



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0125819
(43) 공개일자 2019년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0050113

(22) 출원일자 2018년04월30일

심사청구일자 2018년04월30일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

이재선

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호(서초동, 삼풍아파트)

황현정

경기도 부천시 부광로41번길 64, 101동 209호(괴안동, 태송팰리채아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

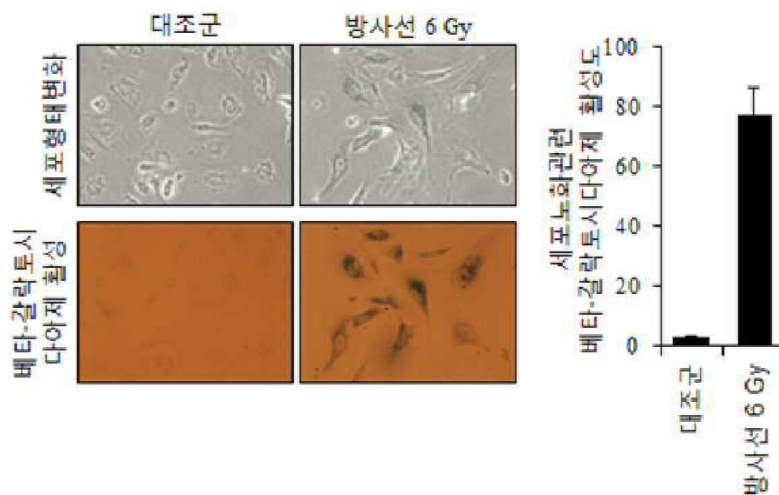
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 암 전이 억제용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자를 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물 및 항암 보조제 조성물과, CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자를 이용한 암 전이 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CDH13 억제제는 방사선으로 인해 노화된 혈관내피세포에 암세포가 부착되는 것을 억제하는 효과를 가지고 있어, 방사선 치료로 인하여 노화된 혈관내피세포에서 발생하는 암 전이를 억제할 수 있는바, 본 발명의 CDH13 억제제는 암 전이 억제, 항암 보조제 및 암 전이 억제제의 스크리닝 방법 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/04 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2018.05)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

강동희

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

박현주

서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 502동 902호
(서초동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711065983

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 저산소 표적 질환 연구센터

기 여 율 30/100

주관기관 인하대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711068722

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 막 단백질 기반 압노화 특이적 신호전달기전 연구

기 여 율 40/100

주관기관 인하대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711072439

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 방사선기술개발사업(R&D)

연구과제명 방사선유도 암혈관노화의 암증식 및 암전이 영향 연구

기 여 율 30/100

주관기관 인하대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

CDH13(cadherin 13) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암 전이는 암세포가 방사선이 조사된 혈관내피세포에 부착(adhesion)되는 것인, 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 CDH13에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)인, 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 CDH13를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA) 또는 miRNA(microRNA)인, 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 siRNA인, 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 항암 보조제 조성물.

