

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/00

(11) 공개번호 특2001-0030617
(43) 공개일자 2001년04월16일

(21) 출원번호	10-2000-7002851	(87) 국제공개번호	WO 1999/14230
(22) 출원일자	2000년03월17일	(87) 국제공개일자	1999년03월25일
번역문제출일자	2000년03월17일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/17991		
(86) 국제출원출원일자	1998년09월18일		
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 감비아 짐바브웨 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자 흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑 스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포 르투갈 스웨덴 핀란드 사이프러스 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비 쏘 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바 이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀 란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기 즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레 소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니 아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간 다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수 단 스웨덴 싱가포르 가나 감비아 크로아티아 인도네시아 시에라리온 유고슬라비아 짐바브웨		
(30) 우선권주장	8/933,149 1997년09월18일 미국(US)		
(71) 출원인	워싱턴 유니버시티		
(72) 발명자	미합중국, 미조리주 63130, 세인트 루이스, 원 부루킹스 드라이브 왓슨,마크,에이. 미합중국,미조리주63146,세인트루이스,메도우사이드드라이브1461. 플레밍,티모씨,피. 미합중국,미조리주63021,세인트루이스,이글부루크드라이브743.		
(74) 대리인	특허법인 원전 임석재, 특허법인 원전 김동엽, 특허법인 원전 김예숙		

심사청구 : 없음

(54) 유방 특이적으로 분비되는 유방암 단백질인 마마글로빈

요약

본 발명에서는 분리, 정제된 DNA서열과 암호화된 유방 특이적으로 분비되는 단백질인 마마글로빈을 개시하고 있다. 또한 본 발명은 유방암 세포에 의한 마마글로빈의 과발현 및 분비를 기초로 하여 유방암을 감지해내는 방법을 개시하고 있다. 본 발명의 방법으로 마마글로빈 또는 마마글로빈을 암호화하는 mRNA의 존재를 감지하고/또는 그 존재량을 측정할 수 있다. 마마글로빈을 발현하는 종양을 가진 유방암 환자를 치료하기 위하여 면역요법을 기초로 한 방법들을 개시하고 있다. 상기 방법들은 체액 및/또는 세포를 매개로 한 종양에 대한 면역반응을 유도하는 마마글로빈 항체를 사용하는 것을 포함한다.

명세서

관련출원

본 출원은 1995년 5월 31일자로 출원된 미국 특허출원 제 08/455,896호의 부분 계속출원(continuation-in-part)인 1996년 5월 31일자로 출원된 PCT/US96/08235의 부분 계속출원이다.

배경기술

(1) 본 발명의 분야

본 발명은 일반적으로 유방암 병원론(pathogenesis) 분야에 관한 것이며, 보다 상세하게는 유방암을 감지하고 치료하기 위한 용도로 사용되는 cDNA 서열 및 암호화된 유방 특이적(mammary-specific) 단백질에 관한 것이다.

(2) 관련기술의 설명

유방암은 가장 흔하면서도 치명적인 암종의 하나이다.

조기 진단 및 치료로써, 상기 질병에 대한 발병률 및 사망률을 감소시킬 수 있으나, 유선조영술을 사용한 명확한 추정치는 단지 25% 정도인 것으로 평가되고 있다(Hall 등, N Engl J Med 327:319-328, 1992, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 따라서, 암이 유선조영술로써 감지가 가능하게 되는 시기보다 더 조기에 암을 감지할 수 있는 수단이 요구되며, 유전적 또는 생화학적 마커(marker)가 유선조영술의 추정치를 보완 및 향상시켜주는 수단으로서 사용될 수 있을 것이다(Hayes, Hematol Oncol Clin N Am 8:485, 1994, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).

유방암이 진전되면서 수많은 유전적 변화들이 수반된다(Porter-Jordan, Hematol Oncol Clin N Am 8:73, 1994 참조, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 이러한 변화들은 전반적인 염색체 변형 및 유전적 마커들의 손실을 포함한다(Devilee 등, Biochim Biophys Acta 1198:113, 1994; Callahan 등, J Cell Biochem Suppl 17:167, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 유방종양의 진행은 또한 성장인자와 이들의 수용체들(Zajchowski 등, Cancer Res 48:7041, 1988, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨), 구조 단백질(Trask 등, Proc Natl Acad Sci 87:2319, 1990, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨), 이차 메신저(messenger) 단백질(Ohuchi 등, Cancer Res 26:2511, 1986, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨) 및 전사 인자들(Harris, Adv Cancer Res 59:69:1992, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)을 암호화하는 이미 동정되어진 유전자들의 발현에 질적 및 양적인 변화를 일으키는 것으로 알려졌다. 이러한 유전자 변화들이 환자의 생검(biopsy) 검체내에 존재하는 유방암종의 발병요인에 정확히 어떠한 역할을 하는지는 잘 밝혀지지 않았으나, 유전자 발현에 있어서의 이러한 변화들은 잠재적으로 유방암 마커 개발의 토대를 형성할 수 있다.

유방암의 조기 감지를 위한 유방암에 대한 유전적 또는 생화학적 마커를 제공할 뿐만 아니라, 예후의 평가, 치료법의 선별 및 평가를 위한 수단 및 치료를 표적화하는(targeting) 수단을 제공할 수 있는 종양 마커가 존재한다면 바람직할 것이다. 수많은 조직 마커들이 동정되어왔으나, 진단 또는 일반 개체군의 선별에 매우 적합한 정도로 충분히 민감하거나 종양 특이적인 것들은 없었다(id.). 따라서, 환자에서 유방암의 출현 및 병으로의 진전을 특이적으로 또한 선택적으로 동정해내는데 사용될 수 있고, 종양 특이적 면역치료에 사용될 수 있는 유전자와 이 유전자가 발현한 단백질과 같은 유방암 마커가 여전히 요구되고 있다.

유방암종으로부터 차별적으로 발현된 서열 태그(tag)들을 분리하기 위하여, 변형된 디퍼렌셜 디스플레이 폴리머라아제 연쇄반응 기술(differential display polymerase chain reaction)을 사용하여, 몇개의 서열 단편들을 분리하여, 종양성 유방 상피조직에 특이적으로 발현시키고 이를 정상 조직의 대조구들과 비교하였다(Watson 및 Fleming, Cancer Res 54:4598-4602, 1994, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 이들 서열태그들 중 DEST002로서 동정된 하나의 서열태그를 발견함으로써, 신규의 완전한 길이의 cDNA 및 여기서 마마글로빈(mammaglobin)으로 언급한 이의 암호화된 단백질을 발견, 분리하게 되었다. 상기 cDNA와 단백질 모두 신규한 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

즉, 본 발명은 유방암에서 그 발현이 증가되는 신규한 유전자의 동정 및 이들 유전자들의 mRNA로부터 cDNA를 분리해내는 것에 관한 것이다. 결과적으로, 본 출원인들은 신규한 cDNA 및 이의 암호화된 유방 특이적 분비단백질을 발견해내는데 성공하였다. 상기 cDNA는 정제 및 분리된 형태이며, 서열번호 1로 나타낸 뉴클레오티드 서열을 가지고, 상기 암호화된 단백질인 마마글로빈은 정제 및 분리된 형태이며, 서열번호 2로 나타낸 아미노산 서열을 갖는다.

마마글로빈은 I기의 일차 유방암 종양에서 27% 과발현된다. 이는 마마글로빈 유전자의 조절이상(dysregulation)이 유방암의 조기에 그리고 빈번하게 일어난다는 것을 암시한다. 따라서, 마마글로빈과 이의 cDNA의 발견은 인간과 다른 포유류들에서의 유방암의 감지 및 치료를 위한 신규한 방법 및 조성물들을 개발할 수 있는 토대를 제공하는 것이다.

따라서, 본 발명은 검체내에서의 유방 종양세포들의 존재를 감지해내는 신규한 방법들에 관한 것이다. 본 발명의 한 구체예에서, 마마글로빈을 암호화하는 cDNA 또는 이 cDNA의 유도체가 검체내의 마마글로빈 mRNA의 존재를 감지해내는데 사용된다. 상기 방법은 다음 단계들을 포함한다: (a) 서열번호 1의 서열을 포함하는 뉴클레오티드 또는 이들의 유도체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 제공하고, (b) 서열이 유방 종양세포들로부터 얻은 mRNA와 혼성화 될 수 있는 조건하에서, 상기 뉴클레오티드 서열을 검체와 함께 인큐베이션 처리한 후, (c) DNA-RNA 혼성 복합체의 존재를 감지해내는 단계.

본 발명의 또다른 측면은 혼성화에 의해 검체내의 유방 종양세포들의 존재를 감지해내는 키트(kit)를 제공하는 것이다. 이 키트는 용기내에 포장된 서열번호 1의 서열을 갖는 뉴클레오티드 또는 이들의 유도체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

본 발명의 또다른 구체예에서, 검체에서의 마마글로빈의 발현은 검체에서 마마글로빈 mRNA로부터 역전사

된 cDNA의 존재를 검출하므로써 결정된다. 상기 방법은 다음 단계들을 포함한다: (a) 환자로부터 얻은 검체내에서 역전사 방법을 사용하여 mRNA로부터 마마글로빈을 암호화하는 cDNA를 생성시키고, (b) 마마글로빈을 암호화하는 cDNA내에 위치하거나 근접해(flank) 있는 올리고머들을 포함한, 폴리머라아제 연쇄반응에 사용되는, 두개의 프라이머(primer)들을 제공하고, (c) 상기 폴리머라아제 연쇄반응에 의해 마마글로빈을 암호화하는 cDNA를 증폭하는 단계. 상기 두개의 프라이머들은 서열번호 3과 서열번호 4를 포함한 뉴클레오티드 서열들을 갖는다.

본 발명의 또다른 구체예에서는 폴리머라아제 연쇄반응에 의해 검체내의 유방 종양세포들의 존재를 검출해내는 키트를 제공한다. 상기 키트는 용기내에 포장된 마마글로빈을 암호화하는 cDNA내에 위치하거나 근접해 있는 올리고머들을 포함한 폴리머라아제 연쇄반응에 사용되는 두개의 프라이머들을 포함한다. 상기 두개의 프라이머들은 서열번호 3과 서열번호 4를 포함하는 뉴클레오티드 서열들을 갖는다.

또다른 구체예에서 본 발명은 마마글로빈 단백질에 대한 특이적인 항체들을 검체에 사용하여 종양세포에 의해 발현된 마마글로빈 단백질의 존재를 감지한다. 상기 특이적인 항체들은 폴리클로날 또는 모노클로날 항체들일 수 있다.

본 발명은 또한 항체-매개된 그리고/또는 세포-매개된 즉, 활성화된 T 세포들을 통해, 마마글로빈 발현 종양에 대한 면역반응을 유도할 수 있는 마마글로빈 항원들을 사용하여 유방 종양성 질환을 치료하는데 사용되는 신규한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조성물의 한 구체예는 마마글로빈 특이적인 B 세포들을 활성화시킬 수 있는 마마글로빈 B 세포 항원을 포함한다. 상기 B 세포 항원은 마마글로빈 특이적인 B 세포 에피토프(epitope)와 T 보조(helper) 세포들에 의해 인식되는 T_H 에피토프 또는 결정인자(determinant)를 포함한다.

또다른 구체예에서, 마마글로빈 항원은 MHC 클래스 I 분자에 대한 T_C 세포 에피토프와 결합부위 또는 아그로토프(agrotope)를 포함하는 마마글로빈 특이적인 세포독성인(cytotoxic) T 림프구에 의해 인식되는 마마글로빈 T_C 세포 항원이다.

다른 구체예에서 본 발명에 따른 조성물은 B 세포 항원 및 T_C 세포 항원들을 포함한다.

마마글로빈을 발현하는 종양이 있는 환자에 대한 치료방법들은 환자로부터 분리해낸 마마글로빈 특이적 림프구들의 마마글로빈 항원을 이용한 생체의 자극에 이어, 환자에게 상기 활성화된 림프구들을 투여하는 것을 포함하며, 마마글로빈 항원을 포함한 백신을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 항마마글로빈 면역반응의 생체내 자극을 포함하는 양자 면역요법(adoptive immunotherapy)을 포함한다.

본 발명에 의해 이룰 수 있는 몇몇 장점들 중에서, 유방 암세포들에 대한 마커로서 제공될 수 있는 뉴클레오티드 서열 및 암호화된 아미노산 서열의 제공; 유방 종양세포들의 존재의 조기 감지방법의 제공; 유선조영술을 보완하여 그 추정치를 높일 수 있는 유방암 감지수단의 제공; 예후평가를 제공할 수 있는 방법; 치료의 표적화를 가능하게 하는 마커들의 제공 및; 종양에 대한 세포성 면역과 체액성 면역을 자극하는 조성물들의 제공은 주목될 수 있는 것들이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 cDNA 말단의 신속 증폭(RACE) 폴리머라아제 연쇄반응(PCR) 기술 및 pGEM7Z와 pCEV27 벡터내로의 연속된 서브클로닝(subcloning)을 포함한, 완전한 길이의 마마글로빈 cDNA를 분리하기 위해 사용된 방법을 예시한 것이다.

