



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0046787
(43) 공개일자 2015년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)	(71) 출원인
<i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)	고쿠리츠다이가쿠호진 니이가타 다이가쿠
<i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>C12N 5/00</i> (2006.01)	일본 니이가타현 니이가타시 니시쿠 이카라시 니
<i>C12N 5/0783</i> (2010.01)	노쵸 8050
(52) CPC특허분류	오츠카 세이야쿠 가부시키가이샤
<i>G01N 33/57484</i> (2013.01)	일본 도쿄도 지요다쿠 간다즈카사마치 2-9
<i>A61K 39/0011</i> (2013.01)	(72) 발명자
(21) 출원번호 10-2015-7008399	가가무, 히로시
(22) 출원일자(국제) 2013년09월03일	일본 9518585 니이가타케 니이가타시 주오쿠 아사
심사청구일자 없음	히마치도리 1-757 니이가타 유니버서티 내
(85) 번역문제출일자 2015년04월01일	나리타, 이치에이
(86) 국제출원번호 PCT/JP2013/074172	일본 9518585 니이가타케 니이가타시 주오쿠 아사
(87) 국제공개번호 WO 2014/038682	히마치도리 1-757 니이가타 유니버서티 내
국제공개일자 2014년03월13일	(뒷면에 계속)
(30) 우선권주장	(74) 대리인
JP-P-2012-193757 2012년09월04일 일본(JP)	장수길, 이석재

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 암 출기세포에서 발현하는 분자를 타깃으로 하는 암 진단 및 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 새로운, 암의 악성도 판정 방법, 암의 진단 방법 및 예후 판정 방법, 암 치료제 및 암 전이 억제제 백신을 제공하는 것을 과제로 한다.

암의 악성도 평가 방법이며, 암 조직 중의 DDX3X 발현량을 측정하는 단계; 및 당해 DDX3X 발현량에 기초하여 당해 암 조직의 악성도를 평가하는 단계를 포함하는 방법.

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12Y 306/04013 (2013.01)
C12N 2501/73 (2013.01)
G01N 2800/00 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

고토, 요시히로

일본 5400021 오사카후 오사카시 주오쿠 오테도리
3-2-27 오츠카 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드 내

하야시, 다카시

일본 5400021 오사카후 오사카시 주오쿠 오테도리
3-2-27 오츠카 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

암의 악성도 평가 방법이며,
암 조직 중의 DDX3X 발현량을 측정하는 단계; 및
당해 DDX3X 발현량에 기초하여 당해 암 조직의 악성도를 평가하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 2

DDX3X에 대한 항체, 또는 DDX3X의 mRNA 또는 그에 대응하는 cDNA에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 함
유하며,
당해 항체 또는 당해 폴리뉴클레오티드가 암 조직 중의 DDX3X 발현량의 측정을 위해 사용되는
암 악성도 평가용 키트.

청구항 3

암의 예후 평가 방법이며,
암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포를 검출하는 단계; 및
당해 검출 결과에 기초하여 암의 예후를 평가하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 4

DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 함유하며,
당해 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드가 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포의 검출을 위해 사용되는
암 예후 평가용 키트.

청구항 5

서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서, 서열 번호 2 내지 87 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 함
유하는 연속한 9 내지 20개의 아미노산 서열, 또는
그와 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 웨티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 암 항원 웨티드인 웨티드.

청구항 7

제5항에 따른 웨티드를 함유하는 암 백신.

청구항 8

제7항에 있어서, 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제용인 암 백신.

청구항 9

항원 제시능을 갖는 세포를 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드로 펄스하는 단계를 포함하는, 양자 면역용 세포의 제
조 방법.

청구항 10

DDX3X 또는 그의 부분 웨티드로 펠스된 항원 제시 세포.

청구항 11

제10항에 따른 항원 제시 세포를 유효 성분으로서 포함하는 DDX3X 특이적 T세포의 유도제.

청구항 12

항원 제시능을 갖는 세포를 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드에 폭로하여 당해 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드에서 유래되는 항원을 제시하는 세포를 얻는 단계; 및

당해 항원 제시 세포를 사용하여 DDX3X 특이적 T세포를 유도하는 단계

를 포함하는, 양자 면역용 세포 조성물의 제조 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 DDX3X 특이적 T세포가 DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포인 제조 방법.

청구항 14

암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제에서의 사용을 위한 DDX3X의 발현 또는 활성을 저해하는 화합물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 암 줄기세포에서 발현하는 분자를 타깃으로 하는 암 진단 및 치료 방법, 특히 암의 악성도 판정 방법, 암의 예후 평가 방법, 암 항원 웨티드, 양자 면역용 세포 조성물의 제조 방법, 및 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대부분의 고형 암성 종양은 불균일한 종양 세포로 구성되고, 비교적 소수의 세포군이, 높은 종양 형성능, 비접착성 세포(sphere) 형성능, 무한한 자기 복제능 및 비대칭성 분화능 등의 유니크한 특성을 나타낸다는 증거가 증가하고 있다. 이 특징적인 세포군은 생물학적, 생화학적 및 분자적 특징이 정상적인 줄기세포와 공통되는 점에서, 암 줄기세포(CSC)라고 한다. 고전적인 CSC 모델에서는 CSC 세포군과 비교적 분화된 대다수를 차지하는 암세포군의 히에라르키는 엄밀하고, 일방향성이라고 여겨졌다. 그러나, 최근 데이터는 CSC와 분화된 암세포가 제어된 밸런스 하에서, 상호 변환할 수 있음을 시사하고 있다(비특허문헌 1).

[0003] 세포 상해성 화학요법과 분자 표적 치료 후에 살아남는 지극히 소수의 암세포가 균일하게 CSC 마커의 하나로 여겨지는 CD133을 발현한 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 2 및 3). CSC는 세포사로부터 벗어나는 복수의 메커니즘을 갖는다. 변이 크로마틴 상태, 다제 배출 트랜스포터, 항 아폽토시스 인자, DNA 수복 유전자 산물 및 줄기세포에 특징적인 생존 시그널 등에 의해, CSC는 세포 상해성 항암제, 분자 표적 치료약, 방사선요법 등에 의해 발생하는 치사적 환경 하에서도 살아남을 수 있다. 이 유니크한 암 집단은 치사적 환경에서 살아남음으로써, 유전자 변이에 의해 영속적인 암세포 내성을 획득하는 암세포의 모세포로서 기능할 수 있다(비특허문헌 2). 따라서, CSC 시스템은 대부분의 치료 실패와 암의 재발을 담당하고 있을 가능성이 높다. CSC의 세포군을 근절하기 위한 효과적인 치료법이 개발되지 않는 한, 지속적인 치유를 달성하기는 매우 곤란하다. 따라서, CSC의 세포군을 근절하기 위한 효과적인 치료법이 요구되고 있다.

선행기술문헌**비특허문헌**

[0004] (비특허문헌 0001) Li Y, Laterra J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? Cancer research. 2012; 72: 576-80.

(비특허문헌 0002) Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-

mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 2010; 141: 69-80.

(비특허문헌 0003) Rappa G, Fodstad O, Lorigo A. The stem cell-associated antigen CD133(Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells.* 2008; 26: 3008-17.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명은 새로운, 암 조직의 악성도 판정 방법, 암의 예후 평가 방법, 암 항원 웹티드, 양자 면역용 세포 조성물의 제조 방법, 및 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제제를 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0006]

본 발명자들은 이전의 연구에서, 종양 소속 림프절 중에서 종양 항원에 의해 프라이밍된 이펙터 T세포가 뇌, 폐, 피부 전이 모델에 있어서, 항종양 치료 활성을 갖고 있는 것을 보고했다(Kagamu H, Shu S. Purification of L-selectin(low) cells promotes the generation of highly potent CD4 antitumor effector T lymphocytes. *J Immunol.* 1998; 160: 3444-52., Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsumoto N, et al. CD 40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4(+) T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. *J Immunol.* 2001; 167: 5678-88). 또한, 최근 들어, 본 발명자들은 CSC 마커의 하나인 CD133에 착안하여, 멜라노마 세포 전체의 1% 미만을 차지하는 CD133 양성 멜라노마의 순화에 성공하였다. 이 CD133 양성 멜라노마는 CSC의 특성을 가졌다. 이 멜라노마 CSC 백신 접종이 특이적인 CD8 양성 T세포 및 타입 17T 헬퍼(Th17) 세포 및 Th1 세포를 유도하는 것을 찾아냈다. 특히, 멜라노마 CSC 특이적 CD4 양성 T세포는 종양 조직에서의 이펙터 T세포와 MHC ClassII를 고발현한 활성형 수상 세포의 장시간 접적을 야기하고, 높은 항종양 효과를 나타냈다. 또한, 멜라노마 CSC 특이적 CD4 양성 T세포를 이용한 마우스에서는 종양 조직 내에서 통상 보이는 제어성 T세포(Treg)의 유도가 인정되지 않았다. 이 치료는 CD133 양성 종양 세포를 근절시켜, 최종적으로는 친수 멜라노마(parental melanomas)를 치유시켰다. 이상의 결과는 CD133 양성 멜라노마 세포가 특이적인 면역원성 항원을 가지며, 그 항원 특이적 T세포는 CSC를 근절함으로써 지금까지 없는 높은 항종양 활성을 가진다는 것을 나타내고 있다.

[0007]

또한, 본 발명자들은 CD133 양성 종양 세포에서 우위로 발현하는 면역원성 단백질을 해명하기 위해서, 이차원 전기영동을 사용하여 단백질 발현을 비교하여 4개의 단백질을 발견하였다. 질량 분석(MS/MS) 데이터에 기초하는 Mascot 연구로부터, 그 하나가 DEAD/H(Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked(DDX3X)라고 동정하였다.

[0008]

이 단백질은 X염색체에 위치하는 ATP 의존적 RNA 헬리카제의 DEAD 박스 패밀리의 단백질(DEAD 박스 헬리카제)이다. DEAD 박스 헬리카제는 RNA 스플라이싱, mRNA의 핵으로부터 세포질에의 반출, 전사 번역 제어, RNA 분해, 리보솜의 구축 등 복수의 기능을 갖고 있다(Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2004; 5: 232-41.). DDX3X는 진화 상에서, 효모로부터 인간까지 보존되고 있고, 세포의 생존에 필수적인 것이 시사되고 있다. DDX3X의 호몰로그에는 Y염색체 위에 위치하는 DDX3Y가 있고, 양자의 유전자는 태아의 발생 과정에서 작용한다. 인간에서는, DDX3X의 결손 또는 기능 부전은 배세포 형성 부전과 관련한다고 여겨지고 있다(Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol.* 2002; 4 Suppl: s41-9).

[0009]

본 발명자들은 본 발명에서, DDX3X가 CD133 양성 멜라노마 세포가 주요한 면역원성 표적 단백질인 것을 발견하였다. 또한, 합성 DDX3X의 백신 접종은 피부 멜라노마 치료 모델에 있어서 종양 퇴행 효과를 나타냈다. 또한, DDX3X는 CSC 마커를 발현하는 인간의 암세포주에서 강하게 발현하지만, 정상 인간 표피세포, 정상 인간 내피세포에서는 조금밖에 발현되지 않았다.

[0010]

이러한 점에서, 본 발명자들은

[0011]

암 조직에서의 DDX3X의 발현량은 암의 악성도 지표가 되는 점;

[0012]

또한, 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포의 유무는 암의 예후를 평가하는 지표가 되는 점;

[0013]

DDX3X의 부분 웹티드(프래그먼트)가 암 백신이 되는 점;

- [0014] 또한, 항 DDX3X 면역요법은 CSC를 근절시켜, 그것에 의해서 암을 치유하는 유망한 방법이 될 수 있는 점
- [0015]에 착상하여, 한층 더 연구한 결과, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0016] 본 발명은 다음 형태를 포함한다.
- [0017] 항 1.
- [0018] 암의 악성도 평가 방법이며,
- [0019] 암 조직 중의 DDX3X 발현량을 측정하는 단계; 및
- [0020] 당해 DDX3X 발현량에 기초하여 당해 암 조직의 악성도를 평가하는 단계
- [0021]를 포함하는 방법.
- [0022] 항 2.
- [0023] DDX3X에 대한 항체, 또는 DDX3X의 mRNA 또는 그에 대응하는 cDNA에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 함유하며,
- [0024] 당해 항체 또는 당해 폴리뉴클레오티드가 암 조직 중의 DDX3X 발현량의 측정을 위해 사용되는
- [0025] 암 악성도 평가용 키트.
- [0026] 항 3.
- [0027] 암의 예후 평가 방법이며,
- [0028] 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포를 검출하는 단계; 및
- [0029] 당해 검출 결과에 기초하여 암의 예후를 평가하는 단계
- [0030]를 포함하는 방법.
- [0031] 항 4.
- [0032] DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 함유하며,
- [0033] 당해 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드가 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포의 검출 위해서 사용되는
- [0034] 암 예후 평가용 키트.
- [0035] 항 5.
- [0036] 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서, 서열 번호 2 내지 87 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 함유하는 연속한 9 내지 20개의 아미노산 서열, 또는
- [0037] 그와 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 웨티드.
- [0038] 항 6.
- [0039] 암 항원 웨티드인 항 5에 기재된 웨티드.
- [0040] 항 7.
- [0041] 항 5에 기재된 웨티드를 함유하는 암 백신.
- [0042] 항 7-2.
- [0043] 암에 대한 백신 접종에서의 사용을 위한 항 5에 기재된 웨티드.
- [0044] 항 8.
- [0045] 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제용인 항 7에 기재된 암 백신.
- [0046] 항 9.
- [0047] 항원 제시능을 갖는 세포를 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드로 펄스하는 단계

- [0048] 를 포함하는, 양자 면역용 세포의 제조 방법.
- [0049] 항 10.
- [0050] DDX3X 또는 그의 부분 웹티드로 펄스된 항원 제시 세포.
- [0051] 항 11.
- [0052] 항 10에 기재된 항원 제시 세포를 유효 성분으로서 포함하는 DDX3X 특이적 T세포의 유도제.
- [0053] 항 11-2.
- [0054] DDX3X 특이적 T세포 유도에서의 사용을 위한 항 10에 기재된 항원 제시 세포.
- [0055] 항 12.
- [0056] 항원 제시능을 갖는 세포를 DDX3X 또는 그의 부분 웹티드에 폭로하여 당해 DDX3X 또는 그의 부분 웹티드에서 유래되는 항원을 제시하는 세포를 얻는 단계; 및
당해 항원 제시 세포를 사용하여 DDX3X 특이적 T세포를 유도하는 단계
- [0058] 를 포함하는, 양자 면역용 세포 조성물의 제조 방법.
- [0059] 항 13.
- [0060] 상기 DDX3X 특이적 T세포가 DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포인 항 12에 기재된 제조 방법.
- [0061] 항 14.
- [0062] DDX3X의 발현 또는 활성을 저해하는 화합물을 함유하는 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제제.
- [0063] 항 14-2.
- [0064] 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제에서의 사용을 위한 DDX3X의 발현 또는 활성을 저해하는 화합물.

발명의 효과

- [0065] 본 발명의 웹티드는 암 항원이며, 이에 의해, 암의 악성도 판정 방법, 암의 예후 평가 방법, 암 항원 웹티드, 양자 면역용 세포 조성물의 제조 방법, 및 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제제 등이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 인간 DDX3X의 아미노산 서열이다.
- 도 2는 CD8 양성 T세포에 의한 IFN γ 의 생산을 나타내는 그래프이다(실시예 1).
- 도 3은 CD4 양성 T세포에 의한 IFN γ 및 IL-17의 생산을 나타내는 그래프이다(실시예 1).
- 도 4는 CD8 양성 T세포에 의한 IFN γ 의 생산을 나타내는 그래프이다(실시예 1).
- 도 5는 CD4 양성 T세포에 의한 IFN γ 및 IL-17의 생산을 나타내는 그래프이다(실시예 1).
- 도 6은 백신 접종한 마우스에서의 종양 성장 곡선 그래프이다(실시예 2).
- 도 7은 백신 접종한, 형성된 피부 종양을 갖는 마우스에서의 종양 성장 곡선의 그래프이다(실시예 3).
- 도 8은 백신 접종한 마우스에서의 종양 성장 곡선 그래프이다(실시예 4).
- 도 9는 DD3C의 부분 웹티드의 자극에 의한 IFN γ 생산을 나타내는 그래프이다(실시예 5).
- 도 10은 DD3C의 부분 웹티드의 자극에 의한 IFN γ 생산을 나타내는 그래프이다(실시예 6).
- 도 11은 백신 접종한 마우스에서의 종양 성장 곡선 그래프(B)이다(실시예 7).
- 도 12는 CD133 발현을 나타내는 유세포 분석(flow cytometry)의 그래프이다 (실시예 8).
- 도 13은 DDX3X 및 β -액틴에 대한 항체를 사용한, 종양 세포에 대한 면역불롯이다(실시예 8).
- 도 14는 세포 손상 수복 실험의 손상 수복의 경과 사진이다(실시예 9).

도 15는 스페로이드 형성능의 검토에서의 스페로이드 사진이다(실시예 11).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0067] 본 발명에서, 「암」이란, 생체에서의 이상한 세포의 비제어 증식이며, 그 예로서는 예를 들어, 고형 종양(예를 들면, 암종, 육종 등), 림프종 및 백혈병 등을 들 수 있다.
- [0068] 보다 구체적으로는, 암으로서는 예를 들어,
- [0069] 성상세포종, 악성 수모세포종, 배세포 종양, 두개인두종, 상의종 등의 소아 뇌종양;
- [0070] 신경교종(glioma), 신경아교종(neuroglioma), 수막종, 하수체 선종, 신경초종 등의 성인 뇌종양;
- [0071] 상악동암, 인두암(상인두암, 중인두암, 하인두암), 후두암, 구강암, 입술암, 설암, 이하선암 등의 두경부암;
- [0072] 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흉선종, 중피종(mesothelioma) 등의 흉부 암 및 종양;
- [0073] 식도암, 간암, 원발성 간암, 담낭암, 담관암, 위암, 대장암, 결장암, 직장암, 항문암, 췌장암, 췌장 내분비 종양 등의 소화기 암 및 종양;
- [0074] 음경암, 신우·요관암, 신장세포암, 고환 종양, 전립선암, 방광암, 윌름종양(Wilms tumor), 요로상피암 등의 비뇨기 암 및 종양;
- [0075] 외음암, 자궁경부암, 자궁체부암, 자궁내막암, 자궁육종, 응모암, 질암, 유방암, 난소암, 난소 배세포 종양 등의 부인과 암 및 종양;
- [0076] 성인 및 소아의 연부육종;
- [0077] 골육종, 유잉 종양(Ewing's tumor) 등의 뼈 종양;
- [0078] 부신피질암, 갑상선암 등의 내분비 조직 암 및 종양;
- [0079] 악성 림프종, 비호지킨 림프종, 호지킨병, 다발성 골수종, 형질세포성 종양, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 성인 T세포 백혈병 림프종, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병 등의 악성 림프종 및 백혈병;
- [0080] 만성 골수 증식성 질환, 악성 흑색종(멜라노마), 편평세포암(squamous cell cancer), 기저세포암, 균장식육증 등의 피부 암 및 종양;
- [0081] 상기 종양 및 암의 전이소 등을 들 수 있다.
- [0082] 그중에서도, 본 발명은 예를 들어, 소세포 폐암, 비소세포 폐암 등의 흉부 암 및 종양; 악성 흑색종(멜라노마) 등의 피부 암 및 종양; 및 유방암 등의 부인과 암 및 종양에 적절하게 적용된다.
- [0083] 「DDX3X」란, DEAD/H(Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked이다.
- [0084] 전술한 바와 같이, 이 단백질은 X염색체에 위치하는 ATP 의존적 RNA 헬리카제의 DEAD 박스 패밀리의 단백질(DEAD 박스 헬리카제)이다. 그의 아미노산 서열은 공지이다. 인간 DDX3X의 서열(UniProtKB/Swiss-Prot: 000571.3)을 도 1(서열 번호 1)에 나타내었다.
- [0085] 본 명세서에서의 염기 서열(뉴클레오티드 서열)이나 핵산 또는 아미노산 등의 약호에 의한 표시는 IUPAC-IUB의 규정[IUPAC-IUB communicationon Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138; 9(1984)], 「염기 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는 명세서 등의 작성을 위한 가이드 라인」(일본 특허청편) 및 당해 분야에서의 관용 기호에 따르는 것으로 한다.
- [0086] 본 명세서 중, 염기 서열은 특별히 기재하지 않는 한, 5' 말단으로부터 3' 말단 방향으로 기재한다.
- [0087] 본 명세서 중, 아미노산 서열은 특별히 기재하지 않는 한, N 말단으로부터 C 말단 방향으로 기재한다.
- [0088] 본 명세서 중, 「유전자」에는 특별히 한정하지 않는 한, 2본쇄 DNA 및 1본쇄 DNA(센스쇄), 및 당해 센스쇄와 상보적인 서열을 갖는 1본쇄 DNA(안티센스쇄) 및 이들 단편의 모두가 포함된다. 또한, 본 명세서에서 「유전자」란, 특별히 한정하지 않는 한, 조절 영역, 코드 영역, 엑손 및 인트론을 구별하지 않고 나타내는 것으로 한다.
- [0089] 본 명세서 중, 「뉴클레오티드」(또는 「폴리뉴클레오티드」)는 핵산과 동의이며, DNA 및 RNA의 양쪽을 포함하

는 것으로 한다. 또한, 이들은 2본체이어도 1본체이어도 좋다. 본 명세서 중, 어떤 서열을 가지는 「뉴클레오티드」(또는 「폴리뉴클레오티드」)는 특별히 한정하지 않는 한, 이에 상보적인 서열을 가지는 「뉴클레오티드」(또는 「폴리뉴클레오티드」)도 포함적으로 의미하는 것으로 한다.

