



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0141951
(43) 공개일자 2017년12월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0075024
- (22) 출원일자 2016년06월16일
심사청구일자 2017년06월15일

- (71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
- (72) 발명자
최은경
서울특별시 송파구 올림픽로35길 93, 102동 2504호 (신천동, 더샵스타리버)
정성윤
경기도 용인시 수지구 포은대로 231, 206동 1102호 (상현동, 서원마을 현대홈타운아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인태백

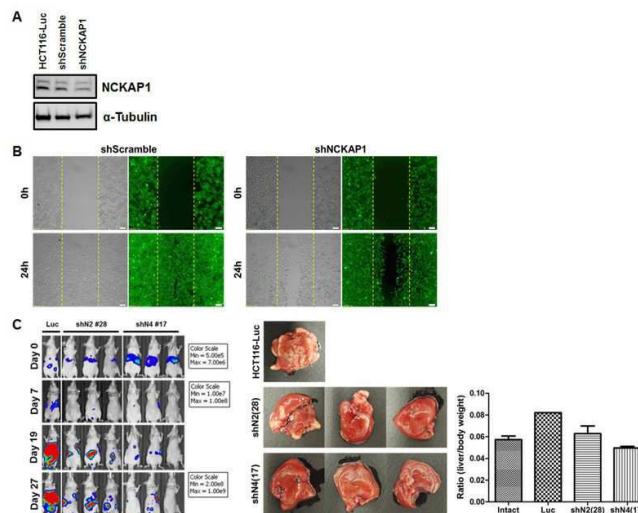
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 NCKAP1을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 또는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 NCKAP1(NCK-Associated Protein 1)을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 또는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 인체 대장암 조직 이식 마우스 모델의 혈액에서 대량 유전자 발현 분석을 통해 신규한 대장암 표적 후보를 발굴하였고, 이를 대장암 세포주 내 표적 후보 유전자 발현 억제제를 통해 실험적 검증을 하였다. 이를 통해 대장암 환자 혈액 및 조직에서 NCKAP1이 과발현되고, NCKAP1의 억제에 의한 암세포의 이동, 침윤 및 전이가 저해됨을 관찰하고, 신규한 대장암 표적으로서 NCKAP1의 가능성을 확인하였다. 따라서 NCKAP1의 발현 수준을 이용한 대장암 진단과 유전자 발현 억제제를 암의 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 33/57419 (2013.01)
 C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/136 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2013.01)

이재희

경기도 고양시 덕양구 강매로 267-23 (강매동)

(72) 발명자

송시열

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015064077

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 혈중 순환 암 세포의 효율적인 분리·동정을 위한 in vivo 및 in vitro 시스템 구축과 이를 활용한 혈중 순환 암 세포 유래 전이암 특이적 마커 개발

기여율 1/2

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0972

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 임상연구인프라조성

연구과제명 항암 T2B 기반구축센터

기여율 1/2

주관기관 서울아산병원

연구기간 2015.08.05 ~ 2020.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

NCKAP1(NCK-Associated Protein 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

NCKAP1 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

NCKAP1의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 NCKAP1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 NCKAP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 NCKAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 대장암 진단용 조성물.

청구항 5

NCKAP1의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 전이 예후 예측용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 NCKAP1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 NCKAP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 NCKAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 대장암 전이 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제3항 또는 제4항의 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트.

청구항 8

제5항 또는 제6항의 조성물을 포함하는 대장암 전이 예후 예측용 키트.

청구항 9

- (1) 환자에서 분리된 시료로부터 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 대장암이라고 판단하는 단계를 포함하는 대장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

- (1) 대장암 환자에서 분리된 시료로부터 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 대장암의 전이 위험성이 높다고 판단하는 단계를 포함하는 대장암 전이 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

NCKAP1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

NCKAP1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 전이 억제용 약학조성물.

청구항 13

- (1) 대장암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (2) 상기 시험물질을 접촉한 대장암세포에서 NCKAP1 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- (3) 대조구 시료와 비교하여 상기 NCKAP1 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 대장암 치료제 스크리닝 방법.

