



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0122468  
(43) 공개일자 2011년11월10일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0042006

(22) 출원일자 2010년05월04일

심사청구일자 2010년05월04일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김태우

경기도 군포시 산본동 1145-14 을지아파트  
611-2301

노경희

경기도 안산시 단원구 고잔1동 고려대학병원 의과  
학연구소 3501호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

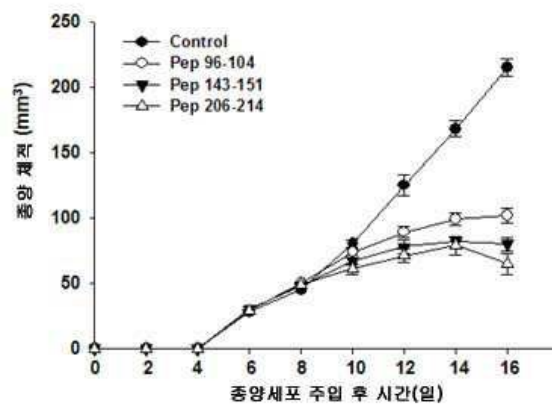
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역 요법 등의 항암치료 후 재발된 암, 내성이 생긴 암, 또는 암전이 치료를 위한 병리적 마커로서 사람의 SCP3 유전자 또는 이의 유사 서열을 갖는 XLR 또는 XMR 유전자를 이용하여 효과적으로 암을 치료할 수 있다.

대표도 - 도16



(72) 발명자

**김진희**

경기도 안산시 단원구 고잔동 대우마이빌 327호

**배현철**

경기도 안산시 단원구 고잔동 주공아파트 522-110

**강태홍**

광주광역시 북구 신안동 682-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0807481/R0905661

부처명 국립암센터/한국학술진흥재단

연구관리전문기관

연구사업명 암정복추진개발사업/(이공)일반연구자지원

연구과제명 신규 종양인자 XLR 매개성 항암면역내성 및 암전이 기전 연구를 통한 항암면역제제  
개발/신규 종양인자 SCP3의 jab1 의존적 항암면역내성 및 암전이 기전 연구 및 SCP3 암백신개발

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단/고려대학교 산학협력단

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일/2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

SCP3(Synaptonemal complex protein 3), XLR(X-linked lymphocyte regulated protein) 및 XMR(Similar to xlr-related, meiosis regulated protein)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 2

SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

에피토프를 함유하는 면역세포는 에피토프로 감작된 면역세포이거나, 에피토프를 발현하는 재조합 벡터로 형질 전환된 면역세포인 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 4

제2항에 있어서,

에피토프는 서열번호 35 내지 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 갖는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 5

제2항에 있어서,

면역세포는 수지상세포, T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 6

SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현 억제제로서, 상기 유전자의 siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

siRNA는 서열번호 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물.

### 청구항 8

SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

정상 대조군과 비교하여 SCP3, XLR, 또는 XMR의 mRNA 또는 단백질 양의 증가로 암전이를 진단하는 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,

SCP3, XLR, 또는 XMR는 사람 또는 마우스 유래인 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물.

#### 청구항 11

제8항에 있어서,

프로브는 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

항체는 서열번호 35 내지 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 에피토프에 결합하는 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물.

#### 청구항 13

제8항에 있어서,

프로브는 SCP3, XLR, 또는 XMR의 mRNA에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 핵산프로브를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물.

#### 청구항 14

SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물.

#### 청구항 15

제14항의 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질을 접촉시키는 단계; 및

상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 증진 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 방법.

## 청구항 16

SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물.

## 청구항 17

제16항의 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질을 접촉시키는 단계; 및

상기 후보물질이 상기 단백질의 기능을 증진 또는 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역 요법 등의 항암치료 후 재발된 암, 내성이 생긴 암, 또는 암전이 치료를 위한 병리적 마커로서 사람의 SCP3 유전자 또는 이의 유사 서열을 갖는 XLR 또는 XMR 유전자를 이용하여 효과적으로 암을 치료할 수 있는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 대한민국 통계청의 분석에 따르면 암은 대한민국의 제1의 사망원인으로 남성이 31.7%, 여성이 22.5%를 차지하며 전체 인구의 31.7%가 암으로 사망한다.

[0003] 우리의 몸은 아주 작은 세포들로 이루어져 있으며 스스로 증식 또는 사멸하거나 유전적 이상을 갖고 있는 비정상세포들을 면역감시체계(immune surveillance)를 통해 제거함으로써 몸의 항상성을 유지 한다. 하지만 많은 유전자의 이상이 중첩되었을 경우 세포는 증식과 사멸을 유지하는 항상성을 잃고 비정상적인 세포 증식이 유도 되어 암으로 발전된다. 따라서 암은 유전자의 이상이 중첩되어 면역세포에 의한 사멸을 회피함으로써 발생하는 면역학적 질환이며, 오랜 시간 동안 이상이 중첩되어 발생하는 만성적인 질환이라고 할 수 있다.

[0004] 암은 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)로 구분되어지는데, 양성종양은 비교적 성장속도가 느리고 종양의 원발생 부위에서 다른 조직으로 이동되어지는 전이(metastasis)가 되지 않는 것에 반해 악성종양은 원발부를 떠나 다른 조직으로 침윤되어 빠르게 성장하는 특징을 가짐으로써 생명을 위협하며 사망에 이르는 아주 중요한 원인이 된다.

[0005] 사람의 세포에는 약 10만개의 유전자가 존재하며, 이 유전자중에는 암과 관련되는 유전자가 존재한다. 암을 조절하는 유전자는 두 가지 부류, 종양 형성 유전자(oncogene)와 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)로 분류된다. 종양 형성 유전자는 성장과 분화를 조절하며, 다양한 암종에서 유전자의 점 돌연변이(point mutation), 증식(amplification) 또는 염색체 전좌(chromosome translocation)에 의해 활성화 되어 있다. 대표적인 종양 형성 유전자로 erbB-2/HER2, Ras 패밀리 및 myc 패밀리 등을 들 수 있다. 이들 종양 형성 유전자의 과발현은 암 환자의 생존율과 반비례한다. 종양 억제 유전자는 비정상적인 세포의 증식을 억제 시키는 것이 주요 기능이다. 대표적인 종양 억제 유전자로 p53, Rb, APC, p21 등을 들 수 있으며, 이들은 세포가 비정상적인 성장을 하는 것을 정지시키는 기능을 하지만 이 유전자에 돌연변이가 형성되거나 손실이 된 경우에는 종양 형성 유전자와 마찬가지로 세포를 비제한적으로 성장하게 된다.

[0006] 암을 치료하기 위해서는 외과적 수술로서 제거하거나, 방사선 치료법, 항암제 치료법, 면역치료법 등이 있으나 많은 연구에도 불구하고 암환자 전체의 50% 이상이 결국 치유되지 못하고 사망한다고 보고된다. 그에 따른 이유는 외과적으로 절제를 하였다 하여도 미세하게 전이된 암세포를 제거하지 못하여 암이 재발하거나, 다양한 항암제의 개발에도 불구하고 항암제를 이용한 암 치료 시 항암제에 대해 암세포가 사멸이 유도되지 않거나 초기에는 반응을 보여 종양이 줄어드는 듯 보이지만 치료도중이나 치료가 끝난 후 암세포에 대한 내성이 생긴 암세포들이 급격히 증식하기 때문이다. 또한, 방사선 치료도 암세포 방사선에 대한 내성을 나타내게 되어 완치가 어렵다.

항암면역치료는 암 특이 항원 또는 암 관련 항원을 이용한 면역 반응을 유도하여 항원을 갖고 있는 암세포를 면역세포를 이용하여 제거하는 방법으로써 부작용이 거의 없어 획기적인 암 치료방법으로 부각되고 있지만, 임상적인 실효성이 매우 미미한 상태이다.

[0007] 따라서, 보다 나은 암 치료를 위해서는 항암제와 방사선 치료에 대한 암세포의 내성을 극복하는 연구가 필요하며, 이와 관련된 유전자의 규명이 매우 필요하다. 또한 규명된 유전자를 타겟으로 하는 암 치료방법이 연구되어야 하며, 암을 초기에 진단하여 빠른 암 치료에 따른 환자의 삶의 질 향상이 절실히 요구되고 있다.

[0008] 현재 몇몇의 유전자가 항암제와 방사선 치료에 대한 내성에 관련되어 있다고 알려져 있다. 그 중 다약제 내성 관련 단백질인 ATP 결합 카세트 막통과 운송체(ATP-binding cassette transmembrane transporter)과 P-당단백질(P-glycoprotein)가 있다. 이들은 ATP 결합 카세트 막통과 수송물질은 ABC 운송체라고도 하며, 그 종류로는 MDR1(ABCB1), MRP1(ABCC1), ABCG2, ABCG5 등 매우 다양하며(*Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):48-58.), 대부분 P-당단백질과 같이 세포막을 통과하여 들어오는 항암제를 다시 세포막 밖으로 펌프를 통해 배출시켜 항암제 내성을 유도한다. 하지만 이러한 유전자들은 일부 환자들의 항암제 내성과 관련되나, 모든 항암제 내성이 이 기전을 통해 이루어 지는 것은 아니다. 이러한 유전자에 의한 내성뿐만 아니라 세포내의 약물 흡수를 감소하거나, DNA 손상이 유도됨에 따른 DNA 수리 유전자의 발현이 증가되는 등 다양한 기전에 따라 세포의 자살이 억제되어 내성이 유도 되기도 한다. 또한, 방사선의 내성에서도 열충격단백질인 HSP27(Heat Shock Protein 27)이 암세포의 사멸을 유도하는 단백질과 결합하여 방사선에 대한 내성을 유도한다.

