(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0131110
(43) 공개일자 2013년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0054919
(22) 출원일자 2012년05월23일
심사청구일자 2012년05월23일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김병삼
울산광역시 남구 신정5동 1875번지 극동스타클래스 101동 1701호
주성아
울산광역시 울주군 범서읍 굴화리 한라아트빌 308호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

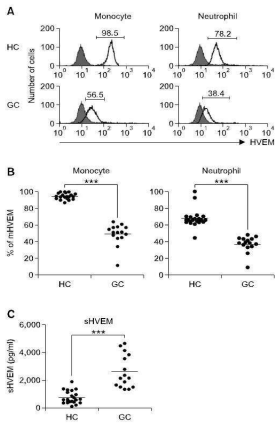
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **sHVEM을 포함하는 위암 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 위암 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)를 포함하는 위암 진단용 바이오마커 조성물, 위암 진단용 키트 및 위암 진단 방법에 관한 것으로, 위암 환자의 조직에서만 특이적으로 발현이 증가하는 sHVEM을 이용하여 생물학적 시료(예컨대, 혈액이나 혈청)로부터 매우 특이적으로 위암을 조기 진단하거나 예후를 판정할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

허숙경

울산광역시 동구 서부동 현대패밀리서부아파트 105동 906호

김규열

울산광역시 동구 서부동 100-4 중앙아파트 3동 202호

김선민

울산광역시 남구 달동 190-14번지

이예솔

울산광역시 북구 중산동 신한디아체아파트 202동 504호

웬티추하

울산광역시 남구 무거동 울산대학교 목련학사 705호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0016983
부처명	교육과학기술부
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	TLR2와 CD137 이중 활성화에 의한 항암면역치료 기작 연구(3)
기 여 율	1/1
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)를 포함하는 위암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)은 정상인의 혈청에 비해 위암 환자의 혈청에서 과발현되는 것인 위암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 위암 진단용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)은 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함되어 있는 것인 위암 진단용 키트.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것인 위암 진단용 키트.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 키트는 마이크로어레이인 것인 위암 진단용 키트.

청구항 7

생물학적 시료 중 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)을 검출하는 단계를 포함하는 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청인 것인 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 검출은 항원-항체 반응 방식으로 실시되는 것인 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 항원-항체 반응은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmnoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immnohistochemical staining), 유체 세포 측정법 (flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 군

으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것인 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)를 포함하는 위암 진단용 바이오마커 조성물, 위암 진단용 키트 및 위암 진단 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암 발생과 사망율이 점진적으로 감소함에도 불구하고, 위암은 전 세계적으로 4번째로 많이 발생하는 암이며 암 사망 원인 중 두 번째에 해당된다. 위암의 발생율은 동아시아, 동유럽 및 라틴 아메리카 일부에서 특히 높은 편이다. 위암 치료에 있어서 외과적 위절제술이 가장 보편적인 치료이며, 종양이 조기 단계에서 제거된 경우에 가장 효과적이다. 그러나, 종양이 전이가 된 경우 환자 생존률은 저조하게 된다. 그러므로, 위암의 조기-단계 발견은 위암환자의 생존률 증가에 있어 결정적이라고 할 수 있다. 이러한 이유로, 한국 및 일본과 같이 위암 발생률이 높은 국가에서는 X-선 형광 촬영 또는 내시경을 이용하여 위암에 대한 전반적인 스크리닝을 보편적으로 실시하고 있다.

[0003] 현재 위암 고 발생 국가들 사이에서 내시경이나 X-선 형광 촬영을 이용하는 스크리닝이 사용되고 있지만, 전립선 암에 있어서의 PSA (prostate specific antigen)이나 간암에 있어서의 AFP (alpha-feto protein)와 같은 혈청 바이오마커를 이용한 테스트는 전 세계에서 실용화 될 수 있는 보다 편리한 스크리닝 방법을 제공할 것이다. 또한, 이러한 편리한 혈청 바이오마커는 위 외과적 수술 및 화학치료 후 위암 환자를 모니터링 하는데 매우 유용할 것이다. 종래에서는 위암에 대하여 CEA, CA19-9, CA72-4 및 AFP를 포함하는 몇 가지 혈청 바이오마커의 예후 유용성을 조사한 바 있다. 그러나, 이러한 바이오마커들은 만족스럽지 못한 결과를 나타내고 있는 실정이다.

[0004] 헤르펙스 심플렉스 바이러스(HSV) 1형 및 2형은 가벼운 증상에서부터 심각한 증상에 이르는 경중 범위의 재발성 감염을 유발한다. HSV는 뉴런에 잠재되어 있다가 나타나서 콤피턴트 세포 면역계의 존재하에 피부 및 기타 조직을 감염시킨다. 비리온 외피내에 위치하는 경막단백질인 HSV의 D 당단백질(gD)은 세포 수용체에 결합하여 감염을 개시한다[Spear et al. (1993), Viral Fusion Mechanisms. Ed. Bentz. CRC press, Boca Raton]. 감염을 위해 HSV가 이용하는 세포 단백질이 확인되었으며, 이를 HSV 유입 매개체(Herpes Virus Entry Mediator, HVEM)라고 명명하였다 [Montgomery et al. (1996) Cell 87:427]. HVEM은 종양 괴사 인자(TNF) 관련 시토킨에 대한 수용체와 상당한 상동성을 나타내는 시스테인이 풍부한 세포외 도메인이 있는 경막 1형 단백질이다[Smith et al. (1994) Cell 76:959; Ware et al. (1995), Pathways of Cytolysis, Eds. Griffiths and Tschopp. Springer-Verlag Basel]. 또한 HVEM은 T세포, B세포, 자연살해세포, 단핵구, 호중구세포 및 수지상세포와 같은 조혈세포의 세포막에서 광범위하게 발현되는 단백질이며 (Kwon *et al.*, 1997; Heo *et al.*, 2006), 면역 반응을 활성화 또는 억제하는 조절자 역할을 수행한다. 이에 따라 HVEM의 신호전달체계인 HVEM/LIGHT/BTLA 경로를 위주로 한 자가면역질환, 감염 및 이식과 관련된 연구가 다량 수행된 바 있으나 (del Rio *et al.*, 2010), 암과 같은 질병과 HVEM의 연관성을 연구한 연구는 수행된 바 없다.

