



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월12일  
(11) 등록번호 10-1612097  
(24) 등록일자 2016년04월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/44 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)  
A61K 38/46 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 38/44 (2013.01)  
A61K 38/16 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0001828  
(22) 출원일자 2015년01월07일  
심사청구일자 2015년01월07일  
(56) 선행기술조사문헌  
Biochemical and Biophysical Research  
Communications, vol. 424, pp.  
34-39(2012.06.16.).\*  
KR1020100085316 A  
JP2010540544A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
충남대학교산학협력단  
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)  
(72) 발명자  
전병화  
대전광역시 서구 둔산남로 127 204동 803호  
최성아  
대전광역시 서구 문정로170번길 167-13  
이유란  
충청북도 보은군 보은읍 향교1길 3-3 에스애피아파트 102동 603호  
(74) 대리인  
김원준

전체 청구항 수 : 총 6 항

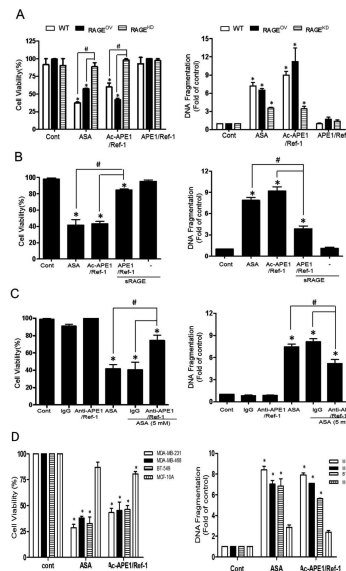
심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 아세틸화된 산화환원조절단백-1의 제조방법 및 이를 함유하는 유방암 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유방암의 예방 및 치료/증상 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아세틸화된 APE1/Ref-1(Ac-APE1/Ref-1)을 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 치료/증상 개선용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

**A61K 38/46** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-0054932  
부처명 미래창조과학부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 선도연구센터육성지원사업(MRC)  
연구과제명 감염신호네트워크응용연구센터  
기 여 율 4/10  
주관기관 충남대학교  
연구기간 2007.05.01 ~ 2016.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617  
부처명 교육부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 중점연구소지원사업  
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발  
기 여 율 4/10  
주관기관 충남대학교  
연구기간 2014.09.01 ~ 2023.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A3015385  
부처명 교육부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 일반연구자지원사업  
연구과제명 아세틸화된 APE1/Ref-1단백질의 세포외 방출과 AGE 수용체의 재인지에 따른 암세포사멸 기  
작의 in vitro/in vivo 모델에서 연구  
기 여 율 2/10  
주관기관 충남대학교  
연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아세틸화된 APE1/Ref-1을 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 유방암은 삼중음성유방암인 것을 특징으로 하는 유방암 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 RAGE(receptor for advanced glycated endproducts)와의 상호작용에 의해 세포자살을 유도하여 유방암 세포의 생존률을 억제하는 것을 특징으로 하는 유방암 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 아세틸화된 APE1/Ref-1은 삼중음성유방암 세포주를 과아세틸화시킨 배양액으로부터 분리한 것을 특징으로 하는 유방암 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 삼중음성유방암 세포주는 MDA-MB-231, MDA-MB-468 또는 BT-549 세포주인 것을 특징으로 하는 유방암 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 6

아세틸화된 APE1/Ref-1을 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 증상 개선용 건강식품 조성물.

#### 청구항 7

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 유방암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0002] 유방암은 전세계 여성들에게 가장 흔히 발병하는 암으로, 유방암의 발생 빈도는 매년 증가하여 2012년에는 약 170만명이 유방암으로 진단을 받았다. 유방암이 겨드랑이에 존재하는 림프절에 전이되는 경우, 폐, 뼈, 뇌 등 다른 원격장기로까지 전이될 가능성이 높기 때문에 가능한 한 빨리 치료를 받는 것이 중요하다.
- [0003] 유방암은 환자의 특성에 따라 치료의 접근법이 다르다. 즉, 유방암이 호르몬과 관련되어 발병한 것으로 에스트로겐 수용체(ER)와 프로게스테론 수용체(PR)의 발현과 관련이 있을 수 있다. ER과 PR에 의해 매개되는 유방암은 가족력, 유방의 비정형증식증, 이른 나이의 초경, 미분만부(nulliparity), 노산 및 늦은 폐경 등이 원인이 되기도 한다. 몇몇 임상 연구들은 ER/PR 양성 유방암은 내분비 치료에 효과적으로 반응함을 보고하였다. 실제로, 타목시펜이나 aromatase 저해제와 같은 ER을 표적으로 하는 차단제가 환자의 생존률과 약물 지속성을 효과적으로 증가시킨다는 임상 결과가 보고되었다. 20~30%의 유방암에서는 인간상피성장인자 수용체(human epidermal growth factor receptor, HER2/neu)의 발현 증가가 관측되기도 한다. HER2/neu를 발현하는 유방암은 ER/PR 양성 유방암에 비해 공격적이고, 성장이 빠르나 마찬가지로 수용체 매개의 시그널링을 저해하는 헤르셉틴(herceptin)이나 타이커브(Tykerb)로 비교적 적은 부작용으로 높은 효과를 기대할 수 있다. 이러한 치료방법들은 특정 호르몬의 성장을 요하는 유방암에서, 수용체를 직접적으로 표적으로 하는 호르몬 기반 물질을 포함한다.
- [0004] 이에 반해 전체 유방암의 10~20%를 차지하는 삼중음성유방암(Triple-negative breast cancers, TNBCs)은 RE, PE 및 HER2 수용체가 발현되지 않는다. 유전성 유방암과 연관되는 BRCA1 변이를 가진 경우, 폐경 전 여성, 흑인종에게는 발현빈도가 20~40%로 증가하기도 한다. TNBCs는 조직학적인 점수가 높고, 전이암의 다수를 차지하며, 원발위치와 떨어진 위치에서 빨리 재발하여 예후가 좋지 않을 뿐 아니라, 다른 유방암들에 비해 매우 공격적인 성향을 나타낸다. 그러나 TNBCs 환자들은 ER, PR 또는 HER2 수용체 발현 유방암과는 달리 최근의 수용체 표적 치료에 효과를 나타내지 않기 때문에 주된 치료는 항암제를 이용할 수 밖에 없으며, 치료에 대한 선택의 폭이 제한적이다. TNBCs에서 항암치료로 인해 발생하는 부작용으로는 탈모, 구토감, 무기력증, 혈구감소 등을 들 수 있으며, 탈모와 무기력증으로 인한 스트레스로 우울증이 동반되는 환자가 많고, 구토감 등으로 영양공급이 원활하지 않아 전신적인 무기력증이 심화되며, 여러 혈구의 감소로 인해 신체 상태가 급격히 악화되기도 하여 새로운 표적 치료가 매우 시급하다.
- [0005] 단백질은 생합성된 후 성숙단백질이 되는 과정에서 절단에 의한 프로세싱이나 아미노산 잔기의 수식과 같은 각종 수식과정을 거치며, 이를 전사 후 변형(PTM, post-translational modification)이라 한다. 예를 들어, 분비단백질의 대부분은 N말단에 신호펩티드가 있는 상태로 생합성되며, 막을 통과할 때 PTM 과정에서 신호펩티드가 잘려져 제거된다. PTM에 의한 아미노산 잔기의 수식에는 아세틸화, 인산화, 아미드화, 메틸화 등이 있으며, 유전자의 발현을 조절하고 치료제에 대한 암세포의 감작에 의해 생존과정 및 세포자살(apoptosis) 사이의 동적인 상호작용을 유발한다. 특히 아세틸화는 진핵생물 세포의 단백질의 주된 PTM의 하나로, 세포주기억류(cell cycle arrest)와 세포자살을 야기하는 세포 조절과정에서 주요한 PTM으로 알려져 있다. PTM을 유도하는 약제는 특히 치료에 저항적인 암세포의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있기도 하다. 예를 들어, HDACi(histone deacetylase inhibitors)와 같은 몇몇 아세틸화제는 또한 in vivo에서 잠재적인 항암활성을 갖는 것이 알려져 있어, 암 치료제로서 유용함을 시사한다. 단백질의 특정 잔기에서의 PTM은 또한 세포내 소기관과 단백질의 핵-세포질 이동에 관여하여 이동된 단백질의 역할의 변화에 영향을 미친다.
- [0006] 산화환원조절단백-1(APE1/Ref-1, apurinic apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1)은 산화적 스트레스를 방어하는 세포내 주요 단백질이다. 대표적 기능으로 손상된 DNA를 수리 또는 복구 시켜주는 기능과 전사인자의 산화환원을 조절하여 세포 내 유전자 발현을 정상적으로 유지시키는 데 중요한 기능을 담당하고 있다.
- [0007] APE1/Ref-1은 318개 아미노산으로 구성되어 있으며 N-terminus 부위에 핵 위치신호(nuclear localization signal, NLS)와 핵 유출신호(Nuclear export signal, NES)가 존재하여 세포 내 위치를 조절하고 있다. 정상적 조건에서 APE1/Ref-1은 주로 핵에 위치하고 있지만 산화적 스트레스 등 세포내 손상을 유도하는 자극에 의해 세포질로 이동됨이 보고되어 있으며, 세포 내 산화환원상태 등 환경변화에 따라 산화환원조절단백-1의 위치이동이 나타나는 것으로 알려져 있다. 최근, 본 발명자들은 APE1/Ref-1의 리신 잔기 K6, K7이 아세틸화되고, HDACi, TSA(Trichostatin A)의 처리에 의해 세포질로 이동하며, 결국 세포외로 분비됨을 보고한 바 있다

