



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월12일
(11) 등록번호 10-1285434
(24) 등록일자 2013년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0038975
(22) 출원일자 2011년04월26일
심사청구일자 2011년04월26일
(65) 공개번호 10-2012-0121161
(43) 공개일자 2012년11월05일
(56) 선행기술조사문헌
US20060019256 A1
US20050250137 A1
염기서열
KR1020090033699 A

(73) 특허권자
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
(72) 발명자
서성욱
서울특별시 강남구 남부순환로 3032, 미도 아파트
105동 404호 (대치동)
이혜원
경기도 안성시 공도읍 용두리 풍림아파트 105동
704호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

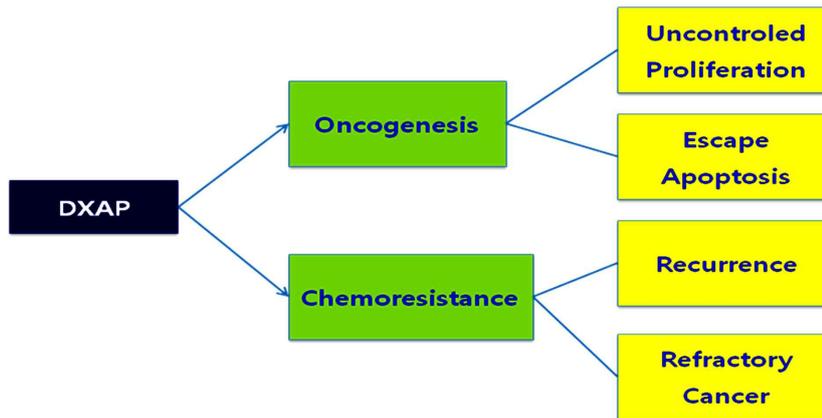
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 R R P 12 억제제를 포함하는 항암 및 항암감작 조성물

(57) 요약

본 발명은 RRP12(ribosomal RNA processing 12 homolog) 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 및 항암감작 조성물, 및 항암제 또는 항암감작제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 RRP12에 대한 암의 표적치료에 활용할 수 있으며, 암세포의 항암제 내성을 억제하여 항암제의 항암 효과를 증가시킴으로써 암세포의 항암제 내성을 억제하여 암 치료에 사용될 수 있는 항암제 및 항암 보조제 개발에 활용할 수 있다.

대표도 - 도12



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0010716
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업
 연구과제명 골육종에서 새로운 종양 관련 단백질인 DXAP의 생물학적 역할 규명
 주관기관 삼성서울병원
 연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0011091
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 기초연구사업-일반연구자지원사업-기본연구지원사업(모험연구)
 연구과제명 골육종에서 새로운 종양 관련 단백질인 DXAP의 생물학적 역할 규명
 주관기관 삼성서울병원
 연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

RRP12(ribosomal RNA processing 12 homolog) 유전자에 특이적인 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 앵타머, 또는 RRP12 단백질에 특이적인 앵타머, 항체 또는 단일사슬 가변영역 단편을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택된 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암은 골육종, 거대세포종, 연골종, 활액막 육종, 방광암, 위암, 유방암, 대장암, 자궁 경부암, 전립선암 및 표피암으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 5

RRP12(ribosomal RNA processing 12 homolog) 유전자에 특이적인 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 앵타머, 또는 RRP12 단백질에 특이적인 앵타머, 항체 또는 단일사슬 가변영역 단편을 포함하는 항암감작 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항암감작 조성물은 항암제 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택된 것인 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 암은 골육종, 거대세포종, 연골종, 활액막 육종, 방광암, 위암, 유방암, 대장암, 자궁 경부암, 전립선암, 및 표피암으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 10

제5항, 제6항, 및 제8항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물 및 항암제를 포함하는 항암 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin)인 항암 조성물.

청구항 12

- (a) 시험물질을 처리한 후 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성을 분석하는 단계; 및
- (b) 시험물질을 처리한 후 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성이 시험물질을 처리하지 않은 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성에 비하여 억제되면 상기 시험물질을 항암제 또는 항암감작제로 판단하는 단계를 포함하는, 항암제 또는 항암감작제 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 RRP12(ribosomal RNA processing 12 homolog) 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 및 항암감작 조성물, 및 항암제 또는 항암감작제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 암(악성 종양)은 현대사회에서 사망률 1위를 차지하는 주요 질병으로 현재까지 많은 연구에도 불구하고 획기적인 치료법이 없는 실정이다. 암의 치료에 있어 항암제와 같은 화학요법제를 이용한 치료는 어느 정도 효과를 거두고는 있으나 암의 다양한 발병기작과 항암제 내성 발현으로 인하여 많은 연구가 요구되고 있다.
- [0003] 최근 수십 년간 진단과 치료기술의 발달로 암치료를 대해 제한적으로나마 치료율의 향상과 기능적 보존이라는 긍정적인 결과를 얻기도 했지만 많은 진행성 암에 있어서 5년 생존율은 5 내지 50%에 머물고 있다. 이러한 암은 공격적인 침습, 림프전전이, 원격전이와 이차 암의 발생을 특징이라 할 수 있는데 일부 암에 있어서는 다양한 연구와 치료에도 불구하고 지난 20년간 생존율이 크게 변하지 못한 상태이다. 최근에는 이러한 암에 대해 분자생물학적인 접근을 통해 치료효과를 높이려는 시도가 많아지고, 암의 증식, 전이와 세포사멸과 관련된 표적치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 이러한 연구와 함께 현재까지 많은 항암제의 개발에도 불구하고, 항암제만으로 완치가 가능한 암은 소수암에 불과한데, 그 이유는 항암제를 이용한 암 치료시 항암제에 암 세포가 반응을 하지 않거나 초기에는 효과적으로 종양이 줄어들지만 치료 도중 또는 치료 후에 항암제에 대한 내성이 생기기 때문이다. 따라서 효과적인 항암제 치료를 위해서는 항암제에 대한 암세포의 내성 등 항암제에 대한 저항성을 극복하여야 한다.
- [0005] 한편, RRP12(ribosomal RNA processing 12 homolog) 유전자는 gene ID 23223의 인간의 10번 염색체 상의 10q24.1의 위치에 있는 유전자로서 FLJ20231, KIAA0690 또는 DKFZp762P1116라고도 불린다. 상기 RRP12 유전자가 코딩하는 단백질은 리보솜의 인 수송(nucleolar transport)을 도와 생체내 합성(biogenesis)에 영향을 주는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 기능과 작용기전이 알려져 있지 않으며, 특히 암 치료과 관련된 RRP12 단백질의 기능은 알려진 바 없다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 점을 고려하여 RRP12 유전자 및 RRP12 단백질의 기능에 대하여 예의 연구한 결과, RRP12 유전자의 종양 세포 내 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 종양 세포 내 활성 억제제가 항암 및 항암감작 효과를 가짐을 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암감작 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항암감작 조성물 및 항암제를 포함하는 항암 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 또는 항암감작제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명에서, 상기 RRP12(ribosomal RNA processing 12 homolog) 유전자는 인간의 10번 염색체 상에 있는 유전자로서, 서열번호 1의 mRNA 서열을 가질 수 있다. RRP12 유전자가 코딩하는 단백질은 리보솜의 인 수송을 도와 생체내 합성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으나, 정확한 기능과 작용 기전은 알려져 있지 않으며, 서열번호 2의 서열을 가질 수 있다. 본 발명자는 상기 RRP12 단백질의 종양 세포와의 연관성을 밝혀내었으며, 특히 독소루비신(doxorubicin) 처리 시에 그 활성이 증가하는 것을 밝혀내어 상기 RRP12을 독소루비신 활성화 단백질(doxorubicin activating protein, DXAP)로 명명한 바, 이하에서 DXAP는 RRP12와 동일한 의미로 취급된다. 또한, 본 발명자는 RRP12가 종양 세포의 생존에 필수적인 단백질이며, 항암제 투여시 RRP12의 인산화 활성이 종양 세포의 항암제에 대한 생존 기전임을 확인할 수 있었다. 본 발명자는 RRP12 단백질의 암과 관련된 특성을 새롭게 규명하고, 이를 이용하여 RRP12 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 또는 항암감작 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 항암 조성물에서 유효성분으로 포함되는 RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제는 이에 제한되지는 않으나, RRP12에 특이적인 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 앵타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편일 수 있으며, 바람직하게는 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 용어, "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법으로 사용된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발, 이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다.
- [0015] 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥(RRP12 mRNA 서열(서열번호 1)에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(RRP12 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.
- [0016] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 불일치(mismatch)(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 팽창/돌출(bulge)(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다.
- [0017] siRNA 말단 구조는 RRP12 유전자의 발현을 RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.
- [0018] 본 발명에서 siRNA 분자는, 전체 길이가 10 내지 50 염기, 바람직하게는 15내지 30 염기, 보다 바람직하게는 18 내지 25 염기일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 siDESIGN SOFTWARE를 이용하여 19 염기의 siRNA를 제작하여 RRP12 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 본 발명의 siRNA는 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 RRP12 mRNA에 상보적이고 RRP12 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, RRP12 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의

