



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년07월27일
(11) 등록번호 10-1052289
(24) 등록일자 2011년07월21일

(51) Int. Cl.
A61K 31/715 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7002964
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년08월21일
심사청구일자 2008년08월20일
(85) 번역문제출일자 2005년02월21일
(65) 공개번호 10-2005-0058425
(43) 공개일자 2005년06월16일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2003/001276
(87) 국제공개번호 WO 2004/018675
국제공개일자 2004년03월04일
(30) 우선권주장
60/319,748 2002년12월02일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02002022635 A1
전체 청구항 수 : 총 9 항

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 브리티쉬 콜롬비아
캐나다, 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 1체드3, 밴쿠버, 애그로노미 로드 103-6190, 유니버시티 인더스트리 리에이중 오피스
(72) 발명자
글리브 마틴 이
캐나다 브이6알 1이8 브리티쉬콜롬비아 밴쿠버 드러몬드애버뉴 4693
안센 브르크하르트
캐나다 브이6케이 3케이3 브리티쉬콜롬비아 밴쿠버 바인스트리트 401-1631
(74) 대리인
리엔목록특허법인

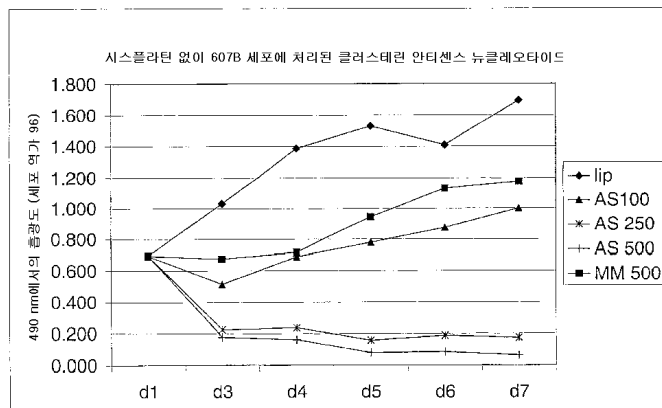
심사관 : 박정웅

(54) 클러스테린 양의 감소에 의한 흑색종의 치료

(57) 요약

흑색종의 치료는 흑색종 세포에서 클러스테린의 유효량의 감소를 통하여 달성된다. 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 흑색종 세포에서 클러스테린의 유효량을 감소시키는 데 유효한 치료제를 치료 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 포유동물, 바람직하게는 인간에서 흑색종의 치료방법을 제공한다. 상기 치료제는 클러스테린을 타겟팅하는, 예컨대, 안티센스 ODN 또는 소역제성 RNA(siRNA) 화합물일 수 있다. 또한, 본 발명은 클러스테린 발현량을 조절하는 데 유효한 제제를 투여 대상 또는 세포주에 투여하는 단계를 포함하는 투여 대상 또는 세포주에서 bcl-xL의 발현을 조절하는 방법을 제공한다. 특히, 클러스테린 발현 세포에서 있어서, 클러스테린의 유효량이 감소되면 bcl-xL의 발현은 하향-조절된다. bcl-xL은 아폽토시스의 억제자로 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에, 상기 억제는 상당히 유효하다.

대표도



(30) 우선권주장

60/405,193 2002년08월21일 미국(US)

60/408,152 2002년09월03일 미국(US)

60/472,387 2003년05월20일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

흑색종(melanoma) 세포에서 클러스테린의 유효량을 감소시키는 데 유효하고, 클러스테린을 표적으로 하고 클러스테린 mRNA에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 포유동물의 흑색종 치료용 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드이고, 상기 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드는 서열번호 2 내지 12로 구성된 군으로부터 선택되는 올리고데옥시뉴클레오티드를 포함하는 것인 포유동물의 흑색종 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드는 번역 개시 위치 또는 종결 위치를 포괄하는 (span) 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드는 동일한 서열을 갖는 비변형(unmodified) 올리고데옥시뉴클레오티드와 비교하여 인 비보 안정성이 개선되도록 변형된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 변형은 2'-O-(2-메톡시에틸) 변형인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드는 서열번호 4의 올리고데옥시뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 올리고데옥시뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 골격을 가지며, 뉴클레오티드 1-4 및 18-21, '윙스(wings)'의 당 부위(moiety)는 2'-O-메톡시에틸 변형을 가지고 나머지 뉴클레오티드는 2'-데옥시뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

흑색종 세포에서 클러스테린의 유효량을 감소시키는 데 유효하고, 클러스테린을 표적으로 하고 클러스테린 mRNA에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 포유동물의 흑색종 치료용 조성물로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 RNAi 기전으로 흑색종 세포에서 클러스테린의 유효량을 감소시키는 데 유효한 RNA 분자이고, 상기 RNA 분자는 서열번호 20 내지 25로 구성된 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 포유동물의 흑색종 치료용 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드는 서열번호 2 내지 12로 구성된 군으로부터 선택되는 올리고데옥시뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드는 서열번호 4의 올리고데옥시뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2002년 8월 21일에 출원된 미국 가출원 60/405,193, 2002년 9월 3일에 출원된 60/408,152, 2002년 12월 2일에 출원된 60/319,748, 그리고 2003년 5월 20일에 출원된 60/472,387에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0002] 본 발명은 테스토스테론-억제 전립선 메시지2(TRPM-2)로 알려져 있는 클러스테린(clusterin)의 억제, 예컨대, 클러스테린에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드의 투여에 의한 흑색종의 안티센스 치료에 대한 것이다.

