

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 11월 5일 (05.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/167183 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004160
- (22) 국제출원일: 2015년 4월 27일 (27.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0051608 2014년 4월 29일 (29.04.2014) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-713 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 고계상 (KO, Je Sang); 150-918 서울시 영등포구 여의동로 3길 10 101-2401(여의도동, 여의도자이아 파트), Seoul (KR). 안형태 (AN, Hyoung-Tae); 472-841 경기도 남양주시 화도읍 가곡로 92, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 135-936 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

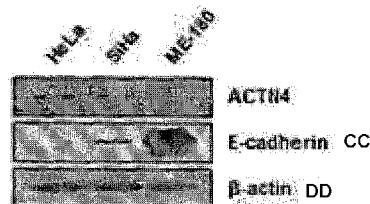
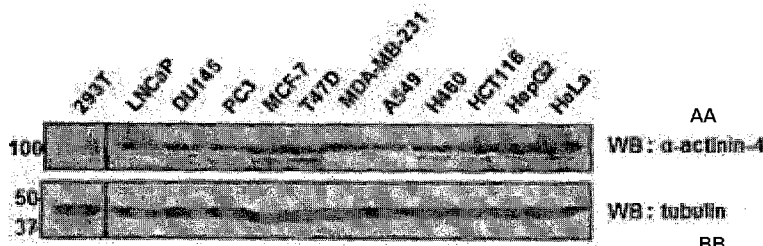
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: PHARMACEUTICAL USE OF ACTININ-4 INVOLVED IN INDUCTION OF CERVICAL CANCER

(54) 발명의 명칭 : 자궁경부암의 유도에 관여하는 악티닌-4의 억제학적 용도



AA ... α -actinin-4
BB ... Tubulin
CC ... E-cadherin
DD ... β -actin

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical use of actinin-4 involved in the induction of cervical cancer, and more specifically, characterizes actinin-4 as a marker protein capable of inducing cervical cancer, thereby providing the pharmaceutical use of actinin-4 that can be used in the diagnosis, prevention or treatment of cervical cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 자궁경부암 유도에 관여하는 악티닌-4의 억제학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자궁경부암 유도능이 있는 마커 단백질로서의 악티닌-4의 특성을 규명함으로써 자궁경부암의 진단, 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 악티닌-4의 억제학적 용도를 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 자궁경부암의 유도에 관여하는 악티닌-4의 억제학적 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 자궁경부암 마커 단백질로서, 자궁경부암 진단, 예방 또는 치료를 위한 악티닌-4의 억제학적 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 상피 중간엽 전이(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)란 상피세포가 중간엽 세포로 변하는 과정을 말한다. 즉 상피세포의 모습을 잃어버리고 중간엽 세포의 특징을 가지게 되는 변이과정으로 개체 형성 발달에 중요한 과정으로 알려져 있다. 또한, 최근 연구결과에 따르면 이 과정이 암세포의 생장(progression), 침윤(invasion), 전이(metastasis)등과 관련됨이 밝혀지고 있다.
- [3] 세포골격단백질(cytoskeletal protein)로 알려진 악티닌-4(actinin-4)는 몇몇 암세포에서 과발현되어 있을 뿐만 아니라 세포의 이동성 및 생장을 유도하는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 현재까지 자궁경부암에서 마커 단백질로서의 악티닌-4의 역할은 규명된바 없다.
- [4] 따라서, 본 발명자들은 다양한 암세포에서 악티닌-4의 발현 정도를 확인하고, 자궁경부암세포에서 과발현된 악티닌-4의 AKT-Snail 신호전달 기전에서의 역할, 세포 증식, 이동성과 침윤성, 종양형성을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 자궁경부암 마커 단백질로서의 악티닌-4의 역할을 규명함으로써 자궁경부암의 진단, 예방, 또는 치료를 위한 악티닌-4의 억제학적 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 악티닌-4(actinin-4) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자궁경부암 진단용 조성물을 제공한다.
- [7] 본 발명은 또한 악티닌-4(actinin-4) 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [8] 본 발명은 또한 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 악티닌-4 저해제의 용도를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 악티닌-4 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 억제학적 유효량을 자궁경부암 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자궁경부암을 치료하는 방법을 제공한다.

- [10] 본 발명은 또한 악티닌-4(actinin-4) 유전자를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 촉진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [11] 본 발명은 또한 악티닌-4(actinin-4) 단백질을 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명은 자궁경부암에서 과발현되고 세포증식, 이동성과 침윤성 및 종양형성에 관여하는 악티닌-4를 억제할 경우 이러한 효과가 상실되어 종양 형성이 억제되므로 악티닌-4 저해를 통해 자궁경부암의 진단, 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 다양한 암세포(전립선암-LNCaP, DU145, PC3, 유방암-MCF-7, T47D, MDA-MB-231, 폐암-A549, H460, 대장암-HCT116, 간암-HepG2, 자궁경부암-HeLa)에서의 악티닌-4 발현량 비교(A) 및 자궁경부암종 HeLa, SiHa 및 ME-180 세포에서 악티닌-4와 E-카데린의 발현 양상(B)을 나타낸 것이다.
- [14] 도 2는 자궁경부암세포인 SiHa 세포에서 악티닌-4 과발현 및 발현억제에 따른 AKT-Snail 신호기전 확인 결과(A) 및 Snail 결합 부위의 유·무에 따른 E-카데린 프로모터의 전사활성(B 및 C)을 나타낸 것이다.
- [15] 도 3은 자궁경부암세포인 HeLa, SiHa 세포에서 악티닌-4 발현억제세포 및 ME-180 과발현세포를 제작하고, 그에 따른 E-카데린, Snail 발현 또는 세포 표현형을 비교한 것이다.
- [16] 도 4는 자궁경부암세포인 HeLa 및 SiHa 세포에서 악티닌-4의 과발현에 따른 세포의 이동성을 나타낸 것이다.
- [17] 도 5는 자궁경부암세포인 HeLa 및 SiHa 세포에서 악티닌-4의 발현억제 세포에서의 이동성(A) 및 침윤성(B)을 나타낸 것이다.
- [18] 도 6은 악티닌-4 발현억제세포 배지에서의 이동성·침윤성(A) 및 세포증식(B) 결과이다.
- [19] 도 7은 악티닌-4의 과발현에 따른 β -카데린의 발현 증가(A) 및 악티닌-4의 β -카데린 분해 억제 및 안정화(B 및 C)를 확인한 결과이다.
- [20] 도 8은 악티닌-4의 과발현에 따른 β -카데린의 프로테아좀 분해 억제(A) 및 β -카데린의 타겟 사이클린 D1의 전사활성 증가(B)를 확인한 결과이다.
- [21] 도 9는 악티닌-4의 발현억제에 따른 콜로니 형성 감소(A 및 B) 및 과발현에 따른 콜로니 형성 증가(C)를 확인한 결과이다.
- [22] 도 10은 악티닌-4의 발현억제에 따른 세포성장을 비교한 것이다.

- [23] 도 11은 악티닌-4 발현억제 세포에서의 PI 염색 분석을 통한 세포증식 억제 확인 결과이다.
- [24] 도 12는 악티닌-4 발현억제 세포를 주사한 마우스에서의 날짜별 종양 형성(A) 및 암이 형성된 마우스 사진(B)이다.
- [25] 도 13은 악티닌-4 발현억제세포를 주사한 마우스에서 추출한 암(A), 암의 크기와 무게(B) 및 암세포 주사 후 마우스 몸무게(C)를 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [27] 본 발명은 악티닌-4(actinin-4) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자궁경부암 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [28] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 악티닌-4는 자궁경부암세포인 HeLa 세포에서 과발현되어(도 1A), 자궁경부암 세포종인 HeLa, SiHa 및 ME-180 세포를 이용하여 악티닌-4과 E-카데린의 발현량을 비교한 결과, HeLa 세포에서는 악티닌-4가 많이 발현되어 있으나, ME-180 세포에서는 거의 발현이 되어있지 않았다. 반면 악티닌-4 발현이 적은 ME-180 세포는 E-카데린의 발현이 많이 되었다(도 1B).
- [29] 또한, 악티닌-4의 증가에 따라 AKT의 활성화 증가 및 전사인자 Snail의 발현 증가를 보이나, 악티닌-4의 발현 억제는 AKT의 활성화를 감소시키며 Snail의 발현 역시 감소되었다(도 2A). Snail은 E-카데린의 프로모터에 결합하여 그 발현을 억제하므로 E-카데린 프로모터의 전사활성을 측정함으로써 악티닌-4는 자궁경부암 세포에서 Snail을 증가시킴으로써 E-카데린의 발현을 조절함을 확인하였다(도 2).
- [30] 악티닌-4는 HeLa, SiHa, ME-180 순으로 적게 발현되므로, HeLa 및 SiHa 세포에서는 악티닌-4의 발현억제세포를, 악티닌-4의 발현이 거의 없는 ME-180 세포에는 과발현세포를 제작하여 실험한 결과, 악티닌-4의 발현억제세포인 HeLa 및 SiHa 세포에서는 Snail의 발현이 줄어들고, E-카데린은 반대로 증가함을 확인하였다(도 3). HeLa 세포의 경우 E-카데린이 발현이 안 되는 세포이며 악티닌-4를 발현억제 하여도 다시 증가되지 않았다. 이는 악티닌-4가 Snail 발현을 통한 E-카데린의 발현조절에 관련되지만, 세포내 다른 여러 인자들에 의한 E-카데린 발현억제도 또한 이뤄지고 있기 때문인 것으로 보인다. 또한, 악티닌-4 과발현된 ME-180 세포에서는 E-카데린이 감소되는 양상을 나타내었다. 이 세포들의 표현형을 확인한 결과 발현억제세포에서 모양이 EMT의 반대현상인 MET 표현형, 즉, 세포-세포 간의 결합이 되는 표현형으로 바뀌어 나타났다(도 3 하단).
- [31] 또한, 악티닌-4의 과발현에 의한 세포의 이동성 증가를 확인한 결과, 악티닌-4의 과발현이 자궁경부암세포에서 이동성을 증가시켰다(도 4). 이동성과 침윤성은 암세포의 전이에 있어서 아주 중요한 과정 중에 하나이므로,

악티닌-4의 발현이 암세포의 이동성 및 침윤성에 관여하는지 확인하기 위하여 트랜스웰 이동 및 매트릭셀 침윤 분석을 진행한 결과, 악티닌-4의 발현억제세포는 대조군 세포에 비해 이동이 감소하였다(도 5A). 매트릭셀 침윤 분석 결과, 악티닌-4의 발현억제세포에서 침윤된 세포의 수가 감소하였다(도 5B). 또한, 악티닌-4는 Snail을 통해 MMP-9의 발현을 증가시키므로, 악티닌-4 발현억제세포인 SiHa 세포에서 얻은 배지를 이용하여 트랜스웰 이동을 통한 이동성을 확인한 결과, 발현억제 세포에서 얻은 배지의 경우 대조군 배지에 비해 세포의 이동성이 감소하였다(도 6A). 이러한 이동성 감소가 세포의 증식 때문에 일어나는지 확인하기 위해 동일 배지를 이용하여 MTT 분석을 진행한 결과, 각 배지에 의한 세포의 증식에는 변화가 없었다(도 6B). 따라서 악티닌-4의 발현은 AKT-Snail-MMP-9 증가 또는 AKT-snail-E-카데린 억제의 기전을 통한 세포의 EMT 및 이동성을 증가시키는 역할을 하는 중요한 암 마커 단백질인 것으로 보인다.

