

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 6월 17일 (17.06.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/067969 A2

(51) 국제특허분류:

C12N 15/12 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/006832

(22) 국제출원일: 2009년 11월 19일 (19.11.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2008-0124481 2008년 12월 9일 (09.12.2008) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)** [KR/KR]; 대전 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **원미선 (WON, Misun)** [KR/KR]; 대전 서구 월평 3동 누리아파트 115-508, 115-508 Daejeon (KR). **정경숙 (CHUNG, Kyung-Sook)** [KR/KR]; 대전 유성구 관평동 운암아파트 612-1902, 305-509 Daejeon (KR). **조선정 (CHO, Sun-Jung)** [KR/KR]; 경상북도 경주시 현곡면 금장리 384-8 금강주공아파트 104-105, 780-922 Gyeongsangbuk-do (KR). **최신정 (CHOI, Shin-Jung)** [KR/KR]; 대전 유성구 신성동 리키아파트 110-809, 305-721 Daejeon (KR). **염영일 (YEOM, Young Il)** [KR/KR]; 대전 동구 용전동 신동아아파트 8동 1302호, 300-766 Daejeon (KR). **김선영 (KIM, Seon-Young)** [KR/KR]; 대전 유성구 도룡동 과기원교수아파트 2-205, 305-340 Daejeon (KR). **송경빈 (SONG, Kyung Bin)** [KR/KR]; 대전 서구 월평 3동 누리아파트 115-508, 302-791 Daejeon (KR). **이희구 (LEE, Hee Gu)** [KR/KR]; 대전 동구 용전동 신동아아파트 14-405, 300-766 Daejeon (KR). **송은영 (SONG, Eun Young)** [KR/KR]; 서울 영등포구 여의도동 진주아파트 B동 907호, 150-010 Seoul (KR). **김영호 (KIM, Young Ho)** [KR/KR]; 서울 강남구 대치3동 우성 1차아파트 5-1303, 135-834 Seoul (KR). **전호경**

(CHUN, Ho Kyung) [KR/KR]; 서울 강남구 일원동 50번지, 135-230 Seoul (KR). **김문희 (KIM, Moon Hee)** [KR/KR]; 서울 서초구 잠원동 금호베스트빌 101동 905호, 137-030 Seoul (KR). **정경은 (JUNG, Kyeong-Eun)** [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 비산동 삼성래미안아파트 128-2206, 431-050 Gyeonggi-do (KR). **오유경 (OH, Yu-Kyoung)** [KR/KR]; 서울 도봉구 도봉2동 삼환아파트 4-405, 132-756 Seoul (KR).

(74) 대리인: **안소영 (AHN, So-Young)**; 서울 서초구 서초동 1676-1 신승빌딩 10층 안소영국제특허법률사무소, 137-881 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL USE OF THE LOC284422 GENE

(54) 발명의 명칭 : LOC284422 유전자의 신규한 용도

(57) Abstract: The present invention provides a composition for cancer diagnosis or anti-cancer drug screening containing the LOC284422 gene or an antibody against the proteins expressed by LOC284422 gene, to a cancer treatment composition containing an inhibitor for said gene, an inhibitor for the proteins expressed by said gene, and a pharmaceutically acceptable carrier, and to a kit for cancer diagnosis containing the LOC284422 gene or one or more of the proteins expressed by the LOC284422 gene. The LOC284422 gene of the present invention is largely expressed in cancer cells, and increases the growth speed of normal cells. Therefore, the inhibition of the expression of this gene leads to the inhibition of the growth of cancer cells. Accordingly, the LOC284422 gene can be used as a target gene for the diagnosis of therapeutic agents for different types of cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질을 위한 항체를 포함하는 암 진단용 또는 항암제 스크리닝용 조성물, 상기 유전자의 억제제 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 억제제 및 억제제로서 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 조성물, LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 LOC284422 유전자는 암 세포에 다량 발현되고 정상세포의 증식 속도를 증가시키므로, 이들 유전자의 발현을 저해시키면 암세포의 성장을 억제시키는 작용 효과를 가져온다. 따라서 LOC284422 유전자는 각종 암의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다.



WO 2010/067969 A2

【명세서】**【발명의 명칭】**

LOC 284422 유전자의 신규한 용도

【기술분야】

본 발명은 LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체를 포함하는 암 진단용 또는 항암제 스크리닝용 조성물, 상기 유전자의 억제제 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 억제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 조성물, LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질 중 하나 이상을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.

【배경기술】

인간 유전체 프로젝트 연구 결과, 인체의 질환을 분자 수준에서 이해하고 새로운 질환 관련 표적을 발굴하고 이를 이용한 신약을 개발하고자 하는 신개념의 바이오 생명공학 기술의 시대가 열리고 있다. 이에 따라, 유전적 환경이 다른 환자 개개인에 맞추어 각종 다양한 질병을 진단, 치료, 예측하는 맞춤의학 시대가 현실로 다가오고 있다. 맞춤의학에는 유전체 진단용 바이오마커의 발굴, 표적화 치료기술, 질병 특이적 약물작용점의 발굴, 표적 치료용 신약, 정확한 임상 정보, 환자의 유전체 정보, 유전체적 역학결과, 그리고 이들을 분석 통합할 수 있는 바이오인포매틱스 등이 상호보완적으로 구성된 약물 유전체기술 개발이 수반되어야 한다. 특히, 맞춤의학에서 경쟁력을 갖추기 위해서는 질환과 개인에 대한 약물 예측 시스템, 진단 바이오마커 발굴, 새로운 표적유전자 및 단백질을 발굴하는 기초연구 및 이를 이용한 치료제의 개발이 중요하다.