배경기술

[0003] 클러스테린 또는 TRPM-2는 다양한 추정 활성을 갖는 유비퀴틴스 단백질이다. 전립선 표피세포에서, 거세 이후 즉시 클러스테린의 발현이 증가하며, 거세 후 3-4일째에 래트 전립선 세포에서 최고 수준에 이르며, 이는 다량

의 세포 사멸의 개시와 동시에 일어난다. 이 결과와 기초하여 몇몇 연구자들은, 클러스테린이 세포 사멸에 대한 마커이고 아폽토시스의 촉진자라는 결론을 내렸다. 다른 한편, 세르톨리 세포와 몇몇 표피세포는 증가된 세포 사멸 없이 고수준의 클러스테린을 발현하였고, 이러한 발견은 상술한 결론의 타당성에 의문을 제기하도록 하였다. Sensibar et al., *Cancer Research* 55:2431-2437(1995)는 전립선 세포 사멸에서의 클러스테린의 역할을 보다 명확하게 규명할 수 있는 인 비트로 실험을 하였다. 이들은 클러스테린을 코딩하는 유전자에 의해 형질전환된 LNCaP 세포를 이용하였고, 이 단백질의 발현이 종양괴사인자 α (TNF α)의 효과를 변화시키는 지 여부를 관찰하였는데, LNCaP 세포는 TNF α 에 민감한 세포이며 일반적으로 약 12시간 이내에 세포 사멸이 발생한다. 형질전환된 LNCaP 세포를 TNF α 로 처리한 경우 몇 시간 동안 클러스테린 양의 일시적 증가가 관찰되었으나, 세포 사멸에 선행하는 DNA 단편화가 관찰되는 시점에서 상기 증가된 양은 없어진다. 클러스테린 서열의 염기 1-21에 상당하는 안티센스 분자는 클러스테린의 발현의 실질적인 감소를 초래하였고, TNF α 에 노출된 LNCaP 세포에서 아폽토시스 세포 사멸을 증가시켰으나, 다른 클러스테린 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 그러하지 않았다. 이러한 결과에 기초하여, Sensibar et al.은 비록 작용기전은 명확하지 않지만, 클러스테린의 과발현이 TNF의 세포독성 효과로부터 세포를 보호할 수 있고 클러스테린의 결핍은 세포 사멸의 개시를 초래한다는 가설을 만들었다.

[0004] 본 명세서에 참조로서 삽입되는 PCT 공개 WO 00/049937은, 클러스테린의 발현을 감소시키는 안티센스 치료방법은 전립선암, 신장세포암 및 유방암과 같은 암의 치료에 치료학적 이점을 제공한다는 사실을 개시한다. 또한, 안티센스 클러스테린과 세포독성 화학요법제(예컨대, 탁산)의 혼합된 이용은 호르몬 불응성 전립선암에서 화학요법제에 대한 민감성을 상승적으로 증가시킨다. 클러스테린을 발현하는 세포를 안티센스 클러스테린 올리고뉴클레오티드(ODN)으로 처리한 경우에, 방사선 민감성도 개선되었다.

발명의 상세한 설명

[0005] 본 발명은 클러스테린의 유효량의 감소를 통한 흑색종의 치료에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 흑색종 세포에서 클러스테린의 유효량을 감소시키는 데 유효한 치료제를 치료 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 포유동물, 바람직하게는 인간에서 흑색종의 치료방법을 제공한다. 상기 치료제는, 클러스테린을 타겟팅하는 예컨대, 안티센스 ODN 또는 소역제성 RNA(siRNA) 화합물일 수 있다.

