(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0036412
(43) 공개일자 2023년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0119225
(22) 출원일자 2021년09월07일
심사청구일자 2022년08월04일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
주식회사 로젠바이오
서울특별시 성동구 뚝섬로1길 31 ,B102호(성수동1가,서울숲M타워)
(72) 발명자
레민수언
울산광역시 남구 대학로121번길 38 무거동 845-17번지 104 호 (무거동)
레안늉
울산광역시 남구 대학로121번길 38 무거동 845-17번지 104 호 (무거동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

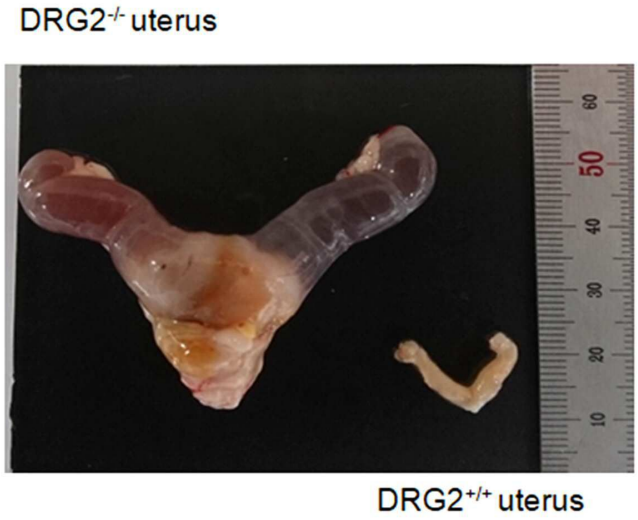
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **바이오마커로서의 DRG2의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 바이오마커로서의 DRG2의 용도에 관한 것으로, 보다 자세하게는, 암발생 위험이 높은 암 발생 고위험군의 분류를 위한, DNA 손상을 유도하는 항암제에 대한 내성 여부 분류를 위한, 또는 생존률을 예측하기 위한 바이오마커로서의 DRG2의 용도, DNA 손상을 유도하는 항암제에 대한 내성을 억제하는 DRG2 활성화제를 포함하는 민감제용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

대 표 도 - 도17



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/574 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/112 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자
이언화
울산광역시 울주군 범서읍 대리2길 46, 203동 1603호(구영지구푸르지오2단지)
박정우
울산광역시 중구 우정2길 45, 109동 302호(우정동, 우정 I'PARK)

추헌수
서울특별시 마포구 백범로 199, 2207호(신공덕동)
정원진
강원도 춘천시 동면 삭주로 231, 107동 1304호(춘천두산위브아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425144147
과제번호	S2942410
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(R&D)
연구과제명	면역항암요법에 대한 DRG2 바이오마커
기 여 율	100/100
과제수행기관명	로켈바이오
연구기간	2020.08.01 ~ 2021.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 생물학적 시료로부터 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

b) 상기 DRG2 유전자의 발현량이 정상인에 비하여 감소되었을 때 암 발생 고위험군으로 분류하는 것을 특징으로 하는, 암 발생 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 복막액, 머리카락, 소변, 대변 또는 생체검사로 획득된 시료인 것을 특징으로 하는, 암 발생 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 발현량을 측정하는 단계는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), 유세포분석(FACS), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 발생 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 암은 유방암, 대장암, 직장암, 폐암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 자궁암, 위암, 골암, 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 발생 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 5

a) 생물학적 시료로부터 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

b) 상기 DRG2 유전자의 발현량이 정상인에 비하여 감소되었을 때 항암제에 대한 내성을 가질 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 항암제 내성에 관한 정보제공방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 복막액, 머리카락, 소변, 대변, 또는 생체검사로 획득된 시료인 것을 특징으로 하는, 항암제 내성에 관한 정보제공방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 발현량을 측정하는 단계는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), 유세포분석(FACS), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 항암제 내성에 관한 정보제공방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 암은 유방암, 대장암, 직장암, 폐암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 자궁암, 위암, 골암, 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 항암제 내성에 관한 정보제공방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 항암제는 DNA에 손상을 유도하는 것을 특징으로 하는, 항암제 내성에 관한 정보제공방법.

청구항 10

a) 생물학적 시료로부터 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

b) 상기 DRG2 유전자의 발현량이 정상인에 비하여 감소되었을 때 낮은 생존률을 예측하는 단계를 포함하는, 암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 복막액, 머리카락, 소변, 대변, 또는 생체검사로 획득된 시료인 것을 특징으로 하는, 암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 발현량을 측정하는 단계는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), 유세포분석(FACS), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 암은 유방암, 대장암, 직장암, 폐암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 자궁암, 위암, 골암, 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 14

DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 물질을 포함하는, 암에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 발현량을 측정하는 물질은 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는, 암에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

상기 키트는 GAPDH, 18s rDNA 또는 β-액틴(actin)의 발현량을 측정하는 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 암에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 17

제 14 항에 있어서,

상기 암에 관한 정보는 암 발생 예측을 위한 정보, 항암제 내성에 관한 정보, 또는 생존률의 예측을 위한 정보인 것을 특징으로 하는, 암에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 18

DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유도제를 유효성분으로 포함하는, 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 유도제는 DRG2 유전자의 발현 촉진제 또는 DRG2 단백질의 활성화제인 것을 특징으로 하는, 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물.

청구항 20

제 18 항에 있어서,

상기 유도제는 DRG2 단백질; 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 mRNA 또는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는, 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 DRG2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물.

청구항 22

제 20 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물.

청구항 23

제 18 항에 있어서,

상기 항암제는 DNA에 손상을 유도하는 것을 특징으로 하는, 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물.

청구항 24

DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유도제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오마커로서의 DRG2의 용도에 관한 것으로, 보다 자세하게는, 암발생 위험이 높은 암 발생 고위험군의 분류를 위한, DNA 손상을 유도하는 항암제에 대한 내성 여부 분류를 위한, 또는 생존률을 예측하기 위한 바이오마커로서의 DRG2의 용도, DNA 손상을 유도하는 항암제에 대한 내성을 억제하는 DRG2 활성화제를 포함하는 민감제용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 현대인의 사망원인에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 질환 중 하나로서 여러가지 원인에 의하여 발생된 유전자의 돌연변이로 인하여 정상세포가 변화하여 발생되는 질병으로서, 정상적인 세포의 분화, 증식, 성장 형태 등을 따르지 않는 종양 중 악성인 것을 지칭한다. 암이란, “제어되지 않은 세포 성장”으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포 성장에 의해 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투되고, 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 약물 요법 등으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 특히, 최근에는 노년 인구의 증가, 환경 악화 등으로 인하여 세계 암 발생률은 매년 5% 이상 증가되고 있는 추세이며, WHO 보고서에 따르면 향후 25년 내 암 발생 인구는 3천 만명으로 증가되고, 이중 2천 만명의 인구는 암으로 사망할 것으로 추정되고 있다.

[0003] 암의 약물 치료, 즉, 항암제는 일반적으로 암세포의 발육이나 증식을 억제하는 약물로서, 크게 세포독성항암제, 표적항암제, 면역항암제 등으로 분류되며, 암의 종류나 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라 항암제를 선택하여 사용하게 된다. 그러나 이러한 항암제는 높은 확률로 내성이 생긴다는 한계점을 나타내고 있다. 특별히 암세포의 DNA 손상을 유도하여 작용하는 항암제의 경우, 암세포의 종류에 따라, 또는 항암제 종류에 따라 서로 다른 내성 기작들을 가지고 있어, 내성을 가지고 있다는 것을 예측하는 것도, 치료를 하는 것도 용이하지 않다. 암 환자에 대한 항암화학요법이 성공하기 위해서는 정상조직이 살아남을 수 있는 혈중 농도에서 암세포를 효과적으로 사멸시켜야 하는데, 항암제에 대한 내성으로 인해 항암제를 투여했음에도 불구하고 암세포가 사멸되지 않아, 암이 치료되지 않는 상황에서 항암 치료로 인해 환자들이 고통 받는 상황들이 빈번히 발생하고 있다.

[0004] 따라서, 암을 효과적으로 치료하기 위해서는, 항암제에 대한 내성을 나타내는 환자를 미리 선별하여, 선택적으로 항암제를 투여하거나, 또는, 항암제에 대한 내성을 억제할 수 있는 민감제(sensitizer)를 항암제와 함께 사용하는 방법들의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국내공개특허 10-2021-0015380

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 항암제에 대한 내성을 가지는 암 환자들의 효과적인 치료를 위한 방법을 개발하기 위하여 예의 연구한 결과, DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현이 낮을수록, 항암제에 대한 내성 발생

률, 사망률, 암 발병률이 높다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명은 DRG2 유전자의 발현량을 측정하는 물질을 포함하는 암에 관한 정보 제공용 키트, DRG2 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 암에 관한 정보제공방법, DRG2 유도제를 유효성분으로 포함하는 항암제 내성을 가지는 암의 민감제용 약학적 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 a) 생물학적 시료로부터 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 b) 상기 DRG2 유전자의 발현량이 정상인에 비하여 감소되었을 때 암 발생 고위험군으로 분류하는 것을 특징으로 하는 암 발생 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다. 상기 암 발생 고위험군은 암의 발생 확률이 높은 개체를 의미한다.

[0010] 또한, 본 발명은 a) 생물학적 시료로부터 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 b) 상기 DRG2 유전자의 발현량이 정상인에 비하여 감소되었을 때 항암제에 대한 내성을 가질 것으로 예측하는 단계를 포함하는 항암제 내성에 관한 정보제공방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 a) 생물학적 시료로부터 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 b) 상기 DRG2 유전자의 발현량이 정상인에 비하여 감소되었을 때 낮은 생존률을 예측하는 단계를 포함하는 암의 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 생체검사에서 얻어지는 모든 시료, 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 복막액, 머리카락, 소변, 대변 등일 수 있으나, DRG2 mRNA 또는 DRG2 단백질을 포함하고 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 발현량을 측정하는 단계는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), 유세포분석(FACS), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 암은 유방암, 대장암, 직장암, 폐암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 자궁암, 위암, 골암, 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, DNA 손상을 유도하는 항암제를 사용하여 치료하는 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항암제는 DNA에 손상을 유도하는 항암제일 수 있으며, 바람직하게는 DNA의 구아닌 교차결합을 손상시키는 알킬화제(Alkylating agent)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 니트로겐 머스타드 계열의 메클로로레타민, 멜팔란, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 벤다무스틴, 트로포스파미드, 우라무스틴 등, 백금 착화물 계열의 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴 등, 알킬 술폰산염 계열의 부설판 등, 에틸렌아민 계열의 알트리타민, 티오테파 등, 또는 독소루비신, 이리노테칸, 에토포시드 등일 수 있으나, DNA 손상을 유도하여 암의 사멸을 유도하는 항암제의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 정상인은 암을 가지고 있지 않은 것으로 확인된 개체를 의미한다.

[0017] 또한, 본 발명은 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유전자의 발현량을 측정하는 물질을 포함하는 암에 관한 정보 제공용 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 발현량을 측정하는 물질은 바람직하게는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있으나, 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 키트는 GAPDH, 18s rDNA 또는 β액틴(actin)의 발현량을 측정하는 물질

을 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 암에 관한 정보는 암 발생 예측을 위한 정보, 항암제 내성에 관한 정보, 또는 생존률의 예측을 위한 정보 등일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유도제를 유효성분으로 포함하는 항암제 내성을 가지는 암의 민감제(sensitizer)용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유도제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유도제는 바람직하게는 DRG2 유전자의 발현 촉진제 또는 DRG2 단백질의 활성화제일 수 있으며, 상기 발현 촉진제는 DRG2 유전자의 발현을 촉진시키는 물질을 의미하며, 상기 활성화제는 DRG2 단백질의 활성을 증가시키는 물질을 의미한다. 더욱 바람직하게는, 핵산, 펩타이드, 압타머, 단백질, 화합물, 천연물, 천연추출물, 지질 등과 같은 생체 고분자 물질 및 이들의 복합체 등을 포함할 수 있다. 상기 발현 촉진제 또는 활성화제의 기작은 특별히 제한되지 않으나, 일례로, 전사, 번역 등 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 유도제는 바람직하게는 DRG2 단백질; 또는 DRG2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 mRNA 혹은 발현 벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, 상기 DRG2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질이거나, 상기 DRG2 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 세포 내의 DRG2 단백질의 양을 증가시킬 수 있는 것이라면 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항암제는 DNA에 손상을 유도하는 항암제일 수 있으며, 바람직하게는 DNA의 구아닌 교차결합을 손상시키는 알킬화제(Alkylating agent)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 니트로겐 머스타드 계열의 메클로로레타민, 멜팔란, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 벤다무스틴, 트로포스파미드, 우라무스틴 등, 백금 착화물 계열의 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴 등, 알킬 술폰산염 계열의 부설판 등, 또는 에틸렌아민 계열의 알트리타민, 티오테파 등일 수 있으나, DNA 손상을 유도하여 암의 사멸을 유도하는 항암제의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0026] 또한, 본 발명은 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유도제(inducer)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항암제에 대한 치료 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