[0090] 본 명세서 중, 「폴리뉴클레오티드」는 특별히 한정하지 않는 한, 「올리고뉴클레오티드」를 포함하는 것으로 한다.

[0091] 또한, 「뉴클레오티드」(또는 「폴리뉴클레오티드」)는 특별히 한정하지 않는 한, 수식된 핵산 또는 핵산 유사체(예, PNA, LNA)를 포함하는 것으로 한다.

[0092] 또한, 「뉴클레오티드」(또는 「폴리뉴클레오티드」)가 RNA일 경우, 서열표에 나타나는 염기 기호 「T」는 「U」로 바꿔 읽을 수 있는 것으로 한다.

[0093] 본 명세서 중, 「cDNA」는 특별히 한정하지 않는 한, mRNA에 상보적인 염기 서열을 가지는 1본체 DNA(1본체 cDNA), 및 당해 1본체 cDNA 및 그의 상보체로 이루어지는 2본체 DNA(2본체 cDNA)의 양쪽을 포함하는 것으로 한다.

[0094] 본 명세서 중, 「특이적 하이브리다이제이션(hybridization)」이란, 통상의 하이브리다이제이션 조건 하, 바람직하게는 염증한 하이브리다이제이션 조건 하(예를 들어, 샘브록들, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 제2판, 1989에 기재된 조건)에서, 시료 중의 다른 폴리뉴클레오티드와의 크로스 하이브리다이제이션을 유의미하게 발생하지 않는 것을 의미한다. 「염증한 하이브리다이제이션 조건」의 구체예로는 예를 들어, 6×SSC, 0.5% SDS 및 50% 포름아미드의 용액 중, 42°C에서 가온한 후, 0.1×SSC, 0.5% SDS의 용액 중, 68°C에서 세정했을 경우에, 양성 하이브리다이즈의 시그널이 관찰되는 조건을 들 수 있다.

[0095] 본 명세서 중, 「단백질」은 특별히 한정하지 않는 한, (당체 등에 의해) 수식되어 있는 단백질 및 비수식 단백질의 양쪽을 포함하는 것으로 한다. 이것은 단백질인 것이 명기되어 있지 않은 단백질에 대해서도 마찬가지이다.

[0096] 본 명세서 중, DDX3X 또는 그의 부분 펩티드에서 유래되는 펩티드를, DDX3X 유래 펩티드라 칭하는 경우가 있다.

[0097] 본 명세서 중, DDX3X의 부분 펩티드(또는 프래그먼트)란, DDX3X의 아미노산 서열의 일부를 함유하는 펩티드를 의미한다.

암의 악성도 평가 방법

[0099] 본 발명의 암 악성도 평가 방법은 암 조직 중의 DDX3X 발현량을 측정하는 단계, 및 당해 DDX3X 발현량에 기초하여 당해 암의 악성도를 평가하는 단계를 포함한다.

[0100] 본 명세서 중, 「암의 악성도」란, 당해 암이 임상적으로, 그의 숙주를 어느 정도 빨리 죽음에 이르게 하는지를 나타내는 것이며, 구체적으로는, 당해 암에 기인하는 사망율의 정도, 당해 암 전이의 가능성, 당해 암 예후의 정도, 또는 당해 암 치료의 곤란성으로서 생각할 수 있다.

[0101] 본 명세서 중, 「암 조직」은 예를 들어, 환자로부터 검사를 위해서 채취된 암 조직, 또는 수술에 의해 적출된 암 조직, 또는 그들의 일부일 수 있다.

[0102] 「DDX3X 발현량」의 측정은 악성도가 높은 암 조직에서의 DDX3X 발현량과 악성도가 낮은 암 조직에서의 DDX3X 발현량의 구별이 가능한 임의의 수단을 채용해서 행하면 된다.

[0103] 본 발명의 일 형태에서, DDX3X 발현량의 측정은 단백질인 DDX3X의 양을 측정함으로써 행할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 필요에 따라 상기 암 조직에서 통상의 방법에 의해 단백질을 추출 또는 제조하고, 계속해서, 이하에 예시하는 방법 등에 의해 DDX3X의 발현량을 측정한다. 단백질의 추출 또는 제조는 예를 들어, 시판되는 키트를 사용해서 실시할 수 있다.

[0104] DDX3X의 양을 측정하는 방법으로서는 특정한 단백질의 양을 측정할 수 있는 방법이라면, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 웨스턴 블로트법, ELISA법, 형광항체법, 단백질 어레이(단백질 칩)법 등을 들 수 있다.

[0105] ELISA법에서는 예를 들어, 상기 암 조직으로부터 추출 또는 제조한 단백질을 함유하는 용액을, 마이크로플레이트 웰의 고상 표면에 흡착시킨 후, DDX3X에 대한 항체를 적용하고, 효소 반응에 의해 DDX3X의 양을 측정한다.

[0106] 단백질 어레이법에서는 예를 들어, DDX3X에 대한 항체를 갖는 단백질 어레이(예, 항체 어레이(항체 칩))를 준비하고, 당해 단백질 어레이에, 상기한 암 조직으로부터 추출한 단백질을 적용하여, 항체 항원 반응을 시킨 후,

상기 항체에 결합한 DDX3X의 양을, ELISA법 등을 사용하여 측정한다.

[0107] 상기 항체는 예를 들어, 폴리클로날 항체, 또는 모노클로날 항체일 수 있다.

[0108] 또한, 상기 항체는 예를 들어, Fab 프래그먼트, F(ab')2 프래그먼트 등의, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 프래그먼트이어도 좋다.

[0109] 상기 항체는 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0110] 예를 들어, 상기 항체가 폴리클로날 항체일 경우에는, 공지된 방법에 의해 대장균 등에서 발현시켜서 제조한 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드, 또는 공지된 방법에 의해 합성한 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 사용하여, 토끼 등의 비인간 포유동물을 면역하고, 당해 면역 동물의 혈청으로부터 관용의 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0111] 한편, 상기 항체가 모노클로날 항체일 경우에는, 공지된 방법에 의해 대장균 등에서 발현시켜서 제조한 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 항원으로서 사용하여, 마우스 등의 비인간 포유동물을 면역하고, 얻어진 항체 생산 세포를 골수종(myeloma)과 세포융합시켜서 제조한 하이브리도마로부터 제조할 수 있다.

[0112] 본 발명에서 사용되는 DDX3X의 부분 웨티드로서는 예를 들어, 후술하는 본 발명의 웨티드가 바람직하다.

[0113] DDX3X 또는 그의 부분 웨티드는 그의 아미노산 서열 정보에 따라 일반적인 화학 합성법에 의해 제조할 수 있다. 당해 방법에는 통상의 액상법 및 고상법에 의한 웨티드 합성법이 포함된다. 이러한 웨티드 합성법으로서는, 예를 들어, 「웨티드 합성」(마루젠; 1975년 발행) 및 Peptide Synthesis, Interscience, New York, (1996)에 기재된 방법이 예시된다. 또한, 예를 들어, 웨티드 합성 장치(어플라이드 바이오시스템즈)와 같은 공지된 화학 합성 장치를 사용해서 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 제조할 수도 있다.

[0114] 또한, 항원으로서 사용되는 DDX3X, 또는 DDX3X의 부분 아미노산 서열로 이루어지는 웨티드는 이를 코딩하는 유전자의 염기 서열 정보에 기초하는 DNA의 클로닝, 플라스미드 구축, 숙주에의 트랜스펙션, 형질전환체의 배양 및 배양물로부터의 단백질 회수 등의 조작을 포함하는 일반적인 유전자 공학적 방법에 의해, 발현 벡터 또는 클로닝 벡터 등을 사용해서 제조할 수도 있다.

[0115] 재조합 벡터는 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적당한 벡터 DNA에 내장함으로써 얻어진다.

[0116] 벡터 DNA는 숙주의 종류 및 사용 목적에 따라 적절히 선택하면 좋다. 벡터 DNA는 천연에 존재하는 DNA일 수도 있고, 천연 DNA에서 중식에 필요한 부분 이외의 DNA 부분이 일부 결핍된 것일 수도 있다. 벡터 DNA로서는 예를 들어, 염색체, 에피솜 또는 바이러스 등에서 유래하는 벡터를 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 세균 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포존, 효모 에피솜, 삽입 엘리먼트, 효모 염색체 엘리먼트, 바이러스(예를 들어, 바클로바이러스, 파포바바이러스, SV40, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 계두 바이러스, 가성 광견 병 바이러스 및 레트로바이러스 등) 등에서 유래하는 벡터 및 그들을 조합한 벡터, 플라스미드 및 박테리오파지의 유전학적 엘리먼트 유래의 벡터(예를 들어, 코스미드 및 파지미드 등)를 들 수 있다.

[0117] 상기 폴리뉴클레오티드를, 공지된 방법에 의해 벡터 DNA에 삽입함으로써, 당해 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터가 얻어진다. 구체적으로는, 예를 들어, 적당한 제한 효소를 사용해서 DNA 및 벡터 DNA를 특정 부위에서 절단하고, 혼합하여 리가아제에 의해 재결합할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드에 적당한 링커를 연결하고, 이것을 목적에 적합한 벡터 DNA의 멀티클로닝 사이트에 삽입함으로써도 상기 재조합 벡터를 얻을 수 있다.

[0118] 상기 폴리뉴클레오티드가 내장된 재조합 벡터를, 공지된 숙주, 예를 들어, 대장균(예를 들어, K12), 바실루스(Bacillus)속 세균(예를 들어, MI114)과 같은 세균, 효모(예를 들어, AH22), 곤충 세포(예를 들어, Sf 세포) 또는 동물 세포(예를 들어, COS-7 세포, Vero 세포, CHO 세포 등) 등에 공지된 방법으로 도입함으로써, 당해 재조합 벡터가 도입된 형질전환체가 얻어진다.

[0119] 유전자 도입 방법으로서는 유전자의 안정성을 고려하면, 염색체 내로의 인테그레이트법을 바람직하게 들 수 있다. 간편하게는 핵외 유전자를 이용한 자율 복제체를 사용할 수 있다. 벡터 DNA의 숙주 세포에의 도입은 예를 들어, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Sambrook들 편, 콜드·스프링·하버·래보라토리즈·프레스, 콜드·스프링·하버, 뉴욕, 1989) 등에 기재되어 있는 표준적인 방법에 의해 행할 수 있다. 구체적으로는, 인산 칼슘 트랜스펙션, DEAE-덱스트란 매개 트랜스펙션, 마이크로인젝션, 양이온 지질 매개 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 형질도입, 스크레이프 부하(Scrape loading), 및 발리스틱 도입(ballistic introduction) 등을 예시

할 수 있다.

[0120] 또한, DDX3X는 상업적으로도 입수 가능하다.

[0121] 또한, 항 DDX3X 항체는 상업적으로도 입수 가능하다.

[0122] DDX3X 양의 측정에 사용되는 항체는 예를 들어, 효소 표지, 방사 표지 및 형광 표지 등의 공지된 표지 방법으로 표지될 수도 있고, 비오틴 등에 의해 수식될 수도 있다.

[0123] 본 발명의 다른 일 형태에서, DDX3X 발현량의 측정은 DDX3X의 mRNA 양을 측정함으로써 행할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 필요에 따라 상기한 암 조직으로부터 관용의 방법에 의해 mRNA를 추출 또는 제조하고, 이하에 예시하는 방법 등에 의해 DDX3X의 mRNA 양을 측정한다. mRNA의 추출 또는 제조는 예를 들어, 시판되는 키트를 사용해서 실시할 수 있다.

[0124] DDX3X의 mRNA 양을 측정하는 방법은 특정한 mRNA의 양을 측정할 수 있는 방법이라면, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, DDX3X의 mRNA 또는 그에 대응하는 cDNA에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드인 프로브 또는 프라이머를 사용한, 서던블롯법, *in situ* 하이브리다이제이션법, 비교 게놈 하이브리다이제이션(CGH), 정량 PCR (예, 리얼 타임 PCR), 또는 인베이더(HOLOGIC사제, 미국)법 등의 공지된 방법을 채용해서 행할 수 있다.

[0125] 마이크로 어레이법에서는 예를 들어, DDX3X의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브가 배치된 핵산 어레이(핵산 칩)를 준비하고, 당해 핵산 어레이에, 상기한 암 조직으로부터 추출하고, 또한 형광 표지 등으로 표지한 mRNA 시료를 적용하고, 상기 프로브에 결합한 DDX3X의 mRNA 표지 시그널을 측정해서 해석한다.

[0126] 리얼 타임 PCR에서는 예를 들어, 상기 암 조직으로부터 추출 또는 제조한 mRNA를, 역전사 효소를 사용해서 cDNA에 역전사하고, 그 cDNA를 주형으로서 사용하여, DDX3X의 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여, 소정 영역을 PCR로 증폭하고, 증폭 산물의 생성을 실시간으로 모니터링한다.

[0127] mRNA 양의 측정에 사용되는 프로브는 DDX3X의 mRNA 또는 cDNA와 특이적으로 하이브리드 형성하도록 설계된다.

[0128] 프로브로서의 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는, 예를 들어, DDX3X mRNA의 전체 염기 서열, 부분 염기 서열 또는 이들의 상보 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드에서 1 내지 수개(예, 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개)의 염기가 결실, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리뉴클레오티드 등이다. 프로브로서의 폴리뉴클레오티드의 길이는 통상 15 내지 500 염기 길이, 바람직하게는 20 내지 200 염기 길이, 보다 바람직하게는 20 내지 50 염기 길이이다.

[0129] 프로브로서의 폴리뉴클레오티드는 DDX3X의 mRNA 양의 측정을 가능하게 하기 위해서, 적당한 표지물, 예를 들어, 형광 색소, 효소, 단백질, 방사성 동위체, 화학 발광 물질 등이 부가 되어 있어도 좋다.

[0130] 정량 PCR 등에 의한 mRNA 양의 측정에 사용되는 프라이머는 DDX3X의 mRNA 또는 cDNA와 특이적으로 하이브리드 형성하도록 설계된다. 프라이머의 설계는 특별히 제한되지 않지만, 공지된 방법, 예를 들어, 프라이머 설계용 알고리즘이나 소프트웨어 등을 이용해서 행할 수 있다. 프라이머는 통상, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한쌍으로 이루어지는 프라이머 세트로서 사용된다.

[0131] 프라이머로서의 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는, 예를 들어, DDX3X의 mRNA의 전체 염기 서열, 부분 염기 서열 및 이들의 상보 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드에서 1 내지 수개(예, 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개)의 염기가 결실, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리뉴클레오티드 등이다. 프라이머로서의 폴리뉴클레오티드 길이는 통상 15 내지 30 염기 길이이다.

[0132] 프라이머로서의 폴리뉴클레오티드는 DDX3X의 mRNA 양의 측정을 가능하게 하기 위해서, 적당한 표지물, 예를 들어, 형광 색소, 효소, 단백질, 방사성 동위체, 화학 발광 물질 등이 부가 되어 있어도 좋다.

[0133] 폴리뉴클레오티드는 유전자 공학적 방법[Methods in Enzymology, 2005; 392: 24-35, 73-96, 173-185, 405-419.; Nucleic Acids Res. 1984; 12: 9441; 속 생화학 실험 강좌 1 「유전자 연구법 II」, 일본 생화학회 편, 105 페이지(1986) 등], 포스포트리에스테르법이나 포스포아미다이드법 등의 화학 합성 수단[J Am Chem Soc. 1967; 89(2): 450-3.; J Am Chem Soc. 1967; 89(26): 7146-7147.] 및 이들 방법의 조합 등에 의해 제조할 수 있다. 또한, RNA의 합성은 시판되고 있는 ABI3900 고처리량 DNA 합성기(Applied Biosystems사제) 등과 함께 RNA 합성용 시약을 사용해서 포스포르아미다이드법에 의해 합성할 수도 있다.

[0134] 또한, 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 합성을 수탁하고 있는 회사 또는 부문에 합성을 위탁함으로써 얻

을 수도 있다.

[0135] 또한, DDX3X 발현량의 측정은 암 조직 중에, DDX3X를 발현하고 있는 세포수의 측정에 의해서도 행할 수 있다. DDX3X를 발현하고 있는 세포수의 측정은 형광 색소, 효소, 단백질, 방사성 동위체, 화학 발광 물질 등으로 표지한 항 DDX3X 항체를 사용하여, 면역 조직 염색한 암 조직 중의 DDX3X 발현 세포를 관찰하는 것, 또는 암 조직 중의 DDX3X 발현 세포의 수를 유세포 분석 등에 의해 계측하는 것 등의 방법에 의해서도 행할 수 있다.

[0136] 본 발명의 암 악성도 평가 방법에서는, 측정된 DDX3X의 발현량이 높은 경우, 암 조직의 악성도는 높다고 평가되고, 측정된 DDX3X의 발현량이 낮은 경우, 암 조직의 악성도는 낮다고 평가된다.

[0137] DDX3X 발현량의 정도와, 암 조직 악성도의 정도는, 예를 들어, 비암 조직, 종래 법에서 악성도가 높다고 평가된 암 조직 및 종래법에서 악성도가 낮다고 평가된 암 조직 등의 각 DDX3X 발현량의 정도에 기초하여, 통계학적 방법(예를 들어, student t 검정, Kaplan-Meier법)을 이용하여, 관계를 맺을 수 있다.

[0138] 본 발명의 암 악성도 평가 방법은 다른 암의 악성도 평가 방법과 조합해서 실시해도 좋다.

암 악성도 평가용 키트

[0139] 본 발명의 암 악성도 평가용 키트는 본 발명의 암 악성도 평가 방법에 사용할 수 있다.

[0140] 본 발명의 암 악성도 평가용 키트는 DDX3X에 대한 항체, 또는 DDX3X의 mRNA 또는 그에 대응하는 cDNA에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 함유한다.

[0141] 본 발명의 일 형태에서, 암 악성도 평가용 키트는 DDX3X에 대한 항체를 함유한다.

[0142] 당해 항체는 단백질인 DDX3X의 양을 측정하기 위해서 사용된다.

[0143] 당해 항체로서는 「암의 악성도 평가 방법」에 대해서 설명한 항체와 마찬가지인 항체를 사용할 수 있다.

