

기술명 : ALPPL2 단백질을 이용한 췌장암 진단 방법

IPC : G01N 33/68|C12Q 1/68|G01N 33/574|C12N 15/115

발명자 : 성균관대학교 이동기

#### 요 약

본 발명은 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질을 이용한 췌장암 진단 방법 등에 관한 것으로, 본 발명에 따른 ALPPL2 단백질은 초기 췌장암 세포주인 Panc-1, 후기 췌장암 세포주인 Capan-1, 및 기타 다 양한 췌장암 세포주들에 특이적으로 결합하기 때문에 정확한 췌장암 초기 진단을 위한 바이오마커로서 사용할 수 있으며, 본 발명에 따른 SQ2 6-30 핵산 압타머는 ALPPL2 단백질에만 특이적으로 결합하기 때문에, ALPPL2 단백질을 표적으로 하는 SQ2 6-30 핵산 압타머를 이용하여 췌장암 진단 및/또는 치료에 다양하게 사용할 수 있다. 또한 ALPPL2 단백질을 이용하여 SQ2 6-30 핵산 압타머 외에 ALPPL2 단백질에 선택적으로 결합하는 물질들을 선별하여 자유롭게 췌장암 진단 및/또는 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대된다. - 도6 이 발명을 지원한 국가연구개발사업 과제고유번호 K2081500004-11A0500-00410 부처명 교육과학기술부 연구관리전문기관 한국연구재단 연구사업명 글로벌연구실사업 연구과제명 RNAi 기반 간암치료제 개발 기 여 율 1/1 주관기관 성균관대학교 산학협력단 연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

#### 청구범위

##### 청구항 1

환자의 시료 중 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2)의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법으로서, 상기 ALPPL2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질인 것을 특징으로 하는, 방법.

##### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 환자의 시료는 췌장 조직, 췌장 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택 되는 것을 특징으로 하는, 방법.

##### 청구항 3

삭제

##### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 ALPPL2의 양을 측정하는 단계는 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 또는 웨스턴블로팅(western blotting)으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 방법.

##### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 ALPPL2의 양을 측정하는 단계는 ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 타겟 분자와 ALPPL2 단백질과의 결합량을 측정하는 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 타겟 분자는 핵산 압타머, 펩타이드, 항원, 항체, 저분자 리간드, 기질, 효소, 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 타겟 분자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 압타머인 것을 특징으로 하는, 방법.

#### 청구항 8

환자의 시료 중 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질의 양을 측정하는, ALPPL2 단백질에 특 이적으로 결합하는 타겟 분자를 포함하는, 췌장암 진단용 키트로서, 상기 ALPPL2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질인 것을 특징으로 하는, 췌장암 진단용 키트.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 환자의 시료는 췌장 조직, 췌장 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택 되는 것을 특징으로 하는, 췌장암 진단용 키트. 청구항 10 제 8 항에 있어서, 상기 타겟 분자는 핵산 압타머, 펩타이드, 항원, 항체, 저분자 리간드, 기질, 효소, 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 췌장암 진단용 키트. 청구항 11 제 8 항에 있어서, 상기 타겟 분자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 압타머인 것을 특징으로 하는, 췌장암 진단용 키트.

#### 기 술 분 야

본 발명은 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질을 이용한 췌장암 진단 방법 등에 관한 것이 다.

#### 배 경 기 술

췌장암(Pancreatic adenocarcinoma)은 췌장에 생긴 암 조직으로서, 췌장관에서 발생하는 췌관선암(pancreatic ductal adenocarcinoma)이 약 90%를 차지하고 있기 때문에 일반적으로 췌장암은 췌관선암을 의미한다(Bardeesy, N. and DePinho, R.A., Nat. Rev. Cancer, (2002) 2:897). 췌장암은 세계적으로 자주 발생하는 암 중 14위를 차지하고 있고, 2009년도 보건복지부에서 발표한 한국인 주요 암의 5년 생존율 추이보고서에 따르면 췌장암의 사망률은 92.2%에 이를 정도로 사망률이 높은 것으로 알려져 있다. 이는 췌장암의 경우 자각 증상이 없어 초기 진단이 어려울 뿐만 아니라, 초음파나 CT 촬영 등을 이용하여도 쉽게 관찰되지 않기 때문이다. 또한 췌장암은 기존의 화학요법적 치료에 대한 강한 내성을 가지고 있는 경우가 대부분이고, 외과적인 수술을 통하여 제거하기 도 용이하지 않기 때문에 초반에 진단이 되지 않으면 치료도 쉽지 않기 때문이다. 한편, 최근에는 다양한 암의 진단 및 치료를 위한 암 특이적 표적 단백질, 즉 바이오마커(biomarker)로서의 단백질을 선별하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 바이오마커는 암에 특이적으로 결합되기 때문에, 기본적으로 진단에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 항암제에 상기 바이오마커를 결합시켜 암 표적 특이적인 치료에도

