



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0042490
(43) 공개일자 2017년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0129968
(22) 출원일자 2016년10월07일
심사청구일자 2016년10월07일
(30) 우선권주장
1020150141667 2015년10월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국원자력의학원
서울특별시 노원구 노원로 75 (공릉동)
(72) 발명자
이기호
서울특별시 도봉구 시루봉로 71 (방학동, 청구아파트) 603동 403호
김성섭
대전광역시 유성구 엑스포로 448 307동 1404호 (전민동, 엑스포아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

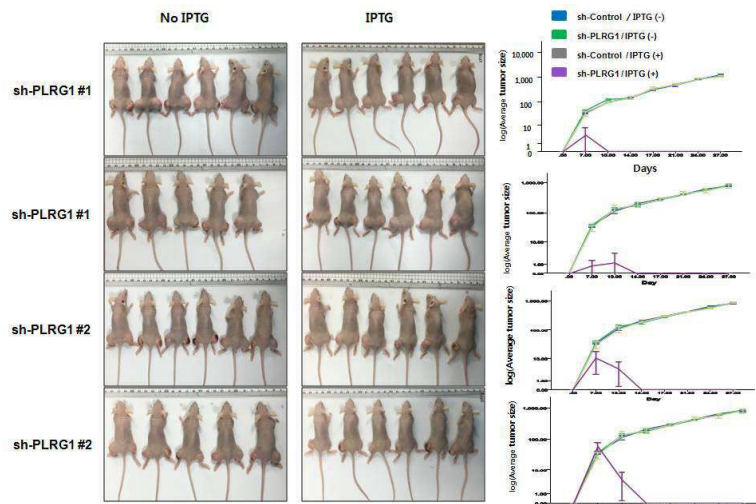
(54) 발명의 명칭 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법, PLRG1의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 암 진단용 조성물, 및 PLRG1의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 및 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

PLRG1 (pleiotropic regulator 1)은 암 세포에서 과발현되고, 이의 발현을 억제하는 경우 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있다. 이에, 본 발명의 PLRG1 억제제는 부작용 없이 항암제로 우수한 효과가 있으며, 또한 PLRG1 발현 수준을 측정함으로써 암 진단 및 항암제 스크리닝 등에 활용할 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

(72) 발명자

김연수

서울특별시 용산구 이촌로 347 신동아 아파트 16동 301호

박은란

서울특별시 노원구 공릉로46길 23 (공릉동, 공릉동 한보아파트 상가) 103동 408호

신현진

서울특별시 강동구 천호대로199길 10 (길동, 지에스강동자이아파트) 108동 101호

이은주

서울특별시 송파구 백제고분로18길 7 (잠실동, 현대아파트) 103동 701호

함용호

서울특별시 노원구 수락산로6길 12 (상계동)

김상범

서울특별시 용산구 이촌로87길 14 (이촌동, 강촌아파트)107동 1202호

박선후

서울특별시 광진구 아차산로 537-17 (광장동)광장힐스테이트 1401동 1202호

한철주

서울특별시 중구 퇴계로 235 (충무로4가, 남산센트럴 자이) B동 2503호

홍성희

서울특별시 도봉구 도봉로180가길 32 (도봉동, 중흥에스-클래스)101동 1402호

김양현

서울특별시 노원구 섭발로 156 (공릉동, 공릉아파트) 204동 708호

김정민

서울특별시 은평구 갈현로 170-2 (구산동, 구궁빌라) 502호

김미연

인천광역시 부평구 부영로 165 (산곡동, 우성아파트) 113동 705호

강문경

대전광역시 유성구 가정로 65 대림 두레아파트 106동 604호

송은영

충청북도 청주시 상당구 용정로 35 한라 비발디 205동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711029867

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 오믹스 기반 간암 비만 조절인자 발굴 및 비만으로 인한 간암진행 연구

기 여 율 1/2

주관기관 한국원자력의학원

연구기간 2015.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711029200

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 암특이적 세포사멸 유도 예후인자를 타겟으로 한 항암 검증물질 개발 및 신약타겟검증

기 여 율 1/2

주관기관 한국원자력의학원

연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PLRG1 억제제는 PLRG1 mRNA의 발현을 억제하는 올리고 뉴클레오티드, 또는 PLRG1 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 PLRG1 mRNA의 발현을 억제하는 올리고 뉴클레오티드는 PLRG1 mRNA에 특이적인 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 앵타머 (aptamer), shRNA 또는 siRNA인 것인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 11 내지 서열번호 20 중 어느 하나의 올리고 뉴클레오티드 및 이의 상보적인 서열을 가지는 올리고 뉴클레오티드의 이중 가닥으로 이루어진 것인 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 21 또는 22의 올리고 뉴클레오티드 서열을 가지는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암의 예방 또는 치료는 암 세포 특이적 세포 사멸 (apoptosis)에 의하여 달성되는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암은 뇌척수종양, 뇌종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중프종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 대장암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암인 것인, 조성물.

청구항 8

PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법.

청구항 9

PLRG1 (pleiotropic regulator 1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 10

- (a) 분리된 생물학적 시료로부터 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 PLRG1 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 생물학적 시료의 PLRG1 발현 수준이 정상 대조군의 PLRG1 발현 수준보다 높을 경우 암으로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

- (a) 대조군인 암이 발병된 실험동물의 시료로부터 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 상기 실험동물에서 암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 투여하는 단계;
- (c) 실험군인 상기 후보물질이 투여된 실험동물의 시료로부터 PLRG1 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (d) 대조군에서 측정된 PLRG1 발현 수준을 실험군에서 측정된 것과 비교하여, 대조군에서 측정된 것 보다도 실험군에서 측정된 것이 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보물질을 암의 발병을 방지하는 예방용 제제 또는 암을 치료하는 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법.

청구항 12

- (a) PLRG1 (pleiotropic regulator 1)을 발현하는 분리된 암 세포에 암 치료 후보 물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 후보 물질이 처리된 분리된 암 세포에서 PLRG1 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 PLRG1 발현 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 암 세포에 비해 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보 물질을 암의 발병을 방지하는 예방용 제제 또는 암을 치료하는 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법.

청구항 13

PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 유전자 서열을 기반으로 PLRG1의 전사 혹은 번역을 억제하거나, PLRG1 단백질의 활성을 억제하는 항암 후보물질을 설계하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제 후보물질의 탐색 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법, PLRG1의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물, 및 PLRG1의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 및 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

암은 정상 세포에 비하여 세포 성장이 조절되지 않고, 근접한 조직으로 침입이 가능하며, 때로는 전이가 되는

특성을 가지고 있다. 암은 기본적으로 조직의 성장 조절에 관련되어 있는 질병으로, 정상 세포가 암 세포로 형질전환이 되면 세포 성장과 분열을 조절하는 유전자의 발현이 변화한다 (Croce., The New England Journal of Medicine, 358(5): 502-511, 2008).

[0005] 항암 치료는 물리적으로 종양 조직을 제거하거나, 또는 방사선 조사나 항암제 투여를 통해 암 유전자 (oncogene)를 비롯하여 항-세포 사멸 분자 (anti-apoptotic molecule), 텔로머라제 (telomerase), 성장인자 수용체 유전자 (growth factor receptor gene), 신호전달 분자 (signaling molecule) 등과 같이 암 세포의 생존에 필요한 유전자의 발현을 저해시키거나 세포 사멸을 유도하는 방식으로 수행된다 (Knudson AG, Nature reviews. Cancer 1(2): 157-162, 2001). 그러나 이와 같은 치료 과정에서 암 세포뿐만 아니라 정상 세포도 영향을 받을 수 있어 부작용이 나타나는 문제점이 있다.

[0007] 본 발명자들은 부작용 없이 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있는 제제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, PLRG1 (pleiotropic regulator 1)이 정상 세포보다 암 세포에서 과발현되며 이를 억제할 경우 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 PLRG1 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 생물학적 시료의 PLRG1 발현 수준이 정상 대조군의 PLRG1 발현 수준보다 높을 경우 암으로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 대조군인 암이 발병된 실험동물의 시료로부터 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 실험동물에서 암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 투여하는 단계; (c) 실험군인 상기 후보물질이 투여된 실험동물의 시료로부터 PLRG1 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 대조군에서 측정된 PLRG1 발현 수준을 실험군에서 측정된 것과 비교하여, 대조군에서 측정된 것보다도 실험군에서 측정된 것이 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보물질을 암의 발병을 방지하는 예방용 제제 또는 암을 치료하는 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) PLRG1 (pleiotropic regulator 1)을 발현하는 분리된 암 세포에 암 치료 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질이 처리된 분리된 암 세포에서 PLRG1 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 PLRG1 발현 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 암 세포에 비해 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보 물질을 암의 발병을 방지하는 예방용 제제 또는 암을 치료하는 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 PLRG1 유전자 서열을 기반으로 PLRG1의 전사 혹은 번역을 억제하거나, PLRG1 단백질의 활성을 억제하는 항암 후보물질을 설계하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제 후보물질의 탐색 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 용어 "PLRG1 (pleiotropic regulator 1)"은 CDC5L (cell division cycle 5-like) 복합체의 일 구성 단백질로, 상기 CDC5L 복합체는 스플라이스좀 (spliceosome)의 일부로 pre-mRNA 스플라이싱에 역할을 한다. PLRG1은 얼터너티브 스플라이싱 (alternative splicing) 위치를 결정하는데 핵심적인 역할을 하며, 발생 단계와 관련하여 일부 보고가 있으나, PLRG1과 암과의 상관관계는 보고된 바 없다.
- [0020] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 종양 조직 및 암 세포주에서 PLRG1의 발현이 정상 조직 및 정상 세포주에 비해 높게 발현되는 것을 최초로 확인함으로써 (도 1), PLRG1이 암 치료 타겟으로 적합함을 확인하였다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "PLRG1 억제제"는 PLRG1의 발현 또는 활성을 감소시키는 체제를 모두 통칭하는 의미로 사용되며, 구체적으로는 PLRG1에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식으로, PLRG1의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나 그 활성을 방해함으로써, PLRG1의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 모든 체제를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 PLRG1의 억제제는 PLRG1을 표적으로 하여 PLRG1의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한 없이 사용 가능하다. 상기 PLRG1 억제제는 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로 PLRG1 mRNA의 발현을 억제하는 올리고 뉴클레오타이드, 또는 PLRG1 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있고, 보다 구체적으로 상기 PLRG1 mRNA의 발현을 억제하는 올리고 뉴클레오타이드는 PLRG1 mRNA에 특이적인 안티센스 올리고 뉴클레오타이드, 앵타머 (aptamer), shRNA 또는 siRNA가 될 수 있으며, 보다 더 구체적으로 상기 siRNA는 서열번호 11 내지 서열번호 20 중 어느 하나의 올리고 뉴클레오타이드 및 이의 상보적인 서열을 가지는 올리고 뉴클레오타이드의 이중 가닥인 것일 수 있고, 상기 shRNA는 서열번호 21 또는 22의 올리고 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고 뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 서열은 상기 PLRG1 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 PLRG1 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위 (translocation), 성숙 (maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고 뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오타이드를 합성하는 한 가지 예는 RNA 중합효소 I을 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위 (MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드의 디자인은 PLRG1의 염기서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "앵타머 (aptamer)"는 단일가닥 올리고 뉴클레오타이드로서, 20 내지 60 뉴클레오타이드 정도의 크기이며, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 서열에 따라 다양한 3 차원 구조를 가지며, 항원-항체 반응처럼 특정 물질과 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된 (modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 바람직하게 상기 앵타머는 PLRG1에 결합하여 PLRG1의 활성을 저해하는 역할을 할 수 있다. 이와 같은 앵타머는 PLRG1의 서열로부터 당업자가 공지의 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knockdown) 방법 또는 유전자

