(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0025048
(43) 공개일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57415 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0120878
(22) 출원일자 2015년08월27일
심사청구일자 2015년08월27일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
장은주
서울 송파구 올림픽로 리센츠아파트 237동 1103호
이은진
서울 강남구 양재대로 39길 14
(74) 대리인
특허법인태백

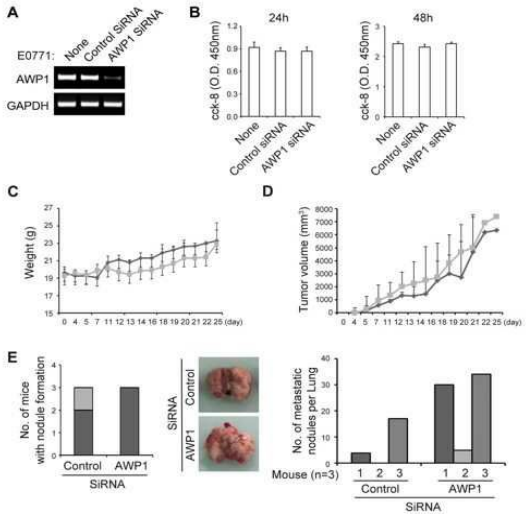
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **AWP1을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 AWP1을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로서, 전이되지 않은 암에 비해 전이가 잘 되는 암에서 AWP1의 발현이 감소함을 확인하여 암 전이에 대한 임상지표자로서 사용될 수 있다. 또한, siRNA를 사용한 AWP1 발현 억제시 암 생장과 전이가 증가함을 확인하였고, AWP1을 과발현시켰을 때 암 생장과 이동을 감소시켜 암 전이를 억제함을 확인하였기에 AWP1은 암 전이 억제제로 활용될 가능성이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/57434 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20120009300
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업기초의약학분야(MRC)
연구과제명 뼈흡수성 질환에서의 병인에 관여하는 세포기능장애 기전연구(3)
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

AWP1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

AWP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물을 포함하는 암 전이 진단용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 암 전이 진단용 키트.

청구항 5

(1) 암 환자 시료로부터 AWP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

(2) 상기 AWP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

(3) 상기 AWP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 낮을 경우 암 전이능이 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는 암 전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 암 전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

AWP1 단백질, AWP1 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 AWP1 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제는 AWP1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 앱타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 AWP1 단백질은 miRNA181b에 의해 조절되는 것을 특징으로 하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

(1) 암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;

(2) 상기 시험물질을 접촉한 암세포에서 AWP1 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및

(3) 대조구 시료와 비교하여 상기 AWP1 단백질의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 암 전이 치료제 스크리닝 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 암 전이 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 AWP1을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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] AWP1은 종양 괴사 인자 수용체-관련 인자 2(Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2; TRAF2)와 결합하여 NF-kB 신호전달에 관여하는 조절인자로 알려져 있다. NF-kB 신호는 암전이 기전의 중요한 신호전달 체계이며, 여러 가지 NF-kB 신호의 조절 인자들이 암세포의 전이에 영향을 미친다는 보고가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 일본공개특허 2005-170796 (2005.06.30)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 AWP1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물, 이를 이용한 암 전이 진단 방법, AWP1 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물 및 AWP1 단백질 발현 수준 측정을 통한 암 전이 치료제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 AWP1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 AWP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물을 포함하는 암 전이 진단용 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 AWP1 단백질의 발현 수준 측정을 통한 암 전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 AWP1 단백질, AWP1 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방

또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 AWP1 단백질의 발현 수준 측정을 통한 암 전이 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 AWP1을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로서, 전이되지 않은 암에 비해 전이가 잘 되는 암에서 AWP1의 발현이 감소함을 확인하여 암 전이에 대한 임상지표자로서 사용될 수 있다. 또한, siRNA를 사용한 AWP1 발현 억제시 암 생장과 전이가 증가함을 확인하였고, AWP1을 과발현시켰을 때 암 생장과 이동을 감소시켜 암 전이를 억제함을 확인하였기에 AWP1은 암 전이 억제제로 활용될 가능성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 마우스 유방암 세포주인 E0771에서 AWP1의 발현 수준 및 AWP1을 녹다운(knockdown) 시킨 후 암세포의 변화를 나타낸다.

도 2는 인간 유방암 세포주에서의 AWP1의 발현 수준, 증식 분석(Proliferation assay) 및 상처 치유 분석(wound healing assay) 결과를 나타낸다.

도 3은 AWP1의 발현이 상대적으로 많은 MCF7 세포주에 AWP1을 녹다운(knockdown) 시킨 후 암세포의 변화를 나타낸다.

도 4는 AWP1의 발현이 상대적으로 적은 MDA-MB-231 세포주에서 AWP1을 과발현시켜 그 효과를 재확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 유방암 세포주에서 AWP1 단백질 수준에서의 발현을 조절하는 miRNA 선별 결과를 나타낸다.

도 6은 전립선암 세포주에서 AWP1의 발현, 세포 증식 및 세포 이동에 대한 결과를 나타낸다.

도 7은 PC3 세포에서 상피중간엽세포이행(Epithelial Mesemchymal Transition; EMT)에 있어서의 AWP1의 과발현 효과에 대해 나타낸다.

도 8은 PC3 세포에서 상피중간엽세포이행(Epithelial Mesemchymal Transition; EMT)에 있어서의 AWP1의 녹다운(knockdown) 효과에 대해 나타낸다.

도 9는 DU-145 세포에서 상피중간엽세포이행(Epithelial Mesemchymal Transition; EMT)에 있어서의 AWP1의 녹다운(knockdown) 효과에 대해 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 AWP1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 전이 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다. 바람직하게는 상기 암은 유방암 또는 전립선암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 "AWP1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질"은 NCBI accession no. NM019006 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 "AWP1"은 "ZFAND6(Zinc Finger, AN1-type Domain 6)"으로 명명될 수도 있다.

