

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0049707
(43) 공개일자 2024년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/10 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/10 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0128573

(22) 출원일자 2022년10월07일

심사청구일자 2022년10월07일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

디어젠 주식회사

대전광역시 서구 청사로 136, 18층 R1846호 (월평동)

(72) 발명자

안영호

서울특별시 강서구 양천로 344, B동 706호(마곡동)

이시은

경기도 고양시 일산서구 킨텍스로 255, 103동 4901호(대화동)

박성수

경기도 용인시 기흥구 동백1로 12, 5101동 902호(중동, 초당마을삼부르네상스아파트)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

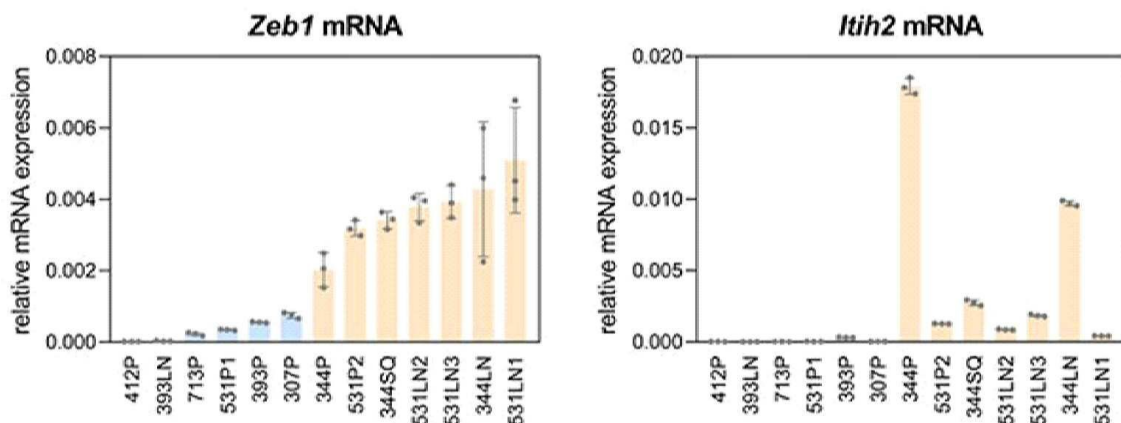
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 ITIH2 억제제의 암 예방 또는 치료 용도

(57) 요약

일 양상은 ITIH2 억제제의 암 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다. 일 양상에 따르면, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)
A61K 31/7105 (2013.01)
A61K 38/08 (2021.08)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157435
과제번호	2022R1A2C1003150
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	폐암 미세환경에서 히알루론산 네트워크 조절을 통한 항암 전략 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711170342
과제번호	2020R1A5A2019210
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	염증-암 미세환경 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 포함하는 상피암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 ITIH2 억제제는 화합물, shRNA, miRNA, siRNA, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 화합물은 아파멜라노타이드(Afamelanotide), 신칼라이드(Sincalide) 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염인, 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 19 내지 23의 염기 서열 중 어느 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드인, 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 ITIH2 억제제는 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 ITIH2 억제제는 상피암 세포 내 히알루론산(hyaluronic acid)의 양을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 ITIH2 억제제는 ZEB1(Zinc finger E-box-binding homeobox 1) 유전자의 발현을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 ZEB1은 상기 ITIH2 유전자의 프로모터 영역과 결합하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 2 또는 3에 있어서, 상기 아파멜라노타이드(Afamelanotide) 또는 상기 신칼라이드(Sincalide)는 1 내지

100 mg/ml의 농도로 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 상피암은 피부암, 구강암, 식도암, 위암, 간암, 췌장암, 대장암, 직장암, 폐암, 방광암, 난소암 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암인, 약학적 조성물.

청구항 11

ITI2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 포함하는 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] ITI2 억제제의 암 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간의 몸을 구성하고 있는 가장 작은 단위인 세포는 정상적일 때 세포 내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하면서 세포 수 균형을 유지한다. 그러나 여러 가지 이유로 인해 이러한 증식과 억제가 조절되지 않는 비정상적인 세포들이 과다하게 증식할 뿐만 아니라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴 형성 및 정상 조직의 파괴를 초래하는 상태를 암(cancer)이라 정의한다. 암은 이렇듯 억제가 안 되는 세포의 증식으로, 정상적인 세포와 장기의 구조와 기능을 파괴하기에 그 진단과 치료의 중요성은 매우 크다.

[0004] 그 중, 폐암은 국내에서 발생률 및 사망률이 높으며, 전 세계적으로도 암과 관련된 사망의 주요 원인으로 나타난다. 폐암의 사망률이 높은 이유는 확실한 조기 진단 마커가 존재하지 않고, 전이 빈도가 매우 높기 때문이다.

[0005] 한편, 여러 연구에서 종양미세환경이 암 발생 및 전이에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다. 폐암을 비롯한 상피성 암에서 종양미세환경은 암 세포 외에 종양을 구성하는 섬유아세포, 면역세포, 혈관세포, 세포외기질 등으로 구성된다. 상기 종양미세환경에서 각 세포 간의 직접적인 접촉 또는 다양한 사이토카인이나 성장인자를 매개로 한 간접적인 상호작용에 의해 암 세포의 성장, 이동, 침윤 및 전이가 조절되는 것으로 알려져 있다. 또한, 종양미세환경은 다양한 방식으로 항암제에 대한 내성 또는 보호막으로 작용할 수 있어, 암의 억제 내성 획득 과정에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 기존의 암 세포 타겟 전략만으로는 효과적인 암 치료에 한계가 존재하며, 이를 극복하기 위해서는 종양미세환경을 타겟하는 새로운 항암 전략의 개발이 필요하다.

[0006] 특히, 종양미세환경은 면역세포 및 암세포의 침투를 촉진하고, 저산소증을 유도하며, 암 줄기세포를 자극하는 등 다양한 신호 및 환경을 제공하여 암 세포의 EMT를 촉진할 수 있다. EMT(Epithelial-to-Mesenchymal transition)란 암 세포 전이 초기 단계에서 나타나며, 세포 부착 감소, 세포 극성 소실, 세포외기질 재구성, 세포의 이동 또는 침윤성 증진 등의 현상을 수반함으로써 암 전이를 촉진할 수 있다. EMT로 활성화된 암 세포는 다시 주변 종양미세환경을 암 친화적으로 조성하여 암 성장 및 전이가 일어나도록 유도할 수 있다. 따라서, EMT와 관련된 다양한 전사 조절 인자, 신호전달계, 사이토카인, 성장인자, miRNA 등이 암의 전이 능력 진단 및 예방 마커, 항암 치료제 개발의 유용한 타겟이 될 수 있다.

[0007] 한편, 종양미세환경의 세포외기질 또한 세포 간 신호 전달, 물질 수송, 대사, 면역 반응 등에서 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 종양미세환경의 세포외기질은 단백질(콜라겐 등), 프로테오글리칸(헤파란 설페이트 등), 다당류(히알루론산 등) 등을 주요 구성 성분으로 하는데, 이 중 히알루론산은 세포외기질을 조직화하여 암 세포의 증식 및 이동을 촉진하고 면역세포들을 끌어들이는 역할을 수행한다. 히알루론산은 합성과 분해, 다른 세포외기질과의 결합, 해당 수용체와의 결합을 통한 세포 내 신호 전달 등 다양한 방식으로 조절될 수 있는

데, 구체적으로, 합성의 경우, 세포막의 히알루론산 합성효소(Hyaluronan synthase, HAS)가 글루코사민(glucosamine) 및 글루쿠론산염(glucuronate)의 단위체를 사슬로 엮어 히알루론산을 합성하여 세포 밖으로 배출한다. 이때, 사슬 길이(분자량)에 따라 고분자 또는 저분자 히알루론산으로 구분된다. 히알루론산 분해효소인 Hyaluronidase가 히알루론산 사슬을 절단할 경우 히알루론산이 분해되는데, 이 경우 조직 침투성을 증가시켜 약제의 수송을 증진시킬 수 있다. 또한, 히알루론산은 CD44, RHAMM 등 세포 표면 수용체와 결합하여 Src/FAK, MAPK 등 세포 내 신호 전달계를 활성화시킬 수 있으며, versican, ITIH(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain) 등과의 결합으로 히알루론산 케이블을 형성하여 성장인자나 사이토카인을 포획하고 면역세포를 유인할 수 있다. 이와 같이, 히알루론산은 수분 항상성의 유지, 세포와 기질 간 상호작용, 조직 손상 치유, 염증, 혈관 신생, 세포 증식 및 이동 등 다양한 세포 생리적 현상에 관여하며, 암에서 히알루론산이 비정상적으로 조절될 경우, 면역세포 또는 섬유아세포 등의 기질 세포의 유인, 혈관 및 림프관의 신생, 염증 반응 등에 이상이 초래될 수 있어, 암 발생 및 전이를 촉진할 수 있다.

[0008] 이에, 종양미세환경을 조성하여 암 발생 및 전이를 촉진하는 히알루론산을 타겟하는 억제제를 개발하고자 연구한 결과, 히알루론산과 결합하는 단백질인 ITIH2를 억제할 경우 상피암의 발생 및 전이가 치료됨을 확인함으로써, ITIH2 억제제의 상피암 예방 또는 치료 용도를 개발하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0001598호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 일 양상은 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 포함하는 상피암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 다른 양상은 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 포함하는 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상피암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 양상은 상피암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 일 양상은 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 포함하는 상피암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 "ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)"는 ITIH 단백질을 구성하는 헤비 체인 중 하나로서, 히알루론산(hyaluronic acid)과 결합하여 히알루론산 네트워크를 형성함으로써 암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 유발한다.

[0018] 일 양상에 따르면, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[0019] 상기 "이동(migration)"은 암 세포가 특정 신호에 반응하여 특정 위치로 옮겨가는 현상을 의미하고, 상기 "전이(metastasis)"는 악성종양이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 전파한 상태를 의미하며, 상기 "침윤(invasion)"은 암 세포가 근처 다른 조직으로 확장되어 관통하는 현상을 의미한다.

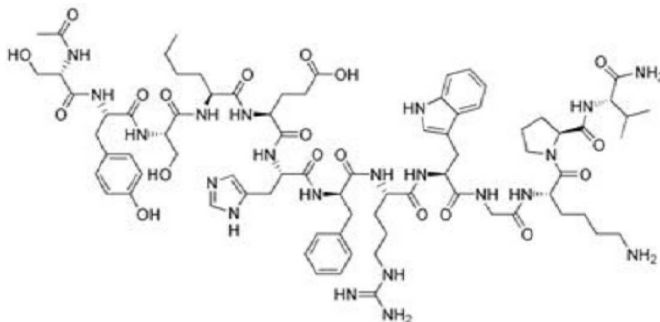
[0020] 상기 "히알루론산(hyaluronic acid)"은 종양미세환경의 세포외기질의 주요 구성 성분 중 하나인 다당류이다. 상기 히알루론산은 ITIH 단백질 등과 결합하여 히알루론산 네트워크를 형성함으로써, 암 발생, 증식, 이동 및 전이를 촉진할 수 있다.

[0021] 상기 "ITIH2 억제제"는 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 ITIH2 유전자 또는 단백질의 기능을 억제하는 핵산, 단백질 또는 화합물 등을 의미한다. 구체적으로, 상기 "ITIH2 억제제"는 ITIH2 유전자의 발현 또는 상기 유전자가 코딩하는 mRNA의 발현 또는 상기 mRNA가 코딩하는 단백질의 발현을 억제할 수 있는 핵산, 단백질 또는 화합물 등을 포함할 수 있고, ITIH2 유전자의 활성 또는 상기 유전자가 코딩하는 mRNA의 활성 또는 상기 mRNA가 코딩하는 단백질의 활성을 억제할 수 있는 핵산, 단백질 또는 화합물 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 ITIH2의 억제는 유전자 교정 수단(예를 들어, CRISPR/Cas9 시스템)에 의해 ITIH2 유전자의 일부 또는 전부를 변이, 치환 또는 삭제시키거나, 상기 ITIH2 유전자에 하나 이상의 염기를 삽입함으로써 이루어질 수도 있다.

