



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0032989

(43) 공개일자 2016년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0123869

(22) 출원일자 2014년09월17일

심사청구일자 2014년09월17일

(71) 출원인

포항공과대학교 산학협력단

경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

반창일

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 7동 302호 (지곡동, 교수아파트)

서재홍

경기도 과천시 관문로 166, 1018동 303호 (중앙동, 주공아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

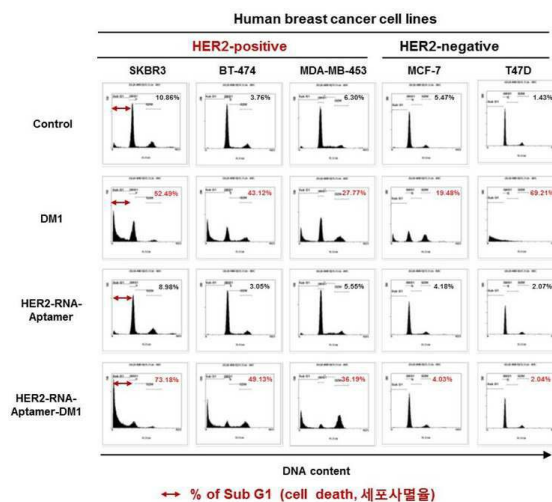
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 HER-2 표적화 압타머 복합체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 HER-2 (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2) 표적화 압타머 복합체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 압타머 복합체를 이용하여 HER-2-positive 유방암 세포주에 대한 특이적인 세포 내 유입(cellular internalization) 및 사멸 효과를 확인하였는바, 유방암의 치료에 있어서, 보다 근본적으로 접근하여 타겟 치료를 할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

김지영

서울특별시 구로구 가마산로20라길 28-8 (구로동)

조현호

부산광역시 사하구 하신중앙로 2, 113동 1402호(장림동, 동원로얄듀크아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C1852020013

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 고려대학교산학협력단

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 압타머 발굴과 유방암 진단 및 치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 포항공과대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 압타머(Aptamer) 및 항암 물질이 결합된 압타머 복합체.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 압타머는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 복합체.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 항암 물질은 maytansine인 것을 특징으로 하는, 복합체.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 복합체는 압타머 및 항암 물질을 1:500~1500의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 복합체.

청구항 5

제 1항의 압타머 복합체를 포함하는 유방암 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 조성물은 HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 HER-2 (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2) 압타머 표적화 복합체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 HER-2를 표적화하는 압타머(Aptamer) 및 항암물질인 maytansine이 결합된 유방암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

국내 유방암의 조 발생률은 1990년대 여성암중 4-5번째의 암종이었으나, 2001년 이후 대부분 환자가 완치되고 예후가 좋은 감상선암을 제외하고는 가장 수위의 암으로 알려져 있다. 예컨대, 국내 여성암 환자에서 암종의 연령표준화 발생률을 보면 초음파 등 진단기기의 보급으로 인하여 급격하게 늘고 있는 감상선암을 제외하고는 유

방암의 발생률이 가장 급격하게 증가하고 있음을 확인할 수 있다. 따라서, 이 같은 유방암의 정확한 진단 및 치료법 개발은 필수불가결하며, 현재도 관련 연구가 활발히 진행 중에 있다.

[0003]

한편, 현재까지 악성종양인 암을 치료하는 방법으로 주로 3가지 치료법 즉, 외과적인 수술, 방사선 치료 및 화학요법이 있으며, 이 중 한 가지 또는 이들의 조합을 통해 암을 치료하고 있다. 구체적으로, 외과적 수술은 질병 조직을 대부분 제거하는 방법으로, 이러한 외과적 수술은 특정 부위, 예를 들면 유방, 결장 및 피부에 위치한 종양을 제거하는 데는 매우 효과적이지만, 척추와 같은 일부 부위에 있는 종양을 치료하거나 분산성 종양을 치료하기에는 부적절하다. 또한, 방사선 치료는 급성염증성 질환, 양성 또는 악성 종양, 내분비기능장애 및 알레르기성 질환 등에 사용되며, 일반적으로 급속히 분열하는 세포로 구성된 악성종양에 효과적으로 사용되고 있다. 이러한 방사선 치료의 단점으로는 방사선의 치료에 따라 정상조직의 기능 약화 또는 상실, 치료 후 치료부위에 피부질환이 발생할 우려가 있으며, 특히 장기의 발육이 진행되는 소아의 경우 지능발달 지연 또는 골 발육장애 등 심각한 부작용을 초래할 수 있다. 아울러, 화학요법은 암세포의 복제 또는 대사를 교란시킴으로써 유방, 폐 및 정소의 암을 치료하는데 널리 이용되고 있는데, 이러한 방법에 있어서 가장 큰 단점은 암 치료에 이용되는 전신성 화학요법에 의하여 유도되는 부작용이다. 화학요법에 의한 부작용은 환자의 생명에 중요한 영향을 미치며 치료에 대한 환자의 불안감을 증가시킬 수 있다. 또한, 화학치료제와 관련된 부작용으로는 일반적으로 이러한 약물의 투여 시 주의해야 하는 용량 제한 독성(dose limiting toxicity, DLT)이 있다. 예를 들면, 점막염은 여러 항암제(항대사물질 세포독소제인 5-플루오로우라실, 메소트렉세이트 및 항종양 항생제인 독소루비신) 등에 대한 용량 제한 독성(DLT)이 있다. 이러한 화학 요법의 부작용 중 대부분은 심한 경우, 입원을 요하거나 통증을 치료하기 위하여 진통제를 필요로 하기도 한다. 이처럼, 화학치료제 및 방사선 치료에 의한 부작용들은 암 환자의 치료에 있어서 중요한 문제로 부각되고 있다.

