

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0101017
(43) 공개일자 2023년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 41/0038 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0190766
(22) 출원일자 2021년12월29일
심사청구일자 2021년12월29일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
이재선
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호(서초동, 삼풍아파트)
황현정
경기도 부천시 부광로41번길 64, 101동 209호(괴안동, 태송팰리채아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

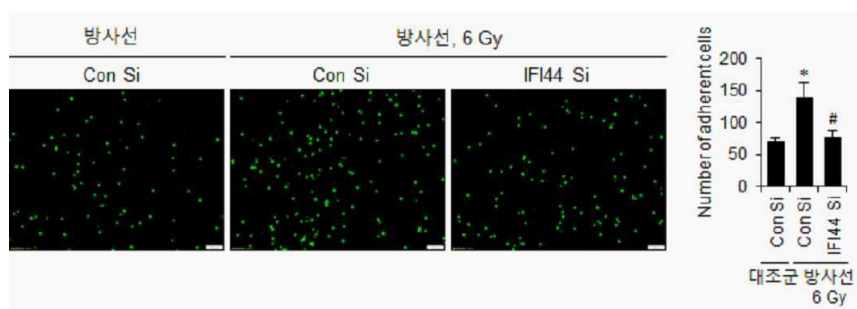
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 IFI44의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물에 관한 것으로, 혈관 내피세포에 대한 암세포의 부착 및 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도를 억제함에 따라, 방사선 민감성 증진용 약학 조성물 또는 방사선요법용 항암치료 보조제로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

강주희

인천광역시 계양구 효서로 381, 215동 705호(작전동, 현대2-1차아파트)

류지간

인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 30, 1503동 1603호(송도동, 송도 더샵 퍼스트파크 F15BL)

강동희

대전광역시 유성구 도안대로 560, 110동 504호(봉명동, 도안마을1단지)

백유림

인천광역시 부평구 장제로 150, A동 1208호(부평동, 유진마젤란아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137725
과제번호	2021R1A5A2031612
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	세포교신 제어 연구센터
기 여 율	50/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133236
과제번호	2020R1A2B5B02002375
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	세포사멸/세포증식과 차별화되는 암세포 노화에서의 p53과 AKT의 기능 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 IFI44의 발현 또는 활성 억제제는 혈관 내피세포에 대한 암세포의 부착을 억제하는 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 IFI44의 발현 또는 활성 억제제는 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도를 억제하는 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 발현 억제제는 IFI44의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 활성 억제제는 IFI44의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물.

청구항 6

IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하며, 방사선 요법과 동시에 병용되는 것을 특징으로 하는 방사선요법용 항암치료 보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0003] 암의 치료법은 수술, 방사선 치료법 및 항암 화학 요법으로 크게 나눌 수 있는데, 전 세계적으로 방사선 치료를 받는 암 환자의 수가 매년 증가하고 있는 추세에 있어 암 치료에 있어 방사선 치료의 중요성 또한 증가하고 있지만, 암세포의 방사선내성 획득, 고선량 방사선 치료시 정상 조직의 손상 등이 치료의 효율을 떨어뜨리는 부작용을 수반한다. 방사선의 부작용을 줄이고 내성을 극복하기 위해 방사선과 병용하여 투여할 때 방사선의 항암 효과를 증가시키는 방사선 민감제에 관한 연구 개발이 이루어지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 미국등록특허 제 8445198호(2009.01.22. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 혈관 내피세포에 대한 암세포의 부착 및 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도를 억제하는 IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물 또는 방사선요법용 항암치료 보조제를 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명에 따르면, IFI44의 발현 또는 활성 억제제는 혈관 내피세포에 대한 암세포의 부착 및 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도를 억제함에 따라, 방사선 민감성 증진용 약학 조성물 또는 방사선요법용 항암치료 보조제로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1A는 인간 혈관내피세포(HUVEC)에 방사선 조사한 3일 후 세포노화 연관 베타-갈락토시다아제(Senescent-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 염색 결과를 나타낸다.