[0022] 구체적으로, 상기 ITIH2 억제제는 화합물, shRNA, miRNA, siRNA, 항체 및 aptamer로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 ITIH2 억제제가 화합물일 경우, 아파멜라노타이드(Afamelanotide), 신칼라이드(Sincalide) 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있다.

[0023] 상기 아파멜라노타이드(Afamelanotide, CAS No: 75921-69-6)는 FDA 승인 약물로서, 하기 화학식 1의 구조를 가지며, IUPAC name은 N-acetyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-norleucyl-L-α-glutamyl-L-histidyl-D-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophylglycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valinamide이다:

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 일 양상에 따르면, 상기 아파멜라노타이드는 히알루론산 결합단백질인 ITIH 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 아파멜라노타이드는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

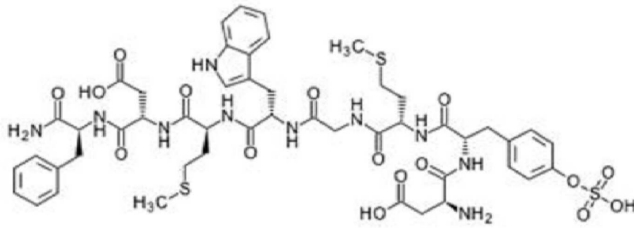
[0027] 일 양상에 있어서, 상기 아파멜라노타이드는 1 내지 100 mg/ml의 농도로 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기 아파멜라노타이드는 1 내지 20 mg/ml, 1 내지 40 mg/ml, 1 내지 60 mg/ml, 1 내지 80 mg/ml, 1 내지 100 mg/ml, 20 내지 40 mg/ml, 20 내지 60 mg/ml, 20 내지 80 mg/ml, 20 내지 100 mg/ml, 40 내지 60 mg/ml, 40 내지 80 mg/ml, 40 내지 100 mg/ml, 60 내지 80 mg/ml, 60 내지 100 mg/ml 또는 80 내지 100 mg/ml의 농도로 투여될 수 있다.

[0028] 상기 아파멜라노타이드가 1 mg/ml 미만의 농도로 투여될 경우, 유효성분이 부족하여 상피암의 예방 또는 치료 효과가 미약할 수 있으며, 100 mg/ml를 초과하는 농도로 투여될 경우, 투여된 유효성분 농도 대비 상피암의 예방 또는 치료 효율이 감소하거나, 상피암 주변의 정상 세포에 독성을 유발할 수 있으므로, 상기 아파멜라노타이드가 1 내지 100 mg/ml의 농도로 투여되는 것이 상피암의 예방 또는 치료에 효과적이다.

[0029] 상기 신칼라이드(Sincalide, CAS No: 25126-32-3)는 FDA 승인 약물로서, 하기 화학식 2의 구조를 가지며,

IUPAC name은 α -aspartyl-O-sulfonyltyrosylmethionylglycyltryptophylmethionyl- α -aspartylphenylalaninamide 이다:

[0030] [화학적식 2]



[0031]

[0032] 일 양상에 따르면, 상기 신칼라이드는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 신칼라이드는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[0033] 일 양상에 있어서, 상기 신칼라이드는 1 내지 100 mg/ml의 농도로 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기 신칼라이드는 1 내지 20 mg/ml, 1 내지 40 mg/ml, 1 내지 60 mg/ml, 1 내지 80 mg/ml, 1 내지 100 mg/ml, 20 내지 40 mg/ml, 20 내지 60 mg/ml, 20 내지 80 mg/ml, 20 내지 100 mg/ml, 40 내지 60 mg/ml, 40 내지 80 mg/ml, 40 내지 100 mg/ml, 60 내지 80 mg/ml, 60 내지 100 mg/ml 또는 80 내지 100 mg/ml의 농도로 투여될 수 있다.

[0034] 상기 신칼라이드가 1 mg/ml 미만의 농도로 투여될 경우, 유효성분이 부족하여 상피암의 예방 또는 치료 효과가 미약할 수 있으며, 100 mg/ml를 초과하는 농도로 투여될 경우, 투여된 유효성분 농도 대비 상피암의 예방 또는 치료 효율이 감소하거나, 상피암 주변의 정상 세포에 독성을 유발할 수 있으므로, 상기 신칼라이드가 1 내지 100 mg/ml의 농도로 투여되는 것이 상피암의 예방 또는 치료에 효과적이다.

[0035] 상기 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 의학적 또는 수의학적으로 과량의 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 합병증 없이 인간 또는 동물에 사용하기에 적합한 상태를 의미하며, 상기 용어 "염"은 상기 아파멜라노타이드(Afamelanotide) 또는 신칼라이드(Sincalide)로 산 또는 염기 염을 제조함으로써 변형된 상기 화합물들의 유도체를 의미한다.

[0036] 일 양상에 있어서, 상기 염은 다양한 유기산 또는 무기산에 의해 형성된 산 부가염을 사용할 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 다이카복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 무독성 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디온산, 벤조산, 클로로벤조산, 메틸벤조산, 디니트로 벤조산, 하이드록시 벤조에이트, 메톡시벤조산, 프탈산, 테레프탈레이트, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 클로로벤젠설폰산, 크실렌설폰산, 페닐아세트산, 페닐프로피온산, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설폰네이트, 프로판설폰네이트, 나프탈렌-1-설폰네이트, 나프탈렌-2-설폰네이트, 만델레이트, 트라이플루오로아세트산 등을 사용하여 제조할 수 있다.

[0037] 또한, 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 상기 아파멜라노타이드(Afamelanotide) 또는 신칼라이드(Sincalide)를 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0038] 일 양상에 있어서, 상기 ITIH2 억제제가 shRNA일 경우, 상기 shRNA는 서열번호 19 내지 23의 염기 서열 중 어느

하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

- [0039] 상기 shRNA는 헤어핀 구조를 포함하는 인공 RNA로, 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 박테리아 벡터 등의 벡터를 통해 세포에 형질감염될 수 있고, 형질감염된 세포에서 표적 mRNA를 절단하거나 표적 mRNA의 번역을 억제함으로써, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 구체적으로, 상기 shRNA는 렌티바이러스 벡터 pLK0.1에 삽입되어, 세포를 형질감염시킴으로써 ITIH2 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [0040] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 shRNA는 상기 서열번호 19 내지 23의 염기 서열 중 어느 하나의 염기 서열과 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 가지는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0041] 상기 "상동성"은 야생형 염기 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.
- [0042] 일 양상에 따르면, 상기 shRNA는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 shRNA는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0043] 일 양상에 있어서, 상기 ITIH2 억제제는 ZEB1(Zinc finger E-box-binding homeobox 1) 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 상기 ZEB1 유전자의 발현은 ZEB1 유전자의 발현 또는 상기 유전자가 코딩하는 mRNA의 발현 또는 상기 mRNA가 코딩하는 단백질의 발현을 모두 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 ZEB1은 발생 과정에 중요한 역할을 하는 전사조절인자로서, 대부분의 상피암에서 EMT(Epithelial-to-Mesenchymal transition) 및 전이를 강력하게 촉진하는 것으로 알려져 있다.
- [0045] 일 양상에 있어서, 상기 ZEB1은 상기 ITIH2 유전자의 프로모터 영역과 결합할 수 있고, 구체적으로 상기 ITIH2 유전자의 프로모터 영역 내 site-1 및 site-2 영역에 결합할 수 있다. 상기 ZEB1은 상기 ITIH2 유전자의 프로모터 영역과 결합함으로써, ITIH2 유전자의 발현을 증진시킬 수 있다.
- [0046] 일 양상에 따르면, 상기 ITIH2 억제제는 ZEB1 유전자의 발현을 억제함으로써, 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제할 수 있다. 이를 통해, 상기 ITIH2 억제제는 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0047] 상기 "상피암"은 상피조직에서 발생하는 암을 의미하며, 비상피성 조직인 혈관, 지방, 근육, 연골, 뼈 또는 신경조직에서 발생하는 암과 구분된다. 일 양상에 있어서, 상기 상피암은 피부암, 구강암, 식도암, 위암, 간암, 췌장암, 대장암, 직장암, 폐암, 방광암, 난소암 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암일 수 있고, 구체적으로 상기 상피암은 폐암일 수 있다. 상기 폐암은 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 폐선암, 폐편평상피암 및 폐대세포암을 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 용어 "예방"이란 상피암의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 상기 용어 "치료"란 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 상피암이 호전되거나 이렇게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0049] 상기 용어 "투여"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 약학적 조성물을 개체에게 물리적으로 도입하는 것을 의미한다.
- [0050] 상기 용어 "개체"란 상피암의 치료를 필요로 하는 대상을 의미한다. 구체적으로, 상기 개체는 인간 또는 영장류, 생쥐, 쥐, 개, 고양이, 말, 돼지, 토끼 및 소 등의 포유류일 수 있다.
- [0051] 상기 "약학적 조성물"은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0052] 구체적으로, 상기 담체는 예를 들어, 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres)

또는 나노 구형입자일 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세 입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.

[0053] 상기 약학적 조성물이 제제화될 경우에는 통상적으로 사용하는 윤활제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 이러한 고형제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있고, 점안제 형태로 제조 시 공지의 희석제 또는 부형제 등이 사용될 수 있다.

[0054] 상기 약학적 조성물은 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 동맥내 주사, 골수내 주사, 심장내 주사, 경막내 주사, 경피주사, 비강내 주사, 장관내 주사, 국소주사, 설하 주사, 또는 흉부내 주사 주입방식과 같은 비경구 투여 및 경구 투여가 가능할 수 있다.

[0055] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0056] 상기 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다. 예를 들어, 격일로 투여되는 것일 수도 있으며, 일주일에 하루 투여되는 것일 수도 있다.

[0057] 상기 약학적 조성물은 종래에 알려져 있는 상피암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 새롭게 개발되는 상피암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 혼합되어 제공될 수 있다. 상기 약학적 조성물이 상피암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 더 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0058] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 약학적 조성물은 단독 투여 또는 다른 상피암 치료제와 병용 투여되는 것일 수 있다. 즉, 상기 약학적 조성물은 상피암의 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 조성물 또는 다른 상피암 치료제와 병행하여 투여될 수 있고, 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0059] 일 실시예에 따르면, 마우스 폐암 세포 13종에서 전사조절인자인 ZEB1 및 히알루론산 결합단백질인 ITIH2의 mRNA 및 단백질 발현양을 비교한 결과, ZEB1 및 ITIH2 mRNA 및 단백질의 발현은 간엽성 세포에서 상대적으로 높고, 상피성 세포에서 상대적으로 낮음을 확인하였고, ZEB1 및 ITIH2 mRNA의 발현 사이에 양의 상관관계가 존재함을 확인하였다. 또한, 폐선암 환자 515명의 TCGA RNA-seq 데이터를 이용해 Spearman correlation 분석으로 상관관계 분석을 수행한 결과, 상기 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA의 발현 사이에 양의 상관 관계가 존재함을 확인하였다(실시예 1 참조).

[0060] 다른 실시예에 따르면, ZEB1을 과발현시킬 경우 ITIH2 mRNA의 발현이 크게 증가하고, ZEB1을 녹다운시킬 경우 ITIH2 mRNA 및 단백질의 발현이 현저하게 감소하여, ZEB1이 ITIH2의 발현을 조절함을 확인하였다. 이후, ZEB1이 ITIH2 발현을 조절하는 기작을 확인하기 위해, ITIH2 유전자의 프로모터 영역을 차례로 결실(deletion)시킨 프로모터 루시퍼레이즈 리포터를 제작하였고, 이를 ZEB1 과발현 벡터와 함께 폐암 세포에 형질감염시킨 뒤, 루시퍼레이즈 활성을 비교하였다. 그 결과, ITIH2 프로모터 영역 내 site-1 및 site-2를 통해 ZEB1이 ITIH2를 활성화시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, site-1 및 site-2가 돌연변이된 mut-1 및 mut-2가 ITIH2 프로모터 영역에 모두 존재할 경우, ZEB1에 의한 ITIH2 프로모터의 활성화가 나타나지 않음을 확인하여, ZEB1이 site-1 및 site-

2에 작용하는 것임을 검증하였다. 추가적으로, ZEB1이 실제로 염색체 DNA 상 ITIH2 프로모터의 site-1 및 site-2 영역에 결합하는지 확인하기 위하여, ChIP 어세이로 ZEB1이 결합된 DNA 단편을 회수하였고, 회수된 DNA 단편과 site-1 및 site-2 영역을 타겟하는 프라이머 세트를 이용해 PCR을 수행하였다. 그 결과, site-1 및 site-2 영역과 일치하는 크기의 PCR 산물이 나타남을 확인하여, ZEB1이 실제로 site-1 및 site-2 영역에 결합하여 작용하는 것임을 검증하였다(실시예 2 참조).