[0027] 또한 본 발명은 DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2) 유도제(inducer)를 유효성분으로 포함하는 조성물의 항암제 치료 효과를 향상시키기 위한 용도를 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 치료 효과를 향상시키는 것은 항암제에 대한 내성을 감소시켜 항암제에 의한 치료 효과를 증가시키는 것을 의미한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 DRG2를 바이오마커로 사용하여, 정상인과 비교하여 DRG2 단백질의 발현량이 감소하였을 때, 암의 발생률이 높아지며, DNA 손상을 유도하는 항암제들에 대한 내성이 증가되며, 암 환자의 생존률 또한 감소되는 것을 예측할 수 있다는 것을 확인하였다. 이를 통하여, DRG2 단백질의 발현량을 측정함으로써 다양한 암 발생 고위험군의 예측, 환자의 항암제에 대한 치료 효과 예측, 생존률 등의 예후를 예측할 수 있다는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 DRG2를 바이오마커로 사용함으로써 항암제에 의한 내성을 미리 예측하여, 항암제에 의한 치료 효과를 미리 예측하여, 항암제에 의한 치료 효과를 향상시켜 환자의 불필요한 고통을 감소시킬 수 있다. 나아가, DRG2 단백질의 발현량을 증가시키는 물질들을 선별하여 항암제와 함께 사용함으로써 DNA 손상을 유도하는 항암제들의 내성을 감소시켜 치료 효과를 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, DNA 손상을 유도하는 항암제를 치료에 적용하는 다양한 암에 폭넓게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 DRG2와 결합하는 단백질을 DNA 손상 자극과 관련된 단백질군으로 분류한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 세포주에 항암제를 처리하였을 때, DRG2 단백질이 핵으로의 이동함

을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암 세포주에 항암제를 처리하였을 때, DRG2 단백질이 핵으로의 이동함을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암 세포주에 항암제를 농도별로 처리하였을 때, DRG2 단백질이 핵으로의 이동함을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 세포주에 레이저를 사용하여 DNA 손상을 인위적으로 유도하였을 때, DNA 손상 부위로 DRG2 단백질의 이동을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 세포주에 다양한 세기의 레이저를 이용하여 DNA 손상을 인위적으로 유도하였을 때, DNA 손상 부위로 DRG2 단백질의 이동을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 164-187aa 위치의 서열이 제거된 DRG2 돌연변이주를 발현하는 암세포에 항암제를 처리하였을 때, DRG2 단백질의 이동을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 164-187aa 위치의 서열이 제거된 DRG2 돌연변이주를 발현하는 암세포에 항암제를 처리하였을 때, DRG2 단백질의 이동을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 importin 저해제 처리 시에, DRG2 단백질의 핵으로의 이동이 억제됨을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 ABL kinase 저해제 처리 시에, DRG2 단백질의 이동을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y178의 인산화 여부가 DRG2 단백질의 핵내 이동에 영향을 미치는지 여부를 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 DRG2 단백질의 존재 여부에 따라 손상된 DNA에 결합되어 있는 PARP1 단백질의 양을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 DNA 손상 시에 PARP1 단백질의 양의 변화를 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 DRG2 단백질과 DNA repair 기작과의 연관 관계를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 DRG2 단백질의 손상된 DNA 회복 효과를 Comet assay로 확인한 결과를 나타낸 도면이다. ***는 $p < 0.001$을 의미하고, ****는 $p < 0.0001$을 의미한다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 DRG2 단백질과 항암제에 대한 내성과의 연관관계에 대하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 DRG2 단백질과 암의 발생과의 연관관계를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장암 환자에서 DRG2 mRNA 양에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 식도암 환자에서 DRG2 mRNA 양에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 육종 환자에서 DRG2 mRNA 양에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 췌장암 환자에서 DRG2 mRNA 양에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 자궁암 환자에서 DRG2 mRNA 양에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 환자에서 DRG2 mRNA 양에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명에서는 DRG2 유전자의 발현량을 확인함으로써, 암 발생 고위험군을 분류하거나, 항암제에 의한 내성을 가질 확률이 높은 환자를 분류하거나, 암 환자의 생존률을 예측할 수 있기 때문에 다양한 정보를 이용하여 암 환자의 치료 효과를 높일 수 있다. 또한, DRG2 유도제를 이용하여 DRG2 단백질의 양을 증가시킴으로써 항암제에 내성을 감소시켜 다양한 암의 치료 효과를 현저히 높일 수 있다.

[0033] 본 명세서에 있어서 "발현량(expression level) 측정"이란, 암에 관한 정보를 확인하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자, 즉 DRG2 유전자로부터 코딩(coding)된 mRNA 또는 단백질의 존재 여부 및/또는 발현량을 확인하는 과정으로 마커 유전자의 mRNA에 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브 세트를 이용하여 mRNA의 양을 측정하거나, 마커 유전자의 단백질에 특이적으로 결합하는 결합분자를 이용하여 단백질의 양을 확인함으로써 측정할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), 유세포분석(FACS), 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 마커 유전자의 mRNA 또는 마커 유전자의 단백질을 확인할 수 있는 방법이라면 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 명세서에 있어서 "생물학적 시료(biological sample)"란, 체내의 DRG2 유전자의 발현 정도를 확인할 수 있은 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 생체검사에서 얻어지는 모든 시료, 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 복막액, 머리카락, 소변, 대변 등일 수 있으나, DRG2 mRNA 또는 DRG2 단백질을 포함하고 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 명세서에 있어서, "키트(kit)"란 DRG2 유전자의 발현량을 측정하여 암에 관한 정보를 제공할 수 있는 검진용 기기를 의미하며, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 DRG2 유전자의 발현량을 정상인의 DRG2 유전자의 발현량과 비교할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 바람직하게는 DRG2 유전자에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브(probe) 또는 프라이머(primer) 세트를 포함할 수 있으며, 또는 DRG2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체(antibody) 또는 앱타머(aptamer)를 포함하는 형태일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 명세서에 있어서, “DRG(Developmentally-regulated GTP-binding protein)”란 세포내의 여러 가지 조절에 관여하는 단백질로서, large superfamily를 이루고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 superfamily에는 trimeric G protein(예를 들어, transducin), monomeric G protein(예를 들어, ras) 및 단백질 합성에 관여하는 GTPase(예를 들어, elongation factor Tu) 등과 같은 중요한 3개의 subfamily가 존재하는데, 최근 이들과 염기서열 및 기능이 다른 새로운 그룹의 G protein들이 발견되었으며, DRG는 GTP와 결합에 필요한 G1부터 G5까지의 5개 region을 모두 지니고 있으며, 크기는 trimeric G protein과 유사한 것으로 알려져 있다. 그러나 아미노산 서열이 trimeric G protein 뿐만 아니라 기존의 G protein subfamily들과 전혀 다른 특성을 지니고 있어 새로운 subfamily로 구분되고 있다. 또한 DRG에는 DRG1과 DRG2가 있는데, 박테리아로부터 사람에 이르기까지 거의 모든 종류의 세포에 존재하는 것으로 알려져 있다.

[0037] 본 명세서에 있어서, "DRG2"는 단백질 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 동일한 단백질 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다. 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 90% 이상의 상동성이 유지되고, DRG2 야생형 단백질과 동일한 활성을 보유하는 한 균등한 단백질임을 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 DRG2 단백질은 야생형과 동일한 단백질 활성을 보유하는 한 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 단백질을 포함할 수 있다. 바람직하게는 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알카리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다. 또한 아미노산 서열상의 변이로 효소 활성이 증대된 변

이체일 수 있다.

[0038] 본 명세서에 있어서, “DRG2 유도제(DRG2 inducer)”란 DRG2 유전자의 발현을 증가시키거나, DRG2 단백질의 활성을 증가시킬 수 있는 모든 물질을 총칭하며, 그 일례로, DRG2 단백질 그 자체이거나, DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 지니는 mRNA 혹은 작동가능하게 연결된 발현 벡터의 형태일 수도 있다. 상기 발현 벡터는 바람직하게는 당업계에 공지된 플라스미드, 파지, 코스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체 등을 의미한다. 바이러스 벡터는 예를 들어, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노바이러스-연관 바이러스, 허피스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipoxvirus) 등이 포함될 수 있다. 그리고 상기 DRG2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하되, 이에 한정되지 않고 서열번호 2의 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 염기서열일 수 있다.

[0039] 본 명세서에 있어서, “개체(individual)”란 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 바람직하게는 포유동물이나, 그 대상에는 제한이 없다.

[0040] 본 명세서에 있어서, “예방(prevention)”이란 암의 발생을 차단하는 광의의 개념을 말하며, 바람직하게는 발생 이전에 미리 방지하는 1차 예방과, 발생을 조기에 발견하고 적시에 치료하는 2차 예방을 모두 포함하나, 암 발생 이전에 대처하는 과정 및/또는 활동이라면 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 명세서에 있어서, “치료(treating)”란 암의 발생에 대처하는 광의의 개념을 말하며, 암의 치료, 치유, 완화, 감소 등을 시키기 위한 과정 및/또는 활동이라면 제한이 없다.

[0042] 본 명세서에 있어서, “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”이란 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 경구투여시에는 결합제, 활탁제, 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, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 당의정, 겔, 환제, 산제, 과립제, 좌제, 외용제, 용액, 현탁액, 서방형 제제, 슬러리 등으로 제형화하여 사용할 수도 있다. 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구 투여가 바람직하며, 예를 들어, 구강, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피내, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하, 직장, 흉골내, 병소내, 두개골내 등이 포함된다.

[0044] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 500 mg/kg 또는 0.001 내지 500 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0046] 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.

[0048] **[실시예]**

[0049] **실시예 1: DRG2와 DNA 손상과의 연관관계 확인**

[0050] **1.1. DRG2와의 결합 단백질 확인**

[0051] DRG2(Developmentally-regulated GTP-binding protein 2)와 결합하는 단백질을 확인하기 위하여, 5,000개의 인간 단백질을 포함하는 ProtoArray™ Human Protein Microarray nc v3.0, 그리고 20,000개의 인간 단백질을 포함하는 HuProt™ v3.1, 2개의 protein microarray를 사용하여 DRG2와 결합하는 단백질을 선별하였다. 그 결과 202개의 단백질이 2개의 protein microarray에서 공동으로 DRG2와 결합하는 것을 확인하였다.

[0052] 202개의 단백질 중에서 DNA 손상 자극에 대한 세포 반응(cellular response to DNA damage stimulus)과 관련된 단백질군(GO0006974)과 DNA 손상 자극에 대한 반응 조절(regulation of response to DNA damage stimulus)과 관련된 단백질군(GO2001020)과 연관된 단백질을 확인하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0053] 도 1에 나타난 바와 같이, 202개의 단백질 중에서 DNA 손상 자극에 대한 세포 반응과 관련된 단백질은 RAD51D, RNF113A, MCM6, APEX2, LIG3, OARD1 등이 포함된 8개였으며, DNA 손상 자극에 대한 반응 조절과 관련된 단백질은 2개인 것을 확인하였다. 특히, TAF9 및 RAD51은 DNA 손상 자극에 대한 세포 반응 및 DNA 손상 자극에 대한 반응 조절 모두에 속한 단백질은 인 것을 확인하였다.

[0055] **1.2. DRG2와 DNA 손상 반응 유전자와의 연관관계**

[0056] DNA 손상 반응 유전자(DNA damage response gene; DDR gene)와 DRG2와의 연관관계를 확인하기 위하여, TCGA(The Cancer Genome Atlas) database 중에서 침윤성 유방암(breast invasive carcinoma) 1,098 case로부터 얻어진 1,222개의 RNA-seq 데이터로부터 DRG2와 연관되어 발현 변화를 보이는 유전자들을 선별하였다. 그 결과, 1,404개의 유전자가 양의 상관관계가 있으며, 30개의 유전자는 음의 상관관계가 있는 것을 확인하였다. 이 중 DRG2와 양의 상관관계를 보이는 1,404개의 유전자들을 대상으로 KEGG pathway 분석을 수행한 결과 SMUG1, LIG1, POLD1, XRCC1, APEX2, POLL, MUTYH 등과 같이 손상된 DNA의 회복과 관련된 Base excision repair 관련 유전자들이 포함된 것을 확인하였다(p=0.0079).

[0057] 또한, GTEx(Genotype-Tissue Expression) database 중에서 질병을 가지고 있지 않은 정상인 1,000명의 54개 조직을 대상으로 얻어진 17,382개의 RNA-Seq 데이터로부터 DRG2와 연관되어 발현 변화를 보이는 유전자들을 선별하였다. 그 결과 868개 유전자들이 DRG2와 양의 상관관계를 보였다. 이 유전자의 KEGG pathway 분석을 수행한 결과 OGG1, APEX1, XRCC1, HMGB1, MUTYH 등과 같은 Base excision repair 관련 유전자 들과(p=0.0132), RFC1, ERCC3, ERCC1, RPA1, ERCC5, GTF2H4 등과 같은 Nucleotide excision repair 관련 유전자들이 포함되어 있는 것을 확인하였다(p=0.0155).

[0058] 또한, GTEx database 중에서 질병을 가지고 있지 않은 정상인의 혈구세포들을 대상으로 얻은 755개의 RNA-seq 데이터로부터 DRG2와 연관되어 발현 변화를 보이는 유전자들을 선별하였다. 그 결과 3,177개의 유전자들이 DRG2와 양의 상관 관계를 보이는 것을 확인하였다. 이 유전자들의 KEGG pathway 분석을 수행한 결과, Base excision repair 관련 유전자 들인 PARP3, LIG1, PARP1, PARP2, OGG1, XRCC1, APEX2, LIG3, UNG, NEIL2, NTHL1, POLD1, APEX1, POLD2, POLE3, POLE 및 MUTYH(p= 0.000002), 그리고 Nucleotide excision repair 관련 유전자들인 RFC5, LIG1, RFC1, XPA, RPA1, GTF2H3, GTF2H4, DDB2, DDB1, ERCC3, POLD1, ERCC1, POLD2, POLE3, ERCC2, RCC6, MNAT1, 및 POLE이 포함되어 있는 것을 확인하였다(p= 0.0002).

