

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0114877

(43) 공개일자 2021년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2021-0030669

(22) 출원일자 2021년03월09일

심사청구일자 2021년03월09일

(30) 우선권주장

1020200029938 2020년03월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정재호

서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 808호(대치동, 한보미도맨션)

김정민

서울특별시 마포구 월드컵북로 481, 상암오벨리스크 2차 1-519호

(74) 대리인

파도특허법인(유한), 이재영

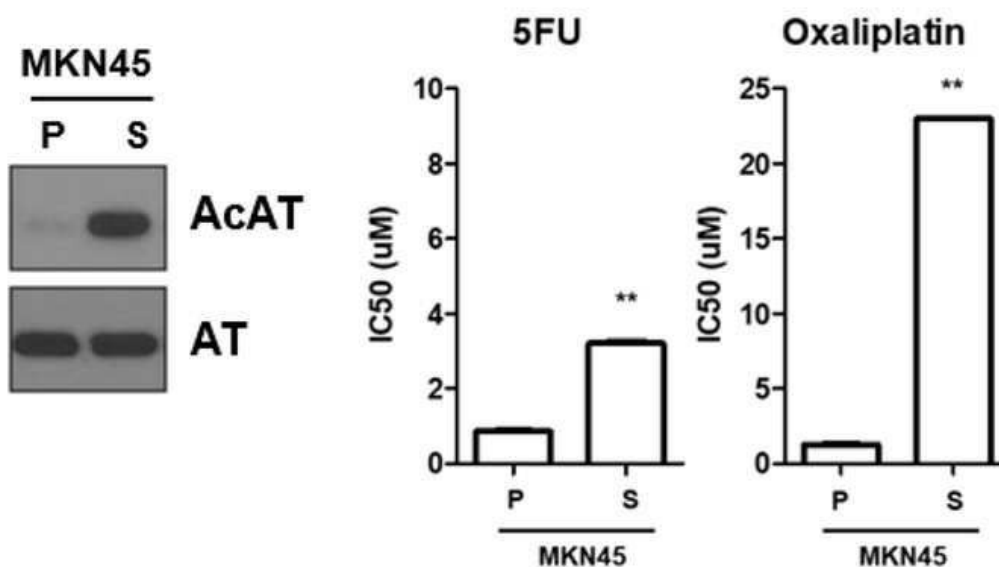
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 항암제 내성 진단 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 항암제 내성 진단용 바이오 마커 조성물을 이용하여, 항암제 내성을 진단하고 이를 극복하는 항암제 내성 치료용 조성물에 관한 것이다. 투약 전에 환자별 항암제 적합성 여부를 미리 예측하여 정확한 기초 정보를 제공함으로써 환자의 비용 부담을 줄일 수 있으며, 아울러 항암제 내성을 치료하여 생존률을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/106 (2013.01)
 C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2800/44 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465028586
과제번호	HR14C0005040019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성(R&D)
연구과제명	제1 유닛(4세부): 종양대사 조절 표적 항암 신약 개발(Development of Novel therapeutics targeting cancer metabolism)

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 세브란스병원
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108917
과제번호	2018R1A5A2025079
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	만성난치질환 시스템의학 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

AcAT(acetylated alpha tubulin) 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 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스큐알분, 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, 5-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, 블레로마이신, 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, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 항암제는 항대사성 약물(antimetabolic agent) 또는 알킬화제 약물(alkylating agent)인, 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 항대사성 약물은 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil; 5-FU)이고, 상기 알킬화제 약물은 옥살리플라틴(Oxaliplatin)인, 조성물.

청구항 7

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 nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인 암의 치료를 위한 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 AcAT(acetylated alpha tubulin) 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 AcAT 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높을 경우, 상기 목적하는 개체에 항암제 내성이 발생하였거나 발생할 가능성이 높을 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조밐, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쑤알븜, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헬타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훌름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 탈티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 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 1종 이상을 포함하는, 방법.

청구항 12

AcAT(acetylated alpha tubulin) 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 13

제 12항에 있어서,

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

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 AcAT 유전자 또는 그 일부 부위에 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 이상인, 조성물.

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 조성물은 히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6) 단백질, HDAC6 단백질의 발현 촉진제 또는 HDAC6 단백질의 활성화제; 또는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 억제제 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 추가로 더 포함하는, 조성물.

청구항 16

제 12항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 5-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, 멜파관, 알트레트민, 다카바진, 치오테과, 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, 조성물.

청구항 17

제 12항에 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 nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인 암의 치료를 위한 것인, 조성물.

청구항 18

AcAT(acetylated alpha tubulin) 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 19

제 18항에 있어서,

상기 조성물은 히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6) 단백질, HDAC6 단백질의 발현 촉진제 또는 HDAC6 단백질의 활성화제; 또는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 억제제 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는, 조성물.

청구항 20

제 18항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조밐, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쑼알븐, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토푸린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 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, 멜파관, 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 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 21

AcAT(acetylated alpha tubulin) 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 22

인-비트로(in vitro)에서 AcAT(acetylated alpha tubulin) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포 또는 암 조직에 대하여 후보 물질을 처리하는 단계; 및

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

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 후보 물질의 처리 후 측정된 AcAT 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] 약물에 대한 저항성(drug resistance)은 성공적인 항암 치료 효과를 반감시키는 주된 요소로 다양한 암종의 예

후를 나쁘게 한다. 암 세포에서의 약물 저항성(chemo-resistance)은 기존에 내재되어있던 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.). 후천적으로 획득된 약물 저항성을 일으키는 요인으로는 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 항암제를 선택적으로 사용할 수 있도록 특정 바이오 마커를 통해 미리 치료 효율을 가늠할 수 있는 척도가 현실적으로 필요한 상황이다. 이렇듯 약물에 대한 내성과 관련된 연구는 거의 없는 실정하기에 본 발명자들은 항암제 내성이 있는 환자를 미리 선별할 수 있는 신규한 마커를 발굴함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 일 목적은 항암제 내성을 진단하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.
- [0005] 본 발명의 다른 목적은 항암제 내성을 진단하는 키트를 제공하고자 한다.
- [0006] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성을 치료하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 감수성을 증진시키는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성 암을 예방 또는 치료하는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물이나 항암제 감수성 증진용 약물의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.
- [0011] 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

- [0012] 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 구체예에는 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.
- [0013] 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.
- [0015] **1. 항암제 내성 진단의 용도**
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 항암제 내성 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명에서 상기 진단용 조성물은 AcAT(acetylated alpha tubulin) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "AcAT(acetylated alpha tubulin)"이란 이 유전자에 의해 아세틸-CoA의 두 분자로부터 아세

토아세틸-CoA의 가역적 형성을 촉매하는 미토콘드리아 국소화 효소를 암호화하는 것으로 알려져 있다. 상기 유전자에 결함이 생기는 원인으로는 3-케토티올라제 결핍, 2-메틸-3-하이드록시부티르산, 2-메틸 아세토아세트산, 티글리글리신 및 부타논의 소변 배설을 특징으로 하는 이소류신 이화 작용의 선천성 오류와 관련이 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 "AcAT 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자"는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 정보가 등록되어 있으며, 상기 AcAT 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 AcAT 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 비제한적인 예로서 상기 AcAT의 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.

[0020] 본 발명에서 "약제" 또는 "항암 치료제"와 "항암제"는 혼용하여 사용될 수 있으며, 상기 약제는 암 줄기세포뿐만 아니라 암 세포를 사멸시켜 항암 효과가 있는 약물에 해당하며, 보다 바람직하게는 위암 치료 효과가 있는 약물을 말한다.

[0021] 본 발명에서 상기 "항암제"란 암 세포를 사멸시키는 기전을 가진 약물로서 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리투시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스콥알봄, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈품, 키토산, 젠시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-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, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 데모졸로마이드, 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 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 상기 "5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)"은 주로 유방암과 소화기계 악성종양에 사용되는 약물로 1957년 헤이델베르거와 안스필드에 의하여 DNA 전구물질인 티민의 구조적 유사체로 개발되었다. 항대사성 약물(antimetabolic agent)에 속하며, 암 세포의 증식에 필요한 대사 과정을 저해하는 작용을 가지는 약물에 해당한다. 유사한 작용을 하는 약물로 사이타라빈(Cytarabine), 메르캅토프린(Mercaptopurine; 6-MP), 메토크렉세이트(Methotrexate; MTX) 등이 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 "옥살리플라틴(Oxaliplatin)"은 알킬화제(alkylating agent)로 DNA 구조를 변형시키고 사슬 절단을 일으켜 항암 효과 및 세포독성 효과를 나타내는 약물에 해당한다. 이와 유사한 작용을 하는 약물의 예로는 부설판(Busulfan), 클로람부실(Chlorambucil), 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide), 멜팔란(Melphalan), 질소 머스타드(Nitrogen Mustard), 니트로소우레아(Nitrosourea), 시스플라틴(Cisplatin), 이포스파미드(Ifosfamide) 등이 있다.

[0024] 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 증가시켜야하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태를 말한다. 본 발명에서 AcAT 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준의 변화를 대조군과 비교하여 증가하는 경우 약제 내성이 있는 것으로 진단하였다.

