(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0047664
(43) 공개일자 2023년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/574 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0130764
(22) 출원일자 2021년10월01일
심사청구일자 2021년10월01일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
전은성
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)
김송철
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 221동 2002호(신천동, 파크리오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

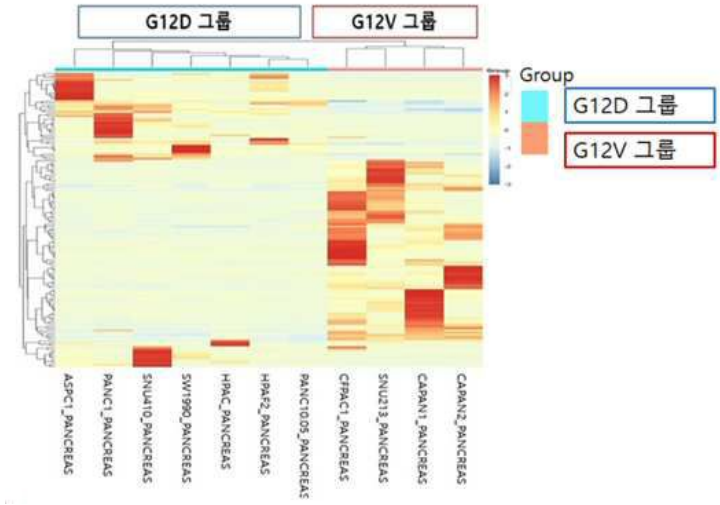
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 진단용 바이오마커 및 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 진단용 바이오마커 및 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, ANPEP 등의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현량을 측정하는 간단한 방법을 통하여 정확하게 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 진단이 가능하고, ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제함으로써 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 세포의 성장 및 이동을 감소시키므로 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 및 전이 억제 용도로 널리 사용될 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/948 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
(72) 발명자
성영훈
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)

김인기
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345315360
과제번호 2018R1D1A1B07048823
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 췌장의 Eicosanoid 대사체 분석을 통한, 전암성 병변의 마커 발굴 및 종양미세환경에서 기능 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711132073
과제번호 2020M3A9I4038667
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 생체대응성이 높은 환자 유래 비임상 모델 구축 및 면역세포치료제의 효능 평가
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2021.03.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

PTGDS, ANGPTL2, CDH11, MFAP5, CDH17, PRODH2 및 NAP1L3로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 것인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 것인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암은 췌장암, 대장암 또는 폐암인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 바이오마커 조성물을 포함하는, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 키트.

청구항 7

개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

PTGDS, ANGPTL2, CDH11, MFAP5, CDH17, PRODH2 및 NAP1L3로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 상기 단백질에 상보적으로 결합하는 펩타이드, 펩타이드 모방체(peptide mimetic), 기질 유사체, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택되는 것인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택되는 것인, KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계;

상기 후보 물질을 처리한 세포주에서 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

상기 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 정도가 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 진단용 바이오마커 및 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] KRAS(V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 유전자는 비소세포 폐암, 대장암, 췌장암 등의 발생에 연관된 여러 유전자 중 하나로서, 세포 성장, 세포 성숙 및 세포 사멸을 조절하는 세포 신호 전달 경로인 RAS/MAPK의 일부를 구성하는 인자를 암호화한다.

[0003] 한편, KRAS 유전자의 코돈 12 및 13에서의 돌연변이는 이 유전자의 산물인 p21-ras 단백질의 기능적 변화를 초래하게 되고, 그 결과 세포핵에 성장 신호를 필요 이상으로 전달함으로써 세포의 성장과 분열을 촉진하여 발암 과정에 관여한다. KRAS 변이는 위치와 서열의 변화에 따라 다양하게 나타날 수 있는데, 대표적으로 12번째 위치의 아미노산 잔기인 글리신이 아스파르트산, 발린, 아르기닌 또는 시스테인으로 치환된 G12D, G12V, G12R, G12C, 또는 13번째 위치의 아미노산 잔기인 글리신이 아스파르트산, 발린 또는 히스티딘으로 치환된 G13D, G13V, G13H 등의 변이가 존재한다.

[0004] 최근, KRAS 변이의 종류에 따라서 종양학적 양상이 달라지고, 세툭시맙 또는 파니튬맵과 같은 항암 치료의 효과 여부를 판단할 수 있으며, 결과적으로 환자의 생존률에 있어서 차이가 발생한다고 보고되고 있다.

[0005] 특히, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 환자의 경우에 평균 생존 기간이 유의하게 감소하는 것으로 나타나므로, KRAS G12D 변이 존재 여부가 예후를 예측할 수 있는 독립적인 인자로서 확인되었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 간단하고 편리한 방법으로 다양한 KRAS 변이 중에서도 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 정확하게 진단할 수 있는 바이오마커를 개발하기 위하여, KRAS G12D 변이와 KRAS G12V 변이를 구분하여 유전자의 발현 패턴을 비교한 결과, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 세포주에서 유의하게 발현이 증가한 ANPEP 등을 확인 및 선별하였고, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 세포주에서 ANPEP의 발현을 억제하는 경우에 세포의 생존률 및

이동률이 감소하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 간단하고 편리한 방법으로 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 정확하게 진단할 수 있는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 또 다른 목적은, 상기 바이오마커 조성물을 이용하여 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 또 다른 목적은, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 세포의 성장 및 이동을 억제할 수 있는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 또 다른 목적은, KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 용어 "ANPEP(Aminopeptidase N)"는 APN, CD13, 멤브레인 알라닐 아미노펩티다아제(membrane alanyl aminopeptidase), 알라닐 아미노펩티다아제(alanyl aminopeptidase; AAP) 또는 알라닌 아미노펩티다아제(alanine aminopeptidase)라고도 불리우며, 유리 아미노기를 가진 말단 아미노산에서부터 순차적으로 펩타이드 결합을 가수분해하는 엑소펩티다아제(exopeptidase)에 속하는 효소를 의미한다. ANPEP는 소장과 신장 미세 융모막 및 다른 원형질막에도 존재하고, 소장에서 ANPEP는 위 및 췌장 프로테아제에 의한 단백질 가수분해로부터 생성된 펩타이드의 최종 소화 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 근위 세뇨관 상피 세포 및 기타 세포 유형에서의 기능은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 한편, ANPEP는 인간 코로나바이러스 229E, 고양이 코로나바이러스 혈청형 II(FCoV-II), (돼지) 전염성 위장염 바이러스(Transmissible gastroenteritis coronavirus; TGEV), 돼지 유행성 설사 바이러스(Porcine epidemic diarrhea virus; PEDV) 및 개 코로나바이러스 유전자형 II(CCoV-II)가 세포에 결합한 다음 세포로 들어갈 수 있도록 하는 수용체 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

[0014] 용어 "KRAS(V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)"는 K-Ras라고도 불리우며, 세포 성장, 세포 성숙 및 세포 사멸을 조절하는 세포 신호 전달 경로인 RAS/MAPK의 일부를 구성하는 인자를 의미한다.

