



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0111176
(43) 공개일자 2021년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2021-0027450
(22) 출원일자 2021년03월02일
심사청구일자 2021년03월02일
(30) 우선권주장
1020200025872 2020년03월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
임중백
서울특별시 강남구 도곡로93길 12, 202동 707호(대치동, 래미안 대치 하이스턴)
최재일
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 218동 803호(남가좌동, DMC파크뷰자이)
정혜원
서울특별시 강남구 도곡로93길 12, 202동 707호(대치동, 래미안 대치 하이스턴)
(74) 대리인
파도특허법인(유한), 이재영

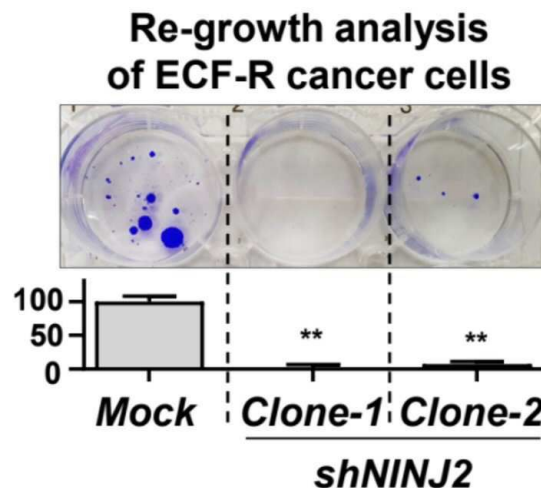
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 항암제 내성 진단 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 위암 치료에 사용되는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF) 내성 진단용 조성물 및 이를 이용한 진단 키트에 대한 것으로, ECF 계열의 약물 치료 후 종양 개시 세포(TIC)가 증가하여 암이 재발하고 내성이 생기는 문제점을 해결하기 위하여 내성 출현을 조기 발견하여 NINJ2를 억제함으로써 위암의 재발을 억제함과 동시에 상기 약물에 대한 내성을 치료할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 2800/44 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711089906
과제번호	2017R1A2B2011728
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	난치성 항암제 다제 내성 암 원인 바이오마커 발굴을 통한 면역세포치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 항암제 내성 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고핵타이드, 리간드, PNA (peptide nucleic acid) 및 앵타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리투시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세특시맙, 비스큐알부민, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 젬투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 항암제는 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 항암제는 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종,

식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인 암의 치료를 위한 것인, 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 페리오스틴(Periostin) 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 항암제 내성 진단용 키트.

청구항 9

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 항암제 내성 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 측정된 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높을 경우, 상기 목적하는 개체에 항암제 내성이 발생하였거나 발생할 가능성이 높은 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 방법은 페리오스틴(Periostin) 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

측정된 페리오스틴 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높을 경우, 상기 목적하는 개체에 항암제 내성이 발생하였거나 발생할 가능성이 높은 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 13

NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키는 제제는 NINJ2 단백질 또는 그 일부 부위에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 15

제 13항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 NINJ2 유전자 또는 그 일부 부위에 상보적으로 결합하는 안티센

스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 16

제 13항에 있어서,

상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성 폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인, 조성물.

청구항 17

서열번호 5 또는 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 항암제 내성 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키는 제제는 NINJ2 단백질 또는 그 일부 부위에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 20

제 18항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 NINJ2 유전자 또는 그 일부 부위에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 21

제 18항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조밍, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쑼알bum, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토푸린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 할티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸,

타목시펜, 토레미펜, 테스토락톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 22

NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 항암제 감수성 증진용 약학적 조성물.

청구항 23

서열번호 5 또는 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는, 항암제 감수성 증진용 약학적 조성물.

청구항 24

NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는, 항암제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 25

서열번호 5 또는 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는, 항암제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 26

NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포를 포함하는 항암제 내성 암 오가노이드.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 암 세포는 NINJ2 이소형 1(isoform 1) 및 이소형 3(isoform 3) 중 적어도 하나의 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시킨 것인, 항암제 내성 암 오가노이드.

청구항 28

인-비트로(in vitro)에서 NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포, 또는 제 26항 또는 제 27항의 암 오가노이드에 대하여 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보 물질의 처리 후 상기 암 세포 또는 암 오가노이드에 대하여 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정하거나 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 항암제 내성 치료용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서,

상기 측정하는 단계 시 CD44 및 페리오스틴 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 발현 수준을 측정하거나 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 더 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 30

제 28항에 있어서,

상기 후보 물질의 처리 후 측정된 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준이 감소하거나, 혹은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소한 경우, 상기 후보 물질을 항암제의 내성 치료용 약물로 판별하는 단계를 더 포함하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암제 내성을 진단하고, 더 나아가 내성을 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망 원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 특히 위암은 2018년 전 세계에서 5번째로 가장 빈번하게 진단되었으며 지난 10년간 암 진단과 치료에 있어 다양한 항암 요법이 비약적으로 발전하고 있지만, 암 발병으로 인한 치사율은 여전히 높다. 또한 다양한 항암제 및 여러 항암 요법을 시도할 때 수반되는 부작용도 여전히 존재한다. 이러한 부작용을 줄이기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0003] 위암 환자에 대한 수술 전 화학 요법 또는 화학 방사선치료의 병행은 수술만을 단독으로 진행하는 경우와 비교하여 생존율을 향상시킨다. 2017년 NCCN(National Comprehensive Cancer Network) 가이드 라인에 따르면, 위암의 첫 번째 화학 요법 중 하나로 에피루비신, 시스플라틴, 및 플루오로우라실(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)의 3가지 약물의 병용 치료를 제시하였는데, 이는 1991년 영국 로얄 마르스덴병원(Royal Marsden Hospital)에서 처음 개발되었다. 수술 전 ECF를 병용하여 치료한 그룹의 5년간 생존율은 수술을 단독으로 진행하는 경우와 비교하여 약 15% 이상 생존 이점이 있음을 확인한 바 있다. 이러한 이점에도 불구하고 상기 약물들에 대한 저항성(drug resistance)은 성공적인 항암 치료 효과를 반감시키는 주된 요소로 위암의 예후를 나쁘게 한다. 암 세포에서의 약물 저항성(chemo-resistance)은 기존에 내재되어 있던 약물 저항성(pre-existing of resistance-mediating factor)과 약물 투여로 인하여 새롭게 획득된 약물 저항성(acquired drug resistance)으로 나뉜다(Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nat Rev Cancer. 2013 Oct;13(10):714-26.).

[0004] 후천적으로 획득된 약물 저항성을 일으키는 요인으로서는 약물 유출 증가, 약물 표적의 돌연변이 발생, DNA 손상 복구, 대체 신호 경로의 활성화 또는 약물 저항성에 의해 유도된 세포 사멸의 회피 등을 예로 들 수 있다. 이렇듯 약물 내성을 지닌 환자에게 해당 약물로 치료한다 할지라도 치료의 효과를 보장할 수 없어 임상 의사 및 환자들의 시간 및 비용이 불필요하게 소모되는 상황이 발생할 가능성이 존재하게 된다. 따라서 항암 치료를 시작할 시에는 치료에 따른 환자의 개개인별 특성을 고려하여 결정하여야 하며, 무작정 치료를 감행하기보다는 개개인에게 맞는 맞춤형 약제를 선택적으로 사용할 수 있도록 특정 바이오 마커를 통해 미리 치료 효율을 가늠할 수 있는 척도가 현실적으로 필요한 상황이다. 이렇듯 상기 약물들에 대한 내성과 관련된 연구는 거의 없는 실정하기에 본 발명자들은 ECF에 내성이 있는 환자를 미리 선별할 수 있는 마커를 발굴함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 항암제 내성을 진단하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 항암제 내성을 진단하는 키트를 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 암을 예방 또는 치료하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성을 치료하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 감수성을 증진시키는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성 암을 예방 또는 치료하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성 암 오가노이드를 제공하고자 한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물이나 항암제 감수성 증진용 약물의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.
- [0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0016] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0018] **1. 항암제 내성 진단의 용도**
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 항암제 내성 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명에서 상기 진단용 조성물은 NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 "NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2)"이란 이 유전자에 의해 인코딩된 단백질은 신경 손상을 유도하는 닌저린 패밀리에 속한다. 손상된 신경의 원위 부분을 둘러싼 Schwann 세포에서 상향 조절되고 신경 돌기 성장을 촉진하여 신경 손상 후 신경 재생에 역할을 할 수 있는 세포 표면 접착 단백질을 말한다. 상기 NINJ2 단백질 및 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있으며(Gene ID: 4815), NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 이소형 1(isoform-1), 이소형 2(isoform-2), 이소형 3(isoform-3)을 포함한 다양한 형태의 변이체(variants)가 존재한다. 본 발명에서 사용된 NINJ2 이소형 1과 이소형 3의 아미노산 서열을 서열번호 1 및 서열번호 2에 나타내었으며, NINJ2 이소형 1과 이소형3 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 서열번호 3 및 4에 나타내었다. 본 발명에서 상기 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 인간 유래이지만, 인간에 한정하지 않고 다양한 종을 모두 포함시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 "NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자"는 서열번호 1로 표시되는 NINJ2 이소형1의 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시되는 NINJ2 이소형3의 아미노산 서열, 서열번호 3으로 표시되는 NINJ2 이소형1의 염기 서열, 또는 서열번호 4로 표시되는 NINJ2 이소형3의 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비제한적인 예에서 상기 NINJ2의 서열과 99% 이상 내지 100% 미만, 95% 이상 내지 99% 미만, 90% 이상 내지 95% 미만, 85% 이상 내지 90% 미만, 또는 80% 이상 내지 85% 미만의 상동성을 가지는 경우일 수 있으며, 당해 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 목적하는 효과를 발휘한다는 것이 자명한 범위 내에서 이에 제한 없이 모두 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 "약제" 또는 "항암 치료제"와 "항암제"는 혼용하여 사용될 수 있으며, 상기 항암제는 암 줄기세포 뿐만 아니라 암 세포를 사멸시켜 항암 효과가 있는 약물에 해당하며, 보다 바람직하게는 위암 치료 효과가 있는 약물을 말한다.
- [0024] 본 발명에서 상기 "항암제"란 암 세포를 사멸시키는 기전을 가진 약물로서 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 만데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조밐, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드,

다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렙투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모페, 팔티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토토펀칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클루루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락솔, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토락톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)일 수 있다. 또한, ECF와 동일 계열에 속하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에서 상기 "에피루비신(Epirubicin)"은 안트라사이클린(anthracyclines) 계열로 분류되는 항암제의 일종으로, DNA에 결합하여 DNA와 RNA 합성을 억제하며, DNA 회전효소(topoisomerase 2)에 의해 DNA cleavage를 유도하여 암세포를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이와 함께 자유 라디칼 생성을 통해 DNA에 손상을 줄 수 있으며 동일 계열의 약물의 예로는 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin) 등이 존재한다.

[0026] 본 발명에서 상기 "시스플라틴(Cisplatin)"은 백금(platinum) 계열로 분류되는 항암제의 일종으로, DNA의 크로스링크를 통해 DNA 수선, 및 DNA 합성을 억제한다. Platinum 계열 항암제들의 예로는 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 네다플라틴(Nedaplatin), 트리플라틴 테트라니트레이트(Triplatin tetranitrate), 페난트리플라틴(Phenanthriplatin), 사트라플라틴(Satraplatin), 피코플라틴(Picoplatin) 등이 존재한다.

[0027] 본 발명에서 상기 "5-플루오로우라실(5-FU)"은 항대사제(antimetabolite)로 분류되는 항암제의 일종으로, 대사체(metabolite)를 억제하여 세포 분열과 종양 성장을 억제하기 위해 사용되는 것으로 알려져 있다. 항대사제 계열 항암제들의 예로는 6-메르캅토프린(6-Mercaptopurine; 6-MP), 카페시타빈(Capecitabine), 사이타라빈(Cytarabine), 플록스유리딘(Floxuridine), 플루다라빈(Fludarabine), 겐시타빈(Gemcitabine), 하이드록시카바마이드(Hydroxycarbamide), 메토티렉세이트(Methotrexate), 페메트렉세드(Pemetrexed), 포토트렉세이트(Phototrexate) 등이 존재한다.

[0028] 본 발명에서 상기 "ECF 병용 치료제"는 2017년 NCCN(National Comprehensive Cancer Network) 가이드 라인에 따르면, 위암의 첫 번째 화학 요법 중 하나로 제시된 바 있는 약물의 종류에 해당한다. 1991년 영국 로얄 마르스덴병원(Royal Marsden Hospital)에서 처음 개발된 약물로서, 수술 전 ECF를 병용하여 치료한 그룹의 5년간 생존율이 향상되는 것으로 알려져 있다. 그러나 ECF 약물의 경우 치료 후에 종양 개시 세포(Tumor initiator cell; TIC)가 증가하여 암이 재발하고 상기 약물에 대한 내성이 생기는 문제점이 존재한다. 따라서 다양한 작용 기전에 관한 연구가 진행 중에 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 ECF(에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실)와 동일 계열의 항암제는 동일한 기전으로 암세포를 억제하는 약물에 해당하므로, ECF 내성 세포에 의한 결과는 ECF 약물에만 한정되는 것은 아니며, 안트라사이클린 계열, 백금 계열, 및 항대사제 계열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 항암제에 동일하게 적용이 가능하다. 따라서 동일한 기전으로 작용하는 약물에 해당한다면, 상기에서 언급된 약물로 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에서 상기 "항암제 내성"이란 약물을 정량 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 감소하는 것을 말하며, 항암제 내성이 있는 환자에게 이전에 경험한 동일한 효과를 얻기 위해서는 그 사용량을 늘리거나 사용빈도를 증가시켜야 하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태를 말한다. 본 발명에서 NIN2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준의 변화를 정상 대조군과 비교하여 증가하는 경우 약제 내성이 있는 것으로 진단하였다.

[0031] 본 발명에서 상기 "진단"은 항암제에 대한 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 발병한 질환이 항암제 내성을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 또는 항암제 내성 암의 예후(예컨대, 해당 약물에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 상기 진단에 대한 정보를 제공하는 것을 포함하는 넓은 개념으로 정의한다.