[0009] 한편, SCP3(Synaptonemal complex protein 3)는 감수분열 전기 동안 상동염색체 사이를 구성하는 접합 복합체(Synaptonemal complex)의 가로섬유의 구성성분이다. 또한, 감수분열 세포의 접합복합체의 결합과 축의 요소에 필수적이며, 수컷의 수정능력과 정소발달에 중요하다(*Mol. Cell* 5:73-83(2000)). SCP3는 세포의 분열, 감수분열 시 염색체의 분리, 정자형성, 유사분열, 세포사멸의 음성적 조절에 대한 기능이 보고되어 있다(*Mol. Cell* 5:73-83(2000), *Biochim. Biophys. Acta* 1518:294-299(2001)). 이러한 기능 중에서 세포사멸의 음성적 조절과 감수분열뿐만 아니라 유사분열에도 영향을 미치는 SCP3의 기능에 주목할 필요가 있다. 또한 SCP3는 XLR(X-linked lymphocyte regulated protein)과 XMR(Similar to xlr-related, meiosis regulated protein) 염기서열의 유사성이 매우 높은 것으로 보고 되어 있으며, 세가지 유전자 모두 감수분열 전기에서 염색체의 중심부를 구성하는 Cor1을 갖고 있다.

[0010] SCP 패밀리는 SCP1, SCP2, SCP3 로 구성되어 있고, SCP1, SCP2, SCP3 모두 염색체를 이루는 중요한 복합체로 존재하며, SCP1은 SYCE1(Synaptonemal complex central element protein 1)와 SYCE2 (Synaptonemal complex central element protein 2)와 함께 물리적 결합을 하여 복합체를 이루고 있고, 최근의 연구에 따르면 생식세포와 암에서만 특징적으로 발현하는 종양고환항원(Cancer testis antigen)으로서 새롭게 동정되었다(*Blood* 106:3105-3113(2005)). 또한, SCP2는 SCP3와 함께 이질이합체(heterodimer)를 이루며 SCP3뿐만 아니라 SMC1A(Structural maintenance of chromosomes protein 1A), SMC3(Structural maintenance of chromosomes protein 3)와 물리적 결합을 한다고 알려져 있다. 특히 염색체 보존 구조 단백질(SMC)은 대표적인 수리 단백질로 알려진 Rad21와 CDCA5 그리고 PDS5A/APRIN와 PDS5B/SCC-112로 복합체를 이루어 염색체에 이상이 생겼을 경우 수리를 촉진하여 세포의 사멸을 억제하고 생존을 증가시킨다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 재발된 암, 내성이 생긴 암, 또는 암전이 병리적 마커로 사람의 SCP3 유전자 또는 이의 유사서열을 갖는 XLR 또는 XMR 유전자를 사용하여 재발암, 내성암, 또는 암전이를 치료할 수 있는 약제학적 용도를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SCP3(Synaptonemal complex protein 3), XLR(X-linked lymphocyte regulated protein) 및 XMR(Similar to xlr-related, meiosis regulated protein)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물을 제공한다.

- [0013] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현 억제제로서, 상기 유전자의 siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한
- [0018] 본 발명의 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0019] 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 증진 또는 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한
- [0022] 본 발명의 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0023] 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능을 증진 또는 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0024] 본 발명은 재발된 암, 내성이 생긴 암, 또는 암전이 병리적 마커로서 SCP3 또는 이의 서열 상동성이 있는 XLR 또는 XMR 유전자를 재발암, 내성암, 또는 암전이를 진단, 억제, 경감 등에 사용할 수 있을 뿐만 아니라 재발암, 내성암, 또는 암전이 치료제의 스크리닝에 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 XLR 및 SCP3의 마우스의 각 조직에서의 발현 여부를 확인한 결과이다.
- 도 2는 다양한 인간 암종에서 본 발명의 인간 SCP3 단백질의 발현 여부를 확인한 결과이다.
- 도 3은 인간 자궁경부암의 진행 단계에 따른 본 발명의 인간 SCP3 단백질의 발현 여부를 나타낸 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 XLR 또는 SCP3를 과발현하는 폐암세포주를 이용하여 XLR 또는 SCP3의 항암면역 내성을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 SCP3를 과발현하는 배아신장세포주를 이용하여 SCP3의 항암면역 내성을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 XLR 또는 SCP3를 과발현하는 암세포주를 이용하여 XLR 및 SCP3의 항암제 5-FU에 대한 내성을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 XLR 또는 SCP3를 과발현하는 암세포주를 이용하여 XLR 및 SCP3의 항암제 시클로포스파미드에 대한 내성을 나타낸 것이다.

도 8은 인간 폐암 세포주 H1299, 대장암 세포주 HCT116 및 간암 세포주 HepG2에서 마우스 SCP3 표적부위 739-761의 센스 siRNA를 처리함에 따른 SCP3 발현 여부를 도시한 것이다.

도 9는 siRNA를 처리하여 SCP3의 발현을 저하시킨 인간 대장암 세포주의 방사선 내성을 조사한 결과이다.

도 10은 siRNA를 처리하여 SCP3의 발현을 저하시킨 인간 대장암 세포주의 항암제인 택솔 및 시클로포스파미드의 농도별 효과를 조사한 결과이다.

도 11은 본 발명의 SCP3를 과발현하는 인간 자궁경부암 세포주를 이용하여 암세포의 이동능을 조사한 결과이다.

도 12는 본 발명의 XLR 또는 SCP3를 과발현하는 폐암세포주를 이용하여 암세포의 이동능을 조사한 결과이다.

도 13은 본 발명의 SCP3를 과발현하는 인간 자궁경부암 세포주를 이용하여 암세포의 침윤능을 조사한 결과이다.

도 14는 본 발명의 XLR 또는 SCP3를 과발현하는 폐암세포주를 이용하여 암세포의 침윤능을 조사한 결과이다.

도 15는 본 발명의 SCP3 펩타이드(표적부위: 아미노산 96-104, 143-151, 206-214)를 감작한 수지상세포주의 SCP3 특이적인 면역반응 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 SCP3 펩타이드(표적부위: 아미노산 96-104, 143-151, 206-214)를 감작한 수지상세포주의 투여시간 경과에 따른 종양 체적 변화량을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0027] 본 발명은 SCP3(Synaptonemal complex protein 3), XLR(X-linked lymphocyte regulated protein) 및 XMR(Similar to xlr-related, meiosis regulated protein)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 명세서에서 "원발암"은 통상의 암을 뜻하며, "재발암"은 통상의 암 치료 후 재발생된 암을 뜻하고, "내성암"은 상기 암 치료에 내성을 갖는 암을 일컫는 말이다. 여기서, 통상의 암 치료는 예를 들어, 수술, 화학치료, 방사선, 치료, 호르몬 치료, 생물학적 치료, 면역치료 등을 포함한다. 상기 암의 종류로는 뇌종양, 척수종양, 망막 세포종, 구강암, 비강암, 부비동암, 인두암, 후두암, 경부암을 포함하는 두경부암, 피부암, 유방암, 갑상선암, 악성부신종양을 포함하는 유방암, 내분비암, 폐암, 흉막종양, 악성부신종양을 포함하는 호흡기암, 식도암, 위암, 소장암, 악성종양, 대장암, 항문암, 간암, 담도암 또는 췌장암을 포함하는 소화기암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암 또는 음경암을 포함하는 비뇨기암, 자궁경부암, 자궁체부암, 용모상피암 또는 난소암을 포함하는 부인암, 급성 또는 만성 백혈병, 악성림프종 또는 다발성 골수증을 포함하는 혈액암, 골종양 또는 연부종양을 포함하는 골 또는 연부 종양, 및 소아 백혈병 또는 소아 고형종양을 포함하는 소아암 등일 수 있다.
- [0029] 또한, 본 명세서에서 "암전이 또는 전이성암"은 특정 부위에서 발생한 원발암 또는 재발암이 다른 부위로 전이된 것을 일컫는다.
- [0030] 본 발명의 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질은 항암면역 내성, 항암제 및 방사선 내성을 나타내고, 전이성이 높은 암 세포에 많이 발현되므로, 상기 단백질의 발현 억제제를 투여함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이 치료적 용도로 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 재발암, 내성암 또는 암전이의 예방, 억제 또는 경감을 포함한다.
- [0032] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 억제제는 상기 단백질들의 발현을 억제하는 물질 또는 기능을 저해하는 물질이 될 수 있는데, 구체적으로, SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체가 될 수 있다.

- [0033] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 에피토프를 함유하는 면역세포를 포함하고 있어 생체 내 면역반응을 증강시키는 면역반응 증강용 조성물이거나, 면역반응을 유도함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이를 예방 또는 경감할 수 있는 백신 조성물일 수 있다.
- [0035] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 에피토프를 포함하는 면역세포는 통상의 방법에 따라 에피토프를 감작시킨 것이거나, 형질전환방법을 통해 상기 에피토프를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.
- [0036] 상기 에피토프는 면역세포가 인식할 수 있는 펩타이드라면 특별히 제한하지 않으나, 서열번호 35 내지 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 사용할 수 있다.
- [0037] 보다 구체적으로,
- [0038] 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 마우스 SCP3의 아미노산 서열(GenBank Accession No. NM\_011517)의 96 - 104 a.a.를 표적부위로 한다.
- [0039] 서열번호 36의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 마우스 SCP3의 아미노산 서열(GenBank Accession No. NM\_011517)의 206 - 214 a.a.를 표적부위로 한다.
- [0040] 서열번호 37의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 마우스 SCP3의 아미노산 서열(GenBank Accession No. NM\_011517)의 182 - 190 a.a.를 표적부위로 한다.
- [0041] 서열번호 38의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 마우스 SCP3의 아미노산 서열(GenBank Accession No. NM\_011517)의 174 - 182 a.a.를 표적부위로 한다.
- [0042] 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 마우스 SCP3의 아미노산 서열(GenBank Accession No. NM\_011517)의 131 - 139 a.a.를 표적부위로 한다.
- [0043] 서열번호 40의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 마우스 SCP3의 아미노산 서열(GenBank Accession No. NM\_011517)의 143 - 151 a.a.를 표적부위로 한다.
- [0044] 상기 면역세포는 수지상세포, T 세포, NK 세포, 또는 B 세포 등을 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현 억제제로서, 상기 유전자의 siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 발현 억제제로서, SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi를 들 수 있다. 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자는 항암면역 내성, 항암제 및 방사선 내성을 나타내고, 암전이와 관련된 유전자이므로, siRNA, 안티센스, 또는 shRNAi에 의해 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자를 억제함으로써, 재발암, 내성암 또는 암전이를 예방 또는 경감할 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단을 통해 RNA 간섭현상을 유도하는 이중사슬 RNA를 의미하며, 표적 유전자의 mRNA와 같은 서열을 가지는 센스서열의 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 서열의 RNA 가닥으로 구성된다.
- [0048] 상기 siRNA는 시험관에서 합성한 siRNA 자체 또는 siRNA를 코딩하는 염기서열을 발현벡터에 삽입하여 발현되는 형태를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 siRNA는 바람직하게는 서열번호 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 가질 수 있다.
- [0050] 보다 구체적으로, 서열번호 5에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 SCP3(GenBank Accession No. NM\_011517)의 739 - 761 nt를 갖는다.
- [0051] 서열번호 7에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 SCP3의 327 - 349 nt를 갖는다.

