



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0125839
(43) 공개일자 2009년12월07일

(51) Int. Cl.

A61K 31/41 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7022294

(22) 출원일자 2008년03월24일

심사청구일자 2009년10월26일

(85) 번역문제출일자 2009년10월23일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2008/001649

(87) 국제공개번호 WO 2008/117970

국제공개일자 2008년10월02일

(30) 우선권주장

60/896,499 2007년03월23일 미국(US)

60/896,504 2007년03월23일 미국(US)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김재홍

경기도 고양시 일산동구 마두동 배마마을 극동삼환 아파트 211-102

최정아

서울특별시 성북구 상월곡동 동아에코빌아파트 115-605

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 23 항

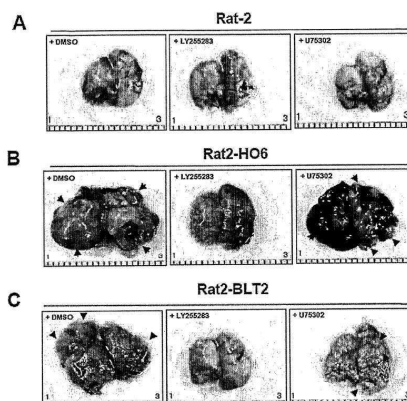
(54) 인간의 암 치료를 위한 류코트리엔 B4 수용체 BLT2의 저해제의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간의 암 치료용 류코트리엔 B4 수용체 BLT2의 저해제의 신규한 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 BLT2 저해제를 포함하는 인간의 암 치료용 약학적 조성물 및 BLT2 저해제를 이용한 인간의 암 치료방법에 관한 것이다.

본 발명자들은 방광, 전립선, 췌장, 및 유방암과 같은 인간의 암의 생존 인자로서 BLT2의 역할을 증명하였으며, BLT2 저해제를 항-암 약물로서 사용할 수 있음을 발견하였다. 본 발명자들은 BLT2가 암 세포의 전이와 종양의 혈관신생에서 중요한 역할을 함을 증명하였으며, BLT2 저해제가 암 세포의 세포사멸을 유도하고, 암 세포의 전이를 억제하고, 또는 종양의 혈관신생을 억제함으로써 항-암 활성을 나타냄을 증명하였다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

김은영

서울특별시 강동구 성내2동 229-13

김근영

충청북도 충주시 지현동 현대아파트 102-904

김철민

경상남도 마산시 구암1동 1339-18 경상아파트 107호

서지민

서울특별시 양천구 신정 5동 937-5 삼성빌라 B-104

김현주

인천광역시 계양구 효성2동 하나아파트 1-1606

이진욱

대전광역시 서구 관저1동 대자연마을아파트 101-905

특허청구의 범위

청구항 1

인간의 암 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 용도.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2와 결합하여 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 화합물인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 LY255283 (1-[5-ethyl-2-hydroxy-4-[[6-methyl-6-(1/-/-tetrazol-5-yl)heptyl]oxy]phenyl]-ethanone)인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 BLT2에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2의 발현을 저해하는 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 siRNA 올리고뉴클레오티드는 서열번호 7의 센스 서열 및 서열번호 8의 안티센스 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2의 상류(upstream) 또는 하류(downstream) 신호전달 경로를 저해하는 화합물인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 인간의 암은 BLT2 단백질 또는 종양유전자 라스(Ras)를 과발현하는 종양인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 인간의 암은 방광암, 전립선암, 췌장암 및 유방암으로 구성된 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 인간의 암 치료는 암 세포들의 세포사멸 유도, 암 세포들의 전이 저해 또는 종양의 혈관 신생을 저해시킴으로서 이루어지는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 12

제 1항에 있어서, 인간의 암 치료용 약제의 제조를 위한 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과, (b) 다른 항암제들과의 혼합물의 용도.

청구항 13

제 12항에 있어서, 유방암 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2 길항제인 LY255283과 에피루비신(epirubicin)의 조합인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 14

제 12항에 있어서, 전립선암 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2 길항제인 LY255283과 안드로젠(androgen) 수용체 길항제의 조합인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 15

활성성분으로서 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질을 포함하는 인간의 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

활성성분으로서 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 억제하는 물질과 (b) 활성 성분으로서 다른 항암제들과의 혼합물을 포함하는 인간의 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 치료학적으로 유효한 양을 암 환자에 투여하는 것을 포함하는 암 환자의 치료 방법.

청구항 18

(a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과 (b) 다른 항암제들의 치료학적으로 유효한 양을 암 환자에 투여하는 것을 포함하는 암 환자의 치료 방법.

청구항 19

하기 단계들을 포함하는 인간의 암 치료용 물질의 스크리닝 방법:

(a) BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석될 상기 물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준을 측정하는 단계로서, 상기 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준은 하향-조절되면, 상기 물질은 인간의 암 치료 효능을 갖는 것으로 결정하는 단계.

청구항 20

BLT2 유전자의 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 인간의 암 검출용 키트.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 키트는 서열번호 9의 정방향(forward) 서열과 서열번호 10의 역방향(reverse) 서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 22

제 20항에 있어서, 상기 키트는 서열번호 11의 정방향(forward) 서열과 서열번호 12의 역방향(reverse) 서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

BLT2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 인간의 암 검출용 키트.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 인간의 암 치료를 위한 류코트리엔 B4 수용체(leukotriene B4 receptor) BLT2의 저해제의 신규한 용

도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 BLT2 저해제를 포함하는 인간의 암 치료용 약학적 조성물 및 BLT2 저해제를 이용한 인간의 암 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 류코트리엔(Leukotriene)은 급성 및 만성염증을 매개하는 5-리폭시제나제(5-LO)와 5-리폭시제나제 활성 단백질(FLAP)의 작용에 의해 아라키돈산(AA)으로부터 유래되는 염증성 리피드 매개체 군이다. 류코트리엔에서 첫 번째로 분리되는 류코트리엔 B₄(LTB₄)는 백혈구의 활성화(activation), 주화성(chemotaxis) 및 탈과립(degranulation)을 포함하는 여러 염증 반응을 유도한다 (Samuelsson, 1987; Woo, 2002; Yokimizo, 1997). 게다가, LTB₄의 과잉생성은 기관지천식과 류마티스 관절염과 같은 염증관련 병들에 영향을 미친다 (Chen, 1994; Griffiths, 1995; Turner, 1996). LTB₄는 BLT1과 BLT2 수용체들에 결합함으로써 생물학적 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Yokimizo, 1997; Choi, 2008). LTB₄ 수용체들의 대부분의 연구들은 높은 친화력의 수용체인 BLT1에 초점이 맞춰져 있으며, 상기 BLT1은 백혈구들과 같은 염증 세포들에 광범위하게 발현되고, 염증형성 과정에 관여한다 (Yokimizo, 1997). BLT1과 대조적으로, BLT2는 LTB₄에 대해 낮은 친화력을 갖으며, 여러 조직들에 폭 넓게 발현되며, 비장, 백혈구 및 난소에서 높은 수준으로 발현된다 (Yokimizo, 1997; Kamohara, 2000). BLT2에 대한 생리학적 기능은 아직 명확히 증명되지 않았다. 최근, BLT2는 종양유전자(oncogene) 라스(Ras)의 다운스트림(downstream) 구성요소로서 라스(Ras)의 형질전화를 매개하는 것으로 인식되었다 (Choi, 2008). 라스(Ras) 신호전달의 다운스트림 구성요소로서 'LTB₄-BLT2'-cascade의 제시된 역할과 일치하게, LTB₄의 증가된 생성이 Rat2-HO6 세포에서 발견되었다 (Yoo, 2004). 흥미로운 것은, 본 발명자들은 BLT2를 과잉생성하는 Rat2-BLT2 세포들에서 LTB₄의 생성이 촉진되는 것을 관찰하였으며 (Yoo, 2004), 이는 서로 상대방의 유도를 일으키는 LTB₄와 BLT2 사이의 누화(crosstalk)의 가능성을 제시한 것이다. 이들 발견은 형질전환된 표현형(phenotype)이 BLT2를 통해 작용하여 LTB₄-의존적 캐스케이드를 증폭하는 고레벨 LTB₄의 자가분비 또는 파라크린(paracrine) 효과에 의해, 유도된다는 것을 제시한다. H-Ras^{V12} 시그널링하는 다운스트림 중간 생성물에 의한 LTB₄와 BLT2의 제안된 기능에 따라서, 종양유전자 H-Ras^{V12} 세포들을 발현하는 Rat2-HO6 세포들은 cPLA₂, 5-LO 및 FLAP의 발현을 증가시키며, 상기 세 가지 단백질들은 LTB₄의 합성을 유도한다 (Yoo, 2004). 이점에 관해서, cPLA₂ 발현은 수 많은 암 세포주들에서 상향조절되며, 형질전환된 표현형의 유도에 기여한다 (Blaine, 2001; Heasley, 1997). 유사하게, 5-LO는 사람의 췌장, 유방 및 전립선 암들에서 상향조절된다 (Gupta, 2001; Hennig, 2002; Jiang, 2003; Matsuyama, 2004). 게다가, 5-LO와 LTB₄ 수용체들은 사람의 췌장 암에서 높게 발현되지만, 정상적인 췌장관 조직에서는 그렇지 않으며 (Jiang, 2003; Ding, 2005), LTB₄ 수용체 BLT1의 길항제인 LY293111가 성장을 억제시키고, 사람의 췌장암 세포들의 세포사멸을 유도한다 (Tong, 2002). 하지만, 악성 형질전환(malignant transformation)에서 BLT2의 역할이 설명되어야 하는 것이 남아있다.

<3> 상기 배경기술을 기초로하여, 본 발명은 (1) 암 세포들의 세포사멸을 유도, (2) 암 세포들의 전이 가능성을 억제, (3) 암 세포들의 혈관신생을 차단하기 위하여 BLT2 저해제의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 (4) Rat2-BLT2 stable 세포들의 세포 성장을 측정함으로써 BLT2 신호전달을 스크리닝하기 위한 새로운 전략을 포함한다. 마지막으로, 본 발명은 (5) 종양 형성에 있어서 중요한 현상인 사람의 여러 종양들에서 BLT2 과잉생성의 새로운 관찰을 포함한다. 따라서, 본 발명은 사람의 종양을 억제하는 치료적 조성물을 개발하기 위한 수단으로써 BLT2의 과잉-활성(over-activation) 또는 과발현의 방해로 표적으로 하는 어떤 전략도 포함한다.

<4> 본 출원서 전반에 걸쳐, 몇몇 특허 및 공개특허는 참조로서 삽입되어 인용된다. 이러한 특허 및 공개특허의 상세한 설명은 본 출원서에 편입되어 본 발명 및 본 발명이 속하는 기술분야의 수준을 더욱 충분히 설명한다.

발명의 상세한 설명

<5> 본 발명의 목적은 인간의 암 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2 저해제의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

<6> 또한, 본 발명의 다른 목적은 활성성분으로서 BLT2 저해제를 포함하는 인간의 암 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

<7> 또한, 본 발명의 다른 목적은 환자에 BLT2 저해제를 투여하는 것을 포함하는, 암 환자의 치료방법을 제공하는 것이다.

- <8> 또한, 본 발명은 BLT2의 발현 또는 신호전달 수준을 감소시키는지를 결정하는 것을 포함하는, 암 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- <9> 또한, 본 발명의 다른 목적은 BLT2 유전자를 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브 또는 BLT2 단백질을 검출하기 위한 항체를 포함하는, 인간의 암 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- <10> 본 발명은 인간의 암 세포들의 전이를 억제하고 세포사멸의 촉진을 이끄는 BLT2 저해제를 찾는것을 기초로 하였다. 부가적으로, 에피루비신 또는 다른 화학요법의 작용제들과 BLT2 길항제인 LY255283 혼합물의 사용은 사람 유방암 세포들의 상승적인 세포사멸을 야기시킨다. BLT2 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드와 같은 새로운 BLT2 저해제들을 사용함으로써, 많은 BLT2-신호전달 억제 효과가 관찰되었다. 따라서, 본 발명은 방광암, 유방암, 전립선암 및 췌장암과 같은 인간의 여러 종양들에 대항하는 치료상의 작용제들을 조제하기위한, LY255283, BLT2 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 다른 BLT2 신호전달 저해제들을 포함하는 새로운 조성물에 대한 것이다. 본 발명은 또한 방광암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 뇌종양, 피부암 및 간암을 포함하는 인간의 대부분의 종양들에서 BLT2가 최소 양으로 발현하는 정상 조직들에 비해 BLT2가 과잉발현됨을 발견하는 것을 기초로하였다. 그리고 본 발명은 과잉발현된 BLT2와 과잉활성된 신호전달이 종양형성을 매개하는 데에 중요한 작용을 함을 발견하는 것을 기초로하였다. 따라서, 본 발명은 인간의 종양에 대한 치료적 조성물을 개발하기 위한 수단으로서 BLT2의 과잉-활성 또는 과발현에 대항하는 타겟팅 방법의 임의적 용도를 포함한다.
- <11> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인간의 암 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 용도를 제공한다. 본 출원서에서, 상기 용어 “BLT2의 발현을 저해한다”는 BLT2의 전사, mRNA 프로세싱, 번역, 전좌(translocation), 및 성숙(maturation) 중 어느 단계를 저해하는 것을 의미하고, 상기 용어 “BLT2의 세포내 신호전달을 저해한다”는 인간의 암을 유도하기 위한 BLT2에 LTB4의 결합, BLT2의 활성화 및 그것의 세포내 신호전달 경로 중 어느 단계를 저해하는 것을 의미한다.
- <12> 인간 BLT2 유전자의 뉴클레오티드 서열은 NCBI(NM_019839)에서 이용가능하고 본 출원서에 서열번호 1로 표시되어 있다. BLT2는 2 종류의 CDS 형태, 장형 CDS(1618-2787) 및 단형 CDS(1711-2787)를 갖는데, 이들 염기 서열은 서열번호 2 및 서열번호 4로 표시되어 있다. 장형 BLT2 단백질의 아미노산 서열은 NCBI(NM_019839)에서 이용가능하고 서열번호 3으로 표시되어 있다. 단형 BLT2 단백질의 아미노산 서열은 NCBI(AB029892)에서 이용가능하고 서열번호 5로 표시되어 있다.
- <13> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 BLT2에 결합하여 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 화합물일 수 있다. 상기 화합물은 BLT2 길항제(antagonist)라고 불리기도 하는데, 이는 BLT2에 대한 LTB4의 작용을 상쇄하는 화합물을 의미한다. 상기 화합물은 상업적으로 이용가능한 화학 DB로부터 본 발명의 스크리닝 방법에 따라 스크리닝될 수 있다.
- <14> 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 LY255283 (1-[5-ethyl-2-hydroxy-4-[[6-methyl-6-(1H-tetrazol-5-yl)heptyl]oxy]phenyl]-ethanone)일 수 있다. 도 1a는 LY255283의 화학적 구조를 보여준다. LY255283은 BLT 수용체의 경쟁적인 길항제이다. LY255283은 10 μ M의 농도에서 80%까지 호산구 주화성(eosinophil chemotaxis)을 저해하고 260 nM의 IC50으로 호산구 막에 방사선 표지된 LTB4의 결합을 저해하는 것으로 알려져 있다 [Ann N Y Acad Sci 629 274-287 (1991)]. 또한, LY255283은 신규한 류코트리엔 B4 수용체 길항제로 알려져 있는데, 이는 폐지에서 호중구의 활성을 제한하여 내독소(endotoxin)에 의해 유도되는 급성 폐 손상(acute lung injury)을 방지한다 [Surgery. 1993 Aug;114(2):191-8]. 그러나, LY255283의 항암 활성은 본 발명자들에 의해 처음으로 밝혀졌다.
- <15> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 BLT2에 대한 항체일 수 있다. 상기 항체는 LTB4와 경쟁적으로 BLT2에 결합하므로, BLT2의 세포내 신호전달을 저해할 수 있다. 상기 항체는 항원으로서 BLT2 또는 그 단편을 사용하여 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 생산하기 위한 전통적인 방법들에 따라 생산될 수 있다.
- <16> 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 BLT2의 발현을 저해하는 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 상기 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오티드는 서열번호 2에서 설명하는 바와 같이 BLT2 mRNA의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 염기서열을 갖는다.
- <17> 본 명세서에 사용된 상기 용어, “안티센스 올리고뉴클레오티드”는 타겟 mRNA의 염기서열에 상보적이고, 타겟 mRNA에 결합하여 단백질로의 번역을 방해하는, 핵산, 바람직하게는, DNA, RNA 또는 그 유도체(derivatives)를 의미하는 것으로 간주된다. 본 발명의 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 BLT2 mRNA의 번역, 전좌, 성숙 또는

다른 생물학적 기능을 저해할 수 있는, BLT2 mRNA에 상보적으로 결합하는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 상기 안티센스 핵산은 길이가 6-100, 바람직하게는 8-60, 더욱 바람직하게는, 10-40 뉴클레오타이드이다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 더 높은 저해 효능을 위해 염기(base), 당(sugar) 또는 백본(backbone)에서 적어도 하나의 변형(modification)을 포함할 수 있다 (De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 상기 변형된 핵산 백본은 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 포스포트리에스터(phosphotriester), 메틸 포스포네이트(methyl phosphonate), 단사슬 알킬 또는 사이클로알킬 당 사이 결합(short chain alkyl or cycloalkyl intersugar linkages) 또는 단사슬 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 당 사이 결합(short chain heteroatomic or heterocyclic intersugar linkages)을 포함한다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moieties)를 포함할 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 하나 이상의 변형된 염기들, 예를 들어, 하이포크산틴(hypoxanthine), 6-메틸아데닌(methyladenine), 5-메틸 피리미딘(특히, 5-메틸시토신(methylcytosine)), 5-히드록시메틸시토신(hydroxymethylcytosine, HMC), 글리코실 HMC(glycosyl HMC) 및 젠티오바이오실 HMC(gentobiosyl HMC), 뿐만 아니라 합성 뉴클레오베이스(synthetic nucleobases), 예컨대, 2-아미노아데닌(aminoadenine), 2-(메틸아미노)아데닌((methylamino)adenine), 2-(이미다졸릴알킬)아데닌((imidazolylalkyl)adenine), 2-(아미노알킬아미노)아데닌((aminoalkylamino)adenine) 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데노신(other heterosubstituted alkyladenines), 2-티오우라실(thiouracil), 2-티오티민(thiOTHYMIN), 5-브로모우라실(bromouracil), 5-히드록시메틸우라실(hydroxymethyluracil), 8-아자구아닌(azaguanine), 7-디아자구아닌(deazaguanine), N⁶(6-아미노헥실)아데닌(N⁶(6-aminohexyl)adenine) 및 2,6-디아미노퓨린(diaminopurine)을 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드의 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 활성 또는 세포 섭취를 강화시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 하나 이상의 모이어티(moieties) 또는 콘주게이트(conjugates)에 화학적으로 결합하는 것을 포함한다. 이러한 모이어티는 콜레스테롤 모이어티(cholesterol moiety), 콜레스테릴 모이어티(cholesteryl moiety)(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6553(1989))와 같은 지질 모이어티, 콜린산(cholic acid)(Manoharan et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 4:1053(1994)), 티오에테르(thioether), 예컨대 헥실-S-트리틸티올(hexyl-S-tritylthiol)(Manoharan et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306(1992); Manoharan et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 3: 2765(1993)), 티오펜(phenylthio)(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 20:533(1992)), 지방족 사슬(aliphatic chain), 예컨대 도데칸디올(dodecanol) 또는 운데실 잔기(undecyl residues)(Saison-Behmoaras et al. EMBO J., 10:111(1991); Kabanov et al. FEBS Lett., 259:327(1990); Svinarchuk et al. Biochimie, 75:49(1993)), 인지질(phospholipid), 예컨대 디-헥사데실-락-글리세롤(di-hexadecyl-rac-glycerol) 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-헥사데실-락-글리세로-3-H-포스포네이트(triethylammonium 1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3-H-phosphonate)(Manoharan et al. Tetrahedron Lett., 36:3651(1995); Shea et al. Nucl. Acids Res., 18:3777(1990)), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(polyamine or polyethylene glycol chain)(Manoharan et al. Nucleosides & Nucleotides, 14:969(1995)), 또는 아다만탄 아세트산(adamantane acetic acid)(Manoharan et al. Tetrahedron Lett., 36: 3651(1995))를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 올리고뉴클레오타이드는 지방 친화성의 모이어티를 포함하며, 이러한 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법들은 본 발명이 속하는 기술분야, 예를 들어, U.S. Pat. Nos. 5,138,045, 5,218,105 및 5,459,255에 알려져 있다. 상기 언급된 변형들은 뉴클레아제(nuclease) 분해에 대해 안정성을 강화시켜 타겟 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 친화도(affinity)를 증가시킨다.

- <18> 상기 안티센스 분자는 시험관내에서 전통적으로 합성되어 세포로 옮겨진다. 또한, 외래 서열로부터 전사에 의해 세포내부적으로 생산된다. 시험관내 합성은 RNA 중합효소 I를 필요로 한다. 안티센스 RNA를 제조하기 위한 시험관내 전사는 반대방향(opposite orientation)에 인식부위(MCS)의 복제지점(origin)을 갖는 벡터를 사용한다. 상기 안티센스 RNA는 바람직하게는 펩티드로의 번역을 저하하기 위한 번역 종결코돈(translation stop codon)을 포함한다.
- <19> 바람직한 구현예에 따르면, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2의 타겟 영역(1738-1752)에 상보적인, 서열번호 6의 염기서열을 가질 수 있다.
- <20> 바람직한 구현예에 따르면, 상기 siRNA 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2의 타겟 영역(1705-1724)에 상보적인, 서열번호 7의 센스 서열과 서열번호 8의 안티센스 서열을 가질 수 있다.
- <21> 본 명세서에 사용된 상기 용어 “siRNA”는 RNA 간섭(RNA interference) 또는 유전자 침묵(gene silencing)를 매개하는 핵산 분자를 말한다 (WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914 참조). 타겟 유전자의 발현을 저해하기 위한 siRNA는 효과적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자 치료

방법을 제공한다. 식물, 곤충, 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*) 및 기생충에서 처음 사용되었으며 최근에는 포유동물 세포 연구에 사용되고 있다.

- <22> 본 발명의 siRNA 분자는 센스 RNA 가닥(BLT2 mRNA에 대응하는 서열을 갖는) 및 안티센스 RNA 가닥(BLT2 mRNA에 상보적인 서열을 갖는)으로 구성될 수 있으며 2중구조(duplex structure)를 형성한다. 다른 방법으로, 본 발명의 siRNA 분자는 자신의-상보적인 센스 및 안티센스 가닥들을 포함하는 단일가닥 구조를 가질 수 있다.
- <23> 본 발명의 siRNA는 두 가닥이 완전하게 쌍을 이루는 RNA 이중구조에 한정되지 않으며 비-상보적인 염기를 갖는 매치되지 않는 부분 및 상반되는 염기가 없는 융기(bulge)와 같은 쌍을 이루지 않는 부분을 포함할 수 있다. 상기 siRNA의 전체 길이는 10-100 뉴클레오티드, 바람직하게는 15-80 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 20-70 뉴클레오티드이다.
- <24> 상기 siRNA는 블런트(blunt) 또는 부착 말단(cohesive end)을 포함하는 한 RNAi 효과에 기인하는 BLT2 발현을 침묵(silent)하게 할 수 있게 한다. 상기 부착 말단은 3' 말단 돌출 구조(overhanging structure) 또는 5' 말단 돌출 구조에서 만들어 질 수 있다. 상기 siRNA는 자신의-상보적인 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)을 삽입함으로써 구성될 수 있다. 발현된 siRNA는 분자 간 혼성화(intramolecular hybridization)에 의해 헤어핀 구조(hairpin structure)를 형성하여, 그 결과 스템-앤-루프(stem-and-loop) 구조의 형성한다. 상기 스템-앤-루프 구조는 시험관내 또는 생체내에서 제조되어 RNAi를 매개하는 활성 siRNA 분자를 생성한다.
- <25> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 BLT2의 상류 또는 하류 신호전달 경로를 저해하는 화합물일 수 있다.
- <26> 바람직한 구현예에서, 상기 인간의 암은 BLT2 단백질 또는 종양유전자 라스(Ras)의 과잉발현에 의해 유발된 어떠한 암일 수 있다. 본 발명자들은 BLT2 단백질이 방광암, 유방암, 전립선암, 간암, 뇌종양, 피부암 등에서 과잉 발현되고, BLT2 과잉발현의 억제제는 암 전이를 억제시킬 수 있음을 발견하였다. 따라서, BLT2 과발현의 저해에 기초한 임의의 항-암 치료 전략은 본 발명으로 포함된다.
- <27> 바람직한 구현예에서, 인간의 암은 방광, 전립선, 췌장 및 유방암으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명자들은 본 발명의 BLT2 저해제가 방광, 전립선, 췌장 및 유방암에 대한 항-암 효과를 가짐을 실험적으로 증명하였다.
- <28> 바람직한 구현예에서, 상기 인간의 암 치료는 암 세포들의 전이를 억제하거나 종양의 혈관신생을 억제시키는 암 세포들의 세포사멸을 유도시킴으로써 이루어질 수 있다.
- <29> 따라서, 인간의 암 세포들에 대한 세포사멸을 유도하는 치료적 조성물로서 BLT2 저해제의 임의의 용도는 본 발명으로 포함된다. 본 발명의 발명자들은 BLT2의 길항제인 LY255283이 예컨대, 방광, 전립선, 췌장 및 유방암에 대한 세포사멸을 유도하는 활성을 갖음을 발견하였다. 또한, 암 세포의 전이를 억제시키는 치료적 조성물으로써 BLT2 저해제의 임의의 용도는 본 발명으로 포함된다. 본 발명의 발명자들은 BLT2 안티-센스 올리고뉴클레오티드 또는 BLT2-신호전달 저해제의 치료로, 쥐에서 종양유전자 라스(Ras)의 과잉발현에 의해 유도된 암 세포의 전이가 현저하게 억제됨을 발견하였다. 또한, 종양혈관신생을 억제하는 치료적 조성물으로써 BLT2 저해제의 임의의 용도는 본 발명으로 포함된다. 본 발명의 발명자들은 BLT2 길항제인 LY255283 또는 BLT2 안티센스 올리고뉴클레오티드가 종양혈관신생을 현저하게 억제함을 발견하였다.
- <30> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과, (b) 인간의 암 치료용 약제의 제조를 위한 다른 항-암 약품과의 혼합물의 용도를 제공한다.
- <31> 바람직한 구현예에 있어서, BLT2 길항제인 LY255283와 에피루비신의 조합은 유방암의 치료를 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다. 상기 에피루비신은 화학요법에 사용되는 안트라사이클린 약물이다. 상기 에피루비신은 초기에 유방암, 난소암, 위암, 폐암 및 임파종에 대해서 이용되었다. 본 발명의 발명자들은 BLT2 길항제인 LY255283와 항-암 약물인 에피루비신의 혼합 조성물이 유방암에 대해서 현저하게 상승된 항-암 효과가 관찰됨을 관찰하였다.
- <32> 바람직한 구현예에 있어서, BLT2 길항제인 LY255283과 안드로젠(androgen) 수용체 길항제의 조합은 전립선암의 치료를 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다. 비칼루타마이드(bicalutamide)와 같은 안드로젠 수용체 길항제는 사람의 전립선암에 대하여 항-암 활성을 갖는다 [Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.357, No.2, 341-346, 2007]. 많은 종류의 안드로젠 수용체 길항제로 예컨대, 6-술폰아미노-퀴놀린-2-온(6-sulfonamido-quinolin-2-one)과 6-술폰아미노-2-옥소-크로멘(6-sulfonamido-2-oxo-chromene) 유도체를 이용할

수 있다 (US Patent 7064207). 그러므로, BLT2 길항제인 LY255283와 안드로젠 수용체 길항제의 혼합 조성물은 전립선암에 대해서 상승적인 항암 효과를 나타낼 것이다.