- [0032] 본 발명의 "예후"란, 질병의 경과 및 사망 또는 생존의 결과를 미리 예측하는 행위를 말한다. 상기 예후 또는 예후 진단이란 질환의 경과가 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 전/후 질병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 예후는 항암제 치료, ECF 각 약물과 동일한 계열의 약물로 볼 수 있는 항암제 치료, 보다 바람직하게는 ECF 병용 치료 후 치료 반응성을 미리 예상하는 행위 또는 이를 토대로 ECF 병용 치료제의 사용 여부를 적절하게 선택하는 행위로 해석될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 "종양" 또는 "암"은 세포 주기가 조절되지 않아 세포 분열을 계속하는 질병으로서, 발생 부위에 따라 암종(Carcinoma)과 육종(Sarcoma)으로 나뉜다. 암종(Carcinoma)은 점막, 피부 같은 상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻하고, 육종(Sarcoma)은 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 등의 비상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻한다.
- [0034] 본 발명에서 상기 암 환자의 항암 치료는 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 이용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)를 이용할 수 있다. 또한, 상기 ECF 각 약물과 동일한 계열로 볼 수 있는 항암제에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에서 상기 예후는 암 환자의 상기 항암제 치료 후 치료 반응성일 수 있으며, 상기 항암제에 내성이 발생하는지 여부를 예측하는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 치료의 대상이 되는 질환으로 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징 지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 항암제 내성 진단용 조성물은 페리오스틴(Periostin) 및 CD44 단백질 중 적어도 하나; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 "페리오스틴(Periostin)"이란 POSTN, PN 또는 조골 세포 특이적 인자(osteoblast-specific factor OSF-2)로도 명명되며 인간에서 POSTN 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 말한다. 페리오스틴 단백질은 알파-V/베타-3(alpha-V/beta-3) 및 알파-V/베타-5(alpha-V/beta-5) 인테그린에 대한 리간드로 작용하여 상피 세포의 부착 및 이동을 가능하게 하는 것으로도 알려져 있다. 페리오스틴 단백질은 gla 도메인 비타민 K 의존 인자이며, 많은 암에서 페리오스틴은 암 세포의 인테그린에 결합하여 Akt/PKB 및 FAK 매개 신호 전달 경로를 활성화하여 세포 생존, 침입, 혈관 신생, 전이 및 상피-간엽 전이를 증가시키는 것으로도 알려진 바 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 페리오스틴 단백질 및 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있으며(Gene ID: 10631), 본 발명에서 사용된 페리오스틴의 아미노산 서열을 서열번호 7에 나타내었다. 본 발명에서 상기 페리오스틴 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 인간 유래이지만, 인간에 한정하지 않고 다양한 종을 모두 포함시킬 수 있다. 비제한적인 예에서 상기 페리오스틴의 서열과 99% 이상 내지 100% 미만, 95% 이상 내지 99% 미만, 90% 이상 내지 95% 미만, 85% 이상 내지 90% 미만, 또는 80% 이상 내지 85% 미만의 상동성을 가지는 경우일 수 있으며, 당해 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 목적하는 효과를 발휘한다는 것이 자명한 범위 내에서 이에 제한 없이 모두 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 "CD44"란 세포 또는 약물 내성 암 세포와 같은 암 줄기세포의 원형질막에서 발현되는 표지자로서, 보다 상세하게는 CD44 항원은 세포-세포 상호 작용, 세포 부착 및 이동에 관여하는 세포-표면 당 단백질을 말한다. CD44는 종양 생성, 암 줄기 세포의 가소성 및 내 화학성에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 CD44 단백질 및 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있으며(Gene ID: 960), 본 발명에서 사용된 CD44의 아미노산 서열을 서열번호 8에 나타내었다. 본 발명에서 상기 CD44 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 인간 유래이지만, 인간에 한정하지 않고 다양한 종을 모두 포함시킬 수 있다. 비제한적인 예에서 상기 CD44의 서열과 99% 이상 내지 100% 미만, 95% 이상 내지 99% 미만,

90% 이상 내지 95% 미만, 85% 이상 내지 90% 미만, 또는 80% 이상 내지 85% 미만의 상동성을 가지는 경우일 수 있으며, 당해 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 목적하는 효과를 발휘한다는 것이 자명한 범위 내에서 이에 제한 없이 모두 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 상기 항암제 내성 진단용 조성물에서 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에서 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당 업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당 업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당 업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 "올리고펩타이드"는 펩타이드로 2 내지 20 개의 아미노산으로 구성되며 디 펩티드, 트리 펩티드, 테트라 펩티드 및 펜타 펩티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 "앵타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

[0047] 본 발명의 상기 항암제 내성 진단용 조성물에서 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA,

mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

- [0050] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA: 올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 NINJ2, 페리오스틴 또는 CD44 단백질이나, 이들을 코딩하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당 업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.
- [0054] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 상기 항암제 내성 진단용 조성물을 포함하는 항암제 내성 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0055] 본 발명에서 상기 "키트"는 바이오 마커 성분에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 항체를 검출 가능한 표지로 표지하여 바이오 마커의 발현 수준을 평가할 수 있는 도구를 말한다. 프로브 또는 항체 관련하여 검출 가능한 물질을 기질과의 반응에 의해서 직접적으로 표지하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 발색하는 표지체가 접합된 간접적 표지도 포함한다. 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 기타 다른 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하여 제작될 수 있다. 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 HPD 예후 예측용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 당 업계에 공지되어 있는 것이라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산 서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로써, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명의 항암제 내성 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명의 항암제 내성 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질

또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

- [0060] 본 발명의 항암제 내성 진단용 키트에서 항원-항체 결합반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 또한, 본 발명의 항암제 내성 진단용 키트에서 2차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(폴리 L-라이신-플루오르세인 아이소티오시아네이트), RITC(로다민-B-아이소티오시아네이트) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 또한, 본 발명의 항암제 내성 진단용 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS[2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD(o-페닐렌디아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 마커 단백질들의 존재 유무를 검출한다.
- [0063] 본 발명의 항암제 내성 진단용 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충 용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액(H₂SO₄)이 바람직하게 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명의 상기 방법은 상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 NINJ2 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 항암제 내성 발생의 유무를 선별하기 위한 것일 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체로, 인간을 포함하는 포유 동물일 수 있고, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명에서 상기 방법은 페리오스틴 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 상기 단백질의 발현 수준의 측정은 단백질 칩 분석, 면역 측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역

분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)에 의해 수행될 수 있다.

- [0073] 또한, 본 발명에서 상기 단백질의 발현 수준의 측정은 다중 반응 모니터링 (multiple reaction monitoring; MRM) 방법에 의할 수 있다.
- [0074] 본 발명에서 상기 다중 반응 모니터링 방법 시 내부 표준 물질은 타깃 펩타이드를 구성하는 특정 아미노산을 동위원소로 치환한 합성 펩타이드 또는 대장균 베타 갈락토시다아제를 사용할 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 상기 NINJ2 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명에서 상기 페리오스틴 단백질은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명에서 상기 CD44 단백질은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에서 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0079] 본 발명에서 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준의 측정은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩에 의할 수 있다.
- [0080] 본 발명에서 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 본 발명의 정보 제공 방법에서 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid), 앵타머(aptamer) 등에 관한 기재와 프라이머, 프로브 등에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0082] 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높을 경우, 상기 목적하는 개체에 항암제 내성이 발생하였거나 발생할 가능성이 높은 것으로 예측되어, 상기 항암제에 대한 치료 반응성이 낮거나 더 나아가서는 암 치료 예후가 좋지 않을 것으로 예측할 수 있다.
- [0083] 또한, 본 발명에서는 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높은 경우 외에도, 추가적으로 페리오스틴 및 CD44 단백질 중 적어도 하나 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높을 경우, 상기 목적하는 개체에 항암제 내성이 발생하였거나 발생할 가능성이 높은 것으로 예측되어, 상기 항암제에 대한 치료 반응성이 낮거나 더 나아가서는 암 치료 예후가 좋지 않을 것으로 예측할 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 "대조군"이란 항암제 내성이 발생하지 아니한 정상 대조군이거나, 항암제 감수성 세포에서의 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준의 평균 내지 중간 값일 수 있다. 대조군에서의 마커 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 발현량과 분석 대상이 되는 암 환자 유래의 생물학적 시료에서의 마커 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 발현량을 비교할 수 있으며, 상기 발현량의 유의한 변화 여부를 판단하여 항암제 내성 여부를 진단할 수 있다. 상기 정상 대조군 시료의 범위로는 해당 항암제에 대하여 내성을 획득하지 않은 것으로 확인된 암 환자 유래의 세포, 이의 배양액, 혈액, 혈청, 혈장, 및 조직도 포함된다.
- [0085] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙류세탄, 햅타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀뮴 키토산,

젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)일 수 있다. 또한, ECF와 동일 계열에 속하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명에서 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0088] 2. 암의 치료 및 항암제 내성 치료 용도

[0089] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0090] 본 발명의 상기 조성물에서, 상기 암은 목적하는 개체에서 발병 되었거나 발병될 가능성이 있는 암으로, 바람직하게는 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 대조군에 비하여 높게 발현되는 암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서 상기 대조군은 정상 개체의 해당 조직에서의 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 이의 평균 값 또는 이의 중앙 값이거나; 암 또는 해당 암에서의 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준, 또는 이의 평균 값 또는 이의 중앙 값일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명의 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0092] 본 발명의 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 암 세포의 제어되지 않은 성장 등에 의해 발생하는 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0093] 본 발명의 상기 "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 암 세포의 제어되지 않은 성장 등에 의해 발생한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0094] 본 발명의 상기 조성물은 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0095] 본 발명에서 상기 NINJ2 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0096] 본 발명의 상기 조성물은 페리오스틴 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 추가로 더 포함할 수 있다.

- [0097] 본 발명에서 상기 페리오스틴 단백질은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 본 발명에서 상기 CD44 단백질은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0099] 본 발명의 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 단백질 또는 그 일부 부위에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 표적 NINJ2 단백질에 직접적으로 작용하여 그의 활성 또는 발현이 저해되는 효과를 도출하는 수단에 해당하는 것으로 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 공지된 기술에 의하여 용이하게 도출 가능한 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함할 수 있다.
- [0100] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스 (Peptide Minetics)"는 NINJ2의 활성 억제제를 이끄는 NINJ2 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어 (Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류 (Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce chemical co. Rockland, IL, 1985), 아제핀 (Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀 (Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β -아미노알콜 (Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환 (Garvey et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0101] 본 발명에서 상기 "앵타머 (Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산 (DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 앵타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후 (Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앵타머들이 계속해서 발굴되었다. 앵타머는 고유의 높은 친화성 (보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [0102] 본 발명에서 상기 "항체"는 상기 단백질 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.
- [0103] 여기서, 상기 다클론 항체는 상기 단백질을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 속주로부터 만들어질 수 있다.
- [0104] 또한, 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.
- [0105] 또한, 상기 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다.
- [0106] 본 발명에서 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질 (solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리 섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.
- [0107] 본 발명에서 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제는 NINJ2 단백질의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 바람직하게는 본 발명의 조성물은 상기 NINJ2 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있으며, 여기서, 상기 항체는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되

는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0108] 본 발명의 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 바람직하게는 상기 유전자 또는 그 일부 부위에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA) 및 리보자임 (ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 표적 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자에 직간접적으로 작용하여 그 발현이 저해되는 효과를 도출하는 수단에 해당하는 것으로 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 공지된 기술에 의하여 용이하게 도출 가능한 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함할 수 있다.
- [0109] 본 발명의 일 예시로 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 일부인 서열번호 5 또는 6으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA) 및 리보자임 (ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0110] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다. 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주 흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [0111] 본 발명에서 상기 "shRNA" 및 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 킥다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열 간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 또한, siRNA는 이중 가닥 RNA(dsRNA)에 의해 타겟이 되는 mRNA를 변형시켜 RNA 간섭 현상(RNA interference; RNAi)을 유도하게 되는 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 이중 가닥의 RNA 단편에 해당하는 것을 말한다.
- [0112] 본 발명에서 상기 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 상기 NINJ2를 코딩하는 유전자에 특이적으로 작용하여 NINJ2의 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭 (RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 NINJ2의 발현을 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.
- [0113] 본 발명의 일 예시로 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 서열번호 9 또는 10으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 shRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0114] 본 발명의 다른 일 예시로 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 서열번호 11 및 12로 표시되는 염기 서열로 이루어진 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0115] 본 발명에서 상기 "리보자임 (ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, NINJ2 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지된 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0117] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성을 치료하거나 항암제 감수성을 증진시키는 약학적 조성물에

관한 것이다.

