



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0103627
(43) 공개일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) A61K 31/7004 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

A61K 31/7004 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0030837

(22) 출원일자 2017년03월10일

심사청구일자 2017년03월10일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

김상윤

서울특별시 송파구 올림픽로 212, B-2701호(잠실동, 갤러리아팰리스)

김승후

서울특별시 송파구 오금로31길 28, 103동 1312호(방이동, 코오롱아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

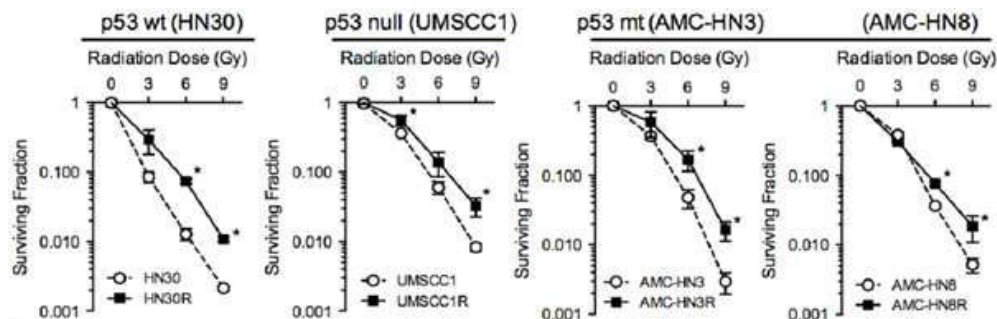
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 방사선 치료후 재발암의 치료를 위한 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2013.01)
G01N 2333/4748 (2013.01)
G01N 2800/54 (2013.01)

(72) 발명자

장효원

경기도 수원시 장안구 정자로41번길 12, 756동
 1803호(천천동, 비단마을 신명아파트)

이혜민

경기도 고양시 덕양구 마상로57번길 114, 103동
 803호(주교동, 우인아크리움빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A01003050

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 암 대사 불균일성에 대한 기전 규명 및 치료표적인자 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 전체 또는 일부의 결실, 치환, 또는 삽입에 의한 p53 단백질 활성의 저해를 포함하는 것으로서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는

- 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체가 결실된 (p53 null) 것;
- 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 것;
- 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 것; 또는
- 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환되고 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암세포는 두경부암, 또는 상부 호흡기계 또는 상부 소화기계에서 발병한 편평상피세포암인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 당대사 표적약물은 해당과정 (Glycolysis)을 억제하는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 당대사 표적약물은 2-Deoxy-D-glucose (2-DG), 또는 (R)-1,1',6,6',7,7'-Hexahydroxy-3,3'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-[2,2'-binaphthalene]-8,8'-dicarboxaldehyde (AT101)인 것인, 방법.

청구항 7

당대사 표적약물을 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 방사선 치료 저항성 재발암은 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 포함하는 것인, 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 전체 또는 일부의 결실, 치환, 또는 삽입에 의한 p53의 활성의 저해를 포함하는 것으로서, 상기 p53의 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는

- 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체가 결실된 (p53 null) 것;
- 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 것;
- 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 것; 또는
- 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환되고 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 것인, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 암은 두경부암, 또는 상부 호흡기계 또는 상부 소화기계에서 발병한 편평상피세포암인, 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 당대사 표적약물은 해당과정 (Glycolysis)을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 당대사 표적약물은 2-Deoxy-D-glucose (2-DG), 또는 (R)-1,1',6,6',7,7'-Hexahydroxy-3,3'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-[2,2'-binaphthalene]-8,8'-dicarboxaldehyde (AT101)인 것인, 조성물.

청구항 13

p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제는 p53 단백질 또는 상기 p53 단백질을 암호화하는 단백질과 상호작용하는 물질인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제는 p53 단백질에 특이적으로 결합하는 소분자 화학물질 (chemical, small molecule), 단백질, 펩타이드, 핵산 분자 (폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 등), 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 p53 단백질을 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질은 p53 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 압타머, 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 전체 또는 일부의 결실, 치환, 또는 삽입에 의한 p53의 활성의 저해를 포함하는 것으로서, 상기 p53의 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것인, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는

- 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 전체가 결실된 것 (p53 null),
 - 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신이 결실된 것,
 - 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 것, 또는
 - 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서, 293번째 아미노산인 글리신이 결실되고 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 것
- 인, 조성물.

청구항 19

p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 포함하는 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 진단키트.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는

- 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 전체가 결실된 것 (p53 null),
 - 2) 서열번호1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인글리신이 결실된 것,
 - 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 것, 또는
 - 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서, 293번째 아미노산인 글리신이 결실되고 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 것
- 인, 진단키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전 세계적으로 가장 치명적인 질병으로 국내에선 사망원인 1위를 차지하며, 외과수술, 약물치료 (항암화학요법, 표적약물치료), 방사선치료, 면역치료 등 새로운 치료 기술들이 비약적으로 발전함에도 불구하고, 암 사망률은 크게 줄지 않고 있다. 특히 방사선 치료는 curative 또는 adjuvant 목적으로 시행되며, 두경부암 환자를 대상으로 기관보존 (organ preservation)과 기능 보존을 위하여 중요한 치료법으로 부각되고 있다.

[0003] 악성 종양에 대해서 방사선 치료시, 생존한 종양이 방사선 저항성을 획득하는 것이 암치료 실패 및 재발암의 주요 원인으로 알려져 있으며, 게다가 재발암의 치료 방법은 매우 제한적이므로 재발암에 대한 치료 향상을 위해서는 상기 방사선 저항성 획득을 감소시키기 위해서 방사선 저항성 기전에 대한 연구가 필수적이라고 할 수 있다.

[0004] 그러나, 현재까지는 방사선 치료후 재발암의 경우 재발암에 대한 구제 수술 (salvage surgery)이 가능한 경우 암에 대한 치료를 기대할 수 있으나, 대부분의 경우 수술적 치료와 방사선 치료가 불가능한 상태에서 재발암이 진단되므로 보조적인 치료 방법인 병합항암화학요법, 표적약물치료, 최근에는 면역치료를 시행하여 재발암 환자

의 생존 기간을 연장하는 방법만이 가능할 뿐이었다.

[0005] 또한, 상기 방사선 치료후 재발암에서 시행되는 병합항암화학요법을 사용하는 경우에도, docetaxel, cisplatin, 및 5-fluorouracil의 세가지 약물의 병합치료를 시행할 수 있으나 약물 부작용인 독성으로 인하여 그 사용이 제한적인 문제가 있었다.

[0006] 이상과 같이, 현재까지는 방사선 치료후 재발암에 대한 치료 방법은 극히 제한적이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제점을 해결하여 방사선 치료 후 재발암을 치료하기 위해서, 본 발명자들은 방사선 치료 후 재발암에서 p53 유전자 돌연변이의 확인을 통한 표적치료 방법을 제공하는 기술을 개발하였다. 이와 같은 기술을 통해서 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공할 수 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이의 확인을 통한 방사선 재발암의 표적치료 방법의 제공은 방사선 치료 내성을 극복하는 새로운 대사 특이적 치료법과 약물개발에 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일례는 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 방사선 치료 저항성 재발암 치료의 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 다른 측면은, 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자를 확인 (또는 진단)하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기 확인하는 단계 이전에 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포를 준비하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0010] 다른 구현예로, 당대사 표적약물을 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 방사선 치료 저항성 재발암은 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 포함하는 것인, 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0011] 다른 구현예로, p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인용 조성물 및 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 포함하는 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 진단키트에 관한 것이다.

[0012] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0013] 본 발명은 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0014] 상기 방법은 상기 확인하는 단계 이전에 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포를 준비하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0015] 상기 'p53'은 암 억제 단백질로 인간은 TP53 유전자로 암호화 되어 있고, 사람의 p53유전자는 17번염색체 단완 (17p13.1)에 존재한다. p53은 다세포 생물의 세포 주기에서 암 억제자로서 암을 예방는 중요한 기능을 한다. 유전체의 돌연변이를 예방하여 유전체의 안정성을 보존하는 역할을 하기에 p53은 "유전체의 수호자"라고 불리기도 한다. p53의 이름은 분자량에서 유래한 것이다. SDS-PAGE에서 53,000 달톤 정도의 분자량을 보여준다. 그러나 아미노산 잔기들을 기초로 하여 계산해보면 p53의 질량은 단지 43,700 달톤 정도밖에 나오지 않는다. 이 차이는 단백질에 많은 수의 프롤린 잔기 때문인데, 이 때문에 SDS-PAGE에서 느린 진행 때문에 실제의 질량보다 더 무겁게 나온다. 이 현상은 사람, 설치류, 개구리, 그리고 어류를 포함하여 다양한 종류에서 관찰된다. G1기가 끝날 무렵, p53유전자에 의해 생성된 단백질은 세포의 DNA가 손상을 입었는지 점검한다. DNA가 건강하다면 p53은 세포분열을 진행시키고, 손상된 DNA를 발견할 경우에는 DNA를 활성화시켜 수선하기위한 다른 단백질의 발현을 유도한다. 만약 손상이 수선하기에 너무 치명적이면 p53단백질은 세포가 스스로 파괴되도록 유도한다. 이를 세포사멸 (apoptosis)라고 부른다. 상기 세포사멸은 손상된 유전 정보를 가진 세포를 제거하는

역할을 수행한다. 다른 건강한 세포는 손상된 세포를 대체하기 위해 세포분열을 촉진한다.

- [0016] 만약 p53 유전자 서열의 돌연변이에 의해 p53 단백질이 정상적으로 작동하지 못한다면 손상을 입은 p53 DNA를 가진 세포는 세포분열을 진행할 수 있게 된다. 이러한 손상된 세포가 계속 분열을 할수록 손상된 DNA를 감지할 능력이 없으므로 더 많은 돌연변이를 낳게 된다. 이와 같은 돌연변이는 암을 유발한다. 인체에서 발생하는 암의 약 50%이상에서 p53 유전자 서열의 돌연변이가 관찰된다.
- [0017] 또한, p53은 에너지 대사작용 및 산화적 스트레스를 조절함을 통해서 세포의 대사를 조절하는 역할을 함이 알려져 있다. p53은 암세포의 당대사 과정 중 glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP), mitochondrial oxidation phosphorylation, 및 지방 대사 (lipid metabolism) 과정 등을 조절하는 핵심 단백질임이 보고되었다.
- [0018] p53에 의한 DNA 손상 복구 기전의 하나로, TIGAR (TP-53-induced glycolysis and apoptosis regulator)의 발현을 증가시켜 glycolysis 또는 당대사를 억제하고 G6P (glucose-6-phosphate)가 PPP 과정을 통해 산화되게 함으로써 손상 DNA 복구에 필요한 핵산 합성의 재료인 리보스와 NADPH의 생산을 유도하는 것이 알려져 있다.
- [0019] 그 외 p53은 PGM (phosphoglycerate mutase), GLUT1/4 (glucose transporter-1/4), hexokinase, SCO2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2), AIF (apoptosis-inducing factor), GLS2 (glutaminase 2), 및 G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase)와 같은 metabolic effector들을 조절하여 미토콘드리아의 산화적 인산화와 지방산 대사를 증가시키는 반면 글루코스 흡수 및 해당과정은 억제하고 세포내 글루타민의 흡수와 산화는 촉진시키는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 상기 p53 단백질은 인간 (Homo sapiens) 등을 포함하는 영장류, 마우스 (Mus musculus), 래트 (Rattus norvegicus) 등을 포함하는 설치류 등의 포유류, 개구리 (Xenopus laevis) 등의 양서류 등으로부터 유래한 것일 수 있다. 예컨대, p53은 인간 p53 (예컨대, NP_000537.3. (유전자: NM_000546.5.) 등), 마우스 p53 (예컨대, NP_001120705.1. (유전자: NM_001127233.1.) 등), 래트 p53 (예컨대, NP_112251.2. (유전자: NM_030989.3.) 등), 초파리 (예컨대 NP_001163694.1. (유전자: NM_001170223.1.) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 '돌연변이'는 긴 사슬형의 디옥시리보핵산 (DNA) 분자에 있는 유전자에서 자연발생적으로, 또는 전자기 방사선이나 화학물질 등과 같은 외부요인으로 발생하는 것으로, DNA에 존재하는 뉴클레오타이드의 결실, 치환, 또는 삽입에 의해서 발생한다. 유성생식하는 사람 또는 다른 동물들의 돌연변이 형태는 체세포 돌연변이와 생식세포 돌연변이로 나뉜다. 체세포 돌연변이는 생식세포 외의 몸을 구성하는 세포들에서 일어나며, 신체의 국부적 변화를 초래한다. 돌연변이가 일어난 체세포로부터 분열된 세포는 돌연변이를 갖고 있지만 자손에게 전달되지는 않는다. 생식세포 돌연변이는 생식세포, 즉 난자나 정자의 유전물질에 돌연변이가 일어나기 때문에 자손에게 전달될 수 있다. 생식세포 돌연변이가 개체를 변화시킬 때 일반적으로 그 효과는 치명적이다. 많은 종류의 유전병이 생식세포 돌연변이 때문에 발생한다.
- [0022] 상기 결실은 유전자에 뉴클레오타이드 쌍이 소실되는 현상이다. 뉴클레오타이드가 소실되면 읽기틀 (frame shift)이 변화되므로 치명적인 영향을 미치는 경우가 많다. 소실되는 뉴클레오타이드 쌍의 수가 3의 배수가 아니면 읽기틀이 이동되어 비정상적인 코돈이 형성되므로 광범위한 아미노산 서열의 변화가 발생하며, 정상보다 짧게 종결되는 경우가 많다.
- [0023] 상기 치환은 한 뉴클레오타이드 쌍이 다른 쌍의 뉴클레오타이드로 바뀌는 것이다. 코돈의 융통성으로 인해 치환이 되어도 암호화된 단백질에 영향을 미치지 않는 경우도 있다. 치환으로 발생한 대표적인 질환으로 낫 모양 적혈구 빈혈증이 있는데, 염기 한 쌍이 치환되어 헤모글로빈을 구성하는 아미노산 중 글루탐산이 발린으로 되고, 결과적으로 낫 모양 적혈구가 형성되는 것이다. 아미노산 서열에 변화가 없는 경우를 중립 돌연변이라고 하며, 대부분은 다른 아미노산으로 변경되는 미스센스 (missense) 돌연변이이고, 돌연변이의 결과 아미노산을 암호화하는 코돈이 종결 코돈으로 바뀌는 난센스 (nonsense) 돌연변이 등이 있다.
- [0024] 상기 삽입은 유전자에 뉴클레오타이드 쌍이 추가되는 현상이다. 읽기틀 (frame shift)이 변화되므로 치명적인 영향을 미치는 경우가 많다. 삽입되는 뉴클레오타이드 쌍의 수가 3의 배수가 아니면 읽기틀이 이동되어 비정상적인 코돈이 이용되므로 광범위한 아미노산 서열의 변화가 발생하며, 정상보다 짧게 종결되는 경우가 많다.
- [0025] 상기 '방사선 조사'란 암세포의 DNA 손상을 통하여 세포분열을 억제하여 세포사멸을 유도하는 기전을 통하여 고형암의 근치적 (curative), 보조적 (adjuvant), 고식적 (palliative) 목적으로 단독 또는 수술적 치료와 함께, 항암화학요법이나 방사선 민감제 (radiation sensitizer)와의 병합요법으로 50-60%이상의 암 환자에게 시행되는

