



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0118910
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0036179
(22) 출원일자 2014년03월27일
심사청구일자 2014년03월27일
(30) 우선권주장
1020130032957 2013년03월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김태원
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
서관 8층
진동훈
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 5층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

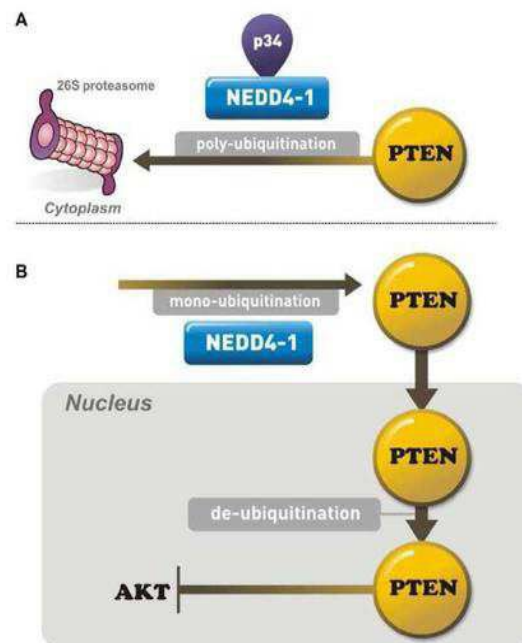
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 p34의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 전이 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 p34의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 전이 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, p34 단백질의 녹다운(knock-down)은 PTEN의 모노-유비퀴틴화를 일으켜 PTEN의 핵국재화(nuclear localization)를 촉진시키는 결과, 종양의 생존, 증식, 침습성 및 전이성과 관련된 Akt 경로를 억제하므로 PTEN 및 NEDD4-1을 동시 발현하는 다양한 암 세포의 종양발생 및 침습 형성능을 현저하게 감소시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제는 암의 치료제 또는 전이 억제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도61



(72) 발명자

홍승우

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 5층

문재희

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 5층

신재식

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 5층

김진선

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 5층

정경아

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 5층

이정신

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
서관 7층

최은경

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
서울아산병원 서관 11층

이재련

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
서관 8층

홍용상

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 융합연구관 13층

김규표

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 교육연구관 5층

남기엽

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 교육연구관 5층

김봉철

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
아산생명과학연구원 교육연구관 5층

특허청구의 범위

청구항 1

p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 억제제는, p34 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

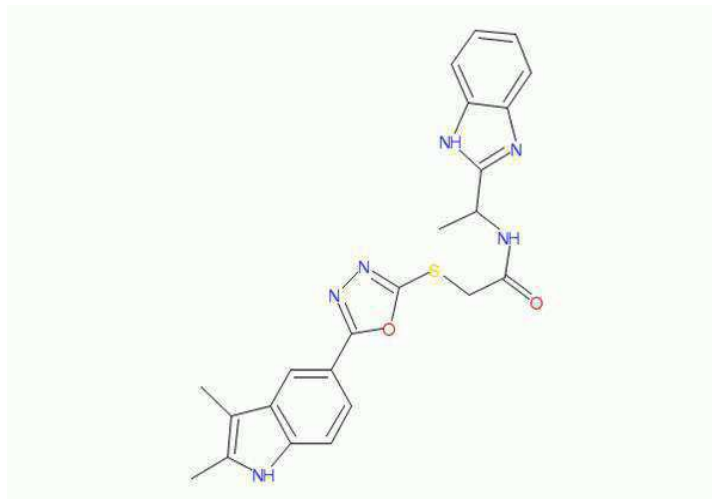
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 활성 억제제는, p34 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드모방체, 기질 유사체, 앵타머, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 p34 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종 중 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적

조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 p34 및 NEDD4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)을 동시에 발현하는 암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 9

p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 암의 치료 또는 전이 억제 방법.

청구항 10

- 1) p34 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 세포주에서 p34 유전자의 발현 정도 또는 p34 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 p34 유전자의 발현 정도 또는 p34 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암의 치료 또는 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 2)단계에서 유전자의 발현 정도는 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯(Northern blot), cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 및 인 시투(in situ) 혼성화 반응으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 암의 치료 또는 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 2)단계에서 단백질의 활성 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 암의 치료 또는 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

- 1) 생물학적 시료에 NEDD4-1(Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 생물학적 시료에서 암 세포의 증식 여부를 측정하는 단계;를 포함하는, p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 1) 단계의 생물학적 시료는 암에 걸린 개체의 혈액, 소변, 타액 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 방법은 3) 생물학적 시료의 암 세포가 증식되면 p34의 발현 억제제 또는 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과가 존재하지 않고, 생물학적 시료의 암 세포가 증식되지 않으면 p34의 발현 억제제 또는 활성 억제제의 치료 효과가 존재한다고 예측하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 p34의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 증식하고 불사화되어 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). 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용이 큰 문제로 대두되고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다.

[0003] 최근, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고는 있지만, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다. 이에 따라, 암과 관련된 다양한 생체 내 분자를 동정하고 이를 표적으로 하는 약물을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이러한 약물 중 일부를 조합하여 암 치료 효과를 증진시키고자 하는 노력 역시 시도되고 있다. 따라서 암과 관련된 표적 분자를 추가적으로 발굴하는 노력은 매우 중요한 일이라고 할 수 있다.

[0004] PI3K(Phosphatidylinositol-3-kinase) 신호전달 단계의 중심적인 음성조절자인 PTEN(Phosphatase and tensin homolog) 종양 억제자는 인간의 암에서 가장 빈번하게 변이, 또는 결실되는 유전자로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면, 종양 억제자인 PTEN의 기능을 조절하는데 있어서 유비퀴틴화와 관련된 중요한 의문들이 제기되어 왔으며, PTEN의 유비퀴틴화에 필요한 조절 기전에 대해 계속해서 연구가 진행되고 있다.

[0005] 본 발명자들은 PTEN의 유비퀴틴화에 관련된 기전에 관하여 연구하던 중, NEDD4-1(Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)의 결합 파트너인 p34 단백질이 NEDD4-1 단백질의 안정성을 조절하며, 이를 통하여 PTEN의 모노 및 폴리-유비퀴틴화의 전환을 조절한다는 것을 확인하였다.

[0006] 보다 구체적으로, p34의 발현증가는 E3 유비퀴틴 리가아제인 NEDD4-1의 WW1 도메인과 상호작용하여 이의 단백질

안정성을 향상시키는 결과, PTEN의 폴리-유비퀴틴화 및 PTEN 단백질의 분해를 초래한 반면, p34의 턴다운(knock-down)은 PTEN의 모노-유비퀴틴화를 일으켜 PTEN의 핵국재화(nuclear localization)를 촉진시키는 결과 종양의 생존, 증식, 침습성 내지는 전이성과 관련된 Akt 경로를 억제하였다.

[0007] 따라서 본 발명자들은 p34는 NEDD4-1 단백질의 안정성을 조절함으로써 PTEN 유비퀴틴화 경로에서 중요한 조절자로서 작용하며, 특히 NEDD4-1 및 PTEN과 관련된 암의 치료에 있어 효과적인 타겟이 될 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 암의 치료 또는 전이 억제 방법을 제공하고자 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 p34를 이용한 암의 치료 또는 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 생물학적 시료에 NEDD4-1의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 처리하는 단계;를 포함하는, p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 암의 치료 또는 전이 억제 방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 암 치료 또는 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0018] 1) p34 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0019] 2) 상기 세포주에서 p34 유전자의 발현 정도 또는 p34 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0020] 3) 상기 p34 유전자의 발현 정도 또는 p34 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.
- [0021] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법을 제공한다:
- [0022] 1) 생물학적 시료에 NEDD4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 처리하는 단계; 및
- [0023] 2) 상기 생물학적 시료에서 암 세포의 증식 여부를 측정하는 단계.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, p34 단백질의 녹다운(knock-down)은 PTEN의 모노-유비퀴틴화를 일으켜 PTEN의 핵국재화(nuclear localization)를 촉진시키는 결과, 종양의 생존, 증식, 침습성 및 전이성과 관련된 Akt 경로를 억제하므로 PTEN 및 NEDD4-1을 동시 발현하는 다양한 암 세포의 종양발생 및 침착 형성능을 현저하게 감소시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제는 암의 치료제 또는 전이 억제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 293, DU145 및 MCF-7 세포에서 NEDD-1을 이용한 면역침강반응 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 293, DU145 및 MCF-7 세포에서 p34, NEDD4-1, 및 PTEN 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 DU145 및 MCF-7 세포의 면역 침강물에서 p34 및 NEDD4-1의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 LS1034 및 MDA-MB231 세포에서 NEDD4-1 단백질에 대한 면역침강반응 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 다양한 결장암 및 유방암 세포주에서 p34, NEDD4-1, 및 PTEN 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 293 세포에서 p34 및 NEDD4-1에 대한 면역침강반응 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 GST-폴 다운 분석 및 웨스턴 블롯을 통한 p34 및 NEDD4-1의 발현 정도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 GST-폴 다운 분석 및 웨스턴 블롯을 통한 p34, PTEN, 및 NEDD4-1의 발현 정도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 NEDD4-1 변이체의 지도 및, GST-폴 다운 분석을 통한 p34 및 NEDD4-1 단백질의 상호작용 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 WW1 도메인이 결실된 NEDD4-1 단백질에서 GST-폴 다운 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 GST-폴 다운 분석을 통한 p34, NEDD4-1, 및 PTEN 단백질의 상호작용 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 p34의 발현 및 MG132 처리 조건에 따른 NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화를 면역침강반응을 통하여 나타낸 도이다.

도 13은 p34의 발현에 따른 NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화를 GST-폴 다운 분석을 통하여 나타낸 도이다.

도 14는 p34 또는 NEDD4-1의 발현, 및 CHX 처리 조건에 따른 NEDD4-1의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 p34의 녹다운에 따른 NEDD4-1 및 p34 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 p34의 녹다운에 따른 PTEN 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 p34의 발현에 따른 PTEN 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 p34의 녹다운 및 CHX 처리 조건에 따른 PTEN 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 19는 293 세포에서 p34로 트랜스펙션 및 MG132 처리에 따른 PTEN 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 각 세포에서 p34로 트랜스펙션 및 MG132 처리에 따른 PTEN 단백질의 유비퀴틴화 정도를 나타낸 도이다.

도 21은 각 세포 내에서 p34 녹다운에 따른 PTEN 단백질의 폴리-유비퀴틴화 정도를 나타낸 도이다.

도 22는 293 세포에서 p34의 발현에 따른 PTEN 지질 인산분해효소 활성을 나타낸 도이다.

도 23은 NEDD4-1 siRNA/shRNA, 및 p34를 트랜스펙션 시킨 세포에서 PTEN의 발현 정도 및 Akt 인산화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 24는 p34, NEDD4-1 siRNA, 및 CHX 처리에 따른 PTEN의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 25는 NEDD4-1 siRNA/shRNA, p34의 트랜스펙션 및 MG132 처리에 따른 PTEN 단백질의 유비퀴틴화 정도를 나타낸 도이다.

도 26은 p34의 발현 및 NEDD4-1의 억하운에 따른 PTEN 지질 인산분해 효소 활성을 나타낸 도이다.

도 27은 XIAP를 억하운시킨 MEF 세포에서의 XIAP의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 28은 XIAP-억하운 MEF 세포에서 p34의 트랜스펙션 결과에 따른 PTEN 단백질 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 29는 XIAP-억하운 MEF 세포에서 p34의 트랜스펙션 결과에 따른 PTEN 단백질 발현 정도를 면역침강 및 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 30은 p34-억하운 MCF-7, MDA-MB-231, DU145, 및 LS1034 세포에서의 모노-유비퀴틴화된 PTEN의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 31은 p34-억하운 MEF 세포에서 모노-유비퀴틴화된 PTEN의 발현 정도를 핵분획물/세포질(cytosol)의 위치별로 나타낸 도이다.

도 32는 p34 또는 NEDD4-1 억하운에 따른 MCF-7 세포에서 모노-유비퀴틴화 PTEN의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 33은 NEDD4-1 또는 p34의 발현에 따른 폴리-유비퀴틴화 PTEN의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 34는 NEDD4-1 또는 p34의 발현에 따른 폴리-유비퀴틴화 PTEN의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 35는 E2 효소의 존재 및 p34, NEDD4-1의 발현에 따른 PTEN의 유비퀴틴화 정도를 나타낸 도이다.

도 36은 p34 억하운 여부에 따른 LS1035 및 MCF7 세포의 성장률을 나타낸 도이다.

도 37은 p34 억하운 여부에 따른 LS1035 및 MCF7 세포의 집락 형성능을 나타낸 도이다.

도 38은 p34 억하운 여부에 따른 LS1035 및 MCF7 세포 집락의 크기를 나타낸 도이다.

도 39는 p34 억하운 여부에 따른 LS1035 및 MCF7 세포에서의 p34, 사이클린 E2, 및 cdc6 유전자의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 40은 테트라사이클린 유도성 p34-shRNA 벡터를 발현하는 DU145 및 MDA-MB-231 변이주의 확립을 TetR의 발현 여부 확인을 통하여 나타낸 도이다.

도 41은 테트라사이클린 유도성 DU145 및 MDA-MB-231 변이주에 테트라사이클린 처리 후, p34, PTEN, 및 인산화 Akt의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 42는 테트라사이클린 유도성 DU145 및 MDA-MB-231 변이주에 테트라사이클린 처리 후, PTEN 인산분해효소 활성 정도를 나타낸 도이다.

도 43은 테트라사이클린 유도성 DU145 및 MDA-MB-231 변이주에 테트라사이클린 처리 후, 집락 형성능을 나타낸 도이다.

도 44는 테트라사이클린 유도성 DU145 및 MDA-MB-231 변이주에 테트라사이클린 처리 후, 세포성장률을 나타낸 도이다.

도 45는 테트라사이클린 유도성 DU145 및 MDA-MB-231 변이주에 테트라사이클린 처리 후, BrdU 혼성정도를 나타낸 도이다.

도 46은 p34 발현 Hs578T 세포주에서 PTEN의 발현 및 집락 형성능을 나타낸 도이다.

도 47은 마우스에 테트라사이클린 유도성 DU145 변이주를 주입하여 종양을 형성시킨 후, 테트라사이클린의 투여에 따른 PTEN, p34 및 NEDD4-1의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 48은 마우스에 테트라사이클린 유도성 MDA-MB-231 변이주를 주입하여 종양을 형성시킨 후, 테트라사이클린의 투여에 따른 PTEN, p34 및 NEDD4-1의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 49는 마우스에 테트라사이클린 유도성 DU145 변이주를 주입하여 종양을 형성시킨 후, 테트라사이클린의 투여에 따른 종양 부피 변화를 나타낸 도이다.

도 50은 마우스에 테트라사이클린 유도성 MDA-MB-231 변이주를 주입하여 종양을 형성시킨 후, 테트라사이클린의 투여에 따른 종양 부피 변화를 나타낸 도이다.

도 51은 마우스에 테트라사이클린 유도성 DU145 변이주를 주입하여 종양을 형성시킨 후, 테트라사이클린의 투여에 따른 PTEN 단백질의 핵국재화(nuclear localization)를 나타낸 도이다.

도 52는 마우스에 테트라사이클린 유도성 MDA-MB-231 변이주를 주입하여 종양을 형성시킨 후, 테트라사이클린의 투여에 따른 PTEN 단백질의 핵국재화(nuclear localization)를 나타낸 도이다.

도 53은 p53^{-/-}/MEF세포에서 PTEN 및 NEDD4-1 단백질의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 54는 p53^{-/-}/MEF세포에서 Ras, p34, 및 NEDD4-1의 발현에 따른 집락 형성능을 나타낸 도이다.

도 55는 NEDD4-1 녹다운-p53^{-/-} MEF 세포에서 PTEN 및 NEDD4-1 단백질의 발현 정도를 나타낸 도이다.

도 56은 NEDD4-1 녹다운-p53^{-/-} MEF 세포에서 Ras, p34, 및 NEDD4-1의 발현에 따른 집락 형성능을 나타낸 도이다.

도 57은 NEDD4-1 녹다운-p53^{-/-} MEF 세포에서 PTEN의 폴리-유비퀴틴화 정도를 나타낸 도이다.

도 58은 p53^{-/-}/MEF세포에서 Ras 활성을 나타낸 도이다.

도 59는 다양한 유방암 및 결장암 세포에서의 NEDD4-1/p34의 발현에 따른 PTEN 단백질의 발현 비율을 나타낸 도이다.

도 60은 다양한 유방암 및 결장암 세포에서의 NEDD4-1/p34의 발현에 따른 PTEN 단백질의 발현 비율을 나타낸 도이다.

도 61은 p34와 NEDD4-1, 및 PTEN 간의 종합적인 상호작용을 도식적으로 나타낸 도이다.

도 62는 인간 유방암 세포 및 대장암 세포에서 p34 활성 억제제 처리에 따른 PTEN 유비퀴틴화 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 63은 p34 활성 억제제 처리에 따른 p34 및 NEDD4-1 단백질의 결합 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 64는 인간 유방암 세포주에서 p34 활성 억제제 처리가 세포 사멸 및 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 65는 인간 유방암 세포주에서 p34 활성 억제제 처리가 PTEN 지질 인산 분해효소 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 66은 인간 대장암 세포주에서 p34 활성 억제제 처리가 세포 사멸 및 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 67은 인간 대장암 세포주에서 p34 활성 억제제 처리가 PTEN 지질 인산 분해효소 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는

[0026]

[0027]

치료용 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 조성물을 제공한다.

[0029] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

[0030] 본 발명에 따른 p34 유전자의 발현 억제제는 p34 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상 일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

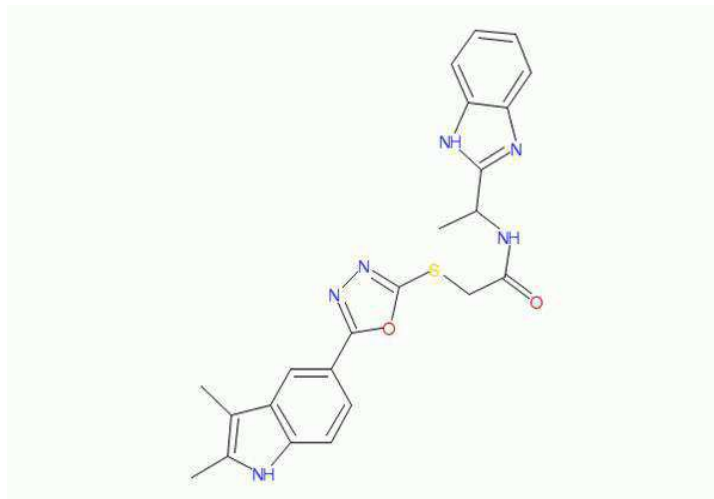
[0031] 본 발명에 따른 p34 단백질의 활성 억제제는 p34 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다.

[0033] 상기 siRNA는 p34 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 25개의 염기로 구성되는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 화합물은 p34 단백질에 특이적으로 결합하여 이의 활성을 억제할 수 있는 임의의 화합물을 모두 포함하고, 바람직하게는 p34와 NEDD4-1 단백질의 결합을 억제하는 활성을 가진 것이며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 p34 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물의 일례로서 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제시한다.

화학식 1



[0035]

[0036] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한 염"은 개체에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이론적인 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 1로 표시되는 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 모두 포함한다.