[0061] 또 다른 실시예에 따르면, ITIH2의 발현을 억제할 경우, 폐암 세포의 이동 및 전이가 억제되는지 확인하기 위하여, 5종류의 ITIH2 shRNA를 이용하여 ITIH2 녹다운 폐암 세포를 제조하였다. 이후, 세포의 이동성을 측정할 수 있는 Boyden 챔버 어세이 및 상처 치유(wound-healing) 어세이를 수행한 결과, ITIH2 녹다운 폐암 세포의 이동성이 대조군 폐암 세포 대비 크게 감소함을 확인하였다. 또한, 동형유전자형 마우스(129/Sv) 왼쪽 폐에 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운 폐암 세포를 동소에 주입(orthotopic injection)한 뒤, 원발암 및 전이암의 노들수를 카운팅한 결과, ITIH2 녹다운 폐암 세포 주입 시 원발암 생성 능력 및 전이 능력이 크게 감소함을 확인하였다. 동형유전자형 마우스(129/Sv) 오른쪽 옆구리에 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운 폐암 세포를 피하에 주입(subcutaneously injection)한 뒤, 원발암 크기 및 전이암의 노들수를 측정한 결과, ITIH2 녹다운 폐암 세포 주입 시 원발암 생성 능력은 대조군에 비해 큰 차이가 없었으나, 폐로의 전이 능력은 크게 감소함을 확인하였다. 추가적으로, ITIH2 발현을 억제할 경우, 히알루론산의 발현 및 분포가 억제되는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 실험 결과, 폐암 세포에서 세포외기질 내 히알루론산 발현 정도가 크게 증가되었으나, ITIH2 녹다운 폐암 세포에서는 히알루론산의 발현 및 분포가 대조군에 비해 크게 감소하였으며, ITIH2 과발현 폐암 세포에서는 히알루론산의 발현 및 분포가 대조군에 비해 크게 증가함을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0062] 또 다른 실시예에 따르면, 심충신경망 머신러닝으로 약물-타겟 상호작용을 예측하는 방법을 이용하여, FDA 승인 약물들 중 ITIH2의 활성을 억제할 것으로 예측되는 후보 약물들을 선별하였고, 상기 약물들이 폐암 세포의 이동 및 침윤을 억제하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 후보 약물들로 Afamelanotide 및 Sincalide가 선별되었고, 상기 약물들의 폐암 세포 이동 억제 효과 및 침윤 억제 효과를 확인하기 위해, 각각 Boyden 챔버 어세이 및 스페로이드(spheroid) 침윤 어세이를 수행하였다. 그 결과, 344SQ 폐암 세포에 Afamelanotide를 처리할 경우, 폐암 세포의 이동성은 크게 감소되었으나, 침윤성은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 344SQ 폐암 세포에 Sincalide를 처리할 경우에는, 폐암 세포의 이동성 및 침윤성이 크게 감소됨을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0064] 다른 양상은 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 포함하는 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0065] 상기 "ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)", "ITIH2 억제제", "상피암", "예방" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0066] 일 양상에 따르면, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 개선에 유용하게 활용될 수 있다.

[0067] 상기 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이때, 상기 건강기능식품은 상피암의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질병의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.

[0068] 상기 건강기능식품에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 건강기능식품은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[0069] 상기 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제,

분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

[0070] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0071] 상기 건강기능식품은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0072] 상기 외에도, 일 양상에 따른 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. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0073] 상기 건강기능식품은 종래에 알려져 있는 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 또는 새롭게 개발되는 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품과 혼합되어 제공될 수 있다. 상기 건강기능식품이 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 더 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0074] 또한, 상기 건강기능식품은 단독 섭취 또는 상기 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품과 병용 섭취되는 것일 수 있다. 상기 건강기능식품은 상피암의 예방 또는 개선 효과를 가지는 공지의 조성물 또는 다른 상피암의 예방 또는 개선용 건강기능식품과 병행하여 섭취될 수 있고, 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 섭취될 수 있으며, 단일 또는 다중 섭취될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 섭취하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0076] 또 다른 양상은 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상피암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0077] 상기 "ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)", "ITIH2 억제제", "개체", "투여", "상피암", "예방", "치료" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0078] 일 양상에 따르면, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[0080] 또 다른 양상은 상피암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 억제제의 용도를 제공한다.

[0081] 상기 "상피암", "예방", "치료", "ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)", "ITIH2 억제제" 등

은 전술한 범위 내일 수 있다.

발명의 효과

[0083] 일 양상에 따르면, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 결합단백질인 ITIH2 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 상피암 세포 내 ITIH2 단백질의 히알루론산과의 결합, 즉, 히알루론산 네트워크의 형성을 억제할 뿐만 아니라, 상피암 세포 내 히알루론산의 합성을 저해하거나 히알루론산의 분해를 촉진시켜, 상피암 세포 내 히알루론산의 양도 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 ITIH2 억제제는 히알루론산 네트워크 형성을 감소시키거나 히알루론산의 양을 감소시킴으로써 상피암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 수 있고, 이에 따라 상피암의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1a는 마우스 폐암 세포 13종에서 측정된 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA 발현양을 나타낸다.
 도 1b는 마우스 폐암 세포 13종에서 측정된 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA 발현 간 상관관계를 나타낸다.
 도 2는 마우스 폐암 세포 13종에서 측정된 ZEB1 및 ITIH2의 단백질 발현양을 나타낸다.
 도 3은 폐선암 환자 515명의 TCGA RNA-seq 데이터로 확인한 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA 발현 간 상관관계를 나타낸다.
 도 4는 대조군 폐암 세포 및 ZEB1 과발현 폐암 세포에서의 ITIH2 mRNA 발현양을 나타낸다.
 도 5a는 대조군 폐암 세포 및 ZEB1 녹다운 폐암 세포에서의 ITIH2 mRNA 발현양을 나타낸다.
 도 5b는 대조군 폐암 세포 및 ZEB1 녹다운 폐암 세포에서의 ITIH2 단백질 발현양을 나타낸다.
 도 6은 ITIH2 유전자의 프로모터 영역을 차례로 결실(deletion)시킨 프로모터별 ZEB1 과발현에 따른 루시퍼레이즈 활성 정도를 나타낸다.
 도 7은 ITIH2 유전자의 프로모터 영역 내 site-1 및 site-2를 모두 돌연변이시킨 후 측정된 ZEB1 과발현에 따른 루시퍼레이즈 활성 정도를 나타낸다.
 도 8은 ChIP(Chromatin immunoprecipitation) 어세이로 ZEB1과 결합한 DNA 단편을 회수하고, site-1 및 site-2를 타겟하는 프라이머를 이용해 PCR로 증폭하여 확인한 PCR 증폭 산물을 나타낸다.
 도 9a는 대조군 폐암 세포 및 ITIH2 녹다운 폐암 세포에서의 ITIH2 mRNA 발현양을 나타낸다.
 도 9b는 대조군 폐암 세포 및 ITIH2 녹다운 폐암 세포에서의 ITIH2 단백질 발현양을 나타낸다.
 도 10은 대조군 폐암 세포 및 ITIH2 녹다운 폐암 세포에서 Boyden 챔버 어세이로 측정된 폐암 세포의 이동 활성을 나타낸다.
 도 11은 대조군 폐암 세포 및 ITIH2 녹다운 폐암 세포에서 상처 치유(wound-healing) 어세이로 측정된 폐암 세포의 이동 활성을 나타낸다.
 도 12는 동형유전자형 마우스(129/Sv)의 왼쪽 폐에 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운 폐암 세포를 동소에 주입(orthotopic injection)한 후 측정된 원발암 및 전이암의 노드 수를 나타낸다.
 도 13은 동형유전자형 마우스(129/Sv)의 오른쪽 옆구리에 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운 폐암 세포를 피하에 주입(subcutaneously injection)한 후 측정된 원발암 크기 및 전이암의 노드 수를 나타낸다.
 도 14는 상피성 폐암 세포 393P 및 간엽성 폐암 세포 344SQ를 스크래치 처리한 후 측정된 히알루론산의 발현 및 분포 정도를 나타낸다.
 도 15는 대조군 폐암 세포 및 ITIH2 녹다운 폐암 세포에서 측정된 히알루론산 발현 및 분포 정도를 나타낸다.
 도 16은 대조군 폐암 세포 및 ITIH2 과발현 폐암 세포에서 측정된 히알루론산 발현 및 분포 정도를 나타낸다.
 도 17은 344SQ 폐암 세포에 Afamelanotide를 처리한 후 Boyden 챔버 어세이로 측정된 폐암 세포의 이동 활성을

나타낸다.

도 18은 344SQ 폐암 세포에 Afamelanotide를 처리한 후 스페로이드(spheroid) 침윤 어세이로 측정한 폐암 세포의 침윤성을 나타낸다.

도 19는 344SQ 폐암 세포에 Sincalide를 처리한 후 Boyden 챔버 어세이로 측정한 폐암 세포의 이동 활성을 나타낸다.

도 20은 344SQ 폐암 세포에 Sincalide를 처리한 후 스페로이드(spheroid) 침윤 어세이로 측정한 폐암 세포의 침윤성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0088] 실시예

[0089] 실시예 1. 폐암 세포에서 ZEB1(Zinc finger E-box-binding homeobox 1)과 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2) 발현 간 양의 상관관계 확인

[0090] ZEB1(Zinc finger E-box-binding homeobox 1)은 발생 과정에 중요한 역할을 하는 전사조절인자로서, 암 세포에서 EMT(Epithelial-to-Mesenchymal transition)를 유도하는 강력한 인자로 폐암을 비롯한 대부분의 상피성 암에서 상피성 마커인 E-cadherin 및 miRNA-200의 발현을 억제함으로써 EMT 및 전이를 강력하게 촉진한다. 상기 ZEB1은 전이성 암 조직에서 상대적으로 높게 발현되며, 대부분의 암종에서 ZEB1 발현이 높은 환자는 나쁜 예후를 보이는 것으로 알려져 있다.

[0091] 폐암 세포에서 ZEB1의 발현과 히알루론산 결합단백질인 ITIH2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2)의 발현 간의 상관관계가 존재하는지 확인하기 위하여, 마우스 폐암 세포 13종에서 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA 및 단백질 발현량을 비교하여 ZEB1 및 ITIH2 발현 간의 상관관계를 분석하였고, 폐선암(lung adenocarcinoma) 환자의 TCGA(The Cancer Genome Atlas) RNA-seq 데이터를 통해 ZEB1 및 ITIH2 발현 간의 상관관계를 분석하였다.

[0092] 마우스 폐암 세포 13종(412P, 393LN, 713P, 531P1, 393P, 307P, 344P, 531P2, 344SQ, 531LN2, 531LN3, 344LN 및 531LN1)에서 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA의 발현량을 측정한 결과, ZEB1 및 ITIH2의 mRNA의 발현은 간엽성 세포인 344P, 531P2, 344SQ, 531LN2, 531LN3, 344LN 및 531LN1에서 상대적으로 높고, 상피성 세포인 412P, 393LN, 713P, 531P1, 393P 및 307P에서 상대적으로 낮음을 확인하였다(도 1a 참조). 또한, Spearman correlation 분석으로 상관관계 분석을 수행한 결과, 상기 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA의 발현 사이에 양의 상관 관계가 존재함을 확인하였다($r=0.7418$, $p=0.0051$)(도 1b 참조).

[0093] 상기 마우스 폐암 세포 13종에서 ZEB1 및 ITIH2의 단백질의 발현량을 측정한 결과, 상기 mRNA 발현량 비교 결과와 유사하게, ZEB1 및 ITIH2의 단백질의 발현은 간엽성 세포에서 상대적으로 높고, 상피성 세포에서 상대적으로 낮음을 확인하였다(도 2 참조).