- <33> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 활성성분으로서 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질을 포함하는, 인간의 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 물질은 화학적 화합물, 펩티드, 항체 단백질, 뉴클레오타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 천연 원료(natural source)의 추출물일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- <34> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 활성성분으로서 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과 (b) 다른 항-암 약물들의 혼합물을 포함하는, 전식 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 다른 항-암 약물들은 종양에 대해 효과적이라고 알려져있는 재래식의 항-암 약물이다.
- <35> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 치료학적으로 유효한 양을 암 환자에 투여하는 것을 포함하는, 암 환자의 치료 방법을 제공한다.
- <36> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과 (b) 다른 항-암 약물들의 혼합 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암 환자의 치료 방법을 제공한다.
- <37> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 인간의 암 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- <38> (a) BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석될 상기 물질을 접촉시키는 단계; 및
- <39> (b) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준을 측정하는 단계로서, 상기 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준이 하향-조절되면, 상기 물질은 인간의 암 치료 효능을 갖는 것으로 결정하는 단계.
- <40> 본 발명의 방법에 따르면, 상기 BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포는 오리지널 BLT2 유전자를 포함하는 세포를 획득하거나 또는 외래 BLT2 유전자로 세포를 유전자 도입(transfecting)시킴으로서 쉽게 제조될 수 있다. 가급적, BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포는 암 세포에 전이되고, 분석될 물질에 처음으로 접촉된다. 본 발명의 스크리닝 방법에 관련하여 본 명세서에 사용된 상기 용어 “물질”은 BLT 유전자의 발현 수준, BLT2 단백질의 양 또는 BLT2 수용체의 세포내 신호전달 수준에 대한 영향을 분석하기 위해 본 발명의 방법에 테스트되는 물질을 말한다. 상기 물질은 화학적 화합물, 펩티드, 항체 단백질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(작은 간섭 RNA) 및 천연 원료(natural source)의 추출물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 그 후에, 세포에서 BLT2 유전자의 발현 수준, BLT2 단백질의 양 또는 BLT2의 세포내 신호전달 수준이 측정된다. BLT2 유전자의 발현 수준, BLT2 단백질의 양 또는 BLT2의 세포내 신호전달 수준이 하향-조절되는 것으로 측정되면, 상기 물질은 인간의 암 치료를 위한 후보물질로 결정된다. BLT2 유전자의 발현 수준의 측정은 본 발명이 속하는 기술분야의 다양한 방법들로 수행될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블로팅 (Peter B. Kaufma et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 및 원위치 혼성화(in situ hybridization) (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))가 사용될 수 있다.
- <41> BLT2 유전자의 발현 수준은 RT-PCR로 분석되는데, 총 RNA는 먼저 분석될 물질로 처리된 세포로부터 분리되고 다음으로 첫 번째 cDNA 가닥은 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 합성된다. 그 후, PCR 증폭은 주형으로 첫 번째 cDNA 가닥 및 BLT2-특이적 프라이머를 이용하여 수행된다. 마지막으로, 상기 PCR 증폭된 산물은 전기영동으로 분석되고 밴드들은 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 분석된다.
- <42> BLT2 단백질의 양은 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 다양한 면역분석법으로 측정될 수 있다. 예를 들어, 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사선면역-침전법(radioimmuno-precipitation), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA(capture-ELISA), 저해제 또는 경쟁 분석법(inhibition or competition assay) 및 샌드위치 분석법(sandwich assay)이 BLT2 단백질의 양을 분석하기 위해 사용된다.
- <43> BLT2 수용체의 세포내 신호전달 수준은 LTB4에 의해 유도된 결과(event)를 모니터링, 예컨대 BLT2-발현 세포 등 (예컨대, BLT 과발현 세포 등)을 이용하여 실시예에서 개시된 바와 같이 세포내 칼슘 농도의 상승을 모니터링함

으로서 측정될 수 있다. 예를 들어, 상기 물질이 BLT2-발현 세포에서 LTB4에 의한 세포내 칼슘 농도를 감소시키면, BLT2 길항제로서 판단될 수 있다.

<44> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2에 개시된 바와 같이 BLT2 유전자의 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 인간의 암 검출용 키트를 제공한다. 따라서, BLT2 과발현이 인간의 여러 암에서 검출된다는 정보에 기초하여 개발된 임의의 방법론 또는 키트는 본 발명에 포함될 수 있다.

<45> 본 발명의 키트에 사용된 프로브 또는 프라이머는 BLT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에 사용된 서열과 관련하여 용어 “상보적인”은 특정 어닐링(annealing) 또는 혼성화(hybridization) 조건 하에서 상기 서열이 BLT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 어닐링되거나 또는 혼성화되는 범위(extent)에 대하여 상보성(complementarity)을 갖는 서열을 말한다. 이점에 있어서는, 본 명세서에 사용된 용어 “상보적인”은 용어 “완벽하게 상보적인”과는 서로 다른 의미를 갖는다. 본 발명에 사용된 프로브 또는 프라이머는 미스매치(mismatch)들이 BLT2 유전자에 특이적 어닐링 또는 혼성화를 완벽하게 배제하기에 충분하지 않은 한 하나 이상의 매스매치가 있을 수 있다.

<46> 본 명세서에 사용된 용어 “프로브”는 타겟 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합가능한, 데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotides) 및 리보뉴클레오타이드(ribonucleotides)를 포함하여, 자연 상태 또는 변형된 모노머의 선형 올리고머 또는 연결(linkages)를 의미한다. 상기 프로브는 자연적으로 발생하거나 또는 인공적으로 합성될 수 있다. 상기 프로브는 바람직하게는 단일가닥이다. 바람직하게는, 본 발명에 사용된 프로브는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드이다.

<47> 본 발명의 프로브는 자연적으로 발생하는 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형된 뉴클레오타이드, 또는 비-자연발생 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 상기 프라이머 또한 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 프로브는 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트(phosphorothioate) DNA, 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate) DNA, 포스포라미데이트(phosphoramidate) DNA, 아마이드-결합(amide-linked) DNA, MMI-연결(MMI-linked) DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트(methylphosphonate) DNA와 같은 백본 변형을 갖는 뉴클레오타이드, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알킬닐 DNA, 헥소오스(hexose) DNA, 피라노실(pyranosyl) RNA, 및 앤히드로헥시톨(anhydrohexitol) DNA와 같은 당 변형(sugar modifications)을 갖는 뉴클레오타이드, 및 C-5 치환된 피리미딘(플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이도(iodo)-, 메틸-, 에틸-, 비닐(vinyl)-, 포르밀(formyl)-, 에틸닐(ethynyl)-, 프로피닐(propynyl)-, 알킬닐(alkynyl)-, 티아졸릴(thiazolyl)-, 이미다졸릴(imidazolyl)-, 피리딜(pyridyl)-을 포함하는 치환체들), C-7 치환체들을 갖는 7-데아자퓨린(deazapurines)(플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이도(iodo)-, 메틸-, 에틸-, 비닐(vinyl)-, 포르밀(formyl)-, 알킬닐(alkynyl)-, 알케닐(alkenyl)-, 티아졸릴(thiazolyl)-, 이미다졸릴(imidazolyl)-, 피리딜(pyridyl)-을 포함하는 치환체들), 이노신(inosine), 및 디아미노퓨린(diaminopurine)와 같은 염기 변형(base modifications)을 갖는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 “프라이머”는 핵산 가닥(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물(primer extension product)의 합성이 일어나는 조건하에 놓여질 때, 다시 말해, 뉴클레오타이드 및 DNA 중합효소와 같은 중합반응 시약의 존재하고 적절한 온도 및 pH에 있는 경우, 합성의 개시점으로 작용 가능한, 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적절한 길이는 프라이머의 온도, 적용 및 소스를 포함하는 여러 요소들에 따르며, 보통, 15-30 뉴클레오타이드 길이이다. 짧은 프라이머는 주형에 안정한 혼성화 2중 구조를 형성하는데 보통 낮은 온도를 필요로 한다.

<48> 프라이머의 서열은 주형에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없다. 프라이머의 서열은 주형에 혼성화되어 프라이머로 제공되는 동안은 몇몇 오합(mismatches)을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 프라이머는 주형으로서 BLT2 유전자에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없다; 그들이 합성의 개시점으로 작용하는 BLT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 어닐링하는 범위(extend)에 대해 상보성을 갖는 것으로 충분하다. 상기 프라이머 디자인은 BLT2 gDNA 또는 cDNA 서열, 바람직하게는 cDNA 서열을 참조하여 전통적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머 디자인은 프라이머 디자인용 컴퓨터 프로그램(예컨대, PRIMER 3 program)을 이용하여 수행될 수 있다.

<49> 본 발명의 예시적인 프라이머는 서열번호 9(센스 프라이머) 및 서열번호 10(안티센스 프라이머)으로 표시되어 있다.

<50> 바람직한 구현예에 따르면, 프로브를 포함하는 인간의 암을 위한 진단 또는 검출 키트는 마이크로어레이, 더욱 바람직하게는 DNA 또는 cDNA 마이크로어레이, 가장 바람직하게는 cDNA 마이크로어레이의 형태이다.

- <51> 마이크로어레이에서, 본 발명의 프로브는 혼성화 가능한 어레이 구성요소로서 제공되어 기관(substrates)에 고정화된다. 바람직한 기관은 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼(wafer), 섬유(fiber), 자성(magnetic) 또는 비자성 비드, 겔, 튜빙(tubing), 플레이트(plate), 거대분자(macromolecule), 미세입자(microparticle) 및 모세관 튜브(capillary tube)와 같은, 적당한 고체 또는 반-고체 지지체(supporters)를 포함한다. 상기 혼성화 가능한 어레이 구성요소들은 배열되어 기관에 고정화된다. 이러한 고정화는 화학적 결합 또는 UV와 같은 공유결합을 통해 일어난다. 본 발명의 구현예에서, 상기 혼성화 가능한 어레이 구성요소들은 에폭시 화합물(epoxy compound) 또는 알데히드기(aldehyde group)를 포함하는 변형된 유리 표면 또는 폴리신(polylysin)-코팅된 표면에 결합된다. 또한, 상기 혼성화 가능한 어레이 구성요소들은 링커(linkers)(예컨대, 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기관에 결합된다.
- <52> 본 발명의 마이크로어레이로 시험될 DNAs는 라벨링되어 마이크로어레이 상에서 어레이 구성요소들과 혼성화될 수 있다. 다양한 혼성화 조건들이 적용가능하고, 혼성화 범위의 검출 및 분석을 위해, 다양한 방법들이 사용된 라벨에 따라 이용가능하다. 인간의 암을 진단하기 위한 본 발명의 방법(The present method)은 혼성화에 따라 수행될 수 있다. 이러한 분석을 위해, 상기 BLT2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 갖는, 프로브들이 사용된다.
- <53> BLT2 유전자 또는 cDNA, 바람직하게는 cDNA로 혼성화 가능한 프로브를 이용하여, 인간의 암은 혼성화-기반 분석법(hybridization-based assay)에 의해 진단 또는 검출된다. 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 프로브에서 몇몇 변형은 상기 변형이 프로브의 이점(advantages)을 파괴하지 않는 한 일어날 수 있다. 이러한 변형, 즉, 상기 프로브에 연결한 라벨은 신호를 발생하여 혼성화를 검출한다. 적절한 라벨은 플루오로포어(fluorophores)(예컨대, 플루오레세인(fluorescein)), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민(rhodamine), 리사민(lissamine), Cy3 및 Cy5 (Pharmacia), 크로모포어(chromophores), 케미루미네서(chemiluminescers), 자성 입자(magnetic particles), 방사성 동위원소(radioisotopes)(예컨대, P32 및 S35), 질량 라벨(mass labels), 전자 치밀 입자(electron dense particles), 효소들(예컨대, 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase) 및 양고추냉이 페록시다아제(horseradish peroxidase)), 보조인자(cofactors), 효소에 대한 기질(substrates for enzymes), 중금속(예컨대, 금), 및 대응물(partners)에 특이적 결합을 갖는 부착소(haptens), 예컨대, 항체, 스트렙토아비딘, 바이오틴, 다이곡시제닌(digoxigenin) 및 킬레이트기(chelating group)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 라벨링은 닉 트랜슬레이션(nick translation), 랜덤 프라이밍(Multiprime DNA labeling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 키네이션(kination)(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))과 같은 본 발명이 속하는 다양한 방법에 따라 수행된다. 상기 라벨은 형광(fluorescence), 방사능(radioactivity), 발색 측정(measurement of color development), 질량 측정(mass measurement), X-레이 회절 또는 흡수, 자기장, 효소적 활성, 질량 분석, 결합 친화도(binding affinity), 고주파 혼성화(high frequency hybridization) 또는 나노크리스탈(nanocrystal)에 의해 검출 가능한 신호를 발생한다.
- <54> 분석될 상기 핵산 샘플(바람직하게는 cDNA)은 다양한 생체 시료로부터 얻은 mRNA를 이용하여 제조될 수 있다. 상기 생체 시료는 바람직하게는 방광, 전립선, 췌장 또는 유방암 유래 세포이다. 프로브를 대신하여, cDNA가 혼성화-기반 분석법을 위해 라벨링될 수 있다.
- <55> 프로브는 인간의 암을 검출하기 위해 엄격한(stringent) 조건 하에서 cDNA 분자와 혼성화된다. 적절한 혼성화 조건은 최적화 과정에 의해 관례적으로 결정될 수 있다. 온도, 구성성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 버퍼 구성성분, 및 그들의 pH 및 이온 세기(ionic strength)와 같은 조건은 프로브의 길이와 GC 함량 및 타겟 뉴클레오티드 서열을 포함하여, 다양한 요소에 따라 변경될 수 있다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 매우 엄격한 조건은 65°C에서 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate) 및 1 mM EDTA에서의 혼성화 및 68°C에서 0.1 x SSC (standard saline citrate)/0.1% SDS에서의 세척을 포함한다. 또한, 매우 엄격한 조건은 48°C에서 6 x SSC/0.05% 피로인산나트륨(sodium pyrophosphate)에서의 세척을 포함한다. 약간 엄격한 조건은 예컨대, 42°C에서 0.2 x SSC/0.1% SDS에서의 세척을 포함한다.
- <56> 혼성화 반응에 이어, 혼성화의 발생을 나타내는 혼성화 신호가 다음으로 측정된다. 상기 혼성화 신호는 라벨에 따라 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소로 라벨링되는 경우에, 혼성화의 발생은 효소에 대한 기질을 혼성화 결과물과 반응시킴으로서 측정될 수 있다. 본 발명에 사용가능한 상기 효소/기질 쌍은 페록시다아제(oxidase)(예컨대, 양고추냉이 페록시다아제)와 클로로나프톨(chloronaphtol)의 쌍, 아미노에틸

카바졸(aminoethylcarbazol), 디아미노벤지딘(diaminobenzidine), D-루시페린(luciferin), 루시제닌(lucigenin) (bis-N-methylacridinium nitrate), 레소루핀 벤질 에테르(resorufin benzyl ether), 루미놀(luminol), 앰플렉스 레드 시약(Amplex Red reagent) (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), HYR (p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(phenylenediamine, OPD) 또는 나프톨(naphtol)/피로닌(pyronine); 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 브로모클로로인돌릴포스페이트(bromochloroindolylphosphate, BCIP)의 쌍, 니트로 블루 테트라졸륨(nitro blue tetrazolium, NBT), 나프톨(naphtol)-AS-BI-포스페이트(phosphate) 또는 ECF 기질; 글루코시다아제(glucosidase)와 t-NBT(nitroblue tetrazolium)의 쌍 또는 m-PMS(phenazine methosulfate)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 프로브가 금 입자로 라벨링되는 경우에, 혼성화의 발생은 질산은(silver nitrate)을 이용하는 은 염색 방법으로 검출될 수 있다. 이와 관련하여, 인간의 암을 진단하기 위한 본 발명의 방법은 혼성화로 수행될 수 있는데, 이는 (i) 핵산 샘플을 BLT2 유전자의 뉴클레오티드에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 프로브에 접촉시키는 단계; 및 (ii) 혼성화의 발생을 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화로부터의 신호 강도는 인간의 암을 나타낸다. 진단될 샘플로부터 BLT2 cDNA에 대한 혼성화 신호가 정상 샘플보다 더 강하게 측정되는 경우에, 상기 샘플은 인간의 암을 가지는 것으로 결정될 수 있다.

<57> 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 증폭 반응에 사용된다.

<58> 본 명세서에 사용된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하기 위한 반응을 말한다. 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 함) (U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202, and 4,800,159), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR이라 함) (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I. (WO 89/06700) 및 Davey, C. et al. (EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction, LCR)(17, 18), Gap-LCR (WO 90/01069), 수선 연쇄반응(repair chain reaction) (EP 439,182), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification, TMA)(19) (WO 88/10315), 자기 부양 서열 복제(self sustained sequence replication) (WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 서열의 선택적 증폭 (U.S. Patent No. 6,410,276), 공통 서열 준비된 중합효소 연쇄반응(CP-PCR) (U.S. Patent No. 4,437,975), 무작위 준비된 중합효소 연쇄반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR) (U.S. Patent Nos. 5,413,909 and 5,861,245), 핵산 서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification, NASBA) (U.S. Patent Nos. 5,130,238, 5,409,818, 5,554,517, and 6,063,603), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-매개 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 포함하여, 다수의 증폭 반응들이 본 발명이 속하는 기술분야에 개시되어 있으나, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 다른 증폭 방법들은, U.S. Patent Nos. 5,242,794, 5,494,810, 4,988,617 및 U.S. Ser. No. 09/854,317에 개시되어 있다.

<59> 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 증폭 반응은 U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159에 개시되어 있는 PCR(중합효소 연쇄반응)에 따라 수행될 수 있다.

<60> PCR은 핵산 증폭을 위한 가장 주된 과정 중 하나이며 다수의 그 변형법 및 적용법이 개발되어 왔다. 예를 들어, PCR 특이성 또는 감수성을 개선하기 위해, 터치다운(touchdown) PCR(24), 숙주 출발(hot start) PCR(25, 26), 이중(nested) PCR(2) 및 부스터(booster) PCR(27)이 전통적인 PCR 과정을 변형하여 개발되어 왔다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 발현차(differential display) PCR (DD-PCR), RACE(rapid amplification of cDNA ends), 다중(multiplex) PCR, 역중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction, IPCR), vectorette PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) 및 다중(multiplex) PCR이 특정 용도를 위해 개시되어 있다. PCR의 상세한 설명은 McPherson, M.J., and Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에서 찾을 수 있으며, 그 내용은 참조로서 본 명세서에 편입된다.

<61> 인간의 암을 진단하기 위한 본 발명의 방법이 프라이머를 이용하여 수행하는 경우에, 상기 핵산 증폭은 BLT2 유전자의 발현 수준을 분석하기 위해 실행된다. 본 발명은 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 의도된 것이기 때문에, 샘플들에서 BLT2 mRNA의 수준을 분석한다. 따라서, 본 발명은 mRNA 또는 cDNA에 어닐링될 주형 및 프라이머와 같이 샘플들에서 mRNA 분자를 이용하여 핵산 증폭을 수행한다.

<62> mRNA 분자를 얻기 위해, 총 RNA는 샘플로부터 분리된다. 총 RNA의 분리는 다양한 방법으로 수행될 수 있다 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001);

Tesniere, C. et al., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); and Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 예를 들어, 세포에서 총 RNA는 트리졸(Trizol)을 이용하여 분리될 수 있다. 그 후, cDNA 분자는 분리된 mRNA 분자를 이용하여 합성된 후 증폭된다. 본 발명에 사용된 총 RNA 분자는 인간 샘플에서 분리된 이후로, mRNA 분자는 폴리-A 꼬리(poly-A tails)를 가지며 dT 프라이머와 역전사효소의 사용에 의해 cDNA로 변환되었다 (PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, et al., Science, 244:569(1989); and Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 합성된 cDNA 분자는 이후 증폭 반응에 의해 증폭된다.

<63> 본 발명에 사용된 프라이머는 주형 상의 영역에서 혼성화되거나 또는 어닐링되어 이중-가닥 구조를 형성한다. 이러한 이중-가닥 구조를 형성하기 위한 안전한 핵산 혼성화 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다. 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 방법의 증폭 단계에 사용될 수 있는데, 이는 열에 안정한 DNA 중합효소인 E. coli DNA 중합효소 I의 “Klenow” 단편, 및 박테리오파지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는 상기 중합효소는 썬머스 아쿠아티쿠스(Thermus aquaticus, Taq), 썬머스 썬모필러스(Thermus thermophilus, Tth), 썬머스 필리포르미스(Thermus filiformis), 썬머스 플라부스(Thermis flavus), 썬모코커스 리터랄리스(Thermococcus literalis), 및 피로코커스 푸리오수스(Pyrococcus furiosus, Pfu)를 포함하여, 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 것으로 열에 안정한 DNA 중합효소이다.

<64> 중합 반응이 시작되면, 반응 용기(reaction vessel)에서 과량으로(in excess) 이러한 반응에 필요한 구성요소를 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응의 구성요소와 관련하여 과량(excess)은 원하는 증폭을 달성하기 위한 능력이 그러한 구성요소의 농도에 의해 실질적으로 제한되지 않을 만큼의 각 구성요소의 양을 말한다. 원하는 증폭의 정도를 유지하기 위해서 반응 혼합물에 Mg^{2+} 와 같은 필요한 양의 보조인자(cofactors)와, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 충분한 양으로 제공하는 것이 바람직하다. 본 발명의 증폭 반응에 사용된 모든 효소들은 동일한 반응 조건 하에서 활성을 띌 수 있다. 실제로, 모든 효소에 존재하는 버퍼는 그들의 최적 반응 조건에 가깝다. 따라서, 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 추가와 같은 임의의 조건의 변화가 없이 단일 반응 부피로 수행될 수 있다.

<65> 본 발명의 방법에서 어닐링 또는 혼성화는 프라이머와 주형 핵산 사이에 특이적 결합을 허용하는 엄격한 조건 하에서 수행된다. 어닐링에 대한 이러한 엄격한 조건은 서열-의존적이며 환경 변수에 따라 변화될 것이다. 상기 증폭된 BLT2 cDNA 분자는 다음으로 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 분석된다. 예를 들어, 상기 증폭된 산물은 겔 전기영동으로 분석되고 생성된 밴드들은 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 분석된다. 진단될 샘플로부터 BLT2 유전자의 발현 수준이 정상 샘플보다 더 높은 것으로 측정되면, 상기 샘플은 인간의 암을 갖는 것으로 결정될 수 있다.

<66> 이와 관련하여, 인간의 암을 진단하기 위한 본 발명의 방법이 증폭에 의해 수행되는 경우에, (i) BLT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머의 사용에 의해 핵산 샘플을 증폭하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭된 산물을 분석하여 BLT2 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

<67> 바람직한 구현예에서, 상기 키트는 서열번호 9의 정방향 서열 및 서열번호 10의 역방향 서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 이 프라이머 세트는 장형 및 단형 BLT2 모두를 검출할 수 있다.

<68> 바람직한 구현예에서, 상기 키트는 서열번호 11의 정방향 서열 및 서열번호 12의 역방향 서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 이 프라이머 세트는 장형의 BLT2만 검출할 수 있는데 상기 프라이머는 장형 CDS의 앞부분을 인식하기 때문이다.

<69> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 BLT2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 인간의 암 검출용 키트를 제공한다. 인간의 암을 위한 진단 키트는 BLT2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 도입함으로써 구성될 수 있다.