[0144] 당해 항체는 단백질 어레이(예, 항체 어레이, 항체 칩)를 구성하고 있어도 좋다. 당해 단백질 어레이는 기판 및 상기 항체를 갖고, 당해 항체는 기판 상에 배치되어 있다. 당해 기판으로서는 단백질을 그 위에 배치할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 유리판, 나일론 멤브레인, 마이크로비즈, 실리콘 칩 및 모세관 등을 들 수 있다. 당해 단백질 어레이(항체 칩)는 예를 들어, 잉크젯 기술을 이용하는 방법 등의, 단백질 어레이 제조에서의 관용 방법을 사용해서 상기 항체를 기판 상에 고정함으로써 제조할 수 있다.

[0145] 본 발명의 다른 일 형태에서, 본 발명의 암 악성도 평가용 키트는 DDX3X의 mRNA 또는 그에 대응하는 cDNA에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 함유한다.

[0146] 당해 폴리뉴클레오티드는 DDX3X의 mRNA 양을 측정하기 위해서 사용된다.

[0147] 당해 폴리뉴클레오티드로서는 「암의 악성도 평가 방법」에 대해서 설명한 폴리뉴클레오티드와 마찬가지인 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있다.

[0148] 당해 폴리뉴클레오티드는 핵산 어레이를 구성하고 있어도 좋다. 당해 핵산 어레이에는 기판 및 상기 폴리뉴클레오티드를 갖고, 당해 폴리뉴클레오티드는 기판 상에 배치되어 있다. 상기 폴리뉴클레오티드로서는 「암의 악성도 평가 방법」에 대해서 설명한 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다. 당해 기판으로서는 핵산을 그 위에 배치할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 유리판, 나일론 멤브레인, 마이크로비즈, 실리콘 칩 및 모세관 등을 들 수 있다. 당해 핵산 어레이에는 예를 들어, 시판되는 스폿터를 이용하는 방법, 또는 잉크젯 기술을 이용하는 방법 등의, 핵산 어레이 제조에서의 관용 방법을 사용해서 상기 폴리뉴클레오티드를 기판 상에 고정함으로써 제조할 수 있다.

[0149] 본 발명의 암 악성도 평가용 키트는 그의 목적 및 형태에 따라, 효소, 완충액, 또는 시약, 또는 취급 설명서 등을 함유해도 좋다.

암의 예후 평가 방법

[0150] 본 발명의 암 예후 평가 방법은

[0151] 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포를 검출하는 단계; 및

[0152] 당해 검출 결과에 기초하여 암의 예후를 평가하는 단계

[0153] 를 포함한다.

- [0156] 본 명세서 중, 「암의 예후」란, 장래 가능한 암의 경과를 의미한다.
- [0157] 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포의 검출은 바람직하게는 암 환자로부터 얻은 혈액 시료 중의 DDX3X 특이적 T세포의 검출에 의해 행하여진다.
- [0158] 당해 혈액 시료의 취득은 관용 방법으로 실시할 수 있다.
- [0159] 혈액 시료 중의 DDX3X 특이적 T세포의 검출은 예를 들어, 항원 의존적 증식의 분석(³H-티미딘 도입 분석 등), 세포 상해성 측정(⁵¹Cr 방출 분석 등), MHC-펩티드 · 사량체 염색법, enzyme-linked immunospot(ELISPOT) 분석, 및 세포 내 사이토카인 분석 등의 관용의 항원 특이적 T세포의 검출 방법에 의해 실시할 수 있다.
- [0160] 이를 검출 방법에서 사용되는 항원은 상기 「암의 악성도 평가 방법」에서 설명한 것을 들 수 있다.
- [0161] 암 환자의 혈중에 DDX3X 특이적 T세포가 검출된 경우, 예후가 좋다고 평가되고, 한편으로, 검출 되지 않은 경우, 예후가 나쁘다고 평가 된다.
- [0162] 본 발명의 암 예후 평가 방법은 다른 암의 예후 평가 방법과 조합해서 실시해도 좋다.
- [0163] 암 예후 평가용 키트
- [0164] 본 발명의 암 예후 평가용 키트는 본 발명의 암 악성도의 평가 방법에 사용할 수 있다.
- [0165] 본 발명의 암 예후 평가용 키트는 DDX3X 또는 그의 부분 펩티드를 함유한다.
- [0166] 당해 DDX3X 또는 그의 부분 펩티드는 암 환자의 혈중 DDX3X 특이적 T세포의 검출을 위해 사용된다.
- [0167] 당해 DDX3X 또는 그의 부분 펩티드는 「암의 악성도 평가 방법」에 대해서 설명한 DDX3X 또는 그의 부분 펩티드와 같다. 바람직하게는, DDX3X 또는 그의 부분 펩티드로서, (이하에서 설명하는) 본 발명의 펩티드가 사용된다.
- [0168] 펩티드
- [0169] 본 발명의 펩티드는 상기한 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서, 후술하는 서열 번호 2 내지 87 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 함유하는 연속한 9 내지 20개의 아미노산 서열, 또는 그와 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0170] 전술한 바와 같이, 서열 번호 1은 DDX3X의 아미노산 서열이다.
- [0171] 서열 번호 2: FLLDLLNAT
- [0172] 서열 번호 3: NITQKVWWV
- [0173] 서열 번호 4: IQMLARDFL
- [0174] 서열 번호 5: TFPKEIQML
- [0175] 서열 번호 6: KYDDIPVEA
- [0176] 서열 번호 7: RYIPPHLRN
- [0177] 서열 번호 8: RNINITKDL
- [0178] 서열 번호 9: KQYPISLVL
- [0179] 서열 번호 10: IGLDFCKYL
- [0180] 서열 번호 11: IELTRYTRP
- [0181] 서열 번호 12: TRYTRPTPV
- [0182] 서열 번호 13: MGNIELTRY
- [0183] 서열 번호 14: LVLAPTRREL
- [0184] 서열 번호 15: YPISLVLAP

[0185] 서열 번호 16: QYPISLVLA
 [0186] 서열 번호 17: LEDFLYHEGY
 [0187] 서열 번호 18: FLDEYIFLA
 [0188] 서열 번호 19: LLVEAKQEV
 [0189] 서열 번호 20: FLLPILSQI
 [0190] 서열 번호 21: DFLDEYIFL
 [0191] 서열 번호 22: SHVAVENAL
 [0192] 서열 번호 23: VAVENALGL
 [0193] 서열 번호 24: ALGLDQQFA
 [0194] 서열 번호 25: LGLDQQFAG
 [0195] 서열 번호 26: GLDQQFAGL
 [0196] 서열 번호 27: DQQFAGLDL
 [0197] 서열 번호 28: NSSDNQSGG
 [0198] 서열 번호 29: KGRYIPPHL
 [0199] 서열 번호 30: PHLRNREAT
 [0200] 서열 번호 31: RGRGDYDGI
 [0201] 서열 번호 32: YDGIGSRGD
 [0202] 서열 번호 33: RSGFGKFER
 [0203] 서열 번호 34: KPLPPSERL
 [0204] 서열 번호 35: LFSGGNTGI
 [0205] 서열 번호 36: FSGGNTGIN
 [0206] 서열 번호 37: INFEKYDDI
 [0207] 서열 번호 38: YDDIPVEAT
 [0208] 서열 번호 39: TGNNCPPHI
 [0209] 서열 번호 40: EIIMGNIEL
 [0210] 서열 번호 41: IIMGNIELT
 [0211] 서열 번호 42: IPIIKEKRD
 [0212] 서열 번호 43: GSGKTA AFL
 [0213] 서열 번호 44: TAAFLLPIL
 [0214] 서열 번호 45: AAFLLPILS
 [0215] 서열 번호 46: IYADGPGEA
 [0216] 서열 번호 47: LAVQIYEEA
 [0217] 서열 번호 48: IYEEARKFS
 [0218] 서열 번호 49: RPCVVYGG
 [0219] 서열 번호 50: CVVYGGADI
 [0220] 서열 번호 51: LLVATPGRL

[0221] 서열 번호 52: ATPGRLVDM
 [0222] 서열 번호 53: GLDFCKYLV
 [0223] 서열 번호 54: LDFCKYLV
 [0224] 서열 번호 55: LVLDEADRM
 [0225] 서열 번호 56: VLDEADRML
 [0226] 서열 번호 57: GFEPQIRRI
 [0227] 서열 번호 58: FSATFPKEI
 [0228] 서열 번호 59: YIFLAVGRV
 [0229] 서열 번호 60: RVGSTSENI
 [0230] 서열 번호 61: ATGKDSDL
 [0231] 서열 번호 62: SLTLVFVET
 [0232] 서열 번호 63: FLYHEGYAC
 [0233] 서열 번호 64: LYHEGYACT
 [0234] 서열 번호 65: LHQFRSGKS
 [0235] 서열 번호 66: QFRSGKSPI
 [0236] 서열 번호 67: ILVATAVAA
 [0237] 서열 번호 68: TAVAARGLD
 [0238] 서열 번호 69: ISNVKHVIN
 [0239] 서열 번호 70: LPSDIEEYV
 [0240] 서열 번호 71: EYVHRIGRT
 [0241] 서열 번호 72: LGLATSFFN
 [0242] 서열 번호 73 : TSFFNERNI
 [0243] 서열 번호 74: FFNERNINI
 [0244] 서열 번호 75: NITKDLLDL
 [0245] 서열 번호 76: DLLDLLVEA
 [0246] 서열 번호 77: EVPSWLENM
 [0247] 서열 번호 78: AYEHHYKGS
 [0248] 서열 번호 79: EHHYKGSSR
 [0249] 서열 번호 80: SRFSGGFGA
 [0250] 서열 번호 81: FGARDYRQS
 [0251] 서열 번호 82: GGGYGGFYN
 [0252] 서열 번호 83: GGYGGFYNS
 [0253] 서열 번호 84: GGFYNSDGY
 [0254] 서열 번호 85: SDGYGGNYN
 [0255] 서열 번호 86: GGNYNNSQGV
 [0256] 서열 번호 87: NYNSQGVDW

- [0257] 이러한 아미노산 서열로서는 예를 들어, 상기 서열 번호 2 내지 87 외에, 후기 서열 번호 88 내지 92로 표시되는 아미노산 서열을 들 수 있다.
- [0258] 서열 번호 88: KQYPISLVLAPTRREL
- [0259] 서열 번호 89: EIIMGNIELTRYTRPTPV
- [0260] 서열 번호 90: KGADSLEDFLYHEGY
- [0261] 서열 번호 91: FVETKKGADSLEDFLYHEGY
- [0262] 당해 서열의 말단 글루타민 잔기는 환화되어 피로글루탐산을 형성하고 있어도 좋다. 이러한 서열로서는 예를 들어, 서열 번호 92: pyroEYPISLVLA를 들 수 있다.
- [0263] 여기서, 「서열 번호 2 내지 87 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 함유하는 연속한 9 내지 20개의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 웨티드」란, 1 내지 수개(예, 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 1개)의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 및 / 또는 부가 등을 갖는 「서열 번호 2 내지 87 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 함유하는 연속한 9 내지 20개의 아미노산 서열」로 이루어지는 웨티드일 수 있다.
- [0264] 본 명세서 중, 「실질적으로 동일한 아미노산 서열」이란, 80% 이상(바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 88% 이상)의 동일성을 갖는 아미노산 서열일 수 있다.
- [0265] 치환은 보존적 치환일 수 있다.
- [0266] 보존적 치환의 예로서는 예를 들어, 아스파라긴산과 글루탐산 간의 치환, 아르기닌과 리신과 히스티딘 간의 치환, 트립토판과 페닐알라닌 간의 치환, 페닐알라닌과 발린 간의 치환, 류신과 이소류신과 알라닌 간의 치환, 글리신과 알라닌 간의 치환 등을 들 수 있다.
- [0267] 서열 번호 2 내지 87 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열 중에서도 바람직하게는, 예를 들어, 서열 번호 2 내지 17, 40 및 41 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열이며, 보다 바람직하게는, 예를 들어, 서열 번호 9, 11 내지 17, 40 및 41 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0268] 본 발명의 암 항원 웨티드는 바람직하게는 9 내지 15개의 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 9 내지 12개의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 9 내지 11개의 아미노산 잔기, 특히 바람직하게는 10개의 아미노산 잔기로 이루어진다.
- [0269] 본 발명의 암 항원 웨티드는 바람직하게는 상기한 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서, 후술하는 서열 번호 2 내지 17 및 88 내지 92 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 함유하는 연속한 9 내지 20개의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0270] 본 발명의 암 항원 웨티드는 특히 바람직하게는, 서열 번호 17, 88 또는 89로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0271] 본 발명의 암 항원 웨티드는 상기 「암 조직의 악성도 평가 방법」에서 DDX3X, 또는 DDX3X의 부분 아미노산 서열로 이루어지는 웨티드에 대해서 설명한 바와 같이, 공지된 방법에 의해, 단리된 웨티드로서 제조할 수 있다.
- [0272] 본 명세서 중, 「단리된」이란, 천연에 존재하는 상태가 아닌 것을 의미한다.
- [0273] 본 발명의 웨티드는 염의 형태이어도 좋다. 당해 염으로서는 예를 들어, 염산 및 인산과 같은 무기산의 염, 및 아세트산 및 타르타르산과 같은 유기산의 염을 들 수 있다.
- [0274] 또한, 본 발명의 웨티드는 당류, 폴리에틸렌 글리콜, 지질 등이 부가된 복합체, 방사성 동위원소 등에 의한 유도체 또는 중합체 등의 형태로서 사용할 수도 있다.
- [0275] 본 발명의 웨티드는 암 항원 웨티드일 수 있다.
- [0276] 본 명세서 중, 「암 항원 웨티드」란, 암 특이적인 세포 상해성 T세포(CTL)로 인식되거나, 또는 CTL을 또한 유도하거나, 또는/및 CTL을 활성화할 수 있는 웨티드를 의미한다.
- [0277] 본 명세서 중, 「인식되는」이란, 인식하는 것이 인식되는 대상을 다른 것과 분별해서 인지하고, 예를 들어, 인지한 대상에 결합하는 것을 의미할 수 있다. 본 명세서에 있어서, 웨티드를 인식하는이란, 인간 백혈구 항원

(HLA) 및 당해 웨티드에 CTL이 T세포 수용체를 개재해서 결합하는 것을 의미할 수 있다.

[0278] 또한, 본 명세서 중, 「활성화하는」이란, 어떤 활성 또는 작용을 갖는 것 또는 그 상태를, 또한 증강하거나 또는 작동시키는 것을 의미할 수 있다. 특히, 「CTL이 활성화하는」이란, CTL이 HLA에 의해 제시된 웨티드를 인식함으로써, 예를 들어, IFN- γ 과 같은 이펙터를 생산하는 것, 또는 CTL이 인식한 표적 세포에 대하여 세포 상해성을 나타내는 것을 의미할 수 있다.

[0279] 또한, 본 명세서 중, 「유도하는」이란, 어떤 활성 또는 작용을 거의 갖지 않는 것 또는 상태로부터, 그 활성 또는 작용을 발생시키는 것을 의미한다. 특히, 「항원 특이적인 CTL을 유도하는」이란, in vitro 또는 in vivo에서, 어떤 항원을 특이적으로 인식하는 CTL을 분화 및 / 또는 증식시키는 것을 의미할 수 있다.

[0280] 또한, 본 명세서 중, 항체 또는 항원에 대해서 「특이적」이란, 면역학적으로 선택적으로 결합하는 것이 가능한 성질을 나타낸다.

암 백신

[0282] 본 발명의 암 백신은 상기한 본 발명의 웨티드를 암 항원으로서 함유한다.

[0283] 본 발명의 웨티드는 단독으로, 또는 각종 담체와 함께, 암 백신으로 제제화할 수 있다.

[0284] 본 발명의 암 백신의 제형은 경구 투여제 또는 비경구 투여제 중 어느 것이어도 된다. 일반적으로는 비경구 투여제가 바람직하다. 비경구 투여제로서는 피하 주사제, 근육 내 주사제, 정맥 내 주사제, 좌약제 등을 들 수 있다.

[0285] 본 발명의 암 백신이 경구 투여제일 경우에는, 본 발명의 웨티드를, 약학적으로 허용되고, 또한 본 발명의 웨티드의 암 항원으로서의 활성을 방해하지 않는 부형제와 함께, 암 백신으로 제제화할 수 있다. 당해 부형제로서는 예를 들어, 전분, 만니톨, 락토오스, 스테아르산 마그네슘, 셀룰로오스, 중합 아미노산 및 알부민 등을 들 수 있다.

[0286] 본 발명의 암 백신이 비경구 투여제일 경우에는, 본 발명의 웨티드를, 약학적으로 허용되고, 또한 본 발명의 웨티드의 암 항원으로서의 활성을 방해하지 않는 담체와 함께, 암 백신으로 제제화할 수 있다. 당해 담체로서는 예를 들어, 물, 식염, 텍스트로오스, 에탄올, 글리세롤 및 DMSO 등을 들 수 있다.

[0287] 본 발명의 암 백신은 또한, 원한다면, 알부민, 습윤제, 및 / 또는 유화제 등을 포함하고 있어도 좋다.

[0288] 또한, 세포성 면역의 활력화를 위해서, 본 발명의 웨티드는 적당한 보조제와 함께 사용할 수 있다. 본 발명의 암 백신은 당해 보조제를 함유해도 좋다.

[0289] 또한, 본 발명의 웨티드는 세포 상해성 T세포(CTL)에 의한 이 웨티드의 인식을 증강하는 화합물 또는 이 웨티드를 면역학적으로 인식하는 항체 등과 함께 사용할 수 있다. 본 발명의 암 백신은 당해 화합물 및 / 또는 항체를 함유해도 좋다.

[0290] 본 발명의 암 백신은 그의 제형에 따른 관용의 방법으로 제조할 수 있다.

[0291] 본 발명의 암 백신은 바람직하게는 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제를 위해서 사용된다.

[0292] 본 발명의 암 백신은 그의 제형에 따른 투여방법에 의해, 인간에게 투여할 수 있다.

[0293] 본 발명의 암 백신의 투여량은 인간 성인에 대하여, 유효 성분인 본 발명의 웨티드로서, 예를 들어, 0.01mg 내지 100mg/일 정도, 바람직하게는 0.1mg 내지 30mg/일 정도를 투여할 수 있다. 투여 간격은 환자의 증상 및 투여 목적 등에 따라서 적절히 정하면 좋다.

양자 면역용 세포의 제조 방법

[0295] 본 발명의 일 형태에서, 양자 면역용 세포의 제조 방법은 항원 제시능을 갖는 세포를 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드로 펄스하는 단계를 포함한다.

[0296] 항원 제시능을 갖는 세포로서는 예를 들어, 수상 세포, 마크로파지 및 또는 B림프구 등을 들 수 있다.

[0297] 펄스는 예를 들어, 항원 제시능을 갖는 세포를, 농도 1 내지 10 μ g/ml 정도의 DDX3X 또는 그의 부분 웨티드를 포함하는 배지 중, 온도 20 내지 30°C 정도에서 30분간 내지 1시간 정도 인큐베이팅함으로써 행할 수 있다. 이에 의해, 세포 표면에, DDX3X 특이적 CTL에 의해 인식될 수 있는 암 항원 웨티드를 제시하는 세포가 얻어진다.

당해 세포는 단리된 세포일 수 있다.

[0298] 당해 「DDX3X의 부분 펩티드」는 바람직하게는 본 발명의 펩티드이다.

[0299] 또한, DDX3X 특이적 CTL에 의해 인식될 수 있는, DDX3X 유래 펩티드를 제시하는 세포는 본 발명의 펩티드를 제시하는 항원 제시 세포(APC)일 수 있다.

[0300] 이와 같이 하여 얻어진, DDX3X 또는 그의 부분 펩티드로 펠스된 APC는 DDX3X 유래 펩티드를 제시하는 APC일 수 있고, DDX3X 특이적 T세포의 유도제로서 사용할 수 있다.

[0301] 당해 APC는 양자 면역용 세포로서, 양자 면역요법을 위해서 인간에게 투여할 수 있다.

[0302] 당해 APC는 인간에게 투여하기 전에, 공지된 방법으로 배양해도 좋다.