[0005] 따라서 본 발명의 발명자들은 암의 진단에 편리하게 사용할 수 있는 혈청 바이오마커를 연구하던 중, 종래 면역 관련 질환 질병 연구에 한정되어 있던 HVEM의 가용성 분획(sHVEM)이 위암 환자의 혈청에서 특이적으로 증가한다는 점을 확인하였고, 이를 위암의 조기진단 또는 예후 판정에 유용하게 사용할 수 있다는 점을 확인 후 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서 본 발명은 위암을 신속하고 정확하게 분자 진단할 수 있는 신규한 바이오마커 및 이의 검출을 위한 키트, 이를 이용한 위암 진단 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)를 포함하는 위암 진단용

바이오마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 위암 진단용 키트를 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 생물학적 시료 중 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)을 검출하는 단계를 포함하는 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 위암 환자의 조직에서만 특이적으로 발현이 증가하는 sHVEM을 이용하여 생물학적 시료(예컨대, 혈액이나 혈청)로부터 매우 특이적으로 위암을 조기 진단하거나 예후를 판정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 위암(GC) 환자 및 대조군(healty control, HC)의 단핵구 및 호중구 세포막의 HVEM 발현 정도를 형광-라벨된 항-HVEM 항체 염색 후 FACS로 조사하는 방법으로 비교한 결과 그래프이다.

도 2는 위암 환자의 백혈구 mHVEM 및 sHVEM 발현에 따른 혈청 사이토카인 수준 분석 결과이다.

도 3은 단핵구를 LPS, PHA, calcium ionophore A23187 및 PMA와 같은 다양한 세포 활성인자와 24시간 동안 배양 후 세포막에서의 HVEM 수준(mHVEM) 및 배양 상청액에서의 sHVEM 수준을 측정한 실험 결과이다.

도 4는 단핵구를 금속단백질분해효소 저해제인 GM6001 존재하에 rhLIGHT rhIL-8 또는 rhTNF-α로 24시간 동안 자극후 mHVEM 및 배양 배지 내의 sHVEM 수준을 측정한 실험 결과이다.

도 5는 위암 환자의 단핵구 및 호중구세포를 대상으로 낮은 HVEM-매개 살균 활성 및 낮은 ROS 생성능을 검토한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator, 가용 HSV 유입 매개체 단백질)를 포함하는 위암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] sHVEM은 HSV 유입 매개체(Herpes Virus Entry Mediator) 단백질의 가용 분획으로, 이는 세포막단백질인 HVEM의 쉐딩(shedding) 기작에 의해 세포막에서 유리되어 혈액 내에 존재한다. 본 발명은 위암 진단용 마커를 규명하고자, 정상인의 혈청, 위암 환자의 혈청 샘플로부터 sHVEM항체를 사용하여 sHVEM의 혈액내 수준을 ELISA를 통해 분석한 결과, 위암 환자에게서 특이적으로 sHVEM의 혈액내 수준이 3배이상 증가하는 것을 확인하였다.

[0014] 따라서 본 발명의 한 구체예에서, 상기 sHVEM은 정상인의 혈청에 비해 위암 환자의 혈청에서 과발현되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에서, 상기 바이오마커는 위암의 발생 및 발전에 대한 지표가 될 수 있으며, 위암의 발생 및 발전의 진단에 이용될 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것,한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0017] 본 발명은 또한 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 위암 진단용 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 sHVEM은 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함되어 있을 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에서, 상기 항체는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein,

European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan , CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다.

[0020] 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 항체 또는 앱타머를 포함하는 위암 진단용 키트는 면역분석용 키트일 수 있다.

[0022] 상기 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmnoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immnohistochemical staining), 유체 세포 측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 일실시예에서, 항체 대신에 본 발명의 마커에 특이적으로 결합하는 앱타머를 이용할 수 있으며, 앱타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앱타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 키트는 마이크로 어레이일 수 있으며, 이때 마이크로어레이의 고상 표면에 항체 또는 앱타머가 고정화 되어 있을 수 있다.

[0025] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0026] 상기 2차 항체 접합체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(coloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein), 및 색소(dye) 등이 사용될 수 있다.

[0027] 상기 발색 기질 용액은 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB (3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-phenylenediamine) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충용액(0.1M NaOAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다.

[0028] 세척액은 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02M 인산염 완충용액, 0.13M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충용액 (PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지용액은 황산 용액이 사용될 수 있다

[0029] 또한 본 발명은 생물학적 시료 중 sHVEM(soluble Herpes Virus Entry Mediator)을 검출하는 단계를 포함하는 위암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 용어 “생물학적 시료”는 포유동물로부터 얻어지는 모든 시료, 예컨대, 위 세포, 위 조직, 혈액, 혈장 또는 혈청 시료를 의미하며, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가

등으로 전처리할 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 sHVEM의 검출은 항원-항체 반응 방식으로 실시될수 있으며, 보다 구체적으로 상기 항원-항체 반응은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmnoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immnohistochemical staining), 유체 세포 측정법 (flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상술한 항원-항체 반응에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 위암을 진단할 수 있다. 즉, 생물학적 시료에서 본 발명의 sHVEM에 대한 시그널이 정상 생물학적 시료(예컨대, 정상 위조직, 혈액, 혈장 또는 혈청)보다 강하게 나오는 경우에는 위암으로 진단된다.

