

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 10월 20일 (20.10.2011)

(10) 국제공개번호
WO 2011/129483 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/535 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003710
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 10일 (10.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0034710 2010년 4월 15일 (15.04.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 박성섭 (PARK, Sung Sup) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 지족동 SK 허브 1506, 305-330 Daejeon (KR). 권기선 (KWON, Ki Sun) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 132동 703호, 305-806 Daejeon (KR). 하중성 (HA, Jong Seong) [KR/KR]; 경기도 평택시 이충동 부영아파트 201동 604호, 459-744 Gyeonggi-do (KR). 김선영 (KIM, Seon Young) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 판

평동 쌍용스윗닷홈 402동 1101호, 305-509 Daejeon (KR). 정봉현 (CHUNG, Bong Hyun) [KR/KR]; 대전광역시 서구 월평동 누리아파트 113동 607호, 302-280 Daejeon (KR). 정용원 (JUNG, Yong Won) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 150-5, 305-804 Daejeon (KR). 성문우 (SEONG, Moon Woo) [KR/KR]; 서울특별시 구로구 신도림동 동아아파트 302동 503호, 152-773 Seoul (KR). 윤탁 (YUN, Tak) [KR/KR]; 경기도 고양시 일산서구 주엽동 강선아파트 404동 304호, 411-370 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 대전광역시 서구 둔산동 949번지 12층 그린국제특허법률사무소, 302-120 Daejeon (KR).

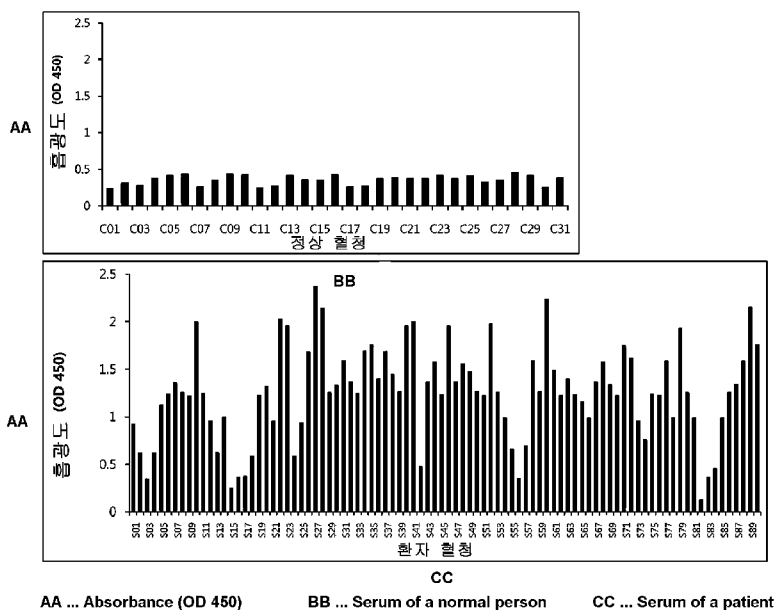
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: XAGE-1D MARKER FOR DIAGNOSING LUNG CANCER, AND DIAGNOSTIC KIT USING SAME

(54) 발명의 명칭: 폐암 진단용 Xage-1d 마커 및 이를 이용한 진단 키트

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a Xage-1d marker for diagnosing lung cancer and to a diagnostic kit using same. In more detail, after confirming that Xage-1d exists in a culture fluid of a lung cancer cell line, it is verified that the amount of the Xage-1d in the serum of an actual lung cancer patient is higher than that of a normal person, and that the sensitivity is excellent, thereby confirming that the Xage-1d can be used as a lung cancer diagnosis marker and can be utilized in a diagnostic kit for lung cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 폐암 진단용 Xage-1d 마커 및 이를 이용한 진단 키트에 관한 것이며, 보다 구체적으로 Xage-1d를 폐암 세포주 배양액에 존재함을 확인한 후, 실제 폐암 환자의 혈청 내에서 Xage-1d의 양이 정상인에 비하여 높으며, 민감도가 뛰어난 것을 확인함으로써, Xage-1d는 폐암 진단용 마커로 이용될 수 있으며, 폐암 진단용 키트에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 폐암 진단용 X a g e - 1 d 마커 및 이를 이용한 진단 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 또는 모니터링 키트 및 면역크로마토그래피 스트립 및 Xage-1d를 이용한 폐암 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 2008년에 발표된 한국중앙암등록본부 자료에 의하면 2003 ~ 2005년 우리나라 연 평균 암발생 중 폐암은 남녀를 합쳐서 전체 암 발생의 12.1%로 2위를 차지하였다. 인구 10만명당 총발생률은 33.2건이며, 남녀의 성비는 3.83:1로 남자에게 더 자주 발생하였고, 발생 건수로는 남성의 암 중에서 2위를 차지하였고 여성의 암 중에서 5위를 차지하였다. 남녀를 합쳐서 본 연령대별로는 60대가 34.3%로 가장 많았고, 70대가 31.0%, 50대가 14.6%의 순으로 보고되었다(보건복지가족부 중앙암등록본부 2008년 10월 15일 발표 자료). 더욱이, 흡연인구의 증가와 대기 오염 등의 원인으로 우리나라에서도 급속히 증가하고 있는 종양이며 암종별 사망률은 21.4%로 1위이고 남자에서는 24.9%, 여자 15.1%로 각각 1위, 2위이다(2006년 사망원인통계연보, 통계청).
- [3] 폐암은 암세포의 성장으로 인한 주변 조직 침범 또는 기도폐쇄, 림프절 전이 등의 증상을 초래하는 것이 보통이지만, 환자의 10 ~ 15% 정도는 아무런 증상을 보이지 않는 상태에서 정기 검진에서 폐암을 진단받는다. 또한, 대부분의 폐암이 진단 당시에 상당히 진행된 상태로 진단되므로, 완치가 어려운 경우들이 대부분이다. 따라서, 폐암을 조기에 진단하여 폐암으로 인한 사망률을 줄이는 것이 시급한 문제이다(Wulfkuhle *et al.*, Nat Rev. Cancer, 3, 267-275, 2003).
- [4] 폐암을 진단하기 위해서 여러 가지 방법이 사용되고 있는데, 현재까지는 종양의 크기를 측정하고, 림프절로의 전이 유무를 조사하거나, 폐 종양 조직이나 림프절 등을 생검하여, 면역조직화학방법으로 분석하거나 흉부 전산화 단층 촬영, 기관지 내시경 등을 이용하고 있다(Manser *et al.*, Curr. Opin. Pulm. Med., 2004, 10, 266-271). 그러나, 흉부 단층 촬영의 경우 폐암의 크기가 약 0.1 cm 이상 되어야 측정가능한데, 이 시기는 이미 암이 다른 조직으로 전이되었을 가능성이 크며, 내시경이 기관지로 삽입되어 폐 내부를 직접 관찰할 수 있는 기관지 내시경 방법은 폐 말단에 있는 종양을 관찰하기 곤란한 한계가 있다.
- [5] 따라서, 암을 진단하기 위하여 폐암 마커를 개발하려는 연구가 있었으며, 이러한 연구의 일환으로 다중 표적 유전자나 단백질의 발현을 조사함으로써 폐암 진단 마커를 발굴한 연구가 보고된바 있다(Hibi *et al.*, Am. J. Pathol., 1999, 155: 711-715; Brechot *et al.* Eur. J. Cancer., 1997, 33: 385-391; Pastor *et al.*, Eur.

Respir. J., 1997, 10: 603-609; Morita *et al.*, Int. J. Cancer., 1998, 78: 286-292). 그 외에도, 마이크로어레이 기술을 이용하여 폐암 마커로서 사용될 유전자의 발굴하려는 보고가 있었다. 또한, 환자의 혈액에서 아스파테이트 아미노트랜스퍼레이즈(Aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 트랜스아미네이스(Alanine transaminase, ALT), 총 빌리루빈(Total bilirubin) 혹은 크레아티닌(Creatinine)의 농도를 측정하여 폐암을 진단하려는 시도가 있었다(Fishman *et al.*, Cancer Res. 28,150-154 (1968), Nagamine *et al.*, Clin. Chem. 29, 379-381 (1983), Muggia *et al.*, 1, 217-228. (1974)). 그러나, 이러한 종양 마커들을 발굴하려는 다양한 연구에도 불구하고, 발굴된 종양 마커들은 아직까지 제한적으로 사용되고 있으며, 공식적으로 권장되고 있는 폐암 혈액 마커는 현재 없는 실정이다.

