



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월11일

(11) 등록번호 10-1492024

(24) 등록일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0022787

(22) 출원일자 2013년03월04일

심사청구일자 2013년03월04일

(65) 공개번호 10-2014-0108910

(43) 공개일자 2014년09월15일

(56) 선행기술조사문헌

US20090163406 A1

J. Clinical Oncology, 26권, 15S호, 19027면(2008)*

Methods Mol. Biol., 568권, 37-56면(2009)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

김광록

대전광역시 유성구 구즉로 16, 109동 906호 (송강동, 한마을아파트)

최상운

대전광역시 유성구 어은로 57, 132-104 (어은동, 한빛아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 문동현

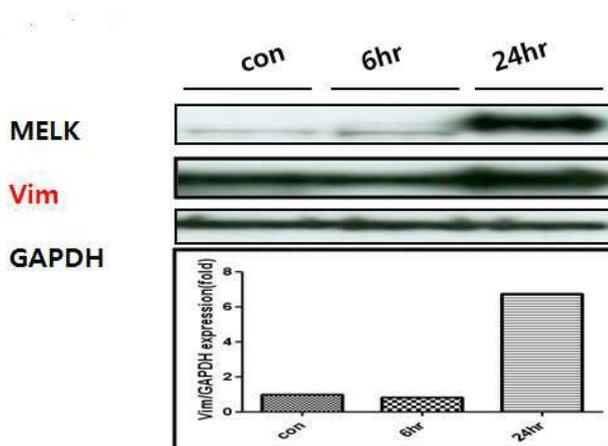
(54) 발명의 명칭 전이성 뇌종양 진단용 마커

(57) 요약

본 발명은 전이성 뇌종양을 진단할 수 있는 마커, 이를 이용한 진단용 조성물, 전이성 뇌종양을 진단 또는 예측할 수 있는 방법 및 이들의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 약물을 선별하는 방법에 관한 것이다.

구체적으로 MELK 유전자, MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질, Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나 이상의 전이성 뇌종양 진단용 마커, 이를 이용한 진단용 조성물, 전이성 뇌종양을 진단 또는 예측할 수 있는 방법 및 이들의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 약물을 선별하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박지훈

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 101동 1503호 (전민동, 엑스포아파트)

전효진

대전광역시 서구 둔산북로 215, 3동 302호 (둔산동, 가람아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1003874420110210010001164510038744201102

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제기술혁신사업

연구과제명 Drug Repositioning 기술을 이용한 신약개발 활용시스템 구축

기여율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.12.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

독시사이클린(doxycyclin) 처리된 MELK 유전자 및 상기 처리된 MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 마커; 및

Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 마커;

로 구성되는 전이성 뇌종양 진단용 마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 MELK는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Vimentin은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 마커 조성물.

청구항 4

제 1항의 마커 조성물의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 전이성 뇌종양 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 MELK 또는 Vimentin 유전자의 수준을 측정하는 물질은 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 MELK 또는 Vimentin 단백질의 수준을 측정하는 물질은 단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

전이성 뇌종양 여부를 진단하는 방법에 있어서, a) 생물학적 시료에 존재하는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물의 발현양 또는 단백질 양을 측정하는 단계, 및 b) 상기 a)단계에서 측정결과를 정상대조군 시료의 MELK 또는 Vimentin 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 동물을 대상으로 전이성 뇌종양을 진단 또는 예측하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunoassay) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 존재하는 MELK 또는 Vimentin 유전자의 발현양이나 단백질의 양이 대조군에 비해 증가된 경우, 전이성 뇌종양이 발병된 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

a) 제 1항의 마커 조성물의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; b) 상기 세포주에서 마커 조성물의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 마커 조성물의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는 MELK 또는 Vimentin의 발현을 억제하는 전이성 뇌종양의 예방 또는 치료용 물질을 선별하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단계 b)의 발현 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blot) 및 RT-PCR로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 마커 조성물에 피검물질을 처리하는 단계; b) 상기 마커 조성물의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 마커 조성물의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는 MELK 또는 Vimentin의 발현을 억제하는 전이성 뇌종양의 예방 또는 치료용 물질을 선별하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 단계 b)의 활성 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석, 단백질 칩, 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제4항의 조성물을 포함하는 전이성 뇌종양의 진단 또는 예측용 키트.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전이성 뇌종양을 진단할 수 있는 마커, 이를 이용한 진단용 조성물, 전이성 뇌종양을 진단 또는 예측할 수 있는 방법 및 이들의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 약물을 선별하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뇌종양은 구개골 내에 비정상적으로 생기는 종양을 의미하는 것으로 다른 원인들에 의해 유발되는 것이나 그 원인에 따라 원발성 또는 전이성(이차성) 뇌종양으로 크게 구분된다. 원발성 뇌종양은 뇌와 그것을 둘러싼 구조물 내의 세포로부터 시작되는 반면, 전이성(이차성) 뇌종양은 몸의 다른 부분(예를 들어, 폐, 신장, 유방, 피부)으로부터 암 세포들이 뇌로 퍼졌을 때 발생한다. 원발성 뇌종양은 많은 형태들이 있으며 시작된 세포에 따라 종양의 형태를 나눌 수 있다. 예를 들어, 성상세포종은 성상세포로부터 발생하는 것으로 뇌에서 가장 흔한 세포형태인 성상세포는 뉴런(신경세포)를 지지하는 역할을 한다. 원발성 뇌종양은 중추신경계 밖으로 거의 퍼지지 않는다.

[0003] 폐, 유방 또는 흑색종 등의 뇌바깥쪽의 암으로부터의 전이되는 전이성 뇌종양은 전신적이고 모든 뇌종양의 반 이상을 차지하고 있으며 두개강내 종양중 가장 흔한 종양중의 하나로 최근 발생빈도가 증가하고 있다. 전이성 뇌병변의 경우 종양의 조직 소견은 원발 부위의 성상을 나타내지만 증상은 원발성 뇌종양과 같이 두통, 오심, 근력약화 및 인지기능 저하의 증상이 그대로 나타날 수 있다. 그러므로 치료에 있어서는 환자의 임상적 특성에 따라 달라질 수 있으나 우선 뇌의 압력증가를 막고 종양의 성장을 억제하기 위한 방사선 치료를 선행하고 이후 전이를 일으킨 원발 병소의 암에 맞추어 항암화학요법을 실시하고 있다.