길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다.

[0020] 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포에이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘 (특히, 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-다이아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 제조방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 올리고뉴클레오티드는 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 올리고뉴클레오티드와 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0021] 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드를 합성하는 한가지 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 디자인은 RRP12 유전자의 염기 서열을 참조하여 당 업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어, "애포머(aptamer)"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 애포머는 RRP12 폴리뉴클레오티드 또는 단백질에 대하여 결합함으로써, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 애포머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 본 발명의 애포머의 길이는 특별히 한정되지 않고 통상 15 내지 200 뉴클레오티드일 수 있지만, 예컨대 100 뉴클레오티드 이하이고, 바람직하게는 80 뉴클레오티드 이하이며, 보다 바람직하게는 60 뉴클레오티드 이하이고, 보다 더 바람직하게는 45 뉴클레오티드 이하일 수 있다. 본 발명의 애포머의 길이는 또한, 예컨대 18, 20 또는 25 뉴클레오티드 이상일 수 있다. 총 뉴클레오티드수가 적으면 화학합성 및 대량 생산이 보다 용이하고, 비용면에서의 장점도 크다. 또한 화학수식도 용이하고, 생체내 안정성도 높으며, 독성도 낮다.

[0024] 본 발명의 애포머는, SELEX법 및 그 개량법을 이용함으로써 제작할 수 있다. SELEX법이란, 10 내지 14개 정도의 상이한 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드의 풀로부터, 표적 물질에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 선별해오는 방법이다. 사용되는 올리고뉴클레오티드는 40잔기 정도의 랜덤 서열을 프라이머 서열로 끼운 구조를 하고 있다. 이 올리고뉴클레오티드 풀을 표적 물질과 회합시켜, 필터 등을 이용하여 표적 물질에 결합한 올리고뉴클레오티드만 회수한다. 회수한 올리고뉴클레오티드는 RT-PCR로 증폭하고, 이것을 다음 라운드의 주형으로서 이용한다. 이 작업을 10회 정도 반복함으로써, 표적 물질과 특이적으로 결합하는 애포머를 취득할 수 있다. SELEX법으로는 라운드수를 늘리거나 경합 물질을 사용함으로써, 표적 물질에 대하여 보다 결합력이 강한 애포머가 농축되고, 선별될 수 있다. 따라서, SELEX의 라운드수를 조절하거나 경합 상태를 변화시킴으로써, 결합력이 상이한 애포머, 결합 형태가 상이한 애포머, 결합력이나 결합 형태는 동일하지만 염기 서열이 상이한 애포머를 얻을 수 있다. 또한, SELEX법에는 PCR에 의한 증폭 과정이 포함되지만, 그 과정에서 망간 이온을 사용하는 등으로 변이를 부여함으로써, 보다 다양성이 풍부한 SELEX를 행하는 것이 가능해진다.

[0025] 또한, 애포머는 종래 SELEX 기법 이외에 복합 타겟, 즉 살아있는 세포 및 조직에 대해 Cell-SELEX 기법을 이용하여 얻을 수 있는데 Cell-SELEX 기법은 표면 마커 타겟이 알려져 있지 않을 때조차도, 질환 세포에 대한 애포머를 개발할 수 있게 하는 장점이 있다. 게다가, 분리된 상태에서는 그 본래의 특성을 나타내지 않을 수도

있어, 생리적 상태에 있는 타겟 단백질은 선별과정에서 더 기능적인 접근을 가능하게 하기 때문에, Cell-SELEX 기법은 종래의 SELEX 과정에 비하여 장점을 가지고 있다.

[0026] 한편, 앵타머는 인산기의 마이너스 전하를 이용한 이온결합, 리보오스를 이용한 수소성 결합 및 수소결합, 핵산 염기를 이용한 수소결합이나 스택킹(stack)결합 등 다양한 결합 양식에 의해 표적 물질과 결합한다. 특히, 구성 뉴클레오티드의 수만큼 존재하는 인산기의 마이너스 전하를 이용한 이온결합은 강하게, 단백질의 표면에 존재하는 리신이나 아르기닌의 플러스 전하와 결합한다. 이 때문에, 표적 물질과의 직접적인 결합에 관련되어 있지 않은 핵산염기는 치환할 수 있다. 특히, 스템 구조의 부분은 이미 염기쌍이 만들어져 있고, 또한 이중 나선 구조의 내측을 향하고 있기 때문에, 핵산 염기는, 표적 물질과 직접 결합하기 어렵다. 따라서, 염기쌍을 다른 염기쌍으로 치환하여도 앵타머의 활성은 감소하지 않는 경우가 많다. 루프 구조 등 염기쌍을 만들지 않은 구조에서도, 핵산 염기가 표적 분자와의 직접적인 결합에 관여하지 않는 경우에, 염기의 치환이 가능하다. 예컨대, 리보스의 2' 위치에 있어서, 히드록실기가 임의의 원자 또는 기로 치환되어 있는 뉴클레오티드일 수 있다. 이러한 임의의 원자 또는 기로서는, 예컨대, 수소 원자, 불소 원자 또는 -O-알킬기 (예: -O-CH₃), -O-아실기 (예, -O-CHO), 아미노기(예, -NH₂)로 치환되어 있는 뉴클레오티드를 들 수 있다. 이와 같이 앵타머는, 표적 분자와의 직접적인 결합에 관련되어 있는 관능기를 치환 또는 삭제하지 않는 한, 그 활성을 유지한다.

