



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0107968
(43) 공개일자 2019년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0602 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0029353
(22) 출원일자 2018년03월13일
심사청구일자 2018년03월13일

(71) 출원인
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박지원
세종특별자치시 달빛로 135, 605동 1003호(상록어
울림아파트 6단지)
장대영
서울특별시 서초구 신반포로 9, 반포아파트 76동
203호
김홍태
경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 305동 903호(
꿈마을건영아파트)
(74) 대리인
조정환

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 한국인 위암 연관 유전자 stable cell line 제작방법

(57) 요약

본 발명의 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주는 위암과 관련하여 지속적으로 발현이 가능한 세포주로 발암모델의 타당성을 확인하고, 다양한 유전학적인 상호작용 연구를 수행하여 종양의 발생, 증식과 전이에 연관되는 기전을 밝혀내는데 도움을 줄 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 2510/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 15182 한임평 512

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 독성평가연구부 임상연구과

연구사업명 주요사업

연구과제명 한국인 특이적 위암 원인유전자 발굴 및 표적치료제 선별 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

PWWP2B 유전자를 발현하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주(stable cell line)

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 PWWP2B의 유전자는 서열번호1의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주

청구항 3

PWWP2B 유전자가 녹아웃(knock-out)된 세포를 배양하는 단계; PWWP2B 유전자 발현 벡터를 이용하여 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 만드는 단계: 대조군 세포주를 만드는 단계: 및 상기 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주와 상기 대조군 세포주의 발현을 비교하는 단계를 포함하여 이루어지는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주는 퓨로마이신 내성 플라스미드를 이용한 벡터를 통하여 제조된 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 벡터는 발암 유전자 Myc와 PWWP2B 유전자를 혼합하여 Myc-PWWP2B 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 Myc-PWWP2B 발현벡터는 PEI 벡터(Polyethylenimine-mediated vector)인 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

청구항 7

제 3항에 있어서, 상기 대조군 세포주는 퓨로마이신 내성 플라스미드를 이용하는 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

청구항 8

제 3항에 있어서, 상기 대조군 세포주는 퓨로마이신 내성 플라스미드와 발암유전자 Myc를 포함하는 pcDNA를 사용하는 제작되는 세포주인 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

청구항 9

제 3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PWWP2B 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 한국인 위암관련 유전자 PWWP2B를 안정적으로 발현하는 안정한 세포주(stable cell line) 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 항암신약이나 새로운 항암화학요법을 개발하기 위한 전임상 연구의 핵심은 항암활성을 정확하고 신속하게 평가하는 데 있다. 새로운 항암제 및 항암화학요법을 개발하기 위해서는 비용 및 신속성의 면에서 시험관(in-vitro) 시험계가 생체내(in-vivo) 실험계에 비해 경제적이고 우수하지만, 시험관 실험계에 있어서 효능평가의 유효성은 상기 실험계가 생체 내 상황을 충분히 대변하여 임상적으로 의미 있는 효능이 검증될 수 있는지의 여부에 달려 있다. 현재까지 전임상 개발 단계를 거쳐 임상시험에 진입한 항암 후보물질들의 약 90%가 최종개발에 실패했는데 이는 적절한 실험계의 부재로 인해 임상 효능의 가능성을 지닌 화합물의 발굴에 실패했기 때문이다(Staquet M.J. et al., Cancer Treat Rep., 67:753, 1983; Twentyman P.R., Ann Oncol., 5:394, 1994; von Hoff D.D., Clin Cancer Res., 4:1079, 1998).

[0004] 지금까지 널리 쓰이고 있는 시험관 내 화학감수성 분석방법(in-vitro chemosensitivity assay)으로는 콜론 형성 분석법(clonogenic assay), 염료 배제 분석법(dye exclusion assay), MTT 분석법(tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay) 또는 SRB 분석법(sulfo-rhodamine B assay) 등이 있다. 상기한 방법은 항암신약개발에 있어서 대량검색(high-throughput)이 필요한 1차 스크리닝계로서는 의미가 있으나, 인체 고형암의 생체 내 조건과는 조건이 매우 달라서 고형암에 대한 반응물을 예측하기에는 무리가 있다. 고형암의 경우, 항암화학요법제에 대한 반응물이 낮은 이유는 고형암 세포의 삼차원적 조직화와 다세포계(multicellular system)에서 기인하는 세포간 및 세포와 세포간질(extracellular matrix, ECM)간의 상호작용 등이 항암약물의 암조직내 침투저하 및 조직 내 농도저하를 가져오는 등의 여러 기전으로 말미암아 약물에 대한 내성을 유발하기 때문으로 알려져 있다(Wolfgang M.K., Crit Rev Oncol Hematol., 36:123, 2000; Bernard D. et al., Crit Rev Oncol Hematol., 36: 193, 2000).