최근, 전 세계적으로 난치병인 암의 생성 및 치료와 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 치료용 표적을 발굴하고 이들을 진단 및 치료제 개발에 이용하기 위한 치열한 경쟁이 불붙고 있다. 게놈 연구의 활성화와 함께 인간 유전자 DNA 칩 또는 프로테옴 분석 연구가 활발하게 이루어지고 암과 관련된 유전자가 대량 발굴됨에 따라 많은 유전자들의 목록과 관련 데이터베이스는 구축되어 있으나 대부분 이들 유전자들에 대한 세포 내에서의 구체적 생물학적 기능 및 암 관련성은 아직 연구되지 않았거나 불확실하여 실제 암 관련성 또는 진단 및 표적 유전자로 활용하기에 상당한 어려움이 있다.

한편, 수많은 인간 유전자들의 기능에 대한 연구의 필요성이 부각됨에 따라 단순한 기능 및 형태 연구가 가능한 모델 생물체에 대한 활용도 및 관심은 더욱 높

아지고 있다. 이에, 세포 내에서 일어나는 기본적으로 진화적으로 잘 보존되어 있는 기작을 이해하기 위하여 오랫동안 여러 분야에서 사용되어 왔던 모델 생물체(model organism)를 암 진단 또는 치료용 타겟 발굴에 이용하는 연구가 진행되고 있다.

한편, 암세포에서 대량 발현된 유전자에 대해 RNAi (RNA interference) 실험 기법을 이용하면 치료용 암 타겟으로의 사용 가능성을 확실히 확인할 수 있다. RNAi는 다양한 형태의 올리고 이중 리보핵산(miRNA, expressed dsRNA, synthetic siRNA)을 이용하여 세포 내에서 특이적으로 해당 염기서열의 mRNA의 분해를 유도하여 유전자의 기능이 나타나지 못하도록 하는 기법이다. 이렇게 유전자의 발현이 저해된 세포의 표현 현상을 관찰함으로써 해당 유전자의 기능 연구 및 신호전달 경로(pathway) 분석이 가능하여 암 표적으로서의 검증(target validation) 등을 통한 신약 개발 연구가 수행되고 있다.

RNAi 기법에 사용 가능한 올리고 이중 리보핵산 중 최근 각광을 받고 있는 siRNA (small interfering RNA)를 이용한 기법은 2002년 Science Journal에서 "breakthrough of the year"라고 선정할 정도로 획기적인 방법이다. siRNA는 짧은 19-23개의 이중 리보핵산쇄로 세포내 도입하면 비특이적 저해(non-specific inhibition) 없이 특정 유전자의 발현만을 억제하는 효과를 나타내므로 암의 생성을 촉진, 세포사멸을 억제하는 유전자에 대한 siRNA는 세포 내에서 해당 유전자 작용을 억제시켜 암세포를 죽이는 효과를 나타내며 이를 이용하여 치료용 표적유전자를 검증할 수 있다. 따라서 최근 질병에 대한 표적 유전자 발굴, 표적 유전자 검증, 치료제 개발을 위한 siRNA 연구가 매우 활발하다.

한편, LOC284422 유전자는 기능에 대해서는 알려진 바가 없으며 암 관련성에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명은 LOC284422 유전자의 신규한 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

보다 구체적으로, 본 발명은 LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체를 포함하는 암 진단용 또는 항암제 스크리닝용 조성물, 상기 유전자의 억제제 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물, LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질 중 하나 이상을 포함하는 암 진단용 키트를 제공하고자 한다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 LOC284422 유전자를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 'LOC284422 유전자'는 별도 언급이 없는 한 이 유전자의 DNA 또는 mRNA를 말하며, DNA 또는 mRNA의 전부 또는 일부를 모두 포함하는 개념이다. 상기 LOC284422 유전자는 "C19orf77", "HSPC323" 또는 "similar to HSPC323"도 불린다. 연구된 바가 없으므로 단백질은 구조적으로 세포막을 통과하는 Transmembrane protein으로 "hypothetical protein LOC284422"로도 알려져 있다. NCBI GenBank Access No.는 NM_001136503.1이다.

본 발명의 조성물은 상기 유전자 외에도 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, LOC284422 유전자는 암세포에서 특이적으로 발현이 증가한다. 따라서 LOC284422 유전자의 과발현 여부를 조사하면 암을 진단할 수 있다.

그러므로 본 발명은 또한 상기 유전자들의 암 진단제 제조 용도 및 상기 유전자와 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하는 단계를 포함하는 암 진단 방법을 제공한다.

본 발명의 진단 방법에서 상기 유전자를 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응 (PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법 (yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이 (in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산과 하이브리드화한 후 당분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 써던블로팅(southern blotting), 노던 블롯팅(Northern blotting) 등으로 이를 검출함으로써 대상자에서 상기 유전자가 과발현된 상태인지 조사하면 암의 발생 여부를 판단할 수 있다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다.

본 발명은 또한 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 상기 단백질 외에도 단백질의 구조를 안정하게 유지시키

는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

앞서 언급한 바와 같이 LOC284422 유전자는 암세포에서 특이적으로 발현이 증가하므로 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 이용하여 LOC284422 유전자 또는 단백질의 과발현 여부를 조사하면 암을 진단할 수 있다.

따라서 본 발명은 또한 상기 단백질들의 암 진단제 제조 용도 및 상기 단백질과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 암을 진단하는 방법을 제공한다.

