



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0118877
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0035616
(22) 출원일자 2014년03월26일
심사청구일자 2014년03월26일
(30) 우선권주장
1020130032393 2013년03월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
오역수
서울특별시 서초구 잠원동 잠원한신아파트 2동 203호
(74) 대리인
손민

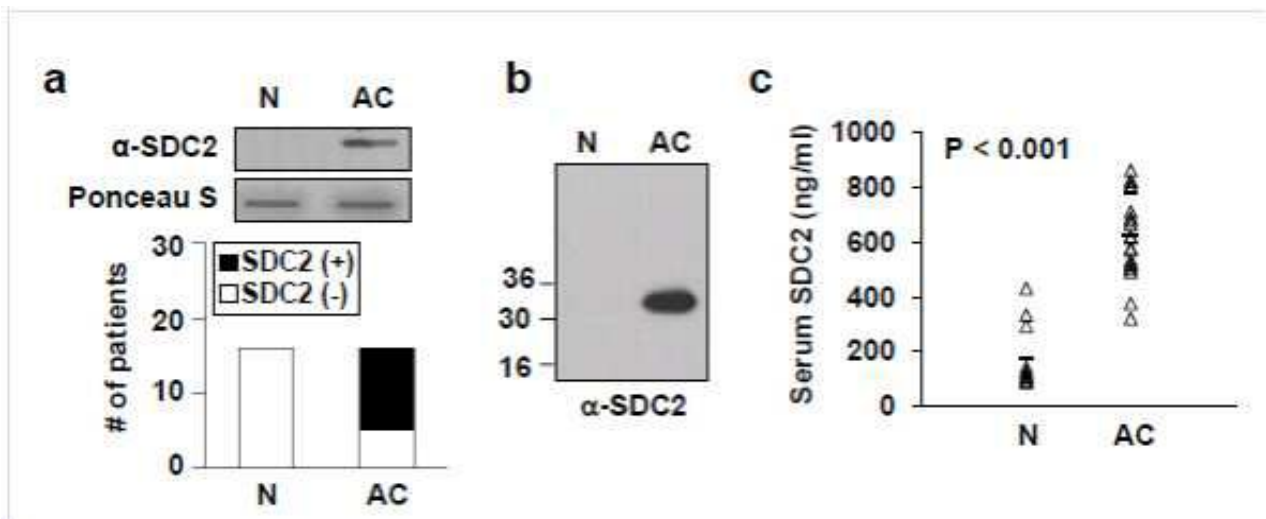
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규한 신데칸-2 단편 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 분리된 폴리펩타이드, 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸-2 단편에 대한 항체를 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 상기 항체를 포함하는 대장암 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도14



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0026103

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 2010년도 중견연구자지원사업 (핵심연구 공동)

연구과제명 Syndecan-2 매개 MMP-7 활성화 기전을 이용한 대장암 억제제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸-2 단편에 대한 항체를 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 결합하여 신데칸-2 단편의 대장암 성장 및 전이 촉진 활성을 저해시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

(i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 및 (ii) 서열번호 11 또는 12로 기재된 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제2 항체를 포함하는, 대장암 진단용 샌드위치 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 키트는 조기 대장암 진단용인 키트.

청구항 5

신데칸(syndecan)-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제를 포함하는, 대장암 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제제는 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체인 것인 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트.

청구항 8

(a) (i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 또는 (ii) 서열번호 11 또는 12로 기재된 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제2 항체 중 어느 하나를 캡처 항체로 코팅한 반응 용기에 대장암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 첨가하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 사용된 항체와 다른 하나를 검출 항체로 사용하여 신데칸-2 단편과 캡처 항체 간의 항원-항체 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 9

(a) 대장암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료에 신데칸(syndecan)-2 단백질 단편의 활성부위인 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제를 처리하여 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준 및 정상 대조군 시료의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 서로 비교하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 10

서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸-2 단편에 대한 항체.

청구항 11

서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 신데칸(syndecan)-2 단백질의 에피토프인 폴리펩타이드.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 분리된 폴리펩타이드; 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸-2 단편에 대한 항체를 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 상기 항체를 포함하는 대장암 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대장암은 병리학적으로는 대부분이 선암(adenocarcinoma)이며, 부위별로는 크게 결장암과 직장암으로 구분된다. 부위별 발생 빈도는 하부 대장, 즉 직장에서 발생하는 경우가 약 50%로 가장 높다. 최근의 연구 결과에 의하면, 식이 습관의 변화로 한국에서도 대장암의 발생률과 그에 따른 사망률이 현저하게 증가하고 있으며, 대장암의 발생률은 1995년 이후 2002년까지 420% 증가하여 암 중 발생률 1위를 나타내고 있다(2003 건강보험통계연보, 국민건강보험공단 발간). 또한 미국 및 유럽에서는 암 관련 사망의 두 번째 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(American Cancer Society statics for 2009).

[0003] 대장암의 발병 원인은 아직 불분명하나, 그 원인으로서는 유전적 요인, 고지방 및 저섬유 음식의 섭취와 관련된 식이습관 및 염증성 장질환 등이 고려되고 있다. 대장암은 모든 연령층에서 발생할 수 있으나, 연령이 증가함에 따라 발생빈도가 높아지며 50대 및 60대에서 자주 발생한다. 또한, 남녀의 발생 비율의 경우, 결장암은 여자, 직장암은 남자에게서 다소 높게 나타난다.

[0004] 대장암의 치료는 외과적 절제술을 근간으로 항암화학요법 및 방사선요법이 병행되고 있다. 이러한 수술적 요법, 항암화학요법 및 방사선요법 등의 진보에도 불구하고, 특정한 증상이 없이 진행되는 대장암의 특성으로 인하여 다른 장기로 전이된 후 진단되는 경우가 빈번하여, 수술 시점을 놓침으로써 높은 사망율을 나타내고 있다. 대장암의 5년 평균생존율은 1기의 경우 90% 이상, 2기의 경우 70% 이상, 3기의 경우 50% 이상이고 4기의 경우에는 5% 이하로 나타나지만, 대장암을 조기에 발견하고 치료할수록 생존율이 현저히 증가하는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 이유로 대장암의 조기 진단 방법이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0005] 대장암의 진단은 주로 대장과 관련된 증세를 보이는 환자에게 직장 수지검사(rectal digital examination), 분변 잠혈검사(fecal occult blood test) 및 대장조영술을 수행하여 이루어지며, 필요에 따라 결장경 검사를 통한 조직검사가 행해지고 있다. 현재 이용 가능한 가장 조기의 검출방법은 분변혈에 대한 시험 또는 내시경 과정을 수반하는 상황이다. 그러나, 분변혈이 검출되는 경우 이미 상당한 크기의 종양이 존재하는 상태이며, 잠혈 기준

(guaiacbased)의 분변 검사의 감수성은 26%로 이는 악성 병변이 있는 74%의 환자가 검출되지 않음을 의미하는 것이다(Ahlquist et al., Gastroenterol. Clin. North Am. 26: 41-55, 1997). 또한, 결장내시경의 경우, 전암성 및 암성 병변의 시각화라는 이점이 있어 조기 검출에 대한 최선의 접근법이지만, 이 방법은 상당한 비용뿐만 아니라 환자에게 고통과 위험을 초래할 수 있다는 문제점을 지닌다.

[0006] 상기와 같은 종래의 방법들은 진단의 정확도가 낮을 뿐만 아니라, 대장암이 발병하기 이전의 환자들에 대한 조기 진단이 불가능하며, 피검체들에게 불편을 주는 문제점이 있다. 이러한 기존 진단방법의 단점을 보완하기 위한 방법으로 환자의 혈장에서 종양 표지자(marker)의 농도를 측정하여 대장암을 진단하고자, 여러 종양 표지자를 개발하고 있다(Clinton et al., Biomed. Sci. Instrum. 39: 408-414, 2003; Rui et al., Proteomics 3: 433-439, 2003; Soletormos et al., Dan. Med. Bull. 48: 229-255, 2001). 그러나, 현재, 태아성암항원(CEA), 종양-연관 당단백질을 근거로 한 진단적 혈장 시험만이 대장암 분야에서의 진단 보조에 이용가능한 것으로 알려져 있다. 그러나, CEA는 대장암뿐만 아니라, 위암, 췌장암 및 대다수의 유방 암종, 폐 암종 및 두경부 암종을 가진 환자로부터 수득된 조직의 95%에서 증가하는 것으로 보고된바 있다. 또한, 비-악성 질환을 가진 환자 역시 높은 CEA 수준을 가짐이 보고된 바 있으며, 대장암이 있는 대다수 환자가 혈청에서, 특히 질환의 초기 단계 동안에는 정상적인 CEA 수준을 나타내며 보고된바 있다. 따라서, 검출 재발에서의 혈청 또는 혈장으로부터 측정된 CEA의 이용은 보고상 논란의 여지가 있으며, 아직 널리 적용되지 못하고 있다.

[0007] 또한, 효과적인 대장암 진단 방법뿐만 아니라, 대장암 치료 방법 역시 그 개발이 지속적으로 요구되고 있다. 대장암 치료는 그 병기에 따라 달라질 수 있는데, 크게 내시경적 절제, 외과적 절제, 항암치료, 방사선 치료 등이 이루어지고 있으며, 또한 혈관 신생을 가져오는 VEGF에 대한 항체인 아바스틴(Avastin) 등이 대장암 치료에 적용되고 있다. 그러나, 서구화된 식습관으로 인하여 대장암 발병 빈도가 높아진 데 반하여, 근본적인 대장암 치료 방법은 개발되지 않은 실정이다. 따라서, 효과적인 대장암의 치료를 가져오기 위해서는 대장암에서 특징적으로 과발현되는 단백질의 활성 부위를 구체적으로 규명하여 이를 특이적으로 억제시킴으로써 대장암을 치료하는 방법을 개발할 필요성이 존재한다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 대장암 진단, 특히 조기 대장암 진단에 사용될 수 있는 마커 및; 대장암 치료 표적으로 사용될 수 있는 대장암에 과발현되는 단백질의 활성 부위를 특이적으로 규명하고 이에 결합하여 활성을 억제하는 항체를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 신데칸(Syndecan)-2 단백질 단편이 대장암 환자의 혈청 등의 시료에서 검출되는 것을 확인하였다. 특히 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위가 대장암 진단에 높은 민감도 및 특이도를 지닐 뿐만 아니라, 대장암 활성을 촉진시키는 부위임을 확인하여, 이 부위를 표적으로 하는 물질을 대장암 진단 및 치료용으로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 분리된 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸(syndecan)-2 단백질 단편에 대한 결합 물질, 특히 항체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸-2 단편에 대한 항체를 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신데칸-2 단백질 단편에 대한 결합 폴리펩타이드를 대장암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장암 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결

합하는 제제를 포함하는, 대장암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 대장암 진단용 조성물을 포함하는, 대장암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 및 (ii) 서열번호 11 또는 12, 바람직하게는 서열번호 9 또는 10으로 기재된 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제2 항체를 포함하는, 대장암 진단용 샌드위치 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 대장암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료에 신데칸(syndecan)-2 단백질 단편의 활성부위인 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제를 처리하여 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준 및 정상 대조군 시료의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 서로 비교하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) (i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 또는 (ii) 서열번호 11 또는 12, 바람직하게는 서열번호 9 또는 10으로 기재된 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제2 항체 중 어느 하나를 캡처 항체로 코팅한 반응 용기에 대장암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 첨가하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 사용된 항체와 다른 하나를 검출 항체로 사용하여 신데칸-2 단편과 캡처 항체 간의 항원-항체 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 분리된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0020] 본 발명에서는, 신데칸-2 단백질 단편이 대장암에서 높은 수준으로 존재하며, 이러한 138개의 아미노산으로 이루어진 인간 신데칸-2 단백질 단편 중에서 단 16개의 아미노산으로 이루어진, 79번째 내지 94번째 아미노산 부위, 148개의 아미노산으로 이루어진 랫트 신데칸-2 단백질 단편 중에서 단 16개의 아미노산으로 이루어진 89번째 내지 104번째 아미노산 부위가 대장암 진단에 있어 높은 민감도 및 특이도를 지니는 것을 확인하였다. 특히, 수 많은 신데칸-2의 세포 외 부위 중에서도 상기 부위가 대장암 활성을 촉진시키는 부위임을 확인하여, 상기 부위에 대한 폴리펩타이드를 대장암을 유도하는 물질로서 이용하거나, 대장암 치료에 사용될 수 있는 항체의 생산에 이용될 수 있는 항원 또는 에피토프로서 이용할 수 있음을 규명하였다.

[0021] 본 발명에서 용어, "신데칸(Syndecan)-2 단백질 단편"은 이에 제한되지는 않으나, 대장암 활성 촉진능을 지니며, 정상 개체와 대장암 개체를 구분할 수 있는 신데칸-2 단백질의 일부 단편이다. 신데칸-2는 세포 표면에 존재하는 세포결합 수용체로, 막횡단 헤파란-설페이트 프로테오글리칸이다. 상기 신데칸-2 유전자 및 단백질 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)와 같은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI에 등록된 NM_002998, NP_002989일 수 있으나, 이의 활성을 갖는 한 변이된 서열 등을 제한없이 포함할 수 있다.

[0022] 상기 신데칸-2 단백질 단편은 신데칸-2 단백질의 세포외 도메인이 MMP(Matrix metalloprotease)-7 단백질에 의하여 잘려서 생성된 신데칸-2 단백질 단편일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 3의 인간 신데칸-2 단백질의 N-말단의 세포 외 도메인의 139번째 아미노산 또는 서열번호 4의 랫트 신데칸-2 단백질의 N-말단의 세포외 도메인의 149번째 아미노산인 류신(Leucine)이 MMP-7에 의하여 절단된, 서열번호 5 또는 6의 신데칸-2 단백질 단편일 수 있다. 본 발명자들은 대장암에서 신데칸-2 단백질이 MMP-7에 의하여 특이적으로 절단되며, 이에 따라 생성된 신데칸-2 단백질 단편이 대장암 진단에 표적이 될 수 있으며 대장암 이동을 촉진시킴을 확인하였다(한국공개특허 제10-2012-0013915호). 또한, 본 발명자들은 130개가 넘는 아미노산으로 이루어진 신데칸-2 단백질 단편 중에서도, 단지 16개의 아미노산 부위, 구체적으로 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 89번째 내지 104번째 아미노산 부위(서열번호 1) 및 인간 신데칸-2 단백질 단편의 79번째 내지 94번째 아미노산 부위(서열번호 2)가 대장암 진

단 및 치료에 있어서 특이적 부위가 될 수 있음을 본 발명에서 최초로 규명하여, 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 분리된 폴리펩타이드를 대장암 진단 또는 치료용 항체의 항원 또는/및 에피토프로 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 단편이 대장암의 치료 타겟이 될 수 있음을 확인하였다.

[0023] 본 발명에서 용어, "서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 폴리펩타이드"는 랫트 신데칸-2 단백질의 암 활성을 나타내는 특이적 부위에 대한 폴리펩타이드로서, 랫트 신데칸-2 단백질의 아미노산 서열의 N 말단을 기준으로 89번째 내지 104번째 아미노산 부위에 대한 폴리펩타이드를 의미한다.

[0024] 본 발명에서 용어, "서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 폴리펩타이드"는 인간 신데칸-2 단백질의 암 활성을 나타내는 특이적 부위에 대한 폴리펩타이드로서, 인간 신데칸-2 단백질의 아미노산 서열의 N 말단을 기준으로 79번째 내지 94번째 아미노산 부위에 대한 폴리펩타이드를 의미한다.

