



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0003111

(43) 공개일자 2015년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0157150(분할)

(22) 출원일자 2014년11월12일

심사청구일자 2014년11월12일

(62) 원출원 특허 10-2012-0083504

원출원일자 2012년07월30일

심사청구일자 2012년07월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태우

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

노경희

경기도 안산시 단원구 당곡1로 9, 524동 304호 (고잔동, 중앙주공아파트5단지)

(74) 대리인

이처영, 장제환

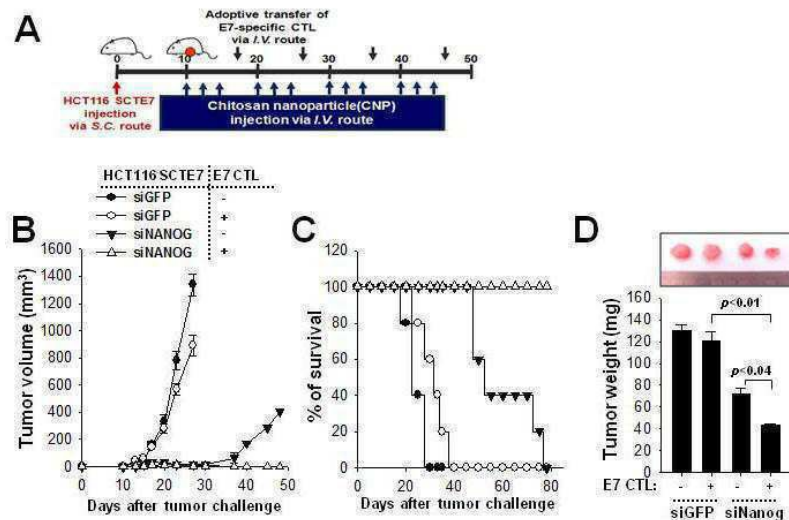
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 면역내성암의 재발 및 암전이 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질에 대한 저해제를 포함하고, 상기 저해제는 siRNA, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, shRNAi, miRNA 또는 이들을 하나를 포함하는 벡터, 또는 항체인 것을 특징으로 하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물 및 NANOG를 과발현하는 세포주를 이용한 항암제 스크리닝 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 병리적 마커로서 NANOG 유전자를 항암면역내성암의 재발 및 전이의 진단, 억제, 경감 등에 사용할 수 있을 뿐만 아니라 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제의 스크리닝에 사용할 수 있어 암에 대한 효과적인 치료제를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도16



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012007527

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 배아줄기세포인자 NANOG의 AKT 의존적 항암면역내성 및 암전이 유도 기전 및 이를 통한 항암치료효능 증진 전략 구축

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

AKT 유전자에 대한 siRNA; 또는 AKT 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AKT 유전자에 대한 siRNA는 서열번호 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 및 37로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 센스 및 서열번호 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 및 38로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 안티센스를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

AKT 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 PCR 조성물.

청구항 4

AKT 유전자와 혼성화 할 수 있는 프로브를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 키트.

청구항 5

AKT 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 키트.

청구항 6

AKT 단백질을 발현하는 세포주에 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 후보물질을 처리하는 단계;

상기 후보물질이 처리된 세포주(실험군) 내의 AKT 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및

상기 후보물질 미처리 세포주(대조군)와 비교하여 AKT 단백질의 발현량이 감소하는 경우의 후보물질을 항암면역내성암의 재발 및 전이의 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세포주는 TC-1/NANOG 또는 CaskiDb/NANOG 세포주인 것을 특징으로 하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제의 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 면역내성암의 재발 및 암전이 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암, 그리고 면역 요법 등의 항암치료 후 재발 또는 전이가 일어난 암들의 치료를 위한 병리적 마커로서 NANOG/TCL-1/AKT/MCL-1 분자 축을 선별한 것으로 항암면역에 대해 내성을 가지는 암에서 관측되는 암의 재발 및 전이를 진단하고 나아가 NANOG/TCL1/AKT/MCL-1의 항암면역내성획득 관련

본자 축을 표적화함으로써 효과적으로 항암면역내성암을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 대한민국 통계청의 분석에 따르면 암은 대한민국의 제1의 사망원인으로 남성이 31.7%, 여성이 22.5%를 차지하며 전체 인구의 31.7%가 암으로 사망한다.
- [0003] 우리의 몸은 아주 작은 세포들로 이루어져 있으며, 스스로 증식 또는 사멸하거나 유전적 이상을 가지고 있는 비정상세포들을 면역감시체계(immune surveillance)를 통해 제거함으로써 몸의 항상성을 유지한다. 하지만 많은 유전자의 이상이 중첩되었을 경우 세포는 증식과 사멸을 유지하는 항상성을 잃고 비정상적인 세포 증식이 유도되어 암으로 발전한다. 따라서 암은 유전자의 이상이 중첩되어 면역세포에 의한 사멸을 회피함으로써 발생하는 면역학적 질환이며, 오랜 시간 동안 이상이 중첩되어 발생되는 만성적인 질환이라고 할 수 있다.
- [0004] 암은 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)으로 구분되어지는데, 양성종양은 비교적 성장속도가 느리고 종양의 원발생 부위에서 다른 조직으로 이동되어지는 전이(metastasis)가 되지 않는 것에 반해 악성종양은 원발부를 떠나 다른 조직으로 침윤되어 빠르게 성장하는 특징을 가짐으로써 생명을 위협하며 사망에 이르는 아주 중요한 원인이 된다.
- [0005] 암을 치료하기 위해서는 외과적 수술로서 제거하거나, 방사선 치료법, 항암제 치료법, 면역치료법 등이 있으나 많은 연구에도 불구하고 암환자 전체의 50% 이상이 결국 치유되지 못하고 사망한다고 보고된다. 그에 따른 이유는 외과적으로 절제를 하였다 하여도 미세하게 전이된 암세포를 제거하지 못하여 암이 재발하거나, 다양한 항암제의 개발에도 불구하고 항암제를 이용한 암 치료 시 항암제에 대해 암세포가 사멸이 유도되지 않거나 초기에는 반응을 보여 종양이 줄어드는 듯 보이지만 치료도중이나 치료가 끝난 후 항암제에 대한 내성이 생긴 암세포들이 급격히 증식하기 때문이다. 또한, 방사선 치료도 암세포 방사선에 대한 내성을 나타내게 되어 완치가 어렵다. 항암면역치료는 암 특이 항원 또는 암 관련 항원을 이용한 면역 반응을 유도하여 항원을 갖고 있는 암세포를 면역세포를 이용하여 제거하는 방법으로써 부작용이 거의 없어 획기적인 암 치료방법으로 부각되고 있지만, 임상적인 실효성이 매우 미미한 상태이다. 중요한 점은 이들 항암치료에 대한 내성을 획득한 암들은 공통적으로 재발과 함께 암전이가 현저히 증가하는 경향을 가진다는 점이다. 따라서 보다 나은 암 치료를 위해서는 항암제와 방사선 치료를 포함한 면역치료 요법에 대한 암세포의 내성을 극복하는 연구가 필요하며, 동시에 관련 내성유전자의 규명이 매우 필요하다. 또한 규명된 유전자를 표적화하는 암 치료방법이 연구되어야 하며, 암을 초기에 진단하여 빠른 암 치료에 따른 환자의 삶의 질 향상이 절실히 요구되고 있다.
- [0006] 한편, NANOG는 다능성 세포의 유지에 필요한 인자 중에 하나로써 배아줄기세포에서 발현되었다. NANOG단백질의 작용기전에 대한 연구는 현재 완전히 밝혀지진 않았으나 OCT4, SOX2와 같은 전사인자들과 함께 작용하며, NF-kB의 전자활성을 억제하고 STAT3와 협동하여 줄기세포의 특성유지를 한다는 보고들이 되어 있다. 뿐만 아니라 최근 몇몇 논문에서 NANOG의 발현이 배아줄기세포뿐만 아니라 여러 암종에서도 그 발현이 증가 된다는 내용이 보고되고 있으나(Jeter CR et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. Stem Cells. 2009;27(5):993-1005) 항암면역내성과 관련된 보고는 없고 특히 이러한 NANOG의 증가가 항암면역내성암의 재발 및 전이와 관련되었다는 보고는 전무하다.
- [0007] 본 발명의 배경이 되는 기술로는, 대한민국 공개 특허 10-2010-0115254에 아피시딘을 포함하는 미분화함 치료용 조성물 및 줄기세포성을 나타내는 유전자인 Nanog, Oct4, 또는 Sox2의 발현을 확인함으로써 아피시딘 병용투여제 스크리닝 하는 방법이 공개되어 있다.
- [0008] 그러나, 항암면역내성을 획득한 종양세포에서 증가된 NANOG가 면역내성획득에 필수적인 분자이며, 이때 NANOG가 AKT 활성화 인자인 TCL1을 직접적으로 전사조절하여 유전자 발현을 증가시키고, 증가된 TCL-1에 의한 AKT 활성화는 항세포사멸 인자인 MCL-1의 발현을 증가시킴으로써 항암면역 내성을 획득하는 NANOG/TCL1/AKT/MCL-1의 항암면역내성획득 관련 분자 축이 실재함이 확인된 적이 없으며, 이를 이용하여 면역 요법 등의 항암치료 후 재발된 암, 내성이 생긴 암, 또는 암전이 치료를 위한 병리적 마커로서 진단에 활용하고 나아가 NANOG/TCL1/AKT/MCL-1의 항암면역내성 관련 분자 축을 표적화함으로써 효과적으로 항암면역내성암을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관해서 알려진 바도 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개 특허 10-2010-0115254(2010.10.27)

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 노경희, 항암면역에 내성을 갖는 종양에서의 AKT의 역할, 2007.

