



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0028854
(43) 공개일자 2011년03월22일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0086469

(22) 출원일자 2009년09월14일

심사청구일자 2009년09월14일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김상훈

서울특별시 동작구 사당동 삼성래미안 아파트 104-303

박진희

인천광역시 동구 화수동 2-17번지 궁전빌라 102호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 10 항

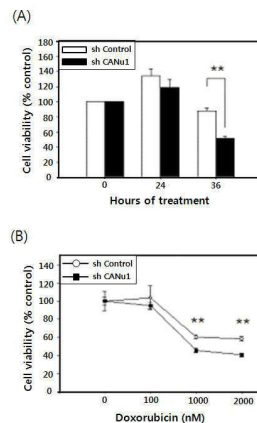
(54) CANu1 단백질을 통한 암세포 성장 억제 및 항암제 민감성 증진제

(57) 요약

본 발명은 대장암과 연관된 단백질 조절을 통한 암세포 성장 억제 및 항암제 민감성 증진제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제 민감성 증진제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 대장암과 연관된 단백질인 CANu1 단백질 발현 억제제가 항암제 투여시 암세포 세포사멸에 효과가 있는지를 DNA 손상(damage)이 가해진 세포에 CANu1 단백질 발현을 억제시킨 후, 독소루비신, 빈블라스틴 및 탁솔과 같은 항암제에 대한 암세포의 민감성을 조사해본 경우, 암세포가 항암제에 민감하게 반응하여 세포사멸이 효과적으로 유도되는 것을 통하여 확인하였다. 따라서, 상기 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 이용함으로써 낮은 농도의 항암제 사용으로 효과적인 암 치료 효과를 기대할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신충렬

서울특별시 동대문구 회기동 경희대학교 생물학과

이연수

경기도 고양시 일산구 대화동 성저마을 13단지 건
영아파트 1003-102

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 CANu1 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절하거나 CANu1 단백질의 작용을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 CANu1 siRNA 또는 shRNA 또는 이를 전사하는 유전자인 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 CANu1 siRNA 또는 shRNA를 전사하는 유전자는 바이러스 벡터에 클로닝되는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 p53 단백질의 유도를 저해시키는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 apoptosis의 표지로 알려진 PARP-1의 분리를 증가시키는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 caspase-3/7의 활성도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 암세포의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 대사 길항제계 중 메토폭사트(methotrexate), 5-플루로우리실(5-fluorouracil), 식물성 알칼로이드계 중 vinca 알칼로이드류의 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 택센(taxane)류의 탁솔(taxol), 파클리탁셀(paclitaxel), 에피도도필로톡신

(epipodophyllotoxin)류의 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide) 또는 항종양 항생제계 중 마이토마이신(mitomycin-C), 블레오마이신(bleomycin), 안트라싸이클린(anthracycline)류의 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 에피루비신(epirubicin)으로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제.

청구항 10

서열번호 4의 염기서열을 포함하는 CANu1 siRNA 또는 shRNA를 전사하는 유전자가 클로닝된 바이러스 벡터.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대장암과 연관된 단백질 조절을 통한 암세포 성장 억제 및 항암제 민감성 증진제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제 민감성 증진제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 육체를 이루는 세포에 어떤 발암인자가 작용하여 불규칙하게 분열함으로써, 그 세포 자체가 육체를 구성하는 제어로부터 벗어나 무계획적이고 일방적으로 증식하여 발생한다.

[0003] 대한암협회의 통계에 따르면, 81년 1만 7599명, 82년 2만 2962명, 83년 2만6632명, 84년 2만 8862명, 85년 3만 272명으로 암에 의한 사망자수가 해마다 늘어나고 있다. 한편, 국립의료원 암등록실이 89년 7월 1일부터 90년 6월 30일까지 조사한 <한국인 암등록 조사자료 분석보고서>에 따르면, 전국 암환자 발생건수는 4만 3205명 이었다. 또 발생률은 전체인구의 0.1% 정도로 추정되고, 남녀비는 1.3 : 1로 남자가 높았다. 연령별로는 50대 28.3%, 60대 24.7%, 40대 11.1% 순이었고, 40대 이하는 7.4%로 조사되었다. 1989년의 사망원인통계에 의하면, 질병에 의한 사인순위에서 전체의 19.36%(3만 6595명)였으며, 남녀 각각 20.87%, 17.13%로 모두 세계 1위 였다. 미국에서는 심장질환에 의한 사망률 다음으로 암이 높게 나타났으며, 일본에서는 1981년부터 암에 의한 사망률이 뇌졸중을 앞질러 제 1의 사망원인으로 나타났다. 최근 한국에서 암에 의한 사망률이 높아지고 있는 원인으로 는 먼저 평균수명이 길어짐에 따른 고령인구의 증가, 급속한 산업화에 따른 각종 공해문제, 청·장년층 흡연인구의 증가, 음주 및 성생활의 변화 등을 들 수 있다.

[0004] 이러한 암에 대한 치료의 최종목표는 체내에 있는 암세포를 완전히 소멸시켜 암을 치유시키거나 가능한한 암세포를 많이 감소시켜서 그 감소된 상태를 오래 유지하여 환자의 수명을 연장시키고 증상을 완화시키는데 있다. 이를 위하여 현재 임상에서 사용하고 있는 치료법에는 크게 1)수술 요법, 2)방사선 요법, 3)화학 요법으로 나눌 수 있다. 1)수술 요법은 가장 근본적인 방법으로 암이 발생한 원발 부위를 철저히 제거하는 수술은 현재까지 암 치료의 기본 치료 방법이다. 2)방사선 요법은 방사선을 조사하여 암세포의 생물학적 변화를 일으키는 방법이다. 방사선을 암세포에 쏘이면 암세포의 가장 중요한 DNA(핵산) 또는 세포핵막을 구성하는 단백질과 충돌하여 변형되어 암세포는 더 이상 세포분열을 할 수 없게 되고 자기수명만 살고 죽게 된다. 그러나 이와 같은 방사선에 의한 세포손상은 암세포뿐 아니라 종양에 인접하여 있는 주변의 정상 세포들도 받게된다. 따라서 피로감, 식욕부진, 오심 등의 부작용이 나타날 수 있다. 3)화학요법은 약물요법이라고도 한다. 이는 암을 치료하기 위하여 약제를 투여하는 것이다. 그러나 약제의 특수성으로 인해 여러 부작용이 나타날 수 있다. 화학요법의 투여방법은 정제 또는 캡슐제 형태의 약을 경구로 투여하는 방법과 주사제를 피하, 근육, 정맥 등으로 투여하는 방법, 그 외에 특수하게 동맥, 척수강, 복강 내로 주사제를 투여하는 방법 등이 있다.

