



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0091925

(43) 공개일자 2015년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0012745

(22) 출원일자 2014년02월04일

심사청구일자 2014년02월04일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

강다원

경남 진주시 내동로348번길 10, 106동 1503호 (가좌동, 주공그린빌아파트)

고은하

경남 진주시 향교로 3, A동 1603호 (평안동, 진주롯데인벤스)

(74) 대리인

손민

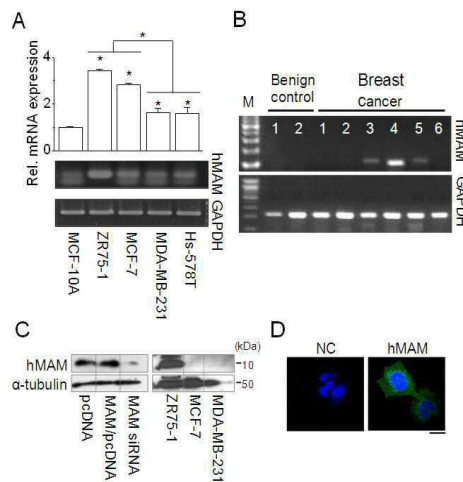
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **맘마글로빈을 포함하는 암전이 억제용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 맘마글로빈(Mammaglobin)을 포함하는 암전이 억제에 관한 것으로, 구체적으로 암전이 억제 표적 분자로서 맘마글로빈 단백질, 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물, 이를 이용한 암전이 억제 방법; 암전이 가능성 예측 키트; 상기 키트를 이용한 암전이 위험군의 선별 방법; 및 암전이 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 맘마글로빈 발현수준의 증가를 통해 암세포의 이동 및 침습을 억제함으로써 암전이를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인한다. 따라서, 본 발명의 맘마글로빈은 암전이 억제를 위한 표적분자로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-1034

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원(교육부)

연구과제명 세포증식·사멸·분화에 있어서 two-pore domain 칼륨 통로의 역할 및 기전 규명

기 여 율 1/1

주관기관 한국연구재단

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

맘마글로빈(mammaglobin, MAM) 단백질, 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 맘마글로빈 단백질은 인간 유래 맘마글로빈(human mammaglobin, hMAM)인 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 맘마글로빈 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 결장암 또는 전립선암인 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물이 항암제를 추가로 포함하는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항암제는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)로 메칠로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 시크로포스파미드(cyclophosphamide),

이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부숴판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 다티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 피리사마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin) 및 C 브레오마이신(C Bleomycin); 및 식물 알칼로이드(plant alkaloid)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테산(topotecan) 및 이리도테산(iridotecan)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 10

맘마글로빈 단백질에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA에 특이적인 프라이머쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항체는 단클론성 항체 또는 다클론성 항체인 것인, 암전이 가능성 예측 키트.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 프라이머쌍은 서열번호 3 및 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 갖는 것인, 암전이 가능성 예측 키트.

청구항 13

- 1) 암전이 의심환자의 분리된 시료로부터, 맘마글로빈 단백질에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA에 특이적인 프라이머쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트를 이용하여 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 검출하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)에서 검출된 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 수준이 전이성 암세포에서 측정된 수준보다 낮은 경우에는 암전이 가능성이 높은 것으로 판정하고, 전이성 암세포에서 측정된 수준보다 높은 경우에 암전이 가능성이 낮은 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 암전이 위험군을 선별하는 방법.

청구항 14

- 1) 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및
- 2) 시험물질 처리 전과 후의 세포 내 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 분석하여 이를 증가시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는, 암전이 억제제를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 맘마글로빈(Mammaglobin)을 포함하는 암전이 억제에 관한 것으로, 구체적으로 암전이 억제의 표적 분자로서 맘마글로빈 단백질, 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물, 이를 이용한 암전이 억제 방법; 암전이 가능성 예측 키트; 상기 키트를 이용한 암전이 위험군의 선별 방법; 및 암전이 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 암은 세포가 무한히 증식해 정상적인 세포의 기능을 방해하는 질병으로, 증식과 억제가 조절되지 않는 비정상적인 세포들이 통제되지 못하고 과다하게 증식하며, 주위 조직이나 장기에 침입하여 정상 조직의 파괴를 초래한다. 암이 발생하는 부위는 제한되지 않으며, 암이 발생하는 원인은 아직도 정확히 밝혀진 바 없다. 지금까지 알려진 바에 따르면 정상적인 세포의 유전자에 돌연변이가 생겨서 나타난다고 알려져 있다. 유전자 발현의 이상은 모든 암의 공통적인 특징인 조절불능의 세포 성장 및 탈분화와 밀접하게 관련되어 있다. 다수의 암 연구에 따르면, 특정 암을 갖는 개체의 게놈에서는 일반적으로 종양 억제유전자로 불리며 정상적으로는 무분별한 세포의 분열과 과잉 성장을 억제하는 기능을 하는 열성유전자의 발현이 감소되며, 정상세포를 암세포로 변형시키는 능력을 갖는 종양유전자가 과다발현된다. 따라서, 유전자 발현과 암의 발병 또는 진행과의 관계에 기초하여 정상세포 대비 암세포에서 특이적으로 과발현되거나 또는 그 발현이 억제되는 유전자를 탐색하면 암 진단이나 치료의 표적을 개발할 수 있다.
- [0003] 또한, 암의 가장 중요한 생물학적 특징 중 하나는 전이를 일으킬 수 있다는 것이며, 이는 암을 치료하는데 가장 큰 장애물로 여겨지고 있다. 실제로 모든 고형 종양 환자의 약 60%는 이미 원발종양 진단 시 미세하게나마 임상적으로 전이된 암을 가지고 있으며, 대부분의 암환자들의 주요 사망 원인이 암전이임은 이미 잘 알려져 있다. 대부분의 암전이는 다발성, 전신성이며, 그 존재 여부의 판정도 어렵기 때문에 현재의 암 치료방법으로는 치료 효능이 만족스럽지 못하다. 하지만 암전이는 1차 종양을 구성하는 암세포의 극히 일부분만이 전이과정의 여러 단계를 성공적으로 마치고 전이암으로 되는 비효율적인 과정이다. 따라서, 전이 과정을 잘 이해하고, 임상적, 생물학적으로 유용한 치료표적의 발굴을 통해 이를 효과적으로 억제할 수 있는 방법을 개발한다면, 암전이에 의한 사망을 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.
- [0004] 이에 암 발생 및 암전이 억제와 관련하여 다양한 연구가 진행되고 있고, 이러한 연구의 일환으로, 암의 진행에서 중요한 역할을 담당하는 분자인 칼슘 채널에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0005] 유방암은 선진국에서 여성이 가장 빈번하게 진단받는 암 중의 하나로 유방암의 원인은 아직 정확하게 밝혀지지 않았다. 유방암은 발암, 진행, 전이, 재발 등에 관여하는 여러가지 인자들에 의해 조절되는 복합적이고 비균질적인 질병이다. 따라서, 설령 같은 병기에 해당하는 유방암 환자에 대해 임상적 예측을 한다고 하더라도 실제로는 전혀 다른 치료 결과를 가져올 수 있다.
- [0006] 최근 호르몬 수용체와 인간 상피성장인자 수용체(Human Epidermal growth Factor Receptor-2, HER2)를 비롯한 바이오 마커를 이용한 개별적(individualized), 분자적(molecular) 및 표적화(targeted) 치료가 중점적으로 개발되고 있다. 그러나, 현재 암진단을 위한 바이오 마커들은 아직 불충분하기 때문에, 유방암 환자의 예후와 치료 결과를 예측하기 위해 분자학적 바이오 마커를 찾는 것이 요구되고 있다.
- [0007] 한편, 유방암은 유선과 림프선이 침예하게 분포하고 있는 조직에 특성에 따라 암 전이의 위험성이 매우 높으며, 암 전이 여부에 의해서 환자의 생존 가능성이 크게 좌우되는 특징이 있다. 유방암이 발생하면 암 전이를 사전적으로 방지하기 위해, 주변 림프절을 같이 절제하는 등 유방암 치료 분야에서는 암 전이 억제가 특히 중요한 치료 방향이라고 할 수 있다.
- [0008] 인간 맘마글로빈(human mammaglobin)은 10 kDa 당단백질을 암호화하는 11번 염색체 상(11q13)에 있는 유테로글루빈 유전자 패밀리의 유방-특이적 유전자이다. hMAM은 유방 상피 및 유방암 조직에서 과발현하는 것이 알려져 있어 유방암에 대한 분자적 마커로 주목받고 있다. 또한, 유방암 세포 표면에 존재함에 따라 유방암 조직으로의 표적 약물(targeted-drug)의 전달을 위한 유용한 분자적 마커로 제안되고 있다. 이 외에도 많은 연구 결과들에서 맘마글로빈이 유방암에 대한 유용한 마커라고 제시하였다. 그러나, 맘마글로빈의 유방암에서의 역할에 대해서는 알려진 바가 없었으며, 유방암의 증식, 이송 및 침입과 같은 종양 형성에 연관되는 능력에 관해서는 아직 발표된 바가 없다.
- [0009] 이에 본 발명자들은 유방암 치료 측면에서의 맘마글로빈의 역할을 밝히고자 예의 노력한 결과, 맘마글로빈의 과발현은 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 반면, 이의 사일런싱(silencing)은 암세포의 이동을 증가시킴을 확인