[0004] 전이성 뇌종양 환자의 1/3은 암의 병력을 가지고 있지 않으며(국립암센터, 전이성 뇌종양의 치료방법) 전이성 뇌종양에 대한 확진은 원발성암(origin cancer)이 병리 조직학적으로 확인되었거나 조직검사 후에나 가능하게 된다. 전이성 뇌종양 환자의 16~35%는 전신암이 발견되지 않고 뇌병변이 먼저 발견된다는 통계가 있다. 전이성 뇌종양을 가지고 있는 환자의 대부분은 전신적으로 암이 많이 퍼져 조절이 불가능하며 이로 인해 수명이 제한될 수 있다. 불행하게도 대부분의 전이성 뇌종양은 방사선 및 항암화학요법에 잘 반응하지 않으며 원발암의 전이경도가 치료방법을 결정하는 데 매우 중요하다.

[0005] 전이성 뇌종양은 원발성암의 치료후에도 수개월 또는 심지어 몇 년 이후에 발병될 수 있으므로 치료를 위한 진단율은 매우 낮은 편이다. 따라서, 이러한 원발성암 발병이후 또는 원발성암의 예후가 없는 상황에서 생존율을 높이고 치료시기를 앞당기기 위한 뇌종양의 전이를 진단 또는 예측할 수 있는 새로운 방법의 개발이 시급하다.

[0006] 최근에는 암을 조기에 진단하기 위한 종양 마커를 이용한 진단방법이 개발되어 있으며 종양 마커의 경우 체내의 특정암세포에서 과발현되는 경우가 많기 때문에 종양 마커가 비정상적으로 과발현된 경우 특정 장기의 암으로 진단할 수 있다. 그러나 종양마커는 암이 발생하는 장소에 따라 그 종류가 다양하고 모든 종류의 암을 확인할 수 있는 마커는 없으므로 발현장기 또는 암의 종류에 따라 마커의 발굴이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Blot J. et al., Dev. Biol. 2002, 241(2):327-338
 (비특허문헌 0002) Davezac N. et al., Oncogene, 2002, 21:7630-7641
 (비특허문헌 0003) Dmitry V. et al., Nat. Cell Biol., 2003, 5:545-551
 (비특허문헌 0004) Hyun-A Seung et al., J. Biol. Chem., 2003, 278:9655-9662

(비특허문헌 0005) Ichiro Nakano et al., J. Neurosci. Res., 2008, 86:48-60; Haiyoung Jung et al., J. Biol. Chem., 2008, 283:34541-34553

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 전이성 뇌종양을 정확하고 신속하게 진단 또는 전이여부를 미리 예측할 수 있는 새로운 마커의 발굴을 목적으로 한다. 이 마커를 이용한 전이성 뇌종양의 새로운 진단방법 및 나아가 이들의 발현 또는 활성을 억제하는 약물을 선별할 수 있도록 함으로써 표적 항암제의 연구개발에 사용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 MELK 유전자, MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질, Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나 이상의 전이성 뇌종양 진단용 마커에 관한 것이다. 바람직하게는 MELK는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖으며 Vimentin은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는다.

[0010] 또한 본 발명은 MELK 유전자, MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질, Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군으로부터 어느 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 수준을 측정하는 체계를 포함하는 전이성 뇌종양 진단용 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, MELK 또는 Vimentin 유전자의 수준을 측정하는 물질은 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, MELK 또는 Vimentin 단백질의 수준을 측정하는 물질은 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 전이성 뇌종양 여부를 진단하는 방법에 있어서, a) 생물학적 시료에 존재하는 MELK 유전자, Vimentin 유전자, MELK 단백질 및 Vimentin 단백질로 이루어진 어느 하나 이상의 발현양 또는 단백질 양을 측정하는 단계, 및 b) 상기 a) 단계에서 측정결과를 정상대조군 시료의 MELK 또는 Vimentin 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 전이성 뇌종양을 진단 또는 예측하는 방법에 관한 것이다. 상기 생물학적 시료는 바람직하게는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어진 군 중에서 선택되어 질 수 있으며 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다. 진단하는 방법에 있어 바람직하게는 상기 생물학적 시료에서 존재하는 MELK 또는 Vimentin 유전자의 발현양이나 단백질의 양이 대조군에 비해 증가된 경우, 전이성 뇌종양이 발병된 것으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 a) MELK 또는 Vimentin의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; b) 상기 세포주에서 MELK 또는 Vimentin의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 MELK 또는 Vimentin의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, MELK 또는 Vimentin의 발현을 억제하는 전이성 뇌종양의 예방 또는 치료용 물질을 선별하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 단계 b)의 발현 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blot) 및 RT-PCR로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 a) MELK 또는 Vimentin에 피검물질을 처리하는 단계; b) 상기 MELK 또는 Vimentin의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 MELK 또는 Vimentin의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, MELK 또는 Vimentin의 활성을 억제하는 전이성 뇌종양의 예방 또는 치료용 물질을 선별하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 단계 b)의 활성 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석, 단백질 칩, 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 구성된 군으로부터 선택된 어느

하나의 방법으로 측정할 수 있다.

