



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0018635
(43) 공개일자 2021년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7004* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/50* (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7004 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0096030

(22) 출원일자 2019년08월07일

심사청구일자 2019년08월07일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

한정민

인천광역시 연수구 송도과학로 85, 진리관 D 311 (송도동, 연세대학교 국제캠퍼스)

유희찬

인천광역시 연수구 송도과학로 85, 진리관 D 317-3 (송도동, 연세대학교 국제캠퍼스)

(74) 대리인

특허법인 하나

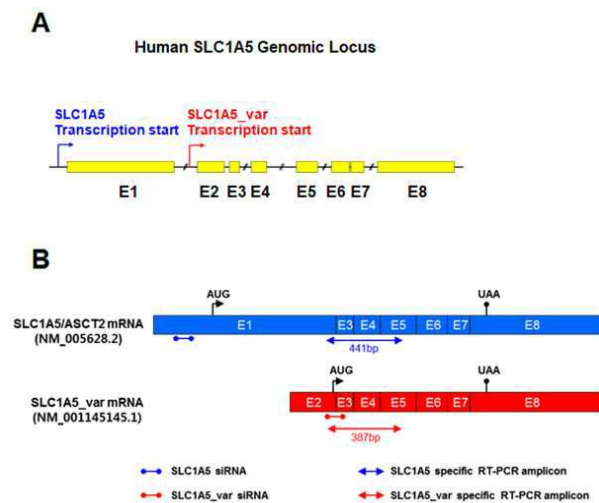
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 SLC1A5 전사물 변이체를 이용한 항암용 조성물, 항암제 스크리닝 방법 및 암 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 SLC1A5 전사물 변이체(transcript variant)를 이용한 항암용 조성물, 항암제 스크리닝 방법, 암 진단용 조성물 및 진단 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345279574
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	BK21플러스사업(R&D)
연구과제명	암대사에서 ASCT2 variants 역할 규명 및 항암약물로서 그에 대한 길항제 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345295623
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	연세대학교 종합약학연구소
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발현 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA 및 miRNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 mRNA는 서열번호 2의 염기서열을 포함하고, 상기 siRNA는 서열번호 7의 염기서열을 포함하며, 상기 shRNA는 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단백질 활성 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 도메인을 갖는 펩타이드, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 추가로 당 대사 억제제를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 당 대사 억제제는 2-디옥시글루코스(2-deoxyglucose), 3-브로모피루베이트(3-bromopyruvate, 3-bp), WZB117, 프롤레틴(phloretin) 및 STF-31로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 암은 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma) 혈액종양(hematopoietic malignancy), 자궁경부암(cervical cancer), 육종(sarcoma), 고환암(testicular cancer), 악성 흑색종(malignant melanoma), 내분비 종양(endocrine tumor), 골암(bone cancer), 전립선암(prostate cancer), 자궁암(uterus cancer), 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 뇌 종양(brain cancer), 간암(liver cancer), 위암(stomach cancer), 췌장암(pancreas cancer), 피부암(skin cancer), 폐암(lung cancer), 후두암(larynx cancer), 두경부암(head and neck cancer), 식도암(esophageal cancer), 대장암(colorectal cancer) 및 난소암(ovarian cancer)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 암은 폐암(lung cancer), 대장암(colorectal cancer) 및 췌장암(pancreas cancer)으로 이루어지는 군에서

선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 9

- (a) SLC1A5 전사물 변이체를 발현하는 세포에 시험 제제를 처리하는 단계;
- (b) 상기 시험 제제를 처리한 세포에서 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 시험 제제를 처리하지 않은 세포에서 발현된 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질의 활성과 비교하여 상기 시험 제제가 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 활성을 억제하는지 여부를 확인하는 단계;를 포함하는 암 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (a) 단계의 SLC1A5 전사물 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 미토콘드리아 타겟팅 서열 및 글루타민 운반체 활성을 갖는 단백질인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 (b) 단계의 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 측정은 mRNA 발현 수준 또는 미토콘드리아에서의 단백질 발현 수준을 측정하는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 (b) 단계의 단백질의 활성은 미토콘드리아의 글루타민 운반체 활성인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 암은 폐암(lung cancer), 대장암(colorectal cancer) 및 췌장암(pancreas cancer)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 14

(a) 피검체로부터 시료를 수득하는 단계;

(b) 상기 시료에서 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 측정된 발현 수준 또는 단백질 활성 수준이 대조군보다 높을 경우 피검체를 암에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 (a) 단계의 시료는 암 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 (b) 단계의 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준은 mRNA 또는 미토콘드리아에서의 단백질 발현 수준인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 (b) 단계의 단백질의 활성화는 미토콘드리아 글루타민 운반체의 활성화인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 암은 폐암(lung cancer), 대장암(colorectal cancer) 및 췌장암(pancreas cancer)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 19

SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 제제는 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브이거나, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머인 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 제제는 SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드 도메인, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 22

SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성화 억제제를 포함하는, 항암제 내성 억제용 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 항암제는 피리미딘 뉴클레오사이드 전구체(pyrimidine nucleoside prodrug)인, 항암제 내성 억제용 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 피리미딘 뉴클레오사이드 전구체는 겐시타빈(gemcitabine)인 것인, 항암제 내성 억제용 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서,

상기 발현 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA 및 miRNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 항암제 내성 억제용 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 mRNA는 서열번호 2의 염기서열을 포함하고, 상기 siRNA는 서열번호 7의 염기서열을 포함하며, 상기 shRNA는 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 것인, 항암제 내성 억제용 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서,

상기 단백질 활성화 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드 도메인, 항체 및 앵타

머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 항암제 내성 억제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SLC1A5 전사물 변이체(transcript variant)를 이용한 항암용 조성물, 항암제 스크리닝 방법, 암 진단용 조성물 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 글루타민은 혈액 중 가장 풍부한 아미노산이며, 세포 내에서 미토콘드리아의 기능을 유지하는 대사 산물의 합성, 항산화제의 생산, 비필수 아미노산, 뉴클레오타이드 및 지방산의 합성, 성장 신호 전달의 활성화 등과 같은 세포 기능을 수행하는데 매우 중요한 역할을 한다.

[0003] 특히, 빠르게 증식하는 세포의 에너지 및 지질 생산 과정에서 미토콘드리아의 글루타민 대사경로는 매우 중요한 보충 경로이므로, 빠르게 증식하는 암세포의 성장에 글루타민의 의존도가 특별히 높은 것으로 보고되어 그 중요성이 강조되고 있다.

[0004] 구체적으로, 암세포는 저산소 상태에서 지질 합성을 위한 acetyl-CoA를 생성하기 위하여 환원성 카복실화 경로를 통해 포도당 대신 글루타민을 사용하기도 하며, 췌장암 세포는 글루타민으로부터 NADPH의 형태로 환원력을 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 글루타민은 특히 Ras 활성화에 따라 산화적 인산화 반응을 위한 고에너지 전자의 주요 공급원으로 보고된 바 있으며, 글루타민이 mTORC1 경로를 활성화시키고 세포 성장을 촉진시킨다는 점에서 생체 내 신호 분자로서의 역할도 중요하다.

[0006] 이와 같이, 암 세포의 대사 과정에서 글루타민은 필수적인 요소로서, 때때로 암 세포가 글루타민에 중독된다는 사실은 그 중요성을 나타내는 것이다.

[0007] 암세포는 SLC1, 6, 7, 및 38의 단백질군에 속하는 여러 글루타민 운반체(glutamine transporter)를 통해 글루타민을 흡수한다. 이 중에서 SLC1A5(또는 ASCT2)는 알라닌, 세린, 트레오닌, 아스파라긴 및 글루타민과 같은 중성 아미노산에 대해 필수적인 나트륨 의존성 운반체이다. SLC1A5는 폐암, 대장암, 위암, 신장암, 난소암, 유방암, 설암 및 췌장암과 같은 다양한 암에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0008] SLC1A5의 발현이 저해되면 글루타민 섭취를 방해하여 mTORC1 신호 전달의 장애와 자가포식(autophagy)의 활성화를 유발한다. 폐암 세포에서의 SLC1A5 발현의 억제는 글루타민의 흡수 및 세포 증식을 감소시키는 것으로 보고된 바 있으며, 이러한 효과는 폐암 외에 급성 골수성 백혈병 및 다중 고형암에서도 보고되었다.

[0009] 이렇듯, 암세포 대사 과정에서 미토콘드리아의 글루타민 대사 과정이 매우 중요하며, 미토콘드리아의 글루타민 대사 과정에서는 세포질의 글루타민이 미토콘드리아의 글루타민 운반체를 통하여 미토콘드리아 막을 통과하는 것이 반드시 선행되어야 하는 바, 글루타민 운반체에 대한 심도 있는 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2008-0110810호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 세포에 시험제제를 처리함으로써, SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 활성 억제 여부를 비교하는 항암제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성 수준을 측정하는 체제를 포함하는 암 진단용 조성물 및 이를 이용한 암 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제를 포함하는 항암제 내성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은, SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 명세서에서 “SLC1A5”는 정식 명칭이 solute carrier family 1 member 5인 중성 아미노산 운반체(neutral amino acid transporter) 단백질을 의미한다. SLC1A5 외에, AAAT, ASCT2, M7V1, M7VS1, R16, RDRC 등으로도 불린다.

[0017] 인간 염색체의 19q13.32 위치에 암호화되어 있는 SLC1A5 유전자는 8개의 엑손(exon)으로 구성되어 있으며, 현재까지 전사 변이에 의한 3종류의 아형(isoform)이 보고되어 있다. 가장 긴 541개 아미노산으로 이루어진 전사물 변이체(NCBI genebank mRNA 서열 NM_005628.2; 단백질 서열 NP_005619.1)는 엑손 2에 해당하는 부분이 결여되어 있다. 본 명세서에서는 별다른 표시 없이 SLC1A5 또는 SLC1A5/ASCT2로 사용하였으며, 정상 세포에서 주로 발현되는 형태라는 의미에서 전사물 변이체가 아니라, SLC1A5의 야생형(WT) 또는 정상형으로 지칭될 수도 있다.

[0018] 본 발명에서 “SLC1A5의 전사물 변이체”는 미토콘드리아 내 글루타민 운반체의 활성화에 필수적인 미토콘드리아 타겟팅 서열 및 글루타민 운반체 활성을 갖는 단백질을 의미하는 것일 수 있다. SLC1A5의 야생형(WT) 또는 정상형보다 짧은 SLC1A5의 전사물 변이체는 339개 아미노산으로 이루어져 있는데(NCBI genebank mRNA 서열 NM_001145145.1; 단백질 서열 NP_001138617.1), 엑손 1에 해당하는 부분이 결여되어 있으며, 본 명세서에서는 SLC1A5_var로 지칭하였다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서 확인한 바에 따르면, SLC1A5의 엑손 1이 결여되어 있는 짧은 SLC1A5_var 전사물 변이체는 단백질의 N-말단 부위에 미토콘드리아로 타겟팅 되기 위한 신호서열(mitochondrial targeting sequence, MTS)을 포함하고 있다. 덕분에 단백질로 발현되어 미토콘드리아의 내막에 타겟팅 되며, 미토콘드리아 내 글루타민 수송을 담당하는 주요한 운반체(mitochondrial glutamine transporter)로서 기능한다. 이에 따라, MTS가 돌연변이 등으로 정상적으로 기능하지 못하면 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아로 타겟팅 되지 못하고, 결과적으로 미토콘드리아 내 글루타민 흡수는 일어나지 않는 것을 확인하였다(도 6).