- [0118] 본 발명의 상기 항암제 내성 치료 또는 항암제 감수성 증진용 약학적 조성물은 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0119] 본 발명의 일 예시로 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 일부인 서열번호 5 또는 6으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA) 및 리보자임 (ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0120] 본 발명의 상기 조성물은 페리오스틴 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0121] 본 발명에서 상기 "항암제 내성"이란 항암제를 정량 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 감소하는 것을 말하며, 항암제 내성이 있는 환자에게 이전에 경험한 동일한 효과를 얻기 위해서는 그 사용량을 늘리거나 사용 빈도를 증가시켜야 하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태를 말한다.
- [0122] 본 발명에서 상기 "내성 치료"란 항암제를 정량 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 감소하거나, 항암제 내성이 있는 환자에게 이전에 경험한 동일한 효과를 얻기 위해서는 그 사용량을 늘리거나 사용 빈도를 증가시켜야 하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태를 회복시키는 작용을 말한다. 보다 구체적으로 항암제를 보다 적은 횟수 또는 보다 적은 용량을 적용하여도 동일한 항암 효과가 나타나게 만들거나 항암제 내성이 발생하기 이전 상태로 되돌려 이전과 같은 용량 또는 이보다 적은 용량의 물질을 투여해도 같은 효과를 얻을 수 있는 상태로 만드는 작용을 말한다.
- [0123] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 케피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쿰알부민, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 갠투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 알티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)일 수 있다. 또한, ECF와 동일 계열에 속하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0124] 본 발명에서 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [0125] 본 발명의 상기 항암제 내성 치료용 약학적 조성물 및 항암제 감수성 증진용 조성물에서 각 단백질 또는 이를

코딩하는 유전자, 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제 등에 대한 기제는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

- [0127] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0128] 본 발명의 상기 조성물은 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0129] 본 발명의 일 예시로 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자의 일부인 서열번호 5 또는 6으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA (short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA) 및 리보자임 (ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0130] 본 발명의 상기 조성물은 페리오스틴 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0131] 본 발명의 상기 조성물은 항암제 저항성이 있는 항암제 내성 암을 매우 효과적으로 치료할 수 있다. 본 발명의 상기 조성물은 항암제 내성을 가진 암의 항암제 저항성을 낮추는 동시에 항암제 감수성을 높여 줌으로써 암의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0132] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 칼티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모줄로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레타민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락솔, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)일 수 있다. 또한, ECF와 동일 계열에 속하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0133] 본 발명에서 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [0134] 본 발명의 상기 항암제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 각 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자, 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제 등에 대한 기제는 암의 예방 또는 치료용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0135] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할

수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0136] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서 (Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0137] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0138] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0139] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개 골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0140] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1 일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg 으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0142] **3. 항암제 내성 암 오가노이드**
- [0143] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 암 오가노이드에 관한 것이다.
- [0144] 본 발명에서 상기 암 오가노이드는 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포를 포함한다.
- [0145] 본 발명에서 상기 NINJ2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 NINJ2 이소형 1 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 이소형 3 중 적어도 하나일 수 있다.
- [0146] 본 발명에서 상기 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 NINJ2 이소형 1의 유전자 및 서열번호 4로 표시되는 염기 서열로 이루어진 이소형 3의 유전자 중 적어도 하나일 수 있다.
- [0147] 본 발명에서 상기 암 세포는 페리오스틴 및 CD44 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 발현하는 것일 수 있다.
- [0148] 본 발명에서 상기 페리오스틴 단백질은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0149] 본 발명에서 상기 CD44 단백질은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0150] 본 발명에서 상기 암 세포는 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 과발현되도록 조작된 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 암 세포 내로 도입되어 형질 감염된 것일 수 있다.
- [0151] 본 발명에서 상기 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 벡터는 목적 유전자 발현을 위한 요소(elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자(operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보솜 결합 부위(ribosome binding site; RBS), IRES (Internal Ribosome Entry Site) 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 벡터는 프로모터로서 상기한 융합 폴리뉴클레오타이드(융합 프로모터)를 갖도록 통상적인 유전공학적인 방법으로 조작된 것일 수 있다. 상기 벡터는 상기 프로모터 이외의 전사 조절 서열(예컨대 인핸서 등)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0152] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터일 수 있으며, 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스 벡터, 아데노-부속 바이러스 벡터 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 비바이러스성 벡터로는 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 리포솜, 세균인공염색체, 효모인공염색체 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0153] 본 발명에서 상기 재조합 벡터에서 상기 목적 유전자는 상기 융합 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 유전자 발현 조절 서열과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 유전자 발현 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다. 상기 재조합 벡터에 있어서, 상기 융합 폴리뉴클레오타이드가 상기 목적 유전자에 작동 가능하게 연결되기 위해서, 상기 융합 폴리뉴클레오타이드는 상기 목적 유전자의 5' 말단에 연결된 것일 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터는, 발현시키고자 하는 목적 단백질의 암호화 유전자가 작동 가능하게 연결될 경우, 적절한 숙주 세포에서 상기 목적 단백질을 높은 효율로 발현시킬 수 있는 목적 단백질의 발현 벡터로 사용될 수 있다.
- [0154] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 전사 조절 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 전사 조절 서열은 폴리아데닐화 서열(pA)과 같은 전사 종결 서열; f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, BBV 복제원점 등의 복제 원점 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0155] 또한, 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 선별 마커를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 재조합 벡터가 숙주 세포 내에 성공적으로 도입되었는지 여부를 확인하거나 안정적인 세포주 구축을 위한 유전자로서, 예컨대, 항생제와 같은 약물 저항 유전자, 대사 관련 유전자, 유전자 증폭 유전자 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0156] 본 발명에서 상기 재조합 벡터의 암 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예컨대, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법(electroporation), 초음파 천공법(sonoporation), 자기장을 이용한 자기주입법(magnetofection), 리포솜-매개 형질감염법, 유전자 밤바드먼트(gene bombardment), 덴드리머 및 무기(inorganic) 나노 입자의 사용 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0157] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쑼알부, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토타렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 란티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레타민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라

졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토락톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)일 수 있다. 또한, ECF와 동일 계열에 속하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0158] 본 발명에서 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0159] 본 발명의 상기 NINJ2 또는 이를 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포는 항암제에 대한 내성을 보여, 본 발명의 목적상 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물이나, 항암제 감수성을 증진시킬 수 있는 약물 등을 스크리닝하는 데에 사용될 수 있는 암 오가노이드를 형성할 수 있다.

[0160] 본 발명의 상기 "오가노이드"는 3D 입체구조를 가지는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통해 제조한 조직과 유사한 모델을 의미한다. 2D 배양과는 달리, 3D 세포 배양은 체외에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있다.

[0162] 4. 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물 또는 항암제 감수성 증진용 약물의 스크리닝 방법

[0163] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물 또는 항암제 감수성 증진용 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0164] 본 발명의 스크리닝 방법은, 인-비트로(in vitro)에서 NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포, 또는 본 발명에서 제공하는 암 오가노이드에 대하여 후보 물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보 물질의 처리 후 상기 암 세포 또는 암 오가노이드에 대하여 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정하거나 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0165] 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다.

[0166] 본 발명에서 상기 암 세포는 목적하는 개체, 바람직하게는 항암제에 대해 내성이 있거나 있을 가능성이 높은 개체로부터 분리된 것이거나, NINJ2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 과발현되도록 조작된 것일 수 있고, 바람직하게는 NINJ2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 암 세포 내로 도입되어 형질 감염된 것일 수 있다.

[0167] 또한, 본 발명에서 상기 암 세포는 CD44 및 페리오스틴 단백질 중 적어도 하나 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 발현하는 것일 수 있고, 혹은 CD44 및 페리오스틴 단백질 중 적어도 하나 또는 이를 코딩하는 유전자가 과발현되도록 조작된 것일 수 있으며, 바람직하게는 CD44 및 페리오스틴 단백질 중 적어도 하나의 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 암 세포 내로 도입되어 형질 감염된 것일 수 있다.

[0168] 본 발명에서 상기 후보 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0169] 또한, 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정하거나 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것 외에, CD44 및 페리오스틴 단백질 중 적어도 하나의 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정하거나 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0170] 본 발명에서 상기한 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머

(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

- [0171] 본 발명에서 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0172] 본 발명에서 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0173] 본 발명에 따른 단백질이나 이를 코딩하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.
- [0174] 본 발명에서 상기 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0175] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 암 세포 또는 암 오가노이드에서 측정된 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준이 감소하거나, 혹은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소한 경우, 상기 후보 물질을 항암제의 내성 극복 또는 치료용 약물 또는 항암제 감수성 증진용 약물로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0176] 또한, 본 발명에서는 상기 후보 물질의 처리 후 상기 암 세포 또는 암 오가노이드에서 NINJ2 단백질의 활성 또는 발현 수준이 감소되거나, 혹은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소된 것 외에도, 추가적으로 CD44 및 페리오스틴 단백질 중 적어도 하나의 단백질의 활성 또는 발현 수준이 감소하거나 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소한 경우, 상기 후보 물질을 항암제의 내성 극복 또는 치료용 약물 또는 항암제 감수성 증진용 약물로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0177] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스콕알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(Cisplatin) 및 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF)일 수 있다. 또한, ECF와 동일 계열에 속하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0178] 본 발명에서 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종,

질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 세포 및/또는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0179] 본 발명의 스크리닝 방법에서 제조합 벡터 및 도입 등에 대한 기재는 항암제 내성 암 오가노이드에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[0180] 본 발명을 이용하는 경우 항암 치료에 사용되는 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실 등의 항암제에 대한 내성을 진단할 수 있어, 임상이가 항후 암 환자에 대한 치료 계획 수립 시 상기 계열의 항암제 사용의 적합성을 투약 전에 미리 예측하여 적절한 대체 항암제를 사용할 수 있도록 함으로써 환자의 신체적, 정신적 그리고 금전적 부담을 줄일 수 있으며, 중국적으로는 환자의 암 치료 효과를 보다 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[0181] 뿐만 아니라, 본 발명을 이용하는 경우 상기 항암제에 대한 내성을 극복하고 더 나아가서는 항암제 내성 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0182] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 각 세포주에 대한 ECF 약물의 투여 과정을 나타낸 도이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 약물의 내성이 없는 모세포와 ECF 약물에 내성이 있는 세포에서 대표적 IC₅₀ 값을 나타낸 도이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 약물의 내성이 없는 모세포와 ECF 약물에 내성이 있는 세포에서 대표적 IC₅₀ 값을 나타낸 도이다.

도 1d는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 약물의 내성이 없는 모세포(parent cell)와 내성이 있는 세포(ECF-resistant cell; ECF-R)가 이종 이식된 종양 마우스 모델에 ECF 주입 후 종양 부피 변화를 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 약물에 대한 내성이 있는 세포주에서 공통으로 나타나는 유전자를 히트맵(Heatmap)을 이용하여 선별하는 과정을 나타낸 도이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 약물의 내성이 없는 모세포(parent cell)와 내성이 있는 세포(ECF-resistant cell; ECF-R)에서 NINJ2 단백질의 발현 수준을 qRT-PCR로 정량 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 약물의 내성이 없는 모세포(parent cell)와 내성이 있는 세포(ECF-resistant cell; ECF-R)에서 NINJ2 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블랏 분석으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-74 세포주로부터 유도된 야생형 세포와 ECF 내성 세포(ECF-R)에서 NINJ2의 표면 발현을 FACS로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-74 세포주로부터 유도된 야생형 세포와 ECF 내성 세포(ECF-R)에서 CD44의 표면 발현을 FACS로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-74 세포주로부터 유도된 ECF 내성 세포(ECF-R)에서 게이트 NINJ2(-) 및 NINJ2(+) 군집에서 CD44 발현을 FACS로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-74 세포주로부터 유도된 야생형 세포와 ECF 내성 세포(ECF-R)에서 각 마커(CD44 및 NINJ2)의 발현량을 면역형광염색을 통해 형광 이미지로 나타낸 도이다.

도 4e는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-74 세포주로부터 유도된 종양 스피어에서 각 마커(CD44 및 hNINJ2)의 발현 정도를 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다.

도 4f는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-74 세포주로부터 유도된 종양 스피어에서 각 마커(CD44 및 hNINJ2)의 발현 정도를 면역형광염색법을 통하여 확인한 도이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 ECF 처리에 의한 대표적 IC₅₀ 값을 나타낸 도이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 CD44 mRNA 발현 정도를 qRT-PCR로 확인한 도이다.

도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 CD44^{high} 세포의 비율을 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인한 도이다.

도 5d는 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 인-비트로 한계 희석법(limiting dilution analysis)을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 5e는 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 형성된 종양 스펙터의 수를 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 세포 주기 변화를 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인한 도이다.

도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 안정한 NINJ2-HaloTag MKN-74 암 세포로부터 NINJ2/페리오스틴 상호작용을 확인하고자 HaloTag 풀다운 시스템 (G6504, Promega)을 사용하여 면역 블롯팅 분석(co-immunoprecipitation; co-IP)한 결과를 나타낸 도이다.

도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 저항성 MKN-74 암세포에서 mRNA를 분리하여 qRT-PCR을 통해 페리오스틴 mRNA의 발현 정도를 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 7c는 본 발명의 일 실시예에 따른, NINJ2 이소형(Iso-1 및 Iso-3) 과발현 MKN-74 세포주에서 높게 발현된 단백질을 웨스턴 블롯팅한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, ECF 내성 MKN-74 세포주에 인간 NINJ2 타겟 shRNA 렌티바이러스 입자(Clone-1, Clone-2)를 도입시킨 뒤 ECF 약물 투여 후 크리스탈 바이올렛 염색(crystal violet staining) 및 WST-1 분석(WST1 assay)을 통해 세포 생존력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9a 및 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른, MKN-28/74 세포주로부터 야생형 또는 스크램블 siRNA RES 및 siNINJ2 RES 암 세포주를 누드 마우스에 이식한 뒤 종양이 100 mm² 크기에 달할 때까지 기다린 후 ECF 및 siRNA를 투여한 뒤 종양 크기 및 무게 변화를 확인한 도이다.

도 10a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 모-오가노이드와 ECF 내성 인간 위암 오가노이드의 형태와, ECF에 대한 대표적 IC₅₀ 값을 나타낸 도이다.

도 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 모-오가노이드와 ECF 내성 인간 위암 오가노이드에서 인간 NINJ2와 CD44의 mRNA 발현 수준을 비교한 결과를 확인한 도이다.

도 10c는 본 발명의 일 실시예에 따른, 부분 반응(PR), 안정 병변(SD) 및 질병 진행(PD)을 보이는 위암 종양 환자의 조직학적 분석을 통해 NINJ2 스코어링을 분석한 도이다.

도 10d는 본 발명의 일 실시예에 따른, 공용 데이터를 통해 위암 환자의 전체 생존기간(OS)에 대한 카플란-마이어 커브를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0183] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0185] 실시예 1: 항암제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF) 내성 세포의 준비

[0186] 에피루비신, 시스플라틴 및 5-플루오로우라실을 포함하는 ECF 병용 치료제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF) 내성 위암 세포를 얻기 위하여, 우선 1 차 인간 위암 세포주(SNU-488 및 SNU-520)와, 전이성 인간 위암 세포주(MKN-28/74, MKN-74, MKN-45, 및 SNU-668)를 준비하였다. 이후, 도 1과 같이 상기 위암 세포주 각각에 ECF IC₅₀, IC₇₀ 및 IC₈₀를 점진적으로 처리한 뒤, 암 세포주에 약물-온(drug-on) (3일) 그리고 약물-오프(drug-off) (1 ~ 3주)의 주기를 2 달 초과로 장기간 유지하였다. ECF-내성 위암 세포주가 형성되었는 지 확

인하기 위하여, 인-비트로 및 이중이식 동물모델에서 약물 반응성을 평가하였다. 그 결과, 모세포에 비하여 1 차 및 전이성 위암 세포주에서 ECF-내성 위암 세포주의 IC₅₀가 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 1b 및 1c). 이중이식 동물 모델의 경우, ECF-내성 위암 세포주 유래 종양의 크기가 점차 증가하였으나, 대조군에서는 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 1d).

