

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0141075 (43) 공개일자 2016년12월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/574 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)	(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)	
(52) CPC특허분류 G01N 33/57446 (2013.01) A61K 38/08 (2013.01)	(72) 발명자 최은경 서울특별시 송파구 올림픽로35길 93 102동 2504호 (신천동, 더샵스타리버아파트)	
(21) 출원번호 10-2015-0074284	정성윤 경기도 용인시 수지구 포은대로 231 206동 1102호 (상현동, 서원마을현대홈타운아파트) (뒷면에 계속)	
(22) 출원일자 2015년05월27일 심사청구일자 2015년05월27일	(74) 대리인 특허법인태백	

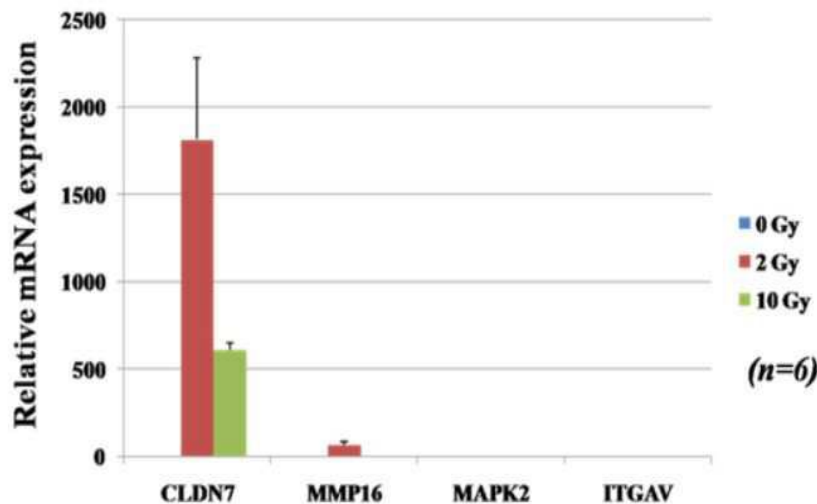
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 방사선 반응성 위암 진단 방법에 관한 것으로서, 특히 실제 암환자와 가장 유사한 동물모델인 실제 환자 위암조직을 이식한 동물모델에서 방사선을 조사하였을 때, 방사선을 조사한 위암조직에서 과발현되는 Claudin 7은 방사선 반응성 위암 진단에 이용될 수 있으며, 차후 방사선 치료 모니터링용 조영제 및 방사선 치료 효과 증진용 약물 전달체 개발 등에 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

송시열

서울특별시 강남구 개포로 310, 6동 403호(개포동,
개포주공아파트)

이경진

서울특별시 성북구 보문로29길 11, 503A호(탁터빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711011159

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심연구지원사업

연구과제명 방사선 반응성 암세포 표면단백질마커 및 리간드 발굴 위한 환자 암조직 이식 마우스에서
in vivo 펩타이드

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

Claudin 7에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 단백질을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 진단용 키트.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 진단용 키트.

청구항 5

위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료로부터 Claudin 7의 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 Claudin 7의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

상기 위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료의 Claudin 7의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 방사선 반응성 위암으로 판단하는 단계를 포함하는 방사선 반응성 위암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 Claudin 7의 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항원-항체 반응은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유체 세포 측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법인 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

Claudin 7에 특이적으로 결합하는 표적화물질(targeting agent)을 유효성분으로 포함하며, 위암에서 방사선 치료 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 표적화물질(targeting agent)은 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체.

청구항 11

위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료로부터 Claudin 7의 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 Claudin 7의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