[0005] 현재 상기 화학요법에 사용되는 항암제로는 1)대사길항제, 2)식물성 알칼로이드, 3)항종양 항생제 등이 있다. 1)대사길항제계 중 메토평렉사트(methotrexate)는 dihydrofolate reductase를 억제하며, 메토평렉사트의 세포독성을 극복하기 위하여 환원형 엽산(leucovorin)을 투여한다. 5-플루로우리실(5-fluorouracil)는 활성화되기

위해 세포내에서 대사된다. 대사물 중 fluorodeoxyuridine monophosphate는 DNA 합성에 필요한 효소의 억제제이고, fluorouridine phosphate는 RNA와 결합하여 그 가공과정과 기능을 방해하며, fluorodeoxyuridine triphosphate는 DNA와 결합하고 가닥의 절단을 초래한다. 상기 대사물의 상호작용을 위해 환원형 엽산을 필요로 하므로 leuovorin을 함께 투여한다. 2)식물성 알칼로이드계중 vinca 알칼로이드류의 빈블라스틴(vinblastine)과 빈크리스틴(vincristine)은 M상에 특이적으로 작용하며 미세소관의 조립을 억제한다. 탁센(taxane)류의 탁솔(taxol), 파클리탁셀(paclitaxel)은 미세소관의 분해를 억제함으로써 M상에 특이적으로 작용한다. 또한 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin)류의 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide)는 튜블린(tubulin)과 결합하지만 DNA 이중쇄분해를 초래하고 그 수복을 가능하게하는 topoisomerase II와 상호작용을 통해 세포독성을 나타낸다. 3)항종양 항생제계 중 마이토마이신(mitomycin-C)은 DNA와 교차결합을 형성하며, 블레오마이신(bleomycin)은 제1 철이온과 DNA에 상호작용하여 유리기를 생성하여 단일 및 이중쇄 DNA 분해를 일으킨다. G2-M상에 세포독성을 일으킨다. 또다른 항종양 항생제계 중 안트라사이클린(anthracycline)류의 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 에피루비신(epirubicin) 등은 topoisomerase II를 억제하며 세포내 유리기를 생산한다.

[0006] 대부분의 항암제는 세포내 유전인자의 본체인 핵산의 합성을 억제하거나 핵산에 직접 결합하여 그 기능을 손상 시킴으로 효과를 나타낸다. 그러나 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직세포에도 손상을 입히기 때문에 골수기능 저하, 위장관 점막손상, 탈모 등 여러 부작용이 나타난다. 항암제 사용의 가장 큰 문제점은 다른 약물과 달리 특이성이 없는 것이다. 즉, 항암제는 분열이나 증식이 빠른 세포에는 모두 작용하므로 정상적으로 세포분열이 왕성한 세포(골수세포, 위장관 상피세포, 모낭)에도 피해를 입혀 정도의 차이는 있으나 골수억제, 위장장애, 탈모 등의 부작용이 거의 모든 환자에게 발생한다. 다만 정상세포와 암세포에 대한 항암제의 효과는 질적인 차이라기보다 양적인 차이여서 암세포가 좀 더 예민하게 반응하므로 많이 파괴되고 또한 정상세포의 재생능력이 빠르기 때문에 치료효과를 거둘 수 있다.

[0007] 항암화학요법을 이용한 암치료를 있어서 장애가 되는 요소 중의 하나는 항암제내성이다. 암 환자에 대한 항암화학요법이 성공하기 위해서는 정상조직이 살아남을 수 있는 혈중농도에서 환자는 부작용을 감수할 수 있어야 하고 암세포는 살해되어야 하는데, 항암제에 대한 약제내성은 암세포를 죽일 수 있는 혈중농도에 도달할 수 있는 양의 항암제를 투여했음에도 불구하고 암세포가 죽지 않는 경우를 말한다. 항암제내성은 환자개개에 따라 다를 수 있으며 심지어 같은 조직으로부터 유래된 종양들 사이의 유전적 차이 등을 포함한 다양한 인자들에 의해 유발될 수 있다.

[0008] 상기와 같이, 종래의 암 치료를 위한 방법들 중 하나로 항암제 투여가 있었으나, 암세포의 사멸과 정상세포의 생존을 위한 적절한 농도를 결정하는 데에는 많은 문제점이 여전히 남아있다. 암세포를 더 효과적으로 치료하기 위해 높은 농도의 항암제를 투여 하게 되면 정상세포까지 세포사멸을 유도할 수 있다. 때문에 낮은 농도의 항암제를 투여함으로써 암세포의 성장을 억제하거나 사멸을 유도하는 방법의 개발이 필요하다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 대장암과 연관된 단백질로 알려진 CANu1 단백질의 발현을 억제한 후 항암제에 대한 민감성을 조사해본 경우, 암세포가 항암제에 민감하게 반응하여 세포사멸이 효과적으로 유도되는 것을 확인하였으며 이에 따라 낮은 농도의 항암제를 사용하여 암을 치료할 수 있으며 항암제에 대한 부작용도 감소 시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 CANu1 단백질 발현 억제로 암 세포의 항암제 민감성이 증가됨으로써 낮은 농도의 항암제를 사용하여 효과적으로 암 치료를 할 수 있는 치료적 적용 가능성을 확인하고, 상기 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 이용한 암세포 생장 억제 및 항암제 민감성 증진제를 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제 민감성 증진제를 제공한다. 하기의 표 1은 CANu1 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[0012] [표 1. CANu1 단백질의 아미노산 서열]

