(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0079459
(43) 공개일자 2022년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/5377 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0170450
(22) 출원일자 2021년12월01일
심사청구일자 2021년12월01일
(30) 우선권주장
1020200168051 2020년12월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
주식회사 로젠바이오
서울특별시 성동구 뚝섬로1길 31 ,B102호(성수동1가,서울숲M타워)
(72) 발명자
박정우
울산광역시 중구 우정2길 45, 109동 302호 (우정동, 우정I'PARK)
조화자
울산광역시 남구 대학로145번길 66 (무거동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

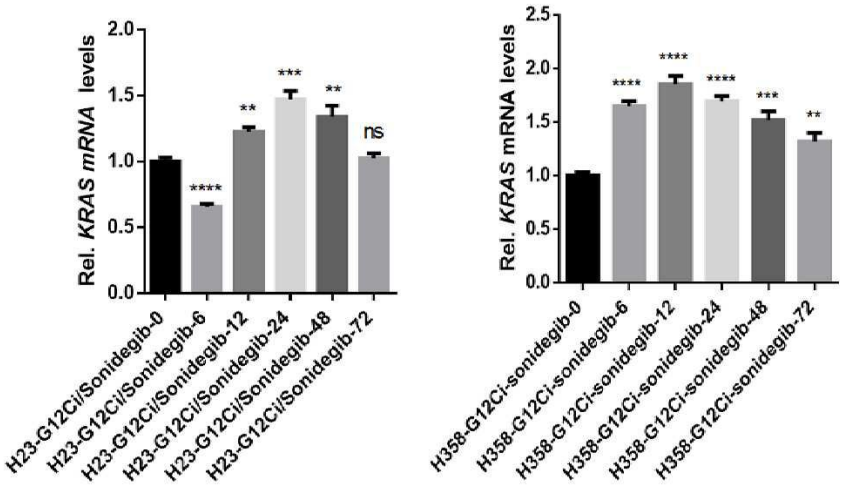
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **KRAS 억제제에 대한 내성 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 암의 치료에 있어서 표적항암제인 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 억제하기 위한 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생 억제용 약학적 조성물, 일차섬모 형성 억제제 및 돌연변이 KRAS 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 암의 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생 억제용 물질의 스크리닝 방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 돌연변이 KRAS 억제제 투여 후 암세포에서 나타나는 일차섬모의 형성을 억제하여 KRAS의 재발현을 억제하는 효과가 있으며, 이에 따라 돌연변이 KRAS 억제제를 투여한 암세포에서 나타나는 항암제 내성 발생을 방지할 수 있다.

대 표 도 - 도5b



(52) CPC특허분류
A61K 31/713 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자
이채영
울산광역시 동구 녹수12길 16, 2동 104호 (전하동,현대3단지아파트)
장지훈
전북 익산시 동서로15길 16, 잉꼬빌패스티발 302호(신동)
최성희
경상북도 예천군 보문면 미호길 152
전지홍
울산광역시 남구 월평로159번길 10, 203호(신정동, 대도아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425149203
과제번호	S2942410
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(R&D)
연구과제명	면역항암요법에 대한 DRG2 바이오마커
기 여 율	7/10
과제수행기관명	로켈바이오
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345318478
과제번호	2014R1A6A1030318
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	메타염증연구센터
기 여 율	3/10
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암의 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 일차섬모 형성 억제제는 SMO(smoothened) 억제제, 및 ARL6(ADP-ribosylation factor-like protein 6) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 SMO 억제제는 SMO에 대한 길항제(antagonist)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 SMO 억제제는 소니데깁(sonidegib), 비스모데깁(vismodegib), 글라스데깁(glasdegib), 탈라데깁(taladegib), 사리데깁(saridegib), 파티데깁(patidegib), 에리스모데깁(erismodegib), 사이클로파민(cyclopamine), 제르빈(Jervine), CUR61414, BMS-833923, PF-5274852, TAK-441, 및 MRT-92로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 ARL6 억제제는 ARL6 유전자의 발현 억제제인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 ARL6 유전자의 발현 억제제는 ARL6 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 및 PNA로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 ARL6 유전자의 발현 억제제는 TTP(tristetraprolin) 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는, 약학적

조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 TTP는 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되거나 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 TTP는 ARL6 mRNA의 3'-UTR(untranslated region)에 결합하여 상기 mRNA의 분해를 촉진하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 돌연변이 KRAS는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 KRAS에서 G12, G13, Q61, E63, K117, D119, 및 A146으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이 돌연변이된 KRAS인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 돌연변이 KRAS는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 KRAS에서 12번째 아미노산인 글라이신이 시스테인으로 치환된 돌연변이 KRAS인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 12번째 아미노산인 글라이신이 시스테인으로 치환된 돌연변이 KRAS에 대한 특이적 억제제는 AMG-510, MRTX849, MRTX1257, ARS-853, ARS-1620, ARS-3248, 및 LY3499446으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 암은 폐암(lung cancer), 유방암(breast cancer), 위암(stomach cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 대장암(colorectal cancer), 소장암(small intestine cancer), 담도암(cholangiocarcinoma), 신장암(kidney cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 난소암(ovary cancer), 요로암(urinary tract cancer), 및 흑색종(melanoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 일차섬모 형성 억제제는 KRAS의 활성 또는 돌연변이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 일차섬모 형성 억제제는 하기 특징 중 어느 하나를 만족하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물:

(a) GLI1, IFT88, PTCH1, ARL6, 및 phospho-ERK으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현을 억제 또는 감소; 및

(b) AURKA 유전자 또는 단백질의 발현을 촉진 또는 증가.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 조성물은 돌연변이 KRAS 억제제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는, KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은 KRAS 억제제 내성을 획득한 환자군인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

하기의 단계를 포함하는, KRAS 억제제 내성 억제용 물질의 스크리닝 방법:

(a) 후보 물질을 KRAS 억제제와 함께 암세포에 처리하는 단계;

(b) 상기 암세포에서 일차섬모 발현량을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 측정된 일차섬모 발현량이 KRAS 억제제만 처리한 대조군과 비교하여 감소된 후보 물질을 선택하는 단계.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 단계 (b)의 일차섬모 발현량을 측정하는 단계는 ARL6 유전자의 발현량 또는 SMO 수용체의 활성을 측정하는 단계인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암의 치료에 있어서, 표적항암제인 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 억제하기 위한 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 억제용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인간의 암세포에서 발견되는 돌연변이들 중 KRAS(Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) 돌연변이는 가장 높은 빈도로 발생하는 것으로 알려져 있다(*Cell* 2018 173: 321-337). KRAS 돌연변이는 다양한 부위에서 일어나는데, 그들 중 아미노산 잔기 12번의 글라이신이 시스테인으로 치환되는 돌연변이($KRAS^{G12C}$)가 가장 높은 빈도로 발생한다고 보고된 바 있다(*Clin Cancer Res* 2017 24: 334-340). KRAS 돌연변이가 일어나는 경우, KRAS는 항상 활성화된 상태로 존재하기 때문에 외부 성장호르몬의 신호가 존재하지 않는 상태에서도 지속적인 세포의 성장을 유도할 수 있다(*Nat Rev Cancer* 2018 18: 767-777). 이러한 KRAS 돌연변이는 다양한 종류의 암에서 발견되는데, 특히 폐암(lung adenocarcinoma) 환자의 13%에서 상기 돌연변이가 발견된다(*Cancer Discovery* 2017 7(8): 818-831). 따라서 많은 연구자들이 돌연변이된 KRAS의 활성을 억제하는 물질을 암의 표적치료제로서 개발하고자 노력을 거듭해 왔다. 그 결과, 암젠(AMGEN) 사에서 개발한 $KRAS^{G12C}$ 억제제 AMG 510(*Nature* 2019 575: 217-223), 미라티 테라퓨틱스(MIRATI Therapeutics) 사에서 개발한 $KRAS^{G12C}$ 억제제 MRTX849 등의 임상시험이 진행 중에 있다. 이외에도 웰스프링 바이오사이언스(Wellspring bioscience) 사에서 개발한 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620는 폐암세포의 성장을 억제할 수 있음이 확인되었다(*Cell* 2018 172: 578-589).

[0004] 상기와 같은 돌연변이 KRAS 억제제들은 돌연변이된 KRAS에만 특이적으로 결합하여 돌연변이 KRAS의 활성을 영구적으로 억제함으로써 암세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 초기에는 돌연변이 KRAS 억제제 처리에 따라 암세포들의 성장이 억제되다가도, 일정 시간이 지나면 돌연변이 KRAS 억제제에 적응한 세포들이 나타나면서 더 이상 돌연변이 KRAS 억제제에 의하여 성장이 억제되지 않는, 즉 내성을 지니는 암세포들이 출현하여 암환자의 치료에 사용되지 못하고 있다. 이를 해결하기 위하여 돌연변이 KRAS 억제제와 함께 EGFR 억제제, HER 억제제, ERK 억제제, AKT 억제제 등의 다양한 억제제를 병용 투여함으로써 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 억제하고자 하는 시도들이 계속되어 왔다(*The Innovation* 2020 1: 100035). 그러나 아직까지도 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성을 효율적으로 억제하는 조합을 찾지 못하여 실제 임상에서는 사용하지 못하고 있는 실정이다.

[0005] 최근의 연구 결과에 따르면, 돌연변이 KRAS 억제제에 의하여 성장이 억제된 암세포들 중 일부에서 새로이 KRAS 발현이 유도되고, 이로부터 세포 성장 신호가 활성화되어 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성을 갖게 됨이 확인되었다(*Nature* 2020 577: 421-425). 특히, 돌연변이 KRAS 억제제에 의하여 세포주기가 G1/G0 단계에 멈추어 있는 세포들 중에서 새로운 KRAS 발현이 유도되는 것이 확인된 것이다(*Nature* 2020 577: 421-425). 이와 같은 결과는 돌연변이 KRAS 억제제에 의하여 세포주기가 G1/G0 단계에 멈추어 있는 세포들이 어떠한 신호전달 체계를 통하여 새로운 KRAS의 발현을 유도하는지 밝혀내고, 이 신호전달을 억제함으로써 새로운 KRAS의 발현을 억제하면 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 막을 수 있음을 시사하는 것이다. 그러나 아직까지 돌연변이 KRAS 억제제 처리에 따라 세포주기가 G1/G0 단계에 멈추어 있는 세포들에서 어떤 기작을 통하여 새로운 KRAS의 발현이 유도되는지에 대하여는 전혀 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Xue JY, Zhao Y, Aronowitz J, Mai TT, Vides A, Qeriqi B, Kim D, Li C, de Stanchina E, Mazutis L, Risso D, Lito P. Rapid non-uniform adaptation to conformation-specific KRAS(G12C) inhibition. Nature. 2020 Jan;577(7790):421-425.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암의 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는, KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은 KRAS 억제제 내성을 획득한 환자군인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 KRAS 억제제 내성 억제용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암의 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는, KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은 KRAS 억제제 내성을 획득한 환자군인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, KRAS 억제제 내성 억제용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0018] (a) 후보 물질을 KRAS 억제제와 함께 암세포에 처리하는 단계;

[0019] (b) 상기 암세포에서 일차섬모 발현량을 측정하는 단계; 및

[0020] (c) 상기 측정된 일차섬모 발현량이 KRAS 억제제만 처리한 대조군과 비교하여 감소된 후보 물질을 선택하는 단계.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 일차섬모 형성 억제제는 SMO(smoothened) 억제제, 및 ARL6(ADP-ribosylation factor-like protein 6) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 SMO 억제제는 SMO에 대한 길항제(antagonist)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 SMO 억제제는 소니데깁(sonidegib), 비스모데깁(vismodegib), 글라스데깁(glasdegib), 탈라데깁(taladegib), 사리데깁(saridegib), 파티데깁(patidegib), 에리스모데깁(erismodegib), 사이클로파민(cyclopamine), 제르빈(Jervine), CUR61414, BMS-833923, PF-5274852, TAK-441, 및 MRT-92로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 ARL6 억제제는 ARL6 유전자의 발현 억제제일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 ARL6 유전자의 발현 억제제는 ARL6 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 및 PNA로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 ARL6 유전자의 발현 억제제는 TTP(tristetraprolin) 또는 이의 단편

일 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 TTP는 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되거나 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 TTP는 ARL6 mRNA의 3'-UTR(untranslated region)에 결합하여 상기 mRNA의 분해를 촉진할 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 돌연변이 KRAS는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 KRAS에서 G12, G13, Q61, E63, K117, D119, 및 A146으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이 돌연변이된 KRAS일 수 있다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 돌연변이 KRAS는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 KRAS에서 12번째 아미노산인 글라이신이 시스테인으로 치환된 돌연변이 KRAS일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 12번째 아미노산인 글라이신이 시스테인으로 치환된 돌연변이 KRAS에 대한 특이적 억제제는 AMG-510, MRTX849, MRTX1257, ARS-853, ARS-1620, ARS-3248, 및 LY3499446으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 암은 폐암(lung cancer), 유방암(breast cancer), 위암(stomach cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 대장암(colorectal cancer), 소장암(small intestine cancer), 담도암(cholangiocarcinoma), 신장암(kidney cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 난소암(ovary cancer), 요로암(urinary tract cancer), 및 흑색종(melanoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 일차섬모 형성 억제제는 KRAS의 활성 또는 돌연변이를 억제할 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 일차섬모 형성 억제제는 하기 특징 중 어느 하나를 만족할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0035] (a) GLI1, IFT88, PTCH1, ARL6, 및 phospho-ERK으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현을 억제 또는 감소; 및

[0036] (b) AURKA 유전자 또는 단백질의 발현을 촉진 또는 증가.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 돌연변이 KRAS 억제제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 또 다른 구현예에서 있어서, 상기 단계 (b)의 일차섬모 발현량을 측정하는 단계는 ARL6 유전자의 발현량 또는 SMO 수용체의 활성을 측정하는 단계일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 본 발명은 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, KRAS 억제제 내성 억제 방법을 제공한다,

[0040] 또한, 본 발명은 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 KRAS 억제제 내성 억제 용도를 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 KRAS 억제제에 대한 내성 억제 약제를 생산하기 위한 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제의 용도를 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0044] 또한, 본 발명은 KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료 약제를 생산하기 위한 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[0045] 또한, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은 KRAS 억제제 내성을

획득한 환자군인 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0046] 또한, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은 KRAS 억제제 내성을 획득한 환자군인 조성물의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료 약제를 생산하기 위한 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은 KRAS 억제제 내성을 획득한 환자군인 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 돌연변이 KRAS 억제제 투여 후 세포주기가 G1/G0 단계에 멈춰있는 암세포에서 나타나는 일차섬모의 형성을 억제하여 KRAS의 재발현, 활성, 돌연변이를 억제하는 효과가 있으며, 이에 따라 돌연변이 KRAS 억제제를 투여한 암세포에서 KRAS가 재발현하는 결과 나타나는 항암제 내성 발생을 방지할 수 있다.

[0050] 따라서 본 발명에 따른 항암제 내성 억제 기술을 바탕으로 돌연변이 KRAS 억제제와 일차섬모 형성 억제제를 병용함으로써 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생 없이 KRAS 변이를 지니고 있는 암환자를 치료할 수 있으므로, 현재까지도 내성 발생 문제로 인해 돌연변이 KRAS 억제제를 암환자의 치료제로 사용하지 못하였던 문제를 극복할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 H23(좌측 그래프) 및 H358(우측 그래프) 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 농도로 처리한 후 KRAS mRNA의 시간대별 발현량을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 H23 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 농도로 처리한 후 시간대별 총 ERK 및 인산화된 ERK 단백질의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 밴드 이미지이다.

도 3a 내지 도 3d는 H23(도 3a 및 도 3b의 좌측 그래프) 및 H358(도 3a 및 도 3b의 우측 그래프, 도 3c, 도 3d의 우측 그래프) 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 농도로 처리한 후 시간대별로 일차섬모의 형성 및 신호전달에 관여하는 GLI1(도 3a), IFT88(도 3b), PTCH1(도 3c), AURKA(도 3d의 우측 그래프)의 mRNA 발현량을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 또한, AURKA(도 3d의 좌측 이미지)의 단백질의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 밴드 이미지이다.

