

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2012년 1월 26일 (26.01.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/011777 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005431
- (22) 국제출원일: 2011년 7월 22일 (22.07.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0070933 2010년 7월 22일 (22.07.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정경숙 (CHUNG, Kyung Sook) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 원미선 (WON, Mi Sun) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806

Daejeon (KR). 김영주 (KIM, Young Joo) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 송은영 (SONG, Eun Young) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 안지원 (AHN, Ji Won) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 염영일 (YEOM, Young Il) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 이희구 (LEE, Hee Gu) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 장예진 (JANG, Yeo-Jin) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9도심공향타워 6층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

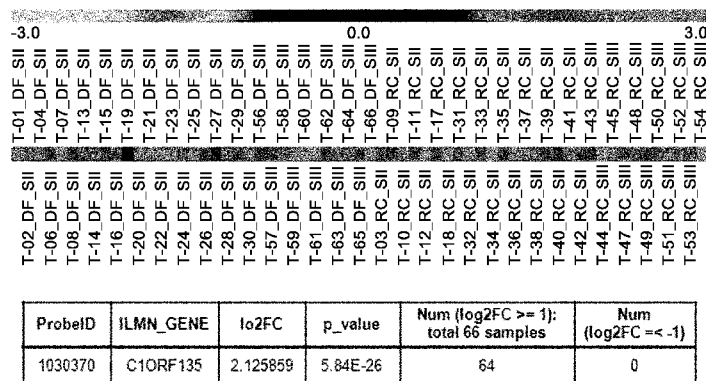
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: KIT FOR DIAGNOSING COLORECTAL CANCER AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF COLORECTAL CANCER

(54) 발명의 명칭: 대장암 진단 키트 및 대장암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for diagnosing colorectal cancer containing a formulation for measuring the expression level of a chromosome 1 open reading frame 135 (C1orf135) gene mRNA or the protein thereof; a kit for diagnosing colorectal cancer containing the composition; a method for providing information on diagnosis of colorectal cancer, the method comprising a step for measuring the expression level of a C1orf135 gene mRNA or the expression level of the protein coded by the gene; a pharmaceutical composition for the prevention or the treatment of colorectal cancer, the composition comprising an expression inhibitor for a C1orf135 gene or an activity inhibitor for the protein thereof; and a method for screening a therapeutic agent for colorectal cancer. The present invention enables the accurate diagnosis of colorectal cancer by providing a gene specific to colorectal cancer, and a diagnostic marker for determining the metastasis and prognosis of colorectal cancer, and can be useful in the diagnosis and prognosis management of colorectal cancer. Also, the present invention enables the development of new bio-medicines having fewer side effects and customized anticancer drugs by providing a colorectal cancer-specific therapeutic agent capable of inhibiting the gene.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2012/011777 A2



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LU, LV,

공개:

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

본 발명은 C1orf135(Chromosome 1 open reading frame 135) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장암 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트, C1orf135 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법, C1orf135 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 대장암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 대장암에 특이적인 유전자를 제공하고 대장암의 전이 및 예후를 판단할 수 있는 진단 마커를 제공함으로써, 정확한 대장암 진단을 가능하게 하며, 대장암의 치료 및 예후판리에 유용하게 사용할 수 있다. 또한, 상기 유전자를 억제하는 대장암 특이적인 치료제를 제공함으로써, 부작용이 적은 바이오 신약 및 맞춤형 항암제의 개발을 가능하게 할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 대장암 진단 키트 및 대장암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 C1orf135(Chromosome 1 open reading frame 135) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장암 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트, C1orf135 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법, C1orf135 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 대장암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 대장암은 일반적으로 소득수준이 높은 집단에서 발생률이 높아 일반적으로 '선진국형 암'으로 인식되어지고 있으며, 서양의 경우 암 사망에 있어서 제2위를 차지하는 암으로 전체 암의 약 15% 정도를 차지하고 있다. 미국의 경우, 연간 약 56,000명이 대장암으로 사망하고 130,000명의 새로운 대장암 환자가 발생한다고 보고되고 있으며, 우리나라에서 대장암은 사망률에서 전체 암에서 차지하는 비율이 위암, 간암, 폐암에 이어 제4위를 차지하는 암이다. 1980년에 전체 암의 5.8%를 차지하던 것이 1985년에는 6.1%, 1995년에는 8.2%, 2002년에는 11.2%로 지속적인 증가 추세를 보이고 있으며, 1991년도 자료와 비교해 볼 때 위암, 간암 및 자궁경부암의 사망률이 감소한 데 비해 대장암에 의한 사망률은 인구 10만 명당 4.7명에서 11.4명으로 2배 이상 증가하였다. 이와 같은 추세가 계속된다면 2010년경에는 우리나라에서의 대장암 발생빈도가 서양의 수준에 도달할 것으로 예측되며 2006년 대장암 발병률은 2위에 해당한다.
- [4] 대장암 환자의 생존률을 높이기 위한 많은 노력이 진행되고 있으나 기존 치료법을 통하여 생존률을 향상시키기는 어려운 상태이다. 대장암 환자의 생존률을 높이기 위해서는 무엇보다도 조기진단과 새로운 대장암 맞춤 타겟의 발굴이 시급하다. 대부분의 대장암은 선종에서 발생하며, 암으로의 변화에 약 10년이 소요되므로 조기진단을 통하여 전암성 병변인선종이나 조기암을 제거할 기회가 많다. 현재 사용되는 선별 검사로는 1) 대변 잠혈 검사, 2) 에스겔장경 검사, 3) 대장 내시경 검사, 4) 대장 조영술이 사용되고 있는데 잠혈 검사는 조기진단용으로는 유용성이 떨어지며, 대장 조영술은 진단의 정확도가 떨어져 1 cm 이하의 경우 20-50%, 1 cm 이상일 때는 10-30%, 조기 대장암의 경우 15-45% 정도의 정확도를 보인다. 따라서 좀 더 정확하고 조기진단이 될 수 있는 진단시스템이 필요하며, 이는 대장암 관련 마커유전자의 발굴이 필요로

되어지는 부분이다. 또한, 대장암이 발병했을 경우 예후를 예측하고 적절한 치료방침을 정하는데 대장암 마커가 적절히 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

- [5] 대장암의 발생과정에는 여러 종류의 암 유전자, 종양 억제유전자등 다양한 유전자 변화가 관여하는 것으로 알려져 있다. 실제 대장암은 발암과정에서 일어나는 유전적 변화가 가장 많이 밝혀진 암이다. 대장암은 한 개의 암 유전자 또는 종양억제 유전자의 변화가 단독으로 암을 유발시킬 수 있는 것이 아니고 정상 대장 점막세포가 선종의 단계를 거쳐 대장암으로 진행되기 위해서는 수년에 걸친 긴 세월을 통해 여러 개의 암 관련 유전자의 변화가 축적되어야 하는데 이를 대장암 발생에 있어서 유전자의 다단계적 변화라고 한다. 여기서 중요한 것은 각 단계에서의 유전자 변화 순서가 아니라 궁극적으로 누적되는 유전자들의 변화의 총합이다. 대장암 발생과정에 관여하는 유전적 변화로는 K-ras, APC, MCC 유전자, 18번 염색체의 DCC유전자, 17번 염색체의 p53 유전자, 그리고 DNA 메틸레이션의 이상 등이 있으며, hMSH2, hMSH1, hPMS1 및 hPMS2 등의 돌연변이도 관계된다.
- [6] 이와 같이, 암의 형성은 다양한 유전자들과 이들 유전자들의 발현 및 조절 기작이 복합적으로 연관되어 진행되므로 최근 들어 다량의 유전자를 사용하는 올리고 칩을 이용한 암 관련 유전자들의 발현률을 비교하여 암의 새로운 진단이나 치료의 마커를 발굴하기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 암세포에서 발현이 증가하거나 감소하는 유전자들은 세포분열, 세포신호전달, 세포 골격, 세포 운동, 세포 방어, 유전자 및 단백질의 발현 그리고 세포내 물질 대사 등 여러 부분에 관여하는 것으로 환자 조직들에 따라 동일한 발현변화를 보이는 유전자가 있는 반면 다른 발현 변화를 보이는 유전자들이 많다. 이것은 각각 환자들이 특이성 때문일 가능성이 크므로 연구하는 대상의 환자 조직들의 정확한 병리학적 소견과 분류에 따라야 하며 정확한 유전자를 이용한 진단에는 보다 많은 새로운 유전자들의 검색과 확인이 필요하다.
- [7] 특정 세포내에서 특정 유전자의 발현 빈도를 조사함으로써 대장암 관련된 유전자의 발굴이 가능하며, 이를 통하여 대장암 진행의 분자적 메카니즘을 이해하게 되고, 나아가 대장암 진단 및 치료 타겟으로의 사용이 가능하게 될 것이다.
- [8] 한편, 현재 C1orf135(Chromosome 1 open reading frame 135, FLJ14264, AIBP, MGC2603) 유전자는 오로라 A-결합 단백질(aurora A-binding protein)을 코딩하는 유전자로 알려져 있고 DNA 손상에 반응하는 ATM 또는 ATR1의 기질로 역할을 함이 알려져 있으나 대장암과의 관련성에 대한 구체적인 연구결과는 알려져 있지 않다.
- [9]
- [10] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의