[0037] 상기 펩티드 모방체(Peptide mimetics)는 p34 단백질의 결합 도메인을 억제하여 p34 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 펩티드 모방체는 펩티드 또는 비펩티드일 수 있고, psi 결합과 같은, 비펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, "구조적으로 강제된(conformationally constrained)" 펩티드, 사이클릭 모방체(cyclic mimetics), 적어도 하나의 엑소사이클릭 도메인(exocyclic domain), 결합 부분(결합 아미노산) 및 활성 부위를 포함하는 사이클릭 모방체일 수 있다. 펩티드 모방체는 p34 단백질의 이차구조 특성과 유사하게 구

조화되고 항체 또는 수용성 수용체와 같은 거대한 분자의 억제 특성을 모방할 수 있으며, 천연의 길항제와 동등한 효과로 작용할 수 있는 신규한 소분자일 수 있다.

[0038] 상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고 뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다. 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적의 기능을 차단할 수 있다.

[0039] 상기 항체는 p34 단백질에 특이적이고 직접적으로 결합하여 p34 단백질의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 p34 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로는 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 모노클로날(monoclonal) 항체를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 p34 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 공지 방법으로 제작하여도 무방하며, 상업적으로 알려진 p34 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 상기 항체는 당업자에게 알려진 종래 방법에 따라 면역원인 p34 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 랫트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근육 내, 복강 내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여할 수 있다. 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 형성된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하여 항체를 분리할 수 있다.

[0040] 본 발명에 따르면, p34를 억제할 경우 PTEN의 모노-유비퀴틴화를 일으켜 PTEN의 핵국재화(nuclear localization)를 촉진시키는 결과, 종양의 생존, 증식, 침습성 및 전이성과 관련된 Akt 경로를 억제하므로, PTEN 및 NEDD4-1을 동시 발현하는 다양한 암 세포의 종양발생 및 침윤 형성능을 현저하게 감소시키는 효과가 있다. 따라서 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제는 암의 치료 또는 전이 억제제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0041] 상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종 등을 포함하며, 바람직하게는 유방암, 결장암, 위암, 간암, 폐암, 전립선암 등을 포함하고, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 또한, 상기 암은 p34 및 NEDD4-1을 동시에 발현하는 암을 모두 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 본 발명의 조성물은 항암 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1 종 이상 더 함유할 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토오스, 전분, 셀룰로오스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며, 여기에 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0045] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 체질 특이성, 제제의 성질 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학적 조성물의 일일 투여량은 약 0.001~1000 mg/kg이나, 임상 실험 결과에 따라 가감될 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

[0046] 본 발명의 약학적 조성물은 투약 단위 형태로 제형화 될 수 있다. 예를 들면, 상기 제형화된 투약 단위는 상기 유효 화합물의 1일 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 개별 투약량은 유효 화합물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

- [0047] 또한, 본 발명의 조성물은 암의 예방 또는 개선에 효과적인 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 유효성분의 양은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 건강기능식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제, 예컨대 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예에는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토스, 수크로스 등의 이당류 및 텍스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예컨대, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g이다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 암의 치료 또는 전이 억제 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 암의 치료 또는 전이 억제 방법은 본 발명의 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질을 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.
- [0052] 본 발명에서 개체는 암에 걸린 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 1) p34 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; 2) 상기 세포주에서 p34 유전자의 발현 정도 또는 p34 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 3) 상기 p34 유전자의 발현 정도 또는 p34 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암의 치료 또는 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0054] 상기 방법에 있어서, 1) 단계의 세포주는 암 세포주를 모두 포함하며, 바람직하게는 p34 및 NEDD4-1을 동시에 발현하는 암 세포주이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 방법에 있어서, 2)단계에서 유전자의 발현 정도는 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯(Northern blot), cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 및 인 시투(in situ) 혼성화 반응 등의 방법을 통해 측정할 수 있으며, 당업자에게 알려진 유전자의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 상기 방법에 있어서, 2)단계에서 단백질의 활성 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS) 등의 방법을 통해 측정할 수 있으며, 당업자에게 알려진 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있고, 이에

제한되지 않는다.

- [0057] 또한, 본 발명은 1) 생물학적 시료에 NEDD4-1(Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 처리하는 단계; 및 2) 상기 생물학적 시료에서 암 세포의 증식 여부를 측정하는 단계;를 포함하는, p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법을 제공한다.
- [0058] 상기 방법에 있어서, 1) 단계의 생물학적 시료는 암에 걸린 개체의 혈액, 소변, 타액 및 조직 등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 상기 방법은 3) 생물학적 시료의 암 세포가 증식되면 p34의 발현 억제제 또는 활성 억제제의 암에 대한 치료 효과가 존재하지 않고, 생물학적 시료의 암 세포가 증식되지 않으면 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 치료 효과가 존재한다고 예측하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0060] NEDD4-1 및 PTEN만 발현하는 암 및 PTEN만 발현하는 암에서는 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 처리에 의하여 치료 효과를 가질 수 없고, NEDD4-1, PTEN 및 p34가 동시에 발현하는 암에서는 p34 유전자의 발현 억제제 또는 p34 단백질의 활성 억제제의 처리에 의하여, 항암 효과를 가질 수 있다.
- [0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0062] **실시예 1. p34 및 NEDD4-1 간의 생체 내 및 시험관 내 상호작용 및 p34가 NEDD4-1 단백질의 안정성에 미치는 영향 분석**
- [0063] **1-1. 내인성 p34 및 NEDD4-1 간의 상호작용 분석**
- [0064] (1) NEDD4-1에 상호작용하는 단백질을 동정하고자 세포 용해액으로부터 NEDD4-1 단백질에 대한 항체를 이용하여 면역침강법, 텀업 친화성 정제, 및 질량분석을 수행하였다. 먼저, 면역침강법을 수행하기 위하여 293(HEK 293) 세포, 전립선 암 세포인 DU145, 및 유방암 세포인 MCF7의 용해액을 항-NEDD4-1 항체와 각각 혼합한 후, 4 °C에서 12시간 동안 배양하였다. 그 다음 20 μl의 단백질 A/G Plus-Sepharose beads(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 상기 배양물에 가하여 혼합한 뒤 2시간 동안 추가배양 하였다. 수득된 면역침강물을 용해완충액(nonidet P-40 lysis buffer)으로 5회 세척한 후, 20 μl의 2xSDS 샘플 완충액을 처리하고 가열하였다.
- [0065] 또한, 웨스턴 블롯을 수행하기 위하여, 각 세포로부터 분리한 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후, 이를 멤브레인PolyScreenmembranes (New England Nuclear, Boston, MA, USA)으로 옮긴 후, 다양한 항체(anti-PTEN(Cell Signaling, Beverly, CA, USA), anti-p34(Enzo LifeSciences, Beverly, MA, USA), anti-NEDD4-1 및 g-tubulin (Santa Cruz Biotechnology))를 이용하여 종래 공지된 방법에 따라 실험을 수행하였다.
- [0066] 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0067] 도 1에 나타난 바와 같이, NEDD4-1과 상호작용한다고 나타난 다양한 단백질 중 p34가 존재함을 확인하였으며(붉은색 화살표로 표시). 도 2에 나타난 바와 같이, 3개의 세포주 중 2개의 암 세포주(DU145, 및 MCF7 세포)에서 p34가 발현 되는 것을 확인하였다. p34는 CDK4(cyclin-dependent kinase 4) 및 XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)에 결합하는 것으로 알려져있다.
- [0068] (2) 상기 결과를 검증하기 위하여, 본 발명자들은 DU145, MCF7 및 LS1034 세포 내에서 내인성 p34와 NEDD4-1의 상호작용을 면역침강법 및 웨스턴 블롯을 통하여 관찰하였다. 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [0069] 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, DU145, MCF7 및 LS1034 세포에서 모두 p34-결합 NEDD4-1 및 NEDD4-1-결합 p34를 확인하였다.

[0070] (3) 상기 실험 결과를 다른 암세포주에서 확인하기 위하여, 본 발명자들은 다양한 결장암 및 유방암 세포주(HT-29, HCT-116, LS174T, DLD1, CoLo201, LS1034, BT-20, MDA-MB-231, Hs578T 등)에서 p34 및 NEDD4-1의 발현을 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0071] 도 5에 나타난 바와 같이, p34 및 NEDD4-1의 상호작용은 p34 및 NEDD4-1 단백질을 동시-발현하는 LS1034 세포주와 MDA-MB231 세포주에서도 관찰되었다.

[0072] 1-2. 외인성 p34 및 NEDD4-1 간의 상호작용 분석

[0073] 외인성으로 발현되는 p34와 NEDD4-1 간의 상호작용을 조사하기 위하여, 내인성으로는 p34를 발현하지 않은 293 세포를 GFP-tagged p34 및/또는 myc-tagged NEDD4-1를 발현하는 구조물(construct)로 트랜스펙션시켰다. 이후, 293 세포의 용해물을 면역블롯을 통해 분석하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0074] 도 6에 나타난 바와 같이, GFP-tagged p34는 상기 293 세포의 myc-tagged NEDD4-1 면역침강물에서 검출되었다. 따라서, 외인성으로 발현되는 p34와 NEDD4-1 간에도 상호작용이 일어남을 확인할 수 있었다.

[0075] 1-3. p34, NEDD4-1 및 PTEN 간의 상호작용 분석

[0076] p34와 NEDD4-1, PTEN 간의 상호작용을 관찰하기 위하여 하기와 같이 GST 풀-다운 분석(GST Pull-down analysis)을 수행하였다. 먼저 *E.coli* BL-21 (DE3) 주로부터 발현되고 정제된 500 ng의 GST-p34 단백질 또는 GST 단백질(대조군)을 준비한 후, 이를 NEDD4-1이 결실된 변이 세포주와 반응 완충액(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM NaCl)에서 혼합한 후 30 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 다음으로 GST-풀 다운 완충액(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.02% BSA, 5 mM 머캡토에탄올)을 가하여 반응을 정지시켰다. 그 후 GST 및 관련 단백질을 글루타치온-세파로오스 비드를 이용하여 4 °C에서 1시간 동안 풀 다운시켰다. 단백질 복합체들을 GST 풀 다운 완충액으로 6회 세척하고 2x SDS 샘플 완충액을 가하였다. 면역침강물 내의 P34 및 NEDD4-1의 존재는 항-GST, 항-T7 항체를 이용한 면역블롯을 통해 각각 분석하였다. 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0077] 도 7에 나타난 바와 같이, 면역침강물 내에서 p34가 결합된 NEDD4-1 단백질이 검출됨을 확인하였다.

[0078] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 정제된 재조합 GST-PTEN을 Myc-NEDD4-1과 배양하여 p34와 PTEN과의 결합을 분석한 결과, PTEN이 결합된 p34 단백질들은 검출되지 않았으며, 이를 통해 p34가 NEDD4-1과 달리 PTEN에는 결합하지 않는다는 것을 확인하였다.

[0079] 상기 실험 결과로부터 p34가 NEDD4-1과 직접적으로 상호작용하나, PTEN과는 상호작용하지 않음을 알 수 있었다.

[0080] 1-4. p34와 상호작용하는 NEDD4-1 도메인의 분석

[0081] (1) 상기 실시예 1-3을 통하여, p34와 상호작용한다고 확인된 NEDD4-1 단백질의 도메인을 분석하였다. 이를 위하여, NEDD4-1 cDNA를 발현하는 플라스미드로부터 T7-tagged 벡터를 이용하여 T7-tagged 야생형(wild-type) NEDD4-1과 NEDD4-1의 일부 도메인이 결실된 NEDD4-1 변이체를 제조하였다. 정제된 GST-p34 단백질을, T7-tagged 야생형 NEDD4-1 또는 NEDD4-1 변이체(C2, WWs 및 HECT(homologous to the E6-AP carboxyl terminus) 도메인 결실(N1), WWs 및 HECT 도메인 결실(N2), C2, WW3, WW4 및 HECT 도메인 결실(N3), C2, WW1, WW2 및 HECT 도메인 결실(N4), C2 및 WWs 도메인 결실(N5))를 발현하는 293 세포의 용해액과 함께 배양하였다. 이후, GST-풀 다운 어세이를 통해 p34가 결합하는 NEDD4-1의 도메인을 분석하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0082] 도 9에 나타난 바와 같이, GST-p34는 NEDD4-1-야생형 및 NEDD4-1-N3에서 검출되었으며, 이것은 p34가 NEDD4-1의 WW1 및 WW2를 포함하는 도메인과 상호작용함을 의미하였다.

[0083] (2) 상기 실험 결과에 근거하여, p34에 직접적으로 결합하는데 관련된 도메인이 NEDD4-1의 WW1 또는 WW2 도메인 중 어느 것인지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여, WW1 또는 WW2 도메인만을 각각 가지는 NEDD4-1의 2가지 변이체 구조물(N6, N7)을 제조하였다. 정제된 GST-p34 단백질을, 상기 NEDD4-1의 변이체를 발현하는 세포의 용해

액과 함께 배양한 후, GST-폴 다운 어ッセ이를 수행하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0084] 도 9에 나타낸 바와 같이, GST-p34는 NEDD4-1의 WW1 도메인에서 명확히 검출되었고, 이를 통해 p34가 직접적으로 NEDD4-1의 WW1 도메인에 결합함을 확인하였다.

[0085] (3) 상기 결과를 검증하기 위하여, GST-tagged되고 WW1 도메인이 결실된 야생형 NEDD4-1의 변이체(GST-delWW1)를 포함하는 플라스미드를 제작하였다. 상기 NEDD4-1의 변이체 단백질을 His-p34를 발현하는 세포로부터 분리한 세포 용해액과 배양한 후, GST-폴 다운 어ッセ이를 수행하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0086] 도 10에 나타낸 바와 같이, p34 단백질은 야생형 NEDD4-1 단백질과 상호작용하였지만, WW1 도메인이 결실된 NEDD4-1 단백질과는 상호작용하지 않았다. 이를 통해 NEDD4-1의 WW1 도메인에 p34가 직접적으로 결합한다는 것을 확인하였다.

[0087] 1-5. p34가 PTEN과 NEDD4-1의 결합에 미치는 영향 분석

[0088] p34가 PTEN과 NEDD4-1의 결합에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여, GST-PTEN 융합 단백질을 Myc-NEDD4-1 및 His-p34를 발현하는 세포의 용해액과 배양한 후, GST-폴 다운 어ッセ이를 수행하였다. 대조군으로는 GST 단백질을 이용하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0089] 도 11에 나타낸 바와 같이, PTEN은 p34의 존재/부존재 하에서 NEDD4-1과 상호작용하였으나, p34가 없을 때보다는 p34가 존재할 때에 강하게 상호작용하였다. 이는 p34가 NEDD4-1과 PTEN의 결합 친화성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 암시한다.

[0090] 상기 실험 결과로부터 p34가 NEDD4-1의 WW1 도메인과 상호작용하지만, PTEN과는 상호작용하지 않으며, NEDD4-1과 PTEN의 상호작용을 방해하지 않는다는 것을 확인하였다. 또한, 상기 실험 결과로부터 p34에 의한 NEDD4-1 단백질의 향상된 안정성이 PTEN의 폴리-유비퀴틴화(poly-ubiquitination)에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있다.

[0091] 1-6. p34가 NEDD4-1의 세포 내 자가-유비퀴틴화에 미치는 영향 분석

[0092] (1) NEDD4-1가 세포 내에서 자가-유비퀴틴화(auto-ubiquitination)된다는 것이 이전에도 보고된 바 있었으므로, p34가 NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화에 미치는 영향을 분석하였다. 293 세포를 NEDD4-1 및/또는 p34로 트랜스펙션한 후, 상기 세포에 MG132(25 mM)를 처리하고 6시간 동안 배양하였다. 세포 배양물을 수득하고 이의 항-Myc 면역침강물을 분석하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0093] 도 12에 나타낸 바와 같이, MG132로 처리된 세포 내에서, NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화는 p34의 존재에 따라 현저하게 감소하였다.

[0094] (2) 상기 결과를 검증하기 위하여, 정제된 단백질을 이용한 세포-프리 시스템에서 NEDD4-1의 유비퀴틴화를 분석하였다. 먼저, His-tagged 벡터를 사용하여 p34 cDNA 발현 플라스미드로부터 His-tagged p34를 제조하였다. 정제된 GST-NEDD4-1 단백질을 E1, UbcH5c 및 상기 His-tagged p34를 발현하는 293 세포 추출물과 함께 배양한 후, 자가-유비퀴틴화를 측정하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0095] 도 13에 나타낸 바와 같이, GST-NEDD4-1 유비퀴틴화는 p34의 발현에 따라 점차적으로 감소하였다. 이를 통해, p34가 온전한 세포(intact cell) 및 세포-프리 시스템 모두에서 NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화를 억제한다는 것을 확인하였다.

[0096] (3) 293 및 MCF7 세포를 각각 p34를 발현하는 플라스미드로 24시간 동안 트랜스펙션하거나, p34에 대한 siRNA(small interfering RNA)로 48시간 동안 트랜스펙션하였다. 상기 세포에 CHX(cycloheximide, 50 mg/ml)를 각 시간대 별로 처리하고, NEDD4-1 단백질을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과를 도 14 및 15에 나타내었다.

[0097] 도 14에 나타낸 바와 같이, GFP-tagged p34와 myc-tagged NEDD4-1로 동시-트랜스펙션된 세포 내에서의 NEDD4-1

단백질 수준은, myc-tagged NEDD4-1만으로 처리된 세포 내에서보다 더 증가되었고 높은 상태로 유지되었다.

- [0098] 또한, 도 15에 나타난 바와 같이, p34에 대한 siRNA를 사용하여 p34를 녹다운시킨 세포 내에서의 NEDD4-1 단백질 수준은 스크램블(scrambled) siRNA로 처리된 세포와 비교하여 상당히 감소하였으며, 이를 통해 p34가 NEDD4-1 단백질을 안정화시킴을 확인하였다.
- [0099] 이러한 결과는 p34는 NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화를 억제하여 NEDD4-1 단백질을 안정화시킨다는 사실을 강하게 암시한다.
- [0100] —
- [0101] **실시예 2. p34가 NEDD4-1에 의해 매개되는 PTEN의 폴리-유비퀴틴화 조절에 미치는 영향 분석**
- [0102] (1) p34의 siRNA를 사용하여, p34의 발현억제로 인한 침묵효과를 분석하였다 (p34-siRNA : I: 5'-GCAAGG GUCUGAAGCGGAA-3, II: 5'-GGAAACGGGAGGAGGAGGA-3', III: 5'-CCGAAUUGGACUACCUCU-3'). MDA-MB-231 및 MCF7 세포를 p34-siRNA로 트랜스펙션한 후, 각 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 그 결과를 도 16에 나타내었다.
- [0103] 도 16에 나타난 바와 같이, p34-siRNA는 농도 의존적으로 PTEN의 발현 증가 및 p-Akt의 발현 감소를 유도함을 확인하였다.
- [0104] 또한, 293 및 MEF(mouse embryonic fibroblasts) 세포를 GFP-tagged p34로 트랜스펙션 한 후, 각 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.
- [0105] 도 17에 나타난 바와 같이, GFP-tagged p34의 발현은 내인성 p34를 발현하지 않은 293 또는 MEF 세포에서 PTEN 단백질의 수준을 감소시켰다. 또한, Akt의 인산화 수준은 p34 발현 수준에 따라 증가하였으며, PTEN의 발현수준과 반비례하였다.
- [0106] 이를 통해, p34가 NEDD4-1에 결합함으로써 PTEN 단백질 수준에 영향을 줄 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0107] (2) 상기 실험 결과에 근거하여, 본 발명자들은 MCF7 세포를 p34-siRNA로 트랜스펙션 한 후, 단백질 합성 저해제인 CHX(cycloheximide)로 처리하고 시간에 따라 내인성으로 발현되는 p34 단백질 수준의 변화를 측정함으로써 PTEN의 턴오버를 조절함에 있어서 p34의 역할을 조사하였다. 그 결과를 도 18에 나타내었다.
- [0108] 도 18에 나타난 바와 같이, 내인성으로 p34를 발현하는 MCF7 세포를 p34-siRNA를 이용하여 p34를 녹다운시킨 경우, PTEN 단백질의 수준이 실질적으로 변하지 않았으나, 대조군 siRNA(스크램블 siRNA)로 트랜스펙션한 세포의 경우 PTEN의 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 p34가 PTEN 단백질 안정성을 감소시킴으로써 PI3K 신호경로를 양성적으로 조절한다는 것을 의미한다.
- [0109] (3) p34가 단백질 분해경로를 통하여 PTEN 단백질의 안정성을 조절하는지 여부를 확인하기 위하여, 내인성으로 p34를 발현하지 않는 293 세포를 GFP-tagged p34로 트랜스펙션시킨 다음, 프로테아솜 저해제인 MG132를 처리하였다. 각 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 그 결과를 도 19에 나타내었다.
- [0110] 도 19에 나타난 바와 같이, 외인성으로 p34를 발현하며, MG132로 처리된 세포의 PTEN 단백질 수준은 대조군 벡터(empty vector)로 트랜스펙션한 세포와 비교하여 상당히 감소하였다.
- [0111] (4) p34가 PTEN의 폴리-유비퀴틴화에 영향을 미치는지 여부를 더 확인하기 위하여, 유비퀴틴화 분석(intracellular ubiquitination assay)을 수행하였다.
- [0112] 먼저, 293 또는 MEF 세포에 GFP-p34를 트랜스펙션 한 후, MG132와 함께 배양하고, PTEN의 유비퀴틴화를 분석하였다. 그 결과를 도 20에 나타내었다.
- [0113] 도 20에 나타난 바와 같이, p34를 이소성 발현시킨 다음 MG132를 처리한 293 세포 또는 MEF 세포에서 폴리-유비퀴틴화된 형태의 PTEN이 검출되었다.
- [0114] 또한, MCF7, MDA-MB-231, 및 DU145 세포에 p34-siRNA를 24시간 동안 트랜스펙션 한 후, MG132와 함께

배양하고, PTEN의 유니퀴틴화를 분석하였다. 그 결과를 도 21에 나타내었다.