- [0052] 서열번호 9에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 SCP3의 395 - 417 nt를 갖는다.
- [0053] 서열번호 11에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 SCP3의 418 - 440 nt를 갖는다.
- [0054] 서열번호 13에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 SCP3의 193 - 215 nt를 갖는다.
- [0055] 서열번호 15에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 XLR (GenBank Accession No.) NM\_011725)의 167 - 189 nt를 갖는다.
- [0056] 서열번호 17에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 XLR(GenBank Accession No.) NM\_011725)의 442 - 464 nt를 갖는다.
- [0057] 서열번호 19에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 XLR(GenBank Accession No.) NM\_011725)의 37 - 59 nt를 갖는다.
- [0058] 서열번호 21에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 XLR(GenBank Accession No.) NM\_011725)의 502 - 524 nt를 갖는다.
- [0059] 서열번호 13에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 마우스의 XLR(GenBank Accession No.) NM\_011725)의 442 - 466 nt를 갖는다.
- [0060] 서열번호 25에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 사람의 SCP3(GenBank Accession No. NM\_153694)의 685 - 707 nt를 갖는다.
- [0061] 서열번호 27에 기재된 siRNA 서열은 표적부위로 사람의 SCP3(GenBank Accession No. NM\_153694)의 364 - 386 nt를 갖는다.
- [0062] 또한, 상기 안티센스는 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 또는 그의 단편으로부터 전사되는 mRNA 서열 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 지니고, 상기 mRNA와 결합하여 상기 암전이 유전자 또는 단편의 발현을 억제할 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 shRNAi(short hairpin RNAi)는 인간 또는 마우스상의 shRNAi 공통 염기서열 부위를 표적으로 하여 통상의 방법에 따라 제작된 것을 사용할 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 mRNA 또는 단백질 억제제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 하나 또는 그 이상의 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0065] SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 억제제 또는 항체는 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)와 함께 사용될 수 있으며, 예를 들어, 시클로포스파미드, 아지리딘, 알킬알콘설포네이트, 나이트로소우레아, 다카르바진, 카르보플라틴, 시스플라틴 등과 같은 알킬화제(alkylating agent), 마이토마이신 C, 안트라사이클린, 독소루비신(아드리아마이신) 등과 같은 항생제, 메토크세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈 등과 같은 항대사제(antimetabolitic agent), 빈카 알칼로이드와 같은 식물유래 약제 및 호르몬 등이 될 수 있다.
- [0066] 또한, 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 mRNA 또는 단백질 억제제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0067] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0068] 또한, 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 mRNA 또는 단백질 억제제를 유효 성분으로 함유하는 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는

보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

- [0069] 또한, 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 회석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0071] 상기 재발암, 내성암 또는 암전이 치료용 조성물의 투여량은 재발암, 내성암 또는 암전이를 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, siRNA일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0072] 본 발명은 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 재발암, 내성암 또는 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0073] 본 명세서에서 "프로브"는 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 또는 단백질과 특이적으로 결합하여 이들을 인지할 수 있는 항체, 프라이머, 핵산 프로브 등을 포괄적으로 포함하는 개념이다.
- [0074] 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물은 생리학적 시료에서 재발암, 내성암 또는 암전이 병리적 마커를 검출하기 위한 것으로,
- [0075] SCP3 유전자 및 이와 염기서열의 유사성이 매우 높은 XLR 또는 XMR 유전자가 재발암, 내성암 또는 전이성이 있는 암세포의 안팎에서 특이적으로 발현이 증가되는 양상을 보이고, 이의 발현량과 비례하여 세포의 이동도도 증가하므로, 암세포 또는 조직에서의 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자, 또는 이로부터 코딩되는 단백질의 발현 정도를 정량분석함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이를 진단할 수 있는 것이다.
- [0076] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR는 사람 또는 마우스에서 유래한 것으로, 공지된 서열, 예를 들어, GenBank Accession No. NM\_011517, GenBank Accession No. NM\_011725, 또는 GenBank Accession No. NM\_153694 등을 포함하거나, 염기 또는 아미노산의 결실, 치환, 부가되어도 동일한 기능을 수행할 수 있는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0077] 예를 들어, 상기 SCP3는 서열번호 1의 염기서열로부터 번역된 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 1의 cDNA 서열 중에서 번역되지 않는 부위를 제외한 실제 단백질로 번역되는 부위를 가질 수 있다. 가장 구체적으로, 서열번호 1의 133 - 843의 염기서열로부터 번역된 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0078] 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물은 상기 프로브로 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다.
- [0079] 상기 에피토프는 서열번호 35 내지 40에 기재된 것을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0080] 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물을 이용한 재발암, 내성암 또는 암전이 진단은
- [0081] 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및
- [0082] 수득한 시료에서 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0083] 또는, 상기 재발암, 내성암 또는 암전이 진단은
- [0084] 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계; 및
- [0085] 수득한 시료를 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 모노클로날 항체와 반응시켜 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0086] 상기 진단방법은, SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 모노클로날 항체를 함유한 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay) 방법을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 생체에서 배출된 암조직이나 세포에 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질 특이적 면역염색(histoimmunostaining)을 이용하여 재발암, 내성암 또는 암전이 여부를 진단할 수 있다. 또는, 생체로부터 배출된 암조직이나 세포에 웨스턴 블롯분석을 이용하여 단백질 수준에서 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질 발현량을 정상대조군과 비교분석함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이 여부를 진단할 수 있다.
- [0087] 또는, 상기 재발암, 내성암 또는 암전이 진단은
- [0088] SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질에 대한 모노클로날 항체를 겔형 지지체에 부착시켜 면역친화컬럼을 제조하는 단계;
- [0089] 상기 단계의 면역친화컬럼을 사용하여 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에서 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질을 HPLC 방법으로 정량하는 단계; 및
- [0090] 상기 정량 결과를 비교분석하여 재발암, 내성암 또는 암전이 정도를 진단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 모노클로날 항체는 당업계에서 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다.
- [0092] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 모노클로날 항체에는 일반적으로 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, AP) 또는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 컨쥬게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하거나, 직접 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨쥬게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다.
- [0093] 또한, 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질 모노클로날 항체 대신에 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수 있으며, 이는 당업계에서 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수 있다.
- [0094] 또한, 상기 프로브는 SCP3, XLR, 또는 XMR의 mRNA에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 핵산 프로브를 포함할 수 있다.
- [0095] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자에 대한 프라이머를 이용한 RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 등을 수행하여 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이를 진단할 수 있다.
- [0096] 또한, 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자에 대한 프로브를 이용하여 노던 블롯 분석 등을 수행하여 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 발현량을 정상군과 비교함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이를 진단할 수 있다.
- [0097] 상기 PCR 프라이머 또는 프로브는 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 뉴클레오타이드라면 특별히 제한하지 않는다.
- [0098] 상기 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자의 mRNA 검출용 프라이머 또는 핵산 프로브를 포함하는 본 발명에 따른 재발암, 내성암 또는 암전이 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직에서 추출한 RNA)과 반

응(RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 또는 노던블롯팅)시켜 정상군과 비교 분석함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이 진단을 수행할 수 있다.

- [0099] 상기 재발암, 내성암 또는 암전이 진단은
- [0100] 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 RNA 시료를 수득하는 단계; 및
- [0101] 수득한 시료를 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR 프라이머 또는 프로브와 반응시켜 상기 유전자의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0102] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.
- [0103] 본 발명의 조성물이 포함하는 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자는 사람 또는 마우스 유래의 전체 염기서열 또는 이의 단편, 또는 다형현상을 포함하는 염기서열 등을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 1 또는 3의 일부 또는 전체 염기서열, 서열번호 1 또는 3의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나 이상이 될 수 있으며, 원핵생물 또는 진핵생물 발현벡터 시스템 내에 포함된 형태로 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 조성물에 포함된다.
- [0104] 본 발명은 또한
- [0105] 본 발명의 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0106] 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 증진 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0107] 본 발명의 스크리닝 방법에서 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자를 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- [0108] 예를 들면, 생체 외부에서(*in vitro*) 상기 유전자와 시험대상물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0109] 이러한 경우 본 발명의 조성물은 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 외에도, 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.
- [0110] 본 발명은 또한 SCP3, XLR 및 XMR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.
- [0111] 본 발명의 조성물이 포함하는 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질은 사람 또는 마우스 유래의 전체 아미노산 서열 또는 이의 단편, 또는 다형현상을 포함하는 아미노산 서열일 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 2 또는 4의 아미노산 서열을 갖거나, 또는 서열번호 1 또는 3의 염기서열, 서열번호 1 또는 3의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나로부터 발현된 단백질, SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질과 동등한 생리적 활성을 나타내는 SCP3, XLR, 또는 XMR 폴리펩타이드 단편 중 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝용 조성물은 재발암, 내성암 또는 암전이를 촉진시키는 효과가 있으므로, SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 염기서열에서 mRNA, 단백질로의 전사, 번역을 저해하는 물질 또는 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질의 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하여 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제로 선택할 수 있다.