사 용할 수 있기 때문에 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이와 같이 췌장암을 효과적으로 치료하기 위해서는, 췌장암을 조기에 정확하게 진단할 수 있는 췌장암 특이적인 바이오마커의 발굴 및 이를 이용한 진단 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

#### 해결하려는 과제

본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 췌장암 특이적인 바이오마커인 Alkaline phosphatase placental like-2(ALPPL2) 단백질, 상기 ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 핵산 압 타머 및 이를 이용한 진단 방법 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다. 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

#### 과제의 해결 수단

본 발명은 환자의 시료 중 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현예로, 상기 환자의 시료는 췌장 조직, 췌장 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 다른 구현예로, 상기 ALPPL2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 ALPPL2의 양을 측정하는 단계는 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 또는 웨스턴블로팅(western blotting)으로 측정하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 ALPPL2의 양을 측정하는 단계는 ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 타겟 분자와 ALPPL2 단백질과의 결합량을 측정하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 타겟 분자는 핵산 압타머, 펩타이드, 항원, 항체, 저분자 리간드, 기질, 효소 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 타겟 분자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 압타머인 것을 특징으로 한다. 또한 본 발명은 환자의 시료 중 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질의 양을 측정하는, ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 타겟 분자를 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예로, 상기 환자의 시료는 췌장 조직, 췌장 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 다른 구현예로, 상기 타겟 분자는 핵산 압타머, 펩타이드, 항원, 항체, 저분자 리간드, 기질, 효소 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 타겟 분자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 압타머인 것을 특징으로 한다.

#### 발명의 효과

본 발명에 따른 ALPPL2 단백질은 초기 췌장암 세포주인 Panc-1, 후기 췌장암 세포주인 Capan-1, 및 기타 다양한 췌장암 세포주들에서 특이적으로 분비되기 때문에 정확한 췌장암 초기 진단을 위한 바이오마커로서 사용할 수 있으며, 세포 외로 분비되기 때문에 체내 및/또는 체외 진단에도 이용될 수 있으며 혈액 내에 포함되어 있는 췌장암 세포를 검출할 수 있는 혈중종양세포(circulating tumor cell) 탐지기술 등에도 사용가능하다. 또한 본 발명에 따른 SQ2 핵산 압타머는 ALPPL2 단백질에만 특이적으로 결합하기 때문에, ALPPL2 단백질을 표