도 2는 인간 cDNA 서열인 서열번호 1(위에 번호붙인 뉴클레오티드들)과 암호화된 유방 특이적 단백질인 마마글로빈의 아미노산 서열(서열번호 2)(아래에 번호붙인 아미노산들), RACE PCR 방법에 의해 분리된 403bp 단편을 표시한 고형 바(solid bar)와 206bp DEST002 서열(서열번호 6)을 표시한 열린 바(open bar)를 예시한 것이다;

도 3은 유방 특이적 단백질인 마마글로빈(hMAM)의 아미노산 서열(서열번호 2)과 쥐의 전립선 스테로이드 결합 단백질 서브유닛 C3(rPSC3)(서열번호 7) 및 인간의 클라라 세포(clara cell) 10kD 단백질(hCC10)(서열번호 8)을 비교 예시한 것으로, 볼드체와 이중선으로써 각 종류를 나타내고 단일선으로 구조적으로 유사한 아미노산들을 표시하였다;

도 4에서 (A)는 유방 특이적 단백질인 마마글로빈(hMAM)을 암호화하는 상기 인간 cDNA 서열의 유방 종양, 정상 유방 및 다른 성인 조직들로부터 얻은 조직에 의해 발현되는 mRNA로의 혼성화의 노던 블롯(Northern blot) 분석을 예시한 것이며, (B)는 유방 종양, 정상 유방 및 다른 성인 조직들로부터 얻은 조직들의 RT/PCR 증폭된 검체들의 분석결과이다;

도 5는 시험관 내에서의 토끼의 망상적혈구(reticulocyte) 용해질 분석시스템내에서의 유방 특이적 cDNA 서열의 번역을 예시한 것이다;

도 6은 다른 8명의 환자들중 세명으로부터 얻은 종양에서(볼드체로 나타냄), 또한 보다 낮은 수준으로 정상 유방조직(이탈릭체로 나타냄)에서의, 종양 2410내의 mRNA를 감지하는 마마글로빈을 암호화하는 cDNA와의 노던 블롯 혼성화를 예시하고 있으며, 종양조직 및 환자의 정상 조직에서의 마마글로빈 mRNA 발현의 두 경우(오른쪽 네줄)를 비교하고 있다;

도 7은 각각 세포매질과 세포 용해질 내에 존재하는 마마글로빈 단백질의 전구체 및 분비형들을 감지하는 면역 펩타이드의 부재(-) 및 존재(+))하에서, MDA-MB-415 유방 종양 세포들로부터 얻은 조직 배지(S)와 세포 용해질(C)에 대하여 마마글로빈 C-말단(서열번호 14)에 대한 폴리클로날 항체를 사용하여 수행한 웨스턴 블롯 분석을 각각 예시하고 있다;

도 8은 글리코실화(glycosylation)를 저해하는 투니카마이신(tunicamycin)의 부재(-) 및 존재(+))하에서,

성장된 MDA-MB-415 유방 종양 세포들로부터 얻은 조절 배지(S)와 세포 용해질(C)에 대하여 항마마글로빈 폴리클로날 항체를 사용하여 수행한 웨스턴 블롯 분석을 예시하고 있으며, 이는 N-말단에 연결된 글리코실화가 억제된 세포들의 용해질 또는 배지내에는 마마글로빈 단백질이 검출될 정도로 충분하지 못함을 나타낸다;

도 9는 인간의 유방 종양 세포로부터의 세포 용해질들의 웨스턴 블롯 분석을 예시하고 있으며, 이는 효소연결된 화학발광물질(chemiluminescence)에 의해 가시화되는 항마마글로빈 폴리클로날 항체와 염소의 항토끼 항체를 사용하여 전구체 마마글로빈 단백질이 검출되는 것을 나타낸다;

도 10은 임신중 및 분만 후의 인간의 유방으로부터 얻은 분비액에 대하여 항마마글로빈 폴리클로날 항체를 사용하여 수행한 웨스턴 블롯 분석을 예시하고 있으며, 이는 증식화(proliferating)되는 마마글로빈 선(gland)에서의 분비된 마마글로빈 단백질의 검출을 나타낸다;

도 11A는 환자로부터 얻은 유방암 세포의 파라핀 고정된 단면을 항 마마글로빈 폴리클로날 항체 및 양고 추냉이(horseradish) 페록시다제로 태그된 염소 항토끼 항체와, 기질로서 DAB를 사용하여 면역조직화학적으로(immunohistochemically) 염색한 칼러 표본을 예시하고 있으며, 마마글로빈 단백질을 발현하는 세포들이 갈색으로 염색된 것을 보여주고 있다.

도 11B는 환자로부터 얻은 유방암 세포의 파라핀 고정된 단면을 항 마마글로빈 폴리클로날 항체 및 양고 추냉이 페록시다제로 태그된 염소 항토끼 항체와, 기질로서 DAB를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된 흑색 표본을 나타낸 것으로, 여기에는 마마글로빈 단백질을 발현하는 세포들이 갈색으로 염색된 부분을 표시하고 있다.

바람직한 구체예의 설명

본 발명의 한 측면은 서열번호 2(도 2)로서 동정된 유방 특이적 분비단백질인 마마글로빈을 암호화하는 서열번호 1로서 동정된 cDNA의 동정 및 서열화에 기초한 것이다. 아래에서 설명되는 바와 같이, PCR 기술을 사용하여 mRNA로부터 출발하여 이를 역전사, 증폭한 후 발현벡터내로 서브클론시켜 완전한 길이의 마마글로빈 cDNA를 분리하였다. 또한, 상기 cDNA에 의해 암호화된 단백질인 마마글로빈을 동정 및 특성화하였다.

무명의 서열 태그를 DEST002로 명명하고 이를 사용하여, 이제까지는 미지였으나 본 발명에서 마마글로빈으로서 동정된 이에 상응하는 유전자 생성물이 유방암 종양세포주 MDA-MB-415에 특히 풍부하다는 것이 증명되었다. 완전한 길이의 마마글로빈 cDNA를 분리하기 위하여, mRNA를 이 세포주로부터 역전사하고, RACE PCR 기술을 사용하여 클론하였다(Edward 등, Nucleic Acids Research 19:5227~32, 1991, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 이 기술은 단일가닥 올리고데옥시리보뉴클레오티드를 단일가닥 cDNA의 3'말단에 결합하는 방법에 기초하고 있다. 이 방법에 의한 마마글로빈 cDNA의 분리를 도 1에 도식적으로 나타내었다.

본 발명자들의 초기 연구(Watson and Fleming, 상기 논문 참조)에서, 상응하는 DEST서열(DEST002, 서열번호 6)로부터 미리 얻은 서열정보와 이 기술에 의해 분리된 403bp 단편(서열번호 5)(도 2)으로부터 얻은 서열정보로부터 완전한 길이의 503 염기쌍(bp) cDNA 서열(서열번호 1)을 유추해내었다. 503bp cDNA 내에는 93개 아미노산의 폴리펩타이드를 암호화하고, 분자질량이 10.5kD(서열번호 2)(도 2)인 것으로 예측되는 279bp의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)이 존재한다. 이같은 오픈 리딩 프레임의 최초 메티오닌은 거의 완전한 코작(Kozak) 공통서열내에 존재한다(Kozak, Cell 22:7~8, 1980, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 이 서열의 60bp 상류는 다른 프레임 내(in-frame) 메티오닌들이나 번역 정지서열들을 포함하지 않는다. 상기 cDNA의 번역되지 않은 3' 서열은 163bp로 구성되며, 폴리아데닐화 신호, AATAAA, 원래의 DEST002 서열의 프라이밍(priming) 위치의 12bp 상류를 포함한다. 이러한 데이터는 완전한 길이의 마마글로빈 cDNA가 분리되었음을 나타내는 것이다. 암호화된 폴리펩타이드의 최초 19개 잔기들이 소수성 펩타이드 신호 서열인 것으로 예측되고, 잔기 53~55 및 68~70이 공통된 N-연결된 글리코실화 위치이며, 이는 마마글로빈이 분비된 글리코 단백질이라는 것을 나타낸다.

BLAST 연산을 사용하여 Genbank에서 마마글로빈 cDNA 서열과 유사한 DNA 서열에 대해 검사하므로써(Benson 등, Nucl Acid Res 21: 2963~2965, 1993; Altschul 등, J Mol Biol 215: 403~410, 1990, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨), 명백한 DNA 서열 동종성을 가지는 것은 발견하지 못하였다. 따라서, 마마글로빈 cDNA는 이제까지는 알려지지 않았던, 신규한 DNA 서열인 것으로 믿어진다.

마마글로빈과 관련된 서열들에 대한 다른 폴리펩타이드들을 조사하므로써, 마마글로빈과 다른 폴리펩타이드들 간의 아미노산 서열 동종성이 있음을 알아내었다. 마마글로빈은 쥐(rat)의 전립선 스테로이드 결합 단백질(프로스타테인; prostatein) 서브유닛 C3(rPSC3)(도 3)(서열번호 7)과 42%의 아미노산 동일성(58%는 보존성 치환을 포함)을 나타내었다. 쥐의 전립선 스테로이드 결합 단백질은 두개의 다른 이량성(dimeric) 서브유닛 C3/C1와 C3/C2로 이루어진 사량체 단백질로 구성된 쥐 복부(ventral) 전립선에서의 주요 분비 단백질이다(Parker 등, Ann N Y Acad. Sci 438: 115~124; Parker 등, J Steroid Biochem 20:67~71, 1984, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 상기 C1, C2 및 C3 유전자들은 모두 약 6 kD의 분비 단백질을 암호화하고, 유전자 복제로부터 생성되는 것으로 추정되나, C1과 C2 유전자들은 서로 동종성이 강한 반면, C3 유전자와는 별로 유사하지 않다. 따라서, 마마글로빈은 C1 또는 C2 단백질과는 서열 동종성을 나타내지 않는다.

위에서 설명한 바와 같이, 전립선 스테로이드 결합 단백질(프로스타테인)은 쥐 복부 전립선에서의 주요 분비 단백질이며, 이의 발현은 안드로겐(androgenic) 스테로이드에 의해 조절된다(Parker 등, Ann N Y Acad Sci 438:115~24, 1984; Parker 등, J Steroid Biochem, 20: 60~71, 1984, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 다른 단백질로, 인간의 에스트라무스틴(estramustin) 결합 단백질(hEMBP)은 인간의 전립선, 인간의 유방암 및 인간의 악성 흑색종(melanoma)에서 발현되는 것으로 보고되었다(Bjork 등, Cancer Res. 42:1935~1942, 1982; Bjork 등, Anticancer Res 11: 1173~82, 1991, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 인간의 에스트라무스틴 결합 단백질은 쥐의 스테로이드 결합 단백질인 프로스타테인과 동일할 것

으로 가정되어온 쥐의 에스트라무스틴 결합 단백질과 면역화학적으로 유사하였다. 상기에서 설명한 바와 같이, 마마글로빈의 아미노산 서열은 프로스타테인의 C3 서브유닛과 42%의 아미노산 동일성을 나타내었고, 보존성 치환을 포함하여 58%의 동종성을 나타내었다. 따라서, 마마글로빈은 어떤면에서는 hMBP와 관련된 것일 수 있다. 그러나, 프로스타테인과 hMBP는 모두 전립선 내에서 감지되지만, 마마글로빈 mRNA는 이 조직내에서는 전혀 존재하지 않는다. 따라서, 마마글로빈은 hMBP와 동일한 단백질도 아니고 이의 서브유닛도 아니며, 또한 상기 hMBP 서열은 아직 결정되지 않아서 마마글로빈이 hMBP의 일부 단편 또는 서브유닛과 어떠한 유사성이라도 있는지는 알려지지 않았다.

최근의 연구들은 SV40 T 항원에 융합된 rPSC3 프로모터가 형질전환 마우스들에서 전립선 및 유방 암종을 생성하는 것을 설명하고 있으나(Maroulakou 등, Proc Nat Acad Sci U.S. 91:11236~11240, 1994; Sandmoller 등, Oncogene 9:2805~2815, 1994, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨), 이 단백질의 진정한 생물학적 기능은 알려지지 않았다. 또한, 쥐 전립선 스테로이드 결합단백질과 인간 EMBP의 관계에 대한 가설에도 불구하고, rPSC3에 상응하는 인간 폴리펩타이드 또는 인간 유전자는 동정된 바가 없다. 따라서, 마마글로빈과 마마글로빈을 암호화하는 cDNA는 이제까지는 알려지지 않았던 신규한 서열을 나타내는 것이다.

매뉴얼 정렬(manual alignment)을 사용하여, 마마글로빈과 rPSC3 단백질 서열 모두에 대해 보다 낮은 BLAST 값을 가진 다른 서열들을 이용한 인간 클라라 세포 10kD 단백질(hCC10)(서열번호 8)(Peri 등, J Clin Invest 92: 2099~2109, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)(도 3) 및 토끼와 마우스의 우테로글로빈 단백질들(Miele 등, Endocrine Rev 8:474~90, 1987; Cato와 Beato, Anticancer Res 5:65~72, 1985; Miele 등, J Endocrinol Invest 17:679~692, 1994, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)과의 다른 동종성도 동정하였다. 이들 동종성은 종에 따라 다르지만 동일성 26% 또는 보존성 치환을 포함하여 40%였다. 특히, 우테로글로빈 서브유닛들간의 디설파이드 결합을 형성시키는 역할을 하는 것으로 알려진 Cys-3과 Cys-69를 포함하여, 많은 아미노산들이 모든 단백질을 중에서 완전하게 보존되었다(아래참조). 이러한 동종성은 마마글로빈이 상피세포들에 의해 분비되는 단백질 소그룹의 새로운 구성원임을 제시하는 것이다(Miele 등, 1994, 상기 논문참조).

hCC10 유전자는 토끼와 마우스의 우테로글로빈 유전자들에 대한 인간의 상동유전자(homologue)이다(Peri 등, J Clin Invest 92:2099~2109, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 우테로글로빈은 원래 토끼의 자궁내 분비 단백질로서 특성화되었으나, 폐, 유방 및 전립선을 포함한 다른 상피기관들에서도 발견되어 왔다. 쥐의 프로스타테인과는 달리, 우테로글로빈은 보존된 잔기들 Cys-2와 Cys-69에 있는 두개의 디설파이드 결합에 의해 짝을 이룬 호모다이머성(homodimeric) 단백질이다(Miele 등, 1994, 상기 논문참조). 우테로글로빈 유전자의 전사는 스테로이드 호르몬에 의해 조절되지만, 황체호르몬(progesterone) 또는 다른 스테로이드 호르몬에 결합하는 단백질 자체의 능력은 아직 논의되고 있으며, 이 단백질의 진정한 생물학적 기능은 알려지지 않았다(Miele 등, 1994, 상기 논문참조).

마마글로빈의 발현은 유방선에 제한된다. 이는 rPSC3가 쥐의 복부 전립선내에서 발현되고(Parker 등, Ann N Y Acad Sci 438:115~1124, 1984, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨), 폐, 자궁, 전립선 및 유방을 포함하여 다수의 조직들 내에서 hCC10/우테로글로빈의 발현이 관찰되는 것과는 대조적이다(Miele 등, 1987, 상기 논문참조; Cato와 Beato, 상기 논문참조; Miele 등, 1994, 상기 논문참조). 마마글로빈과 이들 단백질들 사이의 서열 동종성으로 인하여, 조직 특이적 발현의 패턴을 결정했다.

