



등록특허 10-2377702



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월24일

(11) 등록번호 10-2377702

(24) 등록일자 2022년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7088 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7088 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0129281

(22) 출원일자 2019년10월17일

심사청구일자 2019년10월17일

(65) 공개번호 10-2020-0044695

(43) 공개일자 2020년04월29일

(30) 우선권주장

1020180125073 2018년10월19일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

CN108165631 A

W02017176630 A1

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정재호

서울특별시 서대문구 연세로 50-1

원미선

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 강태현

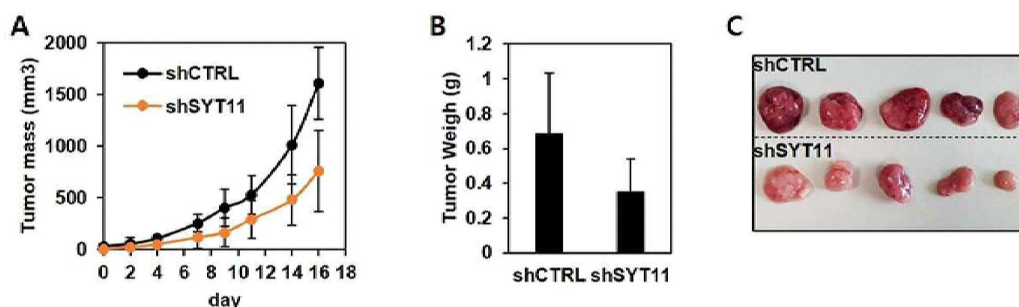
(54) 발명의 명칭 SYT11 억제제를 유효성분으로 포함하는 위암 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 SYT11 (Synaptotagmin 11) 억제제를 유효성분으로 포함하는 위암 치료용 조성물 및 SYT11의 발현 측정을 포함하는 줄기형 위암의 진단 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 SYT11 억제제를 포함하는 조성물은 위암포의 이동 및 침윤을 억제시키고, 세포외기질에 대한 부착능을 억제시키며, 각종 암 전이 관련 사이토카인의 분비를 억제하며, 위암 세포의 증식을 억제함으로써 위암의 전이 억제, 위암의 예방 또는 치료용 조성물로 우수한 효과가 있다. 또한, 본 발명에서는 SYT11의 발현과 줄기형 위암과의 상관관계를 확인하였는바, SYT11의 발현 수준을 측정함으로써 줄기형 위암을 진단하는데 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57446 (2019.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)

(72) 발명자

김보경

대전광역시 유성구 과학로 125

반현승

대전광역시 유성구 과학로 125

박정찬

대전광역시 유성구 과학로 125

염영일

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI13C-2162-020116
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	RNAi screening에 의한 난치암의 치료 타겟 발굴 및 항암 내성 극복 연구
기 여 율	70/100
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2016.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM4751814
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	국가과학기술연구회
연구사업명	주요사업(2015-2018)
연구과제명	유전체 빅데이터 기반 난치성 질환 맞춤치료 원천기술 개발사업
기 여 율	30/100
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

SYT11 (Synaptotagmin 11) 억제제를 유효성분으로 포함하고,

상기 SYT11 억제제는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5로 구성된 그룹으로부터 선택된 염기서열을 가지는 것인, 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 6, 서열번호 15, 서열번호 16, 및 서열번호 17로 구성된 그룹으로부터 선택된 염기서열을 가지는 것인, 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 서열번호 18 및 서열번호 19로 구성된 그룹으로부터 선택된 염기서열을 가지는 것인, 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 위암은 줄기형 또는 혼합형 아형을 가지는 위암인, 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

SYT11 (Synaptotagmin 11)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하고,

상기 SYT11의 발현 수준을 측정하는 제제는, SYT11 유전자에 특이적인 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe), 또는 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide)이거나; 또는 SYT11 단백질에 특이적인 항체;인 것인, 줄기형 위암의 진단용 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

- (a) 분리된 생물학적 위 조직 시료로부터 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 생물학적 위 조직 시료의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준이 정상 대조군의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준보다 높을 경우 줄기형 위암으로 판정하는 단계를 포함하는, 줄기형 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

- (a) SYT11 (Synaptotagmin 11)를 발현하는 분리된 위암 세포에 위암치료 후보 물질을 처리하는 단계;

- (b) 상기 후보 물질이 처리된 분리된 위암 세포에서 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 위암 세포에 비해 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보 물질을 위암 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 위암의 치료용 제제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 SYT11 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 위암 예방 또는 치료용 약학 조성물, SYT11의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물, SYT11의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 및 위암의 치료용 제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화, 식생활의 서구화로 인한 고지방식의 섭취의 일반화, 환경 오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

- [0004] 그 중에서도 위암은 특히 아시아에서 높은 발생빈도를 보이며 암 관련 사망의 주된 원인이 되고 있다. 우리나라에서는 암 환자의 16.2% (남성 암 환자의 20.3% 및 여성 암 환자의 11.2%)가 위암 환자인 것으로 추정된다. 위암의 증상은 전혀 증상이 없는 경우에서부터 격심한 통증에 이르기까지 다양한 양상을 나타내고 있으며, 위암의 증상이 어떤 특성을 갖는 것이 아니라 일반적인 소화기 증상을 보이며, 위암의 초기에는 증상이 없는 경우가 대부분이며, 증상이 있다 하더라도 비교적 경미하여 약간의 소화불량이나 상복부 불편감을 느끼는 정도이므로 대부분의 사람 이를 간과하기 쉬워 위암의 사망률을 높이는 원인이 되기도 한다.

- [0005] 위암 조직의 분류에는 다양한 기준이 알려져 있다. 예를 들어, Lauren classification을 통해 위암의 종류가 분류될 수 있다. Lauren classification에 따르면 위암의 대부분을 차지하는 선암을 장형(intestinal type)과 미만형(diffuse type)으로 나눈다. 헬리코박터 파일로리균 감염이 오래 진행된 위축성 위염이 있는 경우에 특히 장형 위암이 잘 생기는데, 이는 궤양을 잘 형성하며 점착력 있는 종양세포들이 모여 특징적인 관상 구조를 이룬다. 반면, 미만형은 종양세포의 점착력이 낮아서 명확한 종괴의 형성 없이 개별 세포들이 위벽을 침윤하는 유형인데, 젊은 층에서 많이 생기고 예후가 좋지 않은 문제점이 있다. 이러한 미만형 위암의 환자 다수는 성인이 된 이후에 처음으로 헬리코박터에 감염되어 숙주의 강한 거부반응으로 인해서 미만형 위암으로 진행된 결과 나타나게 되는 환자이다. 이러한 반응은 위축성 위염이 적은 젊은 여성일수록 과도하게 나타나며, 결국 급성 감염이 가라앉지 못하고, 위점막의 부종성 및 결절성 변화가 지속되어, 예후가 매우 불량한 미만형 위암으로 진행한다. 따라서 같은 위암 환자라도 미만형 위암으로 진단된 젊은 성인일수록 완치 가능성이 매우 낮으며, 결국 수 년 이내에 사망하게 된다. 위와 같이 미만형 위암은 임상적으로 이의 빠른 확인이 어렵고, 이에 따라 실제 치료가 늦어지거나 치료에 들어가더라도 충분한 치료 효과를 보이는 치료제가 없어 위 문제점이 지속되고 있다.

- [0006] 최근 위암 환자 조직의 Microarray 분석에서 유전자들의 발현 패턴 특징에 따라 장형(intestinal), 줄기형(stem-like), 혼합형(mixed stromal), 염증형(inflammatory)으로 분자아형을 분류할 수 있음이 확인되었으며, 앞서 언급된 바와 같이 장형은 줄기형, 혼합형 및 염증형에 비해 치료가 쉬운 위암으로 알려져 있으며 줄기형은 치료가 어렵고 예후가 매우 나쁜 위암군에 속하는 것으로 보고되어 있다[Nature Medicine 2015; 21: 449-456 Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes].