[0060] 상기 결과들을 통하여, DRG2가 DNA 손상의 회복과 관계되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] **실시예 2: DNA 손상 시 DRG2의 이동 확인**

[0063] **2.1. 유방암 세포주에서 항암제 처리 후 DRG2의 이동 확인**

[0064] 35 mm 세포배양 plate안의 coverslip 위에 유방암 세포주인 MCF7를 배양하였다. 배양한 세포에 10μM의 etoposide(Selleckchem) 또는 irinotecan(Selleckchem)을 처리하고 24시간 반응시킨 후에, 3.7% 파라포름알데이드를 처리하여 세포를 고정시키고, 0.5% Troton X-100/PBS 용액에 20분간 반응시켜 세포의 투과성을 증가시켰다. 3% BSA(bovine serum albumin)/PBS 용액에 1시간동안 반응시켜 blocking 한 다음, anti-DRG2 항체

(Proteintech)와 Alexa Fluor 594가 conjugation 되어 있는 anti-rabbit IgG 항체 (Thermo Fisher Scientific)들과 반응시켰다. 그리고 DAPI를 이용하여 세포의 핵을 염색한 후, confocal microscope(Olympus 1000/1200 Laser Scanning Confocal System)을 이용하여 DRG2의 위치를 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0065] 도 2에 나타난 바와 같이, 항암제를 처리하지 않은 대조군(Non-treatment)의 경우에는 대부분의 DRG2가 세포질에 존재하나, 항암제인 etoposide 또는 irinotecan을 처리한 실험군에서는 DRG2 단백질이 핵 내로 이동하는 것을 확인하였다.

[0067] **2.2. 폐암 세포주에서 항암제 처리 후 DRG2의 이동 확인**

[0068] 폐암 세포주인 PC9에 10μM의 etoposide(Selleckchem) 또는 4μM의 doxorubicin(Selleckchem)을 처리하고 24시간 반응시킨 후에, 실시예 2.1과 동일한 방법으로 세포를 염색하였다. 그리고 confocal microscope을 이용하여 DRG2의 위치를 확인하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0069] 도 3에 나타난 바와 같이, 항암제를 처리하지 않은 대조군(Non-treatment)의 경우에는 대부분의 DRG2가 세포질에 존재하나, 항암제인 etoposide 또는 doxorubicin을 처리한 실험군에서는 DRG2 단백질이 핵 내로 이동하는 것을 확인하였다.

[0070] 또한, 항암제 농도에 따른 DRG2의 이동을 확인하기 위하여, PC9 세포주 또는 DRG2가 넉아웃된 PC9 세포주에 8μM 또는 16μM의 doxorubicin을 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 세포에 protease/phosphatase inhibitor cocktail(Roche)가 첨가된 hypotonic buffer(10 mM HEPES(pH 7.6), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 및 1 mM EDTA)를 첨가하여 세포를 깬 후, 4° C 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포질 분획인 상등액을 획득하였다. 그리고 침전물은 hypotonic buffer로 2회 세척 후 protease/phosphatase inhibitor cocktail(Roche)이 첨가된 high-salt buffer(10 mM HEPES(pH 7.6), 500 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 및 1 mM EDTA)를 이용하여 현탁시켰다. 냉장 조건에서 40분간 반응 시킨 후에 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 핵 분획을 획득하였다. 그리고 각각에서 분리된 단백질들을 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 크기에 따라 분리하였다. 그리고 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 단백질을 이동시키고 5% 스킴 밀크를 이용하여 블록킹 단계를 거친 후에, anri-DRG2 항체(Proteintech), anti-α-tubulin 항체(Santa Cruz), anti-Histone H3 항체(Cell Signaling Technology)를 각각 처리하여, 결합시킨 후에, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG 혹은 anti-mouse-IgG 2차 항체(Cell Signaling Technology)를 처리하고, ECL kit(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0071] 도 4에 나타난 바와 같이, 세포질 분획에서는 세포질 마커인 α-tubulin 밴드가 검출되었고, 핵 분획에서는 핵의 마커인 Histone 3 밴드가 검출되었다. 이 결과로부터 세포질 및 핵이 잘 분리되었음을 확인할 수 있었다. 항암제를 처리하지 않은 세포에서는 대부분의 DRG2 단백질이 세포질에 존재하나, 항암제를 처리한 세포에서는 DRG2 단백질이 핵 내로 이동하는 것을 확인하였다. 또한, 항암제의 농도가 증가될수록, 핵 내로 이동하는 DRG2 단백질의 양은 증가되는 것을 확인하였다. DRG2가 넉아웃된 세포주에서는 DRG2 단백질이 관찰되지 않는 것을 확인하였다.

[0073] **2.3. 유방암 세포주에서 DNA 손상 부위로 DRG2의 이동 확인**

[0074] 유방암 세포주인 MCF7을 10 ng/ml Hoechst 33258(Sigma)로 30분간 반응시켜 감작시킨 후에 405 nm 레이저로 핵에 line 형식으로 DNA damage를 유도하였다. DNA damage 유도 15분 후에 실시예 2.1과 동일한 방법으로 세포를 염색하고, confocal microscope을 이용하여 DRG2의 위치를 확인하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0075] 도 5에 나타난 바와 같이, 아직 대부분의 DRG2가 세포질에 존재하지만, DNA 손상이 유도된 line을 따라 DRG2 단백질이 이동되는 것을 확인하였다.

[0076] 또한, 레이저의 세기를 변화시켜, 핵에 line 형식으로 DNA damage를 유도하였다. 그리고 실시예 2.1과 동일한 방법으로 세포를 염색하고, confocal microscope을 이용하여 DRG2의 위치를 확인하였다. 또한, DNA 손상 마커인 γH2AX에 대한 항체(Cell Signaling Technology)를 이용하여 DNA 손상 위치와 DRG2 단백질의 위치를 재확인하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0077] 도 6에 나타난 바와 같이, 레이저의 세기에 따라 DNA 손상 정도가 증가되었으며, DNA 손상이 증가될수록 DNA 손상된 부위로 DRG2 단백질의 이동량 또한 증가된 것을 확인하였다.

[0079] 상기 결과들을 통하여, DRG2는 DNA 손상이 발생되었을 때, 세포질에서 핵 내로 이동하여 DNA 손상 부위에 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] **실시예 3: DRG2의 핵내 이동을 위한 NLS 확인**

[0082] **3.1. DRG2 단백질 내의 NLS 확인**

[0083] DRG2 단백질(서열번호 1) 내에 nuclear localization signals(NLS)이 존재하는지 확인하기 위하여, cNLS Mapper(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi), NLStradamus(http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/) 및 SeqNLS(http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/)를 이용하여 DRG2 단백질 서열을 분석하였다. 그 결과, 5개의 NLS 후보를 확인하였으며, 아미노산 서열 중 164-187aa 위치의 서열이 NLS일 가능성이 가장 높을 것으로 예측하였다. PCR을 사용하여 사람 DRG2 단백질의 164-187aa 부위를 암호화하는 염기서열을 제거한 돌연변이 DRG2(hDRG2 Δ164-187)를 만든 후 pEGFPN1 발현 벡터에 클로닝하여 pEGFP/hDRG2 Δ164-187를 제작하였다. pEGFP/hDRG2 Δ164-187 벡터를 유방암 세포주인 MCF7에 형질전환하였다. 그리고 대조군으로는 정상 DRG2 단백질에 GFP 단백질을 결합시킨 단백질을 코딩하는 pEGFP/hDRG2 벡터(Mani et al. Mol Biol Cell 2016 27: 334-348)를 MCF7 세포에 형질전환하여 사용하였다. 그리고 각각의 세포주에 4μM의 doxorubicin을 30분 동안 처리하고, confocal microscope을 이용하여 DRG2 단백질의 위치를 확인하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0084] 도 7에 나타난 바와 같이, 정상 DRG2는 항암제 처리 이후 핵으로 이동한 반면, 164-187aa 위치의 서열이 제거된 DRG2 단백질의 경우, 항암제 처리 후에도 핵 내로 이동하지 못하는 것을 확인하였다.

[0085] 또한, 실시예 2.2와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅을 이용하여 DRG2 단백질의 위치를 확인하였다. 원래 세포가 지니는 DRG2와 GFP가 결합된 DRG2 단백질을 동시에 확인하기 위하여 anti-DRG2 항체(Proteintech)를 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0086] 도 8에 나타난 바와 같이, wild type의 MCF7에서는 항암제를 처리하였을 때, DRG2 단백질이 핵 내로 이동하나, 164-187aa 위치의 서열이 제거된 돌연변이주의 경우에는 핵에 존재하는 DRG2 단백질의 양이 증가하지 않음이 확인되었다.

[0088] 상기 결과들을 통하여, DRG2 단백질의 164-187aa 위치의 서열이 NLS로 작동하는 것을 확인할 수 있었다.

[0090] **3.2. DRG2 단백질 내의 NLS 서열 분석**

[0091] DRG2 단백질 내의 아미노산 서열 중 NLS를 포함하는 164-187aa 부위의 아미노산 서열을 다른 단백질들(BENI, ISAV Nucleoprotein, SYNV Nucleocapsid, CHD8, TCoV)의 NLS 서열과 비교한 결과, “KPKK” 아미노산 서열을 공통적으로 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한, KPKK 아미노산 서열에서 두 개 이전의 아미노산 잔기는 트레오닌(T) 또는 세린(S)으로 인산화가 가능한 부위인 것을 확인하였다.

[0092] 또한, NetPhospan(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhospan/) 및 PhosphoNet(http://www.phosphonet.ca/) 프로그램들을 이용하여, 인산화가 가능한 아미노산 잔기들을 분석해본 결과, Y178 잔기가 ABL kinase 등에 의하여 인산화될 가능성이 높은 것을 확인하였다.

[0094] **실시예 4: DRG2 단백질의 핵내 이동 기작 확인**

[0095] **4.1. DRG2 단백질의 핵내 이동을 위한 importin 단백질 확인**

[0096] DRG2 단백질의 NLS 서열에 결합하여, 단백질이 핵 내로 이동하는데 관여하는 importin을 확인하기 위하여, 실시예 1.1에서 확인된 DRG2 단백질과 결합하는 단백질 중에서 importin 단백질을 확인하였다. 그 결과, KPNA2 단백

질이 포함되어 있는 것을 확인하였다. KPNA2 단백질이 핵 내 이동에 관여하는지 확인하기 위하여, 폐암 세포주인 H1975 세포주에 importin 저해제인 Importazole(Selleckchem)과 항암제인 doxorubicin을 처리하고 3시간 후, DRG2 단백질이 핵 내로 이동하는지 DRG2 항체를 이용하여 확인하였다. 대조군으로는 DMSO를 Importazole과 동량 처리하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[0097] 도 9에 나타난 바와 같이, importin 저해제를 처리한 실험군에서는 항암제를 처리하여도, DRG2 단백질이 핵 내로 이동하는 것이 억제되는 것을 확인하였다.

[0099] **4.2. DRG2 단백질의 인산화와 핵내 이동의 연관 관계 확인**

[0100] DRG2 단백질의 인산화가 핵내 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, MCF7 세포주에 ABL kinase의 저해제인 dasatinib(Sigma)을 100nM의 농도로 2시간 동안 전처리한 후에, 항암제인 doxorubicin을 2시간 동안 처리하고, 실시예 2.2와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0101] 도 10에 나타난 바와 같이, ABL kinase 저해제를 전처리한 실험군에서 DRG2 단백질의 핵내 이동이 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, ABL kinase에 의한 인산화가 DRG2 단백질을 핵내로 이동하는 것을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0102] DRG2 단백질의 Y178 잔기 인산화 여부가 핵내 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, site-directed Mutagenesis kit(Enzynomics)를 사용하여 pEGFP/hDRG2 벡터의 DRG2 Y178 잔기를 글루탐산(E)으로 돌연변이 시킨 pEGFP/hDRG2 Y178E를 제작하였다. pEGFP/hDRG2 Y178E 벡터를 MCF7에 형질전환하였다. 그리고 대조군으로는 정상 DRG2 단백질에 GFP 단백질을 결합시킨 단백질을 코딩하는 pEGFP/hDRG2 벡터를 MCF7 세포에 형질전환하였다. 각각의 세포주에 32㎛M의 doxorubicin을 2시간 동안 처리하고, DRG2 단백질의 핵내 이동을 GFP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. 웨스턴 블롯팅의 band intensity는 Image J를 이용하여 정량화하고, 세포질에 존재하는 DRG2 단백질의 농도를 핵내 존재하는 DRG2 단백질의 농도로 나누어 상대적인 양을 계산하였다. 이후 모든 실험은 최소 세 번 이상 반복하였으며, 결과는 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's t-test로 확인하였고, $P < 0.05$이면, 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[0103] 도 12에 나타난 바와 같이, Y178E 돌연변이주에서는 정상 DRG2 단백질과 비교하여, 핵내 이동이 감소되고, 세포질에 존재하는 DRG2 단백질의 양이 높은 것을 확인하였다.

