

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0017323
(43) 공개일자 2024년02월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/5377* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61K 31/5377 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0098972
(22) 출원일자 2023년07월28일
심사청구일자 2023년07월28일
(30) 우선권주장 1020220094875 2022년07월29일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
김현구
서울특별시 서초구 반포대로39길 63-8, A동 402호 (반포동, 반포서래월드메르디앙라스칼라)
최병현
서울특별시 금천구 남부순환로112길 1-12 (가산동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 무한

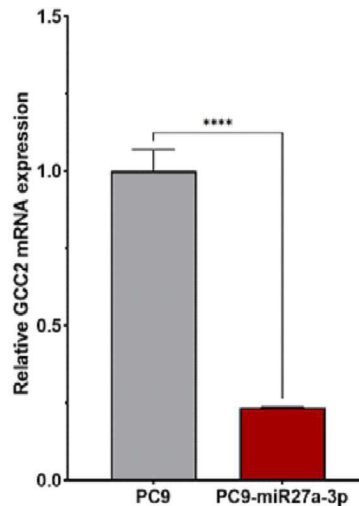
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 GCC2 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명은 폐암의 발생 및 진행과 전이를 억제하기 위한 신규 타겟으로서 GCC2 단백질을 제공하며, 상기 GCC2 발현의 억제를 위한 제제로서 miR27a-3p의 용도와 비침습적 방법으로 폐암을 진단할 수 있는 바이오마커로서의 이용가능성을 제시한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/7105 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자

노지윤

서울특별시 양천구 목동동로 100, 1329동 701호 (신정동, 목동신시가지아파트13단지)

김경수

서울특별시 은평구 가좌로7나길 30, 102동 902호 (응암동, 응암우성아파트)

김창근

서울특별시 강서구 남부순환로11길 44, 403호 (공항동, 위하우스)

전옥화

서울특별시 구로구 구로동로 148, 신관 6층 6277호 (홍부외과의국 (구로동, 고려대부속구로병원))

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711159574

과제번호 2021M3H4A407963012

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (원천)나노소재원천기술개발사업

연구과제명 나노 입자 프린팅 기술을 이용한 고감도 다중 바이오마커검출 및 기계학습을 통한 pattern 분석 기반의 폐암 진단 기술개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.02.01 ~ 2023.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711138151

과제번호 RS-2020-KD000094

부처명 다부처

과제관리(전문)기관명 범부처전주기의료기기연구개발사업단

연구사업명 범부처전주기의료기기연구개발사업

연구과제명 인공지능 기반 혈액 내 엑소좀 분석 폐암 진단 기기제품화

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.03.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465036580

과제번호 HR14C-0007-060022

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성 R&D

연구과제명 엑소좀 기반 실시간 혈액암 조기진단 바이오칩 개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교 안암병원

연구기간 2022.01.01 ~ 2023.01.10

명세서

청구범위

청구항 1

GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폐암은 비소세포폐암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 선암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 폐암의 전이 억제용인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항암제 병용투여용인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항암제는 제피티닙(gefitinib)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 GCC2 발현 억제제는 miR27a-3p인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 miR27a-3p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

miR27a-3p를 유효성분으로 포함하는 폐암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 miR27a-3p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 폐암은 비소세포폐암인 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 선암인 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 13

miR27a-3p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 폐암 진단용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 제제는 miR27a-3p의 일부 또는 전부와 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 폐암 진단용 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 폐암은 비소세포폐암인 것을 특징으로 하는, 폐암 진단용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 선암인 것을 특징으로 하는, 폐암 진단용 조성물.

청구항 17

제13항의 조성물을 포함하는 폐암 진단용 키트.

