

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 15/11 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년09월25일 10-0627377 2006년09월15일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2005-0018140	(65) 공개번호	10-2006-0096872
(22) 출원일자	2005년03월04일	(43) 공개일자	2006년09월13일

(73) 특허권자 한국생명공학연구원
 대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 임동수
 대전 유성구 신성동 한울아파트 107동 604호

 정초록
 대전 유성구 신성동 118-27, 장방아파트빌라 303호

(74) 대리인 이원희

(56) 선행기술조사문헌

US20020147162 A1	US20030186902 A1
US20030194396 A1	US20040018176 A1

* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 조경주

(54) 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1 단백질의 합성을 차단할수 있는 작은 간섭 RNA 및 이를 발현하는 벡터를 이용한 암의 유전자 치료

요약

본 발명은 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(pituitary tumor- transforming gene 1, PTTG1) 단백질의 합성을 차단할 수 있는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 이를 발현하는 벡터를 이용한 암의 유전자 치료에 관한 것으로, 구체적으로는 간세포암 등을 포함하는 각종 암세포에서 과발현 되어있는 PTTG1 mRNA의 염기서열의 부분에 해당하는 19머의 센스서열, 9머의 헤어핀 루프서열 및 상기 센스서열에 상보적으로 결합하는 안티센스서열로 구성되고, 이를 세포내에서 발현할 수 있도록 고안된 플라스미드 형태의 발현벡터 및 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 본 발명의 PTTG1-siRNA 염기서열을 암호화하는 발현벡터를 PTTG1이 과다발현 되어 있는 배양 암세포 및 생쥐 종양모델에 도입함으로써 암 세포의 성장을 억제하였으므로 암의 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

PTTG1, siRNA, 발현벡터, 아데노바이러스 벡터, 암, 유전자 치료

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(pituitary tumor-transforming protein 1, PTTG1) mRNA에 특이적인 siRNA(small interfering RNA)를 발현시키기 위한 발현벡터를 나타낸 개열지도이다.

도 2a는 본 발명의 PTTG1-siRNA 발현벡터가 PTTG1 단백질 합성을 특이적으로 차단함을 나타낸 웨스턴 블롯 분석 결과의 사진이다.

도 2b는 본 발명의 PTTG1-siRNA 발현벡터가 JSHC 담도암 세포주의 증식에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 PTTG1이 p53의 기능을 저해한다는 공지의 사실을 근거로 실제로 PTTG1-siRNA의 작동성을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 PTTG1-siRNA를 함유하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터(Ad.PTTG1-siRNA) 개열지도이다.

도 4b는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA가 세포 내에 내재하는(intrinsic) PTTG1 단백질 합성을 차단함을 나타낸 웨스턴 블롯 분석 결과의 사진이다.

도 5는 각종 간암 및 담도암 세포주에서 PTTG1 단백질의 발현 양상을 웨스턴 블롯 분석의 결과로 나타낸 사진이다.

도 6은 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스가 각종 간암 세포주 및 담도암 세포주의 증식을 저해함을 나타낸 사진이다.

도 7a는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스에 의한 대장암세포의 증식 억제가 암 억제 유전자 p53 의존적으로 일어날 수 있음을 나타낸 그래프이다.

도 7b는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스에 의한 JSHC담도암 세포의 증식 억제 효과가 세포 사멸에 의한 것임을 나타낸 FACS 결과이다.

도 8a는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스가 도입된 Huh-7 간암 세포주를 주사한 누드마우스에서 종양의 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 8b는 JSHC 담도암 세포주를 누드마우스에 이식하여 생긴 종양에 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스를 주사한 후 종양의 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 간암 및 담도암을 포함하는 각종 암세포에서 과다 발현되어 있는 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1 단백질의 합성을 특이적으로 차단할 수 있는 PTTG1-siRNA 염기서열, 상기 siRNA를 발현하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 종양 치료제에 관한 것이다.

최근 동식물에서 이중 가닥 RNA(double stranded RNA: dsRNA)를 동식물체의 세포 내에 도입할 경우 dsRNA는 이에 상응하는 염기서열을 갖는 특정 mRNA를 분해하고 이에 따른 특정 단백질의 합성이 특이적으로 저해되는 현상이 발견되었는데 상기 현상을 RNA 간섭이라 한다(Sharp, P. A. et al., Genes Dev., 16: 485-490, 2001). 이 경우 dsRNA는 아직 명확히 규명되지 않은 기전에 의하여 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)로 전환되어 이에 상응하는 mRNA를 분

해시키지만, 30개 이상의 염기서열을 갖는 dsRNA를 사용할 경우 이에 따른 비특이적 반응 때문에 세포 내에서 단백질 차단 효과가 일어나지 않거나 비효율적이다(Hunter, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 250: 409-417, 1975; Robertson, H. D. and Mathews, M. B., *Biochemie.*, 78: 909-914, 1996). 이를 극복하기 위한 수단으로 21개의 올리고머로 구성된 이중가닥 siRNA를 합성하여 포유동물세포 내에 도입할 경우 이에 상응하는 mRNA가 효과적으로 분해되어 특정 단백질의 합성을 차단할 수 있는 기술이 개발되었다(Hutvagner, H. D. et al., *Science*, 29: 834-838, 2001). 합성 siRNA는 고비용이 들고, 그 효과가 일회적이므로, siRNA를 이용하여 특정 단백질의 합성을 효과적으로 차단하기 위한 다른 수단으로 siRNA를 생체 내에서 발현시킬 수 있는 바이러스성 및 비바이러스성 발현 벡터가 개발되었다(Brummelkamp, T. R. et al., *Science*, 296: 550-553, 2002; Shen, C. et al., *FEBS Lett.*, 539: 111-114, 2003; Xia, H. et al., *Nat. Biotech.*, 20: 1006-1010, 2002).

21개의 올리고머로 구성된 이중가닥 siRNA를 합성하여 암을 포함한 질병을 치료하기 위한 다음과 같은 연구가 실험실 수준에서 진행되고 있다. 합성 베타-카테닌(β -catenin) siRNA를 이용하여 암세포의 빠른 증식에 관여하는 변이된 베타-카테닌(β -catenin)을 배양 대장암세포 및 생쥐 대장암 모델에서 효과적으로 제거할 수 있었다(Verma, U. N. et al., *Clinical Cancer Res.*, 9: 1291-1300, 2003; Annick, H.B. et al., *PNAS USA*, 99: 14849-14854, 2002). 항암 화학요법에서 문제가 되는 약제내성 암세포의 약제 내성을 극복하기 위하여 다중 약물 저항 단백질(multidrug resistance 1, MDR1) siRNA 합성 올리고머를 제작하고 이를 MDR1 발현세포에 도입하였을 경우 MDR1 단백질 합성이 차단되었다(Wu, H. et al., *Cancer Res.*, 63: 1515-1519, 2003). 사이클린 E(Cyclin E)가 과발현되어 있는 간암 세포주에 사이클린 E siRNA 합성 올리고머를 처리하였을 때, 배양 간암세포 및 생쥐에 이식된 간암세포의 증식이 억제되었다(Kaiyi, L. et al., *Cancer Res.*, 63: 3593-3597, 2003). 상기 연구 결과들은 암세포에 과발현되어 있으며, 암세포의 빠른 증식에 필수적인 유전자의 단백질 합성을 특이적으로 차단할 수 있는 siRNA가 항암 치료제로서 개발될 수 있음을 시사하고 있다. 그러나, 합성 siRNA 올리고머는 고비용이 들고, 세포내 전달효율이 낮으며, 비특이적인 반응을 유도하여 세포에 독성을 유도할 수 있고, 생체 내에 적용할 경우 반감기가 짧고, 그 효과가 일회적이어서 지속적이지 않아, 반복 투여가 필요하다는 점 등 때문에 합성 siRNA 올리고머의 생체 내 적용은 한계가 있는 것처럼 보인다.

