



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0099131
(43) 공개일자 2013년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7011239
(22) 출원일자(국제) 2010년11월02일
심사청구일자 2013년04월30일
(85) 번역문제출일자 2013년04월30일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2010/007634
(87) 국제공개번호 WO 2012/060480
국제공개일자 2012년05월10일
(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김문교
경기도 시흥시 월곶동 풍림아이원 아파트 306동 1006호
이덕재
인천광역시 남구 학익2동 306-152 대광아트빌라 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인대백

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 암전이 억제 및 치료용 조성물 그리고 암전이 관련 표적물질 및 암전이 억제물질의 스크린 방법

(57) 요약

본 발명은 다양한 암세포주를 이용한 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동의 상관관계를 규명함으로써 백신이나 항체를 이용하여 에피틴의 암의 진행과 전이를 제어할 수 있는 기술적 토대를 제공하고, 이에 기반하여 시험관내 및 생체내 시험에서 항체를 유도하고 암전이를 억제하는 것이 확인된 항원 펩타이드 및 이를 포함하는 암전이 백신을 제공한다.

(72) 발명자

김충호

인천광역시 남구 주안4동 1477-44

이효선

서울특별시 관악구 신림7동 관악산휴먼시아 아파트
216동 1702호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고펩타이드인 것을 특징으로 하는 암전이를 억제하는 항원 펩타이드.

청구항 2

서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암전이 백신.

청구항 3

제2항에 있어서,

항원 보조제 또는 면역 증강제를 더 포함하는 암전이 백신.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

황산알루미늄, 수산화알루미늄, 수산화마그네슘, 인산알루미늄, 포스포러스 레시틴, 플루로닉 폴리올(Pluronic polyol), 폴리아나이온(polyanion) 및 유성에멀전으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 물질을 더 포함하는 암전이 백신.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고펩타이드를 코딩하는 DNA를 유효성분으로 포함하는 암전이 백신.

청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항원 펩타이드에 대한 면역반응으로 유도된 항체 또는 이러한 항체를 함유하는 혈청을 포함하는 암전이 억제 및 치료용 조성물.

청구항 7

(a) 내피세포를 배양하여 내피세포 층을 준비하는 단계와, (b) 에피틴을 발현하는 세포를 배양하여 준비하는 단계와, (c) 상기 에피틴을 발현하는 세포를 상기 내피세포 층 상에 첨가하는 단계와, (d) 상기 내피세포 층을 통과하여 이동한 세포수를 계수하여 암전이 기준값을 결정하는 단계와, (e) 암전이 억제 후보물질을 첨가하여 상기 (a) 단계 내지 (c) 단계를 수행한 후 상기 내피세포 층을 통과하여 이동한 세포수를 계수하여 상기 (d) 단계에서 얻은 암전이가 기준값과 비교하는 단계를 포함하는 암전이 억제물질의 스크린 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 내피세포 층은 쥐의 내피세포(Mouse endothelial cell)인 MS1 세포층인 것을 특징으로 하는 암전이 억제물질의 스크린 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 내피세포 층에 첨가되는 세포는 흉선 상피세포암 세포인 427.1.86 세포 또는 유방암 세포인 4T1 세포인 것을 특징으로 하는 암전이 억제물질의 스크린 방법.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 내피세포 층에 첨가되는 세포는 표지물질로 표지되는 것을 특징으로 하는 암전이 억제물질의 스크린 방법.

청구항 11

(a) 내피세포를 배양하여 내피세포 층을 준비하는 단계와, (b) 암전이 관련 후보 표적물질을 발현하는 세포를 배양하여 준비하는 단계와, (c) 상기 암전이 관련 후보 표적물질을 발현하는 세포를 상기 내피세포 층 상에 첨가하는 단계와, (d) 상기 내피세포 층을 통과하여 이동한 세포수를 계수하여 암전이 기준값을 결정하는 단계와, (e) 암전이 관련 후보 표적물질의 발현 또는 활성을 감소시킨 세포를 준비한 후 이를 상기 내피세포 층 상에 첨가하고 상기 내피세포 층을 통과하여 이동한 세포수를 계수하여 상기 (d) 단계에서 얻은 암전이가 기준값과 비교하는 단계를 포함하는 암전이 관련 표적물질의 스크린 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 내피세포 층은 쥐의 내피세포(Mouse endothelial cell)인 MS1 세포층인 것을 특징으로 하는 암전이 관련 표적물질의 스크린 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

상기 내피세포 층에 첨가되는 세포는 흉선 상피세포암 세포인 427.1.86 세포 또는 유방암 세포인 4T1 세포인 것을 특징으로 하는 암전이 관련 표적물질의 스크린 방법.

청구항 14

제11항 또는 제12항에 있어서,

상기 내피세포 층에 첨가되는 세포는 표지물질로 표지되는 것을 특징으로 하는 암전이 관련 표적물질의 스크린 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 암전이 억제 및 치료용 조성물에 관

[0001]

한 것으로서, 암세포의 이동과 침윤에 의한 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 암전이 억제 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 상피세포암 표적물질인 에피틴과 이를 발현하는 암세포의 내피세포 투과 이동(Transendothelial migration; TEM)이 암전이와 깊은 상관관계를 갖는 것을 밝히고, 이러한 내피세포 투과 이동 억제제를 이용하여 암전이 관련 표적물질 및 암전이 억제물질을 스크린하는 기반기술을 제공하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 최대의 난치성 질환으로 다양한 유전자 및 단백질이 관여하고 복잡한 신호전달체계에 의해 암 발생, 억제 및 전이 등이 조절되고 있는 것으로 보고되고 있다. 지금까지 암을 조기에 진단하거나 치료하기 위한 다양한 진단제 또는 항암제를 개발하기 위한 연구가 진행되어 왔는데, 최근에는 특정 분자단위 표적을 이용한 선택적 진단제 또는 표적 항암제에 대한 연구가 활발하다.

[0004] 암 발생과 관련된 표적 단백질을 이용한 표적 항암제로서, 아바스틴(Avastin)과 허셉틴(Herceptin) 등 현재 상용화된 표적 항암제는 그 치료효과를 예측할 수 있고, 적은 부작용과 함께 뛰어난 치료 효과를 보이는 장점이 있다. 효과적인 표적 항암제의 개발을 위해서는 암에 대한 일반적인 분자적 이해와 함께 암 특이적 표적 단백질의 동정 및 기능 연구가 반드시 필요하다. 즉, 암발생 관련 표적 단백질을 밝히고 나면, 표적 단백질을 이용한 암발생 메커니즘의 분석이 용이하게 되고 항암제 후보물질의 다양한 유도체를 개발하여 최적의 항암 기능을 수행하는 구조-활성 연관성의 연구도 가능하다.

[0005] 또한, 암은 초기 발병시 외과적 수술과 항암제 치료를 병행하면 예후가 좋은 반면에, 암 발생이 상당히 진행된 경우에는 표적 항암제를 사용하더라도 완치가 어렵고 완치된 이후에도 5년내에 재발하는 확률이 높다. 뿐만 아니라, 암은 재발하면 최초 발병 부위 외에 타기관으로 암세포가 전이하는 경우가 많아 암 환자를 사망에 이르게 한다. 일반적으로 잘 알려진 백혈병, 악성림프종 등과 같은 혈액암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 간암, 피부암, 방광암, 전립선암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암에 대한 조기검진 및 재발여부 검진의 필요성은 인정되고 있으나 극소수의 세포로부터 시작되는 암화 과정의 특성상 조기검진은 기술적으로 어려움이 따른다. 특히, 암 재발시 치료가 어려워지면서 예후가 나쁘고 환자의 생존율을 떨어뜨리는 암전이는 암 병력이 있는 환자에게 있어서 조기에 검진할 필요가 있으며, 암전이의 메커니즘을 규명하고 암 병력이 있는 환자에게 암전이를 사전에 예방할 수 있는 방법에 대한 사회적 요구는 매우 높다고 할 수 있다.

[0006] 이러한 암전이와 관련하여 주목받는 표적 단백질로서 매트립타아제(Matriptase) 또는 에피틴(epithin)으로 불리는 단백질이 있다. 에피틴은 최초로 생쥐 흉선 상피세포에서 확인된 단백질이다. 또한, 에피틴은 인간의 상피암 세포로부터도 분리되었으며 다른 이름으로는 PRSS14, 매트립타아제(Matriptase), MT-SP1 또는 ST14 등으로 불리기도 한다. 에피틴은 난소암, 전립선암, 자궁경부암, 유방암 등 대부분의 상피세포 유래 암 세포에서 그 발현이 현저히 증가되어 있으며, 최근 들어 활성화된 대식세포에서의 발현도 알려지게 되었다.

[0007] 에피틴은 기능적으로는 타입II 막단백질 분해효소(type II transmembrane serine protease)로서, 구조적으로는 세포내 도메인과, 트랜스 멤브레인 영역(TM), SEA 도메인, CUB 도메인, LDLRA(또는 LDL) 도메인 및 세린 단백질 분해효소(serine protease) 도메인을 포함하는 세포외 영역으로 구성되어 있다(도 1 참조). 종래까지 에피틴은 정상 상피세포 분화와 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있었다. 최근에는 에피틴이 최초 암발생, 진행 및 전이에 있어서 여러 단백질 분해효소들과 상호작용하여 세포외 기질(extracellular matrix)의 분해를 통한 암세포의 이동, 기저막(basement membrane)의 침윤(invasion)과 신생혈관생성(angiogenesis)에 중요한 역할을 하는 것이 보고되었다. 이러한 지금까지의 연구결과들을 종합하면 에피틴은 정상세포에 비해 암 세포나 암 조직에서 과발현되어 있어 암의 발생, 성장 및 전이의 전 단계에서 관여하고 있는 물질임을 알 수 있다. 따라서, 에피틴은 암의 진단과 치료를 위한 새로운 표적 단백질이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 에피틴에 의한 암전이 메커니즘을 명확히 규명하면 암전이를 억제하는 방법을 개발할 수 있고, 이에 기초하여 암전이 백신이나 단클론 항체치료 방법을 개발할 수 있는 점에 주목하여 예의 연구를 거듭한 결과, 세포 외부로 절단되어 유리(shedding)된 수용성의 에피틴 모티프의 폴리펩티드가 신생혈관생성에 직접 관여한다는 의미있는 연구결과를 확인한 바가 있다. 또한, 본 발명자들은 에피틴이 혈관 안정성에 중요한 역할을 하는 Tie2 단백질에 작용하고 리간드 결합 도메인을 포함하는 Tie2 부분을 분해함으로써 혈관 세포들 사이의 구조적 안정성이 사라지면서 암세포의 혈관 내피세포 투과 이동이 촉진되고 이로 인해 암전이가 유발되는 메커니즘을 규명하기에 이르렀다. 구체적으로, 본 발명자들은 시험관내(in vitro) 시험에서 4T1 유방암 세포에서의 에

피틴 단백질의 발현 감소는 혈관 내피세포 투과 이동(TEM) 세포수의 유의적인 감소를 유발하고, 동물시험에서 마우스의 혈관 내로 에피틴 단백질 발현이 감소된 4T1 유방암 세포를 주입한 경우 폐로 전이된 종양 결절(tumor nodules)이 감소된 것을 확인하였다.

[0009] 즉, 본 발명자들은 에피틴이 암전이에 작용하는 직접적인 메카니즘을 밝혀냈으며, 다양한 암세포주를 이용한 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동(TEM)의 상관관계를 규명함으로써 백신이나 항체를 이용하여 에피틴의 암의 진행과 전이를 제어할 수 있는 기술적 토대를 제공할 수 있게 되었다.

[0010] 한편, 암 백신과 암전이 백신의 세계적 경향을 살펴보면, 암 백신은 치료용 백신으로서는 항체를 이용하여 암을 치료하는 방법이 대부분이고, 암을 유발하는 것으로 알려진 인유두종 바이러스(Human papilloma virus) 백신이 예방 백신으로 개발되어 사용되고 있으나 부작용과 윤리적 문제가 제기되고 있는 실정이다. 최근들어 새로운 암 치료백신으로 면역기능을 이용한 전립선암 백신과 유방암 백신이 임상실험 중이고 곧 상용화될 전망이다. 따라서, 허셉틴과 같은 단클론 항체를 이용한 표적 암치료제의 개발과 함께 인체에 부작용을 일으키지 않으면서 암과 관련된 표적 단백질에 대한 면역반응을 유도하는 암백신이 큰 주목을 받고 있다.

