

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 28일 (28.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/164568 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002882
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 17일 (17.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0036093 2016년 3월 25일 (25.03.2016) KR
- (71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 엄성희 (UM, Sunghee); 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR). 손성욱 (SON, Sung Wook); 16406 경기도 수원시 권선구 구운로 47번길 54, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층, 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KW, 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.

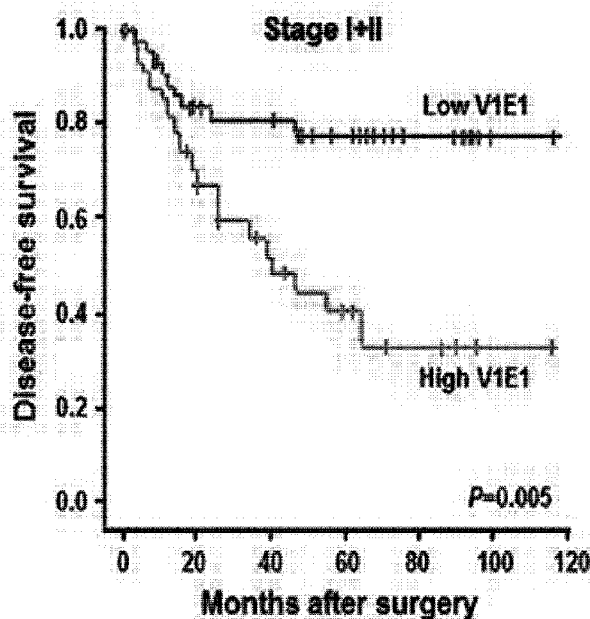
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING SURVIVAL RATE AND PROGNOSIS OF ESOPHAGEAL CANCER PATIENT BY MEASURING PROTEIN EXPRESSION LEVEL OF V-ATPASE SUBUNIT V1E1

(54) 발명의 명칭 : V-ATPase subunit V1E1의 단백질 발현 수준을 측정하여 식도암 환자의 생존율과 예후를 예측하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a marker for a diagnosis or prognosis prediction of esophageal cancer and a use thereof. The present inventors have observed the correlation among the expression level of ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) proteins in esophageal tissues derived from esophageal cancer patients, the histological grade of the esophageal cancer and the survival rate of the patients, and have identified that when ATP6V1E1 gene expression is inhibited, proliferation, mobility, metastasis, apoptosis, and glucose metabolism of esophageal cancer cells are inhibited, and thus the gene is an important factor in tumorigenesis and the development of esophageal cancer. Therefore, the ATP6V1E1 gene is expected to be used as a genetic marker for the diagnosis and prognosis prediction of esophageal cancer, and be variously utilized for screening therapeutic substances of esophageal cancer which inhibit the expression or activity of the gene and developing medicines.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명자들은 식도암 환자 유래 식도 조직에서 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 단백질의 발현수준과 식도암의 조직학적 등급 및 환자의 생존율간의 관련성이 있음을 규명하였고, ATP6V1E1 유전자의 발현 저해 시 식도암 세포의 증식, 운동성, 전이, 세포사멸, 및 당 대사능이 억제되는 것을 통해 상기 유전자가 식도암의 종양형성 및 발달에 중요한 인자임을 확인하였는바, 상기 ATP6V1E1 유전자는 식도암의 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커로써 유용하게 이용될 수 있으며, 상기 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 식도암 치료물질의 스크리닝 및 의약품 개발 용도로도 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: V-ATPase subunit V1E1의 단백질 발현 수준을 측정하여 식도암 환자의 생존율과 예후를 예측하는 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 유전자의 mRNA 또는 단백질을 포함하는 식도암의 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물, 상기 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물, 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법, 식도암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 식도암 치료물질의 스크리닝 방법 등에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 식도암(Esophageal cancer)은 식도에 발생하는 악성 종양으로, 세계에서 8번째로 유병률이 높으며, 사망률은 6번째로 높은 암으로 알려져 있다. 식도암은 크게 식도 편평상피세포암(Esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) 및 식도 선암(Esophageal adenocarcinoma; EAC)으로 분류된다. 편평상피세포암은 전 세계 식도암 중 60~70%의 높은 비율로 발병하며, 식도 선암은 20~30%를 차지한다고 보고되어 있다. 전 세계적으로 식도암은 인구 100,000명당 남자는 2.5~5.0명, 여자는 1.5~2.5명 꼴로 발생하고 있으며, 지역적으로 유병률에 차이가 있는데 남아프리카-카스피해 근방 및 중국 북부지역을 잇는 지역에서는 인구 100,000명당 100명이 넘는 유병률을 보인다고 보고되어 있다.
- [4] 식도암은 식이요소, 만성적인 식도 자극, 흡연, 음주, 방사선, 및 지속적인 위산의 역류에 의해 유발되는 바레트 식도(Barrett's esophagus) 등이 원인으로 작용하여 유발된다. 식도암은 상당히 진행될 때까지 증상이 없으며, 증상이 나타났을 때는 이미 다른 조직으로 전이된 경우가 많다고 보고되어 있다. 대표적인 증상으로는 음식물을 삼키기 힘든 연하곤란이며, 90% 이상의 식도암에서 나타나고, 이는 만성적으로 계속 진행되며 호전되지 않는다. 또한, 체중 감소, 구토, 출혈, 쉼 목소리, 만성 기침이 나타날 수 있고, 소화액이나 이물질 등이 기도로 잘못 흡인되어 흡인성 폐렴이 유발되기도 한다.
- [5] 진단은 내시경을 통한 조직검사를 통해 이루어지며, 내시경, 바륨 식도조영술, 컴퓨터단층촬영(CT), 또는 내시경 초음파를 통해 검사가 이루어진다. 식도암은 처음 진단되었을 때 이미 주변 조직으로 전이된 상태이거나 원격 전이가 발생한 경우가 많으며, 식도암의 5년 생존율은 5~20%로 예후가 매우 좋지 않은 암에 속하므로, 조기 진단이 매우 중요하다. 따라서 식도암의 발병 및 진행에 대한 이해가 매우 중요하나, 발병을 유도하는 분자적 기작에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

- [6] 한편, Vacuolar H⁺ATPase(V-ATPase)는 다수의 서브유닛으로 구성된 복합체로 구성되어 있다. V1(A,B,C,D,E,F,G, 및 H 서브유닛) 도메인은 ATP 가수분해에 관여하고, V0(a, c, c', c'', 및 e 서브유닛) 도메인은 전자의 이동에 관여한다.
- [7] V-ATPase는 엔도솜(endosome), 리소솜(lysosome), 및 분비소포(secretory vesicle)와 같은 세포 내 다양한 기관의 막에 존재하여 상기 기관들의 기능에 중요한 영향을 미친다. 특히, 단백질 분리 및 수송에 중요한 역할을 하고, 세포 내 기관의 산성화, 골흡수(bone resorption)를 포함한 다양한 기능을 수행한다고 알려져 있다.
- [8] 종양 미세 환경(tumor microenvironment)의 pH는 종양에서 해당과정이 활발히 일어나고 젖산의 양이 증가하기 때문에 정상 조직보다 더 산성을 나타낸다. 이러한 종양의 산성환경은 종양형성(tumorigenesis)을 유지하는데 매우 중요하며, 이러한 조절 과정은 V-ATPase에 의해 매개된다고 알려져 있다.
- [9] 그러나 아직까지 V-ATPase의 서브유닛인 V1E1이 식도암의 진단 및 식도암세포의 발병 및 진행에 어떠한 영향을 미치는지 그 연관성에 대해서는 알려진 바가 없다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 식도암의 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커를 발굴하기 위해 예의 연구한 결과, 식도암 환자 유래 식도 조직에서 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 유전자의 발현 수준과 환자의 생존율 및 종양의 조직학적 등급 간의 상관관계가 있음을 확인하였고, 상기 유전자가 식도암 세포의 성장, 전이, 세포사멸 유도, 및 당 대사 조절에 관여함을 실험적으로 규명함으로써 식도암의 진단 및 예후 예측, 치료에 중요한 인자임을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [12] 이에, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [13] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [14] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [15] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[16] 또한, 본 발명은 식도암 치료물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[17] 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.

[18]

과제 해결 수단

[19] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[21] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[22] 본 발명의 일 구현예로, 상기 ATP6V1E1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[23] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 ATP6V1E1 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[24] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.

[25] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[26] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[27] 본 발명의 일 구현예로, 상기 mRNA의 발현수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[28] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단백질 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정

- 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.
- [29] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 예후는 재발, 생존, 또는 무병생존인 것일 수 있다.
- [30] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [31] 본 발명의 일 구현예로, 상기 억제제는 siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(micro RNA), 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 뉴클레오티드, 펩타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 식도암 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)능을 억제할 수 있다.
- [33] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 식도암 세포의 포도당 대사과정을 억제할 수 있다.
- [34] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 식도암 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [35] (a) *In vitro* 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- [36] (b) 상기 세포의 ATP6V1E1 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [37] (c) 후보물질 비처리군에 비해 ATP6V1E1의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 식도암의 치료물질로 선정하는 단계.
- [38] 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포는 식도조직 유래 세포일 수 있다.
- [39] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [40] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (b) 단계는 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 및 면역형광염색법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 이용하여 측정될 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [42] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제의 식도암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [43] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 식도암 진단 또는 예후 예측 용도를 제공한다.
- [44]

발명의 효과

- [45] 본 발명자들은 식도암 환자 유래 식도 조직에서 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 단백질의 발현수준과 식도암의 조직학적 등급 및 환자의 생존율간의 관련성이 있음을 규명하였고, ATP6V1E1 유전자의 발현 저해 시 식도암 세포의 증식, 운동성, 전이, 세포사멸, 및 당 대사능이 억제되는 것을 통해 상기 유전자가 식도암의 종양형성 및 발달에 중요한 인자임을 확인하였는바, 상기 ATP6V1E1 유전자는 식도암의 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커로써 유용하게 이용될 수 있으며, 상기 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 식도암 치료물질의 스크리닝 및 의약품 개발 용도로도 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[46]

도면의 간단한 설명

- [47] 도 1a 및 도 1b는 V-ATPase subunit V1E1 단백질에 대한 항체의 특이성을 평가하기 위한 것으로, 식도암 세포주 TE8 또는 파라핀에 포메시킨 TE8에 ATP6V1E1 siRNA(si-V1E1) 또는 non-silencing siRNA(si-NS)를 트랜스펙션한 후 웨스턴 블롯팅(도 1a) 및 면역조직화학염색법(도 1b)을 통해 ATP6V1E1의 발현수준을 확인한 결과이고, 도 1c는 식도암 환자 유래 식도 조직에서 식도암의 조직학적 등급이 높을수록 V-ATPase subunit V1E1이 높게 발현되는 것을 보여주는 결과이다.
- [48] 도 2a는 식도암 환자 유래 식도 조직에서 면역조직화학염색결과 V-ATPase subunit V1E1의 발현 수준에 대한 평가 등급(0, 1, 2, 3)에 따른 식도암 환자의 무병생존율(disease-free survival)을 분석하여 나타낸 것이고, 도 2b 및 도 2c는 종양등급을 각각 stage I+II(도 2b) 및 stage III+IV(도 2c)로 분류하고, V-ATPase subunit V1E1의 발현 수준에 따른 식도암 환자의 무병생존율(disease-free survival)을 나타낸 것이며, 도 2d는 V-ATPase subunit V1E1의 발현 수준에 따른 무병생존율(disease-free survival)을 나타낸 것이다.
- [49] 도 3a는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포(si-V1E1)의 증식이 저해됨을 나타내는 결과이고, 도 3b는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포에서 세포 주기 관련 단백질(cyclin D, cdk2, p27)과 세포자멸사(apoptosis) 관련 단백질(bcl-2, cleave-caspase3, cleave-PARP)의 발현변화를 확인한 결과이다.
- [50] 도 4a는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우(si-V1E1) 식도암 세포의 이동 및 침습이 감소하는 것을 나타내는 결과이고, 도 4b는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 상피중간엽이행(EMT) 관련 유전자(vimentin, MMP2, MMP7)의 발현 감소를 나타내는 결과이며, 도 4c는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 세포 초점접착 형성 억제를 보여주는 결과이고, 도 4d는 p-JNK 및 p-ERK 단백질의 발현 감소를 통해 V-ATPase subunit V1E1의 세포 침습 및 초점접착 기전을 확인한 결과이다.