[0005] 한편, 위암은 전 세계적으로 발생빈도가 높은 암 중 하나로 한국 및 일본 등 아시아에서 발생하는 가장 흔한 암으로서 사망률 1위를 나타내는 암이다(Parkin et al., Int. J. Cancer, 80:827, 1999; Neugut et al., Semin. Oncol., 23:281, 1996; Parkin, Lancet Oncol., 2:533, 2001). 또한, 위암의 증상은 전혀 증상이 없는 경우에서부터 격심한 통증에 이르기까지 다양한 양상을 나타내고 있으며, 위암의 증상이 어떤 특성을 갖는 것이 아니라 일반적인 소화기 증상을 보이며, 위암의 초기에는 증상이 없는 경우가 대부분이며, 증상이 있다 하더라도 비교적 경미하여 약간의 소화불량이나 상복부 불편감을 느끼는 정도이므로 대부분의 사람이 이를 간과하기 쉬워 위암의 사망률을 높이는 원인이 되기도 한다. 따라서, 실제 위암 환자들 중 원발암(primary culture)의 상태에서 사망하는 것보다 약 90% 정도의 환자가 전이암으로 악화된 후 사망에 이르고 있다.

[0006] 따라서, 전사체 분석을 통해 한국인 특이 발현이 감소 또는 변이가 확인된 암억제 유전자 중 녹아웃 시 암세포의 확산 및 생존능력을 증가시키고 전이를 증가시키는 PWWP2B 유전자를 선정하여 위암의 형성이나 발암에 관여하는 기전을 밝히고자 본 발명에서 제공하는 세포주를 제작하기로 하였다.

[0007] 본 발명에서 임의의 참조 문헌의 언급은, 참조 문헌이 본 출원에 대한 관련 선행 기술이라는 것을 허용하는 것은 아니다.

[0009] 선행기술문헌

[0010] -특허문헌

[0011] (특허문헌 1) KR 10-2012-0115649

[0012] (특허문헌 2) KR 10-2011-0125546

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 녹아웃(knock-out)된 PWWP2B 유전자가 포함된 PWWP2B 안정세포주를 제공하는 것이다.

[0015] 또 다른 본 발명의 목적은 PWWP2B 유전자가 포함된 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 녹아웃된 PWWP2B 유전자가 포함된 PWWP2B 안정세포주를 제공한다

[0018] 또한, 본 발명은 PWWP2B 안정세포주에 사용되는 염기서열을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 PWWP2B 녹아웃된 세포를 배양하는 단계; PWWP2를 이용하여 안정화된세포주를 만드는 단계: 대조군 세포주를 만드는 단계: 및 상기 재조합된 안정세포주과 대조군 세포주의 발현을 비교하는 단계를 포함하는 PWWP2B 안정세포주를 제조하는 방법을 제공한다

[0020] 상기 제조방법의 안정화된 세포주는 푸로마이신 내성 플라스미드(puromycin resistance plasmid)와 PWWP2B 유전자를 발현하는 벡터를 이용하여 재조합하였으며, 상기 벡터는 Myc-PWWP2B-발현 벡터로서, 발암유전자의 일종인 Myc 유전자와 PWWP2B 유전자를 벡터를 PEI 벡터(Polyethylenimine mediated vector)를 이용하여 제조하였다.

[0021] 상기 제조방법의 대조군 세포주는 Promycin 내성 플라스미드와 pcDNA를 재조합하여 제조되었다. 상기 pcDNA는 발암유전자인 Myc 유전자를 포함하여 제조되었다.