청구항 18

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 miR27a-3p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 폐암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 정보제공방법은 상기 측정하는 단계 이후에 정상군의 생물학적 시료에서 miR27a-3p의 발현 수준과 환자의 그것을 비교하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 정보제공방법은 상기 비교하는 단계 이후에 개체의 miR27a-3p의 발현 수준이 정상군의 miR27a-3p 발현 수준의 70% 이하인 경우 상기 개체는 폐암이 발병하였거나 발병가능성이 높은 것으로 판별하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈청, 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 정보 제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물과, GCC2 발현 억제를 위한 miR27a-3p의 용도 및 폐암 진단을 위한 바이오마커로서 miR27a-3p 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐암(lung cancer)은 남녀 모두의 성별에서 두 번째로 흔히 발생하는 암으로서, 모든 암에서 15%를 차지한다. 2011년 미국 암 학회(American cancer society)의 보고에 따르면, 한 해 22만건 이상이 폐암으로 진단을 받으며, 이 중 약 70%가 사망에 이르는데 이는 암 사망 중에서 27%를 차지한다. 폐암 중에서 비소세포성 폐암(non small lung cancer)은 상피성 암(carcinoma)의 일종으로 폐소성암(small lung cancer)이 아닌 모든 상피성 폐암(epithelial lung cancer)을 일컫으며, 폐암 전체의 약 85% 내지 90%를 차지한다. 비소세포성 폐암은 폐소성암에 비해 상대적으로 화학요법(chemotherapy)에 덜 민감하며, TNM 분류법에 기초하여 암의 단계를 나눈다: 종양의 크기(the size of tumor), 국소 림프절(regional lymph node)로의 암 확산 정도 및 암 전이(metastasis)의 유무. 비소세포성 폐암의 치료에 있어서, 초기의 비전이성(non-metastatic) 비소세포성 폐암은 화학요법 및 방사선에 대한 민감도가 매우 낮기 때문에, 일반적으로 백금을 함유하는 시스플라틴(cisplatin)과 관련된 보조적인 화학요법(ancillary chemotherapy)와 함께 수술을 한다. 반면에 초기 단계를 지나, 전이성 비소세포성 폐암인 경우에는, 다양한 화학요법 및 방사선 치료가 사용된다. 비소세포성 폐암의 증상은 지속적인 기침, 흉부 통증, 체중감소, 손톱 손상, 관절 통증, 호흡의 단기화(shortness of breath) 등이 있으나, 비소세포성 폐암은 일반적으로 천천히 진행되기 때문에 초기에는 그 증상을 거의 보이지 않는다. 따라서, 비소세포성 폐암의 조기 발견 및 치료가 어려우며, 뼈, 간, 소장, 및 뇌 등 전신에 전이된 후에 발견할 가능성이 높다. 따라서, 높은 발병률과 사망률에도 불구하고 아직 비소세포성 폐암을 극복할 수 있는 어떠한 약물 또는 치료방법이 개발되지 않았으며, 그 필요성이 대두되고 있다. 비소세포성 폐암은 암세포의 크기, 모양 및 화학적 구성에 따라 몇 가지 하위 종류로 나뉘며, 대표적으로는 선암(adenocarcinoma), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 대세포암(large cell carcinoma) 등이 있다. 선암은 전체 폐암의 40%이상을 차지할 정도로 가장 높은 빈도로 발생하는 폐암으로서, 폐의 바깥부위(outer region)에서 발견되며 다른 폐암보다 천천히 진행되는 경향이 있으나, 초기에 높은 전이 경향을 보이고 또한 높은 방사선 저항성을 보인다. 편평상피암은 전체 폐암의 25-30%를 차지하는 비소세포성 폐암의 한 종류로서, 기도(airway)를 이루고 있는 세포의 초기 단계(early version)에서 시작되며, 상기 암은 주로 흡연자에게서 높은 발병률을 보인다. 또한 전체 폐암의 10-15% 정도를 차지하는 대세포암은 폐의 어느 부위에서나 발병할 수 있으며, 그 진행속도가 소세포성 폐암(small cell lung cancer)과 유사할 만큼 빠르기 때문에 그 치료는 현재까지도 난제로 떠오르고 있다.

[0004] GCC2 단백질 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein)은 세포내 골지체 (Gogi Apparatus)에 존재하는 막 단백질로써, 세포내 수송 역할을 수행한다. 본 발명자들은 폐암 환자의 혈액 샘플 내 엑소솜에서 정상과 비교하여 높은 GCC2 단백질 수준을 확인하여 폐암의 비침습적 진단을 위한 바이오마커로서 엑소솜 내의 GCC2 단백질의 유용성을 확인한 바 있다(특허문헌 1). 본 발명자들은 폐암의 비침습적 진단을 위한 바이오마커 발굴과 치료 타겟으로서 GCC2 단백질의 유용성을 확인하기 위하여 예의연구한 결과 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2080887

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 폐암의 예방 및 치료 타겟으로서 GCC2의 발현 억제와 GCC2 발현 억제제로서 miR27a-3p를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명은 폐암의 진단을 위한 바이오마커로서 miR27a-3p를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 GCC2 발현 억제제는 GCC2 mRNA의 일부 또는 전부와 상보적인 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 또는 aptamer일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 GCC2 발현 억제제는 miR27a-3p일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 약학적 조성물은 폐암의 전이 억제용일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 약학적 조성물은 암세포의 항암제 감수성을 증가시키는 것일 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 항암제와 병용투여 용도일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 항암제는 gefitinib일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 miR27a-3p를 유효성분으로 포함하는 폐암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 miR27a-3p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제제는 miR27a-3p의 일부 또는 전부와 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 miR27a-3p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 폐암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 폐암은 비소세포폐암일 수 있으며, 바람직하게는 비소세포폐암 중에서 편평상피세포암 또는 선암일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 miR27a-3p는 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 정보제공방법은 상기 측정하는 단계 이후에 정상군의 생물학적 시료에서 miR27a-3p의 발현 수준과 환자의 그것을 비교하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 비교하는 단계 이후에 개체의 miR27a-3p의 발현 수준이 정상군의 miR27a-3p 발현 수준의 70% 이하인 경우 상기 개체는 폐암이 발병하였거나 발병가능성이 높은 것으로 판별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 혈청, 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 폐암의 발생 및 진행과 전이를 억제하기 위한 신규 타겟으로서 GCC2 단백질을 제공하며, 상기 GCC2 발현의 억제를 위한 제제로서 miR27a-3p의 용도와 비침습적 방법으로 폐암을 진단할 수 있는 바이오마커로서의 이용가능성을 제시한다.
- [0027] 엑소솜 (extracellular vesicles), 리포솜 (liposome), 세포 밖 소포체 (extracellular vesicles) 등에 miR27a-3p를 encapsulation하여 GCC2 발현 억제를 위한 제제로서 폐암을 치료할 수 있는 타겟 치료제로서의 이