청구항 8

- (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군에서 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 암 전이 억제제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 암 전이 억제용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자를 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물 및 항암 보조제 조성물과, CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자를 이용한 암 전이 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 국내의 사망 원인 중 1위를 차지하고 있는 암은 고령화로 인해 더욱 증가하는 추세에 있다. 생명공학의 진보적인 발전 속에서도 가장 큰 난제 중의 하나로 남아 있는 암에 관한 연구는 근래에 암 유전자의 종양 억제 유전자의 발견에 따라 발암기전에 관한 분자 수준에서의 연구, 새로운 치료제의 개발 등 각 분야에 걸쳐 심도 있는 연구가 이루어져 왔으며 현재의 암 치료제 개발은 주로 암 세포 증식에 관련하는 생리·생화학적 기작을 조절하는 방향으로 많은 연구가 진행되고 있다. 암 치료는 주로 항암제 투여, 방사선 치료, 외과적 수술 등이 있으며 이들을 적절히 병행하는 방법도 사용되고 있으나 모든 암에 적용되는 것은 아니고, 몇몇 종류의 암 치료에만 한정되어 그 효과를 나타내고 있는 실정이다.
- [0004] 방사선 치료는 질병의 진단을 위해 사용하는 방사선보다는 높은 에너지의 방사선을 이용하여 인체에 발생하는 각종 암, 일부 양성종양 및 특정한 양성 질환을 치료하는 의학의 전문분야이다. 종양의 치료는 치료부위, 종양의 종류 및 진행정도 등에 따라 방사선치료, 수술 혹은 항암 약물 치료를 단독 혹은 병행하여 시행하는데, 완치 목적의 방사선치료가 단독으로 시행되는 가장 대표적인 예로 자궁경부암, 비인강암, 초기 성문암이 있다. 수술과 함께 방사선 치료를 시행하는 경우는 수술 전 방사선치료와 수술 후 방사선치료로 나눌 수 있으며 유방암, 직장암, 비소세포성 폐암 등의 치료시 흔히 사용된다. 수술 전 방사선 치료는 종양의 크기를 작게 만들어 수술을 용이하게 하거나 장기의 기능을 보존할 수 있는 수술이 가능하도록 하며 수술 후에 시행하는 방사선 치료는 수술부위 및 인접 림프절에서의 국소재발을 방지하려는 목적으로 시행하고 있다. 또한 전신전이 혹은 국소적으로 질병의 진행이 심한 경우 완치는 시킬 수 없으나 증상을 완화시키고 생명을 연장할 목적으로도 방사선 치료가 시행되고 있다. 미국에서는 암환자의 60% 이상이 방사선 치료를 받는데, 국내에서는 아직 환자의 20% 정도만 방사선 치료를 받고 있는 실정이다. 또한 방사선 치료는 약물요법보다 먼저 암의 표준 치료법으로 인정받았다.
- [0005] 그런데, 방사선 치료는 인체의 조혈기능을 저하시키고 면역계를 억제시키며, 종양 주변 혈관의 노화를 유도함으로써 암 치료의 효율성을 낮춘다. 또한, 반복적인 방사선 조사로 인해 암세포가 저항성을 획득하게 되어 방사선 치료의 어려움을 가져온다. 따라서, 방사선 치료로 인하여 노화된 혈관세포에서의 종양세포의 침습 및 전이를 억제하기 위한 약제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 방사선 치료로 인하여 노화된 혈관세포에서의 종양세포의 침습 및 전이를 억제하기 위한 약제를 개발하기 위하여, 방사선 조사에 따른 혈관내피세포의 mRNA를 분석하여 암 전이 인자를 발굴하고, 이의 억제제를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은, CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물 또는 항암 보조제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은, CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자를 이용한 암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 항암 보조제 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군에서 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 CDH13 억제제는 방사선으로 인해 노화된 혈관내피세포에 암세포가 부착되는 것을 억제하는 효과를 가지고 있어, 방사선 치료로 인하여 노화된 혈관내피세포에서 발생하는 암 전이를 억제할 수 있는바, 본 발명의 CDH13 억제제는 암 전이 억제, 항암 보조제 및 암 전이 억제제의 스크리닝 방법 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 세포노화 연관-베타-갈락토시다아제 염색법으로 방사선 조사에 따른 혈관내피세포의 특성을 분석한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 2는 차세대 시퀀싱을 통해 방사선이 조사된 인간 태줄 정맥 내피세포의 mRNA 분석 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 종양-혈관내피세포 부착 분석을 통해 본 발명에 따른 CDH13 억제제의 암 전이 억제 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물 및 항암 보조제 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, “CDH13(Cadherin 13)”은 T카데린(T-cadherin) 또는 H카데린(H-cadherin, Heart-

cadherin)으로도 불리우는 세포 접착 분자(cell adhesion molecule)를 의미한다. 상기 CDH13은 다른 카데린과 달리 세포 간 도메인(intercellular domain)이 없으며, 이러한 구조상의 차이로 인하여 세포 부착보다 세포와 외부환경 간의 상호 관계를 조절하는 기능을 한다. 상기 CDH13은 심장, 대동맥 벽, 뇌 피질 및 척수의 뉴런 및 비장의 모세혈관에서 높게 발현되며, 혈관 기능 및 혈관 손상 시 재형성에 관여한다.

