

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0112978
(43) 공개일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/19 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0035037

(22) 출원일자 2018년03월27일
심사청구일자 2018년03월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태우

경기도 군포시 산본천로 12, 611동 2301호 (산본동, 을지아파트)

우선량

서울특별시 성북구 오패산로3길 17, 105동 302호 (하월곡동, 동신아파트)

송권호

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

(74) 대리인

이처영, 장제환

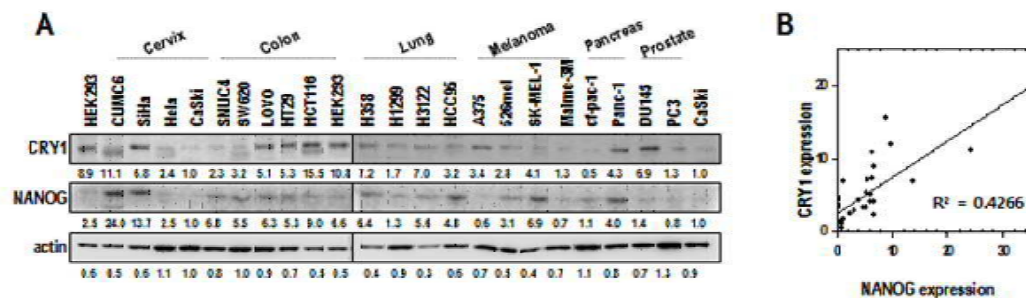
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 NANOG 매개 질환의 치료 또는 진단을 위한 CRY1의 용도

(57) 요약

본 발명은 NANOG 매개 질환의 치료 또는 진단을 위한 CRY1의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 NANOG 발현이 증가되어 있는 항암면역 내성암의 치료 및 진단을 위한 CRY1의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 병리적 마커로서의 새로운 NANOG/CRY1 면역내성 분자축을 이용한 NANOG 의존적 내성암의 치료용 조성물, 상기 내성암 진단 키트 또는 진단을 위한 정보제공 방법은 항암제 또는 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암 및 항암 치료 후 재발 또는 전이가 일어난 암을 보다 정확하고 신속하게 진단하고 치료하는데 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2018.05)

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711044398

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 NANOG 상위조절자의 작용 기전 이해를 통한 난치성 재발 암의 면역내성 극복 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 17069818

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구

연구과제명 NANOG 상위조절자의 작용 기전 이해를 통한 난치성 재발 암의 면역내성 극복 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

CRY1 (cryptochrome 1)의 발현 또는 활성 저해제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 또는 활성 저해제는 CRY1 유전자에 대한 siRNA 또는 CRY1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체, 압타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화합물은 2-에톡시프로피온산 유도체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 면역치료제와 병용하여 사용하는 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

CRY1 유전자와 엄격한 조건에서 혼성할 수 있는 프로브 또는 CRY1 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:

- (a) 분리된 생물학적 시료로부터 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 측정된 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (b) 단계는 대조군에 비해 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준이 증가하는

경우, NANOG 의존적 내성암으로 판단하는 것을 특징으로 하는 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 내성암은 항암제 또는 항암면역 내성암인 것을 특징으로 하는 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 복수액 및 복막액으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 측정은 면역블롯, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질칩으로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NANOG 매개 질환의 치료 또는 진단을 위한 CRY1 (cryptochrome 1)의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 NANOG 발현이 증가되어 있는 항암면역 내성암의 치료 및 진단을 위한 CRY1의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암의 치료를 위해서는 외과적 수술, 방사선 치료법, 항암제 치료법 및 면역 치료법 등이 있으나, 이러한 많은 치료법에도 불구하고 임상적 치료효능이 낮은 이유는 재발암의 발생 때문이다. 임상적 난제인 재발암의 주요 원인은 암이 가지고 있는 고유 내성뿐만 아니라 다양한 항암치료 후에 발생하는 획득내성에 기인한 치료내성으로 더욱 악성화된 특성을 가진 암세포들이 성장하기 때문이다. 따라서 효과적인 암 치료를 위해서는 암이 가지고 있는 고유 내성뿐만 아니라 다양한 항암 치료법에 의해 획득되어지는 내성 극복에 대한 연구가 반드시 필요하다. 내성 극복에 대한 연구는 내성 관련 유전자 또는 분자축의 규명 및 규명된 유전자 또는 분자축을 이용하여 진단 및 표적화하는 암치료법이 연구되어야 한다.

[0004] CRY1 (cryptochrome 1)은 현재 일주기 생체리듬을 조절하는 주요인자로 알려져 있다. 2000년대 후반, 일주기 생체리듬의 교란이 중앙 발생의 위험성과 연결될 수 있음이 다양한 역학연구와 유전학적 연구를 통해 규명되었다. 암 발생률을 검토한 역학연구의 분석에 따르면 국제선 승무원, 교대제 근무자에서 유방암 및 전립선암이 약 40-70%까지 증가한다고 보고되어 있고 (Erren TC et al. *Naturwissenschaften*. 95(5):367-82, 2008), 이에 2007년 세계보건 기구 (WHO)의 부속조직인 국제 암연구기관 (IARC)에서 교대제 업무 (shift-work)를 발암작용의 가능성이 있다고 분류하여 발표하였고, 뿐만 아니라 장기간의 추적연구를 통해 암 환자들 중에서 낮과 밤의 생활주기가 일정한 환자가 그렇지 않은 환자보다 5년간 생존율이 높다고 보고되어 있다 (Straif K et al., *Lancet Oncol*. 8(12):1065-6, 2007).