- [0115] 도 21에 나타난 바와 같이, p34를 넘다운한 MCF7, MDA-MB231 및 DU145 세포에서 PTEN의 폴리-유비퀴틴화가 점차적으로 감소하였다.
- [0116] 또한, 293 세포를 야생형 PTEN 및/또는 p34로 24시간 동안 트랜스펙션 한 후, PTEN 지질 인산분해효소 활성을 측정하였다. 보다 구체적으로, 상기 세포를 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 및 프로테아제 억제제를 포함하는 1% Triton X-100 완충액으로 녹인 후, 항-PTEN 항체를 이용하여 PTEN을 면역침강하였다. 상기 면역침강물을 세척한 후, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)내의 수용성의 diC8-phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 및 10 mM DTT와 함께 37°C에서 40분간 배양하였다. 그 후, 상층액을 모으고, Biomol Green Reagent (Enzo Life Sciences)와 함께 상온에서 30분간 배양하였다. PTEN의 활성은 650 nm에서의 OD값을 측정하는 것을 통해 인산염의 방출을 계산함으로써 측정되었다. 음성 대조군으로 123번째 아미노산의 시스테인(Cysteine)이 세린(Serine)으로 변이된 지질 인산분해효소-결핍 PTEN C124S 변이주를 사용하였다. 그 결과를 도 22에 나타내었다.
- [0117] 도 22에 나타난 바와 같이, PTEN의 지질 인산분해효소 활성은 대조군에 비해 p34를 이소성으로 발현하는 세포에서 현저히 감소하였다.
- [0118] 이러한 결과는 p34가 PTEN의 폴리-유비퀴틴화 및 프로테아솜성 분해를 매개한다는 것을 가리킨다.
- [0119] (5) 최근, PTEN의 유비퀴틴화 및 프로테아솜성 분해가 NEDD4-1에 의해 부분적으로 조절되며, NEDD4-1가 E3 유비퀴틴 리가아제로서 기능한다는 것이 보고되었다(Wang et al., 2007). 상기 실시예 1에서 본 발명자들은 p34가 직접적으로 NEDD4-1과 상호작용함을 밝혀냈기 때문에, NEDD4-1이 PTEN의 유비퀴틴화 및 프로테아솜성 분해에 미치는 영향이 p34 발현 수준에 의존적인지 여부를 조사하였다.
- [0120] 먼저, 내인성 NEDD4-1을 발현하되, p34는 발현하지 않는 293 세포 또는 MEF 세포를 GFP-tagged p34 플라스미드 (또는 GFP 대조군 벡터) 및 NEDD4-1-siRNA/shRNA (또는 스크램블 siRNA)와 공동트랜스펙션시켰다(NEDD4-1-siRNA : 5'-TGCGATTGTGTAACCGAA-3'). 각 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 그 결과를 도 23에 나타내었다.
- [0121] 도 23에 나타난 바와 같이, NEDD4-1-siRNA/shRNA 및 GFP-tagged p34를 공동트랜스펙션 시킨 세포에서는 PTEN 단백질의 수준이 실질적으로 거의 변하지 않았으나, GFP-tagged p34 만을 트랜스펙션 시킨 세포에서는 PTEN 단백질의 수준이 현저히 감소하였다. 일관적으로, Akt의 인산화는 PTEN 단백질 수준에 반비례하였다.
- [0122] (6) 단백질 합성 저해제인 CHX(cycloheximide)의 존재 하에서, p34의 이소성 발현 및 NEDD4-1 넘다운에 의해 PTEN의 턴오버가 영향받는지 여부를 조사하였다. 이를 위해, 293 세포를 p34 발현 플라스미드 및 NEDD4-1 siRNA 트랜스펙션한 후, PTEN 단백질의 반감기를 분석하였다. 그 결과를 도 24에 나타내었다.
- [0123] 도 24에 나타난 바와 같이, PTEN의 수준은 NEDD4-1-넘다운 293 세포에서 외인성 p34의 발현에 의해 감소를 나타내었으나, CHX의 처리 후에는 점진적인 증가를 나타내었으며, 이를 통해 p34가 NEDD4-1 의존적으로 PTEN의 프로테아솜성 분해를 매개한다는 것을 확인하였다.
- [0124] (7) p34가 NEDD4-1에 의존적으로 PTEN의 폴리-유비퀴틴화를 매개하는지 여부를 확인하기 위하여, p34 발현 플라스미드로 야생형(293 또는 MEF 세포) 및 NEDD4-1 넘다운 세포를 트랜스펙션 한 후, MG132를 처리하고, Intact-cell ubiquitination assay를 수행하였다. 그 결과를 도 25에 나타내었다.
- [0125] 도 25에 나타난 바와 같이, 폴리-유비퀴틴화된 PTEN은 p34 발현 플라스미드로 트랜스펙션한 야생형 세포에서 명확하게 검출되었으나, p34 발현 플라스미드로 트랜스펙션한 NEDD4-1 넘다운 세포에서는 검출되지 않았다.
- [0126] 또한, 상기 293 세포의 PTEN 지질 인산분해효소 활성을 분석하였다. 그 결과를 도 26에 나타내었다.
- [0127] 도 26에 나타난 바와 같이, PTEN의 지질 인산분해효소 활성은 p34를 이소성으로 발현하는 293 세포의 NEDD4-1 넘다운 시 유지되었으나, 상기 세포를 스크램블 siRNA로 처리한 경우 이러한 활성이 상실되는 것을 확인하였다.

- [0128] 이러한 결과는 NEDD4-1이 p34에 의존적으로 PTEN의 폴리-유비퀴틴화를 유도한다는 것을 나타낸다.
- [0129] (8) 최근, XIAP가 PTEN의 폴리-유비퀴틴화를 유도한다는 것이 보고되었다(Van Themsche et al., 2009). 이에 p34가 XIAP에 의해 유도된 PTEN 폴리-유비퀴틴화에 영향을 주는지 여부를 평가하기 위하여, XIAP-넉아웃 MEF 세포에서 폴리-유비퀴틴화 실험을 수행하였다. XIAP-넉아웃 MEF 세포는 Dr. Duckett (University of Michigan Medical School)으로부터 제공받았다. 그 결과를 도 27 내지 도 29에 나타내었다.
- [0130] 도 27에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯을 통해 XIAP-넉아웃 MEF 세포에서 XIAP의 발현이 없는 것을 확인하였다.
- [0131] 또한, 도 28에 나타난 바와 같이, XIAP-넉아웃 MEF 세포를 GFP-tagged p34로 트랜스펙션시킬 경우, PTEN 단백질 수준이 현저히 감소됨을 확인하였다.
- [0132] 또한, 도 29에 나타난 바와 같이, GFP-tagged p34로 트랜스펙션시킨 XIAP-넉아웃 MEF 세포에서 PTEN이 강하게 폴리-유비퀴틴화됨을 확인하였다.
- [0133] 상기 결과로부터 p34는 XIAP에 독립적으로 NEDD4-1을 통하여 PTEN의 폴리-유비퀴틴화를 조절한다는 것을 확인하였다.
- [0134] **실시예 3. p34의 NEDD4-1를 통한 PTEN의 모노 및 폴리-유비퀴틴화 조절 분석**
- [0135] (1) 최근 NEDD4-1이 PTEN의 시험관 내 및 세포 내의 폴리-유비퀴틴화 뿐만 아니라, 모노-유비퀴틴화를 매개하며, PTEN의 모노-유비퀴틴화는 PTEN의 핵막공을 통한 핵이동(nuclear import)을 매개한다는 것이 보고되었고(Wang et al., 2007), 상기 실시예 2에 나타난 바와 같이, p34는 NEDD4-1를 통하여 PTEN 폴리-유비퀴틴화를 조절함을 확인하였다. 상기 결과에 근거하여, 본 발명자들은 p34가 PTEN의 모노-유비퀴틴화에 영향을 미치는지 분석하였다.
- [0136] 먼저 내인성으로 p34 및 NEDD4-1을 발현하는 4개의 암 세포주(MCF7, MDA-MB231, DU145, 및 LS1034)를 p34-siRNA로 트랜스펙션시키고, Intact-cell ubiquitination assay를 통해 PTEN의 유비퀴틴화 상태를 조사하였다. 그 결과를 도 30에 나타내었다.
- [0137] 도 30에 나타난 바와 같이, p34의 넉다운은 모든 암 세포주에서 PTEN의 모노-유비퀴틴화를 증가시켰다.
- [0138] 또한, MCF7 세포를 p34-siRNA로 24시간 동안 트랜스펙션시킨 후, 핵과 시토졸 구획을 분획하였다. 웨스턴 블롯을 이용하여 PTEN의 발현을 분석하였다. 그 결과를 도 31에 나타내었다.
- [0139] 도 31에 나타난 바와 같이, PTEN 단백질들은 p34-넉다운 MCF7 세포의 핵분획물에서 강하게 검출되었으나, 스크램블 siRNA로 처리된 세포에서는 PTEN의 핵국재화가 거의 나타나지 않았다. 게다가, 모노-유비퀴틴화된 PTEN은 p34-넉다운 MCF7 세포의 핵분획물에서만 검출되었다. 이는 p34의 발현은 PTEN의 모노-유비퀴틴화 및 핵국재화(nuclear localization)에 영향을 준다는 것을 가리킨다.
- [0140] (2) NEDD4-1이 p34의 발현에 따라 PTEN의 모노-유비퀴틴화에 영향을 미치는지 조사하기 위하여, MCF7 세포를 NEDD4-1-siRNA, p34-siRNA, 및/또는 GFP tagged p34로 24시간 동안 트랜스펙션시킨 후, PTEN의 유비퀴틴화를 분석하였다. 그 결과를 도 32에 나타내었다.
- [0141] 도 32에 나타난 바와 같이, 모노-유비퀴틴화된 PTEN은 p34-넉다운 세포에서는 관찰되었으나, NEDD4-1-siRNA 및 p34-siRNA로 공트랜스펙션한 세포에서는 관찰되지 않았다.
- [0142] (3) 이를 검증하기 위하여, 본 발명자들은 E1 및 E2 효소의 존재 하에, 정제된 GST-PTEN 단백질을 Flag-tagged NEDD4-1를 발현하는 293 세포로부터 분리한 단백질 추출물 및/또는 His-tagged p34와 배양하였다. 그 후 GST-PTEN의 Cell-free ubiquitination assay를 수행하였다. 그 결과를 도 33 및 도 34에 나타내었다.
- [0143] 도 33에 나타난 바와 같이, PTEN은 NEDD4-1만 존재하는 경우 모노-유비퀴틴화되었으나, NEDD4-1 및 p34가 모두

존재하는 경우 강하게 폴리-유비퀴틴화되었다.

[0144] 또한, 도 34에 나타난 바와 같이, PTEN의 폴리-유비퀴틴화는 p34에 의존적으로 점점 감소하였으며, 이는 NEDD4-1에 의해 매개되는 PTEN의 모노 및 폴리-유비퀴틴화가 p34의 발현에 의존적이라는 것을 의미한다.

[0145] (4) p34가 NEDD4-1-매개 PTEN 유비퀴틴화 과정에서 E2-유사 효소역할을 하는지 여부를 조사하였다. E1 및 E2의 존재 또는 부재하에서 GST-PTEN을 p34 및 NEDD4-1과 배양한 후, Cell-free ubiquitination assay를 통해 PTEN의 유비퀴틴화를 분석하였다. 그 결과를 도 35에 나타내었다.

[0146] 도 35에 나타난 바와 같이, 정제된 GST-PTEN은 Flag-tagged NEDD4-1 및 His-tagged p34를 발현하는 293 세포에서 얻은 추출물에서 E2 효소의 존재하에 유비퀴틴화 되었으나, E2 효소가 없을 때는 유비퀴틴화되지 않았다. 이를 통해 p34가 E2-유사 효소로서의 역할을 하지 않음을 확인하였다. 따라서, 상기 결과로부터 p34는 NEDD4-1에 의해 매개되는 PTEN의 모노 및 폴리-유비퀴틴화를 조절한다는 것을 알 수 있다.

[0147] 실시예 4. p34와 암 세포 증식과의 관계 분석

[0148] 상기 실시예 1 내지 3의 실험 결과를 통하여, p34는 NEDD4-1의 자가-유비퀴틴화를 저해함으로써 NEDD4-1 단백질의 안정성을 양성적으로 조절하기 때문에, p34의 억제는 PTEN 폴리-유비퀴틴화를 감소시키며, NEDD4-1에 의해 매개되는 PTEN의 모노-유비퀴틴화를 통하여 PTEN 단백질 수준을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[0149] (1) p34가 NEDD4-1/PTEN 경로에서 강력한 원종양 유전자로서 기능할 수 있는지를 확인하기 위하여, p34-siRNA를 발현하는 MCF7 및 LS1034 세포의 증식을 검사하였으며, 집락 형성 어췌이(Colony-forming assay) 및 소프트-아가 어췌이를 수행하였다.

[0150] 집락 형성 어췌이를 수행하기 위하여, 6 웰 플레이트 당 300개의 농도로 세포를 심은 후, 클론원성 용량(clonogenic capacity)을 측정하였다. 플레이트를 하고 10 내지 14일이 지난 후, 세포를 고정하고, 0.01% 크리стал 바이올렛 용액으로 염색하였다.

[0151] 소프트 아가 어췌이는 하기와 같이 수행하였다. 1.6% 아가로오스를 10% FBS를 포함하는 2X DMEM 또는 2X RPMI-1640 배지를 이용하여 제조한 후, 이를 6 웰 플레이트에 첨가하여 소프트 아가 플레이트를 준비하였다. 여기에 0.7% 아가로오스 및 10% FBS를 포함하는 2X DMEM 또는 2X RPMI-1640 배지에 부유시킨 세포(1×10^4)를 심었다. 이를 2~3주간 37° C 배양기에서 배양한 후, 현미경으로 집락을 계산하였다.

[0152] 그 결과를 도 36 내지 도 38에 나타내었다.

[0153] 도 36에 나타난 바와 같이, p34-siRNA를 발현하는 MCF7 및 LS1034 세포의 성장은 스크램블 siRNA를 발현하는 세포에 비하여 현저하게 감소하였다.

[0154] 또한, 도 37 및 도 38에 나타난 바와 같이, p34-siRNA로 처리된 세포의 집락 형성 빈도는 대조군에 비하여 현저하게 감소되었으며(도 37), 집락의 크기 또한 감소되었다(도 38).

[0155] (2) PTEN의 타겟 유전자인 사이클린 E2와 cdc6 유전자의 발현수준을 하기와 같이 RT-qPCR 분석을 통하여 확인하였다. 세포를 p34-siRNA 또는 스크램블 siRNA로 트랜스펙션 시킨 후, 상기 세포로부터 총 RNA를 TRIzol(Invitrogen)을 이용하여 분리하고, RT 프리믹스(Bioneer, Daejeon, Korea) 및 올리고 dT 16-18 프라이머를 이용하여 상보적인 DNA(cDNA) 가닥을 제조하였다. 그 다음, 하기 표 1의 프라이머 셋트를 이용하여 p34, cdc6, 사이클린 E2 유전자에 대하여 RT-qPCR을 수행하였다. 그 결과를 도 39에 나타내었다.

표 1

p34	F	5'- TGGCCTCTAGCTCCCTCTTT-3'
	R	5'- GCCAGTAAGTTGTCAGCCACA-3'
cdc6	F	5'- CAGGTCTGGACAATGCTGC-3'
	R	5'- CTGCTGAAGAGGAAGGAATC-3'

cyclin E2	F	5'- TGCTGCCTTGTCATTT-3'
	R	5'- GTGCTCTTCGGTGGTGTCATA-3'
GAPDH	F	5'- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'
	R	5'- AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'

[0157] 도 39에 나타난 바와 같이, p34-억다운 세포에서 PTEN의 타겟 유전자인 사이클린 E2 및 cdc6 유전자의 발현수준이 감소하였다. 이를 통해 p34의 억다운은 사이클린 E2 및 cdc6 유전자를 하향조절함으로써 암 세포의 성장을 억제함을 확인하였다.

[0158] (3) p34 억다운의 암 세포 증식에 대한 억제 효과를 더 조사하기 위하여, 본 발명자들은 안정적으로 테트라사이클린-유도성 p34-shRNA 벡터를 발현하는 DU145 및 MDA-MB231 세포주의 변이주를 확립하였다. 먼저 TetR-발현 플라스미드인 pcDNA6.0/TR (Invitrogen)을 DU145 및 MDA-MB231 세포에 트랜스펙션시킨 다음, 블라스티시딘(blasticidin 10 µg/ml)으로 3주 동안 선별하였다. TetR을 발현하는 클론세포들은 항-TetR 항체로 면역블롯 분석을 통해 확인되었다. 두 개의 TetR을 과발현하는 클론들은 2차 선별을 위하여 H1-p34-shRNA 벡터(5'-CCCTCTTTGACCTCTCAGT-3')로 다시 트랜스펙션시킨 후, 제오신(zeocin 300 µg/ml)으로 3주 동안 선별하여 테트라사이클린-유도성(Tet-on inducible) p34 세포주를 확립하였다. 이들을 테트라사이클린에 노출시킨 후 TetR을 발현하는 DU145 또는 MDA-MB231 변이주의 클론을 선별하였다. 상기 변이주에 테트라사이클린을 처리한 후, 웨스턴 블롯을 이용하여 각 단백질의 발현을 분석하였다. 또한, 상기 변이주의 PTEN 지질 인산 분해효소 활성 및 집락 형성 어세이를 수행하였다. 그 결과를 도 40 내지 43에 나타내었다.