치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀(hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스어(dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 PLRG1에 특이적으로 작용하여 PLRG1 mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 PLRG1을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성 방법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 특히, 본 발명의 PLRG1에 대한 siRNA는 서열번호 11 내지 서열번호 20 중 어느 하나의 올리고 뉴클레오티드 및 이의 상보적인 서열을 가지는 올리고 뉴클레오티드의 이중 가닥으로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 shRNA는 서열번호 21 또는 서열번호 22의 올리고 뉴클레오티드 서열을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명에서 용어, "항체"는 생체의 면역계에서 혈액이나 림프를 순환하면서 외부 물질인 항원이 침입한 경우 이에 반응하는 물질을 말하며, 림프조직에서 형성되는 글로불린계 단백질로 면역글로불린이라고도 불린다. 항체는 B세포가 생산해서 체액으로 흘러보내는 단백질로 항원과 특이적으로 결합하며, 하나의 항체 분자에는 두 개의 중사슬(heavy chain)과 두 개의 경사슬(light chain)이 있으며, 각각의 중사슬과 경사슬은 그의 N-터미널 말단에 가변영역을 갖고 있다. 각각의 가변영역은 3 개의 상보성 결정부위(Complementarity determining region: CDR)와 4 개의 구조 형성부위(framework regions: FRs)로 구성되는데, 상보성 결정 부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩티드 서열로 존재한다. 본 발명의 목적상 상기 항체는 PLRG1과 결합하여 PLRG1의 활성을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "암"은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 세포 사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 일컫는다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고, 체내의 정상적인 구조를 파괴하거나 변형시키게 되는데, 이러한 상태를 암이라고 한다. 일반적으로 종양(tumor)이라 하면 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자란 덩어리를 의미하며, 양성 종양(benign tumor)과 악성 종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 악성 종양은 양성 종양에 비해 성장속도가 매우 빠르고, 주변 조직에 침윤하면서 전이(metastasis)가 일어나 생명을 위협하게 된다. 이러한 악성 종양을 통상적으로 '암(cancer)'이라 하며, 암의 종류로는 뇌척수종양, 뇌종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중프종, 식도암, 췌암, 대장암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 대장암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암을 포함하나, 상기 예들에 의해 본 발명의 암의 종류가 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 암은 PLRG1이 정상 조직보다 과발현된 암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 상기 암의 예방 또는 치료는 암 세포 특이적 세포 사멸(apoptosis)에 의하여 달성되는 것일 수 있다. 상기 세포 사멸은 세포가 죽는 일 형태로서 물리적으로 세포가 파괴되는 세포 괴사(necrosis)와는 구별되는데, 예정세포사(programmed cell death)로도 일컬어지며 DNA가 손상되거나 불필요하게 된 세포가 스스로 사멸하는 과정을 말한다.

[0033] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 PLRG1에 대한 siRNA를 세포에 처리하여 PLRG1의 발현을 감소시킨 경우, 암 세포주에서는 단일 클론 성장이 감소하고 세포 증식이 억제되었으나, 정상 세포주에서는 세포 증식에 영향이 없는 것을 확인하였다(도 3). 또한, PLRG1에 대한 siRNA를 처리한 세포에 대하여 Annexin V 단독 또는 Annexin V 및 PI로 염색하여 상기 결과는 PLRG1의 감소에 따라 암 세포 특이적으로 세포 사멸이 일어나기 때문임을 확인하였다(도 4 및 5). 나아가, 이러한 PLRG1 감소로 인한 암 세포 특이적 효과는 정상 세포인 중간엽 줄기세포 및 텔로머라제 활성이 도입된 세포에서도 나타나지 않는 것을 확인함으로써(도 6 및 7), PLRG1 억제는 상당히

엄격하게 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다. 나아가 IPTG-inducible-sh-PLRG1 시스템을 이용하여 상기 결과는 생체 내에서도 동일하게 나타나는 것임을 마우스 동물 모델에서 확인하였다 (도 11). 이는, PLRG1 억제제가 항암제로 사용될 경우 정상 세포에는 영향을 미치지 않고 부작용 없이 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있음을 시사하는 것이다.

- [0035] 본 발명에서 용어, "치료"는 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 바람직하게 본 발명에서는 PLRG1을 억제하는 물질을 포함하는 조성물의 투여로 암의 경과를 호전시키는 모든 행위를 포함한다. 또한, "예방"은 본 발명에 따른 PLRG1을 억제하는 물질을 포함하는 조성물의 투여로 상기 암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0039] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에서 용어, "개체"는 본 발명의 암 질환을 보유하거나 또는 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여함으로써, 간암을 비롯한 암을 완화 또는 치료할 수 있다. 상기 완화는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0041] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0042] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0043] 상기 약학 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0044] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별,

약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0046] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0047] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 PLRG1 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 생물학적 시료의 PLRG1 발현 수준이 정상 대조군의 PLRG1 발현 수준보다 높을 경우 암으로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다. 본 발명을 통해 암 마커 PLRG1을 검출함으로써 암 진단에 필요한 정보를 제공하여 암을 진단할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 용어, "진단"은 생물학적 시료 또는 조직 샘플에서 본 발명의 PLRG1의 존재 또는 부재를 측정함으로써, 암 질환의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 또한, "마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 암 세포 또는 암 질환을 가진 개체를 정상세포 또는 정상 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 암을 가진 세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 암 진단 마커는 정상 세포 또는 조직의 세포에 비하여, 암 세포에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 PLRG1이다.

[0049] 본 발명에서 PLRG1 발현 수준을 측정하는 것은 PLRG1의 mRNA 발현 수준을 측정하거나 PLRG1 단백질 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[0050] 상기 "mRNA 발현 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 암 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 "단백질 발현 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 암 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (complement fixation assay), FACS, 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 일 예로, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 본 발명의 PLRG1의 mRNA에 대한 프라이머 (primer) 쌍, 프로브 (probe), 또는 안티센스 뉴클레오티드 (anti-sense nucleotide)일 수 있으며, 본 발명의 PLRG1의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 당업자가 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 뉴클레오티드 서열을 용이하게 디자인할 수 있다. 다른 일 예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 항체일 수 있다.

[0053] 본 발명에서는 PLRG1의 암 진단 마커로서의 가능성을 확인함으로써, PLRG1의 수준을 측정하여 간암을 비롯한 암을 진단할 수 있는 효과를 확인하였다.

[0055] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 대조군인 암이 발병된 실험동물의 시료로부터 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 실험동물에서 암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 투여하는 단계; (c) 실험군인 상기 후보물질이 투여된 실험동물의 시료로부터 PLRG1 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 대조군에서 측정된 PLRG1 발현 수준을 실험군에서 측정된 것과 비교하여, 대조군에서 측정된 것보다도 실험군에서 측정된 것이 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보물질을 암의 발병을 방지하는 예방용 제제 또는 암을 치료하는 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치

료용 제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0056] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) PLRG1 (pleiotropic regulator 1)을 발현하는 분리된 암 세포에 암 치료 후보 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질이 처리된 분리된 암 세포에서 PLRG1 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 PLRG1 발현 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 암 세포에 비해 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보 물질을 암의 발병을 방지하는 예방용 제제 또는 암을 치료하는 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0057] 암을 예방 또는 치료할 수 있는 후보 물질의 부재 하에 세포에서의 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하고, 또한, 상기 후보 물질의 존재 하에서 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 상기 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준이 상기 후보 물질의 부재 하에서의 수준보다 감소시키는 물질을 암의 예방 또는 치료용 제제로 예측할 수 있다.

[0058] 상기 스크리닝 방법은 생체 내 (in vivo) 또는 시험관 내 (in vitro)에서 수행될 수 있으며, 특별히 제한되지 않는다. 후보 물질은 공지된 물질 또는 신규 물질일 수 있으며, 예를 들어 식물 추출물 또는 케미컬 라이브러리 (chemical library)를 통하여 대규모로 스크리닝을 수행할 수 있다. 이를 통해 PLRG1의 발현 또는 활성을 억제하여 암 세포 특이적 세포 사멸을 유도할 수 있는 암의 예방 또는 치료용 제제를 발굴할 수 있다.

