

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 6월 11일 (11.06.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/116688 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/429 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/015450

(22) 국제출원일:

2018년 12월 6일 (06.12.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER)
[KR/KR]; 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이용선 (LEE, Yong Sun); 10416 경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 402호 (마두동, 백마마을1단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 김인후 (KIM, In Hoo); 10242 경기도 고양시 일산서구 일현로 97-11, 107동 3904호 (탄현동, 일산 위브더제니스), Gyeonggi-do (KR). 이연수 (LEE, Yeon Su); 10085 경기도 김포시 김포한강3로 290-16, 802동 401호 (장기동, 고창마을 이니스더원), Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(84) 지정국

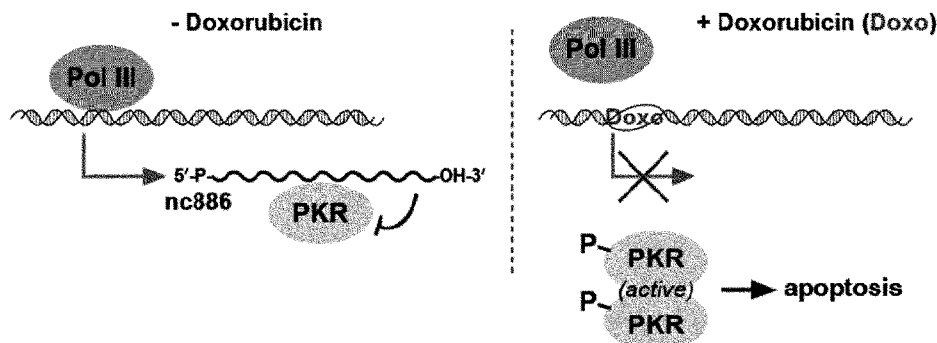
(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: ANTICANCER SUPPLEMENT COMPRISING NC886 AND/OR PKR INHIBITOR, AND METHOD FOR PROVIDING INFORMATION OF DRUG FOR CANCER TREATMENT

(54) 발명의 명칭: NC886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 항암 보조제, 및 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법



(57) Abstract: The present invention relates to an anticancer supplement comprising NC886 and/or a PKR inhibitor, and a method for providing information of a drug for cancer treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 항암 보조제, 및 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법에 관한 것이다.



WO 2020/116688 A1

명세서

발명의 명칭: NC886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 항암 보조제, 및 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 항암 보조제, 및 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 혈액 암과 고형 암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생하며, 이들의 치료방법으로 최근 글리벡 또는 허셉틴과 같은 소수의 표적치료제가 특정 암의 치료에 이용되고 있으나 현재까지는 수술이나 방사선 요법 및 세포증식을 억제하는 화학 요법제를 이용한 항암제 치료가 주된 방법이다. 예를 들어 한국공개특허번호 10-2014-0090500호에는 2-(페닐에티닐)티에노[3,4-b]피라진 유도체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있고, 한국공개특허번호 10-2017-0143457호에는 신규한 이미다조피리딘 유도체, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다.

[3]

- [4] 세포 독성 약물을 사용하는 화학 요법은 전통적으로 암 환자에게 중요한 치료 방법으로 사용해 왔다. 안트라시클린 항생제 계열의 화합물인 독소루비신은 가장 효과적인 항암제 중 하나이며, 거의 반세기 동안 다양한 종류의 악성 종양을 치료하기 위해 첫 번째로 선택되었다. 일반적으로 독소루비신은 DNA 부가물 형성 (DNA adduct formation), DNA 인터칼레이션 (DNA intercalation), 토포아이소머라아제 II 작용에 대한 간섭 및 자유 라디칼의 형성과 같은 유전 독성 효과의 결과로 세포사멸을 유도하는 것으로 생각 되었다. 독소루비신은 광범위하고 오랫동안 임상적으로 사용되었음에도 불구하고 그 세포 독성을 나타내는 정확한 기전은 여전히 논란의 여지가 있다. 독소루비신은 치료용량, 치료 기간 및 종양 유형에 따라 치료효과가 달라진다.

[5]

- [6] PKR (Protein Kinase R)은 인터페론-유도성 세린/트레오닌 키나아제이다. PKR은 대부분의 포유류 세포에 잠복 상태로 존재하며 바이러스 게놈 자체이거나 바이러스 복제 및 전사 중에 생성되는 이중가닥 RNA (dsRNA)에 의해 활성화 된다. PKR이 dsRNA에 결합하면, PKR은 이합체화 및 인산화 된다. 인산화된 PKR은 가장 잘 알려진 기질인 eIF2 α 를 인산화시키는 활성 키나아제이며, 이로 인해 전구체 합성이 중단되고 결과적으로 세포사멸이 일어난다. 상기의 작용은 바이러스 감염세포를 막기 위한 PKR 매개 항바이러스

반응이다. 그러나 PKR 경로는 위의 설명보다 훨씬 복잡하다. PKR은 dsRNA 외에도 NF- κ B, p53, STAT1, 단백질 등 다양한 신호 전달 경로에서 중요한 역할을 하는 세포 및 외부 요인에 의해 제어된다. 이러한 세포 경로는 세포의 사멸 및 세포의 증식을 결정하는데 중요하기 때문에, 암 병리학에서 PKR은 중요한 유전자이다. 비정상적인 PKR에 의해 세포 사멸의 조절에 문제가 있는 경우는 종양 발달 자체에서 중요할 뿐 아니라 암 치료제에 대한 암세포의 내성에도 결정적인 요소이다. PKR이 독소루비신 치료 시 활성화 되고 세포 사멸을 촉진한다는 많은 연구가 있다. 따라서 PKR은 바이러스 감염뿐만 아니라 독소루비신 처리에서도 세포사멸에 중요한 역할을 한다. 독소루비신이 핵에 유전 독성력을 유도한다는 점을 감안할 때, 독소루비신이 PKR을 어떻게 활성화 시키는지에 대한 메커니즘은 밝혀져 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 PKR에 결합하여 PKR의 활성을 억제하는 non-coding RNA를 확인하였다. nc886은 RNA 중합효소 III (Pol III)에 의해 전사되고 정상적인 인간 조직에서 발현된다. nc886의 발현 수준은 일반적으로 암세포에서 증가하지만 일부 악성 종양에서는 CpG DNA과 메틸화에 의해 완전히 침묵하기도 한다. 본 발명자들은 치료적 세포 자살에 있어서 nc886이 PKR 및 독소루비신을 연결하는 중요한 신호 분자라는 사실을 확인하면서, 본 발명을 완성하였다.
- [8]
- [9] 기본적으로 독소루비신은 DNA에 손상을 입힘으로써, DNA가 분열하는 암세포만을 표적하여 세포사멸을 유도한다고 알려져 있었다. 본 발명자들은 독소루비신을 세포에 처리할 경우, nc886 및 PKR의 작용을 연구한 결과, 독소루비신을 처리하면 Pol III 전사를 억제하고 이로 인해 nc886의 발현이 감소하게 되어, PKR의 인산화가 증가하여 세포가 사멸하며 이러한 세포사멸이 독소루비신의 치료적 세포 사멸 활성의 또 다른 측면임을 확인하였다. 정상세포의 경우 nc886과 PKR을 발현하므로, 독소루비신의 위와 같은 활성으로 인하여 사멸할 수 있으므로, 상기 정상 세포의 사멸을 예방하기 위해 PKR 저해제를 독소루비신과 같이 처리해야한다.
- [10] 혹은 독소루비신이 nc886/PKR을 표적함을 응용하여, 암세포를 사멸시킬수도 있다. 일반적으로 암세포에서는 nc886이 증가되어 있으므로, nc886감소 및 PKR 활성화에 따른 세포사멸이 정상세포보다는 더 잘 일어나리라 추정되며, 이 경우에는 독소루비신을 고농도/단기간 처리하면 DNA 손상을 최소화 하면서, nc886/PKR에 의한 세포사멸을 유도할 수 있다. 이 방법의 장점은 분열하는 정상세포 (모발세포나 혈액세포)에 대한 손상을 최소화 할 수 있다는 것에 있다. 위와 같은 사실을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[11]

- [12] 본 발명의 목적은 nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 암 치료제의 부작용의 완화 또는 감소용 조성물을 제공하는 것이다.
- [13]
- [14] 본 발명은 다른 목적은 nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 DNA-손상 제제(damaging agent)의 암 치료 보조제를 제공하는 것이다.
- [15]
- [16] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [17] (a) 병리학적으로 암으로 판단된 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 nc886의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준; 및 PKR의 유전자 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [18] (b) 상기 측정된 nc886 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮으며, PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우 상기 암 환자에게 DNA-손상 제제(damaging agent) 및 PKR 저해제를 투여하도록 하는, 약물 선택 정보를 제공하는 단계.
- [19]
- [20] 본 발명의 다른 목적은 nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암 치료를 위한 약물 또는 이의 투여의 정보를 제공하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [21] 본 발명은 nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소용 조성물; 및 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.
- [22]
- [23] 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자일 수 있다.
- [24]
- [25] 상기 암 치료제는 DNA-손상 제제(damaging agent)일 수 있다.
- [26]
- [27] 상기 DNA-손상 제제는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인일 수 있다.
- [28]

- [29] 상기 안트라사이클린계 약물은 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 또는 미톡산트론일 수 있다.
- [30]
- [31] 상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)일 수 있다.
- [32]
- [33] 본 발명은 또한 PKR 저해제를 포함하는 DNA-손상 제제(damaging agent)의 암 치료 보조제를 제공할 수 있다.
- [34]
- [35] 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886의 전체 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자 일 수 있다.
- [36]
- [37] 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인일 수 있다.
- [38]
- [39] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [40] (a) 병리학적으로 암으로 판단된 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 nc886의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준; 및 PKR의 유전자 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [41] (b) 상기 측정된 nc886 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮으며, PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우 상기 암 환자에게 DNA-손상 제제(damaging agent) 및 PKR 저해제를 투여하도록 하는, 약물 선택 정보를 제공하는 단계.
- [42]
- [43] 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 유전자 전체 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자일 수 있다.
- [44]
- [45] 상기 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드,

멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파일 수 있다.

[46]

[47] 상기 PKR 저해제는 DNA-손상 제제(damaging agent)에 의한 부작용을 완화 또는 감소시킬 수 있다.

[48]

[49] nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암 치료를 위한 약물 또는 이의 투여 정보 제공용 키트를 제공할 수 있다.

[50]

[51] 상기 유전자의 발현을 측정하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있다.

[52]

[53] 상기 단백질의 활성을 측정하는 제제는 PKR의 인산화에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

발명의 효과

[54] 본 발명은, 독소루비신 등 DNA-저해제 계열의 항암제를 이용한 암 치료 시, nc886 및/또는 PKR의 저해제를 병용 투여하여 일반세포에서 항암제의 세포독성을 완화할 수 있는 효과가 있다. 또한, nc886 및/또는 PKR의 발현 및/또는 활성을 측정하여 암 치료를 위한 약물의 정보를 제공하여, 보다 효과적으로 암을 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[55] 도 1은 독소루비신 치료시 nc886의 발현을 확인한 결과로서, A는 H₂O₂ (0.5 mM), 독소루비신 (Doxo; 6 μ M), 데스페리옥사민 (desferrioxamine) (DFX; 100 μ M) 및 악티노마이신D (actinomycin D) (ActD; 2 μ g / ml)를 세포 주에 8시간 처리한 후의 노던 블랏 (Northern blot) 방법으로 nc886의 발현을 확인한 결과이고 (레인 1과 6은 처리하지 않은 군 ("_" 으로 표시), B 내지 E는 nc886의 노던 블랏 및 EtBr 염색한 결과로서, 투여 조건은 도에 표시되어 있다.

[56]

[57] 도 2는 PKR의 존재 또는 부재 하에 독소루비신의 세포 독성 효과를 나타낸 결과로서, A는 독소루비신 투여 후 나타난 단백질의 웨스턴 블랏의 결과이고, B는 세포의 생존을 측정하기 위한 MTT 결과이며, C 및 D는 siRNA로 형질 감염시킨 후의 독소루비신을 투여한 후의 웨스턴 블랏 결과 및 MTT 결과이다.

[58]

[59] 도 3은 독소루비신 처리 후 PKR의 활성화를 나타낸 결과로서, A는 시험관 내 PKR의 인산화 활성 분석 결과이고, B는 표시된 단백질의 웨스턴 블랏 결과이며, C는 NF- κ B 활성을 측정하는 루시퍼라제 분석 결과이며 (루시퍼라이제-발현

플라스미드를 형질감염 시킨 후 24시간 후에 세포를 2-AP (2 mM)로 1 시간 동안 전 처리한 후 독소루비신 (6 μ M)이 함유 된 배지로 8 시간 동안 교체함), D는 2-AP의 치료를 제외하고 패널 C에 기술 된 루시퍼라제 분석 결과이다.

[60]

[61] 도 4는 독소루비신 처리 시 PKR 매개 세포 독성에 대한 nc886의 역할을 보여주는 결과로서, A는 anti-oligos (대조군과 nc886- 표적화)를 24 시간 동안 형질 감염 시켰을 때 나타나는 여러 가지 검정하는 방법의 결과이고, B 및 C는 독소루비신 처리와 nc886 RNA (시험 관내 전사 물)의 형질 감염을 조합하여 실험한 뒤의 웨스턴 결과이고 (Western blot을 위해 12 시간 (HCT116) 또는 6 시간 (Nthy-ori 3-1)에서 세포를 채취하기 전에 형질감염 및 투여를 동시에 수행하였음), D는 돌연변이 nc886을 사용한 것을 제외하고는 패널 B-C와 동일한 실험한 결과이고, E 내지 F는 HCT116 wt 및 p53 null 세포에서 웨스턴 블랏 및 노던 블랏의 결과이다.

[62]

[63] 도 5는 vtRNAs 또는 Vault complex에 독립된 nc886/PKR 매개 세포사멸을 보여주는 결과로서, A는 세포분획을 한 후, 각 분획의 동일한 부분을 노던 및 웨스턴 블랏을 한 결과이고, B는 동일하게 수행되는 표준 vtRNA의 노던 블랏이며, 표시된 안티올리고의 형질 전환 24시간 후 노던 및 웨스턴 블랏 결과이고, D는 효모 tRNA ("-")를 형질 감염시킨 후 웨스턴 블랏이고 vtRNA1-1 및 nc886의 시험 관내 전사물의 결과이며, E 및 F는 MVP에 대한 siRNA를 48 시간 동안 형질 감염시킨 다음, 웨스턴 블랏 (패널 E) 또는 독소루비신 (doxorubicin) 처리로 24 시간 동안 MTT 분석 (패널 F)을 수행한 결과이다.

[64]

[65] 도 6은 Pol III의 축출 및 독소루비신에 의한 억제를 나타내는 결과이로서, A 및 B는 표시된 Pol III 유전자의 노던 블랏의 결과이고, C는 표시된 Pol III 유전자의 qRT-PCR이며, D는 아클라루비신 (Acla, 6 μ M), 에토포사이드 (Etopo; 30 μ M) 및 독소루비신 (Doxo; 6 μ M)을 처리한 후 8시간 후의 노던 및 웨스턴 블랏의 결과이고, E는 원형 플라스미드 DNA 또는 nc886을 발현하는 선형 DNA를 형질 감염한 24 시간 후의 nc886의 발현을 노던 블랏으로 확인한 결과이며, F는 6 μ M 독소루비신을 2 시간 처리 한 후, POLR3A에 결합된 표시된 게놈 영역의 qPCR결과이다.

[66]

[67] 도 7은 μ M 농도의 독소루비신의 짧은 펄스 처리: 3 차원 배양 시스템에서의 응용 및 다양한 암세포에서의 조사를 한 결과로써, A는 펄스 처리 실험의 모식도이고, B 및 C는 A에 모식도와 같이 수행한 후 노던 블랏 및 웨스턴 블랏 결과이며, D는 3 차원 배양 시스템을 생성하는 방법을 설명하는 간략한 요약 및 모식도이고, E 및 F는 패널 C에 기술된 노던 및 웨스턴 블랏 결과이고, G는 791 세포주의 IC₅₀ 값을 오름차순으로 랭크 분포도로 표시이며, H는 6 종이 수집 된

부모 세포 (왼쪽 원)와 독소루비신 내분 제 (오른쪽 삼각형)의 IC₅₀ 값의 도트 플롯 결과이다.

[68]

[69] 도 8은 독소루비신 처리시 nc886/PKR 경로를 요약한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[70] 이하에서 본 발명을 자세히 설명한다.

[71]

[72] 본 발명자들은 DNA-damaging agent 계열 항암제인 독소루비신이 암세포/정상세포에 미치는 영향과 nc886/PKR의 연관성을 연구하였다. 독소루비신을 세포에 처리했을 때, nc886의 발현은 감소하고 PKR의 활성은 증가하여 세포가 사멸하며, 이 세포 사멸의 원인은 p53 유도가 아니라 nc886의 억제를 통해 PKR이 활성화됨이라는 것을 밝혔다 (도 1 내지 4). nc886은 vault RNA (vtRNA)의 paralog로 분류되며 별칭 중 하나는 vtRNA2-1이고, Canonical vtRNA (vtRNA1-1, 1-2 및 1-3)는 암세포의 약물 내성과 관련되어있는 볼트 복합체라는 거대한 리보 핵산 단백질 복합체의 구성 성분 중에 하나이다. 이에 독소루비신 민감도와 nc886/PKR 경로와의 가능한 관계에서 볼트 복합체 (vault complex)에 대한 역할을 조사한 결과, vault complex가 독소루비신에 의한 표준 vtRNA의 억제에도 불구하고, 투여 조건에서 독소루비신에서 역할을 하지 않았다 (도 5). nc886은 Pol III에 의해 전사되고, 이를 이용하여 독소루비신에 의한 nc886 억제에 대한 메커니즘을 조사한 결과 독소루비신이 Pol III 전사를 억제한다는 것을 확인하였다 (도 6). 상기의 실험을 3D 세포 배양에서 한 경우에도, 독소루비신이 nc886을 억제하고 세포 사멸을 유도하였으며, 따라서 nc886/PKR 경로가 실제 생체 내 종양세포에서도 작동하리라고 추정된다 (도 7). 그 결과 도 8과 같이 독소루비신은 Pol III 전사를 억제하고 이로 인하여 nc886의 발현이 억제되고, PKR의 활성이 증가되어 세포사멸이 일어난다는 것을 확인하였다 (도 8).

[73]

[74] 이와 같이, 본 발명은 nc886 및/또는 PKR의 저해제를 투여하여 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소시킬 수 있다.

[75]

[76] 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자일 수 있다.

[77]

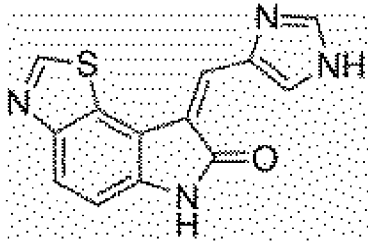
[78] 상기 imidazolo-oxindole compound는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[79]

[80] [화학식 1]

[81]

[82]

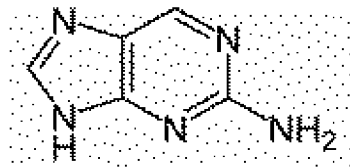


[83] 상기 2-aminopurine (2-AP)는 화학식 2로 표시될 수 있다.

[84]

[85] [화학식 2]

[86]



[87]

[88] 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886의 염기서열은

5'-AGCGUUACCUCUCAUGCCGGACUUUCUAUCUGUCCAUCUCUGUGCUG
GGGUUCGAGACCCGCGGGUGCUUACUGACCCUUUU-3"일 수 있다. 본
발명에서 사용되는 nc896은 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를
들어, nc886 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는
삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, nc886 핵산분자와 기능적으로 동일한
작용을 할 수 있는 변이체를 포함하는 개념이다.