하고, 맘마글로빈의 발현 조절을 통해 암전이를 억제할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 맘마글로빈(mammaglobin, MAM) 단백질, 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 암전이 억제용 약학적 조성물을 이룰 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 맘마글로빈 단백질에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA에 특이적인 프라이머쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 암조직 표본으로부터 맘마글로빈 발현수준을 분석하는 단계를 포함하는 암전이 위험군의 선별 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 시험물질의 처리에 의한 맘마글로빈 발현수준의 변화를 분석하는 단계를 포함하는, 암전이 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 맘마글로빈(mammaglobin, MAM) 단백질, 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 용어 "암전이"는 암세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 이동하여 증식하는 것을 말한다. 암이 신체의 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암조직이 성장하여 직접적으로 주위 장기를 침습하는 것과 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격전이를 하는 것으로 구분된다.
- [0017] 본 발명의 용어 "맘마글로빈"은 10 kDa 당단백질로 인간에서는 특히 유방 특이적으로 발현하는 특징이 있다. 맘마글로빈은 유방암에서 발현이 증가하며, 이에 따라 유방암 마커로 알려져 있다(Mark A. Watson and Timothy P. Fleming, 'Mammaglobin, a Mammary-specific Member of the Uteroglobin Gene Family, Is Overexpressed in Human Breast Cancer', Cancer Res 1996;56:860-865). 즉, 맘마글로빈은 암에 있어 유방암 마커 또는 발암 유전자로 인식되어 있을 뿐이다. 본 발명에서 맘마글로빈의 발현조절에 의해 암세포의 이동 및 침습이 억제될 수 있는 암종으로는 전이를 유발할 수 있는 암이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 유방암, 폐암, 결장암, 전립선암 등일 수 있으며, 특히 유방암일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 맘마글로빈 단백질은 인간 유래 맘마글로빈(human mammaglobin, hMAM)일 수 있으며, 특히 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서는 암전이에 있어서 맘마글로빈의 역할을 규명하기 위해, 맘마글로빈의 유전자 발현/단백질 수준을 침습적 암세포 또는 비침습적 암세포에서 확인하였다. 구체적으로, 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 비침습성 MCF-7 유방암세포와 침습성 MDA-MB-231 유방암세포에서의 맘마글로빈 발현수준을 RT-PCR, 웨스턴 블롯을 통해 비교하였다(도 1). 그 결과, ZR75-1와 MCF-7 세포(에스트로겐 수용체(ER)-양성 비침습성 세포)에서 인간 맘마글로빈의 mRNA 발현 수준이 MDA-MB231 및 Hs-578T(에스트로겐 수용체(ER)-음성 침습성 세포)에 비교하여 높은 것을 확인하였으며, 단백질 또한 비침습성 세포주인 ZR75-1에서만 측정이 되었다. 또한, 맘마글로빈 발현이 유방암세포의 이동에 미치는 영향을 3-D 이동성 분석으로 조사한 결과, MAM의 과발현은 세포의 이동 및 침습을 감소시키는 반면, MAM의 사일런싱은 이들 세포의 이동 및 침습을 증가시킴을 확인하였다(도 2).
- [0020] 또한, 맘마글로빈 발현이 상피세포의 중간엽세포로의 전환(EMT)에 미치는 영향을 알아본 결과, 맘마글로빈에 의하여 비멘틴(EMT 마커)이 감소하는 것과 E-cadherin(상피세포 마커)이 변화하는 것을 확인하였다(도 3). 구체적으로 MAM을 과발현시킨 경우에는 E-cadherin 발현이 약 2.1배까지 증가하였으나, 비멘틴 발현은 약 $60 \pm 7\%$

감소하였다. 따라서 상기 결과는 MAM 발현 조절을 통해 암세포의 전이를 조절할 수 있음을 시사한다.

- [0021] 본 발명은 mamaglobin 발현 수준이 인간 암세포의 이동 침습과 관련되어 있음을 최초로 규명한 것이다. 지금까지, mamaglobin의 역할은 유방암 유발 유전자 또는 유방암 마커로서 연구되었다. mamaglobin 유전자는 유방암을 포함하는 인간 암종에서 과발현됨이 보고되었으나, 이의 발현수준과 암세포 전이와의 연관성에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다. 본 발명은 mamaglobin 발현 수준이 암전이의 결정적인 과정인 세포 이동 및 침습과 관련되어 있음을 밝히고, 암전이 억제를 통한 암 치료의 새로운 표적 분자로서 mamaglobin의 용도를 제안한 것이다.
- [0022] 이에 본 발명은 mamaglobin 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명에서 mamaglobin 단백질은 서열번호 1의 mamaglobin 단백질 또는 이들과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 단백질을 말한다. 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 단백질에는 서열번호 1의 mamaglobin 단백질과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.
- [0024] 상기 "기능적 동등물"에는 서열번호 1의 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로 서열번호 1의 mamaglobin 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.
- [0025] 상기 "기능적 유도체"는 상기 mamaglobin 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 서열번호 1의 mamaglobin 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 mamaglobin 유전자는 상기 mamaglobin 단백질 또는 이의 기능적 동등물을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 염기서열에는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함한다. 바람직하게는 mamaglobin 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열로 표시되며, 가장 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열로 표시된다.
- [0027] 본 발명에서 mamaglobin 단백질은 DNA 재조합 기술을 사용하여 제조될 수 있으며 이를 위하여 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로 mamaglobin 단백질은 상기 mamaglobin 유전자를 사용하여 세균, 효모, 식물 세포주 및 동물 세포주 내에서 재조합 방식으로 주입하는 유전공학 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 유전자 치료용 발현벡터는 상기 mamaglobin 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 말하며, 이에 한정되지는 않지만, 바람직하게는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 mamaglobin 유전자를 pcDNA3.1 벡터에 삽입하여 mamaglobin 유전자를 발현하고 재조합 발현벡터 MAM/pcDNA3.1를 제조하였다.
- [0029] 본 발명에서 "유전자 치료 (gene therapy)"라는 용어는 유전자 이상에 의하여 유발되는 각종 유전병과 암 등을 치료하기 위하여, 질병과 관련이 있는 유전자를 환자의 체내에 직접적으로 주입하고 상기 유전자를 세포 내에서 발현시켜 그의 기능을 정상화시키는 방법을 일컫는다. 따라서 본 발명에서 유전자 치료용 발현벡터는 mamaglobin 유전자를 체내에 직접적으로 전달하여 발현시킴으로써 암세포의 이동 및 침습을 억제할 수 있는 발현벡터를 의미한다.
- [0030] 본 발명에 따른 상기 발현벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 도입할 수 있다. 예를 들어, 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 pcDNA3.1 벡터에 서열번호 2의 mamaglobin 유전자를 삽입하여 발현벡터를 제조하고 이를 'MAM/pcDNA3.1'로 명명하였다. 상기 제조된 발현벡터를 ZR75-1 세포 내로 형질전환시켜 상기 발현벡터로부터 mamaglobin 단백질이 성공적으로 발현됨을 확인하였다(도 1의 C, 왼쪽 블랫).
- [0032] 본 발명에 따른 상기 발현벡터에 의하여 생산된 mamaglobin 단백질은 암세포의 이동과 침습을 저해하는 특징이 있어 암전이를 효과적으로 억제할 수 있다. 따라서 상기 발현벡터 또는 mamaglobin 단백질은 암전이의 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다.