500bp 마마글로빈 mRNA는 종양표본 2410(이 조직으로부터 최초의 서열태그를 분리하였음)에서 쉽게 검출되었으며, 정상적인 인간 유방조직 내에서는 상당히 적은 양으로 감지되었다(도 4A). 마마글로빈 mRNA는 불사화된 유방 상피세포주 B5-589에서는 감지되지 않았다. 또한, 마마글로빈의 발현은 인간의 자궁과 폐, 즉 우테로글로빈이 발현되는 두 위치에서는 검출되지 않았다.

RT/PCR을 사용한 증폭으로 종양 2410과 정상 유방조직 모두에서 마마글로빈 mRNA가 검출되었으나, 정상적으로 rPSC3과 우테로글로빈을 발현하는 조직들(폐, 자궁, 전립선)과, 호르몬에 감응성인 스테로이드 분비성 조직들(난소, 정소, 태반) 및 다른 분비성 상피기관(결장)을 포함한 15개의 다른 조직들에서는 검출되지 않았다. 따라서, 마마글로빈 mRNA의 발현은 비교적 유방조직에 특이적인 것이다.

이러한 연구내용을 기초로 하여 보았을 때, 마마글로빈은 비교적 유방 특이적인 단백질이다. 유방 암종에서 과발현되는 것으로 알려진 두개의 다른 유전자들로는 erb-B와 cyclin D가 있다(Jardines 등, Pathobiology 61:268~282, 1994; Keyomars and Pardee, Proc Nat Acad Sci, U.S. 90:1112~1116, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). erb-B 또는 cyclin D의 과발현과는 달리, 마마글로빈의 과발현은 일반적으로 성장성이나 분열속도의 증가보다는 유방 상피세포에 보다 특이적인 변화를 유발하는 것 같다. 이와 같이, 마마글로빈 유전자 조절이상이나 나타나는 것은 종양의 치료 취약성 또는 임상과정에 보다 특이적인 의미를 가질 수 있다.

단일단계 RT/PCR 분석에 의해 수행할 수 있는 수준의 강도로는 정상적인 림프절 또는 말초림프구에서의 마마글로빈의 발현은 감지되지 않았다. 다른 상피 특이적 유전자들의 경우에 제시되어온 바와 같이, 이는 말초 림프절에서의 마마글로빈 전사내용의 분석이 미지의 유방암 전이를 감지하는데 유용할 것이라는 것을 암시하는 것이다(Schoenfeld 등, Cancer Res. 54:2986~90, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).

마마글로빈 cDNA가 번역가능한 단백질을 암호화하는 것을 설명하기 위하여, 상기 cDNA 클론을 시험관내 번역 분석에서 사용하였다. 도 5는 마마글로빈 cDNA로 프로그램된 토끼의 망상적혈구 용해질로부터의 단백질 생성물을 보여주는 것이다. 마마글로빈 cDNA를 사용하여 약 6kD 단백질을 생성시켰다. 겔보기 분자량은 오픈리딩 프레임의 개념적 번역으로부터 예측하였던 것보다는 더 작았으나, 이러한 결과는 토끼 및 인간의 우테로글로빈 번역 생성물에서 일반적으로 관찰된다.

한 종양표본(즉, 2410)에서 마마글로빈 RNA의 과발현을 감지하였으나, 이러한 과발현이 어떤 빈도로 다른 유방암종에서 관찰되는가는 분명하지 않았다. 따라서, 마마글로빈 cDNA 프로브(probe)와의 노던 블롯 혼성(northern blot hybridization)에 의해 조직학적 유형을 다르게 한 1기의 일차 유방종의 15개 폐

널을 시험하였다. 환경적 영향(예로서, 환자의 호르몬 상태)으로 인한 발현에 있어서의 가능한 다양성이 있기 때문에, 종양표본과 환자 및 매치된(patient-matched) 정상적인 유방조직 샘플을 직접적으로 비교하고자 하였으나, 많은 경우들에 있어서 가능하지 않았다. 도 6에 나타난 바와 같이, 500bp 마마글로빈 mRNA가 정상적인 유방조직과 종양 2410에서 다시 감지되었다. 마마글로빈은 3개의 다른 종양들에서도 감지되었으며, 이들중 두개는 환자와 매치된 정상 조직(B015와 B022)에서는 발현되지 않거나 조금 발현되었다. 결과적으로, 종양들의 4/15(27%)는 마마글로빈 mRNA를 과발현하였다. 이들 데이터는 마마글로빈의 과발현이 단일 종양표본에 있어서만 특이적인 것이 아니고, 사실상 일차적인 유방종양들에 있어서 비교적 빈번하게 일어난다는 것을 암시한다. 또한, 시험된 모든 종양들이 1기의 것이었다는 사실은 이러한 조절이상 이 유방종양 형성의 진행과정중 비교적 초기에 발생된다는 것을 암시한다.

본 발명자들은 마마글로빈이 분비된 단백질이라고 믿으며, 따라서 이 단백질의 존재는 이 유전자 생성물을 과발현하는 종양을 가진 환자들의 혈청내에서 감지될 수 있을 것으로 예측된다. 이와같이, 마마글로빈은 전립선 특이적 항원(PSA)으로서 임상적으로 유용할 수 있으며, 유방암 환자들에 처리하기 위한 다른 고형종양 마커로서도 유용할 수 있다(진단병리학에서 종양마커, Clin Lab Med 10:1-250, 1990, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).

몇개의 일차 유방암종에서 마마글로빈의 발현을 시험하므로써 유방암 종양들의 일반 개체군에서 종양마커로서의 마마글로빈의 우세(prevalence)를 결정하였다. 이 연구에서 시험된 표본의 수는 작지만, 종양의 27%는 마마글로빈 mRNA를 과발현하였다. 이러한 비율은 erb-B 증폭과 p53 돌연변이와 같은 다른 유전적 변화의 우세도와 비교될 수 있다(Slamon 등, Sci 244:707-712, 1989; Thor 등, J Nat'l Cancer Inst 84:845-855, 1992, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 또한, 본 발명에서 이루어진 시험은 1기의 종양들에 제한되었기 때문에, 마마글로빈의 과발현은 이러한 하위그룹(subgroup)의 종양들에서 보고된 어떤 다른 유전적인 변화보다도 실질적으로 더욱 우세할 것이다(Allerd 등, J Nat'l Cancer Inst 85:200-206, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).

유방암 마커로서의 마마글로빈의 동정은 본 발명의 다른 측면에 대한 토대를 제공하며, 이는 환자에서 유방암의 존재를 감지하는 방법을 포함한다.

유방종양 질환의 감지 측면에서 사용된 용어 "감지(detection)"는 환자에서 유방암 존재의 결정, 다른 질병과 유방암의 구별, 질병의 가능한 결과 측면에서 예후의 평가 및 회복에 대한 전망, 질병상태 또는 질병의 재발에 대한 모니터링, 환자를 위한 바람직한 치료선택의 결정과 항암 치료를 표적화하는 것을 포함하는 의미에서 사용되었다.

유방암 감지방법은 폴리뉴클레오타이드를 유방 종양세포들로부터의 mRNA에 혼성화하는 것을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 1의 유도체를 포함한다.

뉴클레오타이드 서열의 유도체의 의미는, 원서열이 유방암 종양세포들로부터의 mRNA에 혼성화되는 엄격한 조건과 동일한 조건하에서, 원서열로부터 유도된 뉴클레오타이드 서열이 유방암 종양세포들로부터 얻은 mRNA에 혼성화되도록 원서열에 충분한 서열 상보성을 갖는다는 점에서 유도된 뉴클레오타이드 서열이 원서열과 실질적으로 동일하다는 것을 의미한다. 상기 유도된 뉴클레오타이드 서열이 뉴클레오타이드 원서열로부터 물리적으로 유도된 것이지만 할 필요는 없고, 예를들면, 화학적 합성 또는 DNA 복제나 역전사 또는 전사를 포함하는 어떤 방법으로도 생성될 수 있다.

유방암 감지 시스템에서 mRNA를 암호화하는 마마글로빈의 존재를 감지하기 위하여, 환자로부터 시료를 얻는다. 시료는 조직 생검 시료 또는 혈액, 혈장, 혈청 등의 시료일 수 있다. 시료안에 포함된 핵산을 추출하기 위해 시료를 처리할 수 있다. 시료로부터 얻어진 핵산은 겔 전기영동법 또는 다른 크기 선별분리기술로 처리된다.

감지는, 혼성 복식체(hybrid duplex)를 형성하기위해 시료중의 핵산들, 특히 mRNA를 프로우브로서의 역할을 하는 DNA 서열과 접촉시키는 것을 포함한다. 용어 "프로우브"는 목표(target) 영역내의 서열에 대해 상보적인 프로우브 서열로 인하여, 목표서열과 함께 혼성구조체를 형성하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 구조체를 뜻한다.

결과적으로 생성된 복식체의 감지는 일반적으로 표지된 프로우브들을 사용하므로써 수행된다. 선택적으로, 상기 프로우브는 표지되지 않을 수도 있지만, 직접 또는 간접적으로, 표지된 리간드와의 특이적인 결합에 의해 감지될 수 있다. 프로우브와 리간드를 표지하는 방법 및 적합한 표지들은 당 기술분야에서 잘 알려져 있으며 예로서, 공지된 방법들(예, 닉(nick) 번역 또는 키나아제 처리), 비오틴, 형광성 작용기, 화학발광성 작용기(예, 디옥세탄(dioxetanes), 특히 트리거된(triggered) 디옥세탄), 효소, 항체 등에 의하여 도입되어질 수 있는 방사성 표지를 포함한다.

마마글로빈 또는 이들의 유도체를 암호화하는 cDNA를 프로우브로서 사용하는 경우, 잘못된 양성반응을 방지하기 위하여 매우 엄격한 조건들이 사용될 수 있다. 마마글로빈으로부터 유도된 서열을 사용하는 경우에는 덜 엄격한 조건이 사용될 수 있다. 혼성화의 엄격한 정도는 혼성 및 세척단계 동안의 온도, 이온 강도, 시간 및 포름아미드의 농도를 포함한 많은 요인들에 의해 결정되어진다. 이러한 요인들은 예로서, Sambrook 등에 개략적으로 설명되어 있다(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 판, 1989).

시료에서 마마글로빈 mRNA의 감지강도를 높이기 위하여, 마마글로빈을 암호화하는 mRNA로부터 전사되는 cDNA를 증폭하는데 역전사/중합연쇄반응(RT/PCR) 기술이 사용될 수 있다. 상기 RT/PCR 방법은 당 기술분야에서 잘 알려져 있다(예, Watson and Fleming, 상기 논문 참조).

상기 RT/PCR 방법은 다음과 같이 수행될 수 있다. 총 세포질 RNA를 예로서, 표준 구아니디늄(guanidinium) 이소시아네이트 방법으로 분리하고, 총 RNA를 역전사한다. 상기 역전사 방법은 역전사효소와 3' 말단 프라이머를 사용하여 RNA 주형상에서 DNA를 합성하는 것을 포함한다. 통상적으로, 프라이머는 올리고(dT) 서열을 포함한다. 이렇게 생성된 cDNA를 PCR 방법 및 마마글로빈 특이적 프라이머들을 사용하여 증폭한다(Belyavsky 등, Nucl Acid Res 17:2919-2932, 1989; Krug and Berger,

Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol. 152, pp. 316-325, 1987, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).

상기 폴리머라아제 연쇄반응은 증폭되어질 DNA 절편의 두 측면(flanking) 영역에 상보적인 두개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머들을 사용하여 수행된다. 상류 및 하류 프라이머들은 일반적으로 20~30 염기쌍 길이이며, 뉴클레오타이드 서열의 복제를 위한 측면 영역들에 혼성화된다. 프라이머들은 증폭되어질 cDNA 가닥에 실질적으로 상보적인 것들이 선택되어진다. 따라서, 프라이머들이 주형의 정확한 서열을 반영할 필요는 없으나, 증폭되어질 가닥과 선별적으로 혼성화되기에 충분히 상보적이어야 한다.

상기 프라이머들로부터의 중합은 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트 또는 뉴클레오타이드 동족체(analogue)들 존재하에서 DNA 폴리머라아제에 의해 촉매화되어, 이중가닥 DNA 분자가 생성된다. 생성된 이중가닥은 물리적, 화학적 또는 효소적인 방법을 포함한 어떤 변성방법에 의하여 분리된다. 일반적으로, 물리적인 변성방법이 사용되며, 이는 핵산을 통상적으로 약 80~105°C의 온도로 약 1~10분동안 가열하는 것을 포함한다. 이 과정을 바람직한 횟수만큼 반복한다.

증폭 후, 에티디움(ethidium) 브로마이드 염색으로써 PCR 생성물을 감지한다(Sambrook 등, 1989, 상기 논문 참조).

본 발명의 또다른 구체예에 있어서, 마마글로빈 cDNA 서열 또는 이의 유도체는 유방암 환자로부터의 표본내에 있는 마마글로빈 유전자의 어떤 변화(즉, 유전자 재배열, 유전자 증폭 또는 유전자 결실)를 특징화하기 위하여 사용될 수 있다. 이는 온전한 mRNA를 포함하지 않은 환자의 표본 또는 시료들도 유전자 구조에서의 변화에 대해 시험될 수 있는 방법을 제공한다.

본 기술의 제 1의 적용에 있어서, 마마글로빈 cDNA 서열 또는 이의 유도체는 환자의 종양, 정상조직, 또는 림프구로부터 분리되어진 환자의 게놈의 DNA에 혼성화되고, 하나 또는 그 이상의 제한 엔도뉴클라아제로 소화되어진다. 당 기술분야에서 잘 알려진, 서던 블롯 방법을 사용하여 환자 또는 환자의 유방암 종양이 결실, 재배열 또는 증폭된 마마글로빈 유전자를 가지는지의 여부를 확인할 수 있다. 이러한 변화들의 감지는 예후의 예측 및 환자의 관리에 유용한 중요한 정보를 제공할 수 있다.

