



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0007275
(43) 공개일자 2023년01월12일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
 <i>A61P 35/04</i> (2006.01) <i>C12Q 1/6886</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/00</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/7088</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0179195(분할)
 (22) 출원일자 2022년12월20일
 심사청구일자 2022년12월20일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2020-0081391
 원출원일자 2020년07월02일
 심사청구일자 2020년07월02일</p> | <p>(71) 출원인
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자
 박현우
 서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 107동 905호(홍제동, 홍제한양아파트)</p> <p>허현빈
 인천광역시 계양구 형제봉길 50, 202동 603호(굴현동, 계양센트레빌2단지)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인충현</p> |
|---|---|

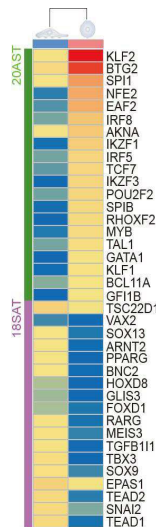
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **폐장암의 전이 억제용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 세포의 부착 의존성을 결정하는 인자를 발굴하고, 이들의 발현 조절을 통해 암, 구체적으로는 전이 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 암 전이에 대한 완전히 새로운 억제 타겟을 제안하여 원발성 암조직으로부터의 순환 종양 세포 생성을 현저하게 차단함으로써, 궁극적으로 암으로 인한 사망률을 유의하게 낮출 수 있는 효율적인 항암 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1g



(52) CPC특허분류

A61P 35/04 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131444
과제번호	2020M3F7A1094089
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	과학난제도전융합연구개발(R&D)
연구과제명	AST 패러다임 개척을 통한 암전이 제어인자 발굴 및 기능 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

IKZF1, BTG2 및 SPIB 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 췌장암의 전이 억제용 조성물로서, 상기 발현 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 shRNA (Short hairpin RNA), siRNA (short interfering RNA), miRNA (micro RNA) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide) 중에서 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 췌장암의 전이 억제용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 NFE2, 및 IRF8 유전자의 발현 억제제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2 및 POU2F2 유전자의 발현 억제제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB111, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1중에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 뉴클레오타이드를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 췌장암은 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성되기 전의 암이며, 상기 조성물은 순환종양세포의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

IKZF1, BTG2 및 SPIB 유전자의 발현을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 췌장암의 전이 또는 재발 진단용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 유전자의 발현이 증가한 경우, 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성됨으로써 췌장암의 전이 또는 재발의 위험이 증가한 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 조성물은 NFE2 및 IRF8 유전자의 발현을 측정하는 제제를 추가적으로 포함하는 것을 특

징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 조성물은 GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2 및 POU2F2 유전자의 발현을 측정하는 제제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)의 생성 억제제의 스크리닝 방법:

(a) IKZF1, BTG2 및 SPIB 유전자, 또는 이들이 인코딩하는 단백질을 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 시료 내 상기 유전자 또는 상기 단백질의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 IKZF1, BTG2 및 SPIB 유전자, 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)의 생성 억제제로 판정한다.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 채장암 세포를 포함하는 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포의 부착 의존성을 변환하는 인자의 발현을 조절하여 순환 종양 세포의 생성을 차단함으로써 채장암 전이를 억제하는 법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암의 전이(metastasis)란 암세포가 원발성 암(primary tumor) 조직에서 이탈하여 주위의 혈관이나 림프관으로 침투해 이를 통로로 하여 체내의 다른 부위로 원거리 이동하면서 새로운 종양을 형성하는 현상을 말한다. 암 환자의 사망원인의 90% 이상은 원발암성 암으로부터의 전이에 기인하므로(Nature Reviews Cancer, 2006, 6:49-458), 암 환자의 사망률을 개선시키기 위해 암 전이를 억제하는 것은 원발암의 치료에 못지않게 매우 중요한 문제이다.

[0004] 전이 과정에서 암세포가 이동성을 획득하는 기작은 아직 완전히 밝혀지지 않았으며, 이에 대한 다양한 이론들이 존재한다. 가장 활발히 연구되고 있는 이론은 EMT(epithelial to mesenchymal transition)/MET(mesenchymal to epithelial transition) 이론으로, 이는 종양 상피세포(epithelial cell)가 유전적 변이에 의해 간엽세포(mesenchymal cell)의 형질을 획득한 세포로 변한다는 이론이다(J Clin Invest. 2009, 119:1417-1419). 간엽세포의 형질을 갖게 된 상피세포는 세포 간 결합이 약화되어 본래 있던 위치에서 이탈하여 혈관으로 이동하며, 혈관을 통해 이동하던 세포가 다시 본래의 상피적 특성을 회복하여(MET) 원발 부위에서 멀리 떨어진 2차 부위에 정착하여 종양을 증식시키게 되는 것이 전이의 과정이라는 이론이다. 하지만 최근 EMT를 동반하지 않고도 암 전이가 일어나는 많은 증례들에 대한 보고가 있을 뿐 아니라 오히려 EMT의 저해 마커인 E-카드헤린이 순환 암세포의 생존을 증가시켜 암 전이를 촉진시킨다는 보고가 있어 EMT의 억제가 암 전이의 효과적인 타겟이 될 수 있을지는 불투명한 상황이다.

[0005] 또 다른 이론은 암 줄기세포(cancer stem cell)의 존재를 통해 전이를 설명하고자 한다. 즉, 종양 조직에도 일반 정상 조직과 마찬가지로 줄기성(stemness)을 가지는 암 줄기세포가 존재하여 종양의 성장, 전이 등의 핵심적인 기능을 담당하는 세포군으로 기능한다는 이론이다. 그러나 성체 암세포와 구별되는 특성을 지닌 암 줄기세

포의 존재가 다양한 연구에서 확인되었음에도 불구하고, 동물 실험에서 암 줄기세포를 통한 전신 전이가 잘 재현되지 않아 이 역시 하나의 가능한 이론으로만 남아 있다(Int J Cancer. 2008;123:73-84).

[0007] 이에, 본 발명자들은 암 전이의 새로운 메커니즘을 제시하고 궁극적으로 암 전이를 억제하기 위한 보다 효율적인 타겟을 제안하기 위해, 혈액을 떠돌아 다니는 순환 암세포(Circulating tumor cells)의 표현형을 결정하는 특이적 유전자를 탐색하고자 하였다. 순환 암세포는 세포의 기질에 부착해서 자라는 원발성 암세포와는 달리 아노이키스(anoikis) 저항성을 가지고 부착 의존적이지 않는데, 이에 부착성 세포와 부유성 세포 간의 배타적으로 발현하는 유전자 리스트를 후보군으로 하여 실제로 이들의 발현으로 인해 암세포가 전이를 일으키는지를 확인하고자 하였다.

[0008]

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 출원 제10-2011-0004016호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 암 환자의 대다수 사망 원인을 구성하는 암전이(metastasis)의 효율적인 억제 타겟을 발굴하여, 궁극적으로 암으로 인한 사망률을 현저히 낮출 수 있는 새로운 치료 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 혈액을 떠돌아다니는 순환 종양 세포(circulating tumor cell, CTC)의 부유성(suspension) 표현형을 결정하는 핵심 유전자를 발굴하고, 세포의 부착 의존성 여부에 따라 배타적으로 발현되는 이들 유전자를 인위적으로 발현시키거나 혹은 발현을 억제할 경우 종양의 전이가 효율적으로 억제됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 암의 전이 또는 재발 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOF2, MYB, BCL11A 및 GFI1B로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명자들은 암 환자의 대다수 사망 원인을 구성하는 암전이(metastasis)의 효율적인 억제 타겟을 발굴하여, 궁극적으로 암으로 인한 사망률을 현저히 낮출 수 있는 새로운 치료 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 혈액을 떠돌아다니는 순환 종양 세포(circulating tumor cell, CTC)의 부유성(suspension) 표현형을 결정하는 핵심 유전자를 발굴하고, 세포의 부착 의존성 여부에 따라 배타적으로 발현되는 이들 유전자를 인위적

으로 발현시키거나 혹은 발현을 억제할 경우 종양의 전이가 효율적으로 억제됨을 발견하였다.

- [0021] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 부유성 세포에서만 발현되고 부착성 세포에서는 발현되지 않는 유전자를 탐색하고, 이들 중 상기 20개 유전자를 인위적으로 발현시킨 세포는 본래 표현형과 달리 부유성 세포로 전환되며 반대로 이들 유전자의 발현을 억제할 경우 부유성 표현형이 사라지면서 부착성 세포로 전환됨을 밝혔다. 나아가, 암세포에서 이들의 발현을 억제할 경우 CTC의 형성이 저해됨으로써 종양의 전이가 억제될 수 있음을 실험적으로 증명하였다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “발현 억제제”는 타겟 유전자의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 타겟 유전자의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, 타겟 유전자의 생물학적 기능이 유의하게 저하될 수 있을 정도로 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.
- [0023] 타겟 유전자의 억제제는 예를 들어 당업계에 이미 그 서열이 공지된 상기 20개 인자의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 타겟 유전자를 인식하는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 시스템과, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, 이들의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 모든 유전자 및 단백질 수준의 억제수단이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 인 비보 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA분자를 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따르면, 본 발명의 발현 억제제는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질의 활성을 저해하는 특이적 항체일 수 있다. 목적 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는

모노클로날 항체이다.

- [0031] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and 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 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [0032] 본 발명은 항체 대신 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용하여 이의 활성을 억제할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발현의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 상기 나열된 20개 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현이 억제되면서 순환 종양 세포의 생성이 저해되어 종양, 구체적으로는 전이된 종양으로 인한 증상의 발현을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0037] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 BTG2 및 IKZF1 유전자의 발현 억제제를 포함한다.
- [0040] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 NFE2, IRF8 및 SPIB 유전자의 발현 억제제를 추가적으로 포함한다. 가장 구체적으로는, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2 및 POU2F2 유전자의 발현 억제제를 추가적으로 포함한다.
- [0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB111, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “뉴클레오타이드”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가진다. 핵산 분자의 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다. 본 발명에서 발현량을 측정하고자 하는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않음은 당업자에게 명확하다. 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있는데, 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈, 코돈의 축퇴성에 의해 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 가지는 핵산분자를 모두 포괄한다.