[0005] 또한, 생쥐에서 중추생체시계인 SCN (suprachiasmatic nucleus)을 제거하면 행동리듬과 체온의 일정한 주기가 교란될 뿐만 아니라 골육종암과 췌장암 세포의 성장도 빨라진다고 알려져 있다 (Filipski E et al., *J Natl Cancer Inst*. 94(9):690-7, 2002). 역학연구에 이어 의학 및 분자생물학에서도 많은 연구가 진행되었고, 다양한 암세포주에서 일주기적 생체리듬이 파괴되어있다는 사실은 많은 연구자들에 의해 확인되었다 (Savvidis C et al. *Mol Med*. 18:1249-60, 2012). 지속적으로 분자 네트워크 상에서 생체시계 핵심 유전자인 BMAL1, CLOCK, period 계열 및 cryptochrome 계열의 시계유전자들이 암 발생 및 항암제 민감성 등과 밀접한 관련이 있다는 증거

들이 잇따라 보고되고 있는 것은 암세포에서 생체시계의 이상이 있음을 강력히 시사하고 있다.

[0006] 특히 CRY1의 경우 대장암에서 CRY1의 과발현은 암 성장과 환자의 나쁜 예후와 관련이 있고, 위암에서도 진행된 암에서 CRY1의 발현이 높은 것으로 보고되었으며 (Hongyan Yu et al. *PLoS One*. 8(4):e61679, 2013; Hu ML et al. *BMC Gastroenterol*. 14:67, 2014), 신경교종에서는 정상세포보다 CRY1의 발현이 증가되어 있다고 보고되어 있다 (Luo Y et al. *Asian Pac J Cancer Prev*. 13(11):5725-8, 2012). 또한, 대표적인 종양 유발 동물 모델 중의 하나인 p53 유전자 결손 생쥐에서 CRY1/2를 추가로 결손시킬 경우 종양의 생성과 성장을 억제한다고 알려져 있다 (Kross E et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(26):10668-72, 2011).

[0007] 이전 연구에서 본 발명자들은 NANOG가 면역내성 획득에 필수적인 분자이며, NANOG/TCL1/AKT/MCL-1의 항암면역 내성관련 분자축을 규명하였다 (대한민국 공개특허 10-2012-0083504).

[0008] 이에, 본 발명자들은 항암면역 치료 후 재발된 암, 내성이 생긴 암 또는 전이암의 직접적인 표적이 될 수 있는 분자축을 규명함으로써 NANOG 의존적 내성암을 효과적으로 진단 및 치료하기 위하여, NANOG에 의한 면역내성 기전에서 CRY1의 발현이 비특이적으로 증가되어 있는 사실을 확인하고, NANOG 매개 항암면역 내성 치료에서 CRY1의 표적화 및 이용 가능성을 조사하였다. 그 결과, CRY1의 발현이 줄기세포 인자인 NANOG에 의해 직접적으로 조절되는 것을 규명하여, 항암면역내성을 획득한 종양세포에서 증가된 CRY1이 면역내성획득에 필수적인 분자임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 NANOG/CRY1 면역내성 분자축의 CRY1를 표적하여 NANOG 발현이 증가되어 있는 항암면역 내성암을 치료 또는 진단하기 위한 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물, 진단용 키트 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CRY1의 발현 또는 활성 저해제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, CRY1 유전자와 엄격한 조건에서 혼성할 수 있는 프로브 또는 CRY1 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 분리된 생물학적 시료로부터 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 병리적 마커로서의 새로운 NANOG/CRY1 면역내성 분자축을 이용한 NANOG 의존적 내성암의 치료용 조성물, 상기 내성암 진단 키트 또는 진단을 위한 정보제공 방법은 항암제 또는 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암 및 항암 치료 후 재발 또는 전이가 일어난 암을 보다 정확하고 신속하게 진단하고 치료하는데 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 다양한 인간 암 세포주에서 CRY1 단백질과 NANOG 단백질의 발현 (A) 및 그 발현의 상관관계 (B)를 확인한 것이다.

도 2는 항암면역 내성 CaSki P3 세포주에서 일주기 생체리듬 인자들 중 비특이적으로 증가된 CRY1의 발현을 확

인하고, 항암면역 내성 CaSki P3 세포의 항암면역 내성 및 종양구 형성능에 대한 CRY1의 역할을 확인한 것이다.

도 3은 항암면역 내성 CaSki P3 세포주에서 NANOG의 발현 억제시 CRY1의 발현이 저하되고 원발암 세포주 CaSki에서 NANOG 과발현시 CRY1의 발현이 증가되는 것을 확인하고, NANOG 과발현 자궁경부암 세포에서 CRY1 발현 저하시 항세포사멸인자 MCL-1발현과 세포증식인자 CyclinA의 발현 감소를 유도하여 항암면역 내성 및 시험관내 종양구 형성능을 확인한 것이다.

도 4는 HEK293 세포주에서 NANOG의 전사활성 의존적으로 CRY1 단백질의 발현 증가, CRY1 mRNA 발현 증가, CRY1 프로모터에서 NANOG 결합부위의 확인, NANOG의 전사활성 의존적으로 CRY1 프로모터 활성의 증가, 및 CRY1 프로모터에서 NANOG 단백질의 직접 결합하고 있음을 확인한 것이다.

도 5는 항암면역 내성 자궁경부암 세포인 CaSki P3 세포주와 NANOG 시그널을 활성화시킨 NANOG 과발현 세포주에서 CRY1 억제 합성화합물에 대한 높은 민감성을 비교한 것이다.

도 6은 항암면역 내성 CaSki P3 세포주에서 CRY1 억제 합성화합물과 면역치료를 병용하였을 때 모암세포주인 CaSki P0에 비해서 높은 민감성을 확인한 것이다.

도 7는 NANOG가 과발현된 자궁경부암 CaSki 세포주를 비롯하여 항암면역 내성 유방암 세포인 MDA-MB231 P3 세포주, 자연적으로 NANOG가 과발현되어 있는 자궁경부암 세포인 SiHa 및 자연적으로 NANOG가 과발현되어 있는 대장암 세포인 HCT116 세포주에서 CRY1 억제 합성화합물과 면역치료를 병용하였을 때 합성화합물 농도 의존적으로 민감도가 증가하는 것을 확인한 것이다.