[89]

[90] 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자의 염기서열은
"5'-CAUGCCGGACUUUCUAUCUGUCCAUCUCUGUG-3"일 수 있다.

[91]

[92] 본 발명의 ncRNA는 단일 가닥 또는 부분적인 이중 가닥 형태로 존재할 수
있다. 또한, 본 발명의 핵산 분자는 RNA, DNA, PNA(peptide nucleic acids) 또는
LNA(locked nucleic acid) 같은 형태로 구성될 수 있다.

[93]

[94] 본 발명의 상기 핵산분자는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법
또는 제조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수
있다. 또한, 본 발명의 조성물은 ncRNA 핵산 분자 자체뿐만 아니라, 세포 내에서
본 발명의 ncRNA의 발현율을 증가시킬 수 있는 기타의 물질, 예를 들어 화합물,
천연물, 신규 단백질 등을 포함할 수 있다.

[95]

[96] 상기 암 치료제는 DNA-손상 제제(damaging agent)일 수 있고, 상기 DNA-손상
제제(damaging agent)는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소

머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인일 수 있다.

[97]

[98] 상기 안트라사이클린계 약물은 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 또는 미톡산트론일 수 있다.

[99]

[100] 상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)일 수 있다.

[101]

[102] 상기 암은 nc886 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮으며, PKR의 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성이 정상 대조군 시료보다 증가될 수 있다.

[103]

[104] 본 발명은 PKR 저해제를 포함하는 DNA-손상 제제(damaging agent)의 암 치료 보조제를 제공할 수 있다.

[105]

[106] 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자일 수 있다.

[107]

[108] 상기 암 치료제는 DNA-손상 제제(damaging agent)일 수 있고, 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인일 수 있다.

[109]

[110] 상기 안트라사이클린계 약물은 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 또는 미톡산트론일 수 있다.

[111]

[112] 본 발명은 또한 하기의 단계를 포함하는 nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법을 제공할 수 있다:

[113]

(a) 병리학적으로 암으로 판단된 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 nc886의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준; 및 PKR의 유전자 발현 수준 또는

이의 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및

- [114] (b) 상기 측정된 nc886 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮으며, PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우 상기 암 환자에게 DNA-손상 제제(damaging agent) 및 PKR 저해제를 계속 투여하도록 하는, 약물 선택 정보를 제공하는 단계.

[115]

- [116] 상기 병리학적으로 암으로 판단된다는 것은 암전이 분류 (tumor or node metastasis: TNM) 시스템에 따라 1기부터 4기 까지 분류되는 암일 수 있다.

[117]

- [118] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[119]

- [120] 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자일 수 있다.

[121]

- [122] 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인일 수 있다.

[123]

- [124] 상기 안트라사이클린계 약물은 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 또는 미톡산트론일 수 있다.

[125]

- [126] 상기 계속 투여는 DNA-손상 제제(damaging agent)를 1 내지 50micromolar 농도로, 바람직하게는 1 내지 25 micromolar 농도로, 더 바람직하게는 6 micromolar 농도로 지속적으로 투여하는 것 일 수 있다.

[127]

- [128] 본 발명에서 "발현량 측정"이란 암의 종류를 확인하기 위해 암 조직 세포에서 상기 유전자의 RNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 예를 들어, 역전사 중합효소반응 (RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[129]

- [130] 본 발명에서 유전자의 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍 또는 프로브이다. 본 발명에서 "안티센스"는

안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서, 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드로 이루어진 올리고머를 지칭한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다. 이 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 저해하고 mRNA의 스플라이스 변이체를 생산하는 mRNA의 프로세싱 과정을 변화시킬 수 있다.

[131]

[132] 본 발명에서 "단백질 발현량 및 이의 활성의 측정"이란 간암의 진행 여부를 확인하기 위하여 암 조직 세포에서 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 단백질의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA:Radioimmunoassay), 방사면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 항체이다.

[133]

[134] 상기 PKR 저해제는 DNA-손상 제제(damaging agent)가 정상세포에 일으키는 부작용을 완화 또는 감소시킬 수 있다. 독소루비신은 원래 DNA-손상 제제(damaging agent)이며, 따라서 분열하는 암세포만 죽인다고 알려져 있으나, 본 발명에 따르면 일반세포도 nc886/PKR경로에 의해 죽게 되는, 원치 않는 부작용이 일어나는 이유를 설명할 수 있게 되었다.

[135]

[136] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

[137] (a) 병리학적으로 암으로 판단된 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 nc886의 유전자 발현 수준; 및 PKR의 유전자 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및

[138] (b) 상기 nc886의 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높으며, PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준이 정상 대조군 시료보다 낮은 경우 상기 환자에게 DNA-손상 제제(damaging agent)를 단기간 투여하도록 약물 선택 정보를 제공하는 단계.

[139]

[140] 상기 단기간은 예컨대, 1분 내지 24시간 일 수 있으며, 바람직하게는 10분 내지

12시간, 보다 바람직하게는 10분 내지 2시간, 특히 바람직하게는 20분 내지 40분 일 수 있고, 가장 바람직하게는 30분일 수 있다.

[141]

[142] 상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)일 수 있다. nc886/PKR을 타겟으로 할 때, 고농도의 독소루비신을 짧은 시간으로 처리하면 DNA 손상을 최소화 할 수 있으며, 따라서 조혈 계통의 세포, 모낭 세포 및 장의 상피 세포와 같은 증식하는 정상 세포의 최소한의 유전 독성 효과를 가지면서 세포 사멸을 유도하는데 충분할 수 있다.

[143]

[144] 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판, 독소루비신 또는 티오테파인일 수 있다.

[145]

[146] 본 발명은 또한 nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암 치료를 위한 약물 또는 이의 투여의 정보 제공용 키트를 제공할 수 있다.

[147]

[148] 상기 약물 정보는 DNA 손상 제제 및 PKR 저해제를 병용으로 투여하는 방법에 대한 정보이다.

[149]

[150] 상기 약물의 투여의 정보는 투여 횟수, 투여 농도 등을 이야기 하는 것으로, nc886 유전자의 발현이 정상 대조군 시료보다 낮으며, PKR의 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성이 정상 대조군 시료보다 증가된 경우, 일반적인 독소루비신 투여 농도보다 낮으며, 투여 횟수 및 투여 기간을 늘리는 것을 이야기 한다.

[151]

[152] 상기 유전자의 발현을 측정하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있다.

[153]

[154] 상기 단백질의 활성을 측정하는 제제는 PKR의 인산화에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[155]

[156] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에

따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[157]

[158] 실시예 1. 세포주, 항체 및 기타 시약

[159]

[160] 모든 세포주, 항체 및 기타 시약은 달리 명시하지 않는 한 문헌[Jeon SH et al., FEBS Lett 586: 3477-348 (2012b)] 및 [Lee K et al., RNA 17: 1076-1089 (2011)]에 기술되어 있다. 독소루비신 (doxorubicin), 에토포사이드 (etoposide) 및 아클라루비신 (aclerubicin)은 EMD Millipore, Sigma-Aldrich 및 Santa Cruz Biotechnology에서 각각 구입하였다. H₂O₂와 메실산테페록사민 (deferoxamine mesylate)는 Fisher Chemical과 Sigma-Aldrich에서 각각 구입하였다. total p53 및 Chk2에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였고, 이들 항체에 대한 인산화 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다.

[161]

[162] 실시예 2. 프라이머, 플라스미드 DNA, RNA 및 형질 감염

[163]

[164] PCR 프라이머 및 노던 프로브에 대한 서열은 하기 표 1에 요약되어 있다. nc886을 발현하는 DNA는 101 nt nc886 전사체와 인접 서열 (flanking sequence) [각각 5' 및 3'측에서 271nt 및 277nt]을 포함하는 PCR 증폭된 649nt PCR 단편이었다. 이 단편을 pCR4-TOPO 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 삽입하였다. 생성된 플라스미드 및 PCR 단편을 도 6E의 형질 감염 실험에 사용하였다. pNF-κB-Luc (Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 NF-κB 루시퍼라제 분석함에 있어서, 표준화를 위해 pRL-SV40를 함께 감염 시켰다. PKR 및 MVP에 대한 siRNA는 PKR의 nt 343-367, 1054-1078 및 1228-1252 및 MVP의 nt 1067-1091 및 1908-1932의 표적 서열인 Stealth RNAi™ siRNA (Invitrogen)를 사용하였다. 유전자의 다른 영역을 표적으로 하는 이들 siRNA를 동일하게 혼합하고 40 nM 농도로 형질 감염시켰다. nc886 및 표준 vtRNA (vtRNA1-1, 1-2, 1-3)에 대항하는 안티 올리고는 변형된 당 (2') 및 포스포로티오에이트 백본(phosphorothioate backbone)을 갖는 DNA-RNA 믹스머를 사용하였고, 이의 표적 서열은 5'-aucucugugcuggguucga-3' (nc886에 상응하는 nt 56-75) 및 5'-ggcuggcuuuagcucagcgg-3' (상응하는 nt 2-21의 vtRNA) 이다. 이들 안티 올리고는 200 nM으로 형질 감염시켰다. 구조 실험을 위해 (도 4B-D 및 6C), 시험 관내 전사 된 nc886 및 vtRNA를 (비특허문헌 015)에 기술된 바와 같이 제조하고 효모 tRNA를 Applied Biosystems / Ambion (Carlsbad, CA)에서 구입 하였다. 짧은 RNA (siRNAs, antioligos 및 in vitro transcripts)를 Lipofectamine™ RNAiMAX 시약 (Invitrogen)으로 형질감염하고, DNA를 Lipofectamine™ 2000 시약 (Invitrogen)으로 형질 감염시켰다.

[165]

[166] [표1]

PCR 프라이머 및 노던 프로브에 대한 서열목록

		Primer 서열
nc886 for PCR	Forward	CGGGTCGGAGTTAGCTCAAGCGG
	Backward	AAGGGTCAGTAAGCACCCGCG
nc886 for northern blot	probe	AAGGGTCAGTAAGCACCCGCG

[167]

[168] 실시예 3. 루시퍼라제 분석, 세포증식 분석 및 시험관내 키나아제 분석

[169] 이러한 모든 분석은 문헌[Kunkeaw N et al., Oncogene 32: 3722-3731 (2013)] 및 [Lee K et al., RNA 17: 1076-1089 (2011)] 에 기재되어 있는 대로 수행하였다. 모든 정량 분석법 (MTT 분석법, 루시퍼라제 분석법, qRT-PCR 및 ChIP-PCR)을 평균, 표준 편차 및 p-값 (양측 t-test)을 계산하기 위해 3번 반복 수행하였다.

[170]

[171] 실시예 4. 세포내 분획화

[172]

[173] Subcellular fractionation은 문헌[Kickhoefer VA et al., J Biol Chem 273: 8971-8974 (1998)] 및 [Lee K et al., RNA 17: 1076-1089 (2011)]에 개시되어 있는 대로 수행하였다. 수확된 세포 (~5*10⁷)를 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)를 함유하는 buffer A (50mM Tris-Cl (pH 7.4), 1.5mM MgCl₂, 75mM NaCl, 0.5 % Nonidet P-40) 1.2ml에 재현탁하고, 10 mM 리보뉴클레오시드-바나딜 복합체 (ribonucleoside-vanadyl complex; New England Biolabs, Ipswich, MA) 및 인간 태반으로 부터의 200 unit/ml RNase 억제제 (New England Biolabs) 0.1 ml를 첨가하였다. 모든 후속 단계는 4°C에서 수행 하였다. 재현탁한 세포를 10분 동안 용해시키고 Optima TLX 초 원심 분리기를 사용하여 TLA-55 로터에서 6,000 xg에서 10 분간 원심 분리 하였다. 펠렛은 핵 분획 (도 6A에서 "P10"으로 표시됨)이었다. 상층액은 벌크 세포질이었고, 100,000x에서 1시간 동안 원심 분리하여 분획화하여, 생성된 상층액 ("S100"로 명명 됨)을 펠렛 ("P100"으로 표시)으로부터 분리 하였다. P10 및 P100 분획을 Trizol 시약으로 후속 RNA 조제 또는 웨스턴 블랏팅을 위한 RIPA 완충액으로 재현탁 하였다. 동량의 이소프로판올을 가하여 S100 분획을 농축시킨 다음 원심 분리(10 분간 12 krpm 속도로)를 수행하였다. 얻어진 펠릿을 Trizol 시약으로 RNA를 추출 하였다. S100 분획의 분액을 웨스턴 블랏팅을 위해 직접 적재 하였다.

[174]

[175] 실시예 5. CHIP assays

[176]

[177] ChIP 분석은 이전에 설명한 [Park K et al., J Leukoc Biol 91: 245-257 (2012)]에

기재된 대로 수행하였다. 간단히 말하면, 세포를 1% 포름알데히드로 가고 결합시키고 팽창 완충액 [5 mM PIPES (pH 8.0), 85 mM KCl, 0.5 % Nonidet P-40] 및 buffer A [10 mM Tris—HCl, 2 mM EDTA, 0.2% 나트륨 도데실 설페이트 (sodium dodecyl sulfate)에서 Bioruptor를 사용하여 초음파 처리 하였다. 염색질 샘플을 Buffer B [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 % Triton X-100, 280 mM NaCl, 0.2 % 데옥시콜레이트 (deoxycholate)]로 희석시키고, POLR3A에 대한 항체로 면역 침전시켰다. Chromatin-항체 복합체는 ProteinA/G Dynabeads로 제거하였다. 프로테아제 K (proteinase K)로 처리하고 가고 결합을 역전시킨 후, 면역 침전된 DNA의 양을 실시간 PCR로 측정 하였다. 칩 프라이머는 하기 표 2와 같다.

[178]

[179] [표2]

칩 프라이머에 대한 서열목록

gene		염기 서열	
nc886	Left	CCAGCACAGAGAT GGACAGA	nc886 PCR primer for POLR3A ChIP
	Right	GTCCCTCTCCACAT CGTCAC	nc886 PCR primer for POLR3A ChIP
Vtrna 1	Left	AGTCTGGAAGCGA AGGAGGT	vtRNA1-1 PCR primer for POLR3A ChIP
	Right	ATGACTCAGCGAC CAGGACT	vtRNA1-1 PCR primer for POLR3A ChIP
GAPD H	Left	CGGCTACTAGCGG TTTTACG	GAPDH PCR primer for POLR3A ChIP
	Right	GCTGCGGGCTCAA TTTATAG	GAPDH PCR primer for POLR3A ChIP

[180]

[181] 실시예 6. 3-D 세포 배양

[182]

[183] 3-D 세포 배양은 n3D Biosciences의 BiO Assay™ kit를 제조자의 지시에 따라 처리하였다. 간단히 말해서, 단층 배양된 3.3×10^6 세포를 200 시간 동안 NanoShuttle™-PL로 16 시간 동안 처리하고, 트립신 처리한 후, 6-웰에서 24 시간 동안 자기 부상을 일으켰다. 부유 세포를 배양액 2 ml (6-well 당)에 현탁시키고, pipetting에 의해 재현 탁하고, 96-웰 (96-웰 당 2.0×10^5 세포)에 바이오 인쇄하여 30 분 동안 링 구동 시켰다. 그리고 독소루비신을 처리하였다. 상기 3-D 세포 배양의 모식도는 도 7D에 개시되어 있다.

[184]

[185] 실시예 7. nc886 발현은 독소루비신 처리 시 감소한다

[186]

[187] nc886의 역할을 확인하는 첫 단계로 nc886 발현이 변경된 생물학적 상황을 조사하였다. 이를 위해 HBE135-E6E7 (부분적으로 변형된 폐 상피세포주)과 HCT116 (대장 암 세포주)을 H_2O_2 (산화 스트레스 유도제), 데스페리옥사민 (desferrioxamine; 저산소증 유사 화합물) 및 독소루비신을 처리하여, 여러 가지 스트레스 조건을 테스트 하였다. 비교를 위해 처리된 전사 억제제인 Actinomycin D는 예상대로 nc886 발현을 억제하였다 (도 1A). 독소루비신은 actinomycin D만큼 nc886 발현을 억제하는데 효과적이었지만, H_2O_2 와 데스페리옥사민 (desferrioxamine)은 거의 효과가 없었다 (도 1A). 본 발명의 용량 적정 실험은 nc886을 감소시키기 위해 독소루비신을 고농도 (최소한 $3 \mu M$ 이상)로 필요로 한다는 것을 보여 주었다 (도 1B). 이 농도는 임상적으로 관련된 농도와 비슷하다는 점에서 유의해야 한다. 환자에게 독소루비신을 볼루스 주사(bolus injection)한 후 최대 혈장 농도는 5 내지 $25 \mu M$ 범위였다. nc886은 2 시간 처리 후에 눈에 띄게 감소되었으며 4-8 시간 후에 간신히 관찰되었다 (도 1C). 8시간 쯤 nc886의 발현이 사라진 후 독소루비신을 포함하는 배지를 신선한 배지로 교체하여도 nc886 발현이 36 시간 후에도 회복되지 않음을 관찰하였다 (도 1C). 상기 시간 경과 데이터는 nc886의 반감기가 1-2 시간이라는 점을 감안할 때, 독소루비신이 치료 즉시 거의 nc886 전사를 차단한다는 것을 보여준다.

[188]

[189] 실시예 8. PKR은 독소루비신 유발성 세포 사멸에 기여한다.

[190]

[191] 독소루비신은 PKR 경로와 궁극적으로 세포 자살 (apoptosis)를 유발하는 것으로 확인되었다. 인간유래 세포의 경우, 상기 세포 자살 경로에 대한 PKR의 기여에 대해 실험적 증거는 주로 small interfering (또는 hairpin) RNA (siRNA 또는 shRNA)를 사용하여 knockdown (KD)을 유도한 실험을 기반으로 하였다. PKR의 이러한 역할은 CRISPR-Cas 기술에 의해 원래의 Nthy-ori 3-1 세포(PKR wt)로부터 생성된 PKR KO 세포에 대한 실험에 의해 뒷받침 되었다 (도 2A의 PKR의 Western blot). 독소루비신 처리는 PKR wt 세포에서 카스파제-3 (caspase-3) 및 절단된 폴리 (ADP-리보스) 중합 효소 (cleaved Poly (ADP-ribose) polymerase; PARP)과 같은 세포 자살과 관련된 단백질을 유도하고, 상기 단백질의 발현은 PKR KO 세포에서 유의하게 약화되었다 (도 2A). PKR wt 및 KO 세포에서 p53 및 Chk2 (도 2A에서 이의 인산 형태로 나타냄)의 유사한 유도는 독소루비신이 이들 2 개의 세포 주에서 동등하게 효과적이었다. 세포 사멸 데이터가 DNA의 손상 반응의 차이로 인한 것이 아닐 수 있음을 보여 주었다. 또한 독소루비신의 양을 적정량으로 처리했을 때, 세포 생존을 측정하기 위해 MTT assays를 수행하였다 (도 2B). PKR KO 세포는 PKR wt (각각 IC_{50} 값 = 22.83 vs $6.49 \mu M$)보다

독소루비신에 내성을 보였으나, 이 두 세포 주는 정상적인 성장 조건에서 유사하게 증식 하였다. PKR KO 세포가 clonally 선택되어 오랫동안 유지되었기 때문에, 이들 세포가 독소루비신 저항성을 우연히 일으킬 수 있는 유전적 또는 후성적 변이를 획득했을 가능성이 있다. 이 가능성을 배제하기 위해 우리는 HCT116 세포에서 siRNA에 의한 급성 PKR KD 후 독소루비신 감수성을 측정하였다. PKR에 대한 siRNA는 PKR 발현을 효과적으로 억제시켰다 (도 2C). 중요하게도, PKR KD는 PKR KO 데이터와 유사하게 IC₅₀ 값을 약 3.5 배 증가시켰다 (도 2D). 상기 데이터는 PKR이 독소루비신에 의해 유발된 세포 사멸에 중요한 역할을 한다는 것을 분명히 보여 주었다.