[0011] 이와 관련하여 미국공개특허 US2004/0105853 A1호에서는 에피틴-유사 세린 단백질분해효소 유전자 산물과 결합하는 물질을 이용한 약리학적 조성물을 개시하고 있으나, 상기 선행기술에서는 에피틴-유사 단백질 항원의 에피톱에 대한 규명이나 에피틴의 암전이 메카니즘의 규명 없이 200 내지 500개의 아미노산들로 구성된 에피틴-유사 단백질 전체를 이용한 면역반응으로 항체를 유도하는 것과, 에피틴-유사 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대해 안티센싱할 것으로 추측되는 안티센스 폴리뉴클레오티드에 의한 에피틴-유사 단백질의 발현 사일런싱(silencing)만을 개시하고 있을 뿐이다. 그러나, 상기 선행기술의 항체는 전장(full length) 에피틴-유사 단백질의 면역반응으로 얻은 것이기 때문에 항원 특이성이 떨어질 수 밖에 없고 암진행 및 전이과정과 관련한 동물 모델에서의 활성화에 대한 데이터가 없어 그 효능이 과학적으로 인정되기 어려우며 부작용이 우려되는 문제가 있다. 즉, 상기 선행기술에서 설명하고 있는 200 내지 500개 아미노산들의 긴 서열의 단백질로는 항원 특이적인 단클론 항체의 생성이 어려우며 암진행 및 전이과정과 직접적으로 관련된 종양 항원 올리고 펩타이드의 규명과는 거리가 먼 것이었다. 또한, 상기 선행기술의 안티센스 폴리뉴클레오티드 역시 그 효능이 전혀 입증되지 않은 것이고 안티센스 RNA를 이용한 기술은 세포 수준에서만 구현가능하고 개체 단위에는 약물전달시스템(drug delivery system)의 개발 없이는 적용이 불가능할 뿐만아니라 상기 선행기술과 같이 염기서열의 길이가 긴 안티센스 폴리뉴클레오티드를 개체 단위에 대한 치료제로 개발한 사례는 전무한 실정이므로 상기 선행기술은 암발생, 진행 및 전이와 관련하여 전혀 적용이 불가능한 기술이라고 할 수 있다.

[0012] 즉, 전술한 바와 같은 종래의 암전이에 대한 연구는 여전히 초기 단계로 많은 사람들이 메카니즘의 연구없이 단순히 암전이에 작용하는 유전자나 단백질 등을 찾고 있으며, 정확한 암전이 메카니즘 규명을 기반으로 하는 표적 단백질을 이용한 암전이 백신 연구는 아직 미미한 실정이다. 이러한 관점에서, 암전이를 억제하는 암백신이나 단클론 항체의 개발은 암 병력이 있는 환자의 암 재발 방지와 환자에게 치명적인 암전이를 방지할 수 있는 획기적인 의료기술의 진보라고 할 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 암전이 억제 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 암세포의 이동과 침윤에 의한 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 암전이 억제 및 치료용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 상피세포암 표적물질인 에피틴과 이를 발현하는 암세포의 내피세포 투과 이동(Transendothelial migration; TEM)이 암전이와 깊은 상관관계를 갖는 것을 밝히고, 이러한 내피세포 투과 이동 억제제를 이용하여 암전이 관련 표적물질 및 암전이 억제물질을 스크린하는 기반기술을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 에피틴이 암전이에 작용하는 직접적인 메카니즘에 대해 예의 연구를 거듭한 결과, 다양한 암세포주를 이용한 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동의 상관관계를 규명함으로써 백신이나 항체를 이용하여 에피틴의 암의 진행과 전이를 제어할 수 있는 기술적 토대를 마련하였고, 이에 기반하여 시험관내 및 생체내 시험에서 항체를 유도하고 암전이를 억제하는 것이 확인된 항원 펩타이드 및 이를 포함하는 암전이 백신을 개발

하기에 이르렀다.

- [0016] 이하, 본 발명의 명세서에서 사용되는 "에피틴"이라는 용어는 마우스 유래의 에피틴 뿐만아니라 인간 유래의 메트립타아제나 다른 이름의 오쏘로그(ortholog)를 포함하는 광의의 개념으로 사용된다. 따라서, 이하에서 정의되는 항원 펩타이드 및 암전이 백신은 마우스 기원, 인간 기원, 래트(rat) 기원 또는 토끼 기원의 올리고펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예의 암전이를 억제하는 항원 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고펩타이드이다.
- [0018] 본 발명의 일실시예의 암전이 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고펩타이드를 유효성분으로 포함한다.
- [0019] 또한, 본 발명의 일실시예의 암전이 백신은 유효 성분으로서 투여되는 상기 올리고펩타이드 이외에 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유할 수 있다. 본 발명의 일실시예의 암전이 백신은 예를 들어, 알룸(alum)과 같은 항원 보조제 또는 면역 증강제(또는 "면역 보강제"라고도 함)(adjuvnat)와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예의 암전이 백신은 황산알루미늄, 수산화알루미늄, 수산화마그네슘, 또는 인산알루미늄과 같은 광물, 포스포러스 레시틴 및 플루로닉 폴리올(Pluronic polyol)과 같은 계면활성제, 폴리아나이온(polyanion), 유성에멀전 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 일실시예의 암전이 백신은 리포솜 중에 혼합하거나, 각종 당류를 함유할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 일실시예의 암전이 백신은 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고펩타이드를 코딩하는 DNA를 유효성분으로 포함한다.
- [0021] 본 발명의 다른 일실시예의 암전이 백신에 있어서, 상기 암전이를 억제하는 항원 펩타이드를 코딩하는 핵산, 바람직하기는 DNA를 발현 벡터에 삽입한 후, 상기 벡터를 동물에 투여함으로써, 암 면역을 생기게 할 수 있다. 이와 같은 DNA 백신은 WO2000/6602 또는 J. Immunol., 160, p. 1717, 1998 등을 참조하여 기술적으로 구현할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 일실시예의 암전이 억제 및 치료용 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 7의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 8의 아미노산 서열(CGDNSEDEQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 9의 아미노산 서열(CSDGSDEKD)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 10의 아미노산 서열(RQARVVGGTDADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드 및 서열번호 11의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항원 펩타이드에 대한 면역반응으로 유도된 항체 또는 이러한 항체를 함유하는 혈청을 포함한다. 바람직하기로는 상기 항체는 단클론항체인 것이 좋다.
- [0023] 한편, 본 발명의 일실시예의 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 또는 암전이 억제 및 치료용 조성물에 있어서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며,

상기 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 또는 암전이 억제 및 치료용 조성물의 투여경로는 이들이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등을 거론할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 일실시예의 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 또는 암전이 억제 및 치료용 조성물의 유효량은 암전이 억제, 예방 및 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 환자의 암종류, 암의 진행과 전이 상태, 제형의 종류, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태, 식이, 투여 시간 및 투여 방법에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 성인에게 암전이를 억제하는 항원 펩타이드, 이를 포함하는 암전이 백신, 또는 암전이 억제 및 치료용 조성물을 투여하는 경우, 1일 1회 투여시 0.1 μ g/kg ~ 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예의 암전이 억제물질의 스크린 방법은, (a) 내피세포를 배양하여 내피세포 층을 준비하는 단계와, (b) 에피틴을 발현하는 세포를 배양하여 준비하는 단계와, (c) 상기 에피틴을 발현하는 세포를 상기 내피세포 층 상에 첨가하는 단계와, (d) 상기 내피세포 층을 투과하여 이동한 세포수를 계수하여 암전이 기준값을 결정하는 단계와, (e) 암전이 억제 후보물질을 첨가하여 상기 (a) 단계 내지 (c) 단계를 수행한 후 상기 내피세포 층을 투과하여 이동한 세포수를 계수하여 상기 (d) 단계에서 얻은 암전이 기준값과 비교하는 단계를 포함한다. 만약, 암전이 억제 후보 물질 첨가에 의해 내피세포 층을 투과 이동한 에피틴을 발현하는 세포의 수가 감소하면 상기 후보 물질이 에피틴의 발현이나 활성을 저해하여 내피세포 층 투과 이동을 감소시킨 것임을 알 수 있고, 이는 상기 후보물질이 암전이를 억제하는 유효한 물질임을 시사하는 것이다.

[0025] 본 발명의 일실시예의 암전이 관련 표적물질의 스크린 방법은, (a) 내피세포를 배양하여 내피세포 층을 준비하는 단계와, (b) 암전이 관련 후보 표적물질을 발현하는 세포를 배양하여 준비하는 단계와, (c) 상기 암전이 관련 후보 표적물질을 발현하는 세포를 상기 내피세포 층 상에 첨가하는 단계와, (d) 상기 내피세포 층을 투과하여 이동한 세포수를 계수하여 암전이 기준값을 결정하는 단계와, (e) 암전이 관련 후보 표적물질의 발현 또는 활성을 감소시킨 세포를 준비한 후 이를 상기 내피세포 층 상에 첨가하고 상기 내피세포 층을 투과하여 이동한 세포수를 계수하여 상기 (d) 단계에서 얻은 암전이 기준값과 비교하는 단계를 포함한다. 만약, 암전이 관련 후보 표적물질의 발현 또는 활성을 감소시킨 세포의 경우 내피세포 층을 투과 이동한 세포의 수가 감소하면 상기 암전이 관련 후보 표적물질이 내피세포 층 투과 이동에 관여하는 것을 알 수 있고, 이는 상기 암전이 관련 후보 표적물질이 암전이와 관련된 물질임을 시사하는 것이다.

[0026] 본 발명의 방법에 있어서, 내피세포 층은 쥐의 내피세포(Mouse endothelial cell)인 MS1 세포층일 수 있고, 내피세포 층에 첨가되는 세포는 흉선 상피세포암 세포인 427.1.86 세포 또는 유방암 세포인 4T1 세포일 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 각종 암조직에서 유래하여 구축된 암세포주가 사용될 수 있음은 물론이다. 또한, 상기 내피세포 층을 투과하여 이동한 세포수를 계수하는 것을 용이하게 하기 위해 상기 내피세포 층에 첨가되는 세포는 형광 단백질과 같은 표지물질로 표지될 수 있다. 예를 들어, 표지물질로는 로다민(rhodamine), FITC, CFSE와 같은 형광 물질, GFP, EGFP, YFP, CFP 또는 RFP와 같은 형광 단백질이 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 방사성 물질 또는 발광성 물질 등 다양한 표지물질이 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따르면, 다양한 암세포주를 이용한 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동의 상관관계를 규명함으로써 백신이나 항체를 이용하여 에피틴의 암의 진행과 전이를 제어할 수 있다.

[0028] 구체적으로, 본 발명은 상피세포암 표적물질인 에피틴과 이를 발현하는 암세포의 내피세포 투과 이동이 암전이와 깊은 상관관계를 갖는 것을 밝히고, 이러한 내피세포 투과 이동 억제제를 이용하여 암전이 관련 표적물질 및 암전이 억제물질을 스크린하는 기반기술을 제공할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 암전이를 억제하는 항원 펩타이드 및 이를 포함하는 암전이 백신은 암전이 항원으로서 기능하여 면역반응을 유도하여 항체를 생성하고, 암세포의 전이를 억제할 수 있어 암전이의 예방 및 치료에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0030] 본 발명의 상기 및 다른 기술적 과제와 특징은 다음과 같은 도면을 참조하여 이루어지는 본 발명의 실시예에 대한 설명을 통하여 당업자에게 명확해 질 수 있을 것이다.

도 1은 에피틴의 단백질 구조를 나타내는 모식도이다.

도 2는 본 발명의 내피세포 투과 이동 어세이를 단계별로 설명하는 도면이다.

도 3은 본 발명의 내피세포 투과 이동 어세이에 있어서 내피세포층을 이동한 형광단백질로 표시된 세포의 형상과 위치를 나타내는 현미경사진이다.

도 4는 본 발명의 내피세포 투과 이동 어세이를 이용하여 MS1 내피세포층을 투과 이동한 GFP-427 세포수와 GFP-427-Epi-KD 세포수를 비교한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 내피세포 투과 이동 어세이를 이용하여 MS1 내피세포층을 투과 이동한 427 세포수와 427-Epi-KD 세포수를 비교한 그래프이다.

도 6은 4T1 세포주로부터 유래한 에피틴 유전자 녹다운 클론들과 대조군 클론들(A7, D5, B3, C5, G3)에 대해 항-에피틴 항체인 mAb5를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 7은 본 발명의 내피세포 투과 이동 어세이에 있어서, 에피틴을 유효하게 발현하는 A7 및 D5 클론들의 세포들은 내피세포층을 유효하게 투과이동하는 반면에 에피틴 발현이 녹다운된 B3, C5 및 G3 클론들의 세포들은 내피세포층을 용이하게 투과이동하지 못하는 것을 보여주는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 내피세포 투과 이동 어세이에 있어서, 에피틴 발현이 녹다운된 B3 클론을 pcDNA3.1/메트립타아제로 트랜스펙션시켜 얻은 AB-B3 클론의 세포들에서 TEM 능력이 회복된 것을 보여주는 그래프이다.

도 9는 4T1 세포주로부터 유래한 클론들이 주입된 마우스의 폐로 전이된 종양 결절을 촬영한 사진들이다.

도 10은 도 9의 종양결절들의 수를 계수하고 각 클론별로 수치화한 그래프이다.

도 11은 본 발명의 항원 올리고펩타이드에 의해 면역 유도된 마우스 항체 AG22-1, AG22-3, AG22-5에 의해 4T1 세포주 유래의 암세포의 내피세포 이동이 저해된 것을 보여주는 그래프이다.