도 8은 항암면역 내성 유방암 세포, MDA-MB231 P3 세포주를 피하 주사법을 통해 NOD/SCID 쥐에 주입하여 종양을 형성시킨 후, CRY1 억제 합성화합물과 CD8+ T 세포를 이용한 면역치료를 병행한 결과 종양 형성이 감소함을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0021] 본 명세서에서 "원발암"은 통상의 암을 뜻하며, "내성암"은 항암제 또는 항암면역에 대한 내성암인 것을 뜻하며, "항암면역 내성암"은 항암면역치료에 대한 내성을 획득한 암을 뜻하며, 항암면역치료란 암 특이 항원 또는 암 관련 항원에 대한 면역반응을 유도하여 암 특이성 독성 면역세포에 의해 암세포를 제거하는 모든 체계의 통합을 지칭한다. 암 항원에 대한 면역유도 방법으로는 유전자, 단백질, 바이러스, 수지상세포 등의 방법을 포함한다. "재발암"은 통상의 암 치료 후 재발생된 암을 뜻하고, "내성암"은 상기 암 치료에 내성을 갖는 암을 일컫는 말이다. 여기서, 통상의 암 치료는 예를 들어, 수술, 화학치료, 방사선치료, 호르몬 치료, 생물학적 치료, 면역치료 등을 포함한다. 상기 암의 종류로는 뇌종양, 척수종양, 망막 세포종, 구강암, 비강암, 부비동암, 인두암, 후두암, 경부암을 포함하는 두경부암, 피부암, 유방암, 갑상선암, 악성부신종양을 포함하는 유방암, 내분비암, 폐암, 흉막종양, 악성부신종양을 포함하는 호흡기암, 식도암, 위암, 소장암, 악성종양, 대장암, 항문암, 간암, 담도암 또는 췌장암을 포함하는 소화기암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암 또는 음경암을 포함하는 비뇨기암, 자궁경부암, 자궁체부암, 용모상피암 또는 난소암을 포함하는 부인암, 급성 또는 만성 백혈병, 악성림프종 또는 다발성 골수증을 포함하는 혈액암, 골종양 또는 연부종양을 포함하는 골 또는 연부 종양, 및 소아 백혈병 또는 소아 고형종양을 포함하는 소아암 등일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "암전이 또는 전이암"은 특정 부위에서 발생한 원발암 또는 재발암이 다른 부위로 전이된 것을 일컫는다.

[0023] 항암면역 내성 획득에 NANOG가 필수 분자(대한민국 공개특허 10-2012-0083504)임이 알려져 있다. 이러한 NANOG에 의한 면역내성 기전에서 CRY1의 발현이 비특이적으로 증가되어 있는 사실을 본 발명에서 확인하였다.

[0024] 본 발명의 CRY1 단백질은 항암면역 내성뿐만 아니라 항암제 및 방사선 내성을 나타내고, 전이성이 높은 암세포에서 많이 발현되므로, 상기 단백질의 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하는 저해제를 투여함으로써 NANOG 매개의 NANOG 의존적인 항암면역 내성암의 재발 및 전이뿐만 아니라 재발암, 내성암 또는 암전이 치료적 용도로 사용될 수 있다.

- [0025] 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이의 예방 또는 치료는 항암면역내성암의 재발 및 전이의 예방, 억제 또는 경감을 포함한다.
- [0026] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, CRY1의 발현 또는 활성 저해제를 유효성분으로 함유하는 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 CRY1 유전자 저해제(발현 저해제)로서, CRY1 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi를 들 수 있다. 상기 CRY1 유전자는 항암면역 내성, 항암제 및 방사선 내성을 나타내고, 암전이와 관련된 유전자이므로, siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi에 의해 NANOG 유전자 발현을 억제함으로써, NANOG 의존적 내성암의 재발 및 전이를 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단을 통해 RNA 간섭현상을 유도하는 이중사슬 RNA를 의미하며, 표적 유전자의 mRNA와 같은 서열을 가지는 센스서열의 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 서열의 RNA 가닥으로 구성된다.
- [0029] 상기 siRNA는 시험관에서 합성한 siRNA 자체 또는 siRNA를 코딩하는 염기서열을 발현벡터에 삽입하여 발현되는 형태를 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 siRNA는 바람직하게는 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 가질 수 있다.
- [0031] 보다 구체적으로, 서열번호 1 내지 5에 기재된 siRNA 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

서열번호	siRNA 서열 (5'→3')	표적부위
1	CAACCGCCTCTAACTTATA	1329-1347
2	AGCTATTAAGAACTGGCAACTGAA	1229-1253
3	GAAGCTGGAGTAGAAGTCATTGTAA	1251-1275
4	GAGATACCAGTAGAGACAATTACTT	1386-1410
5	CAAGCCCTACTGGACTTAGTCCTTA	1633-1657

- [0032]
- [0033] 또한, 상기 안티센스는 CRY1 유전자 또는 그의 단편으로부터 전사되는 mRNA 서열 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 지니고, 상기 mRNA와 결합하여 상기 암전이 유전자 또는 단편의 발현을 억제할 수 있다.
- [0034] 상기 CRY1의 저해제는 상기 단백질들의 발현을 억제하는 물질 또는 기능을 저해하는 물질이 될 수 있는데, 구체적으로, CRY1 단백질의 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 2-에톡시프로피온산 유도체인 KS15인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 상기 CRY1 유전자의 mRNA 또는 단백질 저해제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 항암제 또는 면역치료제를 더 포함하여 제제화하거나, 병용하여 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물과의 병용은 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] CRY1의 저해제 또는 항체는 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent) 또는 방사선 치료와 함께 사용될 수 있으며, 예를 들어, 시클로포스파미드, 아지리딘, 알킬알콘설포네이트, 나이트로소우레아, 다카르바진, 카르보플라틴, 시스플라틴 등과 같은 알킬화제(alkylating agent), 마이토마이신 C, 안트라사이클린, 독소루비신(아드리아마이신) 등과 같은 항생제, 메토틱렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈 등과 같은 항대사제(antimetabolite agent), 빈카 알칼로이드와 같은 식물유래 약제 및 호르몬 등이 될 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 CRY1 유전자의 mRNA 또는 단백질 저해제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한