[0104] 상기 결과들을 통하여, DRG2 단백질의 NLS의 인산화 여부가 핵내 이동에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0106] **실시예 5: DRG2 단백질과 DNA 손상 회복과의 연관 관계 확인**

[0107] **5.1. DRG2 단백질과 PARP1의 연관 관계 확인**

[0108] 일차적으로 DRG2 단백질과 PARP1의 연관 관계를 확인하기 위하여, DNA 손상 위치에서의 PARP1을 확인하였다. 보다 자세하게는, 폐암 세포주인 PC9 세포주(PC9-WT)와 DRG2가 넉아웃된 PC9 세포주(PC9-KO) 각각의 핵에 레이저를 이용하여 DNA damage를 유도하였다. 그리고 PARP1 항체(Cell Signaling Technology)를 이용하여 손상된 DNA에 존재하는 PARP1의 양을 확인하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[0109] 도 12에 나타난 바와 같이, PC9-WT에서는 DNA damage를 유도한 후에, 시간이 흘러도 PARP1 단백질이 손상된 위치에 그대로 유지되나, PC9-KO에서는 4분 이후부터 단백질의 양이 감소되기 시작하여 13분 후에는 PARP1 단백질이 전혀 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, DRG2가 존재하지 않는 세포주에서는 손상된 DNA로부터 PARP1이 빠르게 떨어져나가는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] 손상된 DNA에 결합한 PARP-1이 감소하는 기작으로는 다음과 같은 2가지가 있다. 첫째, PARP-1에 ubiquitin이 결합한 다음 분해되어 전체 양이 감소하는 경우가 있다. 둘째, PARP-1은 손상된 DNA에 결합하면 활성화되어 여러 종류의 단백질들에 PAR(poly (ADP-ribose))를 붙이는데, 활성화된 PARP-1이 자기 자신에게 PAR을 붙이는 경우(auto-PARylation)에는 PARP-1은 손상된 DNA에서 떨어져 나간다. 따라서, 먼저 PARP1 단백질의 분해가 촉진되어 손상된 DNA에 결합된 PARP1 단백질이 감소된 것인지 확인하기 위하여, PC9 세포주와 DRG2가 넉아웃된 PC9 세포주에 각각 독소루비신 1㎛M을 처리하고, PARP1 단백질의 양을 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.

[0111] 도 13에 나타난 바와 같이, PARP1 단백질의 양은 변화가 없는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, PARP1 단백질의 감소는 PARP1 단백질의 분해에 의한 것이 아닌 것을 확인하였으며, 이를 통하여, DRG2 단백질이 PARP1 단백질의 auto-PARylation을 억제할 가능성이 높음을 알 수 있었다.

[0113] **5.2. DRG2 단백질과 DNA 회복 기작과의 연관 관계 확인**

[0114] DRG2 단백질의 DNA 회복 기작과의 연관 관계를 확인하기 위하여, 일반적으로 DNA double strand break에 대한 DNA repair 방법으로 알려져 있는 HR(homologous recombination)과 NHEJ(non-homologous end joining)를 분석하였다. 보다 자세하게는, DR-GFP(HR 분석용) 또는 EJ5-GFP (NHEJ 분석용)를 발현하는 U2OS 세포(Gunn A, Stark JM. Methods Mol Biol. 2012;920:379-91)에 DRG2 siRNA를 처리하여 DRG2 단백질의 발현을 억제시켰다. 이 세포들에 제한효소 I-SceI을 암호화 하는 벡터 1μg을 사용하여 형질변환시켜 세포에 DNA double strand break를 유발 시킨 후 DNA 회복 기작인 HR과 NHEJ를 확인하였다. 이때 형질전환 효율 확인을 위하여 DsRed를 같이 사용하였다. 결과는 도 14에 나타내었다.

[0115] 도 14에 나타난 바와 같이, DRG2 단백질의 발현이 억제된 세포에서는 HR이 증가된 반면, NHEJ는 감소된 것을 확인하였다.

[0117] **5.3. DRG2 단백질의 DNA 손상 및 손상된 DNA의 회복에 미치는 효과 확인**

[0118] DRG2 단백질이 DNA 손상에 미치는 영향을 확인하기 위하여, PC9 세포주와 DRG2가 넉아웃된 PC9 세포주에 각각 4 μM의 doxorubicin을 48시간 동안 처리하여 DNA 손상을 유도시켰다. 또한 DRG2 단백질이 손상된 DNA의 회복에 미치는 영향을 확인하기 위하여 doxorubicin이 처리된 PC9 세포주와 DRG2가 넉아웃된 PC9 세포주를 doxorubicin이 없는 배양액으로 세척 후 24시간 동안 손상된 DNA의 회복 시간을 주었다. 세포를 모아서 PBS에 3 x 10^5 cells/ml 농도로 만든 후 alkaline-Comet assay(single cell gel electrophoresis)를 수행하였다. 그 결과는 도 15에 나타내었다.

[0119] 도 15에 나타난 바와 같이, DRG2가 넉아웃된 세포주에서 항암제에 의한 DNA 손상 정도도 감소되고, 회복 속도 또한 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, DRG2 단백질이 암 세포에서 항암제에 의한 DNA 손상을 증가시키며, DNA 회복 또한 지연시키는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, DRG2 단백질의 발현 감소는 암 세포에서 항암제에 대한 내성을 나타내며, 항암제에 의한 치료 효과를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0121] **실시예 6: DRG2 단백질과 암과의 연관 관계 확인**

[0122] **6.1. DRG2 단백질과 항암제에 대한 내성과의 연관 관계 확인**

[0123] DRG2 넉아웃된 세포주에서 DNA 손상에 따른 DNA 회복 기작에 변화가 발생함이 확인 되었는데, 이와 같은 변화가 항암제 내성에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, DRG2가 넉아웃된 PC9 세포주와 DRG2가 넉아웃된 mLEC(mouse lung endothelial cell) 세포주에 각각 다양한 농도의 doxolubicin을 처리한 후에, colony forming assay 및 MTS assay를 이용하여 세포의 생존률을 확인하였다. Colony forming assay는 다음과 같이 진행하였다. 즉 60 mm 배양 플레이트에 200개의 세포를 접종하고, 세포가 접종된 각 플레이트에 다양한 농도의 doxorubicin이 포함된 배양액을 첨가하여 배양하였다. 2주 배양 후 3.7% 포르말린 용액으로 고정 후 크리스탈 바이오레트 용액으로 20분간 염색하고, 증류수를 사용하여 세척 후 콜로니 수를 세었다. MTS assay는 다음과 같은 방법을 사용하여 수행하였다. 먼저 96 well 플레이트의 각 well에 세포를 1 x 10^4개씩 접종하였다. 24시간 배양 후 다양한 농도의 doxorubicin 처리하고 24시간 추가 배양한 후 CellTiter 96®AQueous One Solution cell proliferation assay(Promega)를 사용하여 MTS assay를 수행하였다. 그 결과는 도 16에 나타내었다.

[0124] 도 16에 나타난 바와 같이, 두 세포주에서 모두 DRG2가 넉아웃된 경우에 항암제에 대한 내성이 발생하는 것을 확인하였다.

[0126] **6.2. DRG2 단백질과 암의 발생과의 연관 관계 확인**

[0127] DRG2 단백질이 암의 발생에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 18개월된 정상 마우스와 DRG2가 넉아웃된 마우스의 조직들을 대상으로 암 발생 여부를 확인하였다. 본 실험은 울산대학교 동물윤리위원회의 심의를 거쳐 허가를 받아 수행하였으며, 동물윤리위원회의 규정(The guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of Ulsan University for Life Sciences)에 따라 실험동물을 다루었다. 또한 실험 동물은 SPF 시설에서 사육하였다. 그 결과, DRG2가 넉아웃된 모든 마우스의 자궁(uterus)에서 암이 발생한 것을 확인하였다. 암이 발생된 자궁은 도 17에 나타내었다.

[0129] 상기 결과들을 통하여, DRG2 단백질이 손상된 DNA의 회복 기작에 영향을 미쳐, 암의 발생 및 항암제에 대한 내성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0131] **실시예 7: DRG2 발현과 암환자 생존률과의 연관 관계 확인**

[0132] Kaplan-Meier Plotter(kmplot.com)를 사용하여 여러 종류의 암을 대상으로 DRG2 mRNA 발현량과 암환자 생존율과의 연관성을 비교하였다. 그 결과는 도 18 내지 23에 나타내었다.

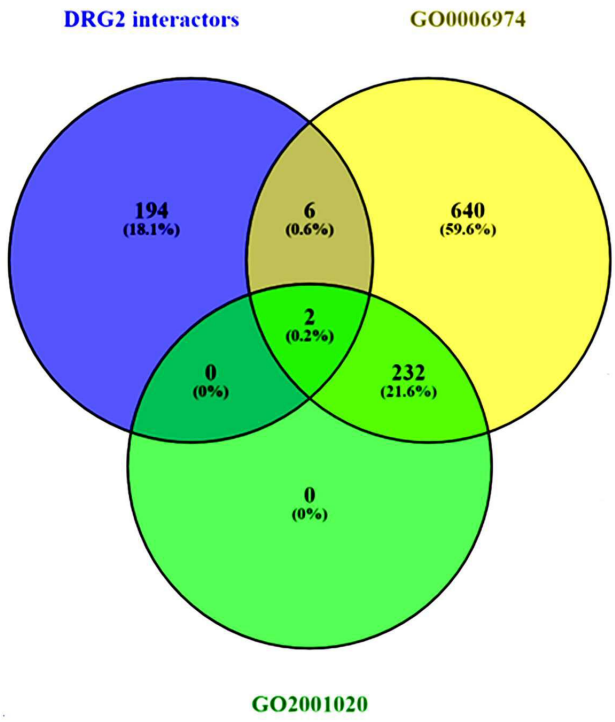
[0133] 도 18 내지 23에 나타난 바와 같이, 신장암, 식도암, 육종, 췌장암, 자궁암 또는 유방암 환자에서 정상인과 비교하여, DRG2 단백질의 발현량이 낮을 경우, 생존률이 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

[0135] 상기 결과들을 통하여, DRG2를 바이오마커로 사용하여, 정상인과 비교하여 DRG2 단백질의 발현량이 감소하였을 때, 암의 발생률이 높아지며, DNA 손상을 유도하는 항암제들에 대한 내성이 증가되며, 암 환자의 생존률 또한 감소되는 것을 예측할 수 있다는 것을 확인하였다. 이를 통하여, DRG2 단백질의 발현량을 측정함으로써 다양한 암 발생 고위험군의 예측, 환자의 항암제에 대한 치료 효과 예측, 생존률 등의 예후를 예측할 수 있으며, 나아가, DRG2 단백질의 발현량을 증가시키는 물질들을 선별하여 항암제와 함께 사용함으로써 DNA 손상을 유도하는 항암제들의 치료 효과를 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

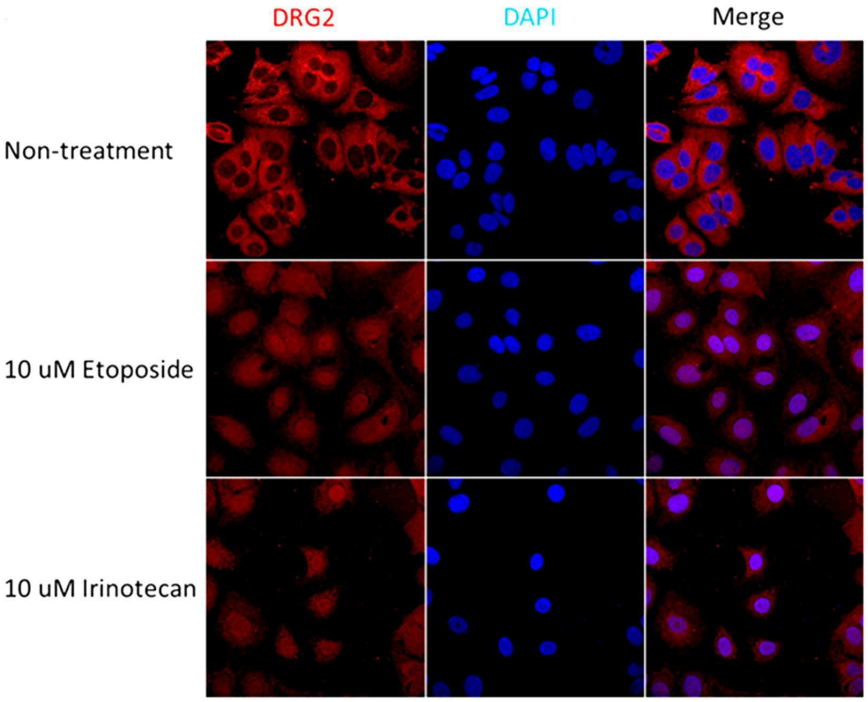
[0137] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

