(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097370
(43) 공개일자 2017년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0019024
(22) 출원일자 2016년02월18일
심사청구일자 2016년02월18일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
장은주
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 237동 1103호 (잠실동, 리센츠)
(74) 대리인
특허법인태백

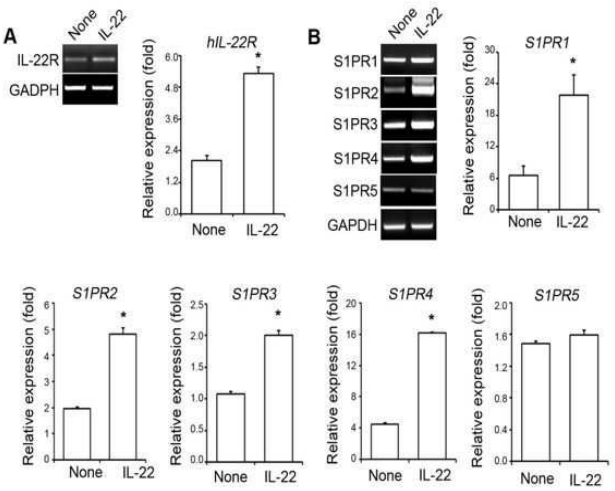
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **IL-22를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 IL-22를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로서, 염증 조건하에서 IL-22는 조골세포 내 스핑고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 생산을 유도하였고, S1P-의존적 방법으로 유방암세포 전이를 조절하였다. 즉, IL-22는 뼈 미세환경 및 뼈 전이성 유방암 사이의 상호작용에 있어 중요한 역할을 수행하므로, 이는 유방암-관련 뼈 전이의 치료 표적으로써 활용될 가능성이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/57415 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/54 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014025360
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 여성과학자지원사업(이공분야)
연구과제명 골대사성 혈관석회화에 관여하는 맥관성평활근세포의 골세포성 분화 연구(2)
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C1916
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 대동맥판 협착증에 관여하는 판막세포의 석회화 기전 연구를 통한 표적 바이오마커 발굴
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 IL-22의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 IL-22 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 IL-22 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 뼈 전이성 유방암 진단용 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 조성물을 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 키트.

청구항 5

(1) 유방암 환자에서 분리된 시료로부터 IL-22 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 IL-22 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

(2) 상기 IL-22 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 IL-22 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

(3) 상기 IL-22 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 IL-22 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 뼈 전이 능이 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

IL-22 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 IL-22 단백질 발현 억제제는 IL-22 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 IL-22 단백질 활성 억제제는 IL-22 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 IL-22 단백질은 스핑고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 수용체의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

(1) 유방암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;

(2) 상기 시험물질을 접촉한 유방암세포에서 IL-22 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및

(3) 대조구 시료와 비교하여 상기 IL-22 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 뼈 전이성 유방암 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IL-22를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)는 IL-10과 20%의 아미노산 상동성을 갖고 있어, 사이토카인 IL-10 패밀리의 멤버로 여겨진다. IL-22는 원래 IL-10-관련 T-세포 유래 유도 인자로 불려졌다. IL-22는 활성 T 헬퍼 17(T helper 17; Th17) 세포, T 헬퍼 22(T helper 22; Th22) 세포 및 자연살해(natural killer; NK) 세포에서 주로 생산되었다. IL-22 수용체(IL-22 receptor; IL-22R)는 클래스 II 사이토카인 수용체 패밀리에 속하고, 특이적인 IL-22R1과 일반적인 IL-10R2로 2개의 서브유닛으로 구성되어 있다. IL-22R1은 피부, 폐, 신장 및 췌장과 같은 다양한 비면역성 조직에서 발견되는 반면, IL-10R2는 T, B 및 NK 세포와 같은 면역세포에서 널리 발현되었다. IL-22는 STAT3의 강력한 활성화 인자이다. IL-22는 IL-22R 복합체에 결합하여, MAPKs (ERK, MEK, JNK 및 p38 키나제), STAT1, STAT3 및 STAT5를 포함하는 Jak1 및 Tyk2 신호 전달 경로를 유도한다. IL-22는 티로신 및 세린 잔기 상에서 STAT3 인산화를 주로 유도하고, ERK1/2 경로를 강하게 활성화하는 반면, IL-10 신호전달은 STAT3 상 티로신 잔기의 인산화를 유도한다.

