(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0118945
(43) 공개일자 2011년11월02일

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 5/095* (2010.01)
(21) 출원번호 10-2010-0038361
(22) 출원일자 2010년04월26일
심사청구일자 2010년04월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김찬화
서울 용산구 이촌1동 이촌코오롱아파트 103-402
박수현
서울특별시 강남구 수서동 동익아파트 802동 902호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

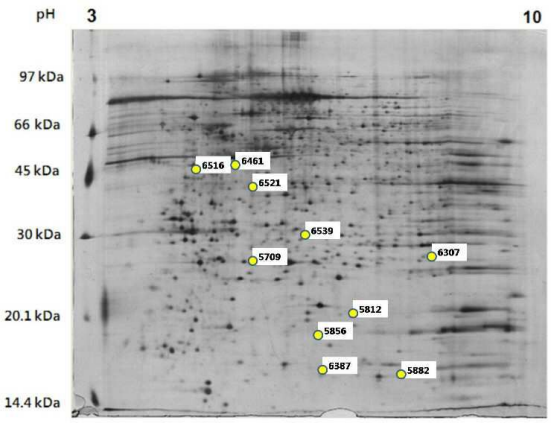
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커

(57) 요 약

본 발명은 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커, 상기 단백질성 마커의 변화를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물, 상기 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 키트, 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 검출하는 방법, 및 상기 단백질성 마커를 활용한 대장암 줄기세포 저해제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

이은경

서울특별시 성동구 옥수2동 극동아파트 2-207

한기연

인천광역시 부평구 산곡3동 현대1차아파트 102동 1301호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커:

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 20-22 kD의 분자량을 갖는 Profilin;

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 16-18 kD의 분자량을 갖는 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein;

서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 16-18 kD의 분자량을 갖는 Prefoldin subunit 5;

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 13-15 kD의의 분자량을 갖는 Histidine triad nucleotide-binding protein 1;

서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고 48-50 kD의 분자량을 갖는 Putative uncharacterized protein;

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고 22-24 kD의 분자량을 갖는 Glutathione S-transferase P;

서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고 41-43 kD의 분자량을 갖는 Actin, aortic smooth muscle;

서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고 32-34 kD의 분자량을 갖는 similar to 40S ribosomal protein SA;

서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고 36-38 kD의 분자량을 갖는 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I; 및

서열번호 10의 아미노산 서열을 가지고 38-40 kD의 분자량을 갖는 Fructose-bisphosphate aldolase A.

청구항 2

제 1항의 단백질성 마커의 존재 여부와, 그 양, 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 단백질성 마커의 존재 여부와, 그 양, 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질은 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물.

청구항 4

제 1항의 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와, 그 발현량, 발현 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와, 그 발현량, 발현 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질은 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 mRNA를 검출하기 위한 RT-PCR용 프라이머인 것을 특징으로 하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물.

청구항 6

제 2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 키트.

청구항 7

대장암 줄기세포의 선별에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자로부터 제 1항의 단백질성 마커를 검출하는 방법.

청구항 8

제 1항의 단백질성 마커를 발현하는 세포 또는 동물에 시험 화합물을 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 상기 단백질성 마커의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 대장암 줄기세포 저해제의 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 대장암 일반 세포에서보다 대장암 줄기세포에서 더 많이 혹은 더 적게 발현되는 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커, 및 이를 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 본 발명은 인간 대장암 세포주를 대장암 줄기세포의 마커라고 알려져 있는 CD133을 이용하여 CD133+ 세포와 CD133- 세포로 분리하였을 때, 이들 사이에서의 단백질 발현량 차이를 확인하고, 차이를 보이는 단백질의 특징 연구를 통하여 대장암 줄기세포를 선별할 수 있는 마커로 사용될 수 있는 단백질 개발에 관한 것이다. 즉, CD133+ 세포에서 특이적으로 더 많이 발현하는 단백질, 및 CD133- 세포에서 더 많이 발현하는 단백질을 확인하여 대장암 줄기세포와 일반 대장암 세포 사이의 특징 차이를 확인할 수 있는 단백질 연구를 통해 대장암 줄기세포 중심의 대장암 치료에 적용하기 위한 마커 개발을 위한 발명이다.

[0003] 암 환자에서 관찰되는 암은 여러 종류의 암세포로 구성되어 있으며 각각의 암세포는 자가 복제 능력을 가지고 있고 유전적 불안정성으로 인하여 여러 신호 작용에 의하여 다른 종류의 암세포로 변화할 수 있다. 모든 암세포가 자가 복제 능력이 있다면 몇몇의 암세포만으로도 암을 형성할 수 있어야 하지만 실제로 일부는 암을 형성할 수 있는 능력이 없거나, 수많은 암세포를 동시에 주입하여야 암이 형성되는 현상을 나타낸다.

[0004] 과거 연구에서 많은 연구자들이 줄기세포의 특이적 표면단백질을 표지분석법을 통해 분석하였고, 암 조직에서 줄기세포 표지인자를 발견하여 선별된 세포들에서 종양능을 비교하여 종양형성능력이 탁월한 일부의 세포가 존재함을 발견하고 이들을 암 줄기세포(cancer stem cells)이라 명명하였다 (Reya, T. et al., (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells, Nature 414,105-111; Collins, A. et al. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, Cancer Res 65,10946-10951).

[0005] 이러한 연구를 통하여 일부의 암세포만 암을 형성할 수 있는 능력을 가지고 있다는 가설이 제시되었고, 이것을 줄기세포와 비슷한 개념으로 암 줄기세포로 연구되기 시작하였다. 암 줄기세포는 자가 복제 능력을 유지하고 자기와 같은 종류의 암 줄기세포를 만들어내는 동시에 좀 더 분화한 형태의 여러 종류의 암세포를 만들어낸다. 이렇게 분화된 세포들은 암 줄기세포와 달리 자가 복제 능력이 없으며 스스로 암을 만들어 낼 수도 없다. 따라서 일반적인 암 조직에는 자가 복제가 가능하고 스스로 암을 만들어 낼 수 있는 소수의 암 줄기세포와 자가 복제가 불가능하며 스스로 암을 만들어 낼 수 없는 일반 암세포가 섞여 암을 생성한다고 할 수 있다.

[0006] 암 줄기세포의 존재가 증명된 이래로 유방암, 뇌종양, 대장암, 대장암 등의 순으로 암 줄기세포가 실재한다는 증거들이 제시되었으며, 특히 대장암 줄기세포 표지자로는 CD133이 주로 연구되었다 (Lucia Ricci-Vitiani, et

al. 2009, Colon cancer stem cells, J Mol Med).

[0007] 이러한 암 줄기세포의 발견은 임상적인 부분에서 중요성을 지니는데, 암 줄기세포 표지자 연구를 통하여 다양한 암세포들 중에서 암을 치료하기 위해 꼭 제거해야할 암세포들을 인지할 수 있다는 점에 있어 기존의 화학적, 물리적 치료방법으로 치료 불가능했던 암 줄기세포를 사멸시키는 치료 방법 연구에 도움을 줄 것이다. 암 줄기세포를 제거하는 것은 암세포를 만들어내는 근원을 제거하는 것으로 암치료에 획기적인 방법을 가져올 것이라고 예상된다. 현재 여러 암에서 암 줄기세포의 표지자가 발견되고 여러 가지 실험방법을 사용하여 암 조직으로부터 암 줄기세포를 분리해낼 수 있게 되었다. 여러 암에서 암 줄기세포를 분리해내어 암 줄기세포의 특징을 이용해 암 줄기세포를 사멸시키는 방법을 찾아내는 일은 암 치료에 많은 도움을 줄 것으로 예상된다.

[0008] 이렇게 암 줄기세포의 표지자 연구와 암 줄기세포 특징 연구가 전 세계에서 이루어지고 있으며, 다양한 종류의 암에 대하여 연구가 진행되고 있다. 그 중에서도 본 발명은 대장암 줄기세포에 대해 진행되었는데, 이 대장암은 서구에서는 두 번째로 발생률과 사망률이 높은 악성 종양이며, 우리나라에서도 식생활 습관이 서구화되면서 점차 발생 빈도와 사망률이 증가하여, 2008년 통계에 따르면 전체 악성 종양 중 3위를 차지하고 있다. 이러한 대장에서 악성 종양이 일어나는 기전은 대장 점막 하부에 위치하는 crypt에 있는 점막 형성에 관여하는 정상적인 줄기세포에서 돌연변이(mutation)가 일어나 과잉 증식하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히 최근의 암 줄기세포 연구는 대장암 상피세포에서의 종양 형성 원인과 바이오마커 개발에 많은 진전을 가져올 수 있게 하였다.

[0009] 이러한 암 줄기세포 특이적 치료법 개발에서 가장 중요한 것은 암 줄기세포의 생물학적 특징을 분석하는 일이다. 여러 종류의 세포가 섞여있는 암 조직에서 암 줄기세포를 분리하고, 공통된 암 줄기세포만의 특징을 밝혀낼 수 있다면, 아직 확실한 치료법이나 치료약이 없는 암 줄기세포에 대한 특이적 치료법을 개발하고 암 환자의 치료 효과를 획기적으로 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 2차원 전기영동기술을 이용하여 인간 대장암 줄기세포에서 일반 암세포에 비하여 감소 및 증가하는 마커 단백질들을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 대장암 줄기세포와 일반 대장암 세포 사이의 특징 차이를 확인할 수 있는 단백질 연구를 통해 대장암 줄기세포 중심의 대장암 치료에 적용하기 위한, 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은, 상기 단백질성 마커의 변화를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은, 상기 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 키트를 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은, 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은, 상기 단백질성 마커를 활용한 대장암 줄기세포 저해제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 제공한다:

[0017] 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 20-22 kD의 분자량을 갖는 Profilin;

[0018] 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 16-18 kD의 분자량을 갖는 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein;

[0019] 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 16-18 kD의 분자량을 갖는 Prefoldin subunit 5;

[0020] 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 13-15 kD의의 분자량을 갖는 Histidine triad nucleotide-binding protein 1;

[0021] 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고 48-50 kD의 분자량을 갖는 Putative uncharacterized protein;

[0022] 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고 22-24 kD의 분자량을 갖는 Glutathione S-transferase P;

[0023] 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고 41-43 kD의 분자량을 갖는 Actin, aortic smooth muscle;

[0024] 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고 32-34 kD의 분자량을 갖는 similar to 40S ribosomal protein SA;

[0025] 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고 36-38 kD의 분자량을 갖는 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I; 및

[0026] 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지고 38-40 kD의 분자량을 갖는 Fructose-bisphosphate aldolase A.