[0027] 또한, 앵타머는 화학 합성이 가능하기 때문에 개질이 용이하다. 앵타머는 MFOLD 프로그램을 이용하여 2차 구조를 예측하거나, X선 해석이나 NMR 해석에 의해 입체 구조를 예측함으로써, 어떤 뉴클레오티드를 치환 또는 결손하는 것이 가능한지, 또한 어디에 새로운 뉴클레오티드를 삽입 가능한지 어느 정도 예측할 수 있다. 예측된 새로운 서열의 앵타머는 용이하게 화학 합성할 수 있고, 그 앵타머가 활성을 유지하고 있는지의 여부를 기존의 분석계에 의해 확인할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어져 특정 항원과 특이적으로 결합하여 항원항체반응을 일으키는 물질로서, 본 발명에서는 RRP12 단백질의 활성을 억제하기 위해서 RRP12 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 사용할 수 있다. 특히, RRP12 단백질에서 인산화되어 단백질 활성화에 관련되는 트레오닌-글루탐산-티로신(Thr-Glu-Tyr, TEY) 부분에 특이적인 인산화 억제 항체를 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 이용될 수 있는 RRP12 단백질에 특이적인 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있으며, 바람직하게는 모노클로날 항체일 수 있다. RRP12 단백질에 특이적인 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법, 예를 들어, 융합 방법(Kohler 및 Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있고 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 RRP12 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0030] 본 발명에서 항체는 단일사슬 가변영역 단편(scFv)을 포함할 수 있다. 상기 단일사슬 가변영역 단편은 "경사슬의 가변성 부위(VL)-링커-중사슬의 가변성 부위(VH)"로 구성될 수 있다. 상기 링커는 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위를 인위적으로 연결하는 작용을 하는 일정 길이의 아미노산 서열을 의미한다.

[0031] 본 발명에서 용어, "항암"은 암의 성장을 억제하거나 예방하는 것을 의미한다. 암의 성장을 억제하거나 예방한다는 것은 치료하거나 처리하지 않았을 때와 비교시에 암의 성장 및 암전이를 감소시키는 것을 포함하는 개념이다. 상기 암전이(metastasis)는 종양(암) 세포가 신체의 멀리 떨어진 부분으로 확산되는 과정을 의미한다.

[0032] 본 발명에서 용어, "암"은 세포 자체의 조절 기능에 문제가 생겨 정상적으로는 사멸해야 할 비정상 세포들이 과다 증식하여 주위 조직 및 장기에 침입하여 덩어리를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는 상태를 의미하며, 악성 종양과 동일한 의미로 사용된다.

[0033] 본 발명에서 상기 암은 골육종, 거대세포종, 연골종, 활액막 육종, 방광암, 위암, 유방암, 대장암, 자궁경부암, 전립선암 및 표피암으로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 골육종 또는 활액막 육종일 수 있으며, 보다 바람직하게는 골육종일 수 있다. 또한, 상기 암은 전이 과정을 통하여 발생하는 암을 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 RRP12 억제제는 항암 효과뿐만 아니라 암세포의 항암제에 대한 저항성을 감소시키는 효과를

가지므로, 본 발명의 항암 조성물은 종래의 항암제에 비하여 항암효과가 현저히 우수하다.

- [0035] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암감작 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "항암감작"은 "화학감작"과 동일한 의미로 사용되는 것으로, 화학 물질 항암제로 암을 치료 시 항암감작 조성물이 없는 경우보다 있는 경우에 화학물질 항암제의 암세포에 대한 독성이 더 강화되거나 증가 되는 것으로서, 항암제 내성 등 항암제에 대한 저항성이 줄어들고 항암제의 효과가 더 잘 발휘되는 것을 의미한다. 본 발명에서 RRP12 억제제를 포함하는 항암감작 조성물이 항암제에 대해 암세포를 민감화시킴으로써, 항암제에 대한 암세포의 저항성을 줄이고 항암제의 효과를 높일 수 있다.
- [0037] 상기 항암제에 대한 저항성은 항암제 투여시 투여한 약물이 암세포를 사멸시키지 못하거나 사멸시키는 정도가 미비한 것을 말하는 것으로서 항암제 내성이 가장 빈번한 원인이다. 일반적으로 "항암제에 대한 내성" 또는 "항암제 내성"이란 항암제를 이용하여 암 환자를 치료할 때, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암 치료 효과가 있으나 지속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미한다. 이와 같이, 항암제를 암환자에게 계속 투여하면 점차적으로 효과가 감소하는 것이 알려져 있으며, 이는 생체 내에서 항암제에 대하여 내성을 가지는 암세포가 출현하여 암의 화학요법을 곤란하게 하는 것에 기인하는 것이다. 본 발명에서 상기 항암감작 조성물은 상기 항암제 내성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에서는 항암제에 대한 내성을 가지고 있다고 알려진 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA와 함께 독소루비신을 투여한 경우 골육종 세포주의 증식이 현저하게 감소된 것을 확인함으로써, RRP12 유전자에 특이적인 siRNA가 독소루비신에 대한 골육종 세포주(MG63)의 내성을 억제하여 독소루비신의 항암효과를 증가시킴을 확인할 수 있었다(도 11).
- [0039] 본 발명에서 상기 항암감작 효과를 얻을 수 있는 암은 골육종, 거대세포종, 연골종, 활액막 육종, 방광암, 위암, 유방암, 대장암, 자궁 경부암, 전립선암 및 표피암으로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 골육종 또는 활액막 육종일 수 있으며, 보다 바람직하게는 골육종일 수 있다. 또한, 상기 암은 전이 과정을 통하여 발생하는 암을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 항암감작 조성물에서 유효성분으로 포함되는 RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제는 이에 제한되지는 않으나, RRP12에 특이적인 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 앵타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편일 수 있으며, 바람직하게는 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA일 수 있으며, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 10으로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 앵타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0041] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항암감작 조성물 및 항암제를 포함하는 항암 조성물을 제공한다. 본 발명의 RRP12 억제제는 암세포의 항암제에 대한 저항성을 감소시키므로 통상의 항암제와 병용 투여하는 보조제로 사용하여 항암제의 효과를 증진시킬 수도 있다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 항암제는 암세포를 죽이기 위해 사용되는 모든 약제를 총칭하며, 대부분의 약제는 암세포의 DNA의 복제, 전자, 번역 과정을 차단하게 된다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택시 고려하는 일반적인 원칙 하에 선택될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)인 메칠로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 시크로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin)일 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 항암 항생제(anti-cancer antibiotic)인 닥티노마이신(dactinomycin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin) 및 C 블레오마이신(C Bleomycin)일 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 식물 알칼로이드(plantalkaloid)인 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테산(topotecan) 및 이리도테산(iridotecan)일 수 있다. 바람

직하게는 상기 항암제는 독소루비신일 수 있다. 그러나, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0043] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 항암제 또는 항암감작제 스크리닝 방법을 제공한다. 구체적으로, (a) 시험물질을 처리한 후 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성을 분석하는 단계; 및 (b) 시험물질을 처리한 후 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성이 시험물질을 처리하지 않은 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성에 비하여 억제되면 항암제 또는 항암감작제로 판단하는 단계를 포함하는, 항암제 또는 항암감작제 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 "RRP12 유전자의 발현 억제제" 또는 "RRP12 단백질의 활성 억제제"는 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻을 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 (a) 단계는 시험물질을 처리한 후 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성을 분석하는 단계로서, 상기 분석은 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 예컨대 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블로팅, cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 인 시투(in situ) 혼성화 반응, 방사능면역분석, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블로팅 등을 이용하여 분석할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 용어, "시험물질"은 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 이에 제한되는 것은 아니나, 화학물질, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함할 수 있다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물일 수 있으며, 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 상기 (b) 단계는 시험물질을 처리한 후 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성이 시험물질을 처리하지 않은 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성에 비하여 억제되면 항암제 또는 항암감작제로 판단하는 단계로서, 상기 시험물질에 의하여 RRP12 유전자의 발현 또는 RRP12 단백질의 활성이 하향 조절(down-regulation)되는 것을 측정하여 항암제 또는 항암감작제로 판정할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고성능(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 RRP12 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 표지될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광 표지(예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민(rhodamine) 6G, 로다민 B, TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM), 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.
- [0049] 검출가능한 표지가 표지된 RRP12 단백질 또는 시험물질을 이용하는 경우, RRP12 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 신호를 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl 및 pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/피로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.
- [0050] 택일적으로, 시험물질의 RRP12 단백질로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 표지 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 RRP12 단백질에 결합하는지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 세포가 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 RRP12 단백질 사이의 결합에 대한 지시자로 이용될 수 있다(McConnell et al., Science 257:19061912(1992)).
- [0051] 시험물질의 RRP12 단백질과의 결합 능력은 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(Sjol

및ter & Urbaniczky, Anal. Chem., 63:2338-2345(1991), 및 Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 표지 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIAcore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 RRP12 유전자의 발현 억제제 또는 RRP12 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암 및 항암감작 조성물을 사용함으로써, RRP12에 대한 암의 표적치료에 활용할 수 있으며, 암세포의 항암제 내성을 억제하여 항암제의 항암 효과를 증가시켜, 암 치료에 사용될 수 있는 항암제 및 항암 보조제 개발에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 활액막 육종(HSSY II)에서 독소루비신 투여시에 인산화(Thr218/Tyr220) 검출 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 실시한 결과를 나타낸다.