[0016] 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.

[0017] 또한, 본 발명은 AWP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물을 포함하는 암 전이 진단용 키트를 제공한다. 바람직하게는 상기 암은 유방암 또는 전립선암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사을 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수

있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA의 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 AWP1에 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.

[0021] 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.

[0022] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "앱타머(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, 앱타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

[0024] 또한, (1) 암 환자 시료로부터 AWP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 AWP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 AWP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 낮을 경우 암 전이능이 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는 암 전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 암은 유방암 또는 전립선암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 상세하게는, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "환자 시료"란 암 전이 진단용 바이오 마커인 상기 AWP1 유전자 또는 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 또한, 본 발명은 AWP1 단백질, AWP1 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다. 바람직하게는 상기 암은 유방암 또는 전립선암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 상세하게는, 상기 AWP1 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제는 AWP1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 앱타머 또는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 상세하게는, 상기 AWP1 단백질은 miRNA181b에 의해 조절될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 (1) 암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉한 암세포에서 AWP1 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조구 시료와 비교하여 상기 AWP1 단백질의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 암 전이 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 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.

[0036] **<실험예>**

[0037] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0038] **1. 전체 RNA 추출, cDNA 합성, RT-PCR 및 정량적 실시간 RT-PCR**

[0039] Qiazol reagent (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 세포로부터 전체 RNA를 추출하였고, RevertiAid First strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Vilnius, Litheania)을 이용하여 1-2㎍ RNA를 cDNA로 역전사시켰다. PCR은 Biorad thermal cycler로 수행하였다. 프라이머의 서열은 다음과 같다: AWP1 5’- CCA AGT GCC TAT GCT TTG TTC CA-3’ (sense)(서열번호 1) 및 5’- ACA GAG GTT GCA GGT GGG CTT AT-3’ (antisense)(서열번호 2); Vimentin 5’- CCG CAC ATT CGA GCA AAG AC-3’ (sense)(서열번호 3) 및 5’- CCT GCT GTC CCG CCG-3’ (antisense)(서열번호 4); SMA 5’- CTT GTC CAG GAG TTC CGC TC-3’ (sense)(서열번호 5) 및 5’- ACG CTG GAG GAC TTG CTT TT-3’ (antisense)(서열번호 6); MMP9 5’- TCT ATG GTC CTC GCC CTG AA-3’ (sense)(서열번호 7) 및 5’- CAT CGT CCA CCG GAC TCA AA-3’ (antisense)(서열번호 8); GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), 5′-AGC CAC ATC GCT CAG ACA-3′ (sense)(서열번호 9) 및 5′-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3’ (antisense)(서열번호 10).

[0040] 정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative real-time RT-PCR; qRT-PCR)은 Power SYBR Green 1-Step Kit and an ABI

7000 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 증폭 프로토콜은 초기 역전사 단계 48℃, 30분, 변성 단계 95℃, 15초, 40회 및 연결 및 연장 단계 60℃, 1분으로 구성되었다. 결과는 GAPDH 산물에 대한 표적 PCR 산물의 비로 나타냈다. 수치는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) 수치로 표준화하였다. 정량은 RQ manager 1.2 software로 ΔΔCT method (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. 데이터는 평균±표준편차로 나타냈다. 모든 샘플은 각 실험에 대하여 3번 반복하여 실험을 수행하였다.

[0041] **2. 유전자 침묵(Gene silencing) 및 형질감염**

[0042] AWP1을 표적으로 하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)의 형질감염은 이전에 보고된 대로 수행하였다. 선별된 4개의 siRNA 올리고뉴클레오티드 서열의 조합인 AWP1에 대한 siRNA의 SMARTpool(ON-TARGET plus Human AWP1) 및 음성대조군 siRNA는 Thermo Scientific Dharmacon (Lafayette, CO, USA)에서 구입하였다. 암세포(eg. MDA-MB-231, MCF7, PC3, DU-145)는 transfection reagent RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 siRNA로 형질감염시켰다. 침묵 효율은 RT-PCR에 의해 측정하였다. 세포는 RNAiMAX를 사용하여 miRNAs로 형질감염시켰고, lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 myc-태그된 AWP1 과발현 벡터를 형질감염시켰다.

[0043] **3. 세포 증식**

[0044] 세포는 CCK-8 분석 (Dojindo Molecular Technologies Inc, Japan)을 위해 96 plates에서 접종한 후, SiRNAs 또는 myc-태그된 AWP1 과발현 구조체로 형질감염시켰다. 배양물은 37℃에서 24시간 또는 48시간 동안 유지하였다. 표시된 시간에서, CCK-8 colorimetric assay를 통해 제조사의 지시에 따라 세포 성장을 측정하였다. 모든 분석은 세 번 이상 반복하여 수행하였다. 10㎕ cell counting kit-8을 각 웰에 첨가하였고, plates는 37℃에서 추가로 1-4 시간 동안 배양하였다. 450 nm에서 각 분주물의 흡광도는 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

[0045] **4. 세포 전이 스크래치 분석**

[0046] myc-태그된 AWP1로 형질감염된 암세포는 48-well plates에서 배양되었다. 멸균된 200㎕ 피펫 팁을 사용하여 상처를 냈고, 세포는 37℃에서 추가로 24시간 동안 배양되었다. AWP1 침묵 실험을 위해, 세포들은 음성대조군 또는 AWP1 siRNA로 형질감염시킨 후, 세포층을 긁어냈다. 세포들은 제조사의 지시에 따라 CellTracker Green (CMFDA) (Invitrogen)으로 염색시켰고, 상처 치유는 형광 현미경 (LSM700, Carl Zeiss)을 이용하여 측정하였다. 채워진 상처 영역의 백분율은 Adobe Photoshop 9.0.2 software를 이용하여 측정하였고, 베이스라인 측정으로 비교하였다. 상처 치유는 음성 대조군과 비교하여 상처의 빽빽한 정도(wound confluence)에 대한 백분율로 측정되었다. 각 실험은 3번 반복하여 수행하였다.

