



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월07일
(11) 등록번호 10-2237463
(24) 등록일자 2021년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A23L 33/17 (2016.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0112830(분할)
(22) 출원일자 2017년09월04일
심사청구일자 2020년08월10일
(65) 공개번호 10-2017-0104424
(43) 공개일자 2017년09월15일
(62) 원출원 특허 10-2015-0114771
원출원일자 2015년08월13일
심사청구일자 2015년08월13일

(30) 우선권주장
1020140105989 2014년08월14일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
Yutaka Shoji, et al., Gynecol Obstetric.
2011, Vol.1(1) (2011.11.18. 공개)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자
김세미
대전광역시 유성구 과학로 125
이윤희
대전광역시 유성구 과학로 125
김솔비
대전광역시 유성구 과학로 125

(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 11 항

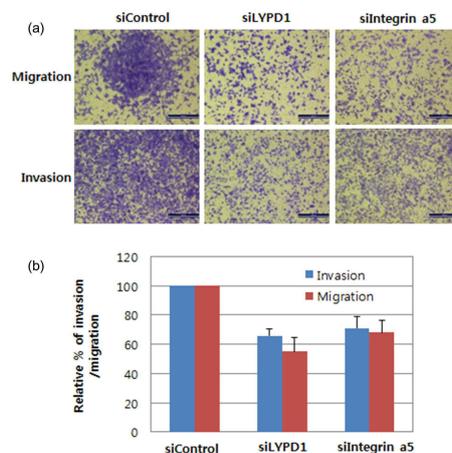
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **암 진단 또는 치료 표적으로서 LYPD1의 용도**

(57) 요약

본 발명은 LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, LYPD1 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물, 상기 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트, 및 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하여 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 또는 암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A23L 33/17 (2016.08)
- A61K 39/395 (2013.01)
- C12Q 1/6886 (2018.05)
- G01N 33/57419 (2013.01)
- G01N 33/57434 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI13C1465
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	암 전이인자 TMPRSS4의 혈액 바이오마커 유용성 검증 및 진단기법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 대장암 또는 전립선암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 유전자의 발현 억제제는 LYPD1 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 microRNA로 구성된 군으로부터 선택되고,

상기 단백질의 활성 억제제는 LYPD1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 대장암 또는 전립선암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 LYPD1 유전자의 발현 억제제는 서열번호 2 내지 5로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 서열과 결합하는 것인 약학적 조성물.

청구항 3

LYPD1 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 대장암 또는 전립선암의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서,

상기 유전자의 발현 억제제는 LYPD1 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 microRNA로 구성된 군으로부터 선택되고,

상기 단백질의 활성 억제제는 LYPD1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 대장암 또는 전립선암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 4

대장 세포 또는 전립선 세포에서 LYPD1 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장암 또는 전립선암 진단용 조성물로서,

상기 유전자 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 LYPD1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이고,

상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 LYPD1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 대장암 또는 전립선암 진단용 조성물.

청구항 5

제4항의 조성물을 포함하는 대장암 또는 전립선암 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 대장암 또는 전립선암 진단용 키트.

청구항 7

(a) 대장암 또는 전립선암이 의심되는 개체의 분리된 시료로부터 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군 시료의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준보다 높은지 여부를 비교하는 단계를 포함하는, 대장암 또는 전립선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로, 분리된 시료가 대장 세포 또는 전립선 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 LYPD1 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계는 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩에 의하여 측정되는 것인, 대장암 또는 전립선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 LYPD1 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 단계는 상기 LYPD1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하는 것인, 대장암 또는 전립선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 LYPD1 유전자의 단백질의 수준을 측정하는 단계는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것인, 대장암 또는 전립선암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

(a) 대장암 또는 전립선암 치료용 후보물질을 LYPD1 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 후보물질을 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우 대장암 또는 전립선암 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 대장암 또는 전립선암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, LYPD1 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물, 상기 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트, 및 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하여 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 또는 암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은, 세포주기가 조절되지 않아 세포분열을 계속하는 질병으로, 폐암, 식도암, 자궁암, 유방암, 대장암, 전립선암 등이 있다. 그 중 대장암은, 병리학적으로는 대부분이 선암(adenocarcinoma)이며, 부위별로는 크게 결장암

과 직장암으로 구분된다. 부위별 발생 빈도는 하부 대장, 즉 직장에서 발생하는 경우가 약 50%로 가장 높다. 대장암은 미국 및 유럽 등지에서 암 관련 사망의 두 번째 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(American Cancer Society statics for 2009). 또한, 대장암의 치료는 외과적 절제술을 근간으로 항암화학요법 및 방사선요법이 병행되고 있다. 이러한 수술적 요법, 항암화학요법 및 방사선요법 등의 진보에도 불구하고, 특정한 증상이 없이 진행되는 대장암의 특성으로 인하여 다른 장기로 전이된 후 진단되는 경우가 빈번하여, 수술 시점을 놓침으로써 높은 사망율을 나타내고 있다. 따라서 이러한 이유로 대장암의 효과적인 진단 및 치료 표적의 개발이 요구되고 있는 상황이다.

[0004] 또한, 전립선암은 전립선에서 발생하는 악성 종양(malignant tumor)으로, 서양의 경우 남성암 중 가장 흔한 암으로서 높은 발생 빈도를 보인다. 그러나 전립선암은 특이한 증상이 없어 조기 발견이 어려우므로, 암 조직이 커지면서 배뇨에 지장을 받거나, 전립선암이 뼈 등의 다른 장기로 전이되어 골 동통 등의 증상이 나타난 후에야 병원을 찾는 경우가 많다. 따라서 이러한 이유로 전립선암의 효과적인 진단 및 치료 표적의 개발이 요구되고 있는 상황이다.

[0006] 한편, LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자는 칩팬치, 개, 소, 쥐 및 닭 등에서 발견되며, 인간의 LYPD1 유전자는 81 종의 생물체와 오솔로그(orthologs)를 가진다. 현재 LYPD1에 대한 논문은 거의 발표된 것이 없으며, HeLa cell에서 종양 억제 역할을 함이 보고된 바 있으나(Exp Cell Res, 2006, 312(6): 865-76), 그 외 암과 관련하여 LYPD1의 기능에 대하여 알려진 바가 없다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 암의 진단 및 치료를 위한 마커를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 암 진단 마커로서 LYPD1이 효과적으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, LYPD1 유전자의 발현을 억제하면 암세포의 침윤, 세포 이동성 및 세포성장 억제되는 반면, LYPD1 유전자의 발현을 강화하면 암세포의 침윤 및 발암과 관련된 주요 세포신호전달이 증가하므로, 이의 발현 또는 활성을 억제하는 경우, 암의 예방 또는 치료에 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 LYPD1 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 LYPD1 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 LYPD1 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 암이 의심되는 개체의 분리된 시료로부터 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군 시료의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준보다 높은지 여부를 비교하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 또는 암 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 암 치료용 후보물질을 LYPD1 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우 암 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에 따르면, 암세포에서 LYPD1 유전자의 발현 또는 활성이 억제되면 암세포의 침윤, 세포 이동성 및 세포 성장이 감소하므로, LYPD1 유전자의 발현 또는 상기 단백질의 활성을 억제하면 암의 예방 또는 치료가

가능하다.

- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "LYPD1"이란 "LY6/PLAUR domain containing 1"의 약어로서, 상기 LYPD1은 HeLa cell에서 종양 억제 역할을 함이 보고된 바 있으나(Yu DH, et al., Exp Cell Res, 2006), 그 외 암과 관련하여 LYPD1의 기능에 대하여 알려진 바가 없다.
- [0022] 오히려, 본 발명에서는 LYPD1이 암세포의 침윤, 세포 이동성 및 세포성장을 촉진시키는 활성이 있어, 이의 발현을 억제시키는 경우 암세포의 침윤, 세포 이동성 및 세포성장이 억제되므로, 암 진단 마커 또는 암 치료제로서 사용 가능함을 확인하였다.
- [0023] 상기 LYPD1의 유전자 및 단백질 정보는 NCBI 유전자 은행과 같은 공지의 데이터베이스를 통하여 용이하게 확인할 수 있으며, 그 예로 NCBI 유전자 은행의 Gene ID: 116372인 LYPD1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 LYPD1은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 또한 특별히 이에 제한되지 않으나, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다.
- [0024] 이러한 LYPD1의 서열을 바탕으로 LYPD1의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 설계할 수 있으며, 상기 서열은 이러한 설계에 있어 일정 정도 변형이 가능하다. 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 98%의 상동성이 유지되는 서열 역시 사용할 수 있음은 자명하다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 대장암 세포인 SW480sub 세포주에서 siRNA에 의해 LYPD1의 발현이 억제되는 경우 세포의 침윤, 이동성 및 세포 성장이 감소함을 확인하였고(실시예 8), LYPD1이 대장암 세포에서 발현이 강화되는 경우 세포의 침윤 능력이 증가함을 확인하였다(도 5).
- [0027] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는 SW480 및 HEK293E 세포를 형질전환한 후, 웨스턴 블랏을 통해, 공통적으로 JNK의 인산화반응 및 전사인자 AP-1(activator protein 1)의 구성성분인 ATF-2의 인산화반응이 증가됨을 확인하였다(도 6). 그 결과 SW480에서는 간엽세포 마커인 비멘틴(vimentin)의 발현이 증가되었고, 또한 cyclin D1 및 cyclin A의 발현이 증가되었으며, HEK293E에서는 ATF-2 외에 AP-1의 구성성분인 c-Jun의 인산화반응 및 cyclin E, cyclin A의 발현이 증가되었음을 알 수 있었다.
- [0028] 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는 HEK293E 세포주에서 루시퍼라제 분석법을 통해 전사인자 AP-1의 활성 변화를 확인한 결과, LYPD1 발현에 의해 AP-1의 활성이 증가함을 확인하였다(도 7). 이를 통해 AP-1 활성은 암 세포 활성(성장 및 침윤)과 밀접한 관련이 있으므로, LYPD1 발현에 의한 AP-1 활성 조절이 침윤/세포 이동성 및 세포성장 조절에 기여함을 나타내는 것이다.
- [0029] 결론적으로, 대장암세포를 포함한 다양한 암세포에서 본 발명의 LYPD1의 발현이 감소되면, 그에 따라 AP-1 활성도 감소되어 암세포의 침윤/세포 이동성 및 세포성장이 감소됨을 알 수 있었다. 즉, 본 발명의 LYPD1은 다양한 암세포의 침윤/세포 이동성 및 세포성장과 관련된 암 진단 또는 치료 표적으로서, LYPD1의 발현을 측정함으로써 암을 진단할 수 있고, 또한 이의 발현 또는 활성을 억제함으로써 암을 치료할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는 전립선암 세포주인 PC3에서 siRNA에 의해 LYPD1의 발현이 억제되는 경우 세포 성장 및 LYPD1 발현이 감소되고(도 9 및 10), 세포 이동성이 감소함을 확인하였다(도 11). 이는 본 발명의 LYPD1의 발현을 억제하는 것이 암 치료에 현저한 효과가 있음을 시사하는 것이다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "LYPD1 유전자의 발현 억제제"은 LYPD1의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 통칭하는 의미로 사용되며, 보다 구체적으로는 LYPD1의 발현을 전사 수준 또는 단백질 수준에서 LYPD1의 발현을 감소시키는 모든 물질을 포함할 수 있다. 상기 LYPD1 발현을 저해하는 물질은 LYPD1을 표적으로 하여 LYPD1의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한없이 사용 가능하다.
- [0033] 구체적으로, 상기 LYPD1 유전자의 발현 억제제는 LYPD1 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 microRNA로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 또한, 구체적으로 상기 LYPD1 유전자의 발현 억제제는 서열번호 2 내지 5로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 서열과 결합할 수 있다. 상기 서열번호 2 내지 5의 염기서열은 LYPD1 유전자에서 상기 억제제와 결합할 수 있는 염기서열 부분이다.
- [0035] 이러한 발현 억제제는 당업계에 통상적으로 알려진 기술에 따라 당업자가 LYPD1의 발현 억제를 가지고 올 수 있

도록 용이하게 설계될 수 있다.

- [0037] 또한, 상기 LYPD1 단백질의 활성 억제제는 LYPD1 유전자로부터 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 이러한 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 상기 항체의 단편들도 본 발명의 항체에 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체, 및 인간 항체 등도 포함하며, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 LYPD1 유전자로부터 발현되는 단백질을 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 또한 본 발명의 조성물은 단독으로 사용할 수 있지만, 치료 효율을 증가시키기 위해 방사선 요법 또는 화학요법(세포 성장 정지 또는 세포 독성 물질, 항생 물질형 물질, 알킬화제, 항대사성 물질, 호르몬제, 면역제, 인터페론형 물질, 사이클로옥시게나제 억제제, 메탈로매트릭스프로테아제 억제제, 텔로머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 항성장인자 수용체 물질, 항-HER 물질, 항-EGFR 물질, 항-혈관생성 물질, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, ras-raf 시그널 전도 경로 억제제, 세포 주기 억제제, 기타 cdk 억제제, 튜블린 결합체, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제 등)과 같은 다른 항암 치료법과 병용하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 목적상 상기 암은 LYPD1 유전자의 발현 또는 상기 단백질의 활성을 억제하여 예방 또는 치료가 가능한 암이라면 제한이 없으나, 구체적으로, 대장암, 전립선암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음분암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종 등일 수 있으며, 더욱 구체적으로 대장암 또는 전립선암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 상기 대장암은 대장의 가장 안쪽 표면인 점막에서 발생한 암으로, 직장암, 결장암 및 항문암을 통칭한 것을 의미한다.
- [0043] 상기 전립선암은 전립선에 발생한 암을 의미한다.
- [0044] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 상기 조성물을 개체에 투여하여 암의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 상기 조성물을 암 질환 개체에 투여하여 암 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있고, 경구 투여시에는 결합체, 활택제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조될 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 사용되는 용어, 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여, 강 내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 조성물의 유효 투여량의 범위는 성별, 체표면적, 질환의 종류 및 중증도, 연령, 약물에 대한 민감도, 투여경로 및 배출비율, 투여시간, 치료기간, 표적세포, 발현 수준 등 기타 의학 분야에 잘 알려진 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 하나의 양태는 LYPD1 유전자의 발현 억제제, LYPD1 단백질의 활성 억제제 또는 이의 혼합물을 유

효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [0050] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0051] 본 발명의 상기 건강기능식품이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0052] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 양태는 LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0055] 상기 LYPD1에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0056] 또한, 상기 기술한 바와 같이 LYPD1의 유전자 및 단백질 정보는 NCBI 유전자 은행과 같은 공지의 데이터베이스를 통하여 용이하게 확인할 수 있으며, 그 예로 NCBI 유전자 은행의 Gene ID: 116372인 LYPD1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 LYPD1은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 또한 특별히 이에 제한되지 않으나, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다.
- [0057] 이러한 LYPD1의 서열을 바탕으로 LYPD1의 발현 수준을 측정하여, 암의 진행 또는 발병 여부를 진단할 수 있다. 상기 서열은 암의 진행 또는 발병 여부를 진단하는데 있어서 일정 정도 변형이 가능하다. 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 98%의 상동성이 유지되는 서열이 본 발명에서 목적하는 암 진단 마커로서 사용될 수 있으며, 또한 정상 개체와 암이 의심되는 개체 간에 발현량 차이를 유의있게 비교 가능하게 하는 한, 본 발명의 상기 서열과 균등한 것임을 쉽게 이해할 것이다.
- [0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 진단은 암의 진행 또는 발병 여부를 확인하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 사용되는 용어 "마커 또는 진단용 마커"란 암세포 또는 암 질환을 가진 개체를 정상세포 또는 정상 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 암이 진행 또는 발병된 세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 암 진단 마커는 LYPD1으로, 암 세포에서 발현이 증가하는 유전자이다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어 "LYPD1 유전자 mRNA의 수준을 측정하는 제제"란, 시료에 포함된 LYPD1의 발현 여부를 확인하는 방법에 사용되는 제제를 의미하는데, 바람직하게는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 유전자 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0064] 본 발명에서 사용되는 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지

길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산서열은 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. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입체(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 용어 "단백질의 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 암 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 구체적으로는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.

