



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0115826
(43) 공개일자 2017년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/5008 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0043521

(22) 출원일자 2016년04월08일

심사청구일자 2016년04월08일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태우

서울특별시 서초구 잠원로 136, 345동 203호 (잠원동, 신반포25차아파트)

송권호

경기도 수원시 권선구 덕영대로1217번길 24, 106동 903호 (권선동, 두산동아아파트)

이효정

대구광역시 북구 침산남로 215, 101동 2204호 (침산동, 강변일성트루엘아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

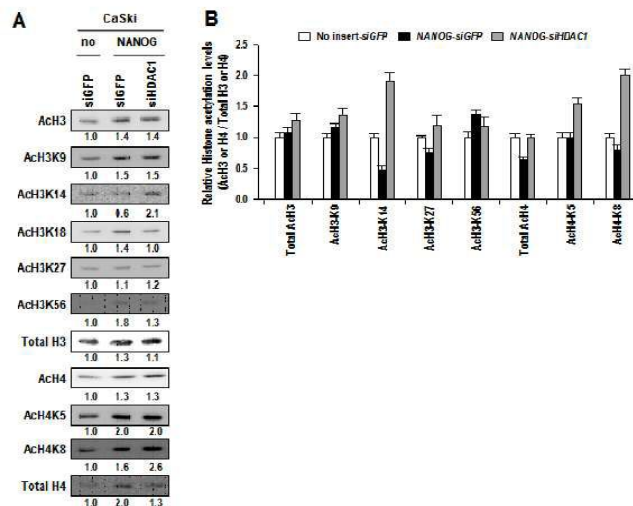
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 HDAC1 및 AcH3K14 또는 AcH3K27를 바이오마커로 이용한 NANOG 매개 복합내성암 치료제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법 및 진단용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 HDAC1-AcH3K14/AcH3K27 분자축을 표적화하여 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단하고 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 병리적 마커로서의 새로운 NANOG-HDAC1-AcH3K14/AcH3K27 분자축을 이용한 항암제 또는 항암면역 내성암 치료제의 스크리닝 방법 및 진단용 조성물은 항암제 또는 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암을 보다 정확하고 신속하게 진단하고 치료제를 개발하는데 매우 유용하다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/5023 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C12Q 2525/205 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013M3A9D3045881
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업>바이오-의료기술개발사업>면역기전제어기술개발
연구과제명	면역내성관련 인자들에 대한 다차원 기전 분석을 통한 내성 극복 기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교
연구기간	2013.08.01 ~ 2018.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2014R1A2A1A10054205
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업>중견연구자지원사업>도약연구지원사업>도약연구지원사업(전략)
연구과제명	NANOG 상위조절자의 작용 기전 이해를 통한 난치성 재발 암의 면역내성 극복 기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교
연구기간	2014.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법:

- (a) HDAC1을 발현하는 세포주에 내성암 치료제 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 후보물질이 처리된 세포주의 HDAC1 단백질 발현량과 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질 발현량을 측정하는 단계; 및
- (c) 후보물질 미처리 세포주와 비교하여 HDAC1 단백질 발현량은 감소하고, Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질 발현량이 증가하는 경우의 후보물질을 NANOG 의존적 내성암 치료제로 선별하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포주는 CaSki-HDAC1인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 4

HDAC1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머; 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트.

청구항 5

HDAC1 유전자와 엄격한 조건에서 혼성할 수 있는 프로브를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암 진단용 키트.

청구항 8

HDAC1 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 및 19로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 센스 및 서열번호 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 및 20으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 안티센스를 포함하는 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암 진단용 조성물.

청구항 11

HDAC1의 발현 또는 활성 억제제; 및 Ach3K14 또는 Ach3K27의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 HDAC1의 발현 또는 활성 억제제는 HDAC1 유전자에 대한 siRNA 또는 HDAC1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 HDAC1 유전자에 대한 siRNA는 서열번호 21, 23, 25, 27 및 29로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 센스 및 서열번호 22, 24, 26, 28 및 30으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 안티센스를 포함하는 siRNA인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법 및 진단용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 HDAC1-Ach3K14/Ach3K27 분자축을 표적화하여 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단하고 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암의 치료를 위해서는 외과적 수술, 방사선 치료법, 항암제 치료법 및 면역 치료법 등이 있으나, 이러한 많은 치료법에도 불구하고 임상적 치료효능이 낮은 이유는 재발암의 발생 때문이다. 임상적 난제인 재발암의 주요 원인은 항암 치료에 대한 암세포의 내성 획득과 관련이 있으므로, 효과적인 암 치료를 위해서는 항암 치료법에 대한 암세포의 내성 극복에 대한 연구가 필요하다. 내성 극복에 대한 연구는 내성 관련 유전자 또는 분자축의 규

명 및 규명된 유전자 또는 분자축을 이용하여 진단 및 표적화하는 암치료법이 연구되어야 한다.

[0004] 히스톤 탈아세틸화효소 (Histone deacetylases, HDACs)는 히스톤 단백질을 비롯하여 다양한 단백질의 아세틸화된 라이신 (Lysine) 잔기의 탈아세틸화 (deacetylation)에 관여함으로써, 염색질의 구조와 기능 조절을 통한 유전자 발현 조절뿐 아니라, 세포내 신호전달 과정에서 중요한 역할을 담당한다. 이러한 HDAC는 클래스 I, IIA, IIB, III 및 IV로 나뉘며 현재까지 19여 종이 알려져 있다. 현재까지 HDAC을 표적화하는 저해제들이 다수 개발되어 있으며, 다양한 고형암 및 혈액암에 대한 항암제로서 연구되고 있다. 하지만, HDAC 표적화가 항암 치료제 개발에 있어 좋은 전략이 될 수 있음에도 불구하고 특정 아형에 특이적이지 않는 광범위 HDAC 저해제를 항암치료에 사용시, 치료효능이 낮을 뿐 아니라 내성암의 출현과 같은 부작용이 유발되기 때문에 내성암 치료에 직접 적용하기에 제한점이 많다. 따라서 내성암 치료에 있어 HDAC 저해제들의 임상적용 확립을 위해서는 내성확득에 대한 HDAC 특정 아형의 개별적 역할과 조절기전을 명확히 밝히는 것이 필요하다.

[0005] 현재까지 알려진 HDACs중 클래스 I에 속하는 HDAC 1, 2, 3, 8은 주로 세포의 핵내에서 발현하고 있으며, 히스톤 탈아세틸화를 통한 전사조절에서 핵심적인 역할을 하고 있다. 클래스 I HDACs은 자궁경부암, 유방암 등 다양한 암종에서 과발현되어 있다는 보고는 있으나, 항암 내성확득에 있어 클래스 I HDAC의 역할에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0006] 이전 연구에서 본 발명자들은 NANOG가 면역내성 획득에 필수적인 분자이며, NANOG/TCL1/AKT/MCL-1의 항암면역 내성관련 분자축을 규명하였다 (대한민국 공개특허 10-2012-0083504).

[0007] 이에, 본 발명자들은 면역요법 등의 항암 치료 후 재발된 암, 내성이 생긴 암, 또는 NANOG 의존적 내성암의 진단 및 치료에 있어 직접적인 표적이 될 수 있는 분자축을 규명하여 효과적인 치료 및 진단을 위하여 예의 노력한 결과, 항암제 또는 항암면역 내성을 획득한 종양세포에서 증가된 HDAC1이 내성 획득에 필수적인 효과인자임을 확인하였다. 아울러, HDAC1의 발현은 줄기세포 인자인 NANOG에 의해 직접적으로 조절되며, NANOG에 의해 증가된 HDAC1은 AcH3K14 또는 AcH3K27의 감소를 유도함을 규명함으로써 NANOG-HDAC1-AcH3K14/AcH3K27 분자축을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 HDAC1을 발현하는 세포주에 항암제 또는 항암면역 내성암 치료제 후보물질을 처리하고, HDAC1 단백질 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량을 측정하여 HDAC1 단백질 발현량은 감소하고, AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량이 증가하는 경우의 후보물질을 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암 치료제로 선별하는 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 HDAC1 유전자에 대한 프로브 및 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 조성물 및 키트; 및 HDAC1 단백질과 결합하는 항체 또는 압타머 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질과 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HDAC1을 발현하는 세포주에 항암면역 내성암 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질이 처리된 세포주의 HDAC1 단백질 발현량과 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량을 측정하는 단계; 및 후보물질 미처리 세포주와 비교하여 HDAC1 단백질 발현량은 감소하고, AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량이 증가하는 경우의 후보물질을 NANOG 의존적 내성암 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, HDAC1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, HDAC1 유전자와 엄격한 조건에서 혼성할 수 있는 프로브를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트를 제공한다.