- [32] 또한, 악티닌-4의 과발현세포인 MDCK 세포에서 β -카데닌의 발현이 증가되어 있고, β -카데닌의 타겟 단백질인 비멘틴(Vimentine) 또한 증가되었다(도 7A). β -카데닌은 세포의 증식을 유도하고, 보통 세포-세포간 결합에 관여하는 E-카데린에 결합되어 존재하나, E-카데린의 감소는 β -카데닌의 감소로 이어진다. 그러나, 본 발명에서 악티닌-4의 과발현세포에서는 E-카데린의 발현이 억제되어 없어짐에도 불구하고 β -카데닌의 발현은 증가되어 있다. 따라서, 악티닌-4의 증가가 β -카데닌의 안정화에 관여할 것으로 판단되어 siRNA를 이용하여 E-카데린의 발현을 감소시킬 때 악티닌-4에 의해 β -카데닌의 분해가 억제되는지 확인한 결과, E-카데린이 감소함에 따른 β -카데닌의 감소가 악티닌-4의 과발현에 따라 억제되었다(도 7B). 또한, 트랜슬레이션 억제제인 사이클로헥사마이드를 처리하여 단백질의 합성을 억제하고 β -카데닌의 분해가 악티닌-4에 의해 억제되는지 시간 별로 확인한 결과 악티닌-4의 과발현의 경우 대조군(mock)에 비해 분해가 더 지연되었고, β -카데닌의 타겟 단백질인 c-myc의 감소도 지연되었다(도 7C). 세포 내에서 β -카데닌의 분해는 프로테오솜(proteosome)에 의해 일어나는 현상이므로, 악티닌-4가 프로테오솜 분해에 의한 분해를 억제하여 β -카데닌의 안정화를 유도하는지 확인하기 위해 프로테오솜 억제제인 ALLN을 처리하여 확인한 결과, 악티닌-4 과발현시 β -카데닌의 프로테오솜 분해가 억제되며 더욱 안정화되어 양이 증가되어 있음을 확인하였다(도 8A). 또한 β -카데닌의 타겟 단백질인 사이클린 D1의 전사활성을 확인한 결과 악티닌-4의 발현 농도 별로 그 활성이 증가하였다(도 8B). β -카데닌 및 그 타겟 단백질인 사이클린 D1의 증가는 세포의 증식을 유도하므로, 악티닌-4의 발현은 세포증식에 관여할 것으로 판단되어 콜로니 형성 분석을 이용하여 세포 증식을 확인한 결과 악티닌-4 발현억제세포인 HeLa 와 SiHa 세포의 경우 콜로니 형성이 억제되었고(도 9A 및 B), 반대로 악티닌-4가 과발현된 ME-180 세포에서는 콜로니 형성이 증가되었다(도 9C). 따라서

악티닌-4의 과발현은 세포의 증식을 증가시켜 암 형성을 유도할 것으로 사료된다. 악티닌-4 발현억제세포에서 콜로니 형성 분석을 통해 세포의 증식이 감소되는 것을 확인한바 있으며, 악티닌-4의 낮은 발현이 세포증식에 관여하는지 MTT 분석을 통해 세포의 성장을 확인한 결과, HeLa와 SiHa 세포 모두 대조군에 비해 세포성장이 감소되었다(도 10). 세포의 성장이나 증식을 확인할 수 있는 PI 염색 분석 결과, 도 11에서와 같이 HeLa 및 SiHa 세포의 악티닌-4 발현억제세포의 경우 S 기의 비율이 감소하였다. 상기 결과로부터 악티닌-4는 암으로 유도되는 세포의 성장을 촉진하는 역할을 하는 것으로 판단된다. 이는 동물실험에서도 입증되었는데, 악티닌-4의 발현이 억제된 SiHa 세포를 마우스에 주사하여 종양 형성을 확인한 결과, 악티닌-4 발현억제 세포에서 대조군 세포에 비해 암 형성이 억제되었고(도 12A), 종양 크기 역시 대조군에 비해 작았다(도 12B). 또한, 악티닌-4의 발현억제세포를 주사한 마우스에서 제거된 종양을 비교한 결과 대조군에 비해 크기가 작았고(도 13A), 암의 크기 및 무게 역시 확연히 감소되었다(도 13B).

- [33] 따라서, 악티닌-4는 자궁경부암을 진단하기 위한 바이오마커로 사용할 수 있다.
- [34] 용어, "진단"은 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 자궁경부암 진단 마커의 발현 유무를 확인하여 자궁경부암의 발병 여부, 발전 및 경감 여부를 확인하는 것을 의미한다.
- [35] 용어, "진단용 마커(diagnosis marker)"란 자궁경부암의 세포를 정상세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 정상세포에 비하여 자궁경부암의 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명에서 제공하는 자궁경부암 진단용 마커는 정상세포에 비해 자궁경부암의 세포에서 발현양이 증가하는 악티닌-4 유전자로부터 발현된 단백질일 수 있다.
- [36] 본 발명의 자궁경부암 진단용 조성물은 악티닌-4 유전자의 mRNA의 발현 수준 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양을 측정하는 제제를 포함하고, 이러한 제제로 악티닌-4 mRNA에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 악티닌-4 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 핵산 프로브나, 악티닌-4 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [37] 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다.

따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 좋다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 증폭 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기관 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

- [38] 상기 핵산 프로브는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

- [39] 상기 악티닌-4에 특이적인 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체를 사용할 수 있다.

- [40] 상기 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062(1995)); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체 등이 포함된다.

- [41] 항체를 파파인(papain)으로 분해하면 2개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 단일 항원 결합 부위가 있는 각 "Fab" 단편, 및 그 나머지인 "Fc" 단편이 생성된다. 펩신을 처리하면, 2개의 항원 결합 부위가 있으며 여전히 항원에 교차결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생성된다. Fv는 완전한 항원인식 및 결합 부위를 포함하는

최소한의 항체 단편이다. 이 부위는 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역의 이합체로 구성되며 비공유결합으로 단단히 결합되어 있다.

- [42] 폴리클로날 항체의 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 포유동물에 1회 이상 면역화제를 주입, 필요한 경우 면역보강제와 함께 주입하여 제조할 수 있다. 통상, 면역화제 및(또는) 면역보강제는 포유동물에 피하주사 또는 복강내 주사로 수 회 주입된다. 면역화제는 본 발명의 단백질 또는 이의 융합 단백질일 수 있다. 면역화되는 포유동물에 면역원성이 있는 것으로 공지된 단백질과 함께 면역화제를 주사하는 것이 효과적일 수 있다.

- [43] 본 발명에 따른 모노클로날 항체는 문헌(Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975))에 기재된 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 제조합 DNA 방법(예를 들어, 미국특허 제4,816,576호 참조)으로 제조할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어, 문헌(Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597(1991))에 기재된 기술을 이용하여 파지항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

- [44] 본 발명에서의 모노클로날 항체는 구체적으로, 목적하는 활성을 발휘한다면 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이 있지만, 쇠(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래된 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 또는 그러한 항체의 단편과 동일하거나 상동성이 있는 "키메라" 항체를 포함한다(Morrison *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81:6851-6855(1984)).

- [45] 비-인간(예를 들어, 쥐과 동물) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇠 또는 그의 단편(예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원 결합 서열)이다. 대부분의 경우 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기를 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 인간 이외의 종(공여자 항체)의 CDR 잔기로 치환시킨 인간 면역글로불린(수용자 항체)을 포함한다. 몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체, 또는 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 일반적으로 둘 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 영역에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 영역에 해당한다. 또한, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간면역글로불린 영역의 일부를 포함한다(Presta, *Curr.Op.Struct.Biol* 2:593-596(1992)).

- [46] 본 발명의 자가경부암 진단용 조성물은 키트의 형태로 포함될 수 있다.

- [47] 상기 키트는 악티닌-4 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있고, 이들의 정의는 상술한 바와 같다.
- [48] 상기 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소 보조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 상기 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [49] 또한, 본 발명의 자궁경부암 진단용 조성물은 마이크로어레이의 형태로 포함될 수 있다.
- [50] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 악티닌-4 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.
- [51] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지될 수 있고, 마이크로어레이 상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [52] 또한, 본 발명은 상기 악티닌-4 유전자의 발현수준 또는 그 발현 단백질 수준을 측정하는 방법을 통해 자궁경부암을 진단하는 방법을 제공하는데, 보다 구체적으로 상기 방법은, (a) 자궁경부암 의심환자의 생물학적 시료로부터 악티닌-4 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군 시료로부터 상기 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양을 측정하여 상기 (a) 단계의 측정결과와 비교하는 단계를 포함할 수 있다.
- [53] 상기에서 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.
- [54] 상기 생물학적 시료는 자궁경부암 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 유전자의

발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있다.

[55] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[56] 상기 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 상기 악티닌-4 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[57] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양과 자궁경부암 환자, 또는 자궁경부암 의심환자에서의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현 양의 정도를 대조군과 비교함으로써 자궁경부암의 발병여부, 진행단계 등을 진단할 수 있다.

[58] 또한, 본 발명에 따른 상기 자궁경부암의 진단방법은 본 발명에 따른 악티닌-4 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양이 정상 대조군 시료에 비해 증가되었을 경우, 자궁경부암이 유발된 것으로 판단할 수 있다.

[59]

[60] 본 발명은 또한 악티닌-4(actinin-4) 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[61] 본 발명은 또한 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 악티닌-4 저해제의 용도를 제공한다.

[62] 본 발명에 따르면, 악티닌-4는 상술한 바와 같이, 자궁경부암세포에서 과발현되고, 악티닌-4의 발현은 AKT-Snail-MMP-9 증가 또는 AKT-Snail-E-카데린 억제 기전을 통해 세포의 EMT 및 이동성을 증가시키고 세포의 증식에 관여하는 β -카데닌의 분해를 억제하여 이의 타겟 단백질인 c-myc의 감소 역시 지연시키고 사이클린 D1의 전사활성을 증가시켜 세포의 증식을 증가시킴으로써 암 형성을 유도하나, 악티닌-4의 발현을 억제하는 경우 MET 표현형, 즉, 세포-세포간의 결합이 되는 표현형을 나타내고, 세포의 이동성과 침윤성이 감소되며, 세포 증식이 감소되고, 동물 모델에서 종양 형성을 억제하고, 형성된 종양 크기 역시 대조군 대비 작았다. 따라서, 악티닌-4의

저해제는 자궁경부암 치료에 사용할 수 있다.

- [63] 따라서, 본 발명의 자궁경부암의 예방 또는 치료용 조성물은 악티닌-4 유전자의 mRNA 발현 또는 이의 단백질의 발현을 감소시키거나, 기능 또는 활성을 감소시키는 제제를 포함할 수 있다.
- [64] 상기 악티닌-4 단백질 저해제는 악티닌-4 단백질과 결합하여 신경 분화 경로의 신호를 조절하는 펩타이드 또는 화합물 등일 수 있다. 이러한 저해제는 단백질을 구조 분석 등의 하기 예시된 스크리닝 방법을 통해 선정될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 설계될 수 있을 것이다.
- [65] 또한, 상기 단백질 저해제는 악티닌-4 단백질에 대한 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체를 사용할 수 있고, 상기 항체의 정의는 상술한 바와 같다.
- [66] 상기 항체를 이용하여 세포 내 악티닌-4의 기능을 억제함으로써 자궁경부암을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [67] 본 발명의 악티닌-4 단백질의 기능 또는 활성 저해제는 리포좀, 바이러스, 유전자 건(gene gun), 폴리머(polymer), 초음파, 전기충격을 이용해 전달될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [68] 상기 악티닌-4 유전자는 이들을 코딩하는 DNA 또는 이로부터 전사되는 mRNA일 수 있다. 따라서, 상기 유전자에 대한 저해제는 유전자 자체에 결합하여 전사를 방해하거나 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여 mRNA의 해독을 방해하는 저해제일 수 있다.
- [69] 따라서, 상기 악티닌-4 유전자의 저해제는 악티닌-4 유전자의 발현을 저해하는 저해제를 모두 포함한다. 예컨대, 이러한 저해제는 상기 유전자에 결합하는 펩타이드, 핵산 또는 화합물 등일 수 있다. 이러한 저해제는 세포 기반 스크리닝 등의 하기 예시된 스크리닝 방법을 통해 선정될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 설계될 수 있을 것이다.
- [70] 한 구체예에서, 상기 저해제는 악티닌-4 유전자에 대한 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터일 수 있다. 이러한 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제작할 수 있다.
- [71] 본 명세서에서 "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단을 통해 RNA 간섭현상을 유도하는 이중사슬 RNA를 의미하며, 표적 유전자의 mRNA와 같은 서열을 가지는 센스 서열의 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 서열의 RNA 가닥으로 구성된다.
- [72] 상기 siRNA는 시험관내에서 합성한 siRNA 자체 또는 siRNA를 코딩하는 염기서열을 발현벡터에 삽입하여 발현되는 형태를 포함할 수 있다.
- [73] 본 발명에 있어서, 상기 "벡터"는 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 내로 삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

