(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월05일
(11) 등록번호 10-2119985
(24) 등록일자 2020년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7006399(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년01월10일
심사청구일자 2019년01월08일
(85) 번역문제출일자 2018년03월05일
(65) 공개번호 10-2018-0026811
(43) 공개일자 2018년03월13일
(62) 원출원 특허 10-2015-7021685
원출원일자(국제) 2014년01월10일
심사청구일자 2015년08월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/011041
(87) 국제공개번호 WO 2014/110366
국제공개일자 2014년07월17일
(30) 우선권주장
61/751,504 2013년01월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Thierry Bettinger et al., Nucleic acids research, Vol. 29(18), pages 3882-3891 (2001년 공개)*
Khammanivong, Ali., University of Minnesota. (2011.07. 공개)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
허즈버그 마크 씨
미국 55410 미네소타주 미니애폴리스 사우스 요크 애비뉴 3927
로스 카렌 파니
미국 55104 미네소타주 세인트 폴 베벌리 로드 2345
소렌슨 브렌트 에스
미국 55109 미네소타주 메이플우드 노스 스탠드릿지 플레이스 3045
(72) 발명자
허즈버그 마크 씨
미국 55410 미네소타주 미니애폴리스 사우스 요크 애비뉴 3927
로스 카렌 파니
미국 55104 미네소타주 세인트 폴 베벌리 로드 2345
소렌슨 브렌트 에스
미국 55109 미네소타주 메이플우드 노스 스탠드릿지 플레이스 3045
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 정의준

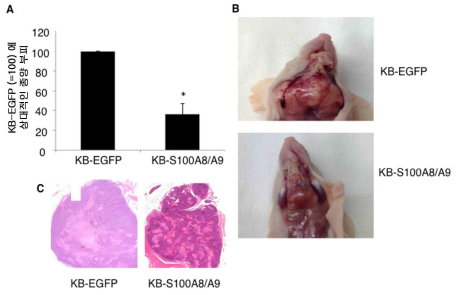
(54) 발명의 명칭 **mRNA 트랜스펙션을 수반하는 치료 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 공개는 종양 억제 및 병원체에 의한 세포 감염의 저해에 관여하는 조성물 및 방법을 기재한다. 일반적으로, 상기 조성물은 상피 세포 내로 도입된 후에 치료적 유익을 제공할 수 있는 mRNA 카르고 (cargo) 를 포함한다. 어떤 경우에, mRNA 는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 어떤 경우에, 폴리펩티드는 상피 세포

(뒷면에 계속)

대 표 도



증식을 억제할 수 있다. 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 선천 면역에 관여할 수 있다. 다양한 구현예에서, 폴리펩티드는 카텔리신 항균성 단백질 (CAMP), 칼프로텍틴, S100A8, S100A9, β-디펜신, S100A7, 분비성 백혈구 저해인자, 리포칼린 2, 또는 리소자임을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 는 안정화 모이어티 예컨대, 예를 들어, 5' 캡 또는 3' 연장을 포함할 수 있다.

(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
C12N 15/87 (2013.01)
C12N 2840/203 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 전암성 구강 염증 질환의 치료를 위한 약학 조성물:

세포 증식의 억제에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하고, 합성 5' 캡 을 포함하는 mRNA 로서, 상기 폴리펩티드가 칼프로텍틴, S100A8, 또는 S100A9 으로부터 선택됨; 및

구강 병변으로의 국소 적용을 위해 제형화된 약학적으로 허용가능한 생체내 전달 비히클.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 5' 캡이 항-역 캡 유사체 (ARCA) 인 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, mRNA 가 추가로 3' 연장 안정화 모이어티를 포함하는 약학 조성물.

청구항 4

하기를 포함하는 암종의 치료를 위한 약학 조성물:

세포 증식의 억제에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하고, 합성 5' 캡 을 포함하는 mRNA 로서, 상기 폴리펩티드가 칼프로텍틴, S100A8, 또는 S100A9 으로부터 선택됨; 및

암종 세포로의 구강 주입을 위해 제형화된 약학적으로 허용가능한 생체내 전달 비히클.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 5' 캡이 항-역 캡 유사체 (ARCA) 인 약학 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, mRNA 가 추가로 3' 연장 안정화 모이어티를 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 정부 지원

[0002] 본 발명은 NIH/NIDCR 에 의해 지급판정을 받은 보조금 번호 1R01DE021206 하의 정부 지원으로 완성되었다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

[0003] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0004] 본 출원은 본원에 참조로 포함되는 2013 년 1 월 11 일에 제출된 미국 가 특허 출원 일련 번호 61/751,504 에 대한 우선권을 주장한다.

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 공개는, 하나의 양상에서, 세포 증식의 억제 방법을 기재한다. 일반적으로 상기 방법은 세포 증식을 억제하는데 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 를 상피 세포 내로 도입하는 단계 및 세포가 부착-비의존적 환경에서 증식할 가능성을 감소시키는데 유효한 양으로 세포가 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 칼프로텍틴 (S100A9 와 복합체화된 S100A8; S100A8/A9), S100A8, 또는 S100A9 를 포함할 수 있다.

[0007] 또다른 양상에서, 본 공개는 세포 감염의 저해 방법을 기재한다. 일반적으로, 상기 방법은 선천 면역에 관

여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 를 세포 내로 도입하는 단계 및 세포가 병원체에 의해 감염될 가능성을 감소시키는데 유효한 양으로 세포가 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 카텔리신 항균성 단백질 (CAMP), 칼프로텍틴, S100A8, S100A9, β-디펜신, S100A7, 분비성 백혈구 저해인자, 리포칼린 2, 또는 리소자임을 포함할 수 있다.

[0008] 위에 요약된 양상의 일부 구현예에서, mRNA 는 안정화 모이어티 (stabilizing moiety) 예컨대, 예를 들어, 5' 캡 (5' cap) 또는 3' 연장 (3' extension) 을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 점막 상피 세포일 수 있다.

[0009] 또다른 양상에서, 본 공개는 일반적으로 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 및 생체내 전달 비히클을 포함하는 조성물을 기재한다.

[0010] 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 상피 세포 증식을 억제할 수 있다. 이들 구현예 중 일부에서, 폴리펩티드는 칼프로텍틴, S100A8, 또는 S100A9 를 포함할 수 있다.

[0011] 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 선천 면역에 관여할 수 있다. 이들 구현예 중 일부에서, 폴리펩티드는 카텔리신 항균성 단백질 (CAMP), 칼프로텍틴, S100A8, S100A9, β-디펜신, S100A7, 분비성 백혈구 저해인자, 리포칼린 2, 또는 리소자임을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 는 안정화 모이어티 예컨대, 예를 들어, 5' 캡 또는 3' 연장을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 요약은 본 발명의 각각의 공개된 구현예 또는 모든 실행예를 기재하는 것을 의도하지 않는다. 하기 설명은 설명적 구현예를 더욱 구체적으로 예시한다. 출원 전체의 여러 장소에서, 예의 목록을 통해 안내가 제공되며, 예들은 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 각 경우에, 언급된 목록은 오직 대표적 군으로서의 역할을 하고 배타적 목록으로 해석되어서는 안된다.

배 경 기 술

[0013] 칼프로텍틴은 칼슘-결합 단백질 S100A8 (MRP8 또는 칼그라눌린 A, 10.8 kDa) 및 S100A9 (MRP14 또는 칼그라눌린 B, 13.2 kDa) 의 이질이합체성 복합체이다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90). S100A8 및 S100A9 는 단백질의 S100 패밀리의 일원이다. 상기 패밀리 일원은 2 개의 EF-핸드 (EF-hand) 칼슘-결합 모티브를 함유하고, 단백질은 세포 성장, 세포 분화, 세포 주기 진행, 세포 생존, 단백질 인산화, 전사, 암 발달 및 염증성 질환에 관여한다 (Donato, 2001. *Int. J. Biochem. Cell biol.* 33: 637-668; Santamaria-Kisiel et al., 2006. *Biochem. J.* 396: 201-14; Khammanivong et al., 2013. *PLoS One* 8: e 69395). 칼슘-결합 모티브는 세균 침입에 대한 상피 세포 저항성에 관여하는 것으로 보인다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90). 칼프로텍틴은 점막 및 표피 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*) 및 세균 예를 들어 카프노사이토파가 스푸티게나 (*Capnocytophaga sputigena*), 에스케리키아 콜리 (Escherichia coli), 스타필로코쿠스 에피데르미스 (*Staphylococcus epidermis*), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 및 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivallis*) 에 대항하는 광범위한 항균 활성을 보인다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90; Miyasaki et al., 1993. *J. Dent. Res.* 72: 517-523; Sohnle et al., 1991. *J. Infect. Dis.* 163: 187 -192; Steinbakk et al., 1990. *Lancet* 336: 763-765; Nisapakultorn et al., 2001. *Infect. Immun.* 69: 4242-4247). 성공적 침입 후 상피내 생존을 용이하게 하기 위해, 리스테리아는 칼프로텍틴을 동원하여 세포질 미세소관과 동시-국부화시켜, 항-리스테리아 활성 및 자율 세포 면역을 전복시키는 것으로 보인다 (Zaia et al., 2009. *MucosalImmunol.* 2: 43-53).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 공개는 세포가 비정상적으로 기능하고/거나 병원체에 의한 감염에 취약할 가능성 및/또는 정도를 감소시킬 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드를 세포가 발현하도록 mRNA 를 세포 내로 도입하는 것을 수반하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 따라서, 상기 방법 및 조성물은, 예를 들어, 감염성 질환을 포함하는 감염으로부터 초래되는 상태 및 특정 신생물에 대항하는 요법을 제공할 수 있다. 일단 세포 내로 도입되면, mRNA 가 표적 세포 내에서 번역될 수 있는 동안에만 폴리펩티드가 발현되며, 즉, 발현은 일시적이고, 영구적이지 않다. 세포가 접근가능한 표적 조직을 이루는 경우, mRNA 는 지속적 치료 유익을 위해 반복적으로 재도입될 수 있다.

[0015] 점막 상피는 미생물의 침입에 대항하는 제 1 선 방어를 제공한다. 구강 및 기타 점막 상피 세포는 2 가지 효과기 항균성 펩티드 (AMPs), 시토졸 내의 칼프로텍틴 (S100A8/S100A9 이질이합체) 및 엔도솜 내의 카텔리시딘 항균성 단백질 (CAMP) 을 사용하여 세포 자율 메카니즘을 통해 침입 세균에 대항하여 보호를 제공한다. 선천 면역이 양성으로 증가되는지 여부를 알기 위해, 우리는 *CAMP*, *S100A8* 및 *S100A9* 열린 해독틀, *A8-IRES-A9* (융합), 또는 *A8-nIRES-A9* (융합, 자연 IRES) 를 함유하는 최적화된 mRNA 구축물로 상피 세포를 일시적으로 트랜스펙션시켰다. mRNA 의 안정성을 유지 하기 위해, 항-역 캡 유사체 (anti-reverse cap analogue) (ARCA) 로 캡핑된 *CAMP* mRNA 는 캡핑 효소 (capping enzyme) (CE) cap 0 또는 CE 1 보다 더욱 효과적이었다. CAMP, S100A8, 및 S100A9 단백질 수준은 일반적으로 mRNA 트랜스펙션 후 16 h 에 최고조에 달했다. 이와 대조적으로, *S100A8/S100A9* 에 의한 동시트랜스펙션은 24 h 에 최대 단백질 발현을 초래했다. 직열 (tandem) mRNA (*A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9*) 로 트랜스펙션 후에, S100A8 단백질 수준은 16 h 에 최대였지만, S100A9 는 32 h 내지 40 h 에 최고조에 달했다. 각각의 mRNA 로 트랜스펙션 후에, CAMP 및 칼프로텍틴은 각각 리스테리아 및 살모넬라에 의한 침입에 대한 상피 세포의 저항성을 48 hr 이하 동안 유의하게 증가시켰다; S100A8/S100A9 의 동시-트랜스펙션은 직열 구축물보다 더욱 효과적이었다. 트랜스펙션은 48 hr 후에 세포 생활력을 20% 만큼 감소시켰으며, 이중 오직 2% 만 세포자멸사에 기인한다. 종합해 보면, 이들 결과는 침입성 병원체에 대한 상피 세포 저항성이 상피 세포 내로의 항균성 mRNA 의 일시적 트랜스펙션에 의해 증가될 수 있다는 것을 시사한다.

[0016] 인간 CAMP 는 세균, 진균, 및 외피보유 바이러스에 대항하여 광범위한 활성을 갖고 또한 면역조정 효과를 보이는 많은 종에서 발현되는 양이온성 항균성 펩티드의 큰 패밀리의 일원이다 (Zanetti, 2004. *J. Leukoc. biol.* 75: 39-48; Buckiet al., 2010. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 58: 15-25; Strandberg et al., 2012. *Infect. Immun.* 80: 3930-3938; Burtonet al., 2009. *Nat. Prod. Rep.* 26: 1572-1584). 신호 펩티드의 절제 후에, *CAMP* 에 의해 인코딩되는 인간 CAP-18 전구체는 프로테이나제 3, 세린 프로테아제에 의한 절단을 통해 활성화되기 전까지 호중구 과립 및 상피 세포 내에 저장된다 (S Ø rensen et al., 2001. *Blood* 2001, 97: 3951-3959). 37-잔기 활성 펩티드 (LL-37) 는 광범위한 생물학적 응답 예컨대, 예를 들어, 미생물의 직접 살해, 주화성 및 케모카인 유도, 염증성 응답의 조절, 및 아주반트, 혈관신생, 및 상처 치유 효과를 매개한다 (Nijnik et al., 2009. *Curr.Opin. Hematol.* 16: 41-47). LL-37 은 호중구 및 마크로파지의 파고라이소솜 내에서 및 급성 염증의 자리에서 직접 항균성인 것으로 보이며 (Nijnik et al., 2009. *Curr.Opin. Hematol.* 16: 41-47), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*) (Turner et al., 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2206-2214), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*) (Larrick et al., 1995. *Immunotechnology* 1: 65-72), 및 스트렙토코수스 (*Streptococcus*) 군 A, B 및 C (Dorschner et al., 2001. *J. Invest. Dermatol.* 117: 91-97) 에 대항하여 광범위한 항균 활성을 보인다. *CAMP* 발현은 1,25-디히드록시 비타민 D3 (Wang et al., 2004. *J. Immunol.* 173: 2909-2912), 병원체 (Midorikawa et al., 2003. *Infect.* Immun. 71: 3730-3739; Nijnik et al., 2009. *Curr. Opin. Hematol.* 16: 41-47) 또는 지질다당류 (LPS) (Nell et al., 2004. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 42: 225-231) 에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, 코스트만병 및 파피용-르페브르 증후군 (Carlsson et al., 2006. *J. Periodontol.* 77: 744-751; de Haar et al., 2006. *Infect. Immun.* 74: 5284-5291), 크론병 (Schauber et al., 2006. *Mol. Nutr.Food Res.* 50: 1006-1012) 및 아토피성 피부염 (Ong et al., 2002. *N. Engl. J. Med.* 347: 1151-1160) 과 같은 질환에서 감소된 CAMP/LL-37 생산은 상피 세포 내의 병원체의 증가된 침입 및 집락형성을 동반한다.

과제의 해결 수단

[0017] 칼프로텍틴은 칼슘-결합 단백질 S100A8 (MRP8 또는 칼그라눌린 A, 10.8 kDa) 및 S100A9 (MRP14 또는 칼그라눌린 B, 13.2 kDa) 의 이질이합체성 복합체이다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90). S100A8 및 S100A9 는 단백질의 S100 패밀리의 일원이다. 상기 패밀리 일원은 2 개의 EF-핸드 (EF-hand) 칼슘-결합 모티브를 함유하고, 단백질은 세포 성장, 세포 분화, 세포 주기 진행, 세포 생존, 단백질 인산화, 전사, 암 발달 및 염증성 질환에 관여한다 (Donato, 2001. *Int. J. Biochem. Cell biol.* 33: 637-668; Santamaria-Kisiel et al., 2006. *Biochem. J.* 396: 201-14; Khammanivong et al., 2013. *PLoS One* 8: e 69395). 칼슘-결합 모티브는 세균 침입에 대한 상피 세포 저항성에 관여하는 것으로 보인다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90). 칼프로텍틴은 점막 및 표피 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*) 및 세균 예를 들어 카프노사이토파가 스푸티게나 (*Capnocytophaga sputigena*), 에스케리키아 콜리 (Escherichia coli), 스타필로코쿠스 에피데르미스 (*Staphylococcus epidermis*), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 및 포르피로모나스 진지발리스

(*Porphyromonas gingivallis*) 에 대항하는 광범위한 항균 활성을 보인다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90; Miyasaki et al., 1993. *J. Dent. Res.* 72: 517-523; Sohnle et al., 1991. *J. Infect. Dis.* 163: 187 -192; Steinbakk et al., 1990. *Lancet* 336: 763-765; Nisapakultorn et al., 2001. *Infect. Immun.* 69: 4242-4247). 성공적 침입 후 상피내 생존을 용이하게 하기 위해, 리스테리아는 칼프로텍틴을 동원하여 세포질 미세소관과 동시-국부화시켜, 항-리스테리아 활성 및 자율 세포 면역을 전복시키는 것으로 보인다 (Zaia et al., 2009. *MucosalImmunol.* 2: 43-53).

[0018] 그러므로, 점막 상피 세포는 주로 2 가지 항균성 효과기 시스템, 대체로 엔도솜 내의 CAMP/LL-37 (Chamilos et al., 2012. *Blood* 120: 3699-3707) 및 시토졸 내의 칼프로텍틴 (S100A8/S100A9) (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90) 을 사용하여 침입성 병원체에 대항하여 보호하고 그것을 억제할 수 있다. 우리는 본원에서 침입성 미생물 병원체에 대항하는 상피내 세포 저항성이 특정 항균성 효과기 mRNA (예를 들어, *CAMP*, *S100A8/S100A9*) 의 일시적 전달에 의해 증가될 수 있는 방식을 기재한다. 치료 목적의 mRNA 트랜스펙션은 전신 또는 생체외 투여를 통해 단백질의 발현을 대체 또는 증가시킬 수 있다 (Tavernier et al., 2011. *J. Control. Release.* 150: 238-47). 이러한 접근법은 DNA 트랜스펙션 및, 예를 들어, 숙주 세포 내로의 부정확한, 돌연변이유발 삽입을 포함하는 수반되는 도전을 회피한다.

발명의 효과

[0019] 점막 선천 면역을 증가시키려는 생각으로, 우리는 인간 상피 세포 내로의 *CAMP* 및 *S100A8/S100A9* mRNA 의 전달 및 그러한 트랜스펙션의 기능적 항세균 효과를 보고한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1. ARCA-캡핑된 (capped) *CAMP* mRNA 또는 CE 캡핑된 *CAMP* mRNA 로 트랜스펙션한 후에 KB 세포에 의한 CAMP 단백질 발현. (A) KB 세포를 ARCA, CE cap0, 또는 cap1-캡핑된 *CAMP* mRNA 로 트랜스펙션한 후의 CAMP 단백질 발현. 상부, 대표적 웨스턴 블롯. 하부, 정량적 해석, 8 h (시) 에서의 ARCA cap 발현을 100 으로 설정함. 재료 및 방법에 기재된 QuantityOne분석을 사용하여 분석 후에, 여러 캡핑 (capping) 방법으로 트랜스펙션한 후의 단백질 발현을 100 에 상대적으로 표시했다. (B) ARCA-캡핑된 *CAMP* mRNA 로 트랜스펙션한 후 시간의 흐름에 따른 CAMP 단백질 발현. 패널 (A) 에서와 같이, ARCA-캡핑된 *CAMP* mRNA 로 트랜스펙션한 후의 CAMP 단백질 발현을 웨스턴 블롯 (상부 패널) 을 사용하여 탐지했고, 하부 패널에 8 h 에서의 수준 (100 으로 설정함) 에 상대적으로 표시했다. 패널 (A) 및 (B) 에서, 에러 바는 3 내지 6 개의 독립적 실험의 평균±SD 를 보여준다.

도 2. ARCA-캡핑된 *S100A8*, *S100A9*, *A8-IRES-A9*, 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 로 트랜스펙션한 후에 KB 세포에 의한 S100A8 및 S100A9 단백질 발현. (A) KB 세포를 *S100A8* mRNA 로 트랜스펙션한 후의 S100A8 단백질 발현, 도 1 에서와 같이 웨스턴 블롯 (대표적 이미지가 제시됨) 을 사용하여 탐지하고 정량화했음. 동일한 실험을 수행하여 하기의 발현의 시간 경과를 확인했다: (B) S100A9 단백질; (C) KB 세포를 *S100A8/S100A9* mRNA 로 동시트랜스펙션한 후의 S100A8 및 S100A9 단백질; (D) KB 세포를 *A8-IRES-A9* mRNA 로 트랜스펙션한 후의 S100A8 및 S100A9 단백질; 및 (E) KB 세포를 *A8-nIRES-A9* mRNA 로 트랜스펙션한 후의 S100A8 및 S100A9 단백질. mRNA 트랜스펙션 후 8 h 에서의 단백질 발현을 100 으로 설정한다. 에러 바는 3 내지 6 개의 독립적 실험의 평균±SD 를 보여준다.

도 3. CAMP 및 칼프로텍틴 mRNA 는 리스테리아 (*Listeria*) 및 살모넬라 (*Salmonella*) 침입에 대한 저항성을 증가시킨다. 단층을 mRNA 로 (A) 8 hr (hours, 시간), (B) 24 hr, (C) 48 hr 동안 트랜스펙션하고, 그 후 2 hr 동안 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*) ATCC 10403S (MOI 100:1) 또는 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028 (MOI 1:1) 과 함께 인큐베이션했다. 24-hr 또는 48-hr 트랜스펙션 후에, 세포를 8 h 에 그리고 다시 32 h 후에 분할하고, 그 후 또다른 16 hr 동안 인큐베이션했다. 생활력 있는 세포내 세균이 비히클 (PBS) 로 모의-트랜스펙션된 KB 세포에서의 CFU (100% 로 설정됨) 에 상대적으로 표현되는 백분율 평균±SD 로서 보고되어 있다. 에러 바는 3 내지 6 개의 독립적 실험에 대한 8-h 비히클 대조군에 상대적인 평균±SD 를 보여준다. *$p < 0.05$.

도 4. mRNA 전달은 세포자멸사를 유발하지 않으면서 세포 생활력을 감소시킨다. (A) KB 세포에 mRNA 구축물의 mRNA 전달 후에 3 일 동안 명시된 시점에 MTT 검정을 사용하여 세포 생활력을 확인했다. PBS-모의-트랜스펙션된 세포를 대조군으로서 사용했으며, 그들의 생활력을 1 로 설정했다. 각각의 실험을 3 차례 수행했고, 적어도 2 회 반복했다. (B) mRNA 구축물의 mRNA 전달 후에 웨스턴 블롯을 사용하는 세포자멸성 세

포의 분석. 유세포분석을 사용하여 아넥신-V-FITC 에 의해 양성 염색된 세포를 세포자멸성으로 여겼다. 패널 A 및 B 에서, 에러 바는 3 내지 6 개의 독립적 실험의 평균±SD 를 보여준다. *p < 0.05. (C) mRNA 구축물의 전달 후 PARP 절단에 대한 웨스턴 블롯 분석. PBS-모의-트랜스펙션된 (비히클) 세포 및 트랜스펙션되지 않은 세포를 대조군으로서 사용했다.

도 5. 항균성 mRNA 는 KB 세포 내에서 32 hr 이하 동안 지속된다. Trizol 시약 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 및 RNeasy plus Mini-키트 (Qiagen, Valencia, CA) 를 사용하여 RNA 를 단리했다. 총 RNA 를 SuperscriptIII (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 로 역전사시켰다. 정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 을 PrimeTime 미리 디자인된 qRT-PCR 검정 (인간 *CAMP* 에 대해 Hs.PT.42.1073747, 인간 *S100A8* 에 대해 Hs.PT.42.3682141, 인간 *S100A9* 에 대해 Hs.PT.42.3080635, 인간 *ACTB* 에 대해 Hs.PT.45.227970.g; Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa) 을 사용하여 수행했다. *CAMP*, *S100A8*, *S100A9* *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 의 발현 수준을 *ACTB* (β-액틴) mRNA 로 정규화했다. (A) *CAMP* mRNA 트랜스펙션. (B) *S100A8*/*S100A9* mRNA (mol/mol=1:1) 동시트랜스펙션. (C) *A8-IRES-A9* mRNA 트랜스펙션. (D) *A8-nIRES-A9* mRNA 트랜스펙션. *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 를 *S100A9* 프라이머에 의해 탐지했다. mRNA 트랜스펙션 후 4 h 에서의 mRNA 존재비 (abundance) 에 100% 의 임의 값을 배정했다. 에러 바는 3 내지 6 개의 독립적 실험의 평균±SD 를 보여준다.

도 6. mRNA 트랜스펙션 후 단백질 발현. (A) 16 hr 동안 *EGFP* mRNA 트랜스펙션, (B) 16 hr 동안 *CAMP* mRNA 트랜스펙션, (C) 16 hr 동안 S*100A8*/*S100A9* mRNA (mol/mol=1:1) 동시트랜스펙션, (D) 40 hr 동안 *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 트랜스펙션의 면역형광 현미경검사 이미지. 비히클, PBS. 바 = 10 μM. 실험을 3 회 수행했고, 대표적 이미지가 제시되어 있다.

도 7. 인간 두경부 조직 및 암종 세포주에서의 S100A8 및 S100A9 의 발현. (A) 정상 인접 (NAT) 및 HNSCC 조직 및 (B) TR146 HNSCC 및 KB 세포에서의 S100A8 및 S100A9 의 mRNA 발현 수준을 qRT-PCR 에 의해 측정하고, GAPDH 로 정규화했다; 점선이 탐지에 대한 역치로서 제시되어 있다. 3 명의 환자 각각으로부터 부합하는 (matching) NAT 및 HNSCC 조직으로부터 추출된 총 RNA 를 유전자 발현 분석을 위해 별도로 모았다 (pool). 표준 조건 하에 배양된 세포주를 대략 70% 세포 포화도 (confluency) 에서 수확하고 분석했다. 데이타는 평균±SD (n = 2) 로서 제시했다. 야생형 및 음성 트랜스펙션 대조군과 비교되는 (C) KB-S100A8/A9 트랜스펙션된 세포 및 (D) TR146-shRNA-S100A8/A9 녹다운 세포에서의 S100A8 및 S100A9 의 대표적 면역블롯. β-액틴을 10% SDS-PAGE 겔에서 분리되는 면역블롯팅 분석을 위한 로딩 대조군으로서 사용했다.

도 8. S100A8/A9 는 KB 세포의 부착-의존적 및 부착-비의존적 성장을 억제했다. (A) KB-EGFP 및 KB 야생형 대조군 세포와 비교되는 KB-S100A8/A9 세포의 성장 곡선. 세포를 비-발열성 폴리스티렌 조직 플라스크 내에서 3 일 마다 10% FBS 로 보충된 신선한 MEM 에서 성장시켰다. (B) KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포의 연한천에서의 부착-비의존적 성장 (평균±SEM, *p < 0.03, n = 4). TR146 WT 및 TR146-shRNA-대조군 세포와 비교되는 TR146-shRNAS100A8/A9KD 세포의 (C) 조직 플라스크 내의 완전 배지에서의 부착-의존적 성장 (평균±SD, *p < 0.02, n = 3) 및 (D) 연한천에서의 콜로니 형성 (평균±SEM, ***p < 0.0005, n = 2).