[0303] 또한, 이와 같이 하여 얻어진, DDX3X 또는 그의 부분 펩티드로 펠스된 APC와 함께, CTL에의 분화능을 갖는 전구 세포를 인큐베이팅함으로써, DDX3X 특이적 CTL을 생체 외에서 유도할 수 있다. 이와 같이 하여 얻어진 DDX3X 특이적 CTL은 단리된 세포일 수 있다.

[0304] 당해 전구 세포로서는 CTL로 분화할 수 있는 세포라면 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들어, 말초혈 단핵구 (PBMC), 나이브 세포, 메모리 세포 등을 들 수 있다.

[0305] 이와 같이 하여 얻어진, 당해 DDX3X 특이적 CTL도 또한, 양자 면역용 세포로서, 양자 면역요법을 위해서 인간에게 투여할 수 있다.

[0306] 당해 DDX3X 특이적 CTL은 인간에게 투여하기 전에, 공지된 방법으로 배양해도 좋다.

[0307] 즉, 본 발명의 다른 일 형태에서, 본 발명의 양자 면역용 세포의 제조 방법은

[0308] 항원 제시능을 갖는 세포를 DDX3X 또는 그의 부분 펩티드에 폭로하여 당해 DDX3X 또는 그의 부분 펩티드에서 유래되는 항원을 제시하는 세포를 얻는 단계; 및

[0309] 당해 세포를 사용하여 DDX3X 특이적 T세포를 유도하는 단계

[0310] 를 포함한다.

[0311] 상기 DDX3X 특이적 T세포는 바람직하게는 DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포이다.

[0312] 얻어진 양자 면역용 세포는 그대로, 또는 각종 담체와 함께 양자 면역용 세포 조성물로 제제화할 수 있다.

[0313] 양자 면역용 세포 조성물의 제형은 경구 투여제 또는 비경구 투여제 중 어느 것이어도 된다. 일반적으로는 비경구 투여제가 바람직하다. 비경구 투여제로서는 피하 주사제, 근육 내 주사제, 정맥 내 주사제, 좌약제 등을 들 수 있다.

[0314] 양자 면역용 세포 조성물이 경구 투여제인 경우에는, 얻어진 양자 면역용 세포를, 약학적으로 허용되고, 또한 당해 양자 면역용 세포의 활성을 방해하지 않는 부형제와 함께, 양자 면역용 세포 조성물로 제제화할 수 있다. 당해 부형제로서는 예를 들어, 전분, 만니톨, 락토오스, 스테아르산 마그네슘, 셀룰로오스, 중합 아미노산 및 알부민 등을 들 수 있다.

[0315] 본 발명의 양자 면역용 세포 조성물이 비경구 투여제인 경우에는, 얻어진 양자 면역용 세포를, 약학적으로 허용되고, 또한 당해 양자 면역용 세포의 활성을 방해하지 않는 담체와 함께, 양자 면역용 세포로 제제화할 수 있다. 당해 부형제로서는 예를 들어, 물, 식염, 텍스트로오스, 에탄올, 글리세롤 및 DMSO 등을 들 수 있다.

[0316] 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제제

[0317] 본 발명의, 암의 예방, 치료, 전이 억제, 또는 재발 억제제는 DDX3X의 발현 또는 활성을 저해하는 화합물을 함유한다.

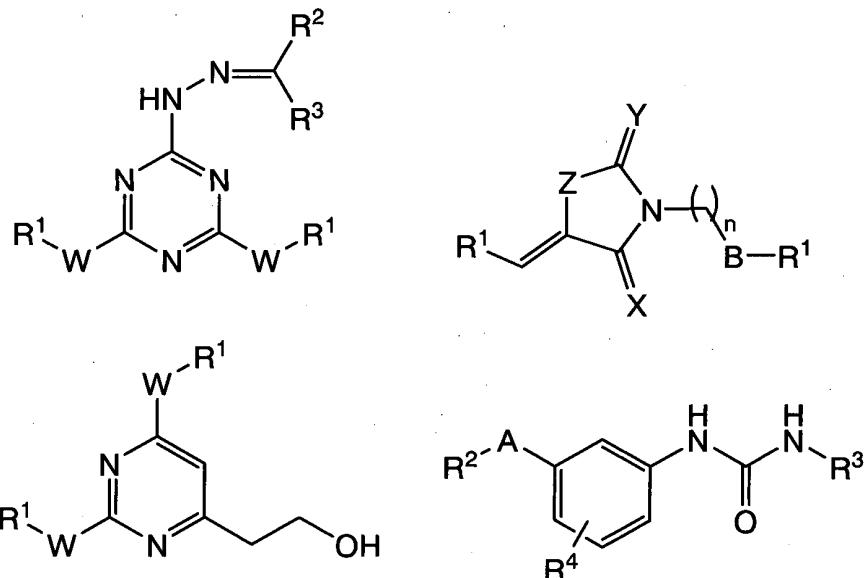
[0318] DDX3X의 발현을 저해하는 화합물로서는 예를 들어, DDX3X 유전자의 센스쇄의 일부 또는 전체 영역의 서열(이하, 간단히 "표적 서열"이라 칭하는 경우가 있음)에 대하여 상보적인 염기 서열(이하, 간단히 "안티센스 서열"이라 칭하는 경우가 있음)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0319] 당해 폴리뉴클레오티드로서는 예를 들어, 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(small interfering RNA) 및 shRNA(small hairpin RNA)를 들 수 있다.

- [0320] 상기 표적 서열의 결정은 NCBI의 BLAST 연구에 의해 실시, 결정할 수 있다. 바람직하게는, 상기 표적 서열은 해당 DDX3X 유전자의 엑손 부위에서 선택된다. 또한, 상기 표적 서열은 표적 DDX3X 유전자의 서열에 대한 특이성이 높은 것이 보다 바람직하다.
- [0321] 상기 표적 서열의 염기수는 예를 들어, 15 내지 30 염기, 바람직하게는 18 내지 25 염기, 보다 바람직하게는 18 내지 25 염기, 더욱 바람직하게는 19 내지 23 염기, 특히 바람직하게는 19 내지 21 염기이다.
- [0322] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 RNA이어도 좋고, DNA이어도 좋다. 또한, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 DDX3X 유전자의 발현을 억제할 수 있는 효과를 갖는 한, 1 내지 수 염기(예, 1 내지 2 염기, 1 내지 3 염기, 1 내지 5 염기)가 적어도 어느 하나의 말단에 부가되어 있거나, 내부에서 결실, 치환 또는 부가되어 있는 상기 안티센스 서열을 가지고 있어도 되다.
- [0323] 상기 siRNA로서는 예를 들어, 상기 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(센스쇄)와, 안티센스 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(안티센스쇄)로 이루어지는 2본쇄 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있다.
- [0324] 상기 센스쇄 및 상기 안티센스쇄는 상기 표적 서열보다 1 또는 수 염기(예, 1 내지 2 염기, 1 내지 3 염기, 1 내지 5 염기) 길이 정도 길어질 수도 있고, 예를 들어, 말단(바람직하게는 3' 말단)에 2 염기의 우라실(U)이 부가될 수도 있다. 또한, 상기 안티센스쇄 및 상기 센스쇄 중 어느 하나 또는 양쪽은 DDX3X 유전자 발현을 억제할 수 있는 효과를 갖는 한, 1 내지 수 염기(예, 1 내지 2 염기, 1 내지 3 염기, 1 내지 5 염기)의 U, T, G, C 또는 A가, 적어도 하나의 말단에 부가되어 있거나, 내부에서 결실, 치환 또는 부가되어 있는 상기 안티센스 서열 또는 표적 서열을 가질 수도 있다.
- [0325] 상기 shRNA(small hairpin RNA)로서는 예를 들어, 상기 siRNA의 센스쇄 및 안티센스쇄를 포함하고, 이들이, 뉴클레오티드 서열, 비뉴클레오티드 서열 또는 이들의 조합으로 이루어지는 조절 부분(루프 부분)으로 연결된 것을 들 수 있다.
- [0326] 상기 조절 부분이 뉴클레오티드 서열일 경우, 상기 뉴클레오티드 서열로서, 1 염기 이상 10킬로 염기 미만의 뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 1 염기 길이 내지 몇백 염기 길이의 뉴클레오티드 서열, 더욱 바람직하게는 1 염기 길이 내지 몇십 염기 길이의 뉴클레오티드 서열, 특히 바람직하게는 1 염기 길이 내지 20 염기 길이의 뉴클레오티드 서열, 또는 스플라이싱 등의 세포에 구비되는 기구에 의해 세포질에서 상기한 길이의 폴리뉴클레오티드를 발생하는 서열로 이루어지는 뉴클레오티드 서열을 예시할 수 있다. 또한, 상기 조절 부분을 구성하는 뉴클레오티드 서열은 상기 센스 서열 및 상기 안티센스 서열을 포함해도 좋다. 또한, 상기 조절 부분을 구성하는 뉴클레오티드 서열로서는,
- [0327] 폴리 A, tRNA, Usn RNA, 레트로바이러스 유래의 CTE 서열 등의 세포질 이행성 서열;
- [0328] NF κ β 결합 서열, E2F 결합 서열, SSRE, NF-AT 등의 유인(decoy) 활성을 갖는 서열;
- [0329] 아데노바이러스의 VA1 또는 VA2 RNA 등의 인터페론 유도 억제 서열;
- [0330] RNase 억제 활성, 안티센스 활성, 리보자임 활성 등을 갖는 서열;
- [0331] tRNA 또는 발현 부위를 특정하기 위한 마커 서열; 및
- [0332] 검출을 위한 대장균에서의 선택 마커 서열 등
- [0333] 의 어느 하나 또는 이들의 2 이상의 조합 서열이어도 좋다.
- [0334] 유인 활성 등의 부분적 2본쇄를 필요로 하는 기능 서열은 상보적인 뉴클레오티드를 포함함으로써 제작되어도 좋다. 또한, 조절 부분의 서열 내부에 인트론의 도너 서열, 억셉터 서열을 포함하는 스플라이싱에 필요한 서열을 구비시켜, 이에 의해 스플라이싱 기구를 갖는 세포 내에서, 조절 부분의 서열 일부가 잘라내져서 다시 연결되도록 설계되어 있어도 좋다. 이들 조절 부분의 서열 구성에 의해, 더욱 원하는 RNA 기능 억제 효과를 늘리는 효과나 상기 센스 서열 및 상기 안티센스 서열의 안정성이 얻어진다.
- [0335] 또한, 상기 조절 부분이 비뉴클레오티드 서열일 경우, 그의 구체예로서는 폴리아미드 골격을 갖는 핵산 유사의 화학 합성 아날로그의 PNA(peptide nucleic acid)를 예시 할 수 있다.
- [0336] 또한, 본 발명에서는 DDX3X 유전자 발현 억제물로서, 상기 DDX3X 유전자의 전사를 억제하기 위한 상기 DDX3X 유전자에 대한 유인형 핵산을 사용할 수도 있다.

[0337] DDX3X의 활성을 저해하는 공지된 화합물로서는 국제 공개 제2011/039735호 팜플릿에 기재되어 있는 화합물, 구체적으로는, 식:

화학식 1



[0338]

[0339] [식 중,

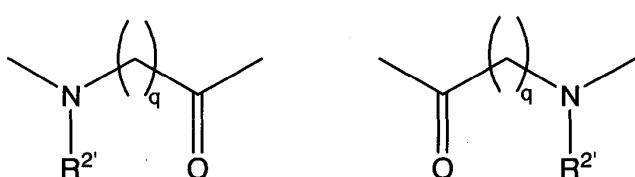
[0340] Z는 CH_2 또는 S를 나타내고,

[0341] X 및 Y는 독립적으로 O 또는 S를 나타내고,

[0342] n은 0 내지 4의 범위 내에 포함되고,

[0343] B는 존재하지 않거나,

화학식 2



[0344]

[0345] (q 는 0 내지 4의 범위 내에 포함되고, $R^{2'}$ 는 수소, $-(\text{CH}_2)_{w'}-\text{OH}$, 또는 $-(\text{CH}_2)_{w'}-\text{NH}_2$ (여기서, w' 는 1 내지 3의 정수임)를 나타냄), B는 C=O 이고,

[0346]

R^1 , R^2 , R^3 은 각각 독립적으로 H, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지의 알킬기, 비치환 또는 치환된 페닐기, 비치환 또는 치환된 페닐알케닐기, 비치환 또는 치환된 페닐알키닐기, 비치환 또는 치환된 비페닐알킬기, 비치환 또는 치환된 복소환기, 비치환 또는 치환된 다환식기, 비치환 또는 치환된 지환기, 또는 $(R^{1a})_m(L-)_pR^{1b}$ -(식 중,

R^{1a} 및 R^{1b} 는 동일하거나 또는 상이하고, 비치환 또는 치환된 복소환기 또는 비치환 또는 치환된 페닐기를 나타내고, R^{1a} 는 또한 비치환 또는 치환된 다환식기도 나타내고, L은 $-(\text{CH}_2)_q-$, $-\text{HC=CH}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$,

$-\text{S}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{NHCONH}-$ 또는 $-\text{NR}^{\text{IC}}-$ 로 이루어지는 군에서 선택되는 2가의 연결기를 나타내고, R^{IC} 는 수소 또는 알킬이며, m 및 p 는 각각 독립적으로 0 또는 1이며, q 는 1 내지 3의 정수임)로 이루어지는 군에서 선택되거나; 또는

[0347] R^2 와 R^3 이 함께는 시클로알킬, 시클로알케닐, 비방향족 복소환, 또는 축합식 또는 다환식 환, 2-옥시인돌(당해 시클로알킬, 시클로알케닐, 축합식 또는 다환식 비방향족 복소환은 상기한 그룹에서 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환될 수도 있음)을 형성할 수도 있고,

[0348] W 는 존재하지 않거나, 또는 독립적으로 0, S, NH, NHCH_2 또는 $\text{N}-\text{R}^5$ (식 중, R^5 는 탄소수 1 내지 6의 직쇄상 또는 분지상 알킬기임)을 나타내고,

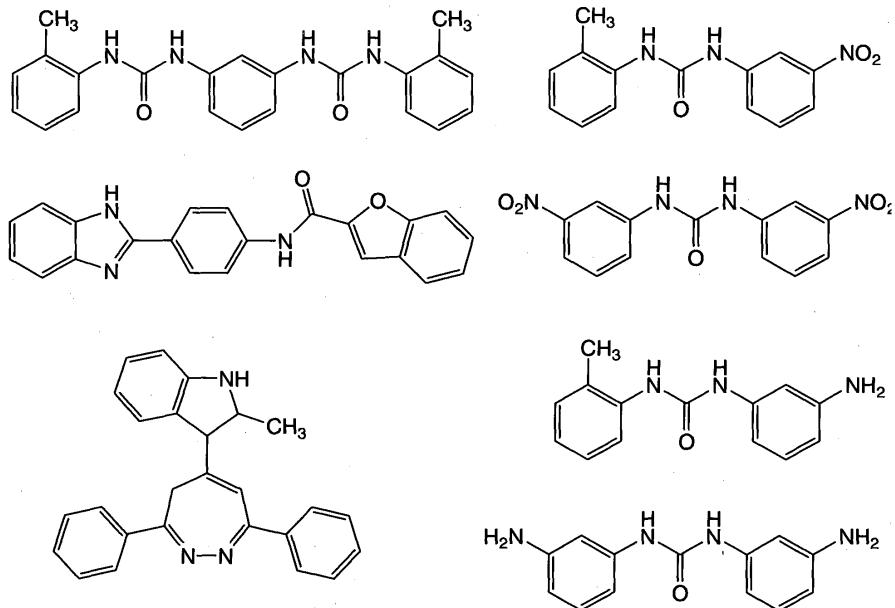
[0349] A는 존재하지 않거나, CONH, NHCO, 또는 NHCONH를 나타내고,

[0350] R^4 는 H, 비치환 또는 치환된 탄소수 1 내지 6의 알킬, 비치환 또는 치환된 알케닐, 비치환 또는 치환된 알키닐, 할로겐, 할로알킬, COOH , OCH_3 , NO_2 , NH_2 , CN, OZ' 또는 SZ' (식 중, Z' 는 H, 또는 비치환 또는 치환된 탄소수 1 내지 6의 알킬임)를 나타냄]

[0351] 로 표시되는 화합물을 들 수 있다.

[0352] 또한, DDX3X의 활성을 저해하는 공지된 화합물로서는 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 22, Issue 5, 1 March 2012, Pages 2094-2098에 기재된 화합물, 구체적으로는 다음 화합물

화학식 3

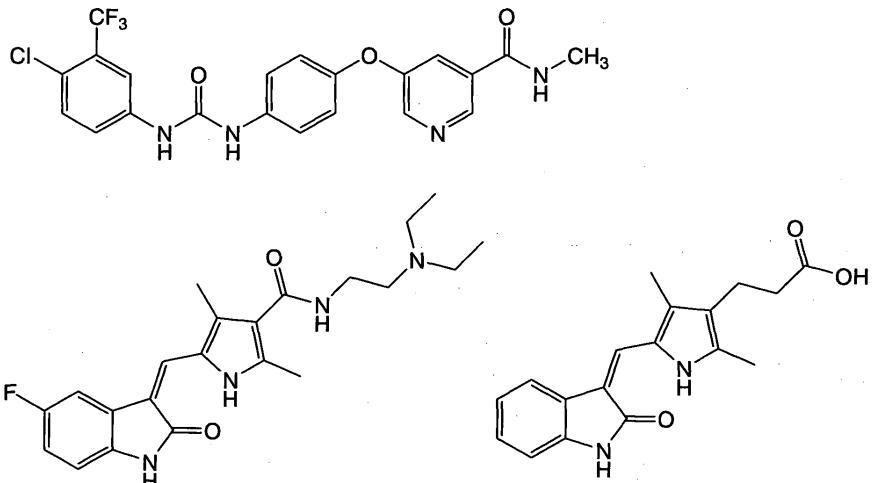


[0353]

[0354] 을 들 수 있다.

[0355] 또한, DDX3X의 활성을 저해하는 공지된 화합물로서는 다음 화합물

화학식 4



[0356]

[0357] 을 들 수 있다.

[0358] 이들 화합물은 약학상 허용되는 염의 형태이어도 좋다.

[0359] 헬리카제인 DDX3X 저해에 의해, 다음 4개의 miRNA: hsa-mir-301a, hsa-mir-301b, hsa-mir-429 및 hsa-miR-3922 가 감소한다. 따라서, 이들 miRNA의 1 이상 (바람직하게는 모두)의 활성을 저해하는 것은 실질적으로 DDX3X의 활성을 저해하는 것을 의미한다. 즉, miRNA 활성을 저해하는 화합물은 본 발명에서의, DDX3X의 활성을 저해하는 화합물에 포함된다.

[0360] 이들 miRNA의 염기 서열을 이하에 나타내었다.

[0361] hsa-mir-301a (miRBase 수탁 번호 MI0000745):

[0362] ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUGCACUACUGUACUUACAGCUAGCAGUGCAUA GUAUUGUCAAAGCAUCUGAAAGCAGG(서열 번호 93)

[0363] hsa-mir-301b (miRBase 수탁 번호 MI0005568):

[0364] GCGCAGGUGCUCUGACGAGGUUGCACUACUGUGGCUCUGAGAACGAGUGCAAUGAUUUG UCAAAGCAUCUGGGACCA(서열 번호 94)

[0365] hsa-mir-429 (miRBase 수탁 번호 MI0001641):

[0366] CGCCGGCCGAUGGGCGUCUUACCAAGACAUGGUAGACCUGGGCCUCUGCUAAUACUGUC UGGUAAAACCGUCCAUCCGCUGC(서열 번호 95)

[0367] hsa-miR-3922 (miRBase 수탁 번호 MI0016429):

[0368] GGAAGAGUCAAGUCAAGGCCAGAGGUCCCCACAGCAGGGCUGGAAAGCACACCUGUGGGAC UUCUGGCCUUGACUUGACUCUUC(서열 번호 96)

[0369] miRNA 활성을 저해하는 화합물로서는 당해 miRNA의 일부 또는 전체 영역(이하, 간단히 표적 서열이라 칭하는 경우가 있음)에 대하여 상보적인 염기 서열(안티센스 miRNA 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0370] 당해 폴리뉴클레오티드로서는 예를 들어, 안티센스 뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0371] 상기 표적 서열의 염기수는 예를 들어, 10 내지 30 염기, 바람직하게는 10 내지 20 염기, 보다 바람직하게는 12 내지 18 염기, 더욱 바람직하게는 14 내지 16 염기이다.