[0047] **5. 웨스턴 블랏 분석**

[0048] 세포로부터 수집한 단백질 상등액은 5×SDS 샘플 완충액에서 끓이고, 세포 용해물은 10-12% SDS-PAGE 젤 상에서 분리시켰으며, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인 (Bio-Rad, Hercules, CA)에 옮겼다. 불특정 단백질의 결합을 배제하기 위해 Tris-buffered saline (20 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.1% Triton X-100)에 녹인 5% I-block solution을 이용하여 1시간 동안 멤브레인을 차단시킨 후, 적절한 1차 항체로 4℃에서 밤새도록 가볍게 흔들면서 반응시켰다. HRP-접합된 2차 항체로 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence solution (Milli-pore, Billerica, MA)을 사용하여 면역반응성을 검출하였다.

[0049] **6. 동물 연구**

[0050] 6주령 C57/B6를 모든 이종이식에 사용하였다. 유방 지방 패드(mammary-fat-pad) 종양 분석을 위해, 세포를 트립산화하여 수확하였고, PBS로 2번 씻어낸 후 계수하였다. 그 후, 세포들을 HBSS buffer에 재현탁하였다(5×10^5 cell/50㎕). 마우스는 마취시켰고, 유선을 드러내기 위해 작게 절개하였고, 5×10^5 cell을 직접 유방 지방 패드(mammary-fat-pad)에 주입하였다. 절개는 수술 실(Silkam, BBRAUN, Rubi, Spain)로 봉합하였고, 종양 길이(L) 및 너비(W)를 측정함으로써 1차 종양 파생물을 매일 관측하였다. 종양 부피는 길이×너비^2×1/2로 계산하였다.

[0051] **<실시예 1> miR181b 조절을 통해 유방암 전이에 관여하는 AWP1**

[0052] 마우스 유방암 세포주인 E0771에서 AWP1의 발현을 보았고, AWP1을 녹다운(knockdown) 시켜 암세포의 변화를 관찰하였다(도 1A). AWP1 녹다운(knockdown)이 E0771 세포주의 생존능에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도

1B). 또한 AWP1을 녹다운(knockdown) 시킨 E0771을 마우스 유방 지방 패드(mammary-fat-pad) 주입하여 암세포 진행 및 전이를 관찰하였다. 주입 후 약 25일간 마우스를 관찰하며, 몸무게와 종양 크기를 측정하였다. AWP1 녹다운(knockdown) 마우스군을 대조군과 비교시, 몸무게와 종양 크기에서 특별히 차이를 보이고 있진 않았다(도 1C 및 도 1D). 반면, 폐 전이에 있어서 AWP1을 녹다운(knockdown) 시킨 마우스군이 대조군에 비해 현저히 결절(nodules) 형성이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 1E). 따라서, AWP1의 발현이 암세포 전이에 관여할 것으로 생각된다.

[0053] 그렇다면, 마우스 뿐만 아니라 인간 암세포에서도 같은 양상을 보이는지 관찰하고자 하였다. 먼저 인간 유방암 세포주에서 AWP1의 발현을 GEO profile을 통해 확인하였다. MCF7에 비해 MDA-MB-231 세포주에서 AWP1의 발현이 상당히 저해되어 있었다(도 2A). 이를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과, GEO profile과 동일하게 MCF7에 비해 MDDA-MB-231 세포주에서 AWP1의 발현이 적게 나타났다(도 2B). 증식 분석(Proliferation assay)을 통하여 MCF7에 비하여 MDA-MB-231 세포가 상대적으로 빨리 자란다는 것을 알 수 있었고(도 2C), 또한 상처 치유 분석(wound healing assay)을 통해 MCF7에 비해 MDA-MB-231 세포의 이동 능력(migration ability)도 높음을 확인하였다(도 2D 및 도 2E). 따라서, AWP1의 발현이 상대적으로 적은 MDA-MB-231 세포는 증식이나 이동이 빠름을 알 수 있었다.

[0054] AWP1의 발현이 상대적으로 많은 MCF7 세포주에 AWP1을 녹다운(knockdown) 시켜 그 효과를 관찰하였다(도 3A). 상처 치유 분석을 통해 대조군에 비해 AWP1 녹다운 그룹이 상처 치유가 빠름을 관찰할 수 있었고(도 3B), 그 통계학적 수치를 표시하였다(도 3C). AWP1 녹다운(knockdown)에 의한 MCF7 세포주의 생존능에는 전혀 영향을 미치지 않음을 관찰하였다(도 3D). 따라서, AWP1의 녹다운(knockdown)에 의해 암세포 이동이 증가할 수 있음을 확인하였다.

[0055] AWP1의 발현이 상대적으로 적은 MDA-MB-231 세포주에서 AWP1을 과발현시켜 그 효과를 재확인하였다. AWP1을 과발현시킨 후 RT-PCR을 통해 AWP1 mRNA가 증가하였음을 관찰하였고(도 4A), 웨스턴 블랏을 통해 단백질 수준도 증가하였음을 확인하였다(도 4B). MDA-MB-231 세포주에 AWP1 과발현은 생존능에는 영향을 미치지 않음을 관찰하였다(도 4C). 반면, AWP1의 과발현으로 상처 치유(wound closure)가 감소하였고(도 4D 및 도 4E), 암 전이(cancer metastasis) 혹은 EMT 관련 마커들이 줄어드는 것도 확인하였다(도 4F). 따라서, AWP1의 과발현은 암세포 이동 및 암 전이 혹은 EMT 관련 마커를 저해할 수 있음을 확인하였다.