[192]

[193] 실시예 9. 독소루비신은 PKR을 활성화 시킨다.

[194]

[195] 시험 관내 키나아제 분석에 의해 PKR 활성화의 특징인 PKR 자동 인산화를 측정하였다. 상기 분석에서, PKR 면역침전 (IP) 활성 PKR 분자를 방사성 표지하고 SDS-폴리 아크릴아미드 겔상에서 분해시켰다 (도 3A). 별표가 있는 밴드는 올바른 위치로 이동하고 PKR KO Nthy-ori 3-1 세포에서 검출되지 않기 때문에 PKR 이다 (도 3A의 오른쪽 두 라인). PKR은 HCT116 및 Nthy-ori 3-1 (PKR wt) 세포에서 독소루비신으로 처리할 때보다 인산화되었다. PKR 활성화는 NF- κ B 반응성 프로모터를 사용하는 루시퍼 레이즈 리포터 분석에서 평가된 바와 같이 eIF2 α 의 인산화 (도 3B) 및 NF- κ B경로의 활성화 ((도 3C-D)에 의해 확증되었다. 상기 두 개의 사건 (eIF2 α 의 인산화 및 NF- κ B경로의 활성화)은 PKR의 하류 경로 (downstream pathways)이다. 독소루비신 처리에 의한 NF- κ B의 유도는 PKR 억제제인 2-aminopurine (2-AP)에 의해 무효화되었고 (도 3C) PKR KO Nthy-ori 3-1 세포에서는 거의 보이지 않았기 때문에 PKR 활성화에 기인한 것이라고 생각하였다 (도 3D). 상기 데이터와 같이 독소루비신은 PKR과 이의 하류 경로를 활성화 시킨다.

[196]

[197] 실시예 10. 독소루비신은 p53 유도를 통해서가 아니라 nc886 억제를 통해 PKR을 활성화시킨다

[198]

[199] 상기 데이터는 독소루비신 처리시 nc886 발현이 억제됨을 보여 주었다. nc886이 PKR 억제제이기 때문에 nc886 억제가 독소루비신-매개 PKR 활성화의 기본 메커니즘이라고 가정하였다. 상기 가설을 증명하기 위해 여러 실험을 수행하였다. 먼저, nc886의 결핍이 독소루비신 처리와 동일한 세포 반응을 유도하는지 확인하기 위해 변형 된 안티센스 올리고 뉴클레오티드 (anti-oligo)를 사용하여 nc886 KD 실험을 수행하였다. anti-oligo (anti-nc886)를 표적으로 하는 nc886은 anti-control (Northern blot; 도 4A의 상단 패널)에 비해 nc886을 억제하고 시험 관내 키나아제 분석 (도 4A의 중간 패널)에 의해 확인되는 바와 같이 PKR

활성화를 유도하였다. nc886 KD는 PKR wt 세포에서 세포 사멸을 유도하고 세포 증식을 억제하는데 충분하였다 (도 4A의 하단 패널). nc886 KD의 이러한 표현형은 PKR KO 세포에서 발생하지 않았기 때문에 PKR 활성화를 통해 일어났다 (도 4A의 왼쪽 패널에서 레인 2와 4 비교). 유사한 결과가 HCT116에서 확인되었다 (도 4A의 우측 패널). nc886 KD는 PKR 활성화 및 이에 따른 세포 사멸 유도에서 독소루비신 처리와 같은 효과를 나타내었다. 독소루비신은 다면 발현 효과를 이끌어낸다. nc886의 기여도를 분별하고 독소루비신 매개 세포 독성이 nc886의 이소성 발현에 의해 완화되었는지 여부를 조사하였다. Pol III 전사체로서 nc886 발현은 유전자 내부 프로모터 요소에 의해 유도되므로 외인성 DNA로부터의 발현도 독소루비신에 의해 억제되었다 (도 6E). 따라서 독소루비신의 존재 하에 nc886 발현을 위한 전략은 *in vitro* transcript의 한 형태로 그것을 전달하는 것 이었다. 독소루비신에 의해 유도된 세포 사멸은 nc886 전사체가 HCT116 및 Nthy-ori 3-1 (PKR wt) 세포로 형질 감염되었을 때 약화되었지만 Nthy-ori 3-1 (PKR KO) 세포에서는 그렇지 않았다 (도 4B-C). PKR 경로에서의 nc886의 역할은 nc886의 2 가지 버전을 시험으로써 확인되었다 (PKR이 nc886 ("mut_46-56")과 접촉 한 46-56에서 돌연변이를 갖는 wt 및 다른 돌연변이를 시험 함) (도 4D). 이 돌연변이체는 PKR 결합이 없었다. 독소루비신 유도 세포자살은 caspase-3 유도에 의해 나타났으며 wt nc886에 의해 완화되었지만 mut_46-56에서는 완화되지 않았다 (도 4D). 상기 모든 데이터는 nc886 억제에 의한 PKR 활성화가 독소루비신에 대한 세포 반응에 중요한 역할을 한다는 것을 분명히 보여준다. 이전 보고서[Yoon CH et al., Proc Natl Acad Sci U S A 106: 7852-7857 (2009)]에서 PKR의 발현과 활성화는 독소루비신에 의해 p53 의존적으로 유도되었다. 그래서 이전 보고서[Yoon CH et al., Proc Natl Acad Sci U S A 106: 7852-7857 (2009)]에 개시되어 있는 동일한 세포주 쌍인 p53 wt 및 null HCT116 세포 (p53 +/+ 및 p53 -/- 도 4E의 p53 웨스턴 블랏 참조)에서 이 가능성을 조사하였다. 이 두 세포 주는 nc886과 비슷한 발현 수준을 보였으며, 이는 거의 동일한 시간 경과 과정에서 독소루비신에 의해 억제되었다 (도 4F). 결과적으로, PKR은 eIF2 α 인산화에 의해 지시된 바와 같이 활성화되어, 세포 자살을 유도 하였다 (도 4E). 이러한 사건은 두 세포 주 모두에서 비슷한 정도로 발생하였다. 전체 PKR 수준이 모든 레인에서 동일하다는 것은 PKR은 p53의 전사 표적도 아니며 독소루비신에 의해 유도되지도 않았다는 것을 나타낸다. 상기 결과는 Yoon 논문 ([Yoon CH et al., Proc Natl Acad Sci U S A 106: 7852-7857 (2009)])과 모순되었지만, 동일한 HCT 116세포주에서 실험을 반복한 결과 Yoon 논문과 비교한 다른 논문 (문헌[Rahman M et al., Cell Cycle 8: 3606-3607 (2009)])과 일치하였다. 도 4의 결과를 종합하면, 독소루비신 처리시 nc886 억제가 p53 상태에 관계없이 PKR 활성화 및 이의 결과로 인한 세포 독성의 주요 원인임을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 모든 연구에서 eIF2 α 의 인산화가 p53 -/- 세포에서 약간 약화 되었기 때문에 p53이 상기 경로에서 중요한 역할을 할 수

있는 가능성이 있다 (도 4E).

[200]

[201] 실시예 11. vault complex은 독소루비신 감수성에서 역할을 하지 않는다.

[202]

[203] nc886은 vault RNA (vtRNA)의 paralog로 분류되며 별칭 중 하나는 vtRNA2-1이다. Canonical vtRNA (vtRNA1-1, 1-2 및 1-3)는 암세포의 약물 내성과 관련되어있는 볼트 복합체 (vault complex)라 불리는 거대한 리보 핵산 단백질 복합체의 구성 성분이다. 따라서 독소루비신 민감도와 nc886/PKR 경로와의 가능한 관계에서 볼트 복합체 (vault complex)에 대한 역할을 조사하였다. subcellular 분별은 리보솜 및 vault 입자와 같은 큰 복합체를 포함하는 불용성 세포질 펠릿 ("P100")에서 핵 분획 (도 5A의 "P10")과 가용성 세포질 분획 ("S100")을 분리하였다. 볼트 컴플렉스 (Major Vault Protein, MVP)의 주요 구성 요소는 P100에만 있었다 (도 5A). nc886이 아닌 vtRNA1-1이 P100에서 발견되었다. nc886은 HBE135-E6E7 세포의 S100에만 독점적으로 존재하였으며, HeLa 세포의 경우에는 분획 동안 RNA 분해로 인해 (도 5A의 EtBr 염색 참조) 거의 검출되지 않았다. 하지만 이 경우에 P100에서 vtRNA1-1을 검출 할 수 있었다. 아마도 이것이 Vault Complex에서 안정적으로 조립되어 RNA 분해로부터 보호되었기 때문이다. 상기 데이터에 따르면 nc886은 이전 보고서와 일치하여 볼트 컴플렉스와 물리적으로 관련이 없는 것으로 나타났다. nc886과 마찬가지로 독소루비신에 의해 억제되는 세 가지 표준 vtRNA가 발견되었다 (도 5B, 도 1A와 비교). nc886이 vault complex와 무관함을 밝히긴 했지만, 표준 vtRNA (및 볼트 컴플렉스)가 nc886과는 독립적으로 독소루비신 감수성에서 어떤 역할을 할 수 있을 가능성은 여전히 존재한다. 상기 가능성은 vDRNA1-1의 KD 및 이소성 발현에 의해 시험되었다 (도 5C-D). 안티 올리고에 의한 vtRNA1-1 KD는 PKR을 활성화시키지 않았고 (phospho-eIF2 α 가 없는 것으로 나타남) 유도된 세포 자살도 아니었다 (도 5C). 시험 관내 전사된 vtRNA1-1의 도입은 독소루비신에 의해 유발된 세포 사멸을 완화시키지 못하였다 (도 5D). 동일한 실험에서 nc886과 상기 결과를 비교하여 nc886의 긍정적인 효과를 재현 가능하게 관찰함으로써 상기 두 실험에서 vtRNA1-1의 이러한 효과의 결핍이 사실임을 확인하였다. 또한 MVP의 siRNA 매개 KD는 Nthy-ori 3-1 세포에서 독소루비신의 IC₅₀ 값에 영향을 미치지 않았다 (도 5E-F). 총체적으로 우리는 vault complex가 독소루비신에 의한 표준 vtRNA의 억제에도 불구하고 우리의 투여 조건에서 독소루비신에서 역할을 하지 않는다고 결론지었다.

[204]

[205] 실시예 12. 독소루비신은 Pol III 전사를 억제한다

[206]

[207] 독소루비신에 의한 nc886 억제에 대한 메커니즘을 조사하였다. nc886은 Pol III에 의해 전사된다. 이전 연구에 의하면 독소루비신은 시험 관내 전사 분석에

도입 될 때, 독소루비신이 Pol III의 전사를 억제한다는 결론을 내렸다. 그러나 상기 관찰은 지금까지 어떤 더 많은 연구에서도 추구되지 않았고 따라서 생물학적 의미는 아직 밝혀지지 않았다. 그래서 독소루비신을 처리하고 nc886 이외에 Pol III 전사된 ncRNA("Pol III 유전자"로 표시)를 측정하였다. 정상 상태의 5S rRNA와 tRNA는 독소루비신(도 6A)에 의해 영향을 받지 않았고, 아마도 매우 풍부하고 안정적인 RNA이기 때문일 것이다. 그래서 다른 Pol III 유전자에 관심을 돌리고 nc886과 비슷한 반감기를 갖는 표준 vtRNA를 측정하기로 결정하였다. 독소루비신 처리시, 세 가지 vtRNA와 nc886은 거의 동일한 동역학으로 감소하였다 (도 6A-C). Precursor-tRNAs (Pre-RNAs)는 Pol III 전사율을 평가하는 가장 민감한 지표로 간주된다. 이는 중간체를 처리하고 반감기가 매우 짧기 때문이다. 2 개의 pre-tRNA의 발현 수준은 1 시간 이내에 거의 완전히 감소하였다 (도 6C의 보라색 라인). 이러한 모든 데이터는 전 세계적으로 진행된 Pol III 전사가 독소루비신 처리 즉시 중단되었음을 강력히 시사하였다. 필수적 세포 기능 (도 6A에서 5S rRNA 및 tRNA)의 PolIII 전사된 ncRNA는 독소루비신 처리 수 시간 이내에 감소하지 않았으며, 따라서 상기 연구에서 관찰한 급성 세포 독성 효과를 설명할 수 없다. 그렇다면 독소루비신은 어떻게 광범위하게 Pol III 유전자의 발현을 억제할까라는 의문이 들었다. 독소루비신은 DNA/염색질에 스트레스를 여러 가지 방식으로 부과한다. 그것은 토폴로지 긴장 (topological tension)을 생성하기 위해 DNA에 인터칼레이션 한다. 독소루비신의 다른 잘 알려진 효과는 topoisomerase II (topo II) 중독이다. 이중 가닥 분열 상태에서 topo II를 포획하고 연결을 방지한다. 상기 효과의 세포 결과는 DNA 스탠드 파손, 염색질로부터의 히스톤 제거, DNA 손상 반응 및 세포 사멸이다. 상기 원인 중에 어떤 것이 Pol III 전사의 억제의 원인인지를 식별하기 위해, 3개의 상이한 화합물을 비교하였다. 평면 방향족 부분으로 구성된 안트라 사이클린 계 약물 중 하나인 아클라루비신(Aclarubicin)은 DNA 인터칼레이터 (DNA intercalator)이다. 그러나 독소루비신과 달리 topo II 독성 물질은 아니다. 따라서 DNA 파손이 발생하면 topo II 중독 메커니즘에 기인 할 수 없다. 아클라루비신(Aclarubicin)이 DNA 파괴를 일으키는 지에 대한 논란이 제기되었는데, 그 이유는 여러 연구에서 모순 된 자료가 확보되었기 때문이다. 비-안트라 사이클린 화합물인 에토포사이드 (etoposide)는 DNA에 인터칼레이션하지 않고 topo II 독성으로 작용한다. 이 세 가지 약물의 특성은 도 6D에 요약되어있다. 처리 용량 [6 μ M 아클라루비신, 30 μ M 에토포시드 및 6 μ M 독소루비신]으로 상기 약물을 처리 했을 때, 독소루비신과 아클라루비신은 nc886 발현을 억제하는 반면, 에토포시드는 억제하지 않았다 (도 6D에서 왼쪽 패널). 세 가지 약물 모두에서 p53과 Chk2의 인산화가 관찰되었으며 (도 6D의 오른쪽 패널), 모든 처리법이 효과적이었으며 nc886 억제가 DNA 손상 반응의 여파로 인한 것이 아님을 나타낸다. 에토포시드 데이터는 Pol III 전사 억제가 topo II 중독 또는 DNA 파손에 의한 것이 아니라는 것을 증명하였다.

트라사이클린 약물 (독소루비신 및 아클라루비신 포함)을 DNA에 인터칼레이션 (intercalation)하면 Pol III의 작용을 방해 할 수 있는 DNA 비틀림이 발생한다 (예: 신장 중합진행 단계). 상기 가능성을 테스트하기 위해 원형 플라스미드 DNA와 nc886 발현을 위한 선형 DNA를 비교하였다. 토폴로지 긴장이 원인인 경우, 원형 DNA가 선형 DNA보다 영향을 많이 받는다. 2 개의 DNA 주형으로부터의 nc886의 전사는 독소루비신에 의해 유사하게 억제되었으며 (도 6E), 위상학적 간섭은 있을 법하지 않은 메커니즘임을 시사했다. 안트라사이클린 (anthracycline) 약물을 DNA에 인터칼레이션 (intercalation)하는 또 다른 결과는 DNA 결합 단백질의 해리입니다. 사실, 독소루비신과 아클라루비신은 히스톤을 DNA로부터 추출한다고 알려져 있으며, 에토포시드는 그렇지 못하다고 알려져 있다. 따라서 이 두 약물이 히스톤의 경우와 마찬가지로 Pol III를 제거 할 것이라고 추측했다. Pol III 서브 유니트 (POLR3A)를 이용한 염색질 면역침전 (ChIP) 결과에 따르면 Pol III가 Pol II 유전자인 GAPDH 유전자 위치에는 결합하지 않았으며, Pol III 유전자인 nc886 및 vtRNA1-1 위치에 결합하였다. 그리고 이러한 결합은 독소루비신에 의해 감소되었다 (도 6F).

[208]

[209] 실시예 13. nc886 / PKR 경로에 대한 독소루비신 처리의 최적화 및 3 차원 (3-D) 세포 배양 시스템에서의 적용

[210]

[211] 상기의 데이터(도 6)에서 총체적으로, nc886의 전사는 독소루비신 처리 즉시 중단되었다. 즉, 짧은 펄스 처리로 nc886 / PKR 경로와 세포 사멸을 활성화 시키는데 충분하다. 세포를 독소루비신으로 처리하고 15, 30, 60 분에 독소루비신이 없는 배지로 교체함으로써 이 가능성을 시험하였다 (실험 계획은 도 7A 참조). 30분은 독소루비신이 nc886을 억제하고 PKR-의존적 방식으로 세포 사멸을 유도하기에 충분한 시간 이었다 (도 7B-C). phospho-Chk2에 의해 측정 된 DNA 손상 반응은 30 분까지는 그렇게 유의하게 유도되지 않았으나 PKR wt 세포에서는 60 분에 약간 유도되었다 (레인 7은 레인 1 ~ 3, 도 7C에서는 레인 4). 비교를 위해 PKR KO 세포에서, phospho-Chk2가 관찰되었고 30분과 60분에 세포 자살이 약간 유도되었다 (도 7C의 7-8 레인). 왜 DNA 손상 반응이 PKR wt 세포보다 PKR KO에서 더 능숙했는지 알지 못하였다. 그럼에도 불구하고, PKR이 존재할 때, nc886/PKR 경로는 세포 사멸을 유도하는데 있어 지배적 이었으나 DNA 손상 반응의 효과는 30 분 펄스 처리에서 최소였다.

[212]

지금까지 실험은 약물 감수성을 포함한 여러 측면에서 생체 내 종양 환경과 크게 다른 2 차원 단층 세포 배양에서 수행되었다. 3 차원에서 배양된 세포는 생체내 생리학에 더 가깝다. 그래서 3차원 배양에서 nc886/PKR 경로를 조사하려고 시도하였다. 다른 방법보다 편리하고 우수한 최근에 개발 된 프로토콜을 사용하였다. 이 기법에서 세포는 자성 나노 입자로 코팅되고 자기장을 가함으로써 부상하게 된다. 공중 부양 된 세포는 세포 외 기질과 함께

3-D 구조를 형성하고 플레이트 위에 생체에 인쇄된다 (도식 및 실제 이미지의 경우 도 7D 참조). 독소루비신은 3차원 배양물에 대한 연속 및 펄스 처리 (각각 도 7E-F의 레인 1 및 3-4)에서 nc886을 억제하고 세포 사멸을 유도하여 nc886/PKR 경로가 3-D 배양 세포에서 작동한다는 것을 시사하며, 또한 생체 내 종양 세포에서도 가능할 수 있다.

[213]

[214] 실시예 14. μM 농도의 독소루비신 처리는 세포의 부분 집합, 특히 침묵된 nc886을 제외한 종양 세포에 광범위하게 적용 할 수 있다.