[0020] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, SLC1A5_var는 다양한 종류의 암세포에서 과발현되어 있으며, 특히 췌장암, 폐암, 대장암 세포에서 정상세포보다 현저하게 발현이 높았다.

[0021] 미토콘드리아 내 글루타민 대사는 특히 빠르게 세포 분열하는 암세포의 증식에 필수적인데, SLC1A5_var 단백질의 발현이 억제되어 미토콘드리아 내 SLC1A5_var 단백질이 부재하게 되면, 미토콘드리아로 글루타민이 수송되지 않고, 암세포의 증식은 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0022] 한편, SLC1A5_var는 글루타민 외에도 알라닌(alanine)과 세린(serine)을 미토콘드리아로 수송하기 때문에, SLC1A5_var의 발현이 억제되면 글루타민뿐 아니라, 알라닌과 세린의 수송도 억제된다. 이는 SLC1A5_var 단백질이 미토콘드리아 글루타민 운반체로서 암세포 대사 및 증식에 매우 중요한 역할을 하며, 미토콘드리아에서 SLC1A5_var 단백질의 발현 수준이나 단백질 활성을 낮춤으로써 암세포 특이적으로 사멸을 유도하는 것이 새롭고 효과적인 항암 치료 전략이 될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0023] 이에 따라, SLC1A5_var 단백질의 발현 수준 또는 단백질 활성을 억제하는 물질 또는 체제는 미토콘드리아 내 글루타민 대사를 억제하는 암 치료제 개발을 위한 후보군이 될 수 있음을 확인하였다.

[0024] 상기 미토콘드리아 타겟팅 서열(mitochondrial targeting sequence, MTS)이란 10 내지 70개의 아미노산으로 구성되어, 신생 단백질을 미토콘드리아로 타겟팅시키는 아미노산 서열을 의미한다. 주로 단백질의 N-말단에서 발견되며, 양수성 나선(amphipathic helix)을 형성할 수 있도록 소수성 아미노산의 서열과 전하를 갖는 아미노산의 서열이 교차되어 있는 패턴으로 구성되어 있다. 미토콘드리아 타겟팅 서열은 추가적으로 미토콘드리아 내에 내막, 외막 기질 등의 구조로 다시 타겟팅 되기 위한 서열을 추가적으로 포함하고 있으며, 타겟팅이 완료되면 신호서열은 잘려 나간다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에서는 SLC1A5_var 단백질의 N-말단에 MTS가 존재하며, 특히 SLC1A5_var 단백질 아미노산

서열의 44번째에 위치한 아르기닌과 45번째에 위치한 라이신이 중요함을 확인하였다. SLC1A5_var 단백질의 N-말단 부위의 염기성 아미노산 중에서, R9A/R15A/K17A 등의 삼중 돌연변이(NT_3A)는 미토콘드리아 타겟팅에 아무런 영향을 미치지 않았으나, R44A/K45A의 이중 돌연변이 (NT_2A)를 포함하는 단백질은 미토콘드리아로 타겟팅 되지 못하고 세포질에 분산되어 분포되는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 SLC1A5_var 단백질의 미토콘드리아 타겟팅 서열은 아미노산 서열의 44번째와 45번째 위치에 각각 아르기닌과 라이신을 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 본 명세서에 표기되는 “(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)”의 형태는 야생형 폴리펩타이드의 해당 아미노산 위치에서, 앞에 표기된 아미노산이 뒤에 표기된 아미노산으로 치환된다는 것을 의미한다. 예를 들어, R44A는 아미노산 서열 44번째에 위치한 아르기닌이 알라닌으로 치환된 점돌연변이를 나타낸다.

[0027] 본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다: A(Ala), 알라닌; C(Cys), 시스테인; D(Asp), 아스파르트산; E(Glu), 글루탐산; F(Phe), 페닐알라닌; G(Gly), 글라이신; H(His), 히스티딘; I(Ile), 이소류신; K(Lys), 라이신; L(Leu), 류신; M(Met), 메티오닌; N(Asn), 아스파라긴; O(Ply), 피롤라이신; P(Pro), 프롤린; Q(Gln), 글루타민; R(Arg), 아르기닌; S(Ser), 세린; T(Thr), 트레오닌; U(Sec), 셀레노시스테인, V(Val), 발린; W(Trp), 트립토판; Y(Tyr), 티로신.

[0028] 구체적으로, 본 발명에서 상기 “발현 억제제”는 SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA에 특이적으로 결합하여 mRNA의 분해를 촉진하거나 단백질로 번역되는 것을 억제하는 등의 기작으로 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준을 감소시키는 것을 의미하는 것으로서, SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA 및 miRNA로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 더욱 구체적으로, 상기 상기 mRNA는 서열번호 2의 염기서열을 포함하고, 상기 siRNA는 서열번호 7의 염기서열을 포함하며, 상기 shRNA는 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에서 “발현(expression)”은 세포에서 단백질 또는 핵산, 특히 단백질을 암호화하는 mRNA가 생성되는 것을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 필요에 따라 적절히 변경하여 적용될 수 있다.

[0031] 구체적으로, 본 발명에서 상기 “단백질 활성 억제제”는 미토콘드리아 내 글루타민 운반 활성을 갖는 SLC1A5 전사물 변이체의 단백질 활성을 억제하는 것이라면 그 물질의 종류나 크기에는 제한을 받지 않으며, SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 도메인을 갖는 펩타이드, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서는 야생형 SLC1A5 단백질의 글루타민 운반체 활성을 억제하는 것으로 알려진 GPNA(1-γ-glutamyl-p-nitroanilide), 벤질세린(benzylserine) 및 HgCl₂ 등의 물질이 SLC1A5_var 전사물 변이체의 미토콘드리아 내 글루타민 운반체 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

[0033] 더욱 구체적으로, 본 발명에 따른 SLC1A5 전사물 변이체의 단백질 활성 억제제는 미토콘드리아 내 글루타민 수송능을 갖는 SLC1A5 전사물 변이체의 단백질 활성은 억제하고, 미토콘드리아가 아닌 세포질의 글루타민 운반을 담당하는 SLC1A5 전사물 변이체의 단백질 활성은 그대로 보존할 수 있는 것을 의미한다. 이런 목적에 부합하는 SLC1A5 전사물 변이체의 단백질 활성 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체, 예를 들어 SLC1A5_var 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머(aptamer)일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 상기 “앵타머”는 단백질이나 탄수화물 등의 특정한 표적 분자에 특이적으로 결합하는 RNA 분자를 의미한다. 상기 항체나 앵타머가 SLC1A5_var 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합함으로써, 단백질 일부의 아미노산 서열을 가림(masking)으로써 미토콘드리아로 적절히 타겟팅 되거나 활성에 필수적인 번역 후 단백질 수정 과정(posttranslational modification)이 일어나지 않게 하거나, 단백질 일부 또는 전체의 구조를 변경시키거나, 활성에 중요한 단백질 부위, 예를 들어 운반체 통로(pore)를 막는 등의 다양한 기작으로 단백질 활성을 억제할 수 있다.

[0035] 또한 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 추가로 당 대사 억제제를 더 포함하는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 당 대사 억제제는 2-디옥시글루코스(2-deoxyglucose), 3-브로모피루베이트(3-bromopyruvate, 3-bp), WZB117, 프롤레틴(phloretin) 및 STF-31로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있고, 가장 구체적으로는 2-디옥시글루코스(2-deoxyglucose)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는 SLC1A5_var에 특이적인 siRNA와 함께 2-디옥시글루코스(2-deoxyglucose 또는 2-deoxy-D-glucose; 2-DG)를 해당 세포주에 처리하면 암세포 생존율이 거의 완벽하게 억제되는 것을 확인하였다. 즉 미토콘드리아 내 글루타민 대사와 당 대사는 밀접하게 연관되어 있어서, SLC1A5_var의 발현의

억제 또는 활성의 억제와 동시에 2-DG 등으로 당 대사를 함께 억제하면 항암 효과가 더욱 배가되는 것을 확인하였다(도 8).

[0037] 구체적으로, 본 발명에서 대상으로 하는 암의 종류는 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma) 혈액종양(hematopoietic malignancy), 자궁경부암(cervical cancer), 육종(sarcoma), 고환암(testicular cancer), 악성 흑색종(malignant melanoma), 내분비 종양(endocrine tumor), 골암(bone cancer), 전립선암(prostate cancer), 자궁암(uterus cancer), 유방암(breast cancer), 방광암(bladder cancer), 뇌 종양(brain cancer), 간암(liver cancer), 위암(stomach cancer), 췌장암(pancreas cancer), 피부암(skin cancer), 폐암(lung cancer), 후두암(larynx cancer), 두경부암(head and neck cancer), 식도암(esophageal cancer), 대장암(colorectal cancer) 및 난소암(ovarian cancer)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 암은 SLC1A5_var 전사물 변이체 단백질이 정상 세포에서보다 과발현된 것으로 확인된 폐암, 대장암 또는 췌장암 중에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 가장 구체적으로는 췌장암일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 다른 측면은 (a) SLC1A5 전사물 변이체를 발현하는 세포에 시험 제제를 처리하는 단계; (b) 상기 시험 제제를 처리한 세포에서 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 시험 제제를 처리하지 않은 세포에서 발현된 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질의 활성과 비교하여 상기 시험 제제가 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 활성을 억제하는지 여부를 확인하는 단계;를 포함하는 암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0039] 본 발명에서 상기 “제제(agent)” 또는 “시험 제제(test agent)”라 함은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 방법을 통해 선별되는 물질은, 예를 들어 메치오닌 아미노산 유사체, siRNA, shRNA, miRNA, ribozyme, DNAzyme, PNA(peptide nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앵타머, 펩티드, 천연추출물 및 화학물질 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0040] 상기 (a) 단계에서 시험 제제를 처리하는 단계는 SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA 또는 단백질 발현 또는 단백질의 활성에 영향을 주는 인자와 시험 제제의 접촉을 유도하는 과정을 의미하는 것이다. 예를 들어, 시험관 내(*in vitro*)에서 시험 제제가 세포막 외부에 처리되어 세포 내로 도입되는 것에 의한 것일 수도 있고, 또는 공지의 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술에 의해 시험 제제가 세포 내에서 발현됨에 따른 것일 수 있으나, 상기 예시에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 구체적으로, 상기 (a) 단계의 SLC1A5 전사물 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 미토콘드리아 타겟팅 서열 및 글루타민 운반체 활성을 갖는 단백질인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 상기 (b) 단계에서 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준을 측정하는 방법은 SLC1A5 전사물 변이체를 암호화하는 mRNA 또는 미토콘드리아에서의 단백질의 수준을 측정하는 것으로서, 해당 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법이라면 제한없이 선택하여 사용할 수 있으며, 분석 방법의 예로서, 역전사 중합효연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA:RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩(microarray chip), RNA 염기서열분석(RNA sequencing), 나노스트링(nanostring)을 이용한 혼성화 방법, 조직 절편의 인시투 혼성화 방법(*in situ* hybridization) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 단백질 수준에서의 발현 수준을 확인하고자 할 때에는 SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질 수준을 확인할 수 있다. 항체와 유사하게 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머 등을 이용할 수도 있다. 한편, 단백질 측정 방법에 따라 항체가 필요하지 않을 수도 있는데, 예를 들어, SLC1A5 전사물 변이체의 표준 물질에 대한 분석을 수반하는 질량 분석(mass spectrometry) 등이 그 예이다.