청구항 14

- (1) 대장암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (2) 상기 시험물질을 접촉한 대장암세포에서 NCKAP1 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- (3) 대조구 시료와 비교하여 상기 NCKAP1 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 대장암 전이 억제제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NCKAP1(NCK-Associated Protein 1)을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 또는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2015년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 따르면, 2013년에 우리나라에서는 225,343건의 암이 발생했는데, 그 중 대장암은 남녀를 합쳐 27,618건으로 전체의 12.3%로 3위를 차지하고 있다. 대장암의 연령표준화발생률의 연간 변화율은 1999년 대비 2013년에 4.6% 증가하였으며 이는 간암, 폐암 등의 발생 감소와 비교하였을 때 대장암의 발생 증가에 따른 대장암 조기진단 및 치료 개발 연구의 중요성을 제시한다고 볼 수 있다.

[0003] 대장암은 근치적 절제술 후 20~50%에서 재발한다. 재발은 국소 재발과 원격전이가 동반되는 광범위한 재발이 많으며 이는 근치적 절제 치료의 한계성을 나타낸다. 전이성 대장암 중 간 전이는 가장 발병률이 높으며 병기가 가장 진행된 상태로 분류되고 대장암 환자의 가장 큰 사망 원인 중 하나이다. 이러한 대장암의 전이와 재발을 추적하기 위한 방법 중 혈청의 암태아성 항원 검사는 비교적 간편하여 대장암의 근치적 절제술 후 추적검사에 중요한 방법으로 쓰이고 있으나, 대장암과 무관한 양성 질환 및 흡연, 음주에 의해서도 양성 반응이 나올 수 있어 진단 활용에 한계가 있다.

[0004] 대장암 환자의 약 15~25%는 진단 당시 이미 간 전이가 있으며, 이 중 80~90%의 경우는 진단 초기에 절제 불가능한 간 전이가 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 대장암 및 전이성 대장암의 조기 진단을 가능케할 신규한 바이오 마커의 개발이 시급하다.

[0005] 바이오 마커는 맞춤형 의료를 앞당길 수 있는 주요 수단이 되고 있으며, DNA, RNA를 기반으로 하는 핵산 기반 바이오 마커와 단백질 및 그 일부분 등을 기반으로 하는 단백질 기반 바이오 마커 등으로 구분된다. 이러한 바이오 마커는 최근 암, 감염성 질환, 심장혈관 질환, 뇌졸중, 치매 등 각종 난치병에 대한 조기진단용, 약물반응 진단 및 치료 진단용 등에 적용되고 있다.

[0006] 대장암을 진단할 수 있는 검사에는 직장 수지 검사, 대변검사 대장조영술, 대장내시경, 영상진단, 혈액검사 등이 시행되고 있으나, 대부분 대장암은 조기 증상이 없어 정기적인 대장 검사가 필요하다. 대장내시경은 대장암 진단의 가장 유용한 방법 중 하나이나 장천공이나 출혈 등의 합병증이 있을 수 있으며 종양이 장관을 막는 경우 상부 대장으로 진행할 수 없는 단점이 있다. CT 대장 조영술은 대장내시경의 단점을 보완할 수 있는 방법으로

비교적 안전하고 검사시간이 짧지만 작은 용종이나 잔변과의 구별이 어려운 경우가 있으며 방사선 조사를 받아야 하고 암 발견 시 다시 대장내시경 검사를 받아야 한다. 이러한 영상진단법은 정확한 검사를 위해 하체를 이용하여 대장을 비우는 것이 필수적이므로 검사 시 불편감이나 통증을 느낄 수 있다. 반면 혈액을 이용한 검사법은 비침습적 방식으로서 매우 간편하고 반복적 검사가 가능하다. 이러한 liquid biopsy는 진단과 치료 효능 평가 및 모니터링에 유용한 암 진단기법으로 전망되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 유럽공개특허 EP 1961825 (2008.08.27 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 NCKAP1을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 또는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물, NCKAP1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 또는 대장암 전이 예후 예측용 조성물, 이를 이용한 대장암 진단 방법 및 대장암 전이 예후 예측방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 대장암 전이 억제용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질의 발현 수준 측정을 통한 대장암 치료제 또는 대장암 전이 억제제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 NCKAP1(NCK-Associated Protein 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 NCKAP1 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 NCKAP1의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 NCKAP1의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 전이 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 NCKAP1의 발현 수준을 측정하여 대장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 NCKAP1의 발현 수준을 측정하여 대장암 전이 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 전이 억제용 약학조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질의 발현 수준 측정을 통한 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질의 발현 수준 측정을 통한 대장암 전이 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 NCKAP1(NCK-Associated Protein 1)을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 또는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 인체 대장암 조직 이식 마우스 모델의 혈액에서 대량 유