용가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1a는 GCC2 siRNA 처리에 의한 GCC2 mRNA 발현 억제를 확인한 RT-qPCR 결과이다.
- 도 1b는 GCC2 siRNA 처리에 의한 GCC2 단백질 발현 억제를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 2는 GCC2 siRNA 처리로 GCC2 억대운된 폐암세포주의 이동능 감소를 확인한 wound healing assay 결과이다.
- 도 3은 GCC2 siRNA 처리로 GCC2 억대운된 폐암세포주의 침투력 감소를 확인한 matrigel invasion assay 결과이다.
- 도 4는 miR27a-3p로 형질감염된 GCC2 과발현 PC9 세포주에서 miR29a-3p의 발현 수준을 확인한 RT-qPCR 결과이다.
- 도 5는 miR29a-3p로 형질감염된 GCC2 과발현 PC9 세포주에서 GCC2 mRNA 발현 수준을 확인한 RT-qPCR 결과이다.
- 도 6은 GCC2 과발현 PC9 세포주에 miR29a-3p 처리에 따른 proliferation 관련 단백질의 발현 감소를 확인한 웨스턴 블롯 수행 결과이다.
- 도 7은 GCC2 과발현 PC9 세포주에 miR29a-3p 처리에 따른 colony formation 감소를 확인한 결과이다.
- 도 8은 GCC2 과발현 PC9 세포주에 miR29a-3p 처리에 따른 세포사멸 증가를 확인한 Annexin V&PI staining assay 결과이다.
- 도 9는 miR29a-3p로 형질감염된 GCC2 과발현 PC9 세포주의 세포티넉에 대한 감수성 증가를 확인한 MTT assay 결과이다.
- 도 10은 GCC2 과발현 PC9 세포주에 miR29a-3p 처리에 따른 이동능 감소를 확인한 wound healing assay 결과이다.
- 도 11은 정상군과 폐 선암 환자의 혈장에서 miR27a-3p 발현 수준을 비교확인한 RT-qPCR 결과이다.
- 도 12는 정상군과 폐 선암 환자의 혈장 유래 miR27a-3p의 ROC 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명자들은 폐암의 비침습적 진단을 위한 바이오마커 발굴과 치료 타겟으로서 GCC2 단백질의 유용성을 확인하기 위하여 예의연구한 결과 본 발명을 완성하였다.
- [0031] 본 발명자들은 앞선 연구에서 폐암 환자의 혈장에서 수득한 엑소좀 내에 GCC2의 과발현을 확인하고, GCC2의 발현 억제를 통해서 폐암의 치료가 가능한지 확인하고자 하였다. 이에, GCC2 유전자를 표적으로 하는 siRNA를 제작하여 GCC2 siRNA를 폐암 세포주에 처리한 결과, 폐암 세포의 이동능과 침투력이 감소함을 관찰하여 폐암의 전이, 예방, 및 치료를 위한 타겟으로서 GCC2가 제공될 수 있음을 확인하였다.
- [0032] 또한, 본 발명자들은 GCC2 발현 억제 분자를 스크리닝하여 miR27a를 선별하였다. miR27a-3p를 GCC2 과발현 세포주에 처리한 결과 GCC2의 발현이 감소되었으며, 세포의 증식과 관련된 단백질의 발현과 암세포의 colony formation이 감소되고, 항암제에 대한 감수성과 세포사멸이 증가하며, 암세포의 이동능이 감소함을 확인하였다.
- [0033] 상기로부터 miR27a-3p가 GCC2를 표적으로 하여 암의 progression에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다. 폐암 환자의 엑소좀에서 GCC2의 발현이 증가되어 있고, miR27a-3p가 GCC2의 발현을 억제함으로부터 miR27a-3p를 폐암의 진단을 위한 바이오마커로 이용할 수 있는지 확인하고자 하였다. 이에, 정상군과 폐 선암 환자의 혈장 샘플에서 miR27a-3p의 발현 수준을 비교한 결과 폐 선암 환자의 혈장에서 miR27-3p의 수준은 정상군의 그것과 비교하여 현저하게 낮음을 확인하였으며, 이는 ROC 분석을 통해 검증되었다.
- [0034] 상기로부터, 본 발명자들은 GCC2 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암의 예방, 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명자들은 GCC2 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 전이의 예방, 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0036] 본 발명에 있어서 상기 GCC2의 발현 억제제는 GCC2 유전자 또는 단백질에 특이적인 억제제를 사용하는 것을 특징으로 하며, 상기 발현 억제제는 GCC2의 발현량을 감소시키거나 분해를 촉진함으로써 세포 내 GCC2의 수준을 감소시키거나 GCC2와 특이적으로 결합하여 그 활성을 감소시키는 것일 수 있으며, siRNA, 앵타머(aptamer), 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명에서 "siRNA"는 이중가닥의 RNA가 다이스에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 GCC2 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상 GCC2 mRNA에 특이적으로 결합하여 GCC2의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 GCC2 발현 억제제의 세포 내로의 도입은 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 공동-침전법, 전기천공법 및 리포좀 이용법 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에서 폐암은 비소세포폐암일 수 있으며, 바람직하게는 비소세포폐암 중에서 편평상기세포암 또는 선암일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 예방이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 폐암의 발생, 진행, 또는 전이를 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 치료란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 폐암의 발생에 따른 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상 개체는 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있고, 보다 구체적으로 폐암 환자이거나 폐암의 발병가능성이 높은 개체일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 약학적 조성물(pharmaceutical composition)은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 "담체(carrier)"란 비이클(vehicle)이라고도 불리며, 세포 또는 조직 내로의 단백질 또는 펩타이드의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기물의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0043] 본 발명에서 "희석제(diluent)"란 대상 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 단백질 또는 펩타이드를 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약학적 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명에 따른 비알코올 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 분해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 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, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌

글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 복강 주입, 국소 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 대용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명자들은 폐암의 진단을 위한 바이오마커로서 개체의 생물학적 시료 내 존재하는 miR27a-3p를 제공한다.
- [0049] 본 발명은 개체의 생물학적 시료 내 존재하는 miR27a-3p의 발현 수준을 측정하여, miR27a-3p가 상대적으로 저발현된 경우 상기 개체가 폐암이 발병하였거나 발병가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는 폐암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 miR27a-3p의 상대적으로 저발현된 경우란 정상군의 miR27a-3p 발현량을 기준으로 하며, 시험 대상 개체를 폐암이 발병하였거나 발병가능성이 높은 것으로 판정하기 위해서는 정상군의 생물학적 시료에서 확인되는 miR27a-3p 발현 수준과 비교하여 70% 수준인 경우, 바람직하게는 65% 수준인 경우에 해당한다.
- [0051] 본 발명에서 생물학적 시료란 개체로부터 분리된 혈청, 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0052] 시료 내 존재하는 miR27a-3p의 발현 수준을 측정하기 위해서 마이크로RNA를 검출할 수 있는 각종 제제들을 사용할 수 있으며, 상기 제제의 비제한적인 예로는 miR27a-3p의 일부 또는 전부와 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 및 프로브 등이 있다.
- [0053] 상기 miRNA 발현 수준 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서 “진단”이란 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0055] 또한, 본 발명은 miR27a-3p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물과 이를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공한다.
- [0056] 본 발명의 폐암 진단용 조성물 및 키트에 포함되는 miR27a-3p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상술한 바와 같이 miR27a-3p의 일부 또는 전부와 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 및/또는 프로브일 수 있으며, 유전자 발현 정도를 측정하는데 이용되는 공지된 방법, 예를 들면 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하거나, 프로브를 이용한 혼성화 반응을 통하여 실시하여 miRNA-27a-3p의 발현 수준을 측정할 수 있다. 또한, 상기 키트에는 상기 측정 제제 이외에도 검출을 용이하게 하는 당업계에서 공지된 여러 도구, 시약, 예를 들어 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 안정화제 등이 포함될 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 miRNA-27a-3p는 이를 구성하는 올리고뉴클레오티드의 작용성 등가물, 예를 들어, miRNA-27a-3p 올리고뉴클레오티드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 마이크로RNA-27a-3p 핵산분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants) 및 모방체(mimic)를 포함하는 개념이다.
- [0058] 본 발명에서 “안티센스 올리고뉴클레오티드”는 상기 miRNA에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로

서, 이에 제한되지는 않으나 antisenseRNA, antagonist miRNA를 포함한다.

[0059] 본 발명에서 “프라이머”는 짧은 자유 수산화기를 가지는 핵산서열로서 상보적인 템플레이트와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산서열을 말한다. 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 “프로브”는 miRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 miRNA의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고 비오틴, FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소 등으로 표지될 수 있다.

[0061] 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예로서 RT-PCR 키트의 경우, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0063] [실시예]

[0064] 1. 폐암 세포주에서 GCC2 발현 억제 효과 확인

[0065] 본 발명자들은 폐암 환자의 혈액샘플에서 수득되는 엑소솜에서 정상보다 높은 수준은 GCC2 단백질을 확인한 바 있다. 이에, 폐암의 치료 타겟으로서 GCC2 단백질의 유용성을 확인하고자 하였다.

[0066] 1-1. GCC2 킥다운(knock-down)

[0067] GCC2를 타겟하는 siRNA는 Dharmacon사에서 구입하여 사용하였다. GCC2를 과발현 하는 H1299 세포주를 이용하여 control siRNA, GCC2 siRNA를 H1299에 처리한 후 RT-qPCR을 수행하여 GCC2 mRNA 발현 수준을 확인한 결과, GCC2 siRNA 처리로 GCC2 mRNA의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 1a). 또한, 상기 각 siRNA를 처리한 H1299 세포를 수득하여 western blot을 수행하여 GCC2 단백질의 발현 수준을 비교한 결과 GCC2 siRNA에 의한 GCC2 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 1b).

[0069] 1-2. wound healing assay

[0070] 이어서, H1299 세포주(Control)와 GCC2 siRNA를 처리한 GCC2 킥다운 H1299 세포주를 대상으로 wound healing assay를 수행하였다. 그 결과, GCC2 킥다운 H1299 세포는 Control과 비교하여 세포의 migration ability가 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(도 2).

[0072] 1-3. matrigel invasion assay

[0073] 이어서, H1299 세포주(Control)와 GCC2 siRNA를 처리한 GCC2 킥다운 H1299 세포주를 대상으로 matrigel invasion assay를 수행하였다. 구체적으로 매트리지젤(Matrigel)이 코팅된 8.0 um pore polycarbonate filter (upper chamber)에 40,000개의 H1299 control cell 또는 GCC2-knockdown H1299 세포를 분주 후 배양하여 Diff-Quick solution과 0.01% crystal violet 시약으로 염색한 결과, GCC2 킥다운 H1299 세포주에서 invasion ability의 감소를 확인할 수 있었다(도 3).