- [51] 도 5a 및 5b는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포(si-V1E1) 내의 젖산 농도 감소(도 5a) 및 ATP 수준 감소(도 5b)를 나타내는 결과이다.
- [52] 도 6a는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포(si-V1E1)의 포도당 흡수율 감소를 보여주는 결과이고, 도 6b는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포에서 포도당 흡수 및 당 분해에 관여하는 유전자들의 발현 감소를 나타내는 결과이다.
- [53] 도 7a 및 7b는 대조군(si-NS) 또는 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포(si-V1E1)에 올리고마이신(oligomycin), FCCP, 및 로테논(rotenone)을 처리하고 포도당을 처리한 후 상기 물질 처리에 따른 산소 소비율(oxygen consumption rate; OCR)(도 7a) 및 세포 외 산성화율(extracellular acidification rate; ECAR)(도 7b)을 측정한 결과이다.
- [54] 도 8은 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포(si-V1E1)에서 p-PKM2와 p-AKT의 발현 감소를 통해 V-ATPase subunit V1E1의 해당과정 촉진 기전을 확인한 결과이다.
- [55] 도 9는 식도암 환자로부터 분리된 1170개의 종양에 대한 RNA 서열분석 결과를 통해 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 및 PKM2 유전자 발현 간의 관련성을 나타내는 결과이다.

[56]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [57] 본 발명자들은 식도암의 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커를 발굴하기 위해 예의 연구한 결과, 식도암의 진단, 예후 예측, 또는 치료에 이용할 수 있는 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 유전자 마커를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [58] 이에, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [59] 또한, 본 발명은 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는 식도암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [60] 본 발명의 상기 ATP6V1E1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 ATP6V1E1 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [61] 본 발명에서 대상으로 하는 질병인 "식도암"은 식도에 발생하는 악성종양을 의미한다. 식도에 발생하는 악성종양은 편평상피세포암(Esophageal squamous cell carcinoma)이 가장 흔하며, 선암이나 림프종, 육종 등은 비교적 드물게 나타난다. 식도암의 진단은 내시경을 통한 조직검사를 통해 이루어지며, 내시경, 바륨 식도조영술, 컴퓨터단층촬영(CT), 또는 내시경 초음파를 통해 검사가 이루어진다. 식도암은 처음 진단되었을 때 이미 주변 조직으로 전이된

- 상태이거나 원격 전이가 발생한 경우가 많으므로 초기 진단이 매우 중요하다.
- [62] 본 발명에서 사용되는 용어, "진단(diagnosis)"이란 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 식도암의 발병 여부 및 진행단계 수준 등을 판단하는 것이다.
- [63] 본 발명에서 사용되는 용어, "예후(prognosis)"란, 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명에서 예후는 식도암의 재발, 생존(overall survival), 또는 무병생존(disease-free survival)을 의미하는 것이나, 이것으로 한정되는 것은 아니다.
- [64] 상기 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 본 발명에서 사용되는 용어, "프라이머"란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [66] 본 발명에서 사용되는 용어, "프로브"란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기 길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [67] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명에서 사용되는 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 마우스 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [69] 본 발명의 진단 또는 예후 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다.
- [70] 예컨대, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$ 를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [71] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는

- 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [72] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고, 기판은 정량구조 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 본 발명의 마커 유전자가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이 형태일 수 있다.
- [73] 또한, 본 발명의 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함하며, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함한다. 상기 ELISA 키트는 "항원-항체 복합체"를 형성한 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소, 및 그의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [74] 본 발명에서 사용되는 용어 "항원-항체 복합체"란 유전자가 코딩하는 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미한다. 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미세입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [76] 상기 피검체 유래의 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨 등을 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [77] 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 또는 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [78] 상기 단백질 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정

분석법(complement fixation assay), 또는 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [79] 본 발명에서 사용되는 용어 "식도암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법"은 진단 또는 예후 예측을 위한 예비적 단계로써 식도암의 진단 또는 예후 예측을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [80] 본 발명자들은 식도암 환자 유래 식도 조직 및 환자들의 생존에 대한 병리학적 자료를 이용하여 ATP6V1E1 유전자의 발현수준이 식도암 종양의 병리학적 등급 및 환자의 생존율과 밀접한 연관성이 있음을 규명하였다.
- [81] 본 발명의 일실시예에서는, 정상인 및 식도암 환자로부터 얻은 식도 조직을 ATP6V1E1 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과, 정상인에서는 ATP6V1E1 단백질이 발현되지 않는 반면, 식도암 종양의 조직학적 등급에 따라 상기 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [82] 본 발명의 다른 실시예에서는, 실시예 2에서 면역화학조직염색 수행 후 산출한 평가점수에 따라 그룹을 나눈 후, 식도암 환자들의 생존율을 분석한 결과 상기 평가점수가 높은 경우 즉, ATP6V1E1의 발현 수준이 높은 경우 무병생존 기간이 평가점수가 낮은 그룹에 비해 짧은 것을 확인하였으며, 식도암 종양 등급에 따른 생존율 분석 결과 초기 단계의 stage I+II의 경우 무병생존율과 ATP6V1E1 발현수준의 상관관계가 높은 것을 확인하였다. 나아가 ATP6V1E1 발현수준에 따른 식도암 환자들의 무병생존율 분석을 통해 상기 유전자의 높은 발현수준이 환자들의 생존율 감소와 상당한 연관성이 있음을 알 수 있었다(실시예 4 참조).
- [83] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 다변량분석(multivariate analyses)을 실시하여 식도암에서 ATP6V1E1이 독립적인 진단 마커로 이용 가능함을 확인하였다(실시예 5 참고).
- [84] 상기 결과를 통해 V-ATPase subunit V1E1인 ATP6V1E1 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질이 식도암의 진단 및 예후 예측을 위한 분자 마커로써 이용될 수 있음을 알 수 있다.
- [85] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 식도암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [86] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 식도암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [87] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 식도암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [88] 상기 발현 또는 활성 억제제는 siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(micro RNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 뉴클레오티드, 펩타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 것일 수 있으며, 바람직하게는 ATP6V1E1

- 유전자의 발현을 저해하는 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [89] 본 발명에서는 식도암 세포주에 ATP6V1E1 siRNA를 트랜스펙션하여 상기 유전자의 발현을 저해시키고, 식도암 세포주의 증식, 생존, 사멸, 전이능의 변화를 분석하고, 식도암 세포에서 상기 유전자의 기능을 규명하였다.
- [90] 본 발명의 일실시예에서는, ATP6V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포의 경우 대조군 세포에 비하여 증식이 억제되고, 세포주기 진행에 관련된 단백질들의 발현 감소를 통해 G1 cell cycle arrest가 일어나며, 세포자멸사(apoptosis) 유도 관련 단백질들의 발현 증가를 통해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [91] 본 발명의 다른 실시예에서는, ATP6V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포에서 이동 및 침습능이 억제되고, 암세포의 전이 과정에서 첫 번째로 일어나는 상피간엽이행(EMT) 관련 유전자들의 발현이 감소하며, FAK(Focal Adhesion kinase) 하위 신호전달 단백질인 ERK와 JNK의 인산화 감소를 통해 식도암 세포의 초점접착능이 억제됨을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [92] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, ATP6V1E1의 발현을 저해시킨 식도암 세포에서 젖산 및 ATP 농도 감소, 포도당 흡수율 감소, 세포 외 산성화를 감소를 확인함으로써 식도암 세포의 포도당 분해 대사과정인 해당과정이 억제됨을 확인하였고, 세포의 산소 소비율 증가를 통해 포도당의 산화가 증가함을 알 수 있었으며, AKT 및 PKM2의 활성 감소를 통해 상기 해당과정 억제 기전은 PI3K(phosphoinositide 3 kinase)/AKT 신호전달 억제에 의한 것임을 확인하였다(실시예 8 참조).
- [93] 상기 결과를 통해 ATP6V1E1이 식도암 세포의 증식 및 생존, 사멸, 전이, 및 당 대사에 밀접히 관여함을 알 수 있으며, 따라서 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제는 식도암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [94] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [95] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나,

바람직하게는 경구투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [96] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [97] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질환종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [98] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 *In vitro* 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 세포의 ATP6V1E1 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 후보물질 비처리군에 비해 ATP6V1E1의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 식도암의 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 식도암 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [99] 상기 세포는 식도 조직 유래 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [101] 상기 ATP6V1E1 유전자의 발현 또는 활성 측정은 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 및 면역형광염색법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [102] 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.

[103] [실시예]

[104] 실시예 1. 실험준비 및 실험방법

[105] **1-1. 환자 유래 조직샘플 준비**

[106] 160명의 식도암 환자 및 31명의 정상인으로부터 외과적 수술을 통해 분리된 식도 조직을 얻었으며, 삼성 서울병원의 병리학과로부터 1996년부터 2007년까지 저장된 상기 식도암 환자에 대한 병리학적 데이터를 공급받았다. 식도 조직은 종양 결절 전이(tumor nodes metastasis; TNM) 분류법에 기반하여 병리학적 특징을 분류하였다. 상기 모든 식도 조직은 10% 포르말린(formalin)으로 고정한 후 파라핀(paraffin)에 포매시켰다.

[107]

[108] **1-2. 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining)**

[109] 상기 실시예 1-1의 방법에 따라 파라핀에 포매시킨 식도암 환자 또는 정상인 유래 식도 조직에 자일렌(xylene)을 처리하여 탈파라핀화시키고, 다시 수화시키는 과정(rehydration)을 진행하였다. 이후 상기 조직을 TrisEDTA buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 9.5) 존재하에 98°C에서 20분 동안 microwave 처리하여 조직 내 항원이 노출되도록 하고, 항체의 비특이적인 결합을 저해하기 위해 슬라이드에 퍼옥시다아제 블로킹 용액(Dako REAL™ Peroxidase Blocking Solution; Dako, CA, USA)을 8분 동안 처리하였다. 다음으로, 조직에 1:100으로 희석한 ATP6V1E1 특이적 1차 항체(Sigma, USA)를 처리하고 배양한 후 washing buffer(0.1% Tween 20 in distilled water)로 헹구고, DAKO REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse(Envision) 검출 용액을 처리하여 반응시켰다. 반응 후 다시 한 번 조직을 헹구고 색소원(chromogen)을 감광하였다. 이후 슬라이드를 Meyers hematoxylin으로 대조염색하고, 탈수과정을 거친 후 Canada balsam으로 마운팅한 후 현미경으로 관찰하였다.