도 4a 내지 도 4d는 H23 및 H358 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제인 ARS-1620 10 μM과 SMO 억제제인 소니데깁 10 μM을 처리한 후 시간대별로 IFT88(도 4a), GLI1(도 4b), PTCH1(도 4c), 및 ARL6(도 4d)의 mRNA 발현량을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5a는 H23 및 H358 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 과 SMO 억제제인 소니데깁 10 μM을 처리한 후 시간대별로 ERK, 인산화된 ERK, IFT88, ARL6, GLI1 단백질의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 밴드 이미지이다.

도 5b는 H23 및 H358 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제인 ARS-1620 10 μM과 SMO 억제제인 소니데깁 10 μM을 처리한 후 시간대별로 KRAS mRNA의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 H358 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제인 ARS-1620 10 μM과 SMO 억제제인 소니데깁 10 μM을 처리한 후 콜로니 분석을 통해 일별로 암세포의 성장을 확인한 결과이다.

도 7은 H358 폐암세포주에 $KRAS^{G12C}$ 억제제인 ARS-1620 10 μM과 SMO 억제제인 소니데깁 10 μM을 처리한 후, 일차 섬모가 있는 세포의 수를 세어 섬모형성 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 8은 인간의 ARL6 mRNA 3'-UTR 염기서열에 존재하는 AU-풍부 요소(AUUUA, 붉은색으로 표시)를 확인한 결과이

다.

도 9는 유방암세포주 MCF7 및 MDA-MB231, 그리고 폐암세포주 A549, H1299 및 H1975를 대상으로 RT-PCR을 수행하여 TTP와 일차섬모의 형성에 관여하는 ARL6의 발현을 분석한 밴드 이미지이다.

도 10은 MDA-MB231 세포에서 TTP를 과발현 시킨 후 RT-PCR(좌측 밴드 이미지)과 qRT-PCR(우측 그래프)을 사용하여 TTP와 ARL6의 발현을 비교 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 11a 및 도 11b는 MCF7(도 11a) 및 A549(도 11b) 세포에서 TTP의 발현을 억제한 후 RT-PCR(각 도의 좌측 밴드 이미지)과 qRT-PCR(각 도의 우측 그래프)을 사용하여 TTP와 ARL6의 발현을 비교 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 리보핵산단백질 면역침강분석법을 사용하여 TTP가 ARL6의 3'-UTR에 결합함을 확인한 도이다.

도 13은 MDA-MB231 세포에서 psiCHECK-ARL6와 pcDNA6-V5/TTP를 공동 트랜스펙션 한 다음, 루시퍼레이즈 활성을 비교 분석한 결과로서, 좌측 그래프는 ARL6 mRNA 3'-UTR 야생형(ARL6-WT)을 포함한 벡터를 사용한 결과이고, 우측 그래프는 AUUUA 모티프를 AGCA로 돌연변이시킨 ARL6 mRNA 3'-UTR을 포함한 벡터를 사용한 결과이다.

도 14는 MDA-MB231 세포에서 TTP의 과발현에 따른 시간대별 ARL6 mRNA의 양을 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 본 발명은 돌연변이 KRAS 억제제 투여 후 암세포에서 나타나는 KRAS의 재발현을 막음으로써 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 억제하고, 이에 따라 암에 대한 치료 효과를 높이는 기술에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 암세포에 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제와 돌연변이 KRAS 억제제를 병용 투여함으로써 KRAS의 활성, 돌연변이, 및 재발현을 억제하고, 이에 따라 암세포에서 발생하는 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 억제하는 기술을 제공함에 그 특징이 있다.

[0054] 본 발명자들은 세포주기가 G1/G0 단계에 머물러 있는 세포들이 일차섬모를 생성하고, 상기 일차섬모에 의한 신호로부터 새로운 KRAS를 생성하여 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성이 발생할 가능성이 있다는 가설을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0055] 본 발명의 일 실시예에서는, $KRAS^{G12C}$ 억제제를 처리한 암세포에서 KRAS가 재발현되고 ERK가 재인산화됨을 확인하였으며, 나아가 일차섬모 형성 및 신호전달과 관련된 유전자인 GLI1, IFT88 및 PTCH1의 발현 수준이 증가함을 확인하였고, 일차섬모 관련 유전자인 AURKA의 발현 수준이 감소함을 확인하였다(실시예 1 및 2 참조).

[0056] 본 발명의 다른 실시예에서는, $KRAS^{G12C}$ 억제제 중 하나인 ARS-1620와 SMO(Smoothened) 억제제 중 하나인 소니데깁(sonidegib)을 병용 처리한 경우 일차섬모 형성 및 신호전달과 관련된 유전자인 GLI1, IFT88, PTCH1, ARL6의 발현 수준이 증가하지 않는 것을 확인하였고, ERK의 인산화가 감소하는 것도 확인하였으며, 나아가 KRAS의 재발현이 억제됨을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0057] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, $KRAS^{G12C}$ 억제제 중 하나인 ARS-1620와 SMO(Smoothened) 억제제 중 하나인 소니데깁(sonidegib)을 병용 처리한 경우, 암세포의 성장이 억제되는 것을 확인하였고, 섬모형성이 억제되는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0058] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 암세포에서 TTP(Tristetraprolin)와 ARL6(ADP-ribosylation factor-like protein 6)의 발현 양상 분석을 통해 TTP가 ARL6의 발현을 억제하며, 이는 TTP가 ARL6 mRNA의 3' UTR에 결합함으로써 상기 mRNA의 분해를 촉진하는 기작에 의한 것임을 밝혔고, 따라서 TTP는 일차섬모의 형성에 직접적으로 관여하는 ARL6 유전자를 직접 표적함으로써 일차섬모가 형성되는 것을 억제할 수 있음을 확인하였다(실시예 5 내지 9 참조).

[0059] 따라서 본 발명은 일차섬모(primary cilia) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암의 돌연변이 KRAS 억제제에 대한 내성 억제용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는, KRAS 억제제 내성 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0061] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 일차섬모 형성 억제제; 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 투여대상은

KRAS 억제제 내성을 획득한 환자군인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0062] 본 발명에 따른 조성물은 일차섬모가 형성되도록 하는 신호전달을 막음으로써 암세포에서 돌연변이 KRAS 억제제 처리 후 나타나는 내성 발생의 원인인 KRAS의 활성, 돌연변이, 재발현을 억제할 수 있으며, 일 양태로서 돌연변이 KRAS 억제제와 일차섬모 형성 억제제를 병용 투여함으로써 효율적으로 암을 예방하고 치료할 수 있다.

[0063] 본 명세서에서 사용된 용어 "KRAS(Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog)"는, RAS 수퍼패밀리 또는 RAS 유사 GTPase로 알려진 작은 구아노신 삼인산(GTP) 결합 단백질 그룹에 속하는 작은 GTPase 트랜스덕터 단백질로서, KRAS4A와 KRAS4B의 두 가지 스플라이스 변이체로 존재하며, 인간 세포에서는 KRAS4B가 우세한 형태이다. 야생형 KRAS의 아미노산 서열은 서열번호 29에 나타내었다.

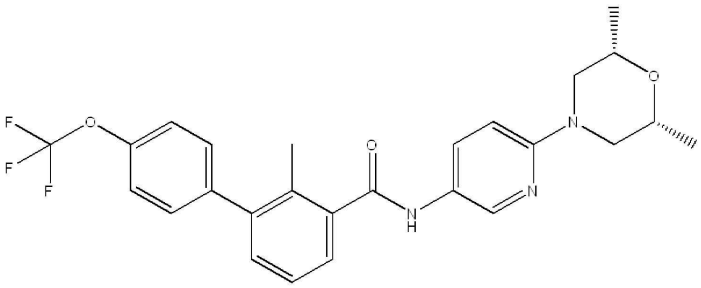
[0064] 본 발명에 있어서, 상기 일차섬모 형성 억제제는 일차섬모의 발현 또는 활성을 억제하며, SMO(smoothened) 억제제 및 ARL6(ADP-ribosylation factor-like protein 6) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 상기 SMO는 헤지혹 신호전달의 양성 조절자로서 작용하며, 세포 증식, 분화 및 배아 패턴 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 상기 ARL6는 ARF(ADP ribosylation factor) 계열의 GTP 결합 단백질로서, 단백질 수송, 막 수송 및 세포 신호전달에 관여한다고 알려져 있다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 SMO 억제제는 SMO에 대한 길항제(antagonist)일 수 있으며, SMO 유전자 또는 단백질의 발현을 억제할 수 있다. 이의 구체적인 예로서 소니데깁(sonidegib), 비스모데깁(vismodegib), 글라스데깁(glasdegib), 탈라데깁(taladegib), 사리데깁(saridegib), 파티데깁(patidegib), 에리스모데깁(erismodegib), 사이클로파민(cyclopamine), 제르빈(Jervine), CUR61414, BMS-833923, PF-5274852, TAK-441, MRT-92 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 일 실시예에서는 본 발명에 따른 SMO 억제제의 대표예로 소니데깁을 사용하였다. 상기 소니데깁은 $C_{26}H_{26}F_3N_3O_3$의 분자식을 갖는 소분자 화합물로서 하기 화학식 1의 구조를 갖는다.

[0069] [화학식 1]

[0070] 

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 ARL6 억제제는 ARL6 유전자의 발현 억제제일 수 있다.

[0073] 본 발명에서 "발현 억제"는 유전자의 전사 억제 및 단백질로의 번역 억제를 포함하는 의미이다. 또한, 유전자의 발현이 완전히 정지된 것뿐만 아니라 발현이 감소된 것도 포함한다.

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 ARL6 유전자의 발현 억제제는 ARL6 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 및 PNA로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 본 명세서에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0076] 본 명세서에서 사용된 용어, "shRNA 및 miRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개하기 위하여 주로 목적 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여, 상기 mRNA의 해독을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 상기 miRNA, siRNA 및 shRNA는 표적 유전자의 발현을 해독수준에서 억제할 수 있기 때문에, 효율적인 유전자 넉다운

(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법에 사용될 수 있다.

[0077] 본 명세서에서 사용된 용어, “리보자임”은 표적 RNA 분자 내 특정 뉴클레오타이드 서열을 인식하여 부위 특이적으로 절단시킴으로써 표적 유전자의 단백질 발현을 억제할 수 있다.

[0078] 본 명세서에서 사용된 용어, “PNA"는 핵산 모방체, 예를 들어, DNA 모방체를 의미하고, 여기에서 데옥시리보오스 포스페이트 백본은 슈도펩티드 백본으로 치환되고 단지 원래 4개의 뉴클레오염기가 유지된다. PNA의 중성의 백본은 낮은 이온성 강도의 조건 하에 DNA 및 RNA에 특이적인 하이브리드를 제공하는 것으로 알려져 있으며, 전사 또는 번역 억제를 유도하거나 복제를 억제하여 유전자 발현의 서열-특이적 조절에 대한 안티센스 또는 항원제제로서 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명에 있어서, 상기 ARL6 유전자의 발현 억제제는 TTP(tristetraprolin) 또는 이의 단편일 수 있다.

[0080] 본 명세서에서 사용된 용어 “TTP(Tristetraprolin)”는, ZFP36(zinc finger protein 36 homolog)이라고도 지칭되는 RNA 결합 단백질로 mRNA의 3'-UTR에 존재하는 AU-풍부 요소(AU-rich element, ARE)에 결합하여 mRNA의 분해를 촉진한다고 알려져 있다. TTP가 mRNA 3'-UTR의 ARE에 결합하면 RNA 분해 효소들이 모집되어 해당 mRNA의 분해가 촉진된다. 인간 유전자들 중 약 8% 정도가 mRNA 3'-UTR에 ARE를 지니고 있음이 확인되었는데, 이들은 세포의 성장 및 분화 등과 같은 다양한 역할을 담당하는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 TTP는 이와 같은 유전자들의 발현 조절을 통하여 세포의 성장 및 분화를 조절할 수 있다.

[0081] 본 발명자들은 오랫동안 TTP에 의한 유전자 발현 조절 연구를 수행하여 왔으며, 그 결과 TTP가 암세포에서 다양한 유전자들의 mRNA 분해를 촉진시킴으로써 암세포의 성장, 전이, 에너지 대사 등을 억제함을 보고/발표한바 있다. 계속하여, TTP에 의하여 mRNA의 분해가 촉진되는 유전자들을 스크리닝 하던 중 TTP가 일차섬모의 형성에 관여하는 ARL6 mRNA의 분해를 촉진함을 확인하였다. ARL6의 mRNA 서열은 여러 종류의 변이체(variants)가 존재하며, 본 명세서에 기재된 서열번호 3의 염기서열은 ARL6 mRNA 서열의 여러 변이체 중 한 종류이다. 상기 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ARL6 mRNA 뿐만 아니라 다른 모든 ARL6 mRNA 변이체가 본 발명의 조성물에 의해 억제되는 유전자에 포함된다.

[0082] 본 발명에 있어서, 상기 TTP는 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되거나 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 TTP는 TTP 단백질 전체뿐만 아니라 mRNA의 ARE 부위에 결합하여 해당 mRNA를 분해할 수 있는 활성을 갖는 것이라면 그의 단편도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0083] 또한, 본 발명에 있어서 상기 TTP는 ARL6 mRNA의 3'-UTR(untranslated region)에 결합하여 상기 mRNA의 분해를 촉진할 수 있다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 돌연변이 KRAS는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 KRAS에서 G12, G13, Q61, E63, K117, D119, 및 A146으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이 돌연변이된 KRAS일 수 있다. 상기에서 G12는 12번째 아미노산인 글라이신을, Q61은 61번째 아미노산인 글루타민을 의미하며, 다른 아미노산들도 마찬가지로 해석된다. KRAS 돌연변이는 G12, G13 및 Q61에서 가장 빈번하다고 알려져 있으며, 일례로 G12의 경우에는 글라이신이 시스테인, 발린, 아스파르트산, 알라닌, 세린, 아르기닌 등의 아미노산으로 치환된 돌연변이 KRAS가 보고된 바 있다. 이와 같이 KRAS에 돌연변이가 일어남으로써 KRAS는 항상 활성화된 상태로 존재하게 되고, 이에 따라 외부 성장호르몬의 신호가 없는 상태에서도 지속적인 세포의 성장이 유도되는 것이다.

[0085] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 돌연변이 KRAS는 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 KRAS에서 12번째 아미노산인 글라이신이 시스테인으로 치환된 돌연변이 KRAS일 수 있다. 또한, 상기 12번째 아미노산인 글라이신이 시스테인으로 치환된 돌연변이 KRAS에 대한 특이적 억제제는 AMG-510, MRTX849, MRTX1257, ARS-853, ARS-1620, ARS-3248, 및 LY3499446 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명에 따른 조성물의 작용 기작을 고려할 때, 현재 시판되고 있는 돌연변이 KRAS 억제제뿐만 아니라, 앞으로 개발될 모든 돌연변이 KRAS 억제제와의 병용 투여시 이에 대한 내성 발생을 억제할 수 있으므로, 상기 열거한 특정 돌연변이 KRAS 억제제로 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0087] 한편, 상기 AMG 510은 암젠(AMGEN) 사에서 개발한 $KRAS^{G12C}$ 억제제로서 임상시험에 대한 정보를 공개하고 있는 인터넷 사이트 'clinicaltrials.gov'에서 식별자 NCT03600883로 검색될 수 있으며, 미라티 테라퓨틱스 사에서 개발한 $KRAS^{G12C}$ 억제제 MRTX849는 식별자 NCT03785249로 검색될 수 있다.

[0088] 본 발명에 있어서, 상기 항암제는 표적 항암제, 면역 항암제 또는 화학 항암제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 돌연변이 KRAS 억제제를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 상기 KRAS 변이는 모든 인간 암에서 가장 흔하게 나타나는 종양 유전자 변이이다. 변이 발생률은 췌장암에서는 90%가 넘고, 대장암에서는 40%, 폐암에서는 30% 이상으로, 전체 전이성 암 7개 중 1개에서 발생하는 것으로 알려져 있다. 40년 가까이 KRAS 억제제 개발을 시도해 왔지만 아직까지도 표준 치료 이후 사용할 수 있는 표적치료제 옵션은 없다.