[0015] KRAS 변이(돌연변이라고도 함)는 KRAS를 암호화하는 유전자의 일부 염기서열이 치환, 결실 또는 삽입되어 발생할 수 있다. KRAS 유전자는 여러 암에서 흔히 돌연변이되는 ras 유전자 가운데 하나로서, KRAS 유전자의 코돈 12 및 13에서의 돌연변이는 이 유전자의 산물인 p21-ras 단백질의 기능적 변화를 초래하게 되고, 그 결과 세포핵에 성장 신호를 필요 이상으로 전달함으로써 세포의 성장과 분열을 촉진하여 발암 과정에 관여한다. KRAS의 돌연변이는 췌장암의 약 90%, 대장암의 약 50%, 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancers)의 약 30%에서 나타나는 등 사람의 암에서 매우 흔하게 발견되며, 이들 돌연변이들의 대부분은 코돈 12 및 13에 집중되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0016] 용어 "KRAS G12D 변이"는 KRAS를 구성하는 12번째 위치의 아미노산 잔기인 글리신이 아스파르트산으로 치환된 것을 의미한다.

[0017] 용어 "KRAS G12V 변이"는 KRAS를 구성하는 12번째 위치의 아미노산 잔기인 글리신이 발린으로 치환된 것을 의미한다.

[0018] 용어 "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 증식하는 공격적인(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적인(invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적인(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다.

[0019] 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.

[0020] 용어 "바이오마커"는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 샘플에서 췌장 신경내분비 종양 발병 여부를 진

단할 수 있는 물질을 의미한다. 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에 비하여 췌장 신경내분비 종양 환자에서 채취한 생물학적 샘플에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예를 들어, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(예를 들어, 단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다.

[0021] 상기 바이오마커 조성물은 PTGDS, ANGPTL2, CDH11, MFAP5, CDH17, PRODH2 및 NAP1L3로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 용어 "PTGDS(Prostagladin D2 Synthase)"는 프로스타글란딘 H2(prostaglandin H2; PGH2)의 프로스타글란딘 D2(prostaglandin D2; PGD2)로의 전환을 촉매하는 글루타티온 독립적인 프로스타글란딘 D2 합성효소를 의미한다. PGD2는 평활근 수축/이완에 관여하며 혈소판 응집의 강력한 억제제 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0023] 용어 "ANGPTL2(Angiopoietin-related protein 2)"은 안지오포이에틴(Angiopoietin)과 상동성을 갖는 분비된 당단백질로서, 자가분비(autocrine) 또는 주변분비(paracrine) 작용을 통하여 내피 세포에 기능을 발휘하며, 혈관신생, 조직 복구, 비만, 죽상경화증 및 발암에 관여하는 단백질을 의미한다. ANGPTL2는 적응 염증 및 후속 조직 재건을 촉진하여 조직 항상성을 유지하는 반면, 장기간 스트레스에 의해 유도된 과도한 ANGPTL2 활성화는 만성 염증으로 인한 조직 항상성의 붕괴를 촉진하여 대사 질환의 발병을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[0024] 용어 "CDH11(Cadherin-11)"은 CAD11, CDHOB, OB 또는 OSF-4라고도 불리우며, 칼슘 의존성 세포-세포 접착을 매개하는 통합 막 단백질인 카드헤린 슈퍼패밀리(cadherin superfamily)에 속하는 단백질을 의미한다. CDH11는 조골 세포주에서 발현 및 분화 동안의 상향 조절을 통하여 뼈 발달 및 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0025] 용어 "MFAP5(Microfibrillar-associated protein 5)"는 MAGP2, MP25 또는 AAT9라고도 불리우며, 세포외기질의 미세섬유의 구성요소인 미세섬유 관련 당단백질을 의미한다. MFAP5는 알파-V-베타-3 인테그린을 통해 미세섬유에 세포가 부착되는 것을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[0026] 용어 "CDH17(Cadherin-17)"은 HPT1이라고도 불리우며, 칼슘 의존성 막 관련 당단백질인 카드헤린 슈퍼패밀리에 속하는 단백질을 의미한다. CDH17는 의학적으로 중요한 펩타이드 기반 약물의 경구 흡수의 첫 번째 단계에서 장내 양성자 의존성 펩타이드 수송체로 작용하는 위장관 및 췌관의 구성요소이며, 간과 장의 형태학적 조직화 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0027] 용어 "PRODH2(Proline oxidase)"는 PRODH, HSPOX2, PIG6, POX, PRODH1, PRODH2, TP53I6 또는 proline dehydrogenase 1라고도 불리우며, 프롤린 이화작용의 첫 번째 단계를 촉매하는 미토콘드리아 프롤린 탈수소효소를 의미한다. PRODH2를 암호화하는 유전자의 결실은 I형 고프롤린혈증과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[0028] 용어 "NAP1L3(Nucleosome Assembly Protein 1 Like 3)"은 MB20 또는 NPL3라고도 불리우며, 뉴클레오솜 어셈블리 단백질(NAP) 패밀리에 속하는 단백질을 의미한다. NAP1L3를 암호화하는 유전자는 X-연관 인지 장애 증후군을 담당하는 유전자 영역과 밀접하게 연결되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0029] 일 구현예에서, 다양한 췌장암 세포주들을 KRAS G12D 변이가 존재하는 그룹과 KRAS G12V 변이가 존재하는 그룹으로 구분한 후에, 그룹별로 발현하는 유전자의 종류 및 그 유전자의 mRNA 발현량을 비교하였다. 그 결과, KRAS G12D 변이가 존재하는 세포주에서 ANPEP, PTGDS, ANGPTL2, CDH11, MFAP5, CDH17, PRODH2 및 NAP1L3 유전자의 발현 수준이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있다. 특히, 상기 8종의 유전자 중에서도 KRAS G12V 변이가 존재하는 췌장암 세포주 대비 KRAS G12D 변이가 존재하는 췌장암 세포주에서 ANPEP 유전자의 발현 수준이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있다.