- [0113] 본 발명은 또한
- [0114] 본 발명의 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0115] 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능을 증진 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0116] 본 발명의 스크리닝 방법에서 SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질을 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- [0117] 예를 들면, SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자, 또는 이들의 단백질과 시험대상물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), SCP3, XLR, 또는 XMR 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩타이드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.
- [0118] 이러한 경우 본 발명의 조성물은 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자로부터 발현된 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생체 내(*in vivo*) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.
- [0119] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 시험대상물질은 통상적인 선정방식에 따라 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.
- [0120] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 증진시키거나 단백질의 기능을 증진시키는 활성을 나타내는 시험대상물질 및 반대로 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 시험대상물질은, 전자의 경우, 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질이 될 수 있고, 후자의 경우는 시험대상물질에 대한 억제제를 개발함으로써 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질이 될 수 있다.
- [0121] 이와 같은 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 후보물질은 이후의 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 재발암, 내성암 또는 암전이 치료제를 개발할 수 있다.
- [0122] 이렇게 하여 얻어진 물질은 SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성 억제효과를 나타내게 되므로, SCP3, XLR, 또는 XMR 유전자 발현 억제 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 저하에 의하여, 재발암, 내성암 또는 암전이, 그 이외에 유발되는 질환들을 억제할 수 있다.
- [0123] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.
- [0124] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0125] <실시예 1> 인간 SCP3 발현 벡터 제조
- [0126] 인간 testis cDNA(Clontech, USA)를 주형으로 하고, XhoI-hSCP3 프라이머 (5'-GCTCGAGATGGTGTCTCCGAAAAAAG-

3' ), hSCP3-EcoRI (5' - CGAATTCAGTCTTATTGTACCTAAGTCTCTG-3' ) 프라이머를 이용하여 변성단계(95℃, 30초), 어닐링단계(56℃, 30초) 및 연장단계(72℃, 40초)를 1 사이클로 하여 35 사이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다.

[0127] pMSCV 벡터(clontech, USA)을 *XhoI*과 *EcoRI*(NEB, USA)로 처리한 후, 상기 증폭된 후 *XhoI*과 *EcoRI*을 처리한 SCP3을 라이게이즈(바이오니아)으로 라이게이션(ligation)하여 SCP3를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 제조하였다. 상기 벡터를 pMSCV hSCP3로 명명하였다.

[0128] <실시예 2> 생쥐 유전자 XLR과 SCP3 발현벡터의 제조

[0129] 생쥐 고환에서 TRIzol 시약으로 페놀/클로로포름법을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 주형으로 하여 역전사효소를 이용하여 생쥐 고환의 cDNA를 제조하였다. 제조한 고환의 cDNA를 주형으로 하여 *XhoI*-XLR 프라이머 (5' -GCTCGAGATGGAAACTGGGACTTGTC-3' ), *XLR*-EcoRI (5' -CGAATTCCTAGTCTGAAGATGGGA-3' ) 프라이머, *XhoI*-mSCP3 프라이머 (5' -GCTCGAGATGATGCTTCGAGGGTGTTGGGA-3' ) 그리고 mSCP3-EcoRI (5' -CGAATTCTCAGAATAACATGGAT-3' ) 프라이머를 이용하여 변성단계(95℃, 30초), 어닐링단계(56℃, 30초) 및 연장단계(72℃, 40초)를 1 사이클로 하여 35 사이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다.

[0130] pMSCV 벡터(clontech, USA)을 *XhoI*과 *EcoRI*(NEB, USA)로 처리한 후, 상기 증폭된 후 *XhoI*과 *EcoRI*을 처리한 XLR과 mSCP3을 라이게이즈(바이오니아)으로 라이게이션(ligation)하여 XLR과 mSCP3를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 제조하였다. 상기 벡터를 pMSCV XLR과 pMSCV mSCP3로 명명하였다.

[0131] <실시예 3> 인간 SCP3를 발현하는 CaSki 및 293Db 세포주 제조

[0132] 실시예 1에서 제조한 벡터와 리포솜 제제인 리포펙타민 2000(lipofectamin 2000, Invitrogen, MD, USA)을 부피비 1:2로 섞어 레트로바이러스 패키징(packaging) 세포주인 피닉스(phenix)세포(clontech)에 3시간 처리 후 혈청이 포함된 배양액을 첨가해 주어 형질주입반응을 정지시켰다. 그 후 24시간 배양 후 퓨로마이신(Invitrogen, MD, USA)이 포함된 배양액으로 형질주입된 피닉스세포를 선택배양하였다. 선택된 세포들을 3~4일간 배양하여 배양액에서 얻은 바이러스를 amicon ultra-15(millipore)을 이용하여 12000 rpm에서 30분간 원심 분리하는 방법으로 농축한 500 $\mu$ l의 농축액과 4 $\mu$ g의 PEI(Polyethyleneimine; Sigma)를 혼합한 혼합액을 인간 자궁경부암세포주인 CaSki와 인간 배아신장세포인 293 세포주에 마우스 MHC class I인 *Db* 유전자가 형질도입되어 있는 293Db(*The Journal of experimental medicine* 185:453-459, 1997)에 처리하여 형질도입시킴으로써, SCP3를 각각 발현하는 CaSki/SCP3와 293Db/SCP3 세포주를 제조하였다.

[0133] <실시예 4> XLR과 SCP3를 발현하는 TC-1세포주 제조

[0134] 실시예 2에서 제조한 각각의 벡터와 리포솜 제제인 리포펙타민 2000을 부피비 1:2로 섞어 레트로바이러스 패키징 세포주인 피닉스세포에 3시간 처리 후 혈청이 포함된 배양액을 첨가해 주어 형질주입반응을 정지시켰다. 그 후 24시간 배양 후 퓨로마이신이 포함된 배양액으로 형질주입된 피닉스세포를 선택배양하였다. 선택된 세포들을 3~4일간 배양하여 배양액에서 얻은 바이러스를 amicon ultra-15 (millipore)을 이용하여 12000 rpm에서 30분간 원심 분리하는 방법으로 농축한 500 $\mu$ l의 농축액과 4 $\mu$ g의 PEI를 혼합한 혼합액을 마우스 폐암세포주인 TC-1(ATCC)에 처리하여 형질도입시킴으로써, XLR과 SCP3를 각각 발현하는 TC-1/XLR 및 TC-1/SCP3 세포주를 제조하였다.

[0135] <실시예 5> 각 조직내 XLR 및 SCP3 발현 확인

[0136] 마우스의 피부, 간, 폐, 뇌, 심장, 장, 신장, 비장, 흉선, 자궁, 고환, 전립선을 각각 추출한 후 TRIzol 시약을 첨가한 뒤 균질기(homogenizer)를 이용하여 잘게 갈아준 뒤 제조사의 지시에 따라 RNA를 분리 하였다. 분리된 RNA는 역전사효소(Super-bio, Korea)를 이용하여 각 조직의 cDNA를 제조하였다. 제조된 cDNA를 주형으로 하여 XLR 프라이머와 SCP3 프라이머(실시예 2)를 이용하여 변성단계(95℃, 30초), 어닐링단계(56℃, 30초) 및 연장단계(72℃, 40초)를 1 사이클로 하여 35 사이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 시료는 1% 아가로스 겔에서 발현 양상을 관찰하였다.

- [0137] 도 1에 나타난 바와 같이, XLR은 간과 전립선을 제외하고는 모든 마우스 조직에서 발현되었고, SCP3는 고환에서 다량 발현되었다.
- [0138] <실시에 6> 인간암세포주에서 SCP3 단백질 발현 확인
- [0139] 인간전립선암세포주인 LNCap, Du145, PC3와 폐암세포주 A549, H1299, 유방암세포주 MCF7, MDA321, MDA435, 간암세포주 HepG2, SNU423, 대장암세포주 HCT116, LOVO, HT29, SW620, SNUC4, 자궁경부암세포주 CaSki, HeLa, SiHa, CUMC6, 피부암세포주 A375P, A375SM, 신장암세포주 RCC4 그리고 위암세포주인 MKN26세포주를 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치 시킨 후 냉장원심분리기에서 13000rpm 30분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 단백질을 정량 후 50 $\mu$ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA 로 1시간 동안 블로킹한 후 SCP3 항체(santa cruz, USA)를 1:1000으로 희석한 후 인큐베이션하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.
- [0140] 도 2에 나타난 바와 같이, 모든 인간 암 중에서 SCP3 단백질이 발현되었다.
- [0141] <실시에 7> 자궁경부암 조직에서 SCP3 발현 확인
- [0142] 자궁경부암 조직 슬라이드 (Super bio chip, Korea)를 자일렌을 이용하여 탈파린화 과정과 알코올을 이용하여 탈수화 과정을 거친 후 시트레이트 버퍼에 슬라이드를 담귀 전자레인지에서 10분간 돌린 후 실온에서 한 시간 동안 식혀주었다. 증류수로 세척하여 실온에서 5% 염소 혈청으로 한 시간 동안 반응시킨 후 SCP3 항체를 1:50으로 희석하여 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체를 반응시킨 후 DAB 키트를 이용하여 발색시켰다.
- [0143] 도 3a는 자궁경부암 조직을 염색하여 광학현미경 하에서 관찰한 결과(S: stroma(스트로마), T: tumor(종양))이고, 3b는 조직에서 자궁경부암의 진행 단계별 SCP3 발현 지수를 나타낸 것이다.
- [0144] 도 3a에 나타난 바와 같이, 종양 부분에서만 갈색으로 염색이 되어 SCP3가 종양에서만 발현됨을 알 수 있었으며, 조직에서 자궁경부암의 진행 단계가 높아질수록 SCP3 발현 양상은 더욱 높아졌다(도 3b).
- [0145] <실시에 8> 항암면역 내성 조사
- [0146] 본 발명의 SCP3 유전자의 항암면역 내성에 대해 조사하기 위해 상기 실시예 3 및 실시예 4에서 제조한 TC-1/SCP3, TC-1/XLR 그리고 293Db/SCP3 세포주를 이용하여 항암면역 내성 실험을 수행하였다.
- [0147] 먼저, CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)를 이용하여 TC-1/no insert, TC-1/SCP3와 TC-1/XLR 세포주에 표식한 후, E7 특이적인 CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 1:1 비율로 섞어준 후 CFSE 표식이 된 TC-1/no insert, TC-1/XLR, TC-1/SCP3 세포주에서의 활성 카스파제-3(active caspase-3)를 FACS를 통해 관찰하였다.
- [0148] CFSE 표식이 된 293Db/no insert 와 293Db/SCP3는 1 $\mu$ g/mL의 E7 펩타이드(아미노산 번호 49-57, RAHYNIVTF)를 1 시간 동안 자극을 준 후 E7 특이적인 CTL을 1:5 비율로 섞어주었다. CFSE 표식이 된 293Db/no insert 와 293Db/SCP3를 활성 카스파제-3 항체를 이용하여 관찰하였다.
- [0149] 도 4에 나타난 바와 같이, SCP3와 XLR을 과발현하는 폐암세포주는 T세포의 공격에 대해 내성을 가짐을 알 수 있었다. 또한, SCP3를 과발현하는 배아신장세포 293Db 세포주 역시 T세포의 공격에 대해 내성을 가짐을 알 수 있었다(도 5).
- [0150] <실시에 9> 항암제 내성 조사
- [0151] 본 발명의 SCP3 유전자의 항암제 내성을 조사하기 위해 상기 실시예 4에서 제조한 TC-1/SCP3와 TC-1/XLR 세포주를 이용하여 항암제 내성 실험을 수행하였다. 항암제 5-FU(5-Fluorouracil)를 1.6, 6.25, 25  $\mu$ M 농도로 처리하고, 시클로포스파미드(Cyclophosphamide)를 0.1, 1.75, 7mM 농도로 각각 처리한 후 24시간 후에 MTT 시약을 첨가한 후 4시간 후 450 nm의 파장에서 ELISA를 통해 그 수치를 확인하였다.
- [0152] 도 6 및 7에 나타난 바와 같이, SCP3와 XLR을 과발현하는 폐암세포주는 항암제인 5-FU, 시클로포스파미드 농도

의존적으로 내성을 나타냈다.