- [0033] 또한, 본 발명은 상기 암전이 억제용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명에서 용어, "대상"은 본 발명의 약학적 조성물을 투여하여 암전이가 억제될 수 있는 질환을 가진 포유류 동물로서 바람직하게는 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등을 의미한다.
- [0035] 본 발명에 따른 암전이 억제용 약학적 조성물 및 이를 이용한 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법이 적용되어 효과적으로 암전이가 억제될 수 있는 암으로는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 뇌종양(Brain Tumor), 양성 성상세포종(Low-grade astrocytoma), 악성성상세포종(High-grade astrocytoma), 뇌하수체 선종(Pituitary adenoma), 뇌수막종(Meningioma), 뇌림프종(CNS lymphoma), 퓌지교종(Oligodendroglioma), 두개내인종(Craniopharyngioma), 상의세포종(Ependymoma), 뇌간종양(Brain stem tumor), 두경부 종양(Head & Neck Tumor), 후두암(Laryngeal cancer), 구인두암(Oropharyngeal cancer), 비강/부비동암(Nasal cavity/PNS tumor), 비인두암(Nasopharyngeal tumor), 침샘암(Salivary gland tumor), 하인두암(Hypopharyngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 구강암(Oral cavity tumor), 흉부종양(Chest Tumor), 소세포성 폐암(Small cell lung cancer), 비소세포성 폐암(NSCLC), 흉선암(Thymoma), 종격동 종양(Mediastinal tumor), 식도암(Esophageal cancer), 유방암(Breast cancer), 남성유방암(Male breast cancer), 복부종양(Abdomen-pelvis Tumor), 위암(Stomach cancer), 간암(Hepatoma), 담낭암(Gall bladder cancer), 담도암(Biliary tract tumor), 췌장암(pancreatic cancer), 소장암(Small intestinal tumor), 대장(직장)암(Large intestinal tumor), 항문암(Anal cancer), 방광암(Bladder cancer), 신장암(Renal cell carcinoma), 전립선암(Prostatic cancer), 자궁경부암(Cervix cancer), 자궁내막암(Endometrial cancer), 난소암(Ovarian cancer), 자궁육종(Uterine sarcoma), 피부암(Skin Cancer) 등이 포함된다. 특히, 본 발명에서 상기 암은 유방암, 전립선암, 결장암 또는 폐암일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 암세포의 이동 및 침습을 특이적으로 저해하여 암전이를 효과적으로 억제하므로, 암세포의 성장 및 증식을 억제하는 것으로 알려진 다른 항암제와 병용투여하는 경우 항암 및 암전이 억제효과 모두를 달성할 수 있어 항암치료에 있어 획기적인 진전을 가져올 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물과 병용 투여될 수 있는 항암제에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)로 메칠로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 시크로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부숴판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 다티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 플리사마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin) 및 C 브레오마이신(C Bleomycin); 및 식물 알칼로이드(plant alkaloid)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등을 예시할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제"는 생물체를 자극하지 않고 함께 투여된 유효성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제 또는 희석제를 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있으며, 특히 흡입 투여용 제형 또는 주사 투여용으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약앰플 또는 다중 투약형태로 제조할 수 있다. 기타 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수

있다. 흡입(inhalation)을 통한 약물 전달은 비침습적(non-invasive) 방법 중 하나로, 특히 폐 질환의 광범위한 치료에 흡입 투여용 제형(예를 들어, 에어로졸)을 통한 치료 핵산 전달이 유리하게 이용될 수 있다. 이는 폐의 해부학적 구조 및 위치가 즉각적이고 비침습적인 접근을 가능케 하고, 다른 기관에는 영향을 미치지 않으면서 유전자 전달 시스템의 국소 적용을 받을 수 있기 때문이다.

[0040]

한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0041]

또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042]

본 발명의 약학적 조성물은 유전자 치료제를 전달하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0043]

본 발명의 약학적 조성물은 또한 효과적인 암전이 억제제를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0044]

또한, 본 발명은 맘마글로빈에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA에 특이적인 프라이머쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트를 제공한다.

[0045]

본 발명에서 용어, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 맘마글로빈 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 적합한 항체는 단클론성 항체인 것이 바람직하고, 인간화 단클론성 항체인 것이 더욱 바람직하다.

[0046]

본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 유리 3'-말단 수산화기(free 3'-terminal hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 작용하는 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형의 복사를 위한 시작 지점으로서의 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에서는 맘마글로빈 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 시행함으로써, 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 맘마글로빈 단백질의 발현수준을 분석할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 본 발명에 적합한 프라이머쌍은 맘마글로빈을 코딩하는 mRNA를 특이적으로 인식하여 증폭시킬 수 있는 것이라면 어느 것이나 제한없이 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호 3 및 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.

[0047]

본 발명에서의 용어, "키트"란, 표적분자인 맘마글로빈 유전자의 mRNA 발현수준 또는 단백질 발현수준을 확인하여 암전이 여부를 예측할 수 있는 도구를 의미한다. 본 발명의 암전이 가능성 예측 키트에는 암전이 진단을 위한 표적 분자로서 맘마글로빈 발현수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0048]

또한, 본 발명은 맘마글로빈 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하여 암전이 위험군을 선별하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 암전이 위험군을 선별하는 방법은