[0027] 본 발명자들은 대장암 줄기세포와 대장암 세포의 프로테옴을 분석하여 대장암 세포에 비하여 대장암 줄기세포에서 특징적으로 발현이 증가 또는 감소하는 단백질들을 검출하여 대장암 줄기세포의 선별에 사용될 수 있는 단백질성 마커들을 발굴하였다.

[0028] 본 발명에 사용된 용어, '프로테옴(proteome)'이란 유전체로부터 만들어질 수 있는 모든 단백질의 총체를 의미하는데, 이는 한 세포 또는 조직에서 특이적인 생리 상태나 병리 상태에 따라 프로테옴의 양상이 항상 변화하게 되는 동적인 개념이다. 프로테오믹스(proteomics)는 이러한 프로테옴을 연구하는 방법과 기술을 포괄적으로 지칭하는 것으로, 단백질의 성질을 유전자의 발현, 번역 후 변형(post-translational modification), 다른 단백질과의 결합에 초점을 두어 연구함으로써 세포내 변형 과정과 네트워크 형성을 질병의 진행 과정과 연계시켜서 총체적으로 이해하고자 하는 연구 분야를 뜻한다. 이와 같이 프로테옴은 한 세포 또는 조직에서의 생리 상태나 병리 상태를 대변하므로, 질병의 진단에 직접 쓰일 수 있는 진단의 마커를 찾는 방법으로는 가장 적합한 것이다. 또한, 암 줄기세포와 같은 경우 특정 유전자의 발현이 암 줄기세포의 증식 및 분화에 관여하여 암 재발을 촉진하는 것으로 확인된다면, 그 단백질의 존재를 확인 및 동정하여 암 줄기세포 저해제 개발의 표적 단백질로 삼을 수도 있다. 게노믹스(Genomics)의 뛰어난 민감도와 유전자의 쉬운 증폭 등의 장점으로 이를 이용한 진단 및 치료제 개발 역시 많이 진행되고 있으나, DNA나 mRNA 단계에서의 변화가 실제로 세포 내에서 활성을 갖는 단백질의 변화로 곧바로 연결되지는 않을 수 있다는 점에서 이론상의 문제점이 남아있으며, 나아가 현실적으로는 유전물질이 없는 체액의 경우 프로테오믹스가 유일한 연구방법이다. 현재 비-침습적 접근(non-invasive approach)으로 진단에 쓰이고 있는 것은 혈장, 혈청, 뇨, 뇌척수액, 양수, 분비액 등의 체액인데, 많은 연구자들이 진단 마커로 질병 특이적인 단백질을 발굴하기 위해 프로테오믹스 방법을 도입하고 있다.

[0029] 본 명세서에서 "대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커"는 대장암 줄기세포를 대장암 세포와 구분해내는 기준이 되는 물질 중에서 이 물질이 특히 단백질을 주요 구성물질로 하고 있는 것을 지칭한다. 본 발명에서 이 단백질성 마커는 초기 대장암 줄기세포에서의 존재량이 대장암 세포에서의 존재량과 비교할 때 특징적으로 많거나 적다.

[0030] 본 발명은 대장암 줄기세포의 프로테옴을 대장암 세포의 프로테옴과 분석한 것이기 때문에, 이렇게 확인된 단백질성 마커는 대장암 줄기세포에 대하여 특이적이라고 할 수 있으며, 따라서 대장암 줄기세포를 선별하는데 유용하게 사용될 수 있다. 나아가, 이렇게 확인된 단백질성 마커가 대장암 줄기세포에서 변화 양상이 두드러지는 것이라는 점을 감안한다면, 이 단백질성 마커의 생리학적 기능은 대장암 줄기세포의 증식 및 분화에 직접적으로 관계된 것일 가능성이 있으며, 따라서 이 단백질성 마커는 대장암 발병 또는 재발의 메커니즘을 연구하거나 대장암 줄기세포를 타겟으로 하는 대장암 치료제의 개발을 위한 표적 단백질로서도 유용하게 사용될 수 있다.

[0031] 특히 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커는 실제의 대장암 줄기세포에서 프로테옴 수준에서 발굴해낸 것이기 때문에, 종래 DNA 또는 mRNA 수준에서 발견되는 대장암 줄기세포의 특이적 마커들에 비하여 더욱 임상적으로 활용 가치가 높은 마커들이며, 대장암 줄기세포에만 한정되어 있다는 점에서 대장암 줄기세포의 저해제의 표적으로서도 매우 유용한 것이다.

[0032] 본 발명에서, 상기 단백질성 마커는 상기 분자량을 가지는 한 상기 서열번호를 가지는 전장 단백질의 일부일 수 있으며, 이 경우 도 5 내지 도 14의 MS/MS 결과에서 빨간색으로 표시된 트립신 분해된 펩티드 서열들을 가진다.

상기 트립신 분해된 펩티드란 프로테옴 분석의 방법으로서 MALDI-TOF 또는 MS/MS 분석을 위해 트립신(trypsin)으로 분해된 단백질의 펩티드를 의미한다. 또한 상기 분자량은 2차원 전기영도(two-dimensional electrophoresis) 상에서 확인된 값으로서 일반적으로 허용되는 실험상의 오차범위를 포함한다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질성 마커의 존재 여부와, 그 양, 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물에서, 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 특이적인 검출은 생물학적 시료 내에 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커가 존재하는지 여부 및 그 양과 패턴을 확인하는 과정을 의미하며, 예를 들어, 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 그 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하는 과정이 활용될 수 있다. 본 명세서에서 "생물학적 시료"란 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴이나, 이 단백질성 마커에 관한 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출할 수 있는 세포나 조직 등을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 "항체"란 항원의 항원결정기(epitope)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함하는 개념이다.

[0035] 본 발명에서, 상기 다클론 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 항원인 단백질성 마커 또는 그 항원결정기를 갖는 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되면, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리·정제한다.

[0036] 또한 상기 단일클론 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein (1975) Nature, 256:495))에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 단백질을 20 μg을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩티드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화 시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, ELISA 방법을 사용하여 원하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 단일클론 항체를 분리·정제한다.

[0037] 상기 항체를 이용하여 단백질의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 측정하는 방법으로는, 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테를로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0038] 이 분석 방법들을 통하여, 대장암 환자의 생물학적 시료에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 대장암 줄기세포의 생물학적 시료에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 판단할 수 있으며, 궁극적으로 대장암 환자의 조직으로부터 대장암 줄기세포를 선별할 수 있게 된다.

[0039] 여기서 "항원-항체 복합체"란 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커와 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량이나 형성 패턴은 통상 2차 항체에 연계된 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기 및 패턴을 검출함으로써 측정이 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 레독스 분자, 방사선 동위원소 등을 예로 들 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, β-D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제, 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β-라타마제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 형광물이 사용되는 경우 이용 가능한 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 리간드가 사용되는 경우 이용 가능한 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 발광물이 사용되는 경우 이용 가능한 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 미소입자가 사용되는 경우 이용 가능한 미소

입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 레독스 분자가 사용되는 경우 이용 가능한 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[RU(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 방사성 동위원소가 사용되는 경우 이용 가능한 방사성 동위원소에는 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I 또는 ^{186}Re 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0040] 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물에서, 상기 “대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 특이적으로 검출하는 물질”은 해당 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 검출하기 위한 분석 방법에서 해당 단백질성 마커에 대하여 특이적으로 사용될 수 있는 임의의 물질일 수 있으며, 반드시 항체로 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물은 대장암 줄기세포와 대장암 세포에서 상기 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 차이를 검출하는 것에 기술적 특징이 있는 것이기 때문에, 이렇게 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 가능하게 하는 물질이라면 어떠한 것이라도 “대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 특이적으로 검출하는 물질”로서 사용될 수 있고 발명이 목적하는 기술적 효과를 달성할 수 있으며, 당업자라면 당업계의 평균적인 지식 및 공지기술을 참고하여 구체적인 실시양상에 따라 적당한 물질을 특별한 어려움 없이 선택하여 사용할 수 있을 것이다.

[0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와, 그 발현량, 발현 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물에서, 상기 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴은, 상기 단백질 자체를 검출하는 방법을 사용하는 것 외에도, 대장암 줄기세포와 대장암 세포가 포함된 시료 또는 조직에서 해당 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출함으로써 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 유추하는 방법을 사용할 수도 있다.

[0043] 여기서 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 검출은 통상적으로 해당 유전자의 전사로 인해 생성된 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하는 과정으로써 수행될 수 있다. 이러한 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하기 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블롯, DNA 칩 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0044] 이 분석 방법들을 통하여, 대장암 환자의 생물학적 시료에서의 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 대장암 줄기세포에서의 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴과 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 판단하며, 궁극적으로 대장암 환자의 조직에서 대장암 줄기세포를 선별하는 것이 가능하게 된다.

[0045] 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물에서, 상기 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 RT-PCR로 측정하기 위한 키트는 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커에 관한 mRNA에 특이적인 프라이머를 포함한다. 본 명세서에서 “프라이머”는 템플레이트(template)와 상보적으로 결합할 수 있고 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 템플레이트의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3’ 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 특정 유전자의 핵산 서열에 상보적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp 의 길이가 사용될 수 있다. 그 외 RT-PCR 키트는 구체적인 실시 양상에 따라 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNAse, RNAse 억제제 DEPC-수 (DEPCwater), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시시킬 수 있다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 다른 염기 서열을 포함할 수도 있다. 프라이머는 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.