[0033] 본 발명의 일실시예에서, 본 발명의 마커 sHVEM이 생물학적 시료에 1.5ng/ml 이상의 농도로 포함되어 있는 경우, 위암으로 진단될 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0035] **<실험예>**

[0036] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0037] **1. 시약**

[0038] 재조합 인간 LIGHT (rhLIGHT)는 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입하였고, 0.1% BSA-PBS 버퍼로 희석시켰다. 엔도톡신 농축액은 LDL 방법에 의해 결정된 바에 따라 1μg 단백질 당 0.1 ng 이하로 사용하였다. 재조합 인간 IL-8(rhIL-8), rhTNF-α 및 rhIL-2 단백질은 Endogen (MA, USA)으로부터 구입하였다. 뉴트로필 희석에 사용하는 Polymorphprep™ 은 Nycomed Pharma (Oslo, Norway)로부터 구입하였고, RPMI 1640 및 Hank's balanced salt solution (HBSS)은 GibcoBRL (Grand Island, N.Y.)로부터 구입하였다. 사이토카인용 ELISA 키트는 Endogen (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)로부터 구입하였다. 이외에 다른 시약은 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입한 것을 사용하였다. 열 불활성화를 위해, 단백질은 80℃에서 20분간 처리되었다.

[0039] **2. 시험 샘플**

[0040] 위암(GC, gastric cancer) 환자 및 건강한 지원자를 대상으로 실험을 수행하였으며, 실험은 울산대학교 병원(#09-30)의 기관윤리위원회의 승인 하에 수행되었다. 건강한 지원자로부터 혈액 샘플을 채취하였으며, 위암 환자의 혈액 샘플은 위암 환자의 첫 화학요법 치료 1일 전에 채취되었다. 모든 지원자는 감염 징후가 없었다.

[0041] **3. 단핵구(monocyte) 및 호중구 세포(neutrophil)**

[0042] 인간 단핵구 및 호중구 세포는 건강한 공여자 및 위암 환자의 헤파린 처리된 혈액(헤파린 20 U/ml)으로부터 정제되었다(Heo *et al.*, 2006). 말초혈액단핵구 세포(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)은 Ficoll Hypaque-1077 구배에 따른 원심분리에 의해 분리되었다. 1차 $CD14^+$ 단핵구는 $CD14^+$ 의 음성선택(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)을 통해 PBMC로부터 분리되었다. 호중구 세포는 Polymorphprep™ 구배에 따라 원심분리를 통해 성인 말초혈액으로부터 정제되었다. Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 없이 HBSS로 두번 세척한 후, 세포는 배지에 재부유되었다.

[0043] **4. 유세포분석**

[0044] 단핵구(CD^{14+} 세포) 및 호중구 세포는 PBS의 20% AB-serum에서 4℃, 30분간 배양되었다. 그후 FACS 버퍼(0.3% BSA 및 0.1% NaN_3 포함 PBS)로 두번 세척한 후, FITC-결합 항-HVEM-FITC mAbs 또는 FITC-결합 isotype control mAbs (Mouse IgG1)와 함께 4℃, 30분간 배양되었다. 샘플은 Becton Dickinson FACScan flow cytometer를 사용하여 유세포분석되었으며, $mHVEM^+$ 세포의 백분율은 CELL-Quest software (BD Biosciences, San Jose CA)로 계

산되었다.

[0045] **5. 사이토카인 ELISA**

[0046] 위암 환자 및 건강한 대조군으로부터 획득된 혈청을 -80℃로 동결시켰다. 사이토카인은 IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 및 TNF-α에 대한 ELISA 키트를 사용하여 분석되었다.

[0047] **6. 단핵구 배양 및 가용 HVEM에 대한 ELISA 분석**

[0048] 건강한 대조군으로부터 획득된 단핵구를 정제하였고, 이는 2×10^6 cells/ml로 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에 배양되었다. 배양시의 온도는 37℃ 이며, 다양한 농도의 rhLIGHT, rhIL-8, rhTNF-α, rhIL-2, PMA, ionomycin, LPS, PHA 또는 A23187 존재 하에 배양하였다. 24시간 후, 원심분리를 통해 비세포 상청액이 수득되었고, -80℃로 동결되었다.

[0049] 혈청 및 배양 상청액 내 sHVEM의 양을 측정하기 위해, 서로 다른 에피토프를 인식하는 두 항-HVEM mAbs (108 및 122)를 사용하여 샌드위치 ELISA를 수행하였다(Heo *et al.*, 2007). 표준곡선은 HVEM-Fc를 항원으로 하여 획득하였다. ELISA 플레이트는 mAb108 (1 μg/ml) 100 μg/well 로 코팅되었고, 4℃에서 하룻밤 배양되었다. 배양 후 플레이트는 세척되었고, 4% BSA를 포함하는 PBS로 블록되었다. 4% BSA를 포함하는 PBS에 희석된 샘플을 이에 가하였고, 플레이트를 4℃에서 하룻밤 배양하였다. 세척 후, 4% BSA의 1 μg/ml 바이오틴-표지된 mAb 122 를 100 μl/well로 가하였고, 배양을 1시간동안 37℃ 조건으로 계속하였다. 스트렙타비딘-HRP를 첨가한 후, 플레이트를 TMB substrate solution (Endogen, Pierce Biotechnology, Rockford, CA)으로 처리하였고, 450 nm에서 흡광도를 분석하였다. HVEM-Fc (R&D system, Minneapolis, MN)로 작성된 표준곡선은 검출 한계가 16 pg/ml였고, 혈청 및 상청액 내 HVEM 농도는 네번 측정된 값의 평균 ± SEM 으로 표시되었다.

[0050] **7. 살균 활성**

[0051] *Staphylococcus aureus* (ATCC 56389; American Type Culture Collection, Manassas, VA.)를 영양 배지(Becton Dickinson, Sparks, MD.)에서 배양하였고, *Helicobacter pylori* (ATCC 26695)를 Brucella broth (Becton Dickinson)에서 배양하였다. 표본은 -80℃에서 동결되었고, 사용 전 해동하였다.