상기 위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료의 Claudin 7의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 방사선 민감성 위암으로 판단하는 단계를 포함하는 위암의 방사선 치료효과 모니터링 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 Claudin 7의 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는 위암의 방사선 치료 효과 모니터링 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물, 이를 이용한 방사선 반응성 위암 진단 방법 및 Claudin 7에 특이적으로 결합하는 표적화물질(targeting agent)을 유효성분으로 포함하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 몸을 구성하고 있는 가장 작은 단위인 세포는 정상적일 때 세포 내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하면서 세포 수 균형을 유지한다. 어떤 원인으로 세포가 손상을 받는 경우, 치료를 받아 회복하여 정상적인 세포로 역할을 하게 되지만, 회복이 안 된 경우는 스스로 죽게 된다. 그러나 여러 가지 이유로 인해 이러한 증식과 억제가 조절되지 않는 비정상적인 세포들이 과다하게 증식할 뿐만 아니라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴 형성 및 정상 조직의 파괴를 초래하는 상태를 암(cancer)이라 정의한다. 암은 이렇듯 억제가 안 되는 세포의 증식으로, 정상적인 세포와 장기의 구조와 기능을 파괴하기에 그 진단과 치료의 중요성은 매우 크다.

[0003] 한편, 암 발병환자 개개인의 유전적 차이로 인해 치료 반응성이 달라 환자별 치료 사례가 달라짐에 따라 치료 시 문제점이 있다. 이에 암 환자의 효과적인 치료를 위해 방사선 반응성에 따라 달라지는 암 미세환경 및 그에 따른 바이오마커 개발이 요구되고 있으며, 이를 통하여 환자 개인별 맞춤형 진단 및 치료를 구현할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US2009/0258795 (2009.10.15)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물, 이를 이용한 방사선 반응성 위암 진단 방법 및 Claudin 7에 특이적으로 결합하는 표적화물질(targeting agent)을 유효성분으로 포함하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 Claudin 7에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 단백질을 포함하는 방사선 반

응성 위암 진단용 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 Claudin 7의 발현 수준을 측정하여 방사선 반응성 위암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 Claudin 7에 특이적으로 결합하는 표적화물질(targeting agent)을 유효성분으로 포함하며, 위암에서 방사선 치료 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 Claudin 7의 발현 수준을 측정하여 위암의 방사선 치료 효과를 모니터링하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 방사선 반응성 위암 진단 방법에 관한 것으로서, 특히 실제 암환자와 가장 유사한 동물모델인 실제 환자 위암조직을 이식한 동물모델에서 방사선을 조사하였을 때 이를 표적하는 특정 펩타이드 서열이 확보되어 있고, 해당 펩타이드의 결합 대상 단백질로써 방사선을 조사한 위암조직에서 과발현되는 Claudin 7은 차후 방사선 치료 모니터링용 조영제 및 방사선 치료 효과 증진용 약물 전달체 개발 등에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 방사선 조사한 위암 표적용 펩타이드의 결합 대상 단백질을 스크리닝을 하기 위해 T7 파아지 디스플레이 방법을 이용하여 찾은 후보군에 대한 정보이다.

도 2는 마우스에 실제 환자 위암조직을 이식 후, 방사선을 조사한 동물모델 구축 방법 및 확인 결과를 나타낸다. A: BRC에서 분양 받은 환자 위암조직, B: NOD/SCID 마우스 옆구리에 이종이소 이식, C: B에서 암조직이 400-500 mm³의 크기로 자라면 계대 배양을 위해 암조직을 3x3 mm 크기로 절단함, D: 누드마우스에 마취제를 복강주사하고, 양쪽 넓적다리 피하에 조직 1개 이종이소 이식한 마우스 모델, E: 암조직이 150-200 mm³의 크기로 자라면 암조직을 형성한 넓적다리 부분에만 10Gy의 방사선량을 조사하였다. 대조군은 방사선 조사하지 않았다.

도 3은 결합 대상 단백질 후보군 중 4가지 후보를 선별하고, Q-PCR을 통해 방사선 조사 여부에 따른 위암 조직에서 mRNA 발현 차이를 확인한 결과이다.

도 4는 결합 대상 단백질 후보군중 mRNA 발현 차이를 명확히 확인한 Claudin 7에 대해 방사선 조사 여부에 따른 위암 조직에서 단백질 발현 차이를 확인한 결과이다.