[0004]

한편, HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)는 1987년 Dr. Slamon이 Science지에 발표한 것으로서, HER-2 유전자가 과발현된 유방암환자가 정상인 환자에 비하여 무병생존기간이 짧고 재발율이 높다는 점이 보고된 이후, HER-2는 유방암의 대표적인 바이오마커로 자리매김하였다. 아울러, 상기와 같은 종래 치료방법의 부작용을 해소하기 위한 방편으로서, 암의 증식과 관련된 신호전달체계를 공격하거나, 신생 혈관을 억제해 암을 굶겨 죽이는 표적치료제에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다. 이에, HER-2 수용체를 표적으로 하는 유방암의 치료에 대한 연구가 이루어지고 있으나(한국 특허공개번호 10-2013-0091750), 아직은 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 HER-2 aptamer-DM1 복합체의 HER-2-positive 유방암 세포주에 대한 특이적인 세포 독성효과를 확인하고 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006]

이에, 본 발명의 목적은 HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 aptamer(Aptamer) 및 항암 물질이 결합된 aptamer 복합체를 제공하는 것이다.

[0007]

또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 aptamer 복합체를 포함하는 유방암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008]

그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009]

상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 aptamer(Aptamer) 및 항암 물질이 결합된 aptamer 복합체를 제공한다.

[0010]

본 발명의 일 구현예로서, 상기 aptamer는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0011]

본 발명의 다른 구현예로서, 상기 항암 물질은 maytansine일 수 있다.

[0012]

본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 복합체는 aptamer 및 항암 물질을 1:500~1500의 중량비로 포함할 수 있다.

[0013]

본 발명은 상기 aptamer 복합체를 포함하는 유방암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

- [0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)를 표적으로 하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 유방암의 치료방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 HER-2 특이적 압타머 복합체를 포함하는 조성물의 유방암의 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 조성물은 HER-2(tyrosine-protein kinase erbB-2) 특이적 압타머 복합체를 유효성분으로 포함하며, 상기 복합체의 HER-2-positive 유방암 세포주에 대한 특이적인 세포 내 유입 및 사멸 효과를 확인하였는 바, 모든 정상세포에서도 세포독성을 유도하여 부작용을 일으킬 수 있는 종래의 치료제와 달리, HER-2 수용체가 발현되어 있는 암세포에 대해서만 특이적으로 작용하여 부작용을 최소화시킬 수 있는 유방암 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 HER-2 압타머의 chromatogram을 실시한 결과이다.
- 도 2는 HER-2 압타머-DM1(maytansine) 복합체의 chromatogram을 실시한 결과이다.
- 도 3은 SKBR3, BT474, MDA-MB-453, MCF7, T47D, 및 MDA-MB-231 유방암 세포주에서 HER-2의 발현여부를 확인한 결과이다.
- 도 4는 세포골격 단백질인 tubulin을 면역형광염색하여 방추사 형성여부를 공초점 레이저 현미경 (confocal microscopy analysis)을 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 5는 HER-2 수용체 단백질을 표지하는 항체를 통하여 HER-2의 세포내 유입 (cellular internalization) 여부를 면역형광염색법을 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 6은 HER-2-positive (SKBR3, BT474, MDA-MB-453) 및 HER-2-negative (MCF-7, T47D) 유방암 세포주에서 세포의 독성여부를 위상차 현미경 (phase contrast microscopy)을 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 7은 HER-2-positive (SKBR3, BT474, MDA-MB-453) 및 HER-2-negative (MCF-7, T47D) 유방암 세포주에서 DM1 단독 처리, 압타머 단독처리, 및 DM1- 압타머 복합체 처리에 따른 암세포의 사멸정도를 DNA 함량분석을 통하여 확인한 결과이다.
- 도 8은 HER-2-positive (SKBR3, BT474, MDA-MB-453) 및 HER-2-negative (MCF-7, T47D) 유방암 세포주에서 HER-2 단백질의 발현 정도와 tubulin의 합성 억제 및 세포사멸 관련 인자들의 활성화를 Western Blotting을 통하여 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명자들은 HER-2 압타머-약물 복합체의 HER-2-positive 유방암 세포주에 대한 세포 내 유입 및 세포분열 정지(mitotic arrest) 효과를 확인하였다. 또한, HER2-positive 유방암 세포주(SKBR3, BT-474, MDA-MB-453)에 대한 특이적인 세포 사멸효과를 확인하고 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명은 HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 압타머(Aptamer) 및 항암 물질이 결합된 압타머 복합체를 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "압타머"란 특정 물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA(ssDNA) 또는 RNA이다. 기존에 개발되어 있는 항체를 이용한 방법은 생체의 면역시스템을 이용하여 만들어지기 때문에 비교적 많은 시간이 들고 고비용이라는 점, 단백질이기 때문에 그 안정성이 문제가 되는 경우가 있는 반면, 압타머는 합성에 있어서, 비교적 단순한 방법으로 가능하고 세포, 단백질 그리고 작은 유기물질까지도 표적물질이 될 수 있기 때문에 이를 이용한 새로운 검출방법들의 개발이 가능하며 그 특이성 및 안정성이 이미 개발되어 있