도 12는 도 11의 항체 투여시 암세포 이동수를 백분율로 표시한 그래프이다.

도 13은 1차 동물실험에서 마우스 Adj, Adj+Epi-2LDL, Adj+Epi-4LDL, Adj+Epi-SP 그룹에 각각 면역 증강제, "면역 증강제+Epi-2LDL", "면역 증강제+Epi-4LDL" 및 "면역 증강제+Epi-SP로 면역하고 암세포를 주입한 후 각 그룹별로 측정된 생존 곡선이다.

도 14는 도 13의 실험과정에서 19일째 되는날 마우스의 폐를 따로 떼어내 디쉬에 놓고 촬영한 사진이다.

도 15는 도 13의 실험 후 Adj, Adj+Epi-2LDL, Adj+Epi-4LDL, Adj+Epi-SP 그룹의 폐무게 및 결절수를 수치화한 그래프이다.

도 16은 도 13의 실험 후 Adj 그룹의 결절수의 평균값을 기준으로 전체 개체를 그 평균 값으로 나누어 백분율을 구한 후 각 그룹별로 나타낸 그래프이다.

도 17은 2차 동물실험에서 마우스 Adj, Adj+2LDL, Adj+4LDL, Adj+SP 그룹에 각각 면역 증강제, "면역 증강제+Epi-2LDL", "면역 증강제+Epi-4LDL" 및 "면역 증강제+Epi-SP로 면역하고 암세포를 주입한 후 각 그룹별로 결절이 생긴 폐의 표면을 촬영한 사진이다.

도 18은 도 17의 실험 후 Adj, Adj+2LDL, Adj+4LDL, Adj+SP 그룹의 결절수를 수치화한 그래프 및 Adj 그룹의 결절수의 평균값을 기준으로 전체 개체를 그 평균 값으로 나누어 백분율을 구한 후 각 그룹별로 나타낸 그래프이다.

도 19는 3차 동물실험에서 각 그룹별로 "면역 증강제+Epi-SP" 및 "면역 증강제+Epi-SP-sc"로 면역하고 4T1 암세포(4T1 Con-D5 또는 4T1 EpiKD-B3)를 주입한 후 각 그룹별로 결절이 생긴 폐의 표면을 촬영한 사진이다.

도 20은 도 19의 실험 후 각 그룹별로 결절수를 수치화한 그래프이다.

도 21은 도 19의 실험 후 Adj+4T1 그룹의 결절수의 평균값을 기준으로 전체 개체를 그 평균 값으로 나누어 백분율을 구한 후 각 그룹별로 나타낸 그래프이다.

도 22는 Adj+SP+4T1 그룹에서 얻은 혈청으로 MCF7에 대한 웨스턴 블롯팅을 수행한 전기영동결과 사진이다.

도 23은 본 발명의 항원 올리고 펩타이드로 형성된 항체가 에피틴에 의해 유도되는 427.1.86 세포의 세동이동을

억제하는 것을 보여주는 사진이다.

도 24는 본 발명의 항원 올리고 펩타이드로 형성된 항체가 수용성 에피틴에 의해 유도되는 MS1 세포의 세동이동을 억제하는 것을 보여주는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌은 본 발명에 참고로서 통합된다.

[0032] 재료 및 방법

[0033] 사용된 시약, 항체 및 실험동물 등

[0034] 본 발명의 하기 실시예들에서 사용된 대부분의 시약들은 미국의 Invitrogen Corporation으로부터 구입하였다. 항-에피틴(항-메트립타아제) 항체(H-270), 항-Tie2 항체, 대조군 shRNA 렌티바이러스(short hairpin lentivirus) 및 에피틴 shRNA 렌티바이러스는 미국의 Santa Cruz Biotechnology, INC로부터 구입하였고, 항-튜불린(anti-tubulin)은 미국의 Sigma로부터 구입하였으며, 단클론 항체 mAb5는 본 발명자가 발표한 이전의 문헌에 기술된 바에 따라 준비하였다(E.G. Cho, M.G. Kim, C. Kim, S.R. Kim, I.S. Seong, C. Chung, R.H. Schwartz, D. Park, N-terminal processing is essential for release of epithin, a mouse type II membrane serine protease, J Biol Chem 276 (2001) 44581-44589). 그리고, pcDNA3 벡터는 Invitrogen Corporation에서 구입하였고, pcDNA3/eGFP 벡터 및 pcDNA3.1/메트립타아제 벡터는 각각 pcDNA3 벡터에 eGFP 유전자 및 메트립타아제 유전자를 재조합하여 준비하였다. 또한, 폐로 암전이가 되는 것을 확인하기 위해 사용된 BalB/c 마우스는 (주)대한바이오링크(대한민국, 충청북도 소재)로 구입하여 사용하였다.

[0035] 사용된 세포주들 및 세포 배양

[0036] 암세포주들(427.1.86, 4T1 등)은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 배양하여 유지시켰다. 그리고, 쥐의 내피세포(Mouse endothelial cell)인 MS1은 5% FBS가 보충된 DMEM 배지에서 배양하여 유지시켰다. 또한, 에피틴을 과발현하는 427.1.86 암세포에서 에피틴을 녹다운(knock-down)(발현 억제 또는 차단 의미)시킨 427 Epi-KD 세포주를 구축하기 위해, 다음과 같은 2개의 합성 올리고뉴클레오타이드들을 포함하는 pSUPER-epi 구조체를 네오마이신 내성 유전자를 코딩하는 pcDNA3 벡터에 재조합한 후 427.1.86 암세포에 트랜스펙션시켰다. 그리고, 800 μ g/ml G418의 존재 하에서 10일 동안 생장시킨 후 단백질과 RNA 발현 레벨이 안정적으로 녹다운된 단일 세포를 선정하여 이로부터 427 Epi-KD 세포주를 구축하였다.

[0037] 정방향 스트랜드 (서열번호 5):

[0038] 5'-GATCCCCGGTGCCTTCAAACTCTTCTCAAGAGAGAAGAGTTTGAAGCGCACCTTTTTA-3'

[0039] 역방향 스트랜드 (서열번호 6):

[0040] 5'-TCGATAAAAAAGTGCCTTCAAACTCTTCTCTTGAAGAAGAGTTTGAAGCGCACCGGG-3'

[0041] 상기 서열번호 5 및 서열번호 6에 있어서 굵은 글씨 및 밑줄로 표시된 염기들의 서열부분은 에피틴을 표적으로 하는 서열을 나타낸다.

[0042] 그리고, GFP-427 세포주 및 GFP-427 Epi-KD 세포주는 pcDNA3 벡터 대신에 pcDNA3/eGFP 벡터를 사용한 것을 제외하고는 427 Epi-KD 세포주 구축과 유사한 방법으로 구축하였다. 4T1 세포를 대조군 shRNA 렌티바이러스(short hairpin lentivirus) 또는 에피틴 shRNA 렌티바이러스(에피틴 발현을 사일런싱하는 shRNA를 코딩하는 렌티바이러스임)로 트랜스펙션시키고, 2 μ g/ml 퓨로마이신(puromycin) 존재 하에서 생장시킨 후 단일 세포 선정과정을 통해 4T1 유래 클론들(A7, D5, B3, C5, G3)을 얻었다. A7 및 D5 클론들은 대조군 shRNA 렌티바이러스로 트랜스펙션시켜 얻은 4T1 세포의 클론들로서 에피틴을 유효하게 발현하고, 반면에 B3, C5 및 G3 클론들은 에피틴 shRNA 렌티바이러스로 트랜스펙션시켜 얻은 4T1 세포의 클론들로서 에피틴 발현이 녹다운되어 있다. 또한, AB-B3 클론은 상기 B3 클론을 pcDNA3.1/메트립타아제로 트랜스펙션시켜 얻은 클론으로서 다시 인간에서 유래된 메트립타아제를 유효하게 발현한다. 벡터들은 리포펙타민(Invitrogen에서 구입)을 이용하여 세포들에 트랜스펙션되었다.

- [0043] **웨스턴 블롯팅 분석법**
- [0044] 본 발명의 실시예들에서 사용된 웨스팅 블롯팅 분석법은 당업계에 이미 잘 알려진 방법에 따라 실시하였다. 단백질 샘플들은 환원 조건 하에서 10% 아크릴아미드 겔(acrylamide gel)상에서 분리하였다. 분리된 단백질들의 시각화를 위해 HRP(horseradish peroxidase)가 접합된 2차 항체가 사용되었고, 증강된 화학발광 시약(enhanced chemiluminescence reagents)(Amersham)을 처리하였다.
- [0045] **실시예**
- [0046] **실시예 1: 내피세포 투과 이동 어세이(Transendothelial migration assay)**
- [0047] 에피틴을 발현하는 암세포의 전이 과정을 연구하기 위하여 에피틴 발현 정도에 따라 TEM(Transendothelial cell migration) 정도에 차이가 있는지를 MS1 세포를 이용하여 테스트하였다. 또한, 이미징 장비를 이용하여 동물 내 암세포 전이정도를 확인하기 위해 형광 단백질을 발현하는 암세포주를 마련하여 생쥐의 암 모델에서 테스트하였다. 또한, 에피틴 발현이 녹다운된 세포주들(도 6 내지 도 8의 B3, C5 및 G3 클론)을 마련하여 세포배양과 생쥐의 암 모델에서 이용하였다(도 9 및 도 10 참조). 본 실시예에서는 다양한 암세포주를 이용한 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동의 상관관계를 규명하고, 이를 생쥐의 암 모델에서 형광으로 염색한 암세포의 전이에 의해 확인함으로써 생쥐 혈관 내피세포 MS1을 이용한 내피세포 투과 이동 어세이(Transendothelial cell migration assay) 방법을 정립하였다(도 2 참조). 이하에서는 이에 대해 상세히 설명한다.
- [0048] **실시예 1-1: 내피세포 간의 이동에 대한 현미경 분석법**
- [0049] MS1 세포를 12-웰 플레이트의 젤라틴-코팅된 커버슬립에서 배양하여 밀집된 단일층(confluent monolayer)으로 형성하였다. 안정적으로 GFP 형광단백질을 발현하는 GFP-427 세포 및 GFP-427-Epi-KD 세포를 Cellstripper™(Cellgro)를 이용하여 분리하고 배양 배지에 10^5 개 세포/ml의 농도로 재현탁하였다. 세포 재현탁액 1 ml을 각각의 MS1 단일층에 첨가하였다. 8시간 후 세포를 세척하고 고정한 다음, 세포를 로다민이 접합된 팔로이딘(Molecular probe)으로 염색하고(액틴을 적색으로 염색함), 10X 플라나포크로마트 대물렌즈(Planapochromat objective lens)가 장착된 형광 현미경(Axiovert 200M, Zeiss)으로 관찰하였다. AxioVision RE 소프트웨어(Zeiss)를 이용하여 이미지들을 분석하였다. 내피세포층을 이동한 세포를 GFP 형광단백질 및 F-액틴 패턴에 기반한 형태에 따라 분석하였다. 2X 디지털 줌 세팅 하의 40X/1.2W Korr 렌즈를 포함하는 LSM510으로 광학 절편(optical sections)을 획득하고 LSM 이미지 브라우저(Image Browser)(Carl Zeiss)를 이용하여 촬영된 이미지를 모아서 정리하였다(도 3 참조).
- [0050] **실시예 1-2: 보이덴 챔버(Boyden Chamber)(Falcon)의 이용 방법**
- [0051] 5×10^4 개의 MS1 세포가 밀집된 상태에 도달할 때까지 $8 \mu\text{m}$ 동공 챔버(pore Chamber; Insert, Falcon)에서 배양하였다. 4T1 세포를 CFSE(Molecular Probes™)로 염색하여 혈청이 없는 DMEM 배지에 재현탁하였다. CFSE로 염색된 10^5 개의 4T1 세포를 MS1 세포층에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 세포들을 3.7% 포름알데하이드(Sigma)로 고정한 후 이동되지 않은(unmigrated) 4T1 세포들을 제거하고 세척하였다. AxioCam MRm(Zeiss)가 장착된 IX-51 현미경(Olympus)을 이용하여 CFSE-양성 세포들의 이미지들을 얻었으며, 세포수를 ImageJ(National Institute of Health)로 분석하였다(도 2, 도 7 및 도 8 참조).
- [0052] **실시예 1-3: 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동의 상관관계 규명**
- [0053] 도 3에 도시된 바와 같이, GFP 형광단백질 및 F-액틴에 의해 시각화된 형태에 기초하여 둥근 형태의 세포들(도 3의 c)은 MS1 내피세포층에 부착된 GFP-427 세포 또는 GFP-427-Epi-KD 세포로 계수하고, 스핀들이나 다각형의 세포들(도 3의 f 및 i)은 MS1 내피세포층을 투과 이동한 GFP-427 세포 또는 GFP-427-Epi-KD 세포로 계수하였다. 수직 절편으로 촬영한 이미지에서 둥근 형태의 세포들은 MS1 세포층 상에 부착된 반구형태(도 3의 c')로 관찰되는 반면에, 스핀들이나 다각형의 세포들은 MS1 세포층에 분산되거나 MS1 세포 사이에 위치하는 것(도 3의 f' 및 i')으로 관찰되었다. 도 3의 f에 표시된 "*"표는 액틴 스트레스 섬유(actin stress fiber)를 나타낸다. 그리고, 3회에 걸친 실험을 통해 GFP 형광단백질 양성인 세포들에 있어서 필드 당 MS1 내피세포층에 부착된 GFP-427 세포수 및 MS1 내피세포층을 투과 이동한 GFP-427 세포수의 평균값을 구하고, 또한 관찰된 필드 당 MS1 내피세포층에 부착된 GFP-427-Epi-KD 세포수 및 MS1 내피세포층을 투과 이동한 GFP-427-Epi-KD 세포수의 평균값을 구한 후, MS1 내피세포층을 투과 이동한 GFP-427 세포수와 GFP-427-Epi-KD 세포수를 비교하였다(도 4 참조).
- [0054] 도 4는 에피틴을 발현하는 세포 GFP-427과 에피틴 발현이 녹다운된 세포 GFP-427-Epi-KD에 있어서 전체 세포수