[0188] **실시예 2: 항암제(Epirubicin, Cisplatin 및 5-Fluorouracil; ECF) 저항성 유전자의 선별 및 NINJ2 바이오 마커의 ECF 내성 진단 가능성 확인**

[0189] 2.1. NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2)의 선별

[0190] 상기 실시예 1로부터 ECF 내성 위암 세포를 수득하였으며, 야생형 세포에 비하여 ECF 약물에 대한 내성이 있는 세포주들에서 공통으로 나타나는 유전자를 선별하기 위하여 히트맵(Heatmap)을 이용하였다(도 2 참조). ECF 약물 저항에 관여하는 신규한 유전자는 mRNA를 통상의 과정에서 행해지는 프로토콜에 의하여 추출한 뒤, affymetrix HG-U133A, HG-U133 Plus 2.0 및 HG-U133A 2.0 플랫폼을 이용하여 mRNA 발현을 측정하였다. 상기 측정된 유전자 발현은 각각 하나의 유전자 발현 값으로 고정한 뒤, 상관관계를 분석하는 과정을 추가적으로 수행하여, 그 결과를 RNA 시퀀싱을 이용한 전사체 분석에 의해 특성화하여 확인하였다. 본 발명자들은 원형질 막 및 세포 부착 단백질의 필수 성분과 관련된 RES 및 WT(Wild type)에서 변화한 유전자에 집중하여 NINJ2(Nerve injury-induced protein 2; Ninjurin 2)의 바이오 마커를 최종적으로 선별할 수 있었다. 히트맵 결과를 참조하면, RES 세포주에서 이미 알려진 줄기세포 마커인 CD44와 마찬가지로 NINJ2의 유전자가 높게 발현되는 것으로 나타나 같은 경향을 띠는 것을 확인하였다(도 2 참조). 상기 마커를 이용함으로써 RES 세포주 즉, 상기 약물에 대한 내성을 가진 세포만을 선별할 수 있다.

[0191] 2.2. NINJ2 마커의 항암제(ECF) 내성 진단 가능성 검증

[0192] 상기에서 선별된 마커 중 NINJ2 마커의 항암제(ECF) 내성 진단이 가능한지를 검증하기 위해 세포 수준과 조직 수준에서의 추가 실험을 수행하였다. 먼저, ECF 내성 1 차 위암 세포주(SNU-488 및 SNU-520)와, 전이성 위암 세포주(MKN-28/74, MKN-74, MKN-45, 및 SNU-668)에 대하여 qRT-PCR 과정 및 웨스턴 블롯을 통하여 NINJ2 mRNA 및 단백질의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이, 모세포에 비하여 ECF 내성 위암 세포주에서 NINJ2의 mRNA와 단백질의 발현 정도가 현저하게 상승되는 것을 확인할 수 있었다.

[0194] **실시예 3: ECF 치료제 내성 위암 세포주에서 NINJ2와 CD44 마커의 상관관계**

[0195] 위암 개시 세포(gastric cancer initiating cells)에서 CD133, CD44, 알데히드탈수소효소 1 (ALDH1) 및 ATP-결합 카세트 서브 패밀리 G 구성원 2(ABCG2)가 발현되었다. 암 줄기세포는 통상적인 암 세포에 비하여 항암 치료 효과가 낮고 재발의 위험 또한 높은 것으로 잘 알려져 있다. CD44 또한 암 줄기세포에서 나타나는 지표 중의 하나로서 NINJ2가 높게 발현되는 ECF 내성 세포주에서 CD44 마커의 발현 정도가 높게 나타난 것을 확인하였다(도 4b 및 도 4c 참조). 또한, ECF 내성 MKN-74 세포 중 표면 NINJ2 양성 세포는 9.6%±1.3%인 반면, 모세포는 0.8%±0.09%이었고, ECF 내성 MKN-74 세포 중 표면 NINJ2 단백질 발현 세포는 13.4%±2.7%인 반면, 모세포는 1.4%±0.7%에 불과하였다(도 4a, 도 4b). NINJ2와 CD44 사이 상관 관계를 분석하기 위하여, ECF 내성 세포 중 NINJ2(+) 또는 (-) 세포에서 CD44 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 4c 및 도 4d에 나타낸 바와 같이, ECF 내성 세포 중 NINJ2(+) 세포군은 대부분이 CD44 고발현 세포인 반면, NINJ2(-) 세포군은 대부분 CD44(-) 세포인 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 ECF 내성 위암 세포에서는 NINJ2(+)CD44hi 위암 개시 세포가 현저히 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0196] 다음으로, 항암제 내성 군집으로 알려진 암 줄기 세포에서 NINJ2 발현을 평가하기 위하여, MKN-74 세포주를 성장 인자(growth factor)가 보충된 세럼 프리 배양배지(serum-free culture medium)에서 배양하여 암 스펜로이드를 제조하였다. MKN-74 유래 종양 스펜로이드에 대하여 qRT-PCR로 CD44 및 NINJ2 mRNA 발현 수준을 측정하고, 웨스턴 블롯을 통해 NINJ2 단백질의 발현 정도를 확인한 결과, 도 4e에서 보는 바와 같이 MKN-74 유래 종양 스펜로이드에서 CD44 및 NINJ2 mRNA 발현 수준과 NINJ2 단백질의 발현 수준이 현저히 증가하였다. 또한, 상기 배양된 스펜로이드는 슬라이드로 옮겨 1 %(w/v) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)를 넣어 세포를 고정하고, 30분 동안 인큐베이션한 후, PBS로 3회 세척하였다. 차단버퍼(BSA 1%, 트리톤 X-100 0.05%)를 넣고 30분 동안 인큐베이션하였다. NINJ2 항체(R&D Systems)를 처리하고 4 ℃에서 16 시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 20

분간 3 회 세척하였다. Alexa-488 태그가 달린 이차 항체(Thermo Fisher Scientific)를 넣고 1 시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 20 분간 3 회 세척하고, CD44 항체를 처리 후 4 °C에서 16 시간 동안 인큐베이션 후 PBS로 20 분간 3 회 세척하였다. Alexa-555 태그가 달린 이차 항체(Thermo Fisher Scientific)를 넣고 1 시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 20 분간 3 회 세척 후 DAPI 염색 후 공초점 현미경을 사용해 형광 이미지를 관찰하였다. 면역형광염색법(immunofluorescence)에 의해 형광 이미지의 확인 결과, 도 4f에서 보는 바와 같이, 상기 스페로이드에서 NINJ2 및 CD44의 공동 위치화를 확인하였고, NINJ2(+)CD44hi 위암 개시 세포는 스페로이드의 외곽에 위치하는 것을 확인하였다. 이를 통해 ECF 내성 위암 세포 중 NINJ2(+) 세포 군집은 주로 CD44 고발현 위암 개시 세포에 해당함을 알 수 있었다.

[0198] **실시예 4: NINJ2 과발현에 의한 암 줄기세포(cancer stem cell, cancer initiating cell)의 증가**

[0199] MKN-74 세포주에서 NINJ2를 과발현시키기 위하여, NINJ2 이소형1 (Isoform-1; Iso-1) (NP_057617.3)과 이소형3 (Isoform-3; Iso-2) (NP_001281275.1)를 pHTC HaloTag® CMV-neo 벡터 (Promega, G7711)에 클로닝하였다. 이후, ViaFect™ 형질 감염 시약을 이용하여 NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 벡터를 MKN-74 세포로 형질 감염시켰다. G-418 (Promega)을 포함하는 성장 배지로 형질 감염된 세포를 선별하였다. NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 위암 세포주에 대하여 ECF 처리 후 세포 생존율을 측정한 결과, 도 5a에서 보는 바와 같이, 모세포에 비하여 NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 위암 세포주의 생존율이 현저히 증가하였다. 또한, NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 위암 세포주에서 CD44 mRNA 발현 수준과 CD44 발현 세포의 수가 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 5b 및 도 5c).

[0200] 다음으로, 종양 형성 성질을 유도하는 위암 개시 세포의 빈도를 확인하기 위하여, 인-비트로 한계 희석법(limiting dilution analysis)에 의해 스피어 형성능을 분석하였다. 보다 구체적으로, NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 세포를 각각 2-폴드 희석으로 1,000 내지 8 cells/well을 96 웰 플레이트에 분주하였다. DMEM-F12에 20 ng/ml rhEGF, 20 ng/ml rhbFGF, 5 ug/ml 인슐린을 넣은 배양액으로 세포를 배양하였으며, ELDA (extreme limiting dilution assay) 분석법을 통해 정량하였다. 그 결과, 도 5d에 나타난 바와 같이, NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 위암 세포에서는 위암 개시 세포가 풍부하였다.

[0201] NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 세포 1,000 개를 24-웰 플레이트에 분주하고 상기에서와 마찬가지로 DMEM-F12에 20 ng/ml rhEGF, 20 ng/ml rhbFGF, 5 ug/ml 인슐린을 넣은 배양액으로 세포를 배양하였다. 10 일 후 종양구(tumorsphere)의 수를 확인하였다. 이때, 구의 크기는 $5,000 \mu m^2$ 이상으로 측정되는 경우에만 카운팅하였으며, 그 결과 NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현에 의해 종양구 수의 증가를 확인할 수 있었다(도 5e 참조).

[0203] **실시예 5: NINJ2 과발현에 의한 세포 주기 정지(cell cycle arrest) 증가**

[0204] 휴면(quiescence) 상태의 암 세포는 많은 항암제에 대해 저항성을 갖게 되는 주요 요인으로 알려져 있다. 이에 따라 본 발명자들은 NINJ2에 의한 세포 주기(cell cycle)의 변화를 확인하고자 하였다. 위암 세포주인 MKN-74로부터 NINJ2 Iso-1 및 Iso-3를 과발현시킨 세포에 브로모데옥 시우리딘(BrdU)을 첨가하여 추가로 1시간 동안 배양하였다. 안티 브로모데옥 시우리딘과 비스벤지마이드(hoeschest 33342) 염색 후 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 세포 주기를 검증하였다. 그 결과, NINJ2 Iso-1 및 Iso-3 과발현 위암 세포에서 G0/G1 주기로부터 항-증식 활성을 유도하는 S 주기로의 진행을 억제함으로써 세포 주기 정지가 현저히 증가된 것을 확인하였다(도 6 참조).

[0206] **실시예 6: ECF 약물 내성 유도 메커니즘의 확인**

[0207] NINJ2가 약물 내성을 유도하는 메커니즘을 조사하기 위해 NINJ2와 상호 작용을 하는 후보 단백질을 선별하고자 하였다. 이를 위하여 NINJ2 복합체를 제조업체의 지시에 따라 HaloTag 풀다운 시스템(G6504, Promega)을 사용하여 풀 다운(pull-down)시켜 액체 크로마토그래피 질량 분석 기기 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS)를 이용하여 분석하였다. NINJ2 상호 작용 단백질로서 페리오스틴(Periostin), PTPRk (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type K), RNA 결합 단백질 28 (RNA-binding protein 28) 및 섬유소원 감마 사슬(fibrinogen gamma chain)을 확인하였다. 상기 후보 단백질 중 약물 내성과 관계가 있는 것으로 알려져 있는 페리오스틴과 PTPRk 중 페리오스틴만이 ECF 약물 내성 유도와 관련이 있으며, NINJ2가 페리오스틴과

상호 작용을 하여 ECF 내성을 유도하는 것을 풀 다운 후 면역 블롯팅 분석을 통해 확인할 수 있었다(도 7a 참조). 추가로 ECF 내성이 있는 MKN74 세포주에서 페리오스틴의 발현 정도를 측정하여 보았다. 그 결과, ECF 내성이 있는 세포주에서 페리오스틴의 발현 정도가 NINJ2과 마찬가지로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다(도 7b 참조). 한편, NINJ2 과발현 위암 세포주를 사용하여 포스포-항체 분석(phospho-antibody array)을 수행한 결과 1.5 배 이상 상향 조절된 단백질로 4 개의 인산화 단백질인 VE-Cadherin (Phospho-Tyr731), VAV2 (Phospho-Tyr142), JunD (Phospho-Ser255) 및 ATF2 (Phospho-Ser112/94)를 확인하였고, 웨스턴 블롯을 통해 일관된 결과를 확인하였다(도 7c 참조). 상기 결과로부터 NINJ2가 VE-cadherin 활성화를 통해 VAV2, JunD 및 ATF2 경로를 ECF 약물 저항성을 유도하는 것임을 알 수 있다. 상기 결과를 종합적으로 고려하면, ECF 내성 진단을 위하여 NINJ2 마커뿐만 아니라 NINJ2와 상호 작용을 하는 페리오스틴 마커를 추가로 이용할 수 있음을 시사한다.