담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0039] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 CRY1 유전자의 mRNA 또는 단백질 저해제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 NANOG 의존적 내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 항암면역내성암의 예방 또는 치료용 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0043] 상기 항암면역내성암의 예방 또는 치료용 조성물의 투여량은 항암면역내성암의 재발 및 전이를 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, CRY1 유전자의 저해제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0045] 본 발명은 다른 관점에서, CRY1 유전자와 엄격한 조건에서 혼성할 수 있는 프로브 또는 CRY1 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0046] 본 명세서에서 "프로브"는 CRY1 유전자 또는 단백질과 특이적으로 결합하여 이들을 인지할 수 있는 항체, PCR 프라이머, 핵산 프로브 등을 포괄적으로 포함하는 개념이다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 CRY1 유전자에 대한 프라이머는 서열번호 6 내지 서열번호 9로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트는 생리학적 시료에서 항암면역내성암의 재발 및 전이 병리적 마커를 검출하기 위한 것으로, CRY1 유전자가 항암면역내성암의 재발 및 전이성이 있는 암세포의 안팎에서 특이적으로 발현이 증가되는 양상을 보이고, 이의 발현량과 비례하여 세포의 종양형성능이 증가하므로, 암세포 또는 조직에서의 CRY1 유전자, 또는 이로부터 코딩되는 단백질의 발현 정도를 정량분석함으로써 항암면역내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있는 것이다.
- [0049] 상기 CRY1는 사람 또는 마우스에서 유래한 것으로, 공지된 서열, 예를 들어, GenBank Accession No. NM_004075 (사람), GenBank Accession No. NM_007771 (마우스) 등을 포함하거나, 염기 또는 아미노산의 결실, 치환, 부가되어도 동일한 기능을 수행할 수 있는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물은 상기 프로브로 CRY1 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트를 이용한 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단은, 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료에서 CRY1 단백질을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0053] 또는, 상기 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단은, 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 CRY1 단백질의 모노클로날 항체와 반응시켜 CRY1 단백질의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0054] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 분리된 생물학적 시료로부터 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는 NANOG 의존적 내성암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 대조군에 비해 CRY1 유전자의 mRNA 수준 또는 CRY1 단백질 수준이 증가하는 경우, NANOG 의존적 내성암으로 판단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 복수액 및 복막액으로 구성되는 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 상기 측정방법은, CRY1 단백질의 모노클로날 항체를 함유한 NANOG 의존적 내성암의 진단용 키트를 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay) 방법을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 생체에서 배출된 암조직이나 세포에 CRY1 단백질 특이적 면역염색(histoimmunostaining)을 이용하여 항암면역내성암의 재발 및 전이 여부를 측정할 수 있다. 또는, 생체로부터 배출된 암조직이나 세포에 웨스턴 블롯분석을 이용하여 단백질 수준에서 CRY1 단백질 발현량을 정상대조군과 비교분석함으로써 NANOG 의존적 내성암의 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [0058] 또는, 상기 NANOG 의존적 내성암의 진단을 위한 정보를 제공은, CRY1 단백질에 대한 모노클로날 항체를 겔형 지지체에 부착시켜 면역친화컬럼을 제조하는 단계; 상기 단계의 면역친화컬럼을 사용하여 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에서 CRY1 단백질을 HPLC 방법으로 정량하는 단계; 및 상기 정량 결과를 비교분석하여 항암면역내성암의 재발 및 전이 정도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0059] 상기 CRY1 단백질의 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다.
- [0060] 상기 CRY1 단백질의 모노클로날 항체에는 일반적으로 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, AP) 또는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 컨주게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 직접 CRY1 단백질 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨주게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다.
- [0061] 또한, 상기 CRY1 단백질 모노클로날 항체 대신에 CRY1 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수 있으며, 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 프로브는 CRY1의 mRNA에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 핵산 프로브를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 CRY1 유전자에 대한 프라이머는 서열번호 6 내지 서열번호 9로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 상기 CRY1 유전자에 대한 프라이머를 이용한 RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 등을 수행하여 CRY1 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 NANOG 의존적 내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 CRY1 유전자에 대한 핵산 프로브를 이용하여 노던 블롯 분석 등을 수행하여 NANOG 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 NANOG 의존적 내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있다.
- [0066] 상기 PCR 프라이머 또는 핵산 프로브는 CRY1 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드라면 특별히 제한하지 않는다.
- [0067] 상기 CRY1 유전자의 mRNA 검출용 프라이머 또는 핵산 프로브를 포함하는 본 발명에 따른 NANOG 의존적 내성암의 재발 및 전이 진단용 키트를 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직에서 추출한 RNA)과 반응(RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 또는 노던블롯팅)시켜 정상군과 비교 분석함으로써 NANOG 의존적 내성암의 재발 및 전이 진단을 수행할 수 있다.
- [0068] 상기 NANOG 의존적 내성암의 재발 및 전이 진단은 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 RNA 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 CRY1 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 프로브와 반응시켜 상기 유전자의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

[0072] **[실시예]**

[0073] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0075] **실시예 1: 인간 암 세포주에서 CRY1 및 NANOG 단백질 발현 확인**

[0076] 인간 자궁경부암 세포주(CUMC6, SiHa, HeLa, CaSki), 대장암 세포주(SNUC4, SW620, LOV0, HT29, HCT116), 폐암 세포주(H358, H1299, H3122, HCC95), 흑색종 세포주(A375, 526mel, SK-MEL-1, Malme-3M), 췌장암 세포주(cf-pac-1, Panc-1) 및 전립선암 세포주 (Du145, PC3)를 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장 원심분리기에서 13000rpm으로 30분간 원심분리하고, 상층액만 취하여 단백질 정량 후 30 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 젤에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 젤을 트랜스퍼하여 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 후 CRY1 항체(Bethyl Laboratories, USA) 및 NANOG 항체(Bethyl Laboratories, USA)를 1:5000으로 희석하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후, HRP가 부착된 2차 항체를 1시간 동안 반응시킨 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0077] 그 결과, 다양한 인간 암 중에서 CRY1 및 NANOG 단백질의 발현을 확인할 수 있었으며, CRY1와 NANOG 단백질 발현의 상관관계를 분석할 수 있었다 (도 1).