[0025] 이와 같은, 상기 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 16개의 아미노산으로 구성된 본 발명의 분리된 폴리펩타이드는, 서로 상동성을 지니는 부위로서 신데칸-2 단백질의 암 활성을 나타낼 뿐만 아니라 높은 진단 특이성 및 민감성을 가지는 부위이므로, 신데칸-2 단백질 단편의 생물학적 활성을 저해시킬 수 있는 항체 생산 및 신데칸-2 단백질 단편을 효과적으로 검출할 수 있는 항체 생산에 있어 에피토프(epitope)로 유용하게 이용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는 신데칸-2 단백질 단편이 대장암의 활성을 촉진시키는 역할을 수행함을 확인하고, 상기 신데칸-2 단백질 단편 부위 중에서 암 촉진 활성을 가지는 특이적 부위를 규명하고자 하였다(실시예 2). 그 재조합단백질을 이용한 실험 결과, 신데칸-2 단백질의 수 많은 도메인 중에서도 세포 외 기질 도메인이 대장암 촉진 활성을 가짐을 확인하였다(실시예 3).

[0027] 또한 신데칸-2 단백질의 수 많은 부위 중에서도 인간 신데칸-2 단백질 단편의 79번 내지 94번 아미노산 부위에 대한 펩타이드 hS2LQ가 대장암 촉진 활성을 가짐을 확인하였다(실시예 4). 신데칸-2 단백질 단편의 세포 외 부위에 속하나 N-말단에 위치한 19번 내지 40번 잔기(서열번호 7)에 대한 펩타이드 hS2EA의 경우에는 hS2LQ와 달리 대장암 촉진 활성을 나타내지 못하였다(실시예 4). 신데칸-2 단백질 단편의 세포 외 부위에 속하나 N-말단에 위치한 19번 내지 40번 잔기(서열번호 7)에 대한 펩타이드 hS2EA의 경우에는 hS2LQ와 달리 대장암 촉진 활성을 나타내지 못하였다(실시예 4). 특히, 상기 부위의 암 촉진 활성을 in vivo 모델을 통하여 확인한 결과, 생쥐 종양 모델, 폐 전이 모델 및 간 전이 모델 모두에서 상기 펩타이드 자체의 주입만으로 종양이 성장이 촉진되며(실시예 4), 폐 및 간으로의 암세포 전이가 촉진되는 결과를 나타내어, 상기 hS2LQ 부위가 신데칸-2 단백질 단편의 활성을 나타내는 부위임을 규명하였다(실시예 4). 또한, 상기 부위는 p38 MAPK의 활성을 조절하고 그 결과 MMP-7의 발현을 조절함으로써 암세포의 전이를 조절하는 것임을 나타내었다(실시예 5).

[0028] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 부위가 신데칸-2 단백질 단편의 여러 부위 중에서도 당화가 되어 있지 않아 항체와 같은 검출용 제제의 결합이 용이할 뿐만 아니라, 신데칸-2 단백질과 높은 상동성을 가진 것으로 알려진 신데칸-4 단백질과도 16개의 아미노산 중 단 두 개의 아미노산만이 중복될 정도로 낮은 상동성을 나타내는 부위임을 확인하여, 상기 부위를 신데칸-2 단백질 단편의 검출에 효과적으로 사용할 수 있음을 확인하였다(실시예 6). 또한, 상기 부위를 이용하여 대장암 진단 효과를 확인하고자 하였고, 그 결과 대장암 세포주, 대장암 환자에서 신데칸-2 단백질이 높은 수준으로 존재하는 것을 검출하였으며, 신데칸-2 단편이 기존에 사용되는 CEA(carcinoembryonic antigen)에 비하여 높은 민감도 및 특이도를 지니는 마커로서 조기 대장암 진단을 가져올 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 79 내지 94번 부위에 대한 항체와, 19번 내지 40번 부위에 결합하는 항체를 이용하여 샌드위치 ELISA를 수행한 결과, 효과적으로 대장암 환자를 검출할 수 있음을 확인하였고, 다른 위치에 결합하는 항체를 페어링하여 사용하는 경우에 비하여 그 효과가 우수함을 확인하여, 상기 두 부위를 이용한 샌드위치 ELISA 키트가 대장암 진단에 효과적일 수 있음을 확인하였다(실시예 6).

[0029] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는, 신데칸(syndecan)-2 단백질 단편에 대한 결합 물질, 바람직하게는 항체를 제공한다.

[0030] 상기 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열, 신데칸-2 단백질 단편에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0031] 본 발명에서 용어, "신데칸-2 단백질 단편에 대한 결합 물질"은 신데칸-2 단백질 단편에 결합하여, 신데칸-2 단

백질의 생물학적 활성을 저해시키는 물질로서, 바람직하게는 신데칸-2의 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열에 결합하는 항체이다.

[0032] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무인 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 상기 항체 단편은 항원결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, Fab' F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중쇄Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0033] 상기 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열은 신데칸-2 단백질 단편의 대장암 활성을 나타내므로, 이 부위에 특이적으로 결합하는 항체는 대장암의 발병 또는 진행을 억제시키기 위한 치료용 항체로서 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 부위는 당화가 되어있지 않고 다른 단백질, 특히 신데칸-4 단백질과도 상동성이 낮아 신데칸-2 단백질 단편의 검출을 통한 대장암 진단에서 높은 민감도 및 특이도를 나타내어, 대장암 진단에 있어서도 유용하게 사용될 수 있는 부위이다.

[0034] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 분리된 폴리펩타이드 또는 신데칸-2 단백질 단편에 대한 결합 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0035] 상기 분리된 폴리펩타이드, 신데칸-2 단백질 단편에 대한 항체, 신데칸-2 단백질에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0036] 본 발명에서 제공하는 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 랫트, 햄스터, 생쥐 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 숙주세포에서 상기 뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 그 예로 파아지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스 또는 레트로바이러스벡터 등에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 형태가 될 수 있다.

[0037] 또한, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 발현벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 발현벡터일 수 있다.

[0038] 본 발명에서 제공하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환된 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO(중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0(생쥐 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NSO(생쥐 골수종), 293T, 보우 멜라노마 세포, HT-1080, BHK(베이비 햄스터 신장세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6(인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

- [0039] 본 발명에서 용어, "도입"은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포에 전달하는 방법을 의미한다. 이와 같은 도입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-텍스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포솜 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시키는 것을 의미한다. 아울러, 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에서 도입은 형질전환과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0040] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 신데칸-2 단백질 단편에 대한 항체를 유효성분으로 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0041] 상기 신데칸-2 단백질 단편 및 신데칸-2 단백질 단편에 대한 항체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0042] 상기 신데칸-2 단백질 단편에 대한 결합 폴리펩타이드는 신데칸-2 단백질 단편 중에서 대장암 활성을 촉진시키는 특이적 부위에 결합하여 이의 생물학적 활성을 저해시키므로, 이를 포함하는 조성물은 대장암의 증식 또는/및 이동성을 감소시켜, 대장암의 예방 또는 치료를 가져올 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 용어, "대장암"은 대장에 생긴 암세포로 이루어진 악성 종양으로서, 그 진행 정도에 따라 1기, 2기, 3기 및 4기로 분류된다. 대장암 1기는 암세포가 점막 및 점막하층에 국한되어 있는 경우를 말하며, 보통 조기 대장암으로 명명된다. 대장암 2기는 암세포가 장벽 외까지 번졌으나 아직 림프절로는 전이가 안된 상태를 의미한다. 대장암 3기는 암세포가 장벽 내에 머물고 있는 림프절에 암세포가 침범한 상태를 의미하며, 대장암 4기는 암세포가 대장을 벗어나 간, 폐, 뼈 등 대장에서 멀리 떨어진 장기에까지 전이된 상태를 의미한다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 대장암의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"란 조성물의 투여에 의해 대장암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0045] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0047] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0049] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0050] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 대장암의 진행 정도, 약

물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서는 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열 부분이 대장암을 촉진시킬 수 있음을 확인하여, 이 부위에 결합하는 폴리펩타이드가 신데칸-2 단백질 단편의 활성을 저해시켜 대장암의 치료를 가져올 수 있음을 확인하였다.

[0052] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 신데칸-2 단백질 단편에 대한 결합 폴리펩타이드를 대장암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0053] 상기 신데칸-2 단백질 단편, 결합 폴리펩타이드에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0054] 상기 대장암을 치료하는 방법은 신데칸-2 단백질 단편에 대한 결합 폴리펩타이드, 바람직하게는 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 대장암이 발병되거나 발병 의심이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암을 치료하는 방법일 수 있으며, 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0055] 상기 개체는 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유 동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 상기 조성물의 투여에 의해 암이 치료되는 개체는 제한없이 포함된다.

[0056] 이때, 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액체, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화되어야 한다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0057] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제를 포함하는, 대장암 진단용 조성물을 제공한다.

[0058] 상기 신데칸-2 단백질 단편에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0059] 본 발명에서는 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 89번 내지 104번 아미노산 부위(서열번호 1) 및 인간 신데칸-2 단백질 단편의 79번 내지 94번 아미노산 부위(서열번호 2)는 신데칸-2 단백질의 여러 부위 중에서 특히 민감도 및 특이도가 높은 부분임을 규명함으로써, 이 부위를 특이적으로 인지하는 제제를 사용하는 경우 효과적인 대장암 진단을 가져올 수 있음을 밝혔다. 특히, 본 발명자들은 상기 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열에 해당하는 부분은, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)과 같은 당이 부착되어 있지 않아, 신데칸-2 단백질 단편에 결합하는 제제, 예컨대 항체가 신데칸-2 단백질 단편에 결합하기가 보다 용이하여, 신데칸-2 단백질 단편의 존재 여부를 보다 확실하게 검출할 수 있어 높은 진단 효율을 가져올 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라, 상기 서열번호 1 또는 2로 표시되는 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위는 신데칸-2 단백질과 높은 상동성을 가진 것으로 알려진 신데칸-4 단백질과도 매우 낮은 상동성을 갖는 것을 확인하였다. 구체적으로는 16개의 아미노산 중 단 2개의 아미노산만이 중복될 정도로 낮은 상동성을 나타내는 부위임을 확인하여 신데칸-2 단백질의 상기 부위를 특이적으로 검출하는 제제를 사용하는 경우 대장암을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0060] 따라서, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제를 포함하는 본 발명의 조성물은 대장암 진단에 용이하게 사용될 수 있다.

[0061] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 진단은 대장암 발병 여부를 확인하는 것을 의미하며, 특히 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열을 특이적으로 인지하는 제제를 이용하여 대장암 발병 여부를 확인하는 것을 의미한다.

- [0062] 본 발명에서 용어, "신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제"는 대장암 세포에서 발현이 증가하는 마커인 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용할 수 있는 분자를 의미한다. 바람직하게는 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적인 항체를 말한다.
- [0063] 대장암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 대장암 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하기 위하여, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에서는, 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 정의되는 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위가 다른 부위와 달리 당화가 되어 있지 않을 뿐만 아니라, 신데칸-2 단백질과 상동성이 매우 높다고 알려진 신데칸-4 단백질과도 단지 두 개의 아미노산만이 겹칠 정도로 상동성이 낮은 부위인 것을 확인하였다. 또한, 신데칸-2 단백질 단편의 N-말단을 특이적으로 인지하는 단일클론항체인 #197과 본 발명의 신데칸-2 단백질 단편의 부위(서열번호 1 또는 2)를 인지하는 다클론항체를 각각 사용하여 신데칸-2 단백질 단편을 인지하는 정도를 확인한 결과, 서열번호 1 또는 2의 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위를 인지하는 항체가 신데칸-2 단백질 단편을 검출하는 효과가 더 뛰어남을 확인하여, 상기 부위가 신데칸-2 단백질 단편의 수준을 검출하여 대장암을 진단하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다(실시예 6).
- [0065] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 대장암 진단용 조성물을 포함하는, 대장암 진단용 키트를 제공한다.
- [0066] 상기 대장암 및 대장암 진단용 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0067] 본 발명의 키트는, 대장암 진단 마커인 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 특이적으로 인지하여 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 확인함으로써 대장암의 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 마커 검출용 키트에는 대장암 진단 마커의 발현 수준을 측정하기 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0069] 그 예로, 본 발명의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색 효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.
- [0070] 상기 키트는 i) SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법, 또는 ii) 항체에 부착된 형광표지에 의한 형광을 검출함으로써 양이 측정되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0071] 상기 항체는 본 발명의 에피토프 또는 항원을 대상으로 당업자에게 알려진 항체 제조방법에 의하여 제조될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 키트는 암을 가진 개체와 정상 개체에서 발현에 차이가 있는 단백질 마커인 신데칸(Syndecan)-2 단백질 단편을 측정하는데 사용될 수 있다. 상기 키트는 개체가 암인지 아닌지를 구별하여 진료 행위자가 진단 및 스크리닝하는 것을 가능하게 할 뿐 아니라, 치료에 대한 개체의 반응을 모니터하여 그 결과에 따라 치료를 변경하는 것을 가능하게 한다.
- [0073] 본 발명의 키트는 상기 단백질 마커에 결합하는 1차 획득 시약(capture reagent) 및 1차 획득시약에 결합하지 않는 2차 획득 시약을 포함할 수 있다.

- [0074] 상기 1차 획득시약은 항체 또는 금속킬레이트, 바람직하게는 항체이고, 2차 획득시약은 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드로 표지한 접합체(conjugate)로 2차 항체이다. 발색효소는 퍼옥시다제(oxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)(예: 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase))일 수 있고 형광물질인 경우, 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸이 가능하다.
- [0075] 개체로부터 수득된 시료를 1차 획득시약, 바람직하게는 마커에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있고 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고정상에 고정될 수 있다. 고정상은 유리나 플라스틱 예를 들어 미세역가 플레이트(microtiter plate), 막대, 비드(bead) 또는 미세비드(microbead) 등이 될 수 있다. 항체는 또한 프로브 기질이나 단백질 칩에 결합될 수 있다. 시료를 항체와 정온배치한 후 세척하여 항체-마커 복합체를 측정할 수 있다. 이는 세척된 혼합물을 2차 획득시약, 바람직하게는 2차 항체와 정온 배치하여 수행된다. 항체-마커 복합체의 양 측정이나 존재 검출은 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 반사 또는 투과를 통해 이루어질 수 있다. 상기 방법 외에도 시료 내의 단백질 마커는 간접적인 분석방법 예를 들어, 단백질 마커의 다른 에피토프에 결합하는 모노클론 항체와 경쟁 또는 억제 반응 분석을 실시하여 검출할 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명의 키트는 상기 단백질 마커에 결합하는 항체를 처리한 후 결합한 항체의 양을 탐색함으로써 대장암을 진단 및 스크리닝할 수 있다.
- [0077] 상기 결합한 항체의 양을 탐색하는 방법으로는 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용하는 것이 바람직하고, 여기에는 형광 표지에 의한 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법, 형광물질의 표지없이 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.
- [0078] 상기 형광법은 형광 스캐너 프로그램을 이용하여 상기 단백질 마커에 특이적 항체에 결합하는 항체를 형광물질로 라벨링한 후 스포팅하여 신호를 확인하는 방법으로, 이 방법을 적용하여 결합 정도를 확인할 수 있다. 상기 형광물질은 Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate, FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(rhodamine-B-isothiocyanate, RITC), 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0079] 상기 SPR 시스템은 형광법과는 달리 시료를 형광물질로 표지할 필요가 없이 항체의 결합 정도를 실시간으로 분석하는 것이 가능하다. SPRI의 경우에는 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하다.
- [0080] 또한, 본 발명의 키트는 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 결합된 단백질 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다. 분석을 위해 사용되는 시료는 혈청, 뇨, 눈물 타액 등 정상적인 상태와 구별될 수 있는 질환 특이적 폴리펩타이드를 확인할 수 있는 생체 시료를 포함한다. 바람직하게는 생물학적 액체 시료, 예를 들어 혈액, 혈청, 혈장으로부터 측정될 수 있다. 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데 예를 들어 환자로부터 수득한 혈청 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전 처리될 수 있다.
- [0081] 또한, 구체적으로 상기 키트는 (i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 및 (ii) 인간 신데칸-2의 1 내지 79번 아미노산 서열(서열번호 11)에 결합하는 제2 항체를 포함하는, 대장암 진단용 샌드위치 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트일 수 있다.
- [0082] 또한, 구체적으로 상기 키트는 (i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 및 (ii) 서열번호 9 또는 10으로 기재된 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제2 항체를 포함하는, 대장암 진단용 샌드위치 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트일 수 있다.

