



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0036820
(43) 공개일자 2019년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0126187
(22) 출원일자 2017년09월28일
심사청구일자 2017년09월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자
오상철
서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호(
대치동, 개포1,2차 우성아파트)

이대희
경기도 용인시 처인구 고진로27번길 28-5(고림동)
조민지
인천광역시 연수구 원인제로 237, 104동 101호(연
수동, 대우1차아파트)

(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 9 항

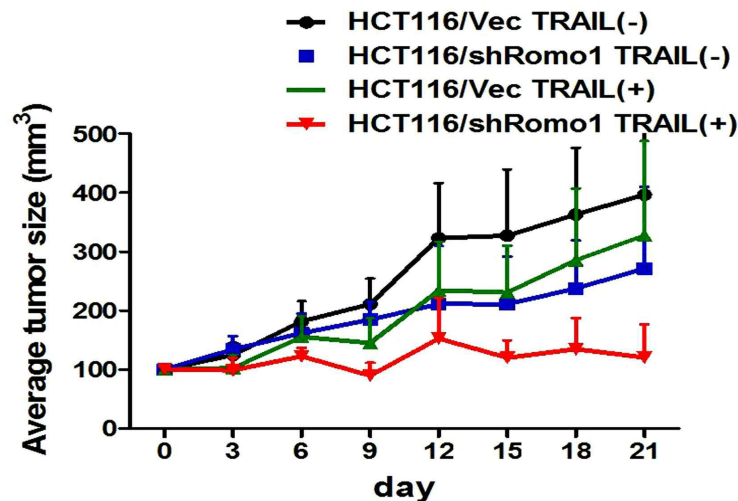
(54) 발명의 명칭 Romo1 억제제를 포함하는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 Romo1 억제제를 포함하는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 항암 보조제는 TRAIL 내성을 극복할 수 있는 Romo1 억제제를 포함함으로써 TRAIL에 대한 내성을 보이는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도20



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2011684

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자사업

연구과제명 헤지호그 억제제 신약 개발 및 내성극복 후보물질 Genipin 병용 연구

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01058303

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 TRAIL 저항성 암줄기세포를 위한 타겟 치료의 적용과 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1665

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구역량 강화지원

연구과제명 바이오메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 포함하는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Romo1 단백질의 발현 억제제는 Romo1 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA 및 shRNA로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Romo1 단백질의 활성 억제제는 Romo1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TRAIL을 이용하여 암, 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 치료할 때 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제, 및 TRAIL을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제는 TRAIL 감수성을 증진시키는 것을 특징으로 하는 항암 보조제.

청구항 9

제7항 또는 제8항의 항암 보조제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Romo1 억제제를 포함하는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포주가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 불사화 되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다(Klaunig & Kamendulis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44:239-267, 2004).

[0003] 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용 또한 큰 문제로 대두되고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다. 또한, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다.

[0004] TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)은 종양괴사인자(Tumor necrosis factor, TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로 알려져 있다. TRAIL은 4개의 수용체를 갖고 있으며, 상기 수용체 중 사멸 수용체(death receptor, DR4, DR5)는 암 세포주에서, 디코이 수용체(Decoy receptor, DcR1, DcR2)는 정상 세포주에서 과발현된다. 상기 TRAIL은 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 사멸 수용체에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도할 수 있다. 상기 디코이 수용체의 경우는 c-터미널 말단에 사멸 도메인을 가지고 있지 않아 세포사멸 신호전달이 세포 내로 전해지지 않는다. 따라서, TRAIL을 기반으로 하는 치료는 정상세포에 대해서는 무해하면서 다양한 암 세포주에 대해서만 독성을 유도한다는 특징을 가지고 있어 매우 효과적인 차세대 항암 치료제이다.

[0005] 그러나, TRAIL을 암세포주에 지속적으로 처리하면 TRAIL에 감수성을 보이던 암세포주도 점차 TRAIL에 대해 내성을 가지게 되는 것이 밝혀지게 되었다. 구체적으로, 많은 암세포는 사멸 수용체의 감소와 세포의 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L)), B-세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL) 또는 골수성 백혈병 세포-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)와 같은 항-세포사멸 단백질을 증가시키는 등 다양한 매커니즘을 통하여 TRAIL에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.

[0006] 따라서, 암세포에 대해 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 TRAIL의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2008-0020083 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 TRAIL의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암 효과를 증진시킬 수 있는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 포함하는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제, 및 TRAIL을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 Romo1 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를 제공한다.

다.

[0012] 아울러, 본 발명은 상기 항암 보조제를 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 항암 보조제는 TRAIL 내성을 극복할 수 있는 Romo1 억제제를 포함함으로써 TRAIL에 대한 내성을 보이는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 TRAIL에 의한 두 가지의 세포사멸 경로를 나타내는 모식도이다.

도 2는 대장암 조직에서 Romo1의 발현이 증가되는 것을 나타내기 위해 대장암 조직을 IHC 염색한 모습을 나타내는 이미지이다.

도 3은 상기 IHC 염색을 통해 대장암 조직에서의 Romo1의 발현량을 나타내는 그래프이다.

도 4는 콜로니 형성능을 실험한 결과, Romo1이 없는 실험군과 Romo1이 있는 세포주에 TRAIL을 처리한 실험군의 경우 콜로니가 덜 형성되는 것을 나타내는 이미지이다.

도 5는 여러 대장암 세포주에서 Romo1이 억제되었을 때에 TRAIL을 처리한 경우 세포 사멸이 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 6은 대장암 세포주에서 Romo1 억제하고 TRAIL을 처리한 경우 세포 사멸 관련 단백질의 발현이 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

도 7은 대장암 세포주에서 Romo1을 과발현시키고 TRAIL을 처리한 경우 세포 사멸 관련 단백질의 발현에 변화가 없는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

도 8은 Romo1 억제시에 TRAIL 신호전달 관련 인자들의 발현량에 변화가 없는 것을 mRNA 수준에서 확인한 결과이다.

도 9는 Romo1 과발현시에 TRAIL 신호전달 관련 인자들의 발현량에 변화가 없는 것을 mRNA 수준에서 확인한 결과이다.

도 10은 Romo1 억제시에 TRAIL 신호전달에 관련된 인자들의 발현을 단백질 수준에서 확인한 결과이다.

도 11은 Romo1 과발현시에 TRAIL 신호전달에 관련된 인자들의 발현을 단백질 수준에서 확인한 결과이다.

도 12는 Bax가 결여된 세포주에 TRAIL을 처리해도 세포 사멸이 많이 일어나지 않는 것에 비해, 같은 조건에서 Romo1만 억제된 세포주에서는 세포 사멸이 많이 일어나는 것을 Western blot 실험을 통해 나타낸 것이다.

도 13은 Bax가 결여된 세포주에 TRAIL을 처리해도 세포 사멸이 많이 일어나지 않는 것에 비해, 같은 조건에서 Romo1만 억제된 세포주에서는 세포 사멸이 많이 일어나는 것을 유세포 분석 실험을 통해 나타낸 것이다.

도 14는 Romo1 억제 세포주에 proteasome inhibitor인 Bortezomib을 처리하는 경우 Bax의 발현이 더 증가하는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

도 15는 Romo1 억제시 Bax의 ubiquitination이 감소되는 것을 나타내는 Co-Immunoprecipitation 결과이다.

도 16은 Romo1 억제시 TRAIL을 처리하면 Romo1의 억제로 인해 발현이 증가된 Bax가 미토콘드리아로 더 많이 이동하는 것을 나타내는 결과이다.

도 17은 Romo1의 억제시 TRAIL을 처리하면 미토콘드리아의 기능 장애로 세포사멸이 더 증가하는 것을 나타내는 결과이다.

도 18은 Romo1 억제시에 TRAIL을 처리하여 Bax의 미토콘드리아로의 이동을 Immunofluorescence로 확인하여 나타낸 것이다.

도 19는 Romo1 억제시에 TRAIL을 처리하여 미토콘드리아에서의 Romo1의 발현을 Immunofluorescence로 확인하여 나타낸 것이다.

도 20은 5주령 누드마우스에 대장암 세포주 HCT116과 Romo1 억제 세포주를 피하에 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 21은 xenograft를 통해 온전한 종양의 크기를 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 22는 TUNEL assay를 통해 Romo1이 없을 때에 TRAIL을 처리한 조직에서 현저히 세포 사멸이 일어나는 것을 확인한 것이다.

도 23은 Immunofluorescence를 통해 Romo1과 Bax의 발현을 확인한 결과 Romo1 억제시에 Bax의 발현이 증가하고, TRAIL을 처리한 것에서 Bax의 발현이 매우 높은 것을 확인한 것이다.

