



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월04일

(11) 등록번호 10-2174347

(24) 등록일자 2020년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) **G01N 33/574** (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/574 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0154250

(22) 출원일자 2018년12월04일
 심사청구일자 2018년12월04일

(65) 공개번호 10-2020-0067419

(43) 공개일자 2020년06월12일

(56) 선행기술조사문헌
 JP2014503063 A
 Andrea Facciabene et al., NATURE, Vol.475.,
 pp.226-230. (2011.07.) 1부.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자
정원윤
 서울특별시 마포구 독막로28길 7, 101동 1501호
 (신수동, 성원아파트)

박광균
 서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 203동
 1003호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
이재영

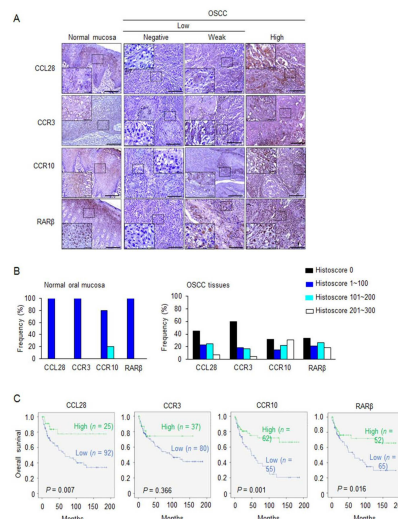
전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 구강암의 예후 예측용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CCL28(Chemokine (C-C motif) ligand 28), CCR10(Chemokine (C-C motif) Receptor 10) 또는 RAR β (Retinoic acid receptor β)의 발현 수준을 측정함으로써 암 중에서도 특히 구강암 환자의 예후나, 침습 가능성을 간단하고 용이할 뿐만 아니라, 정확하게 예측할 수 있다. 또한, 본 발명에서는 상기 CCL28 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 이용하여 암 중에서도 특히 구강암 세포의 침습을 억제하여 상기 침습성 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도9

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2333/705 (2013.01)
 G01N 2333/7158 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2013.01)

장항관

서울특별시 마포구 성미산로 195-11, 303호(연남동)

(72) 발명자

박준희

서울특별시 서대문구 모래내로 151길, 1206호 (디엠씨엘가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI15C1901
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발
연구과제명	구강암 특이 뼈 침습 바이오마커 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2015.11.12 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

CCL28(Chemokine (C-C motif) ligand 28) 또는 CCR10(Chemokine (C-C motif) Receptor 10) 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암의 예후 예측용 조성물로서, 상기 암은 구강편평세포암인, 암의 예후 예측용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 RAR β (Retinoic acid receptor β) 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것인, 암의 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 CCL28 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 것인, 암의 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 RAR β 는 RAR β 2인 것인, 암의 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브인 것인, 암의 예후 예측용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 암의 예후 예측용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 구강편평세포암의 예후 예측용 키트.

청구항 10

CCL28 또는 CCR10 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 침습성 암의 진단용 조성물로서,

상기 암은 구강편평세포암인, 침습성 암의 진단용 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 침습은 뼈 침습인 것인, 침습성 암의 진단용 조성물.

청구항 14

제 10항 또는 제 13항의 조성물을 포함하는 침습성 구강편평세포암의 진단용 키트.

청구항 15

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,

CCL28 또는 CCR10 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법으로서,

상기 암은 구강편평세포암인, 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 상기 mRNA 또는 상기 단백질의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것인, 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,

CCL28 또는 CCR10 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법으로서,

상기 암은 구강편평세포암인, 암의 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 상기 유전자의 mRNA 또는 상기 단백질의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체에서 암의 침습이 발생하였거나 발생할 가능성이 높은 것으로 예측하는 것인, 암의 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 20

제 18항에 있어서,

상기 침습은 뼈 침습인 것인, 암의 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 21

CCR28 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 암의 침습 억제용 약학 조성물로서, 상기 암은 구강편평세포암인, 암의 침습 억제용 약학 조성물.

청구항 22

제 21항에 있어서,

상기 약학 조성물은 CCR10 및 RAR β 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 암의 침습 억제용 약학 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

제 21항에 있어서,

상기 침습은 뼈 침습인 것인, 암의 침습 억제용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 구강암의 예후 예측용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 문명이 발달될수록 암의 발생률이 증가되고 있음에도 불구하고 암의 초기 진단의 어려움 및 조기 암 환자나 특정 암에 처치가 국한된 치료법에 의해 암으로 인해 발생하는 사망은 계속하여 증가되고 있는 추세이다.

[0003] 이러한 암 중에서 특히 구강암 발생 빈도는 인체에 발생하는 전체 악성 종양의 2~5%를 차지하고 있으며, 구강암으로 인한 사망률은 전체 암으로 인한 사망률의 2~3%를 차지하는 것으로 보고되어 있다. 이러한 구강암 중에서 구강편평세포암(oral squamous cell carcinoma; OSCC)이 80~90%의 빈도로 나타난다.

[0004] 상기 구강편평세포암을 포함한 다양한 암 세포가 뼈로 침습(Invasion)되는 경우, 암세포와 뼈의 미세환경 또는 기질 세포(stromal cells) 사이의 상호작용을 통해 심각한 골용해성 병변이 유발될 수 있다. 뼈의 표면 가까운 곳에 존재하는 구강편평세포암 세포는 상피 중간엽 전이(Epithelial-mesenchymal transition) 및 단백질가수분해효소(Proteolytic enzyme)에 의한 골 매트릭스 분해를 통해 뼈로 침습된다. 이렇게 뼈로 침습된 상기 암 세포에서 TNF- α (Tumor necrosis factor- α), 인터루킨(Interleukin), 부갑상선 호르몬 관련 단백질(Parathyroid hormone-related protein; PTHrP) 및 케모카인(Chemokine)이 분비됨으로써 기질 세포 및 골아세포(Osteoblasts)에서 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)의 발현이 자극되어 결과적으로 파골세포 형성이 촉진된다. 뼈 기질에 저장된 성장 인자는 성숙한 파골세포가 뼈를 흡수할 때 뼈 미세환경으로 방출된다. 이렇게 방출되는 성장 인자 중에서, 특히 TGF- β (Transforming growth factor- β)에 의해 암 세포의 성장과 상피 중간엽 전이가 촉진되고 골 용해 인자(Osteolytic factor)의 분비가 더욱 증가되는데, 이로 인해 암의 뼈로의 침습과 뼈 용해가 증가됨으로써 심각한 뼈 손상이 유도될 수 있다.

[0005] 구강암의 5년 생존율은 치료방법의 연구와 발달로 향상 되고 있으며, 병기에 있어서도 조기에 발견되어 적절한 치료를 받게 되는 경우는 생존율이 증가될 수 있다. 그러나, 구강암이 초기에 발견되지 못하고 적절한 치료가 수반되지 않으면, 원거리로 전이될 수 있을 뿐만 아니라, 해부학적으로 턱에 가까운 위치에 기초하여 상악골 또는 하악골로 침습할 수 있다. 이와 같은, 뼈로의 침습은 구강편평세포암에서 확인되는 빈번한 합병증으로, 재발 가능성이 높고 심각한 합병증으로 인하여 예후가 나쁠 수 있다. 나아가, 수술을 통해 환자의 생존을 도모한다고 하여도 합병증 및 재건술 등의 어려움으로 심각한 기능적, 심미적 문제가 발생하여 환자의 삶의 질을 현저하게 저하시킨다는 문제점이 존재한다.

[0006] 따라서, 구강암 환자에게 초기의 적절한 치료와 좋은 예후를 가질 수 있도록 하기 위해서는 구강암 환자에서 보

다 정확한 예측과 진단이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 일 목적은 암의 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 침습성(Invasive) 암의 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 침습 억제용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 암, 특히 구강편평세포암 세포에서 CCL28(Chemokine (C-C motif) ligand 28), CCR10(Chemokine (C-C motif) Receptor 10) 또는 RAR β (Retinoic acid receptor β)의 발현 수준이 낮은 경우에 침습성이 높고 예후가 나쁘며, 이에 따라 CCL28/CCR10 신호 전달이 RARE(retinoic acid response element)와 관련된 전사의 활성화를 통해 RAR β , 특히 RAR β 2의 발현을 유도함으로써 구강편평세포암 세포의 침습을 억제할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에서는 암의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 상기 암의 예후 예측용 조성물은 CCL28, CCR10 및 RAR β 로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 상기 CCL28은 MEC(Mucosae-associated epithelial chemokine), CCK1 및 SCYA28 로 알려져 있는 케모카인으로서, 본 발명의 상기 케모카인 수용체인 CCR3 또는 CCR10을 발현하는 세포의 활성을 조절할 수 있다. 본 발명의 상기 RAR β 는 RARB 유전자에 의해 코딩되는 핵 수용체로서, RAR β , 바람직하게 그의 이성질체에 해당하는 RAR β 2는 세포주기 정지, 분화 및 세포 사멸을 유도하는 억제 인자이며, 이와 같은 유전자의 침묵은 종양의 등급과 상관관계가 존재한다.
- [0017] 본 발명의 상기 CCL28은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 CCR10은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 RAR β 는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 특정 세포 소기관으로 위치화될 수 있는 신호 서열(Signal sequence)가 제거되어 있는 재조합 단백질의 서열일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 암이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체, 즉 암이 발병하였거나 그 발병 가능성이 높은 개체의 생물학적 시료에서 CCL28, CCR10 및 RAR β 의 발현이 감소되어 있는 경우, 암의 예후가 나쁠 수 있음을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 상기 생물학적 시료는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는) 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0021] 본 발명의 상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장암, 신장세포 암종 및 신장골반암종으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 구강암일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 구강편평세포암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 상기 예후란, 질환의 경과 및 사망 또는 생존의 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 상기 예후 또는 예후 예측이란 질환의 경과가 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 전/후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 예후는 암의 발병 이후, 암 세포의 침습 여부를 미리 예상하여 암 환자의 무병생존율 또는 생존율을 예측하는 행위로 해석될 수 있다. 구체적으로, 예후가 나쁠 수 있음은 암의 발병 이후 암세포가 타 장기로 침습되는 현상으로 인하여 환자의 무병생존율 또는 생존율이 낮은 수준을 나타내어, 암 환자가 암의 침습으로 인하여 사망할 가능성이 높을 수 있음을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 상기 무병생존율이란, 치료 여부에 관계없이 환자가 암의 재발 없이 생존할 수 있는 가능성을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 생존율이란, 치료 여부 및 암의 재발 여부와 관계 없이 환자가 생존할 수 있는 가능성을 의미한다.
- [0025] 본 발명의 상기 mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 시료에 포함된 측정 대상이 되는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여, 상기 측정 대상이 되는 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용될 수 있는 제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 제제는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯 분석(Northern blot assay), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 측정 대상이 되는 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 상기 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 주형 가닥(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 기능을 하는 짧은 염기 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충 용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 프로브는 상기 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하고, 이와 같은 프로브는 특정 mRNA의 존재 유무, 발현되는 수준(발현량)을 확인할 수 있도록 라벨링되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 상기 프라이머 또는 프로브는 공지된 CCL28, CCR10 및 RAR β 의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상이 지식을 가진 자가 공지된 방법에 의해 쉽게 제작될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 시료에 포함된 측정 대상이 되는 유전자로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 확인하기 위한 제제를 의미한다.
- [0030] 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(Immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(Immunochromatography), FACS(Fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0031] 본 발명의 상기 항체는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 상기 앵타머는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(Modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 항체는, CCL28, CCR10 및 RAR β 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 얻은 뒤에 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 다른 구현 예에서는 암의 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 상기 예후 예측용 키트는 상기 암의 예후 예측용 조성물을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 상기 예후 예측용 키트는 상기 예후 예측용 조성물을 사용하여 구강암이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 CCL28, CCR10 및 RAR β 의 발현 수준이 감소되어 있는 경우, 암의 예후가 나쁠 수 있음을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 암의 예후 예측용 키트에서 CCL28, CCR10, RAR β , 예후, mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제, 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제 및 암, 구강편평세포암 등은 상기 예후 예측용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0039] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(Rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 상기 키트가 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 경우에는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 다양한 마그네슘 농도), 테옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등이 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 상기 키트가 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 경우에는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등이 포함될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 기재는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지 또는 폴리스티렌 수지로 합성된 96웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 사용될 수 있고, 상기 발색 효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(α -페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 침습성 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 상기 침습성 암의 진단용 조성물은 CCL28, CCR10 및 RAR β 로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0046] 본 발명의 암이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체, 즉 암이 침습되었거나 그 침습 가능성이 높은 개체의 생물학적 시료에서 CCL28, CCR10 및 RAR β 의 발현이 감소되어 있는 경우, 구강암의 침습이 일어날 수 있는 것을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 상기 침습성 암의 진단용 조성물에서, CCL28, CCR10, RAR β , 예후, mRNA 수준을 측정할 수 있는 제제, 단백질의 수준을 측정하는 제제, 생물학적 시료, 암 및 구강편평세포암 등은 본 명세서의 과도한 복잡성

을 피하기 위하여 생략한다.

- [0048] 본 발명의 침습성 암이란, 상피 중간엽 전이 등을 통해 암 세포가 세포외 기질 분해능과 이동성을 갖게 되며, 이를 통해 다른 장소에 정착, 즉 전이되어 증식되는 것을 의미한다. 구체적으로, 암 세포의 경우 정상 세포와 달리 주위 조직을 침범하면서 성장하기 때문에 혈관이나 림프관과 같은 튜브 형태의 구조물과 만나는 경우, 혈액이나 림프액 등을 타고 다른 장기 또는 뼈로 이동되고, 새로운 장기 또는 뼈에 자리 잡아 성장하는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 침습성 암, 특히 침습성 구강암은 원거리로 침습될 수 있을 뿐만 아니라, 해부학적으로 턱에 가까운 위치에 기초하여 상악골 또는 하악골과 같은 턱 뼈에 침습할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이와 같이, 상기 턱 뼈에 암이 침습되는 경우, 암세포와 골아세포, 파골세포, 뼈 기질 등과 같은 뼈 미세환경이 상호작용을 통해, 암 세포의 성장을 촉진하고 조골세포의 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 발현시킬 뿐만 아니라, 파골 세포의 형성을 촉진하며, 뼈 기질의 분해와 같은 현상을 유도하여 궁극적으로 뼈 용해를 일으켜 예후가 매우 나쁠 수 있다.
- [0050] 본 발명의 상기 진단이란 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 진단은 암의 침습 여부 또는 침습 가능성 여부에 대해 확인하는 것을 의미할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 침습성 암의 진단용 키트를 제공한다.
- [0053] 본 발명의 암이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체, 즉 암이 침습 되었거나 그 침습 가능성이 높은 개체의 생물학적 시료에서 CCL28, CCR10 및 RAR β 의 발현이 감소되어 있는 경우, 암의 침습이 일어날 수 있는 것을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 상기 침습성 암의 진단용 키트에서, CCL28, CCR10, RAR β , 예후, mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제, 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제, 구강편평세포암, 생물학적 시료, 암, 키트 및 키트에 더 포함될 수 있는 물질 등은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, CCL28, CCR10 및 RAR β 로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0058] 본 발명의 상기 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법은 상기 암의 예후 예측용 조성물을 사용하여 암이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 CCL28, CCR10 및 RAR β 으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이 감소되어 있는 경우, 상기 목적하는 개체의 예후가 나쁠 수 있음을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법에서 CCL28, CCR10, RAR β , 예후, mRNA 수준을 측정할 수 있는 제제, 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제 및 구강편평세포암 등은 상기 예후 예측용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 암의 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 상기 정보 제공 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, CCL28, CCR10 및 RAR β 로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0063] 본 발명의 상기 암 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법은 상기 침습성 암 진단용 조성물을 사용하여 암이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 CCL28, CCR10 및 RAR β 로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이 감소되어 있는 경우, 상기 목적하는 개체에서 암의 침습과 그로 인한 전이가 발생되었거나 발생할 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 암 침습을 예측하기 위한 정보 제공 방법에서 CCL28, CCR10, RAR β , 예후, mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제, 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제 및 구강편평세포암 등은 상기 예후 예측용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