[0153] <실시예 10> 방사선 내성 조사

[0154] 본 발명의 SCP3 유전자의 방사선 내성을 조사하기 위해 HCT116 인간 대장암 세포주를 이용하여 방사선 내성 실험을 수행하였다. 방사선을 2, 4, 8 그레이 (Gray)로 각각 조사한 후 24시간 후 MTT 시약을 첨가하고 4시간 경과 후 450 nm의 파장에서 ELISA를 통해 그 수치를 확인하였다.

[0155] 또한, siRNA를 처리하여 SCP3의 발현을 저하시킨 후 방사선 내성에 미치는 효과를 조사하였다.

[0156] 각 siRNA 서열과 표적부위는 표 1 내지 3에 나타내었다. 도 8은 인간 폐암 세포주 H1299, 대장암 세포주 HCT116 및 간암 세포주 HepG2에서 마우스 SCP3 표적부위 739-761의 센스 siRNA(서열번호 5)를 처리함에 따른 SCP3 발현 억제 여부를 도기한 것이고, 도 9는 마우스 SCP3 표적부위 739-761의 센스 siRNA(서열번호 5)를 처리하여 SCP3 발현을 저하시킨 인간 대장암 세포주 HCT116에서의 방사선 내성 여부를 도기한 것이다.

## 표 1

마우스 SCP3 특이적인 siRNA

| 표적부위    | siRNA 서열 |                               | 서열번호 |
|---------|----------|-------------------------------|------|
| 739-761 | 센스       | 5'-GUCUCUCAAUCCAUGUUA UU -3'  | 5    |
|         | 안티센스     | 5'-UU CAGAGAAGUUAGGUACAAU -3' | 6    |
| 327-349 | 센스       | 5'-UAGAAAUGUAUACCAAAGC UU -3' | 7    |
|         | 안티센스     | 5'-UU AUCUUUACAUAUGGUUUCG -3' | 8    |
| 395-417 | 센스       | 5'-CAAGAGGAAAUACAGAAGC UU -3' | 9    |
|         | 안티센스     | 5'-UU GUUCUCCUUUAUGUCUUCG -3' | 10   |
| 418-440 | 센스       | 5'-CAAUGAAUAUUCUCAGCAA UU -3' | 11   |
|         | 안티센스     | 5'-UU GUUACUUAUAAGAGUCGUU -3' | 12   |
| 193-215 | 센스       | 5'-GGCUCAGUAAUUGAUAAA UU -3'  | 13   |
|         | 안티센스     | 5'-UU CCGAGGUCAUUAACUAAUU -3' | 14   |

[0157]

## 표 2

마우스 XLR 특이적인 siRNA

| 표적부위    | siRNA 서열 |                               | 서열번호 |
|---------|----------|-------------------------------|------|
| 167-189 | 센스       | 5'-GGUGACAUAACAAGAGGC UU -3'  | 15   |
|         | 안티센스     | 5'-UUCCACUGUAAUUGUUCUCCG -3'  | 16   |
| 442-464 | 센스       | 5'-GACCCUGGAAGCAAUAAA UU -3'  | 17   |
|         | 안티센스     | 5'-UU CUGGGACCUUCGUAAUUU -3'  | 18   |
| 37-59   | 센스       | 5'-UGGGAUAGCUCCAGAAUUG UU -3' | 19   |
|         | 안티센스     | 5'-UU ACCCUUACGAGGCUUAAAC -3' | 20   |
| 502-524 | 센스       | 5'-GACCAACAACUACAAUUG UU -3'  | 21   |
|         | 안티센스     | 5'-UU CUGGUUGUGAUGUUAUAC -3'  | 22   |
| 444-466 | 센스       | 5'-CCUGGAAGCAAUAAAGA UU -3'   | 23   |
|         | 안티센스     | 5'-UU GGGACCUUCGUAAUUUCU -3'  | 24   |

[0158]

표 3

사람 SCP3 특이적인 siRNA

| 표적부위    | siRNA 서열 |                              | 서열번호 |
|---------|----------|------------------------------|------|
| 685-707 | 센스       | 5'-GUCUCUCAAUCCAUGUUAUU-3'   | 25   |
|         | 안티센스     | 5'-UUCAGAGAAGUUAGGUACAAU-3'  | 26   |
| 364-386 | 센스       | 5'-CCAAGAAUUAUCUCAGCAGUU-3'  | 27   |
|         | 안티센스     | 5'-UUGGUUCUUAUAAGAGUCGUC-3'  | 28   |
| 341-363 | 센스       | 5'-CAAGAUCAAAGGCAGAAGCUU-3'  | 29   |
|         | 안티센스     | 5'-UUGUUCUAGUUCCGUCUUCG-3'   | 30   |
| 355-377 | 센스       | 5'-GAAGCUUAAACCAAGAAUUAUU-3' | 31   |
|         | 안티센스     | 5'-UUCUUCGAAUUGGUUCUUAUA-3'  | 32   |
| 224-246 | 센스       | 5'-GGAGUUGGAGUUGACAUAUU-3'   | 33   |
|         | 안티센스     | 5'-UUCCUCAACCUAACUGUAAU-3'   | 34   |

[0159]

[0160]

도 8에 나타난 바와 같이, 인간 폐암 세포주 H1299, 대장암 세포주 HCT116 및 간암 세포주 HepG2 모두에서 siRNA 처리 시 SCP3 단백질의 발현이 억제되었다.

[0161]

또한, 도 9에 나타난 바와 같이, SCP3를 발현하는 인간 대장암 세포주인 HCT116의 경우, 방사선 조사에 내성을 나타냈다.

[0162]

그러나, siRNA를 처리하여 SCP3의 발현을 저하시킨 경우 상기 내성효과에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군인 녹색형광단백질(GFP)의 siRNA를 처리한 인간 대장암 세포주는 방사선 조사 시 생존능에는 거의 영향을 미치지 않았으나, SCP3의 siRNA를 처리한 경우에는 선량 의존적으로 방사선 내성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0163]

<실시예 11> siRNA를 처리한 후 항암제 내성 조사

[0164]

본 발명의 SCP3 유전자의 항암제 내성을 조사하기 위해 HCT116 인간 대장암 세포주를 이용하여 항암제 내성 실험을 수행하였다. siRNA로 마우스 SCP3 표적부위 739-761의 센스 siRNA(서열번호 5)를 사용하고, 항암제 택솔을 0.625, 2.5, 10  $\mu$ M 농도로, 시클로포스파미드(Cyclophosphamide)를 1.75, 7, 28mM 농도로 각각 처리한 후 24시간 후에 MTT 시약을 첨가한 후 4시간 후 450 nm의 파장에서 ELISA를 통해 그 수치를 확인하였다.

[0165]

도 10에 나타난 바와 같이, siRNA를 처리하여 SCP3의 발현을 저하시킨 인간 대장암 세포주는 택솔 또는 시클로포스파미드에 대한 내성 효과가 유의하게 감소하였다.

[0166]

<실시예 12> 세포의 이동능 관찰

[0167]

본 발명의 SCP3 유전자의 이동능을 확인하기 위하여 SCP3를 과발현 하는 CaSki/SCP3, TC-1/SCP3, TC-1/XLR 세포주를 이용하였으며, 대조군으로 CaSki/no insert, TC-1/no insert 세포주를 이용하였다. 세포 배양용 6-웰 플레이트에 각각의 세포를  $1 \times 10^6$  개 깔아준 후, 일정한 넓이로 상처를 낸 후 6, 12, 18, 24, 30시간의 경과에 따른 상처 회복능을 관찰하였다.

[0168]

도 11 및 12에 나타난 바와 같이, SCP3 또는 XLR을 과발현하는 인간 자궁경부암 세포주 및 폐암세포주 모두 SCP3를 포함하지 않은 대조군에 비해 빠른 시간 내에 이동함을 확인하였다.

[0169]

<실시예 13> 세포의 침윤능 관찰

[0170]

본 발명의 SCP3 유전자의 침윤능을 확인하기 위하여 SCP3를 과발현 하는 CaSki/SCP3, TC-1/SCP3, TC-1/XLR 세포주를 이용하였으며, 대조군으로 CaSki/no insert, TC-1/no insert 세포주를 이용하였다. 세포의 침윤능을 확

인하기 위해서는 매트릭셀을 세포배양배지와 1:3 비율로 섞어준 후 8.0 $\mu$ m의 구멍크기를 가진 세포배양첨가막 (Cell culture insert membrane, Falcon, USA)에 50 $\mu$ l 넣고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 정치하여 굳혔다. 세포 배양 용 24-웰 플레이트에 10% FBS 배지를 500 $\mu$ l 넣고 굳힌 매트릭셀이 들어있는 세포배양첨가막을 넣어준 후 그 안에 각각의  $1 \times 10^5$  개 세포를 0.1% FBS 배지와 섞어 넣었다. 24시간 경과 후 세포막을 뚫고 나온 세포의 수를 관찰하였다.

[0171] 도 13 및 14에 나타난 바와 같이, SCP3 또는 XLR을 과발현하는 인간 자궁경부암 세포주 및 폐암세포주 모두 SCP3를 포함하지 않은 대조군에 비해 세포 침윤능이 현저히 증가함을 확인하였다.