내용이 보다 명확하게 설명된다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명자들은 대장암 진단 및 약물 스크리닝에 사용되고 대장암 치료 타겟이 될 수 있는 유전자의 발견을 위하여 예의 연구 노력한 결과, 대장암 세포 내 C1orf135 유전자의 발현이 현저히 증가되며, 이를 억제하는 경우 대장암 치료 효능이 있다는 것을 알아냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 목적은 C1orf135(Chromosome 1 open reading frame 135) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 대장암 의심 환자의 생물학적 시료로부터 C1orf135 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 mRNA 발현수준 또는 단백질 발현수준과 비교하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 C1orf135 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성을 분석하는 단계; 및 (b) 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성이 시험물질을 처리하지 않은 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성에 비하여 억제되면 대장암 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 대장암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[19]

발명의 효과

[20] 본 발명에 따라 대장암에 특이적인 유전자를 제공하고 대장암의 전이 및 예후를 판단할 수 있는 진단 마커를 제공함으로써, 정확한 대장암 진단을 가능하게 하며, 대장암의 치료 및 예후관리에 유용하게 사용할 수 있다. 또한, 상기 유전자를 억제하는 대장암 특이적인 치료제를 제공함으로써, 부작용이 적은 바이오 신약 및 맞춤형 항암제의 개발을 가능하게 할 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 Illumina 48K 칩을 이용한 마이크로어레이 실험을 통해 66명의 대장암 임상 조직에서 C1orf135 유전자의 발현이 증가되었음을 나타내는 그림과 데이터 분석 결과이다.
- [23] 도 2는 16명의 대장암 환자 조직에서 C1orf135 유전자의 발현량의 변화를 RT-PCR을 통해 분석한 결과이다. GAPDH는 대조 유전자로 사용하였다.
- [24] 도 3은 대장암 세포주 및 정상 세포에서 C1orf135 유전자의 발현량의 변화를 Realtime-PCR 을 이용하여 정량적으로 분석한 결과이다. GAPDH를 대조 유전자로 사용하였다.
- [25] 도 4a는 C1orf135 유전자를 클로닝하는 과정을 나타낸다.
- [26] 도 4b는 C1orf135 유전자 과다발현에 의한 세포 성장 속도 변화를 나타낸 그래프와 세포의 성장 축진을 SRB 염색으로 조사한 그림이다.
- [27] 도 5a는 대표세포주로 대장암 세포주 KM12C를 선택하여 C1orf135 siRNA의 효과를 검증한 결과이다. C1orf135의 siRNA를 처리하여 실제 C1orf135 mRNA의 양이 감소되어 단백질이 감소됨을 보여준다.
- [28] 도 5b는 C1orf135의 siRNA를 처리한 경우 그에 따른 KM12C 세포의 성장 억제를 보여준다.
- [29] 도 6은 정상세포 및 대장암 세포주에서 siRNA의 처리에 의한 세포 성장 속도 저해 효과를 나타내는 그래프이다.

[30]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 C1orf135(Chromosome 1 open reading frame 135) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장암 진단용 조성물을 제공한다.
- [32] 본 발명에서 C1orf135 유전자는 AIPB라고도 불리는 유전자로서, 오로라 A-결합 단백질(aurora A-binding protein)을 코딩한다. C1orf135의 mRNA 서열은 서열번호 1에 표시된 것과 같고, 그 ORF 서열은 서열번호 2에 표시된 것과 같다. 서열번호 3은 C1orf135 유전자로부터 발현되는 단백질인 오로라 A-결합 단백질의 아미노산 서열을 표시한 것이다. 본 명세서에서 C1orf135 유전자라 함은 이들 유전자의 DNA 또는 mRNA를 말하며, DNA 또는 mRNA의 전부 또는 일부를 모두 포함하는 개념이다.
- [33] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 진단은 대장암 발병 여부를 확인하는 것이다.
- [34] 본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 대장암 세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로서, 정상 세포에 비하여 대장암을 가진 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드

또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 대장암 진단 마커는 정상 대장 조직의 세포에 비하여, 대장암 세포에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 C1orf135 유전자 및 이에 의해 코딩되는 단백질이다.

[35]

[36] 생물학적 시료 중의 유전자 발현수준은 mRNA 또는 단백질의 양을 확인함으로써 확인할 수 있다.

[37] 본 발명에서 mRNA 발현수준 측정이란 대장암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 대장암 마커 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로서, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[38] 상기 유전자의 mRNA의 발현수준을 측정하는 제제는 대장암 세포에서 발현이 증가하는 마커인 C1orf135의 발현수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것일 수 있다. C1orf135의 mRNA 서열(서열번호 1) 및 그 ORF 서열(서열번호 2)을 바탕으로 당업자는 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

[39] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에서는 C1orf135 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 대장암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[40] 본 발명에서 용어, "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 C1orf135 폴리뉴클레오타이드와

상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 대장암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [41] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[42]

- [43] 본 발명에서 단백질 발현수준 측정이란 대장암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 대장암 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [44] 상기 단백질의 발현수준을 측정하는 제제는 대장암 세포에서 발현이 증가하는 마커인 C1orf135 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것일 수 있다. C1orf135 유전자로부터 발현되는 단백질인 오로라 A-결합 단백질의 아미노산 서열(서열번호 3)을 바탕으로 당업자는 상기 단백질에 특이적인 항체를 디자인할 수 있다.

- [45] 본 발명에서 용어, "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 C1orf135 유전자로부터 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 보다

바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 본 발명의 대장암 진단 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[46]

[47] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트를 제공한다.

[48]

본 발명의 키트는 대장암 진단 마커인 C1orf135의 발현수준을 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 확인함으로써 마커를 검출할 수 있다. 본 발명의 키트에는 대장암 진단 마커의 발현수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[49]

상기 키트는 C1orf135 유전자와 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 대장암을 진단하는 원리를 이용할 수 있다. 상기 C1orf135 유전자와 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응의 확인은 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이(*in vitro* binding assay) 등을 이용할 수 있다. 즉, 상기 유전자의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산과 하이브리드화한 후 당 분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction), 서던 블로팅, 노던 블롯팅 등으로 이를 검출함으로써 대상자에서 상기 유전자가 과발현된 상태인지 또는 저발현된 상태인지 조사하면 대장암의 발생 여부를 판단할 수 있다.

[50]

또한, 상기 키트는 C1orf135 유전자로부터 발현된 단백질과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 대장암을 진단하는 원리를 이용할 수도 있다. 앞서 언급한 바와 같이, 상기 C1orf135 유전자는 대장암세포에서 특이적으로 발현이 증가하므로 상기 유전자의 과발현 여부를 조사하는 것뿐만 아니라, 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 과발현 여부를 조사하면 대장암을 진단할 수 있다. 본 발명의 대장암 진단용 키트에서 상기 단백질을 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-단백질, RNA-단백질, 단백질-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, ELISA(Enzyme

Linked Immunosorbent assay), 특이적 면역염색(histoimmunostaining), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 젤 분석 및 시험관 내 결합 에세이 (*in vitro* binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자들로부터 발현된 단백질의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산 또는 단백질과 하이브리드화한 후 당분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 웨스턴 블로팅(western blotting) 등으로 이를 검출함으로써 대상자에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지 조사하면 대장암의 발생 여부를 판단할 수 있다.