- [0066] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 암 침습 억제용 약학 조성물을 제공한다.
- [0067] 본 발명의 상기 약학 조성물은 CCL28 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0068] 본 발명의 상기 약학 조성물은 CCR10 및 RAR β 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 상기 약학 조성물의 CCL28은 암, 특히 구강편평세포암에서 CCR10과 결합하여 RARE(retinoic acid response element)와 관련된 전사의 활성화를 통해 RAR β (Retinoic acid receptor β), 특히 RAR β 2의 발현을 유도함으로써 암 세포의 침습을 억제하는 효과가 달성되도록 할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 상기 약학 조성물에서 상기 CCL28, CCR10, RAR β , 암, 구강편평세포암 및 침습 등은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0071] 본 발명의 상기 단백질은 아미노산이 펩티드 결합에 의해 연결된 형태인 것으로서, 본 발명의 상기 단백질은 펩타이드와 같은 의미로 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 CCL28 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 CCR10 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 RAR β 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0072] 본 발명의 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 특정 세포 소기관으로 위치화될 수 있는 신호 서열(Signal sequence)가 제거되어 있는 재조합 단백질의 서열일 수 있다.
- [0073] 상기 아미노산 서열에 다른 아미노산, 펩타이드 등이 융합된 형태의 경우에도 침습성 암의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 한 모두 포함될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 상기 단백질은 공지의 단백질 합성법 또는 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 상기 단백질을 형질전환된 숙주세포를 이용하는 경우, 본 발명의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 숙주 세포에 형질도입하여 형질전환체를 제조한 뒤, 당업계에 공지된 임의의 방법을 적절하게 사용하여 상기 형질전환체를 배양할 수 있다. 이렇게 배양된 상기 형질전환체로부터 단백질은 당업계에서 공지된 원심분리, 크로마토 그래피, 전기 영동 등의 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 세포 내에 도입되어 단백질을 발현시키기 위한 수단으로서, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 등 공지의 재조합 발현 벡터를 사용할 수 있으며, 벡터는 DNA 재조합 기술을 이용한 임의의 공지된 방법에 따라 당업자에게 의해 용이하게 제조될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 상기 아미노산 서열은 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들 조합에 의해 용이하게 변형될 수 있다. 따라서, 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 6과 높은 상동성을 갖는 단백질, 예를 들면 상동성이 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상인 경우의 단백질도 본 발명의 상기 단백질에 모두 포함될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 상기 상동성이란, 야생형(Wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열과 상기과 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(Bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드(Nucleotide) 단위체가 공유결합에 의하여 길게 사슬모양으로 이루어진 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하는 것으로, 일정 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥을 지칭한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 CCL28, CCR10 또는 RAR β 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3, 서열번호 5 또는 서열번호 7로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여 코딩 영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어

어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 상기 단백질과 동등한 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 적어도 하나의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0080] 한편, 본 발명의, "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 구강암 세포의 침습으로 인해 발생한 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0081] 또한, 본 발명의, "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 구강암 세포의 침습으로 인해 발생한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0083] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 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, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0084] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 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 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0085] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.

[0086] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0087] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/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. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[0089] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 펩타이드를 발현하도록 제조된 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0090] 본 발명의 상기 약학 조성물은 상기 암 침습 억제용 약학 조성물은 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는, 단백질 또는 펩타이드를 발현하도록 제조된 발현 벡터를 더 포함할 수 있다.

[0091] 본 발명의 상기 약학 조성물의 CCL28은 암, 특히 구강편평세포암에서 CCR10과 결합하여 RARE(retinoic acid response element)와 관련된 전사의 활성화를 통해 RAR β (Retinoic acid receptor β), 특히 RAR β 2의 발현을 유도함으로써 암 세포의 침습을 억제하는 효과가 달성되도록 할 수 있다.

[0092] 본 발명의 상기 약학 조성물에서 상기 CCL28, CCR10, RAR β , 암, 구강편평세포암, 약학 조성물 및 침습 등은 본

명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

- [0093] 본 발명의 상기 발현 벡터는 목적하는 숙주세포에서 목적하는 단백질 또는 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시 코돈, 종결 코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(In frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [0094] 본 발명의 상기 발현 벡터는 프로모터와 본 발명의 폴리뉴클레오타이드가 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 발명에서 상기 '작동가능하게 연결(Operably linked)'이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(Functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 상기 발현 벡터의 백본(Backbone) 으로 사용할 수 있는 벡터는 본 발명의 상기 단백질을 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들면, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA, 상업적으로 개발된 플라스미드 (pGEM® T 벡터, pET22b, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pGEX-4T-1, pET, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, AAAA λ gt11, λ ZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백신시아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 펩타이드를 발현하도록 제조된 발현 벡터가 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 포함하는 암 침습 억제용 약학 조성물을 제공한다.
- [0098] 본 발명의 상기 약학 조성물은 상기 암 침습 억제용 약학 조성물은 서열번호 4 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, 단백질을 발현하도록 제조된 발현 벡터가 형질전환된 형질전환체를 더 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 상기 약학 조성물의 CCL28은 암, 특히 구강편평세포암에서 CCR10과 결합하여 RARE(retinoic acid response element)와 관련된 전사의 활성화를 통해 RAR β (Retinoic acid receptor β), 특히 RAR β 2의 발현을 유도함으로써 암 세포의 침습을 억제하는 효과가 달성되도록 할 수 있다.
- [0100] 본 발명의 상기 약학 조성물에서 상기 CCL28, CCR10, RAR β , 암, 구강편평세포암, 약학 조성물, 발현 벡터 및 침습 등은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0101] 본 발명의 상기 형질전환은 DNA를 숙주 세포로 도입하여 DNA가 염색체 외의 인자로서 또는 염색체와 통합하여 완성됨으로써 복제 가능하게 되는 것을 지칭하는 것일 수 있다.
- [0102] 본 발명의 상기 숙주 세포는 본 발명의 상기 발현 벡터에 포함된 폴리뉴클레오타이드에 의해 단백질을 생산할 수 있는 것이라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면, BL21 또는 DH5 α 등의 대장균(*E. coli*), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포, 사카로마이세스 세레비지에, 스킴조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포, 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포, CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포, 또는 식물 세포를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0104] [서열목록]
- [0105] 서열번호 1: CCL28 아미노산 서열
- [0106] 1 mqqrglaiva lavcaalhas eailpiassc ctevshhisr rllervnmcr iqradgdcdl
- [0107] 61 aavilhvkrr ricvspnht vkqwmkvqaa kknkgknvch rkkhhgkrns nrahqgkhet
- [0108] 121 yghktpy

[0110] 서열번호 2: CCL28 펩타이드의 아미노산 서열

[0111] 1 seailpiass cctevshhis rrlervnmc riqradgdcd laavilhvkr rricvshphh

[0112] 61 tvkqwmkvqa akknkgkgnvc hrkhhhgkrn snrahqkhe tyghktpy

[0114] 서열번호 3: CCL28의 염기 서열

[0115] 1 aggacacctt tagcctcatt tctgatcgac acagcctcac ttgtgttgct gtcagtgcc

[0116] 61 gtagggcagg caggaatgca gcagagagga ctgccatcg tggccttggc tgtctgtgcg

[0117] 121 gccctacatg cctcagaagc catacttccc attgcctcca gctgttgac ggaggtttca

[0118] 181 catcatatct ccagaagct cctggaaaga gtgaatatgt gtcgcatcca gagagctgat

[0119] 241 ggggattgtg acttggctgc tgtcatcctt catgtcaagc gcagaagaat ctgtgtcagc

[0120] 301 ccgcacaacc atactgttaa gcagtggatg aaagtgaag ctgccaagaa aaatggtaaa

[0121] 361 ggaaatgttt gccacaggaa gaaacacat ggcaagagga acagtaacag ggcacatcag

[0122] 421 gggaaacacg aaacatacgg ccataaaact cttattaga gactctacag ataaatctac

[0123] 481 agagacaatt cctcaagtgg acttggccat gattggttgt aagtttatca tctgaattct

[0124] 541 ccttattgta gacaacagaa caaaacaaaa tattggtttt taaaaaatga acaattgtgc

[0125] 601 ggtatgcaaa ttagaccaat aataactca actggaaaat gaaatgaaa gataaactg

[0126] 661 gctgggtatg gtggttcaca cttttatcc cagcacttcg ggaggctgag gcaggaggat

[0127] 721 cacttgagac caggagtgtg agaccagcct gggcaacata gcaagacctc atttctacaa

[0128] 781 acaaaaaaaaa aattggcccg gcatggtagt actgcctat aatcccagcc acatgggagg

[0129] 841 ctgaggtggg aggatcactt gactctggga gagtttgagg ttgcagtgag cagcctgggt

[0130] 901 gacagaatga gacctgtct ctaaaaaata taataataat gatagtgtat atcttcatat

[0131] 961 aatattttta gagagcata tagatataac ttctccaac ttttaatta tagttttcca

[0132] 1021 aacttacaga gaagttaaaa gaatgtaca atgaacatct atatatcttt caccacaata

[0133] 1081 ttaatcattg ttaatatgt gtcacattg ctttctctct cctctcttg tatgtgttc

[0134] 1141 tatataaaat attataactt taaaatata tcttgtttg ctaaacatt tgaataaag

[0135] 1201 ttgcaaaaat catgacactt caccctagt ttctttttgg tgtataact tgacataacc

[0136] 1261 taaaataaag acatttttct acataatcac ctatcagtt ttatactaa aaaattaata

[0137] 1321 atttcatcta atatatcca tattcaaatt tcccaacta ttagagagc attttatgta

[0138] 1381 gtttttttt cactccagta atcaatcaag gtgacatac atattgcaa taattgttat

[0139] 1441 ttttctttaa tatctttcaa tctaagaaag ttcctctgtc tttttttt aatttttaa

[0140] 1501 attattttgt tgaggagggt tcttctgtg tcttccaggc tggagtgcag tggcacaatt

[0141] 1561 ttgatttttg ctactgaag cctcaacttc tagggctcaa gcaatctcc cacctcagcc

[0142] 1621 tcccagatg ctgggatcaa ggtgcatacc caccacacct ggctaatttt gttttttt

[0143] 1681 tgtagagaca ggtctcact atgttgcca ggttgatctc aaactcctgg gctcaagcga

[0144] 1741 tcttcccacc ttagcctccc aaagtactgg gattataggt gtgagccaca gtgcctggcc

[0145] 1801 taattatttt cttgtgatca aattcaggtt taatgtttt ggtaagaat ttcctacgtg

[0146] 1861 aattcgtgta cttattttgt catttagagt tcataaatat tagggtttat tttctaaata

[0147] 1921 gaatagttta aactaaatat aacttcaaaa cgtctagttt gagtagctac cgttgttttg

[0148] 1981 attgaaattt tctgatactg aaaagaacaa aaagcctgcc ttctgcca gaaccttttg

[0149] 2041 cctccccag tcagttcttg gagcagcact agttaggggc ccagagtctg gccttctgtg

[0150] 2101 tgggtgatttt acgctctgcc taaacaagga gcctacatct tttagctcct attccaccct

[0151] 2161 tctcacacgt tttgtttgtt gtttggttgt tttttttga gacagagtct cactctgttg

[0152] 2221 cccaggctgg agtgcagtgg cacaatctcg gctcattgca acctccgct cccgcgttca

[0153] 2281 agtgattctc ttgcctcagc ctccaagta actgatatta caggcgcca gccaccacac

[0154] 2341 cccgctgatt ttgtatttt tagtagagac ggggttttcc cacgttgcc gggctggtct

[0155] 2401 caaactcttg acctcaagtg aaccacccgc ctgtgcctcc caaagtctg gaattaccag

[0156] 2461 cgtgagccac catgccgggc tcacacgttt gagttgatac cattgtgcca ttcctctttt

[0157] 2521 ggcctctttt ttgtccatag aggttcaag atagataggt aagagcccag tagtgttcat

[0158] 2581 aagaagccaa tagagagcag gagccacttt atcaggtggc aggtgtcctg ggcctccctg

[0159] 2641 ctggctagtc ccaagcggtg gtgttgccag gatgtcttgg aggtgataat gggacacaca

[0160] 2701 gaggcactga gtctccatag gttaaaatgc caccaaaact ggcctttgcc taatatccct

[0161] 2761 cattgactat ttagcattha atttattat tttctgaca ttctgcaag ctttgtattt

[0162] 2821 atatttccac ttatagatg aggaaatttg aggtcttag aggtaaaatg acttgcccag

[0163] 2881 gtcacacagg aagtggcaga gacaagcttt ttaaataaga aaaaattaat aaaatataat

[0164] 2941 atgagagtaa cttaaaatat taataacca caattttaa ttaattaacc gtgataacca

[0165] 3001 acattaataa aagttaagat accaaaacac tgggtgctaa ttctttcaac taacaacttg

[0166] 3061 aattattttc cattttaaat taattaaccg tgataacca cattaataa agttaagata

[0167] 3121 ccaaaa

[0169] 서열번호 4: CCR10 아미노산 서열

[0170] 1 mgteateqvs wghysgdeed aysaeplpel cykadvqafs rafqpsvslt vaalglagng

[0171] 61 lvlathlaar raarsptsah llqlaladll laltlpfaaa galqgswlgs atcertisgly

[0172] 121 sasfhagflf lacisadryv aiaralpagp rpstpgrahl vsvivwllsl llalpallfs

[0173] 181 qdgqregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtllaargp

[0174] 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslallld tadllaarer scpaskrkdv allvtsglal

[0175] 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrllrggsc psgpqprgc prrprlsscs aptethslsw

[0176] 361 dn

[0178] 서열번호 5: CCR10 염기 서열

[0179] 1 agagatgggg acggaggcca cagagcaggt ttctggggc cattactctg gggatgaaga

[0180] 61 ggacgcatac tcggctgagc cactgccgga gctttgctac aaggccgatg tccaggcctt

[0181] 121 cagccgggcc ttccaacca gtgtctccct gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa

[0182] 181 tggcctggtc ctggccaccc acctggcagc ccgacgcgca gcgcgtcgc ccacctctgc

[0183] 241 ccacctgctc cagctggccc tgccgacct cttgctggcc ctgactctgc ctttcgcggc

[0184] 301 agcaggggct cttcagggct ggagtctggg aagtgccacc tgccgcacca tctctggcct

[0185] 361 ctactcggcc tccttcacg ccggttctct ctctctggcc tgtatcagcg ccgaccgcta

[0186] 421 cgtggccatc gcgcgagcgc tcccagccgg gccgcggccc tccactccc gccgcgcaca

[0187] 481 ctgtgtctcc gtcacgtgt ggctgtgtc actgtctctg gcgtgcctg cgtgtctctt

[0188] 541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaacg acgtgtcgc ctcatcttcc ccgagggcct

[0189] 601 cagcagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgaggtg gccctgggct tcgcgtgcc

[0190] 661 gctgggcgtc atggtagcct gctacgcgt tctgggccgc acgtgtgtgg ccgccagggg

[0191] 721 gcccgagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgt ggtggctctg gtggcggcct tcgtggtgt