도 24는 TRAIL에 의한 세포사멸 경로에서 Romo1 및 Bax 등의 역할을 나타내기 위한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 발명의 일 측면은 Romo1(Reactive Oxygen Species Modulator 1) 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 포함하는 TRAIL에 대한 감수성 증진용 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명자들은 TRAIL 내성 극복을 위한 치료제 또는 센서타이저(sensitizer)를 개발하기 위한 연구를 실시하였다. 그 결과, Romo1의 발현이 TRAIL 비내성 암 세포주에 비하여 TRAIL 내성 암 세포주에서 현저히 증가되어 있음을 확인하여 Romo1이 TRAIL 내성 획득에 관여하고 있음을 검증하였으며, 나아가 Romo1의 발현 억제를 통하여 TRAIL에 대한 감수성(susceptibility)을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0018] 상기 Romo1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0019] [서열번호 1]
- [0020] MPVAVGPYGGSQPSCFDRVKMGFVMGCAVGMAGALFGTFSLRIGMRGRELMGGIGKTMQSGGTFGTFMAIGMGIRC
- [0021] 상기 Romo1 단백질 발현 또는 활성 억제제는 TRAIL 센서타이저(sensitizer)인 것이 바람직하다.
- [0022] 상기 Romo1 단백질의 발현 억제제는 Romo1 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하다.
- [0023] 상기 Romo1 단백질의 활성 억제제는 Romo1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 염타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하다.
- [0024] 상기 감수성 증진용 조성물은 TRAIL을 이용하여 암, 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 치료할 때 사용되는 것이 바람직하다.
- [0025] 상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나인 것이 바람직하다.
- [0026] 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나인 것이 바람직하다.
- [0027] 또한, 상기 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 그레브스병, 하시모토씨 갑상선염, 애디슨병, 백반증, 경피증, 굿패스처 신드롬, 베제트병, 크론병, 강직성 척추염, 포도막염, 혈소판 감소성 자반증, 심상성 천포창, 소아 당뇨병, 자가면역성 용혈성 빈혈, 크라일로글로불린증, 부신백질이영양증 및 전신성 홍반성 낭창으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나인 것이 바람직하다.

[0028] 안티센스 뉴클레오티드

[0029] 안티센스 뉴클레오티드는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.

[0030] 펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)

[0031] 상기 펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)는 Romo1 활성을 이끄는 Romo1 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce chemical co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β -아미노알콜(Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.

[0032] siRNA 분자

[0033] 센스 RNA와 안티센스 RNA가 이중가닥 RNA 분자를 형성하고, 이때 센스 RNA가 Romo1 mRNA 중 일부의 연속 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 핵산 서열을 포함하는 siRNA 분자인 것이 바람직하다. 상기 siRNA 분자는 Romo1 유전자의 염기서열 내에서 선택되는 10개 내지 30개의 염기로 구성되는 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, Romo1 유전자의 염기서열을 대상으로 상보적으로 결합할 수 있는 센스 서열을 가진 이중가닥 RNA 분자라면 모두 사용 가능하다. 상기 안티센스 서열은 센스 서열과 상보적인 서열을 가지는 것이 가장 바람직하다.

[0034] 항체

[0035] Romo1 항체는 Romo1 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.

[0036] 다클론 항체는 상기 Romo1을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에서 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 속주로부터 만들어질 수 있다.

[0037] 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G et al., Nature 256:495-497, 1975; Kozbor D et al., J Immunol Methods 81:31-42, 1985; Cote RJ et al., Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP et al., Mol cell Biol 62:109-120, 1984).

[0038] 또한, 상기 Romo1에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로써, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는

특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다(Huse WD et al., Science 254: 1275-1281, 1989).

[0039] 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.

[0040] 애포타머(Aptamer)

[0041] 애포타머(Aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 애포타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 애포타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 애포타머들이 계속해서 발굴되었다. 애포타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에서, TRAIL 내성을 보이는 대장암 세포주에 Romo1 shRNA와 TRAIL을 처리하였을 때 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였다. 더욱이, 종양을 이식한 마우스에서 Romo1 shRNA와 TRAIL을 주입하였을 때, 종양의 크기 감소 및 암세포의 사멸이 관찰되었다. 따라서, Romo1 단백질 발현 또는 활성 억제제는 TRAIL 감수성 증진용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0043] 상기 조성물은 Romo1 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.

[0044] 상기 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0045] 상기 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0046] 상기 조성물의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0047] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 Romo1 단백질의 발현 또는 활성 억제제, 및 TRAIL을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 암 세포에 상기 Romo1 단백질의 발현 또는 활성 억제제, 및 TRAIL을 병용처리한 경우 세포사멸이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 구체적으로는, Romo1의 억제는 TRAIL의 신호전달 관련인자인 Bax의 발현을 증가시키고, 발현이 증가된 Bax가 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것이 확인되었다.

- [0050] 상기 약학 조성물은 Romo1 억제제 1 내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명은 Romo1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 함유하는 항암 보조제를 제공한다.
- [0052] 상기 Romo1 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 상기 Romo1 단백질 발현 또는 활성 억제제는 TRAIL 센서타이저(sensitizer)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 상기 Romo1 단백질의 발현 억제제는 Romo1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0055] 상기 Romo1 단백질의 활성 억제제는 Romo1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고 간암, 폐암 또는 대장암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않으며, TRAIL에 대한 내성을 가진 암은 모두 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0057] 또한, 상기 항암 보조제에 있어서, Romo1 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 TRAIL 감수성을 증진시키는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0058] TRAIL 내성을 보이는 대장암 세포주에 Romo1 shRNA와 TRAIL을 처리하였을 때, 세포사멸이 유도되며, 종양을 이식한 마우스에서도 Romo1 shRNA와 TRAIL을 주입하였을 때, 종양의 크기 감소 및 암세포의 사멸을 유도하는 효과를 가지므로, Romo1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 함유하는 항암 보조제로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0059] 상기 항암 보조제는 Romo1 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.
- [0060] 상기 항암 보조제는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0061] 상기 항암 보조제는 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0062] 상기 항암 보조제의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0063] 본 발명의 항암 보조제는 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명은 상기 항암 보조제를 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 Romo1 발현 또는 활성 억제제를 TRAIL과 함께 처리하였을 때, TRAIL에 내성을 갖고 있는 대장암 세포주의 암 특이적인 세포사멸이 증가하였다. 또한, 본 발명에 따른 Romo1 발현 또는 활성 억제제의 암 특이적인 세포 사멸의 생체 내(in vivo) 효과가 종양을 이식한 누드모델에서 관찰되었다.

- [0066] 따라서, 본 발명에 따른 Romo1 발현 또는 활성 억제제를 함유하는 항암 보조제는 암 치료 또는 예방용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [0067] 상기 암 치료 또는 예방용 조성물은 Romo1 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.
- [0068] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0069] **실시예**
- [0070] **실험예 1. 대장암 세포에서 Romo1을 억제시 TRAIL의 민감성이 증대된다.**
- [0071] 대장암에서 Romo1의 발현량 증가 확인 - Immunohistochemistry assay
- [0072] 대장암에서 Romo1의 발현이 증가되어 있는 것을 IHC(Immunohistochemistry) assay를 통해 확인하였다. 먼저, 2009 ~ 2016년도 고대 구로병원 대장암 진단을 받은 환자로부터 적출된 대장암 조직을 샘플로 제작하여 IHC 염색을 실시하였다. 그리고, 상기 염색된 대장암 조직(Colon cancer tissue)이 코팅된 슬라이드를 deparaffinization시킨 후 peroxidase blocking reagent(3 % H₂O₂)를 이용하여 15분간 incubation 시켜주었다. 그 후에 100 °C에서 20분간 heating해주어 antigen retrieval 한 후 Romo1 antibody를 incubation시켜 조직을 염색시켰다. 그리고, Immunohistochemistry를 이용하여 조직에서의 발현여부를 확인하였다.
- [0073] 도 2 및 도 3은 대장암 조직에서 Romo1의 발현이 증가되는 것을 나타내는 immunohistochemistry 분석 결과이다. 도 2는 대장암 조직을 IHC 염색한 모습을 나타내는 이미지이고, 도 3은 상기 IHC 염색을 통해 대장암 조직에서의 Romo1의 발현량을 나타내는 그래프이다. 상기 도 2 및 도 3을 통해, 대장암 조직에서 Romo1의 발현량이 증가된 것을 확인하였다.
- [0074] Romo1 억제시 세포의 콜로니 형성능력 저해됨을 확인
- [0075] 대장암 세포주인 HCT116은 ATCC에서 구입하였고, Romo1 억제 세포주는 대장암 세포주(HCT116)에 Romo1 shRNA(sc-76423, Santa Cruz)를 lentiviral transduction을 통해 구축하였다. Romo1이 세포 성장에 미치는 영향을 확인해 보기 위해서 콜로니 형성능을 확인하기 위하여, 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 그리고, 14일 후 콜로니가 형성되면 염색하여 콜로니의 수를 확인하였다. 도 4는 상기 실험에서 콜로니가 형성된 모습을 나타내는 사진이다. 상기 도 4를 살펴보면, Romo1이 억제된 실험군과 Romo1이 억제된 세포주에 TRAIL을 처리한 실험군은 콜로니가 덜 형성되는 것을 확인할 수 있다.
- [0076] Romo1 억제 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 확인 - Flow cytometry
- [0077] DLD-1, SW480, HCT8, colo205와 같은 여러 대장암 세포주에서 Romo1이 억제되었을 때에 TRAIL에 대한 세포 사멸이 증가하는지 여부를 확인하였다.
- [0078] 상기 확인을 위해, 먼저 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 그리고, 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 cell을 harvest하였다. 그 후, Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 확인하였다. 도 5는 여러 대장암 세포주에서 Romo1이 억제되었을 때에 TRAIL을 처리한 경우 세포 사멸이 증가하는 것을 나타내는 그래프이다. 상기 도 5를 통해, 여러 대장암 세포주에서 Romo1이 억제되었을 때에 TRAIL에 대해 민감성이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0079] Romo1 억제 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 단백질 수준에서 확인 - Western blot
- [0080] 대장암 세포주에서 Romo1을 억제하거나 과발현시킨 후 TRAIL 처리하는 경우에 세포 사멸 관련 단백질의 발현을

