

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 2월 21일 (21.02.2019) WIPO | PCT

WO 2019/035602 A2

(51) 국제특허분류:

G01N 33/574 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/009149

(22) 국제출원일: 2018년 8월 10일 (10.08.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0103383 2017년 8월 16일 (16.08.2017) KR
10-2017-0105210 2017년 8월 21일 (21.08.2017) KR

(71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박원상 (PARK, Won-Sang); 06505 서울시 서초구 신반포로 19길 10, 26동 1002호, Seoul (KR). 윤정환 (YOON, Jung-Hwan); 06575 서울시 서초구 서래로 5길 107, 302호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

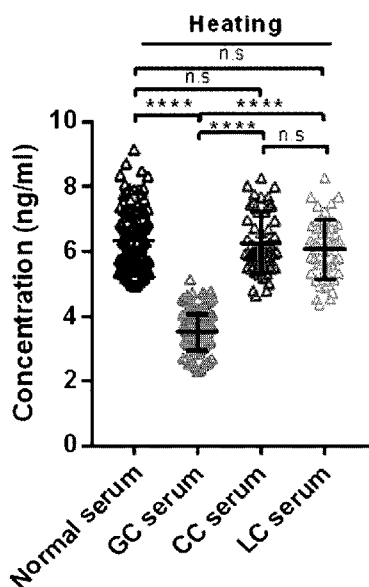
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

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

(54) Title: STOMACH CANCER DIAGNOSIS USING BLOOD GKN1 PROTEIN

(54) 발명의 명칭: 혈액 내 GKN1 단백을 이용하는 위암 진단



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for diagnosis of stomach cancer, the composition comprising an agent for measuring a gastrokine 1 (GKN1) protein level or a stomach cancer diagnosis kit comprising the composition. In addition, the present invention relates to a composition comprising gastrokine 1 (GKN1) protein as an effective ingredient for prevention or treatment of stomach cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물 또는 상기 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트에 관한 것이며, 또한, GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 유효성분으로 포함하는 위암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

WO 2019/035602 A2

명세서

발명의 명칭: 혈액 내 GKN1 단백을 이용하는 위암 진단 기술분야

- [1] 본 발명은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 유효성분으로 포함하는 위암의 진단, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 위암은 전 세계적으로 한국, 중국, 일본 등에서 많이 발생하는 암으로써 미국, 유럽 등의 서구에서는 발생률이 낮으나, 한국의 경우 암 발생률 1위가 위암이고, 사망률은 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다. 위암의 분류를 살펴보면 전체의 95%가 위벽 점막의 샘 세포에서 생기는 선암이며, 그 외 림프계에서 발생하는 림프종, 간질조직에서 발생하는 위장관 간질성종양이 있다.
- [3] 현재 암을 치료하는 방법 중 3가지 주요 치료법으로는 외과적 치료법, 약물요법, 방사선 요법이 있는데, 약물요법은 치료에 동반되는 고통이 적고, 외과적 치료나 방사선 치료에 비해 치료 후에도 암의 재발이 상대적으로 적으므로 이에 대해 기대가 모아지고 있다. 따라서 이에 부응할 만한 수많은 항암제가 개발되어 사용되고 있는데, 이들 대부분의 항암제는 암의 이상 증식을 염두에 두고 활발하게 분열하는 세포를 선택적으로 죽게 함으로써 항암 효과를 나타내는 것이다. 이러한 항암제는 일반적으로 인체 내에서 활발하게 분열하는 세포인 면역세포, 모근세포와 같은 정상세포도 함께 죽이게 되는 심각한 부작용을 동반하므로 장기간 사용이 불가능한 문제점을 안고 있다. 또한, 위암치료를 위한 방법으로는 림프절 절제술, 내시경적 점막절제술, 복강경적 위절제술 등의 방법이 사용되고 있는데, 내시경적 점막절제술은 점막 내 조기위암에 대해 암 병변이 있는 위 점막 주위에 생리 식염수를 주입하여 병변부위를 불룩하게 부풀린 다음 병변이 있는 점막을 절제하는 방법으로, 간단한 내시경 시술로 위 절제수술의 고통을 피할 수 있다는 장점이 있지만, 점막에 국한된 조기위암 중 림프절 전이가 가능성이 낮은 경우에 한해 사용할 수 있다는 한계가 있다.
- [4] 최근 들어, 전 세계적으로 암의 생성 및 치료와 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 치료용 표적을 발굴하고 이들을 진단 및 치료제 개발에 이용하기 위한 연구를 진행하고 있다. 게놈 연구의 활성화와 함께 인간 유전자 DNA 칩 또는 프로테옴 분석 연구가 활발하게 이루어지고 암과 관련된 유전자가 대량 발굴됨에 따라 많은 유전자들의 목록과 관련된 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 유전자로서의 활용과 함께 나아가 암을 효과적으로 치료할 수 있는 유전자의 발굴에 상당한 어려움이 있다. 따라서 지금까지 밝혀진 암 관련 유전자 이외에도 새로운 유전자들의 발굴이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 위암의 진단용 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GKN1 단백 수준을 측정하는 단계; 및 (b) GKN1 단백 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 위암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 유효성분으로 포함하는 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 투여하는 단계를 포함하는 위암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [11] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백 수준을 측정하는 제제는 상기 단백에 특이적으로 결합하는 항체인 것일 수 있다.
- [12] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 혈액, 혈장 또는 혈청에 엑소좀 내에 존재하는 것일 수 있다.
- [13] 또한, 본 발명은 위암의 진단용 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 키트는 ELISA 키트 또는 단백 칩 키트인 것일 수 있다.
- [15] 또한, 본 발명은 (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GKN1 단백 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 GKN1 단백 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 위암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 60 내지 80°C에서 5 내지 15분 동안 열처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 75 내지 85°C에서 8 내지 12분 동안 열처리하는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 70°C에서 10분 동안 열처리하는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암인 것으로 판단되는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암의 발병가능성이 높거나 예후가 좋지 않을 가능성이 높은 것으로

- 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청인 것일 수 있고, 바람직하게는 혈청인 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 측정은 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 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것일 수 있다.
- [21] 또한, 본 발명은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 유효성분으로 포함하는 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 GKN1 단백을 발현하는 세포에서 분리되는 엑소좀인 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 GKN1 단백을 발현하는 세포의 배양 상층액에서 분리되는 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 재조합 GKN1(rGKN1: recombinant GKN1) 단백질이 도입된 세포의 배양 상층액에서 분리되는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 GKN1 단백질은 1 내지 10 ng/ml의 농도로 처리되는 것일 수 있고, 바람직하게는 3 내지 7 ng/ml의 농도로 처리되는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 5 ng/ml의 농도로 처리되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 1 내지 20 ng/ml의 농도로 처리되는 것일 수 있고, 바람직하게는 5 내지 15 ng/ml의 농도로 처리되는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10 ng/ml의 농도로 처리되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [27] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 클라스린(Clatrin)에 의해 암세포로 내재화(internalization)되는 것일 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GKN1 단백질은 암세포의 세포증식을 억제하고 암세포의 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [29] 또한, 본 발명은 GKN1 단백질(Gastrokine 1 Protein)을 투여하는 단계를 포함하는 위암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [30] 본 발명의 암의 치료 방법은 GKN1 단백을 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라

다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

- [31] 상기 개체는 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[32]

발명의 효과

- [33] 본 발명에 따른 GKN1 단백(Gastroke 1 Protein)은 위암의 예측 또는 진단에 유용한 바이오마커로서, 상기 엑소좀의 GKN1 단백을 포함하여 시료 내 총 GKN1 단백 수준이 정상인에 비해 낮은 경우 위암인 것으로 빠르고 편리하게 위암의 진단 또는 예후 예측이 가능할 수 있다.

- [34] 또한, 본 발명에 따른 GKN1 단백(Gastroke 1 Protein)은 GKN1 단백을 발현하는 세포에서 엑소좀으로 분비되고, GKN1 단백을 발현하는 세포의 배양 상층액에서 분리되며, 클라스린(Clathrin)에 의해 암세포로 내재화되어 암세포의 세포증식을 억제하고 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 위암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [35] 도 1은 GKN1 결합 단백을 동정한 결과로서, (a)는 단백 마이크로어레이에서 제조한 GKN1 단백에 결합을 보이는 엑소좀 단백질의 리스트에 관한 것이고, (b)는 GKN1이 COMT 및 YWHAZ 단백질에 대한 결합력을 면역침전법 및 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 2a는 HFE-145 세포, 제조한 GKN1(rGKN1) 단백을 처리/비처리한 AGS 및 MKN1 세포에서 분리된 엑소좀(Exosome), 엑소좀이 제거된 배지(soluble) 및 전체 세포 용해물(WCL)에서의 GKN1, TSG-101 및 CD81에 대한 웨스턴블롯팅의 결과를 나타낸 것이다.
- [37] 도 2b는 HFE-145 세포에서의 전체 배양액(Total media), 엑소좀 분획(Exosome) 및 엑소좀이 제거된 배지(Soluble)를 GKN1 단백질의 농도 측정용 ELISA kit 내 희석 완충용액을 처리한 후 GKN1 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [38] 도 2c는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀에 트립신 및 Triton X-100의 처리/비-처리에 의한 효소 분해 어세이(Trypsin digestion assay)를 한 결과를 나타낸 것이다.
- [39] 도 3a는 제조한 GKN1 단백을 AGS 세포에 처리한 후 분리된 엑소좀을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 3b는 siClathrin을 처리한 AGS 및 MKN1 세포에서 Clathrin 단백질의 발현이 억제됨을 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [41] 도 3c는 siClathrin이 처리된 AGS 및 MKN1 세포에서 GKN1 단백을 포함하는 엑소좀의 위치화(localization)를 조사한 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 3d는 siClathrin이 처리된 AGS 및 MKN1 세포에서 GKN1 및 CD81의