도 5는 방사선 조사한 위암 표적용 펩타이드와 Claudin 7의 결합여부를 확인하고자 면역침강법을 실시한 결과이다. 1: 0 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질, 2: 2 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질, 3: 10 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질, 4: 0 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 펩타이드 파아지로 면역침강, 5: 2 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 펩타이드 파아지로 면역 침강, 6: 10 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 펩타이드 파아지로 면역 침강, 7: 방사선 조사한 위암 표적용 펩타이드 파아지 추출 단백질, 8: 면역 침강에 이용한 magnetic bead, 9: 0 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 펩타이드 없는 파아지로 면역 침강, 10: 2 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 펩타이드 없는 파아지로 면역 침강, 11: 10 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 펩타이드 없는 파아지로 면역 침강, 12: 0 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 항체 없이 면역 침강, 13: 2 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 항체 없이 면역 침강, 14: 10 Gy 방사선 조사 위암 조직 추출 단백질에서 항체 없이 면역 침강.

도 6은 Claudin 7을 표적하는 펩타이드와 약물봉입 리포솜을 연결한 물질의 항암제로써의 가능성 검증을 위한 in vivo tumor growth delay결과이다. 오직 Claudin 7을 표적하는 펩타이드가 연결된 약물봉입 리포솜만이 방사선을 조사한 그룹에서 tumor 치료 효과를 보임을 증명하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 Claudin 7을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 "Claudin 7"은 CLDN7으로도 알려져 있으며, NCBI accession no. NM_001185022 일 수 있으나, 이에

한정되는 것은 아니다.

- [0015] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 Claudin 7에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 단백질을 포함하는 방사선 반응성 위암 진단용 키트를 제공한다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “항체”란 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 Claudin 7에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0018] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0019] 한편, 본 발명의 항체 대신에 본 발명의 바이오마커에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 앵타머 또는 단백질을 이용할 수 있다.
- [0020] 상기 “펩타이드”는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다. 바람직하게는 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열(TVRTSAD)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 “앵타머(aptamer)”란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료로부터 Claudin 7의 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 Claudin 7의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 상기 위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료의 Claudin 7의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 방사선 반응성 위암으로 판단하는 단계를 포함하는 방사선 반응성 위암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0023] 상세하게는, 상기 Claudin 7의 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정될 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 항원-항체 반응은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유체 세포측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0024] 본 명세서에서 “위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료”는 위암 환자 조직에 방사선을 조사할 경우, Claudin 7의 발현이 변화하는 임의의 시료를 포함하며, 바람직하게는 인간, 또는 마우스를 포함한 설치류 조직의 시료일 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 “방사선 반응성 위암 진단”은 위암 환자의 방사선 치료 전략 및 방사선 치료 효과에 대한 예측을 위해 위암 조직이 방사선에 반응하는지 확인하기 위함이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 Claudin 7에 특이적으로 결합하는 표적화물질(targeting agent)을 유효성분으로 포함하며, 위암에서 방사선 치료 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는 방사선 반응성 위암 표적 약물전달체를 제공한다. 상세하게는, 상기 표적화물질(targeting agent)은 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 단백질일 수 있으며, 보다 상세하게는, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열(TVRTSAD)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 “약물전달체”는 약학적으로 유효한 양의 약물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 약물이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 말한다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0028] 상기 “약물”은 동물 또는 사람의 체내에서 생리적인 기능을 촉진 또는 억제하여 목적하는 생물학적 또는 약리학적 효과를 유도할 수 있는 물질로서, 동물 또는 사람에게 투여하기 적합한 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물을 의미하며, (1) 감염 예방과 같은 원하지 않은 생물학적 효과를 예방하여 유기물에 대한 예방효과를 가지고, (2) 질병으로 생기는 컨디션을 경감시키며, 예를 들어 질병의 결과로 생기는 고통 또는 감염을 완화시키며, (3) 유기물로부터 질병을 완화, 감소 또는 완전히 제거할 수 있는 역할을 할 수 있다. 본 발명에 있어서는 위암 치료를 위한 항암제일 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료로부터 Claudin 7의 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 Claudin 7의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 상기 위암 환자 조직에 방사선을 조사한 시료의 Claudin 7의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 방사선 민감성 위암으로 판단하는 단계를 포함하는 위암의 방사선 치료 효과 모니터링 방법을 제공한다.
- [0030] 상세하게는, 상기 Claudin 7의 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정될 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 항원-항체 반응은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0032] <실시예 1> T7 select 파아지 human cDNA 라이브러리 스크리닝
- [0033] 방사선을 조사한 위암을 표적하는 특정 ‘TVRTSAD’ 펩타이드 서열 (서열번호 1)과 결합하는 결합 대상 단백질(counterpart protein)을 스크리닝하기 위해, T7 파아지 human cDNA 라이브러리를 이용한 파아지 디스플레이를 실시하였다. 라이브러리는 T7Select® Human normal stomach cDNA Library(Novagen)을 구입하여 사용하였으며, 총 3번의 바이오패닝 과정을 거쳐 결합 대상 단백질 후보군을 스크리닝하도록 디자인 하였다. 보다 정확하고 특이적으로 결합하는 후보군을 선별하기 위해 3회의 파아지 찾는 과정을 반복하였다. 이를 바이오패닝(biopanning)이라 한다. 과정 이후, 파아지 각각의 서열을 분석하여 그룹화하였고, BLAST 프로그램을 이용하여

