



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0106744
(43) 공개일자 2010년10월04일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0024872

(22) 출원일자 2009년03월24일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

오역수

서울특별시 서초구 잠원동 잠원한신아파트 2-203

(74) 대리인

구현서

전체 청구항 수 : 총 9 항

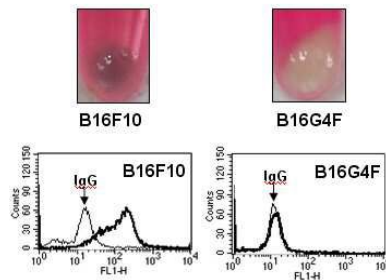
(54) 이동성 피부세포질환 또는 멜라닌 합성관련 질환 예방 또는치료용 조성물

(57) 요약

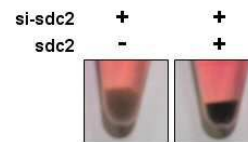
본 발명은 이동성 피부세포질환 또는 멜라닌 합성관련 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도12

A .



B .



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 구성된 신데칸-2를 유효성분으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 이동성 피부질환은 흑색종, 피부색소 증가증, 피부색소 감소증 및 백반증으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 3

서열번호 2로 구성된 신데칸-2 유전자를 유효성분으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 이동성 피부질환은 흑색종, 피부색소 증가증, 피부색소 감소증 및 백반증으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5

서열번호 3 내지 서열번호 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 신데칸-2에 대한 유전자를 유효성분으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 이동성 피부질환은 흑색종, 피부색소 증가증, 피부색소 감소증 및 백반증으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 7

서열번호 1로 구성된 신데칸-2를 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물.

청구항 8

서열번호 2로 구성된 신데칸-2 유전자를 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물.

청구항 9

서열번호 3 내지 서열번호 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 신데칸-2에 대한 유전자를 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 이동성 피부세포질환 또는 멜라닌 합성관련 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부는 크게 피부를 실질적으로 구성하는 keratinocytes 세포와 피부색과 관계된 멜라닌색소를 만들어내는 melanocytes (멜라닌 세포)로 구성되어있다. 정체성인 keratinocyte와는 대조적으로, 멜라닌 세포는 대표적인 이동성 피부세포로서, 이들 세포의 이동성의 비정상적인 증가 또는 감소는 다양한 형태의 질환을 유발하는데, 이를 통틀어 이동성 피부세포질환이라고 한다.

[0003] 이동성 피부세포질환에 대한 연구는 국내보다는 국외에서 훨씬 활발히 진행되고 있는데, 그 이유는 국내보다 훨씬 더 심각한 사회적인 요구 때문이다. 실제로 2002년 유럽의 경우, 약 6만건의 새로운 melanoma (악성흑색종) 환자가 진단되어 1만7천명이 사망했고, 미국에서도 2004년에만 거의 6만건의 새로운 환자가 진단되고 거의 7천여이 이 질환으로 사망할 것으로 예상되고 있다. 미국의 경우, NIH의 NIAMS (www.niams.nih.gov)는 vitiligo (백반증)을 비롯한 전반적인 피부질환의 원인, 치료 및 예방에 대한 연구를 지원하는 체제를 갖추고 있으며, Cold Spring Harbor 연구소의 Scott Lowe 박사를 비롯한 연구팀은 악성흑색종 세포의 세포사멸을 유도하는 Apaf-1 연구의 target으로 삼고 있으며, 피츠버그대학 암연구소는 면역조절물질 histamine dihydrochloride과 interleukin-2에 의한 악성흑색종 환자에 대한 치료효과에 대해 연구하고 있다. IDM 제약회사는 2005년 Aventis사와 합작 개발 중인 흑색종 치료백신 유비덤을, 임상에서 절제수술을 받은 2기와 3기 흑색종 환자를 대상으로 임상2상을 시작하고 있으며, Shering-Plough는 C형 간염치료제로 유럽에서 승인된 Intron A (interferon alpha-2b)를 흑색종 치료제로 개발하는 등 활발한 연구 및 임상을 진행하고 있는 실정이다. 그러나 아직 이동성 피부질환의 근본적인 원인인 세포이동성 제어 측면에서의 연구나 치료제 개발에 대한 기술수준은 빈약한 상태이다.

[0004] 모든 세포의 이동성은 세포의 이동 잠재력과 Extracellular matrix (세포외 기질) remodeling 능력에 의해서 좌우되는데, 이는 세포표면에 존재하는 세포 접착수용체 (cell adhesion receptor)와 세포외 기질의 접착에 의한 신호전달에 의해서 엄격히 조절되고 있다. 생체 내에서 이러한 세포이동성 조절의 실패는 다양한 질병으로 표현되는데, 예를 들어 노화에 따른 세포외 기질의 변화에 의한 멜라닌 세포의 세포이동성의 감소는 세포노화 및 pigmentation (색소침착)을 일으키는 반면, 멜라닌 세포의 이동성의 비정상적인 감소는 백반증을, 멜라닌 세포의 이동성의 비정상적인 증가는 악성흑색종을 일으킨다.

[0005] 백반증은 멜라닌세포의 결핍으로 인하여 여러 가지 크기 및 형태의 하얀색 반점들이 피부에 나타나는 후천적 탈색소 질환 (Le Poole IC, Boissy RE, Sarangarajan R, Chen J, Forristal JJ, Sheth P, Westerhof W, Babcock G, Das PK, Saelinger CB. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2000;36(5):309-19; Yu HS. J Biomed Sci. 2002;9(6):564-73.)으로서, 피부질환 중 가장 흔한 대표적 질환이다. 백반증은 전 인구의 약 1%에서 나타나고 있고 (Whitton ME, Ashcroft DM, Barrett CW, Gonzalez U. Cochrane Database Syst Rev. 2006;1:CD003263), 우리나라에서도 40만 인구가 백반증으로 고통을 받고 있다. 그럼에도 불구하고, 아직까지 백반증은 만족할 만한 치료효과를 거두고 있지 못하여 극히 난치성 질환으로 인식되고 있다.

[0006] 백반증의 주원인 세포인 멜라닌세포는 표피의 밀 부분에 존재하는 세포로 각질세포 10 개마다 1 개가 존재하고 있고, 정상적인 조건에서 멜라닌세포는 각질생성 세포에 색소를 만들어 전달하는 역할을 수행하고 있으므로, 이들의 결핍은 피부를 비롯한 다양한 조직에서 탈색소 질환을 유발한다.

[0007] 백반증의 발생 원인은 아직 미상이나 현재까지 설명되고 있는 원인을 보면, 자가 면역에 의해 유발된다는 면역설, 멜라닌세포 근처에 유리된 신경화학 매개물질의 과다로 이들이 멜라닌세포의 생성과정을 억제하여 세포파괴를 초래한다는 체액설, 그리고 멜라닌 형성과정에서 생긴 중간물질이나 대사물질들이 폐놀복합체로서 이들이 멜라닌세포 내에 축적되어 멜라닌세포를 파괴한다는 멜라닌세포 자가 파괴설이 있다. (Sanli H, Akay BN, Arat M, KoP, Akan H, Beksac M, Ilhan O. Dermatology. 2008;216(4):349-354;Machado Filho CD, Almeida FA, Proto RS, Landman G. Vitiligo:Sao Paulo Med J. 2005;123(4):187-91; Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M, Slominski A, Ellassiuty YE, Kemp EH, Giachino C, Liu JB, Luiten RM, Lambe T, Le Poole IC, Dammak I, Onay H, Zmijewski MA, Dell'Anna ML, Zeegers MP, Cornall RJ, Paus R, Ortonne JP, Westerhof W. Exp Dermatol. 2008;17(2):139-40) 또한 선천적 결함이 있을 때 멜라닌세포가 더 쉽게 손상을 받는다는 유전적

소인도 있다.

- [0008] 그러나 이러한 학설이 독립적으로 작용하기보다는 복합적으로 작용하여 멜라닌세포의 결핍을 유도함으로써 백반증을 일으키는 것으로 생각되어진다.
- [0009] 현재 널리 사용되고 있는 백반증 치료방법은 자외선을 이용한 광선치료가 주류를 이루고 있고(Rivard J, Hessel C, Owen M, Strickland FM, Lim HW, Hamzavi I. Photo adaptation of vitiliginous skin to targeted ultraviolet B phototherapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007;23(6):258-60), 정상적 부위에서 수포를 때어낸 후 백반증 부위에 이식하는 표피 이식이 있다. 약과 연고, 크림 등을 바른 다음 자외선을 투여시키는 광화학요법은 장기간 치료를 요하는 반면, 표피 이식은 단기간에 치료를 끝낼 수 있는 장점이 있으나 비싸다는 경제적인 단점이 있다.
- [0010] 현재 널리 사용되는 광화학요법은 피부를 민감하게 만드는 광감작제인 메톡살렌 (Methoxsalen), 소랄렌 (psoralen)과 같은 약을 먹은 후 자외선을 쬌여주는 치료방법이다. 이 때, 자외선은 경우에 따라서 멜라닌 색소를 재생하기도 한다. 자외선 치료의 경우, 얼굴, 몸통, 팔다리의 위쪽에는 50-70%의 치료효과가 있는 반면, 손발은 치료효과가 적고, 보통 일주일에 두 번씩, 일년 이상의 장기 치료가 필요하다.
- [0011] 지난 수년간, 생화학적, 면역학적, 유전적, 그리고 다양한 생물학적 측면에서 백반증에 대하여 연구되어 왔다. 그럼에도 불구하고 아직까지 정확한 발현 기전은 규명되고 있지 않으며, 또한 자외선을 이용한 광선치료가 널리 이용되고 있지만, 완전한 치료효과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 자외선 조사에 의한 광선치료가 멜라닌세포의 수적인 증가를 가져온다고 하더라도 이는 제한적이고, 부분적인 증가에 지나지 않으며, 더욱이 멜라닌세포의 수적인 증가가 일어난다고 하더라도, 증식된 멜라닌세포가 백반의 병변 부위로 실질적으로 이동하지 않음으로서 백반증 치료의 효과가 거의 없다.
- [0012] 따라서 백반증을 효과적으로 치료하기 위해서는 후천적으로 파괴된 멜라닌세포의 증식을 촉진함과 동시에 백반이 있는 병변 부위로 증식된 멜라닌세포 이동을 유도할 수 있는 방법이 필요하다.
- [0013] 그렇게 하기 위해서는 멜라닌세포 이동 조절기전에 대한 연구를 통해 멜라닌세포의 이동성을 조절하는 새로운 조절인자를 규명함으로써, 실질적으로 멜라닌세포의 이동성을 제어할 수 있는 기반을 마련하는 것이 필요하며, 또한 이러한 기전을 백반증 치료에 응용하기 위해서는 확인된 이동성 조절인자를 제어할 수 있고, 쉽게 적용할 수 있는 천연물질을 스크리닝하는 것이 가장 수월한 방법이라고 생각된다. 만약 이러한 과정이 성공적으로 수행된다면, 자외선 조사에 의한 불완전한 백반증 치료를 획기적으로 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.
- [0014] 백반증 치료의 또 다른 고려사항은 멜라닌 합성 조절이다. 왜냐하면 멜라닌 세포에 의해서 합성된 멜라닌의 함량이 궁극적으로 피부색깔을 결정하기 때문이다. 실제로 멜라닌 합성 조절은 다양하게 피부미백에 응용되고 있다.
- [0015] 피부 미백에 대한 관심은 일찍이 이집트, 그리스, 로마시대부터 꾸준히 이어져 내려왔으며, 우리나라의 역사에서도 쉽게 찾아볼 수 있다. 피부 미백은 특히 웰빙과 맞물려 사회적 관심이 더욱 증가하고 있으며, 25-34세 연령대의 아시아인 절반이 미백 화장품을 사용하기 위해 수십억 달러를 소비하고 있다.
- [0016] 현재 널리 사용되고 미백제에 함유되어 있는 납, 수은, 하이드록시퀴논과 스테로이드 호르몬 등에 의한 유해 가능성이 제기되고 있으며, 직접적인 표백의 부작용에 대한 경계가 높아지고 있다 (Ly F, Soko AS, Dione DA, Niang SO, Kane A, Bocoum TI, Dieng MT, Ndiaye B. *Int J Dermatol*. 2007 46 Suppl1:15-7. Edith Nnoruka and Obiefuna Okoye. *J Natl Med Assoc*. 2006 98(6):934939. Cheng SL, Huang Liu R, Sheu JN, Chen ST, Sinchaikul S, Tsay GJ. *Biol Pharm Bull*. 2006 29(4):655-69). 따라서 독성이 없는 안전한 미백제 개발이 절실히 필요하다.
- [0017] 일반적으로 피부색은 멜라닌세포에서 합성된 멜라닌에 의해서 조절되고 있기 때문에, 세포 독성이 없고 선택적인 멜라닌 합성 제어가 말로 가장 효율적이면서도 근본적인 미백제 개발 전략이다.
- [0018] 따라서 본 발명자들은 세포 표면에 존재하는 세포결합 수용체인 syndecan-2 (신데칸-2)에 의한 멜라닌세포의 세포이동성 등의 조절기전을 규명하고, 신데칸-2 발현 조절을 통해 멜라닌세포의 이동성을 촉진함으로써 백반증과 같은 이동성 피부세포질환 치료를 위한 세포이동성 조절물질을 개발하고자 한다.
- [0019] 또한 신데칸-2에 의한 멜라닌 합성 조절 기전을 규명하고, 신데칸-2 발현 조절 물질을 규명함으로써 향후 멜라닌 합성 조절을 이용한 미백제 개발 가능성을 제시하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0020] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 이동성 피부세포질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 미백용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0022] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 구성된 신데칸-2 단백질을 유효성분으로 하는 이동성 피부질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 구체예에 있어서, 상기 이동성 피부질환은 흑색종, 피부색소 증가증, 피부색소 감소증 및 백반증으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 또한 본 발명은 서열번호 2로 구성된 신데칸-2 유전자를 유효성분으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0025] 서열번호 3 내지 서열번호 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 신데칸-2에 대한 유전자를 유효성분으로 하는 이동성피부질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 서열번호 1로 구성된 신데칸-2를 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.
- [0027] 또 본 발명은 서열번호 2로 구성된 신데칸-2 유전자를 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한 본 발명은 서열번호 3 내지 서열번호 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 신데칸-2에 대한 유전자를 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 신데칸-2 단백질은 서열번호: 1에 개시된 아미노산 서열 뿐 아니라 그 단백질의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 본 발명에서 목적한 신데칸-2의 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 단백질의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [0030] 본 발명에서 폴리펩티드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율 (예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시에 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 Proc. Natl Acad. Sci USA85:2444-2448), 및 BLAST (BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA) 로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) 에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.
- [0031] 또, 본 발명에는 서열번호 1의 아미노산서열을 가진 신데칸-2를 코딩하는 유전자가 포함되고, 그 유전자서열로서는 서열번호 2로 표시되는 것을 들 수 있다.
- [0032] 또, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 신데칸-2의 돌연변이체를 코딩하는 유전자 뿐만 아니라, 서열번호 1의 아미노산 서열을 변이시켜서 얻게 되는 상기 변이 신데칸-2 단백질을 코딩하는 변이 신데칸-2 유전자도 본 발명에 관한 유전자에 포함된다.
- [0033] 본 발명의 siRNA의 경우에도 서열번호 3 내지 6에 기재된 유전자 뿐 아니라, 이들의 변이에 의하여 생성된 신