[0075] 2. GCC2 발현 억제를 위한 miR27a의 유용성 확인

[0076] 본 발명자들은 GCC2 발현 억제를 위한 다양한 분자를 스크리닝한 결과, miR27a를 확인하였다. 이에, GCC2를 과

발현하는 PC9 세포주에 miR27a를 형질감염(transfection)하여 GCC2 발현 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, has-miR27a-3p (Accession: MI0000085)의 sequence는 mirbase.org를 통해 검색하였으며, UUCACAGUGGCUAAGUCCGC(서열번호 1)의 sequence를 바탕으로 BIONEER에서 AccuTarget Human miRNA Mimic을 구입하여 사용하였다.

[0077] GCC2가 과발현 되어 있는 PC9 세포주에 Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)의 protocol을 참고하여 10pmol의 miR27a를 형질감염하였다.

[0078] 1-1. miR27a 형질감염 확인

[0079] PC9 cell에 miR27a-3p를 형질감염한 후 miR27a의 발현량을 확인하기 위하여 RT-qPCR을 수행하였다. Total RNA isolation은 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 이용하였으며, cDNA를 합성하였다. 실험에 사용된 miR27a-3p primer sequence는 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

[0080]	miR27a-3p Forward	5'-TGCGGTTCACAGTGGCTAAG-3'	서열번호 2
	miR27a-3p Revers	5'-CTCAACTGGTGTCTGGA-3'	서열번호 3

[0081] 2X SYBR™ Green PCR Master Mix (AB Science, France)를 이용하여 20ul의 시료 (10ul Master Mix, 1ul primer Forward, 1ul primer Reverse, 2ul cDNA, 6ul RNase free water)로 RT-qPCR을 수행하였다. 그 결과 miR27a-3p을 형질감염한 PC9 세포주는 control PC9 보다 miR27a-3p가 약 3.22배 증가됨을 확인하였다(도 4).

[0082] 1-2. miR27a로 형질감염된 PC9 세포주에서 GCC 발현 감소 확인

[0083] miR27a로 형질감염된 PC9 세포주의 GCC2 mRNA의 정량 비교를 위해 RT-qPCR을 수행하였다. Total RNA isolation은 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 이용하였으며, cDNA를 합성하였다. 실험에 사용된 GCC2 및 GAPDH의 primer sequence 정보는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0084]	GCC2	Forward primer	5'-AAACCTCTGCGGAACAGACCA-3'	서열번호 4
		Reverse primer	5'-GAACCTCGGACTTTGTAGCTCTCG-3'	서열번호 5
	GAPDH	Forward primer	5'-ATCATCCCTGCCTCTACTGG-3'	서열번호 6
		Reverse primer	5'-CCCTCCGACGCCTGCTTAC-3'	서열번호 7

[0085] 2X SYBR™ Green PCR Master Mix (AB Science, France)를 이용하여 20ul의 시료 (10ul Master Mix, 1ul primer Forward, 1ul primer Reverse, 2ul cDNA, 6ul RNase free water)로 RT-qPCR을 수행하였다. 그 결과 miR27a-3p을 형질감염한 PC9 세포주는 control PC9 보다 GCC2 mRNA가 약 4.3배 감소됨을 확인하였다(도 5).

[0087] 3. miR27a 형질감염으로 GCC2 발현 억제 효과 확인

[0088] 3-1. proliferation 관련 단백질의 발현 감소 확인

[0089] control PC9와 miR27a-3p 로 형질감염된 PC9 세포를 수확하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, miR27a로 형질전환된 PC9 세포주에서 세포의 proliferation과 관련된 단백질들의 발현이 감소되어 있는 것을 확인하였다(도 6)

[0091] 3-2. Colony formation 감소 확인

[0092] miR27a를 처리하여 GCC2 발현을 감소시킨 PC9 세포주의 Colony formation을 확인하였다. 그 결과, miR27a를 처리한 세포주에서 cancer colony의 형성이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(도 7).

[0093] 3-3. apoptosis 증가 확인

[0094] 이어서, Annexin V&PI staining을 통해 PC9 cell의 apoptosis를 확인한 결과, control 세포주와 비교하여

miRNA27a를 처리한 세포주에서의 apoptosis가 증가됨을 확인할 수 있었다 (도 8).

[0096] 3-4. 항암제 감수성 증가 확인

[0097] PC9 control 세포주와 miR27a-3p 형질감염 PC9 세포주에 폐암 항암제인 제피티닙(gefitinib)을 처리하고 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, miR27a 처리된 PC9 세포주에서 gefitinib에 민감하게 반응하여 cell viability가 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(도 9).

[0099] 3-5. wound healing assay

[0100] 이어서, miR27a-3p 처리가 GCC2 siRNA 처리와 마찬가지로 세포의 이동능을 감소시키는지 확인하고자 miR27a-3p 형질감염된 PC9 세포주를 대상으로 wound healing assay를 수행하였다. 그 결과, scratch 후 48시간에서 control PC9 세포주는 wound closure되었으나, miR27a-3p로 형질감염된 PC9 세포주는 migration ability가 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 10).

