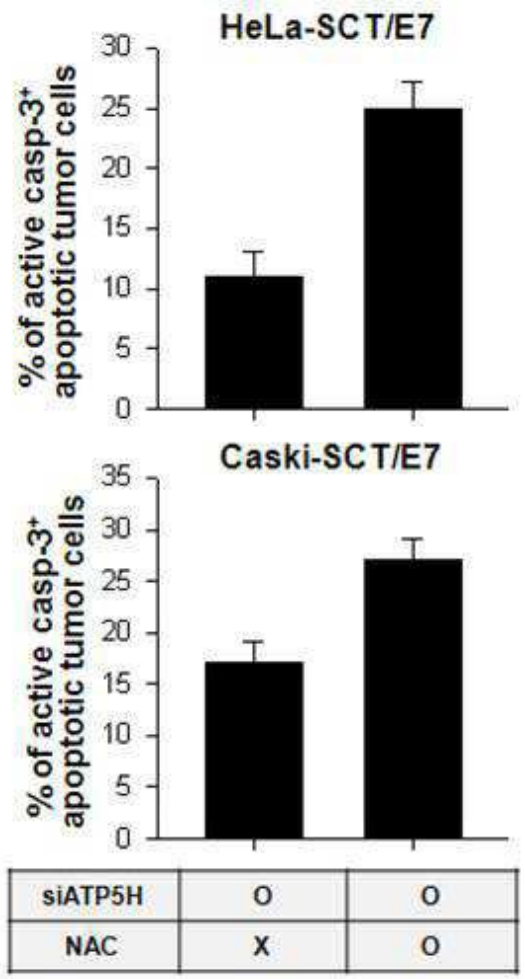
도면17



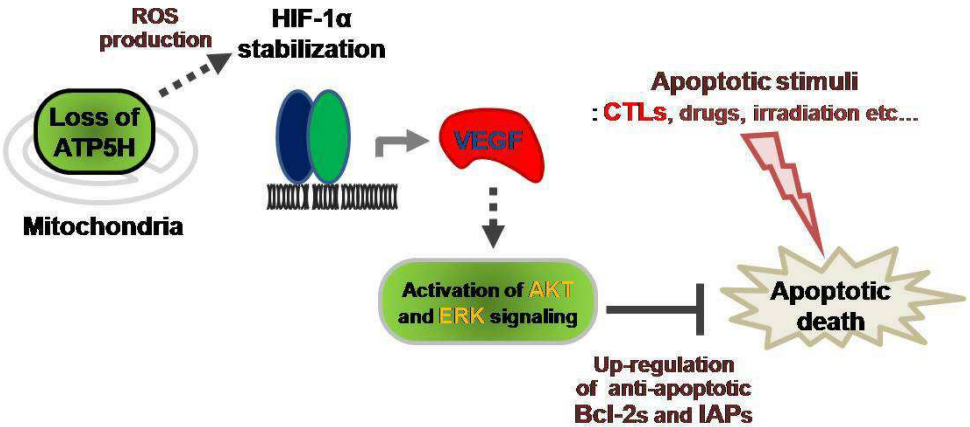
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Pharmaceutical composition comprising siRNA against HIF-1a and antioxidant for treating or prevention recurrent cancer or resistant cancer

<130> P11-121030-01

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2481

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400> 1

atggagggcg ccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60

aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120

gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcatc ttgataaggc ctctgtgatg 180

aggcttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga tttggatatt 240

gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt 300

atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360

ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420

catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480

caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgta ccctaactag ccgaggaaga 540

actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600

tatgatacca acagtaacca acctcagtgt gggtataaga aaccacctat gacctgcttg 660

gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720

actttcctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780

gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840

gctttggact ctgatcatct gaccaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900

accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960

gcaactgtca tatataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020

gttgtgagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaaac agaatgtgtc 1080

cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140

gaagatacaa gtagcctctt tgacaaactt aagaaggaac ctgatgcttt aactttgctg 1200

gccccagccg ctggagacac aatcatatct ttagattttg gcagcaacga cacagaaact 1260

gatgaccagc aacttgagga agtaccatta tataatgatg taatgctccc ctcacccaac 1320

gaaaaattac agaatataaa tttggcaatg tctccattac ccaccgctga aacgccaaag 1380

ccacttcgaa gtagtgctga ccctgcactc aatcaagaag ttgcattaaa attagaacca 1440

aatccagagt cactggaact ttcttttacc atgccccaga ttcaggatca gacacctagt 1500

ccttccgatg gaagcactag acaaagttca cctgagccta atagtcccag tgaatattgt 1560

ttttatgtgg atagtgatat ggtcaatgaa ttcaagttgg aattggtaga aaaacttttt 1620

gctgaagaca cagaagcaaa gaacccattt tctactcagg acacagattt agacttggag 1680

atgttagctc cctatatccc aatggatgat gacttccagt tacgttcctt cgatcagttg 1740

tcaccattag aaagcagttc cgcaagccct gaaagcgcaa gtcctcaaag cacagttaca 1800

gtattccagc agactcaaat acaagaacct actgctaatg ccaccactac cactgccacc 1860

actgatgaat taaaaacagt gacaaaagac cgtatggaag acattaaaat attgattgca 1920

tctccatctc ctacccacat acataaagaa actactagtg ccacatcatc accatataga 1980

gatactcaaa gtcggacagc ctcaccaaac agagcaggaa aaggagtcat agaacagaca 2040

gaaaaatctc atccaagaag ccctaacgtg ttatctgtcg ctttgagtca aagaactaca 2100

gttcctgagg aagaactaaa tccaaagata ctagctttgc agaatgctca gagaaagcga 2160

aaaatggaac atgatggttc acttttcaa gcagtaggaa ttggaacatt attacagcag 2220

ccagacgatc atgcagctac tacatcactt tcttggaaac gtgtaaaagg atgcaaatct 2280

agtgaacaga atggaatgga gcaaaagaca attattttaa taccctctga tttagcatgt 2340

agactgctgg ggcaatcaat ggatgaaagt ggattaccac agctgaccag ttatgattgt 2400

gaagttaatg ctcctataca aggcagcaga aacctactgc agggtgaaga attactcaga 2460

gctttggatc aagttaactg a 2481

<210> 2

<211> 826

<212> PRT

<213> Homo sapience

<400> 2

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu

1 5 10 15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys

20 25 30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His

35 40 45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile

50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
65 70 75 80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
85 90 95
Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
100 105 110
Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
115 120 125
Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
130 135 140
Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu

145 150 155 160
Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
165 170 175
Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
180 185 190
His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
195 200 205
Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
210 215 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225 230 235 240
Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
245 250 255
Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
260 265 270
Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
275 280 285
Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln

290 295 300
Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln

305 310 315 320

Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val

325 330 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe

340 345 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp

355 360 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser

370 375 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu

385 390 395 400

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn

405 410 415

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn

420 425 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu

435 440 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser

450 455 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro

465 470 475 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp

485 490 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu

500 505 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val

515 520 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr

530 535 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu

545 550 555 560

Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser

565 570 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser

580 585 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln

595 600 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu

610 615 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala

625 630 635 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser

645 650 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala

660 665 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro

675 680 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu

690 695 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg

705 710 715 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr

725 730 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp

740 745 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln

755 760 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly

770 775 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys

785 790 795 800

Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu

805 810 815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn

820 825

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> HIF-1a siRNA

<400> 3

ccagatctcg gcgaagtaa 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> HIF-1a siRNA

<400> 4

uuacuucgcc gagaucugg 19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> HIF-1a siRNA

<400> 5

ccuauauccc aauggaugau g 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> HIF-1a siRNA

<400> 6

caucauccau ugggauauag g 21

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> ATP5H siRNA

<400> 7

aaucuucagg gcauuauacu ucu 23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> ATP5H siRNA

<400> 8

aaagaaguau aaugcccuga aga 23

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> ATP5H siRNA

<400> 9

uaauaauuau acaguuaaa 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> ATP5H siRNA

<400> 10

uuuaacugua uaauuauua 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> VEGF siRNA

<400> 11

cccuggcuuu acugcugua 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> VEGF siRNA

<400> 12

gggaccgaaa ugacgucau 19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> VEGF siRNA

<400> 13

ccuccgaaac caugaacuu 19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> VEGF siRNA

<400> 14

ggaggcuuug guacuucuu 19