도 1B는 인간 혈관내피세포(HUVEC)에 방사선 조사 후 실시간 유전자 증폭 및 웨스턴블로팅을 통한 IFI44의 변화를 분석한 결과를 나타낸다.

도 2는 IFI44 억제에 의한 혈관내피세포 노화 유도 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 IFI44 억제 시, 방사선에 의해 노화된 혈관내피세포에 유방암 세포 부착의 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0010] 본 발명자는 기존의 방사선 항암 치료의 효율이 떨어지고 부작용을 유발하는 문제를 극복할 수 있는 조성물 개발에 예의 노력한 결과, IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 기반으로 하여, 암세포의 부착 및 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도를 억제하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 IFI44의 발현 또는 활성 억제제는 혈관 내피세포에 대한 암세포의 부착 및 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 발현 억제제는 IFI44의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 상기 활성 억제제는 IFI44의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명에서 용어, “IFI44의 발현 또는 활성 억제제”는 “IFI44 억제제”와 동일한 의미로서 IFI44의 mRNA 발

현 또는 단백질 활성을 감소시키는 물질을 통칭한다. 보다 구체적으로는 IFI44에 직접적으로 작용하거나 그의 수용체에 간접적으로 작용하는 등의 방식을 통해 IFI44의 발현 또는 활성을 감소시키는 모든 물질을 포함할 수 있다. 상기 IFI44 발현을 저해하는 물질은 IFI44를 표적으로 하여 IFI44의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한 없이 사용 가능하다. IFI44 발현을 저해하는 물질의 예로, IFI44의 mRNA에 특이적으로 결합하여 IFI44 mRNA의 발현을 저해하는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스올리고뉴클레오타이드, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids) 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다. 또한, IFI44 활성을 저해하는 물질의 예로, IFI44의 단백질에 특이적으로 결합하여 IFI44 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 앵타머, 화합물 등이 포함되며, 바람직하게는 항체이나 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에서 용어, “siRNA(small interference RNA)”는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 21 내지 25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각을 의미한다. 본 발명의 siRNA는 센스 가닥(mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일체 구조를 가질 수 있다. 본 발명의 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사를 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.

[0018] 본 발명에서 용어, “shRNA(short hairpin RNA)”는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시키는 방식을 이용한다. 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져있다.

[0019] 본 발명에서 용어, “miRNA(microRNA)”는 21-25 뉴클레오타이드의 단일 가닥 RNA 분자로서, 타겟 mRNA의 파쇄 또는 해독단계에서의 억제를 통하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질이다. 이러한 miRNA는 두 단계의 프로세싱으로 이루어진다. 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNaseIII 타입효소에 의해 70 ~ 90 염기 정도의 스템-루프 구조, 즉 pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)라는 효소에 의해 절단되어 21 ~ 25 염기의 성숙한 miRNA로 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로써 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도한다. miRNAs는 다양한 생리학적 현상 및 질환에 관여한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타낸다.

[0021] 본 발명에서 용어, "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 IFI44에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수항체도 포함된다. 본 발명에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0022] 본 발명에서 용어, "앵타머"는 소정의 표적 분자에 대한 결합활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있는데, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득되는 물질이다. 상기 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적이 가능한 능력을 차단할 수 있다.