이름	아미노산 서열 (N' → C')	서열번호
CANu1 단백질	MAALGVLESD LPSAVTLLKN LQEQVMAVTA QVKSLTQKVQ AGAYPTEKGL	1
	SFLEVKDQLL LMYLMDLTHL ILDKASGGSL QGHDAVRLV EIRTVLEKLR	
	PLDQKLKYQI DKUKTAVTG SLSENDPLRF KPHPSNMMSK LSSEDEEEDE	
	AEDDQSEASG KKS VKGVSKK YVPPRLVPVH YDETEAEREK KRLEAKRRA	
	LSSSMRELK EQYSDAPEEI RDARHPHVTR QSQEDQHRIN YEESMMVRLS	
	VSKREKGRRK RANVMSSQLH SLTHFSDISA LTGGTVHLDE DQNPIKKRKK	
	IPQKGRKKKG FRRRR	

[0013]

[0014] 본 발명의 CANu1 단백질(C14orf120, 진뱅크 허가번호 XP_033371)은 대장암과 연관된 단백질로서 아직 그 기능이 명확히 밝혀진 바는 없으며, 대장암 조기진단 마커로 연구되고 있다. C14orf120 유전자는 315개의 아미노산을 암호화하고 있으며, 염색체의 14q11.2 밴드에 위치하는 것으로 알려져있다. CANu1 단백질은 Sas10/Utp3 패밀리에 속하는 Sas10 및 Utp 요소를 가지고 있으나, 이 패밀리의 정확한 기능은 알려진 바 없다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 기존에 단백질의 발현이나 작용을 억제하기 위해 알려진 어떤 물질이나 방법도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 CANu1 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절하거나 CANu1 단백질의 작용을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제를 제공한다. 여기서 CANu1 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절한다는 것은 CANu1 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 하향조절하거나, 전사후 mRNA를 분해하거나, 번역을 저해하는 등의 모든 하향조절을 포함한다. 또한, CANu1 단백질의 작용을 억제한다는 것은 상기 단백질의 활성을 억제하거나, 상기 단백질과 상호작용하는 단백질의 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 작용을 방해하는 것 등을 포함한다.

[0016] 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제의 예로는 CANu1 유전자의 RNA 간섭(RNA interference; RNAi)을 이용한 siRNA(short interfering RNA) 또는 shRNA(short hairpin RNA)를 들 수 있다. RNAi는 많은 진핵생물에서 보존된 전사후 유전자 조절의 한 방법이다. RNAi는 세포에 존재하는 짧은 이중나선 RNA(dsRNA)분자에 의해 유도된다 [Fire 등 (1998), Nature 391: 806-811]. siRNA 라고도 불리우는 이러한 짧은 dsRNA 분자는 단일가닥으로 분리된 후 RNA-유도 침묵 복합체(RNA induced silencing, RISC)에 결합하여 표적화된 mRNA를 절단하거나 번역을 저해한다 [Elbashir SM 등 (2001), Genes Dev, 15: 188-200].

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 CANu1 유전자의 mRNA와 상보적인 염기서열, 바람직하게는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 CANu1 siRNA 또는 shRNA 또는 이를 전사하는 유전자인 것을 특징으로 하는 항암제 민감성 증진제를 제공한다. 상기 CANu1 siRNA 또는 shRNA를 전사하는 유전자는 바이러스 벡터에 클로닝 되는 것을 특징으로 한다. 다음 표 2는 siRNA/shRNA에 쓰이는 CANu1의 target sequence와 siRNA/shRNA의 서열을 나타낸 것이다.

[0018] [표 2. 염기서열]

이름	염기서열 (5' → 3')	서열번호
CANu1 target sequence	sense : ACGCTTGGTTCCAGTACATTA	2
	anti-sense : TGCGAACCAAGGTCATGUAAT	3
siRNA/shRNA	UGCGAACCAAGGUCAUGUAAU	4

[0019]

[0020] 상기 shRNA는 siRNA의 염기서열을 갖는 두 개의 상보적 부분이 염기쌍을 형성하고 단일쇄의 머리핀(hairpin) 영역에 의해서 공유결합된 단일 분자로서, single strand로 약 50-70 뉴클레오티드 길이이며, 생체 내에서 stem-

loop 구조를 이루고 있다. 5-10 뉴클레오타이드의 loop 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 stem을 형성한다. shRNA는 일반적으로 생체 내에서 Pol III 프로모터부터 상보적인 DNA sequence의 전사에 의해 합성된다. Pol-III로 유도된 전사는 well-defined start site에서 시작되어 4개 이상의 티미딘(thymidine)으로 이루고 있는 선상(-TTTT-)의 second residue에서 종결되어 non-poly(A) transcript 생성한다. Pol III 프로모터는 모든 세포에서 활성화되며 shRNA의 발현이 가능하다. 전사 후 shRNA는 Dicer에 의해 loop가 절단되고 siRNA처럼 RISC와 작용하게 된다 [Tuschl, T. (2002), Cell 110(5): 56374].