[0025] 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.

[0026] 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, 바람직하게는 5-플루오로우라실 또는 옥살리플라틴 치료 후 치료 반응성 또는 상기 항암제에 대해 내성이 발생하는 지 여부를 미리 예상하는 행위 또는 이를 토대로 상기 항암제의 사용 여부를 적절하게 선택하는 행위로 해석될 수 있다.

[0027] 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 발생하는 악성 종양을 뜻하고, 육종(Sarcoma)은 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 등의 비상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻한다. 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.

[0028] 본 발명에서 "CD133"이란 프로미닌-1로도 알려진 항원으로 인간에서 PROM1 유전자에 의해 암호화되는 당 단백질에 해당한다. 세포 돌출부의 펜타스판 막 관통 당 단백질의 구성원이다. 암 줄기세포에 특이적인 표지자로서, 보다 상세하게는 CD133 항원은 세포재생, 종양형성, 전이, 신진대사, 분화, 세포 사멸 등에 관여하는 세포-표면 당 단백질을 말한다. CD133 바이오 마커는 암 줄기 세포의 특성을 갖는 세포를 확인하는데 이용할 수 있다.

[0029] 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 등의 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0030] 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.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0033] 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.

- [0034] 본 발명에서 상기 "애포타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애포타머의 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.
- [0035] 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 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 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.
- [0037] 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.
- [0038] 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 올리고뉴클레오티드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오티드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0039] 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, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 AcAT 단백질이나, 이를 코딩하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당 업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.
- [0042] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 상기 항암제 내성 진단용 조성물을 포함하는 항암제 내성 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0043] 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, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 항암제 내성 진단용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관을 포함하고 기관은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 당 업계에 공지되어 있는 것이라면, 이에 제한되지 않는다.

- [0044] 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.
- [0045] 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 뉴클레오티드로써, 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.
- [0046] 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 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0047] 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.
- [0048] 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.
- [0049] 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.
- [0050] 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.
- [0051] 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.
- [0053] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명의 상기 방법은 상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 AcAT 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 항암제 내성 발생의 유무를 선별하기 위한 것일 수 있다.
- [0056] 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.

- [0057] 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.
- [0058] 본 발명에서 상기 AcAT 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 AcAT 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 상기 AcAT 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.
- [0060] 또한, 본 발명에서 상기 AcAT 단백질의 발현 수준의 측정은 다중 반응 모니터링 (multiple reaction monitoring; MRM) 방법에 의할 수 있다.
- [0061] 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.
- [0062] 본 발명에서 상기 AcAT 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명에서 상기 AcAT 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 AcAT 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 상기 AcAT 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.
- [0065] 본 발명의 정보 제공 방법에서 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid), 앵타머(aptamer) 등에 관한 기재와 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드 등에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0066] 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 AcAT 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.
- [0067] 본 발명에서 "대조군"이란 항암제 내성이 발생하지 아니한 정상 대조군이거나, 항암제 감수성 세포에서의 AcAT 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.
- [0068] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라

파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 케피티니브, 보르테조밐, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세특시맙, 비스큐알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙류세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 칼티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 데모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테과, 니무스틴, 클로람부실, 미토라클, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 약물을 이용한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 5-플루오로우라실 또는 옥살리플라틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 약물들에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

[0069] 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.

[0071] 2. 항암제 내성 치료 용도

[0072] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성을 치료하거나 항암제 감수성을 증진시키는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0073] 본 발명의 상기 조성물은 AcAT 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0074] 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 AcAT 단백질에 직간접적으로 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.

[0075] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스 (Peptide Minetics)"는 AcAT의 활성 억제를 이끄는 AcAT 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.

[0076] 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.

[0077] 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.

[0078] 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 숙주로부터 만들어질 수 있다.

[0079] 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.

[0080] 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.

[0081] 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.

[0082] 본 발명에서 상기 단백질의 활성 또는 발현 수준을 감소시키는 제제는 AcAT 단백질의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 바람직하게는 본 발명의 조성물은 상기 AcAT 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있으며, 여기서, 상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 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 AcAT 단백질을 코딩하는 유전자에 직간접적으로 작용하여 그 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.

[0084] 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 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.

[0085] 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 크기

의 작은 이중 가닥의 RNA 단편에 해당하는 것을 말한다.

- [0086] 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 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 작용하여 aTAT1의 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 AcAT의 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.
- [0087] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, AcAT 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지된 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0088] 본 발명에서 상기 AcAT(acetylated alpha tubulin)의 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 AcAT 단백질의 아세틸화를 억제하는 것일 수 있고, 예를 들면, 히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6) 단백질, HDAC6 단백질의 발현 촉진제 또는 HDAC6 단백질의 활성화제; 또는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 억제제 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함할 수 있으나, 아세틸화 튜블린 단백질의 아세틸화를 조절하는 기능을 가진 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함될 수 있다.
- [0089] 본 발명에서 상기 "히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6)"은 인간 HDAC6 유전자에 의해 암호화되는 효소로서 아세틸화/탈아세틸화가 혈관신생 과정에 관여하며, 저산소상태에서 혈관신생이 유도되어 암 세포의 증식이 활발해지는데 이는 저산소 상태에서 HDAC(histone deacetylase)의 활성이 증가함으로써 종양 서프레스의 작용이 억제되어 혈관 신생이 유도된다. 히스톤 디아세틸라제는 표적 히스톤으로부터 아세틸기를 제거함으로써 전사 억제에 참여하는 히스톤-변형 효소이다. 본 발명에서 상기 HDAC6 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 정보가 등록되어 있으며, 상기 HDAC6 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 비제한적인 예로서 상기 HDAC6의 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.
- [0090] 본 발명에서 상기 "HDAC6 단백질의 발현 촉진제"는 HDAC6 단백질의 발현을 증진시키는 물질로, HDAC6의 발현을 전사(transcription) 수준 또는 단백질 수준에서 증진시키는 물질을 모두 포함하며, 예를 들면, HDAC6 단백질을 코딩하는 유전자, 이를 포함하는 발현 벡터 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 본 발명에서 상기 "HDAC6 단백질의 활성화제"는 HDAC6 단백질과 직접 상호작용하거나 간접적으로 작용하여 HDAC6 단백질의 활성을 양성적으로 조절하는 물질을 의미한다. 예를 들면, 상기 HDAC6 단백질의 활성화제는 HDAC6 단백질과 결합하여 HDAC6 단백질의 활성을 강화하는 물질일 수 있다.
- [0092] 본 발명에서 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자에 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.
- [0093] 본 발명에서 상기 "알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(aTAT1)"는 ATAT1 유전자에 의해 인코딩되는 트랜스퍼라제 패밀리에 속하는 효소로서 TAT, C6orf134, Nbla00487, alpha-TAT, 또는 alpha-TAT1으로도 불린다. 트랜스퍼라제 패밀리에 해당하며, 보다 구체적으로 아실 트랜스퍼라제에 속한다. 상기 ATAT1 유전자는 소포 형성에 중요한 역할을 하는 클라트린 단백질을 암호화하며, 라이신 40(lysine 40; K40) 상의 알파 튜블린을 아세틸화시킨다. 이 과정은 화학 주성(chemotaxis)과 실륜(cilium)을 형성하는 동안 미세소관의 성장에 있어 중요한 것으로 알려져 있다. 본 발명에서 상기 aTAT1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 정보가 등록되어 있으며, 상기 aTAT1 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산

서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 비제한적인 예로서 상기 HDAC6의 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.

[0094] 본 발명의 일 예시로 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제로서, 서열번호 5 및 서열번호 6; 서열번호 7 및 서열번호 8; 또는 서열번호 9 및 서열번호 10;로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 조합으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0095] 본 발명의 조성물은 항암제 내성을 치료하거나 항암제 감수성 증진 효과를 높이기 위하여, 히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6) 단백질, HDAC6 단백질의 발현 촉진제 또는 HDAC6 단백질의 활성화제; 또는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성화 또는 발현 억제제 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0096] 또한, 본 발명의 조성물은 항암제를 추가로 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 게피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테오미드, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쥔알부민, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-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, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 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 1종 이상을 포함하는 약물을 이용한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 5-플루오로우라실 또는 옥살리플라틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0097] 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.

[0098] 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.

[0099] 본 발명의 상기 항암제 내성 치료용 약학적 조성물 및 항암제 감수성 증진용 조성물에서 AcAT 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자, 다양한 항암제 등에 대한 기제는 앞선 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0101] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0102] 본 발명의 상기 조성물은 AcAT 단백질의 활성화 또는 발현 수준을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0103] 본 발명에서 상기 AcAT(acetylated alpha tubulin)의 단백질의 활성화 또는 발현을 감소시키는 제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제는 상기 AcAT 단백질의 아세틸화를 억제하는 것일 수 있고, 예를 들면, 히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6) 단백질, HDAC6 단백질의 발현 촉진제

또는 HDAC6 단백질의 활성화제; 또는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 억제제 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함할 수 있으나, 아세틸화 튜블린 단백질의 아세틸화를 조절하는 기능을 가진 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함될 수 있다.