[0052] *S. aureus* (1 × 107 cells/ml) 및 *H. pylori* (1 × 107 cells/ml)의 하룻밤 배양물은 0.1% 젤라틴(w/v) 및 10% (v/v) 인간 AB 혈청을 포함하는 HBSS에서의 배양을 통해 포식작용이 강화되었다. 1×10^7 의 포식작용 강화된 박테리아를 포함하는 1ml 의 HBSS를 1×10^7 세포/ml 의 단핵구 또는 호중구 세포를 포함하는 100μl의 HBSS에 가하고 식세포작용을 촉진하기 위해 지속적으로 교반하며 3 분간 37℃에서 배양하였다. 비-소화된 박테리아는 5분간 1200rpm으로 분별원심분리하여 제거되었고, 소화된 박테리아를 포함하는 세포는 37℃에서 10분간 rhLIGHT 또는 열 불활성화된 rhLIGHT 존재 하에서 천천히 교반시키며 배양되었다. 그 후 0.01% BSA를 포함하는 1ml 증류수를 가한 후 얼음 상에서 spinning하여 식세포 작용을 중지시켰다. 세포 군집은 vigorous vortexing으로 파괴되었고, 생존한 박테리아 수를 아가 플레이트에서 10배 순차 희석 플레이팅법을 사용하여 계산하였다. % 사멸도는 아래와 같이 계산되었다.

[0053] % 사멸도 [1-(시간 *t* 에서 생존한 세포수 / 시간 *0* 에서 생존한 세포 수)] × 100

[0054] **8. FACS를 통한 ROS(reactive oxygen species) 측정**

[0055] 단핵구 및 호중구세포로부터 생성된 ROC가 ROS-민감성 형광 염색제인 2',7'-디클로로플루오레신 디아세테이트(DCF-DA)를 사용하여 분석되었다. 세포는 5μM DCF-DA로 15분간 37℃, 어두운 조건에서 염색되었다. DCF-DA로 염색 후 PBS 버퍼로 두번 세척되었고, FACs 버퍼에 재부유되었다. DCF-DA-염색된 단핵구는 그 후 rhLIGHT로 45분간 처리되었다. 세척 후, 유세포분석기(FACS Calibur; BD Biosciences, San Jose CA)로 분석되었고, DCF-DA 양성 세포의 수가 계산되었으며, 히스토그램의 형태로 표시되었다.

[0056] **<실시예 1> 실험 대상 환자 특성 검토**

[0057] 등록된 환자의 요약을 아래 표 1에 나타내었다. 15명의 위암 환자 및 22명의 정상 대조군에게서 얻은 혈액 샘플이 분석되었고, 위암 환자군 및 정상 대조군의 평균 연령은 각각 59.5 ± 11.4 및 53.9 ± 2.7 이었다.

[0058] [표 1]

임상병리학적 특징	환자수
Age	
< 60	5
> 60	10
Sex	
Male	6
Female	9
Cancer stage[a]	
IA	5
IB	3
IIA	1
IIB	3
IIIA	1
IIIC	2
Gastritis[b]	
Positive	6
Negative	9
H. pyroli infection[c]	
Positive	1
Negative	3
ND[d]	11

[a]TNM stage; [b]determined by endoscopy; [c]determined by CLO test; [d]not determined

[0059]

[0060] **<실시예 2> 위암 환자의 백혈구 막 HVEM(mHVEM)의 수준 검토**

[0061] 본 발명의 발명자들은 HVEM이 인간 말초혈액에서 분리된 T-세포, B-세포, 단핵구 및 호중구 세포막에서 발현된다는 것을 확인한 바 있다(Heo *et al.*, 2006).

[0062] 상기 세포들 중, 단핵구 및 호중구 세포가 가장 HVEM을 많이 발현하는 세포이다. 위암(GC) 환자 및 대조군(healty control, HC)의 단핵구 및 호중구 세포막의 HVEM 발현 정도는 형광-라벨된 항-HVEM 항체 염색 후 FACS로 조사하는 방법으로 비교되었다. 결과를 도 1에 나타내었다.

[0063] 도 1A를 참조하면, 위암(GC)환자 단핵구는 대조군(HC)의 단핵구보다 매우 낮은 양의 mHVEM을 발현하는 것을 확인할 수 있었다. HVEM-발현 세포의 백분율을 분석한 결과, 대조군은 94.6 ± 3.5%의 단핵구에서 HVEM을 발현하고 있는 반면, 위암 환자는 49.1 ± 12.8%의 단핵구만이 HVEM을 발현하고 있었다(도 1B 참조). HVEM을 발현하는 호중구 세포의 백분율 또한 위암 환자에서 대조군보다 매우 낮게 나타났다 (37.0 ± 9.5% 대 67.7 ± 10.7%).

[0064] 가용 HVEM(soluble HVEM, sHVEM)이 알러지성 천식, 아토피, 류마티스성 관절염과 같이 알러지 및 자가면역질환이 있는 환자에게서 증가하는 경향을 보이는 것이 본 발명의 발명자들에 의해 확인 된 바 있다(Jung *et al.*, 2003). 그러나, sHVEM의 수준을 암 환자를 대상으로 분석한 연구는 현재까지 보고된 바 없다. 따라서 본 발명의 발명자들은 위암 환자를 대상으로 sHVEM의 혈액내 수준을 ELISA를 통해 분석하였고, 결과를 도 1C에 나타내었다. 상기 mHVEM의 결과와 대조적으로, 위암 환자의 혈청내 sHVEM 수준은 대조군(HC)의 혈청내 sHVEM 수준보다 3배 이상 증가함을 확인할 수 있었다 (평균 ± SD; HC 및 GC 환자 각각 748 ± 461 및 2,619 ± 1,195 pg/ml ($P < 0.01$))

[0065] **<실시예 3> 위암 환자 혈청에서 높은 수준의 염증전 사이토카인(proinflammatory cytokine) 검출**

[0066] 위암 환자의 백혈구 mHVEM 및 sHVEM 발현에 따른 혈청 사이토카인 수준을 분석하였다. 결과를 도 2에 나타나었다. 도 2를 참조하면, TNF-α, IL-1β, IL-6, 및 IL-8 수준은 대조군보다 위암 환자에게서 현저히 증가한 반면, IL-2, IL-4, IL-10 및 IFN-γ 수준은 현저히 낮게 나타났으며, IL-12 농도는 위암 환자 및 대조군 모두에서 유사한 수준으로 나타났음을 알 수 있었다.