[110]

[111] **1-3. 면역조직화학염색법 결과 분석방법**

[112] 상기 1-2의 방법에 따라 식도암 환자 또는 정상인 유래 식도조직을 ATP6V1E1에 대한 1차 항체로 면역조직화학염색을 수행하고 현미경으로 관찰한 후, 염색 강도(staining intensity)와 V-ATPase subunit V1E1에 대한 항체로 염색된 세포 비율을 평가하여 점수화하였다. 염색 강도는 1(약함), 2(보통), 또는 3(강함)으로 평가하였고, 염색된 세포의 비율은 1(<5%), 2(5%-25%), 3(26%-50%), 4(51%-75%), 또는 5(>75%)으로 나누어 평가하였다. 이후 상기 염색 강도 및 염색된 세포의 비율에 대한 점수를 곱하여 면역조직화학염색법 평가 점수를 산출하였다. 예컨대, 조직 관찰 결과 염색 강도가 3(강함)이고, 염색된 세포의 비율이 3(26%-50%)으로 평가된 경우, 최종 평가 점수는 상기 두 점수를 곱하여 9점으로 하였다. 각 병변부위는 두 명의 병리학자에게 의뢰하여 관찰 및 점수화하였으며, 소견에 차이가 있을 경우 의논하여 최종 평가 결과를

도출하였다.

[113]

[114] **1-4. 세포 배양 및 트랜스펙션(Transfection)**

[115] 사람 식도암 세포주 TE8은 RIKEN(Saitama, Japan)으로부터 공급받았으며, 10% FBS(Invitrogen, CA, USA)가 첨가된 RPMI1640 배지에서 배양하였다.

[116] 상기 TE8 세포 내 ATP6V1E1의 발현을 억제하기 위해, ATP6V1E1에 특이적인 siRNA(siATP6V1E1, 5'-CAGATGTCCAATTTGATGAAT-3')를 Gfectin(GP2000)을 이용해 세포에 트랜스펙션하고 72시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 어느 유전자도 타겟하지 않는 nonsilencing control siRNA(Qiagen, Germany)를 동일한 조건으로 트랜스펙션 하여 준비하였다.

[117]

[118] **1-5. RNA 추출 및 Quantitative RT-PCR**

[119] 사람 식도암 세포 TE8에 TriRNA 시약(Favorgen, Taiwan)을 처리하여 total RNA를 추출하고, random hexamers를 이용하여 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 qPCR preMix for SYBR Green(Enzynomics, korea)을 이용하여 수행하였으며, 상기 PCR 과정에서 사용한 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[120] [표1]

유전자	방향	서열	서열번호
hV-ATP6V1E1	Forward	5'-GCA CAA GCC GAC CTT TCT-3'	3
hV-ATP6V1E1	Reverse	5'-TTC ACC GGC CTA GCA TTG -3'	4
hHIF-1a	Forward	5'-CGT TCC TTC GAT CAG TTG TC-3'	5
hHIF-1a	Reverse	5'-TCA GTG GTG GCA GTG GTA GT-3'	6
hGlut1	Forward	5'-CGG GCC AAG AGT GTG CTA AA-3'	7
hGlut1	Reverse	5'-TGA CGA TAC CGG AGC CAA TG-3'	8
hHK1	Forward	5'-TGG AGT CCG AGG TTT ATG-3'	9
hHK1	Reverse	5'-TTT GGA TTG TTG GCA AGG-3'	10
hPFK	Forward	5'-CAT GAC CCA TGA AGA GCA CC-3'	11
hPFK	Reverse	5'-CCA ACT CGA ACC ACA GCC CTG-3'	12
hENO1	Forward	5'-CGT ACC GCT TCC TTA GAA C-3'	13
hENO1	Reverse	5'-CAA TGA CTT GGG CCA ATT AC-3'	14
hPKM2	Forward	5'-GCC TGC TGT GTC GGA GAA G-3'	15
hPKM2	Reverse	5'-CTC TCC CAG GAC CTT CCT AA-3'	16
hLDHA	Forward	5'-ATC TTG ACC TAC GTG GCT TGG A-3'	17
hLDHA	Reverse	5'-CCA TAC AGG CAC ACT GGA ATC TC-3'	18
hVimentin	Forward	5'-GGG ACC TCT ACG AGG AGG AG-3'	19
hVimentin	Reverse	5'-CGC ATT GTC AAC ATC CTG TC-3'	20
hMMP2	Forward	5'-CCA CTG CCT TCG ATA CAC-3'	21
hMMP2	Reverse	5'-GAG CCA CTC TCT GGA ATC TTA AA-3'	22
hMMP7	Forward	5'-GAG TGA GCT ACA GTG GGA ACA-3'	23
hMMP7	Reverse	5'-CTA TGA CGC GGG AGT TTA ACA T-3'	24
h18s rRNA	Forward	5'-CGG CGA CGA CCC ATT CGA AC-3'	25
h18s rRNA	Reverse	5'-GAA TCG AAC CCT GAT TCC CCG TC-3'	26

[121]

[122] **1-6. 웨스턴 블롯(Western Blot)**

[123] 사람 식도암 세포 TE8에 Radio-ImmunoPrecipitation Assay(RIPA) 버퍼(150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 1% Nonidet P-40(NP-40), 0.25% Na-deoxycholate, 및 protease inhibitors)를 처리하여 세포를 용해시키고 10분 동안 얼음 위에 놓아둔 후 전체 세포 용해물을 원심분리를 수행하여 단백질을 추출물을 얻었다. 이후 적정 농도의 단백질을 이용하여 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하여 단백질이 크기에 따라 아크릴아마이드 겔 내에서 분리되도록 한 후 트랜스퍼(transfer) 과정을 실시하여 전기적인 흐름에 따라 겔 내의 단백질들이 PVDF 멤브레인으로 옮겨지도록 하였다. 이후 관찰하고자 하는 각각의 단백질에 특이적인 1차 항체를 멤브레인에 처리하여 배양하였다. 본 실시예에서 사용한 1차 항체는 하기에 나열한 바와 같다. ATP6V1E1(Sigma, USA); p-JNK(Thr183/Tyr185), ERK(extracellular signal-regulated kinase), p-ERK, p-paxillin(Tyr 118), cleave-caspase3, cleave-PARP, AKT, p-AKT, PKM2, p-PKM2, AMPK, p-AMPK, mTOR, 및 p-mTOR(Cell Signaling Technology); JNK(cjun Nterminal kinase), cyclin D, cdk2, p27, p-FAK(Tyr 397), FAK(focal adhesion kinase), Bcl-2, 및 β -actin(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); paxillin(BD Biosciences, NJ, USA). 1차 항체와 반응시킨 멤브레인을 버퍼로 헹구고 2차 항체와 반응시킨 후, chemiluminescence 시약을 이용해 감광하여 관찰하고자 하는 단백질의 발현량을 확인하였다. 또한, 상기 β -actin에 대한 1차 항체를 이용해 동일한 조건으로 웨스턴 블롯팅을 수행하여 β -actin 단백질 양으로 각 샘플의 단백질 양을 보정하였다.

[124]

[125] **1-7. 세포 생존능 분석(Cell Viability Assay)**

[126] 생존 세포의 수를 측정하기 위하여, 사람 식도암 세포인 TE8 세포를 현탁하여 일정량으로 분주하고, 트리판 블루(trypan blue) 용액을 처리한 후 5분 동안 상온에 두었다. 이후 혈구계산기(hemocytometer)를 이용해 트리판 블루에 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

[127]

[128] **1-8. 세포 이동 및 침습 분석(Migration and Invasion Assay)**

[129] *In vitro* 매트릭스 젤(Matrigel) invasion assays를 수행하기 위해 6.5mm 트랜스웰 챔버(Costar Inc., CA, USA)를 이용하였다. 트랜스웰 필터를 매트릭스 젤로 코팅하고, 매트릭스 젤 위에 세포를 씨딩한 후 배양하였다. 이후 챔버에서 필터를 제거하고, 매트릭스 젤 내로 침투한 세포들을 고정한 후 헤마톡실린 & 에오신(hematoxylin & eosin)으로 염색하였다. 필터에 부착된 세포들은 광학현미경 하에서 수를 측정하였다.

[130] Migration assay는 필터를 매트릭스 젤로 코팅하지 않은 상태에서 상기 invasion

assay와 유사한 방법으로 수행하였다. 상기 실험들은 독립적으로 3회 반복수행하였다.

[131]

[132] **1-9. 면역세포화학염색(Immunocytochemistry)**

[133] 사람 식도암 세포인 TE8을 PBS로 헹군 후 4%

파라포름알데히드(formaldehyde)를 처리하여 세포를 고정하였다. 상기 용액을 제거하고, 0.2% NP-40을 고정된 세포에 처리하여 세포투과성을 증가시킨 후, BSA(bovine serum albumin)를 1시간 동안 처리하여 블로킹 과정을 수행하였다. 이어서 p-paxillin에 특이적인 1차 항체를 처리하여 반응시키고, 로다민(rhodamine)이 결합된 항마우스 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 처리하거나, 또는 1 mg/ml Hoechst(Invitrogen)가 포함된 Alexa 488 phalloidin(Invitrogen)을 처리하고 배양하였다. 이후 antifading mounting medium(Dako North America)를 이용하여 마운팅하고, 형광 현미경(Axiovert, Zeiss, Germany) 하에서 세포를 관찰하였다.

[134]

[135] **1-10. 세포 내 젖산 및 ATP 농도 측정(Lactate and ATP assay)**

[136] 세포 내 젖산(Lactate) 농도 및 ATP 생성량은 각각 colorimetric L-Lactate assay kit(abcam) 및 EnzyLight™ ADP/ATP Ratio Assay kit(bioassay system)를 이용하여 측정하였으며, 보정을 위해 총 세포 수를 측정하였다.

[137]

[138]

[139] **1-11. 포도당 흡수율 분석(Glucose uptake assay) 및 flow cytometry**

[140] 사람 식도암 세포인 TE8을 6웰 플레이트에 2×10^5 /well 개씩 씨딩하고 24시간 동안 배양한 후 상기 실시예 1-4에 기재된 방법에 따라 ATP6V1E1 siRNA 또는 nonsilencing siRNA를 트랜스펙션하였다. 72시간 후 모든 배양 배지를 제거하고, 10 μ M 농도의 형광을 띄는 2-NBDG(2-deoxy-2[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose)가 첨가되거나 첨가되지 않은 새로운 배양배지를 각 웰 당 2 ml씩 넣어주었다. 이후 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 1시간 동안 추가로 배양한 후 flow cytometry 분석을 실시하였다. Flow cytometry 분석을 위해, 배양한 세포에서 배지를 제거하고 차가운 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 헹구어 2-NBDG 흡수 반응을 정지시키고, 각 웰에 차가운 성장배지 500 μ l를 넣고 세포를 현탁시킨 후 최종농도가 1 μ g/ml이 되도록 PI(Propidium Iodide) 용액을 넣어 주고 4°C에서 보관하면서 30분 이내로 BD FACS Canto II(San Jose, CA, USA)를 이용해 flow cytometry 분석을 실시하였다.

[141]

[142] **1-12. 해당과정 및 산화적 인산화 측정**

[143] 해당과정(glycolysis) 및 산화적인산화(Oxidative phosphorylation; OXPHOS)는

Seahorse XF24 extracellular flux analyzers를 이용하여 각각 세포외 산성화율(extracellular acidification rate; ECAR) 및 산소 소비율(oxygen consumption rate; OCR)을 측정함으로써 분석하였다.