도 9. S100A8/A9 발현은 G2/M 에서 세포 주기 및 유사분열 정지를 유도했다. (A) 동기화후 KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포의 세포 주기 분석. 표준 조건 하에 배양된 세포를 밤새 혈청 결핍시키고 (serum-starved), 아피디콜린 처리로 G1/S 에서 동기화시키고, 자극하여 세포 주기에 재진입시켰다. 동기화된 세포를 프로피디움 아이오다이드 DNA 염색 용액으로 염색하고, G1/S 차단으로부터 해방 후 DNA 함량의 변화에 대해 유세포분석에 의해 분석했다. (B) 인-히스톤 H3 (Ser10) 으로 염색하고 유세포분석에 의해 분석한 동기화된 세포의 유사분열 분석. (C) G2/M 세포의 백분율. KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포를 동기화후 시간의 흐름에 따라 분석하고 평균±SEM 로서 보고했다; n = 2 독립적 실험 (각각의 분석을 2 차례 수행함); *p <0.05. (D) 동기화후 유사분열 세포의 백분율, 2 회의 독립적 반복 실험의 평균을 나타냄. KB-S100A8/A9 세포는 더 적은 유사분열 세포를 보였으며, 이는 더 낮은 인-히스톤 H3 (Ser10) 염색에 의해 보여진다.

도 10. S100A8/A9 는 SCC 에서 G2/M 세포 주기 체크포인트 (checkpoint) 조절 분자를 조정한다. 세포 주기 조절인자의 발현 및 인산화 (활성화/불활성화) 상태가 면역블롯 분석에 의해 제시되어 있다. 제시된 데이타는 복수의 독립적 반복 실험을 대표한다. 염소 항-β-액틴 폴리클로날 IgG 를 사용하여 단백질 로딩 대조군으로서의 β-액틴을 탐지했다. (A) KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 에서의, G1/S 조절 단백질, 사이클린 A, 사이클린 E, p21 및 Rb, Chk2 및 Cdc25B 의 발현. p-Chk2 (Thr68) 의 인산화가 S100A8/A9 발현이 존

재 또는 부재하는 (제시되지 않음) 어떠한 세포에서도 탐지가능하지 않았다. (B) G2/M 조절인자, Chk1/p-Chk1 (Ser345), 유사분열 활성 p-Cdc25C (Thr48), Cdc25C/p-Cdc25C (Ser216), Cdc2/p-Cdc2 (Thr14/Tyr15), 및 사이클린 B1 의 발현 및 인산화 상태. (C) 토끼 항-14-3-3β 폴리클로날 IgG 로 포획된 14-3-3β 와 동시-면역침전된 (IP) Cdc25C 단백질의 면역블롯팅 (IB). 총 14-3-3β 단백질의 면역블롯팅이 또한 제시되어 있다. (D) 야생형 TR146 (TR146 WT), 대조군 shRNA 트랜스펙턴트 (TR146-shRNA-대조군) 및 shRNA-유도 S100A8/A9 녹다운 (TR146-shRNA-S100A8/A9KD) 세포에서의 S100A8, S100A9, Cdc2 및 Cdc2-(Thr14/Tyr15) 의 단백질 수준.

도 11. S100A8/A9 와 PP2A 포스파타제의 상호작용은 활성을 증가시킨다. (A) 면역블롯팅 (IB) 에 의해 탐지된 S100A8/A9 복합체 (27E10 항체와 IP) 또는 S100A9 서브유닛 (왼쪽 패널) 과 동시-면역침전 (co-IP) 된 (IP) PP2AAα/β 및 PP2A-Aα/β 서브유닛과 co-IP 된 S100A9 (S100A8/A9 복합체 마커 단백질로서 사용됨). (B) IB 를 사용하여 탐지된 KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포에서 비교되는 PP2A 서브유닛 단백질 발현, 인산화 및 메틸화. 제시된 블롯은 10% SDS-PAGE 겔에서 분리된 총 단백질 용해물의 복수 반복 (n ≥ 3) 의 대표이다. β-액틴을 단백질 로딩 대조군으로서 사용했다. (C) KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포에서의 PP2A-C 포스파타제 활성을 A 에 제시된 S100A8/A9 (27E10 항체) 와 동시-면역침전된 탐지가능한 PP2A-Aα/β 로 정규화했고, 그 후 KB-EGFP 수준으로 추가로 정규화했다. 데이타를 평균 ±SE (n = 2) 로서 제시했다. #에러 바가 가시적이지 않음. (D) 10 nM 오카다산 (OA) 에 의한 S100A8/A9-의존적 p-Cdc25C (Ser216) 인산화의 저해. IB 에 의해 탐지된 OA 의 부재 (왼쪽 패널) 및 존재 (오른쪽) 하의 p-Cdc25C 의 발현.

도 12. 이 보고에서 요약되는 G2/M 세포 주기 체크포인트 신호전달 경로의 제안된 S100A8/A9 (칼프로텍틴)-매개 조절. 실선은 직접 조절을 나타내고; 파선은 미지의 메카니즘을 나타낸다.

도 13. S100A8/A9 의 안정적 발현은 구강저 (floor-of-the-mouth) 종양 성장을 감소시킨다. S100A8/A9 발현 KB 암종 세포 및 오직 EGFP 만 발현하는 모의 트랜스펙션된 KB-세포를 실시예 3 에 기재된 바와 같이 별개의 그룹의 건강한 마우스의 구강저 내로 주입했다. (A) 구강저에서 KB-S100A8/A9 세포로부터 형성된 동소 종양은 EGFP 발현 KB 세포보다 제 17 일까지 65% 더 작았다 ($p<0.03$). (B) 구강저에서 KB-S100A8/A9 세포로부터 형성된 종양은 KB-EGFP 세포 종양보다 극도로 작고 주변 조직 내로 덜 침윤성이다. (C) KB-EGFP 세포 종양은 유사한 크기의 KB-S100A8/A9 세포 종양보다 조직학적으로 (헤마톡실린 및 에오신으로 염색됨) 더욱 탈-분화되고 더 넓은 괴사 면적을 갖는다. 제시된 데이타는 3 개의 개별 실험 (그룹 당 마우스 3 마리) 으로부터의 데이타이다.

도 14. S100A8/A9 의 안정적 shRNA 녹다운은 더 큰 구강저 종양 성장과 상관관계가 있다. TR146 볼 (buccal) 암종 세포를 내생적 S100A8 및 S100A9 의 발현을 안정적으로 녹 다운 (knock down) 시키는 shRNA 로 트랜스펙션했다. 녹다운은 모의-트랜스펙션된 세포 (Neg3) 에서보다 대략 70% 더 적은 S100A8/A9 단백질 발현 (A8A8c10 세포) 을 초래했다 (데이타는 제시되지 않음). S100A8/A9 의 shRNA 녹다운을 실시한 TR146 세포 (A8A8c10 세포) 는 모의 트랜스펙션된 (Neg3) 세포보다 제 17 일까지 20% 더 큰 동소 종양을 형성한다 ($p<0.2$). 제시된 데이타는 2 개의 개별 실험 (그룹 당 마우스 3 마리) 으로부터의 데이타이다.

도 15. KB 세포 내로의 EGFP mRNA 전달에 대한 타액 농도 및 처리 시간의 효과. 세포를 37℃ 에서 10%, 50% 또는 90% 타액과 함께 (A) 1 분, (B) 3 분, 또는 (C) 5 분 동안 인큐베이션하고, 신선한 배지로 3 회 세정하고, 그 후 EGFP 를 인코딩하는 패키징된 (packaged), 수식된 (modified) mRNA 와 함께 인큐베이션했다. 50% 타액으로 처리했으나 mRNA 전달하지 않은 세포를 대조군으로서 사용했다.

도 16. KB 세포 내로의 EGFP mRNA 전달: 타액 처리의 효과를 역전시키는 세정 빈도의 효과. 세포를 90% 타액으로 3 분 동안 처리하고, 신선한 배지로 명시된 빈도로 세정하고, 그 후 mRNA 트랜스펙션했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] *mRNA 안정성의 최적화*

[0022] mRNA 의 5' 말단에서의 캡핑은 발현되는 메시지의 안정성을 향상시킨다. ARCA 는 80% 이하의 효능으로 캡핑할 수 있고, 캡핑 효소 (CE) 는 캡핑 효율을 100% 로 증가시킬 수 있다 (Zhao et al., 2010. *Cancer Res.* 70: 9053-9061). 캡핑 전략을 최적화하기 위해, 우리는 ARCA-캡핑된 mRNA 를 생성하는 mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 를, 캡핑 효소 (CE), 및 2'-O-메틸트랜스퍼라제 캡핑 효소를 사용하여 cap 0 또는 cap 1 을 생성하는 mScript™ RNA System (Cell Script Inc., Madison, WI) 과 비교했다. *CAMP* mRNA 를 상이한 캡핑 시스템을 사용하여 합성하고, KB 세포 내로 전달하고, 단백질 발현을 웨스턴 블롯

분석에 의해 탐지했다. ARCA-캡핑된 mRNA 로 트랜스펙션 후 8 h, 24 h, 및 48 h 에, KB 세포는 CE cap 1 로 트랜스펙션 후보다 더 많은 CAMP 단백질을 발현했고, CE cap 1 은 CE cap 0 보다 더 많은 CAMP 단백질을 발현했다 (도 1A). CAMP 단백질 수준은 ARCA 캡핑된 mRNA 전달 후 약 16 h 에 최고조에 달했고, 40 h 내지 48 h 에 약 50% 만큼 감소했다 (도 1B). ARCA 캡핑을 그 후 모든 실험에 사용했다. 우리는 또한 64A 및 150A 의 3' 연장과 함께 발현되었을 때 mRNA 안정성을 비교했다. 거기에는 차이가 거의 없었고 (데이타는 제시되지 않음), 우리는 150A 를 모든 후속 실험에 사용했다.

[0023] *항-역 캡 유사체 (ARCA) 로 캡핑된 mRNA 의 안정성*

[0024] KB 세포는 자연적으로 *CAMP*, *S100A8*, 및 *S100A9* 에 대한 mRNA 를 탐지 수준 미만으로 발현한다 (데이타는 제시되지 않음). 그러므로, KB 세포에서 발현되는 내생적 *S100A8*, *S100A9*, 및 *CAMP* mRNA 는 ARCA-캡핑된 mRNA 로 트랜스펙션 후의 후속 수준에 거의 기여하지 않을 것이다. *S100A8* 및 *S100A9* 둘다를 함유하는 융합 mRNA 를 합성하기 위해, Kozak 서열을 함유하는 *S100A8* ORF 를 pIRES MCS A 내로 클로닝하고 S*100A9* 를 MCS B 내로 클로닝했다. pIRES 에 의한 하류 번역의 감쇠를 제거하기 위해, 자연 IRES (nIRES) 를 구축하고 *S100A8* 과 S*100A9* ORF 사이에 삽입했다. 모든 필수적 요소를 함유하는 서열을 pGEM4Z.2bgUTR.150A 내로 클로닝하고, 그 후 *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 를 합성했다. 시험관내 전사된 ARCA-캡핑된 *CAMP*, *S100A8*, *S100A9*, *A8-IRES-A9*, 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 의 트랜스펙션을 qRT-PCR 을 사용하여 분석했다 (도 5). 각각의 mRNA 트랜스펙션 후 4 h 에, 특정 세포내 mRNA 는 최고 수준으로 측정되었다. 트랜스펙션 후 16 h 내지 20 h 에, *CAMP* mRNA 수준은 4 h 에서의 대략 절반이었으며, 이는 KB 세포에서의 반감기가 12 hr 내지 16 hr 임을 나타낸다 (도 5A). 이와 대조적으로, *S100A8* mRNA 의 동시-트랜스펙션은 12 hr 내지 16 hr 의 mRNA 반감기를 초래했지만, *S100A9* mRNA 의 동시-트랜스펙션은 8 hr 내지 12 hr 의 mRNA 반감기를 초래했다 (도 5B). 직열 mRNA 가 트랜스펙션되었을 때, *A8-IRES-A9* 의 반감기는 12 hr 내지 16 hr 였지만, *A8-nIRES-A9* mRNA 의 반감기는 8 hr 내지 12 hr 였다 (도 6C, 6D). 이들 mRNA 의 반감기는 KB 세포에서 8 hr 내지 16 hr 였다.

[0025] *S100A8 및 S100A9 의 동시-트랜스펙션은 각각의 단백질의 안정성을 증가시킴*

[0026] KB 세포 내로 전달 후에, S100A8 (도 2A), S100A9 (도 2B), 및 칼프로텍틴 (1:1 mol/mol *S100A8* + *S100A9*) (도 2C) 에 대한 ARCA-캡핑된 mRNA 를 단백질 발현에 대해 비교했다. S100A8 단백질 단독의 발현은 16 h 에 최대였고 약 28 h 에 약 절반으로 감소했지만 (도 2A), S100A9 단백질은 16 h 에 최대였고 약 40 h 내지 48 h 에 절반으로 감소했다 (도 2B). 이와 대조적으로, *S100A8* 및 *S100A9* mRNA 의 동시-트랜스펙션 (각각 S100A8 또는 S100A9 중 하나의 트랜스펙션에 비해 절반의 양) 은 각각의 펩티드의 안정성을 증가시키는 것으로 보였다.

예를 들어 S100A8 (도 2A) 와 달리, 각각의 단백질은 시간 경과 전체를 통하여 발현되었다 (도 2C, 2D). S100A8 의 경우, 단백질은 24 h 에 최대였고 약 72 h 에 절반으로 감소했다 (도 2C). S100A8 과 동시-트랜스펙션되었을 때, S100A9 단백질은 또한 24 h 에 최대였고 약 48 h 내지 72 h 에 절반으로 감소했다 (도 2C).

S100A8 및 *S100A9* mRNA 의 동시-트랜스펙션은 각각의 펩티드의 증가된 안정성을 초래했으며 이는 칼프로텍틴 이질이합체 형성이 바람직하다는 것을 시사한다.

[0027] *직열 구축물을 사용하는 S100A8/S100A9 단백질 발현*

[0028] *A8-IRES-A9* mRNA 트랜스펙션 후에, S100A8 단백질 발현은 16 h 에 최대였고 24 h 내지 32 h 에 절반으로 감소했지만 (도 2D), S100A9 단백질 발현은 32 h 에 최대였고 약 48 h 내지 72 h 에 절반으로 감소했다 (도 2D). *A8-nIRES-A9* mRNA 트랜스펙션의 경우, S100A8 단백질의 발현은 16 h 에 최대였고 24 h 내지 32 h 에 절반으로 감소했지만 (도 2E), S100A9 단백질은 40 h 에 최대였고 약 40 h 내지 48 h 에 절반으로 감소했다 (도 2E).

S100A8 이 S100A9 과 동시-발현되었을 때와 같이 (도 2C), 직열 mRNA 구축물의 사용은 *S100A8* mRNA 단독 트랜스펙션 (도 2A) 과 비교할 때 일반적으로 단백질 서브유닛을 안정화시키는 것으로 보였다.

[0029] *CAMP 및 칼프로텍틴의 세포내 제시*

[0030] mRNA 트랜스펙션 후에, 면역형광을 사용하여 KB 세포에서 CAMP 및 칼프로텍틴을 또한 탐지했다. 내생적 CAMP, S100A8, 및 S100A9 단백질 수준은 탐지 한계 또는 그 미만이고, 모의 트랜스펙션의 경우 배경보다 높은 형광이 탐지되지 않았다 (도 6). *EGFP*, *CAMP*, 또는 칼프로텍틴 (*S100A8/S100A9*) 에 대한 mRNA 의 전달 후 16 h 에 유의한 형광이 탐지되었으며, 이는 mRNA 전달이 EGFP, CAMP, 및 칼프로텍틴 단백질 발현을 증가시킨다는 것을 시사한다 (도 6A, 6B, 6C). *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 로 트랜스펙션 후 16 h 에, 유의한 형광이 탐지되지 않았다 (데이타는 제시되지 않음). 그러나, mRNA 트랜스펙션 후 40 h 에, 칼프로텍틴에 대한 형광 신호가 탐지되었다 (도 6C). 이들 결과는 웨스턴 블롯 분석 (도 1B, 도 2D, 2E) 과 일치한다.

[0031] *CAMP 또는 칼프로텍틴 mRNA 트랜스펙션은 세균 침입에 대한 KB 세포의 저항성을 증가시킴*

[0032] 우리는 상피 세포 내로 mRNA 트랜스펙션 후에 생산된 선택된 항균성 단백질이 세균 병원체에 의한 침입에 대한 저항성에 영향을 미쳤는지 여부를 확인했다. 모든 CAMP 및 칼프로텍틴 mRNA 구축물로 트랜스펙션 후에, 리스테리아 및 살모넬라에 의한 침입에 대한 상피 세포의 저항성은 8 h (도 3A), 24 h (도 3B), 및 48 h (도 3C)에 유의하게 증가했다. 저항성은 트랜스펙션 후 8h 에 최고인 것으로 보였다. CAMP 및 S100A8 + S100A9 mRNA 트랜스펙션 책략은 직열 mRNA 구축물보다 저항성을 더욱 효과적으로 증가시키는 것으로 보였다. 그러나, 직열 구축물은 S100A8 + S100A9 보다 더 적은 몰 당량의 S100A8 및 S100A9 mRNA 를 함유했다. 따라서, 직열 구축물은 동시-트랜스펙션만큼 효과적일 수 있다.

[0033] *TransIT-mRNA 전달 시스템은 세포자멸사를 유발하지 않으면서 세포 생활력을 감소시킴.*

[0034] TransIT-mRNA 트랜스펙션 시약에 의해 전달된 이들 mRNA 의 세포치사율을 MTT 검정을 사용하여 세포 생활력을 측정함으로써, 그리고 유세포분석 및 PARP-절단을 통해 세포자멸성 세포를 정량화함으로써 분석했다. 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교할 때, 비히클, *CAMP*, *S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9*, 또는 *A8-nIRES-A9* mRNA 에 의한 세포의 트랜스펙션은 48 hr 및 72 hr 후에 세포 생활력을 유의하게 감소시켰다 (도 4A). 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교할 때, 비히클, *CAMP*, *S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9* 또는 *A8-nIRES-A9* mRNA 의 전달은 세포자멸사에 영향을 미치지 않았다 (도 4B). 각각의 트랜스펙션 후 72 h 에 세포자멸성 세포의 적은 증가는 트랜스펙션되지 않은 세포와 구별할 수 없었다. KB 세포의 세포자멸성 상태의 추가의 분석은 카스파제 활성화의 지표인 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제 (PARP) 절단에 대한 웨스턴 블롯 분석을 사용했다 (Taylor et al., 2008. *Nature Rev. Mol. Cell biol.* 9: 231-241). PARP 절단은 mRNA 트랜스펙션 후 32 h 에 증가되었다 (도 4C). 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교할 때, mRNA 의 전달 후 절단된 PARP 의 패턴은 유사했다 (도 4C).

[0035] 우리는 처음으로 시험관내에서 침입성 병원체에 대한 상피 세포 저항성이 항균성 *CAMP* 및 칼프로텍틴 (*S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9*) 을 인코딩하는 mRNA 를 사용하는 일시적 트랜스펙션에 의해 증가될 수 있다는 것을 보인다. mRNA 카르고를 포함하는 유전자 전달 비히클은 합성 용이성 및 트랜스펙션된 mRNA 의 안정성이 유용한 단백질 산물을 산출하기에 불충분한 것으로 판명될 수 있다는 지속적 우려에도 불구하고 질환 치료를 위한 DNA 전달 비히클에 대한 매력적인 대안으로 보인다 (Tavernier et al., 2011. *J. Control. Release.* 150: 238-47). mRNA 전달은 항원의 모든 에피토프의 동시 발현을 촉진하고, 조작 및 정제가 상당히 간단하다.

[0036] 우리가 점막 또는 표피 표면에 대한 또는 접근가능한 조직 내로의 잠재적 치료제의 개발을 위한 이러한 접근법을 고려할 때, mRNA 전달은 DNA 유전자 전달 기술에 비해 여러 이점을 갖는다. mRNA 는 게놈 내로 통합되지 않고 트랜스펙션은 일시적으로 유지되므로, mRNA 트랜스펙션의 약학적 안전성은 DNA 유전자 전달 요법의 경우보다 더 크다. 점막 면역력을 증가시키는 치료제를 개발하는 것을 목표로, 우리는 처음으로 항균성 단백질을 암호화하는 시험관내 전사된, 캡핑된, 및 폴리아데닐화된 mRNA 의 인간 상피 세포 내로의 전달 및 상응하는 기능적 효과를 보여준다.

[0037] 시험관내 번역에 의해 합성된 mRNA 카르고의 안정성은 항-역 캡 유사체 (ARCA) 에 의한 5' 캡핑을 통해 개선되었고, 단백질 발현은 시스 및 트랜스 폴리(A) 사슬을 사용하여 3' mRNA 캡핑에 의해 증가될 수 있다 (Mockey et al., 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340: 1062-1068). 따라서, 특정 mRNA 수식은 mRNA 의 안정성을 개선한다. 그럼에도 불구하고, 특정 mRNA 카르고, 번역된 단백질의 안정성, 및 표적 세포는 모두 새로운 단백질 발현의 동역학 및 효율에 영향을 미친다.

[0038] 우리의 연구에서, 상이한 mRNA 가 비교되었다. CAMP, S100A8 및 S100A9 단백질은 mRNA 트랜스펙션 후 16 h 에 최고조에 달했다 (도 1B, 2A, 2B). *S100A8/S100A9* mRNA 동시트랜스펙션 후에, S100A8 및 S100A9 단백질은 24 h 에 최고조에 달했고 *S100A8* 또는 *S100A9* mRNA 에 의한 단일 트랜스펙션과 비교할 때 서서히 하락했다 (도 2C). S100A8 및 S100A9 는 자발적으로 이질이합체를 형성하므로 (Hsu et al., 2009. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med.* Chem. 8: 290-305), 동시-트랜스펙션 후의 이합체화는 각각의 서브유닛의 붕괴를 저해하는 것으로 제안되었다.

[0039] S100A8 및 S100A9 의 이질이합체성 복합체인, 칼프로텍틴은 상피 세포의 세포질의 선천 면역을 증가시켜 리스테리아 종 (*Listeria* spp.) 및 살모넬라 종 (*Salmonella* spp.) 을 포함하는 침입 세균에 대항하는 저항성을 증가시켰다. S100A8 및 S100A9 mRNA 둘다의 동시-트랜스펙션은 KB 세포에서 S100A8/A9 의 생산을 유도했다 (도 6C). 칼프로텍틴의 번역을 위한 트랜스펙션 과정을 단순화하기 위해, 우리는 pIRES 를 사용하여 동일한 바

이시스트로닉 mRNA 전사체로부터 2 개의 유전자의 높은 수준 발현을 허용하는 포유류 발현 벡터를 구축했다. 상기 벡터는 2 개의 다클로닝 자리 (MCS A 및 B) 가 측면에 있는 뇌심근염 바이러스 (ECMV) 내부 리보솜 진입 자리 (IRES) 를 함유한다 (Bochkov et al., 2006. *Biotechniques* 41: 283-284, 286, 288). 첫번째 시스트론은 캡-의존적 스캐닝 메카니즘에 의해 번역되지만, 두번째 시스트론은 캡-비의존적 IRES 요소 개시 메카니즘에 의해 번역된다 (Bochkov et al., 2006. *Biotechniques* 41: 283-284, 286, 288). pIRES 는 MCS A 에 비해 MCS B 내로 클로닝된 유전자의 번역 속도를 감소시키는 부분적으로 무력화된 IRES 서열을 함유한다 (Rees et al., 1996. *Biotechniques* 20: 102-110). 단일 트랜스펙션 구축물로부터 칼프로텍틴의 번역을 촉진하기 위해, *S100A8* 및 *S100A9* ORF 를 pIRES 벡터 내로 클로닝하고, 플라스미드를 KB 세포 내로 트랜스펙션했다. pIRES 로 직열로 클로닝된 cDNA 를 사용하여, 칼프로텍틴 (S100A8/S100A9 이합체) 의 형성이 관찰될 수 있다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90). 우리가 pIRES 로 직열 mRNA 를 클로닝했을 때, 칼프로텍틴 이합체가 또한 관찰되었고 (도 6D), 신호는 S100A8 및 S100A9 mRNA 의 동시-트랜스펙션과 유사했다 (도 6C).

[0040] pIRES 로 MCS B 자리 내로 클로닝된 S100A9 mRNA 는 감쇠된 번역을 보일 것으로 예상되었으므로, 우리는 또한 자연 (n, 비-감쇠된) IRES 를 함유하는 벡터를 구축했다. pIRES 및 nIRES 에 의한 칼프로텍틴 단백질 발현은 유사했다 (도 6D, 상부 및 하부; 도 2D, 2E). 동등한 농도의 mRNA 벡터가 세포에 전달되었으므로, 직열 구축물은 S100A8 또는 S100A9 단독보다 더욱 효율적으로 번역하는 것으로 보일 것이나 정량적 비교는 실시될 수 없다. 마찬가지로 CAMP mRNA 트랜스펙션 및 번역은 또한 성공적이었으나 우리는 효율을 칼프로텍틴과 비교할 수 없다. 그러나, 동시-트랜스펙션되었을 때 또는 *A8-IRES-A9* 또는 *A8-nIRES-A9* mRNA 가 전달되었을 때 S100A8 및 S100A9 단백질 발현이 더욱 안정적이었다는 것이 명백하다 (도 2D, 2E). *S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 에 대한 여러 구축물은 번역의 상이한 동역학을 초래했고, pIRES (도 2D) 및 nIRES (도 2E) 에 가까운 MCS B 자리 삽입은 지연을 보였음이 명벽하다. 임의의 특정 이론에 구속되는 것을 바라지 않으며, MCS B 자리 내의 mRNA 는 KB 세포에서 낮은 효율, 캡-비의존적 IRES 메카니즘에 의해 스캐닝되고 번역이 개시될 수 있다.

[0041] 우리의 결과는 KB 세포에서 트랜스펙션 후에 ARCA 캡핑된 *CAMP*, *S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9*, 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 의 반감기가 8 hr 내지 16 hr 이었음을 보여줬다 (도 6A-D). 반감기를 증가시키기 위해, 이들 mRNA 구축물은 2 개의 순차적 인간 베타-글로빈 UTRs 를 포함했다. 이들 트랜스펙션된 mRNA 의 안정성의 차이는 RNA 붕괴 효소 및 RNA 붕괴의 조절과 연관되는 보조 단백질에 의한 인지에 영향을 미칠 수 있는 mRNA 2 차 구조로 인한 것일 수 있다. mRNA 반감기의 차이는 리포솜 전달 후에 세포질 붕괴 및 번역에 격리 또는 노출되는 푸울 (pool) 의 비율을 반영할 수 있지만 (Barreau et al., 2006. *RNA* 12: 1790-1793), 이러한 현상은 우리의 결과를 설명할 수 없다. 우리의 트랜스펙션은 상업적으로 입수가능한 비-리포솜, 양이온성 중합체/지질 제형을 사용했다 (*Trans*IT®-mRNA 트랜스펙션 키트, Mirus Bio LLC, Madison WI). 조기 중단 코돈을 갖는 mRNA 는 전장 메시지의 번역을 방지하고 논센스 (nonsense)-매개 붕괴 경로를 통해 전장 단백질의 생산을 방지할 수 있지만 (Apcher et al., 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 11572-11577), 이러한 메카니즘이 우리의 세포에서 mRNA 반감기 및 단백질 번역의 가변성을 설명할 수 있는지 여부는 불명확하다.