- [0043] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 발현량을 측정하고자 하는 뉴클레오타이드는 상기 나열된 유전자의 공지된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 공지된 유전자의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 구체적으로는 80%의 상동성, 보다 구체적으로는 90%의 상동성, 가장 구체적으로는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 암은 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성되기 전의 암이며, 본 발명의 조성물은 순환종양세포의 생성을 억제한다.
- [0046] 본 발명에 따르면, 세포에 부유성(suspension) 표현형을 부여하는 상기 20개의 유전자의 발현을 억제하거나 또는 부착성 표현형을 부여하는 상기 18개의 유전자를 과발현시키면, 생체 내 세포가 부유 환경에 적응하지 못하게 함으로써 혈액 속을 부유하는 순환종양세포의 생성이 차단되며, 이를 통해 순환종양세포로 매개되는 암의 전이 또는 재발이 효과적으로 억제될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 “암의 전이의 예방 또는 치료용 조성물” 또는 “암의 전이 억제용 조성물”로 표현될 수도 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOXF2, MYB, BCL11A 및 GFI1B로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 유전자의 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성된 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB111, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성된 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0051] 종양의 전이 과정은 원발성 암 조직에서 이탈된 암세포가 혈관까지 이동 후 혈액 안으로 유입되어 혈류를 타고 이동함으로써 새로운 위치의 조직에 정착, 분열 및 성장하여 2차 전이암을 형성하는 과정을 통해 이루어진다. 본 발명자들은 원격 전이(distant metastasis)로 불리는 이러한 과정의 진행을 차단하기 위해서는 혈류를 타고 이동하는 순환종양세포의 생성 자체를 억제하는 것이 효과적이나, 이미 순환종양세포가 생성되어 혈관 내로 유입된 경우에는 이들 세포가 2차 부위(secondary site)에 정착하지 못하도록 부유성 표현형을 인위적으로 지속시키는 것이 전이 억제에 보다 효율이라는 사실을 발견하였다. 따라서, 생체 내 CTC의 존재가 검출된 경우 세포에 부유성 표현형을 부여하는 상기 20개의 유전자를 과발현시키거나 부착성 표현형을 부여하는 상기 18개의 유전자를 억제함으로써, 생성된 순환종양세포의 콜로니화(colonization)를 억제하고, 궁극적으로 전이암의 생성을 효율적으로 차단할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOXF2, MYB, BCL11A, GFI1B, TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB111, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 재발 진단용 조성물을 제공한다.
- [0054] 상기 유전자의 발현을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

- [0055] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0058] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 상기 나열된 유전자의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0059] 프라이머는, 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 나열된 유전자의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3' -말단 또는 5' -말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0061] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [0062] 상기 유전자의 발현을 측정하는 제제는 상기 유전자가 인코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하여 이들의 발현을 단백질 수준에서 측정하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따르면, 본 발명의 유전자가 인코딩하는 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 개체의 암 전이 또는 재발의 위험성을 분석하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0064] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체가 이용될 수 있다. 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 강도를 분석함으로써, 암 전이 또는 재발의 위험성을 예측할 수 있다.
- [0065] 본 발명은 항체 대신 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수도 있다. 앵타머에 대한 내용은

이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

- [0066] 본 명세서에서 용어 “진단”은 암의 전이 및 재발이 현재 개체에서 발생되었는지 여부의 판정 및 현재 개체가 암 전이 또는 재발이 발생하지는 않았으나 향후 암 전이 또는 재발이 발생할 가능성과 관련된 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 따라서, 용어 “암의 전이 또는 재발 진단”은 “암의 전이 또는 재발 위험성의 예측”로 표현될 수도 있다.
- [0067] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOF2, MYB, BCL11A 및 GFI1B로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현이 증가한 경우, 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성됨으로써 암의 전이 또는 재발의 위험이 증가한 것으로 판단한다.
- [0068] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB11, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현이 감소한 경우, 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)가 생성됨으로써 암의 전이 또는 재발의 위험이 증가한 것으로 판단한다.
- [0069] 본 발명의 구성 중 “암의 전이 또는 재발 진단용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “발현의 증가”는 대조군 또는 정상군에 비해 해당 유전자의 발현량이 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군 또는 정상군과 비교하여 약 10% 이상 증가, 약 20% 이상 증가, 약 30% 이상 증가, 약 40% 이상 증가, 약 50% 이상 증가, 또는 약 60% 이상 증가한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다. 또한 용어 “발현의 감소”는 대조군 또는 정상군에 비해 해당 유전자의 발현량이 유의하게 낮은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군 또는 정상군과 비교하여 약 10% 이상 감소, 약 20% 이상 감소, 약 30% 이상 감소, 약 40% 이상 감소, 약 50% 이상 감소, 또는 약 60% 이상 감소한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 BTG2 및 IKZF 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0072] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 NFE2, IRF8 및 SPIB 유전자의 발현을 측정하는 제제를 추가적으로 포함한다. 가장 구체적으로는, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2 및 POU2F2 유전자의 발현을 측정하는 제제를 추가적으로 포함한다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)의 생성 억제제 또는 생성된 순환종양세포의 콜로니화 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0075] (a) IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOF2, MYB, BCL11A, GFI1B, TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB11, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질을 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0076] (b) 상기 시료 내 상기 유전자 또는 상기 단백질의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,
- [0077] 상기 IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOF2, MYB, BCL11A 및 GFI1B로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 감소하거나, 상기 TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB11, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 시험물질은 순환종양세포(circulating tumor cell; CTC)의 생성 억제제로 판정하며,
- [0078] 상기 IKZF1, KLF1, IRF8, BTG2, SPIB, GATA1, IKZF3, TAL1, EAF2, POU2F2, KLF2, SP11, NFE2, AKNA, IRF5, TCF7, RHOF2, MYB, BCL11A 및 GFI1B로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 증가하거나, 상기 TSC22D1, VAX2, SOX13, ARNT2, PPARG, BNC2, HOXD8, GLIS3, FOXD8, RARG, MEIS3, TGFB11, TBX3, SOX9, EPAS1, TEAD2, SNA12 및 TEAD1로 구성된 군으로부터 선택되는 하나

이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 생성된 순환중양세포의 콜로니화 억제제로 판정한다.

[0080] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 암세포를 포함한다.

[0081] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 암은 전이 혹은 재발된 암이다.

[0082] 본 발명에서 사용되는 부착 의존성 조절 인자 및 이들의 발현 조절을 통해 예방 또는 치료할 수 있는 암의 성격에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

[0083] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 상술한 유전자를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 암조직, 암세포 또는 이의 배양액을 수 있다.

[0084] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 본 발명의 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 이들 유전자의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 상기 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0086] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0087] (a) 본 발명은 세포의 부착 의존성을 결정하는 인자를 발굴하고, 이들의 발현 조절을 통해 암, 구체적으로는 전이 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0088] (b) 본 발명은 암 전이에 대한 완전히 새로운 억제 타겟을 제안하여 원발성 암조직으로부터의 순환 중양 세포 생성을 현저하게 차단함으로써, 궁극적으로 암으로 인한 사망률을 유의하게 낮출 수 있는 효율적인 항암 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0090] 도 1은 ENCODE 데이터베이스로부터 부착 세포 및 부유 세포 간 상호 배타적으로 발현되는 유전자를 AST 및 SAT 후보로 선정하는 과정을 보여주는 그림이다. 도 1a는 부착 세포 및 부유 세포의 131개의 ENCODE 데이터베이스의 분석 전략을 요약한 모식도이다. 도 1b는 부유 세포에서 고발현되거나 저발현되는 유전자의 볼케이노 플롯을 보여준다. 도 1c는 도 1b의 볼케이노 플롯에서 붉은 점 중 선정된 유전자들의 열지도를 나타낸다. 도 1d는 도 1b의 볼케이노 플롯의 112개 부착 세포 및 21개 부유 세포의 1491개 유전자에 대해 수행한 연관분석 결과를 보여준다. 도 1e는 ENCODE 및 ProteinAtlas.org 데이터베이스로부터 20개 AST 및 18개 SAT를 선정하는 전략을 요약한 모식도이다. 도 1f는 112개 부착 세포 및 21개 부유 세포에서 20개 AST 및 18개 SAT 후보인자들의 발현에 대한 열지도를 보여준다. 도 1g는 20개 AST 및 18개 SAT 후보인자들의 평균값에 대한 열지도를 나타낸다.

도 2는 규명된 AST 인자가 부착 의존성을 리프로그래밍함을 보여주는 그림이다. 도 2a는 렌티바이러스 감염을 통해 AST-SAT를 유도하는 전략을 요약한 모식도이다. 도 2b는 모크(mock) 또는 20개의 AST 인자를 안정적으로 발현하는 HEK293A의 형태를 보여준다. 도 2c는 HEK293A 세포에서 20개의 AST 후보 인자의 면역블롯팅 분석결과를 나타낸다. 도 2d는 푸로마이신(4mg/ml)을 처리한 모크- 및 20 AST-HEK293A 세포에서 채집한 배양배지를 이용한 LIVE/DEAD 어세이 결과를 보여주는 그림이다. 도 2e는 모크- 및 AST-리프로그래밍된 HEK293A 세포의 성장 곡선을 보여준다. 도 2f는 AST-유도된 세포에서 발현되는 AST 후보인자들의 벤-다이어그램을 나타낸다. 도 2g는 모크 또는 10개 AST 인자를 안정적으로 발현하는 HEK293A 세포의 형태를 보여준다. 도 2h는 20개의 AST 인자 중 개별적인 인자를 제거함에 따라 AST-유도 HEK293A 세포의 생성에 미치는 영향을 보여준다. 도 2i는 모크 또는 5개 AST 인자를 안정적으로 발현하는 HEK293A 세포의 형태를 보여준다. 도 2j는 20개의 AST 인자 중 개별적인 인자를 제거함에 따라 AST-유도 HEK293A 세포의 생성에 미치는 영향을 보여준다. 도 2k는 부유세포에서 고발현되거나 저발현되는 유전자들의 볼케이노 플롯 및 5개 AST 인자의 위치를 보여준다. 도 2l은 모크 및 5개

AST 인자를 발현하는 SUIT2, MDA-MB-231 및 HEK293T 세포의 형태를 보여준다. 데이터는 독립적인 세 번의 실험의 대푯값이다.