- [0021] 본 발명자들은 종래 중앙세포에서 소실되어 결합조직 내로 침습 및 전이되는 것을 촉진시킨다고 알려져 있는 CDH13이 방사선 치료로 인하여 노화된 혈관세포에서 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 이의 억제제가 혈관내피세포에 암세포가 부착되는 것을 억제함으로써 암 전이 억제제로 작용함을 확인하였다.
- [0022] 본 발명에 있어서, "CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제"는 생물학적 시료에서 CDH13의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA에 특이적으로 결합하여, 이의 발현을 억제함으로써 암세포가 혈관내피세포에 부착되는 것을 억제할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0023] 상기 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 CDH13에 특이적으로 결합하는 올리고핵타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 애포타머(aptamer)일 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 암 전이 인자인 CDH13에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0025] 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0026] 상기 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 CDH13의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA) 또는 miRNA(microRNA)일 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, "siRNA"는 이중가닥의 RNA가 다이스에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상, mRNA에 특이적으로 결합하여 상기 유전자의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에서, CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하기 위한 제제로서 siRNA인 5'-GUAUUCUGAGCAUGUAA-3'(서열번호 1)을 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명에 있어서, "shRNA"는, 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서 타겟유전자 siRNA 염기서열의 sense와 상보적인 nonsense 사이에 3-10 개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀(hairpin) 구조의 shRNA (short hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 Dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타내는 것을 의미한다. shRNA(small hairpin RNA)를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당분야에서 공지된 방법으로 제조할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서 "miRNA(microRNA)"는, mRNA의 3' 비번역 영역(UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 억제자

역할을 하는 대략 22 nt의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, “암”은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 본 명세서에서 상기 암은 악성 종양(malignant tumor) 또는 악성 복수(malignant ascites)와 동일한 의미로도 사용된다.

[0033] 본 발명의 일 구체 예에서는, 상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상이며, 이에 한정되는 것은 아니나, 가장 바람직하게는 유방암, 폐암, 대장암 및 직장암으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상이다.

[0034] 본 발명에 있어서, “전이(metastasis)”는 암세포가 하나의 장기 혹은 그 부분에서 다른 장기나 장기 주변부로 퍼지는 것을 의미한다. 상기 전이는 암세포들은 1차 암으로부터 빠져 나와서 혈관계로 침투하여 혈관을 순환하고, 혈관에 부착하여 신체의 다른 부위의 정상 조직에서 성장하는 과정을 통해 이루어진다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서, 암 전이는 암세포가 혈관내피세포에 부착되는 것이며, 바람직하게는 암세포가 방사선 이 조사된 혈관내피세포에 부착되는 것이다.

[0037] 본 발명의 **암 전이 억제용 약학적 조성물**은 약학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.

[0041] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요 기간, 질환의 위중도 등을 고려하여 결정하며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물은 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제와 함께 암에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 암의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 **항암보조제 조성물**은 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 형태일 수 있으며, 보다 구체적으로는 항암 약학적 보조제 또는 항암 식품보조제일 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, “항암보조제”는 당업계에서 일반적으로 사용되는 암치료제의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 보조제를 사용함으로써 암 치료제 또는 항암치료의 효과를 증진시킬 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, “식품”은 사람이 일상적으로 섭취하는 음식을 통틀어 이르는 말로, 건강기능식품을 포함하는 개념이다.
- [0049] 본 발명의 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 항암보조제로 식품 조성물에 첨가될 수 있으며, 본 발명의 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 본 발명의 항암보조제와 함께 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택 시 고려하는 일반적인 원칙하에 선택될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 암세포가 혈관내피세포에 부착되는 것을 억제함으로써, 우수한 암 전이 억제 효과를 가지고 있다. 따라서 본 발명의 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 제제는 암치료제 및 항암치료의 효율을 높이기 위한 항암 보조용 의약품 또는 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자를 이용한 암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 스크리닝 방법은 (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군에서 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함한다.
- [0053] 상기 (c) 단계에서, 대상 물질이 실험군의 CDH13 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 경우, 이는 암세포가 혈관내피세포에 부착되는 것을 억제시킬 수 있으므로 암 전이 억제제로 선별될 수 있다.
- [0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0057] **실시예 1. 방사선 조사를 통한 혈관내피세포의 노화 확인**
- [0058] 세포노화 연관-베타-갈락토시다아제(Senescent-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 염색법을 통해, 방사선 조사에 따른 혈관내피세포의 특성을 분석하였다. 구체적으로, 인간 탯줄 정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)에 200 내지 300 cGy의 선량률로 114초 조사하여 누적선량이 6Gy가 되도록 방사선을 조사한 후 지름이 60mm인 배양접시에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 배양접시 내의 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 세척된 배양접시에 농도가 3.7%인 포름알데하이드(formaldehyde)가 포함된 세포고정액을 첨가하여 5분 동안 세포를 고정시켰다. 세포고정액을 제거한 후 배양접시에 베타-갈락토시데이즈 염색용액(1mg/ml X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside), 40mM citric acid/sodium phosphate(pH 5.7), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$)를 처리하여 37℃에서 12 내지 16시간 동안 배양하여 염색하였다. 대조군은 방사선을 처리하지 않고 배양한 인간 탯줄 정맥 내피세포이다. 염