- [0021] 본 발명의 항암제 민감성 증진제에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 p53 단백질의 유도를 저해시키는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 상기 p53 단백질은 종양 억제 단백질로서, 거의 모든 세포성 암의 발생 및 진행을 억제하는데 핵심 기능을 담당하고 있다. 하지만 비정상적으로 과도하게 p53이 활성화되었을 경우 역시 세포의 생존에 치명적이다. 세포에 DNA 손상이 가해지면 p53의 전사가 급격히 유도되며 p53 단백질에 인산화, 아세틸화 등 다양한 변형이 가해진다. 핵 내에서 p53은 4량체(tetramer)를 형성하여 여러 하위 표적 유전자의 프로모터에 존재하는 p53 결합부위에 결합하여 이들의 전사를 활성화시킨다. 그러나 다양한 암세포에서 발견되는 돌연변이 p53 유전자는 DNA에 결합하지 못해 전사를 활성화 시키지 못하는 결함을 지닌 p53 단백질을 암호화한다.
- [0023] 본 발명의 항암제 민감성 증진제에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 apoptosis의 표지로 알려진 PARP-1의 분리를 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 상기 PARP-1(poly(ADP-ribose)polymerase-1)은 세포핵에 존재하며 DNA 손상 감시 기능을 하는 중요한 단백질로서, DNA에 손상이 가해져서 이중나선이 끊어졌을 때 이를 복구하는 역할을 하며 세포의 세포사멸 과정에 관여한다.
- [0025] 본 발명의 항암제 민감성 증진제에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 caspase-3/7의 활성도를 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 상기 caspase-3/7은 CANu1 mRNA의 발현을 저해하며, 세포사멸 과정에 중요한 역할을 한다.
- [0027] 본 발명의 항암제 민감성 증진제에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 암세포의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서, DNA 손상이 가해졌을 때 조골암세포에서 CANu1의 apoptotic 활성화에 대하여 연구함으로써, CANu1 단백질이 억제되었을 때 암세포의 세포사멸을 확인하였다.
- [0028] 본 발명의 항암제 민감성 증진제에 있어서, 상기 CANu1 단백질의 발현 억제제는 통상적으로 사용되는 어떠한 항암제도 될 수 있으나, 대사 길항제계 중 메토폭스레이트(methotrexate), 5-플루로우리실(5-fluorouracil), 식물성 알칼로이드계 중 vinca 알칼로이드류의 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 택센(taxane)류의 탁솔(taxol), 파클리탁셀(paclitaxel), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin)류의 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide) 또는 항종양 항생제계 중 마이토마이신(mitomycin-C), 블레오마이신(bleomycin), 안트라싸이클린(anthracycline)류의 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 에피루비신(epirubicin)의 군에서 선택된 항암제에 대한 민감성을 증가시키는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는, 독소루비신, 빈블라스틴, 탁솔에 대한 감수성에 대하여 확인하였다. 즉, DNA damage가 가해졌을 때, shRNA를 이용한 CANu1 단백질의 발현 억제는 암세포의 성장 억제를 나타내었으며, 단백질 발현 억제 후, 독소루비신을 처리하여 세포 증식률(cell viability)을 측정한 결과, 처리하지 않았을 때보다 50% 이상 세포 증식률이 낮아짐을 관찰하였다. 따라서 CANu1 단백질의 발현 억제는 항암제 독소루비신에 대한 감수성을 증가시킨다. 또한, 항암제 빈블라스틴과 탁솔에 대한 민감성을 조사한 결과도 이와 유사하였다.
- [0029] 본 발명의 항암제 민감성 증진제는 치료용 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 치료용 약제의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.1 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 CANu1 siRNA 또는 shRNA를 전사하는 유전자가 클로닝된 바이러스 벡터를 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0033] 실시예 1. CANu1 단백질 발현 억제 세포주 구축.

[0034] CANu1에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 렌티 바이러스와 대조군 바이러스를 생산하여 조골암세포에 감염시켰다. 먼저, CANu1에 상보적인 short-hairpin sequence의 유전자(sense : 5'- CCG GAC GCT TGG TTC CAG TAC ATT ACT CGA GTA ATG TAC TGG AAC CAA GCG TTT TTT -3'와 anti-sense : 5'- AAT TCA AAA AAC GCT TGG TTC CAG TAC ATT ACT CGA GTA ATG TAC TGG AAC CAA GCG -3')를 합성하여 lentiviral 벡터인 pLKO.1 puro(addgene)의 AgeI, EcoRI 사이트에 클로닝하였다. 대조군 세포는 스크램블 shRNA 서열(pLKO.1-scramble shRNA, Addgene)을 이용하였다. 바이러스는 293T-세포에 pLKO.1-shRNA, envelope(pMD2G), packaging(pCMVdR8.74) 벡터를 transfection하여 생성하였다. 상기 방법으로 생성된 렌티 바이러스를 U2OS 세포에 감염시킨 후, 1.5 µg/ml의 퓨로마이신(puromycin)을 2일 동안 처리하여 바이러스에 감염된 세포만 선택적으로 배양하였다. 이후, RT-PCR 방법등을 이용하여 CANu1 mRNA level을 측정하여 CANu1 발현 억제를 확인하였다 (<http://www.addgene.org> 참조).

[0035] 실시예 2. 항암제 처리 후, 세포증식률(cell viability) 측정.

[0036] 96 well-plate에 CANu1 발현이 정상인 대조군 세포와 CANu1의 발현이 낮아진 실험군 세포를 10000개 씩 심었다. 그 후, 1 µM 독소루비신(doxorubicin), 7 nM 탁솔(taxol)과 200 nM 빈블라스틴(vinblastine)을 처리하였다. 세포증식률은 20 µl의 MTS 용액을 넣고 1 시간 동안 배양한 후, VERSA max microplate(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 290nm에서 흡광도를 측정하여 얻어내었다.

[0037] 실시예 3. 세포 사멸 및 세포 주기별 그물 측정.