[0192] 781 gcagctgccc tacagcctcg ccctgtctgt ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgca

[0193] 841 gcggagctgc cctgccagca aacgcaagga tgtcgcactg ctggtgacca gcggttggc

[0194] 901 cctcgcccgc tgtggcctca atcccgttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca

[0195] 961 ggacctgcgg aggtgtctac ggggtgggag ctgccccca gggcctcaac cccgccggg

[0196] 1021 ctgccccgc cggccccgc tttcttctg ctacagctccc acggagaccc acagtctctc

[0197] 1081 ctgggacaac tagggctgcg aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaagg

[0198] 1141 gagtaggtgg gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt

[0199] 1201 gccacattaa attgataaca tggaaatgag atgcaacca acaa

[0201] 서열번호 6: RAR β isoform 2 아미노산 서열

[0202] 1 miytchrdkn cvinkvtrnr cqyclqkcf evgmskesvr ndrnnkkket skqectesye

[0203] 61 mtaelddlte kirkahqetf pslcqlgkyt tnssadhrvr ldlglwdkfs elatkciiki

[0204] 121 vefakrlpgf tgltiadqit llkaacdil ilrictrytp eqdtmtfsdg ltlrntqmhn

[0205] 181 agfgpltdlv ftfanqlpl emddtetgll saiclicgdr qdleptkvd klqeplleal

[0206] 241 kiyirkrrps kphmfpkilm kitdlrsisa kgaervitlk meipgsmpl iqemlenseg

[0207] 301 hepltpsssg ntaehspsis pssvensgvs qsplvq

[0209] 서열번호 7: RAR β isoform 2 염기 서열

[0210] 1 gtgacagaag tagtaggaag tgagctgttc agaggcagga gggctctatc tttgcaaag

[0211] 61 gggggaccag aattccccca tgcgagctgt ttgaggactg ggatgccgag aacgcgagcg

[0212] 121 atccgagcag ggtttgtctg ggcaccgtcg gggtaggatc cggaacgcat tcggaaggct

[0213] 181 ttttgcaagc atttacttgg aaggagaact tgggatcttt ctgggaaccc cccgccccgg

[0214] 241 ctggattggc cgagcaagcc tggaaaatgg taaatgatca tttgatcaa ttacaggctt

[0215] 301 tttagctggct tgtctgtcat aattcatgat tcggggctgg gaaaaagacc aacagcctac

[0216] 361 gtgcaaaaa aggggcagag tttgatggag ttgggtggac tttctatgc catttgctc

[0217] 421 cacacctaga ggataagcac ttttcagac attcagtga agggagatca tgtttactg

[0218] 481 tatggatgtt ctgtcagtga gtcttggga aatcctggat ttctacactg cgagtccgtc

[0219] 541 ttctgcatg ctccaggaga aagctctcaa agcatgttc agtggattga cccaaaccga

[0220] 601 atggcagcat cggcacactg ctcaatcaat tgaacacag agcaccagct ctgaggaact

[0221] 661 cgtcccaagc ccccatctc cacttctcc cctcgagtg taaaaacct gcttcgtctg

[0222] 721 ccaggacaaa tcatcagggt accactatgg ggtcagcgc tgtgagggt gtaagggtt

[0223] 781 tttccgcaga agtattcaga agaatatgat ttacacttgt caccgagata agaacttgt
 [0224] 841 tattaataaa gtcaccagga atcgatgcc aactgtcga ctccagaagt gctttgaagt
 [0225] 901 gggaatgtcc aaagaatctg tcaggaatga caggaacaag aaaaagaagg agacttcgaa
 [0226] 961 gcaagaatgc acagagagct atgaaatgac agctgagttg gacgatctca cagagaagat
 [0227] 1021 ccgaaaagct caccaggaaa ctttcccttc actctgccag ctgggtaaat acaccacgaa
 [0228] 1081 ttccagtgtc gaccatcgag tccgactgga cctgggcctc tgggacaaat tcagtgaact
 [0229] 1141 ggccaccaag tgcattatta agatcgtgga gtttgctaaa cgtctgcctg gtttactgg
 [0230] 1201 cttgaccatc gcagacaaa ttacctgtc gaaggccgcc tgcctggaca tctgattct
 [0231] 1261 tagaatttgc accaggataa cccagaaca agacacatg actttctcag acggccttac
 [0232] 1321 cctaaatcga actcagatgc acaatgctgg atttggctct ctgactgacc ttgtgttcac
 [0233] 1381 ctttgccaac cagctcctgc ctttggaaat ggatgacaca gaaacaggcc ttctcagtgc
 [0234] 1441 catctgttta atctgtggag accgccagga cttgaggaa ccgacaaaag tagataagct
 [0235] 1501 acaagaacca ttgctggaag cactaaaaat ttatatcaga aaaagacgac ccagcaagcc
 [0236] 1561 tcacatgttt ccaaagatct taatgaaaat cacagatctc cgtagcatca gtgctaaagg
 [0237] 1621 tgcagagcgt gtaattacct tgaaaatgga aattcctgga tcaatgccac ctctcattca
 [0238] 1681 agaaatgctg gagaattctg aaggacatga acccttgacc ccaagttcaa gtgggaacac
 [0239] 1741 agcagagcac agtcttagca tctcaccag ctcagtggaa aacagtgggg tcagtcagtc
 [0240] 1801 accactcgtg caataagaca tttctagct acttcaaaca ttccccagta cttcagttc
 [0241] 1861 caggatttaa aatgcaagaa aaaacatttt tactgtgct tagtttttgg actgaaaaga
 [0242] 1921 tattaaaact caagaaggac caagaagttt tcatatgtat caatatatat actcctcact
 [0243] 1981 gtgtaactta ctagaaata caaacttttc caattttaaa aaatcagcca ttcatgcaa
 [0244] 2041 ccagaaacta gttaaaagct tctattttcc tctttgaaca ctcaagattg catggcaaag
 [0245] 2101 acccagtc aaatgattac cctgggttaa gtttctgaag actttgtaca tacagaagta
 [0246] 2161 tggctctgtt ctttctatag tgatgtttg gtgctttcct tttgtcttgc atactcaaaa
 [0247] 2221 taaccatgac accaaggtta tgaaatagac tactgtacac gtctacctag gttcaaaaag
 [0248] 2281 ataactgtct tgccttcctg gaatagtcaa gacatcaagg taaggaaaca ggactattga
 [0249] 2341 caggactatt gtacagtatg acaagataag gctgaagata ttctacttta gttagtatgg
 [0250] 2401 aagcttgtct ttgctcttcc tgatgctctc aaactgcac ttttatttca tgttgcccag
 [0251] 2461 taaaagtata caaatccct gcaactagcag aagagaattc tgtatcagtg taactgccag
 [0252] 2521 ttcagttaat caaatgtcat ttgttcaatt gttaatgtca ctttaaatta aaagtggttt
 [0253] 2581 attacttgtt taatgacata actacacagt tagttaaaaa aaattttttt acagtaatga
 [0254] 2641 tagcctccaa ggcagaaaca ctttctcagt ttaagttttt gtttacttgt tcacaagcca
 [0255] 2701 ttagggaaat ttcattggat aattagcagg ctggctctacc acctggacca tgtaactcta
 [0256] 2761 gtgtccttcc tgattcatgc ctgatattgg gatttttttt tccagccttc ttgatgcca
 [0257] 2821 ggggctaatt aatattaaca actcccaaag aaacaggcat agaacttgcc tctttgacc
 [0258] 2881 ttgttcaatc actatgaagc agagtgaag ctgtggtaga gtggttaaca gatacaagt

[0259] 2941 tcagttttctt agttctcatt taagcactag tggaattttt tttttttgat atattagcaa
 [0260] 3001 gtctgtgatg tacttttact ggctctgttt gtacattgag attgtttgtt taacaatgct
 [0261] 3061 ttctatgttc atatactgtt tacctttttc catggagtct cctggcaaag aataaaatat
 [0262] 3121 atttatttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 [0263] 3181 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

발명의 효과

[0265] 본 발명은 CCL28(Chemokine (C-C motif) ligand 28), CCR10(Chemokine (C-C motif) Receptor 10) 또는 RAR β (Retinoic acid receptor β)의 발현 수준을 측정함으로써 암 중에서도 특히 구강암 환자의 예후나, 침습 가능성을 간단하고 용이할 뿐만 아니라, 정확하게 예측할 수 있다.

[0266] 또한, 본 발명에서는 상기 CCL28 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 암 중에서도 특히 구강암 세포의 침습을 억제하여 상기 암의 전이를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0267] 도 1의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 침습 분석 및 Chick 용모막요막(Chorioallantoic membrane; CAM) 분석을 통해 구강편평세포암 세포(Ca9.22 및 YD10B)의 침습에 대한 CCL28에 의한 침습 억제 효과 및 TGF- β 에 의해 유도된 침습이 CCL28에 의해 억제된 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 형광 염색을 통해 구강편평세포암 세포(Ca9.22 및 YD10B)에서 CCL28 및 TGF- β 에 의한 E-카드헤린(E-cadherin) 및 β -카테닌(β -catenin)의 위치화(Localization)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석을 통해, 구강편평세포암 세포(Ca9.22 및 YD10B)에서 CCL28 및 TGF- β 에 의한 E-카드헤린(E-cadherin) 및 β -카테닌(β -catenin)의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 CCL28, CCR3 및 CCR10이 녹다운된 구강편평세포암 세포(Ca9.22 및 YD10B)에서 침습 정도를 세포 침습 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이고(도 4의 A 내지 C), Chick CAM 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다(도 4의 D).

도 5의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 TCGA HNSCC 데이터 세트에서 정상조직과 종양조직에서 CCL28, CCR10 및 CCR3 mRNA의 발현 수준을 비교한 결과(도 5의 A)와 CCL28, CCR10 및 CCR3 mRNA의 발현 수준과 환자의 생존율간의 상관관계(도 5의 B)를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6의 A는 본 발명의 일 실시예에 따른 Cignal Finder 리포트 분석을 이용하여 CCR10 녹다운 및 CCL28 처리 유무에 따른 세포 신호전달 경로를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 TCGA HNSCC 데이터 세트에서 CCL28 mRNA의 발현 수준과 RARB 및 RA 시그니처와의 상관관계를 나타낸 것이며, 도 6의 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석을 통해 CCR3 또는 CCR10의 발현 수준을 억제한 Ca9.22 및 YD10B 세포에서 CCL28 처리에 의해 RAR β 및 RAR β 2 단백질의 발현 수준 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 D는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석을 통해 Ca9.22 및 YD10B 세포에서 CCL28 처리에 의해 RAR β 및 RAR β 2 단백질의 발현 수준 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 E는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 침습 분석을 통해 CCL28의 처리에 의해 유도된 세포 침습 억제 효과가, RAR β 에 특이적인 길항제 LE135 및 펜-RAR 역작용제(reverse agonist) BMS493에 의해 차단되는 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 구강암 세포와 조골세포에서 CCL28에 의한 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) 조절을 침습효소결합 면역 흡착 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이고(도 7의 A 내지 C), 골수 유래 대식세포에서 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 형성을 효소 조직 화학 염색으로 확인한 결과를 나타낸 것이다(도 7의 D).

도 8의 A는 본 발명의 일 실시예에 따른 CCL28의 주입으로 인한 구강암 종양의 크기 감소를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 8의 B 및 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 머리뿔개뼈(calvarial)를 μ CT 시스템을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이며, 도 8의 D는 혈청 내에서 칼슘, TRAP, CTX, ALP가 존재하는 수준을 측정한 결과를 나타낸

것이며, 도 8의 E 및 F는 본 발명의 일 실시예에 따른 H&E 및 TRAP 염색을 통해 머리덮개뼈(calvarial) 구역의 조직을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 8의 G는 Ki67, CD31 및 RAR β 에 특이적인 항체를 이용하여 종양 조직에서 면역조직화학염색(Immunohistochemistry; IHC)을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 9의 A 내지 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역조직화학염색 결과와, 그를 통한 히스토스코어 값을 그래프로 나타낸 것이고, 도 9의 C는 환자의 조직에 존재하는 CCL28, CCR3, CR10 및 RAR β 의 발현 수준에 따른 전체 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0268] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0270] 실시예

[0272] [준비예 1] 실험 생쥐(Mouse)의 사육 및 종양 모델 제조

[0273] 5주령의 수컷 BALB/C 누드 생쥐(19 ± 1 g)을 오리엔트 바이오(한국)로부터 구입하고, 4주령의 수컷 ICR 생쥐(21 ± 2 g)을 NARA 생명공학(한국)으로부터 구입하였다. 상업적 설치류 사료 및 수돗물에 자유롭게 접근 가능하고, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ 의 상대 습도 및 12시간의 명암 주기가 있으며, 병원균이 존재하지 않는 조건에서 상기 생쥐를 사육하였다.

[0274] 6주된 수컷 BALB/C 누드 생쥐를 무작위 그룹으로 분류하고, 무균 26 게이지의 바늘이 있는 1 ml 주사기를 사용하여, Ca9.22 세포(1×10^7 세포/100 μl HBSS)를 상기 누드 생쥐 머리덮개뼈의 피하에 주입하였다. 여기서, 대조군으로는 상기 세포를 대신하여 HBSS만 주입하였다. 그런 다음, PBS에 0, 25 또는 50 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량이 포함된 CCL28(Chemokine (C-C motif) ligand 28)을 한주당 3회 복강 내 주입하였다. 상기 세포를 주입한지 21일째 되는 날에 상기 생쥐로부터 혈액, 두경부(Calvair) 및 종양을 수집하였다.

[0276] [준비예 2] 세포주의 배양

[0277] Ca9.22 구강편평세포암(oral squamous cell carcinoma; OSCC)세포의 경우 일본 연구 생물 자원 은행(일본)으로부터 구입하였으며, YD10B 구강편평세포암 세포의 경우 연세대학교 치과대학(한국) 구강 병리학과로부터 얻었다. 5% CO₂, 37°C의 조건에서, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과, 1% 항생제 - 항균제 혼합물이 포함된 DMEM 배양 배지를 이용하여 상기 세포들을 배양하였다.

[0278] hFOB1.19 골아 세포의 경우 ATCC(American type culture collection)로부터 구입하였으며, 37°C의 조건에서 10% 우태아혈청, 0.3mg/ml G418와 1% 항생제 - 항균제가 포함된 페놀 레드가 없는 DMEM/F12 배양 배지를 이용하여 세포를 배양하였다.

[0279] 4주령의 수컷 ICR 생쥐의 경골로부터 Histopaque-1083 밀도 구배 원심 분리를 사용하여 골수 유래 대식세포(BMM)를 분리하였다. 5% CO₂, 37°C의 조건에서, 10% 우태아혈청과, 1% 항생제 - 항균제 혼합물이 포함된 α -DMEM 배양 배지를 이용하여, 상기 분리된 골수 유래 대식세포를 배양하였다.

[0281] [실시예 1] CCL28 억제에 의한 침습 및 상피 중간엽 전이 확인

[0282] [1-1] 세포의 침습 분석 및 Chick 용모막요막(chorioallantoic membrane; CAM) 분석

[0283] 8.0- μm 포어 폴리카보네이트 막(Pore polycarbonate membrane) (Corning Costar)이 있는 6.5-mm 트랜스웰 챔버(Transwell chamber)를 이용하여, 세포의 침습 정도를 확인하였다. 구체적으로, 막의 하부 및 상부 표면을 1mg/ml 젤라틴 및 매트릭젤(BD Bioscience)으로 예비 코팅하였다. 그런 다음, TGF- β (10ng/ml)가 포함되거나 포함되지 않은 5% 우태아혈청이 포함된 배양 배지에 포함된 5×10^4 /0.1ml의 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)를 상부 챔버에 넣고, 하부 챔버는 0.6ml의 10% 우태아혈청 및 0, 5 및 20pg/ml의 CCL28이 포함된 배양 배지를 넣었다. 24시간 동안 배양하고, 현미경을 이용하여 침습이 일어난 세포의 개수를 계수하여, 그 결과를 도 1의 A에 나타내었다.