siRNA를 세포내에서 발현시킬 수 있는 바이러스성 및 비바이러스성 유전자 전달체들은 합성 siRNA 올리고머의 상기한 단점을 상당 부분 해결할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 특히 아데노바이러스 유전자 전달체는 기타 유전자 전달체에 비해 바이러스 증식이 용이하며, 배양 세포 및 생체 내 유전자 전달효율이 탁월하며, 고농도, 고순도의 바이러스를 용이하게 수득할 수 있으므로 암의 유전자 치료용 벡터로서 상품화되고 있다(Keiko, K. et al., *Nat. Biotech.*, 22: 3-4, 2004). 실제로, 아데노바이러스 벡터는 siRNA 발현 벡터로서 다음과 같이 이용되고 있다. 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) siRNA 또는 베타-글루쿠로니다제(β -glucuronidase, GUS) siRNA 발현 시스템이 도입된 아데노바이러스 유전자 전달체는 시험관 내 조건 및 생체 내 조건에서 녹색 형광 단백질 또는 GUS의 발현을 효과적으로 차단하였다(Davidson, B. L. et al., *Nat. Biotech.*, 20: 1006-1010, 2002). p53 siRNA 발현 시스템이 도입된 복제불능 아데노바이러스 벡터는 p53의 발현을 감소시켰다(Reske, S. N. et al., *FEBS Lett.*, 539: 111-114, 2003). 상기 연구 결과들은 아데노바이러스 벡터가 siRNA 전달체로서 유용할 수 있음을 제시하고 있다.

뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(Pituitary tumor-transforming gene 1, PTTG1, securin)은 랫트의 뇌하수체 종양으로부터 처음 분리되어, 간암, 난소암, 신장암을 포함하는 각종 인체암 및 암 세포주에 과발현 되어있는 것으로 보고되었다(Cytogenet, Cell Genet., 83: 93-95, 1998). PTTG1을 과발현 시켰을 경우 NIH3T3 세포주의 암화를 일으켰고(Pintor-Toro, J. A. et al., *Oncogene*, 17: 2187-2193, 1998), PTTG1은 세포분열이 일어날 때 결정적인 역할을 하는 세파라제(separase)와 결합하여 세파라제의 기능을 조절하여 세포주기를 정상적으로 조절하나 PTTG1의 이상 발현은 세파라제의 기능의 이상을 초래하여 암세포에서 흔히 관찰되는 다핵세포(aneuploidy)를 유도할 수 있으며(Lengaur, C., et al., *Cell*, 105 :445-457, 2001; Kirschner, M. W. et al., *Science*, 285: 418-422, 1999; Tyler-Smith, C. et al., *Cancer Lett.*, 30: 213-218, 2003), 암억제 유전자인 p53과 결합하여 p53에 의한 세포 사멸을 억제하는 것으로 밝혀졌다(Pintor-Toro, J. A. et al., *Nat. Genetics*, 32: 306-311, 2002). 또한 PTTG1은 한국인 간암환자에게서 간암세포에 과발현되는 것으로 보고되고 있다(Kang, SH et al., *Genomics & Informatics*, 2: 134-14, 2004). 상기 결과들은 PTTG1의 과발현은 암의 발생 혹은 진행에 관여한다는 것을 강하게 제시하고 있다.

미국 공개 특허 제 US2003/0194396호 및 미국 공개 특허 제 US2003/0190629호에서 PTTG1의 안티센스 올리고머를 이용하여 PTTG1 단백질의 발현을 억제함을 공지하였으나, 합성 올리고머는 고비용이 들고, 세포내 전달효율이 낮으며, 비특이적인 반응을 유도하여 세포에 독성을 유도할 수 있고, 생체 내에 적용할 경우 반감기가 짧고, 그 효과가 일회적이어서 지속적이지 않아, 반복 투여가 필요하다는 점 등의 한계점이 있다. 또한 PTTG1 단백질 억제물에서도 상기 선행 기술의 경우 150 nM의 안티센스 올리고머를 MiaPaCa 췌장암 세포주에 처리한 경우 PTTG1 단백질을 약 80%만을 억제할 수 있었다.

따라서 부작용을 최소화하고 보다 효율적으로 PTTG1 단백질 합성을 차단하여 암세포의 증식을 억제할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이 크게 대두되었다.

이에, 본 발명자들은 PTTG1 단백질 합성을 특이적이고 효과적으로 차단할 수 할 수 있는 PTTG1-siRNA를 제작하였고 이를 발현하는 벡터는 PTTG1이 과다 발현되어 있는 암세포의 증식을 효과적으로 저해함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 과발현에 의한 세포의 암 발생 및 진행에 중요한 기능을 할 것으로 알려진 PTTG1 단백질의 합성을 특이적으로 차단함으로써 암 세포의 증식을 유의성 있게 저해시키는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(pituitary tumor-transforming gene 1, PTTG1) mRNA에 특이적으로 상보 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 siRNA를 발현하는 발현 벡터를 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 siRNA 또는 발현벡터를 유효성분을 포함하는 항암 치료제를 제공한다.

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명은 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(pituitary tumor-transforming protein 1, PTTG1)의 mRNA에 특이적으로 상보 결합하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 제공한다.

이때, 상기 siRNA는 뇌하수체 종양-형질전환 단백질 mRNA 염기서열 내에서 선택되는 17 내지 25개의 센스 서열, 7 내지 11개의 헤어핀 루프서열 및 상기 센스서열에 상보적으로 결합하는 안티센스서열로 구성되며, 이 센스 염기서열은 특히 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호 1로 기재되는 PTTG1 mRNA의 염기서열 부분에 해당하는 염기인 서열번호 2, 6 또는 7로 기재되는 것이 바람직하고, 그 중에서도 PTTG1 mRNA의 551 내지 569번째 염기인 서열번호 2로 기재되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 헤어핀 루프서열은 특별히 한정되는 것은 아니나, 서열번호 5로 기재되는 5'-UUCAAGAGA-3'의 서열을 갖는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 PTTG1-siRNA 발현카세트가 삽입된 발현 벡터를 제공한다.