적으로 하는 SQ2 핵산 압타머를 이용하여 췌장암 진단 및/또는 치료에 다양하게 사용할 수 있으며, 조영제 등에 상기 압타머를 수식하여 체내 영상 진단용으로도 사용 가능하다. 또한 ALPPL2 단백질을 이용하여 SQ2 6-30 핵산 압타머 외에 ALPPL2 단백질에 선택적으로 결합하는 물질들을 선별하여 자유롭게 췌장암 진단 및/또는 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1은 SQ2 6-30 핵산 압타머가 결합된 단백질들을 분리한 결과를 나타내는 도면이다. 도 2는 SQ2 6-30 핵산 압타머에 특이적으로 반응하는 단백질을 확인한 결과를 나타내는 도면이다. 도 3은 SQ2 6-30 핵산 압타머가 ALPPL2 단백질에 선택적으로 결합하는지 확인한 결과를 나타내는 도면이다. 도 4는 ALPPL2 단백질이 세포 외로 분비되는지 확인한 결과를 나타내는 도면이다. 도 5는 SQ2 6-30 핵산 압타머의 ALPPL2 단백질 표적지향성을 확인한 결과를 나타내는 도면이다. 도 6은 SQ2 6-30 핵산 압타머가 ALPPL2 단백질에 선택적으로 결합하는지 확인한 결과를 나타내는 도면이다. 도 7은 ALPPL2 단백질에 결합된 SQ2 6-30 핵산 압타머의 양을 정량화한 결과를 나타내는 도면이다. 도 8은 다양한 암에서의 ALPPL2 단백질 발현을 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명자들은 췌장암(pancreatic adenocarcinoma)을 조기에 정확하게 진단할 수 있는 췌장암 특이적인 바이오 마커(biomarker) 및 이를 이용한 췌장암 진단 방법에 대하여 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다. 본 발명은 췌장암 특이적인 바이오마커인 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서는 ALPPL2 단백질이 다른 암 세포 및 정상 세포에서는 발현이 증가되지 않지만 다양한 종류의 췌장암 세포에서만 특이적으로 발현이 증가된다는 것을 확인하였으며, 다른 실시예에서는 상기 ALPPL2 단백질은 세포 외로 분비된다는 것을 확인하였다(실시예 2 및 3 참조). 상기 결과들로부터, ALPPL2 단백질은 췌장암 특이적인 바이오마커이며, 세포 외로 분비되기 때문에 췌장 조직 및 췌장 세포 뿐만 아니라 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇨 등을 이용한 체외 진단이 가능하다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명은 환자의 시료 중 ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질의 양을 측정하는 단계들을 포함하는, 췌장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 ALPPL2 단백질의 양을 측정하는 방법에는 제한이 없으나, 해당 유전자의 mRNA 또는 단백질의 양을 생명공학 분야에서 사용하는 방법에 따라 측정할 수 있다. 바람직하게는 qRT-PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction), 웨스턴 블로팅(western blotting) 등이다. 더욱 바람직하게는 ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 타겟 분자와 ALPPL2 단백질과의 결합량을 측정하는 방법이다. 상기 ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 타겟 분자의 종류에는 ALPPL2 단백질, RNA 및/또는 DNA에 특이적으로 결합한다면 제한이 없으나, 바람직하게는 펩타이드(peptide), 기질(substrate), 항원(antigen), 항체(antibody), 리간드(ligand), 핵산 압타머(nucleic acid aptamer), 효소(enzyme) 등이다. 더욱 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 압타머이다. 상기 서열번호 1의 염기서열은 ALPPL2 단백질에 선택적으로 결합하기 때문에 서열번호 1을 하나 이상 포함하는 핵산 압타머일 수 있다. 또한 상기 타겟 분자는 비오틴, 형광물질 등으로 표지할 수 있다. 한편, 본 발명에 따른 췌장암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 휴대성

을 높이기 위하여, 키트의 형태로 제공될 수 있다. 따라서 본 발명은 환자의 시료 중 ALPPL2 단백질의 양을 측정하는, ALPPL2(alkaline phosphatase placental like-2) 단백질에 특이적으로 결합하는 타겟 분자를 포함하는 칩장암 진단용 키트를 제 공한다. 본 발명의 칩장암 진단용 키트는 필요에 따라 반응용액, 완충용액 및 검출의 수행 및 분석을 위한 용기들을 포함할 수 있으며, 상기 용기들은 병, 튜브, 봉투, 앰플 등의 형태일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 진단용 키트는 상기 핵산 압타머가 기판상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태를 가짐으로써 DNA 칩 또는 단백질 칩 등의 칩(chip) 형태일 수도 있다. 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 실시예 1. 칩장암 세포주에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머의 제조 칩장암 특이적인 바이오마커를 선별하기 위하여, 칩장암 조직에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머를 제조하였다. 칩장암 조직에 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있는 핵산 압타머 SQ2 (서열번호

3:

AUACCAGCUUAUUCAAUUGCCUGAAAAGCUAUCGCCCAAUUCGCAGUGAUAUCCUUUAAGAUAGUAAGUGCAAUCU)를 이용하여 SQ2 6-30 핵산 압타머(서열번호 1: AGCUUAUUCAAUUGCCUGAAAAGCU) 및 대조군인 SQ2 mut 핵산 압타머(서열번호 4: AGCUUAUUCAUUUUUUUGAAAAGCU)를 제조한 후에, 상기 핵산 압타머들의 끝에 비오틴(biotin)을 결합시켜 비오틴이 수식된 핵산 압타머들을 제조하였다. 상기 핵산 압타머의 경우 모든 C 및 U 서열에는 2'-fluoro로 표기하였다. 실시예 2. 칩장암 특이적인 바이오마커의 선별 2-1. SQ2 6-30 핵산 압타머가 특이적으로 결합하는 단백질의 선별 SQ2 6-30 핵산 압타머가 특이적으로 결합하는 단백질을 선별하기 위하여, 인간 칩장암 세포주인 Panc-1 세포주 및 Capan-1 세포주를 배양하였다. Panc-1 세포주는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함되어 있는 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium)을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 일정 시간 배양한 후, 트립신 (trypsin)을 처리하여 상기 세포를 배양 접시로부터 떼어낸 후에 10% FBS가 첨가되어 있는 DMEM을 이용하여 2회 세척하여 트립신을 완전히 제거하였다. 그리고 새로운 10% FBS가 첨가되어 있는 DMEM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 1시간 동안 배양하여 막 단백질을 복원(renaturation)시킨 후에, 실시예 1의 방법으로 제조한 SQ2 6- 30 핵산 압타머 100pmol과 100배 농도의 yeast tRNA competitor(Invitrogen)를 상기 세포에 함께 처리한 후에 4°C, 5% CO 조건에서 30분 동안 배양하였다. 이후 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합되어 있는 magnetic dynabead(Invitrogen) 150μg을 상기 세포에 처리하고 4°C, 5% CO 조건에서 30분 동안 배양하여 SQ2 6-30 핵산 압타머가 결합되어 있는 세포에 상기 dynabead를 결합시켜 Pacn-1 세포주로부터 SQ2 6-30 핵산 압타머가 결합된 Panc-1+ve 세포주와 결합되지 않은 Panc-1-ve 세포주를 분리하였다. Panc-1-ve 세포주는 3회 계대 배양 후에 약 100%의 Panc-1-ve 세포주를 획득하였고, Panc-1+ve 세포주는 10회 계대 배양 후에 약 100%의 Panc-1+ve 세포주 를 획득하였다. 그리고 Panc-1+ve, Panc-1-ve, Panc-1, 및 Capan-1 세포주에 각각 10% FBS가 포함되어 있는 DMEM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 1X10<sup>6</sup> cells가 되도록 배양하였다. 그리고 상기 세포들을 저장성 완충 용액(hypotonic buffer, 50mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 짧게 2회 세척한 후에 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor)가 포함되어 있는 저장성 완충용액을 첨가하고 4°C에서 30분 동안 배양한 후에 다시 저장성 완충용액 으로 2회 세척하였다. 세척하는 과정에서 배양접시에서 떨어져나온 세포

또는 세포 용해물(lysate)은 원심분리를 통하여 다시 수거하여 배양접시에 다시 첨가하였다. 이후 상기 배양접시들에 단백질 분해효소 억제제가 포함되어 있는 lysis buffer(5mM MgCl, 1% Triton X-100, phosphate buffered saline)를 첨가한 후에 4°C에서 30 분 동안 반응시켜 세포를 용해시키고, 원심분리를 통하여 상층액을 수득하고 10Kd centrifugal cut-off filter(Amicon)를 이용하여 상층액을 농축하였다. 상기 농축된 상층액에 실시예 1의 방법으로 제조된 SQ2 6-30 핵산 압타머 200pmol 및 100배 농도의 yeast tRNA competitor(invitrogen), 또는 대조군인 biotinylated mutant oligo(St Pharma. Inc.) 및 100배 농도의 yeast tRNA competitor(invitrogen)를 첨가한 후에 4°C에서 30분 동안 반응시켜 결합시킨 후 스트렙타비딘이 결합되어 있는 아가로즈 비드(streptavidin-agarose bead)를 이용하여 SQ2 6-30 핵산 압타머 또는 biotinylated mutant oligo(SQ2 mut)가 결합되어 있는 단백질들을 원심분리를 통하여 분리하였다. 상기 분리된 단백질들은 lysis buffer를 이용하여 4회 세척한 후에, 50unit의 RNase If(MBI-Fermentas)를 처리하고 37°C에서 10분간 배양하여 아가로즈 비드로부터 단백질들을 분리하였다. 그리고 분리된 단백질들을 4-15% SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, Capan-1 세포주에서는 대조군으로 사용한 SQ2 mut와는 결합하지 않고 SQ2 6-30에만 특이적으로 결합한 단백질인 약 57Kd 크기의 B1 단백질과 약 130Kd 크기의 B2 단백질을 확인할 수 있었다. 또한 Panc-1-ve 세포주에서는 B1 단백질이 검출되지 않았지만, Panc-1+ve 세포주에서 B1 단백질이 검출되었다. 상기 결과를 통하여 B1 및 B2 단백질은 SQ2 6-30 핵산 압타머가 특이적으로 결합하는 단백질인 것을 확인할 수 있었다. 상기 SQ2 6-30 핵산 압타머가 특이적으로 결합하는 단백질의 서열을 확인하기 위하여, 분리된 단백질을 LC-ESI-MS/MS를 통하여 아미노산 서열을 확인한 후에 MASCOT 데이터베이스를 통하여 단백질의 종류를 예측하였다. 그 결과는 표 1에 나타내었다. 표 1에 나타난 바와 같이, 예측되는 B1 단백질에는 alkaline phosphatase placental like-2(ALPPL2, 서열번호 2)이 있는 것을 확인하였으며, B2 단백질에도 동일한 ALPPL2 단백질이 예측되는 것을 확인하였다. ALPPL2 단백질은 두 개가 서로 결합하여 dimer 형태로 존재할 수 있기 때문에 B2 단백질은 ALPPL2(B1) 단백질이 두 개가 결합된 형태일 수 있다는 것을 예상할 수 있었다.