- [0015] 본 발명은 또한, HDAC1 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, HDAC1의 발현 또는 활성 억제제 및 AcH3K14 또는 AcH3K27의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 병리적 마커로서의 새로운 NANOG-HDAC1-AcH3K14/AcH3K27 분자축을 이용한 항암제 또는 항암면역 내성암 치료제의 스크리닝 방법 및 진단용 조성물은 항암제 또는 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암을 보다 정확하고 신속하게 진단하고 치료제를 개발하는데 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 다양한 인간 암종의 세포주들에서 (A) HDAC1 및 NANOG 단백질의 발현여부 및 (B) 발현의 상관관계를 확인한 결과이다.
- 도 2는 인간 자궁경부암의 진행단계에 따른 (A) HDAC1 단백질의 발현, (B) AcH3K14와 AcH3K27의 정도, (C) NANOG, HDAC1, AcH3K14 및 AcH3K27의 발현 상관관계 및 (D) 생존률을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 항암면역 내성 CaSki P3 세포주의 클래스 I 특이적 HDAC 저해제에 대한 높은 민감성을 확인한 결과이다.
- 도 4는 항암면역 내성 CaSki P3 세포주에서 (A) 증가된 HDAC의 활성 및 (B) 증가된 HDAC1, 2, 8 단백질의 발현을 확인한 결과이다.
- 도 5는 항암면역 내성 CaSki P3 세포에서 HDAC1, 2, 및 3에 의한 (A-B) 항암면역내성, (C) 항암제 Cisplatin과 5-FU에 대한 내성 및 (D) 종양구 형성능을 확인한 결과이다.
- 도 6은 항암면역 내성 CaSki P3 세포에서 NANOG 발현 감소에 따른 (A) HDAC1 특이적 발현 감소 및 (B) 항암제 cisplatin에 대한 민감성 증가와 Class I HDAC 특이적 저해제인 FK228에 대한 민감성 감소를 확인한 결과이다.
- 도 7은 NANOG 과발현시 (A) 특이적으로 HDAC1 단백질의 발현 증가 및 (B) 항암제 cisplatin에 대한 민감성 감소와 클래스 I HDAC 특이적 저해제인 FK228에 대한 민감성 증가를 확인한 결과이다.
- 도 8은 NANOG 과발현 세포주에서 (A) HDAC1의존적 항암제 cisplatin에 대한 내성, (B) 항암면역에 대한 내성, (C) 시험관내 종양구 형성능 및 (D-E) 생체내 종양형성능을 확인한 결과이다.
- 도 9는 HEK293 세포주에서 NANOG의 전사활성 의존적으로 (A) HDAC1 단백질의 발현 증가, (B) HDAC1 mRNA 발현 증가, (C) HDAC1 프로모터에서 NANOG 결합부위의 확인, (D) HDAC1 프로모터 활성의 증가 및 (E) HDAC1 프로모터에서 NANOG 단백질의 직접 결합을 규명하여, NANOG에 의한 HDAC1전사조절 기전을 확인한 결과이다.
- 도 10은 NANOG 과발현 자궁경부암 세포에서 (A) HDAC1의 발현 저하시 AKT 활성, (B) NANOG에 의해 증가된 TCL1, AKT 발현 저하시 HDAC1 단백질의 감소, (C) TCL1-AKT의존적 HDAC1의 발현 감소에 대한 mRNA 수준, (D) TCL1-AKT의존적 HDAC1의 발현 감소에 대한 HDAC1 단백질의 번역 후 단백질의 안정화, (E-F) HDAC1의 유비퀴틴화 후 프로테오솜에서 단백질의 분해 및 (G-J) AKT 신호활성화에 의한 유비퀴틴 결합효소인 CHFR의 활성저하를 규명하여, NANOG에 의한 HDAC1 단백질의 번역 후 조절기전을 확인한 결과이다.
- 도 11은 NANOG 과발현 후 HDAC1의 발현저하 유도한 다음 히스톤 분리 후 (A) 웨스턴 블롯팅 및 (B) 정량분석을 통해 NANOG-HDAC1 의존적으로 변화하는 아세틸화된 히스톤 마커로서 AcH3K14와 AcH3K27을 확인한 결과이다.
- 도 12는 자궁경부암 세포에서 HDAC1 과발현시 HDAC 활성 의존적인 (A) 항세포사멸인자 MCL-1의 발현 증가 및 AcH3K14와 AcH3K27의 발현 감소, (B) 항암제 cisplatin에 대한 내성, (C) 항암면역 내성 및 (D) 시험관내 종양구 형성능을 확인한 결과이다.
- 도 13은 흑색종 유래 526mel, 폐암 유래 H1299, 대장암 유래 HCT116 세포에서 NANOG와 HDAC1의 발현저하 유도시 (A) 작용인자(MCL1, p21, p27)들의 발현 변화 및 HDAC1, AcH3K14, AcH3K27의 발현 변화, (B) 항암제 cisplatin과 5-FU에 대한 내성의 무력화, (C-D) 항암면역 내성의 무력화 및 (E) 시험관내 종양구 형성능의 감소

를 규명하여, 다양한 암종에서 HDAC1의 표적화는 NANOG 표적화와 동일한 효과를 재현할 수 있음을 확인한 결과이다.

도 14는 Class I HDAC 특이적 저해제를 (A) NANOG 과발현 세포주 또는 (B) 대장암 HCT116 및 폐암 H1299 세포에 처리하여 AcH3K14와 AcH3K27의 증가를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0023] 본 발명에서 "항암면역 내성암"은 항암면역치료에 대한 내성을 획득한 암을 뜻하며, 항암면역치료란 암 특이 항원 또는 암 관련 항원에 대한 면역반응을 유도하여 암 특이성 독성 면역세포에 의해 암세포를 제거하는 모든 체계의 통합을 지칭한다. 암 항원에 대한 면역유도 방법으로는 유전자, 단백질, 바이러스, 수지상세포 등의 방법을 포함한다. "재발암"은 통상의 암 치료 후 재발생된 암을 뜻하고, "내성암"은 상기 암 치료에 내성을 갖는 암을 일컫는 말이다. 여기서, 통상의 암 치료는 예를 들어, 수술, 화학치료, 방사선치료, 호르몬 치료, 생물학적 치료, 면역치료 등을 포함한다. 상기 암의 종류로는 뇌종양, 척수종양, 망막 세포종, 구강암, 비강암, 부비동암, 인두암, 후두암, 경부암을 포함하는 두경부암, 피부암, 유방암, 갑상선암, 악성부신종양을 포함하는 유방암, 내분비암, 폐암, 흉막종양, 악성부신종양을 포함하는 호흡기암, 식도암, 위암, 소장암, 악성종양, 대장암, 항문암, 간암, 담도암 또는 췌장암을 포함하는 소화기암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암 또는 음경암을 포함하는 비뇨기암, 자궁경부암, 자궁체부암, 융모상피암 또는 난소암을 포함하는 부인암, 급성 또는 만성 백혈병, 악성림프종 또는 다발성 골수증을 포함하는 혈액암, 골종양 또는 연부종양을 포함하는 골 또는 연부 종양, 및 소아 백혈병 또는 소아 고형종양을 포함하는 소아암 등일 수 있다.
- [0025] 항암면역 내성 획득에 NANOG가 필수 분자(대한민국 공개특허 10-2012-0083504)임이 알려져 있으며, 이러한 암을 치료하거나 약물 내성을 예방하기 위해 HDAC1의 억제제를 사용하는 방법(대한민국 공개특허 10-2015-0127216)이 알려져 있다. 그러나, 항암제 또는 항암면역 내성암의 정확하고 신속한 진단 및 치료제를 스크리닝하기 위한 NANOG-HDAC1-AcH3K14/AcH3K27 분자축에 대해서는 전혀 알려진 바가 없으며, 본 발명을 통해 처음 규명 되었다.
- [0026] 이에, 본 발명에서는 HDAC1 및 AcH3K14/AcH3K27를 이용하면 보다 정확하고 신속하게 NANOG 의존적인 항암제 또는 항암면역 내성암 치료제를 스크리닝할 수 있고, 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 일관점에서 HDAC1을 발현하는 세포주에 내성암 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질이 처리된 세포주의 HDAC1 단백질 발현량과 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량을 측정하는 단계; 및 후보물질 미처리 세포주와 비교하여 HDAC1 단백질 발현량은 감소하고, AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량이 증가하는 경우의 후보물질을 NANOG 의존적 내성암 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 NANOG 의존적 내성암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에서 발현량 측정은 전사체의 양을 측정하는 방법, 단백질의 양을 측정하는 방법 또는 인산화된 단백질을 측정하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0029] 예를 들어 상기 전사체의 양을 측정하는 방법은 RT(Reverse transcriptase)-PCR을 수행하여, 상기 단백질의 양 및 인산화된 단백질을 측정하는 방법은 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0030] 보다 구체적으로 살펴보면, 본 발명의 스크리닝 방법에서 HDAC1 및 AcH3K14 또는 AcH3K27와 후보물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 후보물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류세포와 후보물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 후보물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.