[51]

[52] 본 발명의 키트는 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 마이크로어레이, 유전자 증폭 키트 또는 면역분석(immunoassay)용 키트일 수 있다.

[53] 본 발명의 키트가 마이크로어레이인 경우, 상기 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다. 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 젤, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.

[54] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA 또는 RNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[55] 본 발명의 대장암 진단용 키트는 혼성화에 기초하여 실시할 수 있다. 이 경우, 상술한 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브가 이용된다.

[56] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 메스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는

것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, Nick 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 상기 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

- [57] 본 발명에서 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [58] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate) 등이다.

[59]

- [60] 본 발명의 키트는 바람직하게는 유전자 증폭 키트일 수 있다.
- [61] 본 발명에서 용어, "증폭"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification; TMA, WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication, WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences, 미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction(CP-PCR), 미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR), 미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification(NASBA), 미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.
- [62] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [63] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 원하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요구된다. 증폭 반응에 이용되는 모든

효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[64]

[65] 본 발명의 키트는 면역분석용 키트일 수 있으며, 본 발명의 대장암 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시될 수 있다.

[66] 본 발명에서 이용되는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 시판되는 것을 사용할 수도 있고 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수도 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 모노클로날 항체는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호올스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 컨쥬게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석할 수도 있고, 아니면 직접 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨쥬게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다.

[67] 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[68] 또한, 항원결합성을 갖는 것이면 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수항체도 포함된다.

[69]

[70] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 대장암 의심 환자의 생물학적 시료로부터 C1orf135 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 mRNA 발현수준 또는 단백질 발현수준과 비교하는 단계를 포함하는,

대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

- [71] 본 발명에서 용어, "생물학적 시료"는 대장암 발병에 의해 대장암 마커의 유전자 발현수준이 차이나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [72] 상기 생물학적 시료에서 mRNA 또는 이의 단백질을 분리하는 과정은 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있으며, 상기 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준은 다양한 방법으로 측정할 수 있다.
- [73] 상기 mRNA 발현수준의 측정은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 역전사효소 중합효소반응 또는 DNA 칩에 의한 것일 수 있다.
- [74] 상기의 역전사효소 중합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 대장암 진단 마커로 사용되는 유전자의 mRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 대장암 발생 여부를 간편하게 진단할 수 있다. 또한, 상기 DNA 칩은 상기 대장암 마커 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 대장암의 발병 여부를 판독할 수 있다.
- [75] 상기 단백질 발현수준의 측정은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 해당 단백질에 특이적인 항체를 이용하는 것일 수 있다. 상기 항체를 이용하여 항원-항체 복합체의 형성량을 비교함으로써, 대장암의 발병 여부를 진단할 수 있으며, 상기 항체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [76] 또한, 상기 단백질 발현수준의 측정은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩을 이용하는 것일 수 있다.
- [77] ELISA법을 이용하는 경우, ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을

인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출할 수 있다.

- [78] 대장암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용하는 경우, 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 이때 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 대장암 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커의 발현량과 대장암이 발병한 세포에서의 마커의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. 상기 발현수준은 마커 단백질의 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.
- [79] 대장암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 이용하는 경우, 정상 대장 상피 조직 및 대장암으로 의심되는 조직을 채취 및 고정한 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체를 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 검출라벨로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다.
- [80] 대장암 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 경우, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 대장암 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [81] 상기 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준과 대장암 의심환자에서의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 비교할 수 있고, 대장암 마커 유전자에서 mRNA 또는 이의 단백질로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여, 대장암 의심 환자의 실제 대장암 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [82]
- [83] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 C1orf135 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.
- [84] 본 발명의 억제학적 조성물에서 유효성분으로 포함되는 C1orf135 유전자의 발현 억제제는 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 C1orf135 유전자에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 microRNA일 수 있다.
- [85] 본 발명에서 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)으로서, 생체 내 뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를

달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다. 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 당분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 모이어티의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [86] 본 발명에서 상기 siRNA(small interfering RNA)는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법으로 사용된다. 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스가닥(C1orf135 mRNA 서열(서열번호 1)에 상응하는 서열)과 안티센스가닥(C1orf135 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 불일치(mismatch)(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 팽창/돌출(bulge)(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. siRNA 말단 구조는 C1orf135 유전자의 발현을 RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다. 상기 siRNA 분자는 이에 제한되지는 않으나, 전체 길이가 15 내지 30 염기, 바람직하게는 19 내지 21 염기일 수 있다.

- [87] 상기 siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다. siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/백터는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 출원 제2004/106567 및 2004/0086884호에서는 바이러스성 백터, 비바이러스성 백터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/백터를 제공하고 있다.

- [88] 본 발명에서 상기 shRNA(short hairpin RNA)은 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서, 타겟유전자 siRNA 염기서열의 센스가닥과 상보적인 안티센스가닥 사이에 3-10개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후, 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노 바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀 구조의 shRNA가 만들어지고 세포내의 다이서(dicer)에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타낸다.
- [89] 본 발명에서 상기 마이크로 RNA(microRNA)는 발생, 분화, 증식, 보존 및 아포토시스 등 다양한 생물학적 과정을 조절한다. 마이크로 RNA는 일반적으로 타겟 mRNA를 불안정하게 하거나, 번역을 방해함으로써 타겟 mRNA를 코딩하는 유전자의 발현을 조절한다.
- [90] 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 마이크로RNA를 지닌 발현 컨스트럭트/벡터에 유용한 조절 서열(예를 들어, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 그의 결합) 역시 당분야에서 공지된 내용으로부터 적절히 선택할 수 있으며, 상기 유전자의 발현 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 마이크로RNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다.
- [91] 본 발명의 억제학적 조성물에서 유효성분으로 포함되는 C1orf135 유전자로부터 발현된 단백질의 활성 억제제는 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 C1orf135 단백질에 특이적인 항체일 수 있다.
- [92] 상기 항체에 대하여는 상기에서 설명한 바와 같으며, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클로날 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수도 있고, 이는 당업계에 통상적인 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.
- [93]
- [94] 본 발명의 억제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가적으로 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 억제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 적당한 억제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 단백질의 활성 억제제가 항체일 경우 억제학적으로 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.
- [95] 상기 담체는 투여 방법에 따라 다르게 포함할 수 있으며, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의

경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다.

[96]

[97] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약제학적 조성물을 대장암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암의 치료 방법을 제공한다.

[98] 본 발명에서 상기 대장암 의심 개체는 대장암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 C1orf135 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 포함하는 약제학적 조성물을 대장암 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.

[99] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[100] 본 발명의 치료 방법은 상기 약제학적 조성물을 약제학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유효량은 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. 성인의 경우, 상기 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg-10mg/kg, 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 경우 0.01ng/kg-10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg-10mg/kg, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg-10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다.

[101]

[102] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성을 분석하는 단계; 및 (b) 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성이 시험물질을 처리하지 않은 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성에 비하여 억제되면 대장암 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 대장암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[103] 본 발명에서 상기 (a) 단계는 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성을 분석하는 단계로서, 상기 분석은 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 예컨대 RT-PCR, 노던

블로팅, cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 인 시투(in situ) 혼성화 반응, 방사능면역분석, 면역침전, ELISA, 웨스턴 블로팅 등을 이용하여 분석할 수 있다.

[104] 본 발명에서 용어, "시험물질"은 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성화에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 통상적인 선정방식에 따라 대장암 전이 억제제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별 물질이 될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 핵산, 단백질, 화학물질 및 천연 추출물을 포함할 수 있다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물일 수 있으며, 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

[105] 본 발명에서 상기 (b) 단계는 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성화가 시험물질을 처리하지 않은 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성화에 비하여 억제되면 대장암 치료제로 판단하는 단계로서, 상기 시험물질에 의하여 C1orf135 유전자의 발현 또는 C1orf135 단백질의 활성화가 하향 조절(down-regulation)되는 것을 측정하여 대장암 치료제로 판정할 수 있다.