- [0049] 1) 암전이 의심환자의 분리된 시료로부터, 맘마글로빈 단백질에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA에 특이적인 프라이머쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트를 이용하여 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 검출하는 단계; 및
- [0050] 2) 상기 단계 1)에서 검출된 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 수준이 전이성 암세포에서 측정된 수준보다 낮은 경우에는 암전이 가능성이 높은 것으로 판정하고, 전이성 암세포에서 측정된 수준보다 높은 경우에 암전이 가능성이 낮은 것으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 단계 1)에서 시료는 이로 한정되는 것은 아니나, 암조직 표본으로부터 얻은 박리표본, 파쇄액 또는 총 RNA 일 수 있다. 상기 단계 1)은 암전이 가능성 예측 키트에 포함된 맘마글로빈에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 맘마글로빈 mRNA에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 암조직 표본으로부터 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 검출하는 단계이다. 이 단계에서 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 검출은 노던 블롯(Northern blot), 웨스턴 블롯(western blot), 면역조직화학적 염색(immunohistochemical staining), 인 situ 혼성화 방법(in situ hybridization), 역전사효소 중합반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 실시간 정량적 RT-PCR(real-time quantitative RT-PCR), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0052] 단계 2)는 암전이 가능성을 판정하는 단계로, 단계 1)에서 검출된 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 수준이 전이성 암세포에서 측정된 수준보다 낮은 경우에는 암전이 가능성이 높은 것으로 판정하고, 전이성 암세포에서 측정된 수준보다 높은 경우에 암전이 가능성이 낮은 것으로 판정한다. 또한, 본 발명은 상기 선별 방법을 이용하여 암전이 위험군을 선별하기 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명은 또한 맘마글로빈 단백질을 표적으로 하여 암전이 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명에 따른 스크리닝 방법은
- [0055] 1) 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및
- [0056] 2) 시험물질 처리 전과 후의 세포 내 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 분석하여 이를 증가시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함한다.
- [0057] 단계 1)에서 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포는 맘마글로빈 단백질을 발현하도록 형질전환된 세포나 암환자의 종양조직 또는 혈액, 림프액 등의 체액으로부터 박리된 암세포일 수 있다. 상기 세포에 암전이 억제제인지 여부를 확인하고자 하는 시험물질을 처리한다.
- [0058] 본 발명에서의 용어 "시험물질"은 맘마글로빈의 발현수준을 증가시킬 수 있는 물질로, 올리고 뉴클레오타이드, 단백질, 화합물등을 제한없이 포함한다.
- [0059] 단계 2)에서 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준은 노던 블롯, 웨스턴 블롯, 면역조직화학적 염색, 인 situ 혼성화 방법, 역전사효소 중합반응(RT-PCR), 실시간 정량적 RT-PCR, ELISA 등의 방법을 이용하여 검출한다. 검출된 발현수준을 시험물질 처리 전과 비교하여 처리 전에 비해 맘마글로빈 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 현저히 증가시킨 시험물질을 암전이 억제제로 선별한다.

발명의 효과

- [0060] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 맘마글로빈 발현수준의 증가를 통해 암세포의 이동 및 침습을 억제함으로써 암전이를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인한다. 따라서, 본 발명의 맘마글로빈은 암전이 억제를 위한 표적분자로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 유방암 세포에서 hMAM의 발현 수준을 측정한 도면이다. 구체적으로 (A) 도 1의 A는 종양 형성 능력이 없는 정상 세포주 MCF-10A, 비침습성 세포주 MCF-7 및 ZR75-1, 침습성 세포주 MDA-MB-231 및 Hs-578T에서 hMAM mRNA 발현 수준을 확인한 도면으로, 각기 다른 발현 수준을 가지는 것을 확인하였다. GAPDH 발현 수준으로 보정한 각 세포주의 hMAM mRNA 발현 수준을 비교한 도면이다. 오른쪽 화살표는 BK_{Ca} 밴드의 예상되는 위치를 가리키

며, PCR 반응물의 서열을 분석하였다. (B) 도 1의 B는 유방암 환자 혈청에서의 hMAM의 발현 수준을 측정한 대표적인 도면이다. 도면에서 확인할 수 있듯이, 양성 환자 시료에서는 MAM의 발현이 측정되지 않았으나 유방암 환자 시료에서는 MAM의 발현이 확인되었다. GAPDH는 양성 환자 시료를 포함하여 모든 시료에서 발현되는 것을 확인하였다. 시료들은 전체 시료에서 무작위적으로 선택하여 측정한 것이며, 총 82개의 환자 시료 중에서 40개에서의 hMAM을 측정하였다. (C) 도 1의 C는 ZR75-1 세포주에서의 hMAM 단백질의 발현을 확인한 도면이다. 구체적으로는 ZR75-1, MCF-7 과 MDA-MB-231 세포에서 hMAM 단백질 발현을 측정하였다. 총 단백질 동일량(30 μ g)을 각 레인마다 로딩하여 측정하였으며, 단백질 분자량은 블랏의 오른쪽에 표시하였다. (D) 도 1의 D는 ZR75-1 세포주에서 hMAM 단백질의 면역조직화학적 분석 결과이다. 형광 이미지에서는 MAM-특이적 항체 및 FITC-접합 항-토끼 IgG 항체로 표지하였으며, 핵을 DAPI로 염색하였다. 음성 대조군(negative control, NC)으로 1차 항체의 발광여부를 확인한 결과, 음성 대조군에서는 오직 DAPI 염색만 관찰되고(청색), 녹색 형광신호는 전혀 발현되지 않았다. 스케일 바는 20 μ m을 나타내고, MCF-10A 및 비침습성 세포와 침습성 세포를 비교한 결과 유의미한 차이를 확인하였다($p < 0.05$).

도 2는 인간 유방암세포의 이동 및 침습에 있어서 hMAM의 역할에 대한 것이다. (A) 도 2의 A는 MDA-MB-231 세포에서 hMAM의 과발현과 녹-다운한 결과를 확인한 도면이다. 구체적으로, MDA-MB-231 세포를 pcDNA, MAM/pcDNA, 스크램블 siRNA 및 hMAM siRNA로 형질전환한 후, 전체 RNA를 추출하여 세미-정량 PCR로 분석한 결과를 나타낸 도면이다. (B) 도 2의 B는 hMAM 발현 수준이 MDA-MB-231의 세포 생존 능력에 미치는 영향을 확인한 도면이다. 구체적으로, MDA-MB-231 세포를 pcDNA, MAM/pcDNA, 스크램블 siRNA 및 hMAM siRNA로 형질전환한 후, 2일 뒤에 MTT 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다. (C) 도 2의 C 및 E는 MDA-MB-231 세포(C) 또는 Hs-578T 세포(E)에서 hMAM의 과발현과 녹-다운한 결과, 세포 이동성을 확인한 도면이다. 구체적으로, 3-D 이동 분석에 의한 이동 세포의 대표적 형광 이미지 및 계측 결과이다. 세포를 배양 삽입체에 접종하여 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 맨 아래 표면에서 이동 세포는 1 % 메틸렌 블루로 염색하였다. (D) 도 2의 D 및 F는 MDA-MB-231 세포(D) 또는 Hs-578T 세포(F)에서 hMAM의 과발현과 녹-다운한 결과, 침습성을 확인한 도면이다. 구체적으로, 세포(1.5 x 10⁴ cells/well)를 트랜스웰 배양 삽입체에 접종하여 37℃에서 36시간 동안 배양하였다. 멤브레인 맨 아래쪽에 침습한 세포를 염색하였다. 상기 실험에서 전체 이동 또는 침입 세포는 처음 세포를 심었을 때 개수와 비교하여 계산하여 추정하였다(이동 또는 침입 세포수/처음 접종 세포수). 그 추정된 값은 해당하는 대조군에 의해 보정하여 결과를 이동 또는 침입 %로 표시하였다. 각각의 막대는 5회의 독립적인 실험의 평균±SD를 나타낸다. 스케일 막대는 100 μ m를 의미한다. 각각 상응하는 대조군(pcDNA 또는 스크램블 siRNA)과의 유의미한 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

도 3은 MDA-MB-231 세포에서 hMAM의 수준 변화에 의한 비멘틴과 E-cadherin의 발현 수준 변화를 측정한 도면이다. (A) 도 3의 A는 RT-PCR 실험을 통하여, hMAM 과발현 세포에서 E-cadherin 수준이 증가하고 비멘틴 수준은 낮아지는 것을 보여준다. RT-PCR은 형질전환 후 36시간이 지나고 수행하였으며, 공벡터(pcDNA)로 형질전환한 대조군과 MAM/pcDNA로 형질전환한 세포의 mRNA 발현 수준을 비교하였다. 상기 E-cadherin과 비멘틴은 각각 상피세포와 중간엽 세포의 마커로 사용하였다. (B) 도 3의 B는 상기 도 3의 A 결과를 농도계(Densitometric analysis) 분석한 결과이다. 즉, E-cadherin과 비멘틴의 발현은 hMAM에 의하여 변한다. 막대 그래프는 GAPDH의 발현 수준으로 보정한 E-cadherin과 비멘틴의 mRNA 발현 수준을 보여준다. 각각의 막대는 3회의 독립적인 실험의 평균±SD를 나타낸다. 대조군(pcDNA)과의 유의미한 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0063] 전체 실험은 경상대학교 윤리 위원회의 승인 하에 행하여졌다. 이 실험에 사용된 인간 샘플은 임상 실험 심사 위원회의 프로토콜대로 진행되었다(GNUHIRB-2010-012). 아울러, 별도로 언급하지 않는 한 모든 화합물은 시그마에서 구매하였다.