- [6] Xage-1 유전자는 원래 EST 분석에 의해서 X 크로모솜(chromosome)에 위치한 PAGE/GAGE-연관된 유전자로 동정되었다(Brinkmann U, *et al.*, Cancer Res 1999, 59: 1445-1448). Xage-1의 발현 프로파일(profile)은 암/정소(CT) 항원으로서의 사용될 수 있음을 시사하였다. Xage-1d 유전자의 전사는 프로모터의 CpG 섬의 메틸화(methylation)에 의하여 조절되며, 4 종류의 RNA 스플라이싱(splicing) 변이체인 Xage-1a,b,c 및 d가 동정 되었다(Zendman AJ *et al.*, Int J Cancer, 2002, 97: 195-204, Lim JH *et al.*, Int J Cancer, 2005, 116:200-206). 현재는 Xage-1a (예전의 Xage-1b)와 Xage-1d 만이 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)에 등록되어 있다.
- [7] 종래의 Xage-1 연구를 살펴보면, 4 종류의 Xage-1 중 Xage-1b를 중심으로 연구된 바가 보고되어있다. 예를 들어, Xage-1b로 자극한 수지상 세포를 종양 백신으로 이용하는 연구가 발표되었으며(Clin Exp Immunol. 2008 Sep;153(3):392-400), 비소세포암 환자에서 Xage-1b의 발현과의 관계에 대해서 연구가 보고되어 있으나(Cancer Immun. 2008 Aug 28;8:13), Xage-1d에 관한 연구는 보고된바 없으며, 폐암과의 관계는 밝혀지지 않았다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 폐암 세포에서 발현이 증가하는 단백질들을 발굴하였고, 그 중 Xage1 유전자의 스플라이싱(splicing) 변이체 중 기능을 밝혀지지 않은 Xage-1d 단백질의 폐암과의 관계를 폐암 세포주의 배양액과 실제 폐암 환자의 혈액에서 정상인에 비하여 높은 발현량 및 민감도를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 Xage-1d를 마커로 이용하는 폐암 진단용 또는 모니터링 키트 및 이를 포함하는 면역크로마토그래피 스트립을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또다른 목적은 Xage-1d를 이용한 폐암 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 목적은 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 또는 모니터링 키트를 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명은 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 면역크로마토그래피 스트립을 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명은 Xage-1d를 단백질 마커로 이용한 폐암 진단방법을 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명은 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 예후 모니터링 키트를 제공하는 것이다.
- [15] 아울러, 본 발명은 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 예후 모니터링 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [16] 본 발명의 Xage-1d는 폐암 세포주의 배양액뿐만 아니라, 폐암 환자의 혈액에서 존재하며, 정상인에 비해서 폐암 환자의 혈액에 더 많은 양이 존재하고 있으며, 적은 양으로도 민감하게 폐암을 진단할 수 있으므로, 폐암 진단용 또는 모니터링 키트, 면역크로마토그래피 스트립 및 폐암 진단에 있어서, 단백질 마커로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 폐암세포주의 배양액에서 Xage-1d의 존재를 확인한 효소면역측정법의 결과를 나타낸 그래프이다.
- [18] 도 2는 혈액에서 Xage-1d의 존재를 확인한 효소면역측정법의 결과를 나타낸 그래프이다.
- [19] 도 3은 바이오틴-펩티드에 의한 흡광도 및 펩티드 경쟁에 의한 흡광도 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [20] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [21]
- [22] 본 발명의 목적은 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 또는 모니터링 키트를 제공하는 것이다.
- [23] 상기 항-Xage-1d 항체는 Xage-1d 단백질의 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하고, 상기 Xage-1d(X antigen family member 1 subtype d)는 인간의 Xage-1d인 것이 바람직하고, 서열번호 1로 기재되는 Xage-1d 아미노산 서열을 갖는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.
- [24] 다클론 항체는 상기 Xage-1d 단백질을 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고,

염소, 토끼, 쥐, 래트, 닭, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있고, 토끼를 숙주로 함이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [25] 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 및 쥐 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G *et al.*, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor D *et al.*, *J Immunol Methods* 81:31-42, 1985; Cote RJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP *et al.*, *Mol Cell Biol* 62:109-120, 1984).
- [26] 또한, 상기 Xage-1d 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다(Huse WD *et al.*, *Science* 254: 1275-1281, 1989).
- [27] 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.
- [28] 본 발명의 실시양태에서, Xage1의 전사변이체의 두 종류인 Xage-1a와 Xage-1d 단백질 서열을 비교하였다. Xage-1a는 81개의 아미노산으로 구성된 아미노산이며, Xage-1d는 69개의 아미노산으로 구성됨을 확인할 수 있었으며, 두 아미노산 서열을 비교한 결과, 두 단백질은 아미노산 N 말단으로부터 32개의 아미노산 서열을 공통으로 포함하고 있음을 확인할 수 있었다(표 1 참조).
- [29] 또한, 본 발명의 실시양태에서, Xage-1d의 폐암과의 관계를 밝히기 위하여, 우선 폐암 세포주의 배양액에 Xage-1d의 발현을 비교하기 위하여, 3 종류의 폐암 세포주를 배양한 뒤, 배양액으로부터 Xage-1d의 발현을 확인한 결과, 세포주에 따라 차이가 보였으나, 폐암 세포주에서 Xage-1d의 발현을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 폐암 세포주를 배양하는 기간이 길어질수록 증가함을 확인할 수 있었다(도 1 참조).
- [30] 또한, 본 발명의 실시양태에서, Xage-1d와 실제 폐암과의 관계를 살펴보기 위하여, 폐암 환자의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 Xage-1d의 존재를 정상인 환자의 혈액을 대조군으로 사용하여 비교하였다. 그 결과, Xage-1d의 발현이 정상인 혈액에 비하여, 폐암 환자의 혈액에서 더욱 많이 존재하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 Xage-1d의 폐암에 대한 민감도 및 특이도로 분석한 결과, Xage-1d가 폐암에 대해서 높은 민감도를 보임을 확인할 수 있었다(표 2 참조).

- [31] 또한, 본 발명의 실시양태에서, 혈청에 존재하는 Xage-1d의 양을 정량화하기 위하여, GFGFRRQGEDNT 펩티드 및 이의 바이오틴이 결합된 바이오틴-펩티드를 이용한 ELISA를 수행한 결과, 정상인에 비하여 환자의 혈액에서 Xage-1d의 발현량 및 민감도가 높음을 확인할 수 있었다(도 3 및 표 3 참조).
- [32] 따라서, 본 발명의 실시양태에서 Xage-1d 단백질이 폐암 세포주의 배양액뿐만 아니라, 실제 폐암 환자의 혈청 내 존재하며, Xage-1d 발현량 및 민감도가 정상인에 비해서 폐암 환자에게서 높음을 확인함으로써, Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 키트를 폐암 진단용 또는 모니터링용으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [33]
- [34] 또한, 본 발명의 폐암 진단용 또는 모니터링 키트는 Xage-1d 특이적인 프라이머를 필수 구성요소로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 있다. Xage-1d 특이적인 프라이머를 이용한 Xage-1d 검출 시, PCR 증폭반응에 적용되는 경우, 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [35]
- [36] 본 발명의 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 또는 모니터링 키트에 있어서, 항-Xage-1d 항체는 발색효소, 발색물질 또는 형광분자에 결합된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [37] 또한, 본 발명의 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 또는 모니터링 키트에 있어서, 항-Xage-1d 항체는 바이오틴, 또는 아비딘 또는 스트렙트아비딘에 대해 바이오틴과 본질적으로 동일한 결합 작용을 갖는 바이오틴 유도체인 리간드에 결합된 것을 사용하는 것이 바람직하고, 상기 리간드 특이적 결합분자에 결합된 발색효소, 발색물질 또는 형광분자가 결합된 시각화 컨쥬게이트가 상기 리간드에 결합된 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [38] 상기 발색 효소는 HRP(horseradish peroxidase) 또는 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase)인 것이 바람직하며, 상기 발색물질은 콜로이드 골드(colloid gold)인 것이 바람직하며, 형광분자는 FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate) 및 RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [39] 본 발명의 폐암 진단용 또는 모니터링 키트는 항원-항체 결합반응, 또는 단백질-리간드 결합반응을 통하여 결합 반응을 정량 또는 정성적으로

분석함으로써 폐암을 진단할 수 있으며, 상기 결합 반응은 통상의 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블랏, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있다.