[0069] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기한 바와 같이 암 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0070] 다클론 항체는 상기한 대장암 또는 전립선암 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[0071] 단일클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.

[0072] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0073] 상기 항체를 이용하여 이와 결합한 표적 단백질의 양을 확인하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0076] 본 발명의 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준은 암세포가 정상세포보다 높으므로, 상기 키트로 측정된 시료와 정상세포의 상기 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 비교하여, 시료가 정상세포보다 상기 수준이 높으면 암 세포로 진단할 수 있다.

[0078] 상기 키트는 암의 발병이 의심되는 개체의 시료로부터 LYPD1의 발현 수준을 측정함으로써 암을 진단하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 LYPD1의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.

- [0079] 구체적으로, 본 발명의 LYPD1의 발현 수준을 측정하기 위한 진단 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0080] 또한, 구체적으로 본 발명의 키트는 유전자 칩 분석법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. 유전자 칩 분석용 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0081] 또한, 구체적으로 본 발명의 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0082] 또한, 본 발명의 목적상 상기 암은 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상세포보다 높은한 제한이 없으나, 구체적으로, 대장암, 전립선암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종 등일 수 있으며, 더욱 구체적으로 대장암 또는 전립선암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 진단용 조성물 또는 키트를 이용하여 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데, 구체적으로, (a) 암이 의심되는 개체의 분리된 시료로부터 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군 시료의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준보다 높은지 여부를 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 암 진단 방법일 수 있다.
- [0085] 상기 방법은 또한 추가로 (c) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군 시료의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준보다 높으면 암이 발병하는 것으로 판단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0087] 암이 의심되는 개체에서 mRNA를 분리하는 과정은 공지된 공정을 이용하여 수행할 수 있으며, 본 발명에서 사용되는 용어 "개체의 시료"란 암 마커인 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 차이나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 상기 mRNA 수준은 다양한 방법으로 측정할 수 있으며, 구체적으로 상기 LYPD1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용할 수 있다.
- [0090] 또한, 구체적으로 상기 mRNA 수준은 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩에 의하여 측정되는 것일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 상기 LYPD1 단백질 수준의 측정 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0092] 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 암 의심 환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 암 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여, 암 의심 환자의 실제 암 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [0093] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란 암 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체

복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

[0094] 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노 트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시안네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Co , ^{60}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.

[0095] 단백질 발현수준 측정은 구체적으로는, ELISA법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 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. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 암 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 암 발병 여부를 확인할 수 있다.

[0096] 또한, 구체적으로는, 상기 암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여, 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 암 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 암이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu g/ml$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.

[0097] 또한, 구체적으로는, 상기 암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시하는 것이다. 정상 대장 상피 조직 및 암으로 의심되는 조직을 채취 및 고정된 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체 중 선택된 1개와 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 관독한다.

[0098] 또한, 구체적으로는, 상기 암 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 관독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 암 발병 여부를 확인할 수 있다.

[0099] 또한, 본 발명의 목적상 상기 암은 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상세포보다 높은 한 제한이 없으나, 구체적으로, 대장암, 전립선암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암중, 자궁내막암중, 자궁경부암중, 질암중, 음문암중, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프중, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암중, 신장골반 암중, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프중, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종 등일 수 있으며, 더욱 구체적으로 대장암 또는

전립선암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0101] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 (a) 암 치료용 후보물질을 LYPD1 유전자를 발현하는 분리된 시료에 처리한 다음, 상기 LYPD1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우 암 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0102] 암을 예방 또는 치료할 수 있는 후보 물질의 부재 하에 LYPD1 유전자를 발현하는 세포에서 본 발명의 LYPD1의 수준을 측정하고, 또한, 상기 후보 물질의 존재 하에서 본 발명의 상기 LYPD1의 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 상기 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 상기 LYPD1의 발현 수준을 상기 후보 물질의 부재 하에서의 수준보다 감소시키는 물질을 암 예방 또는 치료용 제제로 예측할 수 있다.

[0103] 또한, 구체적으로 상기 LYPD1 유전자를 발현하는 세포는 대장암, 전립선암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종 세포일 수 있으며, 더욱 구체적으로, 대장암 또는 전립선암 세포일 수 있고, 이에 따라 본 발명은 대장암 또는 전립선암 치료제의 스크리닝 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0105] 본 발명은 현재까지 그 기능이 잘 알려지지 않은 LYPD1(LY6/PLAUR domain containing 1) 유전자가 암세포의 침윤, 세포 이동성 및 세포성장을 조절하며, 또한 세포신호전달을 조절함을 규명한바, 본 발명의 LYPD1을 이용하여 암 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트, 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 암 치료제의 스크리닝 방법; 및 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1은 대장암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 억제한 결과 암세포의 침윤 및 세포 이동성 감소함을 보여주는 도이다. a는 상층 챔버에서 하층 챔버로 이동한 대장암세포를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색한 결과를 보여주는 사진이다. b는 상층 챔버에서 하층 챔버로 이동한 대장암세포의 상대적인 비율을 나타내는 그래프이다.

도 2는 대장암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 억제한 결과 암세포의 성장이 감소됨을 보여주는 도이다.

도 3은 대장암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 48 시간(a) 및 72 시간(b) 동안 억제한 결과, LYPD1 발현이 감소됨을 보여주는 도이다.

도 4는 정상세포에 LYPD1 발현 벡터(p3XFLAGCMV14-LYPD1 및 pFLAGCMV1-LYPD1)의 형질전환을 통해 LYPD1 발현 정도를 확인한 도이다.

도 5는 대장암 세포주에서 LYPD1의 발현을 증가시킨 결과(a), 침윤이 능력이 증가함(b)을 보여주는 도이다.

도 6은 정상세포(a) 및 대장암 세포주(b)에서 LYPD1의 발현을 각각 증가시킨 경우, 세포신호전달의 활성화 여부를 보여주는 도이다.

도 7은 정상세포에서 LYPD1의 발현에 따른 AP-1 리포터 활성 증가를 보여주는 도이다.

도 8은 6종의 대장암 세포주와 2종의 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현을 RT-qPCR 기법으로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 48 시간(a) 및 72 시간(b) 동안 억제한 결과, 암세포의 성장이 감소됨을 보여주는 도이다.

도 10은 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 억제한 결과 LYPD1 발현이 감소됨을 보여주는 도이다.

도 11은 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 억제한 결과 암세포의 이동성이 감소함을 보여주는 도이다. a는 상층 챔버에서 하층 챔버로 이동한 전립선암 세포를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색한 결과를 보여주는 사진이다. b는 상층 챔버에서 하층 챔버로 이동한 전립선암 세포의 상대적인 비율을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0110] **실시예 1. 세포배양**

[0112] 모든 인간 세포주는 American Type Culture Collection(USA)에서 제공받았다. 대장암 세포주인 SW480, HCT116, HT29, HCT15, Lovo, Colo205 세포주 및 전립선암 세포주인 DU145, PC3 세포주는 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신, L-글루타민, 소듐 피루베이트가 포함된 RPMI1640(GIBCO, USA) 배지에서, HEK293E 세포는 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂조건에서 배양하였다. SW480sub는 SW480으로부터 얻은 subpopulation이었다.

[0114] **실시예 2. siRNA 또는 플라스미드의 형질감염**

[0116] SW480 및 PC3 세포를 Microporation 기법(Neon Transfection system, Invitrogen)을 설명서대로 이용하여 형질감염시켰다. 세포를 수확한 뒤, PBS로 세척하고, R 버퍼에 3 x10⁵ cell/12μl의 농도로 재부유시킨 뒤, 40 μM siRNA 2μl 또는 1 μg 플라스미드를 첨가하고 Microporator 기기를 이용하여 형질감염시켰다. 48시간 후, 세포를 수확하여 침윤실험 및 세포를 용균시켜 웨스턴 블랏 실험을 수행하였다. 사용한 LYPD1 특이적 siRNA는 Dharmacon에서 구입하였다(4 종의 mixture). 표적 염기서열 4종은 표 1과 같다(5' → 3' 방향).