[0043] 구체적으로, 상기 (b) 단계의 단백질의 활성은 미토콘드리아의 글루타민 운반체 활성을 의미하는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면은, (a) 피험체로부터 시료를 취득하는 단계; (b) 상기 시료에서 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 발현 수준 또는 단백질 활성 수준이 대조군보다 높을 경우 피검체를 암에 걸린 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0045] 구체적으로, 상기 (a) 단계의 시료는 암 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액 및 소변으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으며, 상기 (b) 단계의 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준은 mRNA 또는 미토콘드리아에서의 단백질 발현 수준이고, 단백질의 활성은 미토콘드리아 글루타민 운반체의 활성인 것일 수 있다.

- [0046] 또한 구체적으로, 상기 암은 폐암(lung cancer), 대장암(colorectal cancer) 및 췌장암(pancreas cancer)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 측면은, SLC1A5 전사물 변이체의 발현 수준 또는 단백질 활성 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0048] 구체적으로, 상기 발현 수준을 측정하는 제제는 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브이거나, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머일 수 있다.
- [0049] 또한 구체적으로, SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드 도메인, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 상기 “프라이머(primer)”는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)를 의미한다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, T_m)가 달라진다.
- [0051] 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 SLC1A5 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 SLC1A5 전사물 변이체의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다.
- [0052] 본 발명에서 상기 “프로브(probe)”는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 mRNA의 발현양을 측정할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브는 검출하고자 하는 특정한 SLC1A5 전사물 변이체, 구체적으로는 SLC1A5_var 전사물 변이체의 mRNA에만 결합하고, 다른 종류의 전사물 변이체 또는 야생형 SLC1A5 mRNA에는 결합하지 않는다. 예를 들어 SLC1A5_var 전사물 변이체의 서열의 경우에는, 도 1에 도시된 바와 같이, 엑손 1(E1)이 결여되어 있고, SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5/ASCT2)는 엑손 2(E2)가 결여되어 있으므로, mRNA 상의 프라이머 또는 프로브의 결합 부위(binding site)가 E2의 일부 또는 전부를 포함하게 디자인함으로써 SLC1A5 전사물 변이체에는 결합하지 않고, SLC1A5_var 전사물 변이체에만 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 제작할 수 있다. 상기 SLC1A5_var 전사물 변이체에만 특이적으로 결합하는 프라이머의 예로서, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 프라이머의 서열이 서열번호 3(정방향; forward primer) 및 서열번호 4(역방향; reverse primer)에 기재되어 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 SLC1A5 전사물 변이체 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0055] 본 발명에서 상기 “항체(antibody)”는 항원성 부위에 특이적으로 결합하는 면역글로불린(immunoglobulin)을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 검출하고자 하는 특정한 SLC1A5 전사물 변이체, 예를 들어, SLC1A5_var 전사물 변이체 이외의 다른 SLC1A5 전사물 변이체 단백질 및 다른 종류의 단백질에는 반응하지 않고, SLC1A5_var 전사물 변이체 단백질에만 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 구체적으로, SLC1A5 전사물 변이체는 엑손 2를 포

함하지 않으므로, 엑손 2 부위 또는 엑손 2와 엑손 3의 접합 부분에 특이적으로 결합하는 항체는 SLC1A5_var 전사물 변이체 단백질에만 특이적으로 결합하는 항체이다. SLC1A5 전사물 변이체에 대한 항체는 SLC1A5 전사물 변이체의 유전자를 발현백터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 수득하고, 수득한 단백질로부터 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다. 상기 항체는 다클론항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론항체(monoclonal antibody)를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함될 수 있다.

[0056] 본 발명의 또 다른 측면은, SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제를 포함하는, 항암제 내성 억제용 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에서, SLC1A5_var 변이체 단백질이 다양한 암 종류의 암세포에 과발현되어 있으며, 발현이 억제되면 암세포 증식이 억제되고 암세포 사멸이 촉진되어 항암 효과를 발휘하는 것을 확인한 바 있다. 다른 일 실시예에서는 SLC1A5_var 변이체 단백질은 이러한 직접적인 항암 효과뿐 아니라, 암세포의 항암제 내성에도 기여함을 발견하였다. 항암 치료제가 성공적인 치료 효과를 발휘하려면, 정상 조직이 살아남을 수 있는 치료제의 혈중 농도에서 암세포는 사멸해야 하는데, 치료 효과를 낼 수 있는 것으로 결정된 혈중 농도에 도달할 수 있는 치료제를 투여했음에도 암세포가 반응하지 않고 사멸되지 않는 것을 말한다. 암세포에 대한 치료 효과는 떨어지고, 항암제에 대한 부작용은 악화될 수 있다.

[0058] 본 발명 일 실시예에서는 젬시타빈(gemcitabine)에 대하여 이미 내성을 획득한 췌장암 세포주에서 SLC1A5_var 변이체의 발현을 억제한 결과, 암세포는 다시 젬시타빈에 대한 감수성(sensitivity)을 회복하여, GI50(half maximal growth inhibition concentration)은 현저하게 감소하고, 암세포 사멸이 촉진됨을 관찰하였다(도 9). 이에 따라 미토콘드리아 내 글루타민의 운반 활성을 갖는 SLC1A5_var 변이체의 발현 또는 단백질의 활성을 억제함으로써 기존의 항암제의 내성 발달을 억제하여 보다 효과적으로 암 치료 효과가 발휘되도록 하는 항암 내성 억제제로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0059] 구체적으로, 상기 항암제는 플라틴 계열 항암제인 시스플라틴(cisplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin), PD-1 저해제, CTLA-4 저해제 및 피리미딘 뉴클레오사이드 전구체(pyrimidine nucleoside prodrug) 계열의 항암제일 수 있고, 더욱 구체적으로는 피리미딘 뉴클레오사이드 전구체(pyrimidine nucleoside prodrug) 계열의 항암제인 젬시타빈(gemcitabine)이나 5-FU등 일 수 있으며, 가장 구체적으로는 젬시타빈(gemcitabine)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 상기 젬시타빈(gemcitabine)은 유방암, 난소암, 비소세포성 폐암, 췌장암, 방광암 등 다양한 암에 이용되는 항암화학치료제이다. 젬시타빈은 뉴클레오사이드 유사체(nucleoside analog) 계열의 화합물로, 새로운 DNA가 생성되는 것을 막아 최종적으로 세포사멸을 유도한다. 보다 상세하게는 젬시타빈은 피리미딘 뉴클레오사이드 전구체(pyrimidine nucleoside prodrug)으로, deoxycytidine의 2' 탄소 위치의 수소(hydrogen, H)가 불소(fluorine, F)로 치환된 뉴클레오사이드 유사체이다.

[0061] 또한, 구체적으로 상기 상기 발현 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA 및 miRNA로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로 상기 mRNA는 서열번호 2의 염기서열을 포함하고, 상기 siRNA는 서열번호 7의 염기서열을 포함하며, 상기 shRNA는 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 상기 단백질 활성 억제제는 SLC1A5 전사물 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드 도메인, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제를 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

[0064] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0065] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 내 투여될 수 있다.

[0066] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

[0067] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0068] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.

[0069] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0070] 본 발명은 SLC1A5 전사물 변이체가 암세포 대사에 필수적인 미토콘드리아 글루타민 운반체임을 구체적으로 확인하였으며, 나아가 SLC1A5 전사물 변이체가 다양한 암세포에서 과발현되어 있고, 항암제 내성에도 관여하며, SLC1A5 전사물 변이체의 발현이 억제되면 암세포 증식이 현저하게 저해된다는 사실을 확인하였는 바, SLC1A5 전사물 변이체는 신규한 암 진단 마커 및 항암 치료의 표적으로서 활용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 본 발명에서 확인한 두 개의 새로운 SLC1A5의 전사물 변이체인 SLC1A5 및 SLC1A5_var를 나타낸 것이다(A: 인간 SLC1A5 유전자의 엑손(exon)과 인트론(intron)의 구성 및 두 개의 전사물 변이체 SLC1A5(NM_005628.2) 및 SLC1A5_var(NM_001145145.1)을 나타냄. B: SLC1A5(청색) 및 SLC1A5_var(적색)의 mRNA 전사물의 엑손 구조로서, siRNA의 결합 부위 및 RT-PCR 증폭산물이 표시되어 있음).

도 2는 여러 암세포에서의 SLC1A5_var 발현 양상을 분석한 결과를 나타내었다(A, B: 췌장암 세포주; C, D: 대장암 세포주; E, F: 폐암 세포주).

도 3은 SLC1A5_var가 세포 내 미토콘드리아에 분포하는 것을 면역형광법으로 확인한 결과를 나타내었다(A: HA-tagged SLC1A5_var 또는 HA-tagged SLC1A5로 형질전환된 HeLa 세포를 면역형광법으로 확인한 결과. B: SLC1A5_var와 세포소기관 마커의 공존 여부를 Zen colocalization analysis를 이용하여 정량분석한 결과).

도 4는 SLC1A5_var가 세포 내 미토콘드리아에 분포하는 것을 세포소기관 분획실험을 통해 확인한 결과를 나타내었다(A: MiaPaCa2 세포에서 수득한 SLC1A5_var의 세포소기관 분획실험의 면역블롯 결과. B: SLC1A5_var에 대한 MiaPaCa2의 미토콘드리아 소기관 분획실험 결과).

도 5는 control 벡터, SLC1A5, SLC1A5_var, 또는 SLC1A5_var D186A 돌연변이를 발현하는 MiaPaCa2 세포에서 분리된 미토콘드리아를 대상으로 SLC1A5 전사물 변이체가 미토콘드리아 글루타민 운반체(glutamine transporter)임을 확인한 실험 결과를 나타내었다(A: 시간 경과에 따른 글루타민 흡수(Gln uptake) 정도. B: 아미노산 흡수(amino acid uptake) 정도. C: control 벡터, SLC1A5, SLC1A5_var, 또는 SLC1A5_var D186A 돌연변이에 대한 siRNA를 처리한 경우의 글루타민 흡수 정도. D: siRNA를 처리한 경우의 아미노산 흡수 정도. E: SLC1A5 전사물 변이체의 억제제가 SLC1A5 전사물 변이체의 글루타민 운반체 활성을 억제하는 것을 보여주는 실험 결과).

도 6은 SLC1A5 전사물 변이체의 점돌연변이를 이용해 미토콘드리아 표적화 신호를 분석하는 실험 결과에 관한 것으로, 야생형(wild type)은 WT로, 3개 아미노산을 점돌연변이(R9A/R15A/K17A) 시킨 것은 3A로, 2개 아미노산을 점돌연변이(R44A/K45A) 시킨 것은 2A로 나타내었다(A: SLC1A5_var의 N-말단(NT)과 C-말단(CT)의 도식. B: EGFP(녹색)의 N-말단에 접합된 SLC1A5_var 단편을 발현하도록 형질전환된 HeLa 세포의 공초점 현미경(confocal microscopy) 관찰 결과로, 미토콘드리아는 MitoTracker(적색)으로 염색함).