[0104] 본 발명의 조성물은 항암제 내성을 치료하거나 항암제 감수성 증진 효과를 높이기 위하여, 히스톤 디아세틸라제 6(Histone Deacetylase 6; HDAC6) 단백질, HDAC6 단백질의 발현 촉진제 또는 HDAC6 단백질의 활성화제; 또는 알파튜블린 N-아세틸 트랜스퍼라제(Alpha-tubulin N-acetyltransferase; aTAT1) 단백질의 활성 또는 발현 억제제 또는 상기 aTAT1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0105] 또한, 본 발명의 조성물은 항암제를 추가로 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테오미드, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토틱렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-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, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 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 약물을 이용한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 5-플루오로우라실 또는 옥살리플라틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0106] 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.

[0107] 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.

[0108] 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 기재는 항암제 내성 치료용 및 항암제 감수성 증진용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0109] 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.

[0110] 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.

[0111] 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, 프로필하이드록

시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0112] 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.

[0113] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0114] 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 중증도를 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.

[0116] 3. 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물 또는 항암제 감수성 증진용 약물의 스크리닝 방법

[0117] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 항암제 내성 극복 또는 치료용 약물 또는 항암제 감수성 증진용 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0118] 본 발명의 스크리닝 방법은, 인-비트로(in vitro)에서 AcAT 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 발현하는 암 세포 또는 암 조직에 대하여 후보 물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보 물질의 처리 후 상기 암 세포 또는 암 조직에 대하여 AcAT 단백질의 활성 또는 발현 수준을 측정하거나 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다.

[0120] 본 발명에서 상기 암 세포는 목적하는 개체, 바람직하게는 항암제에 대해 내성이 있거나 있을 가능성이 높은 개체로부터 분리된 것이거나, AcAT 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 과발현되도록 조작된 것일 수 있고, 바람직하게는 AcAT 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 암 세포 내로 도입되어 형질 감염된 것일 수 있다.

[0121] 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.

[0122] 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.

[0123] 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 폴리뉴클

레오타이드는 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.

- [0124] 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.
- [0125] 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.
- [0126] 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), 리포좀-매개 형질감염법, 유전자 밤바드먼트 (gene bombardment), 텐드리머 및 무기(inorganic) 나노 입자의 사용 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0127] 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.
- [0128] 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.
- [0129] 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.
- [0130] 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.
- [0131] 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.
- [0132] 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.
- [0133] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 암 세포 또는 암 조직에서 측정된 AcAT 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.
- [0134] 본 발명의 스크리닝 방법에서 항암제 및 암 등에 대한 기제는 항암제 내성 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[0135] 본 발명을 이용하는 경우 항암제에 대한 내성을 진단함으로써, 향후 치료 계획에 있어 암 환자별 항암제 적합성에 대한 정확한 기초 정보를 제공할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명을 이용하는 경우 항암제에 대한 내성을 극복하고 더 나아가서는 항암제 내성 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0136] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주인 SK4, MKN45, 및 AGS에서 측정된 AcAT 유전자 발현 수준을 웨스턴블롯 분석을 통해 확인한 도이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 환자 1015명의 TMA 분석을 통해 AcAT 발현 정도에 따른 그룹별 누적 생존율을 확인한 도이다.

도 2a 내지 2c는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 줄기세포 표면 마커(CD133 및 CD44)로 분류한 모세포(parent cell; P cell)에서의 AcAT 발현 및/또는 항암제 저항성의 정도를 웨스턴 블롯 및 MTS 어세이를 통해 확인한 도이다.

도 3a 내지 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주인 SK4, MKN45, 또는 AGS의 P 세포와 S 세포(selected cell; S cell)에서의 AcAT 발현 정도와 항암제 내성 유무에 따른 IC50 값의 변화량을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 환자 유래 오가노이드(Patient-derived organoid; PDO)에서의 AcAT 발현 및 항암제 저항성을 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, SK4 세포주에서 아세틸화 기전(Acetylation status) 조절에 따른 항암제 감수성의 변화를 웨스턴 블롯을 통하여 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, HDAC6 억제제 약물 투여시 항암제 감수성 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, αTAT1(alpha tubulin acetyl transferase1) 유전자의 녹다운시 항암제 감수성 변화를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 아세틸화된 튜블린 타겟 약물 투여시 항암제 감수성을 비교 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0137] 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.

[0139] 실시예 1: AcAT 발현 정도에 따른 그룹별 누적 생존율 확인

[0140] 1.1 항암제 내성 세포의 준비

[0141] 본 발명의 발명자들은 연세대학교 의과대학 평가위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인을 얻어 모든 실험을 수행하였다. 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 인간 위암 세포주인 SK4, MKN45, 및 AGS를 취득하여, 한국 세포주 은행의 가이드에 따라 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)을 추가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(HERAcell 150i, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하여 실험에 이용하였다.

[0143] 1.2 위암 세포주인 SK4, MKN45, 및 AGS에서 측정된 AcAT 유전자 발현 수준

[0144] 상기 취득한 세포주를 배양하여 모세포(parent cell; P cell) 및 모세포를 연속 배양하여 30일 이후에 생존한 세포(selected cell; S cell)로 나누어 AcAT의 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 다양한 위암 세포주 모두에서 줄기세포적 특성을 갖는 S 세포인 경우 상대적으로 상기 단백질의 발현량이 높은 것으로 나타났다(도 1a 참조). AcAT 발현량이 높은 것은 상대적으로 치료율이 낮을 수 있음을 시사한다.

[0146] 1.3 AcAT 발현 정도에 따른 그룹별 누적 생존율

[0147] 본 연구는 임상연구 윤리심의위원회의 심의를 거친 후 전향적 연구로서 허가를 받았으며, 모든 환자들은 충분한 연구 설명을 들은 후 이에 동의한 자에 한하여 연구에 포함하였다. 위암 환자 1015명을 모집하였으며, 이들로부터 파라핀으로 처리된 조직 절편들을 수득하여 단백질 수준을 분석하는 조직 유전자 미세배열 분석 방법(Tissue microarray; TMA)을 이용하여 AcAT 면역 염색을 수행하였다. AcAT 발현이 높게 나타난 환자 그룹에서의 누적 생존율이 AcAT 발현이 상대적으로 낮은 환자 그룹보다 낮게 나타난 것을 확인할 수 있었다(도 1b 참조).

[0149] **실시예 2: 항암제 내성 유무와 줄기세포 표면 마커(CD133 및 CD44)의 상관관계**

[0150] 상기 실시예 1의 방법으로 내성 위암 세포를 수득하였으며, 항암제 내성 세포와 줄기세포와의 상관 관계를 확인하고자 하였다. 암 줄기세포는 통상적인 암 세포에 비하여 항암 치료 효과가 낮고 재발의 위험 또한 높은 것으로 잘 알려져 있으며, CD133 및 CD44는 암 줄기세포에서 나타나는 지표에 해당한다. S 세포군과 줄기세포 표면 마커인 CD133과 CD44로 분류한 모세포(P 세포) 각 군에서의 AcAT 유전자의 발현 정도를 웨스턴 블롯에 의하여 측정하였다. S 세포에서와 같은 양상으로 모세포에서도 줄기세포 표면 마커의 유무에 따른 결과가 나타난 것으로 확인되었다(도 2a 내지 도 2c 참조). 보다 구체적으로 CD133 양성, 및 CD44 양성으로 나타난 모세포의 경우 CD133 음성, 및 CD44 음성으로 나타난 모세포에 비하여 상대적으로 AcAT 발현량이 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. 또한, 약물 반응을 수치화하는 방법으로 예를 들어, IC₅₀은 약물이 투여되었을 때 세포의 활성도(enzyme/protein activity)가 절반으로 떨어지는 순간의 최대 농도(maximal concentration)를 가리킨다. 여기서 세포의 활성도를 나타내는 지표로 사용되었다. CD133 양성, 및 CD44 양성의 경우 AcAT 발현량이 높고, 이 경우 5-플루오로우라실(5-Fu)와 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대하여 IC₅₀이 높게 나타나 항암제 저항성을 갖는 것으로 볼 수 있다. IC₅₀ 농도가 높게 측정될수록 저항성 또한 높아지게 된다.

[0152] **실시예 3: AcAT 마커와 항암제 내성의 상관관계**

[0153] 상기 실시예 1의 방법으로 내성 위암 세포를 수득하였으며, P 세포와 S 세포에서 AcAT의 발현 수준과 5-플루오로우라실(5-Fu) 및 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 IC₅₀ 농도를 측정된 결과, 도 3a 내지 도 3c에서 보는 바와 같이, S 세포에서 AcAT의 발현량이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었고, 이렇게 AcAT가 높게 발현되는 S 세포에서 5-플루오로우라실(5-Fu) 및 옥살리플라틴(Oxaliplatin)의 IC₅₀ 농도가 높게 측정된 것으로부터 항암제 내성이 발생한 것을 확인할 수 있었다.