본 발명의 진단 방법에서 상기 단백질을 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-단백질, RNA-단백질, 단백질-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응 (PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 특이적 면역염색(histoimmunostaining), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이 (in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자들로부터 발현된 단백질의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산 또는 단백질과 하이브리드화한 후 당분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 웨스턴 블로팅(western blotting) 등으로 이를 검출함으로써 대상자에서 상기 유전자가 과발현된 상태인지 조사하면 암의 발생 여부를 판단할 수 있다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다.

다르게는 본 발명의 조성물은 상기 단백질 대신 상기 단백질에 대한 특이적 항체를 포함할 수 있다. 암 세포에서는 LOC284422 유전자가 과발현되어 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양 또한 증가하게 된다. 따라서 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체를 이용하는 경우, 항원-항체 반응을 통해 상기 단백질을 검출해 내어 암을 진단할 수 있으므로, 본 발명은 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체와 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하는 단계를 포함하는 암 진단 방법을 제공한다.

상기 단백질에 대한 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호올스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등

의 효소가 컨쥬게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량 분석할 수도 있고, 아니면 직접 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨쥬게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다. 또한, 모노클로날 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.

본 발명은 또한 LOC284422 유전자를 포함하는 항암제 스크리닝용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 조성물의 항암제 스크리닝용 제제 제조용도 및 상기 유전자를 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시키고, 표적물질과 시험대상물질 간의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 상기 유전자의 발현을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 유전자와 시험대상물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 시험대상물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류 세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다. 이러한 경우 본 발명의 조성물은 상기 유전자 외에도, 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

또한, 본 발명은 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 항암제 스크리닝용 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 단백질의 항암제 스크리닝용 제제 제조 용도 및 상기 단백질을 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시키고, 표적물질과 시험대상물질 간의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 LOC284422 유전자의 발현을 억제 및 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질의 기능을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 단백질과 시험대상물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질과 시험대상물질을 반응시킨

후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 상기 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS (drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다. 이러한 경우 본 발명의 조성물은 상기 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생체 내 (in vivo) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법에서, 시험대상물질은 통상적인 선정방식에 따라 항암제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물, 천연물, 또는 화합물 등이 될 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 증진시키거나 단백질의 기능을 증진시키는 활성을 나타내는 시험대상물질 및 반대로 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 시험대상물질은, 전자의 경우, 항암제 후보물질이 될 수 있고, 후자의 경우는 시험대상물질에 대한 억제제를 개발함으로써 항암제 후보물질이 될 수 있다. 이와 같은 항암제 후보물질은 이후의 항암제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 상기 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 항암제를 개발할 수 있다.

본 발명은 또한 LOC284422 유전자에 대한 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 유전자는 암 세포에서 다량 발현되므로, 상기 유전자의 억제제를 투여하여 상기 유전자의 발현을 저해시키면 암을 억제할 수 있다.

따라서 본 발명은 또한 상기 유전자의 억제제의 암 치료제 제조 용도 및 유효량의 상기 유전자의 억제제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 암 치료는 암의 예방 및 억제를 포함한다.

본 발명에 있어서, 상기 유전자에 대한 억제제는 LOC284422 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내 뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용될 수 있다. 안티센스 뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다(Hogrefe, 1999). 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 당분야에 알려져 있고 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 모이어티의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

또한, 상기 유전자에 대한 억제제는 상기 유전자의 siRNA(Small Interfering RNA)일 수 있다.

siRNA는 상대적으로 낮은 농도로도 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 얻을 수 있는 효과와 동등하거나 높은 효과를 얻을 수 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 대안으로 제시되고 있다(Thompson, 2002). siRNAs의 이용은 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 나타내고 있다.

siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand et al., 2002). siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터의 제조는 당분야에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개공보 제20040106567호 및 제20040086884호에는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/벡터를 제공하고 있다.

당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다. (Andreas Henschel, Frank Buchholz1 and Bianca Habermann (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120.)

암 치료를 위해 사용되는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함한 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 적당한 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.

상기 유전자의 저해제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다. 따라서 종래 당해 기술 분야에서 상기 유전자의 저해제로 알려진 화합물 또한 이용가능하다.

본 발명은 또한 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 유전자를 억제하면 그에 따른 단백질의 발현이 억제되어 암이 억제되는 것이므로, 상기 유전자의 단백질을 저해하면 암을 억제할 수 있다.

따라서 본 발명은 상기 단백질에 대한 억제제의 암 치료제 제조 용도 및 유효량의 상기 단백질의 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 암 치료는 암의 예방 및 억제를 포함한다.

상기 단백질에 대한 억제제는 핵산, 화합물, 천연물 또는 단백질 등일 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질에 대한 억제제는 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클로날 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.

본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 약제학적으로 허

용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 흡윤제 또는 유화제, 방부제, 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.

또한, 본 발명의 암 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 항암제와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 암 치료용 조성물은 예를 들어 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent), 예컨대, 사이클로포스파마이드, 아지리딘, 알킬알콘설포네이트, 나이트로소우레아, 다카르바진, 카르보플라틴, 시스플라틴 등과 같은 알킬화제(alkylating agent), 마이토마이신 C, 안트라사이클린, 독소루비신(아드리아마이신) 등과 같은 항생제, 메토틱렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈 등과 같은 항대사제(antimetabolitic agent), 빈카 알칼로이드와 같은 식물유래 약제 및 호르몬 등을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 암 치료용 조성물은 상기 유효 성분 외에도 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 또는 가용화제 등이 있다.

