



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0112753
(43) 공개일자 2020년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
G01N 33/57438 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2020-0035271
(22) 출원일자 2020년03월23일
심사청구일자 2020년03월23일
(30) 우선권주장
1020190032863 2019년03월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
이경진
경기도 성남시 중원구 자혜로17번길 16, 104동
1204호(은행동, 현대아파트)
황신
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 6동 1407
호(신천동, 장미아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

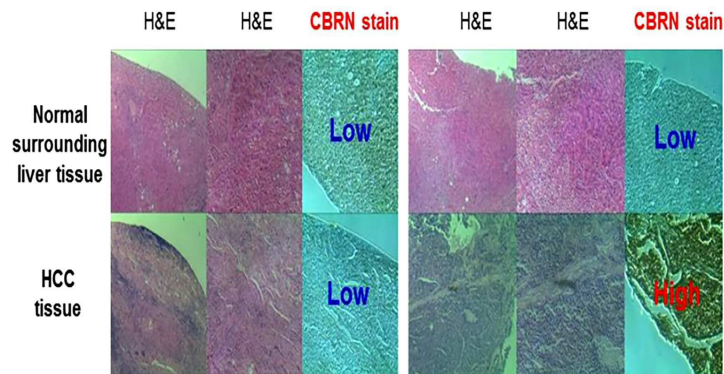
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 간세포암 진단용 바이오마커 세레브론 및 이에 특이적인 신규한 단일클론항체

(57) 요약

본 발명은 간세포암 진단용 바이오마커로서의 세레브론의 용도 및 세레브론 (Cereblon, CRBN)에 특이적인 신규한 단일클론항체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CRBN을 간세포암 진단용 바이오마커로 하여, 간세포암을 진단하거나 또는 예후를 예측하기 위한 조성물, 키트, 간세포암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법, CRBN에 특이적으로 결합하는 2종의 신규한 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포에 관한 것이다. CRBN 단백질의 발현량 차이는 간세포암 환자의 조기 진단뿐만 아니라, 종래 간세포암 예후 예측에 중요한 인자인 미세혈관 침윤 여부보다 더욱 뛰어난 예측력을 나타내어 간세포암 진단 및 간 절제 수술 후 예후를 평가하기 위한 진단 마커로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



Many HCCs show CRBN overexpression.
(~50%)

(52) CPC특허분류

G01N 2333/47 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018RID1A1A02049905
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	다발성 골수종에서 면역조절 치료제의 cereblon 의존적 항암기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교 산학협력단
연구기간	2018.05.01 ~ 2021.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NCCR-HA16C0014010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	국립암센터
연구사업명	암정복추진연구개발사업
연구과제명	다발성 골수종 치료시 세르브론 단백질발현에 따른 치료제 선별기준 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교 산학협력단
연구기간	2016.05.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체는 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체 및 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단일클론항체를 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 7

- (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 간세포암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 8

제7항에 있어서, (c) 상기 (a) 단계의 생물학적 시료에서 측정된 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 정상 개체 또는 상기 (a) 단계의 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 높은 경우, 간세포암으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 간세포암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 9

- (a) 간세포암 환자의 간세포암 조직과 이의 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 각각 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 각 시료에서 측정된 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 10

제9항에 있어서, (c) 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보

다 2배 이상 높은 경우 불량한 예후를 가지는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서, (d-1) 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 2배 이상 높은 경우 CRBN 고발현 환자군으로 분류하고, 2배 미만인 경우 CRBN 저발현 환자군으로 분류하는 단계;

(d-2) 고발현군 환자 및 저발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 각각 AFP(α -fetoprotein) 수치를 측정하는 단계; 및

(d-3) 고발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 측정된 AFP 수치가 저발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 측정된 수치보다 높은 경우 고발현군 환자군 환자가 불량한 예후를 가지는 것으로 판단하는 단계;를 추가로 포함하는, 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 12

제10항 또는 11항에 있어서, 상기 불량한 예후는 병기 II로의 진행, 미세혈관의 침윤, 누적 종양 재발을 증가 및 생존율 감소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는 것을 의미하는, 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 13

수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는, 세레브론 (CRBN)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 단일클론항체는 서열번호 3 및 서열번호 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 세레브론의 영역에 특이적으로 결합하는, 단일클론항체.

청구항 15

수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는, 세레브론(CRBN)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 단일클론항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 세레브론의 영역에 특이적으로 결합하는, 단일클론항체.

청구항 17

제13항의 단일클론항체를 생산하는 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포.

청구항 18

제15항의 단일클론항체를 생산하는 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 간세포암 진단용 바이오마커로서의 세레브론의 용도 및 세레브론 (Cereblon, CRBN)에 특이적인 신규한 단일클론항체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CRBN을 간세포암 진단용 바이오마커로 하여, 간세포암을 진단하거나 또는 예후를 예측하기 위한 조성물, 키트, 간세포암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법, CRBN에 특이적으로 결합하는 2종의 신규한 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 간세포암은 간에서 발생하는 원발성 간암으로 2014년 국가 암 등록 통계에 따르면 전체 암 중 발생률이 6위에 해당되나 5년 생존율은 32.8%에 불과하여 발생빈도 대비 사망률이 매우 높은 암이다. 특히 간염 바이러스 보균율이 높은 우리나라를 포함한 아시아권에서는 발생 빈도가 높을 뿐만 아니라, 암 발생대비 2-3위의 사망률을 나타낼 정도로 예후가 불량한 암 중의 하나로 예방과 조기 발견이 중요하다.
- [0003] 현재까지 간세포암의 절제 후 예후 판정에는 종양 크기 및 개수, 미세혈관침윤(microvascular invasion), FDG-PET CT 소견 및 종양표지자(AFP, PIVKA-II [DCP]) 등을 참조하였으나, 조기 간세포암에서는 이와 같은 종양 특성을 나타내는 인자들이 대부분 낮게 나와서 변별력이 떨어지는 심각한 한계점이 있었다.
- [0004] 국내에 진단 마커 개발을 위하여 유전체학, 단백질체학, 대사체학과 같은 오믹스를 기반으로 하는 연구가 진행 중이며, BT/IT 등을 응용한 진단 바이오칩 분야는 차세대 성장동력 사업의 일부로 추진 중이나, 아직 국내에서 개발된 바이오마커를 이용한 제품은 그리 많지 않은 실정이다. 매우 다양한 임상 경과를 보이는 간세포암에 있어 신뢰성 있는 예후 예측은 매우 중요한 역할을 할 것이다.
- [0005] 최근 여러 연구에서 세포 내 에너지 센서인 AMPK(adenosine monophosphate-activated protein kinase)의 활성 제어를 통한 항암 효과를 확인한 바 있다. AMPK는 α , β , γ 세 개의 소단위체로 이루어진 이삼합 단백질 복합체(heterotrimeric protein complex)로 당, 지질, 콜레스테롤 대사조절에 중요한 역할을 담당한다. 최근 CRL(cullin-ring ubiquitin lipase)의 기질 수용체로 알려진 세레브론(cereblon, CRBN)이 AMPK 삼합체의 α 소단위체와 직접적으로 결합하여 AMPK의 활성을 억제할 수 있다는 것이 확인되었다.
- [0006] CRBN 단백질은 뇌, 태반, 망막, 골격근, 간, 신장, 췌장, 비장, 고환, 전립선, 소장 등을 포함하는 다양한 조직에서 발견된다. 종래 CRBN에 대한 연구에 따르면 CRBN 수치를 통해 다발성 골수종과 백혈병에서 면역조절 약물들(immunomodulatory drugs)에 대한 반응을 예측할 수 있으며, 높은 CRBN 수치는 면역조절 약물들의 효과를 높이고 환자 생존과 연관이 있다고 밝혀졌다. CRBN은 내생적 AMPK의 활성을 억제하는 유일한 단백질로 밝혀져 있으며, 이를 활용하여 다른 종양에 대한 바이오마커 개발이 기대되고 있다.
- [0007] 한편, 대한민국 공개특허 제10-2014-0024914호에는 예측인자로 세레브론(CRBN)을 사용하는 암 및 염증성 질환의 치료를 위한 방법을 개시하고 있으나, CRBN-DDB1 및/또는 CRBN E3 유비퀴틴-리가아제 복합체에 직접적으로 결합하여 CRBN이 제대로 기능하지 못하도록하는(malfunction) 화합물을 이용한 치료방법만을 제시하고 있을 뿐, CRBN에 특이적으로 결합하는 단일클론항체에 대해서는 언급한 바가 없다.
- [0008] 이에 본 발명자들은, 간세포암 환자의 조직에서 CRBN 단백질의 발현을 조사하여, 연구 대상 환자에서 수술 후 간세포암의 재발과 생존을 분석하여 간세포암 조기 진단과 예후 예측을 위한 바이오마커로서 CRBN의 가능성을 평가 및 검증하였으며, 또한 CRBN에 특이적으로 결합하는 신규한 2종의 단일클론항체를 제조하여 이의 간세포암 진단 및 예후 예측 가능성을 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 CRBN을 이용한 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 CRBN을 이용한 간세포암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 CRBN에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인

항체 또는 앵타머를 포함할 수 있다.

- [0015] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 항체는 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체 및 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단일클론항체를 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명은 또한, 전술한 조성물을 포함하는 간세포암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 간세포암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0019] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계;
- [0020] (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계.
- [0021] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 간세포암 진단을 위한 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계의 생물학적 시료에서 측정된 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 정상 개체 또는 상기 (a) 단계의 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 높은 경우, 간세포암으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0023] (a) 간세포암 환자의 간세포암 조직과 이의 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 각각 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0024] (b) 상기 각 시료에서 측정된 수준을 비교하는 단계.
- [0025] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 2배 이상 높은 경우 불량한 예후를 가지는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법은 다음의 단계를 추가로 포함한다:
- [0027] (d-1) 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 2배 이상 높은 경우 CRBN 고발현 환자군으로 분류하고, 2배 미만인 경우 CRBN 저발현 환자군으로 분류하는 단계;
- [0028] (d-2) 고발현군 환자 및 저발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 각각 AFP(α -fetoprotein) 수치를 측정하는 단계; 및
- [0029] (d-3) 고발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 측정된 AFP 수치가 저발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 측정된 수치보다 높은 경우 고발현군 환자군 환자가 불량한 예후를 가지는 것으로 판단하는 단계.
- [0030] 추가로, 본 발명은 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포 및 이에 의해 생산되는, 세레브론(CRBN)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 단일클론항체는 서열번호 3 및 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 세레브론의 영역에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한, 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포 및 이에 의해 생산되는, 세레브론(CRBN)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 단일클론항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 세레브론의 영역에 특이적으로 결합할 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명의 CRBN 특이적 단일클론항체는 종래 CRBN 다중클론항체에 비해 진단적 민감도와 특이도가 현저히 향상