[0006] 또한, 본 발명은 클러스테린 발현량을 조절하는 데 유효한 제제를 투여 대상 또는 세포주에 투여하는 단계를 포함하는 투여 대상 또는 세포주에서 bcl-xL의 발현을 조절하는 방법을 제공한다. 특히, 클러스테린 발현 세포에서 있어서, 클러스테린의 유효량이 감소하면 bcl-xL의 발현은 하향-조절된다. bcl-xL은 아폽토시스의 억제자로 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에, 상기 억제는 상당히 유효하다. 참조문헌으로서 미국 특허 제6,172,216호가 있고, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0007] 본 명세서 및 청구항에서 이용되는 용어 '클러스테린'은 래트 정소로부터 유래된 당단백질, 그리고 다른 포유동물종, 예컨대, 인간으로부터 유래된 동족체 단백질을 의미하며, 이는 클러스테린으로 명명되었거나 다른 이름으로 명명되어 있다. 다양한 클러스테린 분자들의 서열은 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 클러스테린의 서열은 Wong, et al., *Eur. J. Biochem.* 221(3), 917-925(1994) 및 NCBI 서열 접근번호 NM_001831에 발표되어 있고, 서열번호 1에 기재되어 있다. 이 서열에서 코딩 서열은 염기 48 내지 1397이다.

[0008] 본 발명은 특히, 인간의 흑색종을 치료하기 위한 치료학적 조성물, 및 이 조성물을 이용한 방법을 제공한다. 본 발명의 치료학적 조성물 및 방법은 치료를 받은 개체에 존재하는 클러스테린의 유효량을 감소시킨다. 본 명세서에서, '클러스테린의 유효량'은 그 양의 감소에 의해 항-아폽토시스 보호를 제공할 수 있는 클러스테린의 양을 의미한다. 클러스테린의 유효량은 클러스테린의 발현 속도를 감소시키거나, 클러스테린의 파괴 속도를 증가시키거나, 또는 클러스테린을 불활성 상태로 변형(예컨대, 항체와의 결합에 의해)하여 감소시킬 수 있다.

[0009] 안티센스 ODN 치료학

[0010] 본 발명의 일 구현예에서, 클러스테린의 유효량 감소는 안티센스 ODNs, 특히 번역 개시 위치 또는 종결 위치를 포괄(span)하는 클러스테린 mRNA의 부위에 상보적인 안티센스 ODNs의 투여에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 방법에서 안티센스 분자로서 이용될 수 있는 예시적 서열은 PCT 특허출원 공개 WO 00/49937, 미국 특허출원공개

US-2002-0128220A1 및 미국 특허 제6,383,808호에 개시되어 있고, 상기 문헌은 참조로서 본 명세서에 삽입된다. 특정의 안티센스 서열은 본 명세서의 서열번호 2 내지 19에 기재되어 있다.

[0011] 이용되는 ODNs는 인 비보 안정성이 개선되도록 변형될 수 있다. 예를 들어, ODNs는 포스포로티오에이트 유도체 (비-연결 포스포릴 산소 원자를 황 원자로 치환한 것)일 수 있으며, 이는 뉴클레아제 절단에 대한 내성을 증가시킨다. MOE(2'-O-(2-메톡시에틸)) 변형(ISIS 골격) 또한 유효하다. 이러한 변형된 ODN의 구조는 미국 특허출원 10/080,794에 개시되어 있고, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 특히 바람직한 조성은 인간 클러스테린 서열(GenBank 접근번호: NM_001831)의 번역 개시 코돈과 그 옆의 6개 코돈을 타깃팅하는 21 mer 올리고뉴클레오티드(cagcagcagagtcttcatcat; 서열번호 4)로서 2'-MOE 변형된 것이다. 이 올리고뉴클레오티드는 전체적으로 포스포로티오에이트 골격을 가진다. 뉴클레오티드 1-4 및 18-21('윙스'(wings))의 당 부위(moiety)는 2'-O-메톡시에틸 변형을 가지고 나머지 뉴클레오티드(뉴클레오티드 517; '데옥시 캡')는 2'-데옥시뉴클레오티드이다. 윙스(즉, 뉴클레오티드, 1, 4 및 19)의 시토신은 5-메틸시토신이다.

[0012] 안티센스 ODNs의 투여는 당업계에 공지된 다양한 기전을 이용하여 실시할 수 있으며, 이는 내이키드 투여 및 약제학적으로 허용되는 지질 담체를 이용한 투여를 포함한다. 예를 들어, 안티센스 운반용 지질 담체는 미국 특허 제5,855,911호 및 제5,417,978호에 개시되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 일반적으로, 안티센스는 정맥내, 복강내, 피하 또는 구강으로 투여하거나, 또는 직접적으로 종양에 국소 주입할 수 있다.

[0013] 안티센스 ODN의 투여량은 흑색종 세포에서 클러스테린의 발현을 억제하는 데 유효한 양이다. 이 투여량은, 이용되는 안티센스 ODN의 효능, 이용되는 담체의 특성에 따라 다양하게 된다. 어떤 특정 조성물의 적합한 투여량의 결정은 적합한 치료 수준을 평가하도록 디자인된 일련의 표준 시험을 통하여 이루어지며, 당업자의 통상적 기술 범위에 있다.