PTTG1-siRNA를 포함하는 플라스미드형태의 발현 벡터는 H1(pol III 프로모터) 프로모터, 헤어핀 루프(hairpin loop)구조를 형성하도록 고안된 PTTG1-siRNA 및 전사 종료 서열인 다섯 개의 T염기(T₅)로 구성되어진다. 상기 siRNA 염기서열을 함유하는 PTTG1-siRNA는 H1 프로모터에 의해 발현되도록 pSuper 플라스미드 벡터(OligoEngine, USA)의 *Hind* III/*Bgl* II 부위에 클로닝 하여 제작되었다(도 1 참조). 본 발명에서 PTTG1-siRNA를 발현시키기 위한 벡터는 pSuper 벡터에 제한되지 아니하고 PTTG1-siRNA를 발현시키기 위한 프로모터는 H1 프로모터에 제한되지 아니한다. 예를 들어 U6 프로모터, CMV 프로모터 등의 포유동물세포에서 유전자 발현을 유도할 수 있는 발현벡터들이 사용될 수 있다. PTTG1-siRNA 플라스미드 형태의 발현벡터는 칼슘 포스페이트, 리포솜 등의 방법으로 세포 내로 도입될 수 있다.

플라스미드 형태의 발현 벡터는 세포내 유전자 전달효율이 낮은 점이 있어, 본 발명에서는 PTTG1 siRNA의 효과적인 세포내로의 전달을 위한 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 아데노바이러스는 약 36 kb를 가지는 DNA 바이러스이다. 유전자 전달체로 이용되는 아데노바이러스는 바이러스의 복제에 필수적인 E1A 단백질이 결여되어 있으며, 그 자리에 목적 유전자를 대신하고 있어, 원하는 유전자의 전달은 가능하게 하지만, 보통의 세포 내에서 아데노바이러스의 증식에 의한 세포독성이 없도록 고안된 것이다. 본 발명에서 제공되는 아데노바이러스 벡터는 H1 프로모터 부위부터 siRNA 및 전사 종료 서열(T₅)을 포함하는 부위를 포함한다(도 4a 참조). 본 발명에서 아데노바이러스 벡터를 이용하여 PTTG1-siRNA를 발현시키기 위한 프로모터는 H1 프로모터에 제한되지 아니한다. 예를 들어 U6 프로모터, CMV 프로모터 등의 포유동물세포에서 유전자 발현을 유도할 수 있는 어떠한 프로모터들도 사용될 수 있다. 본 발명에서는 혈청형 5의 아데노바이러스를 이용하였지만, 기타 혈청형의 아데노바이러스, 세포 친화성(cell tropism)이 변이된 아데노바이러스 변이체를 이용하여

PTTG1-siRNA를 발현시킬 수 있다. PTTG1-siRNA의 세포 내 발현을 유도하기 위해서 사용되는 유전자 전달체가 아데노바이러스 벡터에만 제한되지 않는다. 예를 들어 PTTG1-siRNA의 세포 내 발현은 아데노-부속 바이러스(adenovirus), 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스, 백시니아바이러스 등의 복제 불능 또는 복제 가능 바이러스를 이용할 수 있다. 특히 암세포 용해성 바이러스(oncolytic adenovirus)가 PTTG1-siRNA 세포내 발현을 효과적으로 유도하기 위해 이용될 수 있다.

상기 발현벡터로 PTTG1이 과발현되어 있는 배양 암세포 및 생쥐 종양모델에 도입함으로써 PTTG1 단백질의 합성을 효과적으로 차단하였다(도 2a 및 4b 참조).

또한, 본 발명은 상기 siRNA 또는 상기 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 항암제를 제공한다.

본 발명의 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.

본 발명의 치료용 조성물은 상기 유효성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 치료용 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 치료용 조성물의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하며, 정맥내 주사에 의한 투여가 더욱 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 화합물의 경우 약 0.1 내지 100 mg/kg 이고, 바람직하게는 0.5 내지 10 mg/kg 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명의 siRNA 또는 siRNA 발현벡터를 마우스에 정맥내 주사에 의하여 투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 독성시험에 의한 50% 치사량(LD₅₀)은 적어도 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단된다.

본 발명의 치료용 조성물은 악성종양의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

본 발명의 PTTG1-siRNA 발현 벡터를 이용하여 암 세포증식을 억제시킬 수 있는 암세포는 간암, 담도암 세포를 포함하며, 특히 PTTG1이 과발현되어 있는 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. PTTG1-siRNA를 플라스미드 형태로 세포에 처리하였을 때 PTTG1이 과 발현된 담도암 세포주 JSHC의 세포증식이 억제되었다(도 2b 참조). 따라서 플라스미드 형태의 PTTG1-siRNA 발현 벡터는 암세포 증식을 억제하기 위하여 사용할 수 있다. Ad.PTTG1-siRNA 바이러스는 JSHC, HLK3와 같은 담도암 및 SK-Hep1, Huh-7, Hep3B 등과 같은 간암세포의 증식을 억제할 수 있고(도 6 참조), Huh-7 종양세포에 직접 투여하고 난 후 누드마우스에 주입한 경우에도 암세포 증식을 제어할 수 있다(도 8a 참조). 또한, 암세포 증식을 저해시킬 때에는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA를 암세포에 직접 주입하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA를 1×10^9 개로 약 200 mm³의 크기를 갖는 JSHC 담도암이 이식된 누드마우스의 암 괴에 직접 주입한 결과, 시간이 지남에 따라 종양의 성장이 현저하게 저해되었으므로(도 8b 참조), 종양을 치료하는데 있어서 매우 효과적일 수 있다.

또한, 본 발명에서 JSHC 담도암 세포주에 PTTG1-siRNA 아데노 바이러스 100 MOI를 처리한 경우 거의 100% 정도로 PTTG1 단백질 발현을 억제할 수 있음을 확인함으로써, 강력한 PTTG1 단백질 발현 억제능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> PTTG1-siRNA의 고안 및 플라스미드 발현 벡터 제작

PTTG1의 발현을 저해할 수 있는 siRNA의 타겟 서열은 PTTG1 mRNA(서열번호 1)의 551-569 부분에 해당하는 5'-GCAUUCUGUCGACCCUGGA-3'(서열번호 2), 182-203 부분에 해당하는 5'-AAAGGCUUUGGGAACUGUCA-3'(서열번호 6), 302-322 부분에 해당하는 5'-AAAGCUCUGUCCUGCCUCAG-3'(서열번호 7)로 디자인되었으며, H1 프로모터에 의해 발현되도록 pSuper 플라스미드 벡터(OligoEngine, USA)의 *Hind* III/*Bgl* II 부위에 각각을 클로닝하여 제작하였고, 상기 벡터들을 이용하여 PTTG1 단백질 합성 차단 효과를 조사한 결과 서열번호 2를 포함한 벡터가 가장 효과적이어서 하기 실시예의 모든 실험은 상기 벡터를 이용하여 진행하였다. PTTG1 단백질 합성을 차단하지 못하는 대조군으로써 상기 서열번호 2의 11번째 염기 G를 A로 치환한 5'-GCAUUCUGUCAACCCUGGA-3'(서열번호 3) 서열을 pSuper 플라스미드 벡터에 *Hind* III/*Bgl* II 부위에 클로닝 하여 PTTG1-siRNA1M이라 하였으며, 3번째 염기 A를 G로, 11번째 염기 G를 A로 치환한 5'-GCGUUCUGUCAACCCUGGA-3'(서열번호 4) 서열을 pSuper 플라스미드 벡터의 *Hind* III/*Bgl* II 부위에 클로닝하여 PTTG1-siRNA2M이라 하였다(도 1). 도 1은 본 발명의 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1 mRNA에 특이적인 siRNA를 발현시키기 위한 발현 벡터를 나타낸 개열지도이다.