전자 발현 분석을 통해 신규한 대장암 표적 후보를 발굴하였고, 이를 대장암 세포주 내 표적 후보 유전자 발현 억제제를 통해 실험적 검증은 하였다. 이를 통해 대장암 환자 혈액 및 조직에서 NCKAP1이 과발현되고, NCKAP1의 억제에 의한 암세포의 이동, 침윤 및 전이가 저해됨을 관찰하고, 신규한 대장암 표적으로서 NCKAP1의 가능성을 확인하였다. 따라서 NCKAP1의 발현 수준을 이용한 대장암 진단과 유전자 발현 억제제를 암의 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 대장암 환자 조직 이식 마우스 혈액 내 유전자 분석 결과이다. A: 다양한 암 환자 조직 이식 마우스 혈액 세포 유래 RNA 수준에서 기존 혈중 암세포 마커인 EPCAM의 발현 확인, B: 대량 유전자 분석 결과 2배 또는 1.5배 발현 차이 나는 유전자 수, C: 신규한 대장암 표적으로서 NCKAP1의 대량 유전자 분석 결과.

도 2는 본 발명의 실시예 2에 따라 대량 유전자 분석에 의해 발굴된 NCKAP1의 발현을 혈액 세포 RNA 및 조직 내 단백질 수준에서 검증한 결과이다. A: 대장암 환자 조직 이식 마우스 유래 혈액 세포 내 NCKAP1 유전자 발현양 비교, B: 대장암 환자 조직 이식 마우스 유래 암 조직에서 NCKAP1 단백질 발현 분석.

도 3은 본 발명의 실시예 3에 따라 대장암 환자 혈액 및 조직에서 NCKAP1의 발현을 검증한 결과이다. A: 대장암 환자 유래 혈액 세포 및 암 조직에서 NCKAP1 유전자 발현양 비교, B: 10명의 대장암 환자 혈액 세포 내 NCKAP1의 유전자 발현양 분석, C: 대장암 환자 조직 내 NCKAP1 단백질 발현 확인.

도 4는 대장암 세포주에서 NCKAP1의 기능 검증을 위해 시행한 상피간엽이행 관련 기능 실험 및 마커 분석 결과이다. A: 대장암 세포주에서 RNA 간섭효과에 의한 NCKAP1 발현 억제 검증, B: NCKAP1의 발현 변화에 의한 상처 치유 능력 비교, C: NCKAP1에 의한 대장암 세포주의 이동 및 침투능 변화 분석, D: NCKAP1에 의한 세포 형태 변화와 상피세포 특이적 마커 발현 분석.

도 5는 암 전이에 대한 NCKAP1의 생체 내 기능을 확인하기 위해 세포주를 확립하고, 전이에 관련된 상처 치유능 및 암 전이 형성능을 비교 검증한 결과이다. A: 대장암 세포주에서 RNA 간섭효과에 의한 NCKAP1 발현 억제 확인, B: NCKAP1에 의한 상처 치유 능력 변화 비교, C: NCKAP1 발현 억제에 의한 대장암 세포의 간 전이 종양 형성능 감소 확인.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 NCKAP1(NCK-Associated Protein 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 바이오마커 조성물 또는 대장암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 "NCKAP1(NCK-Associated Protein 1)"은 NCBI accession no. NM_013436.4 또는 NM_205842.2일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 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.