발현량을 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

- [43] 도 4a는 HFE-145 세포에서 열처리를 하지 않거나(Non-heating) 열처리를 한 경우(Heating)의 전체 배지(Media), 엑소좀(Exosome) 및 엑소좀이 제거된 배지(exosome depleted media)에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 4b는 10명의 건강한 피험자(Normal serum) 및 10명의 위암 환자(cancer serum)의 혈청에서 열처리를 하지 않거나(Non-heating) 열처리를 한 경우(Heating)의 전체 혈청(Whole Serum), 엑소좀(Exosome) 및 엑소좀이 제거된 혈청(W/O Exosome)에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 4c는 100명의 건강한 피험자들로부터 혈청 GKN1 단백질 농도에 따른 나이 및 성별의 관련도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [46] 도 4d는 건강한 피험자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자 및 위암 환자에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다($P < 0.0001$).
- [47] 도 4e는 100명의 건강한 피험자(Normal serum), 150명의 위암 환자(GC serum), 45명의 간암 환자(LC serum) 및 50명의 대장암 환자(CC serum)에서 혈청 GKN1 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [48] 도 4f는 정상 위 점막(normal)을 가진 자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자 및 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자에 대한 위암 환자에서의 혈청 GKN1 수준에 의한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [49] 도 4g는 혈청 GKN1 농도로 위암 환자를 간암 및 대장암 환자와 구분할 수 있는 지에 대한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 4h는 건강한 피험자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자 및 위암 환자 중 조기위암과 진행성 위암 환자에서의 GKN1 단백질의 농도를 분석한 결과를 나타낸 것이다($P < 0.0001$).
- [51] 도 4i는 건강한 피험자, 위축성 위염(atrophic gastritis: Atrophy)이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia: IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자 및 위암 환자 중 조기 위암 환자에서의 GKN1 수준에 대한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [52] 도 5a는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀이 Jurkat T 세포, THP-1 단백질, U937 대식세포의 세포막에 붙었는지 여부를 확인하기 위한 면역형광 어레이 결과를 나타낸 것이다.
- [53] 도 5b는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀 GKN1 및 CD81 단백질이 Jurkat T 세포, THP-1 단백질, U937 대식세포의 세포막 또는 세포질이나 핵에 존재하는지 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [54] 도 5c는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀 GKN1이 Jurkat T 세포, THP-1 단백질,

U937 대식세포의 세포생존율에 영향을 미치는지 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

- [55] 도 5d는 HFE-145 세포 유래의 엑소좀 GKN1이 THP-1 단백질, U937 대식세포의 기능에 영향을 미치는지 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [56] 도 6a는 MKN1(제조합 GKN1 처리/비-처리), AGS(제조합 GKN1 처리/비-처리) 및 HFE-145 세포 유래의 엑소좀을 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에 각각 처리한 후, MTT assay 를 통해 세포생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [57] 도 6b는 MKN1(제조합 GKN1 처리/비-처리), AGS(제조합 GKN1 처리/비-처리) 및 HFE-145 세포 유래의 엑소좀을 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에 처리한 후, BrdU Incorporation Assay를 통해 세포 증식능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [58] 도 6c는 제조합 GKN1(rGKN1) 또는 GKN1 단백을 포함하는 엑소좀(Exosome carrying Gastrokine 1 Protein)을 처리한 후, MTT 와 BrdU Incorporation assay 를 통해 시간에 따른 세포생존율과 세포 증식능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [59] 도 6d는 제조합 GKN1을 AGS 및 MKN1 세포에 처리(rGKN1_exosome)/비-처리(w/o GKN1_exosome)한 후 세포주기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [60] 도 6e는 HFE-145, AGS(제조합 GKN1 처리/비-처리) 및 MKN1(제조합 GKN1 처리/비-처리) 세포에서 p53, p21, CDK4, Cyclin D, Cdc25c, p-Cdc2, Cyclin B, BAX, BCL2, Caspase-3(cleaved 포함) 및 Caspase-8(cleaved 포함)의 발현 변화를 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [61] 도 6f는 제조합 GKN1이 처리/비-처리된 세포에서 유래된 GKN1 단백을 포함하는 엑소좀을 AGS 및 MKN1 세포에 처리한 후, 세포사멸 어세이를 통해 세포사멸 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[62]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [63] 본 발명에서의 용어, "진단"은 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 엑소좀의 GKN1 단백 발현 수준을 확인하여 위암의 진행 여부를 확인하는 것을 의미한다.
- [64] 본 발명에서의 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 GKN1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

이러한 본 발명의 GKN1 단백질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체를 포함한다.

- [65] 본 발명의 위암 진단 키트는 엑소솜의 GKN1 단백에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있고, 단백 수준을 측정하는 키트는 "단백질 발현 수준 측정"을 위해 사용되는 ELISA 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [66] 상기 항체를 이용한 단백 발현 여부 측정은 GKN1 단백 및 그의 항체 간의 항원-항체 복합체를 형성함으로써 측정되며, 다양한 방법에 의해 상기 복합체의 형성량을 측정함으로써 정량적으로 검출할 수 있게 된다.
- [67] 상기 항원-항체 복합체에 의한 측정은 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 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명에서의 용어, "생물학적 시료"란 구체적으로 엑소솜 내 GKN1 단백을 포함하여 총 GKN1 단백 발현 수준을 검출할 수 있는 시료를 의미하며, 예로써 혈액, 혈장 또는 혈청 등을 포함하나, 바람직하게는 혈청을 의미한다.
- [69] 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 획득한 후, 60 내지 80°C에서 5 내지 15분 동안 열처리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 열처리 후 총 시료내 혹은 엑소솜내 GKN1 단백의 발현 수준을 측정하여 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하여 엑소솜의 GKN1 단백 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암인 것으로 판단함으로써 위암의 예측 또는 진단이 가능하다.
- [70] 본 발명은 GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 유효성분으로 포함하는 위암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [71] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 위암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [72] 본 발명의 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 위암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [73] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라

바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[74] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도)에 적용할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[75] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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.

[76] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[77]

발명의 실시를 위한 형태

[78] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[79]

[80] 실시예 1. 실험 방법

[81] 1.1. GKN1 이 도입된 재조합 벡터 제조

[82] 재조합 GKN1 단백을 제조하기 위해 다음과 같이 재조합 벡터를 제조하였다. 먼저 인체 GKN1 cDNA를 PCR 방법을 이용해 증폭시키고, pCMV6-AN-FC(Origene ID PS100055) 벡터에 제한효소 사이트를 이용하여 pCMV6-AN-FC-hGKN1 재조합 벡터를 제조하였다. 보다 구체적으로, pCMV6-AN-FC 벡터와 GKN1 cDNA를 SgfI과 MluI의 제한효소로 처리한 후, pCMV6-AN-FC와 hGKN1 cDNA를 연결시켜 상기 벡터에 GKN1 유전자를

도입시켰다. 이후 대장균에 형질전환하여 아가 플레이트 상에서 생긴 콜로니를 취한 후, 이를 배양하여 DNA를 추출한 후, 시퀀싱을 수행하여 GKN1 유전자가 올바르게 도입된 것인지 확인하였다. 그 후 protein A affinity 크로마토그래피를 이용하여 재조합 GKN1 단백을 정제한 후 이를 웨스턴 블롯법을 이용하여 GKN1 재조합 단백을 확인하였다. 이 후, 상기 GKN1 유전자의 서열을 서열번호 1로, 이로 코딩된 GKN1 단백질의 아미노산 서열을 서열번호 2로 나타내었다.

[83]

[84] **1.2. 세포배양**

[85] GKN1(Gastroke 1) 단백을 발현하지 않는 AGS 및 MKN1 위암세포주(gastric cancer cell lines)와 GKN1을 발현하는 HFE-145 불멸화 위상피세포주(immortalized gastric epithelial cells)는 10% 열-불활성화된 FBS(fetal bovine serum)을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂에서 배양되었다. 또한, Jurkat T 세포, THP-1 단핵구 및 U937 대식세포도 상기와 같은 조건에서 배양되었다.

[86]

[87] **1.3. HuProt™ 마이크로어레이(microarray)를 통한 GKN1 결합단백의 동정**

[88] GKN1 결합단백을 동정하기 위하여, 19,000 개 이상의 전-길이 재조합 인간 단백을 포함하는 Human Proteome Microarray(CDI Labs, USA)가 사용되었다. 간단하게, 단백 마이크로어레이는 2시간 동안 Blocking Buffer (5% BSA in PBS with 0.05% tween-20)가 처리된 후, 1 µg의 biotinylated GKN1가 4°C에서 8시간 동안 처리되었다. 이후, 마이크로어레이에 1 µg의 streptavidin-fluorescence (Alexa-Fluor 635 nm)가 처리되었다. 결과는 GenePix 4100A Microarray Laser Scanner (Molecular Devices, USA)로 확인하였다.

[89]

[90] **1.4. 엑소좀 분리(Exosome Isolation)**

[91] GKN1 단백질이 엑소좀에 존재하는지 조사하기 위하여, AGS 및 MKN1 세포는 재조합 GKN1 단백(rGKN1, ANRT, Daejeon, Korea)으로 처리되었다. 엑소좀은 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포의 상층액으로부터 분리되었다. 간단하게, passage 3 내지 8의 세포가 serum-free 배지에서 배양되었고, 배지를 모으기 전 48시간 동안 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양되었다. 조건화된 배지는 세포 잔해(cell debris)를 제거하기 위해 4°C에서 10분 동안 2000g에서 원심분리되었고, 이후 0.22 µm 필터를 통과시켰다. 필터된 상층액은 새로운 glass tube에 옮겨서 얼음에 놓아두었다. 이후, 새로운 glass tube에 2 ml의 상층액을 0.75ml의 A/B/C solution (101Bio company, CA, USA)과 혼합시키고, 30초 동안 강하게 볼텍싱하였고, 4°C에서 30분 동안 놔두었다. 혼합물은 2개의 층으로 분리되어 위층은 제거되고, 아래층은 microcentrifuge tube에 옮겨 3분 동안 5,000g에서 원심분리되었고, 다시 중간층은 새로운 microcentrifuge tube에 옮겨 3분 동안 5,000g에서 원심분리한 후, 두껍을 열어

상온에서 10분 동안 에어-드라이시켰다. 총 4배 부피의 1X PBS를 tube에 가하고 강하게 파이펫팅하였다. Tube는 horizontal shaker에서 고속으로 15분 동안 처리한 후, 5분 동안 5,000g에서 원심분리하였다. 상층액은 PureExo Column (101Bio company, CA, USA)으로 조심히 옮긴 후, 5분 동안 1,000g에서 원심분리하였다. 통과액은 PBS에 부유된 분리된 엑소좀 분획을 포함하고 있다.

[92]

[93] 1.5. 엑소좀 표지(Exosome Labeling)

[94] 엑소좀은 제조사의 프로토콜(약간 변형)에 따라 PKH26(Sigma, St. Louis, USA)로 표지되었다. 간단하게, 엑소좀 펠릿은 1ml의 Diluent C로 부유되었고, 따로 1ml의 Diluent C는 4 μ l의 PKH26으로 혼합시켜 Stain Solution을 만들었다. 엑소좀 현탁액은 상기 stain solution을 혼합하여 4분 동안 반응시켰고, 표지 반응은 동량의 1% BSA(bovine serum albumin)가 더해지면서 멈추었다. 표지된 엑소좀은 Total Exosome Isolation Kit(Invitrogen)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분리되었다. 간단하게, 0.5 volume의 Isolation Reagent가 표지된 엑소좀에 더해지고 혼합되었다. 표지된 엑소좀은 밤새 4°C에 나두었고, 순차적으로 4°C에서 1시간 동안 10,000g에서 원심분리되었다. 이후, 상층액은 버리고, 각 펠릿은 100 μ l의 PBS로 부유되었다.