- [0031] 본 발명에서 세포주는 상기 HDAC1를 발현하는 플라스미드를 포함하는 Caski-HDAC1 세포주인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 스크리닝 방법에서 HDAC1 단백질 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질과 후보물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- [0034] 예를 들면, HDAC1 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질과 후보물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), HDAC1 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩타이드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화합물 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.
- [0035] 이러한 경우, 본 발명은 HDAC1 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 유전자로부터 발현된 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명은 생체 내(in vivo) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 항암면역 내성암의 치료제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 증진시키거나 단백질의 기능을 증진시키는 활성을 나타내는 후보물질 및 반대로 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 후보물질은, 후보물질에 대한 억제제를 개발함으로써 내성암 치료제 후보물질이 될 수도 있고, 항암면역 내성암의 치료제 후보물질이 될 수 있다.
- [0038] 이와 같은 항암면역 내성암의 치료제 후보물질은 이후의 치료제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질의 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 내성암 치료제를 개발할 수 있다.
- [0039] 이렇게 하여 얻어진 물질은 HDAC1 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성 억제 효과를 나타내게 되므로, HDAC1 유전자 발현 억제 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 저하에 의하여, 항암제 또는 항암면역 내성암을 억제할 수 있다. 또한, Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성화 효과를 나타내게 되므로, Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질의 기능 활성화에 의하여, 항암제 또는 항암면역 내성암을 억제할 수 있다.
- [0041] 본 발명은 다른 관점에서, HDAC1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 키트는 HDAC1 단백질의 에피토프 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 키트를 이용한 내성암의 진단은, 포유류의 조직 또는 세포 시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료에서 HDAC1 단백질 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 또는, 상기 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단은, 포유류의 조직 또는 세포 시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 HDAC1 단백질의 모노클로날 항체 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질의 모노클로날 항체와 반응시켜 HDAC1 단백질 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 진단은, HDAC1 단백질의 모노클로날 항체 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질의 모노클로날 항체를 함유한 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등에 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay) 방법을 사용하여 발색 반응시킴으로써 정량분석하거나, 생체에서 배출된 암조직이나 세포에 HDAC1 단백질 및 Ach3K14 또는 Ach3K27 단백질 특이적 면역염색(histoimmunostaining)을 이용하여 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단할 수 있다. 또는, 생체로부터 배출된

암조직이나 세포에 웨스턴 블롯분석을 이용하여 단백질 수준에서 HDAC1 단백질 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 발현량을 정상대조군과 비교분석함으로써 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단할 수 있다. 또는, 상기 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단은, HDAC1 단백질에 대한 모노클로날 항체 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질에 대한 모노클로날 항체를 겔형 지지체에 부착시켜 면역친화컬럼을 제조하는 단계; 상기 단계의 면역친화컬럼을 사용하여 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에서 HDAC1 단백질 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질을 HPLC 방법으로 정량하는 단계; 및 상기 정량 결과를 비교분석하여 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0046] 상기 HDAC1 단백질의 모노클로날 항체 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질의 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0047] 상기 HDAC1 단백질의 모노클로날 항체 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질의 모노클로날 항체에는 일반적으로 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, AP) 또는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 컨쥬게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 직접 HDAC1 단백질 모노클로날 항체 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨쥬게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다.

[0048] 또한, 상기 HDAC1 단백질 모노클로날 항체 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질 모노클로날 항체 대신에 HDAC1 단백질 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수 있으며, 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, HDAC1 유전자와 엄격한 조건에서 혼성할 수 있는 프로브를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트에 관한 것이다.

[0051] 본 발명에서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 "프로브"는 HDAC1 유전자나 단백질과 특이적으로 결합하여 이들을 인지할 수 있는 항체, PCR 프라이머, 핵산 프로브 등을 포괄적으로 포함하는 개념이다.

[0053] 또한, 상기 프로브는 HDAC1의 mRNA에 특이적으로 결합하는 핵산 프로브를 포함할 수 있으며, HDAC1 유전자에 대한 핵산 프로브를 이용하여 노던 블롯 분석 등을 수행하여 HDAC1 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 항암제 또는 항암면역 내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있다.

표 1

[0054] 인간 HDAC1 특이적 프로브

서열번호	프로브 서열	위치
1	5' - ATCGGAGAACTCTTCCTCACAGGC - 3'	1243 - 1266
2	5' - AAGTTGGAAGAGTCTTGCGGCC - 3'	1288 - 1310
3	5' - TTACTACTACGACGGGATGTG - 3'	36 - 58
4	5' - AAGGCCACCCAATGAAGCCTCACC - 3'	77 - 100

[0055] 이러한 HDAC1의 mRNA에 특이적으로 결합하는 핵산 프로브는 상기 [표 1]에 나타냈으며, HDAC1 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드라면 특별히 제한하지 않는다.

[0056] 본 발명에 따른 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 키트는 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직에서 추출한 RNA)과 반응(노던블롯팅)시켜 정상군과 비교 분석함으로써 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단을 수행할 수 있다. 상기 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단은 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 RNA 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 HDAC1 유전자 및 AcH3K14 또는 AcH3K27 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브와 반응시켜 상기 유전자의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명은 또 다른 관점에서, HDAC1(Histone deacetylases 1) 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 조성물에 관한 것이다.

- [0059] 본 발명에서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서 "프라이머"는 HDAC1 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머이며, 이를 이용한 RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 등을 수행하여 HDAC1 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단할 수 있다.
- [0061] 이러한 PCR 프라이머는 하기 [표 2]에 나타냈으며, HDAC1 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드라면 특별히 제한하지 않는다.

표 2

- [0062] 인간 HDAC1 특이적 프라이머

서열번호	프라이머 서열		위치
5	센스	5 ‘- GGTCCAAATGCAGGCGATTCCT 3’	1134 - 1155
6	안티센스	5 ‘- TCGGAGAACTCTTCCTCACAGG 3’	1244 - 1265
7	센스	5 ‘- CTATCGCCCTCACAAAGCCA 3’	159 - 178
8	안티센스	5 ‘- CTGCTTGCTGTACTCCGACA 3’	251 - 270
9	센스	5 ‘- TGTCGGAGTACAGCAAGCAG 3’	251 - 270
10	안티센스	5 ‘- CACAGCACTTGCCACAGAAC 3’	347 - 366
11	센스	5 ‘- AACTGGGGACCTACGGGATA 3’	621 - 640
12	안티센스	5 ‘- TGGACATGACCGGCTTGAAA 3’	720 - 739
13	센스	5 ‘- CAAAGGACACGCCAAGTGTG 3’	834 - 853
14	안티센스	5 ‘- CTCATATGTCCAGCACCGGG 3’	926 - 945
15	센스	5 ‘- GGGGATCGGTTAGGTTGCTT 3’	802 - 821
16	안티센스	5 ‘- AATGGTGTAAACCCGCCTC 3’	896 - 915
17	센스	5 ‘- CCCGGTGCTGGACATATGAG 3’	926 - 945
18	안티센스	5 ‘- TGGAAGGACTGATGTGGAGC 3’	1026 - 1045
19	센스	5 ‘- GCCTAGTGCGGTGGTCTTAC 3’	759 - 778
20	안티센스	5 ‘- AATCCACACACTTGGCGTG 3’	841 - 860