[0014] RNAi 치료학

[0015] 또한, 클러스테린 유효량의 감소는 RNAi 치료를 이용하여 달성될 수 있다. RNA 방해 또는 'RNAi'는 Fire와 공동연구자들에 의해 처음 명명된 조어로서 이중쇄 RNA(dsRNA)가 해충에 주입되었을 때 유전자 발현이 억제되는 현상을 기술하기 위하여 명명된 것이다(Fire et al.(1998) Nature 391, 806-811, 본 명세서에 참조로서 삽입된다). dsRNA는 척추동물들을 포함하는 많은 유기체에서 유전자-특이, 후-전사 사일런싱을 초래하며, 유전자 기능을 연구하는 새로운 도구를 제공하고 있다. RNAi는 mRNA 파괴에 관여하지만, 이러한 방해 작용을 설명하는 생화학적 기전은 대부분 미지이다. RNAi의 용도는 Carthew et al.(2001) Current Opinions in Cell Biology 13, 244-248 및 Elbashir et al.(2001) Nature 411, 494-498에 개시되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0016] 본 발명에 있어서, 분리된 RNA 분자는 RNAi를 중재한다. 즉, 본 발명의 분리된 RNA 분자는 유전자, 즉 타깃 유전자의 전사 생성물인 mRNA의 파괴를 중재하거나 또는 발현을 억제한다. 또한, 이러한 mRNA는 파괴되는 mRNA로 본 명세서에서 언급될 수 있다. 용어, RNA, RNA 분자(들), RNA 절편(들) 및 RNA 단편(들)은 RNA 방해를 중재하는 RNA를 언급하는 데 상호 교환적으로 이용될 수 있다. 이들 용어들은 이중쇄 RNA, 단일쇄 RNA, 분리된 RNA (부분 정제된 RNA, 필수적으로 정제된 RNA, 합성 RNA, 재조합 생성된 RNA)뿐만 아니라, 자연의 RNA에 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실, 치환 및/또는 변형이 발생된 변형된 RNA를 포함한다. 이러한 변형들은 RNA의 말단(들) 또는 내부(RNA의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드에서)에서 비-뉴클레오티드 물질이 삽입된 것을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 RNA 분자에서 뉴클레오티드는 비-표준 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 이는 비-자연적 뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드를 포함한다. 요약하건대, 이러한 모든 변형된 RNAi 분자들은 자연 RNA의 유사체 또는 유사체들로 언급된다. 본 발명의 RNA는 RNAi를 중재할 수 있을 정도로 자연의 RNA와 충분히 유사하면 된다. 본 명세서에서 'RNAi 중재'는 RNAi 장치 또는 과정에 의해 영향을 받는 mRNA가 구별되도록 하는 능력을 의미한다. RNAi를 중재하는 RNA는 RNAi 장치와 상호작용하여 상기 장치가 특정 mRNAs를 파괴하도록 하거나 또는 타깃 단백질의 발현을 감소시킨다. 일 구현예에서, 본 발명은 자신의 서열에 상당한(corresponding) 특정 mRNA의 절단을 유발하는 RNA 분자에 관한 것이다. 서열의 완전한 상당성을 요구하지는 않으나, 그 상당성은 상기 RNA가 타깃 mRNA를 절단하거나 또는 발현을 억제하여 RNAi 억제를 달성할 수 있을 정도이어야 한다.

[0017] 상술한 바와 같이, 본 발명의 RNA 분자는 RNA 부위 및 다른 추가적 부위, 예컨대, 데옥시리보뉴클레오티드 부위를 포함한다. RNA 분자에서 총 뉴클레오티드의 수는 적합하게는 49 이하이며, 이는 RNAi의 효과적인 중재를 하

기 위해서이다. 바람직한 RNA 분자에서, 뉴클레오티드의 수는 16 내지 29이며, 보다 바람직하게는 18 내지 23 이고, 가장 바람직하게는 21-23이다. 적합한 서열은 본 명세서의 서열번호 20 내지 43에 기재되어 있다.

[0018] 본 발명의 siRNA 분자는 타겟 단백질의 발현을 억제함으로써 치료학적 이점이 달성되는 암 또는 다른 질환들을 가지는 인간을 포함하는 환자의 치료에 이용된다. 본 발명의 siRNA 분자는 하루 한번 또는 그 이상의 주입(정맥내, 피하 또는 초내)으로 환자에게 투여될 수 있고 또는 타겟 mRNA 및 단백질의 조절에 적합한 혈장 및 조직 농도에 도달하도록 한번 또는 그 이상의 치료 사이클을 하기 위한 연속적인 정맥내 또는 초내 투여를 통해 투여될 수 있다.