표 1

서열번호	표적 염기서열 (5' → 3' 방향)
2	GCA CAC UGC UGA ACU GAA G
3	GAA CGU UCA AGA CAU GUG U
4	GGA GCA AAG UGC CGG GAU C
5	CAA GUC CUG UGC AUC AUC A

[0119]

[0120] 인터그린 알파5(integrin alpha5) 특이적 siRNA 서열은 5'-GGACCAAGGCAGAAGGCAG-3'(서열번호 6)이고, 안정성을 위해 3'말단에 TT를 추가하여 사용하였다.

[0121] 또한, HEK293E 세포에 PEI(polyethyleneimine)을 이용하여 플라스미드를 도입하였다(6 웰 기준 플라스미드 2 μg + PEI 4 μg 사용).

[0123] **실시예 3. LYPD1 발현 컨스트럭트 제작**

[0125] LYPD1을 코딩하는 영역(LYPD1 아미노산 서열(서열번호 7, NP_653187.3)의 1번부터 141번까지를 코딩하는 유전자)를 PCR로 얻어 p3XFlag-CMV14(Sigma)의 HindIII-BamHI에 서브클로닝하였다. 프라이머 세트는 포워드 프라이머로 5'-aacccaagcttgccgcatgtgggtcctaggcatcg-3'(서열번호 8) 및 리버스 프라이머로 5'-aacccggatccgcatgtg tgc cga gaa gag g-3'(서열번호 9)을 사용하였다.

[0126] LYPD1를 코딩하는 영역 중 일부(신호 펩타이드를 제외한 서열번호 7의 아미노산 서열 23번부터 141번까지를 코딩하는 유전자)를 PCR로 얻어 pFlag-CMV1(Sigma)의 HindIII-BamHI에 서브클로닝하였다. 프라이머 세트는 포워드 프라이머로 5'-aagcccaagcttatccagtgtaccagtgtgaag-3'(서열번호 10) 및 리버스 프라이머로 5'-aacccggatccctatca gca gtg tgc cga gaa g-3'(서열번호 11)를 사용하였다.

[0127] 이때, PCR에서 사용한 기질(LYPD1를 코딩하는 영역이 서브클로닝된 플라스미드)는 한국인간유전자은행(genbank.kribb.re.kr)에서 구매하였고, 최종 얻어진 플라스미드는 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[0129] **실시예 4. 침윤 분석(Invasion assay) 및 세포 이동 분석(cell migration assay)**

[0131] 암세포 침윤능력의 변화를 분석하기 위하여, control siRNA는 센스 스트랜드 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A-3'(서열번호 12), 안티센스 스트랜드 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA G-3'(서열번호 13)의 서열에 3' 말단에 TT를 각각 추가하여 제작하였고(siGL3; 에스티팜), 상기 control siRNA 또는 LYPD1 특이적 siRNA를 SW480sub 세포주에 형질전환하였다. 또한, LYPD1 발현 벡터 vs empty 벡터로 SW480 세포주를 형질전환하였다. 48시간 뒤 침윤 분석을 수행하였다. 구체적으로, 24-웰 트랜스웰 플레이트(8 포어 사이즈; Costar, 미국)의 다공성 막을 무혈청

배지로 희석된 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 100 μl 매트리지젤(BD Biosciences, 미국)로 코팅하였고, 실온에서 1시간 동안 방치하여 고형화시켰다. 트랜스웰 플레이트의 하층은 화학유인물(chemoattractant)로서 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 콜라겐 타입 I(Sigma) 100 μl 를 이용하여 코팅하였다.

[0132] 무혈청 배지에 재부유시킨 3×10^4 개의 세포를 상층 챔버에 분주하였고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 48시간 동안 배양 하면서 상층 챔버에서 하층 챔버로 이동하도록 하였다. 이동하지 않은 세포는 상층 챔버의 표면에서 제거하였다. 하층 챔버로 전이한 세포는 PBS에 녹인 3.7 % 파라포름알데하이드로 고정하였고, 2 % 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 여분의 크리스탈 바이올렛 용액을 증류수로 세척한 뒤, 선택 면적($\times 100$)의 사진을 찍었고, 이동한 세포수는 5개의 선택 면적에서 계수하였다. 평균값을 구하고, 상대적 %를 계산하였다.

[0134] 세포 이동능력의 변화를 분석하기 위하여, 매트리지젤 코팅없이 1.5×10^4 개의 세포를 상층 챔버에 분주하였다.

[0136] **실시예 5. 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction)**

[0138] RNA 전체를 TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 추출하였고, 상보적 DNA를 역전사효소(Bioneer, 대전, 한국)를 사용하여 합성하였다. LYPD1 특이적 프라이머(5'-CCCGAGTTCATTGTGAATTG-3'(서열번호 14) 및 5'-ACAGGACTTGCGGTACATGA-3'(서열번호 15)); 및 글리세르알데하이드 3-포스페이트 디하이드로제나제 특이적 프라이머(5'-CATGACCACAGTCCATGCCAT-3'(서열번호 16) 및 5'-AAGCCATGCCAGTGAGCTTC-3'(서열번호 17)로 SYBR Green(PKT, 서울, 한국)를 사용하여 Real-time quantitative PCR을 수행하였다(어닐링 온도 58 $^{\circ}\text{C}$).

[0140] **실시예 6. 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)**

[0142] 세포를 RIPA buffer(10 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 % deoxycholate, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 킴플렉스 프로테아제 저해제)에서 용해시켰다. 세포 용해물을 변형된 브래드포드 분석법(Bradford assay; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 정량하였다. 세포 용해물 30 μg 을 SDS 시료 버퍼와 혼합하여 가열하였고, 8-15 % SDS-PAGE 겔에 영동하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 이동시키고, 5 % 스킵 밀크(skim milk)로 차단하였다. 이 후 anti-beta-actin, anti-cyclin E, anti-cyclin A(1:1000 희석; Santa Cruz), anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-ATF2, anti-ATF2, anti-c-Jun, anti-c-Jun, anti-cyclin D1(1:1000; Cell signaling technology), anti-flag, anti-vimentin(1:1000; Sigma)와 함께 반응시켰고, 홀스레디쉬 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 반응시켰다. 이 후 ECL 키트(ECL Plus, Amersham, USA)를 제조사의 방법대로 처리하였다.

[0144] **실시예 7. 프로모터 리포터 분석(Promoter reporter assay)**

[0146] 리포펙타민 200(Invitrogen)으로 세포를 형질전환시켰다. 형질전환을 위해, 2×10^5 세포를 6 웰 플레이트에 시딩 하여 24 시간 배양 후, 2 μg 리포터 플라스미드(AP-1 리포터 DNA; AP-1 cis-Reporting system, pAP-1-Luc; Stratagene) 및 1.8 μg LYPD1 발현 벡터를 함께 형질전환시켰다. 형질 주입 후 48 시간 또는 72 시간 후에 반딧불 루시페라제 활성을 Dual-luciferase reporter assay system(Promega)를 통해 측정하였다. 함께 형질전환된 2 μg 레닐라 루시페라제 벡터 pRL-TK(Promega)에 의해 코딩되는 레닐라 루시페라제 활성을 측정하여 형질전환 효율을 분석하였다.

[0147]

[0148] **실시예 8. 대장암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 억제한 결과**

[0150] **실시예 8-1. 암세포의 침윤 및 세포 이동성 감소**

[0152] SW480sub 세포주에 LYPD1 특이적 siRNA를 Microporation 기법으로 도입한지 48 시간 후 세포를 수확하여 Transwell을 통해 침윤 및 세포 이동성을 분석하였다.

[0153] 그 결과, 침윤은 약 34 %, 세포 이동성은 약 45 % 감소하였고, 양성 대조군으로 인터그린 알파 5 특이적 siRNA를 사용한 경우, 침윤은 약 29 %, 세포 이동성은 32 % 감소하였다(도 1).