- [0083] 본 발명에서 용어, "샌드위치 ELISA"는 항원의 서로 다른 부위에 결합하는 두 개 이상의 항체를 이용하는 ELISA 방법이다. 상기 방법은 항원이 반응용기, 예컨대 플레이트에 잘 결합하도록 항원에 대한 항체(캡처 항체)를 플레이트에 결합시키고, 시료를 반응용기에 반응시키고, 시료에 항원이 포함된 경우, 그 항체와 항원이 결합하게 되고, 여기에 상기 캡처 항체와 다른 항원결정기에 특이적인 2차 항체를 첨가하면 결합된 항원과 반응하게 되므로, 이를 이용하여 시료 내의 항원 존재 여부를 검출하는 방법이다.
- [0084] 본 발명의 양태에 따르면, 인간 신데칸-2의 19 내지 40번 부위에 결합하는 항체와 79 내지 94번 부위에 결합하는 항체를 이용하여 샌드위치 ELISA 방법으로 대장암을 진단하는 경우, 시료 내에 포함된 신데칸-2 단편을 효과적으로 검출할 수 있어, 다른 조합에 비하여 대장암 진단 효율을 높일 수 있음을 나타내었다.
- [0085] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 대장암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료에 신데칸(syndecan)-2 단백질 단편의 활성부위인 서열번호 1 또는 2로 기재된 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제제를 처리하여 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준 및 정상 대조군 시료의 신데칸-2 펩타이드 단편의 발현 수준을 서로 비교하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다. 또한, 상기 정보의 제공 방법은 진단방법일 수 있다.
- [0086] 특히, 본 발명에서는 신데칸-2 단백질 단편의 여러 부위 중에서도 민감도 및 특이도가 뛰어난, 서열번호 1 또는 2의 서열에 결합하는 제제를 이용하므로, 본 발명의 방법은 뛰어난 진단 효과를 가져올 수 있는 방법이다.
- [0087] 본 발명에서 용어, "시료"는, 대장암 마커인 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준이 차이나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 검출하고자 하는 신데칸-2 단백질 단편은 막 횡단 프로테오글리칸인 신데칸-2 단백질의 세포 외 도메인의 일부분이 MMP-7(Matrix metalloprotease-7) 단백질에 의하여 잘려져 세포 밖에 존재하게 되므로, 신데칸-2 단백질 단편을 포함하는 시료는 바람직하게는 혈액, 혈청 또는 혈장일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준을 대장암 의심 개체에서의 발현 수준과 비교함으로써 대장암 의심 개체의 실제 암 환자 여부를 진단할 수 있다. 즉, 대장암으로 추정되는 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하고, 정상 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 본 발명의 마커의 발현 수준이 정상 세포의 것보다 대장암으로 추정되는 세포 유래에서 더 많이 발현되면 대장암으로 추정되는 세포를 대장암으로 예측할 수 있는 것이다.
- [0089] 신데칸-2 단백질 단편 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 대장암 의심 개체에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 대장암 마커 유전자에서 신데칸-2 단백질 단편으로의 유의한 발현량의 증가 여부를 판단하여, 대장암 의심 환자의 실제 대장암 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [0090] 본 발명에서 용어, "항원-항체 복합체"는 대장암 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [0091] 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노 트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 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 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co ,

⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.

- [0092] 단백질 발현수준 측정은 바람직하게는, ELISA 법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 대장암 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 대장암 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [0093] 또한, 바람직하게는, 상기 대장암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 대장암 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 대장암이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. 단백질 단편의 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.
- [0094] 또한, 바람직하게는, 상기 대장암 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 관독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 대장암 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [0095] 그 예로, 신데칸-2 단백질 단편의 발현 수준의 측정은 전기영동(Electrophoresis), MALDI-TOF MS(Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry) 또는 SELDI-TOF MS(surface-enhanced laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry) 방법을 이용하여 측정되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0096] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) (i) 서열번호 1 또는 2로 기재된, 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제1 항체; 또는 (ii) 서열번호 9 또는 10으로 기재된 신데칸-2의 아미노산 서열에 결합하는 제2 항체 중 어느 하나를 캡처 항체로 코팅한 반응 용기에 대장암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 첨가하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 사용된 항체와 다른 하나를 검출 항체로 사용하여 신데칸-2 단편과 캡처 항체 간의 항원-항체 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0097] 상기 제1 항체 및 제2 항체, 신데칸-2, 시료 및 진단에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

- [0098] 신데칸-2 단백질 단편의 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열은, 대장암의 진단 및 치료에 유용한 표적이 될 수 있을 뿐만 아니라, 이 부위에 대한 폴리펩타이드는 신데칸-2 단백질 단편에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 에피토프로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0099] 도 1은, 대장암에서 세포 외 도메인 절단이 신데칸-2 기능에 필수적임을 나타내는 도이다.
- 도 2는, 신데칸-2의 세포 외 도메인 절단이 대장암 세포 이동에 중요함을 나타내는 도이다.
- 도 3은, 대 당 사슬의 영향을 확인하기 위하여 재조합 신데칸-2 단백질 단편을 박테리아에서 발현시킨 다음, 이

를 정제하여 대장암 세포에 처리한 다음, 세포 이동성 및 콜로니 형성능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는, 대장암 활성 촉진능을 가진 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위를 동정한 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 신데칸-2 합성 펩타이드가 *in vivo*에서 피하 종양 성장을 촉진시킴을 나타내는 도이다. (a) 인간 신데칸 2의 합성 펩타이드 (hS2LQ, residues 79-94 or hS2EA, residue 19-40) 및 랫트 신데칸 2의 합성 펩타이드 (rS2LQ, residues 89-104)의 모식도를 상단에 나타내었다. HCT116 세포는 최종 농도 5nM로 합성 펩타이드를 첨가한 다음, 세포 이동을 RTCA 소프트웨어로 분석하여 그 결과를 중간에 나타내었다. 또한, 콜로니 형성 어세이 결과는 하단에 나타내었다. N-말단 인간 신데칸-2 합성 펩타이드 (hS2EA)는 대조군 펩타이드로 사용하였다. 데이터는 평균 $\pm$ s.d., n = 3로 나타내었다.; $**p < 0.01$. (b) 인간 신데칸-2 합성 펩타이드 또는 PBS와 배양한 HT29-luc 세포 (5×10^6 세포/생쥐)를 BALB/c 누드 생쥐의 오른쪽 옆구리에 주입하였고(n = 5/group), 주입한 위치의 *in vivo* 종양 발달을 확인한 대표적인 결과를 본 도면에 나타내었다. (c) 주입 후 7일부터 매주 IVIS로 종양 성장을 정량화하였다(photon/s). PBS, 평균 = $1.59E+06$ photon/s, 95% CI = $1.35E+06$ 내지 $1.83E+06$ photon/s; hS2LQ, 평균 = $2.97E+06$ photon/s, 95% CI = $2.50E+06$ 내지 $3.44E+06$ photon/s; 데이터는 평균 $\pm$ s.d.를 나타낸다. $p < 0.05$. (d) 종양 크기 (mm^3)를 3 내지 4일의 평균으로 나타내었고, 신데칸-2 펩티드 처리군의 21일째의 평균 종양 크기는 $42.75mm^3$ 였고, 95% CI는 $34.52 mm^3$ 내지 $51.00 mm^3$ 인 반면, PBS 처리 군은 평균 $29.21 mm^3$ 이고, 95% CI는 $24.94 mm^3$ 내지 $33.48 mm^3$ 였다. $**p < 0.01$. (e) 종양 크기 측정 결과 및 광자 이미지 결과의 관계를 나타낸 것이다($R^2 = 0.9032$).

도 6은, 신데칸-2 합성 펩티드가 *in vivo* 생쥐 모델에서 전이 및 1차 종양 성장을 증가시킴을 나타내는 도이다.

(a) BALB/c 생쥐(n = 5/그룹)에 신데칸-2 합성 펩티드로 반응시킨 B16F10 멜라노마 세포(1×10^5 세포/생쥐)를 꼬리 정맥으로 주입하였고, 2주 후 희생시켰다. 그 다음, 폐의 전이성 종양 결절을 계수하였고, 2번의 독립적 실험을 수행하였다. 여기서, 바-그래프는 전이성 폐 결절의 수를 나타내는 것이고, 컬럼은 폐 전이성 결절의 평균 $\pm$ s.d.를 나타낸다. $**p < 0.01$. (b) hS2LQ 펩타이드(최종 250 nM) 또는 비교 펩타이드(hS2EA)와 반응시킨 B16F10 멜라노마 세포를 BALB/c 생쥐(n = 7/group)에 꼬리 정맥으로 주입하였다. 두 번의 독립적 실험을 수행하였고, 각 폐의 앞 뒤쪽에 대한 대표적인 사진을 나타내었다. 컬럼은 폐 전이 결절의 평균 $\pm$ s.d.를 나타낸다. $*p < 0.05$. (c) 생쥐 유방암 4T1-luc 세포(1×10^5 세포/생쥐)를 신데칸-2 합성 펩타이드(최종 250 nM) 또는 PBS와 반응시킨 후, BALB/c 생쥐의 비장에 주입하였다. 비장 주입 후 7일째 후 획득한 비장의 4T1-luc 세포의 생물 발광 이미지 및 (왼쪽, 위쪽; PBS, 평균 = $3.17E+06$ photon/s, 95% CI = $2.10E+06$ 내지 $4.24E+06$ photon/s; 신데칸-2 펩타이드, 평균 = $7.32E+06$ photon/s, 95% CI = $2.57E+06$ 내지 $12.07E+06$ photon/s, $p < 0.05$) 간 전이성 4T1-luc 세포의 생물발광 이미지(오른쪽)를 나타내었다. 생쥐 사진에서 각 생쥐의 광자수는 컬러 스케일로 나타내었다. 또한, d-루시페린(150 mg/kg)의 복강 내 주입 후, 10분 내지 20분 사이에 IVIS 이미지 시스템으로 사진을 촬영하였고, 종양 신호를 광자수로 정량화하였다 (왼쪽, 아래).

도 7은, 혈청 내 증가된 신데칸-2 단편 수준과 대장암의 증가된 전이 활성 간의 관계를 나타낸 것이다.

(a) 정상 공여자(N), AC 환자의 신데칸-2 음성(AC-) 및 양성(AC+) 혈청 시료 $40\mu l$ 에 대하여 항-신데칸-2 항체(#197)를 사용하여 슬롯 블롯팅을 사용하였다. 폰슈 S 염색으로 단백질 로딩양을 결정하였다(위쪽). 각 혈청을 처리한 HCT116 세포를 트랜스웰 플레이트에 두어 이동성을 측정하였다(아래쪽). 데이터는 평균 $\pm$ s.d.로 나타내었다, n = 3; $*p < 0.05$.

(b) 신데칸-2 단편 음성(AC-) 및 양성(AC+) 환자의 혈청 시료를 단백질 A 세파로오스와 30분간 $25^\circ C$ 에서 반응시키고, 결합되지 않은 물질들은 IgG- 또는 항-신데칸-2 항체-컨쥬게이션된 단백질 G 세파로오스로 면역제거(immunodepletion)하였다. 그 다음, 상등액을 항-신데칸-2 항체를 사용한 슬롯 블롯팅에 적용하였다. 폰슈 S 염색을 사용하여 단백질 로딩양을 결정하였다(위쪽). 그 다음, 상등액을 HCT116 세포를 사용한 트랜스웰 이동 어세이 및 부착-비의존성 성장 어세이에 적용하였다(아래쪽). 데이터는 평균 $\pm$ s.d.로 나타내었다, n = 3; $*p < 0.05$.

(c) 대장암 세포를 도면에 표시된 혈청 시료로 처리한 다음, 젤라틴-코팅된 트랜스웰 플레이트에 적용하여 이동성을 확인하였다. 데이터는 평균 $\pm$ s.d.로 나타내었다, n = 3; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

도 8은, 신데칸-2 단편 및 펩타이드의 p38 MAP 키나아제를 통한 MMP-7 발현 촉진 결과를 나타낸 것이다.

(a) HT29 세포에 표시된 cDNA로 형질감염한 다음, 전체 RNA를 분리하고 SDC2 및 MMP-7의 발현 수준을 RT-PCR로 분석하였다(왼쪽). CM(Conditioned media)은 수집하고, 단백질을 TCA 침전으로 농축시키고 항-MMP-7 항체를 이용한 면역블롯팅으로 분석하였다(오른쪽).

(b) 무혈청 처리(starvation) 후, HT29 세포에 scrambled (Scr) 또는 인간 (hS2LQ) 펩타이드를 표시한 기간 동안 형질감염시켰다. 그 다음, 전체 RNA를 수득하고 MMP7 발현을 RT-PCR로 분석하였다.

(c) 무혈청 처리 후, HT29 세포에 Scr 펩타이드 또는 인간 hS2LQ 펩타이드를 24시간 동안 처리하였고, MMP7 발현을 RT-PCR로 분석하였다(왼쪽). CM을 수집하고, 단백질을 TCA 침전으로 농축시킨 다음, 항-MMP7 항체를 사용한 면역블롯팅으로 분석하였다(오른쪽).

(d) 신데칸-2를 지속적으로 발현하는 HT29 세포에 표시된 펩타이드 및 CM을 처리하고, 항-신데칸-2 항체를 사용하여 슬롯블롯팅을 수행하였다(왼쪽). 아무것도 처리하지 않은 세포(non) 또는 표시된 펩타이드를 처리한 세포를 대상으로, 신데칸-2의 세포 표면 발현을 유세포 분석기로 확인하였다(오른쪽).

(e) HCT116 세포는 표시된 펩타이드로 24시간 동안 처리하였고, CM에 대하여 항-신데칸-2항체를 사용하여 슬롯블롯팅을 수행하였다(왼쪽, 하단). 또한, TCA 농축된 단백질을 항-MMP7 항체를 이용하여 면역블롯팅을 수행하였다(왼쪽, 상단). 아무것도 처리하지 않거나(non) 또는 표시된 펩타이드를 처리한 세포에 대하여 신데칸-2 세포 표면 발현을 유세포 분석기로 확인하였다(오른쪽).

(f) 표시된 펩타이드를 처리한 HT29 세포를 용해한 후, MAPK 활성화 여부를 phospho-p38 (pp38), -ERK (pERK), 및 -JNK (pJNK) 항체를 사용하여 확인하였다.

(g) SB239063를 한 시간 전처리한 HT29 세포에 신데칸-2 합성 펩타이드를 처리하고, 15분 후 세포를 용해하고 전체 세포 용해물(TCL)을 수득하였다. 이를 표시된 항체로 면역블롯팅을 수행한 다음, p38의 인산화를 확인하였다. 또한, 펩타이드 처리 후 6시간째에 전체 RNA를 추출하고, MMP-7 mRNA 발현을 RT-PCR로 분석하였다(중앙). 그리고 CM에 대하여 항-MMP-7 항체를 사용한 면역블롯팅 또는 항-신데칸-2 항체를 사용한 슬롯블롯팅을 수행하였다(하단).