[144]

[145] 실시예 2. 식도암 환자의 특성 분석

[146] 상기 실시예 1-1에 기재한 160명의 식도암 환자들의 임상병리학적 특성을 연령, 성별, 종양크기, 분화, 종양 결절 전이(TNM) 단계, 종양침습(tumor invasion), 림프절 전이(LN metastasis) 여부, 및 원격전이(distant metastasis) 여부로 분류하여 하기 표 2에 나타내었다.

[147] 보다 구체적으로, 65세 이상 및 65세 미만의 환자들은 각각 123명(77%), 37명(23%)으로 65세 이상의 환자들이 많음을 확인하였고, 성별은 남성 및 여성이 각각 97%, 3%로 남성이 대부분인 것으로 나타났다. 종양 결절 전이 분류법에 근거하여 악성 종양 단계별로 분류한 결과는 1단계 27명(17%), 2단계 53명(34%), 3단계 60명(37%), 및 4단계 20명(12%)으로, 2단계와 3단계에 해당하는 환자들이 70% 이상을 차지하였다. 또한, 종양 침습(tumor invasion)을 일차 종양 크기(tumor size)와 종양 신장(tumor extension)을 바탕으로 T1, T2, T3, 및 T4로 구분하여 분류한 결과 T3 그룹에 속하는 환자들이 55%로 절반 이상을 차지하였다. 전이 측면에서는 식도암 환자의 61%가 림프절에 전이된 것으로 나타났으나, 전체의 87%에서 원격전이는 일어나지 않은 것으로 확인되었다.

[148] [표2]

Characteristics		Case No.(n=160)	%
Age	≥65 years	123	77
	< 65 years	37	23
Sex	Male	155	97
	Female	5	3
Tumor size	≥4.0 cm	90	56
	< 4.0 cm	70	44
Differentiation	W/D	25	16
	M/D	106	66
	P/D	29	18
TMN stage	I	27	17
	II	53	34
	III	60	37
	IV	20	12
Tumor invasion	T1	34	20
	T2	28	18
	T3	90	55
	T4	8	5
LN metastasis	Negative	62	39
	Positive	98	61
Distant metastasis	Absent	138	87
	Positive	22	13

[149]

[150]

[151] 실시예 3. 정상인 및 식도암 환자의 식도 조직에서 V-ATPase subunit V1E1의 발현량 비교분석

[152] 정상인과 식도암 환자의 식도 조직에서 V-ATPase subunit V1E1의 발현수준을 평가하기 위해, 먼저 V-ATPase의 V1E1 subunit에 대한 항체의 특이성을 검증하고자 하였다. 이를 위해, 사람 식도암 세포주인 TE8와 파라핀에 포매시킨 TE8 세포 블록을 이용하여 V-ATPase subunit V1E1의 발현수준을 측정하였다. 그 결과, 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이, 세포에 ATP6V1E1 siRNA를

트랜스펙션하여 발현을 저해시킨 경우(si V1E1), nonsilencing siRNA를 트랜스펙션한 대조군(si NS)에 비하여 세포 내 V-ATPase subunit V1E1의 발현이 현저히 감소되어 있는 것을 확인하였다. 상기 결과는 V-ATPase subunit V1E1를 검출하는 항체의 특이성이 높다는 것을 의미한다.

- [153] 상기에서 특이성을 확인한 항체를 이용하여, 실시예 1-1을 통해 31명의 정상인 및 160명의 식도암 환자로부터 분리한 식도 조직에 대하여 실시예 1-2의 방법에 따라 면역조직화학염색법을 수행한 후 V1E1 subunit의 발현수준을 관찰하였다. 그 결과, 도 1c에 나타낸 바와 같이, 정상인(Non-Tumor) 유래 식도 조직에서는 V1E1 단백질의 발현이 관찰되지 않은 반면, 식도암 환자 유래 조직에서는 식도암의 조직학적 등급(Weak, Moderate, Strong)에 비례하여 V1E1 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[154]

- [155] 실시예 4. 식도암 환자에서 V-ATPase subunit V1E1의 발현수준과 생존율 간의 관련성 분석

- [156] 식도암 환자에서 V-ATPase subunit V1E1의 발현량과 환자의 생존율 간에 관련성이 있는지 분석하기 위하여, 정상인 및 식도암 환자 유래 식도 조직을 조직화학면역염색을 실시하고, 실시예 1-3에 기재된 방법으로 평가 점수를 산출하여 점수에 따라 1(low), 2(medium), 3(high) 그룹으로 나눈 후, 정상인 0(none)을 포함한 각 그룹에 대하여 생존율을 분석하여 Kaplan-Meier 생존 곡선으로 나타내었다. 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 평가점수(immunohistochemistry score)가 2점 이상으로 V1E1이 높은 수준으로 발현되는 환자 그룹의 경우 무병생존기간(disease-free survival time)이 평가점수가 2점 미만인 V1E1 발현수준이 낮은 환자 그룹보다 더 짧은 것을 확인하였다.

- [157] 다음으로, 중앙등급에 따른 생존율과 V1E1 발현수준 간의 관계를 분석하였다. 이를 위해, 중앙등급을 stage I+II 및 stage III+IV의 두 그룹으로 분류하고 각 그룹에서 V1E1 발현수준에 따른 무병생존율을 분석하였다. 그 결과, 도 2b 및 2c에 나타낸 바와 같이 무병생존율 분석 결과, V1E1의 발현 수준이 stage III+IV의 환자들에서 보다 초기 단계의 stage I+II 환자들의 무병생존율과 연관성이 높은 것을 확인하였다.

- [158] 나아가 도 2d에 나타낸 바와 같이, V1E1의 발현수준에 따른 식도암 환자들의 무병생존율 분석 결과를 통해 V1E1의 높은 발현수준이 식도암 환자들의 생존율 감소와 상당한 연관성이 있는 것을 알 수 있었다.

- [159] 상기 결과들은 V-ATPase subunit V1E1이 식도암의 예후, 예측을 위한 표지자로서 이용 가능함을 의미한다.

[160]

- [161] 실시예 5. 식도암 환자에서 진단 변수의 다변량분석

- [162] 식도암에서 V-ATPase subunit V1E1이 독립적인 진단 표지자로 이용 가능한지

평가하기 위하여, 콕스 비례 위험 회귀(Cox proportional hazard regression)법을 이용하여 식도암 환자의 무병생존율에 대한 V-ATPase subunit V1E1의 다변량 분석(multivariate analyses)을 실시하였다. 이를 위해, V-ATPase subunit V1E1의 발현수준에 대한 평가점수뿐만 아니라 환자의 연령, 종양 결절 전이 등급(TNM stage), 화학요법 및 방사선요법 치료 경험을 콕스 비례 위험 회귀 모델에 대입하여 분석을 수행하였다.

[163] 그 결과, 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, V-ATP6V1E1 단백질의 발현은 무병생존율 진단 인자와 독립적인 것을 확인하였다. 종양 결절 전이 등급 III 및 IV 또한 무병생존율 및 전체생존율 진단 인자와 독립적임을 확인하였다. 또한, 방사선 치료를 받은 경험이 있는 식도암 재발 환자의 무병생존율 및 전체생존율은 V-ATP6V1E1을 높은 수준으로 발현하는 환자 군에서 거의 없는 것으로 나타났다.

[164] 상기 결과를 통해 V-ATPase subunit V1E1 과발현은 종양 결절 전이 등급 및 방사선 치료를 받은 식도암 재발 환자에서 연관성이 있음을 알 수 있다.

[165] [표3]

Predictors		Disease-free survival		Overall survival	
		HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
Age	0-65	1.00		1.00	
	65+	1.103(0.6-1.9)	0.720	1.025(0.6-1.9)	0.935
TMN Stage	I	1.00		1.00	
	II	2.320(0.9-6.1)	0.093	3.222(0.9-11.0)	0.062
	III	4.325(1.7-11.1)	< 0.003 *	6.732(2.0-22.0)	0.002*
	IV	7.498(2.7-20.7)	< 0.001 *	9.556(2.7-34.0)	0.001*
Chemotherapy	Absent	1.00		1.00	
	Positive	1.062(0.8-1.4)	0.632	1.116(0.6-1.5)	0.410
Radiation therapy	Absent	1.00		1.00	
	Positive	0.722(0.6-0.9)	0.004*	0.732(0.6-0.9)	0.010*
V-ATP6V1E1	Negative	1.00		1.00	
	Positive	1.748(1.1-2.8)	0.018*	1.394(0.9-2.3)	0.188

[166]

[167] 실시예 6. V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해에 의한 식도암세포 증식 억제 확인

- [168] V-ATPase의 발현이 세포 크기 및 생존을 포함하는 세포 성장과 연관이 있다는 사실에 근거하여, V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해가 식도암 세포의 생존에 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-4의 방법에 따라 식도암 세포주인 TE8 세포에 V-ATP6V1E1 siRNA(si-V1E1) 또는 non-silencing siRNA(si-NS)를 트랜스펙션하고, 실시예 1-7의 방법에 따라 세포 수를 측정하여 세포 생존율을 분석하였다. 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 대조군(si-NS)에 비하여 TE8 식도암 세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다.
- [169] 또한, 실시예 1-6의 방법에 따라 웨스턴 블롯을 통해 세포주기(cell cycle)에 관련된 단백질들의 발현변화를 관찰한 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 세포주기 진행에 관련된 cyclin D와 cdk2 단백질의 발현이 현저히 감소한 것을 통하여 V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해에 의해 G1 cell cycle arrest가 유도되었음을 알 수 있었다.
- [170] 나아가, V-ATPase subunit V1E1의 발현이 TE8 식도암 세포에서 세포자멸사(apoptosis)에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 웨스턴 블롯을 통해 apoptosis에 관여하는 단백질들의 발현변화를 관찰하였다. 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우, 대조군(si-NS)에 비하여 apoptosis 억제에 관여하는 bcl-2 단백질의 발현이 감소하였으며, cleaved caspase3와 cleaved PARP(Poly [ADPribose] polymerase 1) 단백질의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시키는 경우 apoptosis가 유발되는 것을 확인하였다.
- [171] 상기 결과들은 V-ATPase subunit V1E1의 발현이 식도암 세포의 생존율 및 증식, apoptosis를 통한 세포사멸에 영향을 미친다는 것을 의미한다.
- [172]
- [173] 실시예 7. V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해에 의한 식도암 세포의 운동성 및 초점접착 형성 억제 확인
- [174] 종양 침습 및 림프절 전이는 식도암에서 관찰되는 식도암 세포의 중요한 특성이다. 따라서 V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해가 식도암 세포의 이동 및 침습에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-4의 방법에 따라 식도암 세포주인 TE8 세포에 V-ATP6V1E1 siRNA(si-V1E1) 또는 non-silencing siRNA(si-NS)를 트랜스펙션하고, 실시예 1-8의 방법에 따라 세포 이동 및 세포 침습능을 측정하였다. 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우, TE8 식도암 세포의 이동 및 침습이 억제되는 것을 확인하였다. 이는 V-ATPase subunit V1E1이 식도암 세포의 전이적 특성에 영향을 미친다는 것을 의미한다.
- [175] 상기 결과를 바탕으로, 상피암세포(epithelial cancer cell)에서 이동과 침습이 가능한 간엽세포로 표현형이 변화하는 현상으로 암 전이 과정에서 첫 단계로 이루어지는 상피간엽이행(epithelial-mesenchymal transition; EMT)에 V-ATPase

subunit V1E1이 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 이를 위해, 상기 현상에 관여하는 Vimentin, MMP2(matrix metalloproteinases 2), 및 MMP7(matrix metalloproteinases 7)의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 도 4b에 나타낸 바와 같이, 상기 3가지 유전자의 발현이 모두 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해, V-ATPase subunit V1E1의 발현이 식도암 세포의 이동 및 침습과 관련이 있음을 알 수 있었다.