에 대해 투과 이동한 세포수를 백분율로 나타내어 비교하고 있다. 그 결과, 에피틴을 발현하는 세포(GFP-427)에서는 63%가 MS1 세포층을 투과 이동한 반면에, 에피틴 발현이 녹다운된 세포(GFP-427 Epi-KD)에서는 42%만이 MS1 세포층을 투과 이동하여 에피틴의 발현 감소가 TEM 능력을 감소시켰음을 알 수 있다. 도 5에서 재차 확인되는 바와 같이, TEM 어세이를 수행하면 에피틴을 다량 발현하는 흉선상포암 세포주 427을 shRNA로 트랜스펙션시켜 에피틴 발현을 녹다운시킨 427 Epi-KD 세포에서는 TEM 능력이 현저히 감소함을 알 수 있고, 이로부터 에피틴이 암세포의 내피세포 이동에 중요한 기능을 하고 있음을 확인할 수 있으며 에피틴이 암전이에도 관여함을 알 수 있다. 뿐만아니라 이는 TEM 어세이가 암전이 관련 표적 물질 확인 및 암전이 억제 물질 확인에 유효하게 활용될 수 있음을 보여주는 것이다. 한편, 도 4 및 도 5에서 에러 바(error bar)는 표준편차를 나타내고, 별표(*)는 통계학적 유의적 수준이 $P < 0.01$ 인 것을 나타낸다.

[0055] 실시예 1-4: 에피틴 과발현 암세포주가 아닌 4T1 유방암 세포주를 이용한 실험을 통해 TEM 어세이의 암전이 실험모델로서의 신뢰성 검증

[0056] 마우스의 유방암 세포주인 4T1과 전술한 바와 같은 방식으로 4T1 세포주로부터 유래한 클론들(A7, D5, B3, C5, G3)을 이용하여 실험을 수행하였다. 우선, 4T1과 A7, D5, B3, C5, G3 클론에 대해 항-에피틴 항체인 mAb5를 이용한 웨스턴 블롯팅을 수행하여 에피틴의 발현 수준을 체크하고 동일한 양이 로딩되었는지는 항-튜불린 밴드로 확인하였다(도 6 참조). 4T1 세포주 유래의 각 클론들에 대해 실시예 1-2에서 설명한 보이덴 챔버 방식을 이용한 TEM 어세이를 수행하여 MS1 내피세포층을 투과 이동한 세포수를 계수하고 이를 각 클론별로 수치화하여 그래프화하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 에피틴을 유효하게 발현하는 A7 및 D5 클론들의 세포들은 내피세포층을 유효하게 투과이동하는 반면에 에피틴 발현이 녹다운된 B3, C5 및 G3 클론들의 세포들은 내피세포층을 용이하게 투과이동하지 못하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 에피틴 발현이 녹다운된 B3 클론을 pcDNA3.1/메트립타아제로 트랜스펙션시켜 얻은 AB-B3 클론의 세포들은 메트립타아제의 발현으로 내피세포층을 유효하게 투과이동하여 TEM 능력을 회복한 것을 확인할 수 있었다(도 8 참조). 한편, 도 7 및 도 8에서 표시된 각 점들은 현미경 관찰 필드에서 투과이동된 세포수를 나타내고, 이들에 대한 평균값과 표준 편차가 그래프에 표시되어 있으며, 별표(*)는 통계학적 유의적 수준이 $p < 0.001$ 이고 별표(**)는 통계학적 유의적 수준이 $p < 0.01$ 인 것을 나타낸다.

[0057] 혈관 내피세포 투과 이동(transendothelial migration)이 암전이의 필수적인 단계임을 감안할 때, 유방암 세포인 4T1을 대조군 shRNA로 트랜스펙션시켜 유도한 A7 및 D5 클론들의 세포들(에피틴 발현)에서는 TEM 능력이 유지되었으나 유방암 세포인 4T1을 에피틴 shRNA로 트랜스펙션시켜 유도한 B3, C5 및 G3 클론들의 세포들(에피틴 녹다운)에서는 TEM 능력이 결여되었다는 사실은 에피틴이 내피세포 이동에 중요한 역할을 하며 나아가 암전이에 깊이 관여한다는 것을 시사한다. 특히, 에피틴 발현이 녹다운된 B3 클론을 다시 메트립타아제 벡터로 트랜스펙션시키면 TEM 능력이 회복된 점은 이러한 사실을 더욱 강력히 뒷받침하며, 이는 TEM 어세이가 암전이 실험모델로서 신뢰도를 갖고 이용될 수 있음을 입증하는 것이다.

[0058] 실시예 2: 생체내(in vivo) 전이 어세이를 통한 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동의 상관관계 검증

[0059] PBS 용액 내의 5×10^4 개의 4T1 세포주로부터 유래한 클론들(A7, D5, B3, C5, G3)이 각각 6마리의 Balb/c 마우스[(주)대한바이오링크에서 구입]의 꼬리 정맥을 통해 주입되었다. 상기 4T1 세포주로부터 유래한 클론들이 주입된 마우스를 14일 후에 희생시키고 PBS에 녹여진 인디언 잉크(일반적인 먹물로 제조사에 관계없이 사용가능)를 기관(trachea)을 통해 주입하여 폐를 염색하였다. 염색된 폐를 해부하여 PBS로 적절하게 세척한 후, 각 클론마다 이미지를 얻어 종양 결절(nodules)을 계수하였다(도 9 참조). 그리고 계수된 결과를 각 클론별로 수치화하여 그래프화하였다(도 10 참조).

[0060] 도 9에 도시된 바와 같이, 에피틴을 유효하게 발현하는 A7 및 D5 클론들의 세포들이 주입된 마우스의 폐에서는 전체 표면이 종양 결절로 덮혀 있는 반면에, 에피틴 발현이 녹다운된 B3, C5 및 G3 클론들의 세포들이 주입된 마우스의 폐를 덮고 있는 종양 결절의 수는 현저히 감소됨을 알 수 있다. 도 10은 이러한 육안으로 확인한 결과를 수치화한 것으로서 에피틴이 암전이를 유효하게 유도하는 것을 보여준다. 도 10에는 각 클론 별로 종양 결절수에 대한 평균값과 표준 편차가 그래프에 표시되어 있으며, 별표(*)는 통계학적 유의적 수준이 $p < 0.001$ 이고 별표(**)는 통계학적 유의적 수준이 $p < 0.01$ 인 것을 나타낸다.

[0061] 이러한 생체내 실험 결과는 실시예 1의 내피세포 투과 이동 어세이 결과와 일치하였다. 따라서, 본 실시예는 에피틴이 암진행 및 전이에 관계하는 중요 물질임을 재차 확인시켜 주는 동시에 에피틴 발현 정도와 혈관 내피세포 투과 이동이 서로 밀접한 상관관계를 갖는 것을 보여줌으로써 실시예 1의 내피세포 투과 이동 어세이가 암전이 관련 표적물질 및 암전이 억제물질을 스크린하는 유효한 방법임을 입증하고 있다.

[0062] **실시예 3: 본 발명의 암전이를 억제하는 항원 펩타이드의 항체 유도 여부 확인과 이 항체를 이용한 혈관 내피세포 투과 이동 억제**

[0063] 면역성을 이용하여 암전이를 제어하기 위하여 에피틴의 항원성이 면역항체를 만들 수 있는지에 대해 시험하였다. 면역관용을 일으키는데 중요한 기능을 하는 흉선미세환경에서 에피틴 단백질이 발현하기 때문에 에피틴이 면역 반응을 일으키는지 여부는 암전이 백신 개발과 단클론 항체 개발 가능성에 있어서 가장 중요한 확인과정이다. 항원가능성이 높고 인간과 생쥐에 동시에 면역항원으로 가능한 올리고 펩타이드를 선정하여 마우스에 대해 면역을 시행하여 항체 형성을 검증하였다.

[0064] 이를 위해 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드 또는 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드를 KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)과 결합시켜 6마리의 마우스에 3회에 걸쳐 면역시킨 후 3일후 혈청을 회수하여 ELISA 분석을 하였고 항체 형성량이 많은 마우스 3마리를 선정하였다. 그리고 이들 항체(AG22-1, AG22-3, AG22-5)가 에피틴에 의한 암전이를 억제하는지 여부를 확인하기 위해 실시예 1-2에서 설명된 내피세포 투과 이동 어세이(TEM)를 수행하였다.

[0065] 즉, 혈관 내피를 구성하는 혈관내피 세포(MS1)를 보이덴 챔버(Boyden chamber)에서 배양하여 밀집된 층을 형성하고, 4T1 암세포주로부터 유래한 에피틴을 유효하게 발현하는 D5 클론의 1×10^5 개 세포를 혈관내피 세포와 구별하기 위하여 CFSE라는 형광물질로 표지하고 내피세포층 상에 투여하였다. 이때 암세포의 이동을 촉진하기 위해서 혈청의 농도차를 주었으며, 암세포의 이동에 관여하는 인자들을 알아보기 위하여 세포의 단백질 발현을 조절하거나 항체를 투여하여 내피세포 투과 이동 어세이를 수행하였다. 그리고, 혈관내피세포의 반대편으로 이동하는 D5 암세포의 수를 계수하되, 항체를 첨가하지 않은 경우, 앞선 실험에서 유도된 항체(AG22-1, AG22-3, AG22-5)들을 각각 첨가한 경우 그리고 양성 대조군인 H270 항체를 사용한 경우로 나누어 측정하였다. 항체 AG22-1, AG22-3, AG22-5 및 H270 항체의 양은 일반적으로 사용되는 혈청의 양을 기준으로 본 실험에 이용하였고, 본 실험에 사용된 세포 배지의 양(0.5ml)을 기준으로 $5 \mu\text{l}$ 씩 사용하였다(1:100 희석비). 측정된 결과는 도 11에 도시된 바와 같으며 항체 AG22-1, AG22-3, AG22-5에 의해 암세포의 이동이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 도 12에는 항체가 투여되지 않은 경우를 100으로 하여 항체 투여시 암세포 이동수를 백분율로 표시하였다. 그 결과, 본 발명의 항원 올리고펩타이드에 의해 면역 유도된 마우스 항체 AG22-1, AG22-3, AG22-5는 4T1 세포주 유래의 암세포에 대해 각각 대략 63%, 48%, 34% 정도의 암세포 이동 억제력을 보이고 있음을 관찰하였다. 따라서, 본 발명의 항원 올리고펩타이드는 면역 반응을 유도하여 항체를 생성하고 생성된 항체는 내피세포 투과 이동 어세이에서 암세포 이동을 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명의 항원 올리고펩타이드는 암전이 백신으로서 암세포의 전이 과정을 억제하는 효과가 있다고 할 수 있다.

[0066] **실시예 4: 본 발명의 암전이를 억제하는 항원 펩타이드를 이용한 동물실험**

[0067] 실시예 3의 결과를 바탕으로 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드, 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드 또는 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드가 면역반응 유도에 의한 암전이 백신으로 기능하는지를 Balb/c 마우스를 이용하여 확인하였다.