(Biochemical and biophysical research communications 2013; 435(3): 403-7). 상기 논문에서는 아세틸화된 APE1/Ref-1(Ac-APE1/Ref-1)의 양은 면역학적으로 측정하였으나, 분비된 Ac-APE1/Ref-1의 역할에 대해서는 아직 규명을 하지 못한 상태이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Biochemical and biophysical research communications 2013; 435(3): 403-7.  
(비특허문헌 0002) Biochemical and biophysical research communications 2013; 435(4): 621-6.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 유방암, 특히 다른 유방암에 비해 적용할 수 있는 치료방법이 제한적이고 예후가 좋지 않은 삼중음성 유방암의 예방 및 치료 또는 증상 개선을 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 아세틸화된 APE1/Ref-1(Ac-APE1/Ref-1)을 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0011] Ac-APE1/Ref-1은 유방암 세포에서 세포 생존율을 크게 감소시킨다. 특히 삼중음성유방암에서 Ac-APE1/Ref-1은 RAGE(receptor for advanced glycated endproducts)와의 상호작용에 의해 세포자살을 유도하여 유방암 세포의 생존율을 크게 억제하였다.
- [0012] Ac-APE1/Ref-1은 APE1/Ref-1을 Acetyl Co-enzyme A 또는 acetyl-salicylic acid를 사용하여 APE1/Ref-1를 아세틸화 하는 것에 의해 제조될 수도 있으며, 과-아세틸화된 유방암 세포의 배양액으로부터 분리할 수도 있다.
- [0013] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명은 아세틸화된 APE1/Ref-1을 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 증상개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 아세틸화된 APE1/Ref-1은 본 발명의 건강기능식품 조성물에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품류 등이 있다.

### 발명의 효과

- [0015] 이상과 같이 본 발명에 의하면 유방암, 특히 치료가 제한적이고 예후가 좋지 않은 삼중음성유방암 세포의 증식을 효과적으로 억제하므로 유방암의 예방 및 치료또는 증상 완화에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 과-아세틸화에 의한 유방암 세포의 영향을 보여주는 그래프.
- 도 2는 유방암 세포에서 과-아세틸화와 세포사와의 관계를 나타내는 그래프 및 표.
- 도 3은 과-아세틸화된 유방암 세포에서 Ac-APE1/Ref-1 분비의 증가를 보여주는 면역분석 결과 이미지 및 그래프.
- 도 4는 과-아세틸화된 유방암 세포에서 Ac-APE1/Ref-1 분비와 미세소구체의 형성의 상관관계를 보여주는 면역분석 이미지 및 그래프.
- 도 5는 과-아세틸화된 유방암 세포에서 RAGE의 발현증가를 보여주는 면역분석 이미지 및 그래프.
- 도 6은 제조합 Ac-APE1/Ref-1 단백질의 제조 결과를 보여주는 면역분석 이미지.
- 도 7은 Ac-APE1/Ref-1이 RAGE와 상호작용하는 결과를 보여주는 면역분석 이미지 및 면역복합 이미지.
- 도 8은 MAPK 인산화에 대한 Ac-APE1/Ref-1의 영향을 보여주는 면역분석 이미지 및 그래프.
- 도 9는 유방암 세포에서 세포자살에 대한 RAGE와 Ac-APE1/Ref-1의 결합의 영향 및 제조합 Ac-APE1/Ref-1의 삼중 음성 유방암 세포주 세포자살 효과를 보여주는 그래프.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0018] 실시예
- [0019] 실시예 1 : 유방암 세포에서 과-아세틸화에 의한 세포사의 비교
- [0020] 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231와 MCF-7는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 입수하였으며, ATCC 권고안에 따라 5% CO<sub>2</sub>, 37 ° C에서 배양하였다. 세포의 아세틸화에 의한 세포사의 영향을 비교하기 위하여, 세포들을 HDAC 저해제인 Trichostatin A(TSA, Sigma-Aldrich) 0.1 μM과 함께 1시간 사전 배양한 후에, Acetylsalicylic acid(ASA, Sigma-Aldrich)로 처리하여 과-아세틸화를 유도하였다. 대조군은 ASA 대신 Salicylic acid(SA, Sigma-Aldrich)로 처리하였다.
- [0021] 이후 각 세포주의 생존율을 AccuChip4x Kit를 사용하여 automatic cell count machine ADAM(Digital Bio, Seoul, South Korea)으로 측정하고 그 결과를 도 1의 A와 B에 도시하였다. 또한 살아있는 세포에서 propidium iodide(PI)에 양성인 세포의 수의 비율을 automatic cell counter로 측정하는 것에 의해 괴사 세포의 비율을 계산하여 도 1의 C에 도시하였다(n=3, p<0.05).
- [0022] 도 1에 별도로 도시하지는 않았으나, salicylic acid를 처리한 대조군이나 TSA만을 처리한 군에서는 세포사가 일어나지 않았다.
- [0023] 유방암 세포주인 MDA-MB-231 및 MCF-7 세포주는 ASA 처리에 따라 세포 생존률이 감소하였으며, 특히 MDA-MB-231이 더 민감하게 반응하여 5mM ASA를 36시간 처리한 경우 대조군에 비해 MCF-7 세포는 생존률이 약 35.8% 포인트 감소하였으나, MDA-MB-231 세포는 68% 포인트 정도가 감소하였다. MDA-MB-231은 ASA 처리 후 점차적으로 세포 생존률이 감소하였음에 반해, MCF-7은 처리 24시간까지는 대부분이 생존하다가 24시간 후 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 세포투과성 계면활성제를 사용하지 않은 PI 염색결과를 나타내는 도 1의 C에 의하면, MDA-MB-231 세포에 비해 MCF-7 세포에서 괴사성 세포사(necrotic cell death)를 나타내는 PI 양성 세포의 수가 현저하게 증가하였다.

[0024] 이에 MDA-MB-231와 MCF-7 세포에서 과-아세틸화와 세포사와의 관계를 선행연구 방법에 따라(Toxicology and applied pharmacology 2013; 273(3): 659-71) 1) 엔도뉴클레아제의 활성화에 의한 세포질에서의 histone-관련 DNA 조각을 sandwich-type ELISA로 정량하고, 2) sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> DNA 세포의 유세포분석에 의해 확인하였다. 간략하게는 전술한 방법에 의해 ASA를 36시간 처리하여 과-아세틸화를 유도한 후 원심분리에 의해 부착 및 부유 세포를 각각 수집하였다. 수집한 세포를 96-well plate에서 anti-histone 항체와 반응시키고, histone-DNA 복합체를 anti-DNA-peroxidase antibody로 표지한 후 colorimetric reaction의 측정에 의해 세포질의 histone-관련 DNA 조각을 분석하였다.

[0025] 도 2의 A와 B는 각각 ASA를 처리한 MDA-MB-231와 MCF-7 세포의 세포질에서의 histone-관련 DNA 조각의 정량 결과이며, C는 MDA-MB-231와 MCF-7 세포의 대조군 또는 ASA 5mM의 36시간 처리군에서 세포 주기가 sub-G<sub>0</sub>인 세포의 비율을 나타낸다. 도 2의 B의 내부 그림은 부유의 MCF-7 세포에서 비-세포자살 세포사(세포괴사)의 비율을 나타낸다.

[0026] 도 2의 A는 MDA-MB-231 세포에서, ASA 처리량에 비례하여 세포자살 세포의 수가 유의하게 증가함을 보여준다. 도 1에서 MDA-MB-231 세포가 생존 저해에 더 효과적이라는 결과와 마찬가지로, 5 mM ASA를 36시간 처리한 MDA-MB-231에서 DNA 조각은 약 13배 증가하였다. 반면 MCF-7 세포에서는 고농도의 ASA를 처리한 군에서 조차 DNA 조각이 미미하였으며, 배양 상등액에서의 뉴클레오솜은 농도에 비례하여 7배 정도 증가하여 세포자살 외의 세포사가 일어남을 시사하였다. 이는 도 1의 B에서 MCF-7 세포에서는 괴사성 세포사가 일어난다는 결과와 일치하였다. 또한 도 2의 C에 의하면, MDA-MB-231 세포를 ASA로 처리하면 ASA 처리시간에 비례하여 sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 비율이 증가하는 반면, MCF-7 세포에서는 ASA 처리 시간이 24시간 이후에서야 유의적인 변화가 감지되었다. 이는 ASA 처리가 처리 시간 및 농도 의존적으로 MDA-MB-231 세포의 세포자살에 의한 세포사를 야기함을 나타낸다.