본 기술의 제 2의 적용에 있어서, 마마글로빈 cDNA 서열 또는 이의 유도체를 기초로 한 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍들이 환자의 시료로부터 얻은 마마글로빈 유전자의 절편을 증폭하기 위하여 폴리머라아제 연쇄반응에 사용될 수 있다. 결과의 PCR 생성물들을 분석함으로써 마마글로빈 유전자의 특정한 절편이 결실되었거나 재배열되었는지의 여부를 알아낸다. 이러한 정보는 예후 및 환자의 관리에 유용한 정보이다.

유방암을 감지하는 또다른 방법은 환자로부터 얻은 시료에서 마마글로빈 폴리펩타이드의 전구체 및/또는 분비형의 존재를 감지하는 것을 포함한다. 당 기술분야에서 알려진 단백질을 감지해내는 어떤 방법도 사용될 수 있다. 이러한 방법은 이에 제한되지는 않지만, 면역확산, 면역전기영동, 면역화학적 방법, 결합(binder) 리간드 분석, 면역조직화학적 기술, 응집(agglutination) 및 보체 분석을 포함한다(예로서, Basic and Clinical Immunology; Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. pp 217~262, 1991, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 항체들을 마마글로빈의 한 에피토프 또는 복수의 에피토프와 반응시키고, 표지된 마마글로빈 폴리펩타이드 또는 이의 유도체로 경쟁적으로 치환시키는 것을 포함하는 결합 리간드 면역분석방법들이 바람직하다.

여기에서 사용된 용어 "마마글로빈 폴리펩타이드"는 글리코실화되지 않은 전구체형 및 글리코실화된 전구체 형들 및 글리코실화된 분비형, 이들의 유도체들 및 단편들을 포함하는 자연적으로 발생하는 마마글로빈을 의미한다.

상기 자연적으로 발생된다는 의미는 자연적인 공급원, 예로서 정상의 유기체들 및/또는 병든 유기체들로부터 분리되어지며, 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 폴리펩타이드를 의미한다.

마마글로빈의 유도체는 자연적으로 발생하는 마마글로빈의 일부와 실질적인 동일성을 갖는 최소 10개 아미노산의 절편을 포함하는 폴리펩타이드를 의미하고자 하는 것이다. 실질적인 동일성을 갖는 절편은 바람직하게는 적어도 약 20개의 아미노산, 보다 바람직하기로는 적어도 약 50개의 아미노산, 그리고 가장 바람직하기로는 적어도 75개의 아미노산을 가지는 것이다. 두 폴리펩타이드가 BLAST와 같은 서열배열 프로그램들에 의한 최적배열인 경우 실질적인 동일성을 가지며, 이들은 적어도 80%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성, 보다 바람직하기로는 약 95% 서열 동일성, 가장 바람직하기로는 99%의 서열 동일성을 가지는 것이다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적 아미노산 치환들에 의해 구별된다.

보존적 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 가지는 잔기들의 교환 가능성을 의미한다. 예로서, 지방족 측쇄들을 갖는 아미노산 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 로이신, 이소로이신이며; 지방족-히드록실 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 세린과 트레오닌; 아마이드를 포함하는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 아스파라긴과 글루타민; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 페닐알라닌, 티로신과 트립토판; 황을 포함하는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 시스테인과 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹들은: 발린-로이신-이소로이신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린 및 아스파라긴-글루타민이다.

마마글로빈 폴리펩타이드 유도체는 바람직하게는 자연적으로 발생하는 마마글로빈 또는 이의 단편들에 특이적인 모노클로날 또는 폴리클로날의 항마마글로빈 항체와 교차 반응(cross-react)할 것이다.

여기서 사용된 용어 "단편(fragment)"과 "펩타이드"는 완전한 길이의 마마글로빈 cDNA(예, 서열번호 1) 또는 이의 유도체로부터 유도된 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는 마마글로빈 폴리펩타이드를 의미하지만, 아미노 말단 및/또는 카복시 말단 결실이 있는 것이다. 통상적으로, 마마글로빈 단편들 또는 펩타이드들은 적어도 3개의 아미노산 길이를 갖는다. 바람직하게는, 마마글로빈 단편 또는 펩타이드는 길이가 적어도 6개 아미노산 잔기이며, 보다 바람직하기로는 약 12개 아미노산 잔기, 보다 더

바람직하기로는 25개 아미노산 잔기, 그리고 가장 바람직하기로는 50개 또는 그 이상의 아미노산 잔기이다.

다양한 경쟁적 및 비경쟁적 단백질 결합 면역 분석방법들이 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 이러한 분석에 사용되어지는 항체들은 예로서, 응집 시험에서 사용되어지는 것과 같이 표지되지 않거나 또는 여러 분석방법들에 광범위하게 사용되기 위하여 표지되어질 수 있다. 사용될 수 있는 표지들은 방사성 핵종(radionuclides), 효소, 형광제(fluorescers), 화학발광제, 효소 기질 또는 보조 인자, 효소 억제제, 입자, 염료 및 방사면역측정법(RIA), 예로서 효소 결합항체법(ELISA)와 같은 효소면역측정법, 형광면역측정법 등에 사용되는 것들을 포함한다.

B 세포 에피토프를 포함하는 마마글로빈 폴리펩타이드에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 항체들은 면역분석방법에 사용하기 위하여 당 기술분야에서 알려진 많은 방법들에 의해 제조될 수 있다. 여기서 사용된 용어 "B 세포 에피토프"는 마마글로빈 폴리펩타이드의 항원성 결정인자를 의미한다. B 세포 에피토프는 에피토프에 특이적인 공간 구조의 3개의 아미노산들을 포함한다. 일반적으로, B 세포 에피토프는 이러한 아미노산들을 적어도 5개 포함한다. 아미노산들의 공간구조를 결정하는 방법들은 당 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예로서, X선 결정학 및 이차원적 핵자기 공명을 포함한다.

한 단백질에 대한 항체들을 제조하는 한 방법은 그 단백질 전부 또는 일부의 아미노산 서열을 선별, 제조하여 그 서열을 화학적으로 합성한후 적합한 동물, 일반적으로 토끼나 마우스에 주입하는 것이다.

마마글로빈 폴리펩타이드의 제조방법은 이에 제한되지는 않지만 화학적 합성, 재조합 DNA 기술 또는 생물학적 시료들로부터의 분리를 포함한다. 에피토프를 포함하는 펩타이드의 화학적 합성은 예로서, 고전적인 메리펠드(Merrifield) 고체 펩타이드 합성방법(Merrifield, J Am Chem Soc 85:2149, 1963, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨) 또는 신속 자동화된 다중 펩타이드 합성 시스템에서의 FMOC 방법(DuPont Company, Wilmington, DE)(Caprino and Han, J Org Chem 37:3404, 1972, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 의해 수행될 수 있다.

폴리클로날 항체들은 항원을 슬와근(popliteal) 림프절에 주입하여 토끼에 면역을 형성시키고, 항원을 2 주후 복강내(intraperitoneal) 주입하여 연이은 급속한 상승상태(boost)를 만드므로써 제조할 수 있다. 상기 동물들에서 피를 뽑아 일반적으로 ELISA 방법에 의해 순수한 마마글로빈 단백질에 대해 혈청을 분석한다.

모노클로날 항체들은 골수종(myeloma) 또는 림프종(lymphoma) 세포들과 같은 종양세포들을 연속적으로 복제하여 면역형성된 마우스들로부터 얻은 비세포(splenocytes)들을 융합하므로써 밀스테인(Milstein)과 코홀러(Kohler)의 방법을 따라 제조될 수 있다(Milstein and Kohler Nature 256:495-497, 1975; Gultre and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 이렇게 생성된 하이브리도마(hybridoma) 세포들을 제한희석법(limiting dilution)에 의해 클론시키고 상등액은 ELISA나 RIA 방법으로써 항체생성에 대해 분석한다.

상기와 같이 제조된 마마글로빈에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 항체들은 마마글로빈을 발현하는 세포들로부터 얻은 마마글로빈의 전구체 또는 분비형들을 분리, 정제하는데 사용될 수 있다. 예로서, 아래 나타낸 바와 같이, 마마글로빈 cDNA로부터 예측되는 16개의 C-말단 아미노산들(Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe, 서열번호 14)에 대해 생성된 폴리클로날 항체는 시험관 내 번역 시스템에서 합성된 마마글로빈 뿐만 아니라 마마글로빈의 전구체와 분비형들에도 결합한다. 항 마마글로빈 항체를 사용한 마마글로빈의 분리는 당 기술분야에서 잘 알려진 방법들, 예로서 친화성 크로마토그래피를 사용하여 수행될 수 있다.

종양세포에 의해 발현된 표적항원들을 인식하고 특이적으로 결합하는 항체들의 독특한 능력은 암치료에 있어 새로운 접근방법을 제공하는 것이다(LoBuglio and Saleh, Am J Med Sci 304:214-224, 1992; Bagshawe, Adv Pharmacol 24:99-121, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 따라서, 본 발명의 또다른 측면은 유방암 세포들에 의해 과발현되는 것으로 밝혀진 마마글로빈에 대한 항체들을 사용하는 것에 기초하여 동물에서의 유방암 발생예방 및 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

마마글로빈에 특이적인 폴리클로날 또는 모노클로날 항체들은 당 기술분야에서 알려진 어떤 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예로서, 쥐 또는 인간의 모노클로날 항체들은 하이브리도마 기술에 의해 제조될 수 있다. 선택적으로, 마마글로빈 또는 면역학적으로 활성인 이의 유도체나 단편, 또는 항유전형(anti-idiotypic) 항체 또는 이의 단편이 마마글로빈을 발현하는 세포들의 인식이 가능한 항체들의 B세포 생성을 제거하기 위해 동물에 투입될 수 있다.

그리하여 제조된 항체들 또는 이들의 단편들을 방사성 핵종, 독소, 또는 세포독성 약물과 같은 하나 또는 그 이상의 종양세포 붕괴(oncolytic)물질들로 표지하고, 유방암이 있는 것으로 의심되는 환자에게 투여한다. 유방암 세포에 의해 과발현되는 마마글로빈에 표지된 항체가 결합되면 유방암 세포는 사멸될 것이다.

당 기술분야에서 알려진 다양한 종양세포 붕괴물질들중 어떤 것도 이러한 표지된 항체들을 제조하는데 사용될 수 있다. 예로서, 식물과 미생물의 독소를 항체에 결합시키므로써 면역독소를 제조할 수 있다. 이러한 독소들은 예로서, 리신(ricin), 디프테리아 독소 및 슈도모나스(Pseudomonas) 균체외 독소(exotoxin) A를 포함한다. 또한 화학적 치료물질들을 항체에 결합시키므로써 약물-항체 결합체들을 제조할 수 있다. 이러한 용도에 적합한 화학적 치료물질들은 예로서, 토목시펜(tomoxifen), 독소루비신(doxorubicin), 메토포렉세이트(methotrexate), 클로람부실(chlorambucil), 빈카(Vinca) 알칼로이드류 및 마이토마이신(mitomycin)을 포함한다. 또한, 방사성 면역 결합체(radioimmunoconjugate)들은 방사성 핵종을 항체에 안정되게 연결시키므로써 제조될 수 있다. 방사성 면역 결합체들을 제조하는데 적합한 방사성 핵종들은 예로서, ¹³¹I, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y와 ⁴⁷Sc와 같은 β-방사체들; ²¹¹At, ²¹²Bi와

^{212}Pb 와 같은 α -방사체들; ^{125}I 와 ^{77}Br 과 같은 오거(auger) 전자 방사체들; 및 ^{10}B 와 같은 분열가능한 핵종들을 포함한다.

상당한 비율의 유방종양들이 마마글로빈 단백질을 발현한다는 발견은 본 발명의 또다른 측면으로, 이는 마마글로빈 항원들로 마마글로빈 특이적인 B 및/또는 T 세포 림프구들(T_c)을 활성화시키는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명은 마마글로빈 B 세포 항원과 T_c 세포 항원들; 마마글로빈을 발현하는 종양들에 대한 항체 매개된 및/또는 세포 매개된 면역반응을 유도하기 위해서 적어도 하나의 B 세포 마마글로빈 항원 및/또는 적어도 하나의 T_c 세포 마마글로빈 항원을 포함하는 백신들, 그리고 마마글로빈을 발현하는 종양을 지닌 유방암 환자를 치료하는 방법들을 제공한다. 본 발명에 따른 한 방법은 환자에게 활성화된 마마글로빈 특이적인 림프구들을 투여하는 것을 포함한다. 또다른 방법은 환자에게 마마글로빈 특이적인 백신을 투여하는 것을 포함한다.

여기에서 사용된 "마마글로빈 항원"이라는 용어는 마마글로빈 특이적인 B 세포 또는 T_c 세포에 의해 인식되는 B 세포 또는 T_c 세포 에피토프를 포함하는 자연적으로 발생하는 마마글로빈 폴리펩타이드 및 이들의 유도체들과 단편들을 포함한다.

마마글로빈 B 세포 항원은 마마글로빈 특이적인 B 세포 에피토프와 T_H 세포 에피토프를 포함한다. 상기 용어 "B 세포 에피토프"는 B 세포상에 있는 항마마글로빈 면역글로불린 수용체들에 의해 인식되고, 동물에 투여되었을 경우 T_H 세포들로부터 적절한 도움을 받아 항체 생성을 유도해 낼 수 있는 어떤 항원, 합텐(hapten), 에피토프 또는 항원성 결정인자를 의미하는 것이다. B 세포 에피토프는 적어도 4개 아미노산의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 B 세포 에피토프는 적어도 6~25개의 아미노산 길이를 가지며, 보다 바람직하게는 약 15~22개의 아미노산 길이를 가진다. B 세포 에피토프의 아미노산 서열 구성은 자연적으로 발생하는 마마글로빈의 단편에 존재하는 연속된 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일할 수 있다. 선택적으로, B 세포 에피토프의 아미노산 서열 구성은 마마글로빈의 결집된 국소해부적 결정인자를 나타내는 불연속적인 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.