[0003] 염증 조건 하에서, 염증 부위의 IL-22 수준은 증가하는데, 이는 IL-1, IL-6, 및 IL-11과 같은 전염증 분자의 발현을 유도한다. 또한, IL-22의 상승 발현은 염증성 장질환, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis; RA)을 포함하는 염증 질환 환자에서 임상적으로 보고되었다. 최근 보고에 따르면, IL-22가 활액(synovial) 조직 및 혈청에서 증가하고, 이의 상향 조절은 질병 중증도와 관련되어 있다고 제시하였다. 증가된 IL-22는 활액 섬유아세포의 증식을 촉진하였고, CCL2 생산을 유도하였는데, 이는 활막(synovium)으로 단핵구를 이동시켰다. 활액 섬유아세포는 IL-22에 반응하여 핵 인자 카파-B 라간드 수용체 활성화인자(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANKL)를 분비하는데, 이는 파골세포발생(osteoclastogenesis)을 유도한다.

[0004] 유방암은 여성에게서 가장 흔한 암으로서, 비전이성 유방암의 5년 완치율은 약 99%이다. 하지만, 재발하면 암은 다른 장기로 퍼져 사망률을 증가시킨다. 유방암은 뼈로 전이가 잘 되는데, 뼈로 전이되면 심각한 골절, 뼈 통증, 고칼슘혈증 및 척수 압박 증후군을 유발하는 경향이 있다. 뼈 전이에 의한 골격 합병증은 환자의 삶의 질에 심각한 영향을 미친다. 뼈 전이 과정 중, 종양세포 및 뼈 세포와의 상호작용은 필수적이다. 뼈 전이는 골용해(osteolytic), 골형성(osteoblastic) 또는 이의 혼합 병변을 나타낸다. 골용해 병변은 파골세포 수를 상당히 증가시키고, 골형성 활성을 감소시킨다. 유방암세포는 IL-1, IL-6 및 IL-11과 같이 파골세포 전구세포를 활성화시키는 다양한 인자들을 생산하는데, 이는 침윤된 T-세포, 골형성세포 및 활액 섬유아세포에서 RANKL의 생산을 촉진시킨다. 분비된 RANKL은 파골세포 전구세포의 표면상에서 RANK 수용체와 결합하는데, 이는 재흡수 활성을 가진 다핵성 파골세포의 형성을 유도한다. 안타깝게도, 현재 뼈 전이에 대한 치료제인, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 및 데노수맙(denosumab)은 뼈 전이를 가진 유방암 환자에서는 효과가 제한적이다. 이에, 골용해에 관여하는 세포 및 분자 기작에 대한 이해가 필요하고, 유방암의 뼈 전이에 있어서 새로운 분자 치료 표적을 찾아낼 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2013-0118870 (2013.10.30 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커

조성물, IL-22의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 조성물, IL-22 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물 및 IL-22 단백질 발현 수준 측정을 통한 뼈 전이성 유방암 치료제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 IL-22의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 IL-22의 발현 수준 측정을 통한 뼈 전이성 유방암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 IL-22 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 IL-22 단백질의 발현 수준 측정을 통한 뼈 전이성 유방암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 IL-22를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로서, 염증 조건하에서 IL-22는 조골세포 내 스핑고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 생산을 유도하였고, S1P-의존적 방법으로 유방암세포 전이를 조절하였다. 즉, IL-22는 뼈 미세환경 및 뼈 전이성 유방암 사이의 상호작용에 있어 중요한 역할을 수행하므로, 이는 유방암-관련 뼈 전이의 치료 표적으로써 활용될 가능성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 인간 유방암 환자 및 뼈 전이성 인간 유방암세포에서 IL-22가 S1P 수용체 발현을 상향조절한다는 것을 나타낸다. 결과는 평균 및 표준편차로 나타냈다. *P < 0.05 미처리 세포와 비교.

도 2는 IL-22가 S1PR1 mRNA 및 단백질 수준을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 바(Bars)는 3번 반복실험의 평균 및 표준편차로 나타냈다. *P < 0.05 미처리 세포와 비교.