[0019] 추가적 치료제

[0020] 본 발명에 따른 흑색종 치료방법은 활성 클러스테린의 양을 감소시키는 데 유효한 치료제와 함께, 흑색종 치료에 유용한 화학요법제 또는 제제 및/또는 다른 타겟에 작용하는 추가적인 안티센스 ODNs의 추가적인 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 클러스테린 ODNs는 타산(파클리탁셀 또는 도세탁셀), 미토잔트론 및 겐시타빈과 같은 종래의 화학요법제에 대한 민감성을 증가시킨다. 상승적 작용을 나타낼 수 있는 다른 제제는 세포독성제(예컨대, 사이클로포스파미드, 테카르바진, 토포이소머라아제 억제제), 혈관신생 억제제, 분화제 및 신호전달 억제제를 포함한다. 유사하게, 개선된 효능을 얻기 위하여, 클러스테린 안티센스 이외에 안티센스 Bcl-2, Bcl-x1 및 c-myc ODN과 같은 다른 안티센스들의 조합이 이용될 수 있다.

[0021] Bcl-xL 발현 조절 방법

[0022] 클러스테린 단백질에 대하여 차폐론-유사 기능이 이미 제안되었으나, 아포토시스에 대한 클러스테린의 역할에 대한 특정 기전은 아직 알려져 있지 않다. 매우 낮은 양의 클러스테린을 발현하는 인간 흑색종 세포주에서, 안정된 형질전환에 의한 클러스테린의 과발현은 세포독성 치료에 대한 내성을 크게 증가시킬 뿐만 아니라(도 3), 항-아포토시스 bcl2 패밀리의 멤버 bcl-xL의 상향-조절을 야기한다(웨스턴 블롯팅으로 확인). 반대로, 클러스테린-발현 흑색종 세포의 치료는 bcl-xL의 상당한 하향-조절을 초래하며, 이는 클러스테린의 항-아포토시스 효능에 대한 기전을 제시한다. 형질전환에 의한 클러스테린 과발현 또는 클러스테린 안티센스 치료 중 어떤 것도 인간 흑색종 세포에서 Bcl-2 패밀리의 다른 멤버들의 발현을 변화시키지 않는다. 따라서, 클러스테린은 항-아포토시스 bcl-2 패밀리의 멤버 bcl-xL를 조절한다. bcl-xL은 아포토시스의 억제자로 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에, 상기의 억제는 상당히 유효하다(참조문헌으로서 미국 특허 제6,172,216호가 있고, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다).

실시예

[0026] 본 발명은 하기의 비-제한적 실시예에 의해 보다 상세하게 설명된다.

[0027] 실시예 1

[0028] 정상적인 인간 멜라닌세포의 두 개의 다른 배치(NHEM 6083 및 2489) 그리고 4종의 인간 흑색종 세포주(518A2, SKMEL-28, Me1-Juso 및 607B)에서 클러스테린의 발현. 세포를 6 cm 디쉬에서 성장시키고 이들이 80-90 컨플루언시에 도달할 때 수집하였다. 레인 당 30:g 단백질을 10% SDS-PAGE 젤에 적용시킨 다음, 폴리클로날 염소 항-클러스테린 항체로 프로빙 하였다. Panceau 레드 염색제 및 β-액틴 항체를 로딩 대조군으로 이용하였다. 각각의 경우에 있어서, 클러스테린의 안티센스 억제제는 미국 특허출원 10/080,794에 개시된 안티센스 화학 2'MOE에 기초한 것으로서, 서열번호 4의 서열을 가진다.

[0029] 도 1은 100, 250 또는 500 nM의 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 100 nM의 스크램블 미스매치(scrambled mismatch) 대조군으로 607B 흑색종 세포를 처리한 경우에 2일 간격으로 나타낸 결과이다. 올리고뉴클레오티드가 없는 Lipofectin™(lip)을 대조군으로 이용하였다. 96 웰 플레이트에 있는 세포수는 MTS(Cell Titer 96™, Pierce)를 이용하여 광학적으로 측정하였다. 도면에서 볼 수 있듯이, 250 또는 500 nM로 처리한 웰에서의 세포수가 크게 감소하였다.

[0030] 도 2는 시스플라틴 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 스크램블 미스매치 대조군으로 처리한 후의 518A2 세포에서 클러스테린 발현을 보여주는 그래프이다. Lip는 올리고뉴클레오티드가 없는 Lipofectin 대조군이다. 검출은 클러스테린에 대한 항체를 이용하여 실시하였다.

[0031] 인간 흑색종 세포에서 클러스테린은 인간 멜라닌세포에서 보다 훨씬 높은 양으로 발현되었다. 안티센스 억제제(서열번호 4의 MOE 변형)는 클러스테린의 양-의존성 하향 조절을 유발하였고, 이는 mRNA 수준에서 RT-PCR로 단백질 수준에서 웨스턴 블롯팅으로 확인하였으며, 스크램블 미스매치 대조군과 비교하였다. 이러한 하향조절은 안티센스 처치 단독으로 아포토시스 세포 사멸을 증가시키는 결과를 초래하였다. 하나의 흑색종 세포주에서, 이러한 안티센스 처치 단독은 완전한 세포 사멸을 유발하는 데 충분하였다(도 1). 다른 흑색종 세포주에서, 생존 세포들은 세포독성 의약 시스플라틴에 의한 연속 처치에 대하여 증가된 민감성을 나타내었고, 이는 대조군-미스매치 올리고뉴클레오티드로 처치된 세포와 비교되었다(도 2).