상기 용어 " T_H 세포 에피토프"는 MHC 클래스 II 분자들과 결합되므로써 T 보조세포들에 의해 인식되는 어떤 항원성 결정인자를 의미한다. T 보조세포들의 활성화는 휴지상태(resting)의 마마글로빈 특이적인 B 세포들의 보다 높은 친화력의 IgG-분비 세포들로의 분화(differentiation), 즉 이차 항체 응답반응을 유도한다. T 세포의 보조로 보다 높은 역가를 지닌 특이적인 항체생성 B 세포들을 제조하기 위하여 B 및 T_H 세포 결정인자들을 포함한 면역유전성(immunogenic) 펩타이드들의 제조 및 이용은 당 기술 분야에서 잘 알려져 있으며, 예로서 본 명세서에서 참고문헌으로 포함된 Cheronis 등, 미국특허 제 5,573,916, Denton 등, Cancer Letters 70:143~150(1993), Borrás-Cuesta 등, Eur. J. Immunol. 17, 1213~1215(1987), 및 Good 등, Science 235:1059~1062(1987)이 있다. 상기 T_H 세포 에피토프는 마마글로빈 또는 이형의 단백질로부터의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예로서, Denton 등은 공지된 보조 T 세포 결정인자인 인플루엔자 헤마글루티닌 A/X-31의 서열 111~120에 연결되는 MUC-1 유신의 중심에 있는 B 세포 결정인자 영역을 포함하는 합성 펩타이드로 면역된 쥐들에서, 분비 상피에서 발현되고 유방 및 다른 암종과 관련된 복합 글리코단백질인 유신(mucins)에 대한 항체 응답반응의 유도를 설명하였다. T_H 세포 에피토프는 약 6~약 20개의 아미노산 잔기들, 바람직하게는 약 8~18 아미노산 잔기들, 보다 더 바람직하게는 9~15 잔기들로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다.

마마글로빈 T_c 세포 항원은 T_c 세포 에피토프와 MHC 클래스 I 아그리토프(agretope)를 포함한다. 상기 용어 " T_c 세포 에피토프"는 항원이 존재하는 세포의 표면에 있는 MHC 클래스 I 분자에 의해 제공되는 마마글로빈 특이적인 T_c 세포들에 의해 인식되는 어떤 항원, 에피토프 또는 항원성 결정인자를 의미한다. 상기 용어 "MHC 클래스 I 아그리토프"는 항원이 존재하는 세포(APC)상에서 MHC 클래스 I 분자에 의해 마마글로빈 항원이 마마글로빈 특이적인 T_c 세포에 제공되어지도록 하는, MHC 클래스 I 분자에 의해 인식되는 어떤 아미노산 서열을 의미한다. 상기 T_c 세포 에피토프와 MHC 클래스 I 아그리토프는 자연적으로 발생하는 마마글로빈 단편의 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일한 약 6~약 11개 아미노산들의 아미노산 서열내에 포함된다. 바람직하게는 상기 서열은 8 또는 9 아미노산 길이를 갖는다.

단백질 항원에 대한 B 와 T_c 세포 에피토프들의 동정방법들은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예로서, 분비된 마마글로빈을 연결하는 중복(overlapping) 합성 펩타이드들에 응답하는 분리된 마마글로빈 특이적인 B 세포들 또는 마마글로빈 특이적인 T_c 세포들의 능력은 표준 면역생물학 기술을 사용하므로써 결정될 수 있다. 항원성 물질로 동정되는 이들 펩타이드들은 마마글로빈 특이적인 B 또는 T 세포들을 자극하는 능력을 최대화하기 위하여 그 후 어떤 시기에 하나 또는 몇몇 아미노산들로 변형될 수 있다.

B 세포 에피토프들 또한 C 말단이 폴리메틸렌 멀티핀(multipin) 지지체에 결합된 임의의 펩타이드들의 선별을 포함하는 상업적으로 구입가능한 예로서, 캠브리지 리서치 바이오케미칼(Cambridge Research Biochemicals)의 에피토프 맵핑(mapping) 키트를 사용하여 지도화할 수 있다.

선택적으로, 예측되는 마마글로빈 아미노산 서열은 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자들의 알려진 결합 모티프(motif)에 일치하는 서열로서 검색될 수 있다. 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 Hill 등, Nature 360:434(1992), Pamer 등 Nature 360:852(1992) 및 Hammer 등, J. Exp. Med. 176:1007(1992)와 Falk 등, Nature 351:290~296(1991) 참조. 예로서 유방종양 특이적인 CTLs에 의해 인식가능한 항원성 펩타이드들은, 본 발명에 참고문헌으로 포함된 Peoples 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:432~436(1995)에 개시된 바와 같이, HLA-A2-결합 펩타이드들에 대한 마마글로빈 아미노산 서열을 검색하므로써 동정될 수 있다. 환자가 HLA-A2를 발현하는 경우(코카서스인의 약 50%는 HLA-A2를 발현한다)에 항원 제공 분자로서 HLA-A2를 선택하는 것이 적합하다. 예측된 HLA-A2 결합 펩타이드들은 합성될 수 있으며, 합성된 펩타이

드들을 항원 제공(presentation)에 결점을 갖는 인간의 T 세포/B 세포 융합 생성물인 T2 세포주상에, T2 세포들의 표면에 존재하는 HLA-A2 분자들이 외생의 HLA-A2 결합 펩타이드와 효과적으로 결합될 수 있도록 부가함으로써 항원성을 시험할 수 있다(Henderson 등, Science 255:1264~1266(1992), 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 그 후 마마글로빈을 발현하는 유방종양으로부터 분리된 종양 침투 림프구들(TILs)로부터 유도된 유방 특이적인 CTLs와 상기 펩타이드가 적재된 T2 세포들을 함께 인큐베이션하는 것을 포함하는 표준 세포독성 시험을 수행한다. 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 Peoples 등, pp 432~433과 Toso 등, Cancer Research 56:16~20(1996) 참조.

Tc 세포 에피토프들을 포함하는 항원성 마마글로빈 펩타이드들은 종양세포 표면상의 HLA 클래스 I 분자들에 의해 제공되는 내생의 펩타이드를 산 용출함으로써 동정될 수 있다(예로서, Peoples 등, 상기 논문, p.433 참조). 용출된 펩타이드들은 HPLC 분획화를 포함한 당 기술분야에 알려진 여러 기술들을 사용하여 분리될 수 있다. 다른 펩타이드 분획들을 T2 세포들 상에 적재시키고, 표준 면역생물학적 기술을 사용하여 CTLs에 의해 인식되는 펩타이드들이 어느 것인지를 결정하기 위하여 상기 적재된 T2 세포들을 유방종양 특이적인 CTLs와 함께 인큐베이션 시킨다.

본 발명에 따른 마마글로빈 항원의 한 용도는 양자 면역요법에 사용되는 것이다. 이 치료는 마마글로빈을 발현하는 종양을 가진 환자로부터 분리된 항마마글로빈 항체를 생성하는 B 세포들 및/또는 마마글로빈 특이적인 세포독성 T 림프구들(CTLs)의 마마글로빈 항원에 의한 생체외 활성화 및 신장(expansion)을 포함한다. 또한 상기 방법은 마마글로빈 B 세포와 Tc 세포 항원들을 모두 포함하는 조성물을 사용하여 실시될 수 있다. 상기 활성화된 림프구들을 양자면역 치료를 위하여 환자에게 다시 재도입시킨다.

본 발명에 따른 마마글로빈 항원은 마마글로빈 특이적인 백신의 성분으로서도 유용하다. 상기 백신은 면역유전적 자극가능한 양의 마마글로빈 항원을 포함한다. 여기에서 사용된 면역자극가능한 양이란 수용자 내에서 유방암을 경감시키거나 치료하기 위한 바람직한 면역반응을 자극할 수 있을 정도의 항원의 양을 말하는 것이다. 상기 양은 과도한 실험없이도, 당 기술분야에서 당업자에게 잘 알려진 표준방법들에 의하여 경험적으로 결정될 수 있을 것이다.

본 발명의 항원은 예로서, 항체 매개된 및/또는 세포 매개된 바람직한 형태의 면역반응을 유도하기 위하여 설계된 다양한 백신 제제들 중 어느것에서나 제공될 수 있다. 이러한 제제들은 당 기술분야에서 잘 알려져 있다. 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 A. Lanzavecchia, Science 260:937~944(1993) 및 Raychandhuri에게 부여된 미국특허 제 5,585,103호 참조. 면역반응들을 자극하기 위해 사용되는 백신 제제들의 예들은 알루미늄염과 같은 약물학적으로 적합한 보조제들; 스쿠알린 또는 스쿠알렌 및 무라밀(muramyl) 디펩타이드의 에멀전; 리포솜; 안정화 계면활성제, 미셀(micelle)형성제 및 생분해성이며 생물학적으로 적합한(biocompatible) 오일(Raychandhuri, 상기 논문 참조)을 포함하는 조성물들을 포함한다.

마마글로빈 특이적인 백신은 또한 마마글로빈 항원과 함께 포함되어진 운반(carrier) 세포를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 운반세포는 마크로파지, 수상(dendritic) 세포들, 또는 활성화된 B 또는 T 림프구들과 같은 동일 생물에서 유래하는(autologous) 전업(professional) 항원 제공 세포들(APC)로부터 제조되어진다. Lanzavecchia, 상기 논문, p. 937 참조. 전업 APCs는 리간드 B7을 발현하며, 이는 T세포에서 CD28 또는 CTLA4에 결합하여 T 세포 무감증(anergy) 또는 불활성화를 방지하는 시그널 2(Signal 2)로 알려진 항원-비특이적 공동자극성 신호를 전달한다. 따라서, 상기 백신은 또한 무감증 유도를 방지하기 위해 인터루킨-2나 다른 공동자극성 신호를 포함할 수 있다(Lanzavecchia, 상기 논문 참조, p938).

또다른 마마글로빈 특이적인 백신 제제는 발현을 위해 마마글로빈 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터를 포함한다. 세포장해성 T 림프구들을 자극하기 위하여 감염성 성분들을 사용하는 것은 당 기술분야에서 알려져 있다(Raychaudhuri, 상기 논문 참조). 리스테리아와 BCG와 같은 박테리아 뿐만 아니라, 우두진(vaccinia), 소아마비(polio), 아데노- 및 레트로 바이러스들을 사용하는 키메라(Chimeric) 벡터들도 설명되어 왔다. 예로서, 카나리폭스(canarypox) 바이러스 벡터인 ALVAC는 암호화된 이형의 유전자 생성물에 대하여 강한 세포적 면역반응을 유도한다(Taylor 등, Virology 187:321~328(1991), 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 또한, MAGE-1 유전자에 의해 암호화된 MZ2-E 인간 흑색종 거부반응 항원을 발현하는 재조합 ALVAC는 MAGE-1 mRNA를 발현하는 유방종양으로부터 유도된 TIL 개체군내에서 시험관내 MAGE-1 CTL 활성을 자극할 수 있다(Toso 등, 상기 논문 참조). Weiner등에게 부여된 미국특허 제 5593972호(본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 개시된 또다른 방법에서는, 표적화되어질 면역유전성 단백질의 항원을 암호화하는 재조합 발현벡터는 개체의 생체내, 예로서 근육세포에 직접적으로 투입되거나, 생체외에서 세포들 내로의 DNA의 도입을 용이하게 하는 성분과 함께 개체의 세포에 직접 투입된다.

당 기술분야의 당업자는 바람직한 면역반응을 수행하기에 적합한 백신의 제제화 방법을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 예로서, 항마마글로빈 항체들의 생체내 생산을 유도하기 위해, 마마글로빈 특이적인 백신은 B 세포 에피토프와 Th 세포 에피토프를 포함하는 적어도 하나의 마마글로빈 B 세포 항원을 포함한다. 상기 Th 세포 에피토프는 바람직하게는 목적하는 백신 수용자의 적합한 MHC 클래스 II 단형타입(haplotype)과 짝지워진다. 선택적으로, 파상풍 독소이드(toxoid)로부터 얻은 "보편적(universal)" T세포 에피토프와 같은 HLA 타입에 상관없이 인간에 의해 보편적으로 인식되는 것으로 알려진 Th 세포 에피토프가 사용될 수 있다(Panina Bordignon 등, Eur. J. Immunol. 19:2237(1987), 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨). 바람직하게는, 백신은 다른 HLA 타입들의 MHC 클래스 II 분자들에 의해 인식되는 Th 세포 에피토프들과 복수의 마마글로빈 B 세포 항원들을 포함한다.

또다른 구체예에서, 마마글로빈 특이적인 백신은 세포매개된 응답반응을 유도하고, 마마글로빈 특이적인 Tc 세포들을 활성화할 수 있는 적어도 하나의 마마글로빈 Tc 항원을 포함한다. 바람직하게는, 상기 백신은 여러개의 Tc 세포 항원들을 포함한다.

마마글로빈 특이적인 백신은 또한 항체 및 세포매개된 응답반응들을 모두 유도하도록 제조되어질 수 있다. 이러한 구체에는 마마글로빈 B 세포 항원들과 T_H 세포 항원들을 모두 포함한다.

마마글로빈을 발현하는 종양을 가진 환자는 본 발명에 따른 마마글로빈 특이적인 백신을 면역자극적인 양만큼 투여받는 치료를 받을 수 있다. 백신의 투여는 공지된 기술 또는 표준 기술로써 수행될 수 있다. 이들은 이에 제한되지는 않지만, 정맥내 주사, 복강내 주사, 근육내 주사, 피하주사 또는 유방내 주사를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구체예들은 다음의 실시예들에서 설명될 것이다. 본 명세서의 청구범위내에 속하는 다른 구체예들은 여기 개시된 바와 같은 본 발명의 명세서 및 실시를 고려하여 당 기술분야의 당업자들에게는 명백할 것이다. 실시예들과 더불어, 본 명세서는 실시예 이하의 청구항들에 의해서 인지되는 본 발명의 기술사상과 범위를 나타내는 단지 예시적인 목적일 뿐이다.