[0046] 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물에서, 상기 “대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 특이적으로 검출하는 물질”은 해당 단백질성 마커를 코딩하는

유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 분석 방법에 있어서 해당 단백질성 마커에 특이적으로 사용될 수 있는 임의의 물질일 수 있으며, 반드시 RT-PCR용 프라이머에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물은 대장암 환자의 생물학적 시료와 대장암 줄기세포의 생물학적 시료에서 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 검출하는 것에 기술적 특징이 있는 것이기 때문에, 이러한 차이의 검출을 가능하게 하는 물질은 어떠한 것이라도 "대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 특이적으로 검출하는 물질"로서 사용될 수 있고 발명이 목적하는 기술적 효과를 달성할 수 있으며, 당업자라면 당업계의 평균적인 지식을 참고하여 구체적인 실시양상에 따라 적당한 물질을 선택하여 사용할 수 있을 것이다.

[0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 키트를 제공한다.

[0048] 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 키트는, 상기 대장암 줄기세포 선별용 조성물에 포함되는 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 특이적으로 검출하는 물질, 또는 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 특이적으로 검출하는 물질 외에 단백질 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 분석 방법 또는 유전자 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 진단 키트가 단백질의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 검출하기 위한 진단 키트인 경우에는, 이 진단 키트는 예를 들어 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 진단 키트일 수 있으며, 이러한 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 성분들, 예를 들어 표지된 2차 항체, 발색단 (chromopores), 효소 (예를 들어, 항체와 접합된 효소) 및 그의 기질, 및 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체 등을 포함할 수 있다. 한편, 상기 진단 키트가 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출하기 위한 진단 키트인 경우에는, 이 진단 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 진단 키트일 수 있으며, 이러한 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 구체적인 실시 양상에 따라 예를 들어 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNAse, RNAse 억제제 DEPC-수(DEPCwater), 멸균수, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍 등을 포함할 수 있다. 또한, 구체적인 실시 양상에 따라서는, 상기 대장암 줄기세포 선별용 키트는 DNA 칩 또는 단백질 칩을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대장암 줄기세포의 선별에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자로부터 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0050] 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 검출하는 방법은, 상기 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 대장암 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하고, 그 처리 결과로부터 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 차이를 검출함으로써 수행될 수 있다. 또한, 상기 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 대장암 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하고, 그 처리 결과로부터 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 검출함으로써 수행될 수 있다.

[0051] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질성 마커를 발현하는 세포 및 동물에 시험 화합물을 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 상기 단백질성 마커의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 대장암 줄기세포 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0052] 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커는 대장암 줄기세포에서 변화 양상이 두드러지는 것이기 때문에 대장암 줄기세포의 증식 및 분화에 직접 관여하는 단백질일 가능성이 있으며, 따라서 대장암 재발의 메커니즘을 연구하거나 대장암 줄기세포의 저해제의 개발을 위한 표적 단백질로서도 유용하게 사용될 수 있는 것이다. 즉, 본 발명의 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커는 대장암 치료의 중요한 전제를 해결한 것이므로, 따라서 이 단백질성 마커를 이용하여 대장암 치료제를 스크리닝하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다.

[0053] 상기 저해제를 스크리닝하는 방법에 사용하기 위한 시험 화합물을 포함하는 시료로서는 조직 추출액, 유전자 라

이브러리의 발현산물, 합성 화합물, 합성 펩티드, 천연 화합물 등이 있으나 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

[0054] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커, 상기 단백질성 마커의 변화를 검출하는 물질을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 조성물, 상기 대장암 줄기세포 선별용 조성물을 포함하는 대장암 줄기세포 선별용 키트, 상기 대장암 줄기세포 선별용 단백질성 마커를 검출하는 방법, 및 상기 단백질성 마커를 활용한 대장암 줄기세포 저해제 스크리닝 방법이 제공된다.

[0055] 상기 단백질성 마커는 대장암 줄기세포에 대하여 특이적이고 대장암 줄기세포를 선별하는데 유용하게 사용될 수 있다. 나아가, 이 단백질성 마커의 생리학적 기능은 대장암 줄기세포의 증식 및 분화에 직접적으로 관계된 것일 가능성이 있으며, 따라서 이 단백질성 마커는 대장암 재발의 메커니즘을 연구하거나 대장암 줄기세포 저해제의 개발을 위한 표적 단백질로서도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 자성 세포 분류(Magnetic cell sorting) 기법을 이용하여 CD133 양성 세포와 CD133 음성 세포를 분리한 후, 유세포 분석(Flow cytometry)을 이용하여 분리된 세포를 확인한 그래프이다.

도 2a는 2차원 전기영동(two-dimensional electrophoresis)을 이용하여 CD133 양성 세포가 발현하는 단백질을 나타낸 이미지이다.

도 2b는 2차원 전기영동을 이용하여 CD133 음성 세포가 발현하는 단백질을 나타낸 이미지이다.

도 3은 2차원 전기영동을 이용하여 CD133 양성 세포와 음성 세포 사이에 차이가 나는 단백질을 나타낸 이미지이다.

도 4a는 Profilin 2 단백질이 CD133 양성 세포에서 발현량이 증가한 것을 보여주는 웨스턴 블롯(western blot) 이미지이다.

도 4b는 ARPC5L 단백질이 CD133 양성 세포에서 발현량이 증가한 것을 보여주는 웨스턴 블롯 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0058] **실시예 1. 시료준비 (Sample preparation)**

[0059] 한국 세포주 은행에서 인간 대장암 세포주 HT-29를 구입하여 GIBCO사의 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포배양을 하였다. 배양 접시에 세포가 80% 이상 자라면 수거하여 용해버퍼(lysis buffer)를 넣고 차가운 상태를 유지하며 초음파(sonicator)를 이용하여 세포를 부숴주었다. 덩어리가 없도록 부숴준 세포가 포함된 용해버퍼의 5배 용량의 아세톤을 넣고 150분간 -20도에서 흔들어주며 냉각시켰다. -20도에서 침전된 단백질은 원심분리기(Union-55R centrifuge, 한일과학, Korea)로 4℃, 13,000 rpm에서 10분 동안 돌리면 여분의 지질이 제거되고 단백질만이 남게 하였다. 이러한 침전물을 공기 중에서 말리고 시료 완충액을 넣어 단백질 정량을 하여 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 시료 완충액의 조성은 다음과 같다: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-Cl(pH 8.5), 65 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% IPG buffer.

[0060] **실시예 2. CD133+, CD133- 세포의 분리**

[0061] 인간 대장암 세포주 HT-29를 GIBCO사의 RPMI1640 배지를 이용하여 세포배양을 하였다. 배양 접시에 세포가 80% 이상 자라면 수거하여 원심분리기에서 1400 g 로 5분간 침전시키고 배지를 제거하였다. phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, 0.5% bovine serum albumin (BSA)와 2 mM EDTA 로 조성된 MACS 버퍼 용액을 1:20으로

autoMACS Rinsing 용액(Miltenyi Biotec, CA, USA)과 희석하였다. 이 희석 용액으로 세포를 2번 씻어주고 난 후, 30 μl의 CD133 항체와 4℃에서 15분간 반응시켰다. 다시 MACS 버퍼 용액 1 ml로 2번 세포를 씻어주고 30 μl Anti-PE microbeads의 항체와 4℃에서 10분간 반응시켰다. MAC 버퍼 용액으로 세포를 씻어주고 MACS Separator의 자기장 영역에 LS Column을 설치하였다. 500 μl의 MACS 버퍼 용액으로 세포를 부유시킨 후, 천천히 Column에 로딩하여 배출되는 CD133 음성세포를 튜브에 받아냈다. 3 ml의 MACS 버퍼 용액을 3번 추가로 통과시켜 주고난 후, Column을 Separator에서 분리하여 5 ml의 MACS 버퍼 용액을 로딩하고, 피스톤으로 눌러 CD133 양성세포를 튜브에 받았다.

[0062] 이렇게 MACS로 분리한 세포를을 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)로 CD133 항체가 붙은 세포의 비율을 확인한 결과, 도 1의 그래프와 같이 분리가 잘 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이 결과 CD133 항체로 label된 세포가 CD133-로 분리된 군에서는 20% 정도의 낮은 수치를 보였으며, CD133+로 분리된 군에서는 87% 정도로 높은 수치를 보여 MACS를 통한 세포 분리 작업이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0063] **실시예 2. 이차원 전기영동(Two-Dimensional Electrophoresis)**

[0064] 2-1. 일차원 전기영동(Isoelectroforcusing, IEF)

[0065] 시료 완충액으로 처리된 시료의 단백질 양을 60 μg으로 하여 일차원 전기영동을 실시하였다. 시료의 총 부피가 450 μl이 되게 rehydration 완충액(8 M urea, 2% CHAPS, 13mM DTT, 1 % IPG buffer)을 섞어 일차원 전기영동을 할 수 있는 24 cm 스트립 홀더(strip holder)에 넣은 뒤 pH 4-7 범위의 Drystrip(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 스트립 홀더에 장착하였다. 20℃에서 5시간가량 스트립(strip)을 rehydration 완충액으로 불려준 뒤 다음과 같은 조건으로 일차원 전기영동을 수행하였다: 200 V 30분, 500 V 1분, 8,000 V 45분, 8,000 V 72000 Vhrs, 11시간 30분. 총 146 kVhr. 일차원 전기영동은 IPGphore(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 수행하였다.

[0066] 2-2. 이차원 전기영동(SDS-PAGE)

[0067] 일차원 전기영동이 끝난 스트립을 이차원 전기영동을 하기 위해, 일차원 전기영동이 끝난 스트립을 캡튜브(cap tube)에 넣고 일차 평형화 용액(6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT) 10 ml에 15분간 반응시킨 후 버리고, 다시 이차 평형화 용액(6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1.5% IAA) 10 ml을 넣고 10분간 재반응시켰다. 11~16%로 만들어진 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide 25×30 cm) 위에 반응이 끝난 스트립을 장착하고 0.5% 아가로즈로 실링(sealing)하였다. 이차원 전기영동은 Ettan Dalt(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 전기영동 완충액(24 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)을 넣고 전기영동을 실시하였다. 전기영동 조건은 다음과 같다: 70 V 1시간, 180 V 2시간, 360 V 2시간, 430 V 3시간 30분.