된 것으로서, 간세포암의 조기 진단 및 수술 후 예후를 예측하는데 효과적이다. 또한, CRBN 단백질의 발현량 차이는 간세포암 환자의 조기 진단 뿐만 아니라, 종래 간세포암 예후 예측에 중요한 인자인 미세혈관 침윤 여부보다 더욱 뛰어난 예측력을 나타내어 간세포암 진단 및 간 절제 수술 후 예후를 평가하기 위한 진단 마커로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 간세포암의 종양 세포 조직과 이의 주변부의 정상세포 조직에서 CRBN 단백질의 발현 정도를 면역조직화학법으로 확인한 사진이다.
- 도 2는 간세포암 조직(T)과 주변부 정상 조직(N)에서 CRBN 발현량을 웨스턴블랏으로 확인한 결과이다.
- 도 3은 CRBN 고발현군(초록색)과 저발현군(파란색)의 누적 종양 재발율(좌) 및 환자 생존율(우)을 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 미세혈관 침윤 여부에 따른 누적 종양 재발율(좌) 및 환자 생존율(우)을 비교하여 나타낸 그래프이다(파란색; 미세혈관 침윤이 나타나지 않은 환자군, 초록색; 미세혈관 침윤이 나타난 환자군).
- 도 5의 (A)는 세포주에 따른 CRBN 발현 정도를 비교한 웨스턴 블랏 분석, 도 3의 (B)는 세포주에 따른 MMP-9, MMP-2 발현 정도를 비교한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 siRNA를 이용하여 CRBN 유전자 발현을 억제시킨 HepG2 세포주에서 CRBN, MMP-9 및 MMP-2의 발현량을 비교한 결과이다(Scam; 대조군, #1; siRNA 처리군).
- 도 7은 HA-CRBN(pCDNA3)을 이용하여 CRBN을 활성화시킨 인체 유래 간세포암 일차 배양 세포주에서 MMP-9와 MMP-2의 발현량을 비교한 결과이다(110621; 대조군, HA-CRBN; CRBN 발현 활성화)
- 도 8은 WT 및 CRBN 녹다운 일차간세포암 세포주 (CRBN KD-HCC)를 이식한 Nude 마우스에서 종양 부피를 측정 한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 인간 CRBN 단백질 서열 중 단일클론항체 생산에 적합한 항원 펩타이드 서열을 나타낸 것으로, 마우스의 서열과 상동성을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 상술한 바와 같이, 간세포암은 사망률이 매우 높은 암으로, 예방과 조기 발견이 매우 중요하여 이를 신뢰성 있게 조기에 진단할 수 있는 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다. 이에 본 발명자들은 간세포암 조기 진단과 예후 예측을 위한 바이오마커로서 CRBN의 가능성을 평가 및 검증하였으며, 또한 CRBN에 특이적으로 결합하는 신규한 2종의 단일클론항체를 제조하여 이의 간세포암 진단 및 예후 예측 가능성을 입증함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다.
- [0037] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 간세포암 진단 또는 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 용어 "CRBN"은 "세레브론"을 지칭한다. 본 발명에서 용어, "CRBN(cereblon) 단백질"은 CRL(cullin-ring ubiquitin ligase)의 기질 수용체로서 세레브론 유전자에 변이가 나타나면 경증 정신지체가 나타난다고 알려져 있다. 또한 CRBN은 AMPK와 직접적으로 결합하여 AMPK의 활성화를 억제하는 단백질로 알려져 있으며, CRBN의 발현을 억제함으로써 AMPK를 활성화시킴으로써 대사질환을 치료할 수 있다는 점이 보고된 바 있다. 상기 CRBN 단백질은 그 종류가 특별히 제한되지는 않으나, 바람직하게는 인간 CRBN 단백질일 수 있다.
- [0039] CRBN 단백질은 CRBN 유전자에 의해 코딩되며, CRBN 단백질 및 이를 코딩하는 유전자는 진단하고자 하는 개체에서 발생할 수 있는 모든 형태의 CRBN 단백질 및 CRBN 유전자를 각각 포함한다. 구체적으로, 본 발명에서 용어 "CRBN 단백질"은 공지된 442개의 아미노산으로 이루어진 비변이 형태 또는 특정 아미노산의 치환, 삽입, 결실 등이 발생한 변이된 형태의 CRBN 단백질을 포함할 수 있고, 상기 비변이 또는 변이된 CRBN 단백질의 일부분을 포함할 수도 있다. 또한, 용어 "CRBN 유전자"는 상기 모든 형태의 CRBN 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함한다.
- [0040] CRBN에 대한 정보는 미국국립보건원의 GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 Accession Number가 BC_067811 (Gene ID: 51185)인 CRBN 단백질의 정보일 수 있다. 본 발명의 CRBN 단백질은

하기 서열번호 1의 Human CRBN(442 aa)의 아미노산 서열로 표시되는 인간 세레브론 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] [서열번호 1]
 [0042] MAGEGDDQDA AHNMGNHLPL LPAESEEDE MEVEDQDSKE AKKPNIINFD TSLPTSHTYL
 [0043] GADMEEFHGR TLHDDSCQV IPVLPQVMMI LIPGQTLPLQ LFHPQEVSMV RNLIQKDRTF
 [0044] AVLAYSNVQE REAQFGTTAE IYAYREEQDF GIEIVKVKA I GRQRFKVLEL RTQSDGIQQA
 [0045] KVQILPECVL PSTMSAVQLE SLNKCQIFPS KPVSREDQCS YKWWQKYQKR KFHCANLTSW
 [0046] PRWLYSLYDA ETLMDRIKKQ LREWENLKD DSLPSNPIDF SYRVAACLPI DDVLR IQLLK
 [0047] IGS AIQRLRC ELDIMNKCTS LCCKQCQETE ITTKNEIFSL SLCGPMAAYV NPHGYVHETL
 [0048] TVYKACNLNL IGRPSTEHSW FPGYAWTVAQ CKICASHIGW KFTATKKDMS PQKFWGLTRS
 [0049] ALLPTIPDTE DEISPDKVL CL

[0050] 본 발명에서 용어, "CRBN의 mRNA 또는 이의 단백질 발현수준을 측정하는 제제"란 본 발명의 CRBN 유전자 또는 이들 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 바람직하게는 CRBN 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드이거나, 또는 CRBN 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있다.

[0051] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 이러한 본 발명의 바이오마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 암 진단 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0052] 본 발명의 일실시예에서, 상기 키트는 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체 및 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단일클론항체를 포함하며, 이들 항체에 대한 설명은 하기 본 발명의 제4 측면에서 보다 상세히 기술하기로 한다.

[0053] 본 발명에서 용어, "앵타머"란 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.

[0054] 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정되지 아니한다. 상기 CRBN에 결합 활성을 갖는 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지의 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

[0055] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 카피를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명에서는 본 발명 마커 폴리뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 정도를 통해 간세포암의 진단 또는 예후를 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [0056] 본 발명에서 용어, "프로브(probe)"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 본 발명의 CRBN 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 간세포암의 예후를 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0058] 본 발명의 키트는 CRBN 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 이들 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현수준을 확인함으로써 간세포암의 진단 및 예후를 예측하는데 사용할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예에 따르면, CRBN 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 CRBN을 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 CRBN에 의해 코딩된 단백질의 발현수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있으며, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 키트는 본 발명에서 제공되는 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체 및/또는 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론항체를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 키트는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 추가로 포함하여 구성될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 제2 측면은 다음의 단계를 포함하는 간세포암 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다:
- [0065] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0066] (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계.
- [0067] 본 발명의 간세포암 진단을 위한 정보제공방법은, (c) 상기 (a) 단계의 생물학적 시료에서 측정된 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 정상 개체 또는 상기 (a) 단계의 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 높은 경우, 간세포암으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 용어, "mRNA 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 CRBN 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(northern blotting) 또는 DNA 칩(DNA chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 용어, "단백질 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 CRBN 유전자에서 발현된 단백질의 존

재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에서 발현된 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법(protein chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0070] 본 발명에서 용어, "생물학적 시료"란, 조직, 세포, 전혈, 담, 혈청, 혈장, 타액, 뇌, 피부, 림프절, 척수, 세포 배양 상등액, 타액, 뇨, 과열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 단일클론항체와 반응시켜 CRBN 단백질의 존재 또는 간세포암의 진단 및 예후를 예측할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 용어 "개체"란, 간세포암이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0072] 본 발명의 용어 "정상 개체"란, 간세포암이 발병하지 않았거나, 발병이 의심되지 않는 개체를 의미한다.
- [0073] 본 발명의 간세포암의 진단을 위한 정보제공방법에 있어서, 상기 CRBN 유전자의 발현수준을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다. mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법 및 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0074] 본 발명의 간세포암의 진단을 위한 정보제공방법은 본 발명에서 제공되는 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체 및/또는 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단일클론항체를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0075] 따라서, 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명은 상기 단일클론항체를 이용하여 간세포암이 의심되는 개체 또는 간세포암 수술 후 예후를 확인하고자 하는 개체의 분리된 생물학적 시료의 CRBN 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계를 포함하는, 간세포암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 간세포암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법은 본 발명의 CRBN에 특이적인 단일클론항체를 간세포암이 의심되는 개체 또는 간세포암 환자의 분리된 생물학적 시료와 반응시키고 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 CRBN 단백질을 검출할 수 있으며, 이를 통해 간세포암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보를 제공할 수 있다. CRBN는 간세포암에서 과발현되어 있으므로, 정상 세포 또는 주변 정상 조직과 같은 대조군과 발현량을 비교하여 간세포암을 진단할 수 있으며, 수술 후 예후를 예측할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명에서 용어, "항원-항체 복합체"란 시료 중의 CRBN 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 단일클론항체의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 군에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.
- [0078] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제, β -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르, 이소루미닐 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H ,

¹²⁵I, ¹²⁵I-볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.

- [0080] 바람직하게는, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법(ELISA)에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [0081] 상기 단일클론항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 이들 단일클론 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 일 구현예에서는 항원-항체 반응을 이용하여 본 발명의 단일클론항체가 CRBN을 특이적으로 인지함을 확인하였으며, 이때 상업적으로 판매되는 CRBN 다클론항체에 비하여 뛰어난 검출 능력이 있음을 확인함으로써, 본 발명의 항체는 간세포암의 진단 또는 예후 예측에 유용하게 사용할 수 있음을 입증하였다.
- [0083] 본 발명의 제3 측면은 다음의 단계를 포함하는 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다:
- [0084] (a) 간세포암 환자의 간세포암 조직과 이의 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 각각 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0085] (b) 상기 각 시료에서 측정된 수준을 비교하는 단계.
- [0086] 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 2배 이상 높은 경우 불량한 예후를 가지는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 2배 이상 높은 경우 CRBN 고발현군, 2배 미만인 경우 CRBN 저발현군으로 분류할 수 있으며, 고발현군의 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 추가의 간세포암 바이오마커의 수준을 확인함으로써 예후 예측의 정확도를 높일 수 있다.
- [0088] 이를 위해, 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법은 구체적으로 다음의 단계를 추가로 포함할 수 있다:
- [0089] d-1) 상기 (a) 단계의 간세포암 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 주변 정상 조직으로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 것보다 2배 이상 높은 경우 CRBN 고발현 환자군으로 분류하고, 2배 미만인 경우 CRBN 저발현 환자군으로 분류하는 단계;
- [0090] (d-2) 고발현군 환자 및 저발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 각각 AFP(α -fetoprotein) 수치를 측정하는 단계; 및
- [0091] (d-3) 고발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 측정된 AFP 수치가 저발현군 환자로부터 분리된 혈액에서 측정된 수치보다 높은 경우 고발현군 환자군 환자가 불량한 예후를 가지는 것으로 판단하는 단계.
- [0092] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 다수의 간세포암 환자로부터 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준 및/또는 발현 패턴을 측정하고, 측정된 값을 이들 환자의 예후와 함께 데이터베이스화한 후, 예후를 알고자 하는 환자의 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준 및/또는 발현 패턴을 상기 데이터베이스에 입력하여 예후를 예측할 수 있다. 이 경우, 발현 수준 또는 발현 패턴을 비교하기 위한 공지의 알고리즘, 통계분석 프로그램 등을 사용할 수 있다. 또한, 상기 데이터베이스는 간세포암 환자를 병리학적 병기, 치료받은 치료법 등으로 더욱 세분화될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 있어서, 상기 CRBN 유전자의 발현 수준을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다. mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법 및 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법은 상기 간세포암 진단을 위한 정보제공방법에서 설명한 바와 같다.