또한 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

본 발명의 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골

내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

본 발명의 치료 방법에 있어서, "유효량"은 암을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 유전자 또는 단백질의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, LOC284422 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

추가로, 본 발명은 LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질 중 하나 이상을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

상기 암 진단용 키트는 본 발명의 진단용 조성물 외에도 상기 조성물과 시료 간의 반응을 파악하는데 사용되는 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩 등의 적용을 위한 재료를 포함할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 LOC284422 유전자는 서열번호 1의 염기서열 또는 상기 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열을 가질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 LOC284422 유전자의 siRNA는 서열번호 2의 센스 서열 및 서열번호 3의 센스 서열을 가질 수 있다.

상기한 LOC284422 유전자에 대한 siRNA의 서열은 예시일 뿐 이에 한정되는 것은 아님은 당업자에게 자명하다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하는데 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다.

본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in Molecular Biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명의 LOC284422 유전자는 암 세포에 다량 발현되고 정상세포의 증식 속도를 증가시키므로, 이들 유전자의 발현을 저해시키면 암세포의 성장을 억제시키는 작용 효과를 가져온다. 따라서 LOC284422 유전자는 각종 암의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 암 표적 유전자에 특이적인 치료제와 같이 부작용이 적은 바이오 신약 및 맞춤형 항암제의 개발에 크게 활용될 것이다. 또한 새로운 암 관련 기전 경로 연구의 기반을 닦는 원천 기술 개발에 기여할 것이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 대장암 세포주 및 정상 세포에서 LOC284422 유전자의 발현량의 변화를 RT-PCR을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다. GAPDH는 대조 유전자이다.

도 2는 Illumina 48K chip을 이용한 마이크로어레이 실험을 통해 대장암 환자의 조직에서 LOC284422 유전자의 발현이 증가되었음을 나타내는 도로, LOC284422 유전자 발현 프로파일(상단)과 암조직과 정상조직에서의 유전자 발현 정도를 분포도로 비교한 그래프(하단)이다.

도 3은 대장암 환자 20명의 암조직에서 LOC284422 유전자의 발현량의 변화를 realtime PCR을 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 자궁경부암 세포에서 LOC284422 유전자에 siRNA를 처리시 mRNA의 양이 감소된 것을 나타내는 RT-PCR 결과를 나타낸 도(상단)와, 대장암, 자궁경부암, 간암, 위암, 폐암 세포주에서 LOC284422 유전자의 siRNA 처리시 세포의 성장 저해 정도를 SRB 염색으로 조사한 결과를 나타낸 그래프(하단)이다.

도 5는 NIH3T3 세포주에서 LOC284422 유전자 도입시 세포의 성장 속도가 빨라짐을 SRB 염색으로 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시

되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

<실시예 1> LOC284422 유전자의 암 세포주에서의 발현양 변화 확인

유전자의 암 관련성을 추정하는 간단한 방법은 암조직 또는 암세포주에서의 해당 유전자의 발현양의 변화를 비교하는 것이다. 정상 세포에 비해 암세포주에서 다량 발현되어 있는지 또는 감소되어 있는지 비교하여 암 생성 및 진행에 따른 발현량과의 관계를 조사하여야 한다. 이를 위해서는 암세포주에서 실제 해당 유전자의 발현이 어떻게 나타나고 있는지 암 세포주에서 총 RNA를 추출한 후 해당 유전자의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 각 유전자의 양을 정상 세포주와 비교하여 유전자의 세포 내 발현양을 확인하게 된다.

이에 본 실시예에서는 LOC284422 유전자의 발현 정도를 인간 대장암 세포주 및 정상 세포에서 RT-PCR을 실시하여 분석하였다. 대장암 세포주는 HCT116, SW480, SW620, COLO205, DLD-1, HT29 (서울대학교 세포주 은행)를 이용하였다. 정상 세포주로는 IMR90 (human fetal lung fibroblasts, ATCC #CCL-186)을 이용하였다. 본 실험의 RT-PCR은 maxime RT PreMix kit (iNtRON Biotechnology, INC)와 Dr.tag PCR premix(iNtRON Biotechnology, INC)를 이용하여 실시하였다. maxime RT PreMix kit는 cDNA의 합성을 위해 제작된 것으로, oligo dT를 포함하고 있어 각 암세포의 RNA 주형 1 μ g/reaction, 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l로 부피를 맞춰 RT-PCR을 수행하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 Dr.tag PCR premix, 특이적 프라이머(specific primer)를 이용해 PCR을 수행하였다. 상기 PCR에서 사용한 특이적 프라이머는 다음과 같다.

	N-말단 프라이머	C-말단 프라이머
LOC284422	서열번호 4 5'-GTAGTCGGCTTCCTGTCAT-3'	서열번호 5 5'-TCCTTCCTTTGCTGTCTTTT-3'

RT-PCR을 수행한 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1의 GAPDH는 대조 유전자이다.

그 결과, LOC284422는 정상 세포주와 비교하여 인간 대장암 세포주에서 그 mRNA 정도가 다소 증가됨을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 LOC284422 유전자의 발현량 증가가 암진단 지표가 될 수 있음을 의미한다.

<실시에 2> 대장암환자의 암조직과 정상조직에서 LOC284422 유전자의 발현

삼성의료원(서울, 대한민국)으로부터 66명의 대장암 환자의 대장암 조직과 정상 조직을 각각 입수하였다. 각각의 조직은 환자로부터 외과적으로 제거된 후, 분석때 까지 이를 액체질소에 보관하였다.