[0032] **실시예 2**

[0033] 엠티 대조군 벡터(N대) 또는 클러스테린 과발현 벡터로 안정되게 형질전환된 Mel Juso 흑색종 세포를 10 ΦM 시스플라틴을 함유하는 배지에서 배양하였다. 세포 생존율을 Promega에서 구입한 Cell-titer 96 키트를 이용하여 측정하였다. 결과는 도 3에 나타나 있다. 도면에서 볼 수 있듯이, 클러스테린의 과발현은 세포 생존율을 극적으로 증가시켰고, 화학요법제의 효능을 감소시켰다.

도면의 간단한 설명

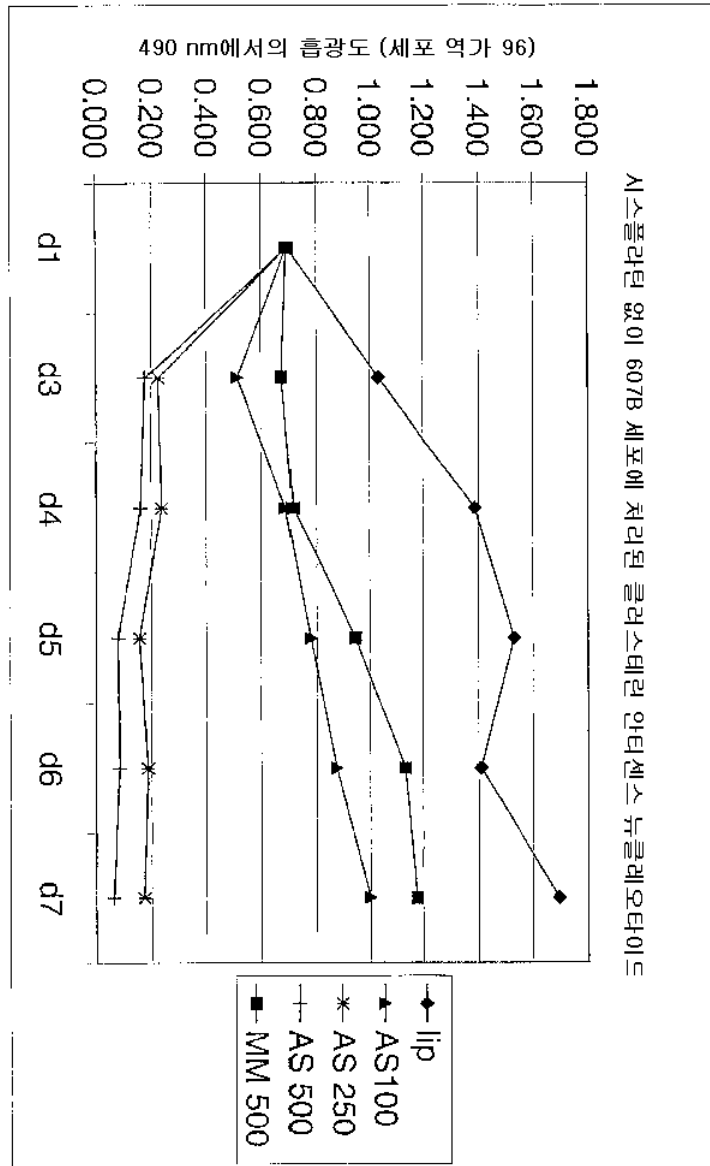
[0023] 도 1은 100, 250 또는 500 nM의 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 100 nM의 스크램블 미스매치(scrambled mismatch) 대조군으로 607B 흑색종 세포를 처리한 경우에 2일 간격으로 나타낸 결과이다.

[0024] 도 2는 시스플라틴 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 스크램블 미스매치 대조군으로 처리한 후의 518A2 세포에서 클러스테린 발현을 보여주는 그래프이다.