[0372] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 예를 들어, RNA, DNA, 또는 LNA이다. 또한, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 그의 서열에서, miRNA의 활성을 억제할 수 있는 효과를 갖는 한, 1 내지 수 염기(예, 1 내지 2 염기, 1 내지 3 염기, 1 내지 5 염기)가 적어도 어느 하나의 말단에 부가되어 있거나, 내부에서 결실, 치환 또는 부가되어 있는 상기 안티센스 miRNA 서열을 가질 수도 있다.

[0373] [실시예]

[0374] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하는데, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0375] 이하의 실시예에서는 이하의 재료 및 방법을 사용하였다.

[0376] 재료 및 방법

[0377] 마우스

[0378] 8 내지 10주령의 C57BL/6J(B6) 계통의 암컷 마우스를, 일본 클래어사에서 구입하여, 무균의 환경에서 사육하고, 실험에 사용하였다.

[0379] 모든 동물 실험은 니이가타 대학 동물 실험 윤리 위원회에 의해 승인된 실험이다.

[0380] 종양 세포

[0381] B6 유래의 멜라노마 세포인 B16F10을, 인비트로에서 유지하였다. 친종양 세포를 피코에리트린(PE) 결합 항 CD133 모노클로날 항체(13A4)와 항 PE 마이크로비즈(밀테니 바이오텍사)로 표지하였다. CD133 양성 종양 세포와 CD133 음성 종양 세포를 autoMACS(상품명, 밀테니 바이오텍사)를 사용하여, 메이커 제공의 프로토콜에 따라서 분리하였다. 세포의 순도는 90%보다 높았다.

[0382] 모노클로날 항체 및 유세포 분석

[0383] 마우스 CD4(GK 1.5, L3T4), CD8(2.43, Lyt-2), CD3(2C11) 및 마우스 CD62L(MEL14)에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마는 American Type Culture Collection에서 입수하였다. 항 CD4 모노클로날 항체, 항 CD8 모노클로날 항체 및 항 CD62L 모노클로날 항체는 아치사선량(500 cGy)의 방사선을 조사한 DBA/2 마우스의 복수로서 얻었다. PE 표지 항 CD80(16-10A) 모노클로날 항체, 항 CD86(GL1) 모노클로날 항체, 항 CD62L(MEL14) 모노클로날 항체, 항 CD8(2.43) 모노클로날 항체 및 항 CD25(PC61) 모노클로날 항체, 플루오레세인 이소시아네이트(FITC) 표지 항 Thy1.2(30-H12) 모노클로날 항체 및 anti-CD4(GK1.5) 모노클로날 항체는 BD PharMingen사에서 구입하였다. 0.5 내지 1×10^6 개의 세포를, 표지 항체를 사용해서 직접 면역 염색법으로 염색하고, 세포 표면의 표현형(페노타입)을 해석하였다. 각각의 검체(샘플)에 대해서, FACScan(상품명) 플로우식 마이크로플루오로미터를 사용하여, 총수 10,000개의 세포에 대해서 해석을 행했다(벡톤-디킨슨 사). 아이소타입의 컨트롤로서 BD PharMingen사에서 구입한 PE 표지 서브클래스 인식 항체를 사용하였다. 검체는 해석 소프트 CellQuest(상품명, 벡톤-디킨슨사)를 사용해서 해석하였다.

[0384] T세포의 분별(fractionation)

[0385] 나일론 울 컬럼(와꼬 줌야꾸사)을 사용하여, 림프절(LN) 세포로부터 T세포를 농축하였다. 고순도(>90%)의 CD62L 저발현(CD62L^{low}) 세포를 얻기 위해서, 림프절의 T세포를 또한, 염소의 항 래트 면역글로불린 항체(Ig Ab)(Jackson ImmunoResearch Laboratories사)/항 CD62L(MEL14) 모노클로날 항체로 예비 코팅한 T-25 플라스크를 사용한 패닝(panning)법과, 양의 항 래트 Ig Ab/항 CD62L 모노클로날 항체 결합 DynaBeads M-450(Dynal사)에 의한 자기 비즈법을 사용해서 분리하였다. 몇 가지의 실험에서는 또한 Hiura T, Kagamu H, Miura S, Ishida A, Tanaka H, Tanaka J, et al. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. J Immunol. 2005; 175: 5058-66에 기술된 자기 비즈를 사용한 디플리션(depletion)법에 의해, CD4 음성 세포와 CD8 음성 세포로 분리하였다. 고순도의 CD4 양성 세포를 순화할 목적으로는 항 CD4 모노클로날 항체 결합 Dynabead와 Detachabeads(Invitrogen사)에 의한 포지티브 셀렉션법을 사용하였다.

[0386] 골수 유래 수상 세포

[0387] 수상 세포(DC)를, Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsumoto N, et al. CD 40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4(+) T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. J Immunol. 2001; 167: 5678-88에 기재된 방법으로, 골수세포(BM)로부터 발생시켰다. 간결하게 기술하면, 마우스의 대퇴골 및 경골로부터 골수세포를 채취하고, 10ng/ml의 재조합 마우스 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자(rmGM-CSF; 기린사에서 양도)를 첨가한 완전 배지(CM 배지)를 사용하여, T-25 플라스크 중에서, 37°C에서 2시간 인큐베이팅하였다. 비접착 세포를 분리하고, 다른 새로운 플라스크에서 배양을 계속하였다. 6일째에, 비접착 세포를 온화한 피펫팅에 의해 회수하였다. 완전 배지는 10% 불활성화 지질다당류(LPS) 특화된(qualified)(엔도톡신 프리) 소 태아 혈청, 0.1mM 비필수 아미노산, 1μM 피루브산 나트륨, 페니실

린100 U/ml, 스트렙토마이신 술페이트 100 μ g/ml(모두 라이프 테크놀로지사제) 및 5×10^{-5} M 2-머캅토에탄올(시그마 케미컬사제)을 보충한 RPMI1640 배지로 구성되었다.

[0388] DC/종양 백신 소속 림프절 세포

BM과 DC를 CM 중에서, 동일 수의 방사선 조사 종양 세포(5,000 cGy)와 함께 밤새 공배양하였다. BM-DC/종양 세포의 혼합 접종 세포수 1×10^6 개가 되도록, B6 마우스의 양측 복부 피하에 접종하였다. 접종한 BM-DC/종양 백신 소속 림프절로서 서혜부 림프절을 적출하였다. Watanabe S, Kagamu H, Yoshizawa H, Fujita N, Tanaka H, Tanaka J, et al. The duration of signaling through CD40 directs biological ability of dendritic cells to induce antitumor immunity. J Immunol. 2003; 171: 5828-36.에서 설명한 방법에 의해, 단세포 부유 액을 제조하였다.

[0390] 양자 면역요법

피하 종양 모델을 제작하기 위해서, 100 μ l의 행크스액(Hanks' balanced salt solution: HBSS)에 혼탁한 B16-F10 종양 세포를, B6 마우스의 정중선 상피 하에 접종하였다. 접종 후 2일째 또는 3일째에, 마우스에, 아치사량(500 cGy)의 방사선을 조사하고, 그 후 BM-DC/종양 백신 소속 림프절로부터 분리한 T세포를 정맥 주사하였다. 이들 림프절 세포는 Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsumoto N, et al. CD 40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4(+) T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. J Immunol. 2001; 167: 5678-88에서 설명한 바와 같이, 충분한 세포수를 얻기 위해서, 항 CD3 모노클로날 항체(2C11)로 자극하고, 40 U/ml의 IL2와 함께 3일간 완전 배지에서 배양한 것이다. 피하 종양의 긴 직경과 그에 수직한 짧은 직경을, 캘리퍼(caliper)를 사용해서 측정하였다.

[0392] 사이토카인 ELISA

T세포를, 완전 배지 중에서, 고상화 항 CD3 모노클로날 항체, 또는 항원 펠스한 BM-DC로 자극하였다. 상청을 회수하고, IFN- γ , IL-4 및 IL-17의 농도를, 마우스 IFN- γ , IL-4 또는 IL-17 ELISA 키트(Genzyme사)를 사용하여, 정량적 샌드위치 효소 항체법에 의해 측정하였다. 방법은 메이커의 프로토콜에 따랐다.

[0394] in vitro 증식능 측정

CD3 자극 전에, 멜라노마 세포를 5 μ M 5-(6)-카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 디에스테르(CFSE; Molecular Probes사제)를 포함하는 행크스액 중, 37°C에서 15분간 라벨링하고, 2회 세정하였다. CFSE 라벨링된 세포와, 라벨링 되지 않은 세포의 비는 1:10이었다. 1×10^5 /ml의 상기 종양 세포를 완전 배지 중에서 배양하여, 계수하고, 마이크로플루오로미터를 사용해서 해석하여, CFSE 라벨링된 세포수를 결정하였다.

[0396] 면역블로팅 해석

세포를 회수하고, 프로테아제 억제제 혼합액(Sigma사)을 포함하는 노니엣(Nonidet) P-40 버퍼에 용해하였다. 동일한 μ g량의 단백질을, 7.5%의 겔을 사용한 SDS-PAGE에 부가하고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(밀리포어사)에 전사하였다. 종양 세포에 대한 면역블로팅은 DDX3X(Sigma사)와 β -액틴(Sigma사)에 대한 항체를 사용해 행했다. 2차 항체는 서양 고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 표지한 항 마우스 Ig 및 항 토키 Ig(BioRad사 및 Dako사)를 사용하였다. 항체가 결합한 단백질은 ECL 키트(Pierce사)를 사용하여, 가시화하였다. 모든 해석에 대해서, 적어도 3회의 독립한 실험을 행하였다.

[0398] shRNA에 의한 DDX3X의 녹다운(knockdown)

DDX3X의 발현 억제 세포는 shRNA 렌티바이러스 플라스미드(pLKO.1-puro; 시그마 알드리치사)를 사용하여 제작하였다. DDX3X 표적 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 CCGGACGTTCTAAGAGCAGTCGATTCTCGAGAACGACTGCTCTAGAACGTTTTTG(서열 번호: 97)이다. B16 CD133 양성 세포를 신선한 배지에 가하고, 각각의 웰에, 헥사디메트린 브로마이드(8 μ g/ml)를 첨가하였다. 메이커의 프로토콜에 따라서, 이들 세포에, pLKO.1-puro 플라스미드 패키징 벡터를 도입하였다. 유전자 도입 후 약 16시간으로 배지를 교환하고, 그 후 48 내지 72시간 더 배양하였다. 피검 세포는 퓨로마이신 (2.0 μ g/ml)을 포함하는 신선 배지에서 배양되어, 3 내지 4일마다 새로운 퓨로마이신 (2.0 μ g/ml)을 포함하는 배지에서, 약제 내성이 동정될 때 까지, 배지 교환을 행하였다. 최저 5개의 퓨로마이신 내성을 콜로니를 획득하고, 각 클론마다 해석을 위해서 세포를 증식시켰다. DDX3X의 녹다운 효과는 면역블로팅으로 확인하였다.

[0400] 통계학적 해석

그룹마다의 비교는 스튜던트의 t검정에 의해 행하였다. 동적인 종양 증식 데이터는 다변량 일반 선형 모델에 의해 해석하였다. 차는 $P<0.05$ 인 경우, 유의차가 있다고 하였다. 통계학적인 해석은 SPSS 통계 해석 소프트(SPSS사) 또는, GraphPad Prism 5.0 소프트웨어를 사용했다(GraphPad Software사).

[0402] DDX3X 및 그의 부분 웹티드

DDX3X 및 그의 부분 웹티드로서는 화학 합성법에 의해 제조한 것을 사용하였다.

DDX3X의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열이다.

웹티드 J의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 89로 표시되는 아미노산 서열이다.

웹티드 K의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 88로 표시되는 아미노산 서열이다.

DDX3X-10mer의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 17로 표시되는 아미노산 서열이다.

DDX3X-15mer의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 90으로 표시되는 아미노산 서열이다.

DDX3X-20mer의 아미노산 서열은 상기 서열 번호 91로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0410] 실시예 1[0411] DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포의, CD133 양성 종양 항원 특이적 사이토카인 방출

발명자들은 합성 DDX3X 항원으로 프라이밍된 T세포가 CD133 양성 멜라노마 세포를 인식할 수 있는지의 여부를 검토하였다. 이 실험을 위해서, CD62L 저발현 T세포(CD62L^{low})를, 합성 DDX3X로 펄스된 수상 세포를 접종하여 얻은 소속 림프절로부터 분리하였다.

[0413] 96웰 플레이트 중에서, 림프절로부터 분리한 CD62L^{low} CD4 양성 또는 CD8 양성 T세포(1×10^5 개)를, 200 μ l의 완전 배지(CM) 중의 1×10^4 개의 수상 세포로 48시간 자극하였다. 자극용의 수상 세포는 동일한 수의, 방사선(5,000 cGy)을 조사한 CD133 양성 종양 세포 또는 CD133 음성 종양 세포, 또는 합성 DDX3X(5 μ g/ml)로 밤새 자극하였다. 수상 세포는 공배양에 앞서, CD11c 마이크로비즈로 정제하였다.

[0414] 발명자들은 이렇게 해서 얻어진 DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포가, 멜라노마 CSC 특이적으로 IFN- γ 과 IL-17을 분비하는 것을 발견하였다. 그러나, DDX3X 특이적 CD8 양성 T세포는 CD133 음성 멜라노마 및 CD133 양성 멜라노마 세포의 양쪽에 응답했다(도 2, 도 3).

[0415] 다음으로, 발명자들은 멜라노마 CSC 특이적 T세포가 DDX3X를 인식하고, 사이토카인의 생산 여부를 검토하였다. 그 결과, CD133 양성 멜라노마 세포를 백신 접종하여 얻은, 멜라노마 CSC 특이적 CD4 양성 T세포가 DDX3X 특이적으로, 사이토카인을 생산하는 것이 명확해졌다(도 4, 도 5). 놀랍게도, 멜라노마 CSC 특이적 CD4 양성 T세포는 멜라노마 CSC 그 자체에 의한 자극보다도, DDX3X 자극에서, 보다 많은 사이토카인을 생산하였다.

[0416] 따라서, DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포는 DDX3X를 발현하는 종양 세포에 대한 항종양 활성을 갖고, 양자 면역요법에 사용할 수 있다.

[0417] 실시예 2[0418] DDX3X의 백신 접종에 의한 멜라노마 세포에 대한 방어 면역의 유도

[0419] 합성 DDX3X를 백신 접종함으로써, B16 멜라노마 세포에 대한 방어 면역이 유도될지의 여부를 실험하기 위해서, 5 μ g/ml의 DDX3X를 펄스한 수상 세포, 5 μ g/ml의 오브알부민(OVA)을 펄스한 수상 세포, 또는 방사선(5,000 cGy) 조사한 CD133 양성 종양 세포와 8시간 공배양한 수상 세포를, 마우스의 우측 복부 피하에 백신 접종하였다. 14일 후에, 상기 마우스 복부의 정중선을 따라 2×10^6 개의 멜라노마 세포를 피하 접종하였다. 각 그룹의 마우스 수는 5마리이다. 도 6에 도시한 바와 같이, 무처리한 수상 세포 또는 OVA를 펄스한 수상 세포에 의한 처리를 한 마우스와 비교하여, DDX3X를 펄스한 수상 세포의 백신 접종을 한 마우스에서는 종양의 성장이 유의적으로 억제되었다. 또한, DDX3X를 펄스한 수상 세포를 백신 접종한 마우스는 방사선 조사한 CD133 양성 종양 세포와 공배양한 수상 세포를 접종한 마우스보다도 현저하게 강력한 방어 면역을 나타냈다.

[0420] 실시예 3[0421] DDX3X 백신 접종의, 형성한 피부 종양에 대한 치료 효과

또한, DDX3X의 백신 접종이 확립된 종양에 대한 치료효과를 가질 것인지의 여부를 검토하였다. 정중앙에 1×10^6 의 B16 멜라노마 세포를 복부 정중선을 따라 피하 접종한 후, 2, 9 및 16일째에 1×10^6 의 수상 세포를 우측 복부에 접종하였다. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DDX3X 또는 OVA를 펠스한 1×10^6 개의 수상 세포를 마우스의 우측 복부에 피하 접종하였다. 각 그룹의 마우스 수는 12마리로 행하였다. 각 마우스의 종양 성장 곡선을 도 7에 나타내었다. DDX3X로 자극받은 수상 세포를 백신 접종한 12마리의 마우스 가운데 6마리는 최종적으로는 치유되었다. 다른 DDX3X를 펠스한 수상 세포를 접종한 마우스에서는 피부 종양의 증식이 현저하게 억제되었다. 무처리 또는 OVA를 펠스한 수상 세포를 백신 접종한 마우스는 모두 종양에 의해 사망하였다.

[0423] 실시예 4[0424] CD133 양성 멜라노마의 면역원성에서의 DDX3X의 의의의 확인

이전에 B16 멜라노마 세포가 많은 면역원성 단백질을 가진 것이 나타나있다.

여기서, CD133 양성 멜라노마의 면역원성에서의 DDX3X의 의의를 밝히기 위해서, 발명자들은 shRNA에 의한 DDX3X의 뉙다운에 의해 CD133 양성 멜라노마 세포(DDX3X 결실 CD133 양성 B16 세포)를 구축하였다. 총선량 5,000 cGy 방사선을 조사한, 모크-shRNA 및 DDX3X 뉙다운 CD133 양성 B16 세포를 수상 세포(DC)와 8시간 공배양하였다. CD11c 마이크로비즈와 autoMACS(상품명)로 정제한 1×10^6 개의 CD11c 양성 세포를, B6 마우스의 피하에 접종하였다. 면역 2주일 후에, 그 마우스의 복부 정중선을 따라, 2×10^6 개의 B16 멜라노마 세포를 피하에 접종하였다. 각 그룹의 마우스 수는 5마리이었다. 도 8에 도시한 바와 같이, CD133 양성 모세포, 또는 CD133 양성 모크 유전자 도입 종양 세포(컨트롤)는 효과적인 방어 면역을 가졌다. 이에 대해서, DDX3X를 결여한 CD133 양성 종양 세포에서는 항종양 방어 면역을 유도하지 않았다. 즉, DDX3X를 결여한 CD133 양성 멜라노마는 백신 효과를 상실하고 있었다.

[0427] 실시예 5

소세포 폐암 환자 말초 혈액 (15ml)을 채취하였다. 림포프레프(Lymphoprep)(상품명)(코스모 · 바이오 가부시끼 가이샤)를 사용한 밀도 구배 원심법에 의해 단핵구 세포 분획을 채취하고, CD14⁺ 세포를 CD14 마이크로비즈와 autoMACS를 사용해서 분리하였다. CD14⁺ 세포를 rhGM-CSF(1 ng/ml, 기린으로부터 양도)와 IL-4(10 ng/ml, R&D systems사)를 가해서 배양함으로써, 5일째까지 수상 세포로 분화, 성숙시켜 사용하였다. 수상 세포는 합성 DDX3X 단백질(3.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 같은 농도의 웨티드(웨티드 J, 웨티드 K)를 포함한 배양액에서 밤새 배양한 후, CD11c 마이크로와 autoMACS에 의해 CD11c 양성 세포를 순화하고, 항원 제시 세포로서 사용하였다. CD14⁻ 분획으로서 얻어진 세포로부터 나이브 T세포와 제어성 T세포를 제거하기 위해서 CD62L^{high} 세포를 항 인간 CD62L 항체(1H3) 결합 Dyna 비즈에 의해 제거하였다. 이 CD62L^{low} CD14⁻ 세포를 BD BioCoat(상품명) T세포 활성화 플레이트(베톤 디킨슨사) 상에서 48시간 배양하고, 그 후 20U/ml rhIL-2(시오노기로부터 양도)를 포함한 배양액에서 4일간 배양하였다. 이 결과 10배 정도로 증가한 세포의 95% 이상이 CD3⁺ T세포인 것을 FACS에 의해 확인하고, 이 CD3⁺ T세포를 반응 세포로서 사용하였다. 반응 세포 (1×10^5)와 항원 제시 세포 (1×10^4)를 200 μl 의 배양액에서 둑근 바닥 96웰 · 플레이트에서 24시간 배양하고, 회수한 상청의 IFN γ 농도를 ELISA법에 의해 측정하였다. 포지티브 컨트롤로서 항 CD3 항체가 고상화된 96웰 · 플레이트에서 응답(responder) 세포 1×10^5 를 배양한 상청을 사용하였다. 결과를 도 9에 나타내었다.