- [0014] 또한, 본 발명은 MELK 유전자, MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질, Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군으로부터 어느 하나 이상의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 전이성 뇌종양 진단용 조성물을 포함하는 전이성 뇌종양의 진단 또는 예측용 키트에 관한 것이다. 바람직하게는 이들 키트는 RT-PCR 키트, DNA 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트가 될 수 있다.
- [0015] 모성 배아 류신 지퍼 키나아제(maternal embryonic leucine zipper kinase, MELK)는 아데노신 모노포스페이트에 의해 활성화되는 세린/트레오닌 키나아제의 일종으로 다양한 암에서 중요한 역할을 한다. MELK는 아프리카 발톱개구리(*Xenopus*)의 수정란에서 처음 발견되었으며 세포 주기의 유사분열 단계에서 그 양이나 활성화가 최대화되는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상은 척추동물세포에서도 확인되었다(Blot J. et al., *Dev. Biol.* 2002, 241(2):327-338; Davezac N. et al., *Oncogene*, 2002, 21:7630-7641). MELK에 의해 인산화되는 단백질로는 세포 주기에 관여하는 CDC25가 알려져 있으며(Dmitry V. et al., *Nat. Cell Biol.*, 2003, 5:545-551), 상기 단백질은 전사 단백질인 ZPR9을 인산화시켜 세포 주기를 조절하는 것으로 알려져 있다(Hyun-A Seoung et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:9655-9662). 최근 유방암 환자나 교아세포암 환자의 조직에서 MELK의 발현이 증가하는 것으로 확인되었으며 MELK의 발현을 억제하는 것 자체만으로도 암세포의 성장이 저해되는 것으로 밝혀졌다(Ichiro Nakano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2008, 86:48-60; Haiyoung Jung et al., *J. Biol. Chem.*, 2008, 283:34541-34553).
- [0016] Vimentin은 간엽세포에서 발견되는 타입 III의 중간섬유 단백질이며, 간엽세포의 세포골격의 주요한 구성성분이다. Vimentin은 세포질내 소기관들의 위치를 지원하고 고정하는 데 중요한 역할을 한다. Vimentin은 핵, 소포체 및 미토콘드리아의 측면이나 말단에 부착되어 있다. Vimentin의 동적 성질은 세포가 유연성을 가지는데 중요한 역할을 하며 최근 과학자들은 생체내 기계적 응력에 미세소관이나 액틴 필라멘트 네트워크가 없는 상태에서 세포에서 탄성력을 제공하는 것을 발견하였다. 따라서, Vimentin은 세포의 보전성을 유지하는 데 있어 중요한 세포골격의 구성요소라고 받아들여지고 있다. (Goldman R. D., Khuon S., Chou Y., Opal P., Steinert P. (1996). "The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity". *J Cell Biol* 134 (4): pp. 97183.)
- [0017] Vimentin이 부족한 형질전환된 마우스에 관한 연구에서 이들 마우스는 기능적으로 정상이었다. 이는 미세소관망이 중간망의 부재를 보충할 수 있다는 것을 보여주며 미세소관과 Vimentin이 밀접하게 교류한다는 것을 시사한다. Vimentin은 세포의 외형, 세포질의 보전성 및 세포골격의 상호작용을 안정화시키는 데 중요한 역할을 한다. 또한, Vimentin은 저밀도 리포프로테인(LDL)의 수송을 조절한다는 것이 밝혀진바 있다.(Sarria A. J., Panini S. R., Evans R. M. (1992). "A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells". *J Biol Chem* 267 (27): pp. 1945563) 세포내에서 콜레스테롤 유래 LDL수송을 막으면 세포들은 Vimentin을 가진 정상세포보다 리포프로테인을 더 낮은 함량으로 저장하였다.
- [0018]
- [0019] 상기 유전자들의 정보는 Genebank에 등록되어 있으며 MELK의 등록번호(Accession No.) NM_014791이며 서열번호 1의 아미노산 서열에 의하여 특정된다. Vimentin의 등록번호는 NM_003380이며, 서열번호 2의 아미노산 서열에 의하여 특정된다.
- [0020] MELK의 아미노산 서열 (NP_055606)은 도6(a)에 기재된 바와 같다.
- [0021] Vimentin의 아미노산 서열 (NP_003371)은 도6(b)에 기재된 바와 같다.
- [0022] 본 발명의 발명자들은 MELK가 선택적으로 과발현되는 세포를 구축하였고, 이들 세포에 독시사이클린(Doxycycline)과 반응하는 단백질 발현 벡터를 도입하고 이러한 독시사이클린(Doxycycline)단백질에 의해 MELK

발현양이 조절되는 벡터 시스템을 도입하여, 궁극적으로 Doxycycline의 존재하에 MELK의 발현이 유도되도록 세포 시스템 (tet-MELK-C4)을 구축하였다. 본 발명에서는 200ng/ml Doxycycline에 의해 처리한 후 6시간 후에 MELK의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였고 이렇게 증가된 MELK의 단백질이 48시간 유지됨을 확인하였다. 24시간 200ng/ml Doxycycline을 tet-MELK-C4세포에 처리 후 단백질을 분리하여 2차원 단백질 분석을 실시하여 Doxycycline을 처리하지 않은 tet-MELK-C4세포와 비교하여 MELK에 의해 증가되는 단백질을 분석하였다.

[0023] 그 결과 Vimentin단백질이 MELK가 증가된 세포에서 증가하였으며 이결과는 웨스턴 블롯팅(Western blotting)결과와도 일치하였다.

[0024] 발명자들은 전이성 뇌종양 환자에서 추출한 세포에서 특이적으로 과발현되는 유전자를 분석한 결과 MELK 및 Vimentin이 특이적으로 발현되어 본 발명에 이르게 되었다.

[0025] 도1에서 볼수 있는 바와 같이 본 발명에서 대조군의 유전자인 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)와 비교하면 24시간 후에 MELK 및 Vimentin의 발현이 특이적으로 높아짐을 확인할 수 있다.

[0026] 상기의 결과는 MELK 또는 Vimentin의 유전자 또는 이들 유전자의 단백질이 전이성 뇌종양의 진단에 특이적인 마커가 될 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 이러한 작용에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서, 본 발명자들은 MELK 유전자, MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질, Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나 이상의 전이성 뇌종양 진단용 마커를 개발하였으며 이 마커가 본 발명의 하나의 양태를 제공한다. 바람직하게는 MELK는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖으며 Vimentin은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는다.

[0027] 또한 본 발명의 다른 양태는 MELK 유전자, MELK 유전자로부터 코딩되는 단백질, Vimentin 유전자 및 Vimentin 유전자로부터 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 전이성 뇌종양 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 구체적으로는, 유전자의 발현 수준을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 검출할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지된 공정을 이용하여 수행할 수 있다.

[0029] 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위하여 프라이머 또는 프로브를 이용할 수 있으며 유전자 정보(Genebank)의 서열을 이용하여 당업자라면 특정영역을 특이적으로 증폭시키는 프라이머 또는 프로브를 디자인 할 수 있다.

[0030] 본 발명의 프라이머는 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. 본 발명에서는 MELK 또는 Vimentin 폴리뉴클레오타이드의 센스 또는 안티센스 프라이머를 이용하여 시료의 mRNA수준에서 발현정도를 측정할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 프로브는 핵산의 상보적인 염기서열 간에 특이적으로 결합하는 물질을 이용하는 것으로 올리고뉴클레오타이드, DNA나 RNA프로브 등이 있다. 본 발명에서는 MELK 또는 Vimentin의 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 발현수준을 측정할 수 있다.

