



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월01일

(11) 등록번호 10-1525229

(24) 등록일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0084086

(22) 출원일자 2011년08월23일

심사청구일자 2013년03월06일

(65) 공개번호 10-2013-0021673

(43) 공개일자 2013년03월06일

(56) 선행기술조사문헌

WO2005059543 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

권기선

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

도소희

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이수정

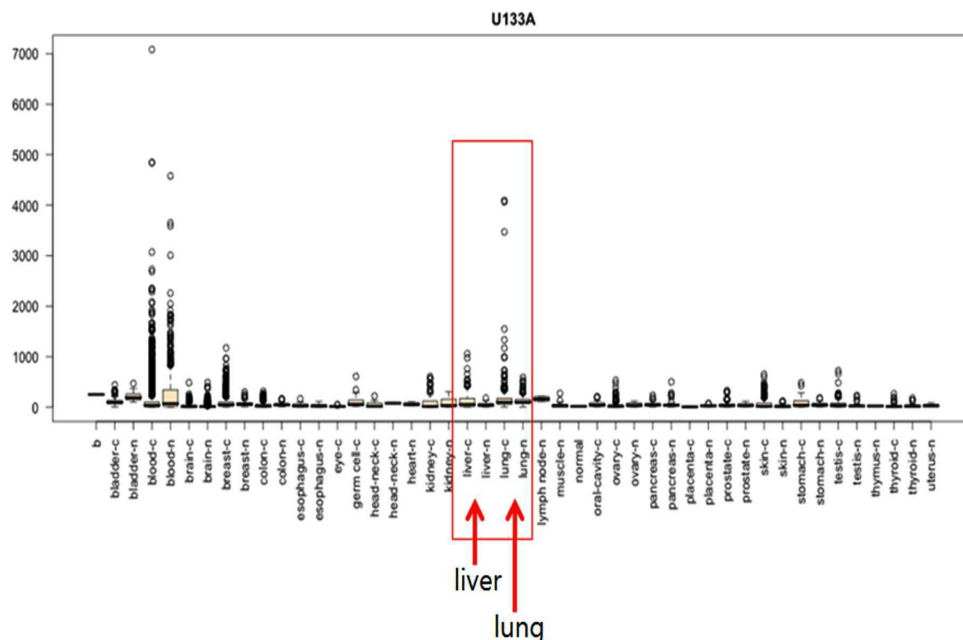
(54) 발명의 명칭 GPR171 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 암 치료 표적인 Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 인체 암 조직의 대규모 유전자 발현 데이터베이스를 구축하여 데이터마이닝 기법을 통해 GPCR(G protein-coupled receptor)을 우선적으로 분석하여, 각 암 조직에서 효과

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



적인 표적화 치료 표적이 될 수 있는 유전자들을 선별하여, 유방암(breast cancer), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 피부암(skin cancer) 및 고환암(testis cancer)과 같은 다양한 암 조직에서 과발현되고 있는 Gpr171을 발굴하였고, Gpr171의 억제에 의해 암세포의 성장, 이동, 침윤이 저해되고 세포사멸이 유도되며, Gpr171의 과발현에 의해 암세포의 성장이 증가하는 것을 확인함으로써, 항암제 표적으로서의 Gpr171의 가능성을 확인하였다. 또한, Gpr171 항체에 의해 Gpr171 암세포 및 종양의 성장이 억제됨을 확인하였으므로, Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 암의 치료 또는 암전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용할 수 있으며, Gpr171의 발현 수준을 이용하여 암을 진단할 수 있다.

(72) 발명자

김선영

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

최소영

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이광표

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0002141
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 교육과학기술부
 연구사업명 원천기술개발사업(바이오의료기술)
 연구과제명 칼슘신호전달시스템의 시간적-공간적 바이오이미징 연구
 기여율 1/4
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0020599
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 교육과학기술부
 연구사업명 미래기반기술개발사업
 연구과제명 산화환원 반응에 의한 세포 내 신호전달 네트워크 규명
 기여율 1/4
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2010.08.01 ~ 2011.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0018053
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 기초연구사업(중견)
 연구과제명 TRIME3 ligase의 신규생체기질 조절에 의한 근골격계분화 연구
 기여율 1/4
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0004156
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 기초연구사업(일반)
 연구과제명 암 유전자발현 DB 마이닝을 통해 발굴한 표적화 암치료 타겟의 실험적 검증
 기여율 1/4
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

Gpr171 유전자에 대한 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA) 및 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 및 Gpr171 단백질에 상보적으로 결합하는 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성 분으로 함유하는, 폐암에 대한 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Gpr171 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폐암에 대한 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

- 1) Gpr171 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 세포주에서 Gpr171 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 Gpr171 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 폐암에 대한 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 폐암에 대한 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 9

- 1) Gpr171 단백질에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 Gpr171 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 Gpr171 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단

계를 포함하는, 폐암에 대한 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 폐암에 대한 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 성장 또는 암 전이 치료 표적인 Gpr171(G protein-coupled receptor 171, H963) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 진행 과정은 암 유발 유전자(oncogene)의 활성화와 종양 억제 유전자 (tumor suppressor gene)의 비활성화를 필요로 하는 복잡한 과정이다. 최근에, 인간 암을 연구 또는 치료하기 위해 마우스 모델을 이용한 연구에서는, 종양 유지를 위해 특정 암 유발 유전자(예를 들어, H-ras, K-ras, Myc 등)들의 지속적인 발현이 필요하며, 이러한 단일 암 유발 유전자의 비활성화에 의해 암이 효과적으로 치료되는 현상이 확인되고 있다. 이는 암 유발 유전자 중독(oncogene addiction)으로 정의되고 있으며, 현재 항암 연구의 중요한 목표는, 암에서 이러한 중독된 암 유발 유전자를 찾기 위해 융합 유전체학(Integrative Genomics)과 시스템 생물학(systems biology)과 같은 새로운 방법들을 통합하여 효과적인 표적화 표적을 찾는 것이다.

[0003] 허셉틴(Herceptin), 리투산(Rituxan), 제피티닙(Gefitinib) 및 글리벡(Gleevec) 등 성공적인 표적화 항암 치료제가 임상에서 쓰이면서 표적화 항암제 시장은 큰 성장을 보이고 있으며, 다국적 제약회사들은 새로운 표적화 항암 치료제를 개발하기 위해 많은 연구 개발을 진행하고 있다. 현재 표적화 항암 표적에 대한 치료제가 개발되어 전임상 또는 임상 시험 단계에 있는 것이 다수 있으나, 여전히 각종 암에서 새로운 표적을 확보하려는 노력이 전 세계적으로 진행되고 있다. 대표적인 연구로는 미국 NCI와 NHGRI가 공동으로 진행하고 있는 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 연구로 각종 암환자의 엑손 시퀀싱(exon sequencing)을 통해 암에서 빈번하게 발생하는 중요한 돌연변이를 찾는 방식으로 새로운 표적을 확보하려고 하고 있다.

[0004] 암은 그 원인 및 진행 과정이 대단히 이질적인 질병으로서 형태학적, 병리학적으로는 비슷하지만 분자수준에서는 서로 현저히 다른 형태로 진행된다. 최근의 임상 경험도 이를 뒷받침 하는데, 허셉틴이나 제피티닙과 같이 임상에서 성공적으로 쓰이고 있는 약물들의 표적인 ERBB2 및 EGFR들은 전체 암환자 중 약 20 내지 30% 정도의 일부 환자들에서만 돌연변이 되거나 과발현되고 있다.

[0005] 이와 같이, 암 진행 과정이 서로 이질적이기 때문에, 중요 표적들을 찾기 위해서는 가능한 한 많은 임상 시료를 확보, 분석하는 것이 필요하다. 현재 전 세계적으로도 몇몇 연구 그룹만이 대규모 유전자 발현 데이터베이스를

확보하고 이를 이용해 표적화 암 치료 표적 발굴 연구를 진행하고 있으며, 국내의 많은 연구들은 아직 대규모 데이터베이스를 확보하지 못한 한계를 가지고 있다.

[0006] 한편, G protein-coupled receptors(GPCRs)는 세포 외부로부터의 신호를 세포 내부로 전달하는 수용체(receptor) 단백질들 중 가장 큰 family를 이루고, 그 구성 단백질은 약 1000개가 알려져 있다(Ritter and Hall, Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Dec;10(12):819-30.). GPCR family는 7개의 막관통 도메인(transmembrane domain)을 가지고 있고, 서열유사성을 기준으로 크게 3개의 subfamily로 나눌 수 있으며, 이 3개의 subfamily는 각각 A, B, C로 명명되어 있다(Bridges and Lindsley, ACS Chem Biol. 2008 Sep 19;3(9):530-41. Epub 2008 Jul 25.). GPCR을 표적으로 삼은 치료제는 현재까지 개발된 치료제 중 약 절반을 차지하고 있다(Bridges and Lindsley, ACS Chem Biol. 2008 Sep 19;3(9):530-41. Epub 2008 Jul 25.). 따라서 GPCR은 신약 개발에 있어 현재까지도 연구자들에게 많은 주목을 받고 있다. GPCR은 암, 면역반응, 대사, 심장질환 등의 조절에 관여하고 있고, 이러한 GPCR과 관련하여 개발된 치료제로는 Lupron, Zoladex 등의 항암제, Singulair, Zyrtec, Claritin, Allegra 등의 알레르기과 관련한 면역반응 치료제, Zantac, Propusid 등의 위산억류와 관련한 소화제, Vasotec, Cozaar, Toprol-XL 등의 고혈압 관련 치료제, Prozac, Paxil, Efexor 등의 우울증 관련 치료제 등이 있다.

[0007] 현재 임상 시험에 들어가 있거나 주로 시판되고 있는 항암 치료용 표적들은 수용체(receptor), 채널(channel), 세포 부착 분자들(cell adhesion molecules) 등의 세포 표면 분자들(cell surface molecules)이 많으며, 이러한 세포 표면에 노출된 표적들이 세포 내부에 위치한 단백질에 비해 항암 치료제로의 접근성이 더 용이하므로, 항암 치료용 표적으로써, 세포 표면에 노출된 분자를 발굴하는 것이 더욱 효과적이다.