[0060] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 유전자 서열을 기반으로 PLRG1의 전사 혹은 번역을 억제하거나, PLRG1 단백질의 활성을 억제하는 항암 후보물질을 설계하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 제제 후보물질의 탐색 방법을 제공한다.

[0061] 상술한 바와 같이 본 발명에서는 PLRG1의 발현을 억제하면 암 세포 특이적으로 증식이 억제되고 세포사멸이 일어나는 것을 시험관 내 및 생체 내에서 각각으로 확인하였다. 즉, 본 발명에서는 PLRG1의 억제가 암 세포 특이적인 항암 효과를 가진다는 것을 최초로 규명하였다. 따라서, 당업자는 본 발명을 통해 PLRG1의 전사 혹은 번역을 억제하거나, PLRG1 단백질의 활성을 억제하는 물질이 항암 활성을 가질 수 있음을 인지할 수 있다. 이에, 본 발명의 실시예에서 그 효과를 확인한 PLRG1에 대한 siRNA 및 shRNA는 단지 이러한 기술적 사상을 입증한 일 예시로 보아야 할 것이고, 당업자는 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 PLRG1 유전자 서열 정보를 기반으로 하여 PLRG1의 발현 혹은 활성 등을 억제할 수 있는 암의 예방 또는 치료용 제제 후보물질을 설계할 수 있다. 이에 대한 구체적인 일 예로, PLRG1 유전자 서열을 기반으로 하여 이를 억제하는 siRNA 혹은 shRNA를 제작할 수 있고, 또는 PLRG1 유전자로부터 번역되는 단백질의 구조를 기반으로 하여 이를 억제할 수 있는 화합물을 컴퓨터 프로그램 등을 통해 예측할 수 있다. 상기 탐색 방법을 통해 선별된 후보 물질들은 시험관 내 혹은 생체 내 스크리닝을 통하여 유효 물질 선별에 활용될 수 있다.

발명의 효과

[0063] PLRG1 (pleiotropic regulator 1)은 암 세포에서 과발현되고, 이의 발현을 억제하는 경우 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있다. 이에, 본 발명의 PLRG1 억제제는 부작용 없이 항암제로 우수한 효과가 있으며, 또한 PLRG1 발현 수준을 측정함으로써 암 진단 및 항암제 스크리닝 등에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 간암 조직 및 간암 세포주에서 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현이 증가되는 것을 확인한 것이다. (A) 간암 주변조직 (N)과 간암조직 (T)에서 PLRG1 발현을 RT-PCR과 웨스턴블랏 (western blot) 방법으로 측정하였다. (B) 정상 세포주와 암 세포주에서 PLRG1 발현을 RT-PCR과 웨스턴블랏 방법으로 측정하였다. L02: 불멸화 세포 (immortalized cells).

도 2는 PLRG1의 발현 억제에 의해 암 세포 단일 클론의 성장 (clonal growth)이 억제되는 것을 확인한 것이다. Control-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA (si-PLRG1#1, si-PLRG#2)가 도입된 SNU475 (A), Hep3B (B), HepG2 (C), 및 Huh7 (D) 암 세포주를 저밀도로 접종한 후 단일 클론 성장을 측정하였다. 형성된 콜로니를 크리스탈 바

이올렛 (crystal violet)으로 염색하여 (상단), 콜로니 수를 수치화하였다 (하단). PLRG1 발현 감소와 internal control beta-actin의 발현은 RT-PCR로 측정하였다.

도 3은 PLRG1 발현 억제에 의한 암 세포 특이적 세포 성장 억제를 확인한 것이다. (A) Control-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA (si-PLRG1#1, si-PLRG#2)가 도입된 Huh7, HDF, IMR90, WI38 및 BJ 세포를 접종하고 5 일 후 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 (상단), OD 595 nm에서 발색 정도를 수치화하여 세포 성장을 비교하였다 (하단). control-siRNA를 처리한 세포와 PLRG1-siRNA를 처리한 세포의 성장 차이에 대한 통계적 유의성을 분석하였다 (Not significant, N.S. $p > 0.05$; significant ***, $p < 0.001$). (B) Huh7 세포에서 PLRG1 발현 감소에 의한 영향을 24 시간 간격으로 측정하여 세포 성장 곡선을 작성하였다. PLRG1, beta-actin의 발현은 RT-PCR로 측정하였다.

도 4는 PLRG1 발현 억제에 의한 암 특이적 세포 사멸(apoptosis)이 유도되는 것을 Annexin V 염색으로 확인한 것이다. (A) Control-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA (si-PLRG#2)가 도입된 SNU475, Huh7, 및 BJ 세포를 각각 접종하고, 96 시간 배양한 후, Annexin V로 죽는 세포를 염색하였다. (B) Annexin V-양성 집단을 FACS로 측정하여 정량화하였다.

도 5는 PLRG1 발현 억제에 의한 암 특이적 세포 사멸 (apoptosis)을 Annexin-PI 염색 방법으로 확인한 것이다. Control-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA (si-PLRG#2)가 도입된 BJ, HDF, WI38 정상 세포주와 SNU475, Huh7 암 세포주를 접종하고, 96 시간 배양하였다. Annexin V와 PI로 염색한 후 PI-양성, Annexin V-양성 및 PI-Annexin-이중 양성 집단을 FACS로 측정하였다.

도 6은 PLRG1 발현 억제가 중간엽 줄기세포 성장에 영향을 없음을 확인한 것이다. (A) Control-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA (si-PLRG1#1, si-PLRG#2)가 도입된 중간엽 줄기세포를 접종하고 7 일간 배양한 세포의 사진이다. (B) 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후 (상단), OD 595 nm에서 발색 정도를 측정하여 세포 성장률을 측정하였다. 세포 성장률은 control-siRNA를 처리한 세포의 염색 정도를 기준으로 계산하였다.

도 7은 텔로머라제 (telomerase) 발현이 유도된 정상 세포의 성장에 PLRG1 발현 억제의 영향이 없음을 확인한 것이다. (A) Control-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA (si-PLRG1#1, si-PLRG#2)가 도입된 BJ 및 BJ-T (텔로머라제-양성 BJ) 세포를 접종하고, 5 일간 배양한 후 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. (B) OD 595 nm에서 발색 정도를 측정하여 세포 성장률을 측정하였으며, 세포 성장률은 control-siRNA를 처리한 세포의 염색 정도를 기준으로 계산하였다. PLRG1, beta-actin의 발현은 RT-PCR로 측정하였다.

도 8a는 PLRG1에 대해 제작한 10 종의 siRNA의 대응 위치를 나타낸 것이다.

도 8b는 SNU475 세포에 대조군 siRNA (si-Con) 또는 PLRG1 siRNA (si-PLRG1#1 내지 siPLRG1#10)를 처리한 경우 PLRG1의 발현 및 콜로니 수를 확인한 것이다.

도 9는 다양한 암 세포주에서 PLRG1 억제에 따른 콜로니 수를 확인한 것이다. 대조군-siRNA (si-Con) 또는 PLRG1-siRNA를 다양한 암 세포에 형질전환시킨 후 콜로니 수를 확인하였다.

도 10은 IPTG-유도 (inducible) sh-PLRG1을 Huh7과 SNU475 세포주에 도입한 뒤 시스템을 확인한 것이다. (A) Human PLRG1 sh-RNA 타겟 염기서열 위치를 도식하였다. (B) PLRG1 sh-RNA 렌티바이러스에 의한 간암 및 정상세포주에서 감염과 이에 의한 암 세포 사멸을 현미경으로 관찰하였다. (C) PLRG1 sh-RNA 렌티바이러스 감염과, IPTG 발현억제 시스템에 의한 암 세포 사멸을 현미경으로 관찰하였다. (D) 암세포 사멸 중 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 측정하였다.

도 11은 동물모델에서 PLRG1 억제 효과를 확인한 것이다. 좌측은 세포를 주입한 후 27 일째의 마우스 사진이고, 우측은 날짜별로 각 마우스에서 종양 크기를 표시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0066]

[0068] 실시예 1. 프라이머 및 siRNA 서열

[0070] 유전자의 발현을 측정하기 위하여 사용한 RT-PCR 및 real-time PCR 프라이머는 다음과 같다.

[0072] [RT-PCR]

[0073] PLRG1 forward primer: ACCGTCCAC AGCCTACAGCGA (서열번호 1)

[0074] PLRG1 reverse primer: ACTATCACGCCCCGCACAGT (서열번호 2)

[0075] GAPDH forward primer: GTCAGTGGTGGACCTGACCT (서열번호 3)

[0076] GAPDH reverse primer: TGCTGTAGCCAAATTCGTTG (서열번호 4)

[0077] β -actin forward primer: GGACTTCGAGCAAGAGATGG (서열번호 5)

[0078] β -actin reverse primer: AGCACTGTGTGGCGTACAG (서열번호 6)

[0080] [Real-time PCR]

[0081] PLRG1 forward primer: CTTAAAGAGAAGGGTCCTCAG (서열번호 7)

[0082] PLRG1 reverse primer: GGTCCTGGTGGGTATGGATGT (서열번호 8)

[0083] β -actin forward primer: GCACCACCTTCTACAATGA (서열번호 9)

[0084] β -actin reverse primer: TAGCACAGCCTGGATAGCAAC (서열번호 10)

[0086] PLRG1 발현을 억제하기 위하여 사용한 siRNA 및 shRNA는 다음과 같다.