<70> 본 발명에 사용된 BLT2 단백질에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날, 바람직하게는 모노클로날일 수 있다. 상기 항체는 융합법(fusion method) (Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA법(recombinant DNA method) (USP 4,816,56) 또는 파지 항체 라이브러리(phage antibody library) (Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) and Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58,

1-597(1991))와 같은 전통적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 항체 생산을 위한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1988; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 개시되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다. 예를 들어, 모노클로날 항체 생산을 위한 하이브리도마 세포주의 제작은 불멸세포(immortal cell)와 항체를 생산하는 림프구의 융합에 의해 수행된다. 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 폴리클로날 항체는 적당한 동물에 BLT2 단백질 항원의 주사, 상기 동물로부터 항체를 포함하는 항혈청의 수집, 및 임의의 공지의 친화도 기술(affinity techniques)로 특이적 항체를 분리함으로써 제조될 수 있다.

<71> 본 발명의 진단 방법이 BLT2 단백질에 대한 항체를 이용하여 수행되는 경우에, 이는 인간의 암 검출을 위한 전통적인 면역분석 과정에 따라 수행될 것이다.

<72> 이러한 면역분석은 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사선면역-침전(radioimmuno-precipitation), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 저해 또는 경쟁 분석법(inhibition or competition assay), 샌드위치 분석법(sandwich assay), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광분석법(immunofluorescence assay) 및 면역친화도 분석법(immunoaffinity assay)을 포함하여, 정량 또는 정성 면역분석 프로토콜에 의해 실행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 면역분석 및 면역염색 과정은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1999에서 찾을 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다.

<73> 예를 들어, 방사선면역분석법에 따르면, 방사성 동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})가 표지된 항체가 BLT2 단백질을 검출하는데 사용될 수 있다.

<74> 또한, 상기 ELISA 방법에 따르면, 본 발명의 방법의 예는 (i) 분석될 세포 용해물(lysate)로 고체 기관의 표면을 코팅하는 단계; (ii) BLT2 단백질에 대한 1차 항체와 상기 코팅된 세포 용해물을 인큐베이션하는 단계; (iii) 효소와 접합된 2차 항체와 상기 결과물을 인큐베이션하는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

<75> 본 발명에 사용가능한 고체 기관은 카보하이드레이트 폴리머(carbohydrate polymer)(예컨대, 폴리스티렌 및 폴리프로필렌), 글라스, 금속 및 겔, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트(microtiter plates)이다.

<76> 상기 2차 항체와 접합된 효소는, 예컨대 알칼리 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 루시페라아제, 시토크롬 P450 및 양고추냉이 페록시다아제를 포함하여, 컬러리메트릭(colorimetric), 플루오로메트릭(fluorometric), 루미네선스(luminescence) 또는 적외선(infra-red) 반응들을 촉진하는 것이다. 알칼리 포스파타아제를 사용하는 경우에는, 브로모클로로인돌릴포스파타아제(BCIP), 니트로 블루 테트라졸륨(NBT) 또는 ECF가 색-발달 반응(color-developing reactions)을 위한 기질로서 사용될 수 있고; 양고추냉이 페록시다아제를 사용하는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시제닌(bis-N-methylacridinium nitrate), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 앰플렉스 레드 시약(10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-phenylenediamine(OPD) 또는 나프톨/피로닌이 기질로서 사용될 수 있으며; 그리고 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase)를 사용하는 경우에는, t-NBT(nitroblue tetrazolium) 또는 m-PMS(phenazine methosulfate)가 기질로서 사용될 수 있다.

<77> 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방법에 따라 수행되는 경우에는, 본 발명의 구체적인 예는 (i) BLT2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 포획하여 고체 기관의 표면을 코팅하는 단계; (ii) 분석될 세포 샘플과 포획하는 항체를 인큐베이션하는 단계; (iii) BLT2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고 검출 가능한 신호를 발생하는 라벨과 접합된 검출 항체와 (ii) 단계의 결과물을 인큐베이션 하는 단계; 및 (iv) 상기 검출 항체와 접합된 라벨로부터 발생하는 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

<78> 상기 검출 항체는 검출 가능한 신호를 발생하는 라벨을 갖는다. 상기 라벨은 화학적(예컨대, 바이오틴), 효소적(알칼리 포스파타아제, 양고추냉이 페록시다아제, β -갈락토시다아제 및 시토크롬 P₄₅₀), 방사능(예컨대, C^{14} ,

I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광(플루오레세인), 발광(luminescent), 화학발광(chemiluminescent) 및 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 라벨을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 다양한 라벨 및 라벨링 항체에 대한 방법들은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있다 (Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). 검출 항체와 접합된 라벨로부터 발생하는 신호의 검출은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 다양한 과정에 의해 수행될 수 있다. 상기 신호의 검출은 정량 또는 정성 방법에서 BLT2 단백질을 분석할 수 있게 한다. 바이오틴 및 루시페라아제가 라벨로서 사용되는 경우에, 상기 신호 검출은 각각 스트렙토아비딘 및 루시페린의 사용에 의해 달성될 수 있다.

<79> 상기 언급된 면역분석으로부터 발생된 신호 강도들의 측정은 인간의 암을 나타낸다. 진단될 생체 시료에서 BLT2 단백질에 대한 신호가 정상 샘플보다 더 높은 것으로 측정되면, 상기 생체 시료는 인간의 암을 갖는 것으로 결정될 수 있다.

<80> 본 발명의 키트는 상기 언급된 프라이머, 프로브 또는 항체와 함께 다른 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 핵산 증폭에 사용될 수 있는 경우에, 이는 버퍼, DNA 중합효소(써머스 아쿠아쿠스(Taq), 써머스 씨모필러스(Tth), 써머스 필리포르미스, 써미스 플라부스, 씨모코커스 리터탈리스, 및 피로코커스 푸리오수스(Pfu)에서 얻은 열에 안정한 DNA 중합효소), DNA 중합효소 보조인자, 및 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트와 같은 PCR 반응을 수행하는데 필요한 시약들을 선택적으로 포함할 수 있다. 상기 키트는, 대체로, 전술한 구성성분들을 개별 패키징(separate packaging)하거나 또는 구획화하여 포함하도록 개조된다.

<81> 인간의 암을 검출 또는 진단하기 위한 상기 키트는 인간의 암의 발달(development), 악화(aggravation) 및 완화(alleviation)를 결정을 가능케 한다. 이점에 있어서는, 질병과 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 “검출하는 것 또는 진단하는 것”은 질병의 존재 뿐 아니라 질병의 발달, 악화 및 완화의 결정도 의미한다.

<82> 약학적 제형에 보통 사용되고, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용가능한 담체는, 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 루버 애러블(rubber arable), 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 알지네이트(arginate), 젤라틴(gelatin), 포타슘 실리케이트(potassium silicate), 마이크로크리стал 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 셀룰로오스, 물, 시럽(syrups), 메틸셀룰로오스(methylcellulose), 메틸히드록시 벤조에이트(methylhydroxy benzoate), 프로필히드록시 벤조에이트(propylhydroxy benzoate), 탈크(talc), 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate), 및 미네랄 오일(mineral oils)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 윤활제(lubricant), 습윤제(humectant), 감미제(sweetener), 착향제(flavoring agent), 유화제(emulsifier), 침강방지제(suspending agent), 및 방부제(preservative)를 더 포함할 수 있다. 적절한 약학적으로 허용가능한 담체 및 제형의 상세한 설명은 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에서 찾을 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다.

<83> 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구(예컨대, 정맥 주사, 피하주사, 근육주사 및 국부 주사)로 투여될 수 있다.

<84> 본 명세서에 사용된 용어 “치료학적 유효량”은 치료되는 환자에서 의학적으로 원하는 결과를 일으킬 수 있는 물질의 양을 의미한다. 본 발명의 약학적 조성물의 정확한 투여량은 특정한 제형, 사용방법, 환자의 나이, 체중 및 성별, 식이조절, 투여시간, 환자의 상태, 약제 조합, 질병의 반응 감수성 및 정도에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 에 대한 일일 적정 투여량은 인간 숙주에 대하여 0.001-100 mg/kg(체중) 범위이다.

<85> 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 전통적인 기술에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 언급된 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 비히클로 제형화될 수 있어, 최종적으로 단위 용량(unit dosage) 형태를 포함하는 여러 가지 형태를 제공한다. 상기 제형화의 비-제한적인 예들은 용액, 현탁액 또는 에멀전, 추출물, 엘릭시르(elixir), 분말, 그라눌(granule), 정제, 캡슐, 경고제(emplastras), 리니멘트(liniment), 로션 및 연고(ointment)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

실시예

<106> 본 발명의 구체적이고 바람직한 구현예는 이하 실시예에 보여지는 바와 같이 설명된다. 그러나, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는, 본 발명의 상세한 설명을 고려하여, 본 발명의 요지 및 범위 내에서 변형 및 개량을 할 수 있는 것으로 보아야 한다.

실시예 1 : BLT2 길항제는 전립선암 세포들의 증식률을 효과적으로 감소시킨다.

(1) RT-PCR (도 1b의 A)

전립선암 세포와 정상 세포에서의 BLT2 mRNA 수준을 RT-PCR로 분석하였다. 총 RNA 세포는 Easy-Blue 시약 (Intron Co.)을 이용하여 추출하였으며, 디에틸피로카보네이트(diethylpyrocarbonate)가 처리된 물을 이용하여 용해시켰다. 2 µg의 RNA를 45 °C에서 30분 동안 역전사하고, 0 mM 트리스(Tris) (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂가 포함되어 있는 버퍼에 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP와 올리고(dT) 프라이머들을 각각 20 µl씩 넣고 94 °C에서 5분 동안 사전-변성(pre-denature) 시켰다. 이후, PCR 반응은 하기와 같이 수행되었다. BLT1과 BLT2에 대한 시료들은 94 °C에서 30초 동안 변성(denature)시키고, 67 °C에서 30초 동안 어닐링(annealing)하였으며, 72 °C에서 30초 동안 복제(extend)하였으며, 이를 33회 반복하였다. 18s를 위해, 시료들을 94 °C에서 30초 동안 변성시키고, 55 °C에서 30초 동안 어닐링하였으며, 72 °C에서 30초 동안 복제하였다. 상기 반응을 19회 반복하였다. PCR에 의한 생성물을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하여 분리하였으며, 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하여 노출시켰다. 본 발명에 사용된 Genotech Inc. (Korea)에서 구입한 프라이머들은 다음과 같다. BLT1 정방향(forward): 5'-TAT GTC TGC GGA GTC AGC ATG TAC GC-3'; 역방향(reverse): 5'-CCT GTA GCC GAC GCC CTA TGT CCG-3'; BLT2 정방향(forward): 5'-AGC CTG GAG ACT CTG ACC GCT TTC G-3', 역방향(reverse): 5'-GAC GTA GAG CAC CGG GTT GAC GCT A-3'; 18s 정방향(forward): 5'-TTC GGA ACT GAG GCC ATG AT-3', 역방향(reverse): 5'-TTT CGC TCT GGT CCG TCT TG-3'). 항존유전자(housekeeping gene)를 발현하는 18s RNA는 시료들을 증폭하고 전사시키기 위해 표준화하여 사용하였다. 그 결과, PWR-1E, 전립선 정상 상피 세포와 비교해볼 때, BLT2 mRNA의 발현이 LNCaP 세포와 전립선암 세포에서 증가됨을 관찰하였다.

(2) MTT assay (B of Figure 1b)

세포 증식률(cell viability)에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 MTT 분석(MT assay)으로 분석하였다. PWR-1 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1.0×10^4 세포의 밀도로 배양시키고, LNCaP 세포를 웰당 1.5×10^4 세포의 밀도로 배양하였다. 36시간 후, 배지를 혈청이 무첨가된 RPMI 1640으로 교체하고, 세포를 높은 농도의 DMSO 또는 LY255283로 자극하였다. LY255283을 처리한지 48시간 후 MTT(1 mg/µl)를 첨가하고, 4시간 더 배양한 후 배지를 DMSO로 교체하였다. 이후, 세포를 상온에서 10분 동안 배양시켰다. 시료들의 흡광도(spectrophotometric absorbance)는 Ultra Multifunctional Microplate Reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 배양된 LNCaP 세포와 PWR-1E 세포를 혈청이 무첨가된 RPMI1640내에서 여러 농도의 LY255283으로 자극하였다. LY255283을 처리한 결과, PWR-1E 세포에서는 영향이 없었으며, LNCaP 세포의 증식률이 농도 의존적으로 감소되었다.

(3) Cell counting (C and D of Figure 1b)

세포수를 카운팅함으로써 LY255283의 영향을 관찰하였다. 세포를 10% FBS가 보충된 배지를 70% 합류시킨 6-웰 클러스터 디쉬(cluster dish)에 배양하였다. 배양 0일에, 배지를 혈청이 무첨가된 RPMI 1640 배지로 교체하고, 세포를 DMSO 또는 1 µM과 5 µM LY255283으로 자극하였다. 세포를 여러 범위(interval)에서 획득하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 소량의 트립신을 처리하여 수거하였다. 총 세포 수는 트립판 블루(Trypan blue) 염료를 이용하여 혈구계산기로 각각의 시료를 두 번씩 집계하여 결정하였다. 혈청이 무첨가된 RPMI1640에서 LY255283으로 처리된 세포를 여러 범위에서 획득하였다. LNCaP 세포의 수는 LY255283에 의해 상당히 감소한 반면, PWR-1E 세포는 그렇지 않았다. LY255283에 의해 세포 증식률이 감소된 결과는 BLT2 mRNA 발현 수준이 증가된 LNCaP 세포에서는 유효하다. 대조적으로, BLT2가 낮은 수준으로 발현된 PWR-1E 세포들은 LY255283에 의해 영향을 받지 않는다.

실시예 2: 세포사멸은 전립선암 세포에서 BLT2 억제에 의해 유도된다.

(1) Hoechst 33258 염색 (도 1c의 A)

6-웰 클러스터 디쉬에서 배양된 세포들을 혈청이 무첨가된 RPMI 1640 배지에서 36시간 동안 5 µM LY255283으로 자극하였다. 세포를 4% 포름알데하이드로 10분 동안 고정시키고, 37 °C에서 10분간 Hoechst 33258(50 µg/ml)(Sigma)로 염색한 후, 형광 현미경(fluorescence microscopy)(Carl Zeiss)으로 관찰하였다. 응결핵(neuclei condensation)의 분열은 LY255283을 처리한 LNCaP 세포에서는 관찰되었으며, PWR-1E 세포들에서는 관찰되지 않았다.

(2) DNA 분열 분석 (도 1c의 B)

- <118> LNCaP와 PWR-1 E 세포를 5 μ M LY255283으로 48시간 동안 처리하고, DNA 분절 분석(fragmentation assay)을 수행하였다. DNA 분절은 모든 DNA 세포를 획득하여 확인하였다. 세포는 10% FBS가 보충된 배지를 70% 합류시킨 10 cm 플레이트에서 배양하였다. 이후, 배지를 혈청이 무첨가된 RPMI 1640으로 교체한 후, 세포를 48시간 동안 5 μ M LY255283으로 처리하였다. 용해 버퍼(1 mM EDTA, 10 mM Tris, 120 mM NaCl, 1% SDS 및 100 μ g/ml proteinase K, pH 8.0)로 50 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 세포를 배양하여 세포질 DNA를 추출하였다. DNA 단편을 분리하기 위해, 용해물을 13,000 $\times$ g으로 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 페놀(phenol)/클로로포름(chloroform)/아이소아밀 알코올(isoamyl alcohol)로 두 번씩 추출하고, 무수 에탄올(absolute ethanol)로 침전시켰다. 펠렛(pellet)을 Tris-EDTA와 10 mg/ml RNase A에 다시 분산시키고, DNA를 1.8% 아가로즈 겔상에서 분리시켰다. 전기영동 후, 겔을 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색한 후, DNA를 UV 광선으로 관찰하였다. 서로 다른 사이즈들의 DNA 단편들의 번짐(smear)이 LY255283을 처리한 LNCaP 세포들에서 관찰되었다.
- <119> (3) 세포주기 분석 (도 1c의 C)
- <120> LNCaP 세포들과 PWR-1E 세포를 5 μ M LY255283으로 48시간 동안 처리한 후, 세포를 70% 에탄올로 고정시키고, PI로 염색하였다. 세포주기(cell cycle)는 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 분석하였다. 6-웰 클러스터 디쉬에서 배양시킨 세포를 혈청이 무첨가된 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 5 μ M LY255283으로 자극하였다. 간단히 트립신으로 처리하여 수집한 세포들을 70% 에탄올로 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 고정시켰다. RNase A(100 μ g/ml)가 함유된 PBS에 세포들을 다시 분산시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 세포를 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide)(50 μ g/ml)(Sigma)로 염색하였다. 획득(acquisition)과 분석은 Cell Quest Alias software(BD Bioscience)를 사용하여 FACS로 수행하였다. 그래프는 LY255283이 처리된 LNCaP와 PWR-1E 세포에서 sub-G1 집단의 상대적인 배수를 나타낸다. sub-G1 DNA를 포함하는 세포의 증가된 집단은 LY255283이 처리된 LNCaP 세포에서 검출되었다. 세포사멸 측정을 위한 다양한 방법들로, LY255283이 전립선암 LNCaP 세포들에서는 세포사멸을 유도하고, 전립선암 정상세포들에서는 유도하지 않는다고 암시했던 것과 같이 유사한 결과가 관찰되었다. 전립선암 세포들과 정상 세포들에서, 세포사멸을 유도하는 LY255283에 대한 서로 다른 영향은 전립선암 세포들의 생존에 중요한 기능을 수행하는 BLT2에 의한 것으로 사료되며, 상기 전립선암 세포들은 BLT2 수준의 발현이 증가되어 있다.
- <121> 도 1c는 LY255283에 의해 유도된 세포 죽음이 동시에 세포사멸(apoptosis)에도 영향을 미침을 나타낸다. 고사(apoptotic) 세포들은 DNA 분절 분석과 Hoechst33258 및 PI로 분절된 세포핵을 염색함으로써 검출하였다.
- <122> **실시예 3: LY255283은 방광암 세포들의 세포사멸과 sub-G1 단계에서 세포 주기의 정지를 유도한다.**
- <123> (1) 광학 현미경을 이용한 형태학적 변화(도 1d의 A와 B)
- <124> 6 웰 플레이트에 배양된 방광암 세포에 10 μ M LY255283과 1 μ M U75302를 48시간 동안 처리하였다. 세포는 광학 현미경(x 100)을 이용하여 관찰하였다. SV- HUC-1 세포(정상 방광 세포)와 253J-BV 세포(방광암 세포)를 다른 농도(1-10 μ M)의 LY255283(BLT2 특정 길항제)과 U75302(BLT1 특정 길항제)로 48시간 동안 처리하였다. 도 1d의 도 A와 B에 나타난 것과 같이, LY255283만 처리한 플레이트로부터 분리된 253J-BV 세포에서 막 수포화(membrane blebbing)가 관찰되었다. 그러나 정상 방광 세포주에는 BLT 길항제를 처리시 형태상의 변화에 영향이 미치지 않았다.
- <125> (2) [^{3} H]-티미딘(Thymidine) 결합 분석(도 1d의 A-B 하부 왼쪽 패널)
- <126> 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1.0×10^4 밀도로 배양하였다. 10% PBS가 보충된 RPMI 1640에서 24시간 동안 배양시킨 후, 배지를 0.5% FBS가 포함된 RPMI 1640으로 교체하여 12시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 서로 다른 농도의 BLT 길항제로 처리하였다. 이후, 길항제 처리 12시간 후, [^{3} H]-티미딘(1 μ Ci/ml)(PerkinElmer Life Sciences)을 첨가하고 36시간 동안 더 배양한 후, 세포를 필터매트(PerkinElmer Life Science)로 수거하고, 상기 필터매트를 건조하여 시료 봉지(PerkinElmer Life Science)에 포장하였다. 마지막으로, Betaplate scint(PerkinElmer Life Science)를 필터매트에 첨가하고 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)(MicroBeta, Wallac/PerkinElmer)로 방사능을 측정하였다. 특정 LTB4 수용체 2의 길항제인 LY255283은 253J-BV 세포에서 티미딘 결합(thymidine incorporation)이 농도 의존적으로 억제(억제)되었으며, SV-HUC-1 세포에서는 그렇지 않았다. LY255283을 10 μ M의 농도로 48시간 동안 처리시 증식이 최소 50% 억제되었다.
- <127> (3) 세포주기 분석(도 1d의 A-B 하부 오른쪽 패널)

- <128> 6-웰 플레이트에 배양한 세포를 0.5% FBS가 함유된 RPMI 1640에서 48시간 동안 5 μ M, 10 μ M LY255283과 1 μ M U75302로 자극하였다. 간단히 트립신을 처리하여 수집한 세포들을 4 $^{\circ}$ C에서 70% 에탄올로 밤새도록 고정하였다. 세포를 RNase A(100 μ g/ml)이 함유된 PBS로 다시 분산시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 프로피디움 아이오다이드(50 μ g/ml)(Sigma)로 염색하였다. 획득(acquisition)과 분석은 Cell Quest Alias software(BD Bioscience)를 사용하여 FACS로 수행하였다. 유사한 결과들이 세포주기 진행에서 나타났다. 세포를 48시간 동안 BLT 길항제로 처리한 후, 세포주기집단을 유세포 분석기로 측정하였다. 간략하게, 세포를 6 웰 플레이트에 평판 배양시키고, 이후 LY255283과 U75302를 48시간 동안 처리하였다. 상기 처리를 마친 후, 세포들은 획득하고 원심분리 하였다. 이후, 세포를 24시간 동안 70% ice-cold 에탄올로 고정시킨 후, 원심분리 하였다. 펠렛을 0.5 ml phosphate-buffered saline (PBS)에 넣고 다시 분산시킨 후, 1 mg/ml PI를 15분 동안 처리하여 배양하였다. LY255283는 sub-G1에서 세포주기를 농도 의존적으로 정지시킴으로써 세포 성장을 억제시켰다.
- <129> LTb4 수용체 1 특이적 길항제인 U75302는 SV-HUC-1과 253J-BV 세포들의 세포증식과 세포주기에 영향을 미치지 않았다. 이후, 10 μ M LY255283과 1 μ M U75302 처리시, 상기 농도가 방광암 세포주 253J-BV에게 유일하게 영향을 미치는 것으로 본 연구에서 확인하였다.
- <130> **실시예 4: LY255283이 253J-BV 방광암 세포에서 미토콘드리아 막전위의 손실과 세포사멸을 유도한다.**
- <131> 선택적인 BLT2 길항제인 LY255283은 인간의 방광암 세포들의 세포 죽음을 유발하고, 증식을 억제함을 보였다. 본 발명자들은 LY255283이 유도한 세포 죽음이 세포사멸에 의한 것인지 아닌지에 대해 연구하였다.
- <132> (1) DNA 분절 (도 1e의 A)
- <133> DNA 분절은 모든 세포질 DNA를 획득하여 확인하였다. 세포를 10% FBS가 보충된 배지를 80% 함유시킨 100mm 플레이트에서 배양하였다. 그 다음, 배지를 0.5% FBS가 함유된 RPMI 1640으로 교체하고, 세포를 1 μ M와 10 μ M LY255283으로 48시간 동안 처리하였다. 세포를 용해 버퍼(1 mM EDTA, 10 mM Tris, 120 mM NaCl, 1% SDS and 100 μ g/ml proteinase K, pH 8.0)로 50 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양시켜서 세포질 DNA를 추출하였다. 손상되지 않은 염색질(nuclear pellet)로부터 DNA 단편을 분리하기 위해, 용해질을 13,000 $\times$ g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 페놀(phenol)/클로로포름(chloroform)/아이소아밀 알코올(isoamyl alcohol)로 두 번씩 추출한 후, 무수 에탄올(absolute ethanol)로 침전시켰다. 펠렛을 Tris-EDTA와 10 mg/ml RNaseA에서 다시 분산시키고, DNA를 1.8% 아가로스 겔상에서 분리하였다. 전기영동 후, 겔을 에티뮴 브로마이드(ethidium bromide)로 염색한 후, DNA를 UV 광원조사하여 관찰하였다. 세포사멸은 DNA 염색체의 분열로 특성화 하였다. 본 발명자들은 방광암 세포주의 DNA 손상에 대한 BLT 길항제의 영향을 연구하였다. 예상대로, 48시간 동안 LY255283으로 처리한 세포들은 DNA 단편들과 같은 패턴의 래더(ladder)가 관찰되었다. 대조적으로, 대조군 세포와 U75302를 처리한 세포에서는 DNA 단편들이 관찰되지 않았다.
- <134> (2) 웨스턴 블롯(Western blot)(도 1e의 B)
- <135> 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 용해 버퍼[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA, 프로테아제 억제제가 첨가된 1% triton X-100]에 넣고 모았다. 수거한 단백질을 시료들을 35 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하여, 100 V에서 90분 동안 폴리비닐리덴 디플루오라이드(polyvinylidene difluoride) 막에 옮긴 후, 아크릴아마이드 겔상에서 SDS-PAGE를 수행하였다. 막을 0.05%(vol/vol) 트윈 20과 5%(wt/vol) 무지방 건조 우유가 함유된 Tris-buffered saline(TBS)로 1시간 동안 차단한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 5% 무지방 우유에 적절한 항체(PARP, 1:2000 dilution, Caspase-9, 1:2000 dilution, Bax 1:2000 dilution, actin, 1:3000 dilution)를 넣고 밤새도록 배양하였다. 단백질-항체 복합체가 결합된 막을 HRP가 결합된 이차 항체로 2시간 동안 배양한 후, 증가된 chemiluminescence kit(Amersham Biosciences, UK)로 현상시켰다. 폴리 ADP-리보스 중합효소(poly ADP-ribose polymerase; PARP) 분열은 세포사멸의 중요한 지표로써 구축되어 있다. LY255283을 48시간 동안 처리한 후, 세포사멸의 유도가 253J-BV 세포주에서 관찰되었다. 웨스턴 블롯(western blot) 분석에서 LY255283이 pro-caspase 9의 억제를 유발함이 관찰되었다. 상기 결과는 LY255283에 의해 유도된 세포사멸이 캐스페이즈(caspase)에 의존적임을 나타낸다. 또한 세포에 10 μ M LY255283을 48시간 동안 처리하였을 경우, pro-apoptotic 단백질과 Bax가 상당히 증가되었다. 그러나, 동일 조건에서 세포에 U75302를 처리하는 경우, 단백질 발현에 상당한 변화가 나타나지 않았다.
- <136> (3) 미토콘드리아 막전위의 측정(도 1e의 C)
- <137> 미토콘드리아의 손상은 caspase-9 경로의 영향을 받는 세포사멸에 중요하다. 미토콘드리아 막전위(MMP)에서 LY255283의 영향을 평가하기 위해, 세포를 fluorescent mitochondria specific cationic dye인 JC-1로 사전처리

하고, 막전위 변화를 유세포 분석기로 측정하였다. 6-웰 플레이트에 24시간 동안 배양시킨 세포를 PBS로 세척하고, 0.5% FBS가 함유된 RPMI 1640에서 서로 다른 농도의 LY25283과 U75302를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 JC-1로 30분 동안 처리하였다. JC-1을 제거한 후, PBS로 세척하고, 트립신 처리하여 수거한 후, PBS에 다시 분산시켰다. 샘플을 유세포 분석기를 이용하여 530nm(FL-1 녹색)과 590nm(FL-2 적색)에서 측정하였다. LY255283를 10 μM 농도로 처리한지 48시간 후, 미토콘드리아 전위의 하락이 유도되었다. LY255283 처리한 경우 대조군에 비해 녹색 형광(green fluorescence; FL-1)이 약 2.5 배 증가하였다. 이러한 결과는 LY255283이 미토콘드리아 기능과 막 투과성이 연계시켜 세포사멸을 유도한 것이다. LY255283을 처리한 세포들에서 미토콘드리아 막전위 손실의 이유로 캐스페이즈가 세포사멸의 과정에 필수적인 역할을 할 수 있음을 생각할 수 있다.