[0008] 의학적으로 중요한 생물학적 과정의 신호전달과 관련되어 있는 GPCR family는 호르몬, 신경전달물질, 성장인자, 및 바이러스와 관련된 수용체(receptor)들을 포함한다(Lefkowitz, Mol Pharmacol. 1991 Nov;40(5):619-26.). H963이라고도 불리는 Gpr171(G protein-coupled receptor 171)은 이러한 GPCR family 중 7 membrane G protein-coupled receptor의 한 종류에 속하며, 7개의 소수성 막관통 도메인들을 포함하고 있다. Gpr171을 통해 다양한 호르몬, 내생의 펩티드, 및 신경전달물질의 신호가 변환되어 세포 내로 전달된다고 알려져 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 표적화 암 치료 표적을 발굴하기 위하여 연구를 진행한 결과, 암 조직의 대규모 유전자 발현 데이터베이스를 구축하여 독창적인 데이터마이닝 기법을 통해, GPCR을 우선적으로 분석하여, 각 암에서 효과적인 표적화 치료 표적이 될 수 있는 유전자들을 선별하여 유방암(breast cancer), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 피부암(skin cancer), 고환암(testis cancer)에서 과발현되는 Gpr171을 발굴하였고, Gpr171의 발현 억제에 의해 암세포의 성장, 침윤 및 전이가 현저하게 저해되며, Gpr171의 과발현에 의해 암세포의 성장이 증가함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 암 성장 또는 암 전이 치료 표적인 Gpr171(G protein-coupled receptor 171) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 Gpr171(G protein-coupled receptor 171)을 이용하여, 암의 성장, 침윤 또는 전이 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 Gpr171(G protein-coupled receptor 171)을 이용하여 개체 내 암을 모니터링 또는 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Gpr171(G protein-coupled receptor 171) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0015] 1) Gpr171 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0016] 2) 상기 세포주에서 Gpr171 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및
- [0017] 3) 상기 Gpr171 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.
- [0018] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0019] 1) Gpr171 단백질에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0020] 2) 상기 Gpr171 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0021] 3) 상기 Gpr171 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.
- [0022] 아울러, 본 발명은 Gpr171 단백질을 이용한 암의 모니터링 또는 진단 방법을 제공한다:
- [0023] 1) 피검체 유래 시료에서 Gpr171 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0024] 2) Gpr171 단백질의 발현 수준이 대조군보다 증가된 피검체를 암에 걸릴 위험이 있는 개체로 판정하는 단계.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에서는 인체 암 조직의 대규모 유전자 발현 데이터베이스를 구축하여 데이터마이닝 기법을 통해 GPCR을 우선적으로 분석하여, 각 암에서 효과적인 표적화 치료 표적이 될 수 있는 유전자들을 선별하여 Gpr171을 발굴하였고, 상기 Gpr171은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암의 조직에서 특이적으로 현저하게 과발현되며, Gpr171의 억제에 의해 암 세포의 성장, 이동 및 침윤이 현저히 저해되고 세포사멸이 유도되며, Gpr171의 과발현에 의해 암세포의 성장이 증가하며, Gpr171 항체에 의하여 암세포 및 종양의 성장이 억제되므로, Gpr171의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 암의 치료 또는 암전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 임상 암환자의 조직에서의 Gpr171의 mRNA 발현 양상을 나타낸 그림이다:
 c: 암 조직; 및
 n: 정상 조직.
- 도 2는 폐암 세포주인 Calu-6 세포에서 Gpr171 발현 억제에 따른 세포 성장을 나타낸 그림이다:
 a: Calu-6 세포를 현미경으로 관찰한 사진;
 b: 위: Gpr171의 shRNA에 의한 Gpr171 단백질의 발현 변화;
 아래: shRNA에 의한 Gpr171 발현 억제가 암세포 성장에 미치는 영향;
 Scrambled: 대조군; 및
 bar: standard deviation.
- 도 3은 간암 세포주인 SNU-475 세포에서 Gpr171 발현 억제에 따른 세포 성장을 나타낸 그림이다:

위: Gpr171의 shRNA에 의한 Gpr171 단백질의 발현 변화;

아래: shRNA에 의한 Gpr171 발현 억제가 암세포 성장에 미치는 영향;

Scrambled: 대조군; 및

bar: standard deviation.

도 4는 폐암 세포주인 A549 세포에서 Gpr171 발현 억제에 따른 세포 성장을 나타낸 그림이다:

위: Gpr171의 siRNA에 의한 Gpr171 단백질의 발현 변화;

아래: siRNA에 의한 Gpr171 발현 억제가 암세포 성장에 미치는 영향;

Scrambled: 대조군; 및

bar: standard deviation.

도 5는 간암 세포주인 PLC-PRF-5 세포에서 Gpr171 발현 억제에 따른 세포 성장을 나타낸 그림이다:

위: Gpr171의 siRNA에 의한 Gpr171 단백질의 발현 변화;

아래: siRNA에 의한 Gpr171 발현 억제가 암세포 성장에 미치는 영향;

Scrambled: 대조군; 및

bar: standard deviation.

도 6은 폐암 세포주인 Calu-6 세포에서 Gpr171 과발현에 따른 세포 성장을 나타낸 그림이다:

위: Gpr171 과발현에 의한 Gpr171 단백질의 발현 변화;

아래: Gpr171 과발현이 암세포 성장에 미치는 영향;

Mock: 대조군; 및

bar: standard deviation.

도 7은 폐암 세포주인 A549 세포에서 Gpr171 발현 억제에 따른 세포 이동 변화를 나타낸 그림이다:

위: shRNA에 의해 Gpr171의 발현이 억제된 A549 세포의 이동을 100 배 배율에서 찍은 세포 사진;

아래: Gpr171 발현 억제에 의한 A549 세포의 이동 변화를 200 배 배율에서 임의적으로 고른 8개 필드(fields)의 세포를 개수하여 수치화한 그림; 및

bar: standard deviation.

도 8은 폐암 세포주인 Calu-6 세포에서 Gpr171 발현 억제에 따른 세포 이동 변화를 나타낸 그림이다:

위: shRNA에 의해 Gpr171의 발현이 억제된 Calu-6 세포의 이동을 200 배 배율에서 찍은 세포 사진;

아래: Gpr171 발현 억제에 의한 Calu-6 세포의 이동 변화를 200 배 배율에서 임의적으로 고른 8개 필드(fields)의 세포를 개수하여 수치화한 그림; 및

bar: standard deviation.

도 9는 폐암 세포주인 A549 세포에서 Gpr171의 발현 억제에 따른 세포 침윤 변화를 나타낸 그림이다:

위: shRNA에 의해 Gpr171의 발현이 억제된 A549 세포의 침윤을 100 배 배율에서 찍은 세포 사진;

아래: Gpr171 발현 억제에 의한 A549 세포의 침윤 변화를 200 배 배율에서 임의적으로 고른 8개 필드(fields)의 세포를 개수하여 수치화한 그림; 및

bar: standard deviation.

도 10은 폐암 세포주인 Calu-6 세포에서 Gpr171의 발현 억제에 따른 세포 침윤 변화를 나타낸 그림이다:

위: shRNA에 의해 Gpr171의 발현이 억제된 A549 세포의 침윤을 200 배 배율에서 찍은 세포 사진;

아래: Gpr171 발현 억제에 의한 A549 세포의 침윤 변화를 200 배 배율에서 임의적으로 고른 8개 필드(fields)의

세포를 개수하여 수치화한 그림; 및

bar: standard deviation.

도 11은 Gpr171 항체에 의한 암세포 및 종양 성장 억제 효과를 나타낸 그림이다:

a: Gpr171 항체가 폐암 세포주인 Calu-6 세포의 성장에 미치는 영향;

b: Gpr171 항체가 이중이식 마우스모델에서 발생한 종양의 부피에 미치는 영향;

c: 위: 대조군으로 IgG를 처리한 누드 마우스; 및

아래: Gpr171 항체를 처리한 누드 마우스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028]

본 발명은 Gpr171(G protein-coupled receptor 171)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029]

상기 Gpr171은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0030]

상기 암은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 폐암 또는 간암인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0031]

상기 Gpr171 단백질의 발현 억제제는 Gpr171 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 상기 Gpr171 단백질의 활성 억제제는 Gpr171 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0032]

상기 siRNA는 인간 Gpr171 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 25개의 염기로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 서열번호 4 또는 5인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033]

상기 안티센스 뉴클레오티드는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.

[0034]

상기 펩티드 미메틱스(Peptide Minetics)는 Gpr171 단백질의 결합 도메인을 억제하는 Gpr171 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 펩티드 미메틱스는 펩티드 또는 비펩티드일 수 있고, psi 결합(Benkirane, N., et al. J. Biol. Chem., 271:33218-33224, 1996)과 같은, 비펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, "구조적으로 강제된(conformationally constrained)" 펩티드, 사이클릭 미메틱스(cyclic mimetics), 적어도 하나의 엑소사이클릭 도메인(exocyclic domain), 결합 부분(결합 아미노산) 및 활성 부위를 포함하는 사이클릭 미메틱스일 수 있다. 펩티드 미메틱스는 Gpr171 단백질의 이차구조 특성과 유사하게 구조화되고 항체(Park, B. W. et al. Nat Biotechnol 18, 194-198, 2000) 또는 수용성 수용체(Takasaki, W. et al. Nat Biotechnol 15, 1266-1270, 1997)와 같은 거대한 분자의 억제 특성을 모방할 수 있으며, 천연의 길항제와 동등한 효과로 작용할 수 있는 신규한 소분자일 수 있다(Wrighton, N. C. et al. Nat Biotechnol 15, 1261-1265, 1997).

[0035]

상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by

exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다(C. Tuerand L. Gold, Science 249, 505 - 510, 2005; A. D. Ellington and J. W. Szostak, Nature 346, 818 - 822, 1990; M. Famulok, et. al., Acc. Chem. Res. 33, 591 - 599, 2000; D. S. Wilson and Szostak, Annu. Rev. Biochem. 68, 611 - 647, 1999). 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조정할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적이 기능하는 능력을 차단할 수 있다.

[0036] 상기 항체는 Gpr171에 특이적이고 직접적으로 결합하여 Gpr171의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 Gpr171에 특이적으로 결합하는 항체는 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 모노클로날(monoclonal) 항체를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 Gpr171에 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작하여도 무방하며, 상업적으로 알려진 Gpr171 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 상기 항체는 당업자에게 알려진 종래 방법에 따라 면역원인 Gpr171 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여할 수 있다. 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 형성된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하여 항체를 분리할 수 있다.