비교하기 위한 실험을 실시하였다. 이를 위해 먼저, 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하고, 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하였다. 6 시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하였다. 그리고, 세포 사멸에 관련한 marker를 사용하여 발현의 변화를 확인하여 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0081] 도 6은 대장암 세포주에서 Romo1 억제하고 TRAIL을 처리한 경우 세포 사멸 관련 단백질의 발현이 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이고, 도 7은 대장암 세포주에서 Romo1을 과발현시키고 TRAIL을 처리한 경우 세포 사멸 관련 단백질의 발현에 변화가 없는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

[0082] 도 6을 살펴보면, HCT116 대장암 세포주에서 Romo1이 억제되었을 때에 TRAIL을 처리한 경우, Caspase 3, Caspase 8, PARP와 같은 세포 사멸에 관련된 단백질들의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 그리고, 도 7을 살펴보면, Romo1 과발현 시에는 TRAIL을 처리하여도 세포 사멸에 관련된 단백질들의 발현에 변화가 없는 것을 알 수 있다.

[0083] 이러한 결과들을 통해, Romo1을 억제하는 경우 TRAIL에 대한 민감성이 증가하는 것을 세포 수준에서 확인할 수 있었다.

[0085] 실험예 2. Romo1의 억제가 Bax의 단백질 수준을 조절한다.

[0086] Romo1 억제시와 과발현시에 TRAIL 신호전달에 관련된 인자들의 발현을 mRNA 수준에서 확인 - RT-PCR

[0087] Romo1의 억제가 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸을 증가시키기 때문에 어떠한 인자가 작용하는 지를 알아보기 위하여, TRAIL 신호전달과 세포 사멸에 관련한 인자들을 mRNA 수준에서 살펴보기 위한 실험을 실시하였다.

[0088] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 cell을 harvest하였다. RNA extraction 후 PCR을 통해 cDNA를 합성하고, PCR한 후 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0089] 도 8은 Romo1 억제시에 TRAIL 신호전달 관련 인자들의 발현량에 변화가 없는 것을 mRNA 수준에서 확인한 결과이고, 도 9는 Romo1 과발현시에 TRAIL 신호전달 관련 인자들의 발현량에 변화가 없는 것을 mRNA 수준에서 확인한 결과이다.

[0091] Romo1 억제시와 과발현시에 TRAIL 신호전달에 관련된 인자들의 발현을 mRNA 수준에서 확인 - Western blot

[0092] Romo1의 억제와 과발현시에 TRAIL 신호전달에 관련한 인자들의 발현의 변화를 단백질 수준에서 살펴보기 위한 실험을 실시하였다.

[0093] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하였다. 상기 웨스턴 블랏 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[0094] 도 10은 Romo1 억제시에 TRAIL 신호전달에 관련된 인자들의 발현을 단백질 수준에서 확인한 결과이고, 도 11은 Romo1 과발현시에 TRAIL 신호전달에 관련된 인자들의 발현을 단백질 수준에서 확인한 결과이다.

[0095] 상기 도 11을 보면, Romo1 과발현시에는 관련 인자들의 단백질 발현의 변화가 없었지만, 도 10을 통해 Romo1 억제시에는 TRAIL 신호전달 관련인자들 중 Bax의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0096] 이로 인해 Romo1이 mRNA 수준을 조절하는 것이 아니라 단백질 수준을 조절하는 것을 알 수 있었다. 즉, Romo1이 transcription을 조절하는 것이 아니라 post-translation을 조절한다는 것을 의미한다.

[0097] 실험예 3. Romo1은 Bax의 Ubiquitination에 관여한다.

[0098] Bax가 결실된 세포주에서 TRAIL을 처리하여 Romo1의 여부에 따른 세포 사멸 확인 - Western blot

[0099] 상기 실험에서 Romo1의 억제시 TRAIL 신호전달 관련인자 중 하나인 Bax의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인한 뒤에, Bax가 결여된 세포주에서 실험을 진행해보았다.

- [0100] Bax가 결실된 대장암 세포주(HCT116 Bax KO) seeding하였다. 24시간 후 Romo1 siRNA를 transfection하고, 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하였다. 그리고, 6시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting 을 실시하였다. 세포 사멸에 관련한 인자들의 발현의 변화를 확인하고 도 12에 나타내었다.
- [0101] 도 12는 Bax가 결여된 세포주에 TRAIL을 처리해도 세포 사멸이 많이 일어나지 않는 것에 비해, 같은 조건에서 Romo1만 억제된 세포주에서는 세포 사멸이 많이 일어나는 것을 Western blot 실험을 통해 나타낸 것이다.
- [0102] Bax가 결실된 세포주에서 TRAIL을 처리하여 Romo1의 여부에 따른 세포 사멸 확인- Flow cytometry
- [0103] Bax가 결실된 대장암 세포주(HCT116 Bax KO) seeding하였다. 24시간 후 Romo1 siRNA를 transfection하고, 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리한 후, 6시간 후 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고, Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 확인한 후, 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [0104] 도 13은 Bax가 결여된 세포주에 TRAIL을 처리해도 세포 사멸이 많이 일어나지 않는 것에 비해, 같은 조건에서 Romo1만 억제된 세포주에서는 세포 사멸이 많이 일어나는 것을 유세포 분석 실험을 통해 나타낸 것이다.
- [0105] 상기 결과들(도 12 및 도 13)을 통해, Romo1이 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸에 중요한 역할을 끼치는 것을 알 수 있었다.
- [0106] Romo1이 Bax 발현의 증가에 관여함을 확인 - Western blot
- [0107] Romo1이 Bax의 단백질 수준을 조절하는 것을 확인하기 위하여, proteasome inhibitor인 Bortezomib을 처리하였다.
- [0108] 먼저, 상기 실험을 위해 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 24시간 후 Bortezomib(10nM)을 처리하고 harvest하였다. lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting 을 실시하고, Bax 발현의 변화를 확인한 후 그 결과를 도 14에 나타내었다.
- [0109] 도 14는 Romo1 억제 세포주에 proteasome inhibitor인 Bortezomib을 처리하는 경우 Bax의 발현이 더 증가하는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.
- [0111] Romo1이 Bax의 ubiquitination에 관여함을 확인 - Co-immunoprecipitation
- [0112] Romo1이 Bax의 ubiquitination에 관여하는지 알아보기 위해 Immunoprecipitation 실험을 진행하였다.
- [0113] 먼저, 상기 실험을 실시하기 위해 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 그리고, 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 cell을 harvest하였다. bead와 Ub antibody을 붙이고 난 후에, Western blotting과 같은 방법을 통하여 Bax의 발현을 확인하여 Bax의 ubiquitination을 확인하였고, 그 결과를 도 15에 나타내었다.
- [0114] 도 15는 Romo1 억제시 Bax의 ubiquitination이 감소되는 것을 나타내는 Co-Immunoprecipitation 결과이다.
- [0115] 상기 실험 결과를 통해, Romo1이 Bax의 ubiquitination을 조절한다는 것을 알 수 있다.
- [0117] **실험예 4. Romo1의 억제는 Bax의 미토콘드리아로의 이동을 증가시키고 미토콘드리아의 기능이상을 초래한다.**
- [0118] 미토콘드리아 분리를 통해 Romo1 억제시 Bax의 미토콘드리아로의 이동을 확인 - Mitochondria fraction, Western blot
- [0119] Romo1은 미토콘드리아의 세포막 단백질이고, Bax는 세포질로부터 미토콘드리아로 이동하여 세포 사멸에 관여하는 단백질이다. Romo1이 Bax의 발현을 조절할 때에 Bax의 미토콘드리아로의 이동에 관여하는지 알아보기 위해 미토콘드리아 분리를 하고 Western blot을 진행하였다.
- [0120] 상기 실험을 위해 먼저, 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 그 후, Homogenizer를 이용하여 미토콘드리아를 분리하고, Western blot을 통해 관련된 인자들의 단백질 발현 변화를 확인하여 도 16

에 나타내었다.