[95]

[96] 1.6. 엑소좀에서 GKN1 단백질 발현

[97] HFE-145, AGS 및 MKN1 세포의 세포 용해물(cell lysate) 및 엑소좀에서의 GKN1 발현은 웨스턴블롯팅으로 분석되었다. 동량의 세포 용해물 및 엑소좀은 12.5% SDS-PAGE로 분리되었고, Hybond-PVDF(polyvinylidene difluoride) transfer membranes (Amersham)으로 옮겨졌다. 0.5% skim milk로 블러킹한 후, 멤브레인은 anti-GKN1 (Abcam, MA, USA), anti-TSG101 및 anti-CD81 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)인 1차 항체로 반응시켰고, HRP(horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibodies로 반응시켰다. 단백질 밴드는 Westernsure ECL substrate (LI-COR Biosciences, NE, USA)로 검출되었고, 밴드는 LAS 4000 (Fuji Film, Japan)으로 가시화되었다.

[98]

[99] 1.7. 공동-면역침전(co-immunoprecipitation)

[100] 제조합 GKN1(rGKN1)으로 처리된 AGS 및 MKN1 세포 유래의 엑소좀은 PBS로 세척되었고, 기존에 기재한 바와 같이 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 1.0 mM NaVO₄ 및 1% protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 PBS(pH 7.2)로 4°C에서 용해되었다(J. Biol. Chem. 2010; 285: 20547-57). 기존에 기재한 바와 같이, 동량의 단백질 알리퀴트(1.0mg)는 2.0 μ g의 GKN1(Abcam, Cambridge, UK), COMT 및 YWHAZ (Genetex, CA, USA)에 대한 항체가 결합된 Protein A/G-agarose(Santa Cruz Biotechnology)에서 면역침전되었다(EBioMedicine. 2016; 9: 97-109).

[101]

[102] **1.8. Trypsin digestion assay**

[103] GKN1 단백질의 엑소좀 내 존재 여부를 확인하기 위해, 기존에 기재한 바와 같이 HFE-145 세포($7\mu\text{l}$ 의 PBS에 $35\mu\text{g}$ 의 단백질)로부터 분리된 엑소좀은 4°C 에서 30분 동안 1% Triton X-100에 의하여 지질막이 분해되었다(Blood, 2009; 113: 1957-66). 엑소좀은 Triton X-100이 없는 동일 조건 하에서 배양되었다. 엑소좀 현탁액은 2가지 효소 농도(15 및 $0.01\mu\text{g/mL}$)로 37°C 에서 트립신으로 분해되었다. Triton X-100 처리는 트립신 활성화에 거의 영향을 주지 않았다 (data not shown). 트립신 처리 후, 샘플은 동량의 Laemmli buffer로 즉시 혼합되었고, 3분 동안 끓인 후 젤 로딩이 이루어졌다.

[104]

[105] **1.9. 세포 생존 및 사멸의 측정**

[106] 세포 생존을 분석의 경우, HFE-145 세포와 5 ng 재조합 GKN1(rGKN1)으로 처리/비-처리된 AGS 및 MKN1 세포에서 유래된 엑소좀을 각 세포에 처리한 후, 24, 48 및 72시간에 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에서 MTT 어세이가 수행되었다. 흡광도는 540nm 에서 spectrophotometer를 사용하여 측정되었고, 세포 생존율은 비-처리된 세포에 상대적으로 표현되었다.

[107] 세포증식 어세이의 경우, 5 ng 재조합 GKN1(rGKN1)로 처리된 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에서 유래된 엑소좀을 각 세포에 처리한 후, BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 24, 48 및 72 시간에 BrdU Incorporation Assay 가 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 흡광도는 450nm 에서 spectrophotometer를 사용하여 측정되었고, 세포 증식율은 비-처리된 세포에 상대적으로 표현되었다. 엑소좀의 GKN1 단백질과 재조합 GKN1(rGKN1) 단백질의 세포 생존율 및 세포 증식에 미치는 효과를 비교하기 위하여, GKN1 단백질(10 ng/mL)을 포함하는 엑소좀 또는 재조합 GKN1(rGKN1) 단백질(10 ng/mL)을 처리한 후 AGS 및 MKN1 세포의 세포 생존율과 세포 증식능을 분석하였다.

[108] 세포사멸 어세이의 경우, Annexin V-binding Assay가 제조사의 지시에 따라 수행되었다. Annexin V는 세포막에 포스파티딜세린을 가지는 세포에 결합하고, PI(propidium iodide)는 약화된 세포막을 가진 세포의 DNA를 염색한다. AGS 및 MKN1 세포는 GKN1 단백질을 포함하는 엑소좀으로 처리되었고, 차가운 PBS로 두 번 세척되었으며, $100\mu\text{l}$ 의 결합버퍼로 부유되었다. 각 경우에 $100\mu\text{l}$ 의 상층액은 $400\mu\text{l}$ 의 블러킹 용액과 혼합되었고, $5\mu\text{l}$ 의 Annexin V-FITC($1\mu\text{g/mL}$) 및 $5\mu\text{l}$ 의 PI ($2\mu\text{g/mL}$)가 혼합액에 더해지고 15분 정도 암실에서 반응되었으며, 세포는 FACS(fluorescence-activated cell sorter, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석되었다. PI 염색이 안된 형광-양성 세포만이 사멸된 세포로 간주되었다.

[109]

[110] **1.10. 세포 주기 측정**

[111] 세포주기 분석의 경우, 5 ng 재조합 GKN1(rGKN1)으로 처리/비-처리된 AGS

세포로부터 분리된 엑소좀을 AGS 및 MKN1 세포에 처리한 후 상기 세포를 모으고, 분석 전에 암실에서 45분 동안 PI(propidium iodide)로 염색되었다. 세포주기 중 각 phase에 있는 세포의 퍼센트는 FACSCalibur Flow Cytometer with CellQuest 3.0 software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)를 사용하여 결정되었다. 실험은 두 번 반복하여 수행되었다.

[112]

[113] **1.11. 세포주기 조절자의 발현**

[114] 엑소좀의 GKN1 단백질이 세포주기 및 세포사멸의 조절에 관여하는지 결정하기 위하여, HFE-145 세포와 재조합 GKN1(rGKN1)가 처리된 AGS 및 MKN1 세포에서 유래된 엑소좀을 처리한 후, 48시간에 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에서 p53, p21, CDK4, cyclin D1, Cdc25, p-Cdc2, BAX, BCL2, Caspase-3 및 8 단백질의 발현 변화가 분석되었다. 세포 용해물은 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 분리되었고, Hybond PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 옮겨졌다. 블러킹 후, 멤브레인은 순차적으로 G0/G1 phase proteins에 대한 항체로 표지되었다. 단백질 밴드는 ECL(enhanced chemiluminescence reagents, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 용액을 사용하여 확인하였다.

[115]

[116] **1.12. 면역형광 연구**

[117] Mouse anti-FITC conjugated GKN1 (Genetex), anti-clathrin (Abcam) 및 Texas-red conjugated goat anti-mouse IgG (invitrogen) secondary antibody 가 면역반응을 위해 사용되었다. 반응의 특이성은 Non-immune Mouse Serum (invitrogen)으로 테스트되었다.

[118]

[119] **1.13. 혈청 샘플**

[120] 위절제술을 할 예정인 위암환자 150명과 건강한 지원자 100명으로 구성된 집단에서 연구가 이루어졌다. 또한, 45명의 간암(hepatocellular carcinoma) 환자와 50명의 대장암(colorectal cancer) 환자가 각각 대조군으로서 사용되었다. 수술 전 암환자 245명과, 100명의 건강한 지원자로부터 전혈이 채취되었고, 샘플링한 후 혈청을 분리하여 즉시 -80°C에 보관하였다. 동결된 혈청은 얼음에서 녹인 다음, 개개인의 혈청 내 총 단백질 농도 차이를 정규화(normalization)하기 위해 인산 완충용액(PBS)으로 혈청 내 총 단백질의 농도를 15µg/ml로 희석하여 사용하였다. GKN1 단백질이 HFE-145 세포의 배양액 및 인간의 혈청에 있는 엑소좀 단백질로서 존재하는지 조사하기 위하여, 샘플은 70°C에서 처리되거나 처리되지 않았다. 전체 배양액, 전 혈청, 엑소좀이 제거된 샘플 및 엑소좀 분획에 있는 GKN1 단백질의 농도는 제조사의 지시에 따라 ELISA kit (USCN, Wuhan, China)을 사용하여 계산되었다. 고지된 동의서가 헬싱키 선언에 따라 제공되었고, 모든 피험자로부터 서면 동의서를 받았다. 본 발명은 Institutional Review Board of The

Catholic University of Korea, College of Medicine (MC16SISI0132)에 의해 승인되었다. 암 환자 누구에게서도 유전성 암의 증거는 없었다.

[121]

[122] **1.14. 통계 분석**

[123] 이지분류법에 근거한 마커의 진단학적 유용성을 평가하기 위하여, ROC(receiver operating characteristic) 곡선 분석이 사용되었다. ROC 곡선은 모든 가능한 한계값에 평가되는 true-positive fraction 대 false-positive fraction의 플롯(plot)이다. 또한, 세포생존율 및 세포증식에서 GKN1의 효과를 분석하기 위하여 Student's t-test가 사용되었다. 모든 실험은 재현성을 증명하기 위해 2번 이상 반복하여 실험하였다. 데이터는 2개의 독립된 실험으로부터 평균 $\pm$ S.D.(standard deviation)으로 표현하였고, P 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[124]

[125] **실시예 2. GKN1 결합 단백질의 동정**

[126] 본 발명자들은 GKN1에 결합하는 단백질을 동정하기 위하여, 단백질 마이크로어레이 어세이를 수행하였다. 그 결과, 재조합 GKN1(rGKN1)에 보통 내지 강한 결합력을 가진 27개의 엑소솜 단백질이 발견되었다(도 1a). 엑소솜 단백질에 대한 GKN1의 결합력을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 HFE-145 세포와 재조합 GKN1(rGKN1)을 처리한 AGS 및 MKN1 세포에서 엑소솜 단백질을 추출하였고, 공동-면역침전 분석에 의하여 엑소솜 단백질 중 GKN1과 COMT 사이의 상호작용 및 GKN1과 YWHAZ 사이의 상호작용을 증명하였다(도 1b).