[0037] 상기 조성물은 암의 증식, 이동, 침윤 또는 전이의 저해 활성을 가질 수 있다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 NCBI의 Gene Expression Omnibus와 EBI의 ArrayExpress의 유전자 발현 데이터로부터, 마이크로어레이 분석을 통해 인체 시료의 유전자 발현 데이터베이스를 구축하였고(표 1 참조), 상기 데이터베이스에는 정상 및 암 조직에 대한 유전자 발현 데이터가 포함되어있다(표 2 참조). 독자적으로 구축한 상기 암 유전자 발현 데이터베이스로부터 암 치료 표적을 발굴하기 위하여, 암 이상값 프로파일 분석(Cancer Outlier Profile Analysis, COPA)을 적용하였다(Tomlins et al. 2005)

[0039] 본 발명자들은 구축된 유전자 발현 데이터베이스로부터 암 치료를 위한 후보 표적 유전자를 선별하기 위해 항암 치료 표적으로 주로 이용되는 수용체(receptor) 중 큰 family를 가지고 있는 GPCR을 우선적으로 분석하여, 각 암에서 효과적인 치료 표적이 될 수 있는 유전자들 중에 Gpr171을 표적화 항암 치료의 후보로서 선별하였으며, Gpr171의 발현을 마이크로어레이 분석을 통해 확인해 본 결과, 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암 등의 조직에서 정상조직 또는 다른 암 조직들에 비해 높게 발현되는 것을 확인하였다(도 1 참조). 따라서, Gpr171은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암의 표적 단백질로 이용될 수 있으며, 특히, 폐암 또는 간암의 표적 단백질로서 이용 가능성을 알 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명자들은, 상기 암 중에서 해당하는 조직의 암세포에서의 발현양상을 고려하여 선별한, 폐암 또는 간암 세포주에 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 또는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA)를 형질도입하여 Gpr171 유전자의 발현을 억제하고, 상기 세포주의 암 세포의 성장, 이동, 침윤 및 전이를 관찰하였다. 그 결과, shRNA 또는 siRNA의 암 세포내 도입에 의해 Gpr171 발현이 억제됨을 확인하였고(도 2 내지 도 5 참조), 암세포의 증식이 현저하게 감소하였고 세포사멸이 증가하였으며(도 2 내지 도 5 참조), 암세포의 이동 및 침윤이 저해됨을 관찰하였다(도 7 내지 도 10 참조). 또한, Gpr171의 과발현에 의해 암세포의 증식이 증가함을 확인하였다(도 6 참조). 따라서, Gpr171의 발현 억제는 폐암 또는 간암과 같은 암세포의 증식을 억제하고, 침윤 및 전이에 결정적인 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

[0041] 아울러, 본 발명자들은, Gpr171 단백질의 활성을 억제하기 위해 Gpr171의 항체를 처리하여 폐암 세포의 성장이 억제되는 것을 확인하였으며(도 11a 참조), 이종이식마우스 모델에서 Gpr171 항체에 의하여 종양의 부피가 감소하는 것을 확인하였다(도 11b 및 도 11c 참조). 따라서, Gpr171 항체에 의한 Gpr171 단백질의 활성 억제는 폐암과 같은 암세포 또는 종양의 증식에 대한 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0042] 따라서, Gpr171은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암 조직 및 상기 암의 세포주에서 과발현하고 Gpr171의 발현이 억제되면 암 세포의 성장, 이동 및 침윤이 저해되며, Gpr171이 과발현되면 암세포의 성장이 증가하고, Gpr171 단백질의 활성을 억제하면 암세포의 성장이 감소하므로, Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 조성물 총 중량

에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 뉴클레오티드 또는 핵산은, 경구, 국소, 비경구, 비 내, 정맥 내, 근육 내, 피하, 안 내, 경피 등의 투여를 목적으로 제조될 수 있다.
- [0046] 바람직하게는, 핵산 또는 벡터가 주사가능한 형태로 사용된다. 이에 따라서 특히 처리될 영역으로는 직접적인 주입을 위하여 주사 가능한 조성물을 위한 임의의 약학적으로 허용되는 매개체와 혼합될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 건조 특히 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 가능케 하는 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 환자의 종양으로의 핵산의 직접적인 주입은 치료 효율을 감염된 조직에 집중시키도록 하므로 유리하다. 사용되는 핵산의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 유전자, 벡터, 사용되는 투여 방식, 문제시되는 질병 또는 대안적으로 요구되는 치료기간에 의해 조절될 수 있다. 또한, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0047] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 약학적 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법 또는 암 전이 억제 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 한정되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0049] 상기 약학적 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0050] 상기 암은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 폐암 또는 간암인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0052] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인체 암 조직의 대규모 유전자 발현 데이터베이스를 구축하여 데이터마이닝 기법을 통해 신규한 표적화 항암 후보 표적을 발굴하였다. 특히, Gpr171이 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암의 조직에서 과발현되고, Gpr171의 억제에 의해 폐암 또는 간암 세포의 성장, 이동, 침윤 및 전이가 저해되고 세포사멸이 유도되며, Gpr171의 과발현에 의해 폐암 세포의 성장이 증가함으로써, 항암제의 표적으로서 Gpr171의 가능성을 확인하였으며, Gpr171의 항체에 의해 폐암 세포의 성장이 억제되고 이종이식 마우스 모델에서 Gpr171의 항체에 의해 종양의 부피가 감소함을 확인함으로써, Gpr171 단백질 활성 억제제가 암세포 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0053] 따라서, Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 암의 치료 또는 암 전이 억제 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

- [0054] 아울러, 본 발명은 Gpr171 단백질을 이용한 암 치료 또는 암 전이 억제용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0055] 상기 암은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 폐암 또는 간암인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 구체적으로, 상기 방법은
- [0057] 1) Gpr171 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0058] 2) 상기 세포주에서 Gpr171 단백질의 발현 정도를 측정하는 단계; 및
- [0059] 3) 상기 Gpr171 단백질의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0060] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 세포주는 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 폐암 또는 간암 세포주인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0061] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 당업자에게 알려진 전자체 또는 그로부터 코딩된 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있다.
- [0062] 또 다른 방법은,
- [0063] 1) Gpr171 단백질에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0064] 2) 상기 Gpr171 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0065] 3) 상기 Gpr171 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인체 암 조직의 대규모 유전자 발현 데이터베이스를 구축하여 데이터마이닝 기법을 통해 신규한 표적화 항암 후보 표적을 발굴하였다. 특히, Gpr171이 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암의 조직에서 과발현되고, Gpr171의 억제에 의해 폐암 또는 간암 세포의 성장, 이동, 침윤 및 전이가 저해되고 세포사멸이 유도되며, Gpr171의 과발현에 의해 폐암 세포의 성장이 증가함으로써, 항암제의 표적으로서 Gpr171의 가능성을 확인하였으며, Gpr171의 항체에 의해 폐암 세포의 성장이 억제되고 이중이식 마우스 모델에서 Gpr171의 항체에 의해 종양의 부피가 감소함으로써, Gpr171이 암세포에서 결정적인 역할을 하는 것을 확인하였다.
- [0068] 따라서, Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 방법은 암의 치료 또는 암전이 억제용 물질을 스크리닝하는 데 유용하게 이용될 수 있다.
- [0069] 아울러, 본 발명은 Gpr171 단백질을 이용한 암의 모니터링 또는 진단 방법을 제공한다.
- [0070] 구체적으로, 상기 방법은
- [0071] 1) 피검체 유래 시료에서 Gpr171 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0072] 2) Gpr171 단백질의 발현 수준이 대조군보다 증가된 피검체를 암에 걸릴 위험이 있는 개체로 판정하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0073] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 Gpr171은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0074] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 암은 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 폐암 또는 간암인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0075] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인체 암 조직의 대규모 유전자 발현 데이터베이스를 구축하여 데이터마이닝 기법을 통해 신규한 표적화 항암 후보 표적을 발굴하였다. 특히, Gpr171이 유방암, 간암, 폐암, 피부암 및 고환암의 조직에서 과발현되고, Gpr171의 억제에 의해 폐암 또는 간암 세포의 성장, 이동, 침윤 및 전이가 저해되고 세포사멸이 유도되며, Gpr171의 과발현에 의해 폐암 세포의 성장이 증가함으로써, 항암제의 표적으로서 Gpr171의 가능성을 확인하였으며, Gpr171의 항체에 의해 폐암 세포의 성장이 억제되고 이종이식 마우스 모델에서 Gpr171의 항체에 의해 종양의 부피가 감소함으로써, Gpr171이 암세포에서 결정적인 역할을 하는 것을 확인하였다.

[0076] 따라서, Gpr171의 발현 수준을 확인함으로써 암의 모니터링 또는 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

[0077] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0078] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 상기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0079] <실시예 1> 암 조직 데이터베이스 구축 및 표적화 치료 타겟 유전자 선별

[0080] <1-1> 대규모 인체 암 조직의 유전자 발현 데이터베이스

[0081] 본 발명자들은 NCBI의 Gene Expression Omnibus 및 EBI의 ArrayExpress의 공개된 유전자 발현 데이터베이스로부터 450가지 이상의 데이터 세트를 수집 및 분석하여 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 33,000개 이상의 시료를 포함하는 차별화된 유전자 발현 데이터베이스를 구축하였다.

[0082] 구체적으로, 서로 다른 데이터 세트들을 통합하여 분석할 수 있도록 가능한 한 마이크로어레이 원시 데이터 파일로부터 일관된 방법으로 데이터들을 통합 및 정리하였다. 첫 번째로, Affymetrix human chip platform을 사용한 데이터들만 수집하였고, 두 번째로, 원시 데이터인 CEL 파일로부터 Affymetrix 고유 알고리즘인 MAS5(microarray suite 5) 방법을 적용하여, 각 유전자 수준에서의 발현값을 구하였고, 전반적인 평균 표준화(global mean normalization)를 동일하게 적용하여, 각 마이크로어레이 플랫폼(microarray platform, U133Plus2)으로 10,000개 이상의 시료를 하나로 통합하여 메타 분석하는 것이 가능하도록 하였다.

표 1

[0083] 인체 시료 유전자 발현 데이터베이스 현황

플랫폼	U133Plus2	U133A	U95A	합계
데이터 세트	155	244	53	452
시료	12974	18035	2272	33,281
탐침	54613	22216	12558	-
데이터 포인트	708,549,062	400,647,525	28,531,776	1,137,728,363

[0084] 상기 데이터베이스에는 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 거의 모든 조직으로부터 유래한, 22,000개 이상의 정상 및 암 조직에 대한 유전자 발현 데이터를 포함하고 있다.