- [176] 다음으로, 전이성 식도암은 FAK(Focal Adhesion kinase) 과발현과 연관성이 있다는 연구결과들에 근거하여, V1E1의 발현 저해가 식도암 세포의 초점접착(focal adhesion)에 영향을 미치는지 알아보하고자 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-4의 방법에 따라 식도암세포주인 TE8 식도암 세포에 V-ATP6V1E1 siRNA(si-V1E1) 또는 non-silencing siRNA(si-NS)를 트랜스펙션하고, 실시예 1-9의 방법에 따라 면역세포화학염색을 실시하였다. 그 결과, 도 4c에 나타낸 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 액틴 세포골격(actin cytoskeleton)과 인테그린(integrin) 사이의 상호작용을 매개하는 p-paxillin 단백질이 거의 염색되지 않은 것을 통해 초점접착 형성이 현저히 억제되는 것을 알 수 있었다.
- [177] 나아가 상기 결과를 바탕으로 V-ATPase subunit V1E1 매개 식도암 세포의 초점접착 및 침습의 분자적 기전을 알아보기 위하여, 세포운동을 매개하는 신호전달경로 관련 단백질들의 발현변화를 웨스턴 블롯을 통해 관찰하였다. 그 결과, 도 4d에 나타낸 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 세포 운동 매개 신호전달 경로에서 FAK의 하위 조절자인 ERK(extracellular signal regulated kinase) 및 JNK(C-Jun N-terminal kinase) 단백질의 인산화(p-ERK 및 p-JNK)가 감소한 것을 확인하였다.
- [178] 상기 결과들은 V-ATPase subunit V1E1이 FAK 및 이의 하위 조절자인 ERK 및 JNK를 통해 세포 운동 및 초점접착 형성을 양성적으로 조절함을 의미한다.

[179]

- [180] 실시예 8. V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해에 의한 식도암 세포의 해당과정 억제 확인

- [181] **8-1. 세포 내 젖산 및 ATP 농도 측정**

- [182] 최근, 식도암의 종양형성(tumorigenesis)은 세포 내 젖산(lactate) 농도 및 해당과정(glycolysis)에 의존적이라는 연구결과들이 보고되었는바, V-ATPase subunit V1E1이 식도암 세포에서 호기성 해당과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 하였다.

- [183] 이를 위해, 상기 실시예 1-4의 방법에 따라 식도암 세포주인 TE8 세포에 V-ATP6V1E1 siRNA(si-V1E1) 또는 non-silencing siRNA(si-NS)를 트랜스펙션하고, 실시예 1-10의 방법에 따라 해당과정 결과 생성되는 주요 에너지원인 젖산과 ATP의 농도를 측정하였다. 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 식도암 세포 내

젖산과 ATP 농도 모두 대조군(si-NS)에 비하여 유의하게 감소하였다. 상기 결과를 통해 V-ATPase subunit V1E1이 미토콘드리아 호흡과정에서 호기성 해당과정을 위한 대사적 흐름을 조절하는데 관여한다는 것을 알 수 있었다.

[184]

[185] 8-2. 포도당 흡수율 변화 분석

[186] 상기 결과를 바탕으로, V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해가 세포의 포도당 흡수율에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실시예 1-11의 방법에 따라 포도당 흡수율 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이 V-ATPase subunit V1E1의 발현이 저해된 경우 대조군(si-NS)에 비해 포도당 흡수율이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이는 V-ATPase subunit V1E1의 발현이 저해된 세포에서 젖산 농도의 감소와 관련이 있는 것으로 판단되었다.

[187] 상기 결과를 통해 V-ATPase subunit V1E1의 발현이 저해된 식도암 세포에서 포도당 흡수율이 감소하는 것을 확인하였으므로, 암세포에서 포도당 흡수를 주로 매개한다고 알려진 Glut1(glucose transporter 1), Glut1 발현과 연관이 있다고 알려진 HIF1(hypoxia inducible factor 1), 및 이들의 표적 유전자들의 발현 변화를 확인하고자 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-5의 방법에 따라 real-time PCR을 수행한 결과, 도 6b에 나타낸 바와 같이, 식도암 세포에서 V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우, Glut1, HIF1- α 를 비롯하여, LDHA(Lactate dehydrogenase A)와 같은 당 분해 관련 효소들의 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[188]

[189] 8-3. V-ATPase subunit V1E1 발현 저해에 의한 포도당 산화 증가 확인

[190] 상기 실시예 8-1 및 8-2를 통해 V-ATPase subunit V1E1의 발현이 저해된 경우 식도암 세포 내 젖산 및 ATP 농도가 감소하고, 세포의 포도당 흡수율이 감소한다는 것을 확인하였으므로, V-ATPase subunit V1E1이 산소 소비율(oxygen consumption rate; OCR)과 세포 외 산성화율(extracellular acidification rate; ECAR) 조절을 통해 식도암 세포의 대사 이동(metabolic shift) 조절에 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 이를 위해, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 세포(si-V1E1) 또는 대조군 세포(si-NS)에 올리고마이신(Oligomycin), FCCP, 및 로테논(Rotenone)을 처리하거나 처리하지 않은 상태에서 25 mM 농도의 포도당을 처리하였다. FCCP는 미토콘드리아에서 호흡을 촉진시키는 역할을 하고, 로테논은 미토콘드리아에서 전자전달계를 저해하는 물질이다. 이후 실시예 1-12의 방법에 따라 미토콘드리아의 산화적 인산화(mitochondrial oxidative phosphorylation; OXPHOS) 수준을 측정하기 위해 산소 소비율을 측정한다. 결과, 도 7a에 나타낸 바와 같이, V1E1의 발현이 저해된 세포에 FCCP를 처리한 경우에는 포도당 처리에 의해 산화적 인산화 수준이 증가하였다. 또한, 동일한 조건에서 로테논을 처리한 경우에는 산소 소비율이 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과는 V1E1의 발현 저해가 포도당 산화를 통한 미토콘드리아 호흡률을

증가시킴을 의미한다.

- [191] 또한, 상기와 동일한 처리 조건에서 세포 외 산성화율을 측정한 결과, 도 7b에 나타난 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 대조군(si-NS)에 비하여 세포 외 산성화율이 전반적으로 감소한 것을 통해 포도당에서 젖산으로의 전환이 감소된 것을 확인하였다.
- [192] 다음으로, V-ATPase subunit V1E1 발현 저해가 미토콘드리아 호흡 및 당분해능의 변화를 유도하는지 알아보기 위해, 대조군(si-NS) 및 V1E1의 발현을 저해시킨 세포에 미토콘드리아 호흡을 억제하는 올리고마이신 또는 로테논을 처리하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과 V1E1의 발현이 저해된 세포의 경우 올리고마이신 또는 로테논을 처리하였음에도 불구하고 미토콘드리아 산화가 증가하는 것을 확인하였다. 더욱이, V-ATPase subunit V1E1의 발현 저해는 세포 외 산성화율을 감소시키고, 이는 해당과정의 감소를 의미한다. 따라서 상기 결과를 통해 ATPase subunit V1E1의 발현 저해는 해당과정을 억제함으로써 포도당의 산화를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.
- [193]
- [194] **8-4. ATPase subunit V1E1에 의한 해당과정 촉진 기전 확인**
- [195] 암세포에서 해당과정은 PI3K(phosphoinositide 3kinase)/AKT 신호전달 경로에 의해 매개된다고 알려져 있다. 활성화된 AKT는 포도당 흡수 및 PKM2(pyruvate kinase M2)의 인산화를 유도하여 당 분해 효소의 발현을 증가시킨다. 따라서 V-ATPase subunit V1E1이 AKT 및 PKM2 활성화에 영향을 미쳐 해당과정의 활성화를 유도하는지 알아보기 위해 V1E1의 발현이 저해된 세포에서 AKT 및 PKM2 단백질의 인산화(pAKT 및 pPKM2) 수준을 관찰하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, V-ATPase subunit V1E1의 발현을 저해시킨 경우 식도암 세포 내 total AKT 및 PKM2 단백질 발현량은 차이가 없는 반면, p-AKT(ser473) 및 p-PKM2(Tyr105)의 발현이 대조군(si-NS)에 비하여 감소하였다. 상기 결과는 V-ATPase subunit V1E1이 AKT 및 PKM2를 통해 해당과정을 촉진함을 의미한다.
- [196] 나아가 식도암에서 V-ATPase subunit V1E1(ATP6V1E1) 및 PKM2 유전자 발현간의 관련성을 확인하기 위해, 식도암 환자로부터 분리된 1170개의 종양에 대하여 Cancer Genome Atlas(TCGA)에서 분석된 RNA 서열 분석 결과를 확인하였다. 상기 서열분석 결과 내에 ATP6V1E1 mRNA 발현 수준을 비교한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, ATP6V1E1 mRNA 발현과 PKM2 발현 간에 상당한 연관성($P < 0.001$, $R^2 = 0.173$)이 있는 것을 알 수 있었다. 상기 결과는 ATP6V1E1 단백질이 식도암에서 해당과정을 위한 PKM2의 발현을 조절함을 의미한다.
- [197] 상기 결과들을 통해, V-ATPase subunit V1E1이 식도암 세포에서 ATP 농도, 젖산 합성, 당 분해 효소의 발현, 및 당대사 관련 신호전달을 조절함으로써 호기성의 해당과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

[198]

[199] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[200]

산업상 이용가능성

[201] 본 발명은 식도암 환자 유래 식도 조직에서 ATP6V1E1(V-ATPase subunit V1E1) 단백질의 발현수준과 식도암의 조직학적 등급 및 환자의 생존율간의 관련성이 있음을 규명하였고, ATP6V1E1 유전자의 발현 저해 시 식도암 세포의 증식, 운동성, 전이, 세포사멸, 및 당 대사능이 억제되는 것을 통해 ATP6V1E1 유전자가 식도암의 종양형성 및 발달에 중요한 인자임을 확인하였는바, ATP6V1E1 유전자는 식도암의 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커로써 유용하게 이용될 수 있으며, ATP6V1E1 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 식도암 치료물질의 스크리닝 및 의약품 개발용도 등으로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

[202]