[0094] 또한, 폐선암 환자 515명의 TCGA RNA-seq 데이터를 이용해 Spearman correlation 분석으로 상관관계 분석을 수행한 결과, 상기 ZEB1 및 ITIH2의 mRNA의 발현 사이에 양의 상관 관계가 존재함을 확인하였다($r=0.172$, $p<0.001$)(도 3 참조).

[0095] 상기 실험을 통해, 암 세포에서 EMT 및 전이를 촉진하는 인자인 ZEB1과 히알루론산 결합단백질인 ITIH2의 발현 간 양의 상관관계가 존재함을 검증하였고, ITIH2가 폐암 세포의 EMT 및 전이와 관련이 있을 수 있음을 확인하였다.

[0097] 실시예 2. ZEB1이 ITIH2의 전사조절인자로서, ITIH2의 발현을 촉진함을 확인

[0098] 상기 실시예 1에서 ZEB1 및 ITIH2의 발현 간 양의 상관관계가 존재함을 검증하였다. 상기 상관관계가 나타나는 이유를 밝히기 위하여, ZEB1 및 ITIH2가 어떤 방식으로 상호작용하는지 확인하기 위한 실험들을 수행하였다.

[0100] (1) ZEB1이 ITIH2의 발현을 조절함을 확인

[0101] ZEB1이 ITIH2 발현에 영향을 미칠 수 있는지 확인하기 위하여, ZEB1을 각각 과발현 또는 녹다운시킬 경우에 따른 ITIH2의 발현양을 측정하였다.

[0102] 우선, ZEB1의 과발현을 위해 마우스 ZEB1 유전자(NCBI Reference Sequence: NM_011546.3)를 pcDNA3.1 벡터(Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, #V79020, USA)에 삽입한 뒤, 마우스 폐암 세포인 393P 세포에 형질감염시켰다. 이후, G418 항생제로 선별하여 안정한 세포(393P-ZEB1)를 구축하였고, 상기 세포에서 ITIH2 mRNA의 발현양을 qRT-PCR로 측정하였다. 그 결과, pcDNA3.1 벡터 자체만 393P 세포에 형질감염시킨 대조군(393P-vec)에 비해, ZEB1을 과발현시킨 393P-ZEB1 세포에서 ITIH2 mRNA의 발현양이 약 791배 증가됨을 확인하였다(도 4 참조).

[0104] ZEB1의 발현을 억제할 경우 ITIH2의 발현도 억제되는지 확인하기 위해서, 렌티바이러스 벡터 pLKO.1(Addgene, #10878, USA)에 3종류의 ZEB1 shRNA(ZEB1_shA, ZEB1_shB 및 ZEB1_shC)를 삽입하여 렌티바이러스를 제작하였고, 이를 마우스 폐암 세포 344SQ에 감염시켜 안정한 ZEB1 녹다운 세포(344SQ-ZEB1_shA, 344SQ-ZEB1_shB 및 344SQ-ZEB1_shC)를 제작하였다. 상기 녹다운 세포에서 ITIH2의 mRNA 및 단백질 발현양을 측정한 결과, shRNA를 삽입하지 않은 렌티바이러스로 감염된 대조군(344SQ-NTC)에 비해, ZEB1을 녹다운시킨 세포 344SQ-ZEB1_shA, 344SQ-ZEB1_shB 및 344SQ-ZEB1_shC에서 ITIH2의 mRNA 및 단백질 발현이 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 5a 및 5b 참조). 상기 ZEB1 shRNA(ZEB1_shA, ZEB1_shB 및 ZEB1_shC)의 염기 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0105]

shRNA	염기 서열
ZEB1_shA	5' CCGG-ATAGAGGCTACAAGCGCTTA-CTCGAG- TAAAGCGCTGTAGCCTCTAT-TTTTGG 3' (서열번호 1)
ZEB1_shB	5' CCGG-CCGCCAACAAGCAGACTATTC-CTCGAG- GAATAGTCTGCTGTTGGCGG-TTTTGG 3' (서열번호 2)
ZEB1_shC	5' CCGG-GAACCTCAAACCTAGTAATTT-CTCGAG- AAATTACTAGGTTTGAGGTTTC-TTTTGG 3' (서열번호 3)

[0107] (2) ZEB1이 ITIH2 프로모터에 결합함으로써 ITIH2 발현을 조절함을 확인

[0108] ZEB1이 ITIH2의 발현을 조절하는 기작을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0109] 우선, 마우스 폐암 세포 344SQ 세포의 염색체 DNA에서 ITIH2 유전자의 프로모터 영역(전사개시 부위 기준으로, -1671 내지 +218 bp 사이, 서열번호 4)을 PCR로 클로닝한 뒤, 루시퍼레이스 리포터 벡터인 pGL3-Basic(Promega, #E1751, USA)에 삽입하였다. 상기 리포터 벡터와 ZEB1 과발현 벡터를 344SQ에 함께 형질감염시킨 뒤, 루시퍼레이스 어세이를 실시하였다. 또한, 상기 프로모터 영역에서 ZEB1이 결합 가능한 위치를 JASPAR webtool(<https://jaspar.genereg.net/>)을 이용해 예측하였고, 상기 프로모터 영역에서 실제 ZEB1이 결합하는 위치를 찾기 위해 프로모터 영역을 차례로 결실(serial deletion)시켜 각각 서로 다른 길이의 프로모터 루시퍼레이스 리포터를 제작하였다. 구체적으로, 가장 긴 프로모터(-1671) 플라스미드를 기반으로, 원하는 부위의 프로모터 영역(-1201, -733 및 -185)을 해당 위치에 결합하는 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였고, 동일한 루시퍼레이스 리포터 벡터인 pGL3-Basic(Promega, #E1751, USA)에 삽입하여 서로 다른 길이의 프로모터 리포터를 제작하였다. 이후, 서로 다른 길이의 프로모터 루시퍼레이스 리포터를 이용하여 루시퍼레이스 활성을 측정하였다.

[0110] 실험 결과, ITIH2 유전자의 프로모터 영역이 삽입될 경우, ZEB1 과발현에 따라 루시퍼레이스 활성이 최대 약 2.5배 증가하였으나, ITIH2 유전자의 프로모터 영역을 삽입하지 않은 대조군(GL3)에서는 ZEB1 과발현에 따른 루시퍼레이스 활성 변화가 나타나지 않았다. 또한, 순차적인 길이에 따른 프로모터 활성을 측정한 결과, 프로모터 활성이 ITIH2 프로모터 영역 내 -1671 내지 -1201 bp 사이에서 한 번 감소되고 -733 내지 -185 bp 사이에서 또 한 번 감소되었다. 이는, -1671 내지 -1201 bp 사이 및 -733 내지 -185 bp 사이에 ITIH2 프로모터 활성을 조절하는 중요한 영역이 포함되어 있음을 의미하므로, 상기 부위에 존재하는 후보 ZEB1 결합 위치를 예측하여 상기 부위를 각각 site-1(서열번호 5: CCCACCTTCTC) 및 site-2(서열번호 6: CCTCCCTG)로 명명하였다(도 6 참조).

[0111] ZEB1이 상기 site-1 및 site-2에 결합하는 것인지 여부를 추가적으로 검증하기 위해, 상기 site-1 및 site-2를 site-directed mutagenesis를 통해 모두 돌연변이시킨 뒤(각각 mut-1 및 mut-2) 프로모터 루시퍼레이즈의 활성을 측정하여 상기 돌연변이가 프로모터 활성에 미치는 영향 분석 및 ZEB1 과발현에 의한 ITIH2 활성화 여부를 실험하였다. 상기 site-directed mutagenesis는 해당 site의 치환된 염기 및 그 주변 영역(좌우 15 뉴클레오타이드)을 포괄하는 프라이머를 제작하여 PCR을 통해 수행되었다. 상기 프라이머 및 치환된 염기 서열(괄호로 표현)은 하기 표 2와 같다.

표 2

프라이머	염기 서열
site-1_primer	CAGCTAATAAAGCCC[CACCT]TCTCTCCACGTCTCC(서열번호 7)
mut-1_primer	CAGCTAATAAAGCCC[GTGTA]TCTCTCCACGTCTCC(서열번호 8)
site-2_primer	CCCCTGCATCAACCT[CCCCT]GTTCTTGCATGTAG(서열번호 9)
mut-2_primer	CCCCTGCATCAACCT[TTTTC]GTTCTTGCATGTAG(서열번호 10)

[0114] 실험 결과, ITIH2 프로모터 영역에 mut-1 및 mut-2가 모두 존재할 경우, ZEB1에 의한 ITIH2 프로모터 활성화가 나타나지 않음을 확인하여, ZEB1이 ITIH2 프로모터의 site-1 및 site-2 영역에 결합하여 ITIH2를 활성화시킬 수 있음을 추가적으로 검증하였다(도 7 참조).

[0116] 추가적으로, ZEB1이 실제로 염색체 DNA 상 ITIH2 프로모터의 site-1 및 site-2 영역에 결합하는지 여부를 확인하기 위하여, ChIP(Chromatin immunoprecipitation) 어세이를 수행하였다. 우선, 마우스 폐암 세포 344SQ 세포를 ZEB1 과발현 벡터로 형질감염시켜 ZEB1을 과발현시키고, 단백질과 염색체 DNA를 cross-linking 시켰다. 이후, 소니케이션을 통해 DNA를 단편화시킨 뒤, ZEB1 항체를 이용하여 면역침강법(immunoprecipitation)을 수행함으로써, ZEB1과 결합한 DNA 단편을 회수하였다. 회수된 DNA 단편에서 site-1 및 site-2 영역을 타겟하는 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다. ZEB1 항체에 대한 음성 대조군으로 마우스 IgG를 사용하였고, ITIH2의 내부 인트론 영역에 대한 프라이머 세트(con-1 및 con-2)를 양성 대조군으로 사용하였다. 상기 실험에서 사용된 프라이머들의 염기 서열은 하기 표 3과 같다.

표 3

프라이머	염기 서열
ZEB1-site1-F	GCCTGTAGCAATCACCCCTA(서열번호 11)
ZEB1-site1-R	CACACCTCAGTGGAGGCTTT(서열번호 12)
ZEB1-site2-F	TCACAAGAATGACGGAACCA(서열번호 13)
ZEB1-site2-R	TCCCTTCTTCCCCCTCTCACT(서열번호 14)
Con1-F	TGCTTGTGGAAGCCACTGAC(서열번호 15)
Con1-R	ACTGTGTGGGAAGAGTTGG(서열번호 16)
Con2-F	CACGCTAGGCTCTCTGCTCT(서열번호 17)
Con2-R	GCTGTCTTTTCCGTTCTGC(서열번호 18)

[0119] 실험 결과, ZEB1 항체를 이용하여 면역침강법을 수행하고 site-1 및 site-2 영역을 타겟하는 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행할 경우 site-1 및 site-2 영역과 일치하는 크기의 PCR 산물이 나타남을 확인하였다. 이와 달리, IgG 항체를 이용하여 면역침강법을 수행할 경우, PCR 산물이 나타나지 않음을 확인하였다(도 8 참조).

[0120] 상기 실험들을 통해, ZEB1이 과발현될 경우, ITIH2 발현이 증가되며, ZEB1이 억제될 경우, ITIH2의 발현이 감소됨을 확인하였다. 또한, ZEB1이 ITIH2 프로모터 영역 내 site-1 및 site-2에 결합함으로써, ITIH2를 활성화시킬 수 확인하였고, ZEB1이 실제 염색체 DNA 상 ITIH2 프로모터 영역 내 site-1 및 site-2에 직접 결합하는 것을 검증하였다.

[0122] 실시예 3. ITIH2의 발현을 억제할 경우, 폐암 세포의 이동 및 전이가 억제됨을 확인

[0123] ITIH2 발현을 억제할 경우, 폐암 세포의 이동 및 전이가 억제될 수 있는지 확인하기 위한 실험들을 수행하였다.