[0284] Chick CAM 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 구체적으로, 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)를 37°C로 미리 데워둔 PBS에서 10 μM 의 CFDA-SE로 표지하였다. 수정란은 37°C의 가습 조건에서 3일 동안 보관하였

다. 상기 수정란에 무균 가위 및 집게를 이용하여 분석을 위한 창(CAM)을 만들었으며, 주사기를 이용하여 3ml의 알부민을 제거하였다. 그런 다음, 상기 창을 접착 테이프를 이용하여 다시 밀봉하고 배양하였다. 11일째, 상기 CFDA-SF로 표지된 상기 구강편평세포암 세포들을 4:1의 비율로 혼합된 DMEM:마트리젤(matrigel)에 혼합하고, CCL28(50pg/ml) 및/또는 TGF- β (10 ng/ml)를 추가로 넣은 뒤, 수정란 1개당 1×10^6 세포를 CAM에 넣었다. 이후, 상기 수정란을 3일 동안 추가로 배양하고 CAM을 수확하였다. 상기 수확된 CAM은 포르말린으로 24시간 동안 고정시키고, Zeiss LSM 700 공 초점 현미경(Zeiss Laboratories)을 사용하여 고정된 CAM의 이미지를 얻고, 이를 ImageJsoftware (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 사용하여 분석하여, 그 결과를 도 1의 B에 나타내었다.

[0285] 도 1의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 과골세포의 골 흡수에 의해 방출되는 골 기질에 풍부하게 저장된 성장인자인 TGF- β 가 존재하는 경우뿐만 아니라, 존재하지 않는 경우에도 Ca9.22 및 YD10B 세포의 침습이 CCL28에 의해 현저하게 억제되는 것을 확인하였다.

[0287] [1-2] 면역 형광 염색 분석 및 웨스턴 블롯

[0288] 면역 형광 염색은 다음과 같은 방법으로 수행되었다. 구체적으로, 슬라이드에 존재하는 하나의 웰당 5×10^3 세포수로 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)를 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, TGF- β (10 ng/ml) 및/또는 CCL28(0, 5 또는 20pg/ml)를 상기 배양된 세포에 처리한 뒤, 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 4% 파라포름알데하이드로 상기 배양된 세포를 고정시키고, 트리트론 X-100이 포함된 완충액을 이용하여 투과화(Permeabilized)시켰다. 이후, 상기 세포를 2% 염소 혈청(Goat serum)이 포함된 PBS를 이용하여 차단하고, 1:200으로 희석된 E-카드헤린(E-cadherin) 및 β -카테닌(β -catenin)에 특이적인 항체를 넣고 4°C에서 배양하였다. 그리고 나서, 상기 세포를 PBS를 이용하여 세척한 뒤, 실온에서 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG 및 Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG(Invitrogen)와 함께 배양하고, DAPI(Vector Laboratories)를 포함하는 마운팅 배지를 넣은 뒤 커버 슬립을 상기 슬라이드 위에 덮었다. Zeiss LSM 700 공 초점 현미경(Zeiss Laboratories)을 사용하여 고정된 이미지를 얻고, 이를 도 2의 A 및 B에 나타내었다.

[0289] 또한, 웨스턴 블롯 분석은 다음과 같은 방법으로 수행되었다. 구체적으로, 100mm 배양 접시에 1×10^6 세포수로 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)를 분주하고, 24시간 동안 배양 하였다. 그런 다음, TGF- β (10 ng/ml) 및/또는 CCL28(0, 5 및 20pg/ml)를 상기 배양된 세포에 처리한 뒤, 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 단백질 분해 억제제가 포함된 RIPA 완충액을 넣어 세포용해물을 얻었다. 상기 세포용해물은 22,000g의 조건에서 15분간 원심분리한 뒤, 핵/사이토졸 분획 키트(BioVision)을 이용하여, 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 상기 세포용해물로부터 핵 및 사이토졸 분획을 얻었다. BCA 키트(Pierce)를 사용하여 측정된 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE에 로딩하고 전기영동하였다. 전기영동이 완료된 상기 겔에 존재하는 단백질을 PVDF 막에 옮겼다. 상기 PVDF 막을 세척 뒤에, TBS-T 완충액에 5%의 탈지 분유가 포함된 블로킹 완충액에 넣고 상온에서 배양하였다. 그런 다음, 3%의 BSA가 포함된 TBS-T 완충액에 1:1,000 희석된 E-카드헤린 및 β -카테닌에 특이적인 항체와 상기 PVDF 막을 실온에서 배양하였다. 이후, PVDF 막을 TBS-T 완충액으로 세척하고, HRP가 결합된 IgG가 포함된 희석액과 함께 상온에서 1시간 동안 배양하였다. TBS-T 완충액을 이용하여 상기 PVDF 막을 3회 세척하고, ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약(Amersham)을 이용하여 시각화하여, 그 결과를 도 3의 A 및 B에 나타내었다.

[0290] 도 2의 A 및 B와, 도 3의 A 및 B에서 보는 바와 같이, E-카드헤린의 감소와 β -카테닌이 핵 내에 축적되는 현상은 상피 중간엽 전이의 기본적인 특징으로 볼 수 있다. 이에 기반하여 CCL28의 처리 유무에 따라 상기 단백질의 발현과 그 존재 위치를 확인한 결과, Ca9.22 및 YD10B 세포 모두에서 CCL28이 처리되었을 때 TGF- β 에 의해 E-카드헤린이 감소되는 현상이 억제되었고, E-카드헤린이 발현된 수준 자체도 증가하였으며, β -카테닌이 핵으로 이동하는 것이 억제되는 것을 확인하였다.

[0291] 상기 결과를 통해, CCL28을 처리하는 경우 구강편평세포암 세포에서 상피 중간엽 전이가 억제됨으로써 암 세포의 침습이 매우 효과적으로 억제될 수 있음을 알 수 있다.

[0293] [실시예 2] CCL28과 그의 기능성 수용체의 녹다운에 의한 암의 침습 증가 확인

[0294] CCL28과, 상기 CCL28의 기능성 수용체로 알려져 있는 CCR3 및 CCR10의 억제에 의한 구강편평세포암의 침습을 확인하였다.

[0295] CCL28, CCR3 및 CCR10의 녹다운을 위해, 대조군에 해당하는 shRNA (SHC002V)와 shRNA (SHCLNV-M_020279, SHCLNV-NM_016602, SHCLNV-NM_001837)를 포함하는 렌티 바이알 파티클을 생성시키고, 이와 같은 파티클이 포함되어 있는 상등액을 수집하였다.

- [0296] 60mm 배양 접시에 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)를 분주하고, 상등액을 10 μ g/ml 폴리브렌(polybrene)(Santa CruzBiotechnology)이 존재하는 환경에서 상기 세포와 상기 바이러스를 24시간 동안 배양하였다. 이후, 바이러스 파티클이 포함된 상등액을 제거하고, 세포를 10% 우태아혈청이 포함된 신선한 배지에서 2일 동안 배양한 뒤에 10 μ g/ml의 퓨로마이신(puromycin) 및 10% 우태아혈청이 포함된 배지로 교체하고 2주 동안 추가로 배양하였다. 여기서, 2주 동안 배양 시에 상기 형질 감염된 세포에 20pg/ml의 CCL28을 처리하거나 대조군으로 아무것도 처리하지 않았다.
- [0297] 상기 감염이 완료된 구강편평세포암 세포를 상기 [1-2]에 기재되어 있는 방법에 따라 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 shRNA에 의한 단백질의 녹다운을 확인하고, 상기 [1-1]에 기재되어 있는 방법에 따라 침습 정도를 확인하여, 그 결과를 도 4의 A 내지 D에 나타내었다.
- [0298] 도 4의 A 내지 C에서 보는 바와 같이, 대조군 shRNA가 형질 감염된 경우에 비하여, CCL28에 특이적인 shRNA가 형질 감염된 구강편평세포암 세포에서는 침습 정도가 현저하게 증가된 것을 확인하였다. 나아가, shRNA가 형질 감염됨으로써 침습이 증가되는 현상은 CCL28가 처리됨으로써 억제되는 것을 확인하였다. 또한, CCR10에 특이적인 shRNA가 형질 감염된 경우에는 침습 정도에 변화가 없었으며, CCL28이 처리되었을 때 침습이 억제되지 않았다.
- [0299] 도 4의 D에서 보는 바와 같이, Chick CAM 분석을 통해 확인한 결과, 시험관 내에서 확인된 세포의 침습 결과와 마찬가지로 CCL28 발현 수준이 억제된 경우에는 침습 정도가 증가되는 것을 확인하였고, CCL28에 특이적인 shRNA가 처리되어 침습이 억제되는 것을 확인하였다. CCR10 발현이 억제된 경우에는 CCL28이 처리된 경우에도 침습이 억제되지 않았다.
- [0300] 상기 결과를 통해, 암 중에서도 특히 구강편평세포암에서 CCL28 발현이 감소되는 경우 침습이 증가될 수 있고, CCL28이 처리되는 경우 CCR10 수용체를 통해 침습을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0302] **[실시예 3] CCL28과 그의 기능성 수용체와 종양 발생 및 환자 생존율 간의 상관관계 분석**
- [0303] CCL28, CCR10 및 CCR3와 환자 생존율 간의 상관관계에 대해 TCGA 연구 네트워크(<http://cancergenome.nih.gov/>)에 의해 생성된 TCGA HNSCC 데이터 세트를 이용하였다. 상기 TCGA HNSCC 데이터 세트에서 두경부암(n=519)와 정상(n=43)에서 CCL28, CCR3 및 CCR10의 mRNA 발현 수준을 얻은 뒤, CCL28 및 그의 기능성 수용체(n=505)의 mRNA와 전체 생존율과의 상관 관계를 분석하였다. Expectation Maximization (RSEM) 값에 의한 정규화된 RNA 시퀀싱 데이터를 사용하여 유전자 박스 플롯을 생성하고, 유전자 발현과 전체 생존율 간의 상관 관계를 평가하여, 그 결과를 도 5의 A 및 B에 나타내었다.
- [0304] 도 5의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 정상 조직에 비하여, 두경부암의 조직에서 CCL28 유전자가 발현된 수준이 낮은 반면, CCR3와 CCR10의 유전자 발현의 경우 정상 조직에 비하여 두경부암의 조직에서 유의미하게 낮은 수준으로 확인되지는 않았다. 나아가, CCL28 및 CCR10이 높은 수준으로 발현된 경우에는 두경부암 환자의 전반적인 생존율이 증가되어 있는 것을 확인하였다.
- [0305] 상기 결과를 통해, CCL28과 그의 기능성 수용체들은 암 중에서도 특히 구강편평세포암의 발암 및 예후와 관련성이 있으며, 정상에 비하여 CCL28과 그의 기능성 수용체인 CCR10의 발현 수준이 낮은 경우 환자의 생존율이 낮아져, 예후가 나쁠 수 있음을 알 수 있다.
- [0307] **[실시예 4] CCL28의 RARE(retinoic acid response element) 관련 전사 인자 활성화 및 RAR β 의 발현 자극을 통한 세포 침습 억제 효과 확인**
- [0308] **[4-1] 리포터 분석을 통해 세포 신호전달 경로를 확인**
- [0309] CCR10을 통한 CCL28의 침습 억제 효과 활성이 어떠한 분자생물학적 메커니즘을 통해 유도되는지 확인하기 위하여, Cignal Finder 리포터 분석을 통해 세포 신호전달 경로를 확인하였다.
- [0310] CCL28의 세포 신호전달 경로 분석은 Cignal finder 리포터 분석(SA isocciences)를 통해 제조사가 제공하는 프로토콜에 따라 수행하였다. 루시페라아제의 활성은 발광 마이크로 플레이트 판독기(Varioskan Flash 3001, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 듀얼-루시페라아제 분석 시스템(Promega)를 사용하여 측정하였다. 여기서, Firefly 루시페라아제의 경우 측정을 위한 샘플 리포터로 사용되었으며, Renilla 루시페라아제의 경우 정규화된 리포터로 사용되었다.
- [0311] CCL28이 0 또는 20ng/ml의 농도로 처리된 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)에서 CCL28이 0ng/ml로 처리

된 샘플을 기준으로 하여 상기와 같이 정규화된 루시퍼라아제 활성을 통해 리포터 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 또한, 상기 실시예 2에 기재된 방식과 동일하게, CCR10을 녹다운시킨 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)에 0 또는 20ng/ml 농도의 CCL28을 처리하고, CCL28이 0ng/ml로 처리된 샘플을 기준으로 하여 정규화된 루시퍼라아제 활성을 통해 리포터 유전자의 발현 변화를 확인하여, 그 결과를 도 6의 A에 나타내었다.

[0312] 도 6의 A에서 보는 바와 같이, CCL28이 처리되었을 때, 구강편평세포암 세포(Ca9.22 및 YD10B)에서 RARE와 관련된 리포터 유전자의 발현이 증가되었지만, CCR10이 shRNA에 의해 녹다운된 구강편평세포암에서는 CCL28의 처리에 의해서도 RARE와 관련된 리포터 유전자의 발현이 증가되지 않았다.

[0313] 상기 RARE와 관련된 리포터 유전자의 발현 증가를 통해, CCR10을 통해 RARE 관련된 유전자의 전사를 활성화하여 CCL28에 의한 침습 억제에 관여할 수 있음을 알 수 있다.

[0315] [4-2] TCGA HNSCC 데이터 세트에서 CCL28과 RAR β 의 상관관계 분석

[0316] 상기 [4-1] 결과를 토대로, CCL28 유전자의 발현이 RAR β 유전자 및 RA 시그니처(RA signature)의 발현과 상관관계가 있는지 확인하기 위하여, TCGA HNSCC 데이터 세트에서 *RARB* 및 RA 시그니처 값과 CCL28 mRNA의 발현 값의 상관관계 분석을 상기 실시예 3에서와 동일한 방법으로 수행하여, 그 결과를 도 6의 B에 나타내었다. 여기서 RA 시그니처는 RAR의 아고니스트(agonist)에 의해 조절되는 것으로 알려진 유전자의 발현 값의 합에 의해 결정될 수 있도록 하였다.

[0317] 도 6의 B에서 보는 바와 같이, CCL28 유전자가 발현된 수준이 레티노산(retinoic acid) 표적 유전자인 *RARB* 및 RA 시그니처 값과 유의한 상관관계가 있는 것을 확인하였다.

[0319] [4-3] CCR10, CCR3 및 RAR β 의 관계 분석

[0320] 3×10^5 세포 수로 분주된 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)에 리포펙타민 RNAiMAX 시약(Invitrogen)을 이용하여, 음성 대조군 siRNA(Santa CruzBiotechnology), CCR3-표적 siRNA(Santa CruzBiotechnology) 또는 CCR10-표적 siRNA(Santa CruzBiotechnology)를 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 그런 다음, CCL28 0ng/ml 또는 20ng/ml을 처리하고 24시간 동안 배양한 뒤, 상기 세포들에서 RAR β , CCR3, CCR10 및 GAPDH에 특이적인 항체를 이용하여 상기 [1-2]에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 6의 C에 나타내었다.