[40] 본 발명의 폐암 진단용 또는 모니터링 키트는 지지체로 나이트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있다.

[41] 본 발명의 폐암 진단용 또는 모니터링 키트는 표지체로 발색효소, 발색물질 또는 형광분자는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등이 사용될 수 있다.

[42] 본 발명의 폐암 진단용 또는 모니터링 키트는 세척액으로 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[43]

[44] 또한, 본 발명은 Xage-1d에 특이적인 항체를 이용하여 폐암 진단용 면역크로마토그래피 스트립을 제공한다.

[45] 본 발명의 실시양태에서 Xage-1d와 폐암과의 관계를 폐암 세포주 및 실제 폐암 환자를 통해서 확인하였으며, Xage-1d의 발현량 및 민감도가 폐암에서 유의하게 높으므로, Xage-1d에 특이적인 항체를 포함한 면역크로마토그래피 스트립을 폐암 진단용으로 유용하게 사용할 수 있다.

[46] 본 발명에 따른 면역크로마토그래피 스트립은 접착성 플라스틱 지지체와, 상기 접착성 플라스틱 지지체에 부착되어 있는 검체 패드, 컨쥬게이트 패드, 신호검출 패드 및 흡수 패드로 이루어지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[47] 구체적으로, 상기 면역크로마토그래피 스트립은 하기와 같은 구성을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[48] 1) 지지체;

[49] 2) 상기 지지체의 상부 표면에 부착되어 있는, 분석하고자 하는 피검 시료를 부착하는 검체 패드;

[50] 3) 상기 검체 패드와 연동되어 있고, 피검 시료에 함유된 Xage-1d 단백질과 특이적으로 결합하는 제 1 항체 컨쥬게이트를 함유하는 컨쥬게이트 패드;

[51] 4) 상기 컨쥬게이트 패드와 연동되어 있고, 상기 컨쥬게이트에 결합하는 제 2 항체가 선형으로 고정된 검출 라인(test line) 및 항-제 1 항체 면역글로불린이 고정된 대조 라인(control line)을 포함하는, 신호검출 패드; 및

[52] 5) 신호검출반응이 종료된 피검 시료를 흡수하는, 상기 신호검출 패드의 다운스트림에 위치하는 흡수 패드.

[53]

[54] 상기 구성에 있어서, 단계 3)의 발색제는 콜로이드성 골드 파티클(gold particle) 또는 HRP(horseradish peroxidase)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[55] 상기 구성에 있어서, 단계 4)의 신호검출 패드는 니트로셀룰로오즈 막으로 이루어진 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[56] 상기 구성에 있어서, 단계 4)의 제 1 항체는 Xage-1d 단백질과 특이적으로 결합하는 단일클론(monoclonal) 또는 다클론(polyclonal) 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[57] 상기 구성에 있어서, 단계 4)의 제 2 항체는 제 1차 항체-컨쥬게이트에 특이적으로 결합하는 단클론 또는 다클론 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[58] 상기 구성에 있어서, 단계 5)의 흡수 패드는 다공성 지지체, 및 상기 다공성 지지체의 공극(pore)에 분산되거나 다공성 지지체의 섬유상에 흡착 또는 코팅되어 있는 흡수제를 포함하는 것이 바람직하며, 상기 다공성 지지체의 상부면에 부착된 다공성 필름층을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 흡수제는 염화칼슘, 염화마그네슘, 규조토, 벤토나이트, 백운석, 석고, 실리카겔 및 이들의 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[59] 본 발명에 따른 면역크로마토그래피 스트립은, 면역크로마토그래피 스트립 상의 대조라인 및 검출라인에 착색선이 나타나면, 피검 시료를 폐암의 양성 시료로 판정하는 것을 특징으로 한다.

[60] 본 발명에 따른 면역크로마토그래피 스트립은, 우선 피검 시료인 혈장을 상기 검체 패드를 통해 면역크로마토그래피 스트립으로 공급된다. 상기 검체 패드는, 분석물질에 대한 선택성을 보다 향상시키기 위해 또는 상기 피검 시료에 포함될 수 있는 간섭물질에 의한 영향을 최소화하기 위해, 필터링의 기능을 추가로 가질 수 있다. 필요한 경우, 상기 검체 패드의 상류에 분석물질과 컨쥬게이트 사이의 반응을 증가시키거나 또는 간섭물질에 의해 영향을 배제할 수 있는 물질을 함유하는 보조 패드를 추가로 구비할 수 있다. 상기 검체 패드를 통해 도입된 혈액은 크로마토그래피적 이동을 통해 상기 검체 패드의 상류에 위치하는 컨쥬게이트 패드로 이동한다. 상기 컨쥬게이트 패드는 혈액에 함유되어 있는 Xage-1d 단백질과 특이적으로 결합하는 컨쥬게이트가 함유되어 있다. 상기 컨쥬게이트는 금입자, 라텍스 입자, 형광물질, 및 효소 등에 의해 레이블링된다. 상기 컨쥬게이트 패드를 통과한 피검 시료는 신호검출 패드로 이동한다. 상기 신호검출 패드는 상기 피검 시료에 분석물질이 존재하는지의 여부를 검출하는 검출라인과, 분석물질의 존재 유무와 관계없이 분석 키트가 정상적으로 작동하였는지 여부를 확인하는 대조라인을 포함한다. 이를 위해, 상기 검출라인에는 분석물질과 상기 컨쥬게이트 패드에 함유된 컨쥬게이트 사이의 결합 산물에 선택적이고 특이적으로 결합하는 물질(또는 신호검출물질)이

코팅되고, 상기 대조라인에는 상기 컨쥬게이트 패드에 함유된 컨쥬게이트에 특이적으로 결합하는 물질이 코팅되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 신호검출 패드는 다공성 멤브레인 패드로 구성되며, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스, 폴리에틸렌, 폴리에테르설폰, 나일론 등으로 이루어질 수 있다.

[61]

[62] 또한, Xage-1d 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 또는 모니터링용 바이오 센서를 제공한다.

[63]

상기 바이오 센서는 피검 대상자의 세포, 조직, 기관 등과 같은 생체조직으로부터 생체 활동 전위에 의해 방사되는 미세한 전자기장과 그의 변화량을 단일 또는 다채널의 바이오센서와 이를 포함하는 질병 진단시스템에 의해 정전용량과 그의 변화량으로 감지하는 바이오 센서를 이용하므로, 폐암의 진단용 또는 모니터링을 위한 수단으로 이용할 수 있다.

[64]

상기 바이오 센서는 Xage-1d에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 부착된 폐암 진단용 기관 및 전기 기관의 항체에 결합한 폐암 특이적 항원을 검출할 수 있는 검출수단이 포함되며, 기관의 항체와 결합한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 일차항체-금접합체 또는 전기 기관의 항체와 결합한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 일차항체 및 전기 일차항체에 특이적으로 결합하는 이차항체-신호물질의 복합체 등을 사용함이 바람직하다.