[106] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은 대장암 고발현 유전자의 발현을 증진시키거나 단백질의 활성을 증진시키는 기능을 나타내는 시험물질 및 반대로 대장암 고발현 유전자의 발현을 억제시키거나 단백질의 활성을 억제시키는 기능을 나타내는 시험물질은, 전자의 경우, 시험물질에 대한 억제제를 개발함으로써 대장암치료제 후보물질이 될 수 있고, 후자의 경우는 대장암 치료제 후보물질이 될 수 있다. 이와 같은 대장암 치료제 후보물질은 이후의 대장암 치료제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 상기 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 대장암 치료제를 개발할 수 있다.

[107]

발명의 실시를 위한 형태

[108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[109]

[110] **실시예 1: 마이크로 어레이 실험에 의한 대장암 환자 임상조직에서의 C1orf135의 발현량 증가 효과 확인**

[111] 1-1. 대장암 임상조직의 준비

[112] 삼성의료원(서울, 대한민국)으로부터 66명의 대장암 환자의 대장암 조직과

정상 조직을 각각 입수하였다. 각각의 조직은 환자로부터 외과적으로 제거된 후, 분석 때까지 이를 액체질소에 보관하였다.

[113]

[114] 1-2. 총 RNA 분리

[115] 총 RNA는 QIAGEN 키트(RNeasy Maxi kit: cat #75162)를 사용하여 분리하였고, Experion RNA StdSens(Bio-Rad사) 칩을 이용하여 정량하였다. 우선 상기 대장암 임상조직과 정상조직을 적절한 크기로 자른 후, 150 μ l의 베타 멀캅토 에탄올을 첨가한 15 ml의 키트 내 분해 완충액에 용해시켰다. 여기에 15 ml의 70% 에탄올을 넣어 잘 섞은 후, 3000 g에서 5분간 원심분리하여 총 RNA를 막에 부착시켰다. 두 차례의 세척을 한 후 1.2 ml의 RNase가 없는 물을 첨가하여 총 RNA를 분리하였다.

[116]

[117] 1-3. 마이크로어레이 실시

[118] 상기 추출된 총 RNA를 Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit(Ambion사)를 이용하여 하이브리드화하였다. T7 Oligo(dT) 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하고, 바이오틴-UTP를 이용하여 인 비트로 전사를 실시하여 바이오틴이 표지된 cRNA를 제조하였다. 제조된 cRNA는 NanoDrop을 이용하여 정량하였다. 정상 대장 상피 세포 및 대장암 세포에서 제조된 cRNA를 Human-6 V2(Illumina사) 칩에 하이브리드화 하였다. 하이브리드화 후 비특이적 하이브리드화를 제거하기 위하여 Illumina Gene Expression System 세척액(Illumina사)을 이용하여 DNA 칩을 세척하였고 세척된 DNA 칩은 스트렙트아비딘-Cy3(Amersham사) 형광 염색약으로 표지하였다. 형광 표지된 DNA 칩은 공초점(confocal) 레이저 스캐너(Illumina사)를 이용하여 스캐닝하여 각 스팟에 존재하는 형광의 데이터를 얻어서 TIFF 형태의 이미지 파일로 저장하였다. TIFF 이미지 파일을 BeadStudio 버전 3(Illumina 사)으로 정량하여 각 스팟의 형광값을 정량하였다. 정량된 결과는 Avadis Prophetic 버전 3.3(Strand Genomics사) 프로그램으로 'quantile' 기능을 이용하여 보정하였다.

[119] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 대장암 환자의 암조직과 정상조직에서 측정된 C1orf135 유전자 발현 프로파일로, 고발현되는 경우 붉은색으로, 저발현되는 경우 녹색으로 나타내었다. C1orf135 유전자는 대장암 조직에서 발현량이 평균 6배 증가되었다. 이러한 결과를 통하여 C1orf135 유전자는 정상 대장 상피세포와 비교하여 발현차이를 크게 나타내므로, 대장암 진단, 약물 스크리닝, 또는 치료타겟 등으로 사용할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도 1은 66개의 대장암 조직 중 64개의 대장암 조직에서 평균 4배 이상의 C1orf135 유전자 발현이 정상조직에 비해 증가되었음을 나타내고 있다.

[120]

[121] **실시예 2: 개별 임상시료에서의 대장암 진단용 유전자 발현 확인**

[122] 66쌍의 대장암 임상환자 샘플(실시예 1의 66쌍의 암 환자로 부터 채취한

암조직(T1-T66)과 정상조직(N1-N66)) 중 임상 2기에 해당하는 환자조직 17쌍(T1-T17 및 N1-N17)을 이용하여 실시예 1에서 확인된 C1orf135 유전자의 발현량을 RT-PCR 방법을 통하여 분석하였다. 실시예 1의 방법을 통하여 총 RNA를 분리하였다.

[123]

[124] 2-1. c-DNA 합성과 주형의 농도 보정

[125] 시료 각각의 총 RNA 2 μ g, 프라이머인 50 μ M 올리고(dT) 1 μ l와 10 mM dNTP 2.5 μ l를 넣고 RNase 저해제인 DEPC(diethyl pyrocarbonate)가 들어 있는 멸균수로 전체가 25 μ l가 되도록 하여 RNA/프라이머 혼합용액을 만들었다. 65°C에서 5분간 반응시킨 후 55°C로 옮겨 보관하였다. 그 다음 10X RT 완충액 5 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 10 μ l, 0.1M DTT 5 μ l, RNase 억제제 1 μ l 및 SuperScriptIII RT 효소 1 μ l를 넣고 전체가 25 μ l가 되도록 한 후 55°C에서 보관 중인 RNA/프라이머 혼합용액과 섞어준 후, 55°C에서 50분간 반응시켰다. 그 후 85°C에서 5분간 반응시켜 RT 효소를 불활성화 한 후 얼음에 넣어 반응을 종결시켰다. 마커유전자를 정량하기 위한 표준 유전자로서 GAPDH를 사용하였다. 표준 유전자의 프라이머를 이용하여 RT-PCR 반응을 수행하고 표준 유전자 GAPDH의 발현량이 동일해지도록 cDNA의 농도를 보정하였다. 우선 각각의 cDNA를 20배 희석한 후 희석된 샘플 2 μ l를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 2X PCR premix(Hot start) 15 μ l, 2 μ l의 GAPDH 5' 프라이머, 2 μ l의 3' 프라이머 및 11 μ l의 증류수를 넣어 사용하였고 20 사이클, 23 사이클 및 25 사이클을 수행하였다. 이때 RT-PCR 반응 조건은 94°C 30초, 50°C 30초 및 72°C 1분으로 수행하였으며, 산물의 크기는 457 bp이었다. 사용된 GAPDH 프라이머는 N-말단 5'-TCATGACCACAGTCCATGCC-3'(서열번호 6), C-말단 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'(서열번호 7)이었다. PCR 산물을 2% 아가로스 젤에 로딩하여 전기영동한 후 젤 사진을 찍고, 이미지를 TotalLab v1.0 프로그램(Nonlinear Dynamix사)으로 정량한 후, 다시 보정하여 PCR을 수행하여 정량하는 방식으로 각 시료의 농도를 동일하게 보정하였다.

[126]

[127] 2-2. RT-PCR을 이용한 발현량 분석

[128] 동일한 양이 되도록 희석한 cDNA를 C1orf135 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 하였다. cDNA 는 3 μ l, 2X premix 10 μ l, 프라이머 각 2 μ l(20 pmole) 및 증류수 2 μ l를 섞어 총 용액 20 μ l로 만들고 PCR 반응은 94°C 1분, 54°C 30초 및 72°C 1분으로 하였으며 35 사이클을 수행하였다. PCR 산물을 확인하기 위하여 2% 아가로스 젤을 이용하여 전기영동하고 이미지 장비를 이용하여 분석하였다. Realtime RT-PCR은 Qiagen사(CA, USA)의 DNASYBRI 시약과 LightCycler(Roche)를 이용하였다. Melt Curve 분석을 이용하여 PCR 산물의 질을 평가하였고 유전자 발현량은 LightCycler 버전 3.5 소프트웨어(Roche)를 사용하여 분석하였다.