[0087] siPLRG1#1 : uccggucuaaagcuaauuuu (서열번호 11)

[0088] siPLRG1#2 : agccaugauacuacaauucga (서열번호 12)

[0089] siPLRG1#3 : cgaggagguacagaaacauucugua (서열번호 13)

[0090] siPLRG1#4 : aaagagaaggguccucagaauugcaa (서열번호 14)

[0091] siPLRG1#5 : cagaacuauaaagaucugggacuug (서열번호 15)

[0092] siPLRG1#6 : uccagucagcuggaaaccagaaauu (서열번호 16)

[0093] siPLRG1#7 : cccaugacauguuuguagcugauaa (서열번호 17)

[0094] siPLRG1#8 : ccaagaacucugcacugauggcuaa (서열번호 18)

[0095] siPLRG1#9 : accguggaaacucucaggguauc (서열번호 19)

[0096] siPLRG1#10 : aagcugauaaaaccuuuaaguaua (서열번호 20)

[0097] shPLRG1#1 : CCATGATACTACAATTCGATT (서열번호 21)

[0098] shPLRG1#2 : GACTTGGCTAGTGGCAAATTA (서열번호 22)

[0100] 실시예 2. 암 세포, 정상세포 및 중간엽 줄기세포의 배양

[0102] ATCC에서 구입한 인간 간암 세포주인 Huh7과 SNU475 세포는 10 % FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 RPMI 배지로 배양하였다. 또 다른 인간 간암 세포주인 Hep3B와 HepG2 세포는 10 % FBS를 함유하는 MEM 배지로 배양하

였다. 정상 세포인 HDF, IMR90, WI38, BJ 및 BJ-T 세포는 10 % FBS를 함유하는 DMEM 배지로 배양하였다. Lonza 에서 구입한 인간 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cell)는 MSCGM (human Mesenchymal Stem Cell Growth BulletKit™ Medium)으로 배양하였다.

[0104] 실시예 3. RNA 분리 및 RT-PCR

[0106] Qiagen RNeasy Mini Kit를 이용하여 RNA를 추출하였고, RNA 농도는 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정하였다. 그리고 iScript™ cDNA Synthesis Kit를 이용하여 (Biorad) cDNA (complementary DNA)를 합성하였고, Maxime PCR PreMix kit (Intron Biotechnology)를 이용하여 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 수행하였다.

[0108] 실시예 4. 단백질 분리 및 웨스턴블랏 (western blot)

[0110] 간암 환자 조직 및 그 주변 조직으로부터 용해 완충액 (lysis buffer)을 이용하여 단백질을 추출하였고, PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 항체 (SIGMA)와 GAPDH 항체 (Santacruz)를 사용하여 웨스턴블랏으로 단백질 발현양을 측정하였다. 각각의 세포주에 대하여도 상기와 동일한 방법으로 웨스턴블랏을 수행하였다. 대조군으로 β -actin 항체 (Santacruz)를 사용하였다.

[0112] 실시예 5. PLRG1 억제제를 이용한 단일 클론 성장 (clonal growth) 억제 측정

[0114] 본 발명자들은 PLRG1 발현을 억제하기 위한 억제제로서, 대표적으로 PLRG1에 대한 siRNA를 이용하였다. 이에 사용한 siPLRG1 #1 내지 siPLRG #10은 Qiagen에서 구입하였고, control-siRNA는 Mbiotech에서 구입하여 사용하였다. 각 세포를 60 mm 배양접시에 접종한 후 control-siRNA와 2 종류의 PLRG1-siRNA를 각각 도입하였다. 24 시간 후에 1,000 개의 세포를 계산하여 다시 접종하고, 10 일 경과 후 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)으로 세포를 염색하였다. 염색된 콜로니를 계산하여 단일 클론 성장을 정량화하였다.

[0116] 실시예 6. PLRG1 억제제를 이용한 세포성장 억제

[0118] 각 세포를 24-웰 배양접시에 접종한 후 control-siRNA와 2 종류의 PLRG1-siRNA를 각각 도입하였다. 5 일 경과 후 크리스탈 바이올렛으로 세포를 염색하고 빙초산으로 녹여내어 O.D 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3 회 반복 실험하였다. Huh7 세포주는 24, 48, 72, 96, 120 시간째에 세포성장을 측정하였다.

[0120] 실시예 7. PLRG1 억제제를 이용한 세포 사멸 (apoptosis) 유도

[0122] 각 세포를 60 mm 배양접시에 접종한 후, control-siRNA와 PLRG1-siRNA를 각각 처리하였다. 72 시간 후, 세포를 모두 모아 Annexin V-FITC를 첨가하여 15 분간 염색시키고 유세포분석기를 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다.

[0123] 이중 염색의 경우, Annexin V-FITC와 PI (propidium iodide)를 동시에 첨가하여 15 분간 염색하고, 유세포분석기를 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다.

[0125] 실험예 1. 간암조직 및 간암 세포주의 PLRG1 (pleiotropic regulator 1) 발현 수준 확인

[0127] 비종양성 주변 간 조직과 간암 조직에 존재하는 PLRG1의 mRNA 양을 각각 RT-PCR 방법으로 측정한 결과, 비종양성 주변 간 조직과 비교하여 간암 조직에서 PLRG1의 mRNA가 과발현되어 있는 것을 확인하였다 (도 1). 웨스턴블롯 방법으로 단백질량을 측정한 결과에서도 간암 조직에서 PLRG1의 발현이 크게 증가되어 있었다 (도 1의 A).

[0128] 세포주를 이용한 실험에서도 암 세포주의 PLRG1 발현양이 정상 세포주의 발현양보다 많음을 확인하였다 (도 1의 B).

[0130] 실험예 2. 암 세포주에서 PLRG1 발현 억제에 의한 단일 클론 성장 (clonal growth) 억제 확인

[0132] 상기 실험예 1의 결과로부터, PLRG1이 암 성장 등 암의 진행 (progression)에 역할을 할 것으로 추정되었으며, 이를 확인하기 위해 PLRG1 발현을 억제시켰을 때 암 세포의 단일 클론 성장에 미치는 영향을 측정하였다.

[0133] 그 결과, PLRG1-siRNA를 암 세포주 SNU475에 처리하여 PLRG1 발현을 감소시키면 control-siRNA를 처리한 대조군과 비교하여 콜로니 형성이 현저히 억제되는 것을 확인하였다 (도 2의 A). 이러한 PLRG1 발현 억제에 의한 암 세포의 콜로니 형성억제는 Hep3B, HepG2, Huh7 암 세포주에서도 마찬가지로 관찰되었다 (도 2의 B, C 및 D). 또한, PLRG1 발현 감소에 의한 단일 클론 성장 억제는 2 종류의 서로 다른 PLRG1-siRNA (#1, #2)를 이용한 실험에서 유사하게 관찰되었다. 상기 결과를 통해 PLRG1 발현 감소는 다양한 암 세포에서 단일 클론 성장을 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

[0135] 실험예 3. 정상 세포주에서 PLRG1의 발현 억제 효과 확인

[0137] PLRG1 발현억제가 정상 세포주의 성장에도 영향을 미치는지 알기 위해, PLRG1-siRNA를 처리한 후 암 세포주와 정상 세포주의 성장을 측정, 비교하였다. 크리스탈 바이올렛 (crystal violet) 염색 방법으로 세포 성장을 측정한 결과, 암 세포주인 Huh7의 경우, 콜로니 형성 실험에서 보여준 것과 같이, PLRG1 발현 억제에 의해 세포 성장이 이루어지지 않았고 (도 3의 A), 오히려 감소되었다 (도 3의 B). 그러나, 실험에 적용한 HDF, IMR90, WI38 및 BJ 정상 세포주의 경우, control-siRNA를 처리한 대조군과 비교하여 PLRG1 발현 억제에 의해 세포 성장 감소 현상이 관찰되지 않았다 (도 3의 A, $p > 0.05$). 상기 결과로부터, PLRG1 발현 감소에 의한 세포 성장 억제는 암 세포 특이적인 것임을 알 수 있다.

[0139] 실험예 4. PLRG1 발현 억제에 의한 세포 사멸 (apoptosis) 확인

[0141] 상기 실험예 2에서 확인한 PLRG1 발현억제에 의한 세포성장 억제가 세포 죽음 (cell death)과 관련 있는지 알기 위하여, 세포 사멸 마커 (apoptosis marker)인 Annexin-V에 염색된 세포를 측정하였다. Huh7과 SNU475 암 세포주의 경우, control-siRNA를 처리한 세포주와 비교하여 PLRG1-siRNA를 처리하였을 때 Annexin V 염색 강도가 크게 증가하였으나, 정상 세포주인 BJ 세포의 경우 대조군과 차이가 없었다 (도 4의 A 및 B).

[0143] 보다 정확한 분석을 위하여, Annexin V와 PI를 이중염색하여 염색된 세포의 변화를 FACS로 분석하였다. 암 세포주인 SNU475, Huh7은 PLRG1-siRNA 처리에 의하여, PI와 Annexin V가 동시에 염색 (late apoptosis marker)된 세포의 수가 크게 증가하였으나, 정상 세포주인 BJ, HDF, 및 WI38에서는 변화가 거의 관찰되지 않았다 (도 5). 따라서, PLRG1 발현억제는 암 세포 특이적으로 후기 세포 사멸 (late apoptosis)을 유도하게 된다는 사실을 알 수 있었다.

[0145] **실험예 5. 중간엽 줄기세포에서 PLRG1 억제 효과 확인**

[0147] PLRG1은 암 세포 또는 조직에서 과발현되어 있고, 발현을 억제하면 정상 세포에는 영향이 없으며 암 세포 특이적으로 사멸을 유도한다는 것을 통해, PLRG1이 암 세포에 특이적으로 필요한 성장 인자임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 보장하기 위하여, 세포분열이 빠른 중간엽 줄기세포를 이용하여 PLRG1의 영향을 측정하였다.

[0148] 그 결과, 다른 정상 세포에서와 같이 중간엽 줄기세포에서도 PLRG1의 발현 감소에 의한 세포 성장 억제는 관찰되지 않았다 (도 6). 구체적으로, 현미경 관찰에 의한 세포 형태 (cell morphology) (도 6의 A) 뿐 아니라 크리스탈 바이올렛 염색에 의한 세포성장 (도 6의 B) 실험에서도 PLRG1 발현 감소에 의한 변화가 관찰되지 않았다.