<138> 실시예 5: LY255283은 췌장암 세포들(Panc-1 & AsPC-1)의 세포사멸을 유도한다.

<139> 췌장암 세포의 증식과 생존에서 선택적인 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 연구하기위해, 본 발명자들은 Panc-1과 AsPC-1 세포들을 LY255283에 48시간 동안 노출시킨 후, MTT 분석으로 세포 증식률을 관찰하였다.

<140> (1) 인간의 췌장암 세포주와 세포 배양

<141> 두 사람의 췌장암 세포주를 이용하였다: Panc-1과 AsPC-1. Panc-1 세포를 DMEM에서 배양하고, AsPC-1 세포를 RPMI 1640에서 배양하였다. 세포를 공기와 CO₂의 혼합가스로 습도를 높힌 37 °C 조건에서 열처리로 비활성화시킨 10% FBS, 100 units/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신이 첨가된 배지에 단층(monolayer)으로 평판 배양하였다.

<142> (2) MTT 분석 (도 1f)

<143> 세포들을 10,000 cells/well 농도로 96-웰 배양판에 배양하였다. 24시간 동안 배양시킨 후, 3시간 동안 혈청을 제거하고, LY255283을 여러 농도(2.5 μM , 5 μM , 10 μM)로 첨가하였다. 실험을 마친 후, PBS로 희석시킨 5 mg/ml MTT 용액 25 μl 을 96-웰 배양판에 첨가하였다. 살아있는 세포에서 yellow tetrazolium salt(MTT)를 고 발색 반응물(dark blue formazan crystal)로 환원시키기 위해, 배양판을 5% CO₂ 분위기 하에 37 °C에서 3시간 동안 배양하였다. 3시간 동안 배양을 끝낸 후, MTT 용액을 제거하고, 포르마잔 결정(formazan crystal)을 용해시키기 위해 100 μl 디메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide)를 첨가하였다. 포르마잔 결정의 완전한 용해를 확인하기 위해, 배양판을 10분 동안 낮은 속도로 천천히 회전시켰다. 각각의 웰들의 흡광도를 흡광도 측정기(microplate reader)로 540 nm에서 측정하였다.

<144> BLT2 길항제인 LY255283은 대조군 세포에 상대적인 췌장암 세포들(Panc-1과 AsPC-3 세포)에서 처리 48시간 때에 농도 의존적으로 세포 증식률을 상당히 감소시켰다. LY255283은 Panc-1과 AsPC-3 세포들 모두에서 농도 의존적으로 세포 증식률을 감소시켰다.

<145> 실시예 6: BLT2 길항제는 유방암 세포들 증식률을 상당히 감소시킨다.

<146> (1) 세포 성장 분석 (도 1g의 A-D)

<147> 유방암의 성장에 대한 BLT2 길항제인 LY255283과 BLT1 길항제인 U75302의 영향을 조사하기위해, 본 발명자들은 유방암 세포주 T47D (ER+), MDA-MB-468 (ER-), MDA-MB-453 (ER-) 및 정상 IMR-90 세포들을 사용하였다. 세포들에 LY255283과 U75302를 농도 의존적으로 처리하고, 트립판 블루 색소 배제 방법(trypan blue dye exclusion method)을 이용하여 세포 수를 분석하였다. 세포를 12-웰 플레이트에 0.5×10^5 또는 5×10^5 cells/well의 밀도로 배양하였다. 24시간 후, 세포들을 0.5% 혈청이 함유된 배지에서 3시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포들에 U75302(0.5, 1 μM), LY255283(5, 10 μM)을 처리하고, 37 °C에서 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 세포의 성장을 측정하기 위해, 처리된 세포들을 각 시간 때에 트립신을 처리하고, 트립판-블루 배제 방법으로 계산하였다.

<148> BLT2 신호전달의 차단을 위한 LY255283의 처리는 처리농도와 처리시간에 의존적으로 모든 유방암 세포주의 성장을 억제시킨다. 또한, 정상 IMR-90은 LY255283에 의한 영향을 받지 않는다. 대조적으로 LY255283, U75302는 유방암 세포들과 정상 세포들의 성장에 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는 BLT2 신호전달이 유방암 성장에 중요한 역할을 함을 암시한다. 이는, BLT2가 유방암에 대한 잠재적 치료 타겟의 가능성을 나타낸다.

<149> 실시예 7: LY255283은 유방암 세포들의 부분적인 apoptotic 세포 죽음을 유발한다.

- <150> 유방암 세포들의 생존에 대한 BLT2 신호전달의 관계를 관찰하기 위해, 세포사멸의 측정을 위해 BLT 길항제가 처리된 세포를 DAPI 염색과 DNA 분열 분석을 사용하여 분석하였다.
- <151> (1) DAPI 염색 (도 1h의 A)
- <152> 세포를 35-mm 플레이트에 7×10^5 cells/plate의 밀도로 멸균된 커버슬립(coverslip)위에 배양하였다. 24시간 후, 세포를 3시간 동안 혈청이 무첨가된 배지에서 배양하였다. 그 후, 세포를 U75302(0.5, 1 μ M), LY255283(5, 10 μ M)로 처리하고, 48시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 이후, 세포를 70% 차가운 에탄올로 상온에서 30분 동안 고정시킨 후, PBS로 한번 세척하였다. DAPI(50 ng/ml)를 고정된 세포에 첨가하고, 상온에서 20분 동안 배양시킨 후, PBS로 세척하였다. 세포를 형광 현미경에 고정시키고 관찰하였다. 핵의 응축과 분열로 사멸된 세포를 확인하였다. 사멸된 세포들의 비율은 총 계산된 세포들 중 사멸된 세포의 비율로 계산하였다. 최소 500개 세포들이 각각 처리된 군에서 계산되었다.
- <153> (2) DNA 분열 분석 (도 1h의 B)
- <154> 세포를 100-mm 플레이트에 2×10^6 cells/plate의 밀도로 평판 배양하였다. 24시간 후, 세포를 3시간 동안 혈청이 무첨가된 배지에서 배양하였다. 그 후, 세포를 U75302(0.5, 1 μ M), LY255283(5, 10 M)로 처리하고, 37 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 부착된 세포와 떨어진 세포들 모두 수집하고, 용해 버퍼(20mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1% SDS, 0.5 mg/ml 프로테이나아제 K)에 다시 분산시킨 후, 50 °C에서 밤새도록 배양하였다. DNA를 페놀/클로로포름으로 추출하였다. DNA 시료를 1.8% 아가로즈 겔로 전기영동하고, 에티듐 브로마이드로 염색하였다.
- <155> (3) 웨스턴 블롯팅(Western blotting)(도 1h의 C)
- <156> 세포를 100-mm 플레이트에 2×10^6 cells/plate의 밀도로 배양하였다. 24시간 후, 세포를 3시간 동안 혈청이 무첨가된 배지에서 배양하였다. 그 후, 세포들을 U75302(0.5, 1 μ M), LY255283(5, 10 M)로 처리하고, 37 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 부착된 세포와 떨어진 세포들을 수집하고, 버퍼(40mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl, 0.1% Nonidet-P40, 100mM 페닐메틸설포닐 플로라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1mM Na 오르소바나데이트(orthovanadate), 2ug/ml 류펩틴(leupeptin), 2ug/ml 아프로티닌(aprotinin))로 용해시켰다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 막으로 옮겼다. 상기 막을 무지방 건조 우유를 넣은 Tris-buffered saline으로 차단시킨 후, PARP와 일차 항체인 캐스페이즈-9를 넣고 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 블롯은(blot) 페록시다아제가 결합된 이차 항체로 전개시키고, 단백질은 제조사들의 추천에 따라 ECL(enhanced chemiluminescence) 절차 (Amersham, USA)로 관찰하였다.
- <157> LY255283 (2, 5, 10 μ M)의 처리시 MDA-MB-468 세포에서 농도-의존적인 방법으로 세포사멸을 유도한다 (A). 동일하게 DAPI로 염색하고, LY255283이 처리된 MDA-MB-468 세포들의 DNA 분열 분석에서 세포사멸의 래더링(laddering) 패턴 특성이 관찰되었다 (B). 그러나, U75302 (0.5, 1 μ M)은 DNA 분열을 유도하지 못하였다 (B). 그 다음, 캐스페이즈가 LY255283이 유도한 세포사멸과 관련있는지에 대해 평가하기 위해, 캐스페이즈-9와 PARP의 분열을 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 이용하여 분석하였다. LY255283은 PARP의 분열과 캐스페이즈-9의 활성을 농도-의존적으로 유도한다 (C). 그러나, U75302는 PARP 분열과 캐스페이즈-9 활성에 영향을주지 않는다. 상기 결과는 BLT2 길항제인 LY255283이 유방암 세포에서 캐스페이즈-의존적인 신호전달을 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 설명된다.
- <158> **실시예 8: 혼합물(LY255283과 에피루비신)의 치료는 유방암 MCF7 세포에서 상승적인 세포사멸을 유도한다.**
- <159> (1) 세포 배양 및 시약
- <160> MCF-10A 세포를 공기와 CO₂의 95%/5% (v/v) 가습(humidified) 혼합가스 분위기하의 37 °C에서 5% (v/v) 말혈청, 100 units/ml 페니실린, 100 mg/ml 상피세포 성장 인자 및 1% (w/v) L-글루타민이 함유된 DMEM/F-12 (50:50, v/v) 배지에 배양시켰다. MCF-7 세포를 공기와 CO₂의 95%/5% (v/v) 가습(humidified) 혼합가스 분위기하의 37 °C에서 열처리로 불활성화시킨 10% FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 배지에 배양시켰다. BLT2 길항제(LY255283)는 BIOMOL (Plymouth Meeting, PA)로부터 구매하였다. 에피루비신은 MP Biomedicals로부터 구매하였다. 세포를 24시간 동안 배양하였다. 6시간 동안 혈청을 제거한 후, 세포에 10 μ M LY255283, 100 ng/ml 에피루비신 또는 혼합물을 처리하였다. 이때, 에피루비신을 처리하기 전에 LY255283를 처리하고 30분 동안 사전배양(preincubation)하였다. MCF-7 인간 유방암 세포에서, RT-PCR 분

석시 BLT2 mRNA 수준이 높게 유도되었다. 그러나, MCF-10A 인간 정상 유선 세포에서는 BLT2의 발현의 검출이 유도되지 않았다. 인간의 유방암 세포에서 BLT2 mRNA의 발현에 대한 상기 결과는 BLT2가 유방암에 중요한 역할을 함을 나타낸다.

(2) BLT2의 RT-PCR (도 1i의 A)

총 RNA 세포는 Easy Blue™ (Intron, Korea)으로 추출하였다. 그 후, 총 RNA 중 1.25 µg을 42 °C에서 1시간 동안 역전사시키고, 인간 BLT2에 대한 특정 프라이머(sense, 5'- AGCCTGGAGACTCTGACCGCTTTCG; antisense, 5'- GACGTA GAGC ACCGGGTGACGCTA)로 PCR을 이용하여 증폭시켰다. BLT2에 대한 PCR 프로토콜은 94 °C에서 60초 동안 변성(denaturation), 68 °C에서 40초 동안 어닐링(annealing), 72 °C에서 45초 동안 연장(elongation)을 33 회 수행하는 것을 포함한다. 증폭된 PCR 생성물을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하고, 에티듐 프로마이드로 염색하여 밴드를 노출시키고, UV 조명에 노출시켰다.

(3) 광학 현미경을 이용한 형태 변화(도 1i의 B)

세포를 6 웰 배양판에 접종(seeded)하였다. 6시간 동안 혈청을 제거한 후, 세포를 10 µM LY255283, 100 ng/ml 에피루비신 또는 혼합물을 처리하였다. 이때, 에피루비신을 처리하기 전에 LY255283를 처리하고 30분 동안 사전 배양(preincubation)하였다. 세포를 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 광학 현미경(× 20)를 이용하여 관찰하였다. 세포의 형태를 광학 현미경(× 20)으로 관찰하였다. LY255283 (10 µM)과 에피루비신 (100 ng/ml)의 혼합물을 처리한지 48시간 후에 MCF-7 세포에서 역동적인 형태 변화가 유도되었다. 시간이 지남에 따라, 처리된 세포들이 둥글게되고, 막의 파열, 염색질 응축 및 핵 분열이 관찰되었으며, 마침내 마이크로플레이트(microplate)로부터 분리되었다. 상기의 형태 변화는 세포사멸의 의한 것임을 이전에 설명되었다.

(4) DNA 분열 분석 (도 1i의 C)

처리제에 노출시킨 후, 부착되고 분리된 세포를 모두 수거하고, 프로테이나아제 K (100 µg/ml)가 함유된 얼려진 상태의 용해 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS)에 다시 분산시켰다. 정제되지 않은 DNA 샘플을 페놀(phenol)/클로로포름(chloroform)/아이소아밀 알코올(isoamyl alcohol)로 두 번씩 추출한 후, 무수 에탄올(absolute ethanol)로 침전시켰다. DNA 펠렛을 트리스-EDTA와 10 mg/ml RNase A에 다시 분산시켰다. DNA 샘플을 1.8% 아가로스 겔로 전기영동시키고, 에티듐 브로마이드로 염색하였다. 에피루비신은 단지 세포 죽음을 약간 증가시켰다. 그러나, LY255283 (10 µM)을 에피루비신 (100 ng/ml)과 함께 처리할 경우, 상승작용으로 DNA 분열을 증가시킴을 관찰하였다.

(5) 웨스턴 블롯 분석(도 1i의 D)

세포질 단백질을 120mM NaCl, 40mM Tris-HCl (pH 8.0) 및 0.1% NP-40이 함유된 단백질 추출 버퍼로 분리하였다. 단백질의 동일 양 (100 µg/ml)을 10% SDS-PAGE 겔로 분류시키고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막으로 옮겼다. 상기 막을 0.05% (v/v) Tween 20과 5% (w/v) 무지방 건조 우유가 함유된 TBS로 1시간 동안 차단시킨 후, anti-PARP와 캐스페이즈-9 일차 항체와 각각 배양하였다. 0.05% (v/v) Tween 20이 함유된 TBS로 세척한 후, ECL 시스템 (Amersham Biosciences, UK)을 사용하여 화학적 발광제(chemiluminescent) 염색을 증가시킨 후, 막을 HRP-결합된 이차 항체와 배양하였다. 세포 죽음이 상기 설명한 세포사멸로 관찰되는지 평가하기 위해, apoptotic 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 에피루비신, LY255283 또는 상기 두 약물의 혼합물과 함께 수행하였다. 세포에 상기 두 약물을 함께 처리할 경우, 캐스페이즈-9의 활성이 나타났다. PARP 분열은 세포에 LY255283 (10 µM) 단독 처리, 에피루비신 (100 ng/ml) 단독 처리할 경우 검출되었다. 대조적으로, 분열된 PARP 밴드는 두 약물의 혼합물을 처리할 경우 더 많이 눈에 띄었다. 상기의 결과는 LY255283과 에피루비신의 혼합물이 MCF-7 세포에서 캐스페이즈-9의존적인 경로를 통한 세포사멸을 유발함을 나타낸다.

(6) 세포주기 분석 (도 1i의 E)

세포사멸을 검출하고 정량하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 세포를 70% 에탄올이 함유된 PBS로 밤새도록 고정시켰다. 원심분리 후, 세포를 PBS로 세척하고, 37 °C에서 30분 동안 RNase A (100 µg/ml)가 함유된 PBS 용액에 다시 분산시켰다. 이후, FACS 하기 전, 프로프디움 아이오다이드(50 µg/ml)를 첨가하였다. 획득(acquisition)과 분석은 Cell Quest Alias software (BD Bioscience)을 이용하여 FACScan으로 수행하였다. G₁ 기 세포 (sub-G₁)보다 DNA 함량이 낮은 세포들은 apoptotic 된 것으로 추측하였다. FACS 분석으로, LY255283(10 µM)과 에피루비신(100 ng/ml) 혼합물의 처리 시 sub-G₁ 집단이 높게 증가함을 관찰하였다.

- <171> (7) 세포 성장 (도 1i의 F)
- <172> 세포 성장률을 측정하기 위해, 세포를 약 2.5×10^5 cells/35-mm로 접종하였다. 세포에 10 μ M LY255283과 100 ng/ml 에피루비신을 24시간, 48시간 동안 처리하였다. 죽은 세포와 잔해물을 제거하기 위해 상기 나타난 시간에 플레이트를 PBS로 두 번씩 씻어내었다. 플레이트 위에 살아있는 세포에 트립신을 처리하고, 개별적으로 수집하였다. 각 배양관의 세포를 카운터(Coulter) 세포 측정기를 이용하여 4번씩 측정하였다. 각 배양관의 평균 세포 수는 성장률을 결정하기 위해 사용되었다. 세포 수는 LY255283 (10 μ M)과 에피루비신 (100 ng/ml) 혼합물 치료에 의해 상당히 감소되었다.
- <173> **실시예 9: LY255283은 라스(Ras)로 형질전환된 암 세포의 전이를 억제시킨다.**
- <174> (1) 전이 분석 실험(도 2a의 A-C)
- <175> 본 발명에 사용된 모든 동물들은 고려 대학교의 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)로부터 승인된 지침에 따라 처리하였다. 주사시 4주령된 암컷 누드 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를, 전이 분석 실험에 사용하였다. 주사하기 위한 Rat-2, Rat2-H06 및 Rat2-BLT2 세포(5×10^5 cells)를 수확시, 대수증식된 배양액으로부터 준비하였다. 세포를 0.025% 트립신과 0.1% EDTA가 함유된 Hanks' balanced salt solution을 간단히 처리하고, 원심분리로 트립신을 빠르게 제거하고, LTB₄가 포함된 염수(saline)에 다시 분산시킨 후, 26-게이지 바늘로 꼬리 측면 정맥내에 0.1ml을 1시간 내에 주사하였다. 저해제 실험을 위해, 저해제를 사전처리한 세포를 주사한지 3, 5일 후, U75302와 LY255283 (0.25 mg/kg for BLT1 길항제 및 2.5 mg/kg for BLT2 길항제)를 복강내 주사하였다. 실험이 끝났을 때(7 weeks) 마우스(n=8, each group)들의 사망률과 폐 전이를 확인하기 위해, 세포 주사를 수행한지 21일 되었을때에 마우스(n=8, 각각의 그룹)들이 희생될때 까지 무균 경계 조건을 유지시켰다.
- <176> BLT2 길항제인 LY255283이 누드 마우스에서 라스(Ras)-종양유전자를 발현하는 형질전환된 세포의 전이를 상당히 감소시켰다. 거시적이고 조직학적 형태의 폐를 기반으로, (B) H- Ras^{V12} 또는 (C) BLT2로부터 유도된 생체내 폐 전이가 BLT2 길항제 (LY255083)에 의해 감소되었다. 그러나, (A) Rat-2 세포 주사의 제어는 폐로의 전이를 초래하지 않는다. LY255283과 달리, DMSO 또는 U75302는 H-Ras^{V12} 또는 BLT2에 대한 반응에서 전이 억제를 초래하지 못한다. 마우스를 세포 주사한지 21일 후 안락사시켰으며, 각 그룹별로 폐 전이 결절(nodule)의 수와 폐의 무게를 분석하였다. 본 발명에 사용된 모든 동물들은 고려 대학교의 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)로부터 승인된 지침에 따라 처리하였다. 주사시 4주령된 암컷 누드 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를, 전이 분석 실험에 사용하였다. 주사하기 위한 Rat-2, Rat2-H06 및 Rat2-BLT2 세포(5×10^5 cells)를 수확시, 대수증식된 배양액으로부터 준비하였다. 세포를 0.025% 트립신과 0.1% EDTA가 함유된 Hanks' balanced salt solution을 간단히 처리하고, 원심분리로 트립신을 빠르게 제거하고, LTB₄가 포함된 염수(saline)에 다시 분산시킨 후, 26-게이지 바늘로 꼬리 측면 정맥내에 0.1ml을 1시간 내에 주사하였다. 저해제 실험을 위해, 저해제를 사전처리한 세포를 주사한지 3, 5일 후, U75302와 LY255283 (0.25 mg/kg for BLT1 길항제 및 2.5 mg/kg for BLT2 길항제)를 복강내 주사하였다. 실험이 끝났을 때(7 weeks) 마우스(n=8, each group)들의 사망률과 폐 전이를 확인하기 위해, 세포 주사를 수행한지 21일 되었을때에 마우스(n=8, 각각의 그룹)들이 희생될때 까지 무균 경계 조건을 유지시켰다. 폐를 절개한 후, 4% 포르마잔을 처리하여 고정시키고, 파라핀으로 보관하였다. 절단부분 (4 μ m)을 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하고, DP71 디지털 카메라 (Olympus)가 장착된 BX51 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 얻었다. 전이 생존율은 Kaplan-Meyer plot으로 분석하였다.
- <177> **실시예 10: LY255283은 라스(Ras)-암 세포를 주사한 마우스의 생존을 연장한다.**
- <178> (1) 전이 분석 실험 및 전이 생존 분석(도 2b)
- <179> 본 발명에 사용된 모든 동물들은 고려 대학교의 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)로부터 승인된 지침에 따라 처리하였다. 주사시 4주령된 암컷 누드 마우스(Charles River, Wilmington, MA)를, 전이 분석 실험에 사용하였다. 주사하기 위한 Rat-2, Rat2-H06 및 Rat2-BLT2 세포(5×10^5 cells)를 수확시, 대수증식된 배양액으로부터 준비하였다. 세포를 0.025% 트립신과 0.1% EDTA가 함유된 Hanks' balanced salt solution을 간단히 처리하고, 원심분리로 트립신을 빠르게 제거하고, LTB₄가 포함된 염수

(saline)에 다시 분산시킨 후, 26-게이지 바늘로 꼬리 측면 정맥내에 0.1ml을 1시간 내에 주사하였다. 저해제 실험을 위해, 저해제를 사전처리한 세포를 주사한지 3, 5일 후, U75302와 LY255283 (0.25 mg/kg for BLT1 길항제 and 2.5 mg/kg for BLT2 길항제)를 복강내 주사하였다. 실험이 끝났을 때(7 weeks) 마우스(n=8, each group)들의 사망률과 폐 전이를 확인하기 위해, 세포 주사를 수행한지 21일 되었을때에 마우스(n=8, 각각의 그룹)들이 희생될때 까지 무균 경계 조건을 유지시킨다. 전이 생존율은 Kaplan-Meyer plot으로 분석하였다.

<180> BLT2 길항제인 LY255283이 라스(Ras)-종양유전자를 발현하는 형질전환된 세포를 주사한 마우스의 생존율을 연장시킨다. Kaplan-Meier 생존률 분석에 따르면, Rat2- H06 세포로 주사한 마우스들의 사망률은 BLT2 신호전달의 억제로 감소되었다.

<181> **실시예 11: BLT2는 혈관신생에 결정적인 역할을 한다.**

<182> (1) BLT2 유전자 도입 마우스의 제조 및 동정

<183> 완전한 래트 BLT2 유전자를 pcDNA3-HA-rBLT2로부터 서브클로닝하고 닭 β -액틴 프로모터의 하류(downstream)를 pCAGGS-B2 벡터에 삽입하였다.