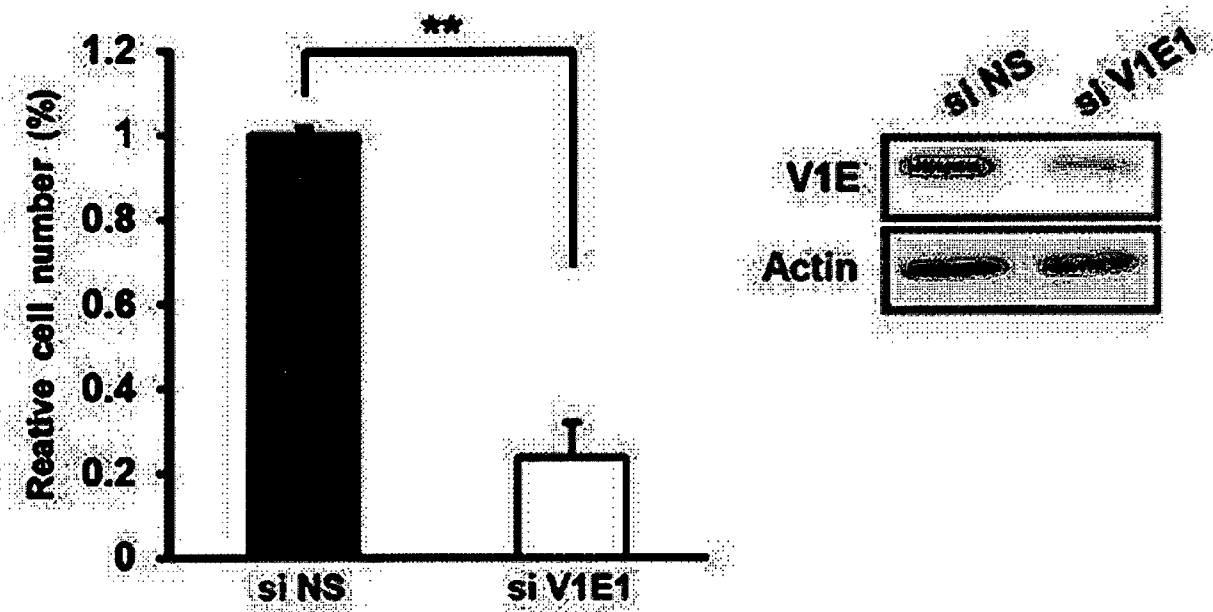
청구범위

- [청구항 1] ATP6V1E1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 ATP6V1E1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 ATP6V1E1 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 마커 조성물.
- [청구항 4] ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 ATP6V1E1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 ATP6V1E1 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 8] 제4항에 있어서,
상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 9] 제4항의 조성물을 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측용 키트.
- [청구항 10] 피검체 유래의 생물학적 시료에서 ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 ATP6V1E1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 ATP6V1E1 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한

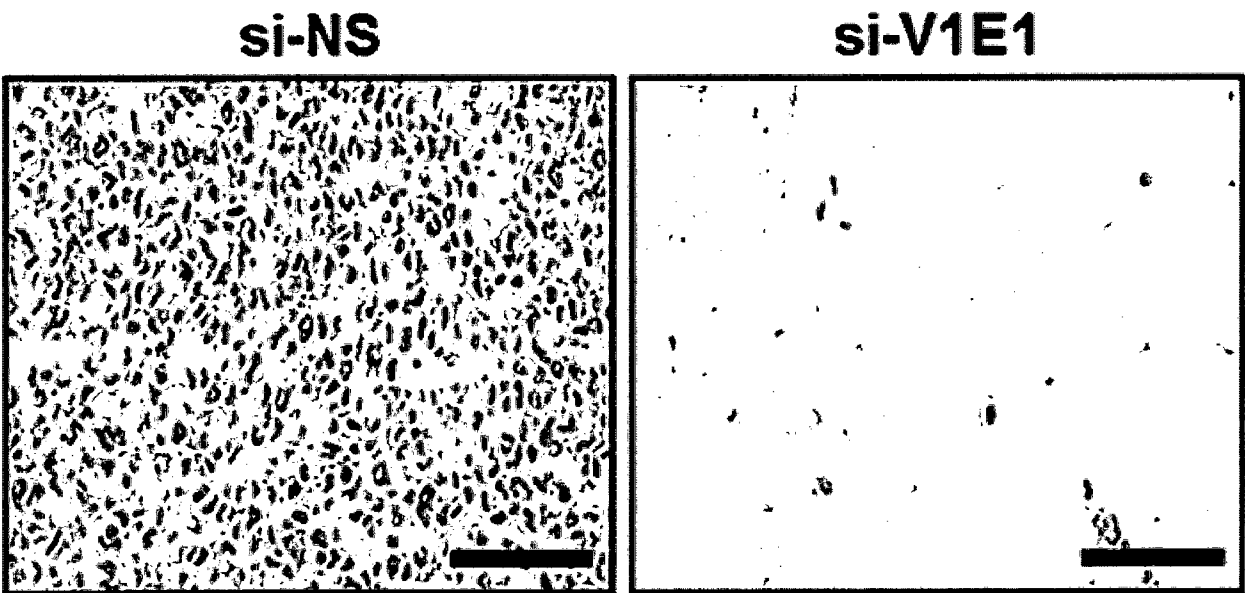
- 정보제공방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서,
 상기 mRNA의 발현수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사
 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR),
 RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA),
 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로
 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을
 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.
- [청구항 14] 제10항에 있어서,
 상기 단백질 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting),
 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역
 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA),
 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry),
 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체
 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로
 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을
 특징으로 하는, 식도암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.
- [청구항 15] 제10항에 있어서,
 상기 예후는 재발, 생존, 또는 무병생존인 것을 특징으로 하는, 식도암
 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.
- [청구항 16] ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 식도암의
 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
 상기 억제제는 siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA),
 miRNA(micro RNA), 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic
 acids), 안티센스 뉴클레오티드, 펩타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진
 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 식도암의 예방
 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제16항에 있어서,
 상기 조성물은 식도암 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)능을
 억제하는 것을 특징으로 하는, 식도암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제16항에 있어서,
 상기 조성물은 식도암 세포의 포도당 대사과정을 억제하는 것을
 특징으로 하는, 식도암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 20] 하기의 단계를 포함하는, 식도암 치료물질의 스크리닝 방법:
 (a) *In vitro* 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
 (b) 상기 세포의 ATP6V1E1 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
 (c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 ATP6V1E1 유전자의 발현 또는

- 활성을 감소시키는 물질을 식도암의 치료물질로 선정하는 단계.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 세포는 식도조직 유래 세포인 것을 특징으로 하는, 식도암
치료물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 22] 제20항에 있어서,
상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물,
핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는,
식도암 치료물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 23] 제20항에 있어서,
상기 (b) 단계는 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray),
노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting),
효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation),
면역화학염색법(immunohistochemistry), 및
면역형광염색법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는
1종 이상의 방법을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는, 식도암
치료물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 24] ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을
개체에 투여하는 단계를 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 25] ATP6V1E1의 발현 또는 활성 억제제의 식도암의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 26] ATP6V1E1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의
식도암 진단 또는 예후 예측 용도.

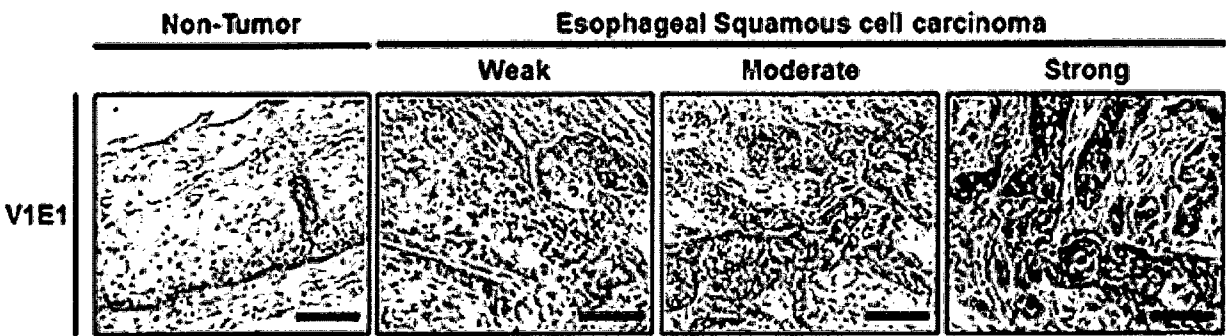
[도1a]



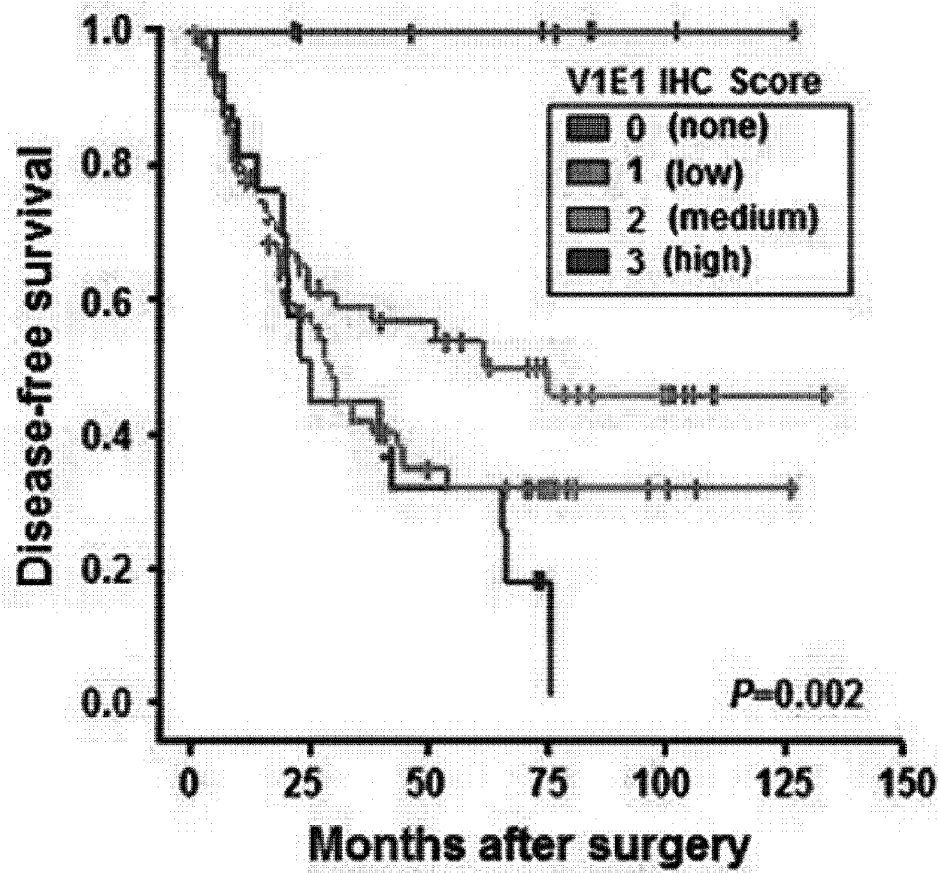
[도1b]



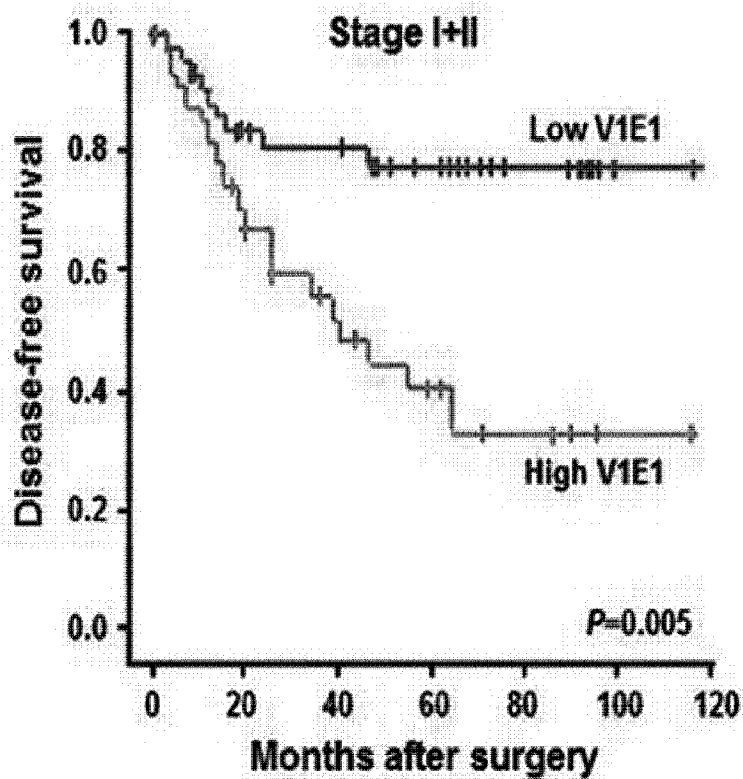
[도1c]