[0026] 본 명세서 용어 “예후(prognosis)”는 질병을 진단하여 판단된 장애의 증세 또는 경과에 대한 전망을 말한다. 암 환자에 있어서 예후는 통상적으로 암 발병 또는 외과적 시술 후 일정기간 내의 전이 여부 또는 생존기간을 뜻한다. 예후의 예측은 특히 대장암 환자의 화학치료 여부를 비롯하여 향후 대장암 치료의 방향에 대한 단서를 제시하므로 매우 중요한 임상적 과제이다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “전이(metastasis)”는 어떤 종양이 그 원발 부위에서 여러 경로를 따라 다른 신체의 부위에 이식되어 그곳에 정착 및 증식하는 상태를 말한다. 암의 전이여부는 해당 암의 고유의 특성에 의하여 결정될 뿐만 아니라 암의 예후 결정에 있어서 가장 중요한 단서가 되는 사건이므로, 암 환자의 생존과 관련된 가장 중요한 임상정보로 다루어진다.

[0028] 또한, 본 발명은 NCKAP1의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 진단용 조성물 또는 대장암 전이 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0029] 상세하게는, 상기 NCKAP1의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 NCKAP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라

이며 또는 프로브, 상기 NCKAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0030] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트 또는 대장암 전이 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0031] 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 복사를 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.
- [0032] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA의 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 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.
- [0033] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 LRP-1에 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.
- [0034] 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.
- [0035] 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.
- [0036] 본 명세서에서 용어 "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 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오타이드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 (1) 환자에서 분리된 시료로부터 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 대장암이라고 판단하는 단계를 포함하는 대장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 (1) 대장암 환자에서 분리된 시료로부터 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 NCKAP1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 대장암의 전이 위험성이 높다고 판단하는 단계를 포함하는 대장암 전이 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0039] 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.
- [0040] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 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.

- [0041] 본 명세서에서 용어 "환자에서 분리된 시료"란 바이오 마커인 상기 NCKAP1 유전자 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 본 발명은 NCKAP1 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 대장암 전이 억제용 약학조성물을 제공한다.
- [0043] 상세하게는, 상기 NCKAP1 단백질 발현 억제제는 NCKAP1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 NCKAP1 단백질 활성 억제제는 NCKAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 또는 천연물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 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, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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.
- [0045] 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, 등맥내, 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 0.1mg/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1mg/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01mg/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 (1) 대장암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉한 대장암세포에서 NCKAP1 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조군 시료와 비교하여 상기 NCKAP1 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 대장암 치료제 스크리닝 방법 또는 대장암 전이 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 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.
- [0048] 본 명세서에서 "암" 또는 "암세포"는 대장암이 가장 바람직하지만, NCKAP1 유전자 또는 NCKAP1 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 암 또는 암세포라면 적용 가능하다. "암" 또는 "암세포"는 유방암, 자궁경부암, 신경교종, 뇌암, 흑색종, 폐암, 방광암, 전립선암, 백혈병, 신장암, 간암, 대장암, 췌장암, 위암, 담낭암, 난소암, 임파종, 골육종, 자궁암, 구강암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 피부암, 혈액암, 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암이거나, 이의 암세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 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 당업

계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0050] <실시예 1> 대장암 환자 조직 이식 마우스 모델을 이용한 혈액 내 대량 유전자 발현 분석