[0068] 2-3. 염색(Staining)

[0069] 이차원 전기영동이 끝난 뒤 젤을 가시화시키기 위해 은(silver) 염색을 하였다. 은 염색과정은 다음과 같다. 50% 메탄올, 12% 아세트산로 이루어진 용액에 12시간동안 반응시켜 고정화(Fixation)하고, 50% 에탄올로 20분간 3회 세척하고, 0.2% 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate) 용액으로 1분간 반응시켜 민감화(Sensitizing)하고, 증류수(distilled water, DW)하고, 0.1% 질산은(Silver nitrate), 0.075% 포름알데히드(formaldehyde, 37%) 용액으로 20분간 반응시켜 반응화(Improving)하고, 증류수로 다시 세척하고, 미리 차게 만든 6% 탄산나트륨(Sodium carbonate), 0.075% 포름알데히드(37%) 용액으로 약 7분간 반응시켜 가시화(Developing)하고, 50% 메탄올, 12% 아세트산 용액으로 처리하여 반응을 정지시켰다.

[0070] 2-4. 이미지 분석(Image Analysis)

[0071] 실험한 젤들을 분석하기 위해 먼저 ImageScanner(Amersham Pharmacia Bio-tech, Uppsala, Sweden)로 스캔하였다. 단백질 발현이 차이나는 점들을 분석하기 위해 이차원 전기영동 분석 전용 프로그램인 ImageMaster(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 분석을 수행하였다.

[0072] 도 2a는 CD133 양성 세포가 발현하는 단백질을 나타낸 이미지 분석결과이고, 도 2b는 CD133 음성 세포가 발현하는 단백질을 나타낸 이미지 분석결과이며, 도 3은 CD133 양성 세포와 음성 세포 사이에 차이가 나는 단백질을 나타낸 이미지 분석결과이다. 이들 결과에서 발현의 차이가 있는 점(spot)들을 이하에서 분석하였다.

[0073] **실시예 3. 질량분석(ESI-Q-TOF/MS/MS Analysis)**

[0074] 이미지 분석프로그램으로 찾아낸 점들을 동정하기 위해 이차원 전기영동이 끝난 젤로부터 점(spot)들을 오려냈다. 먼저 은을 없애기 위해 30 mM 페리시안화칼륨(Potassium Ferricyanide)과 100 mM 티오황산나트륨(Sodium Thiosulfate) 용액이 1:1로 섞인 탈염색 용액 100 μl을 젤 조각에 5분간 처리하였다. 이후에 400 μl의 물로 3번 세척하였다.

[0075] 다시 200 mM 탄화수소암모늄(ammonium bicarbonate)으로 반응한 뒤 물로 세척하였다. 아세토나이트릴(Acetonitrile)을 넣어 젤이 하얗게 변할 때까지 탈수시켰다. 이 젤을 진공 원심분리기(Speed vacuum centrifuge)에 넣어서 젤로부터 용액을 완전히 없앴다. 건조된 젤 조각은 0.2 μg의 트립신(promega)이 들어있는 50 mM의 탄화수소암모늄 20 μl로 얼음상에서 45분간 함수시켰다. 반응용액을 제거 후 50 mM의 탄화수소암모늄 30 μl을 넣은 후 37℃로 밤새 반응시켰다. 그 펩티드 용액은 C18 나노 칼럼(nano column, home made)을 이용하여 염분을 제거하였다.

[0076] 크로마토그래피 칼럼(Custom-made chromatographic columns)은 질량분석 이전에 펩타이드 염분제거와 농축용으로 사용되었다. Poros reverse R2 material(20-30 um bead size, PerSeptive Biosystems)의 100-300 nL로 구성된 칼럼은 단단히 조여진 GELoader tip(Eppendorp, hamburg, Germany)에 팩킹하였다. 10 mL 실린지(syringe)는 공기압으로 칼럼을 통해 물질을 통과시켰다. 펩타이드 용액 30 μl은 5% 포름산(formic acid) 용액 내에서 희석되어 칼럼 안으로 이동되었다. 그리고 30 μl은 5% 포름산 용액으로 세척되었다. MS/MS분석을 위해 펩타이드는 borosilicate nanoelectrospray needle(Micromass, Manchester, UK)에 50% methnol/49% H_2O/1% formic acid와 섞여 용출시켰다.

[0077] MS/MS는 Q-TOF2 mass spectrometer(Micromass, Mancheser, UK)상에서 nano-ESI로 수행하였다. 그 소스(source) 온도는 80℃이다. 1 kV의 전압은 안정된 flow rate(10-30 nL/min)를 생성하기 위해 0-5 psi의 nitrogen back-pressure와 혼합한 이온 소스(ion source)에서 borosilicate nanoelectrospray needles(EconoTipTM, New Objective, USA)에 적용하였다. 그 원뿔(cone) 전류는 40 V이다. Quardrupole analyser는 hexapole collision cell에서 분절화를 하기 위해 전구 이온(precursor ion)을 선택하는데 사용되었다. 충돌가스(collision gas)는 6-7 x 10-5 mbar의 아르곤(Ar)이며 출동 에너지(collision energy)는 20-30 V이다. 생성 이온은 반사기(reflector)와 작은 통로판 검사기(micro channel plate detector) 그리고 time-to-digital 변환기에 맞추어지는 TOF 분석기를 이용하여 분석되었다. 그 자료는 Mass Lynx Widows NT PC system을 이용하여 분석되었다.

[0078] 단백질을 동정하기 위해 모든 MS/MS 스펙트럼은 MASCOT search program (www.matrixscience.com)을 이용하여 NCBInr 데이터베이스에서 단백질 서열을 조사하였다.

[0079] 상기와 같이 대장암 줄기세포와 대장암 일반세포에서 다르게 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 ESI-Q-TOF/MS/MS를 이용하여 확인하였으며, 그 결과는 도 5 내지 도 14에 나타내었다.

[0080] **실시예 4. 웨스턴 블로팅(Western blotting)**

[0081] 4-1. SDS-PAGE 전기영동

[0082] 마그네틱 세포 분리 시스템(magnetic cell sorting system)을 통하여 CD133+ 세포와 CD133- 세포로 분리한 인간 대장암 세포주 HT-29를 단백질 20 μg을 10% SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 혈청 시료 15 ~ 20 μl(단백질 20 μg)에 SDS-PAGE loading 완충액 (60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 25% Glycerol, 14.4 mM 2-Mercaptoethnol, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8) 4 μl을 섞어 mini gel (6×8 ㎝)에서 분자량별(separating gel상에서 120 V로 로딩)로 분리하였다. 이때 사용한 running 완충액의 조성은 0.025 M Tris-Cl, 0.192 M Glycine, 1% SDS(pH 8.3)이다.

[0083] 4-2. 블롯팅(Blotting)

[0084] SDS-PAGE가 끝난 뒤 젤의 단백질을 Semi-dry 형태의 transfer kit(Bio-rad)을 이용하여 니트로셀룰로오스(NitroCellulose) 막으로 옮겼다. 젤 한 장 당 50 mA에서 1시간 30 분 동안 실시하였다.

[0085] 4-3. 항체반응

[0086] Profilin 2와 ARPC5L을 대상으로 하여 실시하였다. 막(Membrane)을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)시켰다. Profilin 2의 측정을 위해 일차 항체로는 Polyclonal antibody인 Profilin 2를 사용하였으며, Profilin 2의 antibody를 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 일차항체의 희석농도는 1/500으로 하였다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 10분씩 3번 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시킨다. 이차항체는 anti-goat를 사용하고, 희석농도는 anti-goat는 1/5,000이였다. 이차항체 반응 후에 15분씩 3번 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL(Pierce Biotechnology, Inc., USA.)로 가시화 시켰다.

[0087] 상기와 같이 이차원 전기영동실험을 수행한 결과, 다음과 같이 CD133+ 세포에서 보다 CD133- 세포에서 새롭게 발현되거나 발현양이 감소 및 증가하는 단백질들이 동정되었다.

[0088] 1) 대장암 줄기세포에서 발현이 증가하거나 감소하는 단백질

[0089] 전기영동을 수행한 결과 5개의 발현이 증가한 단백질(# 5812, # 5856, # 5882, # 6307, #6387)과 5개의 감소하는 단백질(# 5709, # 6461, # 6516, # 6521, # 6536)을 찾을 수 있었다 (표 1 참조). 발현이 감소한 단백질은 CD133 음성 세포의 단백질보다 약 200% 이상 감소하였으며, 증가한 단백질은 약 200% 이상 증가하였다. ESI-Q-TOF를 수행 한 결과 CD133 양성 세포에서 발현이 감소 및 증가한 단백질을 아래 표 1과 같이 동정하였다.