- [0063] 상기 HDAC1 유전자의 mRNA 검출용 프라이머를 포함하는, 본 발명에 따른 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직에서 추출한 RNA)과 반응(RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR)시켜 정상군과 비교 분석함으로써 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단을 수행할 수 있다.
- [0064] 이러한 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단은 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 RNA 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 HDAC1 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머와 반응시켜 상기 유전자의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 항암제 또는 항암면역 내성암의 진단용 조성물은 생리학적 시료에서 항암제 또는 항암면역 내성암에 대한 병리적 마커를 검출하기 위한 것으로, HDAC1 유전자는 항암제 또는 항암면역 내성암의 암세포 안팎에서 특이적으로 발현이 증가되는 양상을 보이고, 이의 발현량과 비례하여 세포의 종양형성능이 증가하므로, 암세포 또는 조직에서의 HDAC1 유전자, 이로부터 코딩되는 단백질의 발현 정도를 정량분석함으로써 항암제 또는 항암면역 내성암을 진단할 수 있는 것이다.
- [0066] 상기 HDAC1은 사람 또는 마우스에서 유래한 것으로, 공지된 서열을 포함하거나, 염기 또는 아미노산의 결실, 치환, 부가되어도 동일한 기능을 수행할 수 있는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명은 또 다른 관점에서, HDAC1의 발현 또는 활성 억제제 및 Ach3K14 또는 Ach3K27의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0069] 본 발명에서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 HDAC1의 발현 또는 활성 억제제는 HDAC1 유전자에 대한 siRNA 또는 HDAC1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 HDAC1 유전자에 대한 siRNA는 서열번호 21, 23, 25, 27 및 29로 구성된 군에서 선택되

는 어느 하나 이상의 센스 및 서열번호 22, 24, 26, 28 및 30으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 안티센스를 포함하는 siRNA인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0072] 본 발명에서 "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단을 통해 RNA 간섭현상을 유도하는 이중사슬 RNA를 의미하며, 표적 유전자의 mRNA와 같은 서열을 가지는 센스서열의 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 서열의 RNA 가닥으로 구성된다.
- [0073] 상기 siRNA는 시험관에서 합성한 siRNA 자체 또는 siRNA를 코딩하는 염기서열을 발현벡터에 삽입하여 발현되는 형태를 포함할 수 있다.
- [0074] 또한, 상기 안티센스는 HDAC1 유전자 또는 그의 단편으로부터 전사되는 mRNA 서열 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 지니고, 상기 mRNA와 결합하여 상기 암전이 유전자 또는 단편의 발현을 억제할 수 있다.
- [0075] 또한, 상기 shRNAi(short hairpin RNAi)는 인간 또는 마우스상의 shRNAi 공통 염기서열 부위를 표적으로 하여 통상의 방법에 따라 제작된 것을 사용할 수 있다.
- [0076] 본 발명에서, 상기 HDAC1 발현 또는 활성 억제제는 단백질들의 발현을 억제하는 물질 또는 기능을 저해하는 물질이 될 수 있는데, 구체적으로, HDAC1 단백질의 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체가 될 수 있다.
- [0077] 또한, 상기 HDAC1의 발현 또는 활성 억제제 및 Ach3K14 또는 Ach3K27의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0078] HDAC1 발현 또는 활성 억제제 및 Ach3K14 또는 Ach3K27의 활성화제는 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)와 함께 사용될 수 있으며, 예를 들어, 시클로포스파미드, 아지리딘, 알킬알콘설폰네이트, 나이트로소우레아, 다카르바진, 카르보플라틴, 시스플라틴 등과 같은 알킬화제(alkylating agent), 마이토마이신 C, 안트라사이클린, 독소루비신(아드리아마이신) 등과 같은 항생제, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈 등과 같은 항대사제(antimetabolitic agent), 빈카 알칼로이드와 같은 식물유래 약제 및 호르몬 등이 될 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명의 HDAC1의 발현 또는 활성 억제제 및 Ach3K14 또는 Ach3K27의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0080] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명의 HDAC1의 발현 또는 활성 억제제 및 Ach3K14 또는 Ach3K27의 활성화제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 항암제 또는 항암면역 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 항암제 또는 항암면역 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0083] 또한, 본 발명의 항암제 또는 항암면역 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0084] 상기 항암제 또는 항암면역 내성암의 예방 또는 치료용 조성물의 투여량은 항암면역 내성암을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로

및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, HDAC1 유전자의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0085] 본 발명의 항암면역 내성암의 치료용 조성물은 HDAC1 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하고 있어 생체 내 면역반응을 증강시키는 면역반응 증강용 조성물이거나, 면역반응을 유도함으로써 항암면역 내성암을 예방 또는 경감할 수 있는 백신 조성물일 수 있다.

[0086] 상기 HDAC1 단백질의 에피토프를 포함하는 면역세포는 통상의 방법에 따라 에피토프를 감작시킨 것이거나, 형질 전환방법을 통해 상기 에피토프를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.

[0087] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

[실시예]

[0090] 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 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0092] 실시예 1: 인간 NANOG를 발현하는 CaSki 세포주 제조

[0093] 대한민국 공개특허 10-2012-0083504에서 제작한 pMSCV-NANOG 벡터와 리포솜 제제인 리포펙타민 2000 (lipofectamin 2000, Invitrogen, USA)을 질량비 1:2로 섞어 패키징 (packaging) 세포주인 피닉스 세포 (Clontech)에 처리하였다. 24시간 배양 후 푸로마이신 (Invitrogen, USA)이 포함된 배양액으로 형질전환된 피닉스 세포를 선별하였다. 선별된 세포들은 3-4일간 배양하여 레트로 바이러스가 포함된 세포배양액을 확보한 후, amicon ultra-15 (millipore, USA)을 이용하여 농축하였다. 최종 배양 농축액 500 μ l와 폴리브렌 (Polybrene, Sigma)을 혼합한 혼합액을 인간 자궁경부암 세포주인 CaSki 세포주에 처리하여 형질도입시킴으로서 NANOG를 발현하는 CaSki-NANOG 세포주를 제조하였다.

[0095] 실시예 2: 인간 HDAC1 WT과 HDAC1 H141A 발현 벡터의 제조

[0096] HDAC1 Flag 벡터 (Addgene plasmid 13820)을 주형으로 하고, Bg/III-HDAC1 프라이머 (5' - AAAGATCTATGGCGCAGACGAGGGCA -3')와 HDAC1-Flag-XhoI 프라이머 (5' - AGAGCTCGAGTTACTTGTCATCGTCGTC 3')를 이용하여 변성단계 (98 $^{\circ}$ C, 30초), 어닐링단계 (60 $^{\circ}$ C, 30초) 및 증폭단계 (72 $^{\circ}$ C, 1분)를 1 사이클로 하여 30 사이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다. pMSCV 벡터 (Clontech, USA)와 상기에서 증폭된 HDAC1 유전자 단편에 Bg/III와 XhoI (NEB, USA)을 처리한 다음, 라이게이즈 (Takara, Japan)로 라이게이션 하여 HDAC1을 발현하는 레트로 바이러스 벡터를 제조하였다. 상기의 벡터는 pMSCV-HDAC1 WT으로 명명하였다.

[0097] QuickChange XL Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene, San Diego, CA, USA)을 이용하여 HDAC1의 탈아세틸화 결핍 변이 유전자인 HDAC1 H141A 변이 벡터를 제조하였다. pMSCV-HDAC1 WT을 주형으로 하고, HDAC1 H141A 센스 프라이머 (5' - GGGCCTGCACGCTGCAAGAAGTCCGAGGCATCTGGCT 3')와 HDAC1 H141A 안티센스 프라이머 (5' - GACTTCTTTGCAGCGTCAGGCCCCAGCCCAATTCACAG 3')를 이용하여, 변성단계 (95 $^{\circ}$ C, 1분), 어닐링단계 (60 $^{\circ}$ C, 1분), 증폭단계 (68 $^{\circ}$ C, 10분)를 1 사이클로 하여 18 사이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다. 상기의 벡터는 pMSCV-HDAC1 H141A으로 명명하였다.