[0027] 상기의 결과에서, 세포의 과-아세틸화는 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포와 MCF-7 세포 모두에서 생존률의 저하를 유발하지만, 구체적인 양상은 서로 상이함을 알 수 있다.

## [0028] 실시예 2 : 세포의 과-아세틸화에 의한 Ac-APE1/Ref-1의 분비 확인

[0029] 본 발명자들은 HEK 293T 세포에서 HDAC 저해에 의한 세포의 단백질의 아세틸화가 APE1/Ref-1의 세포의 방출을 유도한다고 보고한 바 있다. ASA와 TSA 처리 또한 단백질의 과-아세틸화를 야기하고, 상기 실시예에서 확인한 바와 같이 세포자살에 의한 세포사를 유도하여 MDA-MB-231 세포의 생존율을 감소시킨다.

[0030] 따라서 아세틸화된 MDA-MB-231 세포의 세포자살에 의한 세포사가 Ac-APE1/Ref-1의 분비와 관련되어 있을 것으로 가정하고, 세포의 과-아세틸화에 의해 Ac-APE1/Ref-1의 분비가 증가하는지 확인하였다. 즉, 실시예 1과 동일한 방법에 의해 MDA-MB-231 세포에 TSA와 ASA를 처리한 후, 세포와 상등액인 배지를 각각 수집하였다. 세포 용출액과 배지는 각각 anti-acetyl-lysine agarose bead (ImmuneChem Pharmaceuticals, Burnaby, BC, Canada)을 사용하여 면역침강한 후, anti APE1/Ref-1(Novus, Littleton, CO)로 면역블랏팅하고 그 결과를 도 3의 A와 B에 각각 도시하였다.

[0031] 도 3의 A와 B에서, 세포 용출액 중 APE1/Ref-1의 아세틸화는 1시간 이전에 포화상태에 도달한 후 점차 감소하였으나, 세포 외로 분비된 Ac-APE1/Ref-1의 양은 처리한 ASA의 양이 증가함에 따라 증가하였으며, ASA 처리 6시간 까지 증가하였다. 이는 과-아세틸화 조건하에서 APE1/Ref-1의 아세틸화된 형태가 최소 6시간은 유지됨을 나타낸다.

[0032] Ac-APE1/Ref-1의 세포 외 분비에 미세소구체(microvesicles)의 형성이 관여하는지 확인하기 위하여, ASA 처리된 MDA-MB-231 세포의 배양 상등액으로부터 소포(vesicle)를 제조하였다. 즉, 배지를 800 g에서 10분간 원심분리하고 0.2  $\mu$ m 공극의 막으로 여과하여 세포의 잔해를 제거한 후, 100,000 g에서 210분간 초원심분리하여 펠렛 중 미세소구체를 농축하였다. 펠렛을 PBS로 세척한 후 면역침강 및 면역블랏팅에 의해 APE1/Ref-1, CD-9 및 GAPDH를 분석하여 도 4의 A에 도시하였다. 도 4의 A에서 해당 분획에 미세소구체가 많이 함유되어 있음은 CD-9의 발현으로 확인할 수 있었다. 도 4의 A에서 미세소구체의 농축 분획에는 Ac-APE1/Ref-1이 ASA의 처리량 또는 처리 시간에 비례하여 함유되어 있으며, 세포 내 단백질의 아세틸화에 비하여 미세소구체 내 함유된 Ac-APE1/Ref-1의

분비는 약 6시간 정도 지연됨을 나타낸다. 도 4의 B와 C는 각각 면역형광분석 및 면역전자현미경법에 의해 세포 내 APE1/Ref-1의 존재를 확인한 것으로 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[0033] 면역형광분석을 위하여 MDA-MB-231 세포를 커버글라스 상에서 배양하면서 TSA의 처리후 salicylic acid(SA) 또는 ASA를 6시간 처리하였다. ASA 처리 후 PBS로 세포를 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정한 후 0.1% Triton X-100을 처리하였다. 플라스마 막을 염색하는 경우에는 0.1% Triton X-100의 처리는 생략하였다. 이후 통상의 선행연구(*Toxicology and applied pharmacology* 2013; 273(3): 659-71) 방법에 따라 면역형광염색을 실시하였다. 일차 항체로는 anti-APE1/Ref-1(1:200) 및/또는 RAGE(1:100)을 사용하였으며, 상온에서 1시간 처리하였다. 면역형광염색 후 세포를 10분간 DAPI(10 ng/mL) 염색한 후 공초점 현미경으로 관측하였다.

[0034] APE1/Ref-1을 함유하는 분비 소포를 전자주사현미경(TEM)으로 관측하기 위하여, MDA-MB-231 세포( $2 \times 10^5$ /well)을 SA 또는 ASA 5mM로 37℃에서 6시간 처리하였다. 처리된 세포를 수확한 후 냉각된 전자현미경 등급의 2.5% 글루타르알데히드에서 고정하였다. 시료를 세척한 후 postfix하고, 에탄올로 탈수한 후 에폭시 레진에 임베딩하였다. 이후 78 nm 두께의 절편을 생성하여 구리 그리드에 부착시킨 후 rabbit anti APE1/Ref-1 항체로 염색하고, 15 nm 금나노입자가 쿨주게이션된 rabbit IgG 항체(Cyodiagnosics, Baltimore, MD)와 반응시켰다. 그리드에 uranyl acetate와 lead citrate를 떨어뜨려 post-stain한 후 TEM(Hitachi, Tokyo, Japan)으로 7,000× 및 30,000×로 이미지를 관측하였다. 대조를 위하여 상기 공정에서 일차 항체의 처리 공정을 생략한 후 시료를 제작하여 함께 관측하였다. 도 4의 B에서 Ac-APE1/Ref-1 양성인 소포들은 세포질막 가장자리에 분포함을 보여준다. 또한, 도 4의 C에서 과-아세틸화된 MDA-MB-231 세포는 대조군에 비해 플라스마 막의 가장자리에 현저하게 많은 소포들을 배출하며, 분비된 소포 내에 금나노입자가 표지된 Ac-APE1/Ref-1이 존재함을 확인할 수 있다.

[0035] 이상의 결과들은 과-아세틸화에 의해 Ac-APE1/Ref-1의 분비가 증가하며, 세포자살에 의한 세포사에 중요한 역할을 담당함을 나타낸다.

[0036]

### [0037] 실시예 3 : 세포의 과-아세틸화에 의한 RAGE의 발현 증가 확인

[0038] 몇몇 시스템에서 세포사 촉진제들은 세포 내에서 시그널링 캐스케이드를 촉발하거나 조정하는 막 수용체와 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. RAGE(receptor for advanced glycated endproducts)는 알킬화된 분비 단백질을 포함하는 삼차 구조를 갖는 많은 리간드에 대해 세포 외 막 수용체로 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로, RAGE가 아세틸화 PTM에 의해 아세틸화된 APE1/Ref-1의 리신 잔기의 아세틸기 역시 인식할 수 있다고 가정하였다.

[0039] 이를 확인하기 위하여, 실시예 1의 방법에 의해 ASA를 처리한 MDA-MB-231 세포의 세포 용출액과 막 분획을 준비하고 면역블랏팅에 의해 시료 중 RAGE의 발현량을 측정하였다. 막 분획은 다음의 공정으로 준비하였다; 세포를 buffer A (250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, protease inhibitor, pH 7.5)로 수확하고 10초간 균질화하였다. 시료를 500 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하고, buffer B (0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)를 가하여 4℃에서 45분간 흔들어주었다. 다시 시료를 100,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 buffer C (250 mM sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES)에 용해시킨 후 면역분석에 사용하였다.

[0040] 도 5의 A와 B는 세포 용출액에서의 면역블랏팅 결과이며, C는 막분획에서의 면역블랏팅 결과이다. 도 5의 A와 B는 ASA의 처리에 의해 세포에서 RAGE의 발현이 ASA 처리량과 처리시간에 비례하여 증가함을 보여주며, 도 C의 막분획에서 역시 ASA 처리 시간에 비례하여 RAGE의 발현이 증가함을 나타낸다. 도 5의 D는 일차항체로 anti-RAGE 항체를 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 방법에 의해 면역염색한 후 공초점 현미경으로 관측한 이미지 사진이다. 도 5의 D에서 대조군에 비해 ASA 처리군에서 RAGE의 발현이 증가하며, 대조군에서는 핵 근처에 RAGE의 발현이 관측되나, ASA 처리군에서는 플라스마 막에 RAGE의 발현이 집중되어 Ac-APE1/Ref-1을 포함한 리간드 단백질들과 상호작용할 가능성을 시사한다.