표 1

[0090]

스팟	분자량 (kDa)	단백질명	Vol.증감
6387	20.8	Profilin (PFN2)	양성세포에서만 발현됨
5812	16.9	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein (ARPC5L)	217%
5856	17.3	Prefoldin subunit 5 (PFDN5)	237%
5882	13.8	Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1)	311%
6307	48.5	Putative uncharacterized protein ENSP00000382160	양성세포에서만 발현됨
5709	23.3	Glutathione S-transferase P (GSTP1)	-230%
6461	42.0	Actin, aortic smooth muscle (ACTA2)	-372%
6516	32.7	similar to 40S ribosomal protein SA (p40) (RPSAP12)	-611%
6521	36.5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (EIF3I)	음성세포에서만 발현됨
6536	39.4	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)	-529%

[0091] 2) 단백질의 아미노산 서열의 결정

[0092] 상기와 같이 대장암 줄기세포와 대장암 일반세포에서 다르게 발현되는 단백질들을 ESI-Q-TOF/MS/MS를 이용하여 동정하여 도 2a 내지 도 2c의 결과를 얻었다. 이들 단백질의 아미노산 서열은 NCBInr 데이타베이스(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 서치하여 Profilin(서열번호 1), Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein(서열번호 2), Prefoldin subunit 5(서열번호 3), Histidine triad nucleotide-

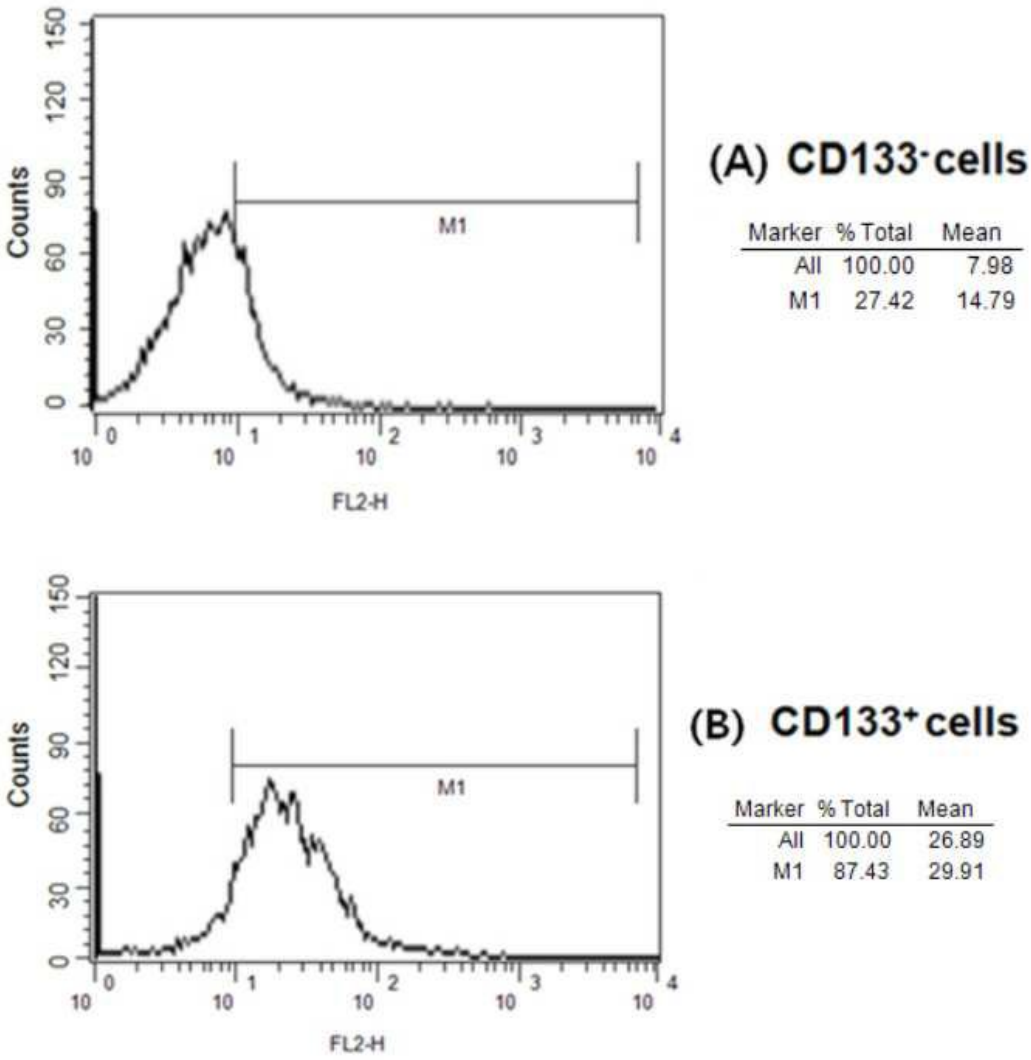
binding protein 1(서열번호 4), Putative uncharacterized protein(서열번호 5), Glutathione S-transferase P(서열번호 6), Actin, aortic smooth muscle(서열번호 7), similar to 40S ribosomal protein SA(p40)(서열번호 8), Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I(서열번호 9), Fructose-bisphosphate aldolase A(서열번호 10)을 가짐을 확인하였다.

[0093] 3) 웨스턴 블롯팅 시험결과

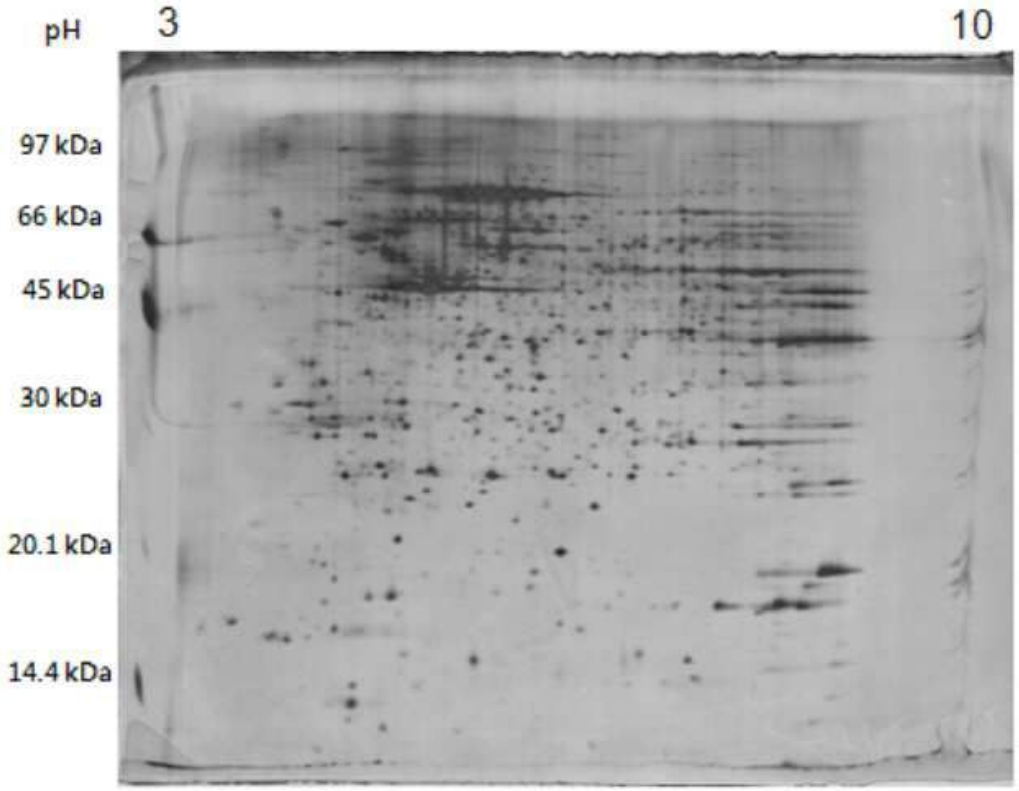
[0094] 상기 발현이 변화된 단백질들 중 대장암 줄기세포에서 발현이 증가한 단백질인 Profilin 2를 웨스턴 블롯 실험한 결과와 그 상대적인 강도를 도 4a에 나타내고, ARPC5L을 웨스턴 블롯 실험한 결과와 그 상대적인 강도를 도 4b에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, 대장암 줄기세포에서 Profilin 2와 ARPC5L의 양이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 2차 전기영동의 결과와 같은 결과를 나타내었다. 이것으로 보아 Profilin 2와 ARPC5L은 대장암의 진단 및 대장암 줄기세포의 연구에 매우 유용할 것으로 생각된다.