[0121] 도 16은 Romo1 억제시 TRAIL을 처리하면 Romo1의 억제로 인해 발현이 증가된 Bax가 미토콘드리아로 더 많이 이동하는 것을 나타내는 결과이다.

[0122] Romo1 억제시 미토콘드리아의 기능장애가 증가함을 확인 - Flow cytometry

[0123] 미토콘드리아의 기능 저해는 세포 사멸로 이어진다는 사실은 이미 알려져 있는 사실로, Romo1의 억제시에 TRAIL을 처리하면 미토콘드리아의 기능의 저해로 인해 세포 사멸로 이어지는 것인지를 확인해보고자 유세포 분석을 진행하였다.

[0124] 상기 실험을 위해 먼저, 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 24시간 후 TRAIL(5 ng/ml)을 처리하고, 6시간 후 37℃에서 JC-1 dye를 염색한 후 10분 뒤 harvest하였다. Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 미토콘드리아의 기능장애 정도를 확인하여 도 17에 나타내었다.

[0125] 도 17은 Romo1의 억제시 TRAIL을 처리하면 미토콘드리아의 기능 장애로 세포사멸이 더 증가하는 것을 나타내는 결과이다.

[0126] Romo1 억제시 TRAIL 처리하여 미토콘드리아의 Bax와 Romo1의 발현 변화 확인 - Immunofluorescence

[0127] 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 seeding하였다. 24시간 후 3.7% formaldehyde를 넣어서 고정화시키고, triton x-100으로 항체의 투과율을 높여준 후 1차 항체, 2차 항체를 붙였다. 그리고, DAPI 염색을 통하여 핵을 염색한 뒤 슬라이드에 마운팅 하여 confocal microscopy를 통하여 Romo1과 Bax의 발현 변화를 확인하였다.

[0128] 도 18은 Romo1 억제시에 TRAIL을 처리하여 Bax의 미토콘드리아로의 이동을 Immunofluorescence로 확인하여 나타낸 것이고, 도 19는 Romo1 억제시에 TRAIL을 처리하여 미토콘드리아에서의 Romo1의 발현을 Immunofluorescence로 확인하여 나타낸 것이다.

[0129]

[0130] 즉, 상기 실험결과들을 통해 Romo1 억제시 TRAIL 신호전달 관련인자인 Bax의 미토콘드리아로의 이동이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0131] **실험예 5. Romo1의 억제는 Bax를 증가시킴으로서 TRAIL에 대한 세포 사멸 감수성을 증대시킨다.**

[0132] Romo1 억제시 TRAIL에 의해 유도된 세포 사멸의 민감성이 증가함 ?? 종양 크기 측정, xenograft

[0133] 이전의 결과들을 바탕으로 Romo1의 억제가 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것을 동물 실험을 통해 확인하고자 하였다.

[0134] 먼저, 5주령 Balb/c-nude mouse의 피하에 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 주입하고 종양이 자라날 때까지 키웠다. 종양의 크기를 2-3일에 한번 측정하고, 일정한 크기(100 mm³)가 되면 TRAIL을 복강에 주사하였다. 3일 간격으로 5번 TRAIL을 복강에 주사하고, xenograft를 통해 종양 크기의 차이를 확인하였다.

[0135] 5주령 누드마우스에 대장암 세포주 HCT116과 Romo1 억제 세포주를 피하에 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과 Romo1이 억제되었을 때 종양이 덜 형성되고, Romo1 억제 세포주에 TRAIL을 처리한 것이 종양이 자라는 속도가 늦는 것을 확인하였다(도 20).

[0136] 그리고, xenograft를 통해 온전한 종양의 크기를 비교한 결과 마찬가지로 Romo1이 억제된 조건에서 TRAIL을 처리한 것의 종양의 크기가 가장 작았다(도 21).

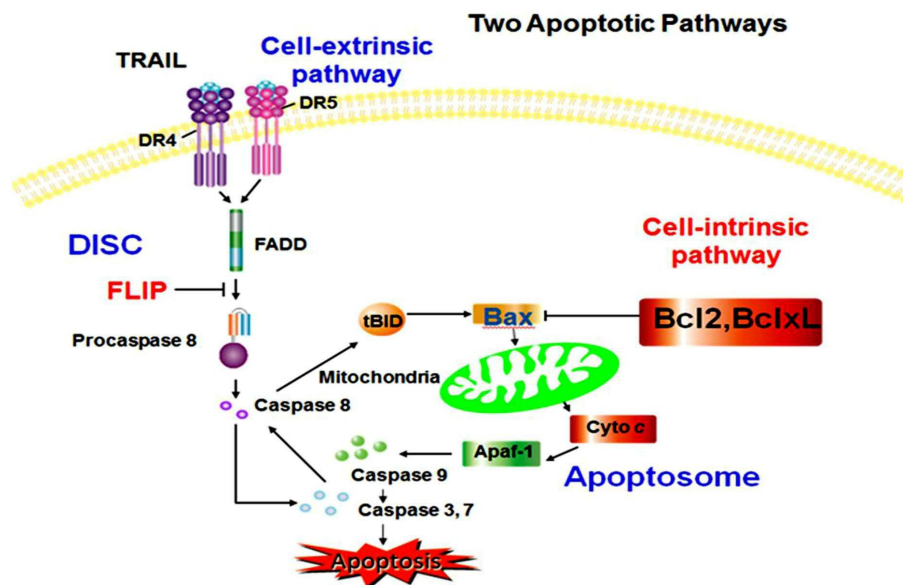
[0137] Romo1 억제시 TRAIL에 의해 유도된 세포 사멸이 증가함 ?? TUNEL assay

[0138] xenograft 한 후에 떼어낸 종양 조직에서 Romo1과 Bax의 발현을 확인하고자 하였다.