[129] 상기 RT-PCR에서 사용한 C1orf135 특이적 프라이머는 다음과 같다. N-말단 프라이머 5'-AGAAAAAGGGGATTCTGCCA-3'(서열번호 4), C-말단 프라이머 5'-CTACGGCTTTGTTTCACCGA-3'(서열번호 5). 그 결과를 도 2에 나타내었으며, 사진에서 N은 정상조직(Non-tumor 조직)을 의미하며, T는 그에 해당하는 대장암 조직을 의미한다. 그 결과, C1orf135 유전자는 확연히 대장암 시료에서 고발현되는 것을 확인함으로써, C1orf135 유전자는 대장암의 진단 또는 약물스크리닝 등을 위한 대장암 마커 또는 치료 타겟 등으로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[130]

[131] 실시예 3: C1orf135 유전자의 대장암 세포주에서의 발현량 증가 효과 확인

[132] 유전자의 암 관련성을 추정하는 간단한 방법은 암조직 또는 암세포주에서의 해당 유전자의 발현량의 변화를 비교하는 것이다. 정상 세포에 비해 암세포주에서 다량 발현되어 있는지 또는 감소되어 있는지 비교하여 암 생성 및 진행에 따른 발현량과의 관계를 조사하여야 한다. 이를 위해서는 대장암 세포주에서 실제 해당 유전자의 발현이 어떻게 나타나고 있는지 대장암 세포주에서 총 RNA를 추출한 후 해당 유전자의 올리고 뉴클레오타이드를 사용하여 RT-PCR 및 Realtime-PCR을 수행하여 각 유전자의 양을 정상 세포주와 비교하여 유전자의 세포 내 발현량을 확인하게 된다. 이에 본 발명에서는 C1orf135 유전자의 발현 정도를 대장암 세포주 및 정상 세포에서 mRNA 레벨을 분석하였다.

[133]

[134] 3-1. 대장암 세포주의 준비

[135] 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, GIBCO사), 페니실린(10000 U/ml)과 스트렙토마이신(10 mg/ml)을 첨가한 DMEM 혹은 RPMI1640(GIBCO) 배양액을 사용하였다. 대장암 세포주인 DLD-1(한국세포주은행), Colo205(한국세포주은행), SW480(ATCC), SW620(한국세포주은행), SNU-C1(한국세포주은행), SNU-C2A(한국세포주은행), KM12C(한국세포주은행), KM12SM(한국세포주은행), HT29(ATCC) 및 Hct116(한국세포주은행, KCLB)를 디쉬당 세포수가 1×10^6 이 되도록 접종하고 이를 37°C, 5% CO₂가 존재하는 배양기에서 배양하였다. 정상 세포주로는 IMR90(human fetal lung fibroblasts, ATCC#CCL-186)을 이용하였다. 대장암 세포주를 세포수가 1×10^6 이 되도록 접종하고 이를 37°C, 5% CO₂가 존재하는 배양기에서 배양하였다.

[136]

[137] 3-2. 총 RNA 분리

[138] 총 RNA는 QIAGEN 키트(RNeasy Maxi kit: cat #75162)를 사용하여 분리하였고, Experion RNA StdSens(Bio-Rad사) 칩을 이용하여 정량하였다. 세포를 원심분리하여 회수한 후 키트 내 분해 완충액 RLN(50 mM TrisCl, pH 8.0, 140 mM

NaCl, 1.5 mM MgCl₂ 및 0.5% NP-40) 1 ml에 베타 멀캅토 에탄올 10 μ l를 첨가하여 용해시켰다. 여기에 1 ml의 70% 에탄올을 넣어 잘 섞은 후, 3000 g에서 5분간 원심분리하여 총 RNA를 막에 부착시켰다. 두 차례의 세척을 한 후 100 μ l의 RNase가 없는 물을 첨가하여 총 RNA를 분리하였다.

[139]

[140] 3-3. c-DNA 합성 및 Realtime PCR 을 이용한 발현량 분석

[141] c-DNA는 실시예 2에서의 방법과 동일한 방법을 통하여 합성하였으며 주형의 농도 보정 과정도 실시예 2와 동일하게 수행하였다. 동일한 양이 되도록 희석한 cDNA를 C1orf135 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 Realtime-PCR을 하였다. Realtime RT-PCR은 Qiagen사(CA, USA)의 DNASYBRGreen I 시약과 LightCycler(Roche)를 이용하였다. Melt Curve 분석을 이용하여 PCR 산물의 질을 평가하였고 유전자 발현량은 LightCycler 버전 3.5 소프트웨어(Roche)를 사용하여 분석하였다. 사용한 C1orf135 특이적 프라이머는 실시예 2에서 사용한 프라이머와 동일하며, 단 컨트롤로 사용한 GAPDH는 Qiagen 프라이머(QT00079247)를 사용하였다. Realtime-PCR을 수행한 결과, C1orf135는 정상 세포주와 비교하여 많은 대장암세포 주에서 그 mRNA 발현 정도가 확실히 증가됨을 확인할 수 있었다(도 3). 이러한 결과는 C1orf135 유전자의 발현량 증가가 대장암 진단 지표 및 치료 타겟이 될 수 있음을 의미한다.

[142]

[143] 실시예 4: C1orf135 유전자의 클로닝

[144] Invitrogen의 인간 두뇌 c-DNA 라이브러리에서 PCR 기법을 이용하여 C1orf135 유전자를 증폭하였다. 이때, 정방향 프라이머 5'-TGCGGATCC ATGAGGCGGACAGGCCCGAG-3'(BamHI 효소 절단 부위 포함-밑줄, 서열번호 8) 및 역방향 프라이머 5'-ATGGATATC TTAGAATTGGTGTCTGATAAC-3'(EcoRV 효소 절단 부위 포함-밑줄, 서열번호 9)를 이용해 55°C에서 35 사이클로 pfu premix(iNtRON, Inc.)를 사용하여 PCR로 유전자를 증폭하였다. C1orf135 유전자의 DNA 밴드를 정제한 후 BamHI/EcoRV 제한효소로 자르고, pENTR3C 벡터에 클로닝하였다. DNA 시퀀싱(sequencing)으로 C1orf135 유전자의 염기서열(1071 bp)을 확인하고, Gateway 시스템(Invitrogen Corp. www.invitrogen.com)을 이용한 제조회사의 매뉴얼에 따라 클로닝을 하였다. C1orf135을 클론하기 위해 pENTR3C-C1orf135를 pDEST-Flag(Invitrogen Corp. www.invitrogen.com)와 LR 반응시켜 클로닝(cloning)하였다. 플라스미드 pENTR3C-C1orf135를 벡터 pDEST-Flag DNA와 함께 섞은 후 LR clonase II 효소 혼합물을 각각 첨가하고 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나고, 프로테나제 K를 첨가하고 37°C에서 10분간 배양하여 LR 반응을 끝낸 후, E. coli DH5 α 컴피턴트 세포에 형질 전환하여 pDEST-Flag-C1orf135 클론을 얻었다.