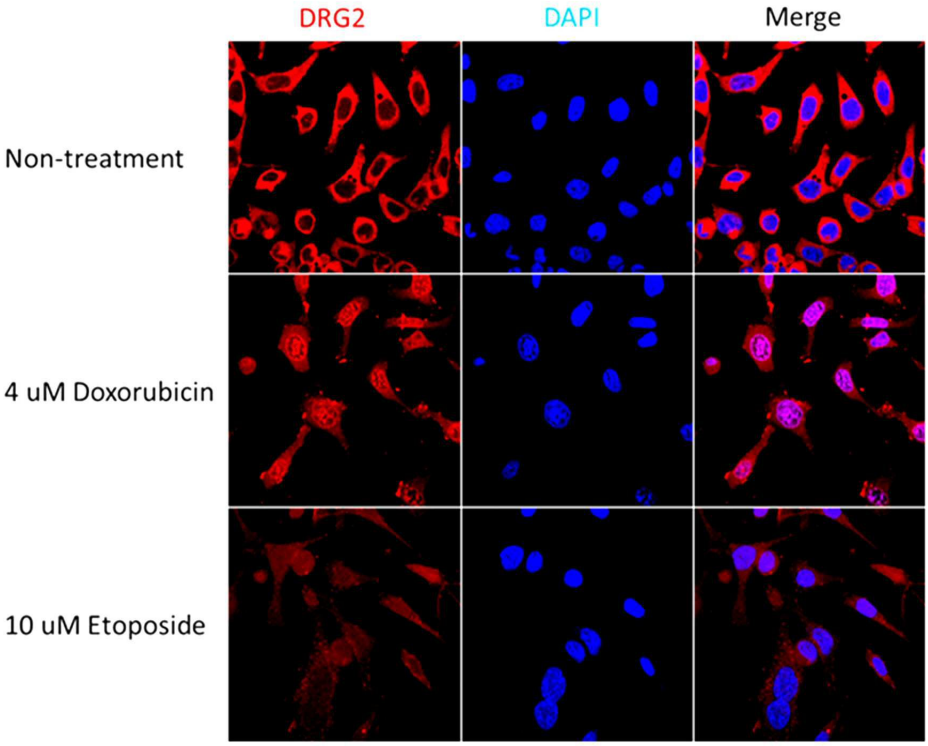
도면1


DRG2 interactors
GO0006974
194
(18.1%)
6
(0.6%)
640
(59.6%)
2
(0.2%)
0
(0%)
232
(21.6%)
0
(0%)
GO2001020

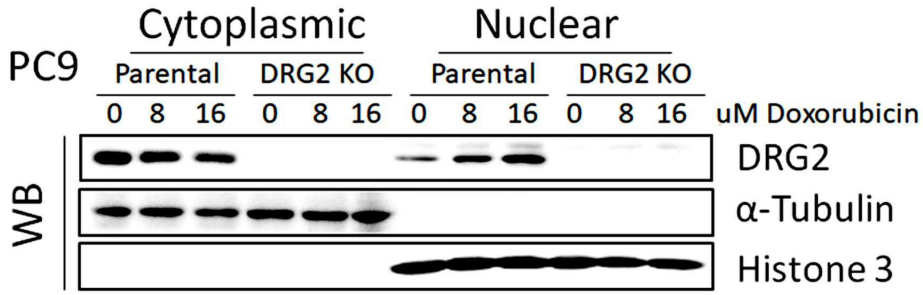
도면2


DRG2
DAPI
Merge
Non-treatment
10 uM Etoposide
10 uM Irinotecan

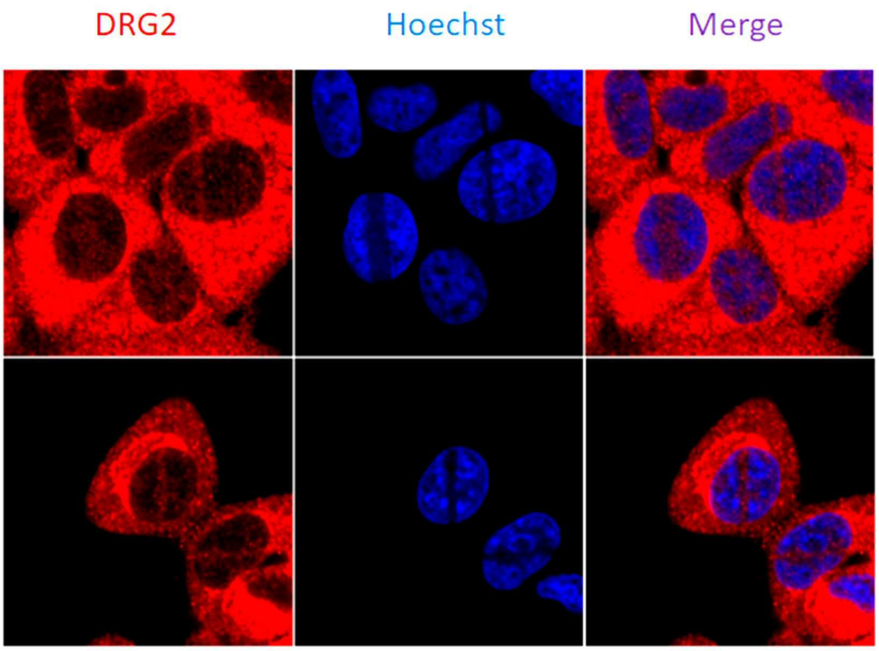
도면3


DRG2
DAPI
Merge
Non-treatment
4 uM Doxorubicin
10 uM Etoposide

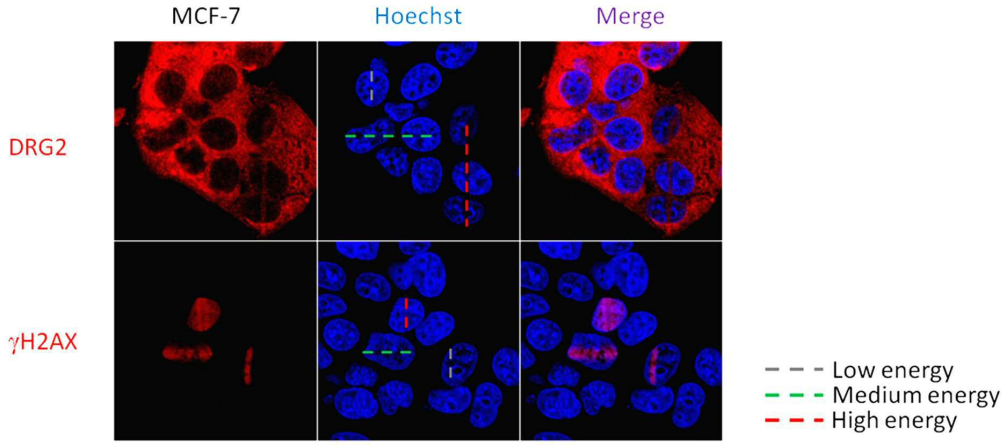
도면4


PC9
Cytoplasmic
Nuclear
Parental
DRG2 KO
Parental
DRG2 KO
0 8 16 0 8 16 0 8 16 0 8 16
uM Doxorubicin
WB
DRG2
α-Tubulin
Histone 3

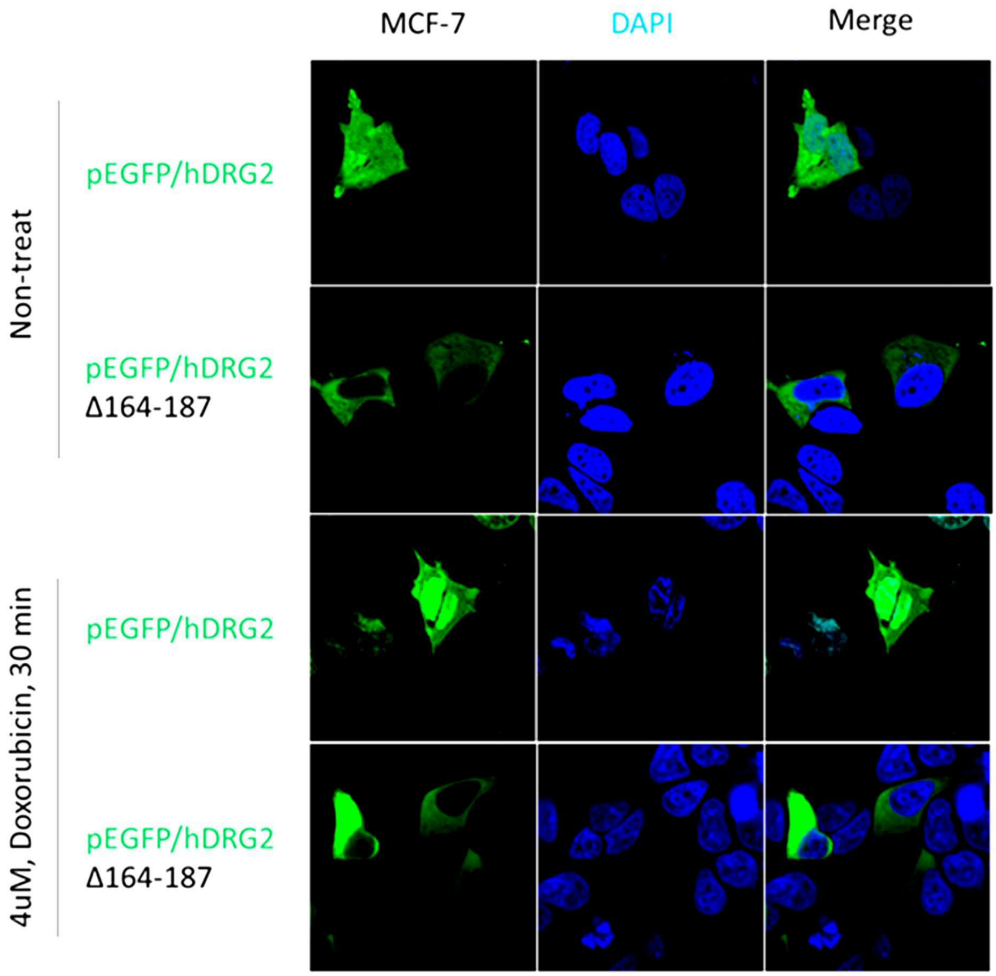
도면5


DRG2
Hoechst
Merge

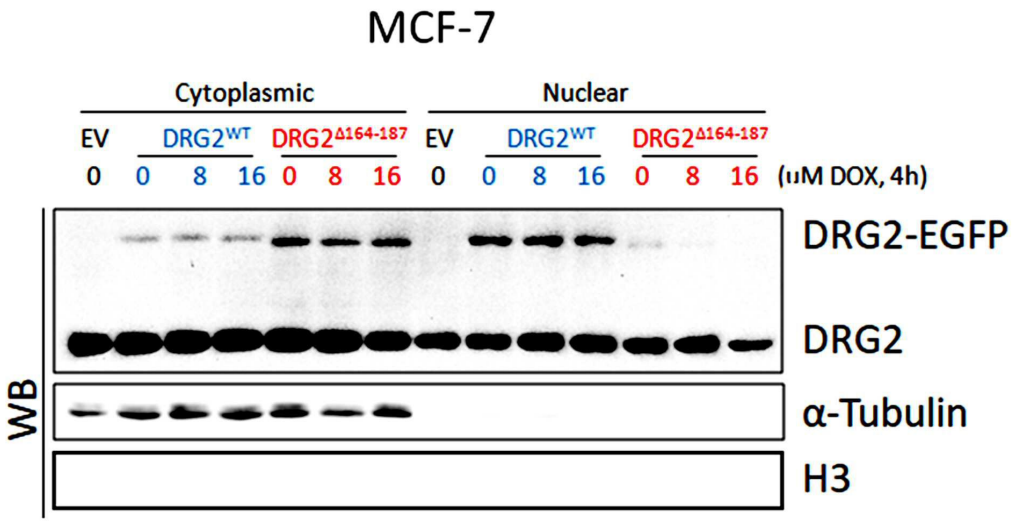
도면6


MCF-7
Hoechst
Merge
DRG2
γH2AX
Low energy
Medium energy
High energy

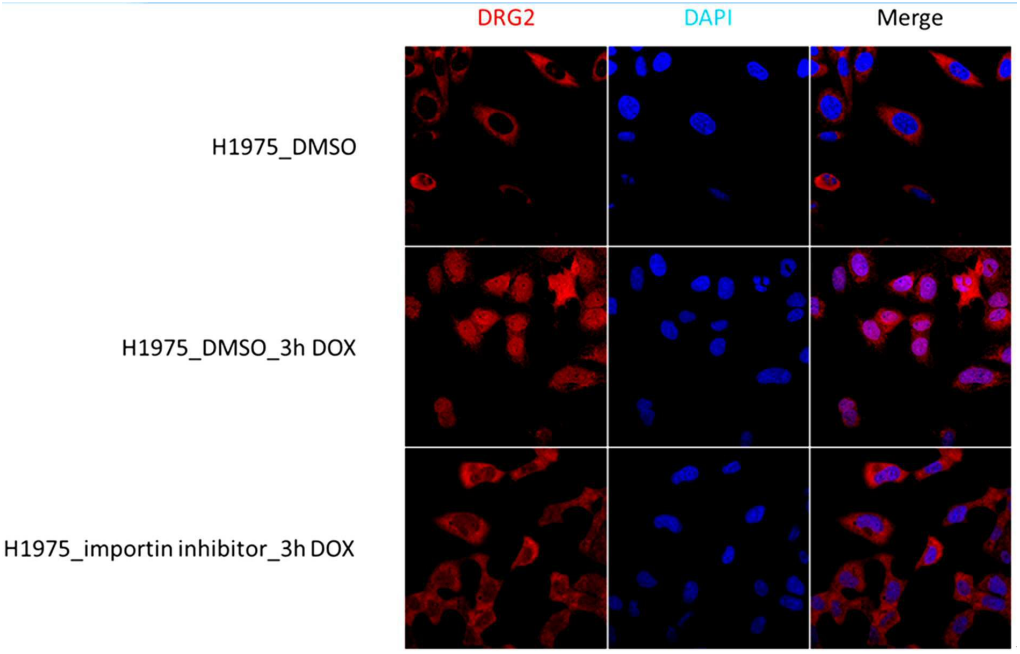
도면7


MCF-7
DAPI
Merge
Non-treat
pEGFP/hDRG2
pEGFP/hDRG2
Δ164-187
4uM, Doxorubicin, 30 min
pEGFP/hDRG2
pEGFP/hDRG2
Δ164-187