[0068] **실시예 4-1: 1차 동물실험을 통한 백신 효능 테스트**

[0069] 서열번호 1의 아미노산 서열(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)을 갖는 올리고펩타이드(이하, "Epi-SP"로 약칭함), 서열번호 2의 아미노산 서열(CGDGSDEEG)을 갖는 올리고펩타이드(이하, "Epi-2LDL"로 약칭함) 또는 서열번호 3의 아미노산 서열(CSDGSDEKN)을 갖는 올리고펩타이드(이하, "Epi-4LDL"로 약칭함)가 4T1 암세포의 전이에 미치는 영향을 알아보기 위하여 한 그룹당 10마리의 마우스 Balb/c로 구성된 총 4개의 그룹(Adj, Adj+Epi-2LDL, Adj+Epi-4LDL, Adj+EpiSP)에 각각 면역 증강제(Adjuvant), "면역 증강제+Epi-2LDL", "면역 증강제+Epi-4LDL" 및 "면역 증강제+Epi-SP"를 3주에 한번씩 총 3번 주사하였다. 첫번째 주사시에서는 $50 \mu\text{g}$ 올리고 펩타이드와 CFA를 섞어($100 \mu\text{l}$ PBS 용액 내의 $50 \mu\text{g}$ 올리고 펩타이드 + $100 \mu\text{l}$ CFA) 각 마우스에 복강내 주사하였고, 두번째 주사시부터는 $20 \mu\text{g}$ 올리고 펩타이드를 IFA와 섞어($100 \mu\text{l}$ PBS 용액 내의 $20 \mu\text{g}$ 올리고 펩타이드 + $100 \mu\text{l}$ IFA) 각 마우스에 복강내 주사하였다(면역증강제와 올리고 펩타이드의 부피비는 1:1로 조정). 그리고 세번째 주사 후 3일째 되는 날, 각 마우스에 4T1 암세포 5×10^5 개/ $200 \mu\text{l}$ PBS를 정맥주사하였다. 19일째 되는 날 마우스의 무게, 폐를 따로 떼어내 폐의 무게, 폐에 생긴 결절수를 세었다(도 14 참조). 폐의 무게와 결절수를 측정하기 위해 마우스를 죽인 후 폐만 따로 떼어내고 떼어낸 폐를 각각 35mm 디쉬(dish)에 올려놓고 사진을 찍고, 사진 상에 나타난 폐에서 흰색의 혹처럼 튀어나온 결절의 수를 세었다. 도 14에서 "사망(dead)"이라고 표시된 것은 확인하기 전에 이미 죽어있던

마우스의 폐이다. 혹의 크기와 관계없이 수를 세었고, 혹 사이가 갈라져 있을 경우에는 각각 다른 혹으로 생각하여 수를 세었다. 또한, 눈에서 피를 뽑아 혈청을 얻었다.

[0070] 구체적으로, Graphpad prism 5 프로그램을 사용하여 각 그룹별로 전술한 실험결과에 대한 생존 곡선(survival curve)을 그렸다(도 13 참조). 4T1 암세포를 주사하고 17일째 되는 날, Adj 그룹의 9마리의 마우스 중 4마리가 죽었고, Adj+Epi-2LDL 그룹의 10마리의 마우스 중 1마리가 죽었다. 18일째 되는 날, Adj+Epi-2LDL 그룹에서 1마리가 더 죽었고, Adj+Epi-4LDL 그룹의 8마리의 마우스 중 1마리가 죽었다. 전이 여부(Metastasis)를 확인하는 19일째 되는 날까지 Adj+EpiSP 그룹의 마우스는 9마리 중 9마리 모두 살아남았다. 이를 도표로 정리하면 하기의 표 1과 같다.

표 1

암백신 3차 면역후 암세포 이식한 경우 19일째 생존률 결과

그룹	면역반응	생존개체수
Adj	Innate (초기 면역 반응)	5/9
Adj + Epi2LDL	Innate + Adaptive (초기면역+적응성면역 반응)	8/10
Adj + Epi4LDL	Innate + Adaptive (초기면역+적응성면역 반응)	7/8
Adj + EpiSP	Innate + Adaptive (초기면역+적응성면역 반응)	9/9

[0071]

[0072] 4T1 암세포를 주사한 후 19일째 되는 날, 각 그룹별 생존률은 Adj에서 55.6%, Adj+Epi-2LDL에서 80%, Adj+Epi4LDL에서 87.5%, 그리고 Adj+EpiSP에서 100%로서 Adj+EpiSP에서 가장 생존률이 높았다. 또한, Graphpad prism 5 프로그램을 사용하여 Adj, Adj+Epi-2LDL, Adj+Epi-4LDL, Adj+EpiSP 그룹의 폐무게 및 결절수를 그래프로 그렸다(도 15). 도 15는 평균값과 표준오차를 사용하여 나타내었다. 폐무게의 경우는 Adj 그룹에서 가장 무거웠고, Adj+Epi-2LDL 그룹, Adj+Epi-4LDL 그룹, Adj+EpiSP 그룹순으로 가벼웠다. 결절수는 Adj 그룹에서 가장 많았고, Adj+Epi-2LDL 그룹, Adj+Epi-4LDL 그룹, Adj+EpiSP 그룹순으로 적었다. Adj 그룹의 결절수의 평균값을 기준으로 놓고 전체 개체를 그 평균 값으로 나누어 백분율을 구하고, 다시 각각의 그룹별로 Prism 5 프로그램을 사용하여 그래프를 그렸다(도 16). 도 16은 평균값과 표준오차를 사용하여 나타내었다. Adj 그룹에 비해 Adj+2LDL 그룹에서 14%, Adj+4LDL 그룹에서 20%, Adj+SP 그룹에서 42% 정도 결절수가 감소하였다. 따라서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 올리고펩타이드로 면역을 하였을 때 암전이 억제효과가 가장 우수한 것을 알 수 있다.

[0073] 실시예 4-2: 2차 동물실험을 통한 백신 효능 테스트

[0074] 실시예 4-1에서의 테스트를 통해 본 발명의 항원 올리고펩타이드가 마우스에서 암전이를 효과적으로 억제하는 것으로 확인이 되었는데, 이러한 결과가 개체간 차이나 실험상의 오류로 인한 우연한 결과인지를 확인하기 위해 그룹 당 마우스 마리수를 늘려 각 그룹당 20마리의 마우스를 사용하여 테스트를 반복하였다. 한 그룹당 20마리의 마우스 Balb/c로 구성된 총 4개의 그룹(Adj, Adj+2LDL, Adj+4LDL, Adj+SP)에 각각 면역 증강제(Adjuvant), "면역 증강제+Epi-2LDL", "면역 증강제+Epi-4LDL" 및 "면역 증강제+Epi-SP"를 3주에 한번씩 총 3번 주사하였다. 첫번째 주사시에는 50 μ g 올리고 펩타이드와 CFA를 섞어(100 μ l PBS 용액 내의 50 μ g 올리고 펩타이드 + 100 μ l CFA) 각 마우스에 복강내 주사하였고, 두번째 주사시부터는 20 μ g 올리고 펩타이드를 IFA와 섞어(두번째 주사시에는 100 μ l PBS 용액 내의 20 μ g 올리고 펩타이드 + 100 μ l IFA; 세번째 주사시에는 50 μ l PBS 용액 내의 20 μ g 올리고 펩타이드 + 50 μ l IFA) 각 마우스에 복강내 주사하였다(면역증강제와 올리고 펩타이드의 부피비는 1:1로 조정). 그리고 세번째 주사 후 3일째 되는날, 각 마우스에 4T1 암세포 1 $\times 10^5$ 개/200 μ l PBS를 정맥주사하였다. 암세포를 주사한 후 28일째 되는 날 마우스의 무게를 측정하고, 기관에 검은색 잉크 1ml을 넣어 폐를 검은색으로 염색하였다. 기관에 검은색 잉크를 넣어 폐를 염색한 다음 각각의 폐를 떼어 내어 디쉬(dish)에 담아 사진을 찍었다. 염색을 통해 폐와 결절의 구분을 좀더 명확하게 할 수 있었고, 염색이 되지 않은 흰색 혹을 결절이라고 생각하여 수를 세었다. 도 17의 사진은 각 그룹별로 결절이 생긴 폐의 표면을 촬영한 사진이다. 암세포를 주사한 후 28일째 되는 날, 결절수는 Adj 그룹에서 가장 많았고, Adj+4LDL 그룹, Adj+2LDL 그룹,

Adj+SP 그룹순으로 적었다.

[0075] Graphpad prism 5 프로그램을 사용하여 Adj 그룹, Adj+2LDL 그룹, Adj+4LDL 그룹, Adj+SP 그룹의 결절수를 그래프로 그렸다. 또한, Adj 그룹의 결절수의 평균값을 기준으로 놓고 전체 개체를 그 평균 값으로 나누어 백분율을 구하고, 다시 각각의 그룹별로 Prism 5 프로그램을 사용하여 그래프를 그렸다(도 18). 도 18은 평균값과 표준오차를 사용하여 나타내었다. Adj 그룹에 비해 Adj+4LDL 그룹에서 58%, Adj+2LDL 그룹에서 62%, Adj+SP 그룹에서 70% 정도 결절수가 감소하였다. 따라서, 한 그룹당 20마리의 마우스를 사용하여 다시 실험한 결과도 실시예 4-1의 실험결과와 거의 동일함을 알 수 있고 본 발명의 항원 올리고 펩타이드가 유효한 백신으로서 사용될 수 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0076] 실시예 4-3: 3차 동물실험을 통한 백신 효능 테스트

[0077] 실시예 4-1 및 실시예 4-2의 실험결과가 본 발명의 항원 올리고 펩타이드의 면역에 의한 것인지를 확인하기 위해 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 올리고 펩타이드(Epi-SP)와, 이에 대한 대조군인 스캐램블된(scrambled) 올리고 펩타이드 Epi-SP-Sc(EQGKGARDWPEWAVQGVNT; 서열번호 4)를 만들어 그 효과를 비교하였다. 그리고 암 전이 억제 모델이 마우스 뿐만 아니라 사람에게도 적용될 수 있는지 시험하기 위해서 쥐와 사람에 모두 사용할 수 있는 면역증강제(Adjuvant)인 임젝트 알룸(Imject alum)을 사용하여 면역하였다. 또한, 에피틴 발현이 녹다운된 암세포주와의 비교를 하기 위하여 에피틴을 발현하는 4T1 Con-D5 세포주와 에피틴 발현이 녹다운된 암세포주 4T1 EpiKD-B3을 사용하였다. 한 그룹당 5마리의 Balb/c 마우스로 구성된 총 11개의 그룹(Adj, Adj+SP, Adj+SP+4T1Con-D5, Adj+SP+4T1EpiKD-B3, Adj+Sc+4T1Con-D5, Adj+Sc+4T1EpiKD-B3, Adj+4T1Con-D5, Adj+4T1EpiKD-B3, 4T1Con-D5, 4T1EpiKD-B3, None)중 8개의 그룹(Adj, Adj+SP, Adj+SP+4T1Con-D5, Adj+SP+4T1EpiKD-B3, Adj+Sc+4T1Con-D5, Adj+Sc+4T1EpiKD-B3, Adj+4T1Con-D5, Adj+4T1EpiKD-B3)에 면역 증강제(Adjuvant), "면역 증강제+Epi-SP" 또는 "면역 증강제+Epi-SP-sc"를 3주에 한번씩 총 3번 주사하였다. 첫번째 주사시에서는 50 μ g 올리고 펩타이드를 임젝트 알룸(Imject alum)과 섞고 두번째 주사부터는 20 μ g 올리고 펩타이드를 임젝트 알룸(Imject alum)과 섞어(첫번째 주사-50 μ l PBS 용액 내의 50 μ g 올리고 펩타이드 + 50 μ l 임젝트 알룸; 두번째 주사-50 μ l PBS 용액 내의 20 μ g 올리고 펩타이드 + 50 μ l 임젝트 알룸) 각 마우스에 복강내 주사하였다(면역증강제와 올리고 펩타이드의 부피비는 1:1로 조정). 그리고 세번째 주사 후 3일째 되는 날, 각 마우스에 4T1 암세포(4T1 Con-D5 또는 4T1 EpiKD-B3) 5×10^5 개/200 μ l PBS를 정맥주사하였다. 암세포를 주사한 후 17일째 되는 날 마우스의 무게를 측정하고, 기관에 검은색 잉크 1ml을 넣어 폐를 염색한 다음 각각의 폐를 떼어 내어 디쉬(dish)에 담아 사진을 찍었다. 도 19의 사진은 각 그룹별로 결절이 생긴 폐의 표면을 촬영한 사진이다. 염색을 통해 폐와 결절의 구분을 좀더 명확하게 할 수 있었고, 염색이 되지 않은 흰색 혹은 결절이라고 생각하여 수를 세었다. 암을 주사한 후 17일째 되는 날, 면역 증강제+Epi-SP로 면역하고 4T1 con-D5를 주입한 마우스의 결절수는 면역 증강제+Epi-SP-Sc로 면역하고 4T1 con-D5를 주입한 마우스의 결절수 보다 적었고, 면역증강제로만 면역하거나 면역하지 않고 4T1 con-D5를 주입한 마우스의 결절수 보다 적었다. 또한, 면역 증강제+Epi-SP로 면역하고 4T1 con-D5를 주입한 마우스의 결절수는 에피틴 발현이 녹다운된 4T1 EpiKD-B3를 주입한 마우스의 결절수와 비슷하였다.