- [0007] 이러한 배경 하에 위와 같이 진단이 어려운 특성의 암을 빨리 진단하고 이를 치료할 수 있는 새로운 기술에 대한 연구 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에, 본 발명자들은 인체에 부작용을 일으키지 않으면서 위암의 치료에 우수한 효과를 보일 수 있는 항암 제제

를 개발하고자 예의 노력한 결과, SYT11 발현 억제제가 독성이 없는 범위 내에서 위암의 치료에 우수한 효과가 있으며 진단 목적으로서도 유용하게 이용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [0010] 본 발명의 하나의 목적은 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 SYT11 (Synaptotagmin 11)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 줄기형 위암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 분리된 생물학적 위 조직 시료로부터 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- [0013] (c) 상기 생물학적 위 조직 시료의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준이 정상 대조군의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준보다 높을 경우 줄기형 위암으로 판정하는 단계를 포함하는, 줄기형 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) SYT11 (Synaptotagmin 11)를 발현하는 분리된 위암 세포에 위암치료 후보 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질이 처리된 분리된 위암 세포에서 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 위암 세포에 비해 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보 물질을 위암 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 위암의 치료용 제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [0017] 본 발명에서 용어 "SYT11 (Synaptotagmin 11, NM_152280.4)"는 Synaptotagmin 유전자 패밀리의 하나로 calcium sensors로 알려진 다른 패밀리 멤버와 유사한 단백질을 암호화하며 synaptic transmission에서 막 수송의 칼슘 의존적 조절을 조정한다. 암호화된 단백질은 ubiquitin-E3-ligase parkin의 기질로 알려져 있다. 위 SYT11은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 일실시예에서는 인간 위암세포주 분석을 통해 암세포주의 분자아형을 intestinal, stem-like, mixed, inflammatory로 분류하고, 분류된 인간 위암 세포주 중 stem-like 아형에서 SYT11의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [0019] 본 발명의 다른 구체적인 일실시예에서는 SYT11 발현 억제에 의한 세포의 전이 변화, 즉, 이동 및 침윤 능력 변화와의 상관관계를 확인하기 위해 위암세포에서 SYT11을 억제하였을 때 침윤능 및 이동능이 현저히 감소됨을 확인하였다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구체적인 일실시예에서는 SYT11 발현 억제에 의한 암세포의 세포외기질에 대한 부착능 변화와의 상관관계를 확인하기 위해 위암세포에서 SYT11 발현을 억제하였을 때 세포외기질에 대한 부착능이 현저히 감소됨을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구체적인 일실시예에서는 SYT11 발현 억제에 의한 암세포 전이와 관련된 Growth factor 또는 cytokine의 변화와의 상관관계를 확인하기 위해 위암세포에서 SYT11 발현을 억제하였을 때 암세포 전이와 관련된 PDGF-AA, VEGF, HGF, IGFBP-2, IL-17A, IL-8, angiopoietin-1, angiopoietin-2 등이 감소됨을 확인하였다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서는 마우스 동물 모델에서 SYT11 발현 억제에 의한 종양의 감소를 확인하였다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구체적인 일실시예에서는 SYT11 억제에 의한 종양 세포의 증식 억제를 확인하였다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "SYT11 억제제"는 SYT11의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 모두 통칭하는 의미로 사용되며, 구체적으로는 SYT11의 발현 감소에 영향을 주거나 SYT11에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식으로, SYT11의 발현양을 전사(transcription), mRNA 수준, 또는 이행 (translation) 수준에서 감소시키거나, SYT11 활성을 방해함으로써, SYT11의 활성을 감소시키는 모든 제제를 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 SYT11의 억제제는 SYT11의 발현 또는 SYT11을 표적으로 하여 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이

드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한 없이 사용 가능하다. 상기 SYT11 억제제는 이에 제한되지는 않으나, SYT11 유전자의 mRNA를 분해시키는 siRNA 또는 shRNA, SYT11 단백질의 발현을 감소시키는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 있다. 또한, SYT11 단백질에 결합하여 기능을 억제하는 SYT11 억제제로 앵타머(aptamer) 또는 저분자 화합물 일 수 있다.

예시적인 일 구현 예에서, 상기 siRNA는 서열번호 2, 3, 4 및 5로부터 선택된 염기서열을 가지는 것일 수 있다.

[표 1]

서열 번호	siRNA 서열 정보
서열번호 2	5'- CAU CAA AGU GCG GAG AGA CAA (dTdT) -3'
서열번호 3	5'- CCU GCU AAG CCG AGA CAA A (dTdT) -3'
서열번호 4	5'- CCA GGU GUC UCU GUC AUA U (dTdT) -3'
서열번호 5	5'- GCA GAA AGC GCA UUG CCA A (dTdT) -3'

예시적인 일 구현예에서, 상기 shRNA는 서열번호 6, 15, 16 및 17로부터 선택된 염기서열을 가지는 shRNA 및 이의 동족체, 동중형, 변이체, 유도체, 단편 등의 합성, 변형된 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 6, 15 내지 17로부터 선택된 염기서열에서 중앙에 존재하는 loop sequence(아래 표 2의 밑줄)가 변형된 것일 수 있다.

[표 2]

서열 번호	shRNA 서열 정보
서열번호 6	CCGGCATCAA AGTGC GGAGA GACA ACTCGA GTTGTCTCTC CGCACTTTGA TGTTTT
서열번호 15	CCTGCTAAGCCGAGACAACTCGAGTTTGTCTCGGCTTAGCAGGTTTT
서열번호 16	CCAGGTGTCTCTGTCATATCTCGAGATATGACAGAGACACCTGGTTTT
서열번호 17	GCAGAAAGCGCATTGCCAATCTCGAGTTGGCAATGCGCTTCTGCTTTTT

예시적인 일 구현예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 18 및 19으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이의 유도체일 수 있고, 상기 유도체는 서열번호 18 및 19으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드에서 phosphorothiotate 변형 및/또는 2'-O-메틸화 변형을 갖는 것일 수 있다.

[표 3]

서열 정보	안티센스 올리고 뉴클레오타이드 정보	설명
AS-SYT11 (서열번호 18)	5'- mA*mU*A* T*G*A* C*A*G* A*G*A* C*A*C* C*TmG* mG-3'	19mer, * : P=S, m : 2-O-methyl
AS-SYT11 (서열번호 19)	5'- mU*mU*G* G*C*A* A*T*G* C*G*C* T*T*T* C*T*mG* mC-3'	19mer, * : P=S, m : 2-O-methyl

본 발명에서 용어, "치료"는 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 바람직하게 본 발명에서는 SYT11을 억제하는 물질을 포함하는 조성물의 투여로 위암의 경과를 호전시키는 모든 행위를 포함한다. 또한, "예방"은 본 발명에 따른 SYT11을 억제하는 물질을 포함하는 조성물의 투여로 상기 위암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 상기 SYT11 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 SYT11 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위 (translocation), 성숙 (maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기 일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 가지 예는 RNA 중합효소 I을 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. 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 SYT11의 염기서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 제작할 수 있다.