중요한 치료방법이다.

- [0026] 상기 '방사선 치료 저항성 재발암'이란 방사선 치료 동안 암세포의 재증식(repopulation)과 유전자 돌연변이를 통하여 방사선 치료 이후에도 손상된 DNA를 포함한 세포분열이 지속되어 방사선에 대한 저항성 획득하여, 방사선 치료후 재발하는 모든 암을 칭하는 것이다.
- [0027] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 1에 기재되어 있고, p53 단백질의 염기서열은 서열번호 2에 기재되어 있다.
- [0028] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는 p53 유전자의 전체 또는 일부의 결실, 치환, 또는 삽입에 의한 p53 단백질 활성의 저해를 포함하는 것으로서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것 일수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 상기 p53 단백질 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것의 의미는 정상적인 세포는 방사선 조사에 의해서 유발된 세포 손상에 반응하여 미토콘드리아 항상성 유지에 관여하는 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현이되지만, p53 단백질 활성이 저해된 세포는 방사선 조사에 의해서 유발된 세포 손상에 반응하여 미토콘드리아 항상성 유지에 관여하는 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현이 되지 못하는 것을 의미할 수 있다.
- [0030] 상기 Parkin의 활성화는 Parkin Ser54의 인산화를 통해 확인할 수 있고, Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현의 측정은 통상적으로 단백질의 인산화 또는 발현을 측정하는 방법으로 수행이 가능할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 p53 단백질 활성의 저해는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체 결실 (p53 null), 또는 일부 결실, p53 유전자 중 DNA-binding domain의 치환 (p53 mutant)된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 일 구체예에서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 다음과 같은 p53 아미노산 서열 또는 유전자의 돌연변이에 의해 유도될 수 있다:
- [0033] 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체가 결실된 돌연변이 (p53 null);
- [0034] 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이;
- [0035] 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 돌연변이; 또는
- [0036] 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환되고 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다._
- [0037] 상기 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이는 293번째 아미노산인 글리신을 암호화하는 뉴클레오타이드 중 한 개가 결실되어 293번째 아미노산인 글리신 이후의 아미노산이 번역되지 않는 것일 수 있으며, 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 393번째 아미노산인 아스파르트산까지 발현이 되지 않는 것 또는 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 1번째 아미노산부터 292번째 아미노산까지 발현되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 p53 유전자 서열의 돌연변이 확인은 p53 유전자 염기서열 분석법을 통해 확인 할 수 있다.
- [0039] 상기 암세포는 두경부암, 또는 상부 호흡기계 또는 상부 소화기계에서 발병한 편평상피세포암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 상부 호흡기계는 코에서 기관까지 이르는 부위를 지칭하는 것으로서, 예를 들면 코, 부비동, 비인두, 구강, 구인두, 하인두, 또는 후두를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 상부 소화기계는 입에서 식도까지 이르는 부위를 지칭하는 것으로서, 예를 들면 구강, 구인두, 하인두, 또는 식도를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계는 p53 단백질의 아미노산 서열

또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 사용하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0043] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제는 방사선 조사후 생존한 암세포 시료에 적용되는 것일 수 있으며, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제는 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질) 및/또는 상기 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질)을 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질일 수 있다.
- [0044] 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 야생형 p53 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질인 경우, 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되는 단백질 또는 유전자는 돌연변이를 갖지 않는 것일 수 있으며, 반면 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되지 않는 경우 돌연변이를 갖는 것으로 확인할 수 있다.
- [0045] 반면, 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 p53 단백질 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 유전자 서열의 돌연변이와 상호작용하는 물질인 경우, 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되는 단백질 또는 유전자는 돌연변이를 갖는 것일 수 있으며, 반면 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되지 않는 경우 돌연변이를 갖지 않는 것으로 확인할 수 있다.
- [0046] 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 야생형 p53 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질인 경우 이를 사용하여 검출되지 않는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이가 존재하는 환자를 선별할 수 있고, 상기 환자는 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자로 확인할 수 있다.
- [0047] 반면, 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 p53 단백질 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 유전자 서열의 돌연변이와 상호작용하는 물질인 경우 이를 사용하여 검출되는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이가 존재하는 환자를 선별할 수 있고, 상기 환자는 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자로 확인할 수 있다.
- [0048] 상기 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에서 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이가 검출된 환자는 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자라고 확인할 수 있고, 따라서 이를 치료하기 위해서 당대사 표적약물을 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 반면, 상기 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에서 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열이 야생형인 환자는 당대사 표적약물 투여에 적합하지 않은 방사선 치료 저항성 재발암 환자라고 확인할 수 있고, 따라서 이를 치료하기 위해서 당대사 표적약물을 처리하지 않을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 또한, 본 발명은 당대사 표적약물을 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 방사선 치료 저항성 재발암은 p53 단백질 또는 유전자의 돌연변이를 포함하는 것인, 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 상기 당대사 표적약물을 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물은 p53 단백질 또는 유전자의 돌연변이를 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암 환자에 대하여 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료를 위한 목적 및/또는 용도로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 당대사 표적약물을 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암의 예방 또는 치료용 조성물을 방사선 치료 저항성 재발암 환자에 사용하기 위해서 p53 단백질 또는 유전자의 돌연변이를 포함하는 방사선 치료 저항성 재발암 환자를 확인하는 방법은 상기 기재된 방법과 동일한 방법일 수 있다.
- [0053] 상기 당대사는 암세포의 당대사를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 '암세포의 당대사'는 대부분의 정상 조직 세포와 달리 암 세포에서 특징적으로 나타나는 세포 대사 경로로 암세포가 빠르게 성장하기 위해 미토콘드리아를 통해 TCA cycle을 돌리는게 아니라, 증식에 필요한 biomass (protein, lipid, nucleic acid들)를 만들기 위해 glycolysis 의존적으로 ATP를 생성하는 것을 의미한다.
- [0055] 상기 당대사 표적약물은 해당과정 (Glycolysis)을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 상기 '표적약물'은 암의 대사과정 중 해당과정에 속하는 특정 위치의 대사경로를 막음으로써 암의 증식을 억제시키는 것이다.

- [0057] 상기 당대사 표적약물은 2-Deoxy-D-glucose (2-DG), 또는 (R)-1,1',6,6',7,7'-Hexahydroxy-3,3'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-[2,2'-binaphthalene]-8,8'-dicarboxaldehyde (AT101)이거나 암의 대사과정 중 해당 과정에 속하는 특정 위치의 대사경로를 막음으로써 암의 증식을 억제시키는 효과가 있는 약물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는 p53 유전자의 전체 또는 일부의 결실, 치환, 또는 삽입에 의한 p53 단백질 활성의 저해를 포함하는 것으로서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것 일수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 상기 p53 단백질 활성의 저해는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체 결실 (p53 null), 또는 일부 결실, p53 유전자 중 DNA-binding domain의 치환 (p53 mutant)된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 일 구체예에서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 다음과 같은 p53 아미노산 서열 또는 유전자의 돌연변이에 의해 유도될 수 있다:
- [0061] 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체가 결실된 돌연변이 (p53 null);
- [0062] 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이;
- [0063] 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 돌연변이; 또는
- [0064] 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환되고 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 상기 p53 유전자 서열의 전체 결실 (p53 null), 또는 일부 결실, p53 유전자 중 DNA-binding domain의 치환 (p53 mutant)된 경우, 해당 세포는 방사선 조사에 의한 p53 단백질의 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 상기 암은 두경부암, 또는 상부 호흡기계 또는 상부 소화기계에서 발병한 편평상피세포암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 상부 호흡기계는 코에서 기관까지 이르는 부위를 지칭하는 것으로서, 예를 들면 코, 부비동, 비인두, 구강, 구인두, 하인두, 후두를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 상부 소화기계는 입에서 식도까지 이르는 부위를 지칭하는 것으로서, 예를 들면 구강, 구인두, 하인두, 또는 식도를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 상기 당대사 표적약물은 해당과정 (Glycolysis)을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 상기 당대사 표적약물은 2-Deoxy-D-glucose (2-DG), 또는 (R)-1,1',6,6',7,7'-Hexahydroxy-3,3'-dimethyl-5,5'-bis(1-methylethyl)-[2,2'-binaphthalene]-8,8'-dicarboxaldehyde (AT101)이거나 암의 대사과정 중 해당 과정에 속하는 특정 위치의 대사경로를 막음으로써 암의 증식을 억제시키는 효과가 있는 약물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 또한, 본 발명은 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인(또는 진단)용 조성물에 관한 것이다.
- [0072] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제는 방사선 조사후 생존한 암세포 치료에 적용되는 것일 수 있으며, 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제는 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질) 및/또는 상기 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질)을 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질일 수 있다.
- [0073] 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 야생형 p53 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질인 경우, 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되는 단백질 또는 유전자는 돌연변이를 갖지 않는 것일 수 있으며, 반면, 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되지 않는 경우 돌연변이를 갖는 것으로 확인할 수 있다.