(비특허문헌 0002) Jeter CR et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. Stem Cells. 2009;27(5):993-1005

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암, 그리고 면역 요법 등의 항암치료 후 재발 또는 전이가 일어난 암에 대한 병리적 마커로 사람의 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 또는 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)으로 이루어진 항암면역내성 획득관련 유전자를 사용하여 항암면역내성 암의 재발 및 전이를 치료할 수 있는 약제학적 용도를 제공하고자 한다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질에 대한 저해제를 포함하고,

[0014] 바람직하게, 상기 저해제는 siRNA, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, shRNAi, miRNA 또는 이들을 하나를 포함하는 벡터, 또는 항체인 것을 특징으로 하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 발현하는 세포주를 포함하는 조성물에 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및

[0018] 상기 후보물질이 처리된 세포주(실험군) 내의 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 또는 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)의 발현량을 측정하는 단계;를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019]

상술한 바와 같은 본 발명에 의하면 면역 요법 등의 항암치료에 대해 내성이 생긴 암, 그리고 면역 요법 등의 항암치료 후 재발 또는 전이가 일어난 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 즉, 병리적 마커로서 새로운 Nanog/Tcl1/pAkt/Mcl1 면역내성 분자 축을 이용함으로써 면역내성암, 재발암 및 전이성 암의 진단, 억제, 경감 등에 사용할 수 있을 뿐만 아니라 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제의 스크리닝에 사용할 수 있어 암에 대한 효과적인 치료제를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 다양한 인간 암종의 세포주들에서 본 발명의 인간 NANOG 단백질의 발현 여부를 확인한 결과이다.

도 2는 인간 자궁경부암의 진행 단계에 따른 본 발명의 인간 Nanog/Tcl1/pAkt 단백질의 암의 진행에 따른 발현 지수(A와 B)와 생존율(C)을 나타낸 결과이다.

도 3은 항암면역내성 TC-1 P3 세포주에서 NANOG 단백질의 발현을 확인한 결과이다. (A) 웨스턴 블랏, (B) 면역 현광염색 왼쪽: 현광이미지 오른쪽: Nanog 발현 (Nanog +) 세포 백분율.

도 4는 항암면역내성 TC-1 P3 세포주와 면역내성이 없는 모세포 TC-1 P0 세포주에서 세포의 증식(A)과 세포주기 (B) 및 세포주기 관련 단백질의 발현(C)을 확인한 결과이다.

도 5는 항암면역내성 TC-1 P3 세포주와 면역내성이 없는 모세포 TC-1 P0 세포주의 시험관내(A: 시험관 내 종양구 형성능 확인) 그리고 생체내 종양형성능(B와 C: 주입된 세포수에 따른 종양형성)을 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 NANOG 의존적 세포증식 및 세포구 형성능을 나타낸 것이다. 항암면역내성 TC-1 P3 세포주에서 NANOG의 발현 저하 시 세포증식 감소(A), 세포주기의 변화, 세포주기 관련 인자 CyclinA의 발현 감소(B) 및 시험관 내 종양구 형성 감소를 확인하였다. 반대로 면역내성이 없는 모세포 TC-1 P0 세포주에 Nanog의 발현을 유도하였을 때 세포증식 증가(D), 세포주기의 변화, 세포주기 관련 인자 CyclinA의 발현 증가(E) 및 시험관 내 종양구 형성 증가를 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 NANOG를 과발현하는 암세포주(TC-1/NANOG)를 이용하여 NANOG의 항암면역에 대한 내성 유도를 확인한 결과이다. NANOG 발현에 의한 세포독성인자인 Granzyme B 유도 세포자멸사에 대한 내성 증가(A) 및 E7 항원특이적인 세포독성세포(E7 CTL) 매개 세포자멸사에 대한 내성 증가(B) 그리고 E7 항원특이적인 세포독세포의 정맥주사 후 NANOG 과발현 종양의 생체 내 항암면역내성 증가 확인(C)한 결과이다.

도 8은 본 발명의 NANOG의 발현 증가가 항암면역을 통해 나타난 것임을 확인하는 결과이다. 항원특이적인 항암 면역을 유도 시에만 NANOG의 발현이 높은 암세포주들(TC-1 P1, P2, P3)이 선택됨을 확인한 결과(A-C)이다.

도 9는 본 발명의 NANOG의 발현증가가 항암면역을 통해 나타나는 것을 인간암세포에서 확인한 결과이다. 본 발명에 사용된 CaSki Db의 면역선택 과정 묘사 (A), 면역선택 과정이 증가함에 따라서 면역내성이 증가함을 확인한 결과(B), 이때 면역선택 횟수가 증가함에 따라서 Nanog 발현 세포의 백분율이 증가함을 확인한 결과(C)이다.

도 10은 항암면역내성을 획득한 인간 자궁경부암 세포주(CaSki Db P3)에서 시험관내(A-C) 뿐만 아니라 생체내(D와 E)에서 종양형성능이 증가됨을 확인한 결과이다.

도 11은 항암면역내성을 획득한 인간 자궁경부암 세포주(CaSki Db P3)에서NANOG 표적화 siRNA를 이용한 NANOG 발현 저하 유도 시 종양형성능(A-D)과 항암면역내성 무력화(E)를 확인한 결과이다.

도 12는 본 발명의 NANOG와 전사활성이 약화된 NANOG의 돌연변이체를 이용하여 Nanog의 전사활성 의존적인 AKT의 활성화(B), 세포주기 조절(C와 D), 종양형성능(E), 항암면역내성 (F), 그리고 항세포자멸관련 단백질 MCL-1의 발현 유도(G)와의 상관관계를 규명한 결과이다.

도 13은 본 발명의 NANOG를 과발현하는 인간 자궁경부암에서 AKT의 활성화 기전을 무력화(AKT 화학저해제 (A-C), AKT 표적화 siRNA (D-F))시켰을 때 종양형성능(B와 E)과 항암면역내성(C와 F)을 조사한 결과이다.

도 14는 본 발명의 NANOG를 과발현하는 인간 자궁경부암에서 Nanog 의존적인 Tcl1a의 발현(A) 및 TCL1A에 의한 pAkt와 CyclinA 및 Mcl-1의 발현 조절(B) 및 Nanog 매개 종양형성능(C: 세포증식, D:시험관 내 종양구 형성)과 항암면역내성 조절(E)을 조사한 결과이다.

도 15는 본 발명의 NANOG가 TCL1A의 promoter-938~-721부분에 물리적으로 결합하여 전사를 조절할 수 있는 것을 조사한 결과이다.

도 16은 본 발명의 NANOG를 키토산 나노파티클을 이용하여 siRNA NANOG를 생체 내 전달 시 Nanog의 발현이 높은 인간 대장암세포주인 HCT116 SCTE7의 종양의 면역내성 감소로 인한 종양체적의 감소를 확인한 결과이다. 이러한 결과는 NANOG는 인간암의 면역치료 시 좋은 표적 분자로서 활용될 수 있음을 실증하는 것이다.

도 17은 본 발명의 NANOG를 생쥐 항암면역내성 세포주인 TC-1 P3 에서 siRNA를 이용하여 발현을 저하시킨 후 세포의 이동능(A)과 침윤능(B)을 시험관내 실험을 통해 확인한 결과이다.

도 18은 본 발명의 NANOG를 인간 항암면역내성 세포주인 CaSki/Db P3 에서 siRNA를 이용하여 발현을 저하시킨 후 세포의 이동능(B)과 침윤능(C)을 시험관내 실험을 통해 확인한 결과이다. 도 17과 18의 결과들은 NANOG가 항암면역내성암세포의 암전이에 중요한 인자로서 진단 및 표적으로 활용될 수 있음을 실증하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0022]

본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leucukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질에 대한 저해제를 포함하고,

[0023]

상기 저해제는 siRNA, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, shRNA, miRNA 또는 이들을 하나를 포함하는 벡터, 또는 항체인 것을 특징으로 하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0024]

본 명세서에서 "원발암"은 통상의 암을 뜻하며, "면역내성암"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, 소장의 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 전이성암"은 특정 부위에서 발생한 원발암 또는 재발암이 다른 부위로 전이된 것을 일컫는다.

[0025]

본 발명의 NANOG 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 항암면역내성암의 재발 및 전이뿐만 아니라 재발암, 내성암 또는 암전이 치료적 용도로 사용될 수 있다.

[0026]

본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이의 예방 또는 치료는 항암면역내성암의 재발 및 전이의 예방, 억제 또는 경감을 포함한다.