[0150] 한편, 중간엽 줄기세포를 비롯한 줄기세포는 암 세포에서와 같이 텔로머라제 (telomerase)가 활성화되어 있다. 중간엽 줄기세포에서 PLRG1 발현 감소의 영향이 관찰되지 않았으므로, 이를 보다 명확히 하기 위해 텔로머라제의 과발현이 유도된 정상 세포를 이용하여 PLRG1 발현 감소의 영향을 측정하였다.

[0151] 그 결과, 텔로머라제 발현이 없는 BJ 세포나 텔로머라제 발현이 유도된 BJ-T 세포 모두 PLRG1 발현 억제에 의하여 세포 성장이 영향을 받지 않는 것을 확인하였다 (도 7의 A 및 B). 이는, 텔로머라제가 발현에 관계 없이 암 세포가 아닌 정상 세포에서는 PLRG1 발현 억제에 의한 영향이 없다는 것을 의미한다.

[0153] **실험예 6. 다양한 PLRG1-siRNA의 암세포 성장 억제 효과 확인**

[0155] PLRG1 억제로 인한 항암효과를 더욱 명확히 확인하기 위해, 추가적으로 PLRG1 유전자를 표적으로 하는 siRNA 10종을 서열을 달리하여 제작하였다 (도 8a). 그리고 각각의 siRNA를 Huh7과 SNU475에 형질전환시키고 세포 성장 및 PLRG1 발현에 미치는 영향을 측정하였다.

[0156] 그 결과, 상기 두 세포주에서 10종의 siRNA (siPLRG1#1 내지 siPLRG1#10)는 모두 PLRG1 발현을 억제하였고, 이에 따라 생존하는 콜로니 수도 크게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (도 8b). 따라서, PLRG1-siRNA 효능은 특정 염기서열을 타겟팅하는 siRNA에 국한된 것이 아님을 알 수 있었다. 상기 결과는 PLRG1 유전자의 발현이 억제되기만 한다면 그 방법에 상관 없이 암 세포 특이적으로 세포 성장을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0158] **실험예 7. 다양한 암 세포주에서 PLRG1 억제 효과 확인**

[0160] 상기 PLRG1 억제에 의한 암 세포 사멸현상이 간암 등 특정 암에 국한된 것인지, 아니면 유래 조직에 상관 없이 모든 암 세포에 범용적으로 적용되는 현상인지 확인하기 위하여, 다양한 암 세포주를 이용하여 추가실험을 진행하였다.

[0161] 그 결과, 실험에 사용하였던 폐암 세포 (A549, H460), 유방암 세포 (MDA231), 자궁경부암 세포 (Hela, SiHa), 골육종 (SaOS2, U2OS), 뇌암 세포 (LN229)와 대장암 세포 (HCT116, SW480) 모두에서 PLRG1의 발현을 억제하였을 때 생존하는 콜로니 수가 크게 감소하는 것을 확인하였다 (도 9). 따라서, PLRG1 발현 억제에 의한 암 세포 사멸은 특정 암에 국한된 것이 아니라 광범위하게 모든 암에 적용이 가능한 현상임을 알 수 있었다.

[0163] **실험예 8. IPTG-유도 (inducible) sh-PLRG1 시스템 제작 및 이에 따른 암 세포 성장 억제 효과 확인**

[0165] PLRG1 결핍에 의한 암세포 성장억제 현상을 좀 더 명확히 규명하기 위해, 본 발명자들은 IPTG-유도 (inducible) sh-PLRG1에 의한 PLRG1 발현조절 시스템을 제작하였다. 사람 PLRG1(NM_002669)에 대한 shRNA가 탑재되어있는 Constitutive 렌티벡터를 시그마에서 구입하였다 (도 10a). Constitutive 렌티벡터 시스템에서 검증된 shPLRG1#1와 shPLRG1#2 염기서열을 inducible 렌티벡터 시스템으로 도입하기 위해 올리고를 합성하였다.

shPLRG1#1와 shPLRG1#2를 대상으로 프라이머를 annealing하였고, 이후 합성된 PCR 산물을 KpnI-EcoRI으로 잘라 LK0-3X Inducible 벡터에 클로닝하였다. 올리고 시퀀스 정보는 아래와 같다.

[0167] shPLRG1#1-F (KpnI): CgaGgtacCCGGCCATGATACTACAATTCGATTCTCGAGAATCGAATTGTAGTATCATGGTTTTTagaattcCG (서열번호 23)

[0168] shPLRG1#1-R (EcoRI): CGgaattctAAAAACCATGATACTACAATTCGATTCTCGAGAATCGAATTGTAGTATCATGGCCGGtacCtcg (서열번호 24)

[0169] shPLRG1#2-F (KpnI): CgaGgtacCCGGGACTTGGCTAGTGGCAAATTACTCGAGTAATTTGCCACTAGCCAAGTCTTTTTGaattcCG (서열번호 25)

[0170] shPLRG1#2-R (EcoRI): CGgaattCAAAAAAGACTTGGCTAGTGGCAAATTACTCGAGTAATTTGCCACTAGCCAAGTCCCGGtacCtcg (서열번호 26)

[0172] 클로닝이 완성된 렌티벡터를 대상으로 바이러스를 합성한 후, 간암 세포주 Huh7, SNU475와 정상 세포주 BJ에 감염시켰다. 이후 7 일간 세포를 유지한 결과 정상세포는 세포 사멸에 영향을 받지 않는 반면, 간암 세포주는 sh-RNA 타겟 시퀀스 sh-PLRG1#1, sh-PLRG1#2에 의해 세포 사멸이 유도되었다 (도 10b). 2 종의 Inducible 렌티벡터 즉, sh-PLRG1#1, sh-PLRG1#2를 대상으로 바이러스를 합성한 후, 간암 세포주 Huh7, SNU475와 정상 세포주 BJ에 2일간 감염 한 후 5 일동안 puromycin으로 감염세포를 선별하였다. 이후 10 일간 1 mM IPTG 처리 하에 세포를 유지한 결과 정상세포는 세포 사멸에 영향을 받지 않는 반면, 간암 세포주는 sh-RNA 타겟 시퀀스 #1, #2에 의해 세포 사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다 (도 10c). sh-RNA 타겟 시퀀스 #1, #2에 의한 간암 세포주의 사멸을 또 다른 세트의 실험에서 확인하였으며, 이때 PLRG1 단백질 발현이 sh-대조군 시퀀스와 비교하여 크게 감소되어 있었다 (도 10d).

[0173]

[0174] **실험예 9. IPTG-유도 (inducible) sh-PLRG1 시스템을 이용한, 동물 모델에서 PLRG1 억제 효과 확인**

[0176] IPTG-inducible sh-PLRG1#1 또는 #2를 도입한 Huh7 세포 (각 3×10^6 개)를 각각 누드 마우스의 우측 대퇴부에 주입하고, sh-대조군 벡터를 도입한 Huh7 세포를 누드 마우스의 좌측 대퇴부에 주입하였다. 그 다음 상기 마우스들을 IPTG를 함유하거나 함유하지 않은 물을 공급하면서 27 일 동안 사육한 뒤, 각 마우스에서 종양 형성여부를 확인하였다.

[0177] 그 결과, IPTG를 함유하고 있는 물을 먹이며 사육한 쥐의 경우, 주입한 Huh7 세포 (즉, sh-PLRG1#1 혹은 #2가 도입된 세포)의 종양형성이 이루어졌으나 일정기간 지난 후 성장감소와 더불어 결국엔 종양이 소멸되는 것을 확인하였다. 그러나 IPTG가 없는 물을 먹이며 사육한 쥐의 경우 종양조직의 크기가 지속적으로 커지는 것을 확인하였다. 또한, sh-대조군을 갖고 있는 Huh7 세포를 주입한 경우 IPTG 유무에 관련 없이 지속적인 성장이 이루어졌다 (도 11).

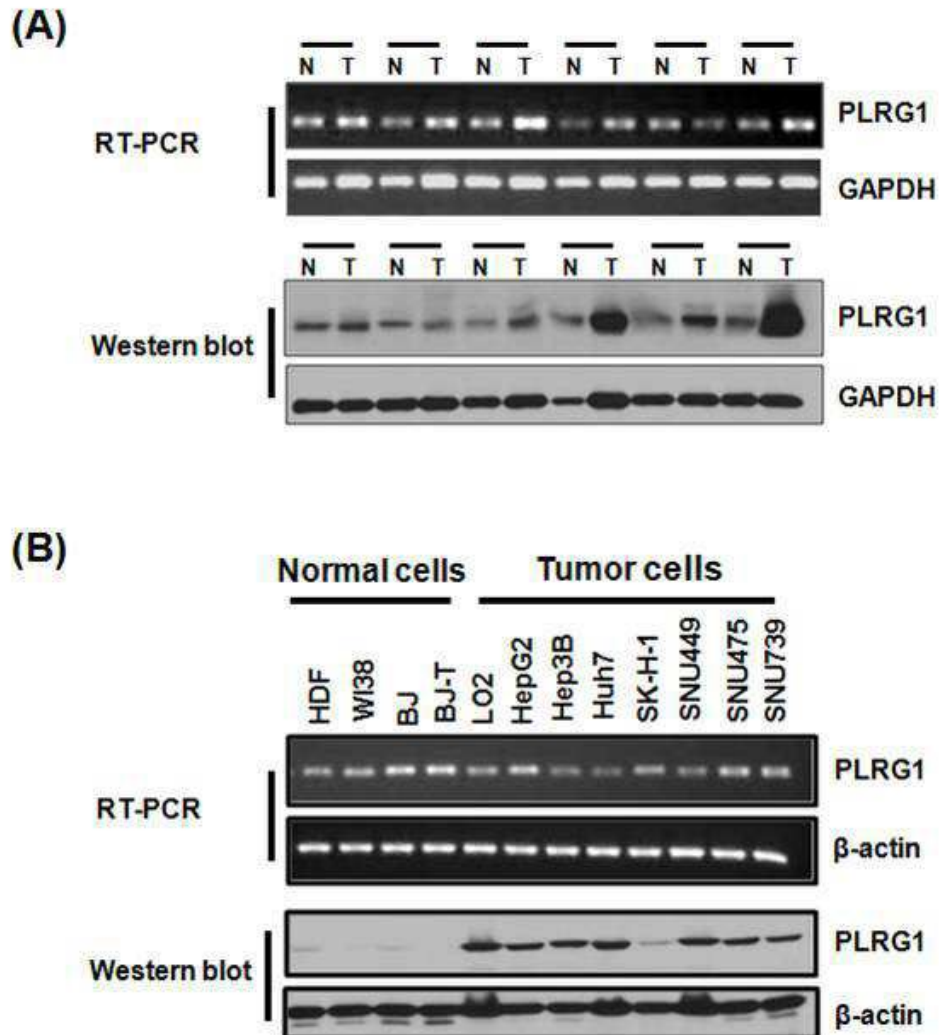
[0179] 상기 결과를 종합하면, PLRG1 발현 억제는 중간엽 줄기세포 등 정상 세포에는 영향이 없으며, 암 세포 특이적으로 세포 사멸을 유도하는 것을 알 수 있었다. 이에, PLRG1 발현을 억제할 수 있는 체제를 이용하여 항암제로 사용할 수 있고, 또한 PLRG1 발현 수준을 측정함으로써 암 진단 및 항암제 스크리닝 등에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