[0038] CANu1 발현이 정상인 대조군 세포와 CANu1의 발현이 낮아진 실험군 세포를 100 mm dish에 심은 후, 항암제 1 µM 독소루비신(doxorubicin), 7 nM 탁솔(taxol)과 200 nM 빈블라스틴(vinblastine)을 처리하였다. 시간대 별로 배양된 세포를 0.25% 트립신을 이용하여 수확하고, 원립분리 하여 세포만 남기고 상층액을 흡입하였다. 세포를 -20 °C에서 70% 에탄올로 30분간 고정시켜 주었다. 고정된 세포를 PBS로 2번 세척하였다. FACS(Flow cytometry Caliber) 분석기에 넣기 전에 DNA staining solution(0.1 mg/ml propidium iodine이 포함된 PBS, 1 mg/ml RNase, 0.1% triton X-100)으로 30분간 염색하였다. 그 후, DNA 함량(DNA content)을 유세포 분석기(flow cytometer)(Becton-Dickinson, Franklin lake, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0039] 실시예 4. 웨스턴 블롯팅(Western blotting).

[0040] CANu1 발현이 정상인 대조군 세포와 CANu1의 발현이 낮아진 실험군 세포에 항암제를 처리한 후, 24 시간 후에 PBS로 세척하고 세포를 수거한 후, 완충용액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, protease inhibitor cock tail(Roche, Mannheim, Germany), 50 mM NaF, 0.2 M Na₃VO₄)을 처리하여 단백질 추출물(extract)을 수거하였다. SDS-PAGE를 통하여 단백질 추출물을 분리시킨 후, 니트로셀룰로오스막(nitrocellulose membrane)으로 옮기고 5% non-fat milk가 첨가된 TBS-T로 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. p53, PARP-1, actin, CANu1 항체로 일차반응을 시킨 후, TBS-T로 세척한 후 HRP(horseradish-peroxidase) conjugated secondary antibodies로 이차반응 시켰다. Enhanced chemiluminescence kit(Santa-cruz)를 이용하여 단백질 신호를 확인하였다.

[0041] 실시예 5. Caspase-3/7 활성도 측정.

[0042] 96-well 배양판에 CANu1 발현이 정상인 대조군 세포와 CANu1의 발현이 낮아진 실험군 세포를 심은 후, 1 mM 독소루비신(doxorubicin)을 처리하였다. Caspase-3/7 활성도를 측정하기 위해 caspase-Glo 3/7 reagent(Promega, Madison, USA)를 이용하였다. 독소루비신을 처리한지 24 시간 후, 상기 시약 100 μ l을 넣고 1 시간 동안 인큐베이션한 후, GloMax20/20 luminometer(Turner Biosystem, Sunnyvale, USA)로 발광률을 조사하였다.

[0043] **실시예 6. DNA 손상(damage)이 가해진 상태에서 CANu1 단백질 발현 억제에 의한 암세포 성장 억제 효과.**

[0044] **6-1. 독소루비신(doxorubicin)에 대한 세포 증식률 측정**

[0045] 본 발명에서는 다른 DNA 손상(damage)이 가해진 상황에서, 유전체 안정성에 관련한 CANu1의 역할을 조사하였다. 본 실시예의 세포 증식률 측정방법은 상기 실시예 2에 나타내었다.

[0046] 도 1의 (A)에서 보이는 것과 같이, shRNA를 이용하여 CANu1 mRNA의 발현을 낮춘 U2OS 세포(실험군)는 외부 스트레스가 없는 상태에서는 세포 증식률에 큰 차이가 없었으나, 1 mM 독소루비신을 가한 후 36 시간 동안 인큐베이션 하였을 때, CANu1 발현이 정상인 대조군에 비하여 53% 낮은 세포 증식률이 관찰되었다. 또한, 도 1의 (B)에서 보이는 것과 같이, 독소루비신을 농도별로 처리하여 36 시간 동안 인큐베이션한 후, 세포의 증식률을 조사한 결과, 독소루비신을 1 nM, 2 nM 처리하였을 때, CANu1 발현이 억제된 세포(실험군)에서 대조군보다 낮은 수치를 나타내었으며 이는 통계적으로 유의하였다. 따라서 CANu1 발현억제는 독소루비신에 대한 감수성을 높이며, 이는 DNA 손상(damage)에 반응하여 세포 증식률을 유지시킴에 있어서 CANu1이 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

[0047] **실시예 7. CANu1의 발현이 억제된 조골암세포의 증가된 세포사멸 확인.**

[0048] **7-1. FACS(Flow cytometry Caliber) 분석을 이용한 세포사멸 분석**

[0049] CANu1의 발현이 억제된 U2OS 세포(실험군)에 독소루비신을 36 시간 동안 처리한 뒤 FACS 분석기를 이용하여 apoptosis population의 비율을 관찰하였다. 본 실시예의 세포사멸 분석방법은 상기 실시예 3에 나타내었다.

[0050] 도 2의 (A)에서 나타난 것과 같이, 1 mM 독소루비신을 처리하였을 때, CANu1의 발현이 정상인 대조군에서는 apoptotic cell(sub-G1)의 비율이 1.3%에서 13%로 증가하였고, CANu1의 발현이 억제된 실험군에서는 1.2%에서 37.8%로 증가하였다.

[0051] **7-2. Annexin dye를 이용한 세포사멸 분석**

[0052] CANu1의 발현억제로 인해 세포사멸이 증가된 결과를 annexin 염색으로 확인하였다.

[0053] 도 2의 (B)에 나타난 것과 같이, CANu1의 발현이 낮은 U2OS 세포(실험군)에서 다수의 pre-apoptotic cells(annexin에 positive)과 post-apoptotic cells(annexin과 PI에 모두 positive)을 발견하였다. 반면, 대조군에서는 적은 수의 dead cells(PI positive)만을 관찰하였다. 이러한 결과는 CANu1의 발현억제가 세포 내 유전체 안정성을 약화시켜 DNA 손상에 반응하여 세포사멸을 유도함을 나타낸다.