<184> 소화되어(digested) 분리된 상기 구성체를 수정된 달걀에 주사하고 그 후에 이들 달걀을 포유암컷(foster female)에 이식하였다. 잠재적 유전자 도입 파운더 마우스(founder mice)는 3주령 마우스의 꼬리로부터 추출된 게놈 DNA를 이용하여 2개의 서로 다른 프라이머 쌍으로 PCR에 의해 스크리닝하여 트랜스유전자 삽입(transgene integration)을 검출하였다. 간단히 설명하면, 상기 마우스 꼬리 생체 시료를 200 μ l TES 버퍼 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.5% SDS)에 넣었다. 프로테이나아제 K (최종 농도: 200 μ g/ml)를 첨가하고 그것을 55°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 페놀 추출 및 에탄올 침전 후 마우스 유전자 도입 DNA를 얻었다. 유전자 도입 마우스를 스크리닝 하기 위한 프라이머는 다음과 같다: 정방향, 5'-GCGCAGGGACTTCCTTTGTC-3' 및 5'-GCTCTAGAGCCTCTGCTAACC-3'; 역방향, 5'-CCGATGGGTGGCACAATTGAC-3'. 상기 BLT에 대한 PCR 프로토콜은 96°C에서 60초간 변성(denaturation), 52°C에서 30초간 어닐링(annealing), 및 72°C에서 120초간 신장(elongation)의 35 사이클에 이어 72°C에서 10분간 최종신장(extension)을 포함하였다. 상기 증폭된 PCR 산물 (924 pb 및 677 bp, 각각)을 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동하고, 이후 밴드들을 에티뮴 브로마이드(ethidium bromide) 염색으로 가시화하였다. 획득된 양성 파운더(positive founder)를 동일한 계통의 암컷 마우스로 양육하였다. 잠재적인 양성 한배새끼(litter) (F1)를 상기 개시된 바와 같이 PCR로 스크리닝하였다. BLT2 과발현을 증명하기 위해, Easy BlueTM을 이용하여 총 RNA를 6주령 BLT2 유전자 도입 마우스 및 동령(age-matched)의 대조군 마우스로부터 분리하였다. 그 후에, 1 μ g의 총 RNA를 42°C에서 60분간 역전사하고 마우스 BLT2에 대한 프라이머로 PCR에 의해 증폭하였다 (정방향, 5'-CAGCATGTACGCCAGCGTGC-3' 역방향, 5'-CGATGGCGCTCACCAGACC-3'). 상기 PCR 프로토콜은 95°C에서 30초간 변성(denaturation), 69°C에서 30초간 어닐링(annealing), 및 72°C에서 45초간 신장(elongation)의 28 사이클에 이어 72°C에서 10분간 최종신장(extension)을 포함하였다. 상기 PCR 산물을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드로 염색하였다.

<185> (2) 생체내 매트릭셀 플러스 분석

<186> FVB 야생형 마우스 또는 BLT2 TG 마우스 (암컷, 8-10 주령)에 헤파린(heparin; 20 유닛) 및 테스트될 시약들을 포함하는 BD Biosciences로부터 입수한 400 μ g의 성장인자-유도성 매트릭셀(growth factor-reduced Matrigel 1)을 피하로 주사하였다. 7일 후, 마우스를 희생시키고, 응고된 매트릭셀을 절개하여, 혈관 염색 키트(the Blood Vessel Staining Kit, Chemicon)에 있는 제조사의 설명서에 따라 10% 포르말린에서 고정, 파라핀에 포매, 5 μ m 절편(sections)으로 절단 및 항-vWF 항체로 염색하였다. 염색된 각각의 매트릭셀 절편은 DP71 디지털 카메라 (Olympus)가 장착된 BX51 현미경을 이용하여 촬영하였으며, vWF-양성 혈관의 영역은 이미지 J 소프트웨어를 이용하여 계산하였다.

<187> (3) BLT2는 혈관신생에 결정적인 역할을 한다 (도 3a의 A-D).

<188> (A) BLT2 TG 마우스를 제조하기 위하여 사용된 DNA 구성체의 개략도. 정방향 및 역방향 프라이머의 두 쌍이 제시되어 있다. (B) PCR을 이용한 파운더의 동정. 꼬리 생체시료로부터 얻은 게놈 DNA를 지시된 두개의 프라이머 쌍을 이용하여 증폭하였다. 프라이머 쌍 1로 형성된 667-bp PCR 산물 및 프라이머 쌍 2로 형성된 924-bp 산물을 나타낸다. BLT2 TG 마우스 제조를 위해 사용도니 DNA 구성체는 양성대조군에 대한 주형으로 사용되었다. L: DNA 래더(ladder), W: 야생형 마우스, B: BLT2 TG 마우스, P: 양성대조군. (C) BLT2 TG 마우스의 다양한 기관에서 BLT2 mRNA의 과발현. 총 RNA를 분리하여, 역전사하고 BLT2 및 GAPDH에 특이적인 프라이머를 이용하여 증폭하였다. W: 야생형 마우스, B: BLT2 TG 마우스. (D) FVB WT 및 BLT2 TG 마우스에 헤파린(20 유닛) 및 EtOH, LTB4

(1 μ g) 또는 12(S)-HETE (0.5 μ g)을 포함하는 성장인자-유도성 매트릭스를 피하로 주사하였다. 상기 언급한 바와 같이 생체 내 혈관 형성을 분석하였다. 데이터는 대조군에 대한 평균 배수 증가(mean fold increases)로 나타내었다.

<189> 실시예 12: BLT2 길항제인, LY255283은 VEGF-유도성 혈관신생을 억제한다.

<190> (1) 튜브 형성 분석

<191> 300 μ l의 성장인자-유도성 매트릭스(BD Biosciences, San Diego, CA)을 24-웰 플레이트에 각각 넣고 37°C에서 12시간 동안 중합하였다. 5% FBS를 포함하는 M199에서 배양된 HUVECs을 트립신 처리하고 1% FBS를 포함하는 M199 배지에 현탁시켰다. 5×10^4 cells/well의 밀도로 매트릭스 층에 접종(seed)되기 전 30분 동안 저해제 또는 길항제로 세포를 전처리하였다. 이후, 세포를 LTB₄, 12(S)-HETE 또는 VEGF로 자극하였다. 12시간 후, 무작위로 선택된 5개 지역을 DP71 디지털 카메라가 장착된 CKX41 현미경으로 영상화하고, 튜브의 길이를 측정하고, 이미지 J 소프트웨어(Image J software)를 이용하여 정량분석 하였다. 상기 이미지 편집 프로그램은 NIH(U.S. National Institutes of Health)에서 개발된 것이다.

<192> (2) 이행 분석

<193> 이행(Transmigration) 분석은 6.5-mm 직경의 폴리카보네이트(polycarbonate) 필터(8- μ m pore size)가 장착된 트랜스웰 챔버(Transwell chambers)(Corning Costar, Cambridge, MA)를 사용하여 수행하였다. 컨플루언트(confluent) 상태의 HUVEC를 5% FBS가 함유된 M199 배지에 4시간 동안 배양하였다. 필터의 아랫면을 37 °C에서 1시간 동안 1% 젤라틴 10 μ l로 코팅하였다. 상기 챔버내에 세포의 최종 농도가 1×10^5 cells/well이 되기 전에, 세포에 트립신을 처리한 후, 1% FBS가 함유된 M199 배지에 다시 분산시켰다. 세포를 챔버의 아랫 부분으로 이동시킨 후, LTB₄, 12(S)-HETE 또는 VEGF를 포함시켰다. 접종(seed)되기 전 30분 동안 저해제 또는 길항제로 세포를 전처리하였다. 5% CO₂상태에서 37 °C로 3시간 동안 배양시킨 후, 필터를 분리하고, 각 필터의 윗면을 면봉으로 닦아냄으로써 세포를 모았다. 필터의 아랫 부분으로 이동시킨 세포는 메탄올로 1분 동안 고정시키고, 헤마톡실린으로 1분 동안 염색하고, 마지막으로 에오신으로 30초 동안 염색하였다. DP71 디지털 카메라가 장착된 CKX41 현미경을 이용하여 영상화 한 후, 세포 이동(cell migration)은 필터의 아랫 부분의 세포를 집계함으로써 정성분석하였다. 다섯 부분을 각각 분석하여 계산하였다.

<194> (3) BLT2 길항제인 255283은 VEGF-유도성 혈관신생을 억제한다 (도 3b의 A-C).

<195> (A) FVB 마우스들에 헤파린(heparin)(20 units)과 PBS, VEGF (100 ng), VEGF + LY255283 (10 μ g), VEGF + U75302 (1 μ g) 또는 VEGF + DMSO가 함유된 400 μ l의 성장 인자-유도성 매트릭스를 피하에 주사하였다. 7일 후, 마우스들을 죽이고, 고체화된 매트릭스를 제거하고, 10% 포르마잔으로 고정시키고, 파라핀으로 포매(embed)시키고, 5 μ m로 절단하고, 제조사의 지시에 따라 혈관 염색 키트(Blood Vessel Staining Kit)(Chemicon)를 이용하여 anti-vWF(anti-von Willebrand factor) 항체와 염색시켰다. 각각의 염색된 매트릭스를 DP71 디지털 카메라가 장착된 BX51 현미경(Olympus)를 이용하여 이미지를 얻었으며, 혈관의 vWF-양성 부분을 이미지 J 소프트웨어(Image J software)를 이용하여 측정하였다. 얻어진 이미지는 각각의 처리로 얻어진 결과를 나타낸 것이다. (B) HUVEC를 5% FBS를 포함하는 M199 배지에서 4시간 동안 배양하고, LY255283과 U75302를 1% FBS를 포함하는 M199 배지에 분산시킨 세포에 30분 동안 첨가하였다. 세포를 성장 인자-유도성 매트릭스가 코팅된 24-well 배양판에 평판 배양시키고, VEGF로 자극하였다. 12시간 후, 무작위로 선택한 5개의 지역을 영상화하고, 튜브 길이를 이미지 J 소프트웨어(Image J software)를 이용하여 측정하였다. 바(bar)는 100 μ m를 나타낸다. (C) HUVEC를 5% FBS를 포함하는 M199 배지에서 4시간 동안 배양시키고, LY255283과 U75302를 1% FBS를 포함하는 M199 배지에 분산시킨 세포에 30분 동안 첨가하였다. 위의 웰(upper well)에 세포를 채워 넣고, 아래 웰(lower well)에 VEGF를 처리하였다. 3시간 후, 세포를 아랫 부분으로 이동시키고, 염색시킨 후 카운트하였다.

<196> 실시예 13: 면역조직화학 염색, 조직학적 지수 및 분석 (도 4a)

<197> 인간의 여러 종양에 상응하는 정사 조직/인간의 방광암 조직 샘플을 Patagen Inc.(Korea)로부터 구입하였다. 토끼 다클론(polyclonal) 항체에 BLT1/2 (dilution 1:250) 또는 MMP-9 (dilution 1:250, Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, Missouri)를 적용하기 전, 항원 회복(antigen retrieval)을 위해 포르마잔으로 고정화하고, 파라핀으로 포매된 절단부분을 10분 동안 프로테이나아제 K(proteinase K)에 놓아두었다. 일차 항체와 바이오틴이 부착된 이차 항체로 배양시킨 후, 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase)을 처리하였다. Fast Red Violet(for BLT1/2 stain; Chemicon, Temecula, CA, APR150) 또는 디아

미노벤지딘(Diaminobenzidine)(for MMP-9 stain; Chemicon, Temecula, CA, DAB150)을 크로모젠(chromogen)으로 사용하였다. 절단 부분을 헤마톡실린으로 대조염색시킨 후, 면역반응성을 두 명의 맹인 관찰자들에 의해 독립적으로 평가하였다. 세포질 염색은 명암도(0-negative, 1-weak, 2-moderate, 3-strong)와 양성 세포의 비율[0, 1 (1-24%), 2 (25-49%), 3 (50-74%), 4(75-100%)]로 등급을 나눴으며, 결과 사이의 불일치는 합의(consensus)로 결정하였다. H-스코어를 위해 등급을 곱하였다(Camp et al., 1999; Ishibashi et al., 2003. 다중 코어(multiple core)로 종양에 대한 H-스코어의 평균을 내었다. 단백질 발현은 낮음(H-score <130) 또는 높음(H-score >130)으로 한정시켰다. 이후, 카이-스퀘어(Chi-square) 분석을 BLT2와 MMP-9 발현 사이의 관계를 분석하기 위해 이용하였다.

[표 1]. 85명의 환자의 방광암 조직 샘플의 류코트리엔 B4 수용체인 BLT1과 BLT2의 발현 수준 및 TMN 단계

TMN stage (total no.)	BLT2 groups			BLT1 groups		
	1	2	3	1	2	3
Stage 0 (18)	4 (22.2%)	9 (50%)	5 (27.8%)	11 (61.1%)	7 (38.9%)	0 (0%)
Stage I (28)	6 (21.4%)	11 (39.3%)	11 (39.3%)	20 (71.4%)	8 (28.6%)	0 (0%)
Stage II (24)	0 (0%)	10 (41.7%)	10 (41.7%)	12 (50%)	8 (33.3%)	0 (0%)
Stage III (13)	2 (15.4%)	5 (38.5%)	6 (46.2%)*	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Stage IV (6)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)*	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

본 발명의 평가 시스템의 일관성을 위해, BLT1/BLT2 스코어를 "0", "1+" = "1", "2+" = "2", "3+" = "3"으로 해석하였다. 모든 샘플에서 발현 양상은 본 명세서에 요약하였다. 피어슨 카이스퀘어는 정상 방광(p <0.001)과의 비교를 위해 이용되었다. 방광암의 85개의 표본을 하기에 나타난 것과 같이 안티-BLT1과 안티-BLT2 항체로 염색하였다.

도 4a는 방광암 환자의 조직에서 BLT2의 발현이 증가됨을 나타낸다. (상단) 여러 종양들과 이에 상응하는 종양 조직들에서 BLT2의 발현을 평가하기 위해, 안티-토끼 BLT2 항체를 이용하여 IHC를 수행하였다. 인간의 여러 종양들에 상응하는 정상 조직/인간의 방광암 조직 샘플들 Petagen Inc. (Korea)로부터 구입하였다. 토끼 다글론 항체에 BLT1/2(dilution 1 :250)을 적용하기 전, 항원 회복을 위해 포르말린으로 고정화되고, 파라핀으로 포매된 절단 부분을 10분 동안 프로테이나아제 K(Biogenex, USA)에 놓아두었다. 일차 항체로 배양한 후, 바이오틴이 부착된 이차 항체를 첨가하고, 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase)을 처리하였다. Fast Red Violet(for BLT1/2 stain; Chemicon, Temecula, CA, APR150)을 크로모젠(chromogen)으로 사용하였다. 절단 부분을 헤마톡실린으로 대조염색시켰다. 관찰된 결과는 유사한 결과를 갖는 3개의 독립적인 실험결과 중 대표물을 나타낸 것이다. BLT2 발현(red)을 인간의 여러 종양에서 강하게 염색된 세포질/플라스마 막에서 관찰하였다. 헤마톡실린은 대비염색제(blue)로 사용되었다. 바(bar)는 100 μm를 나타낸다. BLT 발현이 종양의 병리학적 전위와 관계된 것인지 평가하기 위해, 점수 분석(scoring analysis)을 이용하여 IHC를 수행하고 조사하였다. 관찰된 결과는 유사한 결과를 갖는 3개의 독립적인 실험결과 중 대표물을 나타낸 것이다. N, 정상 방광 조직, Ta/Tis, 전이가 없는 종양; T1, 근육 표면에 전이된 종양, T2/T2b, 심층 근육에 전이된 종양; T3b/T3b-N1/T4-N1M1/T4a-M1, 방광주위의 지방에 전이되거나 또는 임파선 조직 또는 다른 인접한 조직에 전이된 종양이다 (T3b/T3b-N1/T4-N1M1/T4a-M1는 침윤성 종양으로 간주된다 (T3/T4)). Ta/Tis, 0 단계; T1, I 단계; T2/T2b, II 단계; T3, III 단계; T3b-N1/T4-N1M1/T4a-M1, IV 단계(TNM 분류에 따라)이다. 바(bar)는 100 μm이다. (하단) 면역반응성은 눈이 보이지 않은 두 명의 관찰자로부터 독립적으로 평가하였다. 세포질 염색은 명암도(0-negative, 1-weak, 2-moderate, 3-strong)와 양성 세포의 비율(0, 1 (1-24%), 2 (25-49%), 3 (50-74%), 4(75-100%))로 등급을 나눴으며, 결과 사이의 불일치는 합의(consensus)로 결정하였으며, H-스코어를 결정하기 위해 등급을 곱하였다(Camp et al., 1999; Ishibashi et al., 2003. 다중 코어(multiple core)로 종양에 대한 H-스코어의 평균을 내었다. 단백질 발현은 낮음(H-score <130) 또는 높음(H-score >130)으로 한정하였다.

실시예 14: 인간의 유방암에서 BLT2의 저해

(1) BLT2를 위한 원위치 혼성화(in situ hybridization)(도 4b의 A)

BLT2 mRNA에 대한 안티센스 프로브 제작을 위해, 인간 BLT2 발현플라스미드 pcDNA3-BLT2를 pcDNA3 벡터를 이용하여 변형시켜 pcDNA3-역방향BLT2를 제작한 후, DNA 서열분석으로 확인하였다. pcDNA3-역방향BLT2를 아펠(Afel) 제한 효소(MBI Fermentas Ltd)를 이용하여 선형화시킨 후, 선형화된 벡터를 T7 RNA 중합효소와 DIG(digoxigenin)가 부착된 RNA 혼합물(Roche, Germany)을 이용하여 전사시켰다. 전사된 프로브를 에탄올로 침

전시시키고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량분석 하였다. Petagen Inc. (Korea)로부터 얻은 여러 유방암 조직 샘플과 이에 맞는 다수의 정상 조직을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀(deparaffinized) 한 후, 원위치 혼성화를 제조사의 프로토콜에 따라 원위치 혼성화 키트(in situ hybridization detection kit; InnoGenex, CA)를 이용하여 수행하였다. 간단히, 탈라파핀화시킨 조직을 프로테이나아제 K로 처리한 후, RNase-무첨가 PBS에서 1% 포름알데하이드로 고정하였다. DIG-부착된 프로브를 37 °C에서 16시간 동안 혼성화 시킨 후, 안티-DIG 항체로 반응시켰으며, BCIP/NBT(bromo-chloro-indolyl-phosphate /nitroblue tetrazolium chloride) 시약은 발색을 위해 사용되었다. 메이어의 헤마톡실린은 카운터(counter) 염색에 사용하였다. 이후, DP71 디지털 카메라(Olympus)가 장착된 BX51 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 얻었다.

<205> (2) BLT2의 동소 혼성화(도 4b의 B)

<206> BLT2 mRNA에 대한 안티센스 프로브 제작을 위해, 인간 BLT2 발현플라스미드 pcDNA3-BLT2를 pcDNA3 벡터를 이용하여 변형시켜 pcDNA3-역방향BLT2를 제작한 후, DNA 서열분석으로 확인하였다. pcDNA3-역방향BLT2를 아펠(Apel) 제한 효소(MBI Fermentas Ltd)를 이용하여 선형화시킨 후, 선형화된 벡터를 T7 RNA 중합효소와 DIG(digoxigenin)가 부착된 RNA 혼합물(Roche, Germany)을 이용하여 전사시켰다. 전사된 프로브를 에탄올로 침전시키고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량분석 하였다. Petagen Inc. (Korea)로부터 얻은 여러 암 조직 샘플과 이에 맞는 다수의 정상 조직을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀(deparaffinized) 한 후, 원위치 혼성화를 제조사의 프로토콜에 따라 원위치 혼성화 키트(in situ hybridization detection kit; InnoGenex, CA)를 이용하여 수행하였다. 간단히, 탈라파핀화시킨 조직을 프로테이나아제 K로 처리한 후, RNase-무첨가 PBS에서 1% 포름알데하이드로 고정하였다. DIG-부착된 프로브를 37 °C에서 16시간 동안 혼성화 시킨 후, 안티-DIG 항체로 반응시켰으며, BCIP/NBT(bromo-chloro-indolyl-phosphate /nitroblue tetrazolium chloride) 시약은 발색을 위해 사용되었다. 메이어의 헤마톡실린은 카운터(counter) 염색에 사용하였다. BLT 발현이 종양의 병리학적 전위와 관계된 것인지 평가하기 위해, 카이-스퀘어(Chi-square) 테스트를 이용하여 IHC를 수행하고 조사하였다. 도 4b는 유방암 환자에서 BLT2의 발현이 증가되었음을 보여준다.

<207> (3) BLT2를 위한 동소 혼성화(도 4c)

<208> BLT2 mRNA에 대한 안티센스 프로브 제작을 위해, 인간 BLT2 발현플라스미드 pcDNA3-BLT2를 pcDNA3 벡터를 이용하여 변형시켜 pcDNA3-역방향BLT2를 제작한 후, DNA 서열분석으로 확인하였다. pcDNA3-역방향BLT2를 아펠(Apel) 제한 효소(MBI Fermentas Ltd)를 이용하여 선형화시킨 후, 선형화된 벡터를 T7 RNA 중합효소와 DIG(digoxigenin)가 부착된 RNA 혼합물(Roche, Germany)을 이용하여 전사시켰다. 전사된 프로브를 에탄올로 침전시키고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량분석 하였다. Petagen Inc. (Korea)로부터 얻은 여러 유방암 조직 샘플과 이에 맞는 다수의 정상 조직을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀(deparaffinized) 한 후, 원위치 혼성화를 제조사의 프로토콜에 따라 원위치 혼성화 키트(in situ hybridization detection kit; InnoGenex, CA)를 이용하여 수행하였다. 간단히, 탈라파핀화시킨 조직을 프로테이나아제 K로 처리한 후, RNase-무첨가 PBS에서 1% 포름알데하이드로 고정하였다. DIG-부착된 프로브를 37 °C에서 16시간 동안 혼성화 시킨 후, 안티-DIG 항체로 반응시켰으며, BCIP/NBT(bromo-chloro-indolyl-phosphate /nitroblue tetrazolium chloride) 시약은 발색을 위해 사용되었다. 메이어의 헤마톡실린은 카운터(counter) 염색에 사용하였다. BLT 발현이 종양의 병리학적 전위와 관계된 것인지 평가하기 위해, 카이-스퀘어(Chi-square) 테스트를 이용하여 IHC를 수행하고 조사하였다.

<209> 도 4c는 유방암 환자들에서 BLT2의 발현이 증가되었음을 보여준다. 면역반응성은 눈을 가린 두 명의 관찰자로부터 독립적으로 평가하였다. 세포질 염색은 명암도(0-negative, 1-weak, 2-moderate, 3-strong)와 양성 세포의 비율(0, 1 (1-24%), 2 (25-49%), 3 (50-74%), 4(75-100%))로 등급을 나눴으며, 결과 사이의 불일치는 합의(consensus)로 결정하였으며, H-스코어를 결정하기위해 등급을 곱하였다(Camp et al., 1999; Ishibashi et al., 2003). 다중 코어(multiple core)로 종양에 대한 H-스코어의 평균을 내었다. 단백질 발현은 낮음(H-score <130) 또는 높음(H-score >130)으로 한정하였다.

<210> 실시예 15: 간, 유방, 피부 및 갑상선 종양 조직에서 BLT2의 발현 유도

<211> (1) BLT2를 위한 원위치 혼성화(도 4d)

<212> BLT2 mRNA에 대한 안티센스 프로브 제작을 위해, 인간 BLT2 발현플라스미드 pcDNA3-BLT2를 pcDNA3 벡터를 이용하여 변형시켜 pcDNA3-역방향BLT2를 제작한 후, DNA 서열분석으로 확인하였다. pcDNA3-역방향BLT2를 아펠(Apel) 제한 효소(MBI Fermentas Ltd)를 이용하여 선형화시킨 후, 선형화된 벡터를 T7 RNA 중합효소와 DIG(digoxigenin)가 부착된 RNA 혼합물(Roche, Germany)을 이용하여 전사시켰다. 전사된 프로브를 에탄올로 침

전시키고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량분석 하였다. Petagen Inc. (Korea)로부터 얻은 여러 암 조직 샘플과 이에 맞는 다수의 정상 조직을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀(deparaffinized) 한 후, 원위치 혼성화를 제조사의 프로토콜에 따라 원위치 혼성화 키트(in situ hybridization detection kit; InnoGenex, CA)를 이용하여 수행하였다. 간단히, 탈파라핀화시킨 조직을 프로테이나아제 K로 처리한 후, RNase-무침가 PBS에서 1% 포름알데하이드로 고정하였다. DIG-부착된 프로브를 37 °C에서 16시간 동안 혼성화 시킨 후, 안티-DIG 항체로 반응시켰으며, AEC(aminoethyl carbazole) 시약은 발색을 위해 사용되었다. 메이어의 헤마톡실린은 카운터(counter) 염색에 사용하였다. 이후, DP71 디지털 카메라(Olympus)가 장착된 BX51 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 얻었다. 도 4d는 간, 뇌, 유방, 피부 및 갑성선암 환자의 조직에서 BLT2의 발현이 증가되었음을 보여준다.

실시예 16: BLT2 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제는 BLT2 발현에 영향을 미친다. (도 5a).

억제된 BLT2 발현 수준은 RT-PCR로 측정하였다. Rat2-BLT2 안정한 세포는 6웰 플레이트 상에 플레이트 당 5×10^4 세포의 밀도로 평판 배양하였다. 24시간 후, 세포는 BLT2 특이적 안티센스 및 센스 올리고뉴클레오티드 플라스미드로 리포펙타민 시약(Lipofectamin reagent)과 함께 순간적으로 트랜스펙션 시킨 후 추가 24시간 동안 10% FBS가 보충된 신선한 DMEM에서 배양하였다. 추가 배양 후, 트랜스펙션된 세포는 BLT2 전사체 분석을 위해 회수하였다. 총 RNA는 역-전사하였고, PCR 증폭은 BLT2 정방향 프라이머: 5' tctcatcgggcatcacaggt 3' 및 reverse primer: 5' ccaagctccacaccacgaag 3'으로 수행하였다. 트랜스펙션 되지 않은 Rat2-BLT2 안정한 세포 cDNA는 음성대조군(negative control)으로서 사용되었으며 GAPDH는 내부대조군(internal control)으로 나타내었다. 상기 결과는 BLT2 mRNA의 수준이 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 감소되었으나, BLT2 mRNA의 수준은 센스 올리고뉴클레오티드에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

실시예 17: BLT2 siRNA 억제제는 BLT2 발현에 영향을 미친다.