- [0094] 상기 분석방법들을 통하여, 예후가 알려진 간세포암 환자의 시료로부터 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현된 단백질의 발현량과 예후를 알고자 하는 환자의 시료로부터 측정된 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현된 단백질의 발현량을 비교할 수 있고, 발현량의 증감 여부를 판단하여 간세포암 환자의 예후를 예측하는데 활용할 수 있다. 즉, 발현량을 비교한 결과, 예후를 알고자 하는 환자의 샘플이 양호한 예후로 알려진 환자의 시료와 비슷한 발현량 또는 발현 패턴을 나타내었다면, 이는 양호한 예후를 가질 것이라고 예측할 수 있고, 반대로 불량한 예후로 알려진 환자의 시료와 비슷한 발현량 또는 발현 패턴을 나타내었다면, 이는 불량한 예후를 가질 것이라고 예측할 수 있다.
- [0095] 따라서, 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 의하면 간세포암 환자의 예후를 정확하게 예측할 수 있고, 예측된 예후에 따라 적절한 치료계획을 세울 수 있는 이점을 얻을 수 있다. 예컨대, 양호한 예후를 가질 것이라고 판단된 환자에 대해서는 표준 치료 또는 덜 침범적인 치료(invasive treatment) 옵션을 추구하도록 결정할 수 있고, 불량한 예후를 가질 것이라고 판단된 환자에 대해서는 상위 단계의 병기 간세포암 환자에게 사용하는 치료방법 또는 매우 공격적이거나 실험적인 치료를 추구하도록 결정할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 있어서, 용어 "양호한 예후"는 병기 II로 진행되지 않거나, 미세혈관 침윤이 일어나지 않거나, 수술 후 누적 종양 재발율이 낮거나, 수술 후 생존율이 높은 것을 의미할 수 있다. 이와 대조적으로, 용어 "불량한 예후"는 병기 II로 진행되거나, 미세혈관 침윤이 일어나거나, 수술 후 누적 종양 재발율이 높거나, 수술 후 생존율이 낮은 것을 의미할 수 있다. 용어 "예후가 알려진 간세포암 환자"는 간세포암 진단을 받은 환자 중에서 병의 진행 결과가 밝혀진 환자를 의미하며, 예컨대 간세포암으로 인한 외과 수술을 받은 후 재발하여 불량한 예후를 가진 것으로 확정된 환자 또는 외과 수술을 받은 후 재발하지 않고 생존하거나 완치되어 양호한 예후를 가진 것으로 확정된 환자 등이다. 이들 예후가 알려진 환자로부터 채취한 시료와 예후를 알고자 하는 환자로부터 채취한 시료에서 CRBN 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준 또는 발현 패턴을 획득하고, 비교함으로써 예후를 알고자 하는 환자의 예후를 정확하게 예측할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 있어서, "불량한 예후"에서 나타나는 "병기 II"로의 진행은 세계적으로 통용되고 있는 간세포암의 병기체계 중 하나인 AJCC 분류에 따른 것으로, AJCC 분류는 수술 환자의 예후 구분에 효율적인 것으로 알려져 있다 (Ueno S et al., Hepatol Res 2002;24:395-403.) 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 따라 불량한 예후로 예측된 환자는 AJCC 분류 이외에도 UICC/AJCC, Okuda 병기, CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) 병기, French 병기, CUPI (Chinese University Prognostic Index), JIS (Japan Integrated Staging) 및 BCLC (Barcelona-Clinic Liver Cancer) 병기 분류에 따라 상위 단계의 병기로의 진행을 의미할 수 있다.
- [0098] 본 발명의 간세포암의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 있어서, "AFP"는 알파태아단백질을 지칭하며, 종양표지자검사 중 혈액 (또는 혈청) AFP 측정은 가장 일반적으로 사용되고 있는 간세포암종 진단검사이다. 그러나, 간세포암은 종양학적 다양성과 간경변이 동반되는 환자 특성으로 인해 다일 바이오마커가 가지는 예후 예측 능력에는 분명한 한계가 있다고 알려져 있다.
- [0099] 본 발명자들은 CRBN 단독 및 CRBN와 AFP를 복합적으로 검출함으로써, 간세포암 진단 및 예후 예측의 정확도를 높일 수 있음을 확인하였으며 (표 3), 이에 따라 CRBN 단독 및 CRBN과 AFP의 조합을 검출함으로써 간세포암을 조기에 빠르고 정확하게 진단하고, 수술 후 간세포암 환자의 예후를 보다 정확하고 세밀하게 예측할 수 있는 방법을 제안하였다.
- [0100] 본 발명의 제4 측면은 CRBN에 특이적으로 결합하는 단일클론항체에 관한 것으로, 수탁번호 KCTC18596P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체 및/또는 수탁번호 KCTC18598P의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는, 세레브론(CRBN)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0101] 본 발명에서 용어 "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 획득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 도메인으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역(complementarity-determining region, 이하 "CDR"이라 함)이라 불리우는 3개의 다변 가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region, FR)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사

슬에 의해서 식별된다.

- [0102] 한편, 상기 단일클론항체는 인체에 적용하기 위해 면역원성을 감소시킨 키메라성 항체 또는 인간화 항체의 형태일 수 있다.
- [0103] 본 발명에서 용어, "키메라성 항체(chimeric antibody)"는 DNA 재조합 기술에 의하여 마우스 항체의 가변영역과 인간 항체의 불변영역을 재조합시킨 형태의 항체이며, 상기 키메라성 항체의 면역반응은 마우스 항체에 비하여 크게 개선되므로, 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0104] 본 발명에서 용어, "인간화 항체(humanized antibody)"는 마우스 단일클론항체의 CDR 서열의 전부 또는 일부를 인간 항체에 이식시킨 형태의 항체를 의미하며, 그 예로 마우스 단일클론항체의 CDR를 인간 항체 유래의 FR과 재조합시켜 인간화 가변영역을 제조하고 이를 바람직한 인간 항체의 불변영역과 재조합시켜 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 마우스 유래의 CDR만을 이식하는 경우 인간화 항체의 친화도가 떨어지므로 CDR의 3차원 구조에 영향을 줄 것으로 생각될 수 있는 FR 아미노산 잔기를 마우스 항체의 아미노산으로 치환시켜 친화도를 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 본 발명에서 용어, "CRBN(cereblon) 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체"는 CRBN 단백질에 결합하여 CRBN 단백질의 생물학적 활성을 억제할 수 있는 항체를 의미하며, 본 발명에서 항-CRBN 항체와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0106] 본 발명의 단일클론항체의 형태는 상기에서 설명한 바와 같이, 전체 항체 및 항체 단편을 모두 포함할 수 있으며, 키메라성 항체 또는 인간화 항체로 변형시킬 수 있다.
- [0107] CRBN 단백질은 세포 내 에너지 센서인 AMPK 삼합체 중 α 소단위와 직접적으로 결합함으로써 AMPK의 인산화(활성화)를 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 간세포암 환자에서 CRBN의 발현이 현저히 증가하는 점을 발견하고 이를 특이적으로 검출할 수 있는 단일클론항체를 제조하였다. 본 발명의 단일클론항체는 CRBN의 Pep2: C-DMEEFHGRTLHD (서열번호 3), 및/또는 Pep5: C-DRIKKQLREWENLKD (서열번호 6) 부위에 특이적으로 결합하여, CRBN의 발현량을 특이적으로 검출할 수 있으며, 특히 간세포암의 진단 또는 수술 후 예후 예측에 있어 높은 민감도 및 특이도를 가지므로 간세포암의 진단 및 예후 예측에 유용하게 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 CRBN 아미노산 Pep2: C-DMEEFHGRTLHD (63~74 aa) (서열번호 3), Pep4: C-GRQRFKVLRLTQSD (161~175aa) (서열번호 5) 부위 또는 Pep5: C-DRIKKQLREWENLKD (255~270aa) (서열번호 6) 부위를 포함하는 융합 단백질을 항원 단백질로 이용하여 본 발명의 CRBN에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제작하였다 (실시예 1).
- [0108] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 제공되는 단일클론항체는 CRBN에 특이적으로 결합할 뿐만 아니라, 상업적으로 판매되는 CRBN 다클론항체에 비하여 현저히 강한 결합력을 가짐을 확인하였다. 본 발명의 단일클론항체는 주변 정상 조직보다 간세포암 세포에서 현저하게 과발현되는 것을 확인하였으며, CRBN 발현이 억제된 간암 세포주에서 암 전이 관련 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 감소시키는 반면, CRBN 과발현 간암 세포주에서 MMP-9의 활성을 CRBN 단백질 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 나아가 CRBN 발현량에 따라 고발현군과 저발현군으로 분류하고 임상적 지표를 추적 조사한 결과 간세포암 병기의 진행 여부, 간세포암 수술에 따른 생존율, 종양 재발률을 유의미한 수준으로 예측할 수 있다는 점을 확인하였다.
- [0109] 본 발명의 제4 측면과 관련하여, 본 발명은 전술한 단일클론항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0110] 본 발명의 단일클론항체는 공지된 단일클론항체 제조기술로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일클론항체를 제조하는 방법은 면역된 동물로부터 얻은 B 림프구를 사용하여 하이브리도마를 제조함으로써 수행될 수 있거나(Koeher and Milstein, 1976, Nature, 256:495), 파아지 디스플레이(phage display) 기술을 이용함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0111] 본 발명의 단일클론항체는 당해 기술분야에서 공지된 세포융합방법에 의해 생성된 하이브리도마 세포로부터 얻을 수 있다. 일반적으로 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마 세포는 항원 단백질을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주 동물로부터의 면역세포와 암 세포주를 융합함으로써 만들어진다. 이러한 두 가지 세포의 융합은 당업계에서 공지되어 있는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol)을 이용하는 방법을 통해 융합시키고 항체 생산 세포를 표준적인 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법(limited dilution)에 의한 서브클로닝을 실시하여 균일한 세포 집단을 수득하고 난 후, 항원에 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 시험관 또는 생체 내에서 대량으로 배양한다.
- [0112] 세포 융합에 사용되는 골수종 세포로는 마우스 유래의 p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3x63

Ag8, V653, S194, 랫트 유래의 R210 등 다양한 세포주를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에서 사용된 세포주는 골수종 세포 SP-2/0이다.