색된 베타-갈락토시다아제는 광학현미경을 이용하여 관찰하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0059] 도 1에 나타난 바와 같이, 방사선 조사 시 인간 탯줄 정맥 내피세포에서 세포노화 관련 인자인 베타-갈락토시다아제가 염색된 것을 확인하였다. 또한 베타-갈락토시다아제의 활성을 그래프화 하여 확인한 결과, 방사선을 조사한 세포에서 베타-갈락토시다아제의 활성이 방사선을 조사하지 않은 대조군보다 약 80배 증가된 것을 알 수 있다. 이는 방사선 조사가 혈관내피세포의 노화를 유도한다는 것을 의미한다.

[0061] 실시예 2. 혈관내피세포에 대한 암세포의 부착 억제제를 통한 암 전이 억제 인자 후보 발굴

[0062] 혈관내피세포에 대한 암세포의 부착 억제제를 통한 암 전이 억제 인자를 발굴하기 위하여, 방사선을 조사한 인간 탯줄 정맥 내피세포를 수확하여 mRNA의 발현을 분석하였다. 구체적으로, 인간 탯줄 정맥 내피세포에 6Gy의 방사선을 조사한 후 지름이 60mm인 배양접시에서 배양하였다. 방사선 조사 1일 후 세포를 수확하여 mRNA를 추출하였다. 차세대 시퀀싱(Next Generation Sequencing, NGS)((주)LAS, 김포, 대한민국)을 통해 추출된 mRNA를 분석하였다. 추가적으로, 방사선 조사 3일 후 세포를 수확하여 전술한 방법으로 추출된 mRNA를 분석하였다. 대조군은 방사선을 처리하지 않고 배양한 인간 탯줄 정맥 내피세포이다. 방사선이 조사된 인간 탯줄 정맥 내피세포의 mRNA 분석 결과는 도 2에 나타내었다.

[0063] 도 2에 나타난 바와 같이, 방사선으로 노화가 유도된 인간 탯줄 정맥 내피세포에서 세포 부착 물질인 CDH13의 mRNA 발현은 대조군보다 약 5 내지 8배 증가된 것을 확인하였다. 따라서, 방사선이 조사된 혈관내피세포에서 세포 부착 물질인 CDH13의 발현 증가를 확인하였고, 이를 암 전이 억제 인자 후보로 선정하였다.

[0065] 실시예 3. 암 전이 억제 인자 후보인 CDH13에 대한 억제제 제작

[0066] 암 전이 억제 인자 후보인 CDH13의 억제제를 제작하였다. 구체적으로, 상기 CDH13 억제제는 CDH13의 mRNA 발현을 억제하기 위하여 siRNA의 형태로 설계되었으며, 설계된 CDH13 억제제는 분자량이 6671.9이며, GC 함량이 33.3%이고, 서열번호 1의 염기서열로 표시된다. 설계된 CDH13 억제제는 Predesigned siRNA((주)바이오니아, 대전, 대한민국)에 의뢰하여 제작하였다.