[0030] 다른 구현예에서는, KRAS 돌연변이가 존재하지 않는 야생형 췌장암 세포주를 이용하여 인위적으로 KRAS G12D 변이 또는 KRAS G12V 변이가 존재하는 세포주를 각각 구축한 후, ANPEP의 발현량을 비교한 결과, KRAS G12D 변이 세포주에서 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있다. 자연적으로 발생한 KRAS G12D 변이 세포주 뿐만 아니라 인위적으로 유도한 KRAS G12D 변이 세포주에서도 ANPEP 유전자의 발현량이 특이적으로 높은 것을 확인할 수 있다. 또한, ANPEP의 하부 시그널 중 하나인 AKT 유전자의 발현량을 KRAS 돌연변이가 존재하지 않는 야생형 췌장암 세포주 및 KRAS G12V 변이가 존재하는 세포주와 비교한 결과, KRAS G12D 변이 세포주에서 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있다.

[0031] 상기 8종의 단백질의 발현 수준 측정은 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 진단하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 상기 8종의 단백질 중에서 하나 이상의 존재 여부와 그 단백질의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단

백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다.

[0032] 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사선면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter) 또는 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준의 측정은 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 진단하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 상기 8종의 단백질을 암호화하는 유전자 중에서 어느 하나의 존재 여부와 그 유전자의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 유전자의 양을 확인하는 것이다.

[0035] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), RNase 보호 분석법(RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 전립선암, 자궁암, 난소암, 신장암, 췌장암, 간암, 대장암, 결장암, 피부암, 두경부암, 흑색종 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, KRAS G12D 변이가 존재하는 종양 조직이라면 모두 적용 가능할 수 있다. 구체적으로는, 상기 암은 췌장암, 대장암 또는 폐암일 수 있다.

[0038] 다른 양상은, 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0039] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 이용하여 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 진단할 수 있다. 구체적으로는, 상기 키트는 생검을 위하여 개체로부터 채취한 종양 조직을 이용하여 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 진단할 수 있다. 상기 8종의 단백질 또는 유전자 발현량 측정을 통하여, KRAS 단백질 또는 유전자의 서열 분석보다 비교적 간단한 방법으로 정확하게 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 진단할 수 있다.

[0040] 상기 키트에는 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.

[0041] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 해당 기술분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0042] 상기 바이오마커 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0043] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0044] 상기 방법은 PTGDS, ANGPTL2, CDH11, MFAP5, CDH17, PRODH2 및 NAP1L3로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 상기 방법은 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정한 발현 수준보다 증가한 경우 및/또는 KRAS G12V 변이가 존재하는 암 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서

측정한 발현 수준보다 증가한 경우에 KRAS G12D 변이가 존재하는 암으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 용어 "생물학적 샘플"은 일 양상에 따른 8종의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 개체로부터 수득한 모든 샘플을 의미한다.

[0047] 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 객담, 뇌척수액, 세포 배양액, 조직 추출물 또는 종양 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 상기 생물학적 샘플은 생검(biopsy)을 위하여 개체로부터 채취한 종양 조직일 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 해당 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.

[0048] 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 전립선암, 자궁암, 난소암, 신장암, 췌장암, 간암, 대장암, 결장암, 피부암, 두경부암, 흑색종 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, KRAS G12D 변이가 존재하는 종양 조직이라면 모두 적용 가능할 수 있다. 구체적으로는, 상기 암은 췌장암, 대장암 또는 폐암일 수 있다.

[0049] 또 다른 양상은, ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0050] 상기 ANPEP에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0051] 상기 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 상기 단백질에 상보적으로 결합하는 펩타이드, 펩타이드 모방체(peptide mimetic), 기질 유사체, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 상기 siRNA는 표적 서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥일 수 있으며, 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중 사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고, 스템-루프(stem-loop)의 구조를 이루는 헤어핀 구조를 가질 수 있는데, 이를 특히 shRNA(short hairpin RNA)라 지칭한다. 한편, 상기 이중 사슬 또는 스템 부위는 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수도 있다. 또한, 상기 루프 영역은 서열에 특별한 의미가 없으며, 단지 센스 서열과 안티센스 서열을 적당한 간격으로 연결하기 위하여 3-10 정도의 염기를 가지고 있으면 한정되지 않고 사용할 수 있다. siRNA 말단 구조는 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능할 수 있다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조(protruding structure)와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하고 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다.

[0054] 상기 siRNA는 표적 유전자인 KRAS G12D 변이가 존재하는 발현 또는 활성 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0055] 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 전립선암, 자궁암, 난소암, 신장암, 췌장암, 간암, 대장암, 결장암, 피부암, 두경부암, 흑색종 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, KRAS G12D 변이가 존재하는 종양 조직이라면 모두 적용 가능할 수 있다. 구체적으로는, 상기 암은 췌장암, 대장암 또는 폐암일 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, KRAS G12D 변이가 존재하는 췌장암 세포주에서 ANPEP의 발현량은 증가하였으며, siRNA-ANPEP를 이용하여 ANPEP의 mRNA 발현을 억제시킨 결과, 세포의 성장능 및 이동능이 감소한 것을 확인할 수 있다. 따라서, ANPEP의 발현 또는 활성의 억제제는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료, 또는 전이 억제 용도로 사용될 수 있다.

[0057] 상기 약학적 조성물은 유효성분으로서 상기 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성 억제제를, 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 90 중량%, 구체적으로 약 0.5 중량% 내지 약 75 중량

%, 보다 구체적으로 약 1 중량% 내지 약 50 중량%로 함유할 수 있다.