[0027]

본 발명의 NANOG 유전자 저해제(발현 억제제)로서, NANOG 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi를 들 수 있다. 상기 NANOG 유전자는 항암면역 내성, 항암제 및 방사선 내성을 나타내고, 암전이와 관련된 유전자이므로, siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi에 의해 NANOG 유전자 발현을 억제함으로써, 항암면역내성암의 재발 및 전이를 예방 또는 경감할 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, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39 와 41로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 가질 수 있다.
- [0031] 보다 구체적으로, 서열번호 1에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 NANOG(GenBank Accession No. NM_028016)의 830-852 nt를 갖는다.
- [0032] 서열번호 3에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 NANOG의 865-887 nt를 갖는다.
- [0033] 서열번호 5에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 NANOG의 92-114 nt를 갖는다.
- [0034] 서열번호 7에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 NANOG의 327-349 nt를 갖는다.
- [0035] 서열번호 9에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 NANOG의 529-551 nt를 갖는다.
- [0036] 서열번호 11에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 NANOG (GenBank Accession No. NM_024865)의 165-187 nt를 갖는다.
- [0037] 서열번호 13에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 NANOG의 857-879 nt를 갖는다.
- [0038] 서열번호 15에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 NANOG의 810-832 nt를 갖는다.
- [0039] 서열번호 17에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 NANOG의 313-335 nt를 갖는다.
- [0040] 서열번호 19에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 NANOG의 811-833 nt를 갖는다.
- [0041] 서열번호 21에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT1 (GenBank Accession No. NM_005163)의 1007-1029 nt와 AKT2 (GenBank Accession No. NM_001626)의 1010-1032 nt를 갖는다.
- [0042] 서열번호 23에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT1의 96-118 nt를 갖는다.
- [0043] 서열번호 25에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT1의 853-875 nt를 갖는다.
- [0044] 서열번호 27에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT1의 72-94 nt를 갖는다.
- [0045] 서열번호 29에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT1의 527-549 nt를 갖는다.
- [0046] 서열번호 31에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT2의 429-451 nt를 갖는다.
- [0047] 서열번호 33에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT2의 96-118 nt를 갖는다.
- [0048] 서열번호 35에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT2의 1218-1240 nt를 갖는다.
- [0049] 서열번호 37에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 AKT2의 858-880 nt를 갖는다.
- [0050] 서열번호 39에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 TCL1 (GenBank Accession No. NM_021966)의 104-126 nt를 갖는다.
- [0051] 서열번호 41에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 인간의 TCL1의 275-297 nt를 갖는다.
- [0052] 또한, 상기 안티센스는 NANOG, AKT1, AKT2, TCL1 유전자 또는 그의 단편으로부터 전사되는 mRNA 서열 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 지니고, 상기 mRNA와 결합하여 상기 압전이 유전자 또는 단편의 발현을 억제할 수 있다.
- [0053] 또한, 상기 shRNAi(short hairpin RNAi)는 인간 또는 마우스상의 shRNAi 공통 염기서열 부위를 표적으로 하여 통상의 방법에 따라 제작된 것을 사용할 수 있다.

- [0054] 상기 NANOG 단백질의 저해제는 상기 단백질들의 발현을 억제하는 물질 또는 기능을 저해하는 물질이 될 수 있는데, 구체적으로, NANOG 단백질의 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체가 될 수 있다.
- [0055] 또한, 상기 NANOG 유전자의 mRNA 또는 단백질 저해제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0056] NANOG 단백질의 억제제 또는 항체는 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)와 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, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈 등과 같은 항대사제(antimetabolitic agent), 빈카 알칼로이드와 같은 식물유래 약제 및 호르몬 등이 될 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 NANOG 유전자의 mRNA 또는 단백질 저해제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 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.
- [0058] 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.
- [0059] 또한, 상기 NANOG 유전자의 mRNA 또는 단백질 저해제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 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.
- [0060] 또한, 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물은 회석제, 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.
- [0061] 또한, 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 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.
- [0062] 상기 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물의 투여량은 항암면역내성암의 재발 및 전이를 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 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, NANOG 유전자의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0063] 본 발명은 또한 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0064] 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료용 조성물은 NANOG 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하고 있어 생체 내 면역반응을 증강시키는 면역반응 증강용 조성물이거나, 면역반응을 유도함으로써 항암면역

내성암의 재발 및 전이를 예방 또는 경감할 수 있는 백신 조성물일 수 있다.

- [0065] 상기 NANOG 단백질의 에피토프를 포함하는 면역세포는 통상의 방법에 따라 에피토프를 감작시킨 것이거나, 형질 전환방법을 통해 상기 에피토프를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.
- [0066] 본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0067] 본 명세서에서 "프로브"는 NANOG 유전자 또는 단백질과 특이적으로 결합하여 이들을 인지할 수 있는 항체, PCR 프라이머, 핵산 프로브 등을 포괄적으로 포함하는 개념이다.
- [0068] 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물은 생리학적 시료에서 항암면역내성암의 재발 및 전이 병리적 마커를 검출하기 위한 것으로,
- [0069] NANOG 유전자가 항암면역내성암의 재발 및 전이성이 있는 암세포의 안팎에서 특이적으로 발현이 증가되는 양상을 보이고, 이의 발현량과 비례하여 세포의 종양형성능이 증가하므로, 암세포 또는 조직에서의 NANOG 유전자, 또는 이로부터 코딩되는 단백질의 발현 정도를 정량분석함으로써 항암면역내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있는 것이다.
- [0070] 상기 NANOG는 사람 또는 마우스에서 유래한 것으로, 공지된 서열, 예를 들어, GenBank Accession No. NM_024865, GenBank Accession No. NM_028016 등을 포함하거나, 염기또는 아미노산의 결실, 치환, 부가되어도 동일한 기능을 수행할 수 있는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물은 상기 프로브로 NANOG 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물을 이용한 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단은, 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료에서 NANOG 단백질을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0073] 또는, 상기 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단은, 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 NANOG 단백질의 모노클로날 항체와 반응시켜 NANOG 단백질의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 진단방법은, NANOG 단백질의 모노클로날 항체를 함유한 항암면역내성암의 재발 및 전이의 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay) 방법을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 생체에서 배출된 암조직이나 세포에 NANOG 단백질 특이적 면역염색(histoimmunostaining)을 이용하여 항암면역내성암의 재발 및 전이 여부를 진단할 수 있다. 또는, 생체로부터 배출된 암조직이나 세포에 웨스턴 블롯분석을 이용하여 단백질 수준에서 NANOG 단백질 발현량을 정상대조군과 비교분석함으로써 항암면역내성암의 재발 및 전이 여부를 진단할 수 있다.
- [0075] 또는, 상기 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단은, NANOG 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 NANOG 단백질을 HPLC 방법으로 정량하는 단계; 및 상기 정량 결과를 비교분석하여 항암면역내성암의 재발 및 전이 정도를 진단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0076] 상기 NANOG 단백질의 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다.
- [0077] 상기 NANOG 단백질의 모노클로날 항체에는 일반적으로 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, AP) 또는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 컨쥬게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 직접 NANOG 단백질 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨쥬게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다.
- [0078] 또한, 상기 NANOG 단백질 모노클로날 항체 대신에 NANOG 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수 있으며, 이는 당업계에 통상적인 항형질 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수 있다.

- [0079] 또한, 상기 프로브는 NANOG의 mRNA에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 핵산 프로브를 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 NANOG 유전자에 대한 프라이머를 이용한 RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 등을 수행하여 NANOG 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 항암면역내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있다.
- [0081] 또한, 상기 NANOG 유전자에 대한 핵산 프로브를 이용하여 노던 블롯 분석 등을 수행하여 NANOG 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 항암면역내성암의 재발 및 전이를 진단할 수 있다.
- [0082] 상기 PCR 프라이머 또는 핵산 프로브는 NANOG 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드라면 특별히 제한하지 않는다.
- [0083] 상기 NANOG 유전자의 mRNA 검출용 프라이머 또는 핵산 프로브를 포함하는 본 발명에 따른 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직에서 추출한 RNA)과 반응(RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 또는 노던블롯팅)시켜 정상군과 비교 분석함으로써 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단을 수행할 수 있다.
- [0084] 상기 항암면역내성암의 재발 및 전이 진단은 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 RNA 시료를 수득하는 단계; 및 수득한 시료를 NANOG 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 프로브와 반응시켜 상기 유전자의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0085] 본 발명은 또한 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.
- [0086] 본 발명의 조성물이 포함하는 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1) 유전자는 사람 또는 마우스 유래의 전체 염기서열 또는 이의 단편, 또는 다형현상을 포함하는 염기서열 등을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 전체 염기서열의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나 이상이 될 수 있으며, 원핵생물 또는 진핵생물 발현벡터 시스템 내에 포함된 형태로 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝 조성물에 포함된다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 조성물은 상기 NANOG를 발현하는 플라스미드를 포함하는 TC-1/NANOG 또는 CaskiDb/NANOG 세포주를 포함하는 것이 바람직하다. 상기 세포주를 이용하면 NANOG/TCL-1/AKT/MCL-1 항암면역내성 분자 축 스크리닝에 대한 양성 대조군으로서 활용될 수 있다.
- [0087] 본 발명은 또한 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.
- [0088] 본 발명의 조성물이 포함하는 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1) 단백질은 사람 또는 마우스 유래의 전체 아미노산 서열 또는 이의 단편, 또는 다형현상을 포함하는 아미노산 서열일 수 있다. NANOG 단백질 등과 동등한 생리적 활성을 나타내는 NANOG 폴리펩타이드 단편 중 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0089] NANOG는 항암면역내성암의 재발 및 전이를 촉진시키는 효과가 있으므로, 본 발명의 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝용 조성물은 NANOG 유전자 염기서열에서 mRNA, 단백질로의 전사, 번역을 저해하는 물질 또는 NANOG 단백질의 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하여 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제로 선택할 수 있다.
- [0090] 또한, 본 발명은 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 및 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 발현하는 세포주를 포함하는 조성물에 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보물질이 처리된 세포주(실험군) 내의 NANOG, TCL1(T cell leukemia/Lymphoma 1), AKT 또는 MCL1(Myeloid cell leukemia sequence 1)의 발현량을 측정하는 단계;를 포함하는 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0091] 상기 발현량 측정은 전사체의 양을 측정하는 방법, 단백질의 양을 측정하는 방법 또는 인산화된 단백질양을 측정하는 방법으로 수행될 수 있다. AKT의 경우 인산화된 단백질양을 측정함으로써 활성화 정도를 측정할 수 있다. 예를 들어 상기 전사체의 양을 측정하는 방법은 RT(Reverse transcriptase)-PCR을 수행하여, 상기 단백질

의 양 및 인산화된 단백질 양을 측정하는 방법은 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0092] 보다 구체적으로 살펴보면, 본 발명의 스크리닝 방법에서 NANOG 유전자를 포함하는 조성물과 후보물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 생체 외부에서(*in vitro*) 상기 유전자와 후보물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류세포와 후보물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 후보물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현율을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.