[127]

[128] **실시예 3. 위 세포주 유래 엑소솜에서 GKN1 단백질의 검출**

[129] 상기 재조합 GKN1(rGKN1) 단백질이 엑소솜 단백질에 대한 결합력이 있다는 사실로부터, 본 발명자들은 GKN1이 엑소솜 단백질로 자연적으로 분비되고 내재화되는지 조사하기 위하여, HFE-145, AGS 및 MKN1 세포의 배양 상층액으로부터 엑소솜을 분리하여 GKN1의 존재 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, HFE-145 세포 유래의 엑소솜에서는 GKN1 단백질이 포함되어 있었으나, AGS 및 MKN1 위암세포주 유래의 엑소솜에서는 GKN1 단백질이 발현되지 않음을 확인하였다(도 2a). 엑소솜 마커인 TSG101은 분리된 엑소솜 및 세포 용해물에서 확인되었으나, CD81은 단지 엑소솜에서만 존재함을 확인하여 CD81을 추후 실험에서 엑소솜 마커로서 사용하였다(도 2a). 또한, 재조합 GKN1(rGKN1) 단백질을 AGS 및 MKN1 세포에 처리하는 경우 GKN1 단백질의 대부분이 엑소솜에 존재함을 확인하였다(도 2a). 이와 일치하게, HFE-145 세포에서의 전체 배양액, 엑소솜 분획 및 엑소솜이 제거된 배지에서의 GKN1 단백질의 농도는 각각 1.13 ± 0.04 , 1.08 ± 0.07 , 0.05 ± 0.03 ng/ml 이었다(도 2b).

[130] 다음으로, 엑소솜 내 GKN1 단백질의 존재 부위를 확인하기 위하여, 트립신 및 Triton X-100 의 처리/비-처리에 의한 Trypsin Digestion Assay가 수행되었고, 이후

웨스턴블롯팅이 수행되었다(Blood, 2009; 113: 1957-66). 엑소솜에 Triton X-100이 비-처리되고 트립신만 처리된 경우 GKN1은 트립신-의존적 효소 분해가 일어나지 않았다. 그러나, Triton X-100 및 트립신이 모두 처리된 경우 GKN1은 완전히 분해되었다(도 2c). 상기 결과로부터 GKN1 단백질이 엑소솜 내부에 존재한다는 것을 확인하였다.

[131]

[132] 실시예 4. GKN1 단백을 포함하는 엑소솜의 Clathrin-의존적 내재화

[133] 본 발명자들은 엑소솜의 GKN1 단백질의 내재화에 Clathrin이 관련되었는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. Clathrin을 녹다운시키기 위하여 siRNA인 siClathrin을 사용하였으며, siClathrin 및 GKN1 단백을 포함하는 엑소솜을 AGS 및 MKN1 세포에 처리한 후, 상기 세포들에서 GKN1 단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여 면역형광 어세이 및 웨스턴블롯팅을 수행하였다.

[134] 우선, GKN1 단백을 포함한 PKH26-양성 엑소솜을 AGS 및 MKN1 세포에 처리한 경우, 상기 엑소솜들은 AGS 및 MKN1의 세포질에서 명확히 내재화하고 있었다(도 3a 및 3c). 그러나, AGS 및 MKN1 세포에서 Clathrin이 녹다운된 경우에는 세포막과 세포질에서의 PKH26-양성 엑소솜의 존재가 확연히 억제되었다(도 3b 및 3c). 또한, siClathrin에 의한 Clathrin의 사이런싱은 세포막과 세포질에서 GKN1 단백질 발현을 현저히 억제시켰음을 확인하였다(도 3d).

[135] 따라서, Clathrin은 GKN1 단백을 포함하는 엑소솜을 위 점막 상피세포에 부착시키고 내재화시키는데 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였다.

[136]

[137] 실시예 5. 혈청 GKN1 단백질 농도에 의한 위암의 진단

[138] GKN1 단백질이 엑소솜 단백질로서 배지 및 인간 혈청에 존재하는지 확인하기 위하여, HFE-145 세포의 배양액 및 인간 혈청을 70°C에서 10분 동안 처리한 후 ELISA assay로 GKN1 단백질의 농도를 측정하였다. 그 결과, HFE-145 세포에서 열처리되지 않은 경우(Non-heating) GKN1 단백질이 전체 배지, 엑소솜 및 엑소솜이 제거된 배지에서 확인되지 않았고, 반면 70°C에서 10분 동안 열처리한 경우(heating)에는 전체 배지, 엑소솜 및 엑소솜이 제거된 배지(soluble)에서 GKN1 단백질의 농도가 각각 1.13 ± 0.06 , 1.08 ± 0.1 및 0.05 ± 0.04 ng/ml로 확인되었다(도 4a). 이와 일치하여, GKN1 단백질은 열처리되지 않은 전체 혈청, 엑소솜 및 엑소솜이 제거된 혈청에서 확인되지 않았다(도 4b). 10명의 건강한 피험자 중에서, 열처리된 전체 혈청 및 엑소솜에서의 GKN1 단백질 발현 농도는 각각 6.53 ± 0.58 ng/ml 및 6.24 ± 0.55 ng/ml 이었다(도 4b). 또한, 10명의 위암 환자에서, 전체 혈청 및 엑소솜에서의 GKN1 단백질 발현 농도는 각각 3.58 ± 0.54 ng/ml 및 3.28 ± 0.82 ng/ml 이었는데(도 4b), 이는 혈청 GKN1 단백질의 대부분이 엑소솜 내에 존재함을 의미한다. 상기 결과에 따라, 본 발명자들은 100명의 건강한 피험자 및 245명의 위암, 대장암 및 간암 환자에서의 전체 혈청을 얻은 후 70°C에서 10분 동안 열처리한 후 GKN1 농도를 분석하였다.

- [139] 도 4c에서 보는 바와 같이, 정상 건강인에서 혈청 GKN1 단백질의 수준은 나이와 관련이 있는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.338$). 또한, 혈청 GKN1 수준에 있어 남녀간 차이는 보이지 않았다($P=0.074$). 흥미롭게도, 위축성 위염이 있는 자들과 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들은 위염이 없는 피험자보다 낮은 혈청 GKN1 농도를 보였으나, 위암을 가진 환자보다는 현저히 높았다(도 4d).
- [140] 100명의 건강한 피험자 및 150명의 위암 환자의 전체 혈청에 있는 GKN1 농도는 각각 6.35 ± 0.82 ng/ml 및 3.50 ± 0.57 ng/ml 이었고(도 4e), 이로써 위암 환자에서의 혈청 GKN1 단백질 수준이 건강한 피험자의 수준에 비해 현저히 낮음을 확인하였다($P<0.0001$). 더욱이, 간암 및 대장암 환자에서의 혈청 GKN1 농도는 각각 6.07 ± 0.92 및 6.26 ± 0.95 ng/ml 이었고, 이는 건강한 피험자의 수준과 유사하며, 위암 환자에 비해 현저히 높은 수준이었다(도 4e). 특히, ROC 곡선의 area 값이 각각 1.0, 1.0 및 0.9964로 확인됨으로써, 혈청 GKN1 단백질의 농도에 의하여 건강한 피험자, 위축성 위염이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들과 위암 환자를 구별할 수 있음을 확인하였다(도 4f). 또한, 본 발명자들이 혈청 GKN1 수준에 의하여 위암환자와 간암 및 대장암 환자를 구별할 수 있음을 확인하기 위하여, ROC 곡선 값을 측정하였고, ROC 곡선에서 area는 각각 0.9938 및 0.9987로서, 전체 혈청에서의 GKN1 단백질 농도에 의해 위암을 예측 및 진단할 수 있음을 확인하였다(도 4g).
- [141] 위암은 암세포의 위벽 침윤 정도에 따라 조기 위암과 진행성 위암으로 구분된다. 본 연구에서 조기 위암 환자 혈청에서의 GKN1 농도는 3.75 ± 0.47 ng/ml 으로 진행성 위암 환자의 혈청 GKN1 농도인 3.38 ± 0.58 ng/ml 보다 높았으나($P<0.001$)(도 4h), 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들의 혈청 GKN1 농도보다는 낮았다($P<0.001$)(도 4h). ROC 곡선의 area 값이 모두 1.0 으로 확인됨으로써, 혈청 GKN1 단백질의 농도에 의하여 건강한 피험자, 위축성 위염이 있는 자, 장상피화생(intestinal metaplasia, IM)이 동반된 위축성 위염이 있는 자들과 조기 위암 환자를 구별할 수 있음을 확인하였다(도 4i).
- [142] 상기 결과로부터, 본 발명자들은 인간 혈청에 있는 엑소솜 GKN1 단백질 위암의 진단을 위한 유용한 바이오마커로서 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [143]
- [144] 실시예 6. 엑소솜내 GKN1 단백질의 혈구세포에 대한 세포 독성
- [145] 위상피세포에서 생산 분비되어 종양형성 억제 기능을 가진 GKN1 단백질이 혈청에서 확인되었다는 증거에 근거하여, 본 발명자들은 GKN1 단백을 포함한 엑소솜이 혈액 내 림프구, 단핵구 및 대식세포의 세포생존율과 기능에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 흥미롭게도, 면역형광 어세이 결과에서 HFE-145 세포 유래의 GKN1 단백을 포함한 엑소솜은 THP-1 단핵구 및 U937 대식세포의

세포막에 붙었으나 Jurkat T 세포에는 붙지 않았고(도 5a), 웨스턴블로팅으로 엑소솜 GKN1 단백질은 THP-1 단백질 및 U937 대식세포의 세포막 부분에만 존재함을 확인하였다(도 5b). 또한, 엑소솜 GKN1 단백질은 THP-1 단백질 및 U937 대식세포의 세포생존율 및 IL-6를 포함한 사이토카인들의 분비에 아무런 영향을 미치지 않았다(도 5c 및 5d). 상기 결과로부터, 본 발명자들은 엑소솜 GKN1 단백질은 림프구, 단핵구 및 대식세포에 대해 세포 독성이 없음을 확인하였다.

[146]

[147] 실시예 7. 세포증식 및 세포사멸의 측정

[148] 본 발명자들은 엑소솜의 GKN1 단백질에 의한 세포생존율 및 증식에 대한 효과를 확인하기 위하여 MTT assay 및 BrdU Incorporation Assay를 수행하였다. HFE-145, AGS(재조합 GKN1 처리/비-처리) 및 MKN1(재조합 GKN1 처리/비-처리) 세포에서 유래된 엑소솜을 각각 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에 처리하였고, 세포생존율 및 세포증식능을 실험하였다.

[149] 그 결과, AGS 및 MKN1 세포에서 유래된 GKN1-음성 엑소솜(재조합 GKN1이 비처리된 군)을 처리한 경우에는 세포생존율이 확연히 증가되었으나, HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에서 유래된 GKN1 단백을 포함하는 엑소솜(재조합 GKN1이 처리된 군)이 AGS 및 MKN1 세포에서 세포생존율 및 세포증식능을 현저히 억제함을 확인하였다(도 6a 및 6b).