표 2

[0085]

조직	암	정상	합계
방광(Bladder)	126	23	149
혈액(Blood)	1416	1127	2543

골수(Bone Marrow)	1736	5	1741
뇌(Brain)	1285	2239	3524
유방(breast cancer)	3738	158	3896
자궁경부(Cervix_)	138	46	184
대장(Colon)	1116	231	1347
자궁내막(Endometrium)	84	81	165
식도(Esophagus)	32	32	64
두경부(Head Neck)	253	42	295
신장(Kidney)	928	166	1094
간(liver cancer)	354	83	437
폐(lung cancer)	1290	426	1716
림프절(Lymph node)	25	12	37
림프구(Lymphocyte)	180	175	355
근육(Muscle)	0	622	622
난소(Ovary)	977	17	994
췌장(Pancreas)	94	35	129
전립선(Prostate)	473	188	661
피부(skin cancer)	437	80	517
소장(Small intestine)	14	7	21
비장(Spleen)	4	10	14
위장(Stomach)	295	61	356
정소(testis cancer)	206	26	232
갑상선(Thyroid)	130	52	182
자궁(Uterus)	130	25	155
기타	410	268	678
합계	15454	6661	22115

[0086] <1-2> 암 이상값 프로파일 분석(Cancer Outlier Profile Analysis, COPA)을 사용한 암 환자에서의 유전자 발현 변화 확인

[0087] 본 발명자들은 상기 <실시에 1-1>과 같이, 독자적으로 구축한 암 유전자 발현 데이터베이스로부터 치료 표적을 발굴하기 위하여 기존의 접근법과는 차별화된 방법으로 COPA 분석을 적용하였다(Tomlins et al. 2005). 현재 임상에서 효과적으로 쓰이는 치료제의 표적화 항암 표적 유전자들은 전체 환자 중 일부에서만 유전자 돌연변이 또는 유전자 증폭에 의한 과발현이 관찰되고 있다. 예컨대, 허셉틴(Herceptin)의 표적인 ERBB2는 전체 유방암 환자 중 약 25 내지 30% 정도에서만 과발현되는 것으로 나타났고, 이레사(Iressa) 또는 세특시맵(Cetuximab)의 표적인 EGFR도 폐암 환자나 뇌종양 환자의 약 10 내지 20% 정도에서만 유전자 돌연변이 또는 유전자 증폭에 의한 과발현이 관찰된다. 이와 같이, 효과적인 표적 유전자들은 전체 환자 중 일부 환자에서만 변이가 관찰되므로, 기존의 t-test와 같이 환자군과 정상인들의 평균을 비교하여 발현에 차이가 나는 유전자를 찾는 방법보다는 환자군 중 상위 10 내지 20%와 정상인들의 평균을 비교하는 outlier 분석 방법이 더욱 효과적이므로, 이러한 암 이상값 프로파일 분석(Cancer Outlier Profile Analysis, COPA)을 실시하였다.

[0088] <1-3> 표적화 치료 표적 유전자의 선별

[0089] COPA 분석법을 적용하여 의약품이 될 만한(druggable) 표적인 수용체 중에서 큰 family를 가지고 있는 GPCR을 우선적으로 데이터베이스를 분석하여, 각 암에서 효과적인 표적화 치료의 표적이 될 수 있는 유전자들을 선별하였다.

[0090] 구체적으로, 하기의 데이터마이닝 기법을 통해 새로운 항암 후보 표적을 발굴하였다. i) 임상 조직에 대한 유전자 발현 데이터베이스 마이닝을 통해 정상조직에 비해 특정 암 조직에서 특이적으로 많이 발현되고 있는 후보 표적 유전자의 풀(pool)을 형성하였다. ii) 형성된 유전자 풀 내에서 여러 암에서 특정 표적 유전자가 많이 발현되어 있을수록 암 형성에 직접적이고도 중요한 유전자일 가능성이 높은 특이적으로 과발현되어 있는 표적 유전자를 선별하였다. iii) 표적 유전자가 많이 발현되고 있는 임상 조직과 동일한 조직에서 유래한 암 세포주들 중에서 그 표적 유전자가 일정 수준이상 많이 발현되고 있는 세포주를 선별하였다. iv) 선별된 후보 표적 유전자들에 대해 문헌 조사를 수행하여 되도록 암 관련하여 연구가 많이 진행되어 있지 않은 유전자를 선별하여 중

독되는 암 유발 유전자(addicted oncogene)를 찾고자 하였다. 이와 같은 기준을 바탕으로 선별된 후보 표적 유전자들 중에서 GPCR 중 하나인 Gpr171을 표적화 항암 치료를 위한 일차 후보 표적 유전자로서 선택하여 검증하였다.

[0091] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 암 환자의 임상조직에서 Gpr171의 RNA 발현 양상을 확인한 결과, 유방암(breast cancer), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 피부암(skin cancer), 고환암(testis cancer) 등의 다양한 암 조직에서 정상조직에 비해 Gpr171의 발현이 증가되어 있음을 관찰하였으며, 이들 암 중에서 해당하는 조직의 암세포에서의 발현 양상을 고려해 폐암 및 간암에서 Gpr171이 암 치료에 효과적인 치료 표적이 될 수 있음을 알 수 있었다(도 1).

[0092] <실시예 2> Gpr171의 암세포 성장에 대한 영향 분석

[0093] <2-1> shRNA에 의한 Gpr171의 발현 억제를 통한 폐암 및 간암 세포 성장 억제 효과

[0094] 본 발명자들은 Gpr171의 발현 억제에 의한 폐암 및 간암 세포에서의 암세포 성장에 대한 효과를 확인하기 위하여, 폐암 세포주 Calu-6(ATCC, cat#:HTB-56) 및 간암 세포주 SNU-475(ATCC, cat#:CRL-2236)에 Gpr171의 shRNA를 사용하여 암세포의 성장에 대한 영향을 분석하였다.

[0095] 구체적으로, Gpr171의 발현을 억제하기 위하여 Sigma에서 구입한 shRNA(SIGMA, Cat#: SHCLNG-NM_013308)를 사용하였고, 상기 shRNA는 5종류의 shRNA construct들로 구성되어 있으며(CCGGGCAGCTTACATATAACAACCTCTCGAGAAGTTGTTATATGTAAGCTGCTTTTT(서열번호 2), CCGGGCCTGCCTCATCTATATCAATCTCGAGATTGATATAGATGAGGCAGGCTTTTT(서열번호 3), CCGGCCTGTGAATTCGACAGCTCTACTCGAGTAGAGCTGTGCAATTACAAGGTTTT(서열번호 4), CCGGCCGAATACAAGAACCGGATTCTCGAGAATCCGGGTTCTTGTATTCCGTTTT(서열번호 5), CCGGCCTGTACTATACCTCTCAAACCTCGAGTTTGAGAGGTGATAGTACAGGTTTT(서열번호 6), 대조군으로는 Scrambled shRNA Control(SIGMA, cat#: SHC002V)를 사용하였다. 또한, Lipofectamine™ 2000(invitrogen, Cat#:11668-027) 및 Enhancer Q™ Transfection Enhancing Reagent(WelGene, Cat#: TR001-02)를 사용하여 293T 세포(ATCC, cat#:CRL-11268)에 상기 언급한 Gpr171 shRNA constructs 및 레트로 바이러스를 형성하도록 하는 packaging mix인 pLP1(proteolipid protein 1), pLP2(proteolipid protein 2), pVSVG(vesicular stomatitis virus glycoprotein)를 형질감염하여 바이러스 입자를 제조하였다. 48 시간 뒤, 바이러스 배양 상층액을 회수하여 syringe filter(millipore,Cat#: SLHP033RS)로 여과한 다음, 신선한 배양 배지와 1:1로 혼합하였고, 여기에 감염의 효과를 향상시키기 위하여, 4 µg/mL의 polybrene(SIGMA, Cat#:L107689)을 넣어 폐암 세포주 Calu-6와 간암 세포주 SNU-475에 각각 48시간 동안 형질감염하였다. Gpr171의 발현 억제 정도에 따른 세포의 성장을 대조군과 비교하여 조사하기 위해, 24-well plate에 1 내지 4 X 10⁴ 개의 세포를 분주하여 37 °C/5% CO₂에서 각각 0, 1, 2, 3, 4일(폐암 세포주 Calu-6의 경우) 또는 0, 2, 4, 6, 8일(간암 세포주 SNU-475의 경우) 동안 배양하였다. 각 해당 시간에 plate에 Cell Counting Kit-8(CCK-8,DOJINDO, Cat#: CK04-11) 용액을 50ul 첨가하여(해당 세포 배양액이 500ul인 경우) 1시간 동안 어두운 37 °C CO₂ incubater에서 반응시킨 다음, Victor microplate reader(PerkinElmer)에서 450 nm의 흡광도를 측정하여 세포 증식 정도를 관찰하였다.

[0096] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, Gpr171 shRNA가 폐암 세포주인 Calu-6에서 대조군인 scrambled shRNA에 비해 Gpr171의 단백질 발현을 감소시키고, 세포의 성장을 억제하였으며, 세포의 사멸이 증가하였으며, 특히, 4일 후 대조군에 비해 약 80 %의 성장 억제 및 세포 사멸을 나타냄을 확인하였다(도 2).

[0097] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, Gpr171 shRNA가 간암 세포주인 SNU-475에서 대조군인 scrambled shRNA에 비해 Gpr171의 단백질 발현을 감소시키고, 세포의 성장을 억제하였으며, 세포의 사멸이 증가하였으며, 특히, 8일 후 대조군에 비해 약 30 %의 성장 억제 및 세포 사멸을 나타냄을 확인하였다(도 3).

[0098] <2-2> siRNA에 의한 Gpr171의 발현 억제를 통한 폐암 및 간암 세포 성장 억제 효과

[0099] 본 발명자들은 Gpr171의 발현 억제에 의한 폐암 및 간암 세포에서의 암세포 성장에 대한 효과를 확인하기 위하여, 폐암 세포주 A549(ATCC, cat#:CCL-185) 및 간암 세포주 PLC-PRF-5(ATCC, cat#:CRL-8024)에 Gpr171의 siRNA

를 사용하여 암세포의 성장에 대한 영향을 분석하였다.

[0100] 구체적으로, Gpr171의 발현을 억제하기 위하여 2개의 Gpr171 siRNA(5'-CUGUACUAUCACCUCUCA-3'(서열번호 7) 및 5'-CAAUAAGCAGUCAUCCUUA-3'(서열번호 8)를 바이오니아에서 구입하였다. 상기의 siRNA를 대조군인 scrambled siRNA와 함께 Amaxa를 사용하여 폐암 세포주 A549와 간암 세포주 PLC-PRF-5에 전기천공법(electroporation)을 수행하여 형질도입하였다. 이후, 24시간 후, Gpr171의 발현 억제 정도에 따른 세포의 성장을 대조군과 비교하여 조사하기 위해 24-well plate에 1 내지 4 X 10⁴ 개의 세포를 분주하여 37 °C/5% CO₂에서 각각 1, 2, 3, 4일 동안 배양하였다. 세포 증식의 정도는 상기 <실시예 2-1>에서와 같이 CCK-8로 0, 1, 2, 3, 4일 후 측정하였고, Gpr171의 발현 억제는 Immunoblot assay를 사용하여 확인하였다.