BLT2 억제에 대한 BLT2 siRNA 발현 효과를 노던 블로팅으로 확인하였다. CHO-BLT2 안정한 세포는 60 mm 디쉬에서 플레이트당 1×10^5 세포의 밀도로 평판 배양하였다. 24시간 후, 세포를 BLT2 특이적 siRNA로 순간적으로 트랜스펙션 시키고, NM_019839; 5' GAAGGATGTCGGTCTGCTA 3'에 있는 1705-1724 bp에 올리고펙타민 시약으로 타겟팅한 후 추가 24시간 동안 10% FBS가 보충된 신선한 RPMI 1640에서 배양하였다. 추가 배양 후, 총 RNA는 [³²P]-dCTP 표지된 BLT2 프로브로 노던 블롯(Northern blot)을 수행하였다. 스크램블(scramble) RNA 및 코딩되지 않은 서열 BLT2 siRNA는 음성대조군으로 사용하였다. 110 bp PCR 단편은 다음의 두 프라이머를 사용하여 pcDNA3.1-BLT2 클론으로 증폭하였다, 정방향 프라이머: 5' cttctcatcgggcatcacag 3' 및 역방향 프라이머: 5' atccttctgggctcacaggt 3'. 이러한 프로브는 BLT2 코딩 영역에 주로 위치하였다. 총 RNA는 TRIzol 시약으로 추출한 후 아가로스 겔을 포함하는 MOPS에서 2시간 동안 10 마이크로그램의 총 RNA를 로딩하였다. 이 단계 후, 총 RNA를 20 x SSC 버퍼로 밤새도록 Hybond N+ 막에 옮겼다. 상기 막은 68°C에서 18시간 동안 혼성화 버퍼에서 [³²P]-dCTP 표지된 BLT2 프로브로 혼성화하였다. 그 후, 68°C에서 1시간 동안 0.1 x SSC (0.1% SDS)에서 세척하고 방사능사진촬영(autoradiography)을 수행하였다. 상기 결과는 BLT2 mRNA의 수준이 BLT2 siRNA(코딩 서열)에 의해 감소되었으나, BLT2 mRNA의 수준은 BLT2 siRNA(코딩되지 않은 서열)에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

상기 기술한 바와 같이, 본 발명은 (1) 암 세포의 세포사멸 유도, (2) 암 세포들의 전이 가능성을 억제, (3) 암 세포의 혈관신형 억제하기 위한 BLT2 저해제의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 (4) Rat2-BLT2 안정한 세포들의 세포 성장을 측정함으로써 BLT2 신호전달을 스크리닝하기 위한 새로운 방법을 포함한다. 마지막으로, 본 발명은 (5) 인간의 여러 종양들에서 BLT2 과발현의 새로운 관찰을 포함하며, 이는 종양생성에서 중요한 현상이다. 따라서, 본 발명은 인간의 암에 대한 치료적 조성물을 개발하기 위한 수단으로써 BLT2 과발현 또는 과잉-활성을 타겟팅하는 방법의 임의의 용도를 포함한다.

본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 앞에서 언급한 상세한 설명에 개시되어 있는 개념 및 구체적인 구현예들이 본 발명의 동일한 목적을 수행하기 위하여 다른 구현예를 변형 또는 디자인하는데 기초로서 쉽게 사용될 수 있는 것으로 인정할 것이다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 또한 이러한 동등한 구현예들이 첨부된 특허청구범위에 개시된 본 발명의 요지 및 범위에서 벗어나지 않는 것으로 인정할 것이다.

산업상 이용 가능성

본 발명은 인간의 암 치료용 류코트리엔 B4 수용체 BLT2의 저해제의 신규한 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으

로, 본 발명은 BLT2 저해제를 포함하는 인간의 암 치료용 약학적 조성물 및 BLT2 저해제를 이용한 인간의 암 치료방법에 관한 것이다.

- <220> 본 발명자들은 방광, 전립선, 췌장, 및 유방암과 같은 인간의 암의 생존 인자로써 BLT2의 역할을 증명하였으며, BLT2 저해제를 항-암 약물로써 사용할 수 있음을 발견하였다. 본 발명자들은 BLT2가 암 세포의 전이와 종양의 혈관신생에서 중요한 역할을 함을 증명하였으며, BLT2 저해제가 암 세포의 세포사멸을 유도하고, 암 세포의 전이를 억제하고, 또는 종양의 혈관신생을 억제함으로써 항-암 활성을 나타냄을 증명하였다.
- <221> [References]
- <222> Samuelsson, B.; Dahlen, S. E.; Lindgren, J. A.; Rouzer, C. A.; Serhan, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**:1171-1176 1987.
- <223> Yokomizo, T.; Kato, K.; Terawaki, K.; Izumi, T.; Shimizu, T. A Second Leukotriene B₄ Receptor, BLT2: A New Therapeutic Target in Inflammation and Immunological Disorders. *J. Exp. Med.* **192**:421-432 2000.
- <224> Choi JA, Kim EY, Song HW, Kim CM, and Kim JH. "ROS are generated through a BLT2-linked cascade in Ras-transformed cells" (2008) *Free Radical Biol & Med*, 44, 624-634.
- <225> Woo, C. H.; You, H. J.; Cho, S. H.; Eom, Y. W.; Chun, J. S.; Yoo, Y. J.; Kim, J. H. Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**:8572-8578; 2002.
- <226> Yokomizo, T.; Izumi, T.; Chang, K. Takuwa, Y.; Shimizu, T. A. G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* **387**:620-624 1997.
- <227> Chen, X. S.; Sheller, J. R.; Johnson, E. N.; Funk, C. D. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* **372**:179-182 1994.
- <228> Griffiths, R. J.; Pettipher, E. R.; Koch, K.; Farrell, C. A.; Breslow, R.; Conklyn, M. J.; Smith, M. A.; Hackman, B. C.; Wimberly, D. J.; Milici, A. J. Leukotriene B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:517-521 1995.
- <229> Turner, C. R.; Breslow, R.; Conklyn, M. J.; Andresen, C. J.; Patterson, D. K.; Lopez-Anaya, A.; Owens, B.; Lee, P.; Watson, J. W.; Showell, H. J. In vitro and in vivo effects of leukotriene B₄ antagonism in a primate model of asthma. *J. Clin. Invest.* **97**:381-387 1996.
- <230> Kamohara, M.; Takasaki, J.; Matsumoto, M.; Saito, T.; Ohishi, Y.; Ishii, H. M.; Furuichi, K. Molecular cloning and characterization of another leukotriene B₄ receptor. *J. Biol. Chem.* **275**:27000-27004 2000.
- <231> Blaine, S. A.; Wick, M.; Dessev, C.; Nemenoff, R. A. Induction of cPLA₂ in lung epithelial cells and non-small cell lung cancer is mediated by Sp1 and c-Jun. *J. Biol. Chem.* **276**:42737-42743 2001.
- <232> Heasley, L. E.; Thaler, S.; Nicks, M.; Price, B.; Skorecki, K.; Nemenoff, R. A. Induction of cytosolic phospholipase A₂ by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. *J. Biol. Chem.* **272**:14501-14504 1997.
- <233> Gupta, S.; Srivastava, M.; Ahmad, N.; Sakamoto, K.; Bostwick, D. G.; Mukhtar, H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* **91**:737-743 2001.
- <234> Hennig, R.; Ding, X. Z.; Tong, W. G.; Schneider, M. B.; Standop, J.; Friess, H.; Buchler, M. W.; Pour, P. M.; Adrian, T. E. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am. J. Pathol.* **161**:421-428 2002.
- <235> Jiang, W. G.; Douglas-Jones, A.; Mansel, R. E. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leuko. Essent. Fatty Acids* **69**:275-281 2003.
- <236> Matsuyama, M.; Yoshimura, R.; Mitsuhashi, M.; Hase, T.; Tsuchida, K.; Tkemoto, Y.; Kawahito, Y.; Sano, H.; Nakatani, T. Expression of lipoxygenase in human prostate cancer and growth reduction by its

inhibitors. *Int. J. Oncol.* **24**:821-827 2004.

<237> Ding, X. Z.; Talamonti, M. S.; Bell, R. H.; Adrian, T. E. A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anticancer Drugs* **16**:467-473 2005.

<238> Tong, W. G.; Ding, X. Z.; Hennig, R.; Witt, R. C.; Standop, J.; Pour, P. M.; Adrian, T. E. Leukotriene B₄receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **8**:3232-3242 2002.

도면의 간단한 설명

<86> 본 발명의 상기 목적 및 이점은 첨부된 도면을 참고하여 그것의 상세하고 바람직한 구현예에서 설명하는 것에 의해 더욱 명확해질 것이다:

<87> 도 1a는 BLT2 길항제인 LY255283의 화학구조를 나타낸 것이다.

<88> 도 1b는 전립선암 세포의 증식률에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. BLT2 길항제는 전립선암 세포들의 증식률을 현저하게 감소시킨다.

<89> 도 1c는 전립선암 세포의 세포사멸에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. BLT2의 신호차단은 전립선암 세포들의 세포사멸을 유도하였다.

<90> 도 1d는 방광암 세포의 주기와 세포사멸에 대한 BLT2 길항제의 영향을 나타낸 것이다. LY255283은 방광암 세포들의 세포사멸과 세포 주기를 sub-G1기에서 정지하도록 유도하였다.

<91> 도 1e는 방광암 세포의 세포사멸에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. LY255283은 253J-BV 방광암 세포에서 미토콘드리아 막전위의 손실과 세포사멸을 유도하였다.

<92> 도 1f는 췌장암 세포의 세포사멸에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. LY255283은 췌장암 세포(Panc-1 & AsPC-1)의 세포사멸을 유도하였다.

<93> 도 1g는 유방암 세포의 증식률에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. BLT2 길항제는 유방암 세포의 증식률을 현저하게 감소시켰다.

<94> 도 1h는 유방암 세포의 세포사멸에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. LY255283은 유방암 세포들의 부분적인 apoptotic 세포사멸을 유도하였다.

<95> 도 1i는 유방암 세포들에 BLT2 길항제인 LY255283과 에피루비신 혼합 조성물의 치료 효과를 나타낸 것이다. 상기 혼합 조성물의 치료(LY255283과 epirubicin)는 유방암 세포 MCF7에서의 상승된 세포사멸을 유도하였다.

<96> 도 2a는 암 세포들의 전이에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. LY255283은 라스(Ras)로 형질전환된 암 세포들의 전이를 억제하였다.

<97> 도 2b는 라스(Ras) 종양유전자를 발현하는 형질전환된 세포들이 주입된 쥐의 생존에 대한 BLT2 길항제인 LY255283의 영향을 나타낸 것이다. LY255283은 라스(Ras)-암 세포들이 주입된 쥐의 생존에 영향을 미친다.

<98> 도 3a는 종양혈관신생에 대한 BLT2 자극의 결과를 나타낸 것이며, BLT2의 자극은 생체내 종양혈관신생을 유도한다.

<99> 도 3b는 VEGF-유도에 의한 혈관신생에 대한 BLT2 길항제인 255283의 효과를 나타낸 것이다. BLT2 길항제인 LY255283은 VEGF-유도에 의한 혈관신생을 억제하였다.

<100> 도 4a는 방광암의 임상적 표본들에서 BLT2의 증가된 과발현을 나타낸 것이다. BLT2의 발현은 방광암 조직 샘플: 85명의 환자에서 유도되었다.

<101> 도 4b는 유방암의 임상적 표본들에서 BLT2의 증가된 과발현을 나타낸 것이다. BLT2의 유도는 인간의 유방암에서 관찰되었다.

<102> 도 4c는 유방암의 임상적 표본들에서 BLT2의 증가된 과발현을 나타낸 것이다. BLT2의 유도는 사람의 유방암에서 관찰되었다.

<103> 도 4d는 간, 뇌, 유방, 피부 및 갑상선암의 임상적 표본들에서 BLT2의 증가된 과발현을 나타낸 것이다. BLT2 발

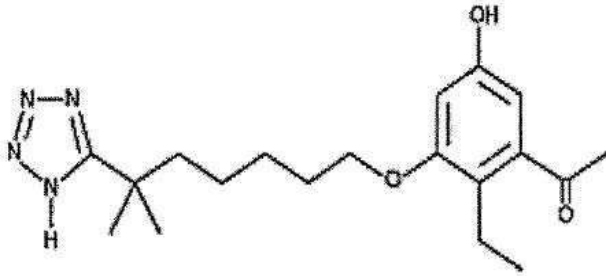
현의 유도는 간, 뇌, 유방, 피부 및 갑상선 종양 조직에서 관찰된다.

<104> 도 5a는 RT-PCR로 BLT2 발현 수준에 대한 BLT2 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 억제효과를 나타낸 것이다.

<105> 도 5b는 노던 블롯(Northern blot)으로 BLT2 발현 수준에 대한 BLT2 siRNA의 억제효과를 나타낸 것이다.