데칸-2의 활성화에 영향을 미치는 모든 siRNA를 포함하는 유전자도 본 발명의 보호 범위에 포함된다.

- [0034] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0035] 본 발명의 펩타이드, 유전자 또는 화합물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용
- [0036] 화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드, 유전자 또는 화합물을 함유하는 화장품 이외에도 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.
- [0037] 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다.
- [0038] 또한, 포말 (foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 펩타이드, 유전자 또는 화합물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형
- [0040] 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 멜라닌 생성 억제제의 구체적인 제형으로서는 시럽제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 액제 또는 현탁제 등이 이용가능하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 아울러, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.
- [0045] 아울러, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 흑색종 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 약학적 조성물은 경구투여용 제형, 예를 들면 정제, 산제, 캡슐제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제; 또는 연고제 등의 다양한 제제로 제형화 할 수 있다. 통상적인 담체를 사용하여 제조된 약학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로 예를 들면, 피부 또는 국소 적용할 수 있다. 또한, 상기 유효성분의 투여 용량은 환자의 나이, 상태 등에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 성인에게 1일에 10 ~ 500, 바람직하게는 50 ~ 300 mg 양이 투여되도록 하며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 수회, 바람직하게는 1회 내지는 6회 분할 투여할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 펩타이드들은 피부약학적 및/또는 화장품학적 활성 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 그러한 조성물은 본 발명의 펩타이드를 본 발명의 펩타이드 및 벌크제(bulk agent)의 중량을 기준으로 0.5 ppm 내지 5,000 ppm(w/w), 바람직하게는 1 ppm 내지 1,000 ppm(w/w) 범위의 유효량으로 함유한다.
- [0048] 본 발명의 펩타이드들은 용액, 분산액 또는 에멀전 형태; 또는 담체, 예를 들면 매크로캡슐, 마이크로캡슐 또는 나노캡슐, 리포솜 또는 사일로마이크론 (chylomicron)에 캡슐화된 형태; 매크로입자, 마이크로입자 또는 나노입자, 또는 미세진균 (microfungus)에 봉입된 형태 (enclosed form); 또는 분말 유기 폴리머, 탈크, 벤토나이트 (bentonite), 및 기타 무기담체에 흡착된 형태로서 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 펩타이드들은 임의의 생약 형태 (galenic form), 예를 들면 에멀전, 밀크, 로션, 연고, 점성 젤라틴질의 리프팅 (lifting) 에멀전화 폴리머, 포마드 (pomade), 샴푸, 비누, 겔, 파우더, 스틱, 스프레이, 바디오

일, 페이스 마스크, 또는 경피용 (transdermal application) 고약 형태로 사용될 수 있다.

- [0050] 본 발명의 펩타이드들은 기타 통상적으로 사용되는 성분, 예를 들면 추출 지질 및/또는 합성 지질, 점성 젤라틴질의 리프팅 에멀전화 폴리머, 수용성 또는 지용성 활성제, 식물 추출물, 조직 추출물 (tissue extract), 해양 추출물 (marine extract), 햇빛 차단제 (sun protection agent), 항산화제, 보습제, 및 차단제 (barrier agent), 그리고 피부 소생 활성제 (skin-revitalizing active)와 함께 사용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 펩타이드들은 백반증, 피부미백, 피부암 등에 관련된 약품 및/또는 화장품 용도로 상기 질환을 예방하고, 상기 질환의 진행을 예방하는 모든 피부 관련 제품에 사용된다.
- [0052] 본 발명의 펩타이드들이 피부 미백용 화장품 조성물로 사용되는 경우에 그 물질을 0.001 내지 5%(w/w), 바람직하게는 0.01 내지 3%(w/w) 함유한다. 0.001% 미만의 농도에서는 실질적인 미백효과를 기대하기 어렵고, 5% 농도를 초과하는 경우에는 낮은 용해도로 인하여 제형 및 제품의 안정성에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있기 때문이다.
- [0053] 본 발명의 피부 미백용 조성물을 제조하는 경우에 용매로서 에탄올, 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 글리세레스-26, 메틸글루세스-20, 이소세틸미리스테이트, 이소세틸옥타노에이트, 옥틸도데실미리스테이트, 옥틸도데칸올, 이소스테아릴이소스테아레이트, 세틸옥타노에이트 및 네오펜틸글리콜디카프레이트 중에서 선택된 1종 이상을 이용한다. 이러한 용매를 사용하여 본 발명의 조성물을 제조하는 경우 화합물의 종류에 따라, 용매의 혼합비에 따라 용매에 대한 화합물의 용해도가 조금씩 다르나, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자라면 제품의 특성에 따라 용매의 종류 및 사용량을 알맞게 선택하여 적용할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 조성물은 피부외용연고나, 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 팩 등의 화장품 형태로 제조될 수 있다. 여기에서 피부외용연고는 본 발명의 유효성분 이외에 바셀린 50.0 내지 97.0중량% 및 폴리옥시에틸렌올레일-에테르 포스페이트 0.1 내지 5.0중량%를 함유하도록 제조되며, 유연화장수는 프로필렌글리콜, 글리세린 등의 다가알콜류 1.0 내지 10.0중량% 및 폴리에틸렌올레일에테르, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유 등의 계면활성제 0.05 내지 2.0중량%를 함유하도록 제조된다. 영양화장수 및 영양크림은 본 발명의 펩타이드의 유효성분 이외에 스쿠알란, 바셀린, 옥틸도데칸올과 같은 오일류 5.0 내지 20.0중량% 및 세탄올, 스테아릴알콜, 밀납 등의 왁스성분 3.0 내지 15.0중량%를 함유하고, 에센스는 글리세린, 프로필렌글리콜 등 다가알콜류 5.0 내지 30.0중량%를 함유한다. 마사지크림은 화학식 1 또는 2의 유효성분 이외에 유동과라핀, 바셀린, 이소노닐이소노나노에이트 등의 오일을 30.0 내지 70.0중량% 함유하여 제조되며, 팩은 폴리비닐알콜을 5.0 내지 20.0중량% 함유하는 필오프 팩 또는 일반 유화형 화장료에 카올린, 탈크, 산화아연, 이산화티탄 등의 안료가 5.0 내지 30.0 중량% 함유된 워시오프 팩으로 제조된다.
- [0055] 본 발명에서 사용된 약자는 다음과 같은 의미를 가진다: α -MSH, α -멜라닌 세포 stimulating hormone; FGF, fibroblast growth factor CD, conditioned media; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECM, extracellular matrix FAK, focal adhesion kinase; FBS, fetal bovine serum; SFM, serum-free medium.
- [0056] 신데칸-2 발현에 의한 멜라닌세포 이동성 조절 및 멜라닌 합성 조절을 기전을 규명하기 위해, ① 일차적으로 멜라노마 또는 멜라닌 세포에서 신데칸-2 발현 변화에 따른 세포이동성 조절기전을 규명하고, ② 신데칸-2 발현 변화에 따른 멜라닌 합성 조절 기전을 규명하며, ③ 신데칸-2에 의한 멜라닌 세포 이동성 및 멜라닌 합성 조절기전을 동물 모델에서 검증하고자 한다.
- [0057] 신데칸-2는 세포표면에 존재하는 세포결합 수용체로, 본 발명자의 연구결과를 보면 대장암, 멜라노마, sarcoma 등의 다양한 암에서 발현이 증가되어 세포의 이동을 촉진하는 것으로 확인되었다. 신데칸-2의 발현과 멜라닌세포에서의 세포이동성 조절은 상당한 연관성을 가지는 것으로 생각된다. 먼저 멜라노마 세포주인 B16 세포주에 신데칸-2를 과발현시키거나, 또는 신데칸-2 siRNA를 이용하여 신데칸-2 발현을 감소시킨 후, FACS와 transwell migration assay를 통해서 신데칸-2의 발현 변화와 이에 따른 멜라노마 세포의 세포이동성을 조사하였다. 이때, 신데칸-2 발현 변화는 신데칸-2 항체를 이용한 FACS를 이용하여 확인하고, 세포이동성은 transwell을 이용한 cell migration assay를 이용하여 분석하였다. FACS 결과와 migration assay 결과를 종합하여 신데칸-2 발현과 멜라닌 및 멜라노마 세포의 세포이동성의 상관성을 규명하였다.
- [0058] Primary 멜라닌 세포를 이용하여 멜라노마 세포와 동일한 실험을 수행함으로써 신데칸-2 발현에 의한 멜라닌세포 이동성 조절 여부를 검증하였다(도 11 참고).
- [0059] 피부조직에서 멜라닌 세포는 keratinocytes에 의해서 조절되고 있다. 따라서 transwell을 통한 세포의 이동성과 keratinocytes들이 존재하는 피부조직에서의 멜라닌세포의 이동성은 동일하지 않을 가능성이 높다. 따라서

keratinocyte로 구성된 인공피부에서 천연물에 의한 멜라닌세포의 이동성 효과를 검증하고자한다(도 10).

[0060] 인공피부는 collagen matrix 상에 일정 비율의 keratinocytes와 멜라닌 세포s를 혼합하여 배양함으로써 정립하고 멜라닌 세포의 이동을 tissue section과 항체염색을 통하여 확인하고자 한다(도 10A). 또한 백반증을 치료하기 위해 사용하는 UVB가 멜라닌 세포의 이동성에 미치는 영향을 조사하기 위해 먼저 UVB로 전처리된 keratinocyte와 멜라닌세포를 같이 배양함으로써, UVB의 영향을 규명하고 (도 10B), 그 뒤 순차적으로 선별된 천연물을 이용하여, keratinocyte를 통한 멜라닌세포의 세포이동성에 미치는 영향을 확인함으로써 천연물의 효과 등을 검증하고자 한다(도 10C). 멜라닌세포의 염색은 멜라닌을 함유하고 있는 세포의 특징을 이용하여 선택적으로 염색한다.

[0061] 또한 본 발명자들은 흑색종에서 신데칸-2의 기능을 밝혔다. 신데칸-2의 과발현은 흑색종 세포의 이동 및 침습을 증가시켰고, 신데칸-2 수준을 small inhibitory RNA들을 사용하여 녹다운할 때 그 반대효과가 관찰되었다. 신데칸-2 발현은 흑색종 세포 이동을 촉진하는 것으로 알려진 fibroblasts growth factor-2에 의하여 증가되었지만, α -멜라닌 세포 stimulating hormone은 신데칸-2 발현 및 흑색종 세포 이동 및 침습을 멜라닌-합성과 비의존적으로 감소시켰다. 또 신데칸-2 과발현은 α -MSH 처리에 의하여 유도된 이동 결손을 회복하였다. 이들 데이터들은 신데칸-2가 흑색종 세포의 이동성에 중요한 역할을 한다는 것을 강력하게 제안한다.

[0062] A. 백반증과 세포이동성:

[0063] 백반증은 멜라닌 세포의 결핍으로 인하여 여러 형태의 백색반점이 피부에 나타나는 후천적 탈색소 피부질환 중 가장 대표적 질환으로서 전 인구의 약1%에서 나타난다. 치료는 장파장의 자외선을 이용한 자외선 치료법으로 비교적 호전되는 효과를 낼 수 있지만 1주 2-3회 정도의 빈도로 적어도 100회 이상의 장기적인 치료가 시행되어야 하고, 피부이식, 흡입수술 등의 외과적 치료도 일부 효과를 보인 경우도 있으나 아직까지 백반증은 만족할만한 치료효과를 기대하지 못하는 난치성질환으로 간주되고있다. 치료가 불가능한 가장 근본적인 이유는 치료 후 주변 멜라닌 세포들이 적절히 이동되어야하는데, 이러한 세포이동이 조절되지 못하기 때문이다. 따라서 멜라닌 세포이동성을 증가시키는 획기적인 기술의 개발이 백반증 치료에 필수적이다.