[0321] 또한, 구강편평세포암 세포(Ca9.22 및 YD10B)에 CCL28 0ng/ml 또는 20ng/ml을 처리하고, 24시간 동안 배양한 뒤, 상기 세포들에서 RAR β , CCR3, CCR10 및 GAPDH에 특이적인 항체를 이용하여 상기 [1-2]에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 6의 D에 나타내었다.

[0322] 도 6의 C에서 보는 바와 같이, CCL28 처리에 의하여 발현된 수준이 증가된 RAR β 이 CCR10의 siRNA 처리에 의해 억제된 반면, CCR3의 siRNA 처리에 의해 억제되지 않음을 확인했다

[0323] 도 6의 D에서 보는 바와 같이, CCL28 처리에 의해 Ca9.22 및 YD10B 세포에서 RAR β 및 RAR β 2 단백질의 발현 수준이 증가된 것을 확인하였다.

[0324] 상기 결과를 통해, CCL28 / CCR10 신호 전달이 세포주기 정지, 분화 및 세포 사멸을 유도하고, 종양의 등급과 상관관계가 있을 것으로 예상되는 RAR β , 특히 RAR β 의 이성질체인 RAR β 2의 발현을 유도함으로써 구강편평세포암 세포의 침습을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0326] [4-4] RAR β 조절에 의한 구강편평세포암 세포의 침습 확인

[0327] 3×10^5 세포 수로 분주된 구강편평세포암 세포(Ca9.22 또는 YD10B)에 RAR β 특이적 길항제인 LE135 또는 팬-RAR 역작용제인 BMS493을 0.5 또는 5 μ M과 CCL28 20ng/ml을 처리하고, 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 침습 분석을 수행하여, 그 결과를 도 6의 E에 나타내었다. 여기서, 대조군으로 CCL28, BMS493 및 LE135를 처리하지 않은 샘플(control)과, CCL28만 처리한 샘플(CCL28)을 사용하였다.

[0328] 도 6의 E에서 보는 바와 같이, Ca9.22 및 YD10B 세포 모두에서 CCL28에 의한 세포 침습 억제 효과가 LE135 또는 BMS493을 처리한 경우 차단되는 것을 확인하였다.

[0329] 상기 결과를 통해, CCL28 / CCR10 신호 전달이 RARE 관련 전사의 활성화를 통해 RAR β , 특히 RAR β 2의 발현을 유도함으로써 암 중에서도 특히 구강편평세포암 세포의 침습을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0331] **[실시예 5] CCL28에 의한 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) 조절 확인**

[0332] 암 세포로부터 유래된 뼈 용해 인자(cancer cell-derived osteolytic factor)에 노출된 조골세포/간질세포에서 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 직접 분비하거나, RANKL이 생산될 수 있도록 자극된다. 이렇게 생산된 RANKL은 파골세포의 전구체에 있는 RANK 수용체와 결합되어 파골세포의 형성을 유도하고 파골세포는 뼈의 흡수에 관여한다. 이와 같은 과정에 CCL28이 처리되는 경우 파골세포의 형성과 RANKL의 기능을 중화시킬 수 있는 OPG(osteoprotegerin)에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

[0333] 96웰 플레이트에 한 웰당 2×10^3 세포수로 구강편평세포암 세포(Ca9.22 YD10B)를 분주하였다. 상기 세포에 0 또는 20 pg/ml의 CCL28을 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 또한, 5×10^3 세포수로 hFOB1.19 골아 세포를 분주하였다. 그런 다음, 상기 구강편평세포암 세포의 배양 배지와 0, 5 또는 20 pg/ml의 CCL28을 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 구강편평세포암 세포의 배양 배지를 넣어주지 않는 조건이 대조군으로 설정될 수 있도록 하였다. 그런 다음, 상기 세포들 각각의 세포 배양 배지에서 CCL28 (BioLegend), RANKL (EIAab) 또는 OPG (Boster)의 시판용 키트를 통해 제조사가 제공하는 프로토콜에 따라 상기 단백질들의 발현 수준을 측정하여, 그 결과를 도 7의 A 내지 D에 나타내었다.

[0334] 파골세포 형성을 확인하기 위해, 5×10^3 세포수로 골수 유래 대식세포(bone marrow-derived macrophages; BMMs)를 분주하고, 세포 배양 배지에 30ng/ml의 M-CSF와 100ng/ml의 RANKL가 포함되도록 하고, 0, 5, 20pg/ml의 CCL28이 포함되도록 하여 5일 동안 배양하였고, 2일마다 새로운 배지로 교체하였다. 그런 다음, 상기 세포를 실온에서 30초 동안 고정액으로 고정시키고, TRAP을 확인하기 위한 시판 키트(sigma-aldrich)를 사용하여 제조사의 지식에 따라 효소 조직 화학 염색을 수행하여, 그 결과를 도 7의 D에 나타내었다.

[0335] 도 7의 A에서 보는 바와 같이, 대조군에 비하여 CCL28이 처리되었을 때 Ca9.22 및 YD10B 세포는 RANKL의 발현 수준이 유의미하게 감소되었고, OPG의 발현 수준에는 영향을 미치지 않았음에도 불구하고 RANKL/OPG의 비율이 감소되는 것을 확인하였다.

[0336] 도 7의 B에서 보는 바와 같이, 구강편평세포암 세포의 배양 배지가 없는 경우에서, 대조군에 비하여 CCL28을 처리한 경우 hFOB1.19 골아 세포에서 RANKL의 발현 수준이 감소되었으나 OPG의 발현 수준에는 영향이 없는 것을 확인하였다.

[0337] 도 7의 C에서 보는 바와 같이, 구강편평세포암 세포의 배양 배지에 의해 hFOB1.19 골아 세포에서 RANKL의 발현 수준이 증가되고, OPG의 발현 수준이 감소되었다. 그러나, CCL28을 처리한 경우에 위와 같이 구강편평세포암 세포의 배양 배지에 의해 나타나는 RANKL의 발현 수준의 증가가 차단되어, RANKL/OPG의 비율이 회복되는 것을 확인하였다.

[0338] 도 7의 D에서 보는 바와 같이, 파골세포 전구체인 골수 유래 대식 세포에서 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 형성이 CCL28의 처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다.

[0339] 상기 결과를 통해, RANKL에 의해 자극된 파골세포 형성이 CCL28에 의해 억제될 수 있을 뿐만 아니라, 구강편평 세포암 세포 및 골아세포 모두에서 RANKL의 발현 수준을 감소시킴으로써 파골세포의 형성을 CCL28이 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0341] **[실시예 6] 생체 내(in vivo)에서 CCL28의 기능 확인**

[0342] 상기 준비예 1의 생쥐에서 디지털 전기 캘리퍼를 사용하여 종양의 직경을 측정하고, 아래의 식 1을 통해 종양의 체적을 계산하였다. 여기서, a는 가장 긴 직경에 해당하고, b는 종양의 최단 직경을 의미한다. 이렇게 측정된 종양의 크기를 도 8의 A에 나타내었다.

[0344] [식 1]

[0345]
$$\text{종양 체적} = (a \times b^2) / 2$$

[0347] 상기 준비예 1에서 수집된 머리뿔개뼈를 μ CT 시스템(SkyScan 1076, SkyScan, Aartselaar)으로 스캔하여 분석하였다. NRecon 소프트웨어 (SkyScan)를 사용하여 3D 이미지를 생성하고, CTAn 소프트웨어(SkyScan)를 사용하여 μ CT 데이터로부터 BV/TV, BS/TV 를 포함한 뼈 형태 측정 매개 변수를 분석하여, 그 결과를 도 8의 B 및 C에 나타내었다.

- [0348] 상기 준비예 1에서 수집된 혈액으로부터 분리된 혈청 내에서, 제조사에서 제공한 방법에 따라 QuantiChrome 칼슘 분석 키트(BioAssay Systems)를 사용하여 칼슘이 존재하는 수준을 측정하였고, TRAP 분석 키트(Immuno Diagnostic Systems) 및 RatLaps 효소 면역분석 키트(Immuno Diagnostic Systems)를 사용하여 TRAP 5b 및 CTX가 존재하는 수준을 측정하여, 그 결과를 도 8의 D에 나타내었다.
- [0349] 또한, 준비예 1에서 수집된 생쥐의 머리덮개뼈(calvarial) 구역의 조직을 이용하여 통상의 방법에 의해 H&E 및 TRAP 염색을 수행하였다. IMT i-Solution 소프트웨어(버전 7.3, IMT i-Solution)를 사용하여 종양이 차지하는 부피 및 종양 가까이 위치한 뼈의 표면에서 TRAP-양성 파골 세포의 생성을 확인하고, 뼈 표면당 파골 세포 면적(OC.S/BS)을 측정하여, 그 결과를 도 8의 E 및 F에 나타내었다. 또한, 상기 종양 조직에서, 1:100으로 희석된 Ki67, CD31 및 RAR β 에 특이적인 항체를 이용하여 면역조직화학염색(Immunohistochemistry; IHC)을 수행하여, 그 결과를 도 8의 G에 나타내었다.
- [0350] 도 8의 A에서 보는 바와 같이, 기적막을 관통하여 골반에 침습되어 골의 용해를 유도하는 구강편평세포암 세포를 생쥐의 피하에 주입한 경우, 종양의 크기가 증가하였으나, 50 μ g/kg의 CCL28이 함께 주입된 경우 종양의 크기가 증가되는 것이 매우 효과적으로 억제되었다. 나아가, 도 8의 B 및 C에서 보는 바와 같이, 뼈의 총 부피(BV/TV) 및 표면 밀도(BS/BV) 역시, 50 μ g/kg의 CCL28가 함께 주입됨으로써 구강편평세포암 세포의 주입에 의해 증가된 뼈 용해가 억제되는 것을 확인하였다.
- [0351] 도 8의 D에서 보는 바와 같이, 구강편평세포암 세포의 주입으로 인해 종양이 유도된 생쥐의 혈청에서 칼슘, TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 5b, CTX(C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen) 및 ALP(alkaline phosphatase)가 존재하는 수준이 증가되는 현상이 CCL28의 투여에 의해 매우 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.
- [0352] 도 8의 E 및 F에서 보는 바와 같이, H&E 염색 결과, 구강편평세포암 세포의 주입으로 인해 종양이 유도된 생쥐의 종양 성장 및 뼈 침습을 CCL28의 주입으로 인해 억제할 수 있음을 확인하였다. 나아가, TRAP 염색을 통해 상기 생쥐의 머리덮개뼈에서 TRAP- 양성 파골세포의 수가 감소된 것을 확인하였다.
- [0353] 도 8의 G에서 보는 바와 같이, IHC 분석을 통해 CCL28의 투여에 의해 종양의 증식 마커인 Ki67와 혈관 내피 세포 마커인 CD31의 발현이 현저하게 억제되는 반면 RAR β 의 발현이 증가된 것을 알 수 있다.
- [0354] 상기 결과를 통해, CCL28에 의해 RAR β 가 상향 조절 됨으로써, 암 중에서도 특히 구강편평세포암 세포의 뼈 침습이 억제될 수 있음을 알 수 있다.
- [0356] **[실시예 7] CCL28, CCR10 및 RAR β 의 발현 수준과 구강편평세포암 환자에서 뼈 침입 및 전체 생존율과의 상관관계 분석**
- [0357] 뼈 침습이 확인된 117명의 인간 구강편평세포암 환자로부터 유래된 파라핀으로 고정된 조직을 이용하여, CCL28, CCR3, CR10 및 RAR β 에 특이적인 항체를 이용하여 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 면역조직화학염색을 수행하였다. 여기서, 음성 대조군으로, 생쥐의 IgG 또는 토끼의 IgG(DakoCytomation)를 음성 사용하였다. 상기 면역조직화학염색에 따른 단백질의 발현 수준은 히스토스코어(histoscore) 방법을 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 염색된 이미지는 임상의에 의해 염색된 비율에 따라 4 단계(0 내지 3의 범위)로 분류되었다. 상기 0 내지 3의 범위는 0은 염색되지 않은 경우, 1은 연한 갈색으로 염색된 경우, 2는 갈색으로 염색된 경우이며, 3은 진한 갈색으로 염색된 경우에 해당하였다. 아래의 식 2를 통해 상기와 같이 분류된 값을 계산하여 히스토스코어 값을 도출하고, 히스토스코어 값이 0 내지 100에 해당하는 경우 낮은 표현 그룹으로 분류하였으며, 히스토스코어 값이 101 내지 300에 해당하는 경우 높은 표현 그룹으로 분류하여, 그 결과를 도 9의 A 및 B에 나타내었다.
- [0359] [식 2]
- [0360]
$$\text{히스토스코어} = (0 \times \text{백분율 백분율}) + (\text{밝은 갈색 세포의 } 1 \times \text{백분율}) + (2 \times \text{갈색 세포의 비율}) + (\text{어두운 갈색 세포의 } 3 \%)$$
- [0362] 상기 도출된 히스토스코어 값과 임상병리학적 특징과의 상관관계를 분석하여, 그 결과를 표 1에 나타내었다.
- [0363] 또한, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 조직 내에 CCL28, CCR3, CR10 및 RAR β 의 존재 수준에 따른 전체 생존율을 확인하여, 그 결과를 도 9의 C에 나타내었다.
- [0364] 도 9의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 정상 조직에서 CCL28, CCR3, CR10 및 RAR β 의 히스토스코어 값이 1~100에 해당하는 빈도가 매우 높은 반면, 구강편평세포암 조직에서는 히스토스코어 값이 0에 해당하거나 100 이상에 해

당하는 빈도가 증가되는 것을 확인하였다.

[0365]

도 9의 C에서 보는 바와 같이, CCL28, CCR10 및 RAR β 의 존재 수준이 상대적으로 낮은 구강편평세포암 환자에 비하여, CCL28, CCR10 및 RAR β 의 존재 수준이 상대적으로 높은 구강편평세포암 환자에는 전체 생존율이 유의미하게 좋은 것을 확인하였다.

[0366]

나아가, 하기 표 1 및 표 2에서 보는 바와 같이, CCL28, CCR10 및 RAR β 의 발현 수준이 상대적으로 낮은 구강편평세포암 환자에서, 뼈 침습이 있는 경우가 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였다.