는 항체에 비해 매우 높은 점에서 착안하여, 본 발명에서는 상기 복합체는 HER-2-positive 유방암 세포주만의 특이적인 작용을 유도하기 위해 HER-2 압타머를 이용하였다. 상기 압타머는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어 질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "항암 물질"이란 압타머와 결합하여 항암활성을 가지는 물질로서, 바람직하게는 유방암세포에 작용하는 물질일 수 있으며, 사용될 수 있는 항암물질로서 바람직하게는 maytansine일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0024] 항암물질인 Maytansine(DM1)은 세포 분열시기인 G2/M기에 방추사를 형성하는 tubulin 단백질에 결합 및 이를 억제하여 염색체의 배열을 저해함으로써 비정상적 방추사의 형성을 유도하여 세포분열을 막고 암세포를 사멸로 이르게 하는 기능을 가진 약물이다. 다만, 일반적으로 상용화되고 있는 Doxorubicin이나 Taxol계의 항암물질처럼 DM1은 유방암뿐만 아니라 모든 정상세포에서도 세포독성을 유도하여 부작용을 일으킬 수 있는바, 이러한 점을 개선하기 위하여 HER-2를 표적화하는 압타머에 DM1을 접목하여 높은 효율로 유방암세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있는 압타머 복합체를 고안하였으며, 상기 복합체를 구성하는 HER-2 특이적 압타머 및 항암 물질은 바람직하게는 1:500의 중량비일 수 있고, 보다 바람직하게는 1:1500의 중량비일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1:1000일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에서는 HER-2 압타머-약물 복합체를 제조 및 정제 하여(실시예 1 및 2 참조) HER-2-positive 유방암 세포주에 대한 세포 내 유입 및 세포분열 정제효과 (실시예 4 참조)를 확인하였으며, HER-2 압타머-약물 복합체의 HER-2-positive 유방암 세포주(SKBR3, BT-474, MDA-MB-453)에 대한 특이적인 세포 사멸효과를 확인하였는바, HER-2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)를 표적으로 하는 유방암 치료용 약학적 조성물로 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다(실시예 5 내지 7 참조).

[0026] 따라서, 본 발명은 압타머 복합체를 포함하는 유방암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 유방암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 본 발명에 따른 치료의 대상인 유방암은 유방에 생긴 암 세포로 이루어진 종괴로서, 일반적으로 유방암은 유방의 유관과 소엽에서 발생한 암을 의미한다. 유방암의 기본적 치료는 병변의 외과적 절제이며, 다른 장기에 전이가 없는 한, 모든 환자는 외과적 절제가 필요하다. 이와 더불어, 보조요법으로서, 항암 화학요법, 방사선 치료, 항호르몬 치료등이 요구되며, 본 발명의 조성물은 분자 표적 치료의 일환으로서, HER-2를 표적으로 하여 부작용이 개선된 유방암 치료제를 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래 의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0032] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150mg, 바람직하게는 0.01 내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있

다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 유방암 치료방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0035] 실시예 1. HER-2 애타머의 제조

[0036] HER-2에 특이적으로 결합하는 애타머 서열 5'-GGGAGGACGAUGCGGGACUGUACGGGGCUCUGCAGACGACUGCCCGA-3' (서열번호 1) 끝에 thiol을 도입하여 프로브를 제작하였다. 2' O-methyl modification을 통해 애타머의 안정성을 높였으며, 합성한 애타머는 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer에서 1.0 M Dithiothreitol (DTT) 10 μ L와 상온에서 15분 동안 반응시킴으로써, 3' thiol의 activation을 실시하였다. 또한 과량의 DTT를 제거하기 위하여 ethyl acetate를 이용하여 3회 이상 추출을 실시하였다.