도 3은 종양세포의 확산과 CTC 형성 여부를 예측하기 위한 ‘인 비트로 CTC 어세이’를 설명하는 그림이다. 도 3a는 CTC 생성과 전이 과정을 재연하는 ‘인 비트로 CTC 어세이’ 모델의 모식도이다. 도 3b는 콜로니 어세이, 부유 어세이(메틸-셀룰로오스 어세이) 및 인 비트로 CTC 어세이에서 다양한 세포주의 형태를 나타낸 그림이다. 도 3c는 검증 어세이를 위해 PI를 처리한 MCF-7, HS578T, MDA-MB-231 및 SUIT-2 세포의 살아있는 세포 이미지를 보여준다. 도 3d는 인 비트로 CTC 형성 단계에서의 MDA-MB-231, SUIT-2 및 AGS 각 세포의 형태를 보여주는 그림이다.

도 4는 순환 종양세포에서 AST 인자의 일시발현이 종양세포의 확산에 필수적임을 보여주는 그림이다. 도 4a는 MDA-MB-231 세포의 부모세포(P), 인 비트로 순환종양세포(CTC) 및 2차 채집세포(S)에서 몇몇 AST 인자에 대한 qRT-PCR 분석결과를 나타낸다. 도 4b는 SUIT-2 세포의 부모세포(P), 인 비트로 순환종양세포(CTC) 및 2차 채집세포(S)에서 몇몇 AST 인자에 대한 qRT-PCR 분석결과를 나타낸다. 도 4c는 AGS 세포의 부모세포(P) 및 인 비트로 순환종양세포(CTC)에서 몇몇 AST 인자에 대한 qRT-PCR 분석결과를 나타낸다. 도 4d 및 4e는 siRNA 20nM의 도입이 MDA-MB-231 및 SUIT2 세포에서 인 비트로 CTC의 생성에 미치는 영향을 각각 보여주는 그림이다. 도 4f 및 4g는 모크(mock) 또는 5개의 AST#1 인자를 안정적으로 발현하는 MCF10A 세포 및 SUIT2를 각각 보여주는 그림이다. SUIT2에는 벨프로산 1mM을 처리하였다. 도 4h는 모크(mock) 또는 4개의 AST 인자를 안정적으로 발현하는 AGS를 보여주는 그림이다. 도 4i는 SUIT-2 및 AGS에서 수집한 부모세포(P), 인 비트로 순환종양세포(CTC) 및 2차 채집세포(S)에서의 EMT 인자(CDH1 및 CDH2)에 대한 qRT-PCR 분석결과를 나타낸다. 도 4i는 모크(mock) 또는 4개의 AST 인자를 안정적으로 발현하는 MDA-MB-231을 보여주는 그림이다.

도 5는 순환종양세포의 생성 후에는 오히려 본 발명의 AST 인자가 활성화되어야 종양의 전이가 억제됨을 보여주는 그림이다. 도 5a는 독시사이클린(5mg/ml) 처리 하에서 TetR 및 20개 AST 후보인자를 안정적으로 발현하는 HEK293A 세포의 형태를 보여준다. 도 5b는 독시사이클린 처리 하에서 tetR 발현-HEK293A 세포에서의 20개 AST 후보인자에 대한 면역블롯팅 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0091] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0093] 실시예

[0094] 실험방법

[0095] DNA 컨스트럭트

[0096] 후보 인간 AST 유전자를 V5 및 FLAG로 태깅하고 Gateway 삽입 벡터인 pENTR4 벡터(Addgene)에 서브클로닝하였다. 서브클로닝된 pENTR4 벡터를 LR 재조합 효소(Invitrogen, 1179019)를 이용하여 목적 벡터인 pLentiCMV 벡터와 재조합함으로써 렌티바이러스 발현벡터를 제작하였다. 모든 컨스트럭트는 시퀀싱을 통해 구조를 검증하였다.

[0098] 세포 배양

[0099] 모든 세포는 5% CO₂, 37℃의 가습 인큐베이터에서 유지하였다. HEK293A, HEK293T, MCF7, MDA-MB-231, HS578T, HT-29, SW620, HCT116 및 A375 세포는 DMEM(Hyclone, SH30243)에서 배양하고, BT549, SUIT-2, ASPC-1, MiaPaCa, AGS 및 MKN28 세포는 10% FBS(Hyclone, 1)과 50 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, 15140122)을 포함하는 RPMI(Hyclone, SH) 배지에서 배양하였다. MCF10A 세포는 5% 말혈청(Invitrogen, 26050088), 20 ng/ml EGF(Peprtech, AF-100-15), 0.5 µg/ml 하이드로코르티손(Sigma, H4001-25G), 100 ng/ml 콜레라톡신(Sigma, C8052-2MG) 및 10 µg/ml 인슐린(Sigma, I1882-100MG)이 보충된 DMEM-F12에서 배양하였다. 본 발명의 어떠한 세포주도 ICLAC 및 NCBI Biosample의 잘못 동정된 세포주 데이터베이스에서 발견되지 않았다.

각 세포주엔 마이코플라즈마에 의한 오염이 없음을 확인하였다.

[0101] 바이러스 감염

[0102] HEK 293T 세포를 Polyplus 시약(Merck)을 이용하여 제조자의 설명서에 따라 pMD2G 및 psPAX2를 코딩하는 플라스미드와 컨스트럭트가 클로닝된 렌티바이러스 벡터로 형질감염시켰다. 바이러스 입자를 함유한 배지를 형질감염 48시간 뒤에 수집하고 0.45 μ m 필터로 여과한 8 μ g/ml 폴리브렌을 첨가하여 사용하였다. 감염 24시간 뒤에, 형질감염된 세포를 신선한 배지에서 24시간 동안 배양하고 푸로마이신 및 블라스티시딘으로 선별하였다.

[0104] 부착-부유 전환(*Adherent-to-Suspension Transition, AST*)의 유도

[0105] HEK293A 세포(5×10^5)를 6-웰 배양 플레이트에 씨딩하고 AST-후보 유전자를 코딩하는 바이러스 입자를 함유하는 배지를 첨가하였다. 감염 2일 후, 형질감염된 세포를 트립신화하고 새로운 플레이트에 다시 씨딩한 다음 푸로마이신(4mg/ml)을 처리하여 선별하였다.

[0107] 항체

[0108] 웨스턴 블롯 분석을 위해 다음의 항체를 지정된 희석농도로 사용하였다: 항-FLAG(Sigma Aldrich), 항-V5(Cell Signaling), 항-E-카드헤린 (Abcam), 항-N-카드헤린(Abcam), 항-비멘틴(이하 Cell Signaling), 항-액틴, 항-INKZF1, 항-BTG2, 항-IRF8 항-NFE2, 항-TAL1 및 항-액틴.

[0110] 정량적 실시간 PCR 분석

[0111] RNeasy Plus mini kit (QIAGEN, 74136)을 이용하여 RNA를 추출하였다. iScript 역전사 효소(Bio-Rad, 1708891)를 이용하여 RNA 시료를 역전사함으로써 cDNA를 획득하였다. qRT-PCR은 KAPA SYBR FAST qPCR 키트(Kapa Biosystems, KK4605)과 7300 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)을 이용하여 수행하였다.

[0113] 통계적 분석

[0114] 모든 실험은 최소 3회 반복되었으며, 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다. 두 평균 간 통계적 차이는 양측 독립표본 스튜던트 *t*-검정으로 평가하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다. 분석에서 제외된 시료는 없으며, 데이터는 정상적인 분포를 보였고, 비교된 그룹 간 유사한 분산을 가졌다. 표본 크기를 결정하기 위한 통계적 방법은 사용하지 않았으며, 표본 크기는 선행 연구에서 경험한 실험적 다양성에 기반하여 결정하였다.

[0116] 실험결과

[0117] ENCODE 데이터베이스로부터 AST 및 SAT 후보인자들의 선정

[0118] 부착 세포와 부유 세포 간 상호 배타적으로 발현되는 유전자를 선별하기 위하여, ENCODE 데이터베이스로부터 112개의 부착 세포 데이터와 21개의 부유 세포 데이터를 선정하여 부유 세포의 모든 유전자의 RNA 발현 패턴을 부착 세포와 비교하면서 스크리닝하였다(도 1a). 특히, RNA-seq 스크리닝 결과에 대한 볼케이노 플롯은 654개 및 862개 유전자가 부착 및 부유 세포에서 각각 현저히 고발현됨을 보여준다(도 1b). 볼케이노 플롯에 기반하여 유의적인 차이를 보여주는 유전자 발현의 열지도 시각화를 통해 부착의존성에 따른 세포주의 군집화 패턴을 알 수 있었다(도 1c). 나아가, 부착 세포 및 부유 세포 간의 발현 양상의 차이를 보임으로써 선정된 유전자들은 피어슨 상관계수 >0.1 로서 서로 연관되어 있었다(도 1d). 이들 유전자를 이용하여, 부착 네트워크 내의 세포 간 선행의 상관관계를 추론하였으며 몇몇 전사인자에 의해 세포의 ECM(extracellular matrix) 부착 여부가 결정될 것이라 예상하였다. 이러한 가설을 시험하기 위해 전사 인자를 인코딩하면서 ProteinaAtlas.org, 데이터베이스에서 부유 세포 또는 부착 세포에서 상호 배타적인 발현 패턴을 보이는 20개 및 19개의 유전자를 각각 부착-

부유 전이(AST) 또는 부유-부착 전이(SAT)를 위한 후보 인자로 선정하였다(도 1e). 흥미롭게도, 열지도에서 AST 또는 SAT 유전자의 발현 분포는 부유 세포 또는 부착 세포에 주로 각각 치우쳐 있었다(도 1f 및 1g).