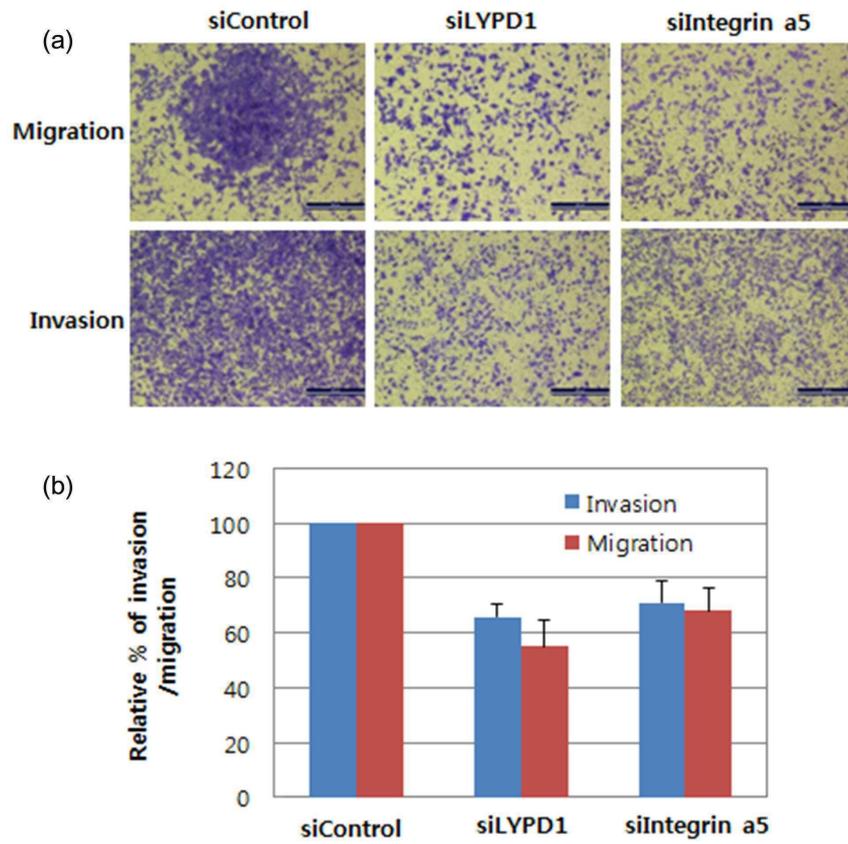
[0155] 이를 통해 LYPD1의 발현을 억제하는 경우 인터그린 알파 5의 발현을 억제하는 것보다 대장암 세포의 침윤 및 세포 이동성이 더 높게 억제됨을 알 수 있으므로, 이는 본 발명의 LYPD1의 발현을 억제하는 것이 암 치료에 현저한 효과가 있음을 시사하는 것이다.

- [0157] 실시예 8-2. 암세포의 세포 성장 감소
- [0159] SW480sub세포주에 LYPD1 특이적 siRNA를 microporation기법으로 도입한지 48 시간 후 세포를 수확하여, 96 웰 플레이트에 3000 cells/100 μ l/웰로 깔고(10% FBS 포함 배지), 배양 후 48 시간 및 72 시간에 세포 성장을 비색 기법으로 측정하였다. CCK-8 시약을 10 μ l를 넣고 2시간 후, OD450nm - OD650nm 값을 측정한 결과, LYPD1-siRNA(siLYPD1)에 의해 세포성장이 각각 34 % 및 46 % 감소함을 확인하였다(도 2).
- [0160] 또한, siRNA에 의한 LYPD1의 발현 억제를 real time quantitative PCR로 확인한 결과, LYPD1 발현이 51 % 감소됨을 확인하였다(도 3).
- [0162] 그 결과, LYPD1의 발현이 억제되면 암세포의 성장이 감소함을 알 수 있었고, 이를 통해 본 발명의 LYPD1의 발현을 억제하는 것이 암 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하였다.
- [0164] **실시예 9. LYPD1의 발현을 증가시킨 결과**
- [0166] 실시예 9-1. 정상세포에서 LYPD1의 발현 정도 확인
- [0168] 실시예 3에서 제작한 LYPD1 발현 벡터(p3XFLAGCMV14-LYPD1 및 pFLAGCMV1-LYPD1)의 LYPD1 발현 정도를 확인하기 위해, 상기 벡터를 정상 세포인 HEK293E 세포에 형질전환하고, 48 시간 후 용해하여 용해물 전체를 얻거나, 무혈청 배지로 바꾼 후 48 시간 동안 배양하여 조정 배지(conditioned medium)를 얻었다. 용해물 및 조정 배지를 anti-flag로 웨스턴 블랏 분석하였다(도 4).
- [0170] 그 결과, p3XFLAGCMV14-LYPD1에 의해 LYPD1이 뚜렷하게 발현됨을 확인하였다. 또한, 조정 배지에서 signal이 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 LYPD1의 전체 또는 일부분 영역이 세포 외로 분비 또는 shedding됨을 알 수 있었다.
- [0172] 실시예 9-2. 암세포의 침윤능력의 증가
- [0174] LYPD1 발현 증가에 따른 암세포의 침윤 능력의 변화를 분석하기 위해, SW480세포에 LYPD1 발현벡터(p3XFLAG-CMV14-LYPD1)를 일시적으로 형질전환한 후 48 시간 후에 세포를 수확하여 Transwell을 이용한 침윤실험을 수행한 결과, 침윤이 26 % 증가함을 확인하였다(도 5).
- [0176] 실시예 9-3. 주요 세포신호전달의 활성화
- [0178] 또한, SW480 및 HEK293E 세포를 형질전환한 후, 48 시간 및 72 시간에 세포를 용해하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, 공통적으로 JNK의 인산화반응 및 전사인자 AP-1(activator protein 1)의 구성성분인 ATF-2의 인산화반응이 증가됨을 확인하였다(도 6).
- [0179] 그 결과, SW480에서는 간엽세포 마커인 비멘틴(vimentin)의 발현이 증가되었고, 또한 cyclin D1 및 cyclin A의 발현이 증가되었으며, HEK293E에서는 ATF-2 외에 AP-1의 구성성분인 c-Jun의 인산화반응 및 cyclin E, cyclin A의 발현이 증가되었음을 알 수 있었다.
- [0180] 이는 LYPD1의 세포성장 및 세포 이동성을 조절하는 경로와 관련 있는 세포신호전달 경로를 시사하는 것이다.
- [0182] **실시예 10. LYPD1의 발현에 따른 AP-1 reporter 활성 조절**
- [0184] HEK293E 세포주에 LYPD1 발현 벡터 또는 empty vector(p3XFLAG-CMV14)를 LF2000을 이용하여 도입한 지 48 시간 후, 루시퍼라제 분석법을 통해 전사인자 AP-1의 활성 변화를 확인하였다(도 7).
- [0185] 그 결과, LYPD1 발현에 의해 AP-1의 활성이 증가함을 확인하였다(48 시간째 2배 증가, 72 시간째 45% 증가). 이러한 결과는 웨스턴 블랏 분석에서, LYPD1 발현에 의한 phospho-c-Jun 등의 증가와 일치하는 결과이다.
- [0187] 이를 통해, AP-1 활성은 암세포 활성(성장 및 침윤)과 밀접한 관련이 있으므로, LYPD1 발현에 의한 AP-1 활성 조절이 침윤/세포 이동성 및 세포성장 조절에 기여함을 알 수 있었다.
- [0189] 결론적으로, 대장암세포를 포함한 다양한 암세포에서 본 발명의 LYPD1의 발현이 감소되면, 그에 따라 AP-1 활성도 감소되어 암세포의 침윤/세포 이동성 및 세포성장이 감소됨을 알 수 있었다. 즉, 본 발명의 LYPD1은 다양한 암세포의 침윤/세포 이동성 및 세포성장과 관련된 암 진단 마커로서, LYPD1의 발현을 억제하는 것이 암 치료에 현저한 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0191] **실시예 11. 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현을 siRNA로 억제한 결과**