[0209] **실시예 7: ECF 내성 위암 세포주를 용한 shNINJ2의 내성 치료 가능성 확인**

[0210] NINJ2가 내성에 관여하는지 평가하기 위해 shRNA 렌티 바이러스 입자와 퓨로 마이신을 사용하여 안정적인 NINJ2 녹다운(knock-down; K/D) ECF 내성 암 세포주를 제조하였다. 보다 구체적으로 ECF 내성 MKN-74 세포에서 안정적인 NINJ2 녹다운을 위해, 하기 표 1에 나타난 NINJ2 유전자(Isoform-1, Isoform-2 및 Isoform-3)의 다른 일부 영역을 표적으로 하는 두 개의 shRNA로서 TRCN0000063773 (Clone-1) 및 TRCN0000063775 (Clone-2)를 이용하였으며, 음성 대조군은 비 표적화 pLKO.1-puro shRNA 대조군 (non-targeting pLKO.1-puro shRNA control; SHC002)을 이용하였다. 각각 pMDLg/pRRE, pRSV-Rev 및 pMD2.G 플라스미드가 포함된 shRNA 클론 (TRCN0000063773, TRCN0000063775 및 SHC002)은 제조사의 지침에 따라 Fugene HD (Promega)를 사용하여 293T 세포로 형질 감염시켰다. 48 시간 후, 상층액을 수집하고 여과하였으며, ECF 내성 MKN-74를 렌티 바이러스 입자에 의해 형질 도입하고 퓨로마이신을 포함하는 성장 배지에서 배양하였다. 렌티 바이러스 형질 도입된 MKN-74 세포는 qRT-PCR을 사용하여 NINJ2 녹다운된 것을 확인한 후 ECF 처리하여 음성 대조군(Mock)과 shNINJ2군(clone1 및 clone2)의 암세포의 재 증식 여부를 확인하였다.

표 1

유전자	클론	NINJ2 타겟 부위 서열	헤어핀 서열
NINJ2	TRCN0000063773	CGTGGTCATTGCACGGCTGAA(서열 번호 5)	5'-CCGG-CGTGGTCATTGCACGGCTGAA-CTCGAG-TTCAGCCGTGCAATGACCACG-TTTTGTG-3'(서열번호 9)
NINJ2	TRCN0000063775	CTGAACCTGAATGAGGTAGAA(서열 번호 6)	5'-CCGG-CTGAACCTGAATGAGGTAGAA-CTCGAG-TTCTACCTCATTCAGGTTTCAG-TTTTGTG-3'(서열번호 10)
Control	SHC002	-	5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTGTTGTTTTT-3'

[0212] 도 8에서 보는 바와 같이, ECF 처리 후 3 주 후에 크리스탈 바이올렛 염색 및 WST-1 분석한 결과 NINJ2 녹다운(K/D) 저항성 암세포(clone-1, clone-2)의 경우 음성 대조군(Mock)과 비교하였을 때 암세포의 재발 및 재성장 현저히 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세포 수준에서 NINJ2 녹다운 시 ECF 약물에 대한 내성이 극복된 것을 시사한다.

[0214] **실시예 8: ECF 내성 위암 세포주를 이식한 동물모델을 이용한 siNINJ2의 내성 치료 가능성 확인**

[0215] 8.1. ECF 내성 위암 세포주를 이식한 동물모델의 제조

[0216] Balb/c 누드 마우스에 MKN-28/74 세포주로부터 실시예 3의 방법으로 제조한 스페로이드를 이종이식하여 마우스 모델을 제조하였다. 구체적으로 Balb/c 누드 마우스에 10⁷ 개의 ECF 저항성 암세포(ECF-R cancer cell)와 모 암세포(parental cancer cell)를 피하 주사하였고, in vitro 상에서 확립된 ECF 저항성 암세포(RES)가 이종이식 모델에서 ECF 약물 내성이 획득되었는지를 확인하였다. 이후, 상기에서 제조된 ECF 저항성 동물모델을 이용하여 NINJ2 억제 시 내성 치료 효과를 확인하고자 아래의 표 2와 같이 서열번호 11 및 12로 표시되는 siNINJ2와 대조군을 위한 프라이머를 이용하여 NINJ2의 발현을 억제시킨 후 추가 약물 투여 실험을 진행하였다. 이를 위해 이종이식 모델의 종양 크기가 100 mm³에 도달한 마우스에 5.7 mg/kg의 에피루비신, 6.67 mg/kg의 시스플라틴 및 22 mg/kg의 5-FU를 15 일 동안 주 1 회 종양 내 투여하였으며, 디지털 캘리퍼스(digital calipers)를 통해 3 일 마다 종양 질량과 종양 부피를 측정하였다. 상기과 같이 대조군, NINJ2를 녹아웃시킨 RES 세포주 군과 NINJ2

발현이 높은 RES 세포주 군으로 나누어 약 한 달 동안 ECF 투여 실험을 진행하였다.

표 2

프라이머	방향	시퀀스(5'→3')	서열번호
siNINJ2	센스	GUAAGGCAUGUCUGUCUAAGGCC	서열번호 11
	안티센스	GGCCUAGACAGACAUGCCUAC	서열번호 12
대조군(control)	센스	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	-
	안티센스	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	-

8.2. siNINJ2의 내성 치료 효과 확인

도 9a를 참조하면 상기 각 세포주군이 이중 이식된 동물모델에 ECF 약물을 투여한 후 종양 조직의 크기 변화를 확인하였다. 이를 수치화하여 그래프로 종양 부피 및 질량의 변화를 나타내었다(도 9b 참조). RES 군과 비교하였을 때, NINJ2 mRNA의 발현을 억제시킨 NINJ2를 녹아웃시킨 RES 세포주에서 종양 부피 및 질량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 시간이 경과됨에 따라 종양 부피의 차이가 크게 나타났으며, 이는 ECF 약물에 대한 내성이 극복된 것을 시사한다.

실시예 9: ECF 내성 위암 오가노이드에서의 NINJ2의 발현 증가의 확인 및 암의 진행에 관한 임상적 중요성

환자 유래 인간 위 종양 오가노이드(HCM-BROD-0115-C16, PDM-135)를 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 ATCC 가이드에 따라 계대 배양하여 실험에 이용하였다. 오가노이드에 ECF를 IC₅₀ 농도로 처리하고 72 시간 후, 배지를 약물 없는 배지로 교체하고 추가로 2 회 계대 배양을 수행하였다. 다음으로, 상기 오가노이드를 적절한 IC₇₀, IC₈₀ 농도에 노출시킨 다음 위의 절차를 반복 수행하였다. 오가노이드가 ECF 약물에 대하여 민감성이 있는 상태로 되돌아가는 것을 막기 위하여 ECF를 IC₈₀ 농도로 매 3 주마다 오가노이드에 처리하여 ECF 내성 오가노이드를 구축하였다. 모-위암 오가노이드와 ECF 내성을 가진 위암 오가노이드를 현미경으로 관찰한 사진과, 각 오가노이드의 ECF에 대한 IC₅₀를 측정한 결과를 도 10a에 나타내었다. 모-위암 오가노이드와 ECF 내성을 가진 위암 오가노이드에서 qRT-PCR을 통해 NINJ2 및 CD44 mRNA의 발현 수준을 정량화한 결과, 도 10b에 나타낸 바와 같이, 역시 세포주에서의 결과와 마찬가지로 모-위암 오가노이드에 비하여 ECF 내성을 가진 위암 오가노이드에서 NINJ2 및 CD44 mRNA의 발현 정도가 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

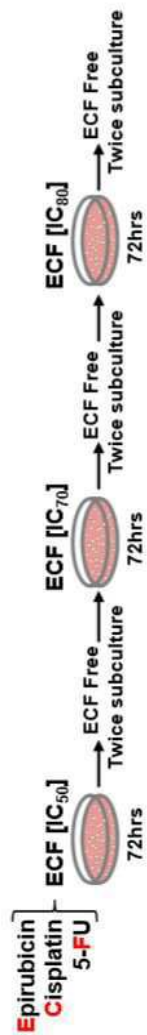
다음으로, NINJ2 발현 수준과 약물 반응에 대한 임상적 관련성을 확인하기 위하여, 두명의 병리학자가 부분 반응(PR), 안정 병변(SD) 및 질병 진행(PD)을 보이는 위암 종양 환자의 조직학적 분석을 통해 NINJ2 강도와 광범위 발현(extensive expression)을 분석하였다. 그 결과 도 10c에서 보는 바와 같이 PR/SD에 비하여 PD에서 NINJ2 광범위 발현이 현저히 증가하였다. 다음으로 NINJ2 발현 수준과 생존율 사이 임상적 관련성을 확인하기 위하여 공용 데이터를 사용하여 위암 환자의 위험함수비율(HR)을 이용한 카플란-마이어 분석 및 로그-순위 검정을 수행하였다. 그 결과, 위암 환자 중 NINJ2 발현 군에서 생존율이 매우 낮은 것을 볼 수 있었고, 특히 Her2 음성 군에서 NINJ2 고발현 군은 Her2 양성군에 비하여 전체적 생존율이 증가한 것을 확인하였다(도 10d 참조).

상기와 같은 실시예 1 내지 9를 종합적으로 고려하면, ECF 내성 진단을 위한 용도로서 NINJ2 마커 및 페리오스틴 마커를 활용할 수 있으며, 더 나아가 NINJ2의 발현을 억제하여 ECF 약물 내성을 극복할 수 있으므로, ECF 약물 치료 후 내성이 발생한 환자에게 상기 항암제에 의한 내성을 치료함으로써 항암 효과를 현저히 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

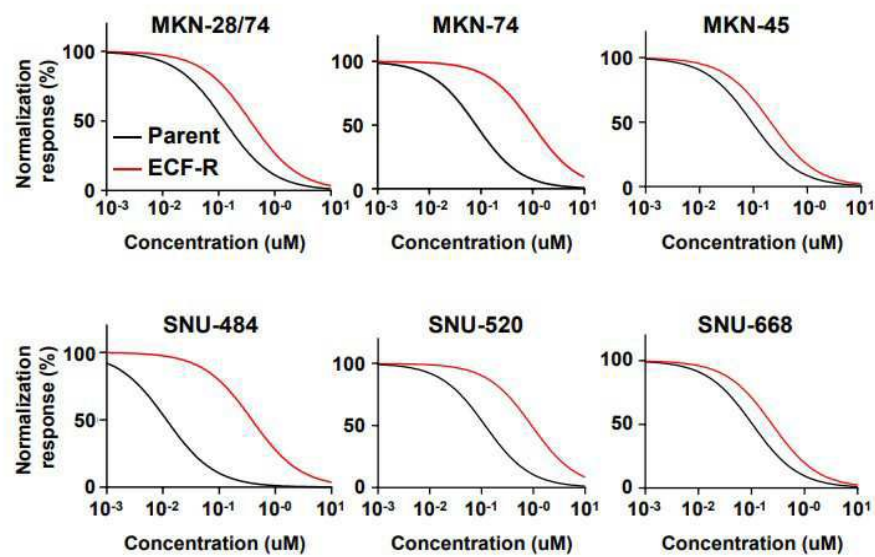
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