[150] 다음으로, 본 발명자들은 엑소솜의 GKN1 단백질 및 재조합 GKN1(rGKN1) 단백을 처리한 후 시간에 따른 AGS 및 MKN1 세포의 세포생존율을 비교하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 상기 세포들에서 엑소솜의 GKN1 단백질과 재조합 GKN1(rGKN1) 단백을 처리하면 시간-의존적으로 세포생존율과 세포증식능이 억제됨을 확인하였고, 특히, 엑소솜의 GKN1 단백을 처리한 경우 재조합 GKN1(rGKN1) 단백을 처리한 세포에서 보다 세포생존율과 세포증식능이 급격하게 감소되었음을 확인하였다(도 6c).

[151] 또한, 본 발명자들은 재조합 GKN1(rGKN1) 단백을 AGS 및 MKN1 세포에 처리(rGKN1_exosome)/비-처리(w/o GKN1_exosome)한 후 세포주기를 분석하는 실험을 수행하였다. 그 결과, AGS 및 MKN1 세포에 재조합 GKN1(rGKN1)을 처리 후 분리된 GKN1 단백을 포함하는 엑소솜(GKN-양성 엑소솜)을 처리한 경우, AGS 및 MKN1 세포 모두에서 S phase에 있는 세포군은 현저히 감소되었고, G1 및 G2/M phase의 세포군은 증가되었음을 확인하였다(도 6d).

[152] 또한, 본 발명자들은 엑소솜의 GKN1 단백질에 의한 G1 또는 G2/M phase arrest에 영향을 주는 세포주기 조절자의 발현 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 엑소솜의 GKN1 단백질은 G1 phase arrest를 위해 p53 및 p21 과 같은 음성 세포주기 조절자의 발현을 증가시켰고, cdk4 및 cyclin D 와 같은 양성 세포주기 조절자의 발현을 감소시켰음을 확인하였다(도 6e). 또한, G2/M phase arrest 를 위해, 엑소솜의 GKN1 단백질은 HFE-145, AGS 및 MKN1 세포에서 p-cdc2, cdc25c 및 cyclin B 단백질의 발현을 하향 조절시켰음을 확인하였다(도 6e).

- [153] 다음으로, 본 발명자들은 재조합 GKN1이 처리/비-처리된 세포에서 유래된 GKN1 단백을 포함하는 엑소좀을 AGS 및 MKN1 세포에 처리한 후, 세포사멸 어세이를 수행하였다. 세포사멸은 FITC-labeled Annexin V에 의해 염색된 세포에 의해 측정되었는데, 재조합 GKN1(rGKN1)이 처리된 AGS 세포에서 유래된 GKN1 단백을 포함하는 엑소좀 투여로 AGS 및 MKN1 세포에서 세포사멸이 현저히 증가하였음을 확인하였다(도 6f). 웨스턴블롯팅 결과에서는 cleaved caspase-3 및 -8 의 발현량이 확연히 증가한 반면, BAX 및 BCL2 발현은 변화가 없었음을 확인하였다(도 6e).
- [154] 따라서, 엑소좀의 GKN1 단백질은 위암세포로 내재화되고 세포질 단백질과 상호작용하여 세포의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도하여 위암을 치료할 수 있으며, 혈구세포에는 세포 독성이 없음을 확인하였다.
- [155]
- [156]

청구범위

- [청구항 1] GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein) 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암의 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 GKN1 단백 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 혈액, 혈장 또는 혈청의 엑소솜 내에 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 따른 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 키트는 ELISA 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 6] (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GKN1 단백 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 GKN1 단백질 수준을 대조군 시료로부터 얻은 기준치와 비교하는 단계를 포함하는 위암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 60 내지 80°C에서 5 내지 15분 동안 열처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암인 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제 6 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질 수준이 기준치에 비하여 낮은 경우에 위암의 발병가능성이 높거나 예후가 좋지 않을 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 6 항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제 6 항에 있어서,
상기 측정은 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 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] GKN1 단백(Gastrokine 1 Protein)을 유효성분으로 포함하는 위암의 예방

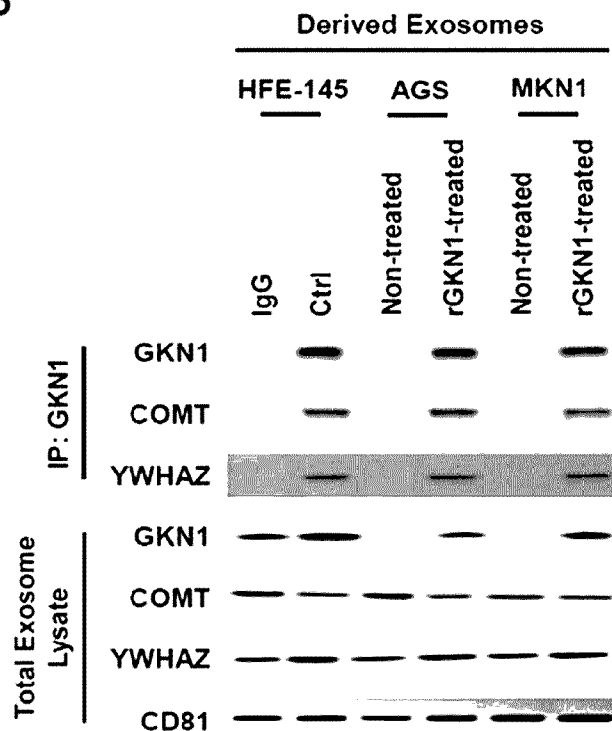
- 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 GKN1 단백을 발현하는 세포의 엑소솜에서 유래되는
것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 14] 제 12 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 GKN1 단백을 발현하는 세포의 배양 상층액에서
분리되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 15] 제 12 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 재조합 GKN1(rGKN1: recombinant GKN1) 단백질이
도입된 세포의 배양 상층액에서 분리되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서,
상기 재조합 GKN1 단백질은 1 내지 10 ng/ml의 농도로 처리되는 것을
특징으로 하는 조성물.
- [청구항 17] 제 12 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 1 내지 20 ng/ml의 농도로 처리되는 것을 특징으로
하는 조성물.
- [청구항 18] 제 12 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 클라스린(Clatrin)에 의해 암세포로
내재화(internalization)되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 19] 제 12 항에 있어서,
상기 GKN1 단백질은 암세포의 세포증식을 억제하고 암세포의 세포사멸을
유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 20] GKN1 단백질(Gastrokine 1 Protein)을 투여하는 단계를 포함하는 위암의
예방 또는 치료 방법.

[도1a]

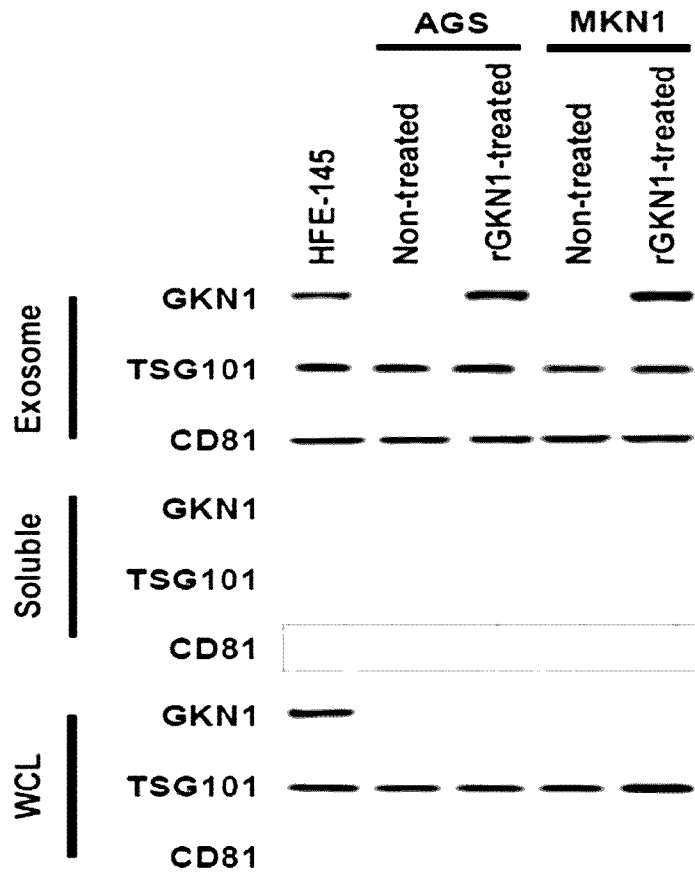
a

Number	Gene symbol	Description	Entrez ID	Chromosome	Map location
1	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	2182	X	Xq22.3-q23
2	AHNAX	AHNAX nucleoprotein	79026	11	11q12.2
3	ALDH1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	10840	3	3q21.3
4	ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	223	1	1q23.1
5	ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	439	19	19q13.3
6	CKB	creatine kinase, brain	1152	14	14q32
7	CLIC1	chloride intracellular channel 1	1192	6	6p21.3
8	COMT	catechol-O-methyltransferase	1312	22	22q11.21
9	CTNS	cystinosis, lysosomal cystine transporter	1497	17	17p13
10	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	2539	X	Xq28
11	GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	130589	2	2p22.1
12	GARS	glycyl-tRNA synthetase	2617	7	7p15
13	GLUL	glutamate-ammonia ligase	2752	1	1q31
14	GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	2819	12	12q13.12
15	GSN	geisolin	2934	9	9q33
16	GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	2947	1	1p13.3
17	HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	3265	11	11p15.5
18	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	3557	2	2q14.2
19	PGD	phosphogluconate dehydrogenase	5226	1	1p36.22
20	PKLR	pyruvate kinase, liver and RBC	5313	1	1q21
21	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	29968	9	9q21.2
22	PSMB6	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6	5694	17	17p13
23	RNH1	ribonuclease/angiogenesis inhibitor 1	6050	11	11p15.5
24	SEC13	SEC13 homolog (S. cerevisiae)	6396	3	3p23-p24
25	SPRR3	small proline-rich protein 3	6707	1	1q21-q22
26	TGM1	transglutaminase 1	7051	14	14q11.2
27	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	7534	8	8q23.1

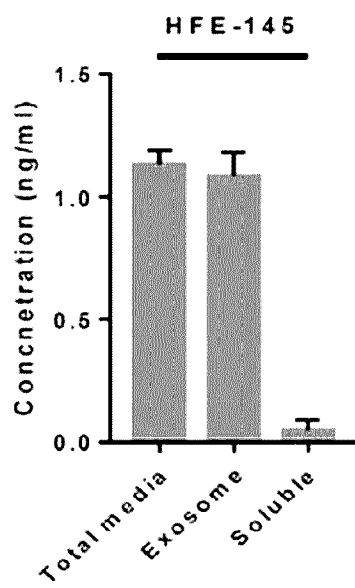
[도1b]

b

[도2a]

a

[도2b]