[0037] 구체적으로 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 18 또는 19의 올리고뉴클레오타이드 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 또한, 상기 서열번호 18 또는 19의 올리고뉴클레오타이드는 상기 서열번호 18 또는 19의 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 동일한 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 및 이의 유도체를 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드란 상기 서열번호 18 또는 19의 염기서열과 각각 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 유도체는 서열번호 18 및 19로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드에서 phosphorothiotate 변형 및/또는 2'-O-메틸화 변형을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명에서 용어, "애포머 (aptamer)"는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드로서, 20 내지 60 뉴클레오타이드 정도의 크기이며, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 서열에 따라 다양한 3 차원 구조를 가지며, 항원-항체 반응처럼 특정 물질과 높은 친화력을 가질 수 있다. 애포머는 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 애포머는 RNA, DNA, 변형된 (modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 바람직하게 상기 애포머는 SYT11에 결합하여 SYT11의 활성을 저해하는 역할을 할 수 있다. 이와 같은 애포머는 SYT11의 서열로부터 당업자가 공지의 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어, "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knock down) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 SYT11에 특이적으로 작용하여 SYT11 mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭 (RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 SYT11을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 구체적으로, 본 발명의 SYT11에 대한 siRNA는 서열번호 2, 3, 4 및 5로부터 선택된 염기서열을 가지는 siRNA 및 이의 상보적인 서열을 가지는 siRNA의 이중 가닥으로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명의 SYT11에 대한 shRNA는 서열번호 6, 15, 16 및 17로부터 선택된 염기서열을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 본 발명의 목적상 상기 항체는 SYT11 또는 SYT11의 리간드 단백질과 결합하여 SYT11의 활성을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어 "리간드"는 생분자 (biomolecule)와 복합체를 형성하여 생물학적 반응을 가져오는 물질을 의미하며, "SYT11의 리간드 단백질" 또는 "SYT11에 대한 리간드 단백질"은 SYT11과 결합하여 SYT11을 활성화 시키거나 활성을 증가시키는 단백질일 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어 "위암"은 위에서 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 일컫는다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고, 위의 정상적인 구조를 파괴하거나 변형시키게 되는데, 이러한 상태를 위암이라고 한다. 일반적으로 종양 (tumor)이라 하면 신체 조직의 자율적인 과잉 증식에 의해 비정상적으로 자란 덩어리를 의미하며, 양성 종양 (benign tumor)과 악성 종양 (malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 악성 종양은 양성 종양에 비해 증식속도가 매우 빠르고, 주변 조직에

침윤하면서 전이 (metastasis)가 일어나 생명을 위협하게 된다. 본 발명에서 위암은 바람직하게 줄기형 아형 및 /또는 혼합형 아형, 보다 바람직하게 줄기형 아형이다.

[0046] 본 발명에서 용어 "전이 (metastasis)"는 악성 종양이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 전파한 상태를 말한다. 하나의 장기에서 시작한 악성 종양이 진행함에 따라 처음 발생한 원발 부위인 장기로부터 다른 조직으로 퍼져 나가는데, 이렇게 원발 부위로부터 다른 조직으로 퍼져 나가는 것을 전이라 할 수 있다. 전이는 악성 종양의 진행에 수반되는 현상이라고 할 수 있는데, 악성 종양 세포가 증식하고 암이 진행함에 따라 새로운 유전 형질을 획득하면서 전이가 일어날 수 있다. 새로운 유전 형질을 획득한 종양 세포가 혈관과 림프선으로 침입하고 혈액과 림프를 따라 순환하다가 다른 조직에 정착, 증식하게 되면 전이가 일어날 수 있다.

[0047] 전이가 발생하는 조직에 따라, 간암, 신장암, 폐암, 위암, 대장암, 직장암, 췌장암 등 각종 암질환이 유발될 수 있다. 본 발명의 조성물은 전이를 억제하여 암이 퍼지는 것을 예방 및 치료할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 용어, "억제"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 암 전이를 억제시키는 모든 행위를 말한다.

[0049] 위암은 분자 아형에 따라 분류될 수 있다. 예를 들어, 위암 검체에서 전장 유전체 수준의 mRNA 발현을 Microarray 기법으로 조사하고 군집 분석을 통해 위암에 내재적인 아형 (subtype)을 확인한 후 각 아형에 특이적인 유전자들을 통계적 검증을 통해 선별할 수 있다. 이렇게 선별된 유전자 발현량을 기반으로 상피세포 특징적인 유전자 발현이 높은 아형을 장형 (intestinal subtype), 발생 단계 신호전달 (EMT) 및 간질(stroma) 유래 유전자 발현이 높은 아형을 줄기형 (stem-like subtype), 장형 및 줄기형의 특징을 모두 발현하는 혼합형 (mixed stromal subtype), 그리고 면역조절 관련 유전자 발현이 높은 염증형 (inflammatory subtype)으로 분류할 수 있다. 각각의 아형은 기존에 잘 규명된 임상 및 병리조직학적 소견과 연관된 차별적인 특성을 가지고 있는 것이 확인되었다.

[0050] 구체적으로, 장형의 경우 위의 하부에 주로 위치하며 조직학적 분화도가 좋은 특징을 보인다. Lauren 분류상 intestinal type과 indeterminate type이 많이 분포하고 있다.

[0051] 반면 줄기형의 경우 60세 미만의 비교적 젊은 연령층에 호발하며 위의 체부와 상부에 위치하며 조직학적 분화도가 불량하다. 특히 인환고리세포형 (Signet ring cell type)이 전체 조직형의 20%를 차지하는 특징이 있으며 Lauren 분류상 diffuse type의 분포가 많다. 줄기형의 경우 매우 불량한 예후를 보이는 임상적 특징이 있다.

[0052] 혼합형은 장형과 줄기형의 특징을 공유하고 있다.

[0053] 염증형은 다른 아형에 비해 특징적으로 위-식도 접합부를 포함한 분문부 (cardia)에 위치하는 경우가 많으며 조직학적으로는 분화도가 좋지 않은 유형이다. 하지만 Lauren 분류상 intestinal type 과 indeterminate type이 많아서 줄기형보다는 장형의 특징에 가깝다. 예후적 관점에서 장형과 혼합형은 중간 정도의 예후를 보이며 염증형의 경우 예후가 가장 양호하다.

[0054] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

- [0056] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 양태는 SYT11 (Synaptotagmin 11) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 위암의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0057] 본 발명에서 용어, "개체"는 본 발명의 위암 질환을 보유하거나 또는 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 인간을 제외한 개체일 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여함으로써, 위암의 치료에 우수한 효과를 보이며 또한 위암의 전이를 억제할 수 있다.
- [0058] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0059] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0060] 상기 약학 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0061] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 비율로 질환을 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 유효한 양은 0.5~1000 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5~500 mg/day/체중kg이다.
- [0062] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양태는 위암 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 SYT11 (Synaptotagmin 11) 억제제를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.
- [0063] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양태는 위암 치료에 사용하기 위한 SYT11 (Synaptotagmin 11) 억제제를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0064] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 양태는 SYT11 (Synaptotagmin 11)의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 줄기형 위암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다. 예를 들어, 서열번호 7 및 서열번호 8의 염기서열이 SYT11 (Synaptotagmin 11)의 발현 수준을 측정하는 체제로 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 분리된 생물학적 위 조직 시료로부터 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- [0066] (c) 상기 생물학적 위 조직 시료의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준이 정상 대조군의 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준보다 높을 경우 줄기형 위암으로 판정하는 단계를 포함하는, 줄기형 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0067] 본 발명에서 용어, "진단"은 생물학적 조직 시료 또는 조직 샘플에서 본 발명의 SYT11의 존재 또는 부재를 측정함으로써, 줄기형 위암 질환의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 또한, "마커 또는 진단 마커 (diagnosis marker)"란 줄기형 위암 세포 또는 줄기형 위암 질환을 가진 개체를 정상세포 또는 정상 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 줄기형 위암을 가진 세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 (단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 줄기형 위암 진단 마커는 정상 세포 또는 조직의 세포에 비하여, 줄기형 위암 세포에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 SYT11이다.
- [0068] 본 발명에서 용어, "분리된 생물학적 위암 조직 시료"는 진단하고자 하는 개체의 조직으로부터 분리된 시료를 말하며, 구체적으로 위 조직이다.
- [0069] 본 발명에서 SYT11 발현 수준을 측정하는 것은 SYT11의 mRNA 발현 수준을 측정하거나 SYT11 단백질 발현 수준을

측정하는 것일 수 있다.