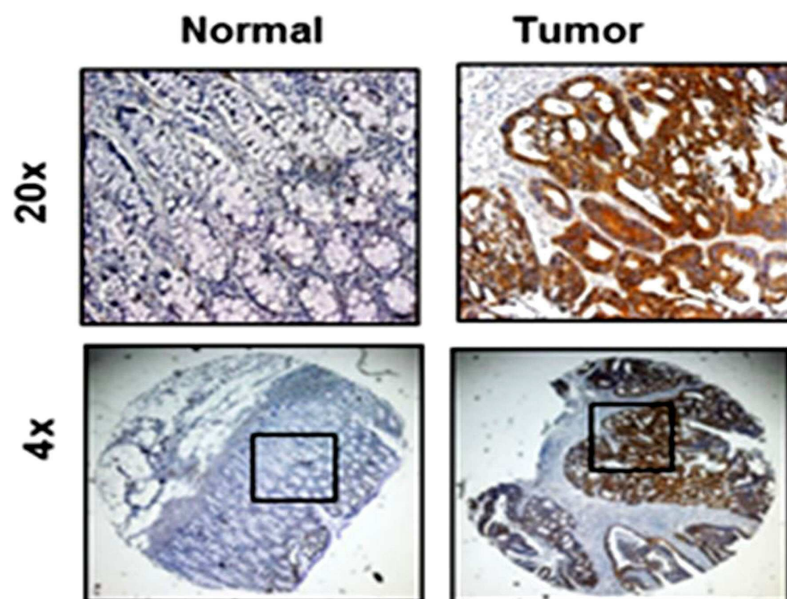
- [0139] 먼저, 5주령 Balb/c-nude mouse의 피하에 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 주입하고 종양이 자라날 때까지 키웠다. 종양이 일정한 크기(100 mm^3)가 되면 TRAIL을 복강에 주사하였다. 3일 간격으로 5번 TRAIL을 복강에 주사한 후 xenograft를 통해 종양을 떼어내었다. 마우스에서 xenograft한 종양을 tissue processing 과정을 거쳐 파라핀에 embedding한 후 섹션하여 슬라이드에 붙였다. TUNEL assay를 통해 염색하고 마운팅한 후 confocal microscope로 세포 사멸의 정도를 확인하였다.
- [0140] 상기 TUNEL assay를 통해 Romo1이 없을 때에 TRAIL을 처리한 조직에서 현저히 세포 사멸이 일어나는 것을 확인하였다(도 22).
- [0141] Romo1 억제시 TRAIL에 의해 유도된 세포 사멸이 Bax의 증가를 통해 일어남을 확인 - Immunofluorescence
- [0142] 상기 xenograft한 후에 떼어낸 종양 조직에서 Immunofluorescence를 통해 Romo1과 Bax의 발현을 확인하고자 하였다.
- [0143] 먼저, 5주령 Balb/c-nude mouse의 피하에 대장암 세포주(HCT116)와 Romo1 억제 세포주를 주입하고 종양이 자라날 때까지 키웠다. 종양이 일정한 크기(100 mm^3)가 되면 TRAIL을 복강에 주사하였다. 3일 간격으로 5번 TRAIL을 복강에 주사한 후 xenograft를 통해 종양을 떼어내었다. 마우스에서 xenograft한 종양을 tissue processing 과정을 거쳐 파라핀에 embedding한 후 섹션하여 슬라이드에 붙였다. Romo1과 Bax를 1차 항체로 붙여준 후 각각 2차 항체를 붙였다. DAPI 염색을 통하여 핵을 염색한 뒤 슬라이드에 마운팅 하여 confocal microscopy를 통하여 Romo1과 Bax의 발현 변화를 확인하였다.
- [0144] 상기 Immunofluorescence를 통해 Romo1과 Bax의 발현을 확인한 결과 Romo1 억제시에 Bax의 발현이 증가하고, TRAIL을 처리한 것에서 Bax의 발현이 매우 높은 것을 확인하였다(도 23).
- [0145] 도 24는 TRAIL에 의한 세포사멸 경로에서 Romo1 및 Bax 등의 역할을 나타내기 위한 모식도이다.
- [0146] 상기 실험 결과들을 통해, Romo1의 억제는 Bax의 발현을 증가시키고, 상기 발현이 증가된 Bax가 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것이 동물실험에서도 확인되었다.
- [0147] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