도면

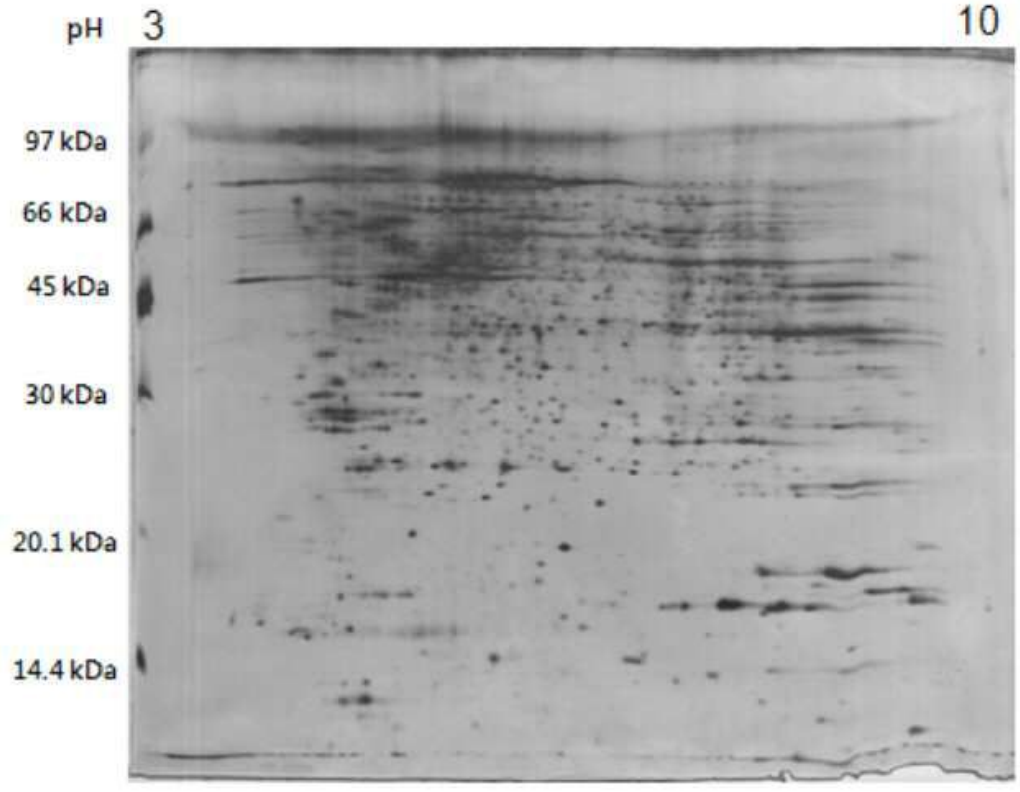
도면1



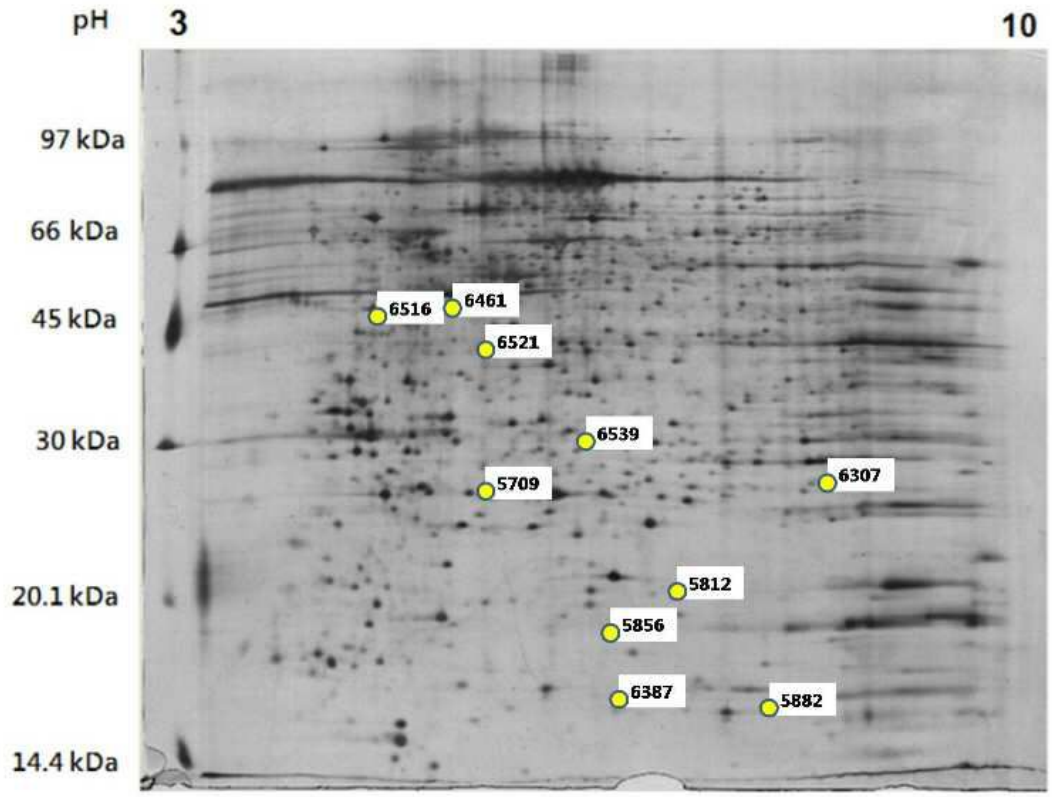
도면2a


pH
3
10
97 kDa
66 kDa
45 kDa
30 kDa
20.1 kDa
14.4 kDa

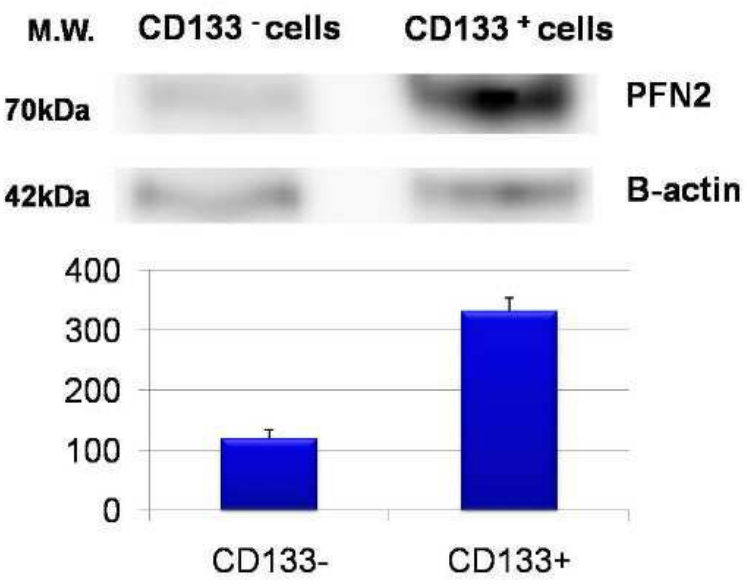
도면2b


pH
3
10
97 kDa
66 kDa
45 kDa
30 kDa
20.1 kDa
14.4 kDa

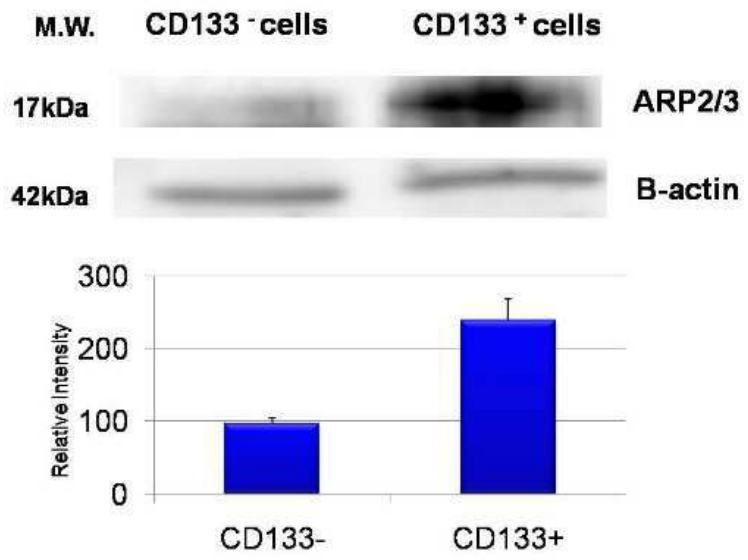
도면3


pH
3
10
97 kDa
66 kDa
45 kDa
30 kDa
20.1 kDa
14.4 kDa
6516
6461
6521
6539
5709
6307
5812
5856
6387
5882

도면4a


M.W.
CD133 - cells
CD133 + cells
70kDa
PFN2
42kDa
B-actin
400
300
200
100
0
CD133-
CD133+

도면4b



도면5

LOCUS NP_005331 126 aa linear PRI 21-JUN-2009
DEFINITION histidine triad nucleotide binding protein 1 [Homo sapiens].
1 madeiakaqv arpggdtifg kiirkeipak iifeddrcla fhdispqapt hflvipkkhi
61 sqisvaeddd esllghlmiv gkkcaadlgl nkgyrmvvne gsdggqsvyh vhlhvlggrq
121 mhwppg

도면6

LOCUS NP_112240 153 aa linear PRI 10-FEB-2008
DEFINITION actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like [Homo sapiens].
1 marntlssrf rrvdidefde nkfvdeqeea aaaaaepgpd psevdgllrq gdmlrafhaa
61 lrnspvntkn qavkeraqgv vlkvltnfks seieqavqsl drngvdllmk yiykgfekpt
121 enssavllqw hekalavggl gsiirvltar ktv

도면7

LOCUS EAW96684 85 aa linear PRI 18-DEC-2006
DEFINITION prefoldin subunit 5, isoform CRA_b [Homo sapiens].
1 myvpgklhdv ehvlidvgtg yyvektaeda kdffkrkidf ltkqmekiqp alqekhamkq
61 avmemmsqki qqltalgaaq ataka

도면8

LOCUS NP_005331 126 aa linear PRI 21-JUN-2009
DEFINITION histidine triad nucleotide binding protein 1 [Homo sapiens].
1 madeiakaqv arpggdtifg kiirkeipak iifeddrcla fhdispqapt hflvipkkhi
61 sqisvaeddd esllghlmiv gkkcaadlgl nkgyrmvvne gsdggqsvyh vhlhvlggrq
121 mhwppg

도면9

Putative uncharacterized protein ENSP00000382160

```
   1 mttsirqfts sssikgssgl gggssrtscq lsgglgagsc rpgsagglgs alggssyssc
  61 ysfgsgggyg sssfegvdgl lvggekatmq nlndrlasyl dkvraleead televkirdw
 121 yqrqapgpar dysqyyriie elqnkiltat vdnanillhi dnahlaaadf rtkfeteqal
 181 clsveading pcrvldeltl aradlemhie nlkeelaylk knheemnapr gqvggeinve
 241 mgaapgvdls rilnemreqy ekmaeknrkd aedwffskte elnrevatns elvqsgksei
 301 selrctmqal eielqsqlsm kaslegnlae tenrycmqls qiqgligsve erlaqllcem
 361 eqqnqeykil ldmkmrlele ittyhrlleg edahegllap thfklpaspa avttcqvpti
 421 veevqdgkvi ssreqvrqtt r
```

도면10

LOCUS EAW74650 173 aa linear PRI 18-DEC-2006
DEFINITION glutathione S-transferase pi, isoform CRA_c [Homo sapiens].

```
   1 mppytvvyfp vrgrcaalrm lladqgqswk eevvtvetwq egslkascly gqlpkfqdgd
  61 ltlyqsntil rhlgrtlgly gkdqqeaalv dmvndgvedl rckyisliyt nyagkddyvk
 121 alpgqlkpfe tllsqnqggk tfivgdqisf adynlldlll ihevlapgcl daf
```

도면11

LOCUS CAG38756 377 aa linear PRI 16-OCT-2008
DEFINITION ACTA2 [Homo sapiens].

```
   1 mceeedstal vcdngsglck agfagddapr avfpsivgrp rhqgvmvgmg qkdsyvgdea
  61 qskrgiltlk ypiehgiitn wddmekiwhh sfynelrvap eehptlltea plnpkanrek
 121 mtqimfetfn vpamyvaiqa vlslyasgrt tgivldsgdg vthnvpiyeg yalphaimrl
 181 dlagrdltdy lmkiltergy sfvttaerei vrdikeklcy valdfenema taasssslek
 241 syelpdgqvi tignerfrcp etlfqpsfig mesagihett ynsimkcdid irkdlyannv
 301 lsggttmypg iadrmqkeit alapstmkik iiapperkys vwiggsilas lstfqqmwis
 361 kqeydeagps ivhrkcf
```

도면12

LOCUS AAH66941 295 aa linear PRI 17-JUL-2006
DEFINITION Ribosomal protein SA [Homo sapiens].

```
   1 msgaldvlqm keedvlkfla agthlggtnl dfqmeqyiyk rksdgiyiin lkrtwekll1
  61 aaraivaien padvsvissr ntgqravlkf aaatgatpia grftpgtfln qiqaafrepr
 121 llvvtdprad hqplteasyv nlptialcnt dsplryvdia ipcnnkgahs vglmwwmlar
 181 evlrmrgtis rehpwevmpd lyfyrdpeei ekegqaaaek avtkeefqge wtapapefta
 241 tqpevadwse gvqvpsvpiq qfptedwsaq patedwsaap taqatewvga ttdws
```