(h) SB239063을 한 시간 전-처리한 HT29 세포를 이용하여 트랜스웰에 적용하고 신데칸-2 펩타이드의 존재 또는 부재 하에서 이동성 정도를 확인하였다. 데이터는 평균 $\pm$ s.d.로 나타내었다, n = 3; **p < 0.01.

도 9는, 신데칸-2 단백질과 상동성이 높은 것으로 알려진 신데칸-4 단백질과의 BLAST(Basic Local Blast Alignment Search Tool) 결과를 나타낸 것으로, 인간 신데칸-2 단백질의 79-94번 아미노산 부위(상단 박스)의 경우, 신데칸-4 단백질과 상동성이 낮아 높은 특이성을 지님을 나타내는 도이다.

도 10은, 신데칸 단백질을 이용하여 제작한 신데칸-2 결합 항체가 인간 신데칸-2 단백질의 인지 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은, 본 발명에서 합성 펩타이드를 이용하여 제작한 신데칸-2 단일클론항체 및 다클론항체의 항원 결합 여부를 확인한 도이다.

도 12는, 대장암 세포주, 동물 모델 및 환자 혈액에서 신데칸-2 단백질 단편을 확인한 결과로서, A는 다양한 대장암 세포주의 배양액을 모은 다음, 신데칸-2 단백질 단편에 대한 항체(#197, M-140)를 처리하여 슬롯 블롯팅한 결과이며, B는 정상 및 Apc(Min/+) 대장암 생쥐 모델의 혈액을 SDC-2 M-140 항체를 이용한 슬롯 블롯팅한 결과이며, C는 정상 공여자 및 대장암 환자(Ade: Adenoma, CIS: carcinoma in situ, AC: advanced cancer)의 혈액을 슬롯 블롯팅한 결과를 나타낸다. C에서, 오른쪽 도는 혈장 IgG를 제거하여 확인한 결과를 나타낸다.

도 13은, 대장암 환자의 암화 과정에서의 혈중 신데칸-2 단백질 단편의 농도 증가 및 CEA 암화 마커와의 민감도를 비교한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 14는, 혈청 내 증가된 신데칸-2 단편 수준과 대장암의 증가된 전이 활성 간의 관계를 나타낸 것이다.

(a) 정상인 공여자 (N) 또는 발전적 대장암 환자 (AC)의 혈청을 대상으로 항-신데칸-2 항체 (#197)를 사용하여 슬롯 블롯팅을 수행하였다. 폰슈 S 염색을 수행하여 단백질 블롯에 대한 로딩 컨트롤을 결정하였다. 본 데이터는 혈청 신데칸-2 단편 음성(□) 또는 혈청 신데칸-2 단편 양성(■)으로 나타난 환자의 수를 나타낸 것이다.

(b) HNO₂로 전처리한 혈청 시료로 15% SDS-PAGE 수행한 다음, 항-신데칸-2 항체로 블롯팅한 결과를 나타낸 것이다.

(c) 대장암 환자(n = 12) 및 정상 대조군(n = 11)으로부터 수득한 혈청에 대하여 ELISA로 분석하여 신데칸-2 단편의 수준을 확인한 것이다. 중앙치는 수평 방향의 바로 나타내었다. AC와 N 간의 차이는 유의하였다(p < 0.001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 하기 실시예에 의해 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

실시예 1: 실험방법

(1) 실험재료

MMP-7에 대한 단일클론항체는 Abcam(Cambridge, 영국)사에서 구입하였고, p-p38, p-JNK 및 p38에 대한 다클론 항체는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)사에서 구입하였고, p-ERK 및 베타-액틴에 대한 단일클론항체는 산타크루즈(California, CA, USA)사에서 구입하였다. 프로-MMP-7 효소는 Calbiochem(CA, USA)사에서 구입하였고, 헤파리나제 III/콘드로티나아제 ABC 및 항-FLAG M2 항체는 시그마(St Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. DEAE-세파로스 패스트 플로우, 단백질 A- 및 G-세파로오스는 GE Healthcare Life Science (Piscataway, NJ, USA)사에서 구입하였고, SB239063은 Calbiochem사에서 구입하였다.

(2) 세포주 및 형질감염(transfection)

암세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였고, HT29 및 HCT116 세포주는 McCoy's 5A(웰진, 서울, 한국)에서 유지하였다. 한편, DLD1, HEK293T, Caco-2 및 B16F10 세포는 DMEM(Gibco BRL, 뉴욕, 미국)에서 유지하였고, LOVO 세포는 RPMI-1640(Gibco BRL)에서 유지하였다. 또한, SW480 세포는 DMEM-F12(웰진) Complete 배지에서 유지하였다.

4T1-luc 및 HT29-luc 발현 세포주(stable cell)은 퓨로마이신(2 µg/mL)이 첨가된, RPMI-1640 및 McCoy's 5A 배지에 유지하였다. 모든 배지에는 10% FBS(fetal bovine serum) 및 젠타마이신(50 µg/mL, 시그마)를 첨가하였고, 또한 37°C에서 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 일시적 형질감염은 리포펙타민 2000(인비트로젠) 시약 또는 Effectene 시약(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였고, 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였다.

(3) RNA 추출, cDNA 합성 및 RT-PCR 분석

배양한 세포로부터 추출한 전체 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였고, 하기와 같은 프라이머를 사용하였다.

랫 신데칸-2 (포워드) 5'- ATGCGGGTACGAGCCACGTC-3'(서열번호 13), (백워드) 5'- CGGGAGCAGCACTAGTGAGG-3'(서열번호 14),

쥐 신데칸-2 (포워드) 5'-TGGCTACTTCGTTTGAGCAC-3' (서열번호 15), (백워드) 5'-CACTACATTCTCAGCCTCCG-3'(서열번호 16);

인간 MMP-7 (포워드) 5'-GGTCACCTACAGGATCGTATCATAT-3'(서열번호 17), (백워드) 5'-CATCACTGCATTAGGATCAGAGGAA-3'(서열번호 18),

인간 β-액틴 (포워드) 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA-3'(서열번호 19), (백워드) 5'-

TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' (서열번호 20).

[0113] 94℃에서 5분간 초기 변성과정을 거친 후, 94℃에서 30초씩 30사이클로 변성과정을 거쳤다. 신데칸-2는 55℃, 인간 MMP-7은 58℃, 인간 β -액틴은 52℃에서 30초 동안 결합과정을 거친 후, 72℃에서 60초 간 신장 단계를 거쳤다. 이 후 1% 아가로즈 겔을 이용하여 분석하였다.

[0114] (4) 이동 및 콜로니 형성 어세이

[0115] 트랜스웰 이동 어세이를 진행하기 위해서 트랜스웰 플레이트 (코스타, 8-mm 포어 사이즈) 각 웰에 PBS에 녹인 젤라틴(10 μ g/ml)을 코팅하고 상온에서 1시간정도 말린 후 24 웰 플레이트에 옮기고, 트랜스웰 챔버의 아래에는 fibroblast growth factor-2 (100 ng/ml)가 들어있는 배지를, 트랜스웰 챔버의 위에는 세포를 넣어주고 5% CO₂, 37℃ 에서 HCT116은 16시간, HT29는 30시간, B16F10은 6시간을 배양했다. 트랜스웰의 아래 표면으로 이동한 세포는 0.6% 헤마톡실린, 0.5% 에오신으로 염색한 후 이동한 세포를 세었다. 실시간 세포 이동을 측정하기 위해서 xCELLigence system (로슈, 스위스)을 이용하였는데, CIM-plate 16 (8-mm 포어사이즈)의 아래 챔버에는 10% FBS가 포함된 배지를, 위 챔버에는 웰당 30 μ l의 FBS가 없는 배지를 채워넣고 37℃, 5% CO₂조건에서 두고 1시간 뒤에 RTCA DP Analyzer를 이용 백그라운드를 측정하였다. 이후 HCT116, HT29 세포는 2 X 10⁴ 개, B16F10 cells 은 1.5 X 10⁴ 개의 세포를 각 웰에 넣어준 후 25 웰에서 30분 안정화 시킨 후 RTCA DP Analyzer를 이용해 37℃, 5% CO₂ 조건에서 5분 간격으로 세포 이동을 측정하였다. 얻어진 데이터는 RTCA software를 이용하여 정리하였다.

[0116] 콜로니 형성 어세이를 진행하기 위해 6웰 플레이트의 각 웰에 아가로즈 혼합물(McCoy's 5A, 10% FBS, 0.6% 아가로즈) 3ml을 코팅하고 굳은 뒤에 HCT116, HT29 세포 1 X 10⁵ 개의 세포가 포함된 탑 아가로즈 혼합물(McCoy's 5A, 10% FBS, 0.3% 아가로즈)을 각 웰에 넣어주고, 이후 절단된 신데칸-2 조각을 농도별로 각 웰에 넣어 준 후 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양했다. 콜로니 형성은 광학현미경으로 매일 관찰하였고, 소프트 아가에서 형성된 콜로니는 14일 이 후 디지털 카메라로 촬영되었다.

[0117] (5) 수용성 신데칸-2의 부분 정제

[0118] HT29 세포를 무혈청 배지에 24시간 동안 배양한 다음, 세포 배양액을 수집하고 원심분리하였다. 완충액 1 (30 mM sodium acetate, pH 4.0, 4 M urea, 200 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 10 mM NEM, 25 mM EDTA, 및 2mM PMSF)로 평형화한 DEAE-세파로오스 컬럼에 수득한 세포 상등액을 적용하였다. 그 다음, 상기 컬럼을 완충액 1로 10 컬럼 부피로 세척하였고, 완충액 2 (30 mM sodium acetate, pH 4.0, 4 M urea, 200 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 10 mM NEM, 25 mM EDTA, 및 2 mM PMSF, pH 4.0)로 10 컬럼 부피로 또 다시 세척하였다. 최종적으로, 결합된 단백질을 완충액 3 (150 mM sodium acetate, pH 4.0, 4 M GuHCl, 및 0.1% Tween-20)으로 용출하였다.

[0119] SDS-PAGE에 적용하기 전에, 정제된 수용성 신데칸-2 세포 외 도메인을, 헤파리나아제 반응 완충액 (50 mM HEPES pH 6.5, 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, and 5 mM CaCl₂) 하에서 2mU 헤파리나아제 III 및 20mU 콘트로티나제 ABC 의 혼합물과 8시간 동안 37℃에서 반응시켰다.

[0120] (6) 펩타이드 합성

[0121] 인간 신데칸-2 세포의 도메인에 위치하는, 신데칸-2의 79-94번 잔기 (hS2LQ: LTSAAPKVVETTLNIQ; 서열번호 2) 및 19-40번 잔기 (hS2EA: ESRAELTSDKMYLDNSSIEEA; 서열번호 7)에 해당하는 펩타이드 및 랫트 신데칸-2 세포의 도메인에 위치하는 89-104번 잔기 (rS2LQ: LTSAAPEVETMTLKTQ; 서열번호 1)에 해당하는 펩타이드 및 hS2LQ에 대한 스크램블 펩타이드는 (Scr: IPNTSVKTLTAQLAET; 서열번호 8) Fmoc chemistry (Anygen Inc., 광주, 한국)을 사용

하여 고체-상 방법의 개선된 버전을 사용하여 합성하였다.

[0122] (7) 동물 및 인간 개체

[0123] BALB/c 생쥐를 사용한 모든 동물실험은 무병원균 조건 하에서 KIST(Korean Institute of Science and Technology)의 가이드라인에 따라 KIST의 동물 사육 시설에서 수행하였다.

[0124] AC(advanced carcinoma) 단계에 있는 인간 환자의 혈청 시료(n=23) 및는 정상인 시료(n=23)는 2009년에서 2011년까지 이화여자대학교 의과대학에서 환자의 사전 동의를 얻은 후 획득하였다.

[0125] (8) 생쥐 종양 전이 모델

[0126] *in vivo* 폐 전이 어세이를 수행하기 위하여, B16F10 멜라노마 세포(1×10^5 세포/생쥐)를 야생형 또는 신데칸-2 비-절단 돌연변이로 형질감염하였다.

[0127] 또한, 200 μ l PBS에서 인간 신데칸-2 펩타이드(최종 농도 50-250nM)로 37°C에서 30분간 배양한 B16F10 세포를 6주령 수컷 BALB/c 생쥐(그룹당 n=5-7, Orient Bio Co., Seoul, Korea)의 꼬리 정맥에 주입하였다. 주입 후 14일째에 폐를 잘라 전이 결절을 촬영하고 이를 계수하였다.

[0128] 간 전이 모델에 대하여, 생쥐 유방암 4T1-luc stable 세포(1×10^5 세포/생쥐)를 인간 신데칸-2 펩타이드(250 nM)와 함께 BALB/c 생쥐에 비장 내 투여하였다. 투여 후 7일째 되던 날, 최초 종양 성장 및 간 전이 발달이 IVIS 이미징 시스템 (IVIS SPECTRUM, Caliper Life Sciences)으로 관찰되었다.

[0129] (9) 생쥐 피하 종양 성장 모델

[0130] 피하 종양 모델의 수립을 위하여, 6주령의 수컷 BALB/c 누드 생쥐에 150 mg/kg의 D-luciferin을 비장 내 주입하고, 1% 이소플루레인(isoflurane)으로 마취시켰다. 마취된 동물에 100 μ l PBS에서 신데칸-2 펩타이드와 배양한 HT29-luc stable 세포 (5×10^6 세포)를 등 측면으로 피하 주입하였다.

[0131] D-루시페린을 주입하고 10 내지 20분 후, 생쥐를 IVIS 이미지 시스템에 놓고 등쪽을 촬영하였다. 7일, 14일 및 21일에 각각 해당 이미지를 캡처하였다. 종양성장은 IVIS로 주마다 모니터링하였고, 외부 캘리퍼 측정(L X W X D)을 24일째에 수행하였다.

[0132] (10) 신데칸-2 단백질의 암 활성 부위(인간: 79-94 a.a., 랫트: 89-104 a.a)에 결합하는 다클론항체의 제작

[0133] 상기 실시예를 통하여 본 발명에서 새롭게 규명한 신데칸-2 단백질의 암 활성 부위를 특이적으로 인지하고, 이의 활성을 저해시킬 수 있는 항체를 개발하기 위하여 인간 신데칸-2 단백질의 79 내지 94번 아미노산 부위 및 랫트 신데칸-2 단백질의 89 내지 104번 아미노산 부위를 타겟으로 하는 다클론항체를 제작하였다.

[0134] 구체적으로, 신데칸-2 단백질의 활성 부위에 대한 펩타이드를 토끼 피하 내에 총 4회 주사하여 다클론항체를 제조하였다. 먼저, 정제된 신데칸-2 단백질의 활성 부위에 대한 펩타이드를 KLH(keyhole limpet hemocyanin)에 컨쥬게이션한 후 어쥬번트(complete freund adjuvant)와 1:1로 섞어 토끼의 피하에 주사하였다. 4주 후에 펩타이드에 어쥬번트(Incomplete freund adjuvant)를 섞어 토끼 피하에 주사하고 1주 후에 귀의 정맥으로부터 혈청을

뽑아서 ELISA 방법으로 항체 역가(titer)를 확인한 다음, 2주 간격으로 동일한 방법으로 주사와 채혈을 반복하였다. 4회 주사 1주일 후에 토끼를 희생시키고 전혈한 다음, 정제하여 신데칸-2 단백질 단편의 암 활성화 부위에 결합하는 다클론항체를 확인하였다.