<실시예 2> PTTG1-siRNA 플라스미드 발현 벡터의 활성 측정

<실시예 2-1> PTTG1-siRNA에 의한 세포 내 PTTG1 단백질 합성 분석

PTTG1-siRNA를 함유하는 플라스미드 발현 벡터가 실제로 PTTG1 단백질 합성을 차단하는지는 PTTG1-siRNA 존재 하에서 Flag 에피토프로 표지된 PTTG1 발현의 감소 여부를 웨스턴 블롯 분석으로 검증하였다. 보다 구체적으로 HEK 293 세포주에 Human PTTG1 cDNA(한국생명공학연구원, 인간 유전체 기능연구사업단에서 제공)로부터 RT-PCR하여 얻은 DNA 절편을 pFlagCMV2(Sigma, USA)에 *Eco*R I/*Bam*H I으로 클로닝하여 제조한 Flag-PTTG1을 포함하여 표지된 각각의 발현 벡터들을 갈슘-포스페이트 방법으로 세포 내에 도입하였다. 48시간 후 세포들을 수거하고 방사성 면역침전 완충액(Radio-immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)으로 파쇄하였다. 이를 SDS-시료 완충액(62.5 mM Tris, 2% SDS, 5% 베타-머캅토에탄올, 10% 글리세롤, 0.01% 브로모페놀 블루)과 혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 12.5% 폴리알킬아마이드 전기영동을 수행하였다. 분리된 단백질들을 PVDF 막으로 이동시킨 후, 막을 5% 탈지분유가 포함된 PBST(0.05% Tween 20[®]이 포함된 인산 완충용액)로 1시간 블로킹하고 마우스 항 플래그 항체로 실온에서 한 시간 반응시켰다. 반응 후 잔여 항체는 PBST로써 충분히 세척하고 호스 래디쉬 퍼옥시다제가 표지된 토끼 항 마우스 항체로 실온에서 한 시간 다시 반응시킨 후, ECL 용액으로 반응 여부를 확인하였다(도 2a). 도 2a는 본 발명의 PTTG1-siRNA 발현 벡터가 PTTG1 단백질 합성을 특이적으로 차단함을 나타낸 웨스턴 블롯 분석 결과의 사진이다.

도 2a에서 보듯이 PTTG1-siRNA에 의해서는 Flag-PTTG1의 발현이 현저히 감소되었으며, 대조군으로 사용된 PTTG1-siRNA1M 및 PTTG1-siRNA2M의 경우 Flag-PTTG1 발현의 감소를 확인 할 수 없었다. 이는 본 발명에서 고안된 염기서열을 갖는 PTTG1-siRNA를 발현하는 벡터가 PTTG1 단백질의 발현을 효과적으로 차단한다는 것을 시사한다.

<실시예 2-2> PTTG1-siRNA에 의한 암세포 증식 저해능 분석

PTTG1-siRNA의 작동능은 PTTG1이 과다 발현된 담도암 세포주 JSHC의 세포 증식 억제를 시험함으로써 검증되었다. JSHC 암 세포주에서 PTTG1 단백질의 발현을 웨스턴 블롯으로 분석하였다(도 4b 및 도 5, 라인 1). 이어 PTTG1-siRNA에 의해서 암세포의 증식에 미치는 결과를 조사하였다. 100-mm 배양접시에 배양된 JSHC 세포주에 15 µg의 PTTG1-siRNA 또는 PTTG1-siRNA1M을 갈슘-포스페이트 방법으로 도입하였다. 도 2a에서 PTTG1-siRNA1M 또는 PTTG1-siRNA2M의 경우 PTTG1 단백질 합성 차단 효과가 관찰되지 않았으므로 PTTG1-siRNA1M 만을 대조로 하여 실험하였다. 도입 12 시간 후 각각의 세포를 트립신 처리하여 단일 세포화하여 웰당 10⁴개의 세포를 6웰 플레이트에 옮기고, 6 시간 간격으로 세포수의 변화를 헤마사이토미터로 확인하였다(도 2b). 도 2b는 본 발명의 PTTG1-siRNA 발현 벡터가 JSHC 담도암 세포주의 증식에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다. Mock은 갈슘-포스페이트 도입 용액만을 실험군과 동일하게 처리하여 나타낸 결과이다.

도 2b에서 보듯이, 대조군(Mock 및 PTTG1-siRNA1M)에 비하여 PTTG1-siRNA를 도입한 경우 JSHC의 증식이 약 2배 정도 늦어짐을 알 수 있었다. 이는 JSHC 경우에는 PTTG1-siRNA를 이용한 암세포의 성장 저해 즉, 항암 효과를 볼 수 있는 모델 세포주가 될 수 있을 것으로 사료되어졌다.

<실시예 2-3> p53 리포터 에세이를 이용한 PTTG1-siRNA의 활성 분석

PTTG1은 암 억제 유전자 p53의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다(Pintor-Toro, J. A. et al., Nat. Gen., 32: 306-311, 2002). 이 사실에 근거하여 PTTG1-siRNA의 활성을 p53 반응 부위(response element, RE)를 가지는 p53RE-luciferase 리포터(Oren, M., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 88: 9979-9983, 1991)로 확인하고자 하였다. 대상 세포주로는 p53 활성이 비정상인 것으로 알려진 HeLa 세포주와 여기에 p53을 도입하여 다음과 같이 시험하였다. 각각의 세포주에 공히 동량의 p53RE-luc과 PTTG1-siRNA, PTTG1-siRNA1M, 또는 PTTG1-siRNA2M 발현 벡터들을 도 3에 제시한 조합으로 리포솜(LipofectaminTM, Invitrogen, USA) 방법으로 도입시키고 24시간 후에 세포를 수거하여 루시페라제 활성을 측정하여 p53의 활성 변화를 관찰하였다(도 3). 도 3은 PTTG1이 p53의 기능을 저해한다는 공지의 사실을 근거로 실제로 PTTG1-siRNA의 작동성을 나타낸 그래프이다.

도 3에서 보듯이, PTTG1에 의한 p53 활성 감소를 확인하였으며, PTTG1 단백질 합성을 차단하는 PTTG1-siRNA가 존재하면 그 활성이 억제되지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 상기 결과에서, PTTG1이 과발현된 암 세포주에서는 p53의 세포사멸 활성이 저해되어 있을 것이며, PTTG1 단백질 합성을 PTTG1-siRNA으로 저해시키면, p53의 세포사멸활성이 높아질 것을 기대 할 수 있었다. 상기 결과로 본 발명의 PTTG1-siRNA를 함유하는 발현벡터가 PTTG1 단백질 합성을 효과적이고, 특이적으로 차단한다는 것을 알 수 있다.