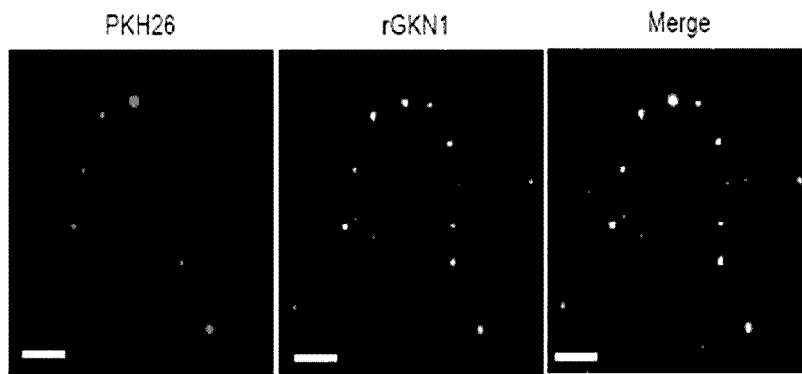
b

[도2c]

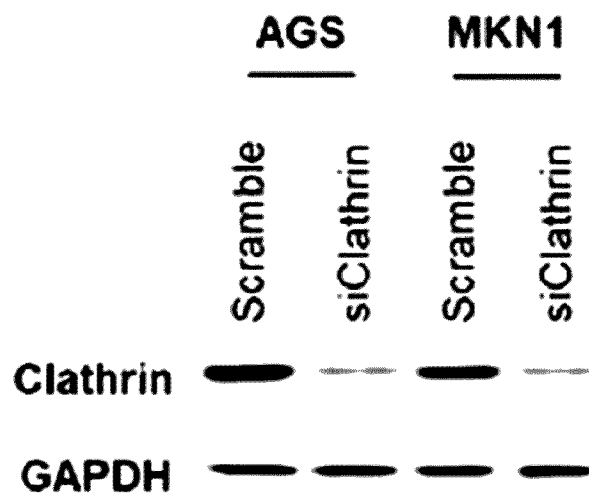
C

Trypsin	-	+	-	+
Triton X-100	-	-	+	+
GKN1				
				Exosome
GKN1				
				WCL

[도3a]

a

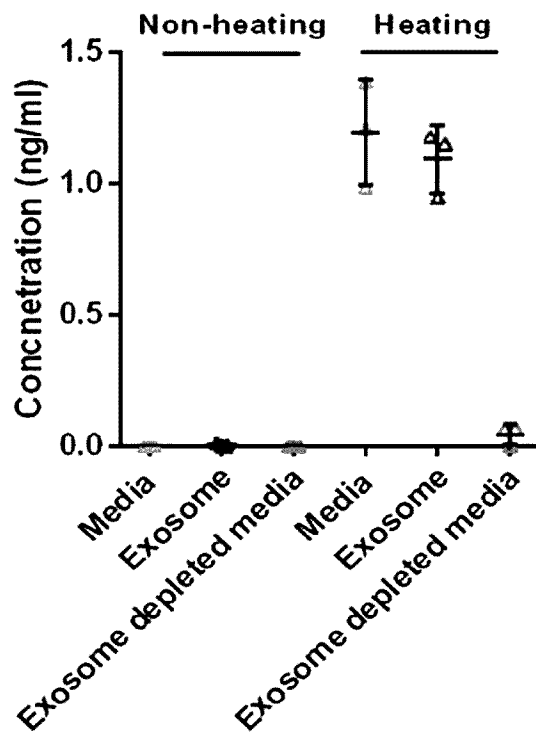
[도3b]

b

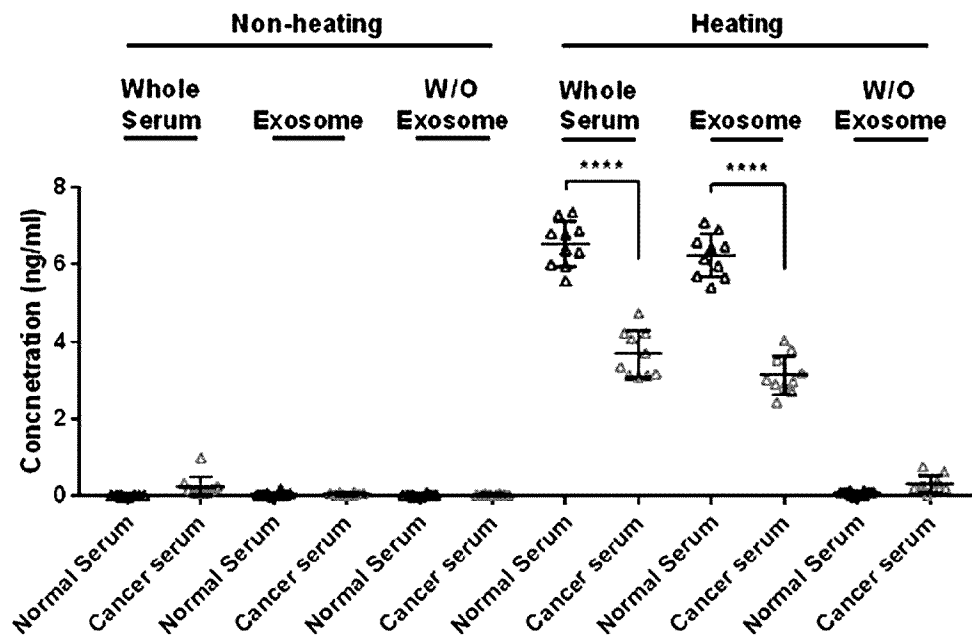
d

	AGS				MKN1			
	Scramble		siClathrin		Scramble		siClathrin	
	Membrane	Cytosol	Membrane	Cytosol	Membrane	Cytosol	Membrane	Cytosol
GKN1	+	+	+	+	+	+	+	+
CD81	+	+	+	+	+	+	+	+
β -tubulin		+		+		+		+

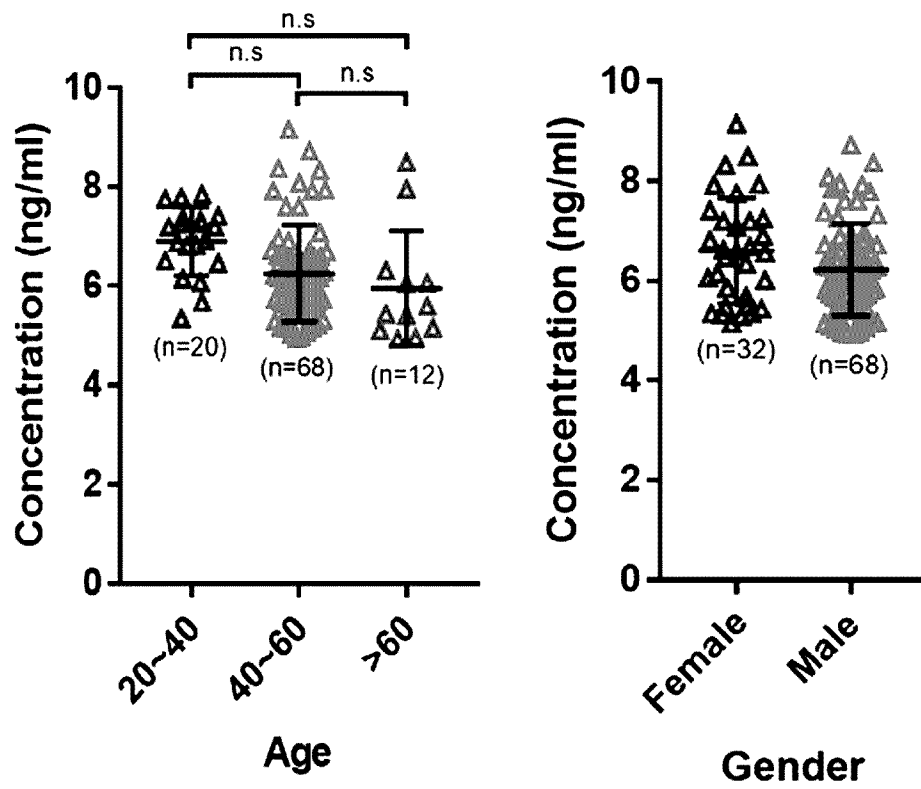
[도4a]



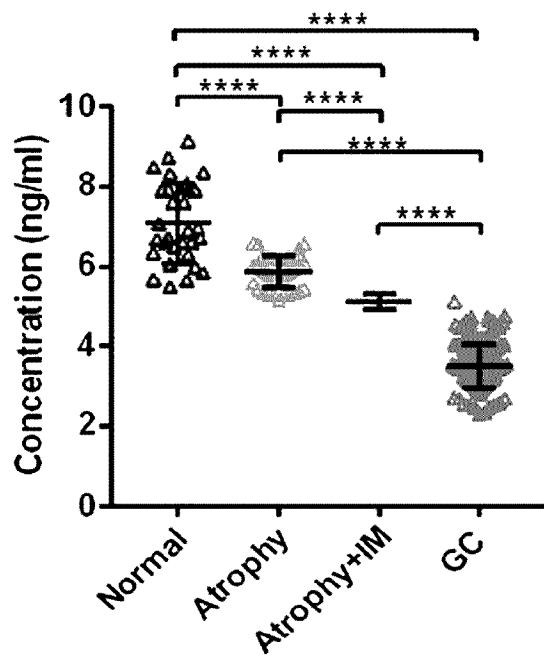
[도4b]



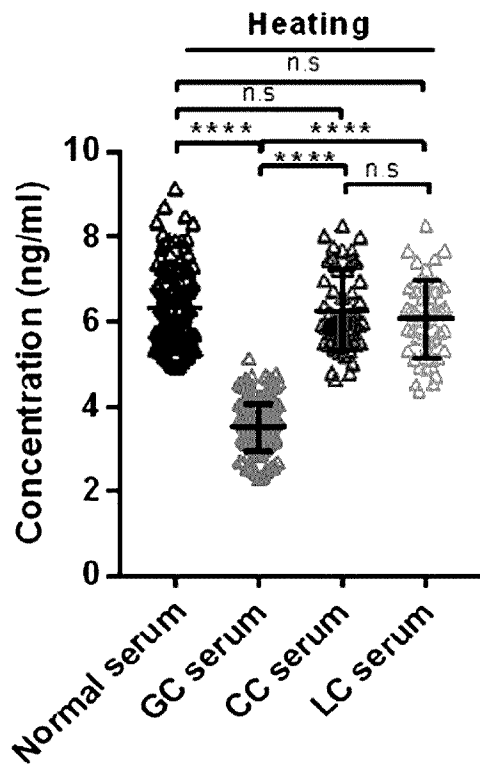
[도4c]