[0056] 이에, 상기와 같은 결과를 토대로 AWP1의 발현은 어떻게 저해되는지 확인하였다. 유방암 세포주의 전이 정도에 따라 AWP1 mRNA 발현의 차이보다 단백질 수준에서 그 발현 정도에 차이가 크다는 것을 확인하였다. 따라서 번역 수준(translational level)에서 AWP1의 발현을 조절하는 것으로 추정하고, 이를 증명하기 위해 AWP1을 표적으로 하고, MCF7에 비해 MDA-MB-231에 많이 발현되는 miRNA을 선별하였다(도 5A). miRNA가 표적할 것으로 추정되는 AWP1 3' UTR 부분을 루시퍼라아제 구조체(luciferase construct)에 클로닝하여 루시퍼라아제 활성(luciferase activity)을 측정하고자 하였다(도 5B). AWP1을 표적화할 것으로 예상되는 5가지 miRNA mimic과 억제 시험을 통해 miR181b가 가장 특이적으로 AWP1을 표적으로 하는 것으로 관찰하였다.

[0057] 따라서, 본 발명은 AWP1의 단백질 수준이 암 전이에 중요하게 관여하며, AWP1의 단백질 수준은 miRNA181b에 의해서 조절됨을 밝혀냈다.

[0058] **<실시예 2> 전립선암 세포에서 AWP1에 의해 조절되는 상피중간엽세포이행(Epithelial-mesenchymal transition)**

[0059] 대표적인 전이성 암인 유방암과 마찬가지로, 전립선암 세포에서도 AWP1이 암전이와 관련된 기능을 가지는지 확인하였다.

[0060] 인간 전립선암 세포주에서 AWP1의 발현을 GEO profile을 통해 확인하였다. DU-145에 비해 PC3 세포주에서 AWP1의 발현이 상당히 저해되어 있음을 확인하였다(도 6A). 이를 RT-PCR 및 웨스턴 블랏으로 확인한 결과, GEO profile과 동일하게 DU-145에 비해 PC3 세포주에서 AWP1의 발현이 적게 나타났다(도 6B 및 도 6C). 증식 분석(Proliferation assay)을 통하여 DU-145에 비하여 PC3 세포가 상대적으로 빨리 자란다는 것을 알 수 있었고(도 6D), 또한 상처 치유 분석(wound healing assay)을 통해 DU-145에 비해 PC3 세포의 이동능(migration ability)도 높음을 확인하였다(도 6E 및 도 6F). 따라서, AWP1의 발현이 상대적으로 적은 PC3 세포는 증식(proliferation) 이나 이동(migration)이 빠름을 알 수 있었다.

[0061] AWP1의 발현이 상대적으로 적은 PC3 세포주에서 AWP1을 과발현시켜 그 효과를 재확인하였다. AWP1을 과발현시킨 후 RT-PCR을 통해 AWP1 mRNA가 증가하였음을 관찰하였다(도 7A). PC3 세포주에 AWP1 과발현은 생존능(viability)에는 영향을 미치지 않음을 관찰하였다(도 7B). 반면, AWP1의 과발현으로 상처 치유(wound

closure)가 감소하였고(도 7C 및 도 7D), 암 전이(Cancer metastasis)의 중요한 특징 중 하나인 상피중간엽세포이행(Epithelial Mesemchymal Transition; EMT)을 확인하고자 관련 마커들(Vimentin, SMA, MMP9)의 변화를 관찰하였고, 이들은 AWP1 과발현으로 인해 그 발현이 감소하는 현상을 나타냈다(도 7E 및 도 7F). 따라서, AWP1의 과발현은 암세포 이동 및 EMT 관련 마커를 저해할 수 있음을 확인하였다.

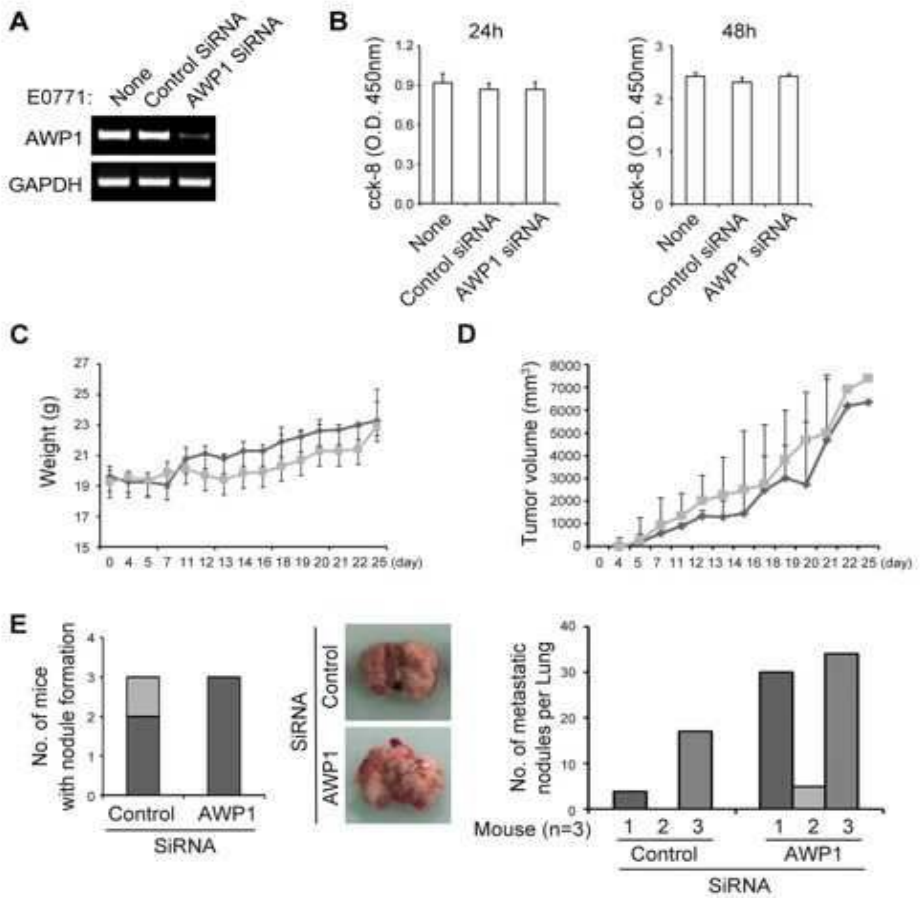
[0062] PC3의 경우 내재적(endogenous) AWP1의 발현이 적지만, 이를 거의 저해시켰을 때 기능도 재확인하였다. PC3 세포주에 AWP1을 녹다운(knockdown)시켜 AWP1 발현을 완전히 제거하고 그 효과를 관찰하였다(도 8A). PC3 세포주에서의 AWP1 녹다운(knockdown)은 생존능(viability)에는 전혀 영향을 미치지 않았다(도 8B). 상처 치유 분석(Wound healing assay)을 통해 대조군에 비해 AWP1 녹다운(knockdown) 그룹의 상처 치유가 상대적으로 빠름을 관찰할 수 있었고(도 8C), 그 통계학적 수치를 표시하였다(도 8D). 상피중간엽세포이행(Epithelial Mesemchymal Transition; EMT)을 확인하고자 관련 마커들(Vimentin, SMA, MMP9)의 변화를 관찰하였고, 이들은 AWP1 녹다운(knockdown)으로 증가하는 현상을 나타냈다(도 8E 및 도 8F). 따라서, AWP1의 녹다운(knockdown)에 의해 암세포 이동 및 EMT 마커가 증가함을 확인하였다.