도 3은 IL-22가 MDA-MB 231 세포에서 S1PR1 발현을 증가시켜 암세포 전이를 증가시킨다는 것을 나타낸다. 바(Bars)는 3번 반복실험의 평균 및 표준편차로 나타냈다. *P < 0.05, IL-22 (10 ng/ml) 존재하에서 VPC24191 미처리 암세포와 비교. #P < 0.05, IL-22 (10 ng/ml) 존재하에서 VPC24191 처리 암세포와 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이에, 본 발명자들은 염증 및 유방암 전이 간의 분자적 상관관계를 확인하기 위하여, IL-22의 상승 수준이 뼈 미세환경, 특히 파골세포 및 조골세포와, 염증 조건 하의 전이성 유방암 사이의 상호작용에 영향을 미치는지 알아보았다. 그 결과, 유방암세포의 전이능 및 유방암의 뼈 전이 관련 기작을 촉진하는데 있어, IL-22가 잠재적인 역할을 하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명은 인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[0017] 또한, 본 발명은 인터루킨-22(interleukin-22; IL-22)의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 상세하게는, 상기 IL-22의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 IL-22 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 IL-22 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물일 수 있으나,

이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단용 키트를 제공한다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사을 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA의 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 IL-22에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0023] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 용어 "앱타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앱타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

[0026] 또한, (1) 유방암 환자에서 분리된 시료로부터 IL-22 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 IL-22 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 IL-22 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 IL-22 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 IL-22 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 IL-22 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 뼈 전이능이 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는 뼈 전이성 유방암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0027] 상세하게는, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "유방암 환자에서 분리된 시료"란 뼈 전이성 유방암 진단용 바이오 마커인 상기 IL-22 유전자 또는 IL-22 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명은 IL-22 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 뼈 전이성 유방암 예방 또는 치

료용 약학조성물을 제공한다.

[0031] 상세하게는, 상기 IL-22 단백질 발현 억제제는 IL-22 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 IL-22 단백질 활성 억제제는 IL-22 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머, 항체 또는 천연물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상세하게는, 상기 IL-22 단백질은 스핑고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 수용체의 발현을 유도할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 (1) 유방암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉한 유방암세포에서 IL-22 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조구 시료와 비교하여 상기 IL-22 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 뼈 전이성 유방암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0038] **<실험예>**

[0039] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0040] **1. 시약 및 항체**

[0041] 재조합 마우스 IL-22 단백질, 인간 종양 괴사 인자-알파(human tumour necrosis factor-alpha; TNF-α), 마우스 RANKL 및 인간 대식세포 콜로니-자극 인자(macrophage colony-stimulating factor; M-CSF)는 PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ)에서 구입하였다. Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit, PD98059, SB203580, SP60025, NS398 및 β-actin 항체는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)에서 구입하였다. cell counting kit (CCK-

8)은 Dojindo (Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. RNAiMAX는 Invitrogen (Grand Island, NY)에서 구입하였다. p-ERK, ERK, p-p38, p38, p-JNK 및 JNK에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA)에서 구입하였다. p-STAT1, STAT1, p-STAT3, STAT3, p-STAT5 및 STAT5에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. 프로테아제(Protease) 및 포스파타아제 억제제 칵테일(phosphatase inhibitor cocktails)은 Thermo Pierce (Rockford, IL)로부터 구입하였다.

[0042] **2. 세포 생존능 분석**

[0043] 세포 생존능은 CCK-8 colorimetric assay (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kunamoto, Japan)로 측정하였다. 간단히 설명하면, 세포를 1-6일 동안 배양한 후, 배양 배지에서 10% CCK-8 용액으로 37℃, 1시간 동안 반응시켰다. 450 nm에서 microtitre plate reader (Bio-Rad, Hercules, CA)로 광학 밀도를 측정하였다.