[0154] AcAT가 높게 발현되는 경우 5-플루오로우라실(5-Fu) 또는 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 약물에 대한 저항성이 높아지는 것을 통해 마커와 내성 발생과의 상관관계를 확인할 수 있다(도 4 참조). 또한, 본 발명자들은 조직에서의 마커의 수준 변화를 관찰하기 위하여 환자 유래 오가노이드(patient-derived organoid; PDO)를 제조하여 상기 실시예에서와 같이 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였으며, 항암제 저항성을 보기 위하여 MTS 어세이를 통해 세포 생존력을 분석하였다. 세럼 프리 배양배지(serum-free culture medium)를 이용하여 성장 인자(growth factor)를 보충하여 하기의 방법에 의하여 암 스페로이드를 제조하였다. 배양된 스페로이드를 15ml 코니컬 튜브로 옮긴 후, 저온의 PBS를 15ml까지 채우고, 1200 rpm으로 5분 동안 원심분리 하고, PBS로 세척하는 과정을 3회 반복하여 매트릭셀을 제거하였다. 4%(w/v) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)를 넣어 세포를 고정하고, 30분 동안 인큐베이션한 후, PBS로 3회 세척하였다. 트리톤 X-100(Triton X-100) 용액 (in PBS; 농도: 1%(v/v))을 세포 시료에 넣고 1시간 동안 인큐베이션한 후, 트리톤 X-100 용액(in PBS; 농도: 2%(v/v))을 넣어주고 2회 세척하였다. 그 후, 차단버퍼 (BSA 0.279g, 염소 혈청 450ul, 트리톤 X-100 180ul, PBS 20X 450ul, DW 7920ul)를 넣고 30분 동안 인큐베이션하였다. BubR1 항체(BD bioscience)를 처리하고 16시간 동안 인큐베이션하였다. 0.2%(v/v) PBS-T (Triton X-100 solution in PBS)로 20분간 3회 세척하였다. HRP 태그가 달린 이차 항체(Thermo Fisher Scientific)를 넣고 16시간 동안 인큐베이션하였다. 0.2%(v/v) PBS-T로 20분간 3회 세척하고, FITC 컨쥬게이션된 튜블린 항체(Abcam)를 1:1000 비율로 처리하고 2일 동안 인큐베이션하였다. 0.2%(v/v) PBS-T로 20분간 3회 세척 후, DAPI를 넣고 하루 동안 인큐베이션하였다.

[0155] 상기 실험 결과 세포의 활성도에 변화를 주는 약물 농도에 차이가 나타났으며, 이러한 차이를 도 4에 나타내었다. 상기 도면은 위암 환자 조직을 이용한 3D 모델 시스템(PDO)의 결과로서 N은 정상(normal) 조직으로 만든 오가노이드를 의미하며, T는 종양(tumor) 조직으로 만든 오가노이드로 각각의 숫자는 수술 환자의 번호(case n

o.)를 의미한다. 도 4를 참조하면 이들 중 293N군, 316N군은 정상 오가노이드이므로 AcAT의 발현이 낮게 나타났으며, 상대적으로 200T군과 215T군, 247T군에서 AcAT가 높은 수준으로 측정되었다. 이 때, 종양 오가노이드 중에서도 247T군에서 상대적으로 낮은 수준의 AcAT가 측정된 것을 확인하여 215T 및 247T 두 개의 군의 약물 저항성을 추가로 확인하였다. 그 결과 AcAT가 가장 높은 수준으로 발현된 215T군에서 5-플루오로우라실(5-Fu)와 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 저항성, 즉 내성이 높게 측정되었으며, AcAT 발현이 상대적으로 낮게 나타난 247T군에서 상기 약물에 대한 감수성이 좋은 것을 확인할 수 있었다. 통상 개발되어 있는 많은 항암 약물들은 어느 정도의 독성은 존재하기에 저농도의 약물 투여만으로도 동일한 효과를 얻을 수 있다면 치료 효과에 크게 기여할 수 있다.

[0157] 실시예 4: 아세틸화 기전의 조절을 통한 항암제 내성 치료 가능성 확인

[0158] SK4 위암 세포주로부터 실시예 1.1에 따라 P 세포와 S 세포를 준비하였으며, P 세포를 대조군(PSK4-WT)과 아세틸화 촉진(PSK4-K40Q)군으로, S 세포를 대조군(SSK4-WT)과 아세틸화 결핍(SSK4-K40R)군으로 나누어 AcAT 마커의 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통하여 측정한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0159] 도 5를 참조하면 각 군에 5-플루오로우라실(5-Fu)와 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 약물을 투여한 후 IC₅₀ 농도의 변화를 확인하고, 이를 수치화하여 그래프로 나타내어 비교한 결과, SSK4 대조군에 비하여 리신40의 아세틸화가 억제된 SSK4군에서의 항암제 저항성이 낮아지는 것을 확인하였고, 이를 통해 항암제 내성이 극복된 것으로 볼 수 있다. 반면에, PSK4 대조군에 비하여 리신40의 아세틸화가 촉진된 PSK4군에서의 항암제 저항성은 되레 4배 내지 5배 이상 증가한 것으로 확인되었다. 이를 통하여 K40의 아세틸화 작용을 조절함으로써 상기 약물에 대한 내성을 치료할 수 있음을 시사한다. 상기 결과를 종합하여 항암제 감수성이 가장 높은 순으로 나열하면, PSK4-WT군, SSK4-K40R군, PSK4-K40Q군, SSK4-WT군으로 PSK4-WT군 및 SSK4-K40R군의 항암 효과가 좋은 반면, PSK4-K40Q군 및 SSK4-WT군의 항암 효과가 낮게 나타났다.

[0161] 실시예 5: HDAC 및 aTAT1 발현 조절을 통한 항암제 내성 치료 가능성 확인

[0162] 아세틸화 기전의 조절을 통한 치료 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 4에서 준비한 PSK4 및 SSK4 세포군으로 나누어 HDAC6 억제제 약물을 처리하거나 aTAT1 발현을 siRNA를 이용해 억제된 시킨 뒤 항암제 저항성의 정도를 MTS 어세이를 통해 분석하였다. 이때, 사용한 siRNA는 아래의 표 1과 같다.

표 1

프라이머	방향	시퀀스(5'→3')	서열번호
si aTAT1 #1	센스	GAGAAGCACACUCUUGCUU	서열번호 5
	안티센스	AAGCAAGAGUGUCUUCUC	서열번호 6
si aTAT1 #2	센스	GAGAGUAGAUCCAGAGUGU	서열번호 7
	안티센스	ACACUCUGGAUCUACUCUC	서열번호 8
si aTAT1 #3	센스	CAGUCCCACAGGUGAACAA	서열번호 9
	안티센스	UUGUUCACCUUGGGACUG	서열번호 10

[0164] 상기 표 1에서 사용한 si aTAT1 리스트 중에서 비교적 효과적으로 억제가 확인된 #3의 si aTAT1을 이용하여 추가로 항암제 저항성의 정도를 확인하였다(도 7 참조). 실험 결과 도 6 및 도 7을 참조하면, HDAC6를 억제한 경우 되레 PSK4 군에서 5-플루오로우라실(5-Fu)와 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 저항성, 즉 상기 약물에 대한 내성이 증가한 것으로 나타났다. 반면, aTAT1 발현을 siRNA(#3)를 이용해 억제시킨 경우 항암제 저항성을 살펴보면, SSK4 군에서 상기 약물에 대한 저항성을 낮추어 내성이 치료된 것을 확인할 수 있다. 한편, 상기 약물이 아닌 다른 항암 약물 중 YH21931 및 Frost-450을 투여하고 MTS 어세이를 통해 분석하였다. 여기서, 상기 YH21931 약물은 YH16899 (Kim DG et al., Nat Chem Biol. 2014 Jan; 10(1) :29-34)와 동일한 약물로 대사작용의 억제 외에도 G2/M기의 세포 주기 정지, 카스파제 활성화 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있는 약물에 해당하며, Frost-450 약물은 미세소관을 표적으로 하는 약물로서 미세소관 중합을 억제하는 소분자로 다양한 암 치료에 사용되는 약물에 해당한다.

[0165] 실험 결과, AcAT 발현이 낮게 나타나는 P 세포군과 AcAT 발현이 높게 나타나는 S 세포군에서 5-플루오로우라실

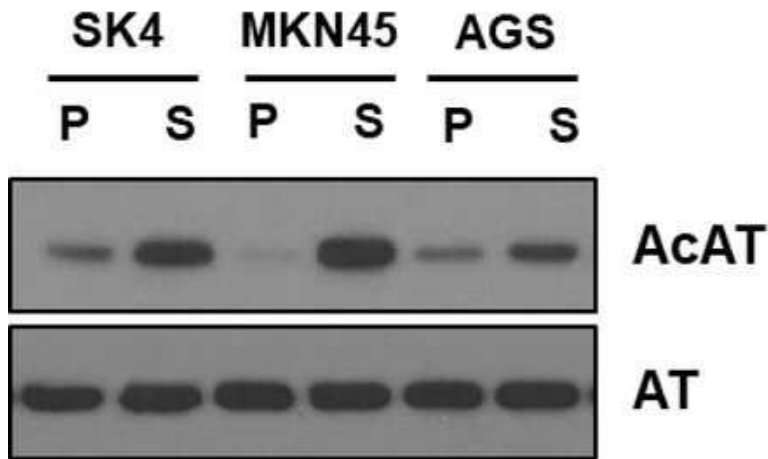
(5-Fu)과 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 약물에서 확인한 양상과 반대의 결과가 나타난 것으로 확인되었다(도 8 참조). 이를 통하여 약물의 종류에 따른 항암제 내성 치료 방법은 약물 종류에 따라 달라질 수 있음을 시사하며, 상기 아세틸화 억제제(HDAC6 촉진제 또는 aTAT1 억제제)를 다른 항암제와 병용 투여할 경우 항암제 내성이 치료됨으로써 항암 작용에 시너지 효과가 유도될 수 있다.