[0090] 본 발명에 있어서, 상기 암은 폐암(lung cancer), 유방암(breast cancer), 위암(stomach cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 대장암(colorectal cancer), 소장암(small intestine cancer), 담도암(cholangiocarcinoma), 신장암(kidney cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 난소암(ovary cancer), 요로암(urinary tract cancer), 및 흑색종(melanoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 열거한 암종은 KRAS 변이 발생이 보고된 암으로서, 이외에도 KRAS 변이가 발생되는 암이라면 그 종류에 관계없이 본 발명의 조성물이 적용될 수 있다.

[0091] 본 발명에 있어서, 상기 일차섬모 형성 억제제는 KRAS의 활성 또는 돌연변이를 억제할 수 있으며, 상기 일차섬모 형성 억제제는 KRAS의 발현 또는 재발현을 억제할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 본 발명에 있어서, 상기 일차섬모 형성 억제제는 하기 특징 중 어느 하나를 만족할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0093] (a) GLI1, IFT88, PTCH1, ARL6, 및 phospho-ERK으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현을 억제 또는 감소; 및

[0094] (b) AURKA 유전자 또는 단백질의 발현을 촉진 또는 증가.

[0095] 본 발명에 있어서, 일차섬모의 형성 과정에는 ARL6 및 IFT88(intraflagellar transport protein 88) 등의 단백질들이 일차섬모의 조립 및 유지에 관여한다. 상기와 같이 형성된 일차섬모는 다양한 신호전달 기작에 중요 역할을 수행하는데, 특히 헤지혹(Hedgehog) 및 PTCH를 통하여 SMO(Smoothened)가 활성화되고, SMO는 전사조절인자인 GLI1를 활성화시켜 Gli 자신을 포함하여 일차섬모 형성에 관여하는 유전자의 발현을 유도한다.

[0096] 본 발명에 있어서, AURKA(Aurora A kinase)는 섬모형성을 억제하는 역할을 수행한다. AURKA의 발현이 감소하면 섬모형성이 유도되고 이로 인하여, KRAS가 재발현 될 수 있다.

[0097] 본 발명에 있어서, KRAS 발현이 증가하면 발암성(oncogenic) 신호가 증가하여 하류(downstream)에 존재하는 ERK의 인산화가 증가하게 된다.

[0098] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 돌연변이 KRAS 억제제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0099] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 후보 물질을 KRAS 억제제와 함께 암세포에 처리하는 단계; (b) 상기 암세포에서 일차섬모 발현량을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 일차섬모 발현량이 KRAS 억제제만 처리한 대조군과 비교하여 감소된 후보 물질을 선택하는 단계를 포함하는, KRAS 억제제 내성 억제용 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0100] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)의 일차섬모 발현량을 측정하는 단계는 ARL6 유전자의 발현량 또는 SMO 수용체의 활성을 측정하는 단계일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0102] 본 발명은 또한, 일차섬모 형성 억제제의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, “약학적으로 허용되는 염”이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.

[0103] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하

여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0104] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0105] 한편, 본 발명의 조성물 내의 상기 일차섬모 형성 억제제의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0106] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0107] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0108] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0109] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0110] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜(PCG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0111] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0112] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0113] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0114] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0115] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩 톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0116] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제(TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0117] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0118] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0119] 본 발명에 따른 약학적 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 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0120] 본 발명에 따른 약학적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0121] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0122] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0123] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0124] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0125] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0127] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0129] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0131] **[실시예]**

[0132] **실시예 1. $KRAS^{G12C}$ 억제제를 처리한 암세포의 KRAS 재발현 및 ERK 재인산화 확인**

[0133] 먼저, 본 발명자들은 폐암세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제인 ARS-1620를 처리한 후 일정 시간이 지나면 KRAS가 재발현되며, ERK가 재인산화 된다는 이전의 보고(Nature 2020 577: 421-425)가 재현되는지 여부를 확인하였다. 이를 위하여 상기 연구에서 사용된 것과 동일한 폐암세포주인 H23 및 H358 세포를 한국세포주은행(KCLB, 대한민국)으로부터 구입하였으며, 이를 10% FBS(Welgene, 대한민국)가 포함된 DMEM(Welgene, 대한민국)을 사용하여 배양하였다. 구체적으로, 상기 세포를 세포배양용 접시(SPL20100)에 70% 빈도(confluency)로 접종하여 24시간 동안 배양한 후 $KRAS^{G12C}$ 억제제로서 ARS-1620(S8707, Selleckchem, 미국)를 10 μM 농도로 처리하였다. 이후 각각 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간이 경과한 시점에서 세포를 모아 TRIzol 시약(Invitrogen, 미국)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 상기 추출한 총 RNA 2 μg으로부터 M-MLV 역전사효소(Promega, 미국)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 대상으로 KRAS에 대한 PCR 프라이머와 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(QIAGEN, 독일)를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 대조군으로는 세포유지 유전자(Housekeeping gene)인 GAPDH를 사용하였다. 상기 KRAS 및 GAPDH를 증폭하기 위한 프라이머 서열은 아래와 같다:

[0134] KRAS, 정방향, 5'-TCG ACA CAG CAG GTC AAG AG-3' (서열번호 5);

[0135] KRAS, 역방향, 5'-CAA AGA AAG CCC TCC CCA GT-3' (서열번호 6);

[0136] GAPDH, 정방향, 5'-ACA TCA AGA AGG TGG TGA AG-3' (서열번호 7);

[0137] GAPDH, 역방향, 5'-CTG TTG CTG TAG CCA AAT TC-3' (서열번호 8).

[0139] 그 결과, 이전의 보고(Nature 2020 577: 421-425)에서와 같이 $KRAS^{G12C}$ 억제제의 처리 후 시간이 지남에 따라 KRAS mRNA의 생성이 점점 증가하여 48시간 및 72시간 째에 급격히 증가함을 확인하였다(도 1 참조).

[0140] 한편, KRAS 발현이 증가하면 발암성(oncogenic) 신호가 증가하여 하류(downstream)에 존재하는 ERK의 인산화가 증가하게 되는데, 이를 확인하기 위하여 H23 세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem)를 10 μM 농도로 처리한 후 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간이 경과한 시점에서 각각 세포를 모아 웨스턴 블롯팅을 이용하여 ERK의 인산화 변화를 분석하였다. 구체적으로, 상기 수집한 세포의 용해물(lysate)에 존재하는 단백질들을 SDS-PAGE를 사용하여 분리하고, 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리된 단백질들은 나이트로셀룰로스 멤브레인(10600001, Amersham, 영국)으로 전기이동(electrotransfer)시킨 후 항-ERK 항체(#9102, Cell Signaling Technology, 미국), 항-phospho-ERK 항체(#4376, Cell Signaling Technology) 및 항-β액틴 항체(A5441, Sigma)와 함께 반응시킨 다음 ECL 웨스턴 블롯팅 기질(Thermo Scientic, 미국)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

[0141] 그 결과, 역시 이전의 보고(Nature 2020 577: 421-425)에서와 같이 $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리 후 시간의 경과에 따라 초기에는 ERK의 인산화가 감소하다가 72시간이 경과된 시점에서 ERK 인산화가 급격하게 증가하는 것을 확인하였다(도 2 참조).

[0143] **실시예 2. $KRAS^{G12C}$ 억제제를 처리한 암세포의 일차섬모 관련 유전자 발현 증가 확인**

[0144] **2.1. GLI1, IFT88, 및 PTCH1의 발현 확인**

[0145] 본 발명자들은 상기 실시예 1을 통해 폐암세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 처리한 후 일정 시간이 지났을 때 KRAS가 재발현되며. ERK가 재인산화 됨을 확인하였다. 다음으로, 동일한 조건에서 일차섬모의 형성 및 신호전달과 관련된 유전자들의 발현 수준에 변화가 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 H23 및 H358 세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 농도로 처리한 후 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간이 경과된 시점에서 각각 세포를 수확하여 RNA를 추출하였고, 이로부터 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 대상으로 GLI1, IFT88, PTCH1 등의 일차섬모 관련 유전자들에 대한 PCR 프라이머, 그리고 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(QIAGEN)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였다. 상기 각 유전자의 RT-PCR을 위한 프라이머 서열은 하기와 같다:

[0146] GLI1, 정방향, 5'-TCC TCT GAG ACG CCA TGT TC-3' (서열번호 9);

[0147] GLI1, 역방향, 5'-CAG ACA GTC CTT CTG TCC CCA-3' (서열번호 10);

[0148] IFT88, 정방향, 5'-GCC GAA GCA CTT AAC ACT TAT-3' (서열번호 11);

[0149] IFT88, 역방향, 5'-GTC TAA TGC CAT TCG GTA GAA-3' (서열번호 12);

[0150] PTCH1, 정방향, 5'-CTC CTT TGC GGT GGA CAA-3' (서열번호 13);

[0151] PTCH1, 역방향, 5'-CCT CAG CCT TAT TCA GCA TTT C-3' (서열번호 14).

[0153] 실험 결과, H23 및 H358 세포주 모두에서 $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리 후 시간이 지남에 따라 일차섬모 신호전달에 의해 발현이 조절되는 전사조절인자 GLI1(도 3a), 일차섬모의 형성에 관여하는 IFT88(도 3b), 그리고 상기 GLI1의 표적 유전자인 PTCH1(도 3c)의 발현 수준이 모두 증가함을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터 $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리 후 일정 시간 지남에 따라 일차섬모의 형성 및 신호전달과 관련된 유전자가 활성화됨을 확인한 것이다.

[0155] **2.2. AURKA의 발현 확인**

[0156] 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 H358 세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 농도로 처리한 후 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간이 경과된 시점에서 각각 세포를 수확하여 RNA를 추출하였고, 이로부터 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 대상으로 섬모 형성을 억제하는 유전자인 AURKA에 대한 PCR 프라이머, 그리고 SYBR 그린 PCR 마스터믹스(QIAGEN)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 상기 각 유전자의 RT-PCR을 위한 프라이머 서열은 하기와 같다:

[0157] AURKA, 정방향, 5'-GCAACCAGTGTACCTCATCCTG-3' (서열번호 30);

[0158] AURKA, 역방향, 5'-AAGTCTTCCAAAGCCCACTGCC-3' (서열번호 31).

[0159] 또한, H358 세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 10 μM 농도로 처리한 후 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간이 경과된 시점에서 각각 세포를 수확하여 웨스턴 블롯팅을 이용하여 AURKA 발현을 분석하였다. 구체적으로, 상기 수집한 세포의 용해물(lysate)에 존재하는 단백질들을 SDS-PAGE를 사용하여 분리하고, 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리된 단백질들은 나이트로셀룰로스 멤브레인(10600001, Amersham, 영국)으로 전기이동(electrotransfer)시킨 후 항- AURKA 항체(#4718, Cell Signaling Technology), 및 항-β액틴 항체(A5441, Sigma)와 함께 반응시킨 다음 ECL 웨스턴 블롯팅 기질(Thermo Scientic, 미국)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

[0160] 실험 결과, H358 세포주에서 $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리 후 시간이 지남에 따라 섬모형성을 억제하는 AURKA의 발현 수준이 감소하는 것을 확인하였다(도 3d 참조). 상기 결과로부터, $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리 후 AURKA의 발현이 감소하며, 섬모형성이 유도되고 KRAS 재발현이 되어 $KRAS^{G12C}$ 억제제에 대한 내성이 생긴다는 점을 알 수 있다.

[0162] **실시예 3. $KRAS^{G12C}$ 억제제와 SMO(Smoothened) 억제제의 병용 처리에 의한 KRAS 재발현 억제 효과 확인**

[0163] **3.1. SMO 억제제의 일차섬모 관련 유전자 발현 억제 효과 확인**

[0164] 상기 실시예 2를 통해 폐암세포에 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620를 처리한 후 일정 시간이 지났을 때 일차섬모 관련 유전자들의 발현이 증가함을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 일차섬모의 형성에 중요한 역할을 하는 SMO(Smoothened)를 억제하는 경우, KRAS의 재발현이 억제되는지 여부를 확인하였다. 이를 위해, 먼저 SMO 억제제인 소니데깁(sonidegib)을 처리하였을 때 일차섬모 관련 유전자 발현 수준이 변화하는지 확인하였다. 구체적으로, H358 및 H23 세포에 10 μM의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem) 및 10 μM의 소니데깁(NVP-LDE225, Selleckchem)을 병용 처리한 후 0, 6, 12, 48 및 72시간이 경과한 시점에서 각각 세포를 수집하여 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 RNA를 추출하고, 이로부터 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 대상으로 일차섬모 관련 유전자 GLI1(서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머), IFT88(서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머), PTCH1(서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머), 및 ARL6(서열번호 17 및 18의 프라이머)에 대한 PCR 프라이머, 그리고 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(QIAGEN)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 대조군으로는 HSC70을 사용하였다.

[0165] 그 결과, $KRAS^{G12C}$ 억제제를 단독으로 처리하였을 때 증가하였던 GLI1, IFT88 및 PTCH1의 발현 수준이(상기 실시예 2 및 도 3a 내지 3c 참조), 소니데깁을 함께 처리한 세포에서는 상기 유전자의 mRNA 발현이 증가하지 않음을 확인하였다(도 4a 내지 도 4c 참조). 또한, 소니데깁을 함께 처리한 세포에서 ARL6의 mRNA 발현이 증가하지 않음을 확인하였다(도 4d 참조). 상기 결과는 $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리 후 일정 시간의 경과에 따라 활성화되는 일차섬모 관련 신호가 소니데깁에 의하여 억제됨을 확인한 것이다.

[0167] **3.2. SMO 억제제의 ERK 인산화 및 유전자 발현 억제 효과 확인**

[0168] 한편, KRAS 발현이 증가하면 발암성(oncogenic) 신호가 증가하여 하류(downstream)에 존재하는 ERK의 인산화가 증가하게 되는데, 이를 확인하기 위하여 H358 및 H23 세포에 10 Mm의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem) 및 10 μM의 소니데깁(NVP-LDE225, Selleckchem)을 병용 처리한 후, 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간이 경과한 시점에서 각각 세포를 모아 웨스턴 블롯팅을 이용하여 ERK의 인산화, IFT88, ARL6, 및 GLI1의 변화를 분석하였다. 구체적으로, 상기 수집한 세포의 용해물(lysate)에 존재하는 단백질들을 SDS-PAGE를 사용하여 분리

하고, 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리된 단백질들은 나이트로셀룰로스 멤브레인(10600001, Amersham, 영국)으로 전기이동(electrotransfer)시킨 후 항-ERK 항체(#9102, Cell Signaling Technology, 미국), 항-phospho-ERK 항체(#4376, Cell Signaling Technology), 항- IFT88 항체(#13967-1-AP, Proteintech), 항-ARL6 항체(#12676-1-AP, Proteintech), 항- GLI1 항체(# 2553, Cell Signaling Technology), 항-β액틴 항체(A5441, Sigma), 항-HSC70 항체(#200-301-A28, Rockland)와 함께 반응시킨 다음 ECL 웨스턴 블롯팅 기질(Thermo Scientic, 미국)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

[0169] 그 결과, 소니데닙과 병용처리한 경우, 시간의 경과에 따라 ERK의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다. 또한 IFT88, ARL6, 및 GLI1의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 5a 참조).

[0171] **3.3. SMO 억제제의 KRAS 재발현 억제 효과 확인**

[0172] 본 발명자들은 상기 실시예 3.1에서와 같이 $KRAS^{G12C}$ 억제제의 처리 이후 활성화되는 일차섬모 관련 신호전달을 억제하는 경우 KRAS의 재발현 또한 억제될 것이라고 추측하였다. 이에 따라, H358 세포에서 $KRAS^{G12C}$ 억제제와 소니데깁을 병용 처리하였을 때 일차섬모 관련 유전자의 발현이 억제된 결과 새로운 KRAS의 발현 또한 억제되는지 여부를 확인하기 위해, 상기 실시예 3에서와 같이 H358 및 H23 세포에 10 μM의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem) 및 10 μM의 소니데깁(NVP-LDE225, Selleckchem)을 병용 처리 후 0, 6, 12, 48 및 72시간이 경과한 시점에서 각각 세포를 수집하여 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 RNA 추출 및 cDNA 합성을 수행하였다. 합성한 cDNA를 대상으로 KRAS PCR 프라이머(서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머)와 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(QIAGEN)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0173] 그 결과, $KRAS^{G12C}$ 억제제를 단독으로 처리하였을 때에는 일정 시간이 경과한 후 다시 급격하게 증가하던 KRAS가(상기 실시예 1 및 도 1 참조), 소니데깁을 병용 처리한 경우에는 상기와 같은 KRAS의 재발현이 억제됨을 확인하였다(도 5b 참조). 상기 결과는 $KRAS^{G12C}$ 억제제의 처리 후 일정 시간이 경과한 뒤부터 활성화되는 일차섬모 관련 신호전달을 억제할 경우 $KRAS^{G12C}$ 억제제에 대한 내성 발생에 중요한 역할을 하는 KRAS의 재발현이 억제됨을 확인한 것이다.