[0093] 이러한 경우 본 발명의 조성물은 NANOG 유전자 외에도, 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

[0094] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 세포주는 상기 NANOG를 발현하는 플라스미드를 포함하는 TC-1/NANOG 또는 CaskiDb/NANOG 세포주이다.

[0095] 본 발명의 스크리닝 방법에서 NANOG 단백질을 포함하는 조성물과 후보물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.

[0096] 예를 들면, NANOG 유전자, 또는 이들의 단백질과 후보물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), NANOG 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩타이드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화합물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.

[0097] 이러한 경우 본 발명의 조성물은 NANOG 유전자로부터 발현된 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생체 내(*in vivo*) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.

[0098] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

[0099] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 증진시키거나 단백질의 기능을 증진시키는 활성을 나타내는 후보물질 및 반대로 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 후보물질은, 전자의 경우, 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 후보물질이 될 수 있고, 후자의 경우는 후보물질에 대한 억제제를 개발함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질이 될 수 있다.

[0100] 이와 같은 항암면역내성암의 재발 및 전이 치료제 후보물질은 이후의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 개발 과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 NANOG 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제를 개발할 수 있다.

[0101] 이렇게 하여 얻어진 물질은 NANOG 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성 억제효과를 나타내게 되므로, NANOG 유전자 발현 억제 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 저하에 의하여, 항암면역내성암의 재발 및 전이, 그 이외에 유발되는 질환들을 억제할 수 있다.

[0102] 본 발명에서 유전공학 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.

[0103] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예만 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0104] <실시예 1> 인간 NANOG 발현 벡터 제조

[0105] pSin-EF2-Nanog-Puro 벡터 (Addgene plasmid 16578)를 주형으로 하고, XhoI-NANOG 프라이머 (5' -GCTCGAGATGAGTGTGGATCCAGCTTG -3'), NANOG-EcoRI (5' -CGAATTCTCACACGCTTGAGGTTG -3') 프라이머를 이용하여 변성단계(95℃, 30초), 어닐링단계(56℃, 30초) 및 연장단계(72℃, 40초)를 1 사이클로 하여 35 사이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다.

[0106] pMSCV 벡터(clontech, USA)와 상기에서 증폭된 NANOG 유전자 단편에 XhoI과 EcoRI(NEB, USA)을 처리한 다음, 라이게이즈(바이오니아)로 라이게이션(ligation)하여 NANOG를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 제조하였다. 상기 벡터를 pMSCV NANOG로 명명하였다.

[0107] <실시예 2> 인간 NANOG를 발현하는 CaSkiDb 세포주 제조

[0108] 실시예 1에서 제조한 벡터와 리포솜 제제인 리포펙타민 2000(lipofectamin 2000, Invitrogen, MD, USA)을 부피비 1:2로 섞어 레트로바이러스 패키징(packaging) 세포주인 피닉스(phenix)세포(clontech)에 3시간 처리 후 혈청이 포함된 배양액을 첨가해 주어 형질전환반응을 정지시켰다. 24시간 배양 후 퓨로마이신(Invitrogen, MD, USA)이 포함된 배양액으로 형질전환된 피닉스세포를 선택배양하였다. 선택된 세포들을 3~4일간 배양하여 배양액에서 얻은 바이러스를 amicon ultra-15(millipore)을 이용하여 12000 rpm에서 30분간 원심 분리하는 방법으로 농축한 500μl의 농축액과 4μg의 PEI(Polyethyleneimine; Sigma)를 혼합한 혼합액을 인간 자궁경부암세포주인 CaSki 세포주에 마우스 MHC class I인 Db 유전자가 형질도입되어 있는 CaSki Db(*The Journal of experimental medicine* 185:453-459, 1997)에 처리하여 형질도입시킴으로써, NANOG를 발현하는 CaSki Db/NANOG 세포주를 제조하였다.

[0109] <실시예 3> NANOG를 발현하는 TC-1세포주 제조

[0110] 실시예 1에서 제조한 각각의 벡터와 리포솜 제제인 리포펙타민 2000을 부피비 1:2로 섞어 레트로바이러스 패키징 세포주인 피닉스세포에 3시간 처리 후 혈청이 포함된 배양액을 첨가해 주어 형질전환반응을 정지시켰다. 그 후 24시간 배양 후 퓨로마이신이 포함된 배양액으로 형질전환된 피닉스세포를 선택 배양하였다. 선택된 세포들을 3~4일간 배양하여 배양액에서 얻은 바이러스를 amicon ultra-15 (millipore)을 이용하여 12000 rpm에서 30분간 원심 분리하는 방법으로 농축한 500μl의 농축액과 4μg의 PEI를 혼합한 혼합액을 마우스 폐암세포주인 TC-1(ATCC)에 처리하여 형질도입시킴으로써, NANOG를 발현하는 TC-1/NANOG 세포주를 제조하였다.

[0111] <실시예 4> 인간암세포주에서 NANOG 단백질 발현 확인

[0112] 인간신장세포주 HEK293, 자궁경부암세포주 CaSki, CUMC6, 유방암세포주 MCF7, MDA321, MDA435, 폐암세포주 H1299, 간암세포주 HepG2, 난소암세포주 OVCAR3, SKOV3, A2780, 대장암세포주 HT29, SNUC4, SW620, HCT116 세포주를 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에서 13000 rpm 30분간 원심 분리하고, 상층액만을 취하여 단백질 정량 후 50μg의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩 하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA 로 1시간 동안 블로킹한 후 NANOG 항체(Millipore, USA)를 1:1000으로 희석한 후 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0113] 도 1에 나타난 바와 같이, 모든 인간 암 종에서 NANOG 단백질이 발현되었다.

[0114]

<실시예 5> 자궁경부암 조직에서 NANOG 발현 확인

[0115]

자궁경부암 조직 슬라이드를 자일렌을 이용하여 탈파린화 과정과 알코올을 이용하여 탈수화 과정을 거친 후 시트레이트 버퍼에 슬라이드를 담귀 전자레인지에서 10분간 돌린 후 실온에서 한 시간 동안 식혀주었다. 증류수로 세척하여 실온에서 5% 염소 혈청으로 한 시간 동안 반응시킨 후 Nanog, Tc11, 그리고 pAkt 항체를 각각 1:50, 1:20, 그리고 1:50 으로 희석하여 임상시료에 도포하였다. HRP가 부착된 2차 항체를 반응시킨 후 DAB 키트를 이용하여 발색시켰다.

[0116]

도 2에 나타난 바와 같이, 조직에서 자궁경부암의 진행 단계가 높아질수록 Nanog/Tc11/pAkt 발현 양상이 증가됨을 확인하였다 (A와 B). 장기간 추적조사를 통한 생존율을 확인한 결과에서도 Nanog/Tc11/pAkt 발현이 높은 암을 가진 환자의 생존율이 유의하게 낮음을 확인하였다 (C).

[0117]

<실시예 6> 항암면역 내성 조사

[0118]

본 발명의 NANOG 유전자의 항암면역 내성에 대해 조사하기 위해 상기 실시예 2 및 실시예 3에서 제조한 293Db/NANOG, CaSki/Db NANOG 및 TC-1/NANOG 세포주를 이용하여 항암면역 내성 실험을 수행하였다.

[0119]

먼저 CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 TC-1/no insert, TC-1/NANOG 세포주에 표식한 후, E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 TC-1/no insert, TC-1/NANOG 세포주에서의 활성 카스파제-3(active caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.

[0120]

CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 CaSki/Db no insert, CaSki/Db NANOG 세포주에 표식한 후, 1ug/ml의 E7 peptide(아미노산 번호 49-57, RAHYNIVTF)를 1시간 동안 자극을 준 후 E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 CaSki/Db no insert, CaSki/Db NANOG 세포주에서의 활성 카스파제-3(active caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.

[0121]

도 7, 도 12, 도 13에 나타난 바와 같이, NANOG을 과발현하는 세포주는 T세포의 공격에 대해 내성을 가짐을 알 수 있었다.

[0122]

각 siRNA 서열과 표적부위는 표 1, 2, 3, 4 및 5 에 나타내었다. 도 6과 도 11은 생쥐의 항암면역내성 세포인 TC-1 P3와 인간 항암면역내성 세포인 CaSki/Db P3에서 마우스 NANOG 표적부위인 830-852(서열번호 1)과 인간 NANOG 표적부위인 165-187(서열번호 11)을 처리함에 따른 NANOG의 발현 여부를 도시 한 것이다.