2-2. 췌장암 특이적인 바이오마커 선별 췌장암 특이적인 바이오마커를 선별하기 위하여, 정상 췌장 세포와 췌장암 세포에서의 단백질 발현의 차이는 DNA 마이크로어레이(DNA microarray)를 통하여 확인하였다. DNA 마이크로어레이를 위하여 췌장암 세포주인 Panc-1-ve, Panc-1+ve, 및 Capan-1 세포주와 정상 췌장세포주인 HPDE6c6 세포주(대조군)를 10% FBS가 포함되어 있는 DMEM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 일정 시간 배양한 후에 TRI Reagent(Qiagen)와 RNeasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 각각의 세포주로부터 total RNA를 추출한 후에 10µg의 total RNA를 주형(template)으로 이용하여 역전사효소(reverse transcriptase)로 이중가닥(double strand)의 cDNA를 합성하였다. 상기 합성된 cDNA는 형광물질인 Cy3로 표지하고, Nimblegen 385K 4-plex human microarray chip을 이용하여 마이크로어레이를 수행하였고, Panc-1+ve에서 2배 이상 증가된 329개의 유전자 중에서 상위 20개의 단백질을 표 2에 나타내었다. 표 2에 나타난 바와 같이, 정상 췌장세포주에 비교하여 ALPP 및 ALPPL2 단백질의 발현이 Panc-1+ve 세포주 및 Capan-1 세포주에서 현저히 증가되는 것을 확인하였고, 또한 Panc-1-ve 세포주에서는 상기 단백질들의 발현이 증가되지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, ALPP 및 ALPPL2 단백질은 췌장암에서 특이적으로 발현이 증가되는 단백질인 것을 확인하였다.