[0079] **실시예 2: 항암면역 내성암 세포주에서 CRY1의 기능**

[0080] 2-1: 항암면역 내성암 세포주에서 CRY1의 유전자 발현 확인

[0081] 모암 세포주 (CaSki P0) 및 항암면역 내성암 세포주 (CaSki P3)의 전체 RNA는 RNeasy Mico Kit (Qiagen)을 사용하여 분리하였고, iScrip cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)를 사용하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하였다. 정량적 real-time PCR은 iQ SYBR Green super mix (Bio-Rad)를 사용하고 CFX96 실시간 PCR 검출 프로토콜을 이용하여 수행되었다. 모든 PCR 실험은 3회 반복 실험하였고, Bio-Rad CFX96 Manager 3.0 소프트웨어를 사용하여 정량 사이클(Cq) 값을 도출하였다. mRNA 수준의 상대적 정량화는 beta-actin을 대조 유전자로 사용하여 비례정량으로 계산하였다. CRY1 유전자에 대한 센스 프라이머 (서열번호 6: 5' -TTGGAAGGAACGAGACGCA-3')와 안티센스 프라이머 (서열번호 7: 5' -AGTTAGAGCGGTTGTCCAC-3') 혹은 센스 프라이머 (서열번호 8: 5' -TGGAATGGAGGCTTCATGG-3')와 안티센스 프라이머 (서열번호 9: 5' -ACGTTTCCCACCACTGAGAC-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다.

[0082] 그 결과, 항암면역 내성 CaSki P3 세포주에서 일주기 생체리듬 인자들 중 비특이적으로 증가된 CRY1의 발현을 확인하였다 (도 2).

[0084] 2-2: CRY1 발현 억제에 따른 세포성장 변화 확인

[0085] 특이적 siRNA 처리는 리포좀 제제인 리포펙타민 2000 (lipofectamin 2000, Invitrogene, USA)을 질량비 1:2로 섞어 항암면역 내성암 세포주에 처리하여 5% CO₂, 37℃ 인큐베이터에서 48-72시간 배양하였다.

[0086] CRY1 특이적 siRNA는 표 1의 서열번호 1 내지 5와 같다.

[0087] 이러한 방법으로 얻어진 세포를 세포배양용 96-웰 플레이트에 각각 5000개씩 접종하였다. 12시간 배양 후 항암제 Cisplatin 또는 방사선을 72시간 동안 처리하였다. 각각의 세포 생존률은 MTT 분석법을 이용하여

측정하였다.

[0088] 그 결과, 모암 세포주 (CaSki P0)에 비하여 항암면역 내성암 세포주 (CaSki P3)는 CRY1 발현 억제에 대해 세포 성장 민감도가 높음을 확인하였고, 이는 CRY1의 발현 증가에 의한 것임을 확인하였다 (도 2).

[0090] 2-3: 시험관내 종양구 형성

[0091] 상기 실시예 2-2의 세포 1000개를 20ng/ml의 EGF (Invitrogen, USA), 20ng/ml의 bFGF (Invitrogen, USA) 및 B27 (Gibco, USA)이 포함된 DMEM-F12 배지에 넣고 24 well-super-low adherence plates (Corning, USA)에서 2주간 배양하여 관찰하였다. 이때 3일마다 새로운 배지를 100 μ l씩 추가해 주었다. 형성된 종양구는 광학현미경을 이용하여 사진 이미지를 획득한 후 종양구의 직경을 측정함으로써 20-50 μ m 이상의 종양구를 계수하여 정량하였다 (도 2).

[0092] 그 결과, 항암면역 내성 CaSki P3 세포에서 CRY1 발현 억제가 종양구 형성능을 감소시키는 것을 확인하였다 (도 2).

[0094] 2-4: CRY1 억제에 따른 면역내성 변화 확인

[0095] 상기 실시예 2-2의 방법으로 얻어진 CRY1 발현 억제된 세포를 이용하여 항암면역 내성 변화 실험을 수행하였다. CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 CaSki P0, CaSki P3 세포주에 표식한 후, 1 μ g/ml의 E7 peptide(아미노산 번호 49-57, RAHYNIVTF: 서열번호 10)를 1시간 동안 자극을 준 후 E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 CaSki P0, CaSki P3 세포주에서의 활성 카스파제-3(active caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.

[0096] 그 결과, 항암면역 내성 CaSki P3 세포에서 CRY1 발현 억제가 항암면역 민감성을 증가시키는 것을 확인하였다 (도 2).

[0098] 실시예 3: NANOG를 발현하는 CaSki 세포주 제조

[0099] 대한민국 공개특허 10-2012-0083504에서 제작한 pMSCV-NANOG 벡터와 리포솜 제제인 리포펙타민 2000 (lipofectamin 2000, Invitrogen, USA)을 질량비 1:2로 섞어 패키징 (packaging) 세포주인 피닉스 세포 (Clontech)에 처리하였다. 24시간 배양 후 퓨로마이신 (Invitrogen, USA)이 포함된 배양액으로 형질전환된 피닉스 세포를 선별하였다. 선별된 세포들은 3-4일간 배양하여 레트로 바이러스가 포함된 세포배양액을 확보한 후, amicon ultra-15 (millipore, USA)을 이용하여 농축하였다. 최종 배양 농축액 500 μ l와 폴리브렌 (Polybrene, Sigma)을 혼합한 혼합액을 인간 자궁경부암 세포주인 CaSki 세포주에 처리하여 형질도입시킴으로서 NANOG를 발현하는 CaSki-NANOG 세포주를 제조하였다.