[0159] 도 40에 나타난 바와 같이, DU145 또는 MDA-MB231 변이주에서 TetR의 발현을 확인하였으며, 도 41에 나타난 바와 같이, DU145 또는 MDA-MB231 변이주에 테트라사이클린(Tet; 1 mg/ml)을 처리할 경우, p34의 발현이 저해되고, PTEN 발현이 증가함을 확인하였다. 인산화 Akt는 PTEN 수준에 반비례하였다.

[0160] 또한, 도 42에 나타난 바와 같이, DU145 또는 MDA-MB231 변이주에서 테트라사이클린 처리에 의해 PTEN 지질 인산분해효소 활성이 증가하였다.

[0161] 또한, 도 43에 나타난 바와 같이, DU145 또는 MDA-MB231 변이주에서 테트라사이클린 처리에 의해 집락 형성이 현저히 감소됨을 확인하였다.

[0162] 추가적으로, 상기 DU145 또는 MDA-MB231 변이주의 세포 성장을 관찰하였으며 및 BrdU 어세이를 수행하였다. 그 결과를 도 44 및 도 45에 나타내었다.

[0163] 도 44에 나타난 바와 같이, 테트라사이클린으로 처리된 세포는 테트라사이클린으로 처리되지 않은 세포에 비하여 성장이 현저하게 감소하였다.

[0164] 또한, 도 45에 나타난 바와 같이, 테트라사이클린으로 처리된 세포는 BrdU(Bromodeoxyuridine)의 혼성이 현저하게 감소되었다.

[0165] (4) p34가 안정적으로 과발현되는 세포를 제조하기 위하여, p34가 검출되지 않는 Hs578T 세포를 레트로바이러스성 벡터인 pBabe-puro(대조군) 또는 pBabe-puro-p34로 트랜스펙션시킨 다음, 퓨로마이신(puromycin 2 µg/ml)으로 2주 동안 선별하였다. p34의 발현은 항-p34 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통하여 확인하였다. 상기 방법으로 제조한 세포의 단백질 분석을 위해 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 집락 형성을 관찰하였다. 그 결과를 도 46에 나타내었다.

[0166] 도 46에 나타난 바와 같이, 대조군 벡터를 발현하는 세포에서보다 p34를 안정적으로 발현하는 Hs578T 세포에서 PTEN의 발현이 감소하였으며, 집락 형성이 현저히 상승하였다.

[0167] 이러한 결과로부터 p34가 PTEN을 통한 암 세포 증식을 억제함을 확인하였다.

[0168] **실시예 5. p34의 종양발생성(tumorigenicity) 강화**

- [0169] (1) p34의 발현이 NEDD4-1의 원종양성에 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 4-(3)에서 확립한 테트라사이클린으로 유도가능하며, p34 shRNA를 안정적으로 발현하여 p34의 발현을 고갈시킨 DU145 변이주 및 MDA-MB-231 변이주를 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다. 확립된 각 세포를 Balb/c 누드 마우스에 피하로 주입하여 이종이식편(xenograft) 종양을 형성시켰다. 종양의 크기를 매 3일 간격으로 2주 동안 관찰하였고, 종양의 크기가 180 mm^3 에 도달하였을 때를 0일로 하여, 10 mg/kg의 농도로 테트라사이클린을 투여하고(대조군은 vehicle로 물 투여), 종양의 크기를 계속하여 관찰하였다. 모든 동물 실험은 아산 메디컬 센터 부설 동물 관리 및 이용에 관한 위원회의 승인을 받은 프로토콜에 따라 진행되었다. 그 결과를 도 47 내지 도 52에 나타내었다.
- [0170] 도 47 및 도 48에 나타낸 바와 같이, p34-shRNA-트랜스펙션된 DU145 변이주 또는 p34-shRNA-트랜스펙션된 MDA-MB-231 변이주를 주입하고, 테트라사이클린을 투여한 군에서 PTEN의 발현이 증가하였으며, NEDD4-1의 발현이 감소하였다.
- [0171] 또한, 도 49 및 도 50에 나타낸 바와 같이, p34-shRNA-트랜스펙션된 DU145 변이주 또는 p34-shRNA-트랜스펙션된 MDA-MB-231 변이주의 주입에 의해 유도된 종양의 성장은 테트라사이클린을 투여한 경우 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다.
- [0172] 또한, 도 51 및 도 52에 나타낸 바와 같이, 각 마우스 종양 조직의 면역조직화학분석 결과, PTEN 단백질은 테트라사이클린 투여 후, 강한 핵 국재화를 나타냄을 확인하였다.
- [0173] 이러한 결과로부터 p34가 NEDD4-1의 원종양성 활성을 강화한다는 것을 확인하였다.
- [0174] (2) p34가 NEDD4-1의 원종양성 활성에 미치는 효과를 검증하기 위하여, 본 발명자들은 내인성 p34를 발현하지 않는 p53-null MEF(p53^{-/-}/MEF) 세포(Millipore, Billerica, MA, USA)를 활용하였다. NEDD4-1은 홀로 원종양성을 가지지 않지만, NEDD4-1의 과발현이 Ras에 의해 매개되는 p53-null MEF 세포의 변형을 증진시킨다는 연구 결과가 보고된 바 있다(Wang et al., 2007). 상기 연구 결과에 기반하여 본 발명자들은 p34의 발현이 Ras에 의해 매개되는 p53-null MEF 세포의 변형에 미치는 효과를 최초로 조사하였다. p53^{-/-}/MEF세포의 단백질 발현 및 집락 형성 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 53 및 도 54에 나타내었다.
- [0175] 도 53에 나타낸 바와 같이, p53^{-/-}/MEF세포에서 단백질 발현을 분석한 결과, p34의 발현은 PTEN 발현의 감소 및 NEDD4-1 발현의 증가를 유발하였다.
- [0176] 또한, 도 54에 나타낸 바와 같이, p53^{-/-}/MEF 세포에서 집락 형성 분석을 수행한 결과, p34의 발현은 Ras를 발현하는 p53^{-/-}/MEF 세포에 비하여 세포 집락수의 면에서 증가를 나타내었다.
- [0177] (3) 레트로바이러스 기반의 shRNA 벡터를 이용하여 제조한 NEDD4-1 녹다운-p53-null(p53^{-/-}) MEF 세포에서 p34의 원종양성 활성을 관찰하였다. NEDD4-1 녹다운-p53-null(p53^{-/-}) MEF 세포의 단백질 발현, 집락 형성 및 유비퀴틴화를 분석하였다. 그 결과를 도 55 내지 도 57에 나타내었다.
- [0178] 도 55에 나타낸 바와 같이, NEDD4-1 녹다운-p53^{-/-} MEF 세포에서 p34의 발현은 PTEN의 감소를 유발하지 않았다.
- [0179] 또한, 도 56에 나타낸 바와 같이, 집락 형성 어췌이 결과, NEDD4-1 녹다운-p53^{-/-} MEF 세포에서 p34의 발현에도 불구하고 세포 형성이 억제됨을 확인하였다.
- [0180] 또한, 도 57에 나타낸 바와 같이, 유비퀴틴화 어췌이 결과, p34의 발현은 대조군 shRNA를 발현하는 p53-null MEF 세포에서 PTEN의 폴리-유비퀴틴화를 유도하였으나, NEDD4-1 shRNA를 발현하는 NEDD4-1 녹다운-p53^{-/-} MEF 세포에서는 PTEN의 폴리-유비퀴틴화를 유발하지 않았다. 이는 p34가 NEDD4-1에 의존적으로, Ras에 의하여 매개되는 p53-null MEF 세포의 변형을 향상시킨다는 것을 의미한다.
- [0181] (4) p34의 NEDD4-1의 원종양성 활성에 미치는 효과가 PTEN에 의존적인지 여부를 확인하기 위하여, PTEN shRNA를

발현하는 p53-null MEF 세포를 이용하여 웨스턴 블롯 및 집락 형성 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 58에 나타내었다.

[0182] 도 58에 나타난 바와 같이, 상기 MEF 세포에서 p34의 발현은 Ras의 변형 활성을 향상시키는데 실패하였다. 이는 p34가 NEDD4-1의 원종양성 활성을 PTEN에 의존적으로 향상시킨다는 것을 의미한다.

[0183] (5) 인간의 암 조직에서 p34, NEDD4-1, 및/또는 PTEN의 임상적인 관련성을 조사하였다. NEDD4-1을 통한 PTEN 유비퀴틴화의 양성적 조절자로서 p34의 기능을 고려하였을 때, 인간의 암 조직에서 p34의 발현은 NEDD4-1에 의하여 유도되는 PTEN 단백질 수준의 감소에 영향을 미칠 가능성이 있었다. 이를 검증하기 위하여, 본 발명자들은 p34, NEDD4-1, 및 PTEN의 발현을 135개의 분리된 유방암 및 191개의 결장암의 파라핀 포매 샘플을 TMA(Tissue microarrays)하여 평가하였다.

[0184] 135개의 유방암 샘플 중 90개(66.7 %)가 p34-양성이었고, 45개(33.3 %)가 p34-음성이었다. 또한, NEDD4-1의 발현은 90개의 p34 양성 샘플 중 85개(94.4 %)의 샘플에서 검출되었으며, 대다수(58/85; 68.2 %)의 NEDD4-1/p34 양성 샘플은 PTEN 단백질을 발현하였다. NEDD4-1은 p34 음성 샘플(45/45; 100 %)에서도 높게 발현되었다. 그러나 p34 양성 샘플에서는 소수(21/45; 46.67 %)만이 PTEN을 발현하였다.

[0185] 또한, 191개의 결장암 조직 중, 177개(61.3 %)의 샘플에서 p34가 양성으로 검출되었고, 74개(38.7 %)의 샘플에서 p34가 음성인 것으로 나타났다. 또한, PTEN의 발현은 127개의 NEDD4-1/p34 이중 양성(double-positive) 샘플 중, 소수(11.8 %)에서만 검출되었다. 반면, p34를 발현하지 않는 149개의 NEDD4-1 양성 샘플 중에서는 8개의 샘플에서만 PTEN이 발현되었다.

[0186] 도 59 및 도 60에 나타난 바와 같이, 유방암 및 결장암 샘플에서는 p34, NEDD4-1, 및 PTEN의 발현 수준 사이에 현저한 반비례 관계가 있었지만, 결장암 샘플에서 p34 음성, NEDD4-1 양성은 PTEN 수준에 영향을 미치지 않았다.

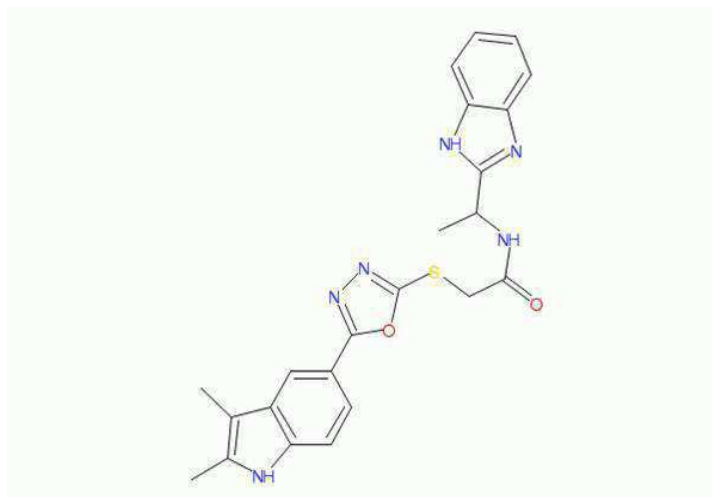
[0187] 따라서 상기 결과들로부터 인간의 유방암 및 결장암에서의 p34의 발현은, NEDD4-1의 원종양성 활성에 대하여 PTEN 의존적으로 기여한다는 것을 추론할 수 있었다.

[0188] p34와 NEDD4-1, 및 PTEN 간의 종합적인 상호작용을 도식적으로 표현하면 도 61과 같다.

[0189] 실시예 6. p34 활성 억제제의 항암 활성 검증

[0190] 상기 실시예 1 내지 5를 통해 확인한 바와 같이, p34 활성 억제제가 실제 항암 활성을 가지는지를 검증하기 위한 실험을 수행하였다. 먼저 시판중인 화합물 라이브러리 스크리닝을 통해 p34 단백질에 결합하여 p34의 활성을 억제하는 화합물을 동정하였다. 동정된 화합물의 화학식을 하기에 나타내었으며, 이하에서는 화합물 27(Compound 27)로 명명하였다.

[0191] [화학식 1]



[0192]

- [0193] 6-1. p34 활성 억제제가 PTEN 유비퀴틴화에 미치는 영향 검증
- [0194] 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 대장암 세포주인 LS1034에 p34 활성 억제제인 화합물 27을 1 μ M의 농도로 24시간 동안 처리한 후, PTEN 항체를 이용하여 면역침강법을 수행하였다. 이 후 유비퀴틴 항체로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과를 도 62에 나타내었다.
- [0195] 도 62에 나타난 바와 같이, 인간 유방암 및 대장암 세포에서 p34 활성 억제제인 화합물 27은 PTEN 유비퀴틴화를 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다.
- [0196] 6-2. p34 활성 억제제가 p34와 NEDD4-1 단백질의 결합에 미치는 영향 검증
- [0197] 정제된 NEDD4-1 단백질, p34 단백질에 반응 완충액 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 120 mM NaCl) 및 p34 활성 억제제인 화합물 27을 1 mM 또는 3 mM의 농도로 처리하고, 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 이 후 GST-폴 다운 완충액 (20mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.02% BSA, 5 mM 머캅토에탄올)을 사용하여 반응을 정지한 후, 글루타치온-세파로오스 비드로 4 $^{\circ}$ C에서 폴 다운 시키고, 항-His, 항-GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과를 도 63에 나타내었다.
- [0198] 도 63에 나타난 바와 같이, p34 활성 억제제인 화합물 27의 처리에 의해 농도 의존적으로 p34 단백질과 NEDD4-1 단백질의 결합이 저해됨을 확인하였다.
- [0199] 6-3. p34 활성 억제제의 PTEN 재활성화 유도를 통한 항암 효과 검증
- [0200] 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 p34 활성 억제제인 화합물 27을 농도 별로 48시간 동안 처리한 후, 트리판 블루 염색 및 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과를 도 64에 나타내었다.
- [0201] 도 64에 나타난 바와 같이, 유방암 세포에서 p34 활성 억제제인 화합물 27의 농도 의존적으로 세포 사멸이 유도되었으며, PTEN 단백질이 재활성화되고, 이에 따라 Akt의 탈 인산화가 나타나며, caspase3가 활성화되는 것이 확인되었다. 이를 통해, p34 활성 억제제의 처리에 의해 p34-NEDD4-1의 단백질 결합이 억제되어 PTEN이 재활성화됨으로써 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였다.
- [0202] 또한, 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 p34 활성 억제제인 화합물 27을 농도 별로 48시간 동안 처리한 후, 세포액을 수거하여 PTEN 항체로 면역침강을 실시하였다. 그 후 water-soluble diC8-phosphatidylinositol 3,4,5 tri-phosphate가 포함된 반응 완충액(100 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM DTT)과 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 반응시킨 후, 상층액만 수거하여 Biomol Green 용액과 30분간 상온에서 반응시키고, OD650nm에서 PTEN 지질 인산분해효소 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 65에 나타내었다.
- [0203] 도 65에 나타난 바와 같이, 유방암 세포에서 p34 활성 억제제인 화합물 27의 처리에 의해 PTEN 지질 인산분해효소 활성이 증가됨을 확인하였다.
- [0204] 상기와 동일한 실험을 인간 대장암 세포주인 LS1034를 이용하여 수행하였다. 그 결과를 도 66 및 67에 나타내었다.
- [0205] 도 66에 나타난 바와 같이, 대장암 세포에서 p34 활성 억제제인 화합물 27의 농도 의존적으로 세포 사멸이 유도되었으며, PTEN 단백질이 재활성화되고, 이에 따라 Akt의 탈 인산화가 나타나며, caspase3가 활성화되는 것이 확인되었다.
- [0206] 또한, 도 67에 나타난 바와 같이, 대장암 세포에서 p34 활성 억제제인 화합물 27의 처리에 의해 PTEN 지질 인산분해효소 활성이 증가됨을 확인하였다.
- [0207] 이하 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구

체적으로 설명하고자 함이다.

[0208] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[0209] **1-1. 산제의 제조**

[0210]	p34 발현 또는 활성 억제제	2 g
[0211]	유당	1 g
[0212]	상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.	

[0213] **1-2. 정제의 제조**

[0214]	p34의 발현 또는 활성 억제제	100 mg
[0215]	옥수수전분	100 mg
[0216]	유 당	100 mg
[0217]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0218]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	

[0219] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0220]	p34 발현 또는 활성 억제제	100 mg
[0221]	옥수수전분	100 mg
[0222]	유 당	100 mg
[0223]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0224]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	

[0225] **제제예 2. 식품 제제의 제조**

[0226] **2-1. 건강식품의 제조**

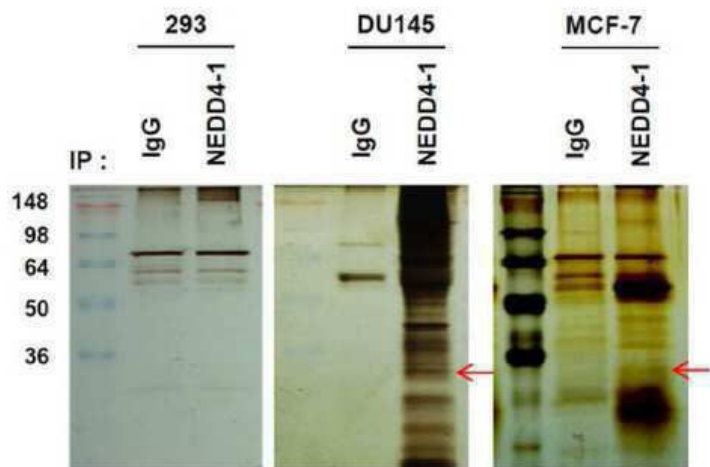
[0227]	p34 발현 또는 활성 억제제	100 mg
[0228]	비타민 혼합물	적량
[0229]	비타민 A 아세테이트	70 g
[0230]	비타민 E	1.0 mg
[0231]	비타민 B1	0.13 mg
[0232]	비타민 B2	0.15 mg
[0233]	비타민 B6	0.5 mg
[0234]	비타민 B12	0.2 g
[0235]	비타민 C	10 mg
[0236]	비오틴	10 g
[0237]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0238]	엽산	50 g

[0239]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0240]	무기질 혼합물	적량
[0241]	황산제1철	1.75 mg
[0242]	산화아연	0.82 mg
[0243]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0244]	제1인산칼륨	15 mg
[0245]	제2인산칼슘	55 mg
[0246]	구연산칼륨	90 mg
[0247]	탄산칼슘	100 mg
[0248]	염화마그네슘	24.8 mg

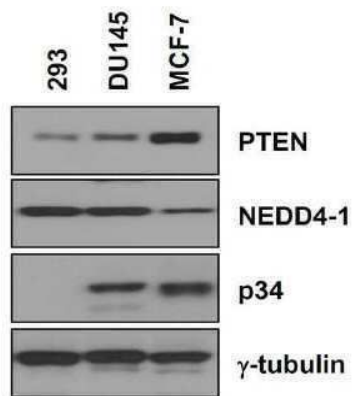
[0249] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