[0120] *AST 인자의 특징을 통한 부착 의존성의 리프로그래밍*

[0121] 20개의 AST 후보 유전자를 평가하기 위해, 렌티바이러스를 통해 이들 유전자를 안정적으로 발현하는 HEK293A 세포를 확립하였다. 형질도입된 세포는 다시 씨딩하여 형질도입 3일 후 푸로마이신(4mg/ml)으로 선별하였다(도 2a). 놀랍게도, 20개 AST 후보 유전자를 부착성 HEK293A 세포에 도입하자 부유 세포로 전환되었다[이하, “유도-부유세포(induced-suspension cell, iS-cell)”이라 칭함](도 2b 및 2c). LIVE/DEAD 및 경쟁적 증식 어세이를 통해, 푸로마이신-저항성 iS-HEK293A 세포가 생존이나 증식에 결함을 가지지 않음을 확인하였다(도 2d, 2e).

[0122] 다음으로, 본 발명자들은 두 개의 독립적인 iS-HEK293A 세포에서 발현하는 일반적인 인자를 시험함으로써 AST를 유도할 수 있는 최소한의 조합을 탐색하고자 하였다. 이를 위해, 부착성 HEK293A 세포에 도입할 경우 AST-유도 세포를 생성하는 10개의 후보 인자(GATA1, IKZF1, IKZF3, SPIB, TAL1, IRF8, EAF2, POU2F2, BTG2, KLF1)를 동정하였다(도 2f, 2g). 다음으로, 부착성 HEK293A 세포에 도입된 10개의 AST 인자로부터 각각의 후보 유전자를 제거한 뒤 AST가 유도된 정도를 측정하였다. 10개의 후보 중 형질도입 대상에서 IRF8, BTG2, SPIB, IKZF1 및 KLF1를 하나씩 제외하자 AST 수준이 크게 감소하고, 이들 5개 인자의 조합이 AST-리프로그래밍된 iS-세포를 형성할 수 있었다(도 2h-2i). 5개 AST 인자 중 하나를 제거하자, 부유세포로 전환된 HEK293A 세포는 유의하게 감소하였다(도 2g). 이러한 결과는 5개의 AST 인자의 조합이 부착 의존성을 리프로그래밍함에 있어 핵심적인 역할을 함을 시사한다. 나아가, 2개의 필수적인 인자인 IKZF1 및 KLF1를 포함하는 5개 인자의 조합이 핵심 요소임을 보였다(도 2j).

[0124] *순환 종양 세포(순환 종양 세포, CTC)의 발달과정을 모방하는 인 비트로 CTC 어세이*

[0125] 지금까지 암전이는 부착성 세포 간의 형태학적 변화인 EMT를 수반하는 것으로 알려져왔다. 그러나, 최근 암전이에서 EMT의 역할에 의심을 가지게 하는 보고들이 이어지고 있으며, 전이가 일어나기 위해서는 암세포가 혈류를 따라 부유 세포가 되어 순환하여야 하는데, 전이에 있어 필연적인 과정인 이러한 순환 종양 세포(CTC)의 발달과 작용 기작은 아직 잘 알려져 있지 않다. 이에 본 발명자들은 본 발명에서 발굴된 AST 인자들이 종양 세포의 확산되어 CTC의 발달, 궁극적으로 암전이의 촉진에 있어 중요한 역할을 할 것이라 가정하였다. 이러한 가정을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 새로운 인 비트로 어세이 플랫폼인 CTC 형성 어세이를 개발하였으며, 이는 암의 악성도 및 확산정도를 측정하는 가장 엄격한 파라미터로 적용될 수 있다. 본 발명자들은 종래의 EMT 전이 모델과 전혀 다른 새로운 암 전이의 개념을 제시한다. 이 모델에서 원발성 종양 세포는 높은 세포밀도와 같은 스트레스 상황에 놓이는데, 이로 인해 AST가 유발된다. 이어서 이러한 AST-유도 종양은 SAT-유도를 통해 2차 부위에 정착한다(도 3a). 놀랍게도, 대부분의 세포주가 암세포의 공격성 및 전이 상태에 대한 정보를 제공하는 것으로 알려진 콜로니 형성 어세이 및 부유 어세이와 같은 시험 어세이를 거쳤음에도, 시험한 14개 세포주 중 3개의 생존하여 CTC-유사 세포를 생성하였다(도 3b). 생존세포 이미징 현미경을 이용하여, 인 비트로에서 CTC-형성 어세이를 시각화하는 동영상 제작하였다. 도 3c 및 3d에서 보는 바와 같이, 세포 밀도가 초고밀도에 도달할 경우 완전히 사멸하는 세포와 살아있기는 하지만 CTC-유사 세포를 형성하지 못하는 세포를 발견하였다. 3개의 세포만이 살아있는 CTC-유사 부유 세포를 생성하였다.

[0127] *암세포에서 AST 인자의 녹다운 및 CTC 형성의 저해*

[0128] 다음으로 본 발명자들은 MDA-MB-231, SUIT2 및 AGS 세포의 CTC-유사 세포에서 몇몇 AST 인자의 mRNA 발현을 조사하였다. 놀랍게도, 이들 세포의 CTC-유사 세포는 MDA-MB-231 세포에서의 NFE2, BTG2, IRF8 및 IKZF1; SUIT2 세포에서의 BTG2, SPIB, IKZF1; AGS 세포에서의 NFE2, BTG2, SPIB 및 IKZF1과 같은 AST 인자의 갑작스런 발현을 보였다(도 4a, 4b 및 4c) 주목할만한 점은 상이한 타입의 암세포는 상이한 AST 인자의 조합을 보인다는 것인데, 이는 상이한 종류의 세포 별로 각각 AST 인자의 다양한 조합이 부착 의존성 조절에 관여함을 말해준다. 이러한 결과를 종합하면 원발성 종양에서는 관찰되지 않던 AST 인자가 전이를 억제하기 효율적인 타겟이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0129] 다음으로, 본 발명자들은 CTC-유사 세포에서 AST 인자의 갑작스런 발현이 이러한 표현형을 야기하는지를 조사하

였다. 이를 위해, MDA-MB-231 및 SUI2 세포에서 AST 인자를 녹다운한 결과, AST 인자의 기능 상실은 CTC-유사 세포의 형성 결핍으로 이어짐을 확인하였다(도 4d 및 4e). 반면 231-CTC 세포 및 SUI2 세포에서 발현되는 5개의 AST 인자를 도입하자 AST-유도된 부유성의 MCF10A 세포 및 SUI2 세포를 각각 수득할 수 있었다. 이러한 결과는 AST 인자가 CTC-유사 부유 세포의 생성을 촉진한다는 사실을 말해준다(도 4f 및 4g). 다음으로 본 발명자들은 CTC 형성 어레이가 EMT를 수반하는지 여부를 조사하였다. SUI2 및 AGS 세포는 상피성 세포로 알려져 있으므로, SUI2 및 AGS의 CTC-유사 세포에서 E-카드헤린 및 N-카드헤린의 mRNA 발현 수준을 조사하였다. 놀랍게도, CTC에서의 E-카드헤린 발현은 기대했던 대로 감소하는 것이 아니라 오히려 증가하였다(도 4h). 또한, AST 인자의 인위적 발현을 통해 유도된 부유 SUI2 세포에서의 E-카드헤린 발현을 조사한 결과 변화가 관찰되지 않아 AST에 EMT가 필수적이지 않음을 알 수 있었다(도 4g).

표 1

AST 인자 및 SAT 인자의 서열목록

서열번호	유전자	서열번호	유전자
1	NFE2	20	SPI1
2	BTG2	21	TSC22D1
3	SPIB	22	VAX2
4	IRF8	23	SOX13
5	RHOXF2	24	ARNT2
6	IKZF3	25	PPARG
7	KLF2	26	BNC2
8	TAL1	27	HOXD8
9	EAF2	28	GLIS3
10	GFI1B	29	FOXD8
11	GATA1	30	RARG
12	KLF1	31	MEIS3
13	MYB	32	TGFB111
14	POU2F2	33	TBX3
15	AKNA	34	SOX9
16	IKZF1	35	EPAS1
17	SPI1	36	TEAD2
18	IRF5	37	SNA12
19	TCF7	38	TEAD1

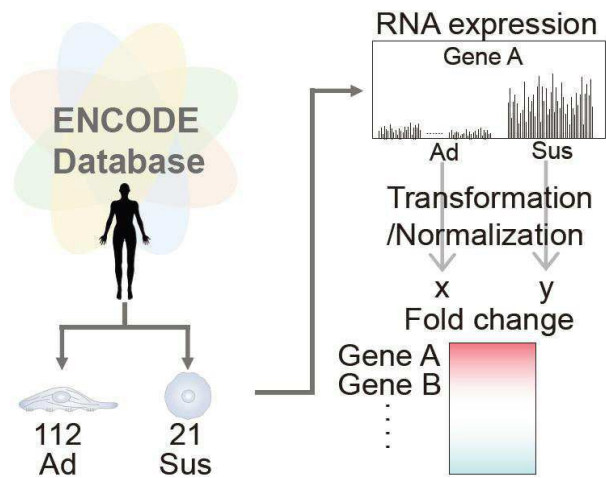
이미 형성된 CTC에서의 AST 인자의 과발현으로 인한 콜로니화의 저해

본 발명자들은 AST인자의 발현으로 CTC가 된 세포가 AST인자의 저해로 다시 부착성을 획득하고 콜로니화가 되는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 HEK293세포에 Tet 억제 단백질인 TetR를 발현하는 플라스미드를 도입하여 AST 후보 인자의 발현을 차단하고 독시사이클린 처리 하에서만 발현되도록 하였다. 흥미롭게도, TetR이 몇몇 후보인자의 발현과 AST의 유도를 효과적으로 억제하는 반면, 독시사이클린을 처리할 경우 AST 후보 유전자의 발현이 유도되고 iS-HEK293A 세포가 발달하였다. 나아가, 독시사이클린을 제거함으로써 HEK293A 세포에서 AST 인자의 발현이 감소됨과 부착성을 획득하여 콜로니화 되는 것을 확인하였다(도 5a 및 5b).