[0032] 상기 프라이머 또는 프로브의 제작 또는 선택 등은 당업자라면 용이하게 할 수 있으며 공지된 조건을 이용하여 변형할 수 있다.

[0033] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시

킬 수 있다. 그 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.

- [0034] 본 발명에서 단백질 발현수준 측정은 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항원-항체 결합반응, 또는 단백질-리간드 결합반응을 통하여 정량 또는 정성적으로 분석함으로써 전이성 뇌종양을 진단할 수 있으며, 상기 결합 반응은 통상의 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 질량분석, 단백질칩, 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있으며 이들 방법에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에서 항체는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 MELK 또는 Vimentin에 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.
- [0036] 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.
- [0037] 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 유전자 발현 수준을 전이성 뇌종양 의심환자에서의 유전자 발현 수준과 비교함으로써 전이성 뇌종양 의심 환자의 실제 암 발병 여부를 진단할 수 있다. 즉, 전이성 뇌종양으로 추정되는 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하고, 정상 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 본 발명의 마커의 발현 수준이 정상 세포의 것보다 전이성 뇌종양으로 추정되는 세포 유래에서 더 많이 발현되면 그 세포를 전이성 뇌종양으로 예측할 수 있는 것이다.
- [0038] 따라서, 본 발명의 또 하나의 양태는 전이성 뇌종양 여부를 진단하는 방법에 있어서, a) 생물학적 시료에 존재하는 MELK 유전자, Vimentin 유전자, MELK 단백질 및 Vimentin 단백질로 이루어진 어느 하나 이상의 발현양 또는 단백질 양을 측정하는 단계, 및 b) 상기 a)단계에서 측정결과를 정상대조군 시료의 MELK 또는 Vimentin 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 전이성 뇌종양을 진단 또는 예측하는 방법을 제공한다.
- [0039] 전이성 뇌종양의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 환자의 시료로부터 MELK 또는 Vimentin의 발현 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하여 MELK 또는 Vimentin을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 환자의 시료란 마커 유전자인 MELK 또는 Vimentin의 발현 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 상기에서 기술한 바와 같이 MELK 또는 Vimentin의 발현 수준을 확인할 수 있는 방법은 MELK 또는 Vimentin 유전자의 mRNA 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 항체, 프라이머 또는 프로브를 이용하는 것이다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

- [0041] 본 발명의 상기 전이성 뇌종양 진단용 마커는 신규약물의 타겟이 될 수 있으며 또한 다양한 약물개발에 활용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태는 a) MELK 또는 Vimentin의 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; b) 상기 세포주에서 MELK 또는 Vimentin의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 MELK 또는 Vimentin의 발현 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, MELK 또는 Vimentin의 발현을 억제하는 전이성 뇌종양의 예방 또는 치료용 물질을 선별하는 방법을 제공하는 것이다. 상기 단계 b)의 발현 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blot) 및 RT-PCR로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정할 수 있다.
- [0042] 구체적으로, 전이성 뇌종양 치료 후보 물질의 존재 및 부재 하에서 MELK 또는 Vimentin의 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 전이성 뇌종양 치료제를 스크리닝하는 데 유용하게 사용할 수 있다. MELK 또는 Vimentin의 농도를 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 전이성 뇌종양의 치료제로서 선택할 수 있다. 즉, 전이성 뇌종양 치료 후보 물질의 부재 하에 전이성 뇌종양 세포에서의 본 발명의 마커 MELK 또는 Vimentin의 발현 수준을 측정하고, 또한 전이성 뇌종양 치료 후보 물질의 존재 하에서 본 발명의 마커 MELK 또는 Vimentin의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 전이성 뇌종양 치료 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 마커의 발현 수준이 전이성 뇌종양 치료 후보 물질의 부재 하에서의 마커 발현 수준보다 감소시키는 물질을 전이성 뇌종양의 치료제로 예측할 수 있는 것이다.
- [0043] 또한, 본 발명의 다른 양태는 a) MELK 또는 Vimentin에 피검물질을 처리하는 단계; b) 상기 MELK 또는 Vimentin의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 MELK 또는 Vimentin의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, MELK 또는 Vimentin의 활성을 억제하는 전이성 뇌종양의 예방 또는 치료용 물질을 선별하는 방법을 제공하는 것이다. 바람직하게는 단계 b)의 활성 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석, 단백질 칩, 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정할 수 있다.
- [0044] 구체적으로, 본 발명은 전이성 뇌종양을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질의 투여 후 MELK 또는 Vimentin 유전자가 코딩하는 단백질의 수준에서 그 활성을 억제하는 물질을 선별함으로써 전이성 뇌종양 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0045] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 전이성 뇌종양 진단용 조성물을 포함하는 전이성 뇌종양 진단 또는 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 키트는 전이성 뇌종양 진단 마커인 MELK 또는 Vimentin의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 마커를 검출할 수 있다. 본 발명의 키트에는 전이성 뇌종양 진단 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0047] 구체적인 예로는 본 발명에서 MELK의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 증폭반응이 적용되는 경우, 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermusfiliformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다.
- [0048] 또한 바람직하게는, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

- [0049] 또한, 본 발명의 MELK 또는 Vimentin에 특이적인 항체를 포함하는 전이성 뇌종양 진단용 키트에 있어서, 항-MELK 또는 Vimentin 항체는 바이오틴, 또는 아비딘 또는 스트렙트아비딘에 대해 바이오틴과 본질적으로 동일한 결합 작용을 갖는 바이오틴 유도체인 리간드에 결합된 것이 사용될 수 있으며 상기 리간드 특이적 결합분자에 결합된 발색효소, 발색물질 또는 형광분자가 결합된 시각화 컨주게이트(conjugate)가 상기 리간드에 결합된 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 증합효소반응, 경쟁적 역전사효소 증합효소반응, 실시간 역전사효소 증합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 전이성 뇌종양 의심환자에서의 mRNA 발현량을 비교할 수 있고, 마커 유전자에서 mRNA로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여 전이성 뇌종양 의심환자의 실제 뇌종양 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [0051]
- [0052] mRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 전이성 뇌종양 마커로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 증합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다. 상기의 역전사효소 증합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 전이성 뇌종양 진단 마커로 사용되는 유전자의 mRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 전이성 뇌종양 발생 여부를 간편하게 진단할 수 있다.
- [0053] 한편, DNA 칩은 상기 전이성 뇌종양 마커 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 전이성 뇌종양의 발병 여부를 관독할 수 있다.
- [0054] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 전이성 뇌종양 의심환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 전이성 뇌종양 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여, 전이성 뇌종양 의심환자의 실제 전이성 뇌종양 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 항원-항체 복합체는 전이성 뇌종양 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [0056] 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 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 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, 마이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, K4 W(CN)8, [Os(bpy) 3] 2+, [Ru(bpy) 3] 2+, [MO(CN) 8] 4- 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H, 14C, 32P, 35S, 36Cl, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 90Y, 125I, 131I, 186Re 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.