[0022] 본 발명의 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주는 한국인 특이적 위암의 원인이 되는 PWWP2B 유전자를 지속적으로 발현이 가능한 세포주로서 발암모델의 타당성을 확인하고, 다양한 유전학적인 상호작용 연구를 수행하여 종양의 발생, 증식과 전이에 연관되는 기전을 밝혀내는데 도움을 줄 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주는 위암과 관련하여 지속적으로 발현이 가능한 세포주로 발암모델의 타당성을 확인하고, 다양한 유전학적인 상호작용 연구를 수행하여 종양의 발생, 증식과 전이에 연관되는 기전을 밝혀내는데 도움을 줄 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0027] 세포배양

[0028] 1) PWWP2B 유전자가 녹아웃 된 세포를 6well plate에 배양하여 PWWP2B 유전자가 녹아웃 된 세포를 제조하였다.

[0029] 2) 상기 배양된 PWWP2B 유전자가 녹아웃 된 세포를 이용하여 안정화된 세포주와 대조군 세포주를 제조하였다.

[0030] 3) 상기 안정화된 세포주는 PWWP2B 푸로마이신 내성 플라스미드 (Puromycin resistance plasmid) 1 ug과 발암

유전자인 myc와 결합된 PWWP2B 발현 벡터 1ug을 이용하여 제조하였다. 상기 두 세포를 재조합하기 위하여 PEI 벡터를 사용하였다.

[0031] 4) 상기 제조된 안정화된 세포주 및 대조군 세포주를 이틀간 배양한 후, PBS용액으로 이물질을 세척한 후에 trypsin-EDTA처리하여 세포를 분리하였다. 상기 분리된 세포를 puromycin 배양액 1ml에 풀어주었다(puromycin 농도 3 ug/ml (Media 500ml에 puromycin 150 ul add)).

[0032] 5) 상기 puromycin 배양액에 풀어준 세포를 이용하여 새로운 6well plate에 1/10 또는 1/50 비율로 추출하여 콜로니(colony)가 뜰 때까지 배양하였으며, 콜로니(colony)가 생기면 네임펜으로 표시하였다. 상기 추출한 이외의 세포들은 형질주입이 되었는지 확인하기 위해 western blotting을 실행하여 확인하였다.

실시예 2

[0034] PWWP2B 유전자가 안정화된 세포 확인

[0035] 1) 24 well plate에 puromycin 배양액을 500 uL씩 넣는다.

[0036] 2) 상기 콜로니가 생성되었다고 표시한 6well plate에 PBS 용액으로 세척하여 이물질을 제거한 후 Trypsin-EDTA 20 uL를 상기 생성된 콜로니(colony)에 주입하였다. 현미경으로 상기 콜로니를 관찰하여 세포가 떨어진 것을 확인하였다.

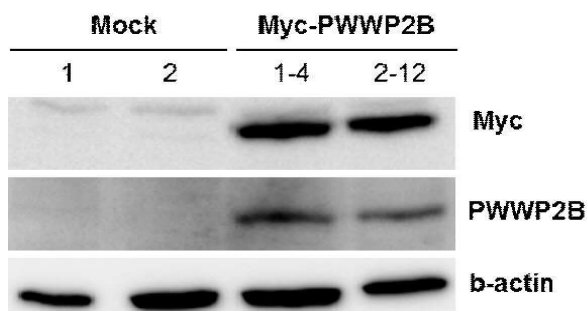
[0037] 3) 상기 1) 단계에서 준비해 놓은 puromycin 배양액 500 uL가 주입되어 있는 24 well plate에서 상기 puromycin 배양액 20 uL을 취해 상기 콜로니(colony)에 살짝 떨어트리고, 상기 puromycin 배양액이 처리된 콜로니(colony)를 다시 팁(tip)을 이용하여 상기 24 well plate에 옮긴 후 현미경으로 콜로니(colony)가 plate에 잘 옮겨졌는지 확인한 후에 1000 pipet을 이용하여 10번 반복하여 혼합하였다. 상기과 같은 과정을 반복하여 24 well plate에서 세포를 배양하였다.

[0038] 4) 상기 24 well plate에 배양한 세포 중 충분히 자란 well만 골라서 표시하였고, 상기 well의 숫자만큼 Western 확인용과 유지용으로 나눠서 6 well plate준비하였다. 상기 표시한 24 well plate의 세포에서 이물질을 제거하기 위해 PBS로 세척한 후 Trypsin-EDTA 처리하여 세포를 분리하였다.