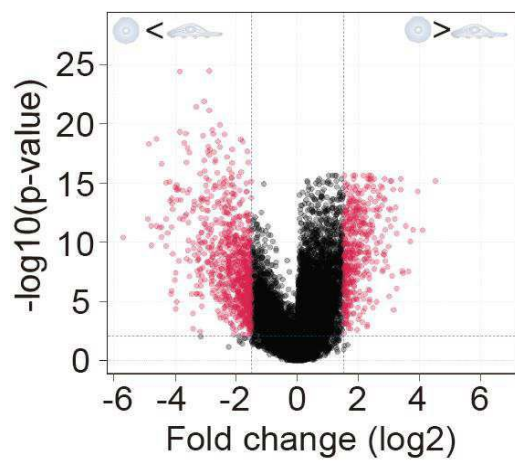
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

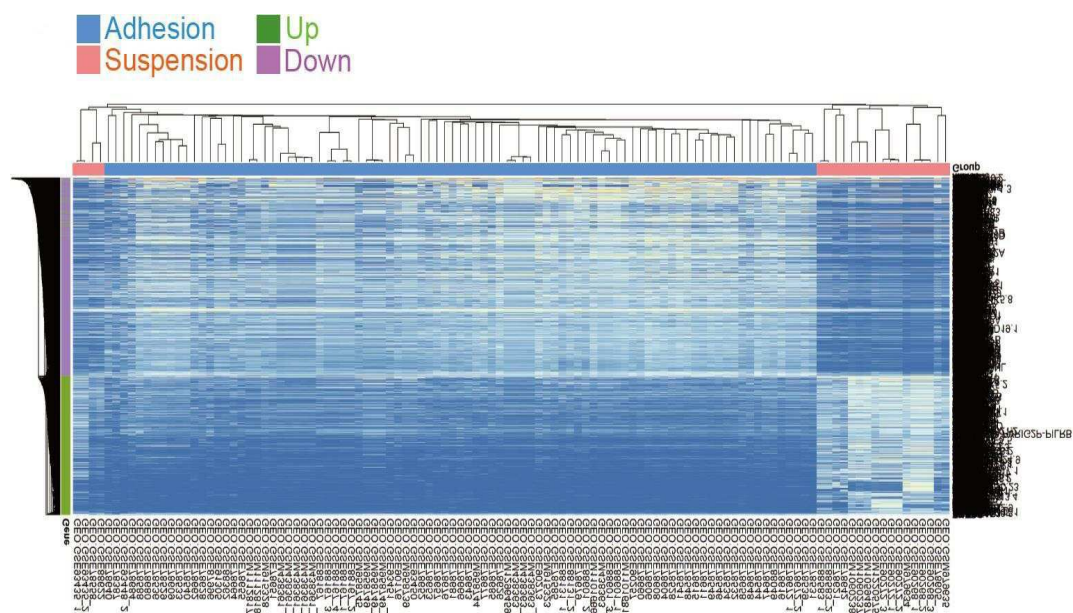
도면1a



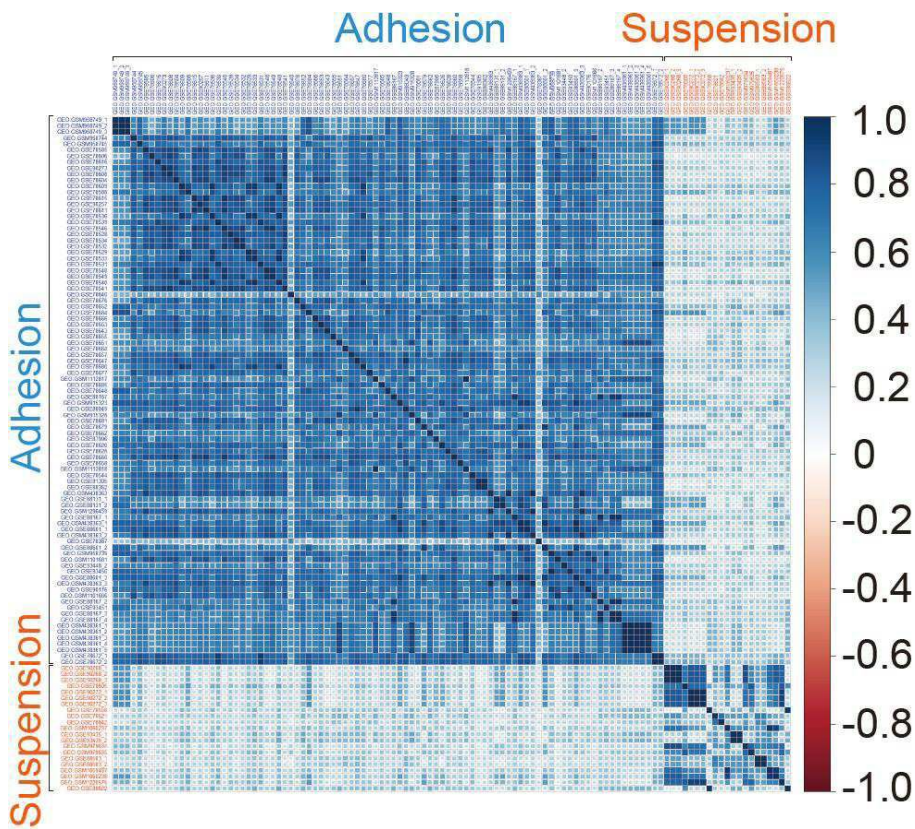
도면1b



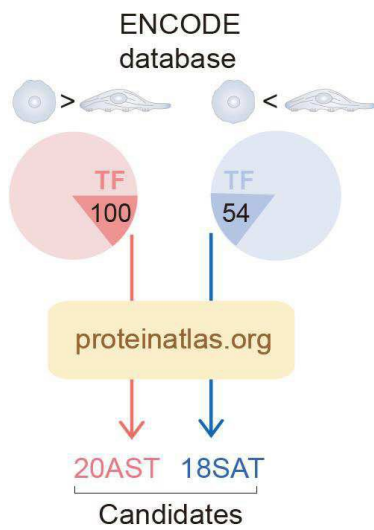
도면1c



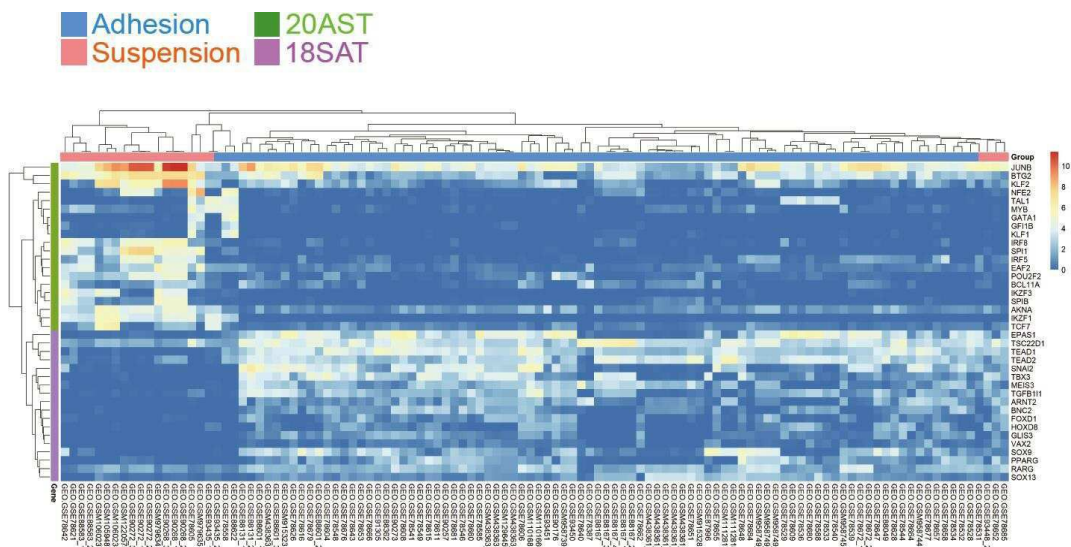
도면1d



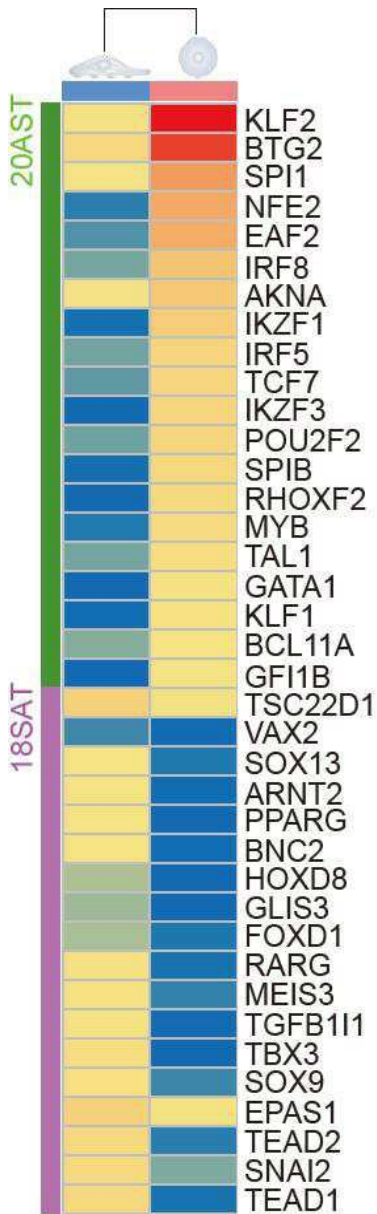
도면1e



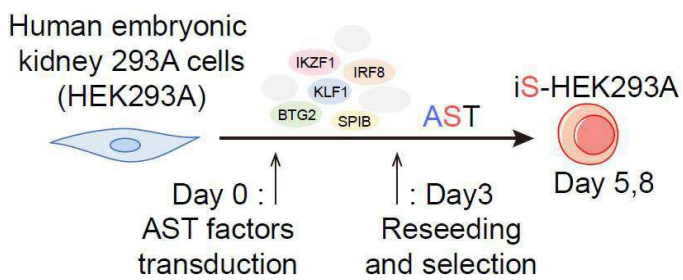
도면1f



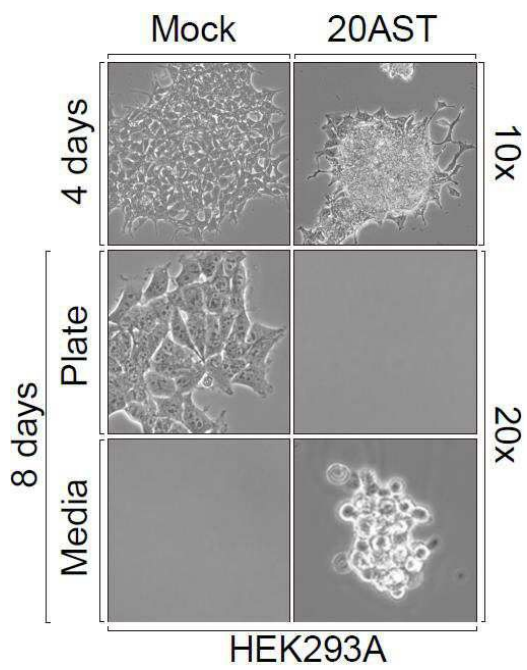
도면1g