[0125] (1) ITIH2 녹다운 폐암 세포의 제작

[0126] 우선, 렌티바이러스 벡터 pLK0.1에 5종류의 ITIH2 shRNA(ITIH2_shA, ITIH2_shB, ITIH2_shC, ITIH2_shD 및 ITIH2_shE)를 삽입하여 렌티바이러스를 제작하였고, 이를 마우스 폐암 세포 344SQ에 감염시켜 안정한 ITIH2 녹다운 세포를 제작하였다. 상기 녹다운 세포에서 ITIH2의 mRNA 및 단백질 발현량을 측정한 결과, shRNA를 삽입하지 않은 렌티바이러스로 감염된 대조군(344SQ-NTC)에 비해, ITIH2를 녹다운시킨 세포 344SQ-ITIH2_shC, 344SQ-ITIH2_shD 및 344SQ-ITIH2_shE에서 ITIH2의 mRNA 발현이 각각 22.8%, 14.2% 및 10.6% 감소함을 확인하였다(도 9a 참조). ITIH2 단백질의 경우, 대조군(344SQ-NTC)에 비해 ITIH2를 녹다운시킨 세포 모두(344SQ-ITIH2_shA, 344SQ-ITIH2_shB, 344SQ-ITIH2_shC, 344SQ-ITIH2_shD 및 344SQ-ITIH2_shE)에서 발현이 감소됨을 확인하였다(도 9b 참조). 상기 ITIH2 shRNA(ITIH2_shA, ITIH2_shB, ITIH2_shC, ITIH2_shD 및 ITIH2_shE)의 염기 서열은 하기 표 4와 같다.

표 4

shRNA	염기 서열
ITIH2_shA	5' CCGG-GAACTGTATGTGTATCCTTT-CTCGAG-AAAGGATACACATACAGTTTC-TTTTGG 3'(서열번호 19)
ITIH2_shB	5' CCGG-GCCAAGAGATACATTGAGAAA-CTCGAG-TTCTCAATGTATCTCTTGGC-TTTTGG 3'(서열번호 20)
ITIH2_shC	5' CCGG-CGCACTGTATTATGGCACCAA-CTCGAG-TTGGTGCCATAATACAGTGCG-TTTTGG 3'(서열번호 21)
ITIH2_shD	5' CCGG-CCTGTCATATCTAAAGGACAA-CTCGAG-TTGTCCTTTAGATATGACAGG-TTTTGG 3'(서열번호 22)
ITIH2_shE	5' CCGG-CGATGGACATTATAAGGATTA-CTCGAG-TAATCCTTATAATGTCCATCG-TTTTGG 3'(서열번호 23)

[0129] (2) ITIH2 녹다운 폐암 세포의 이동성이 억제됨을 확인

[0130] 상기와 같이 제작된 ITIH2 녹다운 폐암 세포에서 이동성이 억제되는지 확인하기 위해, 세포의 이동성을 측정할 수 있는 Boyden 챔버 어레이 및 상처 치유(wound-healing) 어레이를 수행하였다.

[0131] Boyden 챔버 어레이를 위해, 위쪽 인서트에 각 세포들을 1×10^5 개씩 시딩하였고, 아래쪽 웰에 10% FBS가 포함된 세포배양액을 첨가한 상태로 24시간 동안 배양하였다. 이후, 인서트 막(membrane)의 반대쪽으로 이동한 세포들을 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색한 뒤 현미경에서 관찰하였다. 현미경으로 총 3개의 인서트 당 각각 3개 영역을 임의로 정해 사진을 촬영하여 이동한 세포들의 수를 카운팅하였다. 그 결과, ITIH2가 녹다운된 344SQ-ITIH2_shC, 344SQ-ITIH2_shD 및 344SQ-ITIH2_shE 세포들의 이동 활성은 대조군 대비 각각 50.8%, 54.0% 및 56.9% 감소함을 확인하였다(도 10 참조).

[0132] 상처 치유(wound-healing) 어레이를 위해, 대조군 및 ITIH2가 녹다운된 344SQ-ITIH2_shC, 344SQ-ITIH2_shD 및 344SQ-ITIH2_shE 세포들을 융합 상태(confluent status)로 배양한 뒤, 가느다란 피펫 팁을 이용하여 스크래치를 발생시켰고, 24시간 후에 스크래치 또는 상처가 세포의 이동에 의해 다시 회복되는 정도를 측정하였다. 그 결과, ITIH2가 녹다운된 344SQ-ITIH2_shC, 344SQ-ITIH2_shD 및 344SQ-ITIH2_shE 세포들의 이동 활성은 대조군 대비 각각 63.7%, 55.8% 및 57.5% 감소함을 확인하였다(도 11 참조).

[0134] (3) ITIH2 녹다운 폐암 세포의 전이가 억제됨을 확인

[0135] 상기와 같이 제작된 ITIH2 녹다운 폐암 세포의 전이가 억제되는지 확인하기 위해, 동형유전자형 마우스에 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운 폐암 세포를 주입한 뒤, 원발암 생성 능력 및 전이 능력을 측정하였다.

[0136] 첫 번째로, 동형유전자형 마우스(129/Sv)의 왼쪽 폐에 외과 수술을 통해 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운

폐암 세포(344SQ-ITIH2_shC 또는 344SQ-ITIH2_shE)를 1×10^6 세포수/50 μ L PBS의 농도로 직접 동소에 주입(orthotopic injection)하였다. 주입 일주일 후, 마우스를 안락사시킨 뒤, 해부하여 주입한 왼쪽 폐에 생긴 종양(원발암)과 종격동 림프절(mediastinal lymph nodes) 및 주입 반대쪽인 오른쪽 폐에 전이되어 생긴 종양(전이암)의 노들 수를 카운팅하였다. 그 결과, ITIH2 녹다운 폐암 세포 344SQ-ITIH2_shC 및 344SQ-ITIH2_shE의 원발암 생성 능력은 대조군에 비해 평균적으로 각각 65.0% 및 45.7% 감소하였고, 전이 능력은 대조군에 비해 각각 66.5% 및 37.7% 감소함을 확인하였다(도 12 참조).

[0137] 두 번째로, 동형유전자형 마우스(129/Sv)의 오른쪽 옆구리에 대조군 폐암 세포 또는 ITIH2 녹다운 폐암 세포(344SQ-ITIH2_shC 또는 344SQ-ITIH2_shE)를 1×10^6 세포수/100 μ L PBS의 농도로 피하에 주입(subcutaneously injection)하였다. 주입 6주 후, 마우스를 안락사시킨 뒤, 해부하여 주입한 부위에 생긴 종양(원발암)의 크기를 측정하였고, 폐에 전이되어 생긴 종양(전이암)의 노들 수를 카운팅하였다. 그 결과, ITIH2 녹다운 폐암 세포 344SQ-ITIH2_shC 및 344SQ-ITIH2_shE의 원발암 생성 능력은 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었으나, 폐로의 전이 능력은 대조군에 비해 평균적으로 각각 23.0% 및 25.9% 감소함을 확인하였다(도 13 참조).

[0139] (4) ITIH2의 발현을 억제할 경우, 히알루론산의 발현 및 분포가 억제됨을 확인

[0140] 히알루론산은 암 세포에서 종양미세환경을 조성함으로써, 암 발생 및 전이를 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있고, ITIH2는 히알루론산 결합단백질로 작용하여, 히알루론산 네트워크를 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이에, ITIH2를 억제할 경우, 히알루론산 발현 및 분포가 억제되는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0141] 우선, 폐암 세포에서의 히알루론산 발현 정도를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 히알루론산 결합단백질(HABP)의 일부분에 비오틴을 결합시킨 비오틴-HABP를 프로브로 사용하여 폐암 세포의 세포외기질 내 히알루론산을 염색하였다. 구체적으로, 상기 상처 치유(wound-healing) 어세이를 실시한 세포를 고정한 뒤 비오틴-HABP를 반응시키고, 비오틴을 적색의 Alexa594 형광이 결합된 스트렙타비딘으로 검출하였고, 세포의 핵은 청색의 DAPI로 염색하였다. 이후, 세포의 이동 시 히알루론산의 발현 및 네트워크 분포를 컨포컬 현미경 및 이미징 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0142] 그 결과, 스크래치를 처리할 경우 이동 중인 최전선의 세포들 주변에서 히알루론산이 다량 검출되었으며, 상피성 세포인 393P 보다 간엽성 세포인 344SQ에서 히알루론산의 발현 및 분포가 광범위함을 확인하였다. 구체적으로, 344SQ 세포의 세포외기질 내 히알루론산 발현 정도는 393P 세포 비해 약 153.3% 증가됨을 확인하였다(도 14 참조).

[0143] 이후, ITIH2 발현의 억제가 히알루론산의 발현 및 분포에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해, ITIH2 녹다운 폐암 세포 및 대조군(NTC) 세포에서 세포외기질 히알루론산 염색 분석을 수행하였다. 분석 결과, ITIH2 녹다운 폐암 세포의 세포외기질에서 히알루론산의 발현 및 분포가 대조군에 비해 약 64.4% 감소함을 확인하였다(도 15 참조).

[0144] 또한, ITIH2를 과발현시킬 경우, 히알루론산의 발현이 증가되는지 확인하기 위해, pcDNA3 벡터에 ITIH2 유전자를 삽입한 뒤 393P 세포에 형질감염시켜 ITIH2를 과발현하는 폐암 세포를 제작하였다. 이후, ITIH2 과발현 폐암 세포 및 대조군(vec) 세포에서 세포외기질 히알루론산 염색 분석을 실시하였다. 분석 결과, ITIH2 과발현 폐암 세포의 세포외기질에서 히알루론산의 발현 및 분포가 대조군에 비해 약 261.8% 증가함을 확인하였다(도 16 참조).

[0145] 상기 실험들을 통해, ITIH2를 억제할 경우, 폐암 세포의 이동 및 전이가 억제됨을 확인하였으며, 폐암 세포의 세포외기질 내 히알루론산의 발현 및 분포 또한 억제됨을 확인하였다.

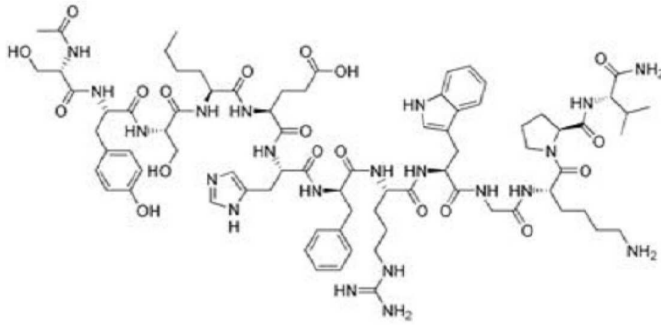
[0147] 실시예 4. ITIH2 억제제 Afamelanotide 및 Sincalide가 폐암 세포의 이동 및 침윤을 억제함을 확인

[0148] 심층신경망 머신러닝으로 약물-타겟 상호작용을 예측하는 방법을 이용하여, FDA 승인 약물들 중 ITIH2의 활성을 억제할 것으로 예측되는 후보 약물들을 선별하였고, 상기 약물들이 폐암 세포의 이동 및 침윤을 억제하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0149] 상기 후보 약물로 Afamelanotide(CAS No: 75921-69-6) 및 Sincalide(CAS No: 25126-32-3) 두 가지 약물이 선별되었다. Afamelanotide는 멜라닌 세포 자극 호르몬 유사체로서, 적혈구조혈 프로토포르피린증 환자에서 햇빛에

의한 피부 손상을 방지하기 위한 약물로 하기 화학식 1의 구조를 가진다:

[화학식 1]

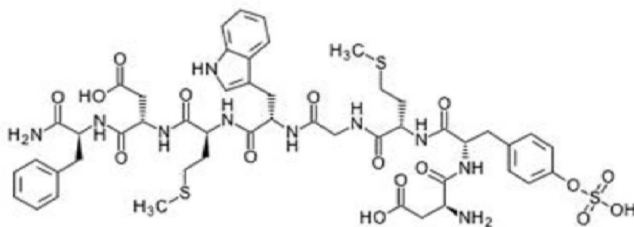


상기 Afamelanotide의 폐암 세포 이동 억제 효과를 확인하기 위하여, Boyden 챔버 어세이를 수행하였다. 344SQ 폐암 세포에 Afamelanotide를 10 mg/ml 농도로 처리할 경우, 폐암 세포의 이동성이 DMSO를 처리한 대조군의 80.7% 수준으로 감소됨을 확인하였다(도 17 참조).