[0063] 마지막으로, AWP1의 발현이 상대적으로 많은 DU-145 세포주에 AWP1을 녹다운(knockdown) 시켜 그 효과를 관찰하였다(도 9A). AWP1 녹다운(knockdown)은 DU-145 세포주의 생존능(viability)에는 전혀 영향을 미치지 않음을 관찰하였다(도 9B). 상처 치유 분석(Wound healing assay)을 통해 대조군에 비해 AWP1 녹다운(knockdown) 그룹의 상처 치유(wound closure)가 빠름을 관찰할 수 있었고(도 9C), 그 통계학적 수치를 표시하였다(도 9D). 뿐만 아니라, 암 전이(Cancer metastasis)의 중요한 특징 중 하나인 상피중간엽세포이행(Epithelial Mesemchymal Transition; EMT) 관련 마커들(Vimentin, SMA, MMP9)이 AWP1 녹다운(knockdown)으로 인해 증가하는 현상을 나타냈다(도 9E). 따라서, 내재성(endogenous) AWP1 발현 양상이 암세포 이동 및 전이(metastasis)에 관여함을 확인하였다.

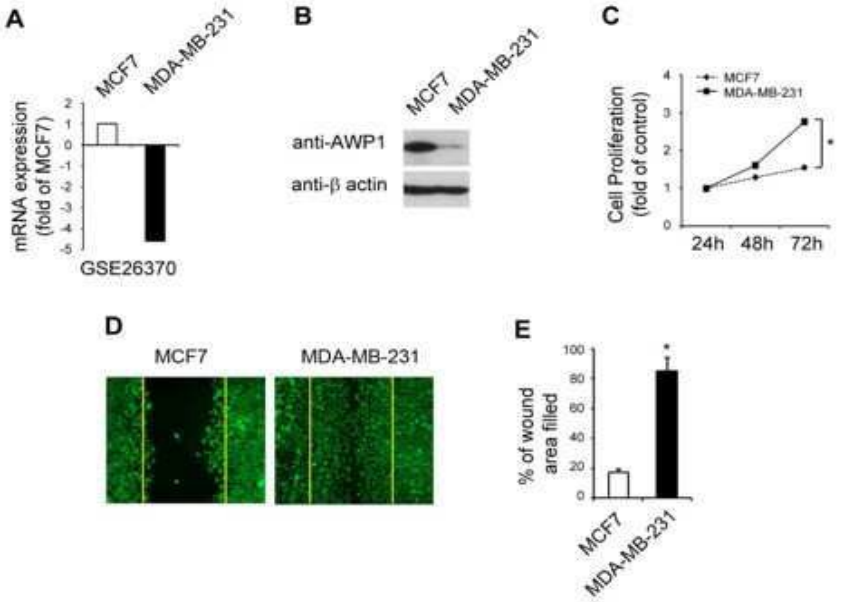
[0064] 이상으로 본 발명을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

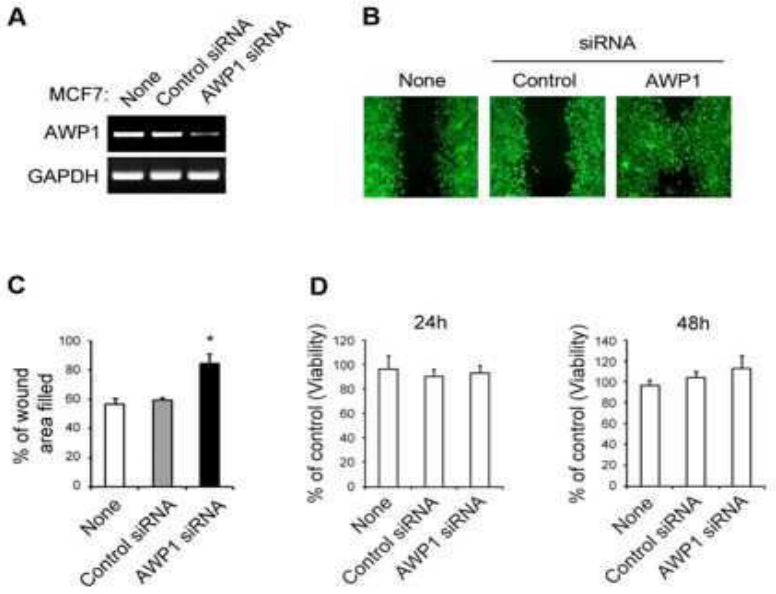
도면1


A
E0771:
None
Control SiRNA
AWP1 SiRNA
AWP1
GAPDH
B
24h
48h
cck-8 (O.D. 450nm)
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
C
Weight (g)
(day)
D
Tumor volume (mm³)
(day)
E
No. of mice with nodule formation
Control
AWP1
SiRNA
Control
AWP1
No. of metastatic nodules per Lung
Mouse (n=3)
1 2 3
1 2 3
Control
AWP1
SiRNA