[65]

특히, 검출수단으로서 이차항체-신호물질의 복합체를 사용할 경우, 신호물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 형광물질(예를 들어, Cy-3, Cy-5, FITC, GFP(green fluorescent protein), RFP(red fluorescent protein), 텍사스레드(Texas Red) 등), 발광물질, 방사성 동위원소, 효소(예를 들어, HRP(horse raddish peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 베타 갈락토시다제(β -galactosidase), 루시페라제(luciferase) 등) 등을 사용함이 바람직하고, 효소를 신호물질로서 사용할 경우에는 폐암 진단용 키트에 전기 효소에 의하여 발색반응을 일으키는 발색시약을 추가적으로 포함할 수도 있다.

[66]

[67] 또한, Xage-1d 단백질에 특이적으로 결합하는 생물분자들이 고형기질에 집적된 유방암 모니터링, 진단 및 스크리닝용 바이오칩을 제공한다.

[68]

상기 생물분자는 항체 또는 앵타머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[69]

상기 고형기질은 플라스틱, 유리, 금속 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[70]

[71] 또한, Xage-1d의 양을 피검대상으로부터 탐색하기 위한 방법으로는 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용하는 것이 바람직하고, 여기에는 검출체로 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법; 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로

측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[72]

[73] 또한, 시료를 Xage-1d에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한 여러 종류의 항체가 고정된 플레이트에 반응시킨 후, 결합된 단백질을 질량분석(mass spectrometry) 방법으로 분석하는 폐암 진단용 또는 모니터링 방법을 제공한다.

[74]

[75] 아울러, 본 발명은 Xage-1d를 단백질 마커로 이용한 폐암 진단 방법을 제공하는 것이다.

[76]

본 발명의 실시양태에서 Xage-1d 단백질과 폐암과의 관계를 폐암 세포주 및 실제 폐암 환자를 통해서 확인하였으며, Xage-1d의 발현량 및 민감도가 폐암에서 유의하게 높으므로, Xage-1d를 폐암 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

[77]

구체적으로 본 발명의 폐암 진단 방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[78]

1) 피검체로부터 유래한 혈액시료에서 Xage-1d의 발현량을 측정하는 단계;

[79]

2) 단계 1)의 Xage-1d의 발현량과 정상 혈액시료의 Xage-1d의 발현량을 비교하는 단계; 및

[80]

3) Xage-1d 발현량이 정상 대조군에 비해 증가하는 경우 폐암에 걸릴 위험이 높은 것으로 판정하는 단계.

[81]

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 피검체는 인간을 포함한 척추동물이고, 바람직하게는 포유동물이며, 보다 바람직하게는 인간, 유인원류, 소, 돼지, 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개 또는 고양이를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[82]

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 Xage-1d의 발현량은 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학 검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[83]

[84] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[85]

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[86]

[87] <실시예 1> 세포배양

[88]

세포주에서의 단백질 분비를 관찰하기 위하여 폐암 세포주 A549(lung carcinoma), H460(lung adenocarcinoma)(Zhu et al., British J. Cancer, 94, 1936-1941

(2006)), 비소세포암주 HOP92(Zhong et al., J. Biol. Chem. 284, 23225-23233. (2009)) 및 대조군으로 293T(인간 배아 신장 세포주, human embryonic kidney cell line)(Senechal et. al., Human Mol. Genetics 14, 1613-1620, (2005)) 세포를 배양하였다. A549, H460, HOP92 세포주는 RPMI1640 배지 (Invitrogen)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)(FBS, Invitrogen)을 첨가하여 습도가 유지된 5% CO₂ 37°C 배양기에서 배양하였으며, 293T 세포주는 Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM, Invitrogen)에 10% FBS를 첨가한 배지에서 배양하였다. 모든 세포는 1 × 10⁵ 세포를 60 mm 배양접시에 분주하였으며, 2일, 3일 후 배지를 취하여 실험에 사용하였다.

[89]

[90] <실험예 1> 폐암 세포주 배양액에서 Xage-1d의 검출

[91] Xage1은 a, b, c, 및 d의 4 종류로 RNA 스플라이싱(splicing)에 의한 전사변이체가 존재하며, Xage1의 전사변이체의 두 종류인 Xage-1a와 Xage-1d 단백질을 서열을 비교하였다.

[92] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, Xage-1a는 81개의 아미노산으로 구성된 아미노산이며, Xage-1d는 69개의 아미노산으로 구성됨을 확인할 수 있었으며, 두 아미노산 서열을 비교한 결과, 두 단백질은 아미노산 N 말단으로부터 32개의 아미노산 서열을 공통으로 포함하고 있음을 확인할 수 있었다(표 1 참조).

[93] 또한, 폐암 세포주의 배양액에서 상기 아미노산 서열의 차이를 확인한 Xage-1d의 존재 유무를 확인하기 위하여, 상기 실시예에서 배양한 폐암 세포 주 A549, 폐 선암 세포주 H460, 비소 폐암 주 HOP92 및 293T 세포를 배양한 후, 세포 배양액 100 μ l를 취하여 Xage-1d의 존재를 확인하였다.[94] 구체적으로, 효소면역측정법인 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다. Xage-1d에 특이적인 항체로는 카복실 말단의 GFGFRRQGEDNT에 결합하는 항체 AB27477(Abcam)을 코팅 용액[1 l 기준 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 2 ml 10% NaN₃, pH 9.5]에 녹여 웰 당 1 μ g씩 96-웰 플레이트(Nunc #439454)에 24시간 처리하여 코팅하였다. 비특이적 결합을 억제하기 위하여 웰 당 200 μ l의 블로킹 용액[0.1% BSA (Bovine serum albumin), 0.02% 티메로살(Thimerosal)이 포함된 PBS]을 상온에서 2시간 처리하였다. 2시간 후, 웰에서 블로킹 용액을 버린 후 웰을 워싱(washing)용액[0.02% Thimerosal, 0.05% 트윈-20(Tween-20)이 포함된 PBS]으로 5번 씻고, 세포주의 배양액 100 μ l를 각 웰에 첨가하였다. 대조군으로는 3일 배양한 293T 인간 배아 신장 세포주(human embryonic kidney cell line) 배양액을 동일한 양으로 사용하였다. 상기 코팅한 플레이트를 2 ~ 3시간 상온에서 보관하여 반응을 유도한 후 200 μ l의 워싱용액으로 5회 세척하였다. Xage-1d를 검출하기 위한 1차 항체는, 아미노말단을 특이적으로 인식하는 것으로 알려진 LS-B318(Lifespan) 토끼 항체를 1:2,000으로 PBS에 희석하여 웰 당 100 μ l 씩 첨가한 후 상온에서 2 ~ 3시간 반응시켰다. 반응 후, 웰 당 200 μ l의 워싱용액으로 5회 세척한 후,

HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 항-토끼-염소 항체를 PBS에 1:5,000 ~ 10,000으로 희석하여 각 웰에 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, 워싱용액으로 5회 세척하였다. 퍼옥시데이즈 발색을 위하여 각 웰에 50 μ l의 TMB 기질용액(GenDEPOT)을 첨가하여 상온에서 10분 반응한 후, 다시 50 μ l의 정지용액(GenDEPOT)을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

- [95] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 실험에 사용한 3종류의 폐암 세포주에서 Xage-1d의 존재를 확인할 수 있었으며, 폐암 세포주를 비교하여 살펴보면, 선암(adenocarcinoma) 세포주 H460의 배양액에서 A549나 HOP92보다 많은 양이 존재함을 알 수 있었다(도 1).

[96]

[97] 표 1

Xage-1의 전사변이체에 의한 단백질 서열

Xage1 변이체 종류	참조 서열 번호	서열	아미노산 갯수
Xage-1a(Xage-1b으로도 알려져 있음)	NP_001091061 NP_001091063 NP_001091066 NP_06514 NP_001091073	<u>MESPKKKNOO LKVGILHLGS</u> <u>ROKKIRIOLRSQC</u> ATWKVIC KSCISQTPGI NLDLGSGVKV KIIPKEEHCK MPEAGEEQPQ V	81
Xage-1d	NP_001091062 NP_001091065 NP_001091067 NP_59767 NP_001091073	<u>MESPKKKNOO LKVGILHLGS</u> <u>ROKKIRIOLRSQV</u> LGREM RD MEGDLQELHQ SNTGDKSGFG FRRQGEDNT	69

- [98] * 두 단백질은 밑줄친 아미노산을 아미노말단에 공통으로 포함하고 있다.