- [0074] 반면, 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 p53 단백질 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 유전자 서열의 돌연변이와 상호작용하는 물질인 경우, 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되는 단백질 또는 유전자는 돌연변이를 갖는 것일 수 있으며, 반면, 상기 상호작용하는 물질에 의하여 검출되지 않는 경우 돌연변이를 갖지 않는 것으로 확인할 수 있다.
- [0075] 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 야생형 p53 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질인 경우 이를 사용하여 검출되지 않는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이가 존재하는 환자를 선별할 수 있고, 상기 환자는 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자라고 판단할 수 있고, 따라서 이를 치료하기 위해서 당대사 표적약물을 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 반면, 상기 돌연변이를 검출하기 위한 제제가 p53 단백질 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 유전자 서열의 돌연변이와 상호작용하는 물질인 경우 이를 사용하여 검출되는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이가 존재하는 환자를 선별할 수 있고, 상기 환자는 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자라고 판단할 수 있고, 따라서 이를 치료하기 위해서 당대사 표적약물을 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 상기 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질)과 상호작용하는 물질은 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질)에 특이적으로 결합하는 소분자 화합물 (chemical, small molecule), 단백질, 펩타이드, 핵산 분자 (폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 등), 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 상기 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질)을 암호화하는 유전자와 상호작용하는 물질은 p53 단백질 (예컨대, 야생형 또는 돌연변이된 p53 단백질)을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 압타머 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] p53 단백질을 및/또는 p53 단백질을 암호화하는 유전자의 돌연변이 여부는 상기 단백질 또는 유전자와 상호작용하는 물질을 이용하는 통상적인 모든 단백질 또는 유전자 분석 방법에 의하여 측정될 수 있으며, 예컨대 p53 단백질을 암호화하는 유전자와 혼성화 가능한 프라이머, 프로브, 또는 압타머를 사용하는 통상적인 유전자 분석 방법, 예컨대, 폴리머레이즈 연쇄 반응법 (PCR; 예컨대 qPCR, real-time PCR 등), FISH (Fluorescent in situ hybridization), 마이크로어레이법, 등을 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 상기 프라이머는 p53 단백질을 암호화 하는 유전자 (전장 DNA, cDNA, 또는 mRNA)의 염기서열 중 연속하는 5 내지 1000 bp 예컨대 10 내지 500 bp, 20 내지 200 bp, 또는 50 내지 200 bp의 유전자 단편을 검출할 수 있는 것으로, 상기 유전자 단편의 3'-말단 및 5'-말단 각각의 연속하는 5 내지 100 bp, 예컨대, 5 내지 50 bp, 5 내지 30 bp, 또는 10 내지 25 bp 부위와 혼성화 가능한 (예컨대, 상보적인) 염기서열을 포함하는 프라이머쌍일 수 있다. 상기 프로브 또는 압타머는 총 길이가 5 내지 100 bp, 5 내지 50 bp, 5 내지 30 bp, 또는 5 내지 25 bp인 것일 수 있으며, p53 단백질을 암호화 하는 유전자 (전장 DNA, cDNA, 또는 mRNA)의 염기서열 중 연속하는 5 내지 100 bp, 5 내지 50 bp, 5 내지 30 bp, 또는 5 내지 25 bp의 유전자 단편과 결합 가능 또는 혼성화 가능한 (예컨대, 상보적) 염기서열을 갖는 것일 수 있으며, 상기 프로브 또는 압타머가 결합 가능 또는 혼성화 가능한 위치는 p53 단백질을 암호화 하는 유전자의 돌연변이된 위치를 포함하는 부위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 상기 '결합 가능'하다 함은 상기 유전자 부위와 공유결합 등의 화학적 및/또는 물리적 결합에 의하여 결합할 수 있음을 의미할 수 있고, 상기 '혼성화 가능'하다 함은 상기 유전자 부위의 염기서열과 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 상보성을 가짐으로써 상보적 결합이 가능함을 의미할 수 있다.
- [0082] 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는 p53 유전자의 전체 또는 일부의 결실, 치환, 또는 삽입에 의한 p53 단백질 활성의 저해를 포함하는 것으로서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 방사선 조사에 의한 Parkin의 활성화 또는 Bnip3의 발현을 유도하지 못하는 것 일수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 상기 p53 단백질 활성의 저해는 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체 결실 (p53 null), 또는 일부 결실, p53 유전자 중 DNA-binding domain의 치환 (p53 mutant)된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0084] 일 구체예에서, 상기 p53 단백질 활성의 저해는 다음과 같은 p53 아미노산 서열 또는 유전자의 돌연변이에 의해 유도될 수 있다:
- [0085] 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체가 결실된 돌연변이 (p53 null);
- [0086] 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이;
- [0087] 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 돌연변이; 또는
- [0088] 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환되고 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] 또한, 본 발명은 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 제제를 포함하는 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 검출하기 위한 진단키트에 관한 것이다.
- [0090] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 p53 단백질을 암호화하는 유전자 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 상보적인 올리고뉴클레오타이드가 집적된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 아미노산 서열 또는 유전자의 돌연변이를 검출하기 위한 진단용 마이크로어레이를 제공하는 것일 수 있으며, 상기 집적된 올리고뉴클레오타이드는 p53 유전자 서열의 돌연변이와 결합 가능 또는 혼성화 가능한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 상보가닥 분자는 상기 바이오마커 유전자의 15 내지 50개, 바람직하게는 15 내지 30개, 더욱 바람직하게는 18 내지 25개의 핵산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 상기 마이크로어레이는 당업자에게 알려진 방법으로 제작할 수 있다. 예를 들면, 상기 마이크로어레이를 칩으로 제작하는 경우, 상기 탐색된 유전자 마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 파이프조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로파이펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0093] 상기 마이크로어레이 칩의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 활성기가 코팅된 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0094] 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막, 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 상기 진단키트는 지지체, 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질액, 또는 1,6-N-아세틸글루코사민 당쇄까지 변화를 측정하기 위한 L4-PHA, 폴리(A) RNA 분리시약 등을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0096] 상기 지지체는 니트로셀룰로오즈막, 폴리비닐수지로 합성된 96웰 플레이트(96 well plate), 폴리스티렌수지로 합성된 96 웰 플레이트, 또는 유리로 된 슬라이드글래스 등일 수 있고, 상기 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 또는 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등일 수 있으며, 상기 형광물질은 FITC, 또는 RITC 등일 수 있고, 상기 발색 기질액은 ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzenothiazoline-6-sulfonic acid)), OPD(o-Phenylenediamine), 또는 TMB(Tetramethyl Benzidine) 등일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0097] 상기 상기 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이는
- [0098] 1) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열 전체가 결실된 돌연변이 (p53 null);
- [0099] 2) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이;
- [0100] 3) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔기로 치환된 돌연변이; 또는
- [0101] 4) 서열번호 1의 p53 단백질의 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌 잔기가 트립토판 아미노산 잔

기로 치환되고 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 돌연변이일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0102]

본 발명은 환자로부터 분리된 방사선 조사후 생존한 암세포에서 p53 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 방법에 의하면 당대사 표적약물 투여에 적합한 방사선 치료 저항성 재발암 환자 확인이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0103]

도 1은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 조사후 생존한 세포들을 선별하는 과정에서 방사선 조사 후 생존율을 나타내는 그림이다.

도 2은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 조사후 생존한 암세포주에 당대사 표적약물을 처리시 세포 성장의 변화를 나타내는 그림이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따라 p53 부존재 암세포에 p53 도입하고 방사선 조사후 생존한 암세포주에 당대사 표적약물 처리시 세포 성장의 변화를 나타내는 그림이다.

도 4은 본 발명의 실시예에 따라 in vivo 상에서 방사선 저항성 암세포에 당대사 표적약물 처리시 세포 성장의 변화를 나타내는 그림이다.

도 5은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 당흡수의 차이를 확인한 그림이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 젖산의 생성 차이를 확인한 그림이다.

도 7은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 세포외기질 산화도 (ECAR) 발생의 차이를 확인한 그림이다.

도 8은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 당대사 중간산물의 생성을 측정한 그림이다.

도 9은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 당대사 과정에 관여하는 효소들의 발현 변화를 real-time PCR을 사용하여 측정한 그림이다.

도 10은 본 발명의 실시예에 따라 p53 돌연변이형 또는 비존재형 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 증가되는 당대사 과정을 도식화한 그림이다.

도 11은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델의 산소 소모율 (OCR)을 측정한 그림이다.

도 12은 본 발명의 실시예에 따라 p53 비존재형 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 미토콘드리아 형태를 전자현미경을 통하여 관찰한 그림이다. M은 미토콘드리아를 나타내고, N은 핵을 나타낸다.

도 13은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 미토콘드리아의 양 (Mass)를 측정한 그림이다.

도 14은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 미토콘드리아의 ROS 및 세포의 ATP 생성을 측정한 그림이다.

도 15은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 mitochondrial dynamics와 mitophagy 관련 단백질의 발현을 확인한 그림이다.

도 16은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 mitophagy의 flux를 확인한 그림이다.

도 17은 본 발명의 실시예에 따라 p53 야생형 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 p53 녹다운 후 mitophagy 관련 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인한 그림이다.

도 18은 본 발명의 실시예에 따라 p53 야생형 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 p53 녹다운 후 mitophagy 관련 단백질의 발현 변화를 면역세포화학분석 (immunocytochemistry)을 통해 확인한 그림이다.

도 19은 본 발명의 실시예에 따라 p53 부존재형 방사선 치료 저항성 재발암 모델에서 p53 유전자를 형질주입

후 mitophagy 관련 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인한 그림이다.

도 20은 본 발명의 실시예에 따라 방사선 조사후 생존한 유방암세포주에 당대사 표적약물을 처리시 세포 성장의 변화를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0104] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0106] **실시예 1. 방사선 치료 저항성 재발암 모델 구축**
- [0107] **1-1: 암세포의 배양**
- [0108] p53 야생형 (HN30 (wild type p53, Dr. Jeffrey N. Myers from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center에서 제공 받음), p 53 부존재형 (UM-SCC-1 (p53 null type, Dr. Thomas E. Carey from the University of Michigan에서 제공), p53 돌연변이형 (AMC-HN-3 (서열번호 1의 p53 단백질 아미노산 서열중에서 282번째 아미노산인 아르기닌이 트립토판으로 치환된 형태의 돌연변이 p53 단백질을 발현, R282W) 및 AMC-HN-8 (서열번호 1의 p53 단백질 아미노산 서열중에서 293번째 아미노산인 글리신부터 아미노산이 발현이 되지 않는 형태의 돌연변이 p53 단백질을 발현)은 아산병원에서 larynx 환자로 부터 확립한 세포주) 암세포를 배양하기 위해서, 상기 암세포들을 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 및 10% fetal bovine serum를 포함하는 Dulbecco's modified eagle 배지 (DMEM, Gibco Life Technologies, Grad Island, NY) containing]상에서 5% CO₂, 37℃ 온도의 세포 배양기에서 배양하였다.
- [0110] **1-2: 암세포에 방사선 조사**
- [0111] 상기 배양한 암세포에 대하여 X-RAD 320 방사선 조사기 (Precision X-ray Inc., North Branford, CT, USA)를 사용하여, 100-mm dish에 50% 컨플루언시 (confluency)로 세포가 자라게 되면 2 Gy의 방사선을 2-3일 간격으로 지속적으로 조사하여 총 70Gy가 되도록 장기간 반복적으로 방사선을 조사하였다. 또한 암세포들이 70-80% 컨플루언시로자라게 되면 새로운 디시 (dish)로 계대배양 하였다.
- [0113] **1-3: 암세포에 방사선 조사후 생존한 암세포주 선별 (확립)**
- [0114] 상기 방사선 조사후 생존한 세포들을 모아서, 1-1의 세포 배양 방법과 동일하게 세포를 배양하였다.
- [0115] 상기 암세포주들을 60-mm 디시에 방사선 조사량에 따라 서로다른 세포수를 심은 (seeding) 후 3, 6, 9 Gy의 방사선을 조사하여 적어도 50개 이상의 세포들이 모여 하나의 콜로니 (colony)를 형성하는 10-14일 뒤, 0.5% (w/v) crystal violet을 50% (v/v) methanol 와 10% (v/v) glacial acetic acid에 녹인 용액으로 상기 콜로니들을 염색하여 그 수를 세고 나서, 그 모세포의 방사선 저항성 커브 (방사선 조사후 시간에 따른 생존한 세포의 비율)와 70Gy를 조사받은 후 생존한 세포의 방사선 저항성 커브를 각각 그려서, 상기 70Gy를 조사받은 후 생존한 방사선 저항성이 그에 대응되는 모세포보다 저항성이 높으면 그 생존한 세포를 방사선 저항성 세포로 선별한다.
- [0116] 상기 저항성이 확인된 세포주에 대해서는 모 암세포 명칭에 R을 붙여 구분하였다.
- [0118] **1-4: p53 부존재형 암세포에 p53을 형질주입하고, 방사선 조사한 후 생존한 암세포주 선별**
- [0119] 실시예 1-1에서 사용한 p53 부존재형 (UM-SCC-1) 세포에 대하여 pBABE 벡터를 주입한 세포, 또는 p53 야생형 유전자가 포함된 pBABE 벡터를 주입한 세포는 Dr. Jeffrey N. Myers from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center로 부터 제공받았다. 상기 세포들은 실시예 1-1에서 사용한 것과 동일한 방법으로 배양하고, 실시예 1-2 및 1-3과 같은 방법으로 방사선을 조사하고, 생존한 세포주를 선별하였다. 저항성이 확인된 세포주들에 대해서는 모 암세포 명칭에 R을 붙여 구분하였다._