[0175] **실시예 4. $KRAS^{G12C}$ 억제제와 SMO(Smoothened) 억제제의 병용 처리에 의한 암세포 성장 및 섬모형성 억제 효과 확인**

[0176] **4.1. SMO 억제제의 암세포 성장 억제 효과 확인**

[0177] 본 발명자들은 상기 실시예 3.3.에서 H358 세포에서 $KRAS^{G12C}$ 억제제와 소니데깁을 병용 처리하였을 때 새로운 KRAS의 발현 또한 억제되는 것을 확인하였는바, $KRAS^{G12C}$ 억제제와 소니데깁을 병용 처리하는 경우 암세포 성장 또한 억제할 것이라고 추측하였다. 이에 따라, 직경 35㎜ 세포배양 용기에 2 x 10^5의 H358 세포를 접종한 후 24시간 배양하였다. 이후 H358 세포에 10 μM의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem)의 단독처리, 및 10 μM의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem)과 10 μM의 소니데깁(NVP-LDE225, Selleckchem)을 병용 처리 후 0, 1, 2, 3, 5, 및 10일이 경과한 시점에 각각 콜로니 분석을 하였다. 콜로니 분석을 위하여 먼저 배양액을 제거한 다음 70% 에탄올에 2% 메틸렌블루(methylene blue)가 들어 있는 용액을 넣고 1시간 배양하였다. 메틸렌블루 용액을 제거한 다음 증류수로 세척 후 건조한 후 관찰하였다.

[0178] 그 결과, $KRAS^{G12C}$ 억제제를 단독으로 처리하였을 때에는 암세포의 성장이 약화되다가 다시 증가되는 반면, 소니데깁을 병용 처리한 경우에는 암세포의 성장이 억제됨을 확인하였다(도 6 참조). 상기 결과는 $KRAS^{G12C}$ 억제제의 처리 후 일정 시간이 경과한 뒤부터 활성화되는 일차섬모 관련 신호전달을 억제할 경우 암세포의 성장이 억제됨을 확인한 것이다.

[0180] **4.2. SMO 억제제의 섬모형성 억제 효과 확인**

[0181] 본 발명자들은 상기 실시예 3.1.에서 $KRAS^{G12C}$ 억제제와 소니데깁을 병용 처리하였을 때 일차섬모 관련 유전자인 GLI1, IFT88, PTCH1, 및 ARL6의 발현 수준이 증가하지 않음을 확인하였는 바, 암세포에서 섬모형성이 억제될 것이라고 추측하였다. 이에 따라, H358 세포에 10 μM의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem)의 단독처리, 및 10 μM의 $KRAS^{G12C}$ 억제제 ARS-1620(S8707, Selleckchem)과 10 μM의 소니데깁(NVP-LDE225, Selleckchem)을 병용 처리 후 72시간 경과한 시점에 배양액을 버리고 차가운 PBS로 3회 세척 후 3.7% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, Sigma)로 고정하였다. 세포를 0.2% 트리톤 X-100가 포함된 PBS로 처리 후, blocking solution(10 mM Tris-Cl pH 7.4, 100 mM MgCl2, 0.5% Tween 20, 3% BSA, 5% FBS)으로 blocking 한 다음 일차 섬모 마커인 아세틸화 튜불린에 대한 항체(#T7451, Sigma)로 염색하고, 공초점 현미경(confocal microscope)을 사용하여 일차 섬모가 있는 세포의 수를 세었다.

[0182] 그 결과, $KRAS^{G12C}$ 억제제를 단독으로 처리하였을 때 일차 섬모가 있는 암세포의 수가 증가하였던 반면, 소니데깁을 함께 처리한 경우에 일차 섬모가 있는 세포의 수가 감소한 것을 확인하였다(도 7 참조). 상기 결과는 $KRAS^{G12C}$ 억제제 처리로 암세포에서 섬모형성이 유도되지만, 소니데깁에 의하여 암세포의 섬모형성이 억제됨을 확인한 것이다.

[0184] **실시예 5. 암세포에서 TTP(Tristetraprolin)와 ARL6(ADP-ribosylation factor-like protein 6)의 발현 양상 분석**

[0185] 본 발명자들은 TTP가 일차섬모의 기능 및 신호전달 관련 유전자의 발현 조절과 연관성이 있는지 여부를 조사하기 위하여 상기 유전자들을 대상으로 mRNA 3'-UTR에 RRP 결합 부위인 ARE(AU-rich element, AUUUA)의 존재 여부를 스크리닝하였다.

[0186] 그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 일차섬모의 신호전달에 관여하는 ARL6(ADP-ribosylation factor like GTPase 6) mRNA의 3'-UTR에 여러 개의 AUUUA 서열들이 존재함을 확인하였다. 이들 중 특히 AUUUAUUUA 서열이 TTP의 표적일 가능성이 높다고 판단되었다.

[0187] 본 발명자들은 상기와 같이 일차섬모의 생성 및 신호전달 관련 유전자인 ARL6의 mRNA 3'-UTR에 TTP가 결합할 수 있는 모티프(motif)인 ARE가 존재함을 확인한 후, 여러 종류의 암세포를 대상으로 TTP와 ARL6의 발현 상관관계를 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 한국세포주은행(KCLB, 대한민국)에서 구입한 유방암세포주 MCF7 및 MDA-MB231, 그리고 폐암세포주 A549, H1299 및 H1975을 10% FBS(Welgene)가 포함된 DMEM(Welgene)을 사용하여 배양하였다. 상기 세포는 세포배양용 접시(SPL20100)에 70% 빈도로 접종하여 24시간 동안 배양한 후 세포를 모아 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. M-MLV 역전사효소(Promega)를 사용하여 2 μg의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성한 cDNA를 대상으로 TTP, ARL6 및 GAPDH에 대한 PCR 프라이머를 사용하여 반-정량적 PCR을 수행하였다. 상기 TTP 및 ARL6에 대한 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0188] TTP, 정방향, 5'-CGC GCT ACA AGA CTG AGC TA-3' (서열번호 15);

[0189] TTP, 역방향, 5'-AAG CTG ATG CTC TGG CGA AG-3' (서열번호 16);

[0190] ARL6, 정방향, 5'-GAT GGA AAG TCA CAA TAC AAG CTG-3' (서열번호 17);

[0191] ARL6, 역방향, 5'-TTC TGT ATC TTC CTT GAC CTG ACA-3' (서열번호 18).

[0193] 실험 결과, 상대적으로 TTP의 발현 수준이 높은 MCF7 및 A549 세포들에서는 ARL6 발현 수준이 매우 낮았으며, 이와는 반대로 TTP의 발현 수준이 상대적으로 낮은 MDA-MB231 및 H1975 세포들에서는 ARL6 발현 수준이 매우 높은 것으로 나타났다(도 9 참조). 이러한 결과는 암세포에서 TTP가 ARL6의 발현을 억제할 가능성이 높음을 확인한 것이다.

[0195] **실시예 6. 암세포에서 TTP의 발현이 ARL6 발현에 미치는 영향 분석**

[0196] 상기 실시예 5의 결과로부터, 암세포에서의 TTP가 ARL6의 발현을 억제할 가능성이 있음을 발견하였고, 이를 확인하고자 암세포에 TTP를 과발현시키거나 또는 발현을 억제하였을 경우 ARL6의 발현에 변화가 발생하는지 여부를 분석하였다. 이를 위하여, TTP의 발현 수준이 상대적으로 낮은 MDA-MB231 유방암세포를 배양용기에 접종하고 24시간 동안 배양한 다음, TurboFect™ 인비트로 트랜스펙션 시약(Thermo Scientific)을 사용하여 pcDNA6-V5/TTP 플라스미드(J Biol Chem 2010 285: 17329-17337)를 트랜스펙션 하였다. 대조군으로서 pcDNA6-V5 빈 벡터(empty vector)를 위와 동일한 방법으로 트랜스펙션 하였다. 또한, TTP를 상대적으로 높은 수준으로 발현하는 MCF7 및 A549 세포에 리포펙타민™ RNAiMAX(Invitrogen)를 사용하여 TTP에 대한 siRNA(small interfering RNA; TTP-siRNA; Santa Cruz Biotechnology, Inc., 미국)를 트랜스펙션 하였다. 대조군으로는 컨트롤 siRNA(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 사용하였다. 상기와 같이 트랜스펙션 후 24시간 동안 배양한 다음 세포를 수집하여 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. cDNA는 2 μg의 총 RNA로부터 M-MLV 역전사효소(Promega)를 사용하여 합성하였다. 상기 합성한 cDNA를 대상으로 TTP(서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머), ARL6(서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머), GAPDH(서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머)에 대한 PCR 프라이머를 사용하여 반-정량적 PCR을 수행하였다. 또한, 합성한 cDNA를 대상으로 TTP 및 ARL6에 대한 PCR 프라이머와 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(QIAGEN)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였다. 상기 TTP 및 ARL6에 대한 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0197] TTP, 정방향, 5'-TCT TCG AGG CGG GAG TTT TT-3' (서열번호 19);

[0198] TTP, 역방향, 5'-TGC GAT TGA AGA TGG GGA GTC-3' (서열번호 20);

[0199] ARL6, 정방향, 5'-GGC TTC AAG ATC AGA TCC AGA CT-3' (서열번호 21);

[0200] ARL6, 역방향, 5'-AAG GTC AGA GTC CAT AAA TGC AAG-3' (서열번호 22).

[0202] 실험 결과, pcDNA6-V5/TTP 플라스미드가 트랜스펙션된 세포는 TTP의 발현이 증가하였으며(도 10의 좌측 밴드 이미지 참조), 상기 TTP가 과발현된 세포를 대상으로 ARL6의 발현 수준 변화를 분석한 결과 대조군과 비교하여 ARL6 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(도 10 우측 그래프 참조).

[0203] 또한, TTP의 발현 수준이 상대적으로 높은 MCF7 유방암세포 및 A549 폐암세포에서 TTP의 발현을 억제시킨 결과, 두 세포 모두에서 ARL6 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다(도 11a 및 11b 참조). 상기와 같은 결과를 종합하면, TTP와 ARL6의 발현 수준은 상관관계가 있으며, TTP의 발현 증가에 따라 ARL6의 발현이 감소함을 나타내는 것이다.

[0205] **실시예 7. TTP가 ARL6 mRNA의 3'-UTR에 결합함을 확인**

[0206] 상기 실시예 6의 결과로부터 암세포들에서 TTP의 발현이 증가하면 ARL6 발현이 감소함을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 현상이 TTP가 ARL6 mRNA 3'-UTR에 존재하는 ARE에 결합하여 나타나는 현상인지를 확인하고자 하였다. 이를 위해, 먼저 인간 ARL6 mRNA 3'-UTR에 존재하는 ARE 모티프(AUUUAUUUA) 부분을 포함하는 올리고뉴클레오티드(ARL6-WT)와 상기 모티프의 AUUUAUUUA 서열을 AGCAGCA로 변환시킨 올리고뉴클레오티드(ARL6-M)를 각각 합성하였다(ST Pharm. Co., Ltd., 대한민국). 합성한 올리고뉴클레오티의 서열은 하기와 같다.

[0207] ARL6-WT, 정방향, 5'-TCG AGC TGA GAC TAA GTT AAG CTG AAT TTA TTT ATT CAG TGT ATG TTG AAC ATC GC-3' (서열번호 23);

[0208] ARL6-WT, 역방향, 5'-GGC CGC GAT GTT CAA CAT ACA CTG AAT AAA TAA ATT CAG CTT AAC TTA GTC TCA GC- 3' (서열번호 24);

[0209] ARL6-M, 정방향, 5'-TCG AGC TGA GAC TAA GTT AAG CTG AAG CAG CAT TCA GTG TAT GTT GAA CAT CGC-3' (서열번호 25);

[0210] ARL6-M, 역방향, 5'-GGC CGC GAT GTT CAA CAT ACA CTG AAT GCT GCT TCA GCT TAA CTT AGT CTC AGC-3' (서열번호 26).

[0212] 상기와 같이 합성한 올리고뉴클레오티드는 각각 psiCHECK2 레닐라/파이어플라이 이중-루시퍼레이즈 발현 벡터

(Renilla/Firefly dual-luciferase expression vector; Promega)의 XhoI/NotI 부위에 클로닝하여 psiCHECK2-ARL6-WT 및 psiCHECK2-ARL6-M을 제조하였다. TurboFect™ 인비트로 트랜스펙션 시약(Thermo Scientific)을 상기 제조한 psiCHECK2-ARL6-WT 또는 psiCHECK2-ARL6-M 플라스미드를 pcDNA6-V5/TTP와 함께 MDA-MB231 세포에 공동 트랜스펙션 한 후 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 1% 포름알데하이드로 배양한 후 단백질 분해 효소 억제제가 함유되어 있는 변형된 RIPA 버퍼(modified radioimmuneprecipitation assay buffer; Roche Applied Science, 독일)를 사용하여 파쇄하였다. 면역침강법은 항-V5 항체(Genwa Biotech, 미국)와 프로틴 G-아가로스(100004, Invitrogen)를 사용하여 수행하였고, 이를 통해 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 수득하였다. 대조군으로는 아이소타입 컨트롤(isotype control) 항체(Sigma)를 사용하였다. 상기 RNP에 존재하는 RNA로부터 cDNA를 추출하고 레닐라 루시퍼레이즈 특이적 프라이머를 사용하여 레닐라 루시퍼레이즈 유전자를 증폭하였다. RNP에 존재하는 TTP는 항-V5 항체를 사용한 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 상기 레닐라 루시퍼레이즈 특이적 프라이머의 서열은 하기와 같다.

[0213] 레닐라 루시퍼레이즈, 정방향, 5'-ACG TGC TGG ACT CCT TCA TC-3' (서열번호 27);

[0214] 레닐라 루시퍼레이즈, 역방향, 5'-GAC ACT CTC AGC ATG GAC GA-3' (서열번호 28).

[0216] 실험 결과, TTP는 ARL6 mRNA 3'-UTR에 결합함을 확인하였다(도 10 참조). 또한, ARL6 mRNA 3'-UTR에 존재하는 ARE 모티프 서열이 AGCAGCA로 돌연변이 된 ARL6에는 TTP가 결합하지 않음을 확인하였다(도 12 참조).

[0218] **실시예 8. TTP의 ARL6 발현 억제 효과 확인**

[0219] 상기 실시예 7의 결과로부터 TTP가 ARL6 mRNA 3'-UTR에 결합함을 확인하였고, 이에, 상기와 같은 결합이 ARL6 유전자의 발현 억제를 유발하는지 여부에 대해 확인하였다. 이를 위해, 상기 실시예 6에서와 같이 MDA-MB231 세포에 psiCHECK2-ARL6-WT 또는 psiCHECK2-ARL6-M 플라스미드를 pcDNA6-V5/TTP와 함께 공동 트랜스펙션하고, 24시간 동안 배양한 후 루시퍼레이즈 분석 시약(Promega)을 사용하여 세포를 용해시켜 마이크로플레이트 리더(microplate reader; SpectraMax L, Molecular Devices)를 사용하여 화학발광(chemiluminescent) 신호를 측정하였다. 각 시료들의 파이어플라이 루시퍼레이즈 활성은 레닐라 루시퍼레이즈 값으로 정규화하여 분석하였다.

[0220] 실험 결과, TTP를 과발현시킨 세포에서는 ARL6 mRNA 3'-UTR을 지니는 루시퍼레이즈의 활성이 감소함을 확인하였다(도 13 좌측 그래프 참조). 반면에 3'-UTR의 모티프 서열을 AUUUAUUUA에서 AGCAGCA로 돌연변시킨 ARL6 mRNA 3'-UTR을 지니는 루시퍼레이즈의 경우 TTP에 의한 발현 감소가 일어나지 않았다(도 13 우측 그래프 참조). 상기 결과는 TTP가 ARL6 mRNA 3'-UTR에 결합하여 유전자 발현을 감소시킴을 증명한 것이다.