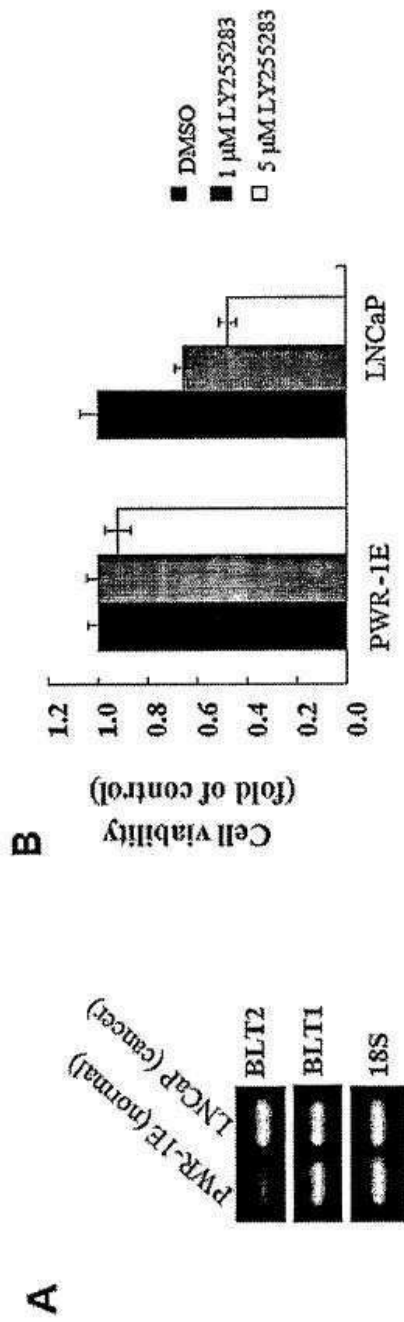
도면

도면1a

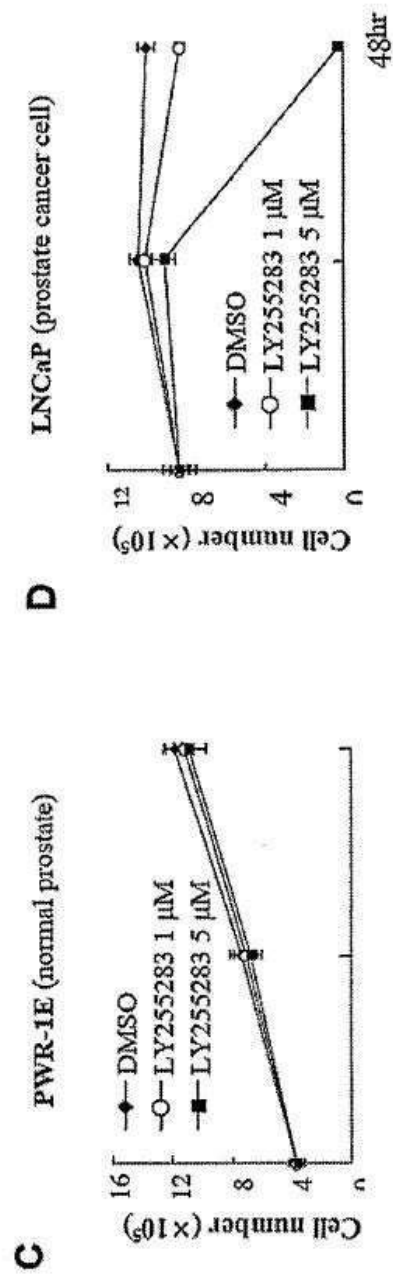


LY255283

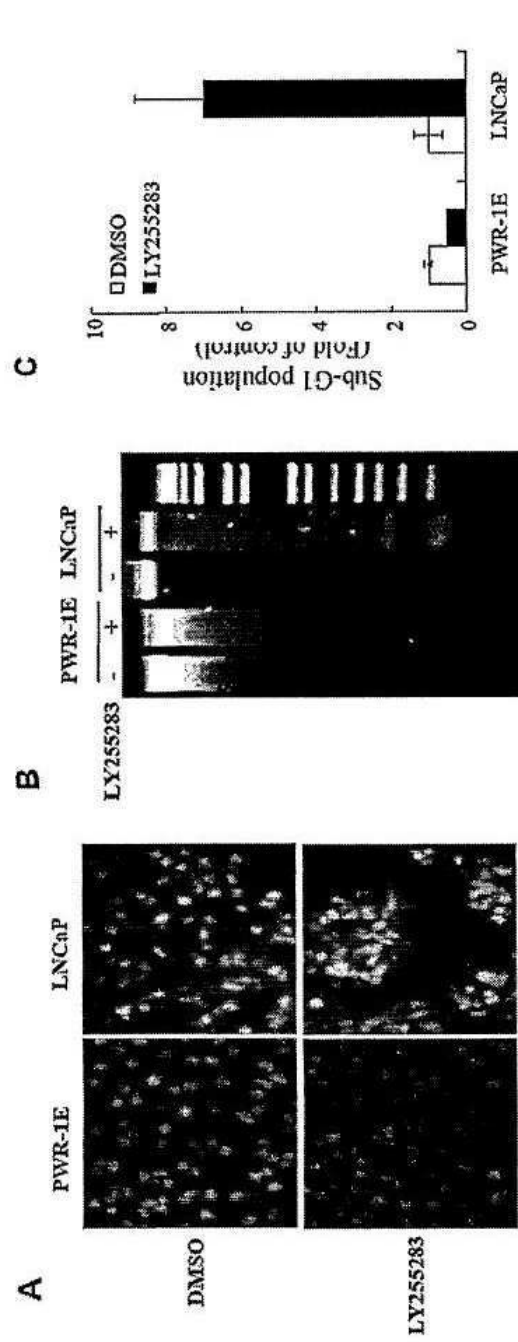
도면1b



LY255283 처리 48시간 후 MTT 분석

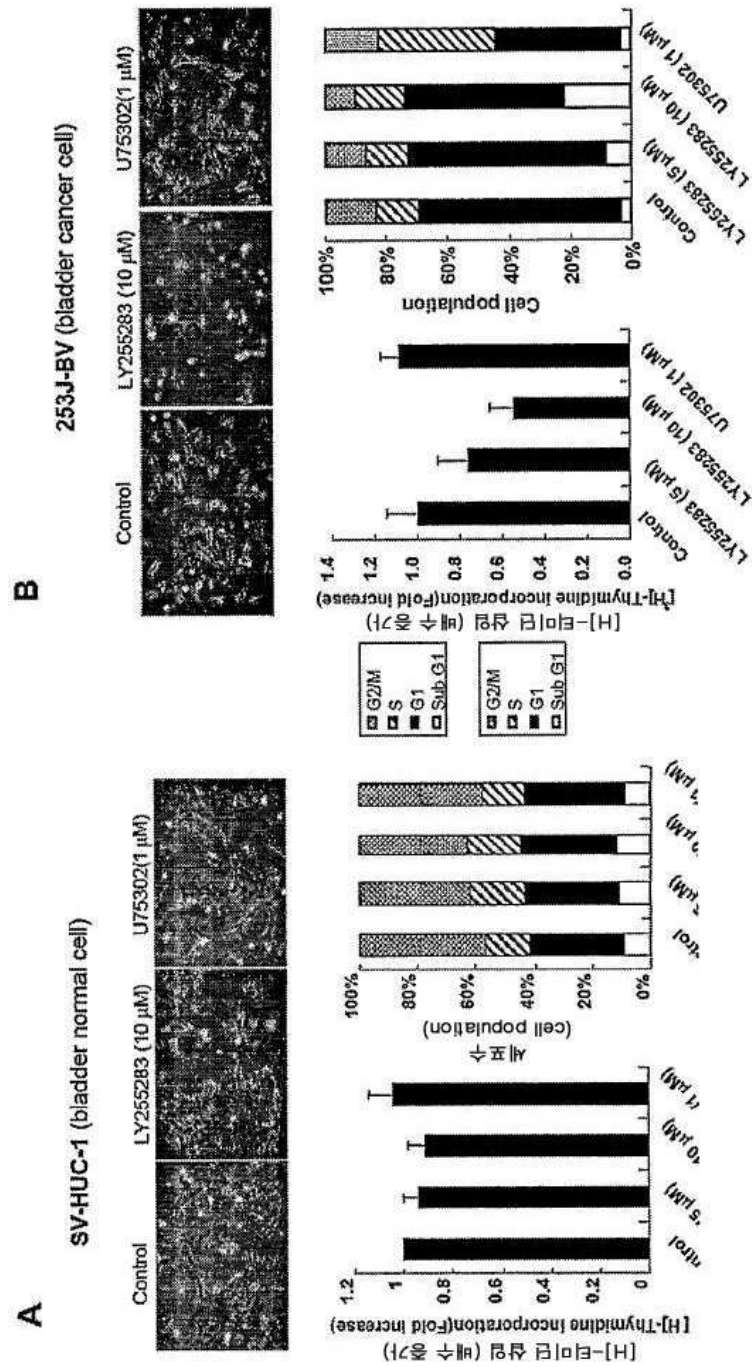


도면1c

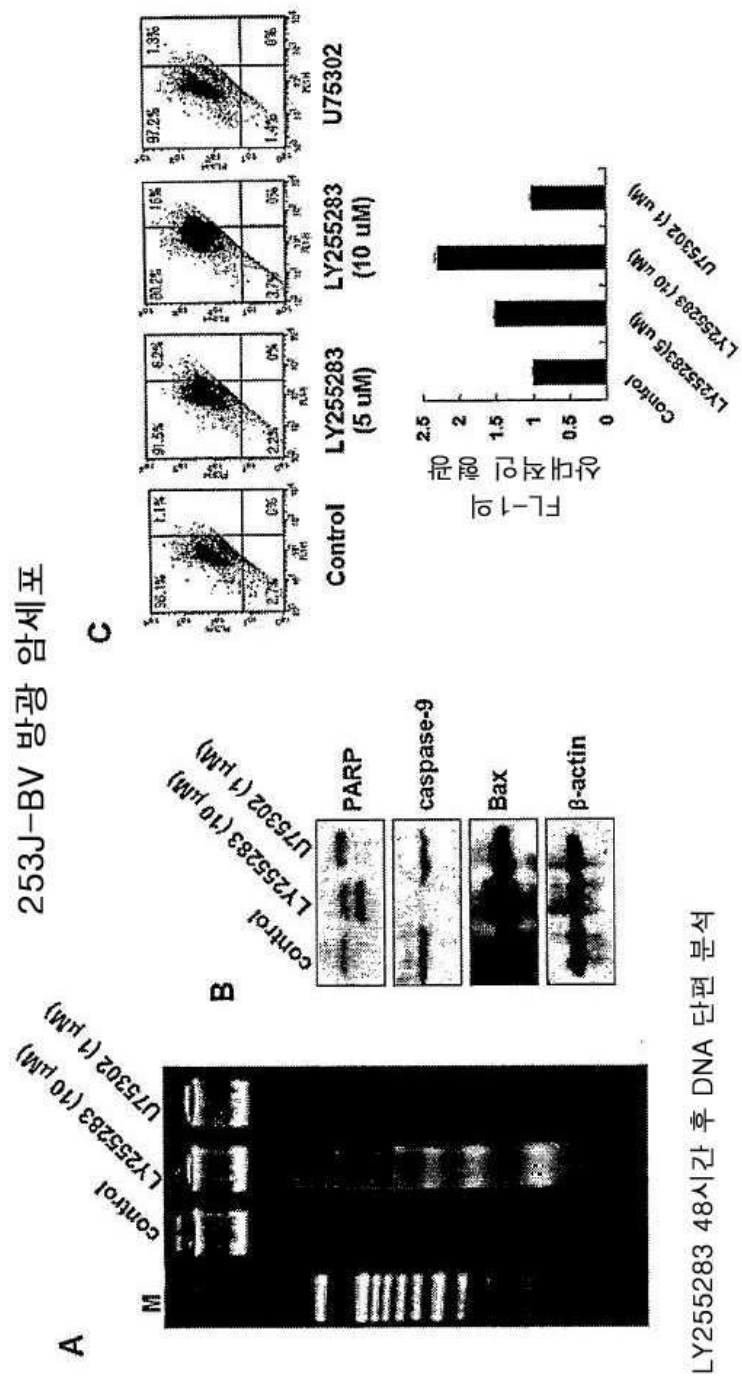


LY255283 처리 36시간 후 Hoechst 33258 LY255283 처리 48시간 후 DNA 단편 분석 및 세포 사이클 분석

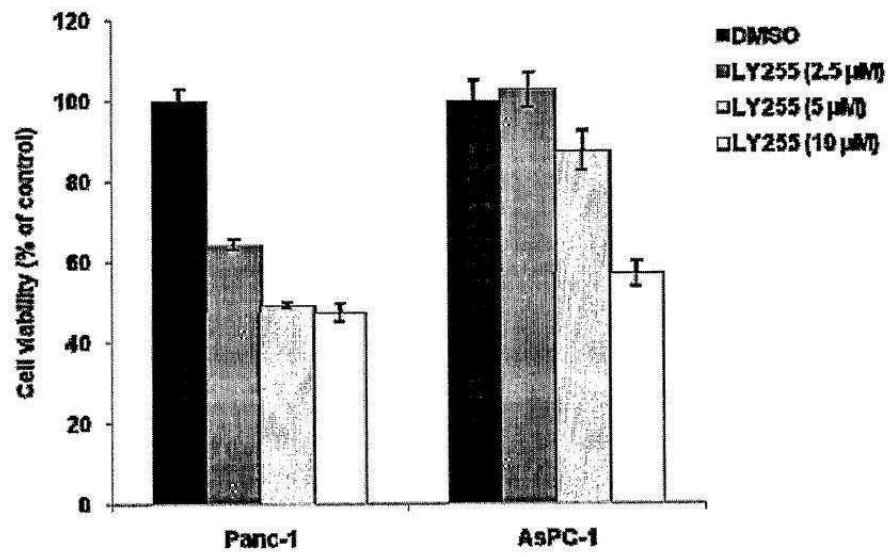
도면1d



도면1e

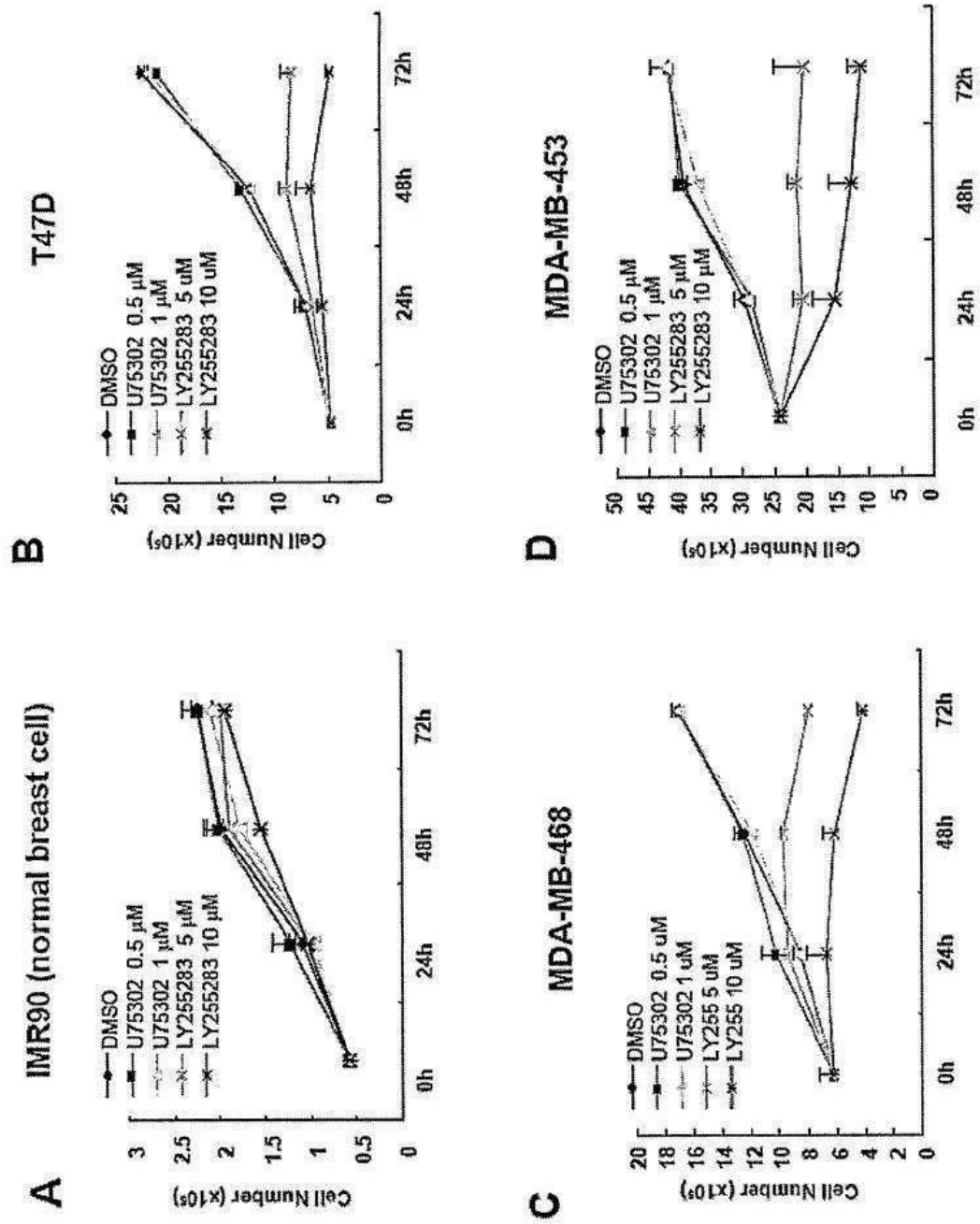


도면1f

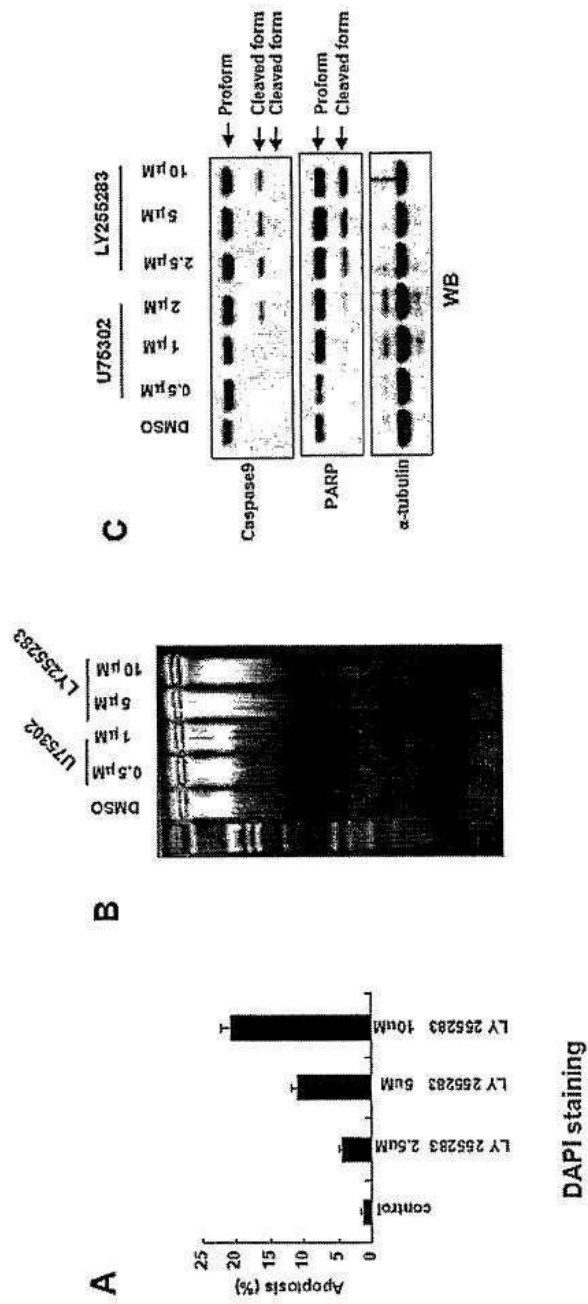


LY255283 또는 DMSO 존재 하에서 48시간 배양 후 MTT 분석

도면1g

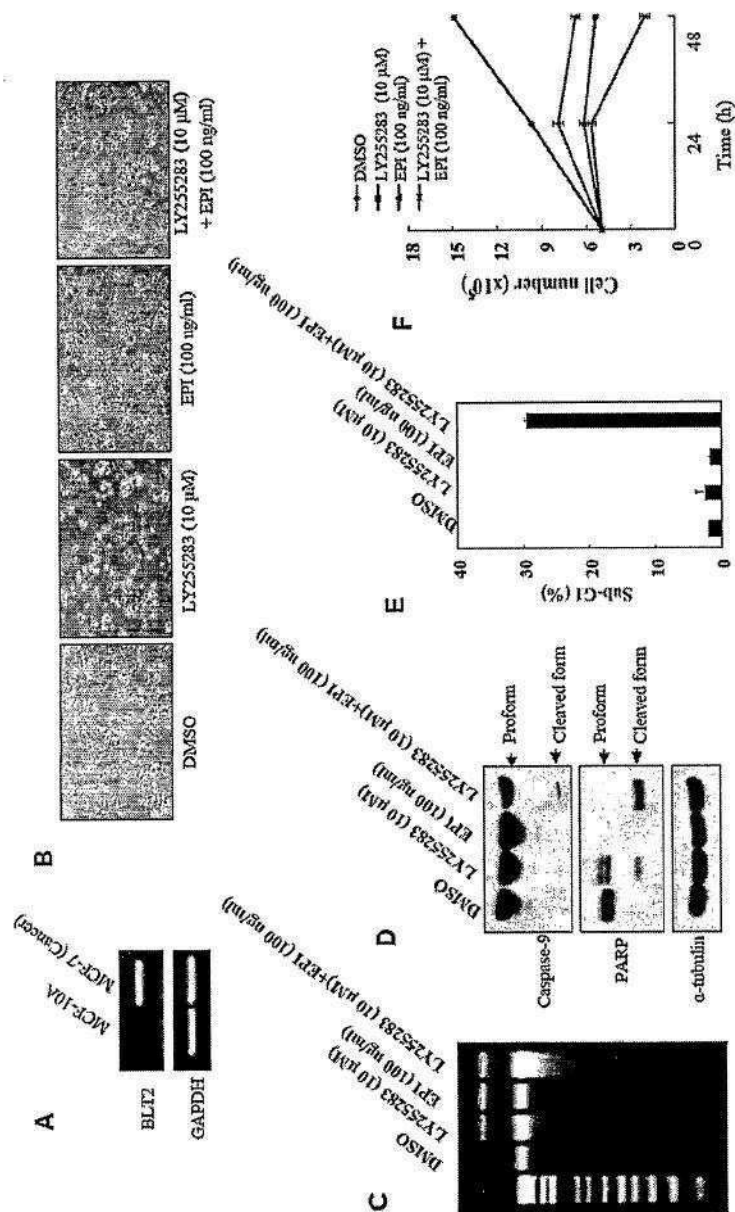


도면1a

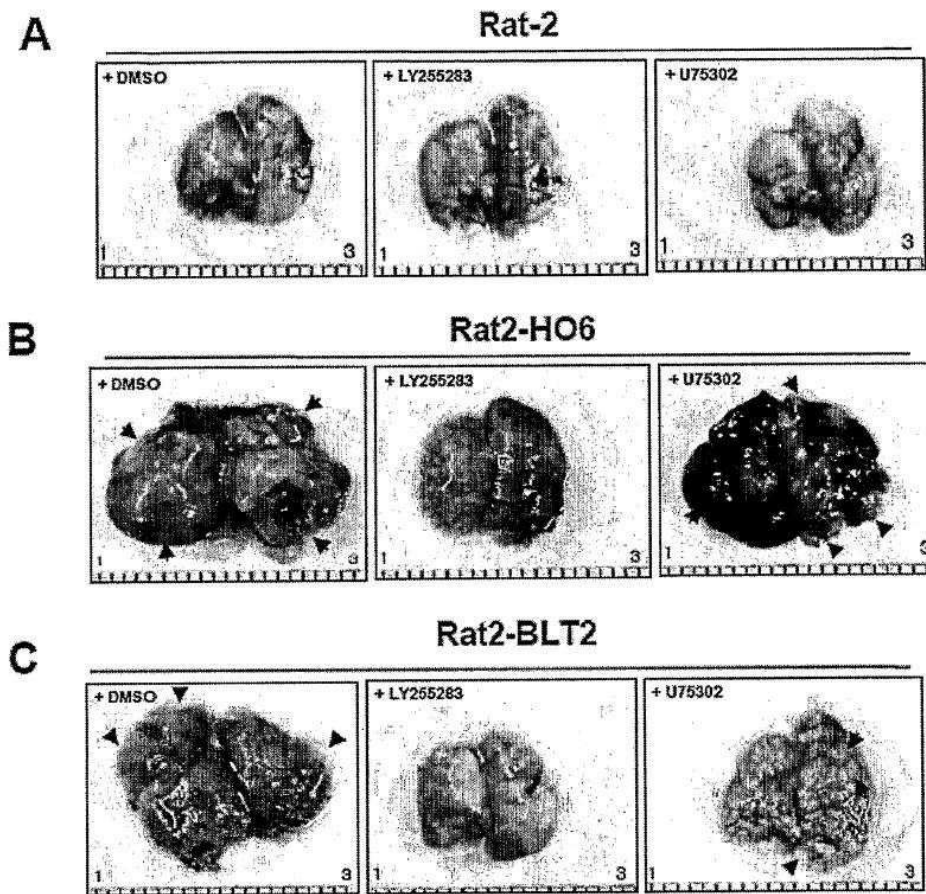


(MDA-MB-498 유방암 세포)