[0135] (11) 인간 신데칸-2 결합 단일클론항체의 제작

[0136] 인간 신데칸-2의 세포 외 기질에 결합하는 단일클론항체를 제작하였다. 구체적으로, 신데칸-2의 세포 외 도메인을 PCR로 증폭하여 인간 면역글로불린 중쇄 보존영역(Fc)과 융합하여 벡터를 제작하였고, 이를 HEK293 세포에 형질감염하였다. 무혈청 DMEM 배지에서 배양한 상기 세포에서 세포 및 배지를 수집한 다음, 세포를 제거하고 0.4 μ m 필터로 필터링한 다음, 정제하여 신데칸-2-Fc 단백질을 수득하였다. 수득된 단백질을 BALB/c 생쥐에 반복적으로 면역화한 다음, 비장세포를 수득하고, 수득한 비장세포를 생쥐 골수종 Sp2/0 세포와 융합한 다음, 스크리닝 및 단일 세포 클로닝을 수행하였다. 이와 같은 과정에서 수득한 하이브리도마 세포에서 인간 신데칸-2의 세포 외 기질의 아미노기 (서열 1-79)에 결합하는 단일클론항체를 각각 수득하였고, 이를 각각 #197 및 #302로 명명하였다.

[0137] 또한 인간 신데칸-2의 19번째 내지 40번째 아미노산 서열(서열번호 9)을 제작하고 합성된 펩타이드를 BALB/c 생쥐에 반복적으로 면역화한 다음, 비장세포를 수득하고, 수득한 비장세포를 생쥐 골수종 Sp2/0 세포와 융합한 다음, 스크리닝 및 단일 세포 클로닝을 수행하였다. 그 결과 인간 신데칸-2의 19번째 내지 40번째 아미노산 서열에 결합하는 단일클론항체를 수득하였고, 이를 각각 #1G4로 명명하였다.

[0138] (12) 신데칸-2 단편에 대한 샌드위치 ELISA 방법

[0139] 코스타 ® 96-웰 EIA/RIA 스트립웰™ 플레이트에, 캡처 항체로 탄산 완충액(pH 7.4)에 포함된 항-신데칸-2 다클론항체 (2.5 μ g/ml)로 코팅하였고, 4℃에서 밤새 반응시켰다. 그 다음, 웰을 5% 무지방 밀크(in PBS)로 2시간 동안 상온에서 블로킹하였고, 대장암 환자 및 정상 개체로부터 수득한 인간 혈청을 항체 코팅된 웰에 1.5 시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 그 다음, 웰을 세척하고, 실시예 1-(11)의 항-신데칸-2 항체(#197, #302 또는 #1G4)를 0.25 μ g/ml(in PBS)의 최종 농도로 희석시켜 이를 각 웰에 첨가하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 세척 후, 염소-항-토끼 IgG-HRP (1:10,000 희석비율, Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA) (in blocking buffer)를 웰에 첨가하였고, 1.5시간 동안 반응시켰다. 최종 세척 후, TMB 기질 용액(Amresco, OH, USA)을 각 웰에 첨가하고 25분간 반응시켰다. 반응은 0.5M H₂SO₄를 첨가하여 중지시켰고, 광학 밀도는 450nm에서 마이크로플레이트 분광기를 사용하여 측정하였다.

[0140] 또한, 상기 다클론 항체 대신 단일클론 항체의 조합을 사용하여 상기와 같은 방법으로 샌드위치 ELISA를 실시하였다.

[0141] 실시예 2: 세포 배양액으로부터 정제한 신데칸-2 단백질 단편 및 재조합 신데칸-2 펩타이드에 의한 암 활성화 조절 확인

[0142] (1) 신데칸-2의 세포 외 도메인의 절단과 암 간의 연관성 확인

[0143] 랫트 신데칸-2 단백질의 148번 및 149번 잔기(Asn148-Leu149)가 Asn148-Ile149로 치환되어 절단되지 않는 돌연변이 단백질(NC)를 제조하였다. MMP-7의 0.05 유닛은 재조합 야생형 신데칸-2의 50% 가량을 절단하는 반면, 비-절단 신데칸-2 돌연변이 단백질의 경우, 절단되는 비율이 야생형에 비하여 5배 가량 감소하는 결과를 나타내었다(도 1a).

- [0144] WT-SDC2를 발현하는 벡터로 형질감염된 HT29 및 HCT116 세포에서는 절단된 신데칸-2 단백질 단편의 수준이 공벡터를 감염시킨 세포에 비하여 증가하였다. 또한, WT-SDC2를 발현하는 벡터로 형질감염한 HT29 및 HCT116 세포의 경우, 공벡터를 감염한 세포에 비하여 세포 이동 정도가 현저하게 증가하였고, 반면, NC-SDCS를 발현하는 벡터로 형질감염시킨 세포의 경우 이러한 이동 비율이 현저하게 감소하는 결과를 보였다(도 1의 b 중간). 콜로니 형성 어세이를 통한 신데칸-2 매개 정착-비의존적 성장을 확인한 결과에서도 WT-SDC2에 의한 콜로니 형성 증가 결과가 NC-SDC2 군에서는 현저하게 감소한 결과를 나타내었다(도 1의 c 아래).
- [0145] 신데칸-2 단백질은 B16F10 생쥐 멜라노마 세포의 전이능을 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에, B16F10 세포의 CM(conditioned media)에서 신데칸-2 단편을 검출하였다.
- [0146] 이러한 결과를 바탕으로 신데칸-2를 과발현하는 B16F10 세포의 세포 이동성을 측정하였고, 그 결과 신데칸-2의 과발현은 B16F10 세포의 이동성을 촉진시켰으나, 비-절단 돌연변이의 경우에는 이동성을 촉진시키지 않는 결과를 나타내었다(도 1의 c).
- [0147] *in vivo*에서 신데칸-2 세포 외 도메인의 절단을 분석하기 위하여, B16F10 세포의 생쥐 신데칸-2 (mSdc2)를 녹다운시켰고, 랫트 신데칸-2 (rSdc2)를 코딩하는 벡터로 다시 감염시켰다. 이러한 B16F10 세포를 6주령의 BALB/c 생쥐의 꼬리 정맥에 주입하여 폐 전이 실험 모델을 수립하였다.
- [0148] NC-SDC2를 형질감염한 B16F10 세포를 주입한 생쥐로부터 수득한 폐 샘플을 분석하여, 폐 전이 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 1 d에 나타낸 바와 같이, WT-SDC2로 형질감염된 세포에 비하여 NC-SDC2가 형질감염된 세포에서의 폐 전이 정도가 현저히 감소한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 신데칸-2에 의해 유도되는 암 촉진 활성이 세포 외 도메인의 절단에 기인하는 것임을 나타내는 것이다.
- [0149] **(2) 신데칸-2 세포 외 단편의 암 촉진 활성 확인**
- [0150] 신데칸-2의 세포 외 단편이 암 촉진 활성을 강화시키는지 확인하기 위하여, 신데칸-2 단편 자체로 대장암의 활성을 촉진시킬 수 있는지 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0151] 구체적으로, Flag 태그된 WT-SDC2를 발현하는 벡터 또는 Flag 태그된 NC-SDC2를 발현하는 벡터로 형질감염한 HT29 세포에서 신데칸-2 세포 외 단편의 정도를 확인한 결과, NC-SDC2 군에서는 단편의 수준이 대조군과 비슷하였으나, WT-SDC2 군에서는 단편이 대조군에 비하여 현저히 증가한 결과를 나타내었다(도 2 a의 상단). 또한, 대장암 세포주인 HT29 및 HCT116 세포에 WT-SDC2 발현 HT29세포의 CM을 처리한 결과, 세포의 이동성이 현저하게 증가한 결과를 나타내었다(도 2 a의 하단).
- [0152] 또한, WT-SDC2 발현 HT29 세포의 CM은 HCT116 세포의 이동성을 증가시킨 반면, CM에서 신데칸-2 단편을 제거한 경우에는 세포 이동성이 증가하지 않은 결과를 나타내었다(도 2 b).
- [0153] 또한, HT29 세포의 CM에서 신데칸-2 단편을 정제하여(도 2 c의 왼쪽), 정제된 신데칸-2 단편을 HT29 및 HCT116 세포에 처리하여 세포 이동성을 증가시킬 수 있는지를 확인하였고, 그 결과 세포 이동성을 두 세포 모두에서 증가시키는 결과를 나타내었다(도 2 c의 오른쪽).
- [0154] 상기와 같은 세포 이동성을 실시간으로 관찰하였고, 그 결과를 도 4d에 나타내었다. 그 결과, HT29 세포의 CM으로부터 정제한 신데칸-2 단편은 HT29 및 HCT116 세포의 이동성을 모두 향상시키는 결과를 나타내어, 신데칸-2

단편이 암세포의 이동성을 촉진시킴을 나타내었다.

[0155] 신데칸-2 단편의 효과를 보다 더 명확히 규명하기 위하여, 당화되지 않은 재조합 신데칸-2 단편의 암 촉진 활성을 확인하였다.

[0156] 구체적으로, 신데칸-2 단백질의 활성화에 당사슬이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 상기 His-태그된 신데칸-2 세포 외 도메인을 클로닝한 다음, 이를 박테리아에 형질전환시키고, 신데칸-2 단백질 단편을 발현 및 정제하였다. Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피로 분리정제한 결과를 도 3 A에 나타내었다.

[0157] 그 다음, 이를 대장암 세포에 처리한 다음, 이동성 및 콜로니 형성능을 확인하였다. 그 결과, 박테리아에서 발현되어 당사슬이 없는 신데칸-2 단백질 역시 대장암 세포의 이동성 및 콜로니 형성능을 촉진시키는 결과를 나타내었다(도 3 B). 이와 같은 결과는 신데칸-2 단백질 단편의 당사슬 유무에 관계없이 신데칸-2 단백질 단편이 대장암의 진행에 관여함을 시사하는 결과이다.

[0158] 상기와 같은 결과들은, 신데칸-2 단백질 단편이 대장암의 발생 및 진행에 있어 주요하게 관여함을 시사하는 결과이다.

[0159] 실시예 3: 신데칸-2 단백질 단편의 대장암 활성 촉진 부위 동정

[0160] 상기와 같이 신데칸-2 단백질 단편이 대장암 활성을 촉진시킬 수 있음을 확인한 다음, 대장암 활성을 촉진시키는 신데칸-2 단백질 단편의 주요 부위를 규명하고자 하였으며, 이에 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0161] 구체적으로, 혈중 신데칸-2 단백질 단편에 대하여, 세포 밖으로 분비시키기 위한 신호 전달 펩타이드(S.P, Signal peptide), 랫트 신데칸-2 단백질 단편 및 IgG1 Fc가 서로 연결된 형태(ss2E-Fc); 신호 전달 펩타이드, 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 N 말단 부위인, 1번 내지 88번 아미노산 부위 및 IgG1 Fc가 서로 연결된 형태(N2E-Fc); 및 신호 전달 펩타이드, 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 C-말단 부위인 89번 내지 148번 아미노산 부위 및 IgG1 Fc가 서로 연결된 형태(C2E-Fc)에 대한 작제물(Construct)을 제작하였다.

[0162] 보다 구체적인 작제물의 제작 과정은 하기와 같았다.

[0163] 랫트 신데칸-2를 주형으로 하여 1 내지 88번 아미노산 부위; 또는 89 내지 104번 아미노산 부위까지만을 읽히도록 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하였다. 이때, 프라이머에는 *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소 사이트를 함께 넣었다. PCR 산물과 세포에 발현시키기 위한 플라스미드 벡터 pcDNA 3.1에 각각의 제한효소를 넣어 37℃에서 2시간 반응시키고, 이들을 접합시켰다. 그 다음, 전기영동을 통해 클로닝이 제대로 수행되었는지를 확인하였고, 이를 HEK 293T 세포에 형질감염(transfection)시켜 세포 배양액에 신데칸-2 단편이 분비되어 나오도록 하였다.

[0164] 그 다음, 이를 대장암 세포에 처리한 다음 대장암 세포 이동성 및 콜로니 형성능을 확인하였고, 그 결과를 도 4 A에 나타내었다. 그 결과, 도 4 A에 나타난 바와 같이, 신데칸-2 단백질 단편 중 C 말단 부위가 세포 이동성 및 콜로니 형성능 모두에서 N 말단 부위에 비하여 큰 활성을 나타냄을 확인하였다. 특히, 세포 이동성의 경우, N 말단 부위는 대조군과 유사한 정도의 세포 이동성을 나타낸 반면, C 말단 부위는 전체 길이의 랫트 신데칸-2 단백질 단편과 유사한 정도의 세포 이동성을 나타내어, 신데칸-2 단백질 단편 중 C 말단 부위가 신데칸-2 단백질 단편의 활성화에 중요함을 시사하였다.

[0165] 상기 결과에 비추어, 신데칸-2 단백질 단편의 C 말단 부위가 그 활성화에 중요한 부위임을 확인하고, C 말단 부위를 더 나누어 대장암 활성 여부를 측정하였다.

- [0166] 구체적으로, 세포 밖으로 분비되기 위한 신호 전달 펩타이드, 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 89번 내지 148번 아미노산 부위 및 IgG1 Fc 단편이 서로 연결된 형태(C2E-Fc); 신호 전달 펩타이드, 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 89번 내지 104번 아미노산 부위 및 IgG1 Fc 단편이 서로 연결된 형태(C2EQ¹⁰⁴-Fc); 및 신호 전달 펩타이드, 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 89번 내지 123번 아미노산 부위 및 IgG1 Fc 단편이 서로 연결된 형태(C2EE¹²³-Fc)를 제작하여, 이를 대장암 세포에 처리하고 세포 이동성 및 콜로니 형성능을 확인하였다.
- [0167] 그 결과, 신데칸-2 단백질 단편의 C-말단 부위 중에서도 신데칸-2 단백질 단편의 89번 내지 104번 아미노산 부위(서열번호 1)가 활성 부위로 기능함을 나타내었다(도 4 B). 이를 헬라노마 세포주 B16F10으로 다시 한번 확인하였고, 그 결과 도 4 B와 대응되는 결과를 나타내어, 신데칸-2 단백질 단편 중 C-말단의 89번 내지 104번 아미노산 부위가 신데칸-2 단백질 단편의 암 활성화에 중요한 역할을 함을 규명하였다.
- [0168] **실시예 4: 신데칸-2 단백질 단편의 암 활성 부위에 대한 펩타이드의 암 활성 촉진 확인**
- [0169] 실시예 3에서 확인한, 신데칸-2 단백질 단편의 활성 부위를 펩타이드로 제작한 다음, 이를 세포주 및 동물 모델에 처리하여 실제 암 활성을 촉진시킬 수 있는지 여부를 추가로 확인하였다.
- [0170] 구체적으로, 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 활성 부위인 랫트 신데칸-2 단백질 89번 내지 104번 아미노산 부위(서열번호 1); 및 이에 대응되는 인간 신데칸-2 단백질 단편의 79번 내지 94번 아미노산 부위(서열번호 2)에 대하여 각각 펩타이드를 제작하였고, 이를 각각 rS2LQ, hS2LQ로 명명하였다.
- [0171] 상기 두 합성 펩타이드를 대장암 세포에 처리하여 세포 이동성 및 부착-비의존적 성장을 촉진하는지 여부를 확인하였고, 그 결과를 도 5A에 나타내었다.
- [0172] 그 결과, 상기 두 펩타이드는 세포 이동성 및 부착 의존성 성장을 모두 증가하는 결과를 나타내었고, 대조군 펩타이드인 hS2EA(세포 외 도메인의 N-말단에서 유래)는 세포 이동성 및 부착 의존성을 증가시키지 못하는 결과를 나타내었다.
- [0173] 상기 신데칸-2 펩타이드의 대장암 세포 1차 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 루시페라아제-발현 인간 대장암 세포를 6주령 수컷 BALB/c 누드 생쥐에 주입하고, 종양의 발달 여부를 확인하였고, 세포 주입 후 7일에서 21일까지 측정하였다.
- [0174] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 신데칸-2 펩타이드를 처리한 생쥐의 경우, PBS 처리 대조군 생쥐와 달리 종양 위치에서 광자 방출이 증가되는 결과를 나타내었다(b 및 c). 또한, 신데칸-2 펩타이드를 처리한 생쥐의 경우에는 PBS 처리 생쥐에 비하여 종양 성장 속도가 현저히 빠른 결과를 나타내었고(d), 종양 무게와 양자수는 정적 상관관계를 나타내었다(e, $R^2 = 0.9032$).
- [0175] 상기 결과에 더하여, *in vivo* 전이 모델을 이용하여 상기 신데칸-2 펩타이드의 효과를 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0176] 먼저, 신데칸-2 펩타이드가 폐 전이에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여 인간 신데칸-2의 합성 펩타이드를 서로 다른 양으로 B16F10 세포에 전-처리하고, 상기 세포를 생쥐 꼬리 정맥에 주입하여 폐 전이가 나타나는지 확인하였다.
- [0177] 그 결과, 본 발명의 합성 펩타이드는, 대조 펩타이드인 hS2EA와 달리, 매우 효과적으로 폐 전이를 유도하였으며, 또한 농도 의존적으로 폐 전이를 야기하는 결과를 나타내었다(a 및 b).
- [0178] 또한, 루시페라아제를 발현하는 4T1 stable 세포를 생쥐의 비장에 주입하여 간 전이 모델을 수립하고, 종양 성장 및 간 전이를 확인한 결과, 주입 후 7일 제에 1차 종양 수립 및 간 전이가 확인되었고, 대조군에 비하여 종양 수립 및 간 전이 정도가 현저한 결과를 보였다(c).
- [0179] 상기와 같은 *in vivo* 결과는 신데칸-2 단편은 직접적으로 일차 종양 성장 및 전이에 주요한 역할을 수행하는 것