[0044] **3. 실시간 PCR 및 RT-PCR**

[0045] QIAzol reagent (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여, 세포로부터 RNA를 분리하였고, RevertiAid First-strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania)을 이용하여 1-2 ㎍의 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. mRNA 발현 수준은 RT-PCR로 분석하였다. 정량적 실시간 PCR은 Power SYBR Green 1-Step Kit 및 ABI 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)을 이용하여 수행하였다. 본 발명에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: IL-22R, 5'-GAC TCC ATT TGG GTC ATC GC-3' (sense)(서열번호 1) 및 5'-CCT GTC ACC GTG TGT CAT CA-3' (antisense)(서열번호 2); IL-10R, 5'-AAC GGA CAG GCA ATG ACG AA-3' (sense)(서열번호 3) 및 5'-GAA GAG ACG TCC CAG AAC GG-3' (antisense)(서열번호 4); IL-22, 5'-CAT GCA GGA GGT GGT ACC TT-3' (sense)(서열번호 5) 및 5'-AGC TTC TTC TCG CTC AGA CG-3' (antisense)(서열번호 6); ALP, 5'-CCA ACT CTT TTG TGC CAG AGA-3' (sense)(서열번호 7) 및 5'-GGC TAC ATT GTT GAG CTT TT-3' (antisense)(서열번호 8); Bglap2, 5'-CTG ACC TCA CAG ATC CCA AGC-3 (sense)(서열번호 9) 및 5'-TGG TCT GAT AGC TCG TCA CAA G-3' (antisense)(서열번호 10); Runx2, 5'-TTC AAC GAT CTG AGA TCT GTG GG-3' (sense) (서열번호 11)및 5'-GGA TGA GGA ATG CGC CCT A-3' (antisense)(서열번호 12); COX2, 5'-TCA AAA GAA GTG CTG GAA AAG GTT-3' (sense)(서열번호 13) 및 5'-TCT ACC TGA GTG TCT TTG TTG ACT GTG-3' (antisense)(서열번호 14); S1PR1, 5'-TCC ATG TAA ACT GGG TCA AG-3' (sense)(서열번호 15) 및 5'-AAA GGT GCT GTA GGG GTT AG-3' (antisense)(서열번호 16); S1PR2, 5'-TTT TAA AAT TGG GAC AGG GT-3' (sense)(서열번호 17) 및 5'-TTC TCC ACA GGA TTT AGC AA-3' (antisense)(서열번호 18); S1PR3, 5'-ATG GCA TTT GCT CTT GTT TA-3' (sense)(서열번호 19) 및 5'-TAT TTT TCC CTT AAC CCA GC-3' (antisense)(서열번호 20); S1PR4, 5'-AAC TGT GGG TAT GAC TCT GG-3' (sense)(서열번호 21) 및 5'-ATA-CAG TTG GAA CAG TTG GG-3' (antisense)(서열번호 22); EP4, 5'-ACC ATT CCT AGA TCG AAC CGT-3' (sense)(서열번호 23) 및 5'-CAC CAC CCC GAA GAT GAA CAT-3' (antisense)(서열번호 24); M-CSF, 5'-GGC TTG GCT TGG GATGAT TCT-3' (sense)(서열번호 25) 및 5'-GAG GGT CTG GCA ACT-3' (antisense)(서열번호 26); RANKL, 5'-AGC CGAGAC TAC GGC AAG TA-3' (sense)(서열번호 27) 및 5'-AAA GTA CAG GAACAG AGC GAT G-3' (antisense)(서열번호 28); osteoprotegerin (OPG), 5'-CAG AGA AGC CACGCA AAA GTG-3' (sense)(서열번호 29) 및 5'-AGC TGT GTC TCC GTT TTATCC T-3' (antisense)(서열번호 30); 및 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase), 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTA-3' (sense)(서열번호 31) 및 5'-GAG TTG CTG TTG AAG TCG CA-3' (antisense)(서열번호 32).

[0046] **4. 효소-결합 면역흡착법(Enzyme-linked immunosorbent assay)**

[0047] 혈청 내 수용성 마우스 IL-22의 수준은 mouse IL-22 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems)으로 측정하였다. 간단히 설명하면, 분석 희석액으로 연속적으로 희석된 재조합 마우스 IL-22를 표준용액으로 사용하였다. 대조군, 표준용액, 야생형 및 IL-22 넉아웃 마우스 유래 혈청을 3개의 웰에 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 씻어낸 후, 각 웰은 비오틴화된 항-마우스 IL-22 항체로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 플레이트는 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 씻어냈고, 겨자무 퍼록시다아제-접합 스트렙타비딘(horseradish peroxidase-conjugated streptavidin)로 30분 동안 반응시켰다. 색깔 반응은 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine) 용액으로 진행시킨 후, 0.1 M H_2SO_4로 중단시켰다. Bio-Rad microtitre plate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 블랭크(blank) 웰의 평균 흡광도는 뺐다. RANKL and OPG ELISA kits (R&D Systems)을 이용하여, 배양 배지 내로 분비된 마우스 RANKL 및 OPG의 양을 측정하였다.