[0042] 아래 더욱 상세히 기재되는 바와 같이, mRNA 는 하나 이상의 수식된 염기를 포함하도록 구축될 수 있다. 그러한 수식된 mRNA 는 증가된 안정성 및/또는 면역 응답에 대한 감소된 잠재력을 나타낼 수 있다 (Kormann et al, 2011, *Nat Biotechnol* 29(2):154-157).

[0043] 궁극적으로, mRNA 트랜스펙션 효율에 대한 시험은 새롭거나 증가된 기능 및 최소 연관된 세포독성 또는 세포자멸사의 유도이다. 우리의 데이타는 CAMP 또는 칼프로텍틴 mRNA 전달이 리스테리아 및 살모넬라에 의한 침입에 대한 상피 세포의 저항성을 유의하게 증가시킬 수 있었음을 보여줬다 (도 3A-3C). 이들 실험을 수행하기 위해, 우리는 TransIT-mRNA 트랜스펙션 시약의 최적 사용에 필요한 세포 포화도 (60-90%) 와, 항생제 보호 검정 (antibiotic protection assay) 의 최적 성능을 위한 40-60% 세포 포화도의 차이를 조화시켰다 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90; Nisapakultorn et al., 2001. *Infect. Immun.* 69: 4242-4247; Nisapakultorn et al., 2001. *Infect.* Immun. 69, 3692-3696). 최적 트랜스펙션 후에 항생제 보호 검정을 수행하기 위해, 세포를 트랜스펙션 후 8 h 및 32 h 에 분할하고, 그 후 세포를 또다른 16 hr 동안 인큐베이션하여 세포 포화도를 세균 침입을 위해 40% 내지 60% 로 조정했다. mRNA 트랜스펙션 후 24 h 및 48 h 에서의 항균 활성은 트랜스펙션 후 8 h 에서의 항균 활성보다 더 낮았다 (도 3A-3C); 시간의 흐름에 따른 세포 분열 (및 계대배양) 은 세포내 CAMP 또는 칼프로텍틴 단백질 수준을 감소시켰다. 그럼에도 불구하고, 잔류 LL-37 및 칼프로텍틴 수준은 트랜스펙션 후 48 h 까지 침입 병원체에 대한 저항성의 통계적으로 유의한 증가를 제공하

기에 충분했다.

[0044] 우리는 임의의 카르고 mRNA 의 mRNA 전달 또는 그들의 번역된 단백질 산물이 세포자멸사를 유도했다는 것을 시사하는 증거를 발견하지 못했다. 비히클 대조군은 mRNA 전달과 유사한 생활력 감소를 보였으므로, 우리는 시간의 흐름에 따른 생활력의 작은 손실이 단백질 발현 보다는 TransIT-mRNA 전달 시스템에 기인했다는 결론을 내렸다. 트랜스펙션되지 않은 세포와 비교했을 때, 항균성 단백질 mRNA (*CAMP*, *S100A8*/*S100A9*, *A8-IRES-A9*, 및 *A8-nIRES-A9*) 전달 및 세포내 단백질 생산은 세포자멸사를 유의하게 유발하지 않았다. 종합해 보면, 데이타는 TransIT-mRNA 전달 시스템이 세포 생활력을 감소시키지만, 세포자멸사를 유발하지는 않는다는 것을 시사한다. 이러한 시약에 의한 생활력의 손실은 생체내에서는 초래될 것으로 여겨지지 않는다. 전신 투여는 면역 세포 활성화를 야기하지 않고 (Karikó et al., 2011. *Nucl.Acids Res.* 39: e142), 이러한 시약은 독성이 덜해 보이고 전기천공보다 더 큰 트랜스펙션 효율을 보인다 (Gonzalez et al., 2007. *J. Virol. Methods.* 145: 14-21). 가장 중요한 것은, 세포자멸사 결과는 비히클 대조군과 유사했으므로 트랜스펙션으로 초래되는 세포 생활력의 손실이 침입 데이타에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다는 점이다 (도 3, 4A). 이들 데이타는 mRNA 전달 시스템이 점막 감염의 치료 또는 통제를 위한 DNA 유전자 요법 접근에 대한 효과적 대용일 수 있다는 것을 보여준다. 점막 감염에서 치료 목적을 위한 이러한 접근법의 사용은 mRNA 안정성을 증가시키고/거나, 면역 활성화를 최소화하고/거나, 더욱 구체적으로 점막 상피 세포를 표적화하는 mRNA 포장 시스템으로 향상될 수 있다.

[0045] 구강 점막 표면 위의 타액의 존재는 치료 목적을 위한 국소 mRNA 트랜스펙션에 장벽일 수 있다. 타액은 고분자량 뮤신 및 입 안의 상피 세포의 표면에서 확산 장벽을 형성할 수 있는 많은 기타 단백질을 함유한다. 또한, 타액은 치료적 mRNA 를 붕괴할 수 있는 RNase 를 함유한다.

[0046] 이러한 가능성을 시험하기 위해, 우리는 시험관내에서 상피 세포를 표적화하는 타액을 첨가하고, EGFP mRNA 로 트랜스펙션을 시도하고, 녹색 형광의 방출에 의해 EGFP 의 번역에 대해 시험했다. 우리는 또한 mRNA 의 뉴클레오티드 조성을 수식하여 그것의 안정성을 증가시키고 잠재적 면역원성을 감소시켰다 (Kormann et al, 2011, *Nat Biotechnol* 29(2):154-157). 상기 수식은 시티딘의 25% 를 메틸시티딘으로, 우리딘의 25% 를 2-티오우리딘으로 대체한다. 아데닌 및 구아노신은 변화되지 않은 채 유지된다.

[0047] 첨가된 타액의 부재시 (0% 타액), 트랜스펙션된 상피 세포는 EGFP 를 생산했다; 트랜스펙션하지 않은 경우 타액의 존재 또는 부재시 녹색 형광이 관찰되지 않았다 (도 15 A-C). 증가하는 시간 (5 분 이하) 동안 증가하는 양의 타액에 의한 세포의 예비처리는 녹색 형광의 생성을 없앴다. 증가하는 반복 빈도 (5 회 이하의 세정)의 신선한 배양 배지에 의한 세포의 세정은 mRNA 트랜스펙션의 녹색 형광 생산 무력을 역전시켰다 (도 16). 세포의 5 회 세정은 성공적 mRNA 트랜스펙션의 회복을 최대화했지만, 효율은 타액의 부재시보다 낮았다.

[0048] 시험관내에서 타액-처리된 상피의 세정은 mRNA 트랜스펙션 접근법의 저해를 역전시켰다. 임상 상황에서, 점막 상피의 세정 및 타액에의 재노출의 방지는 트랜스펙션에 대한 타액 장벽을 극복하고 트랜스펙션 효율을 증가시키는 것을 도울 수 있다. 더욱이, 타액은, 특히 조성 및 점도에 관해, 점막 유체의 대표적 모델이다. 따라서, 도 15 및 도 16 에 제시된 타액 세정 결과는 표면으로부터 점막 유체의 세정에 의한 점막 표면의 예비처리가, 예를 들어, 비뇨생식계, 눈, 또는 기타 편평 점막의 점막 상피와 같은 기타 점막 상피의 형질전환 효율을 증가시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0049] 우리는 또한, 예를 들어, 자궁경부암 및 두경부암과 같은 상피암 내로 직접 접종되는 경우 종양 억제성일 수 있는 2 개의 단백질 (이는 항균성임) 의 복합체를 발현하는 mRNA 트랜스펙션의 사용을 지지하는 데이타를 제시한다 (Khammanivong et al., 2013. *PLoS One* 8:e69395. Doi: 10.1371/journal.pone.0069395). 성장 억제의 상실은 암의 전형적 특징 중 하나이며 (Hanahan and Weinberg, 2011. *Cell* 144: 646-674), 악성 형질전환 및 종양형성에 기여한다. 비정상 세포 주기 조절 및 성장을 초래하는 분자 메카니즘은 상이한 유형의 암에서 각기 다르고, 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC) 에서 여전히 밝히기 힘들다. 칼프로텍틴은 HNSCC 및 기타 편평 세포 암종 (SCC) 에서 성장 조절 및 종양형성에 관여할 수 있다. S100A8/A9 는 구강 및 구강인두부의 건강한 편평 상피 세포의 세포질에서 본질적으로 발현된다 (Ross et al., 2001. *Infect Immun* 69: 3248-3254; Hitomi et al., 1998. *Arch Histol Cytol* 61: 163-178). 염색체 유전자좌 1q21 상의 인간 상피 분화 복합체를 지도화하는 코딩 영역에 의해 인코딩되는, S100A8 및 S100A9 는 세포 분화, 세포 주기 진행 및 성장의 칼슘-의존적 제어에 관여하는 2 개의 정준 (canonical) EF-핸드 칼슘-결합 모티브를 함유하는 단백질의 S100 패밀리의 일원이고 (Itou et al., 2002. *J Mol Biol* 316: 265-276), 암 발달 및 기타 염증성 질환에 연루된다. 암에서, 전형적으로 침투하는 다형핵 백혈구 및 마크로파지의 세포질로부터 방출되는 (Hessian et al., 2001.

EurJ Biochem 268: 353-363; Hsu et al., 2009. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 8: 290-305), 세포외 S100A8/A9 는 염증 및 질환의 진행과 연관된다 (Gebhardt et al., 2002. *Oncogene* 21: 4266-4276). 방출되었을 때, S100A8/A9 는 최종 당화 산물에 대한 수용체 (RAGE) 및/또는 톨-유사 수용체 4 (toll-like receptor 4) (TLR4) 를 통해 신호전달하여 종양-연관 염증 및 진행 단계 선암종 및 대장염-연관 암의 진행을 촉진할 수 있다 (Hermani et al., 2006. *Exp Cell Res* 312: 184-197; Gebhardt et al., 2006. *Biochem Pharmacol* 72: 1622-1631; Ehrchen et al., 2009. *J Leukoc Biol* 86: 557-566; Turovskayaet al., 2008. *Carcinogenesis* 29: 2035-2043). 그러나, S100A8/A9 의 세포내 역할 및 상기 단백질 복합체가 암 세포에서 기능을 조절하는 방법에 대해서는 거의 알려진 것이 없다.

[0050] 세포내 S100A8/A9 의 발현은 세포- 및 조직-특이적으로 보이고, 상이한 악성종양에서 차별적으로 조절될 수 있다. S100A8/A9 수준은 정상적으로 상기 단백질을 발현하지 않는 조직, 예컨대 피부 (Gebhardt et al., 2002. *Oncogene* 21: 4266-4276), 유방 (Arai et al., 2008. *CurrCancer Drug Targets* 8: 243-252; Moon et al., 2008. *Mol Cancer Res* 6: 1544-1553), 갑상선 (Ito et al., 2009. *Anticancer Res* 29: 4157-4161), 간 (Nemeth et al., 2009. *Hepatology* 50: 1251-1262), 위점막 (Yong et al., 2007. *Arch Pharm Res* 30: 75-81), 전립선 (Hermani et al., 2006. *Exp Cell Res* 312: 184-197), 난소 (Odegaard et al., 2008. *Am J Obstet Gynecol* 198: 418 e411-417), 방광 (Yao et al., 2007. *Anticancer Res* 27: 3051-3058) 및 폐 (Arai et al., 2001. *Oncol Rep* 8: 591-596) 에서 기원하는 인간 1 차 종양에서 비정상적으로 상승될 수 있다. 이들 조직에서, 증가된 S100A8/A9 수준이 종양형성에 대한 응답인지 또는 실제로 종양 발달 및 진행을 추진하는지 여부는 불명확하다. 이와 대조적으로, S100A8/A9 발현은 정상적으로 상기 단백질 복합체를 본질적으로 발현하는 편평 상피 세포 기원의 인간 종양, 예컨대 두경부 (구강, 비인두 및 구강인두를 포함함) (Melle et al., 2004. *Cancer Res* 64: 4099-4104; Gonzalez et al., 2003. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 754-759; Funget al., 2000. *Life Sci* 67: 923-936), 식도 (Kong et al., 2004. *World J Gastroenterol* 10: 1093-1097; Wang et al., 2004. *Cell Res* 14: 46-53) 및 자궁경부 (Tugizov et al., 2005. *J Virol* 79: 1099-1112; Coleman et al., 1994. *HumPathol* 25: 73-79) SCC 에서 감소할 수 있다. 이들 편평 상피 암에서, 감소된 S100A8/A9 는 분화의 상실 및 성장 및 침윤성의 증가와 상호연관된다. 반대로, S100A8/A9-발현 SCC 는 덜 공격적으로 보인다. 그러므로, 우리는 S100A8/A9 가 SCC 에서 성장 조절 인자로서 기능하는지 여부를 확인하려고 시도했다.

[0051] S100A8/A9-음성 암종 세포에서 구조 (rescue) 에 의해 S100A8/A9 의 조절 역할을 시험하기 위해, 우리는 KB 세포를 S100A8/A9 단백질 복합체를 발현하도록 안정적으로 트랜스펙션했다. KB 세포에서 S100A8/A9 의 안정적 발현은 S100A8/A9-의존적 G2/M 세포 주기 정지를 초래했고, 연한천에서 부착-비의존적 성장 및 콜로니 형성을 감소시켰다. S100A8/A9 수준 감소의 효과를 확인하기 위해, S100A8 및 S100A9 를 TR146 세포에서 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 를 하용하여 침묵 (silence) 시켰다. TR146 세포에서, S100A8 및 S100A9 발현의 침묵은 성장 및 클론원성 (clonogenicity) 에 대한 억제 효과를 역전시키고 G2/M 체크포인트 제어의 상실과 연관되는 것으로 보인다. G1/S 및 G2/M 세포 주기 체크포인트 둘다가 암종에서 이상조절되어, 제어되지 않는 세포 성장 및 증식을 초래한다. KB 세포에서 S100A8/A9 에 의한 성장 조절은 G1, G1/S 체크포인트 또는 S 기를 통하는 것으로 밝혀지지 않았다. 그 대신, S100A8/A9 발현은, 명백히 G2/M 체크포인트 신호전달의 조정 및 회복 및 암종 성장의 감소에 관여하는 것으로 보이는 단백질-단백질 상호작용을 통해, 단백질 포스파타제 2A (PP2A) 활성을 증가시킨다.

[0052] PP2A 는 G2/M-특이적 Cdc25C 를 표적화하여 Thr48 에서의 탈인산화에 의해 불활성시켜 유사분열 퇴장, 및 세포 분열을 저해함으로써 세포 주기 체크포인트를 조절하는 것으로 알려진 세린 및 트레오닌 (Ser/Thr) 단백질 포스파타제이다 (Forester et al., 2007. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19867-19872; Margolis et al., 2006. *Cell* 127: 759-773). PP2A 는 광범위한 인단백질을 표적화하고, 또한 세포 생존 및 증식 경로에서 AKT 및 C-MYC 를 저해함으로써 그리고 세포 주기 정지를 유도함으로써 항-종양 활성을 발휘하는 것으로 밝혀졌다 (Guenin et al., 2008. *Int J Oncol* 32: 49-57). S100A8/A9 [B30] 와 상호작용할 때, PP2A 는 활성화되어 G2/M 체크포인트에서 세포 주기 진행의 조절 역할을 발휘할 수 있다. 그러므로 S100A8/A9 및 PP2A 는 상호작용 상대로서 기능하여 유사분열을 조절하고 세포 성장을 제어할 수 있다. 암종 (예를 들어 HNSSC) 에서 S100A8/A9 의 감소는 감소된 PP2A 포스파타제 활성 및 증가된 성장 및 종양형성을 초래할 수 있다.

[0053] *정상 및 SCC 샘플에서 qRT-PCR 에 의한 S100A8 및 S100A9 유전자 발현*

[0054] S100A8/A9 단백질 발현은 HNSCC 에서 감소된다 (Driemel et al., 2007. *Proteomics Clin Appl* 1: 486-493; Roesch et al., 2005. *EurJ Cell Biol* 84: 431-444). 우리는 실시간 정량적 역-전사 폴리머라제 연쇄 반응

(qRT-PCR) 을 사용하여 부합하는 (matching) HNSCC 및 정상 인접 (NAT) 조직에서 *S100A8 및 S100A9* 서브유닛 유전자의 발현을 비교했다. 발현 분석을 내부 및 총 RNA 로딩 대조군으로서의 GAPDH 항존 (housekeeping) 유전자로 정규화했다. HNSCC 및 NAT 조직으로부터의 총 RNA 를 3 명의 상이한 단계 II, III 및 IVA 종양 환자로부터 별도로 모으고 차별적 mRNA 발현에 대해 분석했다. qRT-PCR 을 사용하여, 우리는 S100A8 및 S100A9 발현이 HNSCC 에서 정상 조직 대조군으로서의 NAT 에서보다 대략 10-배 더 낮았음을 발견했다 (도 7A).

[0055] 우리는 또한 마이크로어레이 유전자 발현 프로파일링을 사용하여 HNSCC 의 35 개 이상의 임상 사례 및 11 개의 건강한 구강 점막 샘플에서 S100A8 및 S100A9 발현의 수준을 연구했고, 이들 단백질의 발현이 또한 정상 대조군 조직에 비해 하락했음을 발견했다 (데이타가 공개되지 않음). TR146 및 KB-S100A8/A9 세포에서 S100A8 및 S100A9 의 발현은 S100A8/A9-음성 KB 및 KB-EGFP 세포에서보다 대략 1- 내지 2-로그 (log)-배 더 컸다 (도 7B; 점선은 탐지 역치로서 제시됨). KB-S100A8/A9 세포는 S100A8/A9 를 과발현하도록 트랜스펙션된 S100A8/A9-음성 KB 세포이지만, KB-EGFP 세포는 모의-트랜스펙션된 대조군이다. KB 야생형 및 모의-트랜스펙션된 KB-EGFP 세포에서, S100A8 및 S100A9 mRNA 및 단백질 발현은 탐지하기 어려웠지만, 트랜스펙션된 KBS100A8/A9 및 TR146 세포는 명백히 S100A8 및 S100A9 단백질 발현을 보였다 (도 7C, 7D). TR146 세포의 S100A8-특이적 및 S100A9-특이적 안정적 shRNA 트랜스펙션은 내생적 S100A8 및 S100A9 단백질을 탐지하기 어려운 수준으로 감소시켰다 (도 7D). S100A8 및 S100A9 단백질 수준은 면역블롯팅에 의해 보여지는 바와 같이 상이해 보인다 (도 7C, 7D). 그러한 차이는 실제이거나 사용된 1 차 항체의 민감도의 차이를 반영하는 것일 수 있다. 따라서, S100A8 및 S100A9 의 수준은 서로 직접 비교될 수 없었다.

[0056] *S100A8/A9 에 의해 억제되는 암종 세포의 부착-의존적 및 -비의존적 성장*

[0057] S100A8/A9 의 세포 성장 조절 능력을 트랜스펙션된 KB-S100A8/A9 세포에서 표준 비-발열성 폴리스티렌 조직 배양 플라스크에서 부착-의존적 (부착성) 성장 조건으로 및 연한천에서 부착-비의존적 성장 조건으로 시험했다. 고도 악성 세포는 생존하고, 콜로니를 형성하고, 부착 비의존적으로 증식할 수 있고, 일상적으로 연한천에서 시험된다. KB 야생형 또는 KB-EGFP 세포와 비교될 때, KBS100A8/A9 세포는 시험관내에서 대략 2-배 더 낮은 부착-의존적 성장을 보였다 (도 8A). 절단된 카스파제 1 및 절단된 카스파제 3 은 모두 면역블롯에 의해 탐지가능하지 않았으므로 S100A8/A9 의 이소성 발현은 표준 부착 조건 하에 성장될 때 KB-S100A8/A9 세포에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 보이지 않았지만, KB 야생형, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포는 유사한 총 카스파제 1 및 카스파제 3 수준을 보였다 (데이타는 제시되지 않음). 연한천에서 부착-비의존적 성장 동안, KB-S100A8/A9 세포는 불량하게 성장하여, KB 및 KB-EGFP 세포보다 더 작고 더 적은 콜로니를 형성했다 (도 8B). 세포 성장에 대한 S100A8/A9 의 효과를 확인하기 위해, TR146-shRNA-S100A8/A9KD 세포에서 내생적 S100A8/A9 발현의 녹다운은 녹다운-음성 대조군 세포 (TR146-shRNA-대조군) 에 비해 증가된 부착-의존적 (도 8C) 및 부착-비의존적 (도 8D) 성장을 보여줬다.

[0058] *S100A8/A9 는 G2/M 세포 주기 체크포인트 정지를 유도함*

[0059] S100A8/A9 가 세포 주기를 조절함으로써 암종 세포 성장을 억제했는지 여부를 확인하기 위해, 우리는 S100A8/A9-발현 및 비-발현 KB 세포에서 세포 주기 분석을 수행했다. 암종과 같이 신속하게 분열하는 세포는 정상 세포보다 더 높은 속도로 세포 주기를 통하여 진행한다. DNA 함량의 세포 변화는 프로피디움 아이오다이드 (PI)-염색에 의해 시간의 흐름에 따라 측정될 수 있다. 세포 주기 진행의 차이를 확인하기 위해, 암종 세포를 혈청 기아에 뒤이어 정상 성장 배지에서 12 hr 동안 아피디콜린 처리에 의해 G1/S 기에서 동기화했다. 아피디콜린-유도 G1/S 차단으로부터의 해방 후에, KB 야생형, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포는 DNA 의 PI-염색에 의해 확인되는 바와 같이 대략 동일한 속도로 G1/S 기를 통하여 진행하고 G2/M 기에 진입했다 (도 9A, 9C). KB 및 KB-EGFP 세포는 동기화후 11 h 까지 G2/M 기를 퇴장하고 G2/M 세포 집단은 13 h 까지 배경 수준으로 복귀했다. 그러나, KB-S100A8/A9 세포는 G2/M 기에서 적어도 3 hr 동안 정지하는 것으로 보인다. 이들 관찰과 일관되게, KB-S100A8/A9 세포는 동기화후 9 h 에 더 적은 유사분열 세포를 보였고, KB-EGFP 세포보다 더 오래 중기에서 머물렀다 (도 9B, 9D).

[0060] *S100A8/A9 는 G2/M 신호전달 경로를 조정함*

[0061] S100A8/A9 가 G2/M 체크포인트를 조절하는지 여부를 확인하기 위해, 우리는 면역블롯팅에 의해 G1/S 및 G2/M 세포 주기 체크포인트 조절인자의 단백질 발현 및 활성화 상태를 시험했다. KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포는 유사한 수준의 세포 주기 조절인자 사이클린 A, 사이클린 E, p21, Rb, Chk2, 및 Cdc25B 를 발현했으며 (도 10A), 이는 G1/S 체크포인트가 S100A8/A9 발현에 의해 영향을 받지 않았다는 것을 시사한다. 유사분열 내로 진입 동안 사이클린-의존적 키나제 1 (Cdc2) 활성에 요구되는 G2/M 체크포인트 조절인자인 사이클린 B1 은

(Soni et al., 2008. *Cell Cycle* 7: 1285-1300), KB-S100A8/A9 에서 KB 및 KB-EGFP 세포에서보다 더 낮은 mRNA (데이타는 제시되지 않음) 및 단백질 (도 10B) 수준을 보였다. 더욱 유의하게, S100A8/A9 발현은 KB-S100A8/A9 에서 G2/M-연관 체크포인트 키나제 p-Chk1 (Ser345), 포스파타제 p-Cdc25C (Ser216) 및 p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 의 인산화를 증가시켰으나, 이들 단백질의 발현 수준을 변경하지는 않았다 (도 10B). S100A8/A9 는 또한 유사분열 활성 형태의 p-Cdc25C (Thr48) 를 감소시켰다 (도 10B). KB-S100A8/A9 세포에서, 우리는 Cdc25C 와 14-3-3β 의 더 큰 동시-면역침전을 발견했으며 (도 10C), 이는 Cdc25C 와 14-3-3β 사이의 증가된 상호작용을 시사한다. 총 14-3-3β 단백질 발현은 S100A8/A9 발현에 의해 영향을 받지 않았다.

TR146-shRNA-S100A8/A9KD 세포에서 S100A8/A9 의 녹다운은 p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 인산화를 감소시켰다 (도 10D). 종합해 보면, 우리의 결과는 S100A8/A9 가 G2/M 체크포인트 지연의 유지와 일치하게 정준 G2/M 신호 전달 경로를 조정하는 것을 시사한다.

[0062] *S100A8/A9 는 PP2A 포스파타제와 상호작용하고 활성을 증가시킴*

[0063] S100A8/A9 와 직접 상호작용할 수 있는 후보 세포 주기 조절인자를 식별하기 위해, 공지되고 예측되는 단백질-단백질 상호작용 상대의 엄선된 데이타베이스 (Ingenuity Pathway Analysis, Genedata Inc., San Francisco, CA) 를 조사했다. 우리는 S100A8/A9 가 공지된 세포 주기 조절인자인 단백질 포스파타제 2A (PP2A) 의 활성의 조정인자 및 결합 상대일 수 있다는 것을 발견했다. PP2A 는 3 개의 서브유닛 (구조 단백질 서브유닛 A, 조절 서브유닛 B, 및 촉매 서브유닛 C) 을 갖는 이질삼합체성 전효소이다. PP2A-C 촉매 활성은 Tyr307 에서의 인산화에 의해 음성적으로 조절되고, C-말단 Leu309 메틸화는 전체적 포스파타제 활성에 본질적이다. PP2A-B 56δ 동형 (isoform) 은 Cdc25C 및 G2/M 세포 주기 체크포인트 활성을 제어하는 것으로 보고되었다 (Guenin et al., 2008. *Int J Oncol* 32: 49-57; Perrotti et al., 2008. *Cancer Metastasis Rev* 27: 159-168). PP2A 에 대한 S100A8/A9 결합은 S100A8/A9 복합체 또는 PP2A 에 대항하는 항체를 사용하여 동시-면역침전 검정에 의해 확인되었다. PP2A 는 27E10 항체 (S100A8/A9 복합체에 특이적임) 로 포획되었을 때 S100A8/A9 와 동시-면역침전되었다 (도 11A). 상호작용은 또한 PP2A-Aα/β 항체로 포획되었을 때 S100A9 (S100A8/A9 복합체에 대한 마커로서 사용됨) 의 탐지에 의해 확인되었다. KB-S100A8/A9 세포에서의 S100A8/A9 발현은 면역블롯팅 분석에 의한 PP2A 서브유닛 단백질 수준 (서브유닛 Aα/β, B56δ 및 Cα/β) 에 영향을 미치지 않았다; 그러나, 서브유닛 Cα/β (Tyr307) 의 인산화는 감소된 것으로 보였다 (도 11B). C-말단 메틸화는 S100A8/A9 발현에 의해 영향을 받지 않는 것으로 보였으며, 이는 항-메틸화된-PP2A-C (Leu309) 항체에 의해 확인된다.

[0064] PP2A 포스파타제 활성을 확인하기 위해, PP2A-C 촉매 서브유닛에 대항하는 항체를 사용하여 S100A8/A9 발현이 존재 또는 부재하는 세포 용해물로부터의 전효소를 면역침전시켰다. 그 후 포스포펩티드 기질로부터 무기 인산 (Pi) 방출의 수준을 측정함으로써 면역침전된 PP2A 의 포스파타제 활성을 확인했다. 동기화후 7 hr 이하 동안, PP2A 포스파타제 활성은 S100A8/A9 의 존재시에 S100A8/A9 의 부재 (KB-EGFP 세포) 시에 비해 대략 5-배 더 컸으며, 동기화후 12 h 에 7-배 만큼 감소했다. 포스파타제 활성을 S100A8/A9 (27E10 항체) 와 동시-면역침전된 탐지가능한 PP2A-Aα/β 수준으로 정규화했다 (도 11C). 그러므로, KB 세포에서 PP2A 활성의 S100A8/A9-의존적 조정은 세포 주기의 시기에 좌우되는 것으로 보인다. KB-EGFP 로부터의 세포 용해물을 1 ㎍ 의 정제된 S100A8/A9 와 예비인큐베이션했을 때 PP2A 활성의 유사한 변화가 또한 관찰되었다 (데이타는 제시되지 않음). PP2A 저해인자, 오카다산 (OA) 으로 처리된 KB-S100A8/A9 세포는 KB 및 KB-EGFP 세포와 유사한 수준의 p-Cdc25C (Ser216) 를 보였으며, 이는 p-Cdc25C (Ser216) 인산화의 S100A8/A9-매개 증가가 저해되었다는 것을 시사한다 (도 11D).