[0058] 상기 약학적 조성물은, 통상적인 방법에 따라 제제로 배합되는 통상적이고 무독성인 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0059] 상기 약학적 조성물에 사용되는 첨가제의 예는 감미제, 결합제, 용매, 용해 보조제, 습윤제, 유화제, 등장화제, 흡수제, 붕해제, 산화방지제, 보존제, 윤활제, 활택제, 충전제, 향미제 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 첨가제는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스, 글리신, 실리카, 활석, 스테아르산, 스테아린, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 알루미노실리케이트, 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 알긴산, 나트륨 알기네이트, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 한천, 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 염화나트륨, 염화칼슘, 오렌지 에센스, 딸기 에센스, 바닐라 향 등을 포함할 수 있다.

[0060] 상기 약학적 조성물은 경구 투여(예를 들어, 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 시럽 또는 에멀젼) 또는 비경구 투여(예를 들어, 근육내, 정맥내 또는 피하 주사)를 위한 다양한 제제 형태로 배합될 수 있다.

[0061] 구체적으로는, 상기 약학적 조성물은 경구 투여용 제제로 배합될 수 있으며, 이때 사용되는 첨가제로는 셀룰로스, 칼슘 실리케이트, 옥수수 전분, 락토오스, 수크로스, 덱스트로스, 칼슘 포스페이트, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 젤라틴, 활석, 계면활성제, 현탁제, 유화제, 희석제 등이 포함될 수 있다. 또한, 활택제(Glidant)의 예시로는 콜로이드성 이산화규소(Colloidal Silicon Dioxide), 마그네슘 실리케이트(Magnesuim Sillicate) 등이 있고; 희석제(Diluent)의 예시로는 미세결정질 셀룰로오스(Microcrystalline Cellulose), 락토오스 무수물(Lactose Anhydrous), 락토오스 일수화물(Lactose Monohydrate), 규화(silicified) MCC HD 90 등이 있으며, 붕해제(Disintegrant)의 예시로는 크로스카르멜로스 소듐(Croscarmellose Sodium), 크로스포비돈(Crospovidone) 등이 있고; 윤활제(Lubricant)의 예시로는 마그네슘 스테아레이트(Magnesium Stearate), 소듐 라우릴 설페이트(Sodium Lauryl Sulfate), 스테아르산(Stearic Acid) 등이 있다.

[0062] 또한, 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0063] 또한, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61. 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0064] 상기 약학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 환자에 투여될 수 있다.

[0065] 용어 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0066] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0067] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성 억제제의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 약 0.1 mg 내지 약 1,000 mg, 또는 약 5 mg 내지 약 200 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 범위는 이에 한정되지 않는다.

[0068] 또한, 상기 약학적 조성물은 화학요법, 방사선 요법, 면역요법, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기세포 대체 치료,

다른 생물학적 치료, 수술적 개입 또는 이들의 조합과 병용하여 종양 요법을 위해 투여될 수 있다. 예를 들어, 장기적으로 진행되는 다른 치료 전략과 함께 보조 요법으로 사용되거나, 중증 환자에서 종양 퇴행 또는 화학 예방 요법 후 환자의 상태를 유지하기 위해 사용될 수 있다.

[0069] 또 다른 양상은, KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계; 상기 후보 물질을 처리한 세포주에서 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 상기 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 정도가 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0070] 용어 "KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질"은 통상적인 선정 방식에 따라 암의 예방, 치료 또는 전이 억제의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 또는 화합물 등이 될 수 있다.

[0071] 용어 "대조군"은 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질을 처리하지 않은 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 세포주를 포함하는 군으로, 상기 후보 물질을 처리한 군과 병렬 관계에 속하는 세포주를 포함하는 군을 의미한다.

[0072] 상기 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질 스크리닝 방법은 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 세포주에 상기 후보 물질들을 처리하여, 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하는 방식일 수 있다.

[0073] 상기 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보 물질을 처리하는 경우에, 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성이 감소하면, 해당 후보 물질을 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료제 또는 전이 억제제로 판단하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0074] 이러한 스크리닝 방법에 의하여 선택된 물질은 이후의 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료제 개발 과정에서 선도 물질(leading compound)로 작용하게 되며, 선도 물질을 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방 또는 치료제를 개발할 수 있다.

[0075] 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 전립선암, 자궁암, 난소암, 신장암, 췌장암, 간암, 대장암, 결장암, 피부암, 두경부암, 흑색종 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, KRAS G12D 변이가 존재하는 종양 조직이라면 모두 적용 가능할 수 있다. 구체적으로는, 상기 암은 췌장암, 대장암 또는 폐암일 수 있다.

[0076] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

[0077] 일 양상에 따른 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 진단용 바이오마커 조성물을 이용하면, 개체의 생물학적 샘플에서 ANPEP 등의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 간단한 방법을 통하여 KRAS G12D 변이가 존재하는 암을 정확하게 진단할 수 있다.

[0078] 일 양상에 따른 KRAS G12D 변이가 존재하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하면, ANPEP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제함으로써 KRAS G12D 변이가 존재하는 암세포의 성장 및 이동을 감소시키므로, KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 예방, 치료 및 전이 억제 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1는 일 양상에 의한 KRAS G12D 변이가 존재하는 췌장암 세포주 그룹과 KRAS G12V 변이가 존재하는 췌장암 세포주 그룹의 유전자 발현 패턴을 비교 분석한 결과이다.

도 2는 일 양상에 의한 KRAS G12D 변이가 존재하는 췌장암 세포주 그룹과 KRAS G12V 변이가 존재하는 췌장암 세포주에서 ANPEP 유전자의 mRNA 발현량(도 2a) 및 ANPEP 단백질의 발현량(도 2b)을 비교한 결과이다.

도 3은 일 양상에 의한 KRAS G12D 변이가 존재하는 마우스 모델의 종양 조직과 KRAS G12V 변이가 존재하는 마우

스 모델의 종양 조직에서 ANPEP 단백질의 발현 여부(도 3a) 및 그 발현량(도 3b)을 비교한 결과이다.

도 4a는 일 양상에 의한 인위적으로 KRAS G12D 변이 또는 KRAS G12D 변이 세포주를 구축하기 위한 재조합 발현 벡터의 개열지도이고, 도 4b는 KRAS G12D 또는 KRAS G12D 변이 여부를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 진행한 결과이다.

도 5는 일 양상에 의한 인위적으로 유도한 KRAS G12D 변이 또는 KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP 유전자의 mRNA 발현량(도 5a) 및 AKT 유전자의 mRNA 발현량(도 5b)을 비교한 결과이다.