[0064] B. 악성흑색종과 세포이동성:

[0065] 피부암 중, 가장 악성도가 높은 악성흑색종은 멜라닌 세포가 악성화된 종양으로, 연간 발생수는 1000-1500명 전후(인구 10만명당 1-1.5명)이며 해마다 증가하는 경향이다. 악성흑색종도 다른 암과 마찬가지로 조기발견, 조기치료가 중요한데, 가장 중요한 치료수단은 수술에 의한 외과치료이지만, 악성흑색종은 세포이동성이 매우 강하여, 초기 발병소만을 절제하게 되면 그 주위에서 상당히 높은 확률로 종양이 재발하는 특징을 가지고 있다. 따라서 악성흑색종을 치료하기 위해서는 먼저 이들의 세포이동성을 억제하는 기술의 개발이 필수적이다.

[0066] C. 기타 멜라닌 세포 이동성 관련 질병:

[0067] 멜라닌 세포의 세포이동성의 변이는 눈, 귀, 표피 등의 다양한 조직에서 다양한 형태의 악성흑색종과 백반증을 유도하기 때문에 멜라닌 세포의 세포이동성 제어기술의 필요성이 크게 증가하고 있다.

[0068] D. 흡착수용체 신데칸과 멜라닌 세포 세포의 세포이동성:

[0069] 신데칸은 세포표면에 존재하는 세포와 세포의 기질의 결합을 조절하는 세포접착 수용체 중의 하나이며, 동시에 세포의 기질의 구성성분으로서 세포의 증식, 이동 분화 등 다양한 생리활성을 적극적으로 조절하고 있다. 특히 세포의 이동성에 관여하는 세포의 기질의 remodeling과 세포이동성 조절에 필수적인 세포골격 변화를 동시에 직접 조절할 수 있는 유일한 수용체이다. 본 발명자들이 수년간 수행하여온 암세포의 세포이동성 조절에 대한 연구를 통하여, 세포이동성이 낮은 정상상피세포에는 발현이 되지 않은 신데칸-2가 세포이동성이 높은 암세포에서는 발현이 증가되어 세포의 이동성을 조절한다는 사실을 확인하였다. 즉 암화과정에서 세포이동성을 억제하는 수용체가 사라지고, 세포이동성을 증가시키는 수용체의 발현이 증가되는, 수용체 치환 (receptor exchange)에 의해 암세포의 세포이동성이 증가되는 것이다. 이러한 현상과 유사하게, 신데칸-2의 발현증가는 멜라닌 세포의 세포이동성을 증가시켰으며, 신데칸-2의 발현 억제는 멜라닌 세포의 세포이동성을 감소시키는 것으로 확인되었다. 이는 신데칸-2 발현 조절만으로도 멜라닌 세포의 세포이동성을 조절할 수 있다는 사실을 시사하는 것이다.

[0070] 본 발명은 생리활성 단백질 응용 기술로서 멜라닌 세포 세포이동성의 비정상적인 변화에 의해 유발되는 대표적인 피부질환인, 색소침착, 백반증 및 악성흑색종을 치료하는 치료제 개발을 위해, (1) 세포 접착수용체의 치환을 이용한 세포이동성을 조절하는 기초연구를 바탕으로 효과적인 세포이동성의 제어원리를 규명하고,

(2) 신데칸을 비롯한 세포결합수용체의 발현 및 세포이동성을 제어하는 기술을 확립하여, 이를 이용한 효과적인 멜라닌 세포 이동성 제어물질을 찾아 멜라닌 세포 이동 제어기전을 통하여 세포이동성 피부질환 치료제를 개발하는데 그 목적이 있다.

- [0071] 멜라닌 세포의 이동성의 비정상적인 변이는 피부에서는 백반증, melanosia (피부색소증가증), leukoderma (피부색소감소증), 및 악성흑색종 등의 다양한 피부질환을 유발하고 있고, 또한 멜라닌 세포 세포 이동성의 제어 없이는 이러한 피부질환의 치료가 불가능하다는 사실 때문에, 멜라닌 세포의 세포이동성 제어기술은 피부질환 치료제 개발의 핵심적인 기술이다. 멜라닌 세포의 세포이동성의 변이는 눈, 귀, 표피 등의 다양한 조직에서 다양한 형태의 악성흑색종, 백반증, Harada's syndrome, Waardenburg syndrome 등의 질병의 원인이 되기 때문에 멜라닌 세포의 세포이동성 제어기술은 다양한 질병의 치료제 개발에 응용될 수 있다. 또한 세포이동성의 이상은 천식, 관절염, 치매, 동맥경화, 암 등의 발병원인이 되기 때문에, 본 과제에 연구결과를 이용한 세포이동성 제어기술은 다양한 질병의 치료제 개발에도 광범위하게 활용되는 응용성을 가지는 등, 응용 생명과학 분야에 다양하게 적용할 수 있는 기술 기반성을 갖는다.
- [0072] 일반적으로 피부질환치료제를 개발하기 위해서는 다양한 접근 방법이 가능하지만, 본 발명의 이동성 피부세포 질환의 경우는 궁극적으로 세포이동성을 제어하지 않으면 치료가 불가능하기 때문에, 실질적인 치료 목적을 위해서는 이동성제어기술의 개발이 가장 본질적이고 핵심적인 기술이다.
- [0073] 세포표면 수용체는 기질선택성 및 기능 특이성이 높고, 세포표면에 존재하기 때문에 개발된 약의 작용점이 세포 외부라는 장점 때문에, 선택성 있는 신약개발의 가장 좋은 target이라고 널리 인정되고 있다. 따라서 가장 효율적이면서도 선택적인 세포이동성 제어를 위해서는 세포 접착수용체 제어기술 개발이 가장 핵심적인 기술이다. 실제로 특정 기능을 갖는 생리활성 수용체 치환 기술은 생화학 및 세포생물학적 기술들은 현대 생명공학의 핵심기술로서 피부질환 뿐만 아니라 다양한 질병에 관여하는 유전자 및 단백질의 기능 조절에 필수적으로 적용되는 기술이며, 부작용을 최소화하면서 효율을 극대화 할 수 있는 피부질환치료제 개발의 핵심기술이다.
- [0074] 세포이동성은 세포의 기질의 remodeling과 세포내부의 세포골격의 변화에 의해서 복합적으로 조절되고 있는데, 이 두 가지를 직접 제어할 수 있는 접착수용체는 신데칸이 유일하다. 따라서 신데칸에 의한 세포이동성 제어는 가장 효율적, 핵심적 제어기술이다.
- [0075] 본 발명자들은 흑색종을 사용한 신데칸-2의 종양형성 활성화에 대한 증거를 제공한다. 본 발명자들은 인간 흑색종으로부터 유래한 조직 샘플에서는 신데칸-2 발현을 동정하였지만 정상 멜라닌 세포에서는 그 발현을 확인하지 못 하였다(도 2A). 유사하게, 신데칸-2 발현은 테스트한 모든 흑색종 세포주에서 증가하였다(도 2B). 증가된 신데칸-2 발현은 증가된 흑색종 세포 이동과 상관관계가 있으나 siRNAs를 사용하여 신데칸-2 발현이 억제된 경우에 그 반대 효과가 관찰되었다(도. 3 & 4). 따라서, 신데칸-2는 암세포에서 일반적인 전-종양형성(pro-tumorigenic) 부착 수용체로서 작용하는 것을 나타낸다.
- [0076] 멜라닌 세포 및 흑색종 세포는 흑색종 세포의 이동에서 중요한 역할을 하는 수용체인 신데칸-2의 세포 표면 발현이 다르다. 흥미롭게도, 신데칸-2 발현은 멜라닌 합성을 촉진하는 뇌하수체-유래 펩타이드인 α -MSH에 의하여 조절되었다. 이러한 결과는 α -MSH에 의한 신데칸-2 발현의 감소는 흑색종 세포의 이동을 억제한다는 것을 나타낸다(도 7). FGF-2는 신데칸-2 발현을 증가시켜, 흑색종 세포의 이동을 증가시킨 반면(도 6), BPE 또는 α -MSH는 신데칸-2 발현을 억제하여 흑색종 세포 이동을 감소시켰다(도 6 & 7). 흥미롭게도, α -MSH-매개된 신데칸-2 발현은 멜라닌 합성과 독립적으로 일어난다(도 8). 따라서 α -MSH는 세포 이동 및 멜라닌 생합성 경로에서 신데칸-2 발현의 조절에서 독자적인 역할을 한다.
- [0077] 세포 표면 부착 수용체인 신데칸-2는 흑색종 세포의 이동 능력을 조절하는데도 중요한 역할을 한다. 또 α -MSH는 멜라닌 생합성 경로와 독립적으로 신데칸-2의 발현을 억제하고, 동시에 세포 이동을 저해한다. 이러한 발견들은 종양의 전이 능력에 대한 단서를 제공하고 흑색종의 전이를 감소시키는 새로운 약제의 개발하는 방법에 기여할 수 있다.
- [0078] 또한 신데칸-2가 멜라닌 합성 조절에 관여한다는 사실도 확인하였다. 악성 흑색종과 악성 흑색종에 비하여 신데칸-2의 발현이 상대적으로 낮은 정상 피부세포 (멜라닌 세포)에 신데칸-2를 과발현 시킴으로써, 신데칸-2에 의한 멜라닌 합성량의 변화를 관찰함으로써 암화 및 암 활성화에 역할을 하는 신데칸-2가 흑색종 및 멜라닌 세포에서 멜라닌 색소의 침착을 유도하는지를 조사하였다.
- [0079] 또한 조직면역염색을 이용한 신데칸-2에 의한 멜라닌 합성 변화 관찰을 다음과 같이 수행하였다; 신데칸-2가 과발현 되었을 때, 실제로 조직에서 증가된 멜라닌을 관찰하기 위하여 신데칸-2 및 melanosome marker

(HBM-45)를 이용한 면역염색을 통하여 이들의 상관관계를 확인하였다.

효 과

- [0080] 본 발명에서 알 수 있는 바와 같이 세포 표면 부착 수용체인 신데칸-2가 이동성 피부세포질환 또는 멜라닌 합성에서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있어서, 이를 이용하여 피부 미백, 백반증 및 흑색종의 전이를 감소시키는 새로운 약제의 개발하는 방법에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0081] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 목적으로 기재된 것으로, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 한정되지 아니한다.
- [0082] 본 발명에서 사용된 시약 및 항체 중 vinculin, paxillin 및 phosphotyrosine (4G10)에 대한 단클론 항체들은 Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY)으로부터 구입하였다. FAK에 대한 mAb 및 인산화 부위-특이적 FAK[PY³⁹⁷] 및 FAK[PY⁸⁶¹]에 대한 다중클론 항체들은 BioSource Quality Controlled Biochemicals, Inc. (Morgan Hill, CA)사로부터 구입하였다. 인간 멜라노솜에 대한 단클론 항체(Clone HMB-45)들은 Dako (Denmark)로부터 구입하였다. b-galactosidase 발현 플라스미드(pCMV/β-gal) 및 Luciferase Reporter Gene Assay 키트를 Promega Corp. (Madison, WI)로부터 구입하였고, Effectene은 Qiagen (Hilden, Germany)으로부터, 소 뇌하수체 추출물(BPE)은 Lonza (Visp, Switzerland)로부터, α-MSH는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구입하였고, 항-Ig HRP 검출 키트는 BD Biosciences (San Jose, CA)으로부터 구입하였다.
- [0083] 신데칸-2에 대한 신데칸-2-mAb의 세포외 도메인에 대한 단클론 항체의 생성은 AdipoGen Inc. (Korea)에 의하여 생성하였다. 세포외 도메인(S2E)을 나타내는 쥐 syn-2 cDNA의 부위는 중합효소 연쇄반응에 의하여 증폭하였고, 인간 면역글로불린 중쇄 고정 부위(Fc)의 클론된 업스트림은 pAGCF 및 pAGPCF2 모두에서 구축되었다; 전자는 천연 리더 서열을 이용하였고, 후자는 플라스미노젠 액티베이터 저해제-1 (PAI-1) 리더 펩타이드를 이용하였다. Fc-융합 컨스트럭트는 인간 배아 신장 293 (HEK293) 세포로 트랜스펙션하였다. DMEM 혈청-없는 배지를 2일 동안 컨후루언트 세포로부터 쥐 sys-2-Fc 융합 단백질을 수집하는데 사용하였다. 그 배지를 모아서 세포를 제거하기 위하여 회전시키고, 1M Tris로 pH를 8.0으로 조정하였다. 그 후 그 배지를 0.4-μm 여과지를 사용하여 여과하고, Protein-A 컬럼에 로딩하여서 100mM glycine, pH 3.0으로 용리하고, 1/10 부피의 1M Tris pH 8.0로 즉시 중화하였다. 양 컨스트럭트들은 유사한 양의 쥐 syn-2-Fc를 낸다. Balb/c 마우스는 면역화된 마우스로부터 다중클론 혈청이 강한 면역 반응을 나타낼 때까지 S2E-Fc 융합 단백질로 반복적으로 면역화하였다. 비장림프구(Splenocyte)들을 마우스로부터 분리하여서 마우스 골수종 Sp2/0으로 융합하였다. 스크리닝과 단일 세포 클로닝은 확립된 표준 프로토콜에 따랐다. 복수는 면역저하 Balb/c 마우스로부터 얻었다. 면역글로불린 분획을 Protein G를 통하여 얻었다. 신데칸-2에 대한 mAb를 분리하는 세 안정한 하이브리도마 클론들(#194, #197 및 #302)을 얻었다(도 1). 그 mAb들에 대한 특이성 및 교차-반응성은 웨스턴 블롯 분석, 슬롯 블롯 분석, FACS 분석 및 면역조직화학에 의하여 결정되었다.
- [0084] 실시예 1: 세포 배양 및 트랜스펙션
- [0085] 인간 대장 샘암종 세포 HT-29 및 CT116, 인간 흑색종 세포 A375 및 SK-MEL-28, 마우스 흑색종 세포 B16 및 B16F10, 및 인간 섬유육종 HT1080 세포는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. HT-29 세포를 McCoy's 5A 완전 배지(Life Technologies, Rockville, MD), 10% (v/v) 우태아 혈청(FBS), penicillin (100 units/ml) 및 streptomycin (10 μg/ml, Gibco BRL)에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 유지하였다. A375, B16, B16F10, 및 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 10% (v/v) 우태아 혈청(FBS) 및 gentamicin (50 μg/ml, Sigma)이 제공된 RPMI (Life Technologies, Rockville, MD)에서 SK-MEL-28 세포주를 유지하고, HT1080 세포주들을 DMEM (Life Technologies, Rockville, MD)에서 유지하였다. 트랜지언트 트랜스펙션을 제조업자의 지시에 따라서 Effectene 시약(Qiagen) 또는 LipofecATMINE 2000 (Invitrogen)을 사용하여 수행하였다.
- [0086] 실시예 2: 신데칸-2 cDNA의 안정된 트랜스펙션
- [0087] HT29 세포들을 트립신처리하여서 모았다. 그 세포들을 콜드 PBS로 2회 세척하고 3 x 10⁶ 세포들을 얼음에서 20분 간 대조군- 또는 신데칸-2 발현 벡터로 배양하였다. 트랜스펙션은 0.2kV, 1 펄스 타임과 15 초의 기간을 사용한