[0065] 따라서, 단백질의 S100 패밀리의 일원으로서, 복합체 (S100A8/A9, 또는 칼프로텍틴) 내의 S100A8 및 S100A9 는 세포 주기 진행에서 조절 역할을 하는 것으로 여겨진다. 이 연구에서, 우리는 S100A8/A9 가 G2/M 세포 주기 정지를 유도함으로써 KB 세포 및 TR146 인간 암종 세포에서 세포 분열 및 성장의 음성 조절인자로서 기능한다는 것을 발견했다. KB 세포를 기능 획득 (gain-of-function) 연구를 위한 시험관내 모델로서 사용했으며, 이는 이러한 암종 세포주는 mRNA 및 단백질 수준 둘다에서 S100A8 및 S100A9 의 발현을 결여하기 때문이다. TR146 는 이용가능한 다른 세포주에 비해 S100A8/A9 발현이 탐지가능한 더욱 분화된 HNSCC 세포주이다. S100A8 대 S100A9 의 비율은 TR146 및 KB-S100A8/A9 세포에서 비교될 수 없으나, G2/M 체크포인트의 제어에서의 귀속 역할은 동일해 보인다. 따라서, 개별 서브유닛이 상기 세포주에서 과잉량으로 존재하는 경우, 그러한 불일치는 S100A8/A9 의 알려진 세포내 기능을 설명하지 않는다. 우리의 현재의 발견으로부터, S100A8/A9 의 감소된 수준 및 결과적인 기능 손실은 그러므로 SCC 에서 성장을 조절해제 (de-regulate) 하고 발암작용에 기여할 수 있었다. 염증성 또는 과증식성 구강 병변 및 HNSCC 조직에서, S100A8/A9 복합체는 정상 점막에

비해 mRNA 및 단백질 수준 둘다에서 현저히 하향-조절된다 (S100A8/A9 는 일반적으로 편평 암종 세포에서 탐지 가능하지 않음). 더욱이, 우리는 HNSCC 가 NAT 보다 대략 10-배 더 낮은 S100A8 및 S100A9 유전자 발현을 보인다는 것을 발견했다. NAT 에서의 S100A8/A9 수준은 구역 암화 (field cancerization) 를 반영할 수 있다. 암이 없는 개체의 점막 조직에서의 S100A8/A9 유전자 발현은 훨씬 클 수 있지만, 감소된 S100A8/A9 발현 수준은 발암작용과 명백히 연관된다.

[0066] HNSCC 에서 S100A8/A9 의 이상조절이 암 표현형의 원인 또는 효과인지 여부를 확인하기 위해, 우리는 세포 주기 조절에서의 역할을 확인하려고 시도했다. S100A8/A9 단백질은 세포질에서 발견되고, 세포 성장 상태에 따라 핵 (The HumanProtein Atlas 데이타베이스, www.proteinatlas.org 에서 접근가능) 또는 핵주위 영역 (Champaiboon et al., 2009. *J Biol Chem* 284: 7078-7090) 에서 국소화하는 것으로 보인다. 세포 분열 동안 및 G2/M 체크포인트를 제어할 때, S100A8/A9 는 유사분열 방추체의 극에서 미세소관 형성 중심으로 국소화한다. G2/M 체크포인트는 체크포인트 키나제 Chk1/2 의 제어 하에 있다 (Agarwal et al., 2003. *Oncogene* 22: 8271-8282; Taylor et al., 2001. *Oncogene* 20: 1803-1815). Chk1/2 는 사이클린 B/사이클린-의존적 키나제 1 (CDK1, 또한 Cdc2 로도 알려짐) 복합체의 활성화 및 유사분열 내로의 진입에 요구되는 단백질 포스파타제 Cdc25 를 불활성화시킨다 (Agarwal et al., 2003. *Oncogene* 22: 8271-8282; Taylor et al., 2001. *Oncogene* 20: 1803-1815). S100A8/A9 의 존재시, 우리는 p-Chk1 (Ser345) 의 활성화 인산화의 수준이 증가되었음을 발견했다. 유사하게, p-Cdc25C (Ser216) 및 p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 의 저해성 인산화가 상승되었다. G2/M-특이적 키나제 p-Chk1 의 Ser345-과인산화는 p-Chk1 (Ser345) 이 S100A8/A9 에 의해 아직 알려지지 않은 메카니즘을 통해 활성화될 가능성이 있음을 시사한다 (Shiromizu et al., 2006. *Genes Cells* 11: 477-485). 동시-면역침전에 의해 S100A8/A9 와 Chk1 사이의 단백질-단백질 상호작용을 확인하려는 시도는 성공적이지 않았다 (데이타는 제시되지 않음). 정준 G2/M 체크포인트 신호전달 경로에서, 활성화된 p-Chk1 (Ser345) 은 Ser216 에서 G2/M-특이적 포스파타제 Cdc25C 를 인산화하고 분자 샤페론 14-3-3β 에 대한 그것의 결합을 촉진한다 (Peng et al., 1997. *Science* 277: 1501-1505; Peng et al., 1998. *Cell Growth Differ* 9: 197-208) (도 12 참조). 14-3-3β 에 대한 결합은 p-Cdc25C (Ser216) 를 불활성화시키고 시토졸 축적을 촉진한다 (Graves et al., 2001. *Oncogene* 20: 1839-1851). 대안적으로, 활성 p-Cdc25C (Thr48) 는 p-Cdc2 의 저해성 잔기 Thr14 및 Tyr15 를 탈인산화시키고 Cdc2/사이클린 B1 복합체를 활성화시켜, 유사분열 내로의 진입을 초래한다 (Ozen et al., 2005. *Clin Cancer Res* 11: 4701-4706). KB-S100A8/A9 세포에서 S100A8/A9 발현은 저해성 p-Cdc25C (Ser216), Cdc25C/14-3-3β 복합체, 및 p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 의 수준의 현저한 증가를 유도했다. 유사분열 활성 p-Cdc25C (Thr48) 및 사이클린 B1 의 수준은 S100A8/A9 의 존재시에 크게 감소되었다. 이들 결과는 Cdc25C 의 불활성화 및 유사분열 정지를 초래하는 G2/M DNA 손상 체크포인트의 S100A8/A9-의존적 활성화를 시사한다.

[0067] G2/M 세포 주기 진행을 음성 조절하는 Cdc25C 및 사이클린 B1/Cdc2 복합체의 S100A8/A9-유도 불활성화는 암종 성장을 감소시키는 것으로 시사되고 종양 형성을 저해할 수 있다. 실제로, S100A8/A9-발현 KB-S100A8/A9 및 TR146 세포는 둘다 S100A8/A9-음성 또는 S100A8/A9-녹다운 세포와 비교할 때 성장 및 클론원성의 유의한 감소를 보였다. KB-S100A8/A9 세포는 NAT 로 표시되는 정상 조직보다 S100A8 및 S100A9 를 덜 발현했지만 (세포내 대조군으로서의 GAPDH 항존 유전자에 상대적으로), 이소성 발현은 실질적 성장 억제를 야기했다. TR146 세포에서 S100A8/A9 의 녹다운은 연한천에서의 성장 및 콜로니 형성에서 현저한 증가를 초래했으므로, 그러므로, 우리의 데이타는 암종 세포 성장 및 클론원성에 대한 S100A8/A9 의 농도-의존적 효과를 강하게 시사한다. 조직 내 S100A8/A9 발현의 추가의 손실은 HNSCC 에서 종양 성장 및 악성 형질전환을 가속시킬 것으로 예상될 것이다.

[0068] G1/S 및 G2/M 체크포인트 둘다의 손실이 암종에서의 증가된 성장 및 증식에 요구되지만, G2/M 체크포인트의 S100A8/A9-의존적 유도는 KB 세포의 유사분열 활성 및 성장의 억제에 유의하게 기여했다. S100A8/A9 의 발현은 KB-S100A8/A9 세포가 G2/M 에서 정지하고 축적하는 것을 야기하여, G1/S-에서-G2/M 으로의 이행 속도에 영향을 미치지 않으면서 유사분열 내로의 진행을 저해했다. 전체적으로, S100A8/A9 의 이러한 성장 저해 효과는 S100A8/A9 의 이소성 일시적 발현이 세포 분열 및 증식을 억제했던 표피 각질세포에서의 보고와 일치한다 (Voss et al., 2011. *FEBS Lett* 585: 440-446). 우리의 실험에서, *S100A8* 및 *S100A9* 유전자의 서열 분석은 정준 분비에 요구되는 상류 신호 펩티드를 보이지 않으므로 암종 성장에 대한 효과는 세포외 S100A8/A9 단백질에 기인하지 않을 수 있다. 게다가, 우리의 기술로는, TR146 또는 트랜스펙션된 KB 로부터의 세포외 S100A8/A9 는 탐지가능한 수준 미만이었으며, 이는 특이적 ELISA 를 사용하여 확인되었다 (데이타는 제시되지 않음). 따라서, 연구되는 S100A8/A9 는 시토졸 단백질 복합체이고, 정상 성장 조건 하에 상피에 의해 세포외 공간 내로 분비될 것 같지 않다. S100A8/A9 발현은 또한 G1/S-연관 하류 조절인자 단백질의 수준에 명백

한 효과를 갖지 않았고, G1/S 및 S 기의 S100A8/A9-양성 및 -음성 세포의 백분율은 동기화로부터의 해방 후에 유사했다. G1/S 에서의 결함은 엄격히 배제되지 않았지만, 세포 주기의 S100A8/A9-매개 조절은 G2/M 에 영향을 미치는 것으로 강하게 시사되었다.

[0069] 우리는 이제 S100A8/A9 가 Cdc25C 의 불활성화 및 G2/M 세포 주기 정지의 유도를 신호 (signal) 하는 방식을 설명하는 첫번째 기제 통찰을 보고한다. 유사분열 p-Cdc25C (Thr48) 인단백질의 감소는 Ser/Thr 단백질 포스파타제 2A (PP2A) 에 의한 탈인산화를 통해 신호되는 것 같다. PP2A 는 p-Cdc25C (Thr48) 를 표적화 및 탈인산화시켜 세포 주기 정지를 유도하는 것으로 보고되었으며 (Forester et al., 2007. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19867-19872; Margolis et al., 2006. *Cell* 127: 759-773; Gueninet al., 2008. *Int J Oncol* 32: 49-57), 위에 기재된 바와 같이 불활성화 및 핵 외수송을 위해 Cdc25C 가 p-Chk1 (Ser345) 에 의해 Ser216 에서 인산화되는 것을 허용한다.

[0070] PP2A-Cα/β 서브유닛은 PP2A 의 효소 활성 자리이고, 그것의 포스파타제 활성은 Tyr307 에서의 인산화 및 Leu309 에서의 메틸화에 의해 제어되며, 이는 또한 전효소 조립에 본질적이다. KB-S100A8/A9 세포에서, S100A8/A9 의 발현은 PP2A-Aα/β, PP2A-B56δ (Cdc25C 의 표적화를 신호하는 것으로 알려진 조절 서브유닛) 또는 PP2A-Cα/β 서브유닛의 단백질 수준에 영향을 미치지 않았다. PP2A-C (메틸-PP2A-C) 서브유닛의 Leu309 메틸화 수준이 또한 KB-S100A8/A9, KB-EGFP 및 야생형 대조군 세포에서 유사했다. 이들 데이타는 S100A8/A9 가 KB 세포에서 PP2A 발현 또는 전효소 조립에 대한 조절 효과를 갖지 않는다는 것을 시사한다. 그러나, PP2A-C 의 Tyr307 저해성 잔기의 인산화 수준은 KB-S100A8/A9 세포에서 감소되었으며, 이는 효소의 증가된 포스파타제 활성을 시사한다.

[0071] S100A8/A9 발현은 KB-S100A8/A9-트랜스펙션된 세포에서 예비-유사분열 PP2A 포스파타제 활성을 증가시켰다. 정제된 S100A8/A9 단백질을 KB-EGFP 세포 용해물 (S100A8/A9 를 결여함) 과 함께 예비인큐베이션했을 때, PP2A 활성이 유사하게 조정되었다. 따라서, S100A8/A9 는 PP2A 의 탈인산화 및 활성화의 증가를 직접 신호하는 것으로 보인다. 유사분열후 PP2A 포스파타제 활성은 S100A8/A9 발현에 의해 현저히 억제되었으며, 이는 S100A8/A9 에 의한 2 상, 세포 주기-의존적 조절을 시사한다. PP2A 포스파타제 활성은 동기화후 t= 0 h 에 현저히 상승되었다. t = 0 에서의 수준은 G1/S 동안의 활성을 반영할 수 있다. PP2A 는 또한 G2/M 체크포인트 신호전달 경로에 독립적으로, G1/S 세포 주기 정지에서 역할을 수행한다 (Pitre et al., 2012. *Mol Biol Cell* 23: 1243-1253; Hofstetter et al., 2012. *PLoS One* 7: e30059). t = 0 에 관찰된 PP2A 포스파타제 활성의 증가는 세포를 G1/S 에서 동기화시키는데 사용된 아피디콜린에 의한 일시적 G1/S 차단으로 인한 것 같다. S100A8/A9 가 G1 → S 세포 주기 진행을 변경하지 않았지만, G1/S 의 S100A8/A9-비의존적 저해 (이 경우에 아피디콜린에 의해 약리학적으로) 는 PP2A 활성화를 신호할 수 있었다. 가장 중요한 점은, G1/S 에서의 PP2A 포스파타제 활성이 KB-S100A8/A9 세포에서의 S100A8/A9 발현에 의존적이거나 그에 의해 증강된 점이며, 이는 우리의 장래의 연구에서 추가로 조사될 것이다. 흥미롭게도, 동시-면역침전 실험에 근거하여 PP2A 및 S100A8/A9 는 직접 상호작용하는 것으로 보였으며, 이는 S100A8/A9 단백질 복합체에 의한 PP2A 활성화의 가능한 메카니즘을 시사한다.

[0072] Cdc25C 의 S100A8/A9-유도 불활성화가 PP2A 활성에 의존적이었다는 추가의 증거를 제공하기 위해, PP2A 활성을 특이적으로 저해하는 오카다산 처리는 발현된 S100A8/A9 의 존재 하에 p-Cdc25C (Ser216) 인산화를 감소시키는 것으로 밝혀졌다. Ser216 인산화 (Chk1 에 의한) 를 통한 Cdc25C 의 불활성화가 PP2A 에 대한 공지된 기질인 Thr48 에서 Cdc25C 의 탈인산화를 요구하므로 이러한 발견은 문헌과 일치한다 (Zhou et al., 2000. *Mol Cell* 6: 873-883). 그러므로, 오카다산 처리는 저해성 p-Cdc25C (Ser216) 의 S100A8/A9-유도 PP2A의존적 인산화를 저해했다. 그러므로, 정상 성장 조건 하에, S100A8/A9 는 G2/M 체크포인트의 PP2A 재활성화 및 세포 주기 지연을 매개한다.

[0073] 이 연구에서 밝혀진 p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 의 과인산화 및 사이클린 B1 의 발현의 S100A8/A9-의존적 감소는 또한 암종에서 흔히 보고되는 Cdc2 불활성화 및 G2/M 체크포인트 정지와 일치한다 (Yang et al., 2010. *Free Radic Res* 44: 792-802; Maalouf et al., 2009. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74: 200-209; Wang et al., 2008. *J Cell Biochem* 104: 1181-1191). TR146 HNSCC 세포에서 shRNA 에 의한 S100A8/A9 의 녹다운에서 관찰되는 바와 같이, S100A8/A9 의 감소는 p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 저인산화와 연합하여 연한천에서의 성장 및 콜로니 형성을 유의하게 증가시켰다. G2/M 체크포인트의 S100A8/A9-의존적 조절의 상실, G2 → M 이행의 증가된 신호전달, 및 구성적 이상조절된 G1/S 체크포인트는 TR146 세포의 성장 속도의 증가를 야기하는 것으로 강하게 시사되었다.

[0074] 요약하면, 우리는 PP2A-의존적 경로를 통한 G2/M 세포 주기 체크포인트 및 유사분열 정지의 유도에서 핵심 신호 전달 매개인자로서 S100A8/A9 를 포함하는 모델을 제안한다 (도 12). S100A8/A9 발현은, 잠재적으로 직접 단백질-단백질 상호작용 및 촉매 서브유닛 PP2A-C 의 저해성 잔기 Tyr307 의 탈인산화를 통해, PP2A 포스파타제 활성을 증가시켜 PP2A 의 활성화를 증가시킨다. 활성화된 PP2A 는 p-Cdc25C (Thr48) 를 표적화하고 탈인산화시켜, Cdc25C 가 저해성 잔기 Ser216 에서 Chk1 에 의해 인산화되는 것을 허용한다고 가정된다 (Perry et al., 2007. *Cell division* 2: 12). 암종 세포에서 G2/M 세포 주기 체크포인트는 이상조절되어, p-Cdc25C 의 Thr48 의 증가된 인산화 및 가속된 세포 성장을 초래한다. S100A8/A9 는 p-Cdc25C (Thr48) 의 수준을 감소시킴으로써 및 p-Chk1 (Ser345) 및 p-Cdc25C (Ser216) 의 수준을 증가시킴으로써 PP2A 를 통해 G2/M 체크포인트를 활성화시켜 유사분열 정지 (및 성장 감소) 를 유도한다. G2/M 체크포인트 및 Chk1 키나제의 활성화 (Ser345 에서의 인산화에 의한) 가 S100A8/A9 발현에 의해 또는 Thr48 에서 Cdc25C 의 PP2A 탈인산화에 의해 직접 신호전달되는지 여부는 아직 불확실하지만, Cdc25C 의 Thr48 및 Ser216 잔기 둘다가 동시에 인산화될 수는 없다. 인산화된 p-Cdc25C (Ser216) 는 14-3-3β 에 의해 표적화되고 결합되어, Cdc25C 의 불활성화 및 시토졸 축적을 초래한다. 그 결과, 사이클린 B1/p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) 복합체가 불활성화되어, 세포 주기를 G2/M 체크포인트에서 정지시킨다. 다른 유사분열 체크포인트 저해인자는 영향을 받지 않는다. 그러므로 S100A8/A9 (또는 칼프로텍틴) 는 편평 상피 세포에서 종양 억제인자로서 기능할 수 있고, 감소된 발현은 질환 진행에 대한 지표로서의 역할을 할 수 있다. 따라서, HNSCC 및 기타 SCC 에서 S100A8/A9 의 세포내 발현의 인위적으로 증가는 효과적 치료 전략으로 입증될 수 있다.

[0075] 예를 들어, 세포내 S100A8/A9 는 마우스에서 구강저 종양 (동소) 형성을 감소시킨다. MATRIGEL (BD Biosciences, San Jose, CA) 에 현탁된 종양 세포를 확립된 프로토콜을 사용하여 nu/nu 마우스의 구강저 내로 접종했다 (Henson B. et al., 2007. *J Oral Pathol Med.* 36:363-370). S100A8/A9 를 발현하는 KB 세포는 제 17 일까지 대조군 모의 트랜스펙션된 KB 세포 (EGFP 를 발현함) 보다 65% 더 작은 ($p < 0.02$) 동소 종양을 생성한다 (도 13A). S100A8/A9 발현은 더욱 분리되고 덜 침윤성인 종양 (도 13B), 감소된 괴사 면적, 및 덜 공격적인 조직학적 표현형 (도 13C) 과 상관관계가 있다. 반대로, TR146 볼 암종 세포는 TR146 세포에서 모의 녹다운 후에 형성된 종양보다 20% 더 큰 구강저 (동소) 종양을 형성했다 (도 14). 이들 데이타는 종양 세포에서 S100A8/A9 의 발현이 구강저에서 형성되는 종양의 부피 및 명백한 침윤성을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0076] 따라서, 우리는 구강저 종양 (동소) 에서 암종 세포에 의한 S100A8/A9 의 발현이 형성하는 종양의 크기와 반비례 관계에 있다는 것을 밝혔다. 따라서, S100A8/A9 는 종양 억제인자로서 기능할 수 있다. S100A8/A9 의 증가된 발현을 초래하는 방법은, 예를 들어, 구강저의 종양을 포함하나 그에 제한되지 않는 두경부암과 같은 상피 세포의 신생물을 수반하는 특정 암의 치료 방법으로서 사용될 수 있다. 그러한 방법은 세포가 S100A8/A9 의 생산을 증가시키도록 성분 S100A8/A9 를 인코딩하는 하나 이상의 mRNA 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 대안적 구현예에서, 그러한 방법은 S100A8/A9 의 발현의 증가를 초래하는 하나 이상의 활성제를 대상에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예시적 활성제는, 예를 들어, 조절성 사이토카인 예컨대 IL-1α, IL-1α 와 각질세포 성장 인자, IL-6, IL-8 (CXCL8 와 함께 또는 없이), IL-22, TNFα, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20 를 포함한다. 예시적 활성제는 또한 S100A8/A9 를 상향조절하는 화합물 예컨대, 예를 들어, 포르볼 미리스테이트 아세테이트를 포함한다.

[0077] 그러므로, 하나의 양상에서, 본 공개는 병원체 미생물에 의한 점막 상피의 감염의 가능성 및/또는 중증도의 감소 방법을 기재한다. 상기 방법은 일반적으로 선천 면역에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 를 세포 내로 도입하는 단계 및 세포가 병원체에 의해 감염될 가능성을 감소시키는데 유효한 양으로 세포가 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용하는 단계를 수반한다. 또다른 양상에서, 본 공개는 상피 세포 증식의 가능성 또는 정도의 감소 방법을 기재한다. 상기 방법은 일반적으로 세포 증식을 억제하는데 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 를 상피 세포 내로 도입하는 단계 및 세포가 부착-비의존적 환경에서 증식할 가능성을 감소시키는데 유효한 양으로 세포가 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용하는 단계를 수반한다. 본원에서 사용되는, 용어 "폴리펩티드" 는 서열의 길이에 상관없이 아미노산 잔기의 서열을 언급한다. 그러므로, 용어 "폴리펩티드" 는 적어도 2 개의 아미노산을 갖는 임의의 아미노산 서열을 언급하고, 전장 단백질을 포함한다.

[0078] 다양한 구현예에서, 상기 방법은 시험관내에서 또는 생체내에서 수행될 수 있다. mRNA 는 임의의 적합한 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 생체내에서 mRNA 를 도입할 때, 전형적으로 생체내 전달 비히클의 도움으로 mRNA 를 세포 내로 도입할 수 있다. 예시적 생체내 전달 비히클은, 예를 들어, TransIT-mRNA 및 TransIT-mRNA 부스트 (boost) 시약 (Mirus Bio LLC, Madison WI) 과 같은 성분을 포함할 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서, 세포는 상피 세포 예컨대, 예를 들어, 점막 상피의 세포이거나, 그것으로부터 유래될 수 있다. 따라서, 방법의 생체내 구현예에서, 예시적 세포는 암종 세포를 포함한다. 예시적 세포는 구강 점막, 질 점막, 생식기 점막, 편도선 상피, 구강인두부, 비인두, 폐, 위장 점막, 또는 눈 주위 점막 상피의 세포를 추가로 포함한다. 결과적으로, 상기 방법은, 예를 들어, 암종, 치은염, 치주염, 구강칸디다증, 스트렙토코쿠스 인후염, 점막염, 세균성 기관지염, 세균성 폐렴, 질염, 기타 질 및 자궁경과 질의 감염, 질 효모 감염, 위장 감염 (예를 들어, 리스테리아 및 살모넬라 GI 감염), 눈의 감염, 점막 및/또는 주위점막 (perimucosal) 감염을 포함하는 상태의 치료법으로서 사용될 수 있다. 방법을 동등하게 실시하여 mRNA 를 점막 및 관련 상피에 도입하여 예방적 또는 치료적 가치를 가질 수 있는 사실상 임의의 단백질 예컨대 종양 억제인자 또는 상처 치유를 개선하는 단백질을 일시적으로 발현하게 할 수 있다. 예를 들어, 난치성 피부 상처의 치류를 개선하거나, 피부암 예컨대 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종에 대항하거나, 난절 및 켈로이드 형성을 방지하거나, 또는 표피 모반에서 혈관신생 과정을 역전시킬 수 있는 단백질이 mRNA 트랜스펙션을 사용하여 발현될 수 있다.

[0080] 방법의 시험관내 구현예에서, 세포는 바로 위에서 확인된 임의의 생체내 세포 유형이거나, 그것으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 세포는, 임의의 적합한 상피 세포주 예컨대, 예를 들어, 인간 KB 세포 (ATCC CCL-17) 이거나, 그것으로부터 유래될 수 있다.

[0081] mRNA 는 선천 면역에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩한다. 선천 면역에 관여하는 예시적 폴리펩티드는, 예를 들어, 카텔리신 항균성 단백질 (CAMP), 칼프로텍틴, S100A8, S100A9, 임의의 α-디펜신, β-디펜신, S100A7, S100A12, 분비성 백혈구 저해인자, 리포칼린 2, 및 리소자임을 포함한다. mRNA 는 또한 선천 면역에 관여하는 둘 이상의 폴리펩티드의 임의의 조합을 인코딩할 수 있다. 본원에서 사용되는, "선천 면역에 관여하는 폴리펩티드" 는 전장 폴리펩티드, 그의 유효 조각, 또는 전장 폴리펩티드 또는 유효 조각의 전구체를 언급한다.
예를 들어, *CAMP* mRNA 는 프로테이나제 3, 세린 프로테아제에 의해 LL-37 로 활성화되는 전구체인 CAP-18 을 인코딩할 수 있다. 선천 면역 외에, mRNA 카르고는 임의의 작용을 도입, 대체, 또는 증가시키는 사실상 임의의 숙주 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다.

[0082] 상기 방법을 사용하여 병원체에 의한 감염의 가능성 및/또는 정도를 감소시킬 수 있다. 병원체는 세포가 감염의 표적인 임의의 병원체일 수 있다. 예시적 병원체는, 예를 들어, 진균 예컨대, 예를 들어, 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 아시네토박테르 바우만니이 (*Acinetobacter baumannii*), 아스페르길루스 종 (*Aspergillus* spp.) (예를 들어, 아스페르길루스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*) 및 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*)), 및 세균 예컨대, 예를 들어, 카프노사이토파가 스푸티게나 (*Capnocytophaga sputigena*), 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*), 스타필로코쿠스 종 (*Staphylococcus* spp.) (예를 들어, 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 및 스타필로코쿠스 에피데르미스 (*Staphylococcus epidermis*)), 스트렙토코수스 종 (*Streptococcus* spp.) (예를 들어, 스트렙토코수스 폐렴 (*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코수스 군 A, 스트렙토코수스 군 B, 및 스트렙토코수스 군 C), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivallis*), 탄네렐라 포르시티아 (*Tannerella forsythia*), 트레포네마 덴티콜라 (*Treponema denticola*), 슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 클라미디아 종 (*Chlamydia* spp.), 네이세리아 종 (*Neisseria* spp.), 가르드네렐라 종 (*Gardnerella* spp.), 및 트리코모나스 종 (*Trichomonas* spp.) 을 포함한다.