도면

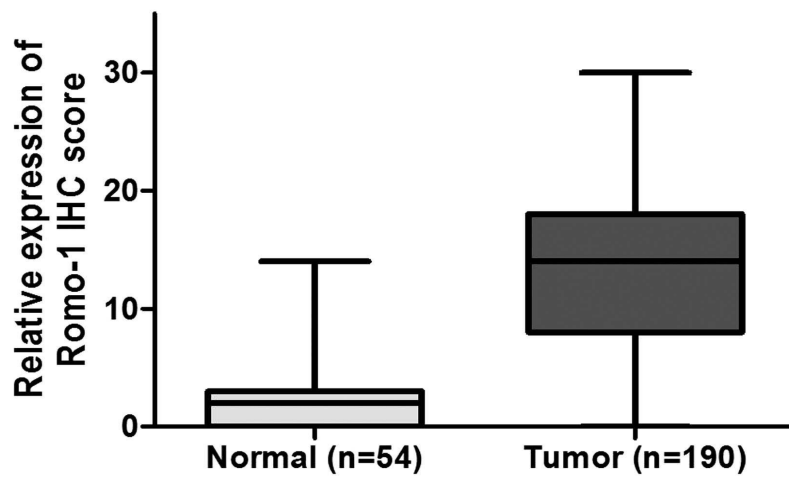
도면1



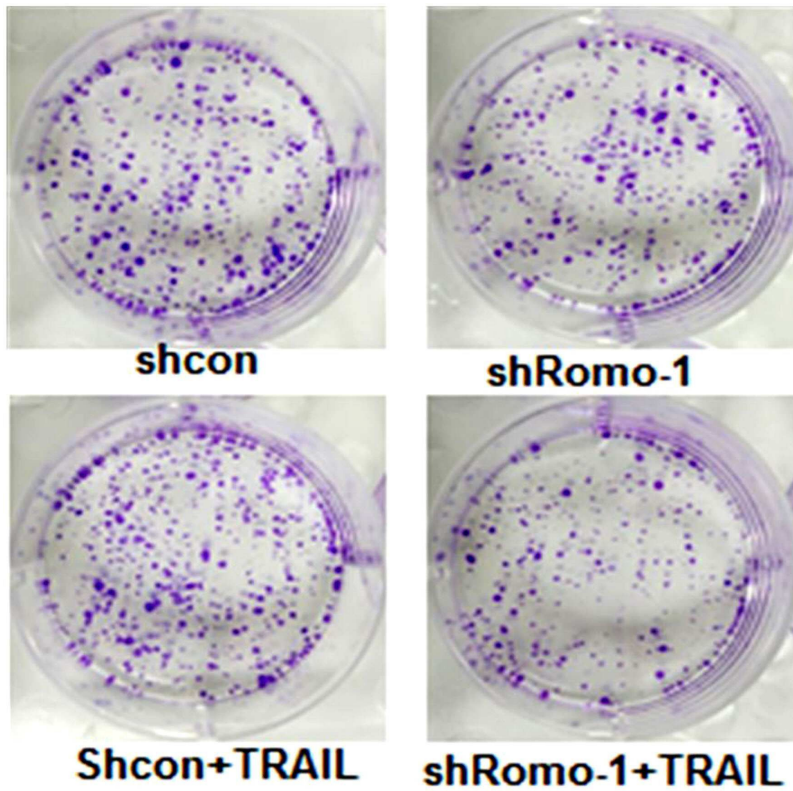
도면2



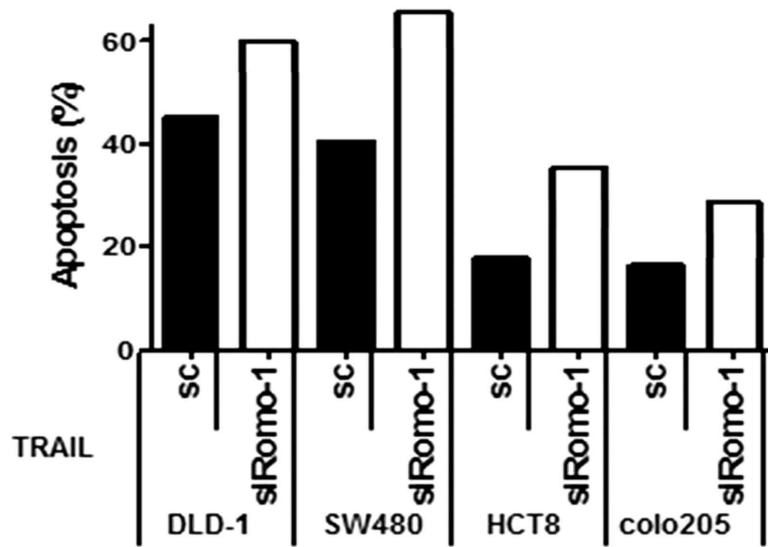
도면3



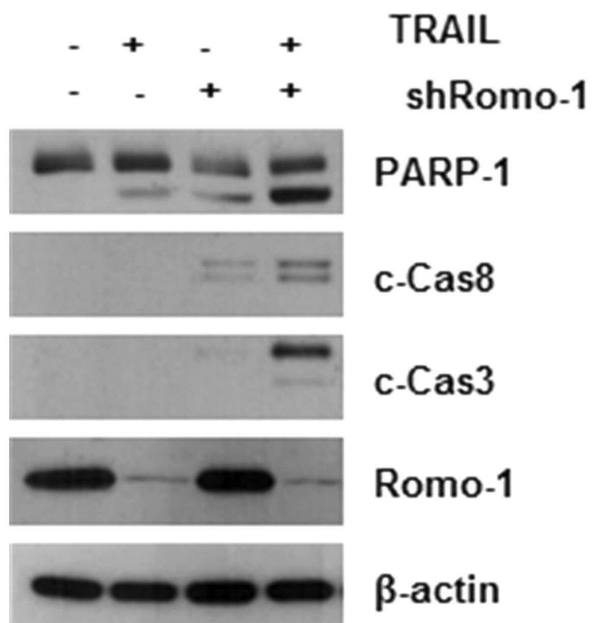
도면4



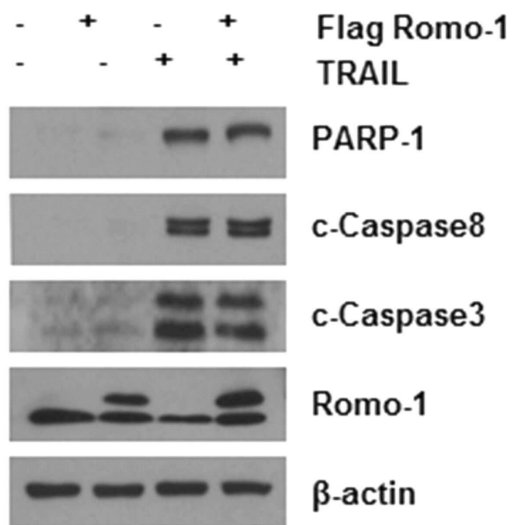
도면5



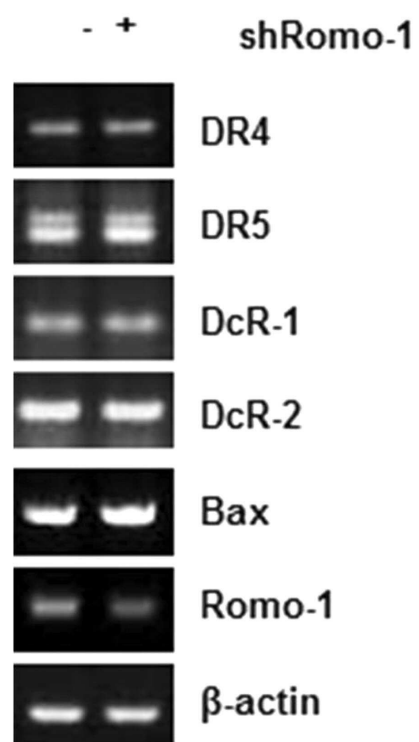
도면6



도면7



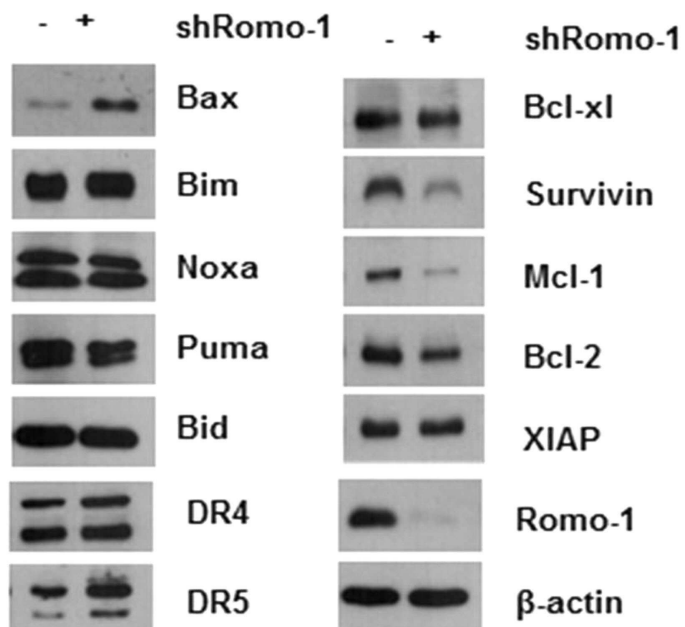