[215]

[216] 6 μM 독소루비신은 이용 가능한 데이터에 근거하여 대부분의 암세포에서 효과적인 것으로 예상된다. 암 약물 데이터베이스

(<http://www.cancerrxgene.org/>)에서 독소루비신을 검색하고 931 세포주의 IC_{50} 값을 다운로드 하였다. 또한 출판된 연구에서 957 세포주에서 CpG 메틸화 데이터를 얻었다. 두 데이터 세트의 비교는 791 개의 세포주에서 IC_{50} 값과 메틸화 값을 보였다. 오름차순으로 IC_{50} 값을 분류하였을 때 (도 7G), $\text{IC}_{50} > 6 \mu\text{M}$ 인 세포주는 27개 였다. IC_{50} 컷오프를 조금 낮추어도 (1.5 μM) 83 개의 세포 (10.5 %)만이 상기 기준을 충족시켰다. 화학 요법의 주요 문제점은 약물 내성 세포의 출현이며, 결과적으로 악성 종양의 재발이다. 여러 가지 보고서에서 이러한 내성 세포는 화학 요법 후 점차적으로 약물 농도가 증가하거나 환자의 반복 종양으로부터 분리되어 개발되었다. 문헌 조사를 통해 원래 세포와 독소루비신 내성 유도 세포주로부터 IC_{50} 값을 수집하여 도트 플롯에 표시하였다 (도 7H 및 표 3). 독소루비신 내성 그룹의 모든 부모 세포 (38 개 중 38개)와 대부분의 세포 (71 개 중 60 개는 84.5 %)는 IC_{50} 이 6 μM 미만으로 처리 조건 (6 μM 에서 30분)은 재발성 종양에서도 크게 효과적이다. nc886/PKR에 의한 세포사멸에 효과적인 독소루비신 농도는 6 μM 정도였으며, IC_{50} 값이 이 농도보다 높은 독소루비신 내성 세포주들이 (예를 들어, 도 7G의 83 개 세포주) 소수이지만 존재한다. nc886과 PKR이 정상 인간 조직에서 대부분 발현되어 있지만, 이전 연구에 따르면 nc886/PKR 경로는 모든 종양에서 작동하지 않는다. nc886의 특징은 일부 악성 세포에서 CpG DNA과 메틸화에 의한 침묵 현상이다. 이 특징은 Pol III 유전자들 사이에서 흥미롭고 독특하다. 이론적으로 그리고 상기 데이터에 근거하여, 이 침묵은 PKR이 활성화되었으므로 세포 사멸을 야기했을 것이다. 그러나 nc886-silenced in vitro 및 nc886-silenced된 종양세포가 존재한다. 이전 연구는 종양 감시 모델에 의해 이것을 설명했다. 이 모델에서 이러한 세포 사멸은 암 발병률의 감소에 기여했을 전암 세포의 제거를 확실히 하기 위해 발생했을 것이다. 그러나 특정 세포는 유전적/후성 변형을 획득하는데, 예를 들어 phospho-eIF2 α 의 세포 사멸 효과를 중화하는 eIF2B의 과발현이 PKR 세포 사멸 경로를 우회 할 수 있다. 그 세포들만이 nc886 silencing시 살아남을 수 있었고 임상적으로 검출 가능하고 in vitro에서 분리

가능한 악성 세포로 발전하였다. 이 세포들이 세포 사멸을 위한 PKR 경로를 잃어버렸고 그러므로 독소루비신, 특히 μM 농도,에 내성인 경향이 있다고 가정하였다. nc886은 마이크로 RNA 나 mRNA가 아니므로 공공 배열이나 시퀀싱 데이터에서 발현 수준을 추정하는 것은 어렵다. 따라서 nc886 silencing의 프록시 지시자로서 CpG 메틸화 값을 조사하였다. nc886에는 CpG 섬 (-189 ~ +82, nc886 사본의 5'끝이 +1 참조 지점임)이 있으며 이 섬내 또는 근처의 10CpG 사이트를 분석하였다. 10개 사이트의 평균을 계산하고 > 90 %가 과 메틸화라고 간주하였다. 이 분석에서 (도 7G의 원형 차트), 632 개의 독소루비신 감수성 ($\text{IC}_{50} < 0.6$) 세포주 중 nc886-과 메틸화 (12.0 %)만이 86개 였다. 독소루비신 내성 ($\text{IC}_{50} > 1.5$) 세포 주에서 동일한 분석을 실시한 결과, 과 메틸화 세포의 농축이 통계적으로 유의한 수준 ($p = 0.041$)으로 83회 중 20회 (19.4 %) 관찰되었다. 이러한 데이터는 PKR 세포 죽음 경로가 독소루비신에 대한 저항성에 기여하는 요인이 될 nc886-silenced 세포에서 결함이 있음을 지지하였다.

[217]

청구범위

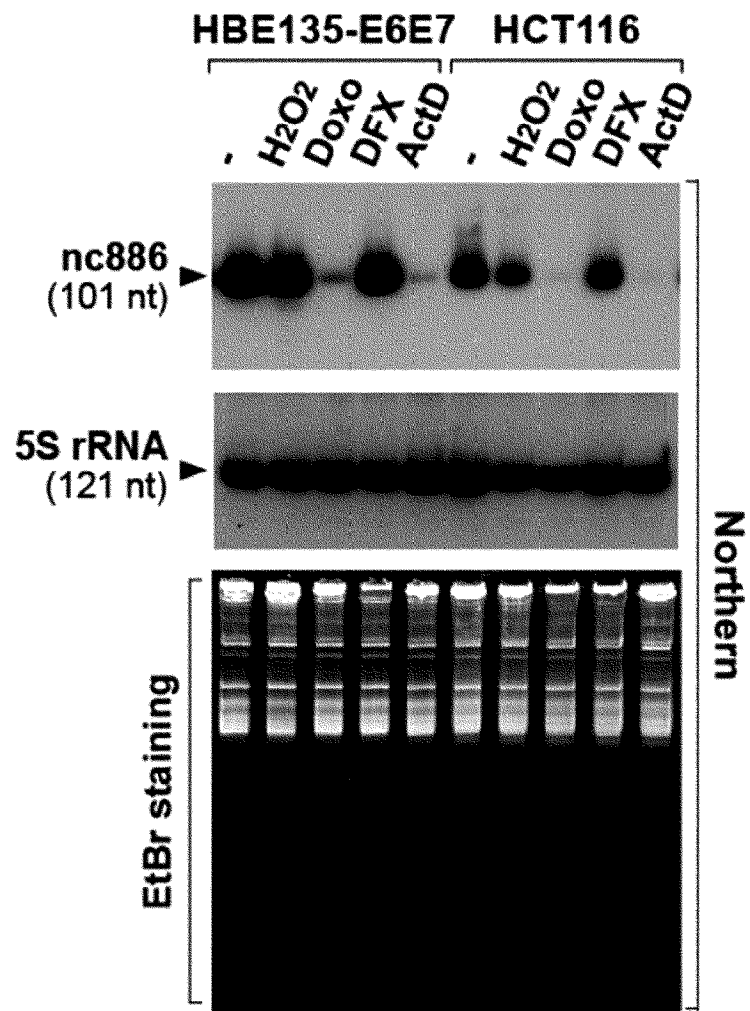
- [청구항 1] nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는, 암 치료제의 부작용의 완화 또는 감소용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 PKR 저해제는 이미다졸로-옥신돌(imidazolo-oxindole) 화합물, 2-아미노퓨린(2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자, 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자인, 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소용 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 암 치료제는 DNA-손상 제제(DNA damaging agent)인, 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소용 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 DNA-손상 제제는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인, 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소용 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 안트라사이클린계 약물은 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 또는 미톡산트론인, 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소용 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암 또는 신경아세포종(neuroblastoma)인, 암 치료제의 부작용을 완화 또는 감소용 조성물.
- [청구항 7] nc886 및/또는 PKR 저해제를 포함하는, DNA-손상 제제(DNA damaging agent)의 암 치료 보조제.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 PKR 저해제는 이미다졸로-옥신돌(imidazolo-oxindole) 화합물, 2-아미노퓨린(2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자, 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자인, DNA-손상 제제(damaging agent)의 암 치료 보조제.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인, DNA-손상 제제(damaging agent)의 암 치료 보조제.
- [청구항 10] (a) 병리학적으로 암으로 판단된 암 환자로부터 분리된 생물학적

시료로부터 nc886의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준; 및 PKR의 유전자 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 nc886 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮으며, PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우, 상기 암 환자에게 DNA-손상 제제(damaging agent) 및 PKR 저해제를 투여하도록 하는, 약물 선택 정보를 제공하는 단계;

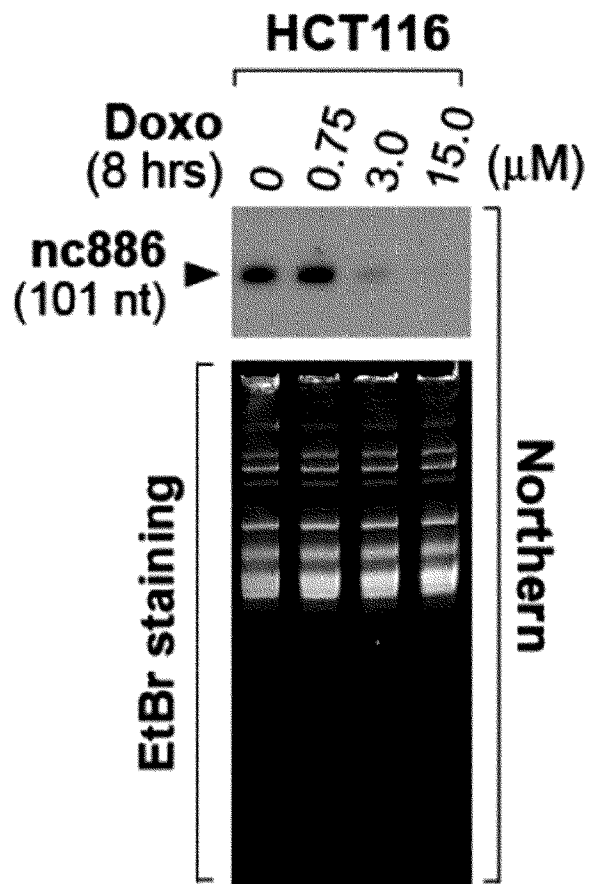
를 포함하는, nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법.

- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 PKR 저해제는 imidazolo-oxindole compound, 2-aminopurine (2-AP), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 nc886 전체 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 nc886의 일부 유전자인, nnc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 DNA-손상 제제(damaging agent)는 백안트라사이클린계 약물, 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 또는 티오테파인, nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법.
- [청구항 13] 제 10항에 있어서, 상기 PKR 저해제는 DNA-손상 제제(damaging agent)에 의한 부작용을 완화 또는 감소시키는, nc886의 유전자의 발현 수준; 및 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준에 따른 암 치료를 위한 약물의 정보 제공 방법.
- [청구항 14] nc886의 유전자의 발현 수준; 및/또는 PKR의 유전자의 발현 수준 또는 이의 단백질의 활성 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 암 치료를 위한 약물 또는 이의 투여의 정보를 제공하기 위한 키트.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 상기 유전자의 발현을 측정하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍 또는 프로브인, 암 치료를 위한 약물의 정보를 제공하기 위한 키트.
- [청구항 16] 제 14항에 있어서, 상기 단백질의 활성을 측정하는 제제는 PKR의 인산화에 특이적으로 결합하는 항체인, 암 치료를 위한 약물의 정보를 제공하기 위한 키트.

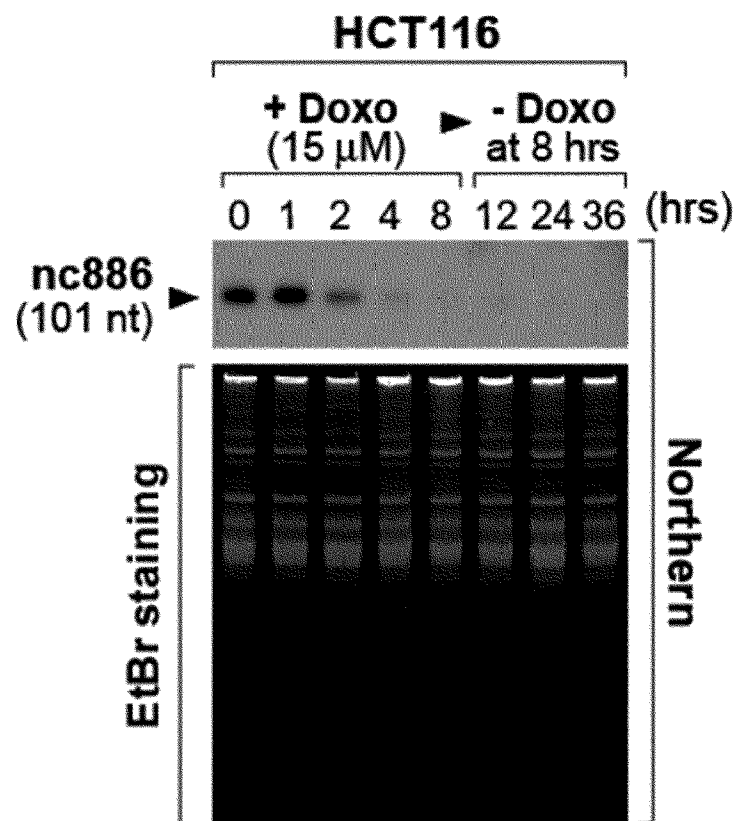
[Figure 1a]



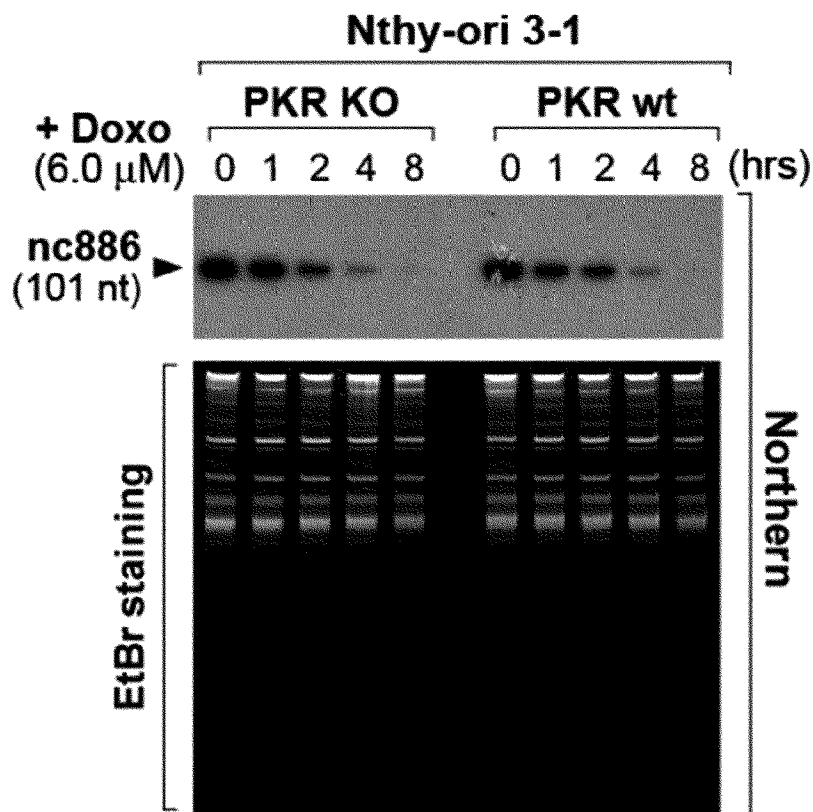
[도1b]



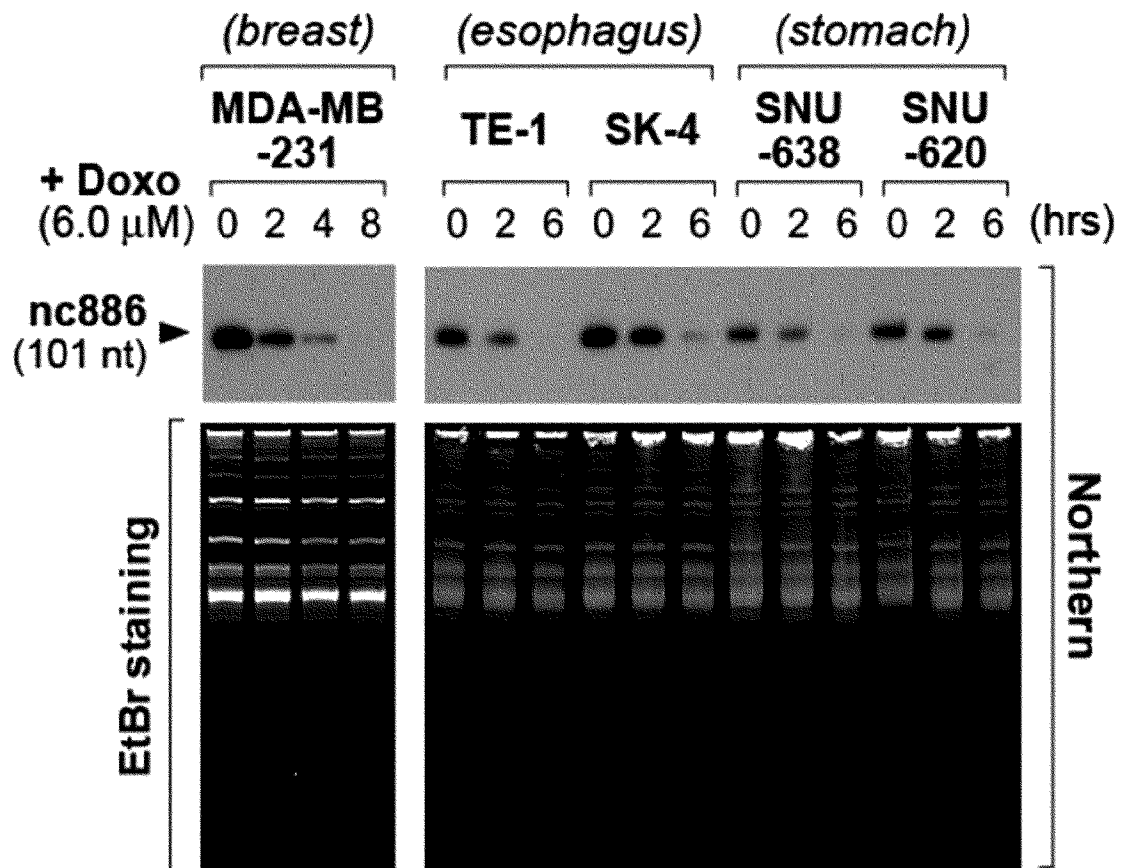
[도1c]