[0039] 상기 분리된 세포를 6well plate에 옮긴 후 상기 well에 puromycin 배양액 500 uL를 넣고 4/5는 확인용으로 1/5는 유지용으로 배양하였다.

[0040] 5) 상기 확인용 6 well plate에서 세포가 충분히 자라면 whole cell를 이용하여 세포를 분리한 후 western blotting으로 확인하였다. (1/10 loading).

[0041] 다음은 western blotting 분석결과 이다.



[0042]

[0043] 상기 결과를 통하여 본 발명에서 제공하는 PWWP2B 유전자가 안정화된 세포주는 Myc, PWWP2B 유전자를 지속적으로 모두 발현하는 것으로 확인되었다.

서열 목록

<110> KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION

Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Stable cell line of gene associated with gastric cancer of Korean patients and a method of producing thereo

<130> 18-FP-017

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PWWP2B Sequence

<400> 1

atggagccgc gcgccgctg ccggtcgccg gtgcgggtgg agcaggtcgt caacggcgcg 60

ctggtgggtca cggtagagctg cggcgagcgg agcttcgcgg ggatcctgct ggactgcacg 120

aaaaagtccg gcctctttgg cctacccccg ttggctccgc tgccccaggt cgatgagtec 180

cctgtcaacg acagccatgg ccgggctccc gaggaggggg atgcagaggt gatgcagctg 240

gggtccagct cccccctcc tgccccgggg gttcagcccc ccgagaccac ccgccccgag 300

ccacccccgc ccctcgtgcc gccgtgccc gccggaagcc tgcccccgta ccctccctac 360

ttcgaaggcg cccctttccc tcaccgctg ttgctccggg acacgtacaa gctgtgggtg 420

ccccagccgc cggccaggac catcaagcg acgcggcggc gtctgtcccg caaccgcgac 480

ccggggcgcc tcctcctcag caccatccgc ctgcggccgc gccaggtgct ctgtgagaag 540

tgcaagagca cgctgagccc cccggaggcc agccccggac cccagccgc gccagggcc 600

cgcaggaggc tgggcagcgg cccggacagg gagctccgca agccggagga gccggagaac 660

ggcgagccca cggctgcggc caccgccagg aggagcaaga gggagaggcg caggaggagc 720

agggccccgg cagagcaggt ccccgggagc ccggtcatca agatctecta cagcacgccc 780

cagggaagg gagaggtggt caagatcccc tccgctgctg acggctctct ggagcccttc 840

cgtccccagc agggccccga ggacgacggc agccaggacc ccgaggtgct ggacagagag 900

tcccgggacc ggccgtcctg cgcgcctcgc gcctccatcc ccaagttgaa actgacacgg 960

cctgtgccgg ccggcgcgga cctgccgccc cctaagatcc gccigaagcc ccaccgtctg 1020

ggggacagcg agcacgagcc cgtgtaccgg gccgagctgg tgggggagct gaacgggtac 1080

ctgcgggaca gtcgccggc gccctgtgctg gacggccctg ccggtgggct ggcggacttg 1140

tcttctggaa gticgggtga ggacgatgac ttcaagagct gtccccaggg tccacaggga 1200

cgcgagggtc tggtttttct cgtcagctgc cctgagggga gagcggactg tgccagttag 1260

tcggcgtgca gcagcgacag cctggacgag gccagatcgt ccggctcgga agggacgccg	1320
gcagacacgg gtgacctctc gcctggccac ggcgcgctcag cgccctcggt gtccagagag	1380
gctcgccaaa cggtgccgcc cctgacggtc aggctgcaca cacagagcgt gtcggagtgc	1440
atcacggagg acggcaggac tgtggccgtg ggggacatcg tctggggtaa gatccatggt	1500
tttccttggg gcccggcgcg tgttcttgac atcagtctcg gccagaagga ggacggagag	1560
ccgtcttggc gagaagcgaa ggtctcgtgg ttgggttctc cgactacgtc gttcttgtct	1620
atttcaaac tctccccttt ctctgaattt ttcaactga gatttaatcg taagaagaag	1680
gggatgtatc ggaaagctat aaccgaggct gcaaatgccg caagacacgt ggccccgga	1740
atcagggagc tcttaacca gtttgaaacg taa	1773