[0041]

### [0042] 실시예 4 : Ac-APE1/Ref-1와 RAGE의 결합 확인

[0043] 1) Ac-APE1/Ref-1의 제조

[0044] rh APE1/Ref-1은 pET28/APE1/Ref-1 플라스미드로부터 분리·정제한 후(*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 435, 621-626) Acetyl Co-enzyme A 또는 acetyl-salicylic acid를 사용하여 아세틸화

하였다.

- [0045] 보다 상세하게는, rh APE1/Ref-1 단백질 40 µg을 5X HAT buffer ( 0.25 M Tris (pH8.0), 0.5mM EDTA, 50% glycerol, 5 mM DTT, 50 mM sodium butyrate), 2.5 mM Acetyl-coenzyme A (sigma Aldrich), 0.6 µg HAT domain (Milipore)과 함께 상온(24℃)에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 반응액을 7k Zeba column (Thermo)으로 3000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 아세틸화된 APE1/Ref-1 단백질만 얻었다.
- [0046] 또는 rh APE1/Ref-1 단백질 50 µg과 함께 44 mM acetyl-salicylic acid를 총 볼륨의 10분의 1씩 1시간마다 넣어 주며 4시간 동안 반응시켰다. acetyl-salicylic acid를 제거하기 위해 7k zeba column에 넣고 3000rpm에서 2분간 원심분리하여 아세틸화 APE1/Ref-1 단백질을 얻고 lysine-acetyl antibody를 사용하여 APE1/Ref-1단백질의 아세틸화를 확인하였다.
- [0047] 도 6에서 Acetyl Co-enzyme A과 acetyl-salicylic acid에 의한 APE1/Ref-1의 과-아세틸화는 배양시간에 따라 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있다.
- [0048] 2) 면역블랏팅
- [0049] MDA-MB-231 세포에서 과-아세틸화에 의해 Ac-APE1/Ref-1이 세포외로 분비되고, RAGE 발현이 증가한다는 것으로부터 Ac-APE1/Ref-1와 RAGE의 결합이 세포사를 야기할 것이라고 가정하였다.
- [0050] 상기 가설을 확인하기 위하여, 분비된 Ac-APE1/Ref-1이 RAGE와 직접적으로 상호작용하는 지 확인하였다. 결합은 특이적인 각각의 단일클로날 항체를 사용하여 배지로부터 분비된 Ac-APE1/Ref-1, RAGE를 발현하는 막분획과 rh Ac-APE1/Ref-1와 rh RAGE-Fc를 anti APE1/Ref-1과 anti RAGE로 공동면역침강(Co-IP, co-immunoprecipitation)하여 평가하였다; a) rh Ac-APE1/Ref-1와 rh RAGE-Fc(R&D System), b) 배지에 분비된 Ac-APE1/Ref-1과 RAGE-Fc, c) 배지에 분비된 Ac-APE1/Ref-1과 막분획의 RAGE.
- [0051] a)~c)의 co-IP를 위하여 Protein A/G agarose beads에 의해 면역침강된 RAGE-Fc 1 µg을 binding buffer (20 mM Tris·HCl, pH 7.4, 0.1% TritonX-100, 5% glycerol, 10 mM butyrate, 10 mM nicotinamide, 5 µM TSA)에서 Ac-APE1/Ref-1와 함께 4℃에서 교반하면서 밤새 처리하였다. RAGE-Fc 단백질은 지정된 시간에 수집한 순화 배지와 반응시켰다. 별도로, 순화배지로부터 침강된 APE1/Ref-1은 RAGE protein으로 처리하였다. 또한 순화배지로부터 침강된 APE1/Ref-1은 ASA 처리된 세포의 막분획으로 처리하였다. 단백질 면역복합체들은 binding buffer로 4회 세척하고, 결합 단백질을 2× reducing SDS loading buffer로 용리시킨 후 면역블랏팅을 실시하였다.
- [0052] 도 7의 A는 rh Ac-APE1/Ref-1이 rh RAGE-Fc와 면역복합체를 형성함을 보여준다. 도 7의 B는 ASA 처리된 MDA-MB-231 세포의 배양액으로 분비된 Ac-APE1/Ref-1이 RAGE-Fc와 결합하는 것을 보여준다. 마지막으로 도 7의 C로부터 ASA 처리된 MDA-MB-231 세포의 배양액으로 분비된 Ac-APE1/Ref-1이 ASA 처리된 MDA-MB-231 세포의 막분획에 존재하는 RAGE와 결합하는 것을 확인할 수 있다.
- [0053] 3) proximity ligation assay(PLA)
- [0054] Ac-APE1/Ref-1과 RAGE의 결합을 Duolink II fluorescence kit를 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 가시화하였다. 구체적으로 유리의 커버그라스 상에 배양한 MDA-MB-231 세포에 SA 또는 ASA를 12시간 처리하였다. 배지를 제거한 후 세포를 rh Ac-APE1/Ref-1 또는 분비된 Ac-APE1/Ref-1를 포함하는 배양 상등액과 3시간 반응시켰다. 세포를 PBS-4% 파라포름알데히드로 15분간 고정하였으며, 플라스마 막에서의 제한된 RAGE 염색을 위하여 침투화(permeabilization)는 실시하지 않았다. 비특이적 시그널을 줄이기 위하여 세포를 blocking solution으로 60분간 처리한 후, mouse anti-RAGE monoclonal antibody (1:100, Santa Cruze)와 anti-APE1/Ref-1 rabbit polyclonal antibody (1:100)로 4℃에서 밤새 처리하였다. 단백질들이 40nm 이내의 인접거리에 있는지 바로 확인하기 위하여 specific oligonucleotides conjugated - the PLA Probe anti-Mouse Minus와 anti-Rabbit Plus를 가하여 37 °C에서 1시간 처리하였다. 음성 대조군은 일차항체인 RAGE mouse monoclonal antibody만을 세포에 처리하였다. PLA 시그널에 대해서는 ex/em 590/670 nm, DAPI에 대해서는 410/470 nm를 사용하여 세포의 형광 현미경 이미지를 얻었다. 시그널들은 모두 순차적으로 수집하였다.
- [0055] PLA 분석을 위한 RAGE 과발현 세포주(RAGE<sup>ov</sup>)는 MDA-MB-231 세포를 pcDNA4/TO/myc-his-RAGE (ABGENT Company)로

형질감염하여 제조하였다. 간략하게는  $2 \times 10^6$  세포를 100 mm 배양 접시에 담고 Lipofectamin 2000을 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 10  $\mu$ g의 플라스미드로 일시적 형질감염시킨 후 zeocin을 이용하여 선별하였다. 선별된 세포주는 RAGE 항체를 사용한 면역블랏팅으로 확인하였다. RAGE의 발현은 독시사이클린(doxycycline) 존재 하에 유지되었다.

[0056] 도 7의 D는 RAGE<sup>OV</sup>를 rh APE1/Ref-1(위) 또는 rh Ac-APE1/Ref-1(아래)로 처리하여 얻은 PLA 결과 이미지이며, E는 ASA를 처리한 MDA-MB-231 세포를 rh Ac-APE1/Ref-1(위) 또는 분비된 Ac-APE1/Ref-1를 포함하는 배양 상등액(아래)과 함께 처리하고 얻은 PLA 결과 이미지이다. 도 7의 F는 SA(위) 또는 ASA(아래)로 MDA-MB-231 세포를 처리한 후 얻은 PLA 결과이다. 각 이미지에서 DIC는 differential interference contrast 현미경 관측 결과이며, PLA 특이적인 형광은 빨간색, DAPI는 파란색으로 검출되었다. 도 7의 D에서 RAGE<sup>OV</sup>를 rh Ac-APE1/Ref-1로 처리하는 경우 빨간색 형광의 PLA 신호가 검출되었으나, APE1/Ref-1로 처리한 경우에는 신호가 검출되지 않음을 확인할 수 있다. 또한 도 7의 E에서 ASA 처리에 의해 과-아세틸화된 MDA-MB-231 세포를 Ac-APE1/Ref-1 또는 배양 상등액과 처리한 경우에도 SA를 처리한 대조군(Control)에 비해 강한 PLA 신호가 검출되었다. 마지막으로 도 7의 F는 ASA 처리된 MDA-MB-231 세포의 플라스마 막에서 대조군에 비해 많은 PLA 신호가 검출되는 것을 보여주어, RAGE와 Ac-APE1/Ref-1이 40nm 이내의 거리에 존재함을 나타내었다.