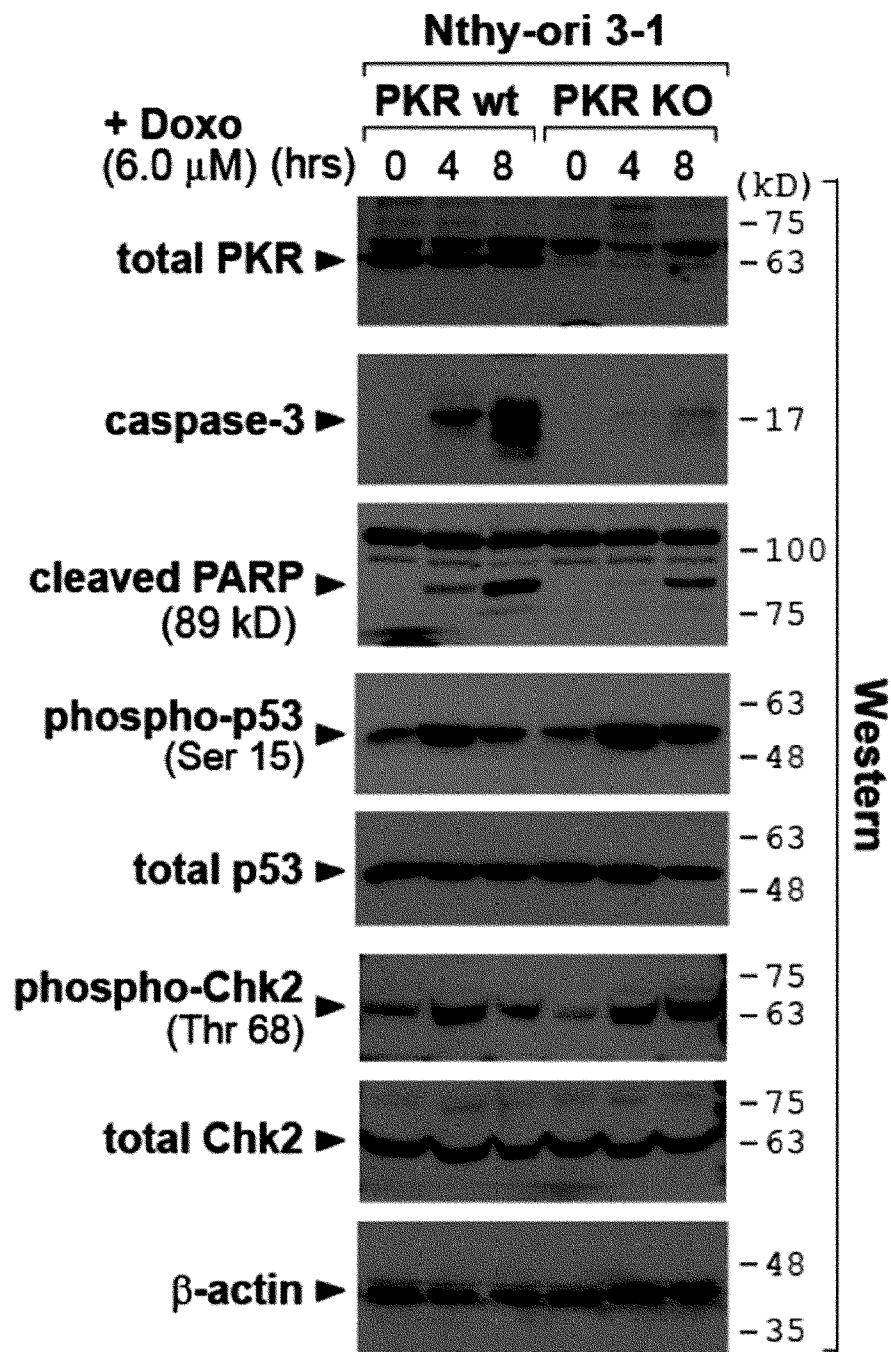
[도1d]



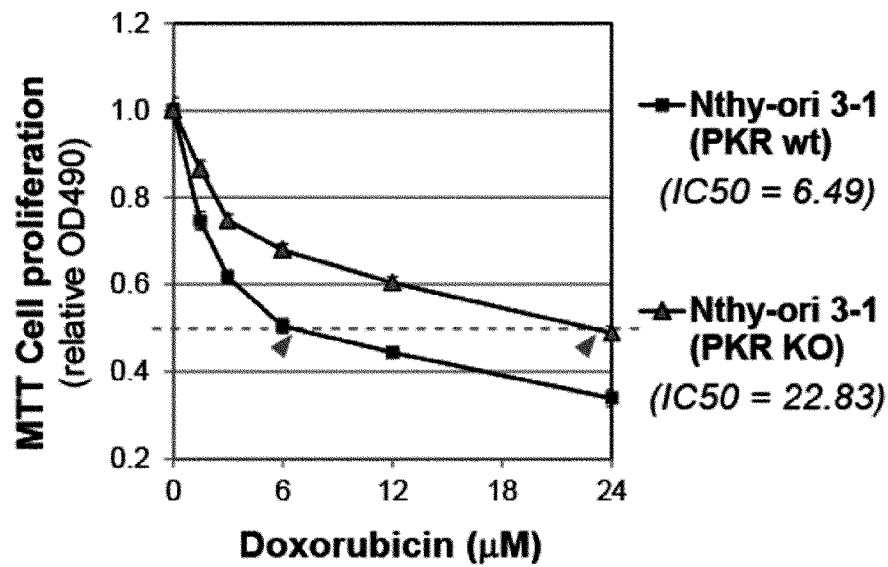
[도1e]



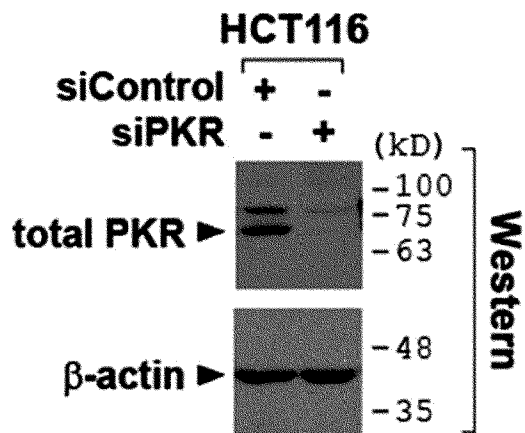
[도2a]



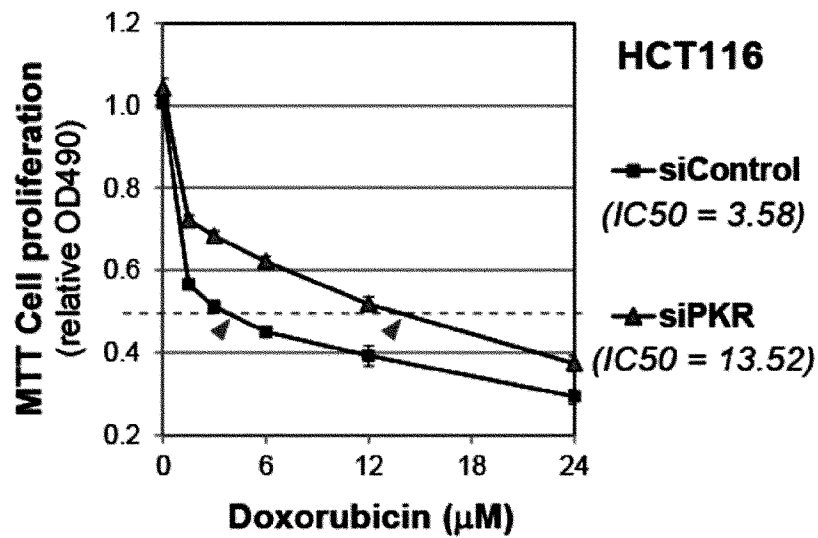
[도2b]



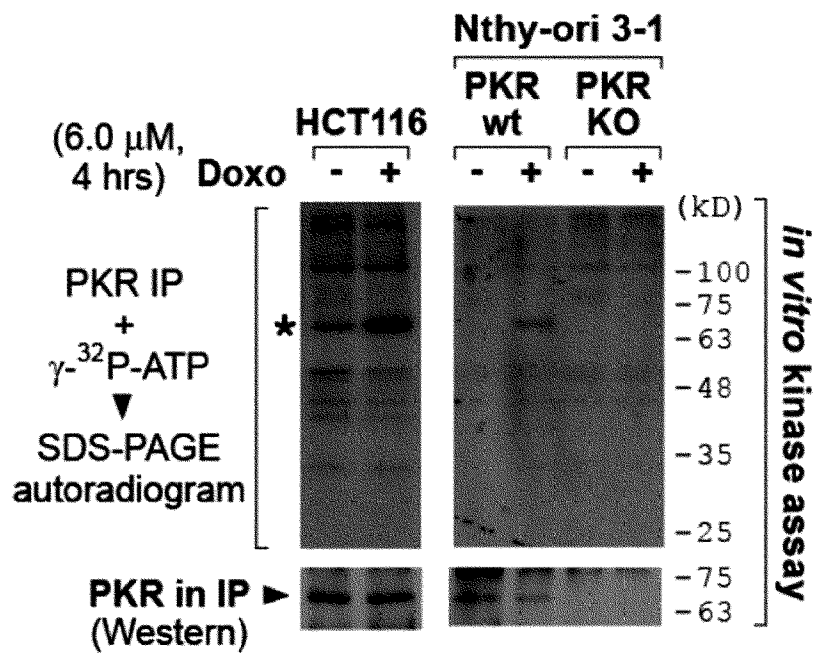
[도2c]



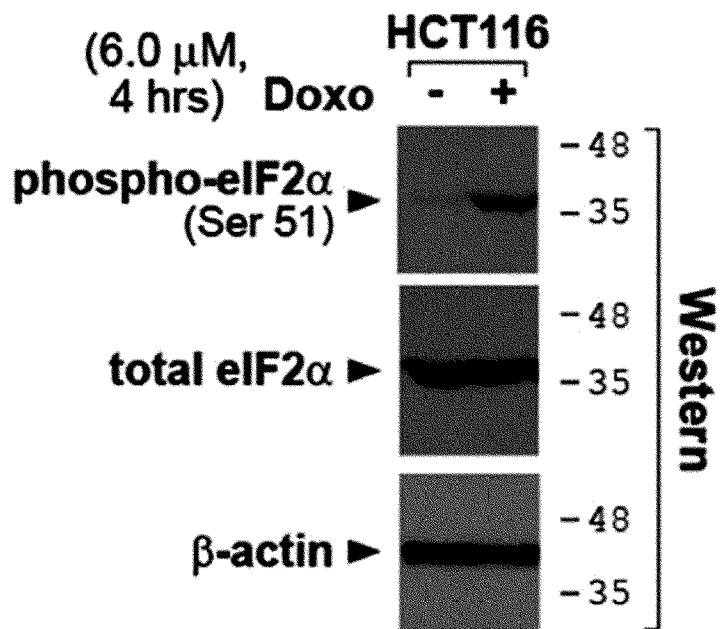
[도2d]



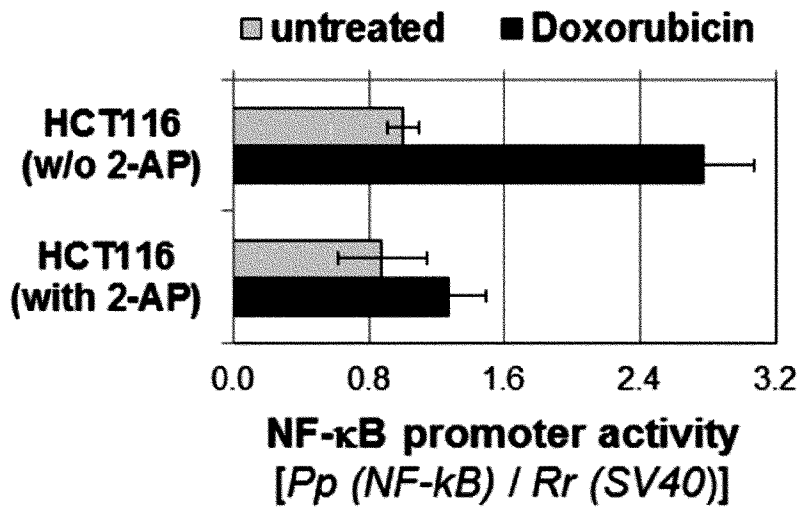
[도3a]



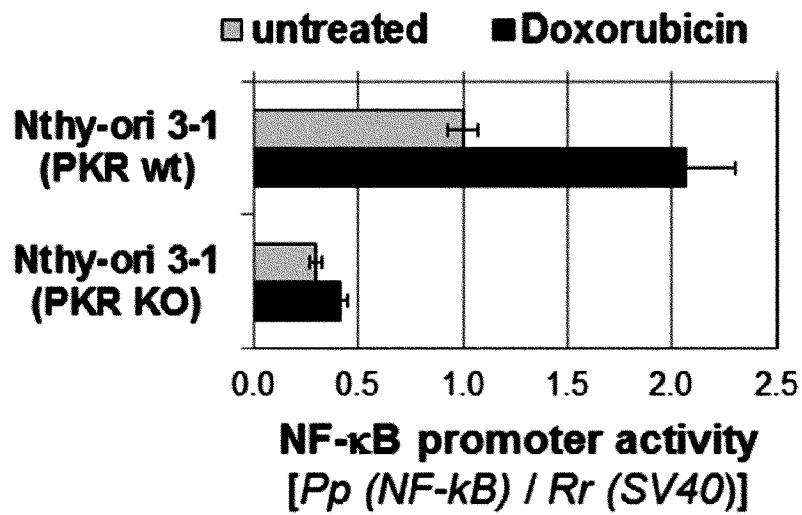
[도3b]



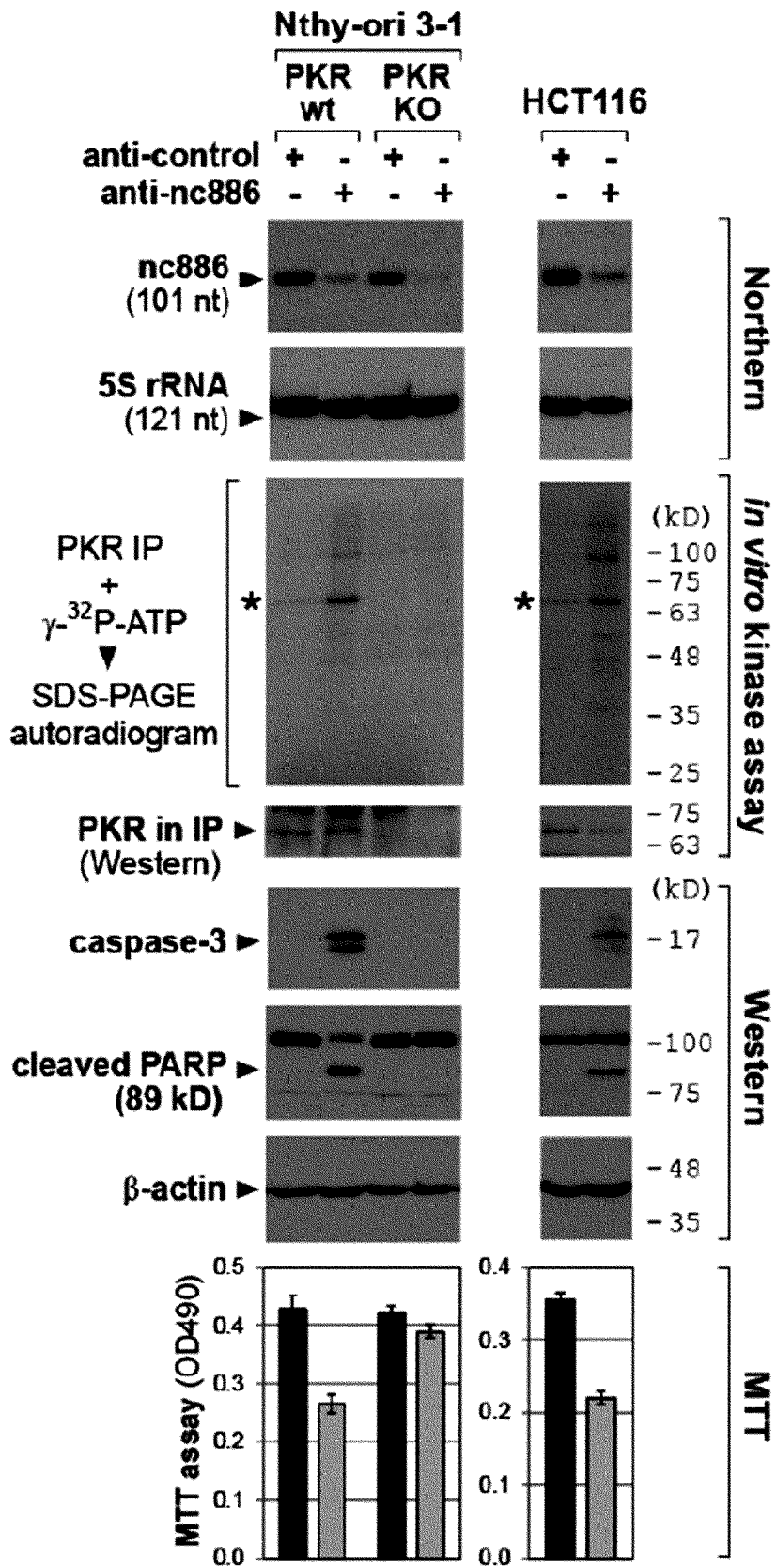
[도3c]



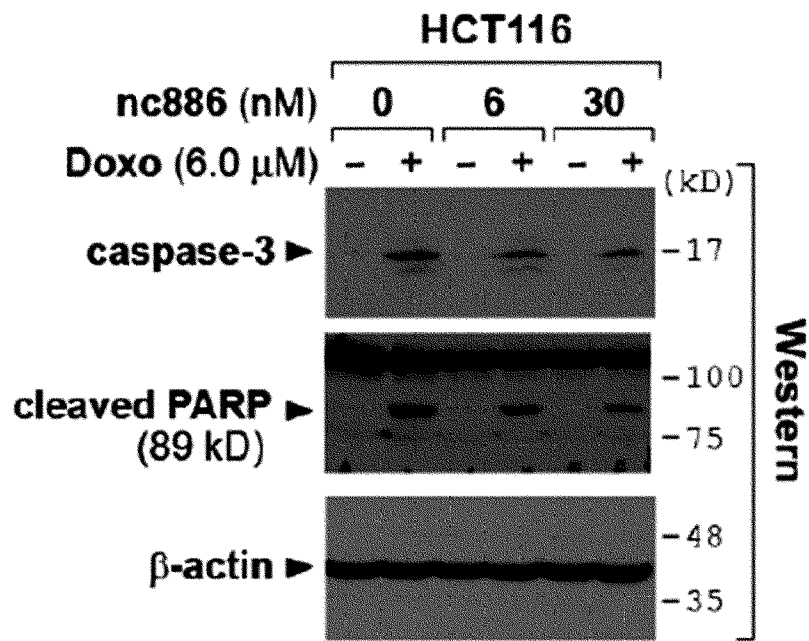
[도3d]



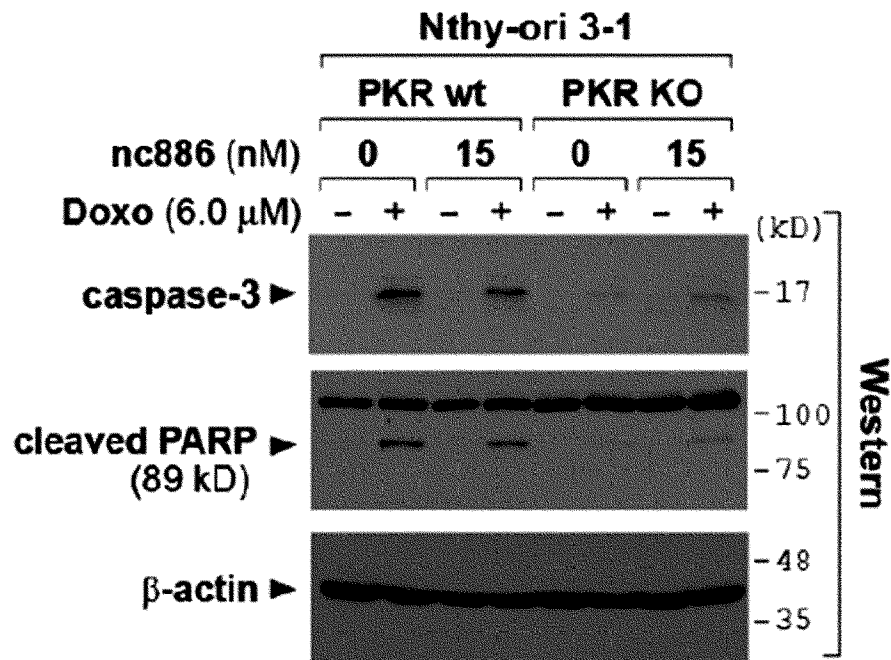
[도4a]