2-3. SQ2 6-30 핵산 압타머에 특이적으로 결합하는 단백질의 선별

췌장암에서 특이적으로 발현이 증가하는 ALPP 단백질 및 ALPPL2 단백질이 SQ2 6-30 핵산 압타머에 특이적으로 반응하는지 확인하기 위하여, Panc-1-ve 세포주 및 Panc-1+ve 세포주에서 ALPP와 ALPPL2 단백질의 발현량을 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)을 이용하여 확인하였다. qRT-PCR을 위하여, isol-RNA lysis reagent(5 PRIME Inc.)를 이용하여 각각의 세포주로부터 mRNA를 추출한 후에, 추출한 mRNA 1 $\mu$ g을 주형으로 이용하여 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit으로 cDNA를 합성하였다. 그리고 상기 cDNA를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였으며, 비교군으로 GAPDH(house keeping gene) 유전자를 사용하여 RNA 농도를 보정하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, ALPP 단백질의 경우에는 Panc-1+ve 세포주와 Panc-1-ve 세포주에서 발현량의 차이가 미비한 것을 확인할 수 있었고, ALPPL2 단백질의 경우에는 Panc-1+ve 세포주에서 Panc-1-ve 세포주에서보다 100 배 이상 발현이 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여 ALPP 단백질과 ALPPL2 단백질은 98%의 상동성(homology)을 가짐에도 불구하고, ALPPL2 단백질만이 SQ2 6-30 핵산 압타머의 결합에 특이적으로 반응한다는 것을 확인하였다. SQ2 6-30 핵산 압타머가 ALPPL2 단백질에 선택적으로 결합하는지 확인하기 위하여, 웨스턴 블로팅(western blotting)을 수행하였다. ALPPL2 단백질은 GPI 닻형 단백질(glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein)군으로 특수한 당지질을 매개로 하여 세포막 면에 연결되어 있는 단백질이다. 상기 GPI 닻형 단백질군은 일반적으로 세포막의 lipid rafts 부분에 주로 위치하고 있기 때문에, 단백질을 추출하기 위하여 일반적으로 사용되는 비이온 세제(non-ionic detergent)는 효율적이지 않은 것으로 알려져 있기 때문에, 1% Triton X-100 용액 및 0.2% 사포닌(saponin)이 포함되어 있는 1% Triton X-100 용액을 이용하여 4°C 및 37°C에서 단백질을 추출해 본 결과, 0.2% 사포닌이 포함되어 있는 1% Triton X-100 용액을 이용하여 37°C에서 단백질을 추출한 경우에 가장 효율적으로 단백질이 추출되는 것을 확인하였다. 따라서 하기 실험은 0.2% 사포닌이 포함되어 있는 1% Triton X-100 용액을 이용하여 37°C에서 막 단백질을 추출하여 수행하였다. 단백질을 추출하기 위하여, Panc-1+ve, Panc-1-ve, Capan-1 세포주, 및 HPDE 세포주(대조군)에 각각 10% FBS가 포함되어 있는 DMEM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 1X10<sup>6</sup> cells가 되도록 배양하였다. 그리고 상기 세포들을 저장성 완충용액(hypotonic buffer, 50mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 짧게 2회 세척한 후에 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor)가 포함되어 있는 저장성 완충용액을 첨가하고 4°C에서 30분 동안 배양한 후에 다시 저장성 완충용액으로 2회 세척하였다. 이후 상기 세포들을 배양접시로부터 긁어내어 수거한 후에 단백질 분해효소 억제제가 포함되어 있는 lysis buffer(150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2% saponin, 20mM Tris-HCl, pH 8)를 첨가한 후에 37°C에서 30분 동안 반응시켜 세포를 용해시키고, 원심분리를 통하여 단백질을 분리하고, anti-ALPPL2 monoclonal antibody를 이용하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3A에 나타난 바와 같이, Capan-1 세포주 및 Panc-1+ve 세포주에서는 ALPPL2 단백질의 양이 HPDE 세포주 및 Panc-1-ve 세포주에 비교하여 현저히 높은 것을 확인하였다. 또한 도 3B에 나타난 바와 같이, SQ2 6-30 핵산 압타머에 특이적으로 결합하는 단백질은 ALPPL2 단백질인 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과들을 통하여 췌장암에서는 ALPPL2 단백질이 특이적으로 발현이 증가된다는 것을 확인하였으며, 또한 상기 ALPPL2 단백질은 SQ2 6-30 핵산 압타머가 특이적으로 결합하기 때문에 SQ2 6-30 핵산 압타머를 이용하여 ALPPL2 단백질의 양을 측정하여 췌장암을 진단할 수 있다는 것을 확인하였다. 실시예 3. 췌장암 진단용 바이오마커로서 ALPPL2 단