도면

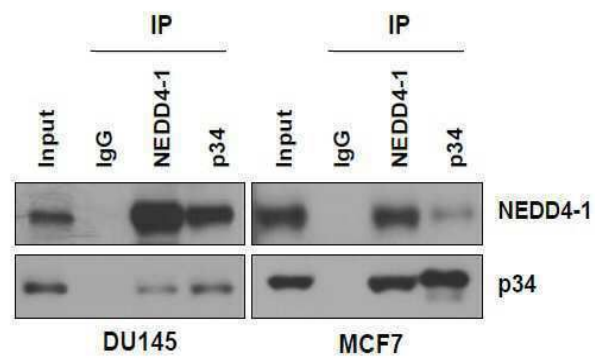
도면1



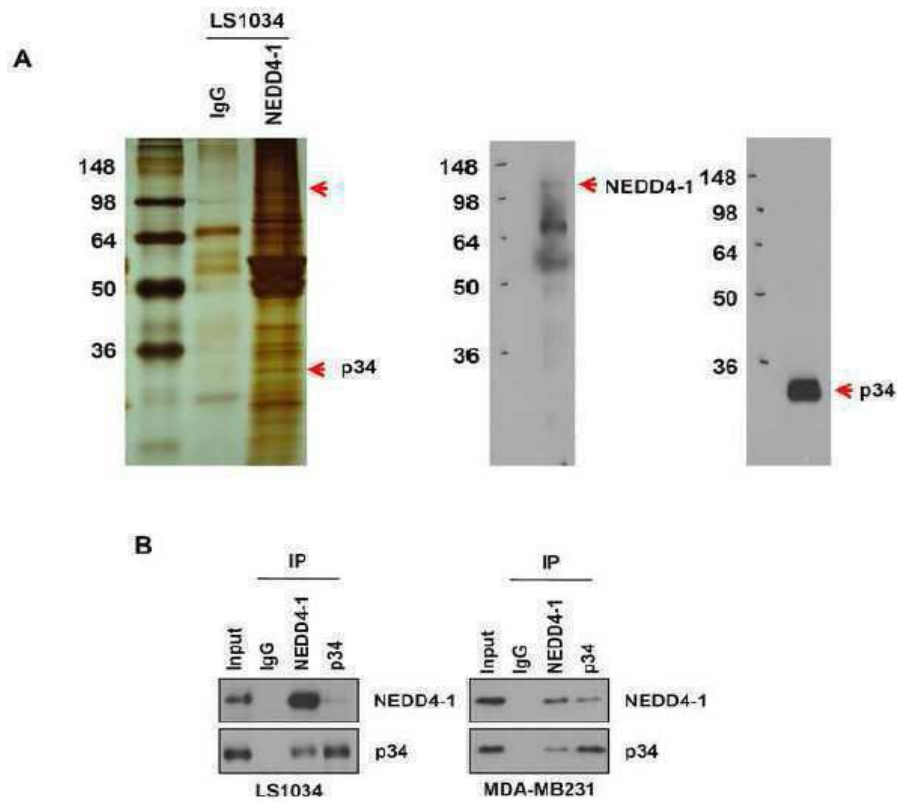
도면2



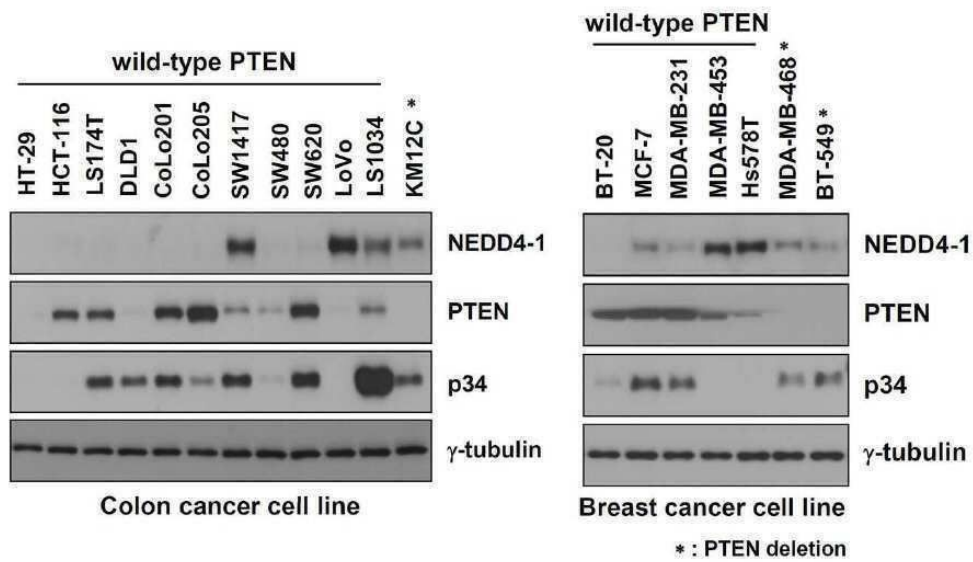
도면3



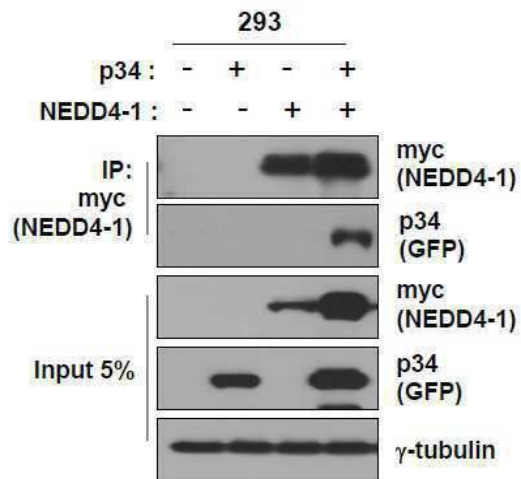
도면4



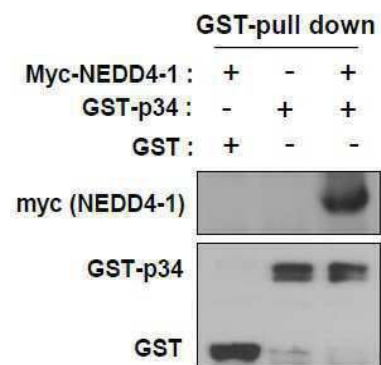
도면5



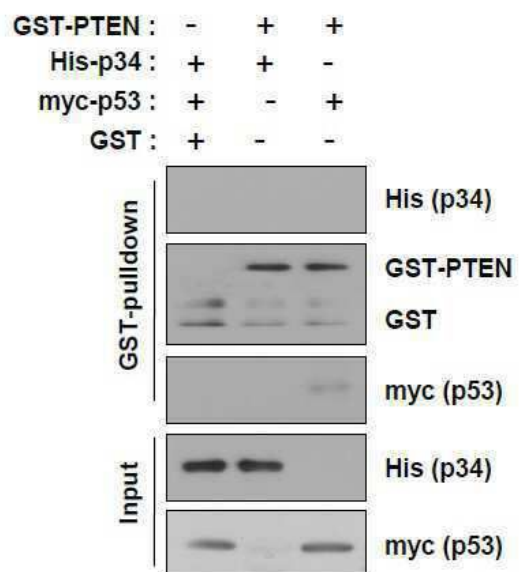
도면6



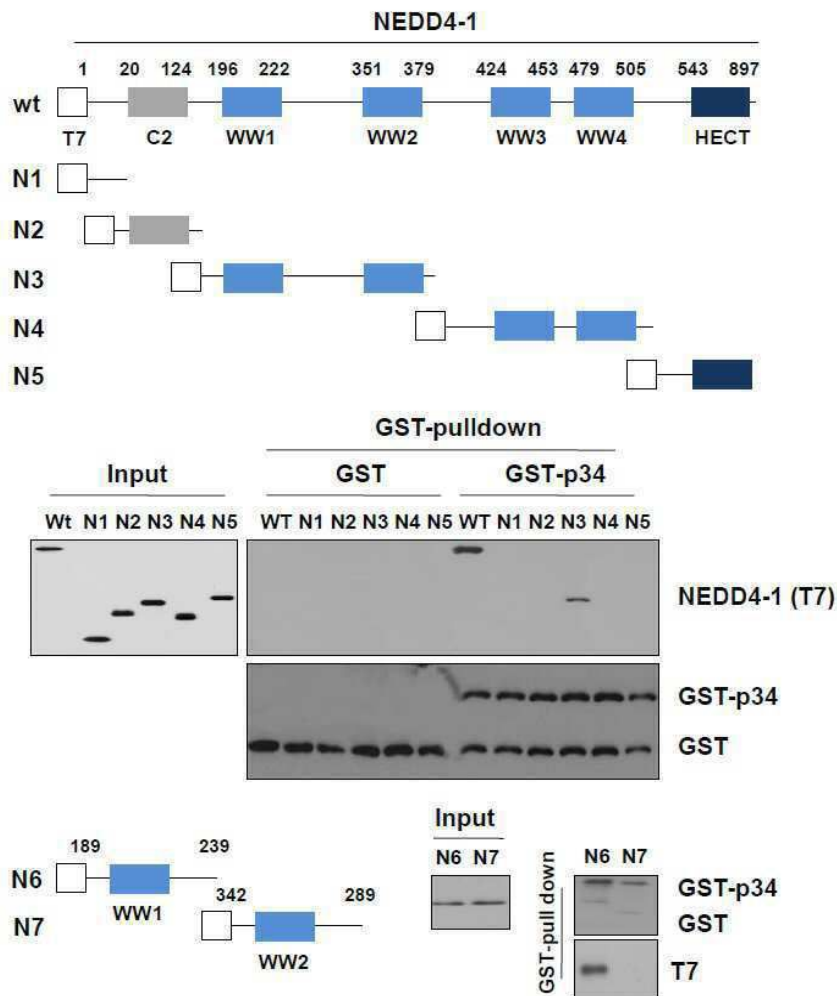
도면7



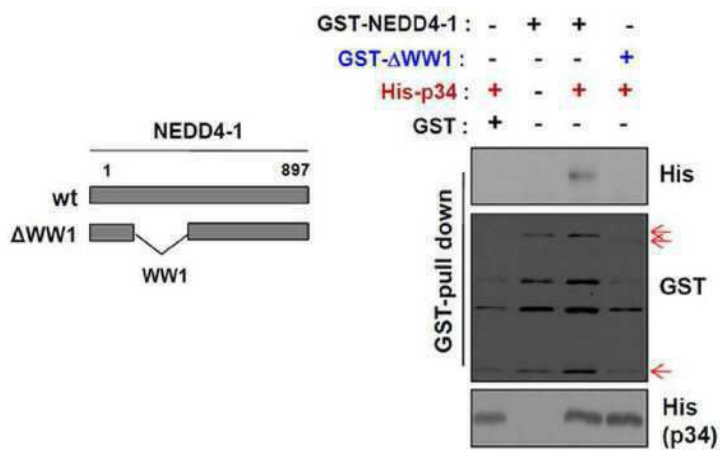
도면8



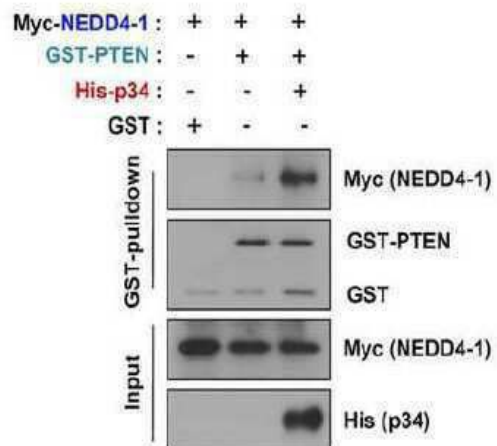
도면9



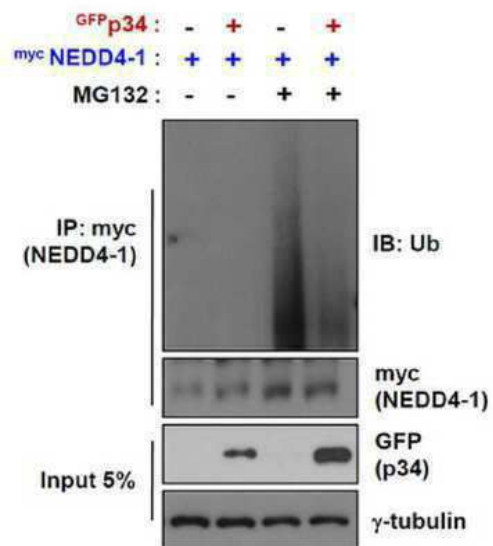
도면10



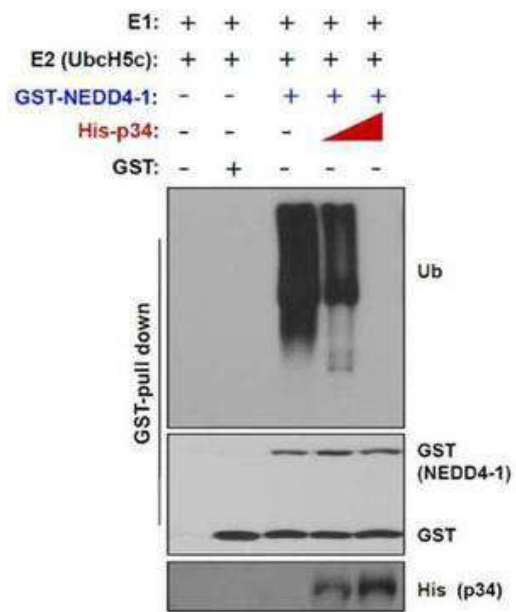
도면11



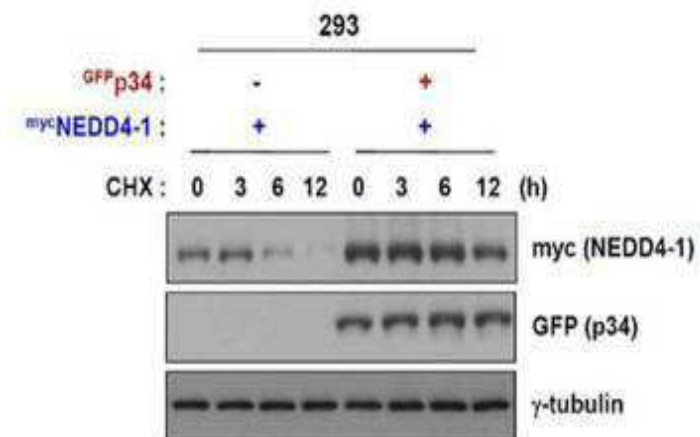
도면12



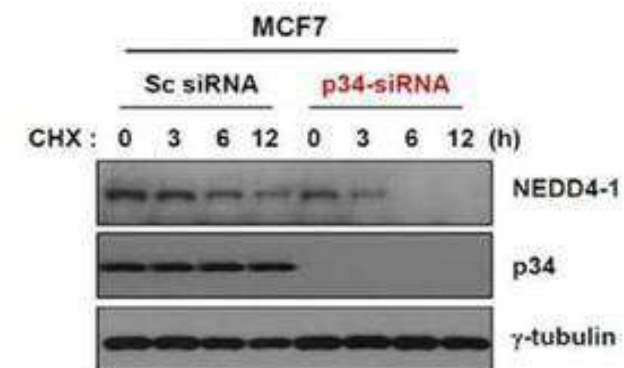
도면13



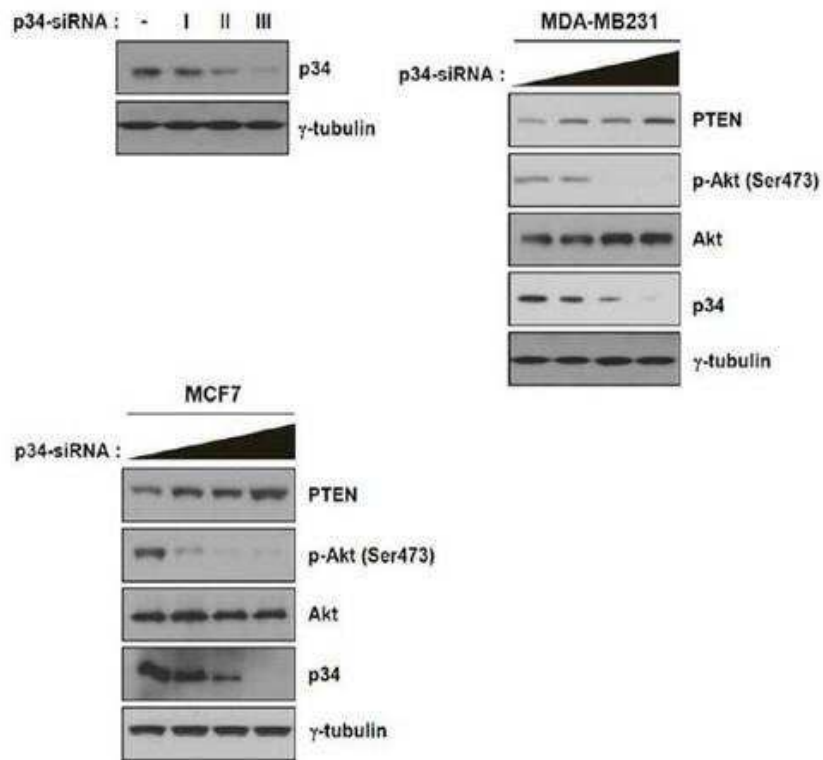
도면14



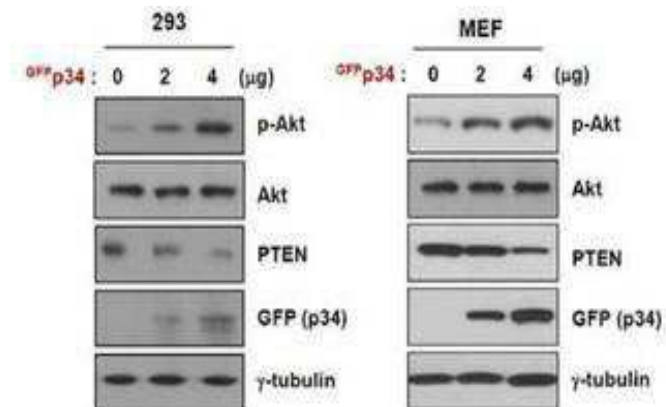
도면15



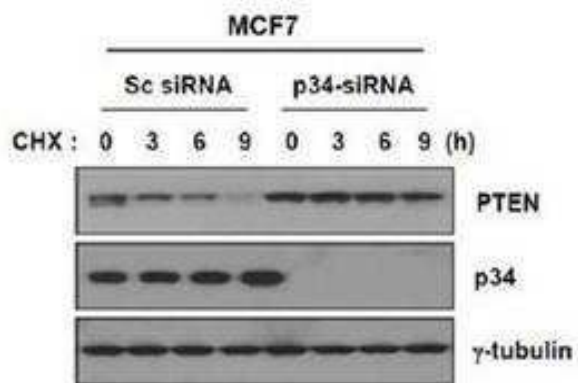
도면16