[0102] 4. 폐암 환자의 혈장 샘플 내에서 miR27a-3p 수준 확인

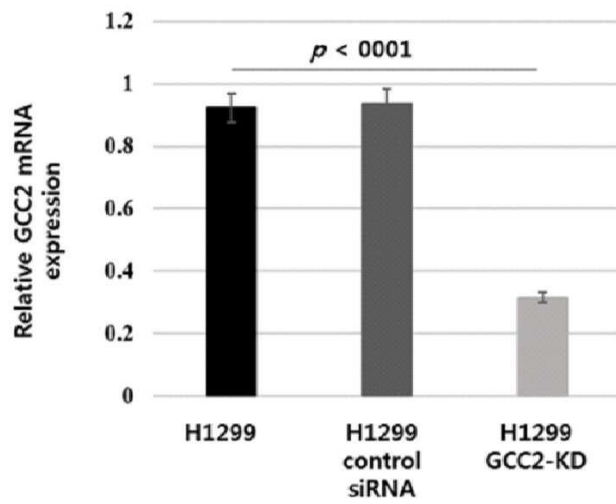
[0103] 이어서, GCC2 발현을 감소시키는 miR27a가 폐암의 진단을 위한 바이오마커로 이용될 수 있는지 확인하고자 하였다. 이에, 정상인과 폐암 환자의 혈장 내 miR27a-3P의 수준을 정량 비교하였다. 정상인 (n = 3)과 폐 선암 환자 (n = 3)의 혈장을 확보하고, GeneA11 (Seoul, Korea)사의 Hybrid-R miRNA isolation kit를 이용하여 0.2ml의 혈장 샘플에서 miRNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 RT-qPCR을 수행하였다. RT-qPCR에 사용된 miR27a-3p의 primer sequence의 정보는 상기 표 1과 동일하다. 그 결과, 폐 선암 환자의 혈장 내 miR27a-3p는 정상군 보다 약 - 61.3% 수준으로 감소되어 있는 것을 확인하였다 (도 11). RT-qPCR 결과를 바탕으로 정상군과 폐 선암 환자의 miR27a-3p 발현 수준의 ROC 분석을 수행한 결과 AUC = 1.000 ($p < 0.001$)로 확인되었다(도 12).

[0106] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0107] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