[145]

[146] 실시예 5: C1orf135의 과발현에 의한 세포 성장 속도 증가 효과 확인

[147] 정상세포주인 NIH3T3 섬유아세포(ATCC)를 5% 송아지 혈청(bovine calf serum)과 페니실린(10,000 단위/ml)-스트렙토마이신(10 mg/ml)의 혼합액(GIBCO, 15140)을 100배 희석한 DMEM 배지(GIBCO)에 1.4×10^5 세포/ml의 농도로 60 mm 디쉬에 5 ml 접종한 후 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 24시간 동안 배양하였다. C1orf135 플라스미드 DNA를 배양된 상기 세포에 트랜스펙션(transfection)하였다. 6시간 후 배지를 모두 제거하고 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 3회 씻어준 후, 5% 혈청이 든 배지로 갈아주었다. 트랜스펙션 후 24시간이 경과하면 0.5% EDTA-트립신을 처리하여 세포를 모아 혈구계수기(heamacytometer)로 세포수를 측정한 다음, 24 웰 플레이트에 1×10^5 세포/ml의 농도로 접종(seeding)하여 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 SRB(Sulforhodamine B) 분석을 할 때까지 배양하였다. 배양 후 12시간 마다 플레이트를 하나씩 꺼내어 SRB 분석 방법으로 세포성장율(cell growth rate)을 측정하였다. 비교를 위해 pDEST-플래그 벡터 DNA로 트랜스펙션하고 정상세포주인 상기 NIH3T3 세포주에 동일하게 처리하여 대조군으로 사용하였다. 그 결과를 도 4b에 나타내었다. 도 4b의 가로축은 시간을 세로축은 세포성장율(cell growth rate)을 나타내며, pDEST-Flag는 C1orf135 유전자가 없는 벡터를 트랜스펙션한 세포를 의미하고, pDEST-Flag-C1orf135는 C1orf135 유전자가 클론된 벡터를 트랜스펙션하여 C1orf135 단백질이 과발현된 세포를 의미한다.

[148] 그 결과, C1orf135 유전자가 과량 발현된 세포에서는 성장 속도가 약 30% 정도 증가하였는데, 이것은 C1orf135 유전자는 종양세포의 특징인 세포의 성장 속도를 증가시키는 것과 관련되어 있음을 나타낸다(도 4b). 이러한 결과는 C1orf135 유전자의 발현량 증가가 종양세포 진단 지표가 될 수 있음을 의미한다.

[149]

[150] 실시예 6: 대장암세포주에 siC1orf135의 도입에 따른 대장암세포주의 성장 억제 효과 확인

[151] 대장암세포 조직 또는 대장암세포주에서 다량 발현되는 유전자의 경우 siRNA 기법을 통해 유전자 발현을 억제하여 세포의 증식 속도에 변화가 있는지를 관찰할 수 있다. 이에 본 발명에서는 C1orf135에 대한 각각의 siRNA를 디자인하여 대장암 세포주에 도입한 후 해당유전자 mRNA 발현 저하에 따른 대장암세포주의 성장 속도의 변화를 관찰하였다. 8개의 대장암 세포주, DLD-1(한국세포주은행), Colo205 (한국세포주은행), SW480(ATCC), SW620(한국세포주은행), SNU-C1(한국세포주은행), SNU-C2A(한국세포주은행), KM12C(한국세포주은행) 및 KM12SM(한국세포주은행, KCLB)와 정상 세포주 IMR90(human fetal lung fibroblasts, ATCC#CCL-186)을 이용하였다.

[152]

[153] 6-1. KM12C 세포주를 이용한 siC1orf135에 의한 C1orf135의 mRNA 저해 효과 확인

[154] 먼저 C1orf135 및 대조군으로 사용할 siRNA를 디자인하여 합성하였다(삼천리 제약, 대한민국). 합성된 siRNA는 유전자 염기서열을 바탕으로 디자인된 19개 올리고뉴클레오타이드의 이중 리보핵산쇄에 단쇄의 2염기가 매달린 구조로 이루어져 있다. 대조군 siRNA(siControl)는 세포의 증식에 아무 영향을 미치지 않는 siRNA 실험의 음성대조군으로 사용되었다.

[155] 대장암 세포주 KM12C를 70% 컨플루언시로 배양 후, 하이퍼펙트 방법(Qiagen Co.)으로 siC1orf135(센스서열, 서열번호 10), siControl(센스서열, 서열번호 11)을 세포 내에 도입하여 72시간 동안 배양하며 형질 전환하였다. 각 세포에서 RNA를 추출하고 상기에서 상세히 기술한 바와 같이 RT-PCR을 수행하여 해당 유전자 mRNA가 감소되었음을 확인하고 웨스턴 블롯을 통한 단백질 발현을 분석하여 siRNA에 의한 유전자 발현 억제가 이루어졌음을 확인하였다(도 5a). siControl은 음성대조군을 나타낸다. siControl은 인간의 유전자와 상동성이 없는 시퀀스에 대한 siRNA로 타겟하는 부분이 없는 것을 보여준다. 각 세포를 SRB(Sulfur rhodamine B, Sigma Co.)로 염색하고 현미경을 통해 세포 성장에 큰 변화가 없는 siControl를 처리한 시료의 SRB 염색한 세포의 사진을 관찰함으로써 siC1orf135를 처리한 세포에서 성장 억제가 일어났음을 보여주고 있다(도 5b).

[156]

[157] 6-2. 다양한 대장암 세포주에서의 siC1orf135에 의한 성장 저해 효과 검증

[158] 좀 더 다양한 세포주에서 siRNA에 의한 세포 성장 저해 정도를 조사하기 위해 1.0×10^5 세포/ml의 농도로 24 웰 플레이트에 0.5 ml 접종(seeding)한 후 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 24시간 동안 배양하였다. 대조군 siRNA(Control siRNA)(센스서열, 서열번호 11)와 siC1orf135(센스서열, 서열번호 10)을 위의 방법대로 세포 내로 트랜스펙션한 후 72시간 동안 배양하며 siRNA에 의한 세포의 성장 억제 정도를 조사하였다. 각 세포를 SRB(Sulfur rhodamine, Sigma Co.)로 염색하고 컨트롤(control)인 siControl을 처리한 세포주를 기준으로, 세포의 성장 억제 정도를 비교하여 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6의 X축은 각 세포주를 나타내며, Y축은 상대세포성장비(Relative cell growth)를 나타낸다. 그 결과 대부분의 대장암 세포주에서 C1orf135의 유전자 발현 억제가 세포 성장 억제를 나타내었다. 이러한 결과는, C1orf135 유전자의 siRNA는 대장암 세포주의 성장 억제를 유발할 수 있으므로 C1orf135 유전자가 대장암 치료 타겟으로 활용 가능성을 의미한다.

[159] 표 1은 C1orf135 유전자에 대한 siRNA의 예를 보여준다.

[160] 표 1

[Table 1]

mRNA 내 siRNA 위치	서열	GC content	Indentity
794	CGUAGUCCAGUUUCUGUG UTT	0.47	19
850	GAGUCAACUUUUCACUGA ATT	0.37	19
807	CUGUGUUUUCCUGGGACA ATT	0.47	19
896	CACAACACUAGAGCUCCU UTT	0.47	19
261	CAGAAAGUCAGAUCAACA ATT	0.37	19
274	CAACAAAGAGUCCAAGAA ATT	0.37	19
668	CAGCCCUUAGGCAAGACU ATT	0.53	19
911	CCUUUUCAAGAUGUAACC ATT	0.37	19

[161]

[162] 이 상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[163]

산업상 이용가능성

[164] 본 발명에 따라 대장암에 특이적인 유전자를 제공하고 대장암의 전이 및 예후를 판단할 수 있는 진단 마커를 제공함으로써, 정확한 대장암 진단을 가능하게 하며, 대장암의 치료 및 예후관리에 유용하게 사용할 수 있다. 또한, 상기 유전자를 억제하는 대장암 특이적인 치료제를 제공함으로써, 부작용이 적은 바이오 신약 및 맞춤형 항암제의 개발을 가능하게 할 수 있다.