[0101] 실시예 4: CRY1 프로모터에 결합하는 NANOG의 전사활성 확인

[0102] HEK293 세포를 10 % FBS가 함유 된 세포배양 배지로 유지시키고, 분석하기 1일 전에 12-well plate에 10⁵ cells/well을 적응시켰다. 리포터 벡터, pGL3-basic, pGL3-CRY1 Wt, GL3-CRY1 Mut와 함께 NANOG Wt, NANOG Mut를 각각 동시에 과발현시켰다. 또한 이와 동시에 모든 샘플에 transfection 효율을 확인하기 위한 대조 벡터 pCMV- β -Gal도 함께 리포펙타민 2000을 사용하여 HEK293 세포로 공동 형질 감염시켰다. 24 시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 Cell Culture Lysis Reagent (Promega, USA)로 용해시켰다. 루시퍼라제 활성은 40 μ l의 루시퍼라제 분석 시약 (Promega, USA)을 첨가 한 후 Turner Biosystems TD-20 / 20 루미넌스로 측정 하였다. β -갈락토시다아제 활성은 1 mM 클로로 페놀 레드 β -D- 갈락토피라노사이드 기질 (Roche)을 함유하는 β -갈락토시다아제 측정 시약의 첨가 후 570 nm 파장에서 uQuant 마이크로 플레이트 판독기 (BioTek, Winooski, VT)로 측정 하였다. 상대적인 루시퍼라제 활성은 세포 용해물의 β -갈락토피라노사이드 활성으로 표준화시켰다.

[0103] 그 결과, NANOG의 전사활성 의존적으로 CRY1 단백질의 발현 증가, CRY1 mRNA 발현 증가는 CRY1 프로모터에서 NANOG 결합부위가 존재하며, NANOG의 전사활성 의존적으로 CRY1 프로모터 활성의 증가 및 CRY1 프로모터에서

NANOG 단백질이 직접 결합하고 있음을 확인한 것이다 (도 4).

[0105] 실시예 5: 항암면역 내성암에서 CRY1 저해제, KS15의 항암면역 내성 억제 기능 확인

[0106] 모암세포 (CaSki P0)와 항암면역 내성암세포 (CaSki P3)를 비롯하여 실시예 3-1을 통해서 얻어진 세포들을 세포 배양용 96-웰 플레이트에 각각 5000개씩 접종하였다. 12시간 배양 후 CRY1 저해제, KS15를 0, 50, 100uM의 농도로 72시간 동안 처리하였다. 각각의 세포 생존률은 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다.

[0107] 그 결과, 모암 세포주 (CaSki P0)에 비하여 항암면역 내성암 세포주 (CaSki P3)가 CRY1 저해제에 대해 세포 성장 민감도가 높음을 확인하였고, 동시에 NANOG 과발현된 세포에서도 CRY1 저해제에 대한 민감도가 높음을 확인하였다 (도 5).

[0109] 실시예 6: CRY1 저해제, KS15에 따른 면역내성 변화 확인

[0110] 모암세포 (CaSki P0)와 항암면역 내성암세포 (CaSki P3)에 CRY1 저해제, KS15의 sublethal dose인 10uM을 처리한 후 항암면역 내성 변화 실험을 수행하였다. CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 CaSki P0, CaSki P3 세포주에 표식한 후, 1ug/ml의 E7 peptide(아미노산 번호 49-57, RAHYNIVTF: 서열번호 10)를 1시간 동안 자극을 준 후 E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 CaSki P0, CaSki P3 세포주에서의 활성 카스파제-3(active caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.

[0111] 그 결과, 항암면역 내성 CaSki P3 세포주에서 CRY1 저해제, KS15와 면역치료를 병용하였을 때 모암세포주인 CaSki P0에 비해서 높은 민감성을 확인한 것이다 (도 6).

[0113] 실시예 7: NANOG 과발현된 다양한 암종에서 CRY1 저해제, KS15에 따른 면역내성 변화 확인

[0114] NANOG가 과발현된 자궁경부암 CaSki 세포주를 비롯하여 항암면역 내성 유방암 세포인 MDA-MB231 P3 세포주, 자연적으로 NANOG가 과발현되어 있는 자궁경부암 세포인 SiHa 및 자연적으로 NANOG가 과발현되어 있는 대장암 세포인 HCT116 세포주에 CRY1 저해제, KS15의 sublethal dose인 10uM을 처리한 후 항암면역 내성 변화 실험을 수행하였다. CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 CaSki P0, CaSki P3 세포주에 표식한 후, 1ug/ml의 E7 peptide(아미노산 번호 49-57, RAHYNIVTF: 서열번호 10)를 1시간 동안 자극을 준 후 E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 CaSki P0, CaSki P3 세포주에서의 활성 카스파제-3(active caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.

[0115] 그 결과, NANOG가 과발현되어 있는 다양한 암종에서 모두 CRY1 저해제, KS15와 면역치료를 병용하였을 때 합성 화합물 농도 의존적으로 민감도가 증가하는 것을 확인한 것이다 (도 7).

[0117] 실시예 8: CRY1 저해제, KS15에 의한 생체내 항암면역 내성 무력화 확인

[0118] MDA-MB231 P3 세포를 NOD-SCID생쥐군 (암컷, 5주령, n=5, 중앙실험동물) 각각의 복부 표피에 2×10^6 개씩 주입하고, 주입 7일째에 KS15 (0.01mg/kg) 또는 DMSO를 포함하는 열감응성 키토산 하이드로겔을 종양 내로 주입하였다. 저해제 주입 후 다음 날 2×10^6 MART-1-specific T세포를 IL-2와 함께 정맥주사하여 면역하였다. 7일 간격으로 동일 세트를 진행하였고 3회 반복하였다. 각각의 생쥐에 대하여 종양체적을 캘리버 (caliber; Mitutoyo, Japan)로 측정하여, 종양체적은 (단축x장축²)/2의 식으로 구하였다.