표 1

[0123]

마우스 NANOG 특이적인 siRNA

표적부위	siRNA 서열		서열번호
830-852	센스	5'-CCACAAGCCUUGGAAUUUAU UU -3'	1
	안티센스	5'-UU GGUGUUCGGAACCUUAAUA-3'	2
865-887	센스	5'-GACUCCACCAGGUGAAUA UU-3'	3
	안티센스	5'-UU CUGAGGUGGUCCACUUUAU -3'	4
92-114	센스	5'-CCCGAGAACUAUUCUUGCU UU-3'	5
	안티센스	5'-UU GGGCUCUUGAUAAGAACGA-3'	6
327-349	센스	5'-CACUCAAGGACAGGUUCA UU-3'	7
	안티센스	5'-UU GUGAGUCCUGUCCAAAGU-3'	8
529-551	센스	5'-CAGCAUCCAUUGCAGCUAU UU-3'	9
	안티센스	5'-UU GUCGUAGGUAACGUCGAUA-3'	10

표 2

[0124]

사람 NANOG 특이적인 siRNA

표적부위	siRNA 서열	서열번호
165-187	센스	5'-CCUCCAUGGAUCUGCUUUAU UU-3'
	안티센스	5'-UU GGAGGUACCUAGACGAAUA -3'
857-879	센스	5'-CCACAAACCAUGGAUUUAU UU -3'
	안티센스	5'-UU GGUGUUUGGUACCUAAAUA-3'
810-832	센스	5'-GGGAAGGCCUUAAUGUAAU UU-3'
	안티센스	5'-UU CCCUCCGGAUUACAUA-3'
313-335	센스	5'-CCAGCUGUGUACUCAU UU-3'
	안티센스	5'-UU GGUCGACACACAUGAGUUA-3'
811-833	센스	5'-GGAAGGCCUUAAUGUAAUA UU-3'
	안티센스	5'-UU CCUCCGGAUUACAUAU-3'

표 3

[0125]

사람 AKT1 특이적인 siRNA

표적부위	siRNA 서열	서열번호
1007-1029	센스	5'-GUGGUCAUGUACGAGAUA UU-3'
	안티센스	5'-UU CACCAGUACAUAGCUCUAU-3'
96-118	센스	5'-GCACCUUCAUUGGUACAA UU-3'
	안티센스	5'-UU CGUGGAAGUAACCGAUGUU-3'
853-875	센스	5'-CGGGCACAUAUAGAUACA UU-3'
	안티센스	5'-UU GCCGUGUAAUUCUAGUGU-3'
72-94	센스	5'-GCUACUCCUCCUCAAGAA UU-3'
	안티센스	5'-UU CGAUGAAGGAGAGUUCUU-3'
527-549	센스	5'-GCCAUGAAGAUCUCAAGA UU-3'
	안티센스	5'-UU CGGUACUUCUAGGAGUUCU-3'

표 4

[0126]

사람 AKT2 특이적인 siRNA

표적부위	siRNA 서열	서열번호
1010-1032	센스	5'-GUGGUCAUGUACGAGAUA UU-3'
	안티센스	5'-UU CACCAGUACAUAGCUCUAU-3'
429-451	센스	5'-GGGCUAAAGUGACCAUGAA UU-3'
	안티센스	5'-UU CCCGAUUUCACUGGUACUU-3'
96-118	센스	5'-GCUCCUUAUUGGGUACAA UU-3'
	안티센스	5'-UU CGAGGAAGUAACCCAUGUU-3'
1218-1240	센스	5'-GGUUCUCCUCAGCAUCAA UU-3'
	안티센스	5'-UU CCAAGAAGGAGUCGUAGUU-3'
858-880	센스	5'-GCCACAUAAGAUCACUGA UU-3'
	안티센스	5'-UU CGGUGUAGUUCUAGUGACU-3'

표 5

[0127]

사람 TCL1 특이적인 siRNA

표적부위	siRNA 서열	서열번호
104-126	센스	5'-CCCUUAAACCAUCGAGAUAA UU-3'
	안티센스	5'-UU GGGAAUUGGUAGCUCUAUU-3'
275-297	센스	5'-CGCUUAGUGUACCAUCAU UU-3'
	안티센스	5'-UU GCGAAUCACAUGGUGUAGU-3'

[0128] 도 11에 나타난 바와 같이, 인간 항암면역내성세포주인 CaSki/Db P3세포에 siRNA 처리 시 NANOG 단백질의 발현이 억제되었다.

[0129] 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, NANOG를 발현하는 인간 항암면역내성세포주의 경우, T세포의 공격에 내성을 나타냈다.

[0130] 그러나, siRNA를 처리하여 NANOG의 발현을 저하시킨 경우 상기 내성효과에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군인 녹색형광단백질(GFP)의 siRNA를 처리한 인간 항암면역내성 세포주는 T세포의 공격에 거의 영향을 미치지 않았으나, NANOG의 siRNA를 처리한 경우에는 T세포의 공격에 대한 내성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0131] 도 13은 CaSki/Db NANOG 세포주에서 인간 AKT1 표적부위인 1007-1029 (서열번호 21)과 인간 AKT2의 표적부위인 1010-1032 (서열번호 21)을 처리함에 따른 T세포의 공격에 대한 내성이 무력화됨을 보여준다 (서열번호 21은 인간 AKT1과 AKT2를 동시에 표적화 한다).

[0132] 도 14는 CaSki/Db NANOG 세포주에서 인간 TCL1 표적부위인 104-126 (서열번호 39)를 처리함에 따라 pAKT 발현량이 감소됨과 동시에 T세포의 공격에 대한 내성이 무력화됨을 보여준다.

[0133] <실시예 7> 세포의 이동능 관찰

[0134] 본 발명의 NANOG 유전자가 세포이동능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 NANOG를 과발현하는 TC-1 P3 와 CaSki/Db P3 세포주를 이용하였다. 대조군으로 siRNA GFP를 이용하였으며, siRNA NANOG를 이용하여 TC-1 P3와 CaSki/Db P3 세포에서 NANOG의 발현을 저하시킨 후, 세포 배양용 6-웰 플레이트에 각각의 세포를 1×10^6 개 깔아주었다. 일정한 넓이로 상처를 낸 후 12, 24시간의 경과에 따른 상처 회복능을 관찰하였다.

[0135] 도 17 및 도 18에 나타난 바와 같이, NANOG를 과발현하는 세포주 모두 NANOG를 포함하지 않은 대조군에 비해 빠른 시간 내에 이동함을 확인하였다. 그러나, siRNA NANOG를 이용하여 TC-1 P3와 CaSki/Db P3 세포에서 NANOG의 발현을 저하시키면 세포의 이동능력이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0136] <실시예 8> 세포의 침윤능 관찰

[0137] 본 발명의 NANOG 유전자의 침윤능을 확인하기 위하여 NANOG를 과발현하는 TC-1 P3 와 CaSki/Db P3 세포주를 이용하였다. 대조군으로 siRNA GFP를 이용하였으며, siRNA NANOG를 이용하여 TC-1 P3와 CaSki/Db P3 세포에서 NANOG의 발현을 저하시킨 후, 매트릭젤을 세포배양배지와 1:3 비율로 섞어준 후 8.0 μ m의 구멍크기를 가진 세포 배양첨가막 (Cell culture insert membrane, Falcon, USA)에 50 μ l 넣고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 정치하여 굳혔다. 세포 배양용 24-웰 플레이트에 10% FBS 배지를 500 μ l 넣고 굳힌 매트릭젤이 들어있는 세포배양첨가막을 넣어준 후 그 안에 각각의 1×10^5 개 세포를 0.1% FBS 배지와 섞어 넣었다. 24시간 경과 후 세포막을 뚫고 나온 세포의 수를 관찰하였다.

[0138] 도 17 및 도 18에 나타난 바와 같이, NANOG를 과발현하는 세포주 모두 NANOG를 포함하지 않은 대조군에 비해 침윤능이 현저히 증가함을 확인하였다.

[0139] <실시예 9> 시험관내 종양형성능 확인(종양구 형성 실험)

[0140] 각각의 세포 5×10^3 개를 20 ng/ml EGF(epidermal growth factor; Invitrogen, USA)와 20 ng/ml의 bFGF(basic fibroblast growth factor; Invitrogen) 그리고 1X B27 가 포함된 1 ml DMEM-F12 배지에 넣고 24well-super-low adherence plates (Corning, Lowell, MA)에서 2주간 키우면서 관찰하였다. 이때 3일마다 새로운 배지를 100ul씩 넣어주었다. 형성된 종양구는 광학현미경을 이용하여 사진 이미지를 획득한 후 종양구의 직경을 측정함으로써 20~50 μ m이상의 종양구를 계수하여 정량하였다.

[0141] <실시예 10> 생체내 종양형성능 확인

[0142] 각각의 세포를 Opti-MEM I(GIBCO, USA)에 넣어 희석한 후 NOD/SCID 생쥐의 복부 표피에 1×10^2 , 1×10^3 , $1 \times$

10^4 , 1×10^5 의 세포를 각각 주입한다. 각각의 생쥐에 대하여 종양의 생성 유무를 일주일에 3번씩 관찰하고 기록하였다.