도 2 내지 4는 정상세포와 다양한 종양 세포에서 RT-PCR을 실시하여 RRP12 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타낸다. 글리세르알데하이드 3인산 탈수소효소(GAPDH)를 대조군으로 사용하였다.

도 5는 정상세포(hDF)와 활액막 육종(HSSY II)에서 독소루비신 투여시에 웨스턴 블로팅을 실시하여 RRP12 단백질의 인산화 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 베타-액틴(β -actin)을 대조군으로 사용하였다.

도 6은 골육종 세포주(MG63, SaOS2, U2OS)에서 독소루비신 투여시에 웨스턴 블로팅을 실시하여 RRP12 단백질의 인산화 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 베타-액틴(β -actin)을 대조군으로 사용하였다.

도 7은 골육종 세포주(MG63)에서 독소루비신 투여시에 세포면역화학염색을 실시하여 RRP12 단백질의 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 핵의 위치를 확인하기 위하여 DAPI 염색을 실시하였다.

도 8은 골육종 세포주(MG63)에서 서열번호 5 내지 10의 서열을 갖는 siRNA를 형질도입한 경우 RT-PCR을 실시하여 RRP12 유전자의 발현정도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 인산화 RRP12 단백질의 활성 억제를 확인한 결과를 나타낸다(ne: 대조군 siRNA 투여, siDXAP: RRP12 유전자에 특이적인 siRNA 투여).

도 10은 정상세포(hDF)와 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 RRP12를 억제할 경우 골육종 세포주의 증식정도를 MTT assay를 실시하여 확인한 결과를 나타낸다(ne: 대조군 siRNA 투여, DXAP: RRP12 유전자에 특이적인 siRNA 투여).

도 11은 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA와 함께 독소루비신을 투여한 경우 골육종 세포주의 증식정도를 MTT assay를 실시하여 확인한 결과를 나타낸다(ne: 대조군 siRNA 투여, siDXAP: RRP12 유전자에 특이적인 siRNA 투여).

도 12는 RRP12의 기능을 정리한 결과를 나타낸다.

도 13은 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 RRP12를 억제할 경우 골육종 세포주의 세포사를 확인하기 위하여 유동세포계수 분석(flowcytometric analysis)을 실시한 결과를 나타낸다.

도 14는 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 RRP12를 억제할 경우 웨스턴 블로팅을 실시하여 카스파제-3(caspase-3)과 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly(ADP-ribose)polymerase, PARP)의 활성 여부를 확인한 결과를 나타낸다(ne: 대조군 siRNA 투여, siDXAP: RRP12 유전자에 특이적인 siRNA 투여).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0055] 세포의 준비

[0056] 활액막 육종 세포인 HSSY II (서울대학교 병원으로부터 입수)와 인간에서 유래된 섬유아세포(fibroblast, hDF, 삼성서울병원, 장기이식센터 제공), 골육종 세포주(MG63, SaOS2, U2OS) 등을 10% 우태아혈청, 50U/ml 페니실린, 50ug/ml 스트렙토마이신으로 충전된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다.

[0057] 실시예 1: RRP1 단백질의 분리

[0058] 활액막 육종(HSSY II)에서 독소루비신 투여시에 인산화(Thr218/Tyr220) 검출 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 실시하였다. 상기에서 배양된 활액막 육종 세포로부터 세포 용해물을 제조하고, 30ug의 세포 용해물을 10% SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기영동한 후, 폴리플루오린화비닐리덴(polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(bio-rad)으로 옮기고, 1시간 동안 상온에서 차단 용액(5% 우혈청 알부민이 함유된 TBST)으로 배양하였다. 상기 배양 후, 인산화(Thr218/Tyr220) 검출 항체(Cell signaling, USA) 및 β -actin(Santa Cruz Biotechnology)에 대한 1차 항체(rabbit polyclonal antibody)가 포함된 차단 용액에서 2시간 동안 추가 배양하였다. 상기 멤브레인을 수세한 다음, 1시간 동안 HRP(horseradish peroxidase, Santa Cruz Biotechnology)가 접합된 2차 항체(1:5,000)가 포함된 TBST(Tris-buffered Saline with tween-20) 용액에서 배양하였다. 상기 멤브레인을 다시 수세한 다음, ECL 시약(enhanced chemiluminescence reagent, Intron Biotechnology)으로 현상하고 그 결과를 기재하였다. 140kd 위치에서 항상 일정하게 활성을 보이는 단백질을 발견하였다(도 1). 140kd 위치에서 발견되는 모든 단백질을 채취하여 질량 분석(Gel MS)을 시행한 결과, 13개의 후보 단백질을 발견하였다(표 1). 그 중에서 인산화(Thr218/Tyr220) 검출 항체가 인식한 아미노산 배열, 즉 트레오닌-글루탐산-티로신(Thr-Glu-Tyr, TEY)을 가진 한 개의 단백질을 분리해 내었다. 상기 단백질은 서열 번호 2의 RRP12 또는 KIAA0690이라고 불리는 단백질로서, 독소루비신 투여시에 인산화되어 활성을 보였으나 그 기능은 아직 잘 알려지지 않은 단백질이었다.

표 1

gi 194376150	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 189054178	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 221040426	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 119573109	coatomer protein complex, subunit alpha, isoform CRA_b [Homo sapiens]
gi 194380132	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 435476	cytokeratin 9 [Homo sapiens]
gi 31657129	phosphoribosylformylglycinamide synthase [Homo sapiens]
gi 4758012	clathrin heavy chain 1 [Homo sapiens]
gi 3327194	KIAA0690 protein [Homo sapiens]
gi 307383	RNA helicase A [Homo sapiens]
gi 30582355	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila) [Homo sapiens]
gi 20380096	Non-SMC condensin I complex, subunit D2 [Homo sapiens]
gi 3420277	glypican 4 [Homo sapiens]
gi 7019503	prolactin regulatory element-binding protein [Homo sapiens]

[0059]

[0060] 실시예 2: 다양한 종양 세포에서의 RRP12 유전자 발현 확인

[0061] 상기 실시예 1에서 분리해낸 RRP12 단백질의 유전자가 다양한 종양 세포에서도 과발현되는지 확인하기 위하여

RT-PCR을 실시하여 다양한 종양 세포에서 RRP12 유전자의 발현을 확인하였다. 정상세포(hDF, HNSC), 표피암(A431), 골육종(SaOs2, U2OS, MG63), 거대세포종(giant tumor), 활액막 육종(HSSY II), 방광암(T24), 위암(MKN1), 유방암(MCF7, sKBR3), 대장암(HCT116), 자궁 경부암(HeLa), 전립선암(PC3) 및 연골종(chondroma)의 세포에서 easy-blue™ total RNA extraction Kit(intron biotechbology)를 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다. cDNA synthesis(superscript III reverse transcriptase, invitrogen)를 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 실험 세포에서 합성한 cDNA에 RRP12 primer F-GACGCCATGGAAGAAGAGGC(서열번호 3), R-GCAGCGAAGTACTCAGTCTCC(서열번호 4)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[0062] 그 결과, 정상세포에서는 RRP12 유전자의 발현 정도가 매우 낮은 반면에 종양 세포에서는 현저하게 발현 정도가 높은 것을 확인할 수 있었다(도 2 내지 4). 이러한 결과는 RRP12 유전자가 다양한 종양 세포에서 과발현되며, 종양 세포의 생존 또는 증식과 연관이 있음을 의미한다.