<실시예 3> PTTG1-siRNA 아데노바이러스 벡터 제작 및 PTTG1 단백질 합성 차단능 분석

<실시예 3-1> Ad.PTTG1-siRNA 및 Ad.PTTG1-siRNA1M 벡터 제작

본 발명에서 제공하는 PTTG1-siRNA를 포함하는 아데노바이러스 벡터(Ad.PTTG1-siRNA)는 하기와 같은 방법으로 제작되었다: 세포 내로 전달 및 발현을 원하는 유전자를 제공하는 아데노바이러스 제작용 pShuttle(BD Bioscience, USA) 벡터에 상기에서 제작된 PTTG1-siRNA 플라스미드를 *Xba* I/*Hind* III로 처리하여 H1 프로모터에서 T₅ 전사종료 서열을 함유하는 DNA 절편을 클로닝함으로써 제작하였다 (pShuttle/PTTG1-siRNA). 아데노바이러스의 E1A 유전자 대신 PTTG1-siRNA로 치환된 아데노바이러스 벡터를 만들기 위해 pAdEasy-1 플라스미드(Stratagene, USA)와 상기 기술한 pShuttle/PTTG1-siRNA를 사용하였다. 아데노바이러스 유전자를 포함하고 있는 pAdEasy-1과 pShuttle/PTTG1-siRNA 간의 재조합은 *E. coli* BJ5183 균주에 동시에 형질도입함으로써 수행되었다. PTTG1의 단백질 발현을 차단하지 못하는 PTTG1-siRNA1M이 도입된 대조 아데노바이러스 벡터도 상기와 같은 방법으로 제작되었다. 대장균에서 상동재조합에 의해 얻어진 재조합 아데노바이러스 유전체 함유 플라스미드는 카나마이신 선택배지에서 자란 *E. coli* 콜로니로부터 DNA를 분리하여 제한 효소 분석을 통해 확인하였다(도 4a). 도 4a는 본 발명의 PTTG1-siRNA를 함유하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터(Ad.PTTG1-siRNA) 개열지도이다.

재조합 아데노바이러스 유전체 함유 플라스미드에서 아데노바이러스 입자 제작은 하기와 같이 수행하였다: Ad.PTTG1-siRNA 및 Ad.PTTG1-siRNA1M을 갖고 있는 재조합 아데노바이러스 유전체 함유 플라스미드를 *Pac* I으로 절단하여 아데노바이러스의 복제원점인 말단 반복 서열(terminal repeat, TR)들이 양쪽 끝에 존재하도록 선형화하고 60-mm 배양접시에서 70-80%의 밀도로 자란 HEK293 세포에 칼슘 포스페이트 방법으로 도입하였다. 재조합 아데노바이러스 유전체 함유 플라스미드가 도입되어 아데노바이러스 입자가 만들어지는 세포는 2-3일 후 주위 세포보다 커졌고, 4-5일 후에 전체 세포의 약 50%가 뭉치거나 배지위로 떠올라 이를 배지와 함께 수거하여 바이러스 입자가 포함되는 일차 세포 추출액을 확보하였다. 세포 수거액을 동결-해빙(freezing-thawing) 방법을 통하여 세포 속 바이러스 입자까지 배지로 탈출하도록 하고, 이 상층액을 다시 100-mm 배양접시에 60-70% 정도로 준비된 세포에 재감염 시켜 바이러스의 존재 유무 및 재감염의 가능성을 확인하였다. 아데노바이러스 감염 후 증식에 의해 세포가 죽게 되면, 다시 수거하여 다량의 HEK293 세포주에 재감염시킴으로써 아데노바이러스 입자를 증폭하고 플라크 형성법을 이용하여 바이러스의 수를 결정하였다. 아울러 아데노바이러스 입자로부터 DNA를 분리하여 제한 효소로 절단하여 Ad.PTTG1-siRNA 또는 Ad.PTTG1-siRNA1M이 아데노바이러스임을 확인하여 복제 불능 Ad.PTTG1-siRNA 및 Ad.PTTG1-siRNA1M 바이러스 벡터를 수득하였다.

<실시예 3-2> Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스 벡터의 PTTG1 단백질 합성 차단능 분석

Ad.PTTG1-siRNA 및 Ad.PTTG1-siRNA1M 아데노바이러스의 활성을 확인하기 위하여 하기와 같은 방법으로 수행하였다: JSHC 담도암 세포주에 각각의 아데노바이러스를 50 또는 100 MOI(multiplicity of infection)로 감염시키고 24시간 후 세포들을 수거하고 RIPA완충액으로 파쇄하였다. 이를 SDS-시료 완충액과 혼합하여 95°C에 5분간 끓인 후 12.5% SDS-PAGE하였다. 분리된 단백질을 PVDF 막으로 이동시키고 PTTG1 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 (도 4b). 도 4b는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA가 세포 내에 내재하는(intrinsic) PTTG1 단백질 합성을 차단함을 나타낸 웨스턴 블롯 분석 결과의 사진이다.

도 4b에서 보듯이, Ad.PTTG1-siRNA에 의해서 내재하는(intrinsic) PTTG1의 단백질 합성이 현저하게 차단되었으나, Ad.PTTG1-siRNA1M에 의한 PTTG1 단백질 합성 차단 효과는 관찰되지 않았다. 이 결과는 상기 실시예 2-1(도 2a 참조)에 제시한 PTTG1-siRNA발현 벡터를 이용하여 얻은 결과와 일치하고 있다. 상기 결과는 본 발명의 PTTG1-siRNA 함유 아데노바이러스 벡터가 PTTG1 단백질 합성을 특이적으로 차단한다는 것을 시사한다. 또한 PTTG1 단백질 억제물에서도 미국 공개 특허 제 US2003/0194396호 및 미국 공개 특허 제 US2003/0190629호에서 경우 150 nM의 안티센스 올리고머를 MiaPaCa 췌장암 세포주에 처리한 경우 PTTG1 단백질을 약 80%만을 억제한 것에 비해 PTTG1-siRNA 아데노 바이러스 100 MOI를 처리한 경우 거의 100% 정도로 PTTG1 단백질 발현을 억제할 수 있음을 확인함으로써, 강력한 PTTG1 단백질 발현 억제능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

<실시예 4> 각종 암세포주에서 PTTG1 단백질 발현 양상 분석

각종 간암 세포주인 SK-Hep1, SNU368, Huh-7, Hep3B, Chang liver 및 담도암 세포주인 JSHC, HLK3, CK-K1에서 PTTG1의 발현 양상을 알아보기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 각 세포주를 10cm 배양 접시에 약 10⁵개의 세포수로 초기 배양하여 성장이 활발한 이틀 후에 수거하여 RIPA 완충액에 녹이고 초음파 분쇄기로써 완전히 분쇄 하여 세포 추출액을 준비 하였다. 이를 상기 실시예 3과 같이 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 5는 각종 간암 및 담도암 세포주에서 PTTG1 단백질의 발현 양상을 웨스턴 블롯 분석의 결과로 나타낸 사진이다.

도 5에서 보듯이, PTTG1 단백질은 담도암 세포주 JSHC에서 특별히 과발현되어 있었으며, 다음으로 SK-Hep1, Huh-7 등의 간암 세포주에서 높은 발현양상을 나타내었다. 담도암 세포주 HLK3, 간암 세포주 Hep-3B, SNU368, 담도암 세포주 CK-K1, Chang's liver 세포주에서도 PTTG1의 발현이 확인되었지만, 그 발현정도는 JSHC, SK-Hep1, Huh-7 암세포주보다 현저하게 낮았다. 사람의 정상 섬유아 세포주 MRC5에서는 상기한 암 세포주에 비해 PTTG1 단백질 발현이 매우 낮음을 알 수 있었다.