도면8



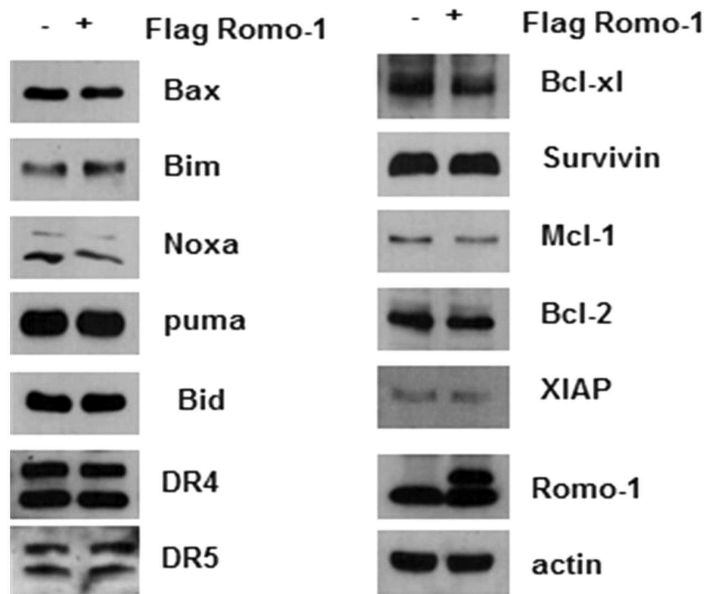
도면9



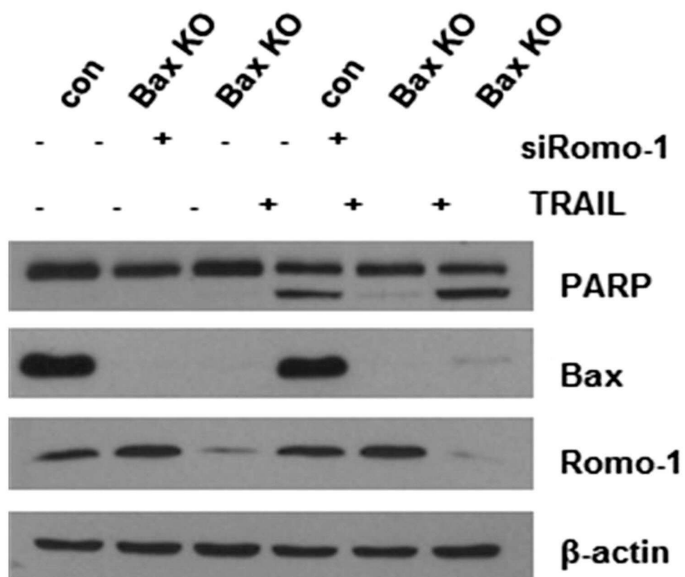
도면10



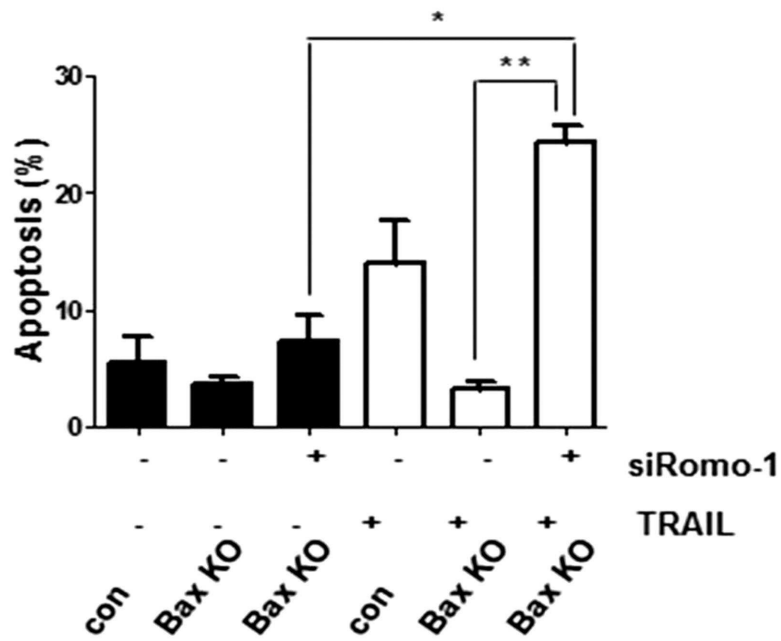
도면11



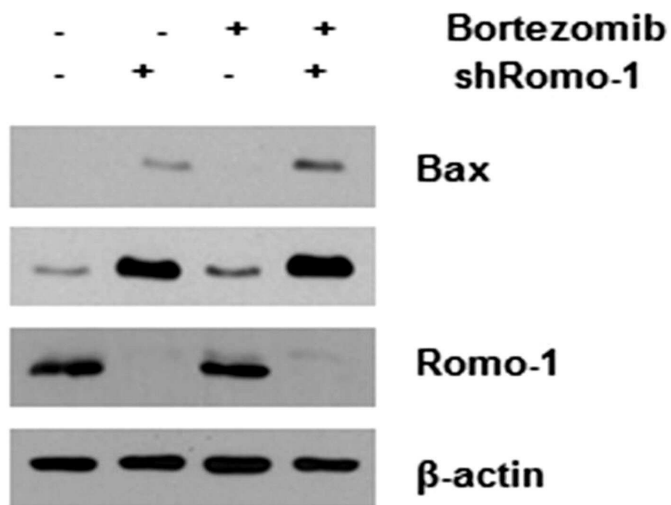
도면12



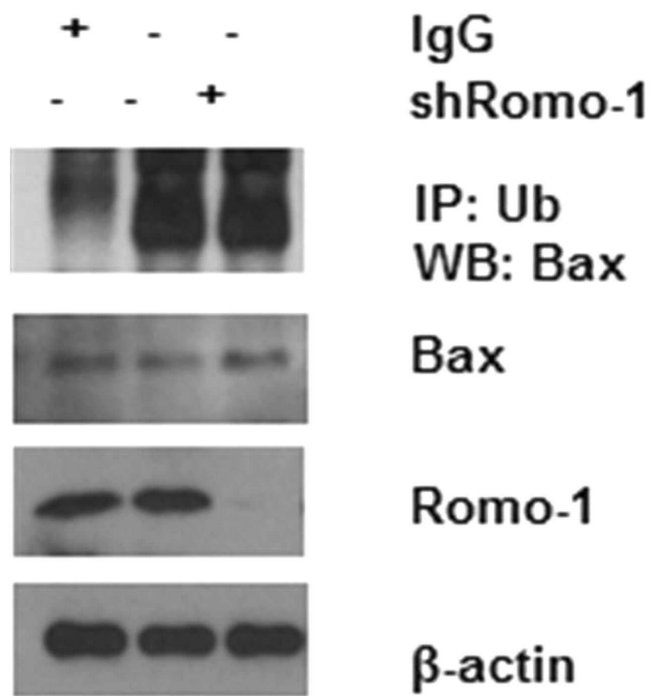
도면13



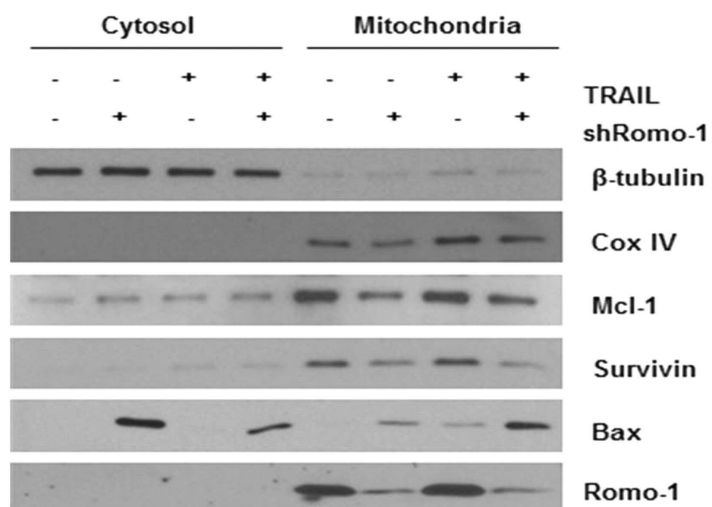
도면14



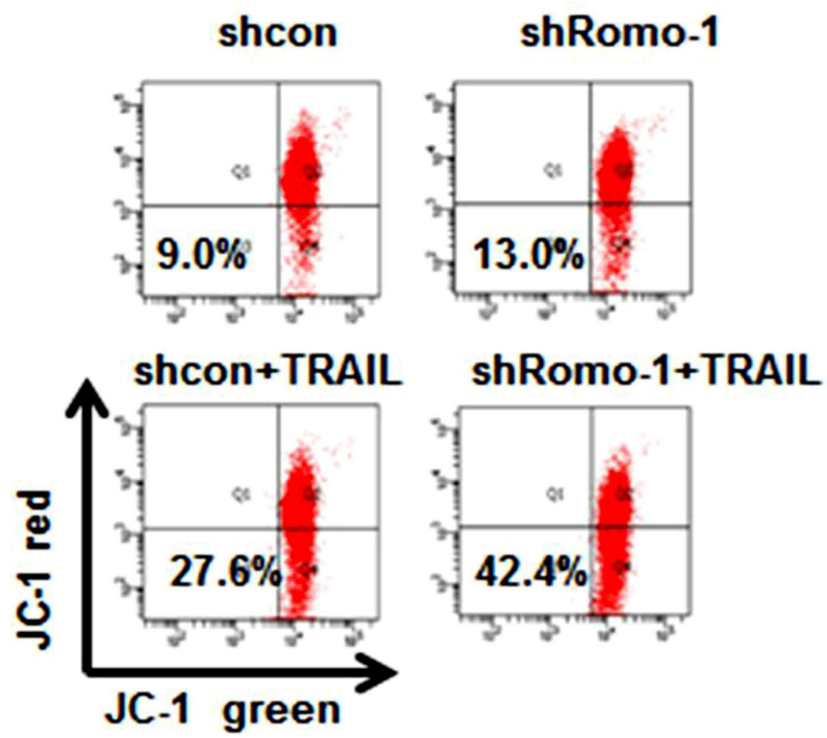