후보군 정보를 확인하였다. 상기 후보군 정보를 도 1에 나타내었다.

[0034] <실시예 2> 환자 위암 조직 이식 마우스 모델 구축

[0035] 기존의 암세포 이식 동물모델의 한계를 극복하고자 실제 환자의 암 미세환경과 유사한 이상적인 암 질환 동물 모델을 확보하고, 방사선 조사에 따른 암조직의 영향을 확인할 수 있는 모델을 구축하기 위해, 먼저 실제 위암 환자로부터 적출된 암 조직을 이식한 마우스 모델을 확립하였다. 상기 동물 모델 구축을 위해 적출한 환자 암 조직을 NOD/SCID 마우스에서 배양하여 암조직이 확보되면, 다음 계대배양에서부터는 Balb/c 누드마우스를 사용하여 계대배양 하였다. 구체적으로, NOD/SCID 마우스에 마취제를 복강 주사하여 마취한 후, 3x3 mm 크기로 암조직을 절단하여 마우스 양쪽 옆구리 피하에 각각 조직 1개씩 이식하고, 100 ul의 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 100 µg/ml gentamicin, 2.5 µg/ml amphotericin B 항생제 혼합액 처리 후 봉합한 뒤, 보온패드에서 회복한다.(약 2 시간 소요). 이 후 매 주마다 암 조직 형성 및 성장을 관찰하고, 암 조직이 400-500 mm³의 크기로 자라면 분리하여 계대 배양을 위해 암조직을 3x3 mm 크기로 절단한다. 이후 다음 계대배양을 위해 누드마우스에 마취제를 복강주사하고, 양쪽 넓적다리 피하에 조직 1개씩 이식하였다. 이식 부위를 양쪽 넓적다리 피하로 변경함은 차후 다른 부위에 영향을 주지 않고 방사선을 부분적으로 조사하기 위함이며 상기와 같은 방법을 통해 계대배양을 진행, 4번째까지 재이식하여 암조직을 형성한 마우스 모델을 구축하였으며, 약 1개월(4주) 까지 암 조직의 성장을 관찰하여 암 조직의 크기가 200 mm³ 정도 성장하였을 때, 암 조직에만 국소적으로 10 Gy 또는 2 Gy의 방사선을 조사하고, 24 시간 회복시간을 가진 후에 실험에 사용하였다. 방사선 조사군의 대조군으로 동일 마우스 모델에서 방사선 조사만 하지 않은 마우스 모델 (0 Gy)도 준비하였다. 마우스 모델 구축 결과를 도 2에 나타내었다.