[0181] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 다른 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는

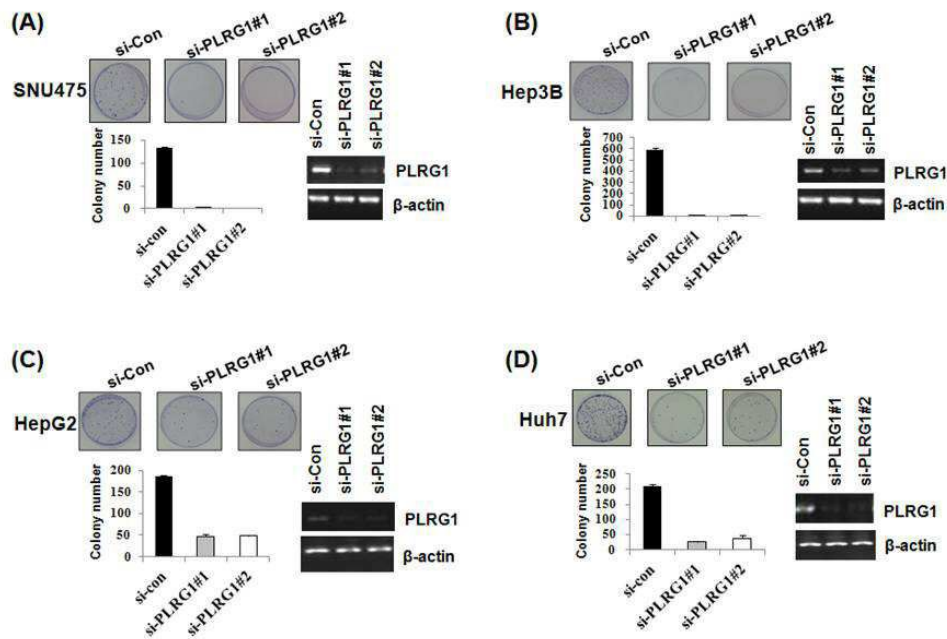
모든 변경 또는 변경된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