[0057] 단백질 발현수준 측정은 바람직하게는, 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. 전이성 뇌종양 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 전이성 뇌종양 발병 여부를 확인할 수 있다.

[0058] 또한, 바람직하게는, 상기 전이성 뇌종양 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 전이성 뇌종양 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 전이성 뇌종양이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.

[0059] 또한, 바람직하게는, 상기 전이성 뇌종양 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시하는 것이다. 정상 대장 상피 조직 및 전이성 뇌종양으로 의심되는 조직을 채취 및 고정된 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 과라핀 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.

[0060] 또한, 바람직하게는, 상기 전이성 뇌종양 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 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, 전이성 뇌종양 발병 여부를 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명은 예측 또는 진단이 어려운 전이성 뇌종양의 진단 마커를 제공함으로써 전이성 뇌종양의 치료 및 예후 관리에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 전이성 뇌종양을 간단하고 빠르게 진단함으로써 종양의 유무를 정확하고 손쉽게 측정할 수 있어 치료시기를 앞당길 수 있으며 현재의 높은 사망률을 낮출 수 있다.

[0062] 또한, 이들 마커는 표적 특이적 항암제의 연구개발에 타겟으로 활용될 수 있으며 다양한 약물의 선별(스크리닝)에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도1은 대조군과의 MELK 및 Vimentin의 세포내 발현을 비교한 것이다.
 MELK(maternal embryonic leucine zipper kinase); Vim(Vimentin); GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

도2는 세포 이동능(Migration assay)을 조사한 결과이다.

도3은 침윤능(Invasion assay)을 측정한 결과이다.

도4는 U87-melk세포의 이동능 조사 결과이다.

도5는 세포 이동능을 scratch wound assay로 조사한 결과이다.

(a) 독시사이클린(Doxycycline, DOX)를 처리하지 않은 것

(b) 독시사이클린(Doxycycline, DOX)를 200ng/ml로 처리한 것
 도6의 MELK 및 Vimentin의 각각의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
 (a) MELK, (b) Vimentin

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명하고자 한다. 하기의 실시예는 하나의 예시일 뿐 실시예에 한정하지 않는다.

[0065] **실시예 1 : MELK 유도발현세포주 제작**

[0066] Clontech사의 Tet-On 3G system을 이용하여 U87MG에 MELK 발현 벡터를 도입하였다. 세포에 원하는 벡터를 안정적으로 유지하기 위하여 G418과 Hygromycine을 각각 50ug/ml의 농도로 처리하였다. MELK 유도발현세포주의 경우 Doxycycline을 200ng/ml 처리하여 MELK의 단백질 양을 증가시킬 수 있다. Doxycycline처리 후 6시간 이후 MELK 단백질의 증가를 관찰하였으며 48시간 이상 유지되는 것을 확인하였다.

[0067] **실시예 2 : 2차 전기영동법에 의한 단백질 분석**

[0068] MELK 유도 발현세포주에 대조군으로 DMSO를 처리하고 MELK발현군에는 Doxycycline 200ng/ml을 처리하여 24시간 후에 차가운 phosphate buffer saline (PBS)로 세포를 씻어 주고 10% TCA (Trichloroacetic acid)를 처리하여 원심분리를 한 다음 상층액은 버리고 세포덩어리를 아세톤으로 현탁시켜 초음파 파쇄를 실시한 다음 원심분리하였다. 분리된 단백질을 urea가 들어 있는 세포분해용액 (8M Urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCl)에 녹인 다음 단백질을 정량하였다. 정량된 단백질을 rehydration buffer (48% Urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG)와 섞고 IPG strip에서 pH3-10사이에서 분리하였다. pH에 의해 분리된 단백질을 아크릴아마이드젤에서 크기로 분리하여 가로축은 pH 세포축은 단백질 크기에 의해 분리하여 대조군과의 비교하여 변화가 있는 단백질을 선별하여 아크릴아마이드젤에서 분리하였다. 분리한 단백질은 trypsin을 처리하여 MALD-TOF TOF기기에서 단백질을 동정하였다.

[0069]
 [0070] **실시예 3 : 세포배양**

[0071] 10% 소태아혈청(fetal bovine serum) (GIBCO BRL., Gaithersburg, MD, USA), 50 ug/ml G418 (GIBCO BRL., Gaithersburg, MD, USA), 50 ug/ml 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) (GIBCO BRL., Gaithersburg, MD, USA)을 포함한 RPMI1640 배지(GIBCO BRL., Gaithersburg, MD, USA) 에서 배양하였다.

[0072] **실시예 4 : 웨스턴 블롯팅(Western blotting)**

[0073] U87MG 세포를 37℃ 배양기에서 꺼내어 배지를 제거하고 PBS 용액으로 2번 씻어주었다. 스크래퍼(scraper)로 U87MG 세포를 모아 2500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 다음 pro-prep 용액을 펠렛(pellet)과 1:1 비율이 되도록 넣고 잘 섞어 준 후, 얼음에 10분간 방치하였다. 13000 rpm에서 10분간 원심분리를 한 다음 상등액을 이용해 단백질을 정량하였다. 30 µg의 단백질, 샘플 버퍼(Sample buffer), 환원 시약(Reducing agent), pro-prep 용액을 새 용기에 혼합해 70 °C에 10분 동안 방치 한 후 얼음에서 식혔다. 전기영동 탱크의 댐 안쪽에 200 ml의 Mops SDS 완충액과 500 µl의 산화방지제(Antioxidant)를 넣어주고, 댐 바깥쪽에 600 ml의 Mops SDS 완충액을 채워주었다. 젤(gel)의 각 well당 혼합액의 10 µl씩을 넣어 100-150 V로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 젤을 PVDF 막으로 트랜스퍼(transfer)하고 얻어진 막을 블로킹 완충액(Blocking buffer)에 담아 80 rpm으로 1 시간가량 방치하였다. 블로킹 버퍼에 일차항체를 1:1000으로 희석하여 4 °C에서 24 시간가량 방치하였다. 0.1% TBST에 120 rpm으로 10분씩 6번 PVDF 막을 씻어주었다. HRT 형광표지된 이차 항체를 0.1% TBST에 1:2000으로 희석하여 80 rpm에 1 시간 동안 방치하였다. 0.1% TBST에 120 rpm으로 10분씩 6번 PVDF 막을 씻어주었다. ECL 용액(Amersham)을 PVDF 막에 골고루 묻히고 암실에서 필름에 현상하였다.