도 6은 일 양상에 의한 KRAS G12D 변이가 존재하는 췌장암 세포주에서 ANPEP 유전자의 발현을 억제시킨 후, 세포의 생존률의 변화를 측정한 결과이다.

도 7은 일 양상에 의한 KRAS G12D 변이가 존재하는 췌장암 세포주에서 ANPEP 유전자의 발현을 억제시킨 후, 이동한 세포 수의 변화를 확인하기 위하여 세포를 염색한 사진(도 7a) 및 이동한 세포 수를 정량화하여 비교(도 7b)한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0081] **실시예 1. KRAS G12D 변이 세포주 특이적 발현 유전자 선별**

[0082] KRAS 변이의 subtype 종류인 G12D 또는 G12V 변이에 따른 특이적 발현 유전자를 발굴하기 위해, CCLE(cancer cell line encyclopedia, https://sites.broadinstitute.org/ccle/)의 public data를 활용하여 유전자 발현 패턴 분석을 진행하였다. KRAS G12D 변이 췌장암 세포주(ASPC1, HPAC, HPAFII, PANC10.05, PANC1, SNU410, SW1990)와 KRAS G12V 변이 췌장암 세포주(CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213)를 각각 하나의 그룹으로 묶고, 그룹별로 발현하는 유전자의 종류 및 발현량의 차이를 SPSS(Statistical Product and Service Solutions), R 통계분석 프로그램을 통해 분석하였다(도 1). P-value가 0.05 미만인 경우를 유의미한 차이가 있는 것으로 보았다. 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP, NAP1L3, ANGPTL2, CDH17, CDH11, MFAP5, PRODH2, PTGDS의 발현량이 유의미하게 높은 것을 확인하였다.

표 1

[0083]

	G12D							G12V				
SYMBOL	ASPC1	HPAC	HPAFII	PANC10.05	PANC1	SNU410	SW1990	CAPAN1	CAPAN2	CFPAC1	SNU213	P-value
ANPEP	**8707.5**	**70.0**	**42.5**	**16705.8**	**78913.3**	**2456.0**	**3440.0**	**62.0**	**42.0**	**112.4**	**52.1**	**0.000000049**
NAP1L3	5.0	0.0	0.0	0.0	47.3	862.5	352.5	0.0	0.0	2.0	1.8	0.000156708
ANGPTL2	8743.8	30435.6	19.8	11.7	5.7	671.2	79.6	21.0	7.5	76.6	14.1	0.000004126
CDH17	292807.2	61.7	103867.4	5.9	84.7	18.1	13.1	90.5	1119.8	103.2	13.2	0.000060959
CDH11	22.5	34.3	42.5	13.7	37.5	18.1	25891.0	11.7	15.8	17.4	42.4	0.000004380
MFAP5	22.5	159.2	23.6	20.5	4.1	12.6	23222.6	1.7	31.5	30.7	15.0	0.000015528
PRODH2	1894.0	0.0	187.9	2.0	0.8	1.6	2.6	5.0	0.0	3.1	0.9	0.000154640
PTGDS	1145.4	1841.3	13.2	16.6	121.4	76245	14.4	21.8	8.3	5.1	12.4	0.000000630

[0084] **실시예 2. KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP 발현량 측정**

[0085] **실시예 2.1 야생형 세포주, KRAS G12V 변이 세포주와 mRNA 발현량 비교**

[0086] KRAS 변이가 존재하지 않는 KRAS wild type 췌장암 세포주(BxPC3), KRAS G12D 변이 세포주(ASPC1, HPAF2, PANC1, PACN10.05, SNU410, SW1990), KRAS G12V 변이 세포주(CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213)를 동일한 세포 배양액에서 배양한 후, 셀 스크레이퍼(cell scraper)를 사용하여 세포 용해물(cell lysate)을 확보하였다. Blood/Cultured Cell Total RNA purification Mini Kit(FAVORGEN, Taiwan)를 사용하여, 각 세포주 용해물에서 RNA를 분리하였다. cDNA Synthesis Platinum Master Mix(GenDEPOT, Texas, 미국)의 지침서에 따라 분리한 각각의 RNA로부터 cDNA를 합성하고, CFX Connect Real-Time PCR Detection System(Bio-RAD, California, 미국)으로 각 세포주별 ANPEP/GAPDH mRNA 발현량을 비교하였다. 그 결과, KRAS wild type 세포주 및 KRAS G12V 변이 세포주와 비교하여 KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP mRNA 발현량이 현저하게 증가되어 있음을 확인하였다(도 2a).

[0087] **실시예 2.2 야생형 세포주, KRAS G12V 변이 세포주와 단백질 발현량 비교**

[0088] KRAS wild type 세포주(BxPC3), KRAS G12D 변이 세포주(ASPC1, HPAF2, PANC1, PACN10.05, SNU410), KRAS G12V

변이 세포주(CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213)를 동일한 세포 배양액에서 배양한 후, RIPA 용해 완충액(lysis buffer) 및 셀 스크레이퍼를 사용하여 세포를 용해하고 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA protein assay reagent(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 미국)를 사용하여 정량화하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분해한 후, Polyvinylidene fluoride(PVDF) 0.45 μm으로 transfer하였다. 1차 항체를 5% non-fat skim milk(PBST buffer)로 희석하고 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 그 후, PBST buffer를 사용하여 15분씩 2회 세척하고, 5% non-fat skim milk(PBST buffer)로 희석한 2차 항체를 한 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후, PBST buffer를 사용하여 15분씩 4회 세척한 후, Western blot substrates(BIOMAX, 서울, 한국)로 각 세포주별 ANPEP/Actin 단백질 발현량을 비교하였다. 그 결과, KRAS wild type 세포주 및 KRAS G12V 변이 세포주에서는 ANPEP 단백질이 거의 발현되지 않았으며, KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP 단백질 발현량이 현저하게 증가되어 있음을 확인하였다(도 2b).