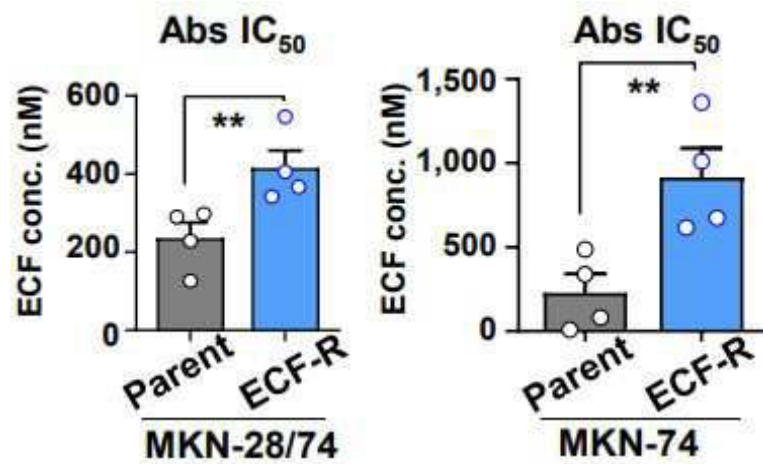
도면1a



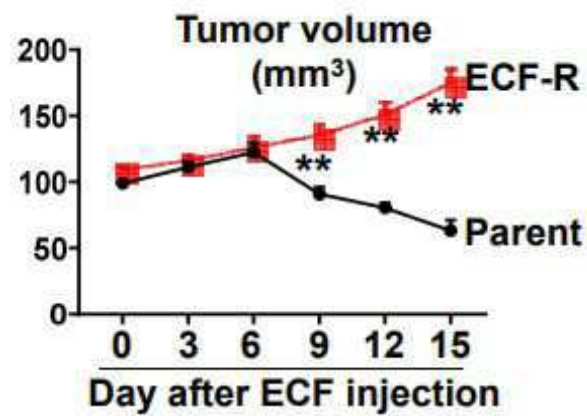
도면1b



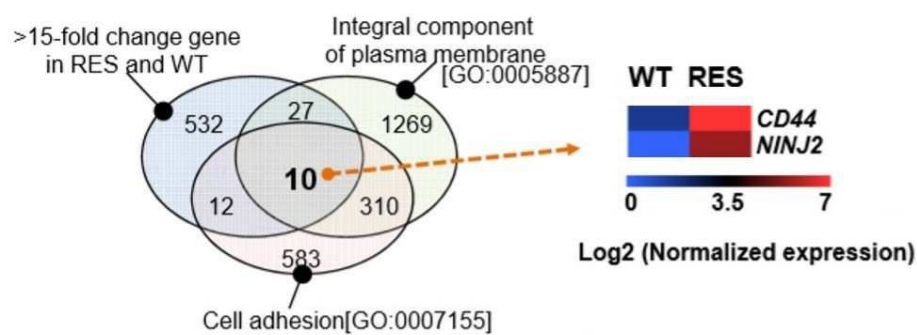
도면1c



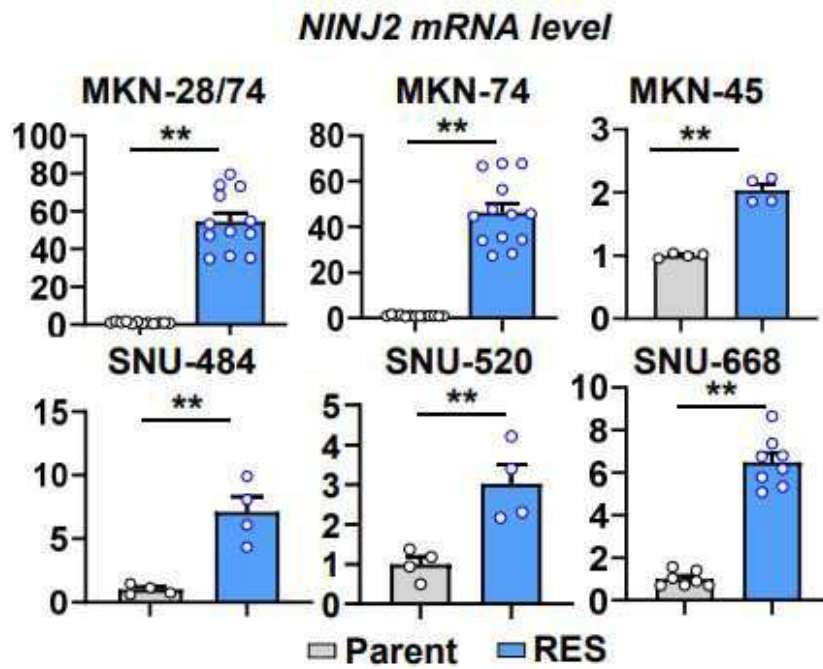
도면1d



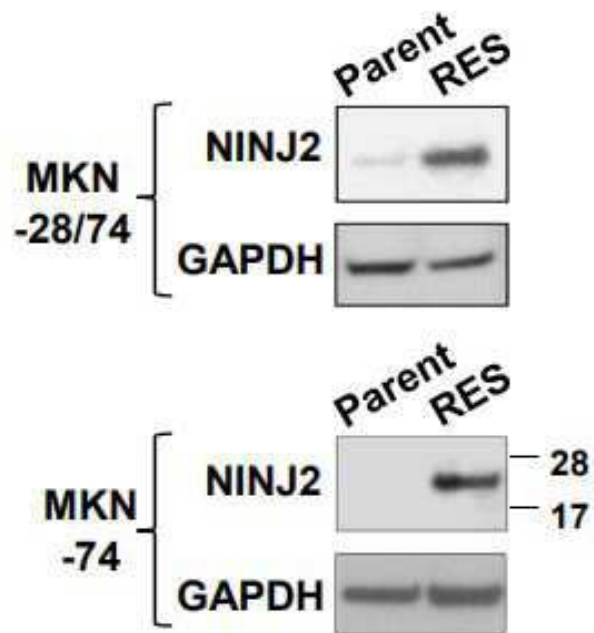
도면2



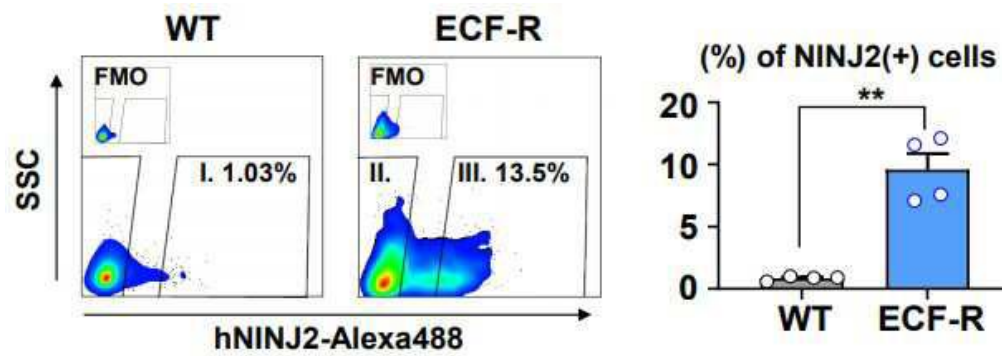
도면3a



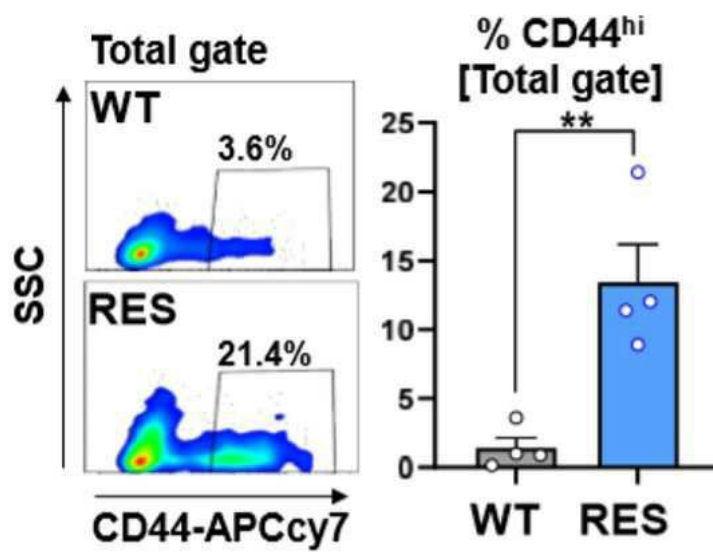
도면3b



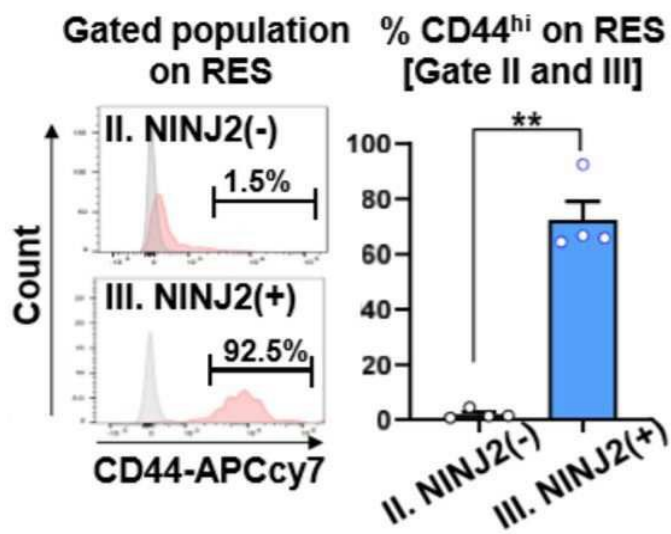
도면4a



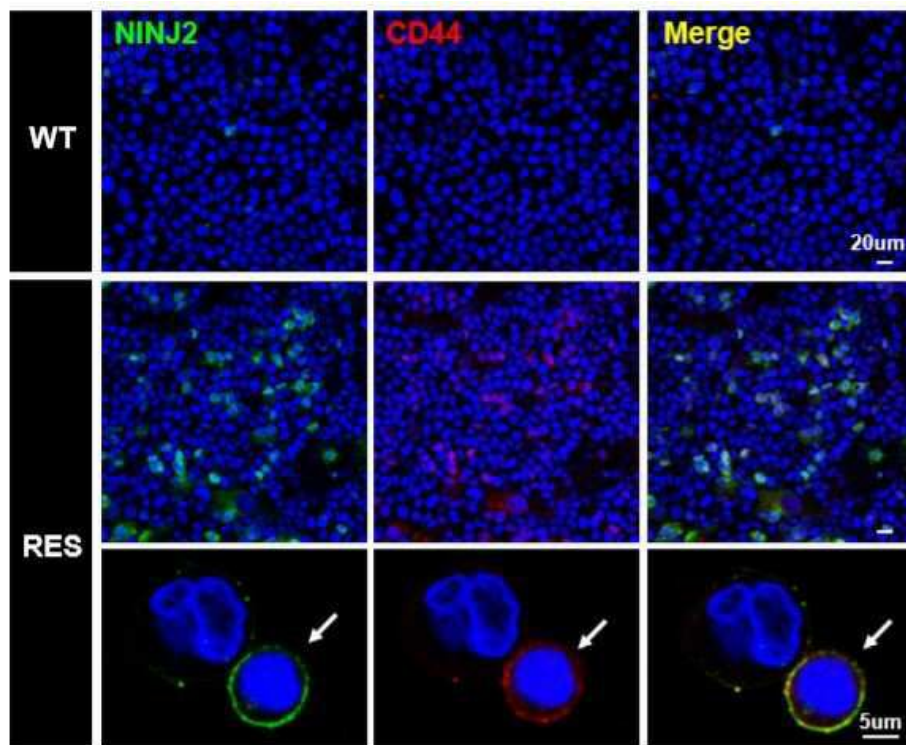
도면4b



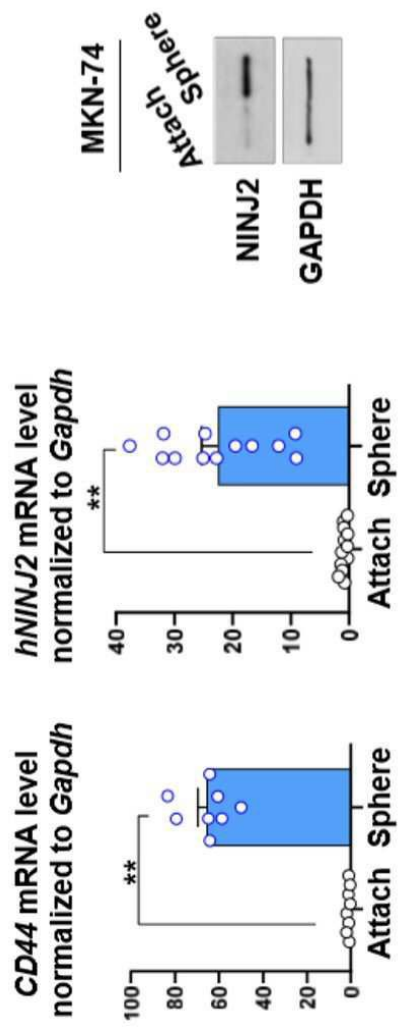
도면4c



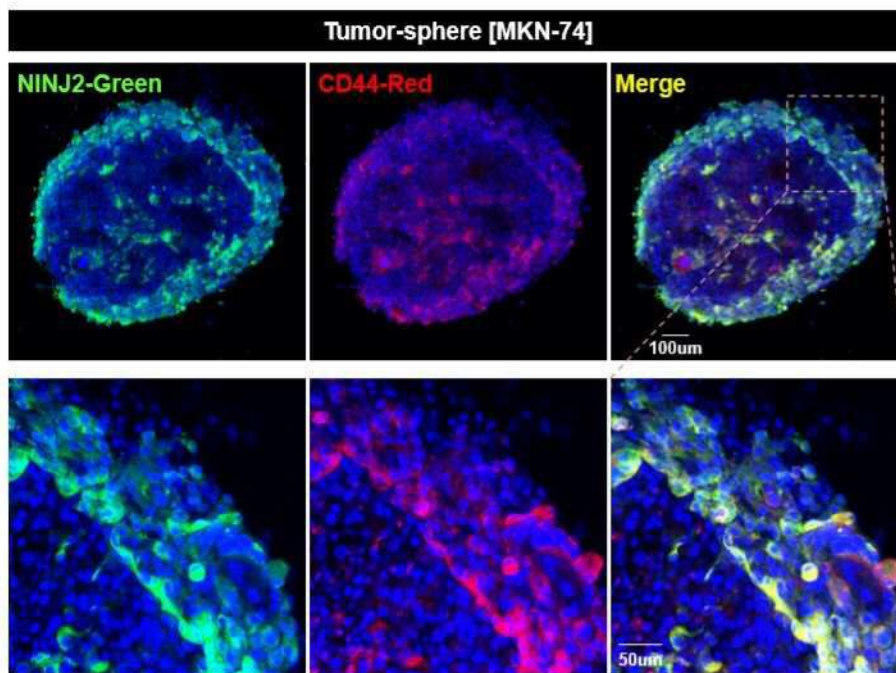
도면4d



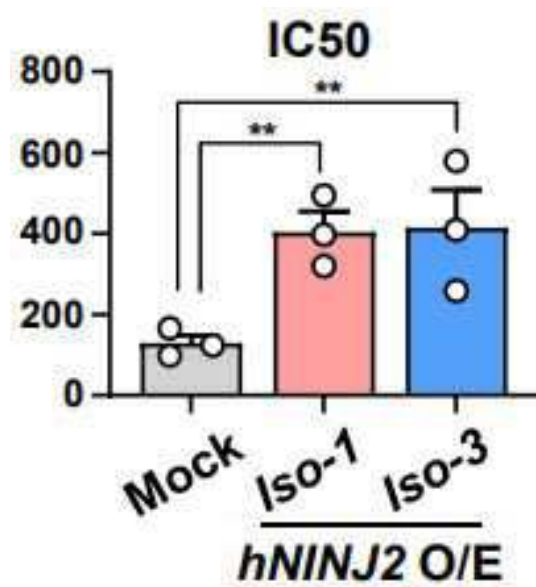
도면4e



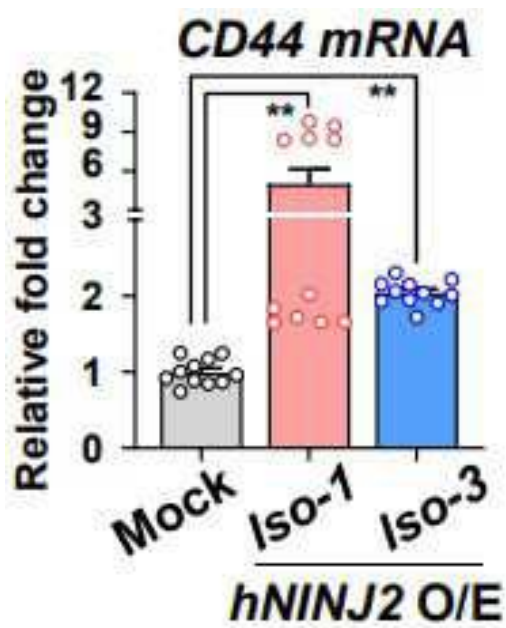
도면4f



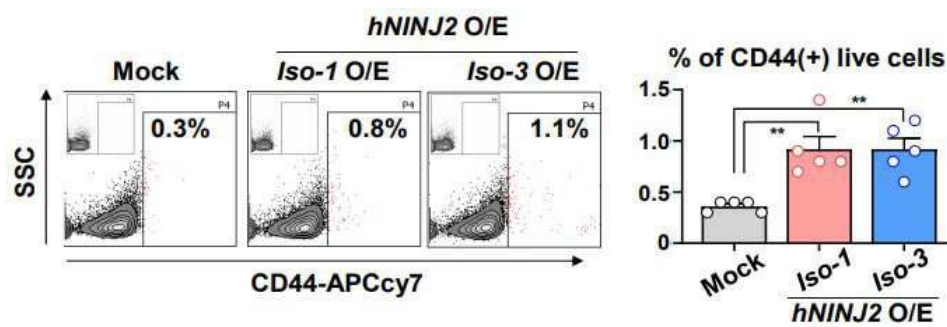
도면5a



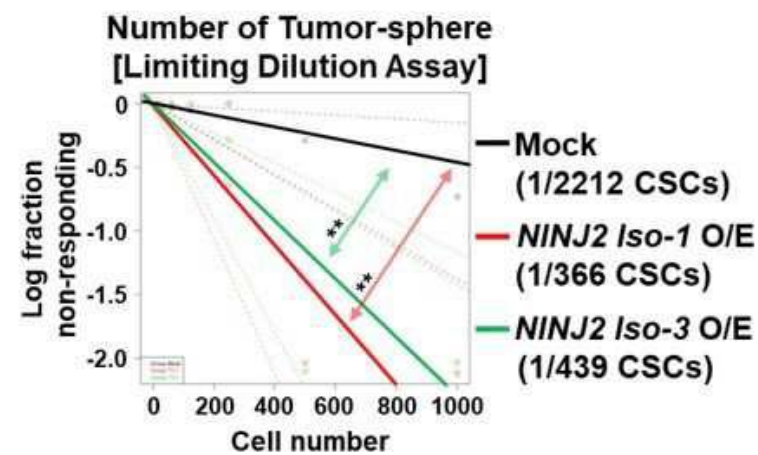
도면5b



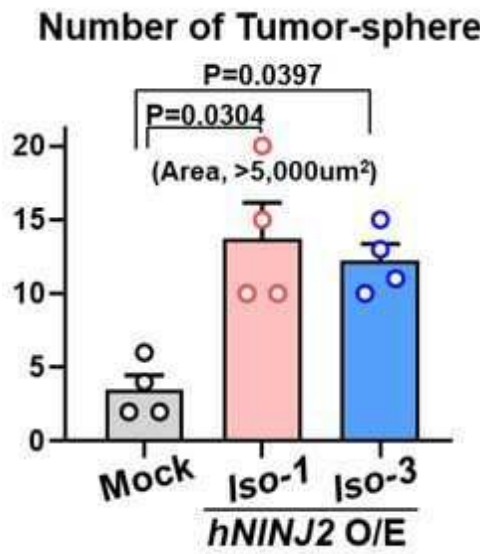
도면5c



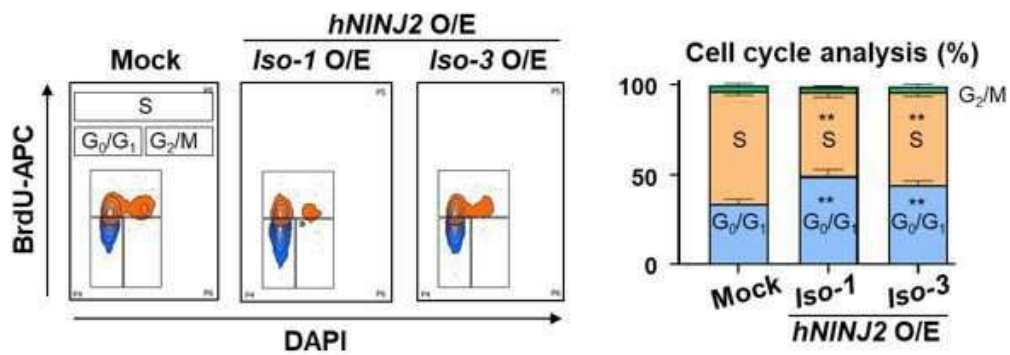
도면5d



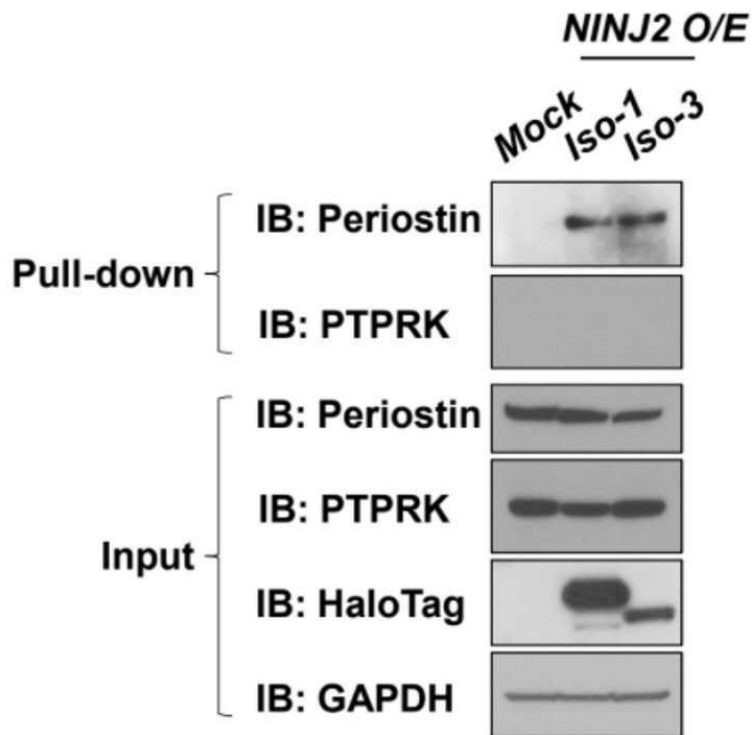
도면5e



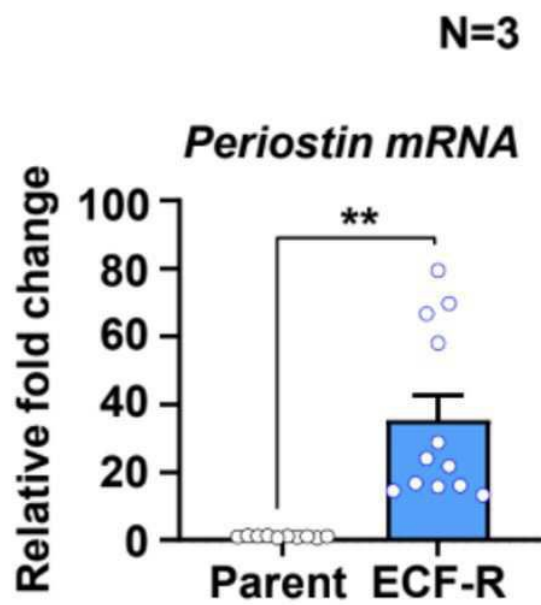
도면6



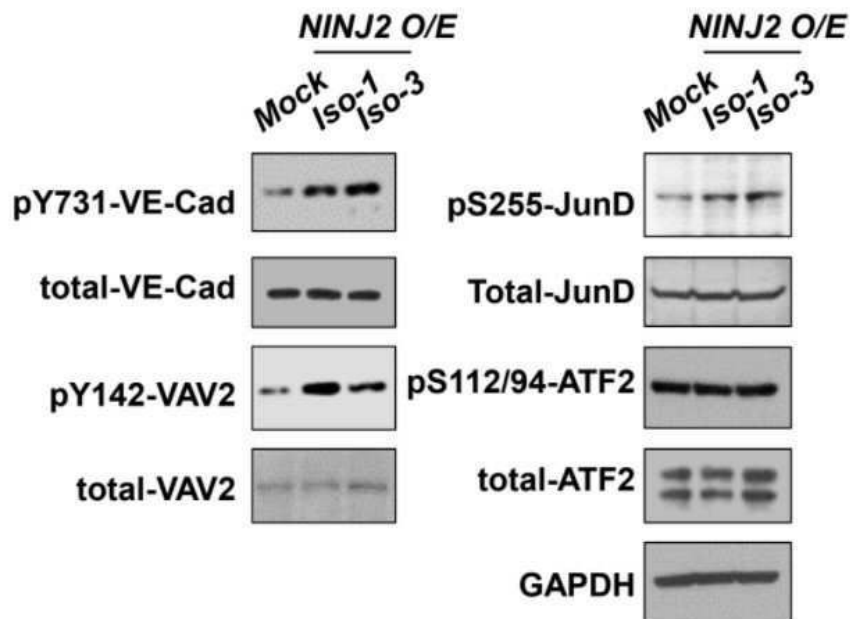
도면7a



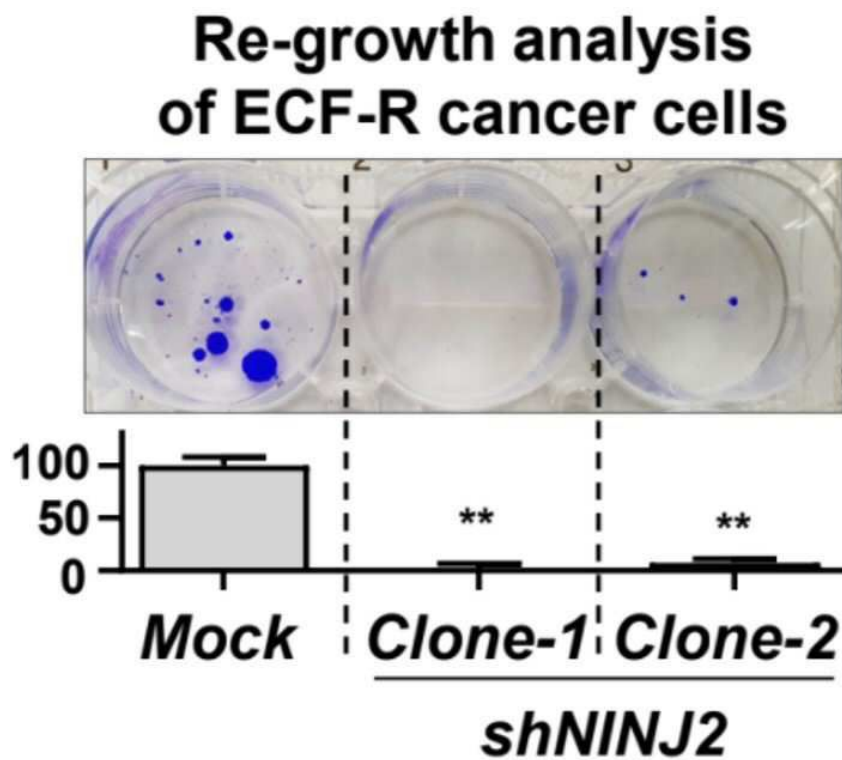
도면7b



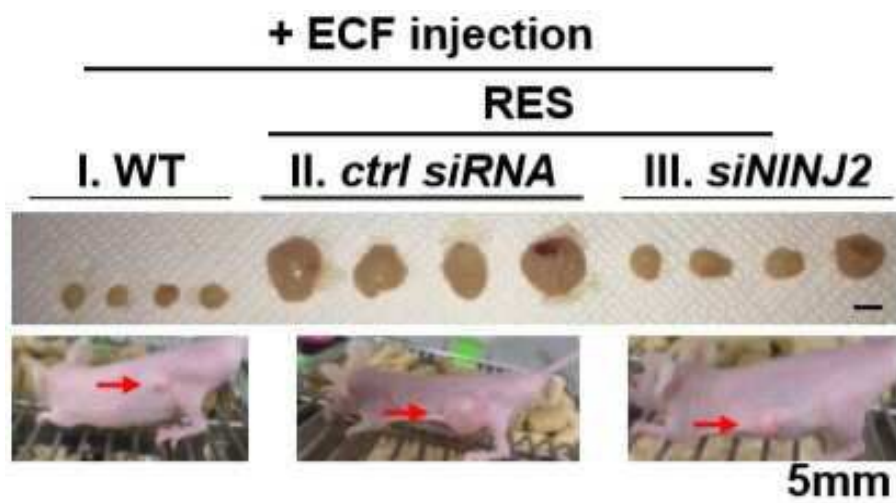
도면7c



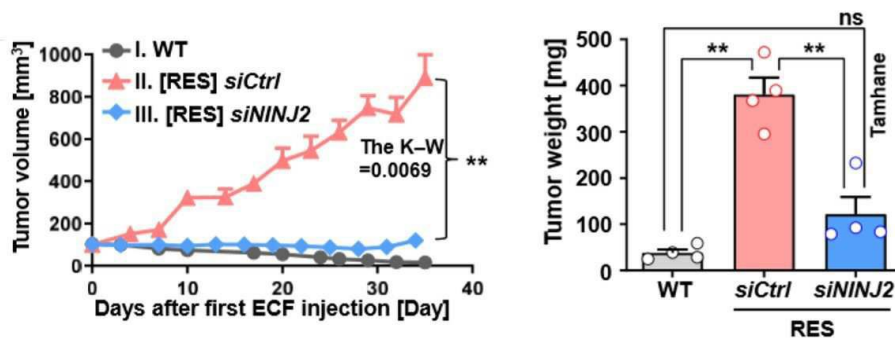
도면8



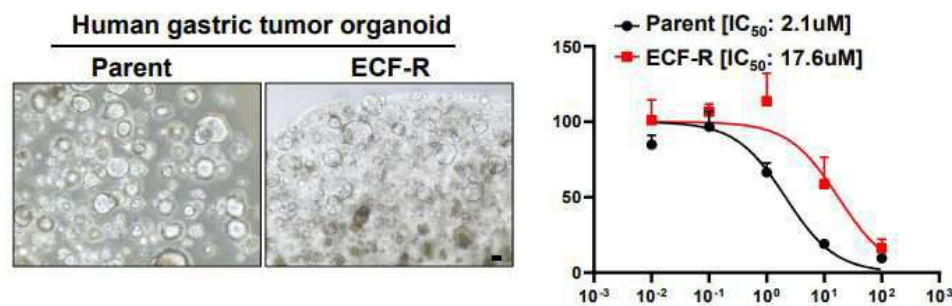
도면9a



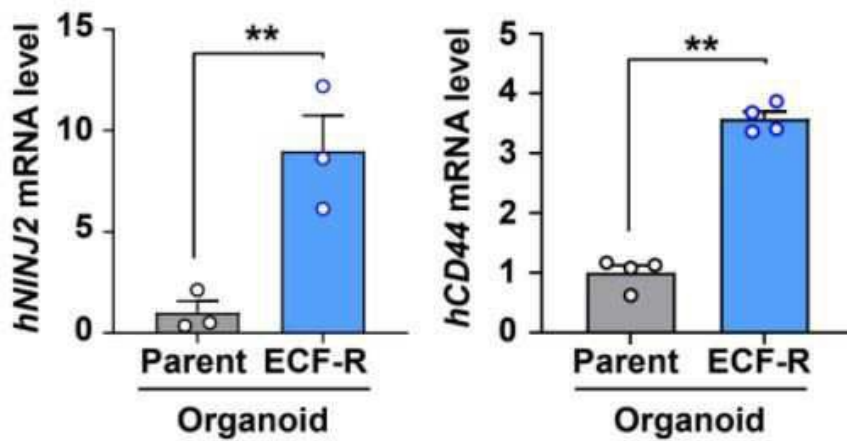
도면9b



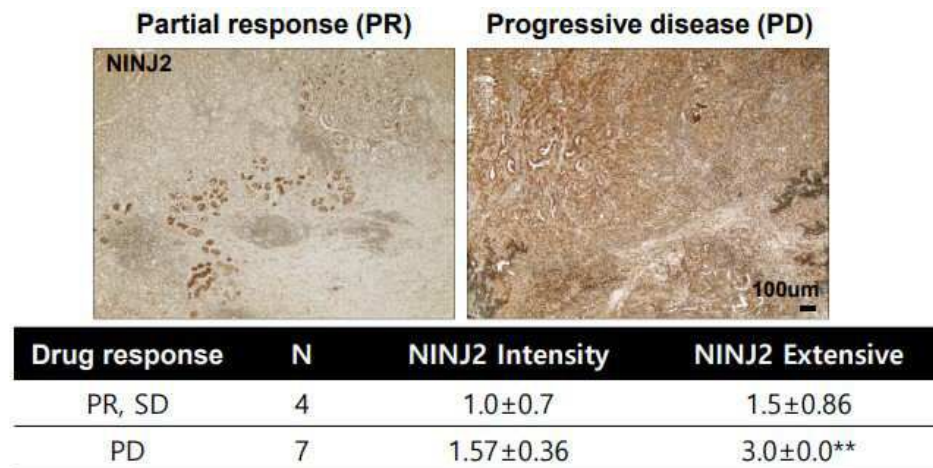
도면10a



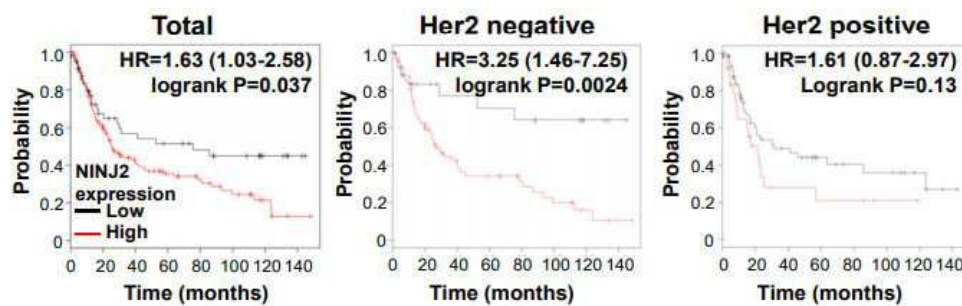
도면10b



도면10c



도면10d



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Composition for diagnosing or treating drug resistant cancer
- <130> PDPB201832k01
- <150> KR 10-2020-0025872
- <151> 2020-03-02

<160> 12
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Glu Ser Ala Arg Glu Asn Ile Asp Leu Gln Pro Gly Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Pro Arg Ser Gln Pro Ile Asn Leu Asn His Tyr Ala Thr Lys Lys Ser
 20 25 30
 Val Ala Glu Ser Met Leu Asp Val Ala Leu Phe Met Ser Asn Ala Met
 35 40 45
 Arg Leu Lys Ala Val Leu Glu Gln Gly Pro Ser Ser His Tyr Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Leu Val Thr Leu Ile Ser Leu Ser Leu Leu Gln Val Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Leu Leu Val Val Ile Ala Arg Leu Asn Leu Asn Glu Val Glu
 85 90 95

Lys Gln Trp Arg Leu Asn Gln Leu Asn Asn Ala Ala Thr Ile Leu Val
 100 105 110
 Phe Phe Thr Val Val Ile Asn Val Phe Ile Thr Ala Phe Gly Ala His
 115 120 125
 Lys Thr Gly Phe Leu Ala Ala Arg Ala Ser Arg Asn Pro Leu
 130 135 140

<210> 2
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Leu Asp Val Ala Leu Phe Met Ser Asn Ala Met Arg Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Val Leu Glu Gln Gly Pro Ser Ser His Tyr Tyr Thr Thr Leu Val Thr
 20 25 30
 Leu Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Gln Val Val Ile Gly Val Leu Leu
 35 40 45
 Val Val Ile Ala Arg Leu Asn Leu Asn Glu Val Glu Lys Gln Trp Arg
 50 55 60
 Leu Asn Gln Leu Asn Asn Ala Ala Thr Ile Leu Val Phe Phe Thr Val
 65 70 75 80
 Val Ile Asn Val Phe Ile Thr Ala Phe Gly Ala His Lys Thr Gly Phe

85 90 95
 Leu Ala Ala Arg Ala Ser Arg Asn Pro Leu
 100 105

<210> 3

<211> 918

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

agagactcag acggcggagc ctggaggagc ccacgcagtc tgttcccggc acccggtgcg 60
 tgtgaaggga cttgagggca gcgagatgga atcagcaaga gaaaacatcg accttcaacc 120
 tggaagctcc gaccccagga gccagcccat caacctgaac cattacgcca ccaagaagag 180
 cgtggcggag agcatgctgg acgtggccct gtcatgtcc aacgccatgc ggctgaaggc 240

 ggtgctggag cagggacat cctctcacta ctacaccacc ctggtcaccc tcatcagcct 300
 ctctctgctc ctgcaggtag tcatcgggtgt cctgctcgtg gtcattgcac ggctgaacct 360
 gaatgagga gaaaagcagt ggcgactcaa ccagctcaac aacgcagcca ccatcttggt 420
 ctcttctact gtggtcatca atgttttcat tacagccttc ggggcacata aaacagggtt 480
 cctggctgcc agggcctcaa ggaatcctct ctgaatgcag cctgggaccc aggttctggg 540