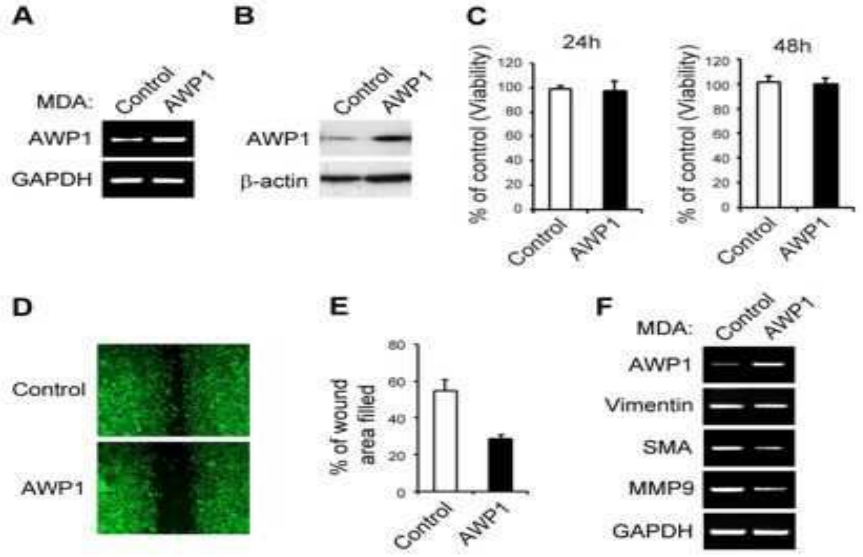
도면2


A
MCF7
MDA-MB-231
mRNA expression (fold of MCF7)
GSE26370
B
MCF7
MDA-MB-231
anti-AWP1
anti-β actin
C
MCF7
MDA-MB-231
Cell Proliferation (fold of control)
24h 48h 72h
D
MCF7
MDA-MB-231
E
% of wound area filled
MCF7
MDA-MB-231

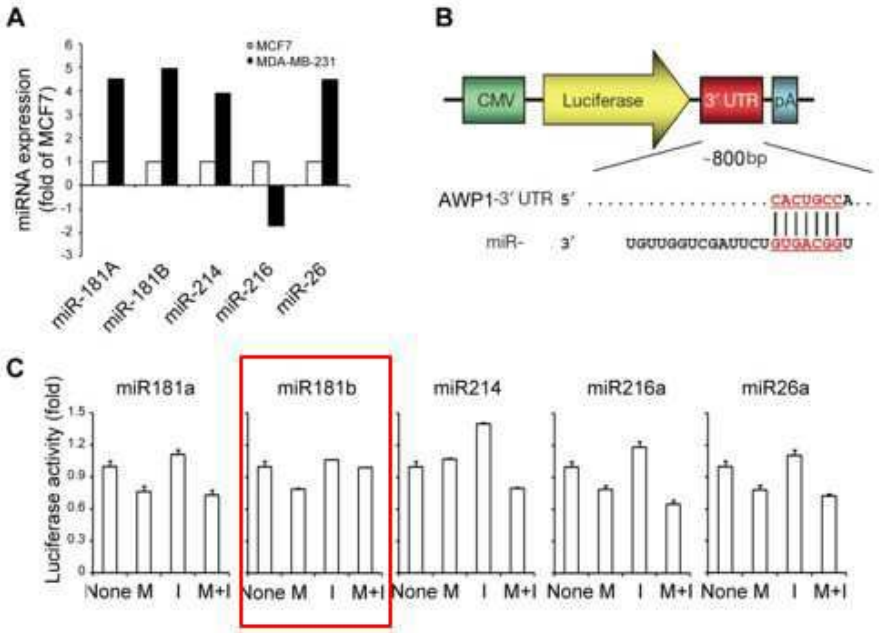
도면3


A
MCF7:
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
AWP1
GAPDH
B
siRNA
None
Control
AWP1
C
% of wound area filled
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
D
24h
48h
% of control (Viability)
None
Control siRNA
AWP1 siRNA