이하의 실시예에서, 세포주들은 미국 세포표본 보관소(American Type Culture Collection)로부터 얻었으며, 10% 소 태반 혈청으로서 공급되어진 Dulbecco의 최소 필수배지에서 배양되었다. 조직 생검 시료들은 Human Cooperative Tissue Network로부터 얻었다(LiVolsi 등, Cancer 71:1391~1394, 1993, 본 명세서에 참고문헌으로 포함됨).

실시예 1

본 실시예에서는 마마글로빈 cDNA의 분리를 설명한다.

세포주 MDA-MB415로부터의 총 세포질 RNA를 표준 구아니딘늄 이소시아네이트 방법을 사용하여 분리하였다(Belyavsky 등, 상기 논문 참조). 이 RNA를 Amplifinder 키트(Clontec사)를 제조자에 의해 제시된 사용방법에 따라 이용하는 RACE PCR 방법에 사용하였다.

첫번째 cDNA 가닥의 합성은 반응부피 20 μ l 내에 RNA 1 μ g, 특이적 마마글로빈 프라이머 D2R(5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3')(서열번호 4) 10 μ M, 5X RT 버퍼(250mM 트리스Cl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)

4 μ l, 100mM DTT 2 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l 및 SuperscriptTM II 역전사제 200유닛(Gibco사/BRL)를 포함하는 표준 반응액에서 수행되어졌다. 반응을 45 $^{\circ}$ C에서 한시간동안 진행시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 인큐베이션하여 종결시켰다. RNA를 65 $^{\circ}$ C에서 30분동안 400 μ M NaOH로 가수분해하고 400 μ M 아세트산으로 중화하였다.

상기 반응 혼합물을 3배 부피의 6M NaI와 처리된 유리 비드(bead) 10 μ l에 첨가하였다. 비드들을 80% EtOH로 세번 세척하고, 핵산을 45 μ l의 물로 비드로부터 용출시켰다. 그 후 핵산이 침전되면 10 μ l 물에 재현탁시켰다. 정제된 첫번째 cDNA 가닥을 T4 RNA 리가제를 사용하여 27 $^{\circ}$ C에서 20시간동안 제조자에 의해 제공된 앵커(anchor) 올리고뉴클레오타이드(서열번호 9, 5'-CAC GAA TTC ACT ATC GAT TCT GGA ACC TTC AGA GG-3')에 결합시켰다. 결합반응의 심분의 일은 제조자에 의해 제공된 앵커 프라이머(서열번호 10, 5'-CTG GTT CGG CCC ACC TCT GAA GGT TCC AGA ATC GAT AG-3') 1 μ M, 제조자에 의해 제공된 마마글로빈 특이적인 프라이머 D2Rb(서열번호 11, 5'-AAT CCG TAG TTG GTT TCT CAC C-3') 1 μ M, dNTPs 200 μ M, VentTM DNA 폴리머라아제 5 유닛 및 1X 폴리머라아제 버퍼(10mM KCl, 20mM 트리스Cl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% 트리톤 X-100)를 포함한 50 μ l 반응액 내에서의 PCR 증폭에 사용하였다. 상기 반응을 94 $^{\circ}$ C에서 2분간, 그 후 94 $^{\circ}$ C에서 45초간, 50 $^{\circ}$ C에서 1분간, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 90초 동안 총 40주기 인큐베이션 처리하였다.

마마글로빈 특이적인 내포된(nested) 두개의 하류 올리고뉴클레오타이드들은 D2R(서열번호 4)와 D2Rb(서열번호 11)였다. 상류 마마글로빈 특이적인 조절 올리고뉴클레오타이드 D2F(5'-CTT TCT GCA AGA CCT TTG GC-3')(서열번호 12) 또한 제조자 설명에 따라 사용하였다. 모든 PCR 증폭은 Vent DNA 폴리머라아제(New England Biolabs사)로써 수행되었다. 증폭된 RACE 생성물을 EcoRI로 소화시키고 플라스미드 벡터 pGEM7Z(Promega, Madison, WI)의 EcoRI와 SmaI 위치내로 결합시켰다.

Taq DNA 폴리머라아제 열 순환(cycle) 서열화 키트를 제조자(Promega)에 의해 제시된 사용방법에 따라 사용하여 서열화를 수행하였다. 사용방법을 다음에 간략히 기재하였다.

10pmol의 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 10 μ l의 반응용액내에서 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제를 사용하여 10pmol의 ³²P- γ ATP(3,000 Ci/mmol과 10mCi/ml)로 말단 표지시켰다. 100ng의 플라스미드 주형, 1.5pmol의 표지된 서열 프라이머 및 5 유닛의 서열화 등급의 Taq 폴리머라아제를 포함한 중합반응액을 제조자에 의해 제공된 17 μ l 버퍼에서 제조하였다. 이 반응액을 제조자에 의해 제공된 데옥시뉴클레오타이드와 디데옥시-A, C, G 또는 T의 혼합물을 포함한 4개의 반응튜브 세트에 분액하였다. 4개의 튜브 세트를 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 인큐베이션시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 45 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간, 총 30주기로 인큐베이션 시켰다. 반응이 완료된 후, 3 μ l의 80% 포름아미드/브롬페놀 블루 염색제를 각 튜브에 첨가하였다. 시료들을 70 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열하고 6% 아크릴아미드/7.5M 우레아 서열화 겔에 적재하고 2~4시간동안 60W의 일정전압으로 가동시켰다. 상기 겔을 건조한 후 Kodak XAR5 엑스레이 필름에 2~24시간동안 노출시켰다.

상기와 같이 제조된 서열은 도 2에 나타난 바와 같이 고체 바(bar)의 403bp 단편(서열번호 5)이었다. 초기 연구에서 DEST002 태그 서열을 분리하였다(Watson and Fleming, 상기 논문참조). 이 서열은 도 2에 나타난 바와 같이 열린 바의 서열 206bp 단편(서열번호 6)이었다. 상기 두 서열들로부터 얻은 정보를 결합하여 완전한 길이의 마마글로빈의 503bp cDNA가 추론되어졌다(도 2).

실시예 2

본 실시예에서는 마마글로빈 발현이 유방선 종양세포들에 제한되어 있고, 보다 낮은 수준으로 정상의 유

방선 세포들에 제한되어 있다는 것을 설명한다.

총 세포질 RNA 시료들을 표준 구아니딘늄 이소시아네이트 방법을 사용하여 분리하고 RNA 효소(RNase)가 포함되지 않은 DNA 효소(DNase)로 처리하였다. RT/PCR 분석을 위해 1 μ g의 표시된(indicated) 총 RNA를 제조자 설명서에 따라 올리고 dT₂₁(서열번호 13)과 Superscript II 역전사효소(Gibco/BRL)를 사용하여 역전사하였다.

200ng의 올리고 dT₂₁(서열번호 13)과 1 μ g의 총 RNA를 10 μ l 부피로 65°C에서 5분간 인큐베이션 시켰다. 시료를 얼음으로 냉각시키고, 여기에 4 μ l의 5X RT 버퍼(250mM 트리스Cl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2 μ l의 100mM DTT, 1 μ l의 10mM dNTPs와 200유니트의 SuperscriptTM II 역전사효소(Gibco/BRL)를 첨가하였다. 상기 반응을 45°C에서 1시간동안 진행시키고 95°C에서 5분간 인큐베이션시켜 종료시켰다.

각 RT반응액의 십분의 일을 마마글로빈 특이적인 프라이머 D2R(5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3')(서열번호 4)과 d2102(5'-CAG CGG CTT CCT TGA TCC TTG-3')(서열번호 3)를 사용하여 40회의 94°C × 30초/55°C × 1분/72°C × 1분의 표준반응 조건으로 PCR 분석하였다.

노던 분석을 위해, 20 μ g의 총 RNA를 완전한 길이의 마마글로빈 cDNA 프로우브를 사용하여 상기 설명한 바와 같이(Watson and Fleming, 상기 논문참조) 분석하였다. 각 RNA 시료의 보존성 및 균등한 적재(loading)는 에티디움 브로마이드 염색으로써 평가하였다.

도 4A에 나타난 바와 같이, 500bp 마마글로빈 메세지는 종양 표본 2410(원래의 DEST를 분리해낸 조직)에서 쉽게 감지되며, 정상적인 인간 유방조직에서는 훨씬 낮은 수준으로 감지되었으나, 불사화된 유방 상피세포주 B5-589, 또는 인간의 폐, 태반, 자궁 및 난소에서는 감지되지 않았다(도 4A). RT/PCR 분석을 사용한 증폭후에도, 조사된 15개 조직에서는 마마글로빈 발현이 감지되지 않았다(도 4B). 이들 반응에서 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH) 메세지(도 4B)와 EGF 수용체 메세지(데이타는 나타나지 않았음)의 감지는, 발현의 부재가 분해된 RNA 또는 다른 사소한 이유들로 인한 것이 아니라는 것을 설명해 준다. 따라서 마마글로빈 mRNA의 발현은 유방조직에 대하여 비교적 특이적이다.

실시예 3

본 실시예에서는 마마글로빈 cDNA가, 적절히 예측된 분자질량의 단백질 생성물을 제조하는 번역가능한 뉴클레오타이드 서열을 암호화하는 것을 설명한다. 제조자 설명서에 따라 T7 RNA 폴리머라아제를 갖는 TNTTM 토끼 망상적혈구 번역키트(Promega) 및 ³⁵S-메티오닌(> 1000Ci/mmol; 10mCi/ml, Amersham)을 사용하여 시험관내 번역을 수행하였다.

25 μ l의 TNTTM 토끼 망상적혈구 용해질에 제조자에 의해 제공된 반응 버퍼 2 μ l, T7 RNA 폴리머라아제, 메티오닌이 빠진 20 μ M의 아미노산 혼합물, 40 μ iCi ³⁵S-메티오닌(1,000 Ci/mmol 및 10mCi/ml), 40유니트의 리보뉴클레아제 억제제, 1 μ g의 마마글로빈/pGEM7 플라스미드 및 충분한 양의 DEPC 처리된 물을 첨가하여, 최종 반응부피가 50 μ l가 되도록하였다. 이 반응액을 30°C에서 60분동안 인큐베이션시켰다. 이 반응용액 5 μ l를 20 μ l의 SDS 겔 버퍼에 첨가하여 2분간 끓이고, 17.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 적재하였다.

마마글로빈 cDNA로 프로그램된 토끼 망상적혈구 용해질은 6kD의 단백질을 생성하였으나, cDNA 없이 프로그램된 것은 어떤 단백질도 생성하지 못하였다.

실시예 4

본 실시예에서는 일차(원발성) 유방암종에서 마마글로빈의 과발현이 많이 일어나는 것을 설명한다.

유방암종에서의 마마글로빈 과잉발현의 빈도를 결정하기 위하여, 마마글로빈 cDNA 프로우브를 사용하여 노던 블롯 혼성화로 조직학적 유형을 달리하는 1기의 일차 유방암종 15개의 패널을 실험하였다. 또한 환자 매치된 정상 유방조직 시료들을 두 환자들로부터 얻은 조직들과 비교하였다(도 6). 500bp의 마마글로빈 mRNA가 정상 유방조직과 종양 2410, 그리고 다른 3개의 종양들에서 감지되었으며, 시험했을때 이들중 2개는 환자에 매치된 정상조직에서 발현되지 않거나 적게 발현되었다(B015 v. B016; B022 v. B023)(도 6). 결과적으로, 종양의 15분의 4(27%)는 마마글로빈 mRNA를 과발현하였다.

이러한 데이타는 마마글로빈의 과발현이 단일한 종양 표본에 대해 특이적인 것은 아니며, 실제로 일차 유방 종양에서 비교적 빈번하다는 것을 나타낸다. 또한, 시험된 모든 종양들이 1기라는 사실은 이러한 조절이상 유방암종의 진행에서 비교적 초기에 일어난다는 것을 암시한다.

실시예 5

본 실시예에서는 항마마글로빈 폴리클로날 항체를 사용하여 마마글로빈 단백질을 감지하는 것을 설명한다.

마마글로빈 cDNA로부터 예측된 16개의 C-말단 아미노산들(Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe, 서열번호 14)에 상응하는 펩타이드를 키홀 림팻 헤모시아닌(Keyhole Lymphet Hemocyanin)에 커플링시키고, Freund 보조제와 함께 토끼에게 주사하여 항마마글로빈 폴리클로날 항체를 제조하였다. 접종된 토끼들을 3주간격으로 재접종하여 체내 농도를 높이고(boost), 피를 뽑아, 혈청이 없는 조절 배지내에서 유방암 종양세포주 MDA-MB-415와 MCF-7의 배양액으로부터 마마글로빈을 감지하는 능력을 혈청에 대해 분석하였다. 마마글로빈 메세지를 과발현하는 세포주로서 MDA-MB-415가 초기에 동정되었고, 검출가능한 마마글로빈 mRNA를 전혀 생성하지 않은 세포주로서 MCF-7이 초기에 동정되었다.

조절 배지를 24시간 배양하고 이를 채취하여 감소 조건하에서(즉, 디설파이드 결합들의 수를 감소시키기 위하여 시료를 디티오프레이톨(DTT)과 2-머캅토에탄올(BME)을 포함한 버퍼내에서 가열하였다) 12% SDS

아크릴아미드 겔에 녹이고, Nytran 필터상에서 블로팅시킨 후, 이 분석에서의 주 항체로서 상기 언급된 C-말단 펩타이드에 대한 항체를 사용하여 표준 웨스턴 블롯방법으로 분석하였다. 일차 항체결합 후, 상기 블롯을 세척하고 이차 항체(염소 항토끼)를 첨가하였다. 마마글로빈-항체 복합체를 효소결합된 화학 발광제(ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약, Amersham, Arlington Heights, IL)로써 가시화하였다.

항마마글로빈 폴리클로날 항체는 MDA-MB-415 세포 배양액의 조절 배지에서 약 21kD의 겔보기 분자량을 가진 밴드(band)를 검출해내었다(데이타는 개시하지 않았음). MCF-7 세포 배양액의 조절 배지에서는 어떤 밴드도 검출되지 않았다(데이타는 개시하지 않았음). 따라서, mRNA 데이타와 일치하게 MDA-MB-415 세포들은 마마글로빈 단백질을 분비하지만 MCF-7 세포들은 마마글로빈 단백질을 분비하지 않는다.