[0429] 실시예 6[0430] DDX3X 유래 웨티드에 의한 CTL의 유도 및 IFN γ 생산

DDX3X 특이적 CTL의 유도 및 DDX3X 유래 웨티드 자극에 의한 IFN γ 생산 평가를 실시하였다.

사용한 시약류를 표 1에, 유도에 사용한 웨티드를 표 2에 나타내었다.

표 1

시약명	공급처	카탈로그 번호
Lymphoprep	AXISSHIELD	1114547
Hank's Balanced Salt Solution	SIGMA	H9269-500ML
헤파린 나트륨 주사액	아지노모또	70111
AIM-V	life technologies	12055-091
Human AB Serum	다이닛폰 스미토모	2931949
Recombinant Human IL-7	PeproTech, Inc.	200-07
Recombinant Human IL-2	PeproTech, Inc.	200-02
셀 맹커	와코 줌야쿠 고교	630-01601
OptEIA Kit(Human IFN-γ)	BD bioscience	555142
BD OptEIA Reagent Set B	BD bioscience	550534

표 2

펩티드명	서열	공급처
DDX3X-10mer	LEDFLYHEGY	
DDX3X-15mer	KGADSLEDFLYHEGY	American Peptide Co. Inc.
DDX3X-20mer	FVETKKGADSLEDFLYHEGY	

배지류의 제조

Human AB serum은 56°C, 30분으로 비활성화를 행하고, 0.22 μm 필터(Serum Acrodisc, Pall사)를 사용해서 여과하여 사용하였다. 배지는 500mL의 AIM-V에 비활성화한 human AB serum(50mL)을 클린 벤치 내에서 첨가 및 혼합한 것을 사용하였다. 헤파린 함유 HBSS는 500mL의 Hank's Balanced Salt Solution에 10mL의 헤파린 나트륨 주사액(10000 U/mL)을 첨가·혼합한 것(20 U/mL 헤파린)을 사용하였다. 모두 사용시까지는 4°C에서 보존하였다.

채혈 대상자 선발

채혈 대상자는 HCT116이 갖는 HLA-A0201, 또는 소프트웨어(데카머를 선택하였음)를 사용한 계산에 의해 DDX3X 펩티드가 고친화성을 나타낸다고 예측된 HLA-A*2601을 갖는 정상인 지원자를 선발하였다. 또한, HLA-A*0201을 갖는 지원자는 6명, HLA-A*2601을 갖는 지원자는 5명이었다.

말초혈 유래 단핵구(PBMC)의 제조

정상인 자원자로부터 얻어진 말초혈(40mL)을 20mL당 13mL의 헤파린 함유 HBSS로 희석하고, Lymphoprep 15mL를 넣은 립프구 분리 투브(Leucosep(상품명), Greiner사)에 중충하였다. 원심 분리(2000rpm, 20°C, 20분) 후, 중간층(PBMC)을 50mL 원심관에 회수하고, 배량의 헤파린 함유 HBSS로 희석하여 다시 원심분리하였다(1800rpm, 20°C, 5분). 얻어진 펠렛을 10mL의 헤파린 함유 HBSS로 혼탁하고, 원심분리하였다(1200rpm, 4°C, 5분). 이 조작을 다시 반복하였다. 얻어진 PBMC의 펠렛을 배지(1mL)로 혼탁하고, 1.5×10^7 세포를 DDX3X 특이적 CTL 유도용에 사용하고, 나머지를 재자극 시의 항원 제시 세포용에 사용하였다. 재자극 시의 항원 제시 세포용 PBMC에 대해서는 셀 맹커에 혼탁해서 -80°C 동결보존하고, 사용 시에 용해해서 사용하였다.

DDX3X 특이적 CTL의 유도

PBMC (1.5×10^7 세포)를 1.5×10^6 세포/well로 24웰 플레이트에 과종했다(Day 0). 다음으로, 각 well에 DDX3X 유래 펩티드 3종류(최종 농도는 각 20 $\mu\text{g/mL}$) 및 IL-7(최종 농도 10 ng/mL)을 첨가해 37°C, 5% CO_2 로 배양하였다.

1주일 후(Day 7), 재자극을 행하였다. 재자극에는 먼저, 항원 제시 세포로서 Day 0에서 동결보존한 PBMC를 용해하고, 세포수를 3×10^6 세포/mL 이하로 제조해 DDX3X 유래 펩티드 3종(최종 농도 각 20 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하여 37°C, 2시간 표지하였다. 계속해서 마이토마이신 C[교와 핫고 기린] 용액을 최종 농도 50 $\mu\text{g/mL}$ 가 되게 첨가하고, 37°C, 45분간 처리하였다. 이 세포를 AIM-V로 2회 세정하고, 배지에 재현탁하여 항원 제시 세포 혼탁액으로 하였다. 다음으로, 1주일 배양한 세포를 회수하고, 1.2×10^6 세포/웰로 24웰 플레이트에 과종하고, 항원

제시 세포 혼탁액을 동등한 세포수로 과종하였다. 마지막으로 IL-7을 10 ng/mL가 되게 첨가하고, 37°C, 5% CO₂로 배양하였다. 2일 후(Day 9)에 각 웨의 배양액을 절반량 조용히 빼내고, 대신에 40 U/mL의 IL-2 함유 배지를 첨가해서 배양을 계속하였다. 그후 1일 간격으로(Day 11, Day 13) 20 U/mL의 IL-2 함유 배지로 마찬가지로 배양액의 절반량 교환 조작을 행하였다. Day 14 및 Day 21에도 마찬가지의 조작으로 재자극을 행하고, 20 U/mL의 IL-2 존재 하에서 공배양하고, 1일 간격으로(Day 16, Day 18, Day 20 및 Day 23, Day 25, Day 27) 20 U/mL의 IL-2 함유 배지로 마찬가지로 배양액의 절반량 교환 조작을 행하고, Day 28까지 배양을 계속하였다.

[0444] DDX3X 유래 웨티드 자극에 의한 IFN γ 생산 평가

Day 21, Day 28에 회수한 세포를 배지로 적절히 희석해 96웰 둥근 바닥 플레이트에 과종하였다 (100 μ L씩). 계속해서, DDX3X 유래 웨티드가 40 μ g/mL 포함되는 배지를 제조하고, 동일하게 96웰 둥근 바닥 플레이트에 100 μ L씩 첨가해(웨티드 최종 농도=20 μ g/mL), 5% CO₂/37°C에서 배양하였다. 또한, ELISA는 각 자극에 대하여 3회 실시하였다. 또한, 음성 대조 자극으로서 용매인 DMSO에 의한 자극을 채용하였다.

[0446] 웨티드 자극 후 24시간 배양한 후, 각 웨로부터 배양 상청을 조용히 회수하였다. 각 배양 상청 중의 IFN- γ 농도는 ELISA 시약 세트(BD OptEIA ELISA set(human IFN- γ)(상품명))를 사용하고, 첨부 프로토콜을 개변하여 ELISA를 행하였다. 즉, 코팅용 항체, 검출용 항체, HRP 표지 항체는 500배 희석으로 사용하였다. 측정은 가능 과정 흡광 마이크로플레이트 리더(VERSAmax(상품명), Molecular Device사)에서 행하였다.

[0447] 결과

[0448] 결과를 도 10에 도시한다. 도면 중 각 도너(A 내지 J)에 대한 막대 그래프의 칼럼은 좌측으로부터, DMSO, 10mer, 15mer, 20mer를 나타낸다.

[0449] Day 21 평가 시에는 A*0201을 갖는 3검체는 어느 자극에서도 IFN γ 생산은 인식되지 않았다. 한편, A*2601을 갖는 5검체 중 2검체에서 DDX3X-10mer 자극시에만 IFN γ 생산이 인식되었다.

[0450] 계속해서, Day 28 평가 시에는 A*0201을 갖는 6검체 중 1검체에서 DDX3X-10mer 자극 시에 IFN γ 생산이 인식되었다. 한편, A*2601을 갖는 5검체 가운데 Day 21에 DDX3X-10mer 자극 시 IFN γ 생산이 인식된 2검체 이외에도, 새롭게 1검체가 DDX3X-20mer 자극 시에 IFN γ 생산이 인식되었다.

[0451] 이상에서 정상인 PBMC를 DDX3X 유래 웨티드 자극함으로써, 자극 특이적인 IFN γ 생산 세포의 유도가 가능한 것이 나타났다.

[0452] 실시예 7

[0453] DDX3X/DC 면역 자극 CD4 양성 T세포의 항종양 효과

[0454] 수상 세포를, 5 μ g/mL의 합성 DDX3X로 8시간 펄스하고, CD11c 마이크로비즈와 autoMACS(상품명)에서, CD11c 양성 세포(DDX3X/DC)로서 분리하였다. CD62L^{low} T 세포는 DDX3X/DC 백신 소속 럼프절로부터 분리하였다. 럼프절 T세포인 CD62L^{low} T 세포는 "재료 및 방법"에서 설명한 방법에 따라, 5일간 배양하였다. 배양된 CD62L^{low} T세포를, 아치사량(500 cGy)의 전신 방사선 조사를 행한 후 2일간 지난 피부 멜라노마를 갖는 마우스에, 정맥 주사하였다. DDX3X 특이적 T세포는 항종양 활성을 갖고, 피부 종양의 성장을 현저하게 억제하는 것이 명확해졌다(도 11A).

[0455] 이 점에서, DDX3X/DC 백신 소속 럼프절 T세포가 항종양 치료효과를 가진다는 것이 명확해졌다.

[0456] 또한, CD4 양성 T세포 또는 CD8 양성 T세포의 어느 것이 항종양 활성을 담당하는지를 조사하였다. 배양 5일 후의 럼프절 T세포를 자기 비즈를 사용해서 정제하여, CD4 양성 T세포 및 CD8 양성 T세포를 얻었다. 10×10^6 개의 CD4 양성 럼프절 T세포 또는 CD8 양성 T세포를 정맥 주사하였다. 10×10^6 개의 CD8 양성 T세포를, 아치사량(500 cGy)의 전신 방사선 조사를 행한 후 2일이 지난 피부 멜라노마를 갖는 마우스에 주입했지만, 유의한 항종양 활성은 인식되지 않았다. 이에 대해, DDX3X 특이적 CD4 양성 T세포는 높은 항종양 활성을 나타내고, 그 결과, 종양이 치유되었다(도 11B).

[0457] 실시예 8

[0458] DDX3X의 특이적 발현

- [0459] DDX3X가 인간의 종양 세포에서 발현하고 있는지의 여부를 검토하기 위해서, 추정 CSC 마커인 CD133, CD44 및 CD24에 대해서, 87.5 및 S2(인간 소세포 폐암), HCT116(인간 대장암), A549(인간 비소세포 암성 폐암), WM115(인간 멜라노마) 및 MCF7(인간 유방암) 세포를 해석하였다.
- [0460] 도 12에 도시한 바와 같이, 87.5 및 HCT116은 CD133을 발현하고 있고, 기타 세포는 발현하지 않았다. 87.5 세포는 부유 응집체 형상으로 증식하고, 용이하게 종양 덩어리를 형성하였다. MCF7은 $CD44^+$ 및 $CD24^{-/low}$ 의 표현형을 나타내고, 일반적인 유방암 줄기세포의 표현형이라고 생각되었다(후기 참고 문헌 1 내지 3).
- [0461] 참고 문헌 1: Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003; 100: 3983-8.
- [0462] 참고 문헌 2: Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer research. 2005; 65: 5506-11.
- [0463] 참고 문헌 3: Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. Breast Cancer. 2010; 17: 80-5.
- [0464] 또한, 정상 인간 세포(인간 상피 각화 세포(NHEK), 인간 미소 혈관 내피 세포(HMEC), 정상 인간 기관지 상피 세포(NHBE)) 및 암세포(87.5, S2, HCT116, A549, WM115, MCF7)로부터 전체 세포 용해액을 추출하였다. DDX3X 및 β -액틴에 대한 항체를 사용하여, 종양 세포에 대한 면역 블로팅 분석을 하였다.
- [0465] 실험에 사용된 모든 세포에서 DDX3X가 발현되어 있던 것에 대해서, 정상 인간 상피 각화 세포(NHEK), 인간 미소 혈관 내피 세포(HMEC) 및 정상 인간 기관지 상피 세포(NHBE)에서는 DDX3X는 조금밖에 발현하지 않았다. 또한, 87.5, HCT116 및 MCF7과 같은, 추정 CSC 마커 양성 세포에서는, DDX3X가 강하게 발현하고 있었다(도 13). 따라서, DDX3X는 마우스 멜라노마 줄기세포에서 발현할 뿐만 아니라, 인간의 각종 종양에서 발현하는 것이 나타났다.
- [0466] 실시예 9
- [0467] 인간 주화 대장암 세포 HCT116은 CD133 양성 세포가 그 대부분을 차지하고, DDX3X를 고발현하고 있다. 렌티바 이러스 벡터에 의해 도입한 shRNA에 의해 DDX3X를 높다운한 1-4 세포와 모크(mock) 유전자 도입 세포인 1-6 세포를 사용하여, 세포 손상 수복 실험을 행하였다. 또한, 1-4 세포와 1-6 세포의 증식 속도에 차가 없는 것을 미리 확인하였다. 24-웰 플레이트에 동일수 과종한 1-4 세포와 1-6 세포가 서브 콘플루언트에 이른 상태에서 피펫 칩에 의해 직선상으로 세포 박리를 행하고, 그 후 경시적으로 손상 수복의 경과를 관찰하였다. 그 결과, DDX3X를 높다운한 1-4 세포에서는 조직 수복이 지연되었다(도 14).
- [0468] 실시예 10
- [0469] 주화한 소세포 폐암 세포는 DDX3X를 대량으로 발현하고 있었던 점에서, 소세포 폐암 환자 말초혈 중에 DDX3X를 인식해서 사이토카인 생산하는 T림프구가 존재하는지를 검토하였다. 본 연구는 니이가타 대학 의학부 윤리 위원회에서 승인되었다.
- [0470] 설명에 따른 동의를 얻은 후, 말초 혈액 (15ml)을 채취하였다. 림포프레프(상품명)(코스모·바이오 가부시끼가 이샤)를 사용한 밀도 구배 원심법에 의해 단핵구 세포 분획을 채취하고, $CD14^+$ 세포를 CD14 마이크로비즈와 autoMACS를 사용해서 분리하였다. $CD14^+$ 세포는 rhGM-CSF(1 ng/ml, 기린으로부터 양도)와 rhIL-4(10 ng/ml, R&D Systems사)를 가해서 배양함으로써, 5일째까지 수상 세포로 분화되었다. 수상 세포는 합성 DDX3X 단백질 (3.3 μ g/ml) 또는 같은 농도의 OVA를 포함한 배양액에서 밤새 배양하고, CD11c 양성 세포를 CD11c 마이크로비즈와 autoMACS에 의해 순화하고, 항원 제시 세포로서 사용하였다. $CD14^-$ 분획으로서 얻어진 세포로부터 나이브 T세포와 제어성 T세포를 제거하기 위해서 CD62L^{high} 세포를 항 CD62L 항체(1H3) 결합 Dyna 비즈에 의해 제거하였다. 이 CD62L^{low} $CD14^-$ 세포를 BD BioCoat(상품명) T세포 활성화 플레이트(벡톤 디킨슨사) 상에서 48시간 배양하고, 그 후 20 U/ml rhIL-2(시오노기 세야꾸로부터 양도)를 포함한 배양액에서 4일간 배양하였다. 이 결과 얻어진 세포의 95% 이상이 CD3 양성 T세포인 것을 FACS에 의해 확인하고, 반응 세포로서 사용하였다. 반응 세포

(1×10^5)와 항원 제시 세포 (1×10^4)를 200 μ l의 배양액에서 둑근 바닥 96웰·플레이트에서 24시간 공배양하였다. 공배양 후 회수한 상청을 사용해서 ELISA법에 의해 IFN γ 농도를 측정하였다. 항원 제시 세포로서, 단백질의 펠스를 행하지 않은 수상 세포, DDX3X를 펠스한 수상 세포, OVA를 펠스한 수상 세포를 사용하였다. 표 3 중, "Yes"는 DDX3X를 펠스한 수상 세포와 공배양했을 때에만 T세포로부터 유의차를 가진 IFN γ 생산이 인식된 것을 나타내고 있다. 또한, 표 중의 %Treg와 %Teff는 말초혈로부터 분리한 직후에 단핵구 분획을 FACS 해석하고, 총 CD4 $^+$ T세포수에 대한 제어성 T세포 비율, 이팩터 T세포 비율을 나타낸 것이다. FACS 해석은 Koyama K, Kagamu H, et al. Reciprocal CD4 $^+$ T-cell balance of effector CD62L $^{\text{low}}$ CD4 $^+$ and CD62L $^{\text{high}}$ CD25 $^+$ CD4 $^+$ regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. Cl in Cancer Res. 2008; 14: 6770-9.에 보고한 대로, CD62L $^{\text{high}}$ CD25 $^+$ CD4 $^+$ T세포를 제어성 T세포(Treg), CD62L $^{\text{low}}$ CD4 $^+$ T세포를 이팩터 T세포(Teff)로서 행했다.

[0471]

이 결과, 정상인(HV), 원격 전이를 갖는 소세포 폐암 환자(SCLC-ED), 치유된 소세포 폐암 환자에서는 일례도 DDX3X에 반응하는 T세포를 검출할 수 없었지만, 원격 전이가 없는 소세포 폐암(SCLC-LD)에서는 12명 중 5명에서 DDX3X에 반응해 특이적 IFN γ 생산을 나타내는 T세포가 존재하고 있는 것이 명확해졌다. 이것은 DDX3X 특이적 T세포를 갖는 소세포 폐암 환자의 예후가 양호한 것을 나타내고 있다.

[0472]

표 중, 「Yes」는 혈중에 DDX3X-특이적 T세포가 검출된 것을 나타내고, 「No」는, 혈중에 DDX3X-특이적 T세포가 검출되지 않은 것을 나타낸다.

표 3

	피시험자	DDX3X- 특이적 T 세포	% Treg	% Teff
SCLC-LD	#1	Yes	2.83	30
	#2	Yes	1.06	26
	#3	No	3.88	8.8
	#4	No	3.48	9.7
	#5	Yes	4.88	30
	#6	No	4.95	
	#7	No	7.53	
	#8	No	8.59	
	#9	No		
	#10	No		
	#11	Yes		
	#12	Yes	4.23	
SCLC-ED	#13	No	4.15	60
	#14	No	3.47	5.3
	#15	No	1.62	30
	#16	No	6.49	
	#17	No	4.03	
	#18	No	1.82	12
치유된 SCLC	#19	No	2.36	
	#20	No	4.84	16.6
	#21	No	3.98	21
	#22	No	1.92	13.4
	#23	No		27
HV	#24	No	0.95	8.1
	#25	No	1.56	8.7
	#26	No	2.37	
	#27	No	1.12	16.2
	#28	No	1.87	21.2
	#29	No	1.57	

[0473]

[0474] 실시예 11

[0475] 인간 주화 대장암 세포 HCT116로부터 DDX3X 녹다운한 1-4 세포의 부유 세포 집괴(스페로이드) 형성능을 검토하였다. 비접착 상태에서의 배양에서, 친수 HCT116(CDD133+)은 스페로이드 형성 능력을 가지고 있지만, DDX3X 발현을 상실한 1-4 세포에 스페로이드 형성능은 보여지지 않았다(도 15).