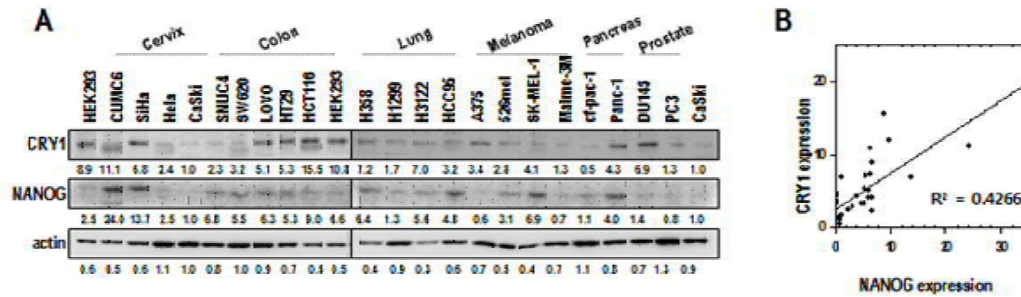
[0119] 그 결과, CRY1 억제 합성화합물과 CD8+ T 세포를 이용한 면역치료를 병행한 결과 종양 형성이 감소함을 확인한 것이다 (도 8).

[0121] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고

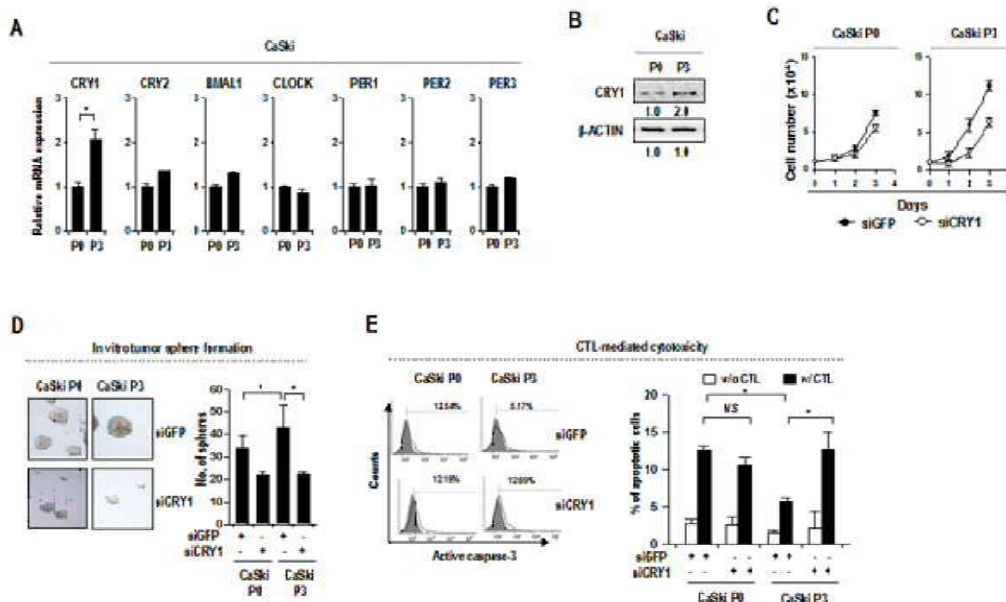
할 것이다.