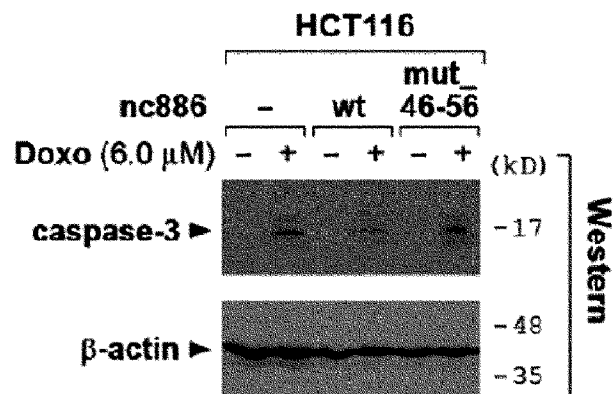
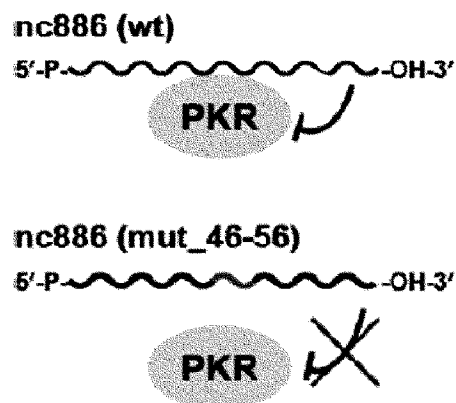
[도4b]



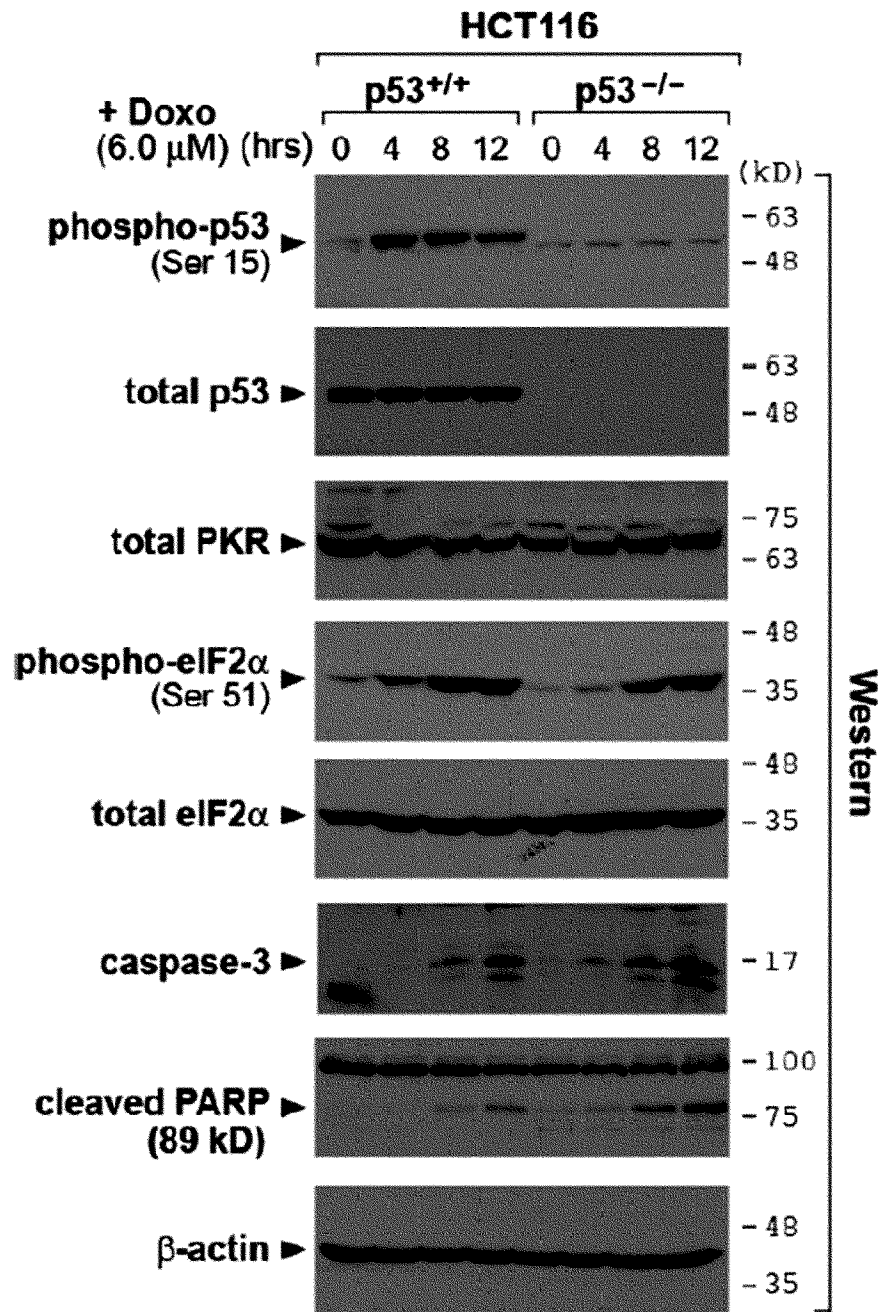
[도4c]



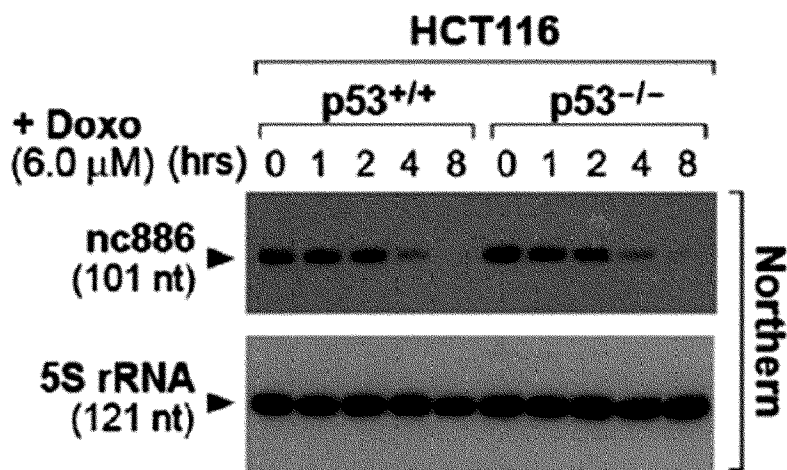
[도4d]



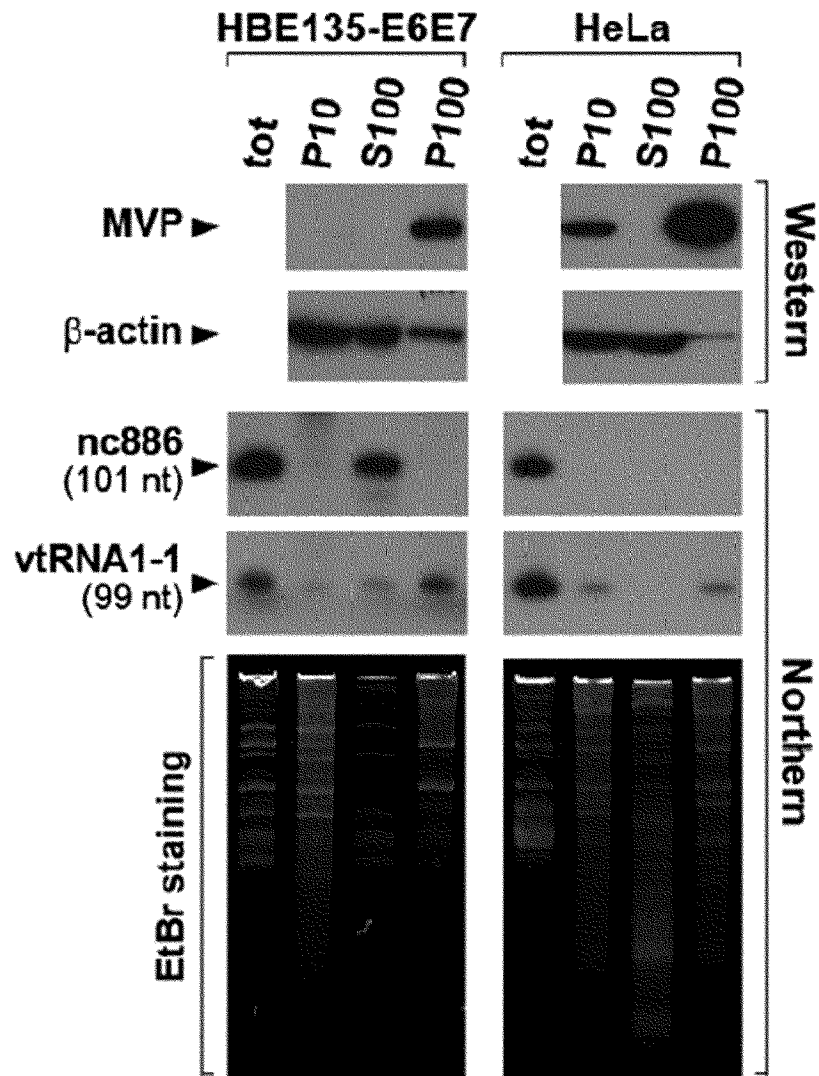
[도4e]



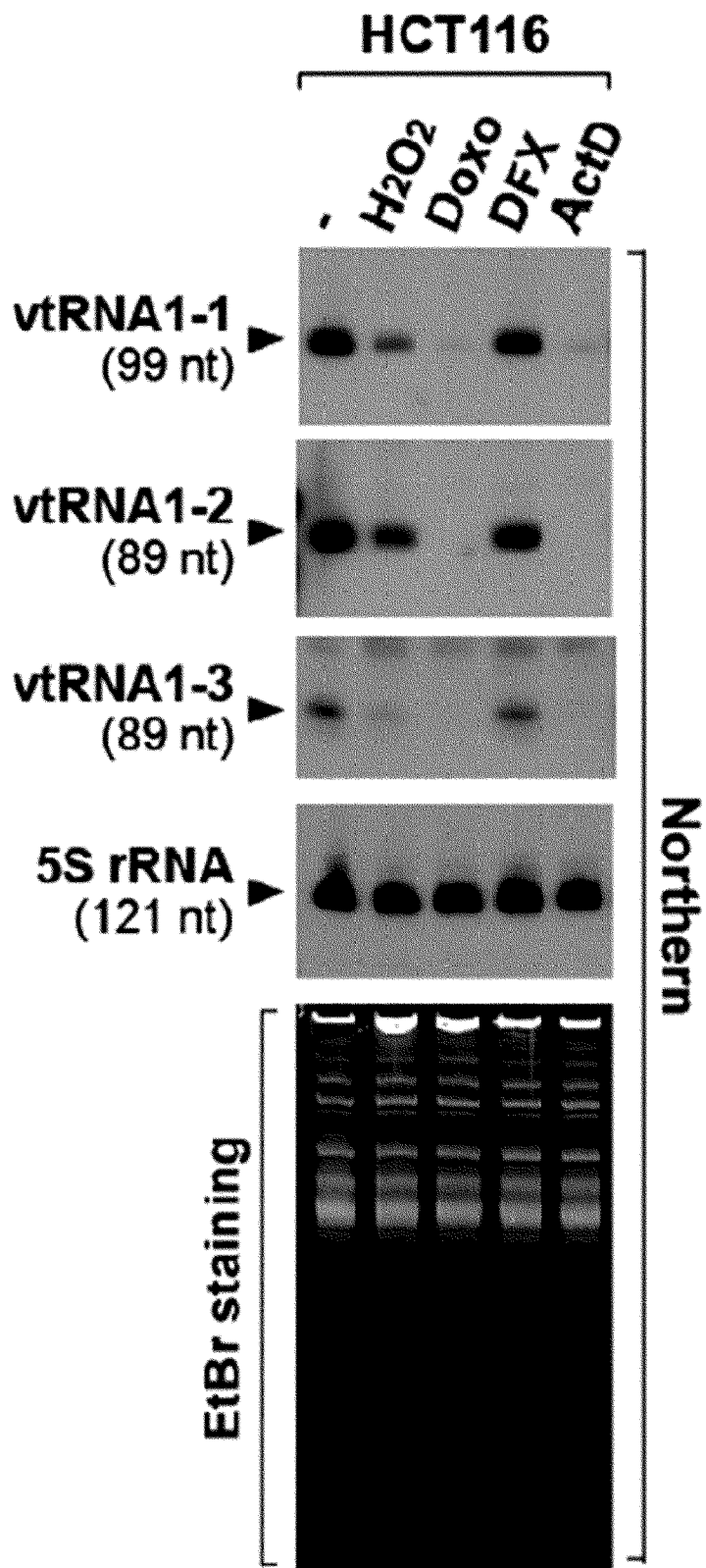
[도4f]



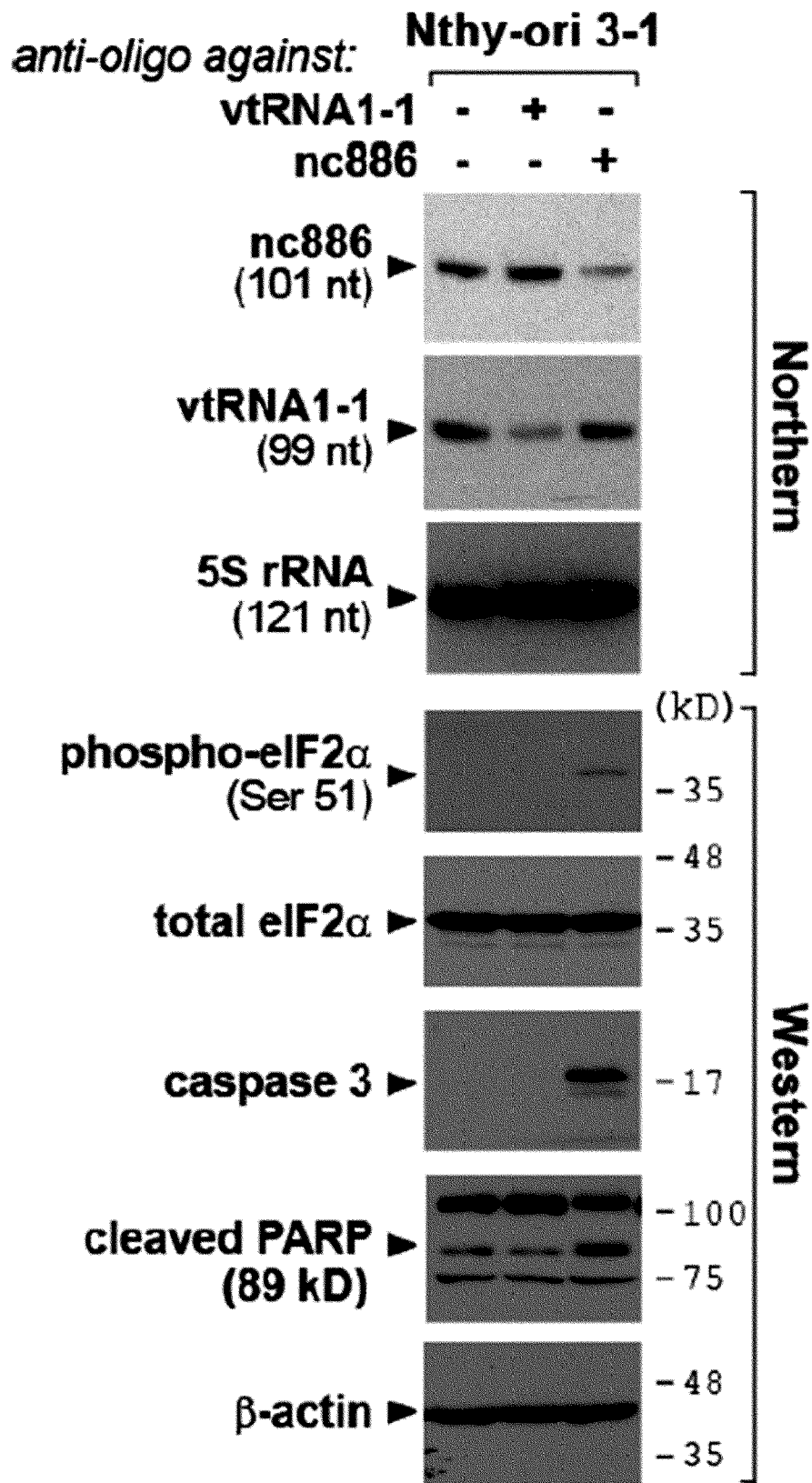
[도5a]



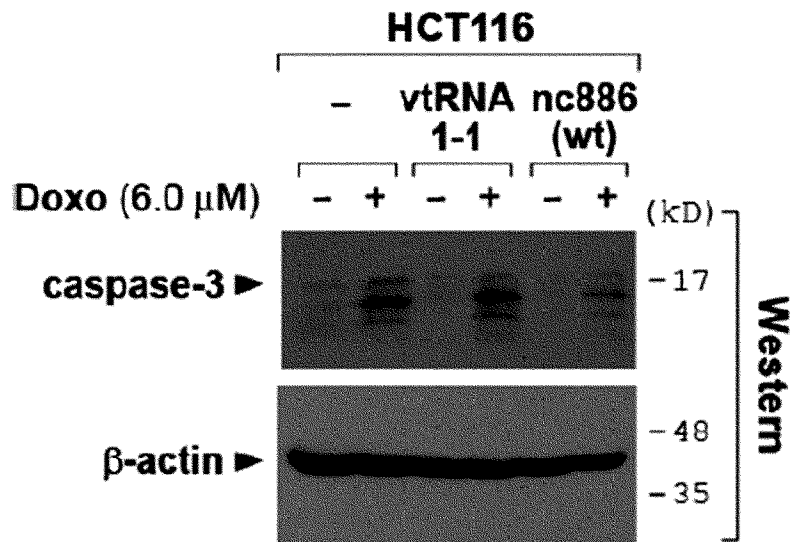
[도5b]



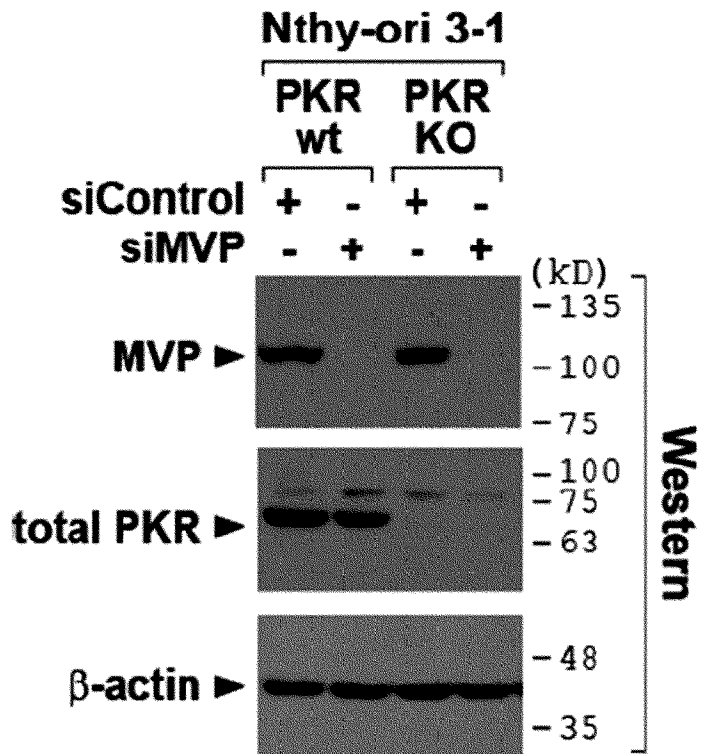
[도5c]