[0051] 다양한 암 종의 환자 유래 암 조직을 서울아산병원의 Bio Resource Center (BRC)로부터 규정에 의한 경로를 통해 분양받았고, 이를 서울아산병원 임상연구윤리위원회와 아산생명과학연구소 동물실험 윤리위원회의 승인 후 철저한 규정 준수 아래 Balb/c 누드마우스에 이식하여 동물 모델을 구축하였다. 구축된 동물 모델에서 종양의 성장이 확인된 마우스를 마취한 후 심장 채혈을 통해 전혈을 회수하고 이로부터 RNA를 추출하였다. 다양한 암 종의 환자 조직 이식 마우스에서 추출된 RNA에서 기존 혈중 암세포 마커로 사용되는 EPCAM 유전자의 발현 여부를 확인하였고, 그 중 발현이 관찰된 C87 대장암 케이스를 선택하여 RNA의 quality control(QC) 후 Affymetrix GeneChip® human Gene 2.0 ST Array를 사용한 대량 유전자 발현 분석을 수행한 결과, 정상 마우스 혈액 대비 C87 대장암 이식 마우스 모델 유래 혈액에서 1.5배 이상 발현이 차이나는 유전자가 3,917개 존재함을 확인하였다. 이 유전자 (DEG; differential expressed gene) 중 본 발명에 관한 NCKAP1의 발현은 정상 마우스 대비 환자 조직 이식 마우스의 혈액에서 2.66배 증가하였고 상기 내용의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0052] <실시예 2> 대장암 환자 조직 이식 마우스 모델에서 NCKAP1 발현 검증

[0053] 대량 유전자 분석을 통해 선택된 NCKAP1을 검증하기 위해 분석에 사용된 C87 케이스를 포함한 총 4 케이스의 대장암 이식 마우스 모델의 혈액 RNA에서 정량적 유전자 분석법(Q-PCR; quantitative PCR)을 통해 NCKAP1의 발현을 확인한 결과 각 케이스별 5, 5.43, 5.61, 6.05배 증가하는 것을 관찰하였다. 대장암 환자 조직이 이식된 마우스 혈액에서 NCKAP1의 발현이 유의적으로 증가함은 NCKAP1이 환자 혈액을 이용한 대장암 진단을 위한 마커로 활용 가능함을 보여주었다. 또한 환자 암 조직에서 NCKAP1의 단백질 발현을 확인하기 위해 파라핀 절편(FFPE tissue; formalin-fixed, paraffin-embedded tissue)에서 조직면역염색(IHC; immunohistochemistry)을 시행하였고, 그 결과 마우스에 이식되었던 총 4 케이스의 대장암 환자 조직의 선암 세포(adenocarcinoma cell)에서 NCKAP1의 발현이 확인되었다. 대장암 환자 조직 이식 마우스 모델을 이용한 혈액 및 조직에서의 NCKAP1의 발현을 확인한 결과는 도 2에 나타내었다.

[0054] <실시예 3> 대장암 환자 혈액 및 조직에서 NCKAP1의 검증

[0055] 조직자원센터(BRC)에서 구입한 동결보존된 10 케이스의 대장암 환자의 암 조직과 정상 조직 및 백혈구 연층(buffy coat)에서 RNA를 추출하여 NCKAP1의 발현양을 상대 비교하였다. 그 결과 정상인 대비 대장암 환자의 혈액에서 NCKAP1의 RNA 수준 발현이 18.89배 증가함을 확인하였고, 정상 조직 대비 암 조직 내에서는 2.61배 증가하였다. 기존 대장암 진단 마커로 사용되고 있는 CEA와 RNA 수준에서의 발현 여부를 비교하였을 때, CEA는 혈액 세포 내 RNA에서 발현이 확인되지 않은 반면 NCKAP1의 경우 10 케이스의 모든 대장암 환자 혈액에서 그 수준이 높게는 64.7배 이상 높아진 것을 관찰하였다. 또한 대장암 환자의 파라핀 조직 절편에서 NCKAP1에 대한 조직면역염색 결과, 정상 조직 대비 암 조직에서의 NCKAP1 단백질 발현이 높은 것을 확인하고 이를 도 3에 나타내었다.