[0074] **실시예 5 : 세포 이동능 실험(Migration Assay)**(Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA)

[0075] 96well 이동성 플레이트를 10분간 상온에서 방치하였다. 무혈청 배지에 U87MG 세포 현탁액을 3×10^4 cells/ml의 농도로 준비하였다. 화합물을 세포 현탁액에 원하는 농도로 처리하였다. 96well 이동성 플레이트에서 플레이트 커버(Plate cover)와 막 챔버(Membrane chamber)를 분리하였다. 피더 트레이(Feeder tray)의 각 well에 소태아 혈청(Fetal bovine serum)이 10% 함유된 DMEM 배지 150 μ l를 넣었다. 막 챔버를 다시 피더 트레이 위로 가져다 놓았다. 미리 준비한 U87MG 세포 현탁액을 100 μ l만큼 막 챔버에 넣었다. 플레이트 커버를 덮고 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C 배양하였다. 배양이 끝나기 전에 미리 데워둔 세포 분리 용액(Cell detachment solution)을 96well 세포 채취 트레이(Cell harvesting tray)에 well당 150 μ l를 넣어주었다. 96 well 이동성 플레이트를 배양기에서 꺼내어 플레이트 커버를 열고 피더 트레이로부터 막 챔버를 조심스럽게 분리하였다. 막 챔버를 뒤집어 타올에 털어서 U87MG 세포가 들어있는 배지를 제거하였다. 그리고 150 μ l 세포 분리 용액이 들어있는 세포 채취 트레이 안에 분리한 막 챔버를 조심히 얹어 놓은 후, 30분 동안 37 $^{\circ}$ C 배양하였다. 막 챔버를 얹은 세포 채취 트레이에 플레이트 커버를 덮어 살짝 두드리거나 가볍게 흔들어 잘 섞어서 막 접촉면으로부터 세포가 완전히 세포 분리 용액으로 이동하게 하였다. 4X 용해 완충액(Lysis buffer)과 CyQuant GR 염색제를 75:1 비율로 준비하였다. 4X 용해 완충액과 CyQuant GR 염색제 혼합액을 150 μ l 세포 분리 용액이 들어있는 96well 플레이트에 well당 50 μ l씩 첨가한 후, 상온에서 20분 동안 배양하였다. 혼합액 중 well당 150 μ l를 형광 측정에 적당한 96well 플레이트(Griner)로 옮긴 후, 480/520 nm에서 측정하였다 (도2).

[0076] 상기 결과를 도시한 도2에서와 같이 독시사이클린(Doxycycline)을 처리한 경우 이동능이 현저히 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0077] **실시예 6 : 침윤능 분석(Invasion Assay)** (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA)

[0078] 멸균상에서 96well 침윤성 플레이트(Invasion plate)를 10분간 상온에서 방치하였다. 따뜻한 무혈청 배지 100 μ l를 막 챔버(Membrane chamber)의 기저막층(Base membrane layer)을 1시간 동안 다시 수화하였다. 무혈청 배지에 U87MG 세포 현탁액을 1×10^6 cells/ml의 농도로 준비하였다. 화합물을 세포 현탁액에 원하는 농도로 처리하였다. 수화된 배지 타올에 털어 제거하였다. 96well 침윤성 플레이트의 커버와 막 챔버(Membrane chamber)를 분리하여 피더 트레이(Feeder tray)의 각 well에 소태아 혈청(Fetal bovine serum)이 10% 함유된 DMEM 배지 150 μ l를 넣었다. 막 챔버를 다시 피더 트레이 위로 가져다 놓았다. 미리 준비한 U87MG 세포 현탁액을 100 μ l만큼 막 챔버에 넣었다. 플레이트 커버를 덮고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C 배양하였다. 배양이 끝나기 전에 미리 데워둔 세포 분리 용액(Cell detachment solution)을 96well 세포 채취 트레이(Cell harvesting tray)에 well당 150 μ l를 넣어주었다. 96 well 이동성 플레이트를 배양기에서 꺼내어 플레이트 커버를 열고 피더 트레이로부터 막 챔버를 조심스럽게 분리하였다. 막 챔버를 뒤집어 타올에 털어서 U87MG 세포가 들어있는 배지를 제거하였다. 그리고 150 μ l 세포 분리 용액이 들어있는 세포 채취 트레이 안에 분리한 막 챔버를 조심히 얹어 놓은 후, 30분 동안 37 $^{\circ}$ C 배양하였다. 막 챔버를 얹은 세포 채취 트레이에 플레이트 커버를 덮어 살짝 두드리거나 가볍게 흔들어 잘 섞어서 막 접촉면으로부터 세포가 완전히 세포 분리 용액으로 이동하게 하였다. 4X 용해 완충액(Lysis buffer)과 CyQuant GR 염색제를 75:1 비율로 준비하였다. 4X 용해 완충액과 CyQuant GR 염색제 혼합액을 150 μ l 세포 분리 용액이 들어있는 96well 플레이트에 well당 50 μ l씩 첨가한 후, 상온에서 20분 동안 배양하였다. 혼합액 중 well당 150 μ l를 형광 측정에 적당한 96well 플레이트(Griner)로 옮긴 후, 480/520 nm에서 측정하였다 (도 3).

[0079] 그 결과는 도3에 도시하였으며 독시사이클린(Doxycyclin)을 처리한 결과 세포의 침윤능이 현저히 증가하였다.