[0057] 이상의 결과를 종합하면, 과-아세틸화된 세포에서 RAGE와 분비된 Ac-APE1/Ref-1은 직·간접적으로 서로 결합하고 있음을 알 수 있다.

#### [0058] 실시예 5 : Ac-APE1/Ref-1의 자극과 세포자살의 관계 규명

[0059] Ac-APE1/Ref-1와 RAGE의 결합과 세포자살의 관계를 규명하기 위하여 세포의 생존과 세포자살의 조절에 연루된 MARK의 인산화에 대한 영향을 관련 단백질에 대한 면역블랏팅에 의해 평가하였다.

[0060] 도 8은 대조군과 ASA 처리된 MDA-MB-231 세포의 세포 용출액을 사용한 면역블랏팅 결과를 나타낸다. MDA-MB-231 세포에 ASA를 처리하면, Tyr<sup>182</sup>에서 p38 MAPK의 인산화가 ASA 처리 시간에 비례하여 증가하였다. 인산화의 증가는 ASA를 처리한 지 3시간 후부터 관측되었으며, 24시간 동안 지속되었다. 그러나 p38 MAPK의 농도는 일정하게 유지되어 p38 MAPK의 인산화가 p38 MAPK 농도의 증가에 기인하는 것은 아님을 나타내었다. p38 MAPK에 반해 MDA-MB-231 세포의 ASA 처리는 JNK나 ERK의 인산화를 증가시키지는 않았다.

[0061] 도 8의 B는 p38 MAPK의 다운스트림 메카니즘에 관련된 단백질들의 면역블랏팅 결과이다. 도 8의 B에서 과-아세틸화에 의해 다중 도메인 프로아포토틱(proapoptotic) 단백질인 Bax의 발현을 1.5~2배 정도 증가하는 반면, 안티-아포토틱(anti-apoptotic) 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하였다. ASA의 처리는 또한 ASA 처리 24시간 후 카스파제-3(caspase-3)의 단백질 가수분해 활성화에 의한 PARP의 증가를 야기하였다.

[0062] 이들 결과를 종합하면, Ac-APE1/Ref-1의 결합에 의해 RAGE는 p38 MAPK 활성화와 Bcl-2족 단백질 매개의 세포자살 시그널링을 캐스케이드함을 시사한다.

#### [0063] 실시예 6 : 세포자살에 대한 Ac-APE1/Ref-1와 RAGE의 결합의 영향 확인

[0064] 세포자살에 대한 Ac-APE1/Ref-1의 결합에 의해 자극되는 RAGE의 영향을 확인하기 위하여 실시예 4의 RAGE<sup>OV</sup>와 유사한 방법에 의해 MDA-MB-231 세포의 RAGE 녹다운 세포주(RAGE<sup>KD</sup>)를 제작하였다. 형질감염을 위한 플라스미드로는 RAGE shRNA 플라스미드(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였으며, 형질감염된 세포주는 puromycin을 이용하여 선별하였다.

[0065] MDA-MB-231 및 RAGE<sup>OV</sup>와 RAGE<sup>KD</sup>을 SA (대조군)사용하여 실시예 1에 기재된 방법에 따라 ASA, rh Ac-APE1/Ref-1 또는 rh APE1/Ref-1을 처리한 후, 세포의 생존률을 측정하고 세포질에서의 histone-관련 DNA 조각을 정량하여 도 9의 A에 도시하였다. WT MDA-MB-231 세포와 RAGE<sup>OV</sup> 세포는 ASA나 rh Ac-APE1/Ref-1의 처리에 의해 생존률이 크게 감소하였으며, 세포질에서의 histone-관련 DNA 조각의 정량 결과 역시 이와 일치하여 ASA와 rh Ac-APE1/Ref-1의 처리에 의해 WT와 RAGE<sup>OV</sup> 세포에서 DNA 조각이 크게 증가하였다. 반면 rh APE1/Ref-1은 생존률과

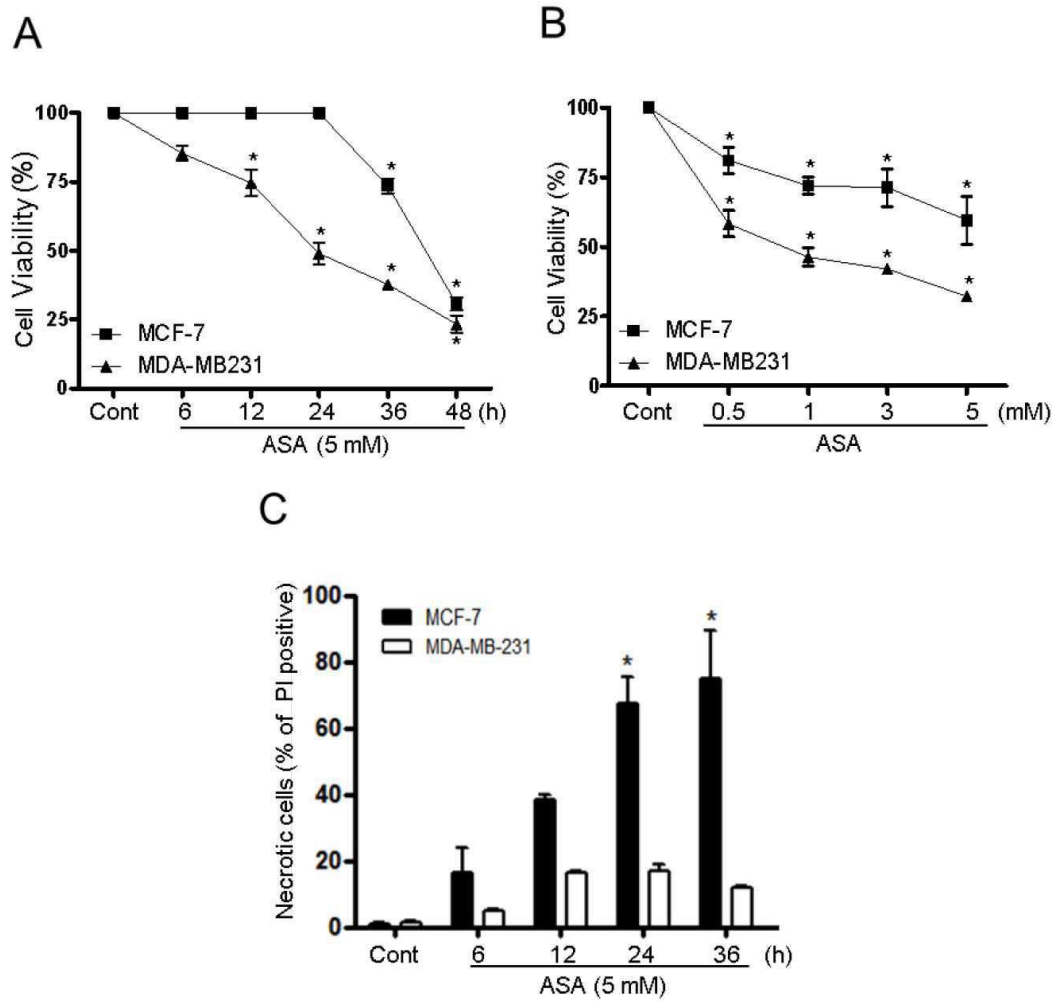
DNA 조각의 정량 결과에 큰 영향을 미치지 않았다. 이에 반해, RAGE<sup>KD</sup> 세포에서는 APE1/Ref-1는 물론 ASA나 Ac-APE1/Ref-1 역시 생존률에 큰 영향을 미치지 않았다. 이는 Ac-APE1/Ref-1은 RAGE와의 상호작용에 의해 세포자살을 야기함을 나타낸다.

[0066] Soluble RAGE(ProSpec)와 anti APE1/Ref-1 항체를 사용하여 RAGE와 APE1/Ref-1의 상호작용을 차단하는 것에 의해 세포사에서의 RAGE의 역할을 재확인하였다. RAGE의 발현을 상향조절하기 위하여 MDA-MB-231 세포를 5mM ASA로 6시간 처리하고, 신선한 배지로 바꿔주었다. 세포에 soluble RAGE 1  $\mu$ g, rabbit-IgG 2  $\mu$ g, 또는 anti-APE1/Ref-1 2  $\mu$ g를 2시간 처리한 후 rh Ac-APE1/Ref-1로 36시간 처리하여 생존률을 측정하고, DNA 조각을 정량하여 도 9의 B와 C에 각각 도시하였다. 도 9의 B에서 ASA 또는 Ac-APE1/Ref-1의 처리에 의해 감소한 세포 생존률은 soluble RAGE의 전처리에 의해 현저하게 증가하였다. ASA 또는 Ac-APE1/Ref-1의 처리에 의한 DNA 조각의 정도역시 soluble RAGE 처리에 의해 유의적으로 감소하였다. soluble RAGE만은 세포 생존률이나 DNA 조각에 유의적인 영향을 미치지 않았다. Anti-APE1/Ref-1의 전처리 역시 soluble RAGE와 마찬가지로 ASA 또는 Ac-APE1/Ref-1의 처리에 의한 생존률의 감소와 DNA 조각 증가를 유의적으로 완화시키는 역할을 하였으며, Anti-APE1/Ref-1의 전처리만으로는 생존률이나 DNA 조각에 영향을 미치지 않았다(도 9의 C) 이로부터 MDA-MB-231 세포에서 RAGE와 Ac-APE1/Ref-1의 상호작용이 세포자살에 중요한 역할을 함을 다시 확인할 수 있었다.