- [0023] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 유회제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 유회제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 유회제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01mg/kg ~ 200mg/kg, 구체적으로는 0.1mg/kg ~ 200mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1mg/kg ~ 100mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명은 IFI44(Interferon Induced Protein 44)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하며, 방사선 요법과 동시에 병용되는 것을 특징으로 하는 방사선요법용 항암치료 보조제를 제공한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 항암치료 보조제는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 의한 방사선요법용 항암치료 보조제는 피하주사로 투여되는 것이 바람직하다. 상기 보조제는 또한 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 방사선요법용 항암치료 보조제는 항암 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.
- [0031] 본 발명의 방사선요법용 항암치료 보조제는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료학적으로 유효한 (therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 및 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 병용되는 항암요법의 종류, 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예컨대 성인기준으로 1회 1mg 내지 1000mg의 본 발명의 항암치료 보조제를 투여할 수 있다.
- [0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0035] **[실시예 1] 노화 연관 타겟 분자 IFI44의 방사선 조사 후 변화 분석**
- [0036] 방사선에 의해 혈관내피세포 노화 유도 후 IFI44의 변화를 분석하기 위해, 먼저 방사선 조사를 통해 세포 노화

를 유도하였다. 인간 혈관내피세포(HUVEC)에 방사선 6Gy를 조사하고 3일 후 세포노화 연관 베타-갈락토시다아제(Senescent-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 염색법을 통해 세포노화관련 베타-갈락토시다아제를 측정하여 노화 유무를 확인하였다. 구체적으로, 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)에 누적선량이 6Gy가 되도록 방사선을 조사한 후 지름이 60mm인 배양접시에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 배양접시 내의 배지를 제거한 후 DPBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 농도가 3.7%인 포름알데하이드(formaldehyde) 세포고정액을 첨가하여 5분 동안 세포를 고정시켰다. DPBS로 세포고정액을 세척한 후 배양접시에 베타-갈락토시다아제 염색용액[1mg/ml X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -Dgalactoside), 40mM citric acid/sodium phosphate(pH 5.7), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl 및 2mM $MgCl_2$]을 1mL 처리하여 37°C 세포 배양기에서 12 내지 16시간 동안 염색하였다. 대조군은 방사선을 처리하지 않고 배양한 인간 탯줄 정맥 내피세포를 사용하였고, 염색된 베타-갈락토시다아제는 광학 현미경을 이용하여 세포 모양과 염색 여부를 관찰하였다.

[0037] 그 결과, 방사선 조사한 실험군은 대조군과 비교하여 염색이 된 것을 확인하였고, 이를 통해 혈관 세포 노화가 유도되었음을 확인하였다(도 1A).

[0038] 또한, 인간 혈관내피세포(HUVEC)에 방사선 6Gy를 조사한 후, 실시간 유전자 증폭과 웨스턴블로팅을 통해, 노화 연관 신규 타겟 분자 IFI44의 mRNA와 단백질 양의 변화를 확인하였다. IFI44의 mRNA 양의 변화는 실시간 중합효소 연쇄반응으로 확인하였다. 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)에 누적선량이 6Gy가 되도록 방사선을 조사한 후 지름이 60mm인 배양접시에서 2일 동안 배양하였다. 배양된 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)는 배지를 제거하고 DPBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 1mL DPBS를 넣고 스크래퍼로 세포를 모은 후, TRIzol을 넣어 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA와 RevertAid M-MuLV RTase를 이용하여 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)를 합성하였다. IFI44의 mRNA에 대한 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR, RT-PCR)을 수행하였으며, 방사선 조사된 인간 탯줄 정맥 내피세포(HUVEC)에서 IFI44 mRNA 양 변화를 측정하였다. IFI44 단백질 양의 변화는 웨스턴블로팅 방법으로 확인하였다. 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)에 누적선량이 6Gy가 되도록 방사선을 조사한 후 지름이 60mm인 배양접시에서 1~3일 동안 배양하였다. 배양된 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)는 배지를 제거하고 DPBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 1mL DPBS를 넣고 스크래퍼로 세포를 모은 후, RIPA buffer(5M NaCl, 10% Triton X-100, Deoxycholic Acid, 10% SDS, 1.5M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M EDTA 및 H_2O)를 넣고 세포를 깨어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford assay로 정량한 후 SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 이동시키고, 각 단백질에 특이적인 1차 항체 및 2차 항체를 순서대로 붙였다. 그 후 TBST로 워싱 후, ECL reagents(Thermo Scientific)로 단백질 양을 확인하였다.