[0064] **실시예 1 : 유방암 환자의 혈청에 대한 역전사 효소-중합효소연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)**

[0065] 유방암(n=82) 또는 양성 유방암(n=16) 환자로부터 얻은 말초혈액 시료에 대하여 역전사 효소 - 중합효소연쇄반

응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 수행하였다. 유방암 또는 양성 유방암을 가진 환자의 병력과 임상학적 특징, 말초혈액 시료의 혈장 분리와 RT-PCR의 방법은 이전 논문(Lee GW, et al., 'Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer', Genet Mol Res., 11(4): 4034-42)에 개시되어 있는 바와 같다.

구체적으로는, 경상 국립 대학교 병원 중앙센터의 98명 유방암 환자에 대하여 2007년부터 2010년까지 연구를 진행하였으며, 환자의 나이는 26세에서 82세였고 중간값은 50세였다. 유방암 및 병기의 진단 및 1차 암의 병리학 적 특징은 American Joint Commission on Cancer에서 정한 분류를 통해 정의하였다. 환자 중에서 74명은 침습 적 도관암을 가지고 있었고, 3명은 침습적 점액암을 가지고 있었고, 5명은 다른 종류의 침습성 암을 가지고 있었다. 반면 나머지 16명은 양성 유방암을 가지고 있었다. 이러한 환자의 특징을 정리하면 하기 표 1과 같다.

표 1

Variable	Number	hMAM mRNA [Positive (%)]	P
Histologic grade			
1	23	3 (13.0)	<0.001
2-3	59	37 (62.7)	
Nuclear grade			
1	25	4 (16.0)	<0.001
2-3	57	36 (63.2)	
Nodal metastasis			
No	42	10 (23.8)	<0.001
Yes	40	30 (75.0)	
Stage			
I+II	47	11 (23.4)	<0.001
III+IV	35	29 (82.9)	
Estrogen receptor			
Negative	25	17 (68.0)	0.030
Positive	57	23 (40.4)	
Progesterone receptor			
Negative	20	14 (70.0)	0.040
Positive	62	26 (41.9)	
c-erbB2			
Negative	65	31 (47.7)	0.788
Positive	17	9 (52.9)	

상기와 같은 환자군으로부터 수득한 말초혈액 시료에서 전 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다.

한편, 상기 수득한 말초혈액 시료에 존재하는 인간 맘마글로빈(human mammaglobin, hMAM)과 상피세포로부터 중간엽세포로의 변이(epithelial-mesenchymal transition : EMT) 마커인 E-cadherin, Keratin14, Vimentin의 발현량을 확인하기 위하여 RT-PCR를 수행하였다. 이에 사용한 프라이머는 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

Gene Name	Primer sequences (5'-3')	GenBank Accession number	Expected size (bp)
Mamma-globin	Forward: GCTGCCCTTATTGGAGAAT Reverse: TGGCATTGTAGTGGCATTG	NM_002411	114
GAPDH	Forward: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC Reverse: GAAGATGGTGTATGGGATTG	NM_002046	225
E-cadherin	Forward: TGGTAATGTGGCTCCCAAGA Reverse: CAAAGCCAATGGTGGAGATG	NM_004360	318
Keratin 14	Forward: CTAAAGGGCATCCTGGGC Reverse: TTACTCCTTGGAGGCCATG	NM_000526	462
Vimentin	Forward: CGTGTGCACCTTCACCTACC Reverse: GACACGAAACCGATGAGCAC	NM_003380	460
GAPDH	Forward: CAGAACGTGCGTACCCTGTC Reverse: TCAGAGGGATACCCAGCACA	M33197	145

[0070]

[0071]

상기 표 2의 프라이머와 상기 환자군에서 수득한 cDNA를 이용하여, RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 조건은: 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초의 증폭과정을 40주기 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 5분간 신장과정을 수행하였다. 이를, 2.5 % 아가로스 겔에 전기영동하여 각 유전자의 발현량을 측정하였다.

[0072]

실시예 2 : 세포 배양

[0073]

인간 유방암 세포주 Hs-578T, MCF-7, MDA-MB231 및 ZR75-1은 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 정상 유방상피 세포 MCF-10A는 덕성 여자대학교의 문애리 교수(Prof. Mun Aeri)으로부터 분양받았다. MCF-10A, MDA-MB231, Hs-578T는 5% 소태아혈청(fetal bovine serum : FBS)과 항생제(100 U/ml 페니실린/ 100 µg/ml 스트렙토마이신 : Pen-Strep)가 들어간 DMEM에서 배양했다. MCF-7, ZR75-1은 5% FBS와 Pen-Step이 첨가된 RPMI 1640 에서 배양했다. 세포들은 95% 공기 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 2일에 한 번씩 교체해주었다.

[0074]

실시예 3 : 형질전환(Transfection)

[0075]

인간 맘마글로빈 유전자(secretoglobin family 2A, member 2, SCGB2A2; GenBank accession number NM_002411)를 클로닝한 후 pcDNA 3.1 벡터에 서브클로닝하여 재조합 발현벡터 hMAM/pcDNA3.1를 제조하였다. 세포는 형질전환 48시간 전에 24웰 배양접시에 5 x 10⁴의 세포농도로 접종하여 5% FBS를 포함하는 배양액으로 배양하였다. 이에 마그네토펙션(MagnetofectionTM system)을 이용하여 제조사의 설명에 따라 hMAM/pcDNA3.1를 세포로 주입하는 형질전환을 수행하였다. 구체적으로는 폴리MAG(Chemicell GmbH, Berlin, Germany) 1µl에 1µg의 DNA를 혼합하여 실온에서 20분간 배양하였다. 500 µl의 무혈청 배지가 포함된 각 웰에 상기 혼합물을 첨가하였다. 웰 플레이트를 실온에서 20분간 마그네토펙터 플레이트 24 (MagnetofACTOR plate 24 device) 장치에 넣어둔 후, 새로운 배지로 교체하고, 37℃, 95% 공기 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 형질전환시킨 유전자의 발현은 이들 후에 관찰하였다.

[0076] **실시예 3 : 세포생존능 분석**

[0077] 세포 생존능은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약을 사용하여 비색법으로 확인하였다. 세포 생존능 분석은 기존에 사용된 방식대로 수행하였으며, 이는 구체적으로 다음과 같다.

[0078] 대수증식기의 세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 밀도로 접종한 후, 세포에 화학물질을 처리하고 24시간 후 0.05 mg/ml의 MTT 용액 10 μ l를 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 흡입하여 제거하고 각 웰 내 포르마잔 결정을 37℃에서 30분간 100 μ l의 DMSO에 용해시켰다. 각 웰의 흡광도 값을 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다.