[0078] Graphpad prism 5 프로그램을 사용하여 각 마우스 그룹별 노들수를 그래프로 그렸다. 도 20은 평균값과 표준오차를 사용하여 나타내었다. Adj+SP+4T1 그룹에서 평균값의 표준오차를 크게 상회하는 값을 제외하고 비교하였을 때, 에피틴을 발현하는 암세포주 4T1 con-D5를 주사한 마우스 그룹 중에서는 Epi-SP로 면역한 마우스의 결절수가 가장 적었고, Epi-SP-Sc로 면역한 마우스나 면역증강제로만 면역한 마우스 그리고 면역처리를 하지 않은 마우스 그룹에서는 훨씬 많은 노들수가 계수되었다. 에피틴 발현이 녹다운된 4T1 EpiKD-B3를 주사한 마우스 그룹에서는 모두 비슷한 결절수가 계수되었고, Adj+SP+4T1 그룹의 결절수와 유사하였다. 또한, Adj+4T1 그룹의 결절수의 평균값을 기준으로 놓고 전체 개체를 그 평균 값으로 나누어 백분율을 구하고, 다시 각각의 그룹별로 Prism 5 프로그램을 사용하여 그래프를 그렸다(도 21). 도 21은 평균값과 표준오차를 사용하여 나타내었다. Adj+4T1 그룹에 비해 Adj+SP+4T1 그룹의 결절수가 74% 감소하였고, 이는 에피틴 발현이 녹다운된 4T1 EpiKD-B3를 주사한 다른 마우스 그룹과 유사한 비율로 감소한 것이었다.

[0079] 사람에서 사용되는 면역증강제인 알룸(Alum)을 사용한 경우에는 실시예 4-1 및 4-2의 CFA 및 IFA를 사용한 결과와 유사한 결과를 얻어 본 실험을 사람에게도 적용할 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 Epi-SP 항원 올리고 펩타이드와 대조군인 Epi-SP-sc 올리고 펩타이드를 사용하여 마우스를 면역처리한 후 암세포를 주입하여 폐로 전이된 결절수를 비교한 결과, 본 발명의 Epi-SP 항원 올리고 펩타이드의 경우에만 전이된 결절수가 감소하였다. 이는 본 발명의 Epi-SP 항원 올리고 펩타이드가 특이적으로 암 전이를 억제할 수 있다는 것을 보여준다. 또한,

에피틴 발현이 녹다운된 암세포주인 4T1 EpiKD-B3를 주사한 마우스 그룹에서는 결절의 형성이 4T1 con-D5를 주사한 마우스 그룹보다 적게 일어났다. 그리고, 4T1 EpiKD-B3를 주사한 마우스 그룹의 결절수는 본 발명의 Epi-SP 항원 올리고 펩타이드로 면역한 후 4T1 con-D5를 주사한 마우스 그룹의 결절수와 비슷하였다. 이를 통해 암세포 주사 후 폐로 전이된 결절을 억제하는데 있어서, 본 발명의 Epi-SP 항원 올리고 펩타이드로 면역하여 에피틴의 활성을 억제하는 방법이 에피틴 발현을 녹다운시킨 4T1 EpiKD-B3를 주사한 것과 비슷한 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[0080] 한편, 인간 유방암 세포주인 MCF7 세포의 세포파쇄물을 10% 젤에서 전기영동한 후 1차 항체로 항-메트립타아제 항체(H-270, Santacruz)와, 전술한 바와 같이 Adj+SP로 면역된 처리된 마우스로부터의 1번-4번 혈청 및 면역 후 암전이 실험을 한 마우스로부터의 5번 혈청을 사용하였다. H-270 항체는 컨트롤로 사용한 것으로서 화살표로 표시된 것이 항원 전체 크기(full size)를 나타내는 밴드이다. 즉, 도 22에서 확인되는 바와 같이, 면역된 처리된 마우스로부터 얻은 혈청으로 웨스턴 블롯팅을 하였을 때, 인간의 메트립타아제를 전기영동시 확인시켜주는 H-270 처리에서와 같은 사이즈에서 밴드를 나타내었다. 결국, MCF7에 대해 H-270의 밴드와 같은 사이즈에서 밴드를 보이는 것을 통하여 본 발명의 Epi-SP 항원 올리고 펩타이드에 대한 항체가 MCF7에 있는 메트립타아제(또는 에피틴)와 결합할 수 있는 것을 알 수 있으며, 이는 마우스 내에서 형성된 항-Epi-SP 항원 올리고 펩타이드 항체가 인간 세포에 있는 메트립타아제(또는 에피틴)와도 결합하여 암세포의 전이에 영향을 주어 암진행 및 전이를 억제할 수 있다는 사실을 보여준다.

[0081] 실시예 5: 세포이동 억제 시험

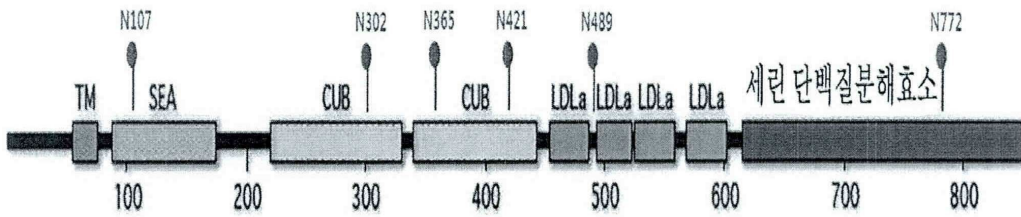
[0082] 실시예 4-3의 과정을 통해 만들어진 항체의 기능적 효과 중 세포의 이동에 있어서의 항체의 효과를 확인하기 위한 시험관내(*in vitro*) 실험을 추가로 수행하였다. 세포는 에피틴을 발현하는 마우스의 427.1.86 세포를 사용하였다. 427.1.86 세포를 밀집되게 배양한 후 블루팅을 이용하여 세포층에 상처를 내고 배양배지(culture media)와 함께 각각 클론의 항체를 3:2의 비율로 더해 주었다. 그 후 20시간을 배양하고 세포의 이동을 현미경으로 관찰하였다. 항체를 넣어주지 않은 a번의 경우에는 세포의 이동이 관찰되는 반면에 실시예 4-3의 과정을 통해 얻은 본 발명의 항원 올리고 펩타이드에 대한 4가지 항체(c~f)를 각각 첨가한 경우에는 세포의 이동이 억제되는 것을 확인할 수 있다(도 23 참조). b번은 효과가 없다고 보여지는 음성(negative) 클론의 항체를 사용한 결과이며, g번은 하이브리도마(hybridoma)를 얻기 위해 면역한 마우스로부터 얻은 혈청(serum)을 사용한 결과이다. 이들 결과로부터 실시예 4-3의 과정을 통해 얻은 단클론 항체가 시험관내(*in vitro*) 실험에서 상피세포 암세포 자체의 이동을 억제한다고 볼 수 있다.

[0083] 다음으로, 핏줄형성과 암의 전이에 중요하게 기능을 하는 내피 세포에서 위와 동일한 실험을 진행했다. 세포는 MS1을 사용하였고, 위와 동일한 방법으로 진행되었다. 그리고 에피틴에 의한 세포 이동이 일어나고 본 발명의 항체가 이를 억제 하는지 여부를 확인하려고 하는 실험목적을 감안하여 에피틴을 과발현하는 427.1.86 세포를 기른 조건배지(conditioned media; CM)를 첨가함으로써 CM에 포함된 수용성 에피틴을 첨가하고 이때 관찰되는 내피세포의 이동을 관찰하였다. 도 24에 도시된 바와 같이, a번은 항체와 427.1.86 CM 모두 첨가하지 않은 경우에 MS1 세포 자체만으로 이동이 없음을 보여주고 있고, b번은 427.1.86 CM을 첨가하여 수용성 에피틴에 의한 세포의 이동이 유도되었음을 보여준다. d~g번은 본 발명의 항원 올리고 펩타이드에 대한 4가지 항체를 각각 첨가한 경우에는 세포의 이동이 억제되는 것을 보여주고, c번은 음성 클론의 항체, 그리고 h번은 하이브리도마(hybridoma)를 얻기 위해 면역한 마우스로부터 얻은 혈청(serum)을 사용한 결과를 보여준다. 도 24를 참조하면, 내피세포에서 수용성 에피틴에 의해 세포의 이동이 일어나며, 본 발명의 항원 올리고 펩타이드에 대한 항체에 의해 세포의 이동이 억제되는 것을 다시 한번 확인할 수 있다.

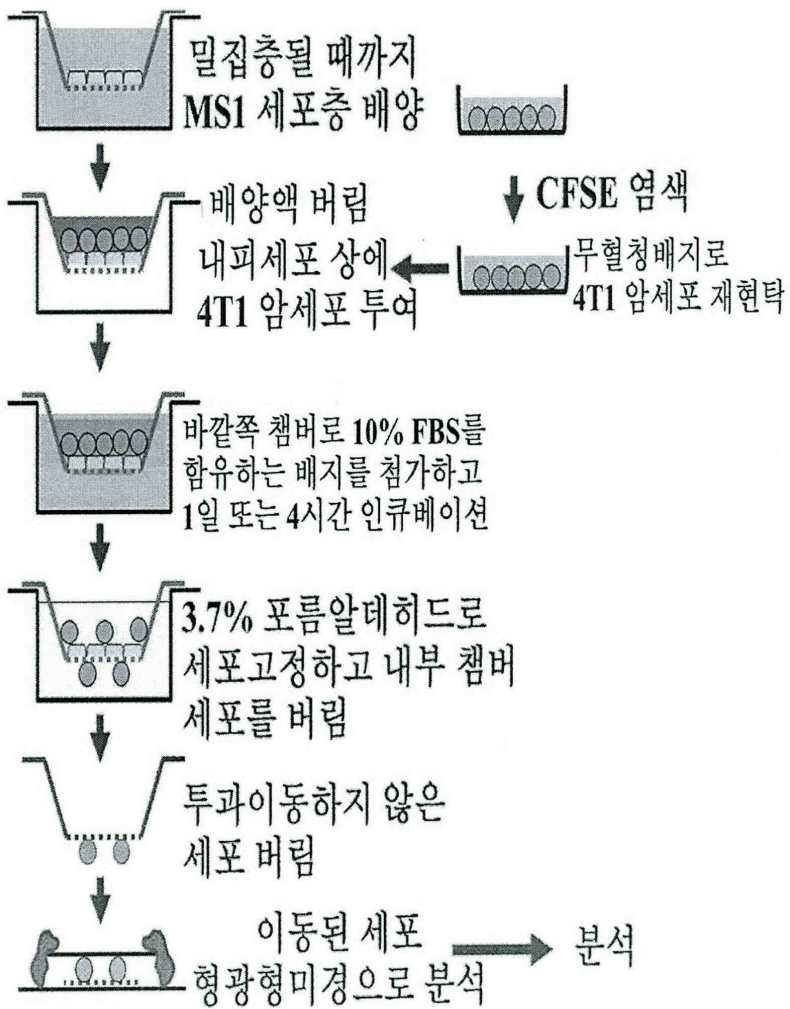
[0084] 이상 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