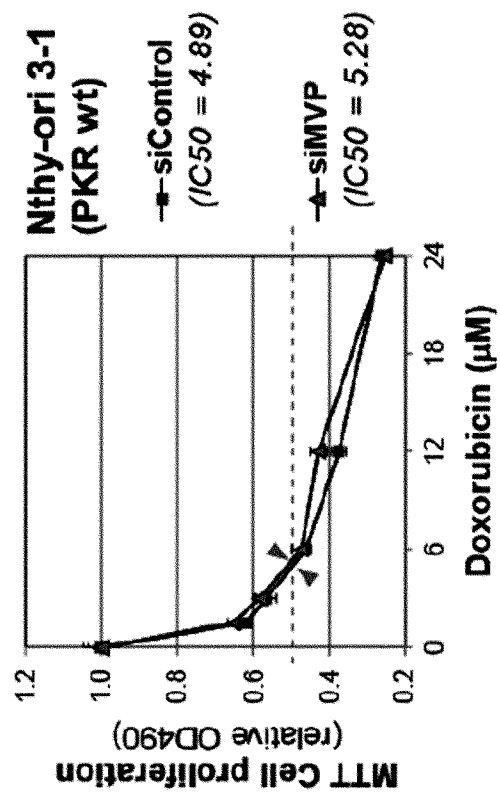
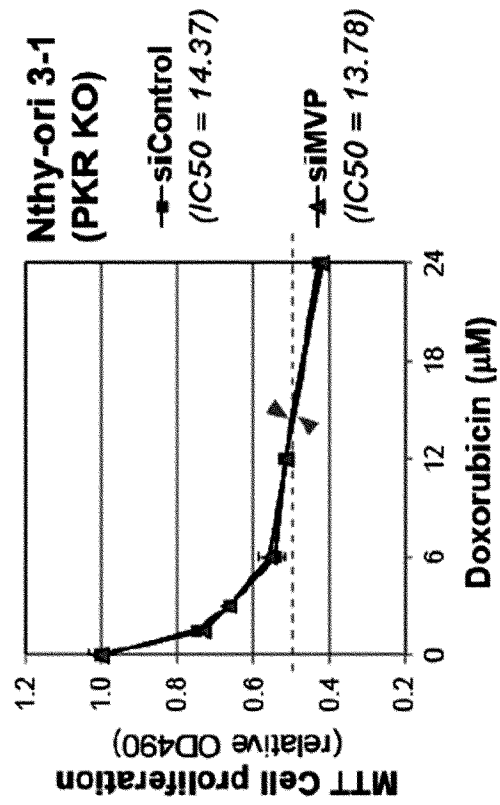
[도5d]



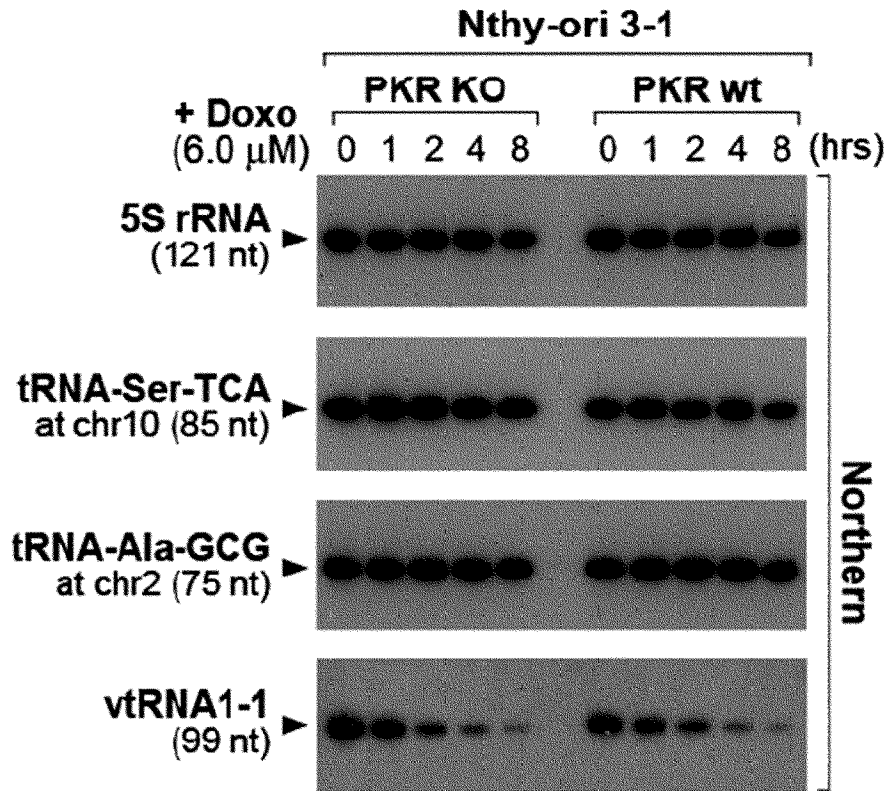
[도5e]



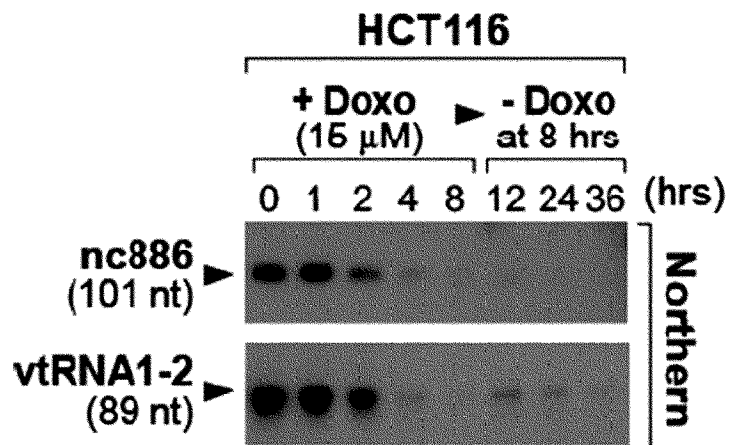
[도5f]



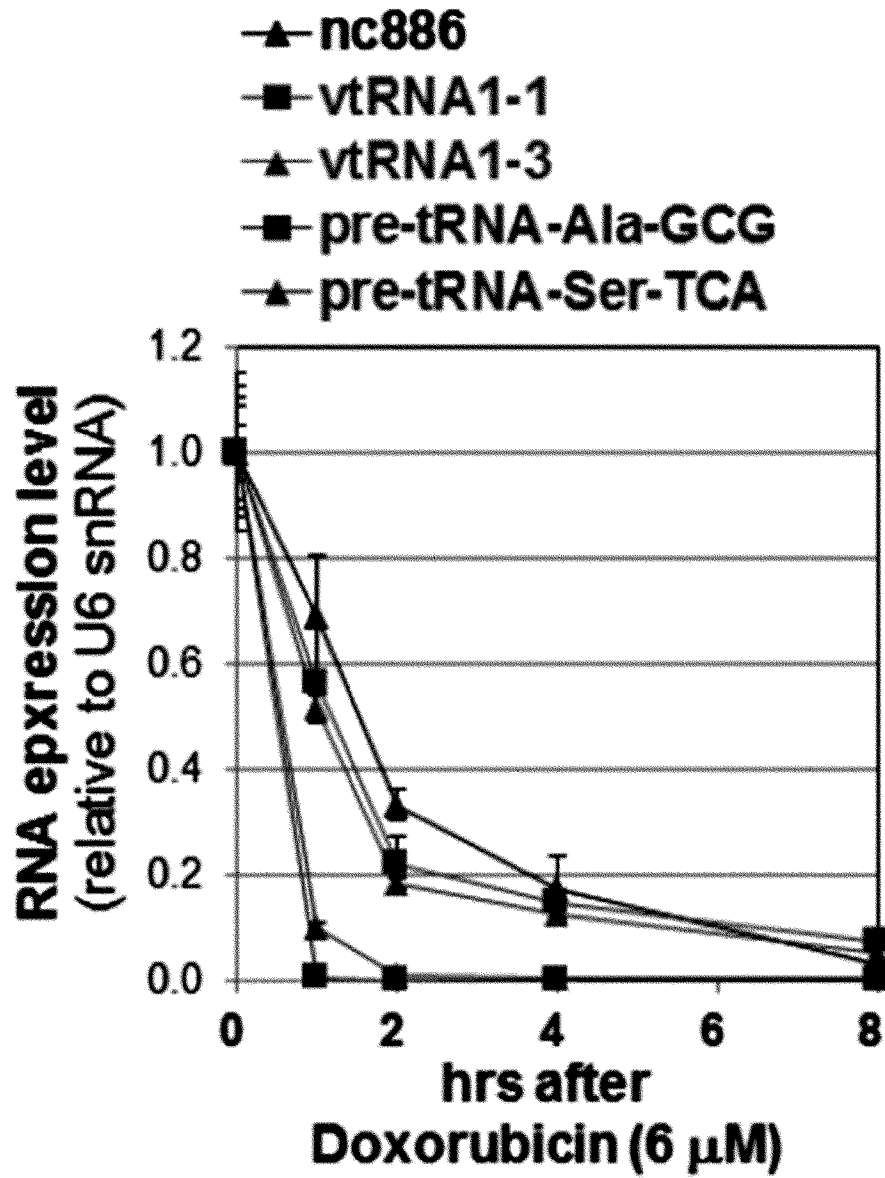
[도6a]



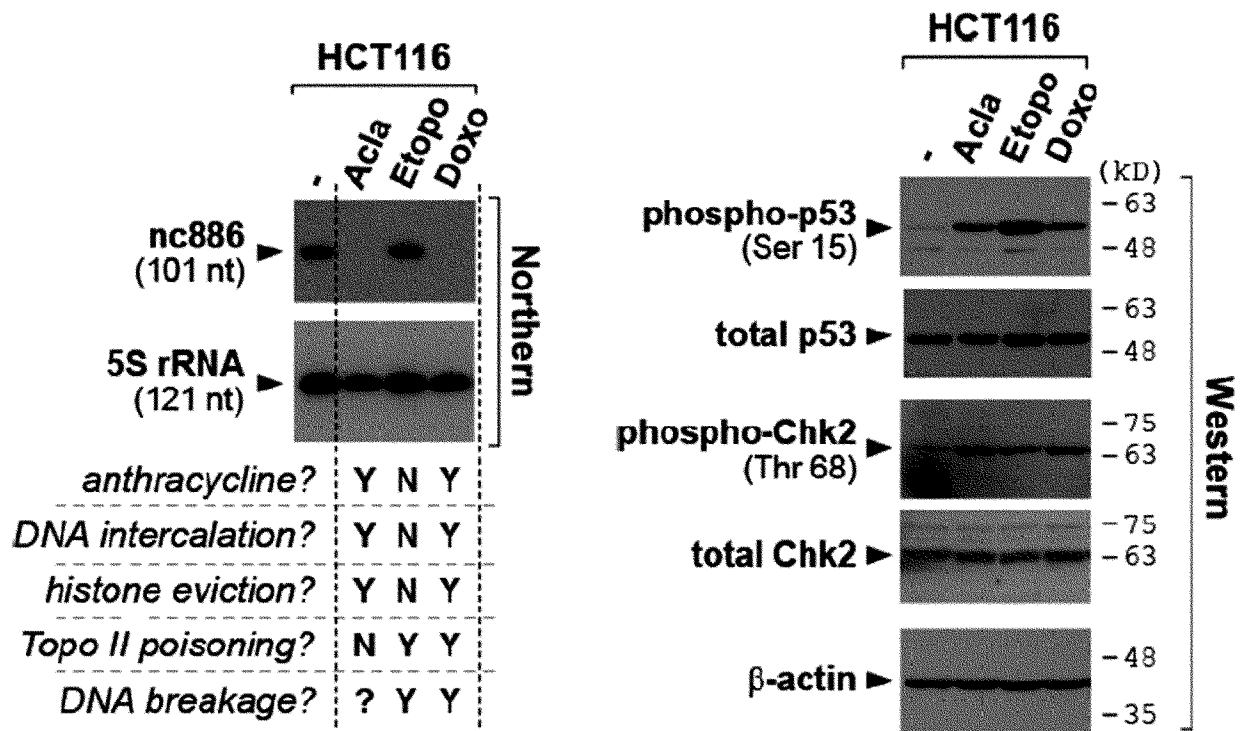
[도6b]



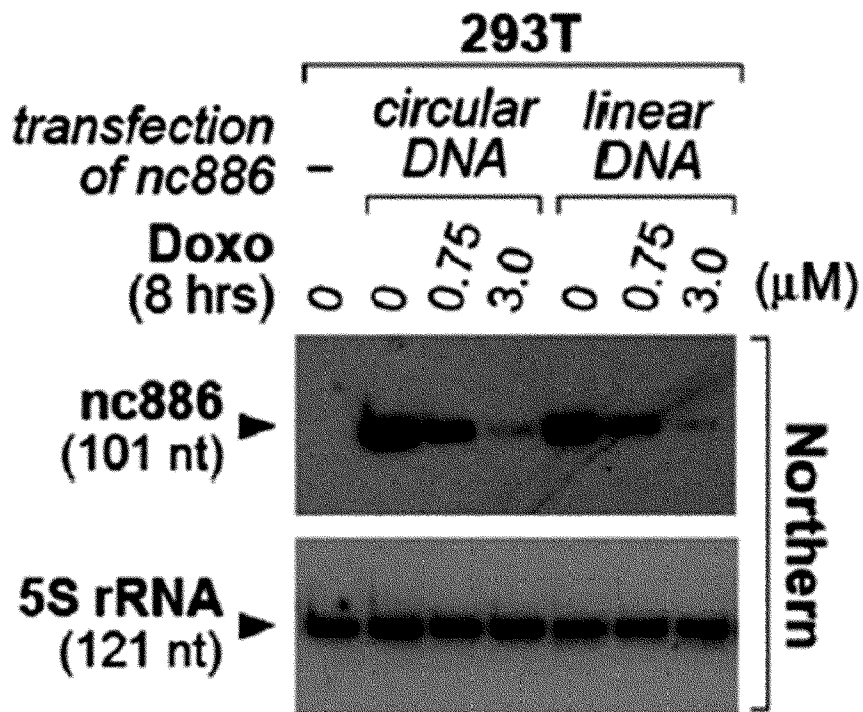
[도6c]



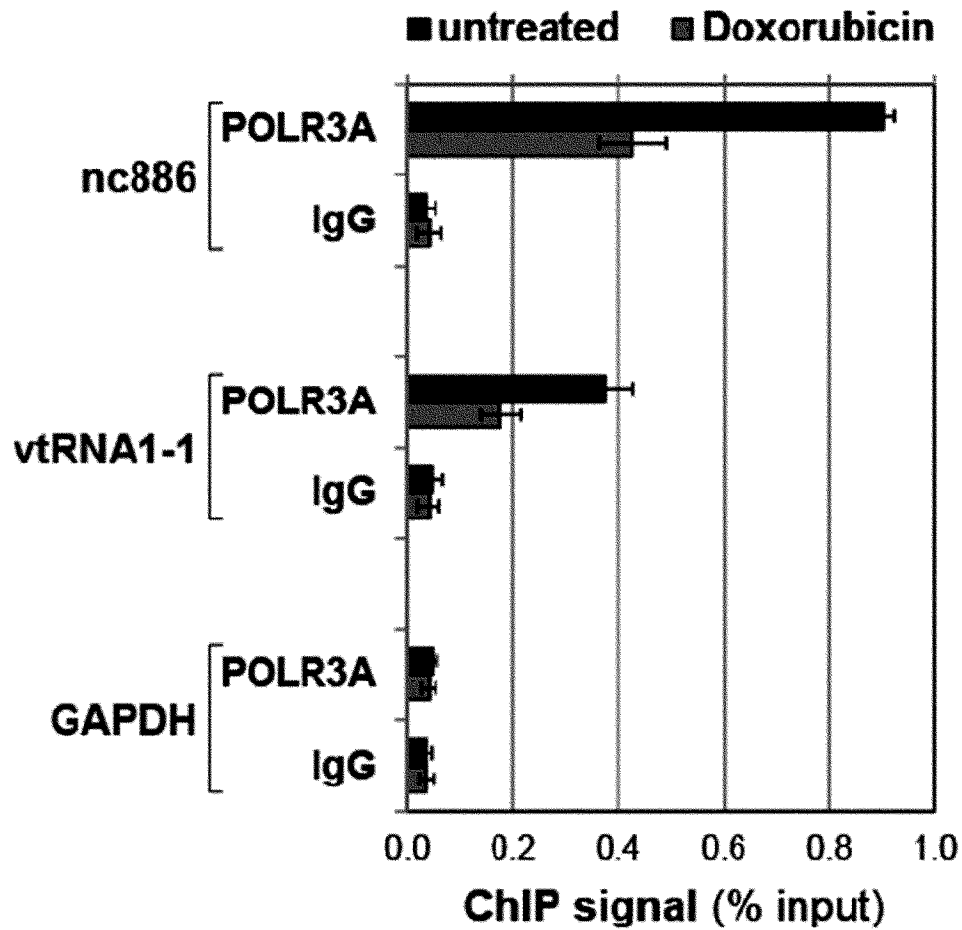
[도6d]



[도6e]



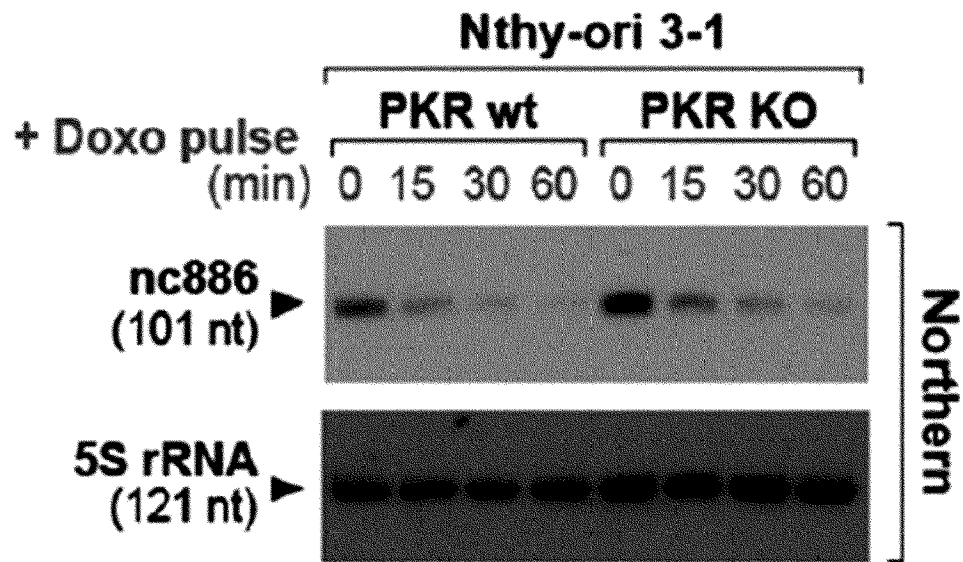
[도6f]