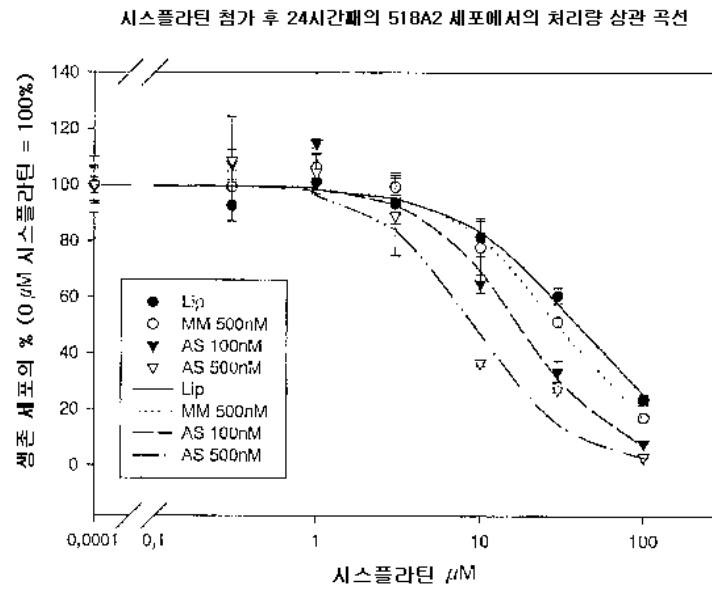
[0025] 도 3은 엠티 대조군 벡터(Neo) 또는 클러스테린 과발현 벡터로 안정되게 형질전환된 Mel Juso 흑색종 세포로서 10 μM 시스플라틴을 함유하는 배지에서 성장시킨 세포의 생존율을 보여준다.

도면

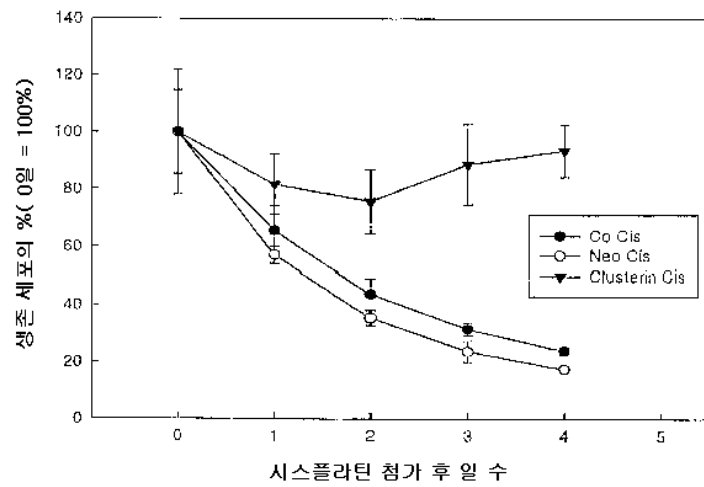
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> The University of British Columbia
GLEAVE, Martin, E.
- <120> Treatment of Melanoma by Reduction in Clusterin Levels

- <150> US60/405,193
- <151> 2002-08-21

- <150> US60/408,152

<151> 2002-09-03

<150> US60/319,748

<151> 2002-12-02

<150> US60/472,387

<151> 2003-05-20

<160> 43

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1676

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattccgcc gctgaccgag gcgtgcaaag actccagaat tggaggcatg atgaagactc 60