도면

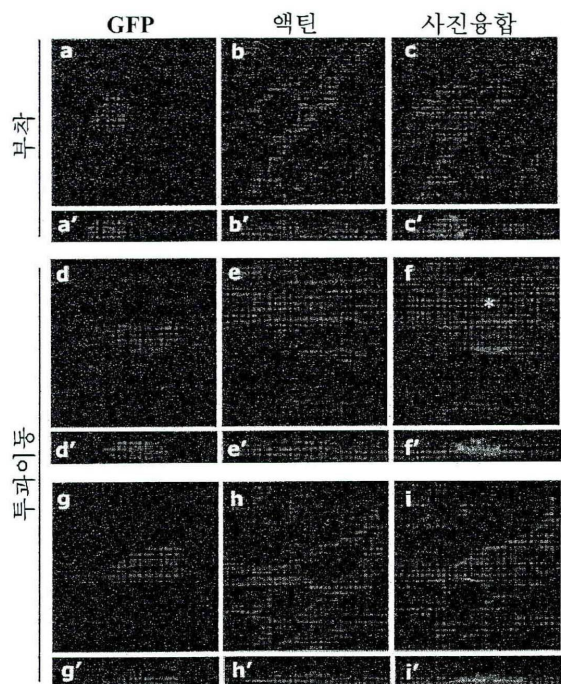
도면1



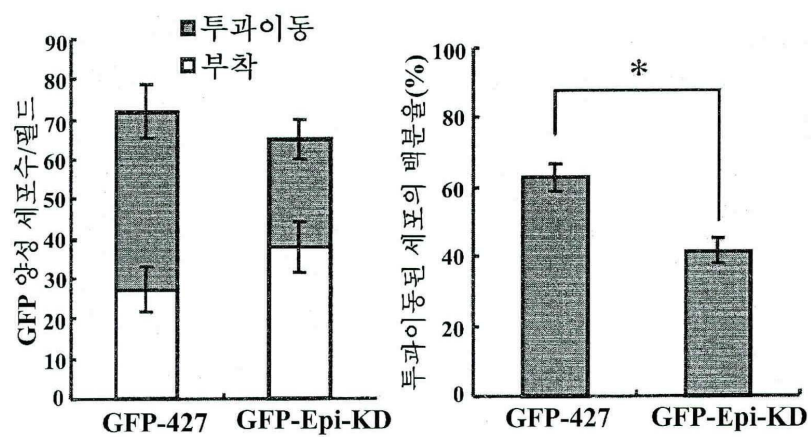
도면2



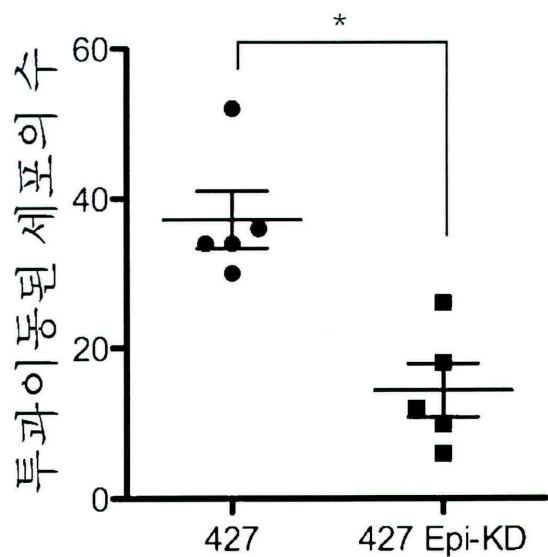
도면3



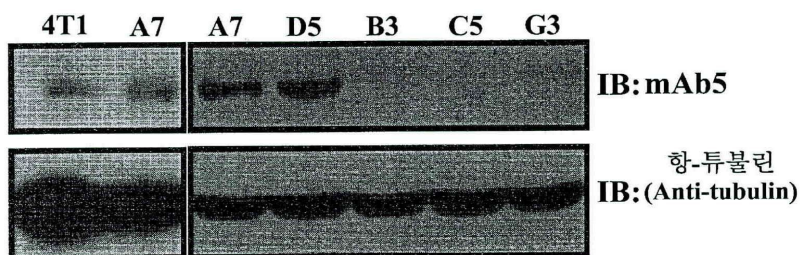
도면4



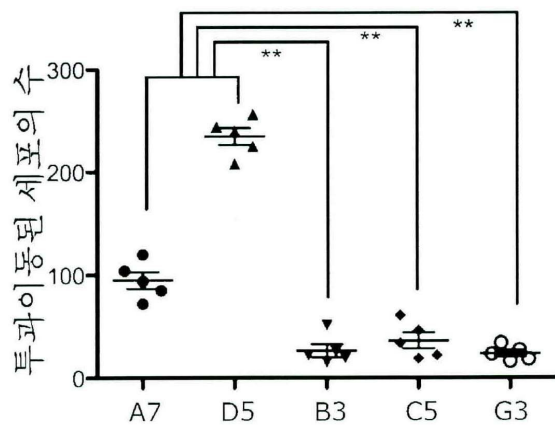
도면5



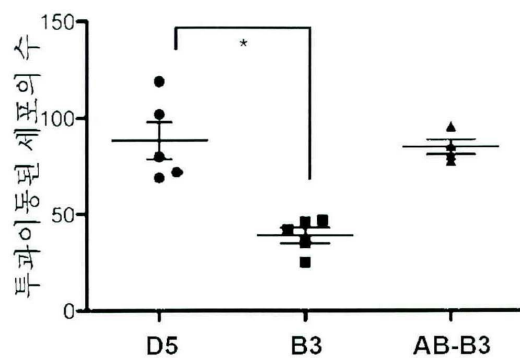
도면6



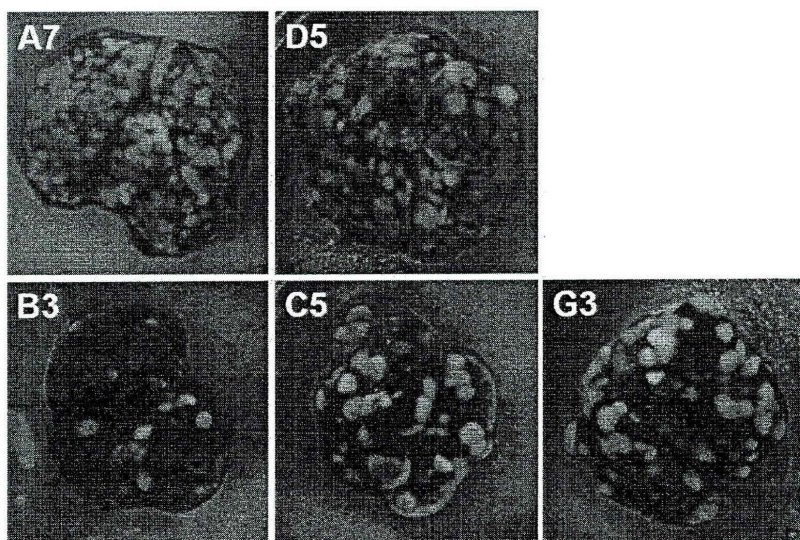
도면7



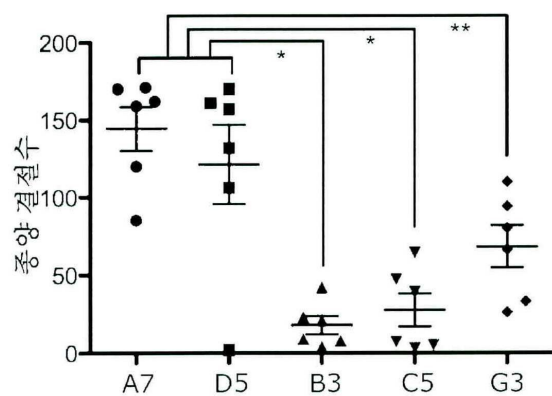
도면8



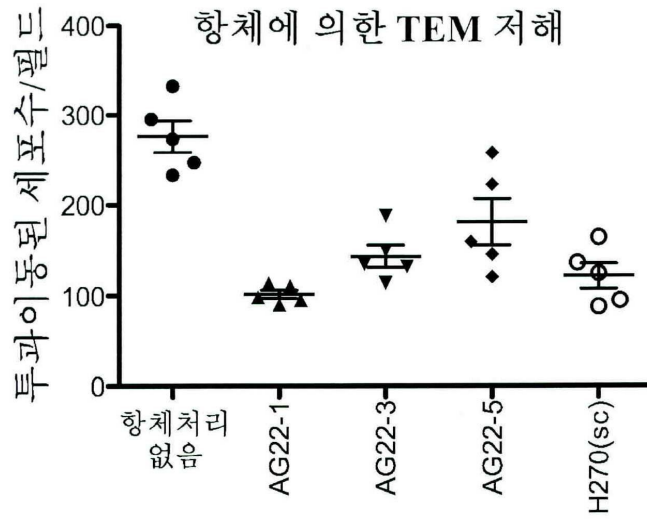
도면9



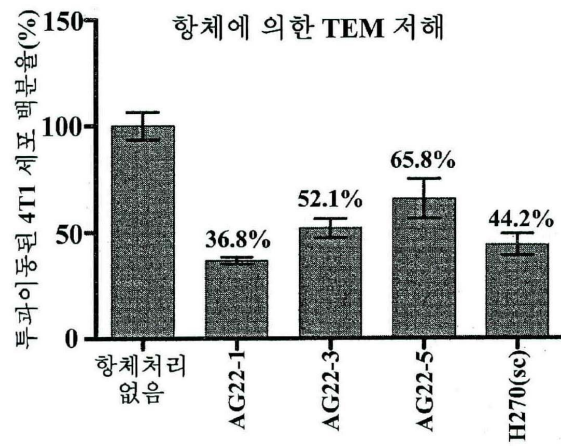
도면10



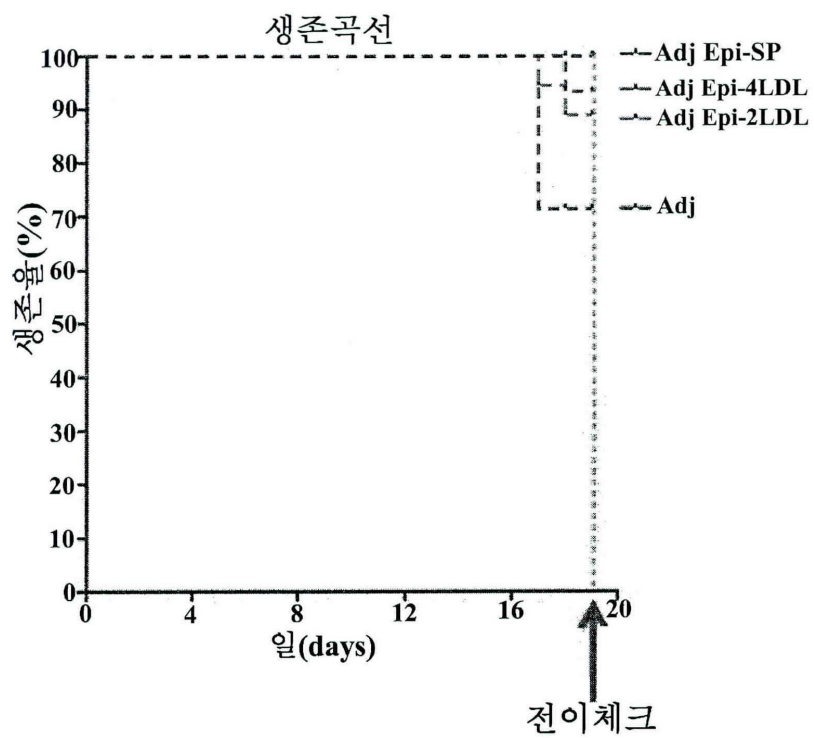
도면11



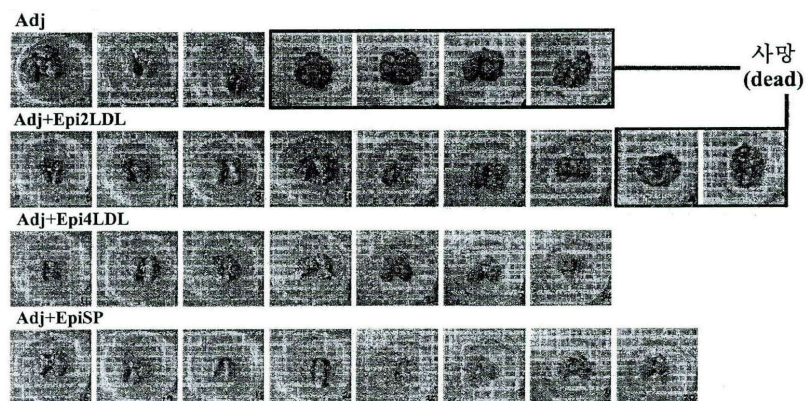
도면12



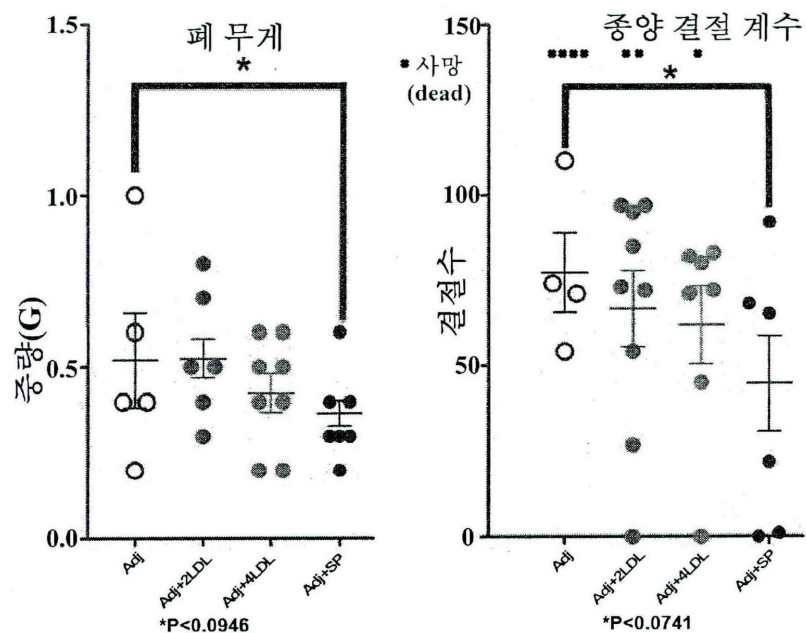
도면13



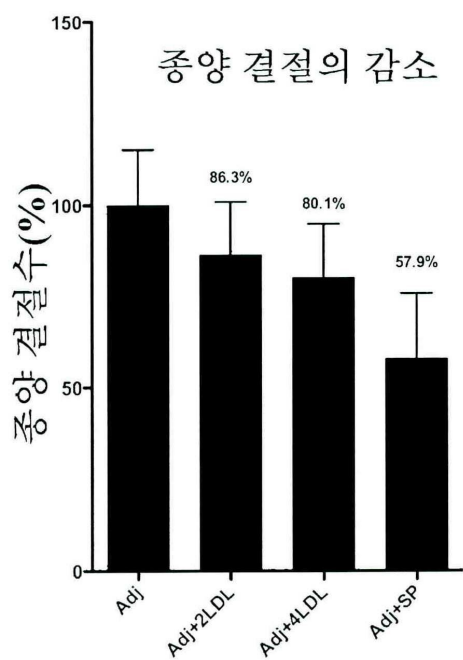
도면14



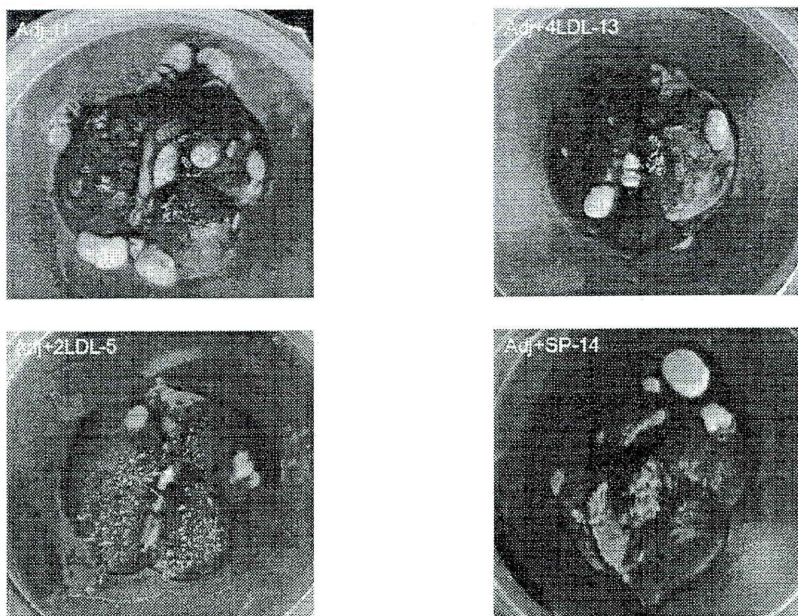
도면15



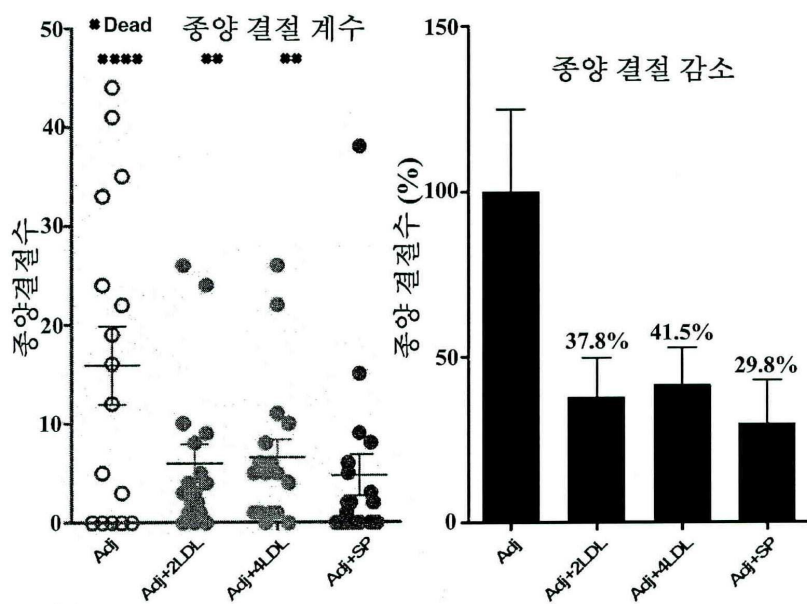
도면16



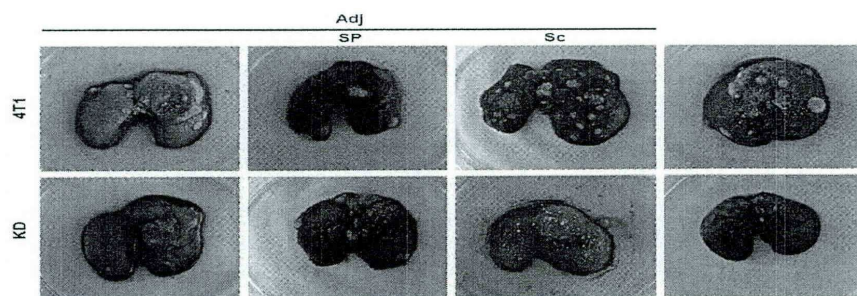
도면17



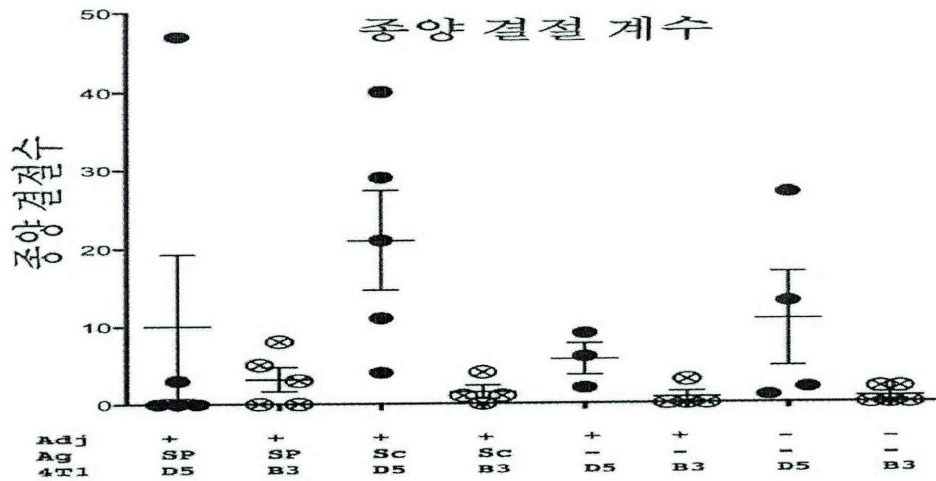
도면18



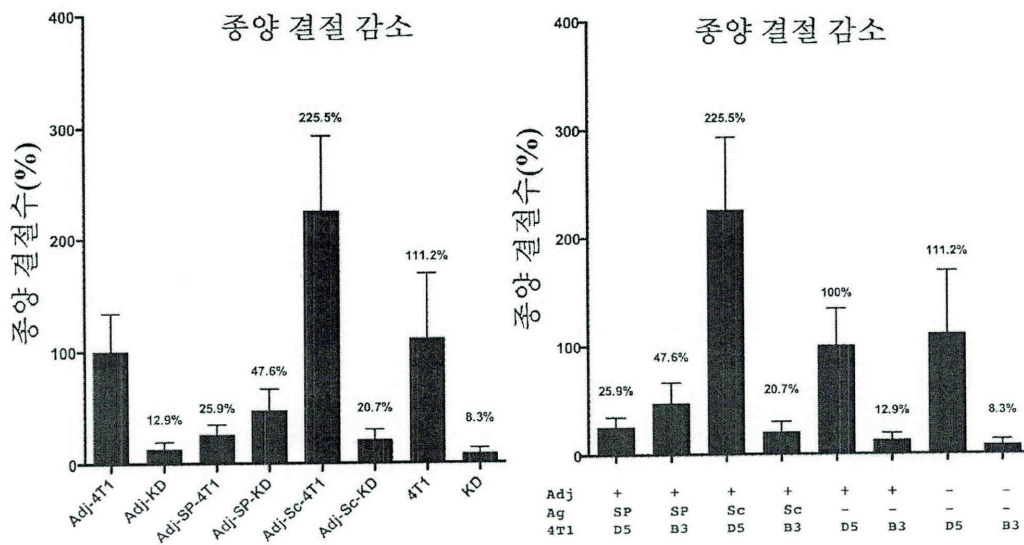
도면19



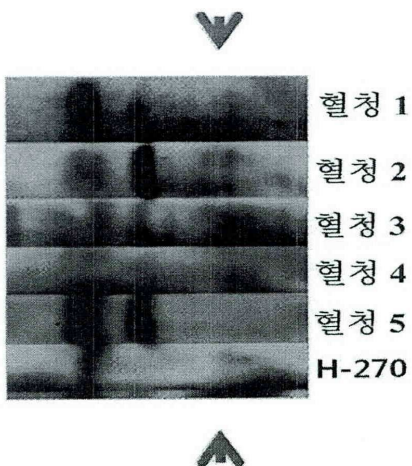
도면20



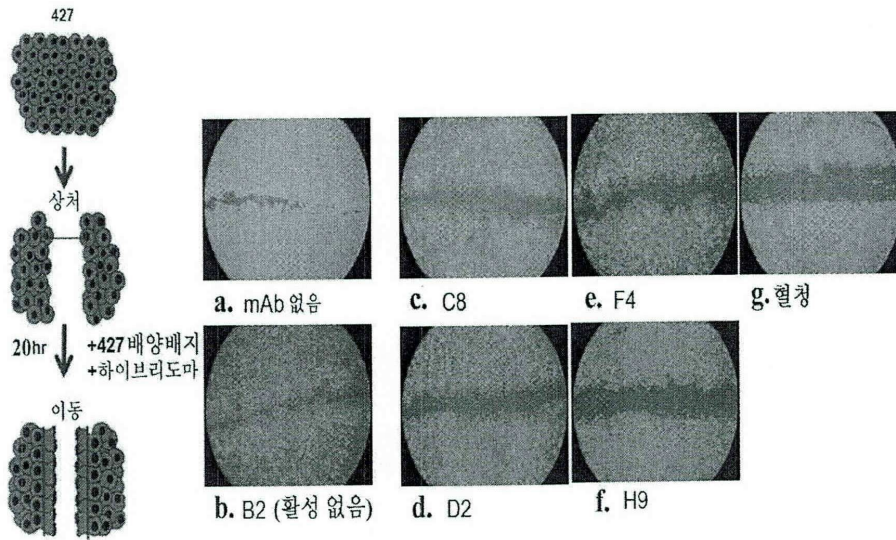
도면21



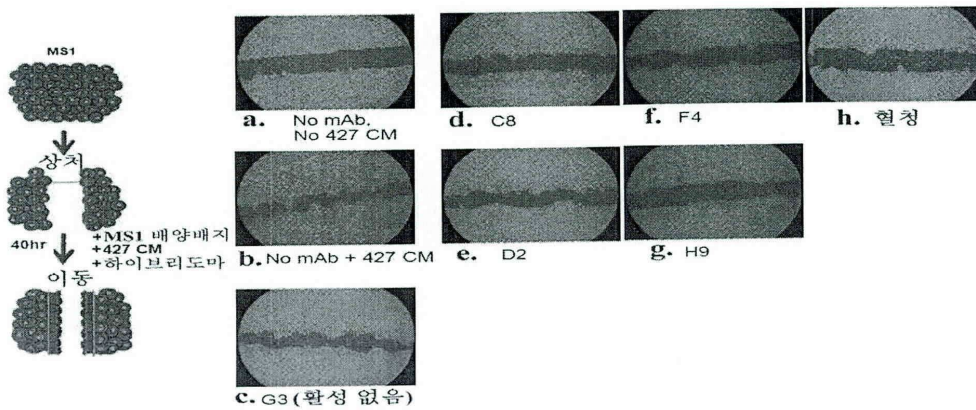
도면22



도면23



도면24



서열목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Antigen peptide inhibiting cancer metastasis, cancer metastasis vaccine and composition for inhibiting and treating cancer metastasis comprising the same, and method for screening target material related to cancer metastasis and cancer metastasis inhibitor
- <130> OP-2010-0056
- <160> 11
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 1 (SP cancer metastasis vaccine; mouse

origin)

<400> 1

Lys Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asn Ala Asp Glu Gly Glu Trp

1 5 10 15

Pro Trp Gln

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 2 (2LDL cancer metastasis vaccine; mouse