[0101] 그 결과, 상기 2개의 Gpr171 siRNA 모두 대조군으로 사용된 scrambled siRNA와 비교하여 폐암 세포주 A549에서 Gpr171의 단백질 발현을 감소시키고, 세포의 성장을 억제하였으며, 세포 사멸이 증가함을 확인할 수 있었으며, 특히, 4일 후에는 약 80%의 뚜렷한 세포 성장의 억제 및 세포의 사멸을 나타냄을 확인하였다(도 4).

[0102] 또한, 상기 2개의 Gpr171 siRNA 모두 대조군으로 사용된 scrambled siRNA와 비교하여 간암 세포주 PLC-PRF-5에서 Gpr171의 단백질 발현을 감소시키고, 세포의 성장을 억제하였으며, 세포 사멸이 증가함을 확인할 수 있었으며, 특히, 4일 후에는 대조군에 비해 약 30%의 성장 억제 및 세포 사멸을 나타냄을 확인하였다(도 5).

[0103] <2-3> Gpr171의 과발현에 의한 암세포 성장 증진 효과

[0104] 본 발명자들은, Gpr171의 과발현에 의하여 폐암 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 폐암 세포주에 Gpr171 과발현 벡터를 도입하여, Gpr171을 과발현시킨 후, 암세포의 성장을 확인하였다.

[0105] 구체적으로, Gpr171의 과발현을 위하여 pCMV6-Gpr171(Origene, Cat#: SC115273)을 구입하였다. pCMV6-Gpr171은 대조군인 pCMV6 mock vector 및 Lipofectamine™ 2000(invitrogen, Cat#:11668-027)와 Enhancer Q™ Transfection Enhancing Reagent(WelGene, Cat#: TR001-02)를 사용하여 폐암 세포주인 Calu-6에 형질감염(transfection)하였다. 형질감염 24시간 후, Gpr171의 과발현에 따른 세포의 성장을 대조군과 비교하기 위하여 24-well plate에 1 내지 4 X 10⁴ 개의 세포를 분주하여 37 °C/5% CO₂에서 각각 2, 4, 6일 동안 배양하였다. 세포 증식 정도는 상기 <실시예 2-1>에 기재된 CCK-8으로 0, 2, 4, 6일 후 측정하였으며, Gpr171의 과발현은 Immunoblot assay를 사용하여 확인하였다.

[0106] 그 결과, Gpr171을 과발현시킨 폐암 세포주 Calu-6에서 6일 후 대조군인 mock에 비해 약 60%의 세포 성장 증가 및 세포 사멸 감소를 확인하였다 (도 6).

[0107] 이를 통해, Gpr171이 폐암 및 간암에서 oncogene addiction을 잘 나타내며, 폐암 및 간암의 치료를 위한 좋은 표적이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0108] <실시예 3> Gpr171 유전자의 암세포 이동 및 침윤에 대한 영향 분석

[0109] <3-1> Gpr171의 발현 억제에 의한 폐암 세포 이동 저해 효과

[0110] 본 발명자들은, Gpr171의 발현 억제에 의한 폐암 세포주인 A549 및 Calu-6의 이동 저해 효과를 확인하기 위하여, transwell(8 um pore size, coastar, Cat#: 3422) 시스템을 이용하였다.

[0111] 구체적으로, 상기 <실시예 2-1>에 기재된 방법으로 Gpr171에 대한 shRNA로 A549와 Calu-6 세포에서 Gpr171의 발현을 억제시켰다. 이때, 세포에서 lenti-viral vector shRNA에 의한 비특이적인 반응을 배제하기 위하여, Scrambled shRNA Control Transduction particles을 음성대조군으로 사용하였다. 감염 48 시간 후, 각각의 암세포의 이동 능력을 확인하기 위하여, trypsin-EDTA(Gibco 25300)로 세포를 plate에서 떼어내고 모은 다음, RPMI migration 배지(RPMI, 10mM HEPES, 0.5% BSA)로 두 번 씻은 후에 1.5x10⁵ 세포/ml의 A549 세포 및 2.5x10⁵ 세포/ml의 Calu-6 세포를 migration media에 재부유하였다. 24-well transwell plate는 insert 아래쪽 면에 0.05% gelatin(Sigma G1393)을 사용하여 실온에서 한 시간 동안 코팅한 후, insert에 남아있는 젤라틴(gelatin)을 제거하고 PBS로 한번 씻었다. 위의 과정이 끝난 후 5% FBS가 첨가된 RPMI migration 배지를 chamber에 600 ul 넣고, 소독된 포셉을 사용하여 insert를 chamber에 넣은 다음, 상기의 재부유하여 준비해둔

세포를 insert안에 100 ul 넣고 37 °C/5% CO₂에서 A549 세포는 24시간, 및 Calu-6 세포는 72시간 동안 배양하였다. 세포의 이동을 측정하기 위해 먼저 insert의 위쪽 면을 PBS에 적신 면봉으로 닦아내고 3.7% paraformaldehyde 500 ul가 들어있는 chamber에 insert를 넣어서 실온에서 30분 동안 고정하였다. 다음으로 1% crystal violet/100 mM NaBorate 500 ul로 30분 동안 염색하고 물로 씻은 후에 건조하여 현미경으로 x100 및 x200 배율에서 사진을 찍고, 세포를 개수하였다.

[0112] 그 결과, 폐암 세포주 A549에서 대조군으로 사용된 scrambled shRNA에 비하여 Gpr171 shRNA를 감염시킨 경우 세포의 이동이 약 90% 저해되었음을 확인하였다(도 7).

[0113] 또한, 다른 폐암 세포주인 Calu-6에서 대조군에 비해 Gpr171 shRNA를 감염시킨 세포의 경우 세포의 이동이 약 60% 저해되었음을 확인하였다(도 8).

[0114] 이를 통해, Gpr171이 암세포의 이동에 있어 결정적인 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0115] <3-2> Gpr171의 발현 억제에 의한 폐암 세포 침윤 저해 효과

[0116] 본 발명자들은, Gpr171의 발현 억제에 의한 폐암 세포주인 A549 및 Calu-6의 침윤 저해 효과를 확인하기 위하여, transwell(8 um pore size, costar, Cat#: 3422) 시스템을 이용하였다.

[0117] 구체적으로, trypsin-EDTA(Gibco 25300)로 세포를 plate에서 떼어내고 모은 다음, RPMI invasion 배지(RPMI, 10mM HEPES, 0.5% BSA)로 두 번 씻은 A549 세포 3.0x10⁵ 세포/ml 및 Calu-6 세포 5.0x10⁵ 세포/ml를 migration 배지에 재부유하였다. 24-well transwell plate(8 um pore size, costar Cat#: 3422)는 matrigel(BD 35423 4)을 1 mg/ml로 무혈청 배지(RPMI, 10mM HEPES)에 희석하여 insert 위쪽 면에 실온에서 한 시간 동안 코팅한 후, insert에 남아있는 matrigel을 제거하고 serum-free media로 한번 씻은 후 5% FBS가 첨가된 RPMI invasion 배지를 chamber에 600 ul 넣었다. 소독된 포셉을 사용하여 insert를 배지가 들어있는 chamber에 넣은 다음, 상기의 준비하여 둔 세포 부유물을 insert안에 100 ul 넣고 37 °C/5% CO₂에서 A549 세포는 24시간, Calu-6 세포는 72시간 동안 배양하였다. 그 후, matrigel을 통과한 침윤 세포를 측정하기 위해 insert의 위쪽 면을 PBS에 적신 면봉으로 닦아내고 3.7% paraformaldehyde 500 ul(Sigma HT50)가 들어있는 chamber에 insert를 넣어서 30분 동안 실온에서 고정하여 1% crystal violet(Sigma C3886)/100 mM NaBorate(Sigma S9640) 500 ul로 30분 동안 염색하고 물로 씻은 후에 건조시켜서 현미경으로 x100과 x200 배율에서 세포를 개수하였다.

[0118] 그 결과, 대조군으로 사용된 scrambled shRNA에 비하여 Gpr171 shRNA로 감염된 폐암 세포주 A549는 Matrigel을 분해하고 이동해 간 암세포의 수가 약 80% 정도 줄어드는 침윤 저해 효과를 나타냄을 확인하였다(도 9).

[0119] 또한, 다른 폐암 세포주인 Calu-6는 Gpr171 shRNA로 감염된 세포가 대조군에 비해 약 70% 정도의 침윤 저해 효과를 나타냄을 확인하였다(도 10).

[0120] 이를 통해, Gpr171이 암세포의 침윤에 있어 결정적인 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0121] <실시예 4> Gpr171 항체를 이용한 암 성장에 대한 영향 분석

[0122] <4-1> Gpr171 항체를 이용한 폐암 세포 성장 억제 효과

[0123] 본 발명자들은, Gpr171이 세포 표면에 노출된 표적이므로 접근성이 용이하다는 사실에 착안하여, 폐암 세포주에 Gpr171 항체를 이용한 폐암 세포의 성장 억제 효과를 확인하였다.

[0124] 구체적으로, 폐암 세포주인 Calu-6 세포 1 X 10⁴ 개/ml에 30 ug/ml의 anti-Gpr171 항체(Abcam, Cat#:ab60843) 또는 동량의 대조군인 normal rabbit IgG(millipore, cat#:12-370)를 섞은 후 37 °C/5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 20분 후, 24-well plate에 세포 배양액과 함께 배양한 세포/항체 혼합물을 분주하여 37 °C/5% CO₂ incubator에서 각각 1, 2, 3, 4일 동안 배양하였다. 세포 증식 정도는 상기 <실시예 2-1>에서와 같이 CCK-8으로 0, 1, 2, 3, 4일 후 측정하였다.

[0125] 그 결과, Gpr171 항체를 처리한 폐암 세포에서 대조군인 IgG를 처리한 폐암 세포에 비해 약 80%의 세포 성장 증가 및 세포 사멸 감소를 확인하였다(도 11a).