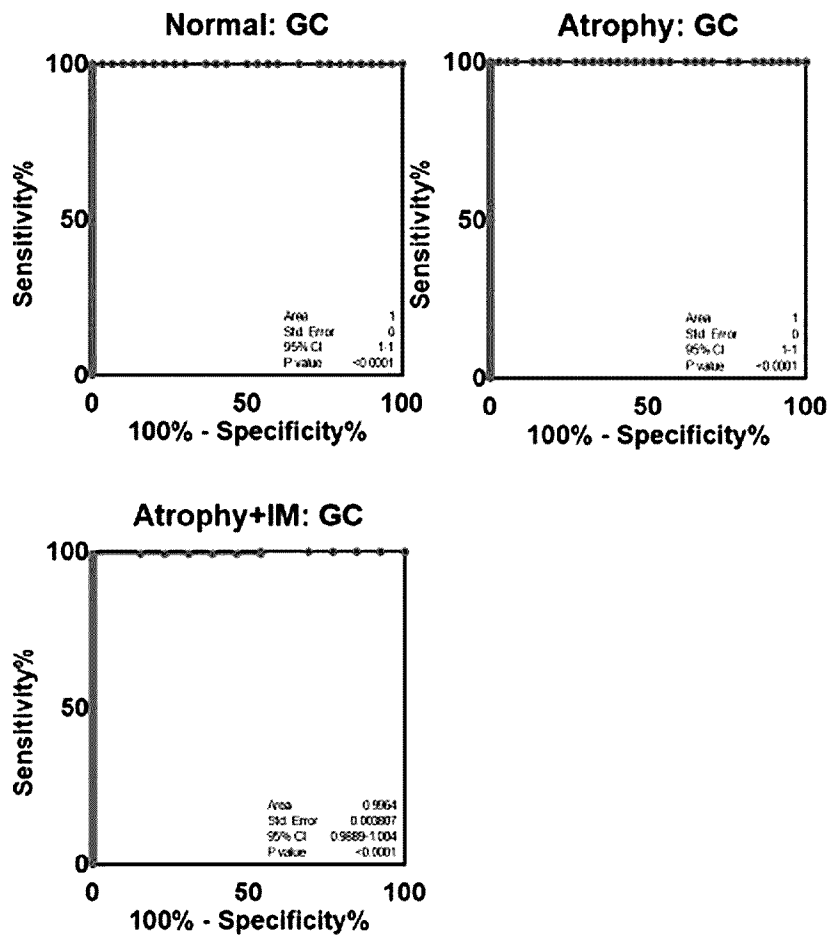
[도4d]



[도4e]

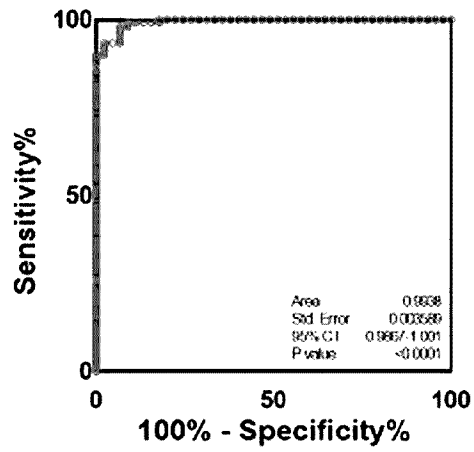


[도4f]

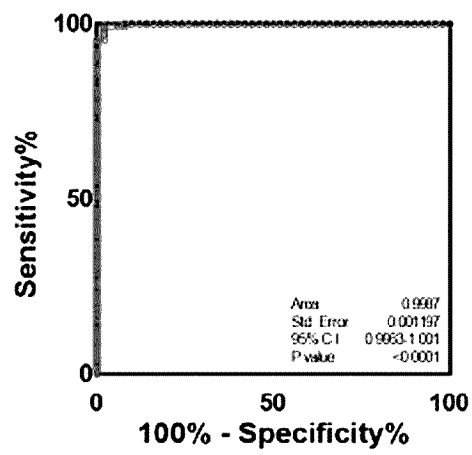


[도4g]

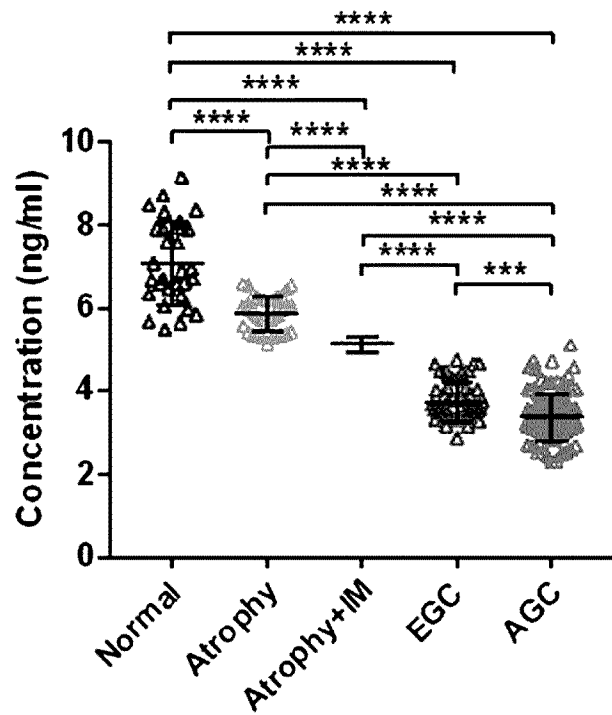
Liver cancer: Gastric cancer



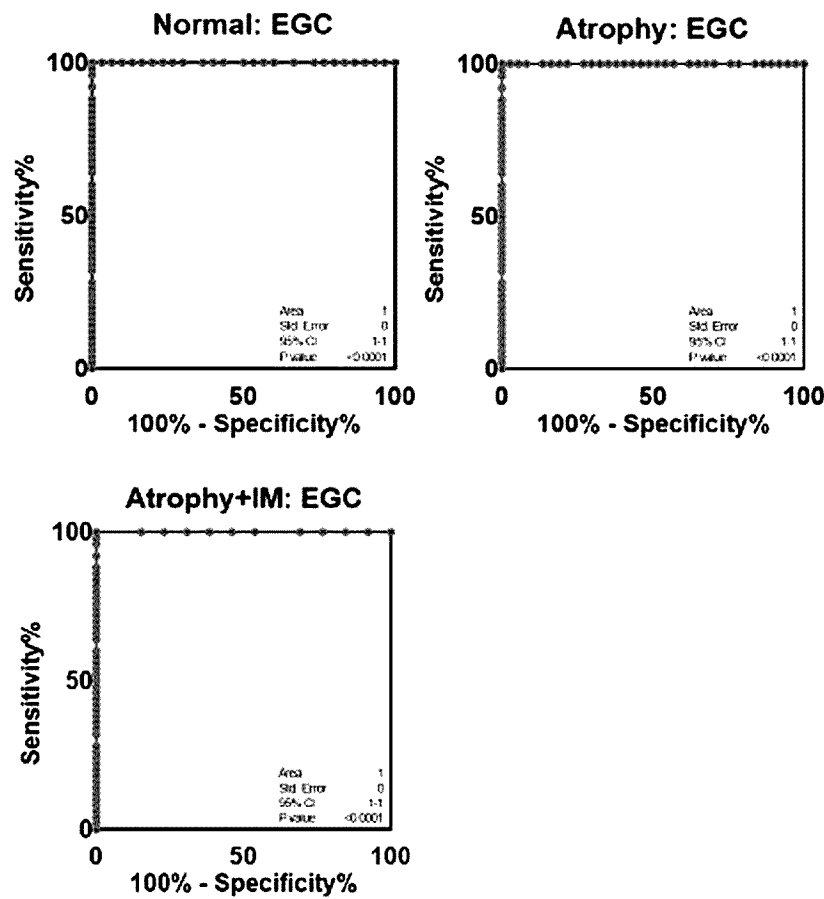
Colon cancer: Gastric cancer



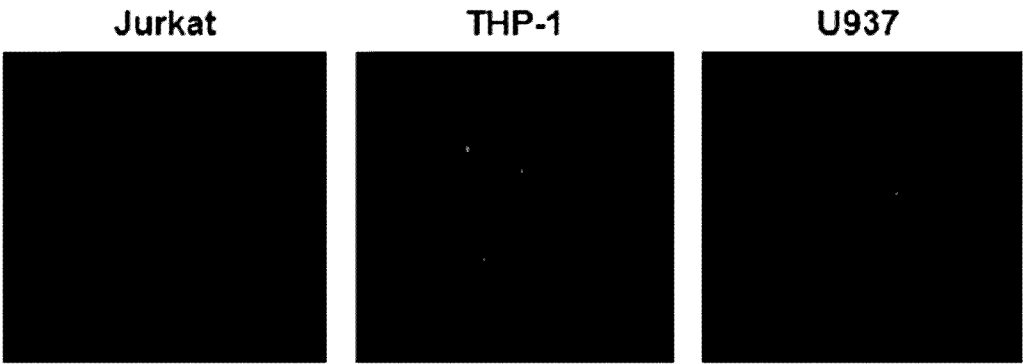
[도4h]



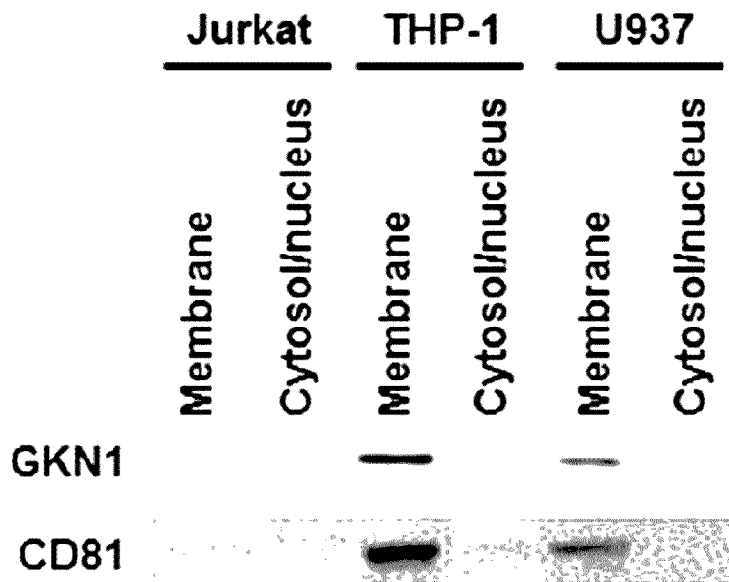
[도4i]