[0083] 일부 구현예에서, mRNA 는 일단 mRNA 가 세포 내로 도입된 후 mRNA 의 반감기를 증가시키는 안정화 모이어티를 포함할 수 있다. 안정화 모이어티는 5' 캡 예컨대, 예를 들어, 항-역 캡 유사체 (ARCA) 또는 7-메틸구아닐레이트 (m^7G) 캡을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 안정화 모이어티는 3' 폴리(A) 연장을 포함할 수 있다. 예시적 폴리(A) 연장은 임의의 수의 아데닌 잔기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리(A) 연장은 mRNA 의 반감기에서 별다른 뚜렷한 차이가 없는 64 개 아데닌 잔기 또는 150 개 아데닌 잔기를 포함할 수 있다. 안정화는 또한 mRNA 구축물을 합성할 때 수식된 염기를 사용하는 것을 수반할 수 있다.

[0084] 일부 구현예에서, 상기 방법은 병원체를 mRNA 가 내부에 도입된 세포와 접촉하는 것을 허용하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0085] 생체내 방법에서, mRNA 가 도입되는 세포는 병원체에 의한 감염에 의해 야기되는 상태를 갖는 또는 가질 위험에 처한 대상의 세포일 수 있다. 본원에서 사용되는, 병원체에 의한 감염에 의해 야기되는 상태를 갖는 대상은 상태의 하나 이상의 증상 또는 임상 징후를 나타내는 대상을 언급한다. "증상" 은 질환 또는 환자의 상태의

임의의 주관적 증거를 언급한다. "징후" 또는 "임상 징후" 는 환자가 아닌 사람에 의해 발견될 수 있는 특정 상태에 관한 객관적 신체적 발견을 언급한다. 본원에서 사용되는, 용어 "위험에 처한" 은 대상이 기재된 위험을 실제로 보유하거나 보유하지 않을 수 있음을 언급한다. 따라서, 예를 들어, 감염 상태의 "위험에 처한" 대상은 다른 개체가 감염 상태를 갖는 것으로 확인된 지역에 존재하고/거나 대상이 아직 미생물에 의한 감염의 탐지가능한 징후를 발현하지 않은 경우에도 및 동물이 준임상 (subclinical) 양의 미생물을 보유하는지 여부와 무관하게 감염 물질에 노출될 가능성이 있는 대상이다.

[0086] 따라서, mRNA 의 도입은 대상이 상태의 증상 또는 임상 징후를 처음 나타내기 전에, 그 동안, 또는 그 후에 또는, 감염 상태의 경우에, 대상이 감염 물질과 처음 접촉되기 전에, 그 동안, 또는 그 후에 실시될 수 있다. 대상이 상태와 연관되는 증상 또는 임상 징후를 처음 나타낸 후에 개시되는 처리 - 즉, 치료적 처리 - 는 상태의 증상 및/또는 임상 징후의 중증도의 감소, 상태의 완전한 해소, 및/또는 조성물이 투여되지 않는 동물에 비해 상태의 임상 증거를 경험할 가능성의 감소를 초래할 수 있다. 유사하게, 대상이 상태와 연관되는 증상 또는 임상 징후를 처음 나타내기 전에 개시되는 처리 - 즉, 예방적 처리 - 는 상태의 증상 및/또는 임상 징후의 중증도의 감소, 상태의 완전한 해소, 및/또는 조성물이 투여되지 않는 동물에 비해 상태의 임상 증거를 경험할 가능성의 감소를 초래할 수 있다.

[0087] 상기 방법은 특정 상태를 갖는, 또는 가질 위험에 처한 대상에게 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 발명의 이러한 양상에서, "유효량" 은 상태와 관련된 증상 또는 임상 징후를 임의의 정도로 감소, 진행 제한, 개선, 또는 해소하는데 효과적인 양이다.

[0088] mRNA 를 함유하는 제형은 용액, 현탁액, 에멀전, 스프레이, 에어로졸, 또는 임의의 형태의 혼합물을 포함하나 그에 제한되지 않는 임의의 적합한 형태로 제공될 수 있다. 조성물은 임의의 약학적으로 수용가능한 부형제, 담체, 또는 비히클과 함께 제형으로 전달될 수 있다. 제형은 예컨대, 예를 들어, 아주반트 또는 불활성 담체 (예를 들어, 나노입자) 를 포함하는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0089] 대상에게 투여되는 mRNA 의 양은 대상의 중량, 신체 상태, 및/또는 연령, 투여 경로, 특정 mRNA 카르고, 및/또는 결과적인 단백질 발현의 안정성을 포함하나 그에 제한되지 않는 다양한 인자에 따라 다를 수 있다. 따라서, 주어진 단위 투여 형태에 포함되는 mRNA 의 절대량은 광범위하게 다를 수 있고, mRNA 카르고, 치료 지시, 대상의 인종, 연령, 중량 및/또는 신체 상태, 뿐만 아니라 투여 방법과 같은 인자에 좌우된다. 따라서, 모든 가능한 적용에 효과적인 mRNA 의 양을 구성하는 양을 일반적으로 제시하는 것은 실용적이지 않다. 그러나, 당업자는 상기 인자들을 충분히 고려하여 적당한 양을 용이하게 결정할 수 있다.

[0090] 일부 구현예에서, mRNA 는, 예를 들어, 단일 투여물 내지 복수 투여물로 투여될 수 있다. mRNA 는 대상의 게놈 내로 통합되지 않기 때문에, 대상의 세포 내로의 mRNA 도입의 치료적 및/또는 예방적 효과는 시간의 흐름에 따라 자연적으로 소멸할 것이다. 따라서, 대상의 세포 내로 mRNA 를 도입하는 것을 수반하는 치료적 또는 예방적 섭생법은 복수의 처리를 포함할 수 있다.

[0091] 또다른 양상에서, 본 공개는, 본원에 기재된 바와 같은, 선천 면역에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA, 및 생체내 전달 비히클을 포함하는 조성물을 기재한다. 상기 조성물은 항-종양, 항균, 및/또는 항진균 활성을 가질 수 있고, 그러므로, 항-종양, 항균, 및/또는 항진균제일 수 있다.

[0092] 본원에 기재된 mRNA 는 "담체" 와 함께 조성물로 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는, "담체" 는 임의의 용매, 분산매, 비히클, 코팅, 희석제, 항세균, 및/또는 항진균제, 등장화제, 흡수 지연제, 완충제, 운반 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 상기 매질 및/또는 물질의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 종래의 매질 또는 물질이 활성 성분과 비양립성인 경우를 제외하고는, 치료 조성물에서의 사용이 고려된다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0093] "약학적으로 허용가능한" 은 재료가 생물학적으로 또는 다른 이유에 의해 바람직하지 않지 않음을 의미하며, 즉, 재료는 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하거나 그것이 함유되는 약학적 조성물의 다른 성분들과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 mRNA 와 함께 개체에게 투여될 수 있다.

[0094] mRNA 는 약학적 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적 조성물은 바람직한 투여 경로에 맞춰 조정된 여러가지 형태로 제형화될 수 있다. 따라서, 조성물은, 예를 들어, 경우, 비경구 (예를 들어, 피내, 경피, 피하 등), 또는 국소 (예를 들어, 비강내, 폐내, 유방내, 질내, 자궁내, 피내, 경피, 직장으로 등) 을 포함하는 알려진 경로를 통해 투여될 수 있다. 조성물은, 예컨대, 예를 들어, 질, 코, 또는 호흡기 점막에 대한 투여에 의해 (예를 들어, 스프레이 또는 에어로졸에 의해) 점막 표면에 투여될 수 있다고 생각된다. 조성물은 또한 지속

또는 지연 방출을 통해 투여될 수 있다.

[0095] 제형은 단위 투여 형태로 간편하게 제공될 수 있고, 약학 분야에서 잘 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체로 조성물을 제조하는 방법은 mRNA 를 함유하는 벡터를 하나 이상의 부속 성분을 구성하는 담체와 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 화합물을 액체 담체, 미분 고체 담체, 또는 둘다와 균일하게 및/또는 밀접하게 연합시키고, 그 후, 필요에 따라, 생성물을 원하는 제형으로 성형함으로써 제조될 수 있다.

[0096] 상기 설명에서, 특정 구현예는 별개로 명확성을 위해 기재될 수 있다. 특정 구현예의 특색이 또다른 구현예의 특색과 비양립성이라고 명백히 다르게 명시되지 않으면, 특정 구현예는 본원에 기재된 양립가능한 특색과 하나 이상의 구현예의 조합을 포함할 수 있다.

[0097] 별개의 단계를 포함하는 본원에 공개된 임의의 방법에서, 단계는 임의의 실현가능한 순서로 실시될 수 있다. 그리고, 적절한 경우에, 둘 이상의 단계의 임의의 조합이 동시에 실시될 수 있다.

[0098] 용어 "및/또는" 은 열거된 요소들 중 하나 또는 전부 또는 열거된 요소들의 임의의 둘 이상의 조합을 의미한다; 용어 "포함하다" 및 그의 변이형은 제한적 의미를 갖지 않으며 이들 용어는 명세서 및 청구항에서 보인다; 다르게 명시되지 않으면 "하나" 및 "하나 이상" 은 호환되게 사용되고 하나 또는 하나 초과를 의미한다; 종점에 의한 수치 범위의 설명은 그 범위에 포함되는 모든 수를 포함한다 (예를 들어, 1 내지 5 는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5 등을 포함한다).

[0099] 본 발명은 하기 실시예에 의해 설명된다. 특정 예, 재료, 양, 및 절차는 본원에 제시된 발명의 범위 및 주제에 따라 광범위하게 해석되어야 한다고 이해될 것이다.

[0101] 실시예

[0102] 실시예 1

[0103] *세포 배양*

[0104] 인간 KB 세포 (American Type CultureCollection, ATCC CCL-17) 를 5% CO_2 인큐베이터 내에서 37℃ 에서 10% 소 태아 혈청 (FBS) 이 보충된 변형 이글 배지 (MEM, Mediatech Inc, Herndon, VA) 에서 배양했다.

[0105] *세균*

[0106] 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*) ATCC 10403S 및 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*) 혈청형 티피무리움 (살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*)) ATCC 14028 을 뇌 심장 침출액 배지 (DIFCO, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) 내에서 및 트립신처리 콩 한천 (DIFCO, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) 상에서 37℃ 에서 성장시켰다. 리스테리아 및 살모넬라 세포를 620 nm 에서 0.4-0.6 의 흡광도에서 각각 로그기 및 정지기로부터 수확하고, 이를 사용하여 KB 세포를 감염시켰다.

[0107] *플라스미드 구축*

[0108] pGEM4Z.ss1bbz.2bgUTR.150A (Prof. Carl H. June& Dr. Yangbing Zhao, University of Pennsylvania 에 의해 제공됨) 를 NotI 및 HindIII 을 사용하여 소화시켜 삽입물을 제거했다 (Zhao et al., 2010. *Cancer Res.* 70: 9053-9061.). 그 후 *EGFP* (프라이머 쌍 P1 & P2), 인간 *CAMP* (프라이머 쌍 P3 & P4), *S100A8* (프라이머 쌍 P5 & P6) 및 Kozak 서열을 함유하는 *S100A9* (프라이머 쌍 P7 & P8) 의 열린 해독틀 (ORF) 을 pGEM4Z.2bgUTR.150A 내로 클로닝했다 (표 1). 다른 한편으로는, Kozak 서열을 함유하는 *S100A8* ORF 를 pIRES 벡터 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) 의 첫번째 다중 클로닝 자리 (MCS) 내로 Nhe I 및 XhoI 를 통해 클로닝했다 (프라이머 쌍 P11 & P12). Kozak 서열을 함유하는 *S100A9* ORF 를 두번째 MCS 내로 XbaI 및 NotI 을 통해 클로닝했다 (프라이머 쌍 P13 & P14) (표 1). 그 후 A8-IRES-A9 조각을 증폭시키고 (프라이머 쌍 P9 & P10) 또한 pGEM4Z.2bgUTR.150A 내로 클로닝하여 플라스미드 pGEM4Z.A8-IRES-A9.2bgUTR.150A 를 생성했다 (표 1).

[0109] 표 1: 올리고뉴클레오티드 탐침

표 1: 올리고뉴클레오티드 탐침

명칭	조각	올리고뉴클레오티드서열 (5'-3')	SEQ ID NO:
pGEM4Z.2bgUTR.150A 벡터 내로 클로닝되는 조각을 위한 프라이머			
P1 (센스)	*EGFP*	***CCTAAGCTTGCCACC***ATGGTGAGCAAGGG	2
P2 (안티센스)		***ATTTGCGGCCGCT***TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	3
P3 (센스)	*CAMP*	CCTAAGCTTGCCACCATGAGACCCAAAGGGATGGCC	4
P4 (안티센스)		***ATTTGCGGCCGC***CTAGGACTCTGTCCTGGGTACAAGATTCC	5
P5 (센스)	*S100A8*	***CCTAAGCTTGCCACC***ATGTTGACCGAGCTGGAGAAAGCC	6
P6 (안티센스)		***ATTTGCGGCCGC***CTACTCTTTGTGGCTTTCTTCATGGC	7
P7 (센스)	*S100A9*	***CCTAAGCTTGCCACC***ATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTG	8
P8 (안티센스)		ATTTGCGGCCGCTTAGGGGGTGCCCTCCCC	9
P9 (센스)	*A8-IRES-A9*	***CCTAAGCTTGCCACC***ATGTTGACCGAGCTGGAGAAAGCC	10
P10 (안티센스)		ATTTGCGGCCGCTTAGGGGGTGCCCTCCCC	11
pIRES 벡터 내로 클로닝되는 조각을 위한 프라이머			12
P11 (센스)	*S100A8*	***CTAGCTAGCGCCACC***ATGTTGACCGAGCTGGAGAAAGC	13
P12 (안티센스)		***CCGCTCGAG***CTACTCTTTGTGGCTTTCTTCATGGC	14
P13 (센스)	*S100A9*	GCTCTAGAGCCACCATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTG	15
P14 (안티센스)		***ATTTGCGGCCGC***TTAGGGGGTGCCCTCCCC	16

[a]유전자/조각으로부터 유래되지 않은 올리고뉴클레오티드 부분은 *볼드 및 이탤릭체* 이다.

[0110]

[0111] pIRES 벡터 내의 IRES 는 부분적으로 무력화된 서열이다 (Rees et al., 1996. *Biotechniques* 20: 102-110; Bochkov et al., 2006. *Biotechniques* 41: 283-284, 286, 288 passim). 2 개의 MCS 사이에 자연 IRES (nIRES) 를 구축하기 위해, pGEM4Z.A8-IRES-A9.2bgUTR.150A 벡터를 주형으로 사용하고 프라이머 쌍 5'-AAACGTCTAGGCCCCCCGAACC-3'/ 5'-TTTAACCTCGACTAAACACATGTAAAGCATGTGC-3' 로 증폭시켰다. 생성물을 정제하고 자가-결찰시켜 플라스미드 pGEM4Z.A8-IRES/mut1-A9.2bgUTR.150A 를 생성했다. 프라이머 쌍 5'-ACCATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTG-3'/ 5'-ATTATCATCGTGTTTTTCAAAGGAAAACCAC-3' 를 사용하여 pGEM4Z.S100A8-IRES/mut1-S100A9.2bgUTR 을 주형으로 사용하여 증폭시키고, 그 후 조각을 정제하고 자가-결찰시켜 플라스미드 pGEM4Z.A8-nIRES-A9.2bgUTR.150A 를 생성했다.

[0112] *시험관내 전사*

[0113] 주형을 상응하는 플라스미드 구축물로부터 증폭시키고 겔로부터 추출했다. 정제된 조각을 0.5% SDS 및 100 ㎍/㎖ 프로테아제 K 로 50℃ 에서 30 분 동안 처리하고, 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올 (25:24:1) 로 및 그 후 클로로포름으로 추출했다. 에탄올 침전 후에, 주형을 10 mM Tris-HCl 에 용해시키고, -80℃ 에서 저장했다. mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 또는 ScriptCapTM m7G Capping System/ScriptCapTM 2'-O-메틸트랜스퍼라제 키트 (Cell Script, Madison, WI) 를 사용하여 mRNA 를 합성하고, 그 후 MEGAclear Kit (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 그에 뒤이어 에탄올 침전을 사용하여

정제했다.

[0114] *mRNA 트랜스펙션*

[0115] 대략 60%-90% 세포포화도 (confluence) 에서, 세포를 TransIT-mRNA Kit 시약 (Mirus Biol LLC, Madison, WI) 을 제조사의 지침에 따라 사용하여 mRNA 로 트랜스펙션시켰다.

[0116] *웨스턴 블롯 분석*

[0117] 세포를 포유류 세포-PE LBTM 완충액 (G-Bio-sciences, St. Louis, MO) 을 사용하여 추출했다. 추출된 단백질을 SDS-PAGE 에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막 위로 옮기고, 하기 중 하나와 함께 인큐베이션했다: 토끼 항-β-액틴 (DB070, Delta Biolabs, LLC, Gilory, CA), 마우스 항-LL37 (sc-166770, Santa Cruz Biotechnolology, Inc., Santa Cruz, CA), 마우스 항-S100A8 (sc-48352, Santa Cruz Biotechnolology, Inc., Santa Cruz, CA), 토끼 항-S100A9 (sc-20173, Santa Cruz Biotechnolology, Inc., Santa Cruz, CA), 토끼 항-PARP (#9542S, 세포 신호전달). 그 후 토끼 일차 항체를 홀스래디시 퍼옥시다제 (HP)-접합된 염소 항-토끼 항체와 함께 인큐베이션하고, 한편 마우스 일차 항체를 HP-접합된 염소 항-마우스 항체 (이차 항체, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 와 함께 인큐베이션했다. 면역반응을 SuperSignalWest Pico 화학발광 기질 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) 을 사용하여 시각화하고, Amersham Hyperfilm ECL 필름 (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) 에 노출시켰다. 단백질 밴드를 QuantityOne 분석 (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 에 의해 정량화했다.

[0118] *세균 침입 검정*

[0119] 세균 침입을 항생제 보호 검정 (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol. Chem.* 284:7078-90; Nisapakultorn et al., 2001. *Infect. Immun.* 69: 3692-3696) 에 의해 확인했다. 간략히, KB 세포 ($1.0-1.2\times10^5$ 세포) 를 밤새 24-웰 플레이트 내에 시딩 (seed) 했다. 그 후 세포를 리스테리아 모노사이토게네스 ATCC 10403S 또는 살모넬라 티피무리움 ATCC 14028 과 함께 각각 100:1 및 1:1 의 감염 다중도 (MOI) 로 인큐베이션했다. 2 hr 의 인큐베이션 후에, 단층을 DPBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 로 세정하고, 100 ㎍/㎖ 젠타마이신 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 을 함유하는 10% FBS 로 보충된 MEM 에서 1.5 hr 동안 인큐베이션하고, 세포를 멸균 증류수와 함께 15 분 동안 인큐베이션하여 용해시켰다. 방출된 세균을 희석하고, 나선형 플레이터 (spiral plater) (Spiral Biotech, Bethesda, MD) 로 플레이팅하고, 밤새 37℃ 에서 인큐베이션하고, 그 후 세포내 세균의 콜로니-형성 단위 (CFU) 의 수를 콜로니 계수기 (C-110, New Brunswick Scientific, Enfield, CT) 에서 계수했다.

[0120] *시험관내 독성학 검정*

[0121] 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 (MTT) 검정 (시험관내 독성학 검정 키트, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 을 사용하여 세포 생활력을 정량적으로 확인함으로써 시험관내 mRNA 전달의 독성 효과를 분석했다. 간략히, MTT 용액 (5 mg/㎖) 을 각각의 웰에 배양 배지 부피의 10% 와 동등한 양으로 첨가했다. 그 후 세포를 2 hr 동안 37℃ 에서 인큐베이션하고, 흡광도를 570 nm 의 파장에서 측정하고, 생활력 있는 세포의 백분율을 트랜스펙션된 및 트랜스펙션되지 않은 세포의 흡광도의 비율로서 계산했다.

[0122] *세포자멸사의 분석*

[0123] 세포자멸 상태를 평가하기 위해, 트랜스펙션된 세포를 위에 기재된 바와 같이 토끼 항-PARP 를 사용하여 웨스턴 블롯으로 및 아넥신 V-FITC 세포자멸사 탐지 키트 (MBL International Corp, Watertown, MA) 를 제조사의 권고에 따라 사용하여 유세포분석에 의해 PARP 절단에 대해 평가했다. 트랜스펙션 후 72 h 까지, 세포를 트립신처리하고, PBS 중 2.5% FBS 로 세정하고, 어둠 속에서 5 min 동안 실온에서 결합 완충액 중 아넥신 V-FITC + 프로피디움 아이오다이드와 함께 인큐베이션했다. 염색된 세포를 Becton Dickinson FACSCalibur 유세포 분석기 (BD Biosciences, San Jose, CA) 를 CellQuest 소프트웨어와 함께 사용하여 FITC 신호를 FL1 에, 프로피디움 아이오다이드 신호를 FL2 에 배치하여 분석했다. 아넥신-V-FITC 에 의해 양성 염색된 세포를 세포자멸성으로 간주했다 (Pelicano et al., 2003. *J. Biol. Chem.* 278: 37832-37839).

[0124] *통계 분석*

[0125] 각각의 조건에서, 적어도 3 내지 6 회의 독립적 실험을 수행하고 분석했다. 평균 값의 차이를 분석하기 위해, 스튜던트 t-검정을 Excel 소프트웨어 (Microsoft, Redmond, WA) 를 사용하여 적용했다.

[0126] *정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 분석*

[0127] Trizol 시약 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 및 RNeasy plus Mini-키트 (Qiagen, Valencia, CA) 를 사용하여 총 RNA 를 단리하고, SuperscriptIII (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 으로 역전사했다. 정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 을 PrimeTime 미리 디자인된 qRT-PCR 검정 (인간 *CAMP* 에 대해 Hs.PT.42.1073747, 인간 *S100A8* 에 대해 Hs.PT.42.3682141, 인간 *S100A9* 에 대해 Hs.PT.42.3080635, 인간 *ACTB* 에 대해 Hs.PT.45.227970.g; Integrated Device Technology, San Jose, CA) 을 사용하여 수행했다. *CAMP*, *S100A8*, *S100A9* *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 의 발현 수준을 *ACTB* mRNA 로 정규화했다.

[0128] *면역형광*

[0129] 16 hr 동안 *CAMP*, *S100A8*/*S100A9* mRNA 트랜스펙션 후에, 세포를 4% 파라포름알데히드로 10 분 동안 고정하고, PBS (pH 7.4) 로 세정하고, 그 후 0.25% Triton X-100 으로 10 분 동안 투과화했다. PBS/0.1% Tween 20 중 1% BSA 로 1 hr 차단 및 PBS 3X 헹굼 후에, 세포를 마우스 항-칼프로텍틴 (mAb 27E10, sc-33714, Santa Cruz Biotechnolology, Inc., Santa Cruz, CA) 또는 마우스 항-LL37 (sc-166770, Santa Cruz Biotechnolology, Inc., Santa Cruz, CA) 와 함께 1 hr 동안, 그에 뒤이어 Alexa Fluor 568-접합된 염소 항-마우스 IgG 또는 Alexa Fluor 488-접합된 염소 항-토끼 IgG (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) 와 함께 1 hr 동안 인큐베이션했다. *EGFP* mRNA 트랜스펙션을 위해, 항체 인큐베이션은 필요하지 않았다. 핵을 DAPI 로 염색했다. 형광 이미지를 형광 현미경 시스템을 사용하여 캡처했다. *A8-IRES-A9* 및 *A8-nIRES-A9* mRNA 트랜스펙션을 40 hr 동안 또한 수행했다.

[0130] 실시예 2

[0131] *세포주 및 배양 조건*

[0132] S100A8/A9 발현에 대해 음성인, 인간 암종 세포주 KB (ATCC CCL-17) 를 최소 필수 배지 (MEM) 에서 배양했다. S100A8/A9 를 내생적으로 발현하는 인간 HNSCC 세포주 TR146 을 둘베코 변형 이글 배지/Ham's F-12 (DMEM/F-12) 에서 배양했다. TR146 세포는 원래 잘-분화된 볼 암종의 자궁경부 림프절 전이로부터 유래되었고 (Rupniak et al., 1985. *J Natl Cancer Inst* 75: 621-635), Dr. Reuben Lotan, University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 로부터의 선물이었다 (Eicher et al., 1996. *Clin Cancer Res* 2: 1659-1664). MEM 및 DMEM/F-12 배양 배지 둘다 10% 열 불활성화된 소 태아 혈청 (완전 배지) 으로 보충되었고, 세포를 5% CO_2 중에서 37℃ 에서 유지했다. 각각의 세포주는 사용 전에 qPCR 에 의해 마이코플라스마 (*Mycoplasma*) 음성에 대해 시험되었다.

[0133] *인간 암종 세포주에서 S100A8/A9 의 안정적 발현*

[0134] S100A8/A9 (KB-S100A8/A9, 이전에 KB-MRP8/14 로 알려짐) 또는 모의 대조군 벡터 (KB-EGFP) 를 발현하도록 안정적으로 트랜스펙션된 암종 세포를 이전에 보고된 바와 같이 KB 세포로부터 생성했다 (Nisapakultorn et al., 2001. *Infect Immun* 69: 4242-4247). 간략히, *S100A8* (*MRP8*) 또는 *S100A9* (*MRP14*) 서브유닛 유전자, 및 선별가능 마커 pSV2-*neo* (G418 설페이트-저항성 마커 유전자) 를 함유하는 포유류 발현 벡터, pIRES-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA) 로 KB 세포를 동시-트랜스펙션했다. 결과적인 세포주, KBS100A8/A9 는 S100A8/A9 단백질 복합체를 발현한다. 삽입물이 없는 (insertless) pIRES-EGFP 및 pSV2-*neo* 의 동시-트랜스펙션에 의해 KB-EGFP 모의-트랜스펙션 대조군을 생성했다. KBS100A8/A9 및 KB-EGFP 둘다 700 ㎍/㎖ G418 설페이트 (Geneticin, Mediatech Inc., Manassas, VA) 중에 유지했다. 트랜스펙션된 세포에서의 시토졸 S100A8/A9 발현을 샌드위치 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA) 및 항-S100A8/A9 이질이합체-특이적 모노클로날 항체, 27E10 (Bachem, King of Prussia, PA) 를 이용하는 간접 면역형광 둘다에 의해 확인했다. 동시-면역침전을 또한 수행하여 단백질 복합체 형성을 확인했다.

[0135] *실시간 정량적 RT-PCR 에 의한 유전자 발현 분석*

[0136] 각각 혀, 후두 및 타액선에서 기원하는 단계 II (T2N0M0), III (T3N0M0) 및 IVA (T4N0M0) 종양을 갖는 3 명의 환자로부터 절제된 인간 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC) 및 부합하는 (matching) NAT 의 임상 표본에서 S100A8 및 S100A9 발현을 분석했다. 3 명의 HNSCC 환자로부터의 HNSCC 종양 조직 및 종양 세포의 증거를 보이지 않은 NAT 를 상업적 조직 은행 (ProteoGenex, Inc., CulverCity, CA) 을 통해 고지에 입각한 동의를 받아 수득했다. 종양 및 NAT 를 절제후 30 분 내에 급속 냉동시키고, 절편으로 만들고, 신생 세포에 대해 분석했다. RNA 를 70% 이상의 종양 세포를 함유하는 HNSCC 표본 및 NAT 의 영역으로부터 Trizol 을 사용하여 추출하고,

Agilent Bioanalyzer 2100 을 사용하여 품질 제어에 대해 분석했다. 각각의 환자로부터의 종양 및 NAT 총 RNA 를 별도로 모으고, 역 전사시키고, 실시간 정량적 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 을 사용하여 SYBR Green 으로 정량화했다.