[0172] <실시예 14> 에피토프를 이용한 면역유도 치료

[0173] 마우스 골수에서 골수세포를 분리하여 GM-CSF가 포함된 배지에서 분화시켜 골수유래의 수지상세포를 준비하였다.

[0174] 골수 유래의 수지상세포는 7주령 C57BL/6생쥐의 다리뼈에서 분리한 골수세포들을 GM-CSF와 IL-4가 포함된 배양액에서 6일간 배양하여 90% 이상 수지상세포 특이적 인자인 CD11c<sup>+</sup>를 나타내는 세포들을 골수유래의 수지상세포로 이용하였다.

[0175] 준비된 골수 유래 수지상세포에 합성된 SCP3 펩타이드를 시험관내에서 수지상세포에 감작시킨 후 50 $\mu$ l OPTI-MEM 배지(Invitrogen, MD, USA)에 현탁한 후 생쥐 각각의 발바닥에 주사하였다. C57BL/6 생쥐 (암컷, 5주령, n=5, 대한바이오링크)에 주입하여 SCP3에 대한 면역을 유도하여 주었다. 1주일 이후에 동일한 방법으로 각각의 그룹에 다시 주사한 후, 마지막 주사 후 7일 경과 시 비장세포를 적출하여 1 $\mu$ g/mL 농도의 SCP3 펩타이드(anygen, Korea)로 자극한 후, CD8<sup>+</sup>와 IFN- $\gamma$  + SCP3 특이 CD8 T 세포 반응을 형광 유세포 분석기인 BD FACS CALIBUR(BD Bioscience, USA)로 분석하였다.

#### 표 4

마우스 SCP3 특이적인 에피토프

| 표적부위    | 에피토프 부위    | 서열번호 |
|---------|------------|------|
| 96-104  | GADINKALL  | 35   |
| 206-214 | DVEKNNDNL  | 36   |
| 182-190 | SRI VQSQRM | 37   |
| 174-182 | QQQKIFQQS  | 38   |
| 131-139 | TQQEEIQKL  | 39   |
| 143-151 | YSQQFMNY   | 40   |

[0176]

[0177] 도 15에 나타난 바와 같이, SCP3 에피토프(펩타이드)를 감작시킨 수지상세포주 모두 SCP3 특이적인 면역반응을 나타냈다.

[0178] <실시예 15> 수지상세포주를 이용한 SCP3 특이적인 항암작용 확인

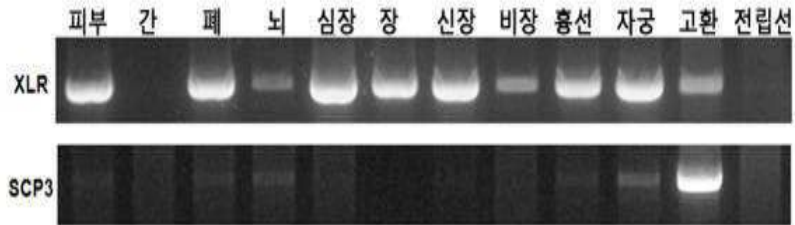
[0179] 종양세포인 TC-1/SCP3을 C57BL/6 생쥐군(암컷, 5주령, n=5, 대한바이오링크) 각각의 복부 표피에  $1 \times 10^5$  개씩 주입하고, 주입 3일 및 10일째에 SCP3 펩타이드를 감작한 수지상세포주를 한 마리당  $2 \times 10^6$  개씩 50 $\mu$ l OPTI-MEM 배지에 혼탁하여 발바닥에 주사하여 면역하였다. 각각의 생쥐에 대하여 종양체적을 종양세포 주입 3일, 10일, 13일, 16일 및 19일째에 캘리버(caliber; Mitutoyo, Japan)로 측정하여, 종양체적은 (단축 $\times$ 장축<sup>2</sup>)/2의 식으로 구하였다.

[0180] 도 16에 나타난 바와 같이, SCP3 에피토프(펩타이드)를 감작시킨 수지상세포주 모두 대조군에 비해 유의적으로

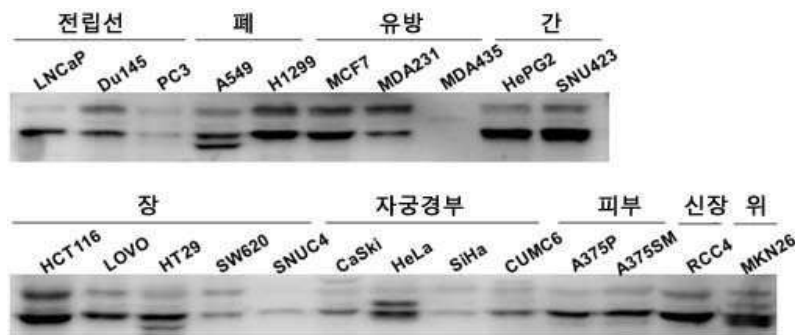
종양체적이 감소하였다.