[0056] <실시예 4> 대장암 세포주를 이용한 NCKAP1 기능 검증

[0057] HCT116 대장암 세포주에서 NCKAP1의 기능을 검증하기 위해 짧은 간섭 RNA(siRNA; small interfering RNA)를 사용하였다. 짧은 간섭 RNA는 상보적인 배열을 하는 RNA를 선택적으로 분해하여 특정 단백질의 생산을 억제함으로써 유전자의 발현을 방해한다. 본 발명에서는 NCKAP1 유전자에 상보적인 배열을 지닌 siRNA인 siNCKAP1을 이용하여 그 유전자의 발현을 억제함으로써 암 전이에 중요한 상피간엽이행(EMT; epithelial-mesenchymal transition) 능력의 변화를 관찰하였다. 암 상피세포는 간엽세포로의 전환을 통해 세포의 모양이 방추형으로 변이되고 세포의 극성(apicalbasal polarity)이 사라지면서 세포의 운동성과 모양 가변성(plasticity) 및 세포 사멸에 대한 저항성이 획득된다. 이러한 과정은 원발암 세포가 혈관 내 침투 후 이동하여 다른 장기에 정착하고 증식하는 원격전이(metastasis)에 매우 중요하다. 도 4에서 siNCKAP1 처리된 HCT116 대장암 세포주의 RNA 및 단백질 수준에서 NCKAP1 발현억제를 확인하였고, 상피간엽이행 능력의 변화를 관찰하기 위해 암 세포의 상처 치유능(wound healing), 이동(migration) 및 침투능(invasion) 분석을 시행하였다. 그 결과 NCKAP1의 발현이 억제된 세포주에서 상피간엽이행 관련 기능이 유의적으로 감소하는 것과 세포의 모양이 입방형으로 변이되고 상피세포 마커인 E-cadherin의 발현이 증가됨을 면역염색법을 통해 관찰함으로써 NCKAP1이 상피간엽이행 기능에 주요하게 작용함을 확인하였다.

[0058] <실시예 5> NCKAP1에 의한 생체 내 암 전이능 비교

[0059] 생체 내(in vivo) 실험을 위해 shRNA(short hairpin RNA)를 유전자 도입(transfection)시켜 RNA 간섭(RNAi;

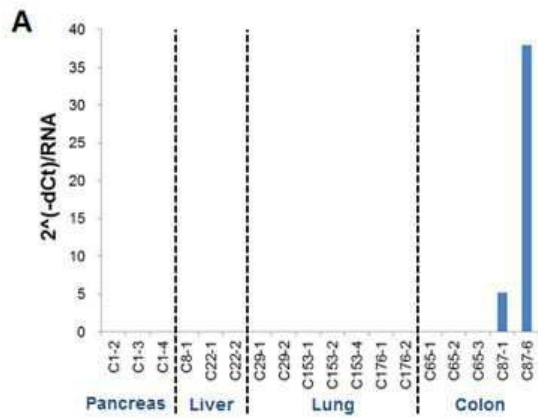
RNA interference) 효과에 의한 NCKAP1 발현 억제 세포주를 확립하였다. NCKAP1 단백질 발현의 감소를 확인하기 위해 단백질 면역 분석법인 western blot을 시행하였고, shNCKAP1이 삽입된 세포주에서 그 발현이 억제된 것을 확인하였다. 실시예 4에서 시행하였던 세포주의 상처치유능을 비교한 결과 대조군인 shScramble 대비 shNCKAP1이 삽입된 세포주에서 그 기능이 억제됨을 관찰하여 상피간엽이행 능력의 감소를 관찰하였다. *In vivo* 동물 모델에서 암 세포의 전이에 관련된 NCKAP1의 기능을 검증하기 위해 실험적 대장암 전이 모델을 확립하였다. 대장암 세포주를 비장의 비정맥 아래에 이식함으로써 간문맥을 통한 간으로의 직접적인 전이를 유도하고 비장을 제거하여 원발암의 형성을 억제시켜 전이암 형성의 관찰을 용이하게 하였다. 종양 형성 관찰을 위한 생체 이미징 기법을 사용하기 위해 발광 효소인 luciferase 활성을 지닌 HCT116 대장암 세포주를 대조군으로 하여 전이암 형성율을 비교한 결과, NCKAP1의 발현이 억제된 세포주에서 간 전이 암의 형성이 현저히 감소한 것을 확인하였다. 실험 종료 시점에서 암 세포가 이식되지 않은 마우스 대비 간의 무게를 비교하였을 때, 대조군에서는 종양 결절 형성에 의해 간의 무게가 크게 증가한 반면 shNCKAP1이 삽입된 그룹에서는 그 무게가 크게 차이나지 않는 것을 관찰하였고 이를 도 5에 나타내었다.