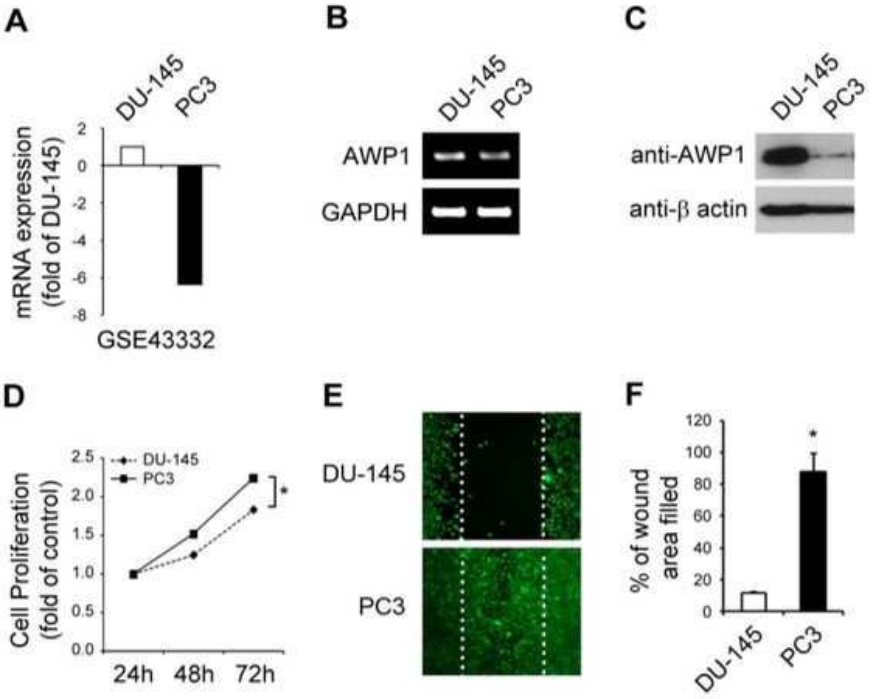
도면4


A
MDA:
Control
AWP1
AWP1
GAPDH
B
Control
AWP1
AWP1
β-actin
C
24h
48h
% of control (Viability)
Control
AWP1
D
Control
AWP1
E
% of wound area filled
Control
AWP1
F
MDA:
Control
AWP1
AWP1
Vimentin
SMA
MMP9
GAPDH

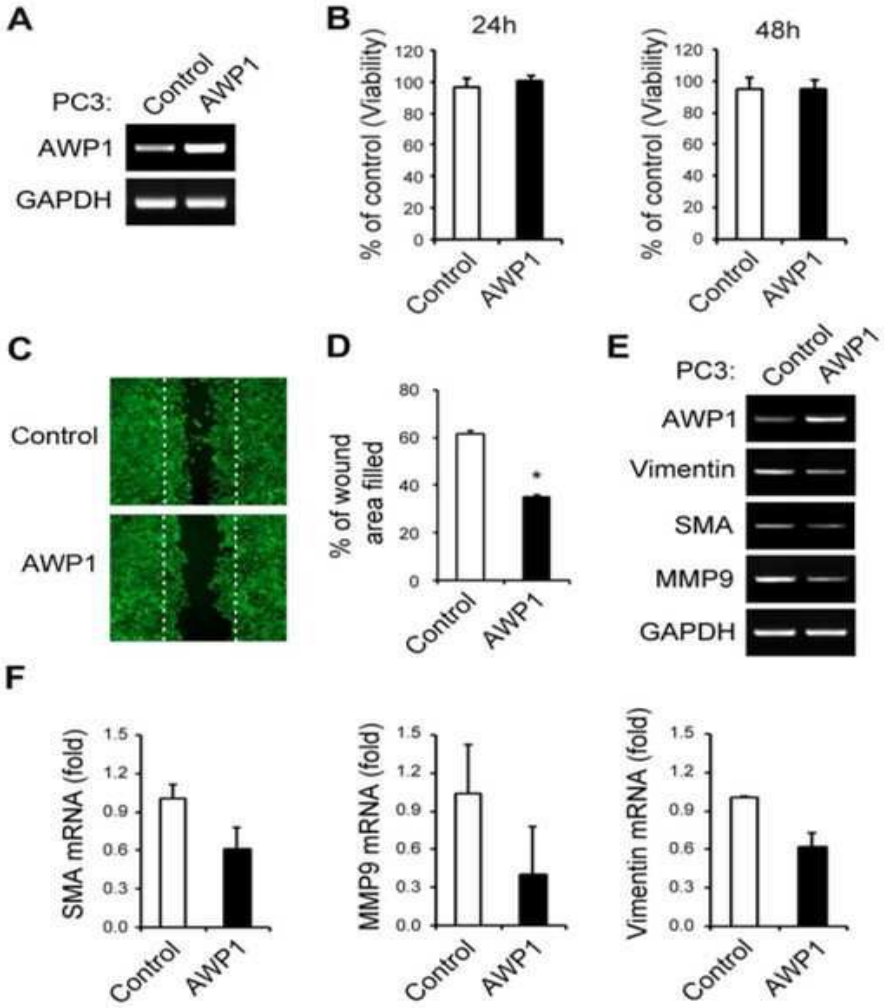
도면5


A
MCF7
MDA-MB-231
miRNA expression (fold of MCF7)
miR-181A
miR-181B
miR-214
miR-216
miR-26
B
CMV
Luciferase
3' UTR
pA
~800bp
AWP1-3' UTR 5'
CACUGCCA
miR- 3'
UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU
C
Luciferase activity (fold)
miR181a
miR181b
miR214
miR216a
miR26a
None M I M+I