이며, 특히 신데칸-2의 79번 내지 94번 아미노산 부위(인간 기준; 랫트의 경우, 89 내지 104번)가 신데칸-2 단편의 합성에 중요함을 나타내는 결과이다.

[0180] 또한, 대장암 환자의 혈청에 존재하는 신데칸-2 단편이 대장암 활성화와 연관성을 나타낼 수 있는지를 확인하였다.

[0181] 구체적으로, 항-신데칸-2 항체를 이용한 슬롯 블롯팅 결과에서, 혈청 시료 내에 신데칸-2 단편이 존재함을 확인하였으며, 또한 상기 혈청이 암과 관련된 활성을 나타내는지 확인하였다.

[0182] 그 결과, CM으로부터 수득한 신데칸-2 단편을 이용한 결과와 동일하게, 신데칸-2 단편을 포함하는 환자의 혈청 시료(AC(+))는, 낮은 수준으로 신데칸-2 단편을 포함하는 대조군 시료(AC(-))와 달리, HCT116 대장암 세포의 이동을 현저하게 증가시키는 결과를 나타내었다(도 7 a). 또한, AC 환자의 신데칸-2 단편을 포함하는 혈청은 실험한 대부분의 대장암 세포의 이주를 촉진하는 결과를 보였다(도 7 b). 반면, 상기 혈청으로부터 신데칸-2 단편을 제거하였을 경우에는 혈청을 처리하여도 대장암 세포의 이동 및 증식을 증가시키지 않는 결과를 나타내어(도 7 c), 신데칸-2 단편을 포함하는 혈청이 대장암 세포의 암 진행을 촉진시킴을 나타내었다.

[0183] 실시예 5: 신데칸-2 단편 및 펩타이드의 p38 MAP 키나아제를 통한 MMP-7 발현 촉진

[0184] 신데칸-2 단편 및 본 발명의 신데칸-2 펩타이드(서열번호 1 또는 2)가 MMP-7의 발현을 촉진시킬 수 있는지 확인하였다.

[0185] 그 결과, HT29 세포에서 WT-SDC2의 과발현은 MMP-7의 발현 수준을 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 현저히 증가시킨 반면, 비-절단 돌연변이형인 NC-SDC2의 경우에는 MMP-7을 증가시키지 않는 결과를 나타내어, MMP-7 발현 수준의 증가는 SDC2 단편에 기인한 것임을 나타내었다(도 8 a).

[0186] 더욱이, 본 발명의 펩타이드인 hS2LQ를 처리하여도 HT29 세포에서 3시간 만에 MMP-7의 발현이 현저하게 증가하는 결과를 나타내었고(도 8 b), 처리 24시간 후에는 mRNA 및 단백질 발현을 현저하게 증가시키는 결과를 보였다(도 8 c).

[0187] 상기 결과와 동일하게, HT29 세포에 상기 펩타이드를 처리한 경우 신데칸-2의 세포 표면 발현이 감소하였고, CM에서 신데칸-2 단편의 발현 수준이 증가하는 결과를 나타내었고(도 8 d), HCT116 세포에서도 상기 펩타이드의 처리에 의하여 신데칸-2의 세포 표면 발현이 감소하고 CM에서 신데칸-2 단편의 수준이 증가하는 결과를 나타내었다(도 8 e).

[0188] 한편, MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로는 MMP-7 발현의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에, 신데칸-2 단편과 상기 펩타이드가 MAPK 신호전달 경로에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0189] 그 결과, 대조군 세포와 달리, 합성 펩타이드 처리는 p38 MAPK의 인산화를 현저하게 증가시키는 결과를 나타내어(도 8 f), 신데칸-2 단편-매개 MMP-7 발현은 p38 MAPK 활성화 증가와 밀접하게 관련되어 있음을 나타내었다. 또한, HT29 세포에 SB239063 (p38 MAPK 특이적 억제제)를 전처리한 결과, 본 발명의 펩타이드 hS2LQ에 의한 MMP-7의 발현 증가가 감소하며 이때 p38 MAPK 인산화 감소 역시 나타나며(도 8 g), 이동성 역시 감소하는 결과를 나타내었다(도 8 h). 이러한 결과는 모두 신데칸-2 단편, 특히 79 내지 94번 부위가 MAPK 신호전달 경로를 조절하여 대장암의 암 촉진 활성을 조절함을 나타내는 결과이다.

[0190] 실시예 6: 서열번호 1 또는 2에 해당하는 신데칸-2 세포 외 부위를 이용한 대장암 진단

[0191] (1) 신데칸-2 단백질 단편의 당 사슬 위치 확인

[0192] 신데칸-2 단백질 단편 중에서 대장암 진단 민감도 및 특이도가 높은 부분을 규명하기 위하여, 신데칸-2 단백질 단편의 당 사슬 위치를 확인하였다. 당 단백질 중 당이 부착되어 있는 부위에 결합하는 항체의 경우, 당 사슬에 의하여 접근이 제한되기 때문에 진단 민감도 및 특이도가 떨어질 수 있기 때문에, 신데칸-2 단백질 단편 중 당 사슬이 부착되어 있지 않은 부위를 특이적으로 규명하고자 하였다.

[0193] 그 결과, 인간 신데칸-2 단백질 단편 중 79번 내지 94번 아미노산 부위를 포함하는 부위의 경우, N-글리코실화 및 GAG 부착 부위를 포함하지 않아 당화가 되지 않음을 확인하였다.

[0194] (2) 인간 신데칸-2 및 신데칸-4 단백질의 상동성 확인

[0195] 신데칸-2 결합 항체를 이용하여 신데칸-2 단백질 단편의 수준을 측정함으로써 대장암을 진단하기 위해서는, 다른 단백질과의 상동성이 높지 않은 부위를 특이적으로 검출하는 것이 노이즈가 적어 진단 특이성이 높아 유리하므로, 신데칸-2 단백질과 높은 상동성을 가진 것으로 알려진 단백질인 신데칸-4 단백질과의 상동성을 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)로 비교하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0196] 그 결과, 인간 신데칸-2 단백질의 79-94번 아미노산 부위의 경우 총 16개의 아미노산 중 단 2개의 아미노산만이 동일한 결과를 나타내었다(도 9). 실시예 6-1의 결과와 서로 종합하면, 상기 인간 신데칸-2 단백질의 79-94번 부위는 당화가 되어 있지 않을 뿐만 아니라, 기존에 상동성이 높다고 보고된 신데칸-4 단백질과도 상동성이 매우 낮은 부위이므로, 이 부위를 특이적으로 인지하는 제제, 구체적으로는 항체를 사용하여 신데칸-2 단백질 단편의 수준을 측정하는 경우, 대장암을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0197] (3) 신데칸-2 결합 항체의 특이성 확인

[0198] 실시예 1-(11)에서 제작한 두 가지 단일클론항체의 신데칸-2 검출 여부를 확인하였다. 이때, 항체로는 단일클론 항체인 #197 항체를 사용하였으나 #302 항체도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

[0199] GST(Glutathione S-Transferase), GST-인간 신데칸-2, GST-랫트 신데칸-2 재조합 단백질 각각을 정제한 뒤, 동일한 양의 각각의 단백질을 로딩하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 그 결과, 항-신데칸-2 단일클론항체 모두 인간 신데칸-2 단백질을 항원 특이적으로 인지하는 것을 확인하였다(도 10 B). 또한, FACS 분석을 이용하여 대장암 세포주인 HCT-116에서 신데칸-2 단일클론항체인 #197 및 #302가 세포 표면에 발현한 인간 신데칸-2를 인지하는 것을 확인하였고(도 10 C). 또 다른 대장암 세포주인 HT29에서 신데칸-2를 과발현시킨 세포에서 단일클론 항체가 세포 표면에 발현된 신데칸-2를 인지하는 것을 확인하였다(도 10 D).

[0200] 실시예 1-(10)에서 펩타이드를 이용하여 제작한 다클론항체 및 1-(11)에서 제작한 단일클론항체(#1G4)의 신데칸-2 검출 여부를 다시 확인하였다.

[0201] 상기 CBB R-250 염색 결과를 바탕으로 동일한 양의 각각의 단백질을 로딩하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 이때, 항체로는 인간 신데칸-2 단백질 단편의 19번 내지 40번 아미노산 부위 또는 랫트 신데칸-2 단백질 단편의 29번 내지 50번 아미노산 부위를 특이적으로 인지하는 단일클론항체인 #1G4 항체; 및 본 발명의 신데칸-2 단백질 단편의 암 활성 부위(서열번호 1 또는 2)를 인지하는 실시예 1의 다클론항체를 사용하였다(도 10 E).

[0202] 항-GST 항체, 항-신데칸-2 #1G4 단일클론항체 또는 다클론 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 항-신데칸-2 #1G4 항체 단일클론항체 및 다클론 항체 모두 인간 신데칸-2 단백질 단편을 인지하는 결과를 나타내었으며, 본 발명의 신데칸-2 단백질 단편의 암 활성 부위를 인지하는 실시예 1의 다클론항체의 경우 그 특이성이

더 높은 결과를 나타내었다.

[0203] (4) 실시예 1-(10) 및 1-(11)의 다클론항체 및 단일클론항체의 신데칸-2 검출 능력 확인

[0204] 실시예 1-(10)에서 제작한 다클론항체 및 1-(11)에서 제작한 두 가지 단일클론항체의 신데칸-2 검출 여부를 다시 확인하였다.

[0205] 구체적으로, 인간 및 랫트 신데칸-2의 재조합 단백질을 SDS-PAGE 겔에 내려 전체 단백질양을 코마지 염색으로 확인하였고(도 11 B의 왼쪽), 이후 동일한 단백질을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 단일클론항체인 #1G4 단일클론 항체(도 11 B의 가운데)와 다클론항체(도 11 B의 오른쪽)가 항원 특이적으로 서로 다른 부위의 인간 신데칸-2를 인지하는 것을 확인하였다.

[0206] 또한, FACS 분석을 이용하여 대장암 세포주인 HCT-116에서 신데칸-2 다클론항체가 세포 표면에 발현한 인간 신데칸-2를 인지하는 것을 확인하였고(도 11 C의 왼쪽). 같은 HCT-116 세포주에서 다클론 항체 또한 세포 표면의 인간 신데칸-2를 인지하는 것을 확인하였다(도 11 C의 가운데). 또 다른 대장암 세포주인 HT29에서 신데칸-2를 과발현시킨 세포에서 다클론 항체가 세포 표면에 발현된 신데칸-2를 인지하는 것을 확인하였다(도 11 C의 오른쪽).

[0207] 상기와 같은 결과들은, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 정의되는 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위가 대장암 진단에 있어, 유용하게 사용될 수 있으며, 단일클론항체 및 다클론항체가 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 정의되는 신데칸-2 단백질 단편의 특정 부위를 인지하는 진단에 유용한 항체임을 시사하는 결과이다.

[0208] (5) 대장암 발병 과정에서 신데칸-2 단백질 단편의 존재 확인

[0209] 대장암 발병 과정에서 신데칸-2 단백질 단편이 관여하는지를 확인하기 위하여, 대장암 세포주, 대장암 동물 모델 및 대장암 환자 샘플을 사용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0210] 우선, HT-29, Caco-2, LoVo, HCT116 대장암 세포주를 배양한 다음 이의 배양액을 모은 다음, SDC-항체(#197, M-140)를 사용하여 슬롯 블롯팅을 수행하였다.

[0211] 그 결과, CM(Conditioned media)에서 신데칸-2 단백질 단편 조각이 세포 밖으로 유출되었음을 나타내었다(도 12 A). 이를 대장암 동물 모델에서 알아보기 위하여, 대조군으로서 정상 생쥐 및 실험군으로서 Apc(Min/+) 대장암 생쥐 모델을 각각 사용하여, 이의 혈액을 채취한 다음, SDC-2 M-140 항체를 처리하여 슬롯 블롯팅을 수행하였다. 그 결과, 상기 도 12 A의 결과와 유사하게 대조군과 달리 대장암 동물 모델의 혈액에서는 신데칸-2 단백질 단편이 유출된 결과를 나타내었다(도 12 B).

[0212] 또한, 대장암 환자에서 신데칸-2 단백질 단편이 유출된 결과를 하기와 같이 확인하였다.

[0213] 구체적으로, 대조군으로서 정상 공여자 혈액 샘플을 사용하고, 실험군으로서 대장암 환자(Ade: Adenoma, CIS: carcinoma in situ, AC: advanced cancer) 혈액 샘플을 사용하여, 이에 신데칸-2 단백질 단편에 대한 항체(#197)를 처리하여 슬롯 블롯팅을 수행하였고, 그 결과, 정상 공여자 혈액과 달리 대장암 환자의 혈액에서는 신데칸-2 단백질 단편이 유출된 결과를 나타내었다(도 12 C, 왼쪽). 특히, 혈장에서 IgG를 제거하면 더욱 선명한 신데칸-2 단백질 단편을 선택적으로 확인할 수 있었다(도 12 C, 오른쪽)

[0214] 상기와 같은 결과는, 신데칸-2 단백질 단편이 대장암에 대한 표지자로 사용될 수 있음을 나타내었다.