[0063] 실시예 3: 항암제 투여시 종양 세포에서 RRP12 단백질 활성 측정

[0064] 3-1. 활액막 육종(HSSY II)에서의 RRP12 단백질 활성 측정

[0065] 정상세포(hDF)와 활액막 육종(HSSY II)에서 독소루비신 투여시에 RRP12 단백질의 활성을 웨스턴 블로팅을 실시하여 측정하였다. 정상세포와 활액막 육종 세포로부터 세포 용해물을 제조하고, 30ug의 세포 용해물을 10% SDS-PAGE에서 전기 영동한 후, 폴리플루오린화비닐리덴(polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(bio-rad)으로 옮기고, 1시간 동안 상온에서 차단 용액(5% 우혈청 알부민이 함유된 TBST)으로 배양하였다. 상기 배양 후, 인산화(Thr218/Tyr220) 검출 항체(Cell signaling, USA), RRP12 검출 항체(Novus, USA) 및 β-actin(Santa Cruz Biotechnology)에 대한 1차 항체(rabbit polyclonal antibody)가 포함된 차단 용액에서 2시간 동안 추가 배양하였다. 상기 멤브레인을 수세한 다음, 1시간 동안 HRP(horseradish peroxidase, Sata Cruz Biotechnology)가 접합된 2차 항체(1:5,000)가 포함된 TBST(Tris-buffered Saline with tween-20) 용액에서 배양하였다. 상기 멤브레인을 다시 수세한 다음, ECL 시약(enhanced chemiluminescence reagent, Intron Biotechnology)으로 현상하고 그 결과를 기재하였다. 정상세포와 활액막 육종에서 독소루비신을 투여하지 않은 경우와 독소루비신을 50nM 투여한 경우의 인산화 RRP12 단백질의 활성을 측정된 결과, 활액막 육종에서 독소루비신을 투여했을 경우에만 RRP12 단백질의 인산화 활성을 관찰할 수 있었다(도 5).

[0066] 3-2. 골육종에서의 RRP12 단백질 활성 측정

[0067] 3종의 각기 다른 골육종 세포주(MG63, SaOS2, U2OS)에서 독소루비신 투여시에 RRP12 단백질의 활성을 측정하였다. 골육종 세포주에서 독소루비신을 투여하지 않은 경우와 독소루비신을 50nM 투여한 경우의 인산화 RRP12 단백질의 활성을 측정하였다. 3종의 골육종 세포주를 배양하고 독소루비신 50nM 투여 후 24시간 이후에 세포를 수집하여 추출된 단백질로 실시예 3-1에서 제시한 웨스턴 블로팅 방법을 이용하여 단백질의 활성을 측정하였다. 그 결과, 독소루비신을 투여하지 않은 경우에는 RRP12 단백질의 활성이 관찰되지 않는 반면, 독소루비신을 투여한 경우에는 RRP12 단백질의 인산화 활성을 관찰할 수 있었다(도 6).

[0068] 골육종 세포주(MG63)에서 독소루비신 50nM 투여 후 24시간 이후에 세포면역화학염색을 실시하였다. 골육종 세포주를 5% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 10분간 고정된 후, 0.1% 트리톤(Triton X-100)이 포함된 완충제(buffer)로 처리하여 투과화(permeabilization)시킨 후 일차항체 p-RRP12(Cell signaling, USA), 항-RRP12 항체(Novus, USA) 처리 후 이차항체(Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit, mouse, goat or chicken antibody)를 처리하였다. 형광현미경 또는 공초점현미경으로 영상을 확보하였다. DAPI 염색(파란색 형광)을 통하여 핵의 위치를 확인하고 활성화된 RRP12 단백질의 염색(초록색 형광)을 통하여 결과를 분석하였다. 독소루비신을 투여하지 않은 경우에는 핵 주변에 RRP12 단백질이 관찰되었으나, 독소루비신을 투여한 경우에는 RRP12 단백질이 활성화되어 핵으로 들어가는 것을 관찰할 수 있었다(도 7).

[0069] 이러한 결과는, 종양 세포인 활액막 육종과 골육종 세포주에서 항암제인 독소루비신에 의한 RRP12의 인산화 활성을 유발하는 기전이 존재함을 의미하며, 상기 기전이 항암제에 대한 종양 세포만의 특이적 반응, 즉 세포사의 촉진 또는 항암제에 대한 생존 기전과 연관됨을 예측할 수 있었다.

[0070] 실시예 4: siRNA를 이용한 RRP12 유전자 발현의 억제

[0071] 4-1. siRNA의 제작 및 siRNA를 이용한 RRP12 유전자 발현 억제

[0072] RRP12 유전자의 발현 억제제를 제조하기 위하여, siDESIGN SOFTWARE를 이용하여 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 제작하였다. 서열번호 5 내지 10의 서열을 갖는 6개의 후보 siRNA를 합성하였다(표 2). 골육종 세포주(MG63)에 상기 6개의 후보 siRNA를 형질도입(transfection)하고 3일 후에 실시예 2에서 제시한 RT-PCR 방법을 이용하여 mRNA의 발현 정도를 확인한 결과, 6개의 siRNA를 형질도입한 모든 군에서 RRP12 유전자의 발현이 감소하였음을 확인하였다(도 8).

표 2

siDXAP #1	GCAACAAGATGGAGGAAGA	서열번호 5
siDXAP #2	GTGCTTATTAAGAAGTTCT	서열번호 6
siDXAP #3	CAGTGAATTCATGTTTGAA	서열번호 7
siDXAP #4	GGAGAAAGCCCACATCAAC	서열번호 8
siDXAP #5	CCTTTTCGAGTTTAAAGGT	서열번호 9
siDXAP #6	TTTGGAAACTCCAAATGGA	서열번호 10

[0073]

[0074] 이러한 결과는 상기 제작한 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA는 RRP12 유전자의 발현을 효과적으로 억제한다는 것을 의미하며, 특히 서열번호 5, 7, 10의 서열을 갖는 siRNA의 경우 효과가 더욱 현저하므로 이후 실시예에서 상기 siRNA를 사용하여 실험을 수행하였다.

[0075] 4-2. siRNA를 이용한 인산화 RRP12 단백질의 억제

[0076] RRP12 유전자에 특이적인 siRNA에 의하여 인산화된 형태의 RRP12 단백질이 억제되는지 여부를 확인하였다. 골육종 세포주(MG63)에서 독소루비신에 의해 인산화 RRP12 단백질에 대하여 웨스턴 블로팅을 실시하였다. RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 120pmol 처리하고 2일 후에 독소루비신을 50nM 투여한 후 24시간 이후에 세포를 수집하여 추출된 단백질로 실시예 3-1에서 제시한 웨스턴 블로팅 방법을 이용하여 단백질의 활성을 측정하였다.

[0077] 그 결과, 독소루비신을 투여하지 않은 경우에는 인산화 RRP12 단백질이 검출되지 않았으며, 독소루비신을 투여한 경우에는 인산화 RRP12 단백질이 검출되었으나, RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 처리한 경우에는 인산화 RRP12 단백질의 양이 현저하게 감소한 것을 관찰할 수 있었다(도 9).