[0089] **실시예 3. KRAS G12D 변이가 존재하는 종양 조직에서 ANPEP 발현량 측정**

[0090] KRAS 변이가 존재하는 세포주를 이용하여 종양 모델을 만들기 위해, 생후 6-8주령 수컷 BALB/c-nu 마우스(오리엔트 바이오, 대한민국) 20마리를 구입하고, KRAS G12D 변이 세포주 2종(PANC1, ASPC1)과 KRAS G12V 변이 세포주 2종(CFPAC, SNU213)을 배양하였다. 각 세포주별로 5마리씩 마우스에 세포를 이식하기 위하여 다음과 같이 세포를 준비하였다. 각 세포주별로 5 x 10^6개의 세포를 마트리겔(Matrigel)과 PBS(phosphate buffered saline)에 1:1 비율로 혼합한 후, 5 x 10^6 cell/100 $\mu\ell$ 농도로 마우스의 옆구리 피하에 주입하였다. 마우스에 종양 세포를 이식한 후에, 3일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. 종양 크기가 100 ~ 200 mm^3로 자랐을 때, CO_2를 이용하여 마우스를 질식시킨 뒤, 종양을 채취하였다. 채취한 종양은 manual disruptor와 RIPA 용해 완충액를 이용하여 조직을 용해하고 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA protein assay reagent(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 미국)를 사용하여 정량화하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분해한 후, Polyvinylidene fluoride(PVDF) 0.45 μm으로 transfer하였다. 1차 항체를 5% non-fat skim milk(in PBST)로 희석하고 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 그 후, PBST buffer를 사용하여 15분씩 2회 세척하고, 5% non-fat skim milk(in PBST)로 희석한 2차 항체를 한 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후, PBST buffer를 사용하여 15분씩 4회 세척한 후, Western blot substrates(BIOMAX, 서울, 대한민국)로 각 종양 조직별 ANPEP/Actin 단백질 발현량을 비교하였다. 그 결과, KRAS G12G 변이 세포주(CFPAC, SNU213)를 이식하여 만든 종양 조직과 비교하여, KRAS G12D 변이 세포주(PANC1, ASCP1)를 이식하여 만든 종양 조직에서 ANPEP 발현량이 현저하게 증가되어 있음을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

[0091] **실시예 4. 인위적으로 조작된 KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP 발현량 측정**

[0092] **실시예 4.1 KRAS G12D/G12V 변이 세포주의 구축**

[0093] pLVX-EF1a-mRFP-P2A-puro-IRES-ZsGreen vector를 사용하여, KRAS 변이가 포함된 다양한 construct를 제작하였다(도 4a). KRAS wild type, KRAS G12D 변이, KRAS G12V 변이를 삽입(insertion)하기 위하여 클로닝(cloning)을 수행하였다. 렌티바이러스 벡터(Lentivirus vector)를 사용하여, KRAS 변이가 없는 췌장암 세포주 BxPC3에 형질도입(transduction)하였다. 또한, 세포 배양액에 푸로마이신(Puromycin) 항생제를 첨가하여, 푸로마이신을 처리하여도 사멸하지 않는 클로닝된 세포를 선별하였다. 셀 스크레이퍼를 사용하여 세포 용해물을 확보한 후, DNA를 분리하였고, KRAS 부분에 대한 시퀀싱(sequencing)을 수행하여, KRAS 변이별 세포주가 구축되었음을 확인하였다(도 4b).

[0094] **실시예 4.2 구축된 KRAS G12D/G12V 변이 세포주에서 ANPEP 발현량 측정**

[0095] KRAS wild type 세포주(BxPC3)를 기반으로, KRAS G12D/G12V 변이 세포주를 구축하였고, 동일한 세포 배양액을 사용하여 배양하였다. 셀 스크레이퍼를 사용하여 세포 용해물을 확보하였다. Blood/Cultured Cell Total RNA purification Mini Kit(FAVORGEN, Taiwan)를 활용하여, 각 세포주 용해물에서 RNA를 분리하였다. cDNA Synthesis Platinum Master Mix(GenDEPOT, Texas, 미국)의 지침서에 따라 분리한 각각의 RNA로부터 cDNA를 합성하고, CFX Connect Real-Time PCR Detection System(Bio-RAD, California, 미국)으로 각 세포주별 ANPEP와 AKT의 mRNA 발현량을 비교하였다. AKT는 ANPEP의 하부 시그널 중 하나에 속한다. 그 결과, KRAS wild type 세포주 및 KRAS G12V 변이 세포주와 비교하여 KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP(도 5a) 및 AKT(도 5b) 발현량이 현저하게 증가되어 있음을 확인하였다.

[0096] **실시예 5. KRAS G12D 변이 세포주에서 ANPEP의 기능 확인**

[0097] **실시예 5.1 ANPEP 발현 억제를 통한 세포 증식 변화 관찰**

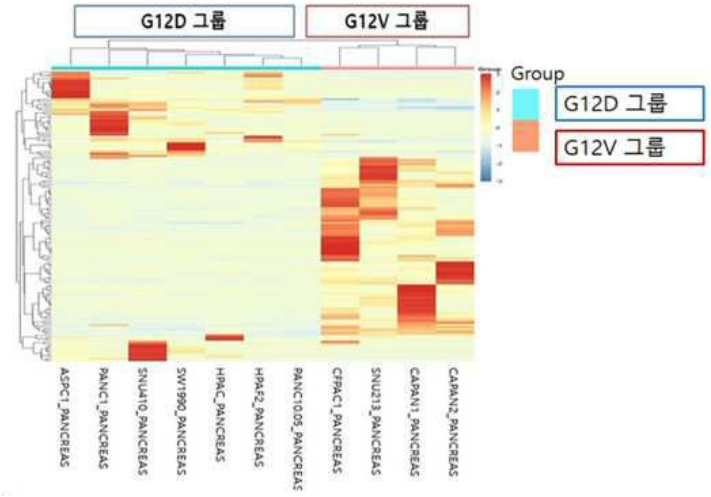
[0098] KRAS G12D 변이 세포주 PANC1을 96 웰 플레이트에 웰 당 $3x10^3$ cells개를 분주하고, 18시간 동안 배양하였다(37℃, 5% CO_2 incubator). siRNA-control 10 nM/㎖, siRNA-ANPEP 10nM/㎖, siRNA-ANPEP 20nM/㎖을 각각 처리하고, 24시간 후, RPMI-1640 배양액(10% FBS, 1% antibiotics 포함)으로 교체하였다. 72시간 후, 세포의 증식률을 분석하기 위해 EZ-Cytox(DoGenBio, 대한민국)와 배지를 9:1의 비율로 섞고 100 ㎕/well로 분주하였다. 90분 후, ELISA reader 기기를 통해 흡광도 (measurement wave length 450 nm/Reference wave length 600 nm)를 측정하여, 세포 생존률(cell viability)을 비교하였다. 그 결과, siRNA-ANPEP를 처리하여 ANPEP의 발현이 억제됨에 따라 KRAS G12D 변이 세포주의 생존률이 감소하고, 처리한 siRNA의 농도가 높을수록 KRAS G12D 변이 세포주의 생존률이 더 감소하는 것을 확인하였다(도 6). 이를 통하여, ANPEP의 발현 억제제는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 치료 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0099] **실시예 5.2 ANPEP 발현 억제를 통한 세포 이동 변화 관찰**