[99]

[100] <실험예 2> 폐암환자 혈액에서 Xage-1d의 검출

- [101] 폐암 세포주의 배양액에서 검출된 Xage-1d가 실제 폐암 환자의 혈액에서 존재하는지 확인하기 위하여, 국립암센터에서 제공한 폐암환자 90인의 혈액과 정상인 31인의 혈액을 이용하여 Xage-1d의 혈액 중에 존재하는 양을 ELISA 실험을 통해서 비교하였다. 적혈구와 혈소판을 제거한 혈청 100 μ l를 상기 효소면역측정법 실험을 이용하여 분석하였다.

- [102] Xage-1d에 특이적인 항체로는 카복실 말단의 GFGFRRQGEDNT에 결합하는

항체 AB27477(Abcam)을 코팅 용액[1 ℓ 기준 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 2 ml 10% NaN₃, pH 9.5]에 녹여 웰 당 1 μg씩 96-웰 플레이트에 (Nunc #439454) 24시간 처리하여 코팅하였다. 비특이적 결합을 억제하기 위하여 웰 당 200 μℓ의 블로킹 용액[0.1% BSA (Bovine serum albumin), 0.02% Thimerosal이 포함된 PBS]을 상온에서 2시간 처리하였다. 2시간 후, 웰에서 블로킹 용액을 버린 후 웰을 200 μℓ의 워싱용액[0.02% Thimerosal, 0.05% Tween-20이 포함된 PBS]으로 5번 씻고, 폐암 환자의 혈액 100 μℓ를 각 웰에 첨가하였다. 대조군으로는 정상인의 혈액을 동일한 양으로 사용하였다. 상기 코팅한 플레이트를 2 ~ 3시간 상온에서 보관하여 반응을 유도한 후 200 μℓ의 워싱용액으로 5회 세척하였다. Xage-1d를 검출하기 위한 1차 항체는, 아미노말단을 특이적으로 인식하는 것으로 알려진 LS-B318(Lifespan) 토끼 항체를 1:2,000으로 PBS에 희석하여 웰 당 100 μℓ씩 첨가한 후 상온에서 2 ~ 3시간 반응시켰다. 반응 후, 웰 당 200 μℓ의 워싱용액으로 세척한 후, HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 항-토끼-염소 항체를 PBS에 1:5,000 ~ 10,000으로 희석하여 각 웰에 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, 워싱용액으로 5회 세척하였다. 퍼옥시데이즈 발색을 위하여 각 웰에 50 μℓ의 TMB 기질용액(GenDEPOT)을 첨가하여 상온에서 10 분 반응한 후, 다시 50 μℓ의 정지용액(GenDEPOT)을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[103] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 31개의 정상인 시료에서 측정된 흡광도는 평균 0.353이고 최고는 0.448인 반면, 90개의 환자 시료에서 측정된 값의 평균은 1.256, 최저값은 0.124, 최고값은 2.365으로 정상인의 환자에 비해서 높은 흡광도를 보였다(도 2).

[104] 폐암 환자의 시료 중 정상인 시료에 비해서 낮은 값을 보인 경우는 7개였으나, 흡광도 값을 정상인의 최고값을 기준으로 민감도와 특이도를 계산한 결과, 각각 92.2%와 100%였다. 즉, 매우 높은 특이도임에도 불구하고, 민감도 역시 매우 높은 결과를 통해서, 혈액 내 존재하는 Xage-1d가 폐암에 대하여 매우 민감함을 알 수 있었다(표 2).

[105]

[106] 표 2

흡광도 값을 정상인의 시료 최대값인 0.448으로 하였을 때의 민감도 및 특이도.

		정상	환자
시료 (총 121)		31	90
흡광도 0.448 기준	≤ 0.448	31	7
	> 0.448	0	83
	민감도(Sensitivity)	민감도 =(83/90) ×100 = 92.2(%)	
	특이도(Specificity)	특이도 =(31/31)×100 = 100(%)	

[107]

[108] <실험예 3> 혈청에서의 Xage-1d 단백질의 정량화 곡선 분석

[109] ELISA 실험방법은 여러 종류의 항체를 사용하는 관계로 유도될 수 있는 항체간 반응을 피하고, 더불어 혈청에 존재하는 Xage-1d의 발현량을 정량적으로 측정하기 위하여 펩티드 경쟁 효소면역측정법을 시행하였다. 즉, Xage-1d의 카복실 말단에 해당하는 펩티드(GFGFRRQGEDNT, Abcam사) 및 펩티드에 바이오틴을 결합시켜 합성된

바이오틴-펩티드(biotin-GFGFRRQGEDNT)(Peptron사)를 이용하여 HRP가 결합된 스트렙타비딘(STR-HRP)으로 발색을 유도하였다.

[110] Xage-1d의 카복실 말단에 특이적으로 결합하는 항체(AB27477)를 코팅 용액에 녹여 96-웰 플레이트에 코팅한 후 블로킹 용액으로 비특이적 결합을 억제하였다. 워싱용액으로 코팅되지 않은 항체나 블로킹 용액을 세척한 다음, 바이오틴-펩티드 (biotin-GFGFRRQGEDNT)를 PBS에 농도별로 녹여 플레이트에 첨가한 다음 2 ~ 3시간 상온에서 반응시켰다. 워싱용액으로 플레이트를 5회 세척한 후 각 웰에 바이오틴에 특이적인 스트렙타비딘에 HRP가 결합된 STR-HRP (Pierce사)를 1:10,000으로 희석하여 첨가하고 2 ~ 3시간 결합시킨 후, 다시 웰을 워싱용액으로 세척한 후, 퍼옥시데이즈 발색을 위하여 각 웰에 TMB 기질용액(GenDEPOT)을 첨가하여 상온에서 반응한 후, 다시 정지용액(GenDEPOT)을 첨가하여 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[111] 그 결과, 도 3의 A에 나타난 바와 같이, 코팅된 항체에 바이오틴-펩티드(biotin-GFGFRRQGEDNT)가 특이적으로 결합하며 STR-HRP에 의해 발색되고, 바이오-펩티드의 양에 비례하여 흡광도가 증가함을 확인할 수 있었다(도 3의 A). 이러한 결과를 바탕으로, 항원경쟁 효소면역 측정에 사용할 바이오틴-펩티드의 양을 4 ng/ml로 결정하였다.

[112] 따라서 바이오틴-펩티드의 양을 고정시키고 바이오틴이 결합되지 않은 펩티드(GFGFRRQGEDNT)를 다양한 농도로 첨가한 후, 코팅된 항체에 경쟁적으로 결합시키면 첨가한 펩티드의 농도에 따라 흡광도가 변화하게 된다. 이 방법을 이용하여 혈청에 포함된 Xage-1d의 농도를 계산할 수 있는 정량화 곡선을 그릴 수 있었다. Xage-1d의 카복실 말단에 특이적으로 결합하는 항체(AB27477)를 코팅 용액에 녹여 96-웰 플레이트에 코팅한 후 블로킹 용액으로 비특이적 결합을 억제하였다. 워싱용액으로 코팅되지 않은 항체나 블로킹 용액을 세척한 다음, 4 ng으로 고정된 바이오틴-펩티드에 바이오틴이 결합되지 않은 펩티드를 농도별로 첨가하여 잘 섞은 후, 플레이트에 첨가하고 2 ~ 3시간 상온에서 반응시켰다. 워싱용액으로 플레이트를 5회 세척한 후 각 웰에 바이오틴 특이적인 스트렙타비딘에 HRP가 결합된 STR-HRP (Pierce사)를 1:10,000으로 희석하여 첨가하고 2 ~ 3시간 결합시킨 후, 다시 웰을 워싱용액으로 세척한 후, 퍼옥시데이즈 발색을 위하여 각 웰에 TMB 기질용액(GenDEPOT)을

첨가하여 상온에서 반응한 후, 다시 정지용액(GenDEPOT)을 첨가하여 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[113] 그 결과 첨가한 펩티드의 양에 반비례하여 흡광도가 감소하는 도 3의 B와 같은 정량화 곡선을 완성하였다(도 3의 B).