[0215] **(6) 대장암 환자의 암화 과정에서 혈중 신데칸-2 농도 증가 및 CEA 암화 마커와의 민감도 비교**

[0216] 인간 신데칸-2의 19 내지 40번 부위에 결합하는 항체와 79 내지 94번 부위에 결합하는 항체를 이용한 샌드위치 ELISA의 진단 효과를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0217] 구체적으로, 대장암 환자 혈장에서 대장암 진행 단계별로 신데칸-2 단백질 단편의 존재 여부를 확인하였고, 특히 실시예 1에서 제작한 다클론항체와 단일클론 항체 #197를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 실험을 통하여 기존 종양 표지자로 알려진 CEA(carcinoembryonic antigen)과 그 농도를 서로 비교하여 민감도를 확인하였고, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0218] 그 결과, 대장암 환자의 혈청 CEA 수준을 측정한 결과, 악성 종양 단계(AC)에서 민감도를 보였다. 이때, 정상 범위는 5ng/ml 수준이었다(도 13 A). 반면, 신데칸-2 단백질 단편의 경우 대장암 환자의 혈중 신데칸-2 단백질 조각 수치를 샌드위치 ELISA를 이용하여 측정하였을 때, 초기 선종 단계에서 검출되는 결과를 나타내었다(도 13 B).

[0219] 상기와 같은 결과는 본 발명의 신데칸-2 단백질 단편이 기존에 대장암 진단 표지자로 사용되는 CEA보다 높은 민감도를 가지고 있음을 나타내는 결과로서, 신데칸-2 단백질 단편이 대장암 진단, 특히 초기 대장암 진단에 있어 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 결과이다.

[0220] **(7) 대장암 환자의 혈청에서 대장암 정도와 신데칸-2 단편 수준 간의 연관성 확인**

[0221] 또한, 단일클론 #197 항체를 이용하여 신데칸-2 단편을 검출한 결과, 발전적 대장암(advanced colon cancer, AC) 환자 혈청의 69%에서 발견된 반면, 정상인의 혈청에서는 검출되지 않았다(도 14 a). 이러한 결과는, 대장암 환자의 경우 높은 신데칸-2 단편 수준을 가짐을 나타내는 것으로, 웨스턴 블롯을 이용한 결과에서도 상기 a와 동일한 결과를 확인하였다(도 14 b).

[0222] 이에 대장암 환자의 혈청을 대상으로 샌드위치 ELISA 어세이(실시예 1의 다클론항체 및 #197 항체 사용)를 수행하였고, 그 결과, 발전적 대장암 환자 혈청의 신데칸-2 단편의 수준은 625.9 ng/ml (범위 321.2-863.6 ng/ml) 이었던 반면, 정상인의 혈청에서 신데칸-2 단편 수준은 176.3 ng/ml (범위 87.4-431.0 ng/ml)를 나타내었다(도 14 c).

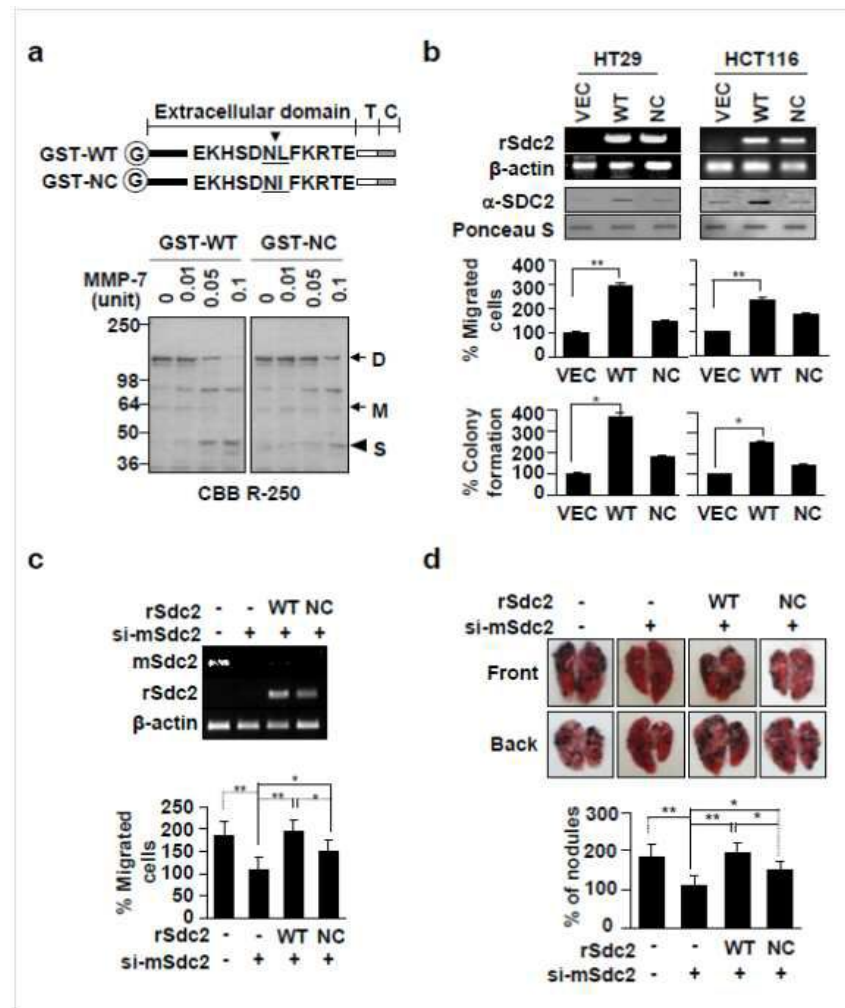
[0223] 인간 신데칸-2의 1 내지 79번 부위, 바람직하게는 19 내지 40번 부위에 결합하는 항체와 79 내지 94번 부위에 결합하는 항체를 이용하여, 샌드위치 ELISA 방법으로 대장암을 진단하는 경우, 신데칸-2의 다른 부위에 대하여 페어링하여 ELISA를 수행하는 경우보다 효과적으로 대장암을 높은 정확도 및 민감도로 진단할 수 있음을 나타내었다.

[0224] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는

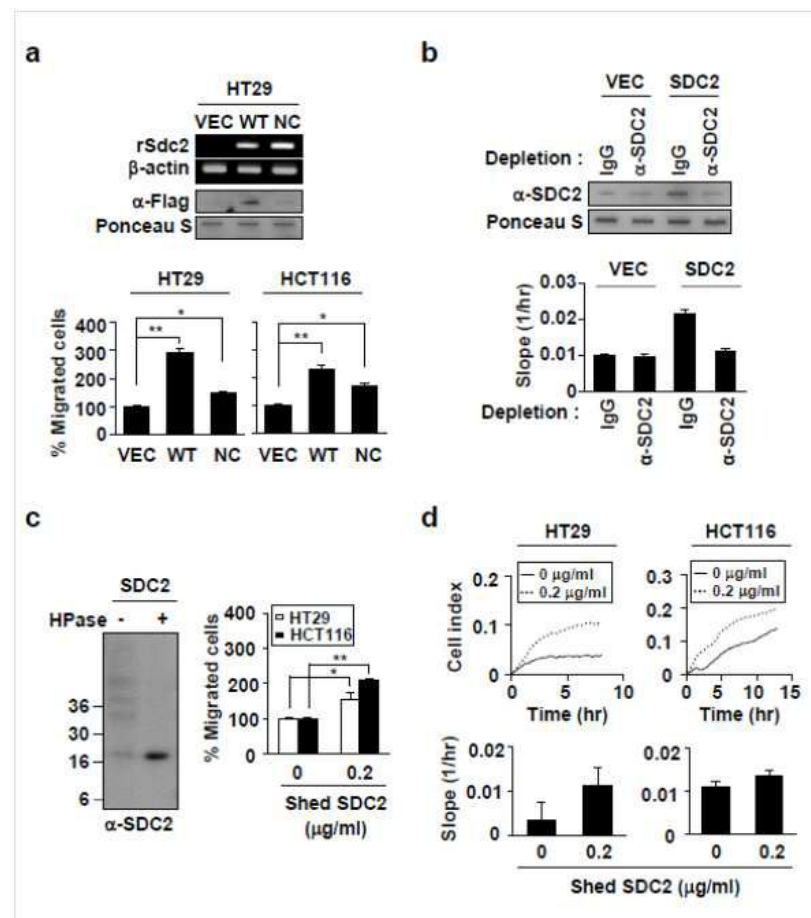
모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