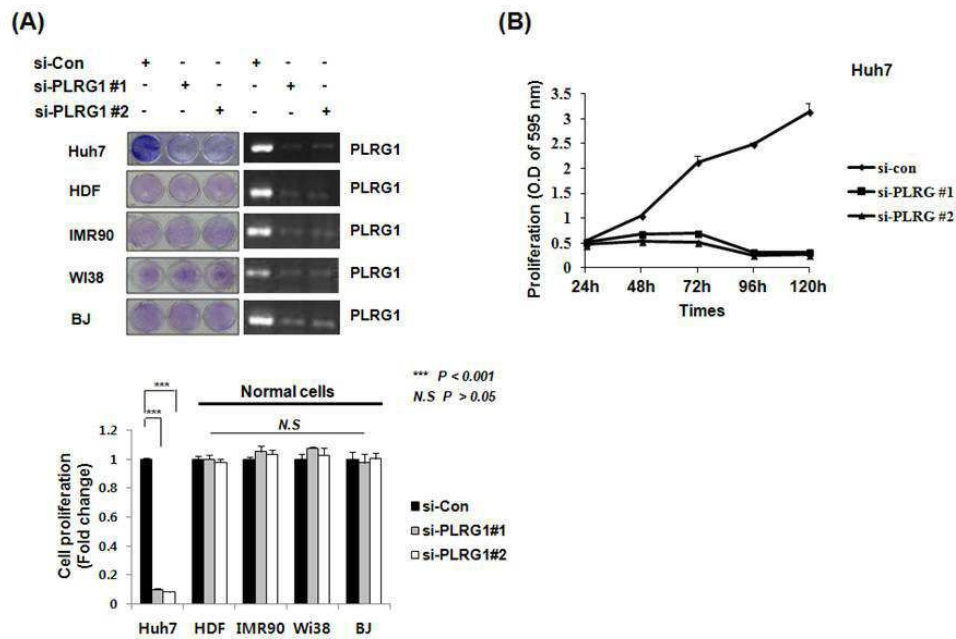
도면1



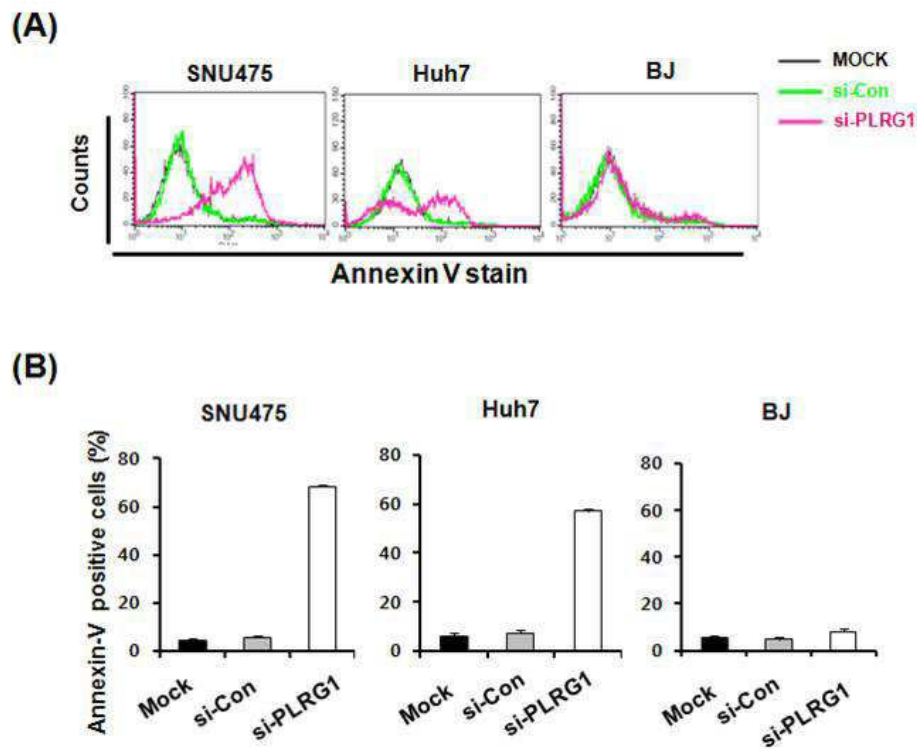
도면2



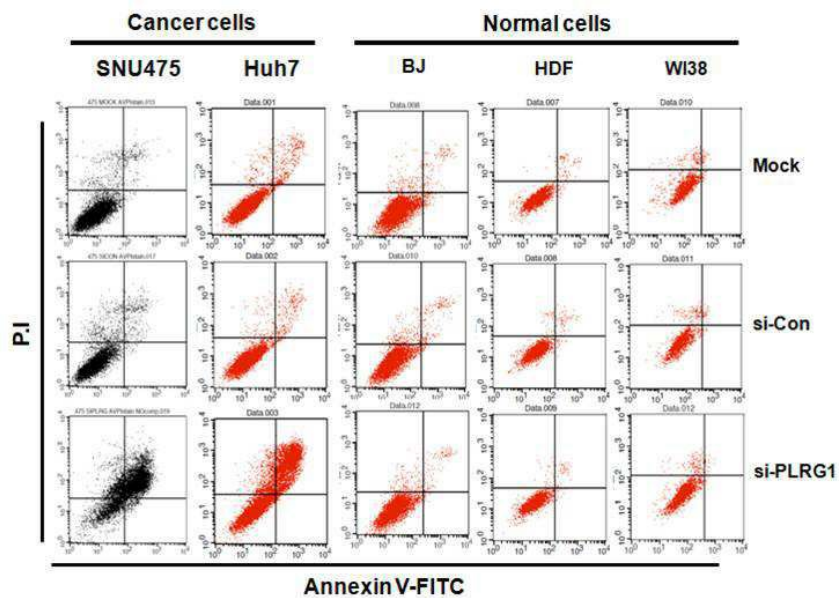
도면3



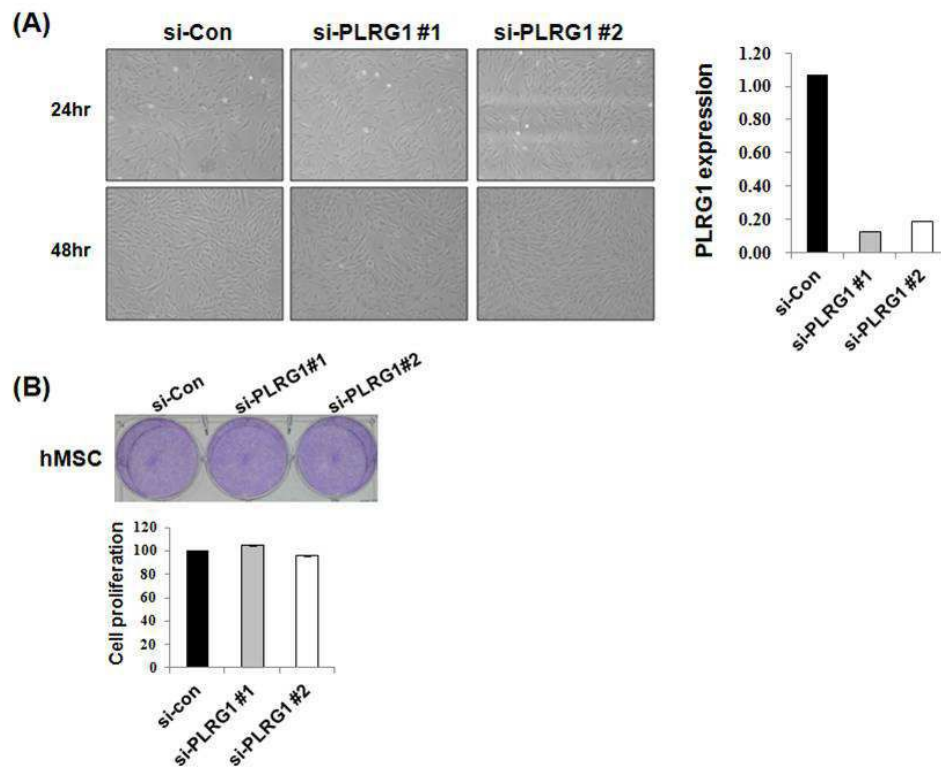
도면4



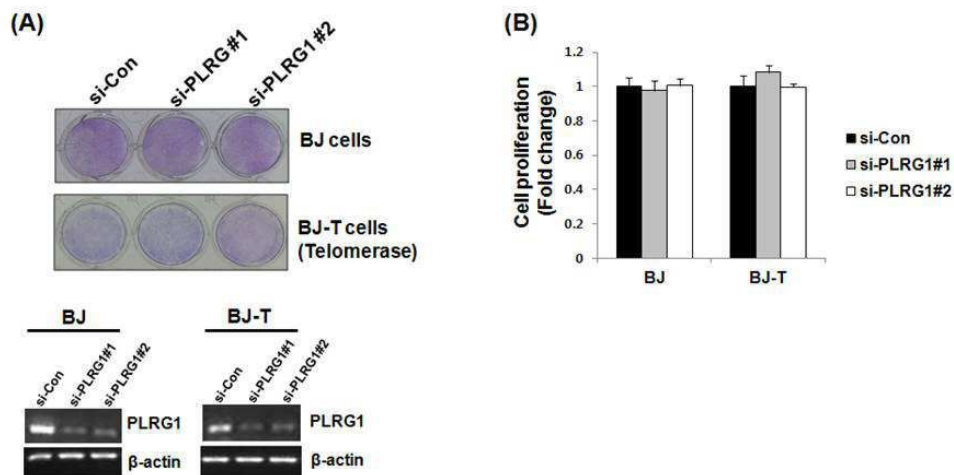
도면5



도면6



도면7



도면8a

Homo sapiens pleiotropic regulator 1 (PLRG1), transcript variant 1, mRNA
 ACCESSION NM_002669

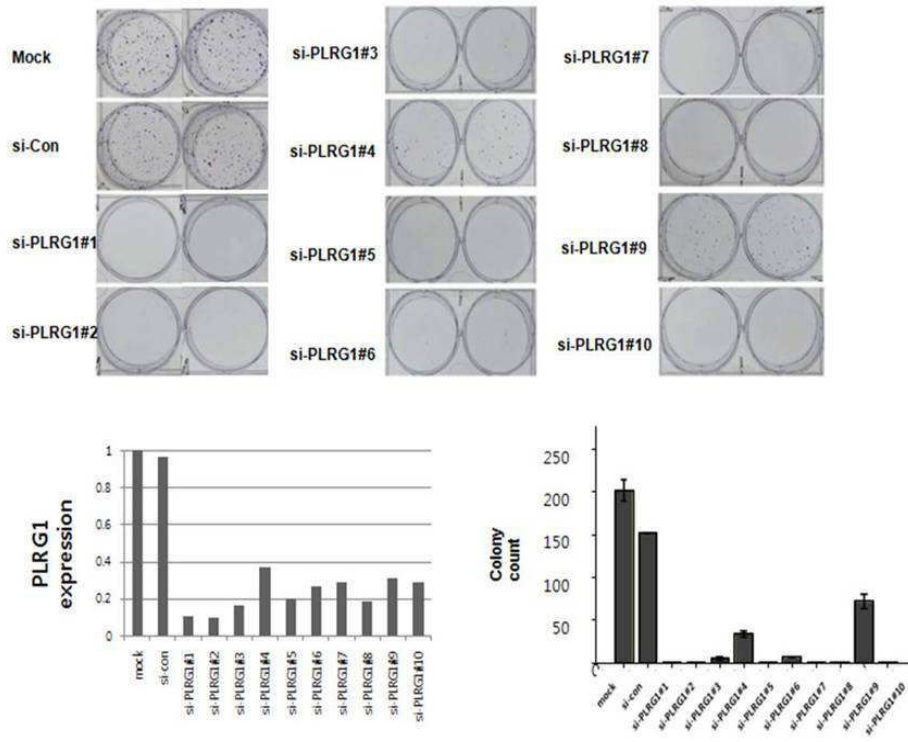
```

1 agagcttgca tcacatccgc cgccctggcg cccaattccg gaaggtgctg cacagctgtg
61 gcggcgggta ctgcgttagt gattagagtt tctccctgc cggaggtggg atacacggta
121 gcatcatggt cgaggaggta cagaaacatt ctgtacacac ccttggttc aggtcgttga
      si-PLRG1#3
181 agaggaccca tgacatgttt gtagctgata atggaaaacc tggccttta gatgaagaga
      si-PLRG1#7
241 gtcacaaaac aaaaatggca atcaagcttc gtaatgagta tggctctgtg ttgcatatgc
301 ctacttcaa agaaaatctt aaaggagaa atctctagna tgcac cggat tcatatgttc
      si-PLRG1#4
361 ataacagta ccttgccaat caaggacaag aagttgaata ctttgggca ggtacacatc
421 cataccacc aggacctggg gttgcttga cagcagatac taagatccag agaatgccaa
481 gtgaatcagc tgcacagtc ttacgggtgg cattacctt gcagaccaag gctgatgcaa
541 atcgactgc cctagtggg agtgaatacc gacatcctgg ggcttctgac cgtccacagc
601 ctacagcgat gaattcaatt gtcattgaga ctggcaatac caagaactct gcactgatgg
      si-PLRG1#8
661 ctaaaaaagc ccttacaatg ccaaaacccc agtggcacc accgtggaaa ctctacaggg
      si-PLRG1#9
721 ttatcagtag gcattctggc tggattgat gtattgctgt ggaacctgga aatcagtggt
781 ttgttactgg atctgctga agaactatac agatctggg cttagt ggcaaatata
      si-PLRG1#5
841 aactgtcatt gactgggcat attagtactg tgcggggcgt gatagtaagc acaaggagcc
901 catatctgtt ctctgtgga gaagacaaac aagtgaatg ctgggatctc gaatacaata
961 aggttatagc gcattatcat ggacatttaa gtgcagtgtg tggtttggat ttgcaccgga
1021 caatagatgt gttggaacc ttagtctgag attcaactgc acggatttgg gatgtgagaa
1081 ctaaaagccag tgtacacaca ttatctggac atacaaatgc agttgctaca gtgagatgtc
1141 aggcctcaga accacaaatt attacagga gcacataac tacaattgga ttatgggac
      si-PLRG1#2
1201 tggtagctgg aaaaacaaga gtacatttaa caaatcaaa aaatcagtt agggctgtgg
1261 ttatcatcc aagacattac acatttgcatt ctggttctcc agataacata aagcagtgga
1321 aattccctga tggaaagttc attcaaaatc ttccgggtca taatgctatt attaacacat
      si-PLRG1#1
1381 tgacggtaaa ttctgatgga gtgctgtat ctggagctga caatggcacc atgcattctt
1441 gggactggag aactggctac aattttcaga gatttcacgc agctgtgcaa cctgggtctt
1501 tggacagtga atcaggaata ttgcttggg cttttgatca gtctgaaagt cgattactaa
1561 cagctgagc tgataaaacc attaaagtat acagagagga tgacacagcc acagaagaaa
      si-PLRG1#10
1621 ctcatcagct cagctggaaa ccagaaatta tcaagagaaa gagattttaa tgaatgtgga
      si-PLRG1#6

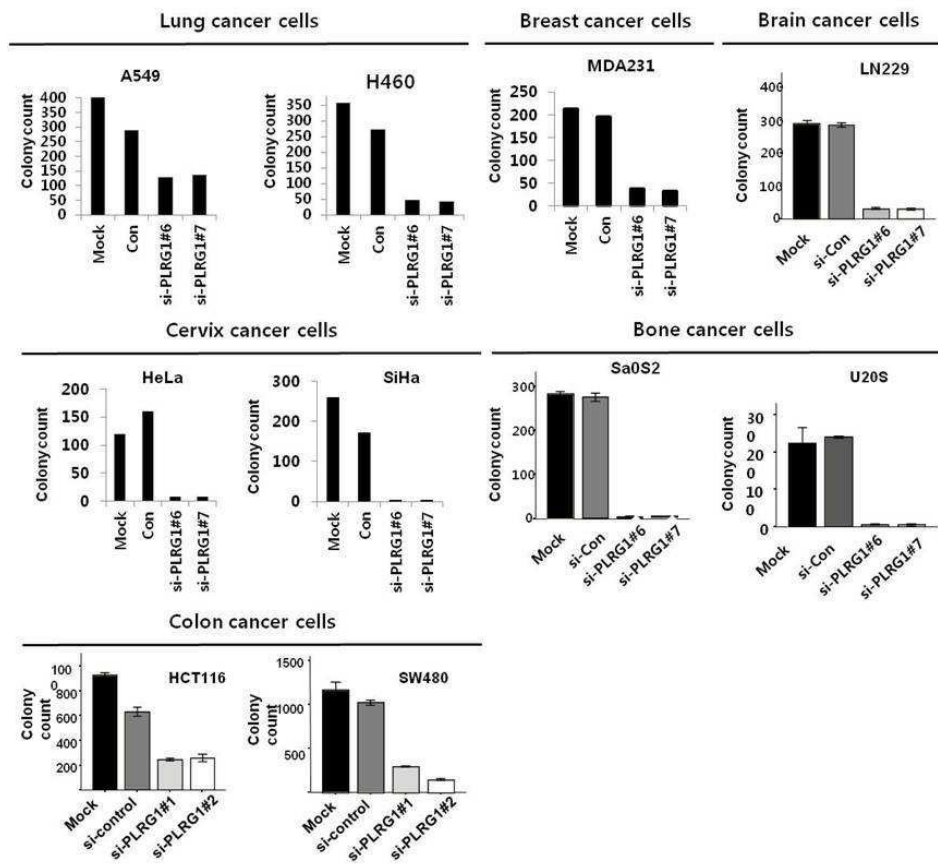
```