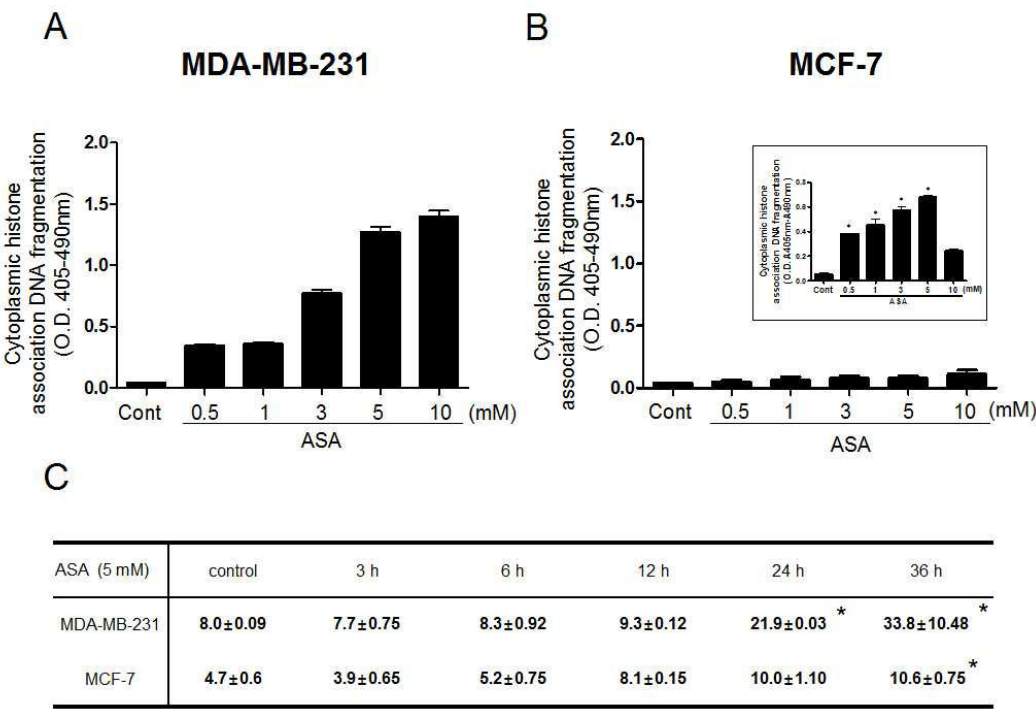
[0067] 과-아세틸화 및 재조합 Ac-APE1/Ref-1에 의해 유도되는 세포자살 세포사를 다른 삼중음성유방암으로 확장하기 위하여, 인간 유방암 MDA-MB-468, BT-549 세포와 정상 인간 유방 상피세포주 MCF-10A에 대해 동일한 실험을 실시하였다. 각 세포주는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 입수하여 ATCC 권고안에 따라 배양하며 사용하였다. 도 9의 D는 상기 각 세포주의 생존률 및 DNA 조각 측정 결과로, MDA-MB-231와 마찬가지로 다른 삼중음성유방암 세포에서도 과-아세틸화 및 재조합 Ac-APE1/Ref-1 처리에 의해서 생존률이 크게 감소하고 DNA 조각이 증가함을 보여준다. 반면, 정상상피 세포인 MCF-10A에 대해서는 별다른 영향을 미치지 않음을 제시하였다.