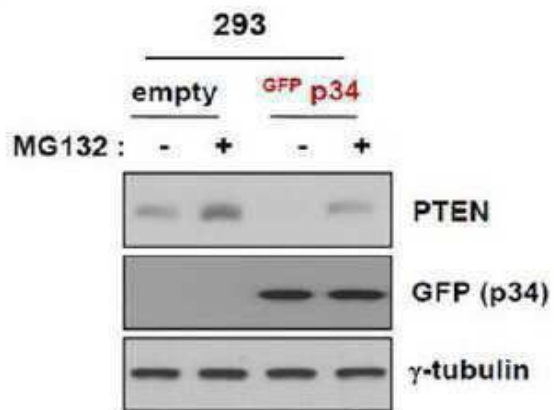
도면17



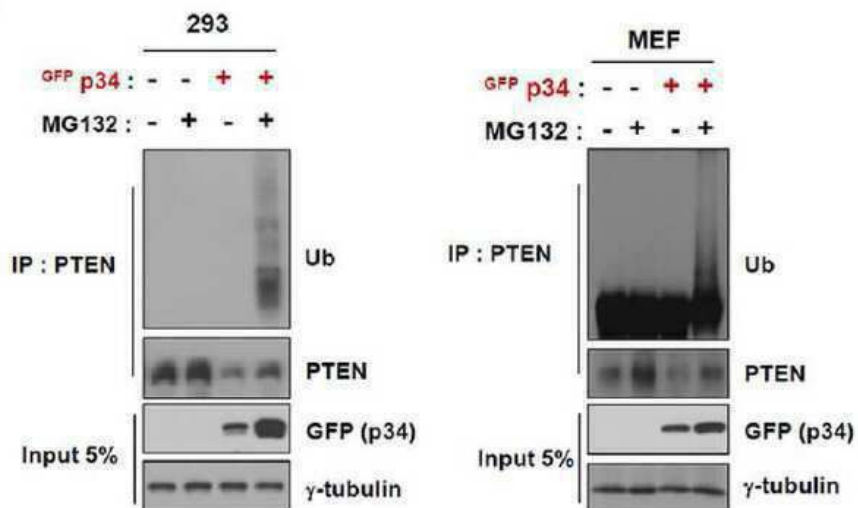
도면18



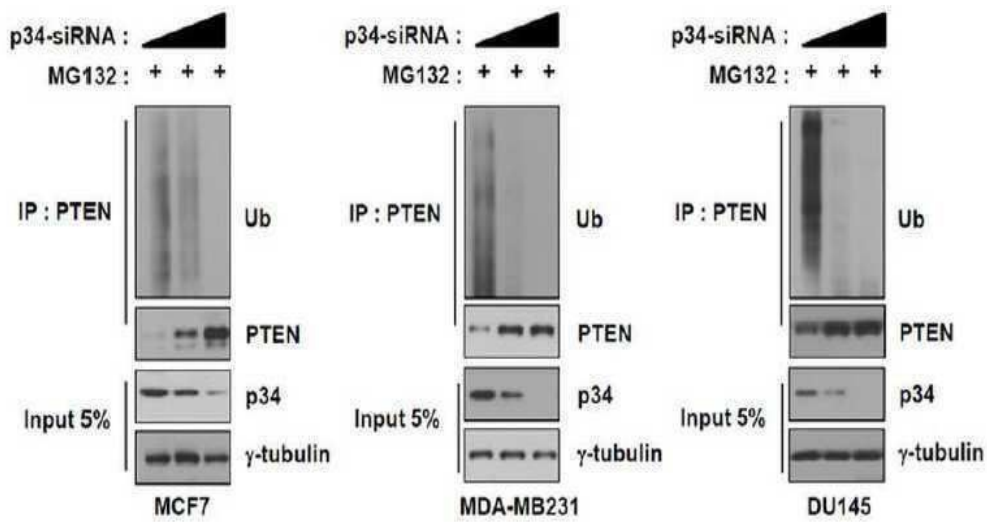
도면19



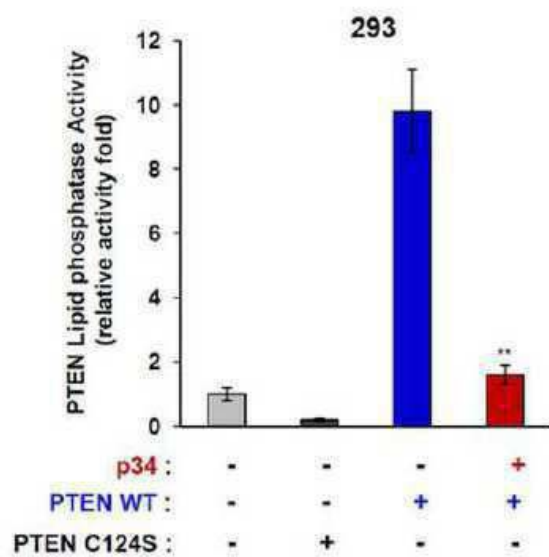
도면20



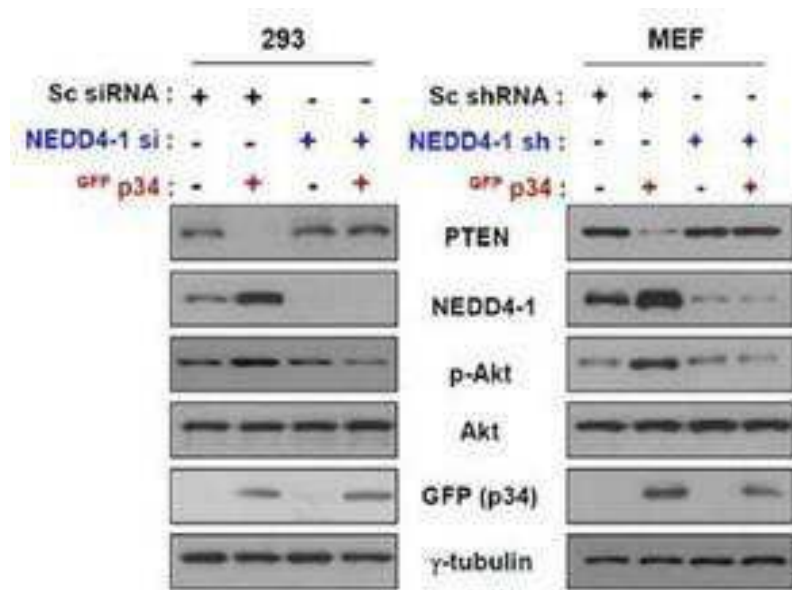
도면21



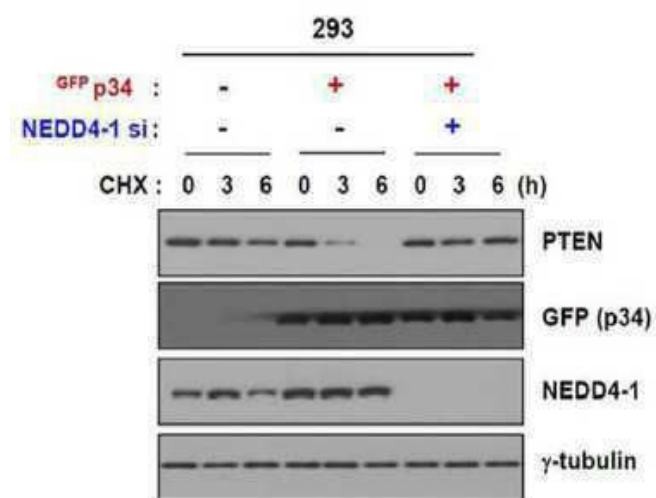
도면22



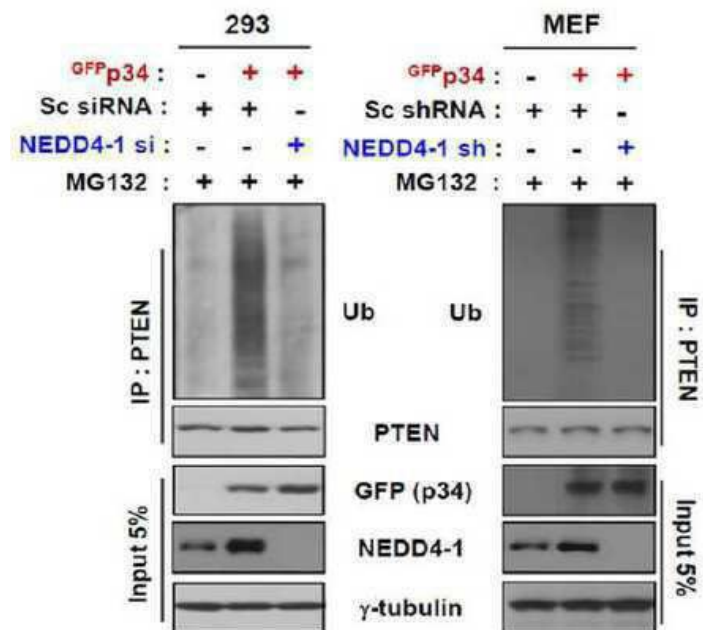
도면23



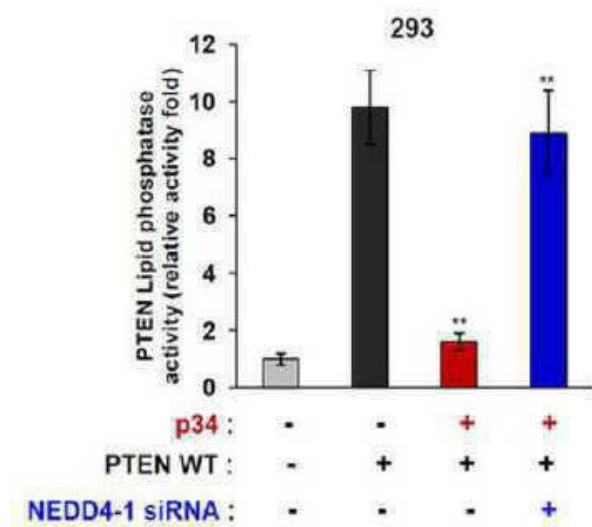
도면24



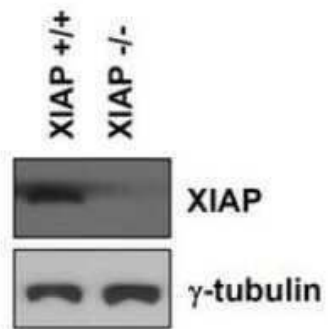
도면25



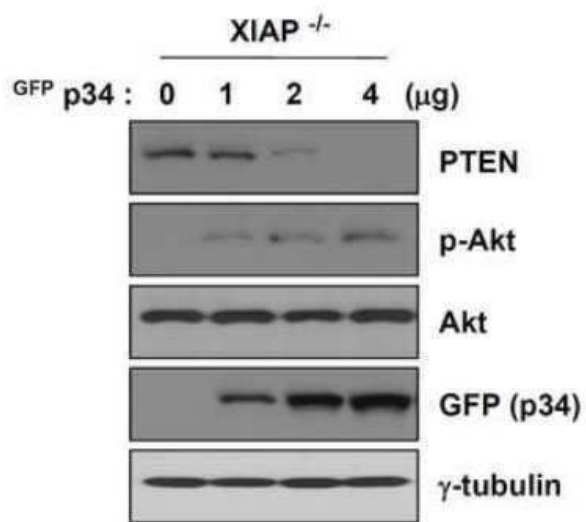
도면26



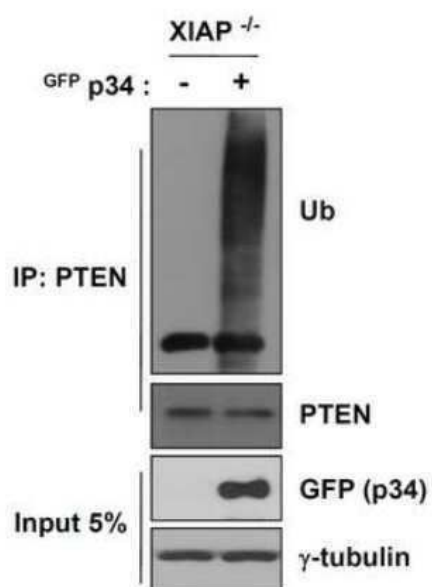
도면27



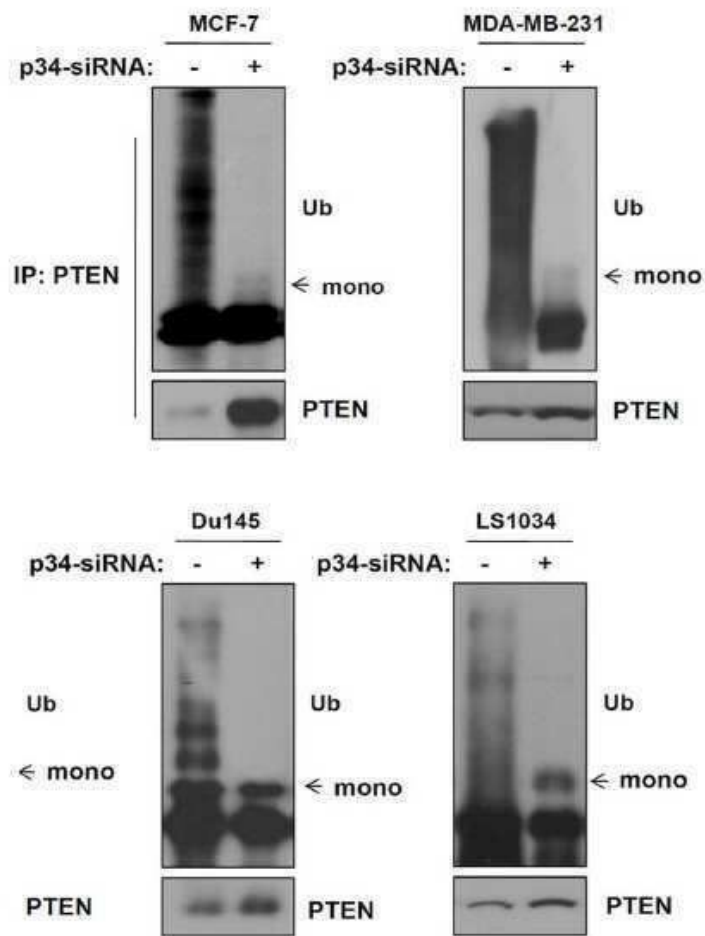
도면28



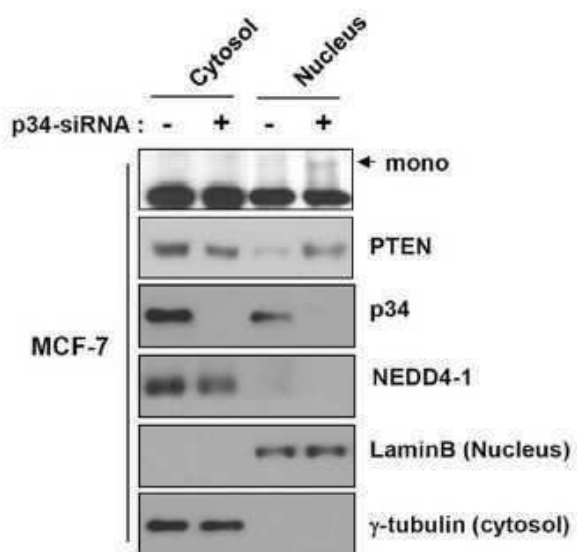
도면29



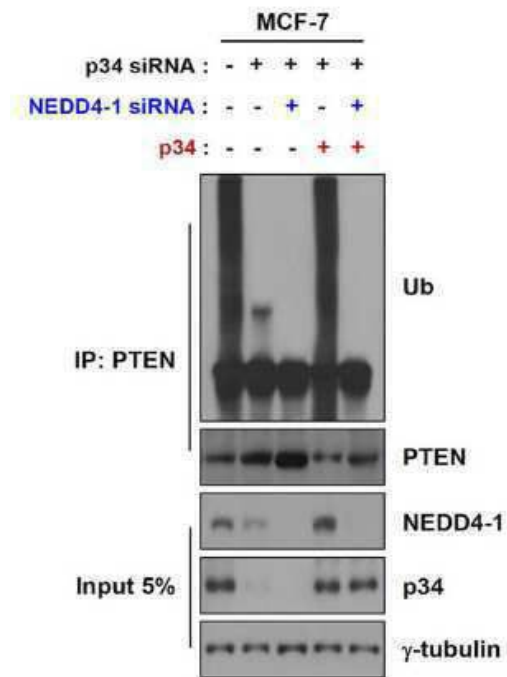
도면30



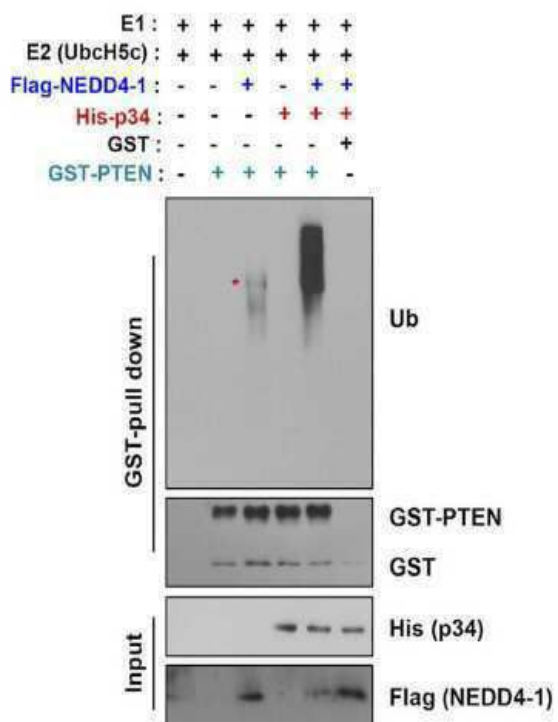
도면31



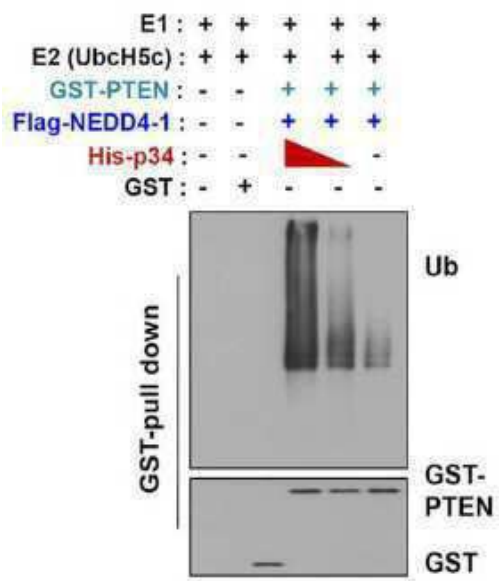
도면32