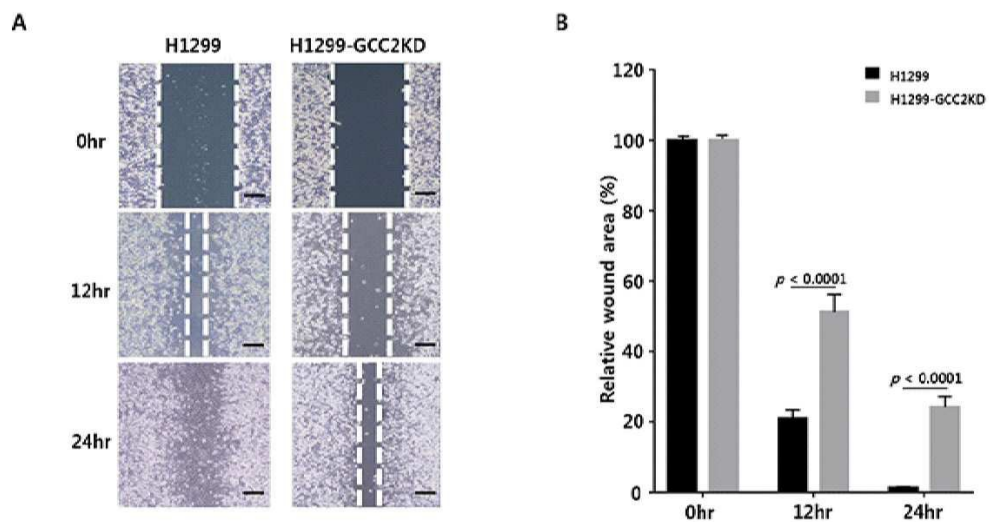
도면1a



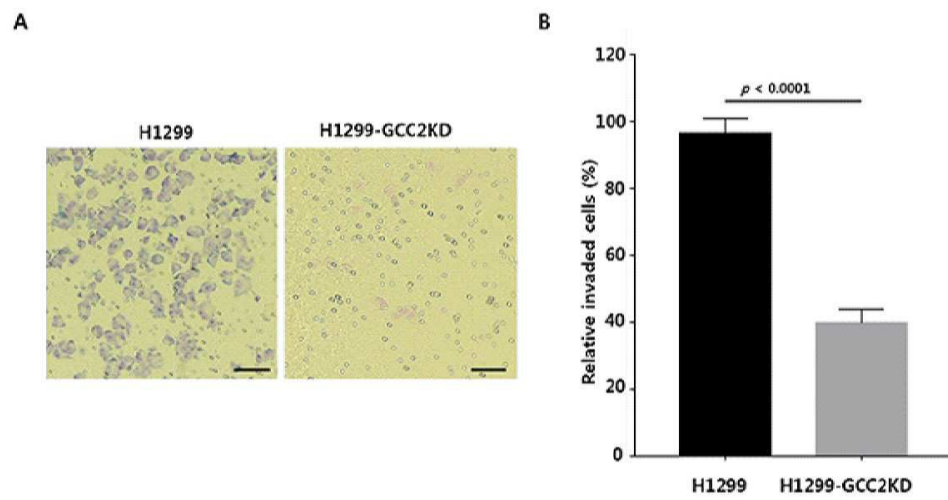
도면1b



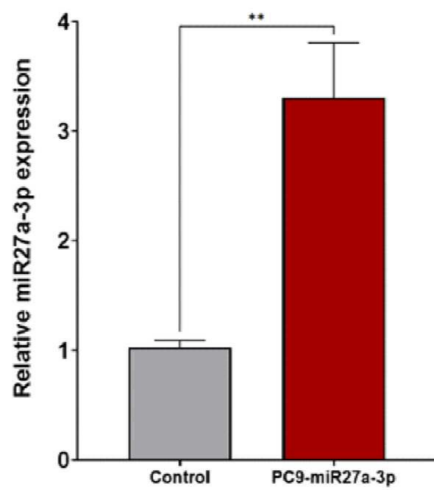
도면2



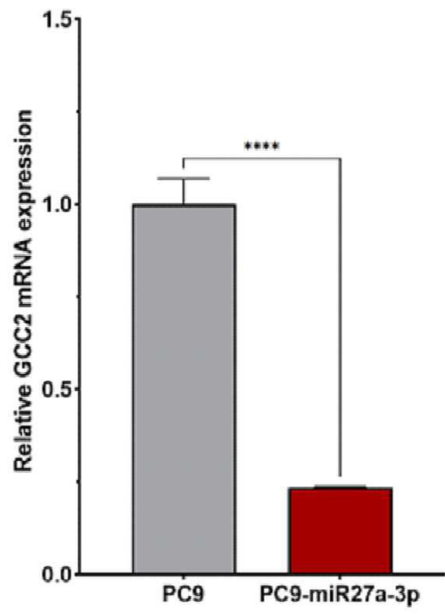
도면3



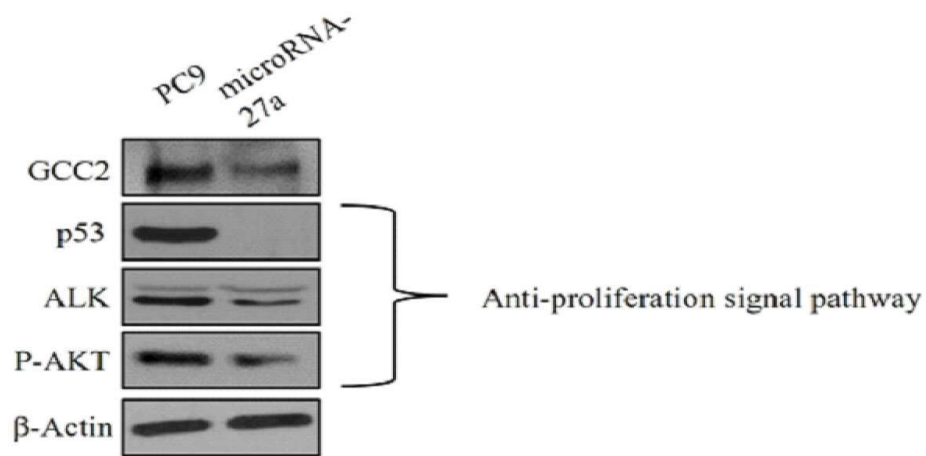
도면4



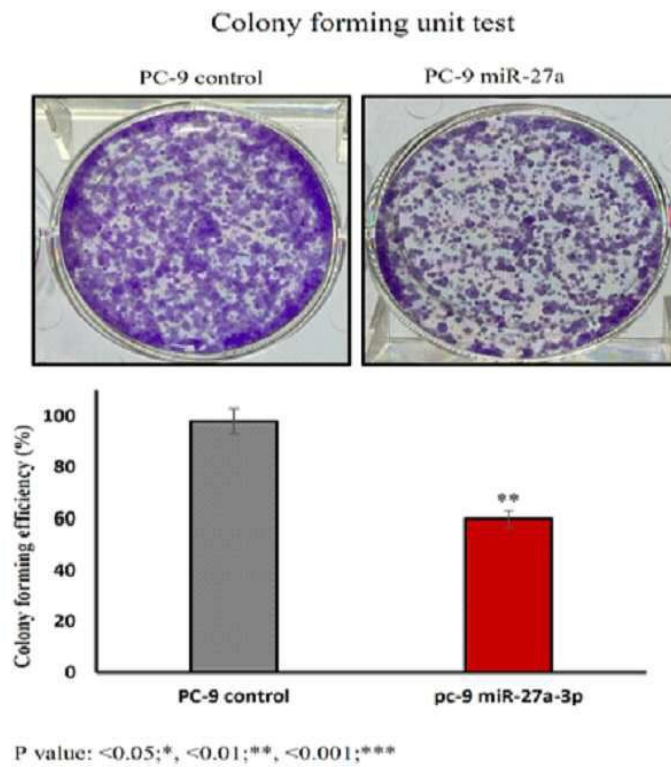
도면5