[0080] **실시예 7 : 스크래치 어세이 (Scratch Assay)**

[0081] Incucyte 96-well WoundMaker 시스템 (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 세포의 이동성을 보았다. (도4,5). 방법과 결과분석은 Essen Bioscience의 방법을 그대로 사용하였다. 이미지장비는 세포배양기안에서 작동하였으며 실시간 측정을 실시하였다.

[0082]

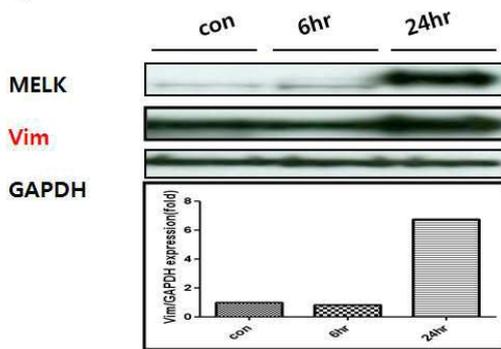
그 결과는 도4 및 5에 도시하였으며 독시사이클린(Doxycyclin)를 처리한 결과 세포의 이동성이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있다.

[0083]

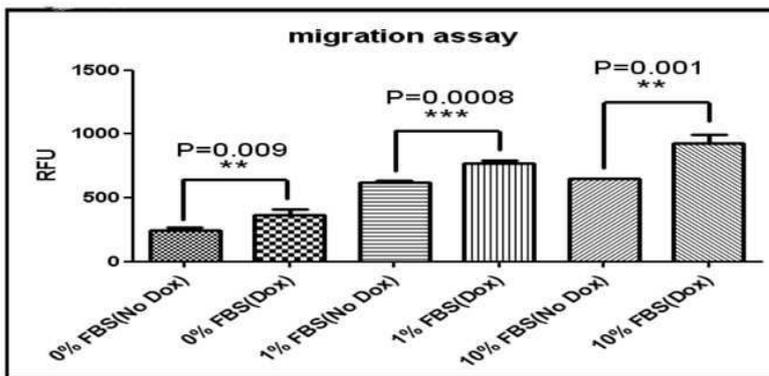
이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에 서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 한정하기 위한 것이 아니므로 본 발명의 기술적 사상의 범위가 본 실시예로 한정되지는 않을 것이다. 본 발명의 보호범위는 아래의 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이며 특허청구범위에 기재된 기술적 구성과 동등한 범위내에 모든 기술적 사상은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

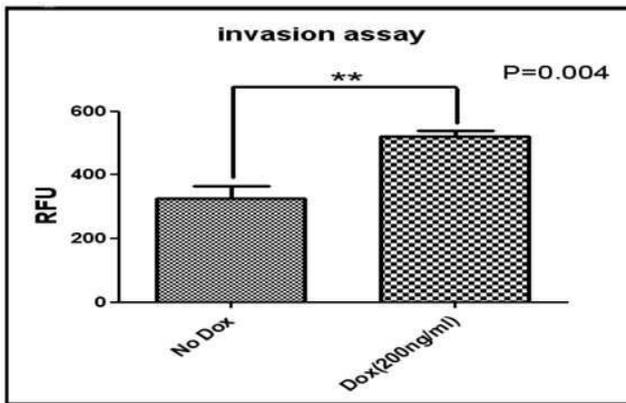
도면1



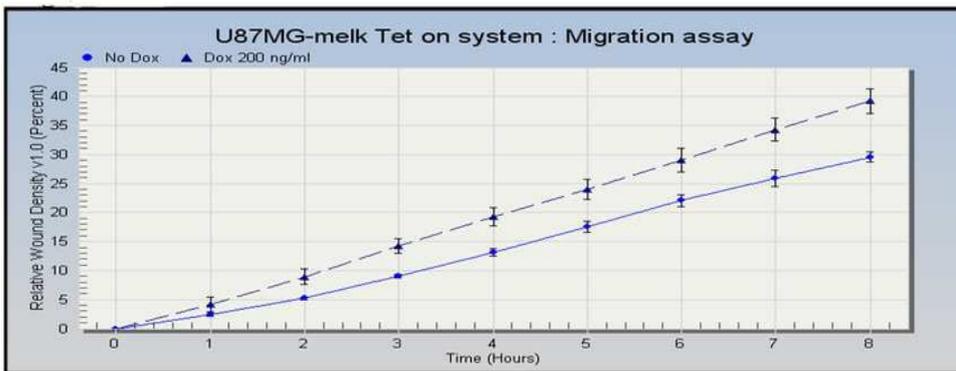
도면2



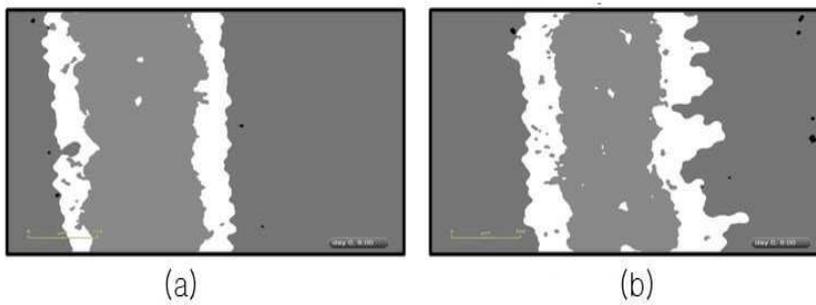
도면3



도면4



도면5



도면6

(a)

MKDYDELLKY YELHETIGTG GFAKVKLACH ILTGEMVAIK IMDKNTLGSD LPRIKTEIEA
 LKNLRHQHIC QLYHVLETAN KIFMVLEYCP GGELFDYIIS QDRLSEEETR VVFRQIVSAV
 AYVHSQGYAH RDLKPENLLF DEYHKLKID FGLCAKPKGKNDYHLQTCCG SLAYAAPELI
 QGKSYLGSEA DVWSMGILLY VLMCGFLPFD DDNVMALYKK IMRGKYDVPK WLSFSSILL
 QQMLQVDPKK RISMKNLLNH PWIMQDYNYP VEWQSKNPF I HLDDDCVTEL SVHHRNNRQT
 MEDLISLWQY DHLTATYLLL LAKKARGKPV RLRLSSFSCG QASATPF TDI KSNNWSLEDV
 TASDKNVVAG LIDYDWCEDD LSTGAATPRT SQFTKYWTES NGVESKSLTP ALCRTPANKL
 KNKENVYTPK SAVKNEEYFM FPEPKTPVNK NQHKREILTT PNRYTTPSKA RNQCLKETP I
 KIPVNSTGTD KLMTGVISPE RRCRSVELDL NQAHMEETPK RKGAKVFGSL ERGLDKVITV
 LTRSKRKGSA RDGPRRLKLH YNVTTRLVN PDQLLNEIMS ILPKKHVDFV QKGYTLKCQT
 QSDFGKVTMQ FELEVCQLQK PDVVGIRRQR LKGDAAVYKR LVEDILSSCK V