[0037] 실시예 2. HER-2 애타머-약물 복합체의 제조 및 정제

[0038] Maytansine (DM1)은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 10 mM stock으로 제조하였다. HER-2 애타머와 DM1의 복합체 형성은 50% DMSO와 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 포함하는 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 내에서 이루어졌으며, 애타머와 약물의 비율은 1:1000으로 하여 상온에서 48 시간 반응시켰다. Gently shaking을 통해서 mild한 조건으로 복합체를 형성하였다.

[0039] 애타머-DM1 복합체의 정제는 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 통하여 진행하였다. Eclipse XDB-C18 column을 이용하여 분리를 진행하였고, binding buffer (95% 0.1 M TEAA, 5% Acetonitrile)와 elution buffer (50% 0.1 M TEAA, 50% Acetonitrile)의 gradient를 통해 복합체를 분리하였다. 애타머 및 애타머-DM1 복합체의 HPLC를 실시하였으며, HPLC의 피크들은 mass spectroscopy 방법을 통해서 분석하였고, 그 중에서 HER-2 애타머-DM1의 분자량과 일치하는 피크들만 취하였다. 또한 실험에의 사용을 위하여 동결건조를 실시하였다.

[0040] 실시예 3. 각 유방암 세포주별 HER-2 발현여부 확인

[0041] 세포형광면역염색 (immunocytochemistry) 기법을 통하여 HER-2가 발현되는 유방암 세포주를 확인하였다. 세포의 핵을 나타내는 표지 인자로서, DAPI (4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)를 이용하였다.

[0042] 도 3에 나타난 바와 같이, HER-2 수용체의 발현이 HER-2-positive breast cancer 세포주들 (SKBR3, BT474 및 MDA-MB-453)의 세포막에 높게 발현됨을 확인하였다. 반면에 Luminal 타입의 MCF7 및 T47D 유방암 세포주와 Basal 타입의 MDA-MB-231 세포주에서는 HER-2 단백질이 거의 발현되지 않았음을 확인하였다.

[0043] 실시예 4. DM1의 효능 및 HER-2 애타머-DM1 복합체의 세포 내 유입의 확인

[0044] DM1이 유도하는 비정상적 방추사 형성을 증명하기 위하여 세포골격 단백질인 tubulin을 면역형광염색하여 공초점 레이저 현미경 (confocal microscopy analysis)을 통하여 관찰하였으며, 모든 약물은 동일한 100 nM의 농도로 48시간 동안 HER-2-positive BT474 유방암 세포주에 처리하였다. 또한, HER-2 애타머-DM1 복합체의 세포내부 유입을 증명하기 위하여 HER-2 수용체 단백질을 표지하는 항체를 이용하여, 면역형광염색법을 수행한 뒤 HER-2의 세포내 유입 (cellular internalization)을 확인하였다.