[0067] **<실시예 4> 단핵구의 자극을 통한 mHVEM의 감소 및 sHVEM의 방출 유도**

[0068] T 림프구 세포가 활성화되면, T 림프구의 막에 결합된 HVEM의 발현이 억제되는 것이 보고된 바 있다(Morel *et al.*, 2000). 그러나, 백혈구에서의 HVEM 발현 조절은 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 발명의 발명자들은 염증 유발인자에 의해 활성화된 백혈구가 mHVEM의 세포 외 방출을 촉진하며, 이를 통해 위암 환자의 혈청내 sHVEM 수준이 증가한다는 가설을 세우고, 이를 입증하였다.

[0069] 상기 가설을 입증하기 위해, 단핵구를 LPS, PHA, calcium ionophore A23187 및 PMA와 같은 다양한 세포 활성인자와 24시간 동안 배양하였고, 이후 세포막에서의 HVEM 수준(mHVEM) 및 배양 상청액에서의 sHVEM 수준을 측정하였다. 결과를 도 3에 나타내었다.

[0070] 도 3A를 참조하면, 모든 활성인자는 mHVEM 수준을 감소시켰으며, 반면 sHVEM 수준을 증가시켰음을 알 수 있었다. 따라서 단핵구의 비특이적 활성화는 mHVEM의 배양 배지로의 방출을 촉진시킴을 알 수 있었다. HVEM의 특이 리간드인 rhLIGHT 또한 용량-의존적으로 mHVEM 을 감소시켰으며, sHVEM 을 증가시켰다(도 3B 참조). 위암 환자가 TNF-α 및 IL-8과 같은 전신 염증성 사이토카인 수준이 높은 바(도 2 참조), 상기 사이토카인이 단핵구의 mHVEM 발현 및 sHVEM 수준에 영향을 미치는지 조사였고, 예상대로 상기 두 사이토카인은 mHVEM 수준을 감소시켰고, 배양 배지의 sHVEM 수준을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 3C참조).

[0071] ectodomain shedding 이라 하는 세포외 단백질 도메인의 방출은 막관통 단백질을 기능을 조절하는 중요한 기작으로 보고되어 왔다. 금속단백질분해효소 디스인테그린 및 기질금속단백질분해효소와 같은 아연-기초 금속단백질분해효소 (Zinc-based metalloproteases)는 다양한 막 수용체의 외부 절단 및 사이토카인을 매개한다(Arribas and Borroto, 2002). 어떠한 금속단백질분해효소가 백혈구 활성에 의해 유도된 sHVEM 방출을 활성화시키는지 확인하기 위해, 금속단백질분해효소의 저해 효과가 있는 GM6001를 대상으로 연구하였다. 대조군(HC)으로부터 분리된 인간 단핵구는 GM6001 존재 하에 rhLIGHT rhIL-8 또는 rhTNF-α로 24시간 동안 자극되었고, mHVEM 및 배양 배지 내의 sHVEM 수준이 측정되었다. 결과를 도 4에 나타내었다.

[0072] 도 4A를 참조하면, GM6001은 지속적으로 rhLIGHT에 의해 유발된 mHVEM 감소 및 rhLIGHT-매개 sHVEM 증가를 억제하는 것을 알 수 있었다. rhIL-8 및 rhTNF-α에 의한 단핵구의 mHVEM 방출 또한 GM6001 에 의해 저해되었다(도 4B 참조). 상기 결과는 위암환자에서 mHVEM이 높고 sHVEM이 낮은 원인은 위암환자의 혈액에 존재하는 염증성 사이토카인에 의해 단핵구의 금속단백질분해효소가 활성화되어 mHVEM을 분해하여 세포밖으로 분비한 결과임을 시사한다.

[0073] **<실시예 5> 위암 환자의 백혈구를 대상으로 한 낮은 HVEM-매개 살균 활성 및 낮은 ROS 생성능 검토**

[0074] mHVEM이 위암 환자의 백혈구에서 낮은 레벨로 존재한다는 발견을 바탕으로, mHVEM 레벨의 변화에 따른 HVEM-매개 백혈구 기능을 분석하였다.

[0075] 재조합 인간 LIGHT (rhLIGHT)의 밸혈구의 HVEM의 결합이 세포질내 포스포리파아제 γ1을 활성화시키고, 이에 따라 ROS가 생성되며, 살균 활성이 증진됨이 보고된 바 있다(Heo *et al.*, 2006, 2007). 대조군 및 위암 환자로부터 호중구세포 및 단핵구가 분리되었으며, *S. aureus* 및 1, 10, 및 100 ng/ml 의 rhLIGHT와 함께 10분간 포식작용이 일어나도록 배양하였고, 생존 박테리아 수를 계수하여 박테리아 생존률을 측정하였다. 결과를 도 5A에 나타내었다.

[0076] 도 5A를 참조하면, 대조군 단핵구 및 호중구 세포의 살균 활성은 rhLIGHT의 농도-의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 위암 환자의 단핵구 및 호중구 세포의 살균 활성 또한 rhLIGHT가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나, 증가 정도가 낮았다. 열-불활성화된 rhLIGHT는 단핵구 및 호중구 세포의 살균 활성을 증가시키지 못하였고, 이는 엔도톡신에 의한 오염이 없는 것을 시사한다.

[0077] 다음으로, 위암 환자의 단핵구 및 호중구세포의 rhLIGHT-유도된 살균 활성을 위암의 주요 인자로 알려진 *H. pylori* 균을 대상으로 분석하였다. 결과를 도 5B에 나타내었다. 도 5B를 참조하면, 위암 환자 단핵구 및 호중구세포의 *H. pylori* 균에 대한 살균 활성은 대조군보다 매우 낮게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 상기 결과는 위암 환자의 백혈구는 HVEM-매개 *H. pylori* 감염 회복능이 떨어지며, 이는 위암 발병과 관련된 염증반응을 악화시킬 수 있다는 점을 시사한다.