[0079] **실시예 4 : 유방암 세포에서의 역전사-중합효소(RT-PCR) 분석**

[0080] 올리고 dT(SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 유방암 세포의 전체 RNA로부터 첫 번째-가닥 cDNA를 합성하였다. 첫 번째-가닥 cDNA를 PCR 증폭의 주형으로 사용하고, 각 유전자에 특이적인 프라이머와 Taq 중합효소(Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은: 94℃에서 4분간 초기 변성과정을 거쳐, 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 60초의 증폭과정을 27 내지 30주기 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 10분간 신장과정을 수행하였다. 이렇게 RT-PCR로 얻은 DNA 단편을 ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(Applied Biosystems, CA, USA)을 이용해 분석하였다. 발현수준은 GAPDH 발현 수준을 기준으로 정량화하였다. PCR 산물은 1.2 %(w/v) 아가로스 겔에서 전기 영동하여 산물의 크기를 확인하였다.

[0081] **실시예 5 : 웨스턴 블랏팅 분석**

[0082] 본 실험에 사용된 유방암 세포주들을 50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM 다이티오프레이트 (DTT), 0.5% NP-40, 1% 트리톤 X-100, 1% 테옥시콜레이트, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 μ M 류페틴, 1 μ M 캡스타틴 A, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF) 및 0.1 μ M 아프로티닌을 함유하는 단백질 추출용액(PRO-PREP™, iNtRON Biotechnology Inc, Seongnam, Korea)을 이용하여 균질화시켰다. 이어서 균질화 혼합물을 간헐적인 볼텍스 과정을 병행하여 얼음 상에 60분간 인큐베이션하였다. 수득된 추출물을 4℃에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리(16,609Xg, Micro 17TR, Hanil, Korea)하여 분획하였다.

[0083] 이렇게 얻은 상층액의 단백질을 12% SDS-폴리아크릴 아마이드겔을 사용하여 분리시킨 후 세미-드라이 트랜스퍼(Bio-Rad, CA, SUA)를 통해 PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인으로 이동시켰다. 이 멤브레인을 5% 탈지분유를 이용해 블라킹한 후, hMAM 단일클론 항체(1:1000 희석) 및 α -튜불린 단일클론 항체(1:10000 희석)와 인큐베이션하였다. 이어서 퍼옥시다아제-연결 항-토끼 또는 항-마우스 이차 항체(1:10000 희석)와 인큐베이션하였다. 면역-양성 밴드를 ECL 키트(ECL Plus kit, ELPIS, 대전, 한국)를 사용하여 관찰하였다. 상기 사용한 마우스 IgG로부터 수득한 항-hMAM 항체 및 인간, 원숭이, 마우스 및 토끼 유래의 mamaglobin은 ZETA 회사에서 구입하여 사용하였다.

[0084] **실시예 6 : 면역세포화학 (Immunocytochemistry)**

[0085] ZR75-1 세포는 폴리-L-라이신으로 코팅된 둥근 커버슬라이드에서 배양하고 4% 파라포름알데하이드가 들어간 0.1 M 인산염 완충 식염수(phosphate buffer saline: PBS)로 30분간 고정시켰다. 이어서 샘플을 세척하고, 1% 정상염소 혈청 및 0.1% 트리톤 X-100이 함유된 차단용액 중에서 가볍게 흔들어 주면서 2시간 동안 배양하였다. 세포는 hMAM 단백질에 대하여 결합친화적 방법으로 정제된 다중클론 항체를 1 : 400으로 희석한 PBS로 4 ℃에서 하룻밤 배양하였다. 그 후, PBS로 3회 세척 후 세포를 PBS로 1:400으로 희석된 FITC-접합 항-토끼 IgG 이차항체

(1:400)와 어두운 곳에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 이 세포에 4',6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 처리하여 핵을 염색하였다. 염색된 세포는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(confocal laser-scanning microscope)을 사용하여 젖은 상태로 장착하여 관찰하였다.

실시예 7 : 이동성 분석 (Migration assay)

트랜스 웰 (3-D) 이동성 분석은 폴리카르보네이트 멤브레인(pore size = 8 μ m)을 포함하고 CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 간단하게 설명하면, 무혈청 배지에 1X10⁵ 세포/ml 농도의 세포 부유물 300 μ l를 각 삽입체의 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버는 10% FBS가 함유된 배지를 포함하고 있어 트랜스 웰 배양 삽입체의 하부 표면으로의 세포이동을 가능케 하였다. 세포는 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션시켰다. 트랜스 웰 배양 삽입체의 내부면에서 이동되지 않은 세포를 면봉으로 훑어서 제거하였다. 바닥면으로 이동된 세포를 세포-염색 용액 (1% 메틸렌블루)으로 10분간 염색하였다. 현미경을 이용하여 각각 다섯장씩 현미경 사진을 얻고 이동된 세포의 평균 개수를 계수하였다. 염색된 삽입체를 세척하고, 추출용액(트리톤 X-100)으로 용해시켜서 10분간 인큐베이션시켰다. 각 샘플들을 96웰 마이크로타이트 플레이트(microtiter plate)로 옮겨서 560 nm 흡광도에서 플레이트판독기(Infinite F200, Tecan, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

실시예 8 : 침습 분석 (Invasion assay)

세포의 침습성은 제조사의 지시에 따라 QCM™ 24웰 세포침입 분석(QCM™ 24-well cell invasion assay)을 이용하여 테스트하였다. 구체적으로, 침습성 분석은 조직배양 웰내에 놓여진 세포배양 삽입체로 구성된 침습 챔버를 이용하였다. 이 삽입체는 ECMatrix™ 층으로 코팅된 8 μ m 기공 크기의 폴리카보나이트 멤브레인을 갖는다. 무혈청 배지에 2.3 x 10⁵ 세포/ml 밀도로 부유된 세포를 배양 삽입체에 접종하였다. 36시간 동안 세포가 기저막층으로 침습하게 놔두었다. 막을 통해 침습된 세포를 세포-염색 용액(1% 메틸렌 블루)으로 염색하고, 막의 상부 표면에서 비-침습성 세포를 닦아내어 제거한 후 현미경으로 관찰하였다.

실시예 9 : siRNA를 이용한 유전자 사일런싱

세포를 DharmaFECT 3 형질감염 시약을 사용하여, 무혈청 배양액에서 100 nM의 ON-TARGET Non-targeting Pool(Thermo Pflugers Archiv-European Journal of Scientific Dharmacon, Lafayette, CO, USA)로 형질감염시켰다. hMAM의 표적 서열은 GACAGCAGUCUUGUGAUU(서열번호 15), CUACAAUGCCAUAGAUGA(서열번호 16), GACAAUCAUCCACAAGUG(서열번호 17) 및 GAAACUCUGAGCAAUGUUG(서열번호 18)이다. 6시간 인큐베이션 후, 세포를 새로운 배지로 갈아주고 추가로 1일간 성장시켰다. 유전자 사일런싱의 효과를 RT-PCR로 확인하였다. 100 nM의 siRNA로 형질감염된 세포에서 hMAM mRNA가 형질감염 2일 후 약 80%까지 감소되었음을 알 수 있다.

실시예 10 : 데이터 분석 및 통계

mRNA와 단백질의 상대적인 수준은 각각 GAPDH와 α -튜불린을 기준으로 보정하여 측정하였다. 발광 이미지 분석 기인 LAS-4000 (Fujifilm corp, Tokyo, Japan)로 아가로스 겔 및 웨스턴 블롯의 이미지를 포착하였다. RT-PCR로부터 입수된 밴드를 Sigma Gel image analysis software (version 1.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA)를 이용하여 정량하였다.

서로 다른 그룹은 터키 테스트(Tukey's test, SPSS18 software)를 이용하여 post-hoc 비교를 통해 one-way

ANOVA 테스트로 분석하였다. $p < 0.05$ 를 유의미한 값으로 정하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SD를 사용하였다.