- [0113] 상기의 하이브리도마 세포가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며, 또한 다양한 통상의 방법, 예를 들면 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등을 이용하여 고순도로 정제하여 사용될 수 있다.
- [0114] CRBN 단백질을 선택적으로 인식하는 단일클론을 선별하기 위하여 통상 사용되는 다양한 방법, 예를 들면, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역흡착법(ELISA), 면역형광법(Immunofluorescence), 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 및 유세포 분석법 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 의하면, 효소면역흡착법(ELISA)에 의해 단일클론을 선별한다.
- [0115] 본 발명의 단일클론항체는 당해 기술분야에서 공지된 파아지 디스플레이 방법에 의해 제조될 수 있다. 파아지 디스플레이 기술을 이용한 항체 라이브러리는 하이브리도마를 제작하지 않고 바로 B 림프구로부터 항체 유전자를 얻어 파아지 표면에 항체를 발현시키는 방법이다. 파아지 디스플레이 기술을 이용하면 B-세포 불멸화(immortalization)에 의해 단일클론항체를 생성하는데 관련된 기존의 많은 어려움이 극복될 수 있다. 일반적으로 파아지 디스플레이 기술은 1) 파아지의 외피 단백질(coat protein) pIII (또는 pIV) N-말단에 해당하는 유전자 부위에 무작위 서열의 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 삽입하는 단계; 2) 천연형의 외피 단백질 일부와 상기 무작위 서열의 올리고뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 융합 단백질을 발현시키는 단계; 3) 상기 올리고뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 결합할 수 있는 수용체 물질을 처리하는 단계; 4) 수용체에 결합된 펩티드-파아지 입자들을 낮은 pH나 결합 경쟁력 있는 분자를 이용하여 용출시키는 단계; 5) 패닝(panning)에 의하여 용출된 파아지를 숙주 세포 내에서 증폭시키는 단계; 6) 원하는 양을 얻기 위해 상기 방법을 반복하는 단계; 및 7) 패닝에 의해 선별된 파지 클론들의 DNA 서열로부터 활성이 있는 펩티드의 서열을 결정하는 단계로 구성된다.
- [0116] 바람직하게 본 발명의 단일클론항체는 하이브리도마 세포로부터 제조할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 하이브리도마 유래의 단일클론항체 또는 파아지 디스플레이 클론을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열분석될 수 있다. 그 예로, 하이브리도마 또는 파아지 주형 DNA로부터 당해 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 디자인된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용할 수 있다. 일단 상기 폴리뉴클레오타이드가 단리되면, 이를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 상기 발현 벡터를 적당한 숙주세포에 도입하여, 형질전환된 숙주세포(즉, 형질전환체)로부터 원하는 단일클론항체를 생산할 수 있다. 따라서 본 발명의 상기 단일클론항체의 제조 방법은 단일클론항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 증폭시키는 단계를 포함하는, 단일클론항체의 제조방법일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0119] 세레브론(CRBN) 항원 생산

[0120] 1-1. CRBN 서열 중 항원결정 펩타이드 선정

[0121] 서열번호 1로 표시되는 인간 CRBN 단백질 서열 중 단일클론항체 생산에 적합한 항원 펩타이드 서열을 선정하기 위해 각 서열의 친수성 및 소수성 측정을 하였다.

[0122] 그 결과 서열번호 3(PEP2), 서열번호 5(PEP4) 또는 서열번호 6(PEP5)으로 표시되는 펩타이드 서열에 대한 단일클론항체 제작 가능성이 높은 것으로 나타났다.

[0123] [서열번호 2]

[0124] Prediction 1: C-EDEMEVEDQDSKEAK (28-42aa, 16mer)

[0125] [서열번호 3]

[0126] Prediction 2: C-DMEEFHGRTLHD (63-74aa, 13mer)

- [0127] [서열번호 4]
- [0128] Prediction 3: C-EIYAYREEQDFGIE (140-153aa, 15mer)
- [0129] [서열번호 5]
- [0130] Prediction 4: C-GRQRFKVLRLTQSD (161-175aa, 16mer)
- [0131] [서열번호 6]
- [0132] Prediction 5: C-DRIKKQLREWDENLKD (255-270aa, 17mer)
- [0133] 1-2. 항원 생산
- [0134] 합성된 펩타이드는 SMCC(Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 이용하여 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)와 BSA(Bandeiraea simplicifolia agglutinin)에 접합(conjugation)시킨 후 ELISA 스크리닝하였다.

실시예 2

- [0135] 하이브리도마 세포의 제작
- [0136] 2-1. 단일클론항체 생산 세포주 제작을 위한 마우스의 면역
- [0137] 하이브리도마 세포의 제조에 필요한 면역화된 마우스를 얻기 위하여, 상기실시에 1에서 제조된 재조합 CRBN 항원 단백질 PEP2, PEP4 및 PEP5(각각 $30\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 혼합하여 인산염 완충액(phosphate buffered saline; PBS) 150 μl 에 희석하고 동일한 부피의 프로인트 완전 아주반트(complete Freund's adjuvant, Sigma)와 혼합하여 에멀전을 제조하였다. 상기 에멀전은 3주 간격으로 4차례 BALB/C(암컷, 8 주령) 마우스의 복강에 200 μl 씩 주사하였다. 4번째 면역 후 한 달 후 꼬리 정맥으로 정제된 재조합 CRBN 단백질을 투여한 3일 후에 비장을 적출하여 세포융합에 사용하였다.
- [0138] 2-2. 세포 융합
- [0139] 먼저, 세포융합을 위해 골수종 세포(myeloma cell)를 준비하였다. 골수종 세포인 SP2/0 세포를 배양하고, 세포밀도를 $2.5 \sim 5 \times 10^4 / \text{ml}$ 로 하였다. 세포융합 24시간 전에 SP2/0 세포를 1/3로 희석하여 준비하였다.
- [0140] 세포융합은 폴리에틸렌글리콜을 사용하는 일반적인 방법(Ed Harlow, David Lane: Antibodies, A laboratory manual. Cold Springs Harbor press, 1988 P139-244)에 따라 다음과 같이 실시하였다.
- [0141] 상기 실시예 2-1에서 면역화된 마우스의 혈청에서 ELISA 법으로 항체의 역가를 확인하여 항체 생성력이 있음을 확인한 후, 면역화된 마우스를 에테르로 마취시키고 몸통의 좌측에 위치한 비장세포(spleen cell)를 적출하였다. 적출한 비장에서 비장세포들(splenocytes)을 세포 스트레이너 (cell strainer) (Falcon, 미국)를 이용하여 분리하고, 1×10^8 세포/ml의 농도로 희석하였다. 1×10^7 세포/ml의 골수종(myeloma) 세포와 1ml의 PEG1500(Sigma, 미국)을 혼합하여 융합시켰다. 융합이 완료된 세포를 200ml의 HAT(Sigma, 미국) 배지에 희석시킨 후 96 웰 마이크로플레이트에 100 μl 씩 분주하고, 5% 탄산가스가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.
- [0142] 2-3. 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선별 및 클로닝
- [0143] 상기 실시예 2-2에서 제조한 융합세포군 중에서 CRBN에만 특이적으로 반응하는 융합세포들을 선별하고 항체의 생성여부를 확인하기 위하여, 효소면역방법을 이용하여 스크리닝하였다.
- [0144] 세포융합 후 8 ~ 9일째에 배지를 교환하고, 96 웰에서부터 24 웰까지 잘 자랄 때까지 cDMEM2에서 배양하였다. 배지를 교환한 후 5 ~ 7일째에 색이 변한 웰의 상층액을 거두고 cDMEM2로 채운 후 ELISA 시험을 수행하였다. ELISA 시험 후 웰을 선택하여 24 웰로 옮겨 배양하였다. 24 웰에서 배양한 후 다시 ELISA 시험을 수행하였다. 구체적으로는, 24 웰의 융합세포 농도를 확인하고, 96 웰 플레이트에 0.5 세포/웰이 되도록 15ml의 배양액에 융합세포를 희석하였다. 융합세포 희석액을 각 웰당 150 μl 씩 분주하였다. 현미경으로 검경하여 1개의 세포가 들어 있는 웰을 체크하였다. 세포가 어느 정도 자란 웰의 상층액을 거두어 ELISA 및 웨스턴 블랏으로 확인하여 1차 스크리닝을 수행하였다. 1차 스크리닝을 토대로 선택된 융합세포를 24 웰로 옮겨 배양하고 원심분리한 후 상층액을 거두어 ELISA 및 웨스턴 블랏으로 확인하여 2차 스크리닝을 수행하였다. 24 웰에서 키운 융합세포의 450 nm 흡광도(O.D 값)를 ELISA로 확인하고, 흡광도가 1이 넘는 융합세포만 선택하여 25T/C 배양 플라스크로 옮겨

배양하고 원심분리한 후 상층액을 거두어 ELISA 및 웨스턴 블랏으로 확인하여 3차 스크리닝을 수행하였다. 3차 스크리닝을 토대로 선택된 융합세포를 다시 75T/C 배양 플라스크로 옮겨 배양하고 ELISA로 흡광도를 확인하여 흡광도가 1이 넘는 융합세포만 선택하였다. 최종적으로 선택한 융합세포를 각각 1D3 및 4E11로 명명하였으며, 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 각각 2017년 08월 30일자로 기탁하였다(수탁번호: KCTC18596P (4E11), KCTC18598P(1D3)).

실시예 3

[0145] CRBN에 대한 단일클론항체의 생산 및 정제

[0146] 3-1. CRBN에 대한 단일클론항체의 생산

[0147] 상기 실시예 2에서 선택한 최종 하이브리도마 세포("1D3" 및 "4E11")로부터 CRBN에 대한 단일클론항체를 생산하기 위하여, 7 ~ 8 주령의 암컷 Balb/C 마우스 복강(abdominal cavity)에 프리스탄(pristane) 500 μ l를 주사하였다. 75T/C 배양 플라스크에서 배양한 융합세포를 수거하여 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 인산염 완충액에 넣고 피펫팅하였다. 프리스탄 투여 7 ~ 10일 후 상기 실시예 2에서 선택한 융합세포[1D3 및 4E11]를 각각 $8 \times 10^5 \sim 4 \times 10^7$ 으로 마우스의 복강 내에 주사하였다. 5 ~ 7일 후에 마우스의 복강에 복수(ascites)가 가득찼을 때 18G 주사 바늘을 이용하여 복수를 뽑았다. 복수를 4℃에서 하룻밤 두었다가 다음날 원심분리하여 노란 지방층을 포함한 덩어리 물질을 제거하고 상층액만을 분리하였다. 분리한 상층액은 분주하여 -20℃에 보관하였다.

[0148] 3-2. CRBN에 대한 단일클론항체의 정제

[0149] 저장액(20% 에탄올)에 저장되어 있는 Protein G Fast Flow Bed를 적당량 컬럼에 채우고 20% 에탄올을 흘려 내린 후, 5 Bed Volum의 결합 완충액(20 mM sodium phosphate, pH 7.0)으로 세척하였다. 복수액을 인산염 완충액으로 적당량 희석시킨 후 Protein G 컬럼에 로딩하였다. 3 Bed Volum의 결합 완충액(20 mM sodium phosphate, pH 7.0)으로 결합한 후, 3 Bed Volum의 용출 완충액(0.1 M glycine buffer, pH 3.0~2.5)으로 0.5ml씩 분획을 용출하였다. 각 분획을 35 μ l의 중화 완충액(1 M Tris-HCl, pH 9.0)으로 중화시켰다. 70% 에탄올로 냉장온도에서 하룻밤 정치시킨 후, 다시 저장액(20% 에탄올)에서 다음 번 사용시까지 냉장 보관하였다. 각 분획의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였으며, Amersham GE 컬럼으로 탈염(desalting)하였다.

[0150] 그 결과 1130 μ g의 복수액으로부터 1938 μ g의 CRBN에 대한 단일클론항체가 Protein G 컬럼을 이용하여 정제되었고, GE 컬럼을 이용하여 염이 제거된 CRBN에 대한 단일클론항체는 1309 μ g 이었다. 회수율은 11.7% 이었다.

실시예 4

[0151] 하이브리도마 세포(1D3 및 4E11)의 CRBN 항원에 대한 결합 특이성 실험 - ELISA

[0152] 본 발명의 하이브리도마 세포 (1D3 및 4E11)의 CRBN 항원 (PEP2, PEP4 및 PEP5)에 대한 결합 특이성을 확인하기 위하여, ELISA 실험을 통해 확인하였다.

[0153] 본 발명의 하이브리도마 세포 (1D3 및 4E11)의 CRBN 항원(PEP2, PEP4 및 PEP5)에 대한 결합 특이성을 ELISA를 통해 확인한 결과는 하기 [표 1]에 나타내었다.