- [0121] 실시예 2. *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 당대사 표적약물에 대한 방사선 치료 저항성 재발암의 반응성 확인
- [0122] 2-1: 방사선 조사후 생존한 암세포주에 당대사 표적약물 처리시 세포 성장의 변화
- [0123] 실시예 1에서 선별한 각각의 방사선 저항성 세포주에 대하여 당대사 표적약물을 처리하여 암세포의 성장을 억제하는지 확인하였다.
- [0124] 구체적으로, 상기 방사선 저항성 세포주에 대하여 해당과정 (Glycolysis)에 관여하는 헥소키나아제 저해제인 2-DG (2-DG; hexokinase inhibitor, Sigma-Aldrich)를 처리하거나, 젖산 디하이드로제나아제 A (Lactate dehydrogenase A) 저해제인 AT101 (AT101; LDHA inhibitor, TOCRIS)을 하기와 같은 방법으로 세포에 처리하였다. 상기 선별된 p53 야생형, 부존재형, 돌연변이형의 방사선 저항성 암세포를 6 well plate에 1×10^5 개씩 심고, 배지[(DMEM, Gibco Life Technologies, Grad Island, NY) containing 2 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 100U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum]에 10 mM의 2-DG 또는 5 μ M의 AT101을 주입하여, 각 세포에 대하여 DMSO를 48시간, 10 mM의 2-DG를 48시간, 또는 5 μ M의 AT101을 48시간동안 각각 처리하였다.
- [0125] 당대사 표적약물을 처리한 후, 암세포의 성장의 억제를 확인하기 위해서, 상기 당대사 표적약물을 처리한 세포를 trypsinized 한 뒤 trypan blue로 염색하여 Countess II automated cell counter (Life technology, Bothell, WA, USA)를 이용하여 세포수를 계산하였다.
- [0126] 그 결과, 도 2에 나타난 것과 같이, p53 야생형의 R 세포주에 대하여 당대사 표적약물인 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때, p53 야생형 세포 (모세포)에 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때 암세포의 성장의 변화에 비해서 암세포의 성장의 유의한 감소가 관찰되지 않았지만, p53 돌연변이형 또는 부존재형의 R 세포주에서는 암세포 표적약물인 2-DG 또는 AT101을 처리한 경우, p53 돌연변이형 또는 부존재형 세포 (모세포)에 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때 암세포의 성장의 변화에 비해서 암세포 성장이 0.5배 내지 0.8배가량 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0128] 2-2: p53 부존재 암세포에 p53 도입하고 방사선 조사후 생존한 암세포주에 당대사 표적약물 처리시 세포 성장의 변화
- [0129] 실시예 1-4에서 제작한, p53 부존재형 암세포에 p53을 형질주입한후 방사선 조사하고 생존한 암세포주에 대하여 실시예 2-1과 같은 방법으로 당대사 표적약물을 처리하고 암세포의 성장이 억제되는지 확인하였다.
- [0130] 그 결과 도 3에서 볼 수 있는바와 같이, 도 2의 결과에서 p53 야생형 세포에 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때에 비해서 p53 야생형에서 유래한 R 세포주에 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때에 암세포 성장 변화의 유의한 감소가 없었던 것과 마찬가지로, p53 부존재형 암세포인 UMSCC1에 p53 유전자를 형질주입하고, 방사선 조사후 생존한 R 세포주에 대하여 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때 p53 야생형을 형질주입한 UMSCC1 암세포에 2-DG 또는 AT101을 처리했을 때 암세포의 성장 변화와 비교해서 암세포 성장의 유의한 감소가 나타나지 않았다.
- [0131]
- [0132] 2-3: *in vivo* 상에서 방사선 저항성 암세포에 당대사 표적약물 처리시 세포 성장의 변화
- [0133] 실시예 1에서 제작한 p53 야생형 세포주 또는 p53 비존재형 방사선 저항성 세포주를 *in vivo* 마우스 모델에 이식시켜, 암세포의 성장에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0134] 구체적으로, 6주령의 수컷 (male NOD/SCID gamma) 마우스 (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)의 오른쪽 옆구리에 세포주를 1×10^7 심은 뒤 종양 (tumor) 크기가 100-200 mm³ 정도가 되면 500 mg/kg의 2-DG를 매일 2주간 intraperitoneal (IP)로 주고 이틀에 한 번씩 종양 크기를 측정하였다. 종양 크기는 하기 식을 이용하여 계산하였다 .
- [0135] $V = D \times d^2 \times 0.52$; D = 장경, d = 단경.
- [0136] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, p53 야생형 세포주 (HN30)와 p53 비존재형의 R 세포주 (UMSCC1R)를 마우스에 심고 500 mg/kg 2-DG를 처리한 결과, p53 비존재형의 R 세포주 (UMSCC1R)의 경우 2-DG처리에 의해서 암세포 성장이 저해되는 반면 p53 야생형의 세포주 (HN30)의 경우 2-DG 처리에 의해서 암세포 성장 변화에 큰

차이가 없음을 확인할 수 있었다.

[0138] **비교예 1.**

[0139] p53 야생형 유전자를 가지고 있는 유방암세포인 MCF-7 세포를 실시예 1과 같은 방법으로 배양, 방사선 조사, 및 생존한 암세포주를 선별하고, 실시예 2와 같은 방법으로 당대사 표적약물을 처리하고 암세포의 성장의 변화를 관찰하였다.

[0140] 그 결과 도 20의 왼쪽에서 볼 수 있는 바와 같이, p53 야생형 유전자를 가지고 있는 MCF-7에서 유래한 방사선 저항성 세포주에 당대사를 표적으로 하는 약물 (2-DG, AT-101)을 처리했을 때 암세포 성장의 억제 정도는, 그 모세포에 동일한 약물을 처리했을 때에 암세포 성장의 억제 정도에 비해서 유의성 있는 변화가 없었다.

[0142] **비교예 2.**

[0143] p53 돌연변이형 유전자 (p53 단백질의 280번째 아미노산 아르기닌이 리신으로 치환됨, R280K) 를 가지고 있는 유방암세포인 MDA-MB-231 세포를 실시예 1과 같은 방법으로 배양, 방사선 조사, 및 생존한 암세포주를 선별하고, 실시예 2와 같은 방법으로 당대사 표적약물을 처리하고 암세포의 성장의 변화를 관찰하였다.

[0144] 그 결과 도 20의 오른쪽에서 볼 수 있는 바와 같이, p53 돌연변이형 유전자를 가지고 있는 MDA-MB-231 세포에서 유래한 방사선 저항성 세포주에 당대사를 표적으로 하는 약물 (2-DG, AT-101)을 처리했을 때 암세포 성장의 억제 정도는, 그 모세포에 동일한 약물을 처리했을 때에 암세포 성장의 억제 정도에 비해서 유의성 있는 변화가 없었다.

[0146] **실시예 3. 당대사의 변화 확인**

[0147] **3-1: 세포내 당 유입 및 젖산의 생성량 측정**

[0148] 실시예 1에서 제작한 방사선 치료 저항성 재발암 모델에 대하여 당대사 의존도의 차이가 있는지 확인하기 위해서 하기와 같은 방법으로 포도당 흡수 (glucose uptake), 젖산 생성 (lactate production), 및 세포외기질 산화도 (ECAR)를 확인하였다.

[0149] 구체적으로, 실시예 1과 같은 방법으로 p53 야생형의 R 세포주와 모세포주, 그리고 p53 돌연변이형 부존재형의 R 세포주와 모세포주를 배양한 후 제조사에서 제공한 프로토콜을 사용하여 포도당 흡수 (세포내 당 유입)는 glucose colorimetric uptake assay kit (abcam)를 통해 측정하고, 젖산 생성량은 lactate colorimetric assay kit (Biovision, Inc., Milipal, CA, USA)를 통해 측정하였다.

[0150] 한편, 세포외기질 산화도(ECAR)는 XF-24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다. Assay 하기 전, cartridge sensor에 웰 (well) 당 1 ml Seahorse Bioscience XF-24 Calibrant solution을 넣고 37 °C, CO2가 없는 배양기에서 하루밤 배양시켰다. 분석 당일 웰 당 2X104 세포가 되게 심은 다음 24 well plate를 37 °C, CO2가 없는 배양기에서 1 시간 배양하였다. ECAR은 분석동안 주입되는 화합물에 따라 측정하였다. 25 mM glucose, 0.5 ug/ml oligomycin, 1 M 2-DG, Seahorse XF-24 분석기의 프로그램은 제조업체에서 제공된 지침에 따라 설정하였다. 또한 ECAR은 mpH/min로 표현하였다. Micro BCA protein assay kit (Thermo-Fisher Scientific)을 이용하여 각 웰에 대한 단백질 농도를 측정하여 단백질 농도로 보정하였다.

[0151] 그 결과 도 5 내지 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, p53 야생형의 R 세포주는 그 모세포에 비하여 세포내 세포내 당 유입, 젖산 생성량, 및 세포외기질 산화도에 있어 유의한 변화가 관찰되지 않았지만, p53 돌연변이형 또는 부존재형의 R 세포주는 그 모세포에 비하여 세포내 당 유입과 젖산 생성량이 1.2배 내지 1.5배가량 증가하였으며 세포외기질산화도도 p53 부존재형에서는 1.2배, p53 돌연변이형에서는 1.7배 증가하였다.

[0153] **3-2: 당대사 중간산물의 생성 측정**

[0154] 실시예 1에서 제작한 방사선 치료 저항성 재발암 모델에 대하여 당대사 의존도의 차이가 있는지 확인하기 위해

서 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0155] 구체적으로, 세포내 대사산물 (Metabolite) 농도를 측정하기 위해서, 실시예 1의 방법으로 제작 및 배양한 세포를 순차적으로 PBS 와 H₂O로 세척한 후, 상기 세포를 80% (v/v) cold methanol로 수확하였다. 대사산물들은 CHCl₃/H₂O (35% v/v)을 첨가하여 액체-액체 추출에 의해 액상만을 모아 vacuum centrifuge로 건조한 후, LC-MS/MS [liquid chromatography-mass tandem mass spectrometry; 1290 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), Qtrap 5500 (AB Sciexm Concord, Ontario, CAN), 그리고 reverse phase column (Synergi fusion RP 50 x 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA)]를 이용하여 상기 대사산물의 생성을 측정하였다.

[0156] 3 uL를 LC-MS/MS 시스템에 주입한 후 turbo spray ionization source로 이온화했다. 메탄올 중 5 mM ammonium acetate in H₂O 및 5 mM ammonium acetate in methanol을 각각 이동상 A 및 B로 사용하였다. 분리구배는 다음과 같음 : 0 % B에서 5 분간, 0 % 내지 90 % B에서 2 분간 유지, 90 분간 8 분간, 90 % 내지 0 % B에서 1 분간 유지 한 후 0 % B에서 유지 9 분. LC 흐름은 7-15 분 사이에 140 uL/분을 제외하고는 70 uL/분이었고, 컬럼 온도는 23로 유지하였다. 다중 반응 모니터링 (MRM)은 음이온 모드에서 사용되었으며 추출된 이온 크로마토 그래피 (EIC)는 각 대사 물질의 특정 전이와 일치하여 정량화에 사용되었다. 각 EIC의 곡선 아래 면적은 내부 표준의 EIC에 대해 표준화되었으며, 각 대사 물질의 내부 표준 물질에 대한 피크 면적비는 샘플에서 Bradford 분석 (Bio-Rad)을 수행하여 결정된 단백질 함량을 사용하여 표준화 한 다음 상대 비교를 위해 사용되었다.

[0157] 또한, 실시예 1에서 제작한 방사선 치료 저항성 재발암 모델에 대하여 유전자 발현의 변화를 qRT-PCR를 수행하여 확인하였다. 구체적으로, 실시예 1의 방법으로 제작 및 배양한 세포내의 RNA를 PureLinkTM RNA mini kit (Thermo-Fisher Scientific)을 이용하여 추출하였고 cDNA는 First-Strand cDNA Synthesis Kit by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR: iNtRON Biotechnology)을 이용하여 합성하였다. SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NY)가 qPCR에 사용되었다. 모든 반응은 96-well plate에서 3 회 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다. qPCR은 Applied Biosystems Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다.

표 1

[0158]

명명	서열 (5' > 3')	Tm (°C)	Cycles	서열번호
GLUT1_F	CTTTGTGGCCTTCTTTGAAG	60	40	3
GLUT1_R	CCACACAGTTGCTCCACAT	60	40	4
GLUT3_F	CGGCTTCCTCATTACCTTC	60	40	5
GLUT3_R	GGCAGCACTTAGACATTGG	60	40	6
HKII_F	CAAAGTGACAGTGGGTGTGG	60	40	7
HKII_R	GCCAGGTCCTTCACTGTCTC	60	40	8
PFK_F	GGATTACTGACCGCTCTTTAGTT	60	40	9
PFK_R	GCATTCCGTGAATTGTCCATC	60	40	10
LDHA_F	ACAACAGGATCTAGGTGGAGGTT	60	40	11
LDHA_R	GAGTTGATGTTTTCCCACTCCAT	60	40	12
b-actin-F	AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA	60	40	13
b-actin_R	ATAGGGACATGCGGAGACCG	60	40	14

[0159] 그 결과 도 8 내지 도 9에서 확인할 수 있는바와 같이, p53 야생형의 R 세포주는 그 모세포에 비하여 당대사 과정에서 중간물질들의 생성의 변화 및 당대사 과정과 관련된 효소들의 발현 변화가 관찰되지 않았으나, p53 돌연변이형 또는 부존재형의 R 세포주는 그 모세포에 비하여 당대사 과정에서 중간물질인 G6P/F6P, 및 3PG의 생성이 현저하게 증가했고, p53 돌연변이형 또는 부존재형의 R 세포주는 그 모세포에 비하여 당대사 과정과 관련된 효소인 Glut1, Glu3, HKII, 및 LDHA의 유전자 발현 또한 현저하게 증가하였다.