- [74] 본 발명과 관련된 벡터는 상기 유전자를 저해하는 핵산 서열이 게놈 내로 삽입된 벡터로서, 이들 벡터는 DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 효모 벡터, 또는 바이러스 벡터를 예로 들 수 있다.
- [75] 또한, 상기 안티센스는 악티닌-4 유전자 또는 그의 단편으로부터 전사되는 mRNA 서열 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 지니고, 상기 mRNA와 결합하여 상기 악티닌-4 유전자 또는 단편의 발현을 억제할 수 있다.
- [76] 또한, 상기 shRNAi(short hairpin RNAi)는 인간 또는 마우스의 shRNAi 공통 염기서열 부위를 표적으로 하여 통상의 방법에 따라 제작된 것을 사용할 수 있다.
- [77] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [78] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 고질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [79] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [80] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [81] 본 발명의 조성물은 전신 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지의 기술로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [82] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. 악티닌-4는 식염수 또는 완충액에 잘 용해되므로 냉동 건조 상태로 보관한 후, 유효량의 악티닌-4를 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등에 적합한 형태로 식염수 또는 완충액에 투여 직전에 용액으로 제제화하여 투여할 수도 있다.

- [83] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방, 억제 또는 경감 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다.
- [84] 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여 시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여 시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [85] 본 발명은 또한 악티닌-4 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 약제학적 유효량을 자궁경부암 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자궁경부암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [86] 상기 자궁경부암의 치료 방법에 사용되는 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [87] 한편, 상기 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 투여할 수 있는 개체는 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 생쥐와 같은 인간을 제외한 동물일 수 있다.
- [88]
- [89] 본 발명은 또한 악티닌-4(actinin-4) 유전자를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 촉진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [90] 또한, 본 발명은 악티닌-4(actinin-4) 단백질을 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [91] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 먼저 상기 유전자 또는 단백질을 포함하는 자궁경부암 세포에 분석하고자 하는 후보물질을 접촉시킬 수 있다.
- [92] 상기 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 악티닌-4 유전자 염기서열에서 mRNA, 단백질로의 전사, 번역을 촉진하거나 억제하는 물질 또는 악티닌-4 단백질의 기능 또는 활성을 증진하거나 억제하는 의약으로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 펩타이드, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.
- [93] 이후, 후보물질이 처리된 세포에서 상기 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, 상기 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 증가 또는 감소하는 것이 측정되면 상기 후보물질은

자궁경부암을 치료 또는 예방할 수 있는 물질로 판단할 수 있다.

- [94] 상기에서 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 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) 등을 이용하여 수행할 수 있다.
- [95] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제하는 활성을 나타내는 후보물질은, 자궁경부암 치료제 후보물질이 될 수 있다.
- [96] 이와 같은 자궁경부암 치료제 후보물질은 이후의 자궁경부암 치료제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 악티닌-4 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능을 촉진 또는 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 자궁경부암 치료제를 개발할 수 있다.
- [97] 본 발명에서 유전공학적인 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 더욱 명확하게 된다.
- [98] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [99] 이하, 실험에 사용된 시약, 배지 등의 입수처는 다음과 같다:
- [100] Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 우태아혈청 (fetal bovine serum (FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, Lipofectamine 2000 reagent는 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였다.
- [101] 항-ACTN4, 항-비멘틴, 항-N-카데린, 항- β -액틴 및 항-AKT1 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)에서 구입하였고, 항-p-GSK3 β , 항-snail 및 항-p-AKT(S473) 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였으며,

항-E-카데린, 항- β -카데린 항체는 BD Biosciences에서 구입하였다. 모노클로날 항-Flag-M2 항체는 Aligent Technology에서 구입하였다.

[102] sh-ACTN4 플라스미드는 Open-biosystem으로부터 구입하였다.

[103] 트립판 블루 (Trypan blue) 및

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)는 Sigma (St, Louis, MO)에서 구입하였다.

[104]

[105] <실시예 1> 다양한 암세포들에서의 악티닌-4 발현 및 자궁경부암세포에서의 발현 비교

[106] 다양한 암세포에서의 악티닌-4의 발현량을 비교하기 위해 웨스턴 블랏을 이용하여 단백질 발현량을 비교하였다.

[107] 이를 위해, 일반세포인 사람 배아 신장 세포 (human embryonic kidney, HEK-293T)를 포함, 여러 암세포 (전립선암: LNCaP, DU145, PC3 / 유방암: MCF-7, T47D, MDA-MB-231 / 폐암: A549, H460 / 대장암: HCT116 / 간암: HepG2 / 자궁경부암: HeLa)에서의 악티닌-4의 발현을 비교하였다. 각 세포의 단백질량은 30 μ g과 10% SDS-PAGE 젤을 사용하였으며, 악티닌-4의 항체 (Santa Cruz)는 1:3000 비율로 사용하였다. 각 단백질 검출을 위해서 West Pico ECL (Thermo scientific, Rockford, IL)을 사용하여 암실에서 확인하였다. 튜블린 항체 (Santa Cruz)는 각 세포의 단백질을 동일량으로 비교한 것인지 알 수 있는 대조군으로서 1:3000 비율로 처리하였다.

[108] 도 1A에 나타나 바와 같이, 다른 암세포에 비해 자궁경부암세포인 HeLa 세포에서 과량의 악티닌-4가 발현되었다.

[109] 상기 결과를 기반으로 자궁경부암 세포종인 HeLa, SiHa 및 ME-180 세포를 이용하여 악티닌-4의 발현량을 비교하고, 발현량에 따른 E-카데린(E-cadherin)의 발현을 확인하였다.

[110] 이를 위해, 자궁암 세포에 포함되는 3가지 자궁암세포 (HeLa, SiHa, ME-180)에서 얻은 30 μ g의 단백질을 웨스턴 블랏을 이용하여 악티닌-4와 E-카데린 (BD Biosciences)의 단백질 발현량을 비교하였다. E-카데린 항체는 1:5000 비율로 사용하였다.

[111] 도 1B에 나타난 바와 같이, HeLa 세포에서는 악티닌-4가 많이 발현되어 있고, ME-180 세포에서는 거의 발현이 되어있지 않았다. 반면 악티닌-4 발현이 적은 ME-180 세포는 E-카데린의 발현이 많이 되어있었다.

[112] 이러한 결과는 악티닌-4의 과발현에 따른 E-카데린의 발현조절에 의한 것으로 보인다.

[113]

[114] <실시예 2> 자궁경부암세포에서 악티닌-4의 발현에 따른 AKT-Snail 신호기전 및 E-카데린의 전사활성 조사

[115] 선행 연구 보고에서, MDCK 세포에서 악티닌-4의 발현에 따른 AKT-Snail의

신호기전을 확인한바 있다. 따라서, 자궁경부암 세포에서도 같은 기전이 일어나는지 확인하였다.

- [116] 이를 위해, SiHa 세포에 flag-악티닌-4 DNA (1 μ g) 또는 sh-악티닌-4 (1.5 μ g)를 Lipofectamine2000 (Invitrogen)을 이용하여 트랜스펙션 하였다. DNA와 Lipofectamine2000의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. sh-악티닌-4의 경우 Open-biosystem에서 구입하여 사용하였다. 해당 세포들에서 RIPA 라이시스 버퍼를 이용하여 단백질을 추출 후 30 μ g의 단백질을 웨스턴 블랏으로 각각 (FLAG : Aligent Technology, p-AKT : Cell Signaling Technology, AKT : Santa Cruz, p-GSK3 β , snail : Cell Signaling Technology 및 β -액틴 : Santa Cruz)의 항체를 사용해 단백질들의 발현을 확인하였고, 각각의 항체는 1:3000 비율로 사용하였다.
- [117] 또한, HEK-293T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰당 2×10^5 세포를 씨딩한 후 0.5 μ g의 E-카데린 프로모터 구조물 (전장 크기 : -427 ~ +53, Del-mutant : -78 ~ +53)와 Flag-ACTN4 (0.5 μ g) 또는 sh-ACTN4 (0.5 μ g)를 동시에 트랜스펙션하였다. Deletion mutant 제작은 전장 프로모터에서 snail 결합부위를 포함한 -207 ~ -194 부분을 제외한 -78 ~ +53 부분을 클로닝하여 제작하였다. *sn* 은 snail의 결합부위 (-207~-194)를 나타낸다. 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 리포터 라이시스 버퍼 (Promega, Madison, WI)로 웰당 80 μ l를 사용하여 세포를 깬 후 10,000 $\times$ g에 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수집하고 루시페라아제 활성을 측정하였다. 기기는 Luminometer 20/20ⁿ (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA)를 사용하였다. 표준화(Normalization)를 위해서 pSV40- β -갈락토시다아제를 함께 트랜스펙션(co-transfected) 하였다. 수집된 상등액은 β -갈락토시다아제 활성을 측정하여 루시페라아제 활성을 보정하여 값을 그래프로 나타내었다. 여기에 β -갈락토시다아제 효소 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)이 사용되었고, DU530 spectrophotometer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA)를 사용하여 분석하였다.
- [118] 도 2A에 나타난 바와 같이, 악티닌-4의 증가에 따라 AKT의 활성화 증가 및 Snail의 발현증가를 나타내나, 악티닌-4의 발현 억제는 AKT의 활성화를 감소시키며 Snail의 발현 역시 감소시켰다.
- [119] 전사인자 Snail은 E-카데린의 프로모터에 결합하여 그 발현을 억제하는 역할을 한다. 따라서 Snail의 결합 부위를 포함하거나 제거된 두 가지 E-카데린 프로모터의 전사활성을 측정한 결과, Snail 부위가 포함된 프로모터에서는 전사활성이 감소되며 제거된 경우는 전사활성이 악티닌-4의 유·무에 따른 변화가 없었다(도 2B). 또한, 악티닌-4의 발현을 억제한 경우 E-카데린의 전사활성이 증가되었다(도 2C).
- [120] 이러한 결과를 볼 때 악티닌-4는 자궁경부암 세포에서 Snail을 증가시킴으로써 E-카데린의 발현을 조절하는 것으로 보인다.
- [121]