[0048] **5. 작은-간섭 RNA 형질감염**

[0049] 대조군으로서 ON-TARGET plus Non-targeting pool (D-001810-10-05) 및 ON-TARGET plus mouse IL-22R-specific small-interfering RNA (siRNA) oligonucleotides (L-057635-01-0005)는 Dharmacon (Lafayette, CO)로부터 구입하였다. transfection reagent RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 전-조골세포(Pre-osteoblasts)에 siRNAs를 형질감염시켰다.

[0050] **6. 트랜스웰 전이 분석**

[0051] MDA-MB 231 인간 유방암 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 구입하였고, 매뉴얼에 따라 유지시켰다. 세포는 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다. IL-22로 24시간 동안 전처리한 MDA-MB 231 세포(5×10^4)는 8-㎛ pore size Transwell system (Costar, Corning, NY)의 상단에 접종하였다. 첨가물은 하단에 추가하였다. Transwell assay은 37℃에서 6시간 동안 수행하였다. 내부 막을 통한 세포 전이는 헤마톡실린으로 세포를 염색하여 정량화하였다. 막의 윗면 상의 세포는 제거하였다.

[0052] **7. 면역 블랏 분석**

[0053] 1차 조골세포는 표시된 시간 동안 IL-22 (10 ng/ml)로 처리되었고, 세포는 차가운 PBS로 씻어냈으며, 프로테아제 및 포스파타아제 억제제가 포함된 Pro-pre™ Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)에 용해시켰다. 세포 용해물은 12,000×g로 5분 동안 원심분리하였고, 상등액을 모았으며, 단백질은 10%-12% SDS-PAGE 젤에서 분해시켰다. 분리된 단백질들은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(polyvinylidene difluoride membrane; Bio-Rad, Hercules, CA)으로 옮긴 후, 0.1% Tween이 함유된 트리스-완충된 식염수 용액에 녹인 5% 스킴 밀크로 1시간 동안 차단시켰다. 멤브레인은 4℃에서 밤새도록 적절한 1차 항체와 반응시켰고, 씻어냈으며, 겨자무 퍼록시다아제-접합 2차 항체로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. chemiluminescence system (Merck-Millipore, Darmatadt, Germany)을 사용하여 반응 단백질을 가시화시켰다.

[0054] **<실시예 1> 뼈 전이성 유방암세포에서 S1P 수용체의 발현을 상향 조절하는 IL-22**

[0055] IL-22R1의 발현은 피부, 신장, 췌장, 간 및 위장관의 상피세포에서 확인되지만, 면역세포에서는 확인되지 않는다. 반대로, IL-10R2는 어디에서나 발현된다. 따라서, 본 발명자들은 유방암세포가 IL-22에 반응하는지 확인하였다. RT-PCR 분석 결과, IL-22는 MDA-MB 231 인간 유방암 세포주에서 미처리된 대조군 MDA-MB 231 세포에 비해 IL-22R1 mRNA 발현을 상당히 증가시켰다(도 1A). IL-22가 염증 조건하의 다양한 세포에서 발현되지만, 유방암 악성화 및 전이에 있어서 IL-22의 역할은 불분명하다. 골형성 S1P 생산은 뼈 전이성 전립선암의 증식 및 전이를 촉진시키기 때문에, 본 발명자들은 MDA-MB 231 세포에서 S1P 수용체의 발현을 확인하였다. 본 발명자들은 외재성 IL-22가 MDA-MB 231 세포 내 S1P 수용체 수준에 영향을 미칠 수 있는지 확인하기 위하여, 재조합 인간 IL-22 (10 ng/ml)와 함께 상기 유방암세포를 배양하고 S1PR1-S1PR5의 mRNA 수준을 측정하여 RT-PCR을 수행하였다. 미처리 대조군에 비해 IL-22-자극 실험군에서 S1PR1, S1PR2, S1PR3 및 S1PR4 mRNA의 수준이 증가하는 것으로 확인되었다(도 1B). 하지만, IL-22는 신경세포에서 작용하는 S1PR5에는 영향을 미치지 않았다. 상기 결과는 IL-22가 전이성 유방암에서 S1P 수용체 발현을 조절할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0056] 유방암은 뼈 뿐만 아니라 폐, 간 및 뇌와 같은 필수 장기로 흔히 전이된다. 본 발명자들은 게놈-와이드 유전자 발현 데이터를 이용하여 전이된 암 환자의 코호트(cohort)를 분석하였다. Gene Expression Omnibus (GEO)에 공개된 데이터(GSE14020)를 이용하여, 뼈 전이되지 않은 암 환자(n=47) 및 뼈 전이된 암 환자(n=17) 사이의 S1P 수용체 발현 분석을 수행하였다. 분석 결과, 뼈 전이되지 않은 암 환자 보다 뼈 전이된 암 환자에서 암에서 전-전이성 효과를 나타내는 S1PR1의 발현이 상당히 증가하는 것으로 나타났다(도 2A). S1PR1에 주목하여, 본 발명자들은 MDA-MB 231 유방암세포에서 외재성 IL-22가 이의 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. MDA-MB 231 세포는 IL-22 (10 ng/ml)로 72시간 동안 처리하였다. 밀도측정기를 사용하여, S1PR1 단백질 수준이 IL-22 자극에 의하여 상당히 증가되는 것을 확인하였다(도 2B). 면역형광분석 결과는 면역블랏 결과와 일치하게, 외재성 IL-22는 시간-의존적 방법으로 S1PR1 발현(녹색)을 증가시켰다(도 2C). 핵은 DAPI로 교차염색하였다(파란색). 상기 결과는 IL-22가 전이성 유방암에서 전-전이성 효과를 나타내는 S1PR1의 mRNA 및 단백질 수준을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0057] **<실시예 2> IL-22에 의해 유도되어 증가된 S1PR1의 뼈 미세환경으로의 유방암세포 전이 촉진 효과**