또한, Afamelanotide의 폐암 세포 침윤 억제 효과를 확인하기 위해, 스페로이드(spheroid) 침윤 어세이를 수행하였다. 행잉-드랍(hanging-drop) 방식으로 344SQ 폐암 세포의 스페로이드를 제조하고, 콜라겐 겔에 넣어 굳힌 뒤 세포 배양액을 첨가하여 1 내지 2일 동안 배양하면 스페로이드 주변으로 세포들이 콜라겐 겔 속으로 이동 및 침투하는 현상을 관찰할 수 있다. 이러한 세포의 침투 정도를 측정함으로써, 세포의 침윤 활성을 측정할 수 있는데, Afamelanotide를 10 mg/ml 농도로 처리할 경우, 344SQ 폐암 세포의 침윤성이 8.7% 감소되었으나, 통계적인 유의성은 없는 것으로 확인되었다(도 18 참조).

한편, 상기 후보 약물 중 Sincalide는 담낭 및 췌장 질환의 진단을 위한 약물로, 콜레시스토키닌의 C-말단의 8개 아미노산으로 구성되어 있으며, 하기 화학식 2의 구조를 가진다:

[화학식 2]

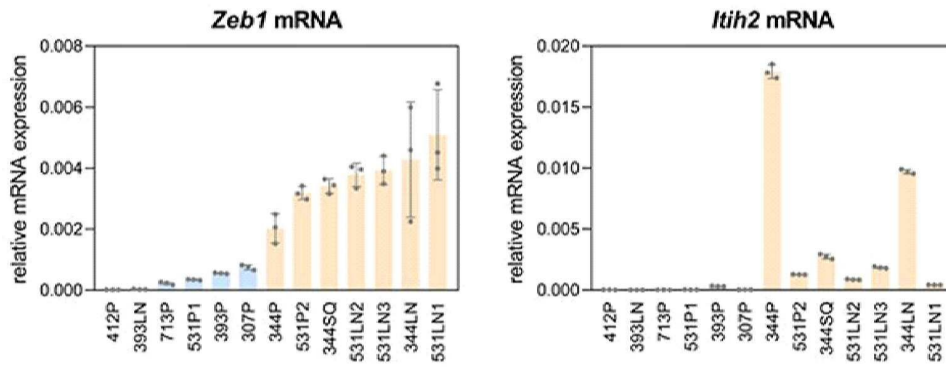


상기 Sincalide를 이용하여 Boyden 챔버 어세이 및 스페로이드 침윤 어세이를 수행한 결과, 344SQ 폐암 세포에 Sincalide를 10 mg/ml 농도로 처리할 경우, 폐암 세포의 이동성이 DMSO를 처리한 대조군의 57.6% 수준으로 감소되었으며, 폐암 세포의 침윤성 또한 대조군의 63.0% 수준으로 감소됨을 확인하였다(도 19 및 20 참조).

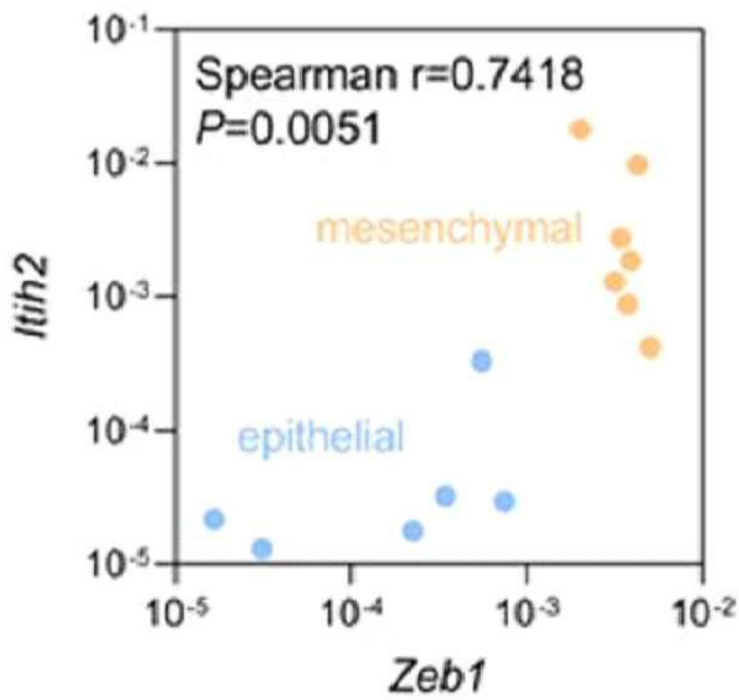
상기 실험을 통해, ITIH2 억제 활성을 가진 약물이 폐암 세포의 이동성 및 침윤성을 감소시킨다. 상기 약물들은 기존 FDA 승인 약물로서, 인체에 대한 안전성 검증이 이미 수행된 바, 폐암의 예방 또는 치료에 안전하게 활용될 수 있다.