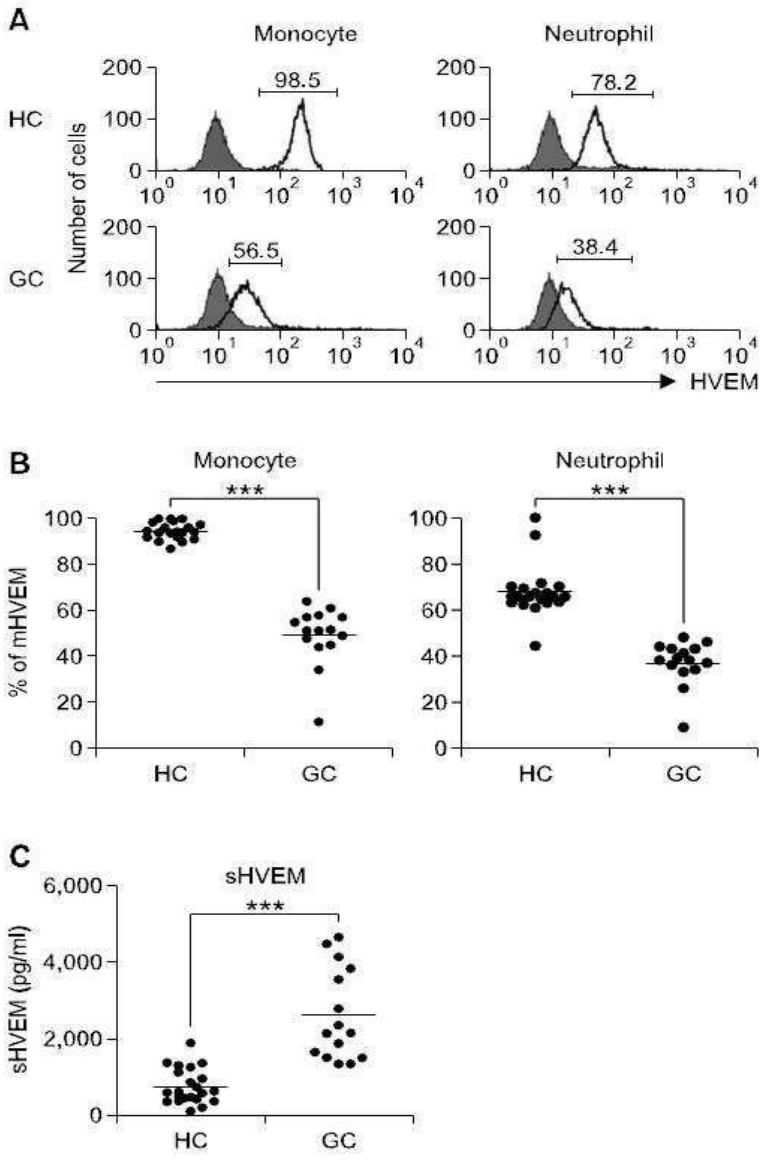
[0078] ROS는 활성화된, 파고솜-결합된 NADPH 옥시다아제로부터 생성되며, 단핵구 및 호중구 세포의 살균 활성의 주요 인자이다. 또한 rhLIGHT-HVEM 상호결합은 인간 단핵구 및 호중구 세포에서의 ROS 생성을 촉진시킴이 보고된 바 있다 (Segal, 2005). 본 실시예에서는 위암 환자 및 대조군 간의 rhLIGHT-유도 ROS 생성 정도를 비교하였다. 결과를 도 5C에 나타내었다. 도 5C를 참조하면, rhLIGHT (1 및 10 ng/ml) 에 노출된 대조군의 단핵구 및 호중구세포는 ROS 생산이 증가되었으나, 100 ng/ml의 rhLIGHT가 처리된 경우에는 증가 정도가 조금 감소하였다. 위암 환자의 단핵구 및 호중구세포에 rhLIGHT를 처리한 경우 또한 마찬가지로 ROS 생산이 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 ROS 생산을 자극하는 최대값인 100 ng/ml의 rhLIGHT가 처리된 호중구세포를 제외하고, ROS 양성인 위암 환자의 백혈구 수의 백분율이 동일한 양의 rhLIGHT 가 처리된 대조군 백혈구 수에 비해 낮게 나타났다. 따라서 상기 결과는 백혈구의 mHVEM 수준은 백혈구의 HVEM-매개 ROS 생성 기능에도 영향을 미침을 시사한다.

[0079] 따라서 단핵구의 mHVEM은 단핵구가 세균을 살해할때 수용체로 사용되는데, 위암환자는 mHVEM이 낮아 단핵구가 세균을 살해하는 능력이 감소되어 있고, 위암환자의 대부분은 *H. pyroli*에 감염된 상태이나 위암환자는 이 세균을 살해하는 능력이 떨어져 염증이 심해지고 이는 mHVEM 발현을 감소시키는 악순환을 초래함을 알 수 있었다.