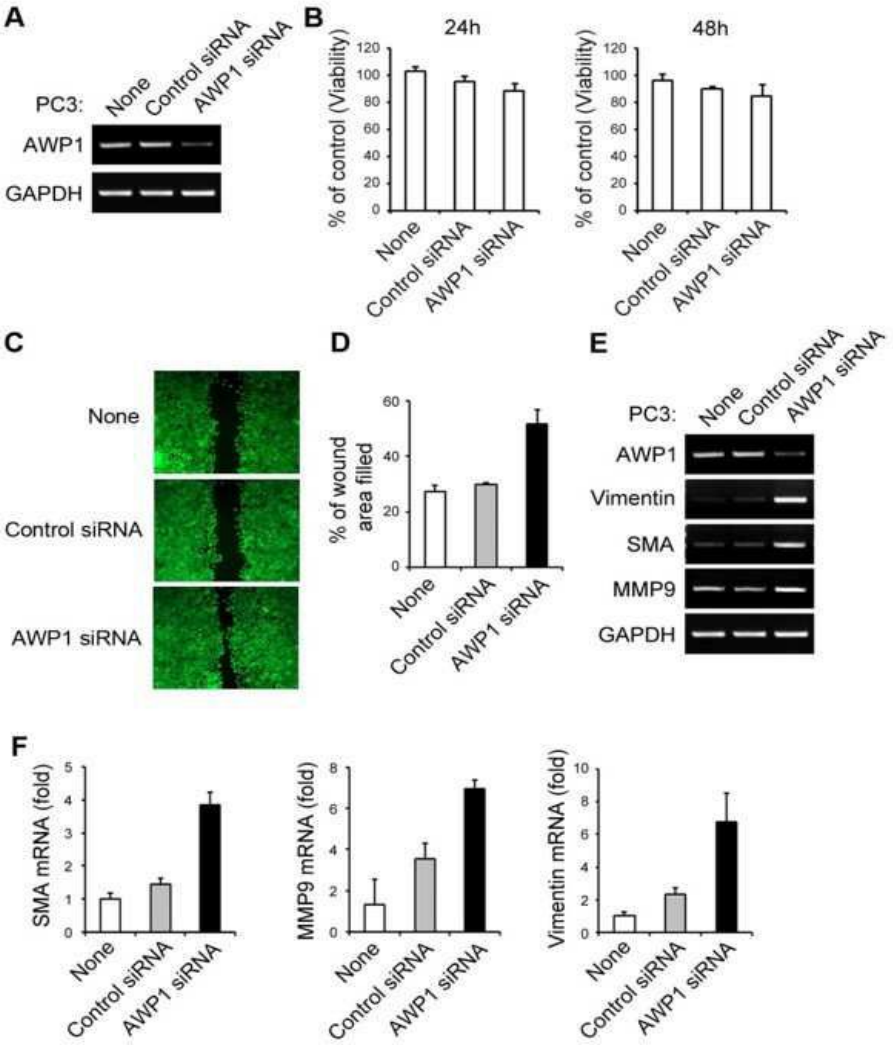
도면6


A
DU-145
PC3
mRNA expression (fold of DU-145)
GSE43332
B
DU-145
PC3
AWP1
GAPDH
C
DU-145
PC3
anti-AWP1
anti-β actin
D
DU-145
PC3
Cell Proliferation (fold of control)
24h 48h 72h
E
DU-145
PC3
F
% of wound area filled
DU-145
PC3

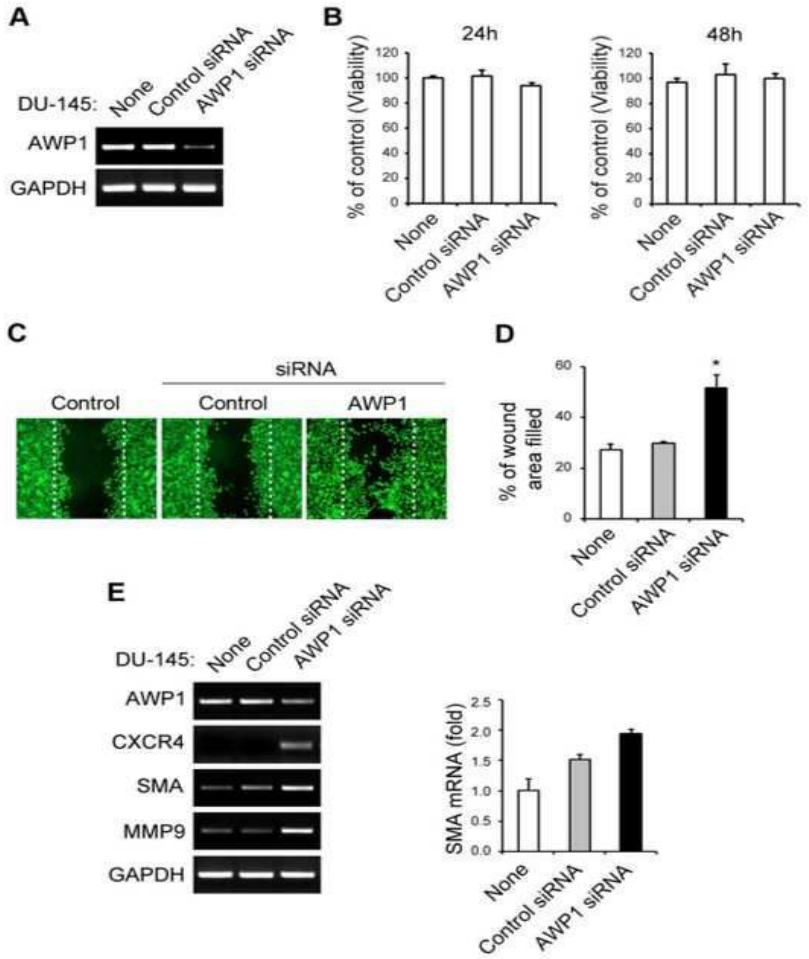
도면7


A
PC3:
Control
AWP1
AWP1
GAPDH
B
24h
48h
% of control (Viability)
120
100
80
60
40
20
0
Control
AWP1
C
Control
AWP1
D
% of wound area filled
80
60
40
20
0
*
Control
AWP1
E
PC3:
Control
AWP1
AWP1
Vimentin
SMA
MMP9
GAPDH
F
SMA mRNA (fold)
MMP9 mRNA (fold)
Vimentin mRNA (fold)
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
Control
AWP1

도면8


A
PC3:
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
AWP1
GAPDH
B
24h
48h
% of control (Viability)
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
C
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
D
% of wound area filled
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
E
PC3:
None
Control siRNA
AWP1 siRNA
AWP1
Vimentin
SMA
MMP9
GAPDH
F
SMA mRNA (fold)
MMP9 mRNA (fold)
Vimentin mRNA (fold)
None
Control siRNA
AWP1 siRNA

도면9



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Biomarker composition for diagnosing cancer metastasis comprising AWP1

<130> ADP-2015-0237

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ccaagtgcct atgctttgtt cca 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400

> 2

acagaggttg caggtgggct tat 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ccgcacattc gagcaaagac 20

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

cctgctgtcc cgccg 15

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

cttgtccagg agttccgctc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

acgctggagg acttgctttt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tctatggtcc tcgccctgaa 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

catcgtccac cggactcaaa 20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

agccacatcg ctcagaca 18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gcccaatacg accaaatcc 19