도면

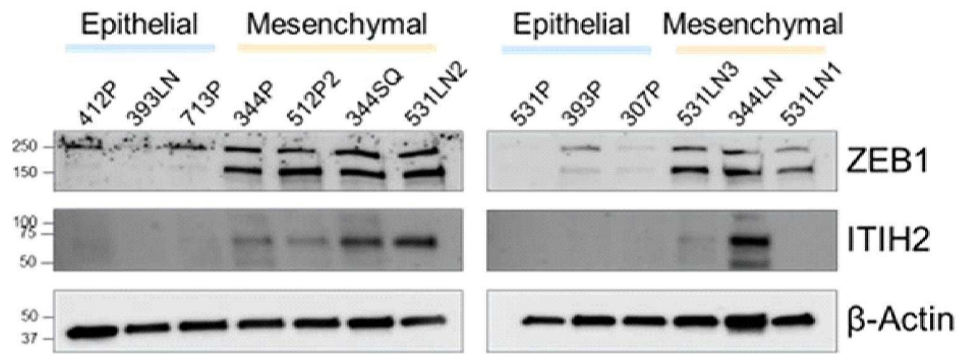
도면1a



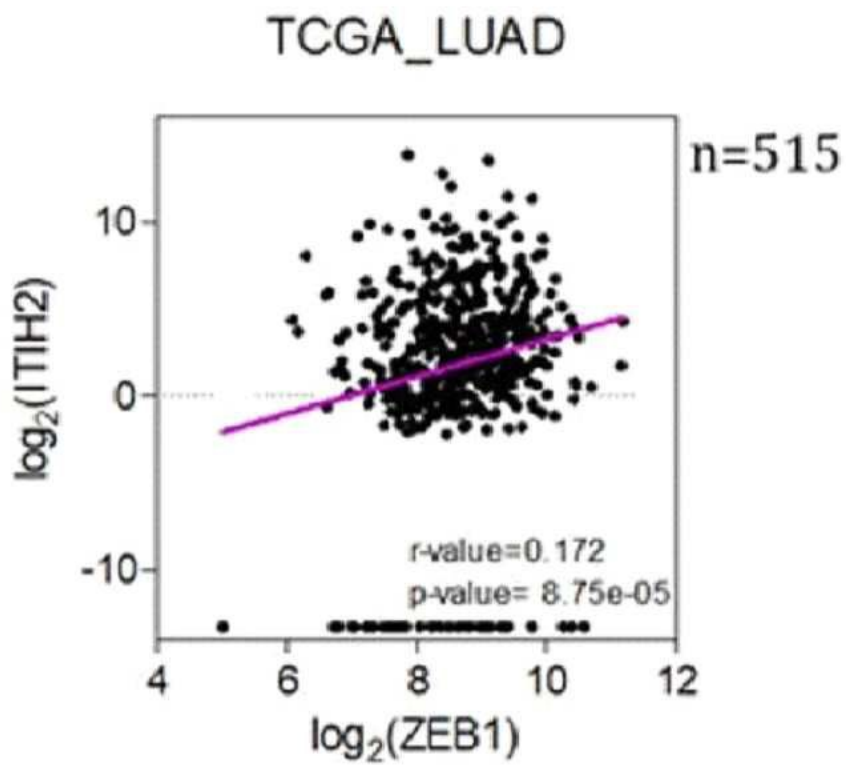
도면1b



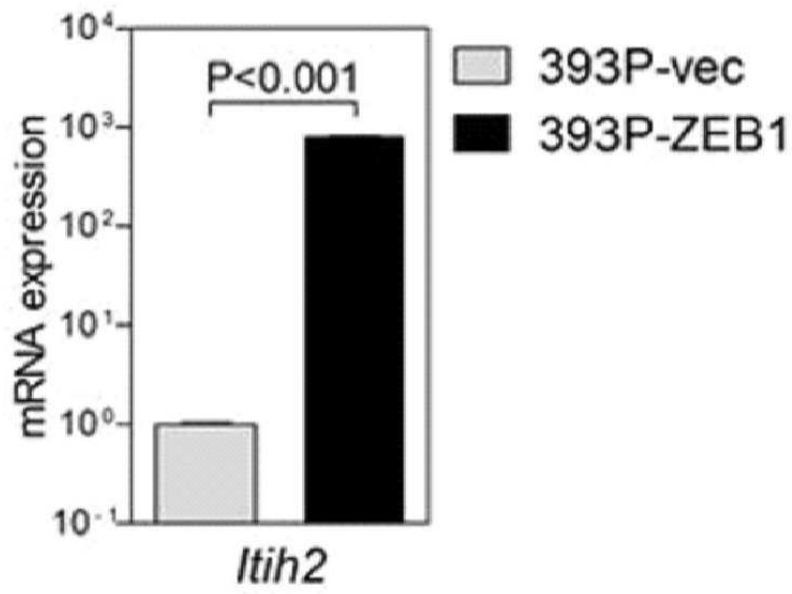
도면2



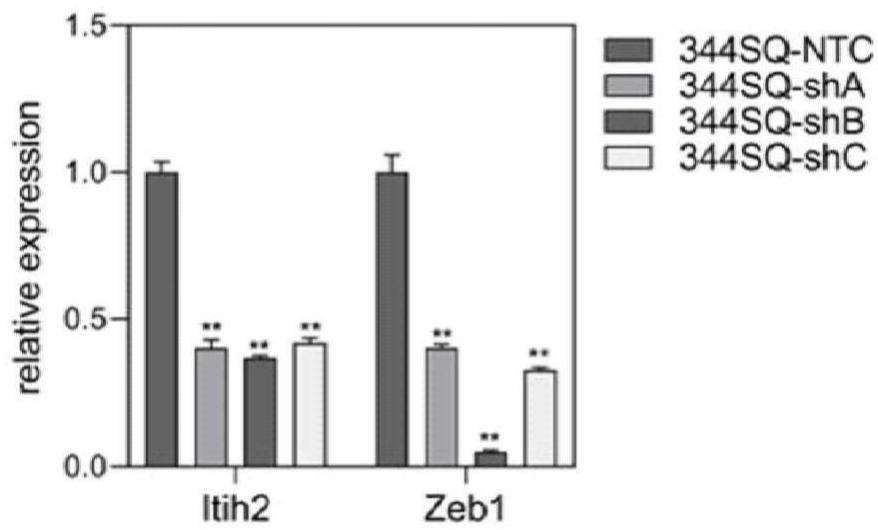
도면3



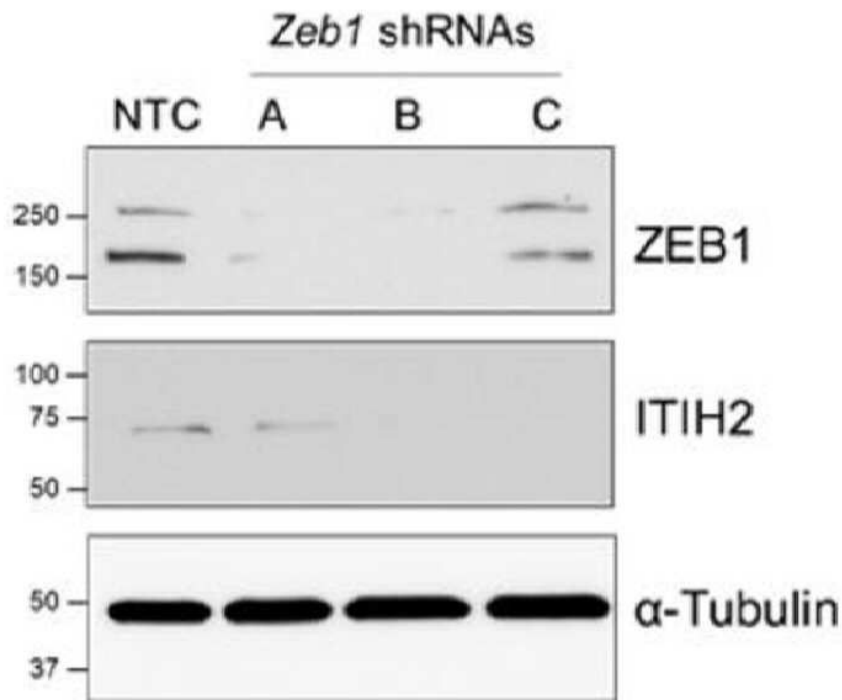
도면4



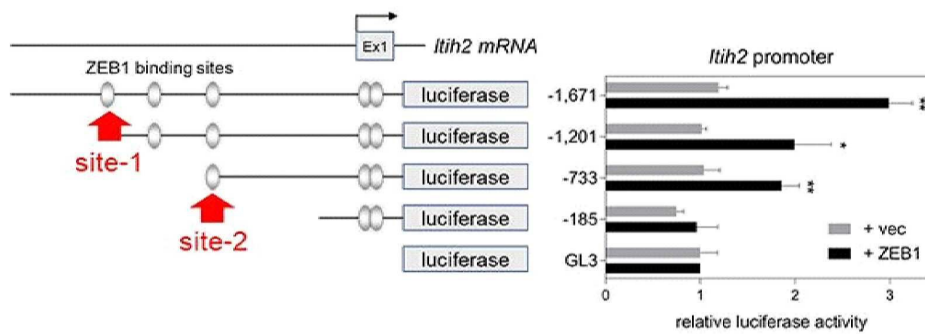
도면5a



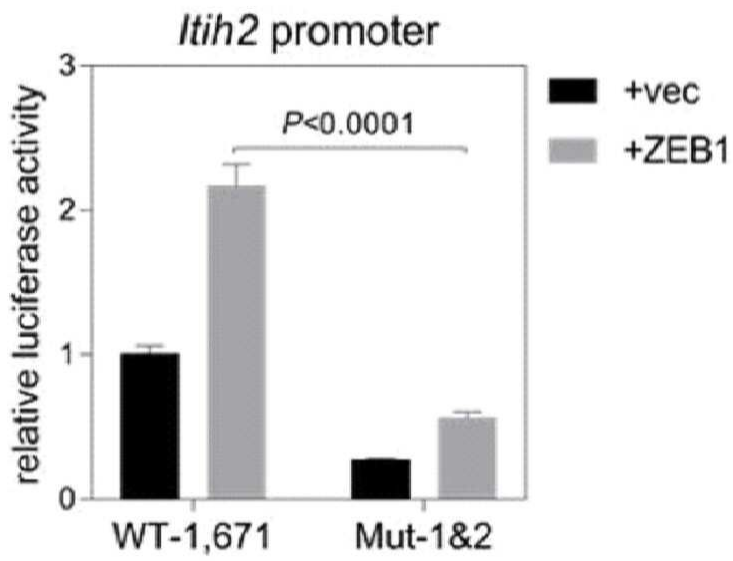
도면5b



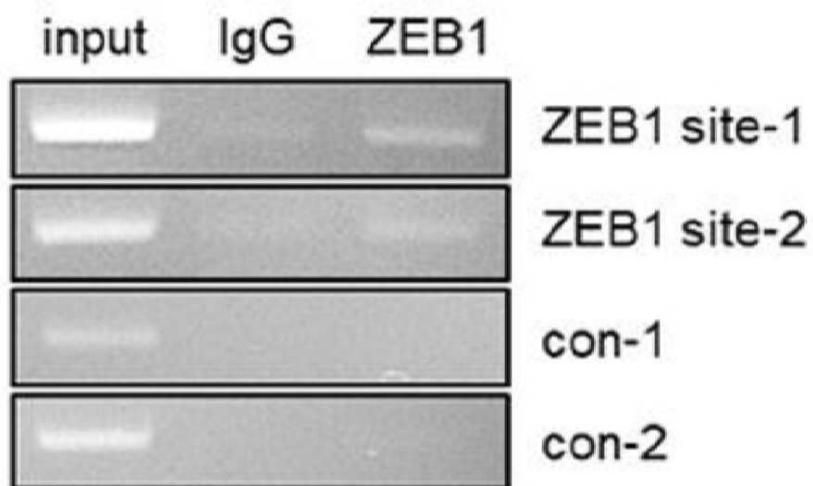
도면6



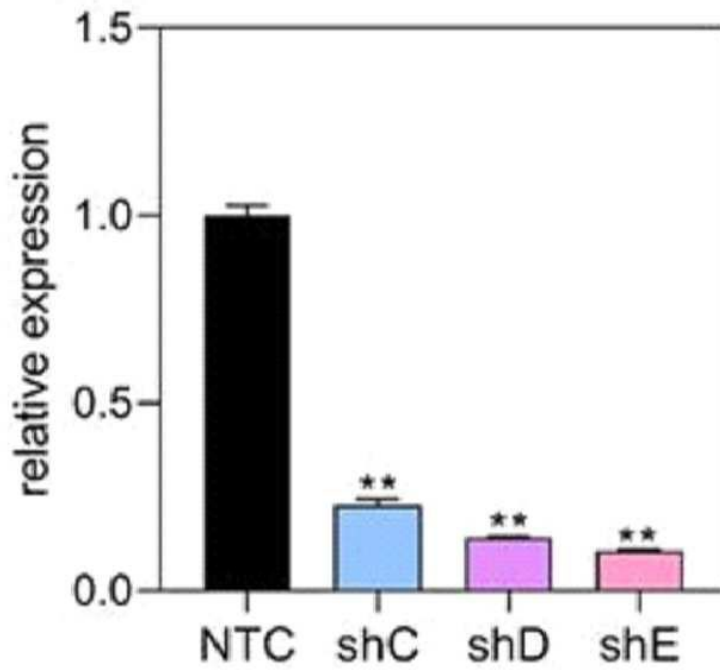
도면7



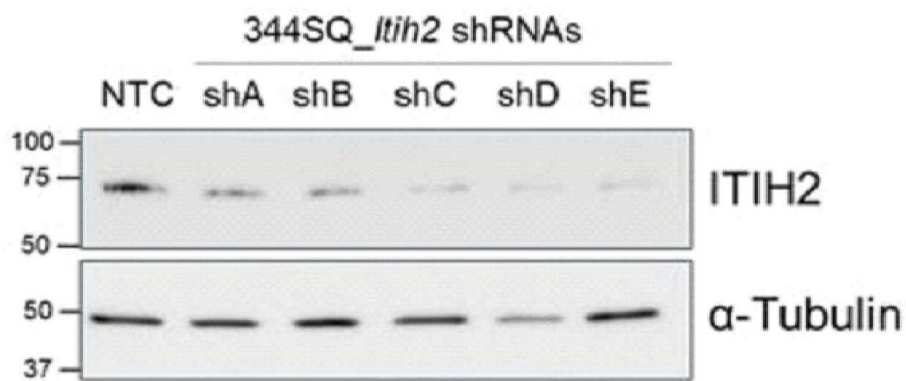
도면8



도면9a

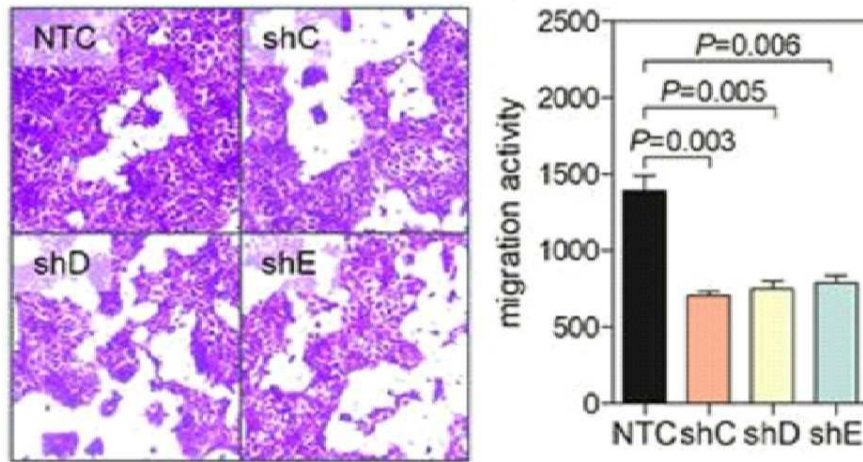


도면9b

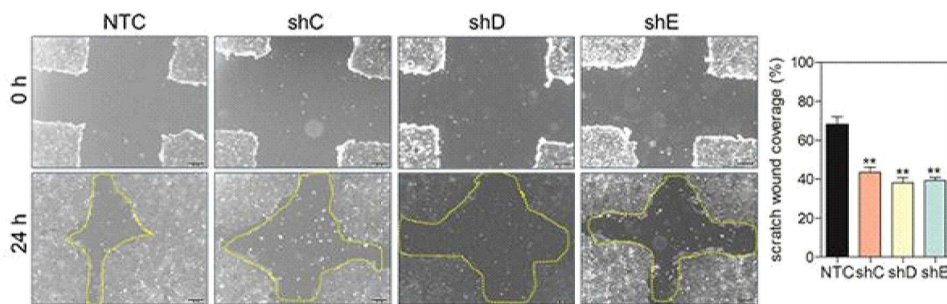


도면10

Boyden chamber assay

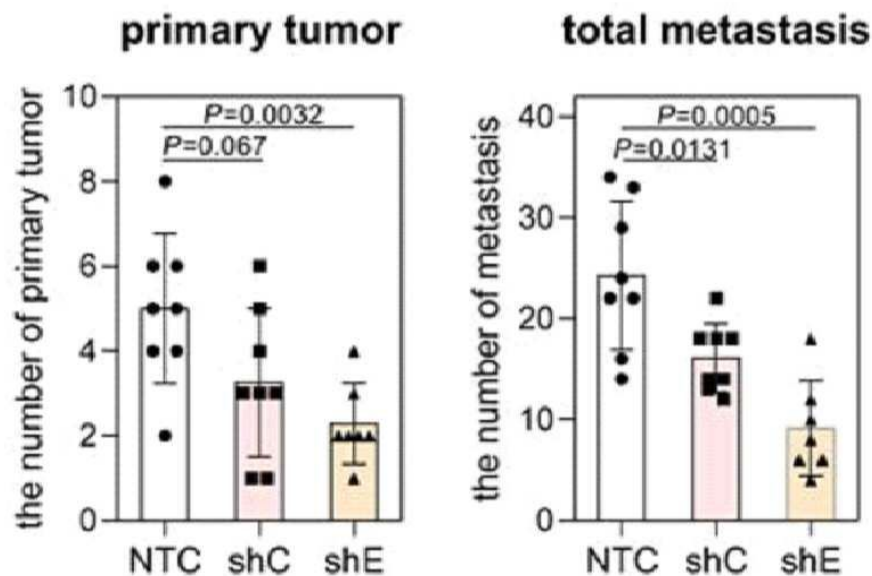


도면11

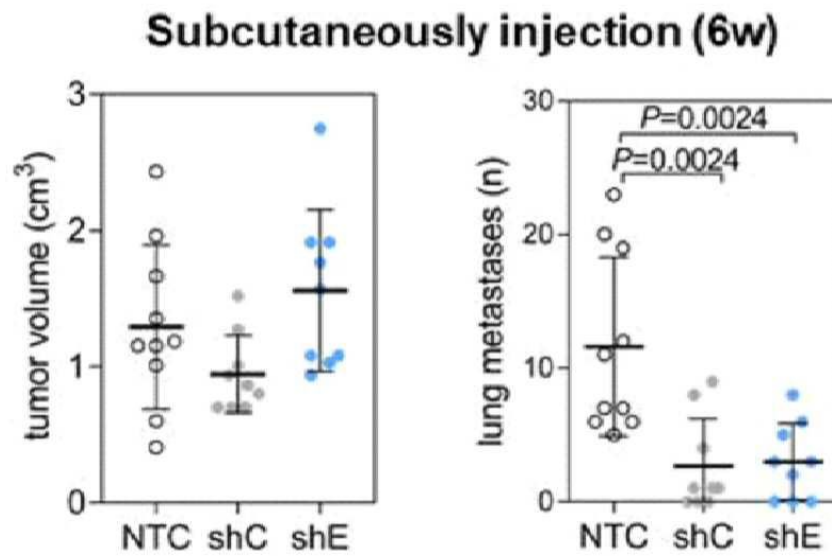


도면12

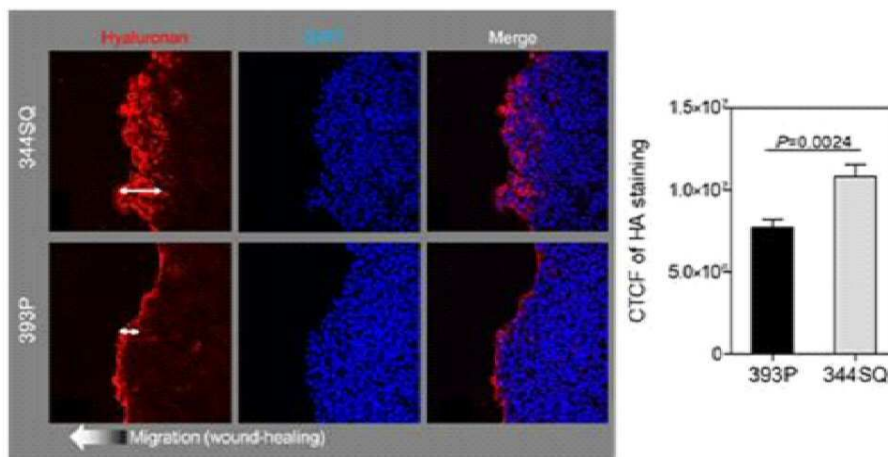
Orthotopic injection (7d)