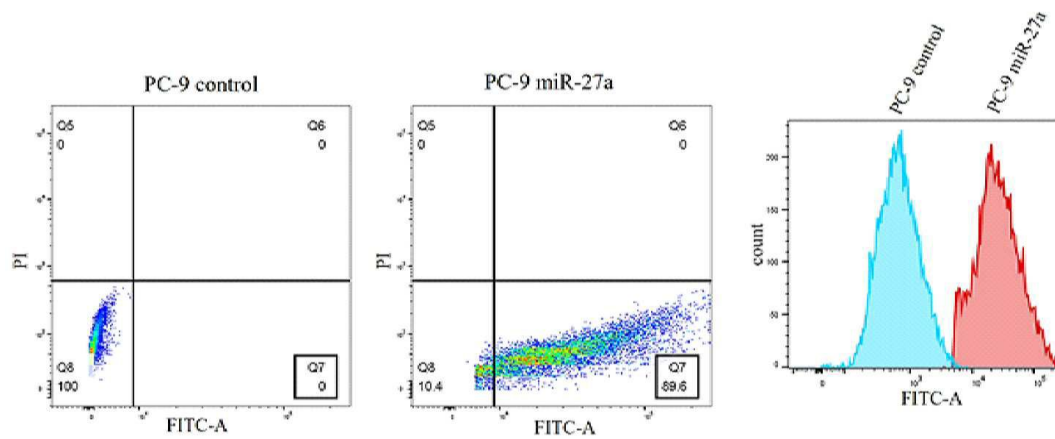
도면6



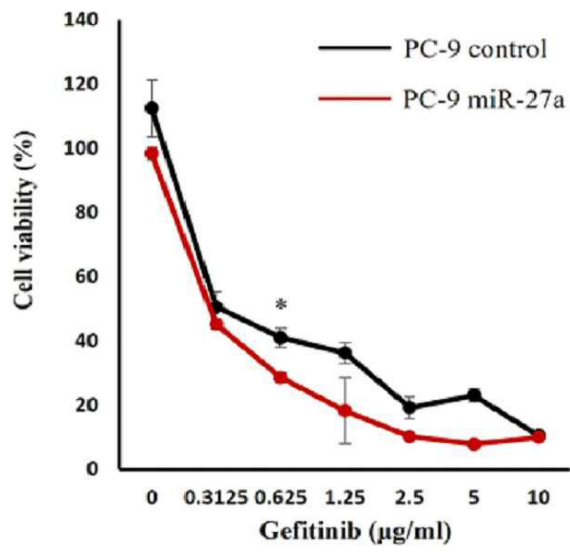
도면7



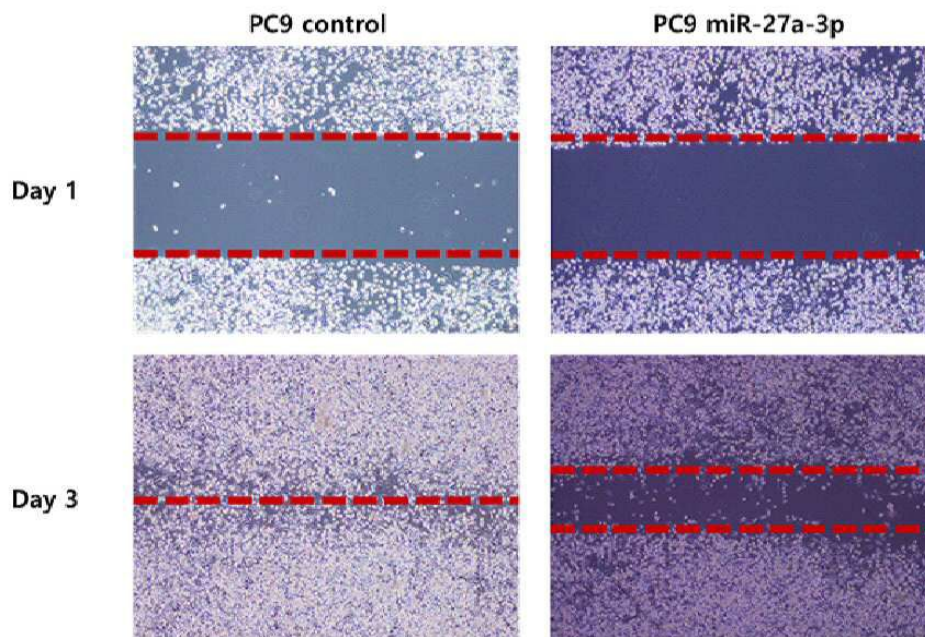
도면8



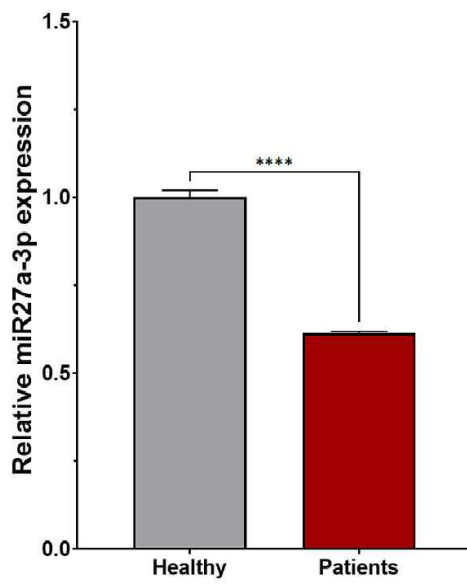
도면9



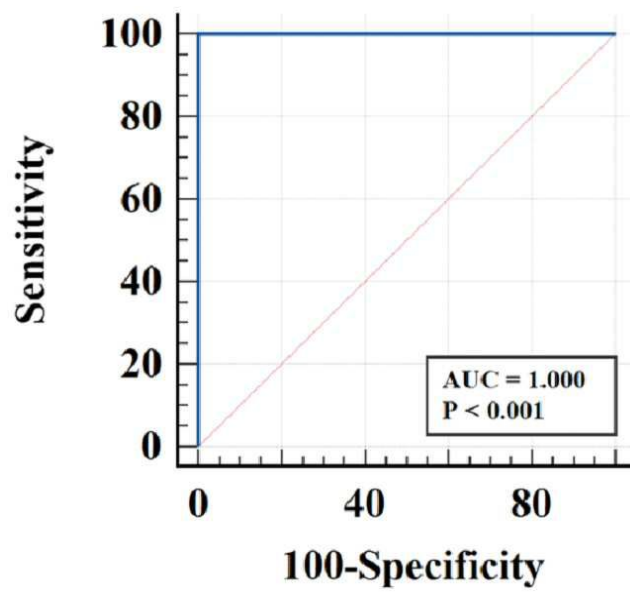
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.