[114]

[115] <실험예 4> 바이오틴-펩티드를 이용한 혈청에서의 Xage-1d 단백질 정량화

[116] 혈청에서의 Xage-1d 단백질을 정량화하기 위하여 상기 실험예 3에서 펩티드를 대신하여 혈청을 사용하여 흡광도를 측정하고, 측정한 흡광도를 도 3의 B에 대입하여 Xage-1d의 농도를 계산하였다. 펩티드(GFGFRRQGEDNT)에 특이적인 항체를 코팅 용액에 녹여 96-웰 플레이트에 코팅한 후 블로킹 용액으로 비특이적 결합을 억제하였다. 워싱용액으로 코팅되지 않은 항체나 블로킹 용액을 세척한 다음, 혈청을 PBS에 농도별로 녹여 플레이트에 첨가한 다음 2~3시간 상온에서 반응시켰다. 워싱용액으로 플레이트를 5회 세척한 후 각 웰에 바이오틴에 특이적인 스트렙타비딘에 HRP가 결합된 STR-HRP (Pierce사)를 1:10,000으로 희석하여 첨가하고 2~3시간 결합시킨 후, 다시 웰을 워싱용액으로 세척한 후, 퍼옥시데이즈 발색을 위하여 각 웰에 TMB 기질용액(GenDEPOT)을 첨가하여 상온에서 반응한 후, 다시 정지용액(GenDEPOT)을 첨가하여 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값에 펩티드와 Xage-1d 단백질의 분자량 비를 계산하여 혈액에 존재하는 Xage-1d를 정량화하였다.

[117] 그 결과 표 3에 나타난 바와 같이, 정상인의 시료 평균값은 0.867 ng/ml인 반면 환자혈액의 평균은 그 25배 이상인 22.342 ng/ml이었다. 정상인이 완전히 배제되는 정상인 최대량을 기준으로 할 때 환자 혈액은 8개가 낮은 값을 보여 폐암환자에 대한 민감도는 89.3이었으며, 정상인의 평균값을 기준으로 할 때에는 환자혈액 중 단 1개가 낮은 값을 보였다(표 3).

[118]

[119] 표 3

정상인의 혈액 최고량 및 평균량을 기준으로 하였을 때의 민감도 및 특이도 비교.

시료 (총 108개)		정상	환자
		33	75
최대량 (ng/ml)		1.306	90.949
최소량 (ng/ml)		0.607	0.812
평균 (ng/ml)		0.867	22.342
1.306 ng/ml 기준(정상인의 최대량)	1.306	33	8
	> 1.306	0	67
	민감도 (Sensitivity)	민감도 = $(67/75) \times 100 = 89.3$	
	특이도(Specificity)	특이도 = $(33/33) \times 100 = 100$	
0.867 ng/ml 기준(정상인의 평균)	0.867	16	1
	> 0.867	17	74
	민감도 (Sensitivity)	민감도 = $(74/75) \times 100 = 98.7$	
	특이도(Specificity)	특이도 = $(16/33) \times 100 = 48.5$	

[120]

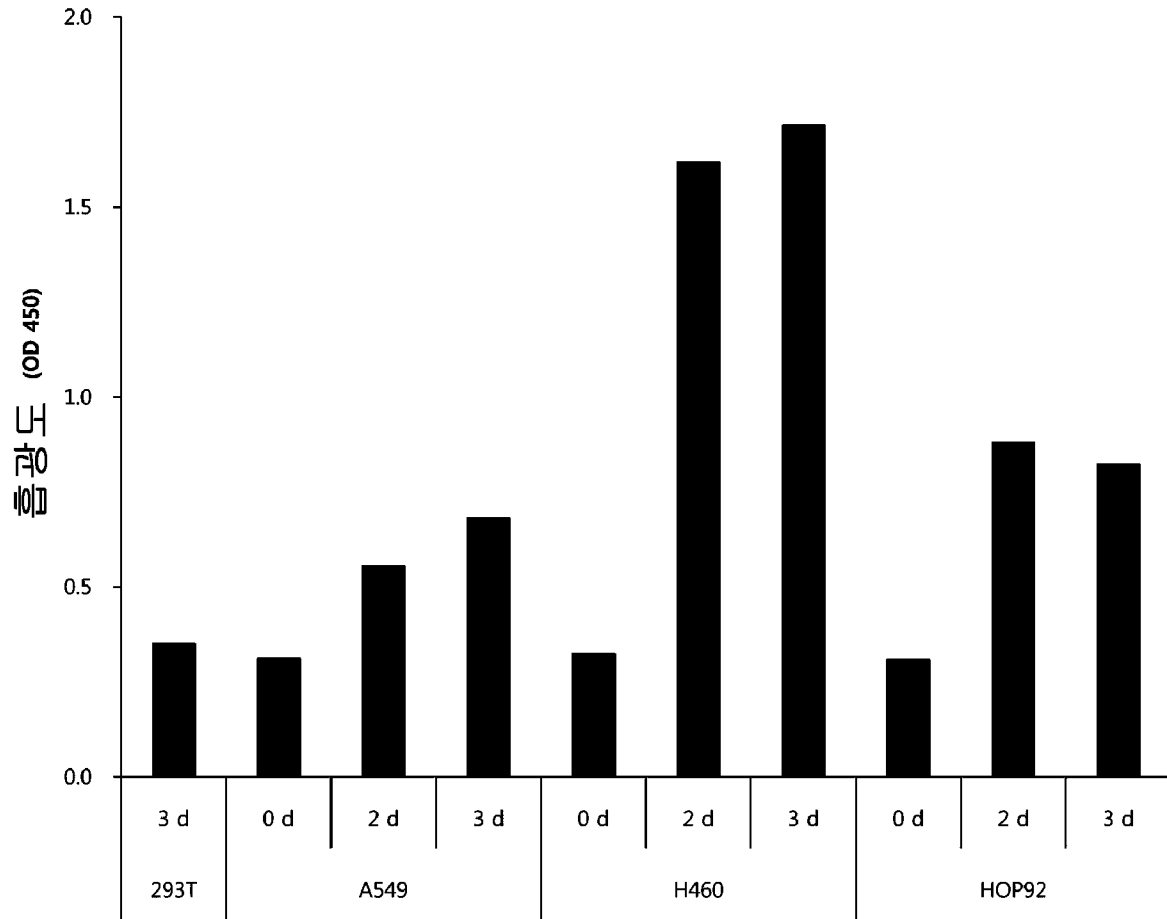
산업상 이용가능성

[121] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 Xage-1d는 폐암 세포주의 배양액뿐만 아니라, 폐암 환자의 혈액에서 존재하며, 정상인에 비해서 폐암 환자의 혈액에 더 많은 양이 존재하고 있으며, 적은 양으로도 민감하게 폐암을 진단할 수 있으므로, 폐암 진단용 단백질 마커로서 Xage-1d를 이용하여, 진단용 키트 및 면역크로마토그래피 스트립 및 폐암 진단에 이용될 수 있다.