[0060]

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



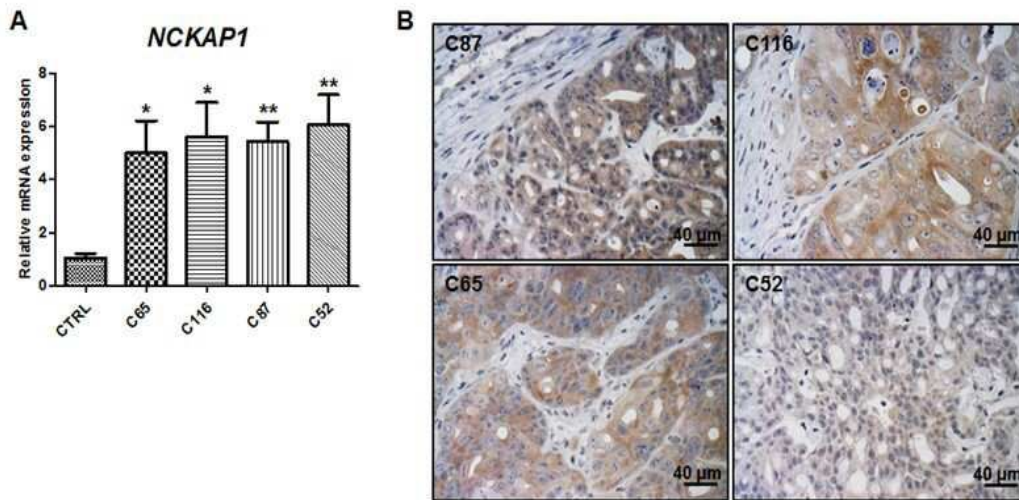
B

CRC PDX vs. Normal			
Cut off	Up	Down	Total
2 fold	285	329	614
1.5 fold	1,978	1,941	3,917