[0036] <실시예 3> 방사선 조사한 위암 조직에서 결합 대상 단백질 후보군의 mRNA 발현 차이 확인

[0037] 결합 대상 단백질 후보군이 실제 방사선 조사한 위암 조직에서 나타나는지 확인하기 위해 Q-PCR 방법을 실시하여 mRNA 발현 여부를 규명하였다. 총 4개의 결합 대상 단백질 후보군을 선정하여 각각의 유전자에 대한 프라이머를 제작하였다. 또한 상기 실시예 2에서 구축한 환자 위암조직 이식 마우스 모델에서 종양 적출 후, 동결 보관한다. 해당 종양 조직에서 각각 mRNA를 정제하고, cDNA를 합성하는 과정을 거쳐, 제작한 프라이머와 해당 cDNA를 이용하여 Quantitative PCR (Q-PCR)를 실시하였다. 그 결과, 후보군 중 Claudin 7이 방사선을 조사하지 않은 위암 조직 (0 Gy)에서는 mRNA 발현이 거의 확인되지 않고, 2 Gy 및 10 Gy 방사선을 조사한 위암 조직에서 mRNA 발현 차이가 높아지는 결합 대상 단백질 후보임을 증명하였고 해당 결과는 도 3에 나타내었다. 다른 후보군은 방사선 조사 여부와 관계없이 발현이 확인되지 않아 결합 대상 단백질 후보에서 제외하였다.

[0038] <실시예 4> 방사선 조사한 위암 조직에서 Claudin 7의 단백질 발현 차이 확인

[0039] 상기 실시예 3에서 mRNA 발현 차이를 확인한 Claudin 7 에 대하여 단백질 발현 단계의 차이를 확인하기 위해 western blotting 방법을 실시하였다. 실시예 3과 동일한 마우스 모델의 종양에서 단백질을 추출하였고, western blotting을 위한 샘플을 준비하였다. 0 Gy, 2 Gy, 10 Gy의 방사선을 각각 조사한 위암 조직을 적출하여 단백질을 추출하고 각각의 Claudin 7 항체를 이용하여 단백질 발현 차이를 확인한 결과, 0 Gy의 위암 조직에서는 발현되지 않던 단백질이 2 Gy, 10 Gy에서는 단백질이 명확히 발현됨을 확인하였다. 해당 결과를 도 4에 나타내었다. 해당 결과는 실시예 3의 결과를 뒷받침하는 결과로써, Claudin 7이 위암에서 방사선 조사에 따라 과발현됨을 규명하는 결과이다.

[0040] <실시예 5> 방사선 조사한 위암 표적용 펩타이드와 Claudin 7의 결합 규명

[0041] 방사선 조사한 위암 표적용 펩타이드의 결합 대상 단백질 후보군 중 가장 유력한 Claudin 7이 실제로 결합하는지 규명하기 위해 면역침강법 (immunoprecipitation assay)을 실시하였다. 0 Gy, 2 Gy, 10 Gy의 방사선을 각각 조사한 위암 조직을 적출하여 단백질을 추출하고, Claudin 7과 M13 항체 및magnetic bead를 이용하여 면역침강법을 실시하였고, 면역침강의 확인은 western blotting을 통해 확인하였다. 방사선 조사한 위암 표적용 펩타이드와 Claudin 7 이 실제로 결합함을 확인하였고, 따라서 Claudin 7은 방사선을 조사한 위암 표적용 특정 펩타이

드 서열의 결합 대상 단백질을 규명하였다. 해당 결과는 도 5에 나타내었다.

[0042] <실시예 6> Claudin 7 표적하는 표적항암제의 유효성 검증

[0043] Claudin 7을 표적하는 펩타이드를 약물이 봉입된 리포솜과 연결하여 약물전달체를 제작하였고, 해당 위암 표적용 항암제의 유효성 검증을 위해 in vivo tumor growth delay를 실시하였다. 실시예 2에서 구축한 방사선 조사 반응성 xenograft 마우스 모델 및 대조군을 구축하고, 종양 크기가 100 mm³ 정도 되었을 때 그룹핑을 진행하여 1; PBS, 2; 방사선 조사 (2 Gy), 3; DOX(2 mg/kg) + 방사선 조사 (2 Gy), 4; LP-DOX (2 mg/kg) + 방사선 조사 (2 Gy), 5; P1(peptide)-LP-DOX (2 mg/kg) + 방사선 조사 (2 Gy) 로 총 5개 그룹으로 실시하였으며, 5번 그룹은 실험군, 1~4 그룹은 대조군으로 지정하여 관찰하였다. 각 그룹당 5 마리를 포함하였다 (n=5). 대조군에 비해 실험군인 5번 그룹의 종양크기가 현저히 작은 것을 검증하였으며 그에 따라 신개념 항암제로써의 유효성을 검증한 결과를 도 6에 나타내었다. 이는 Claudin 7을 표적하는 펩타이드와 약물 봉입 리포솜을 연결한 표적항암제의 유효성 검증을 통해 Claudin 7을 표적하는 다른 항암제의 개발 가능성을 보여준 결과임을 나타낸다.