- [0070] 상기 "mRNA 발현 수준 측정"이란 줄기형 위암을 진단하기 위하여 생물학적 조직 시료에서 줄기형 위암 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 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 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 상기 "단백질 발현 수준 측정"이란 줄기성 위암을 진단하기 위하여 생물학적 위 조직 시료에서의 줄기성 위암 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법 (radioimmunoassay), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (complement fixation assay), FACS, 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 일 예로, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 본 발명의 SYT11의 mRNA에 대한 프라이머 (primer) 쌍, 프로브 (probe), 또는 안티센스 뉴클레오티드 (anti-sense nucleotide)일 수 있으며, 본 발명의 SYT11의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 당업자가 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 뉴클레오티드 서열을 용이하게 디자인할 수 있다. 다른 일 예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 항체일 수 있다.
- [0073] 본 발명에서는 SYT11의 줄기성 위암 진단 마커로서의 가능성을 확인함으로써, SYT11의 수준을 측정하여 줄기성 위암을 진단할 수 있는 효과를 확인하였다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) SYT11 (Synaptotagmin 11)를 발현하는 분리된 위암 세포에 위암치료 후보 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질이 처리된 분리된 위암 세포에서 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 SYT11 (Synaptotagmin 11) 발현 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 위암 세포에 비해 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보 물질을 위암 치료용 제제로서 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 위암의 치료용 제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0075] 위암을 치료할 수 있는 후보 물질의 부재 하에 세포에서의 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하고, 또한, 상기 후보 물질의 존재 하에서 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 상기 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준이 상기 후보 물질의 부재 하에서의 수준보다 감소시키는 물질을 위암의 치료용 제제로 예측할 수 있다.
- [0076] 상기 스크리닝 방법은 생체 내 (in vivo) 또는 시험관 내 (in vitro)에서 수행될 수 있으며, 특별히 제한되지 않는다. 후보 물질은 공지된 물질 또는 신규 물질일 수 있으며, 예를 들어 식물 추출물 또는 케미컬 라이브러리 (chemical library)를 통하여 대규모로 스크리닝을 수행할 수 있다. 이를 통해 SYT11의 발현 또는 활성을 억제하여 위암, 특히 줄기형 아형 위암을 억제할 수 있는 제제를 발굴할 수 있다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명에 따른 SYT11 억제제를 포함하는 조성물은 위암 세포의 이동 및 침윤을 억제시키고, 세포외기질에 대한 부착능을 억제시키며, 각종 암 전이 관련 사이토카인의 분비를 억제하며, 위암 세포의 증식을 억제함으로써 암의 전이 억제, 암의 예방 또는 치료용 조성물로 우수한 효과가 있다.
- [0079] 또한, 본 발명에서는 SYT11의 발현과 줄기형 위암과의 상관관계를 확인하였는바, SYT11의 발현 수준을 측정함으로써 줄기형 위암을 진단하는데 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0081] 도 1은 intestinal, stem-like, mixed, inflammatory subtype을 가지는 위암 세포주 중 stem-like subtype 위암 세포주에서 SYT11 발현 증진을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 2는 위암 세포주에서 SYT11 발현 감소에 의한 위암 세포주 이동 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 위암 세포주에서 SYT11 발현 감소에 의한 위암 세포주 침윤 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 위암 세포주에서 SYT11 발현 감소에 의한 세포외 기질에 대한 부착능 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 위암 세포주에서 SYT11 발현 감소에 의한 암 전이 관련 성장 인자 및 사이토카인 분비 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 마우스 동물 모델에서 SYT11 발현 감소에 따른 종양 감소 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 위암 세포주에서 SYT11 발현 감소에 의한 암 전이 관련 성장 인자 및 사이토카인 분비 억제를 확인한 결과와 마우스 동물 모델로부터의 종양 조직에서 SYT11 억제에 의한 암 전이 관련 성장 인자 및 사이토카인 분비 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 위암 세포주에서 다양한 siRNA를 이용한 SYT11 발현 억제에 의한 세포 증식 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 9는 위암 세포주에서 SYT11 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 암세포 증식 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 10은 위암 세포주에서 SYT family의 발현 억제에 따른 세포 성장 억제를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0083] <실시예 1> 줄기형 (Stem-like subtype) 위암 세포주에서 SYT11 발현 변화 확인

[0084] 25개의 인간 위암세포주에서 Microarray 분석을 통해 암세포주의 분자 아형을 intestinal, stem-like, mixed, inflammatory로 분류하였다. 또한, 대표적인 11종의 위암 세포주를 이용하여 웨스턴 블랏 및 RT-PCR 기법을 통해 SYT11 발현의 차이를 확인하였다.

[0085] 웨스턴 블랏 (Western blotting) 실험을 위해 세포주로부터 리파 용액(RIPA buffer, millipore사)을 이용해 단백질을 추출하고 폴리 아크릴아마이드 겔에서 전기영동으로 분리한 후, 겔로부터 폴리비닐리덴 플루오라이드 막으로 단백질을 이동시켰다. 막으로 이동된 단백질은 SYT11 항체를 이용하여 기질과의 반응으로 확인하였다.

[0086] 세포주로부터 RNA 추출 용액 (Trizol, Invitrogen사)을 이용해 mRNA를 분리하여 RT-PCR과 마이크로어레이 (Microarray)를 수행하였다. mRNA로부터 RT transcript(엔지노믹스 사)를 이용하여 상보적 DNA를 합성하였다. 상보적 DNA로부터 합성된 SYT11 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 또한, 대조군 유전자로는 RPL13A 프라이머를 사용하였다. 실험에 사용된 프라이머 서열 정보는 표 2에 나타내었다. PCR이 끝난 후, 샘플을 에티듐 브로마이드(etidium bromide)가 포함된 아가로스 겔에 전기영동하고 UV를 조사하여 밴드를 확인하였다.

[0087] [표 4]

서열정보	서열
SYT11 Forward primer (서열번호 7)	CCGGTCTCTCAGGTAATCCT
SYT11 Reverse primer (서열번호 8)	CTCATTCTTGGTGGTGGAT
RPL13A Forward primer (서열번호 9)	CATCGTGGCTAAACAGGTAC
RPL13A Reverse primer (서열번호 10)	GCACGACCTTGAGGGCAGC

[0088]

[0089] 마이크로어레이는 추출된 RNA로부터 상보적으로 결합할 수 있는 올리고 염기가 심어진 칩 (illumina 사, San Diego, CA, USA)을 사용하여 각 유전자의 발현 정도를 측정하였다.

[0090] 그 결과를 도 1의 A 및 도 1의 B에 나타내었다.

[0091] 도 1의 A는 25개의 인간 위암세포주에서의 Microarray 분석 결과를 나타내며, SYT11의 mRNA 발현이 줄기형 위암 아형에서 현저히 증가하는 것이 확인되었다.

[0092] 도 1의 B는 각 분자아형의 대표적인 세포주에서 웨스턴 블랏 및 RT-PCR을 통해 SYT11의 발현을 확인한 결과를 나타낸다. 도 1의 B에서 확인되는 바와 같이 줄기형 위암 아형 세포주로 확인되는 MKN1, SK4, SNU484 및 SNU638 세포주(위암의 줄기형 아형의 특성을 가지는 세포주들에 해당함) 모두에서 SYT11의 발현이 웨스턴 블랏 및 RT-

PCR 결과 모두에서 크게 증가되는 것이 확인되었다.