[0054] **실시예 8. CANu1의 발현억제가 세포사멸 경로(apoptosis pathway)에 미치는 영향 조사.**

[0055] **8-1. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 이용한 단백질 발현 조사**

[0056] DNA 손상을 가했을 때, CANu1에 의해 영향을 받는 세포사멸 관련 단백질을 조사하였다. 본 실시예의 웨스턴 블롯팅 방법은 상기 실시예 4에 나타내었다.

[0057] 도 3의 (A)에 나타난 것과 같이, CANu1의 발현이 억제된 세포(실험군)에서는 CANu1 발현이 정상인 대조군에 비하여 독소루비신에 의한 p53 단백질의 발현이 억제되었다. 또한, Apoptosis의 마커라고 여겨지는 PARP의 cleavage가 대조군에서는 독소루비신 처리 후 12 시간부터 유도된 반면, CANu1 발현이 감소된 세포(실험군)에서는 더 이른 6 시간부터 유도되었다.

[0058] **8-2. Caspase-3/7 활성 측정**

- [0059] 본 실시예의 caspase-3/7 활성 측정방법은 상기 실시예 5에 나타내었다.
- [0060] Caspase-3/7 활성을 측정한 결과, 도 3의 (B)에 나타낸 것과 같이, DNA 손상에 반응하여 CANu1의 발현이 억제된 세포(실험군)에서 CANu1의 발현이 정상인 대조군에서보다 2.5배 높은 caspase-3/7 활성을 나타냈다. 이러한 caspase-3/7 활성의 변화가 CANu1에 의한 것인지를 확인하기 위하여, CANu1의 발현이 억제된 U2OS 세포에 CANu1을 다시 transfection시켜 과발현을 유도한 다음 caspase-3/7 활성도를 조사하였다. 그 결과, 도 3의 (C)에 나타낸 것과 같이, CANu1 발현억제에 의해 증가되었던 caspase-3/7의 활성이 다시 감소하였다. 상기의 결과로, DNA 손상이 가해진 상황에서 CANu1은 세포사멸에 관련하는 단백질들의 활성을 조절하여 세포내에서 세포사멸을 유도함을 확인하였다.

[0061] **실시예 9. 다른 항암제에 대한 CANu1 조절에 따른 세포사멸 증진 효과 확인.**

[0062] **9-1. 빈블라스틴(vinblastine)에 대한 민감성 조사**

- [0063] CANu1의 발현이 억제된 세포(실험군)에서 독소루비신에 의한 세포사멸의 유도가 다른 항암제에서도 효과가 있는지 조사하기 위하여 microtubule-disrupting agent인 빈블라스틴(vinblastine)을 CANu1 발현이 억제된 세포에 처리한 후 세포 증식률을 측정하였다.
- [0064] 측정 결과, 도 4의 (A)에 나타낸 것과 같이, 200 nM의 빈블라스틴을 처리할 경우, CANu1이 낮게 발현된 세포(실험군)의 세포 증식률은 대조군에 비하여 처리 3시간 후 53%, 12시간 후 52%가 각각 감소하였다.

[0065] **9-2. 탁솔(taxol)에 대한 민감성 조사**

- [0066] 상기 실시예 9-1과 같이 CANu1의 발현이 억제된 세포(실험군)에 탁솔(taxol)을 처리한 후 세포 증식률을 측정하였다.
- [0067] 측정 결과, 도 4의 (B)에 나타낸 것과 같이, 7 nM의 탁솔을 처리할 경우, 처리 3시간 후부터 CANu1의 발현이 억제된 세포의 세포 증식률이 대조군에 비해 56%가 감소하였으며, 12시간 후 41%가 감소하였다.

산업이용 가능성

- [0068] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 대장암과 연관된 단백질로 알려진 CANu1 단백질의 발현을 억제하는 경우, 항암제에 대한 암세포의 감수성이 증가됨으로써 암세포의 세포사멸을 효과적으로 유도 할 수 있다.
- [0069] 상기 실시예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 생체내 암세포의 항암제 민감성을 증진시키기 위한 CANu1 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제 민감성 증진제에 관한 것으로, DNA 손상(damage)이 가해진 세포의 CANu1 단백질의 발현을 억제시킨 후 여러 항암제에 대한 민감성을 조사한 결과 암세포가 항암제에 민감하게 반응하여 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 낮은 농도의 항암제를 사용하여 암을 치료 할 수 있으며, 항암제에 대한 부작용도 감소시킬 수 있다. 또한 향후 CANu1 단백질의 발현 감소 시스템을 활용한 화학요법 병용치료제로의 사용이 기대된다.

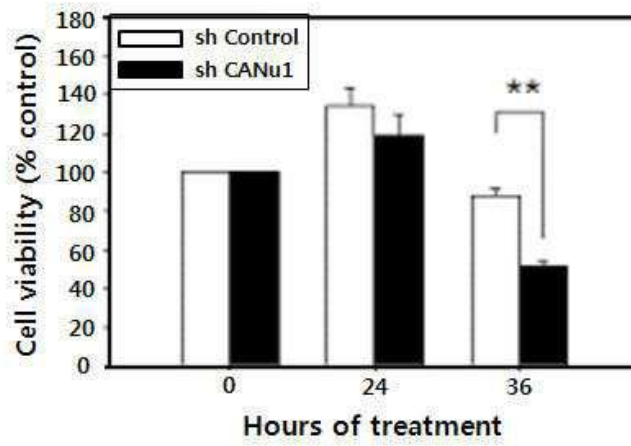
도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1은 CANu1 단백질 발현을 억제시킨 U2OS 세포에 독소루비신 처리 후, cell viability 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [0071] 도 2의 (A)는 CANu1 단백질 발현을 억제시킨 U2OS 세포에 독소루비신 처리 후, FACS 분석으로 세포사멸을 분석한 결과를 나타낸 것이며, 도 2의 (B)는 annexin dye를 이용하여 세포사멸을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [0072] 도 3의 (A)는 CANu1 단백질 발현을 억제 시켰을 때, CANu1의 영향을 받는 세포사멸 관련 단백질의 발현을 조사하여 나타낸 것이다. 도 3의 (B)와 (C)는 CANu1 단백질 발현을 억제 시켰을 때, caspase-3/7 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.
- [0073] 도 4는 CANu1 조절에 따른 빈블라스틴(A)과 탁솔(B)에 대한 세포사멸 분석 결과를 나타낸 것이다.