- [0126] <4-2> Gpr171 항체를 이용한 마우스 이중이식 모델에서의 종양 증식 억제 효과
- [0127] 본 발명자들은, Gpr171 항체를 이용하여, in vivo 마우스 이중이식 모델에서 종양 증식 억제 효과를 확인하였다.
- [0128] 구체적으로, 폐암 세포주인 Calu-6 세포 1×10^6 개/ml에 25 ug의 anti-Gpr171 항체(Abcam, Cat#:ab60843) 또는 동량의 대조군인 normal rabbit IgG(millipore, cat#:12-370)를 섞은 100 ul의 세포/항체 혼합물을 37 °C/5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 20분 후, 6주령 BALB/c nude 암컷 마우스(오리엔트 바이오) 각각 5 마리의 옆구리에 피하주사로 배양한 세포/anti-Gpr171 혼합물 또는 배양한 세포/normal IgG 대조군 혼합물을 주입하였다. 그 후 5, 12, 15, 18일 후 25 ug의 anti-Gpr171 항체(Abcam, Cat#:ab60843) 또는 normal IgG 대조군 항체(millipore, cat#:12-370)를 정맥 주사로 각각 주입하였다. 8, 12, 15, 18, 22, 26일 후, 종양 세포 증식이 가장 높은 마우스와 가장 낮은 마우스를 제외한 3마리에서 종양의 부피를 측정하여 종양 증식 정도를 측정하였다.
- [0129] 그 결과, Gpr171 항체를 처리한 누드마우스의 종양의 부피가 대조군에 비해 최대 약 80% 감소함을 확인하였다 (도 11b 및 도 11c).
- [0130] 이를 통해, Gpr171 단백질의 활성이 암의 성장에 있어 결정적인 역할을 함을 알 수 있다.
- [0131] <제조예 1> 약학적 제제의 제조
- [0132] 1. 산제의 제조
- [0133] Gpr171의 발현 또는 활성 억제제 2 g
- [0134] 유당 1 g
- [0135] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0136] 2. 정제의 제조
- [0137] Gpr171의 발현 또는 활성 억제제 100 mg
- [0138] 옥수수전분 100 mg
- [0139] 유 당 100 mg
- [0140] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0141] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0142] 3. 캡슐제의 제조
- [0143] Gpr171의 발현 또는 활성 억제제 100 mg
- [0144] 옥수수전분 100 mg
- [0145] 유 당 100 mg
- [0146] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0147] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0148] 4. 주사제의 제조

- [0149] Gpr171의 발현 또는 활성 억제제 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- [0150] 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지
- [0151] 주이용 염화나트륨 BP 최대 1 ml
- [0152] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 Gpr171의 발현 또는 활성을 억제제를 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 °C에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0153] 5. 환의 제조

- [0154] Gpr171의 발현 또는 활성 억제제 1 g
- [0155] 유당 1.5 g
- [0156] 글리세린 1 g
- [0157] 자일리톨 0.5 g
- [0158] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0159] 6. 과립의 제조

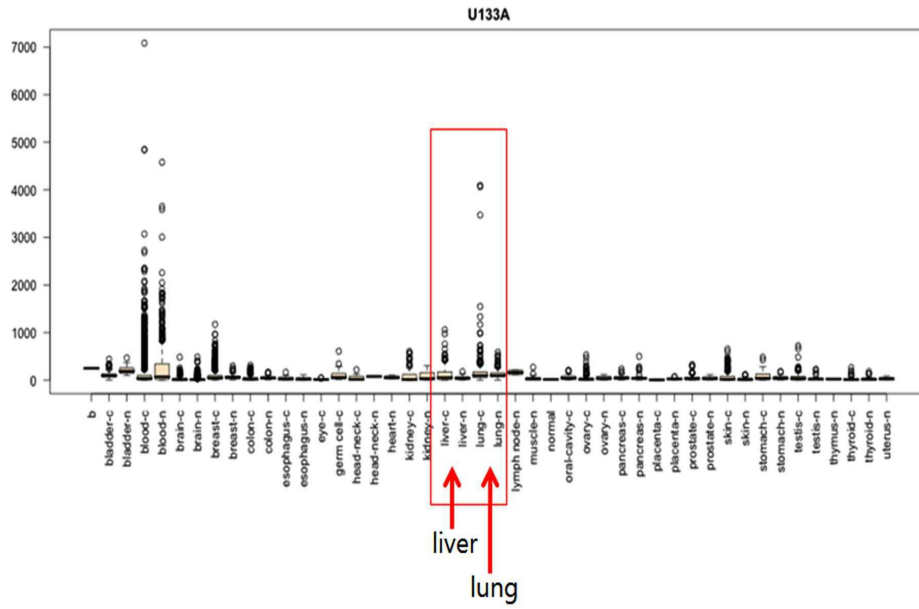
- [0160] Gpr171의 발현 또는 활성 억제제 150 mg
- [0161] 대두 추출물 50 mg
- [0162] 포도당 200 mg
- [0163] 전분 600 mg
- [0164] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

산업상 이용가능성

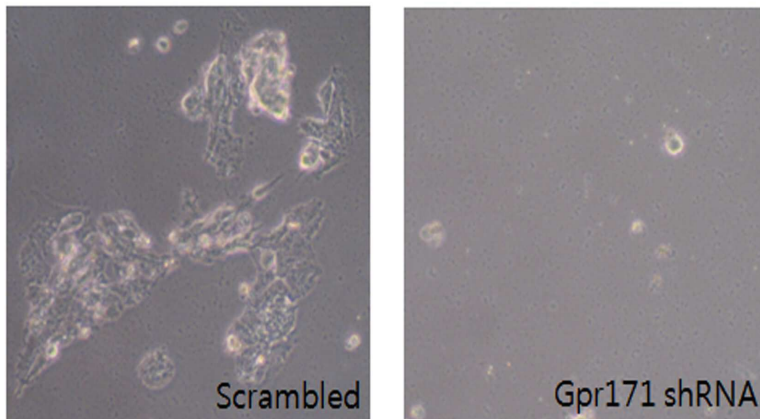
- [0165] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명을 통해 Gpr171 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 이용한 암 치료제 개발이 가능하고, Gpr171을 바이오마커로 이용하여 암을 모니터링 또는 진단할 수 있는 방법을 개발할 수 있으며, 암 성장 또는 전이 억제제를 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면