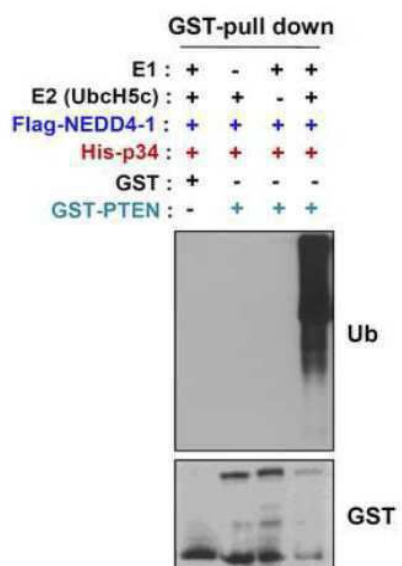
도면33



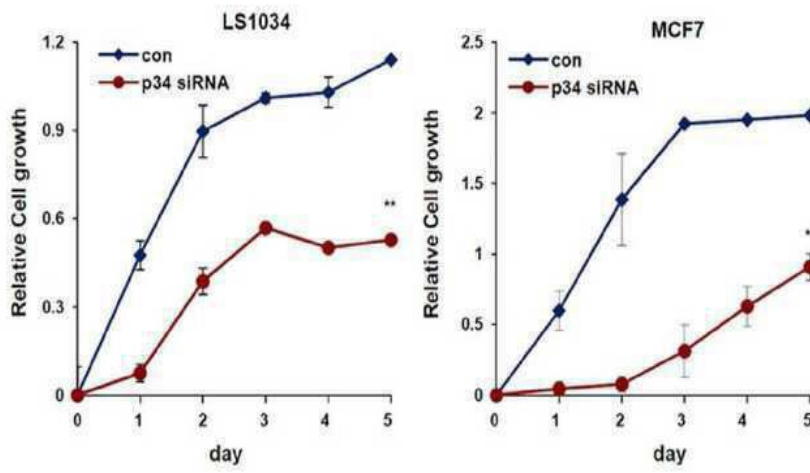
도면34



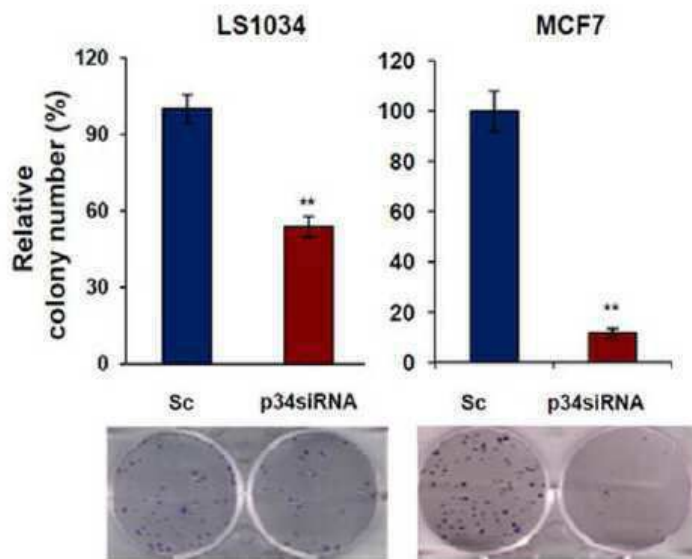
도면35



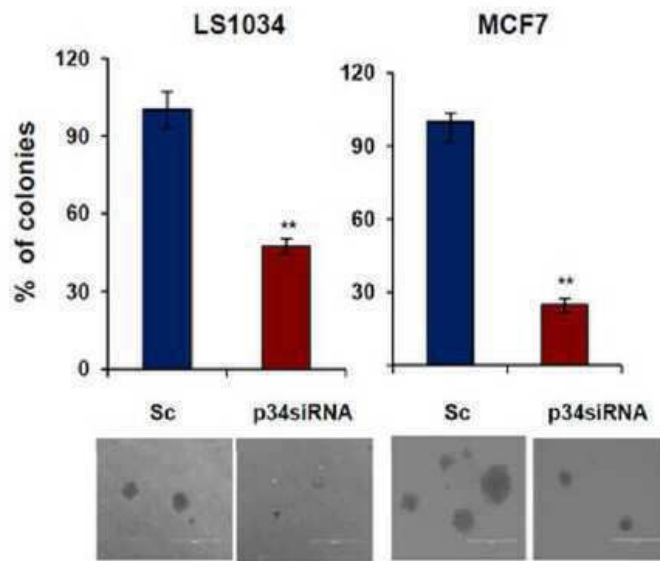
도면36



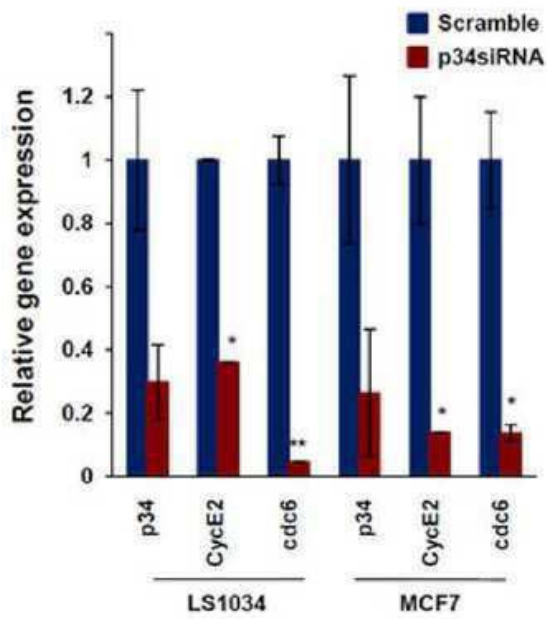
도면37



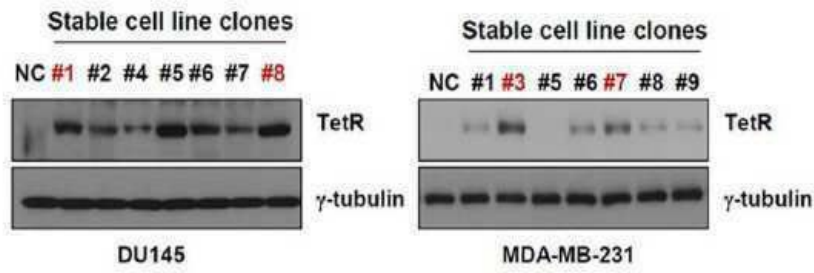
도면38



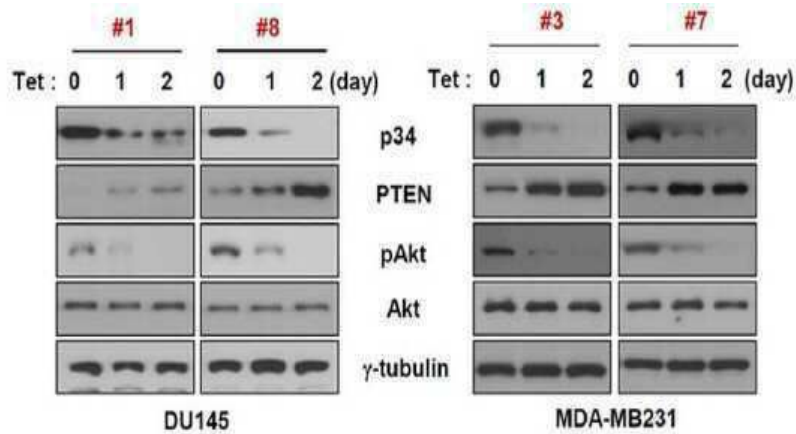
도면39



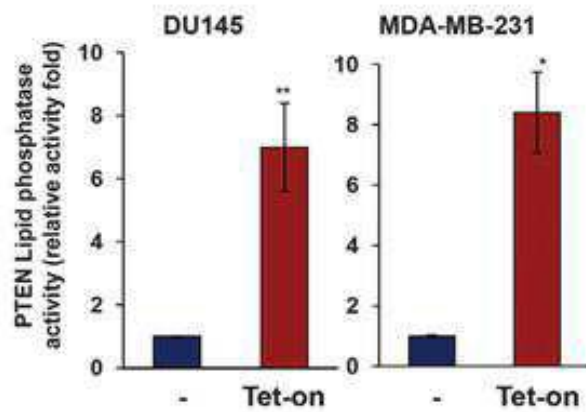
도면40



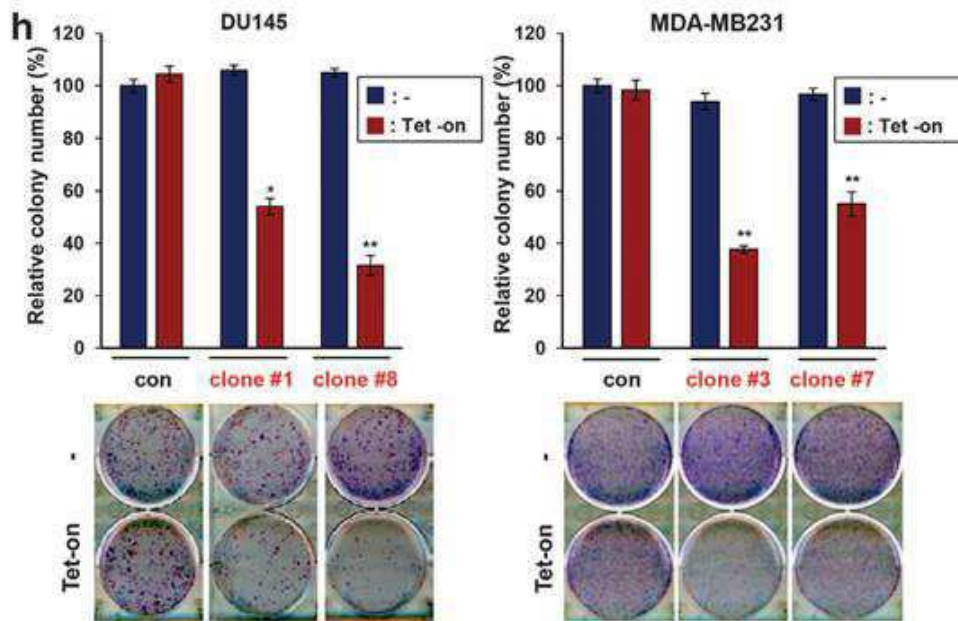
도면41



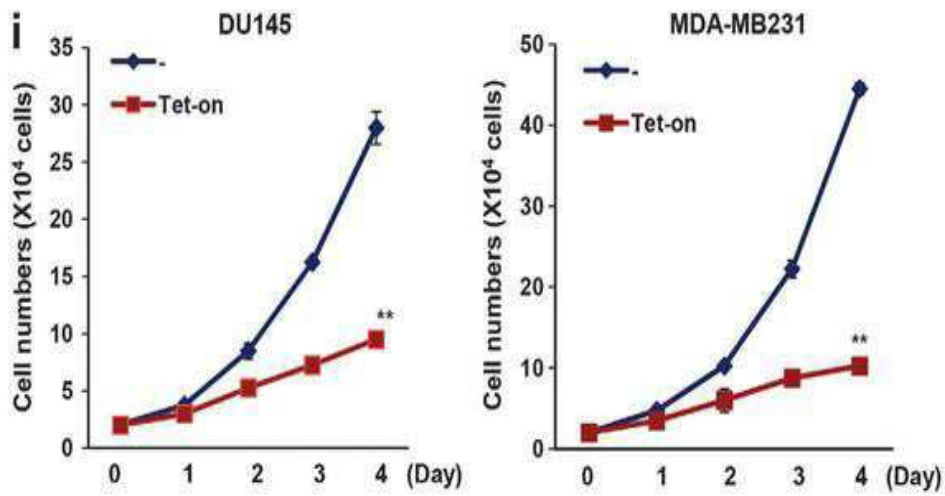
도면42



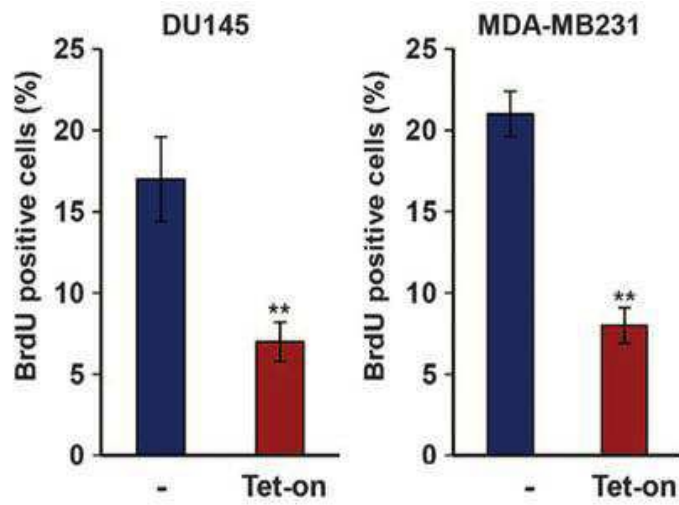
도면43



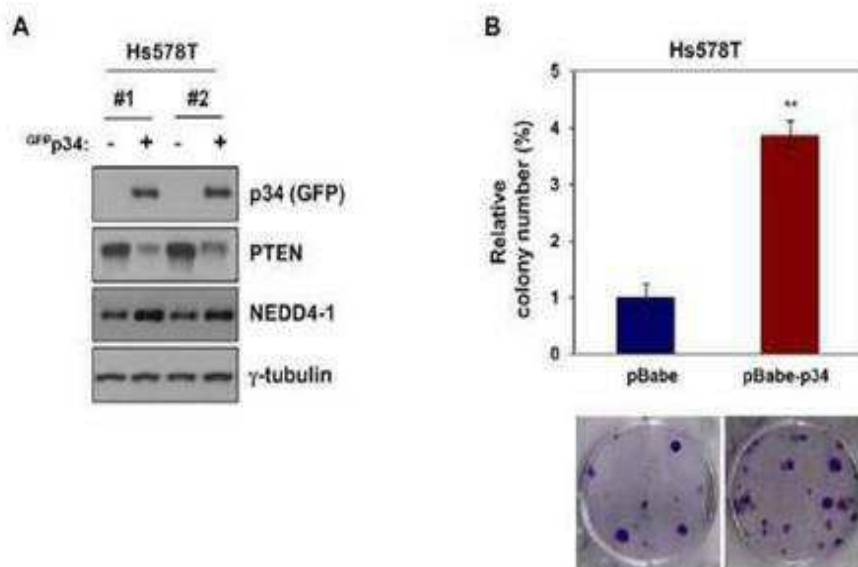
도면44



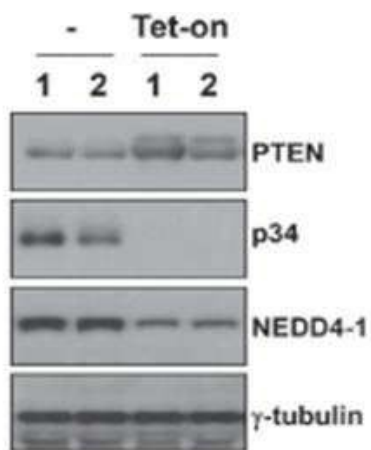
도면45



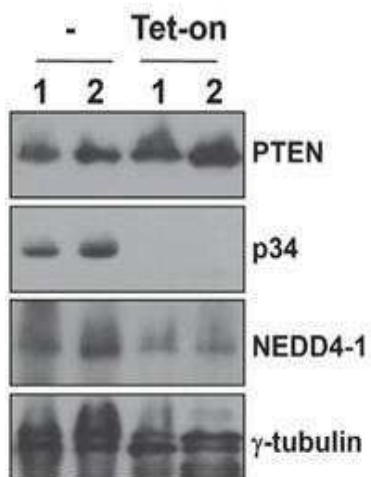
도면46



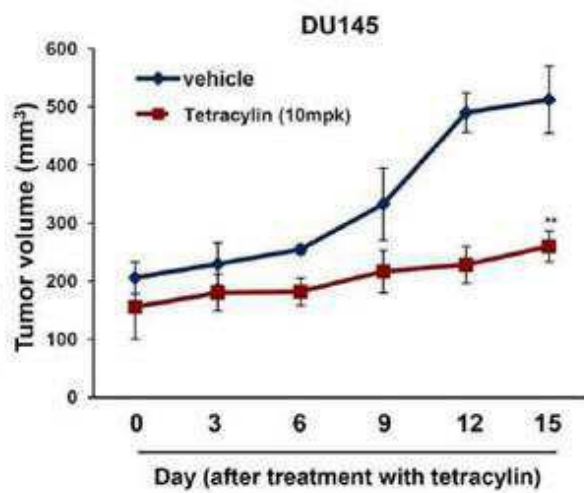
도면47



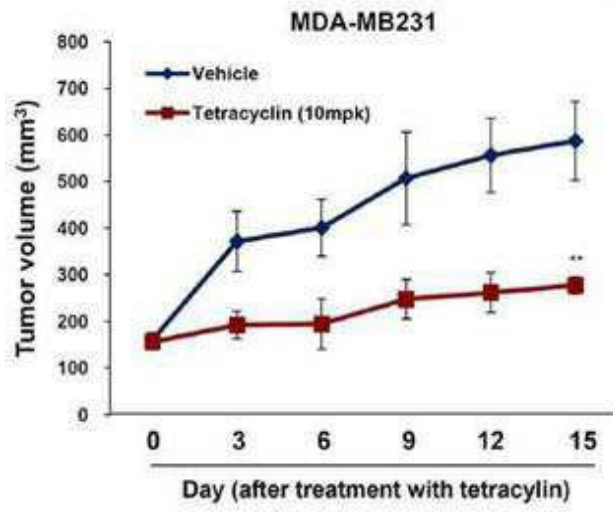
도면48