## 도면

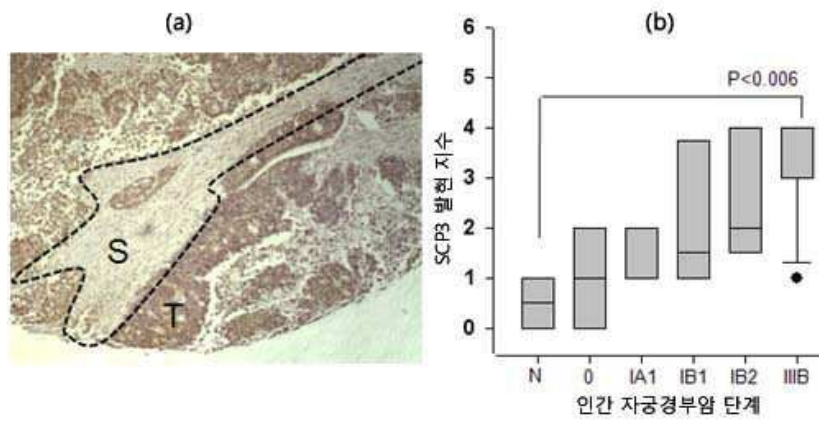
### 도면1



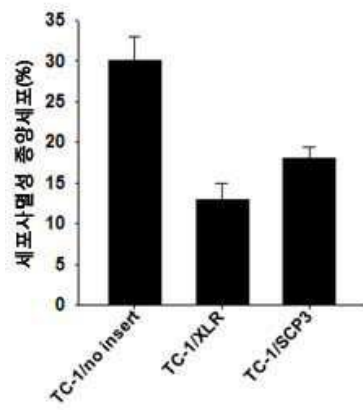
### 도면2



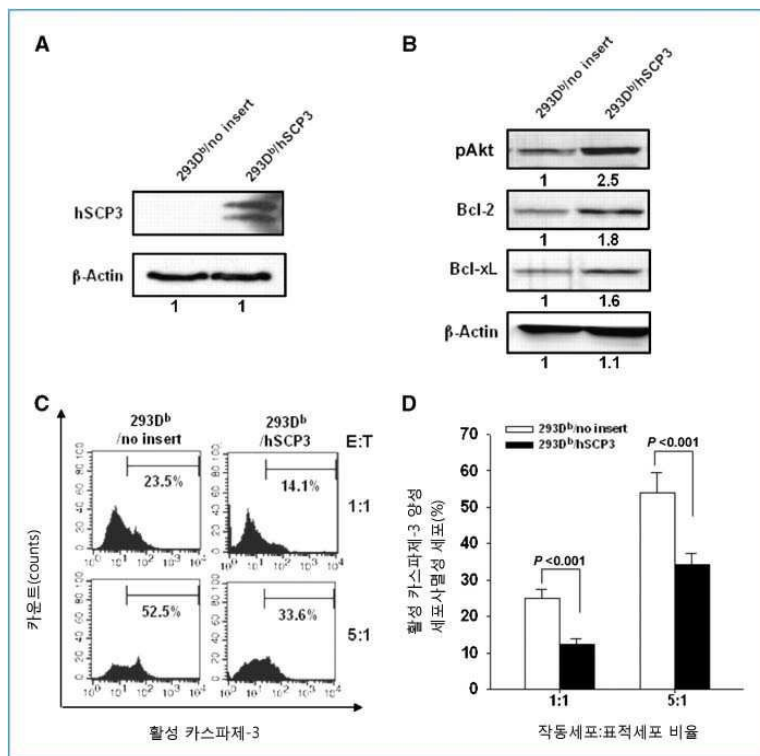
### 도면3



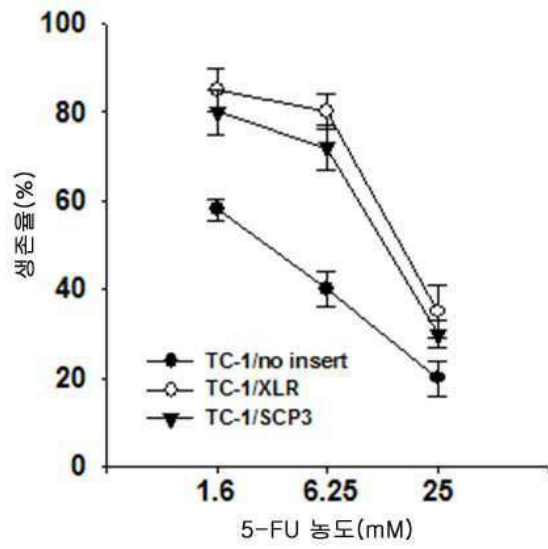
도면4



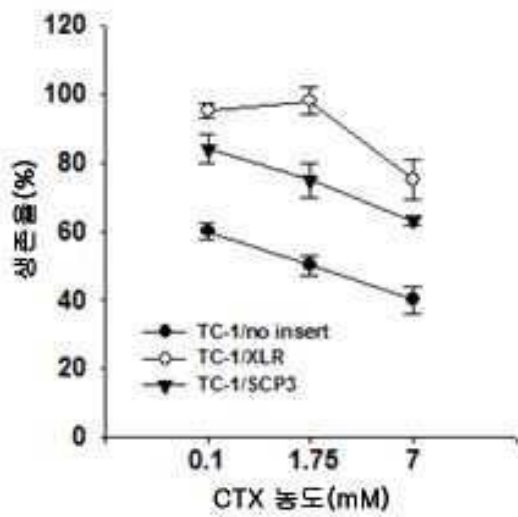
도면5



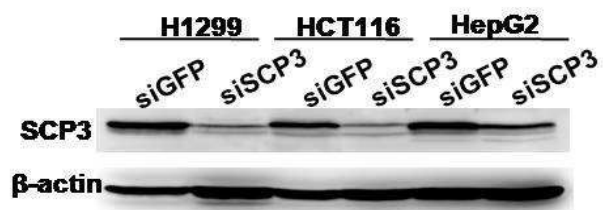
도면6



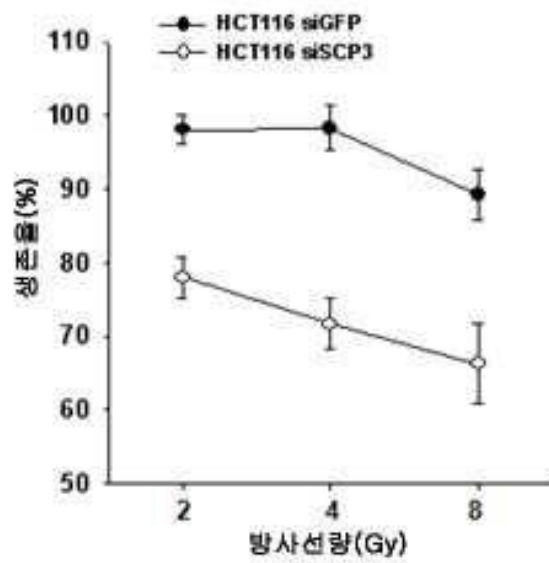
도면7



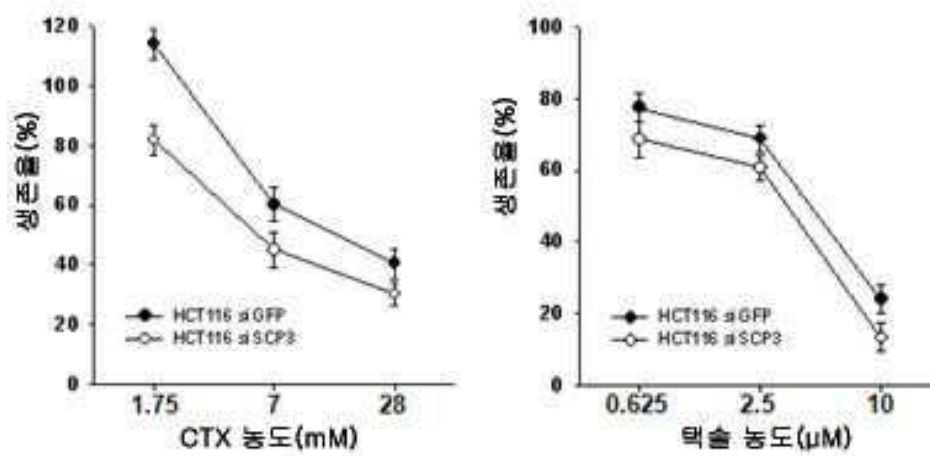
도면8



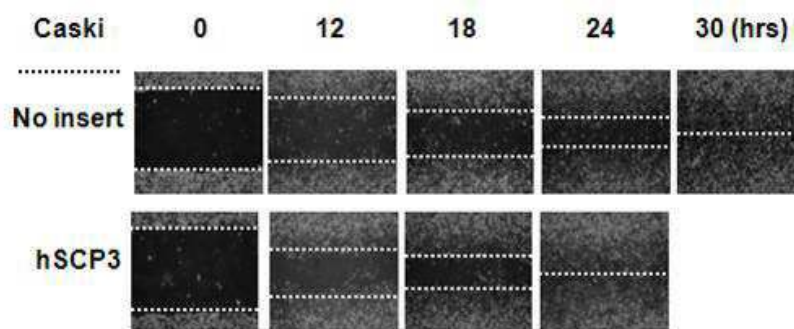
도면9



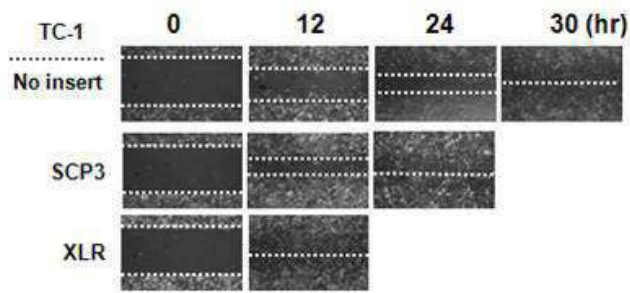
도면10



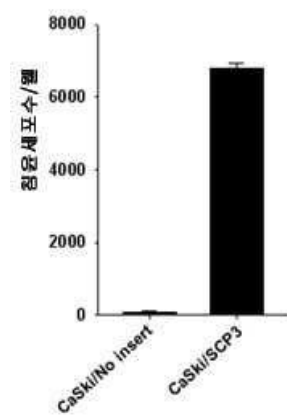
도면11



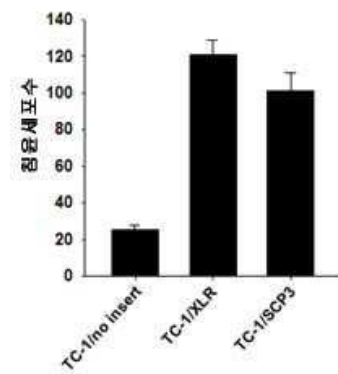
도면12



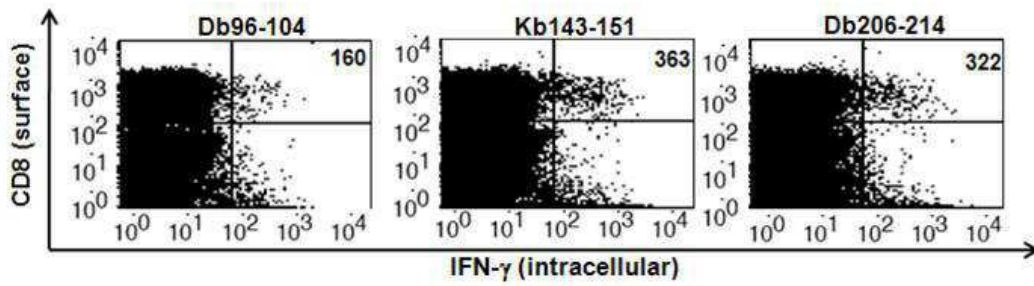
도면13



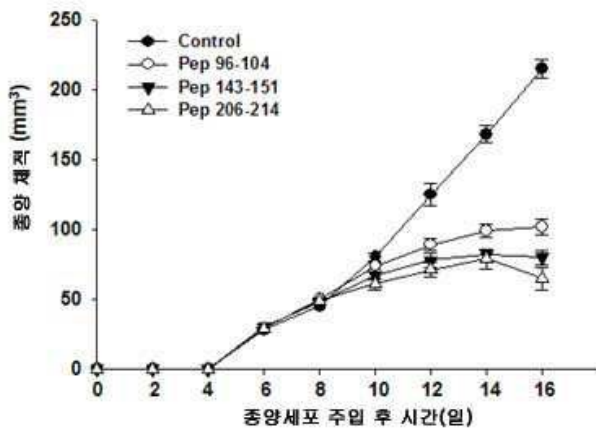
도면14



도면15



도면16



## 서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Composition for treating recurrent or resistant cancer, or metastasis
- <160> 40
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1126
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1126)
- <223> Synaptonemal complex protein 3(SCP3)
- <400> 1

ttgcctcaga agcgtcgcgg agaaggggcc acctcaggtg aagcgcgctt gtggaggagt

60

tgtggaggac gcctgtcgac gaccagtaac tggtcctcgg ccattgcggt gtgtttcagg 120

aagcatctaa atatggtgtc ctccggaaaa aagtattcca ggaaatctgg gaagccgtct 180

gtggaagatc agtttacgag agcctatgac tttagactg aagataagaa agatctgagt 240

ggatcagagg aagatgttat tgaagggaag actgcagtca ttgagaaacg taggaagaaa 300

aggtcttctg caggagtagt tgaagatatg gggggtgaag tgcagaatat gctggaagga 360

gttgagttg acattaacaa ggctcttctt gccaagagaa agagactaga aatgtatacc 420

aaggcttctc tcaaaactag taaccagaaa attgaacatg ttggaaaac acaacaagat 480

caaaggcaga agcttaacca agaataattct cagcagtttc tgactttgtt tcagcagtg 540

gatttagata tgcagaaagc tgaggaacaa gaagaaaaaa tacttaatat gtttcgacag 600

caacaaaaga ttcttcaaca atctagaatt gttagagcc agagattgaa aacaattaaa 660

cagttatatg agcagttcat aaagagtatg gaagagttgg agaagaatca tgataatcta 720

cttactggtg cacaaaatga atttaaaaaa gaaatggcta tgttgcaaaa aaaaattatg 780

atggaaactc agcagcaaga gatagcaagt gttaggaagt ctcttcaatc catgttattc 840

tgatgactct ttgaagaaag aacttgaacc taagtaatat gatacaatta taacgttagc 900

taagaagcat attgtaagtc tttagaatag ttttaattgta acatctttaa tcataaacct 960

gtttcattgt aagacctccc ttctgttaa gtcaaatcta aatagttatg agttagttag 1020

caactattcc taaagaatat gtattaagct ttcagctctt tagtaatgat agtgaatfff 1080

tctctctaac actgtcaatt aaataaagac gatttaattt taaaaa 1126

<210> 2

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(236)

<223> Synaptonemal complex protein 3(SCP3)

<400> 2

Met Val Ser Ser Gly Lys Lys Tyr Ser Arg Lys Ser Gly Lys Pro Ser

1 5 10 15

Val Glu Asp Gln Phe Thr Arg Ala Tyr Asp Phe Glu Thr Glu Asp Lys

20 25 30

Lys Asp Leu Ser Gly Ser Glu Glu Asp Val Ile Glu Gly Lys Thr Ala  
 35 40 45  
 Val Ile Glu Lys Arg Arg Lys Lys Arg Ser Ser Ala Gly Val Val Glu  
 50 55 60  
 Asp Met Gly Gly Glu Val Gln Asn Met Leu Glu Gly Val Gly Val Asp  
 65 70 75 80