표 1

	PEP2	PEP4	PEP5	대조군
1D3	1.511	0.062	0.229	0.068
4E11	1.270	0.091	0.827	0.079

[0155] 따라서, 본 발명의 하이브리도마 세포(1D3 및 4E11)는 모두 세레브론 유래 펩타이드와 결합반응을 한다는 점을 확인하였으며, 특히 4E11 클론은 PEP2 및 PEP5와 교차반응을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

실시예 5

[0156] 이소타이핑(isotyping)에 의한 단일클론항체의 선별

[0157] 상기 실시예 3에서 제조한 단일클론항체의 이소타입(isotype) 결정을 위해 ELISA를 실시하였다. 구체적으로, 토

끼에서 생선 된 각각의 쥐(mice)의 이소타입에 대한 정제된 항체가 탄산염 완충액(carbonate buffer, pH 9.4)로 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석한 다음 Maxisorp ELISA 플레이트(Nunc, 미국)의 각 웰 당 100 μl 씩 첨가하고, 4°C에서 16시간 반응시켜 항체를 코팅하였다. 각각의 이소타입 항체가 코팅된 각 웰에 1% BSA가 포함된 블러킹 완충용액(PBS, 0.05% Tween-20, 1% BSA, 3% 열 비활성 말 혈청)을 처리하여 37°C에서 1시간 동안 비특이적 반응을 차단하였다. 각 웰에 단일클론항체 생성 하이브리도마 세포배양액을 50 μl 씩 첨가하고, 4°C에서 1 시간 반응한 다음, 세척완충용액(PBS, 0.05% Tween-20, 0.05% BSA)으로 3회 세척하였다. 세척 후 1:1000배 희석한 HRP(Horseradish peroxidase)-축합 항-마우스 IgG+IgA+IgM 항체 (1:2000; Sigma, 미국)를 각 웰 당 100 μl 씩 첨가하고 37°C에서 1 시간 반응시킨 다음 세척 완충용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 TMB(3,3',5,5' - tetramethylbenzidine) (Sigma, 미국) 기질용액을 각 웰에 100 μl 씩 첨가하고 암소에서 30분간 반응시켜 발색한 후, 2N H₂SO₄를 처리하여 효소반응을 정지시켰다. 반응 후 ELISA 리더(Perkinelmer Victor X3)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 [표 2]에 나타내었다.

[0158] 하기 [표 2]에 나타난 바와 같이, 이소타입을 분석한 결과, 중쇄(heavy chain)의 서브클래스에 따라 분류할 수 있었으며, 4종류의 하이브리도마 세포에서 생산된 단일클론항체는 모두 IgG1/Kappa 서브클래스 이소타입이라는 것을 확인할 수 있었다.

표 2

[0159]

	1D3	4E11
IgG1	2.792	2.412
IgG2a	0.269	0.164
IgG2b	0.064	0.051
IgG3	0.080	0.058
IgA	0.090	0.065
IgM	0.226	0.107
Kappa	2.555	0.606
Lambda	0.082	0.068

실시예 6

[0160]

CRBN 발현 확인을 위한 면역조직화학법(immunohistochemistry)

[0161]

서울아산병원의 임상시험심사위원회의 승인을 받아 2009년 9월부터 2011년 12월까지 서울아산병원 외과에서 간세포암으로 수술을 받았던 환자 중 AJCC(The American Joint Committee on Cancer) 7판 병기 I과 II 에 해당하는 40명의 환자를 대상으로 서울아산병원 Bio-Resource Center 에 보관되어 있는 수술 후 간 조직 중 간세포암 조직과 주변 정상 간 조직을 각각 40건씩 이전 받아 실험에 사용하였다.

[0162]

간세포암 조직과 주변 정상 간 조직을 동결 상태에서 마이크로톰을 이용하여 5 μm 로 자른 후 실온에서 30분 동안 인산 완충액(1 M Na₂HPO₄ 77.4 ml, 1 mM Na₂HPO₄ 22.6 ml, 증류수 900 ml)에 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 슬라이드에 고정하였다. 고정된 조직을 0.5% Triton X-100(Merck, Darmstadt, Germany)에 5분 동안 투과시키고 실온에서 1시간 동안 2% NGS(normal goat serum)와 PBS(phosphate-buffered saline)에 2% NGS(normal goat serum)를 더한 용액과 배양하여 블로킹(blocking)하였다. 그 후 4°C에서 하룻밤 동안 1차 항체 (E-cadherin, 1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA and N-cadherin, 1:500, Abcam)와 배양시켰다. 1차 항체는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC, fluorescein isothiocyanate) 또는 CY3(cyanin)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 검출하였고, 2차 항체인 항-토끼(anti-rabbit, 1:500, Invitrogen) 또는 항-마우스(anti-mouse, 1:2000, Invitrogen)와 실온에서 약 1시간 동안 결합시켰다. 형광현미경(fluorescence microscope, Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 정상군과 간세포암군에서 CRBN 발현량을 비교하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0163]

도 1에 나타난 바와 같이, 간세포암 조직과 주변의 정상 조직의 냉동 절편에 실시예 3에서 생산한 CRBN 단일클론항체를 사용하여 면역조직화학법으로 확인한 결과, 정상 간 조직에 비해 간세포암 조직에서 CRBN 단백질 발현이 2배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

실시예 7

[0164] CRBN 발현 정량화를 위한 웨스턴 블랏(Western blot)

[0165] 총 단백질은 30분 동안 -20℃에서 Pro-Prep protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Boca Raton, FL, USA)에 용해하여 배양 추출하였다. 용해물은 4℃에서 5분 동안 20,217 x g로 원심분리하였다. 단백질 농도는 Standard Bradford Assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 추출한 60 μg의 단백질은 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)로 실온, 80 ~ 120 V 조건에서 전기 영동을 하였고, 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene fluoride) 막으로 4℃ 260 mA에서 90분 동안 이동시킨 후 5% 탈지유 (skim milk)로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 상기 고정시킨 세포막에 1차 항체를 추가하여 4℃

[0166] 에서 하룻밤 동안 배양하였다. 1차 항체는 다클론 CRBN 항체(polyclonal CRBN antibody, Sigma)를 5% 탈지유에 1:1000으로 희석하였고, 대조군으로서 액틴(Actin, anti-rabbit)은 5% 탈지유에 1:5000으로 희석하여 사용하였으며, 4℃에서 하룻밤 동안 배양시킨 후 1X TBST(NaCl 8.766 g/ Tris-base 1.211 g/ Tween20 500μl)로 20분간 세 번 반복 세척하였다. 2차 항체로서 항-마우스(anti-mouse)를 5% 탈지유에 1:2000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양시킨 후 1X TBST로 20분 간 세 번 반복 세척하였고, 단백질 밴드를 ECL(electrogenenerated chemiluminescent) 시약(Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용해 시각화 하였다. 적절한 밴드의 밀도는 Bio-Rad GS-670 imaging densitometer의 반사율 농도측정으로 분석하였다.

[0167] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 주변 정상 간 조직(N)에 비해 간세포암 조직(T)에서 CRBN 발현량이 더 높은 것으로 나타났다.

[0168] 웨스턴 블랏 분석에서 CRBN이 주변 간 조직에 비해 간세포암 조직에서 2배 이상으로 높게 측정되었을 때 CRBN 발현의 컷오프 값(cut-off value)으로 정의하고, CRBN 고발현 환자군과 저발현 환자군으로 분류하였다.

실시예 8

[0169] 임상자료 수집 및 유의미성 분석

[0170] 연구 대상 환자 40명에 대하여 의무기록을 후향적으로 조사하였다. 수술 당시 환자의 나이, 성별, 수술명, 수술 전 ICG 값, B형 간염표면항체 유무, 수술 전 AFP와 PIVKA를 조사하였다. 수술 후 조직 검사를 바탕으로 간경화 여부, 간세포암의 크기와 개수, 미세혈관 침윤 여부, 병기를 조사하였다. 수술 후 무병기간, 재발여부, 생존 기간 및 생존 여부를 조사하였다.

[0171] 먼저, CRBN 단백질의 발현 정도에 따른 임상 지표와 수술 후 재발 및 생존 여부를 비교하였다. 범주형 변수에 대해서는 카이-스퀘어 검정(Chi-Square test)을 사용하였고, 연속형 변수는 스튜던트 t-검정(Student's t-test)으로 비교하였다. 재발률과 생존율은 카플란-마이어 법(Kaplan-Meier method)으로 구하였고, 로그순위법(Log-rank test)으로 비교하였다. p-value 0.05이하일 때 통계적 유의성이 있다고 판정하였다.

[0172] 연구 대상 환자들의 임상 및 병리학적 특성은 하기 [표 3]에 정리하였다. 상기 실시예 7의 웨스턴 블랏 분석에서 주변 조직보다 간세포암에서 2배 이상의 CRBN이 발현된 환자(CRBN 고발현군)는 19명(47.5%)이었고, CRBN이 2배 미만으로 발현된 환자(CRBN 저발현군)는 21명(52.5%)으로 비슷하게 나타났다.

표 3

[0173] CRBN 발현량에 따른 임상병리학적 특징

	CRBN 고발현 N=19 (47.5%)	CRBN 저발현 N=21 (52.5%)	p-value	
환자의 평균 연령, y, 범위	56.3 ± 5.7	53.1 ± 7.5	0.25	
성별(남/여)	16/3	15/6	0.94	
간 경변증 발생수, n (%)	15 (78.9)	20 (95.2)	0.120	
HBsAg (+), n (%)	19 (100)	20 (95.2)	0.335	
수술 전 ICG-R15, %, 평균	15.3 ± 6.2	16.4 ± 5.4	0.692	
수술명, n (%)			0.755	

	Right hepatectomy	2 (10.5)	1 (4.8)		
	Left hepatectomy	1 (5.3)	2 (9.5)		
	Right anterior sectionectomy	5 (26.3)	4 (19)		
	Right posterior sectionectomy	4 (21.1)	8 (38.1)		
	Left lateral sectionectomy	1 (5.3)	1 (5.3)		
	Left medial sectionectomy	0 (0)	1 (4.8)		
	Partial hepatectomy	6 (31.6)	4 (19)		
종양 마커(수술 전)					
	AFP, 평균 ng/mL		929.9 ± 1595.8	198.1 ± 370.8	0.001
	PIVKA II, 평균 mAU/mL		1988.9 ± 4676.2	649.8 ± 1510.7	0.052
평균 종양 크기, cm	4.3 ± 2.3	3.6 ± 1.6	0.278		
평균 종양의 수, n	1 (100)	1 (100)			
AJCC 병기, n (%)			0.005		
	I기		13 (68.4)	21 (100)	
	II기		6 (31.6)	0 (0)	
미세혈관 침윤(+), n (%)	6 (31.6)	0 (0)	0.005		
BCLC 병기, n (%)			0.087		
	0기		0 (0)	3 (14.3)	
	A기		19 (100)	18 (85.7)	
종양 재발 횟수, n (%)	14 (73.7)	10 (47.6)	0.093		
HCC-관련 사망자 수, n (%)	10 (52.6)	4 (19)	0.026		

[0174] CRBN 고발현군과 저발현군 환자를 비교했을 때, 성별 및 수술 당시 나이, 간경화 정도, B 형 간염 표면항체, ICG-R15 값은 두 군 사이에 통계학적 차이는 없었다($p > 0.05$). 수술 후 조직 검사에서 발견된 종양의 크기는 두 군 간에 차이가 없었으나($p = 0.278$), CRBN의 발현이 높은 환자군에서 병기 II에 해당하는 환자들 유익한 수준으로 더 많이 나타났다($p = 0.005$). 간세포암 진단 마커인 AFP는 CRBN이 높게 발현된 환자에서 현저히 높게 측정되었으며(고발현군 929.9 ± 1595.8 ng/mL; 저발현군 198.1 ± 370.8 ng/mL, $p = 0.001$), PIVKA-II의 경우 CRBN 고발현 환자군에서 높게 측정되었으나 통계학적 차이를 보이지는 않았다(고발현군 1988.9 ± 4676.2 mAU/mL; 저발현군 649.8 ± 1510.7 mAU/mL, $p = 0.052$). CRBN이 낮게 발현된 환자군에서는 조직학적으로 간세포암의 미세혈관 침윤(microvascular invasion)이 발견되지 않았으나, CRBN이 높게 발현된 환자군의 31.6%에서 발견되었다($p = 0.005$).