[0143] <실시예 11> 생체내 항암면역내성 무력화 확인

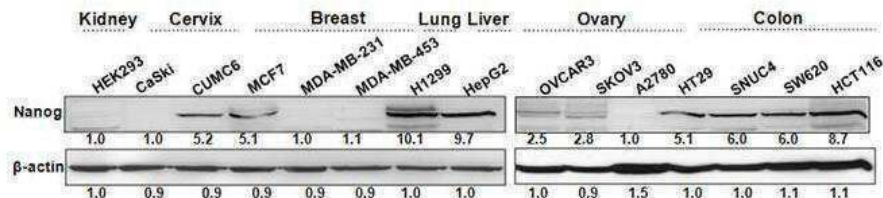
[0144] HCT116/SCT E7 세포를 NOD-SCID생쥐군(암컷, 5주령, n=5, 중앙실험동물) 각각의 복부 표피에 1×10^6 개씩 주입하고, 주입 10일째에 siRNA NANOG를 탑재한 키토산 나노파티클을 정맥주사로 주입하였다. 이때 대조군으로는 siRNA GFP를 탑재한 키토산 나노파티클을 주입하여 확인하였다. 키토산 나노파티클은 2일 간격으로 3번 주입하고 2일 경과한 후 E7특이적인 CD8+ T세포를 IL-2와 함께 정맥주사하여 면역하였다. 또다시 2일 경과 후 키토산 나노파티클 3번 주입과 E7 T세포의 주입을 하는 과정을 2번 반복하였다. 각각의 생쥐에 대하여 종양체적을 캘리버(caliber; Mitutoyo, Japan)로 측정하여, 종양체적은 (단축x장축²)/2의 식으로 구하였다.

[0145] 도 16에 나타난 바와 같이, siRNA NANOG를 탑재한 키토산 나노파티클과 CD8+ T세포를 함께 주입하여 준 그룹에서 대조군에 비해 유의적으로 종양체적이 감소하였다. 이는 Nanog 표적화에 의해 Nanog 의존적 면역내성 무력화되어 항암면역치료 효능이 증진됨을 실증하는 것이다.

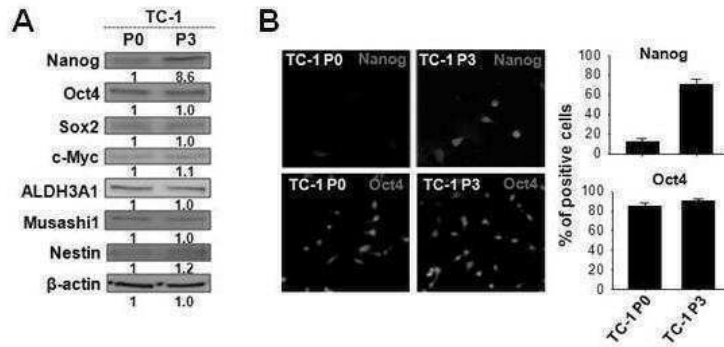
[0146] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