[165]

청구범위

- [청구항 1] C1orf135(Chromosome 1 open reading frame 135) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장암 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA의 발현수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 발현수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 키트는 마이크로어레이, 유전자 증폭 키트 및 면역분석(immunoassay)용 키트로 구성된 군으로부터 선택된 것인 키트.
- [청구항 6] (a) 대장암 의심 환자의 생물학적 시료로부터 C1orf135 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 유전자의 mRNA 발현수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 mRNA 발현수준 또는 단백질 발현수준과 비교하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 mRNA 발현수준의 측정은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것인 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 단백질 발현수준의 측정은 해당 단백질에 특이적인 항체를 이용하는 것인 방법.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 단백질 발현수준의 측정은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩을 이용하는 것인 방법.
- [청구항 10] C1orf135 유전자의 발현 억제제 또는 이의 단백질의 활성 억제제를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제제는 C1orf135 유전자에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 microRNA로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 단백질의 활성 억제제는 C1orf135

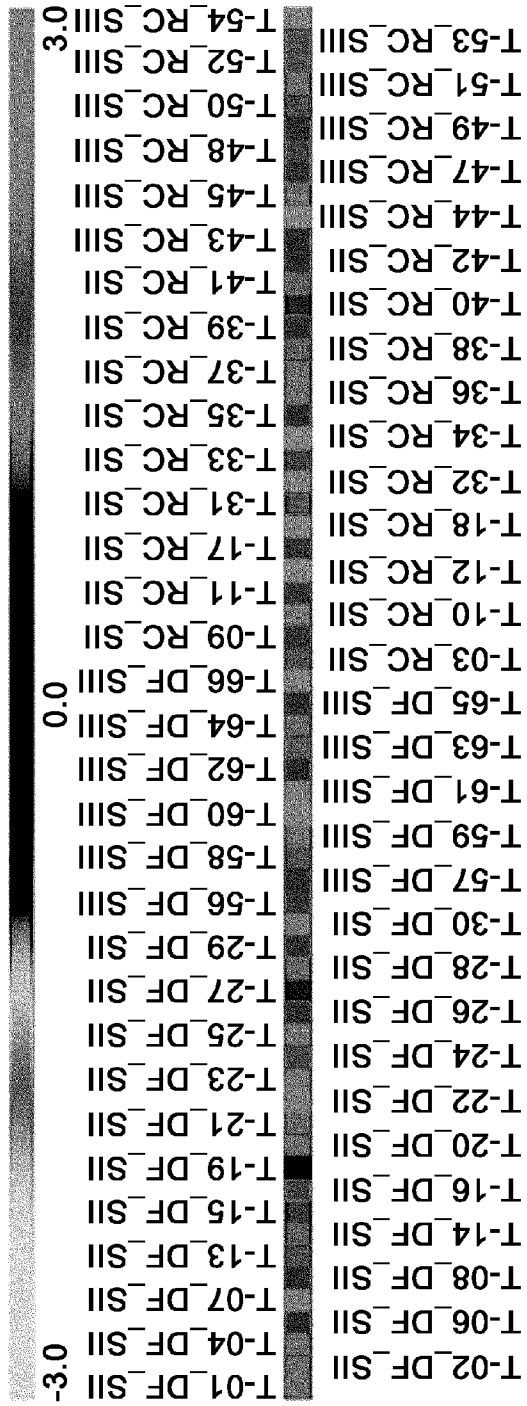
[청구항 13]

단백질에 특이적인 항체인 것인 조성물.

(a) 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성을 분석하는 단계; 및

(b) 시험물질을 처리한 후 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성이 시험물질을 처리하지 않은 C1orf135 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성에 비하여 억제되면 대장암 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 대장암 치료제의 스크리닝 방법.

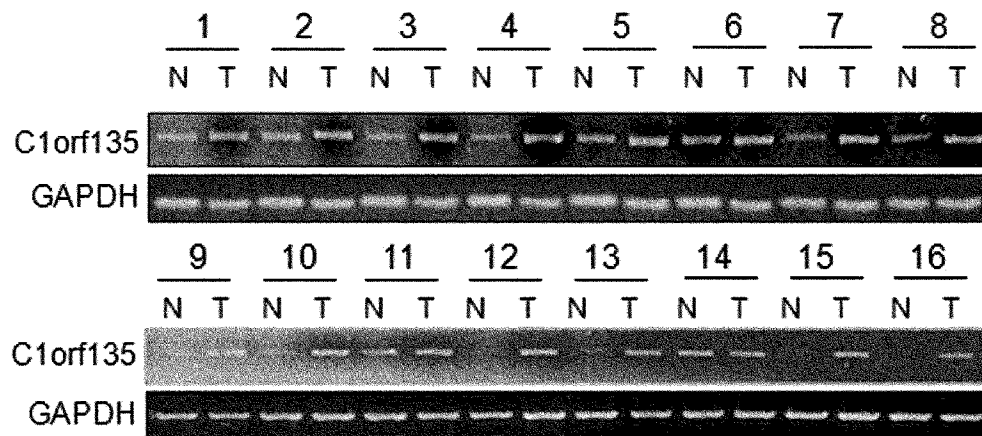
[Fig. 1]



ProbeID	ILMN_GENE	lo2FC	p_value	Num (log2FC >= 1): total 66 samples	Num (log2FC <= -1)
1030370	C1ORF135	2.125859	5.84E-26	64	0

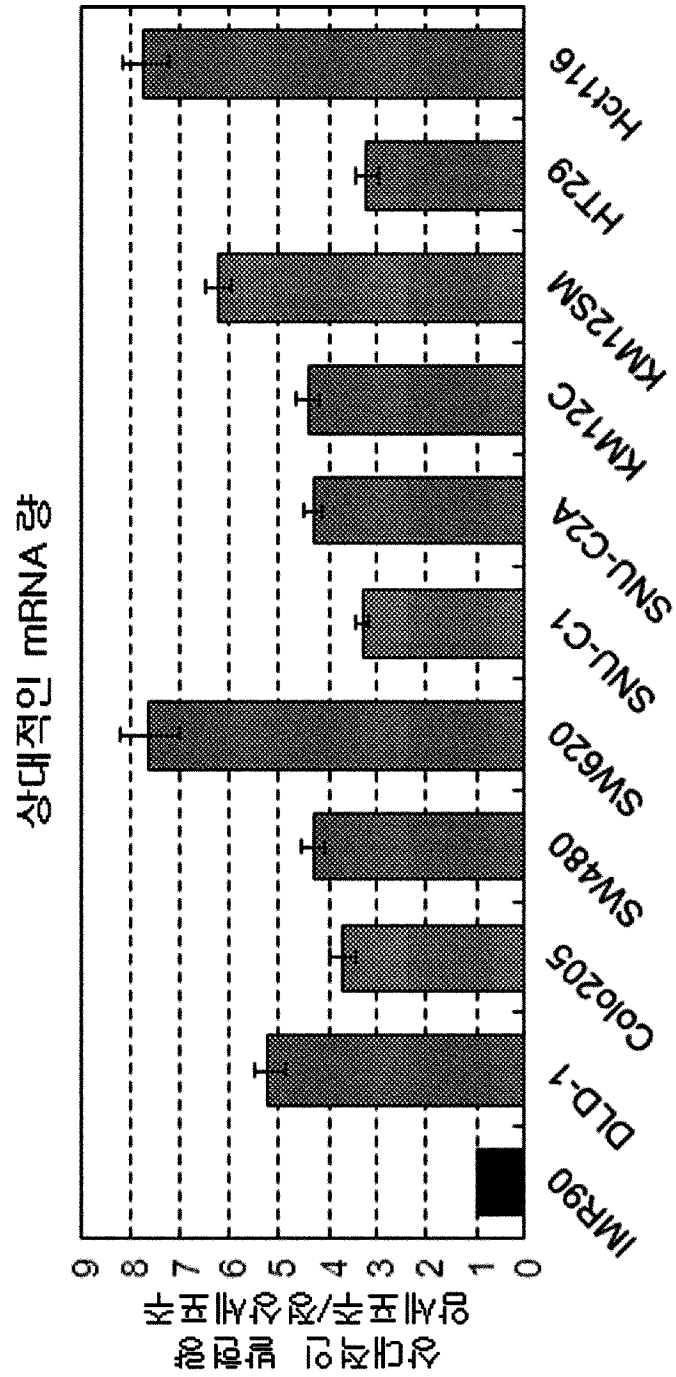
[Fig. 2]