도면13

```
LOCUS       NP_003748    325 aa    linear    PRI 12-MAR-2010
DEFINITION  eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I [Homo sapiens].
            1 mkpillqghe rsitqikynr egdllftvak dpivnvwysv ngerlgtymg htgavwcvda
           61 dwdtkhvltg sadnscrlwd cetgkqlall ktnsavrtcg fdfggniimf stdkqmgyqc
          121 fvsffdlrdp sqidnnepym kipcndskit savwgplgec iiaghesgel nqysaksgev
          181 lvnvkehsrq indiqlsrdm tmfvtaskdn taklfdsttl ehqktfrter pvnsaalspn
          241 ydhvvlgggq eamdvtttst rigkfearff hlafeeefgr vkghfgpins vafhpdgksy
          301 ssggedgyvr ihyfdpqyfe fefea
```

도면14

```
LOCUS       CAG46678    364 aa    linear    PRI 29-JUN-2004
DEFINITION  ALDOA [Homo sapiens].
            1 mpyqypaltp eqkkelsdia hrivapgkgi laadestgsi akrlqsigte nteenrrfyr
           61 qllltaddrv npciggvilf hetlyqkadd grpfpqviks kggvvgikvd kgvvplagtn
          121 getttqgldg lsercaqykk dgadfakwrc vlkigehtps alaimenanv laryasicqr
          181 ngivpivepe ilpdgdhdlk rcqyvtekvl aavykalsdh hiylegtllk pnmvtpghac
          241 tqkfsheeia matvtalrrt vppavtgitf lsggqseeea sinlnainkc pllkpwaltf
          301 sygralqasa lkawggkken lkaaqeeyvk ralanslacq gkytpsgqag aaaseslfvs
          361 nhay
```

서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation

<120> Proteinic markers for selecting colon cancer stem cells

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ala Gly Trp Gln Ser Tyr Val Asp Asn Leu Met Cys Asp Gly Cys
  1               5                  10                  15
Cys Gln Glu Ala Ala Ile Val Gly Tyr Cys Asp Ala Lys Tyr Val Trp
             20                  25                  30

Ala Ala Thr Ala Gly Gly Val Phe Gln Ser Ile Thr Pro Ile Glu Ile
         35                  40                  45
Asp Met Ile Val Gly Lys Asp Arg Glu Gly Phe Phe Thr Asn Gly Leu
     50                  55                  60
```

Ala Leu Gly Ala Lys Lys Cys Ser Val Ile Arg Asp Ser Leu Tyr Val
65 70 75 80
Asp Gly Asp Cys Thr Met Asp Ile Arg Thr Lys Ser Gln Gly Gly Glu
85 90 95
Pro Thr Tyr Asn Val Ala Val Gly Arg Ala Gly Arg Val Leu Val Phe

100 105 110
Val Met Gly Lys Glu Gly Val His Gly Gly Gly Leu Asn Lys Lys Ala
115 120 125
Tyr Ser Met Ala Lys Tyr Leu Arg Asp Ser Gly Phe
130 135 140

<210> 2
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Ala Arg Asn Thr Leu Ser Ser Arg Phe Arg Arg Val Asp Ile Asp
1 5 10 15
Glu Phe Asp Glu Asn Lys Phe Val Asp Glu Gln Glu Glu Ala Ala Ala

20 25 30
Ala Ala Ala Glu Pro Gly Pro Asp Pro Ser Glu Val Asp Gly Leu Leu
35 40 45
Arg Gln Gly Asp Met Leu Arg Ala Phe His Ala Ala Leu Arg Asn Ser
50 55 60
Pro Val Asn Thr Lys Asn Gln Ala Val Lys Glu Arg Ala Gln Gly Val
65 70 75 80
Val Leu Lys Val Leu Thr Asn Phe Lys Ser Ser Glu Ile Glu Gln Ala
85 90 95

Val Gln Ser Leu Asp Arg Asn Gly Val Asp Leu Leu Met Lys Tyr Ile
100 105 110
Tyr Lys Gly Phe Glu Lys Pro Thr Glu Asn Ser Ser Ala Val Leu Leu
115 120 125
Gln Trp His Glu Lys Ala Leu Ala Val Gly Gly Leu Gly Ser Ile Ile

130 135 140

Arg Val Leu Thr Ala Arg Lys Thr Val

145 150

<210> 3

<211> 85

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Tyr Val Pro Gly Lys Leu His Asp Val Glu His Val Leu Ile Asp

1 5 10 15

Val Gly Thr Gly Tyr Tyr Val Glu Lys Thr Ala Glu Asp Ala Lys Asp

20 25 30

Phe Phe Lys Arg Lys Ile Asp Phe Leu Thr Lys Gln Met Glu Lys Ile

35 40 45

Gln Pro Ala Leu Gln Glu Lys His Ala Met Lys Gln Ala Val Met Glu

50 55 60

Met Met Ser Gln Lys Ile Gln Gln Leu Thr Ala Leu Gly Ala Ala Gln

65 70 75 80

Ala Thr Ala Lys Ala

85

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Gln Val Ala Arg Pro Gly Gly Asp

1 5 10 15

Thr Ile Phe Gly Lys Ile Ile Arg Lys Glu Ile Pro Ala Lys Ile Ile

20 25 30

Phe Glu Asp Asp Arg Cys Leu Ala Phe His Asp Ile Ser Pro Gln Ala

35 40 45

Pro Thr His Phe Leu Val Ile Pro Lys Lys His Ile Ser Gln Ile Ser

50 55 60

Val Ala Glu Asp Asp Asp Glu Ser Leu Leu Gly His Leu Met Ile Val

65 70 75 80

Gly Lys Lys Cys Ala Ala Asp Leu Gly Leu Asn Lys Gly Tyr Arg Met

85 90 95

Val Val Asn Glu Gly Ser Asp Gly Gly Gln Ser Val Tyr His Val His

100 105 110

Leu His Val Leu Gly Gly Arg Gln Met His Trp Pro Pro Gly

115 120 125

<210> 5

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Thr Thr Ser Ile Arg Gln Phe Thr Ser Ser Ser Ser Ile Lys Gly

1 5 10 15

Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg Thr Ser Cys Gln Leu Ser

20 25 30

Gly Gly Leu Gly Ala Gly Ser Cys Arg Pro Gly Ser Ala Gly Gly Leu

35 40 45

Gly Ser Ala Leu Gly Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Cys Tyr Ser Phe Gly

50 55 60

Ser Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Phe Glu Gly Val Asp Gly Leu

65 70 75 80

Leu Val Gly Gly Glu Lys Ala Thr Met Gln Asn Leu Asn Asp Arg Leu

85 90 95

Ala Ser Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Ala Asp Thr Glu

100 105 110

Leu Glu Val Lys Ile Arg Asp Trp Tyr Gln Arg Gln Ala Pro Gly Pro

115 120 125

Ala Arg Asp Tyr Ser Gln Tyr Tyr Arg Ile Ile Glu Glu Leu Gln Asn

130 135 140

Lys Ile Leu Thr Ala Thr Val Asp Asn Ala Asn Ile Leu Leu His Ile
145 150 155 160
Asp Asn Ala His Leu Ala Ala Ala Asp Phe Arg Thr Lys Phe Glu Thr
165 170 175
Glu Gln Ala Leu Cys Leu Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly Pro Cys
180 185 190
Arg Val Leu Asp Glu Leu Thr Leu Ala Arg Ala Asp Leu Glu Met His

195 200 205
Ile Glu Asn Leu Lys Glu Glu Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Asn His Glu
210 215 220
Glu Met Asn Ala Pro Arg Gly Gln Val Gly Gly Glu Ile Asn Val Glu
225 230 235 240
Met Gly Ala Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met
245 250 255
Arg Glu Gln Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu
260 265 270

Asp Trp Phe Phe Ser Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr
275 280 285
Asn Ser Glu Leu Val Gln Ser Gly Lys Ser Glu Ile Ser Glu Leu Arg
290 295 300
Cys Thr Met Gln Ala Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met
305 310 315 320
Lys Ala Ser Leu Glu Gly Asn Leu Ala Glu Thr Glu Asn Arg Tyr Cys
325 330 335
Met Gln Leu Ser Gln Ile Gln Gly Leu Ile Gly Ser Val Glu Glu Arg

340 345 350
Leu Ala Gln Leu Leu Cys Glu Met Glu Gln Gln Asn Gln Glu Tyr Lys
355 360 365
Ile Leu Leu Asp Met Lys Met Arg Leu Glu Leu Glu Ile Thr Thr Tyr
370 375 380
His Arg Leu Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Glu Gly Leu Leu Ala Pro
385 390 395 400

Thr His Phe Lys Leu Pro Ala Ser Pro Ala Ala Val Thr Thr Cys Gln
405 410 415

Val Pro Thr Ile Val Glu Glu Val Gln Asp Gly Lys Val Ile Ser Ser
420 425 430

Arg Glu Gln Val Arg Gln Thr Thr Arg
435 440

<210> 6

<211> 173

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Pro Tyr Thr Val Val Tyr Phe Pro Val Arg Gly Arg Cys Ala
1 5 10 15

Ala Leu Arg Met Leu Leu Ala Asp Gln Gly Gln Ser Trp Lys Glu Glu
20 25 30

Val Val Thr Val Glu Thr Trp Gln Glu Gly Ser Leu Lys Ala Ser Cys
35 40 45

Leu Tyr Gly Gln Leu Pro Lys Phe Gln Asp Gly Asp Leu Thr Leu Tyr
50 55 60

Gln Ser Asn Thr Ile Leu Arg His Leu Gly Arg Thr Leu Gly Leu Tyr
65 70 75 80

Gly Lys Asp Gln Gln Glu Ala Ala Leu Val Asp Met Val Asn Asp Gly
85 90 95

Val Glu Asp Leu Arg Cys Lys Tyr Ile Ser Leu Ile Tyr Thr Asn Tyr
100 105 110

Ala Gly Lys Asp Asp Tyr Val Lys Ala Leu Pro Gly Gln Leu Lys Pro
115 120 125

Phe Glu Thr Leu Leu Ser Gln Asn Gln Gly Gly Lys Thr Phe Ile Val
130 135 140

Gly Asp Gln Ile Ser Phe Ala Asp Tyr Asn Leu Leu Asp Leu Leu Leu
145 150 155 160

Ile His Glu Val Leu Ala Pro Gly Cys Leu Asp Ala Phe

165 170

<210> 7

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Cys Glu Glu Glu Asp Ser Thr Ala Leu Val Cys Asp Asn Gly Ser
1 5 10 15

Gly Leu Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val
20 25 30

Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met Val Gly
35 40 45

Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg

50 55 60

Gly Ile Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Ile Thr Asn
65 70 75 80

Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Ser Phe Tyr Asn Glu Leu
85 90 95

Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu
100 105 110

Asn Pro Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr Gln Ile Met Phe Glu Thr
115 120 125

Phe Asn Val Pro Ala Met Tyr Val Ala Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu
130 135 140

Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly
145 150 155 160

Val Thr His Asn Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala
165 170 175

Ile Met Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met
180 185 190

Lys Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Val Thr Thr Ala Glu Arg

195 200 205

Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp

210 215 220

Phe Glu Asn Glu Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu Glu Lys

225 230 235 240

Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg

245 250 255

Phe Arg Cys Pro Glu Thr Leu Phe Gln Pro Ser Phe Ile Gly Met Glu

260 265 270

Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp

275 280 285

Ile Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Asn Val Leu Ser Gly Gly

290 295 300

Thr Thr Met Tyr Pro Gly Ile Ala Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr

305 310 315 320

Ala Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu

325 330 335

Arg Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser

340 345 350

Thr Phe Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ala Gly

355 360 365

Pro Ser Ile Val His Arg Lys Cys Phe

370 375

<210> 8

<211> 295

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ser Gly Ala Leu Asp Val Leu Gln Met Lys Glu Glu Asp Val Leu

1 5 10 15

Lys Phe Leu Ala Ala Gly Thr His Leu Gly Gly Thr Asn Leu Asp Phe

20 25 30