도면15



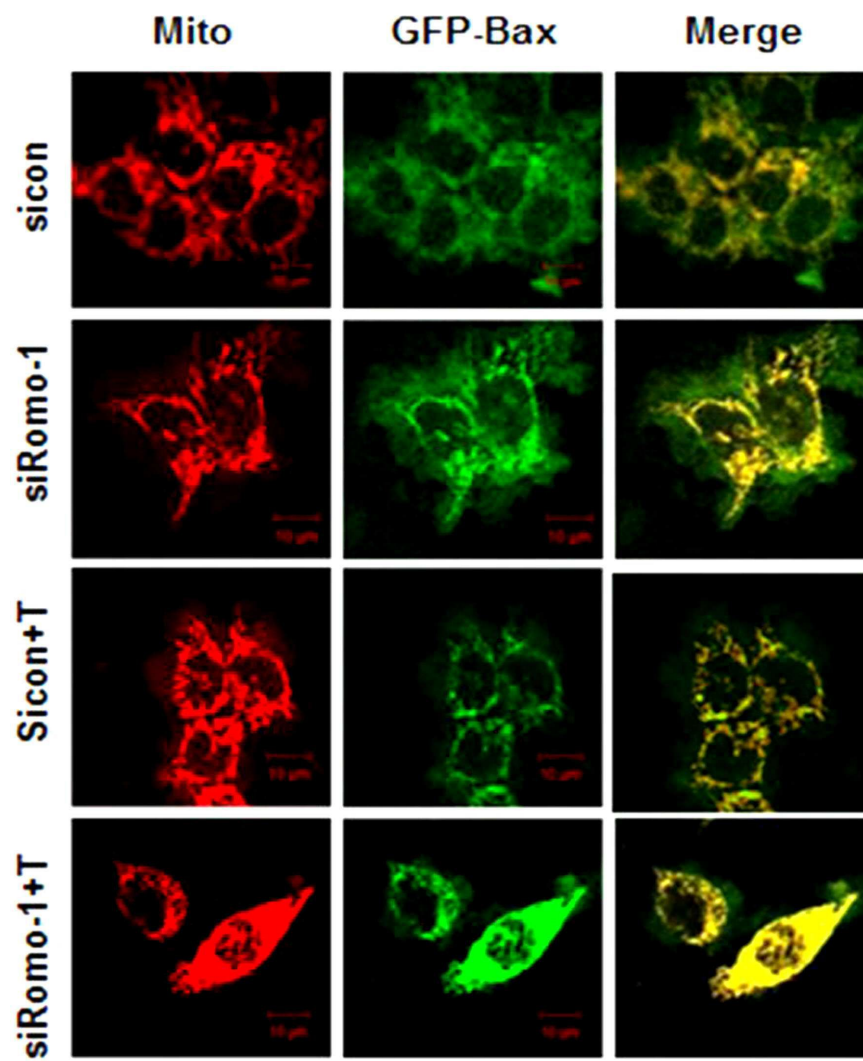
도면16



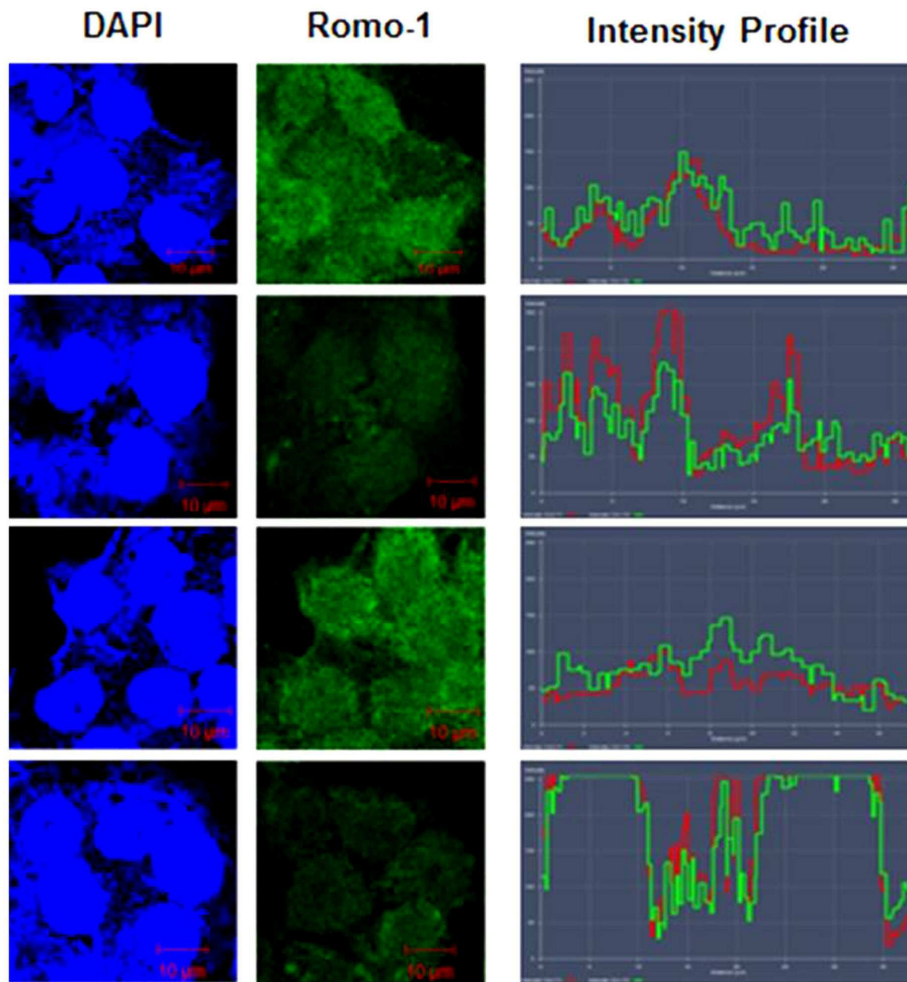
도면17



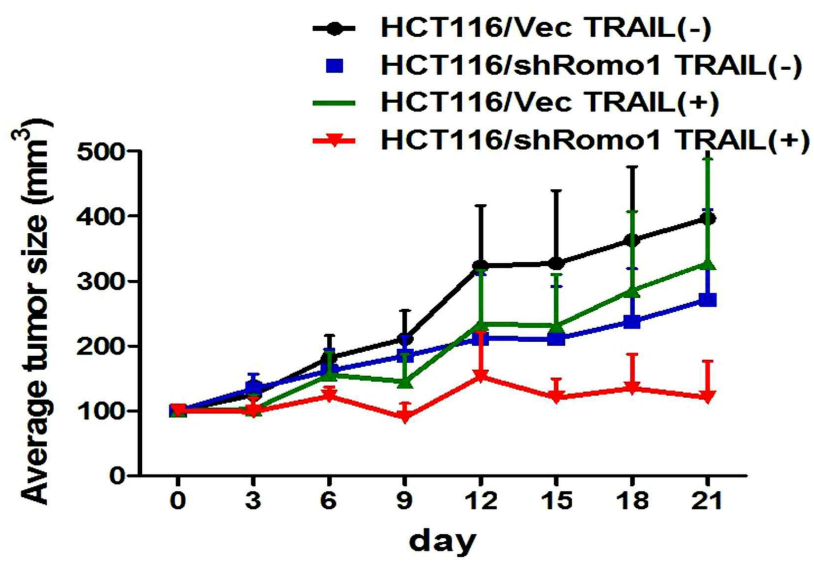
도면18



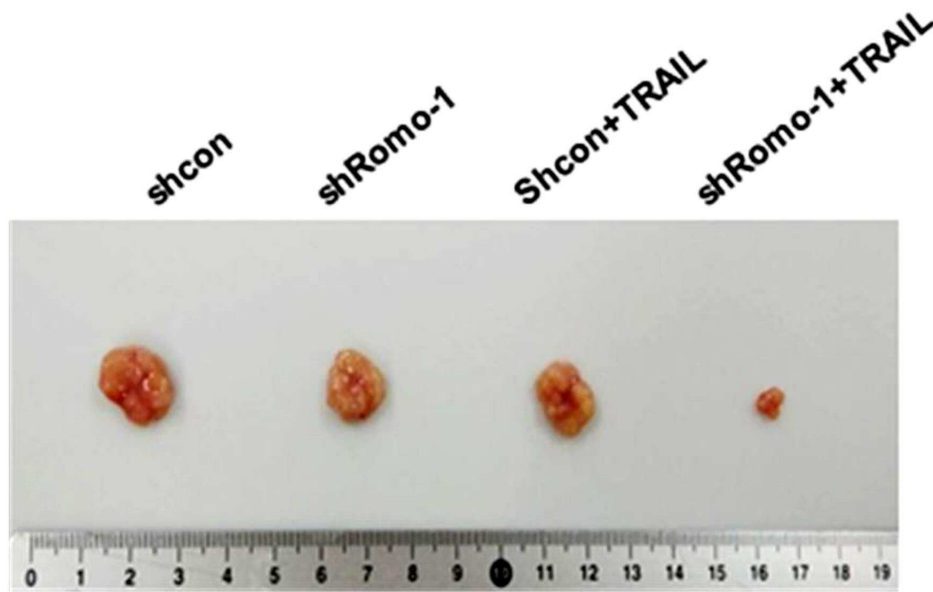
도면19



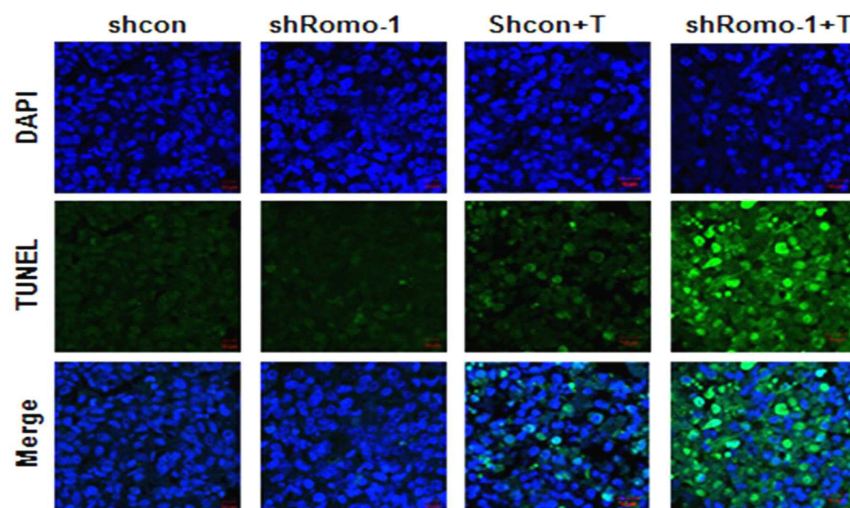
도면20



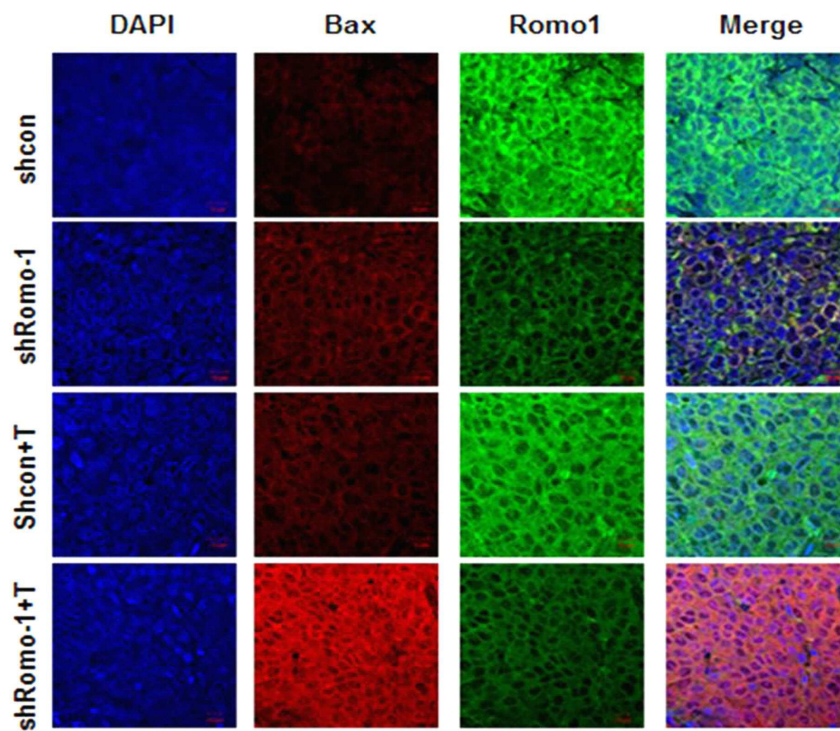
도면21



도면22



도면23



도면24