전기천공에 의하여 진행하였다. 클론들을 3 주 동안에 G418 (1mg/ml)을 사용하여 선택하였다. 신데칸-2 발현은 신데칸-2 특이적인 프라이머를 사용한 RT-PCR에 의하여 평가하였다.

[0088] 실시예3:small interfering RNA 컨스트럭트의 합성

[0089] 9-bp 헤어핀 루프를 포함하는 인간 신데칸-2 또는 마우스 신데칸-2를 타겟팅하는 올리고뉴클레오타이드들을 고안하였다. 올리고뉴클레오타이드들을 어닐링하였고, pSUPER 벡터로 클로닝하였다. 프라이머의 서열들을 다음과 같다: 인간-신데칸-2 센스 프라이머, 5'GATCCCTGACGATGACTACGCTTCTTCAAGAGAACTGCTACTGATGCGAAGATTTTGGAAA-3'(서열번호 3) 인간-신데칸-2 앤티센스 프라이머, 5'AGCTTTTCCAAAAATGACGATGACTACGCTTCTCTCTTGAAGCTGCTACTGATGCGAAGAGGG-3'(서열번호 4)

[0090] 마우스-신데칸-2 센스 서열, 5'GGAGAAACAUUCAGACAAU -3'(서열번호 5)

[0091] 마우스-신데칸-2 앤티센스 서열, 5'AUGUCUGAAUGUUUCUCC -3'(서열번호 6) 볼드체는 신데칸-2 서열을; 이태릭체는 헤어핀 루프를 나타낸다. 스크램블된 small interfering RNA (siGENOME Non-Targeting siRNA #2)는 Dharmacon, Inc. (Chicago, IL)으로부터 구입하였다.

[0092] 실시예 4:전이의 분석

[0093] 세포들을 0.02% EDTA를 가진 PBS로 5분간 배양 디쉬로부터 떼어내서 원심분리하고, 200 μ l의 PBS로 재부유하였다. 실험적 전이를 위하여, 세포들(1×10^5 /마우스)을 5 주령 암컷 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 마우스를 주사 13일 후에 희생하였고, 폐의 표면에서 전이성 결절을 관찰하였다.

[0094] 실시예 5:RNA 추출 및 역전사 PCR

[0095] 배양 세포로부터 추출한 전체 RNA를 역전사 효소 반응을 위한 주형으로 사용하였다. cDNA를 하기 프라이머를 사용하여 증폭하였다:

[0096] Rat 신데칸-2 (포워드) 5'-ATGCGGGTACGAGCCACGTC -3' 및 (백워드)(서열번호 7)

[0097] 5'-CGGGAGCAGCACTAGTGAGG-3'(서열번호 8) ; Rat β -actin (포워드) 5'-TGAATCCTGTGGCATCCATGAAA-3'(서열번호 9) 및 (백워드) 5'-TAAACGCA GCTCAGTAACAGTCCG-3'(서열번호 10) . 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 변성 후, 30 사이클의 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 어닐링, 및 72 $^{\circ}$ C에서 60초간의 확장이 수행되었다. 그 반응 산물들을 1.5% 아가로스 젤에서 분석하였다. 그 증폭된 DNA 절편을 클로닝하고 그 PCR 산물들을 확인하기 위하여 시퀀싱하였다.

[0098] 실시예 6:면역침전 및 면역블롯팅

[0099] 그 배양물을 PBS로 2회 세척하고 그 세포들을 프로테아제 저해제 각테일(1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml antipain, 5 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 20 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)을 함유한 RIPA 버퍼(50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4)에서 파쇄하였다. 그 파쇄액을 13,000 x g, 4 에서 15분간 원심분리하여 맑게 하고, SDS 샘플 버퍼로 변성하고, 가열하고 SDS-PAGE로 분석하였다. 면역침전을 위해서, 200에서 1,000 μ g의 전체 단백질을 함유한 각 샘플을 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 적절한 항체로 배양하고, protein G-Sepharose 비드로 1시간 동안 배양하였다. 면역 복합체들을 원심분리로 모았다. 그 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) 상에 옮기고 적당한 항체들로 프로브하였다. 그 신호들을 enhanced chemiluminescence (Amersham Life Science)에 의하여 검출하였다.

[0100] 실시예 7:슬롯 블롯팅

[0101] 그 배양물을 PBS로 2회 세척하고 그 세포들을 프로테아제 저해제 각테일을 함유한 RIPA 버퍼(50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4)에서 파쇄하였다. 그 파쇄액을 면역블롯 장치 (Slot blot, Bio-Rad)에서 약한 진공 하에서 PVDF 막(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)에 적용하였다. 그 후 그 막을 5% 탈지 분유가 보충된 TBS-T에서 장상온에서 1시간 배양하여 블로킹한 후 항-sdc2 mAb으로 4에서 오버나잇 배양하였다. 세척 후, 그 막을 중-특이적인 HRP-컨쥬게이트된 2차 항체들(Amersham Bioscience)로 배양하고, 검출은 ECL 시스템(Ab Frontier, Korea)을 사용하여 수행하였다.

[0102] 실시예 8:유세포 분석

- [0103] 60-mm 직경 조직 배양 디쉬에서 배양된 흑색종 세포들을 PBS로 세척하고 1 mM EDTA에 의하여 킬리스한 후 5% FBS를 가진 PBS를 첨가하였다. 펠leting 후, 세포들을 PBS에서 재부유하고 계수하였다. 세포들(1×10^6 /ml)을 10% FBS를 가진 PBS에서 4℃에서 1시간 동안 항-신데칸-2 항체로 배양하였다. 0.05% Tween-20를 가지는 PBS로 3회 세척 후, 세포들을 10% FBS를 가지는 PBS에서 30분간 FITC-컨쥬게이트된 항-마우스 항체로 배양하였다. 신데칸-2 발현은 유세포 분석에 의하여 분석하였다.
- [0104] 실시예 9: 이동 분석
- [0105] 젤라틴($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 Transwell 플레이트(Costar; $8\text{-}\mu\text{m}$ 구경)의 각 웰에 첨가하고, 그 막들을 25℃에서 1시간 건조하였다. 그 Transwell 플레이트들을 24-웰 플레이트 내에서 어셈블리하였고, 그 하단 챔버를 새로운 배지에 FGF-2 ($100 \text{ ng}/\text{ml}$)를 충전하였다. 세포들(5×10^4)을 각 상단 챔버에 첨가하고 그 플레이트들을 37℃, 5% CO_2 에서 12시간 동안 배양하였다. 그 필터의 하단 표면으로 이동한 세포들을 0.6% hematoxylin 및 0.5% eosin을 염색하고 계수하였다. 인 비트로 침습 분석을 위하여, 24-웰 Transwell 플레이트(Costar; $8\text{-}\mu\text{m}$ 구경)를 막의 하단에서 젤라틴($10\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 코팅하고, 상단에서는 Matrigel ($30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 코팅하였다.
- [0106] 실시예 10: 생검
- [0107] 2 밀리리터 펀치 생체검사를 카톨릭 의대 기관 심사 위원회의 정책에 따르는 그들의 동의를 제공한 환자로부터 얻었다. 그 펀치 생체검사들은 악성 병변 및 외래 환자의 정상 피부로부터 얻었다. 생검들(Biopsies)을 즉시 액체 질소에서 동결하고, 차후 분석을 위하여 사용할 때까지 -70℃에서 유지하였다.
- [0108] 실시예 11: 면역조직화학분석
- [0109] 환자로부터 얻은 5 세트의 생검들을 10% 중화된 버퍼 포르말린에서 24시간 고정하고, 파라핀에 넣어서, 절편화하고, 염색을 위하여 파라핀을 제거하였다. 그 절편들을 hematoxylin 및 eosin으로 염색하였다. 면역염색을 위하여, 그 절편들을 세척하고, 내생적인 퍼옥시데이즈 활성을 3% 과산화수소 및 10% 메탄올로 PBS에서 블로킹한 후, 0.2% Triton X-100 (PBS-T) 및 3% 소 혈청 알부민(BSA)을 가지는 PBS에서 2시간 미리배양하였다. 그 후 그 절편들을 항-SDC2 항체(1:1000) 또는 항-멜라노솜 HBM-45 항체(1:50)를 함유하는 PBS-T에서 16시간 배양하였다. PBS로 세척 후, 그들을 세척하고 3% 소 혈청 알부민(BSA)을 가지는 PBS-T에서 바이오틴화된 2차 항체(1:1,000, Dako, Denmark)로 상온에서 60분간 배양하였다. 그 다음에 그 절편들을 퍼옥시데이즈 표지된 스트렙타비딘(Dako, Denmark)으로 60분간 배양한 후 diaminobenzidine ($0.5 \text{ mg}/\text{ml}$) 및 과산화수소로 반응하였다. 세척 후, 그 절편을 고정하고, 탈수하고, 커버슬립으로 덮었다. 모든 이미지들을 Carl Zeiss Axioskop2으로 얻었다.
- [0110] 실시예 12: 전사 신데칸-2 리포터 플라스미드의 구축
- [0111] 3 kb 길이의 신데칸-2 프로모터 유전자를 아래 마우스 신데칸-2 프라이머를 사용하여 PCR에 의하여 증폭하였다: (포워드) 5'
- [0112] GGTACCATCTCATCAACACCAA-3'(서열번호 11) 및 (백워드) 5'AGGGATATGAGGCCATGGTAAT-3' (서열번호 12) 94℃에서 5분간 초기 변성 후, 30 사이클의 94℃에서 30초, 55℃에서 30초간 어닐링, 및 72℃에서 60초간의 확장이 수행되었다. 그 신데칸-2 프로모터 유전자를 *Kpn/Xho* 클로닝 부위에서 pGL3-베이직 벡터로 라이게이션하였다.
- [0113] 실시예 13: 루시퍼레이즈 분석
- [0114] B16 흑색종 세포들을 표준화하는 대조군으로 $0.1 \mu\text{g}$ 의 pCMV/b-GAL와 함께 신데칸-2 리포터 컨스트럭트 또는 $0.2 \mu\text{g}$ 의 pGL3-베이직 벡터로 트랜스펙션 전 24시간 동안 24웰 플레이트에 플레이트하였다. 트랜스펙션 24시간 후, 세포들을 PBS로 세척하고 리포터 라이시스 버퍼(Promega)로 파쇄하였다. 수용성 추출물을 모아서 제조업자의 지시에 따라서 루시퍼레이즈 및 β -갈락토시데이즈 활성을 측정하였다. 모든 트랜스펙션은 다른 플라스미드 조제물을 사용하여 적어도 3회 반복하였다.
- [0115] 실시예 14: 상처-치유 분석
- [0116] 흑색종 세포들을 60-mm 조직 배양 플레이트에 플레이팅하고 오버나잇 배양하였다. 한 스트리크를 멸균된 피펫 팁을 사용하여 모노레이어의 중간에 만든 후, 그 세포들을 PBS로 2회 세척하고 새로운 배지에서 배양하였다. 상처 거리(wound distance)의 사진들을 여러 시간 간격으로 촬영하였다.
- [0117] 실시예 15: 멜라닌 양의 측정