[0222] **실시예 9. TTP에 의한 ARL6 mRNA의 분해 촉진 효과 확인**

[0223] 상기 실시예 7과 실시예 8의 결과로부터 TTP가 ARL6 mRNA 3'-UTR에 결합하여 유전자의 발현을 억제함을 확인하였다. 이와 같은 억제가 ARL6 mRNA의 분해를 촉진하여 나타난 결과인지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 6에서와 같이 MDA-MB231 세포에 pcDNA6-V5/TTP 또는 pcDNA-V5 빈 벡터를 트랜스펙션 한 다음 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포에 5 mg/ml의 액티노마이신 D를 처리한 다음 일정 시간 간격으로 세포를 수확하였다. 수확한 세포로부터 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 RNA를 추출한 후 M-MLV 역전사효소(Promega)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 상기 합성한 cDNA를 대상으로 ARL6(서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머), GAPDH(서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머) 및 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(QIAGEN)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. mRNA의 반감기는 그래프패드 프리즘 5.00 소프트웨어의 1상 지수감쇠모델(one-phase exponential decay model, nonlinear regression)을 사용하여 계산하였다.

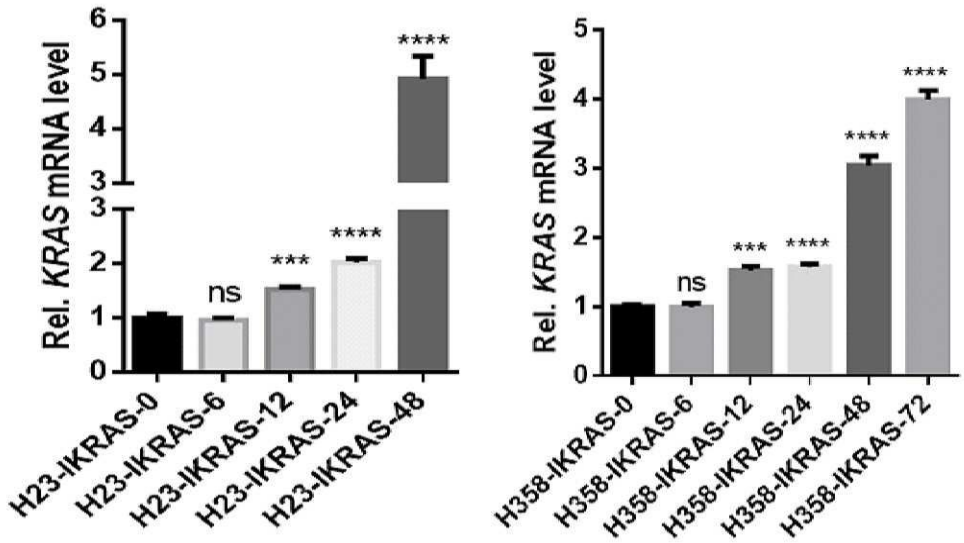
[0224] 그 결과, TTP가 과발현된 세포에서는 ARL6 mRNA의 분해가 증가함이 확인되었다(도 14 참조).

[0225] 상기 실시예 1 내지 9를 통해, 본 발명자들은 표적항암제인 KRAS 억제제에 대한 암세포의 내성 획득 기작을 밝히고, 이를 토대로 KRAS 억제제 투여시 일차섬모의 형성을 함께 억제함으로써 KRAS 억제제에 대한 내성 발생을 억제할 수 있음을 보였다. 따라서 다양한 종류의 돌연변이 KRAS를 표적하는 항암제를 이용한 암 환자의 치료에 있어서, 상기 항암제에 대한 내성이 발생하는 것을 방지하기 위해 본 발명에 따른 조성물이 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

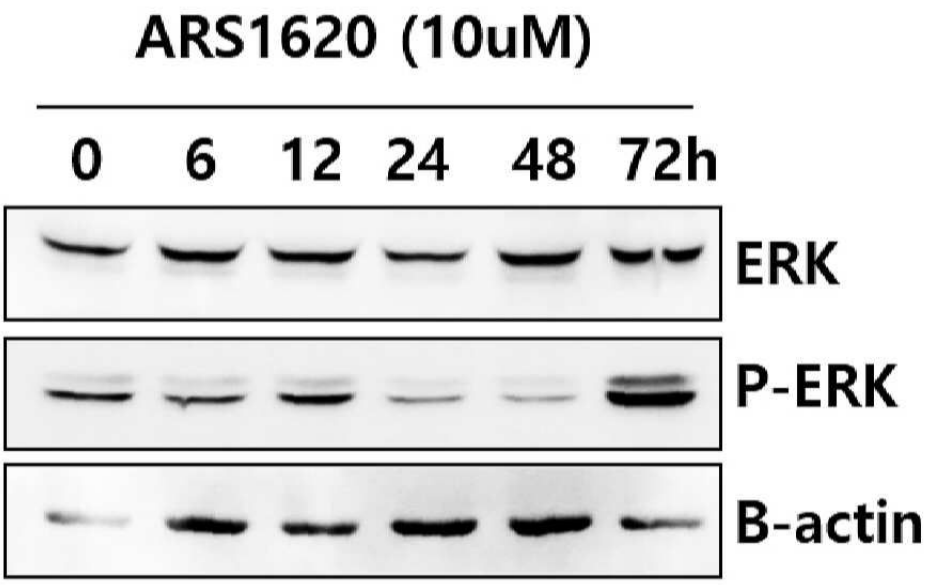
[0227] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

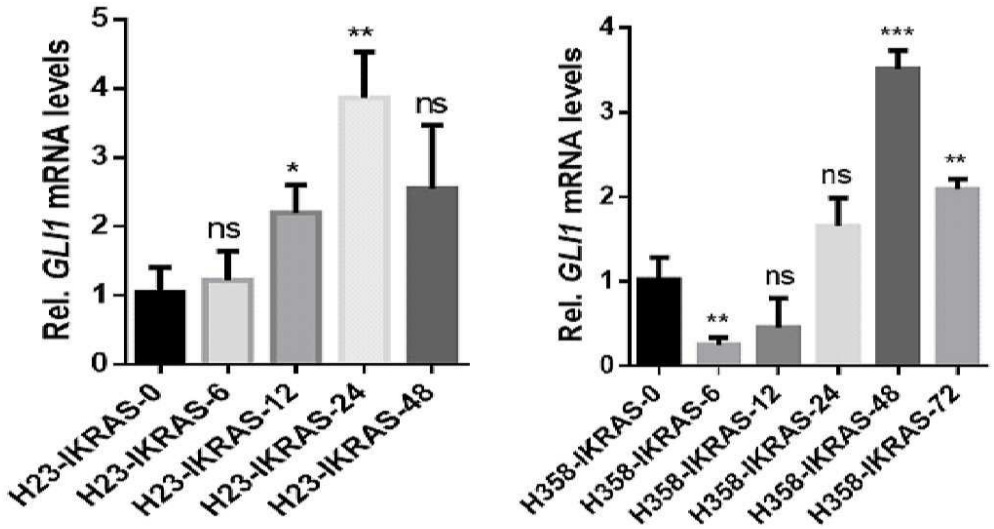
도면1



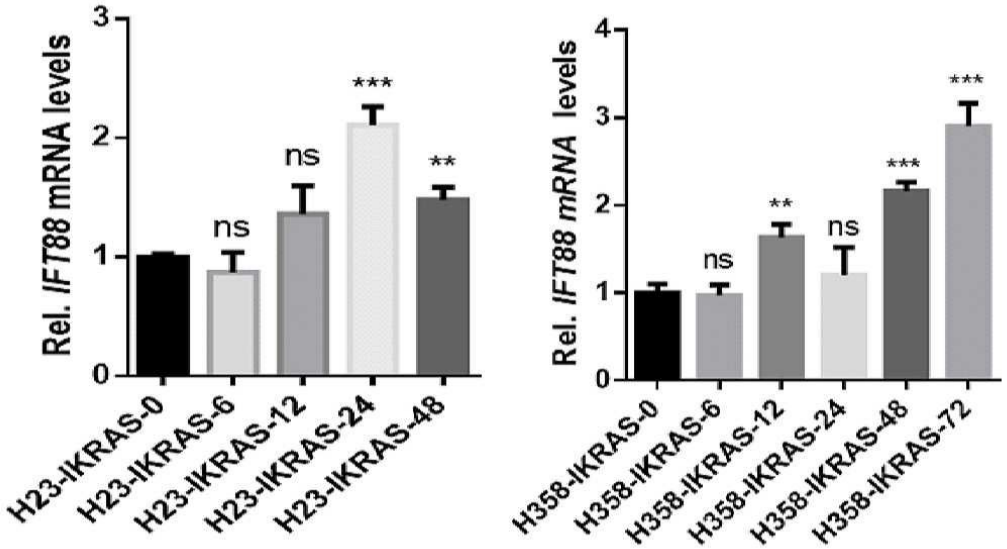
도면2



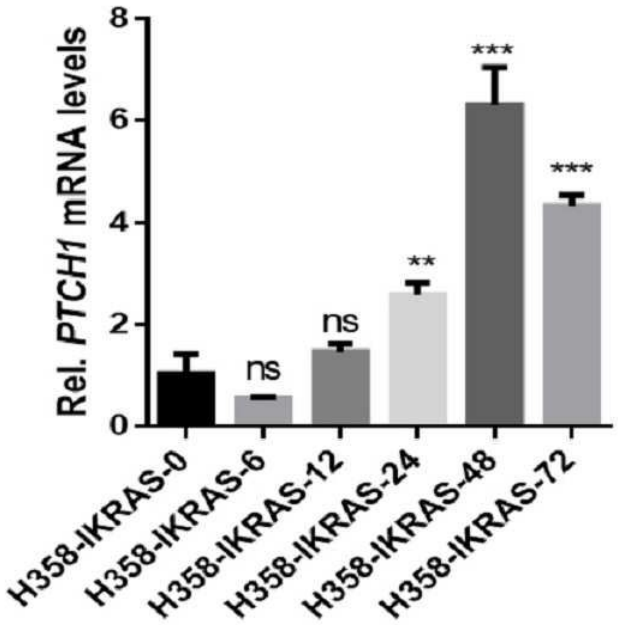
도면3a


Rel. GLI1 mRNA levels
0
1
2
3
4
5
ns
*
**
ns
H23-IKRAS-0
H23-IKRAS-6
H23-IKRAS-12
H23-IKRAS-24
H23-IKRAS-48
Rel. GLI1 mRNA levels
0
1
2
3
4
**
ns
**
ns
***
**
H358-IKRAS-0
H358-IKRAS-6
H358-IKRAS-12
H358-IKRAS-24
H358-IKRAS-48
H358-IKRAS-72

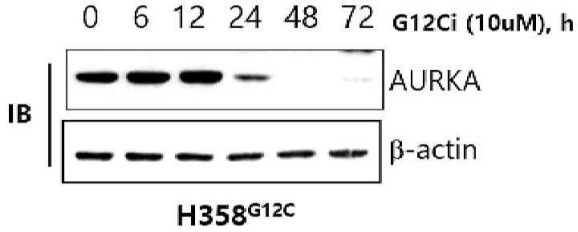
도면3b

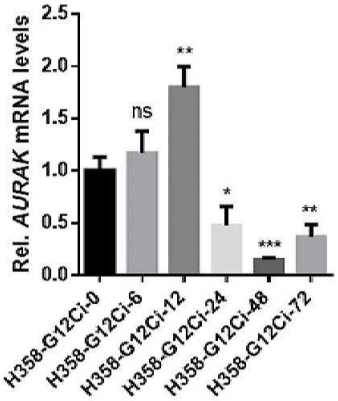

Rel. IFT88 mRNA levels
0
1
2
3
ns
ns
***
**
H23-IKRAS-0
H23-IKRAS-6
H23-IKRAS-12
H23-IKRAS-24
H23-IKRAS-48
Rel. IFT88 mRNA levels
0
1
2
3
4
ns
**
ns
***
***
H358-IKRAS-0
H358-IKRAS-6
H358-IKRAS-12
H358-IKRAS-24
H358-IKRAS-48
H358-IKRAS-72

도면3c

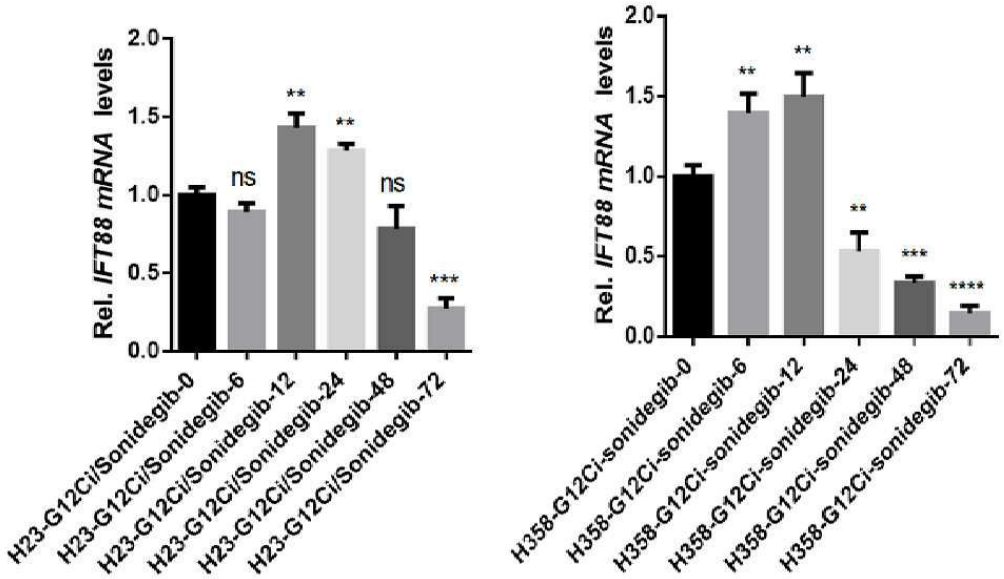

Rel. PTCH1 mRNA levels
8
6
4
2
0
ns
ns
**
***
***
H358-IKRAS-0
H358-IKRAS-6
H358-IKRAS-12
H358-IKRAS-24
H358-IKRAS-48
H358-IKRAS-72

도면3d

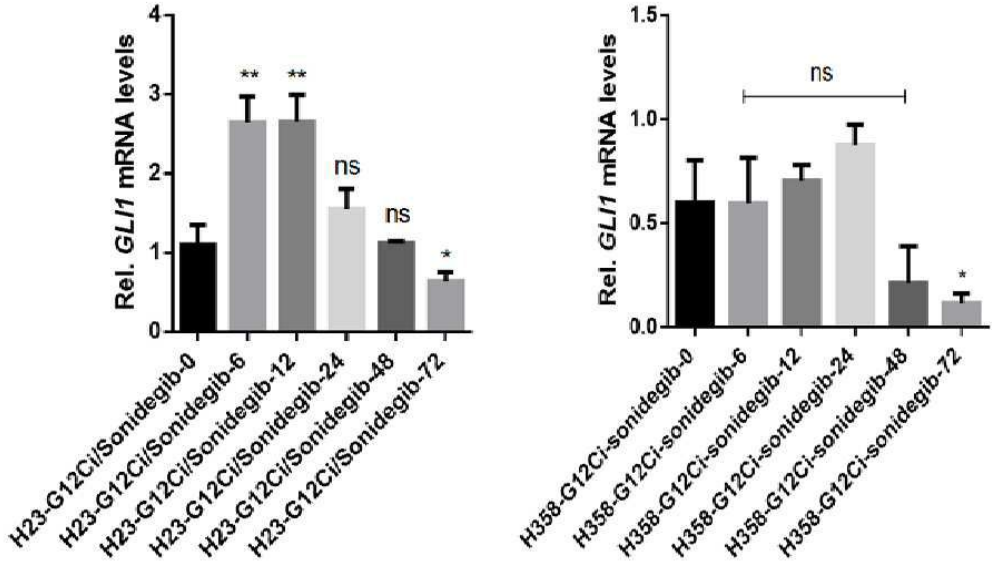

0 6 12 24 48 72 G12Ci (10uM), h
IB
AURKA
β-actin
H358G12C


Rel. AURAK mRNA levels
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
**
*
***
**
H358-G12Ci-0
H358-G12Ci-6
H358-G12Ci-12
H358-G12Ci-24
H358-G12Ci-48
H358-G12Ci-72