MDA-MB-415 배양 배지내로 분비된 마마글로빈의 겔보기 분자량은 서열번호 2의 예측된 아미노산 서열로부터 계산된 분자량 10.5kDa 보다 더 컸다. 거의 모든 분비된 단백질들이 글리코실화 되었기 때문에, 분비된 마마글로빈의 어떤 전구체 형들이 감지될 수 있는지의 여부를 알아보기 위하여 항마마글로빈 폴리클로날 항체로 MDA-MB-415 세포들의 시토졸(cytosol)을 분석하였다.

MDA-MB-415 세포들을 혈청이 없는 배지에서 24시간동안 배양하고, 배지 배양액을 모아서 원심분리기로 탈수한 후, 결과의 상등액을 모았다. 덩어리진 세포들을 포스페이트 완충된 식염수(PBS)로 세척하고 1X Laemmli 시료 버퍼(2% SDS, 10% 글리세롤, 100mM DTT, 60mM 트리스, pH 6.8, 0.001% 브로모페놀 블루)로써 용해하였다. 용해 혼합물을 5분동안 끓인 후 5분간 10,000g으로 원심분리 탈수시켜서 세포 파편들을 펠렛화하였다. 세포 용해질을 새 튜브로 옮기고 아래 설명한 바와 같이 웨스턴 블롯분석에 사용하였다.

상기 배양 상등액과 세포 용해질을 감소 조건(즉, DTT와 BME를 포함한 버퍼내에서 시료를 끓였다)하에서 12% SDS 아크릴아미드 겔에서 전개시키고 표준기술을 사용하여 PVDF 막 위에 블로팅하였다. 상기 블롯을 항체를 생성하는데 사용되는 경쟁적 펩타이드의 존재하와 부재하에서 C-말단 펩타이드에 대한 폴리클로날 항체로 탐지하였다.

마마글로빈-항체 복합체의 시각화는 상기 설명된 바와 같이 수행하였다. 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 경쟁적 펩타이드의 부재하에서(-) 조절 배지(S)는 분비된 마마글로빈 단백질의 표현형인 21kD 밴드를 나타내었다. 세포 용해질(C)은 약 14kD에서 현저한 밴드 및 약 21kD에서 하나의 밴드를 포함하여, 몇 개의 보다 높은 분자량 밴드를 나타내었다. 웨스턴 블롯이 경쟁적 펩타이드 존재하에서(+) 수행될 때, 마마글로빈의 분비형 및 세포내 존재형은 가시화되지 않았으며, 이는 이들 단백질이 그에 대한 항체가 형성된 펩타이드를 포함한다는 것을 나타낸다.

세포 용해질내에서는 단지 14kD 밴드가 검출되었으며, 이는 마마글로빈의 전구체 또는 처리되지 않은 형태를 나타내는 것이다. 마마글로빈에 대한 예측된 아미노산 서열은 서열번호 2의 53~55 잔기 및 68~70 잔기에 위치한 공통된 N-글리코실화 위치, Asn-X-Thr를 가졌으며, 관찰된 분비된 21kD 형은 단백질의 어느정도 글리코실화된 형태를 나타낸다.

이 가설은 MDA-MB-415 세포들을 진핵세포 단백질들의 N-연결된 글리코실화를 억제하는 약물인 투니카마이신(tunicamycin)의 존재 및 부재하에서 배양함으로써 테스트하였다. 투니카마이신 1ug/ml을 두개의 동일한 배양액에 첨가하고, 두 배양액을 하룻밤동안 인큐베이션 처리하였다. 처리된 배양액 및 대조 배양액으로부터 배지 배양액과 세포 용해질을 제조하고 상기 언급한 바와 같이 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

도 8에 나타난 바와 같이, 투니카마이신으로 처리된(+) 배양액(S)로부터의 배지는 분비된 마마글로빈이 검출가능한 정도가 아니었으며, 이는 분비된 마마글로빈이 글리코실화된 것이라는 것을 의미한다. 놀랍게도, 마마글로빈의 세포 시토졸 형태(14kD) 또한 투니카마이신으로 처리된 MDA-MB-415 세포들의 용해질에서 검출되지 않았다(가장 오른쪽 줄). 투니카마이신에 의한 초기 글리코실화의 저해는 마마글로빈 전구체 형을 불안정화시키고 변형시킨다는 가설로써, 투니카마이신으로 처리된 세포들의 시토졸내에서의 검출가능한 14kD 단백질의 부족함을 설명할 수 있다.

마마글로빈의 C-말단 펩타이드에 대한 폴리클로날 항체 또한 초기 인간 유방암 표본으로부터의 세포 용해질내에 있는 마마글로빈의 14kDa 전구체를 감지하였다. 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 마마글로빈의 전구체 형태는 종양표본 B023내에 존재하지만, 동일한 환자로부터의 정상 유방조직 시료(B022)에서는 검출되지 않았다. 흥미롭게도, 마마글로빈 전사체(즉, 087R, 014, 75A 및 2410)를 발현하는 어떤 종양 시료들은 웨스턴 블롯 분석으로 분석했을 때 마마글로빈 단백질을 검출가능한 농도로 포함하지 않았다. 이들 데이타에 맞는 한 가설은 마마글로빈 발현은 전사 및 번역수준에 따라서 별도로 조절되어진다는 것과 이러한 별도의 조절은 종양의 발전단계를 결정한다는 것이다.

또한 항마마글로빈 폴리클로날 항체는 증식된 유방선으로부터의 유방 분비액 내에서 분비된 마마글로빈을 찾아내는데 사용되었다. 초유(Colostrum) 또는 성숙유 액(시료 500 ul)을 임신한 여성으로부터 임신 기간중 첫번째 세달과 그 후 세달이 지난후 다시 세달동안, 분만시에, 그리고 분만후 3, 14, 21일에 손으로 짜서 모았다. 시료들을 2X 램리(Laemmli) 시료 버퍼(4% SDS, 20% 글리세롤, 200mM DTT, 120mM 트리스, pH 6.8, 0.002% 브로모페놀 블루)를 동량사용하여 희석하였다. 희석된 시료들을 5분간 끓이고, 4°C에서 5분간 10,000g으로 원심탈수시켜 세포파편들을 펠렛화하였다. 상기와 같이 웨스턴 블롯 분석하기 전에 변성된 시료들을 새 튜브로 옮기고 -20°C에서 보관하였다.

도 10에 나타난 바와 같이, 상기 항체는 유방 상피세포들이 높은 증식이 일어나는 기간인 임신중에 채취한 유방 분비물에 존재하는 21kD의 분비된 마마글로빈을 감지하였다. 그러나, 유방 상피 분화단계인 수유기에는, 분만후 3일까지 마마글로빈 농도가 현저히 감소되고 분만후 14일 이후에는 마마글로빈이 더이상 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 분비되는 마마글로빈은 유방 상피세포들의 증식과 관련이 있다는 것을 의미하며, 인간의 유방암에서 분비된 마마글로빈의 감지와 일치한다.

마마글로빈 펩타이드에 대한 항체와의 반응성은 유방 종양세포에 대하여 유방암 환자의 표본의 파라핀 고정 단편을 면역조직화학적으로 염색하므로써 나타내어졌다(도 11). 면역조직화학적 염색은 일차 항체로서 마마글로빈 펩타이드에 대한 항체를 사용하여 수행하고, 양고추냉이 페록시다아제로 태그된 염소

항토끼 항체와 기질로서 3, 3' 디아미노벤젠 테트라하이드로클로라이드(DAB)를 사용하여 마마글로빈-항체 복합체를 검출하였다. 마마글로빈 단백질을 발현하는 세포들은 갈색으로 염색되었다.

이러한 결과들로부터, 마마글로빈 단백질은 전구체 단백질로부터 합성되고, N-연결된 글리코실화와 같은 번역후 변형들로 인해 분비 전에 겉보기 분자량이 증가되며; 마마글로빈의 전구체 형들의 안정성은 N-연결된 글리코실화에 따라 달라지며; 유방 종양세포들이 증식되므로써 마마글로빈 단백질이 분비되는 것으로 믿어진다. 마마글로빈 단백질의 감지는 유방종양 마커로써 마마글로빈 단백질을 사용한 암 진단학과 유방 종양의 재발 평가, 종양세포들을 오염시키기 위한 동일동물 유래의 척수/분지 세포 이식체의 조사, 및 항체-매개된 복합체들을 통한 치료적 간섭을 위한 유방 종양세포들의 표적화에 적용할 수 있다. 분리, 정제된 마마글로빈 폴리펩타이드는 유방종양들에 대한 항체들의 생성과 다른 종양 특이적 면역요법 접종의 개발에 유용하다.

상기 내용들에 의하여, 본 발명의 장점들이 달성되고 다른 유리한 결과들을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

본 발명의 범위로부터 벗어나지 않고 상기 방법과 조성물들에 여러 다양한 변화들이 만들어질 수 있으며, 상기 설명에 포함되고 첨부된 도면들에서 나타난 모든 사항들은 제한적인 의미에서 사용된 것이 아니라 단지 예시적인 것으로 해석될 수 있을 것이다.