[0099] 실시예 3: 인간 HDAC1 WT과 HDAC1 H141A를 발현하는 CaSki 세포주 제조

[0100] 실시예 2에서 제작된 pMSCV-HDAC1 WT과 pMSCV-HDAC1 H141A 벡터와 리포펙타민 2000 (lipofectamin 2000, Invitrogen, USA)을 질량비 1:2로 섞어 패키징 (packaging) 세포주인 피닉스 세포 (Clontech)에 처리하였다.

24시간 배양 후 퓨로마이신 (Invitrogen, USA)이 포함된 배양액에서 형질전환된 피닉스 세포를 선별하였다. 선별된 세포들은 3-4일간 배양하여 레트로 바이러스가 포함된 세포배양액을 확보한 후, amicon ultra-15 (millipore, USA)을 이용하여 농축하였다. 최종 배양 농축액 500 μ l와 폴리브렌 (Polybrene, Sigma)을 혼합한 혼합액을 인간 자궁경부암 세포주인 CaSki 세포주에 처리하여 형질도입시킴으로서 HDAC1 WT 및 HDAC1 H141A를 발현하는 CaSki-HDAC1 WT과 CaSki-HDAC1 H141A 세포주를 제조하였다.

[0102] 실시예 4: 인간 암 세포주에서 HDAC1 및 NANOG 단백질 발현 확인

[0103] 인간 자궁경부암 세포주(CaSki, SiHa, CUMC6), 대장암 세포주(SW620, HCT116, SNUC4), 폐암 세포주(A549, H1299), 흑색종 세포주(SK-MEL-1, 526mel, Malme-3M) 및 췌장암 세포주(cf-pac-1, Panc-1)를 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장 원심분리기에서 13000rpm으로 30분간 원심분리하고, 상층액만 취하여 단백질 정량 후 30 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼하여 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 후 HDAC1 항체(Cell signaling, USA) 및 NANOG 항체(Bethyl Laboratories, USA)를 1:5000으로 희석하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후, HRP가 부착된 2차 항체를 1시간 동안 반응시킨 후 ECL 용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0104] 그 결과, 다양한 인간 암 중에서 HDAC1 및 NANOG 단백질의 발현을 확인할 수 있었으며, HDAC1과 NANOG 단백질 발현의 상관관계를 분석할 수 있었다 (도 1).

[0106] 실시예 5: 자궁경부암 조직에서 HDAC1, Ach3K14 및 Ach3K27 발현 확인

[0107] 자궁경부암 조직 슬라이드를 자일렌을 이용하여 탈파린화 과정과 알코올을 이용하여 탈수화 과정을 거친 후 시트레이트 버퍼에 슬라이드를 담귀 전자레인지에서 10분간 돌린 후 실온에서 한시간 동안 식혀주었다. 증류수로 세척하여 실온에서 5% 염소 혈청으로 한시간 동안 반응시킨 후 HDAC1 항체 (Cell Signaling, USA), Ach3K14 항체 (Cell Signaling, USA), Ach3K27 항체 (Cell Signaling, USA)를 각각 1:200, 1:250, 1:1000으로 희석하여 2시간 동안 반응시켰다. HRP가 부착된 2차 항체를 반응시킨 후 DAB 키트를 이용하여 발색시켰다.

[0108] 그 결과, 조직에서 자궁경부암의 진행 단계가 높아질수록 HDAC1의 발현 양상이 증가되고, Ach3K14 또는 Ach3K27 발현 양상은 감소됨을 확인하였으며, NANOG의 발현과 상관관계를 분석할 수 있었다. 또한 장기간 추적조사를 통한 생존율을 확인한 결과에서도 HDAC1 발현이 높고 Ach3K14 또는 Ach3K27 발현이 낮은 암의 환자 생존율이 유의하게 낮게 나타났다 (도 2).

[0110] 실시예 6: 항암면역 내성암 세포주의 HDAC의 활성 및 HDAC 단백질들의 발현 확인

[0111] 항암면역 내성암 세포주를 RIPA 버퍼 (Elpis, korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에서 13000rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 단백질 정량 후 10 μ g의 단백질을 취하여, HDAC Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA)을 이용하여 HDAC 활성을 측정하였다. 동일한 단백질 샘플 30 μ g을 취하여 웨스턴 블롯을 수행하여 HDAC (HDAC1, 2, 3, 4, 8) 단백질들의 발현양을 비교하였다.

[0112] 그 결과, 항암면역 내성암 세포주는 모암 세포주에 비해 HDAC 활성이 높고, Class I HDAC에 속하는 HDAC1, 2, 3 단백질 발현이 현저히 증가되어 있음을 확인하였다 (도 4).

[0114] 실시예 7: 항암제 및 HDAC 저해제에 대한 세포 생존율 측정

[0115] 항암면역 내성암 세포주 CaSki P0, P3 (도 3), CaSki P3-siHDAC1, siHDAC2, siHDAC3 (도 5), CaSki P3-siGFP, siNANOG (도 6), CaSki-no, CaSki-NANOG (도 7), CaSki-NANOG-siGFP, siHDAC1 (도 8), CaSki-no, HDAC1 WT, HDAC1 H141A (도 12), 526mel-siGFP, siNANOG, siHDAC1; H1299-siGFP, siNANOG, siHDAC1; HCT116-siGFP, siNANOG, siHDAC1 (도 13) 세포를 세포배양용 96-웰 플레이트에 각각 5000개씩 접종하였다. 12시간 배양 후 항암제 Cisplatin과 5-FU, 5-AzaC, 광범위 HDAC 저해제인 NaB 또는 Class I HDAC1 저해제인 FK228를 72시간 동안 처리하였다. 각각의 세포 생존율은 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다.

표 3

인간 HDAC1 특이적 siRNA 서열

표적 부위	siRNA 서열		서열번호
1325 - 1343	센스	5'- GAGUCAAACAGAGGAUGA UU -3'	21
	안티센스	5'- UU UCAUCCUCUGUUUGACUC -3'	22
446 - 464	센스	5'- GCUUCUGUUACGUCAAUGA UU -3'	23
	안티센스	5'- UU UCAUUGACGUAACAGAAGC -3'	24
506 - 524	센스	5'- GGGUGCUGUACAUUGACAU UU -3'	25
	안티센스	5'- UU AUGUCAUGUACAGCACCC -3'	26
691 - 709	센스	5'- GGGAUUGAUGACGAGUCCU UU -3'	27
	안티센스	5'- UU AGGACUCGUCAUCAAUCCC -3'	28
809 - 827	센스	5'- GGUUAGGUUGCUCAAUCU UU -3'	29
	안티센스	5' - UU AGAUUGAAGCAACCUAACC 3 '	30

각 siRNA 서열과 표적부위는상기 표 3에 나타내었다.

그 결과, 모암 세포주 (CaSki P0)에 비하여 항암면역 내성암 세포주 (CaSki P3)는 항암제 Cisplatin 과 5-FU에 대해서는 내성을 가지며, HDAC 저해제, 특히 Class I HDAC 저해제에 대해 민감도가 높음을 확인하였고 (도 3), 이는 HDAC1의 발현 증가에 의한 것임을 확인하였다 (도 5). Cisplatin에 대한 내성과 FK228에 대한 높은 민감도는 NANOG의 발현에 의해 결정되며 (도 6 및 도 7), NANOG 의존적 cisplatin에 대한 내성은 HDAC1의 발현저하에 의해 무력화되었다 (도 8 및 도 13). 또한, Cisplatin에 대한 내성은 HDAC1의 HDAC 활성 의존적으로 유발됨을 확인하였다 (도 12).

실시예 8: 시험관내 종양 형성능 확인 (종양구 형성 실험)

실시예 7의 각각의 세포 1000개를 20ng/ml의 EGF (Invitrogen, USA), 20ng/ml의 bFGF (Invitrogen, USA) 및 B27 (Gibco, USA)이 포함된 DMEM-F12 배지에 넣고 24 well-super-low adherence plates (Corning, USA)에서 2주간 배양하여 관찰하였다. 이때 3일마다 새로운 배지를 100 μ l씩 추가해 주었다. 형성된 종양구는 광학현미경을 이용하여 사진 이미지를 획득한 후 종양구의 직경을 측정함으로써 20-50 μ m 이상의 종양구를 계수하여 정량하였다 (도 8).