tgtgtctgtt tgtggggctg ctgctgacct gggagagtgg gcaggtcctg ggggaccaga 120

cggtctcaga caatgagctc caggaaatgt ccaatcaggg aagtaagtac gtcaataagg 180

aaattcaaaa tgtgttcaac ggggtgaaac agataaagac tctcatagaa aaaacaaacg 240

aagagcgcaa gacactgctc agcaacctag aagaagccaa gaagaagaaa gaggatgccc 300

taaatgagac cagggaatca gagacaaagc tgaaggagct cccaggagtg tgcaatgaga 360

ccatgatggc cctctgggaa gagtgtaac cctgcctgaa acagacctgc atgaagtctt 420

acgcacgctg ctgcagaagt ggctcaggcc tggttggccg ccagcttgag gatttctga 480

accagagctc gcccttctac ttctggatga atggtgaccg catcgactcc ctgctggaga 540

acgaccgca gcagacgcac atgctggatg tcatgcagga ccacttcagc cgcgcgtcca 600

gcatcataga cgagctcttc caggacaggt tcttcaccgc ggagccccag gatacctacc 660

actacctgcc cttcagcctg ccccaccgga ggcctcactt cttctttccc aagteccgca 720

tctgctcgag ctigatgccc ttctctcctg acgagccct gaacttccac gccatgttcc 780

agcccttctt tgagatgata caccaggctc agcaggccat ggacatccac ttccacagcc 840

cggccttcca gcacccgcca acagaattca tacgagaagg cgacgatgac cggactgtgt 900

gccgggagat ccgccacaac tccacgggct gctgctggat gaaggaccag tgtgacaagt 960

gccgggagat ctigtctgtg gactgttcca ccaacaacc ctcccaggct aagctgcggc 1020

gggagctcga cgaatccctc caggctcctg agaggttgac caggaaatac aacgagctgc 1080

taaagtcta ccagtggaag atgctcaaca cctcctcctt gctggagcag ctgaacgagc 1140

agtttaactg ggtgtcccgg ctggcaaacc tcacgcaagg cgaagaccag tactatctgc 1200

gggtcaccac ggtggcttcc cacacttctg actcggacgt tccttccggt gtcactgagg 1260

tggtcgtgaa gctctttgac tctgatccca tcaactgtgac ggtccttcta gaagtctcca 1320

ggaagaacce taaatttatg gagaccgtgg cggagaaagc gctgcaggaa taccgcaaaa 1380

agcaccggga ggagtgagat gtggatgttg cttttgcacc ttacgggggc atcttgagtc 1440

cagctcccc caagatgagc tgcagcccc cagagagagc tctgcacgtc accaagtaac 1500

caggccccag cctccaggcc cccaactccg cccagcctct ccccgtctg gatcctgcac 1560

tctaacactc gactctgctg ctcatgggaa gaacagaatt gctcctgcat gcaactaatt 1620

caataaaact gtcttgtgag ctgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaattc 1676

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 2

| | |
|--------------------------|----|
| gcacagcagg agaattctca t | 21 |
| <210> 3 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 3 | |
| tggagtcttt gcacgcctcg g | 21 |
| <210> 4 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 4 | |
| cagcagcaga gtcttcatca t | 21 |
| <210> 5 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 5 | |
| attgtctgag accgtctggt c | 21 |
| <210> 6 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 6 | |
| cccttcagctt tgtctctgat t | 21 |
| <210> 7 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 7 | |

agcagggagt cgatgcggtc a 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 atcaagctgc ggacgatgcg g 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gcaggcagcc cgtggagtgt t 21

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 ttcagctgct ccagcaagga g 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 aatttaggt tcttctgga g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12

| | |
|--|---------------------|
| <p>gctgggcgga gttggggcc t</p> <p><210> 13 <211> 17 <212> DNA <213> Homo sapiens</p> <p><400> 13 ggtgtagacg ccgcacg</p> | <p>21</p> <p>17</p> |
| <p><210> 14 <211> 16 <212> DNA <213> Homo sapiens</p> <p><400> 14 gcagcgacg ccctgg</p> | <p>16</p> |
| <p><210> 15 <211> 22 <212> DNA <213> Homo sapiens</p> <p><400> 15 gcagcagccg cagcccggct cc</p> | <p>22</p> |
| <p><210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> Homo sapiens</p> <p><400> 16 agccgcagcc cggtcct</p> | <p>18</p> |
| <p><210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Homo sapiens</p> <p><400> 17</p> | |

cagcagccgc agccccgctc 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 gcagcagccg cagccccgct 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 agcagccgca gcccgctcc 20

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 20
 ccagagcncg cccnncnact t 21

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

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 21
 gnagaagggc gagcncnggt t 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 22
 gangcncaac accnccnct t

21

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)
 <223> n denotes uridine

<400> 23
 ggaggaggng nngagcanct t 21

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 24
 naanncaaca aaacngntt 19

<210> 25

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

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n denotes uridine

<400> 25
 gacagmnna nngaannagt t

21

<210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)

<223> n denotes uridine

<400> 26

naanncaaca aaacngntt

19

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(8)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> n denotes uridine

<400> 27

acagnnnngn nngaannatt

20

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 28
 angangaaga cncngcngct t

21

<210> 29
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)
 <223> n denotes uridine

<400> 29
 gcagcagagn cncancant t

21

<210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)

<223> n denotes uridine

<400> 30

ngaangaagg gacnaaccng tt

22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n denotes uridine

<400> 31
 caggnnagnc ccncannca tt 22

<210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)
 <223> n denotes uridine

<400> 32
 cagaaanaga caaagngggg tt 22

<210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(17)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)
 <223> n denotes uridine

<400> 33
 cccacnng ncnanncng tt

22

<210> 34
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)

<223> n denotes uridine

<400> 34

acagagacna agggaccaga tt

22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n denotes uridine

<400> 35

acagagacna agggaccaga tt

22

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 36
 ccagagcncg cccnncnact t 21

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)
 <223> n denotes uridine

<400> 37
 gnagaagggc gagcncnggt t 21

<210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)

<223> n denotes uridine

<400> 38

gnccccgcanc gncgcagct t

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi for human clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)

<223> n denotes uridine

<400> 39

gcngcggacg angcgggact t

21

<210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)
 <223> n denotes uridine

<400> 40
 cnaanncaan aaaacngnct t

21

<210> 41
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n denotes uridine

<400> 41
 gacagmnna nngaannagt t

21

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RNAi for human clusterin

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)
 <223> n denotes uridine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)

<223> n denotes uridine

<400> 42

angangaaga cncngcngc

19

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNAi fo rhuman clusterin

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> n denotes uridine

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)
<223> n denotes uridine

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)
<223> n denotes uridine

<400> 43
gcagcagagn cncancan

19