총 RNA는 QIAGEN 키트 (RNeasy Maxi kit: cat #75162)를 사용하여 분리하였고 Experion RNA StdSens(Bio-Rad사) 칩을 이용하여 정량하였다. 우선 대장암 임상 조직과 정상조직을 적절한 크기로 자른 후 150ul 의 베타 멀캅토 에탄올을 첨가한 15ml의 키트 내 분해 완충액에 용해시켰다. 여기에 15ml의 70% 에탄올을 넣어 잘 섞은 후, 3000g에서 5분간 원심분리하여 총 RNA를 막에 부착시켰다. 두 차례의 세척을 한 후 1.2ml의 RNase가 없는 물을 첨가하여 총 RNA를 분리하였다. 부착된 세포주의 경우는 트립신, EDTA를 이용하여 회수한 후 키트 내 분해 완충액 1ml에 용해시켰다.

상기 추출된 총 RNA를 Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion사)을 이용하여 하이브리드화 하였다. T7 Oligo(dT) primer를 이용하여 cDNA를 합성하고, biotin-UTP를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하여 biotin-labeled cRNA를 제조하였다. 제조된 cRNA는 NanoDrop을 이용하여 정량하였다. 정상 대장 상피세포 및 대장암 세포에서 제조된 cRNA를 Human-6 V2 (Illumina사) 칩에 하이브리드화 하였다. 하이브리드화 후 비특이적 하이브리드화를 제거하기 위하여 Illumina Gene Expression System 세척액 (Illumina사)을 이용하여 DNA 칩을 세척하였고 세척된 DNA 칩은 streptavidin-Cy3(Amersham사) 형광 염색약으로 표지하였다. 형광 표지된 DNA 칩은 공초점(confocal) 레이저 스캐너 (Illumina사)를 이용하여 스캐닝하여 각 스팟에 존재하는 형광의 데이터를 얻어서 TIFF 형태의 이미지 파일로 저장하였다. TIFF 이미지 파일을 BeadStudio version 3(Illumina사)으로 정량하여 각 스팟의 형광값을 정량하였다. 정량된 결과는 Avadis Prophetic version 3.3(Strand Genomics사) 프로그램으로 'quantile' 기능을 이용하여 보정하였다.

그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2의 상단은 대장암 환자의 암조직과 정상 조직에서 측정된 LOC284422 유전자 발현 프로파일로, 고발현 되는 경우 붉은색으로, 저발현되는 경우 녹색으로 나타내었다. 도 2의 하단은 암조직과 정상조직에서

의 유전자 발현 정도를 분포도로 비교한 그래프이다. ACTB(Homo sapiens actin, beta)는 유전자 발현의 차이를 판단하기 위한 표준유전자를 의미한다. 그 결과 LOC284422는 대장암조직에서의 발현량이 66환자 중 49환자에서 2배 이상 발현이 증가되었음을 확인할 수 있다.

이러한 결과는 LOC284422 유전자의 발현량 증가가 암진단 지표가 될 수 있음을 의미한다.

<실시예 3> Realtime PCR에 의한 LOC284422 유전자의 대장암 조직에서의 발현양 변화 확인

유전자의 암 관련성을 추정하는 간단한 방법은 암조직 또는 암세포주에서의 해당 유전자의 발현량의 변화를 비교하는 것이다. 정상 세포에 비해 암세포주에서 다량 발현되어 있는지 또는 감소되어 있는지 비교하여 암 생성 및 진행에 따른 발현량과의 관계를 조사하여야 한다. 이를 위해서는 암세포주에서 실제 해당 유전자의 발현이 어떻게 나타나고 있는지 암 세포주에서 총 RNA를 추출한 후 해당 유전자의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 Realtime PCR을 수행하여 각 유전자의 양을 정상 세포주와 비교하여 유전자의 세포 내 발현량을 확인하게 된다.

이에 본 실시예에서는 LOC284422 유전자의 발현 정도를 대장암 조직에서 Realtime PCR을 실시하여 분석하였다. Realtime PCR은 Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen)을 이용해 실시하였다. 이 키트는 Quantitect SYBR Green master Mix 5 μ l에 각 암세포의 cDNA 주형, 특이적 프라이머(specific primer), 3차 증류수를 넣어 총 10 μ l로 부피를 맞춰 Realtime PCR을 수행하였다. 상기 Realtime PCR에서 사용한 특이적 프라이머는 실시예 1에서 사용한 것과 같다.

도 3은 암환자에서 LOC284422 유전자의 발현량을 나타내고 있다. 도 3에서 유전자 발현의 차이를 판단하기 위해, 표준유전자로 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 사용하여 보정한 상대적인 값을 나타내고 있으며, N은 Normal, T는 Tumor를 나타내고 y축은 상대발현비(relative expression ratio)를 나타낸다. 도 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, 20 환자의 정상조직과 암조직을 비교했을 때 정상 조직에 비해 환자의 암조직에서 LOC284422의 mRNA가 증가되어 있음을 확인하였다.

이러한 결과는 LOC284422 유전자의 발현량 증가가 암진단 지표가 될 수 있음을 의미한다.

<실시예 4> 암세포주로의 LOC284422의 siRNA 도입에 따른 암세포주의 성장 억제 확인

암세포 조직 또는 암세포주에서 다량 발현되는 유전자의 경우 siRNA 기법을 통해 유전자 발현을 억제하여 세포의 증식 속도에 변화가 있는지를 관찰할 수 있다. 이에 본 발명에서는 LOC284422에 대한 siRNA를 디자인하여 자궁경부암 세포주 Hela에 도입한 후 해당유전자 mRNA 발현 저하에 따른 암세포주의 성장 속도의 변화를 관찰하였다.