[0160] 상기 실시예 3의 결과를 바탕으로, p53 야생형 세포주에 비해서 p53 돌연변이형 또는 부존재형 세포주는 방사선 저항성을 획득함을 통해서 당대사가 증가하는 대사 리모델링 (Metabolic remodeling)이 발생했음을 알 수 있다.

[0162] 실시예 4. 미토콘드리아의 기능 및 형태 변화 확인

[0163] 4-1: 산소 소모율 (OCR; O₂ consumption rate)의 변화 확인

- [0164] p53 야생형 세포주에 비해서 p53 돌연변이형 또는 부존재형 세포주는 방사선 저항성을 획득함을 통해서 당대사가 증가하므로, 당대사의 증가에 따라서 산소 소모율이 증가하는지 하기의 방법으로 확인하였다.
- [0165] 구체적으로, 산소 소모율 (OCR)측정을 위해 XF-24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA)를 이용하여 측정 하였다. Assay 하기 전, cartridge sensor에 웰 당 1 ml Seahorse Bioscience XF-24 Calibrant solution을 넣고 37℃이며, CO2가 없는 배양기에서 하루밤 배양시켰다. 분석 당일 웰당 2×10^4 세포가 되게 심은 다음 24 웰 플레이트를 37℃이며, CO2가 없는 배양기에서 1시간 배양하였다. Seahorse XF-24 분석기의 프로그램은 제조업체에서 제공된 지침에 따라 설정하였다. 또한 OCR은 pmol/min로 표현하였다. Micro BCA protein assay kit (Thermo-Fisher Scientific)을 이용하여 각 웰에 대한 단백질 농도를 측정하여 단백질 농도로 보정하였다.
- [0166] Oligomycin은 미토콘드리아의 F0 부분 ATP synthase의 양자채널을 차단하여 ATP 합성을 억제하는 역할을 하고, Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenenylhydrazone (FCCP)는 ATP synthase의 양자채널에 걸쳐 수소이온을 운반하여 ATP합성을 방해하기 때문에 uncoupling으로 작용하여 미토콘드리아의 ATP 생성없이 에너지와 산소를 급속하게 소비시켜 OCR또는 ECAR이 증가하게 하는 역할을 하고, Rotenone은 NADH로부터 전자와 양성자를 최초로 수용하는 FMN에서 CoQ로 전자가 이동하는 것을 방해하여 산소와 ATP 생성이 모두 억제하는 역할을 하고, Antimycin A는 cyt b에서 cyt c1으로 전자의 이동을 막아 산소와 ATP생성을 모두 억제하는 역할을 한다.
- [0167] 그 결과 도 11에서 나타난바와 같이, p53 야생형 R 세포주는 그 모세포에 비해서 최대 산소 소비량 (최대 산소 소비량은 FCCP를 처리했을 때의 OCR 값에서 Rotenone/antimycin A를 처리했을 때의 OCR 값의 차이)수치의 차이가 없었지만, p53 돌연변이형 또는 부존재형 R 세포주는 그 모세포에 비해서 최대 산소 소비량 수치가 현저하게 낮음을 확인할 수 있었다.
- [0169] **4-2: 미토콘드리아 형태 관찰**
- [0170] 미토콘드리아의 형태 변화는 미토콘드리아의 기능 및 그 항상성 유지와 밀접한 관련이 있으며, 방사선에 의한 스트레스에 의해서 미토콘드리아의 형태 변화가 유발됨이 알려져 있다. 따라서, 방사선에 의해서 미토콘드리아 손상을 통해 p53 돌연변이형 또는 부존재형 세포주가 그 모세포에 비해서 당대사가 증가된 것인지 여부를 하기와 같은 방법으로 확인하였다.
- [0171] 구체적으로, 세포들을 150 mM cacodylate 완충액에 용해된 2.5% (v/v) glutaraldehyde로 고정시킨 후 4℃에서 2% (w/v) osmium tetroxide에 1시간 노출시키고, 2% (w/v) uranyl acetate 수용액으로 블록 염색을 수행하였다. 그리고 나서, 에탄올 시리즈 (70, 80, 90, 96, 100% 에탄올)에 탈수시키고 spurr's resin 시리즈 (Spurr/에탄올 1:1, 2:1, 100%, Sigma-aldrich EM0300)에 침투시키고, 60℃에서 8시간동안 중합시켰다. Embedded 세포는 ultramicrotome (MTX-L, RMC)에서 다이아몬드 칼로 잘랐다. 절편들은 150 mesh copper grids (Gilder, G200)에 직접 mount하였고, 50% (v/v) 메탄올에 2% (w/v) uranyl acetate로 20분 동안 염색하고 Reynold's lead citrate에 10분 동안 염색하였다. Grid는 120 kV에서 JEOL JEM1400 전자현미경(FRED HUTCH Research Institute, Seattle, WA)를 사용하여 배율은 2 um로 관찰하였다.
- [0172] 그 결과 도 12에 나타난 바와 같이, p53 부존재형의 R 세포주는 그 모세포에 비하여 전체 미토콘드리아 중 비정상적인 미토콘드리아의 비율이 약 2배 정도 증가하였다.
- [0174] **4-3: 미토콘드리아의 양 (Mass) 및 ROS (Reactive oxygen species)의 생성 변화 확인**
- [0175] 방사선 조사에 의해서 암세포 미토콘드리아의 기능 변화를 확인을 위해 미토콘드리아의 양 (mass) 및 미토콘드리아에만 생성되는 ROS의 양적 변화를 확인했고, p53 null 형태를 발현하는 세포의 경우 미토콘드리아의 기능이 저해되어 있음에도 불구하고 glycolysis shift를 통해 ATP가 유지되고 있는지를 확인하기 위해 총 ATP발현 양을 확인하는 실험을 하기와 같은 방법으로 수행하였다.
- [0176] 구체적으로, 실시예 1과 같은 방법으로 배양한 암세포 배지에 200 nM 농도가 되도록 MitoTracker Green FM (Invitrogen)을 주입하여 37에서 20분간 배양한 후, 제조사가 제공하는 방법을 이용하여 fluorescence activated flow cytometer (FACScan; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)로 미토콘드리아 양을

측정하였다. 미토콘드리아에서 발생하는 ROS는 5 uM 농도가 되도록 MitoSOXTM Red Mitochondrial Superoxide indicator (Thermo-Fisher)를 암세포 배지에 주입하고 제조사가 제공하는 방법을 이용하여 FACScan으로 미토콘드리아에서 발생한 ROS의 양을 측정하였다.

[0177] 또한, ATP assay kit (Biovision, K354-100)을 이용하여 제조사가 제공하는 방법을 사용하여 ATP 생성변화를 확인하였다.

[0178] 그 결과 도 13 내지 14에 나타난 것과 같이, p53 돌연변이형의 R 세포주에서 세포당 미토콘드리아의 양 및 세포 내 생성된 미토콘드리아에서만 생성되는 ROS가 그 모세포의 것에 비해서 1.3 배가량 증가하였으나, 반면에 p53 야생형 R 세포주는 그 모세포에 비해서 유의한 증가를 나타내지 않았다.

[0179] 또한, 총 ATP 생산량은 p53 야생형 및 부존재형의 R 세포주와 각각의 모세포주간에 큰 차이가 관찰되지 않았다.

[0181] 실시예 5. p53 돌연변이와 mitophagy 의 발생

[0182] 5-1: Mitophagy 의 발생 측정

[0183] p53 돌연변이형 암세포가 방사선 저항성을 획득하는 과정에서 미토콘드리아의 형태적 및 기능적 이상으로 인해서, mitophagy의 발생이 증가하는지 확인하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0184] 구체적으로, 실시예 1-1과 같은 방법으로 암세포를 배양하고, 암세포에 대하여 X-RAD 320 irradiator (Precision X-ray Inc., North Branford, CT)를 이용하여 4Gy의 방사선을 조사하였다. 웨스턴 블롯을 수행하기 위해서 세포내 단백질은 protease와 phosphatase inhibitor (Thermo Scientific, Rockford, IL)가 포함된 RIPA buffer를 이용하여 추출하였고, Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 정량하였다. 20 ug의 단백질을 10~13% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 분리하였다. Nitrocellulose membrane (Amersham International Plc., Little Chalfont, UK)에 transfer 한 후 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Bio-world, Dublin, OH) in 1X TBS containing 0.05% Tween-20 (TBST)에 50 분간 blocking 한 후 1차 항체를 배양했다 (Cell signaling Laboratories, Danvers, MA: phospho-p53 (Ser15)(9284S), Drp1(8570); Abcam, Cambridge, UK: phospho-parkin (Ser65)(ab154995), parkin(ab15954) 및 Bnip3 (ab10433); Santa Cruz Biotechnologies, La Jolla, CA: p53 (sc-126), Fis1 (sc-376469) 및 Tom20 (sc-17764); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO: β -actin (A5441)). Membrane을 TBST로 washing한 후 2차 항체 (anti-mouse or anti-rabbit IgG HRP conjugate; Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX)를 붙였다. TBST로 washing한 후 SuperSignal® West Pico Trial kit (Thermo-Fisher Scientific, Rockford, IL)을 이용하여 현상하였다.

[0185] 한편, 방사선 스트레스로 인하여 세포가 손상되면 탈분극된 미토콘드리아가 발생하면서 mitophagy가 유도되는데, 상기 mitophagy 유도 여부를 확인하는 방법은 다음과 같다.

[0186] 첫번째는 Parkin 의존적인 mitophagy로 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)이 활성화되어 Parkin의 N-terminal ubiquitin ligase domain의 Ser65 및 Ubiquitin의 Ser65를 인산화시켜 mitophagy를 유도된다. 따라서, Parkin Ser54의 인산화 및 Ubiquitin Ser65의 인산화 양의 증가를 확인하여 mitophagy의 유도 여부를 확인할 수 있다.

[0187] 두번째는 Parkin의 비의존적인 mitophagy로 Bnip3의 발현의 증가를 확인하여 mitophagy의 유도 여부를 확인할 수 있다.

[0188] 세번째는, mitophagy 유도에 의해서 미토콘드리아가 감소되는데, 상기 미토콘드리아의 감소를 Tom20의 발현 감소를 통해 확인하여 mitophagy가 유도되는 것을 확인할 수 있다.

[0189] 그 결과 도 15에서 확인할 수 있는 바와 같이, p53 야생형 (HN30) 및 p53 비존재형 (UMSCC1) 세포주에 방사선 조사 후 mitophagy (phospho-Parkin, 또는 Bnip3)의 발현을 확인해본 결과, p53 야생형 암세포에 방사선을 조사한 경우에서만 방사선에 의해 Bnip3 및 p-Parkin의 발현이 각각 4.2배, 4.7배가량 증가하여, Tom20의 발현은 0.5배 감소하는 것을 통해 mitophagy의 발생이 증가하였으나, p53 비존재형 (UMSCC1) 세포주에 방사선 조사 한 경우에는 Bnip3 및 p-Parkin 그리고 Tom20의 발현 변화를 확인할 수 없었다.