도 7은 siRNA를 이용하여 SLC1A5 전사물 변이체의 발현을 억제한 경우의 항암 효과를 확인한 결과를 나타내었다(A: 체장암 세포주 및 환자 유래 체장암 세포의 상대적인 증식 정도(cell growth). B: 체장암 세포주에서 SLC1A5_var의 녹다운(knockdown)으로 유발되는 세포사멸(apoptosis)의 정도. C: control vector 또는 SLC1A5_var shRNA를 발현하는 MiaPaCa2 세포의 이종이식(xenograft) 실험 결과).

도 8은 siRNA를 이용한 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 억제 및 2-DG의 병용 처리가 암세포 성장에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타내었다.

도 9는 WST-1 에세이를 이용하여 암세포의 세포생존율(cell viability)을 측정함으로써, SLC1A5 전사물 변이체와 항암제인 젬시타빈(gemcitabine)에 대한 약물내성 효과와의 관련성을 확인한 결과를 나타내었다(A, B: SLC1A5_var의 과발현이 젬시타빈 감수성(sensitivity)에 미치는 영향. C, D: SLC1A5_var의 녹다운이 젬시타빈 감수성(sensitivity)에 미치는 영향).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0074] 실시예 1. 암세포에서의 SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5_var)의 발현 양상 확인

[0075] 현재까지 확인된 바 없는 미토콘드리아 내 글루타민 운반체(mitochondrial glutamine transporter)를 찾아내기 위하여, 글루타민 운반체의 전사물 변이체들을 조사하였다.

[0076] 인간 SLC1A5 유전자는 8개의 엑손으로 구성되어 있으며, 전사 시작점(transcription start site)이 다른 두 개의 전사물 변이체가 존재한다(NM_005628.2 및 NM_001145145.1; 도 1A). 길이가 긴 전사물 변이체(SLC1A5/ASCT2, NM_005628.2)는 엑손 2가 결여되어 있으며, 541개 아미노산으로 이루어져 있고, 짧은 전사물 변이체(SLC1A5_var, NM_001145145.1)는 엑손 1이 결여되어 있으며, 339개 아미노산으로 이루어져 있음을 확인하였다(도 1B). SLC1A5 전사물 변이체는 SLC1A5_var로 명명하였다.

[0077] 다양한 암 세포주에서의 SLC1A5 전사물 변이체의 발현 양상을 확인하기 위하여, RT-PCR을 이용하여 각 전사물 변이체의 mRNA 수준을 분석하였다.

[0078] 구체적으로, 상기 RT-PCR을 위한 RNA는 RNA 추출 키트(MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, Takara)를 사용하여 분리되었으며 cDNA 합성 키트(PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit, Takara)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 갖는 프라이머로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여, 95℃, 45℃ 및 72℃에서 각 30초씩 26 사이클 조건에서 역전사중합체연쇄반응(RT-PCR)을 통해 증폭 후, 1% 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis) 방법을 통해 반응 결과를 확인하였다. 결과는 ImageJ

소프트웨어를 사용하여 정량 분석되었으며 GAPDH를 정량 기준으로 사용하였다.

[0079] 그 결과, 모든 췌장암 세포주의 SLC1A5_var의 발현이 정상 췌장관 상피세포(human pancreatic ductal epithelial cell, HPDE)보다 증가하였으며, 특히 Panc-1, MiaPaCa-2, AsPC1, 및 Panc10.05 세포주에서 더욱 과 발현된 것을 확인하였다(도 2의 A, B).

[0080] 또한, 다양한 대장암 세포주에서도 인간의 정상 대장 상피세포(human colon epithelial cell, FHC)보다 SLC1A5_var의 발현 수준이 높게 측정되었다(도 2의 C, D).

[0081] 반면, SLC1A5_var과 달리 SLC1A5는 췌장암이나 대장암 세포주에서의 발현이 증가하지 않았다.

[0082] NCI-H358을 제외한 폐암 세포주에서는 인간의 정상 섬유아세포(human fibroblast, BJ) 또는 정상 기관지 상피세포(human bronchial epithelial cell; 16HBE)와 비교하여 SLC1A5와 SLC1A5_var 모두 발현이 증가한 것을 확인 하였다(도 2의 E, F).

[0083] 이와 유사하게, 암세포에서의 SLC1A5 및 SLC1A5_var의 mRNA 발현 양상은 면역 블롯을 이용하여 확인한 단백질 발현 수준과도 일치하는 것을 확인하였다.

[0084] 실시예 2. 면역형광법을 이용한 SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5_var)의 세포 내 분포 양상 확인

[0085] 암세포에서 발현수준이 높은 것이 확인된 SLC1A5 전사물 변이체 단백질의 세포내 분포 패턴을 확인하였다. SLC1A5 전사물 변이체의 cDNA에 HA-tag을 접합하여 HeLa 세포에 형질전환 시키고, 세포소기관 마커와 공존 (colocalization) 양상을 분석하였다.

[0086] 구체적으로, 실험에 사용된 세포는 HeLa 세포이며 메탄올로 고정 후 각각 1차 항체로서 항 Cox4 항체, 항 Na^+/K^+ ATPase 항체, 항 ERp72 항체, 항 GM130 항체, 항 LAMP2 항체로 라벨링하였다. 그 후 2차 항체로서 Alexa-488 또는 Alexa-594 형광이 표지되어 있는 항체를 사용하여 라벨링하였다. 세포핵은 DAPI로 염색하였으며 이후 공초 점 현미경으로 관찰하였다. 이미지 겹침 정도는 각 샘플당 10개 이상의 이미지를 Zen imaging 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0087] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, HA-tag을 포함하는 SLC1A5 전사물 변이체 단백질은 미토콘드리아 마커(COX 4)와 공존하는 것으로 관찰되었으나, 세포막(Na, K -ATPase), 소포체(ERp72), 골지체(GM130) 또는 라이소좀 (LAMP2) 등의 마커와는 발현 양상이 상이하여 SLC1A5 전사물 변이체 단백질은 미토콘드리아에 존재하는 것을 확인하였다(도 3의 A, B).

[0088] 이와 대조적으로 SLC1A5 단백질은 Na, K -ATPase와 공존하여, 세포막에 존재하는 것을 확인하였다.

[0089] 실시예 3. 세포소기관 분획실험을 통한 SLC1A5 전사물 변이체(SLC1A5_var)단백질의 미토콘드리아 내 분포 양상 확인

[0090] SLC1A5_var 단백질이 미토콘드리아 내에 존재하며, 그 분포 양상을 더욱 자세히 알아보기 위하여 세포소기관 분 획실험을 실시하였다(도 4).

[0091] 구체적으로, 상기 세포소기관 분획실험의 모든 절차는 4 °C 이하의 차가운 온도에서 진행하였으며, 미토콘드리아는 KPBS 버퍼(136 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , pH7.2)를 사용하여 분리하였다. 세포를 먼저 KPBS 버퍼를 사용하여 채취하고, 세포 부유액을 900g, 3min 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 펠렛만 단백질 분해 효소 억제제인 아프로티닌(aprotinin) 5mg/ml, 류펩틴(leupeptin) 10mg/ml 및 PMSF 250mM가 포함된 KPBS로 재부유 시켰다. 이 후 Dounce homogenizer를 사용하여 세포를 깨고, 깨진 세포를 600g, 5분 동안 원심분리하였다. 다시 상층액은 버리고 펠렛만을 7000g에서 2번, 10000g에서 한번씩 각각 10분 동안 원심분리하는 과정을 거쳐 생성된 펠렛을 미토콘드리아 분획으로 사용하였다.

[0092] 미토콘드리아의 내막 분리는 저삼투압 조건에서 실시하였다. 상기 미토콘드리아 분획을 스웰링(swelling) 버퍼 (10M KH_2PO_4 , 디지토닌 2 mg/ml, pH 7.4)에 넣어준 후 1시간 동안 얼음 위에서 보관하였다. 그리고 같은 부피의 iso-osmotic 용액(32% sucrose, 30% glycerol, and 10mM MgCl_2)을 넣어주었다. 그 후 10000g, 10min로 원심분 리하여 이 때 발생하는 상층액을 미토콘드리아 외막 분획으로, 그리고 펠렛은 미토콘드리아 내막과 매트릭스 분 획으로 사용하였다. 상기 펠렛을 다시 디지토닌이 없는 스웰링 버퍼를 사용하여 재부유시켜 1시간 동안 얼음 위 에 보관하고, 다시 같은 부피의 iso-osmotic 용액을 넣은 후 17000g, 1시간 동안 원심분리 하였다. 분리 후 상

층액을 매트릭스 분획으로, 펠렛을 미토콘드리아 내막 분획으로 사용하였다.

[0093] 상기 미토콘드리아의 소기관 분획을 대상으로 면역 블롯을 실시하였다. 면역블롯을 위해서 용해 버퍼(pH 7.4의 40mM HEPES, 0.5% 트리톤 X-100, 10mM β -글리세롤 포스페이트, 10mM 파이로포스페이트, 2.5mM $MgCl_2$)와 초음파를 이용해 세포를 분쇄하였다. SLC1A5_var의 관찰을 위해서 PNGase F를 처리하였다. 통상적인 면역 블롯(immunoblotting)과는 다르게 샘플을 끓이는 과정은 하지 않았고, 샘플당 최소 약 30ug 정도의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 이후 PVDF 막으로 전이하는 과정을 거친 후, 각 단백질에 해당하는 1차 항체를 4℃에서 8시간 동안 처리하고, 각 1차 항체를 인식하는 HRP가 붙어있는 2차 항체를 붙여 막에 존재하는 각 단백질을 확인하였다.

[0094] 그 결과, 실시예 2의 면역형광실험 결과와 유사하게 SLC1A5 단백질은 Na,K-ATPase가 집중적으로 분포하는 세포막 분획에서 관찰되었으나, SLC1A5_var 단백질의 대부분은 COX4가 집중된 미토콘드리아 분획에서 확인되었다(도 4A).

[0095] 나아가 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아 내막의 마커인 Tim23과 함께 분리되었으나, 미토콘드리아 외막의 마커인 Tom20이나 미토콘드리아 기질의 마커인 MnSOD2와는 독립적으로 분획되었다(도 4B). 따라서 SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아에, SLC1A5 단백질은 세포막에 분포하는 것을 확인하였다.

[0096] 실시예 4. SLC1A5_var가 미토콘드리아의 글루타민 운반체인지 여부 확인

[0097] SLC1A5_var가 미토콘드리아에서 글루타민 흡수에 관여하는지 알아보기 위하여, SLC1A5_var의 NMDG 모티프의 보존 부위 내 나트륨 이온이 결합하는 부위의 아스파르트산을 알라닌으로 변경한 돌연변이(D186A)를 제작하였다.

[0098] 웨장암 세포주인 MiaPaCa2 세포에 SLC1A5_var 또는 SLC1A5_var D186A를 각각 안정적으로 발현시키고, 미토콘드리아 내 글루타민 흡수 활성을 측정하였다.