먼저 LOC284422 및 scrambled siRNA를 디자인하여 합성하였다 (삼천리 제약). 합성된 siRNA는 유전자 염기서열을 바탕으로 디자인된 19개 올리고뉴클레오타이드의 이중 리보핵산쇄에 단쇄의 2 염기가 매달린 구조로 이루어져 있다. scrambled siRNA는 세포의 증식에 아무 영향을 미치지 않는 siRNA 실험의 음성 대조군으로 사용되었다.

자궁경부암 세포주 Hela(서울대 세포주은행)를 70% 컨플루언시로 배양 후 K-Max 방법으로 siLOC284422(센스서열: 서열번호 2+3), scrambled siRNA(센스서열: 서열번호 6)를 세포 내에 도입하여 72시간 동안 배양하며 형질 전환하였다. 각 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였으며, 그 결과를 도 4의 상단에 나타내었다. 도 4의 상단에서 보는 바와 같이 해당 유전자 mRNA가 감소되었음을 확인하고 siRNA에 의한 유전자 발현 억제가 이루어졌음을 확인하였다. NT는 siRNA를 처리하지 않은 세포에서의 유전자 발현양을 나타내고, scrambled는 타겟하는 부분이 없는 것을 보여준다.

대장암 세포주 Colo205 (서울대 세포주은행), HCT116 (서울대 세포주은행), 폐암 세포주 A549, 간암세포주 Huh7(전남대학교 김대곤 박사에게서 분양), Snu387(서울대 세포주은행), 위암세포주 Snu638, 자궁경부암 Hela를 70% 컨플루언시로 배양 후 K-Max 방법으로 siLOC284422(센스서열: 서열번호 2+3), scrambled siRNA(센스서열: 서열번호 6)를 세포 내에 도입하여 72시간 동안 배양하며 siRNA에 의한 세포의 성장 억제 정도도 조사하였다. 각 세포를 SRB (Sulfur rhodamine, Sigma Co.)로 염색하고 현미경을 통해 세포 성장에 큰 변화가 없는 컨트롤인 scrambled siRNA를 처리한 세포주를 기준으로, SRB 분석하여 해당 유전자 siRNA를 도입한 세포의 성장 억제 정도를 비교하였다. 그 결과를 도 4의 하단에 그래프로 나타내었다. 그래프의 x축은 세포주를 y축은 상대성장비(Relative growth ratio)를 나타낸

다. 그 결과 대부분의 세포주에서 LOC284422의 유전자 발현 억제가 세포 성장 억제를 유도하였다. 위 실험 결과, LOC284422 유전자의 siRNA 처리를 통해 대장암 세포주 및 폐암, 간암 세포주의 성장 억제를 유발할 수 있으므로 LOC284422 유전자가 암 치료 타겟으로 활용 가능함을 알 수 있다.

<실시예 5> LOC284422 유전자 도입에 따른 세포 성장 속도 확인

NIH3T3 cell(ATCC CRL-1658)을 10% 송아지 혈청과 penicillin-streptomycin의 혼합액이 든 Low glucose DMEM 배지에서 1.4×10^5 cells/ml의 농도로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 세포형질전환을 위해 serum free media, LOC284422 plasmid DNA, plus reagent를 각각 넣은 혼합액과 serum free media, lipofectamine reagent를 넣은 혼합액을 하나로 모아 약하게 vortexing하여 잘 섞어준 뒤 상온에서 15분간 배양한다. 24시간 동안 배양한 dish를 serum free media로 갈아준 뒤, 앞서 준비한 혼합용액을 well 전체에 골고루 퍼지도록 한 방울씩 떨어뜨려주고, 앞뒤로 가볍게 여러번 흔들어준다. 3시간 30분이 경과하면 media를 모두 제거하고 PBS로 씻어준 후, 10% serum이 든 배지로 갈아준다. 형질전환 시킨 후 24시간이 경과하면 0.5% EDTA-Trypsin을 처리하여 세포를 모으고 heamacytometer로 세포수를 측정한 다음, 24 well plate에 1×10^5 cells/ml의 농도로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 SRB assay를 할 때까지 배양한다. 배양 후 6-12시간 마다 plate를 하나씩 꺼내어 4% Formaldehyde로 상온에서 30분간 고정한 후, 1% acetic acid에 SRB(sulforhodamine B)(Sigma, S-9012)를 0.4% 농도로 녹인 용액으로 SRB assay하여 cell growth rate를 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 NIH3T3 cell(ATCC CRL-1658) 세포주에 LOC284422 유전자 도입시 세포의 성장 속도가 빨라짐을 SRB 염색으로 조사한 그래프로 x축은 시간(시간), y축은 성장속도(%)를 의미하고, pCNS(EV)는 유전자가 없는 벡터만 도입한 세포주를 의미하고, pCNS-LOC284422는 LOC284422 유전자가 도입된 NIH3T3 (ATCC CRL-1658) 세포주를 의미한다.

그 결과 LOC284422 유전자를 과발현한 세포에서 성장 속도가 약 2배 증가되었음을 확인하였다.