[0078] 이러한 결과는, RRP12 유전자에 특이적인 siRNA에 의하여 종양 세포에서 항암제에 의해 인산화 RRP12 단백질이 현저하게 억제된다는 것을 의미한다.

[0079] 4-3. siRNA를 이용한 RRP12 유전자 발현의 억제시 종양 세포의 증식 확인

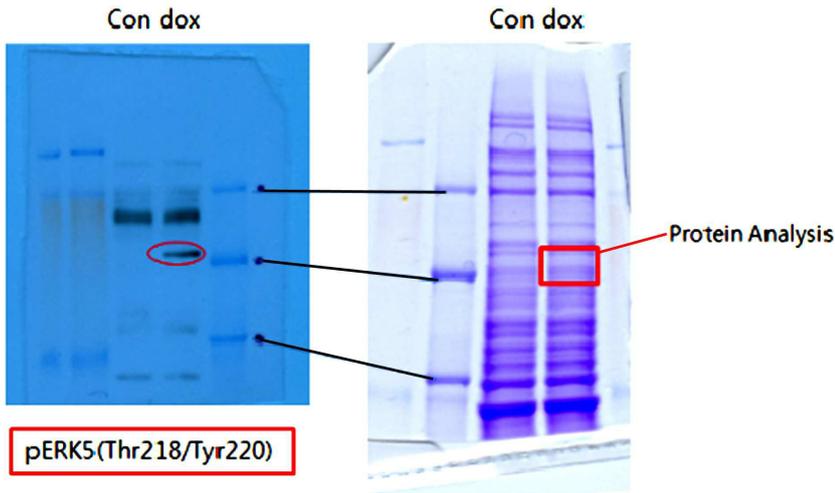
[0080] 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 RRP12를 억제할 경우 골육종 세포주의 증식정도를 확인하였다. 정상 섬유세포(hDF)와 골육종 세포주(MG63)에서 대조군(control) siRNA와 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 각각 투여한 경우, 2일 후에 MTT assay를 실시하여 골육종 세포주(MG63)의 세포 증식정도를 측정하였다. 정상 섬유세포와 골육종 세포주에 각각 MTT 용액 50ug/ml를 처리하고 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 상기 배양 후, MTT 용액은 버리고, 200ul DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 불용성 물질(formazan crystal)을 녹이고 스펙트로포토미터를 사용하여 595nm에서 O.D.(광학 밀도)를 측정하였다. 대조군 siRNA에 감염된 세포에 대하여 RRP12 siRNA에 감염된 세포의 O.D. 수치의 비율을 계산하고 그 결과를 기재하였다. 모든 통계 처리는 스튜던트 테스트(Student's T test)를 사용하였으며, p 수치가 0.05 이하인 경우 유의적인 것으로

고려하였다.

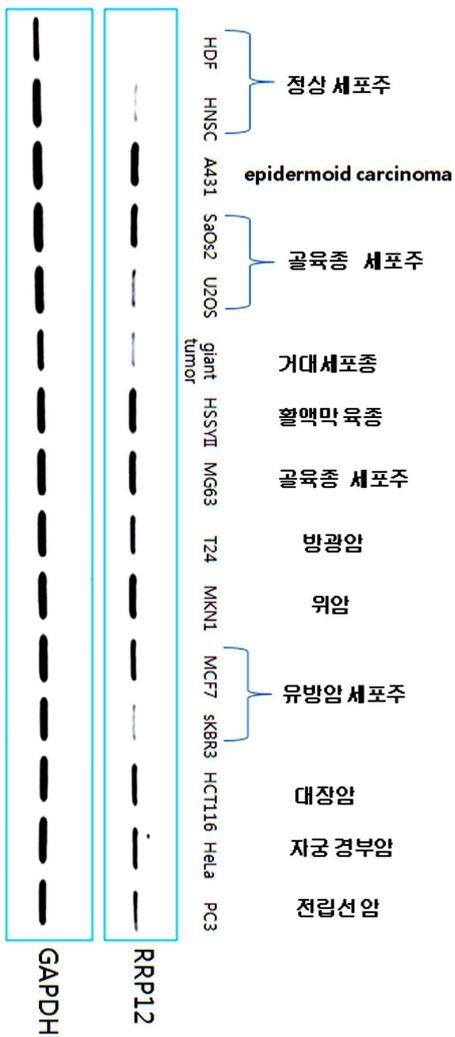
- [0081] 그 결과, RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 투여한 군에서 세포 증식이 감소됨을 관찰할 수 있었으며, 특히 골육종 세포주에서 세포 증식이 현저하게 감소됨을 관찰할 수 있었다(도 10). 이러한 결과는, 골육종 세포주에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 투여한 경우 RRP12 유전자의 발현이 억제되어 세포 증식이 억제됨을 나타내며, RRP12 유전자가 골육종 세포주의 증식에 필수적이므로 RRP12 유전자의 억제시 항암효과가 나타남을 의미한다.
- [0082] 추가적으로, 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA와 함께 독소루비신을 투여한 경우 골육종 세포주의 증식정도를 확인하였다. 골육종 세포주에서 대조군(control) siRNA와 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 각각 투여하고, 추가적으로 독소루비신을 투여한 군과 투여하지 않은 군의 세포 증식정도를 상기 MTT assay를 실시하여 비교하였다.
- [0083] 그 결과, RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 투여한 군에서 독소루비신을 투여한 군보다 골육종 세포주의 증식이 감소됨을 관찰할 수 있었으며, 독소루비신과 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 함께 투여한 군에서는 세포 증식이 더욱 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 11).
- [0084] 이러한 결과는, RRP12 억제제가 독소루비신보다 항암효과가 우수하며, 골육종 세포주에서 항암제인 독소루비신과 함께 투여했을 경우에 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA가 독소루비신의 항암효과를 증가시켜 세포 증식을 억제한다는 것을 의미한다. 상기 실시예들의 결과를 토대로 RRP12의 기능을 정리한 결과는 도 12와 같다.
- [0085] 4-4. siRNA를 이용한 RRP12 유전자 발현의 억제시 종양 세포의 세포사 확인
- [0086] 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 RRP12를 억제할 경우 골육종 세포주의 세포사를 관찰하였다. 골육종 세포주에서 대조군(control) siRNA와 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 각각 투여하고, 추가적으로 독소루비신을 투여한 군과 투여하지 않은 군의 세포사 여부를 확인하기 위하여 유동세포계수 분석(flowcytometric analysis)을 실시하고, 세포사 과정에서 활성화되는 효소인 카스파제-3(caspase-3)과 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly(ADP-ribose)polymerase, PARP)의 활성 여부를 웨스턴 블로팅을 이용하여 분석하였다(도 13 내지 14).
- [0087] 그 결과, 골육종 세포주(MG63)에서 RRP12 유전자에 특이적인 siRNA를 투여한 경우 세포사가 일어남을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 RRP12가 골육종 세포주의 생존에 필수적인 단백질을 의미하며 독소루비신 투여시 RRP12의 인산화 활성은 종양 세포의 항암제에 대한 생존 기전임을 판단할 수 있었다.