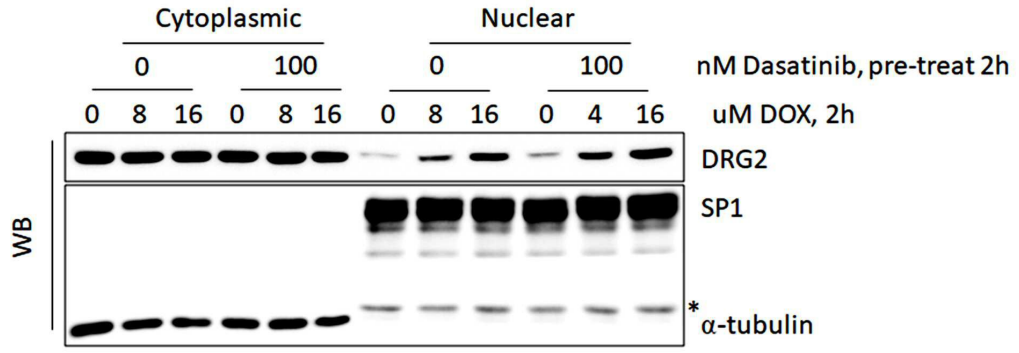
도면8


MCF-7
Cytoplasmic
Nuclear
EV
DRG2WT
DRG2Δ164-187
EV
DRG2WT
DRG2Δ164-187
0 0 8 16 0 8 16 0 0 8 16 0 8 16 (uM DOX, 4h)
WB
DRG2-EGFP
DRG2
α-Tubulin
H3

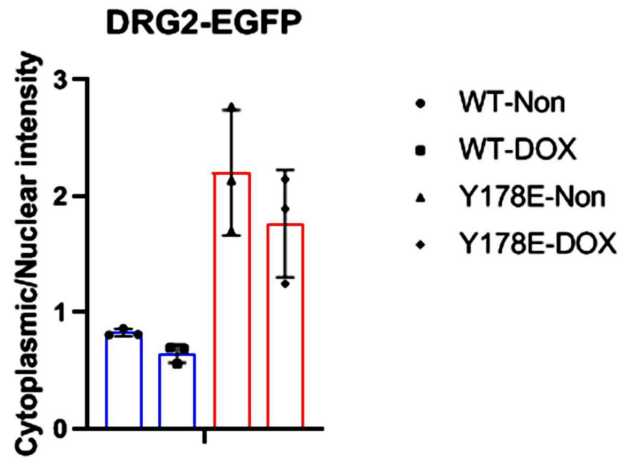
도면9



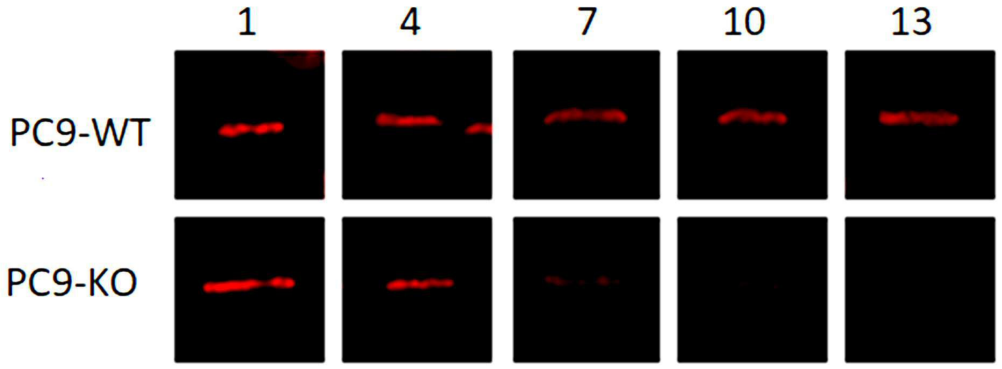
도면10



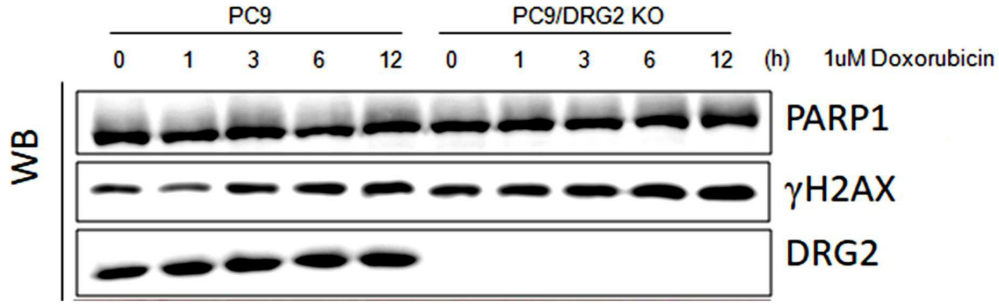
도면11



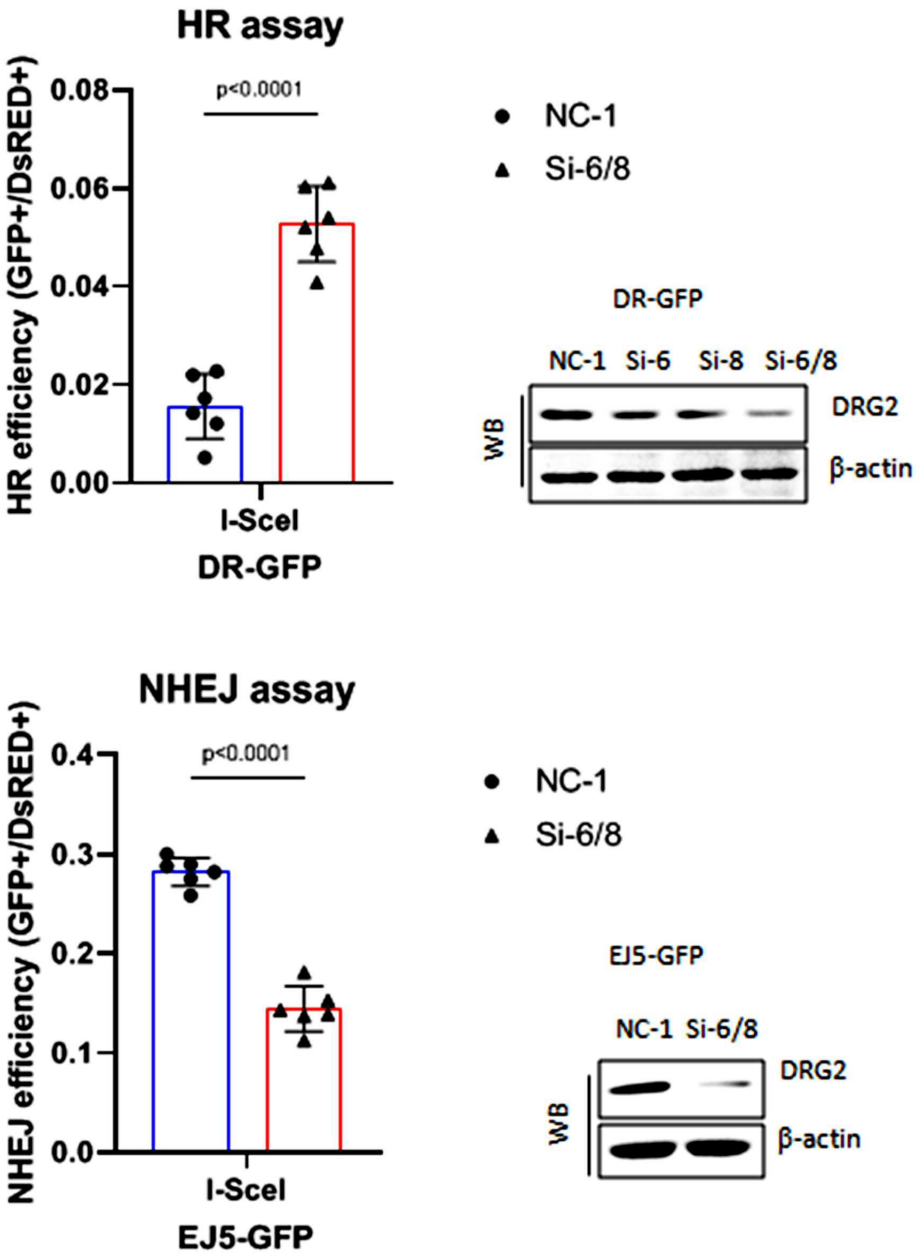
도면12


1
4
7
10
13
PC9-WT
PC9-KO

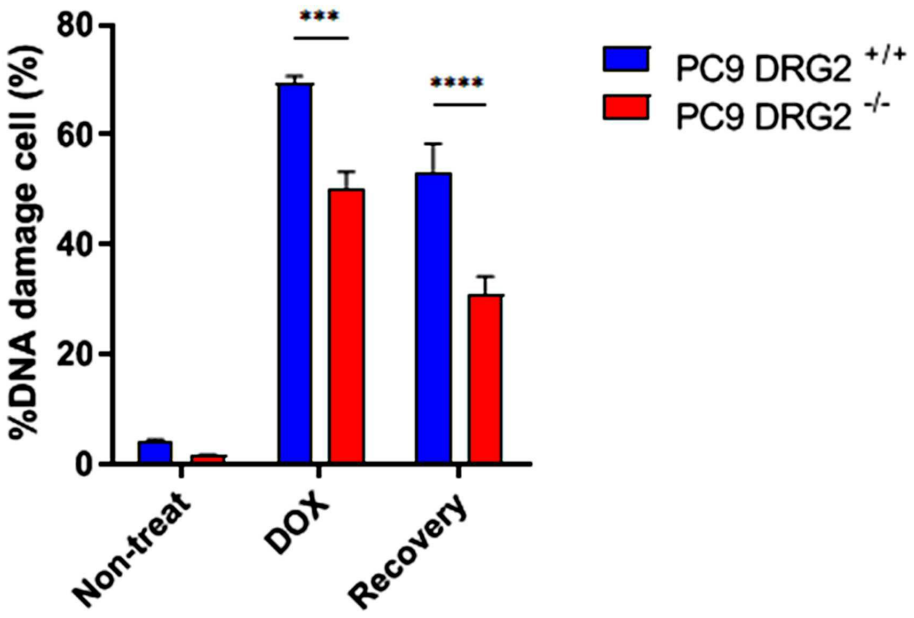
도면13


PC9
PC9/DRG2 KO
0 1 3 6 12 0 1 3 6 12 (h)
1uM Doxorubicin
WB
PARP1
γH2AX
DRG2

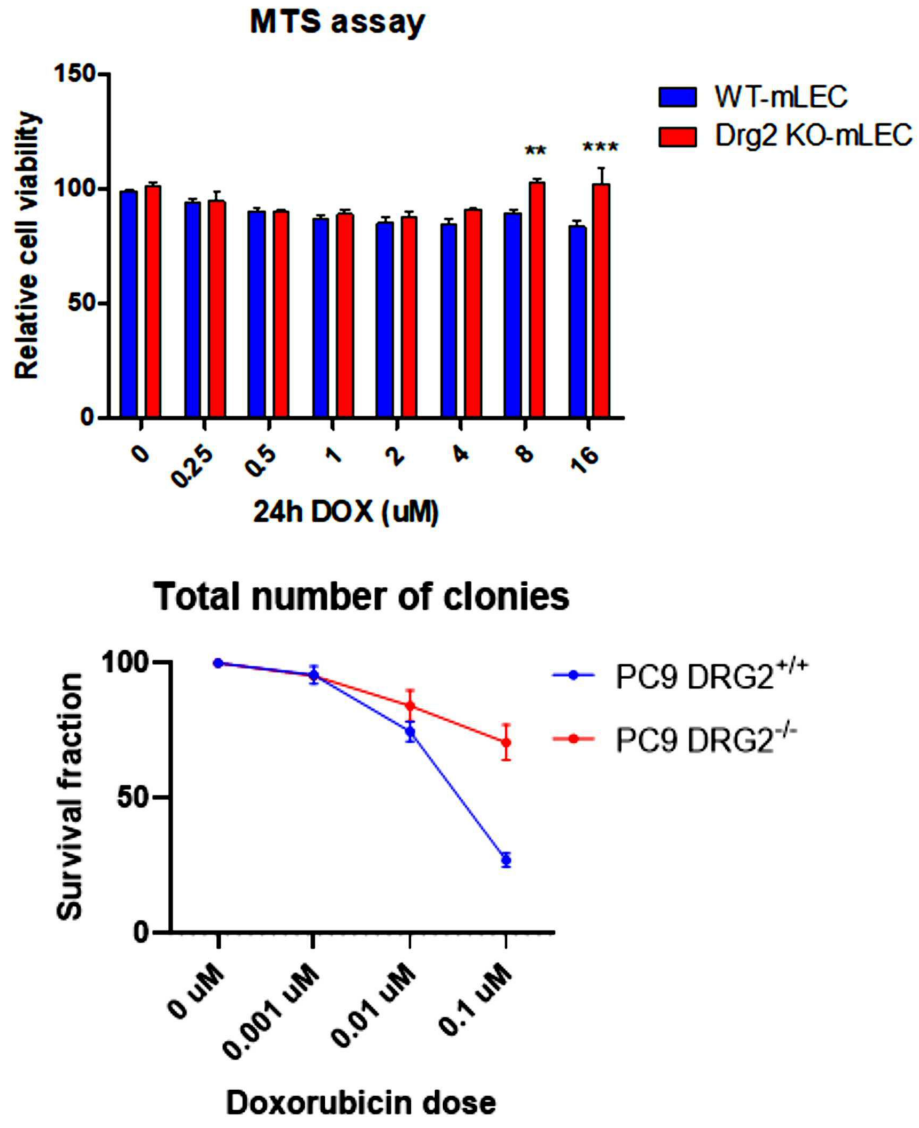
도면14


HR assay
p<0.0001
HR efficiency (GFP+/DsRED+)
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
I-SceI
DR-GFP
NC-1
Si-6/8
DR-GFP
NC-1 Si-6 Si-8 Si-6/8
WB
DRG2
β-actin
NHEJ assay
p<0.0001
NHEJ efficiency (GFP+/DsRED+)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
I-SceI
EJ5-GFP
NC-1
Si-6/8
EJ5-GFP
NC-1 Si-6/8
WB
DRG2
β-actin