<실시예 5> Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스 벡터의 각종 담도암 및 간암세포주의 증식 억제능 분석

Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스에 의한 간암세포주의 성장 억제능 시험은 하기와 같이 수행하였다: 간암 세포주 SK-Hep1, Huh-7, Hep3B, SNU368, Chang's liver 및 담도암 세포주 JSHC, HLK3, CK-K1, 정상 섬유아세포 MRC5 세포주를 웰당 10⁵개의 세포수로 12웰 플레이트에 준비하였다. 각각 세포주에 0, 10, 50, 100 또는 200 MOI의 Ad.PTTG1-siRNA 또는 Ad.PTTG1-siRNA1M 대조 바이러스를 감염시키고 48시간 후 크리스탈 바이올렛 염색으로 세포의 상태를 관찰하였다(도 6). 도 6은 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스가 각종 간암 세포주 및 담도암 세포주의 증식을 저해함을 나타낸 사진이다.

도 6에서 보듯이, Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스는 담도암 세포주 JSHC에서 가장 강한 세포성장 저해효과를 나타내었으며, 간암 세포주 Huh-7, SK-Hep1 등에서도 성장을 강하게 저해하는 것으로 나타났다. 반면, SNU368, Hep3B 간암 세포주에서는 그 효과가 미미하였고, Chang' liver, CK-K1 등의 암 세포주에서는 그 효과가 거의 관찰되지 않았다. 또한 정상 섬유아 세포주 MRC5에서는 세포독성이 상당히 낮은 수준으로 나타났다. 이 결과는 웨스턴 블롯 분석에서 얻은 PTTG1 단백질 발현양상과 대부분 일치하고 있다. 다시 말해서 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA에 의한 암 세포 증식저해효과는 세포 내 PTTG1 단백질 발현량과 비례하여 나타났다. 상기 실험 결과로부터 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노 바이러스는 PTTG1이 과발현되어 있는 암세포의 증식을 저해할 수 있음을 시사한다.

<실시예 6> Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스 벡터의 암세포 증식억제 기전 분석

PTTG1이 p53과 결합하여 p53에 의한 세포사멸기능이 저해된다는 연구 보고(Pinto-Toro, J. A. et al., Nat. Genet., 32: 306-311, 2002)에 근거하여 PTTG1의 암세포 증식 저해 효과가 암 억제 유전자 p53 의존적으로 일어나는지 또 실제로 세포사멸이 유도되는지를 하기와 같이 확인하였다: 야생형 p53을 가진 대장암 HCT116과 p53이 제거된 HCT116세포주

(HCT116Δ53)를 웰당 10^5 개의 세포수로 12웰 플레이트에 준비하였다. 각 세포주에 0, 10, 50, 100 또는 200 MOI의 Ad.PTTG1-siRNA 및 Ad.PTTG1-siRNA1M 대조 바이러스를 감염시키고 48시간 후 크리스탈 바이올렛 염색으로 세포의 상태를 관찰하였다(도 7a). 도 7a는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스에 의한 대장암세포의 증식 억제에 암 억제 유전자 p53 의존적으로 일어날 수 있음을 나타낸 그래프이다.

도 7a에서 보듯이, 야생형 p53을 가진 HCT116 대장암세포가 p53이 결손된 세포주보다 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스에 의해 효과적으로 사멸되었다.

담도암 세포주 JSHC는 야생형 p53을 가지고 있는 것으로 본 발명자들에 의해 조사되었다. 그러므로 Ad.PTTG1-siRNA에 의한 JSHC의 성장 저해는 p53 항암 유전자의 활성화에 기인하는 것으로 추측되어지고, 이를 확인하기 위하여 FACS 분석을 수행하였다. 준비한 담도암 JSHC에 각 50 MOI의 Ad.PTTG1-siRNA 또는 Ad.PTTG1-siRNA1M 아데노바이러스를 감염시키고 48 시간 후 세포를 수거하고 10 μ g/ml 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide:정상적인 이중구조 염색체에 염색되는 색소)로 세포 사멸(염색체의 절편화가 일어남으로 염색정도가 정상과 다름) 정도를 관찰하였다(도 7b). 도 7b는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스에 의한 JSHC담도암 세포의 증식 억제 효과가 세포 사멸에 의한 것임을 나타낸 FACS 결과이다.

도 7b에서 보듯이, Ad.PTTG1-siRNA에 의해 약 31%의 세포가 사멸되었음을 알 수 있었다. 상기 결과는 암세포에서 PTTG1이 야생형 p53과 결합하여 p53의 세포사멸기능을 저해하고 있어 세포사멸에 내성이 있으나, 본 발명의 PTTG1 단백질을 차단할 수 있는 PTTG1-siRNA가 세포 내에서 발현되어 PTTG1 단백질의 합성을 차단함으로써 p53의 세포 사멸능력이 회복한 결과로 해석될 수 있으며, PTTG1-siRNA의 암 세포 성장 억제 효과는 부분적으로는 세포사멸에 의한 것으로 추정될 수 있다.

<실시예 7> Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스 벡터의 생쥐종양 모델에서의 항암 효과 분석

<실시예 7-1> Ad.PTTG1-siRNA 바이러스로 감염된 간암세포주가 이식된 누드마우스 모델에서의 항암효과

상기 실시예 5(도 6 참조)에서 Huh-7 간암 세포주에 Ad.PTTG1-siRNA를 처리하였을 경우 그 증식이 현저하게 저해됨이 관찰되었다. 이 현상이 생체 내에서 일어나는지를 알아보기 위하여 5×10^6 개의 Huh-7 세포에 Ad.PTTG1-siRNA 또는 Ad.PTTG1-siRNA1M 바이러스를 각 100 MOI로 감염시키거나 인산완충액으로 처리한 후 각각의 Huh-7 세포를 6 주령의 암컷 누드마우스에 피하주사하였다(각 군당 생쥐 3마리). 생쥐에 이식된 Huh-7 간암 세포의 증식이 Ad.PTTG1-siRNA 바이러스에 의해 억제되는 지를 17일 동안 종양의 크기를 측정하여 조사하였다(도 8a). 종양의 크기는 '가로² × 세로² / 2 = 종양 부피 (mm³)'공식을 이용하여 계산하였다. 도 8a는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스가 도입된 Huh-7 간암 세포주를 주사한 누드마우스에서 종양의 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 8a에서 보듯이, Ad.PTTG1-siRNA1M 및 포스페이트 완충용액으로 처리한 군(PBS)(n=3)의 경우에 비해 Ad.PTTG1-siRNA를 처리한 암세포가 이식된 생쥐에서 암 세포의 증식이 현저히 저해되는 것을 알 수 있었다. 이는 Ad.PTTG1-siRNA는 생체 내 조건에서도 암세포의 증식을 현저히 감소시킴을 확인 할 수 있었다.