```
Gln Met Glu Gln Tyr Ile Tyr Lys Arg Lys Ser Asp Gly Ile Tyr Ile
         35                  40                  45
Ile Asn Leu Lys Arg Thr Trp Glu Lys Leu Leu Leu Ala Ala Arg Ala
     50                  55                  60
Ile Val Ala Ile Glu Asn Pro Ala Asp Val Ser Val Ile Ser Ser Arg
 65                  70                  75                  80
Asn Thr Gly Gln Arg Ala Val Leu Lys Phe Ala Ala Ala Thr Gly Ala
                 85                  90                  95

Thr Pro Ile Ala Gly Arg Phe Thr Pro Gly Thr Phe Thr Asn Gln Ile
            100                 105                 110
Gln Ala Ala Phe Arg Glu Pro Arg Leu Leu Val Val Thr Asp Pro Arg
        115                 120                 125
Ala Asp His Gln Pro Leu Thr Glu Ala Ser Tyr Val Asn Leu Pro Thr
    130                 135                 140
Ile Ala Leu Cys Asn Thr Asp Ser Pro Leu Arg Tyr Val Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160
Ile Pro Cys Asn Asn Lys Gly Ala His Ser Val Gly Leu Met Trp Trp

                165                 170                 175
Met Leu Ala Arg Glu Val Leu Arg Met Arg Gly Thr Ile Ser Arg Glu
            180                 185                 190
His Pro Trp Glu Val Met Pro Asp Leu Tyr Phe Tyr Arg Asp Pro Glu
        195                 200                 205
Glu Ile Glu Lys Glu Gly Gln Ala Ala Ala Glu Lys Ala Val Thr Lys
    210                 215                 220
Glu Glu Phe Gln Gly Glu Trp Thr Ala Pro Ala Pro Glu Phe Thr Ala
225                 230                 235                 240

Thr Gln Pro Glu Val Ala Asp Trp Ser Glu Gly Val Gln Val Pro Ser
                245                 250                 255
Val Pro Ile Gln Gln Phe Pro Thr Glu Asp Trp Ser Ala Gln Pro Ala
            260                 265                 270
Thr Glu Asp Trp Ser Ala Ala Pro Thr Ala Gln Ala Thr Glu Trp Val
        275                 280                 285
```

Gly Ala Thr Thr Asp Trp Ser

290 295

<210> 9

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Lys Pro Ile Leu Leu Gln Gly His Glu Arg Ser Ile Thr Gln Ile

1 5 10 15

Lys Tyr Asn Arg Glu Gly Asp Leu Leu Phe Thr Val Ala Lys Asp Pro

20 25 30

Ile Val Asn Val Trp Tyr Ser Val Asn Gly Glu Arg Leu Gly Thr Tyr

35 40 45

Met Gly His Thr Gly Ala Val Trp Cys Val Asp Ala Asp Trp Asp Thr

50 55 60

Lys His Val Leu Thr Gly Ser Ala Asp Asn Ser Cys Arg Leu Trp Asp

65 70 75 80

Cys Glu Thr Gly Lys Gln Leu Ala Leu Leu Lys Thr Asn Ser Ala Val

85 90 95

Arg Thr Cys Gly Phe Asp Phe Gly Gly Asn Ile Ile Met Phe Ser Thr

100 105 110

Asp Lys Gln Met Gly Tyr Gln Cys Phe Val Ser Phe Phe Asp Leu Arg

115 120 125

Asp Pro Ser Gln Ile Asp Asn Asn Glu Pro Tyr Met Lys Ile Pro Cys

130 135 140

Asn Asp Ser Lys Ile Thr Ser Ala Val Trp Gly Pro Leu Gly Glu Cys

145 150 155 160

Ile Ile Ala Gly His Glu Ser Gly Glu Leu Asn Gln Tyr Ser Ala Lys

165 170 175

Ser Gly Glu Val Leu Val Asn Val Lys Glu His Ser Arg Gln Ile Asn

180 185 190

Asp Ile Gln Leu Ser Arg Asp Met Thr Met Phe Val Thr Ala Ser Lys

195 200 205

Asp Asn Thr Ala Lys Leu Phe Asp Ser Thr Thr Leu Glu His Gln Lys

210 215 220

Thr Phe Arg Thr Glu Arg Pro Val Asn Ser Ala Ala Leu Ser Pro Asn

225 230 235 240

Tyr Asp His Val Val Leu Gly Gly Gly Gln Glu Ala Met Asp Val Thr

245 250 255

Thr Thr Ser Thr Arg Ile Gly Lys Phe Glu Ala Arg Phe Phe His Leu

260 265 270

Ala Phe Glu Glu Glu Phe Gly Arg Val Lys Gly His Phe Gly Pro Ile

275 280 285

Asn Ser Val Ala Phe His Pro Asp Gly Lys Ser Tyr Ser Ser Gly Gly

290 295 300

Glu Asp Gly Tyr Val Arg Ile His Tyr Phe Asp Pro Gln Tyr Phe Glu

305 310 315 320

Phe Glu Phe Glu Ala

325

<210> 10

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Pro Tyr Gln Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Glu Gln Lys Lys Glu Leu

1 5 10 15

Ser Asp Ile Ala His Arg Ile Val Ala Pro Gly Lys Gly Ile Leu Ala

20 25 30

Ala Asp Glu Ser Thr Gly Ser Ile Ala Lys Arg Leu Gln Ser Ile Gly

35 40 45

Thr Glu Asn Thr Glu Glu Asn Arg Arg Phe Tyr Arg Gln Leu Leu Leu

50 55 60

Thr Ala Asp Asp Arg Val Asn Pro Cys Ile Gly Gly Val Ile Leu Phe

65 70 75 80

```
His Glu Thr Leu Tyr Gln Lys Ala Asp Asp Gly Arg Pro Phe Pro Gln
                85                  90                  95
Val Ile Lys Ser Lys Gly Gly Val Val Gly Ile Lys Val Asp Lys Gly

            100                 105                 110
Val Val Pro Leu Ala Gly Thr Asn Gly Glu Thr Thr Thr Gln Gly Leu
        115                 120                 125
Asp Gly Leu Ser Glu Arg Cys Ala Gln Tyr Lys Lys Asp Gly Ala Asp
    130                 135                 140
Phe Ala Lys Trp Arg Cys Val Leu Lys Ile Gly Glu His Thr Pro Ser
145                 150                 155                 160
Ala Leu Ala Ile Met Glu Asn Ala Asn Val Leu Ala Arg Tyr Ala Ser
                165                 170                 175

Ile Cys Gln Arg Asn Gly Ile Val Pro Ile Val Glu Pro Glu Ile Leu
            180                 185                 190
Pro Asp Gly Asp His Asp Leu Lys Arg Cys Gln Tyr Val Thr Glu Lys
        195                 200                 205
Val Leu Ala Ala Val Tyr Lys Ala Leu Ser Asp His His Ile Tyr Leu
    210                 215                 220
Glu Gly Thr Leu Leu Lys Pro Asn Met Val Thr Pro Gly His Ala Cys
225                 230                 235                 240
Thr Gln Lys Phe Ser His Glu Glu Ile Ala Met Ala Thr Val Thr Ala

                245                 250                 255
Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Ala Val Thr Gly Ile Thr Phe Leu Ser
            260                 265                 270
Gly Gly Gln Ser Glu Glu Glu Ala Ser Ile Asn Leu Asn Ala Ile Asn
        275                 280                 285
Lys Cys Pro Leu Leu Lys Pro Trp Ala Leu Thr Phe Ser Tyr Gly Arg
    290                 295                 300
Ala Leu Gln Ala Ser Ala Leu Lys Ala Trp Gly Gly Lys Lys Glu Asn
305                 310                 315                 320

Leu Lys Ala Ala Gln Glu Glu Tyr Val Lys Arg Ala Leu Ala Asn Ser
```

325 330 335

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

340 345 350

Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser Asn His Ala Tyr

355 360