[0099] 구체적으로, 상기 실시예 3의 방법으로 미토콘드리아 분획을 얻은 후, KPBS 버퍼에 10mM NaCl과 100mM 글루타민, 100 mM 세린, 100 mM 알라닌 또는 100 mM 글루탐산이 포함된 버퍼로 재부유 시킨 후 37℃에 보관하는 것으로 아미노산 흡수를 시작하였다. 이후 20mM $HgCl_2$ 를 넣어 반응을 종료하였고, 종료 후 각 샘플은 10000g, 5min 동안 원심분리 하였다. 이후 상층액을 취하여 남아있는 처음 대비 소모된 아미노산을 아미노산 측정 키트를 사용하여 측정하였다. 측정한 값은 각 샘플의 미토콘드리아의 단백질 양을 측정하여 정량시 기준값으로 사용하여 보정하였다.

[0100] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, SLC1A5_var를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아에서만 시간의 흐름에 따라 대조군 백터 이상으로 글루타민 수준이 증가하는 것을 확인하였다. 반면 SLC1A5 또는 SLC1A5_var D186A를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 글루타민이 흡수되지 않는 것을 확인하였다(도 5 A).

[0101] 또한 SLC1A5_var를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 글루타민 뿐 아니라, SLC1A5의 다른 알려진 기질인 알라닌과 세린도 흡수되는 것으로 나타났다(도 5B).

[0102] 한편, si-RNA를 이용하여 SLC1A5_var의 과발현을 억제한 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 글루타민의 흡수가 억제되었으나, SLC1A5의 과발현을 억제한 세포에서 분리된 미토콘드리아에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다(도 5C). 알라닌과 세린에 대해서도 같은 결과가 관찰되었다(도 5D).

[0103] 나아가, 기존에 알려진 SLC1A5의 억제제들인 GPNA(1- γ -글루타미드-p-니트로아닐라이드)와 벤질세린(benzylserine)이 SLC1A5_var에 의한 미토콘드리아 글루타민 수송을 억제할 수 있는지 확인한 결과, 상기 억제제들은 기저 수준(basal level) 및 SLC1A5_var가 매개하는 미토콘드리아의 글루타민 흡수를 억제하는 것으로 나타났다(도 5E). 또한 프로테오리포솜(proteoliposome)에서 SLC1A5에 의한 수송 반응을 종결시키는 것으로 알려진 $HgCl_2$ 역시 미토콘드리아 글루타민 흡수를 억제하였다.

[0104] 상기한 결과를 종합적으로 고려할 때, SLC1A5_var가 미토콘드리아의 글루타민 운반체임을 명확히 확인하였다.

[0105] 실시예 5. SLC1A5_var의 미토콘드리아 타겟팅 신호 확인

[0106] 상기 실시예에서 확인된 바와 같이, SLC1A5_var 단백질은 미토콘드리아 내막에 존재하고 있으므로, SLC1A5_var이 미토콘드리아에 특이적인 타겟팅 신호를 포함하고 있는지 확인하였다.

[0107] 단백질이 미토콘드리아로 운송되기 위해서는, 새로 생성되는 단백질은 분자 샤페론(molecular chaperone)에 의하여 인식되는 미토콘드리아 타겟팅 서열(mitochondrial targeting sequence, MTS)을 가지고 있어야 한다. 분

자 샤페론은 미토콘드리아 전이효소(mitochondria translocase)가 위치한 미토콘드리아 표면으로 타겟팅될 단백질을 전달하는 역할을 한다.

[0108] MTS는 단백질의 N-말단 부위에 위치하며, 17~23개의 아미노산으로 이루어진 소수성의 알파 나선 막투과 부위(α -helical transmembrane region)와 이에 연결된 한 두 개의 염기성 아미노산으로 구성되어 있다. 이에 따라 SLC1A5_var 단백질의 N- 또는 C-말단 위를 녹색 형광 단백질(Enhanced green fluorescent protein, EGFP; GenBank: AFA52654.1)에 접합하여 MTS의 존재 여부를 확인하였다. MTS와 관련된 SLC1A5_var 단백질의 염기성 아미노산에 점돌연변이를 도입하여 EGFP의 미토콘드리아 타겟팅 여부를 확인하였다(도 6A).

[0109] 구체적으로, 세포를 공초점 현미경 전용 세포 배양 접시에 배양하면서, 각 세포에 대해 컨트롤 벡터 또는 SLC1A5_var의 일부분인 NT_WT, NT_3A, NT_2A, CT와 EGFP를 발현할 수 있는 플라스미드를 형질주입(transfection)하였다. 48시간 지난 후 미토콘드리아를 염색할 수 있는 시약인 MitoTracker Red를 사용하여 미토콘드리아를 표지한 후 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0110] 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 야생형 N-말단(NT_WT로 지칭)과 R9A/R15A/K17A N-말단 돌연변이(NT_3A로 지칭)와 결합한 EGFP는 미토콘드리아로 타겟팅되었으나, R44A/K45A N-말단 돌연변이(NT_2A로 지칭)와 결합한 EGFP는 미토콘드리아로 타겟팅되지 못하고, 세포질 내 분산되어 있었다.

[0111] 이와 유사하게, 차등 원심분리(differential centrifugation)를 이용한 세포분획 실험에서도 NT_WT 또는 NT_3A에 접합된 EGFP는 미토콘드리아가 분리되는 분획에서 COX4와 함께 감지된 반면, NT_2A에 접합된 EGFP나 대조군 EGFP는 세포질 또는 세포내막(endomembrane)이 분리되는 분획에서 관찰되었다.

[0112] 최종적으로, NT_2A와 같은 돌연변이를 포함하도록 제작된 SLC1A5_var(SLC1A5_var_2A)는 세포 내에서 미토콘드리아로 타겟팅되지 못했으며, SLC1A5_var_2A를 과발현하는 세포에서 분리된 미토콘드리아 역시 글루타민을 흡수하지 못하는 것으로 나타났다.

[0113] 상기한 결과는 SLC1A5_var가 N-말단 부위에 미토콘드리아 타겟팅을 위한 기능적인 MTS를 포함하고 있음을 시사하는 것이다.

[0114] 실시예 6. SLC1A5_var의 발현 억제 및 항암 효과 확인

[0115] 상기한 실시예들로부터 다양한 암 세포주에서 SLC1A5_var가 과발현되어 있음을 확인하였다. 암 세포 대사에 글루타민이 필수적이므로, 암 세포에서의 SLC1A5_var의 기능을 확인하기 위하여, 췌장암 세포에서 siRNA를 이용하여 SLC1A5_var의 발현을 억제하고 종양 성장에 미치는 영향을 확인하였다.

[0116] SLC1A5_var에만 특이적으로 결합하는 si-RNA를 이용하여 SLC1A5_var의 발현을 억제한 결과, 분석 대상인 8종류의 췌장암 세포주(AsPC1, BxPC3, SU.86.86, Panc10.05, Panc1, MiaPaCa2, CFPAC-1, HPAF-II) 및 2종류의 환자 유래 췌장암 세포(YPAC-16, YPAC-26)에서 모두 암 세포의 성장이 현저하게 저해된 것을 확인하였다(도 7A).

[0117] 또한, SLC1A5_var의 발현이 억제된 암세포에서의 세포사멸 여부에 대해서도 확인하였다. 구체적으로, 96웰 세포 배양 플레이트에 배양 중인 세포에 siRNA를 이용하여 SLC1A5 및 SLC1A5_var를 각각 녹다운 시켰다. 그 후 세포가 자라는 것을 실시간 세포 배양 현미경인 Incucyte를 사용하여 관찰하였다. 그 후 세포사멸 세포(apoptotic cell)를 FITC가 부착된 Annexin V 탐침을 사용하여 FACS 분석하였다. 상기 Annexin V는 세포사멸 세포의 세포막에 노출되는 포스파티딜 세린에 특이적으로 강하게 결합하게 되는데, 이를 이용하여 세포사멸 세포를 표지하여 정량할 수 있다.

[0118] 상기 세포사멸 실험 결과, SLC1A5_var의 발현이 억제된 암세포에서는 세포사멸도 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 7B).

[0119] 반면, SLC1A5에 대한 siRNA는 이러한 암세포 증식 억제 효과가 전혀 나타나지 않았으며, SLC1A5_var에 특이적인 siRNA로 성장이 억제된 췌장암 세포주(MiaPaCa2)에 SLC1A5_var의 cDNA를 재도입하면 암세포 성장 속도가 회복되는 것을 확인하였다.

[0120] 나아가, 세포 실험에서 관찰된 SLC1A5_var 발현 억제에 따른 항암 효과는 마우스를 모델로 한 생체 실험에서도 그대로 관찰되었다.

[0121] 구체적으로, 대조군 DNA 또는 SLC1A5_var에 특이적인 shRNA로 형질전환된 MiaPaCa2 췌장암 세포주(MiaPaCa2, 1.0×10^7 개)를 누드 마우스의 견갑골 부위에 피하 주입하고 마우스에서의 종양 성장 경과를 이들에 한번씩 관찰

하였다.

[0122] 그 결과, SLC1A5_var의 발현이 억제된 세포를 주입한 마우스에서는 종양이 거의 자라지 못하였다(도 7C). 이 같은 결과는 SLC1A5_var에 의한 미토콘드리아 내 글루타민 수송 및 글루타민 대사가 암 치료를 위한 새롭고 효과적인 치료제 표적이 될 가능성을 시사한다.

[0123] **실시예 7. SLC1A5_var의 발현 억제와 항암제와의 병용요법의 효과 확인**

[0124] 본 발명자들은 SLC1A5_var의 발현을 억제하기 위한 siRNA와 당 대사를 억제하기 위한 2-디옥시글루코오스(2-DG)를 병용하였을 때, 췌장암 성장 억제의 효과가 극대화되는 것을 확인하였다(도 8).

[0125] 대조군 또는 SLC1A5에 대한 siRNA(각각 si-con 및 si-1A5)를 처리하였을 때에는 췌장암 세포주(MiaPaCa2)의 세포생존율에 큰 변함이 없었고, 2-DG를 첨가했을 때에만 생존율이 절반 수준으로 감소하였다.

[0126] 반면, SLC1A5_var에 특이적인 siRNA(si-1A5_var)를 처리한 경우 암세포 생존율이 절반 이하로 감소하였고, 여기에 2-DG를 첨가하면 암세포의 생존율이 거의 완벽하게 억제되는 것을 확인하였다.

[0127] 즉 이러한 결과는 암세포에서 SLC1A5_var를 통한 글루타민 대사과 당 대사는 서로 배가시키는 효과가 있어서, 항암 치료 전략에 있어서 미토콘드리아 내 글루타민 수송을 억제함과 동시에 또는 순차적으로 당 대사를 억제하는 것이 매우 효과적일 것임을 시사하는 것이다.

[0128] **실시예 8. SLC1A5_var의 항암제 내성 억제효과 확인**

[0129] 상기 실시예에서 확인한 SLC1A5_var가 암세포의 증식을 직접적으로 억제하는 효과 외에, 기존에 알려진 항암제 내성 발달에도 관여하는지 확인하였다.

[0130] 췌장암 세포의 약물 내성은 저산소 상태(hypoxia)가 주요 결정인자라는 것이 알려져 있으므로, 본 실시예에서도 췌장암 세포주 및 환자 유래 췌장암 세포에 저산소 상태를 유도하여 항암제인 젬시타빈(gemcitabine)에 대한 내성이 생기는 것을 확인하였다.