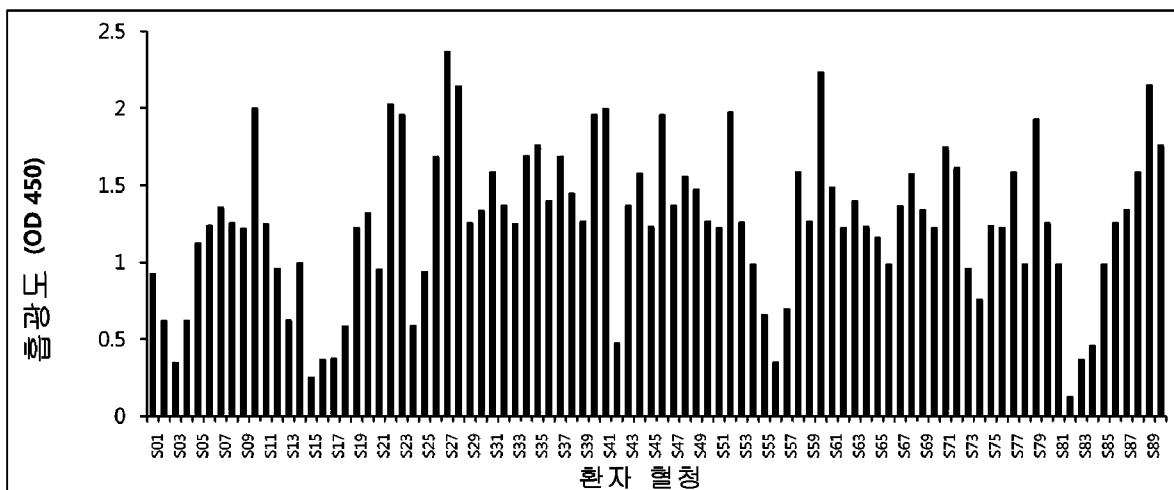
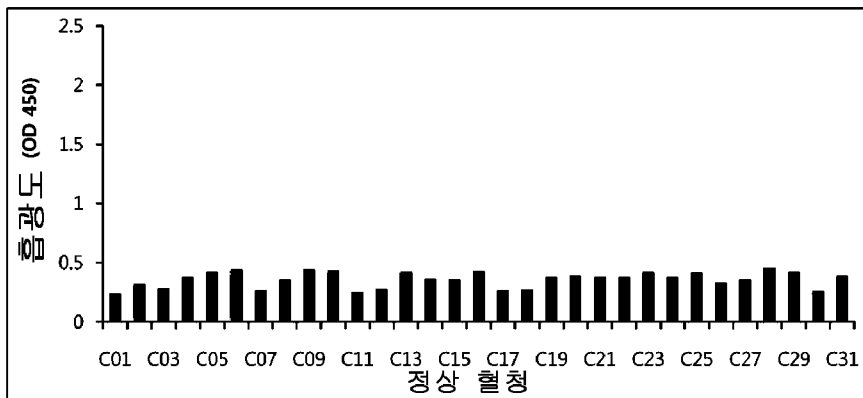
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 기재되는 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항-Xage-1d 항체는 발색효소, 발색물질 또는 형광분자에 결합된 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 발색효소는 HRP(horseradish peroxidase) 또는 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase)인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 발색물질은 콜로이드 골드(colloid gold)인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 형광분자는 FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate) 또는 RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 항-Xage-1d 항체는 리간드에 결합된 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 리간드는 바이오틴, 또는 아비딘 또는 스트렙트아비딘에 대해 바이오틴과 본질적으로 동일한 결합 작용을 갖는 바이오틴 유도체인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.
- [청구항 8] 1) 지지체;
2) 상기 지지체의 상부 표면에 부착되어 있는, 분석하고자 하는 피검 시료를 부착하는 검체 패드;
3) 상기 검체 패드와 연동되어 있고, 피검 시료에 함유된 Xage-1d 단백질과 특이적으로 결합하는 제 1 항체 컨쥬게이트를 함유하는 컨쥬게이트 패드;
4) 상기 컨쥬게이트 패드와 연동되어 있고, 상기 컨쥬게이트에 결합하는 제 2 항체가 선형으로 고정된 검출 라인(test line) 및 항-제 1 항체 면역글로불린이 고정된 대조 라인(control line)을 포함하는, 신호검출 패드; 및
5) 신호검출반응이 종료된 피검 시료를 흡수하는, 상기 신호검출 패드의 다운스트림에 위치하는 흡수 패드로 구성된, 폐암 진단용 면역크로마토그래피 스트립.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 단계 4)의 신호검출 패드는 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스, 폴리에틸렌, 폴리에테르설폰 및 나일론으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역크로마토그래피 스트립.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 단계 4)의 제 1 항체는 Xage-1d 단백질과

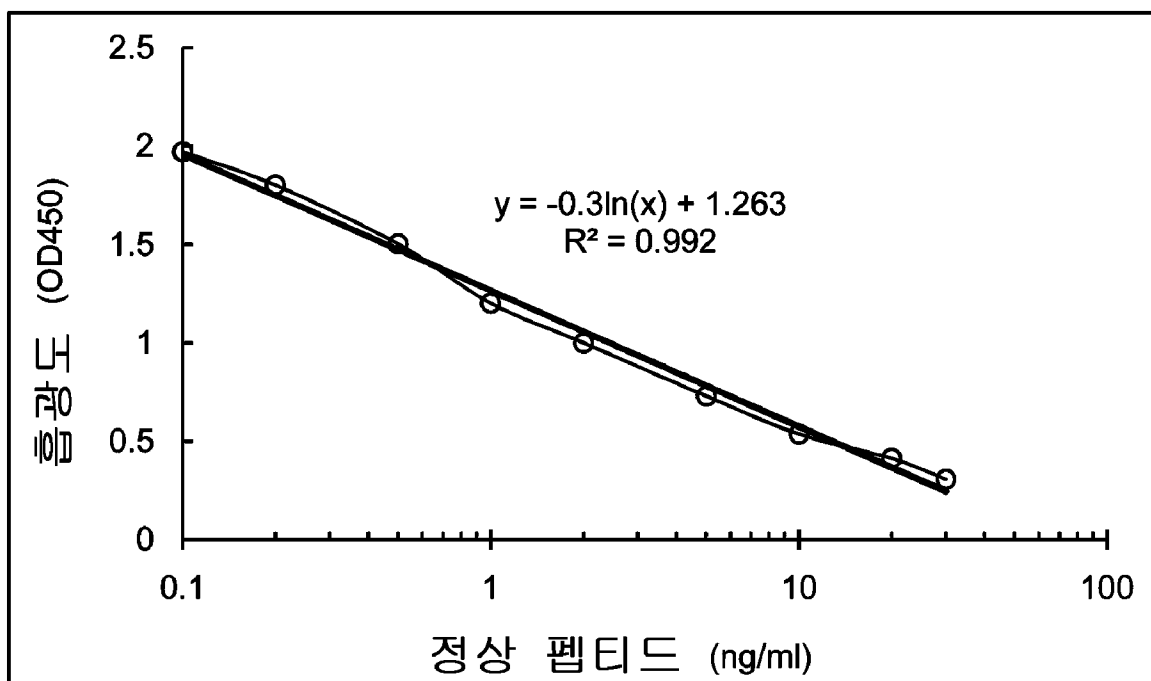
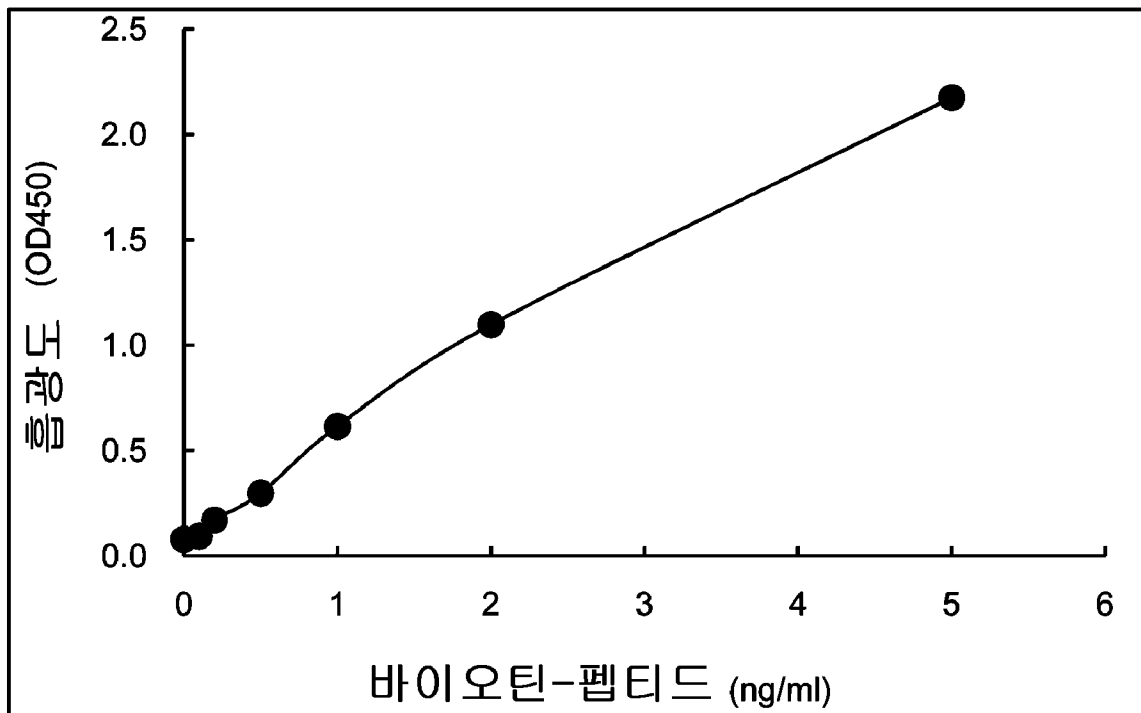
- 특이적으로 결합하는 단클론(monoclonal) 또는 다클론(polyclonal) 항체인 것을 특징으로 하는 면역크로마토그래피 스트립.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 단계 4)의 제 2 항체는 제 1차 항체-컨쥬게이트에 특이적으로 결합하는 단클론 또는 다클론 항체인 것을 특징으로 하는 면역크로마토그래피 스트립.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 단계 5)의 흡수 패드는 다공성 지지체, 및 상기 다공성 지지체의 공동(pore)에 분산되거나 다공성 지지체의 섬유상에 흡착 또는 코팅되어 있는 흡수제를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역크로마토그래피 스트립.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 면역크로마토그래피 스트립 상의 대조라인 및 검출라인에 착색선이 나타나면, 피검 시료를 폐암의 양성 시료로 판정하는 것을 특징으로 하는 면역크로마토그래피 스트립.
- [청구항 14] 1) 피검체로부터 유래한 혈액시료에서 Xage-1d의 발현량을 측정하는 단계;
2) 단계 1)의 Xage-1d의 발현량과 정상 혈액시료의 Xage-1d의 발현량을 비교하는 단계; 및
3) 피검체 유래의 Xage-1d 발현량이 정상 대조군에 비해 증가하는 경우 폐암에 걸릴 위험이 높은 것으로 판정하는 단계를 포함하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 단계 1)의 Xage-1d의 발현량의 측정 방법은 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학 검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 단백질 검출 방법.
- [청구항 16] 서열번호 1로 기재되는 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 예후 모니터링 키트.
- [청구항 17] 서열번호 1로 기재되는 Xage-1d에 특이적인 항체를 포함하는 폐암 예후 모니터링 방법.
- [청구항 18] 1) 피검체로부터 유래한 혈액시료에서 Xage-1d의 발현량을 측정하는 단계;
2) 단계 1)의 Xage-1d의 발현량과 정상 혈액시료의 Xage-1d의 발현량을 비교하는 단계; 및
3) 피검체 유래의 Xage-1d 발현량이 정상 대조군에 비해 증가하는 경우 폐암에 걸릴 위험이 높은 것으로 판정하는 단계를 포함하는 폐암을 진단하는 방법.