도면

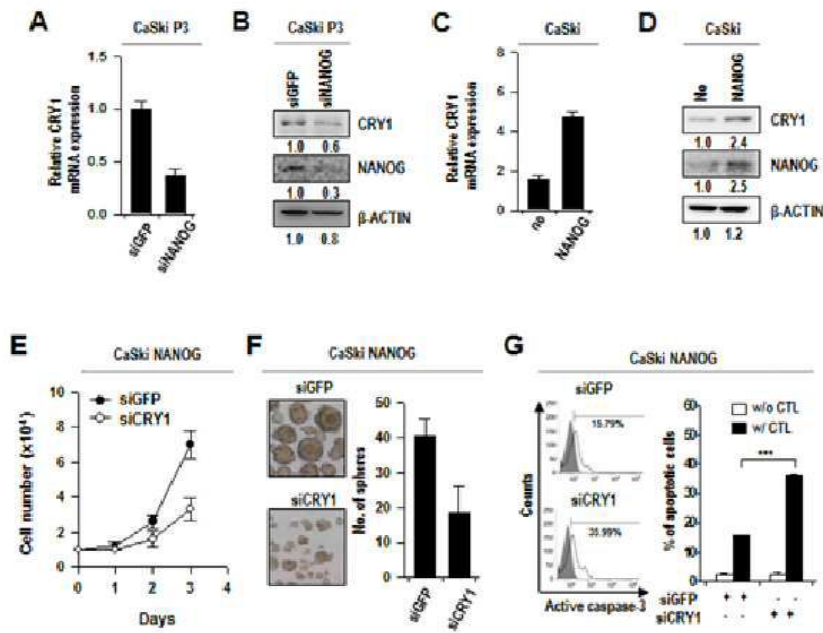
도면1



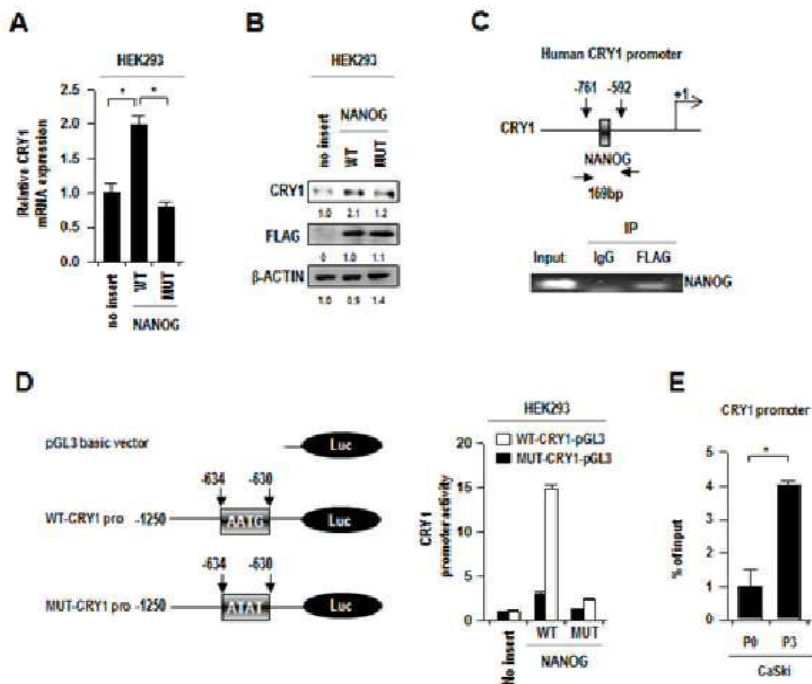
도면2



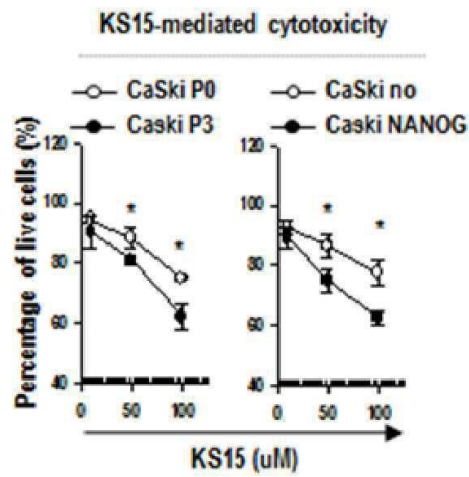
도면3



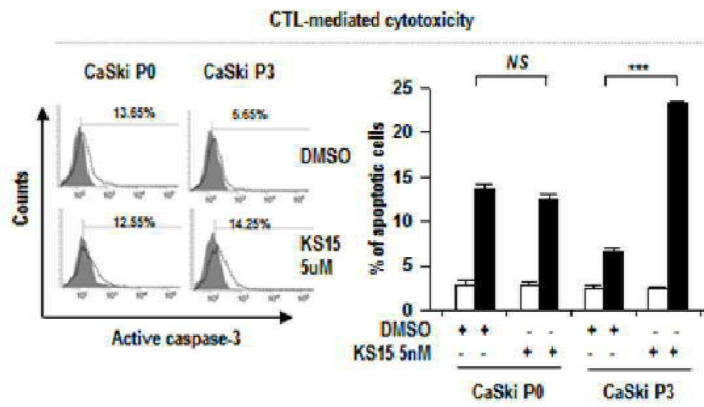
도면4



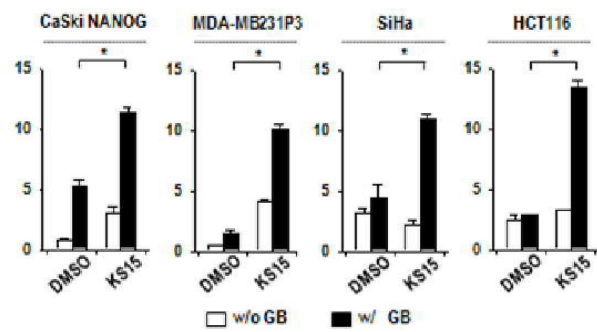
도면5



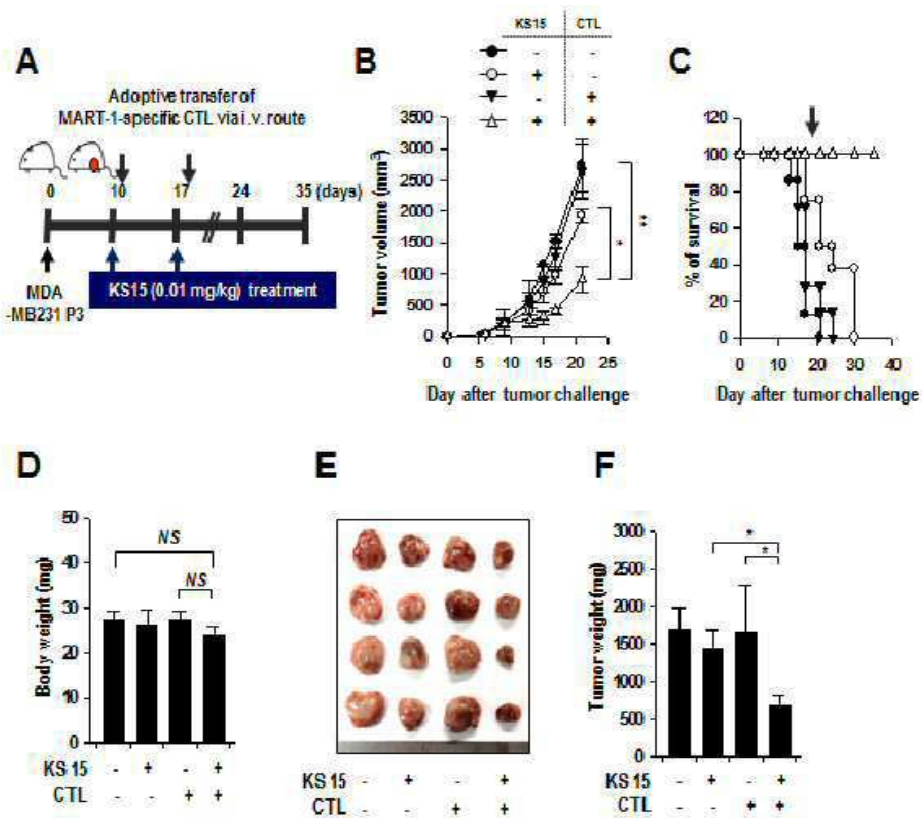
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Use of CRY1 for Treating or Diagnosing NANOG-mediated Diseases
- <130> P17-B216
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> siRNA 1
- <400> 1
- caaccgcctc taacttata
- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> siRNA 2

<400>	2	
agctattaag aaactggcaa ctgaa		25
<210>	3	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA 3	
<400>	3	
gaagctggag tagaagtcac tgtaa		25
<210>	4	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA 4	
<400>	4	
gagataaccag tagagacaat tactt		25
<210>	5	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA 5	
<400>	5	
caagccctac tggacttagt cctta		25
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	S1 primer	
<400>	6	
ttggaaagga acgagacgca		20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS1 primer

<400> 7

agtttagaggc ggttgtccac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S2 primer

<400> 8

tgggaatgga ggcttcatgg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS2 primer

<400> 9

acgtttccca ccactgagac

20

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E7 peptide

<400> 10

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1

5