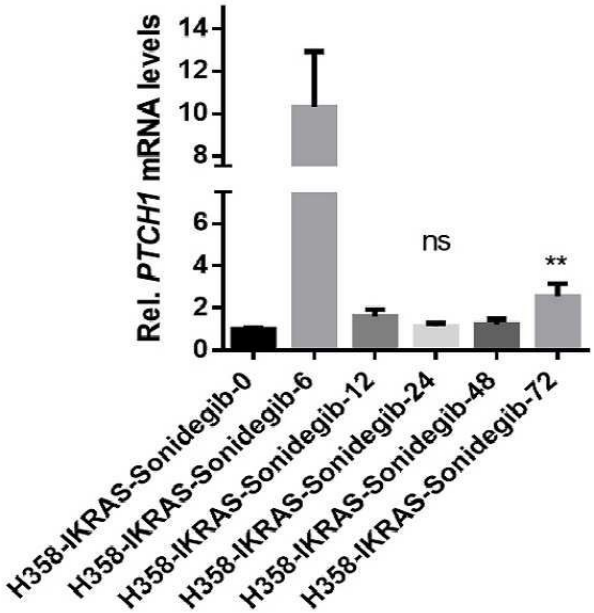
도면4a


Rel. IFT88 mRNA levels
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
**
**
ns
***
H23-G12Ci/Sonidegib-0
H23-G12Ci/Sonidegib-6
H23-G12Ci/Sonidegib-12
H23-G12Ci/Sonidegib-24
H23-G12Ci/Sonidegib-48
H23-G12Ci/Sonidegib-72
Rel. IFT88 mRNA levels
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
***
****
H358-G12Ci-sonidegib-0
H358-G12Ci-sonidegib-6
H358-G12Ci-sonidegib-12
H358-G12Ci-sonidegib-24
H358-G12Ci-sonidegib-48
H358-G12Ci-sonidegib-72

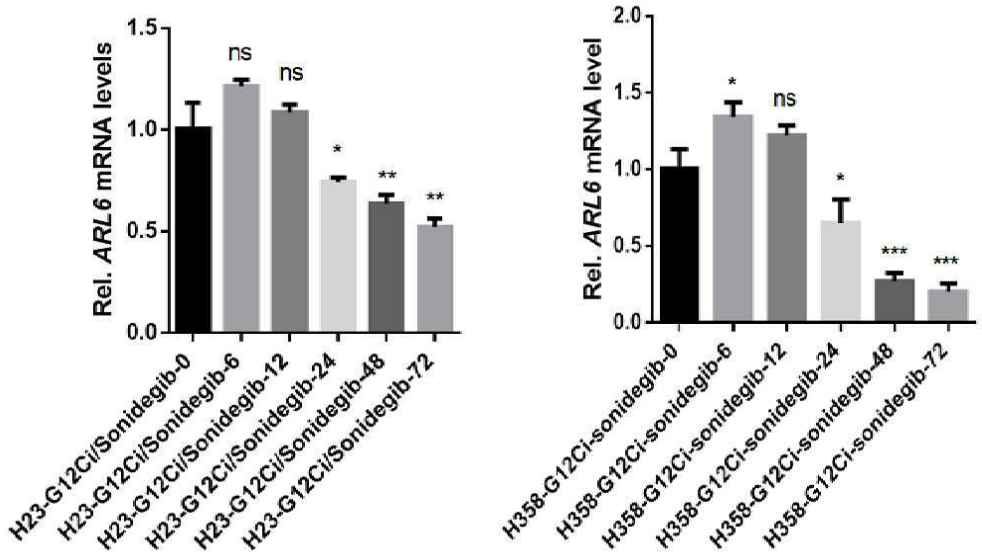
도면4b


Rel. GLI1 mRNA levels
4
3
2
1
0
**
**
ns
ns
*
H23-G12Ci/Sonidegib-0
H23-G12Ci/Sonidegib-6
H23-G12Ci/Sonidegib-12
H23-G12Ci/Sonidegib-24
H23-G12Ci/Sonidegib-48
H23-G12Ci/Sonidegib-72
Rel. GLI1 mRNA levels
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
*
H358-G12Ci-sonidegib-0
H358-G12Ci-sonidegib-6
H358-G12Ci-sonidegib-12
H358-G12Ci-sonidegib-24
H358-G12Ci-sonidegib-48
H358-G12Ci-sonidegib-72

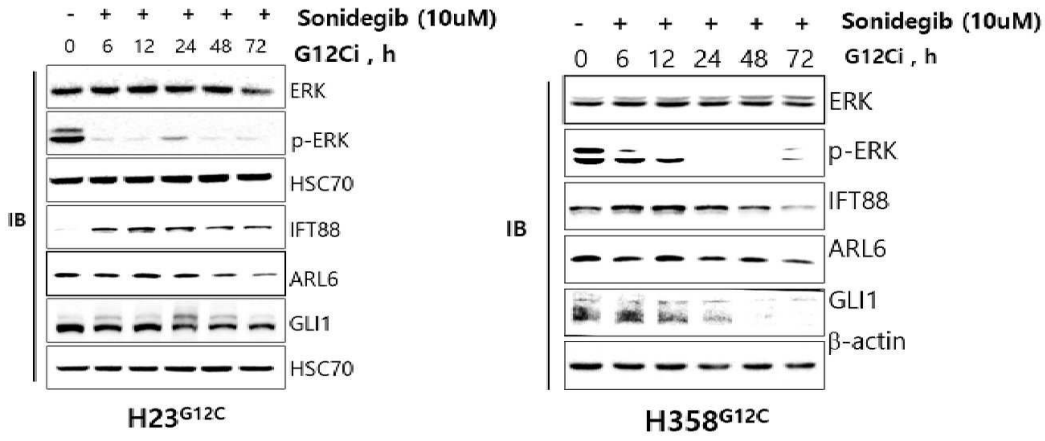
도면4c


Rel. PTCH1 mRNA levels
14
12
10
8
6
4
2
0
ns
**
H358-IKRAS-Sonidegib-0
H358-IKRAS-Sonidegib-6
H358-IKRAS-Sonidegib-12
H358-IKRAS-Sonidegib-24
H358-IKRAS-Sonidegib-48
H358-IKRAS-Sonidegib-72

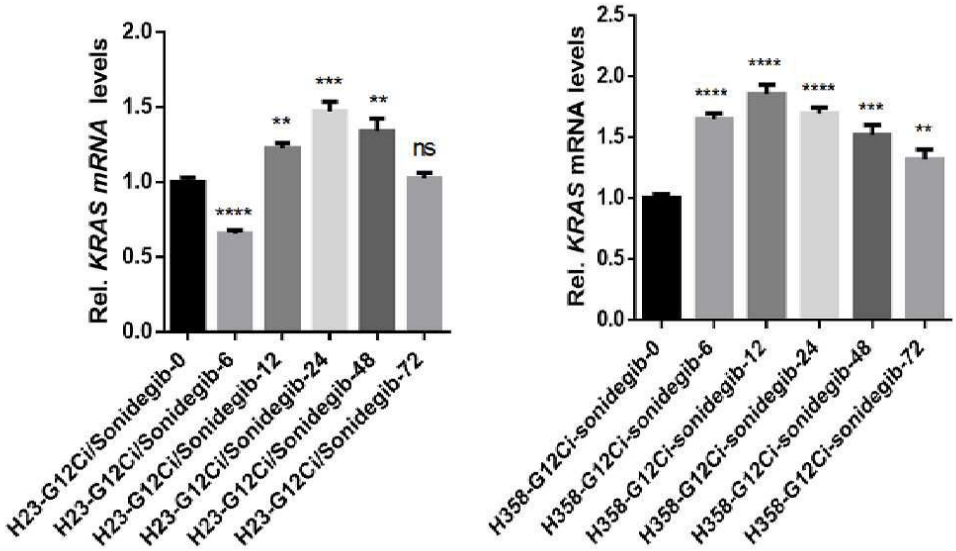
도면4d


Rel. ARL6 mRNA levels
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
ns
*
**
**
H23-G12Ci/Sonidegib-0
H23-G12Ci/Sonidegib-6
H23-G12Ci/Sonidegib-12
H23-G12Ci/Sonidegib-24
H23-G12Ci/Sonidegib-48
H23-G12Ci/Sonidegib-72
Rel. ARL6 mRNA level
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
ns
*
***
***
H358-G12Ci-sonidegib-0
H358-G12Ci-sonidegib-6
H358-G12Ci-sonidegib-12
H358-G12Ci-sonidegib-24
H358-G12Ci-sonidegib-48
H358-G12Ci-sonidegib-72

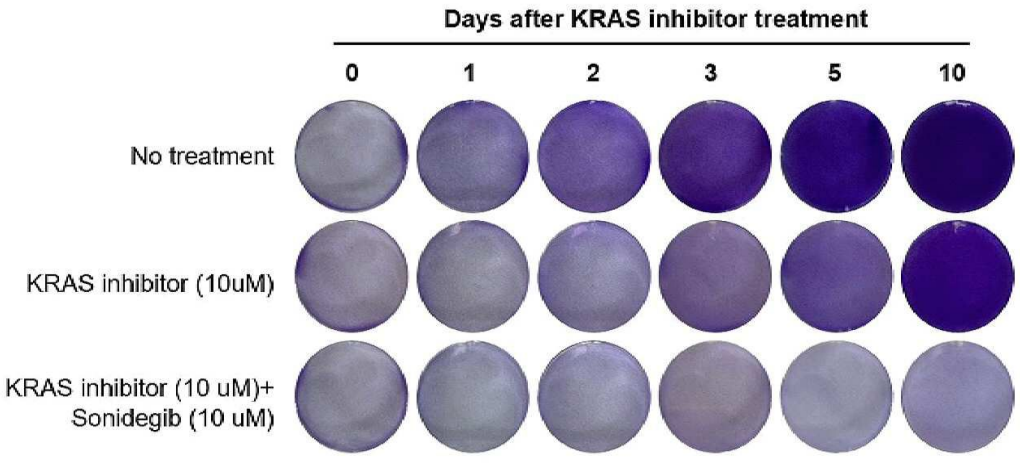
도면5a



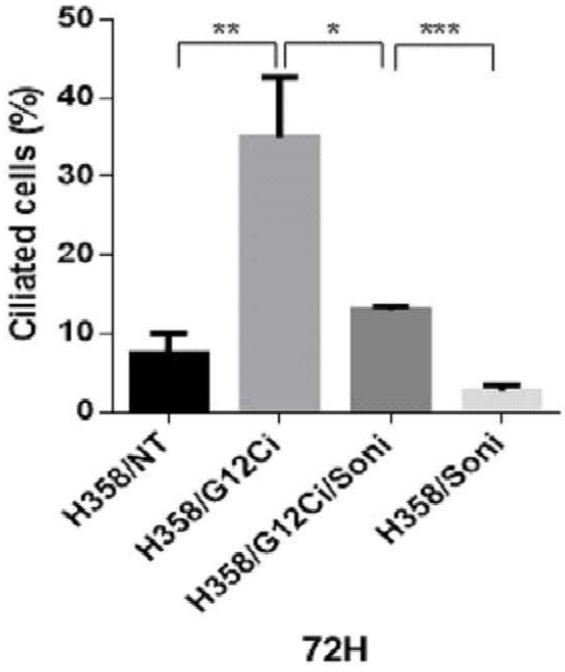
도면5b



도면6



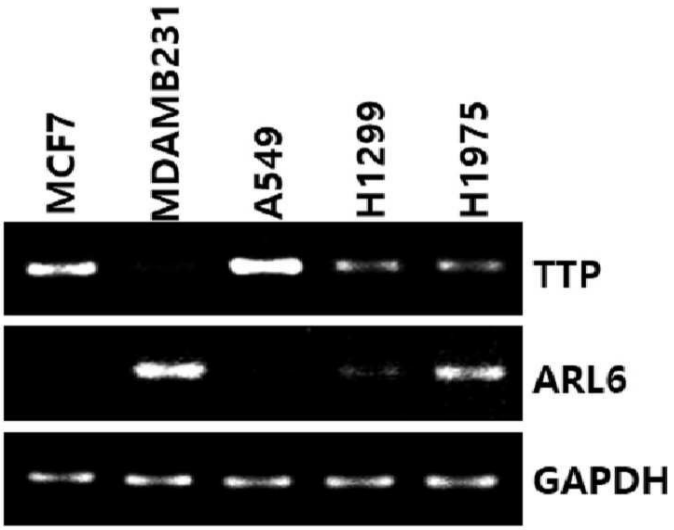
도면7


50
40
30
20
10
0
Ciliated cells (%)
**
*
***
H358/NT
H358/G12Ci
H358/G12Ci/Soni
H358/Soni
72H