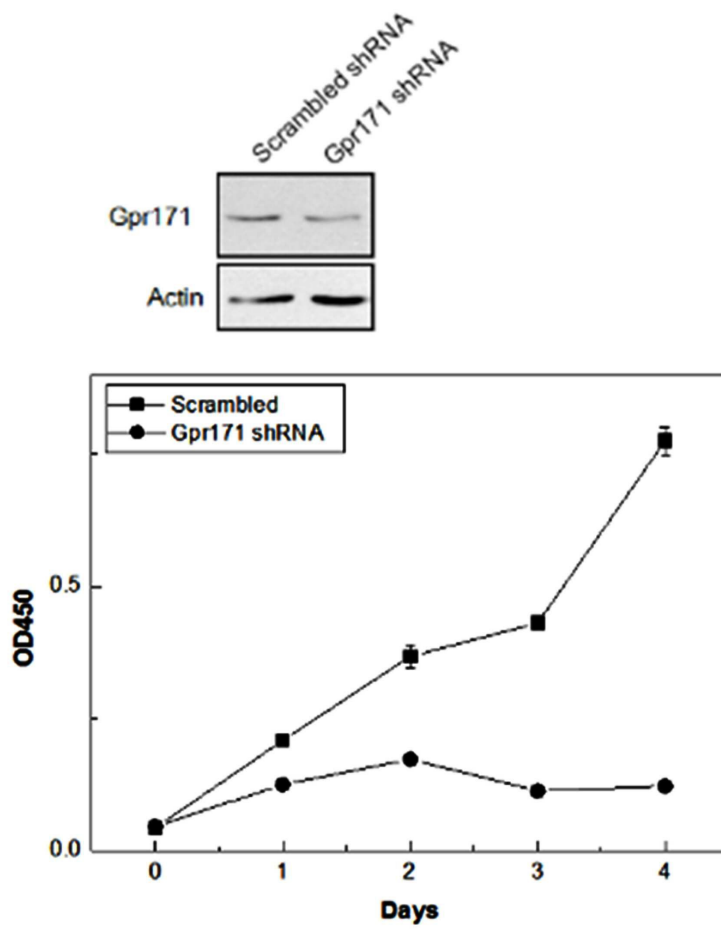
도면1



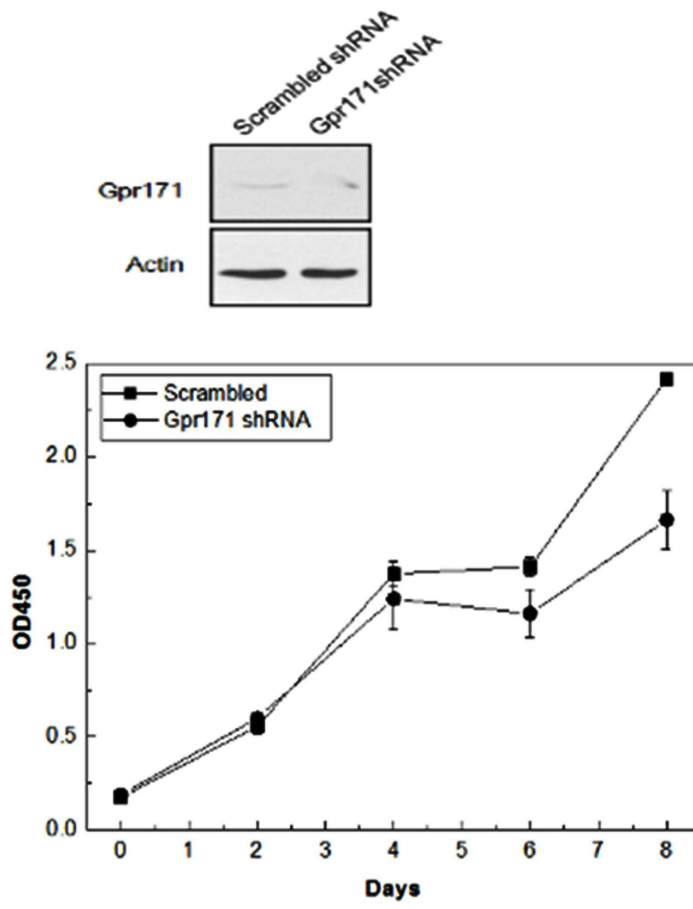
도면2a



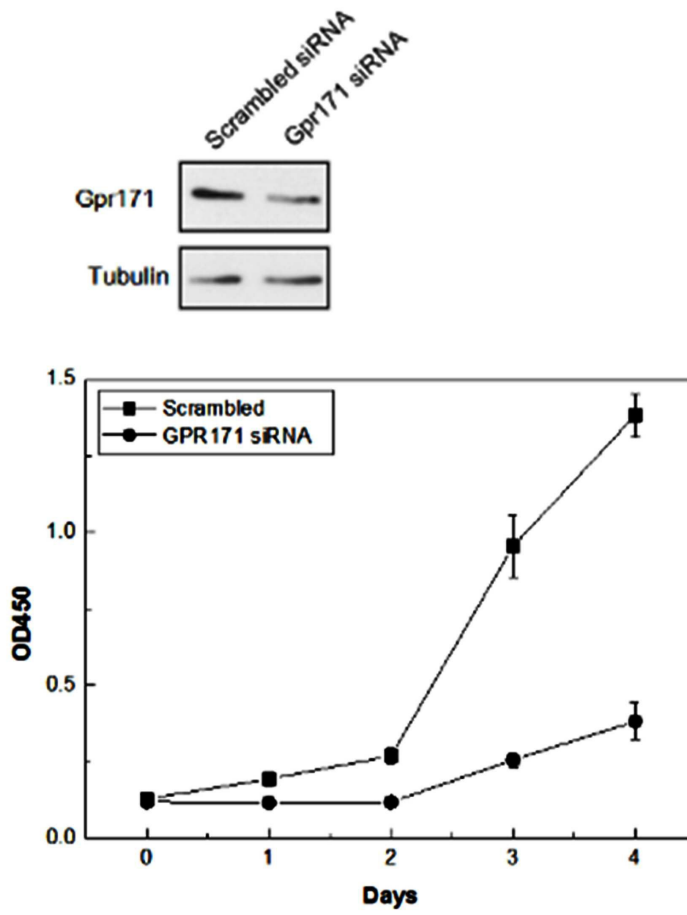
도면2b



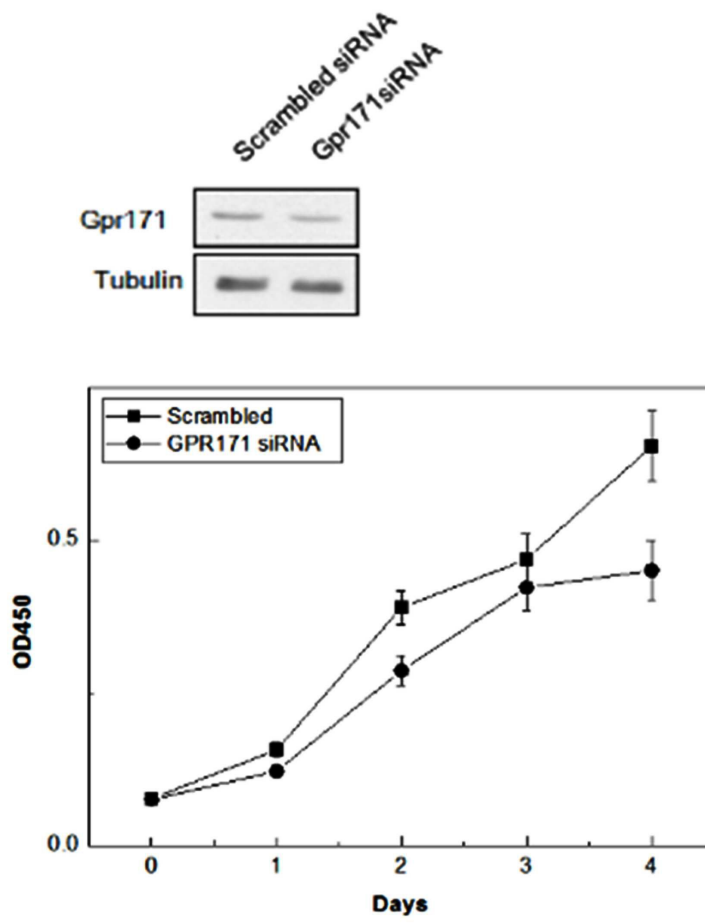
도면3



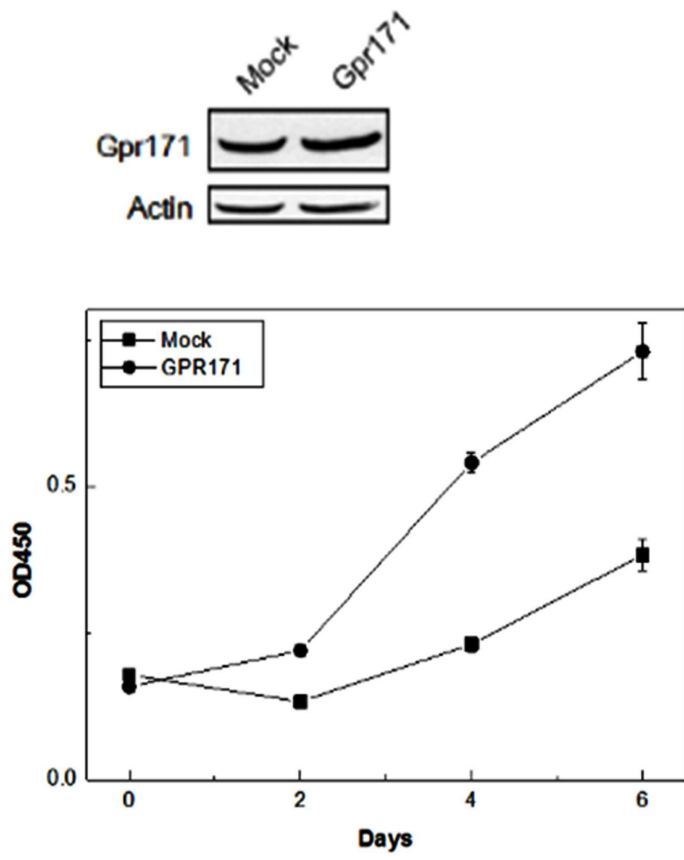
도면4



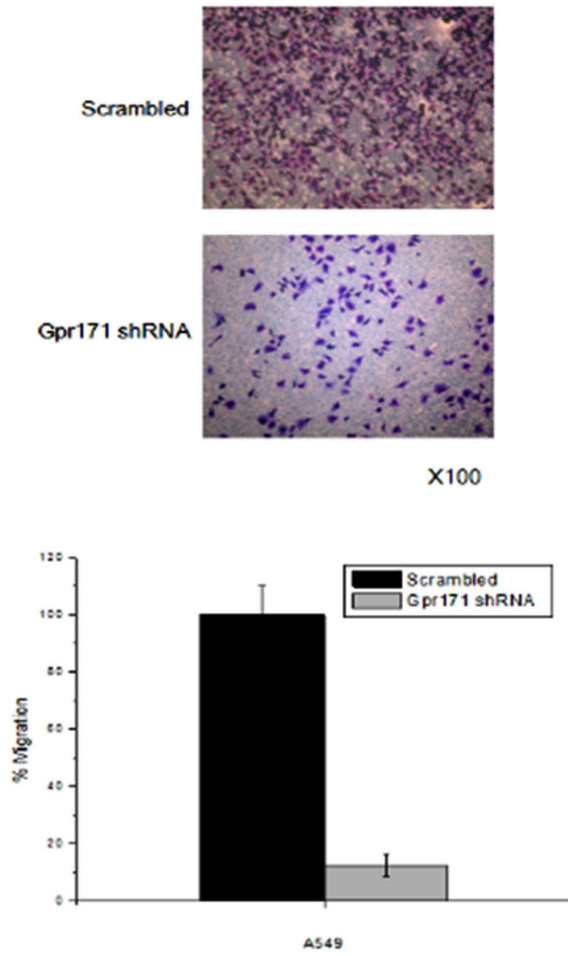
도면5



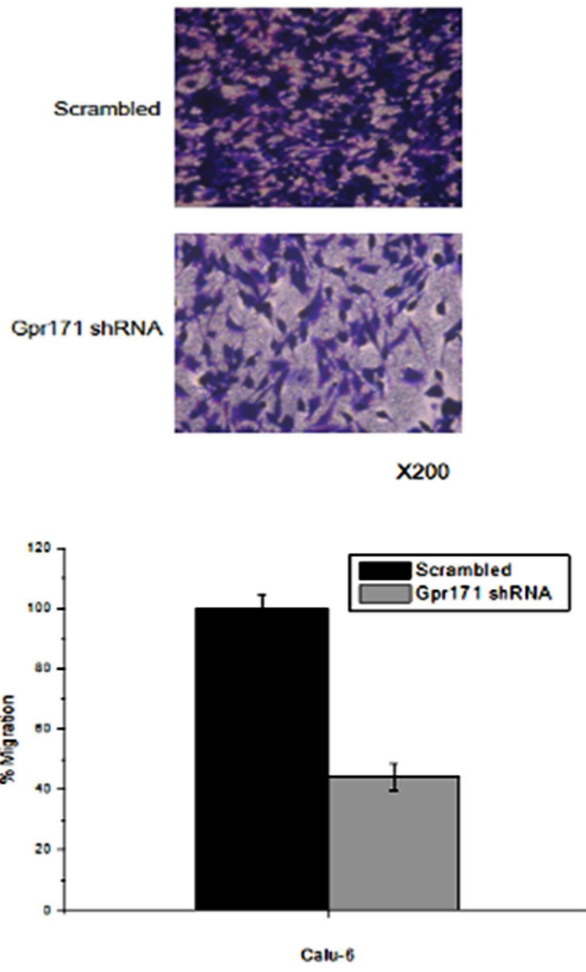
도면6



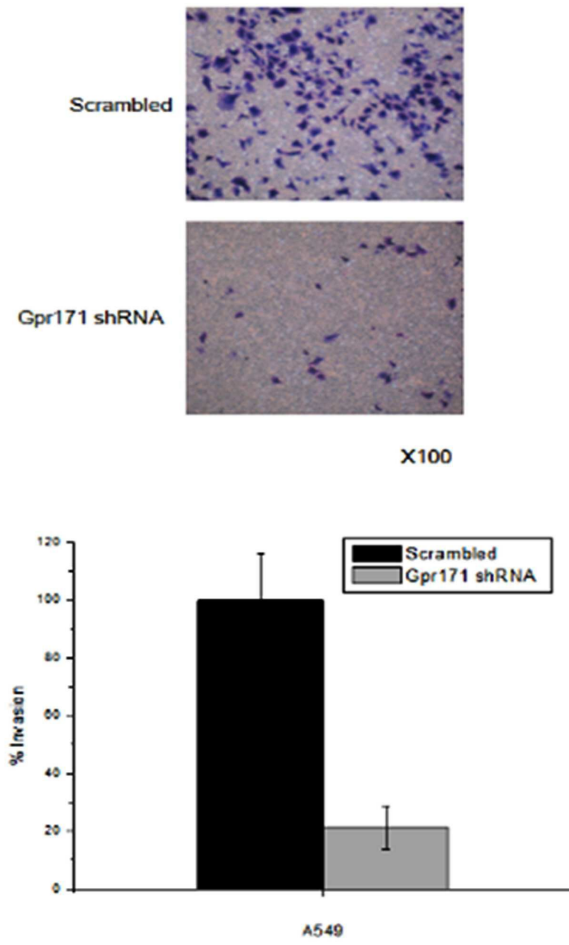
도면7



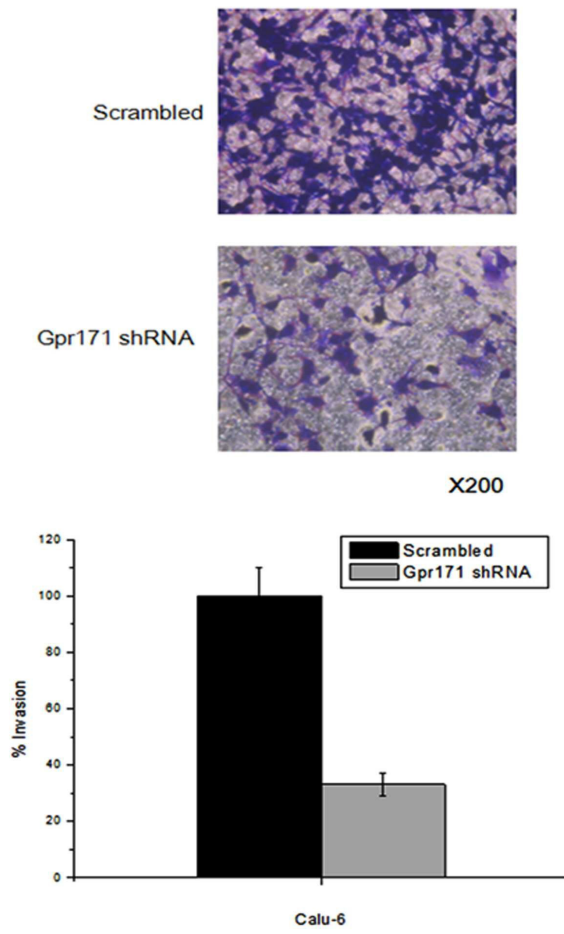
도면8



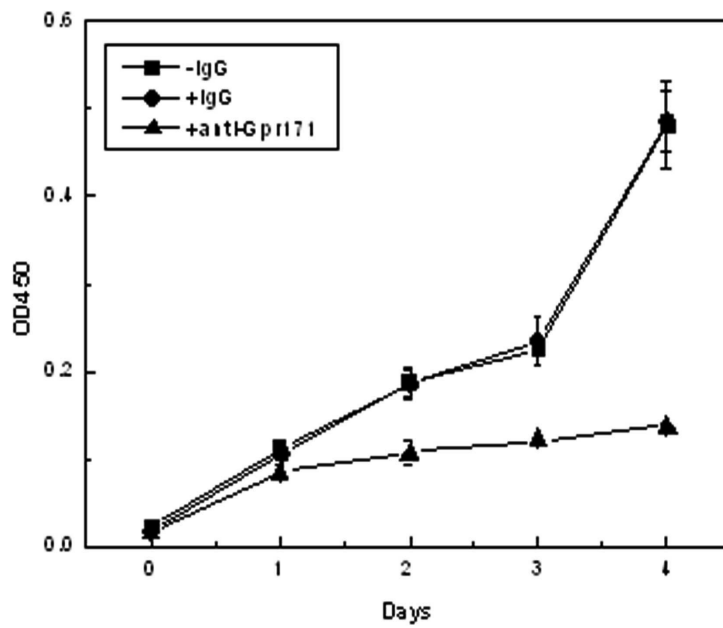
도면9



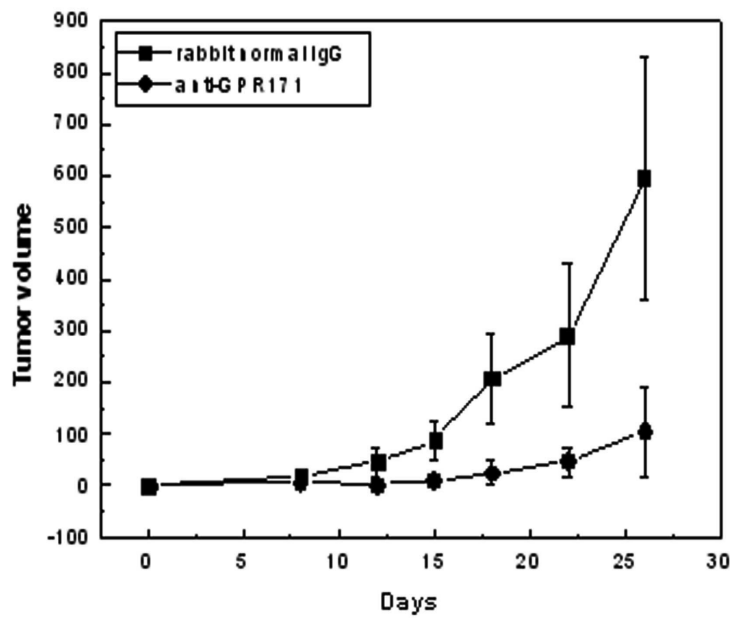
도면10



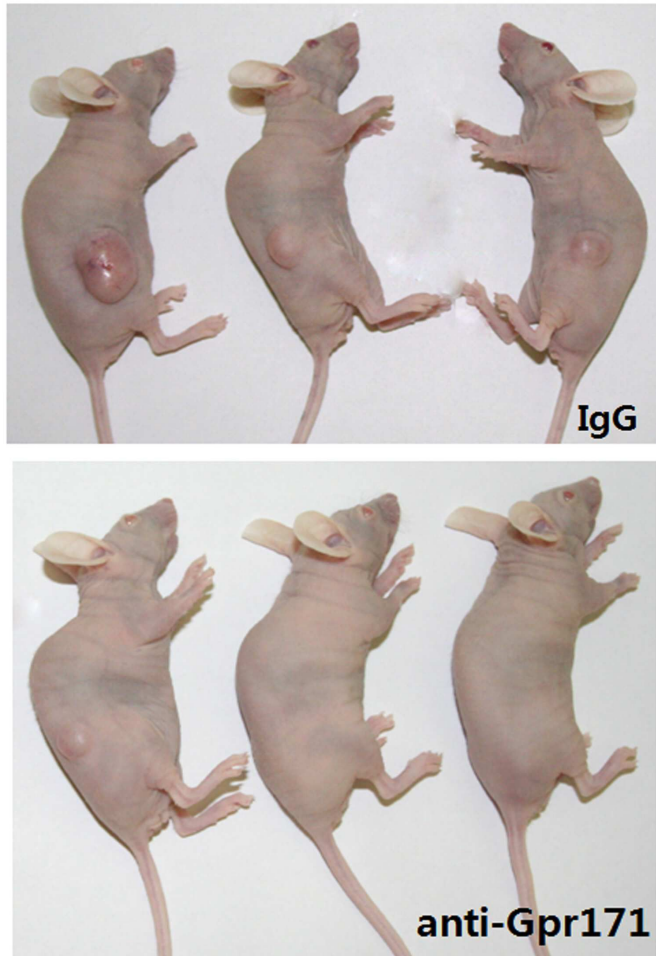
도면11a



도면11b



도면11c



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Pharmaceutical composition for the treatment of cancers or inhibition of cancer metastasis containing the inhibitors of Gpr171 expression or activity
- <130> 10p-12-28
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 319
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Thr Asn Ser Ser Phe Phe Cys Pro Val Tyr Lys Asp Leu Glu Pro

1 5 10 15
 Phe Thr Tyr Phe Phe Tyr Leu Val Phe Leu Val Gly Ile Ile Gly Ser
 20 25 30
 Cys Phe Ala Thr Trp Ala Phe Ile Gln Lys Asn Thr Asn His Arg Cys
 35 40 45
 Val Ser Ile Tyr Leu Ile Asn Leu Leu Thr Ala Asp Phe Leu Leu Thr
 50 55 60
 Leu Ala Leu Pro Val Lys Ile Val Val Asp Leu Gly Val Ala Pro Trp
 65 70 75 80
 Lys Leu Lys Ile Phe His Cys Gln Val Thr Ala Cys Leu Ile Tyr Ile
 85 90 95
 Asn Met Tyr Leu Ser Ile Ile Phe Leu Ala Phe Val Ser Ile Asp Arg
 100 105 110
 Cys Leu Gln Leu Thr His Ser Cys Lys Ile Tyr Arg Ile Gln Glu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Ala Lys Met Ile Ser Thr Val Val Trp Leu Met Val Leu Leu
 130 135 140
 Ile Met Val Pro Asn Met Met Ile Pro Ile Lys Asp Ile Lys Glu Lys
 145 150 155 160