[0191] 5-2: Mitophagy 유동(flux)의 변화

- [0192] p53 돌연변이형 암세포가 방사선 저항성을 획득하는 과정에서 미토콘드리아의 형태적 및 기능적 이상으로 인해, 미토콘드리아 분열과 mitophagy의 발생이 증가함을 상기 실시예 5-1에서 확인하였다. 상기 mitophagy 발생의 변화를 정량적으로 분석하기 위해서 lysosome 억제제와 mitophagy 억제제를 처리하여 mitophagy가 분해되는 것을 막은 다음 CCCP로 mitophagy를 임의적으로 증가시켰을때 증가되는 정도를 통해 mitophagy 유동의 변화를 하기와 같은 방법으로 확인하였다.
- [0193] 구체적으로, 실시예 1과 같은 방법으로 제작하여 배양한 암세포에 10 nM MitoTracker Deep Red (Invitrogen, M22426)를 처리하고 37°C 에서 15분간 배양 하고 이를 PBS로 세척한 다음 30 uM CQ (lysosome inhibitor인 chloroquine) 또는 5 uM CsA (mitophagy inhibitor인 cyclosporine A)를 3시간 처리하고, CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine)를 6, 20 시간 처리후 변화하는 MitoTracker Deep Red의 양을 실시예 4-1과 같은 방법으로 FACScan를 이용하여 측정하였다.
- [0194] Mitophagy flux를 확인하기 위해 mitophagy 유도시 감소되는 미토콘드리아 막전위를 MitoTracker Deep Red를 이용하여 FACScan으로 측정하였으며, 이때 lysosome 억제제와 mitophagy 억제제가 존재하지 않았을때에 비해 lysosome 억제제와 mitophagy 억제제가 존재하였을때의 MitoTracker Deep Red의 측정값의 비율을 control로 normalization하여 mitophagy flux의 증감을 확인하였다.
- [0195] 그 결과 도 16에서 확인할 수 있는 바와 같이, p53 야생형 (HN30) 세포주에 방사선 조사 후의 경우에서만 mitophagy flux가 증가하였고, p53 비존재형 (UMSCC1) 세포주에 방사선 조사 후의 경우에는 mitophagy flux의 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

[0197] 5-3: p53 녹다운 후 Mitophagy 의 발현 변화

- [0198] p53 야생형 암세포에서 p53의 발현을 감소시킨 후에, 방사선을 조사한 경우 mitophagy 의 발현이 p53 야생형 암세포에 비해서 어떻게 변화하는지 확인하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0199] 구체적으로, On-target plus smart pool p53 과 non-targeting siRNA는 Dharmacon (Lafayette, CO)에서 구매하였다. 실시예 1과 같은 방법으로 배양한 HN30 또는 UMSCC1 세포를 antibiotics가 없는 배지에서 24시간 전에 seeding한 후 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 siRNAs을 transiently transfection을 수행 하였다. 하기 표 2에 기재된 siRNAs를 포함하는 On-target plus smart pool p53 또는 non-targeting siRNA를 처리하고 48시간 후 4 Gy의 방사선을 조사한 후 6, 12, 24 시간마다 샘플링하여 웨스턴 블롯 및 면역형광 염색 (immunofluorescence)를 수행하였다.
- [0200] 웨스턴 블롯은 상기 (실시예 5-1) 방법과 동일하게 수행하였고, 면역형광 염색 (immunofluorescence)의 경우 샘플링한 세포를 3.7% formaldehyde (Sigma-Aldrich)에서 15분간 고정시킨 후, 0.1% (v/v) triton-X 100 (Sigma-Aldrich)에 10분간 permeabilization시켰다. 세포는 PBS로 3번 세척 한 후 1% (w/v) BSA에 1시간 blocking시키고 Tom20 (Santa Cruze, sc-17764)과 LAMP2 (Abcam, ab25631)를 2시간 배양한 후 PBS로 세척한 후 rabbit 또는 mouse Alexa-Fluor-488- 및 Alexa-Fluor-633-conjugate secondary antibodies (Life Technologies)를 1시간 배양하였다. PBS로 세척 후 10 ug/ml DAPI (Sigma)를 5분간 염색한 후 슬라이드를 fluorescent solution (Dako Cytomation, Carpinteria, CA)로 mount하였다. 이미지화를 위해서 제조사의 방법에 따라서 confocal laser microscopy (Leica, St-Gallen, Switzerland)를 이용하여 관찰하였다.

표 2

명명	서열 (5'> 3')	서열번호
p53 siRNA #1	GAAAUUUGCGUGGAGUA	15
p53 siRNA #2	GUGCAGCUGUGGUUGAUU	16
p53 siRNA #3	GCAGUCAGAUCCUAGCGUC	17
p53 siRNA #4	GGAGAAUUAUUCACCCUUC	18
Non-targeting siRNA	UGGUUUACAUGUCACUAA	19

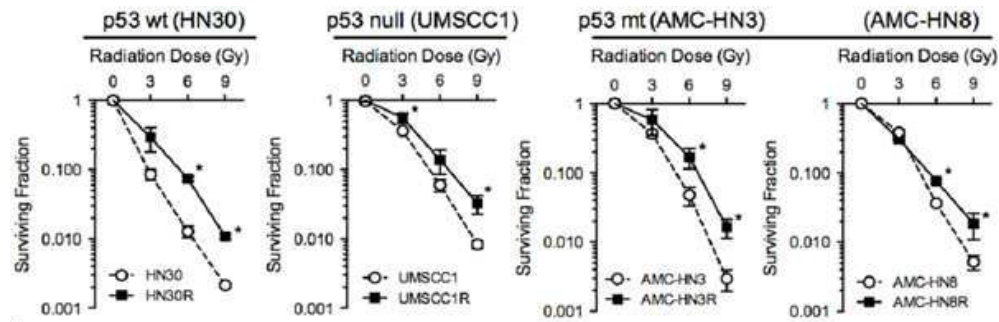
- [0202] 그 결과 도 17 내지 18에 나타난 것과 같이, p53 야생형 암세포 (HN30)에서 p53 발현을 siRNA를 이용하여 감소시킨 후 방사선을 조사하게 되면, p53 야생형 암세포에서 방사선 조사후 증가되던 mitophagy의 발생이 반대로 감소함을 확인할 수 있었다.

[0203]

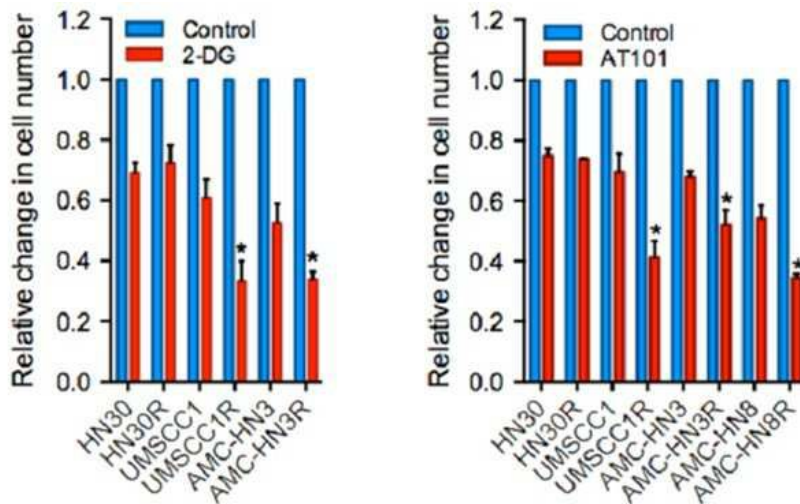
또한, 도 19에 나타난 것과 같이, p53 부존재형 암세포 (UMSCC1)에 p53 유전자를 실시예 1-4와 같은 방법으로 형질주입한 후 방사선을 조사하면, p53 부존재형 암세포에서 방사선 조사후 변화없던 mitophagy의 발생이 p53 유전자의 발현에 의해서 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