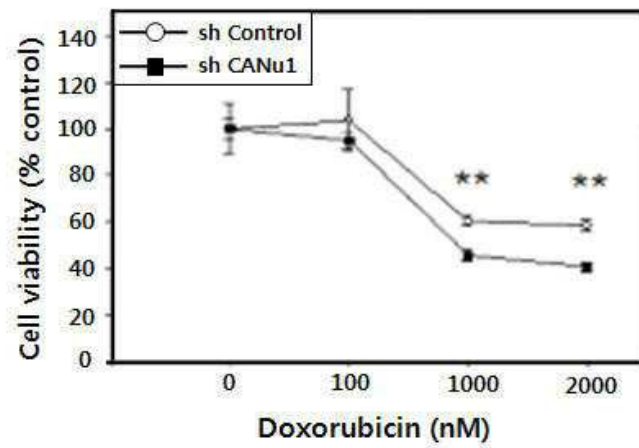
도면

도면1

(A)

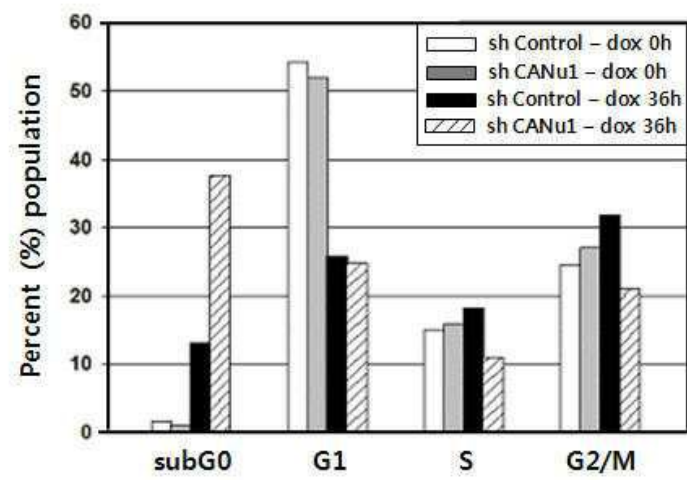


(B)

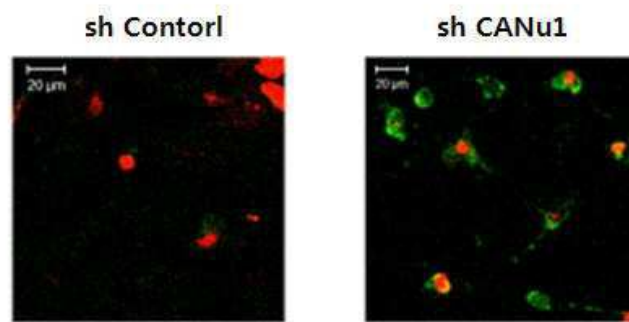


도면2

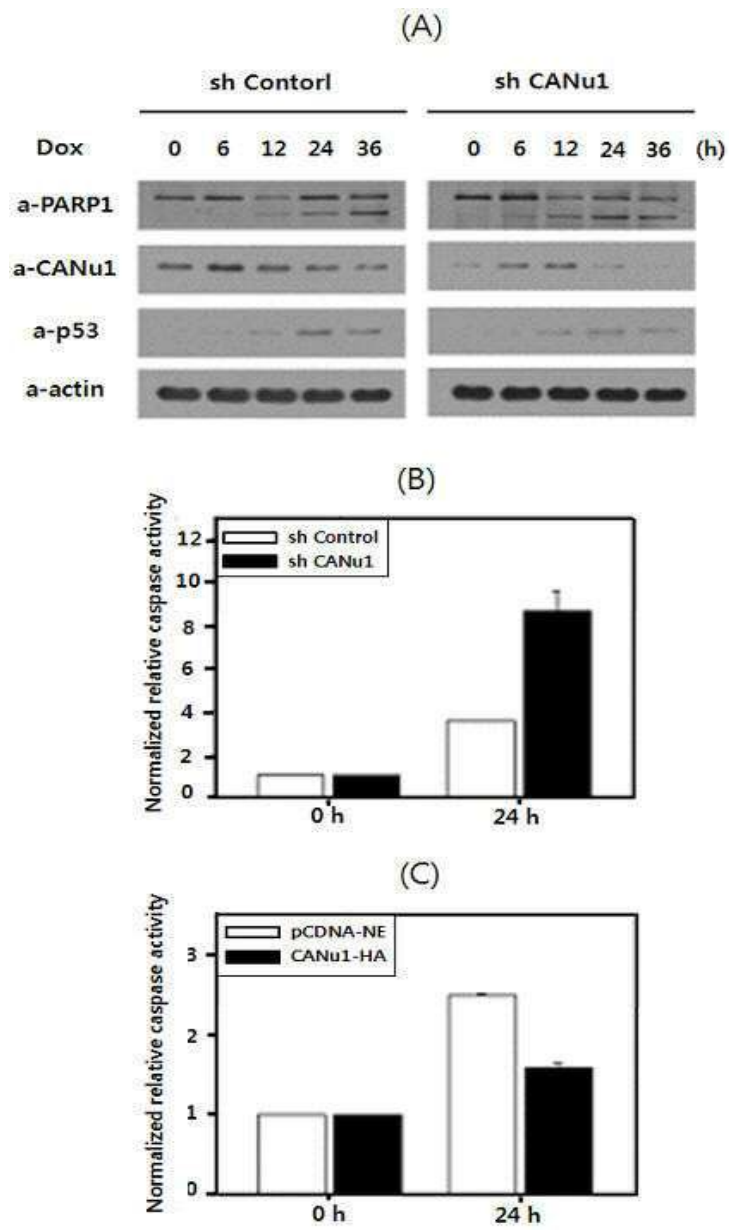
(A)