 cctggaactt ctgcctcctt cctccgtgat ctgccaggct cgtgggcact ttccacagcc 600
 caggagagct tctgaaagga cagtatagct gcccttgctc cctaccaca gcacctgagt 660

 taaaaagtga tttttatgtt attggtctaa gggacttcca tcttggctctg aagtcctgag 720
 ctgagacgca ggtactgcca gccatacctt cctggttagca tctgctggac ctaagtaagg 780
 catgtctgtc taaggccaag tctgcccggc ttaaggatgc tggttctgac tctacccac 840
 tgcttccttc tgctccagga ctcaattttc ctttcttgta aaatggaatc tatatctata 900

aaggttttctt caaatcca	918
<210> 4	
<211> 926	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gttgcaaagc agccgctcgg tggccgtaca acgttcac c tctccgagcc tcggtttcct	60
catctccagc cctaaaatga cgacacgccc cacaggtctt gggaggatta agtgagggga	120
catgagcctg gaagctccga cccagggagc cagcccatca acctgaacca ttacgccacc	180
aagaagagcg tggcggagag catgctggac gtggccctgt tcatgtccaa cgccatgcgg	240
ctgaaggcgg tgctggagca gggaccatcc tctcactact acaccaccct ggtcacctc	300
atcagcctct ctctgtcct gcaggtggc atcggtgtcc tgctcgtgtt cattgcacgg	360
ctgaacctga atgaggtaga aaagcagtgg cgactcaacc agctcaaca cgcagccacc	420
atcttggctt tcttcaactgt ggtcatcaat gttttcatta cagccttcgg ggcacataaa	480
acagggttcc tggctgccag ggcctcaagg aatcctctct gaatgcagcc tgggaccag	540
gttctgggcc tggaaactct gcctccttcc tccgtgatct gccaggtcgc tgggcacttt	600
ccacagccca ggagagcttc tgaaaggaca gtatagctgc ccttgctccc tacccacagc	660
acctgagtta aaaagtgatt tttatgttat tggctcaagg gacttccatc ttggtctgaa	720
gtctgagct cagacgcagg tactgccagc cataccttcc tggtagcatc tgctggacct	780
aagtaaggca tgctgtcta aggccaagtc tgcccggctt aaggatgctg gttctgactc	840
tacccactg cttccttctg ctccaggcct caattttccc ttcttgtaaa atggaatcta	900
tatctataaa ggtttcttca aatcca	926
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
cgtggtcatt gcacggctga a	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<400> 6

ctgaacctga atgaggtaga a

21

<210> 7

<211> 779

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val

1	5	10	15
Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser			
20	25	30	
Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln			
35	40	45	
Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr			
50	55	60	
Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys			
65	70	75	80
Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu			
85	90	95	
Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr			
100	105	110	
Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly			
115	120	125	
Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn			
130	135	140	
Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu			
145	150	155	160
Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr			
165	170	175	
Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu			
180	185	190	
Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys			

195 200 205
 Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His
 210 215 220

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

 290 295 300
 Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val
 305 310 315 320
 Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp
 325 330 335
 Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val
 340 345 350
 Thr Asn Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp
 355 360 365

 Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe
 370 375 380
 Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp
 385 390 395 400
 Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp
 405 410 415
 Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His
 420 425 430
 Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile

 435 440 445

Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr
 450 455 460
 Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly
 465 470 475 480
 Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu
 485 490 495
 Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe
 500 505 510

 Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro
 515 520 525
 Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met
 530 535 540
 Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln
 545 550 555 560
 Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly
 565 570 575
 Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys

 580 585 590
 Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys
 595 600 605
 Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val
 610 615 620
 Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu
 625 630 635 640
 Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys Phe Val
 645 650 655

 Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr Lys Pro Ile
 660 665 670
 Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr
 675 680 685
 Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys
 690 695 700

Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys
 705 710 715 720
 Lys Leu Leu Gln Glu Glu Val Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly

725 730 735
 Gly Asp Gly His Leu Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln
 740 745 750

Gly Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val Gln Gly
 755 760 765

Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg Ser Gln
 770 775

<210> 8
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Asp Lys Phe Trp Trp His Ala Ala Trp Gly Leu Cys Leu Val Pro

1 5 10 15
 Leu Ser Leu Ala Gln Ile Asp Leu Asn Ile Thr Cys Arg Phe Ala Gly
 20 25 30

Val Phe His Val Glu Lys Asn Gly Arg Tyr Ser Ile Ser Arg Thr Glu
 35 40 45

Ala Ala Asp Leu Cys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Leu Pro Thr Met Ala
 50 55 60

Gln Met Glu Lys Ala Leu Ser Ile Gly Phe Glu Thr Cys Arg Tyr Gly
 65 70 75 80

Phe Ile Glu Gly His Val Val Ile Pro Arg Ile His Pro Asn Ser Ile
 85 90 95

Cys Ala Ala Asn Asn Thr Gly Val Tyr Ile Leu Thr Ser Asn Thr Ser
 100 105 110

Gln Tyr Asp Thr Tyr Cys Phe Asn Ala Ser Ala Pro Pro Glu Glu Asp
 115 120 125

Cys Thr Ser Val Thr Asp Leu Pro Asn Ala Phe Asp Gly Pro Ile Thr

130 135 140
 Ile Thr Ile Val Asn Arg Asp Gly Thr Arg Tyr Val Gln Lys Gly Glu

 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Asn Pro Glu Asp Ile Tyr Pro Ser Asn Pro Thr Asp Asp

 165 170 175
 Asp Val Ser Ser Gly Ser Ser Ser Glu Arg Ser Ser Thr Ser Gly Gly

 180 185 190
 Tyr Ile Phe Tyr Thr Phe Ser Thr Val His Pro Ile Pro Asp Glu Asp

 195 200 205
 Ser Pro Trp Ile Thr Asp Ser Thr Asp Arg Ile Pro Ala Thr Arg His

 210 215 220

 Ser His Gly Ser Gln Glu Gly Gly Ala Asn Thr Thr Ser Gly Pro Ile
 225 230 235 240
 Arg Thr Pro Gln Ile Pro Glu Trp Leu Ile Ile Leu Ala Ser Leu Leu

 245 250 255
 Ala Leu Ala Leu Ile Leu Ala Val Cys Ile Ala Val Asn Ser Arg Arg

 260 265 270
 Arg Cys Gly Gln Lys Lys Lys Leu Val Ile Asn Ser Gly Asn Gly Ala

 275 280 285
 Val Glu Asp Arg Lys Pro Ser Gly Leu Asn Gly Glu Ala Ser Lys Ser

 290 295 300
 Gln Glu Met Val His Leu Val Asn Lys Glu Ser Ser Glu Thr Pro Asp
 305 310 315 320
 Gln Phe Met Thr Ala Asp Glu Thr Arg Asn Leu Gln Asn Val Asp Met

 325 330 335
 Lys Ile Gly Val

 340

 <210> 9
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shNINJ2 Clone 1

<400>	9	
ccggcgtggt cattgcacgg ctgaactcga gttcagccgt gcaatgacca cgtttttg		58
<210>	10	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	shNINJ2 Clone 2	
<400>	10	
ccggctgaac ctgaatgagg tagaactcga gttctacctc attcaggttc agtttttg		58
<210>	11	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense siNINJ2	
<400>	11	
guaaggcaug ucugucuaag gcc		23
<210>	12	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	anti-sense siNINJ2	
<400>	12	
ggccuuagac agacaugccu uac		23