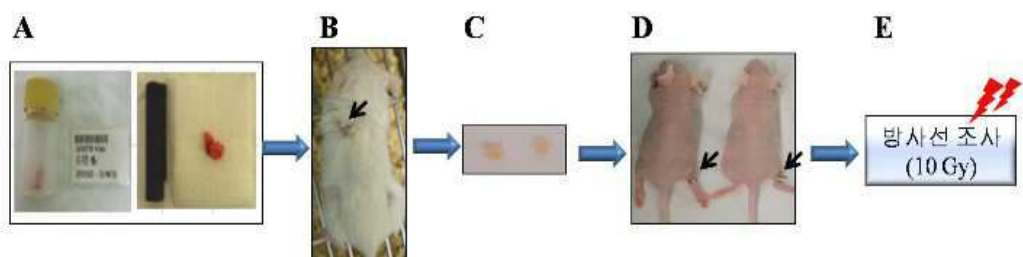
[0044] 이상으로 본 발명을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

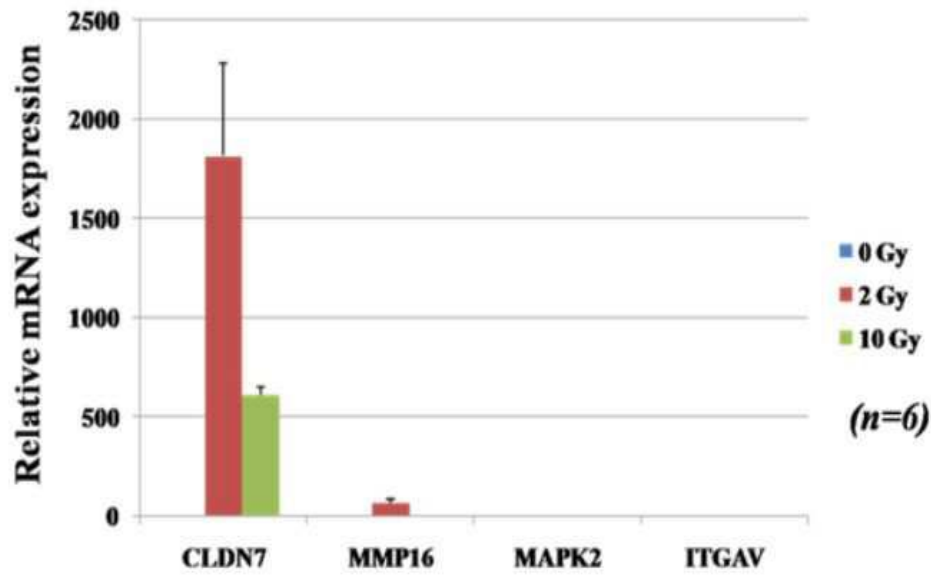
도면1

Predicted protein by BLAST(blastn)	Occurrence
Claudin 7 (CLDN7)	17
APOBEC1 complementation factor (A1CF)	15
Leucine rich repeat containing 8 family, member D (LRRC8D)	12
Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)(MMP16)	11
Integrin, alpha V (ITGAV)	6
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2)	3
Growth associated protein 43 (GAP43)	1
DENN/MADD domain containing 5A (DENND5A)	1
Teashirt zinc finger homeobox 2 (TSHZ2)	1
Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein (BET1)	1
Bestrophin 1 (BEST1)	1
Human coagulation factor IX fusion protein	1
Zic family member 5 (ZIC5)	1
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1-like	1