도면

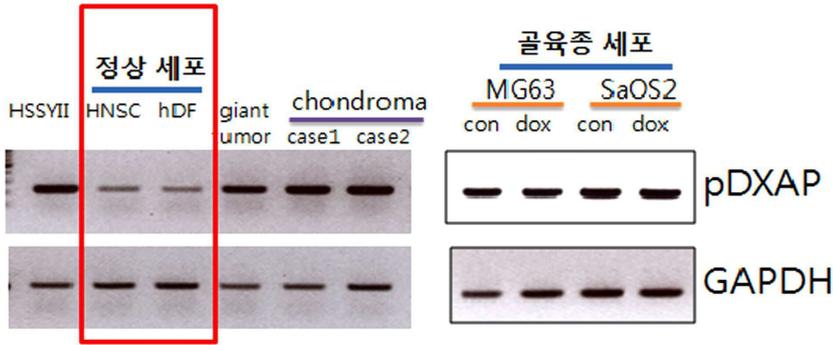
도면1



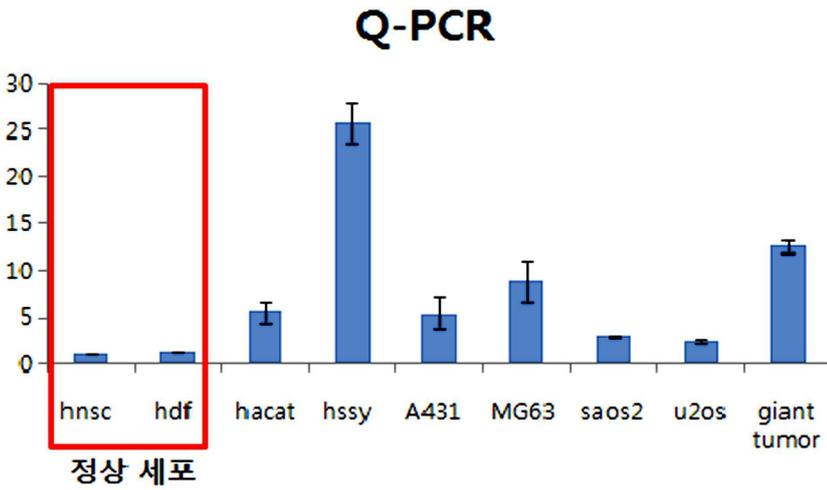
도면2



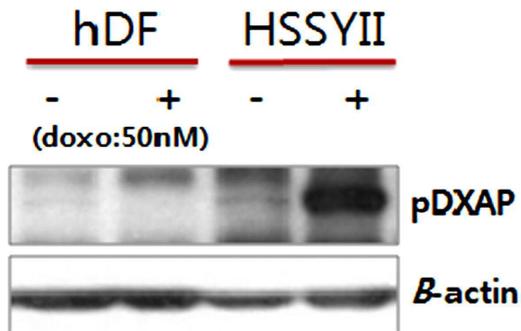
도면3



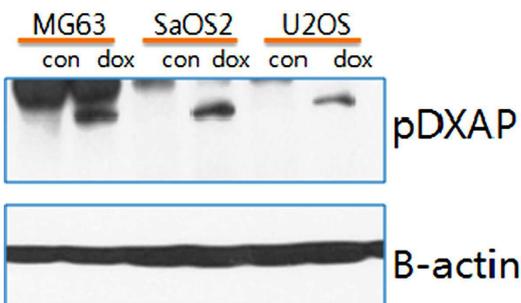
도면4



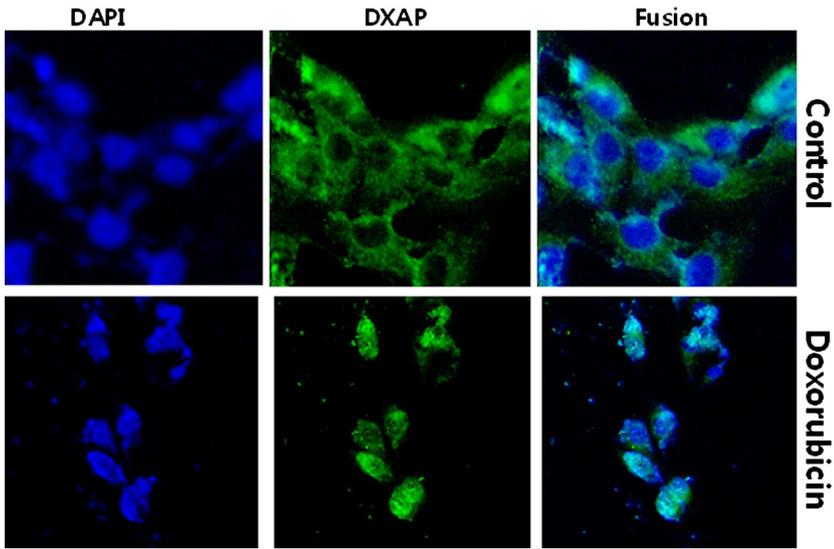
도면5



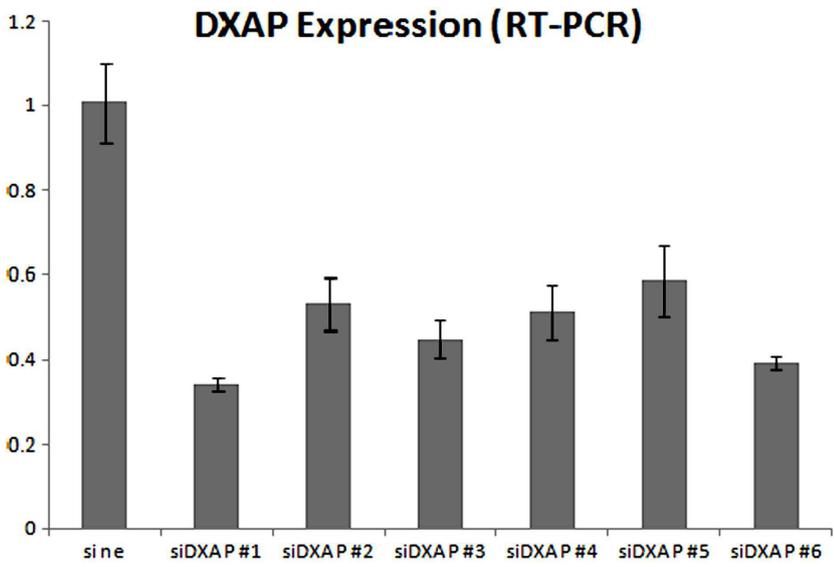
도면6



도면7

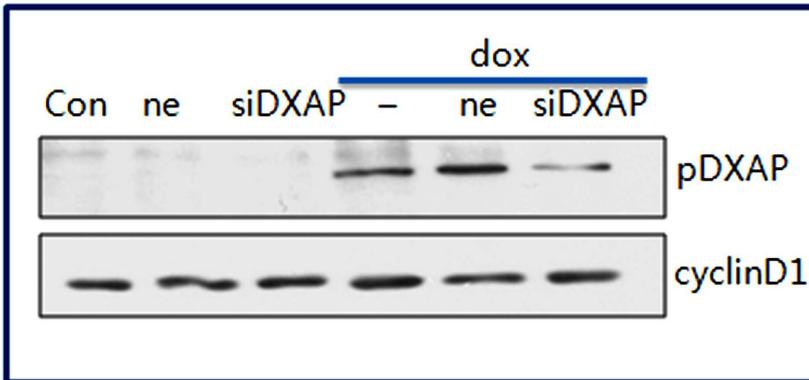
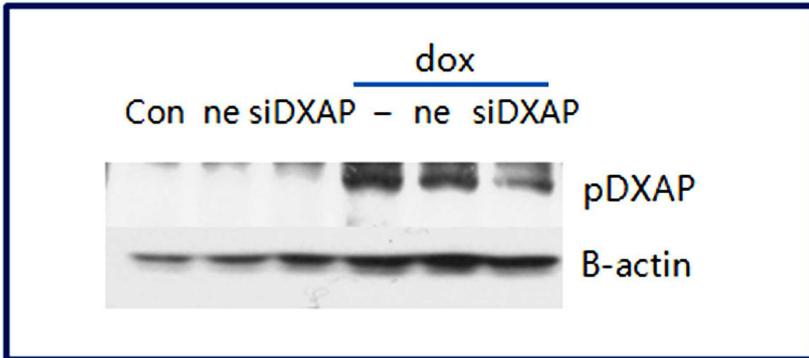