[0093] <실시예 2> 위암 세포주에서 SYT11 억제에 의한 이동/침윤 억제 확인

[0094] siSYT11의 위암 세포 이동능 억제를 확인하기 위하여 위 세포주들 중 SNU484 세포를 사용하여 실험을 수행하였다. 구체적으로, siSYT11 (서열번호 2) 및 대조군으로 siSC (서열번호 11)을 transfection시킨 SNU484세포를 96 well-Image Loc plate에서 접종하고 24시간 키운 후 wound maker로 scratch내고 실시간 세포분석시스템 (Incucyte)을 이용하여 세포의 이동을 0시간, 20시간, 및 40시간에 wound healing assay로 확인하였다.

[0095] 위 실험 결과를 도 2에 나타내었다.

[0096] 도 2의 A는 SNU484 세포에 siRNA (SYT11) (서열번호 3, 4 또는 5) 또는 siSC (서열번호 11)을 웨스턴 블랏을 통해 SYT11의 억제를 확인한 결과이다.

[0097] 도 2의 B는 시간에 따른 wound healing assay 결과를 보여주는 도면이다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 위암 세포주에 siSYT11를 처리한 결과 위암 세포의 이동 능력이 현저히 감소되는 것이 확인되었다.

[0098] 또한, siSYT11의 위암 세포 침윤 억제를 확인하기 위하여 Invasion assay를 수행하였다. 구체적으로, 24-well plate 세포배양용 insert를 사용하여 실험을 수행하였으며, 위와 같이 siSYT11 또는 siSC를 transfection시킨 SNU484 세포를 matrigel로 코팅한 insert에 접종하고 24시간 후 insert 아래로 이동한 세포를 Sulforhodamine B (SRB) 용액으로 염색하여 흡광도를 측정하였다.

[0099] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0100] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 도 3의 A는 Invasion assay를 통한 세포 침윤을 확인한 결과를 나타내며, 도 3의 B는 이를 도식화한 결과를 나타낸다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, SYT11 억제는 control에 비해 암세포 침윤을 약 40% 정도 감소시킴이 확인되었다.

[0101] <실시예 3> 위암 세포주에서 SYT11 억제에 의한 세포외기질에 대한 부착능억제 확인

[0102] 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)은 세포의 외부를 둘러싸고 있는 단백질과 다당류로 이루어진 기질로서 세포가 정상적인 기능을 할 수 있는 환경을 제공한다. Integrin은 세포막에 존재하며 cell-cell 또는 cell-matrix 간의 결합을 통해 focal adhesion과 관련된 신호전달에 관여하며, 암세포 전이과정에서 integrin은 세포 외기질 내의 fibronectin, collagen, laminin 등과 결합하고 cell-matrix 간의 결합을 통해 암세포 이동시 세포 부착 기능을 유도하는 기능한다.

[0103] 이에 따라, SYT11이 암세포 부착능에 미치는 영향을 확인하기 위해 BSA, collagen, fibronectin 으로 코팅한 96 well plate에 위 실시예 2와 동일하게 siSYT11 또는 siSC를 transfection시킨 SNU484세포를 접종하고 1 시간 뒤 PBS로 세척하여 plate에 붙지 않은 세포를 제거하였다. Plate에 붙은 세포를 SRB 용액으로 염색하여 흡광도를 측정하였다. 또한, SNU484 세포를 siSYT11 또는 siSC 을 transfection시킨 48시간 후 단백질을 추출하고 전기영동 후 Western blot을 수행하여 integrin 단백질들의 발현 변화를 확인하였다.

[0104] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0105] 도 4의 A는 Adhesion assay 결과를 나타낸다. 도 4의 A에서 확인되는 바와 같이 collagen이나 fibronectin에 결합된 세포는 SYT11 억제로 인하여 Adhesion이 감소됨이 확인되었다.

[0106] 도 4의 B는 integrin 단백질들의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 4의 B에서 확인되는 바와 같이, SYT11 억제에 의해 다양한 integrin 단백질 발현이 저해됨이 확인되었다.

[0107] <실시예 4> 위암 세포주에서 SYT11 억제에 의한 암 전이 관련 사이토카인 분비 억제 확인

[0108] SYT11 억제가 암세포 전이와 관련된 growth factor나 cytokine의 분비에 영향을 미치는지 확인하기 위해 cytokine array (R&D system사, proteome profiler antibody arrays)를 수행하였다. 구체적으로, SNU484 세포를 실시예 2에서와 같이 siSYT11 또는 siSC를 transfection시키고 24시간 후 혈청이 없는 배지로 교체하여 hypoxia 상태(2% O₂) 로 24시간 배양 후 세포배양액을 이용하여 PDGF-AA, VEGF, HGF, IGFBP-2, IL-17A, IL-8, angiopoietin-1, angiopoietin-2의 cytokine을 확인하였다.

[0109] 또한 세포는 수거하여 RNA를 추출하고 mRNA로부터 RT transcript (엔지노믹스 사)를 이용하여 상보적 DNA를 합성하였다. 이후 real-time PCR pre mix (솔젠트 사)를 이용하여 VEGFA, HGF, IL-8, angiopoietin-1의 프라이머

(바이오니아 사)로 qPCR을 수행하였다.

[0110] 상기 실험 결과를 도 5에 나타내었다.

[0111] 도 5의 A는 Proteome profile-cytokine assay를 수행한 결과를 나타낸다. 도 5에서 확인되는 바와 같이, siSYT11 처리에 따라 암세포 전이와 관련된 growth factor나 cytokine의 분비가 크게 감소하였다.

[0112] 또한, 5의 B는 qPCR 결과를 도식화한 결과를 나타낸다. 도 5에서 확인되는 바와 같이, Normoxia 및 Hypoxia 조건 모두에서 암세포 전이와 관련된 growth factor나 cytokine과 관련된 mRNA 발현이 크게 감소됨이 확인되었다.

[0113] <실시예 5> 동물 모델에서 SYT11 억제에 의한 암 치료 효과 확인

[0114] 위암세포주 SNU484에 shSYT11-Lentivirus를 infection하여 knockdown된 세포 또는 shControl-Lentivirus infection된 세포를 누드마우스에 주사하고 2-3일 간격으로 종양의 크기를 측정하여 이의 질량 및 부피 변화를 확인하였다.

[0115] 여기서 shSYT11(sigma 사)로 나타낸 shRNA는 서열번호 6, shControl (CTRL)(sigma 사)로 나타낸 shRNA는 서열번호 12의 염기서열을 가진다.

[0116] 위 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6의 A는 일자에 따른 종양 크기 변화를 확인한 결과이며, 도 6의 B는 16일차에 마우스를 희생하여 종양의 무게를 확인한 결과를 나타내며, 도 6의 C는 생성된 종양의 사진을 보여주는 것이다. 도 6의 결과들에서 확인되는 바와 같이, shSYT11이 억제된 경우 shControl에 비해 종양형성이 억제되는 것이 확인되었다.

[0117] 또한 위 동물 모델의 조직을 취하여 qPCR을 통해 암세포 전이와 관련된 growth factor나 cytokine의 발현 변화, Intergrin의 발현 변화, tumor-specific endothelial marker인 ANTXR1을 실시예 4와 동일한 방법으로 확인하였다.

[0118] 이와 함께 SNU484 세포에서도 실시예 2에서와 같이 siSYT11 또는 siSC를 transfection하고 RT-PCR을 통해 유전자 발현 변화를 확인하였다.

[0119] 위 결과를 도 7에 나타내었다.

[0120] 도 7의 A의 SNU484 세포에서 확인되는 바와 같이, siSYT11처리에 따라 angiopoietin-1, angiopoietin-2, Intergrin-β1, ANTXR1 모두 감소됨이 확인되었다.