표 1

[0367]

	A11 n=117 (%)	CCL28		P	CCR3		P	CCR10		P	RAR β		P
		히스토스코어			히스토스코어			히스토스코어			히스토스코어		
		낮음 n=92 (%)	높음 n=25 (%)		낮음 n=80 (%)	높음 n=37 (%)		낮음 n=55 (%)	높음 n=62 (%)		낮음 n=65 (%)	높음 n=52 (%)	
나이													
<62	58(49.6)	34(58.6)	24(41.4)		42(72.4)	16(27.6)		24(41.4)	34(58.6)		27(46.6)	31(53.4)	
≥62	59(50.4)	46(78.0)	13(22.0)	0.024	50(84.7)	9(15.3)	0.104	31(52.5)	28(47.5)	0.226	38(64.4)	21(35.6)	0.052
성별													
남자	78(66.7)	54(69.2)	24(30.8)		61(78.2)	17(21.8)		36(46.2)	42(53.8)		46(59.0)	32(41.0)	
여자	39(33.3)	26(66.7)	13(33.3)	0.779	31(79.5)	8(20.5)	0.873	19(48.7)	20(51.3)	1	19(48.7)	20(51.3)	0.293
병변 위치(Lesion site)													
혀	23(19.7)	9(39.1)	14(60.9)		16(69.6)	7(30.4)		7(30.4)	16(69.6)		8(34.8)	15(65.2)	
입 바닥	6(5.1)	5(83.3)	1(16.7)		4(66.7)	2(33.3)		3(50.0)	3(50.0)		3(50.0)	3(50.0)	
어금니 뒤 삼각	15(12.8)	11(73.3)	4(26.7)		13(86.7)	2(13.3)		6(40.0)	9(60.0)		8(53.3)	7(46.7)	
잇몸	62(53.0)	48(77.4)	14(22.6)		52(83.9)	10(16.1)		33(53.2)	29(46.8)		40(64.5)	22(35.5)	
볼	11(9.4)	7(63.6)	4(36.4)	0.015*	7(63.6)	4(36.4)	0.32	6(54.5)	5(45.5)	0.397	6(54.5)	5(45.5)	0.189
T 스테이지													
T1-2	41(36.0)	25(61.0)	16(39.0)		29(70.7)	12(29.3)		17(41.5)	24(58.5)		19(46.3)	22(53.7)	
T3-4	73(64.0)	54(74.0)	19(26.0)	0.149	61(83.6)	12(16.4)	0.107	38(52.1)	35(47.9)	0.277	45(61.6)	28(38.4)	0.114
N 스테이지													
N0	67(57.8)	44(65.7)	23(34.3)		52(77.6)	15(22.4)		28(41.8)	39(58.2)		36(53.7)	31(46.3)	
N1-3	49(42.2)	36(73.5)	13(31.0)	0.37	40(81.6)	9(18.4)	0.597	27(55.1)	22(44.9)	0.156	29(59.2)	20(40.8)	0.559
분화(Differentiation)													
Well	28(23.9)	18(64.3)	10(35.7)		21(75.0)	7(25.0)		11(39.3)	17(60.7)		10(35.7)	18(64.3)	
Moderate	70(59.8)	51(72.9)	19(27.1)		56(80.0)	14(20.0)		33(47.1)	37(52.9)		43(61.4)	27(38.6)	
Poor	19(16.2)	11(57.9)	8(42.1)	0.4	15(78.9)	4(21.1)	0.861	11(57.9)	8(42.1)	0.455	12(63.2)	7(36.8)	0.053
히스토스코어 낮음: 0-100 높음: 100-300													

표 2

[0368]

	All n=117 (%)	CCL28 히스토스코어		P	CCR3 히스토스코어		P	CCR10 히스토스코어		P	RAR β 히스토스코어		P
		낮음 n=92 (%)	높음 n=25 (%)		낮음 n=80 (%)	높음 n=37 (%)		낮음 n=55 (%)	높음 n=62 (%)		낮음 n=65 (%)	높음 n=52 (%)	
신경 주위 침습(Perineural invasion)													
No	100(85.5)	65(65.0)	35(35.0)		77(77.0)	23(23.0)		43(43.0)	57(57.0)		51(51.0)	49(49.0)	
Yes	17(14.5)	15(88.2)	2(11.8)	0.057	15(88.2)	2(11.8)	0.296	12(70.6)	5(29.4)	0.035*	14(82.4)	3(17.6)	0.016*
혈관 침습(Vascular invasion)													
No	107(91.5)	72(67.3)	35(32.7)		86(80.4)	21(19.6)		47(43.9)	60(56.1)		58(54.2)	49(45.8)	
Yes	10(8.5)	8(80.0)	2(20.0)	0.408	6(78.6)	4(40.0)	0.133	8(80.0)	2(20.0)	0.029*	7(70.0)	3(30.0)	0.336
뼈 침습(Bone invasion)													
No	50(42.7)	26(52.0)	24(48.0)		35(70.0)	15(30.0)		16(32.0)	34(68.0)		21(42.0)	29(58.0)	
Yes	67(57.3)	54(80.6)	13(19.4)	0.001*	57(85.1)	10(14.9)	0.049*	39(58.2)	28(41.8)	0.005*	44(65.7)	23(34.3)	0.011*
히스토스코어													
낮음: 0-100													
높음: 100-300													

[0369]

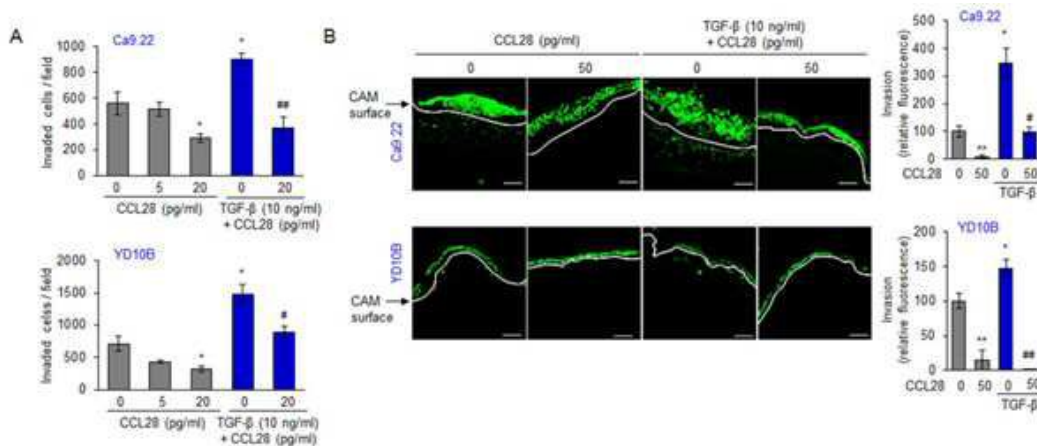
상기 결과를 통해 정상에 비하여 CCL28, CCR10 및 RAR β 의 존재 수준이 낮은 경우에 암 중에서도 특히 구강편평 세포암 환자의 전체 생존율이 낮고, 뼈 침습 가능성이 높아 예후가 매우 나쁠 수 있음을 알 수 있다.

[0371]

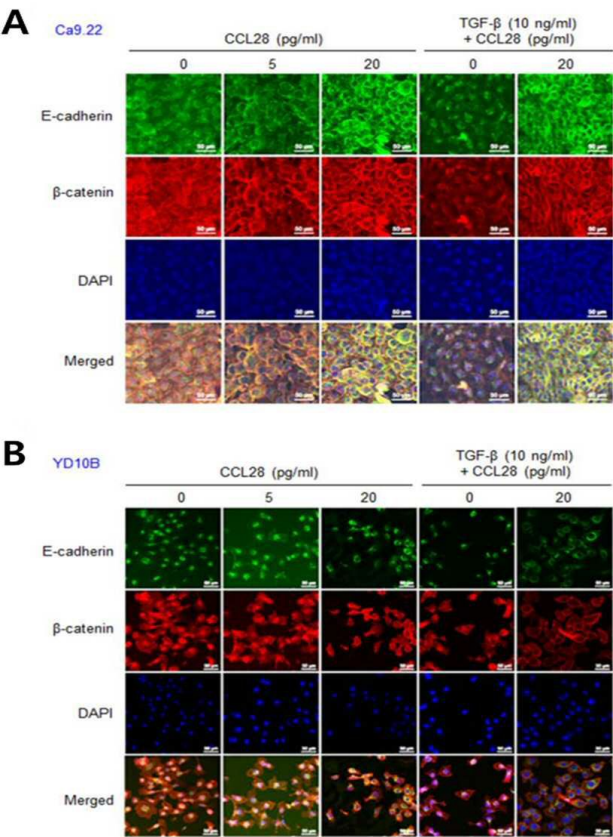
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