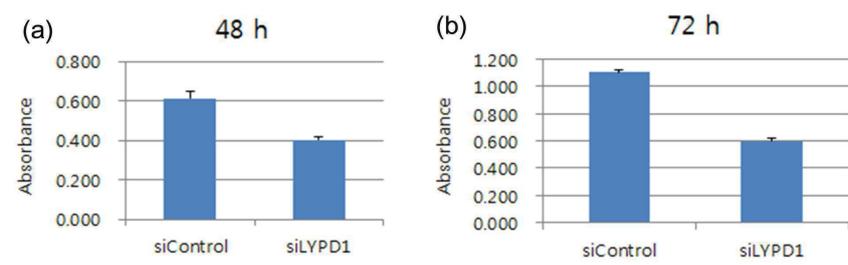
- [0193] 실시예 11-1. 대장암 세포주 및 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현 분석
- [0195] 다양한 암세포주에서 LYPD1 유전자의 발현을 확인하기 위하여 상기 실시예 1의 조건으로 배양한 다양한 세포주로부터 Trizol(Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 분리하고, 이를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 또한, 상기 실시예 5의 real time quantitative PCR 을 수행하였다.
- [0196] 그 결과, 대장암 세포주 및 전립선암 세포주에서 LYPD1의 발현수준이 다양함을 확인하였다(도 8).
- [0198] 실시예 11-2. 암세포의 세포 성장 감소
- [0200] PC3 세포주에 LYPD1 특이적 siRNA을 microporation기법으로 도입한지 48 시간 후 세포를 수확하여, 96 웰 플레이트에 3000 cells/100 μ l/웰로 깔고(10% FBS 포함 배지), 배양 후 48 시간 및 72 시간에 세포 성장을 비색 기법으로 측정하였다. CCK-8 시약을 10 μ l를 넣고 2시간 후, OD450nm - OD650nm 값을 측정한 결과, LYPD1-siRNA(siLYPD1)에 의해 세포성장이 각각 21 % 및 27 % 감소함을 확인하였다(도 9).
- [0201] 또한, siRNA에 의한 LYPD1의 발현 억제를 real time quantitative PCR로 확인한 결과, LYPD1 발현이 70 % 감소됨을 확인하였다(도 10).
- [0203] 이를 통해, LYPD1의 발현이 억제되면 전립선암 세포의 성장이 감소함을 알 수 있었고, 이를 통해 본 발명의 LYPD1의 발현을 억제하는 것이 암 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하였다.
- [0205] 실시예 11-3. 암세포의 이동성 감소
- [0207] PC3 세포주에 LYPD1 특이적 siRNA을 Microporation 기법으로 도입한지 48 시간 후 세포를 수확하여 Transwell 을 통해 세포의 이동성을 분석하였다.
- [0208] 그 결과, 세포 이동성은 약 21 % 감소하였다(도 11).
- [0210] 이를 통해, LYPD1의 발현을 억제하는 경우 전립선암 세포의 이동성이 매우 높게 억제됨을 알 수 있으므로, 이는 본 발명의 LYPD1의 발현을 억제하는 것이 암 치료에 현저한 효과가 있음을 시사하는 것이다.
- [0212] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