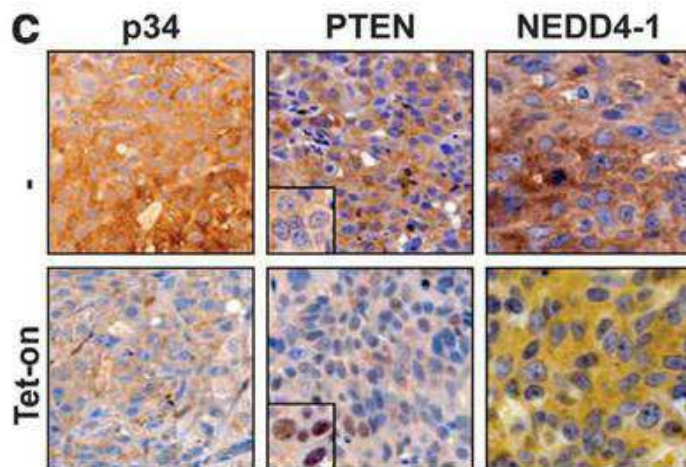
도면49



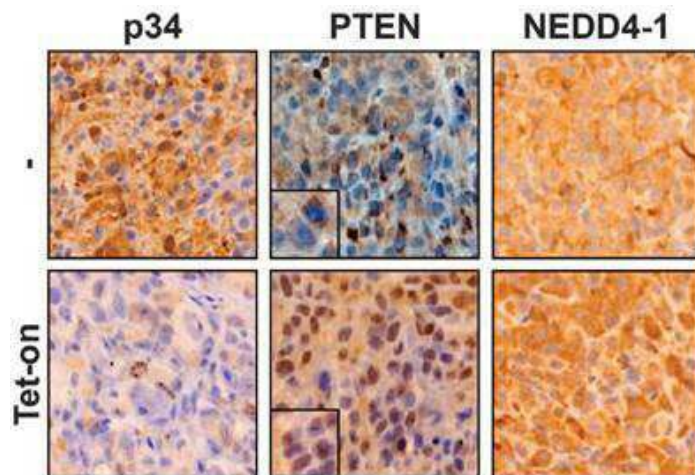
도면50



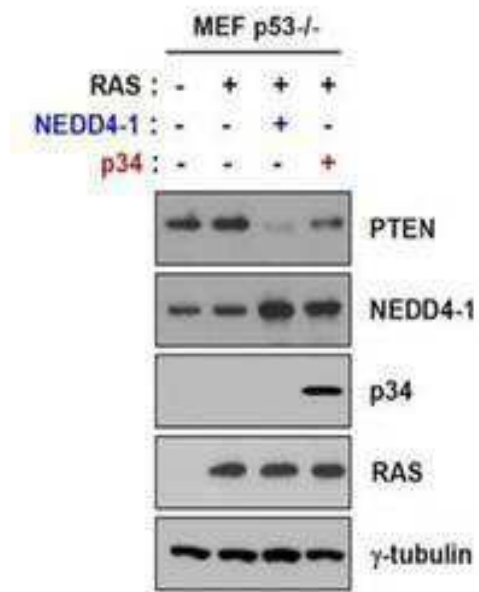
도면51



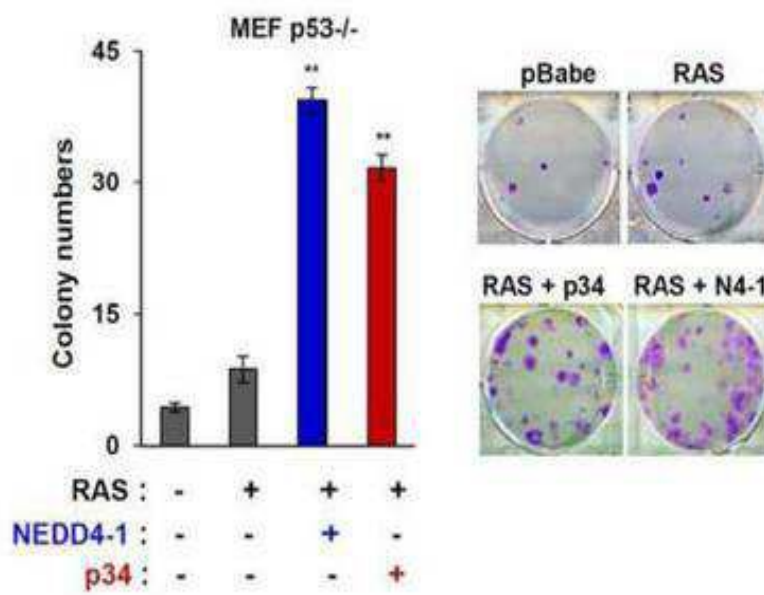
도면52



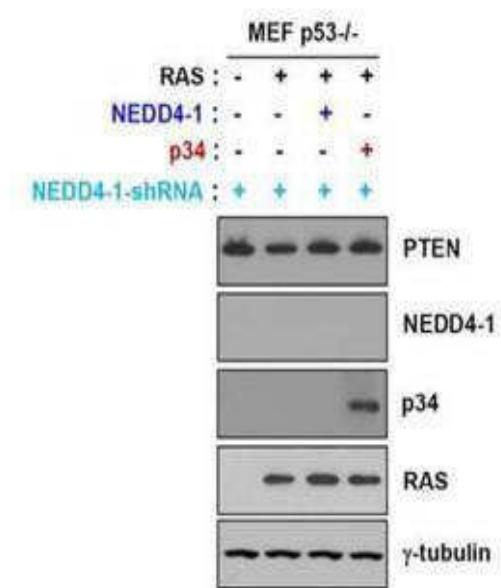
도면53



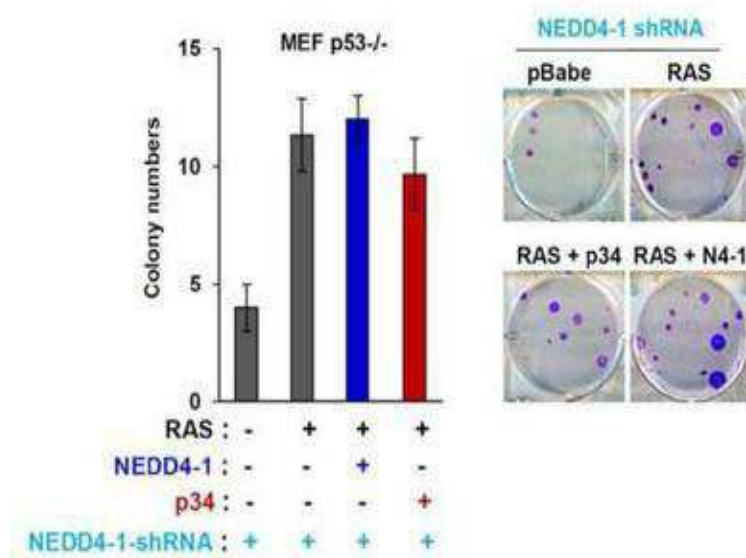
도면54



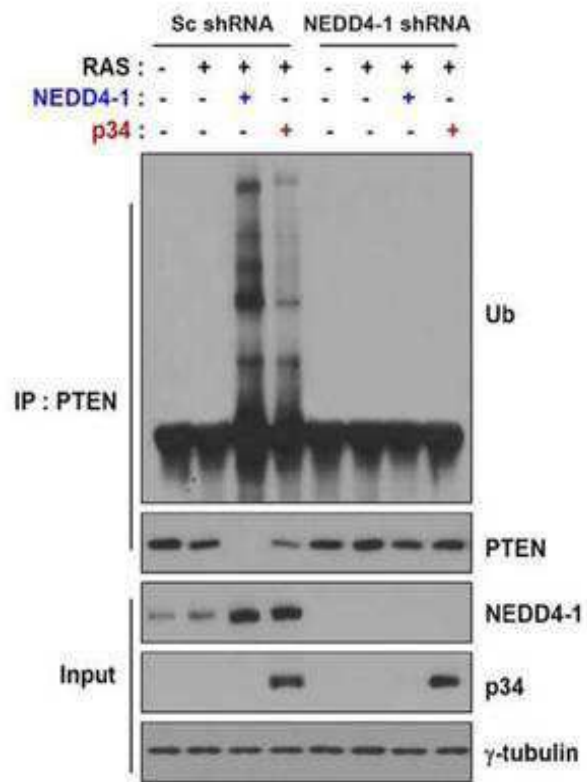
도면55



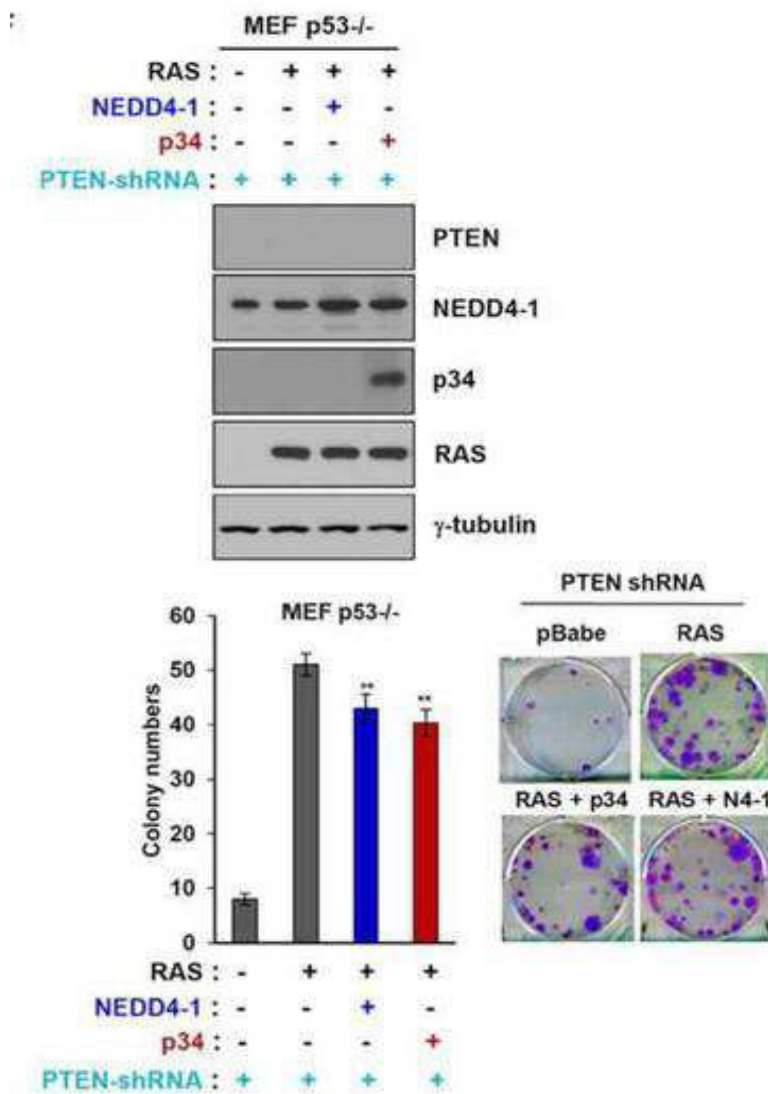
도면56



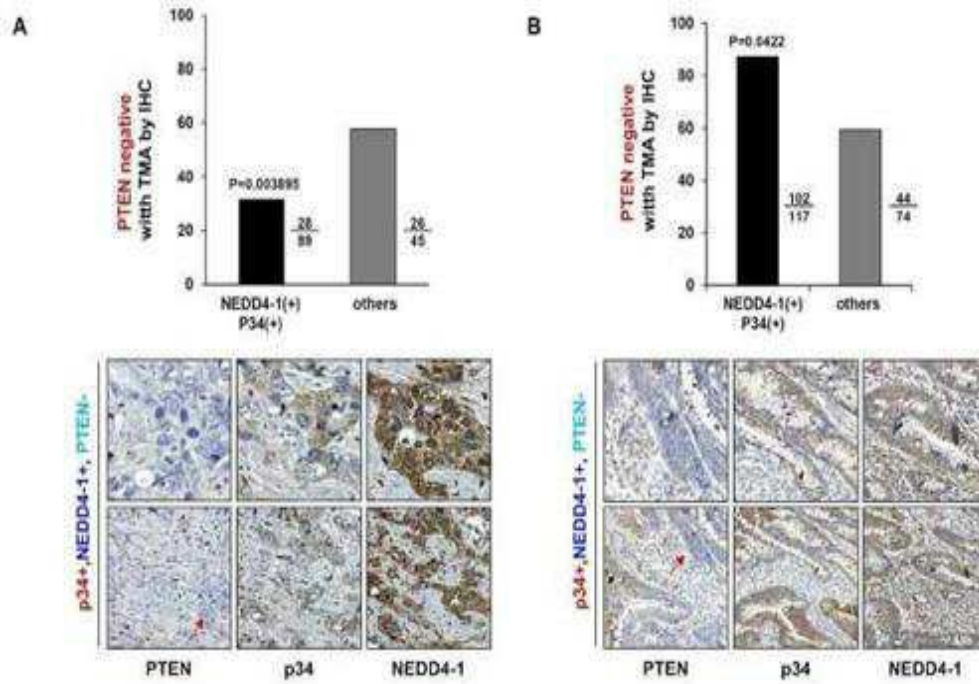
도면57



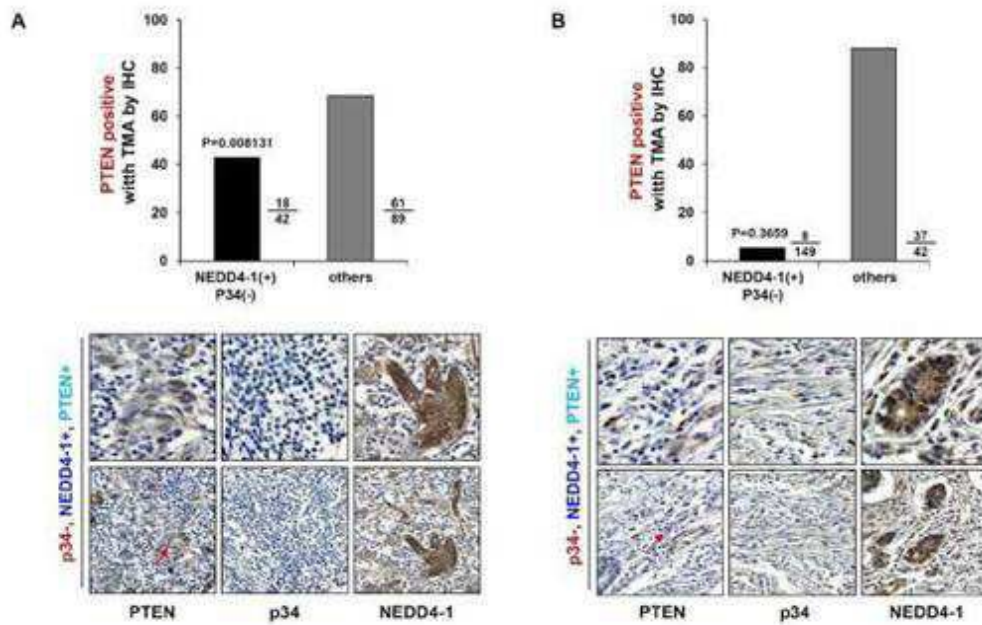
도면58



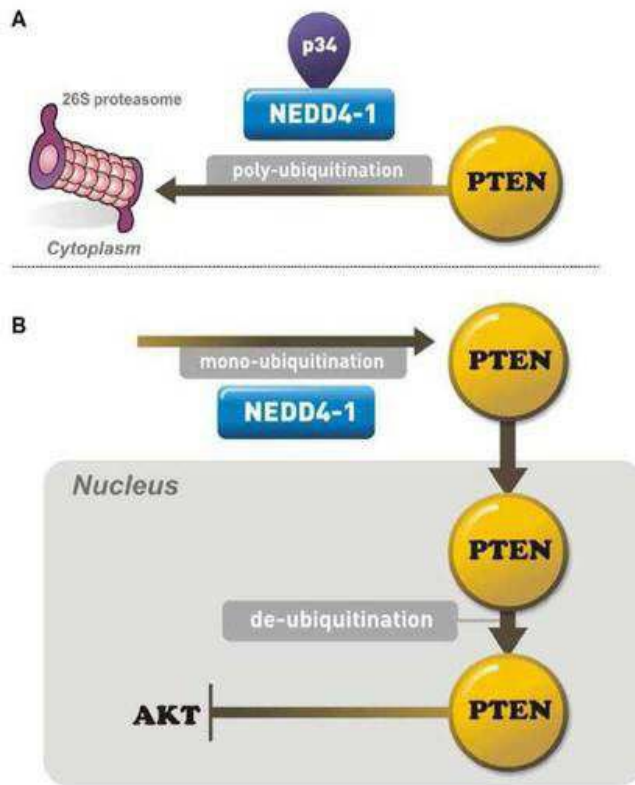
도면59



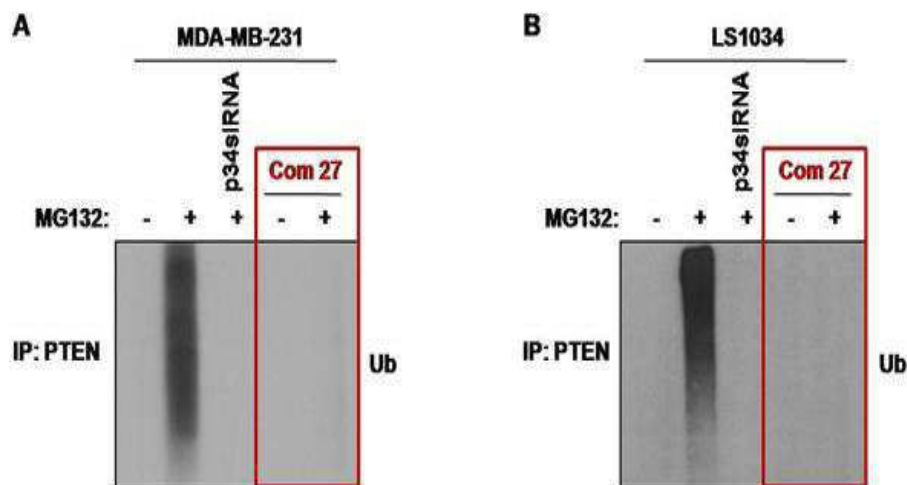
도면60



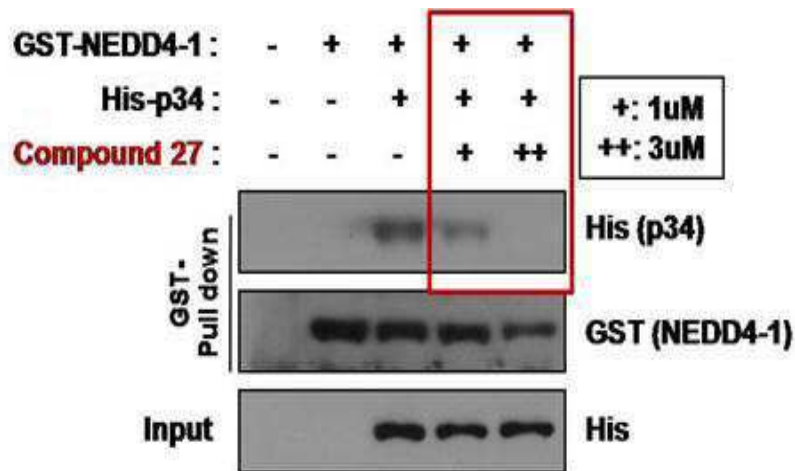
도면61



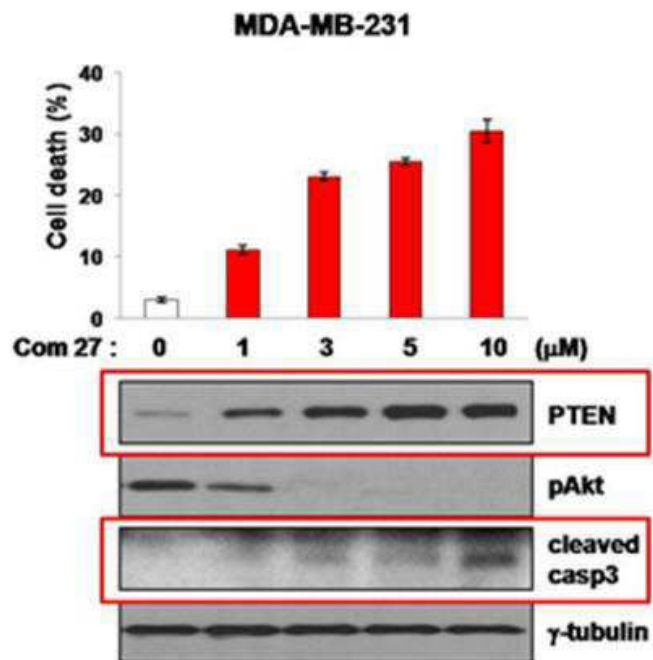
도면62



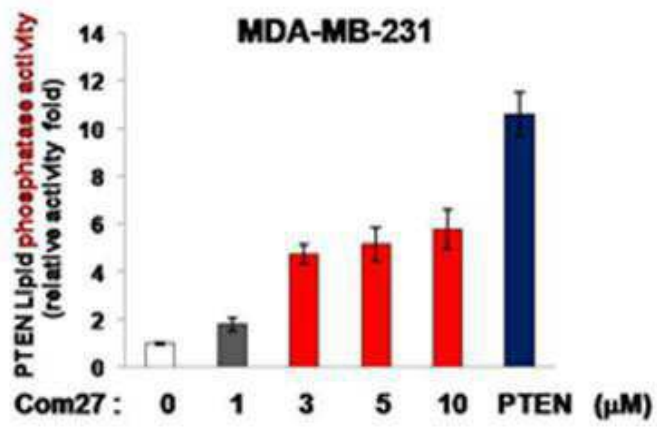
도면63



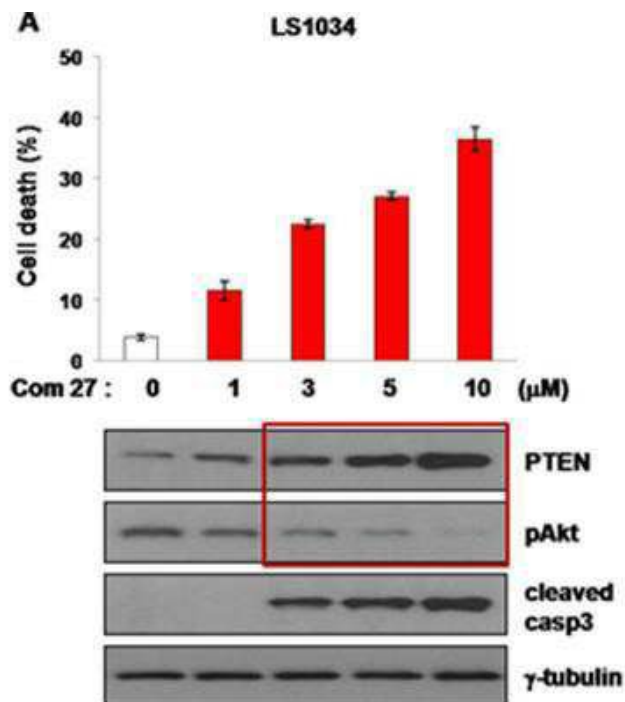
도면64



도면65



도면66



도면67