<상기에 7-2> 종양이 형성된 누드마우스 모델에서 Ad.PTTG1-siRNA 바이러스의 항암효과

상기 실시예 5(도 6 참조)에서 담도암 세포주 JSHC 세포주에 Ad.PTTG1-siRNA를 처리하였을 경우 그 증식이 현저하게 저해됨이 관찰되었다. 이 현상이 실제로 생체 내에서 일어나는지를 알아보기 위하여 107개의 담도암 세포주 JSHC를 누드마우스의 피하에 주사하고, 1 주일 후 종양이 평균 직경 5 mm로 되었을 때 각각 109개 (plaque-forming unit)의 정제된 Ad.PTTG1-siRNA 또는 Ad.PTTG1-siRNA1M 바이러스를 함유하거나 함유하지 않은 포스페이트 완충용액 100 μ l를 종양피에 직접 한 번 주사하고 이후 종양의 크기를 19일 간 측정하였다(도 8b). 도 8b는 JSHC 담도암 세포주를 누드마우스에 이식하여 생긴 종양에 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA 아데노바이러스를 주사한 후 종양의 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 8b에서 보듯이, Ad.PTTG1-siRNA1M(n=7) 및 포스페이트 완충용액으로 처리한 군(PBS)(n=5)의 경우에 비해 Ad.PTTG1-siRNA(n=7)를 주사한 경우 1마리에서 종양이 완전히 소실되었고 전체적으로 종양의 성장이 현저히 억제되었다. 이는 본 발명의 Ad.PTTG1-siRNA는 생성된 종양피에서도 종양의 성장을 현저히 억제함을 확인 할 수 있었다.

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1에 특이적인 siRNA 및 상기 siRNA의 발현백터를 종양세포에 도입시킬 경우, PTTG1 단백질의 합성을 억제하여 부분적으로는 암 억제 유전자 p53의 세포사멸 활성을 높임으로써 종양 세포의 세포 사멸을 촉진시킬 수 있음을 확인할 수 있었고, 누드마우스 모델에서도 종양의 형성 억제뿐만 아니라 생성된 종양의 소실 및 성장의 억제를 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1에 특이적인 siRNA 및 상기 siRNA의 발현 백터는 단독으로 또는 다른 항암 치료제와 병용하여 암을 치료하기 위한 유전자 치료에 있어서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

이상에서 주장하고 입증하였듯이, 본 발명은 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(pituitary tumor-transforming gene 1)의 mRNA에 특이적으로 상보 결합하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA), 그를 발현하는 백터 및 그를 유효성분으로 포함하는 항암 치료제를 제공한다. 본 발명에서 제공하는 PTTG1-siRNA를 포함하는 발현백터는 PTTG1 단백질 발현을 효과적이고 특이적으로 차단하였고, PTTG1이 과발현 되어 있는 암 세포의 성장을 배양세포 및 생쥐 종양 모델에서 저해하는 효과를 나타내었다. 따라서 PTTG1-siRNA를 포함하는 발현 백터는 단독으로 또는 다른 항암 치료제와 병용하여 암을 치료하기 위한 유전자 치료 소재로서 매우 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 2, 6 또는 7인 센스서열, 7 내지 11머의 헤어핀 루프서열 및 상기 센스서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1(pituitary tumor-transforming protein 1)의 mRNA에 특이적으로 상보 결합하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA).

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1항에 있어서,

상기 헤어핀 루프서열은 서열번호 5인 것을 특징으로 하는 작은 간섭 RNA.

청구항 5.

제 1항의 작은 간섭 RNA를 발현하는 발현백터.

청구항 6.

제 5항에 있어서,

상기 발현백터는 플라스미드 또는 아데노-부속 바이러스, 레트로바이러스, 백시니아바이러스, 및 암세포 용해성 바이러스로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 바이러스성 벡터인 발현 백터.

청구항 7.

제 6항에 있어서,

상기 플라스미드는 도 1의 개열지도로 나타내어지는 PTTG1-siRNA인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 8.

제 6 항에 있어서,

상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 발현벡터인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 9.

제 8항에 있어서,

상기 아데노바이러스는 도 4a의 개열지도를 갖는 Ad.PTTG1-siRNA인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 10.

제 1항의 작은 간섭 RNA 또는 제 5 내지 9항 중 어느 한 항의 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 악성 종양 치료제.

청구항 11.

제 10항에 있어서,

역학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 악성 종양 치료제.

청구항 12.

제 10항에 있어서,

상기 악성 종양은 뇌하수체 종양-형질전환 유전자 1의 단백질이 과발현되어 악성 종양인 것을 특징으로 하는 악성 종양 치료제.

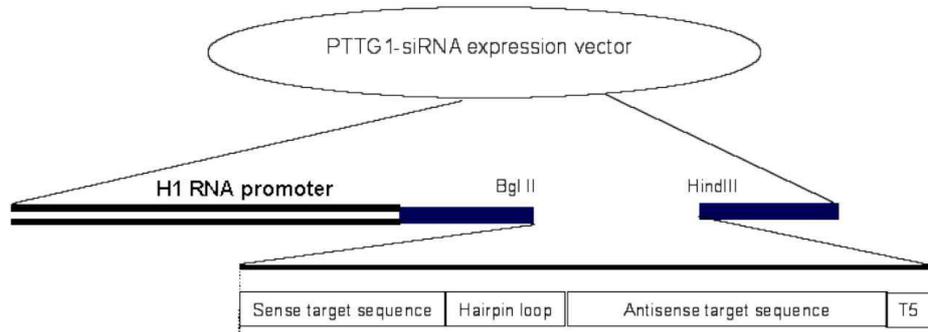
청구항 13.

제 10항에 있어서,

상기 악성 종양은 간암 또는 담도암인 것을 특징으로 하는 악성 종양 치료제.