[0166] 상기 실시예 1 내지 4를 종합적으로 고려하면, 항암제 내성 진단을 위한 용도로서 AcAT 마커를 활용할 수 있으며, 더 나아가 HDAC의 발현을 촉진하거나 aTAT1의 발현을 억제하여 5-Fu와 옥살리플라틴 약물 내성을 극복할 수 있으므로, 해당 약물 치료 후 내성이 발생한 환자를 선별하여 약물 내성을 치료함으로써 항암 효과를 현저히 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

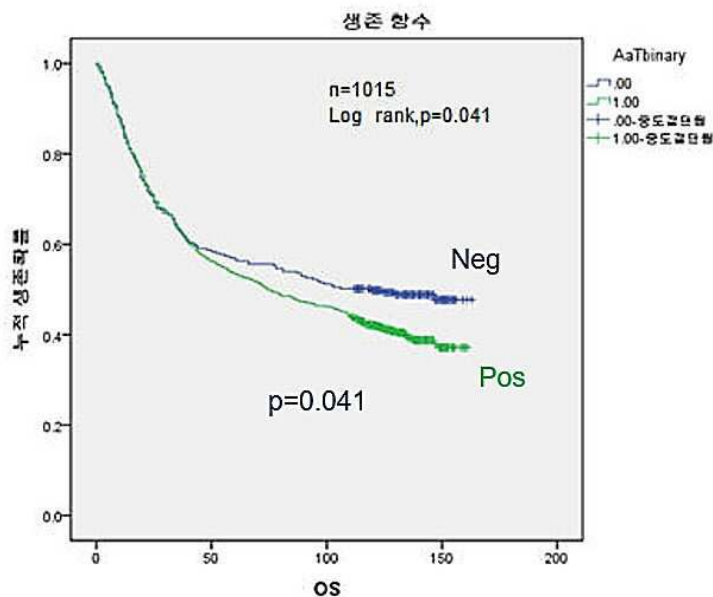
[0168] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