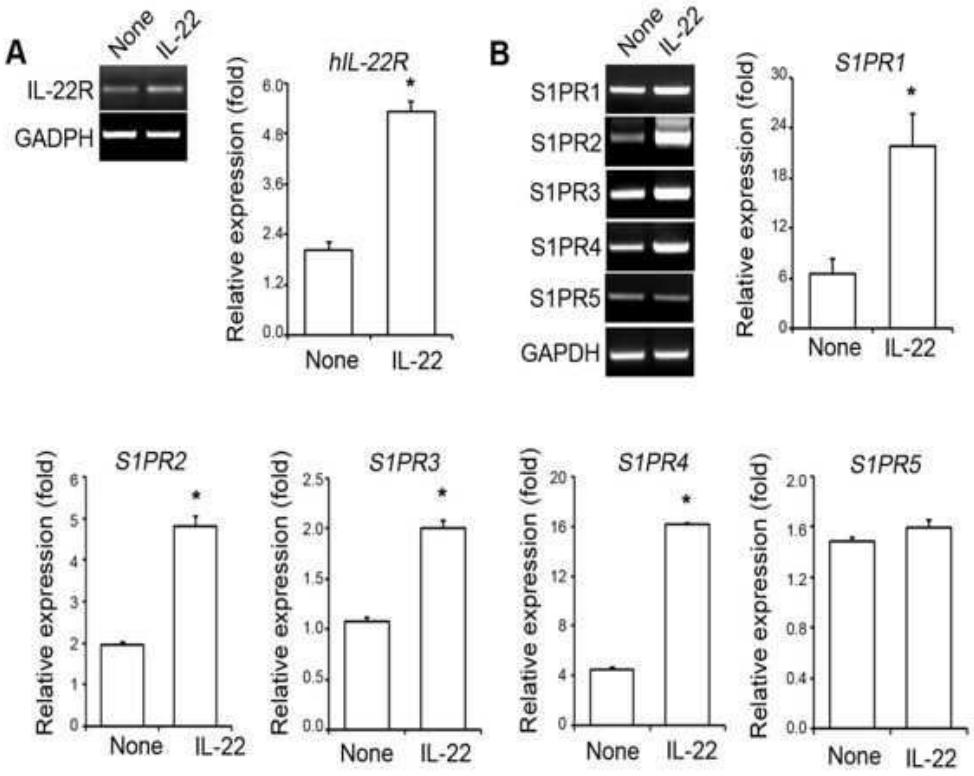
[0058] 본 발명자들의 연구 결과에 따르면, IL-22는 조골세포에서 S1P 생산을 증가시키는 것으로 나타났다. 이에, 본 발명자들은 유방암세포에서의 S1PR1 발현 및 조골세포에서의 S1P 생산을 모두 증가시킴으로써, IL-22가 전이성 유방암 세포의 전이에 영향을 미치는 지 확인하였다. 본 발명자들은 트랜스웰(Transwell) 전이 분석 시스템을