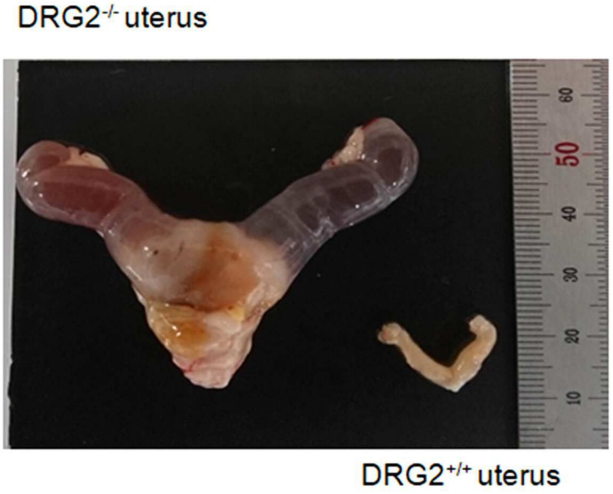
도면15


%DNA damage cell (%)
80
60
40
20
0
***
****
Non-treat
DOX
Recovery
PC9 DRG2 +/+
PC9 DRG2 -/-

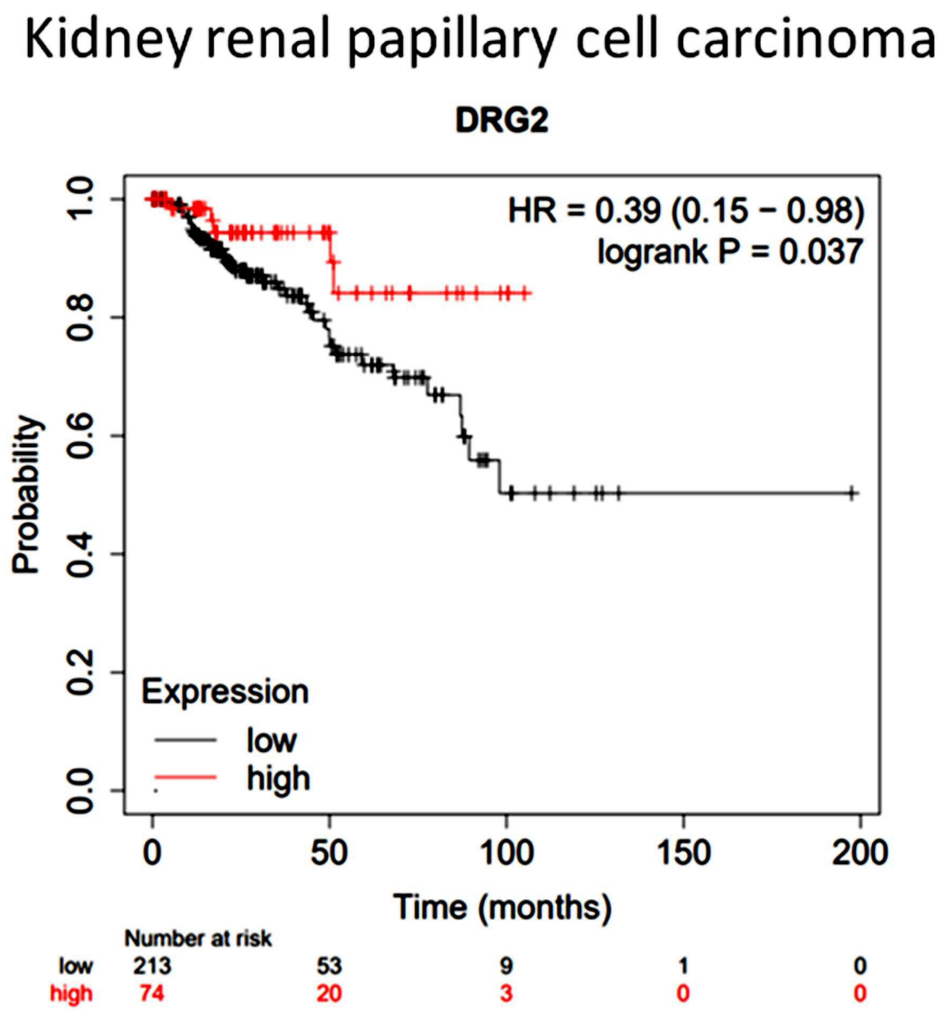
도면16


MTS assay
Relative cell viability
150
100
50
0
WT-mLEC
Drg2 KO-mLEC
**
***
0
0.25
0.5
1
2
4
8
16
24h DOX (uM)
Total number of clonies
Survival fraction
100
50
0
PC9 DRG2+/+
PC9 DRG2-/-
0 uM
0.001 uM
0.01 uM
0.1 uM
Doxorubicin dose

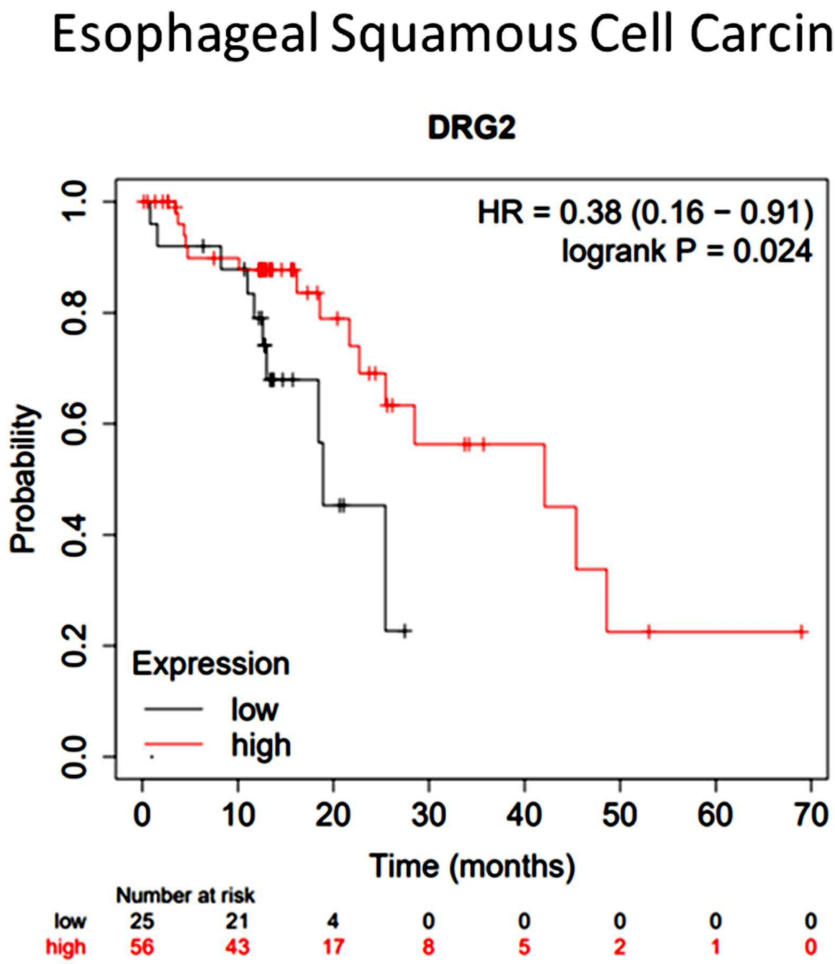
도면17


DRG2-/- uterus
DRG2+/+ uterus

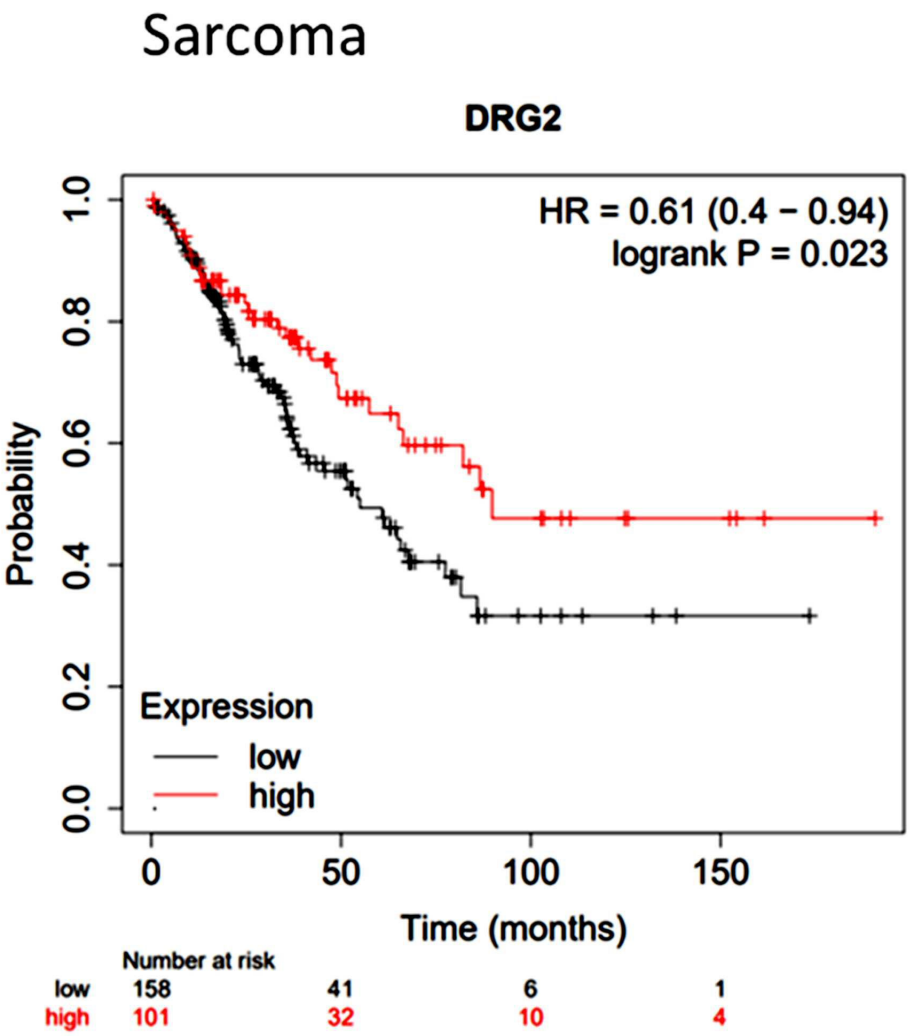
도면18


Kidney renal papillary cell carcinoma
DRG2
HR = 0.39 (0.15 − 0.98)
logrank P = 0.037
Probability
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Expression
low
high
0
50
100
150
200
Time (months)
Number at risk
low 213 53 9 1 0
high 74 20 3 0 0

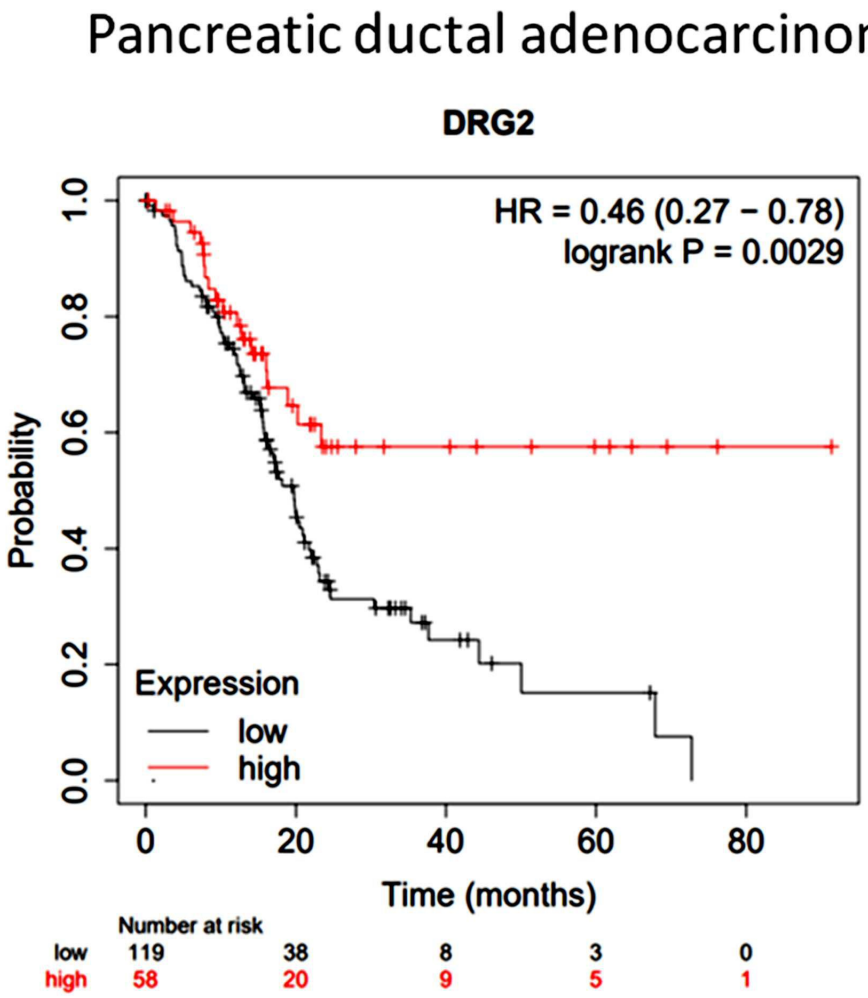
도면19


Esophageal Squamous Cell Carcinoma
DRG2
HR = 0.38 (0.16 − 0.91)
logrank P = 0.024
Probability
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Expression
low
high
0
10
20
30
40
50
60
70
Time (months)
Number at risk
low 25 21 4 0 0 0 0 0
high 56 43 17 8 5 2 1 0