- [122] <실시예 3> 자궁경부암 세포종인 HeLa, SiHa 및 ME-180 세포에 악티닌-4 발현억제세포 및 과발현세포 제작에 따른 Snail과 E-카데린 발현 양상 조사
- [123] 실시예 1에서 악티닌-4는 HeLa, SiHa, ME-180 순으로 적게 발현되었다. 따라서 HeLa 및 SiHa 세포에서는 악티닌-4의 발현억제세포를 제작하였으며, 악티닌-4의 발현이 거의 없는 ME-180 세포에는 과발현세포를 제작하였다.
- [124] 악티닌-4 발현억제 안정화 세포를 제작하기 위해 HeLa, SiHa 세포에 shACTN4 플라스미드 (1.5 μ g)를 트랜스펙션하여 2주간 푸로마이신 (puromycin)(2 μ g/mL)으로 선별하였다. 해당 세포에서 단백질 추출 후 웨스턴 블랏을 이용하여 악티닌-4와 Snail의 단백질 발현량을 확인하였다. 또한, ME-180 세포에서는 악티닌-4의 과발현 안정화 세포를 제작하기 위해 Flag-ACTN4 플라스미드를 트랜스펙션한 후 2주 동안 G-418 (400 μ g/mL; Sigma)을 처리함으로써 선별하였다. 해당 세포들의 표현형 (세포모양)을 확인하기 위해 현미경을 통해 사진을 찍었다 (Zeiss Axiovert100 ; 배율 $\times$ 10).
- [125] 도 3에 나타난 바와 같이, 악티닌-4의 발현억제세포인 HeLa 및 SiHa 세포에서는 Snail의 발현이 감소하였고, E-카데린은 반대로 증가하였다. HeLa 세포는 E-카데린이 발현이 안 되는 세포이며 악티닌-4를 발현 억제하여도 다시 증가되지 않았다. 이는 악티닌-4가 Snail 발현을 통한 E-카데린의 발현 조절에 관련되지만, 세포내 다른 여러 인자에 의한 E-카데린 발현 억제도 또한 이뤄지고 있기 때문으로 생각된다.
- [126] 다음으로 악티닌-4 과발현된 ME-180 세포에서는 E-카데린이 감소되는 양상을 나타내었다. 이 세포들의 표현형을 확인한 결과 발현억제세포에서 모양이 EMT의 반대현상인 MET 표현형, 즉, 세포-세포 간의 결합이 되는 표현형으로 바뀌어 나타나는 것을 확인하였다(도 3 하단).
- [127]
- [128] <실시예 4> 자궁경부암세포에서 악티닌-4의 과발현에 따른 세포의 이동성 조사
- [129] 자궁경부암세포에서 악티닌-4의 과발현에 의한 세포의 이동성을 확인하기 위해, 상처 치유 분석 (wound healing assay)를 진행하였다.
- [130] 상처 치유 분석을 위해, 6-웰 플레이트에 각 웰당 HeLa 및 SiHa 5×10^5 세포를 씨앗하여 악티닌-4 (1 μ g)를 트랜스펙션한 후 각 웰의 세포를 200p 팁을 이용하여 직선으로 세포를 긁어낸 후 세포가 제거된 위치로 각 표면의 세포들이 이동하는 정도를 비교하였다 (HeLa 24h, SiHa 48h).
- [131] 도 4에서와 같이 악티닌-4의 과발현이 세포의 이동성을 증가시켰다.
- [132] 이동성과 침윤성은 암세포의 전이에 있어서 아주 중요한 과정 중의 하나이다. 따라서 악티닌-4의 발현이 암세포의 이동성 및 침윤성에 관여하는지 확인하기 위하여 악티닌-4 발현억제세포에서 트랜스웰 이동(transwell migration) 및 매트릭셀 침윤 분석(matrigel invasion assay)를 진행하였다.
- [133] 세포의 이동성 측정 (migration)을 위해 악티닌-4의 발현억제 안정화 세포

(HeLa-KD, SiHa-KD)를 이용하여 트랜스웰 이동을 진행하였다. 8 μ m-기공 크기의 구멍이 있는 트랜스웰 인서트(BD Biosciences)에 콜라겐 I (20 μ g)을 1시간 동안 코팅하였다. 그 후 HeLa (대조군과 KD 세포 : 3×10^5)와 SiHa (대조군과 KD 세포 : 5×10^5) 세포를 인서트에 씨딩하여 36시간 후 기공의 반대편으로 넘어간 세포의 수를 측정하여 그래프로 나타냈다.

[134] 도 5A에 나타난 바와 같이, 악티닌-4의 발현억제세포가 대조군 세포에 비해 이동이 감소하였다.

[135] 매트릭셀 침윤 분석은 하나의 암 조직의 세포에서 다른 생체 기관으로 전이될 경우 혈관 또는 조직으로 침투할 수 있는 능력이 필요하기 때문에 그러한 능력을 보기 위해 사용하는 실험이다. 매트릭셀을 지나서 멤브레인의 반대로 이동을 하게 되는 세포 수를 측정하였다.

[136] 이를 위해, 8 μ m-기공 크기의 구멍이 있는 인서트 플레이트 (BD Biosciences)에 매트릭셀 (2 mg/mL ; BD Biosciences)을 1시간 동안 코팅하였다. 그 후 HeLa (대조군과 KD 세포 : 5×10^5)와 SiHa (대조군과 KD 세포 : 5×10^5) 세포를 인서트 플레이트에 씨딩하여 36시간 후 기공의 반대편으로 넘어간 세포의 수를 측정하여 그래프로 나타냈다.

[137] 도 5B에 나타난 바와 같이, 악티닌-4의 발현억제세포에서 침윤된 세포의 수가 감소하였다.

[138] 또한, 악티닌-4는 Snail을 통해 MMP-9의 발현을 증가시키므로, 악티닌-4 발현억제세포에서 얻은 배지 역시 세포의 이동성을 억제할 것으로 생각되어, 악티닌-4 발현억제세포인 SiHa 세포에서 얻은 배지를 이용하여 트랜스웰 이동을 통한 이동성을 확인하였다.

[139] 이를 위해, 악티닌-4 발현억제 세포에서 얻은 커디션드 배지(conditioned medium; CM)를 HeLa와 SiHa 세포에 처리하여 세포의 이동성 (migration)을 트랜스웰 이동 방법을 이용하여 실험하였다. CM은 악티닌-4 발현억제 SiHa 세포를 6-웰 플레이트에 웰당 5×10^5 세포를 씨딩한 후, 무혈청 DMEM을 48시간 처리 후 그 배지를 수집하여 500 $\times$ g에 5분 동안 원심분리하여 남아있는 세포를 제거하고 배지만 회수하였다. 세포 이동성 (migration) 실험 방법은 상술한 이동성 실험과 동일하게 수행하였다.

[140] 또한, 해당 배지(CM)가 세포의 성장에 관여하는지 확인하기 위해 96-웰 플레이트에 HeLa 및 SiHa 각각 1×10^4 수의 세포를 씨딩한 후 SiHa-악티닌-4 발현억제 세포에서 얻은 CM (대조군 CM 또는 ACTN4-KD CM)을 처리하여 시간별(0-48h)로 세포 수를 측정하여 그래프로 나타내었으며 각각 3번씩 실험 진행하였다. 각각의 웰에 MTT 용액 100 μ L (5 mg/mL, Sigma)를 6시간 처리 후 반응을 정지하기 위해 100 mL의 디메틸 설펝사이드 (DMSO)를 넣어주었다. 590 nm 파장으로 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Inc)를 이용하여 측정하였다.

[141] 도 6A에 나타난 바와 같이, 발현억제세포에서 얻은 배지는 대조군 배지에 비해 세포의 이동성이 감소하였다.

- [142] 이러한 이동성 감소가 세포의 증식 때문에 일어나는지 확인하기 위해 동일 배지를 이용하여 MTT 분석을 진행한 결과, 각 배지에 의한 세포의 증식에는 변화가 없었다(도 6B).
- [143] 따라서, 악티닌-4의 발현은 AKT-Snail-MMP-9 증가 또는 AKT-snail-E-카데린 억제에 의한 세포의 EMT 및 이동성을 증가시키는 역할을 하는 중요한 암 마커 단백질인 것으로 확인되었다.
- [144]
- [145] <실시예 5> 악티닌-4의 과발현세포에서 β -카테닌의 발현 조사
- [146] 악티닌-4의 과발현세포인 MDCK 세포에서 β -카테닌의 발현을 조사하기 위해, MDCK 세포에서 악티닌-4의 과발현 안정화 세포를 제작하였다. 이를 위해, Flag-ACTN4 플라스미드를 트랜스펙션한 후 2주 동안 G-418 (400 $\mu\text{g/mL}$; Sigma)을 처리함으로써 선별하였다. 해당 세포에서 RIPA 라이시스를 진행하여 단백질 추출 후 30 μg 의 단백질을 사용하여 웨스턴 블랏으로 β -카테닌 (BD Biosciences)과 그 타겟 유전자인 비멘틴 (Santa Cruz)의 발현을 확인하였다. 각각의 항체는 1:3000 비율로 확인하였다.
- [147] 놀랍게도, 악티닌-4의 과발현세포인 MDCK 세포에서 β -카테닌의 발현이 증가되었고, β -카테닌의 타겟 단백질인 비멘틴(Vimentine) 또한 증가되었다(도 7A).
- [148] β -카테닌의 세포에서의 역할은 세포의 증식을 유도하는 것이고, β -카테닌은 보통 세포-세포간 결합에 관여하는 E-카데린에 결합되어 존재한다. 그러나 E-카데린의 감소는 β -카테닌의 감소로 이어진다. 하지만 악티닌-4의 과발현세포에서는 E-카데린의 발현이 억제되어 없어짐에도 β -카테닌의 발현은 증가되어 있다. 따라서, 악티닌-4의 증가가 β -카테닌의 안정화에 관여할 것으로 생각되어, siRNA를 이용하여 E-카데린의 발현을 감소시킬 때 악티닌-4에 의해 β -카테닌의 분해가 억제되는지 확인하였다.
- [149] 이를 위해, si-E-카데린 (oligo nucleotide CAGACAAAGACCAGGACUA, Bioneer) 을 제작하였다. SiHa 세포에 si-E-카데린 (100 nM)과 악티닌-4 (1 μg) 유전자를 트랜스펙션하여 E-카데린의 발현이 억제될 경우 β -카테닌과 비멘틴의 발현량을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. 각 해당 항체는 1:3000 비율로 사용하였다.
- [150] 도 7B에 나타난 바와 같이, E-카데린이 감소함에 따른 β -카테닌의 감소가 악티닌-4의 과발현에 따라 억제되었다.
- [151] 또한, 악티닌-4에 의해서 β -카테닌의 분해가 억제되는지 확인하기 위해 단백질 합성 억제제인 사이클로헥사마이드(Cyclohexamide, CHX, 40 $\mu\text{g/mL}$)를 시간별 (0-36h)로 처리하여 악티닌-4의 과발현에 따른 변화를 확인하였다. 웨스턴 블랏을 이용해 β -카테닌과 그 타겟 단백질인 c-myc을 확인하였다. 각 항체는 1:3000 비율로 사용하였다.
- [152] 그 결과, 악티닌-4의 과발현의 경우 대조군(mock)에 비해 분해가 더 지연되고,

β -카테닌의 타겟 단백질인 c-myc 감소도 지연되었다 (도 7C).