- [0118] 멜라닌 양은 Kazuomi et al (Sato, K., Takahashi, H., Iraha, R., and Toriyama, M. (2008) *Biol Pharm Bull* **31**(1), 33-37)에 의하여 보고된 방법과 같이 측정하였다. 요약하면, 세포들을 10% 열 비활성된 FBS를 포함하는 DMEM에서 1 mM a-MSH 또는 200 mM Kojic acid으로 48시간 처리한 후 트립신/EDTA로 배양하여 떼어내었다. 펠leting 후, 세포들을 세포 계수를 위하여 DMEM에서 재부유하거나 끓는 2 M NaOH에서 20분간 용해하였다. 상온으로 냉각한 후, 그 용액의 흡광도를 멜라닌 양을 결정하기 위하여 405 nm에서 측정하였다.
- [0119] 실시예 16: 세포 증식 분석
- [0120] 세포 증식은 MTT을 사용하여 비색(colorimetric) 분석에 의하여 측정하였다. MTT 분석은 (Park, H., Kim, Y., Lim, Y., Han, I., and Oh, E. S. (2002) *J Biol Chem* **277**(33), 29730-29736)에 기재된 것과 같이 수행되었다.
- [0121] 상기의 실시예의 결과는 다음과 같다.
- [0122] 인간 피부 흑색종의 발생에서 신데칸-2의 역할을 조사하기 위하여, 신데칸-2의 발현을 정상 피부 및 악성 피부 암으로부터 얻은 조직들을 비교하였다. 면역조직화학 분석들은 정상 피부에서 신데칸-2 발현의 부존재를 나타내었다(도 2A, b). 반면에, 본 발명자들은 진피내 모반에서 신데칸-2 발현이 증가된 것을 발견하였다(도 2A, f, g). 흥미롭게도, 신데칸-2 발현은 인접한 슬라이드에서 흑색종의 주지된 마커인 HMB-45로 양성 염색된 악성 흑색종에서 크게 증가하였다(도 2A, k, l)(도 2A, d, h, i, m, n), 반면에 전-면역(pre-immune) 혈청은 악성 흑색종에서 멜라닌 과립을 제외하고는 염색이 되지 않았다(도 2A, c). 이 관찰과 일치하게, 신데칸-2의 증가된 세포 표면 발현을 인간 흑색종 세포주에서 관찰되었다(도 2B). 이들 데이터는 신데칸-2 발현이 악성 흑색종에서 증가한다는 것과 신데칸-2 발현은 멜라닌 합성을 촉진한다는 사실을 시사하고 있다.
- [0123] 종양형성 활성의 조절에서 신데칸-2의 역할을 직접적으로 평가하기 위하여, 본 발명자들은 흑색종 세포 이동에 대한 신데칸-2 발현의 효과를 조사하였다. 인간 흑색종 A375 세포들을 신데칸-2 cDNA (S2W)으로 트랜스펙션하고 transwell 이동 분석을 수행하였다(도 3A). S2W로 트랜스펙션 후, 세포 이동은 벡터-트랜스펙션된 세포(즉, vec)보다 A375 세포들에서 현저하게 높았다. 반면에, 세포 이동은 신데칸-2 발현이 small inhibitory RNAs (siRNAs)에 의하여 억제되었을 때 감소하였다(도 3B). 인간 흑색종 세포와 같이, 신데칸-2의 증가된 세포 표면 발현은 마우스 흑색종 세포주에서도 관찰되었다(도 4A). 신데칸-2 과발현은 transwell 이동(도 4A) 및 상처-치유 분석(도 4B)에 기초한 마우스 흑색종 B16 세포의 이동을 증가시킨 반면에, 신데칸-2 발현이 small inhibitory RNAs (siRNAs)에 의하여 억제된 경우에는 세포 이동이 감소하였다(도 4C). siRNA에 의한 신데칸-2 발현의 억제는 마우스에서 B16F10 흑색종 세포의 전이력을 감소시켰다(도 4D). 이들 발견은 신데칸-2이 흑색종 세포에서 세포이동을 조절한다는 것을 강력하게 나타낸다.
- [0124] Focal adhesion kinase (FAK)는 암세포 이동에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Owens, L. V., Xu, L., Dent, G. A., Yang, X., Sturge, G. C., Craven, R. J., and Cance, W. G.. (1996) *Ann Surg Oncol* **3**(1), 100-105; Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T., and Cance, W. G.. (1995) *Cancer Res* **55**(13), 2752-2755). 본 발명자들은 전체 세포 타이로신 인산화는 S2W-과발현 B16 흑색종 세포에서 증가한다는 것을 발견하였다(도 5A). FAK에 의하여 매개된 증가된 타이로신 인산화는 종종 세포 이동 촉진에 반응하여 일어난다(Park, H., Han, I., Kwon, H. J., and Oh, E. S. (2005) *Cancer Res* **65**(21), 9899-9905). 네 종류의 폴리펩타이드의 타이로신 인산화(즉 p120, p80, p60, 및 p50)는 대조군 벡터로 트랜스펙션된 세포에서보다 S2W로 트랜스펙션된 세포들에서 더욱 높았다. 또, S2W 발현은 타이로신 397 (즉, Y397)에서 자가인산화, phosphorylation of FAK 타이로신 861(즉, Y861)는 세포 형질전환을 조절하는 것으로 알려짐)의 인산화(도 5B), 및 FAK의 기질로 잘 알려진 paxillin의 타이로신 인산화(도 5C)를 증가하였다. 이들 데이터는 신데칸-2-유도된 이동 활성은 FAK-매개된 신호전달의 활성화와 관련이 있다는 것을 나타낸다.
- [0125] 신데칸-2 발현의 조절을 더 조사하기 위하여, 본 발명자들은 반딧불 루시페레이즈 리포터 유전자를 함유하는 루시페레이즈 발현 플라스미드에 그 신데칸-2 프로모터 서열(즉 그 유전자의 3 kb 부위 직접적으로 업스트림)을 클로닝하였다(도 6A). 빈 벡터 또는 신데칸-2 프로모터를 포함하는 플라스미드를 B16 마우스 흑색종 세포로 일시적으로 트랜스펙션시키고 FGF-2에 대한 루시페레이즈 활성을 측정하였다. 본 발명자들은 FGF-2 처리에 반응하여 신데칸-2의 세포 표면 발현 및 증가된 루시페레이즈 활성을 관찰하였다(도 6B). 흑색종 세포의 이동은 FGF-2 처리에 의해서도 역시 증가하였다(도 6D). 이들 결과들은 신데칸-2 발현이 FGF-2-증가된 세포 이동과 상관관계가 있다는 것을 나타낸다.
- [0126] 소 뇌하수체 추출물(BPE)은 인간 멜라닌 세포에 대한 성장 배지에 분열촉진(mitogenic) 보충제로 통상적으로 사용된다(Donatien, P., Surleve-Bazeille, J. E., Thody, A. J., and Taïb, A. (1993) *Arch Dermatol Res*

285(7), 385-392). FGF-2 처리와 대조적으로, BPE 처리는 신데칸-2 루시퍼레이즈 활성, 신데칸-2의 세포 표면 발현(도 6C) 및 흑색종 세포 이동(도 6D)을 감소시켰고, 이것은 신데칸-2 발현이 흑색종 세포 이동과 상관관계가 있다는 것을 지지하였다. BPE은 α -MSH를 포함하기 때문에, 본 발명자들은 흑색종 세포에서 α -MSH가 inhibits 신데칸-2 발현을 저해하는지를 조사하였다. 예측한 것과 같이, α -MSH는 신데칸-2의 세포 표면 발현을 감소시켰다(도 7A-C). 감소된 신데칸-2 발현과 일관되게, α -MSH는 흑색종 세포의 이동과 침윤을 감소시켰다(도 7D & 7E), 반면에 세포 증식은 24시간 동안에 α -MSH 처리에 의하여 크게 영향을 받지 않았다(도 7F). 또, 신데칸-2 과발현은 α -MSH 처리에 의하여 유도된 이동 저해를 회복하였다(도 8). 총체적으로 이들 결과들은 α -MSH가 신데칸-2의 감소된 발현을 통하여 흑색종 세포 이동을 저해하고, 신데칸-2 발현이 흑색종 세포 이동에서 중요한 역할을 한다는 것을 지지한다.

[0127] 실시예 17: 멜라닌 세포에서의 이동성

[0128] 세포 배양과 트랜스펙션

[0129] 인간 일차 멜라닌세포인 HEM 세포는 MGM-4 media (LonZa), 마우스 악성 흑색종 세포주인 B16F10은 10%의 FBS와 50 μ g/ml의 gentamicin이 첨가된 DMEM (Life Technologies) media, 또 다른 마우스 악성 흑색종 세포주인 B16G4F는 200nM의 L-glutamine, 10%의 FBS와 50 μ g/ml의 gentamicin이 첨가된 DMEM (Life Technologies) 배지에서 37°C, 5% CO₂가 유지되는 습기가 있는 배양기 안에서 배양하였다. 일시적인 트랜스펙션은 제공된 제조사의 설명서에 따라 LipofecATMINE 2000 (Invitrogen)으로 수행하였다.

[0130] Small interfering RNA 제작

[0131] 마우스 신데칸-2를 타겟으로 디자인된 올리고뉴클레오타이드의 염기서열은 sense 염기서열, 5'-GGAGAAACAUUCAGACAAU -3(서열번호 5) antisense 염기서열, 5'-AUUGUCUGAAUGUUUCUCC -3(서열번호 6)이다.

[0132] 생체조직

[0133] 2mm의 일반 피부조직과 악성 흑색종 병변 피부조직은 카톨릭대학교 강남 성모병원에 방문하는 환자들 중에 카톨릭의학 연구협회의 정책에 동의한 환자들로부터 받았다. 생체조직들은 즉시 액체 질소로 얼려서 70°C에서 보관되었다.

[0134] 조직면역염색

[0135] 환자들로부터 받은 5 썬트의 생체조직들을 10% neutralized buffered formalin에서 24시간동안 고정시키고, 파라핀안에 끼워 넣고 절개한 후 염색을 위해 파라핀을 제거하였다. 단면들을 세척하고 내생(endogenous)한 퍼옥시데이즈의 활성을 PBS에 3% hydrogen peroxide와 10% 메탄올이 첨가된 용액으로 저해하고 0.2% Triton X-100 (PBS-T) 와 3% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 PBS로 2시간 배양시켰다. 그 후 단면들을 항-신데칸-2 (1:1000) 항체나 항-melanosome HMB-45 항체 (1:50)가 들어있는 PBS-T로 16시간동안 배양시켰다. PBS로 세척한 후 3% BSA가 첨가된 PBS-T에 biotinylated된 2번째 항체 (1:1,000, Dako)를 실온에서 60분간 반응시켰다. 조직 단면들을 적당히 행군 다음에 peroxidase가 콘주게이트된 streptavidin (Dako)와 60분간 반응시킨 후에 diaminobenzidine (0.5 μ g/ml)과 hydrogen peroxide와 반응시켰다. 또 한번 행군후에 조직단면들을 슬라이드에 고정시키고 탈수시키고 coverslip으로 덮은 후 Carl Zeiss Axioskop2으로 조직 사진들을 찍었다.

[0136] Migration assay

[0137] Gelatin (10 μ g/ml)을 Transwell 플레이트 (Costar; 8-pore size)의 각 well의 membrane에 코팅하고 25°C에서 1시간 말렸다. Transwell 플레이트는 24 웰로 구성되어 있고 아래 챔버는 FGF-2 (100 ng/ml)가 첨가된 신선한 배지로 채웠다. 1×10^5 개의 세포들은 각각의 위 챔버에 놓여지고 플레이트들을 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 24시간동안 배양시켰다. 위 챔버의 필터 아래 쪽 표면으로 이동된 세포들은 0.6% hematoxylin과 0.5% eosin으로 염색되어졌고 염색된 세포수를 셸다. 인 비트로 침습(invasion) 분석을 위해 24-well Transwell 플레이트 (Costar; 8-pore size) transwell membrane의 아래쪽 면은 젤라틴(10 μ g/ml)으로 코팅하고 위쪽 면은 Matrigel (30 μ g/ μ l)으로 코팅한 뒤 진행하였다.

[0138] 유세포 분석기(Flow cytometry)

[0139] 60 mm 컬처 플레이트에 배양된 세포들을 PBS로 행구고 1 mM EDTA와 5% FBS가 들어있는 PBS로 떨어트렸다. Pelletting 후 세포들을 PBS에 다시 풀고 수를 세었다. 1×10^6 /ml의 세포들을 10% FBS가 들어있는 PBS에 anti-

신데칸-2 항체와 함께 4 °C에서 12 간동안 반응시켰다. 0.05% Tween-20이 들어있는 PBS로 3회 행군 후 세포들을 FITC 결합되어 있는 anti-mouse 항체와 함께 10% FBS가 들어있는 PBS안에서 실온에서 30분간 반응시켰다. 신데칸-2 발현을 flow cytometry를 통해 분석하였다.