[Fig. 2]



[Fig. 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/003710**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/574(2006.01)i, C07K 16/32(2006.01)i, G01N 33/535(2006.01)i, G01N 33/533(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/574; A61K 39/395; C12N 5/02; A61K 39/00; A61K 35/74; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Xage-1d, lung cancer, diagnostic kit, diagnostic strip

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EGLAND KA. et al.. Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers. Mol. Cancer Ther. 2002, Vol. 1, pages 441-450. See the entire document and table 1.	1-16
A	SATO S. et al.. Identification of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAGE-1b in testis and tumors. Cancer Immunity. 2007, Vol. 7, page 5. See the entire document and figure 2.	1-16
A	US 2008-0292633 A1 (HENDERSON et al.) 27 November 2008 See the entire document.	1-16
A	US 7608394 B2 (VAN DEN BOOM et al.) 27 October 2009 See abstract.	1-16
A	US 2009-0324651 A1 (OLD et al.) 31 December 2009 See abstract.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 JUNE 2011 (23.06.2011)

Date of mailing of the international search report

23 JUNE 2011 (23.06.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/003710

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **17, 18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17 and 18 pertain to a diagnostic method of the human by surgery or therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/003710

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2008-0292633 A1	27.11.2008	US 2006-088527 A1 US 2008-171048 A1 US 2008-171690 A1 US 7425607 B2	27.04.2006 17.07.2008 17.07.2008 16.09.2008
US 7608394 B2	27.10.2009	EP 1774027 A2 EP 1774027 A4 US 2006-0210992 A1 US 2006-210992 A1 WO 2006-017083 A2 WO 2006-017083 A2 WO 2006-017083 A3 WO 2006-017083 A3	18.04.2007 27.05.2009 21.09.2006 21.09.2006 16.02.2006 16.02.2006 16.02.2006 29.11.2007
US 2009-0324651 A1	31.12.2009	EP 1943344 A2 JP 2009-510169 T US 2009-324651 A1 WO 2007-044406 A2 WO 2007-044406 A2 WO 2007-044406 A3	16.07.2008 12.03.2009 31.12.2009 19.04.2007 19.04.2007 14.06.2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/574(2006.01)i, C07K 16/32(2006.01)i, G01N 33/535(2006.01)i, G01N 33/533(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574; A61K 39/395; C12N 5/02; A61K 39/00; A61K 35/74; C12Q 1/68 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Xage-1d, 폐암, 진단 키트, 진단 스트립		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EGLAND KA. 등. Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers . Mol. Cancer Ther. 2002년, 1권, 441-450면. 전문 및 표1 참조.	1-16
A	SATO S. 등. Identification of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAG E-1b in testis and tumors. Cancer Immunity. 2007년, 7권, 5면. 전문 및 도2 참조.	1-16
A	US 2008-0292633 A1 (HENDERSON 외 12명) 2008.11.27 전문 참조.	1-16
A	US 7608394 B2 (VAN DEN BOOM 외 1명) 2009.10.27 요약 참조.	1-16
A	US 2009-0324651 A1 (OLD 외 4명) 2009.12.31 요약 참조.	1-16
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 06월 23일 (23.06.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 06월 23일 (23.06.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 문동현 전화번호 82-42-481-8298 

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐

서면

☒

전자적 형태

b. 제출시기

☐

출원시 국제출원에 포함

☒

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 17,18
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제17항, 제18항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약
규칙 39.1 (iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를
요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2008-0292633 A1	2008.11.27	US 2006-088527 A1 US 2008-171048 A1 US 2008-171690 A1 US 7425607 B2	2006.04.27 2008.07.17 2008.07.17 2008.09.16
US 7608394 B2	2009.10.27	EP 1774027 A2 EP 1774027 A4 US 2006-0210992 A1 US 2006-210992 A1 WO 2006-017083 A2 WO 2006-017083 A2 WO 2006-017083 A3 WO 2006-017083 A3	2007.04.18 2009.05.27 2006.09.21 2006.09.21 2006.02.16 2006.02.16 2006.02.16 2007.11.29
US 2009-0324651 A1	2009.12.31	EP 1943344 A2 JP 2009-510169 T US 2009-324651 A1 WO 2007-044406 A2 WO 2007-044406 A2 WO 2007-044406 A3	2008.07.16 2009.03.12 2009.12.31 2007.04.19 2007.04.19 2007.06.14