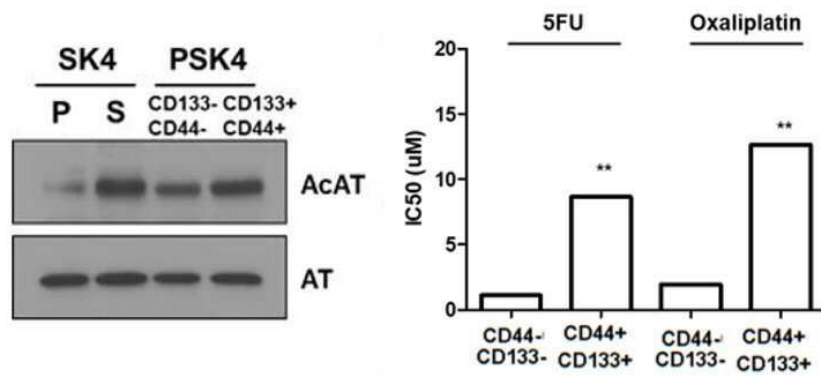
도면1a



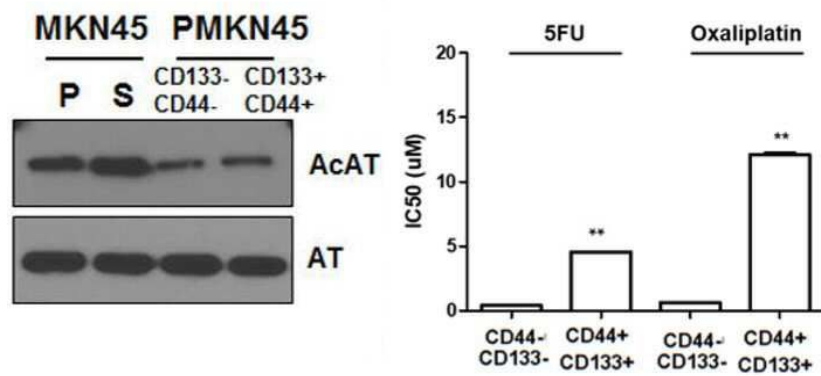
도면1b



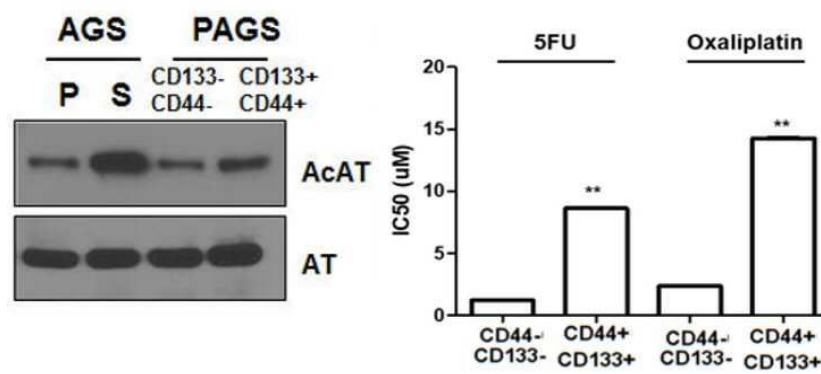
도면2a



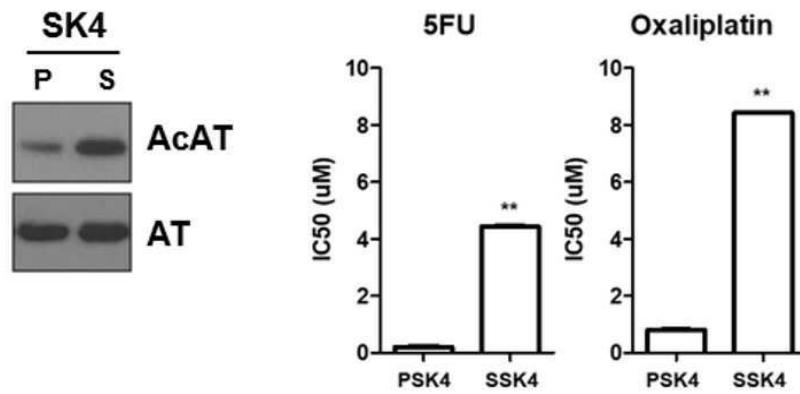
도면2b



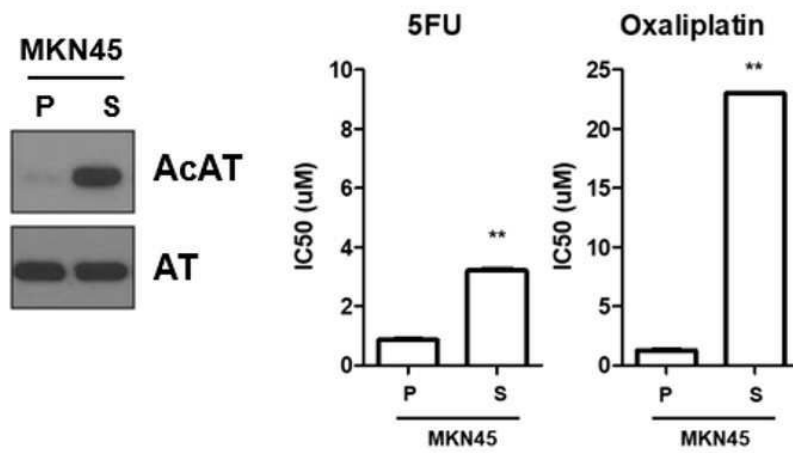
도면2c



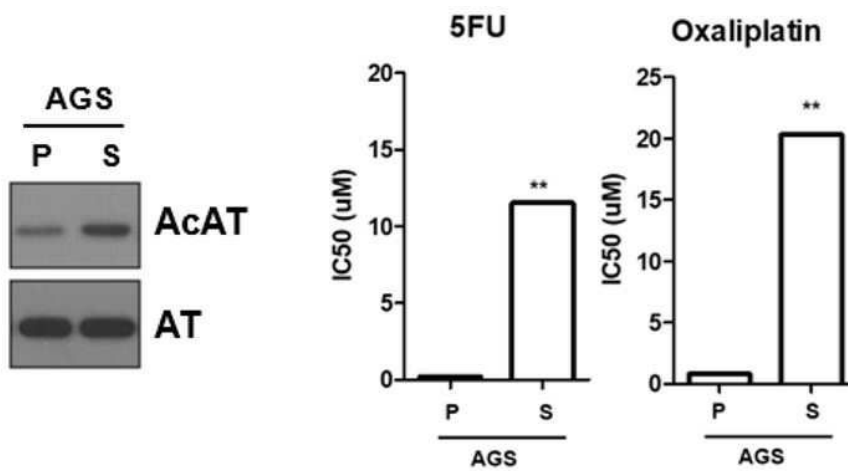
도면3a



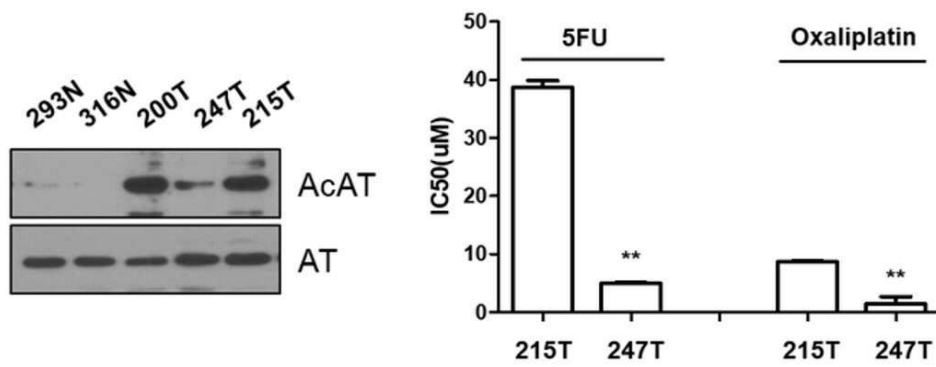
도면3b



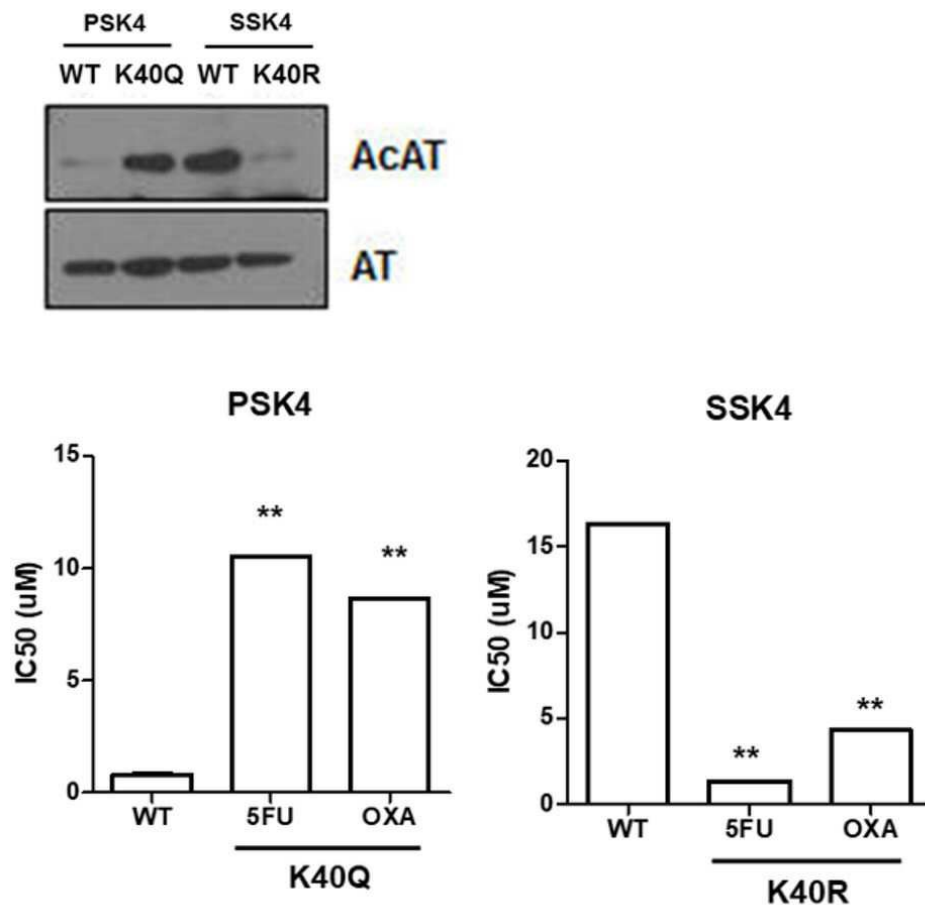
도면3c



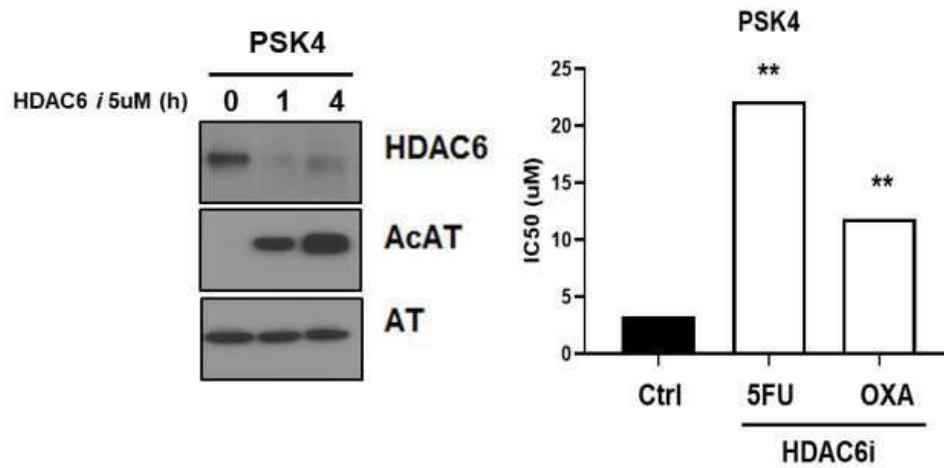
도면4



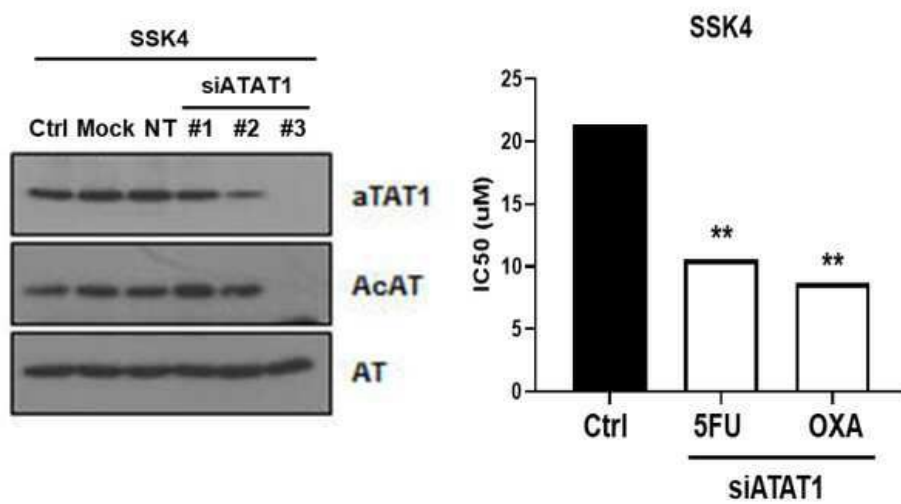
도면5



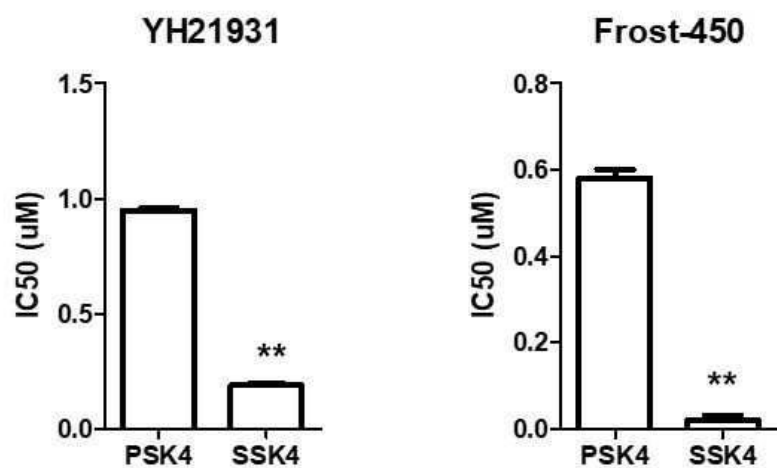
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
 <120> Composition for diagnosing or treating drug resistant cancer
 <130> PDPB201840k01
 <150> KR 10-2020-0029938
 <151> 2020-03-11
 <160> 10
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Arg Glu Cys Ile Ser Ile His Val Gly Gln Ala Gly Val Gln Ile

1 5 10 15

Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Tyr Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Pro

20 25 30

Asp Gly Gln Met Pro Ser Asp Lys Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asp Ser