도면

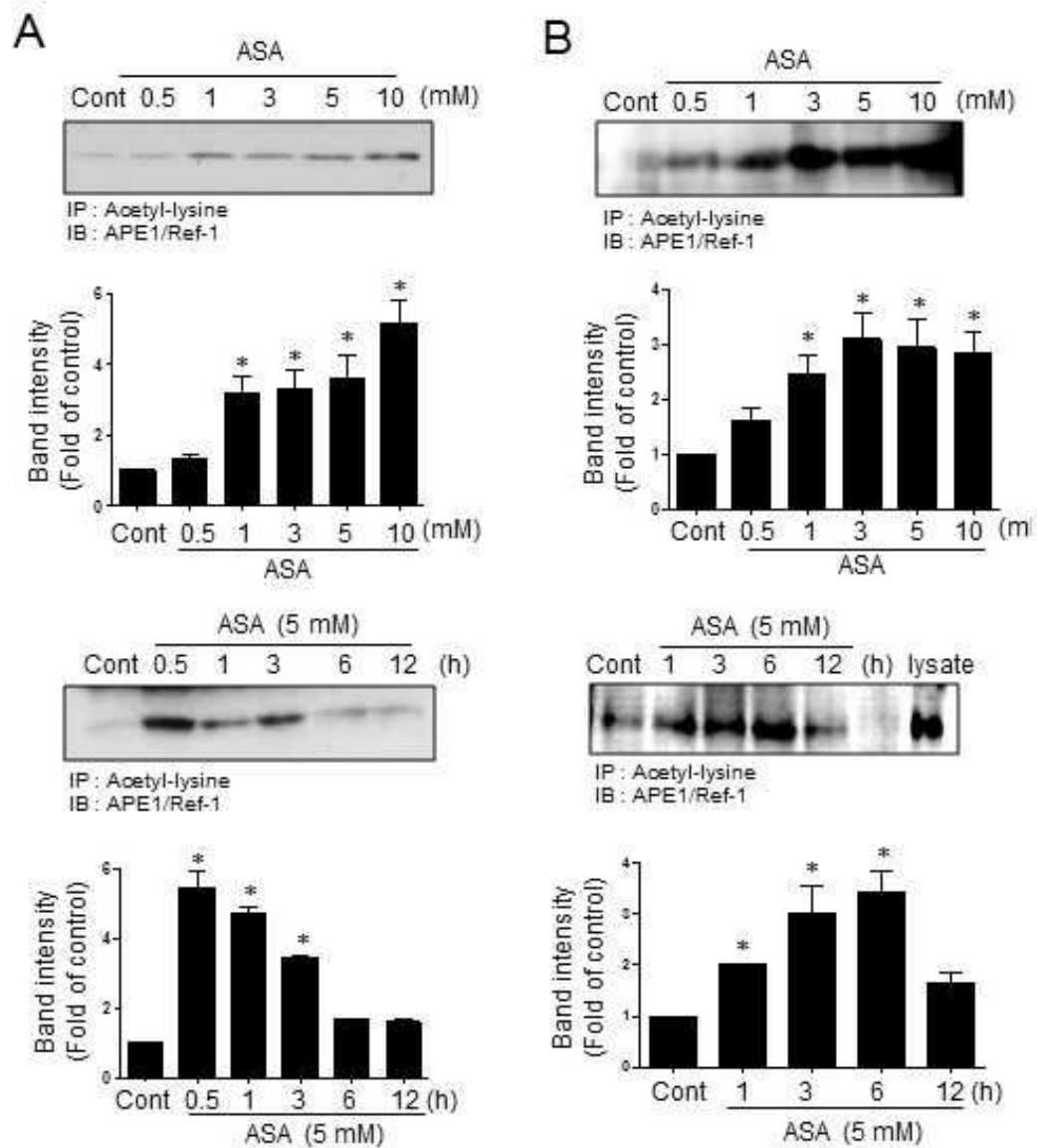
도면1



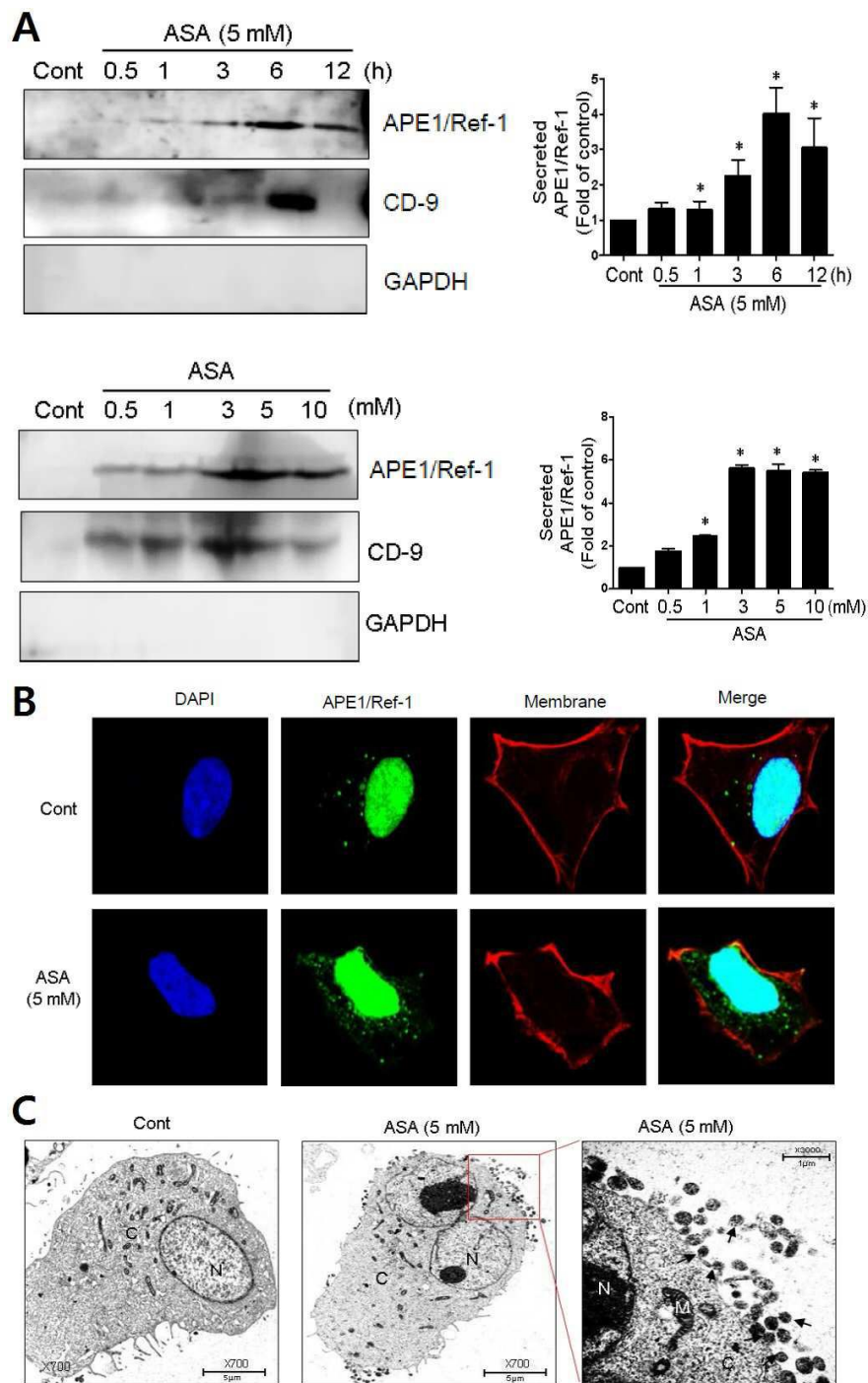
도면2



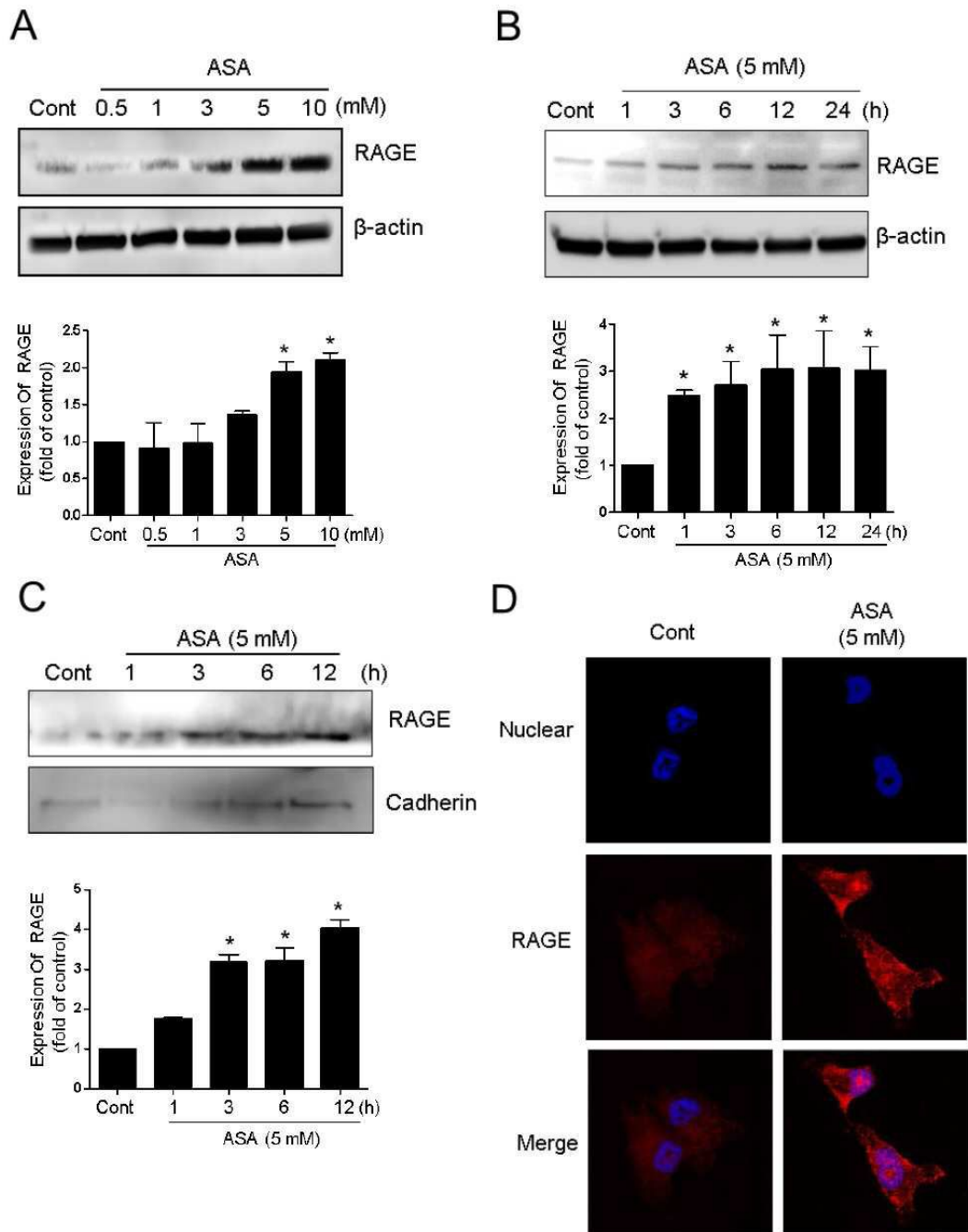
도면3



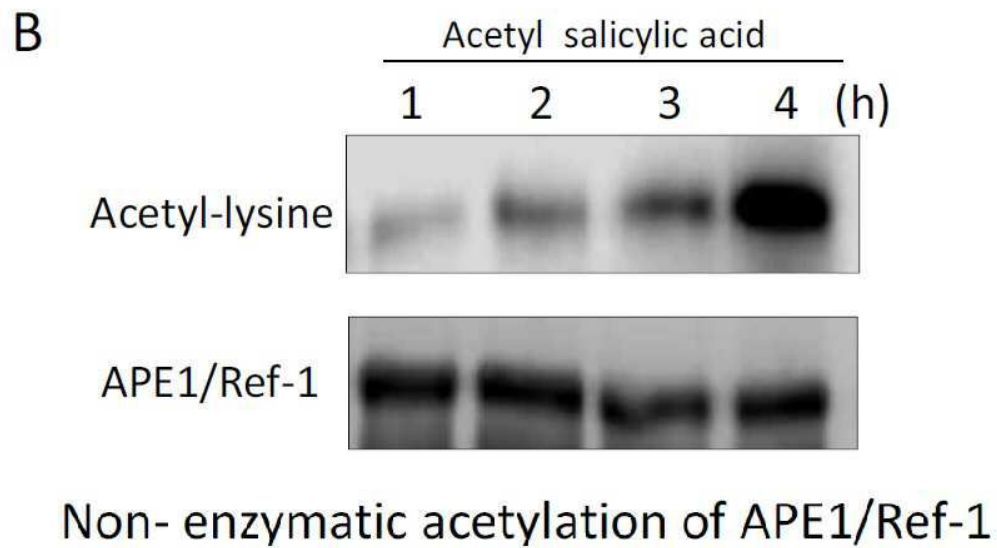
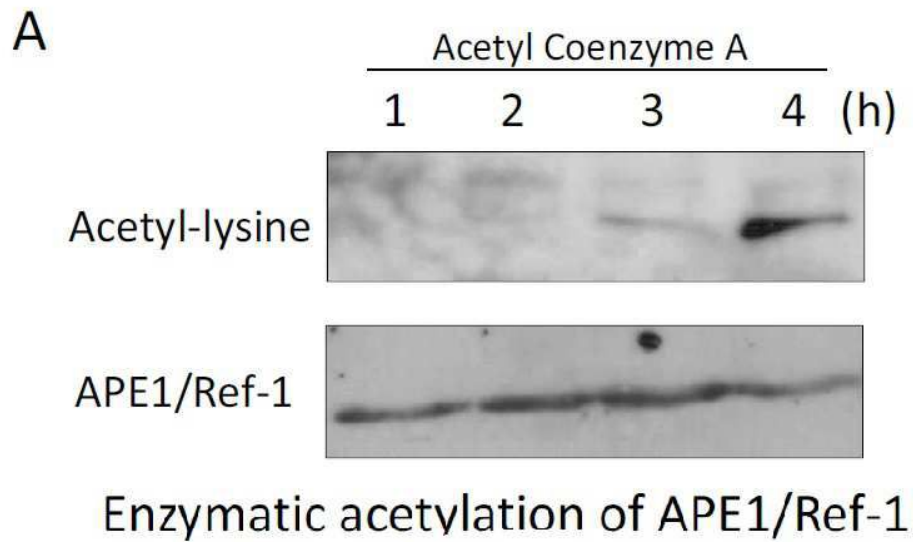
도면4