【산업상 이용가능성】

본 발명은 LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에

대한 항체를 포함하는 암 진단용 또는 항암제 스크리닝용 조성물, 상기 유전자의 억제제 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 억제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 조성물, LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질 중 하나 이상을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 LOC284422 유전자는 암 세포에 다량 발현되고 정상세포의 증식 속도를 증가시키므로, 이들 유전자의 발현을 저해시키면 암세포의 성장을 억제시키는 작용 효과를 가져온다. 따라서 LOC284422 유전자는 각종 암의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

LOC284422 유전자를 포함하는 암 진단용 조성물.

【청구항 2】

LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

【청구항 3】

LOC284422 유전자를 포함하는 항암제 스크리닝용 조성물.

【청구항 4】

LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 항암제 스크리닝용 조성물.

【청구항 5】

LOC284422 유전자에 대한 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자에 대한 억제제가 LOC284422 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 암 치료용 조성물.

【청구항 7】

제5항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자에 대한 억제제가 LOC284422 유전자의 siRNA인 암 치료용 조성물.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 siRNA가 서열번호 2의 센스 서열 및 서열번호 3의 센스 서열을 갖는 siRNA인 암 치료용 조성물.

【청구항 9】

LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제가 상기 단백질에 대한 항체인 암 치료용 조성물.

【청구항 11】

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 암 치료용 조성물.

【청구항 12】

LOC284422 유전자 또는 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질 중 하나 이상을 포함하는 암 진단용 키트.

【청구항 13】

LOC284422 유전자와 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하는 단계를 포함하는 암 진단 방법.

【청구항 14】

LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체와 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하는 단계를 포함하는 암 진단 방법.

【청구항 15】

LOC284422 유전자를 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시키고, 표적물질과 시험대상물질 간의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 LOC284422 유전자의 발현을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법.

【청구항 16】

LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질을 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시키고, 표적물질과 시험대상물질 간의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 LOC284422 유전자의 발현을 억제 및 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질의 기능을 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법.

【청구항 17】

LOC284422 유전자에 대한 억제제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.

【청구항 18】

제17항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자에 대한 억제제가 LOC284422 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 암 치료방법.

【청구항 19】

제17항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자에 대한 억제제가 LOC284422 유전자의 siRNA인 암 치료방법.

【청구항 20】

제19항에 있어서, 상기 siRNA가 서열번호 2의 센스서열 및 서열번호 3의 센

스서열을 갖는 siRNA인 암 치료방법.

【청구항 21】

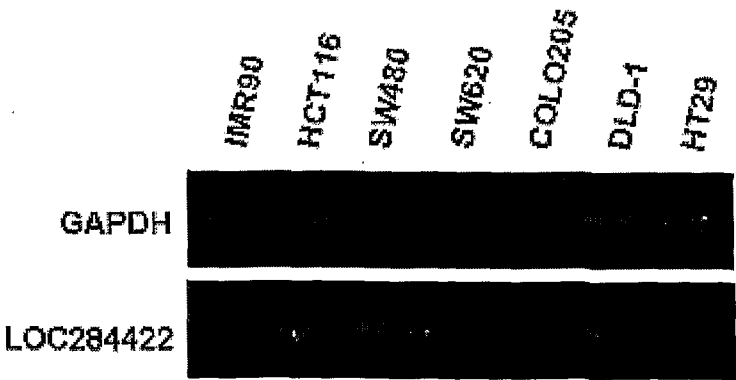
LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.

【청구항 22】

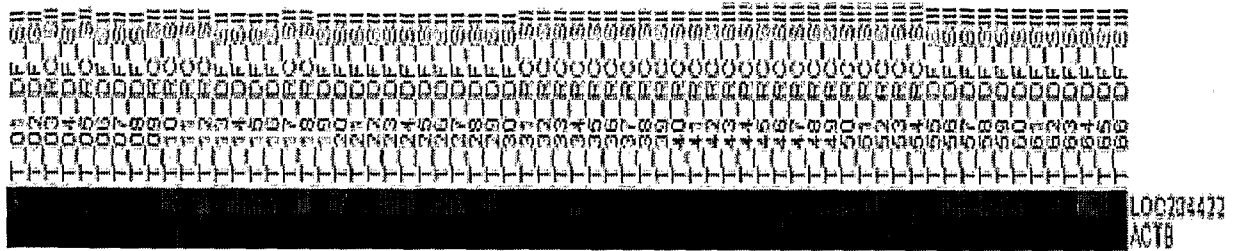
제21항에 있어서, 상기 LOC284422 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제가 상기 단백질에 대한 항체인 암 치료방법.