- [0045] 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, 대조군 (DMSO control)과 HER-2 애타머 단독 처리군에서는 세포분열기 (M기, mitotic phase)에서 정상적인 방추사의 배열 형태가 관찰되었으나 DM1 (d-f)과 HER-2 애타머-DM1 복합체 (j-l) 처리군에서는 비정상적인 방추사의 배열 형태를 나타내었다. 또한, DAPI에 의한 핵염색 결과에서는 암세포의 DNA 복제 이후, M기에서 염색체들이 비정상적으로 배열됨을 확인하였다(d, j). 또한, 대조군과 DM1 처리군에서는 HER-2 수용체가 세포막에 발현되는 것으로 관찰되었으나 (m-o 및 p-r), HER-2 애타머 및 HER-2 애타머-DM1 복합체 처리군에서는 HER-2가 세포막에서 세포내부로 유입된 것이 관찰되었다(u, x). 특히 HER-2 애타머-DM1 복합체 처리군에서 주목할 점은, HER-2가 세포내로 유입이 확인된 세포에서만 염색체의 비정상적 배열과 mitotic arrest 현상이 관찰되었다는 것이다.
- [0046] 상기 결과는 세포내로 들어간 DM1이 tubulin에 결합하여, 정상적인 세포 분열을 방해하여 세포분열 정체 (mitotic arrest)를 유도함을 의미한다.
- [0047] **실시에 5. 애타머-DM1 복합체의 선택성 및 독성 확인**
- [0048] HER-2 애타머-DM1 복합체가 유도하는 세포독성이 HER-2-positive 유방암 세포들에만 특이적으로 반응하는지를 조사하기 위하여, HER-2가 과다발현 되어있는 유방암 세포주들 (SKBR3, BT-474, MDA-MB-453)과 HER-2 negative 유방암 세포주들 (MCF-7, T47D)에서 각각 대조군, DM1, HER-2 애타머, 및 HER-2 애타머-DM1 복합체를 각각 10 nM의 농도로 72 시간 동안 처리한 후, 세포의 독성여부를 위상차 현미경 (phase contrast microscopy)을 이용하여 세포의 형태 변화를 관찰하였다.
- [0049] 도 6에 나타난 바와 같이, DM1 단독 처리군에서 대조군과 비교하여, HER-2-positive 및 HER-2-negative 유방암 세포주들에 대하여 세포질이 수축하는 형태 변화가 관찰되었으며, 세포독성으로 인하여 일부의 세포가 부유한 상태로 관찰되었다. HER-2 애타머-DM1 복합체를 처리한 HER-2-positive 유방암 세포주인 SKBR3, BT474 및 MDA-MB-453 세포에서는 DM1 및 HER-2 애타머 단독 처리군 보다 현저히 높은 세포독성을 나타내는 것을 세포형태 변화와 부유 정도를 통해 확인할 수 있었으나, HER-2-negative MCF7 및 T47D 세포에서는 애타머-DM1 복합체에 의한 세포독성이 전혀 나타나지 않았다.
- [0050] 상기 결과는 애타머-DM1 복합체는 HER-2-positive 유방암 세포주에서만 특이적으로 반응하며, DM1 단독 처리군 보다 높은 세포 독성을 유도함을 나타낸다.
- [0051] **실시에 6. HER-2 애타머-DM1 복합체 독성의 정량적 측정**
- [0052] 실시예 5에서 확인한 세포 독성을 명확하게 증명하기 위하여, 유세포 측정기 (Flow cytometry)를 이용하여 각각의 약물이 유도하는 암세포의 사멸정도를 DNA 함량분석을 통하여 측정하였다. 일반적으로 세포주기 (cell cycle)는 세포내 DNA의 함량에 따라 G1 (세포성장기)-S (세포복제기)-G2/M (세포분열기)로 나뉘어진다. 세포사멸이 유도되면, DNA의 절편현상 (DNA fragmentation)을 동반하여, 더 이상 DNA 복제 및 분열이 불가능해지며, DNA의 함량이 G1기보다 현저히 적어지게 된다. 이러한 세포사멸의 결과는 Sub G1 부위로써 세포 주기상에 나타나게 된다.
- [0053] 도 7에 나타난 바와 같이, DM1 (10 nM) 단독 처리군에서 72 시간 동안 HER-2-positive 및 HER-2-negative 유방암 세포주들에 대하여 세포사멸이 유도되는 것이 관찰되었다(유방암 세포사멸율; (Sub G1, cell death), SKBR3; 52%, BT474; 43%, MDA-MB-453; 27%, MCF7; 19%, T47D: 69%). 특히, HER-2-positive 유방암 세포에서 HER-2 애타머-DM1 복합체 처리군은 DM1 단독 처리군보다 훨씬 효과적으로 암세포사멸을 증대시키는 결과를 확인하였다 (HER-2-positive 유방암 세포의 사멸율; (Sub G1, cell death), SKBR3; 73%, BT-474; 49%, MDA-MB-453; 36%). 이러한 애타머-약물전달체의 세포사멸 증폭효과는 애타머가 유도하는 HER-2의 세포내 유입에 따른 분해작용과 함께, 세포내로 유입된 DM1에 의하여 세포사멸이 촉진된 결과이다. 또한, HER-2-negative 유방암 세포에서는 DM1 단독 처리군에서 세포사멸 (Sub G1, MCF7; 19%, T47D: 69%)이 강하게 유도되었음에도 불구하고, 애타머-DM1 복합체에 의해서는 세포사멸이 전혀 일어나지 않았다.
- [0054] 이를 통하여 HER-2-애타머 DM1 복합체는 HER-2-positive 유방암 세포의 HER-2를 인식하며, 내포작용 (Endocytosis)을 통하여 DM1이 세포 내부로 유입되어 강력한 독성작용과 함께 암세포사멸을 유도함을 검증하였다.

[0055] 실시예 7. HER-2 애타머-DM1 복합체의 세포 사멸 기작 확인

[0056] HER-2 애타머-DM1 복합체가 HER-2가 과다 발현된 유방암 세포에 미치는 세포 사멸 기작을 증명하기 위하여, HER-2 단백질의 발현 정도와 tubulin의 합성 억제 및 세포사멸 관련 인자들의 활성화를, Western Blotting 기법을 통하여 조사하였다.