- [153] 세포 내에서 β -카테닌의 분해는 프로테오솜(proteasome)에 의해 일어나는 현상이다. 따라서 악티닌-4가 프로테오솜 분해에 의한 분해를 억제하여 β -카테닌의 안정화를 유도하는지 확인하기 위해 프로테오솜 억제제인 ALLN (20 μ M/mL, Calbiocam)을 6h 처리하여 악티닌-4에 의해 β -카테닌의 분해가 억제되는지 웨스턴 블랏을 이용해 확인하였다.
- [154] 또한, HEK-293T 세포에 악티닌-4를 농도별 (0, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 μ g)로 발현시킨 후 사이클린 D1 (0.5 μ g, CCND1)의 프로모터 루시퍼라아제 활성을 측정하였다.
- [155] 그 결과 악티닌-4 과발현시 β -카테닌(β -카테닌)의 프로테오솜 분해가 억제되며 더욱 안정화되어 양이 증가하였다(도 8A). 또한 β -카테닌의 타겟 단백질인 사이클린 D1(CCND1)의 전사활성 역시 악티닌-4의 발현 농도별로 증가하였다(도 8B).
- [156]
- [157] <실시에 6> 악티닌-4 발현억제세포 및 과발현세포의 증식 조사
- [158] β -카테닌 및 그 타겟 단백질인 사이클린 D1의 증가는 세포의 증식을 유도하므로 악티닌-4의 발현은 세포증식에 관여할 것으로 생각되어, HeLa와 SiHa의 악티닌-4 발현억제 안정화 세포(HeLa-KD, SiHa-KD)의 증식을 콜로니 형성 분석을 이용하여 확인하였다. 12-웰 플레이트에 각각의 세포를 3×10^3 수를 씨딩하여 5일간 유지한 후 콜로니가 형성된 수를 확인하였다. 또한, 악티닌-4의 과발현 안정화 세포인 ME-180-OV#3 세포를 이용하여 세포증식 정도를 콜로니 형성 실험을 통해 확인하였다. 이를 위해, 12-웰 플레이트에 각각의 세포를 3×10^3 수를 씨딩하여 5일간 유지 후 콜로니가 형성된 수를 확인하였다. 콜로니의 염색은 0.05 % 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)으로 24시간 염색 후 증류수 (DW)로 헹군 후 Nikon COOLPIX P300 digital camera (12.2 Mega-pixel; Nikon Corp., Tokyo, Japan)로 사진을 찍었다.
- [159] 그 결과, 악티닌-4 발현억제세포인 HeLa와 SiHa 세포의 경우 콜로니 형성이 억제되었으나(도 9A 및 B), 반대로 악티닌-4가 과발현된 ME-180 세포에서는 콜로니 형성이 증가하였다(도 9C). 따라서 악티닌-4의 과발현은 세포의 증식을 증가시켜 암 형성을 유도할 것으로 생각되었다.
- [160] 상기에서 악티닌-4 발현억제세포에서 콜로니 형성 분석을 통해 세포의 증식이 감소되어, 자궁경부암세포인 HeLa와 SiHa-악티닌-4 발현억제 안정화 세포에서 악티닌-4의 세포증식 관여 여부를 확인하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. 이를 위해, 96-웰 플레이트에 HeLa 및 SiHa 발현억제 세포 각각 1×10^4 수를 씨딩한 후 시간 별(12-36h)로 측정하여 그래프로 나타내었으며 각각 3번씩 실험을 진행하였다. 각각의 웰에 MTT 용액 100 μ l (5 mg/mL, Sigma)를 6h 처리 후 반응을 정지하기 위해 100 μ l의 디메틸 설폭사이드 (DMSO)를 넣어주었다. 590 nm 파장으로 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Inc)를 이용하여 측정하였다.

- [161] 도 10에 나타난 바와 같이, HeLa와 SiHa 세포 모두 대조군에 비해 세포성장이 감소되었다.
- [162] 또한, 세포의 성장이나 증식을 확인할 수 있는 실험으로 프로피디움 아이오다이드 (propidium iodide, PI) 염색 분석이 있다. 이것은 세포의 분화과정을 확인할 수 있는 실험으로써 G0, G1, S, G2/M기의 세포를 구별하여 그 수를 측정하는 방법이다. 상기 결과에서와 같이 세포의 성장 및 증식이 증가하게 되면 세포의 분열이 증가할 경우 S기의 세포 수가 증가하고, 반대로 증식이 감소할 경우 S기의 세포수가 감소하는 원리를 이용한 실험이다. 이를 위해, HeLa와 SiHa의 대조군 세포 (control)와 발현억제 세포 (KD)를 100mm 디쉬에 2×10^6 세포를 씨당한 후 세포 고정을 위해 70% 에탄올에 -20°C 에서 1시간 동안 고정작업을 진행하였다. 고정된 세포는 RNase를 포함한 프로피디움 아이오다이드 (Sigma) $50 \mu\text{g/mL}$ 농도를 넣어주고 37°C 에서 30분간 인큐베이션하였다. 30분 후 해당 세포들을 FACSsan (BD Biosciences, FACS Calibur)를 이용하여 각 세포주기별 세포수 (%)를 확인하였다.
- [163] 도 11에서와 같이 HeLa 및 SiHa 세포의 악티닌-4 발현억제세포의 경우 S기의 비율이 감소하였다.
- [164] 이로부터, 악티닌-4는 암으로 유도되는 세포의 성장을 촉진하는 역할을 하는 것으로 판단된다.
- [165]
- [166] <실시예 7> 악티닌-4의 발현억제세포를 주사한 마우스에서 종양형성 조사
- [167] 상기 실시예 6에서 악티닌-4의 과발현이 세포의 성장을 증가시키므로, 마우스 모델에서 이 효과를 실험하였다.
- [168] 이를 위해, 악티닌-4 발현 억제세포와 대조군 세포를 이용하여 실험용 누드 마우스에서 암조직의 형성 유무를 확인하기 위해 SiHa-대조군 또는 SiHa-KD (0.1 mL 의 PBS에서 3×10^6 개의 세포수) 세포를 피하주사 (S.C.)하였다. 4주령의 수컷 BALB/c 누드 마우스 (Orient Bio Inc.)를 사용하였으며 각 세포마다 5마리씩 사용하였다 ($n=5$). 암세포를 주사 후 마우스들은 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도와 $50 \pm 10\%$ 습도에서 12 h light / 12 h dark를 유지하였다. 생성된 암의 크기 측정은 주사 후 1 - 28 일 동안 디지털 캘리퍼 (digital caliper)를 사용하여 매일 측정하였으며, 볼륨은 $V = 0.5 \times (\text{width}^2 \times \text{length})$ 로 계산하였다.
- [169] 또한, 암세포 주사 28일 후 SiHa-대조군과 SiHa-발현억제군의 누드 마우스에 형성된 암의 크기를 사진을 찍어 비교하였다. 사진은 Nikon COOLPIX P300 digital camera (12.2 Mega-pixel; Nikon Corp., Tokyo, Japan)를 이용하였다.
- [170] 상기에서 형성된 각군의 암조직을 추출하여 크기를 비교하기 위해 사진으로 찍었고, 사진은 Nikon COOLPIX P300 digital camera (12.2 Mega-pixel; Nikon Corp., Tokyo, Japan)를 이용하였다.
- [171] 또한, 형성된 암의 크기 (digital caliper, $V = 0.5 \times (\text{width}^2 \times \text{length})$)와 무게 (Adventurer™, OHAUS Corp. USA)를 측정하고, 암세포 주사 후 날짜별로 각

마우스군의 몸무게를 비교하였다.

[172] 악티닌-4의 발현이 억제된 SiHa 세포를 마우스에 주사하여 종양 형성을 시간별로 확인한 결과, 악티닌-4 발현억제 세포에서 대조군 세포에 비해 암 형성이 억제되었다(도 12A). 또한 주사 28일 후 마우스에서 생성된 종양 형성을 확인한 결과 대조군에 비해 보이는 크기 역시 작았다(도 12B).

[173] 또한, 악티닌-4의 발현억제세포를 주사한 마우스에서 제거된 종양을 비교한 결과 대조군에 비해 크기가 작았다(도 13A). 마우스에서 추출된 암을 비교한 결과, 악티닌-4 발현억제세포의 경우 암의 크기와 무게가 확연히 감소하였다(도 13B). 그러나 암세포를 주사한 마우스들의 몸무게에는 변화가 없었다(도 13C).

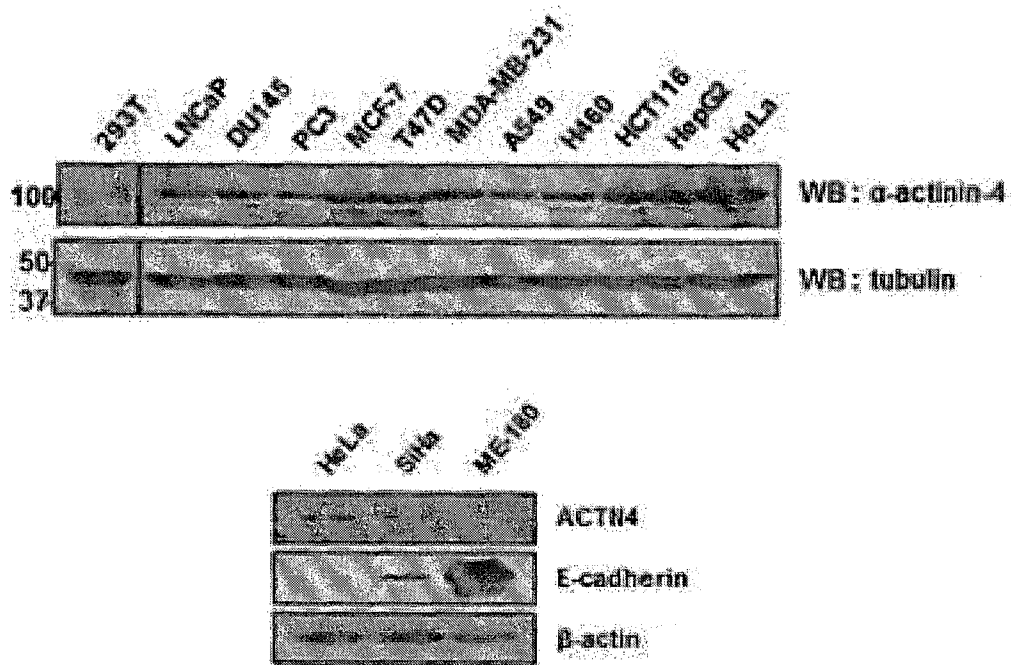
산업상 이용가능성

[174] 본 발명은 자궁경부암의 진단용 키트, 예방 또는 치료제에 사용할 수 있다.