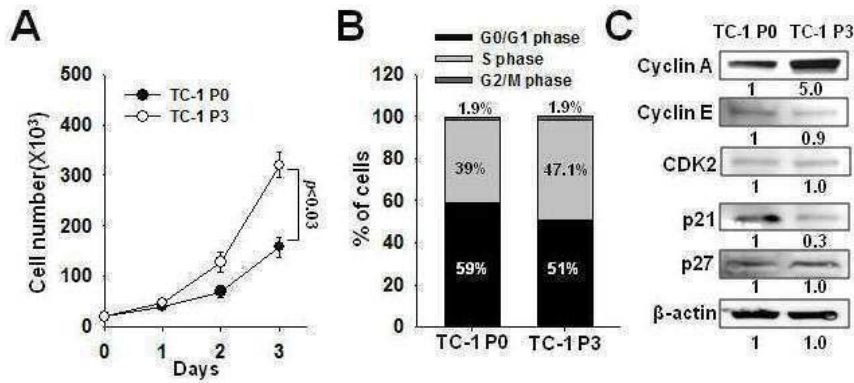
도면1



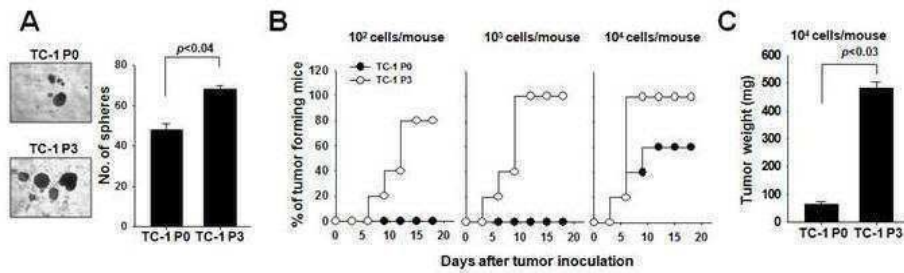
도면3



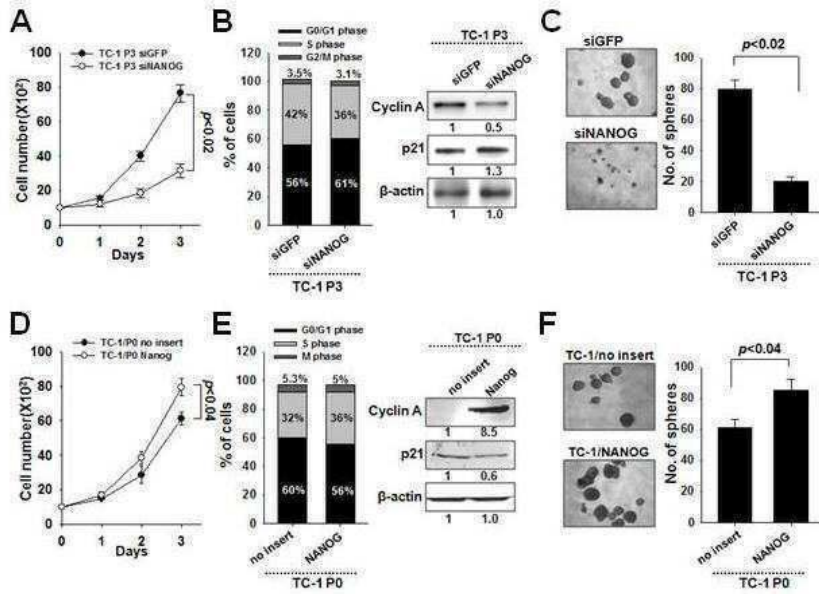
도면4



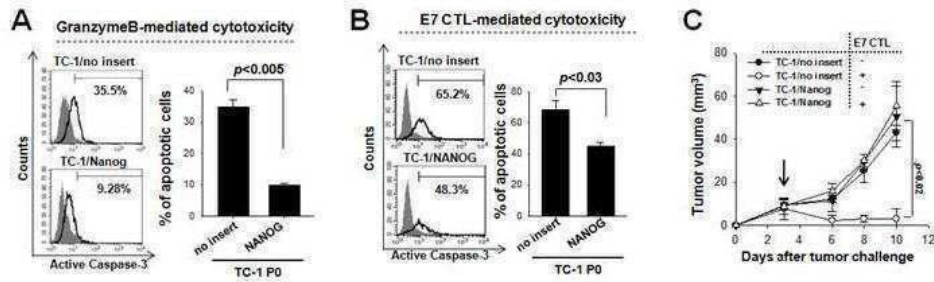
도면5



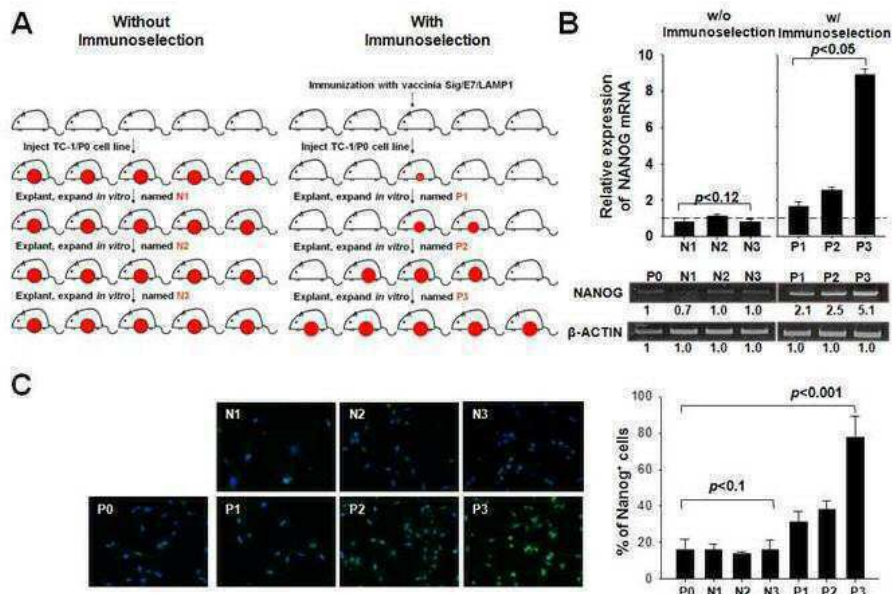
도면6



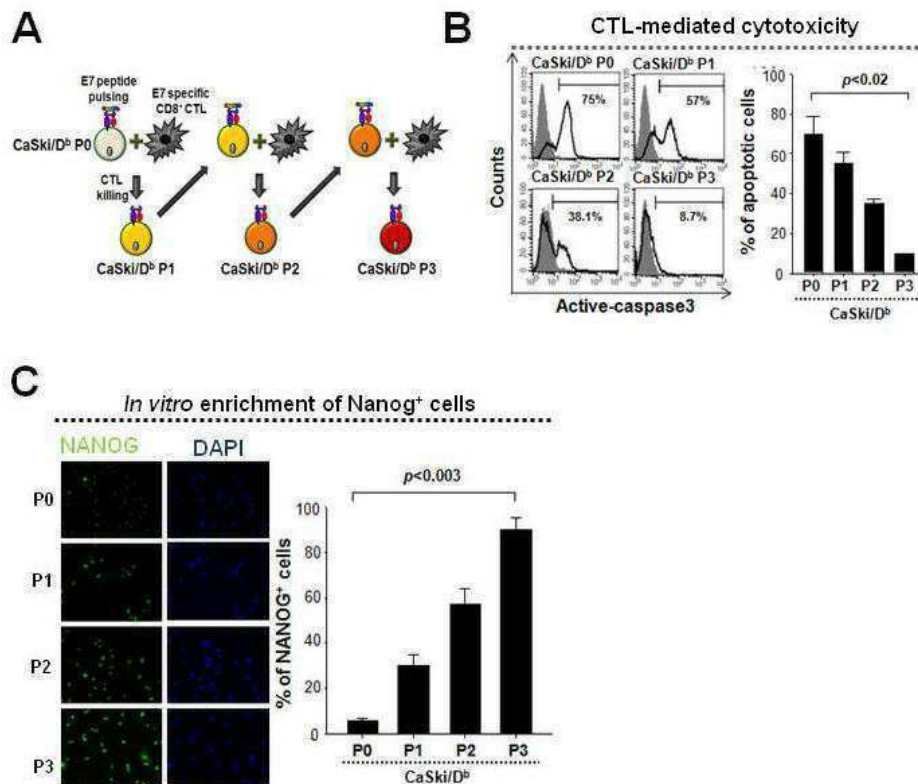
도면7



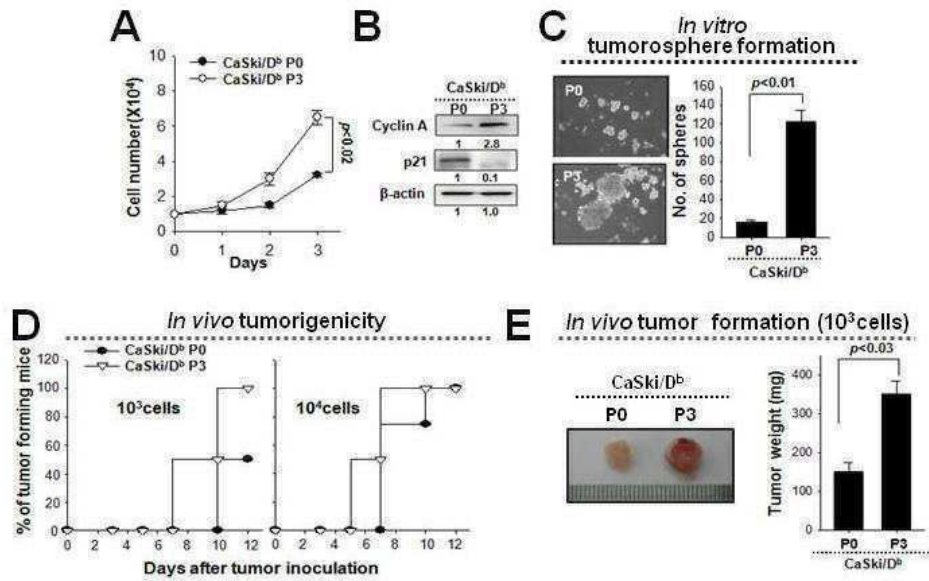
도면8



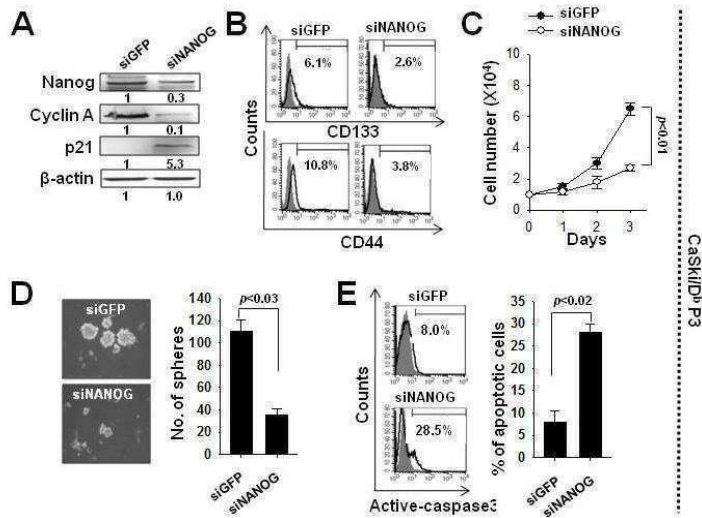
도면9



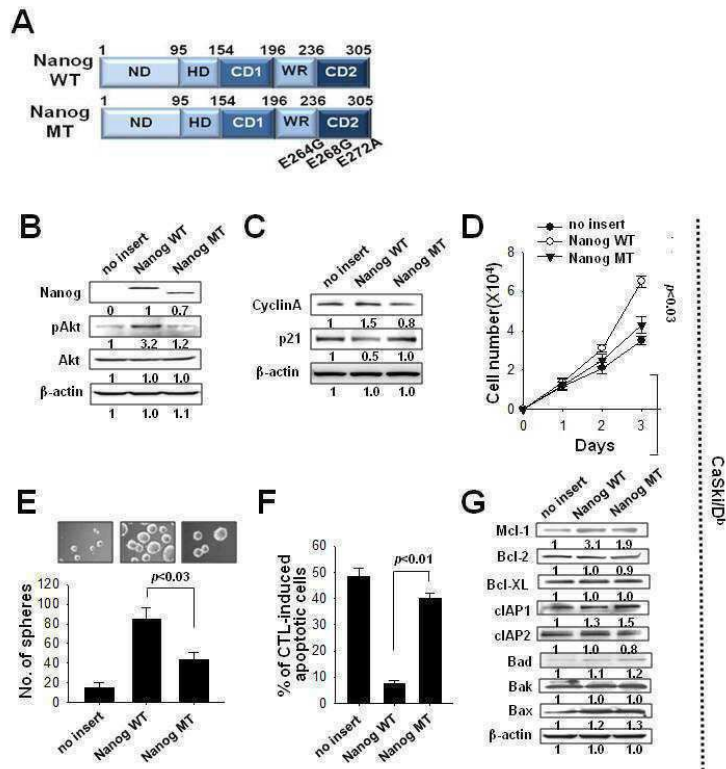
도면10



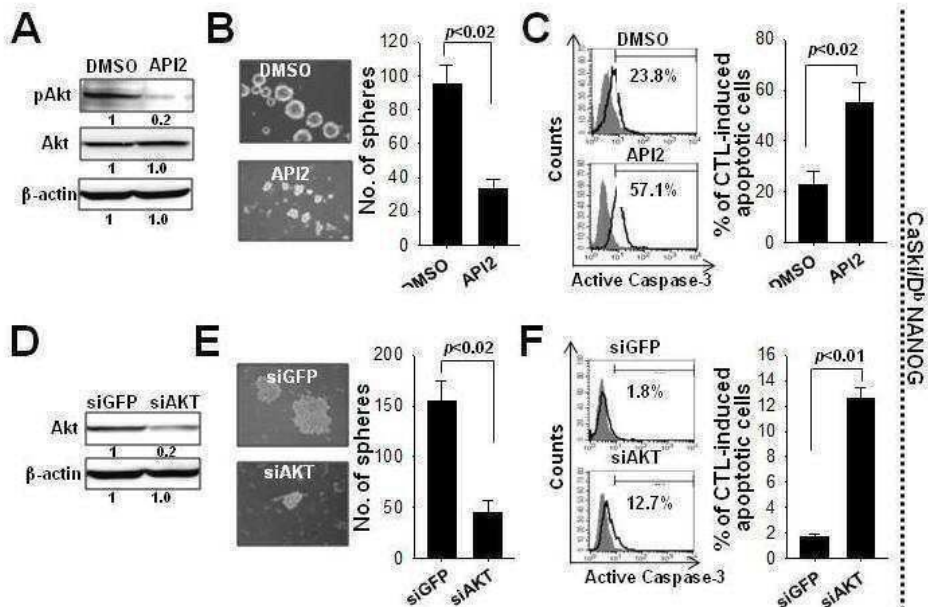
도면11



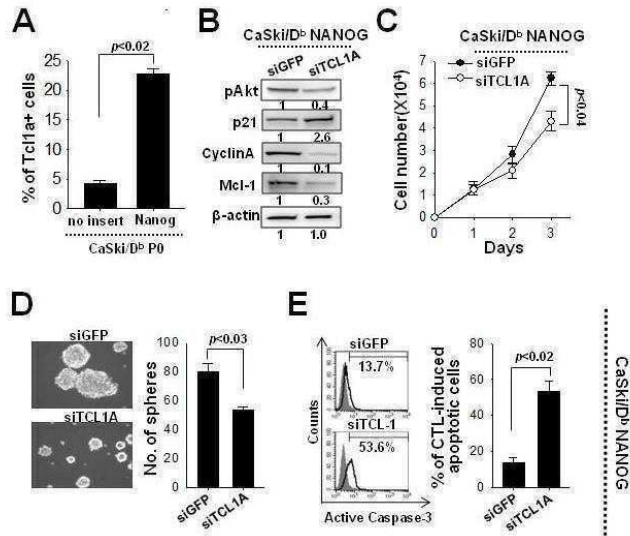
도면12



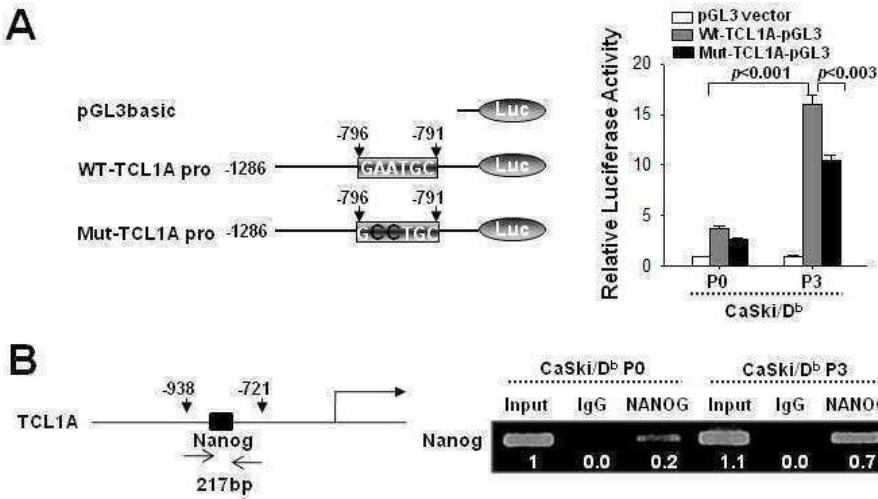
도면13



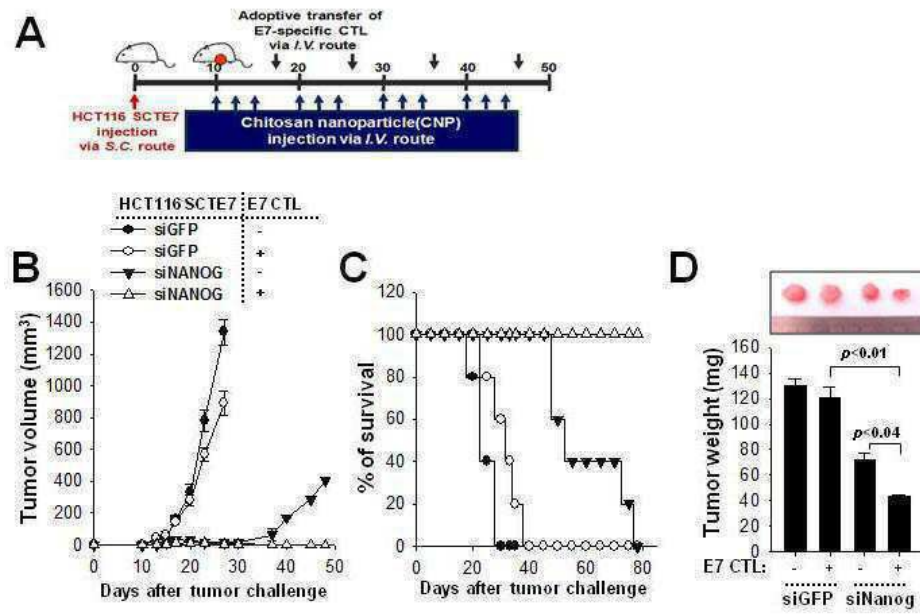
도면14



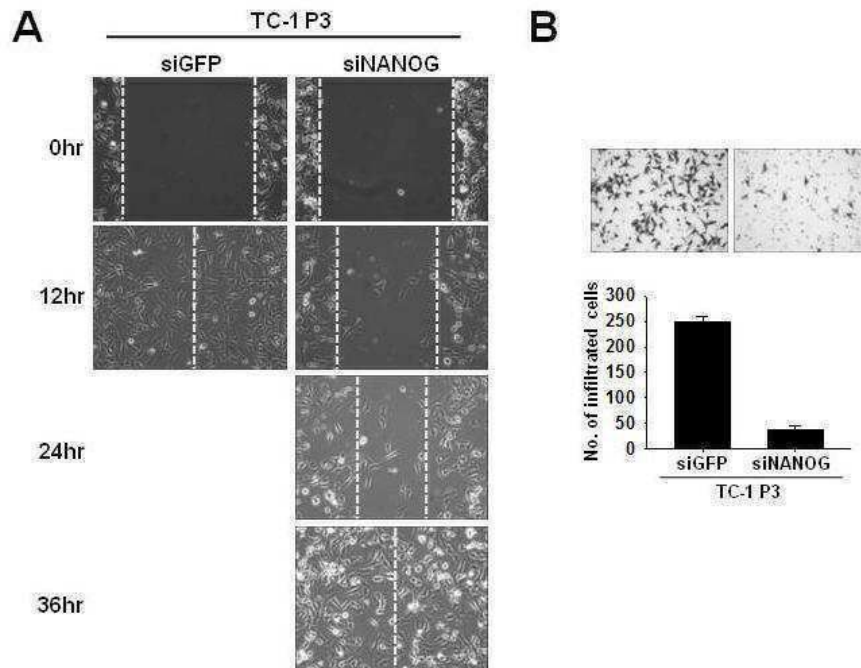
도면15



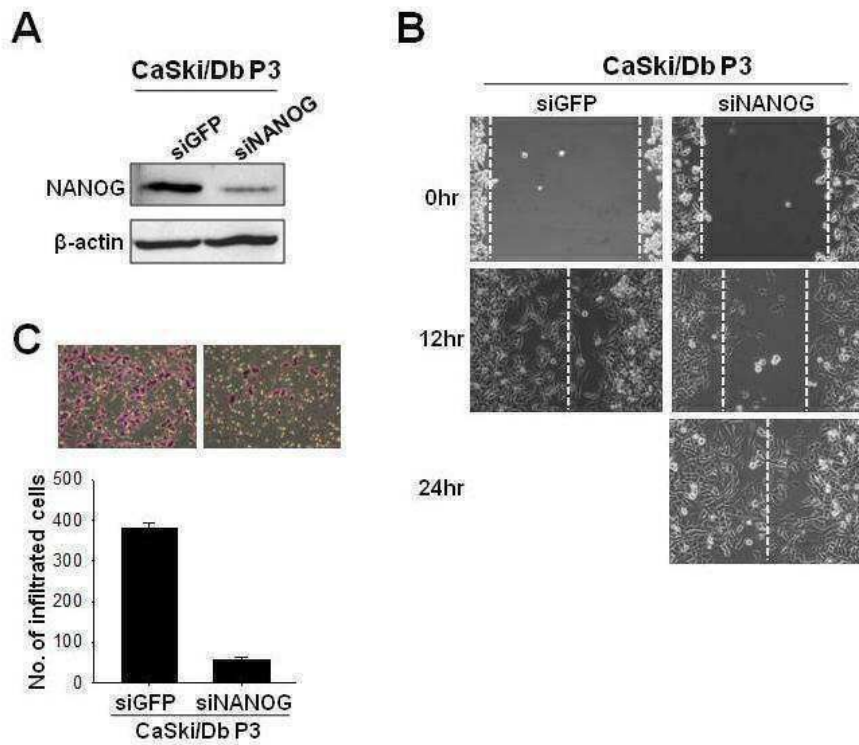
도면16



도면17



도면18



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Composition for prevention or treating recurrent or metastatic cancer having immunoresistance
- <130> P11-120626-01
- <160> 42
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> siRNA
- <400> 1
- ccacaagccu uggaauuuuu u
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

uugguguucg gaaccuuaau a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 3

gacuccacca ggugaaauau u

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

uucugaggug guccacuuua u

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 5

cccgagaacu auucuugcuu u

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 6

uugggcucuu gauaagaacg a

21

<210> 7

<211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	7	
cacucaagga cagguuuc	u	21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	8	
uugugaguuc cuguccaaag	u	21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	9	
cagcauccau ugcagcuauu	u	21
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	10	
uugucguagg uaacgucgau	a	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	11	
ccuccaugga ucugcuuauu	u	21

<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	12	
uuggagguac cuagacgaau a		21
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	13	
ccacaaacca uggauuuauu u		21
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	14	
uugguguuug guaccuaau a		21
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	15	
gggaaggccu uaauguaauu u		21
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	16	

uucccuuccg gaauuacauu a