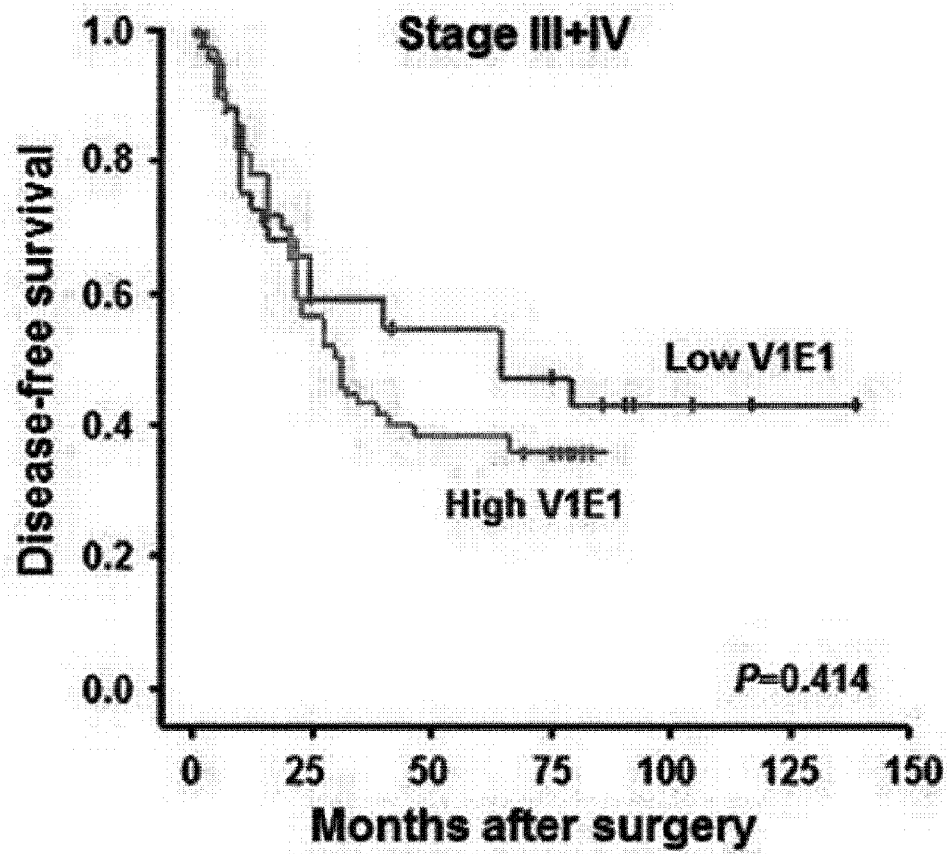
[도2a]



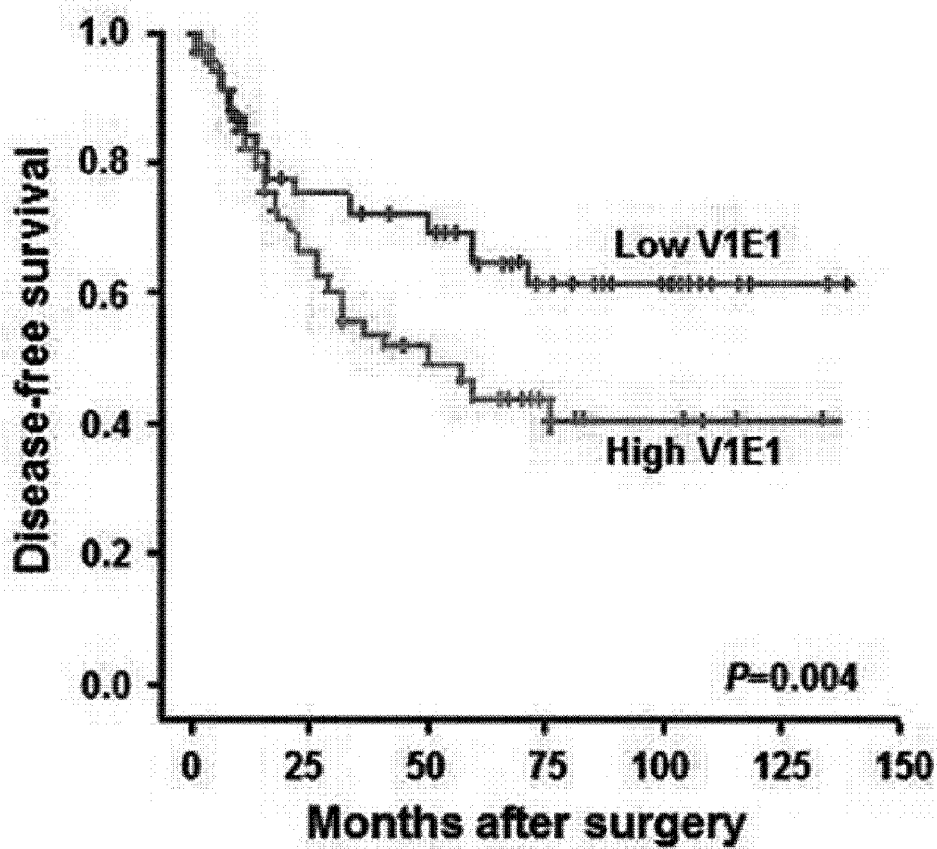
[도2b]



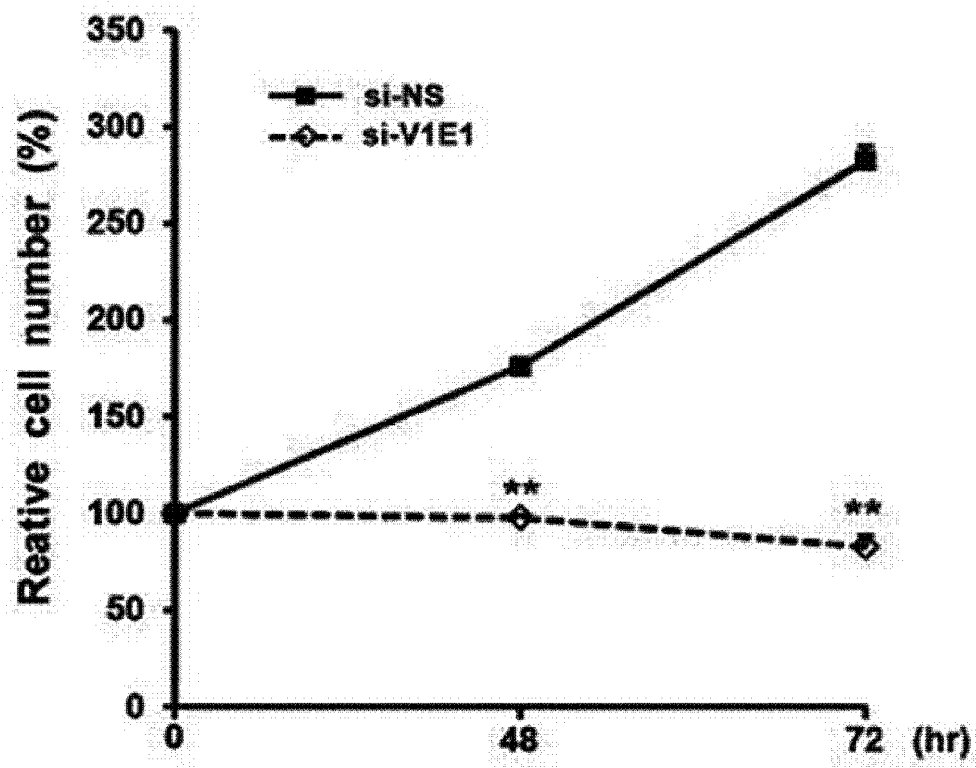
[도2c]



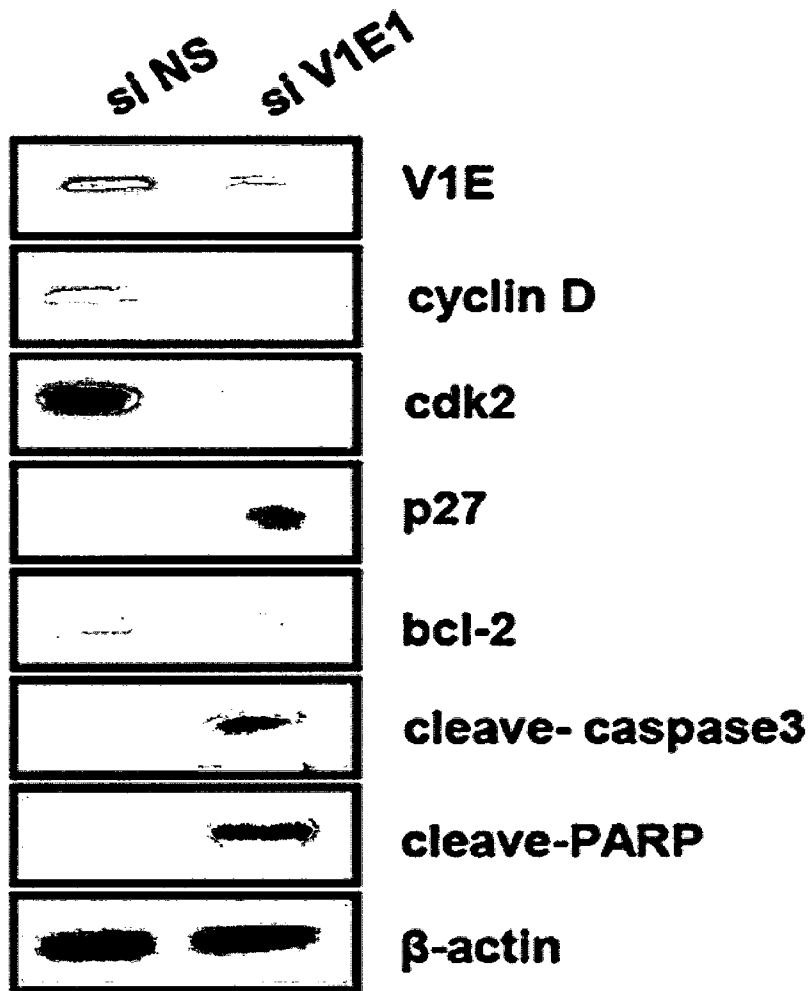
[도2d]