35 40 45

Phe Asn Thr Phe Phe Ser Glu Thr Gly Ala Gly Lys His Val Pro Arg

50 55 60

Ala Val Phe Val Asp Leu Glu Pro Thr Val Ile Asp Glu Val Arg Thr

65 70 75 80

Gly Thr Tyr Arg Gln Leu Phe His Pro Glu Gln Leu Ile Thr Gly Lys

85 90 95

Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Ile Gly Lys

100 105 110

Glu Ile Ile Asp Leu Val Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ala Asp Gln

115 120 125

Cys Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Val Phe His Ser Phe Gly Gly Gly

130 135 140

Thr Gly Ser Gly Phe Thr Ser Leu Leu Met Glu Arg Leu Ser Val Asp

145 150 155 160

Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Glu Phe Ser Ile Tyr Pro Ala Pro Gln

165 170 175
Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Ile Leu Thr Thr His
180 185 190
Thr Thr Leu Glu His Ser Asp Cys Ala Phe Met Val Asp Asn Glu Ala
195 200 205
Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Asn Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
210 215 220
Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Gly Gln Ile Val Ser Ser Ile Thr Ala
225 230 235 240

Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Leu Thr Glu Phe Gln
245 250 255
Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Pro Leu Ala Thr Tyr
260 265 270
Ala Pro Val Ile Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Ser Val
275 280 285
Ala Glu Ile Thr Asn Ala Cys Phe Glu Pro Ala Asn Gln Met Val Lys
290 295 300
Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ala Cys Cys Leu Leu Tyr Arg

305 310 315 320
Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Thr Ile Lys
325 330 335
Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
340 345 350
Val Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
355 360 365
Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Leu Ser Asn Thr Thr Ala Ile
370 375 380

Ala Glu Ala Trp Ala Arg Leu Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ala
385 390 395 400
Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly

405 410 415
 Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Met Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr
 420 425 430
 Glu Glu Val Gly Val Asp Ser Val Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Gly
 435 440 445
 Glu Glu Tyr

450
 <210> 2
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 atgcgtgagt gcatctccat ccacgttggc caggctgggtg tccagattgg caatgcctgc 60
 tgggagctct actgcctgga acacggcatc cagcccgatg gccagatgcc aagtgacaag 120
 accattggggg gaggagatga ttccttcaac accttcttca gtgagacggg ggctggcaag 180
 catgtgcccc gggcagtggt ttagacttg gaaccacag tcattgatga agttcgact 240
 ggacactacc gccagctctt ccacctgag caacttatca caggcaaaga agatgctgcc 300
 aataactatg cccgagggca ctacaccatt ggcaaggaga tcattgacct cgtgttgac 360
 cgaattcgca agctggccga ccagtgcacg ggtctccagg gcttcttgggt ttccacagc 420
 tttgggtggg gaactgggtc tgggttcacc tcgctgctca tggaacgtct ctcagttgat 480
 tatggcaaga agtccaagct ggagttctct atttaccgg cgccccaggt ttccacagct 540
 gtagttgagc cctacaactc catctcacc acccacacca ccctggagca ctctgattgt 600
 gccttcatgg tagacaatga ggccatctat gacatctgtc gtagaaacct cgatattgag 660
 cgtccaacct atactaacct gaatagggtta ataggtaaaa ttgtgtctc catcactgct 720
 tccctgagat ttgatggagc cctgaatgtt gacctgacag aattccagac caacctggtg 780
 ccctatcccc gcatccactt ccctctggcc acatatgccc ctgtcatctc tgctgagaaa 840
 gcctaccatg aacagcttcc ttagcagag atcaccaatg cttgctttga gccagccaac 900
 cagatggtga aatgtgacct tcgcatggt aaatacatgg cttgtgcct gttgtaccgt 960
 ggtgacgtgg ttcccaaaga tgtcaatgct gccattgcca ccatcaagac caagcgtacc 1020
 atccagtttg tggattgggtg cccactggc ttcaagggtg gcataacta ccagcctccc 1080
 actgtggtgc ctggtggaga cctggccaag gtacagagag ctgtgtgcat gctgagcaac 1140

accacagcca ttgtctgagc ctgggctcgc ctggaccaca agtttgacct gatgtatgcc 1200

aaacgtgcct ttgttactg gtacgttggg gaggggatgg aggaaggtga gttttcagag 1260

gcccgtgagg acatggtcgc ccttgagaag gattatgagg aggttggtgt ggattctgtt 1320

gaaggagagg gtgaggaaga aggagaggaa tactaa 1356

<210> 3

<211> 1215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Thr Ser Thr Gly Gln Asp Ser Thr Thr Thr Arg Gln Arg Arg Ser

1 5 10 15

Arg Gln Asn Pro Gln Ser Pro Pro Gln Asp Ser Ser Val Thr Ser Lys

20 25 30

Arg Asn Ile Lys Lys Gly Ala Val Pro Arg Ser Ile Pro Asn Leu Ala

35 40 45

Glu Val Lys Lys Lys Gly Lys Met Lys Lys Leu Gly Gln Ala Met Glu

50 55 60

Glu Asp Leu Ile Val Gly Leu Gln Gly Met Asp Leu Asn Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Leu Val Leu Asp Glu Gln Leu Asn Glu

85 90 95

Phe His Cys Leu Trp Asp Asp Ser Phe Pro Glu Gly Pro Glu Arg Leu

100 105 110

His Ala Ile Lys Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Leu Leu Asp Arg Cys

115 120 125

Val Ser Phe Gln Ala Arg Phe Ala Glu Lys Glu Glu Leu Met Leu Val

130 135 140

His Ser Leu Glu Tyr Ile Asp Leu Met Glu Thr Thr Gln Tyr Met Asn

145 150 155 160

Glu Gly Glu Leu Arg Val Leu Ala Asp Thr Tyr Asp Ser Val Tyr Leu

165 170 175

His Pro Asn Ser Tyr Ser Cys Ala Cys Leu Ala Ser Gly Ser Val Leu
180 185 190

Arg Leu Val Asp Ala Val Leu Gly Ala Glu Ile Arg Asn Gly Met Ala
195 200 205

Ile Ile Arg Pro Pro Gly His His Ala Gln His Ser Leu Met Asp Gly
210 215 220

Tyr Cys Met Phe Asn His Val Ala Val Ala Ala Arg Tyr Ala Gln Gln
225 230 235 240

Lys His Arg Ile Arg Arg Val Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Gln Phe Thr Phe Asp Gln Asp Pro Ser Val Leu Tyr
260 265 270

Phe Ser Ile His Arg Tyr Glu Gln Gly Arg Phe Trp Pro His Leu Lys
275 280 285

Ala Ser Asn Trp Ser Thr Thr Gly Phe Gly Gln Gly Gln Gly Tyr Thr
290 295 300

Ile Asn Val Pro Trp Asn Gln Val Gly Met Arg Asp Ala Asp Tyr Ile
305 310 315 320

Ala Ala Phe Leu His Val Leu Leu Pro Val Ala Leu Glu Phe Gln Pro
325 330 335

Gln Leu Val Leu Val Ala Ala Gly Phe Asp Ala Leu Gln Gly Asp Pro
340 345 350

Lys Gly Glu Met Ala Ala Thr Pro Ala Gly Phe Ala Gln Leu Thr His
355 360 365

Leu Leu Met Gly Leu Ala Gly Gly Lys Leu Ile Leu Ser Leu Glu Gly
370 375 380

Gly Tyr Asn Leu Arg Ala Leu Ala Glu Gly Val Ser Ala Ser Leu His
385 390 395 400

Thr Leu Leu Gly Asp Pro Cys Pro Met Leu Glu Ser Pro Gly Ala Pro
405 410 415

Cys Arg Ser Ala Gln Ala Ser Val Ser Cys Ala Leu Glu Ala Leu Glu
420 425 430

Pro Phe Trp Glu Val Leu Val Arg Ser Thr Glu Thr Val Glu Arg Asp
435 440 445

Asn Met Glu Glu Asp Asn Val Glu Glu Ser Glu Glu Glu Gly Pro Trp
450 455 460

Glu Pro Pro Val Leu Pro Ile Leu Thr Trp Pro Val Leu Gln Ser Arg
465 470 475 480

Thr Gly Leu Val Tyr Asp Gln Asn Met Met Asn His Cys Asn Leu Trp
485 490 495

Asp Ser His His Pro Glu Val Pro Gln Arg Ile Leu Arg Ile Met Cys
500 505 510

Arg Leu Glu Glu Leu Gly Leu Ala Gly Arg Cys Leu Thr Leu Thr Pro
515 520 525

Arg Pro Ala Thr Glu Ala Glu Leu Leu Thr Cys His Ser Ala Glu Tyr
530 535 540

Val Gly His Leu Arg Ala Thr Glu Lys Met Lys Thr Arg Glu Leu His
545 550 555 560

Arg Glu Ser Ser Asn Phe Asp Ser Ile Tyr Ile Cys Pro Ser Thr Phe
565 570 575

Ala Cys Ala Gln Leu Ala Thr Gly Ala Ala Cys Arg Leu Val Glu Ala
580 585 590

Val Leu Ser Gly Glu Val Leu Asn Gly Ala Ala Val Val Arg Pro Pro
595 600 605

Gly His His Ala Glu Gln Asp Ala Ala Cys Gly Phe Cys Phe Phe Asn
610 615 620

Ser Val Ala Val Ala Ala Arg His Ala Gln Thr Ile Ser Gly His Ala
625 630 635 640

Leu Arg Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr
645 650 655

Gln His Met Phe Glu Asp Asp Pro Ser Val Leu Tyr Val Ser Leu His
660 665 670

Arg Tyr Asp His Gly Thr Phe Phe Pro Met Gly Asp Glu Gly Ala Ser

675 680 685
 Ser Gln Ile Gly Arg Ala Ala Gly Thr Gly Phe Thr Val Asn Val Ala
 690 695 700
 Trp Asn Gly Pro Arg Met Gly Asp Ala Asp Tyr Leu Ala Ala Trp His
 705 710 715 720
 Arg Leu Val Leu Pro Ile Ala Tyr Glu Phe Asn Pro Glu Leu Val Leu
 725 730 735
 Val Ser Ala Gly Phe Asp Ala Ala Arg Gly Asp Pro Leu Gly Gly Cys
 740 745 750