[0476]

[0477] 실시예 12

DDX3X는 RNA 헬리카제 활성을 갖고, *C. elegans*나 *Drosophila*에서는 miRNA의 핵-세포질 수송, 프로세싱, 성숙에 관계되는 것이 알려져 있지만, 인간 세포에서 miRNA에 관여하고 있는 것은 보고되어 있지 않다. 따라서, DDX3X를 고발현하고 있는 인간 종양 세포, HCT116에서 DDX3X를 녹다운함으로써 변동하는 miRNA가 존재하는지를 검토하였다.

[0478] HCT116 세포로부터 DDX3X를 녹다운한 1-4 세포와 모크 도입 세포인 1-6 세포를 사용하여, miRCURY LNAmeration(상품명) microRNA Array 6th generation(필젠파)을 행하였다. 주석 정보로서 miRBase Release17 을 사용하고, 어레이의 판독에는 GenePix 4000B(Molecular Devices사), 화상의 수치화 및 보정은 Array-Pro

Analyzer Ver 4.5(Media Cybemetics사), 정상화(normalization)에는 Local regression법을 사용하였다. 검토한 2684의 miRNA 중, 1-6 세포에 대하여 1-4 세포에서 발현이 증가하고 있는 것은 인식되지 않았다. 한편, 정상화 강도(normalized intensity) ≥ 10 , 정상화 강도(합계) \geq 음성 대조의 평균값(=85)을 만족하고, 1-6 세포에 대하여 1-4 세포에서 정상화 강도 비 ≤ 0.5 로 감소하고 있던 miRNA로서 hsa-miR-301a, hsa-miR-429, hsa-miR-301b, hsa-miR-3922-3p의 4개를 발견하였다.

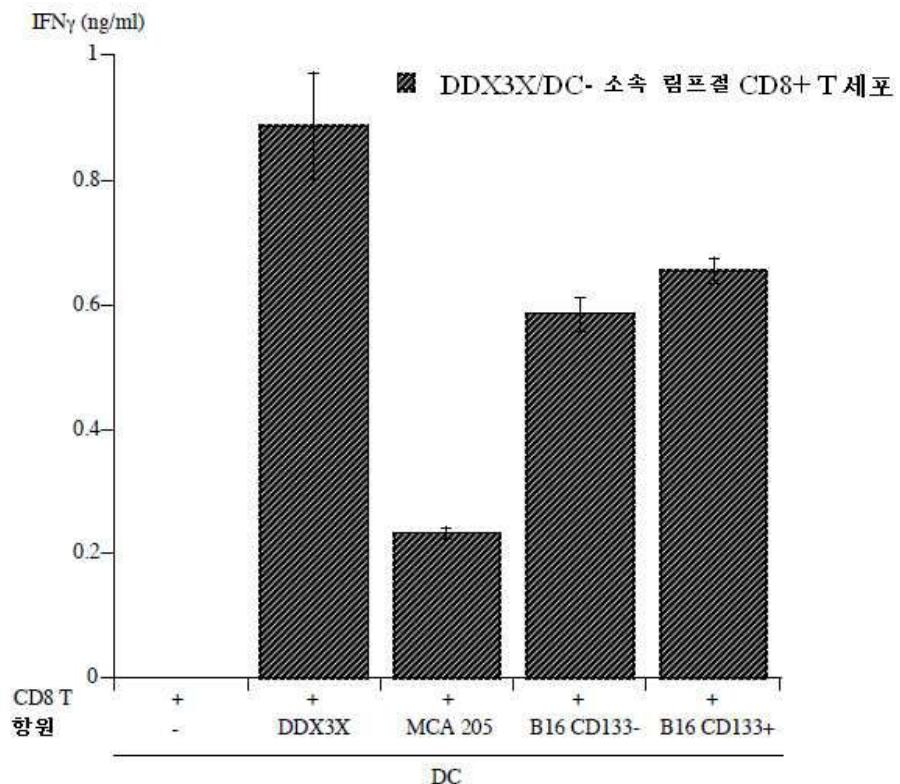
도면

도면1

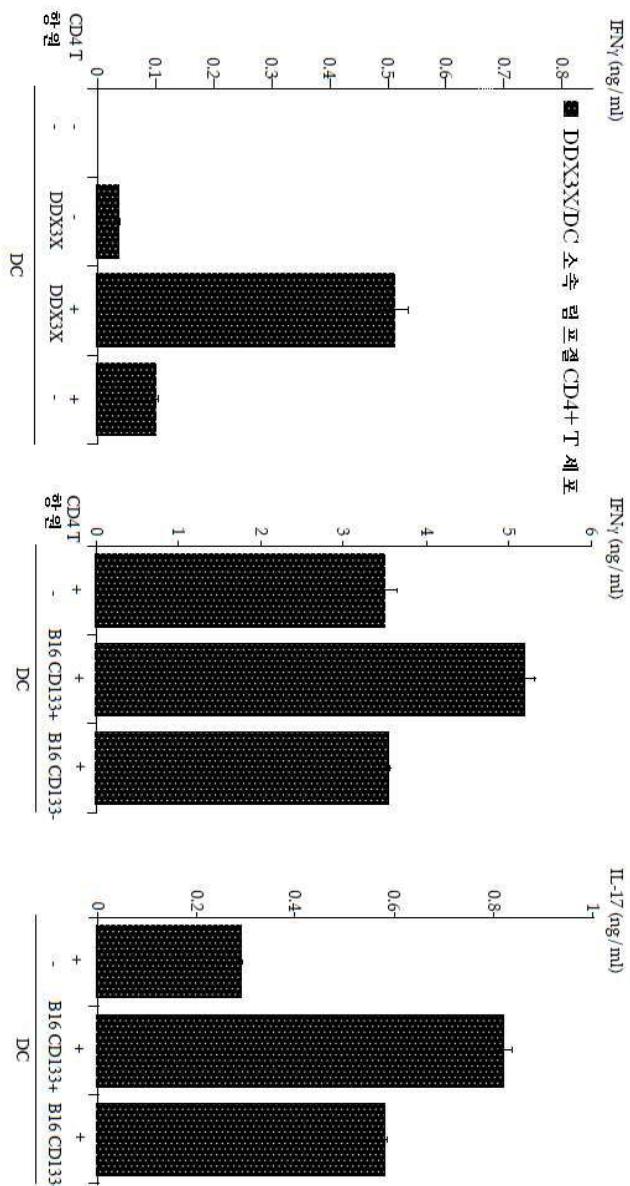
서열 번호: 1

1 mshwavenal gldqqfagld lnsstdnsggg staskgryip phlrnreatk gfydkdssew
 61 ssskdkdays sfgsrsdsrg kssffsdrsg gsrgrfddrg rsdydgisr gdrsgfgkfe
 121 rgnsrwodk sdeddwskpl ppserleqel fsggntginf ekyddipvea tgnncpphie
 181 sfsdvmegi imgnietry trptpvqkha ipi ikekrdl macaqtgssk taafl1pils
 241 qiydgpgea lramkengry grrkaypisl vlaptrrelav qiyeearkfs yrsrvrpbvv
 301 yggadigqqi rdlergchll vatpgrlvdm mergkigldf ckylvlddead rmldmgfepq
 361 irriqeodtm ppkgvrhrtm fsatfpkeiq mlardfldey iflavgrvgs tsenitqkvv
 421 wveesdkrsf lldllnatgk dsltlvfvet kkgadsledf lyhegyacts ihgdrsqrdr
 481 eealhqfrsg kspilvatav aargldisnv khvinfdlps dieeyvhrieg rtgrvgnlgl
 541 atsffnerni nitkdlldll veakqevpsw lenmayehhy kessrgrsks srfsggfear
 601 dyrqssgass ssfsssrass srsgggghgs srgfsgggys gfyndgysg nynsqgvdw
 661 gn