[0121] 또한, 도 7의 B의 in vivo 모델에서 확인한 결과 역시 angiopoietin-1, angiopoietin-2, Intergrin-β1, ANTXR1 모두 SYT11 처리에 따라 감소됨이 확인되었다.

[0122] <실시예 6>SYT11 억제에 의한 암 세포 증식 억제 확인

[0123] <6-1> siRNA 서열을 이용한 암 세포 증식 억제 확인

[0124] SNU484세포에 실시예 2에서와 같이 siSYT11 또는 siSC를 transfection하고 실시간 세포분석시스템 (Incucyte)을 이용하여 4일 동안 세포 증식을 확인하였다.

[0125] 또한, 이와 유사하게 다른 siRNA 서열을 가지는 siSYT11(서열번호 2, 3, 4 또는 5)으로 위 실시예 2와 동일하게 siSYT11 또는 siSC를 transfection하고 72 시간 후 Sulforhodamine B (SRB) 용액으로 염색하여 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 확인하였다.

[0126] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0127] 도 8의 A는 웨스턴 블랏을 통해 SYT11의 발현 감소를 확인한 결과를 나타내며, 도 8의 B는 시간 변화에 따른 암세포 증식을 확인한 결과를 나타낸다.

[0128] 도 8 A 및 B에서 확인되는 바와 같이, SYT11의 발현 감소에 따라서 암세포의 증식이 저해되는 것이 확인되었다.

[0129] 또한, 도 8의 C는 SNU484 세포에 siRNA (SYT11) (서열번호 3, 4 또는 5) 또는 siSC (서열번호 11)을 웨스턴 블랏을 통해 SYT11의 억제를 확인한 결과이며, 도 8의 D는 세포 증식률을 확인한 결과로 세포 증식은 서열번호 2, 3, 4 또는 5를 가지는 siRNA에 의해 모두 억제되는 것을 확인하였다.

[0131] <6-2> 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 암 세포 증식 억제 확인

[0132] SNU484세포에 실시예 6-1에서와 같이 안티센스 올리고뉴클레오타이드 AS-SYT11(서열번호 18 또는 19), 또는 음성

대조군 AS-NC (서열번호 20)를 transfection하고 실시간 세포분석시스템 (Incucyte)을 이용하여 3일 동안 세포 증식을 확인하였다.

[0133] 또한, 위 실시예 6-1과 동일하게 안티센스 올리고뉴클레오티드 AS-SYT11 (서열번호 18 또는 19) 또는 음성대조군 AS-NC (서열번호 20)을 transfection하고 72 시간 후 Sulforhodamine B (SRB) 용액으로 염색하여 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0134] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0135] 도 9에서 확인되는 바와 같이, SYT11의 억제제로서 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용한 경우에도 실시예 <6-1>의 siRNA를 사용한 실험과 마찬가지로 SYT11의 억제에 따라서 암세포의 증식이 저해되는 것이 확인되었다. 반면, 음성대조군 (서열번호 20)을 처리한 경우는 세포 증식에 영향을 주지 않았다.

[0137] 상기 결과들로부터 SYT11이 줄기형 위암에 대한 진단 인자로서 사용될 수 있음이 확인되었다. 또한, SYT11에 대한 억제제가 위암세포의 이동 및 침윤을 억제시키고, 세포외기질에 대한 부착능을 억제시키며, 각종 암 전이 관련 사이토카인의 분비를 억제하며, 위암 세포의 증식을 억제함을 확인함으로써 위암 치료용 조성물로 우수한 효과가 있음을 확인하였다.

[0139] <실시예 7> SYT11 선택적인 암 세포 증식 억제 확인

[0140] SNU484세포에 실시예 2에서와 같이 siSC, siSYT11, SYT family의 다른 유전자로 SYT4을 억제하는 siSYT4 (서열번호 13), 또는 SYT7을 억제하는 siSYT7 (서열번호 14)를 transfection하고 72 시간 후 Sulforhodamine B (SRB) 용액으로 염색하여 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

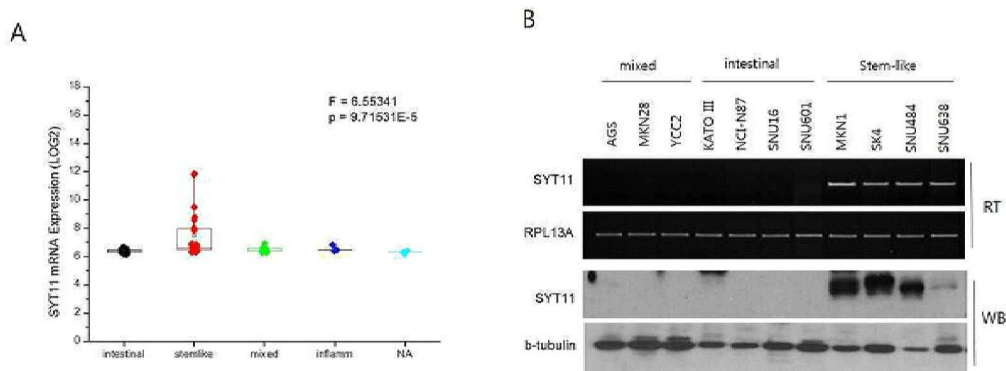
[0141] 상기 결과를 도 10에 나타내었다.

[0142] 도 10에서 확인된 바와 같이, SNU484 세포 증식은 SYT11 knockdown 선택적으로 억제되었으며 다른 SYT family인 SYT4, SYT7 등에 의해서는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다.

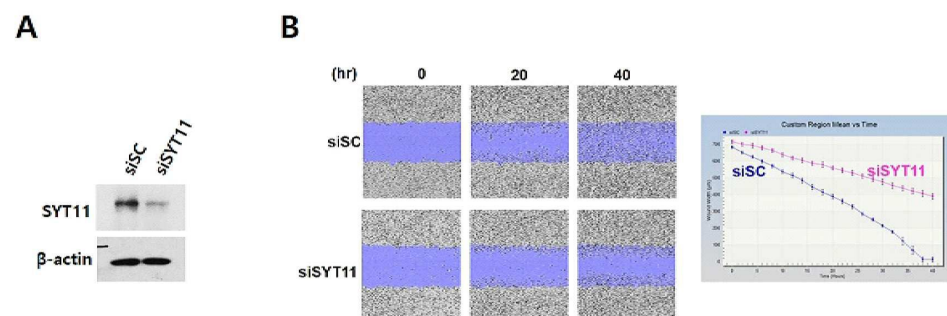
[0143] 위 결과로부터 SYT11만이 위암, 특히 줄기형 아형 위암에 대해 특이적으로 치료 효과가 있음을 확인하였다.