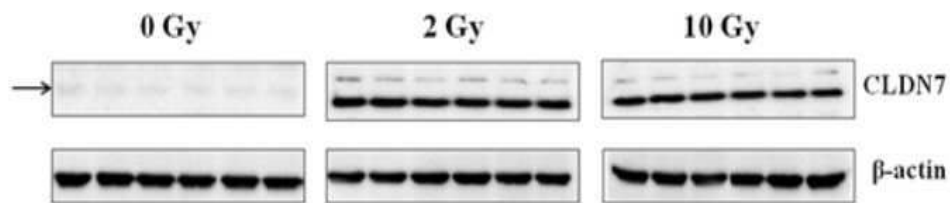
도면2



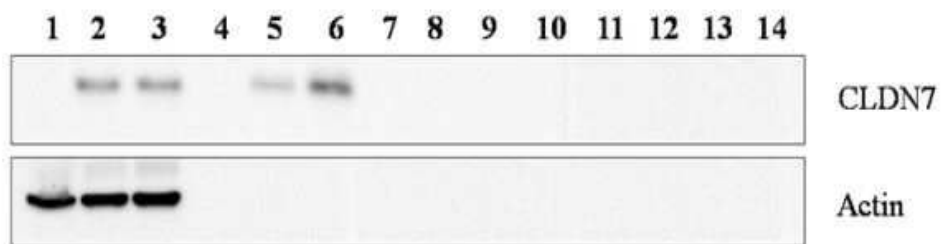
도면3



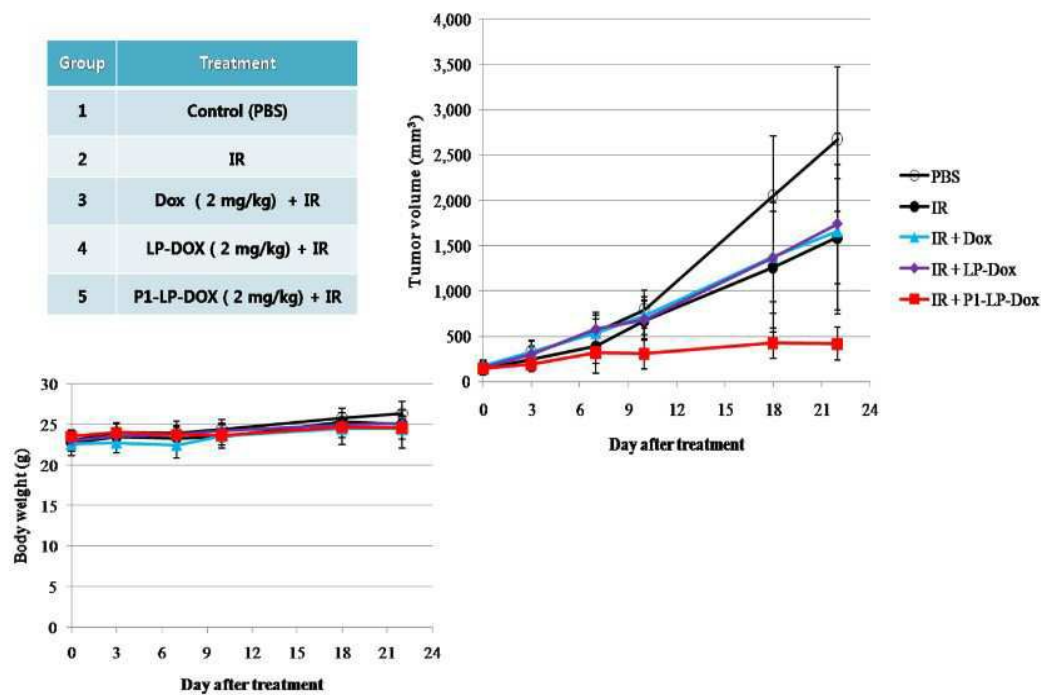
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
 - <120> Biomarker composition for diagnosing radiation responsive gastric cancer comprising Claudin 7
 - <130> ADP-2015-0112
 - <160> 1
 - <170> Kopatent In 2.0
 - <210> 1
 - <211> 7
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> peptide
 - <400> 1
- Thr Val Arg Thr Ser Ala Asp

1

5