대장암조직

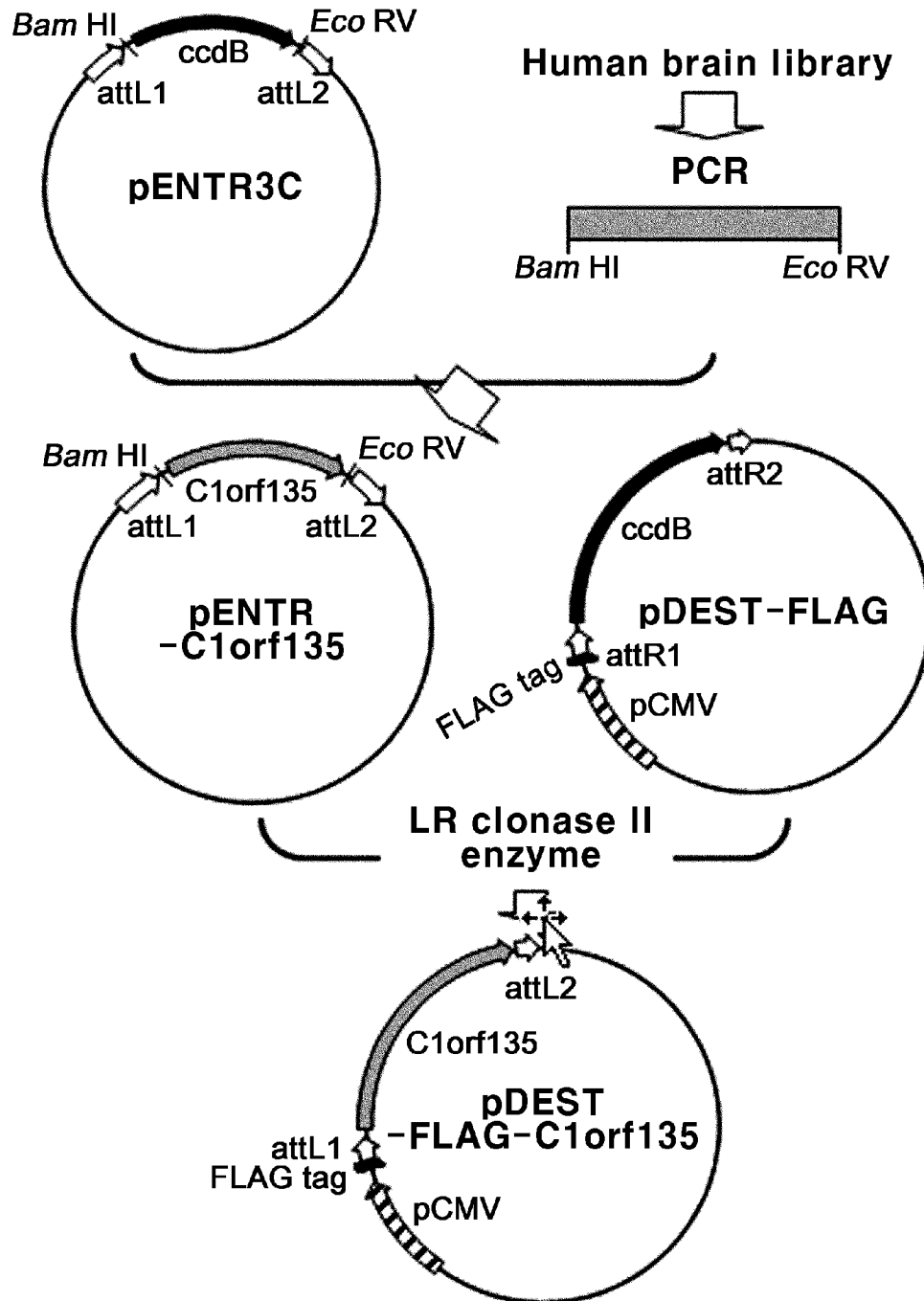


N: Non-tumor T: Tumor

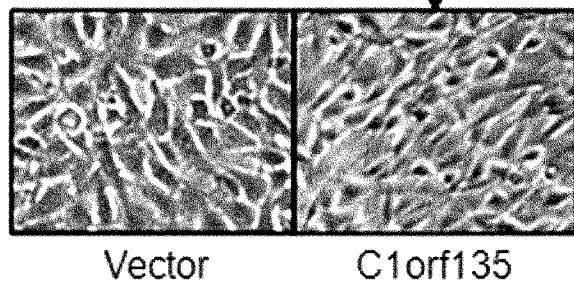
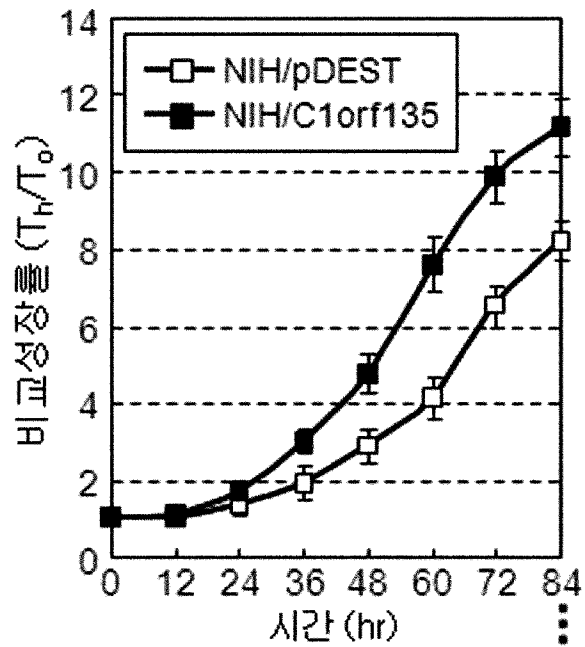
[Fig. 3]



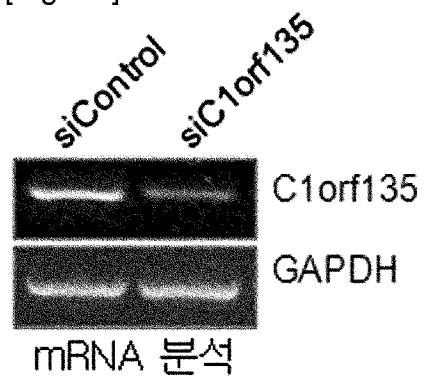
[Fig. 4a]



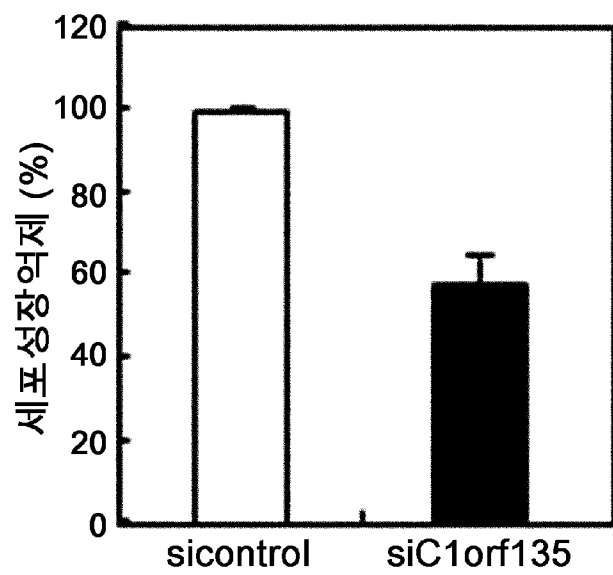
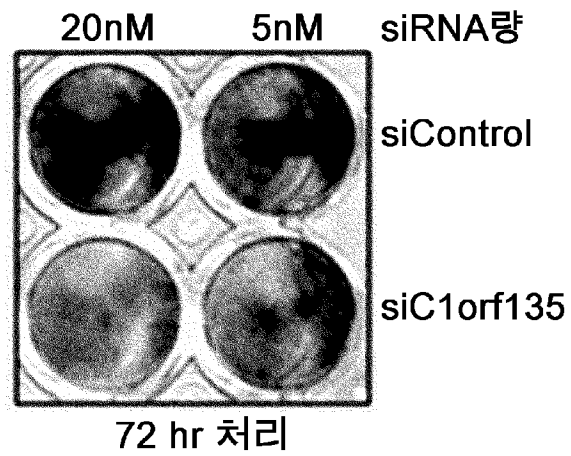
[Fig. 4b]



[Fig. 5a]



[Fig. 5b]



[Fig. 6]