실시예 9: 생체내 종양 형성능 확인

실시예 7의 각각의 세포를 Opti-MEM 배지 (Gibco, USA)에 넣어 희석한 후, 생쥐의 복부 표피에 10,000개 또는 100,000개의 세포를 각각 주입하였다. 각각의 생쥐에 대하여 종양의 생성 유무를 2일 간격으로 관찰하고 기록하였다. 16일째, 생쥐로부터 종양을 절제하여 각각의 종양 무게를 측정하여 비교하였다 (도 8).

실시예 10: 히스톤 단백질의 분리와 아세틸화 히스톤 확인

실시예 7의 각각의 세포를 hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT)에 희석 후, 냉장 교반기에서 30분간 반응시킨 뒤 냉장 원심분리기에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 남은 세포의 핵은 400 μ l의 0.4N 황산에 녹인 후, 냉장상태에서 16시간 동안 반응 시킨 뒤 냉장 원심분리기에서 13,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액에 존재하는 히스톤 단백질은 TCA 침전법으로 분리하여 단백질 정량 후 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 분리된 단백질을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 후 Histone H3 항체 (Cell signaling, USA), Ach3 항체(Cell signaling, USA), Ach3K9 항체 (Cell signaling, USA), Ach3K14 항체 (Cell signaling, USA), Ach3K18 항체 (Cell signaling, USA), Ach3K27 항체 (Cell signaling, USA), Ach3K56 항체 (Cell signaling, USA), Histone H4 항체 (Cell signaling, USA), Ach4 항체 (Cell signaling, USA), Ach4K5 항체 (Cell signaling, USA) 및 Ach4K8 항체 (Cell signaling, USA) 를 1:3000으로 희석한 후 12시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척과정 후, HRP가 부착된

2차 항체를 1시간 동안 반응시킨 후, ECL용액을 이용하여 각 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0128] 그 결과, NANOG-HDAC1 의존적으로 변화하는 아세틸화 히스톤인 AcH3K14와 AcH3K27을 선별하였다 (도 11).

[0130] 실시예 11: HDAC 저해제에 대한 아세틸화 히스톤 확인

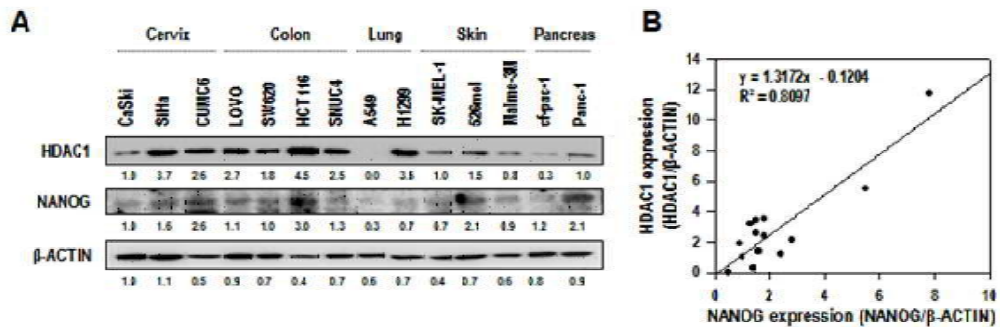
[0131] 항암면역 내성암 세포주 CaSki-NANOG, 대장암 세포주 (HCT116) 및 폐암 세포주 (H1299)에 Class I HDAC 특이적 저해제인 FK228와 HDAC1 특이적 siRNA (표 3)을 처리하여, HDAC 저해제에 대한 아세틸화 히스톤을 조사하였다.

[0132] 그 결과, 아세틸화 히스톤 AcH3K14 및 AcH3K27가 증가한 것을 확인하였으며, 이는 HDAC1 특이적 저해제가 아세틸화 히스톤의 활성화제임을 나타낸 것이다.

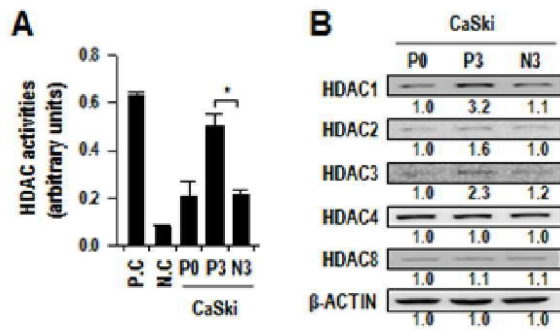
[0134] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