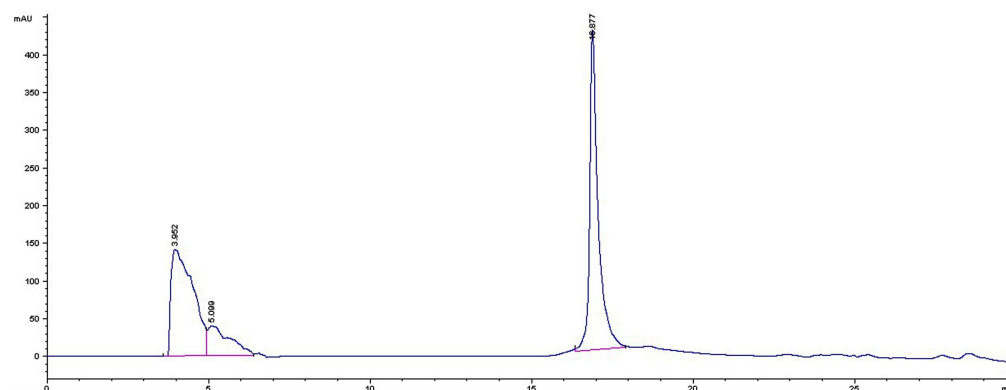
[0057] 도 8에 나타난 바와 같이, HER-2-positive 유방암 세포에서, HER-2 애타머-DM1 복합체 처리군은 DM1 또는 HER-2 애타머 단독 처리군에 비해 훨씬 더 HER-2의 분해를 촉진하였으며, tubulin의 합성도 애타머-약물전달체에 의해 더 효율적으로 억제된 것을 확인하였다. 세포사멸을 유도하는 대표적인 인자인 caspase-3의 활성화 형태인 cleaved caspase-3의 양은 DM1보다 HER-2 애타머-DM1 복합체에 의해 더욱 증가되었으며, DNA 회복 인자인 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase)는 HER-2 애타머-DM1 복합체에 의해 분절화 (cleavage)된 형태가 증가되었다. 또한, MCF7은 caspase-3 유전자가 결핍되어 있는 HER-2-negative 유방암 세포주으로써 DM1의 효과를 Caspase-7의 활성화 형태인 cleaved-caspase-7로 대체하여 조사하였으며, DM1 단독 처리군에서만 caspase-7의 활성화가 관찰 되었고, 애타머-DM1 복합체에 의해서는 유도되지 않았다. 아울러, 유방암세포의 증식에 가장 중요한 인자인 cyclin D 의 발현은 모든 유방암 세포주에서 DM1에 의해 억제되었으나, 애타머-DM1에 의해서는 오직 HER-2-positive 유방암 세포주에서만 cyclin D의 발현이 현저히 억제되었다.

[0058] 상기 결과는 DM1 단독 처리군은 모든 유방암 세포주에 독성 반응을 나타내었으나, 애타머-DM1은 오직 HER-2가 과다 발현된 유방암 세포에서만 HER-2 수용체를 인지하여 세포내로 유입된 후, 유리된 DM1이 암세포사멸을 유도 한다는 것을 다시 한번 확인하였다.

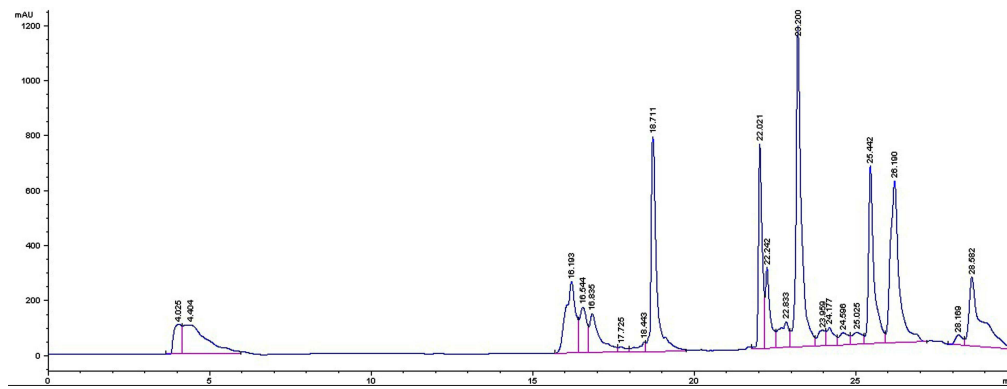
[0059] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