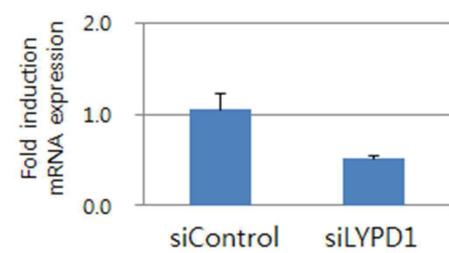
도면1



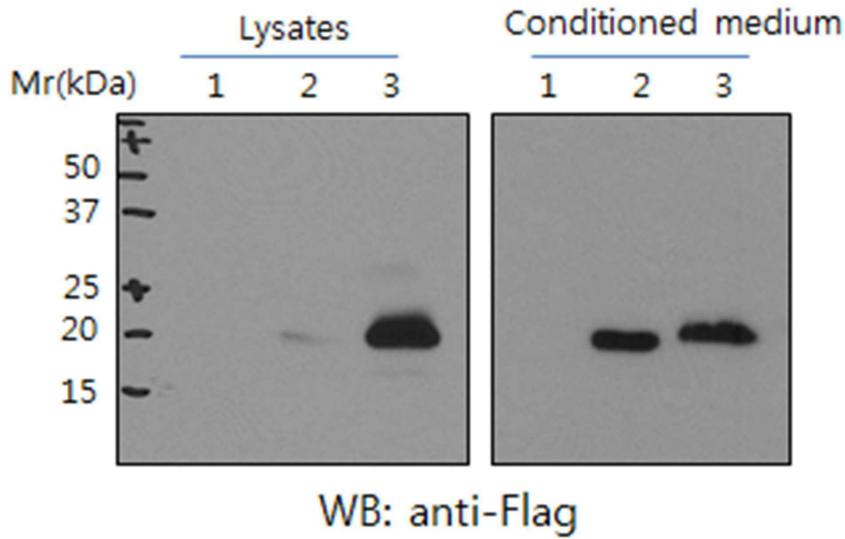
도면2



도면3

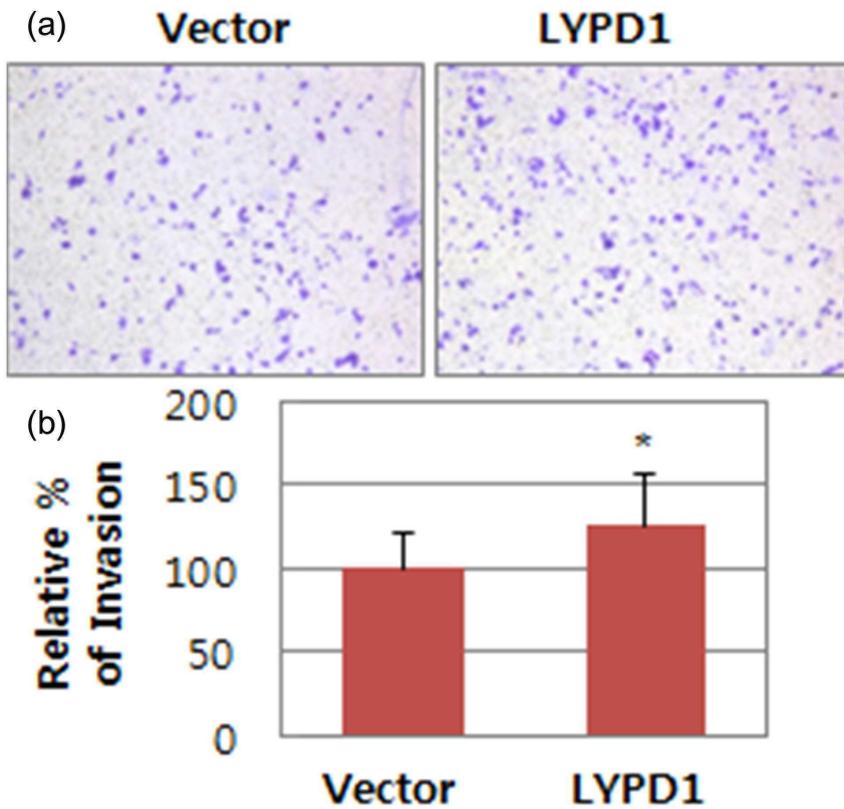


도면4

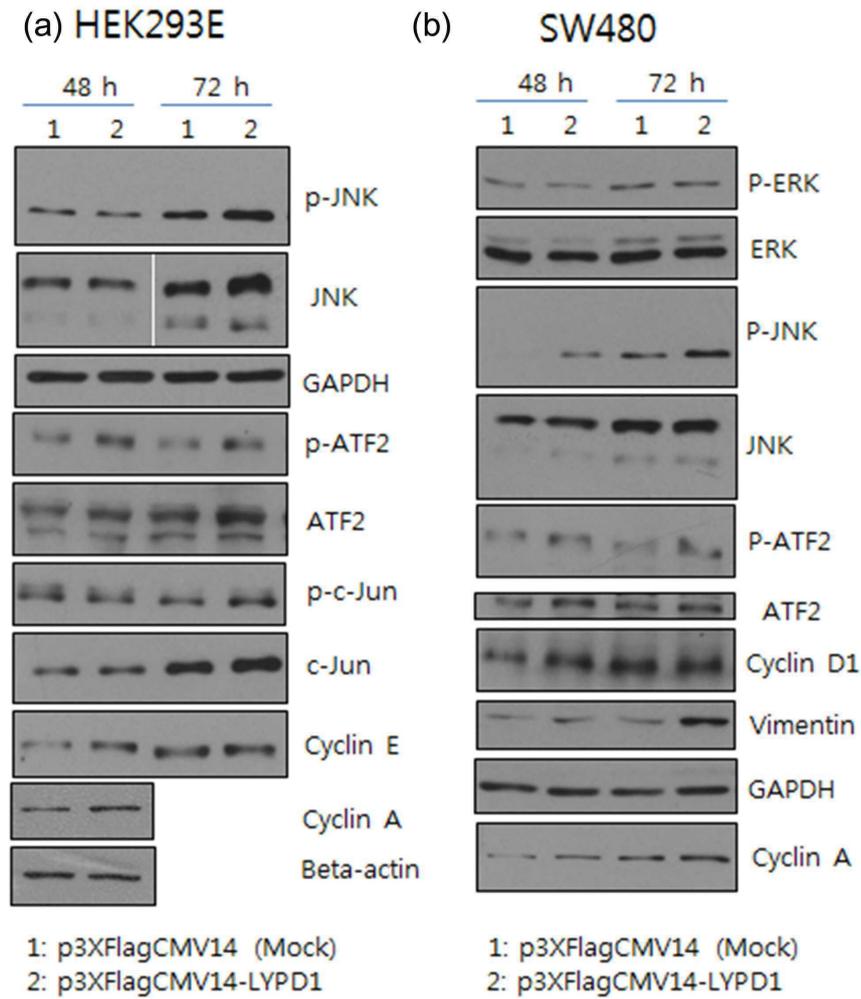


Lane 1: p3XFlagCMV14(empty vector)
 Lane 2: pFlagCMV1-LYPD1(23..141)
 Lane 3: p3XFlagCMV14-LYPD1