백질의 효능 확인 3-1. ALPPL2 단백질의 세포 외 분비능 측정 ALPPL2 단백질을 효과적인 췌장암 진단용 바이오마커로 사용하기 위해서는, 세포 외로 분비되어야 하기 때문에, ALPPL2 단백질이 세포 외로 분비되는지 확인하기 위하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 웨스턴 블로팅을 수행하기 위하여, Capan-1 및 HPDE 세포주를 각각 10% FBS가 포함되어 있는 DMEM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 배양접시의 80%가 채워질 때까지 배양하고, 상기 세포들을 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후에 FBS가 포함되어 있지 않은 DMEM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 상기 배양액을 수거하여 원심분리를 통하여 세포를 완전히 제거하고 10,000Kd centrifugal filter(Millipore)를 이용하여 상층액(conditioned media)을 농축하였다. 상기 농축된 상층액을 이용하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, HPDE 세포주에서는 ALPPL2 단백질이 검출되지 않았지만, Capan-1 세포주에서는 SQ2 6-30 핵산 압타머에 결합된 ALPPL2 단백질을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통하여, ALPPL2 단백질은 막에도 결합되어 있지만, 세포 외로도 분비가 된다는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 췌장 조직, 췌장 세포 뿐 만 아니라 뇨, 혈액, 타액 등을 이용한 체외 진단이 가능하다는 것을 확인하였다. 3-2. SQ2 6-30 핵산 압타머의 표적지향성 확인 SQ2 6-30 핵산 압타머가 ALPPL2 단백질에 특이적으로 결합하는 표적지향성을 가지고 있는지 확인하기 위하여, ALPPL2 단백질의 siRNA(서열번호 5-10)를 Panc-1+ve 세포주에 도입하여 ALPPL2 단백질의 발현이 억제된 siALPPL2 돌연변이주들을 제조하였다. 대조군으로는 siGFP(서열번호 11-12)를 이용하여 siGFP 돌연변이주를 제조하였다. 상기 siRNA들은 ST 바이오팜에서 합성하였다. 제조된 돌연변이주들을 이용하여 실시예 2와 동일한 방법으로 qRT-PCR 및 웨스턴 블로팅을 수행하여 SQ2 6-30 핵산 압타머의 표적지향성을 확인하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5A에 나타난 바와 같이, siALPPL2 돌연변이주들의 경우에는 ALPPL2 단백질과 높은 상동성을 가지는 ALPP mRNA의 발현은 억제되지 않고, ALPPL2 mRNA의 발현만 선택적으로 억제된 것을 확인하였다. 또한 도 5B에 나타난 바와 같이, mRNA 뿐만 아니라 ALPPL2 단백질의 발현도 90% 이상 억제된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여 siRNA를 이용하여 ALPPL2 단백질의 발현이 효과적으로 억제된 siALPPL2 돌연변이주들이 제조된 것을 확인하였다. 상기 Panc-1+ve 세포주, siGFP 돌연변이주, 및 siALPPL2 돌연변이주에 TAMRA(Carboxytetramethylrhodamine)로 표지된 SQ2 6-30 핵산 압타머(3'-TAMRA-labelled SQ2) 50nM을 첨가하고 37°C, 5% CO 조건에서 20분간 배양하여 결합시킨 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 또한 세포핵은 10µg/mL의 Hoechst33342로 염색하고 Nucleocounter NC3000(Chemometec)를 이용하여 각각의 세포주에서 5,000 cells를 분석하여 형광 세기(mean fluorescent intensity, MFI)를 정량화하였다. 그 결과는 도 6 및 도 7에 나타내었다. 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, siGFP 돌연변이주의 경우에는 SQ2 6-30 핵산 압타머가 세포의 표면에 결합되어 형광이 관찰되었지만, siALPPL2 돌연변이주들의 경우에는 SQ2 6-30 핵산 압타머가 결합되지 않아 형광이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, SQ2 6-30 핵산 압타머가 ALPPL2에 선택적으로 결합한다는 것을 확인할 수 있었다. 3-3. SQ2 6-30 핵산 압타머의 췌장암 특이성 확인 SQ2 6-30 핵산 압타머가 췌장암 특이적으로 결합하는지 확인하기 위하여, 3'-TAMRA-labelled SQ2 핵산 압타머를 췌장암 세포주인 Capan-1, Panc-1, MiaPaCa-2, Bxpc3, AsPC-1, HpaF-II, 및 Cfpac-1 세포주와 다른 암 세포주인 SK-BR-3(유방암), LnCap(전립선암), Hep G2(간암), HeLa(자궁경부암), A549(폐암), SK-N-SH(신경암), 및 T98G(아교모세포종)에 처리하여 SQ2 6-30 핵산 압타



머가 결합되었는지 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다. 대 조군으로는 HPDE 세포주를 사용하였다. 그 결과는 표 3 및 도 8에 나타내었다. 표 3 및 도 8에 나타난 바와 같이, SQ2 6-30 핵산 압타머는 다른 암 세포주들에는 결합하지 않고, 다양한 췌장 암 세포주 중에 Capan-1, Panc-1, AsPC-1, HpaF-II, 및 Bxpc3 세포주들에는 결합하고, MiaPaCa-2 및 Cfpac-1 세포주에는 결합하지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, SQ2 6-30 핵산 압타머는 다양한 췌장암 세포주들에서 특이적으로 발현되는 ALPPL2 단백 질에 선택적으로 결합한다는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 상기 ALPPL2 단백질은 세포 외로 분비되기 때문에 체내 및/또는 체외 진단용 바이오마커로 사용될 수 있다는 것을 확인하였다. 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명 의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해 할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.