[0068] 실시예 4. CDH13 억제제의 암 전이 억제 효과 확인

[0069] 암 전이(metastasis)는 암세포가 혈관세포를 투과하는 과정(Trans-endothelial migration)과 혈관 내로 이동한 암세포가 혈관 벽에 부착하는 과정(adhesion)이 매우 중요하다. 실시예 3에서 제작된 CDH13 억제제의 암 전이 억제 효과를 확인하기 위하여, 종양-혈관내피세포 부착 분석(Tumor-endothelium adhesion assay)을 수행하였다.

[0070] 구체적으로, 96 웰 플레이트에 인간 탯줄 정맥 내피세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 시딩하여, 세포가 단층(monolayer)이 되도록 준비하였다. 준비된 세포에 실시예 3에서 제작된 CDH13 억제제를 형질감염(transfection)시켜 1일 동안 배양하였다. 배양된 세포에 6Gy의 방사선을 조사하여 1일 동안 배양하였다. 각 웰에 칼세인-AM(Calcein-AM)으로 염색한 암세포를 농도가 1×10^3 cells/well이 되도록 첨가하여 1시간동안 배양하였다. 상기 암세포는 유방암 세포인 MDA-MB-231, 비소세포성 폐암세포인 H460, 대장암 세포인 HCT116 및 직장암 세포인 LoVo를 각각 사용하였다. 배양 종료 후 PBS로 웰을 세척하여 부착되지 않은 암세포를 제거하였으며, 부착된 암세포를 형광현미경으로 관찰하여 CDH13 억제제의 암 전이 억제 효과를 확인하였다. 대조군 1은 실험군과 동일하게 준비하되, 방사선을 조사하지 않았으며 세포분열 억제를 위하여 티미딘(thymidine)을 처리하였다. 또한 대조군 2는 실험군과 동일하게 준비하되, 방사선을 6Gy 조사하였으며 세포분열 억제를 위하여 티미딘(thymidine)을 처리하였다. CDH13 억제제의 암 전이 억제 효과를 확인한 결과는 도 3에 나타내었다.

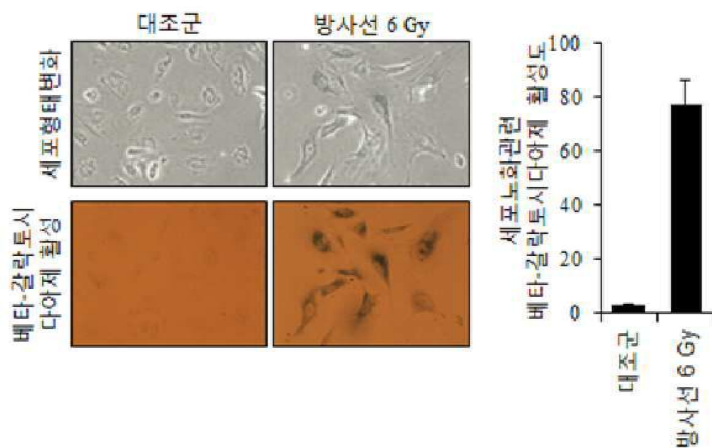
[0071] 도 3에 나타난 바와 같이, 방사선을 조사하지 않은 대조군 1보다 방사선을 조사한 대조군 2에서 암세포인 MDA-MB-231, H460, HCT116 및 LoVo의 부착이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 방사선을 조사한 인간 탯줄 정맥 내피세포에 CDH13 억제제를 처리한 결과, 암세포인 MDA-MB-231, H460, HCT116 및 LoVo의 부착이 억제된 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 CDH13 억제제가 암세포가 방사선이 조사된 혈관내피세포에 부착하는 것을 억제하므로, 방사선 치료로 인해 노화된 혈관내피세포에서 증가하는 암 전이를 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