도면8b

SNU475 cells * 10nM siRNA treatment



도면9

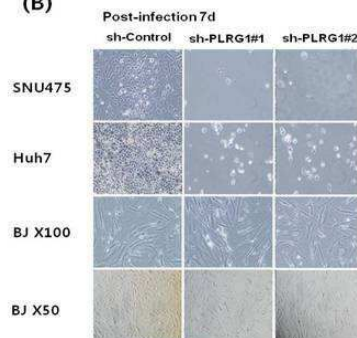


도면10

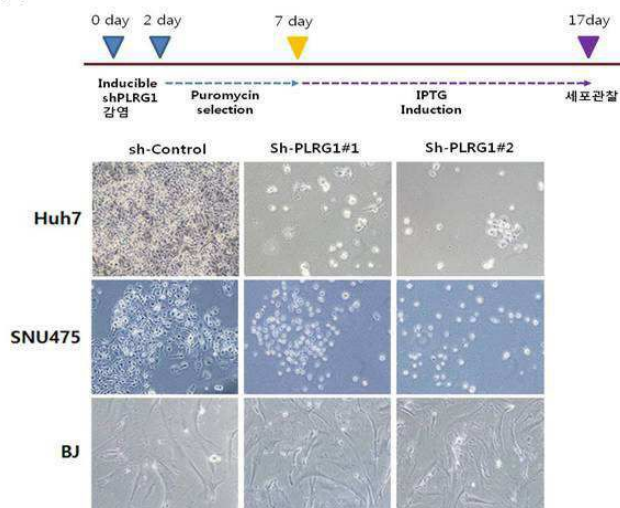
(A)

	PLRG1(NM_002669)
TRCN0000022224 (sh-PLRG1#1)	CCGGCCATGATACTACAATTCGATTCTCGAGAAATCGAATTGTAGTATCATGTTTTT
TRCN00000420011 (sh-PLRG1#2)	CCGGGACTTGGCTAGTGGCAAATTACTCGAGTAATTGGCCACTAGCCAAGTCTTTTTTG

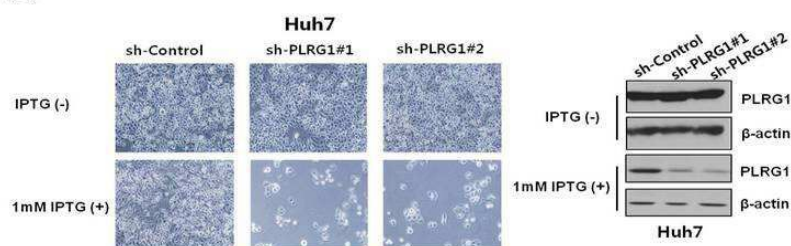
(B)



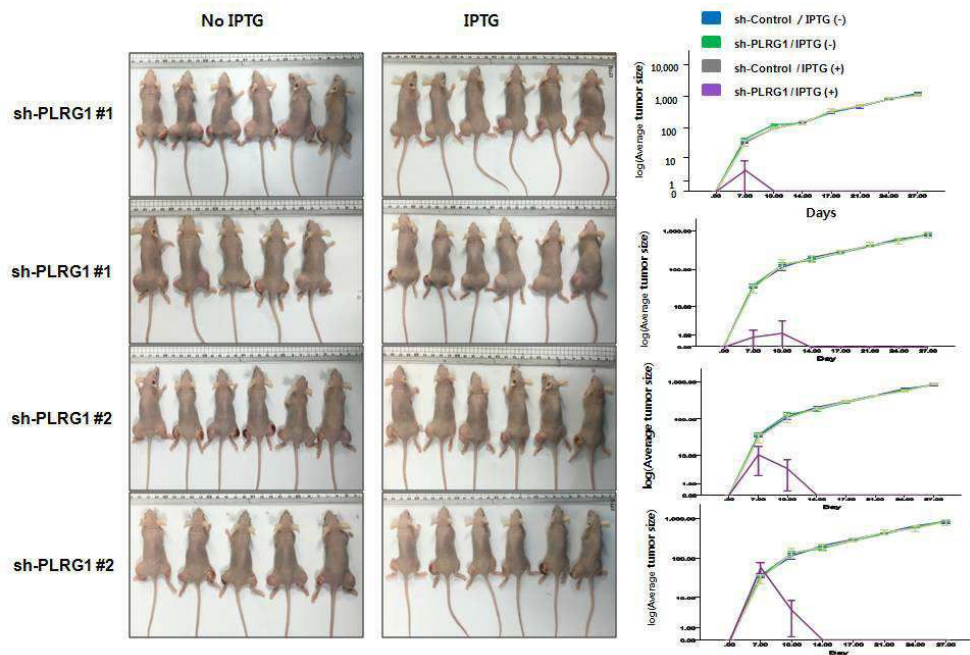
(C)



(D)



도면11



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES
- <120> A composition for treating cancer comprising an inhibitor of
PLRG1
- <130> KPA150905-KR-P1
- <150> KR 10-2015-0141667
- <151> 2015-10-08
- <160> 26
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PLRG1 RT-PCT primer-F
- <400> 1
accgtccaca gcctacagcg a
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PLRG1 RT-PCT primer-R	
<400>	2	
	actatcacgc cccgcacagt	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH RT-PCT primer-F	
<400>	3	
	gtcagtggtg gacctgacct	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH RT-PCT primer-R	
<400>	4	
	tgctgtagcc aaattcgttg	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	b-actin RT-PCT primer-F	
<400>	5	
	ggacttcgag caagagatgg	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	b-actin RT-PCT primer-R	
<400>	6	
	agcactgtgt tggcgtacag	20
<210>	7	
<211>	21	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PLRG1 real-time PCT primer-F	
<400>	7	
	cttaaagaga agggctcctca g	21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PLRG1 real-time PCT primer-R	
<400>	8	
	ggtcctggtg ggtatggatg t	21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	b-actin real-time PCT primer-F	
<400>	9	
	gcaccacacc ttctacaatg a	21
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	b-actin real-time PCT primer-R	
<400>	10	
	tagcacagcc tggatagcaa c	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siPLRG1#1	
<400>	11	
	uccggucuaa augcuauuuau u	21

<210> 12
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siPLRG1#2
 <400> 12

agccaugaua cuacaaauucg a 21

<210> 13
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siPLRG1#3
 <400> 13

cgaggaggua cagaaacauu cugua 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siPLRG1#4
 <400> 14

aaagagaagg guccucagaa ugcaa 25

<210> 15
 <211> 25
 <212> RNA
 <213>

Artificial Sequence

<220><223> siPLRG1#5
 <400> 15

cagaacuaua aagaucuggg acuug 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siPLRG1#6

<400>	16	
uccagucagc	uggaaaccag	aaauu
		25
<210>	17	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siPLRG1#7	
<400>	17	
cccaugacau	guuuguagcu	gauaa
		25
<210>	18	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siPLRG1#8	
<400>	18	
ccaagaacuc	ugcacugaug	gcuaa
		25
<210>	19	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siPLRG1#9	
<400>	19	
accguggaaa	cucuacaggg	uuauu
		25
<210>	20	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siPLRG1#10	
<400>	20	
aagcugauaa	aaccuuuuu	guaua
		25
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> shPLRG1#1

<400> 21

ccatgatact acaattcgat t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shPLRG1#2

<400> 22

gacttggcta gtggcaaatt a 21

<210> 23

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shPLRG1#1-F

<400> 23

cgaggtaccg gccatgatac tacaattcga ttctcgagaa tcgaattgta gtagcatggt 60

ttttagaatt ccg 73

<210> 24

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shPLRG1#1-R

<400> 24

cggaattcta aaaacatga tactacaatt cgattctcga gaatcgaatt gtagtatcat 60

ggccggtacc tcg 73

<210> 25

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shPLRG1#2-F

<400> 25

cgaggtaccg ggacttggct agtggcaaat tactcgagta atttgccact agccaagtct 60

tttttgaatt ccg 73

<210> 26

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shPLRG1#2-R

<400> 26

cggaattcaa aaaagacttg gctagtggca aattactcga gtaatttgcc actagccaag 60

tcccggtacc tcg 73