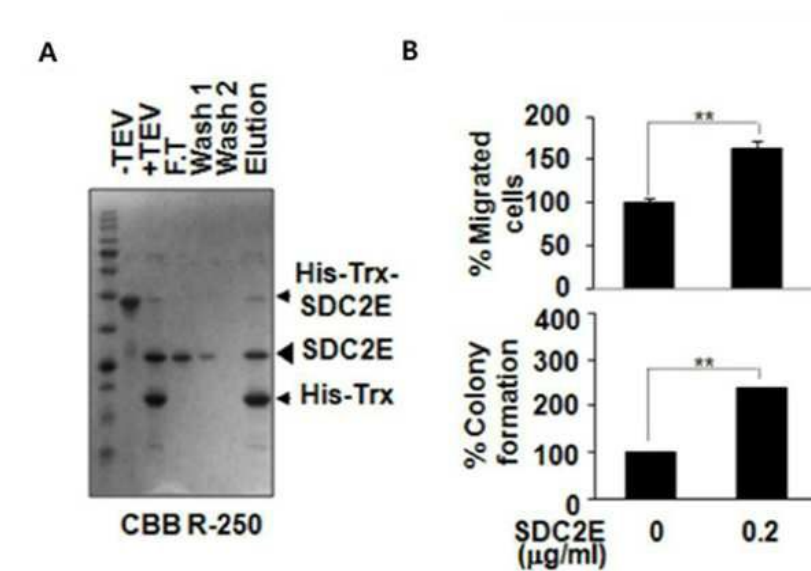
도면1



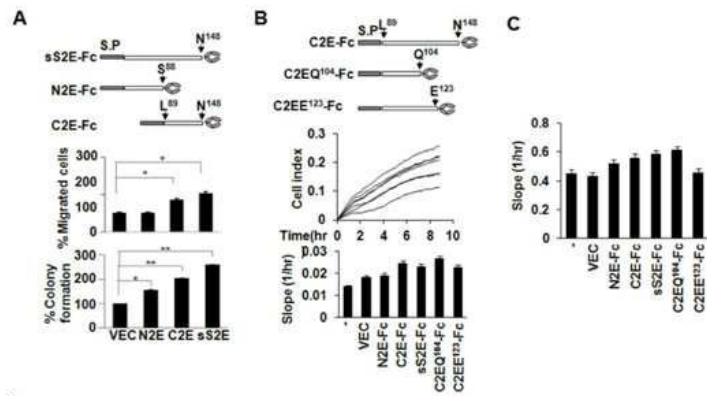
도면2



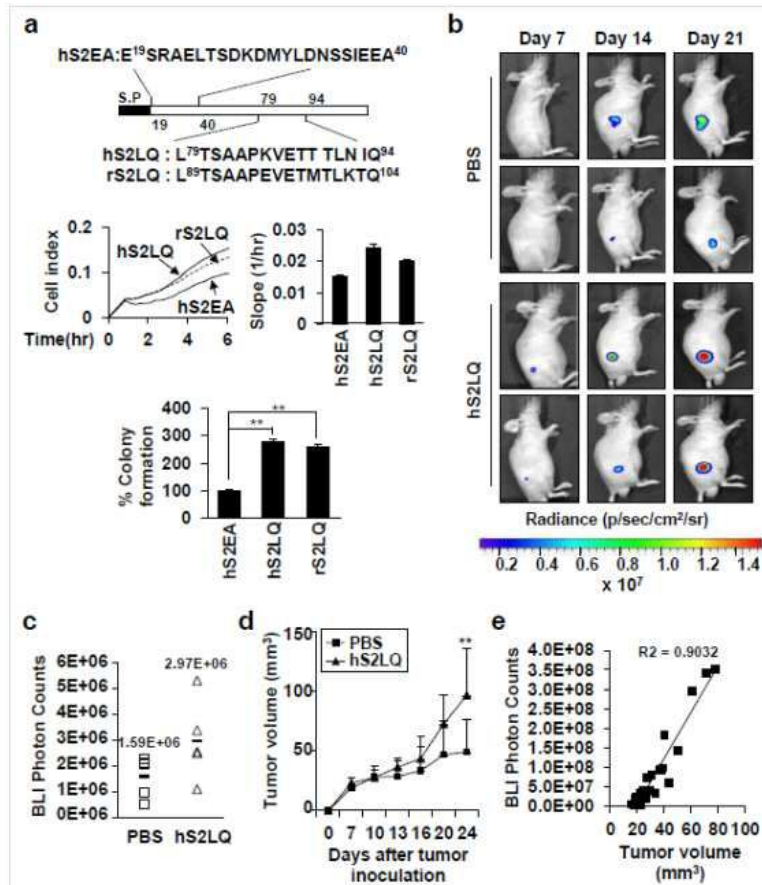
도면3



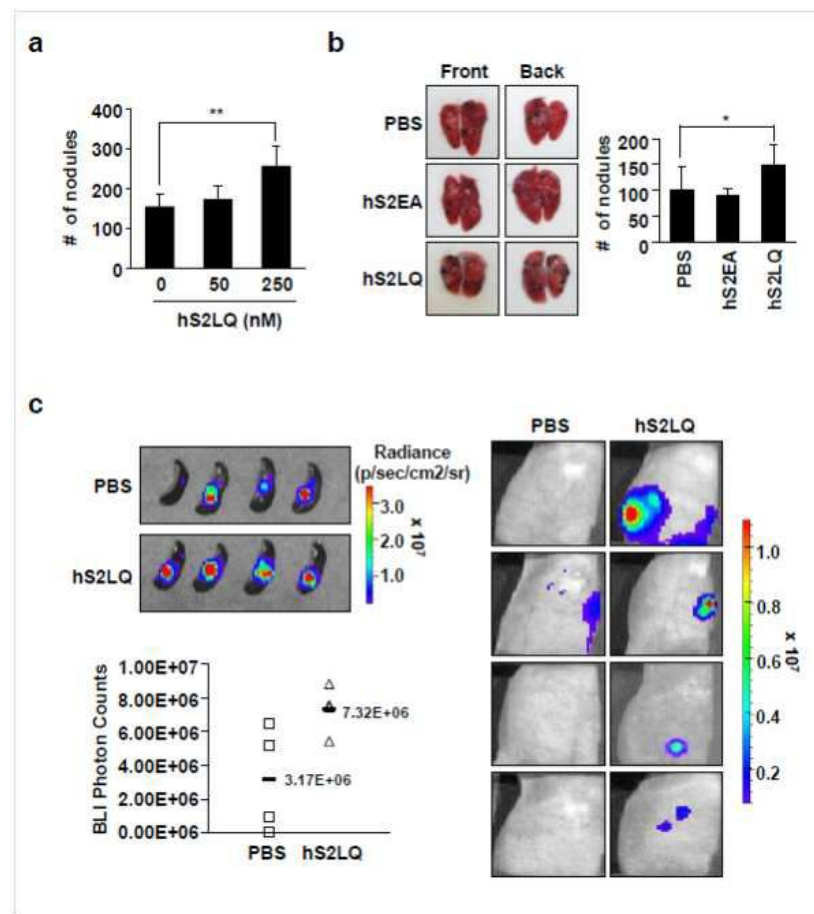
도면4



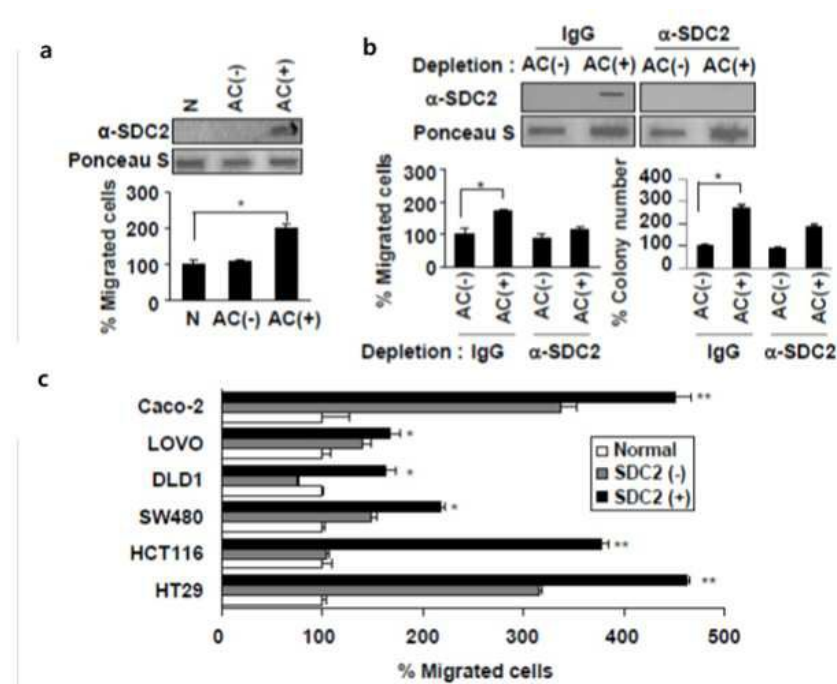
도면5



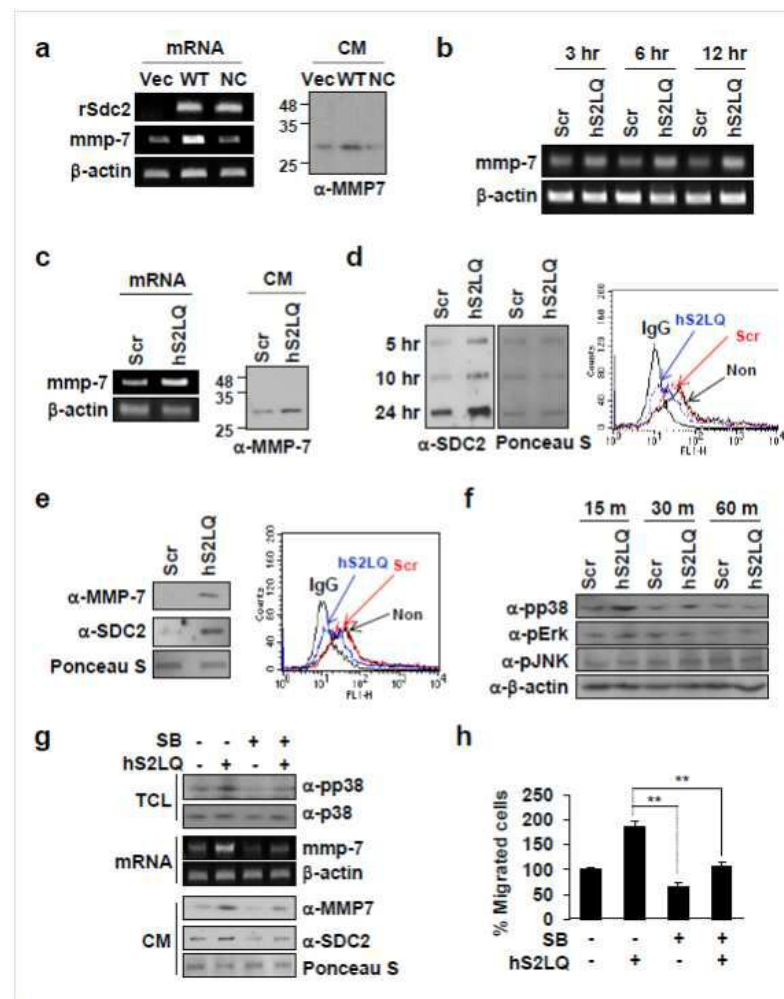
도면6



도면7



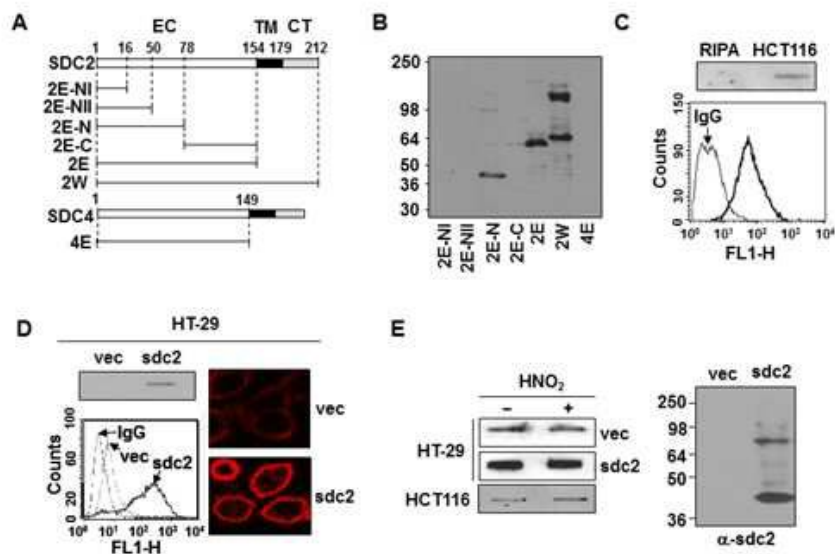
도면8



도면9

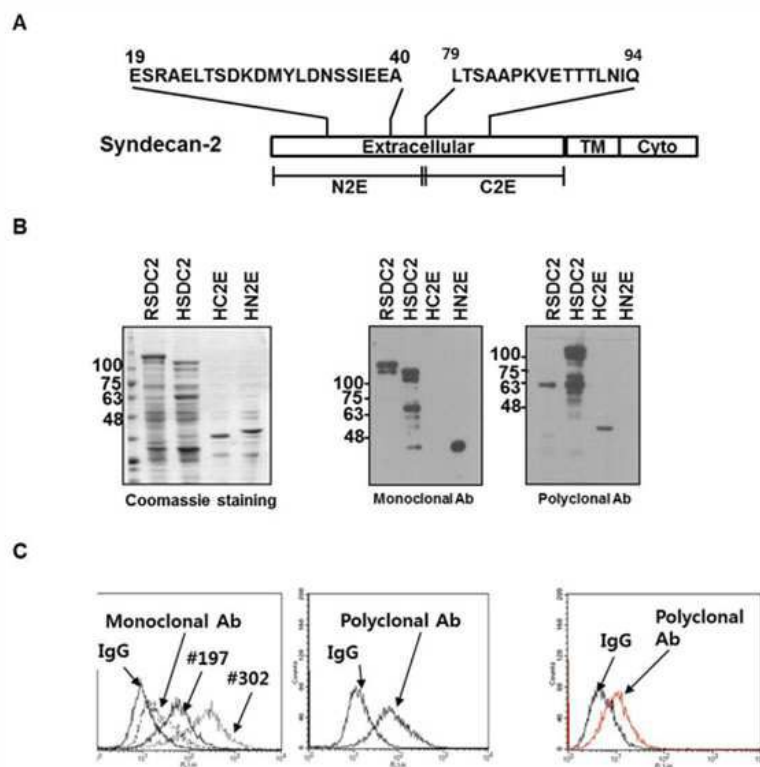
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
108 bits(270)	2e-33	Compositional matrix adjust.	70/164(43%)	96/164(58%)	23/164(14%)
Query	57	SGA---DEDVESP-----ELTTSRPLPKIIL	LTSAAPKVETTLNIG	NKIPAQTKSP	106
Sbjct	39	SGA DEDV P EL+ S L + + P+V + + NIP + S +	DSMIGPEVVHPLVPLD	NHIPERAGSGS	98
Query	107	TDKEKVLSDSE---RKMDPAEEDTNVYTEK-----HSDSLFKRTEVLAAVIAGGVIGF		++F+RTEVLAA+I GG++G	157
Sbjct	99	VPTEPKKLEENEVIPKRISPVEESEDVSNKVSMSSTVQGSNIFERTEVLAAALIVGGIVGI			158
Query	158	LFAIFLILLLVYRMKKDEGSYDLGERKPSSAAYQKAPTKEFYA			201
Sbjct	159	LFA+FLILL+YRM+KKDEGSYDLG +KP Y+KAPT EFYA			198

도면10



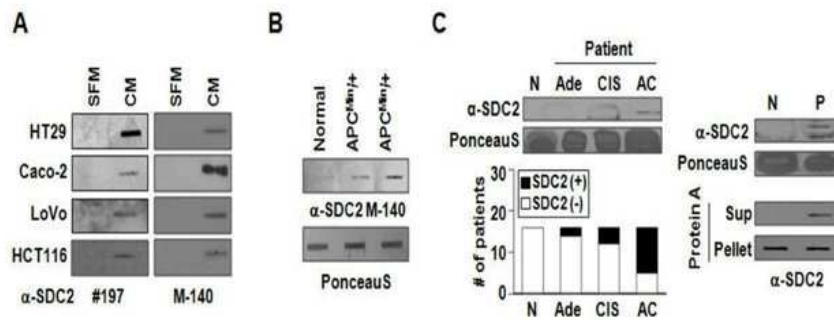
20

도면11

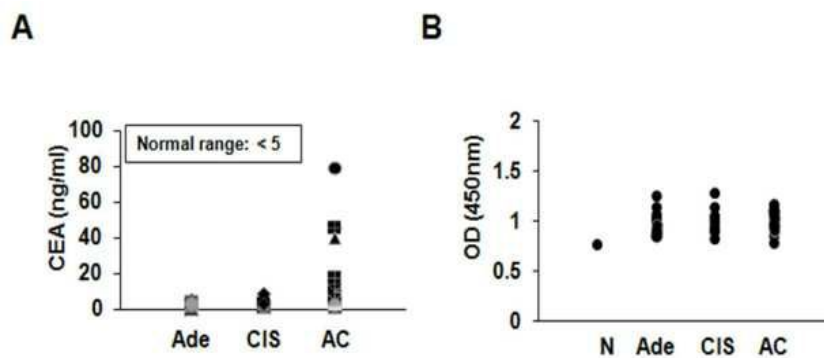


21

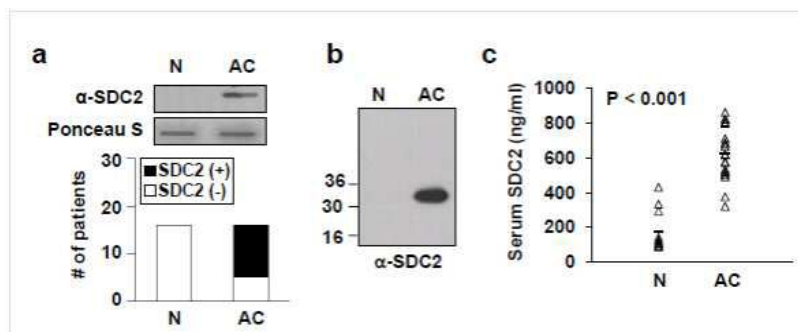
도면12



도면13



도면14



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Novel syndecan-2 fragment and use thereof
- <130> PA120963-KR-P1
- <150> KR 10-2013-0032393
- <151> 2013-03-26
- <160> 20
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid region 89-104 of Rat syndecan-2 (rS2LQ)
 <400> 1
 Leu Thr Ser Ala Ala Pro Glu Val Glu Thr Met Thr Leu Lys Thr Gln
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid region 79-94 of Human syndecan-2 (hS2LQ)
 <400> 2
 Leu Thr Ser Ala Ala Pro Lys Val Glu Thr Thr Thr Leu Asn Ile Gln
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 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> 4
<211> 211
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 4

Met Arg Val Arg Ala Thr Ser Pro Gly Asn Met Gln Arg Ala Trp Ile
1 5 10 15

Leu Leu Thr Leu Gly Leu Met Ala Cys Val Ser Ala Glu Thr Arg Ala
20 25 30

Glu Leu Thr Ser Asp Lys Asp Met Tyr Leu Asp Ser Ser Ser Ile Glu
35 40 45

Glu Ala Ser Gly Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Asp Asp Tyr Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Tyr Glu Asp Lys Gly Ser Pro Asp Leu Thr Thr
65 70 75 80

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

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

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

165 170 175
 Leu Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Leu Gly
 180 185 190
 Glu Arg Lys Pro Ser Ser Ala Ala Tyr Gln Lys Ala Pro Thr Lys Glu
 195 200 205
 Phe Tyr Ala

210
 <210> 5
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

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

130 135

<210> 6

<211> 148

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Arg Val Arg Ala Thr Ser Pro Gly Asn Met Gln Arg Ala Trp Ile

1 5 10 15

Leu Leu Thr Leu Gly Leu Met Ala Cys Val Ser Ala Glu Thr Arg Ala

20 25 30

Glu Leu Thr Ser Asp Lys Asp Met Tyr Leu Asp Ser Ser Ser Ile Glu

35 40 45

Glu Ala Ser Gly Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Asp Asp Tyr Ser Ser Ala

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Tyr Glu Asp Lys Gly Ser Pro Asp Leu Thr Thr

65 70 75 80

Ser Gln Leu Ile Pro Arg Ile Ser Leu Thr Ser Ala Ala Pro Glu Val

85 90 95

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

100 105 110

Ser Pro Glu Glu Thr Asp Lys Lys Glu Phe Glu Ile Ser Glu Ala Glu

115 120 125

Glu Lys Gln Asp Pro Ala Val Lys Ser Thr Asp Val Tyr Thr Glu Lys

130 135 140

His Ser Asp Asn

145

<210> 7

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hS2EA peptide
 <400> 7

Glu Ser Arg Ala Glu Leu Thr Ser Asp Lys Asp Met Tyr Leu Asp Asn
 1 5 10 15
 Ser Ser Ile Glu Glu Ala
 20

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Scrambled peptide
 <400> 8

Ile Pro Asn Thr Ser Val Lys Thr Leu Thr Ala Gln Leu Ala Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human syndecan-2 19-40 residues
 <400> 9

Glu Ser Arg Ala Glu Leu Thr Ser Asp Lys Asp Met Tyr Leu Asp Asn
 1 5 10 15
 Ser Ser Ile Glu Glu Ala
 20

<210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rat syndecan-2 29-50 residues
 <400> 10

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

1 5 10 15

Ser Ser Ile Glu Glu Ala

20

<210> 11

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human syndecan-2 1-79

<400> 11

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

65 70 75

<210> 12

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rat syndecan-2 11-89

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ser Ser Ser Ile Glu Glu Ala Ser Gly Leu Tyr Pro Ile Asp Asp

35 40 45

Asp Asp Tyr Ser Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ala Tyr Glu Asp Lys Gly

50 55 60

Ser Pro Asp Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ile Pro Arg Ile Ser Leu

65 70 75

<210> 13

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for rat syndecan (F)

<400> 13

atgcgggtac gagccacgtc 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for rat syndecan (R)

<400> 14

cgggagcagc actagtgagg 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for mouse syndecan (F)

<400> 15

tggctacttc gtttgagcac 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for mouse syndecan (R)

<400> 16

cactacattc tcagcctccg 20

<210> 17

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for human syndecan (F)
 <400> 17
 ggtcacctac aggatcgat catat 25

<210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for human syndecan (R)
 <400> 18
 catcactgca ttaggatcag aggaa 25

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for human beta actin (F)
 <400> 19
 tggaatcctg tggcatccat gaaa 24

<210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for human beta actin (R)
 <400> 20
 taaaacgcag ctcagtaaca gtccg 25