[0140] 멜라닌 색소의 생성은 피부, 모발 및 눈에서 α -MSH에 의하여 촉진된다(Price, E. R., Horstmann, M. A., Wells, A. G., Weilbaecher, K. N., Takemoto, C. M., Landis, M. W., and Fisher, D. E. (1998) *J Biol Chem* **273**(49), 33042-33047). α -MSH는 세포내 cAMP의 업레귤레이션 및 여러 색소화 효소(예를 들어, 멜라닌 합성에서 율속단계를 촉매하는 타이로시네이즈)의 연속적인 활성화를 촉진한다(Passeron, T., Valencia, J. C., Bertolotto, C., Hoashi, T., Le Pape, E., Takahashi, K., Ballotti, R., and Hearing, V. J. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(35), 13984-13989). 따라서 본 발명자들은 멜라닌 합성이 흑색종 세포의 신데칸-2-매개된 세포 이동에서 중요한 역할을 하는지를 조사하였다. α -MSH는 흑색종 세포의 멜라닌 양을 증가(즉 대략 121%)한 반면에, 멜라닌 생성은 타이로시네이즈 저해제인 kojic acid (즉 대략 76%)에 의하여 감소하였다(도 9A). 반면에, 신데칸-2 발현은 α -MSH 처리에 의하여 감소하였지만, kojic acid에 의하여 변하지 않다(도 9B & 9C). 따라서, 세포 이동에서 α -MSH-매개된 감소는 감소된 신데칸-2 발현과 일치하지만, 타이로시네이즈 활성의 저해는 흑색종 세포 이동에 영향을 미치지 않았다(도 9D). 따라서 α -MSH는 멜라닌 생합성 경로와 독립적으로 신데칸-2-매개된 세포 이동을 저해한다는 것을 나타낸다.

[0141] 실시예 18: 신데칸-2 발현에 의한 멜라닌 합성량 비교 :

[0142] 신데칸-2의 발현이 비교적 높은 B16F10 악성 흑색종에 마우스 신데칸-2 siRNA(서열번호 5와 서열번호 6)를 처리하여 신데칸-2를 knock down 시킨 후, 멜라닌 합성을 비교한 경우, 신데칸-2 발현이 감소한 세포에서 멜라닌 합성이 감소하였다 (data 생략). 신데칸-2 known-down 세포에 다시 쥐-신데칸-2 cDNA를 인위적으로 과발현시켰을 때 멜라닌의 합성이 증가함을 관찰 할 수 있었다(도 12).

[0143] 실시예 19:조직 면역염색법을 이용한 멜라닌 합성 변화 관찰:

[0144] 정상 피부 조직과 암화된 피부조직을 각각 신데칸-2 항체와 멜라노솜 marker인 HBM-45로 염색하여 신데칸-2 발현과 멜라닌의 합성의 상관성을 조사하였다. 그 결과 syndcan-2 발현이 높은 멜라닌 세포와 멜라노마에서 멜라닌 그레놀이 증가되는 것을 관찰하였다 (도 13).

[0145] 사람 primary 멜라닌세포에 신데칸-2를 과발현시켰을 경우, 대조군에 비해 세포 표면의 신데칸-2 발현이 증가되었으며 세포의 이동성과 침윤성 역시 증가되었다.

[0146] 한편 도 12의 A는 B16F10과 B16G4F 세포들을 원심분리기로 가라앉혀 보면 B16G4F 세포는 흰색 펠렛인데 비해 B16F10 세포는 검정색 펠렛이다. 이로써 B16F10 세포가 B16G4F 세포보다 멜라닌을 더 많이 합성하고 있다는 사실을 알 수 있다. 또한 B16F10 세포가 B16G4F 세포에 비해 세포 표면의 신데칸-2의 발현양도 매우 높음을 알 수 있다. 12의 B는 B16F10 세포를 small interfering RNA를 이용해서 endogenous한 신데칸-2의 발현을 저해하고 empty vector와 신데칸-2 cDNA를 각각 transfection한 후 각각 세포를 원심분리기를 이용하여 가라앉혀보면 신데칸-2를 과발현 세포의 펠렛이 vector 세포보다 더 검정색을 띄어 멜라닌을 더 많이 합성하고 있다는 것을 알 수 있다.

[0147] 도 13은 생체조직에서 신데칸-2발현 정도와 melanosome 형성 정도를 알아보기 위해 면역조직염색을 한 결과 일반 피부조직에서는 신데칸-2의 발현과 melanosome 형성이 거의 없는데 비해 악성 흑색종 병변 피부조직에서는 신데칸-2의 발현이 굉장히 높고, melanosome 형성 역시 활발히 이루어지고 있음을 확인할 수 있다.

[0148] 따라서 상기의 결과들은 신데칸-2 발현 증가는 멜라닌 합성을 증가와 관련이 있다는 것을 알 수 있다.

[0149] 본 발명에서 melanin 합성량 측정법은 Tube에 세포를 모은 뒤, 1N NaOH/10%DMSO를 처리한 후 80°C에서 2시간 반응시켜 수용화(solubilization)시킨다음에, 원심분리(12,000g, 10분)를 이용하여 pellet은 남기고 상등액을 얻어내어 새로운 tube로 옮겼다. 합성 또는 정제된 melanin을 사용하여 0-20 ug/ml의 농도로 표준 곡선을 잡은 후, 470nm 파장에서 준비된 상등액의 멜라닌 함량을 측정하였다.

도면의 간단한 설명

[0150] 도 1은 신데칸-2에 대한 단클론 항체의 특성화이다. A, GST-신데칸-2 및 -4 코어 단백질의 도식적인 설명. 세포 외 도메인은 흰 박스로 표시(EC), 막 횡단 도메인은 검은 박스로 표시(TM)하였고 원형질 도메인은 회색 박스

(CT)로 표시하였다. 신데칸-2 및 -4은 결손 돌연변이체의 부위를 나타내는 아미노산 번호로 표시하였다. B, GST-신데칸-2 코어 단백질들은 대장균에서 발현하였다. 정제된 재조합 단백질들을 10% SDS-PAGE에서 분리하고 지시된 신데칸-2 항체로 면역블롯하였다. C, HCT116 결장암 세포를 지시된 신데칸-2 항체와 배양하고, 신데칸-2의 세포 표면 발현 수준을 유세포 분석에 의하여 분석하였다(탐 패널). IgG를 대조군으로 사용하였다. HCT116 으로부터 얻은 전체 세포 파쇄액을 항-신데칸-2 항체(mAb #197, 아래 패널)로 슬릿 블롯팅하여서 분석하였다. D, HT-29 결장암 세포 및 HT-29 안정적으로 발현하는 신데칸-2 (HT-29-sdc2) 으로부터 얻은 전체 세포 파쇄액을 지시된 신데칸-2 항체로 슬릿블롯팅하여서 분석하였다(탐, 왼쪽 패널). 세포들을 항-신데칸-2 항체(mAb #197)로 배양하고, Texas Red-컨주게이트된 2차항체로 염색하고, 공초점 현미경 하에서 촬영하였다(탐, 오른쪽 패널). 세포들을 지시된 신데칸-2 항체로 배양하고, 신데칸-2의 세포 표면 발현 수준을 유세포 분석으로 분석하였다. IgG를 대조군으로 사용하였다(아래 패널). HT-29 세포에서 발현된 쥐 신데칸-2는 양 mAbs #197 및 #302 모두에 의하여 인지되지만, HCT116 세포에서 내생적인 인간 신데칸-2는 mAb #197에 의하여 특이적으로 인지된다.

[0151] 도 2는 신데칸-2가 인간 피부 흑색종 세포에서 크게 발현된다는 것을 보여준다. A, 파라핀-충진된 조직 절편을 hematoxylin 및 eosin (H&E, a), hematoxylin (e 및 j)으로 염색하거나, 또는 항-신데칸-2 항체로 면역염색 하였다(SDC2 mAb #197, b, f, k). c는 전(pre)-면역 혈청으로 면역염색을 위한 음성 대조군이다. 면역반응성을 니켈에 의하여 강화된 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)으로 육안화하였다. g 및 i는 각각 f 및 k의 더 큰 확대이다. 항-HMB-45 항체로 면역염색은 그 동일한 방법으로 검출하였고(HBM-45, d, h, m). i 및 n는 각각 h 및 m의 더 큰 확대이다. 화살표는 각각 신데칸-2 및 HMB-45의 면역반응성을 가지는 멜라닌 세포를 나타낸다. 그림들은 다섯 실험 중 하나의 대표적인 것을 나타낸다. B, 인간 흑색종 세포주로부터 얻은 세포를 항-신데칸-2 항체로 배양하고, 단백질 발현 수준을 유세포 분석에 의하여 분석하였다. IgG를 대조군으로 사용하였다.

[0152] 도 3은 신데칸-2가 인간 흑색종 이동을 조절하는 것을 나타낸다. A375 인간 흑색종 세포들을 2 μ g의 sdc2 cDNA (A) 또는 si-신데칸-2 플라스미드(B)로 트랜스펙션시켰다. 전체 세포 파쇄액을 항-신데칸-2 항체로 슬릿블롯팅 하여서 분석하였다(탐 패널). 세포들을 항-신데칸-2 항체로 배양하고, 신데칸-2의 세포 표면 발현 수준을 유세포 분석으로 분석하였다. IgG를 대조군으로 사용하였다(중간 패널). Transwell 이동 분석은 하단 챔버에서 화학 유인물질로 FGF-2를 사용하여 지시된 A375 세포로 수행하였다. 세포들(5×10^4)을 10 μ g/ml 젤라틴 코팅된 Transwell 플레이트에 12 시간 동안 이동하게 한다. 고정 및 0.6% hematoxylin 및 0.5% eosin으로 염색 후, 이동된 세포의 수를 계수하였다. 컬럼, 적어도 3회의 독자적인 실험의 평균(아래 패널). * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ versus 대조군. 침습 분석을 위하여, 세포를 Matrigel (30 μ g/ml) 코팅된 플레이트의 상단 구역에 로딩하고 12 시간 배양하였다.

[0153] 도 4는 신데칸-2가 마우스 흑색종 세포 이동을 조절하는 것을 나타낸다. A, B16 세포들을 신데칸-2 cDNA로 트랜스펙션하였다. 전체 RNA를 추출하고, 신데칸-2의 발현은 역 전사-PCR로 분석하였다. GAPDH mRNA를 로딩 대조군으로 사용하였다(탐 패널). 세포들을 항-신데칸-2 항체로 배양하고, 신데칸-2의 세포 표면 발현 수준을 유세포 분석으로 분석하였다. IgG를 대조군으로 사용하였다(중간 패널). 도 3에 기재된 것과 같이 Transwell 이동 분석은 하단 챔버에서 화학유인물질로 FGF-2를 사용하여 지시된 B16 세포로 수행하였다(하단 패널). B, B16 세포들을 신데칸-2 cDNA로 트랜스펙션시키고, 24시간 후에, 상처-치유 분석을 수행하였다. 한 스크리크를 멸균된 피펫 팁을 사용하여 모노레이어의 중앙에 만들고 상처 거리(wound distance)의 사진을 각 시간 지점에서 촬영하였다. 도 3에 기재된 것과 같이 세포들(5×10^4)을 Transwell 플레이트에 이동하게 한다. 컬럼, 적어도 3회의 독자적인 실험의 평균. * $p < 0.01$ versus 대조군. D, B16F10 세포들을 신데칸-2 si-RNA로 트랜스펙션하였다. 세포들을(1×10^5) 5 주령 c57BL/6 마우스에 정맥내 주사하였다. 마우스를 주사 13일 후에 희생시켰다. 폐의 표면의 전이성 결절을 관찰하였다.

[0154] 도 5는 Focal adhesion kinase가 신데칸-2-매개된 흑색종 세포 이동의 조절에 관여한다는 것을 나타낸다. A, 빈 벡터(대조군) 또는 신데칸-2 cDNA (sdc2)로 트랜스펙션한 B16 세포를 RIPA 버퍼로 파쇄하고 스크립핑 후에 항-포스포타이로신(a-PY) 항체 및 항-vinculin 항체로 웨스턴 블롯에 의하여 분석하였다. B, B16 세포들을 파쇄하고 부위-특이적인 FAK 인산화를 항-FAK[PY³⁹⁷] 및 항-FAK[PY⁸⁶¹] 항체로 분석하고, 스트립핑 한 후 항-FAK 항체로 리프로빙하였다. C, B16 세포 추출물을 paxillin에 대한 항체로 면역침전하고, 단백질의 인산화 상태를 항-포스포타이로신(PY) 항체를 면역블롯팅하여서 결정하였다. 각 면역침전체에서 단백질의 레벨을 항-paxillin 항체로 면역블롯팅하여서 결정하였다.

[0155] 도 6은 신데칸-2 발현이 흑색종 세포 이동과 상관관계가 있다는 것을 나타낸다. A, 반딧불이 루시퍼레이즈 리포

터 유전자와 링크된 마우스 신데칸-2 프로모터 서열들의 5'-프랜킹 부위를 가지는 신데칸-2 프로모터 컨스트럭트의 묘사도. B, C, 신데칸-2 리포터 플라스미드로 트랜스펙션된 B16 세포를 BPE (0.4% v/v) 또는 FGF-2 (300 ng/ml)로 24시간 동안 처리하고, 루시퍼레이스 활성을 측정하였다. 컬럼, 적어도 3회의 독자적인 실험의 평균 (탑 패널). 세포들을 항-신데칸-2 항체로 배양하고, 그 단백질 발현 레벨을 유세포 분석에 의하여 분석하였다. IgG를 대조군으로 사용하였다(아래 패널). D, BPE 또는 FGF-2로 처리된 세포들(5×10^4)을 도 3에 기재된 것과 같이 Transwell 플레이트 상에서 이동하게 하였다. 컬럼, 3회의 독자적인 실험의 평균. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ versus 대조군.