(b)

MSTRSVSSSS YRRMFGPGT ASRPSSRSY VTTSTRYSL GSALRPSTR SLYASSPGGV
 YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR TNEKVELQEL NDRFANYIDK
 VRFLEQQNKI LLAELEQLKG QGKSRLGDLY EEEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLAE
 DIMRLREKLQ EEMLQREEAE NTLQSFRQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLKKLHEE
 EIQELQAQIQ EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEBW YKSKFADLSE
 AANRNNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN FAVEAANYQD
 TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY RKLEGEESR ISLPLPNFSS
 LNLRETNLDS LPLVDTHSKR TLLIKTVETR DGQVINETSQ HHDDLE

서열목록

- <110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY
- <120> Markers for diagnosis of metastatic brain tumor
- <130> P12111311498
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 651
- <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Lys Asp Tyr Asp Glu Leu Leu Lys Tyr Tyr Glu Leu His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ile Gly Thr Gly Gly Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala Cys His Ile Leu
 20 25 30
 Thr Gly Glu Met Val Ala Ile Lys Ile Met Asp Lys Asn Thr Leu Gly
 35 40 45
 Ser Asp Leu Pro Arg Ile Lys Thr Glu Ile Glu Ala Leu Lys Asn Leu
 50 55 60
 Arg His Gln His Ile Cys Gln Leu Tyr His Val Leu Glu Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Lys Ile Phe Met Val Leu Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe Asp
 85 90 95
 Tyr Ile Ile Ser Gln Asp Arg Leu Ser Glu Glu Glu Thr Arg Val Val
 100 105 110
 Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val Ala Tyr Val His Ser Gln Gly Tyr
 115 120 125
 Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Phe Asp Glu Tyr His
 130 135 140
 Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Cys Ala Lys Pro Lys Gly Asn
 145 150 155 160
 Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly Ser Leu Ala Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Pro Glu Leu Ile Gln Gly Lys Ser Tyr Leu Gly Ser Glu Ala Asp Val
 180 185 190
 Trp Ser Met Gly Ile Leu Leu Tyr Val Leu Met Cys Gly Phe Leu Pro
 195 200 205
 Phe Asp Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Tyr Lys Lys Ile Met Arg Gly
 210 215 220
 Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu Leu
 225 230 235 240

Gln Gln Met Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Arg Ile Ser Met Lys Asn

245 250 255

Leu Leu Asn His Pro Trp Ile Met Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Val Glu

260 265 270

Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile His Leu Asp Asp Asp Cys Val Thr

275 280 285

Glu Leu Ser Val His His Arg Asn Asn Arg Gln Thr Met Glu Asp Leu

290 295 300

Ile Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Leu

305 310 315 320

Leu Ala Lys Lys Ala Arg Gly Lys Pro Val Arg Leu Arg Leu Ser Ser

325 330 335

Phe Ser Cys Gly Gln Ala Ser Ala Thr Pro Phe Thr Asp Ile Lys Ser

340 345 350

Asn Asn Trp Ser Leu Glu Asp Val Thr Ala Ser Asp Lys Asn Tyr Val

355 360 365

Ala Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp Asp Leu Ser Thr Gly

370 375 380

Ala Ala Thr Pro Arg Thr Ser Gln Phe Thr Lys Tyr Trp Thr Glu Ser

385 390 395 400

Asn Gly Val Glu Ser Lys Ser Leu Thr Pro Ala Leu Cys Arg Thr Pro

405 410 415

Ala Asn Lys Leu Lys Asn Lys Glu Asn Val Tyr Thr Pro Lys Ser Ala

420 425 430

Val Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Met Phe Pro Glu Pro Lys Thr Pro Val

435 440 445

Asn Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu Thr Thr Pro Asn Arg Tyr

450 455 460

Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn Gln Cys Leu Lys Glu Thr Pro Ile

465 470 475 480

Lys Ile Pro Val Asn Ser Thr Gly Thr Asp Lys Leu Met Thr Gly Val

Ser Arg Ser Leu Tyr Ala Ser Ser Pro Gly Gly Val Tyr Ala Thr Arg
 50 55 60
 Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro Gly Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Asp Ser Val Asp Phe Ser Leu Ala Asp Ala Ile Asn Thr Glu Phe
 85 90 95
 Lys Asn Thr Arg Thr Asn Glu Lys Val Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp
 100 105 110
 Arg Phe Ala Asn Tyr Ile Asp Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn
 115 120 125
 Lys Ile Leu Leu Ala Glu Leu Glu Gln Leu Lys Gly Gln Gly Lys Ser
 130 135 140
 Arg Leu Gly Asp Leu Tyr Glu Glu Glu Met Arg Glu Leu Arg Arg Gln
 145 150 155 160
 Val Asp Gln Leu Thr Asn Asp Lys Ala Arg Val Glu Val Glu Arg Asp
 165 170 175
 Asn Leu Ala Glu Asp Ile Met Arg Leu Arg Glu Lys Leu Gln Glu Glu
 180 185 190
 Met Leu Gln Arg Glu Glu Ala Glu Asn Thr Leu Gln Ser Phe Arg Gln
 195 200 205
 Asp Val Asp Asn Ala Ser Leu Ala Arg Leu Asp Leu Glu Arg Lys Val
 210 215 220
 Glu Ser Leu Gln Glu Glu Ile Ala Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ile Gln Glu Leu Gln Ala Gln Ile Gln Glu Gln His Val Gln Ile
 245 250 255
 Asp Val Asp Val Ser Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Val
 260 265 270
 Arg Gln Gln Tyr Glu Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu
 275 280 285
 Glu Trp Tyr Lys Ser Lys Phe Ala Asp Leu Ser Glu Ala Ala Asn Arg