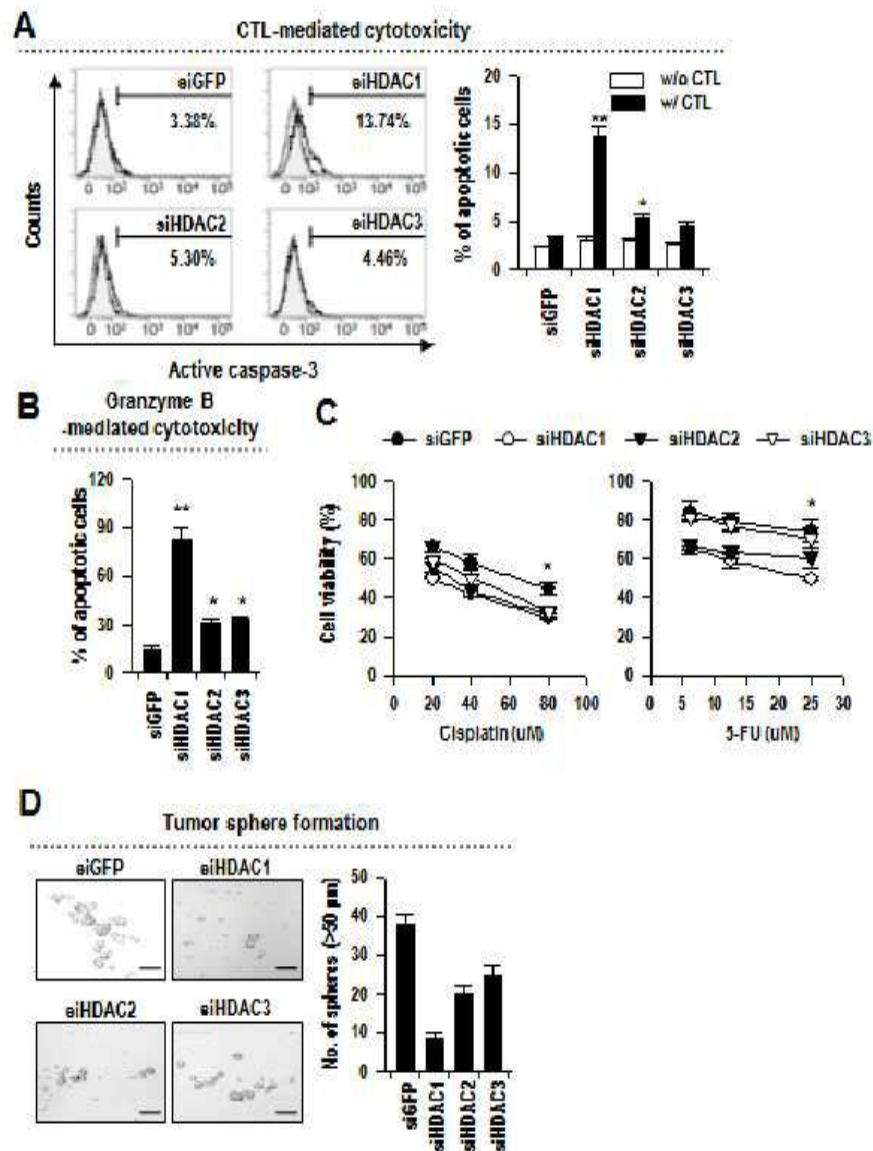
도면1



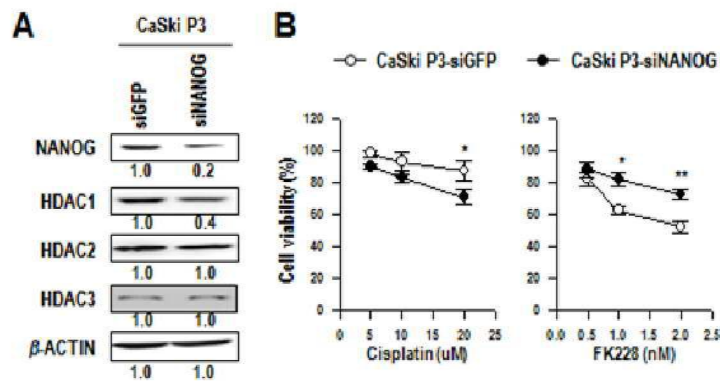
도면4



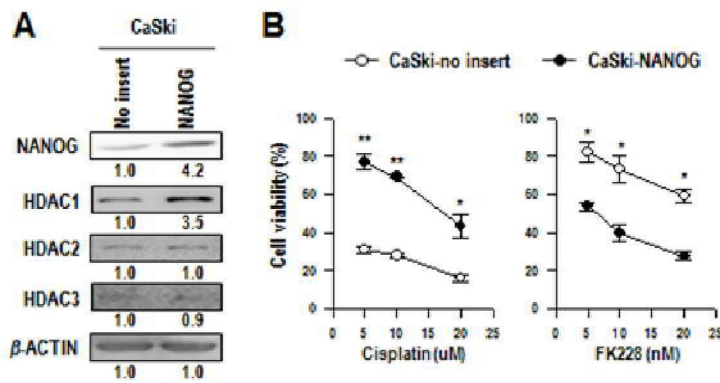
도면5



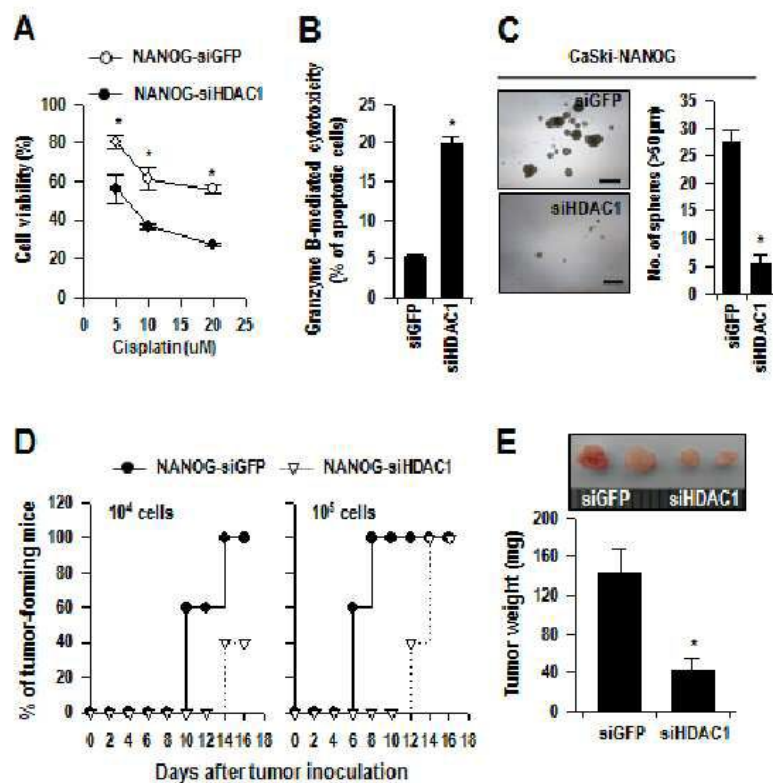
도면6



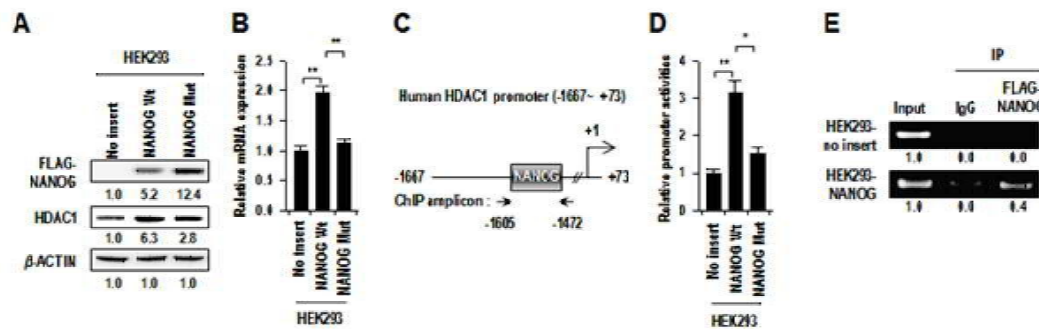
도면7



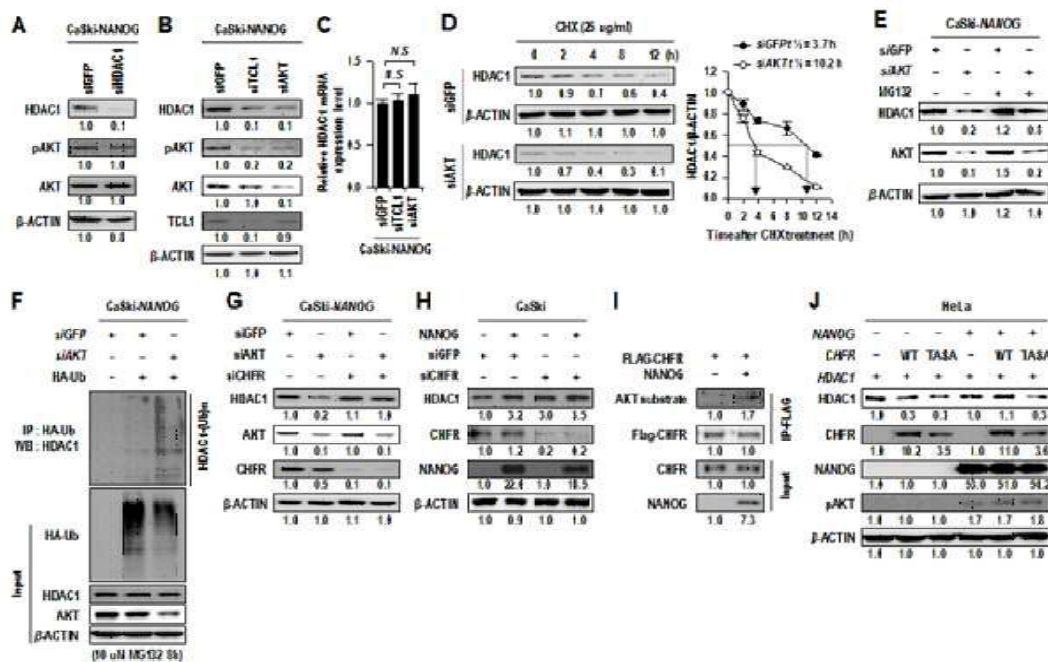
도면8



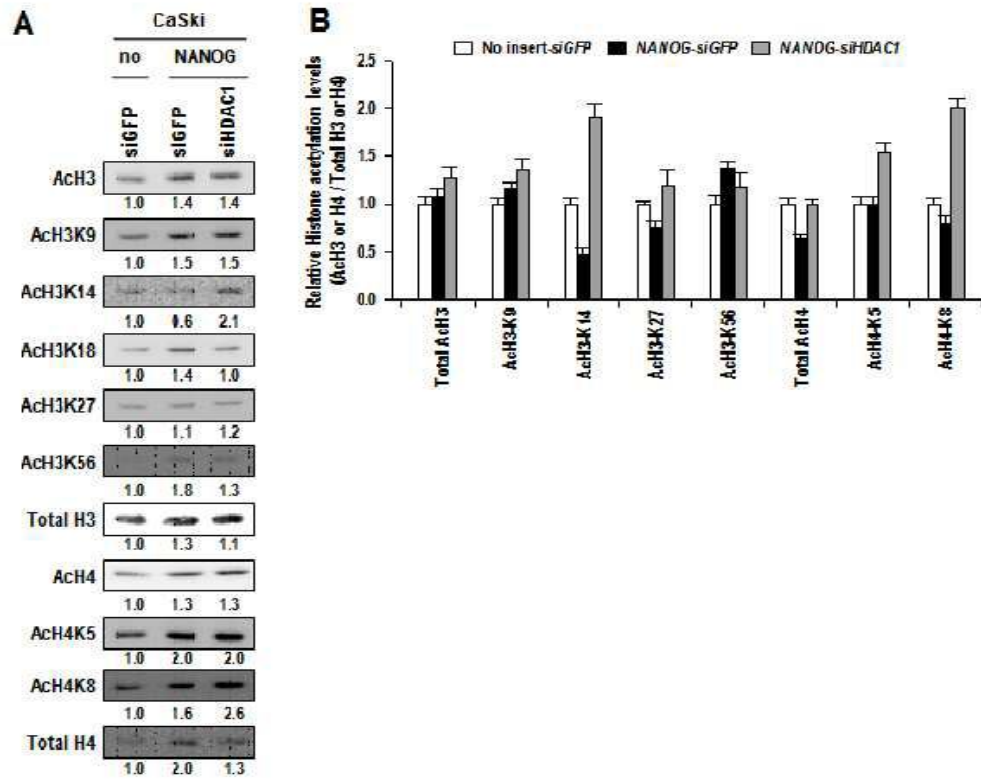
도면9



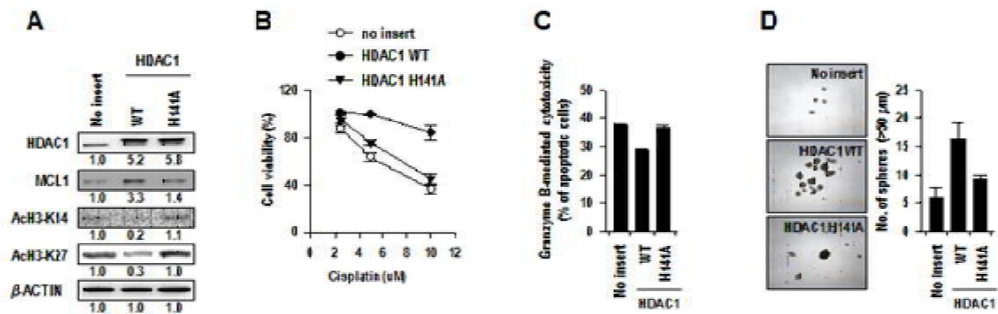
도면10



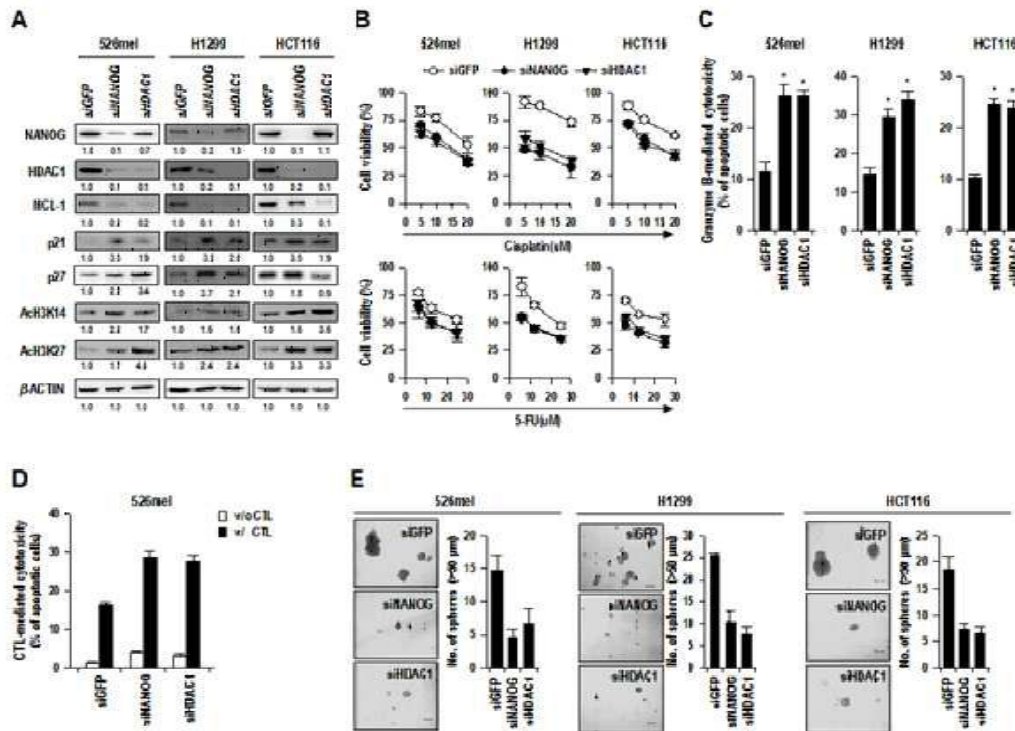
도면11



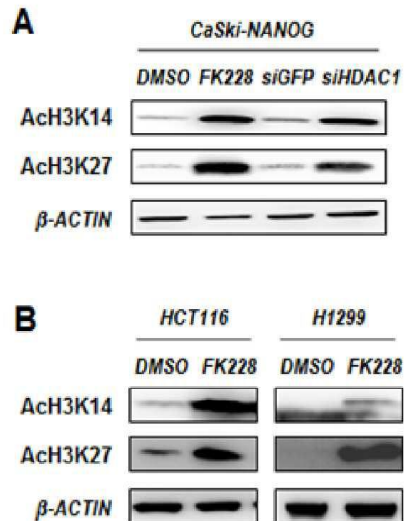
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Screening Therapeutic Agent of NANOG-mediated Cancer Using HDAC1 and AcH3K14 or AcH3K27
- <130> P16-B014
- <160> 30
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HDAC-probe1
 <400> 1
 atcggagaac tcttcctcac aggc 24
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> HDAC-probe2
 <400> 2
 aagttggaag agttcttgcg gcc 23
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HDAC-probe3
 <400> 3
 ttactactac gacggggatg ttg 23
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HDAC-probe4
 <400> 4
 aaggccaccc aatgaagcct cacc 24
 <210> 5

 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HDAC-primer5s

<400>	5	
ggtccaaatg caggcgattc ct		22
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer6a	
<400>	6	
tcggagaact cttcctcaca gg		22
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer7s	
<400>	7	
ctatcgccct cacaagcca		20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer8a	
<400>	8	
ctgcttgctg tactccgaca		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer9s	
<400>	9	
tgtcggagta cagcaagcag		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	HDAC-primer10a	
<400>	10	
cacagcactt gccacagaac		20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer11s	
<400>	11	
aactggggac ctacgggata		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer12a	