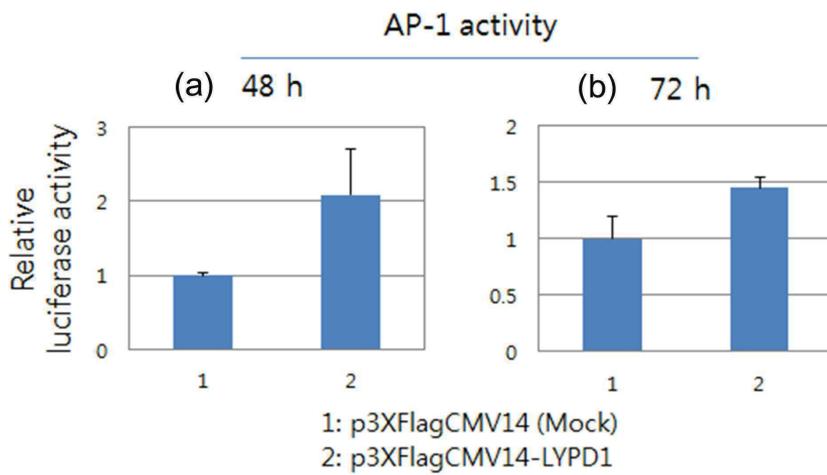
도면5



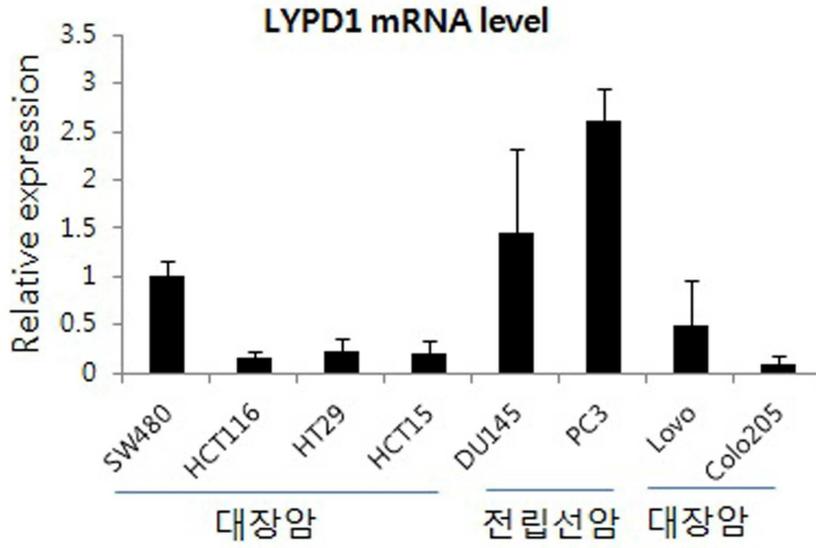
도면6



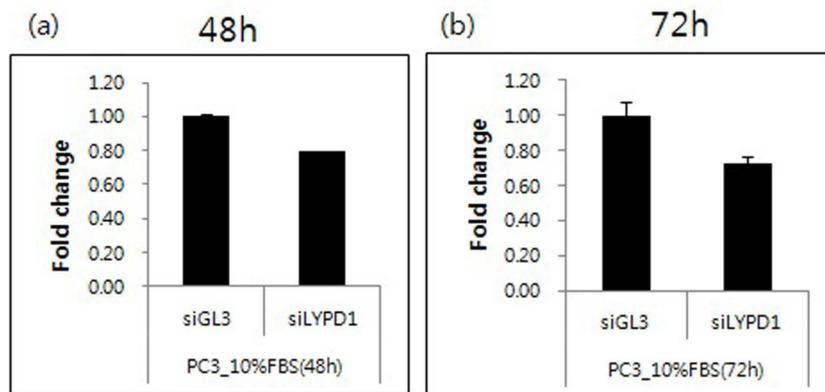
도면7



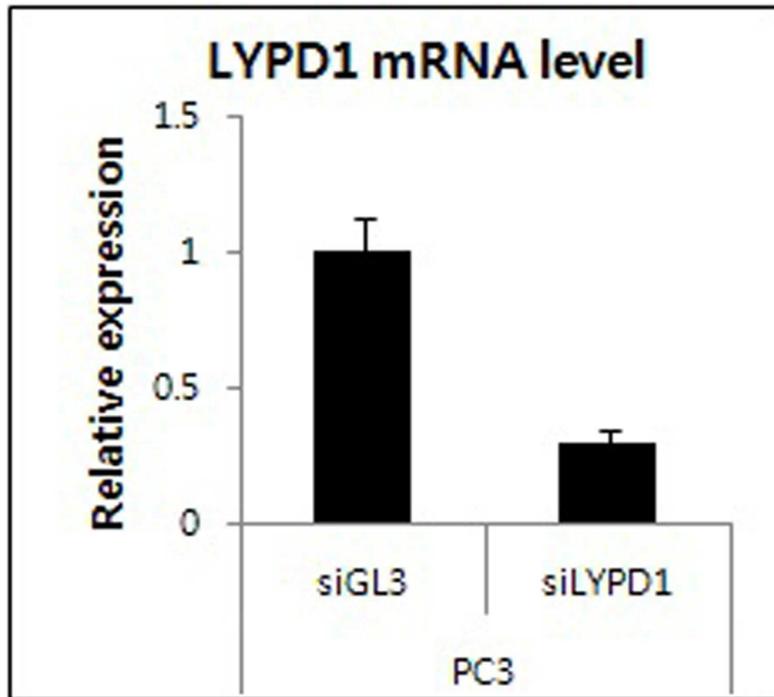
도면8



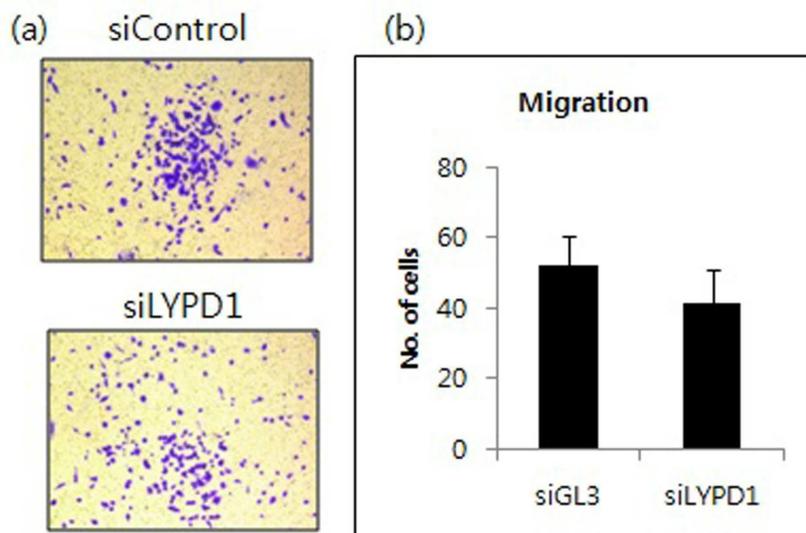
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Use of LYPD1 for cancer diagnostic or therapeutic marker
- <130> KPA140674-KR-P1-D1
- <150> KR 10-2014-0105989
- <151> 2014-08-14
- <160> 17
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 2683
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens LYPD1
 <400> 1

agggcggtgt caatgcacc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcggcccc 60
 ggcaagtgag acagttaagg cagtgtcccc accacacccc caccagatt ggccacgccg 120
 agctggttct tgacagaagg ccttcgcgga ggaagagggg gcacagctgc acaggacacc 180

ctacggagcc tgcgggcgtg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc ctttctgtc 240
 agcctcccgg ggcgccaggc tcccgcggcc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggt 300
 ggaccagtc gctggggtac cgaccagtcc tggaaaggcg agaggacgtg gagtggggag 360
 gctgccttcc taigtgcgaa gggccagccg ggcacgcagt cctcagacc tagtccgcac 420
 ccggcagtc cccacggcac ctgtcgcgcc ctctcgcg ccctcccaac ctccccatct 480
 cagaaaaacta ccagttctct cccgcccccc ggcgcccctt tcccaggaac gtgcggaggc 540
 gggagaagag gaagacagga agggggtggg gatgtgaagc gaccgtcca gccttccccg 600

cccgccacc ccacccaac tcggcagccg tcacgtgatg cctggagtgg gagtgggga 660
 gaaaaggcga gacttttgtg ggtgtcccc atcgccagta gttccttcag tctcagccg 720
 caactccgga ggcgcggtgc tcggcccggg agcgcgagcg ggaggagcag agaccgcag 780
 ccgggagccc gagcgcgggc gatgcaggt cgcgagcgg cacctgcggc tctctaaag 840
 tacgaccgtc gtctccgagg cagcagcgcg ggccccagca gcctcggcag ccacagccg 900
 tgcagccggg gcagcctccg ctgtgtcgc ctctctgat gccttgccc tctccggcc 960
 ccgggactcc gggagaatgt gggctctagg catcgcggca actttttgcg gattgttctt 1020

gcttcaggc tttgcgtgc aaatccagt ctaccagtgt gaagaattcc agctgaacaa 1080
 cgactgctcc tccccgagt tcattgtgaa ttgcacgggt aacgttcaag acatgtgtca 1140
 gaaagaagt atggagcaaa gtgccgggat catgtaccg aagtctgtg catcatcagc 1200
 ggctgtctc atgcctctg ccgggtacca gtcttctgc tcccaggga aactgaactc 1260
 agtttgcatc agctgtgca acaccctct ttgtaacggg ccaaggccca agaaaagggg 1320
 aagtctgccc tcggcctca ggcagggtc ccgaccacc atcctgttcc tcaaattagc 1380
 cctcttctcg gcacactgt gaagctgaag gagatgccac cccctctgc atgttcttc 1440

cagccctgc cccaacccc ccacctcct gactgagttt cttctgggtg tccttttatt 1500
 ctgggtaggg agcgggagtc cgtgttctct tttgttctg tgcaataat gaaagagctc 1560

ggtaaagcat tctgaataaa ttcagcctga ctgaattttc agtatgtact tgaaggaagg 1620
 aggtggagtg aaagttcacc cccatgtctg tgtaaccgga gtcaaggcca ggctggcaga 1680
 gtcagtcctt agaagtcact gaggtgggca tctgcctttt gtaaagcctc cagtgtccat 1740
 tccatccctg atgggggcat agtttgagac tgcagagtga gagtgacgtt ttccttagggc 1800
 tggagggccca gttcccactc aaggctccct cgcttgacat tcaaacttca tgctcctgaa 1860

aaccattctc tgcagcagaa ttggetggtt tgcgcctga gttgggctct agtgactcga 1920
 gactcaatga ctgggactta gactggggct cggcctcgct ctgaaaagtg cttaaagaaa 1980
 tcttctcagt tctccttgca gaggactggc gccgggacgc gaagagcaac gggcgctgca 2040
 caaagcgggc gctgtcggtg gtggagtgcg catgtacgcg caggcgcttc tcgtggttgg 2100
 cgtgctgcag cgacaggcgg cagcacagca cctgcacgaa caccgccga aactgctgcg 2160
 aggacaccgt gtacaggagc gggttgatga ccgagctgag gtagaaaaac gtctccgaga 2220
 aggggaggag gatcatgtac gcccggaagt aggacctcgt ccagtcgtgc ttgggtttgg 2280

ccgcagccat gatcctccga atctggttgg gcatccagca tacggccaat gtcacaacaa 2340
 tcagccctgg gcagacacga gcaggaggga gagacagaga aaagaaaaac acagcatgag 2400
 aacacagtaa atgaataaaa ccataaaaata tttagccctc ctgttctgtg cttactggcc 2460
 aggaaatggt accaattttt cagtgttggc cttgacagct tcttttgcca caagcaagag 2520
 agaatttaac actgtttcaa acccggggga gttggctgtg ttaaagaaag accattaat 2580
 gctttagaca gtgtatttat accagttgat gtctgttaat tttaaaaaaa tgttttcatt 2640
 ggtgtttggt tgcgtatcca gaaagcagtt catgttatcc ata 2683

- <210> 2
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

gcacacugcu gaacugaag 19

- <210> 3
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 3

gaacguuca gacaugugu 19

- <210> 4

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 ggagcaaagu gccgggauc 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA

 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 caaguccugu gcacauca 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> integrin alpha5-specific siRNA
 <400> 6
 ggaccaaggc agaaggcag 19
 <210> 7
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens LYPD1
 <400> 7
 Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Leu Leu
 1 5 10 15

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

Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro Gly Lys Leu Asn Ser Val

85 90 95

Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys

100 105 110

Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala Leu Arg Pro Gly Leu Arg Thr Thr

115 120 125

Ile Leu Phe Leu Lys Leu Ala Leu Phe Ser Ala His Cys

130 135 140

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LYPD1 forward primer

<400> 8

aaccaagct tgccgcatg tgggtcctag gcatcg 36

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LYPD1 reverse primer

<400> 9

aaccggatc cgcagtgtgc cgagaagagg 30

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LYPD1 except signal peptide_forward primer

<400> 10

aagccaagc ttatccagtg ctaccagtgt gaag 34

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> LYPD1 except signal peptide_reverse primer
 <400> 11
 aaccggatc cctatcagca gtgtgccgag aag 33
 <210> 12
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siGL3 sense strand
 <400> 12
 cuuacgcuga guacuucga 19
 <210> 13
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siGL3 anti-sense strand
 <400> 13
 ucgaaguacu cagcguaag 19
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LYPD1-specific primer
 <400> 14
 cccgagttca ttgtgaattg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LYPD1-specific primer
 <400> 15
 acaggacttg cggtacatga 20
 <210> 16

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-specific primer
<400> 16
catgaccaca gtccatgcca t 21
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-specific primer
<400> 17
aaggccatgc cagtgagctt c 21