도면

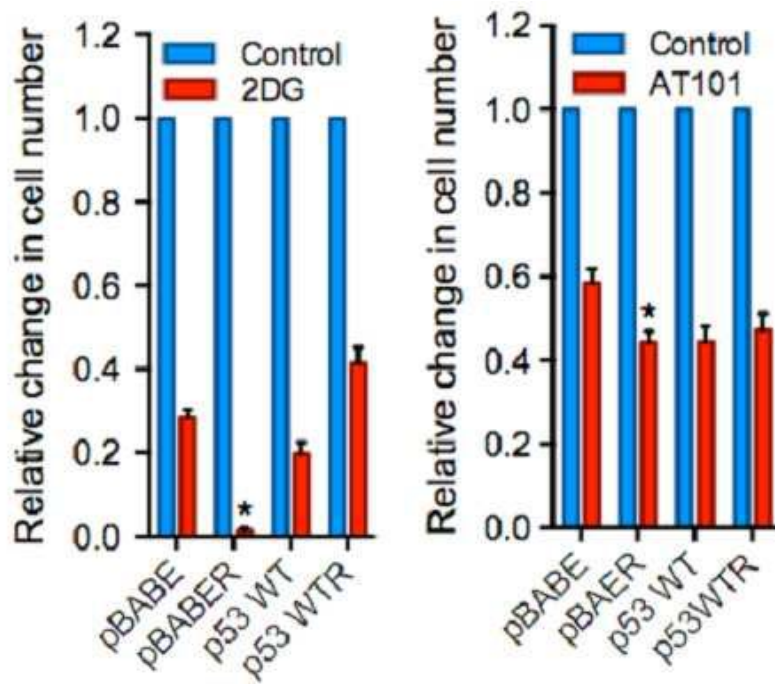
도면1



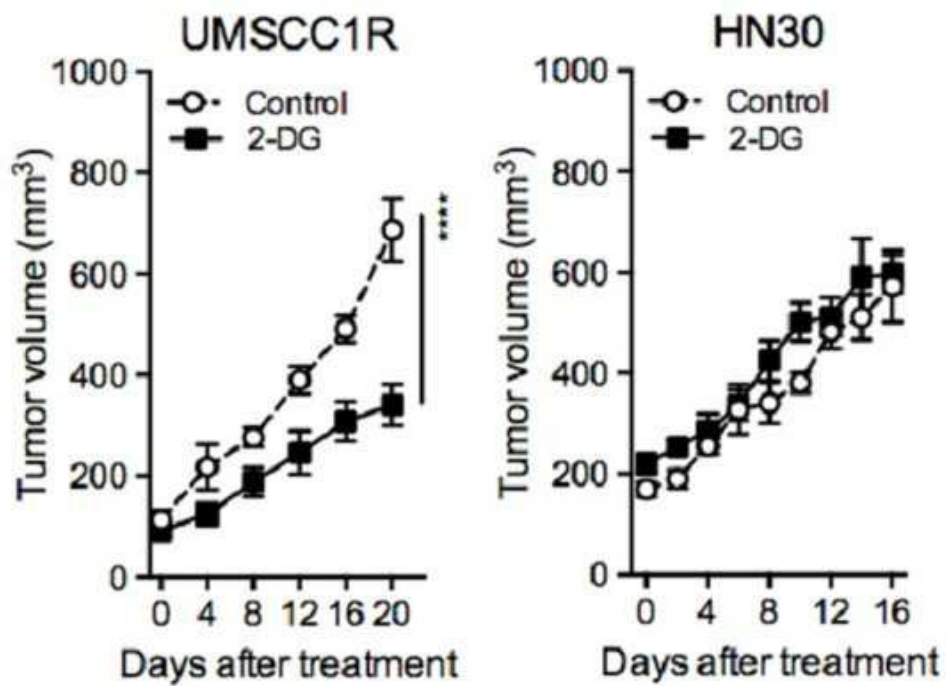
도면2



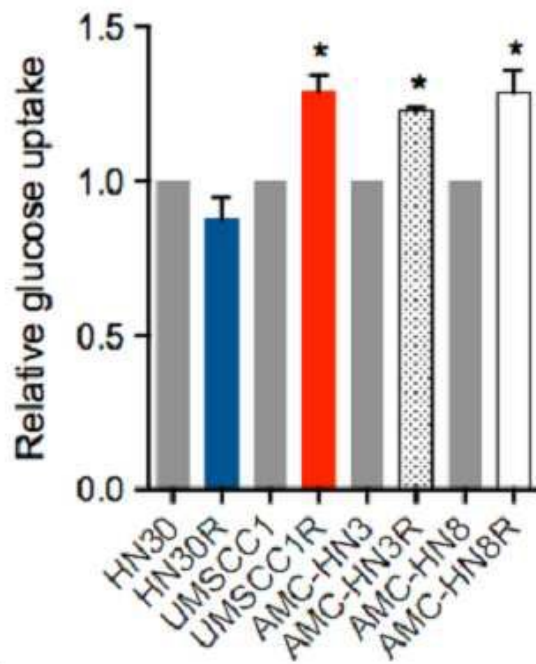
도면3



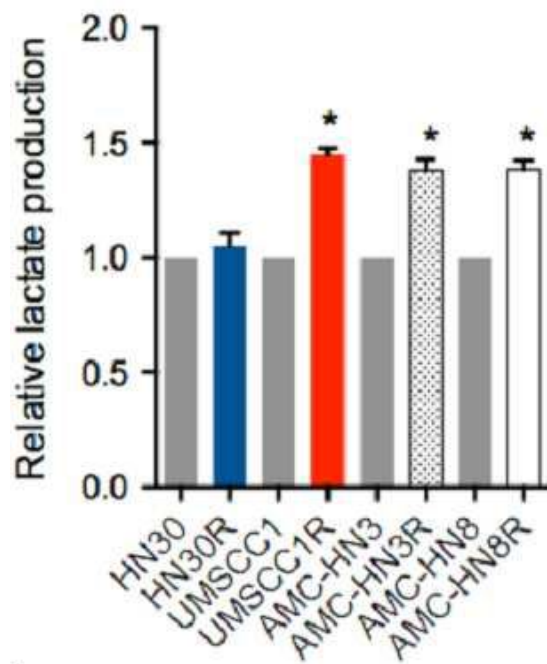
도면4



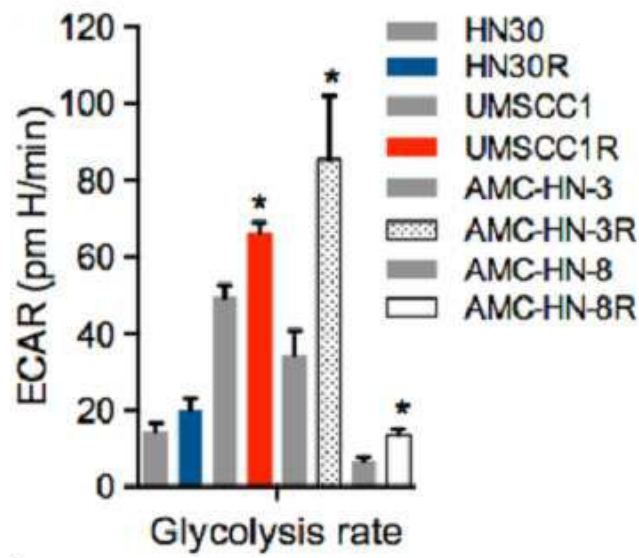
도면5



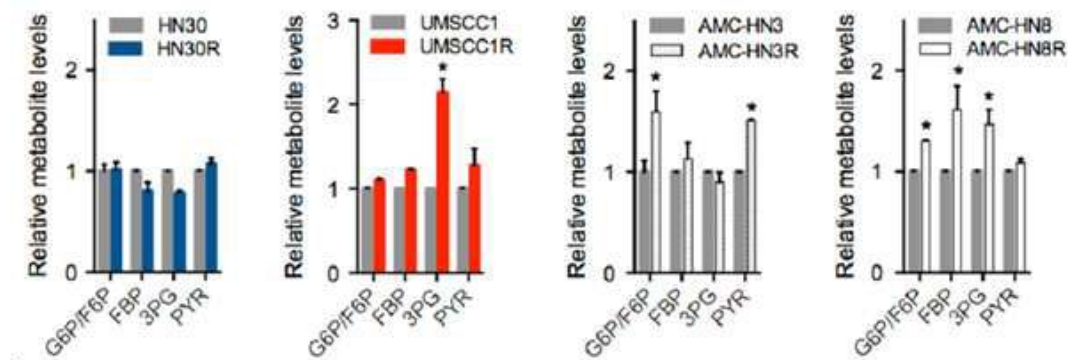
도면6



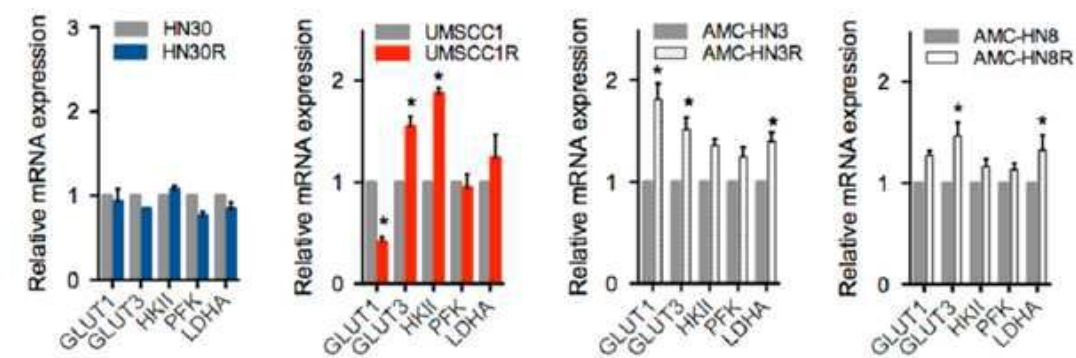
도면7



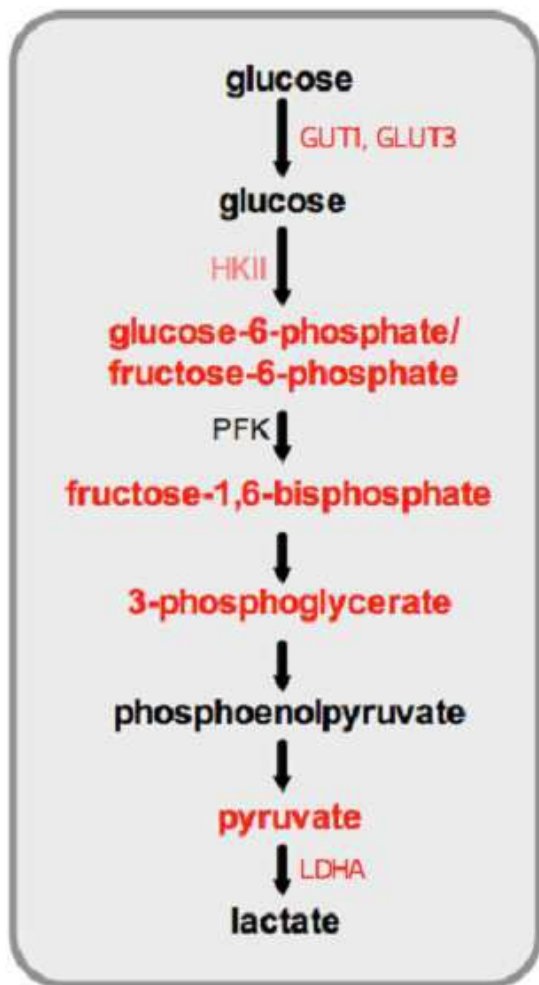
도면8



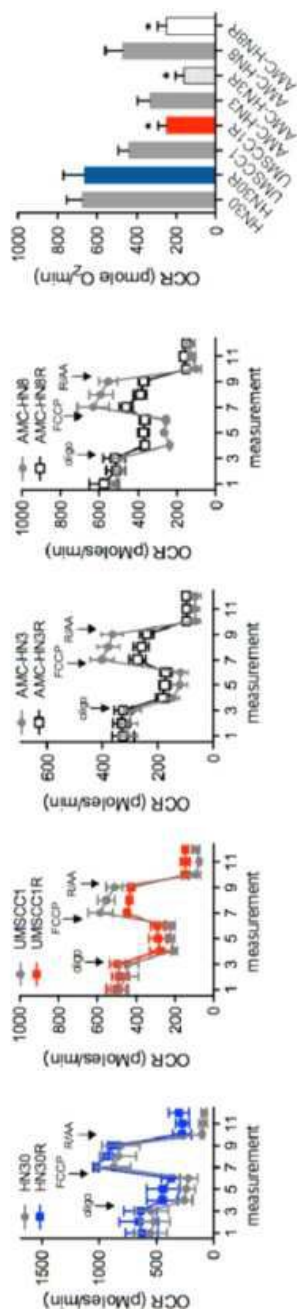
도면9



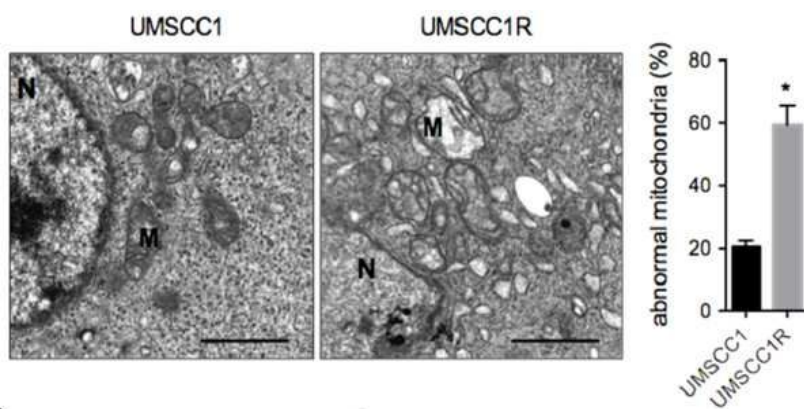
도면10



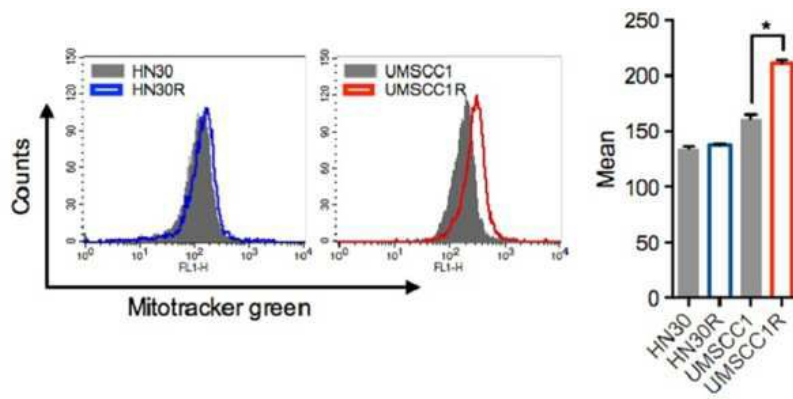
도면11



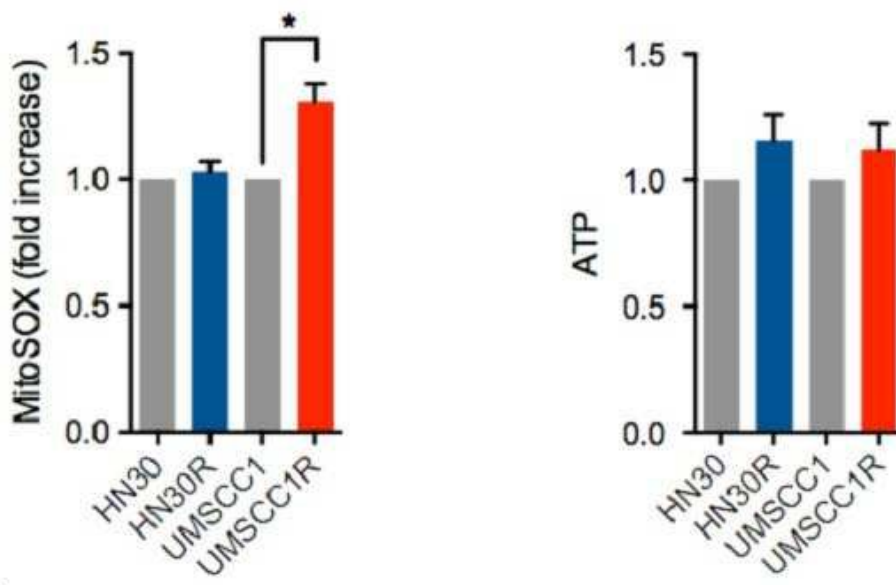
도면12



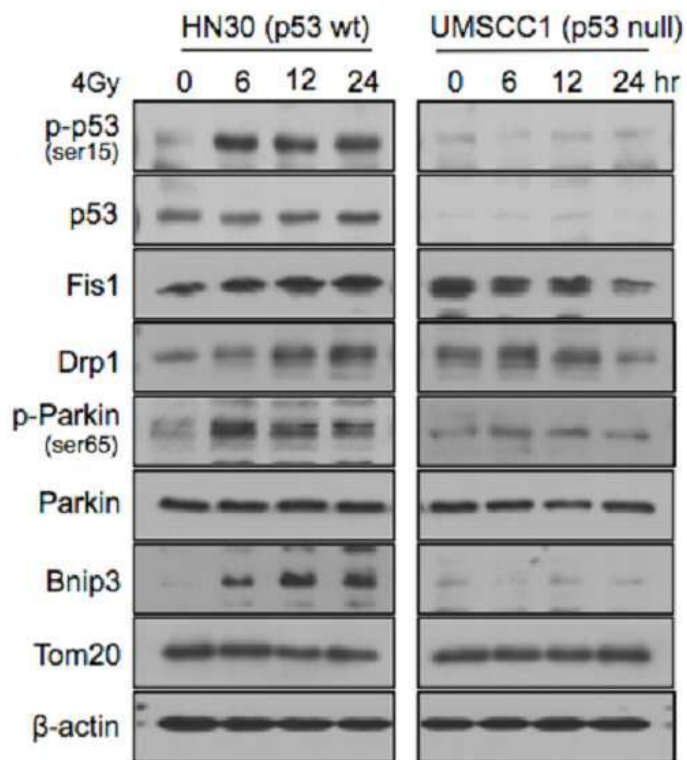
도면13



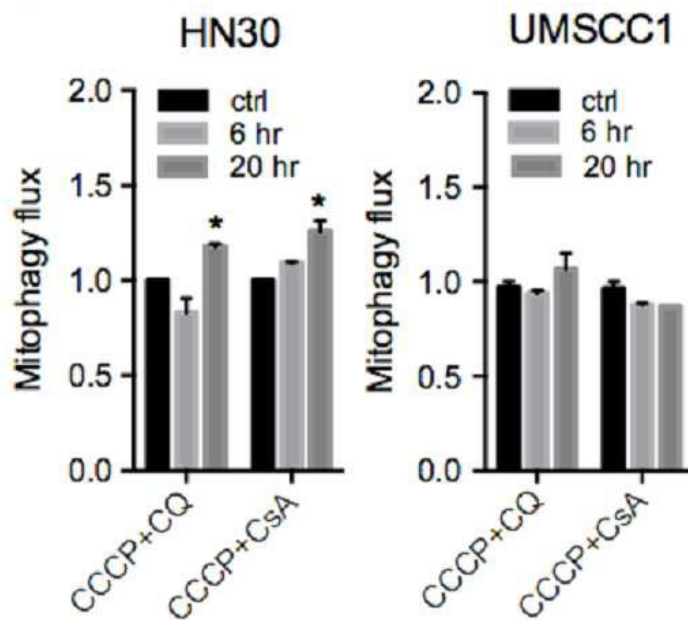
도면14



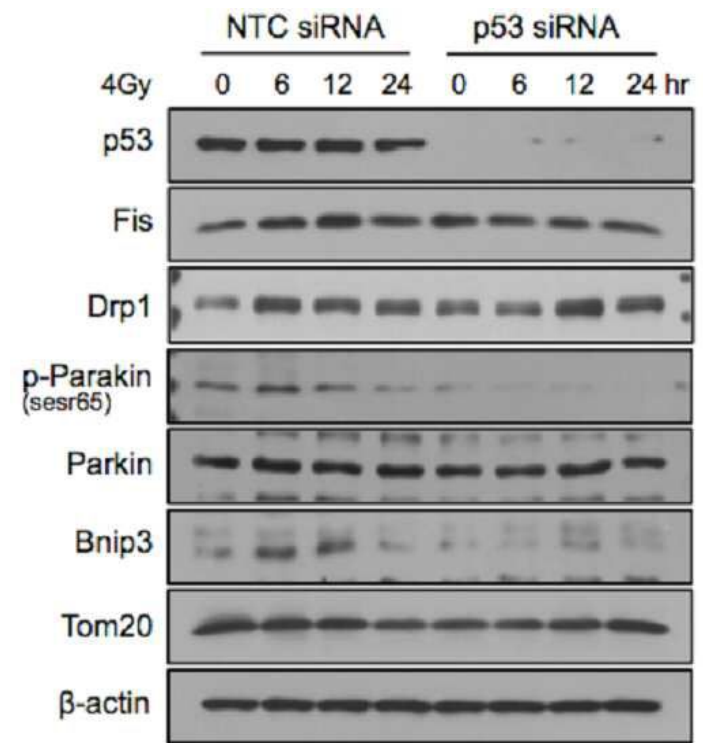
도면15



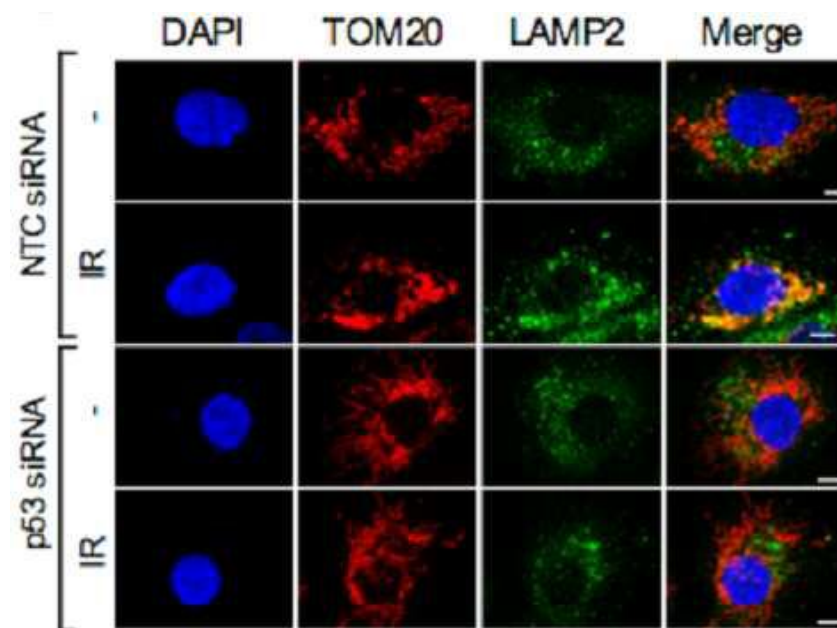
도면16



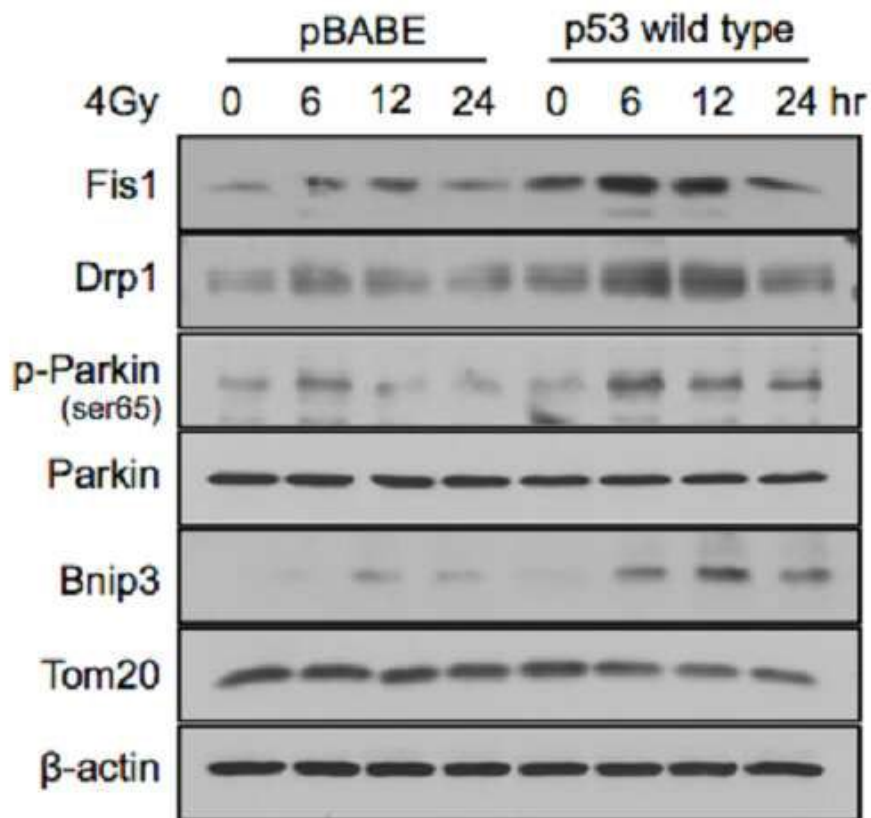
도면17



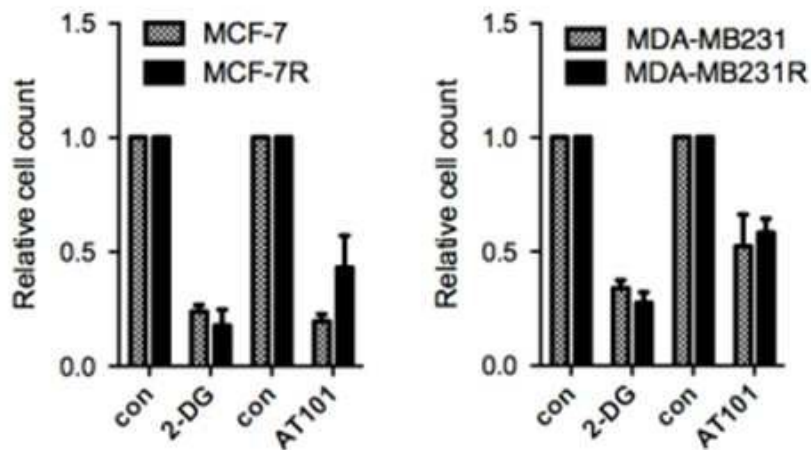
도면18



도면19



도면20



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Biomarker for therapy of recurrent cancer after radiation treatment

<130> DPP20165083KR

<160> 19
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 20 25 30
 Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 35 40 45
 Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
 50 55 60
 Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
 65 70 75 80
 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
 85 90 95
 Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110
 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp

195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300
 Lys Arg Ala Leu Ser Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys

305 310 315 320
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335
 Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350
 Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365
 Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

<210> 2

<211> 2451

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cggtgctttcc acgacgggtga cacgcttccc tggattggcc agactgcctt ccgggtcact 60

gccatggagg agccgcagtc agatcctagc gtcgagcccc ctctgagtca ggaaacattt 120

tcagacctat ggaaactact tcctgaaaac aacgttctgt ccccttggcc gtcccaagca	180
atggatgatt tgatgctgtc cccggacgat attgaacaat ggttactga agaccaggt	240
ccagatgaag ctcccagaat gccagaggct gctccccgct tggccctgc accagcagct	300
cctacaccgg cggccccctgc accagcccc tcctggcccc tgtcatcttc tgccttcc	360
cagaaaacct accagggcag ctacggtttc cgtctgggct tcttgcatte tgggacagcc	420
aagtctgtga cttgcacgta ctcccctgcc ctcaacaaga tgttttgcca actggccaag	480
acctgcctg tgcagctgtg ggttgattcc acacccccgc ccggcaccgc cgtccgcgc	540
atggccatct acaagcagtc acagcacatg acggaggttg tgaggcgtg cccccacat	600
gagcgtgct cagatagcga tggcttggcc cctcctcagc atcttatccg agtggagga	660
aatttgcgtg tggagtattt ggatgacaga aacacttttc gacatagtgt ggtggtgcc	720
tatgagccgc ctgaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac	780
agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac	840
tccagtggta atctactggg acggaacagc tttaggtgc atgtttgtgc ctgtcctggg	900
agagaccggc gcacagagga agagaatctc cgcaagaaag gggagcctca ccacgagctg	960
ccccaggga gactaagcg agcactgtcc aacaacacca gctcctctcc ccagccaaag	1020
aagaaaccac tggatggaga atatttcacc cttcagatcc gtgggcgtga gcgcttcgag	1080
atgttccgag agctgaatga ggccttggaa ctcaaggatg cccaggctgg gaaggagcca	1140