[0156] 도 7은 α -MSH가 세포의 이동을 감소시킴과 같이 신데칸-2의 발현을 저해시킨다는 것을 나타낸다. A, B16 세포들을 α -MSH (1.0 μ M)로 24시간 처리하였다. 전체 RNA를 추출하고, 신데칸-2의 발현을 역전사-PCR로 분석하였다. β -actin mRNA를 로딩 대조군으로 사용하였다. B, B16 세포들을 FGF-2 (300 ng/ml) 또는 α -MSH (1.0 μ M)로 처리하였다. 24 시간 후, 전체 세포 과쇄액을 슬롯 블롯팅에 의하여 분석하였다. C, 지시된 양의 α -MSH (1.0 μ M)로 24시간 처리한 B16 세포들을 항-신데칸-2 항체(mAb #197)로 배양하고, 그 단백질 발현 수준을 유세포 분석으로 분석하였다. IgG를 음성 대조군으로 사용하였다 D, B16 세포들을(5×10^4)을 FGF-2 (300 ng/ml) 또는 α -MSH (0.5 μ M, 1.0 μ M)로 24시간 전처리한 후 도 3에 기재된 것과 같이 Transwell 플레이트 상에서 이동하게 하였다. 컬럼, 3회의 독자적인 실험의 평균. E, B16 세포들을 α -MSH (1.0 μ M)로 24시간 전처리하였다. Transwell 세포 이동 또는 침습 분석을 도 3에서와 같이 수행하였다. 컬럼, 3회의 독자적인 실험의 평균. F, B16 세포들을 FGF-2 (300 ng/ml) 또는 α -MSH (1.0 μ M)로 처리한 후, MTT 분석을 수행하였다. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ versus 대조군.

[0157] 도 8은 α -MSH는 신데칸-2의 감소된 발현을 통하여 흑색종 세포 이동을 저해하는 것을 나타낸다. A, α -MSH (1.0 μ M)로 24시간 동안 처리한 후 B16 세포를 빈 벡터 또는 신데칸-2 cDNA로 트랜스펙션시켰다. 신데칸-2 발현 수준(A) 및 세포 이동(B)을 도 3에 기재된 것과 같이 분석하였다. 컬럼, 3회의 독자적인 실험의 평균.

[0158] 도 9는 신데칸-2-매개된 세포 이동이 멜라닌 합성과 독립적인 것을 나타낸다. A, B16F10 세포를 α -MSH (1.0 μ M) 또는 kojic acid (200 μ M)로 48시간 처리한 후, 그 세포의 멜라닌 양을 실시예와 같이 측정하였다. 컬럼, 3회의 독자적인 실험의 평균. B, 신데칸-2 리포터 컨스트럭트로 트랜스펙션된 B16F10 세포를 1.0 μ M의 α -MSH 또는 200 μ M의 kojic acid로 48시간 처리하였다. 신데칸-2 프로모터 활성을 루시퍼레이스 분석에 의하여 분석하였다. C, B16F10 세포들을 α -MSH (1.0 μ M) 또는 kojic acid (200 μ M)로 48시간 동안 처리하였다. 신데칸-2의 세포 표면 발현(탑 패널) 및 세포 이동 활성(아래 패널)을 도 3에서와 같이 분석하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 대조군.

[0159] 도 10은 인공피부모델을 이용한 천연물의 세포이동성 조절 효과 검증하는 그림이다.

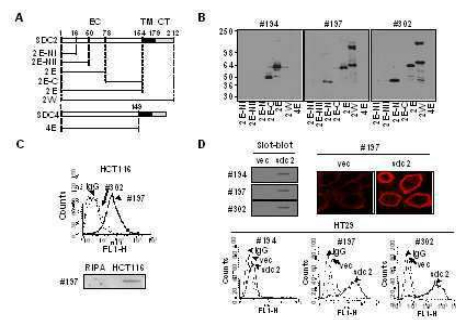
[0160] 도 11은 신데칸-2는 멜라닌 세포의 세포 이동성을 증가시킨다는 것을 나타내는 그림이다. 60 mm 컬처 플레이트에 멜라닌 세포를 배양하고 빈 벡터와 신데칸-2 cDNA를 각각 트랜스펙션한 뒤 48시간 후 유세포 분석과 transwell 세포이동 및 침윤분석을 진행하였다. 세포들을 신데칸-2 항체와 반응시킨 뒤 세포 표면의 신데칸-2의 발현양을 유세포 분석하였다. IgG는 대조군으로 사용하였다 (위 패널). Transwell 세포이동 및 침윤분석은 1×10^5 개의 세포들을 이용하여 도 3에 기재된 것과 같이 24시간 동안 진행하였다 (아래 패널).

[0161] 도 12는 신데칸-2는 악성 흑색종 세포주의 멜라닌 합성을 증가시킨다는 것을 나타내는 그림이다. A, 마우스 악성 흑색종 세포주인 B16F10과 B16G4F를 각각 60 mm 컬처 플레이트에 배양한 뒤 원심분리기로 가라앉히고 펠렛의 사진을 찍고 (위 패널), 세포들을 신데칸-2 항체와 반응시킨 뒤 세포 표면의 신데칸-2의 발현양을 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. IgG는 대조군으로 사용하였다 (아래 패널). B, B16F10 세포를 신데칸-2 si-RNA와 empty vector나 신데칸-2 cDNA를 co-트랜스펙션하고 세포를 원심분리기로 가라앉힌 후 펠렛의 사진을 찍었다.

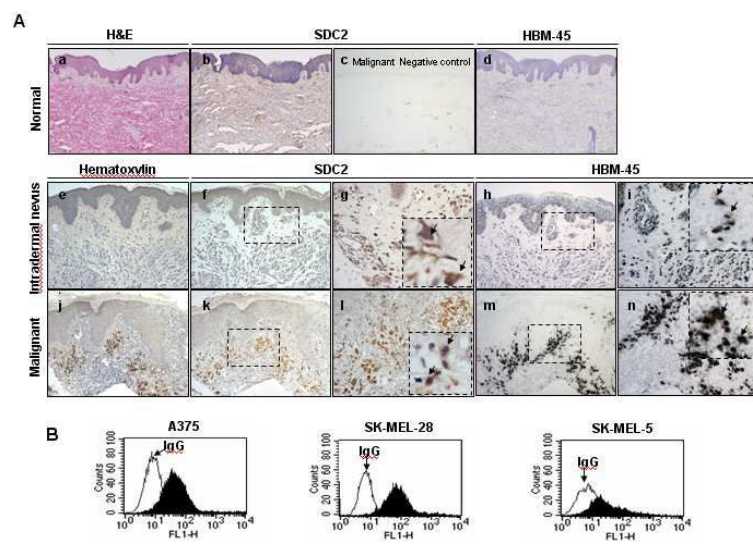
[0162] 도 13은 악성 흑색종에서 신데칸-2가 높이 발현되어 있고, 멜라닌 합성도 증가되어있다는 것을 나타내는 그림이다. 파라핀 충전된 조직단편들을 항-신데칸-2 항체 (SDC2, a, b)과 항-HMB-45 항체 (c, d)로 면역염색하였다. 화살표들은 신데칸-2와 HMB-45의 강한 면역반응이 나타내는 곳을 표시했다. 그림들은 5번의 실험들 중 대표적인 한 사진만을 나타냈다.