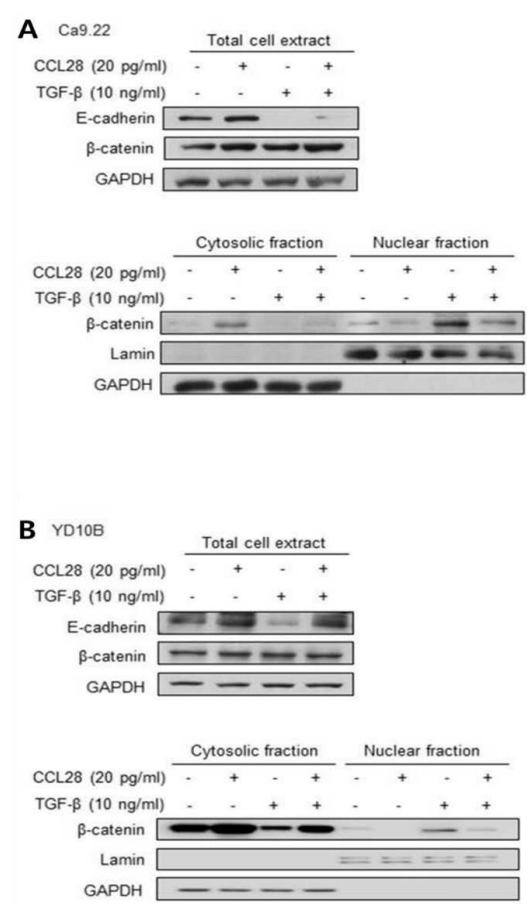
도면1



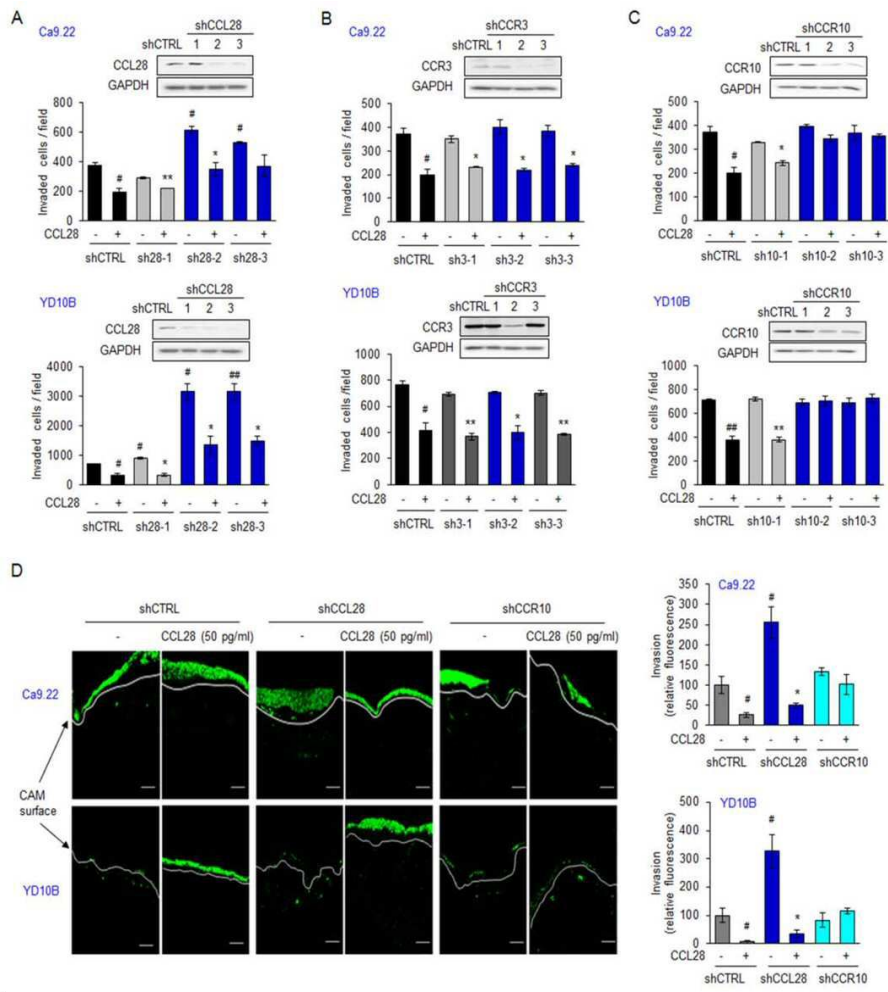
도면2



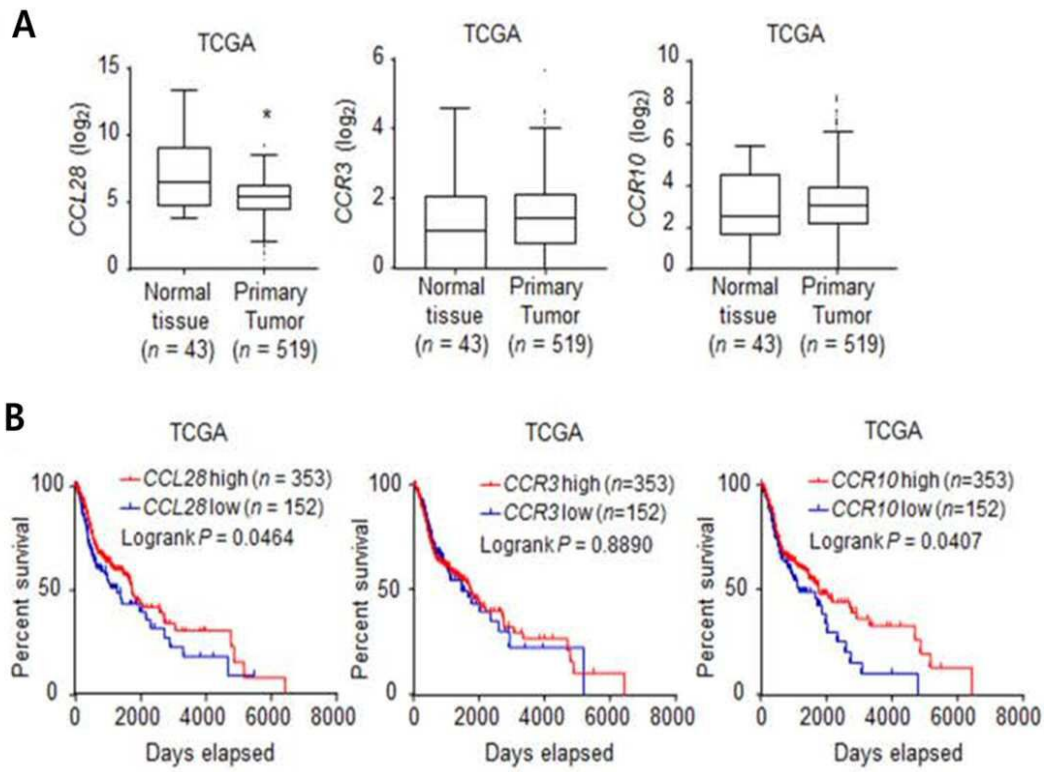
도면3



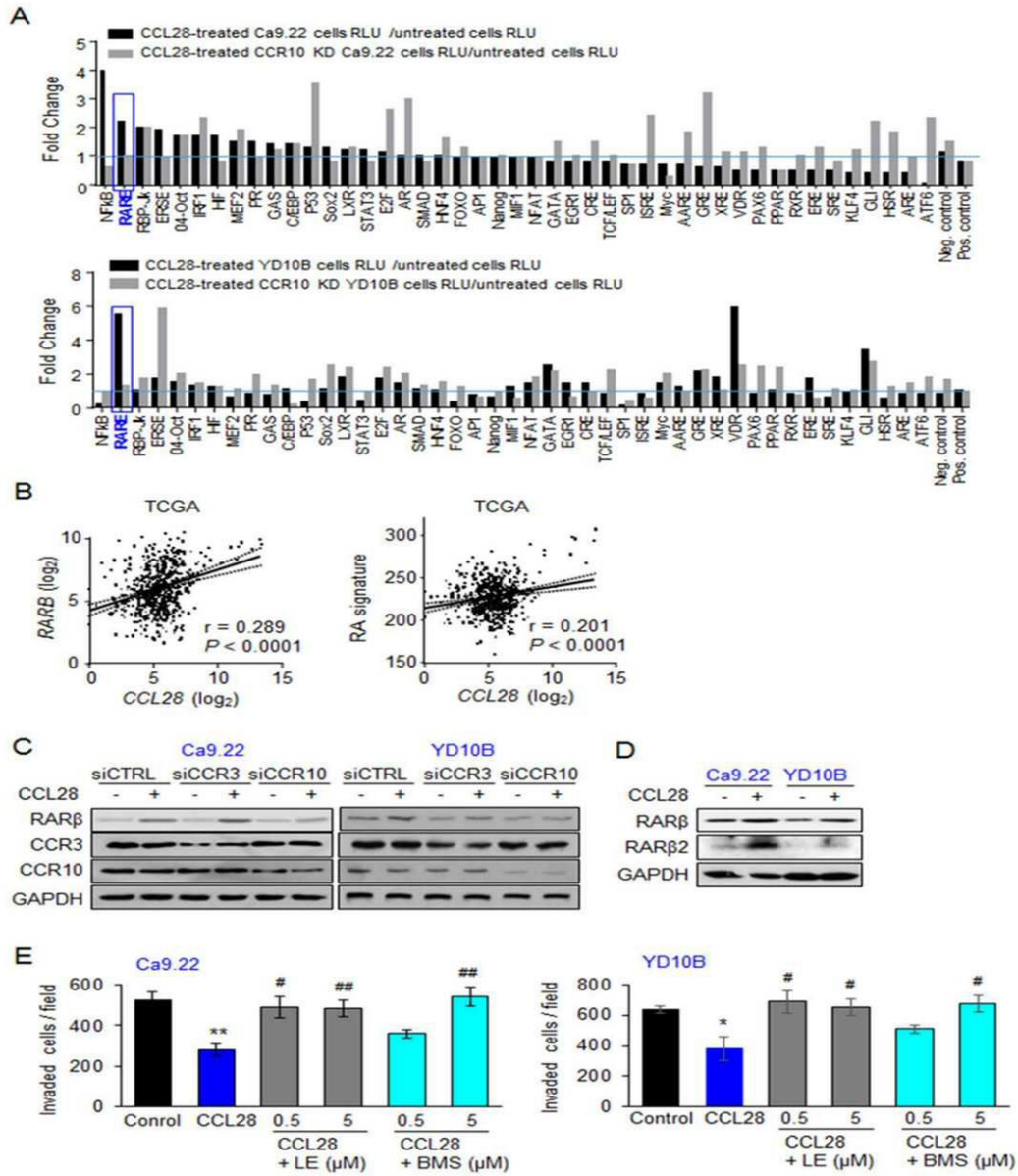
도면4



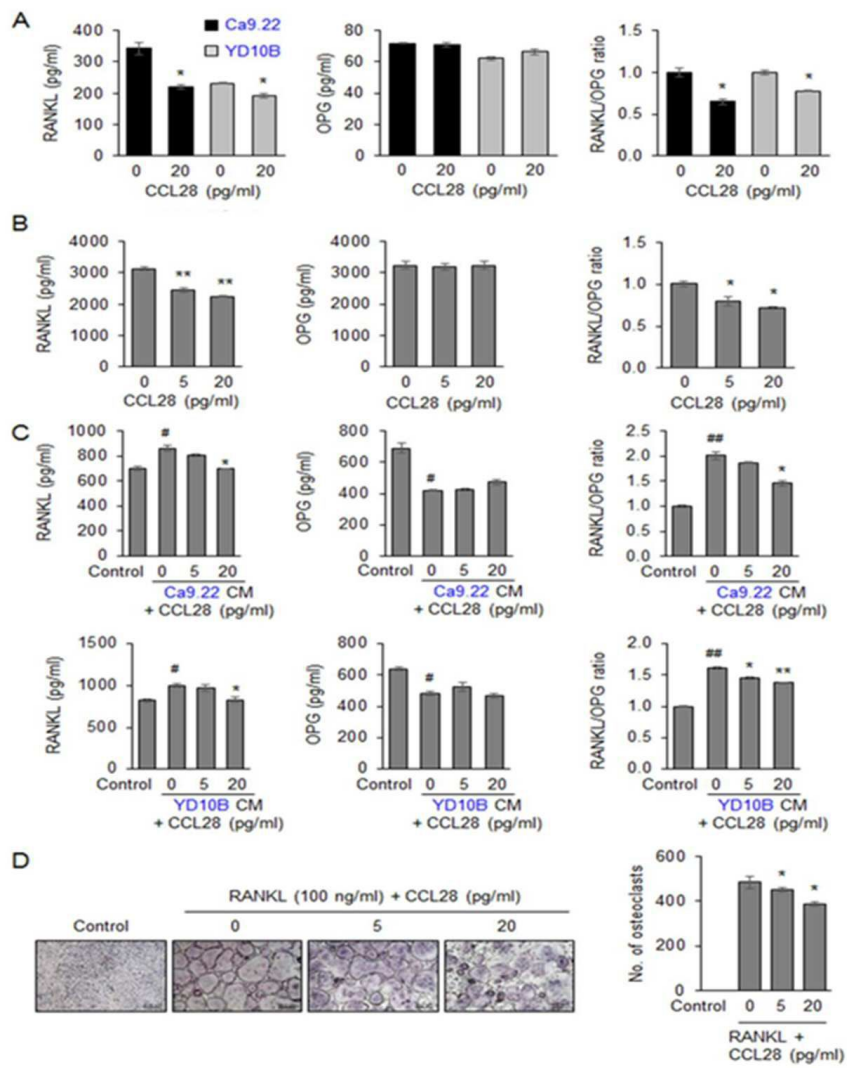
도면5



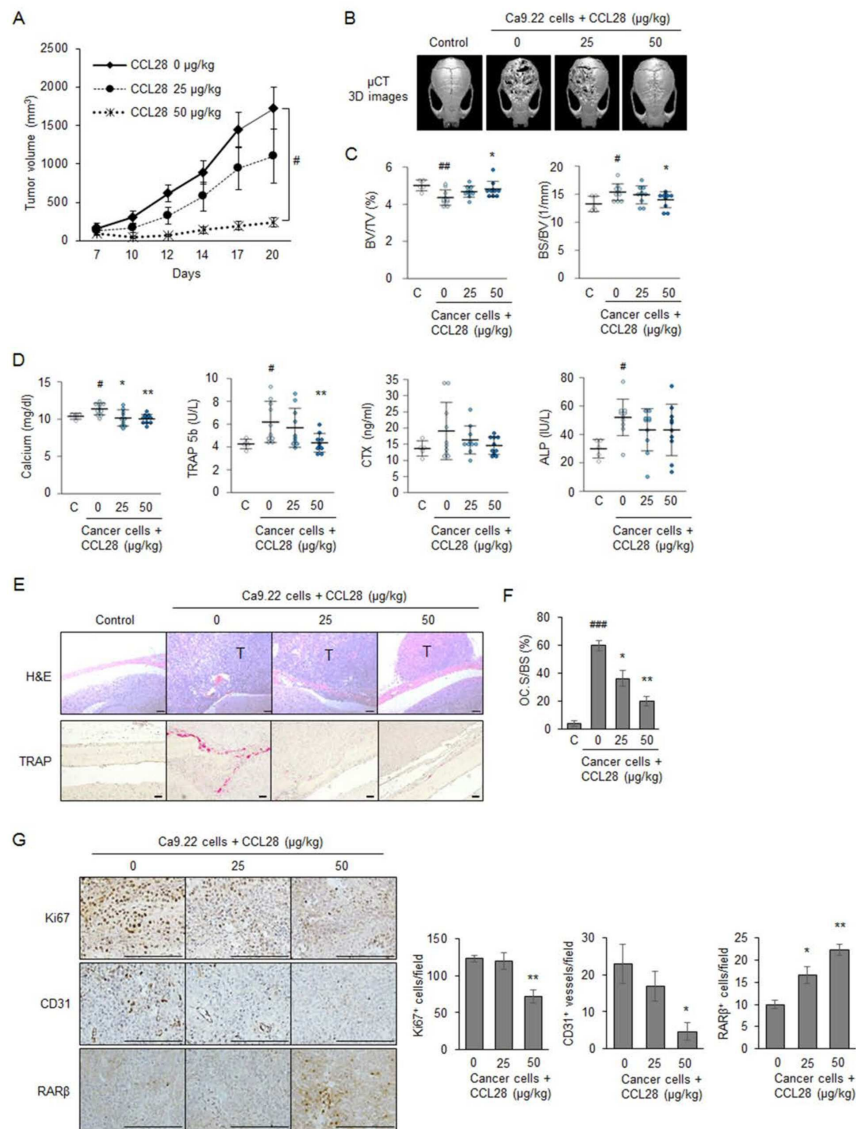
도면6



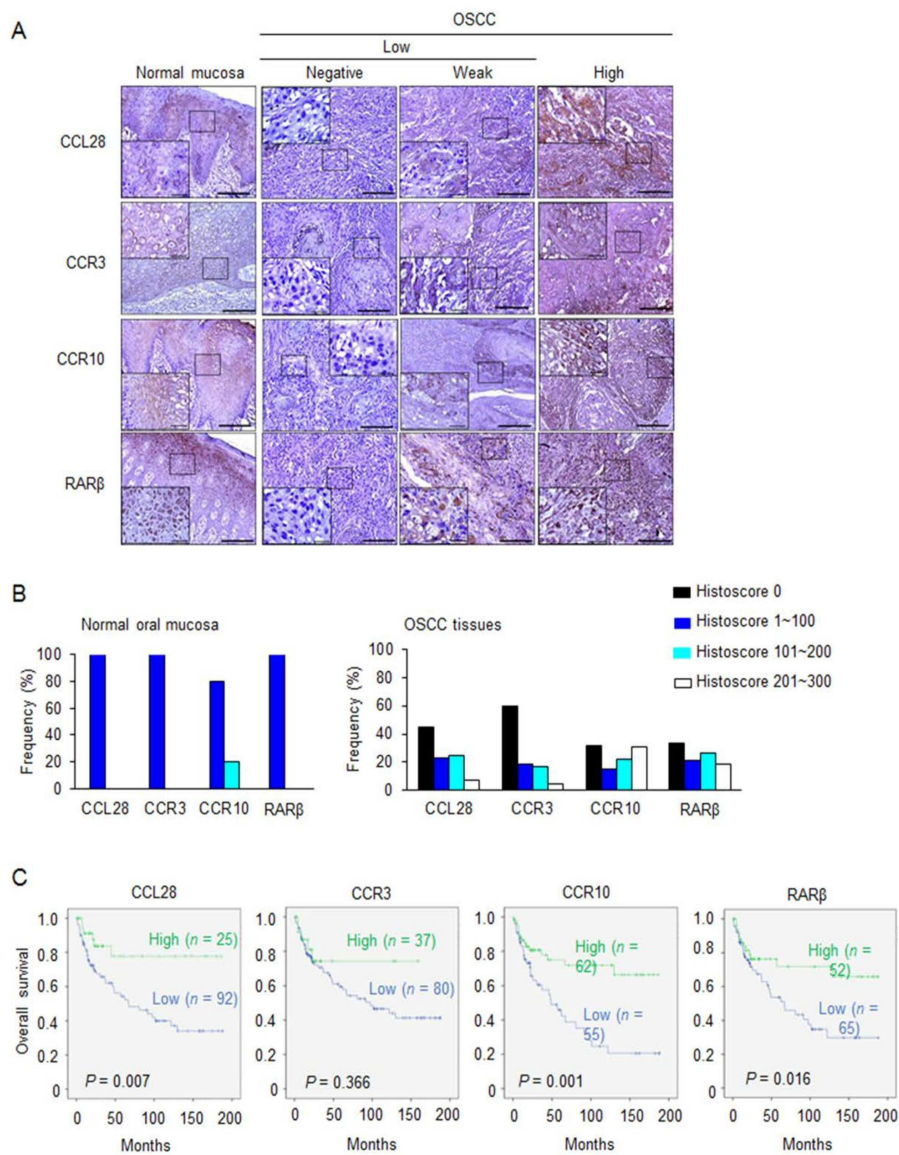
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A Composition for predicting the prognosis of oral carcinoma
- <130> PDPB187307
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 127
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Gln Arg Gly Leu Ala Ile Val Ala Leu Ala Val Cys Ala Ala

1 5 10 15

Leu His Ala Ser Glu Ala Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr

20 25 30

Glu Val Ser His His Ile Ser Arg Arg Leu Leu Glu Arg Val Asn Met

35 40 45

Cys Arg Ile Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile

50 55 60

Leu His Val Lys Arg Arg Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr

65 70 75 80

Val Lys Gln Trp Met Lys Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly

85 90 95

Asn Val Cys His Arg Lys Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg

100 105 110

Ala His Gln Gly Lys His Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr

115 120 125

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCL28 peptide sequence

<400> 2

Ser Glu Ala Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr Glu Val Ser

1 5 10 15

His His Ile Ser Arg Arg Leu Leu Glu Arg Val Asn Met Cys Arg Ile

20 25 30

Gln Arg Ala Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile Leu His Val

35 40 45

Lys Arg Arg Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr Val Lys Gln

50 55 60

Trp Met Lys Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly Asn Val Cys

65	70	75	80
His Arg Lys Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg Ala His Gln			
	85	90	95
Lys His Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr			
	100	105	
<210>	3		
<211>	3126		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	3		
aggacacctt tagcctcatt tectgatcga acagcctcac ttgtgttgct gtcagtgcc			60
gtagggcagg caggaatgca gcagagagga ctgccatcg tggccttggc tgtctgtgcg			120
gccctacatg cctcagaagc catacttccc attgcctcca gctgttgac ggaggtttca			180
catcatatgt ccagaaggct cctggaaaga gtgaatatgt gtcgcatcca gagagctgat			240
ggggattgtg acttggctgc tgtcatcctt catgtcaagc gcagaagaat ctgtgtcagc			300
ccgcacaacc atactgttaa gcagtggatg aaagtgaag ctgccaagaa aaatggtaaa			360
ggaaatgttt gccacaggaa gaaacacat ggcaagagga acagtaacag ggcacatcag			420
gggaaacacg aaacatacgg ccataaaact ccttattaga gagtctacag ataaatctac			480
agagacaatt cctcaagtgg acttggccat gattggttgt aagtttatca tctgaattct			540
ccttattgta gacaacagaa caaaacaaaa tattggtttt taaaaaatga acaattgtgc			600
ggtatgcaa tgtagccaat aatatactca actggaaaat gaaatgaaaa gataatactg			660
gctgggtatg gtggttcaca ctttttatcc cagcacttcg ggaggctgag gcaggaggat			720
cacttgagac caggagtgtg agaccagcct gggcaacata gcaagacctc atttctacaa			780
acaaaaaaaa aattggcccg gcatggtagt acttgccat aatcccagcc acatgggagg			840
ctgaggtggg aggatcactt gagtctggga gagtttgagg ttgcagtgag cagcctgggt			900
gacagaatga gaccctgtct ctaaaaataa taataataat gatagtgtat atcttcatat			960
aatattttaa gaggagcata tagatataac ttctcccaac tttttaatta tagttttcca			1020
aacttacaga gaagttaaaa gaatggtaca atgaacatct atatatcttt caccacaata			1080
ttaatcattg ttaatatgtg gtcacatttg ctttctctct cctctctttg tatgtgtttc			1140
tatataaaat attataactt ttaaaatata tcttgttttg ctaaaccatt tgaaaataag			1200
ttgcaaaaat catgacactt caccctagt ttcttttttg tgttataact tgacatacce			1260