ggggggagca gggctcactc cagccacctg aagtccaaaa agggtcagtc tacctccgc	1200
cataaaaaac tcattgtcaa gacagaaggc cctgactcag actgacatc tccacttctt	1260
gttccccact gacagcctcc cacccecatc tctccctccc ctgccatttt gggttttggg	1320
tctttgaacc cttgcttgca atagggtgtc gtcagaagca cccaggactt ccatttgctt	1380
tgccccgggg ctccactgaa caagttggcc tgcactggtg ttttgttgtg gggaggagga	1440
tggggagtag gacataccag cttagatttt aaggttttta ctgtaggga tgtttgggag	1500
atgtaagaaa tgttcttgca gtttaagggtt agtttacaat cagccacatt ctaggtaggg	1560
gcccacttca ccgtactaac caggaagct gtcctcact gttgaatttt ctctaacttc	1620
aaggcccata tctgtgaaat gctggcattt gcacctacct cacagagtgc attgtgaggg	1680
ttaatgaaat aatgtacatc tggccttgaa accacctttt attacatggg gtctagaact	1740
tgacccctt gaggggtgctt gttccctctc cctgttggtc ggtgggttgg tagtttctac	1800
agttgggcag ctggttaggt agaggaggt gtcaagcttc tgctggcca gccaaacct	1860
gtctgacaac ctcttggtga accttagtac ctaaaaggaa atctacccc atcccacacc	1920

ctggaggatt tcattctcttg tatatgatga tctggatcca ccaagacttg ttttatgctc 1980

agggtcaatt tcttttttct tttttttttt ttttttcttt ttctttgaga ctgggtctcg 2040

ctttgttgcc caggctggag tggagtggcg tgatcttgge ttactgcage ctttgcctec 2100

ccggctcgag cagtcctgcc tcagctccg gagtagctgg gaccacaggt tcatgccacc 2160

atggccagcc aacttttga tgtttttag agatggggtc tcacagtgtt gccaggtg 2220

gtctcaaaact cctgggctca ggcatccac ctgtctcage ctccagagt gctgggatta 2280

caattgtgag ccaccacgtc cagctggaag ggtcaacatc ttttacattc tgcaagcaca 2340

tctgcatttt caccaccac ttcctctct tctcctttt tataatccat ttttatatcg 2400

atctcttatt ttacaataaa actttgctgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2451

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLUT1_F

<400> 3

ctttgtggcc ttctttgaag 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLUT1_R

<400> 4

ccacacagtt gctccacat 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLUT3_F

<400> 5

cggttctctc attaccttc 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLUT3_R
 <400> 6
 ggcacgactt agacattgg 19
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HKII_F
 <400> 7
 caaagtgaca gtgggtgtgg 20
 <210> 8
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HKII_R
 <400> 8
 gccaggtcct tcactgtctc 20
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFK_F
 <400> 9
 ggattactga ccgcctcttt agtt 24
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFK_R
 <400> 10
 gcattccgtg aattgtccat c 21

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LDHA_F
 <400> 11
 acaacaggat tctaggtgga ggtt 24
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LDHA_R
 <400> 12
 gagttgatgt ttttccagt ccat 24
 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> b-actin-F
 <400> 13
 agatgaccca gatcatgttt gaga 24

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> b-actin-R
 <400> 14
 atagggacat gcggagaccg 20
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> p53 siRNA #1
 <400> 15

gaaaauugcg uguggagua	19
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> p53 siRNA #2	
<400> 16	
gugcagcugu ggguugauu	19
<210> 17	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> p53 siRNA #3	
<400> 17	
gcagucagau ccuagcguc	19
<210> 18	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> p53 siRNA #4	
<400> 18	
ggagaauuu ucacccuuc	19
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Non-targeting siRNA	
<400> 19	
ugguuuacau gucgacuaa	19