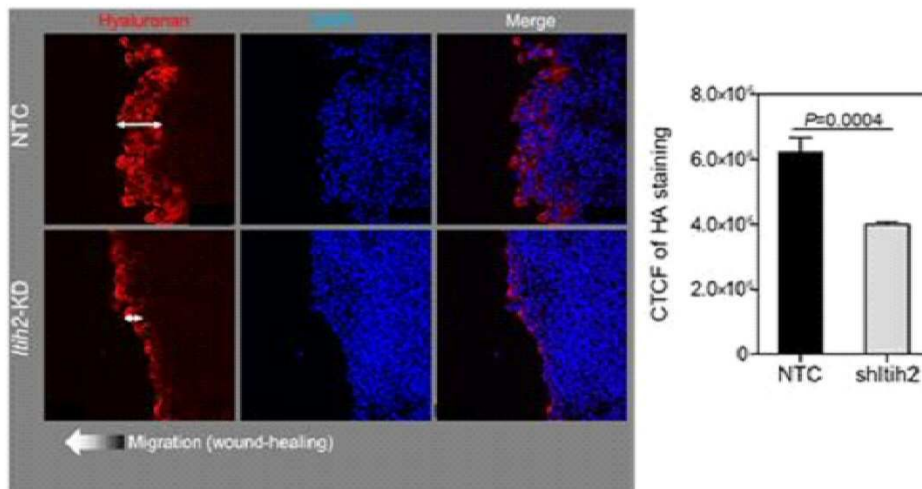
도면13



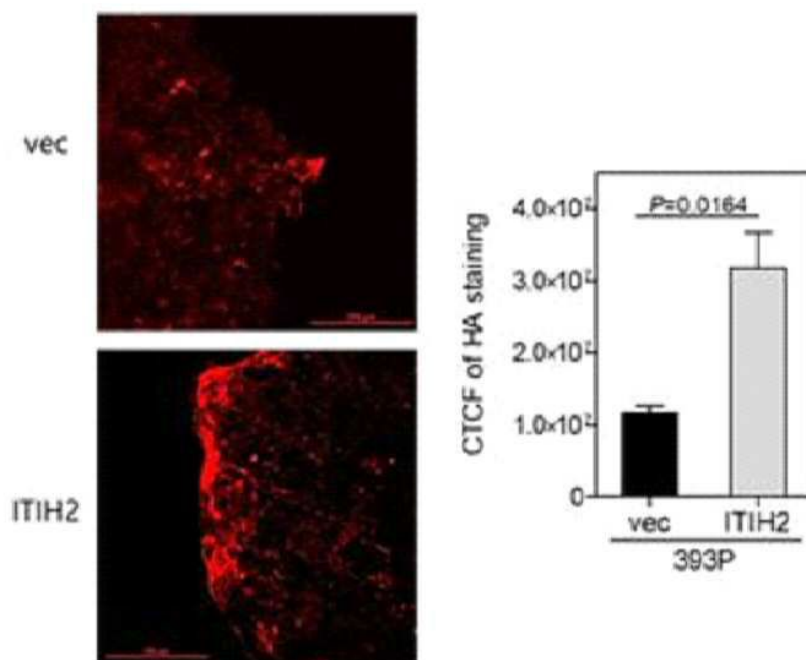
도면14



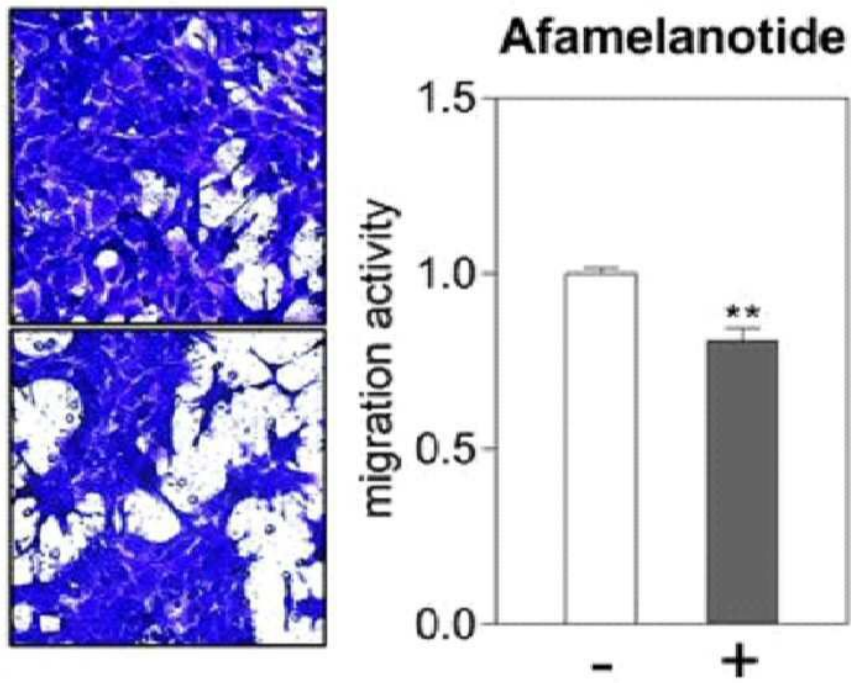
도면15



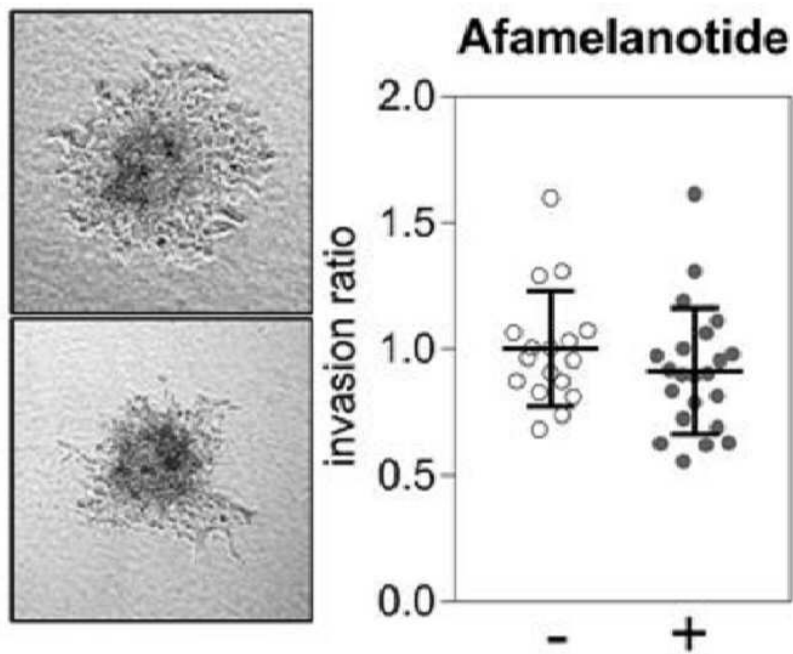
도면16



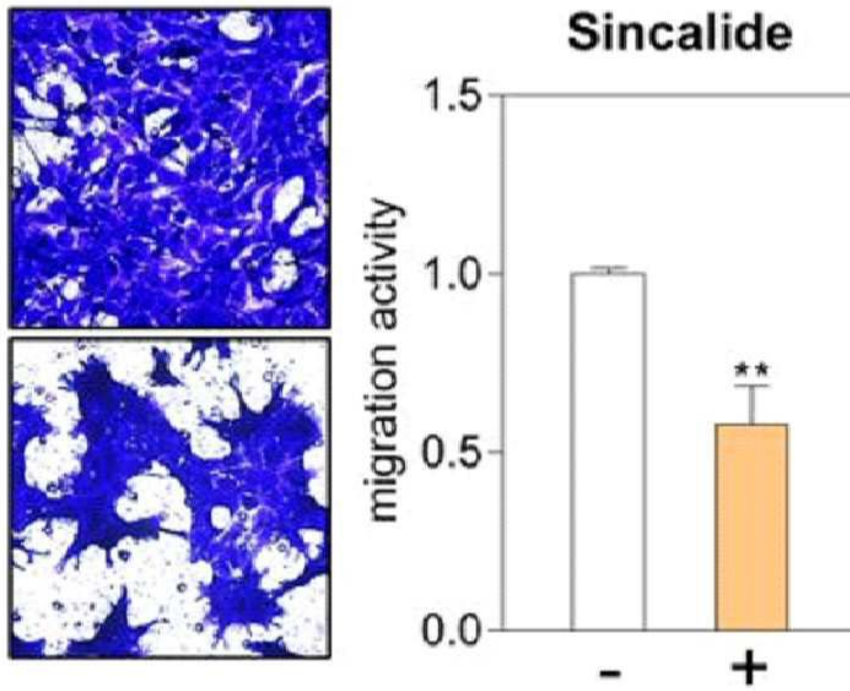
도면17



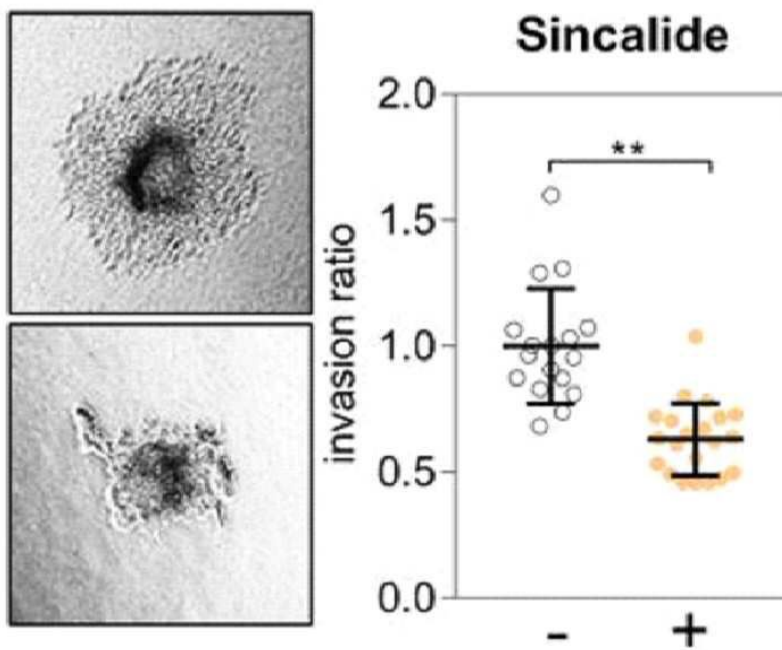
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.