[0131] WST-1 에세이를 이용하여 암세포의 세포 생존율(cell viability)을 측정함으로써 췌장암 세포주에서 젬시타빈 내성과 SLC1A5_var의 발현 사이의 상관관계를 확인하였다. 구체적으로, 물에 잘 녹는 tetrazolium salt가 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소(dehydrogenase)에 의해 환원되면 색을 나타내는 formazan dye가 되는 것을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 활성을 측정하였다. 세포에 WST-1 키트에서 제공하는 WST-1 용액을 넣어준 후 1시간 뒤 450nm 흡광도를 측정하였다.

[0132] 그 결과 도 9A에 나타난 바와 같이, 대조군 또는 SLC1A5를 과발현하는 MiaPaCa2 세포에서 젬시타빈이 세포 증식을 억제할 수 있는 농도인 GI₅₀가 각각 27.7±8.1 nM 및 30.9±9.4 nM인 반면, SLC1A5_var를 과발현하는 MiaPaCa2 세포에서의 GI₅₀이 247.5±47 nM로 측정되어 젬시타빈의 암세포 증식 억제 효율이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 다른 췌장암 세포주인 Panc-1 세포주에서도 젬시타빈의 암세포 증식 억제 효율이 크게 감소하여 이와 동일한 결과를 나타내었다(도 9B).

[0133] 반면, si-RNA를 이용하여 SLC1A5_var의 발현을 억제시키면, 췌장암 세포주는 다시 젬시타빈 감수성을 회복하고, 젬시타빈의 GI₅₀는 크게 감소하여 암세포의 증식이 억제되고 세포사멸은 증가하는 것을 확인하였다(도 9의 C, D).

[0134] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

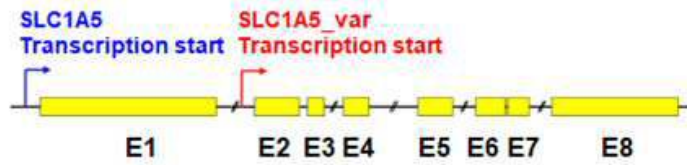
[0135] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