【도면】

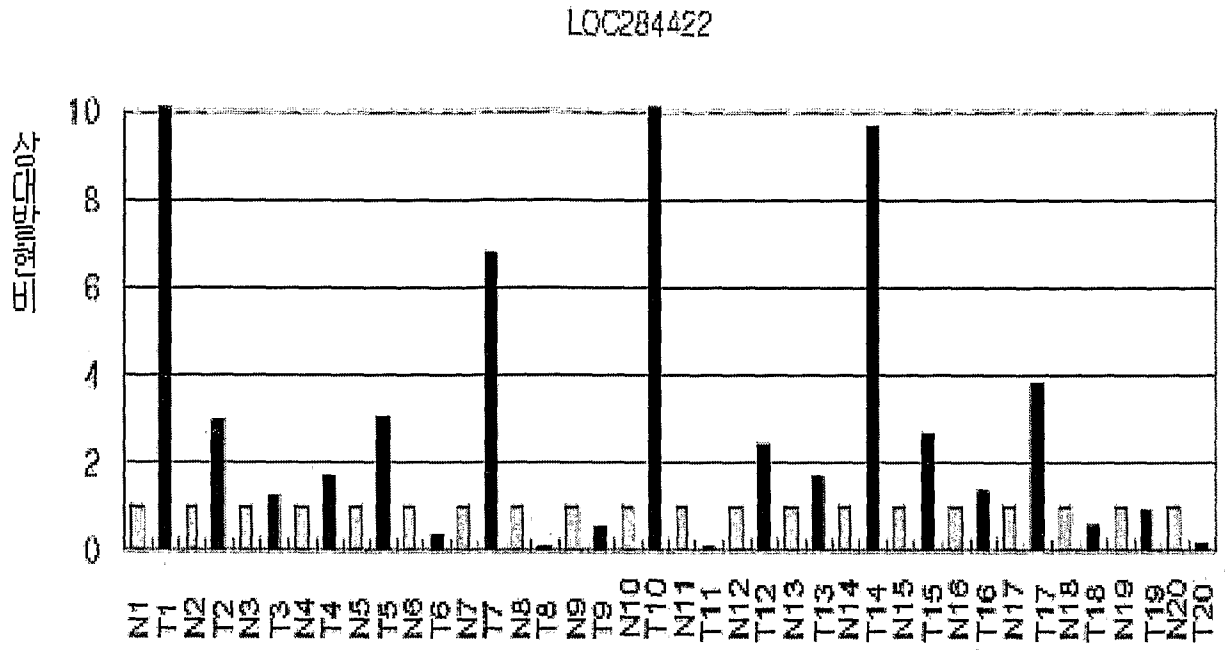
【도 1】



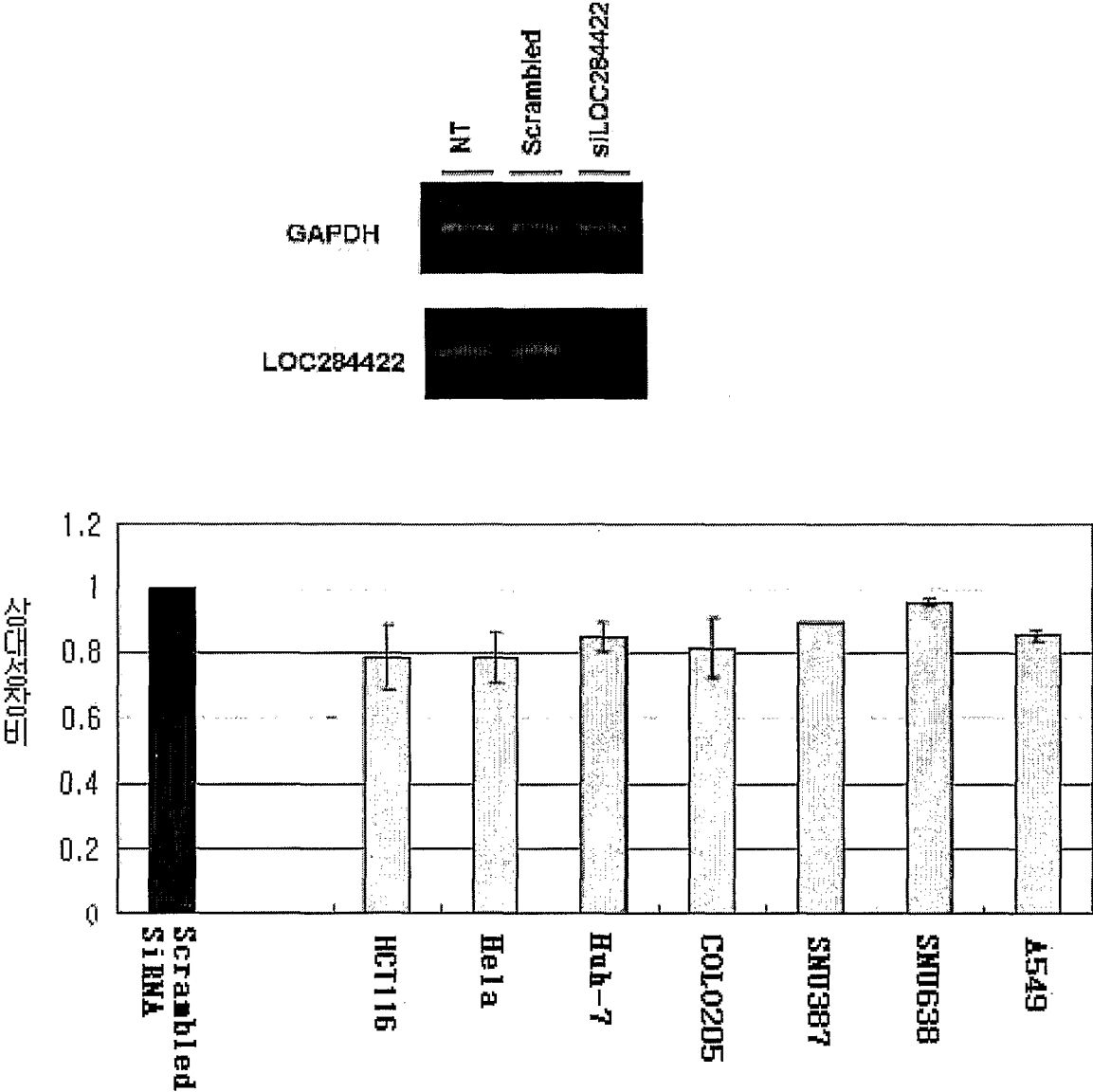
【도 2】



【도 3】



【도 4】



【도 5】