도면

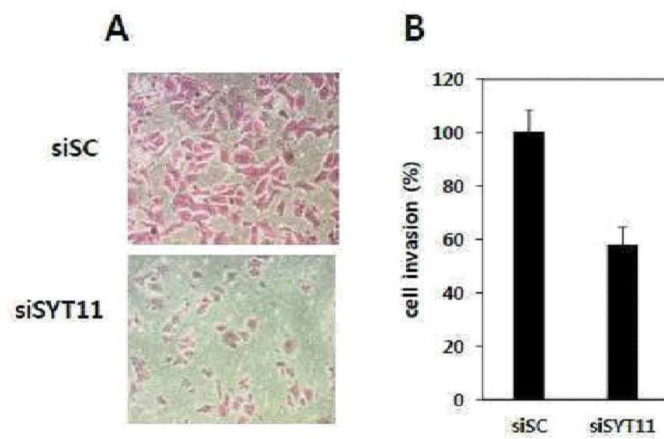
도면1



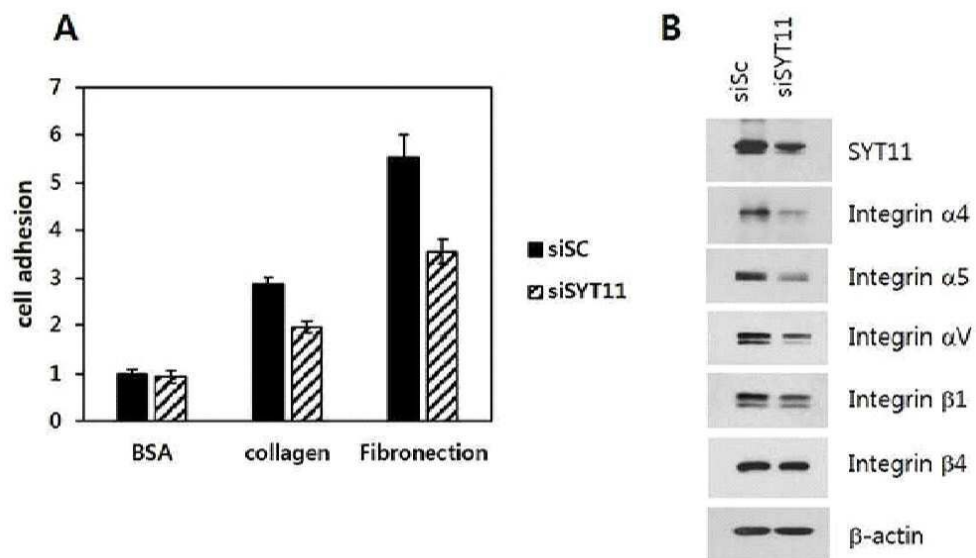
도면2



도면3

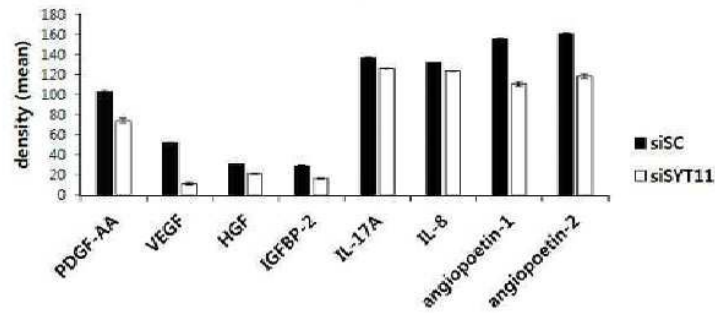


도면4

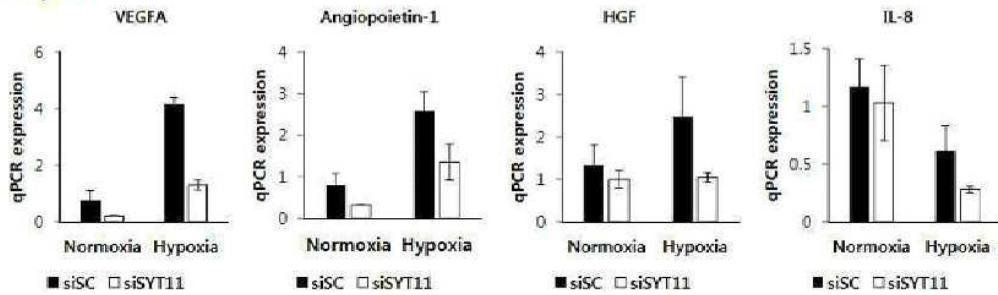


도면5

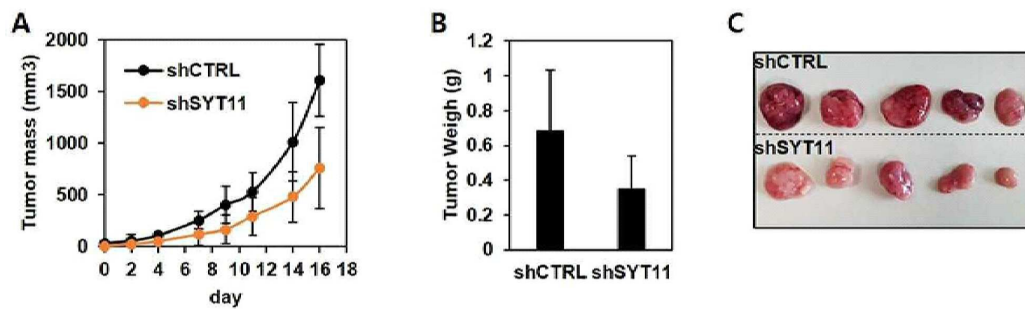
A. Proteom profile – cytokine array



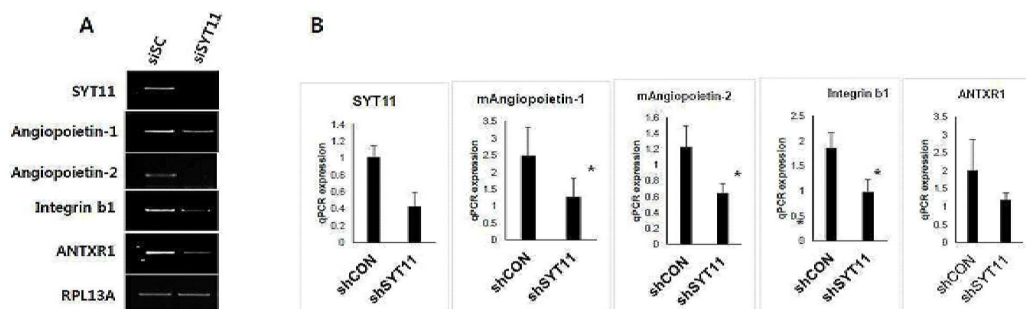
B. qPCR



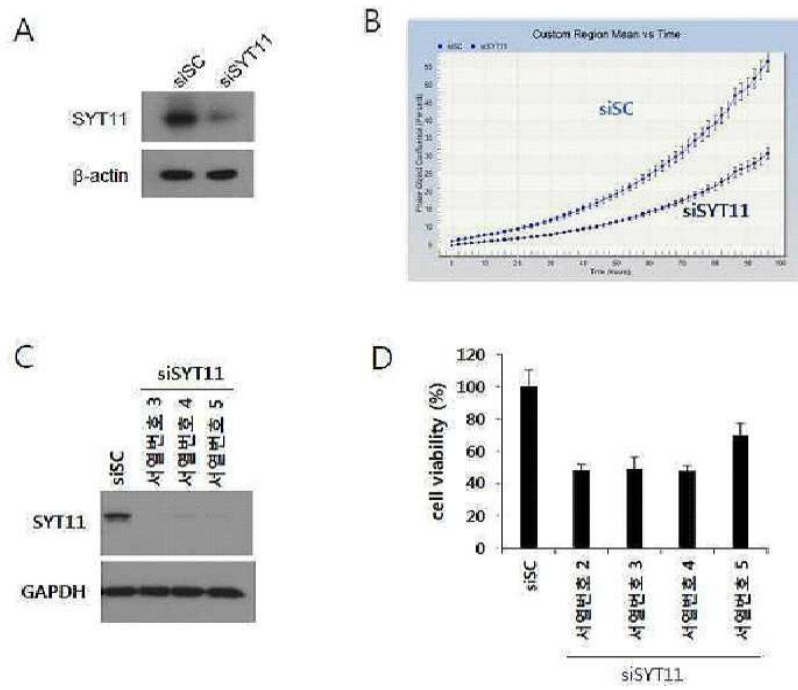
도면6



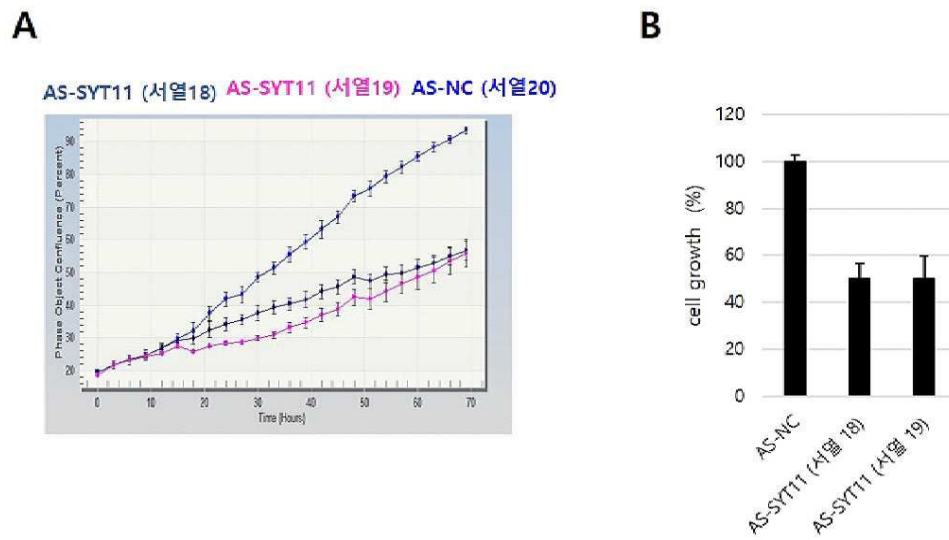
도면7



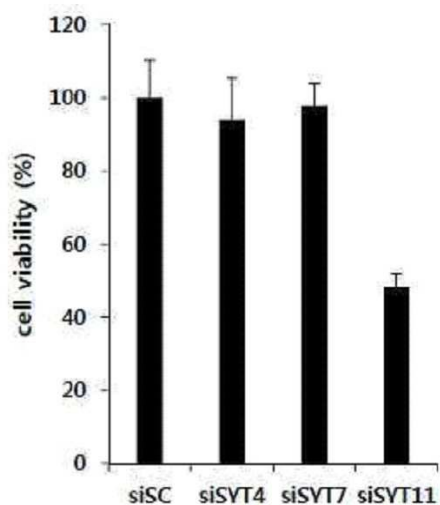
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> A composition for treating stomach cancer comprising an inhibitor of SYT11
- <130> 2018-DPA-3445
- <150> KR 2018/0125073
- <151> 2018-10-19
- <160> 20
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 431
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220><221> PEPTIDE
- <222> (1)..(431)
- <223> SYT11
- <400> 1

Met Ala Glu Ile Thr Asn Ile Arg Pro Ser Phe Asp Val Ser Pro Val

1 5 10 15

Val Ala Gly Leu Ile Gly Ala Ser Val Leu Val Val Cys Val Ser Val

20 25 30

Thr Val Phe Val Trp Ser Cys Cys His Gln Gln Ala Glu Lys Lys Gln

35 40 45
 Lys Asn Pro Pro Tyr Lys Phe Ile His Met Leu Lys Gly Ile Ser Ile
 50 55 60
 Tyr Pro Glu Thr Leu Ser Asn Lys Lys Lys Ile Ile Lys Val Arg Arg
 65 70 75 80
 Asp Lys Asp Gly Pro Gly Arg Glu Gly Gly Arg Arg Asn Leu Leu Val

 85 90 95
 Asp Ala Ala Glu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Asp Lys Asp Pro Arg Gly
 100 105 110
 Pro Ser Ser Gly Ser Cys Ile Asp Gln Leu Pro Ile Lys Met Asp Tyr
 115 120 125
 Gly Glu Glu Leu Arg Ser Pro Ile Thr Ser Leu Thr Pro Gly Glu Ser
 130 135 140
 Lys Thr Thr Ser Pro Ser Ser Pro Glu Glu Asp Val Met Leu Gly Ser
 145 150 155 160

 Leu Thr Phe Ser Val Asp Tyr Asn Phe Pro Lys Lys Ala Leu Val Val
 165 170 175
 Thr Ile Gln Glu Ala His Gly Leu Pro Val Met Asp Asp Gln Thr Gln
 180 185 190
 Gly Ser Asp Pro Tyr Ile Lys Met Thr Ile Leu Pro Asp Lys Arg His
 195 200 205
 Arg Val Lys Thr Arg Val Leu Arg Lys Thr Leu Asp Pro Val Phe Asp
 210 215 220
 Glu Thr Phe Thr Phe Tyr Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Leu Gln Asp Leu

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

290 295 300

Ala Gln Arg Met Thr Val Val Val Leu Lys Ala Arg His Leu Pro Lys

305 310 315 320

Met Asp Ile Thr Gly Leu Ser Gly Asn Pro Tyr Val Lys Val Asn Val

325 330 335

Tyr Tyr Gly Arg Lys Arg Ile Ala Lys Lys Lys Thr His Val Lys Lys

340 345 350

Cys Thr Leu Asn Pro Ile Phe Asn Glu Ser Phe Ile Tyr Asp Ile Pro

355 360 365

Thr Asp Leu Leu Pro Asp Ile Ser Ile Glu Phe Leu Val Ile Asp Phe