[0175] 이로부터 간세포암 환자의 CRBN 발현 정도는 간세포암 진단 마커 AFP 발현량, AJCC 병기 II기로 진행되는지 여부, 미세혈관 침윤 여부 및 생존 여부와 유의미한 관계가 있다는 것을 알 수 있었다.

[0176] 또한, AJCC 7판 병기 I과 II에 따라 분류한 환자들의 임상병리학적 특성을 비교하여 하기 [표 4]에 정리하였다.

[0177] 간세포암 진단 마커인 AFP와 PIVKA-II 모두 병기 II 환자에서 현저히 높은 수준으로 측정되었으며($p = 0.000$), 병기 I 환자에서는 CRBN 저발현 환자(61.8%)가 더 많았으나, 병기 II 환자는 모두 CRBN 단백질 고발현군인 것으로 나타났다($p = 0.005$).

표 4

	I 기 N=34 (85%)	II 기 N=6 (15%)	p-value
환자의 평균 연령, y, 범위	55.7 ± 6.6	49.8 ± 5.8	0.466
성별 (남/여)	25/9	6/0	0.152

간 경변증, n (%)		29 (85.3)	6 (100)	0.315
HBsAg (+), n (%)		33 (97.1)	6 (100)	0.671
평균 ICG R15, %, 범위		15.8 ± 5.5	16.3 ± 7.6	0.354
수술명, n (%)				0.215
	Right hepatectomy	1 (2.9)	2 (33.3)	
	Left hepatectomy	2 (5.9)	1 (16.7)	
	Right anterior sectionectomy	8 (23.5)	1 (16.7)	
	Right posterior sectionectomy	11 (32.4)	1 (16.7)	
	Left lateral sectionectomy	2 (5.9)	0 (0)	
	Left medial sectionectomy	1 (2.9)	0 (0)	
	Partial hepatectomy	9 (26.5)	1 (16.7)	
종양 마커(수술 전)				
	AFP, 평균 ng/ml	264.4 ± 539.8	2140 ± 2296.7	0.000
	PIVKA II, 평균 mAU/mL	687.9 ± 1512.3	4674 ± 7754.1	0.000
평균 종양 크기, cm		3.7 ± 1.5	4.9 ± 3.6	0.004
평균 종양의 수, n		1 (100)	1 (100)	
CRBN 발현, n (%)				0.005
	고발현	13 (38.2)	6 (100)	
	저발현	21 (61.8)	0 (0)	
BCLC 병기, n (%)				0.449
	0기	3 (8.8)	0 (0)	
	A기	31 (91.2)	6 (100)	
종양 재발 횟수, n (%)		19 (55.9)	5 (88.3)	0.206
HCC-관련 사망자 수, n (%)		11 (32.4)	3 (50)	0.403

실시예 9

[0179] CRBN 발현량에 따른 예후 예측 가능성 분석

[0180] 상기 실시예 7에서 분류한 CRBN 고발현군과 CRBN 저발현군을 대상으로 간세포암 수술 후 누적 종양 재발율과 생존율을 비교하였다.

[0181] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, CRBN 고발현군에서 저발현군에 비해 누적 종양 재발율이 유의하게 높았고(도 3의 (A), $p = 0.017$), 환자생존율이 유의하게 낮았다(도 3의 (B), $p = 0.025$).

[0182] CRBN 단백질의 발현량 차이가 수술 후 간세포암 예후를 예측하는데 얼마나 효율적인지 확인하기 위하여, 간세포암 병기의 진행 여부를 결정하는 미세혈관 침윤 여부에 따라 간세포암 수술 후 누적 종양 재발율과 생존율을 비교하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 미세혈관 침윤 여부에 따라 누적 종양 재발율($p = 0.114$)과 환자생존율($p = 0.334$) 모두 유의미한 차이를 보이지 않았다.

[0183] 이로부터 환자의 수술 후 예후를 예측하는데 있어서 CRBN 단백질의 발현량은 병기 I, II기의 단일 간세포암을 가진 환자들에게서 전통적으로 가장 중요한 예후 인자인 미세혈관 침윤보다 더 우수한 예측력을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 10

[0184] 기존 구축된 세포주를 이용한 CRBN 단백질 발현 검증

[0185] 10-1. 세포주별 CRBN 발현량과 MMP-2, MMP-9 활성 비교

[0186] 서로 다른 간 세포에서 CRBN 발현량을 비교하기 위하여, 상기 실시예 6의 방법으로 3개의 세포주에 대한 웨스턴 블랏 분석을 하였으며, 실험 대상 세포주는 아래와 같다.

[0187] i) Chang Liver(HeLa derivative) cell line(Sigma-Aldrich): HeLa에서 유래한 정상 간세포 유사 세포주

[0188] ii) HepG2 cell line(Korean Cell Line Bank): 15세 남성의 간모세포종(hepatoblastoma)에서 얻어졌으며, 인간 간 모델을 연구하는데 가장 대표적인 세포주

- [0189] iii) Hepalclc7 cell line(CRL-2026): 마우스 유래 간암 세포주
- [0190] 그 결과 도 5의 (A)에 나타난 바와 같이, 사람의 정상 간세포주인 Chang Liver, 사람의 간모세포종 세포주인 HepG2, 마우스 간암 세포주인 Hepalclc7에서 각각 CRBN의 발현을 확인할 수 있었고, 정상 세포인 Chang Liver에서 보다 중양 세포인 HepG2와 Hepalclc7에서 CRBN 발현량이 증가하였다. 이로부터 정상 간세포보다 간암 세포에서 CRBN 발현량이 증가한다는 것을 알 수 있었고, 이는 CRBN 단백질의 발현이 세포의 암화 과정 또는 암화 진행 후 발현이 증가되었을 것으로 생각된다.
- [0191] 또한, 이들 세포주의 중양 특성을 확인하기 위하여 각 세포주에서 암 전이 관련 단백질인 MMP-2와 MMP-9의 활성 분석을 수행하였다. 그 결과 도 5의 (B)에 나타난 바와 같이, CRBN 단백질 발현량이 높았던 간세포암 세포주(HepG2, Hepalclc7)에서 암전이 관련 단백질인 MMP-9의 활성이 증가한 것을 알 수 있었다.
- [0192] 10-2. CRBN 발현량 변화에 따른 MMP-2, MMP-9 활성 변화
- [0193] CRBN의 발현량과 암 전이 단백질의 활성의 변화를 확인하기 위하여, CRBN 단백질 발현을 억제 또는 과발현 시킨 후 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 확인하였다.
- [0194] 구체적으로 siRNA CRBN(251, 제놀루션) 또는 Ha-CRBN(pCDNA 3, 제놀루션)을 이용하여, 각각 인간 간암 세포주(HepG2)와 인체 유래 간세포암 일차 배양 세포에 형질전환(transfection)시킨 후 24시간 뒤에 웨스턴 블랏 분석을 통해 CRBN 단백질의 발현량 변화를 조사하였다. 젤라틴 자이모그래피(Gelatin zymography)는 젤라틴을 함유한 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 전기영동하면 조직에 포함된 단백 분해효소에 의해 겔 내의 젤라틴이 분해되어 겔의 염색 후에는 투명한 띠로 남게 되는 현상을 이용한 기법으로, MMP-2 및 MMP-9의 경우 72 kDa와 95 kDa를 동시에 겔 상에서 확인할 수 있기 때문에 MMP-2 및 MMP-9의 활성화 여부를 쉽게 확인할 수 있다. 1% 젤라틴(Sigma, USA)이 포함된 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(8×10 cm)을 만들고, 대조군과 함께 시료 10 μ l에 3× 로딩 버퍼[pH 6.8, 62 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.05% bromphenol blue] 5 μ l를 혼합한 시료 15 μ l를 겔에 적재하고 Vertical Electrophoresis Unit(Hoefer, USA)에서 100 V로 4시간 동안 전기영동 하였다. 겔을 2.5% Triton X-100 용액으로 30분간 2회 세척한 뒤, 콜라게나제 버퍼[50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 1% Triton X-100]를 넣고 37℃ 진탕기에 두고 반응시켰다. 24시간 후, 겔을 2.5% Triton X-100 용액으로 1회 세척한 뒤, 쿠마시 블루(Coomassie Blue) 용액[1% Coomassie brilliant blue R250, 30% methanol, 10% acetic acid]으로 2시간 염색하고, 탈색용액[30% methanol, 10% acetic acid]으로 30분간 2회 탈색시켜 겔을 관찰하였다.
- [0195] 그 결과, 인간의 간모세포종 세포주인 HepG2에 siRNA CRBN을 처리하여 CRBN의 발현을 저해하였을 때(도 6의 (A)), 암전이 효소인 MMP-2 및 MMP-9의 활성이 감소하였다(도 6의 (B)). 이는 간암세포주에서 CRBN 단백질이 간세포암 전이 관련 단백질인 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 조절한다는 것을 의미한다.
- [0196] 반대로, 인체 유래 간세포암으로부터 분리한 일차 배양 세포에 HA-CRBN(pCDNA 3)을 도입하여 CRBN 단백을 과발현시킨 경우(도 7의 (A)), CRBN 발현량의 증가에 따라 MMP-9의 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 한편, MMP-2는 CRBN 과발현 여부와 관련 없이 유의성 있는 증가를 확인할 수 없었다(도 7의 (B)).
- [0197] 이러한 결과를 종합해 볼 때, 정상 혹은 간암세포주 및 일차배양 암세포 생체 외(*in vitro*) 실험에서 정상 간세포에 비하여, 간암세포에서 CRBN 단백질이 발현이 유의성 있게 증가하였고, 이렇게 증가한 CRBN 단백질이 암전이 관련 MMP-9의 활성 조절에 관여한다는 것을 알 수 있다.