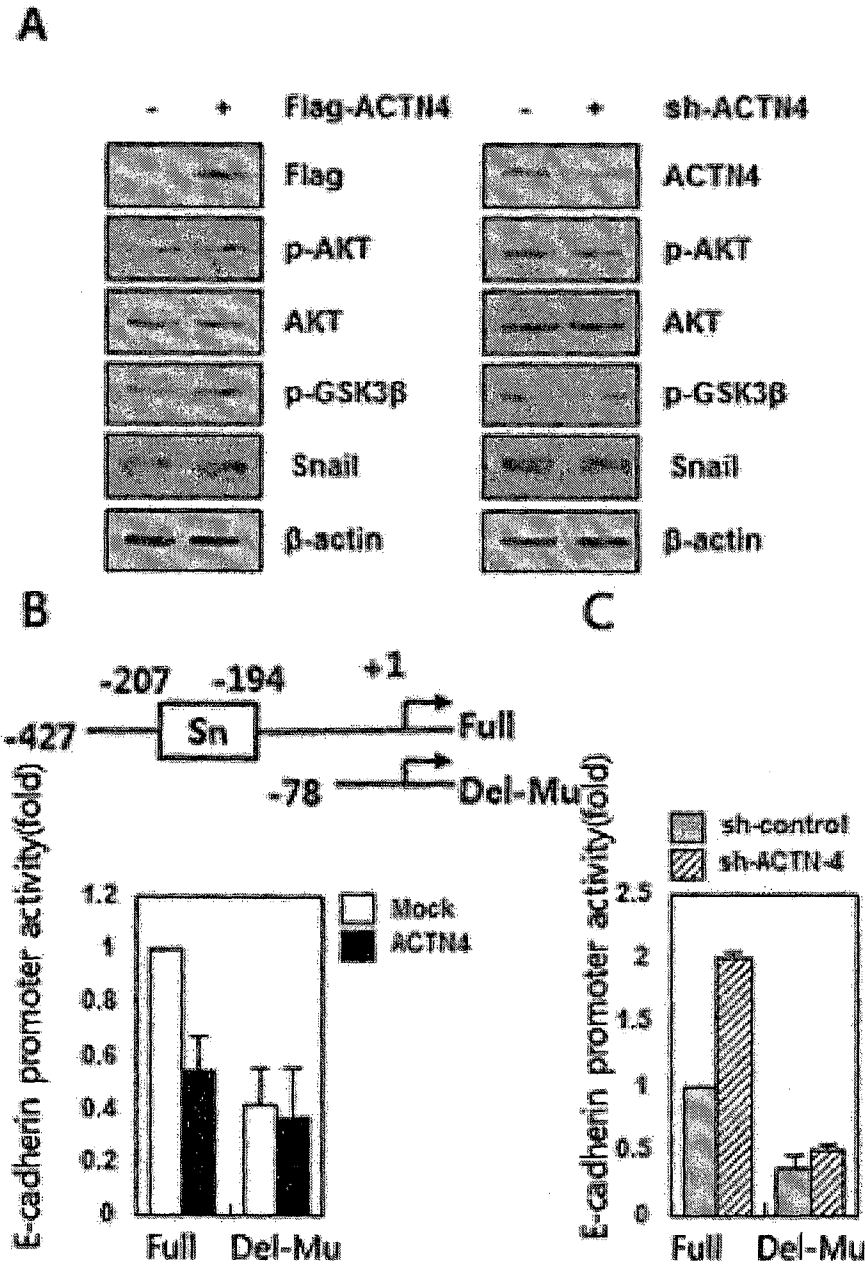
청구범위

- [청구항 1] 악티닌-4(actinin-4) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자궁경부암 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 유전자의 mRNA를 측정하는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 자궁경부암 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 자궁경부암 진단용 조성물.
- [청구항 4] 악티닌-4(actinin-4) 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
악티닌-4 저해제는 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이를 포함하는 벡터; 또는, 항체 중 어느 하나인 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 따른 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조를 위한 악티닌-4(actinin-4) 저해제의 용도.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
악티닌-4 저해제는 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이를 포함하는 벡터; 또는, 항체 중 어느 하나인 용도.
- [청구항 8] 악티닌-4(actinin-4) 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 약제학적 유효량을 자궁경부암 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자궁경부암을 치료하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
악티닌-4 저해제는 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이를 포함하는 벡터; 또는, 항체 중 어느 하나인 방법.
- [청구항 10] 악티닌-4(actinin-4) 유전자를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 촉진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.
- [청구항 11] 악티닌-4(actinin-4) 단백질을 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

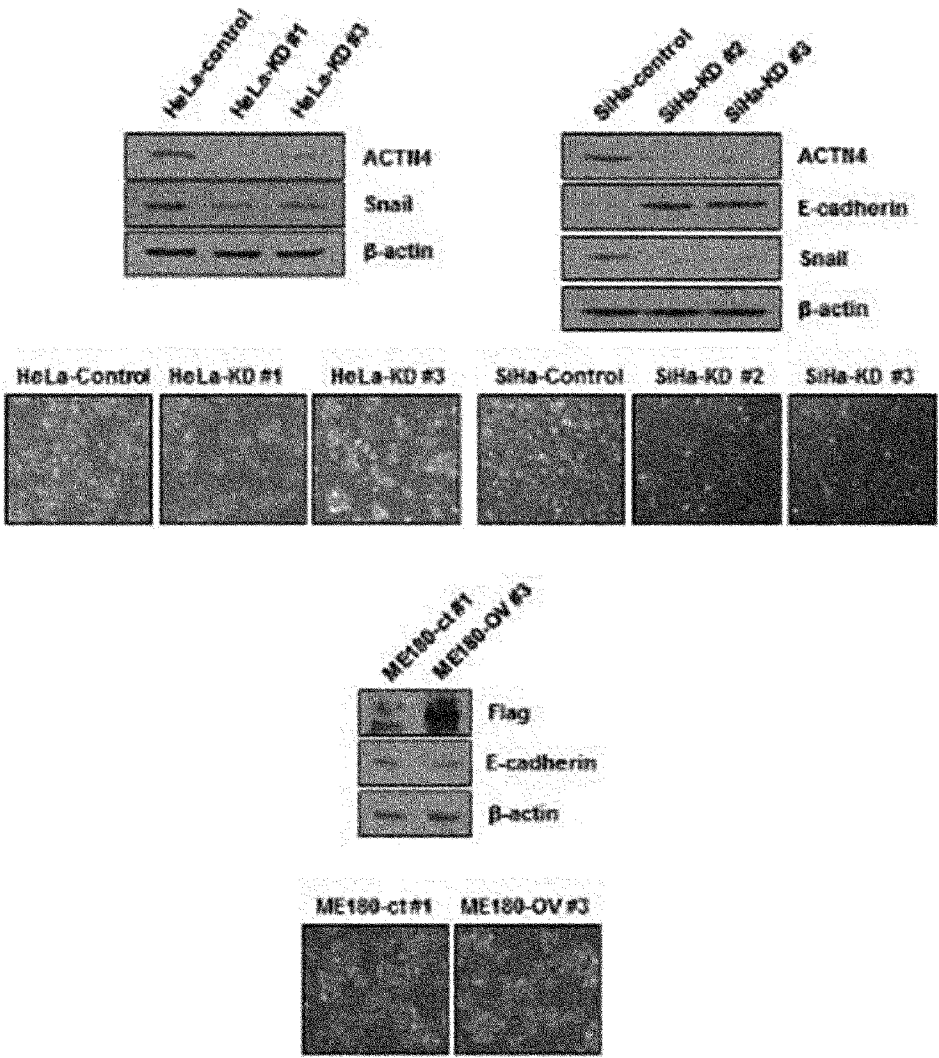
[Fig. 1]



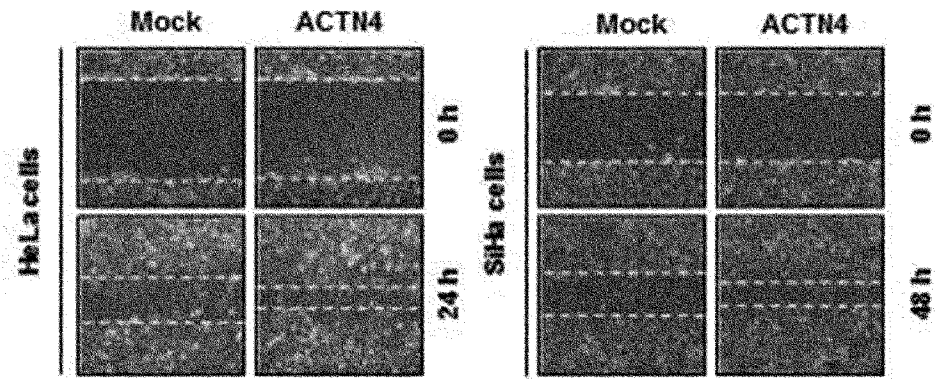
[Fig. 2]



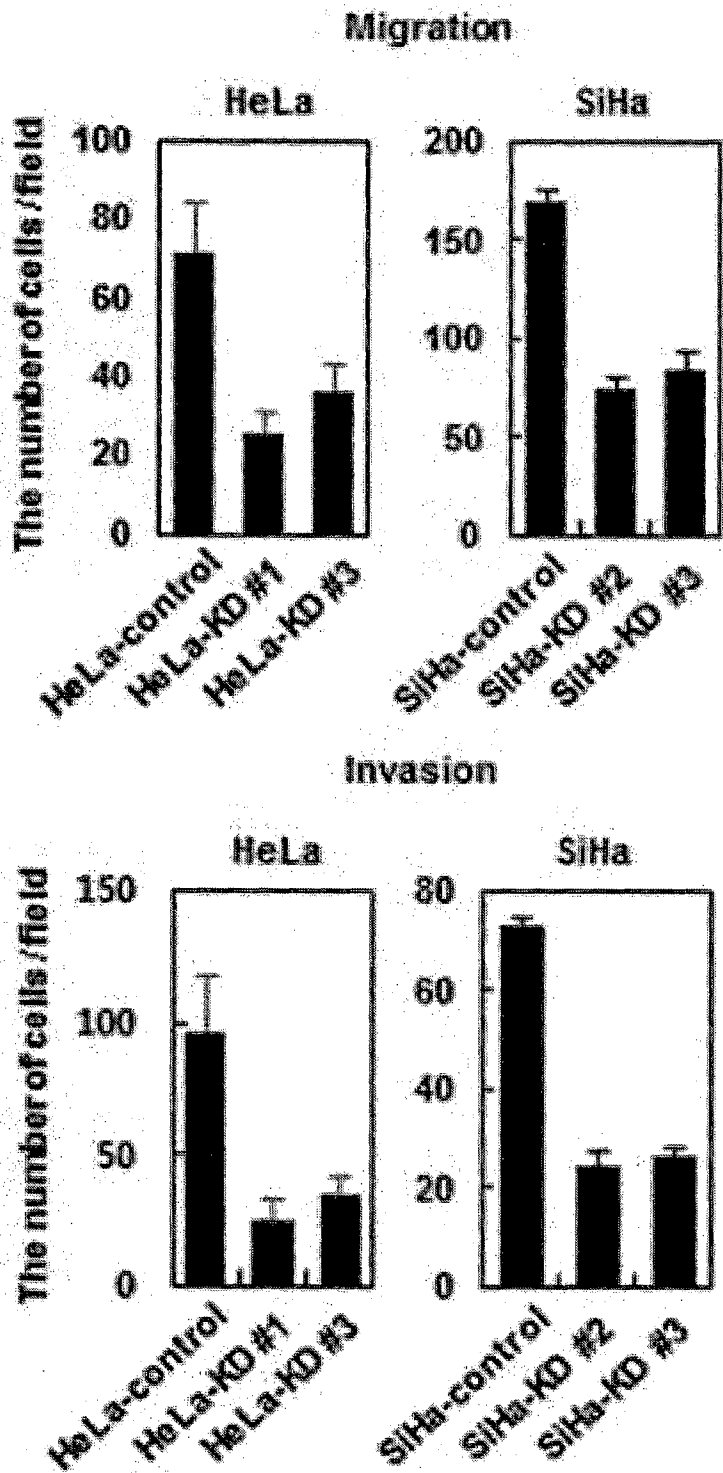
[Fig. 3]



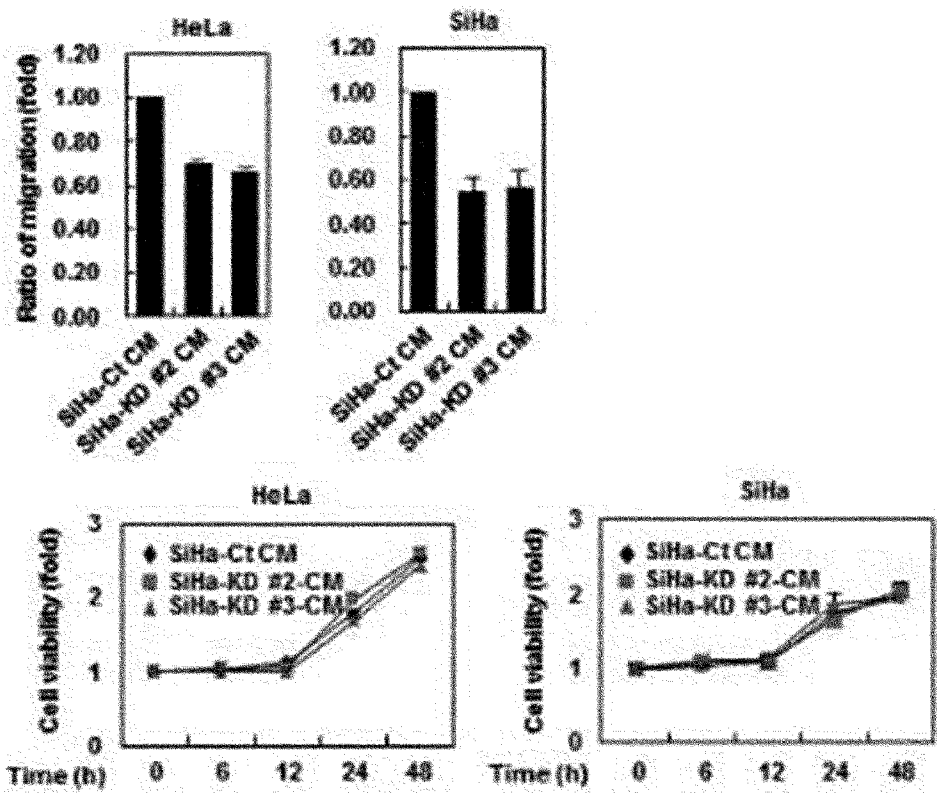
[Fig. 4]