370 375 380

Asp Arg Thr Thr Lys Asn Glu Val Val Gly Arg Leu Ile Leu Gly Ala

385 390 395 400

His Ser Val Thr Ala Ser Gly Ala Glu His Trp Arg Glu Val Cys Glu

405 410 415

Ser Pro Arg Lys Pro Val Ala Lys Trp His Ser Leu Ser Glu Tyr

420 425 430

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

SYT11 siRNA

<400> 2

caucaaagug cggagagaca a 21

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYT11 siRNA

<400> 3

ccugcuaagc cgagacaaa 19

<210> 4

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SYT11 siRNA
 <400> 4
 ccaggugucu cugucauau 19
 <210> 5
 <211>
 > 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SYT11 siRNA
 <400> 5
 gcagaaagcg cauugccaa 19
 <210> 6
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SYT11 shRNA
 <400> 6
 ccggcatcaa agtgcggaga gacaactcga gttgtctctc cgcactttga tgttttt 57
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SYT11 Forward primer
 <400> 7
 ccggtctctc aggtaatcct 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SYT11 Reverse primer
 <400> 8

ctcattcttg gtggtgcat 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RPL13A forward primer

<400> 9

catcgtggct aaacaggtac 20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RPL13A reverse primer

<400> 10

gcacgacctt gagggcagc 19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siSC RNA

<400> 11

ccuacgccac caauuucgu 19

<210> 12

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shControl RNA

<400> 12

cgggcaaca gatgaagagc accaactcga gttggtgctc ttcatttgt tgtttt 57

<210> 13

<211> 19

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	SYT4 siRNA	
<400>	13	
cagguuuugu	gucaguacu	19
<210>	14	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SYT7 siRNA	
<400>	14	
acguuccuug	uaaauccaa	18
<210>	15	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SYT11 shRNA	
<400>	15	
cctgctaagc	cgagacaaac tcgagtttgt ctcggcttag caggttttt	49
<210>	16	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SYT11 shRNA	
<400>	16	
ccaggtgtct	ctgtcatatc tcgagatatg acagagacac ctggttttt	49
<210>	17	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SYT11 shRNA	
<400>	17	
gcagaaagcg	cattgccaac tcgagttggc aatgcgcttt ctgcttttt	49
<210>	18	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS-SYT11

<400> 18

auatgacaga gacacctgg 19

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS-SYT11

<400> 19

uuggcaatgc gctttctgc 19

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AS-NC

<400> 20

cctacgccac caatttcgu 19