[0095]

실험예 1 : 유방암 세포에서 hMAM의 발현과 국지성

[0096]

정상 유방 상피세포 MCF-7 세포와 인간 유방암 세포에서의 mamaglobin의 mRNA 발현 수준을 비교하였다. 추가적으로 유방암 세포주들인 ZR75-1, MCF-7, MDA-MB231 및 Hs-578T에서 세미-정량 RT-PCR로 mamaglobin의 발현 수준을 비교하였다.

[0097]

도 1의 A에서 확인할 수 있듯이, 세미-정량 RT-PCR 데이터는 암세포주에서 MCF-10A 세포보다 mamaglobin의 mRNA 발현 수준이 유의미하게 높다는 것을 보여준다($n=5$, $p<0.05$). 암세포주에서 볼 수 있는 상기 발현과 같이, mamaglobin mRNA는 양성 환자의 혈장보다 유방암 환자에서 과발현되어 있었다(도 1의 B). 양성 환자의 혈장에서는 MAM의 발현이 관찰되지 않은데 비하여, 약 50 %의 유방암 환자에서 MAM이 과발현되어 있었다. 이러한 결과는 본 발명자들이 기존 논문(Lee GW, et al., 'Plasma human mamaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer', Genet Mol Res., 11(4): 4034-42)에서 확인한 결과와 유사하다.

[0098]

암 세포 중에서, ZR75-1와 MCF-7 세포(에스트로겐 수용체(ER)-양성 비침습성 세포)에서 인간 mamaglobin의 mRNA 발현 수준이 MDA-MB231 및 Hs-578T(에스트로겐 수용체(ER)-음성 침습성 세포)에 비교하여 높은 것을 확인한 반면, hMAM 단백질은 오직 ZR75-1 세포주에서 발견이 되고, MCF-7 및 MDA-MB231에서는 전혀 측정이 되지 않았다(도 1의 C, 오른쪽 블랏).

[0099]

한편, mamaglobin에 대한 항-MAM 항체의 특이성은 ZR75-1 세포주에서 인간 mamaglobin 과발현이나 사일런싱을 통하여 확인하였다(도 1의 C, 왼쪽 블랏). 또한, 인간 mamaglobin은 ZR75-1 세포의 perinucleus, 세포질 및 세포막에 제한적으로 존재하였다(도 1의 D-국지성).

[0100]

실험예 2: 유방암 세포의 세포 이동과 침습에서의 hMAM 역할

[0101]

인간 mamaglobin 플라스미드 DNA와 siRNA의 효과를 조사하기 위해서, MDA-MB-231 세포를 공벡터(pcDNA3.1, pcDNA), pcDNA3.1에 hMAM을 삽입한 hMAM/pcDNA 벡터, 스크램블 siRNA(scrambled siRNA) 및 MAM siRNA로 형질전환시켰다. 형질전환 2일 뒤에 mRNA의 발현량을 세미-정량 PCR을 통하여 분석하였다.

[0102]

MAM mRNA의 발현 수준은 MAM 과발현시킨 세포에서 증가하였고, MAM siRNA로 형질전환한 세포에서는 감소하였다(도 2의 A).

[0103]

한편, pcDNA, MAM/pcDNA, 스크램블 siRNA 및 MAM siRNA로 형질전환된 MDA-MB-231 세포에서 MTT, 세포 이동 및 침습 분석으로 hMAM이 세포의 증식과 이동에 연관되는지를 확인하였다. MAM 과발현 세포는 pcDNA 과발현 세포보다 생존능력이 낮은 것을 볼 수 있다($p<0.05$, $n=3$). 그러나 세포에서의 hMAM의 녹-다운(Knock-down)은 세포 생존 능력에서 유의미한 변화를 가져오지는 않았다(도 2의 B).

[0104]

세포 이동능력은 매우 잘 알려져 있는 특징 중의 하나이다. 이에 본 발명에서는 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포 사이의 mamaglobin 발현수준의 차이가 이러한 세포의 특성을 조정하는지 여부를 조사하기 위해 하기 실험을 진행하였다.

[0105]

hMAM의 발현이 MDA-MB-231 세포의 이동능력에 미치는 영향을 3-D 이동과 침습 분석을 통해 확인하였다. pcDNA, MAM/pcDNA, 스크램블 siRNA 및 MAM siRNA를 MDA-MB-231 세포에 일시적으로 형질전환시켰다. 그 결과, MDA-MB-231 세포에서 MAM의 과발현에 의해 세포이동이 감소한 반면, MAM siRNA가 형질감염된 세포에서는 세포 이동이 증가하는 것을 확인하였다. 구체적으로, MAM 과발현은 MDA-MB-231 세포의 이동을 41.6 ± 14.5 % 정도 감소시킨 반면, MAM siRNA는 세포이동을 41.0 ± 14.5 % 증가시켰다(도 2의 C, $n = 5$). MDA-MB-231 세포의 침습성은 MAM의 과발현에 의해 51.5 ± 19.3 % 감소된 반면, MAM의 녹-다운에 의해 약 4배 증가됨을 확인하였다($n = 3$, 도 2의 D). Hs578T 세포에서 MAM 발현 수준에 의한 이동과 침입 능력은 MDA-MB-231 세포와 비슷하였다($n = 3$, 도 2의 E 및 F).

[0106] 이 결과는 MDA-MB-231 세포의 이동과 침입은 hMAM의 발현 수준에 의하여 조절된다는 것을 입증하였다.

[0107] **실험예 3: MAM 과발현이 상피세포의 중간엽 세포로의 전환에 미치는 영향**

[0108] MAM의 수준이 침습성 암세포의 증식과 이동을 조절하는지 여부를 조사하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0109] MDA-MB-231과 Hs-578T 세포는 침습성 암세포로써 상피세포의 중간엽 세포로의 전환(EMT)의 특성을 보인다. EMT는 상피성 암세포에서 공격성, 침습성에 관련되며 잠재적으로 전이와 연관된다. hMAM 과발현에 의해 EMT의 억제를 통한 이동과 침입이 감소하는지를 확인하기 위하여 MAM 과발현시킨 MDA-MB-231 세포에서 세미-정량 PCR을 실시하고 EMT 마커의 발현의 변화를 분석했다.

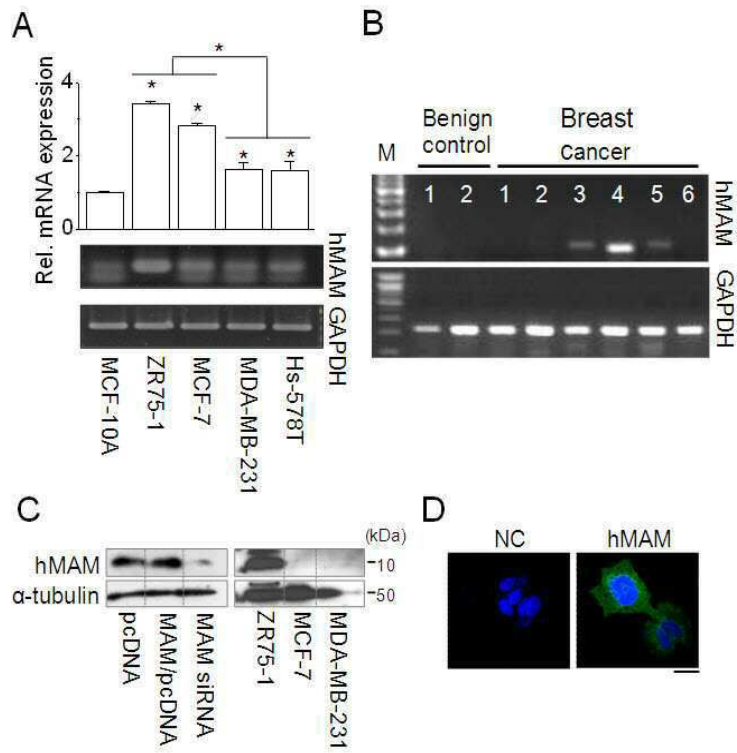
[0110] 상기 RT-PCR 실험을 통하여 비멘틴(EMT 마커)이 감소하는 것과 E-cadherin(상피성 마커의 특징)이 증가하는 것을 확인하였다(도 3). 구체적으로 MAM을 과발현시킨 경우에는 대조군(pcDNA 공벡터 형질전환 세포)에 비해서 E-cadherin 발현이 약 2.1배까지 증가하였으나, 비멘틴 발현은 약 $60 \pm 7\%$ 감소하는 것을 확인하였다. 케라틴(Keratin)은 Hs-578 세포에서 MAM의 과발현에 의해 아주 높이 증가하였다. MDA-MB-231 세포에서는 케라틴의 mRNA가 보이지 않았고 비멘틴 발현에 비해 E-cadherin의 발현이 낮은 것을 확인하였다.