[0039] 그 결과, 방사선 조사 후 IFI44 mRNA의 발현 및 단백질 양이 증가하는 것을 확인하였다(도 1B).

[실시예 2] IFI44 억제에 의한 혈관내피세포 노화 유도 영향 분석

[0042] IFI44 억제에 의한 혈관내피세포 노화 유도 영향을 분석하기 위해, 인간 혈관내피세포(HUVEC)에 Control siRNA(Con Si, 5' -CCUACGCCACCAUUUCGU(dTdT)-3') 및 IFI44 siRNA(IFI44 Si, 5' -CACUGUUUGUUGUGAUGU(dTdT)-3')를 transfection한 후, 방사선 6Gy 조사하여 3일 동안 배양하였다. 3일 동안 배양 후 세포노화 연관 베타-갈락토시다아제(Senescent-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 염색법을 통해, 방사선에 의한 인간 혈관내피세포(HUVEC)의 노화 유도 여부를 확인하였다. 구체적으로, 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)에 누적선량이 6Gy가 되도록 방사선을 조사한 후 지름이 60mm인 배양접시에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 배양접시 내의 배지를 제거한 후 DPBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 농도가 3.7%인 포름알데하이드(formaldehyde) 세포고정액을 첨가하여 5분 동안 세포를 고정시켰다. DPBS로 세포고정액을 세척한 후 배양접시에 베타-갈락토시다아제 염색용액[1mg/ml X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -Dgalactoside), 40mM citric acid/sodium phosphate(pH 5.7), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl 및 2mM $MgCl_2$]를 1mL 처리하여 37°C 세포 배양기에서 12 내지 16시간 동안 염색하였다. 대조군은 방사선을 처리하지 않고 배양한 인간 탯줄 정맥 내피세포를 사용하였고, 염색된 베타-갈락토시다아제는 광학 현미경을 이용하여 세포 수와 염색 여부를 관찰하였다.

[0043] 그 결과, 대조군과 비교하여 방사선 조사한 실험군에서 염색이 되고 세포수가 증가하지 않는 것을 통해 세포 노

화가 유도되었음을 확인하였고, IFI44 발현 억제 시 방사선 조사에 의한 세포 노화 유도가 억제됨을 확인하였다(도 2).

[실시예 3] IFI44 억제 시, 방사선에 의한 노화된 혈관 내피세포에 유방암 세포 부착의 영향 분석

IFI44 억제 시, 방사선 의한 노화 유도 세포의 암세포 부착의 영향을 분석하기 위해, 종양-혈관 내피세포 부착 분석 방법을 이용하여 인간 혈관내피세포(HUVEC)에 대한 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)의 부착을 확인하였다. 구체적으로, 96 웰 플레이트에 인간 태줄 정맥 내피세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 시딩하여, 세포가 단층(monolayer)이 되도록 준비하였다. 준비된 세포에 제작된 IFI44 억제제(siRNA)를 형질주입(transfection)시켜 1일 동안 배양하였다. 배양된 세포에 6Gy의 방사선을 조사하여 1일 동안 배양하였다. 각 웰에 칼세인-AM(Calcein-AM)으로 염색한 암세포를 농도가 1×10^3 cells/well이 되도록 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 상기 암세포는 유방암 세포인 MDA-MB-231을 사용하였다. 배양 종료 후 DPBS로 웰을 세척하여 부착되지 않은 암세포를 제거하였으며, 부착된 암세포를 형광현미경으로 관찰하여 IFI44 억제제의 암세포 부착 억제 효과를 확인하였다. 대조군 1은 실험군과 동일하게 준비하되, 방사선을 조사하지 않았다. 또한 대조군 2는 실험군과 동일하게 준비하되, 방사선을 6Gy 조사하였다.