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 17

ccagcugugu guacucauuu u

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 18

uuggucgaca cacaugaguu a

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 19

ggaaggccuu aauguaauu u

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 20

uuccuuccgg aaauacauua u

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	siRNA	
<400>	21	
	guggucaugu acgagaugau u	21
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	22	
	uucaccagua caugcucuac u	21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	23	
	gcaccuucan uggucaacu u	21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	24	
	uucguggaag uaaccgaug u	21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	25	
	cgggcacauu aagaucacu u	21
<210>	26	
<211>	21	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	26	
	uugcccgugu aaucucagug u	21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	27	
	gcuacuuccu ccucaagaau u	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	28	
	uucgaugaag gaggaguucu u	21
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	29	
	gccaugaaga uccucaagau u	21
<210>	30	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	30	
	uucgguacuu cuaggaguuc u	21
<210>	31	

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 31
 gggcuaaaagu gaccaugaau u 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 32
 uucccgauuu cacugguacu u 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 33
 gcuccuucan ugguuacaau u 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 34
 uucgaggaag uaaccaugu u 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 35

gguucuuccu cagcaucaau u	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA	
<400> 36	
uuccaagaag gagucguagu u	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA	
<400> 37	
gccacaucaa gaucacugau u	21
<210> 38	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA	
<400> 38	
uucgguguag uucuagugac u	21
<210> 39	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA	
<400> 39	
cccuuaacca ucgagauau u	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA	

<400> 40

uugggaauug guagcucuau u

21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 41

cgcuuagugu accacaucau u

21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 42

uugcgaauc caugguguag u

21