실시예 11

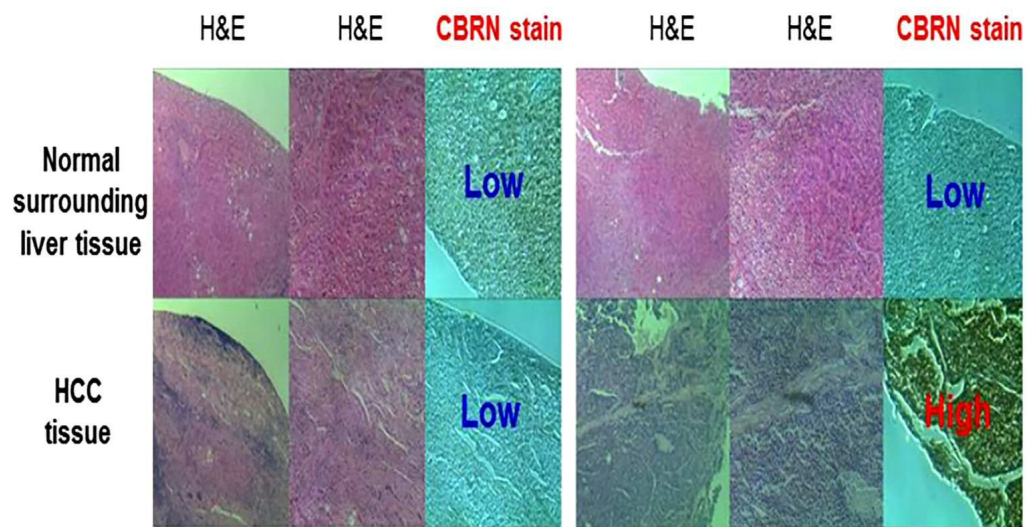
- [0198] CRBN 킥다운 (Knock down) 일차간세포암 세포주를 이용한 중양 성장의 확인
- [0199] 생체 내 (*in vivo*)에서 CRBN 발현에 따른 중양 성장의 변화를 확인하기 위해, shRNA CRBN(251, 제놀루션)을 이용하여, CRBN이 킥다운된, 일차 간세포암 세포주 (CRBN KD-HCC)를 확립하였고, 이러한 간세포암 세포주를 Nude 마우스에 이식한 후 CRBN WT-HCC를 이식한 마우스와 비교 관찰하였다.
- [0200] 도 8에 나타난 바와 같이, CRBN KD-HCC를 이식한 마우스에서의 중양 부피가 CRBN WT-HCC를 이식한 마우스에서의 중양 부피보다 유의적으로 감소된 것을 확인하였으며, 이러한 결과를 통해 CRBN의 발현이 중양 성장에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

[0202] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 [0203] 수탁번호 : KCTC18596P
 [0204] 수탁일자 : 20170830

[0206] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 [0207] 수탁번호 : KCTC18598P
 [0208] 수탁일자 : 20170830

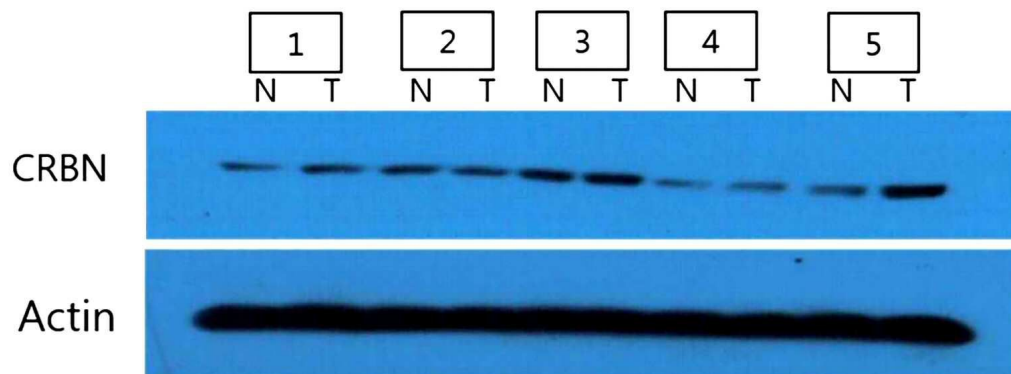
도면

도면1

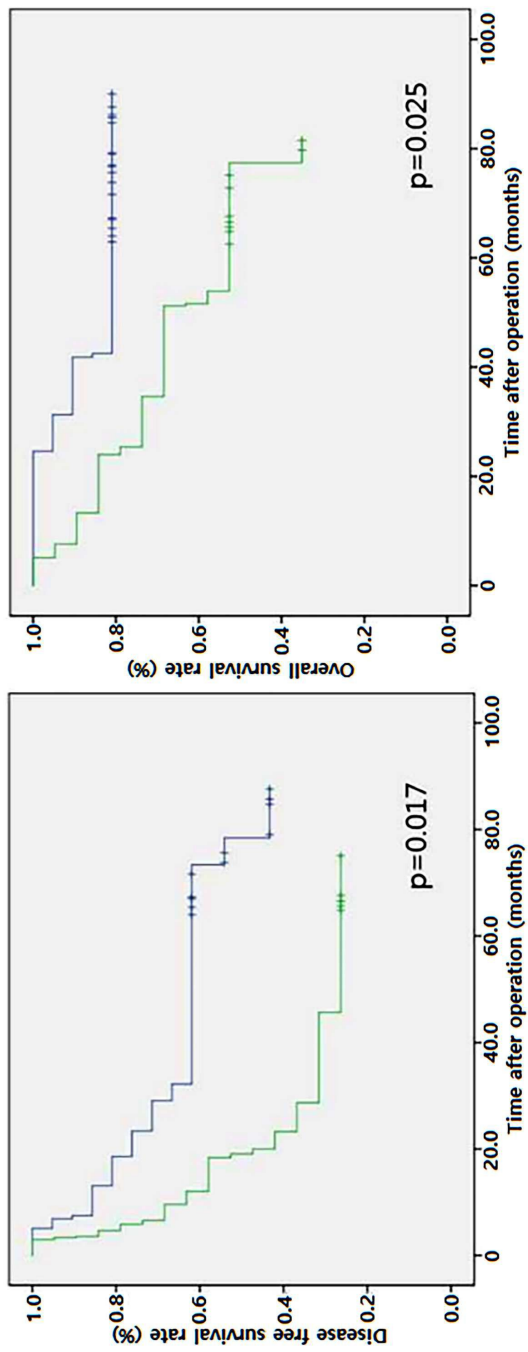


**Many HCCs show CRBN overexpression.
 (~50%)**

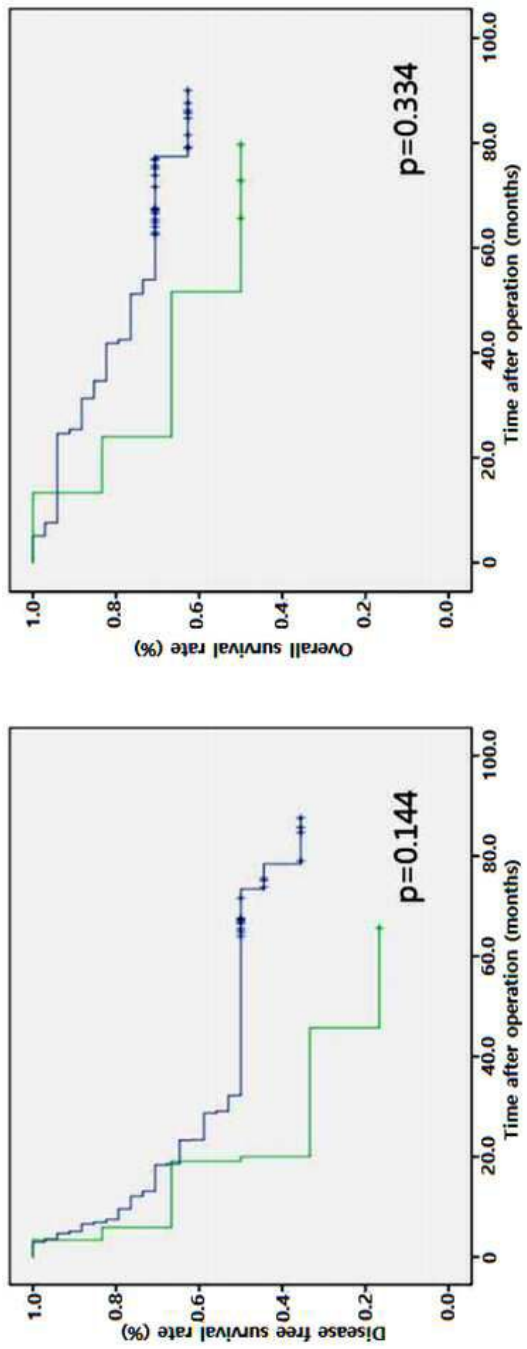
도면2



도면3

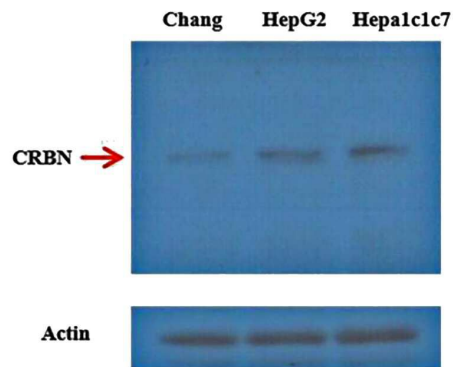


도면4

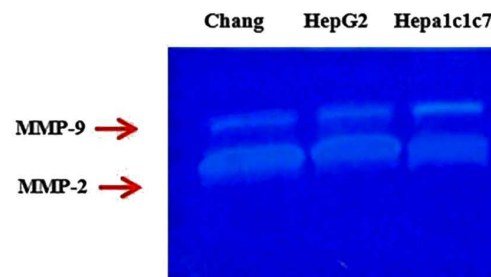


도면5

(A)

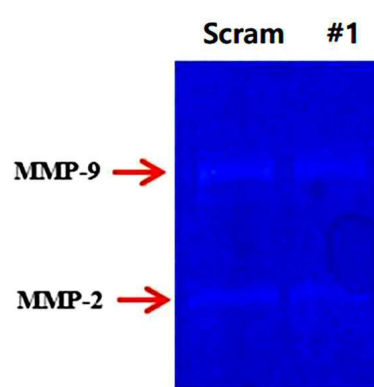
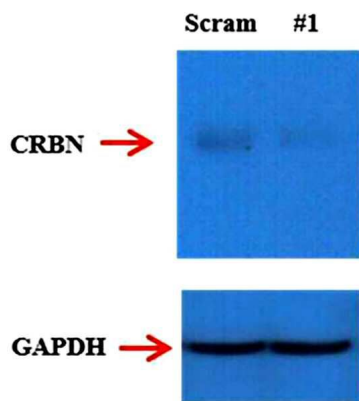


(B)

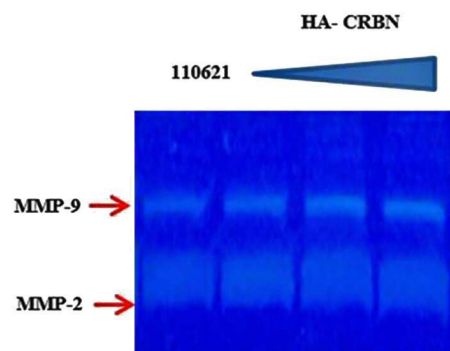
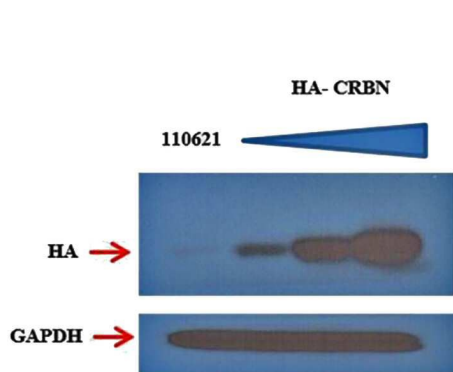