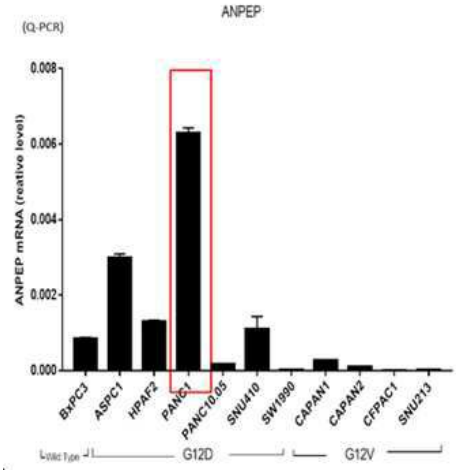
[0100] KRAS G12D 변이 세포주 PANC1을 6 웰 플레이트에 웰 당 $5x10^5$/well개를 분주한 뒤, 18시간 동안 배양하였다(37℃, 5% CO_2 incubator). siRNA-control 10nM/㎖, siRNA-ANPEP 10nM/㎖, siRNA-ANPEP 20nM/㎖를 각각 처리하고, 24시간 후, transwell의 upper chamber(SPLInsert™ Hanging; SPL Life sciences, 대한민국)에 $5x10^4$/well을 분주하였다. 그리고 나서, 24시간 동안 37℃ CO_2 배양기(incubator)에서 세포를 배양한 뒤, upper chamber를 분리하고, 4% PFA 용액을 사용하여 세포를 고정하였다. 0.2% crystal violet을 사용하여 세포를 염색하고(도 7a), Image J 프로그램을 통하여 이동 세포의 수를 정량화하였다. 그 결과, siRNA-ANPEP를 처리하여 ANPEP의 발현이 억제됨에 따라 이동한 KRAS G12D 변이 세포 수가 감소하고, 처리한 siRNA의 농도가 높을수록 이동한 KRAS G12D 변이 세포 수가 더 감소하는 것을 확인하였다(도 7b). 이를 통하여, ANPEP의 발현 억제제는 KRAS G12D 변이가 존재하는 암의 전이 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