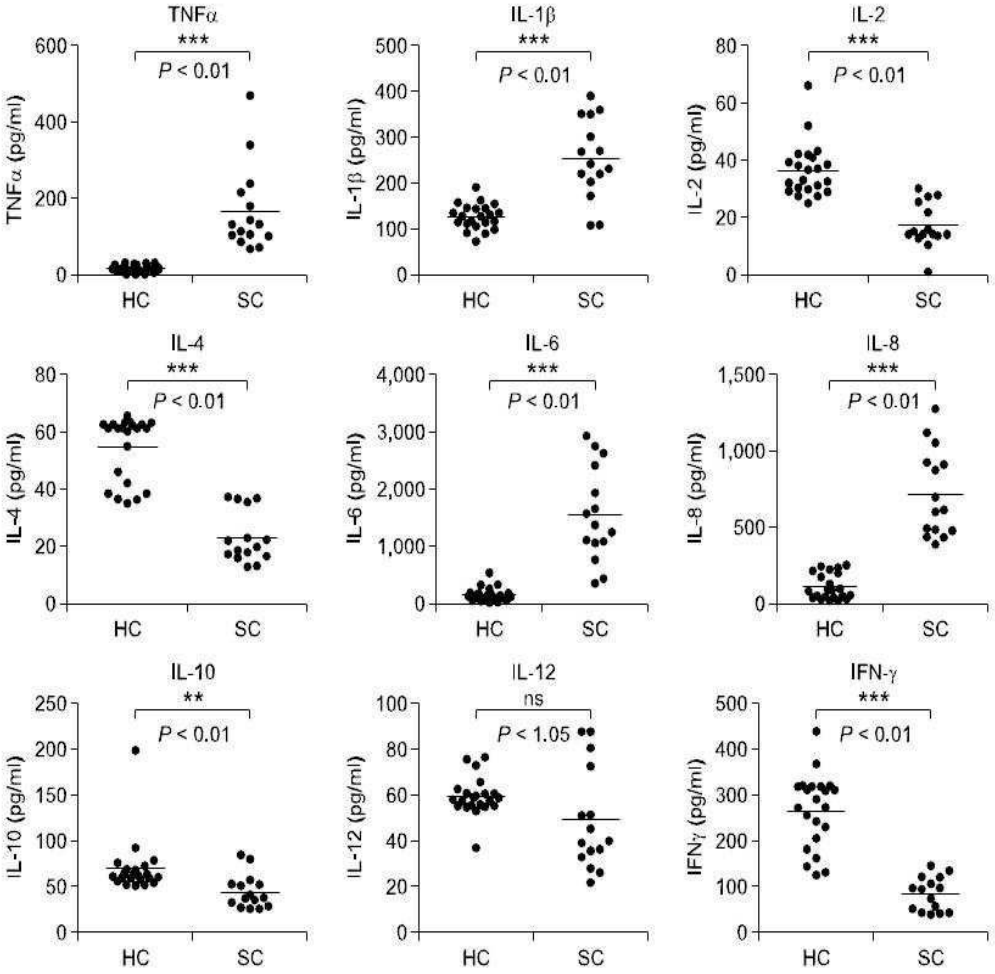
[0080] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

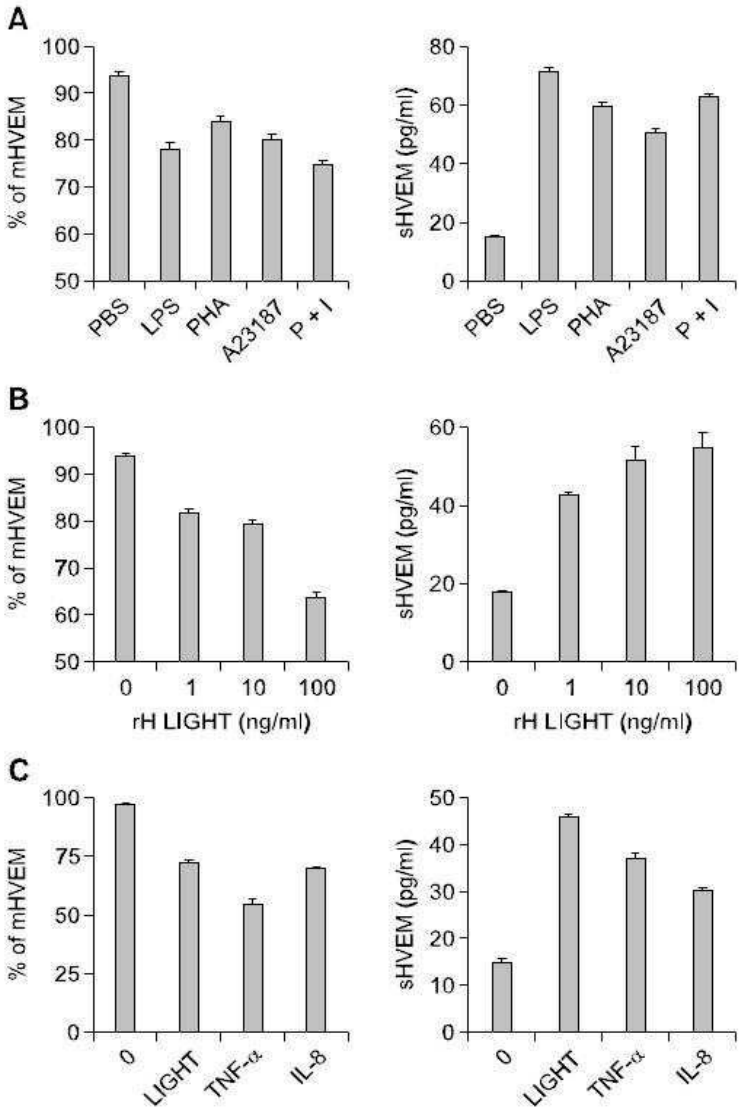
도면1


A
Monocyte
Neutrophil
HC
GC
98.5
78.2
56.5
38.4
Number of cells
HVEM
B
Monocyte
Neutrophil
***
% of mHVEM
HC
GC
C
sHVEM
***
sHVEM (pg/ml)
6,000
4,000
2,000
0