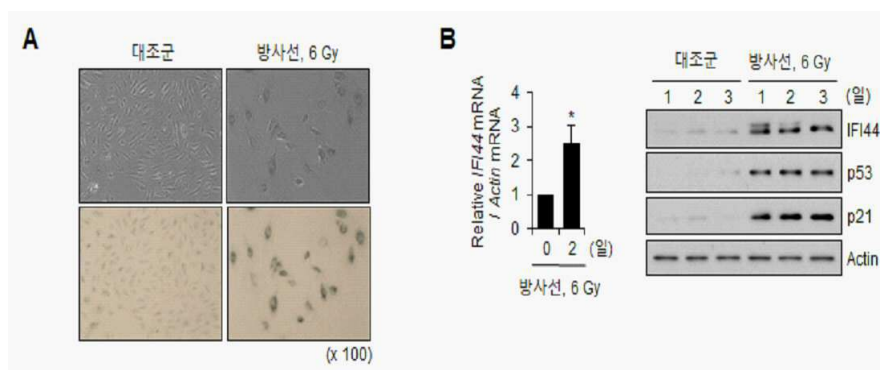
그 결과, 인간 태줄 정맥 내피세포(HUVEC)에 방사선 조사하여 노화 유도 시, 대조군과 비교하여 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)의 부착이 증가하였고, IFI44 발현 억제 후 방사선 조사 시, 방사선만 조사한 실험군과 비교하여 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)의 부착이 감소하는 것을 확인하였다(도 3). 이는 혈관 내피세포에 IFI44 억제 시, 혈관 내피세포에 대한 유방암 세포의 부착이 억제되는 것을 입증한다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

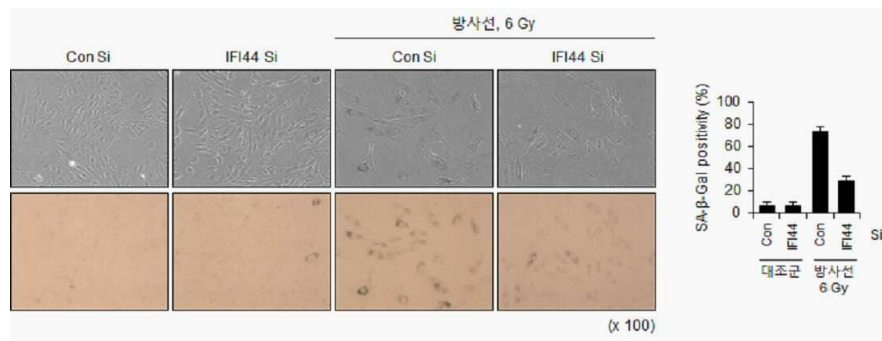
본 발명의 범위는 후술하는 특허 청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

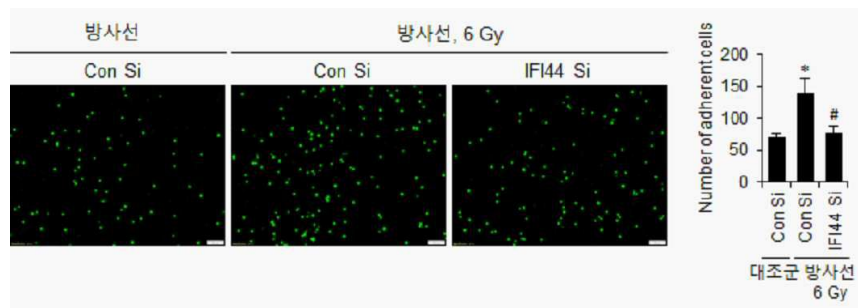
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Pharmaceutical composition for enhancing radiation sensitivity comprising an inhibitor of expression or activity of IFI44 as an active ingredient
- <130> ADP-2021-0713
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IFI44 siRNA
- <400> 1
cacuguuuug uugugaugu
- <210> 2

<211> 19

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Control siRNA

<400> 2

ccuacgccac caauuucgu

19