 Gln Val Ser Pro Glu Gly Tyr Ala His Leu Thr His Leu Leu Met Gly
 755 760 765
 Leu Ala Ser Gly Arg Ile Ile Leu Ile Leu Glu Gly Gly Tyr Asn Leu
 770 775 780
 Thr Ser Ile Ser Glu Ser Met Ala Ala Cys Thr Arg Ser Leu Leu Gly
 785 790 795 800
 Asp Pro Pro Pro Leu Leu Thr Leu Pro Arg Pro Pro Leu Ser Gly Ala
 805 810 815
 Leu Ala Ser Ile Thr Glu Thr Ile Gln Val His Arg Arg Tyr Trp Arg

 820 825 830
 Ser Leu Arg Val Met Lys Val Glu Asp Arg Glu Gly Pro Ser Ser Ser
 835 840 845
 Lys Leu Val Thr Lys Lys Ala Pro Gln Pro Ala Lys Pro Arg Leu Ala
 850 855 860
 Glu Arg Met Thr Thr Arg Glu Lys Lys Val Leu Glu Ala Gly Met Gly
 865 870 875 880
 Lys Val Thr Ser Ala Ser Phe Gly Glu Glu Ser Thr Pro Gly Gln Thr
 885 890 895

 Asn Ser Glu Thr Ala Val Val Ala Leu Thr Gln Asp Gln Pro Ser Glu
 900 905 910
 Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Leu Ala Gln Thr Ile Ser Glu Ala Ala
 915 920 925
 Ile Gly Gly Ala Met Leu Gly Gln Thr Thr Ser Glu Glu Ala Val Gly

930 935 940
 Gly Ala Thr Pro Asp Gln Thr Thr Ser Glu Glu Thr Val Gly Gly Ala
 945 950 955 960
 Ile Leu Asp Gln Thr Thr Ser Glu Asp Ala Val Gly Gly Ala Thr Leu

 965 970 975
 Gly Gln Thr Thr Ser Glu Glu Ala Val Gly Gly Ala Thr Leu Ala Gln
 980 985 990
 Thr Thr Ser Glu Ala Ala Met Glu Gly Ala Thr Leu Asp Gln Thr Thr
 995 1000 1005
 Ser Glu Glu Ala Pro Gly Gly Thr Glu Leu Ile Gln Thr Pro Leu Ala
 1010 1015 1020
 Ser Ser Thr Asp His Gln Thr Pro Pro Thr Ser Pro Val Gln Gly Thr
 1025 1030 1035 1040

 Thr Pro Gln Ile Ser Pro Ser Thr Leu Ile Gly Ser Leu Arg Thr Leu
 1045 1050 1055
 Glu Leu Gly Ser Glu Ser Gln Gly Ala Ser Glu Ser Gln Ala Pro Gly
 1060 1065 1070
 Glu Glu Asn Leu Leu Gly Glu Ala Ala Gly Gly Gln Asp Met Ala Asp
 1075 1080 1085
 Ser Met Leu Met Gln Gly Ser Arg Gly Leu Thr Asp Gln Ala Ile Phe
 1090 1095 1100
 Tyr Ala Val Thr Pro Leu Pro Trp Cys Pro His Leu Val Ala Val Cys

 1105 1110 1115 1120
 Pro Ile Pro Ala Ala Gly Leu Asp Val Thr Gln Pro Cys Gly Asp Cys
 1125 1130 1135
 Gly Thr Ile Gln Glu Asn Trp Val Cys Leu Ser Cys Tyr Gln Val Tyr
 1140 1145 1150
 Cys Gly Arg Tyr Ile Asn Gly His Met Leu Gln His His Gly Asn Ser
 1155 1160 1165
 Gly His Pro Leu Val Leu Ser Tyr Ile Asp Leu Ser Ala Trp Cys Tyr
 1170 1175 1180

Tyr Cys Gln Ala Tyr Val His His Gln Ala Leu Leu Asp Val Lys Asp
 1185 1190 1195 1200
 Ile Ala His Gln Asn Lys Phe Gly Glu Asp Met Pro His Pro His
 1205 1210 1215
 <210> 4
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Trp Leu Thr Trp Pro Phe Cys Phe Leu Thr Ile Thr Leu Arg Glu
 1 5 10 15
 Glu Gly Val Cys His Leu Glu Ser Val Asp Leu Gln Gln Gln Ile Met
 20 25 30
 Thr Ile Ile Asp Glu Leu Gly Lys Ala Ser Ala Lys Ala Gln Asn Leu
 35 40 45
 Ser Ala Pro Ile Thr Ser Ala Ser Arg Met Gln Ser Asn Arg His Val
 50 55 60
 Val Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Ser Ala Arg Pro Ala Gly Lys Gly Ala
 65 70 75 80
 Ile Ile Gly Phe Ile Lys Val Gly Tyr Lys Lys Leu Phe Val Leu Asp
 85 90 95
 Asp Arg Glu Ala His Asn Glu Val Glu Pro Leu Cys Ile Leu Asp Phe
 100 105 110
 Tyr Ile His Glu Ser Val Gln Arg His Gly His Gly Arg Glu Leu Phe
 115 120 125
 Gln Tyr Met Leu Gln Lys Glu Arg Val Glu Pro His Gln Leu Ala Ile
 130 135 140
 Asp Arg Pro Ser Gln Lys Leu Leu Lys Phe Leu Asn Lys His Tyr Asn
 145 150 155 160
 Leu Glu Thr Thr Val Pro Gln Val Asn Asn Phe Val Ile Phe Glu Gly
 165 170 175
 Phe Phe Ala His Gln His Arg Pro Pro Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr

180 185 190
 Arg His Ser Arg Ala Ala Ala Val Asp Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala
 195 200 205
 Arg Lys Leu Pro Pro Lys Arg Ala Glu Gly Asp Ile Lys Pro Tyr Ser
 210 215 220
 Ser Ser Asp Arg Glu Phe Leu Lys Val Ala Val Glu Pro Pro Trp Pro
 225 230 235 240

Leu Asn Arg Ala Pro Arg Arg Ala Thr Pro Pro Ala His Pro Pro Pro
 245 250 255
 Arg Ser Ser Ser Leu Gly Asn Ser Pro Glu Arg Gly Pro Leu Arg Pro
 260 265 270
 Phe Val Pro Glu Gln Glu Leu Leu Arg Ser Leu Arg Leu Cys Pro Pro
 275 280 285
 His Pro Thr Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala Asp Pro Gly Gly Ser Pro
 290 295 300
 Ala Gln Arg Arg Arg Thr Arg Gly Thr Pro Pro Gly Leu Val Ala Gln

305 310 315 320
 Ser Cys Cys Tyr Ser Arg His Gly Gly Val Asn Ser Ser Ser Pro Asn
 325 330 335
 Thr Gly Asn Gln Asp Ser Lys Gln Gly Glu Gln Glu Thr Lys Asn Arg
 340 345 350
 Ser Ala Ser Glu Glu Gln Ala Leu Ser Gln Asp Gly Ser Gly Glu Lys
 355 360 365
 Pro Met His Thr Ala Pro Pro Gln Ala Pro Ala Pro Pro Ala Gln Ser
 370 375 380

Trp Thr Val Gly Gly Asp Ile Leu Asn Ala Arg Phe Ile Arg Asn Leu
 385 390 395 400
 Gln Glu Arg Arg Ser Thr Arg Pro Trp
 405

<210> 5
 <211> 19
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense si aTAT1 #1

<400> 5

gagaagcaca cucuugcuu

19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense si aTAT1 #1

<400> 6

aagcaagagu gugcuucuc

19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense si aTAT1 #2

<400> 7

gagaguagau ccagagugu

19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense si aTAT1 #2

<400> 8

acacucugga ucuacucuc

19

<210> 9

<211>

19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense si aTAT1 #3

<400> 9

cagucccaca ggugaacaa

19

<210> 10

<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-sense si aTAT1 #3
<400> 10
uuguucaccu gugggacug

19