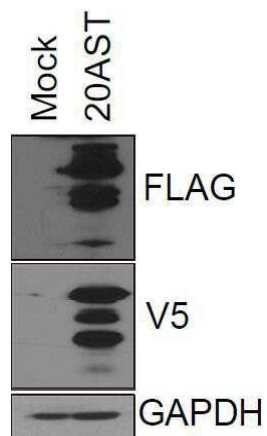
도면2a



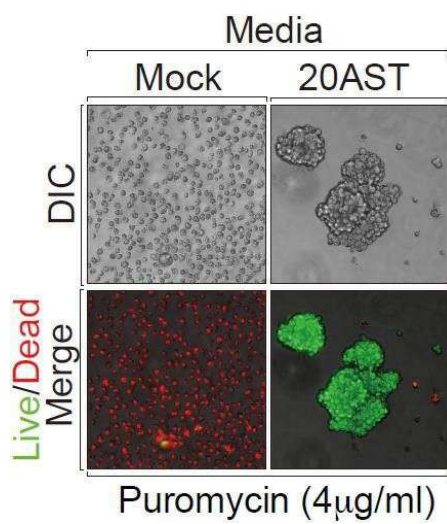
도면2b



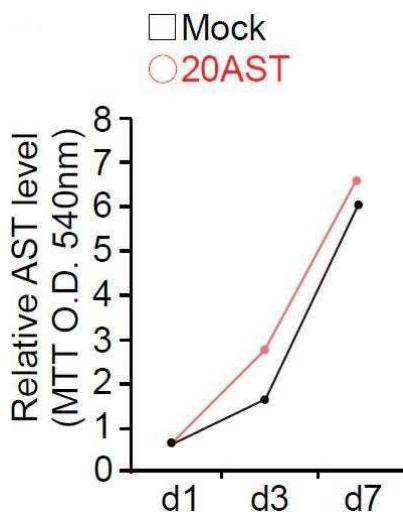
도면2c



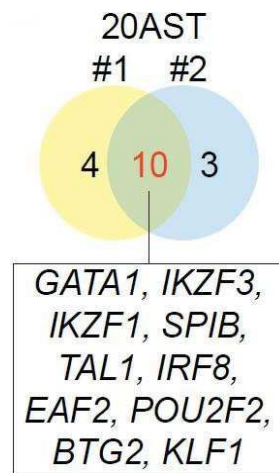
도면2d



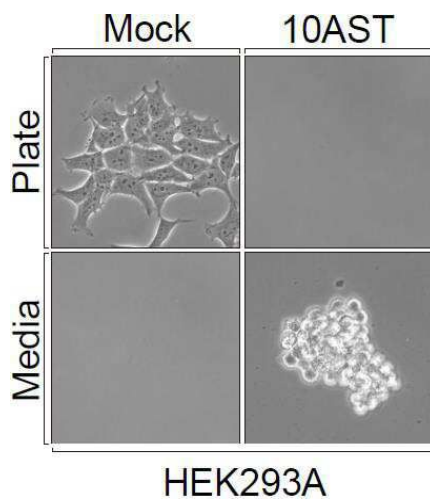
도면2e



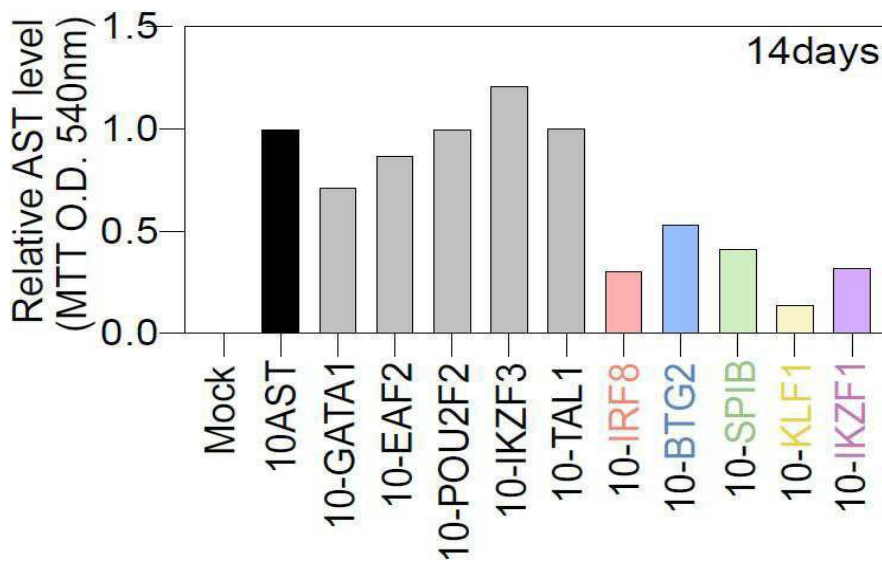
도면2f



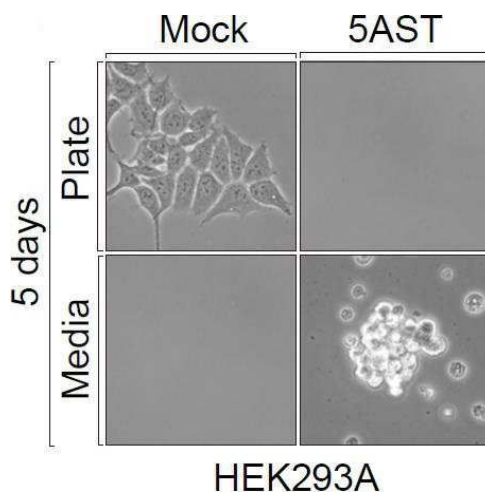
도면2g



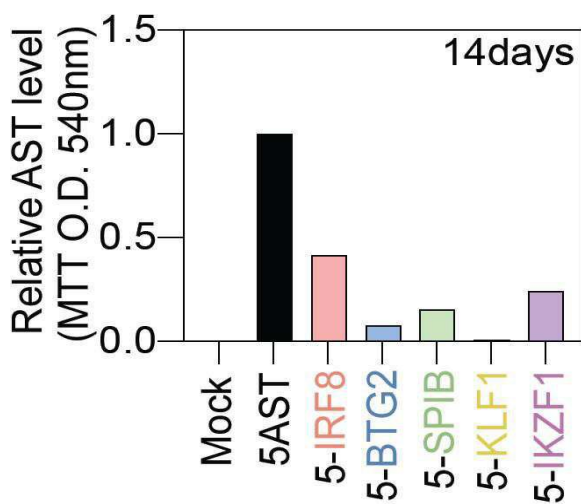
도면2h



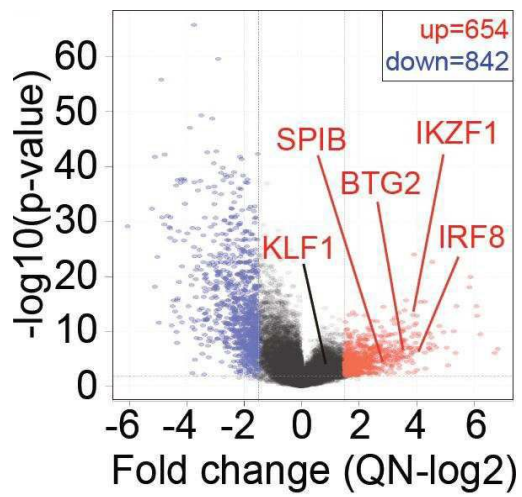
도면2i