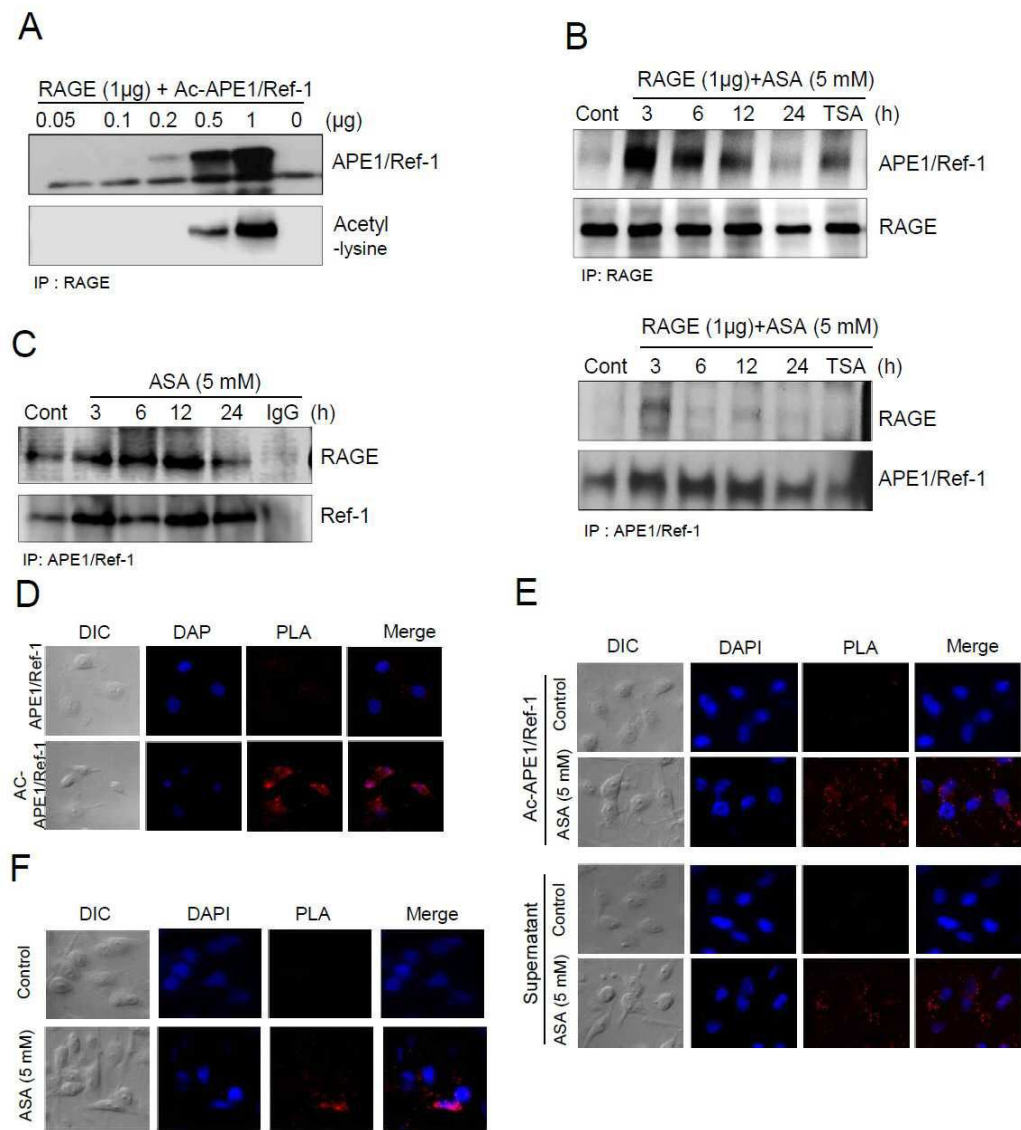
도면5



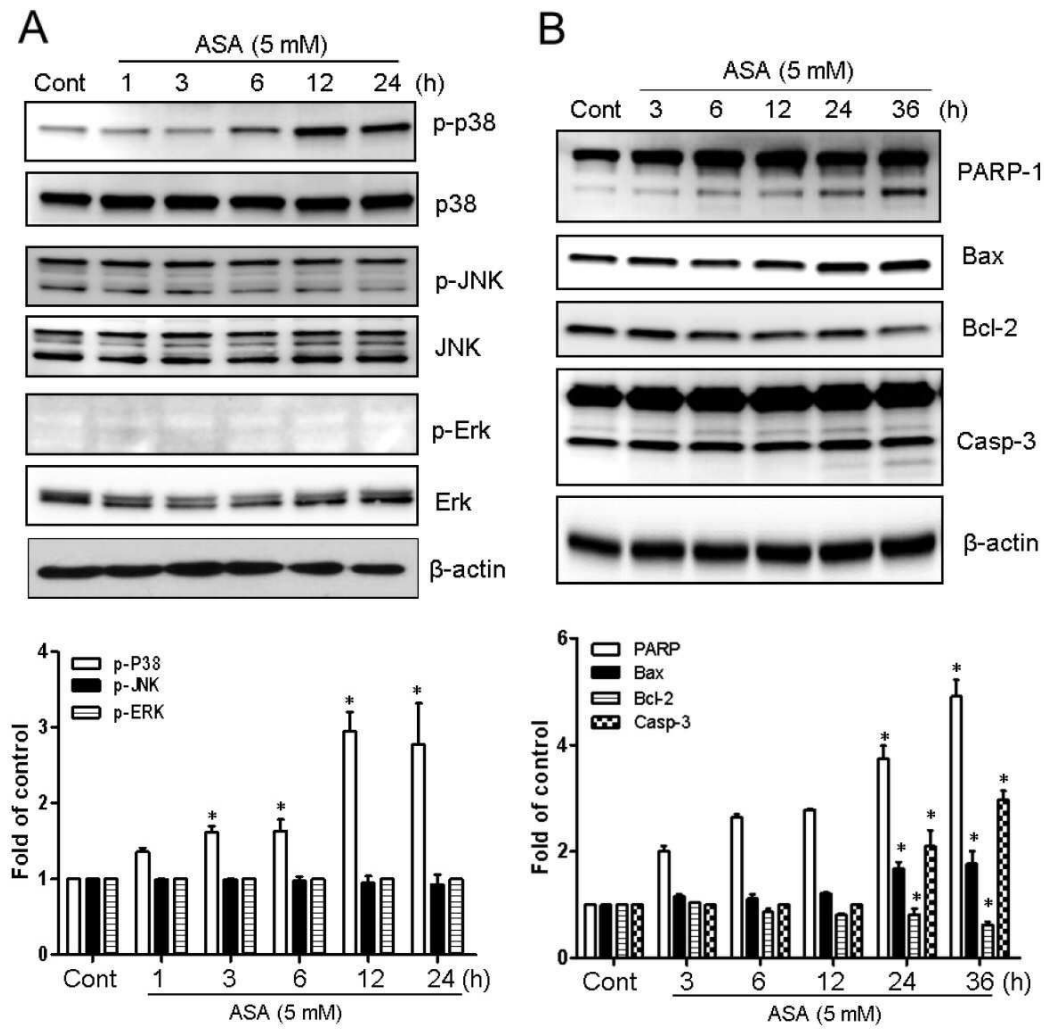
도면6



도면7



도면8



도면9