[0111] 이와 같은 결과는, 본 발명의 맘마글로빈이 암세포의 이동 및 침습성을 감소시킬 수 있음을 확인한 것으로, 맘마글로빈이 암전이 억제제로 사용될 수 있음을 확인한 것이다.

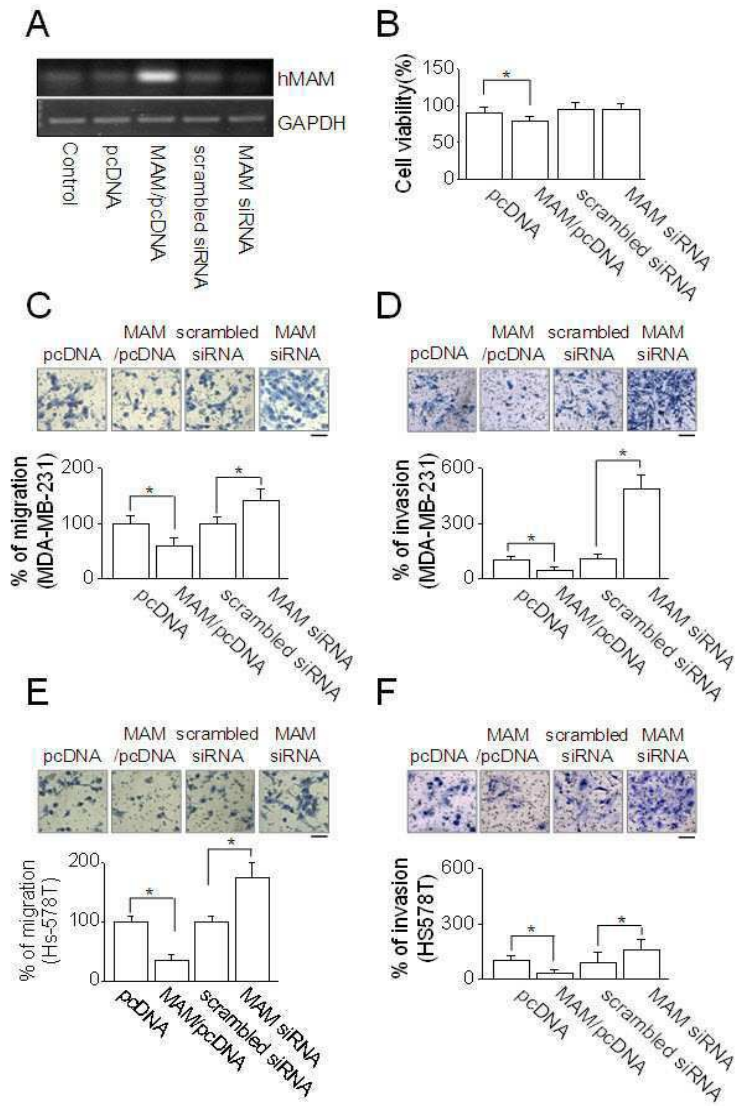
[0112] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

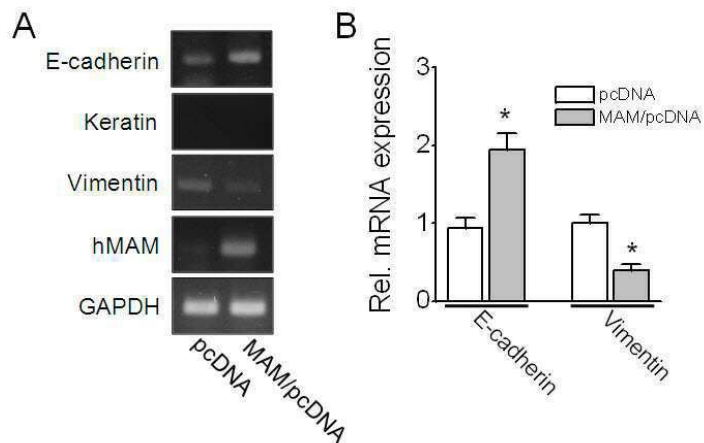
도면1



도면2



도면3



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> A composition comprising mammaglobin for suppressing cancer
 metastasis
 <130> PA131131KR
 <160> 18
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> hMAM amino acid
 <400> 1

Met Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys
 1 5 10 15
 Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr
 20 25 30
 Ile Asn Pro Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu
 35 40 45
 Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu
 50 55 60
 Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe
 85 90

<210> 2
 <211> 517
 <212> DNA
 <213> hMAM nucleotide
 <400> 2
 tccacagcgg cttccttgat ccttgccacc cgcgactgaa caccgacagc agcagcctca 60
 ccatgaagtt gctgatggtc ctcatgctgg cggccctctc ccagcactgc tacgcaggct 120
 ctggctgccc cttattggag aatgtgattt ccaagacaat caatccacaa gtgtctaaga 180
 ctgaatacaa agaacttctt caagagttca tagacgacaa tgccactaca aatgccatag 240
 atgaattgaa ggaatgtttt ctaaaccaaa cggatgaaac tctgagcaat gttgaggtgt 300

ttatgcaatt aatatatgac agcagtcctt gtgatttatt ttaactttct gcaagacctt	360
tggtcacag aactgcaggg tatggtgaga aaccaactac ggattgctgc aaaccacacc	420
ttctctttct tatgtctttt tactacaaac tacaagacaa ttgttgaaac ctgctatata	480
tgtttatttt aataaattga tggcaaaaaa aaaaaaa	517
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hMAM forward primer	
<400> 3	
gctgcccctt attggagaat	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
><223> hMAM reverse primer	
<400> 4	
tggcatttgt agtggcattg	20
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH forward primer	
<400> 5	
gaaggtgaag gtcggagtc	19
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH Reverse primer	
<400> 6	
gaagatggtg atgggattc	19

<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	E-cadherin forward primer	
<400>	7	
	tggtaatgtg gctccaaga	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	E-cadherin Reverse primer	
<400>	8	
	caaagccaat ggtggagatg	20
<210>	9	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Keratin 14 forward primer	
<400>	9	
	ctaaagggca tcctgggc	18
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Keratin 14 Reverse primer	
<400>	10	
	ttactccttg gaggccatg	19
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Vimentin forward primer	
<400>	11	

cgtgtgcacc ttcacctacc	20
<210>	
12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Vimentin Reverse primer	
<400> 12	
gacacgaaac cgatgagcac	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH forward primer	
<400> 13	
cagaacgtgc gtaccctgtc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH Reverse primer	
<400> 14	
tcagagggat acccagcaca	20
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hMAM target sequence	
<400> 15	
gacagcaguc uuugugauu	19
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> hMAM target sequence

<400> 16

cuacaaaugc cauagauga

19

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAM target sequence

<400> 17

gacaaucaau ccacaagug

19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAM target sequence

<400> 18

gaaacucuga gcaauguug

19