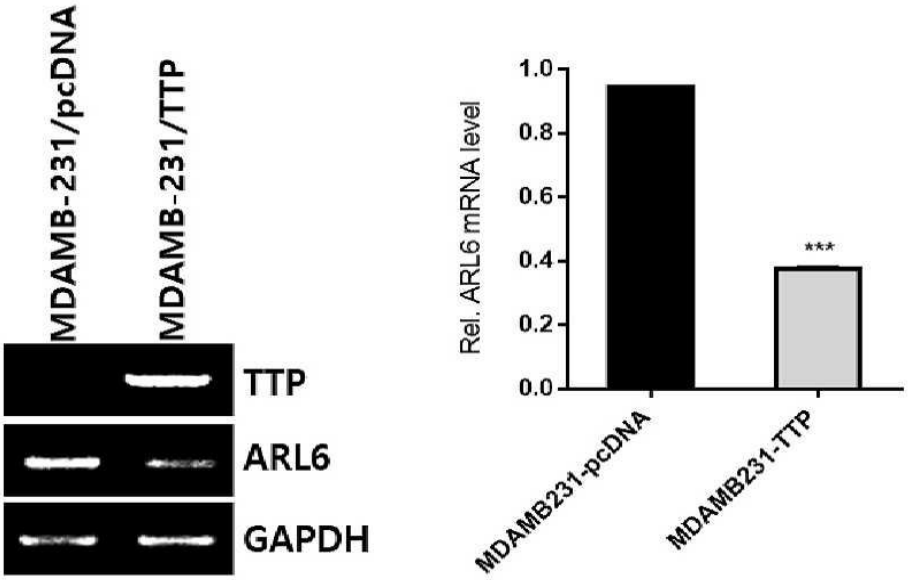
도면8


ARL6 3UTR
AAAGAUAAUAGUUGGAAACCUCAGCAAUUUUCAAUUCAAGGAAUCUAUCUAAGACAAAUAGAAU
ACAUUUUGUAAAAGAUGUUUAUGCAUCAAAAAAUAUAAUUUUCUGCUUGCAUUUAUGGACUCU
GACCUUUUUAAGAACAUAGGACUUCAGGUAUGCUAAUUUGGCCAUUAAUUAUUUAAAACUAA
AUAUUCCCUCAAAAGGGCUCCCUAGAAUUAUCAAGUUCUUAGUGAAGGUCUACAUUUGAUUGU
ACGUAGAAUGUUUAAAAGUCAGUUAUAAGCCAUCUCAUCCCAUCAUAAUUUAUGAUAUGUUUA
AUAUAUUUUAUUUUUUAAUUGUCUUUUUAAAAAAUUUAGUUUAUGACUUUGCAGUAUGAAUUG
UGCUUGUGAAAAAGAACUUUAAAUAUUUAUAAGGGACCAUGGGUAAUUAAUAUAUAUUCAAUU
UUUACUAUGUGUCACUGUCAAUAAAAUGUAAAAUAUAAUGUGCCAACUAGUGCGCUUUGUUUA
UGCUGAAAAGAAUAAUGCUCUGUUAGUAUGGUAUUUCGUGUCAUACUGUCAAGCAUUUGUAA
ACCAUCUGAGACUAAGUUAAGCUGAAUUUAUUUAUUCAGUGUAUGUUGAACAUCUCUACACCA
ACUAGUCAGACAUAGUCCUAGGCAAUGAUGUUACGAGGUAAAUAAGACAUAUCCUUAUCUUCA
GAGAACUUAAAAUUUAAUGAGGGAUAAUUUGAGAACCUUUCCAUGGAUAGUAUCUAAUUUUAU
UUCAUUGGCUGAAUGAAAAUAUUGCAUCUUCAGAUUAAGAGGUAUAAAGUAAAUUAAUAUUUG
ACUGUUCAGUAAUCAUUACUGACAUCUUGUUUUUCACUUUUAAAUGCCUCCAAUUUACCAUAG
CACUUUGUUAAAAUAAAUUGUGACUUUUAACUUUUUCAUGAACAUAACUGCUACAUAAAUGUU
CUUUAGAAUUUUAGACAUAUCUCAGGCACACAAAUUAUUAGUUCUCACAAAUUAGAGAACACU
UAUAAUUGUGAACUCUAAAUAGAAACCUUCAUUUUAAUCACUGAGCAACAGUAUAUAGAGCAA
UAUUGUUGAUCCUGAUAAACACUGCAUAUAAAGAAAAACUGUAAUAUACAAUAUAUACCAUCUC
AAGUAUGCUUAGCUUUGAAAAUGAUGAAAAUAGAAGGCAAAAGUAAGUGAGUAAUAAAGAUGU
UAUAGUAACUGCAGUAGUGGUACAUGUUUCACAAAGAUUUUAAUAAAAGCACAUAAAGCUACA
AUAAAAGUUCUAUAUUCCAGUUUCUUAUAGUCCAGAAAUAGCAGUGAUUUGGCAUUUGGCAAA
UUGAAAGUUACCCAGAAAAUUCCAAUGGCUCAGCAUCUUAGCUAGUUUACCAUCUCUCUUGUA
AAUUGUUUUAGAGGAUACAAAAUGAAAAUCUCAUUAAUCUAAAGUUGCUGCAGAUAUAGGAAG
GACAUAAGGAUGGAAACAAUGAAUGUAAUUUUUUAAAAAACUGAUAUGCUACAACUAUUUUAG
GAUGGAGAAAGAAUUGAUUGAGAAUUCAAAUCCUCACUCACUUACCAUAAGGUAGUAAUAAAA
UUAAUAAUAGUUACUACUAUAUGAUCAUUAUAUUAUAAGCAGGUAUUACACAUACAGAAUUUU
CAACAUUUAAUCCUCCCAAUAAGCCUAUGUGGCAGGUUUUAUUAUUUCCAUUUUAUAGAUCAG
UAAACUGAGGCGUUAAAAUGUUAUGUAAUUUGCCAAAGUUCAAAAAGCUGGUAAGUCUGGUAC
UAGGAUUCAGUACCAAGCAGUCUGUUUUAAGACAGAUGAUUCAAGAGUAUGAUAGAUAUUAGA
AAUACAGAUAUAUCUGCCAGAAUAACAAUUAAAAUGAUAGAAAAGGCUCUUACUUGGGACAGC
AACCAGGACAGGGAUGGUAGAGGGAAGGUCAGAGACUAGAGACUACUCUUUGCUUUUUUUGU
UUUCUUUUUUUUUCUUUUAAAGCUAUUAACACUACUCAAAUUUUAAACUCUGGAUACAAAUGA
CUUUGAUAAAAGUCCUUAAAACUAUUUUGACAUUAAAUUAUUUGGUAUUCCACAAACUACAGU
AGCUCAUACCUAUGCAAAUAUUUAGAAGAAGGAGAAGUACCCUUUUUCUUUGUUUUCAUGAUC
UCCAAAAUCUAGUUUUUAGUCUAUAAACAUCCAUCCCUACUCCACAUUUUCAUGUAAAGAUUA
UGUAGAAGUUGGGCAACAGUGUAGUCACAGGAUGUCAUAUAAGUGUGAAUAAGCUGAGAUUA
UUGCAUUUGUAUUUAGCAUAUUAUACAAUUAAAAUGUAUUUUAUUAAACCUGAAGCAAGUUUU
CUUUCAUGUCUAGACAUCAGUGUGUUACAGAGUUUAAUUCAUUAAGCUCUGUAUUUGAAUAUA
ACACCUUGUAAAAAUGUUUGAAACUUAUCCUCUUGUAUGUUAAAUAUUUAAAUAUUUGUAUAU
GGCCCUAUUCAGCCUGUGCUUUAUAAAUCACAAAAGAGCUGGGUUUUAUAUGUUUGUUUUUU
AUUUCUAAGCUCUCUGCGAAAAAGUUACAAAUUGUCUCCUUAAGAUAUUUUUCUUUGUAAUU
UUUUUAUAUCAUGUUGUGAUUUCCAUAAAUAUGUGCAGUUACUCUUGAUAAUACUUGUCUUAU
UCAUUUCAGGUUGCUAUAACAAAGUACCAUAGACUGGGUGGCUUAUAAACGACAGAAAUUUAU
UUCUUACAGCUCUGGAGCUGGAAGUCUGAGAUCAGAUUACCAGCAUGGUUGGGUUCUGGUGA
GAGCCGUCUUGGUUGCAGACUGCCAUCUUCUUGUAUCCUCACAUGGCCAAAAGAGGACAAGA
GAACUCUCUGGAGUCUGUUUGAUAAGAGCAUGAAUCCCAUUACAUCUUCACAUGGCUCCUCC
CAAAGACCCCACCUCCUAAUAUCAUCACAUGUCAUCACAUAGGGGGUUAGAAUUUCAACAUAG
AAAUUUUGGGAGAACACAAACAUUCAGUCAGUUGCAAUACUUAAGGCAAAUUCAUCUUGCUUA
UAACUCUGGUGCAUGUGCAUUAAAAUACUAUUGCAUUGUAACUGAGUUUGUACCUAUUUUCU
GCUUUCUGAUUAUUUCCUUUGUUCAUGAAAAUAAAUGACUGGUAUUACAAGGU.

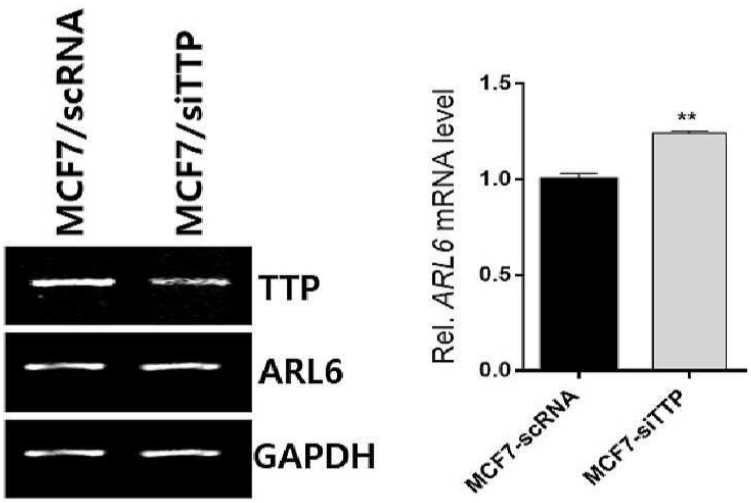
도면9


MCF7
MDAMB231
A549
H1299
H1975
TTP
ARL6
GAPDH

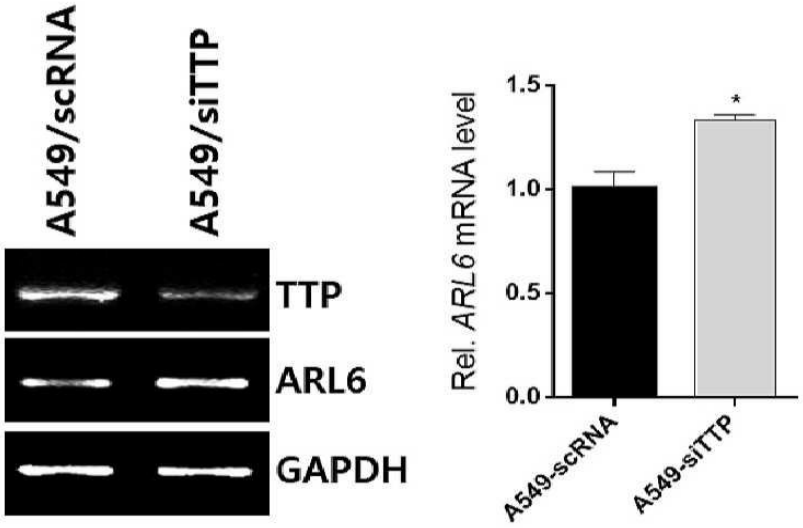
도면10


MDAMB-231/pcDNA
MDAMB-231/TTP
TTP
ARL6
GAPDH
Rel. ARL6 mRNA level
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
MDAMB231-pcDNA
MDAMB231-TTP

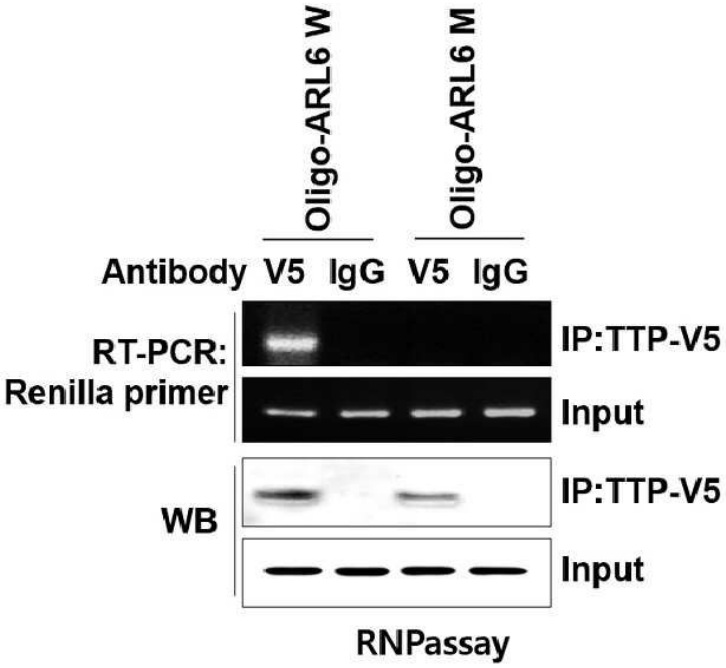
도면11a


MCF7/scRNA
MCF7/siTTP
TTP
ARL6
GAPDH
Rel. ARL6 mRNA level
1.5
1.0
0.5
0.0
**
MCF7-scRNA
MCF7-siTTP

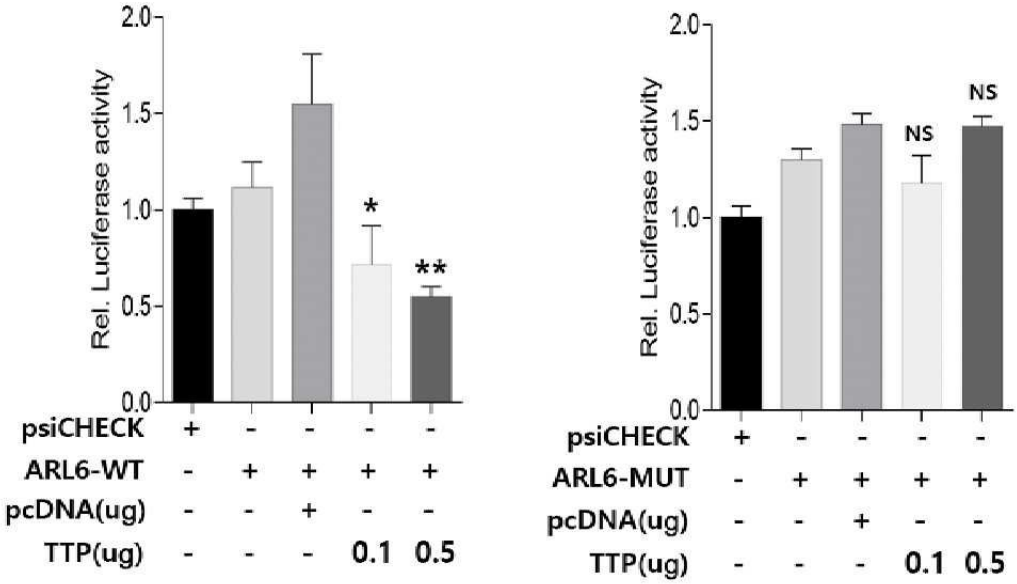
도면11b


A549/scRNA
A549/siTTP
TTP
ARL6
GAPDH
Rel. ARL6 mRNA level
1.5
1.0
0.5
0.0
*
A549-scRNA
A549-siTTP

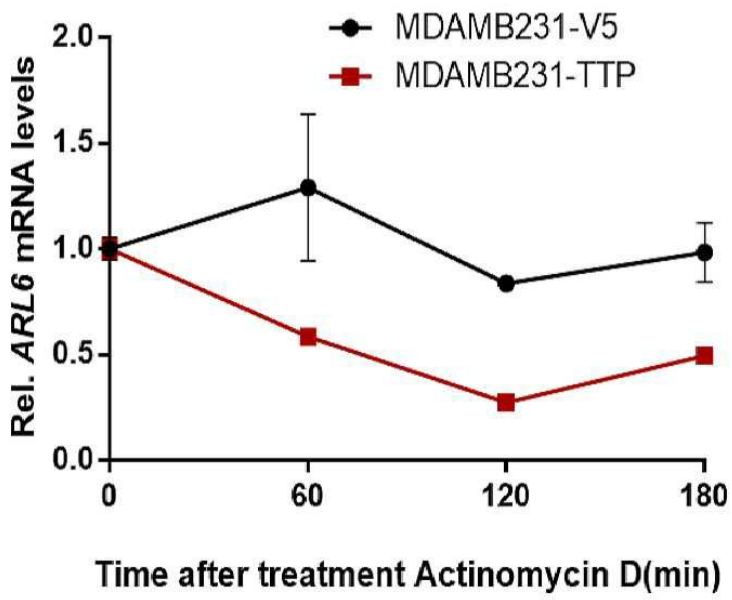
도면12


Oligo-ARL6 W
Oligo-ARL6 M
Antibody V5 IgG V5 IgG
RT-PCR:
Renilla primer
IP:TTP-V5
Input
WB
IP:TTP-V5
Input
RNPassay

도면13


Rel. Luciferase activity
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
psiCHECK + - - - -
ARL6-WT - + + + +
pcDNA(ug) - - + - -
TTP(ug) - - - 0.1 0.5
Rel. Luciferase activity
NS
NS
psiCHECK + - - - -
ARL6-MUT - + + + +
pcDNA(ug) - - + - -
TTP(ug) - - - 0.1 0.5

도면14



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

RopheLBio Co., Ltd.