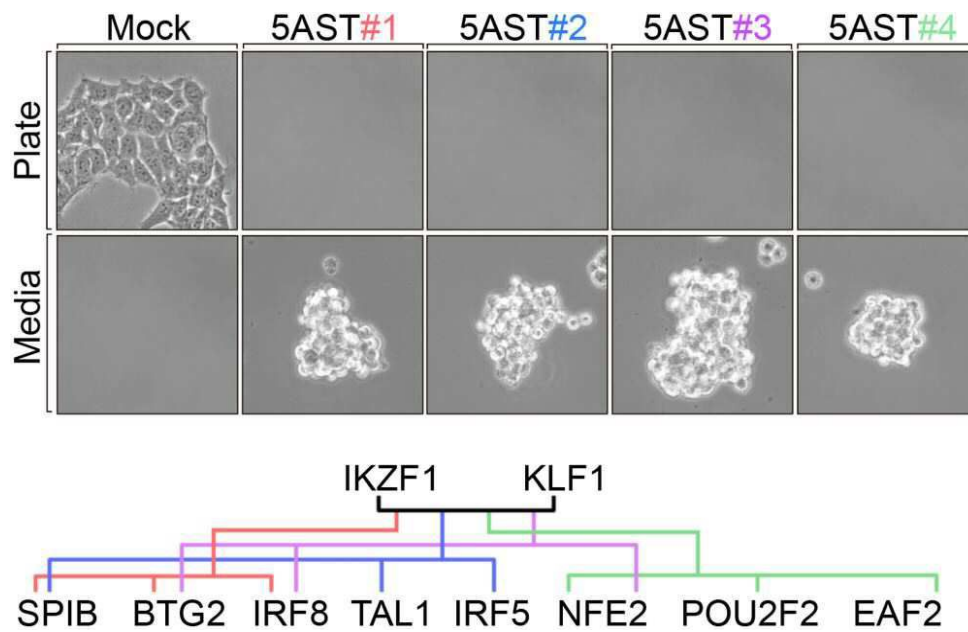
도면2j



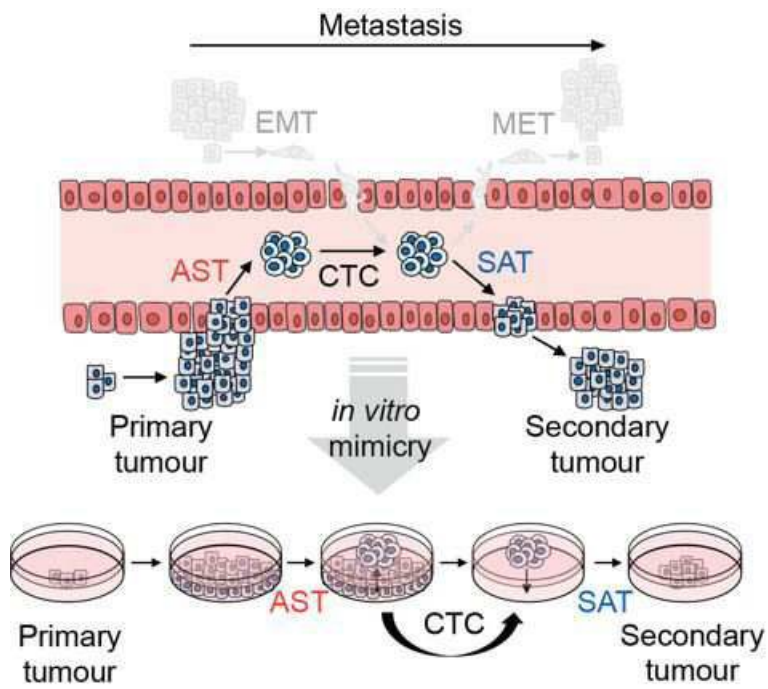
도면2k



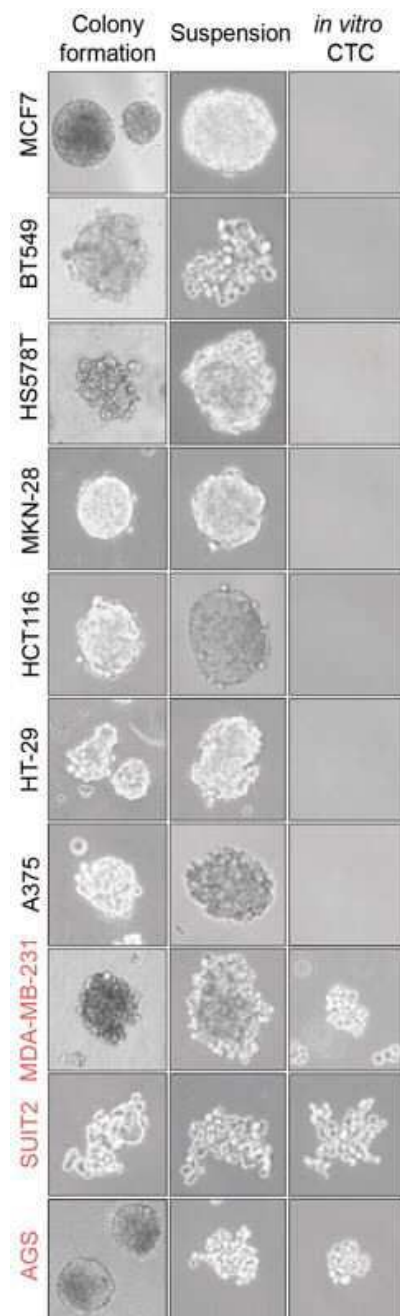
도면2l



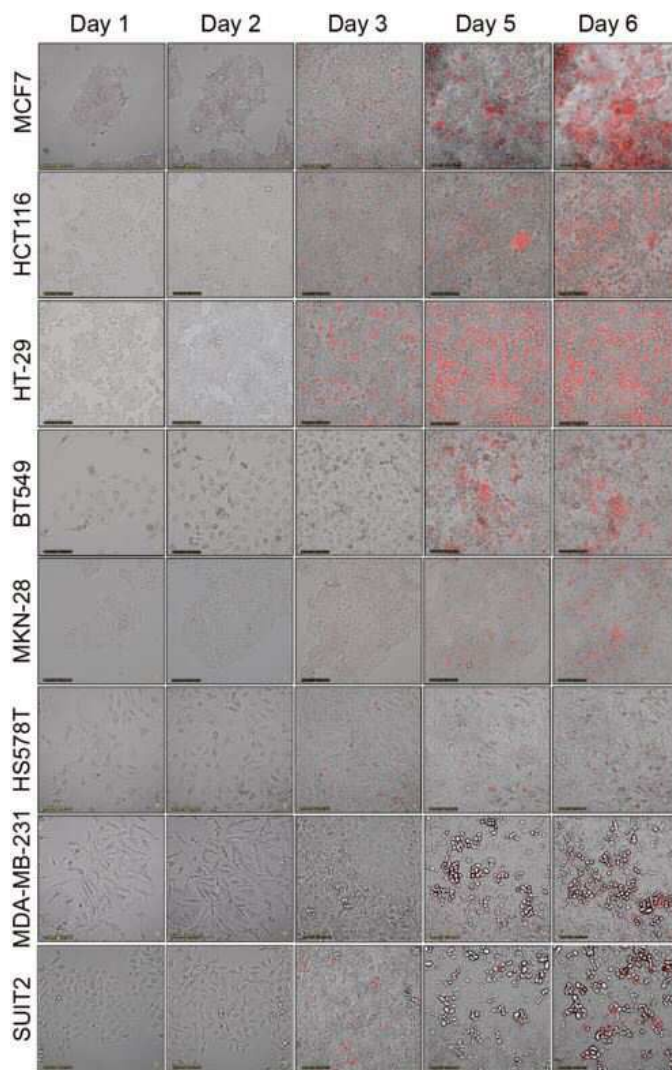
도면3a



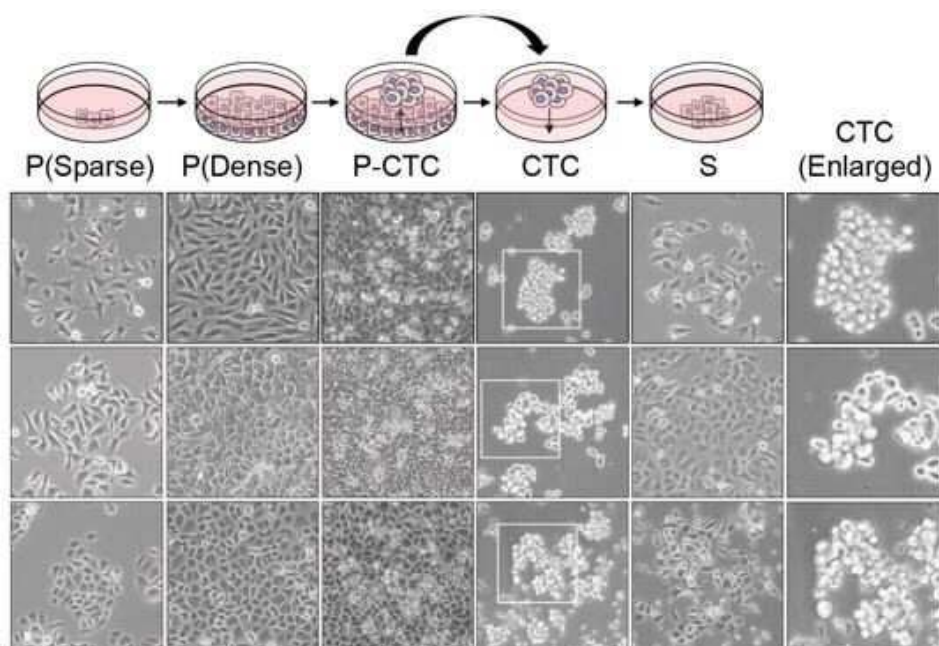
도면3b



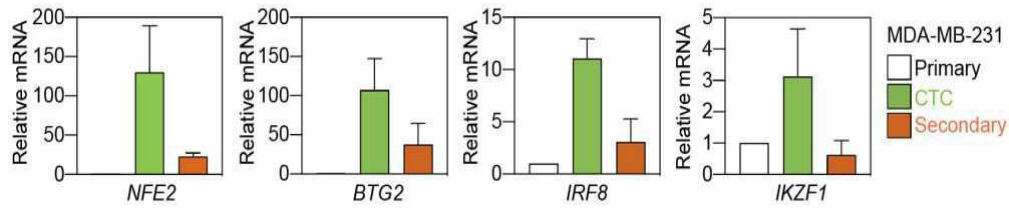
도면3c



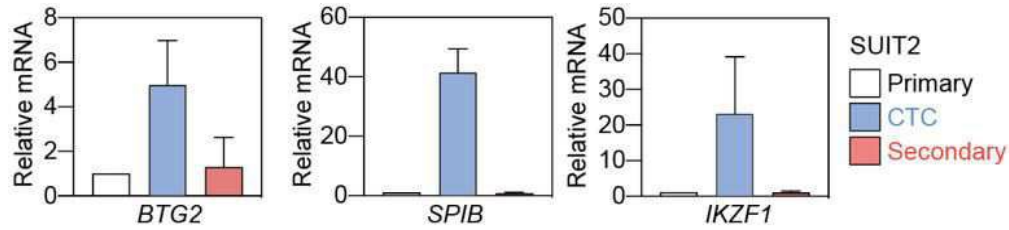
도면3d



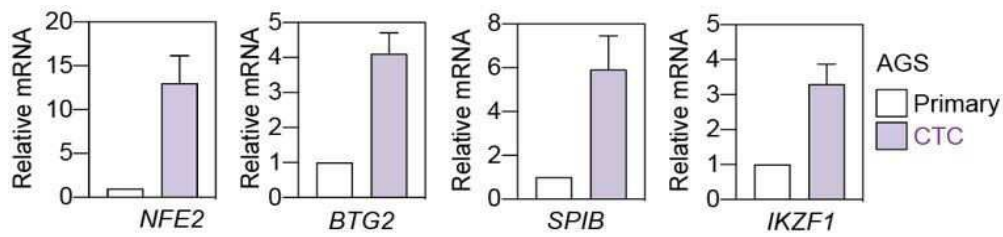
도면4a



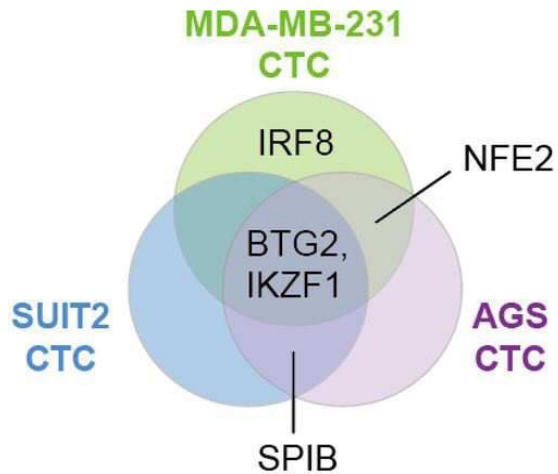
도면4b