<400>	12	
tggacatgac cggtttgaaa		20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer13s	
<400>	13	
caaaggacac gccagtgtg		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer14a	
<400>	14	
ctcatatgtc cagcaccggg		20
<210>	15	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer15s	
<400>	15	
	ggggatcggg taggttgctt	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer16a	
<400>	16	
	aatggtgtaa ccaccgcctc	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer17s	
<400>	17	
	cccgggtgctg gacatatgag	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer18a	
<400>	18	
	tggaaggact gatgtggagc	20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer19s	
<400>	19	
	gcctagtgcg gtggtcttac	20

<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-primer20a	
<400>	20	
aattccacac acttggcgtg		20
<210>	21	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA21s	
<400>	21	
gagucaaaac agaggau u		21
<210>	22	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA22a	
<400>	22	
uuucauccuc uguuuugacu c		21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA23s	
<400>	23	
gcuucuguua cgucaaugau u		21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA24a	

<400>	24	
uuucauugac	guaacagaag c	21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA25s	
<400>	25	
gggugcugua	cauugacauu u	21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA26a	
<400>	26	
uuauucaau	guacagcacc c	21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA27s	
<400>	27	
gggauugaug	acgaguccuu u	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HDAC-siRNA28a	
<400>	28	
uuaggacucg	ucaucaaucc c	21
<210>	29	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> HDAC-siRNA29s

<400> 29

gguuagguug cuucaaucuu u

21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HDAC-siRNA30a

<400> 30

uuagauugaa gcaaccuaac c

21