도면8

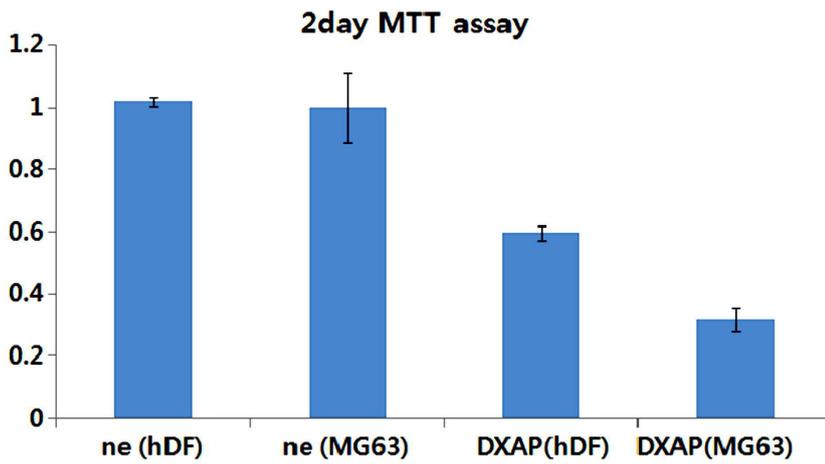


도면9

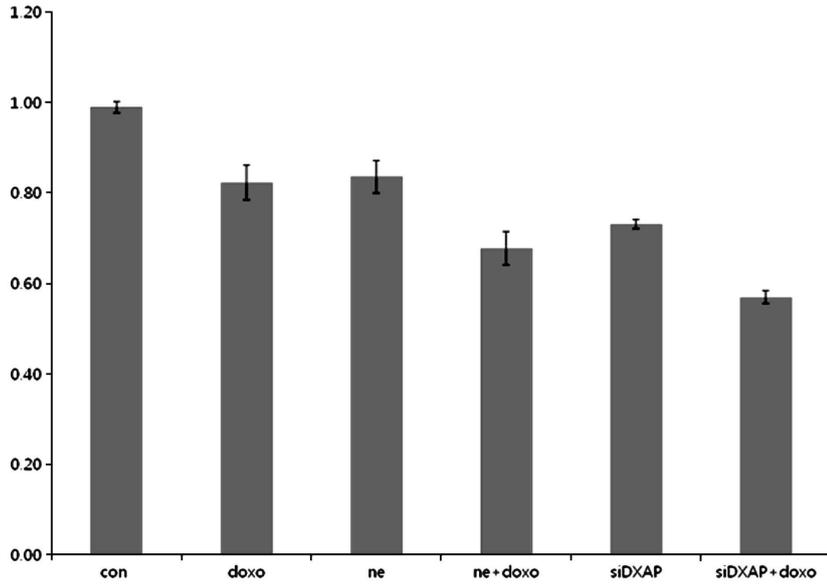
Western blot



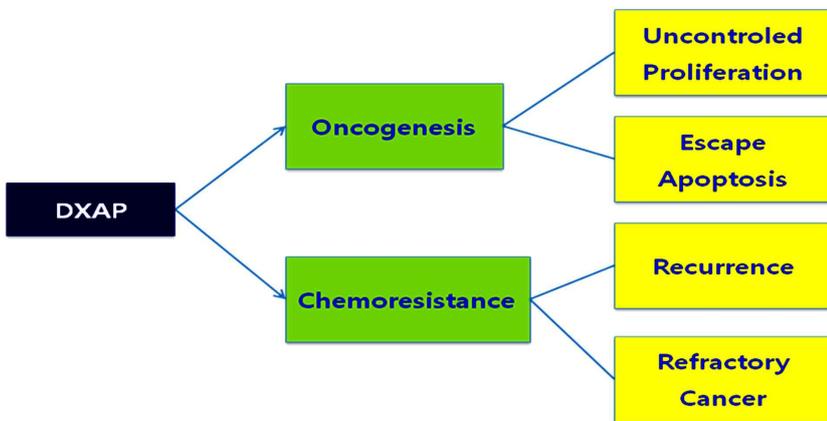
도면10



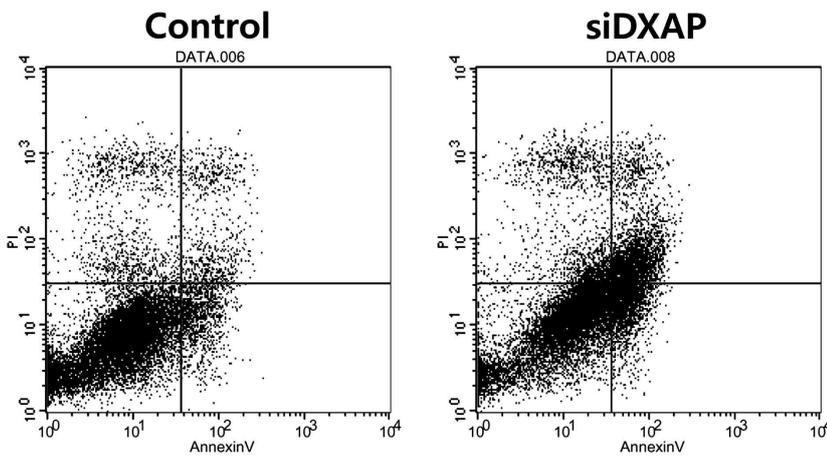
도면11



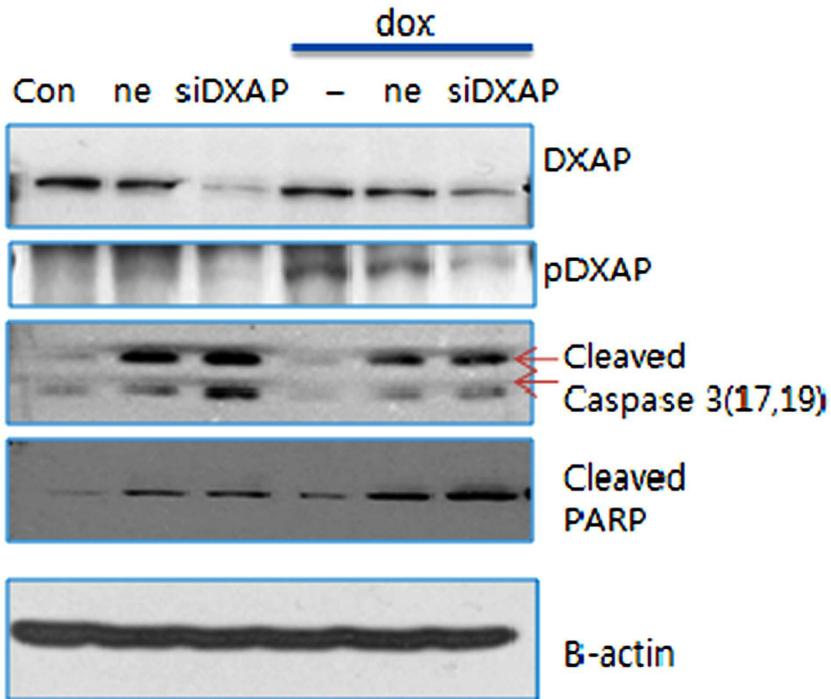
도면12



도면13



도면14



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)