- [0073] 종합적으로 본 발명자들은 방사선 조사에 따른 혈관내피세포의 mRNA를 분석하여 암 전이 인자인 CDH13를 발굴하고, 이로부터 CDH13 억제제를 개발하였으며, 상기 CDH13 억제제가 방사선으로 인해 노화된 혈관내피세포에 암세포가 부착되는 것을 억제하는 효과를 가지고 있음을 확인하였다. 이는 CDH13 억제제가 방사선 치료로 인한 암 전이를 억제한다는 것을 의미하는바, 본 발명의 CDH13 억제제는 항암 보조제 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.
- [0075] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.
- [0077] **제제예 1. 약학적 조성물의 제조**
- [0078] **1-1. 산제의 제조**
- [0079] CDH13 억제제 20 mg
- [0080] 유당 100 mg
- [0081] 탈크 10 mg
- [0082] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0084] **1-2. 정제의 제조**
- [0085] CDH13 억제제 10 mg
- [0086] 옥수수전분 100 mg
- [0087] 유당 100 mg
- [0088] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0089] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0091] **1-3. 캡슐제의 제조**
- [0092] CDH13 억제제 10 mg
- [0093] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0094] 락토오스 14.8 mg
- [0095] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [0096] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0098] **1-4. 주사제의 제조**
- [0099] CDH13 억제제 10 mg
- [0100] 만니톨 180 mg
- [0101] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0102] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0103] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

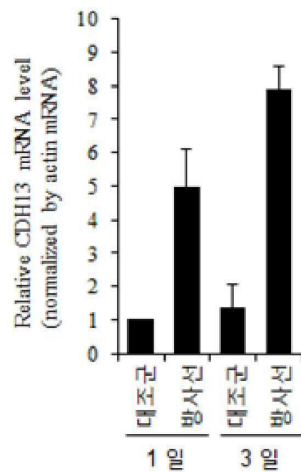
- [0105] 1-5. 액제의 제조
- [0106] CDH13 억제제 20 mg
- [0107] 이성화당 10 g
- [0108] 만니톨 5 g
- [0109] 정제수 적량
- [0110] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0112] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

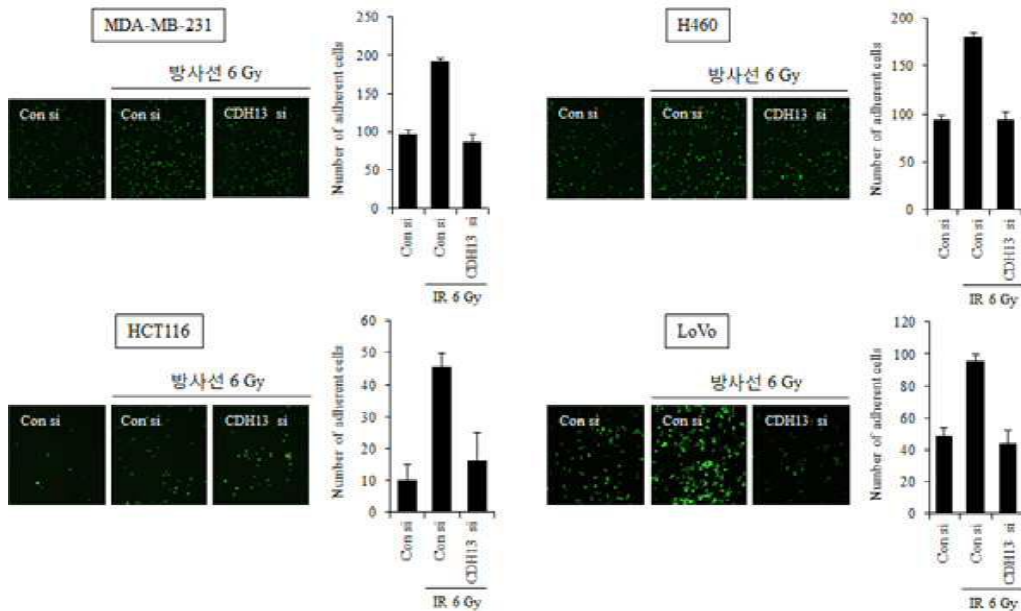
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Composition for suppressing cancer metastasis comprising suppressor of CDH13 or gene encoding the same
- <130> 1-265P
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDH13 siRNA

<400> 1

guauucugug agcauguaa

19