사용하였다. 유방암세포 부착을 향상시키기 위해서, 멤브레인을 0.1% 젤라틴으로 코팅하였다. MDA-MB 231 세포는 재조합 인간 IL-22 (10 ng/ml)로 24시간 동안 처리 또는 미처리하였고, 트랜스웰(Transwell) 전이 분석에 적용하였다. 우태아혈청(fetal bovine serum)에 포함된 성장인자의 영향을 배제하기 위해서, 무-혈청 배지를 사용하였다. MDA-MB 231 유방암세포(5×10^4)는 재조합 인간 IL-22로 24시간 동안 무-혈청 배지에서 전처리되었는데, 챔버 상단에는 대조군(1% DMSO) 또는 S1PR1 antagonist (VPC23019)가 포함되었다. 챔버 하단에는 대조군(1% DMSO) 또는 주화성 인자(chemotactic agent)로 알려진 S1PR1 agonist (VPC24191)가 포함된 무-혈청 배지를 넣었다. 상기 챔버는 6시간 동안 배양되었고, 이후 멤브레인을 통하여 전이된 암세포는 푸른색으로 염색되었다(도 3A). 대조군과 비교하여, IL-22 및 S1P 수용체 agonist가 포함된 경우, 전이된 유방암세포의 수는 증가하였다. S1P 수용체 antagonist가 첨가되면, 세포 전이에 있어 IL-22의 효과는 차단되었다(도 3B). 즉, 상기 결과는 IL-22가 S1PR1을 통한 전이능을 증가시켜, 유방암의 뼈 전이를 촉진한다는 것을 나타낸다.

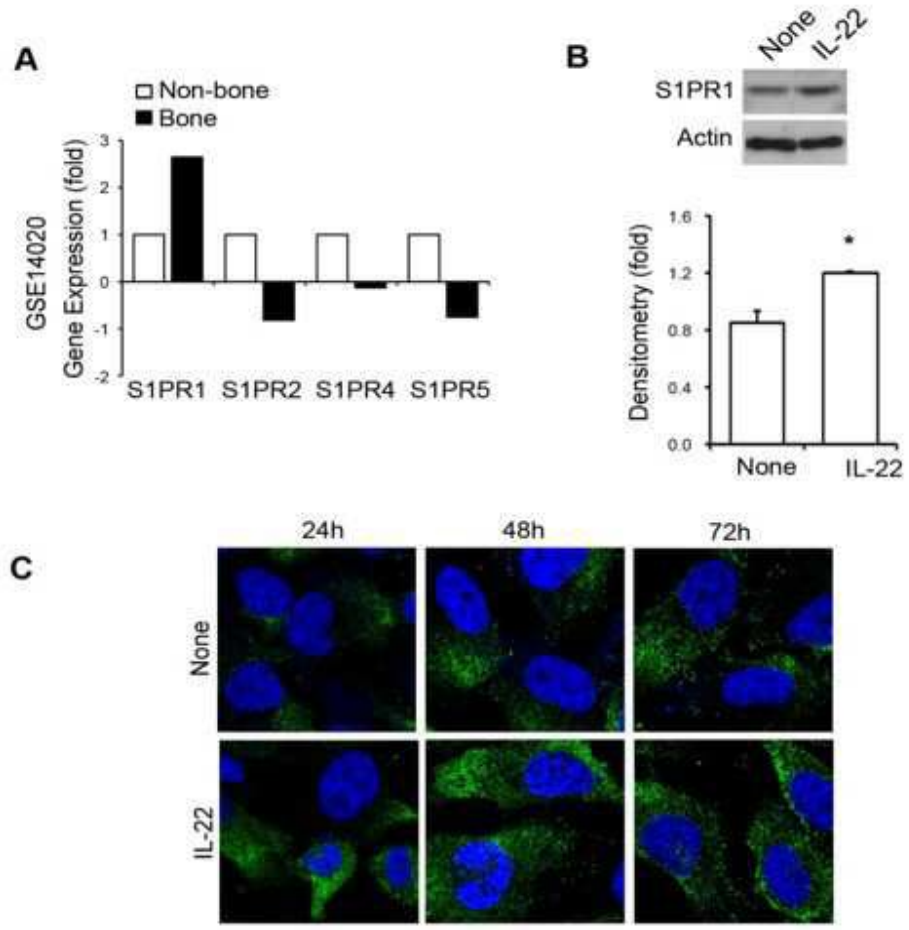
[0059] 이상으로 본 발명을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