도면

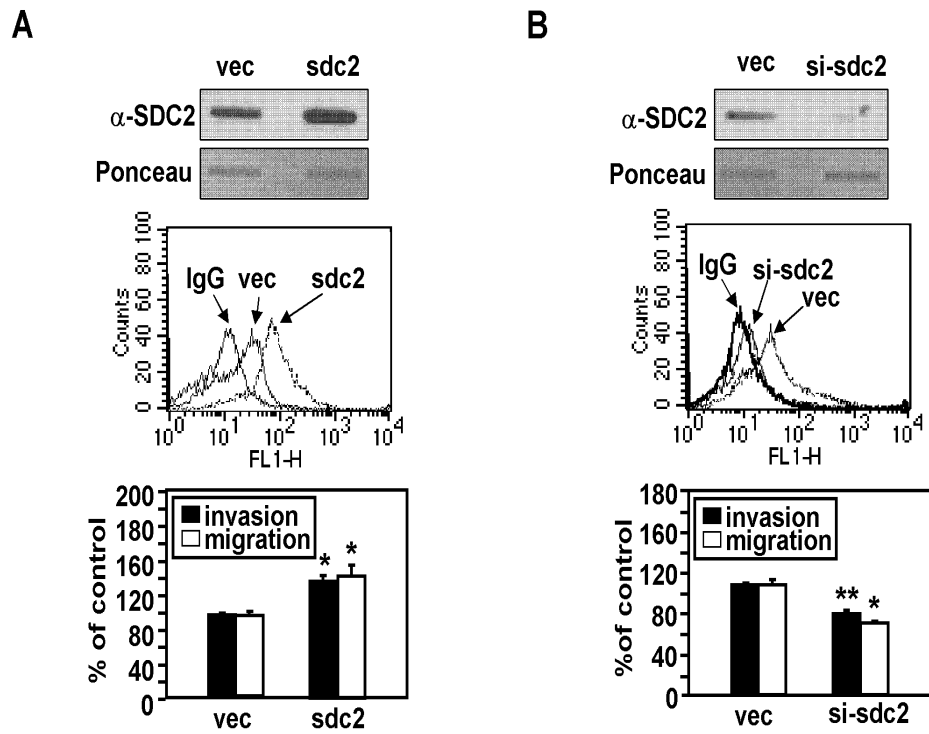
도면1



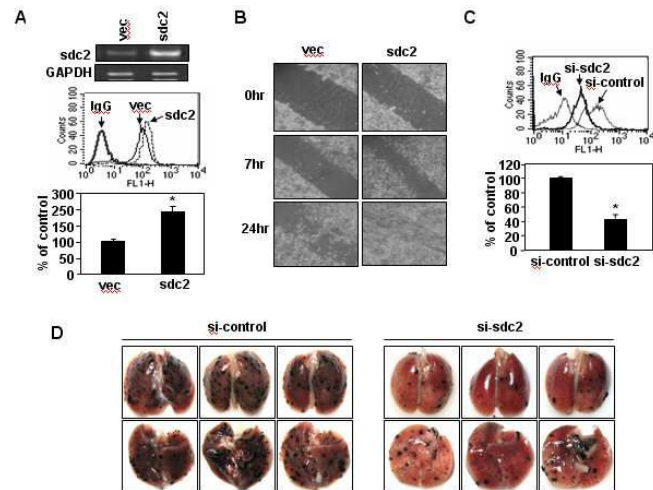
도면2



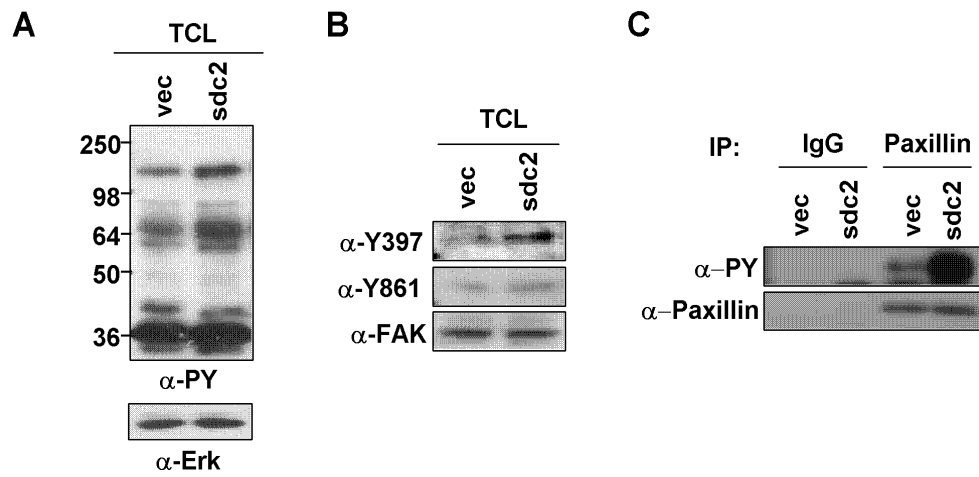
도면3



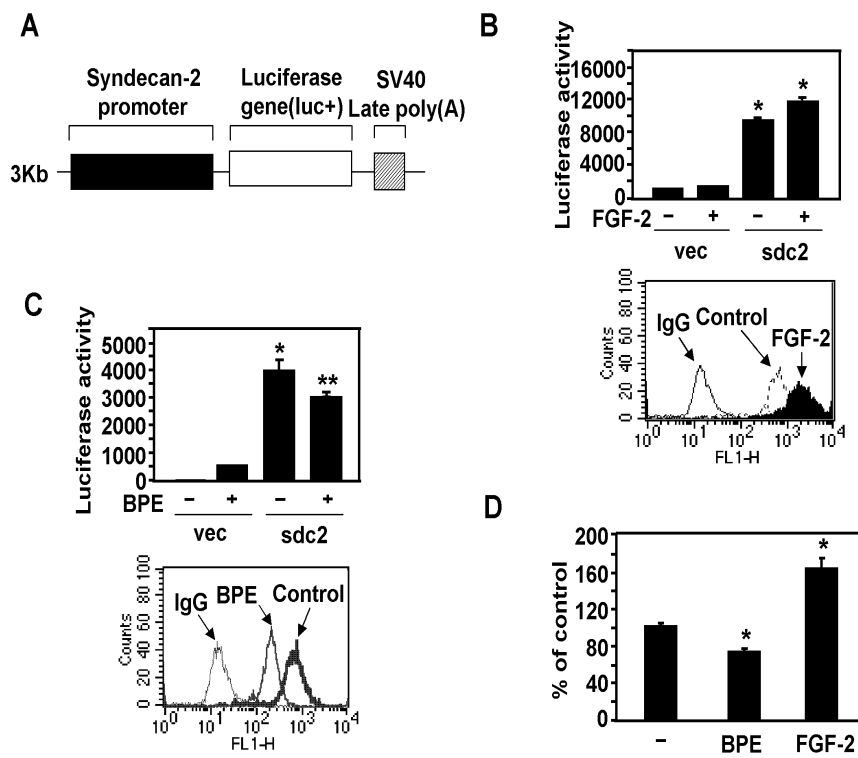
도면4



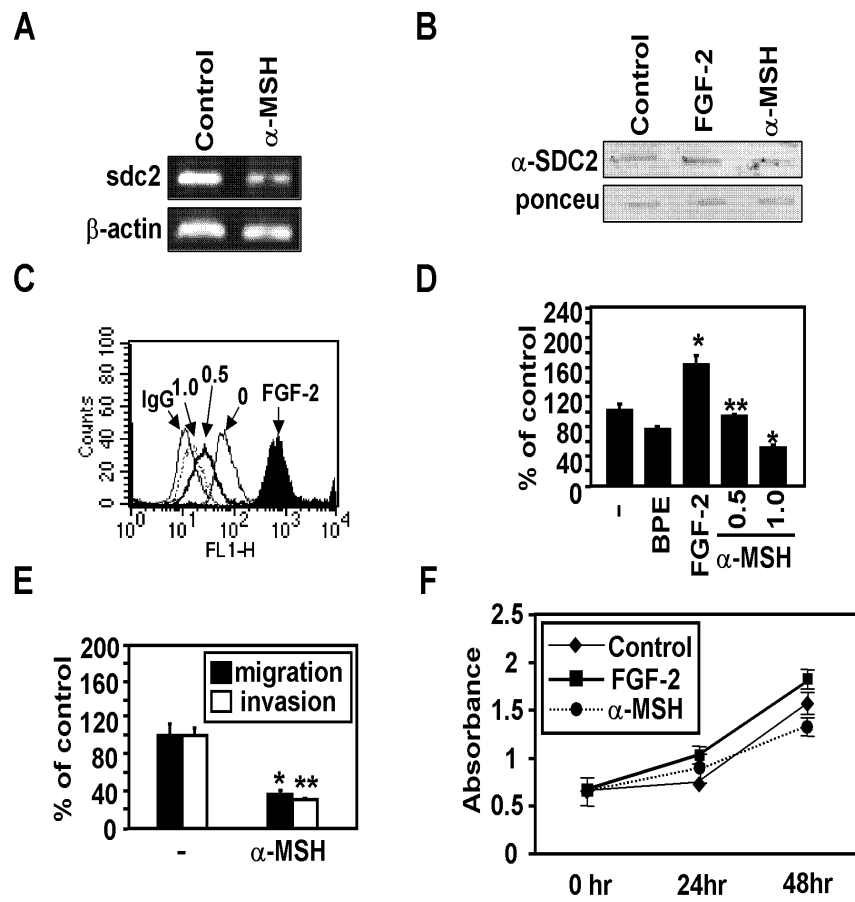
도면5



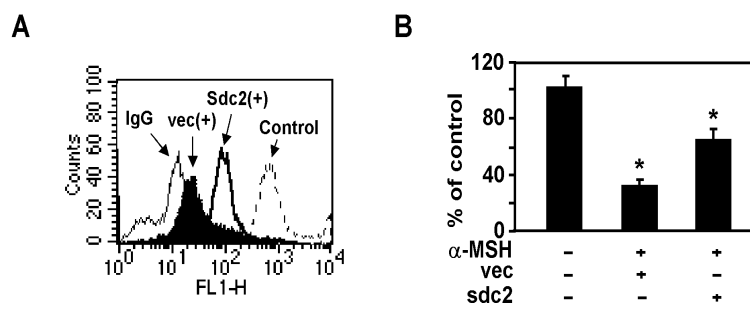
도면6



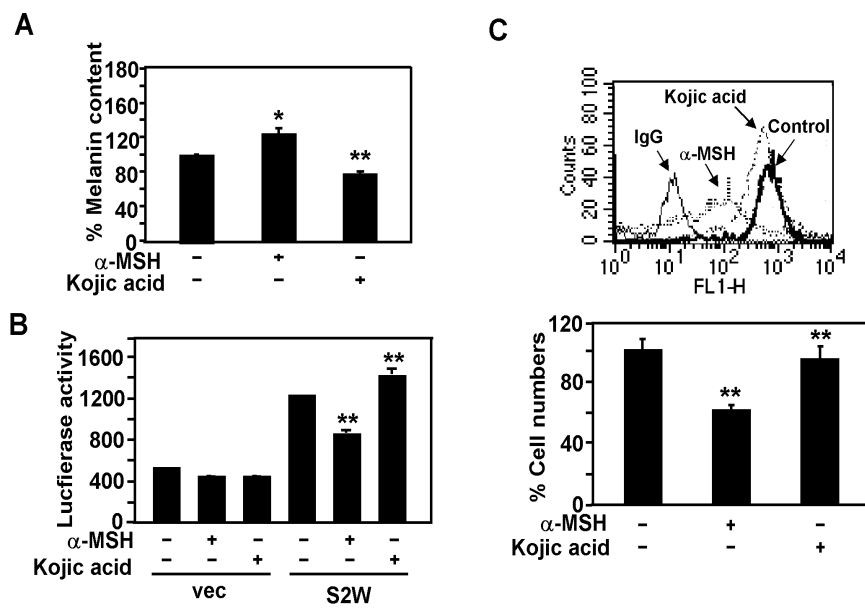
도면7



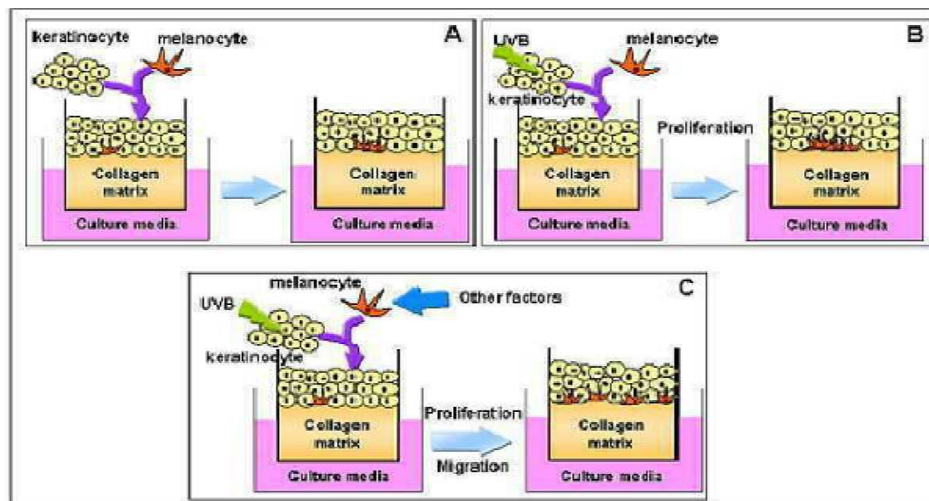
도면8



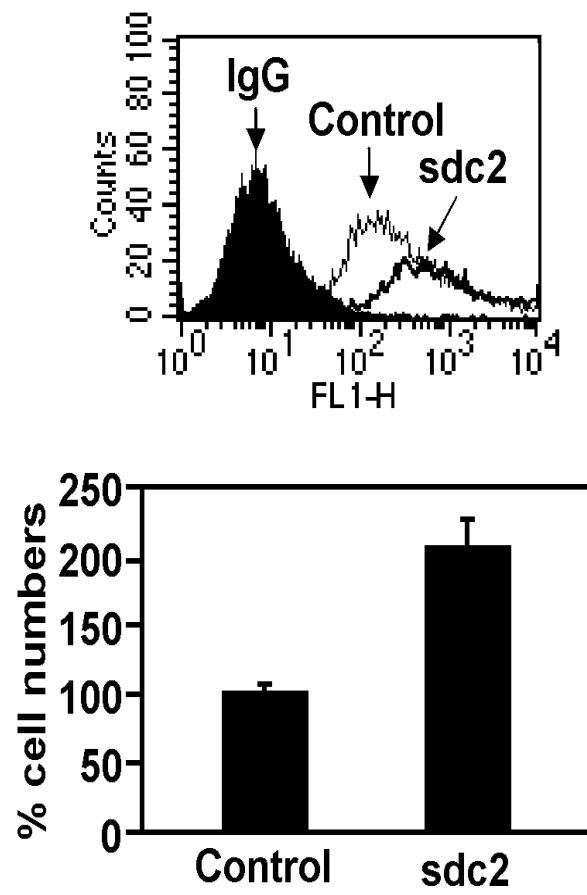
도면9



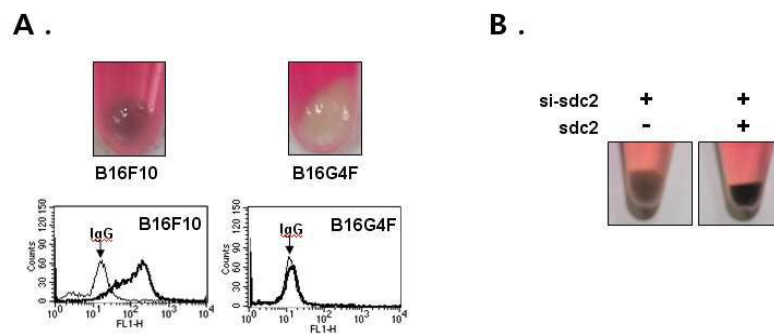
도면10



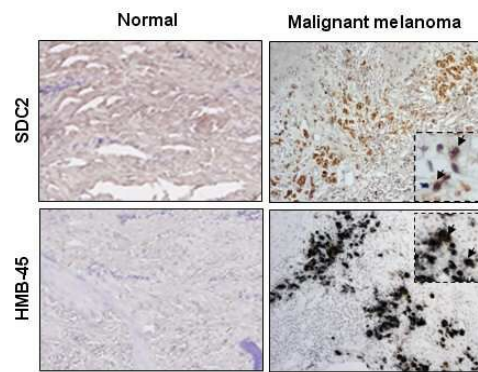
도면11



도면12



도면13



서열 목록

<110> EHWA UNIVERSITY INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
 <120> A composition for preventing or treating migratory skin cell or melanin synthesis related diseases

<160> 12

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 201

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Arg Ala Trp Ile Leu Leu Thr Leu Gly Leu Val Ala Cys Val
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Ser Arg Ala Glu Leu Thr Ser Asp Lys Asp Met Tyr Leu
 20 25 30

Asp Asn Ser Ser Ile Glu Glu Ala Ser Gly Val Tyr Pro Ile Asp Asp
 35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ala Asp Glu Asp Val Glu
 50 55 60

Ser Pro Glu Leu Thr Thr Ser Arg Pro Leu Pro Lys Ile Leu Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Lys Val Glu Thr Thr Thr Leu Asn Ile Gln Asn Lys
85 90 95

Ile Pro Ala Gln Thr Lys Ser Pro Glu Glu Thr Asp Lys Glu Lys Val
100 105 110

His Leu Ser Asp Ser Glu Arg Lys Met Asp Pro Ala Glu Glu Asp Thr
115 120 125

Asn Val Tyr Thr Glu Lys His Ser Asp Ser Leu Phe Lys Arg Thr Glu
130 135 140

Val Leu Ala Ala Val Ile Ala Gly Gly Val Ile Gly Phe Leu Phe Ala
145 150 155 160

Ile Phe Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Asp Glu
165 170 175

Gly Ser Tyr Asp Leu Gly Glu Arg Lys Pro Ser Ser Ala Ala Tyr Gln
180 185 190

Lys Ala Pro Thr Lys Glu Phe Tyr Ala
195 200

<210> 2
<211> 606
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atgcggcgcg cgtggatcct gctcaccttg ggcttggtgg cctgcgtgtc gccggagtcg 60

agagcagagc tgacatctga taaagacatg taccttgaca acagctccat tgaagaagct 120

tcaggagtgt atcctattga tgacgatgac tacgcttctg cgtctggctc gggagctgat 180

gaggatgtag agagtccaga gctgacaaca tctcgaccac ttccaaagat actgttgact 240

agtgctgctc caaaagtgga aaccacgacg ctgaatatac agaacaagat acctgctcag 300

acaaagtcac ctgaagaac tgataaagag aaagttcacc tctctgactc agaaaggaaa 360

atggaccag ccgaagagga tacaatgtg tatactgaga aacactcaga cagtctgttt 420

aaacggacag aagtcctagc agctgtcatt gctggaggag ttattggctt tctctttgca 480

atctttctta tctgctgtt ggtgtatcgc atgagaaaga aggatgaagg aagctatgac 540

cttgagaaac gcaaaccatc cagtgtgtgt taccagaagg cacctactaa ggagttttat 600

gcgtaa 606

<210> 3
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
 gatccctga cgatgactac gcttctttca agagaactgc tactgatgcg aagatttttg 60

gaaa 64

<210> 4
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
 agcttttcca aaaatgacga tgactacgct tcttctcttg aaactgctac tgatgcgaag 60

aggg 64

<210> 5
 <211> 19
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 5

ggagaaacau ucagacaau

19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 6

auugucugaa uguuucc

19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

atgcgggtac gagccacgtc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

cgggagcagc actagtgagg 20

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
tggaatcctg tggcatccat gaaa 24

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
taaaacgcag ctcaagtaaca gtccg 25

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
ggtaccatct catcaacacc aa 22

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

agggatatga ggccatggta at

22