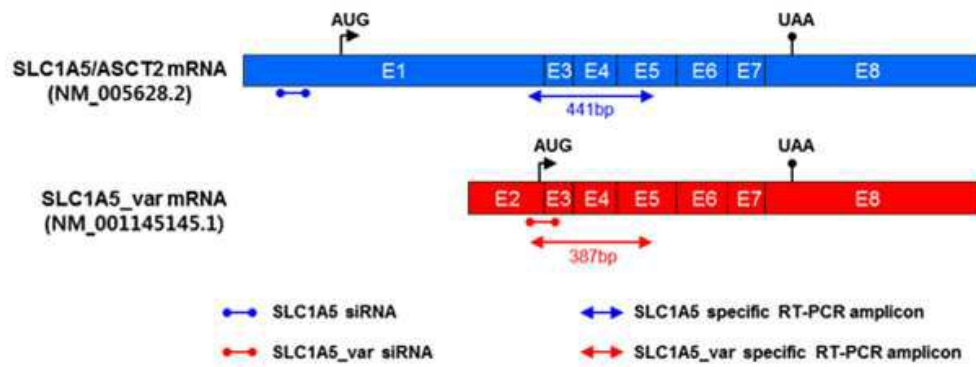
도면1

A

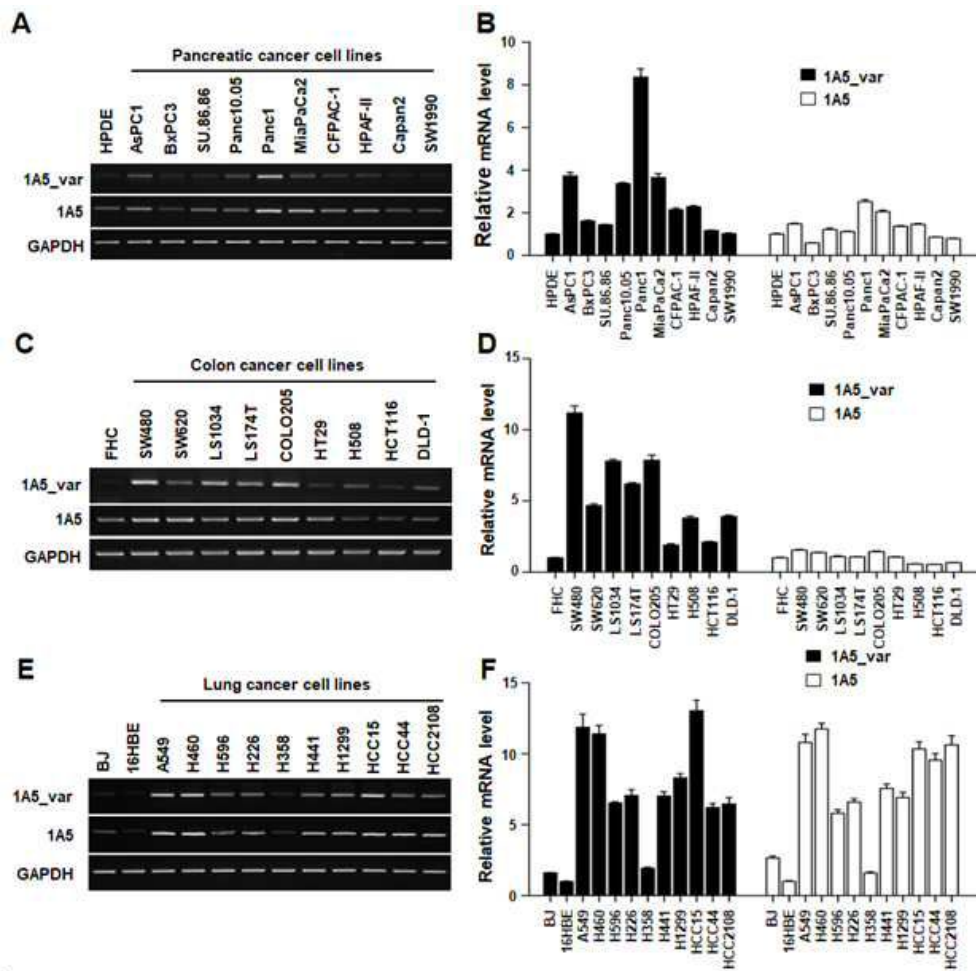
Human SLC1A5 Genomic Locus



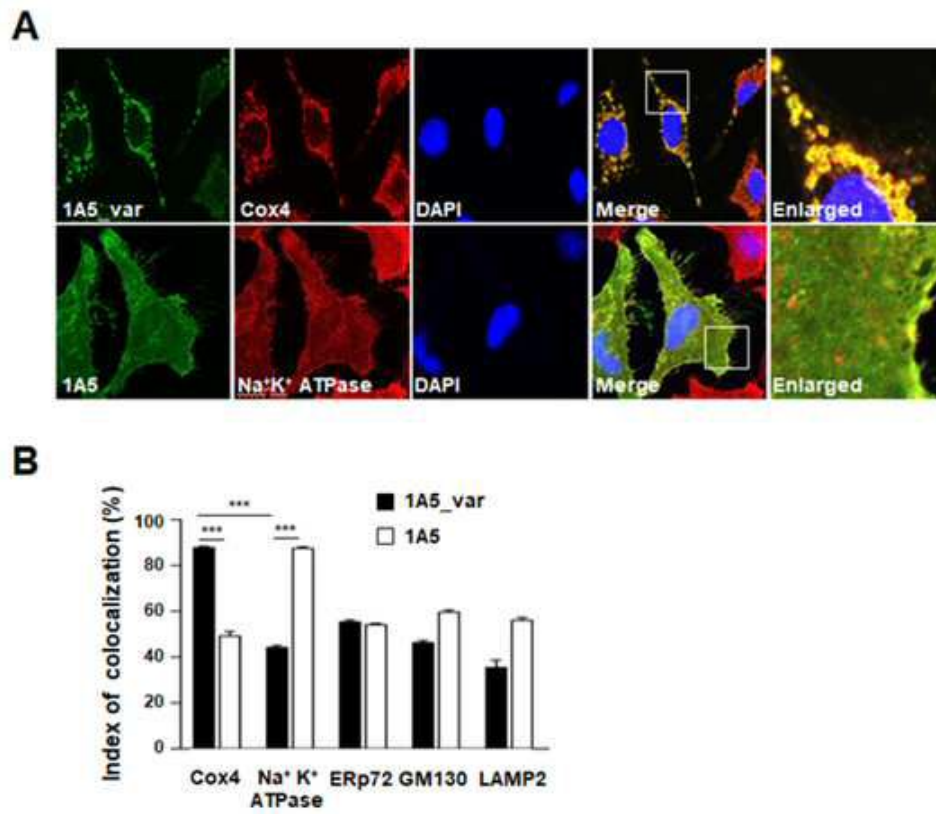
B



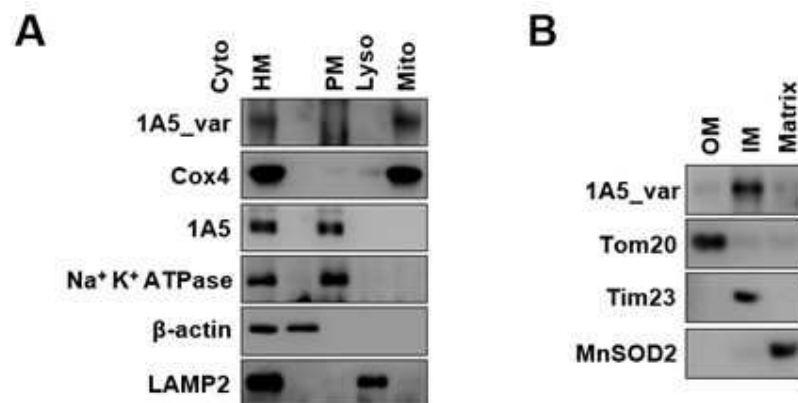
도면2



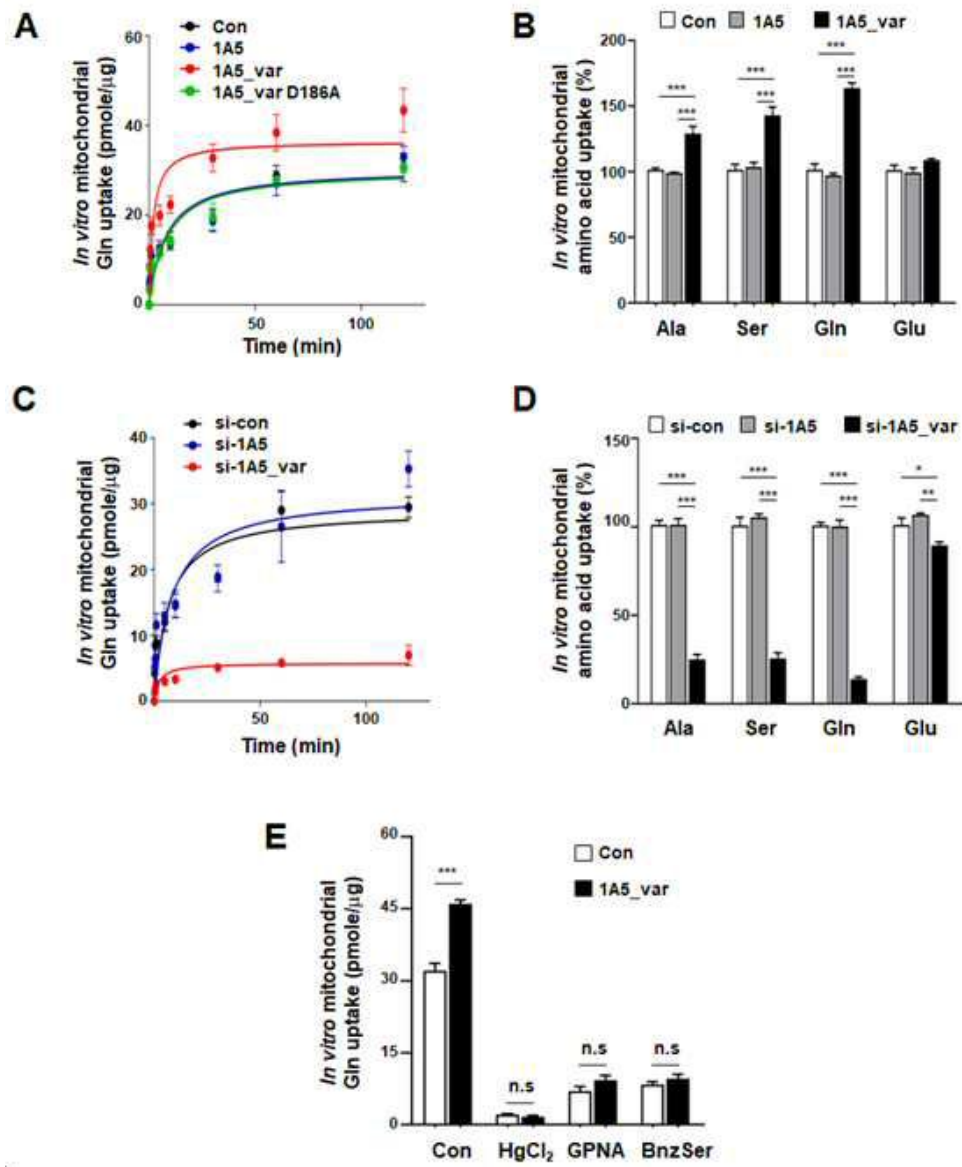
도면3



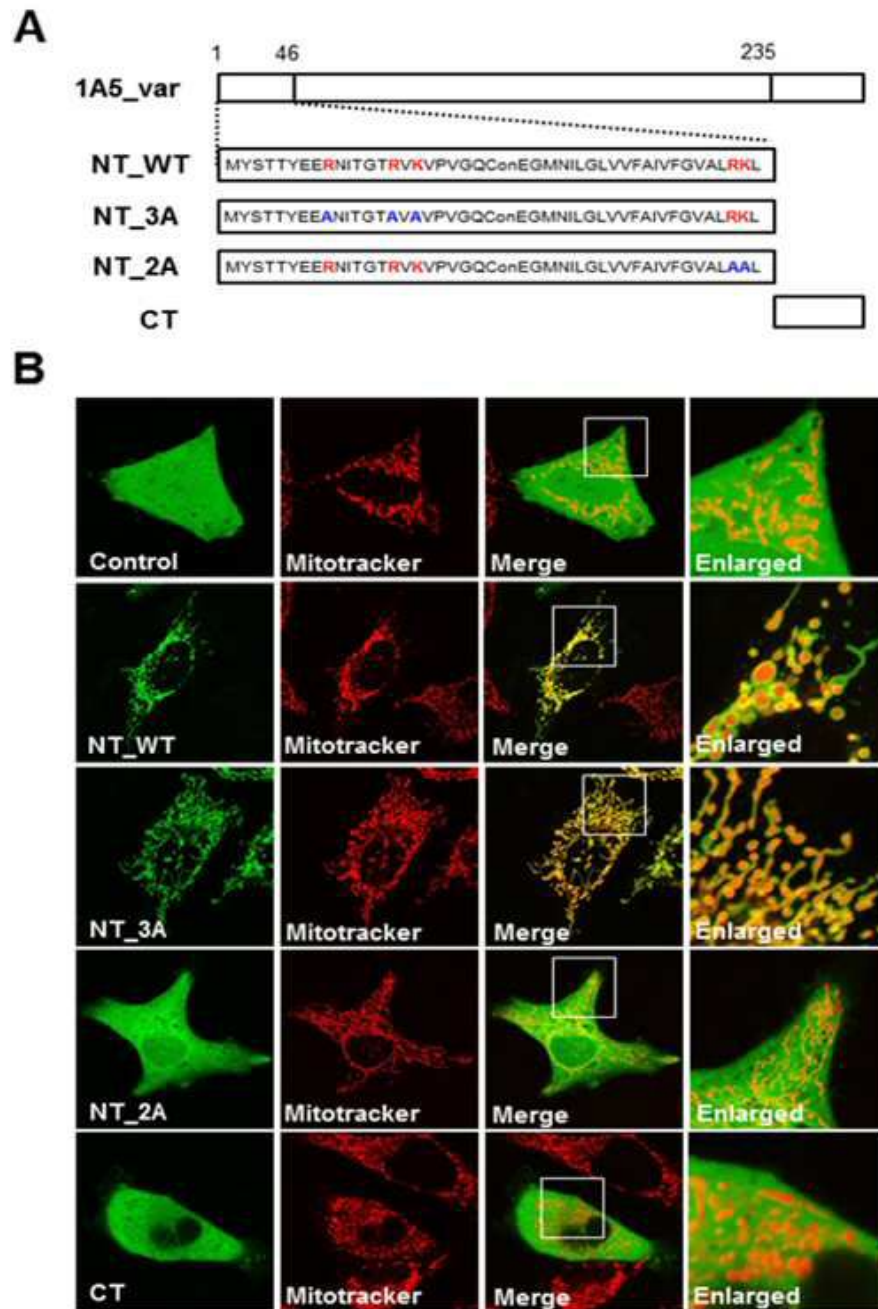
도면4



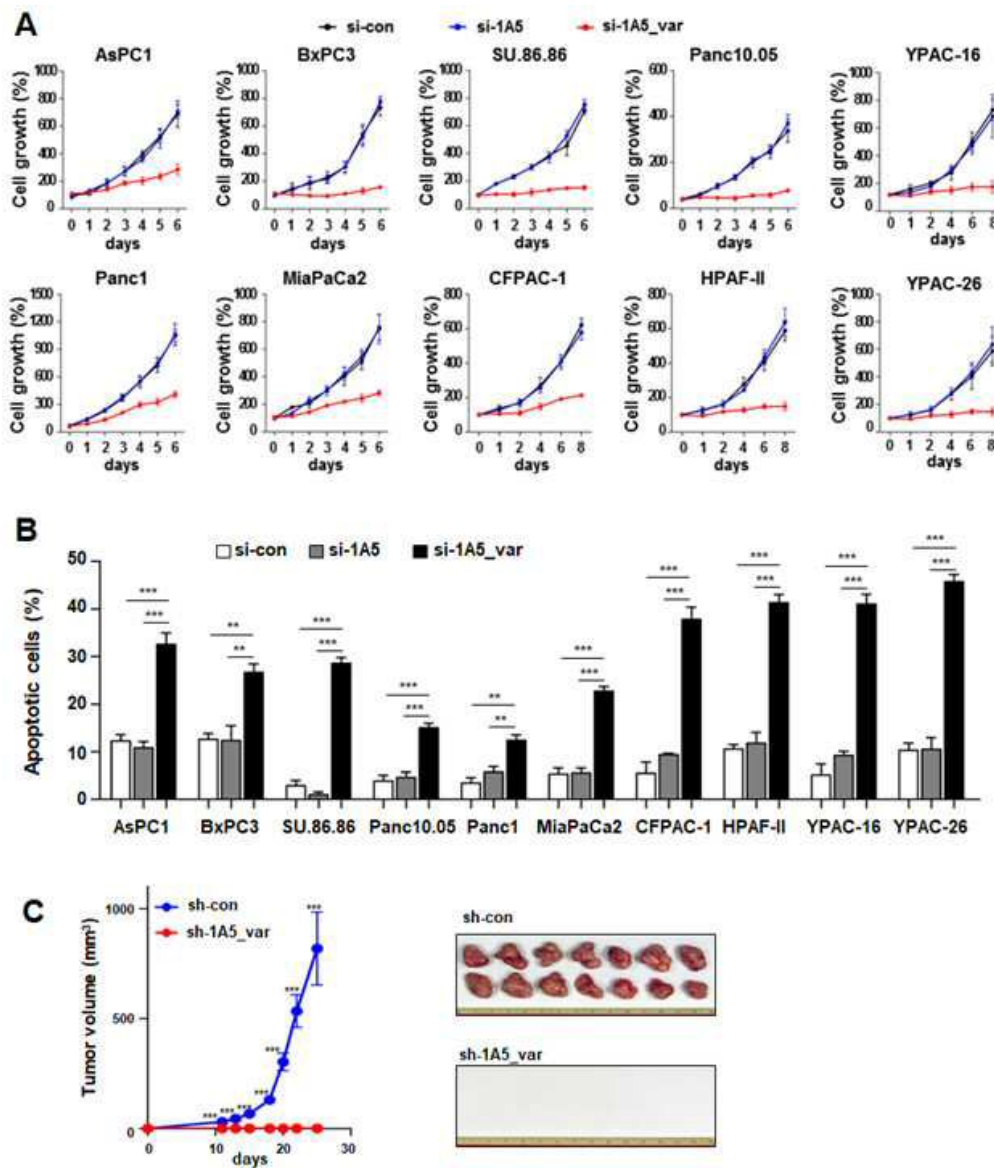
도면5



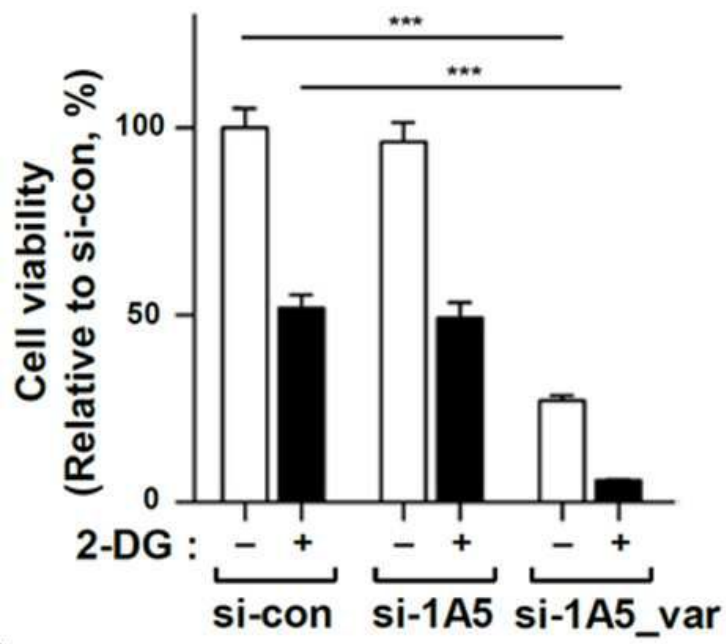
도면6



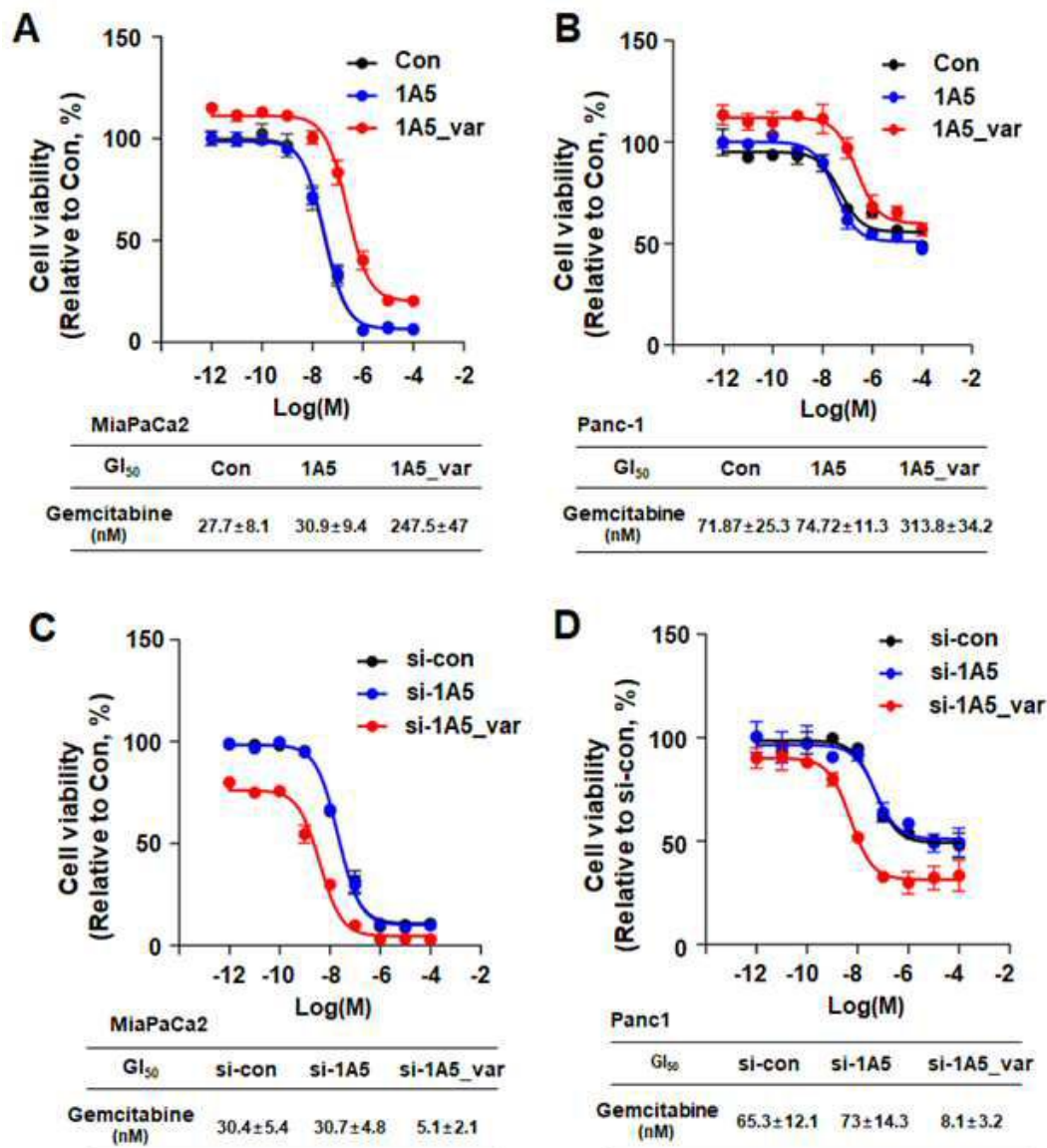
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> COMPOSITION FOR ANTICANCER USING SLC1A5 TRANSCRIPT VARIANT,
SCREENING METHOD FOR ANTICANCER DRUG, AND METHOD FOR DIAGNOSING
CANCER
- <130> 19PP30506
- <160> 11
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 339
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) protein

<400> 1

Met Tyr Ser Thr Thr Tyr Glu Glu Arg Asn Ile Thr Gly Thr Arg Val

1 5 10 15
Lys Val Pro Val Gly Gln Glu Val Glu Gly Met Asn Ile Leu Gly Leu

20 25 30
Val Val Phe Ala Ile Val Phe Gly Val Ala Leu Arg Lys Leu Gly Pro

35 40 45
Glu Gly Glu Leu Leu Ile Arg Phe Phe Asn Ser Phe Asn Glu Ala Thr

50 55 60
Met Val Leu Val Ser Trp Ile Met Trp Tyr Ala Pro Val Gly Ile Met

65 70 75 80

Phe Leu Val Ala Gly Lys Ile Val Glu Met Glu Asp Val Gly Leu Leu

85 90 95
Phe Ala Arg Leu Gly Lys Tyr Ile Leu Cys Cys Leu Leu Gly His Ala

100 105 110
Ile His Gly Leu Leu Val Leu Pro Leu Ile Tyr Phe Leu Phe Thr Arg

115 120 125
Lys Asn Pro Tyr Arg Phe Leu Trp Gly Ile Val Thr Pro Leu Ala Thr

130 135 140
Ala Phe Gly Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Leu Pro Leu Met Met Lys

145 150 155 160
Cys Val Glu Glu Asn Asn Gly Val Ala Lys His Ile Ser Arg Phe Ile

165 170 175
Leu Pro Ile Gly Ala Thr Val Asn Met Asp Gly Ala Ala Leu Phe Gln

180 185 190
Cys Val Ala Ala Val Phe Ile Ala Gln Leu Ser Gln Gln Ser Leu Asp

195 200 205
Phe Val Lys Ile Ile Thr Ile Leu Val Thr Ala Thr Ala Ser Ser Val

210 215 220

Gly Ala Ala Gly Ile Pro Ala Gly Gly Val Leu Thr Leu Ala Ile Ile
 225 230 235 240
 Leu Glu Ala Val Asn Leu Pro Val Asp His Ile Ser Leu Ile Leu Ala
 245 250 255
 Val Asp Trp Leu Val Asp Arg Ser Cys Thr Val Leu Asn Val Glu Gly
 260 265 270
 Asp Ala Leu Gly Ala Gly Leu Leu Gln Asn Tyr Val Asp Arg Thr Glu
 275 280 285
 Ser Arg Ser Thr Glu Pro Glu Leu Ile Gln Val Lys Ser Glu Leu Pro

 290 295 300
 Leu Asp Pro Leu Pro Val Pro Thr Glu Glu Gly Asn Pro Leu Leu Lys
 305 310 315 320
 His Tyr Arg Gly Pro Ala Gly Asp Ala Thr Val Ala Ser Glu Lys Glu
 325 330 335
 Ser Val Met

<210> 2

<211> 1927

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) mRNA

<400> 2

atggggtgga gctgaggccc ggggcgacct gcctggcct gccgtgggag gccagcattc 60

ctcacccga acccacaatg cctcagggt agcacgccag cctcttgggg ctgaaggagg 120

ctgactcccc aagtcttgca aaggggtgca agcctagtgc caacctgcc gggctgaggc 180

atgagtaggg gctgtatttg cgtgcaggcg gggccccaaa gcttcactc gctgccttaa 240

aacgccaacc cagcctctca gacaatgtg ccctcccact atgtactcta ccacctatga 300