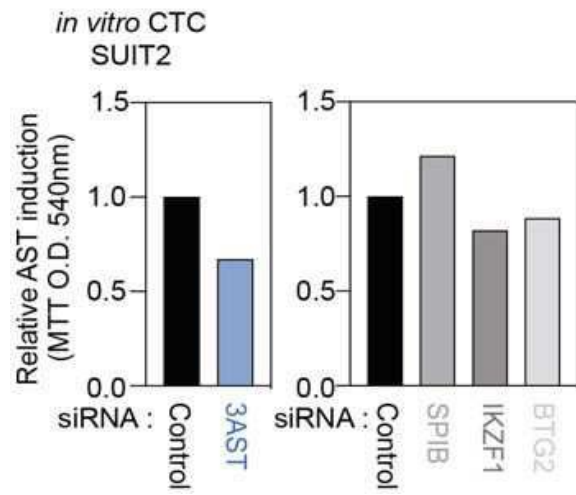
도면4c



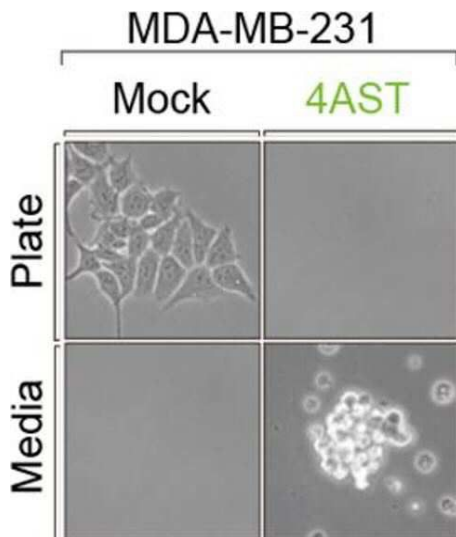
도면4d



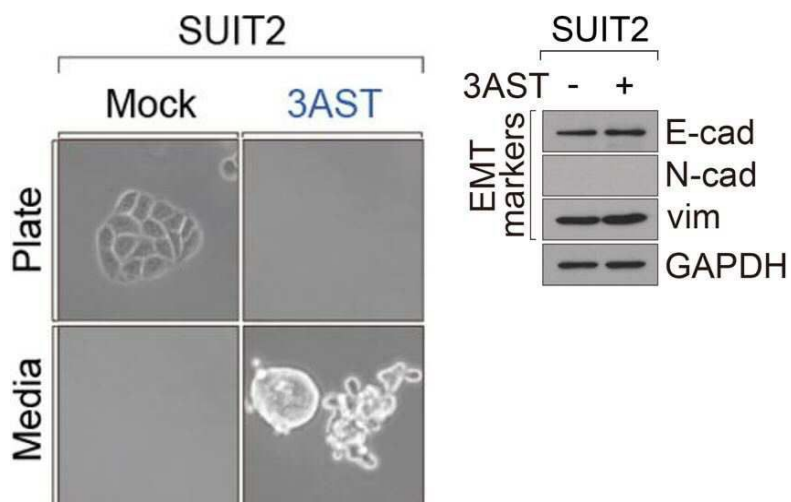
도면4e



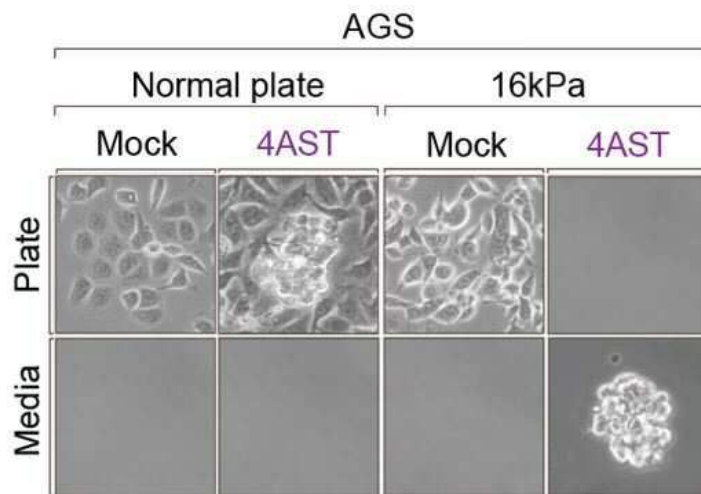
도면4f



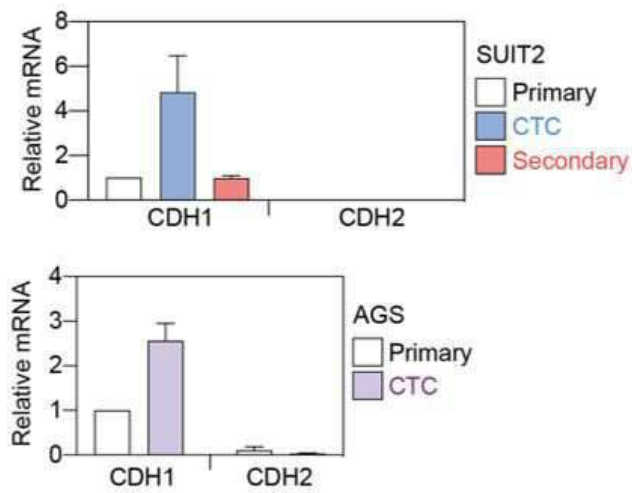
도면4g



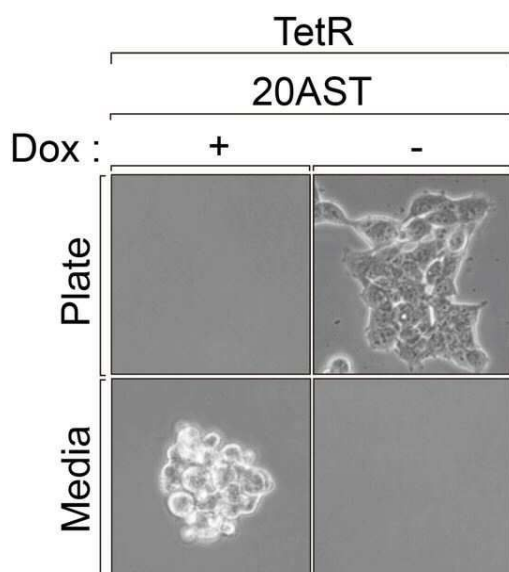
도면4h



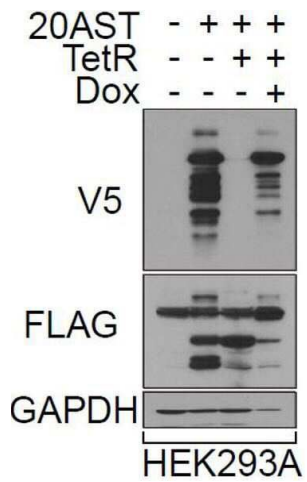
도면4i



도면5a



도면5b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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