[0137] 별도의 실험에서, 총 RNA 를 KB 및 TR146 세포로부터 Qiagen RNeasy Mini Kit 를 사용하여 추출하고, NanoDrop 분광광도계를 사용하여 정량화하고, S100A8 및 S100A9-특이적 mRNA 를 상기와 같이 실시간 qRT-PCR 을 사용하여 정량화했다.

[0138] *인간 HNSCC 세포주에서 S100A8/A9 의 안정적 녹다운*

[0139] 이전에 기재된 바와 같이 (Sorenson et al., 2012. *MucosalImmunol.* 5: 66-75) S100A8/A9-녹다운 클론 (TR146-shRNA-S100A8/A9KD) 을 생성하기 위해, TR146 세포 (내생적 S100A8/A9 발현이 있음) 를 S100A8 및 S100A9 유전자 전사물에 대한 간섭 shRNA 를 생성하는 올리고 서열을 함유하는 GeneEraser 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 포유류 발현 벡터 (Stratagene, Cedar Creek, TX) pGE-1 로 트랜스펙션시켰다. 일부 세포를 무작위혼합 (scrambled) shRNA 를 함유하는 pGE-1 대조군 벡터로 트랜스펙션시켜 S100A8 및 S100A9 유전자 침묵 클론에 대한 음성 대조군 (TR146-shRNA-대조군) 을 생성했다. 250 ㎍/㎖ G418 설페이트의 존재 하에 성장한 클론을 선별했다. S100A8/A9 유전자 및 단백질 발현을 qRT-PCR 및 면역블롯에 의해 정량화했다.

[0140] *S100A8/A9-양성 및 -음성 세포의 성장*

[0141] 부착-의존적 성장 속도를 확인하기 위해, 종양 세포를 비-발열성 폴리스티렌 조직 배양 플라스크 내에서 완전 배지 (상기 참조) 에서 배양하고, 트립신처리에 의해 수확하고, 트리판 블루 제외에 의해 카운트 (count) 했다. 카운트수를 Vi-Cell 세포 생활력 분석기 (Beckman Coulter, Fullerton,CA) 를 사용하여 확인했다. 37℃ 에서 5% CO_2 중에서 2.5 주 이하 동안 표준 연한천 배지 (0.5% 고체 한천 위에 플레이팅된 완전 배지 중 0.25% 한천) 에서 성장시킨 후 세포 콜로니를 계수함으로써 부착-비의존적 성장을 확인했다.

[0142] *세포 동기화 및 세포 주기 분석*

[0143] KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포를 1×10^5 세포/㎖ 의 밀도로 파종하고, 이전에 기재된 바와 같이 완전 배지에서 배양했다. G1/S 에서 동기화하기 위해, 70% 세포 포화도 (~ 48 hr 동안 배양됨) 에서 세포를 밤새 혈청 결핍시키고, 그 후 12 hr 동안 완전 배지에서 3 ㎍/㎖ 아피디콜린으로 차단했다. G1/S 차단을 해방시키고, 세포 주기 내로의 재진입을 촉진하기 위해, 동기화된 세포를 칼슘 및 마그네슘 없는 둘베코 포스페이트-완충 식염수 (DPBS) 로 3 회 세정하여 아피디콜린을 제거하고, 10% FBS 를 함유하는 신선한 배지에서 배양했다.

G1/S 차단으로부터의 해방 후에, 세포를 다양한 시점에 수확하고, 70% 빙냉 에탄올에서 고정시키고, DNA 를 37℃ 에서 30 분 동안 25 ㎍/㎖ 프로피디움 아이오다이드 (PI) 용액 (DPBS 중 0.1% Triton X-100 및 1 mg/㎖ RNase 를 함유함) 으로 염색했다. PI-염색된 DNA 함량을 유세포분석을 사용하여 분석했다. 동기화된 배양물 중 유사분열 세포를 또한 인-히스톤 H3 (Ser10)-특이적 폴리클로날 항체를 사용하여 면역염색하고, 이를 PE-접합된 이차 항체에 의해 탐지하고, 다른 곳에 기재된 바와 같이 유세포분석에 의해 분석하여 계수했다 (Krutzik et al., 2003. *Cytometry A* 55: 61-70).

[0144] *세포 용해 및 단백질 추출*

[0145] 단층으로 배양된 암종 세포를 트립신처리에 의해 수확하고, DPBS 로 2 회 세정하고, 2 hr 동안 얼음 위에서 신선한 프로테아제 저해인자 칵테일 (Cat# P8340, Sigma-Aldrich Biotechnology, St. Louis, MO) 로 1:100 희석율로 보충된 면역침전 용해 (IP) 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM Na_3VO_4, 2 mM NaF) 을 사용하여 용해시켰다. 불용성 물질을 15,000 x g 에서 10 분 동안 4℃ 에서 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 수집하고, 단백질 농도를 BCATM 단백질 검정 (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) 에 의해 확인했다.

[0146] *면역블롯 분석*

[0147] 단백질 샘플을 1X 샘플 완충액 (12.5% 글리세롤, 0.005% 브로모페놀 블루 및 2.5% 베타메르캅토에탄올을 함유하는, 31.25 mM Tris-HCl, pH 6.8 중 1% SDS) 중에서 5 분 동안 끓였다. SDS-폴리아크릴아미드 겔에 명시된 바와 같이 50 내지 100 ㎍ 총 단백질/웰 을 로딩하고, PVDF 또는 니트로셀룰로스 막으로 Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 반건조 단백질 수송 장비에 의해 옮기고, TBS-T 완충액 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 중 5% 탈지유로 밤새 차단하고, 실온에서 1 hr 동안 차단 완충액 중

1:1000 로 희석된 일차 항체와 함께 인큐베이션했다. 그 후 블롯을 각각 TBS-T 로 5 분 동안 3 회 세정하고, 또다른 1 hr 동안 차단 완충액 중 1:3000 로 희석된 홀스래디시 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 이차 항체와 함께 인큐베이션했다. 인-PP2A-C (Tyr307) 토끼 모노클로날 항체 (Epitomics, Inc., Burlingame,CA) 를 제외하고는, 세포 주기 조절인자를 탐지하는 모든 항체를 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) 로부터 구입했다. 마지막 세정을 TBS-T 로 3 회 수행한 후, ECL 웨스턴 블롯팅 탐지 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 에서 블롯을 인큐베이션했다. 화학발광 밴드를 기록하고, Kodak XAR-5 X-선 필름에 노출시켜 분석했다.

[0148] *동시-면역침전*

[0149] 각각의 세포주로부터 동등한 양의 용해물 단백질을 Ezview Red 단백질 A 친화성 겔 (단백질-A 겔, Sigma-Aldrich) 과 함께 인큐베이션하여 비-특이적 결합을 최소화했다 (사전-정화 (pre-clear)). 그 후 사정-정화된 용해물을 5 ㎍ 의 포획 항체와 혼합하고, TBS 로 부피를 1 ㎖ 로 조정했다. 혼합물을 4℃ 에서 약하게 회전하면서 1 hr 동안 인큐베이션하고, 그에 뒤이어 25 ㎕ 의 단백질-A 겔을 첨가하고, 부가적 시간 동안 4℃ 에서 약하게 회전하면서 인큐베이션했다. 그 후 단백질-A-항체-단백질 복합체를 차가운 면역침전 용해 완충액으로 3 회 세정하고, 1X 샘플 완충액 (상기와 같음) 으로 단백질-A 겔로부터 용리했다. 잠시 원심분리 후에, 상청액을 끓는 물에서 5 분 동안 인큐베이션하고, 면역블롯팅에 의해 분석했다. 14-3-3β:Cdc25C 상호작용 연구를 위해, 마우스 항-14-3-3β 를 co-IP 포획 항체로서, 토끼 항-Cdc25C 를 면역블롯 탐지를 위해 사용했다. 마우스 항-S100A8/A9 항체 27E10 또는 항-S100A9 및 염소 항-PP2A-Aα 항체를 사용하여 S100A8/A9 및 PP2A 를 동시-면역침전시켰다. 모든 항체를 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 로부터 구입했다.

[0150] *오카다산 처리에 의한 PP2A 저해*

[0151] KB, KB-EGFP 및 KB-S100A8/A9 세포를 3×10^5 세포/웰 의 밀도로 파종하고, 위에 기재된 바와 같이 완전 배지에서 밤새 배양한다. 배양된 세포를 10 nM 오카다산 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 또는 비히클 대조군 (DMSO) 을 함유하는 신선한 배지와 함께 24 hr 동안 인큐베이션했다. 세포를 차가운 DPBS 로 2 회 세정하여 수확하고, 얼음 위의 웰 내에서 바로 포스파타제 용해 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% 나트륨 데옥시콜레이트, 1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4, 2 mM NaF 및 10% 프로테아제 저해인자) 으로 용해했다. 세포 용해물을 -80℃ 에서 2 회의 동결-해동 주기에 적용하고, 4℃ 에서 원심분리하고, BCA 에 의한 단백질 정량화 및 면역블롯팅을 위해 상청액을 수집했다.

[0152] *PP2A 포스파타제 활성 검정*

[0153] 포스파타제 활성 검정을 면역침전 포스파타제 검정 키트 (Cat# 17-313, EMD Millipore, Billerica, MA) 를 사용하여 수행했다. 동기화된 세포를 수확하고, DPBS 로 2 회 세정하고, 펠렛화하고, 위에 기재된 바와 같은 그러나 포스파타제 저해인자, Na_3VO_4 및 NaF 를 함유하지 않는 신선한 프로테아제 저해인자 칵테일로 보충된 IP 용해 완충액에 재현탁시켰다. 신선한 세포 용해물을 각각의 반응에 사용했다. PP2A 포스파타제 활성을 제조사의 프로토콜에 따라 측정했다. 간략히, 100 ㎍ 의 총 단백질 (IP 용해 완충액으로 농도 조정됨) 을 2 ㎍ 의 마우스 모노클로날 포획 항체 (PP2A, C 서브유닛 클론 1D6, EMD Millipore) 와 혼합하고, 동형 마우스 IgG2b 를 대조군으로서 사용하고, 부피를 pNPP Ser/Thr 검정 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 μM, $CaCl_2$) 으로 500 ㎕ 로 조정하고, 그에 뒤이어 일정하게 흔들면서 1 hr 동안 4℃ 에서 인큐베이션했다. 인큐베이션 후에, 25 ㎕ 의 단백질 A 아가로스 비드를 각각의 반응 혼합물에 첨가하고, 일정하게 흔들면서 또다른 1 hr 동안 4℃ 에서 인큐베이션을 계속했다. 그 후 비드를 TBS 로 3 회 세정하고, 그에 뒤이어 Ser/Thr 검정 완충액으로 1 회 세정하고, Ser/Thr 검정 완충액 중에 희석된 750 μM 트레오닌 포스포펩티드 (K-R-pT-I-R-R) 용액에서 일정하게 흔들면서 10 분 동안 30℃ 에서 인큐베이션했다. 방출된 총 무기 인산 (Pi) 을 Malachite Green 포스페이트 탐지 용액 (키트에 포함됨) 을 사용하여 측정했다.

[0154] 실시예 3

[0155] *세포주*

[0156] 칼프로텍틴 (KB-S100A8/A9, 이전에 KB-MRP8/14 로 알려짐) 또는 모의-대조군 벡터 (KB-EGFP) 를 발현하도록 안정적으로 트랜스펙션된 상피 세포를 KB 세포로부터 이전에 보고된 바와 같이 생성했다 (Nisapakultorn et al., 2001. *Infect. Immun.* 69: 3692-3696). 간략히, *S100A8* (*MRP8*) 및 *S100A9* (*MRP14*) 칼프로텍틴 서브유닛 코딩 영역, 및 선별가능 마커 pSV2-*neo* (G418 설페이트-저항성 마커) 를 함유하는 포유류 발현 벡터, pIRES-EGFP

(Clontech, Palo Alto, CA) 로 KB 세포를 동시-트랜스펙션했다. 결과적인 세포주, KB-S100A8/A9 는 칼프로텍틴 복합체를 발현한다. 삽입물이 없는 pIRES-EGFP 및 pSV2-*neo* 의 동시-트랜스펙션에 의해 KB-EGFP 모의-트랜스펙션 대조군을 생성했다. KB-S100A8/A9 및 KB-EGFP 둘다 10% 소 태아 혈청 (FBS) 으로 보충되고 5% CO_2 에서 37℃ 에서 유지되는 MEM (CELLGRO, Mediatech, Inc., Manassas, VA) 에서 700 ㎍/㎖ G418 설페이트 (Geneticin, Mediatech Inc., Manassas, VA.) 중에서 유지했다. 세포를 모든 실험에 앞서 2 일 동안 G418 없는 10% FBS 함유 MEM (완전 배지) 에서 유지했다.

[0157] TR146 세포는 MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 에서 Dr. Reuben Lotan 로부터 얻은 볼 암종 세포주이다. 세포를 상기와 같이 G418 없이 배양했다. 일부 세포를 S100A8/A9 의 발현 및 생산을 억제하는 shRNA 또는 모의 트랜스펙션 대조군으로 표준 방법을 사용하여 안정적으로 트랜스펙션했다.

[0158] *구강저 종양 형성의 동물 모델*

[0159] 6- 내지 8-주령 암컷 품종 01N70 [Cr:NIH(S)-nu/nu Nude]마우스를 12-hr 명-암 주기를 사용하는 특정 무병원체 조건에서 마이크로아이솔레이터 케이지 (microisolator cage) 내에 수용하고 음식 및 물을 무제한 공급했다. 동물을 O_2 2L min^{-1} 에서 5% 이소플루오란을 사용하여 마취시켰다. KB (1×10^5) 또는 TR146 (5×10^4) 세포 또는 트랜스펙션된 파생세포를 100 ㎕ 1:1 둘베코 포스페이트 완충 식염수 (DPBS)/MATRIGEL (BD Biosciences, San Jose, CA) 에 현탁시키고, 구강저에 동소 주입했다. 동물을 보행할 때까지 모니터링하고, 실험 동안 매일 체크했다. 주입후 제 17 일에, 마우스를 CO_2 로 안락사시켰다. 종양을 포함하는 구강 조직을 수집하고, DPBS 에서 헹구고, 10% 포르말린 용액에 보존하고, 파라핀-포매하고, 조직학 분석을 위해 헤마톡실린 및 에오신 (Histoserv Inc, Germantown, MD) 으로 염색했다.

[0160] 결과가 도 13 에 나타나 있다.

[0161] 실시예 4

[0162] 25% 2-티오우리딘을 첨가하고, 25% 5-메틸시티딘을 첨가하여 실시예 1 에 기재된 바와 같이 pGEM4Z.2bgUTR.150A 로부터 주형을 증폭시키고, mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion, Life Technologies Corp., Grand Island, NY,) 를 사용하여 ARCA 캡핑하여 mRNA 를 합성했다. *Trans*IT-mRNA 키트 (Mirus Bio LLC, Madison, WI) 를 사용하여 세포를 트랜스펙션했다. 트랜스펙션 실험 직후 3 마리의 공여체로부터 타액을 수집하고, 모으고, 12,000×g 에서 5 분 동안 원심분리하여 미립자를 제거하고, 타액 상청액을 모든 실험에 사용했다.

[0163] 용량-응답 관계를 보이도록 타액을 희석하고, 상피 세포 배양물과 함께 1 분, 3 분, 또는 5 분 동안 인큐베이션했다. 일부 실험에서, 타액-처리된 세포를 세정하여 처리를 역전시켰다. 타액 처리 직후, 세정을 실시하거나 실시하지 않고, 세포를 EGFP mRNA 로 트랜스펙션했다. mRNA 트랜스펙션 후 16 h 에, 세포를 4% 파라포름알데히드로 10 분 동안 고정하고, DAPI 로 핵을 염색했다. 형광 이미지를 형광 현미경으로 포착했다. 결과가 도 15 및 도 16 에 제시되어 있다.

[0164] 실시예 5

[0165] *치주염의 동물 모델 및 S100A8/A9 mRNA 처리의 효능*

[0166] 포르피로모나스 진지발리스 (Porphyromonas gingivallis)-유도 치주염에 대한 감수성을 야생형 C57BL/6 마우스 (이들은 S100A8/A9 -/-, 인간 S100A8/A9 의 상피 조직-특이적 발현이 있는 S100A8/A9-/- 마우스, 또는 잇몸 상피에 국소 적용된 S100A8/A9 mRNA 트랜스펙션을 받은 S100A8/A9-/- 마우스임) 에서 평가한다.

[0167] *포르피로모나스 진지발리스에 의한 구강 감염*

[0168] 포르피로모나스 진지발리스 ATCC 53977 (A7A1-28) (Costalonga, et al., 2009, *J Periodontal Res* 44:537-542) 는 다른 포르피로모나스 진지발리스 균주보다 더 큰 골 파괴를 유도한다 (Baker, et al., 2000, *Oral Microbiol Immunol* 15:27-32). 구강 감염을 야기하기 위해, 마우스를 항생제로 전처리하고, 2% 카르복시메틸셀룰로스 중 4×10^9 CFU 포르피로모나스 진지발리스 또는 대조군 락토바실루스 무리누스 (Lactobacillus murinus)를 이전에 기재된 바와 같이 경구 위관영양법에 의해 4 일 간격으로 6 회 공급했다 (Costalonga, et al., 2009, *J Periodontal Res* 44:537-542). 락토바실루스 무리누스는 치주 골 소실 또는 염증을 야기하지 않는다. 첫번째 위관영양법 전에 및 50 일 후에 마우스의 구강에서 샘플채취하여 포르피로모나스 진지발리스 및 락토바실루스 무리누스 집락형성을 시험한다.

[0169] *사용된 동물*

[0170] C57BL/6J 마우스 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 에 포르피로모나스 진지발리스 ATCC 53977 을 경구 위관영양법에 의해 접종한다. 모든 마우스를 특정 무병원체 (SPF) AAALAC-승인받은 시설에 수용한다. 이전 파워 계산에 기초하여, 각각의 처리 또는 대조군 (모의) 을 받는 21 마리의 마우스는 포르피로모나스 진지발리스 ATCC 53977-감염된 및 모의-감염된 마우스 사이에 치아 주변 골 파괴의 정도 (α 를 0.05 로 설정할 때) 에서 10-15% 의 90% 파워 차이를 탐지하기에 충분하다.

[0171] *염증의 측정*

[0172] 상악골 및 하악골을 0 및 50 일에 수확하고, 해부하고, 기재된 바와 같이 정준선에서 분리하여 4 개의 표본을 얻었다 (Costalonga, et al., 2009, *J Periodontal Res* 44:537-542). 각각의 실험군 또는 처리로부터의 오른쪽 반하악골 및 반상악골 14 개 중 7 개를 4% 파라포름알데히드에 고정하고, 1 주 동안 pH 8 에서 10% EDTA 에서 석회질제거했다. 표본을 기재된 바와 같이 파라핀에 포매하고 (Sato, et al., 1986, *Am J Pathol* 125:431-435) 헤마톡실린-에오신으로 염색하거나 OCT 에 동결시키고 면역 세포의 면역형광 식별을 위해 가공했다.

[0173] 인접치간 조직의 세포질을 특성분석하기 위해, 모든 3 개의 어금니의 표본을 수직적으로 (apico-coronally) 7 ㎛ 절개하여 근원심 (meso-coronally) 절편을 만든다. 염증 및 부착 손실 (attachment loss) 의 존재를 각각 염증 핵의 우세 및 시멘트질-사기질 접합부로부터 접합부 상피의 치근첨 이주에 의해 확인한다.

[0174] *하악으로부터 세균의 회수*

[0175] 수확 직후에, 오른쪽 반하악골 및 반상악골 14 개 중 다른 7 개를 사용하여, 뼈로부터 조직을 벗겨내거나 또는 결합 조직으로부터 상피층을 소화시키는 디스파제로 하악을 처리하여 잇몸 상피로부터 세균을 회수한다. 대안적으로, 미리환원된 배양 배지에서 하악을 균질화시킨다. 일부를 무산소실 내의 혈액 한천에 플레이팅하고, CFU 를 계수한다. 또한 분취물을 사용하여, 균질액에 대해 qPCR 을 사용하여 포르피로모나스 진지발리스 및 락토바실루스 무리누스의 수준을 추정한다.

[0176] *치조 골 소실의 확인*

[0177] 왼쪽 반하악골 및 반상악골에서 스캘펠을 사용하여 조심히 살을 발라낸다. 하악을 증류수 중에서 10 분 동안 끓이고, 1 N NaOH 에 3 hr 동안 배치하여 남은 각질 잇몸을 제거하고, 마지막으로 1% 메틸렌 블루로 1 분 동안 염색한다. 살을 발라낸 반하악골 및 반상악골을 설측을 위로 하여 유연한 몰드 위에 얹고, 기재된 바와 같은 디지탈 카메라가 장착된 입체현미경 아래서 40X 배율로 사진찍는다 (Costalonga, et al., 2009, *J Periodontal Res* 44:537-542). 샘플-대물 각도와 관련된 이미지 왜곡을 최소화하기 위해, 반하악골 및 반상악골의 설측 뷰 (lingual view) 를 표준화하여 볼 중간 교두의 먼쪽 가장자리와 혀 중간 교두의 먼쪽 가장자리 사이의 투영 면적이 10,000 ±500 픽셀이 되도록 했다. 사진찍은 하악을 각각의 3 개의 어금니의 시멘트질-사기질 접합부 (CEJ) 로부터 치조골 능선까지 어도비 포토샵 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA) 에서 표준화된 그리드를 사용하여 측정한다. 이전에 기재된 바와 같이 가시적인 치근본체의 표면적 내의 픽셀의 수로서 치조골 수준 변화를 간접 측정한다 (Costalonga, et al., 2009, *J Periodontal Res* 44:537-542).

[0178] 또한, 일부 하악을 마이크로 컴퓨터 단층촬영 (CT) 을 사용하여 평가한다.

[0179] *분석*

[0180] C57BL/6 마우스 및 S100A8/A9-/- 마우스에서 4 개의 독립적 군 (포르피로모나스 진지발리스-감염된, 락토바실루스 무리누스-감염된 대조군) 에서 골 면적 측정의 평균을 분산 분석에서 독립 변수로서 사용한다. 측정 방법의 감도는 90% 파워로 능선 뼈 (crestal bone) 수준의 10% 변화의 탐지를 허용한다.

[0181] 유사하게, S100A8/A9 의 존재 및 부재 하의 일반적으로 세균 및 포르피로모나스 진지발리스 및 구체적으로 대조군 락토바실루스 무리누스의 성장을 비교한다.

[0182] 염증을 반정량적으로 추정한다.

[0183] 인간 S100A8/A9 의 상피-특이적 구조 (rescue) 가 있는 C57BL/6 야생형 및 S100A8/A9-/- 마우스에서 치주염에 대한 감수성을 평가하기 위해, 포르피로모나스 진지발리스 또는 대조군 락토바실루스 무리누스를 사용하여 야생형 C57BL/6 (쥐과 S100A8/A9+/+) 마우스, S100A8/A9-/- 마우스, 및 인간 상피-특이적 S100A8 및 S100A9 로 녹-인 (knock-in) 하여 구조된 S100A8/A9-/- 마우스를 감염시킨다. C57BL/6 배경의 마우스에서 S100A8/A9 에

대한 삭제 돌연변이를 트랜스포손 통합가능 다유전자 벡터 (Moriarity et al., 2013, *NucleicAcids Res* 41:e92) 를 사용하여 마우스 내로 다유전자를 도입하는 시스템을 사용하여 구조한다. 이러한 시스템을 사용하여, ROSA26 유전자좌 (Soriano, P.. 1999, *Nature Genetics* 21:70-71) 를 S100A8 및 S100A9 에 대한 코딩 영역을 함유하는 다유전자 벡터로 표적화하여 K14 프로모터로 녹-인할 수 있다. 따라서, 녹-인은 오직 상피 세포에서 발현된다. 인간 S100A9 의 발현은 S100A8/A9-/- 마우스에서 마우스 S100A8 의 번역을 허용할 수 있으며, 그 이유는 마우스 S100A8 이 인간 S100A9 와 복합체화되어 하이브리드 이질이합체를 형성하지 않기 때문이다 (Propper et al., 1999, *J Biol Chem* 274:183-188).

[0184] 3 가지 품종의 마우스를 위에 기재된 바와 같이 포르피로모나스 진지발리스를 병원체로서, 락토바실루스 무리누스를 공생, 비-병원체 대조군으로서 사용하여 치주염의 발현에 대해 비교한다. 치주염은 야생형 C57BL/6 (쥐과 S100A8/A9+/+) 및 인간 상피-특이적 녹-인 (S100A8/A9-/- 배경) 품종에서 유사하게 발현된다. S100A8/A9-/- 마우스는 최고량의 치조 골 소실을 보인다.

[0185] 이 실험은 S100A8 및 S100A9 에 대한 코딩 영역이 치주염에 대한 저항성에서 선천 면역 인자라는 것을 보여준다. 치주염 확립 전후의 3 가지 품종의 연조직 조직병리학의 비교는 인간 및 쥐과 S100A8/A9 의 잇몸 상피에의 국소화 및 S100A8/A9-/- 마우스에서 감염 후 상피 완전성의 상실을 확인한다.

[0186] *인간 상피-특이적 S100A8/A9 의 녹-인*

[0187] 상피-특이적 S100A8/A9 를 ROSA26 유전자좌를 표적화하는 통합가능 다유전자 벡터 (Moriarity et al., 2013, *NucleicAcids Res* 41:e92) 를 사용하여 S100A8/A9-/- ES 세포에 녹-인한다. 록스-스탑-록스 (lox-stop-lox) 카세트를 K14 프로모터와 인간 S100A8 및 S100A9 코딩 영역을 함유하는 다유전자 벡터 사이에 배치한다. (인간 S100A8/A9 는 상피 세포 내에서 자발적으로 복합체를 형성한다 (Champaiboon et al., 2009, *J Biol Chem* 284:7078-7090)). Keratin14-CRE 및 다유전자 (S100A8 및 S100A9)^{cre} 조건부 대립유전자에 동종접합인 마우스를 이종교배하여 실험 마우스를 생성한다. 성공적으로 이종교배된 마우스는 상피 조직에서 S100A8/A9 를 발현한다. 본원에서 S100A8/A9-/- 로서 기재된 마우스는 실제로 S100A9-/- 이며, S100A8 mRNA 는 발현하지만 S100A8 단백질은 발현하지 않는다 (Hobbs et al., 2003, *Mol Cell Biol* 23:2564-2576; Manitz et al., 2003, *Mol Cell Biol* 23:1034-1043). 쥐과 S100A8/A9 는 온전하게 유지되어 S100A8/A9 과발현은 오직 플록스-인 (flox-in) 된 인간 단백질로부터이다.

[0188] *치주염의 평가*

[0189] 위에 기재된 방법 및 접근법을 사용하여, 염증을 추정하고, 포르피로모나스 진지발리스-감염된, 야생형, S100A8/A9-/- 및 인간 S100A8/A9 녹-인 (S100A8/A9-/- 배경) 에서 상피의 포르피로모나스 진지발리스 감염 및 치조골 수준을 실험 시작시 및 초기 접종 후 50 일에 측정한다. 데이타를 각각의 배경의 락토바실루스 무리누스-감염된 (대조군) 마우스에 비교하여 포르피로모나스 진지발리스 감염에 대한 저항성에서의 S100A8/A9 의 역할을 확인하다.