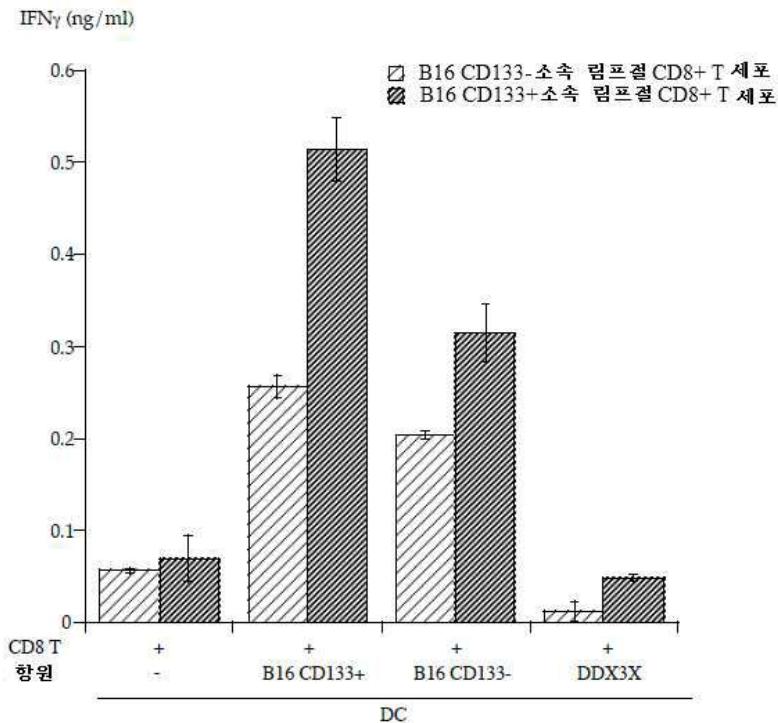
도면2



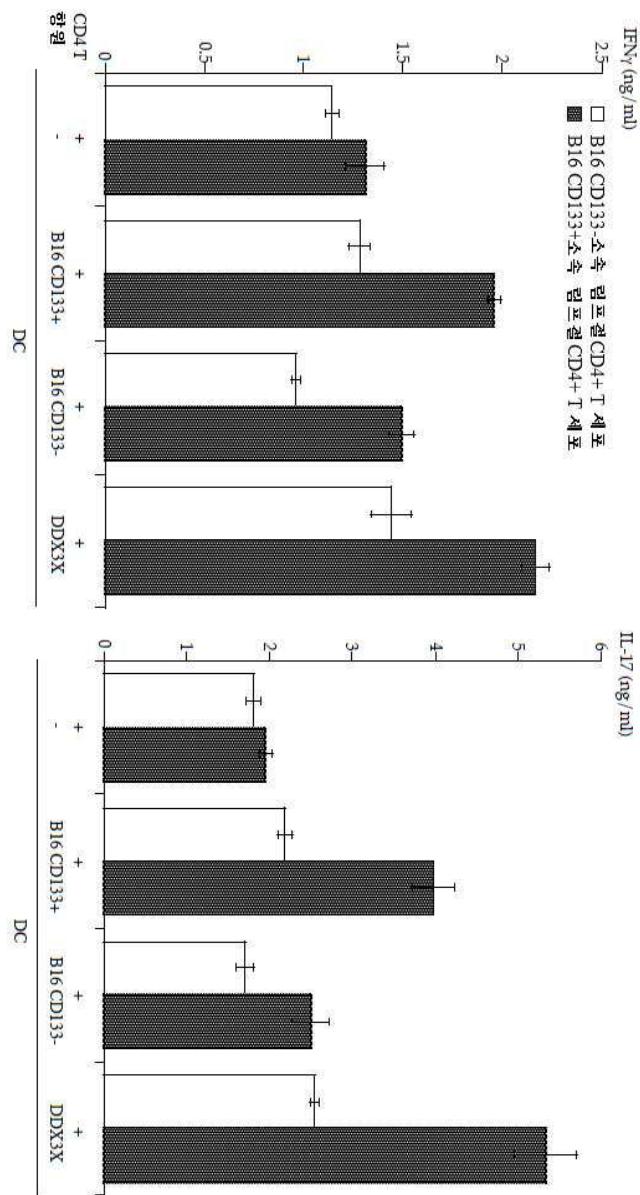
도면3



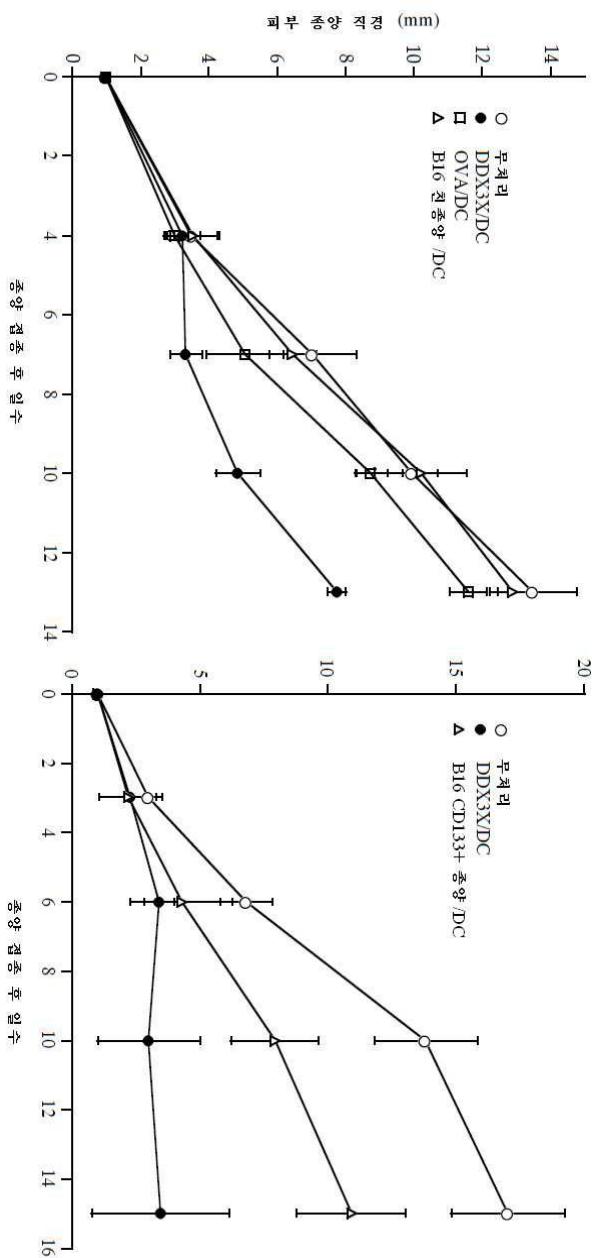
도면4



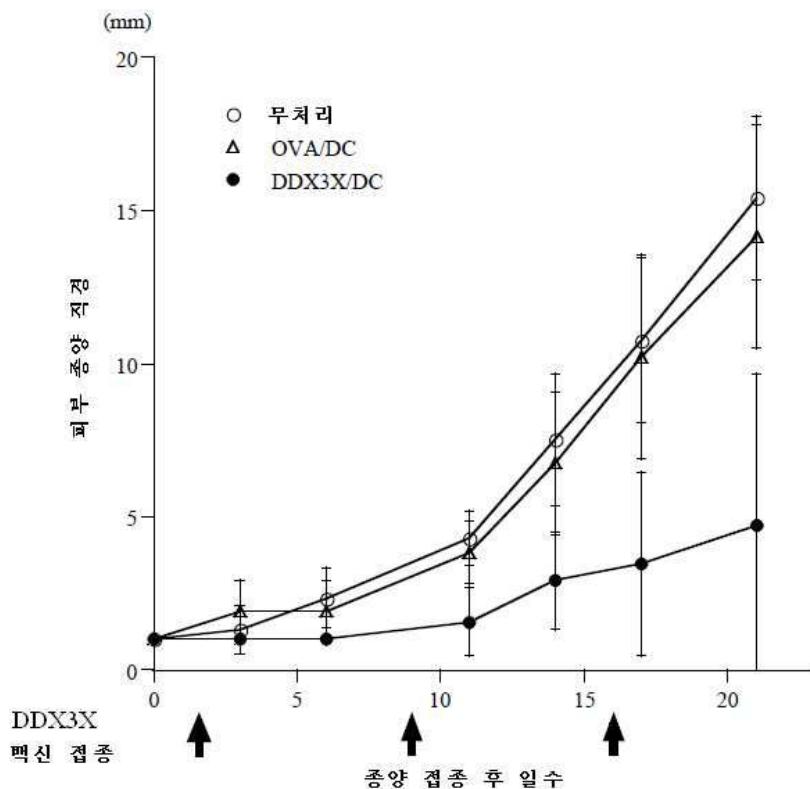
도면5



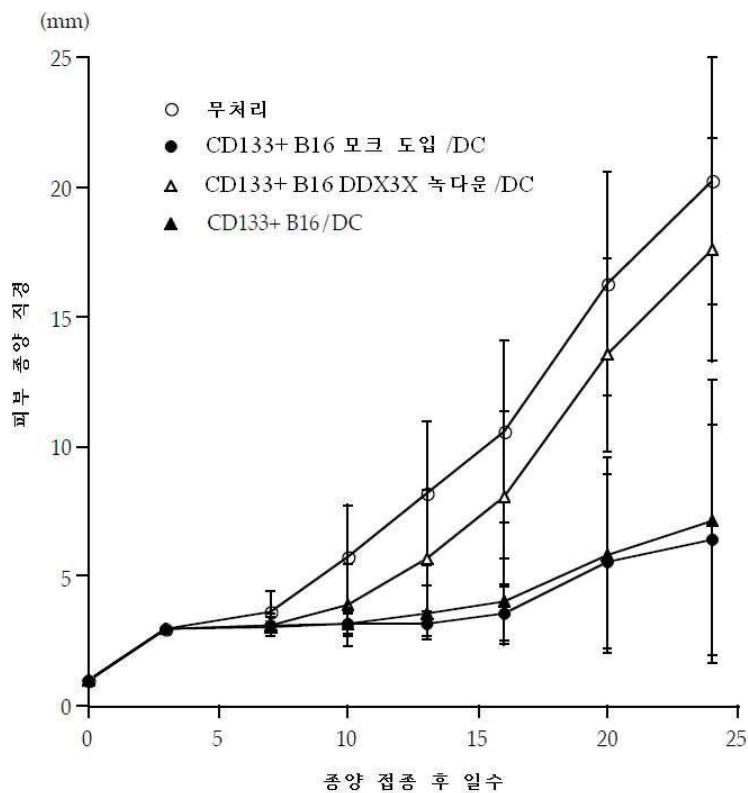
도면6



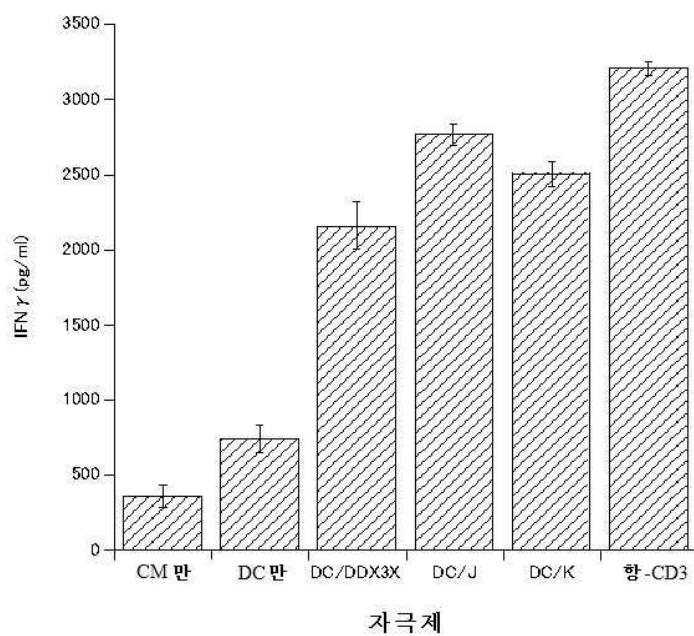
도면7



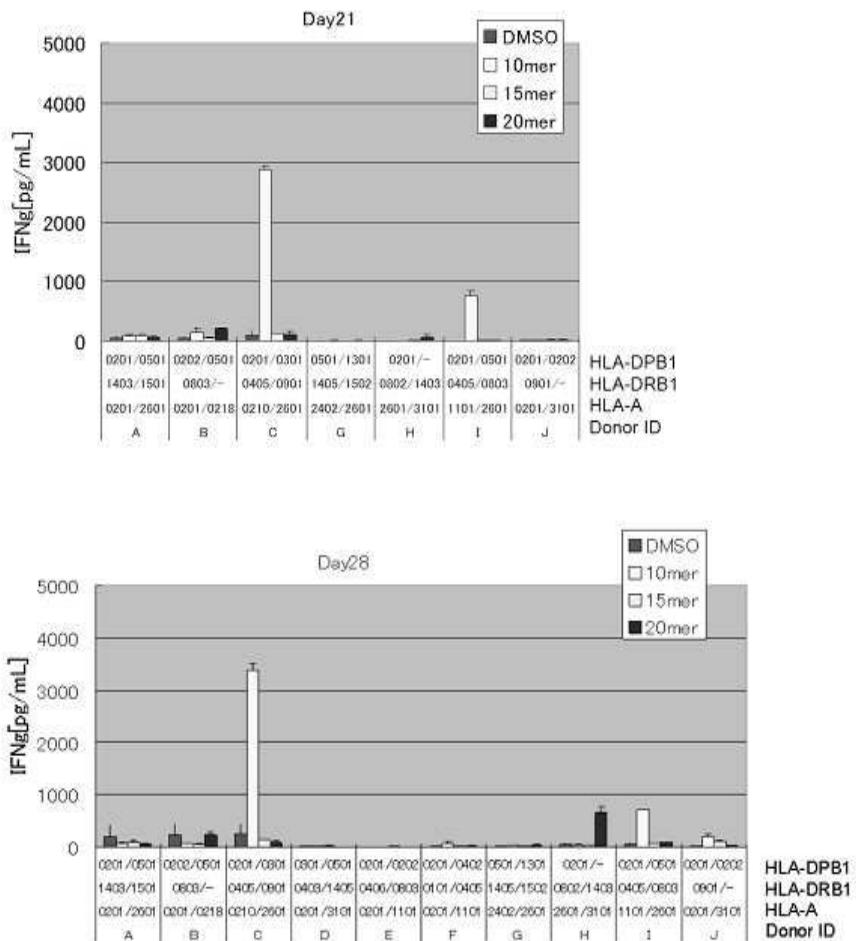
도면8



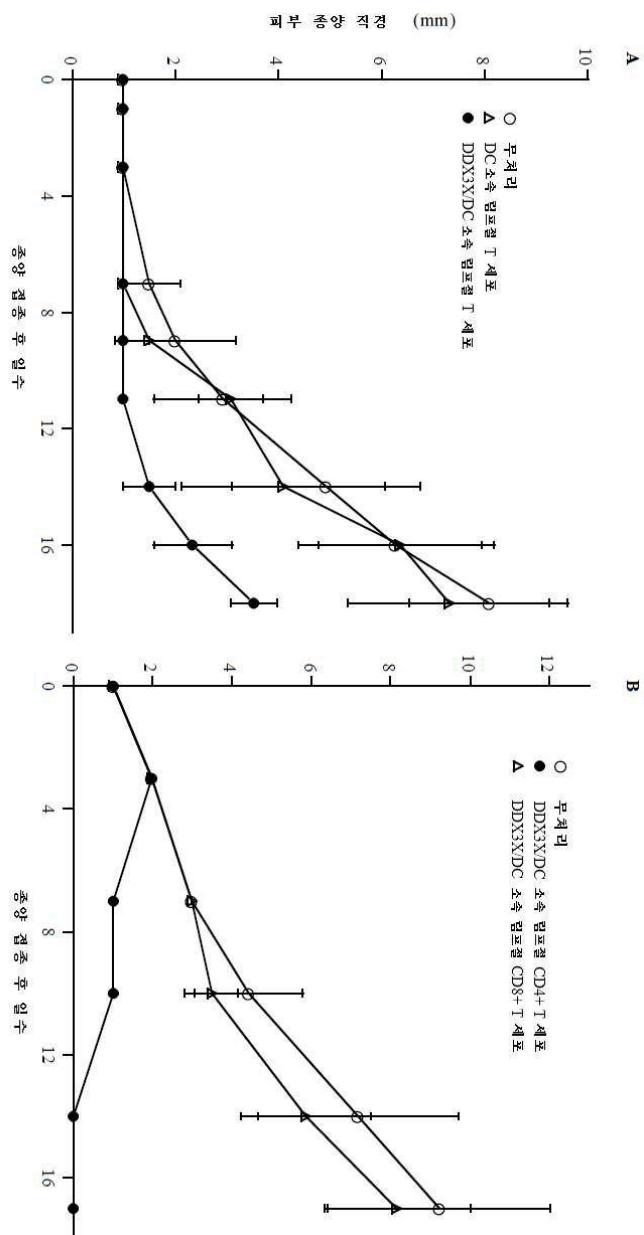
도면9



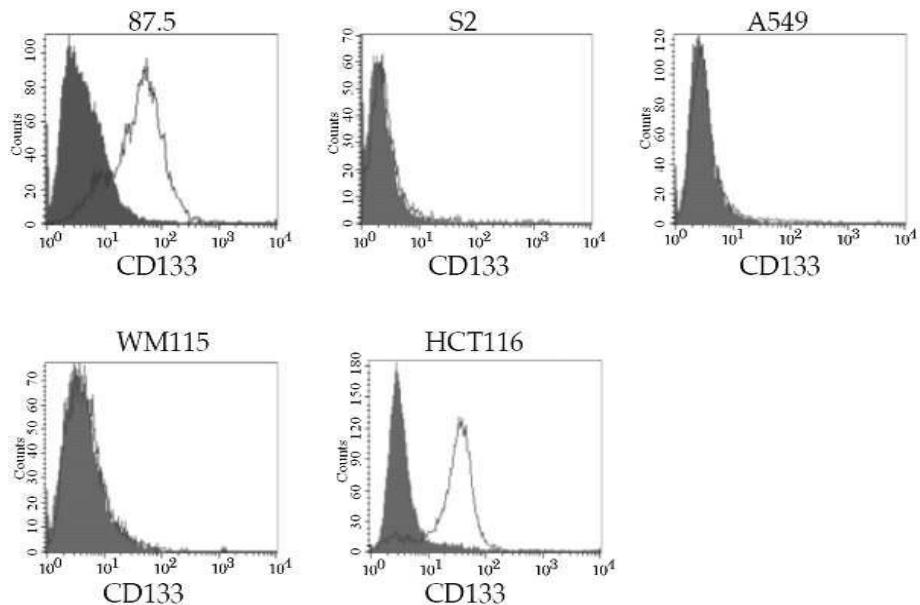
도면10



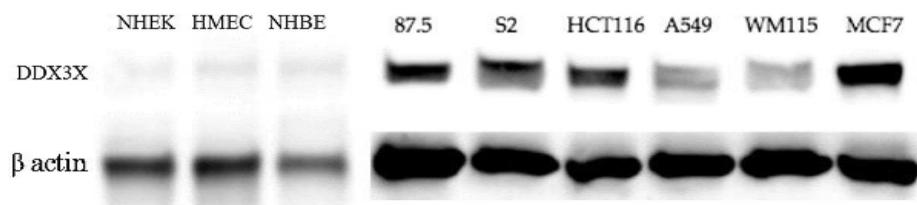
도면11



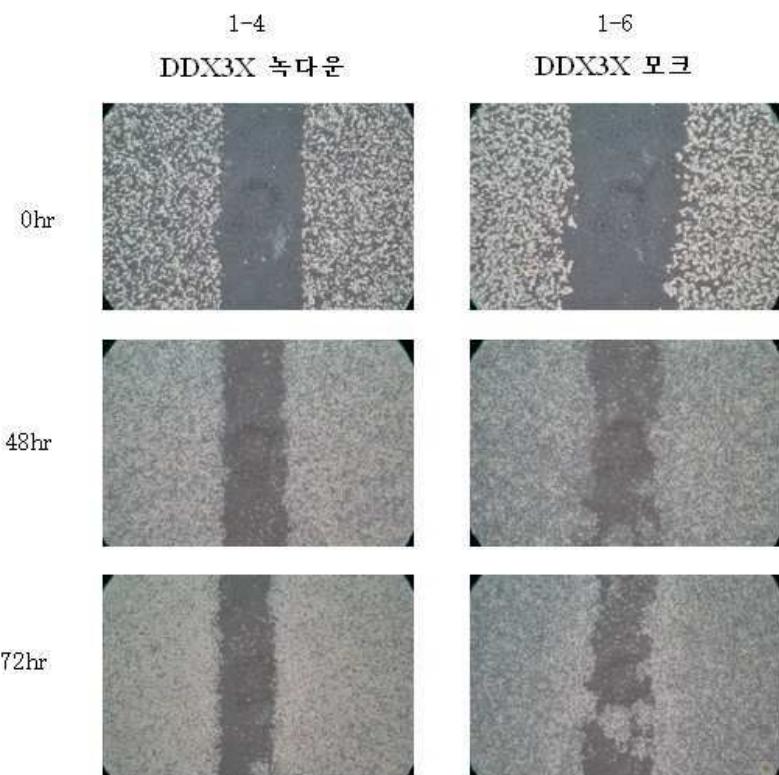
도면12



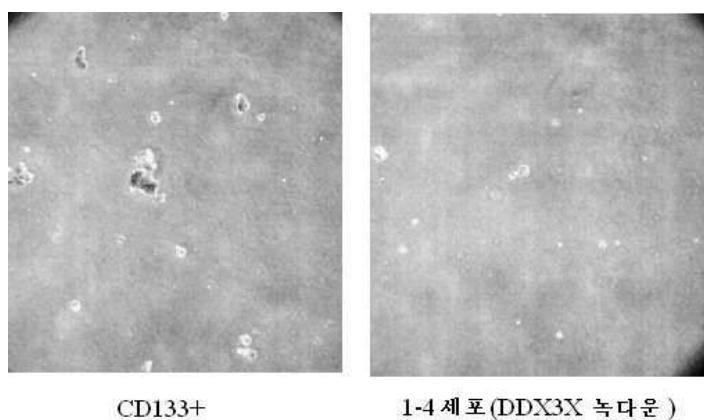
도면13



도면14



도면15



CD133+

1-4 세포 (DDX3X 녹다운)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110>?NIIGATA UNIVERSITY

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> CANCER DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC METHOD TARGETING MOLECULES EXPRESSED IN CANCER STEM CELLS

<130> P13-117
 <150> JP 2012-193757
 <151> 2012-09-04
 <160> 97
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Ser His Val Ala Val Glu Asn Ala Leu Gly Leu Asp Gln Gln Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Gly Leu Asp Leu Asn Ser Ser Asp Asn Gln Ser Gly Gly Ser Thr

20	25	30
----	----	----

Ala Ser Lys Gly Arg Tyr Ile Pro Pro His Leu Arg Asn Arg Glu Ala

35	40	45
----	----	----

Thr Lys Gly Phe Tyr Asp Lys Asp Ser Ser Gly Trp Ser Ser Ser Lys

50	55	60
----	----	----

Asp Lys Asp Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Ser Arg Ser Asp Ser Arg Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

Lys Ser Ser Phe Phe Ser Asp Arg Gly Ser Gly Ser Arg Gly Arg Phe

85	90	95
----	----	----

Asp Asp Arg Gly Arg Ser Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Arg Gly Asp

100	105	110
-----	-----	-----

Arg Ser Gly Phe Gly Lys Phe Glu Arg Gly Gly Asn Ser Arg Trp Cys

115	120	125
-----	-----	-----

Asp Lys Ser Asp Glu Asp Asp Trp Ser Lys Pro Leu Pro Pro Ser Glu

130	135	140
-----	-----	-----

Arg Leu Glu Gln Glu Leu Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile Asn Phe

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Glu Lys Tyr Asp Asp Ile Pro Val Glu Ala Thr Gly Asn Asn Cys Pro

165	170	175
-----	-----	-----

Pro His Ile Glu Ser Phe Ser Asp Val Glu Met Gly Glu Ile Ile Met
 180 185 190

Gly Asn Ile Glu Leu Thr Arg Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val Gln Lys
 195 200 205

His Ala Ile Pro Ile Ile Lys Glu Lys Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala
 210 215 220

Gln Thr Gly Ser Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser
 225 230 235 240

Gln Ile Tyr Ser Asp Gly Pro Gly Glu Ala Leu Arg Ala Met Lys Glu
 245 250 255

Asn Gly Arg Tyr Gly Arg Arg Lys Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu
 260 265 270

Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ala Val Gln Ile Tyr Glu Glu Ala Arg Lys
 275 280 285

Phe Ser Tyr Arg Ser Arg Val Arg Pro Cys Val Val Tyr Gly Ala
 290 295 300

Asp Ile Gly Gln Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Cys His Leu Leu
 305 310 315 320

Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met Met Glu Arg Gly Lys Ile
 325 330 335

Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met
 340 345 350

Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Arg Ile Val Glu Gln Asp
 355 360 365

Thr Met Pro Pro Lys Gly Val Arg His Thr Met Met Phe Ser Ala Thr
 370 375 380

Phe Pro Lys Glu Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu Asp Glu Tyr
 385 390 395 400

Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg Val Gly Ser Thr Ser Glu Asn Ile Thr
 405 410 415

Gln Lys Val Val Trp Val Glu Glu Ser Asp Lys Arg Ser Phe Leu Leu

420	425	430	
Asp Leu Leu Asn Ala Thr Gly Asp Ser Leu Thr Leu Val Phe Val			
435	440	445	
Glu Thr Lys Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu			
450	455	460	
Gly Tyr Ala Cys Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Ser Gln Arg Asp Arg			
465	470	475	480
Glu Glu Ala Leu His Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ile Leu Val			
485	490	495	
Ala Thr Ala Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Ser Asn Val Lys His			
500	505	510	
Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val His Arg			
515	520	525	
Ile Gly Arg Thr Gly Arg Val Gly Asn Leu Gly Leu Ala Thr Ser Phe			
530	535	540	
Phe Asn Glu Arg Asn Ile Asn Ile Thr Lys Asp Leu Leu Asp Leu Leu			
545	550	555	560
Val Glu Ala Lys Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu Asn Met Ala Tyr			
565	570	575	
Glu His His Tyr Lys Gly Ser Ser Arg Gly Arg Ser Lys Ser Ser Arg			
580	585	590	
Phe Ser Gly Gly Phe Gly Ala Arg Asp Tyr Arg Gln Ser Ser Gly Ala			
595	600	605	
Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly			
610	615	620	
Gly Gly Gly His Gly Ser Ser Arg Gly Phe Gly Gly Gly Tyr Gly			
625	630	635	640
Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Asn Tyr Asn Ser Gln Gly			
645	650	655	
Val Asp Trp Trp Gly Asn			
660			

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Phe Leu Leu Asp Leu Leu Asn Ala Thr

1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Asn Ile Thr Gln Lys Val Val Trp Val

1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu

1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Thr Phe Pro Lys Glu Ile Gln Met Leu

1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Lys Tyr Asp Asp Ile Pro Val Glu Ala

1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Arg Tyr Ile Pro Pro His Leu Arg Asn

1 5
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Arg Asn Ile Asn Ile Thr Lys Asp Leu

1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Lys Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu

1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Ile Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu

1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Ile Glu Leu Thr Arg Tyr Thr Arg Pro

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr Arg Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Gly Asn Ile Glu Leu Thr Arg Tyr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Val Leu Ala Pro Thr Arg Glu Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu Ala Pro

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu Ala

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu Gly Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Leu Asp Glu Tyr Ile Phe Leu Ala

1 5

<210> 19

<211> 9

<

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Leu Val Glu Ala Lys Gln Glu Val

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Ile

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Phe Leu Asp Glu Tyr Ile Phe Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser His Val Ala Val Glu Asn Ala Leu

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Ala Val Glu Asn Ala Leu Gly Leu

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Leu Gly Leu Asp Gln Gln Phe Ala

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Gly Leu Asp Gln Gln Phe Ala Gly

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Leu Asp Gln Gln Phe Ala Gly Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Gln Gln Phe Ala Gly Leu Asp Leu

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asn Ser Ser Asp Asn Gln Ser Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Lys Gly Arg Tyr Ile Pro Pro His Leu

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Pro His Leu Arg Asn Arg Glu Ala Thr

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Arg Gly Arg Gly Asp Tyr Asp Gly Ile

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Arg Gly Asp

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Arg Ser Gly Phe Gly Lys Phe Glu Arg

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Lys Pro Leu Pro Pro Ser Glu Arg Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Leu Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile Asn

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Asn Phe Glu Lys Tyr Asp Asp Ile

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Tyr Asp Asp Ile Pro Val Glu Ala Thr

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Thr Gly Asn Asn Cys Pro Pro His Ile

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Ile Ile Met Gly Asn Ile Glu Leu

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Ile Met Gly Asn Ile Glu Leu Thr

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ile Pro Ile Ile Lys Glu Lys Arg Asp

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Ser Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ile Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Glu Ala

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Leu Ala Val Gln Ile Tyr Glu Glu Ala

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ile Tyr Glu Glu Ala Arg Lys Phe Ser

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Pro Cys Val Val Tyr Gly Gly Ala

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Cys Val Val Tyr Gly Gly Ala Asp Ile

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu Leu Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Arg Ile

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Phe Ser Ala Thr Phe Pro Lys Glu Ile

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Tyr Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg Val

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Arg Val Gly Ser Thr Ser Glu Asn Ile

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Thr Gly Lys Asp Ser Leu Thr Leu

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Leu Thr Leu Val Phe Val Glu Thr

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Phe Leu Tyr His Glu Gly Tyr Ala Cys

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Tyr His Glu Gly Tyr Ala Cys Thr

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Leu His Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ile

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Leu Val Ala Thr Ala Val Ala Ala

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Thr Ala Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ile Ser Asn Val Lys His Val Ile Asn

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Glu Tyr Val His Arg Ile Gly Arg Thr

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Leu Gly Leu Ala Thr Ser Phe Phe Asn

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Ser Phe Phe Asn Glu Arg Asn Ile

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Phe Phe Asn Glu Arg Asn Ile Asn Ile

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Asn Ile Thr Lys Asp Leu Leu Asp Leu

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Asp Leu Leu Asp Leu Leu Val Glu Ala

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu Asn Met

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Ala Tyr Glu His His Tyr Lys Gly Ser

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Glu His His Tyr Lys Gly Ser Ser Arg

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Ser Arg Phe Ser Gly Gly Phe Gly Ala

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Phe Gly Ala Arg Asp Tyr Arg Gln Ser

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Phe Tyr Asn

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Gly Tyr Gly Gly Phe Tyr Asn Ser

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Gly Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Gly Tyr

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Asn Tyr Asn

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gly Gly Asn Tyr Asn Ser Gln Gly Val

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Asn Tyr Asn Ser Gln Gly Val Asp Trp

1 5

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

1 5 10 15

<210> 89

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Glu Ile Ile Met Gly Asn Ile Glu Leu Thr Arg Tyr Thr Arg Pro Thr

1 5 10 15

Pro Val

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu Gly Tyr

1 5 10 15

<210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Phe Val Glu Thr Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr

1 5 10 15

His Glu Gly Tyr

20

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID

<400> 92

Xaa Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu Ala

1 5

<210> 93

<211> 86

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 93

acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua	60
guauugucaa agcaucugaa agcagg	86

<210> 94

<211> 78

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 94

gccgcaggug cucugacgag guugcacuac ugugcucuga gaagcagugc aaugauauug	60
ucaaagcauc uggaacca	78

<210> 95

<211> 83

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 95

cgcggccg ugugcgcucuu accagacaug guuagaccug gccucuguc uaaucuguc	60
ugguaaaacc guccaucgc ugc	83

<210> 96

<211> 84

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400>

> 96

ggaagaguca agucaaggcc agagguccca cagcagggcu ggaaagcaca ccugugggac	60
---	----

uucuggccuu	gacuugacuc	uuuc	84			
<210>	97					
<211>	58					
<212>	DNA					
<213>	Homo sapiens					
<400>	97					
ccggacgttc	taagagcagt	cgattctcg	aatcgactg	ctcttagaac	gtttttg	58