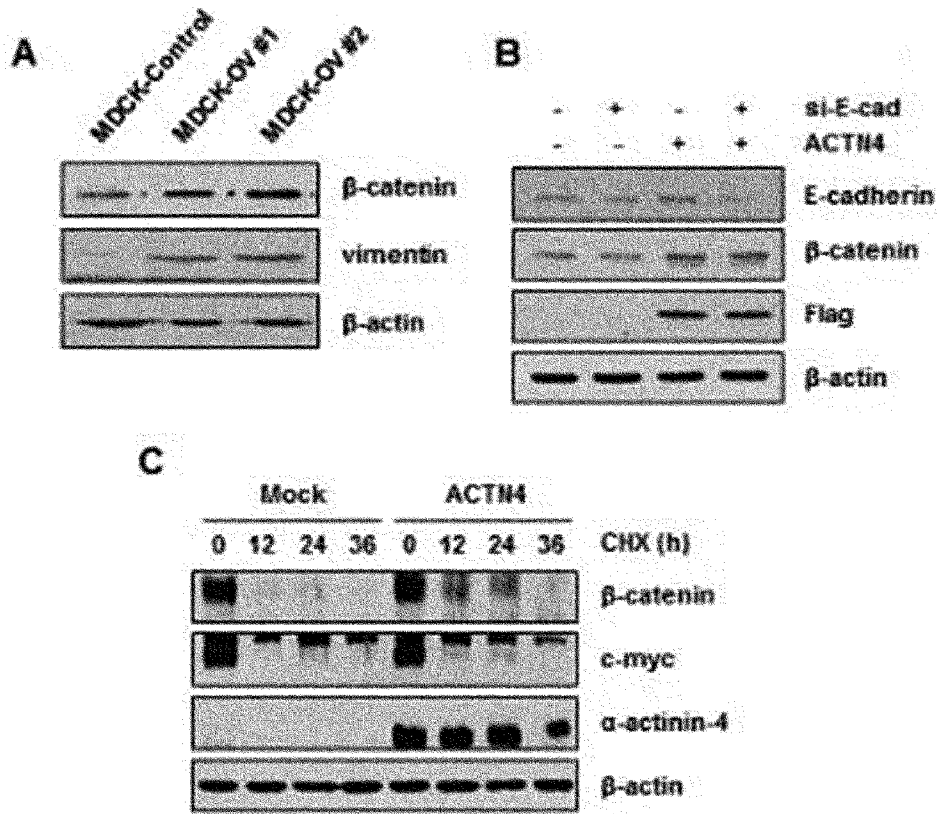
[Fig. 5]



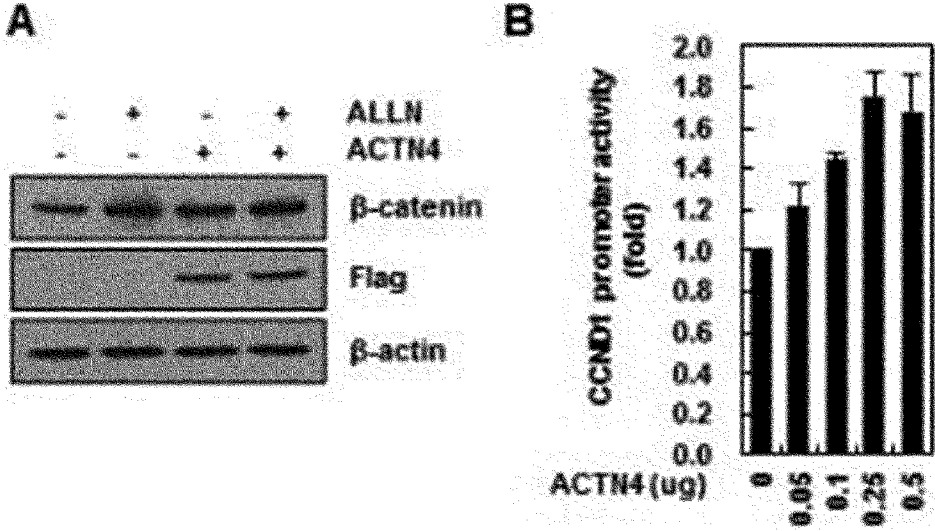
[Fig. 6]



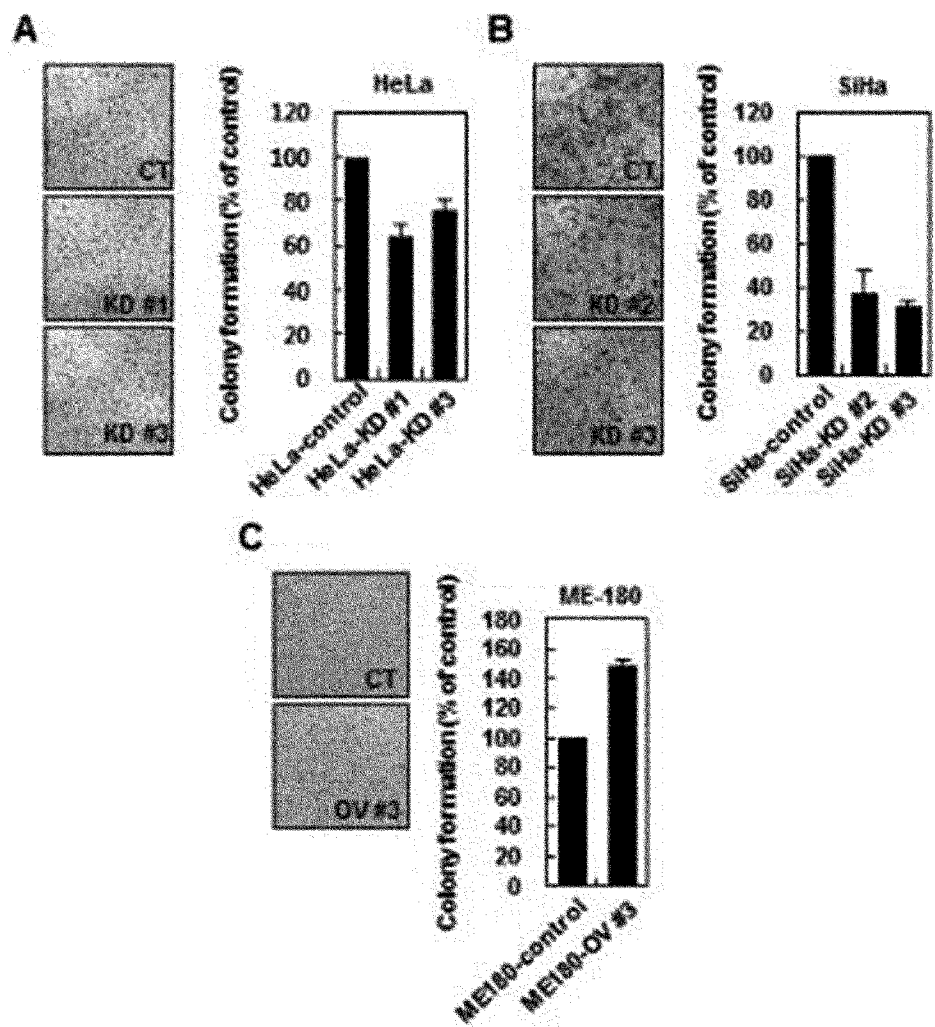
[Fig. 7]



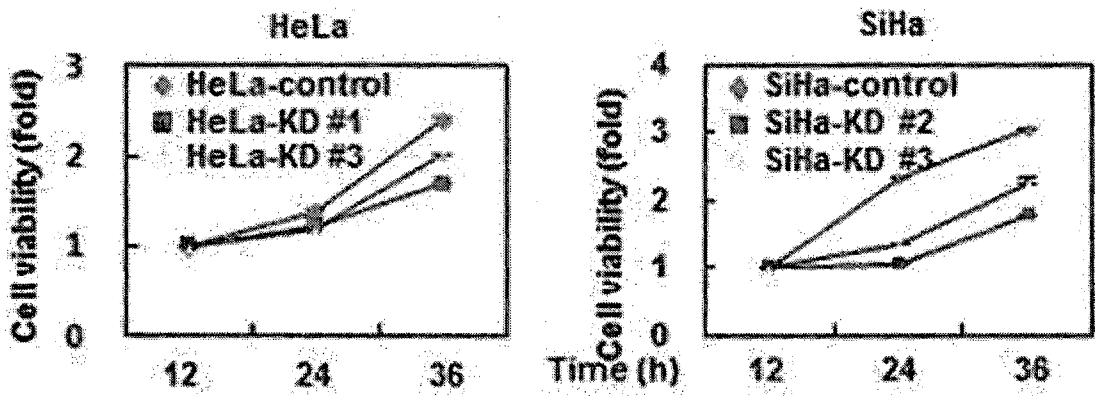
[Fig. 8]



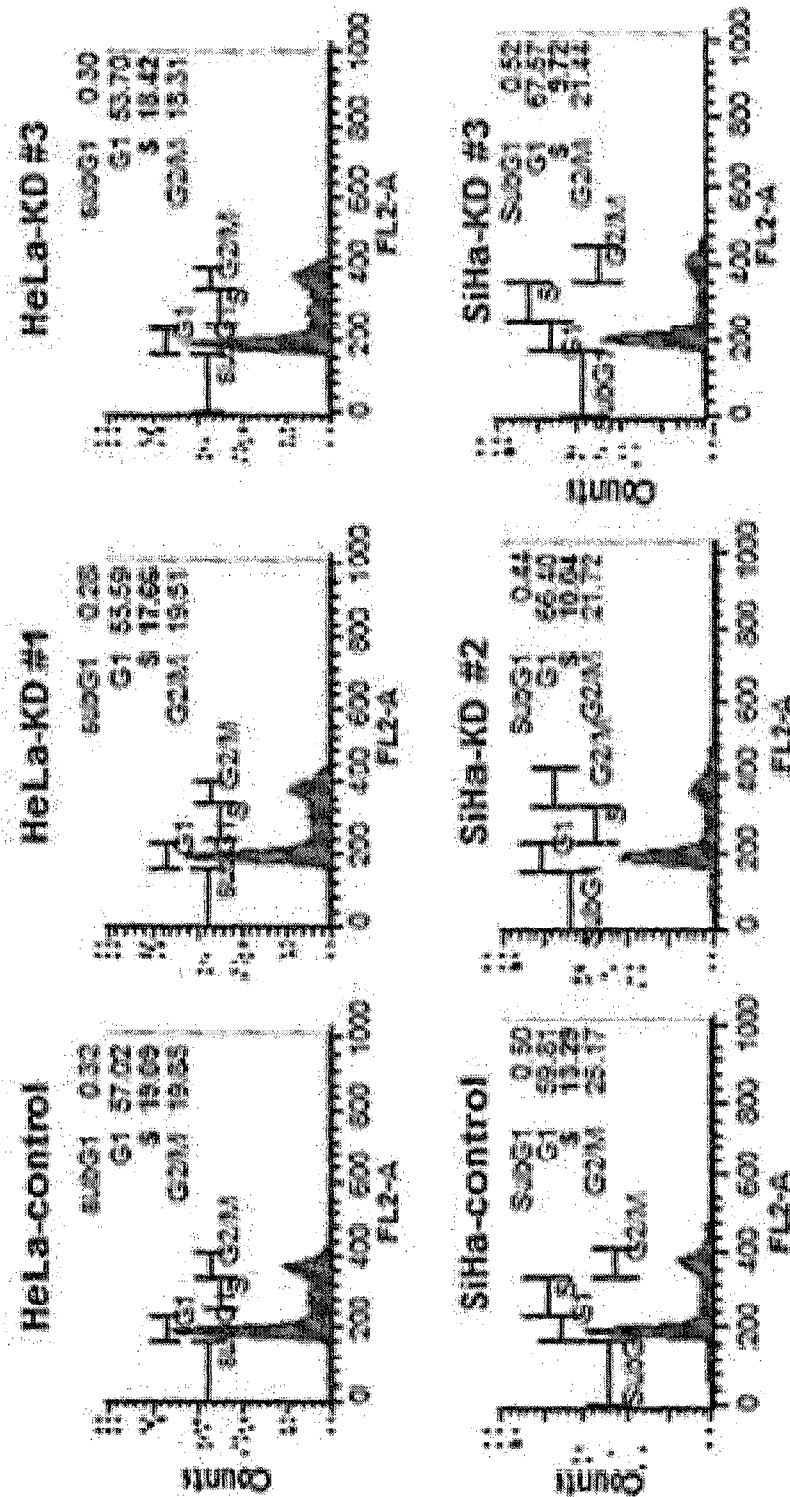
[Fig. 9]