[0190] *분석*

[0191] C57BL/6 마우스, S100A8/A9-/- 마우스, 및 S100A8/A9-/- 배경에서 인간 S100A8/A9 구조된 마우스에서 골 면적 측정의 평균을 6 개의 독립적 군 (포르피로모나스 진지발리스-감염된, 락토바실루스 무리누스-감염된 대조군) 의 분산 분석에서 독립 변수로서 사용한다. 측정 방법의 감도는 90% 파워로 능선 뼈 수준의 10% 변화의 탐지를 허용한다. 유사하게, S100A8/A9 의 존재 및 부재 하의 상피에서 일반적으로 세균 포르피로모나스 진지발리스 및 구체적으로 대조군 락토바실루스 무리누스의 성장을 비교한다.

[0192] 염증을 반정량적으로 추정한다.

[0193] S100A8/A9 mRNA 가 잇몸에 국소 적용된 및 적용되지 않은 C57BL/6 S100A8/A9-/- 마우스에서 치주염에 대한 감수성을 평가하기 위해, 포르피로모나스 진지발리스 또는 대조군 락토바실루스 무리누스를 사용하여 야생형 (쥐과 S100A8/A9+/+) 마우스, S100A8/A9-/- 마우스, 및 패키징된 인간 S100A8/A9 mRNA 의 국소 적용에 의해 구조된 S100A8/A9-/- 마우스를 감염시킨다. 상피 세포는 S100A8 및 S100A9 에 특이적인 mRNA 로 트랜스펙션되어 두가지 단백질을 모두 발현하고 항균성 S100A8/A9 복합체를 형성할 수 있다 (Zou et al., 2013, *Infect Immun* 81:3975-3983). 트랜스펙션 시스템은 본질적으로 국소적이다. 패키징된 mRNA 는 상피 표면에 직접 첨가되고, mRNA 는 상피 세포 내로 흡수되고, 새로운 S100A8 및 S100A9 단백질이 동일한 세포에서 동시-발현되고, 침입 세균성 병원체에 대한 저항성이 증가한다.

[0194] 생체내 실험을 위해, 마우스 구강 상피로부터 타액을 세정하여 패키징된 mRNA 의 흡수에 대한 타액 장벽을 감소시킨다. 본질적으로 폐에서의 사용에 대해 기재된 바와 같이 고강도 아토마이저를 사용하여 패키징된 mRNA 를 치아-잇몸 경계면에 직접 적용하기에 앞서 상피를 공기 건조시킨다 (Kormann et al., 2011, *Nature Biotechnology* 29:154-157; Mays et al., 2013, *J Clin Invest* 123:1216-1228). 아토마이저에는 좁은 구멍 바늘이 갖추어져 있어서 의도하는 경계면으로의 mRNA 의 방향을 허용한다.

[0195] S100A8/A9 mRNA 는 포르피로모나스 진지발리스의 각각의 적용 하루 전에 잇몸에 적용되어 프로토콜의 방해를 최소화한다. 3 가지 조건의 마우스를 위에 기재된 바와 같이 포르피로모나스 진지발리스를 병원체로서, 락토바실루스 무리누스를 공생, 비-병원체 대조군으로서 사용하여 치주염의 발현에 대해 비교한다.

[0196] 치주염은 야생형 (쥐과 S100A8/A9+/+) 및 패키징된 인간 S100A8/A9 mRNA 의 국소 적용에 의해 구조된 S100A8/A9-/- 마우스에서 유사하게 명백하다. S100A8/A9-/- 마우스는 최고량의 치조 골 소실을 보인다.

[0197] 이 실험은 S100A8 및 S100A9 이 치주염에 대한 잇몸 상피 저항성에서 선천 면역 인자라는 것을 확인해준다. 치주염 확립 전후의 3 가지 조건의 연조직 조직병리학의 비교는 잇몸 상피에서 인간 및 쥐과 S100A8/A9 의 국소화 및 S100A8/A9-/- 마우스에서 감염 후 상피 완전성의 상실을 확인한다.

[0198] *분석*

[0199] 야생형 (쥐과 S100A8/A9+/+) 마우스, S100A8/A9-/- 마우스, 및 패키징된 인간 S100A8/A9 mRNA 의 국소 적용에 의해 구조된 S100A8/A9-/- 마우스에서 골 면적 측정의 평균을 6 개의 독립적 군 (포르피로모나스 진지발리스-감염된, 락토바실루스 무리누스-감염된 대조군) 의 분산 분석에서 독립 변수로서 사용한다. 분석은 위에 기재된 바와 같다.

[0200] 예시적 구현예

[0201] 구현예 1. 하기 단계를 포함하는 방법:

[0202] 세포 증식을 억제하는데 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 를 상피 세포 내로 도입하는 단계; 및

[0203] 세포가 부착-비의존적 환경에서 증식할 가능성을 감소시키는데 유효한 양으로 세포가 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용하는 단계.

[0204] 구현예 2. 구현예 1 에 있어서, 폴리펩티드가 칼프로텍틴, S100A8, 또는 S100A9 를 포함하는 방법.

[0205] 구현예 3. 하기 단계를 포함하는 방법:

[0206] 선천 면역에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 를 세포 내로 도입하는 단계; 및

[0207] 세포가 병원체에 의해 감염될 가능성을 감소시키는데 유효한 양으로 세포가 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용하는 단계.

[0208] 구현예 4. 구현예 3 에 있어서, 폴리펩티드가 카텔리신 항균성 단백질 (CAMP), 칼프로텍틴, S100A8, S100A9, β-디펜신, S100A7, 분비성 백혈구 저해인자, 리포칼린 2, 또는 리소자임을 포함하는 방법.

[0209] 구현예 5. 선형 구현예 중 어느 하나에 있어서, mRNA 가 안정화 모이어티를 포함하는 방법.

[0210] 구현예 6. 구현예 5 에 있어서, 안정화 모이어티가 5' 캡을 포함하는 방법.

[0211] 구현예 7. 구현예 5 에 있어서, 안정화 모이어티가 3' 연장을 포함하는 방법.

[0212] 구현예 8. 선형 구현예 중 어느 하나에 있어서, 세포가 점막 상피 세포인 방법.

[0213] 구현예 9. 구현예 3-8 중 어느 하나에 있어서, 세포가 병원체에 노출되는 것을 허용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0214] 구현예 10. 구현예 3-9 중 어느 하나에 있어서, 병원체가 세균을 포함하는 방법.

[0215] 구현예 11. 구현예 10 에 있어서, 세균이 카프노사이토파가 스푸티게나 (*Capnocytophaga sputigena*), 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*), 스타필로코쿠스 종 (*Staphylococcus* spp.), 스트렙토코수스 종 (*Streptococcus* spp.), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivallis*), 탄네렐라 포르시티아 (*Tannerella forsythia*), 트레포네마 덴티콜라 (*Treponema denticola*), 슈

도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 클라미디아 종 (*Chlamydia* spp.), 네이세리아 종 (*Neisseria* spp.), 가르드네렐라 종 (*Gardnerella* spp.), 또는 트리코모나스 종 (*Trichomonas* spp.) 을 포함하는 방법.

[0216] 구현예 12. 구현예 3-9 중 어느 하나에 있어서, 병원체가 진균을 포함하는 방법.

[0217] 구현예 13. 구현예 12 에 있어서, 진균이 진균 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 아시네토박테르 바우만니이 (*Acinetobacter baumannii*), 또는 아스페르길루스 종 (*Aspergillus* spp.) 을 포함하는 방법.

[0218] 구현예 14. 구현예 3-13 중 어느 하나에 있어서, 세포가 병원체에 의한 감염에 의해 야기되는 상태를 갖는 또는 가질 위험에 처한 대상의 세포인 방법.

[0219] 구현예 15. 구현예 14 에 있어서, 상태가 암종을 포함하는 방법.

[0220] 구현예 16. 선행 구현예 중 어느 하나에 있어서, 세포 내로 mRNA 를 도입하기 전에 세포를 세정하여 세포로부터 점막 유체를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0221] 구현예 17. 구현예 16 에 있어서, 점막 유체가 타액을 포함하는 방법.

[0222] 구현예 18. 하기를 포함하는 조성물:

[0223] 상피 세포에서 세포 증식을 억제하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA; 및

[0224] 생체내 전달 비히클.

[0225] 구현예 19. 구현예 18 에 있어서, 폴리펩티드가 칼프로텍틴, S100A8, 또는 S100A9 를 포함하는 조성물.

[0226] 구현예 20. 구현예 18 또는 구현예 19 에 있어서, 폴리펩티드가 상피 세포가 부착-비의존적 환경에서 성장될 때 상피 세포의 세포 증식을 억제하는 조성물.

[0227] 구현예 21. 하기를 포함하는 조성물:

[0228] 선천 면역에 관여하는 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA; 및

[0229] 생체내 전달 비히클.

[0230] 구현예 22. 구현예 21 에 있어서, 폴리펩티드가 카텔리신 항균성 단백질 (CAMP), 칼프로텍틴, S100A8, S100A9, β-디펜신, S100A7, 분비성 백혈구 저해인자, 리포칼린 2, 또는 리소자임을 포함하는 조성물.

[0231] 구현예 23. 구현예 18-22 에 있어서, mRNA 가 안정화 모이어티를 포함하는 조성물.

[0232] 구현예 24. 구현예 23 에 있어서, 안정화 모이어티가 5' 캡을 포함하는 조성물.

[0233] 구현예 25. 구현예 23 에 있어서, 안정화 모이어티가 3' 연장을 포함하는 조성물.

[0234] 본원에서 언급된 모든 특허, 특허 출원, 및 공개, 및 전자적으로 입수가능한 물질 (예를 들어, 예를 들어, GenBank 및 RefSeq 에서의 뉴클레오티드 서열 제출, 및 예를 들어, SwissProt, PIR, PRF, PDB 에서의 아미노산 서열 제출, 및 GenBank 및 RefSeq 에서의 주석달린 코딩 영역으로부터의 번역) 의 완전한 공개는 그 전문이 참조로 포함된다. 본 출원의 공개와 본원에 참조로 포함된 임의의 문헌의 공개 사이에 임의의 불일치가 존재하는 경우, 본 출원이 우선할 것이다. 전술한 상세한 설명 및 실시예는 오직 이해의 명확성을 위해 제시된 것이다. 그것으로부터 불필요한 제한이 해석되지 않아야 한다. 본 발명은 제시되고 기재된 정확한 세부사항에 제한되지 않으며, 당업자에게 명백한 변화가 청구항에 의해 정의된 본 발명에 포함될 것이다.

[0235] 다르게 명시되지 않으면, 명세서 및 청구항에서 사용되는 성분의 양, 분자량 등을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 용어 "약" 에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 다르게 반대로 명시되지 않으면, 명세서 및 청구항에 제시된 수치 한도는 본 발명에 의해 추구되는 원하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 적어도, 그리고 청구범위에 대한 균등론을 제한하려는 시도로서가 아니라, 각각의 수치 한도는 적어도 보고된 유효 숫자 자리수에 비추어 그리고 일상적 반올림 기술을 적용하여 해석되어야 한다.

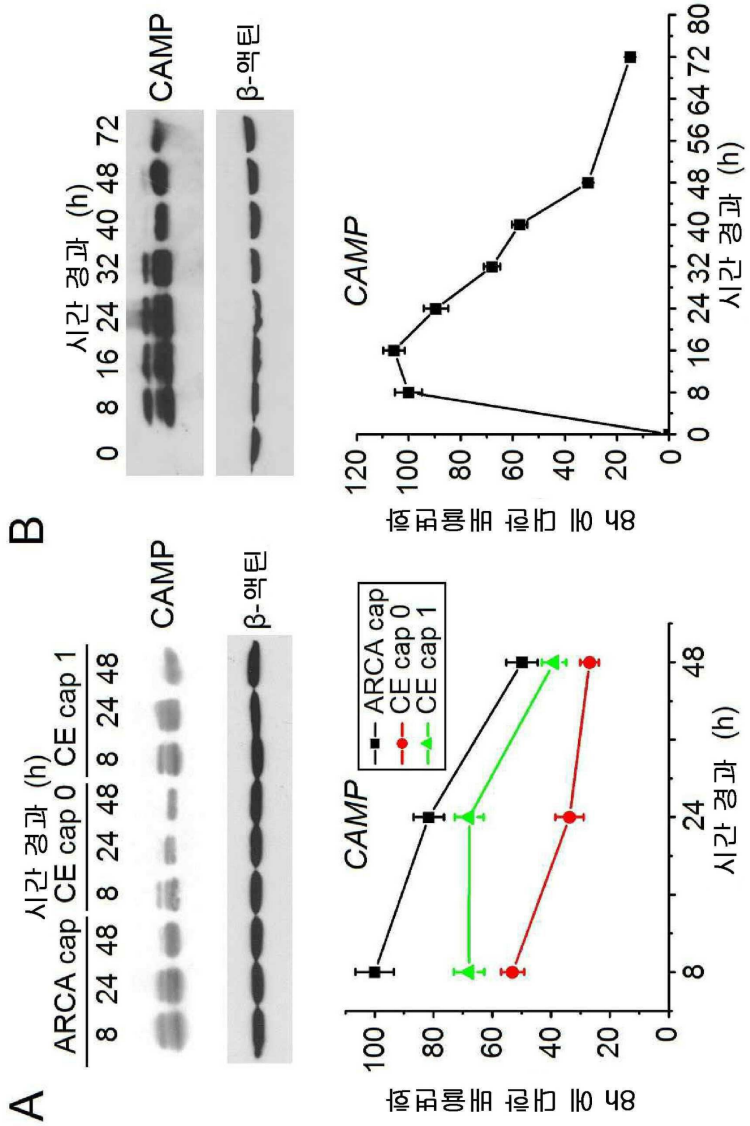
[0236] 본 발명의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위 및 한도가 근사치임에도 불구하고, 구체적 예에서 제시된 수치는 가능한 한 정확히 보고되어 있다. 그러나, 모든 수치는 그들 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로부터 필수적으로 초래되는 범위를 본질적으로 함유한다.

[0237] 모든 제목은 독자의 편의를 위한 것이고, 명시되지 않는 한 제목 뒤에 이어지는 본문의 의미를 제한하는데 사용

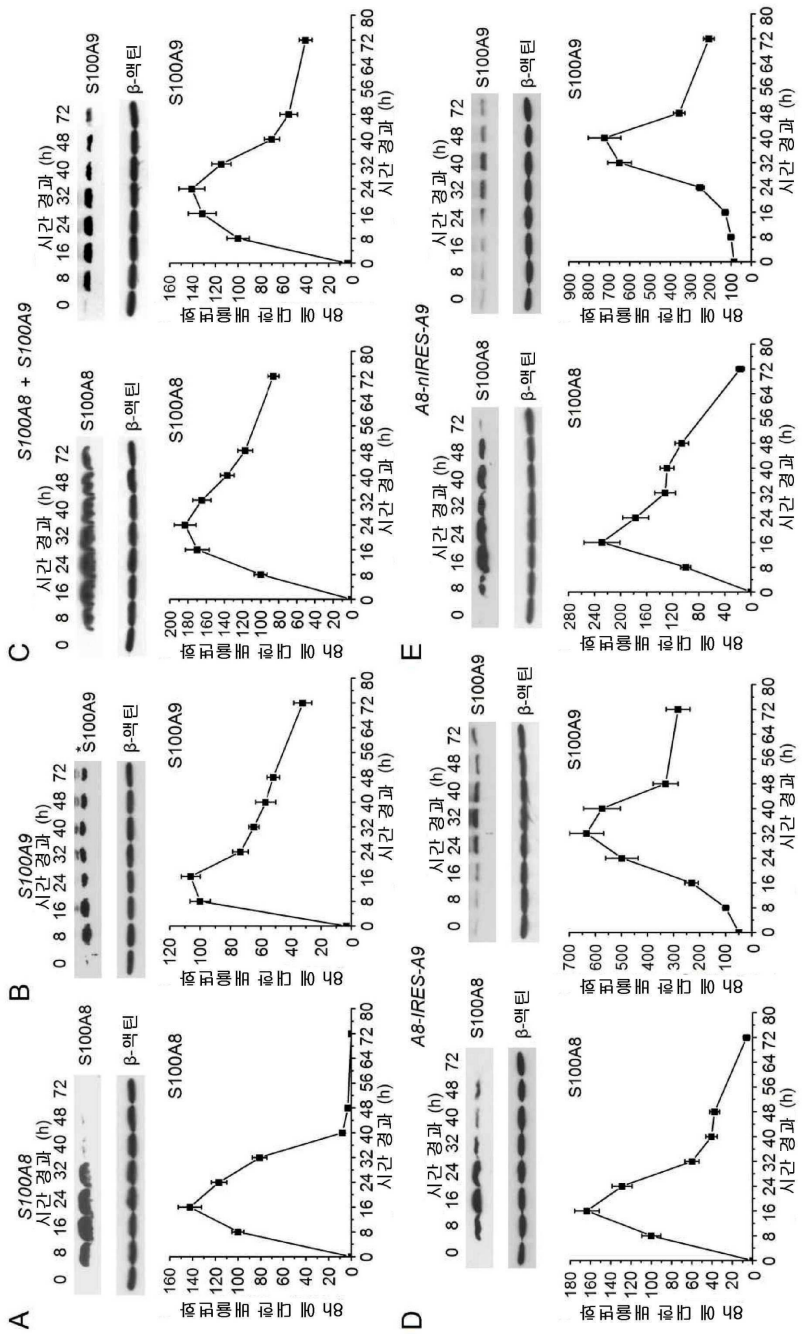
되어서는 않된다.

도면

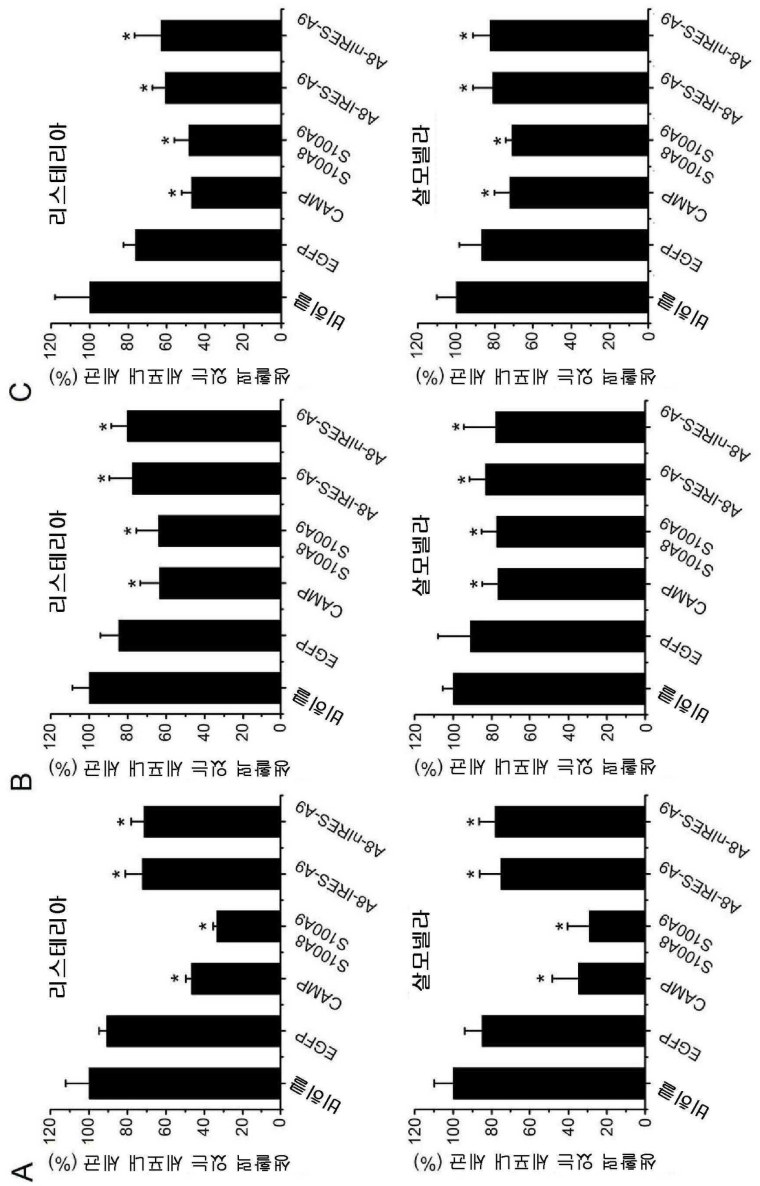
도면1



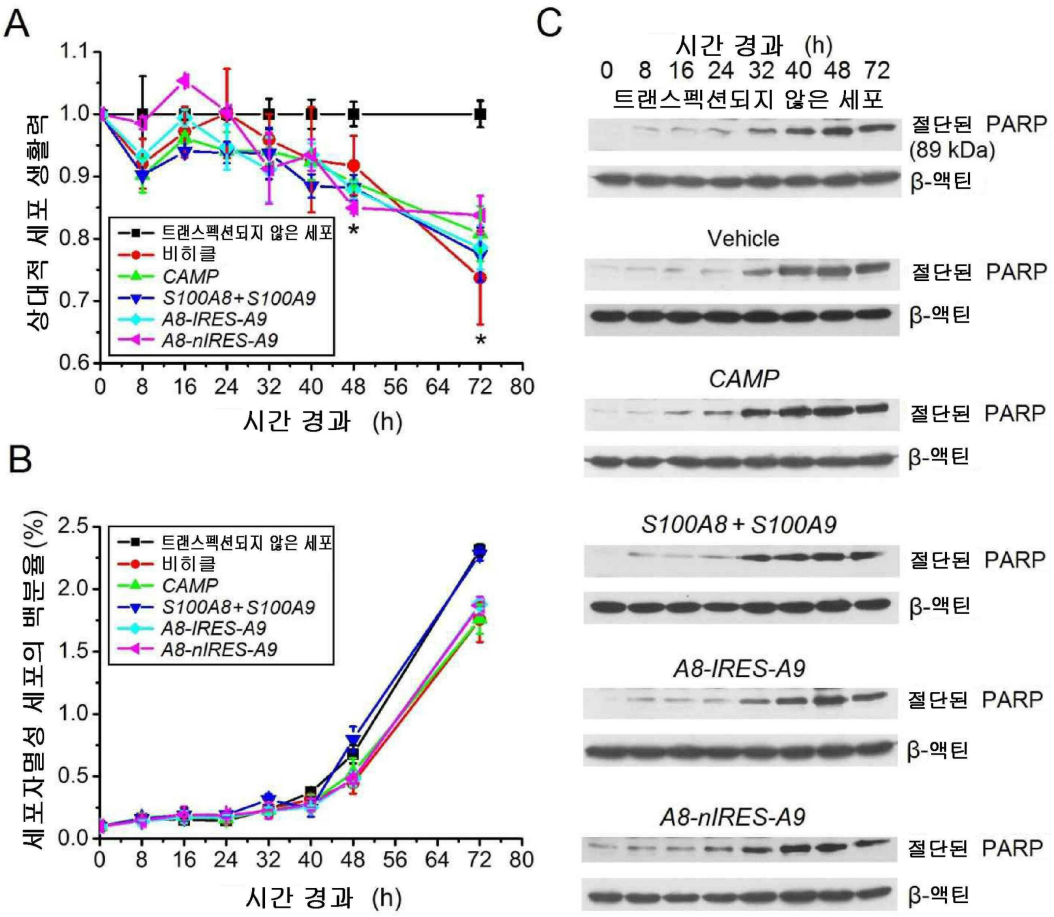
도면2


A
S100A8
시간 경과 (h)
0 8 16 24 32 40 48 72
S100A8
β-액틴
S100A8
시간 경과 (h)
B
S100A9
시간 경과 (h)
0 8 16 24 32 40 48 72
S100A9
β-액틴
S100A9
시간 경과 (h)
C
S100A8 + S100A9
시간 경과 (h)
0 8 16 24 32 40 48 72
S100A8
S100A9
β-액틴
D
A8-IRES-A9
시간 경과 (h)
0 8 16 24 32 40 48 72
S100A8
S100A9
β-액틴
E
A8-nIRES-A9
시간 경과 (h)
0 8 16 24 32 40 48 72
S100A8
S100A9
β-액틴

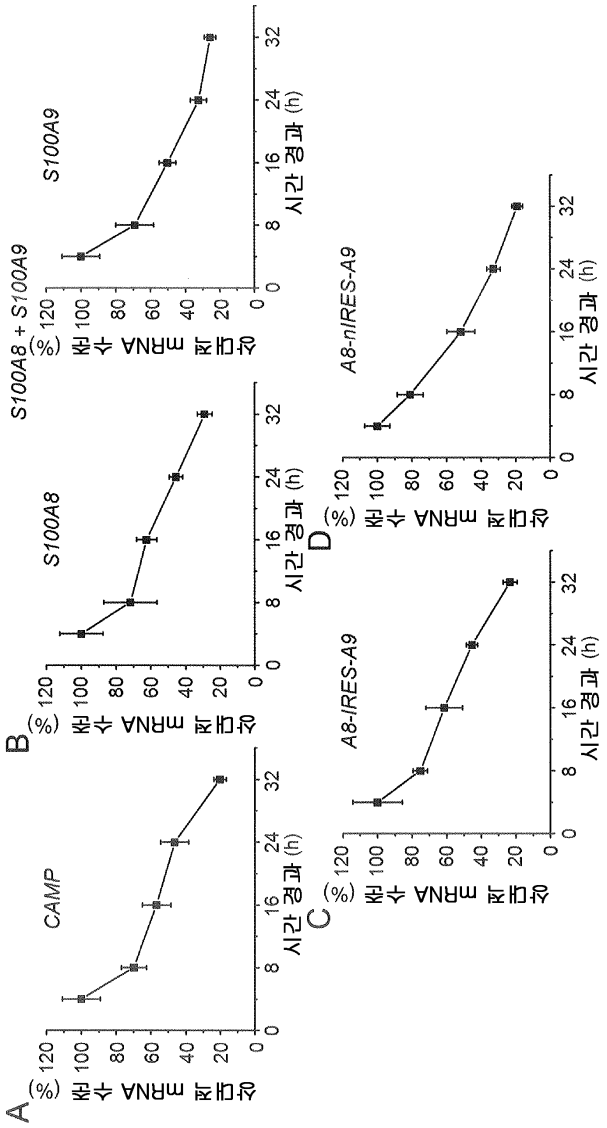
도면3


A
B
C
리스테리아
살모넬라
생활력 있는 세포내 세균 (%)
0
20
40
60
80
100
120
비히클
EGFP
CAMP
S100A8
S100A9
A8-IRES-A9
A8-nIRES-A9
*