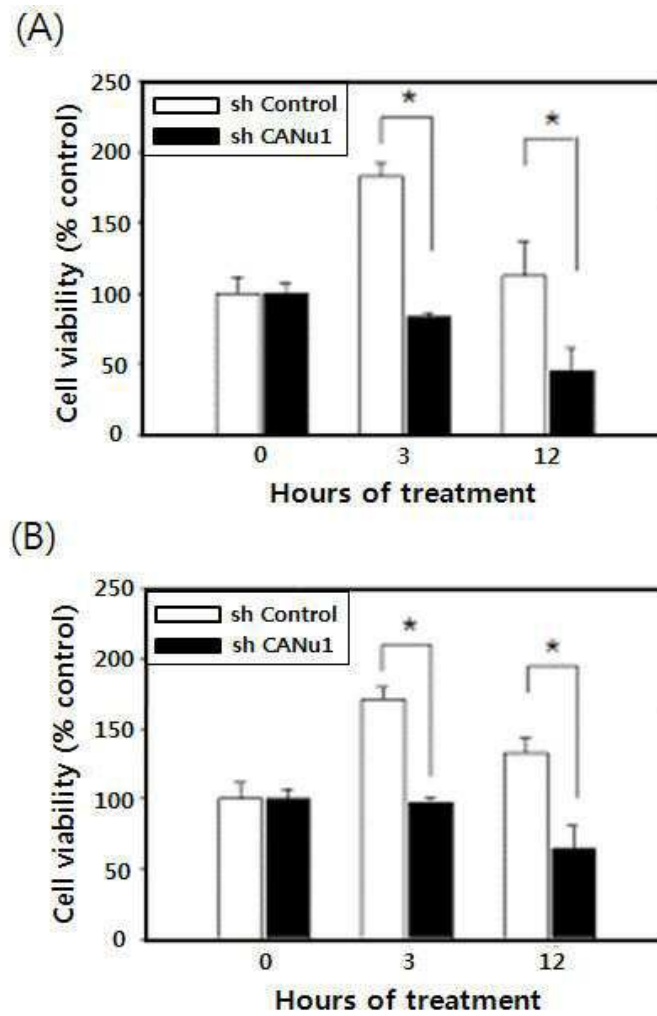
(B)



도면3



도면4



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Sensitivity enhancer to anti-cancer drug and growth inhibition of cancer cell by control of CANu1 protein

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Leu Gly Val Leu Glu Ser Asp Leu Pro Ser Ala Val Thr

1	5	10	15
Leu Leu Lys Asn Leu Gln Glu Gln Val Met Ala Val Thr Ala Gln Val	20	25	30
Lys Ser Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Gly Ala Tyr Pro Thr Glu Lys	35	40	45
Gly Leu Ser Phe Leu Glu Val Lys Asp Gln Leu Leu Leu Met Tyr Leu	50	55	60
Met Asp Leu Thr His Leu Ile Leu Asp Lys Ala Ser Gly Gly Ser Leu	65	70	75
Gln Gly His Asp Ala Val Leu Arg Leu Val Glu Ile Arg Thr Val Leu	85	90	95
Glu Lys Leu Arg Pro Leu Asp Gln Lys Leu Lys Tyr Gln Ile Asp Lys	100	105	110
Leu Ile Lys Thr Ala Val Thr Gly Ser Leu Ser Glu Asn Asp Pro Leu	115	120	125
Arg Phe Lys Pro His Pro Ser Asn Met Met Ser Lys Leu Ser Ser Glu	130	135	140
Asp Glu Glu Glu Asp Glu Ala Glu Asp Asp Gln Ser Glu Ala Ser Gly	145	150	155
Lys Lys Ser Val Lys Gly Val Ser Lys Lys Tyr Val Pro Pro Arg Leu	165	170	175
Val Pro Val His Tyr Asp Glu Thr Glu Ala Glu Arg Glu Lys Lys Arg	180	185	190
Leu Glu Arg Ala Lys Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ser Val Ile Arg Glu	195	200	205
Leu Lys Glu Gln Tyr Ser Asp Ala Pro Glu Glu Ile Arg Asp Ala Arg	210	215	220
His Pro His Val Thr Arg Gln Ser Gln Glu Asp Gln His Arg Ile Asn	225	230	235
			240

Tyr Glu Glu Ser Met Met Val Arg Leu Ser Val Ser Lys Arg Glu Lys
245 250 255

Gly Arg Arg Lys Arg Ala Asn Val Met Ser Ser Gln Leu His Ser Leu
260 265 270

Thr His Phe Ser Asp Ile Ser Ala Leu Thr Gly Gly Thr Val His Leu
275 280 285

Asp Glu Asp Gln Asn Pro Ile Lys Lys Arg Lys Lys Ile Pro Gln Lys
290 295 300

Gly Arg Lys Lys Lys Gly Phe Arg Arg Arg Arg
305 310 315

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
acgcttggtt ccagtacatt a 21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense of CANu1 target sequence

<220>
<223> anti-sense of CANu1 target sequence

<400> 3
tgccaaccaa ggcatguaa t 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA/shRNA of CANu1 target sequence

<400> 4

ugcgaaccaa ggucauguuaa u

21