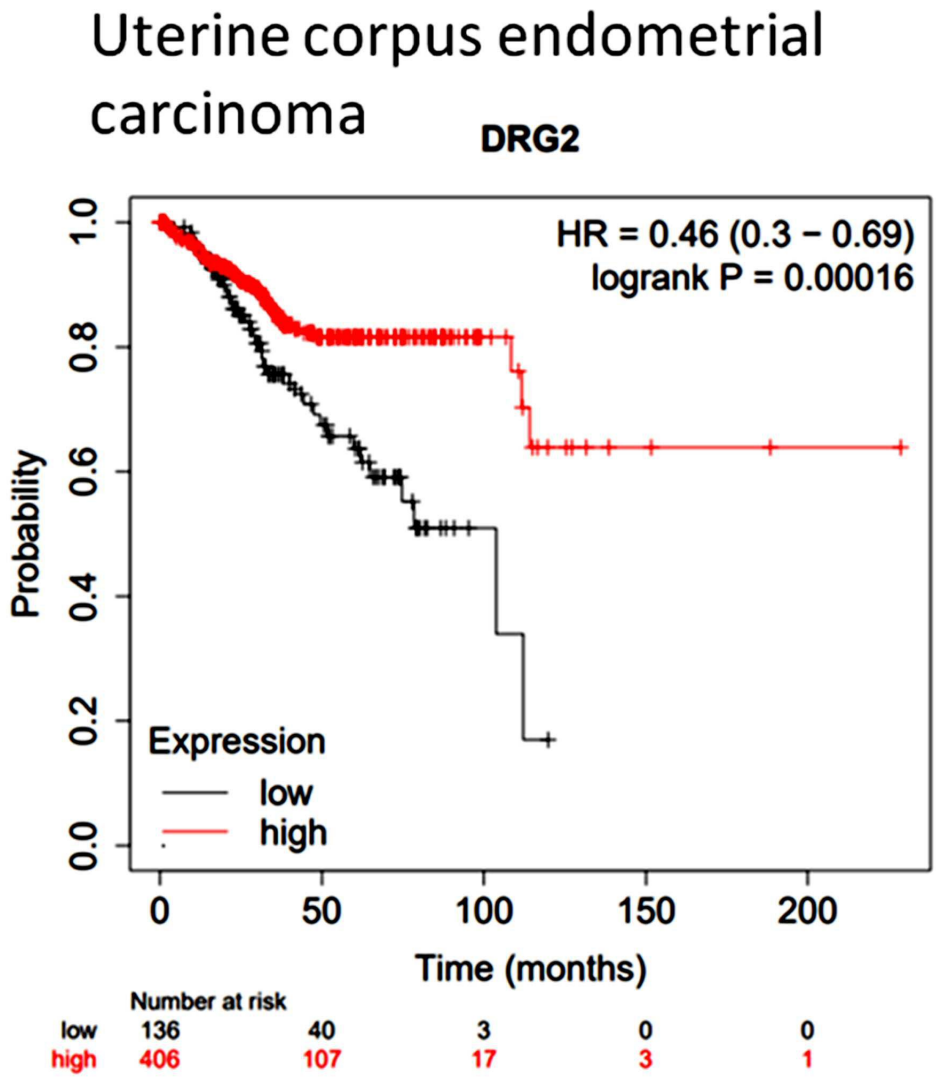
도면20


Sarcoma
DRG2
HR = 0.61 (0.4 − 0.94)
logrank P = 0.023
Probability
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Expression
low
high
0
50
100
150
Time (months)
Number at risk
low 158 41 6 1
high 101 32 10 4

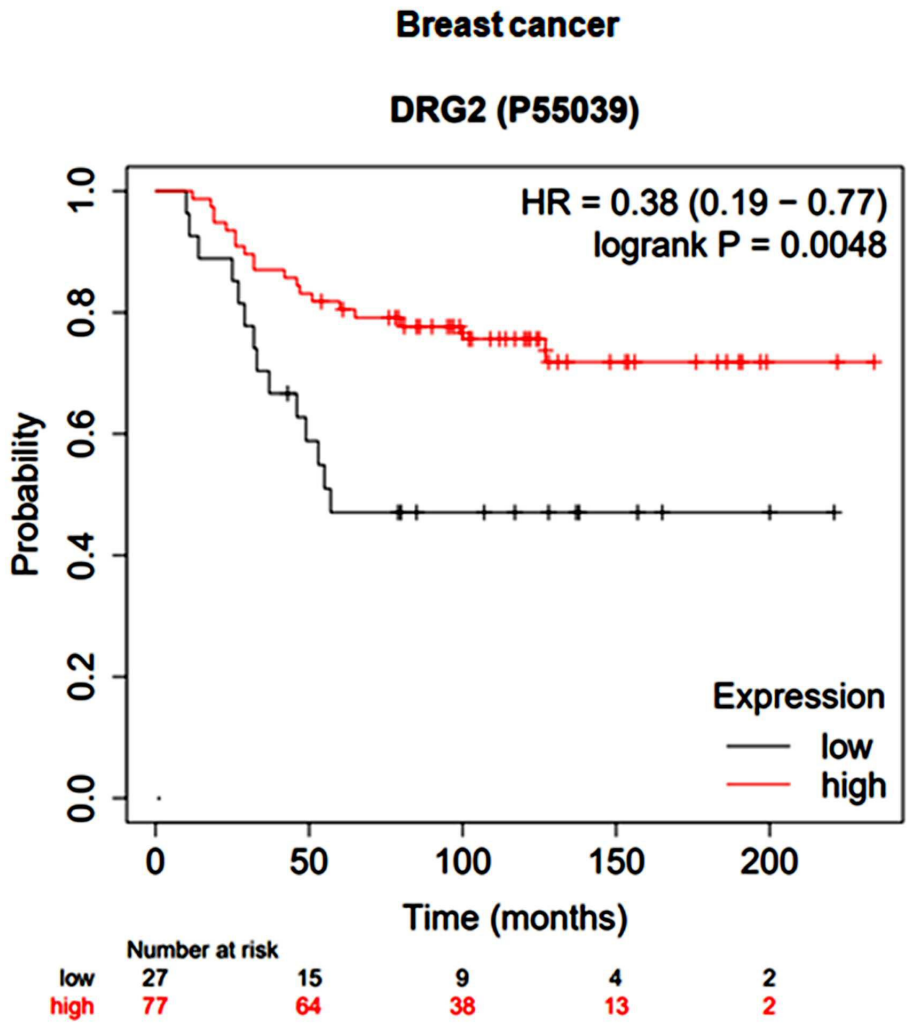
도면21


Pancreatic ductal adenocarcinoma
DRG2
HR = 0.46 (0.27 − 0.78)
logrank P = 0.0029
Probability
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Expression
low
high
0
20
40
60
80
Time (months)
Number at risk
low 119 38 8 3 0
high 58 20 9 5 1

도면22


Uterine corpus endometrial carcinoma
DRG2
HR = 0.46 (0.3 − 0.69)
logrank P = 0.00016
Probability
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Expression
low
high
0
50
100
150
200
Time (months)
Number at risk
low 136 40 3 0 0
high 406 107 17 3 1

도면23



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

RopheLBio Co., Ltd.

<120> The use of DRG2 as a biomarker

<130> MP21-120

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ile Leu Glu Lys Ile Ser Glu Ile Glu Lys Glu Ile Ala Arg

1 5 10 15

Thr Gln Lys Asn Lys Ala Thr Glu Tyr His Leu Gly Leu Leu Lys Ala
20 25 30

Lys Leu Ala Lys Tyr Arg Ala Gln Leu Leu Glu Pro Ser Lys Ser Ala
35 40 45

Ser Ser Lys Gly Glu Gly Phe Asp Val Met Lys Ser Gly Asp Ala Arg
50 55 60

Val Ala Leu Ile Gly Phe Pro Ser Val Gly Lys Ser Thr Phe Leu Ser
65 70 75 80

Leu Met Thr Ser Thr Ala Ser Glu Ala Ala Ser Tyr Glu Phe Thr Thr
85 90 95

Leu Thr Cys Ile Pro Gly Val Ile Glu Tyr Lys Gly Ala Asn Ile Gln

100 105 110

Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ile Ile Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Gly
115 120 125

Arg Gly Arg Gln Val Ile Ala Val Ala Arg Thr Ala Asp Val Ile Ile
130 135 140

Met Met Leu Asp Ala Thr Lys Gly Glu Val Gln Arg Ser Leu Leu Glu
145 150 155 160

Lys Glu Leu Glu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asn Lys His Lys Pro Asn
165 170 175

Ile Tyr Phe Lys Pro Lys Lys Gly Gly Gly Ile Ser Phe Asn Ser Thr
180 185 190

Val Thr Leu Thr Gln Cys Ser Glu Lys Leu Val Gln Leu Ile Leu His
195 200 205

Glu Tyr Lys Ile Phe Asn Ala Glu Val Leu Phe Arg Glu Asp Cys Ser
210 215 220

Pro Asp Glu Phe Ile Asp Val Ile Val Gly Asn Arg Val Tyr Met Pro
225 230 235 240

Cys Leu Tyr Val Tyr Asn Lys Ile Asp Gln Ile Ser Met Glu Glu Val

245 250 255

Asp Arg Leu Ala Arg Lys Pro Asn Ser Val Val Ile Ser Cys Gly Met

260 265 270

Lys Leu Asn Leu Asp Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Glu Tyr Leu Ala

275 280 285

Leu Thr Cys Ile Tyr Thr Lys Lys Arg Gly Gln Arg Pro Asp Phe Thr

290 295 300

Asp Ala Ile Ile Leu Arg Lys Gly Ala Ser Val Glu His Val Cys His

305 310 315 320

Arg Ile His Arg Ser Leu Ala Ser Gln Phe Lys Tyr Ala Leu Val Trp

325 330 335

Gly Thr Ser Thr Lys Tyr Ser Pro Gln Arg Val Gly Leu Thr His Thr

340 345 350

Met Glu His Glu Asp Val Ile Gln Ile Val Lys Lys

355 360

<210> 2

<211> 1095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggggatct tagagaagat ctcggagatc gagaaggaga tcgctcggac acagaagaac 60

aaggccactg agtatcatct gggcctgctg aaagctaagc tcgccaagta tcgggcccag 120

ctcctggaac cgtccaaatc ggcctcgtcc aaaggagagg gctttgatgt catgaagtcg 180

ggtgatgccc gtgtggcgct gattggattt ccctctgtgg gtaagtccac attcttgagt 240

ctgatgacct ccacggccag cgaggcagcg tcctatgagt tcaccactct gacgtgtatt 300

cctggggtca ttgaatacaa aggtgccaac atccagctcc tggaccttcc tggaatcatt 360

gaaggcgcag cccaaggaaa aggccgtggc cggcaggtga tcgctgtggc gcgcacggct 420

gacgtcatca tcatgatgct ggatgccacc aagggagagg tgcagaggtc tctgctggag 480

aaggagctgg agtctgtggg catccgcctc aacaagcaca agcctaacat ctacttcaag 540

cccaagaaag gtggtggcat ctcctttaac tcgacagtca cgctgaccca gtgctcggaa 600

aagctggtgc agctcatcct gcacgaatac aagatcttca atgcagaagt gcttttccga 660

gaagactgct ccccggacga gttcatcgat gtgatcgtgg gcaaccgggt gtacatgccc 720

tgcctgtatg tttataacaa aatcgaccag atctccatgg aagaggtgga ccgcctggcc 780

cgaaaaccca acagtgtggt catcagctgc ggcatgaagc tgaacctgga ctatctgctg 840

gagatgcttt gggagtactt ggccctgacc tgcatctaca ccaagaagag aggacagagg 900

ccagacttca cagacgccat cattctccgg aaaggggcct cagtggagca cgtgtgccac 960

cgcatccacc ggtcactcgc cagccagttc aagtacgccc tggtgtgggg caccagcacc 1020

aagtacagtc cgcagcgggt gggcctgacc cacaccatgg agcatgagga cgtcatccag 1080

atcgtgaaga agtaa 1095