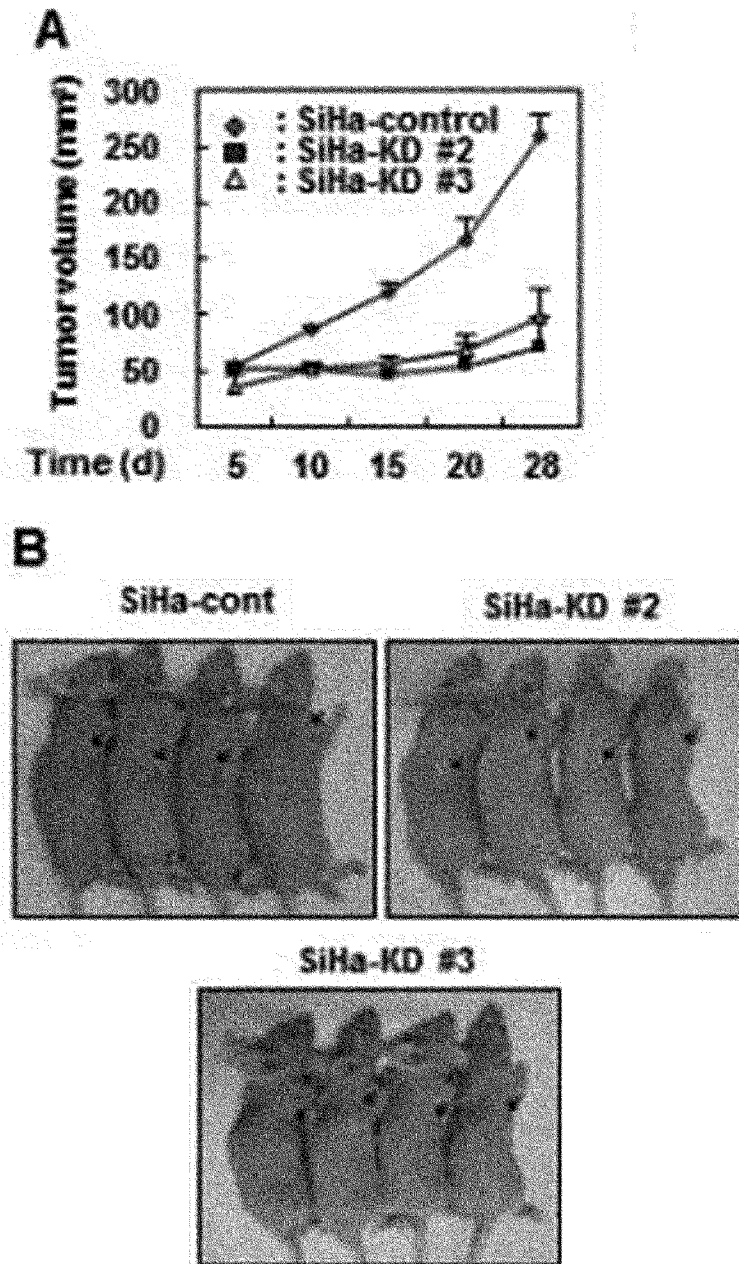
[Fig. 10]



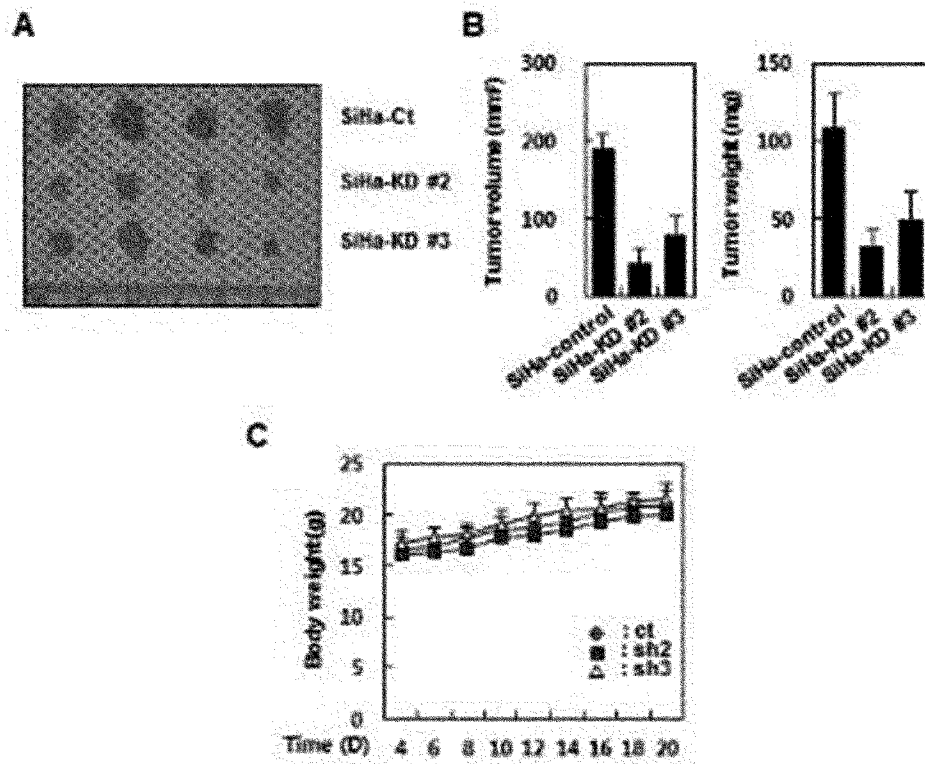
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004160**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), "cervical cancer, ACTN4, actinin-4, diagnose, determine, etc."

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0136486 A1 (PYEON, D. et al.) 28 May 2009 - See the entire document, especially claim 1; abstract; table 2B.	1-7,10,11
A	US 2012/0052484 A1 (LU, P. S. et al.) 01 March 2012 - See the entire document, especially claim 1; abstract.	1-7,10,11
A	EP 1326894 B1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 16 January 2008 - See the entire document.	1-7,10,11
A	MIYANAGA, A. et al., "Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours" Ann. Oncol., Vol. 24, No. 1, pp. 84-90, 10 August 2012 - See the entire document.	1-7,10,11
A	WATABE, Y. et al., "Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma" Cancer Med., Vol. 3, No. 3, pp. 613-622, 27 February 2014 - See the entire document.	1-7,10,11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 JULY 2015 (17.07.2015)

Date of mailing of the international search report

17 JULY 2015 (17.07.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004160

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8, 9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 and claim 9, which is dependent on claim 8, of the present international application pertain to a method for treating cervical cancer, comprising a step of administering, to an individual, a pharmaceutical composition for preventing or treating cervical cancer containing an actinin-4 inhibitor, and the method substantially corresponds to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004160

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0136486 A1	28/05/2009	US 2011-301059 A1	08/12/2011
		US 8012678 B2	06/09/2011
		WO 2009-015294 A1	29/01/2009
		WO 2009-015294 A8	25/06/2009
US 2012-0052484 A1	01/03/2012	US 2004-018487 A1	29/01/2004
		US 2005-255460 A1	17/11/2005
		US 2007-128699 A1	07/06/2007
		US 2008-124702 A1	29/05/2008
		US 7312041 B2	25/12/2007
		US 7972774 B2	05/07/2011
		US 8048676 B2	01/11/2011
EP 1326894 B1	16/01/2008	AT 384080 T	15/02/2008
		AU 2001-292782 B2	26/07/2007
		AU 2001-92782 A1	26/03/2002
		AU 9278201 A	26/03/2002
		CA 2422828 A1	21/03/2002
		DE 60132475 D1	06/03/2008
		DE 60132475 T2	12/03/2009
		EP 1326894 A2	16/07/2003
		EP 1326894 A4	31/08/2005
		ES 2298267 T3	16/05/2008
		JP 2004-518630 A	24/06/2004
		JP 2004-518630 T	24/06/2004
		PT 1326894E	08/04/2008
		US 2006-0292644 A1	28/12/2006
		US 7060802 B1	13/06/2006
		US 7820400 B2	26/10/2010
		WO 02-22851 A2	21/03/2002
		WO 02-22851 A3	01/05/2003

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'cervical cancer, ACTN4, actinin-4, diagnose, determine, 외'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2009/0136486 A1 (PYEON, D. 외) 2009-05-28 - 본문 전체 참조, 특히 청구항 1; 초록; 표 2B.	1-7, 10, 11
A	US 2012/0052484 A1 (LU, P. S. 외) 2012-03-01 - 본문 전체 참조, 특히 청구항 1; 초록.	1-7, 10, 11
A	EP 1326894 B1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 2008-01-16 - 본문 전체 참조.	1-7, 10, 11
A	MIYANAGA, A. 외, 'Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours' Ann. Oncol., Vol. 24, No. 1, pp. 84-90, 2012-08-10 - 본문 전체 참조.	1-7, 10, 11
A	WATABE, Y. 외, 'Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma' Cancer Med., Vol. 3, No. 3, pp. 613-622, 2014-02-27 - 본문 전체 참조.	1-7, 10, 11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 07월 17일 (17.07.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 07월 17일 (17.07.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이준혁

전화번호 +82-42-481-8115



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 8, 9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
본 국제출원의 청구항 8 및 그 종속항인 청구항 9는 ‘악티닌-4 저해제를 포함하는 자궁경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 자궁경부암 개체에 투여하는 단계’를 포함하는 ‘자궁경부암을 치료하는 방법’에 관한 것이고, 이는 실질적으로 사람을 대상으로 하는 치료방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0136486 A1	2009/05/28	US 2011-301059 A1 US 8012678 B2 WO 2009-015294 A1 WO 2009-015294 A8	2011/12/08 2011/09/06 2009/01/29 2009/06/25
US 2012-0052484 A1	2012/03/01	US 2004-018487 A1 US 2005-255460 A1 US 2007-128699 A1 US 2008-124702 A1 US 7312041 B2 US 7972774 B2 US 8048676 B2	2004/01/29 2005/11/17 2007/06/07 2008/05/29 2007/12/25 2011/07/05 2011/11/01
EP 1326894 B1	2008/01/16	AT 384080 T AU 2001-292782 B2 AU 2001-92782 A1 AU 9278201 A CA 2422828 A1 DE 60132475 D1 DE 60132475 T2 EP 1326894 A2 EP 1326894 A4 ES 2298267 T3 JP 2004-518630 A JP 2004-518630 T PT 1326894E US 2006-0292644 A1 US 7060802 B1 US 7820400 B2 WO 02-22851 A2 WO 02-22851 A3	2008/02/15 2007/07/26 2002/03/26 2002/03/26 2002/03/21 2008/03/06 2009/03/12 2003/07/16 2005/08/31 2008/05/16 2004/06/24 2004/06/24 2008/04/08 2006/12/28 2006/06/13 2010/10/26 2002/03/21 2003/05/01