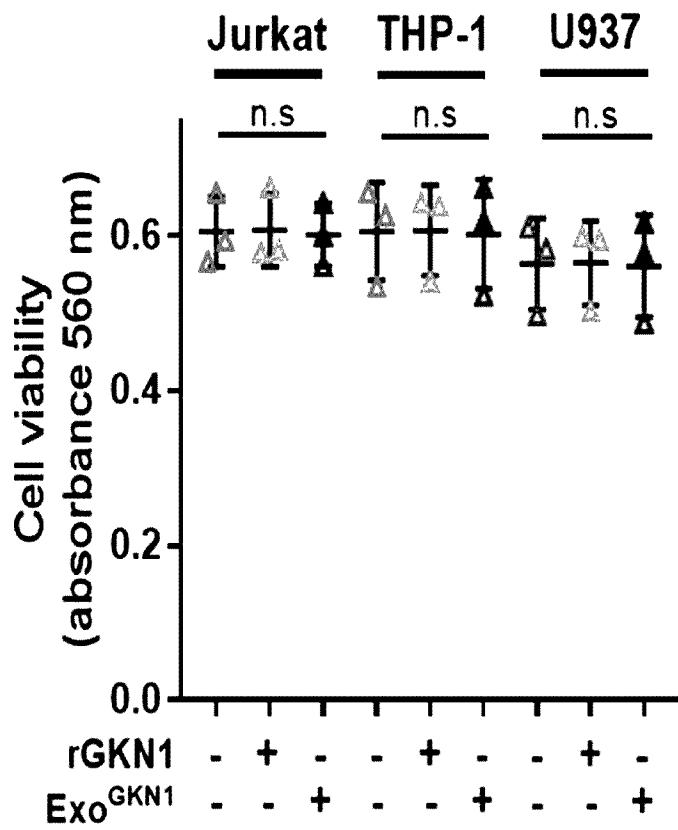
[도5a]



[도5b]



[도5c]



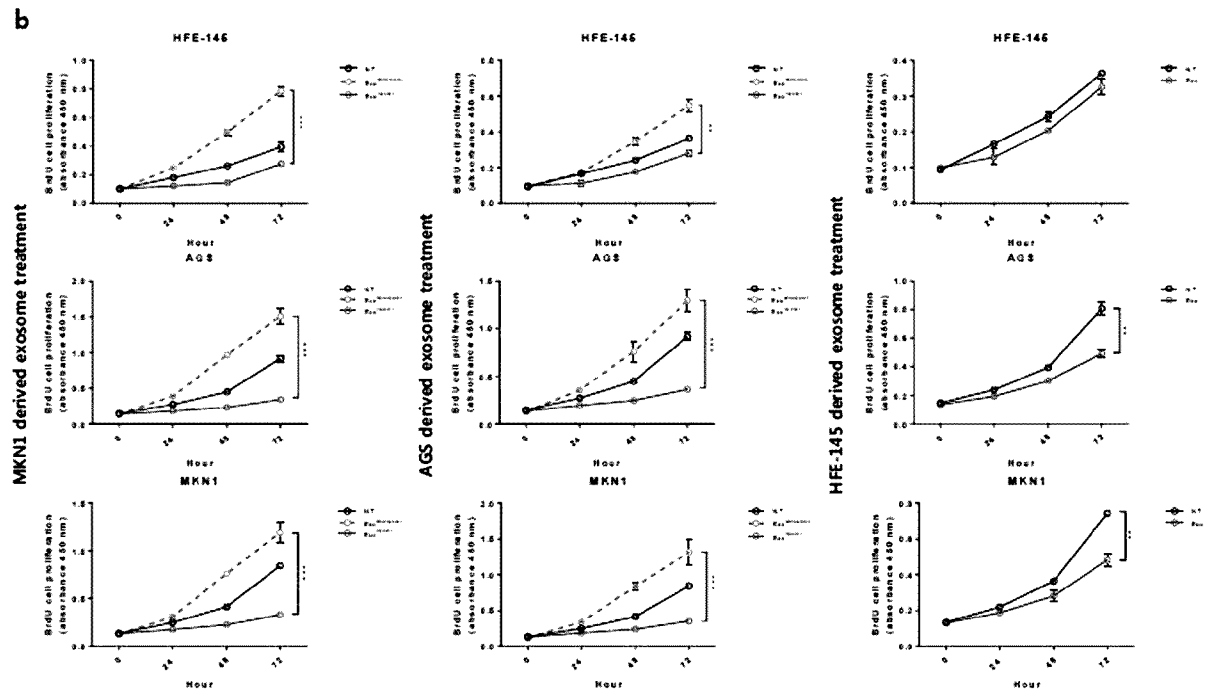
THP-1

Cytokine	rGKN1	Exo ^{GKN1}	Relative mRNA expression (Fold change)
TNFα	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-6	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-8	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-10	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-17A	-	-	~1.0
	+	-	~1.0

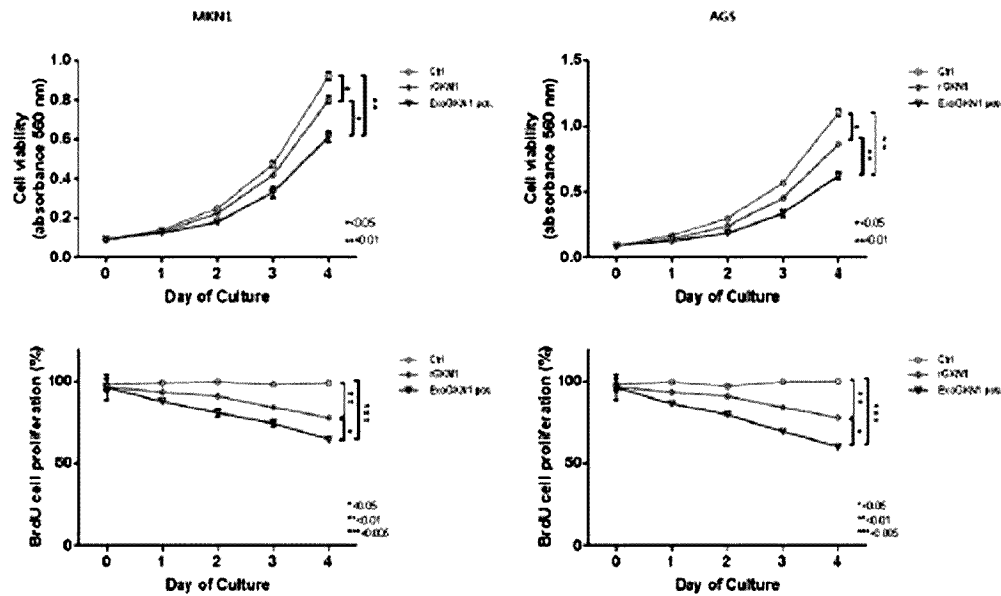
U937

Cytokine	rGKN1	Exo ^{GKN1}	Relative mRNA expression (Fold change)
TNFα	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-6	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-8	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-10	-	-	~1.0
	+	-	~1.0
IL-17A	-	-	~1.0
	+	-	~1.0

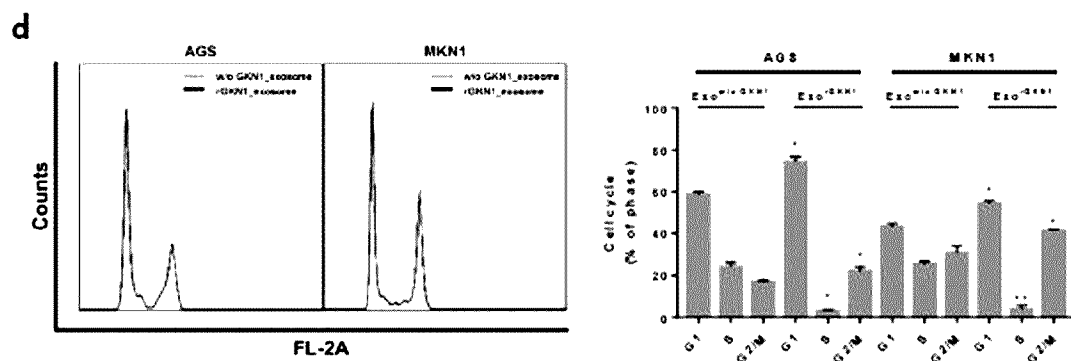
[도6b]



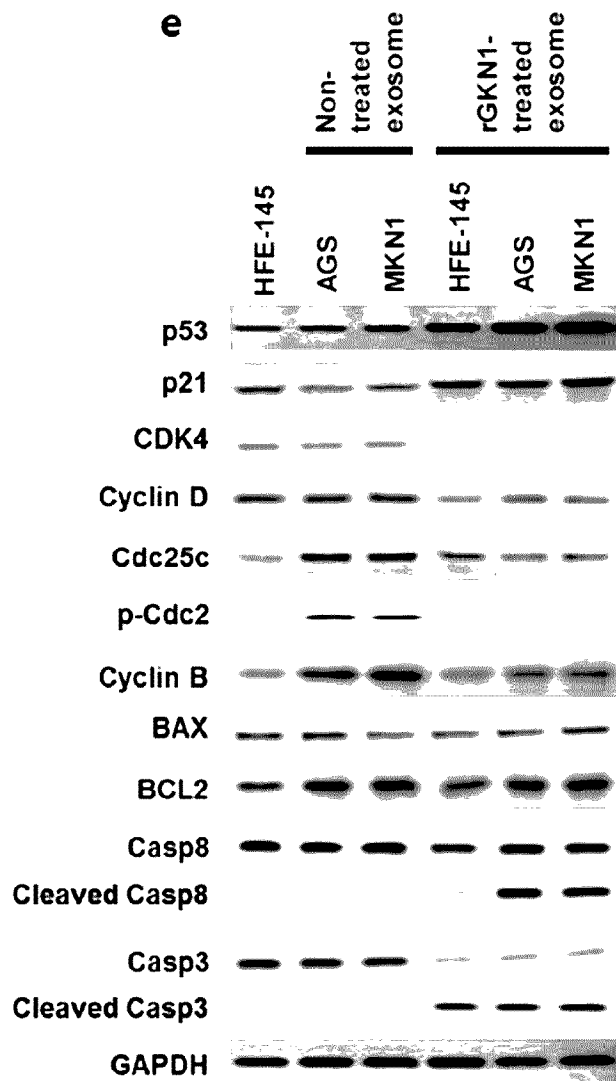
[도6c]



[도6d]



[도6e]



[도6f]

f