origin)

<400> 2

Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Glu Gly

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 3 (4LDL cancer metastasis vaccine; mouse

origin)

<400> 3

Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asn

1 5

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Scrambled control

<400> 4

Glu Gln Gly Lys Gly Ala Arg Asp Trp Pro Glu Trp Ala Val Gln Gly

1 5 10 15

Val Asn Thr

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pSUPER-epi construct forward strand

<400> 5

gatccccggt gcgcttcaaa ctcttcttca agagagaaga gtttgaagcg caccttttta 60

60

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pSUPER-epi construct reverse strand

<400> 6

tcgataaaaa ggtgcgcttc aaactcttct ctcttgaaga agagtttgaa gcgcaccggg 60

60

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 4 (SP cancer metastasis vaccine; human origin)

<400> 7

Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp

1

5

10

15

Pro Trp Gln

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 5 (2LDL cancer metastasis vaccine; human origin)

<400> 8

Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 6 (4LDL cancer metastasis vaccine; human origin)

<400> 9

Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp

1 5

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 7 (SP cancer metastasis vaccine; rabbit origin)

<400> 10

Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp

1 5 10 15

Pro Trp Gln

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen oligopeptide 8 (SP cancer metastasis vaccine; rat origin)

<400> 11

Lys Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asn Ala Asp Glu Gly Glu Trp

1 5 10 15

Pro Trp Gln