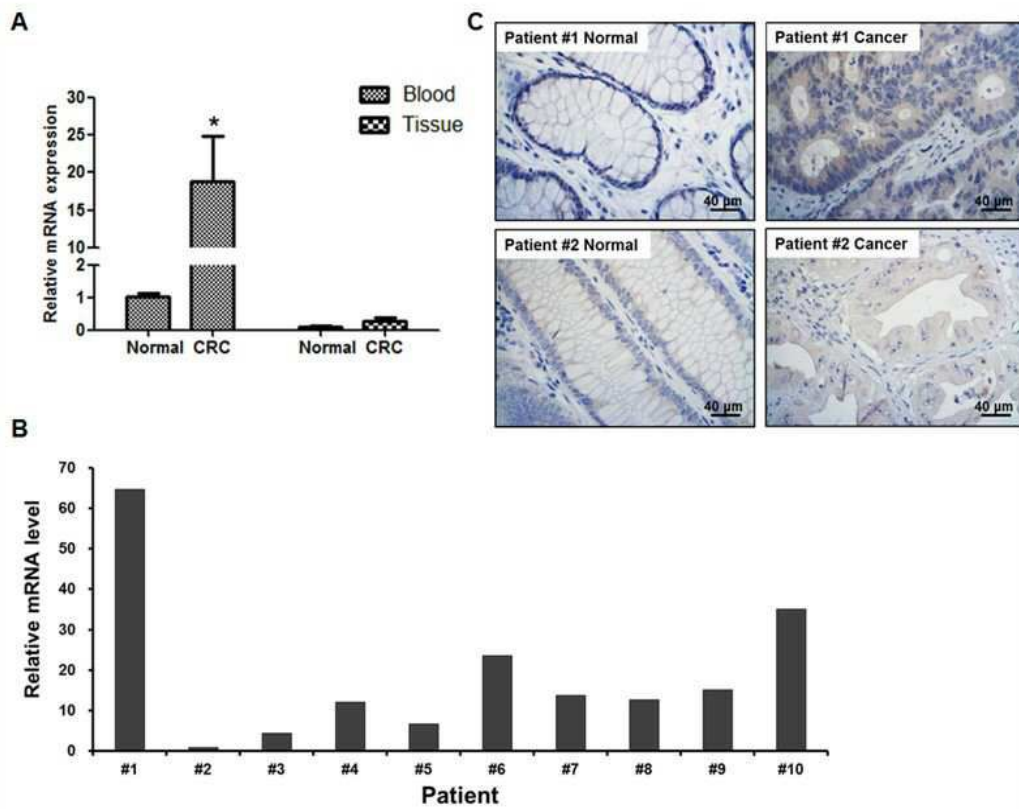
C

Probe Set ID	Absolute Fold Change	Gene Symbol	Gene Description	UniGene Expression Information
16906184	2.66	NCKAP1	NCK-associated protein 1	vascular adrenal tumor bladder carcinoma breast (mammary gland) tumor cervical tumor chondrosarcoma colorectal tumor esophageal tumor gastrointestinal tumor germ cell tumor glioma head and neck tumor kidney tumor leukemia liver tumor lung tumor non-neoplasia normal ovarian tumor pancreatic tumor primitive neuroectodermal tumor of the CNS prostate cancer retinoblastoma skin tumor soft tissue/muscle tissue tumor uterine tumor

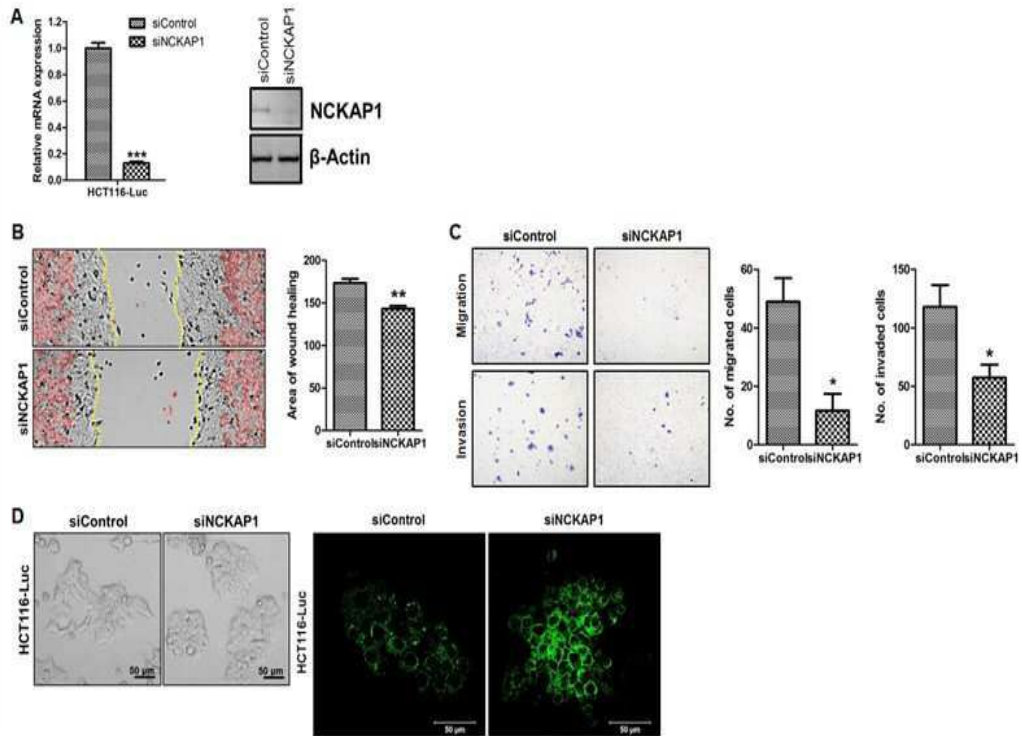
도면2



도면3



도면4



도면5