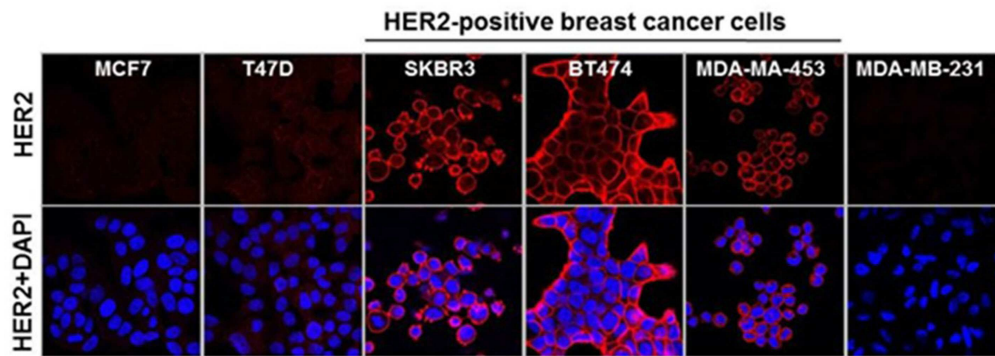
도면1



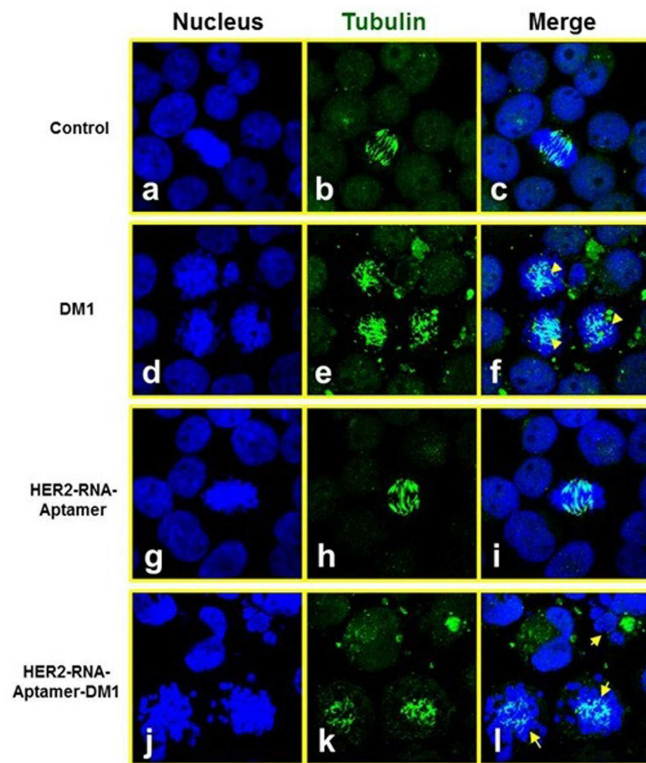
도면2



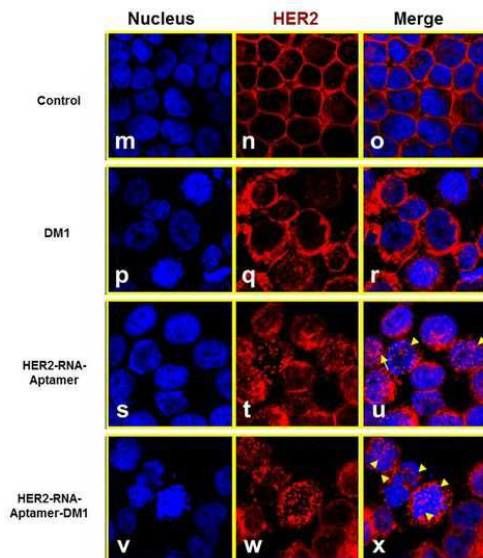
도면3



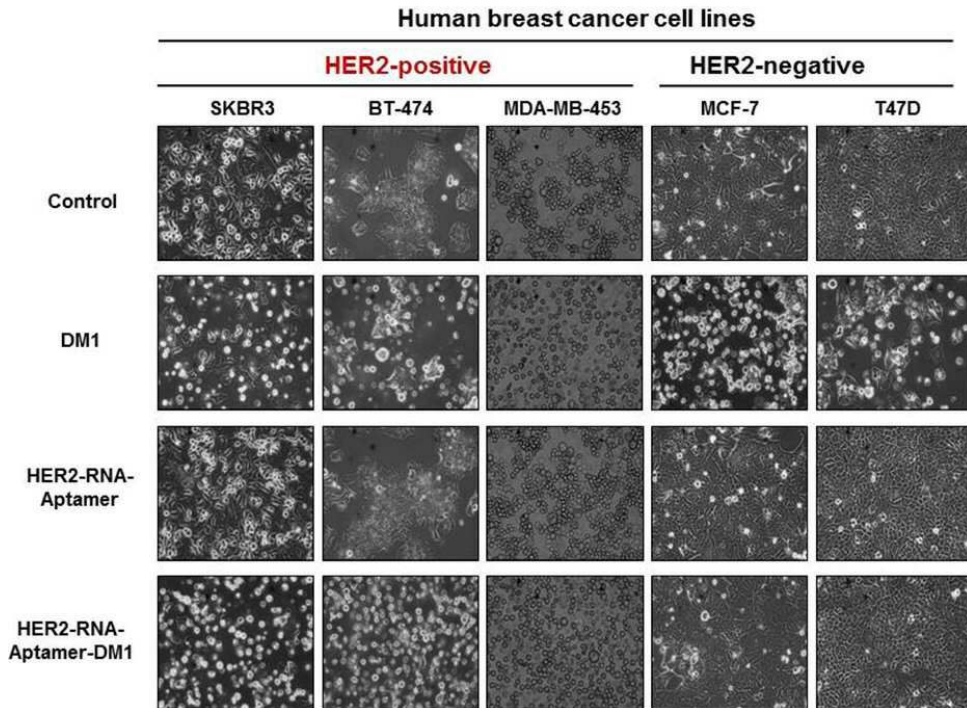
도면4



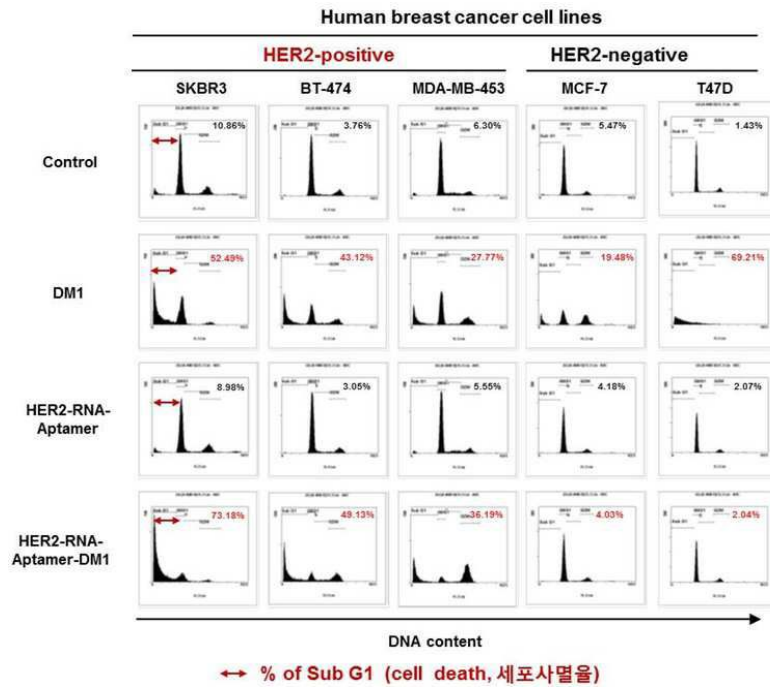
도면5



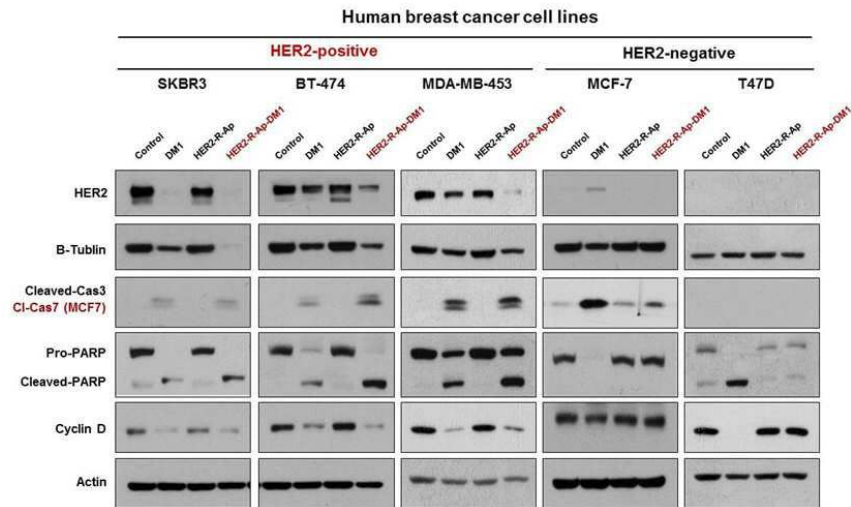
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION
Korea University Research and Business Foundation
- <120> HER-2 targeted aptamer complex and use thereof
- <130> P2014182-01-KR_PB14-12166
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 50
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> HER-2 aptamer
- <400> 1

gggaggacga ugcgggacug uacggggcuc ugugcagacg acucgcccgga

50