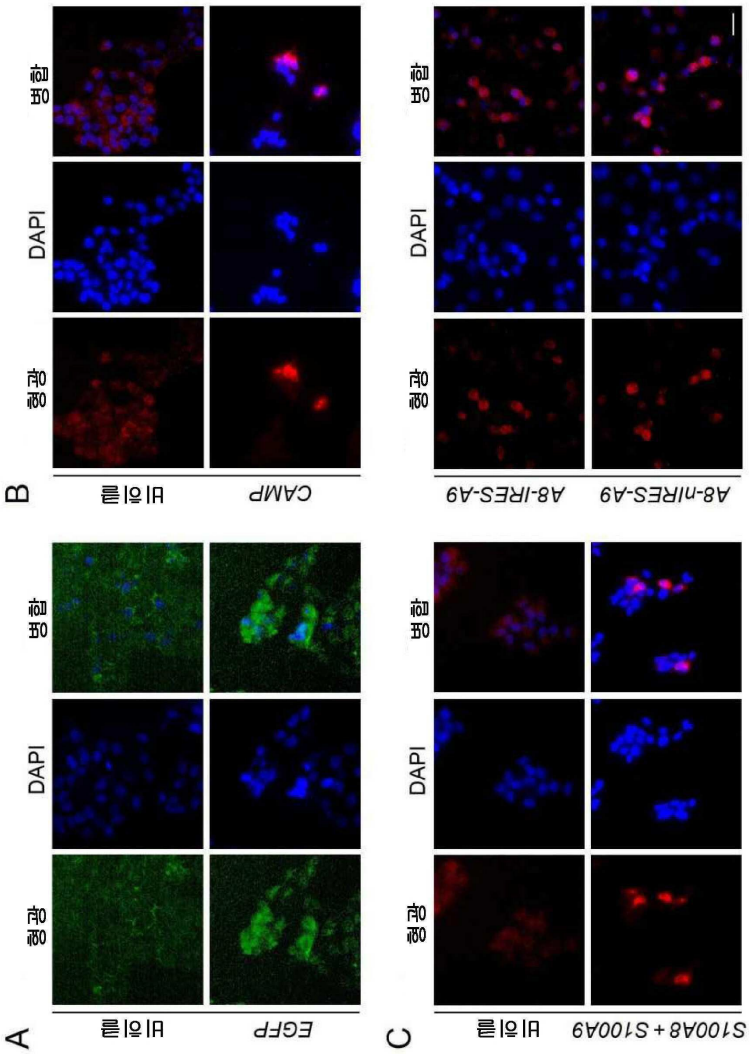
도면4


A
상대적 세포 생활력
시간 경과 (h)
트랜스펙션되지 않은 세포
비히클
CAMP
S100A8+S100A9
A8-IRES-A9
A8-nIRES-A9
B
세포자멸성 세포의 백분율(%)
시간 경과 (h)
C
시간 경과 (h)
0 8 16 24 32 40 48 72
트랜스펙션되지 않은 세포
절단된 PARP (89 kDa)
β-액틴
Vehicle
CAMP
S100A8 + S100A9
A8-IRES-A9
A8-nIRES-A9

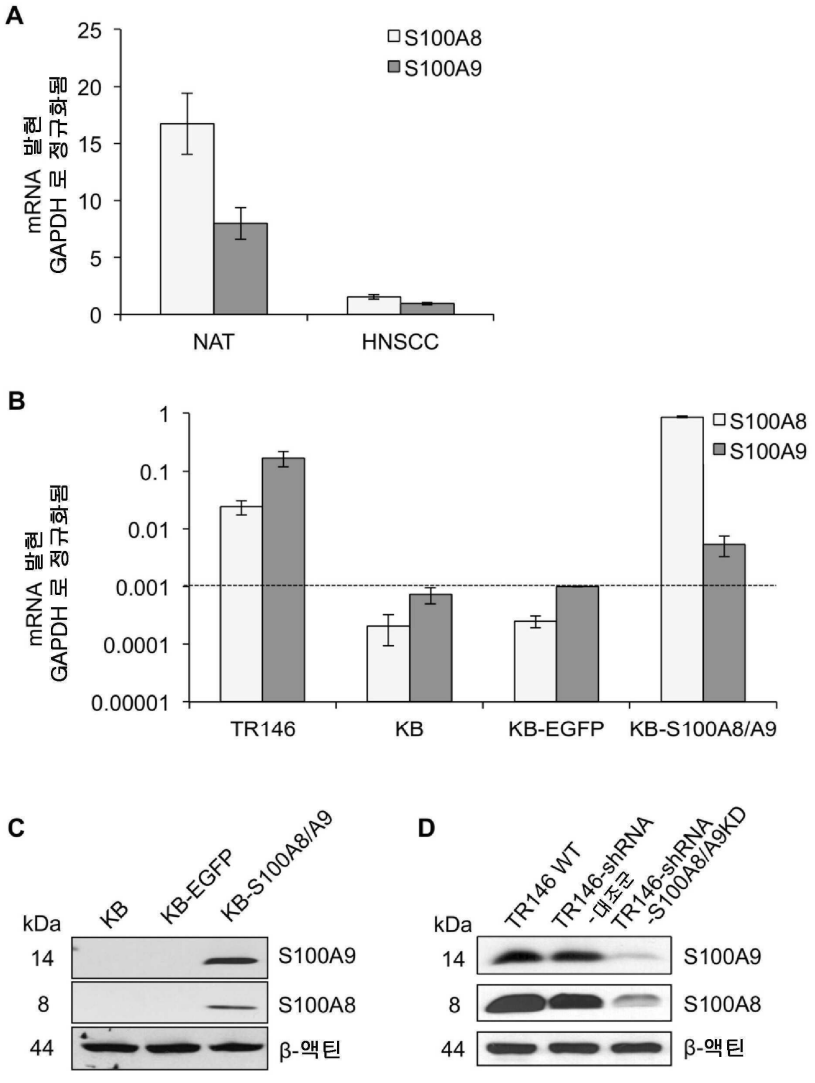
도면5


A
CAMP
B
S100A8
S100A8 + S100A9
S100A9
C
A8-IRES-A9
D
A8-nIRES-A9
(%)
상대 mRNA 발현량
시간 경과 (h)
0
8
16
24
32
0
20
40
60
80
100
120

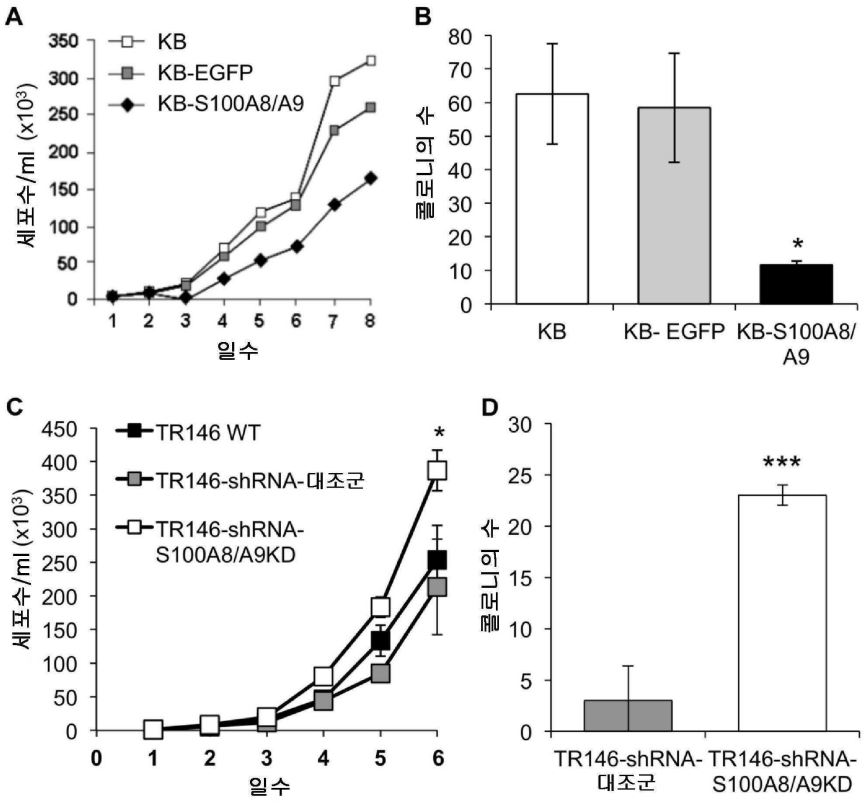
도면6


A
B
C
EGFP
CAMP
S100A8 + S100A9
A8-IRES-A9
A8-nIRES-A9
비히클
형광
DAPI
병합

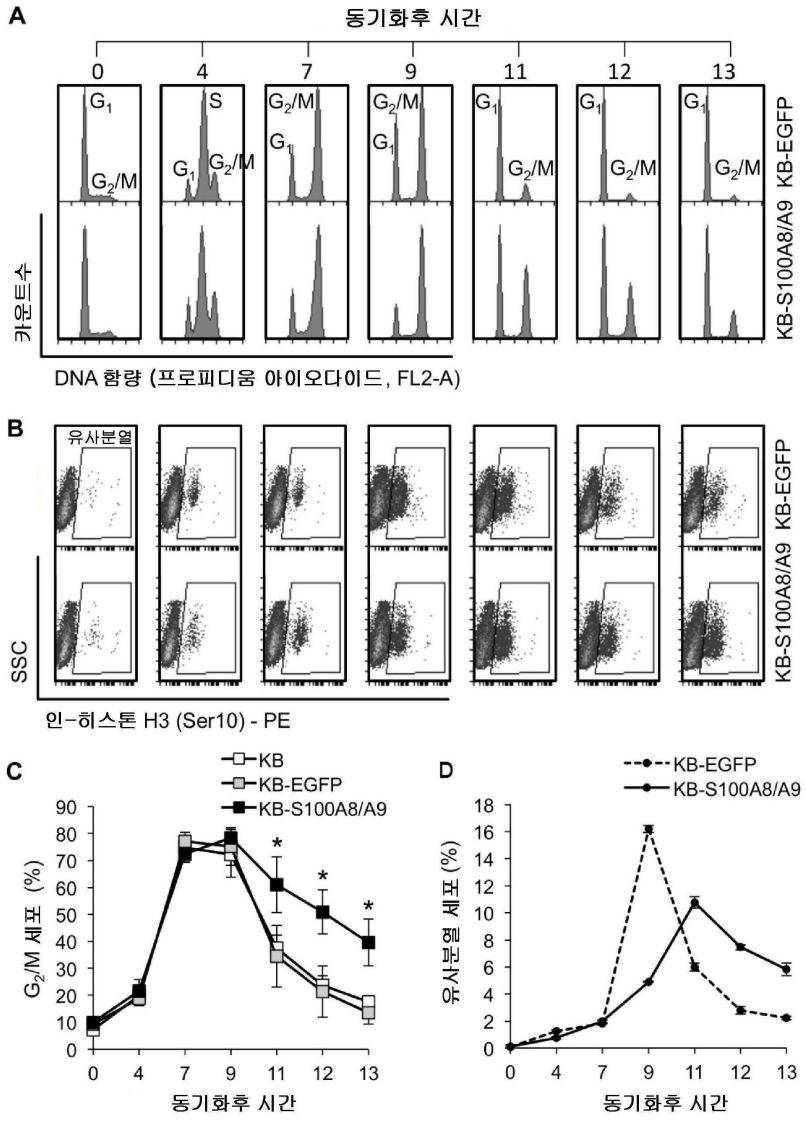
도면7


A
25
20
15
10
5
0
mRNA 발현
GAPDH 로 정규화됨
S100A8
S100A9
NAT
HNSCC
B
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
mRNA 발현
GAPDH 로 정규화됨
S100A8
S100A9
TR146
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
C
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
kDa
14
8
44
S100A9
S100A8
β-액틴
D
TR146 WT
TR146-shRNA -대조군
TR146-shRNA -S100A8/A9KD
kDa
14
8
44
S100A9
S100A8
β-액틴

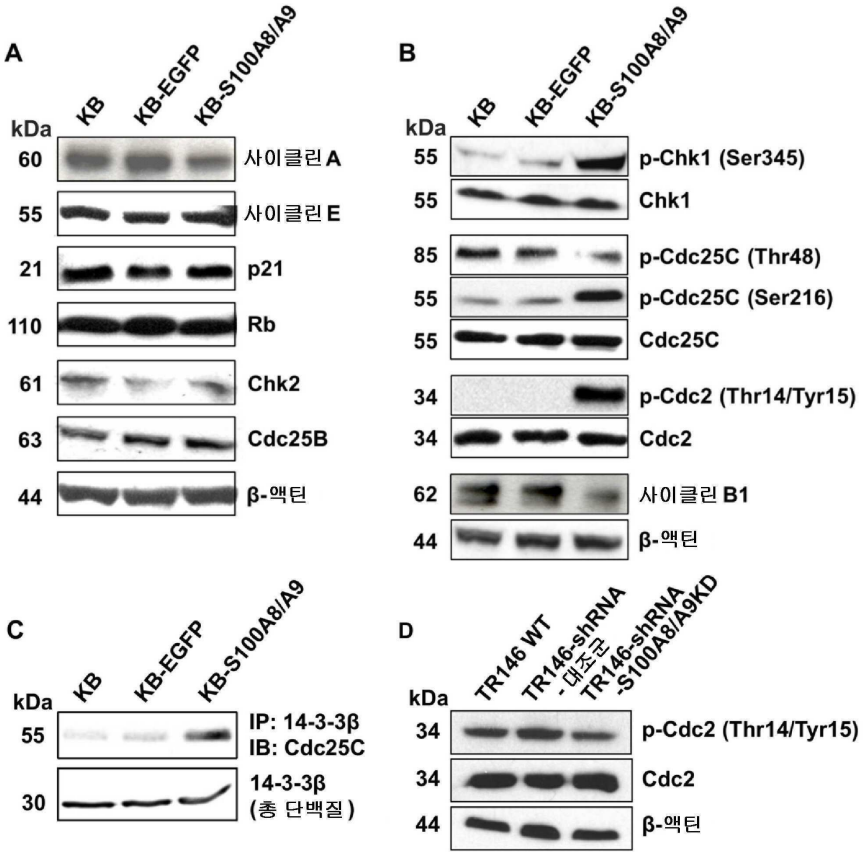
도면8


A
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
세포수/ml (x10³)
일수
B
콜로니의 수
KB
KB- EGFP
KB-S100A8/A9
C
TR146 WT
TR146-shRNA-대조군
TR146-shRNA-S100A8/A9KD
세포수/ml (x10³)
일수
D
콜로니의 수
TR146-shRNA-대조군
TR146-shRNA-S100A8/A9KD

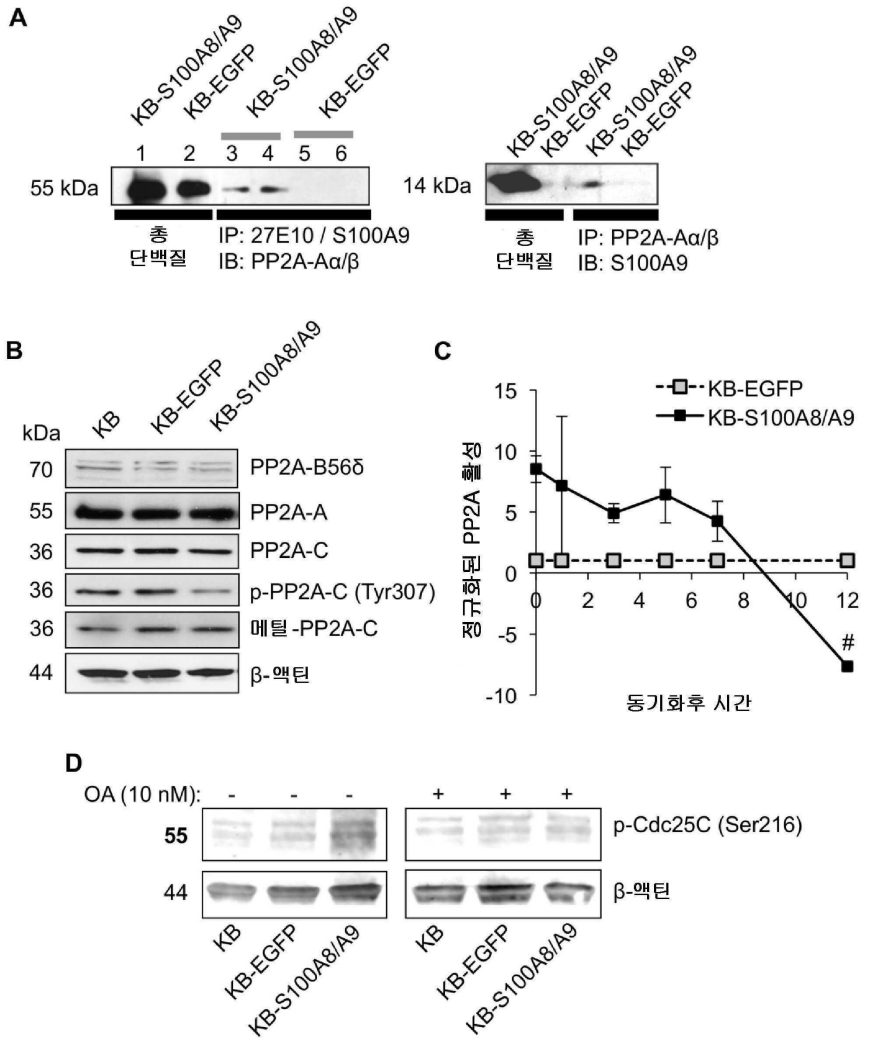
도면9


A
동기화후 시간
0
4
7
9
11
12
13
G1
S
G2/M
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
카운트수
DNA 함량 (프로피디움 아이오다이드, FL2-A)
B
유사분열
SSC
인-히스톤 H3 (Ser10) - PE
C
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
G2/M 세포 (%)
동기화후 시간
D
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
유사분열 세포 (%)
동기화후 시간

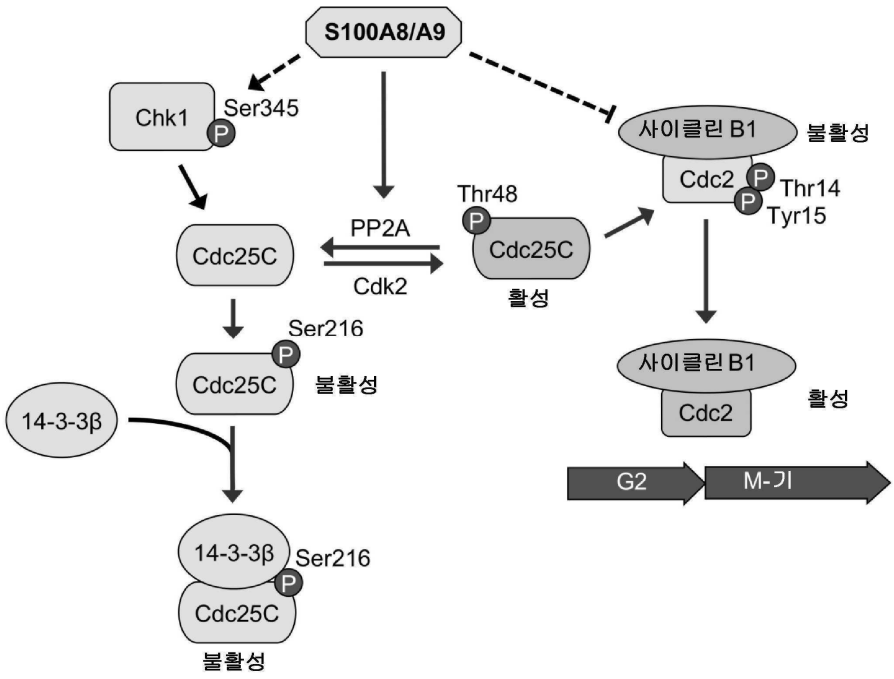
도면10


A
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
kDa
60
사이클린 A
55
사이클린 E
21
p21
110
Rb
61
Chk2
63
Cdc25B
44
β-액틴
B
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
kDa
55
p-Chk1 (Ser345)
55
Chk1
85
p-Cdc25C (Thr48)
55
p-Cdc25C (Ser216)
55
Cdc25C
34
p-Cdc2 (Thr14/Tyr15)
34
Cdc2
62
사이클린 B1
44
β-액틴
C
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
kDa
55
IP: 14-3-3β
IB: Cdc25C
30
14-3-3β
(총 단백질)
D
TR146 WT
TR146-shRNA - 대조군
TR146-shRNA -S100A8/A9KD
kDa
34
p-Cdc2 (Thr14/Tyr15)
34
Cdc2
44
β-액틴

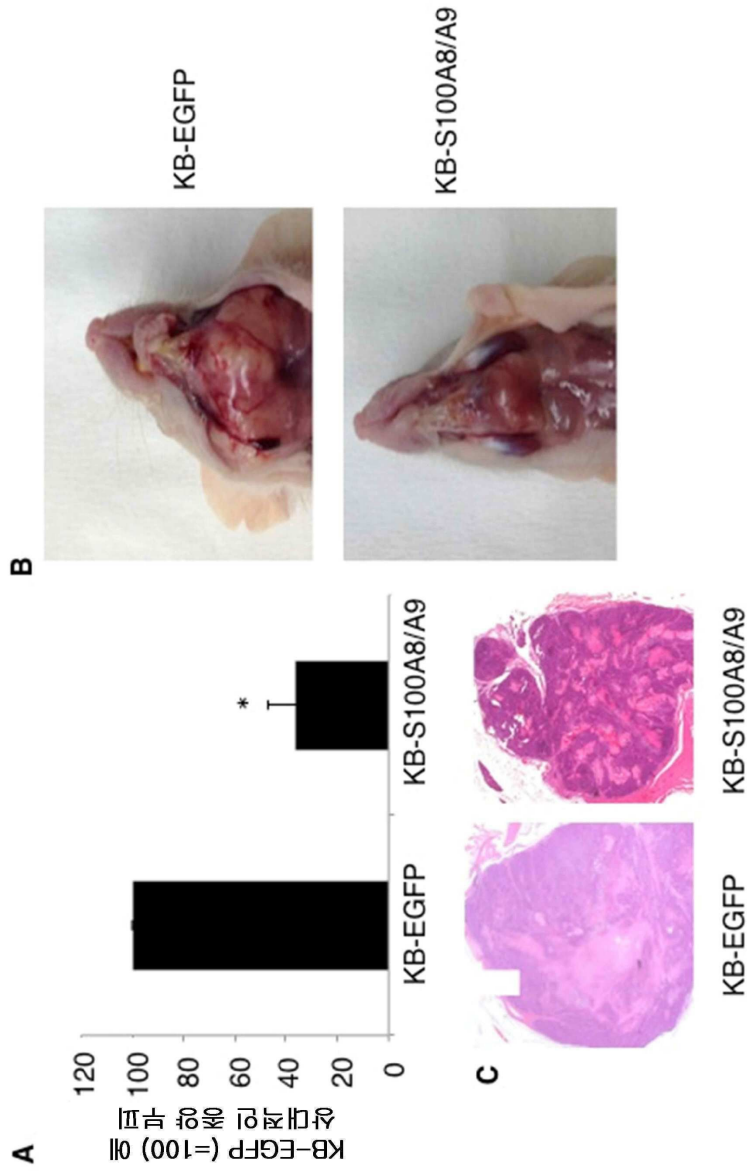
도면11


A
KB-S100A8/A9
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
KB-EGFP
1 2 3 4 5 6
55 kDa
총 단백질
IP: 27E10 / S100A9
IB: PP2A-Aα/β
14 kDa
총 단백질
IP: PP2A-Aα/β
IB: S100A9
B
kDa
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
70 PP2A-B56δ
55 PP2A-A
36 PP2A-C
36 p-PP2A-C (Tyr307)
36 메틸-PP2A-C
44 β-액틴
C
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
정규화된 PP2A 활성
15
10
5
0
-5
-10
0 2 4 6 8 10 12
#
동기화후 시간
D
OA (10 nM): - - - + + +
55
44
p-Cdc25C (Ser216)
β-액틴
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
KB
KB-EGFP
KB-S100A8/A9

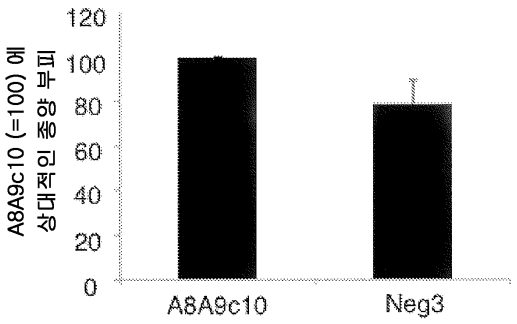
도면12


S100A8/A9
Chk1
Ser345
P
사이클린 B1
불활성
Cdc2
P
Thr14
P
Tyr15
Thr48
P
PP2A
Cdc25C
Cdk2
Cdc25C
활성
Ser216
P
Cdc25C
불활성
사이클린 B1
Cdc2
활성
14-3-3β
G2
M-기
14-3-3β
Ser216
P
Cdc25C
불활성

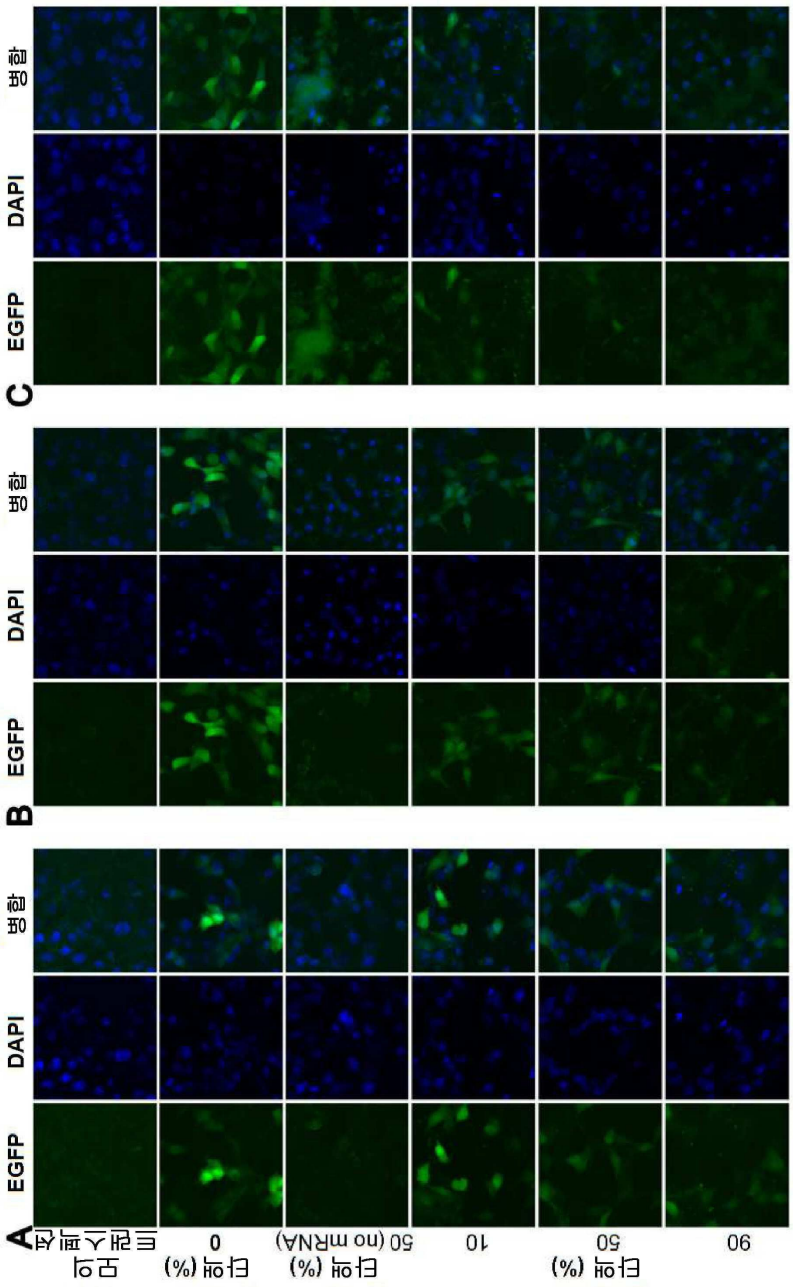
도면13


A
KB-EGFP (=100) 에
상대적인 종양 부피
120
100
80
60
40
20
0
*
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
B
KB-EGFP
KB-S100A8/A9
C
KB-EGFP
KB-S100A8/A9

도면14


A8A9c10 (=100) 에
상대적인 종양 부피
120
100
80
60
40
20
0
A8A9c10
Neg3

도면15



도면16