Ile Asn Lys Ala Leu Leu Ala Lys Arg Lys Arg Leu Glu Met Tyr Thr  
 85 90 95  
 Lys Ala Ser Leu Lys Thr Ser Asn Gln Lys Ile Glu His Val Trp Lys  
 100 105 110  
 Thr Gln Gln Asp Gln Arg Gln Lys Leu Asn Gln Glu Tyr Ser Gln Gln  
 115 120 125  
 Phe Leu Thr Leu Phe Gln Gln Trp Asp Leu Asp Met Gln Lys Ala Glu  
 130 135 140  
 Glu Gln Glu Glu Lys Ile Leu Asn Met Phe Arg Gln Gln Gln Lys Ile

145 150 155 160  
 Leu Gln Gln Ser Arg Ile Val Gln Ser Gln Arg Leu Lys Thr Ile Lys  
 165 170 175  
 Gln Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Lys Ser Met Glu Glu Leu Glu Lys Asn  
 180 185 190  
 His Asp Asn Leu Leu Thr Gly Ala Gln Asn Glu Phe Lys Lys Glu Met  
 195 200 205  
 Ala Met Leu Gln Lys Lys Ile Met Met Glu Thr Gln Gln Gln Glu Ile  
 210 215 220

Ala Ser Val Arg Lys Ser Leu Gln Ser Met Leu Phe  
 225 230 235

<210> 3  
 <211> 627  
 <212> DNA  
 <213> Mouse  
 <220><221> gene  
 <222> (1)..(627)

<223> X-linked lymphocyte regulated protein(XLR)  
 <400> 3  
 atggaaaact gggacttgtc aagtgatgaa atgcaaatg ggaatgctcc agaattggac 60  
 gttattgaag aacataatcc agtaactcgt gatgatgaga atgcaaatcc tgaagaagta 120  
 gttggagata cagcatctcc agtacaaaat attctgggaa aatttgaagg tgacattaac 180  
 aagaggcttc acataaagag aaaacgcgatg gaaacttata tcaaagattc tttcaaagac 240  
  
 agcaacgtga aattagaaca actttggaaa acgaacaaac aagagagaaa gaagattaac 300  
 aacaaatfff gtgagcagta tataactaca tttcagaagt ttgatatgga tgtccagaaa 360  
 ttcaatgaag aacaagaaaa atcagtgaac aattatcaaa aagaacaaca agcattaaaa 420  
 ctgtccaaat gtagtcagag ccagaccctg gaagcaatta aagacatgca tgaaaactac 480  
 atggagggtc tgatgaactt ggagaccaac aactacaata tgctttttga ttagatgggt 540  
 gaactgagaa aagaaatgtc agtgttttaa aaagacctca tgaagcatag tctgaagtac 600  
 tcttctagtt tcccatcttc agactaa 627

<210> 4  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> Mouse  
 <220><221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(208)

<223> X-linked lymphocyte regulated protein(XLR)  
 <400> 4  
 Met Glu Asn Trp Asp Leu Ser Ser Asp Glu Met Gln Asp Gly Asn Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Glu Leu Asp Val Ile Glu Glu His Asn Pro Val Thr Arg Asp Asp  
 20 25 30  
 Glu Asn Ala Asn Pro Glu Glu Val Val Gly Asp Thr Arg Ser Pro Val  
 35 40 45  
  
 Gln Asn Ile Leu Gly Lys Phe Glu Gly Asp Ile Asn Lys Arg Leu His  
 50 55 60  
 Ile Lys Arg Lys Arg Met Glu Thr Tyr Ile Lys Asp Ser Phe Lys Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Asn Val Lys Leu Glu Gln Leu Trp Lys Thr Asn Lys Gln Glu Arg

85 90 95  
 Lys Lys Ile Asn Asn Lys Phe Cys Glu Gln Tyr Ile Thr Thr Phe Gln  
 100 105 110  
 Lys Phe Asp Met Asp Val Gln Lys Phe Asn Glu Glu Gln Glu Lys Ser  
 115 120 125  
 Val Asn Asn Tyr Gln Lys Glu Gln Gln Ala Leu Lys Leu Ser Lys Cys  
 130 135 140  
 Ser Gln Ser Gln Thr Leu Glu Ala Ile Lys Asp Met His Glu Asn Tyr  
 145 150 155 160  
 Met Glu Gly Leu Met Asn Leu Glu Thr Asn Asn Tyr Asn Met Leu Phe  
 165 170 175  
 Asp Val Asp Gly Glu Leu Arg Lys Glu Met Ser Val Phe Lys Lys Asp  
 180 185 190

Leu Met Lys His Thr Leu Lys Tyr Ser Ser Ser Phe Pro Ser Ser Asp  
 195 200 205

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 gene 739-761 nt specific sense siRNA  
 <400> 5

gucucuuaa uccauguuau u 21

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 gene 739-761 nt specific antisense siRNA  
 <400> 6

uucagagaag uuagguacaa u 21

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse SCP3 gene 327-349 nt specific sense siRNA

<400> 7

uagaaaugua uaccaaagcu u 21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse SCP3 gene 327-349 nt specific antisense siRNA

<400> 8

uuauuuuuac auauuuuuuc g 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse SCP3 gene 395-417 nt specific sense siRNA

<400> 9

caagaggaaa uacagaagcu u 21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse SCP3 gene 395-417 nt specific antisense siRNA

<400> 10

uuguucuccu uuauuuuuuc g 21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse SCP3 gene 418-440 nt specific sense siRNA

<400> 11

caaugaaau ucucagcau u 21

<210> 12

<211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 gene 418-440 nt specific antisense siRNA  
 <400> 12  
 uuguuacuua uaagagucgu u 21  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 gene 193-215 nt specific sense siRNA  
 <400> 13  
 ggcuccagua auugauaaa u 21  
  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 gene 193-215 nt specific antisense siRNA  
 <400> 14  
 uuccgagguc auuaacuauu u 21  
 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse XLR gene 167-189 nt specific sense siRNA  
 <400> 15  
 ggugacauua acaagaggcu u 21  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213>  
 Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SLR gene 167-189 nt specific antisense siRNA  
 <400> 16

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| uuccacugua auuguucucc g                                       | 21 |
| <210> 17                                                      |    |
| <211> 21                                                      |    |
| <212> RNA                                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                                     |    |
| <220><223> Mouse XLR gene 442-464 nt specific sense siRNA     |    |
| <400> 17                                                      |    |
| gaccucggaa gcaauuaau u                                        | 21 |
| <210> 18                                                      |    |
| <211> 21                                                      |    |
| <212> RNA                                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                                     |    |
| <220><223> Mouse XLR gene 442-464 nt specific antisense siRNA |    |
| <400> 18                                                      |    |
| uucugggacc uucguuaau u                                        | 21 |
| <210> 19                                                      |    |
| <211> 21                                                      |    |
| <212> RNA                                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                                     |    |
| <220><223> Mouse XLR gene 37-59 specific sense siRNA          |    |
| <400> 19                                                      |    |
| ugggaaugcu ccagaaugu u                                        | 21 |
| <210> 20                                                      |    |
| <211> 21                                                      |    |
| <212> RNA                                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                                     |    |
| <220><223> Mouse XLR gene 37-59 nt specific antisense siRNA   |    |
| <400> 20                                                      |    |
| uuacccuac gaggucuuaa c                                        | 21 |
| <210> 21                                                      |    |
| <211> 21                                                      |    |
| <212> RNA                                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                                     |    |

<220><223> Mouse XLR gene 502-524 nt specific sense siRNA

<400> 21

gaccaacaac uacaauaugu u 21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse XLR gene 502-524 nt specific antisense siRNA

<400> 22

uucugguugu ugauguuaua c 21

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse XLR gene 444-466 nt specific sense siRNA

<400> 23

cccuggaagc aaauaaagau u 21

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse XLR gene 444-466 nt specific antisense siRNA

<400> 24

uugggaccuu cguuaauuuc u 21

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SCP3 gene 685-707 nt specific sense siRNA

<400> 25

gucucuucac uccauguuau u 21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SCP3 gene 685-707 nt specific antisense siRNA

<400> 26

uucagagaag uuagguacaa u 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SCP3 gene 364-386 nt specific sense siRNA

<400> 27

ccaagaauau ucucagcagu u 21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SCP3 gene 364-386 nt specific antisense siRNA

<400> 28

uugguucuua uaagagucgu c 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SCP3 gene 341-363 nt specific sense siRNA

<400> 29

caagaucaaa ggcagaagcu u 21

<210> 30

<211> 21

<212>

RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens SCP3 gene 341-363 nt specific antisense siRNA

<400> 30

uuguucuagu uuccgucuuc g 21

<210> 31  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Homo sapiens SCP3 gene 355-377 nt specific sense siRNA  
 <400> 31  
 gaagcuuaac caagaauau u 21  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Homo sapiens SCP3 gene 355-377 nt specific antisense siRNA  
 <400> 32  
 uucuucgaau ugguucuuau a 21  
 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Homo sapiens SCP3 gene 224-246 nt specific sense siRNA  
 <400> 33  
 ggaguuggag uugacauuau u 21  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Homo sapiens SCP3 gene 224-246 nt specific antisense siRNA  
 <400> 34  
 uuccucaacc ucaacuguua u 21  
 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 96-104 a.a. specific epitope

<400> 35  
 Gly Ala Asp Ile Asn Lys Ala Leu Leu  
 1 5  
 <210> 36  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 206-214 a.a. specific epitope  
 <400> 36  
 Asp Val Glu Lys Asn Asn Asp Asn Leu  
 1 5  
 <210> 37  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 182-190 a.a. specific epitope  
 <400> 37  
 Ser Arg Ile Val Gln Ser Gln Arg Met  
 1 5  
 <210> 38  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 174-182 a.a. specific epitope  
 <400> 38  
 Gln Gln Gln Lys Ile Phe Gln Gln Ser  
 1 5  
 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mouse SCP3 131-139 a.a. specific epitope  
 <400> 39

Thr Gln Gln Glu Glu Ile Gln Lys Leu

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse SCP3 143-151 a.a. specific epitope

<400> 40

Tyr Ser Gln Gln Phe Met Asn Tyr

1 5