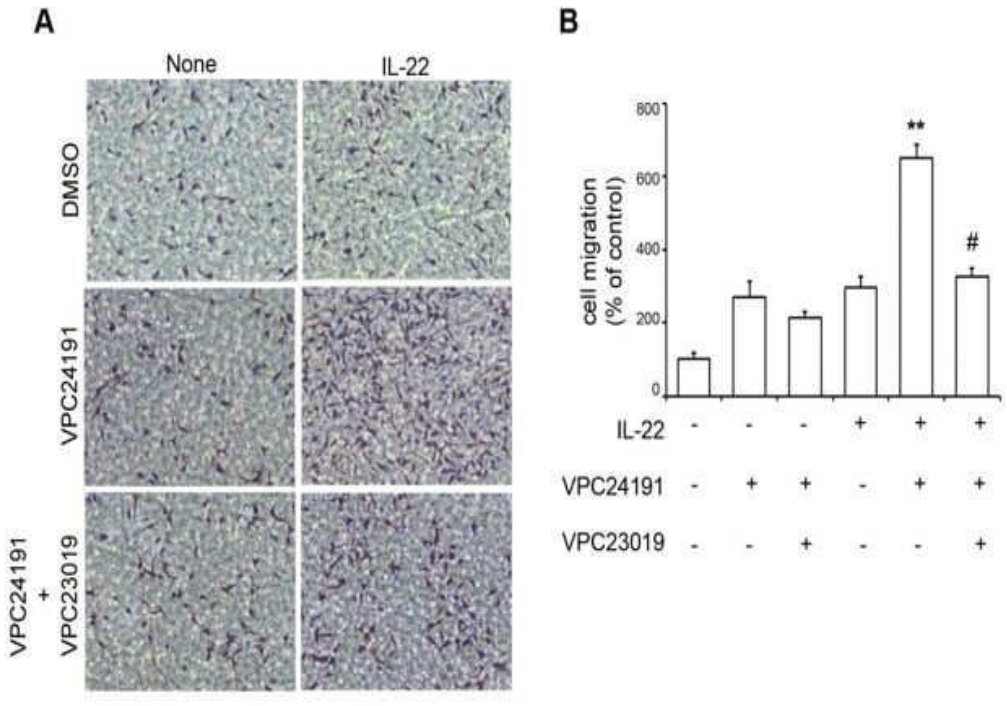
도면1



도면2


A
Non-bone
Bone
GSE14020
Gene Expression (fold)
S1PR1 S1PR2 S1PR4 S1PR5
B
None
IL-22
S1PR1
Actin
Densitometry (fold)
None
IL-22
C
24h
48h
72h
None
IL-22

도면3


A
None
IL-22
DMSO
VPC24191
VPC24191 + VPC23019
B
cell migration (% of control)
IL-22
VPC24191
VPC23019

서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Biomarker composition for diagnosing bone metastatic breast cancer comprising IL-22

<130> ADP-2015-0628

<160> 32

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gactccattt gggtcatcgc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

cctgtcaccg tgtgtcatca 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

aacggacagg caatgacgaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gaagagacgt cccagaacgg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

catgcaggag gtggtacctt 20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

agcttcttct cgctcaga 18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ccaactcttt tgtgccagag a 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ggctacattg ttgagctttt 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

ctgacctcac agatcccaag c 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

tggtctgata gctcgtcaca a 21

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ttcaacgatc tgagatctgt ggg 23

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ggatgaggaa tgcgccct 18

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

tcaaaagaag tgctggaaaa ggtt 24

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

tctacctgag tgtctttgtt gactgtg 27

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

tccatgtaaa ctgggtcaag 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

aaaggtgctg taggggttag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

ttttaaaatt gggacagggt 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

ttctccacag gatttagcaa 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

atggcatttg ctcttgttta 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

tatttttccc ttaacccagc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

aactgtgggt atgactctgg 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

atacagttgg aacagttggg 20

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

accattccta gatcgaaccg t 21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

caccaccccg aagatgaaca t 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

ggcttggctt gggatgattc t 21

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 26

gagggtctgg caact 15

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

agccgagact acggcaagta 20

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 28

aaagtacagg aacagagcga tg 22

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

cagagaagcc acgcaaaagt g 21

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

agctgtgtct ccgttttatc ct 22

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

tggccttccg tgttccta 18

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

gagttgctgt tgaagtcgca 20