<110> WASHINGTON UNIVERSITY

<120> MAMMAGLOBIN, A SECRETED MAMMARY SPECIFIC BREAST CANCER PROTEIN

<150> US 08/933,149

<151> 1997-09-18

<160> 14

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 503

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc      60
atgaagtgtc tgatggtcct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct      120
ggctgccctc tatggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact      180
gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat      240
gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt      300
atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatitt aactttctgc aagacctttg      360
gctcacagaa ctgcagggtg tggtagagaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt      420
ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg      480
tttatittaa taaattgatg gca                                         503

```

<210> 2

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys

1 5 10 15

Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr

20 25 30

Ile Asn Pro Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu

35 40 45

Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu

50 55 60

Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe
65 70 75 80
Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe
85 90
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
cagcggcttc ctgatcctt g 21
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4
ataagaaaga gaaggtgtgg 20
<210> 5
<211> 403
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc 60
atgaagttgc tgaatgtcct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct 120
ggctgccctt tatggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact 180
gaatacaaag aactttctca agagttcata gacgacaatg ccaactacaa tgccatagat 240
gaattgaagg aatgttttct taaccaaacg gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt 300
atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatatt aactttctgc aagacctttg 360
gctcacagaa ctgcagggtg ttgtgagaaa ccaactacgg att 403
<210> 6
<211> 206
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
tttatgcaat taatatatga cagcagtctt tgtgatttat ttaactttc tgcaagacct 60
ttggctcaca gaactgcagg gtatggtgag aaaccaacta cggattgctg caaaccacac 120
cttctctttc ttatgtcttt ttactacaaa ctacaagaca attgttgaaa cctgctatac 180
atgtttattt taataaattg atggca 206
<210> 7
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Met Lys Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Val Thr Ile Pro Ile Cys Cys

1 5 10 15

Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Cys Ser Ile Leu Asp Glu Val Ile Arg Gly
 20 25 30
 Thr Ile Asn Ser Thr Val Thr Leu His Asp Tyr Met Lys Leu Val Lys
 35 40 45
 Pro Tyr Val Gln Asp His Phe Thr Glu Lys Ala Val Lys Gln Phe Lys
 50 55 60
 Gln Cys Phe Leu Asp Gln Thr Asp Lys Thr Leu Glu Asn Val Gly Val
 65 70 75 80
 Met Met Glu Ala Ile Phe Asn Ser Glu Ser Cys Gln Gln Pro Ser
 85 90 95

<210> 8
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

cacgaattca ctatcgattc tggaaccttc agagg 35

<210> 10
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

ctgggttcggc ccacctctga aggttcacaga atcgatag 38

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

aatccgtagt tggttttotca cc	22
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 12	
ctttctgcaa gacctttggc	20
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
tttttttttt tttttttttt t	21
<210> 14	
<211> 16	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe	
1 5 10 15	

(57) 청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 적어도 여섯개의 연속된 아미노산을 포함하는 적어도 하나의 마마글로빈 항원을 면역유전학적 유효량으로 포함하는 마마글로빈 특이적인 백신.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 운반(carrier) 세포상에 적재되어 있는 것을 특징으로 하는 마마글로빈 특이적인 백신.

청구항 3

제 1항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 보조제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 마마글로빈 특이적인 백신.

청구항 4

제 1항에 있어서, 마마글로빈 B 세포 항원과 마마글로빈 T_c 세포 항원들의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 마마글로빈 특이적인 백신.

청구항 5

발현을 위해 마마글로빈 B 세포 항원 및/또는 마마글로빈 T_c 세포 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한 재조합 벡터를 포함하는 마마글로빈 특이적인 백신.

청구항 6

면역유전학적 유효량의 마마글로빈 항원을 포함한 마마글로빈 특이적인 백신을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 마마글로빈을 발현하는 종양을 지닌 환자의 치료방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 항원은 운반 세포상에 적재되어 있는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 백신은 약제학적으로 적합한 보조제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 9

제 5항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 재조합 벡터의 뉴클레오티드 서열에 의해 발현을 위해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 10

종양으로부터 마마글로빈 특이적인 림프구들을 분리하고, 적어도 하나의 마마글로빈 항원으로 림프구들을 활성화시킨 후, 활성화된 림프구들을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 마마글로빈을 발현하는 유방 종양을 지닌 환자의 치료방법.

청구항 11

글리코실화 되고 서열번호 2의 아미노산 20~93으로 구성된, 자연적으로 발생하는 분비된 마마글로빈 폴리펩타이드에 특이적인 B 세포들 및/또는 T_c 세포들에 의해 인식되는, 서열번호 2중의 적어도 6개의 연속된 아미노산을 포함하는 적어도 하나의 마마글로빈 항원을 포함하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 서열번호 2중의 적어도 12개의 연속된 아미노산들을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 서열번호 2중의 적어도 25개의 연속된 아미노산들을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 글리코실화되고 서열번호 2의 아미노산 20~39로 구성된 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 글리코실화되고 서열번호 2로 구성된 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 16

제 11항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 유방암 환자로 부터 얻은 B 세포의 시험관내 활성화와 신장을 유도하는 마마글로빈 B 세포 항원인 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 마마글로빈 B 세포 항원은 이형 단백질로부터의 T_H 세포 에피토프를 포함하는 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 18

제 11항에 있어서, 상기 마마글로빈 항원은 유방암환자로부터의 T_c 세포들의 시험관내 활성화와 신장을 유도하는 마마글로빈 T_c 세포 항원인 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 19

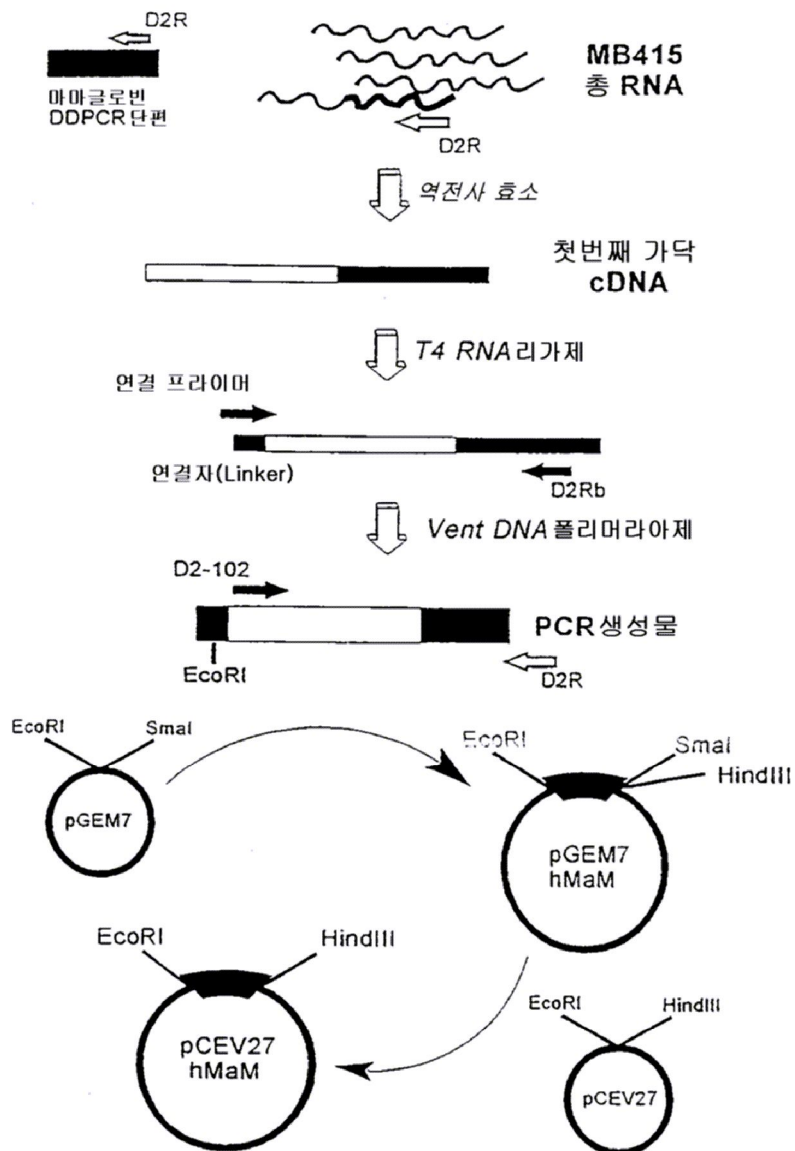
제 18항에 있어서, 상기 마마글로빈 T_c 세포 항원은 서열번호 2의 8개 또는 9개의 연속된 아미노산들을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

청구항 20

제 11항에 있어서, 마마글로빈 B 세포항원과 마마글로빈 T_c 세포 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리, 정제된 폴리펩타이드.

도면

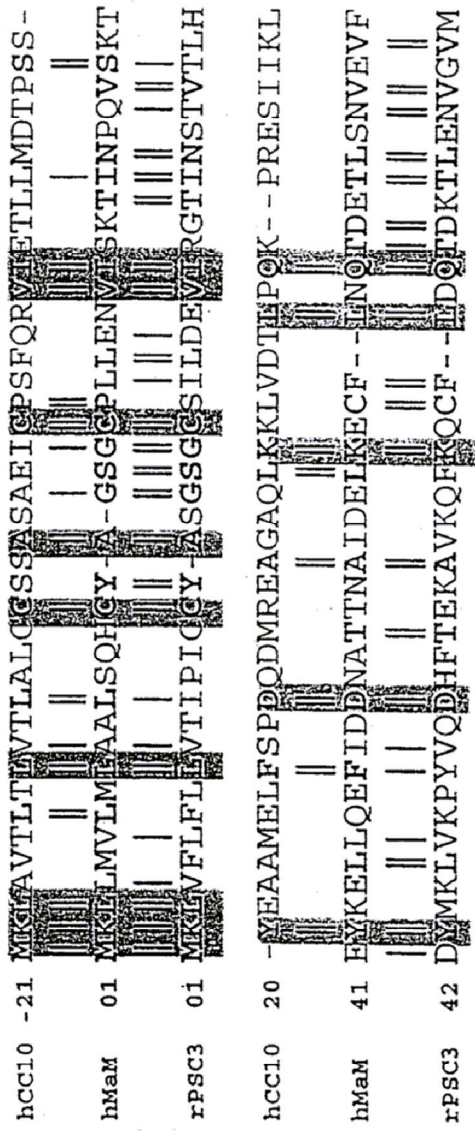
도면1



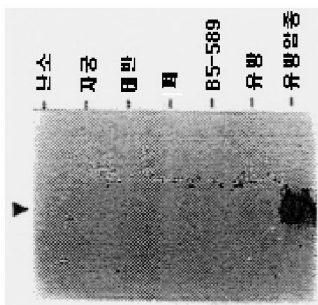
도면2

	9	18	27	36	45	54
5'	GAC AGC GGC TTC CTT GAT CCT TGC CAC CCG CGA CTG AAC ACC GAC AGC AGC AGC					
	63	72	81	90	99	108
	CTC ACC ATG AAG TTG CTG ATG GTC CTC ATG CTG GCG GCC CTC TCC CAG CAC TGC					
	Met Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys					
	1			10		
	117	126	135	144	153	162
	TAC GCA GGC TCT GGC TGC CCC TTA TTG GAG AAT GTG ATT TCC AAG ACA ATC AAT					
	Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr Ile Asn					
	20			30		
	171	180	189	198	207	216
	CCA CAA GTG TCT AAG ACT GAA TAC AAA GAA CTT CTT CAA GAG TTC ATA GAC GAC					
	Pro Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp					
	40			50		
	225	234	243	252	261	270
	AAT GCC ACT ACA AAT GCC ATA GAT GAA TTG AAG GAA TGT TTT CTT AAC CAA ACG					
	Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln Thr					
	60			70		
	279	288	297	306	315	324
	GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GAG GTG TTT ATG CAA TTA ATA TAT GAC AGC AGT					
	Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser					
	80					
	333	342	351	360	369	378
	CTT TGT GAT TTA TTT TAA CTT TCT GCA AGA CCT TTG GCT CAC AGA ACT GCA GGG					
	Leu Cys Asp Leu Phe ***					
	90					
	387	396	405	414	423	432
	TAT GGT GAG AAA CCA ACT ACG GAT TGC TGC AAA CCA CAC CTT CTC TTT CTT ATG					
	441	450	459	468	477	486
	TCT TTT TAC TAC AAA CTA CAA GAC AAT TGT TGA AAC CTG CTA TAC ATG TTT ATT					
	495					
	TTA ATA AAT TGA TGG CA 3'					

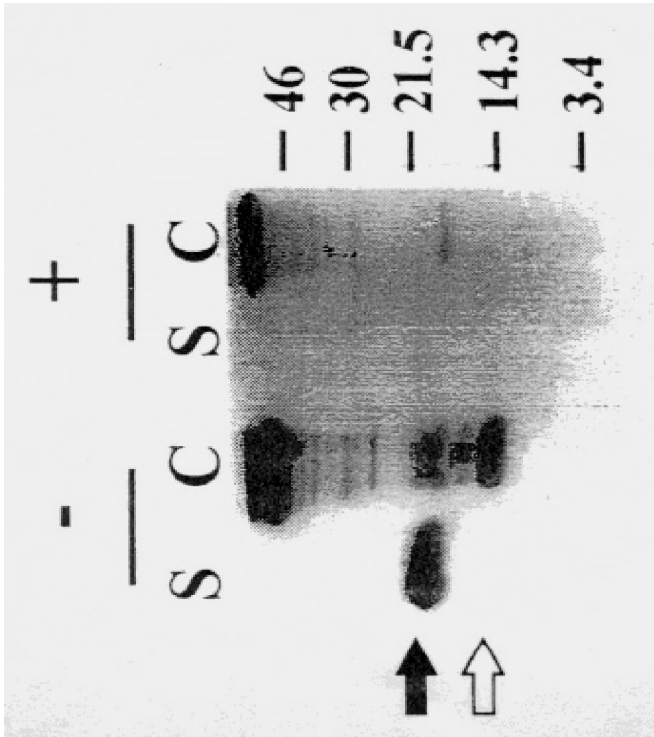
도면3



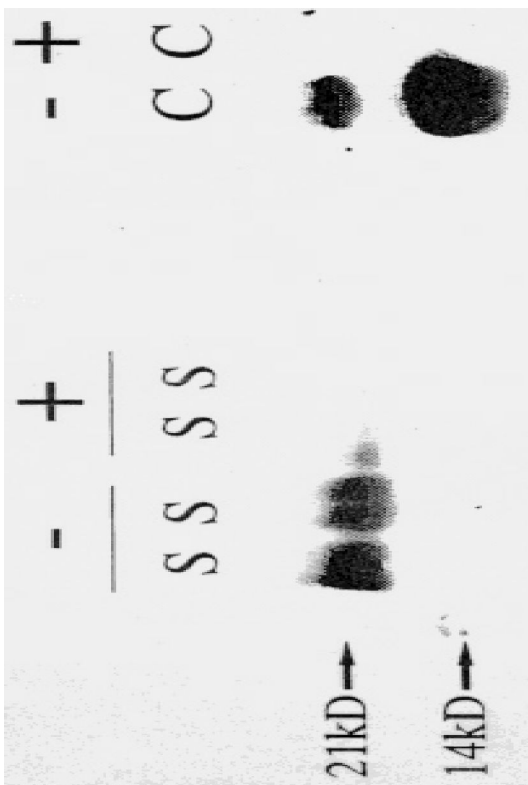
도면4A



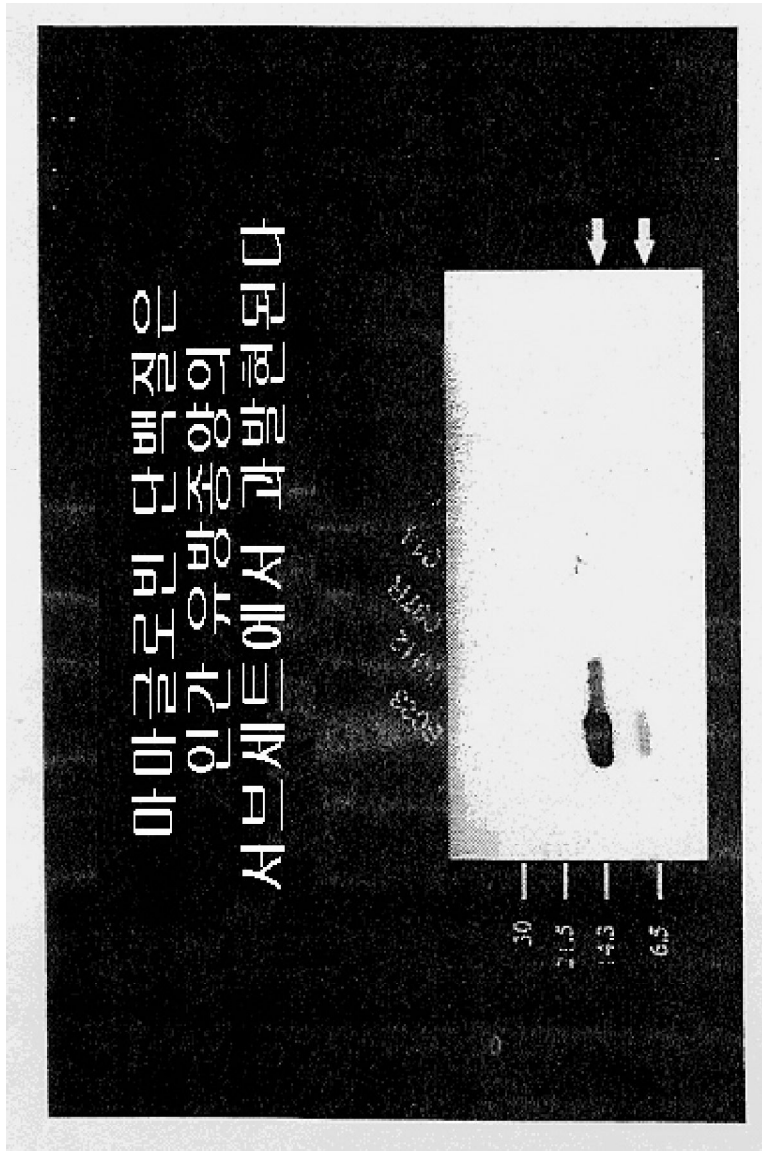
도면7



도면8

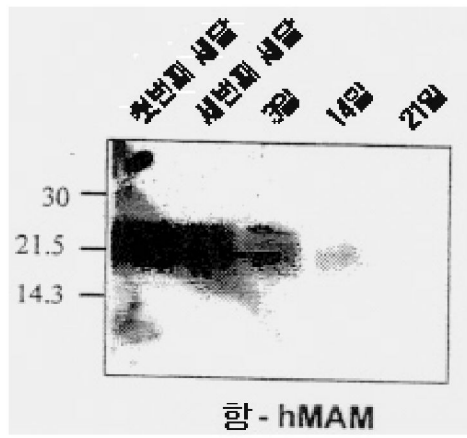


도면9



도면10

유선이 증식되므로써
마마글로빈 단백질이 분비된다.



도면11A



도면 11B