도면6

HepG2

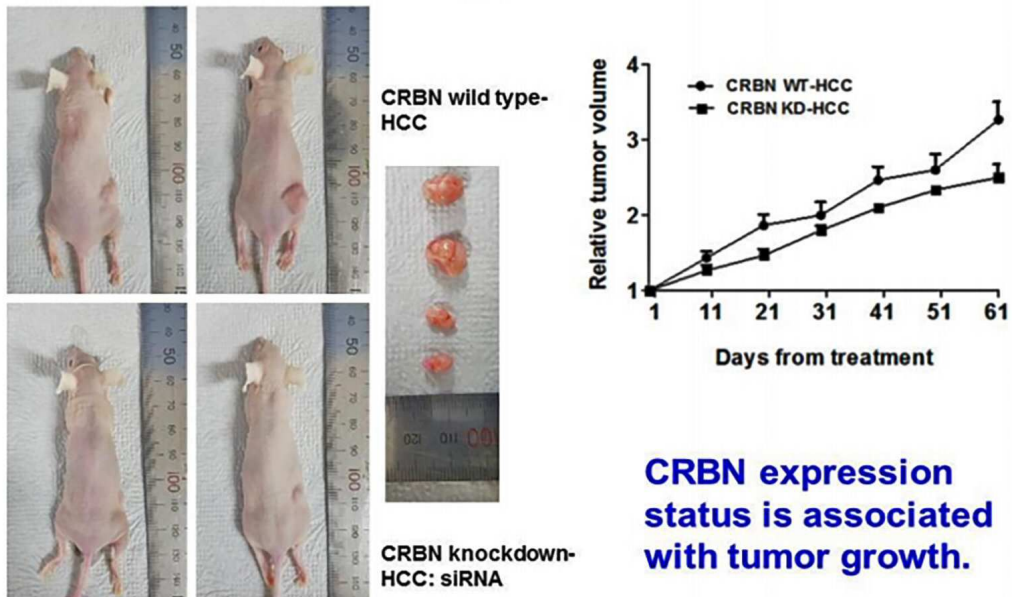


도면7



도면8

In vivo study with nude mouse



도면9

1	Human	MAGEGQQDA AHIMGHPL LPASEED--EIMEVEDDD SKEAKIPNII NFDISLPTSH TYLGDMEEF HGRTLHDDSS	80
	Mouse	MAGEGQQDA AHIMGHPL LPADSEDD EIMEVEDDD SKEAKIPNII NFDISLPTSH TYLGDMEEF HGRTLHDDSS	
		Prediction 1	
81	Human	COVIPVLPOV MUILPGOTL PLOLFHPQEV SMVRNLIQKD RTFAVLAYSN VOEREADQFGT TAEIVAYREE QDFGIEVKV	160
	Mouse	COVIPVLPEV MUILPGOTL PLOLSHPQEV SMVRNLIQKD RTFAVLAYSN VOEREADQFGT TAEIVAYREE QDFGIEVKV	
		Prediction 3	
161	Human	KAI BRQRFKV LELRTQSDQI QOAKVGI LPE QVLPSTMSAV QLESINKCOI FPSKPVSRD QCSYKWNQKY QKPKFHCANL	240
	Mouse	KAI BRQRFKV LELRTQSDQI QOAKVGI LPE QVLPSTMSAV QLESINKCOV FPSKPI SWED QYSCXWNQKY QKPKFHCANL	
		Prediction 4	
241	Human	TSWPRWLYSL YDAETLMRI KKQLREWDEN LKQSLPSNP IDFSYRVAAC LPIDDLRLQ LKIGSAIOR LRCELDIMNK	320
	Mouse	TSWPRWLYSL YDAETLMRI KKQLREWDEN LKQSLPENP IDFSYRVAAC LPIDDLRLQ LKIGSAIOR LRCELDIMNK	
		Prediction 5	
321	Human	CTSLGGKQCC ETEITTKNEI FSLSLGGPMA AYVNPBGVYH ETLTVYKACH LNLIGRPSTE HSWFPGYAWT VAGCKIGASH	400
	Mouse	CTSLGGKQCC ETEITTKNEI FSLSLGGPMA AYVNPBGVYH ETLTVYKASN LNLIGRPSTV HSWFPGYAWT IAOCKIGASH	
401	Human	IGWKFATKK DMSPQKFWGL TRSALLPTIP DTEDEISPK VILQL	445
	Mouse	IGWKFATKK DMSPQKFWGL TRSALLPTIP ETEDEISPK VILQL	

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

THE ASAN FOUNDATION

<120> Biomarker for diagnosing hepatocellular carcinoma, Cereblon and novel monoclonal antibody specific to the same

<130> 1067300

<150> 10-2019-0032863

<151> 2019-03-22

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human CRBN

<400> 1

Met Ala Gly Glu Gly Asp Gln Gln Asp Ala Ala His Asn Met Gly Asn

1 5 10 15

His Leu Pro Leu Leu Pro Ala Glu Ser Glu Glu Glu Asp Glu Met Glu

20 25 30

Val Glu Asp Gln Asp Ser Lys Glu Ala Lys Lys Pro Asn Ile Ile Asn

35 40 45

Phe Asp Thr Ser Leu Pro Thr Ser His Thr Tyr Leu Gly Ala Asp Met

50 55 60

Glu Glu Phe His Gly Arg Thr Leu His Asp Asp Asp Ser Cys Gln Val

65 70 75 80

Ile Pro Val Leu Pro Gln Val Met Met Ile Leu Ile Pro Gly Gln Thr

85 90 95

Leu Pro Leu Gln Leu Phe His Pro Gln Glu Val Ser Met Val Arg Asn

100 105 110

Leu Ile Gln Lys Asp Arg Thr Phe Ala Val Leu Ala Tyr Ser Asn Val

115 120 125

Gln Glu Arg Glu Ala Gln Phe Gly Thr Thr Ala Glu Ile Tyr Ala Tyr

130 135 140

Arg Glu Glu Gln Asp Phe Gly Ile Glu Ile Val Lys Val Lys Ala Ile

145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Phe Lys Val Leu Glu Leu Arg Thr Gln Ser Asp Gly

165 170 175

Ile Gln Gln Ala Lys Val Gln Ile Leu Pro Glu Cys Val Leu Pro Ser

180 185 190
 Thr Met Ser Ala Val Gln Leu Glu Ser Leu Asn Lys Cys Gln Ile Phe

 195 200 205
 Pro Ser Lys Pro Val Ser Arg Glu Asp Gln Cys Ser Tyr Lys Trp Trp
 210 215 220
 Gln Lys Tyr Gln Lys Arg Lys Phe His Cys Ala Asn Leu Thr Ser Trp
 225 230 235 240
 Pro Arg Trp Leu Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Glu Thr Leu Met Asp Arg
 245 250 255
 Ile Lys Lys Gln Leu Arg Glu Trp Asp Glu Asn Leu Lys Asp Asp Ser

 260 265 270
 Leu Pro Ser Asn Pro Ile Asp Phe Ser Tyr Arg Val Ala Ala Cys Leu
 275 280 285
 Pro Ile Asp Asp Val Leu Arg Ile Gln Leu Leu Lys Ile Gly Ser Ala
 290 295 300
 Ile Gln Arg Leu Arg Cys Glu Leu Asp Ile Met Asn Lys Cys Thr Ser
 305 310 315 320
 Leu Cys Cys Lys Gln Cys Gln Glu Thr Glu Ile Thr Thr Lys Asn Glu

 325 330 335
 Ile Phe Ser Leu Ser Leu Cys Gly Pro Met Ala Ala Tyr Val Asn Pro
 340 345 350
 His Gly Tyr Val His Glu Thr Leu Thr Val Tyr Lys Ala Cys Asn Leu
 355 360 365
 Asn Leu Ile Gly Arg Pro Ser Thr Glu His Ser Trp Phe Pro Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Trp Thr Val Ala Gln Cys Lys Ile Cys Ala Ser His Ile Gly Trp

 385 390 395 400
 Lys Phe Thr Ala Thr Lys Lys Asp Met Ser Pro Gln Lys Phe Trp Gly
 405 410 415
 Leu Thr Arg Ser Ala Leu Leu Pro Thr Ile Pro Asp Thr Glu Asp Glu
 420 425 430

Ile Ser Pro Asp Lys Val Ile Leu Cys Leu

435

440

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PEP 1

<400> 2

Cys Glu Asp Glu Met Glu Val Glu Asp Gln Asp Ser Lys Glu Ala Lys

1

5

10

15

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PEP2

<400> 3

Cys Asp Met Glu Glu Phe His Gly Arg Thr Leu His Asp

1

5

10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PEP3

<400> 4

Cys Glu Ile Tyr Ala Tyr Arg Glu Glu Gln Asp Phe Gly Ile Glu

1

5

10

15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213>

> Artificial

<220><223> PEP4

<400> 5

Cys Gly Arg Gln Arg Phe Lys Val Leu Glu Leu Arg Thr Gln Ser Asp

1 5 10 15

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PEP5

<400> 6

Cys Asp Arg Ile Lys Lys Gln Leu Arg Glu Trp Asp Glu Asn Leu Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 7

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mouse CRBN

<400> 7

Met Ala Gly Glu Gly Asp Gln Gln Asp Ala Ala His Asn Met Gly Asn

1 5 10 15

His Leu Pro Leu Leu Pro Ala Asp Ser Glu Asp Glu Asp Asp Glu Ile

20 25 30

Glu Met Glu Val Glu Asp Gln Asp Ser Lys Glu Ala Arg Lys Pro Asn

35 40 45

Ile Ile Asn Phe Asp Thr Ser Leu Pro Thr Ser His Thr Tyr Leu Gly

50 55 60

Ala Asp Met Glu Glu Phe His Gly Arg Thr Leu His Asp Asp Asp Ser

65 70 75 80

Cys Gln Val Ile Pro Val Leu Pro Glu Val Leu Met Ile Leu Ile Pro

85 90 95

Gly Gln Thr Leu Pro Leu Gln Leu Ser His Pro Gln Glu Val Ser Met

100 105 110

Val Arg Asn Leu Ile Gln Lys Asp Arg Thr Phe Ala Val Leu Ala Tyr

115 120 125

Ser Asn Val Gln Glu Arg Glu Ala Gln Phe Gly Thr Thr Ala Glu Ile

130 135 140

Tyr Ala Tyr Arg Glu Glu Gln Glu Phe Gly Ile Glu Val Val Lys Val

145 150 155 160

Lys Ala Ile Gly Arg Gln Arg Phe Lys Val Leu Glu Leu Arg Thr Gln

165 170 175

Ser Asp Gly Ile Gln Gln Ala Lys Val Gln Ile Leu Pro Glu Cys Val

180 185 190

Leu Pro Ser Thr Met Ser Ala Val Gln Leu Glu Ser Leu Asn Lys Cys

195 200 205

Gln Val Phe Pro Ser Lys Pro Ile Ser Trp Glu Asp Gln Tyr Ser Cys

210 215 220

Lys Trp Trp Gln Lys Tyr Gln Lys Arg Lys Phe His Cys Ala Asn Leu

225 230 235 240

Thr Ser Trp Pro Arg Trp Leu Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Glu Thr Leu

245 250 255

Met Asp Arg Ile Lys Lys Gln Leu Arg Glu Trp Asp Glu Asn Leu Lys

260 265 270

Asp Asp Ser Leu Pro Glu Asn Pro Ile Asp Phe Ser Tyr Arg Val Ala

275 280 285

Ala Cys Leu Pro Ile Asp Asp Val Leu Arg Ile Gln Leu Leu Lys Ile

290 295 300

Gly Ser Ala Ile Gln Arg Leu Arg Cys Glu Leu Asp Ile Met Asn Lys

305 310 315 320

Cys Thr Ser Leu Cys Cys Lys Gln Cys Gln Glu Thr Glu Ile Thr Thr

325 330 335

Lys Asn Glu Ile Phe Ser Leu Ser Leu Cys Gly Pro Met Ala Ala Tyr

340 345 350

Val Asn Pro His Gly Tyr Val His Glu Thr Leu Thr Val Tyr Lys Ala

355 360 365

Ser Asn Leu Asn Leu Ile Gly Arg Pro Ser Thr Val His Ser Trp Phe

370 375 380
 Pro Gly Tyr Ala Trp Thr Ile Ala Gln Cys Lys Ile Cys Ala Ser His

 385 390 395 400
 Ile Gly Trp Lys Phe Thr Ala Thr Lys Lys Asp Met Ser Pro Gln Lys

 405 410 415
 Phe Trp Gly Leu Thr Arg Ser Ala Leu Leu Pro Thr Ile Pro Glu Thr

 420 425 430
 Glu Asp Glu Ile Ser Pro Asp Lys Val Ile Leu Cys Leu

 435 440 445