agagaggaat atcacgggaa ccagggtgaa ggtgcccggt gggcaggagg tggaggggat 360

gaacatcctg ggcttggtag tgtttgccat cgtctttggt gtggcgctgc ggaagctggg 420

gcctgaaggg gagctgctta tccgtttctt caactccttc aatgaggcca ccatgtttct 480

ggctctcctgg atcatgtggt acgcccctgt gggcatcatg ttcttggtgg ctggcaagat 540

cgtggagatg gaggatgtgg gtttactctt tgccgcctt ggcaagtaca ttctgtgctg 600

cctgctgggt cagccatcc atgggctcct ggtaactgcc ctcactact tcctcttcac	660
ccgcaaaaac ccctaccgt tcctgtgggg catcgtgacg ccgtggcca ctgcctttgg	720
gacctcttc agttccgcca cgctgccgt gatgatgaag tgcgtggagg agaataatgg	780
cgtggccaag cacatcagcc gtttcatcct gcccatcggc gccaccgtca acatggacgg	840
tgccgcgtc ttccagtgcg tggccgcagt gtccattgca cagctcagcc agcagtcctt	900
ggacttcgta aagatcatca ccatcctggt caccggcaca gcgtccagcg tgggggcagc	960
gggcatccct gctggagggt tcctcactct ggccatcatc ctgaagcag tcaacctccc	1020
ggtcgacat atctccttga tcctggctgt ggactggcta gtcgaccgt cctgtaccgt	1080
cctcaatgta gaaggtgacg ctctgggggc aggactctc caaaattacg tggaccgtac	1140
ggagtcgaga agcacagagc ctgagttgat acaagtgaag agtgagctgc ccctggatcc	1200
gctgccagtc cccactgagg aaggaaaccc cctctcaaa cactatcggg ggccccgagg	1260
ggatgccagc gtcgcctctg agaaggaatc agtcatgtaa accccgggag ggaccttccc	1320
tgccctgctg ggggtgctct ttggacactg gattatgagg aatggataaa tggatgagct	1380
agggtcttgg gggctctgct gcacactctg gggagccagg ggccccagca ccctccagga	1440
caggagatct gggatgcctg gctgtctggag tacatgtgtt cacaagggtt actcctcaa	1500
acccccagtt ctactcatg tccccaactc aaggctagaa aacagcaaga tggagaaata	1560
atgttctgct ggttccccac cgtgacctgc ctggcctccc ctgtctcagg gagcaggtea	1620
caggtcacca tggggaattc tagccccac tggggggatg ttacaacacc atgtgggtta	1680
ttttggcggc ttagttgtg gggggatgtg tgtgtgcacg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	1740
tgtgtgtgtg tgtgtgttct gtgacctct gtcccatgg tacgtccac cctgtccca	1800
gatccctat tcctccaca ataacagaaa cactccagg gactctgggg agaggctgag	1860
gacaaatacc tgctgtcact ccaggagaca ttttttttag caataaaatt gagtgtcaac	1920
tatttaa	1927
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) specific primer (forward)	
<400> 3	
cactatgtac tctaccac	18

<210> 4

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) specific primer (reverse)
 <400> 4
 ctcacatctact tctctcttc 18
 <210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SLC1A5 primer (forward)
 <400> 5
 gcgggatgac atcttgcc 18
 <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SLC1A5 primer (reverse)
 <400> 6
 ctcacatctact tctctcttc 18
 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) specific siRNA
 <400> 7
 gcugcccccacacuaugua 19
 <210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SLC1A5 siRNA
 <400> 8

ccagagaaac ucucguauu

19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> control siRNA

<400> 9

acaacagcca caacgucua

19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLC1A5 transcript variant (SLC1A5_var) specific shRNA

<400> 10

ctatgtactc taccacctat g

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> control shRNA

<400> 11

acaacagcca caacgtctat a

21