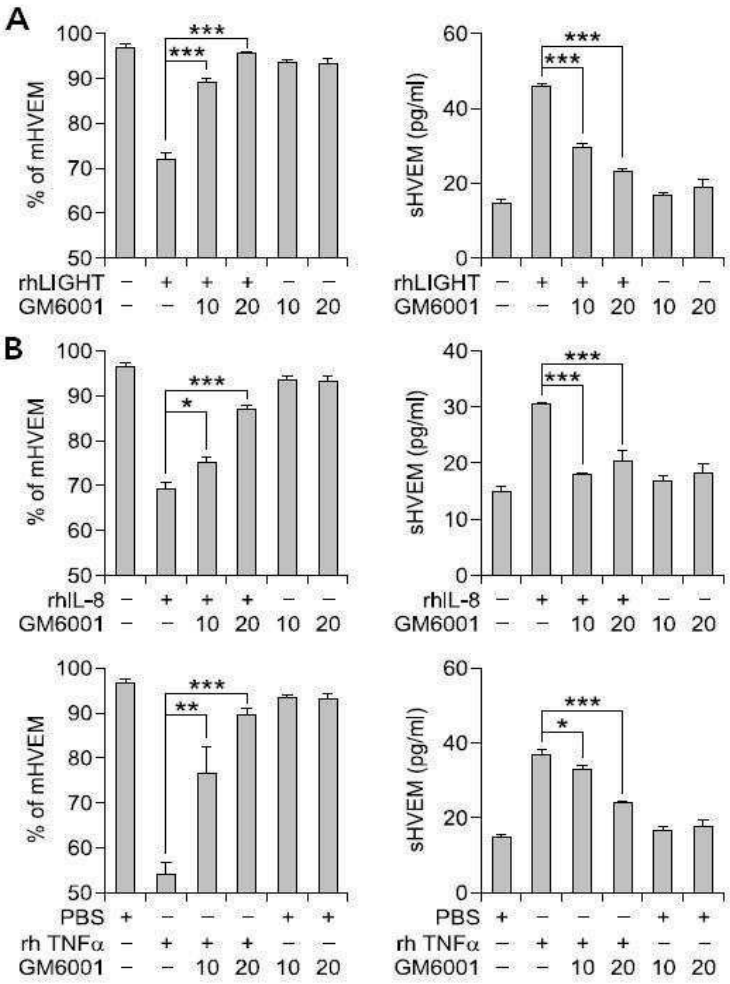
도면2


TNFα
***
P < 0.01
TNFα (pg/ml)
600
400
200
0
HC
SC
IL-1β
***
P < 0.01
IL-1β (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
HC
SC
IL-2
***
P < 0.01
IL-2 (pg/ml)
80
60
40
20
0
HC
SC
IL-4
***
P < 0.01
IL-4 (pg/ml)
80
60
40
20
0
HC
SC
IL-6
***
P < 0.01
IL-6 (pg/ml)
4,000
3,000
2,000
1,000
0
HC
SC
IL-8
***
P < 0.01
IL-8 (pg/ml)
1,500
1,000
500
0
HC
SC
IL-10
**
P < 0.01
IL-10 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
HC
SC
IL-12
ns
P < 1.05
IL-12 (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
HC
SC
IFN-γ
***
P < 0.01
IFNγ (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
HC
SC

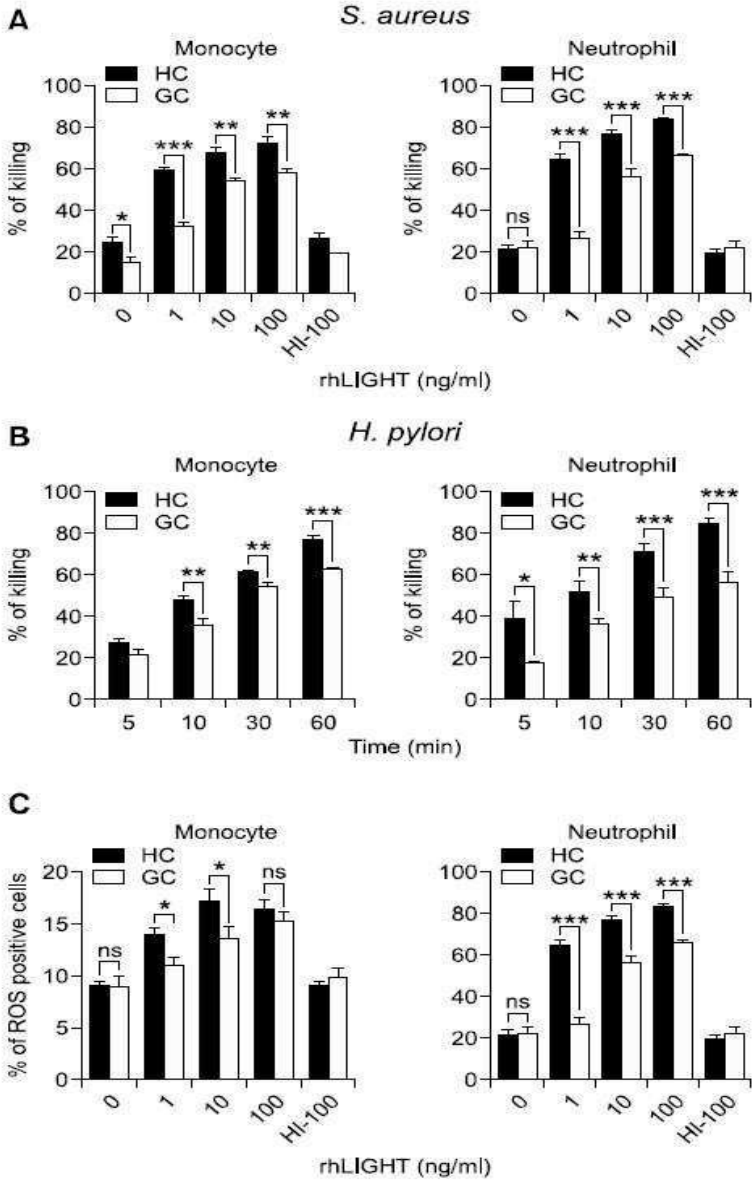
도면3


A
% of mHVEM
100
90
80
70
60
50
PBS
LPS
PHA
A23187
P + I
sHVEM (pg/ml)
80
60
40
20
0
PBS
LPS
PHA
A23187
P + I
B
% of mHVEM
100
90
80
70
60
50
0
1
10
100
rH LIGHT (ng/ml)
sHVEM (pg/ml)
60
40
20
0
0
1
10
100
rH LIGHT (ng/ml)
C
% of mHVEM
100
75
50
25
0
0
LIGHT
TNF-α
IL-8
sHVEM (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
0
LIGHT
TNF-α
IL-8

도면4



도면5


A
S. aureus
Monocyte
Neutrophil
HC
GC
% of killing
rhLIGHT (ng/ml)
B
H. pylori
Time (min)
C
% of ROS positive cells
0
1
10
100
HI-100
5
10
30
60
ns