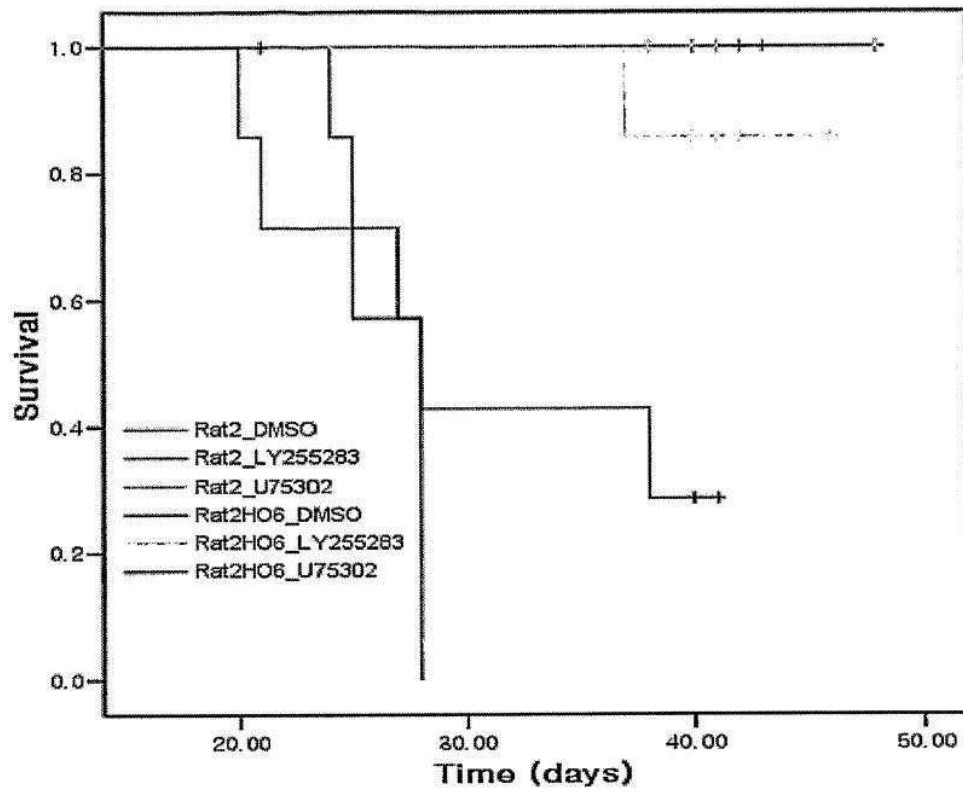
도면11



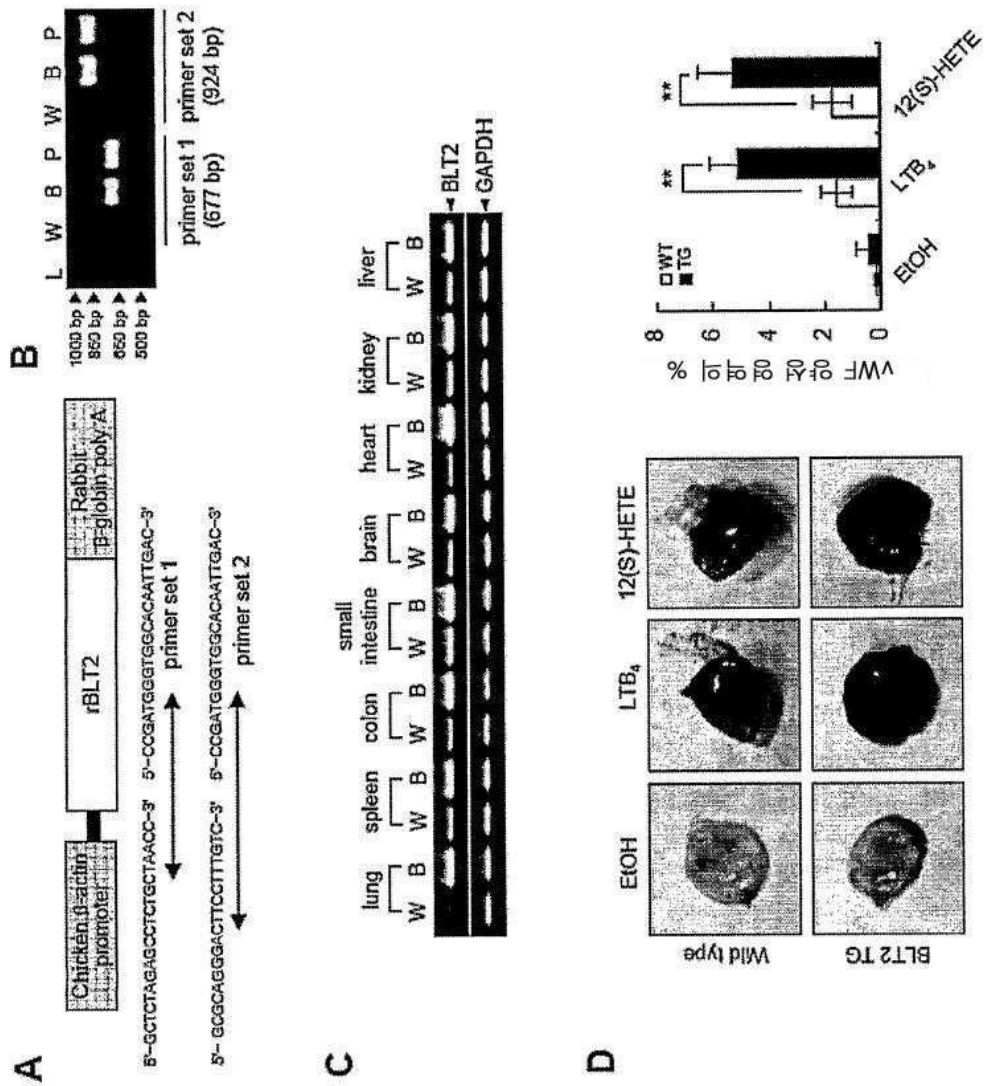
도면2a



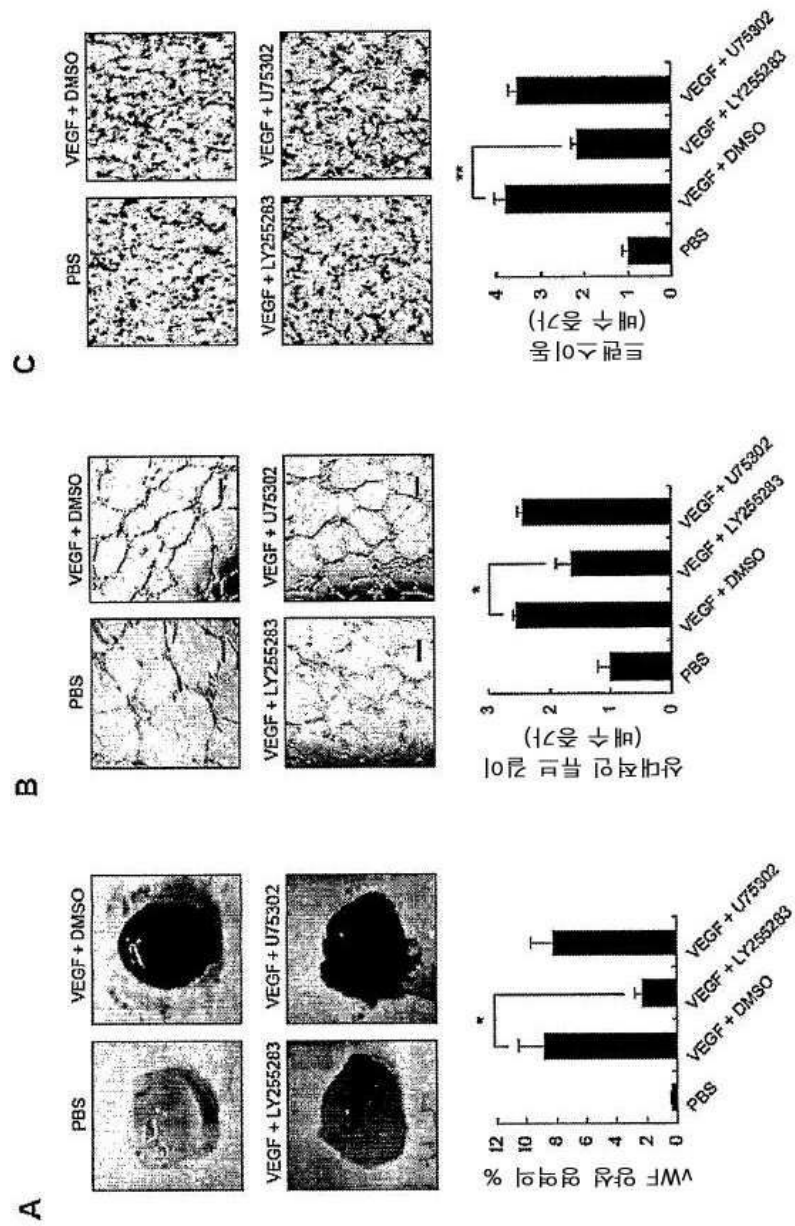
도면2b



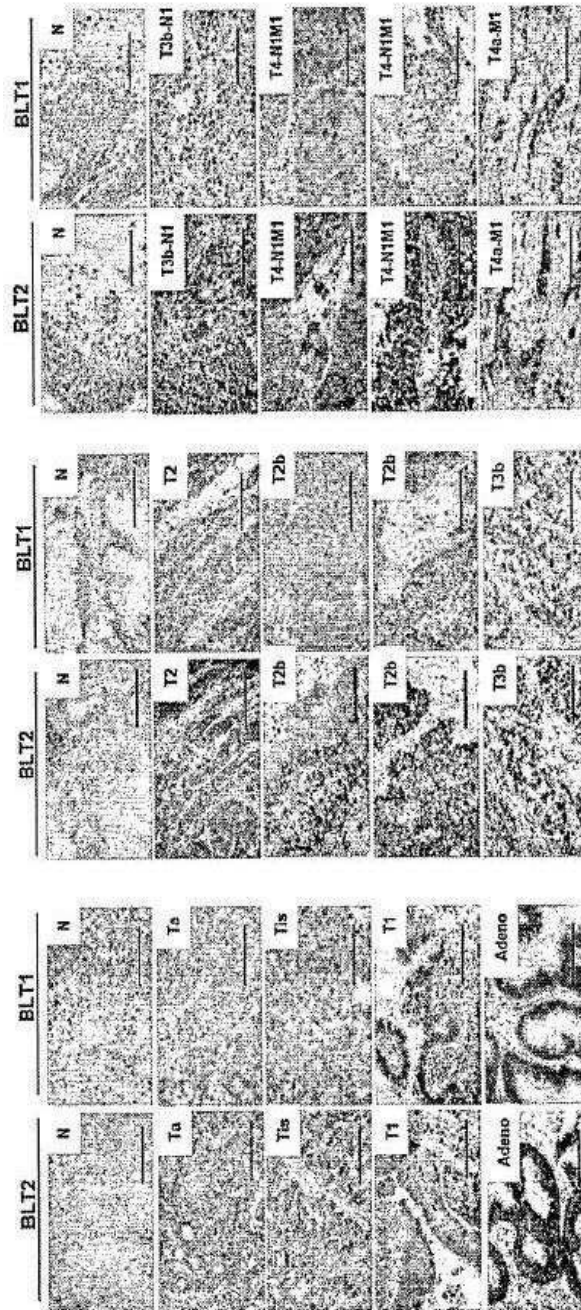
도면3a



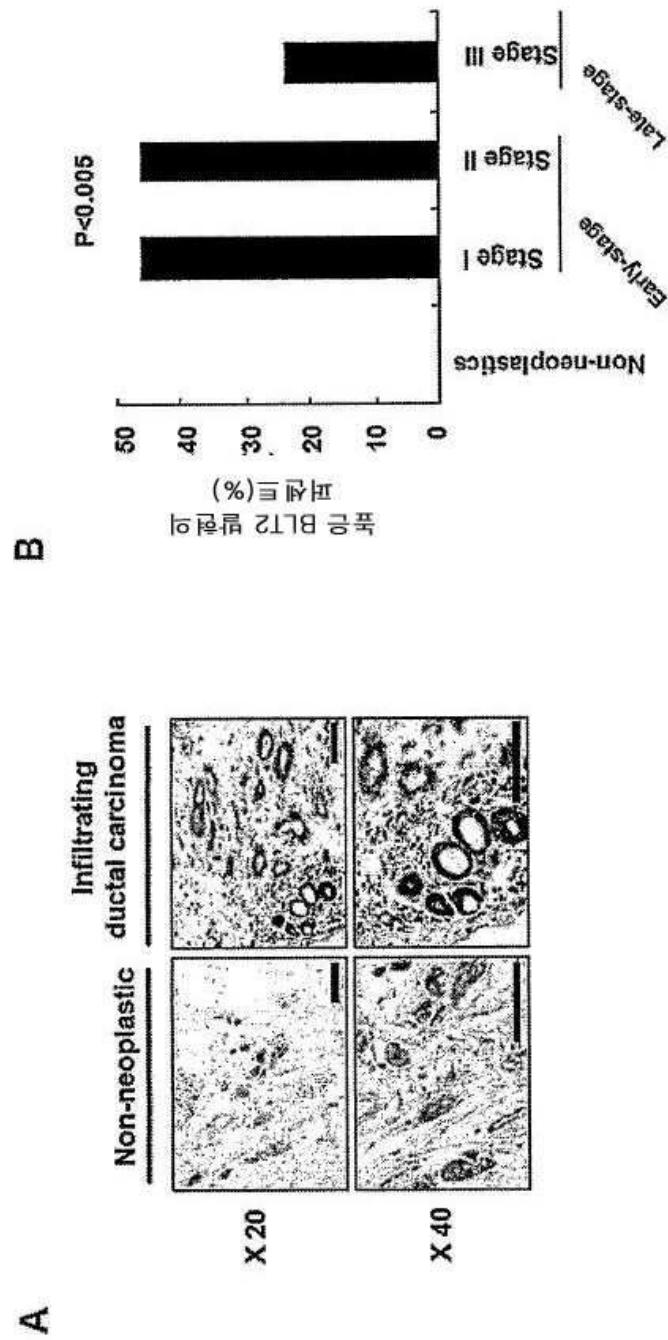
도면3b



도면4a



도면4b

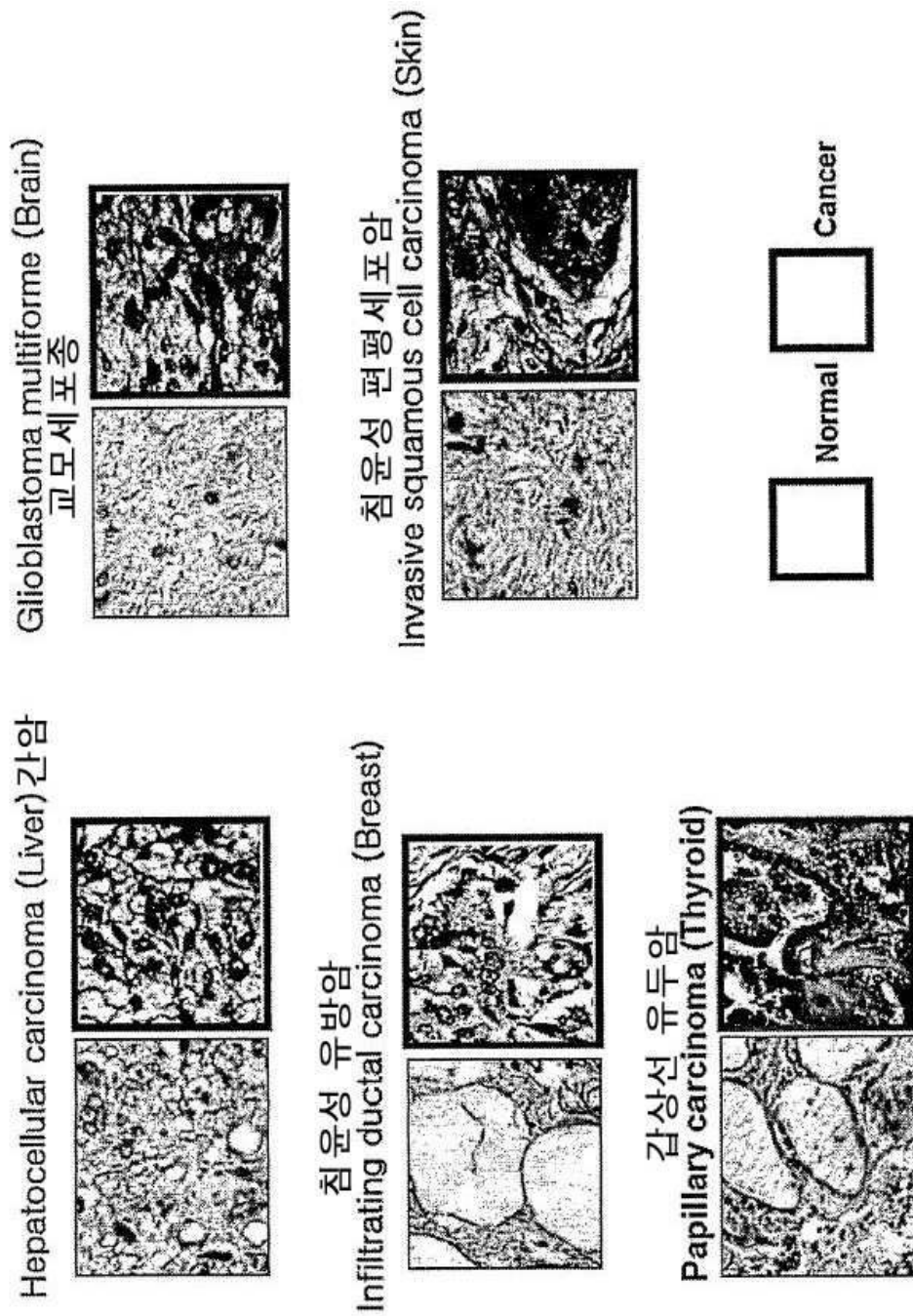


도면4c

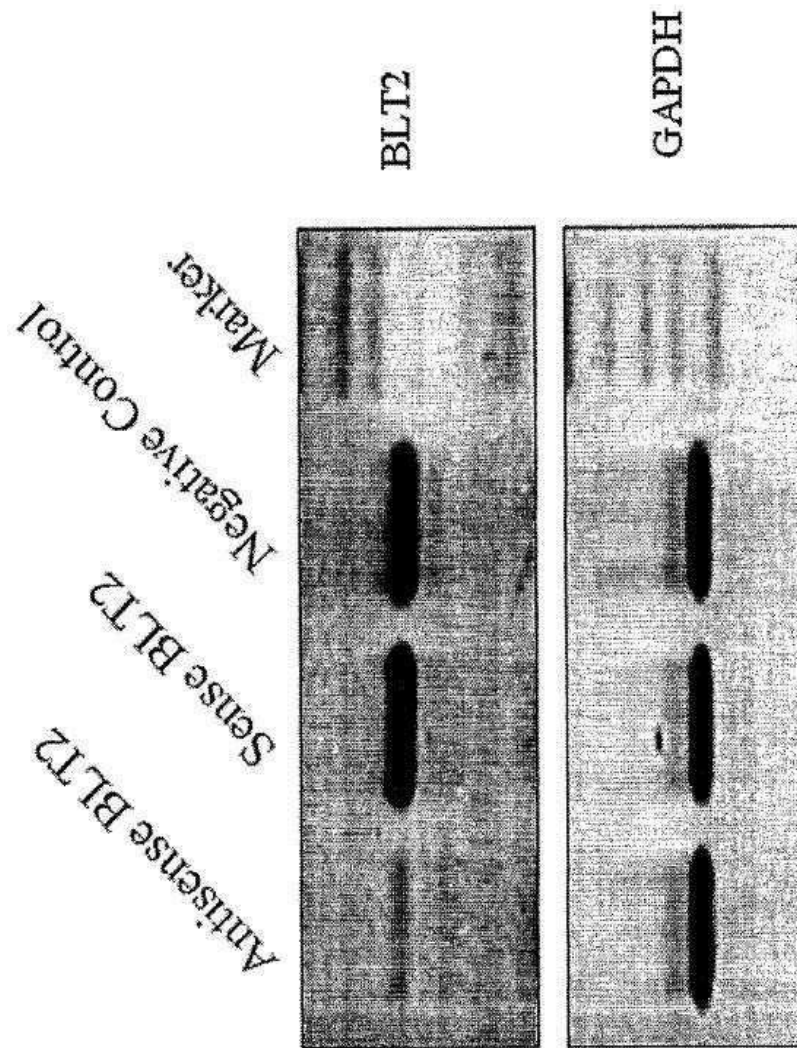
cytoplasmic (Total)	Low	Med	High
Stage 0 (4)	4 (1)	0 (1)	0 (2)
Stage 1 (13)	2 (4)	5 (5)	6 (5)
Stage 2 (39)	8 (11)	13(14)	18(15)
Stage 3 (18)	6(5)	18(6)	4 (7)

(): 예상 값

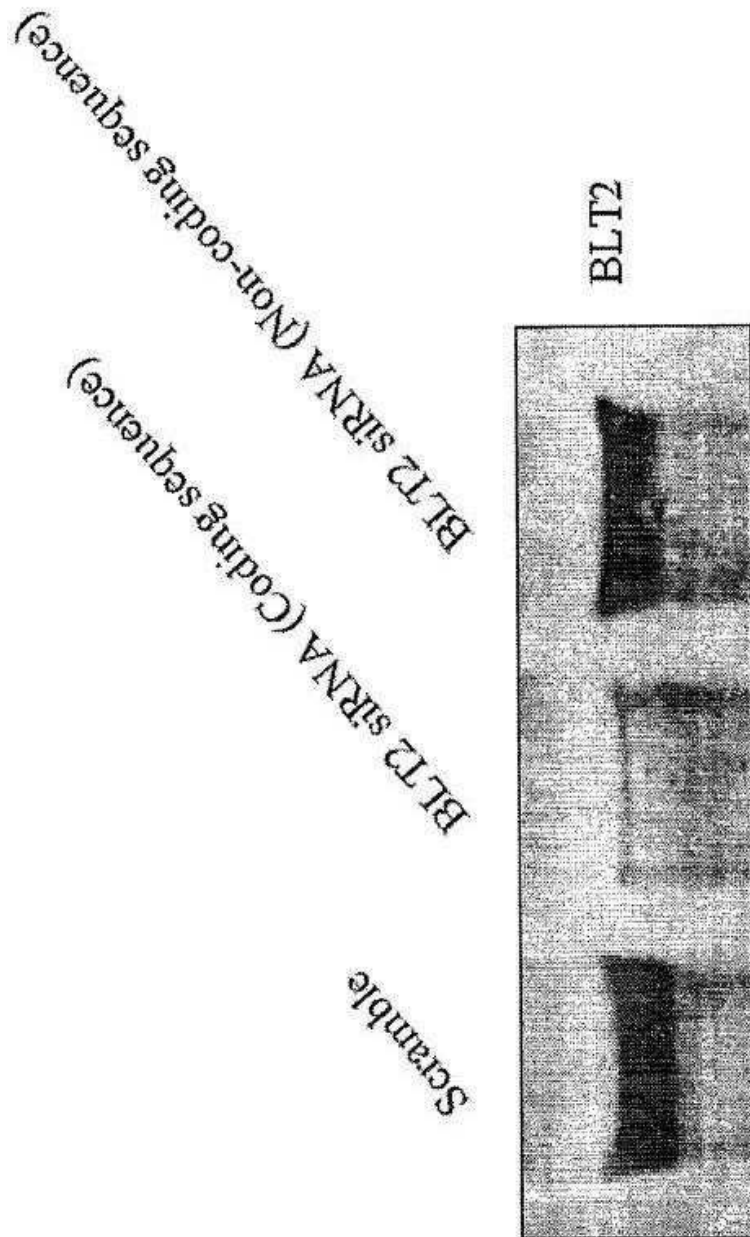
도면4d



도면5a



도면5b



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> USE OF INHIBITORS OF LEUKOTRIENE B4 RECEPTOR BLT2 FOR TREATING HUMAN CANCERS
- <160> 12
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 2798

<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 1
aaactggccc tggccctgaa ccaaatcct tgaaccctcg taaactccat accctgaccc 60

ccttgttttg gatataccca ggtagaaca ctcctctctca ctgtctgttg tgaggatacg 120

ctgtagccca ctcatgaagt acattctcct aataaatgct ttggactgat caccctgcca 180

gtcttttgtc ttgggcaatc tatacttttc tcagaggttc ccaaggccta ctgaagggac 240

ttaacatact cttaatggct ttectctctc ttgttttacc ttatgccctc acttctgag 300

ttaacctccc aaatacagga tcacctgtac ccaagccctt agctcaagaa tacaggatca 360

cctgtaccca agcccttagc tcaagctctg ctttggaaga acccaaaacta agacagtgt 420

cctggtgccc tccccaagca acctcaagtt ctggctgtta cttgagcaga ggcctttctt 480

ttcccttccc ccagctctat ccatctgcca ggccccctc aaatctcttc atttccaagt 540

tttgcttgac tttccaaga ggagagggtc gcttcttagt atgtccctac tcctccttc 600

ctttcttgtc ttgtatcctg gtgcagcctg gtaatggggc ctcttcatgg ttgtgtgtca 660

tgactcccta accattatgc ctccatgcat ccctgttcc tcctggaacc tagcaccatg 720

ccttacatgg aaaagctgtc attgacagcc cggtagagc cctgagggtg gactgactgg 780

ggcagggcct gaggaagag gtgggaggag gtaggaggcc aggggctcag ccggaccagg 840

agactggaaa caggcaagga taaggcaggt gggggactga gttgtttggg tcacctctgc 900

aggccagaga gaccaggcaa catacacact gcagaagggt ggctgggagg attggggcca 960

gagctggggg agggatgaga acagaagcag gaccaggatt cagcagagtc ctctatttc 1020

cttccaccac cagggaatct tactgcccc cttcagcttg tgctgtttcc tggcaaggca 1080

ggctctcaca tgcttgacg cctgggtgcg ttggtgatgg gaaggagcag ggtgaggag	1140
gggccccagg agaggccag gatgagcctc atcttgctcc tccccattct tgtcttacc	1200
tctgcaaatg tgataggcac aggacaggag taggcacctc gcctactgct gcttaacctt	1260
tcagcttctc caggccccca atcctgcttg ctcccagctt ggtaagtaga tctgtgcacg	1320
tccctttaca cccaccatc cagttttgcc cagatgtgct agaatggggc tggacaaaga	1380
aggaggggcc agactagagg agtgggtgta gagatagtga cagcctgggg tgaggacttt	1440
atgcctgttt accactgagc tctgggaagg aggccaggag tggggcaggt caactgactg	1500
ggagcagggg atctgggttc caagaaggag ttgtgtttga ggtgggtctt gggtcctcgt	1560
ggaagtccag actcccagc agaaaaggagg caggctgcag ggaagtaagg aggaggcatg	1620
gcaccttctc atcgggcac acaggtgggg ttttgcccca cccctgaacg cctctgtgg	1680
cgctttccac ccactgtag gccagaagg atgtcggtct gctaccgtcc cccagggaac	1740
gagacactgc tgagctggaa gacttcgcgg gccacaggca cagccttcct gctgctggcg	1800
gcgctgctgg ggctgcctgg caacggcttc gtggtgtgga gcttggcggg ctggcgccct	1860
gcacgggggc gaccgctggc ggccacgctt gtgctgcacc tggcgtggc cgacggcgcg	1920
gtgctgctgc tcacgccgt ctttgtggc ttcctgacct ggagggcctg gccgctgggc	1980
caggcgggct gcaaggcggg gtactacgtg tgcgcgtca gcatgtacgc cagcgtgctg	2040
ctcaccggcc tgctcagcct gcagcgtgc ctgcagtea cccgcccctt cctggcgctt	2100
cggtgcgca gcccgccct ggcccgccgc ctgctgctgg cggctctggct ggccgcccctg	2160
ttgctgcgcg tcccgccgc cgtctaccgc cacctgtgga gggaccgct atgccagctg	2220

tgccaccgt cgccgtcca cgccgccgc cacctgagcc tggagactct gaccgtttc 2280

gtgcttcctt tcgggtgat gctcggctgc tacagctga cgctggcacg gctgcggggc 2340

gcccgtggg gctccgggcg gcacggggcg cgggtgggcc ggctggtag cgccatctg 2400

cttgcttcg gcttgctctg ggccccctac cacgcagtca accttctgca ggcggtcgca 2460

gcgctggctc caccggaagg ggccttggcg aagctgggcg gagccggcca ggcggcgca 2520

gcgggaacta cggccttggc cttcttcagt tctagctca acccggtagt ctacgtcttc 2580

accgctggag atctgctgcc ccgggcaggt ccccgtttcc tcacgcggt cttcgaaggc 2640

tctggggagg cccgaggggg cggccgctct agggaaggga ccatggagct ccgaactacc 2700

cctcagctga aagtgtggg gcagggccgc ggcaatggag acccgggggg tgggatggag 2760

aaggacggtc cggaatggga cttttgacag cagaccct 2798

<210> 2
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1167)

<400> 2
 atg gca cct tct cat cgg gca tca cag gtg ggg ttt tgc ccc acc cct 48
 Met Ala Pro Ser His Arg Ala Ser Gln Val Gly Phe Cys Pro Thr Pro
 1 5 10 15

gaa cgc cct ctg tgg cgc ctt cca ccc acc tgt agg ccc aga agg atg 96
 Glu Arg Pro Leu Trp Arg Leu Pro Pro Thr Cys Arg Pro Arg Arg Met
 20 25 30

tcg gtc tgc tac cgt ccc cca ggg aac gag aca ctg ctg agc tgg aag 144
 Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp Lys
 35 40 45

act tcg cgg gcc aca ggc aca gcc ttc ctg ctg ctg gcg gcg ctg ctg Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Ala Ala Leu Leu 50 55 60	192
ggg ctg cct ggc aac ggc ttc gtg gtg tgg agc ttg gcg ggc tgg cgg Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp Arg 65 70 75 80	240
cct gca cgg ggg cga ccg ctg gcg gcc acg ctt gtg ctg cac ctg gcg Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu Ala 85 90 95	288
ctg gcc gac ggc gcg gtg ctg ctg ctc acg ccg ctc ttt gtg gcc ttc Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala Phe 100 105 110	336
ctg acc cgg cag gcc tgg ccg ctg ggc cag gcg ggc tgc aag gcg gtg Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala Val 115 120 125	384
tac tac gtg tgc gcg ctc agc atg tac gcc agc gtg ctg ctc acc ggc Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr Gly 130 135 140	432
ctg ctc agc ctg cag cgc tgc ctc gca gtc acc cgc ccc ttc ctg gcg Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu Ala 145 150 155 160	480
cct cgg ctg cgc agc ccg gcc ctg gcc cgc cgc ctg ctg ctg gcg gtc Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala Val 165 170 175	528
tgg ctg gcc gcc ctg ttg ctc gcc gtc ccg gcc gcc gtc tac cgc cac Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg His 180 185 190	576
ctg tgg agg gac cgc gta tgc cag ctg tgc cac ccg tcg ccg gtc cac Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val His 195 200 205	624
gcc gcc gcc cac ctg agc ctg gag act ctg acc gct ttc gtg ctt cct Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu Pro 210 215 220	672

ttc ggg ctg atg ctc ggc tgc tac agc gtg acg ctg gca cgg ctg cgg 720
Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu Arg
225 230 235 240

ggc gcc cgc tgg ggc tcc ggg cgg cac ggg gcg cgg gtg ggc cgg ctg 768
Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg Leu
245 250 255

gtg agc gcc atc gtg ctt gcc ttc ggc ttg ctc tgg gcc ccc tac cac 816
Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr His
260 265 270

gca gtc aac ctt ctg cag gcg gtc gca gcg ctg gct cca ccg gaa ggg 864
Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu Gly
275 280 285

gcc ttg gcg aag ctg ggc gga gcc ggc cag gcg gcg cga gcg gga act 912
Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly Thr
290 295 300

acg gcc ttg gcc ttc ttc agt tct agc gtc aac ccg gtg ctc tac gtc 960
Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr Val
305 310 315 320

ttc acc gct gga gat ctg ctg ccc cgg gca ggt ccc cgt ttc ctc acg 1008
Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu Thr
325 330 335

cgg ctc ttc gaa ggc tct ggg gag gcc cga ggg ggc ggc cgc tct agg 1056
Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser Arg
340 345 350

gaa ggg acc atg gag ctc cga act acc cct cag ctg aaa gtg gtg ggg 1104
Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val Gly
355 360 365

cag ggc cgc ggc aat gga gac ccg ggg ggt ggg atg gag aag gac ggt 1152
Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp Gly
370 375 380

ccg gaa tgg gac ctt tga 1170
Pro Glu Trp Asp Leu
385

<210> 3
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 3
 Met Ala Pro Ser His Arg Ala Ser Gln Val Gly Phe Cys Pro Thr Pro
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Leu Trp Arg Leu Pro Pro Thr Cys Arg Pro Arg Arg Met
 20 25 30

Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp Lys
 35 40 45

Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu
 50 55 60

Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp Arg
 65 70 75 80

Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu Ala
 85 90 95

Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala Phe
 100 105 110

Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala Val
 115 120 125

Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr Gly
 130 135 140

Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu Ala
 145 150 155 160

Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala Val
 165 170 175

Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg His
 180 185 190

Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val His
195 200 205

Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu Pro
210 215 220

Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu Arg
225 230 235 240

Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg Leu
245 250 255

Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr His
260 265 270

Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu Gly
275 280 285

Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly Thr
290 295 300

Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr Val
305 310 315 320

Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu Thr
325 330 335

Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser Arg
340 345 350

Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val Gly
355 360 365

Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp Gly
370 375 380

Pro Glu Trp Asp Leu
385

<210> 4
<211> 1077
<212> DNA
<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1074)

<400> 4

atg tcg gtc tgc tac cgt ccc cca ggg aac gag aca ctg ctg agc tgg 48
Met Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp
1 5 10 15

aag act tcg cgg gcc aca ggc aca gcc ttc ctg ctg ctg gcg gcg ctg 96
Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ala Leu
20 25 30

ctg ggg ctg cct ggc aac ggc ttc gtg gtg tgg agc ttg gcg ggc tgg 144
Leu Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp
35 40 45

cgg cct gca cgg ggg cga ccg ctg gcg gcc acg ctt gtg ctg cac ctg 192
Arg Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu
50 55 60

gcg ctg gcc gac ggc gcg gtg ctg ctg ctc acg ccg ctc ttt gtg gcc 240
Ala Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala
65 70 75 80

ttc ctg acc cgg cag gcc tgg ccg ctg ggc cag gcg ggc tgc aag gcg 288
Phe Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala
85 90 95

gtg tac tac gtg tgc gcg ctc agc atg tac gcc agc gtg ctg ctc acc 336
Val Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr
100 105 110

ggc ctg ctc agc ctg cag cgc tgc ctc gca gtc acc cgc ccc ttc ctg 384
Gly Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu
115 120 125

gcg cct cgg ctg cgc agc ccg gcc ctg gcc cgc cgc ctg ctg ctg gcg 432
Ala Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala
130 135 140

gtc tgg ctg gcc gcc ctg ttg ctc gcc gtc ccg gcc gcc gtc tac cgc 480
Val Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg

145	150	155	160	
cac ctg tgg agg gac cgc gta tgc cag ctg tgc cac ccg tcg ccg gtc				528
His Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val				
	165	170	175	
cac gcc gcc gcc cac ctg agc ctg gag act ctg acc gct ttc gtg ctt				576
His Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu				
	180	185	190	
cct ttc ggg ctg atg ctc ggc tgc tac agc gtg acg ctg gca ccg ctg				624
Pro Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu				
	195	200	205	
cgg ggc gcc cgc tgg ggc tcc ggg cgg cac ggg gcg ccg gtg ggc cgg				672
Arg Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg				
	210	215	220	
ctg gtg agc gcc atc gtg ctt gcc ttc ggc ttg ctc tgg gcc ccc tac				720
Leu Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr				
225	230	235	240	
cac gca gtc aac ctt ctg cag gcg gtc gca gcg ctg gct cca ccg gaa				768
His Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu				
	245	250	255	
ggg gcc ttg gcg aag ctg ggc gga gcc ggc cag gcg gcg cga gcg gga				816
Gly Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly				
	260	265	270	
act acg gcc ttg gcc ttc ttc agt tct agc gtc aac ccg gtg ctc tac				864
Thr Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr				
	275	280	285	
gtc ttc acc gct gga gat ctg ctg ccc cgg gca ggt ccc cgt ttc ctc				912
Val Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu				
	290	295	300	
acg cgg ctc ttc gaa ggc tct ggg gag gcc cga ggg ggc ggc cgc tct				960
Thr Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser				
305	310	315	320	
agg gaa ggg acc atg gag ctc cga act acc cct cag ctg aaa gtg gtg				1008
Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val				

325 330 335

ggg cag ggc cgc ggc aat gga gac ccg ggg ggt ggg atg gag aag gac 1056
Gly Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp
340 345 350

ggt ccg gaa tgg gac ctt tga 1077
Gly Pro Glu Trp Asp Leu
355

<210> 5
<211> 358
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5
Met Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp
1 5 10 15

Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ala Leu
20 25 30

Leu Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp
35 40 45

Arg Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu
50 55 60

Ala Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala
65 70 75 80

Phe Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala
85 90 95

Val Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr
100 105 110

Gly Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu
115 120 125

Ala Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala
130 135 140

Val Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg
145 150 155 160

His Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val
165 170 175

His Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu
180 185 190

Pro Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu
195 200 205

Arg Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg
210 215 220

Leu Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr
225 230 235 240

His Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu
245 250 255

Gly Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly
260 265 270

Thr Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr
275 280 285

Val Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu
290 295 300

Thr Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser
305 310 315 320

Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val
325 330 335

Gly Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp
340 345 350

Gly Pro Glu Trp Asp Leu
355

<210> 6
<211> 15

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hBLT2 anti-sense sequence

<400> 6
cagcagtgtc tcgtt 15

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hBLT2 siRNA sense sequence

<400> 7
gaaggauguc ggucugcuau u 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hBLT2 siRNA antisense sequence

<400> 8
uagcagaccg acauccuucu u 21

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for hBLT2

<400> 9
agcctggaga ctctgaccgc ttctg 25

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for hBLT2

<400> 10
gacgtagagc accgggttga cgcta 25

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for re-hBLT2

<400> 11
tctcatcgagg catcacaggt 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for re-hBLT2

<400> 12
ccaagctcca caccacgaag 20