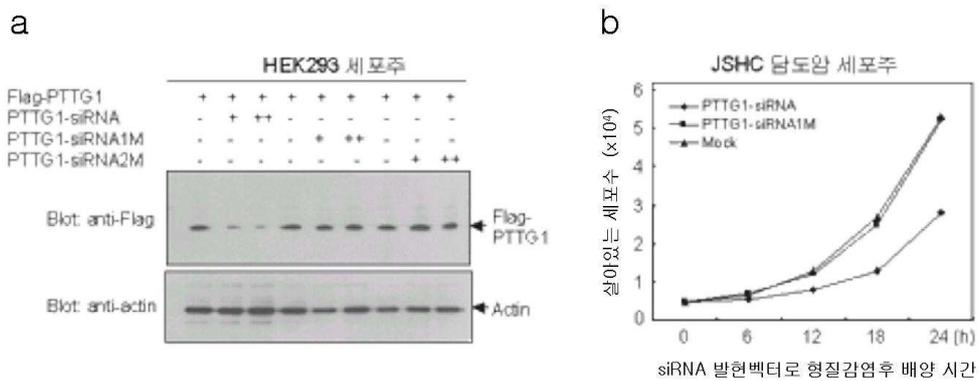
도면

도면1

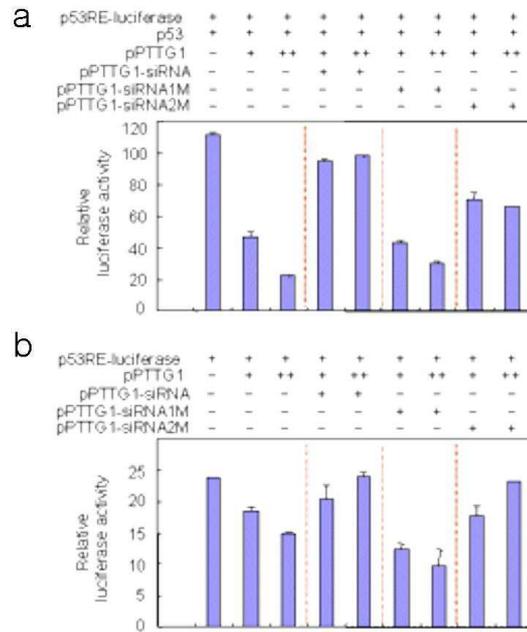


PTTG1-siRNA : GCATTCTGTCGACCCTGGAttcaagagaTCCAGGGTCGACAGAATGCTTTTT
 PTTG1-siRNA1M : GCATTCTGTCAACCCTGGAttcaagagaTCCAGGGTTGACAGAATGCTTTTT
 PTTG1-siRNA2M : GCGTTCTGTC AACCCCTGGAttcaagagaTCCAGGGTTGACAGAACGCTTTTT

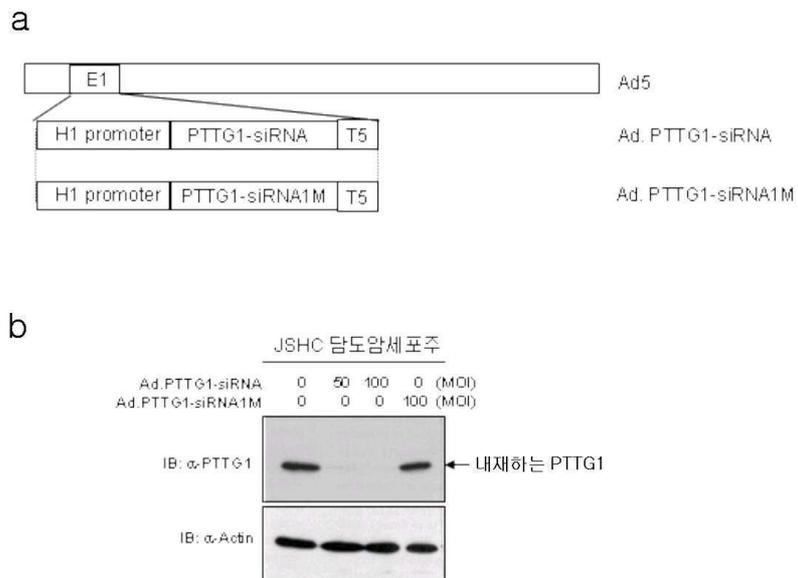
도면2



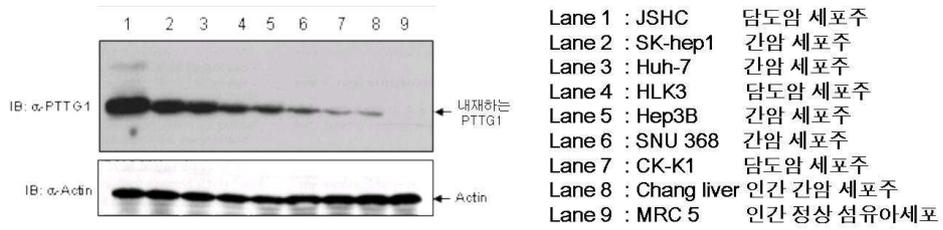
도면3



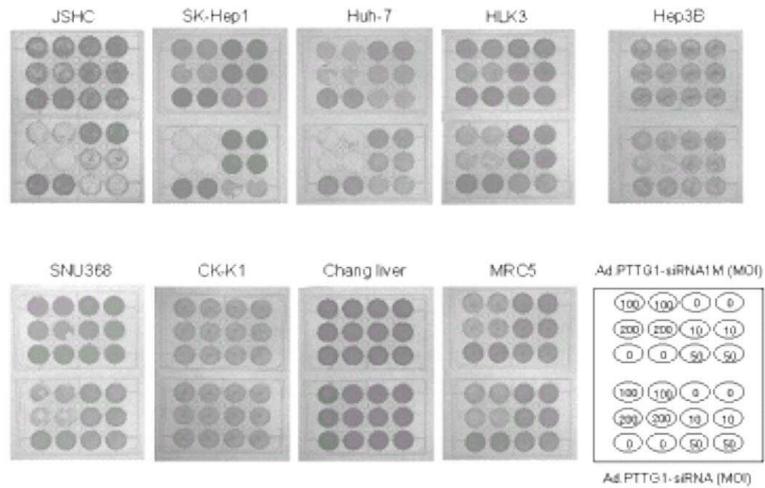
도면4



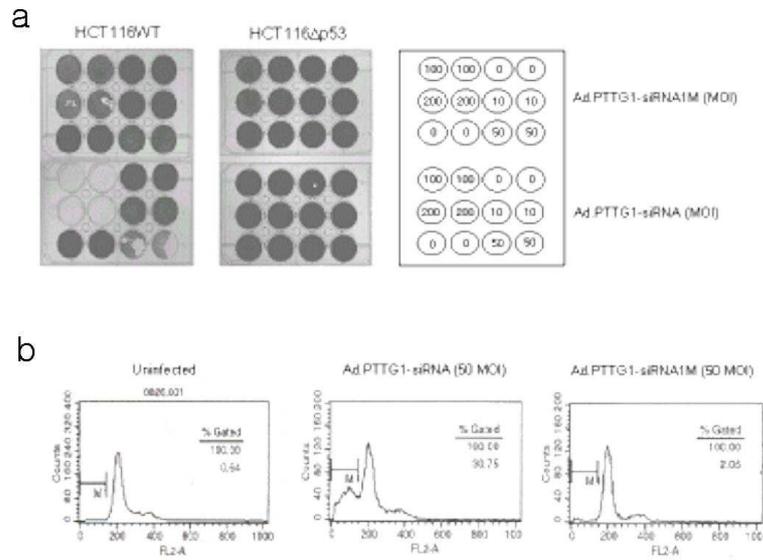
도면5



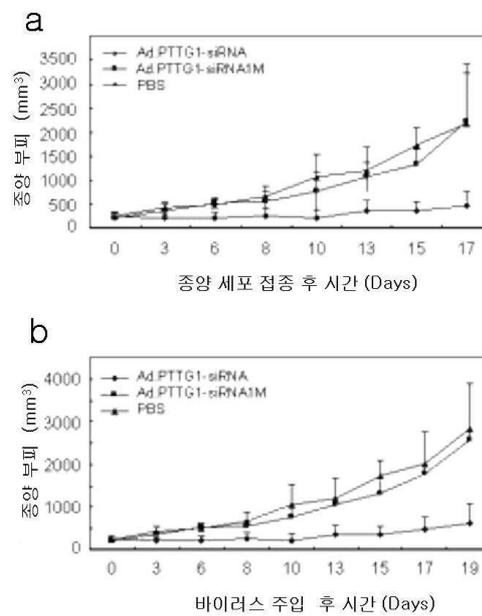
도면6



도면7



도면8



서열목록

서열목록 전자파일 첨부