도면

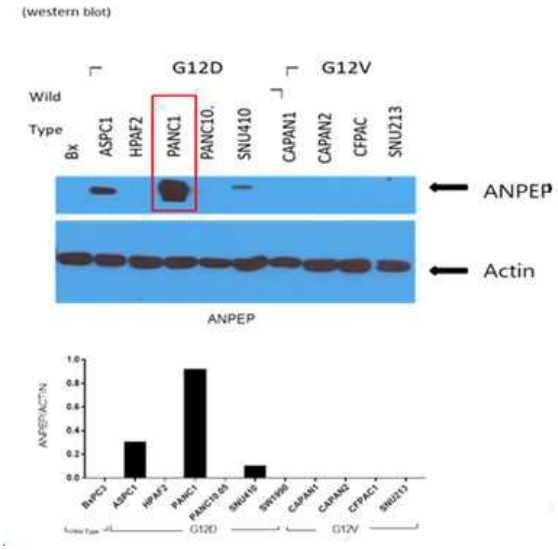
도면1



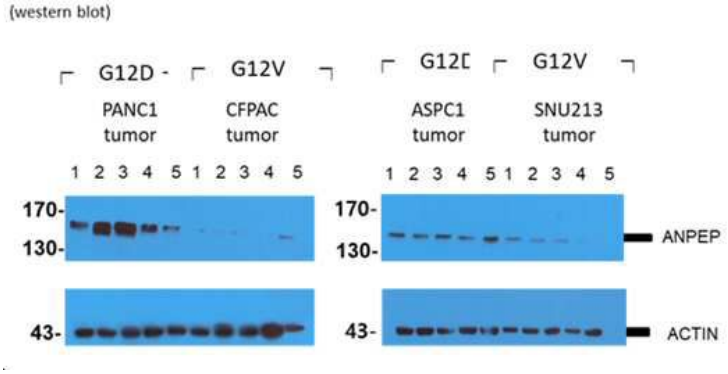
도면2a



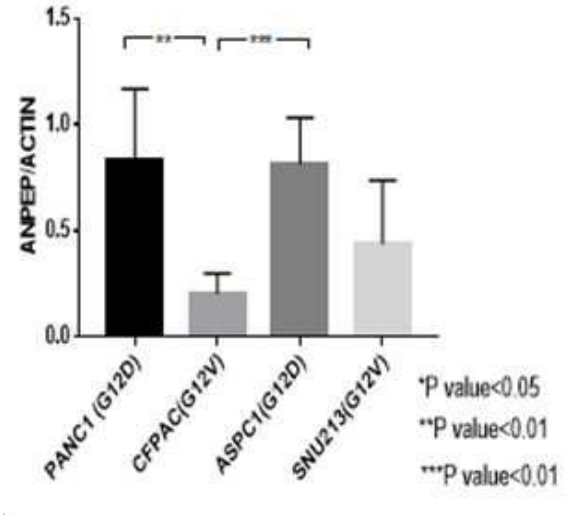
도면2b



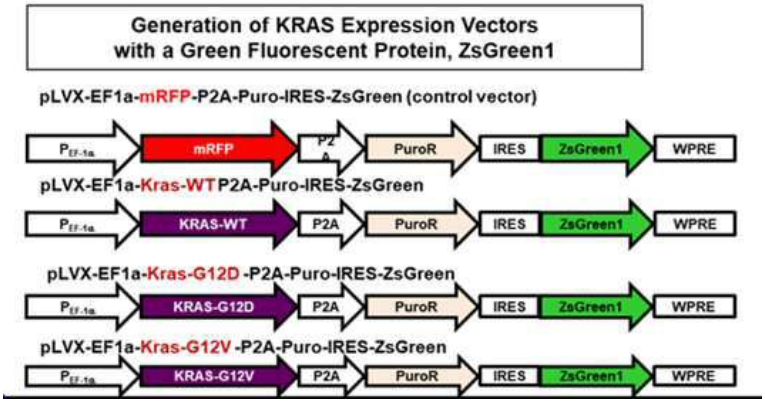
도면3a



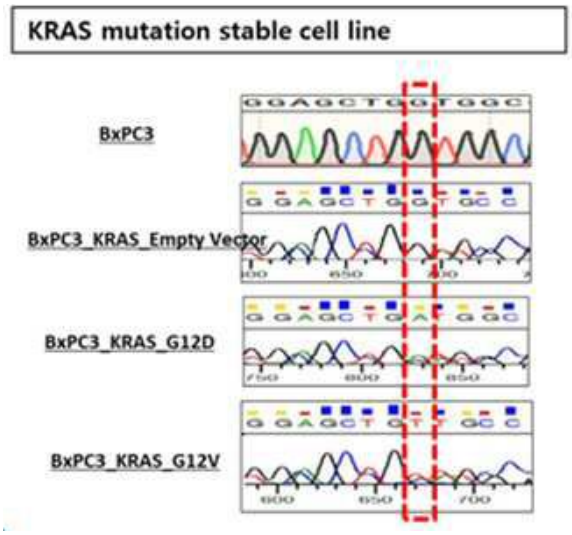
도면3b



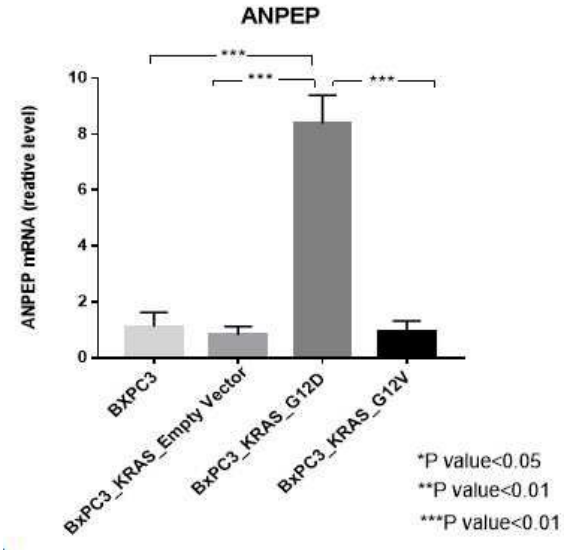
도면4a



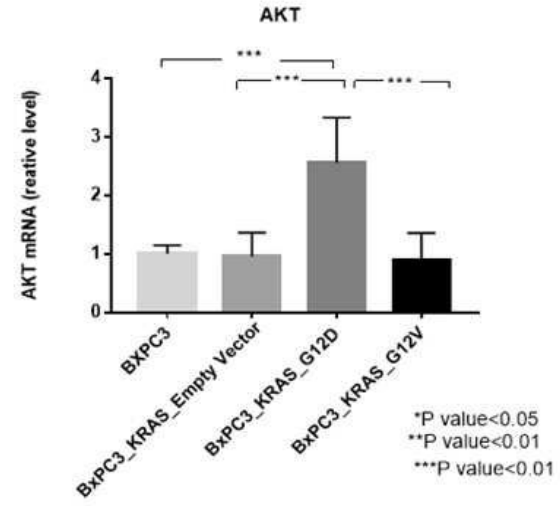
도면4b



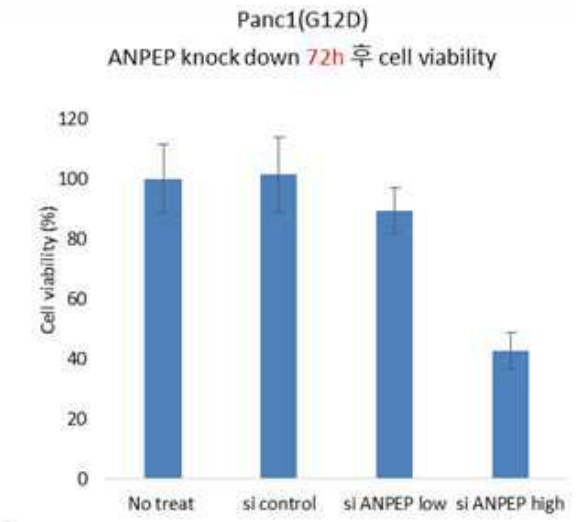
도면5a


ANPEP
ANPEP mRNA (reative level)
10
8
6
4
2
0
***
***
***
BXPC3
BxPC3_KRAS_Empty Vector
BxPC3_KRAS_G12D
BxPC3_KRAS_G12V
*P value<0.05
**P value<0.01
***P value<0.01

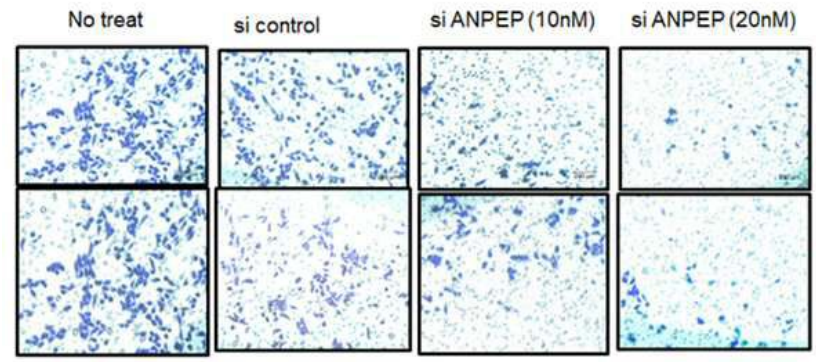
도면5b


AKT
AKT mRNA (reative level)
4
3
2
1
0
***
***
***
BXPC3
BxPC3_KRAS_Empty Vector
BxPC3_KRAS_G12D
BxPC3_KRAS_G12V
*P value<0.05
**P value<0.01
***P value<0.01

도면6



도면7a



도면7b