<120> Composition for inhibiting the resistance to KRAS inhibitor

<130> MP20-216P1

<150> KR 10-2020-0168051

<151> 2020-12-04

<160> 31

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1747

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agcctgactt cagcgctccc actctcggcc gacacccctc atggccaacc gttacaccat 60

ggatctgact gccatctacg agagcctcct gtcgctgagc cctgacgtgc ccgtgccatc 120

cgaccatgga gggactgagt ccagcccagg ctggggctcc tcgggaccct ggagcctgag 180

cccctccgac tccagcccgt ctggggtcac ctcccgcctg cctggccgct ccaccagcct 240

agtggagggc cgcagctgtg gctgggtgcc cccacccccc ggcttcgcac cgctggctcc 300

ccgcctgggc cctgagctgt caccctcacc cacttcgccc actgcaacct ccaccacccc 360

ctcgcgctac aagactgagc tatgtcggac cttctcagag agtgggcgct gccgctacgg 420

ggccaagtgc cagtttgccc atggcctggg cgagctgcgc caggccaatc gccaccccaa 480

atacaagacg gaactctgtc acaagttcta cctccagggc cgctgcccct acggctctcg 540

ctgccacttc atccacaacc ctagcgaaga cctggcggcc ccgggccacc ctcctgtgct 600

tcgccagagc atcagcttct ccggcctgcc ctctggccgc cggacctcac caccaccacc 660

aggcctggcc ggcccttccc tgtcctccag ctccttctcg ccctccagct ccccaccacc 720

acctggggac cttccactgt caccctctgc cttctctgct gcccctggca ccccccctggc 780

tcgaagagac cccaccccag tctgttgccc ctcctgccga agggccactc ctatcagcgt 840

ctgggggccc ttgggtggcc tggttcggac cccctctgta cagtccctgg gatccgaccc 900

tgatgaatat gccagcagcg gcagcagcct ggggggctct gactctcccg tcttcgaggc 960

gggagttttt gcaccacccc agcccgtggc agccccccgg cgactcccca tcttcaatcg 1020

catctctgtt tctgagtgac aaagtgactg cccggtcaga tcagctggat ctcagcgggg 1080

agccacgtct cttgcactgt ggtctctgca tggaccccag ggctgtgggg acttggggga 1140

cagtaatcaa gtaatcccct tttccagaat gcattaaccc actcccctga cctcacgctg 1200

gggcaggtcc ccaagtgtgc aagctcagta ttcatgatgg tgggggatgg agtgtcttcc 1260

gaggttcttg ggggaaaaaa aattgtagca tatttaaggg aggcaatgaa ccctctcccc 1320

cacctcttcc ctgcccaaat ctgtctccta gaatcttatg tgctgtgaat aataggcctt 1380

cactgcccct ccagttttta tagacctgag gttccagtgt ctcctggtaa ctggaacctc 1440

tcctgagggg gaatcctggt gctcaaatta ccctccaaaa gcaagtagcc aaagccgttg 1500

ccaaacccca cccataaatc aatgggccct ttatttatga cgactttatt tattctaata 1560

tgattttata gtatttatat atattgggtc gtctgcttcc cttgtatttt tcttcctttt 1620

tttgtaatat tgaaaacgac gatataatta ttataagtag actataatat atttagtaat 1680

atatattatt accttaaaag tctatttttg tgttttgggc atttttaaat aaacaatctg 1740

agtgtaa 1747

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Leu Thr Ala Ile Tyr Glu Ser Leu Leu Ser Leu Ser Pro Asp

1 5 10 15

Val Pro Val Pro Ser Asp His Gly Gly Thr Glu Ser Ser Pro Gly Trp
20 25 30
Gly Ser Ser Gly Pro Trp Ser Leu Ser Pro Ser Asp Ser Ser Pro Ser
35 40 45
Gly Val Thr Ser Arg Leu Pro Gly Arg Ser Thr Ser Leu Val Glu Gly

50 55 60
Arg Ser Cys Gly Trp Val Pro Pro Pro Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ala
65 70 75 80
Pro Arg Leu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Ser Pro Thr Ser Pro Thr Ala
85 90 95
Thr Ser Thr Thr Pro Ser Arg Tyr Lys Thr Glu Leu Cys Arg Thr Phe
100 105 110
Ser Glu Ser Gly Arg Cys Arg Tyr Gly Ala Lys Cys Gln Phe Ala His
115 120 125

Gly Leu Gly Glu Leu Arg Gln Ala Asn Arg His Pro Lys Tyr Lys Thr
130 135 140
Glu Leu Cys His Lys Phe Tyr Leu Gln Gly Arg Cys Pro Tyr Gly Ser
145 150 155 160
Arg Cys His Phe Ile His Asn Pro Ser Glu Asp Leu Ala Ala Pro Gly
165 170 175
His Pro Pro Val Leu Arg Gln Ser Ile Ser Phe Ser Gly Leu Pro Ser
180 185 190
Gly Arg Arg Thr Ser Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Ser Leu

195 200 205
Ser Ser Ser Ser Phe Ser Pro Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Gly Asp
210 215 220
Leu Pro Leu Ser Pro Ser Ala Phe Ser Ala Ala Pro Gly Thr Pro Leu
225 230 235 240
Ala Arg Arg Asp Pro Thr Pro Val Cys Cys Pro Ser Cys Arg Arg Ala
245 250 255
Thr Pro Ile Ser Val Trp Gly Pro Leu Gly Gly Leu Val Arg Thr Pro

260 265 270

Ser Val Gln Ser Leu Gly Ser Asp Pro Asp Glu Tyr Ala Ser Ser Gly
275 280 285
Ser Ser Leu Gly Gly Ser Asp Ser Pro Val Phe Glu Ala Gly Val Phe
290 295 300
Ala Pro Pro Gln Pro Val Ala Ala Pro Arg Arg Leu Pro Ile Phe Asn
305 310 315 320
Arg Ile Ser Val Ser Glu
325

<210> 3
<211> 4353
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3

aactcccatg atgctacgcc gggaactgcc cggctcctcg caggaaatag gcagctcacc 60

ctgccacctg tgcacacatt tttcttcaat gtatagttcc tcggcgcgcc tctgaccttt 120
tcccggagct cttcaatccc agaagctata gcacaacggc tgaatcgcca ggacccccgg 180
ggaggcgtgg cttcaggacc ggaagaagct cctgttgcca agggaacggt gcctgccaag 240
gcgcctgctc agcgactgat gcacagactg ctgcagaggc tgccggtttt cccaacttct 300
agagacggct ttgctcatta ccaggcatcc ttcccatgta ggcatcgaga agaaggctga 360
gggaccctcg caccagattt ccatcccgga gaccgatacg agtgcgtcca ttcctgttgc 420
cagctcctgc gccctccgga ctaacctcaa aaaccagaaa aactgcctgc tcttctaaat 480

tgtgtgtccc aaaatatttc attaacaagt atcaagtgat aatccatgga aaagtgatgg 540
aaagtcacaa tacaagctgg tttgtaaata tttgaatcac attatgggat tgctagacag 600
actttcagtc ttgcttggcc tgaagaagaa ggaggttcat gttttgtgcc ttgggctaga 660
taatagtggc aaaacgacga tcattaacaa acttaaacct tcaaatgctc aatctcaaaa 720
tatccttcca acaataggat tcagcataga gaaattcaaa tcatccagtt tgtcatttac 780
agtgtttgac atgtcaggtc aaggaagata cagaaatctc tgggaacact attataaaga 840
aggccaagct attatttttg tcattgatag tagtgataga ttaagaatgg ttgtggccaa 900

agaagaactc gatactcttc tgaatcatcc agatattaaa caccgtcgaa ttccaatctt 960
attctttgca aataaaatgg atcttagaga tgcagtgaca tctgtaaaag tgtctcagtt 1020

gctgtgttta gagaacatca aagataaacc ctggcatatt tgtgctagtg atgccataaa 1080

aggagaaggc ttgcaagaag gtgtagactg gcttcaagat cagatccaga ctgtgaagac 1140

atgaaaagat aatagttgga aacctcagca attttcaatt caaggaatct atctaagaca 1200

aatagaatac attttgtaaa agatgtttat gcatcaaaaa atataatttt ctgcttgcat 1260

ttatggactc tgacctttt aagaacatag gacttcaggt atgctaattt ggccattaat 1320

tatttaaaaa ctaaatattc cctcaaaagg gctccctaga attatcaagt tcttagtgaa 1380

ggtctacatt tgattgtacg tagaatgttt aaaagtcagt tataagccat ctcatcccat 1440

cataatttat gatatgttta atatatttta ttttttaatt gtctttttaa aaaatttagt 1500

ttatgacttt gcagtatgaa ttgtgcttgt gaaaaagaac tttaaatatt tataagggac 1560

catgggtaat taatatatat tcaattttta ctatgtgtca ctgtcaataa aatgtaaaat 1620

ataatgtgcc aactagtgcg ctttgtttat gctgaaaaga ataatgctct gttagtatgg 1680

tatttcgtgt catactgtca agcatttgta aaccatctga gactaagtta agctgaattt 1740

atttattcag tgtatgttga acatctctac accaactagt cagacatagt cctaggcaat 1800

gatgttacga ggtaaataag acatatcctt atcttcagag aacttaaaat ttaatgaggg 1860

ataatttgag aacctttcca tggatagtat ctaattttat ttcattggct gaatgaaaat 1920

attgcatctt cagattaaga ggtataaagt aaattaatat ttgactgttc agtaatcatt 1980

actgacatct tgtttttcac ttttaaatgc ctccaattta ccatagcact ttgttaaaat 2040

aaattgtgac ttttaacttt ttcatgaaca taactgctac ataaatgttc tttagaattt 2100

tagacatatc tcaggcacac aaattattag ttctcacaaa ttagagaaca cttataattg 2160

tgaactctaa atagaaacct tcattttaat cactgagcaa cagtatatag agcaatattg 2220

ttgatcctga taaacactgc atataaagaa aaactgtaat atacaatata taccatctca 2280

agtatgctta gctttgaaaa tgatgaaaat agaaggcaaa agtaagtgag taataaagat 2340

gttatagtaa ctgcagtagt ggtacatgtt tcacaaagat tttaataaaa gcacataaag 2400

ctacaataaa agttctatat tccagtttct tatagtccag aaatagcagt gatttggcat 2460

ttggcaaatt gaaagttacc cagaaaattc caatggctca gcatcttagc tagtttacca 2520

tctctcttgt aaattgtttt agaggataca aaatgaaaat ctcattaatc taaagttgct 2580

gcagatatag gaaggacata aggatggaaa caatgaatgt aatttttaa aaaactgata 2640

tgctacaact attttaggat ggagaaagaa ttgattgaga attcaaatcc tcactcactt 2700

accataaggt agtaataaaa ttaataatag ttactactat atgatcatta tattataagc 2760

aggtattaca catacagaat tttcaacatt taatcctccc aataagccta tgtggcaggt 2820

tttattattt ccattttata gatcagtaaa ctgaggcgtt aaaatgttat gtaatttgcc 2880

aaagttcaaa aagctggtaa gtctggtact aggattcagt accaagcagt ctgttttaag 2940

acagatgatt caagagtatg atagatatta gaaatacaga tatatctgcc agaataacaa 3000

ttaaaatgat agaaaaggct cttacttggg acagcaacca ggacagggat ggtagaggga 3060

aggtcagaga ctagagacta ctctttgctt tttttgtttt ctttttttct cttttaaagc 3120

tattaacact actcaaattt taaactctgg atacaaatga ctttgataaa agtccttaaa 3180

actattttga cattaaatta tttggtattc cacaaactac agtagctcat acctatgcaa 3240

atatttagaa gaaggagaag tacccttttt ctttgttttc atgatctcca aaatctagtt 3300

tttagtctat aaacatccat ccctactcca cattttcatg taaagattat gtagaagttg 3360

ggcaacagtg tagtcacagg atgtcatata agtgtgaata agctgagatt attgcatttg 3420

tatttagcat attatacaat taaaatgtat tttattaaac ctgaagcaag ttttctttca 3480

tgtctagaca tcagtgtgtt acagagttta attcattaag ctctgtattt gaatataaca 3540

ccttgtaaaa atgtttgaaa cttatcctct tgtatgttaa atatttaaat atttgtatat 3600

ggccctattc agcctgtgct ttataaatca caaaagagct gggttttata tgtttgtttt 3660

ttatttctaa gctctctgcg aaaaagttac aaattgtctc cttaagatat tttttctttg 3720

taatttttt atatcatgtt gtgatttcca taaatatgtg cagttactct tgataatact 3780

tgtcttattc atttcaggtt gctataacaa agtaccatag actgggtggc ttataaacga 3840

cagaaattta tttcttacag ctctggagct ggaagtctga gatcagatta ccagcatggt 3900

tgggttctgg tgagagccgt cttggttgca gactgccatc ttcttgtatc ctcacatggc 3960

caaaagagga caagagaact ctctggagtc tgtttgataa gagcatgaat cccattacat 4020

cttcacatgg ctcctcccaa agaccccacc tcctaatatc atcacatgtc atcacatagg 4080

gggttagaat ttcaacatag aaattttggg agaacacaaa cattcagtca gttgcaatac 4140

ttaaggcaaa ttcatcttgc ttataactct ggtgcatgtg cattaaaata ctattgcatt 4200

gtaactgagt ttgtacctat tttctgcttt ctgattattt cctttgttca tgaaaataaa 4260

tgactggtat tacaaggtca cctaaataaa taggtttgtg tacgtctgcg actagagaga 4320

aatactacag tgattaaaaa aaaaaaaaaa aaa 4353

<210> 4

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Leu Leu Asp Arg Leu Ser Val Leu Leu Gly Leu Lys Lys Lys

1 5 10 15

Glu Val His Val Leu Cys Leu Gly Leu Asp Asn Ser Gly Lys Thr Thr

20 25 30

Ile Ile Asn Lys Leu Lys Pro Ser Asn Ala Gln Ser Gln Asn Ile Leu

35 40 45

Pro Thr Ile Gly Phe Ser Ile Glu Lys Phe Lys Ser Ser Ser Leu Ser

50 55 60

Phe Thr Val Phe Asp Met Ser Gly Gln Gly Arg Tyr Arg Asn Leu Trp

65 70 75 80

Glu His Tyr Tyr Lys Glu Gly Gln Ala Ile Ile Phe Val Ile Asp Ser

85 90 95

Ser Asp Arg Leu Arg Met Val Val Ala Lys Glu Glu Leu Asp Thr Leu

100 105 110

Leu Asn His Pro Asp Ile Lys His Arg Arg Ile Pro Ile Leu Phe Phe

115 120 125

Ala Asn Lys Met Asp Leu Arg Asp Ala Val Thr Ser Val Lys Val Ser

130 135 140

Gln Leu Leu Cys Leu Glu Asn Ile Lys Asp Lys Pro Trp His Ile Cys

145 150 155 160

Ala Ser Asp Ala Ile Lys Gly Glu Gly Leu Gln Glu Gly Val Asp Trp

165 170 175

Leu Gln Asp Gln Ile Gln Thr Val Lys Thr

180 185

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of KRAS

<400> 5

tcgacacagc aggtcaagag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of KRAS

<400> 6

caaagaaagc cctccccagt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of GAPDH

<400> 7

acatcaagaa ggtggtgaag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of GAPDH

<400> 8

ctgttgctgt agccaaattc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of GLI1

<400> 9

tcctctgaga cgccatgttc 20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of GLI1

<400> 10

cagacagtcc ttctgtcccc a 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of IFT88

<400> 11

gccgaagcac ttaacactta t 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of IFT88

<400> 12

gtctaatgcc attcggtaga a 21

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of PTCH1

<400> 13

ctcctttgcg gtggacaa 18

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of PTCH1

<400> 14

cctcagcctt attcagcatt tc 22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of TTP for semi-quantitative PCR

<400> 15

cgcgctacaa gactgagcta 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of TTP for semi-quantitative PCR

<400> 16

aagctgatgc tctggcgaag 20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of ARL6 for semi-quantitative PCR

<400> 17

gatggaaagt cacaatacaa gctg 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of ARL6 for semi-quantitative PCR

<400> 18

ttctgtatct tccttgacct gaca 24

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of TTP for real-time PCR

<400> 19

tcttcgaggc gggagttttt 20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of TTP for real-time PCR

<400> 20

tgcgattgaa gatggggagt c 21

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of ARL6 for real-time PCR

<400> 21

ggcttcaaga tcagatccag act 23

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of ARL6 for real-time PCR

<400> 22

aaggtcagag tccataaatg caag 24

<210> 23

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward sequence of ARL6-WT Oligonucleotide

<400> 23

tcgagctgag actaagttaa gctgaattta tttattcagt gtatgttgaa catcgc 56

<210> 24

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse sequence of ARL6-WT Oligonucleotide

<400> 24

ggccgcgatg ttcaacatac actgaataaa taaattcagc ttaacttagt ctcagc 56

<210> 25

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward sequence of ARL6-M Oligonucleotide

<400> 25

tcgagctgag actaagttaa gctgaagcag cattcagtgt atgttgaaca tcgc 54

<210> 26

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse sequence of ARL6-M Oligonucleotide

<

400> 26

ggccgcgatg ttcaacatac actgaatgct gcttcagctt aacttagtct cagc 54

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of Renilla luciferase

<400> 27

acgtgctgga ctccttcatc 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of Renilla luciferase

<400> 28

gacactctca gcatggacga 20

<210> 29

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr

20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly

35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr

50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys

65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr

85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val

100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys

115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr

130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val

145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys

165 170 175

Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met

180 185

<210> 30

<211> 22

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AURKA Primer_F

<400> 30

gcaaccagtg tacctcatcc tg 22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AURKA Primer_R

<400> 31

aagtcttcca aagcccactg cc 22