taaaataaag acatTTTTCT acataatcac cttatcagtt ttatacctaa aaaattaata	1320
atttcaccta atatattcca tattcaaatt ttcccaacta tttagagagc attttatgta	1380
gttttttttt cactccagta atcaatcaag gttgacatac atattgcaaa taattgttat	1440
ttttctttaa taictttcaa tctaagaaag ttctctgtc tttttttttt aatttttaaa	1500
attatTTTgt tgaggagggt tcttgctgtg tcttcaggc tggagtgcag tggcacaatt	1560
ttgattttgg ctactgaag cctcaacttc tagggctcaa gcaatcctcc cacctcagcc	1620
tcccagatct ctgggatcaa ggtgcatacc caccacacct ggctaatttt gtttatTTTT	1680
tgtagagaca gggctcact atgttgccca ggttgatctc aaactcctgg gctcaagcga	1740
tcctcccacc ttagcctccc aaagtactgg gattataggt gtgagccaca gtgcctggcc	1800
taattatTTT ctgtgatca aattcagggt taatgtTTTT ggttaagaat ttcctacgtg	1860
aattcgtgta cttatTTTgt catttagagt tcataaatat tagggTTTT tttctaaata	1920
gaatagtTTa aactaaatat aacttcaaaa cgtctagttt gtagtagtac cgttgTTTgg	1980
attgaaattt tctgatactg aaaagaacaa aaagcctgcc tttctgccca gaacctTTTg	2040
cctccccag tcagtTcttg gagcagcact agttaggggc ccagagttcg gccttctgtg	2100
tggatTTTT acgtctgcc taaacaagga gcctacatct tttagctcct attccacct	2160
tctcacagt tttgtTgtt gtttggtTgt tttttttga gacagagtct cactctgttg	2220
cccaggctgg agtgcagtgg cacaatctcg gctcattgca acctccgcct cccgcgttca	2280
agtgattctc ttgcctcagc ctcccaagta actgatatta caggcgccca gccaccacac	2340
cccgtgatt tttgtatTTT tagtagagac ggggtTTTcc cacgttggcc gggtggtct	2400
caaactcttg acctcaagtg aaccacccgc ctgtgcctcc caaagtgtg gaattaccag	2460
cgtgagccac catgccgggc tcacacgttt gaggtagtac cattgtgcca ttcctctTTT	2520
ggcctctTTT ttgtccatag aggcctcaag atagataggt aagagcccag tagtgttcat	2580
aagaagccaa tagagagcag gagccacttt atcagggtggc aggtgtcctg ggcctccctg	2640
ctggctagtc ccaagcgggt gtgttgccag gatgtcttgg aggtgataat gggacacaca	2700
gaggcactga gtctccatag gttaaaatgc caccaaaact ggcctttgcc taatatccct	2760
cattgactat ttagcattta atttatTTat tttctgaca tttctgcaag ctttgtatTT	2820
atatttccac tttatagatg aggaaatttg aggcctcttag aggtaaaatg acttgcccag	2880
gtcacacagg aagtggcaga gacaagcttt ttaaataaga aaaaattaat aaaatataat	2940
atgagagtaa cttaaaatat taataaacca caattttaaa ttaattaacc gtgataacca	3000
acattaataa aagttaagat accaaaacac tgggtgtctaa ttttttcaac taacaacttg	3060
aattatTTTc catTTTaaat taattaaccg tgataaccaa catttaataa agttaagata	3120

ccaaaa

3126

<210> 4

<211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Thr Glu Ala Thr Glu Gln Val Ser Trp Gly His Tyr Ser Gly

1 5 10 15

Asp Glu Glu Asp Ala Tyr Ser Ala Glu Pro Leu Pro Glu Leu Cys Tyr

20 25 30

Lys Ala Asp Val Gln Ala Phe Ser Arg Ala Phe Gln Pro Ser Val Ser

35 40 45

Leu Thr Val Ala Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala

50 55 60

Thr His Leu Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ser Pro Thr Ser Ala His

65 70 75 80

Leu Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro

85 90 95

Phe Ala Ala Ala Gly Ala Leu Gln Gly Trp Ser Leu Gly Ser Ala Thr

100 105 110

Cys Arg Thr Ile Ser Gly Leu Tyr Ser Ala Ser Phe His Ala Gly Phe

115 120 125

Leu Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Val Ala Ile Ala Arg

130 135 140

Ala Leu Pro Ala Gly Pro Arg Pro Ser Thr Pro Gly Arg Ala His Leu

145 150 155 160

Val Ser Val Ile Val Trp Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala

165 170 175

Leu Leu Phe Ser Gln Asp Gly Gln Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg

180 185 190

Leu Ile Phe Pro Glu Gly Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala

195	200	205	
Val Ala Gln Val Ala Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Val			
210	215	220	
Ala Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro			
225	230	235	240
Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe			
245	250	255	
Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ala			
260	265	270	
Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ser Lys Arg Lys			
275	280	285	
Asp Val Ala Leu Leu Val Thr Ser Gly Leu Ala Leu Ala Arg Cys Gly			
290	295	300	
Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu Arg Phe Arg Gln Asp			
305	310	315	320
Leu Arg Arg Leu Leu Arg Gly Gly Ser Cys Pro Ser Gly Pro Gln Pro			
325	330	335	
Arg Arg Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro			
340	345	350	
Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp Asp Asn			
355	360		
<210>	5		
<211>	1244		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	5		
agagatggggc acggaggcca cagagcaggc ttcctggggc cattactctg gggatgaaga		60	
ggacgcatac tcggctgagc cactgccgga gctttgctac aaggccgatg tccaggcctt		120	
cagccggggc ttccaacca gtgtctccct gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa		180	
tggcctggtc ctggccacc acctggcagc ccgacgcga gcgcgctcgc ccacctctgc		240	
ccacctgctc cagctggccc tggccgacct cttgctggcc ctgactctgc ccttcgcggc		300	

agcaggggct cticagggct ggagctctggg aagtgccacc tgccgcacca tctctggcct 360
ctactcggcc tccttcacg ccggttctct ctctctggcc tgtatcagcg ccgaccgcta 420
cgtggccatc gcgcgagcgc tcccagccgg gccgcggccc tccactcccg gccgcgcaca 480
cttggctctc gtcatcgtgt ggctgctgtc actgctcctg gcgctgcctg cgctgctctt 540
cagccaggat gggcagcggg aaggccaacg acgctgtcgc ctcatcttcc ccgagggcct 600
cacgcagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgccaggtg gccctgggct tcgctgtgcc 660
gctgggcgtc atggtagcct gctacgcgt tctgggccgc acgctgctgg ccgccagggg 720

gcccagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgt ggtggctctg gtggcggcct tcgtggtgct 780
gcagctgccc tacagcctcg ccctgctgct ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga 840
gcggagctgc cctgccagca aacgcaagga tgcgcactg ctggtgacca gcggcttggc 900
cctcgcccgc tgtggcctca atccgttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca 960
ggacctgcgg aggtctgtac ggggtgggag ctgccccca gggcctcaac cccgccgcgg 1020
ctgccccgc cgccccgcc tttcttctg ctacgtccc acggagacc acagtctctc 1080
ctgggacaac tagggctcgc aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaaggg 1140

gagtaggtgg gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt 1200
gccacattaa attgataaca tggaaatgag atgcaacca acaa 1244

<210> 6

<211> 336

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ile Tyr Thr Cys His Arg Asp Lys Asn Cys Val Ile Asn Lys Val

1 5 10 15

Thr Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Leu Gln Lys Cys Phe Glu Val

20 25 30

Gly Met Ser Lys Glu Ser Val Arg Asn Asp Arg Asn Lys Lys Lys Lys

35 40 45

Glu Thr Ser Lys Gln Glu Cys Thr Glu Ser Tyr Glu Met Thr Ala Glu

50 55 60

Leu Asp Asp Leu Thr Glu Lys Ile Arg Lys Ala His Gln Glu Thr Phe

65 70 75 80

Pro Ser Leu Cys Gln Leu Gly Lys Tyr Thr Thr Asn Ser Ser Ala Asp

	85	90	95
His Arg Val Arg Leu Asp Leu Gly Leu Trp Asp Lys Phe Ser Glu Leu			
	100	105	110
Ala Thr Lys Cys Ile Ile Lys Ile Val Glu Phe Ala Lys Arg Leu Pro			
	115	120	125
Gly Phe Thr Gly Leu Thr Ile Ala Asp Gln Ile Thr Leu Leu Lys Ala			
	130	135	140
Ala Cys Leu Asp Ile Leu Ile Leu Arg Ile Cys Thr Arg Tyr Thr Pro			
145	150	155	160
Glu Gln Asp Thr Met Thr Phe Ser Asp Gly Leu Thr Leu Asn Arg Thr			
	165	170	175
Gln Met His Asn Ala Gly Phe Gly Pro Leu Thr Asp Leu Val Phe Thr			
	180	185	190
Phe Ala Asn Gln Leu Leu Pro Leu Glu Met Asp Asp Thr Glu Thr Gly			
	195	200	205
Leu Leu Ser Ala Ile Cys Leu Ile Cys Gly Asp Arg Gln Asp Leu Glu			
	210	215	220
Glu Pro Thr Lys Val Asp Lys Leu Gln Glu Pro Leu Leu Glu Ala Leu			
225	230	235	240
Lys Ile Tyr Ile Arg Lys Arg Arg Pro Ser Lys Pro His Met Phe Pro			
	245	250	255
Lys Ile Leu Met Lys Ile Thr Asp Leu Arg Ser Ile Ser Ala Lys Gly			
	260	265	270
Ala Glu Arg Val Ile Thr Leu Lys Met Glu Ile Pro Gly Ser Met Pro			
	275	280	285
Pro Leu Ile Gln Glu Met Leu Glu Asn Ser Glu Gly His Glu Pro Leu			
	290	295	300
Thr Pro Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Glu His Ser Pro Ser Ile Ser			
305	310	315	320
Pro Ser Ser Val Glu Asn Ser Gly Val Ser Gln Ser Pro Leu Val Gln			
	325	330	335

<210> 7
 <211> 3222
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

gtgacagaag tagtaggaag tgagctgttc agaggcagga gggctctatc ttigccaaag 60
 gggggaccag aattcccca tgcgagctgt ttgaggactg ggatgccgag aacgcgagcg 120
 atccgagcag ggtttgtctg ggcaccgtcg gggtaggatc cggaacgcat tcggaaggct 180
 ttttgcaagc atttacttgg aaggagaact tgggatcttt ctgggaaccc cccgccccgg 240
 ctggattggc cgagcaagcc tggaaaatgg taaatgatca tttggatcaa ttacaggctt 300

ttagctggct tgtctgtcat aattcatgat tcggggctgg gaaaaagacc aacagcctac 360
 gtgcaaaaaa aggggcagag ttgatggag ttgggtggac ttttctatgc catttgcctc 420
 cacacctaga ggataagcac ttttcagac attcagtga agggagatca tgtttgactg 480
 tatggatgtt ctgtcagtga gtectgggca aatcctggat ttctacactg cgagtccgtc 540
 ttctgcatg ctccaggaga aagctctcaa agcatgcttc agtggattga cccaaaccga 600
 atggcagcat cggcacactg ctcaatcaat tgaaacacag agcaccagct ctgaggaact 660
 cgtccaagc ccccatctc cacttctcc cctcagagtg taaaaacct gcttcgtctg 720

ccaggacaaa tcatcagggt accactatgg ggtcagcgcc tgtgagggat gtaagggtt 780
 tttccgcaga agtattcaga agaatatgat ttacacttgt caccgagata agaacttgtt 840
 tattaataaa gtcaccagga atcgatgcca atactgtcga ctccagaagt gctttgaagt 900
 gggaatgtcc aaagaatctg tcaggaatga caggaacaag aaaaagaagg agacttcgaa 960
 gcaagaatgc acagagagct atgaaatgac agctgagttg gacgatctca cagagaagat 1020
 ccgaaaagct caccaggaaa ctttccttc actctgccag ctgggtaaat acaccacgaa 1080
 ttccagtgtc gaccatcgag tccgactgga cctgggcctc tgggacaaat tcagtgaact 1140

ggccaccaag tgcattatta agatcgtgga gtttgctaaa cgtctgcctg gtttactgg 1200
 ctgaccatc gcagaccaa ttacctgtc gaaggccgcc tgcctggaca tctgattct 1260
 tagaatttgc accaggtata cccagaaca agacaccatg actttctcag acggccttac 1320
 cctaaatcga actcagatgc acaatgctgg atttggctct ctgactgacc ttgtgttcac 1380
 ctttgcaac cagctcctgc ctttggaat ggatgacaca gaaacaggcc ttctcagtgc 1440
 catctgttta atctgtggag accgccagga ccttaggaa cgcacaaaag tagataagct 1500
 acaagaacca ttgttgaag cactaaaaat ttatatcaga aaaagacgac ccagcaagcc 1560

tcacatgttt ccaaagatct taatgaaaat cacagatctc cgtagcatca gtgctaaagg	1620
tgcagagcgt gtaattacct tgaaaatgga aattcctgga tcaatgccac ctctcattca	1680
agaaatgctg gagaattctg aaggacatga acccttgacc ccaagttcaa gtgggaacac	1740
agcagagcac agtcctagca tctcaccag ctctagtgga aacagtgggg tcagtcagtc	1800
accactcgtg caataagaca ttttctagct acttcaaaca ttccccagta ccttcagttc	1860
caggatttaa aatgcaagaa aaaacatttt tactgctgct tagtttttgg actgaaaaga	1920
tattaaaact caagaaggac caagaagttt tcatatgtat caatatatat actcctcact	1980
gtgtaactta cctagaaata caaacttttc caattttaaa aaatcagcca ttctatgcaa	2040
ccagaaacta gttaaaagct tctattttcc tctttgaaca ctcaagattg catggcaaag	2100
accagtcaa aatgatttac ccctggttaa gtttctgaag actttgtaca tacagaagta	2160
tggctctgtt ctttctatac tgtatgtttg gtgcttttct tttgtcttgc atactcaaaa	2220
taacatgac accaaggtta tgaaatagac tactgtacac gtctacctag gttcaaaaag	2280
ataactgtct tgctttcatg gaatagtcaa gacatcaagg taaggaaaca ggactattga	2340
caggactatt gtacagtatg acaagataag gctgaagata ttctacttta gttagtatgg	2400
aagcttgtct ttgctcttcc tgatgctctc aaactgcatc ttttatttca tgttgcccag	2460
taaaagtata caaatccct gcactagcag aagagaattc tgtatcagtg taactgccag	2520
ttcagttaat caaatgtcat ttgttcaatt gttaatgtca ctttaaatca aaagtggttt	2580
attacttggt taatgacata actacacagt tagttaaaaa aaattttttt acagtaatga	2640
tagcctccaa ggcagaaaca cttttcagtg ttaagttttt gtttacttgt tcacaagcca	2700
ttagggaaat ttcatgggat aattagcagg ctggctctacc acctggacca tgtaactcta	2760
gtgtccttcc tgattcatgc ctgatattgg gatttttttt tccagccttc ttgatgccaa	2820
ggggctaatt aatattaaca actcccaaag aaacaggcat agaactctgcc tcctttgacc	2880
ttgttcaatc actatgaagc agagtgaag ctgtggtaga gtggttaaca gatacaagtg	2940
tcagtttctt agttctcatt taagcactag tggaattttt ttttttgat atattagcaa	3000
gtctgtgatg tactttcact ggctctgttt gtacattgag attgtttgtt taacaatgct	3060
ttctatgttc atatactgtt taccittttc catggagtct cctggcaaag aataaaatat	3120
atttatttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	3222