 Ser Asn Val Gly Cys Met Glu Phe Lys Lys Glu Phe Gly Arg Asn Trp
 165 170 175
 His Leu Leu Thr Asn Phe Ile Cys Val Ala Ile Phe Leu Asn Phe Ser
 180 185 190
 Ala Ile Ile Leu Ile Ser Asn Cys Leu Val Ile Arg Gln Leu Tyr Arg
 195 200 205
 Asn Lys Asp Asn Glu Asn Tyr Pro Asn Val Lys Lys Ala Leu Ile Asn
 210 215 220
 Ile Leu Leu Val Thr Thr Gly Tyr Ile Ile Cys Phe Val Pro Tyr His

 225 230 235 240
 Ile Val Arg Ile Pro Tyr Thr Leu Ser Gln Thr Glu Val Ile Thr Asp
 245 250 255

Cys Ser Thr Arg Ile Ser Leu Phe Lys Ala Lys Glu Ala Thr Leu Leu
 260 265 270
 Leu Ala Val Ser Asn Leu Cys Phe Asp Pro Ile Leu Tyr Tyr His Leu
 275 280 285
 Ser Lys Ala Phe Arg Ser Lys Val Thr Glu Thr Phe Ala Ser Pro Lys
 290 295 300

Glu Thr Lys Ala Gln Lys Glu Lys Leu Arg Cys Glu Asn Asn Ala
 305 310 315

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gpr171 shRNA

<400> 2

ccgggcagct tacatataac aacttctcga gaagttgtta tatgtaagct gcttttt 57

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gpr171 shRNA

<400> 3

ccgggcctgc ctcatctata tcaatctcga gattgatata gatgaggcag gcttttt 57

<

210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gpr171 shRNA

<400> 4

ccggccttgt aattcgacag ctctactcga gtagagctgt cgaattacaa ggttttt 57

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gpr171 shRNA
 <400> 5
 ccggccgaat acaagaaccc ggattctcga gaatccgggt tcttgatttc ggTTTT 57
 <210> 6
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gpr171 shRNA
 <400> 6
 ccggcctgta ctatcacctc tcaaactcga gtttgagagg tgatagtaca ggTTTT 57

 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gpr171 siRNA
 <400> 7
 cuguacuauc accucuaa 19
 <210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gpr171 siRNA
 <400> 8
 caaauagcag ucauccua 19