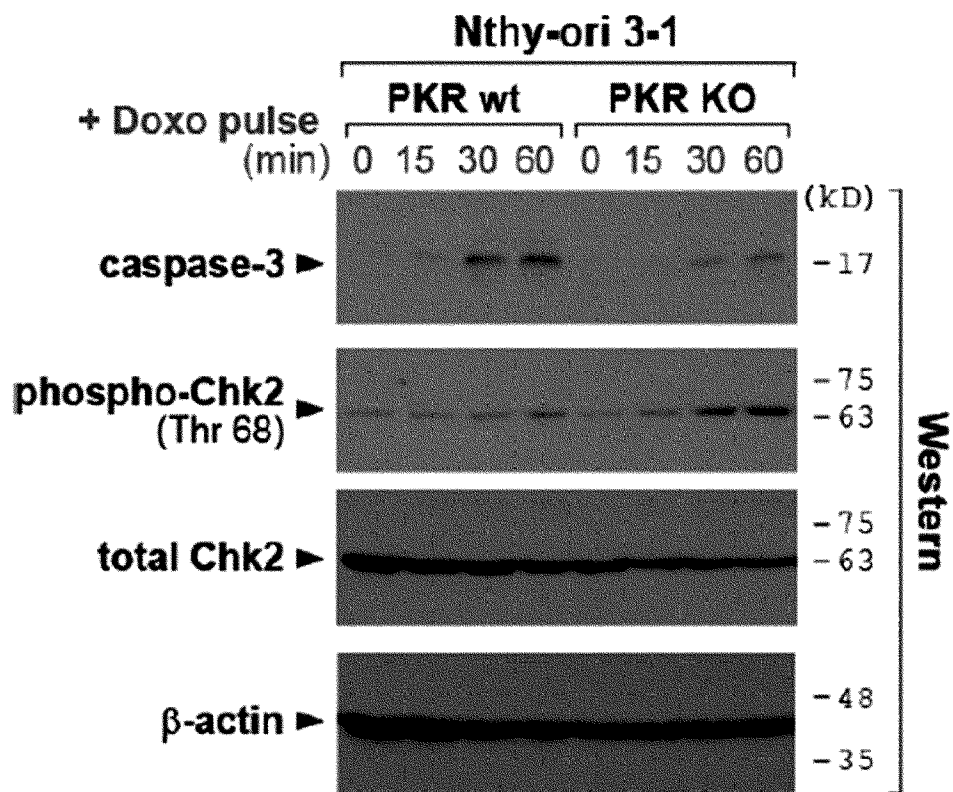
[도7a]



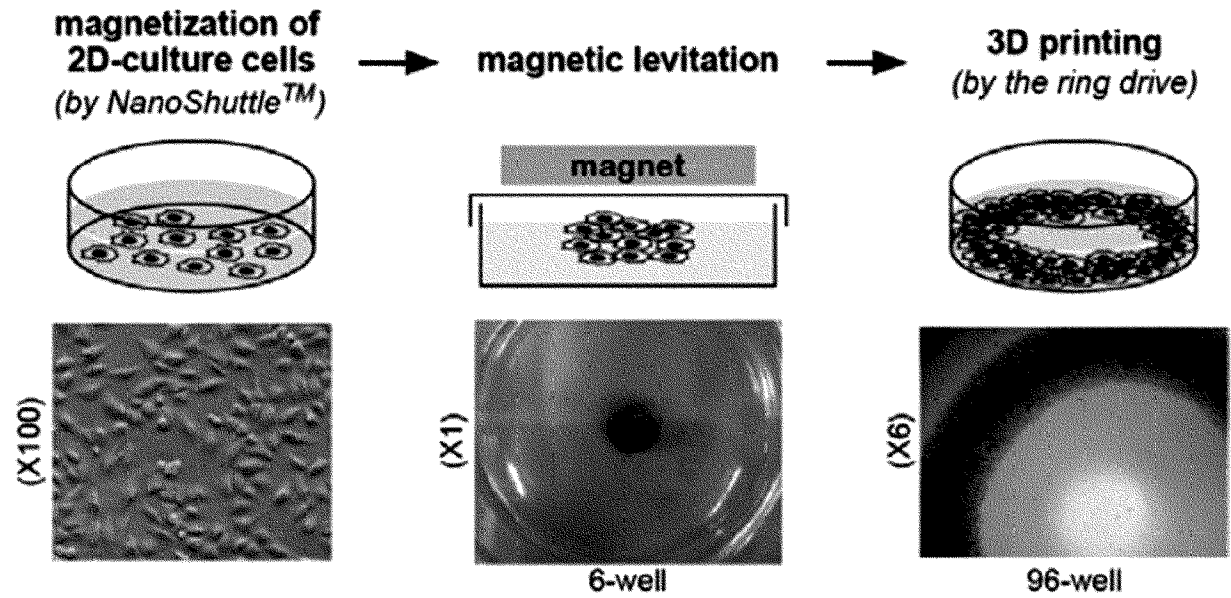
[도7b]



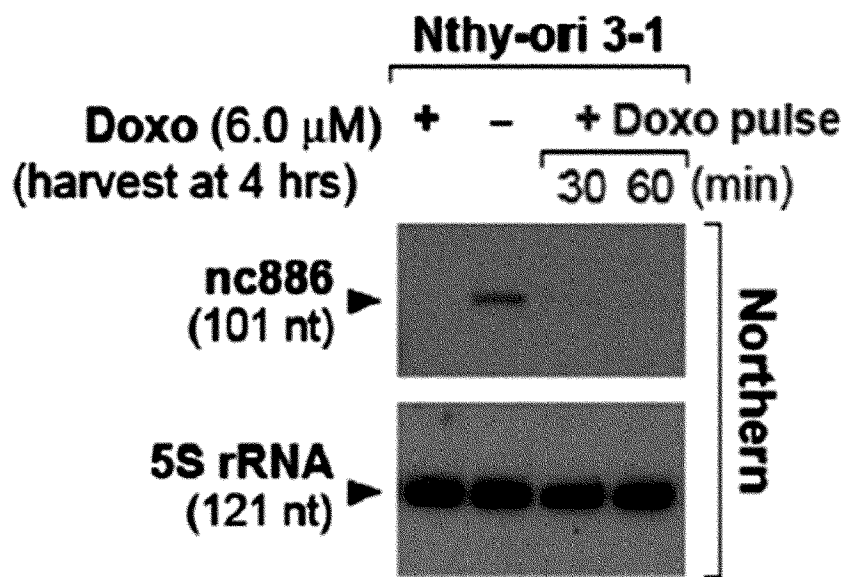
[도7c]

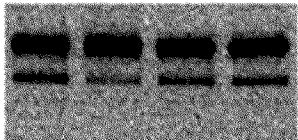


[도7d]



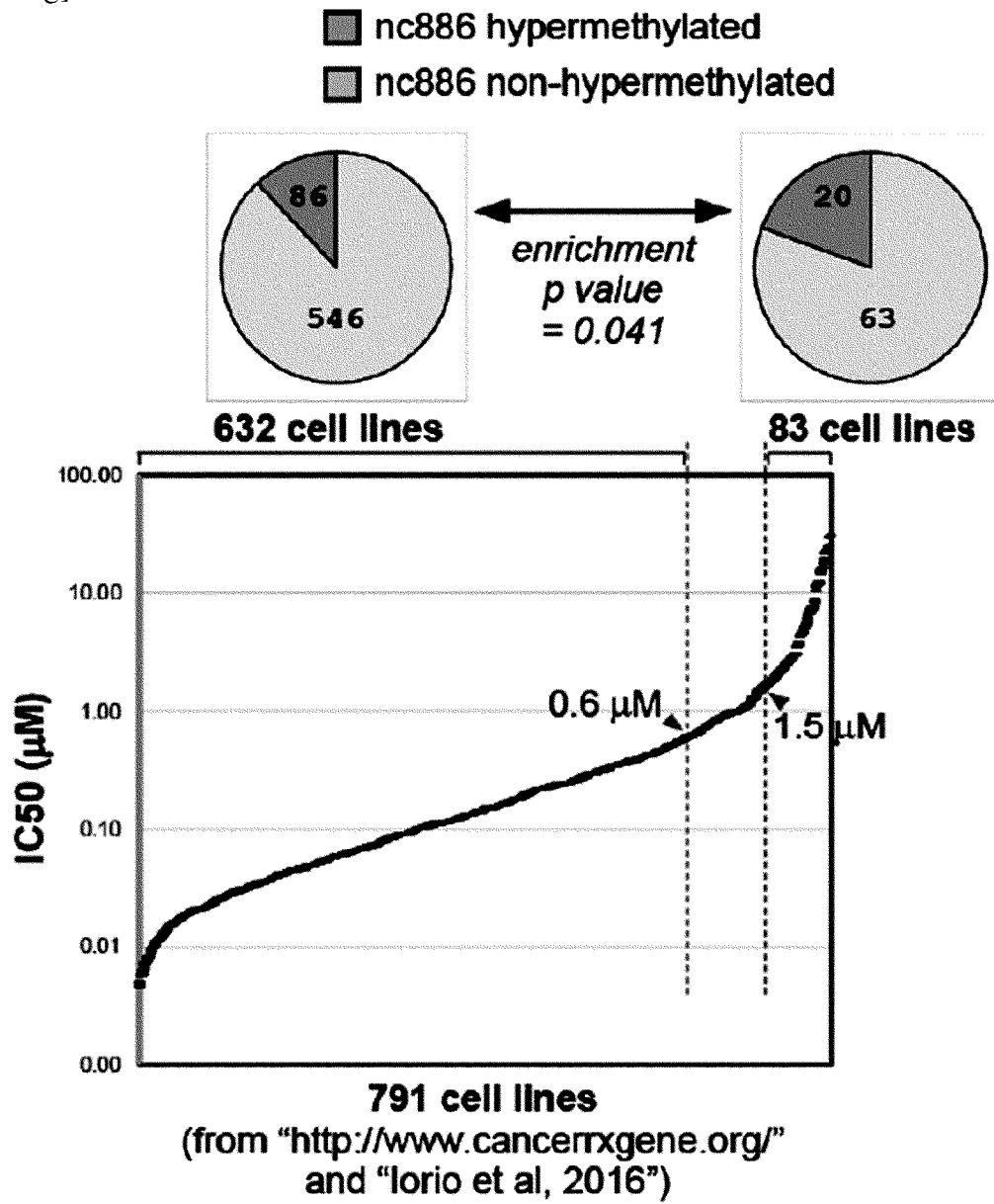
[도7e]



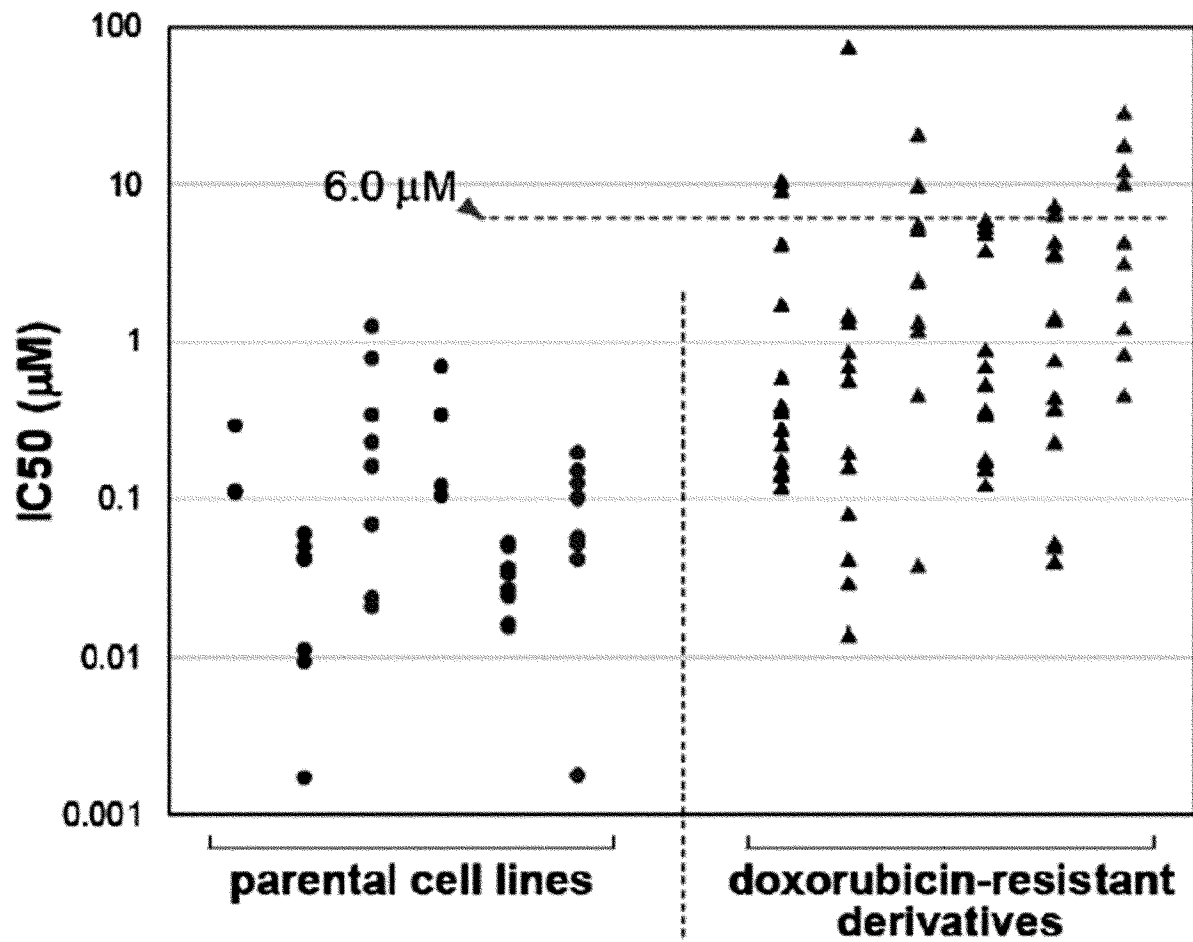
		Nthy-ori 3-1				
Doxo (6.0 μ M)		+	-	+ Doxo pulse		
(harvest at 4 hrs)				(30 60 (min))		
cleaved PARP (89 kD) ▶						-100 -75
caspase-3 ▶						-17
β -actin ▶						-48 -35

Western

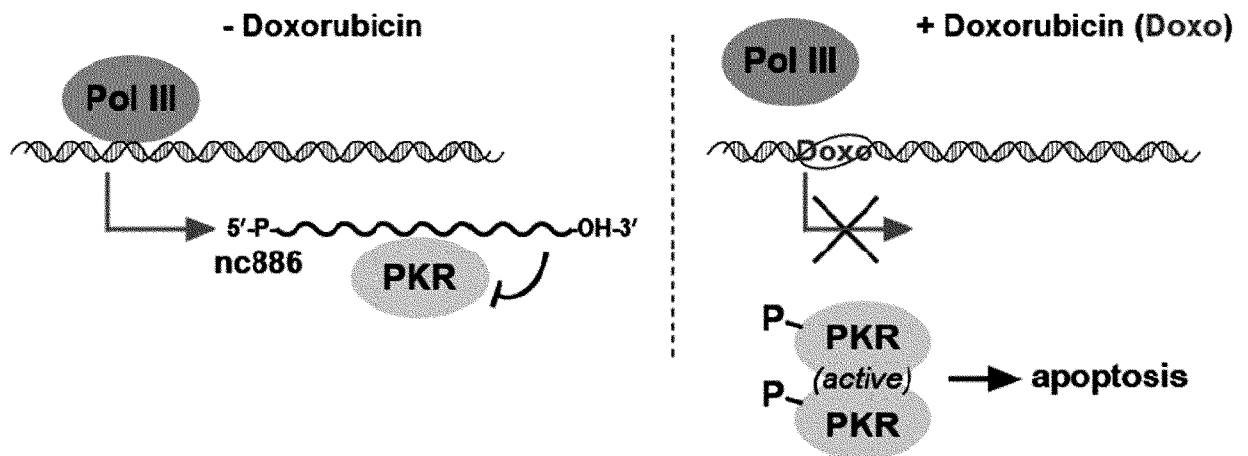
[도7g]



[도7h]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/015450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/429(2006.01)i, A61K 31/52(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12Q 1/6886(2018.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/429; A61K 31/52; A61K 31/7088; A61P 35/00; C12Q 1/6886; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: NC886, PKR inhibitor, anti-cancer, side-effects, DNA damaging agent

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JEON, S. H. et al. A tumor surveillance model: a non-coding RNA senses neoplastic cells and its protein partner signals cell death. International journal of molecular sciences. 2012, vol. 13, no. 10, pages 13134-13139 See abstract; page 13136.	1-16
A	KIM, Y. et al. PKR is activated by cellular dsRNAs during mitosis and acts as a mitotic regulator. Genes & development. 2014, vol. 28, no. 12, pages 1310-1322 See abstract; page 1316.	1-16
A	BENNETT, R. L. et al. Increased expression of the dsRNA-activated protein kinase PKR in breast cancer promotes sensitivity to doxorubicin. PLoS One. 2012, vol. 7, no. 9, e46040, pages 1-12 See abstract.	1-16
A	LEE, E. K. et al. nc886, a non-coding RNA and suppressor of PKR, exerts an oncogenic function in thyroid cancer. Oncotarget. 2016, vol. 7, no. 46, pages 75000-75012 See abstract.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 AUGUST 2019 (28.08.2019)

Date of mailing of the international search report

28 AUGUST 2019 (28.08.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/015450

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AHN, J.-H. et al. nc886 is induced by TGF- β and suppresses the microRNA pathway in ovarian cancer. Nature Communications. 21 March 2018, vol. 9, document no. 1166, pages 1-14 See abstract.	1-16
A	KUNKEAW, N. et al. Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. Oncogene. 2013, vol. 32, pages 3722-3731 See abstract.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/015450

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

None

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/429(2006.01)i, A61K 31/52(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12Q 1/6886(2018.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/429; A61K 31/52; A61K 31/7088; A61P 35/00; C12Q 1/6886; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: NC886, PKR 저해제 (PKR inhibitor), 항암(anti-cancer), 부작용 (side-effects), DNA 손상제제 (DNA damaging agent)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JEON, S. H. 등, "A tumor surveillance model: a non-coding RNA senses neoplastic cells and its protein partner signals cell death", International journal of molecular sciences, 2012, 제13권, 제10호, 페이지 13134-13139 초록; 페이지 13136 참조.	1-16
A	KIM, Y. 등, "PKR is activated by cellular dsRNAs during mitosis and acts as a mitotic regulator", Genes & development, 2014, 제28권, 제12호, 페이지 1310-1322 초록; 페이지 1316 참조.	1-16
A	BENNETT, R. L. 등, "Increased expression of the dsRNA-activated protein kinase PKR in breast cancer promotes sensitivity to doxorubicin", PLoS One, 2012, 제7권, 제9호, e46040, 페이지 1-12 초록 참조.	1-16
A	LEE, E. K. 등, "nc886, a non-coding RNA and suppressor of PKR, exerts an oncogenic function in thyroid cancer", Oncotarget, 2016, 제7권, 제46호, 페이지 75000-75012 초록 참조.	1-16

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 08월 28일 (28.08.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 08월 28일 (28.08.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	AHN, J.-H. 등, “nc886 is induced by TGF- β and suppresses the microRNA pathway in ovarian cancer”, Nature Communications, 2018.03.21, 제9권, 문헌번호 1166, 페이지 1-14 초록 참조.	1-16
A	KUNKEAW, N. 등, "Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma", Oncogene, 2013, 제32권, 페이지 3722-3731 초록 참조.	1-16

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음