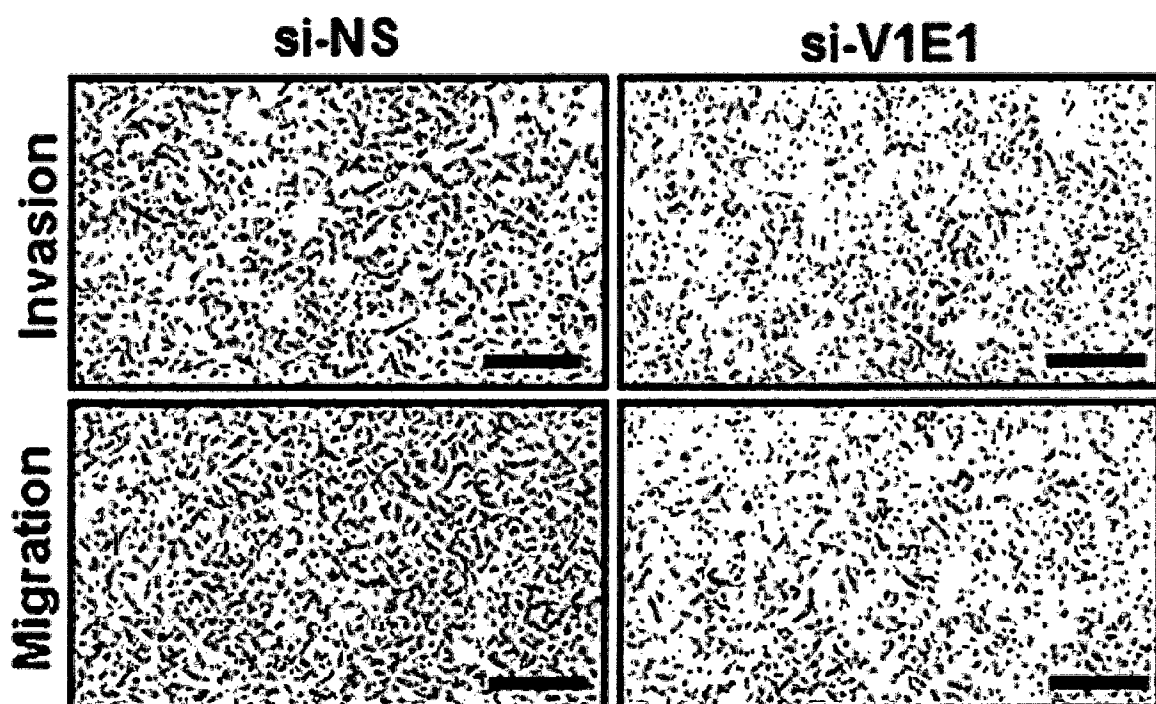
[도3a]



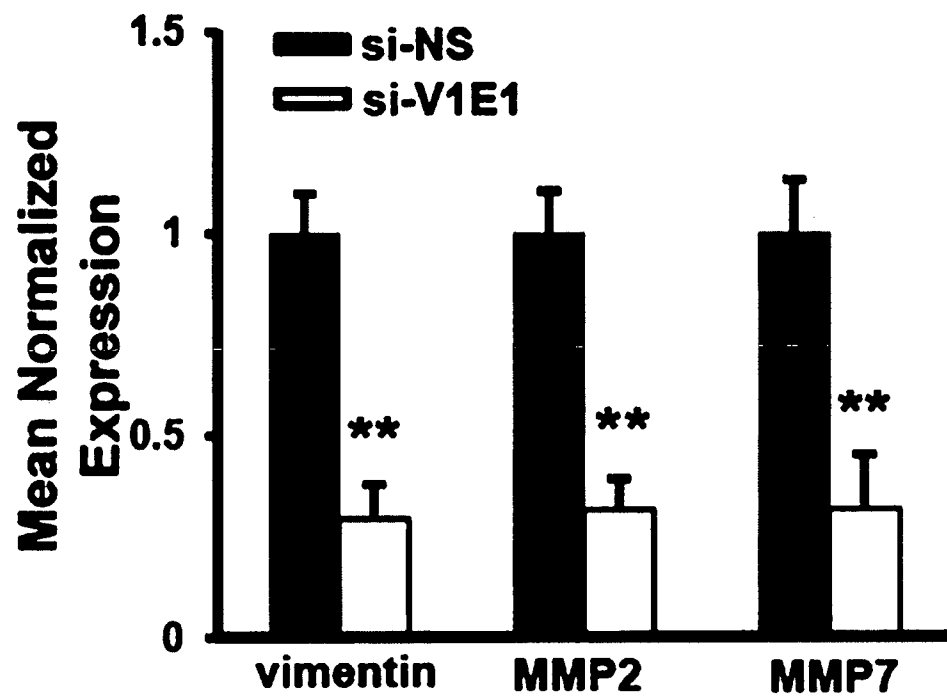
[도3b]



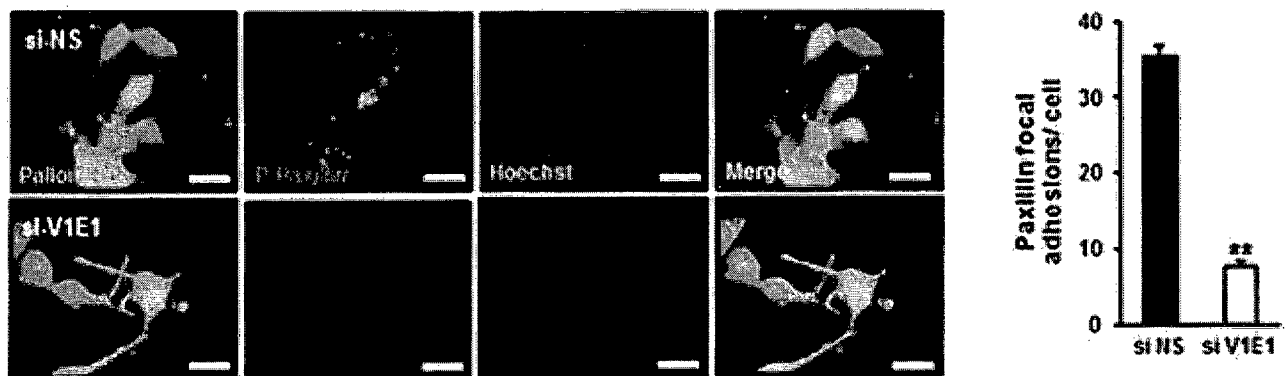
[도4a]



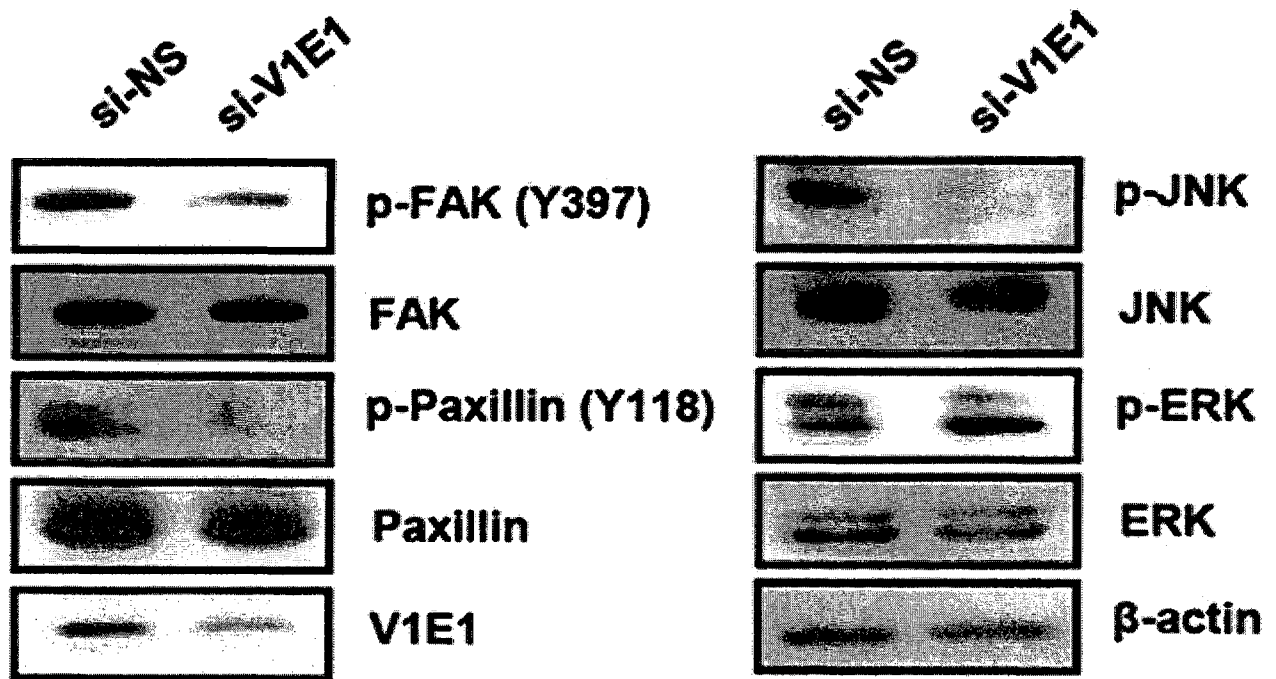
[도4b]



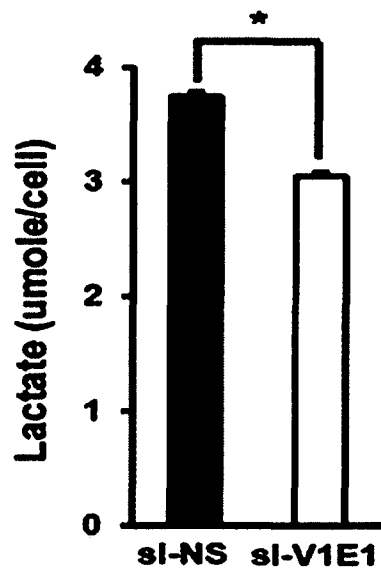
[도4c]



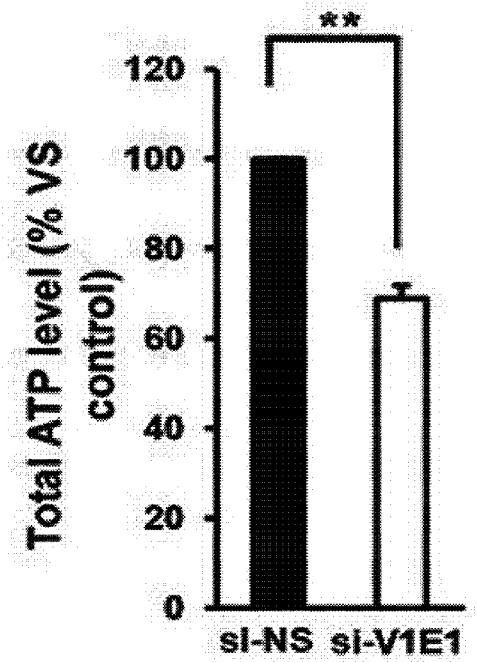
[도4d]



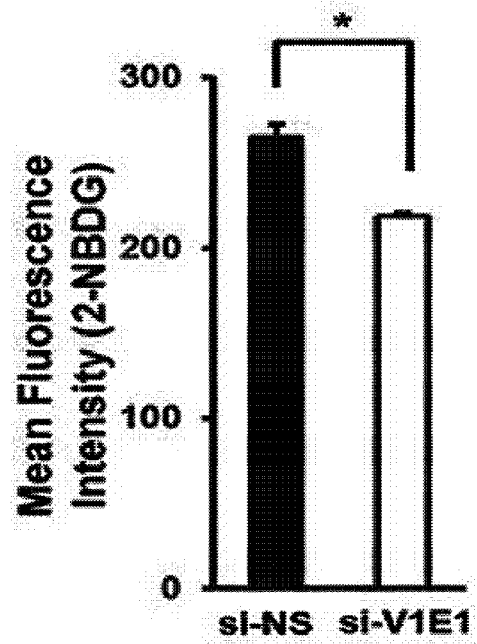
[도5a]



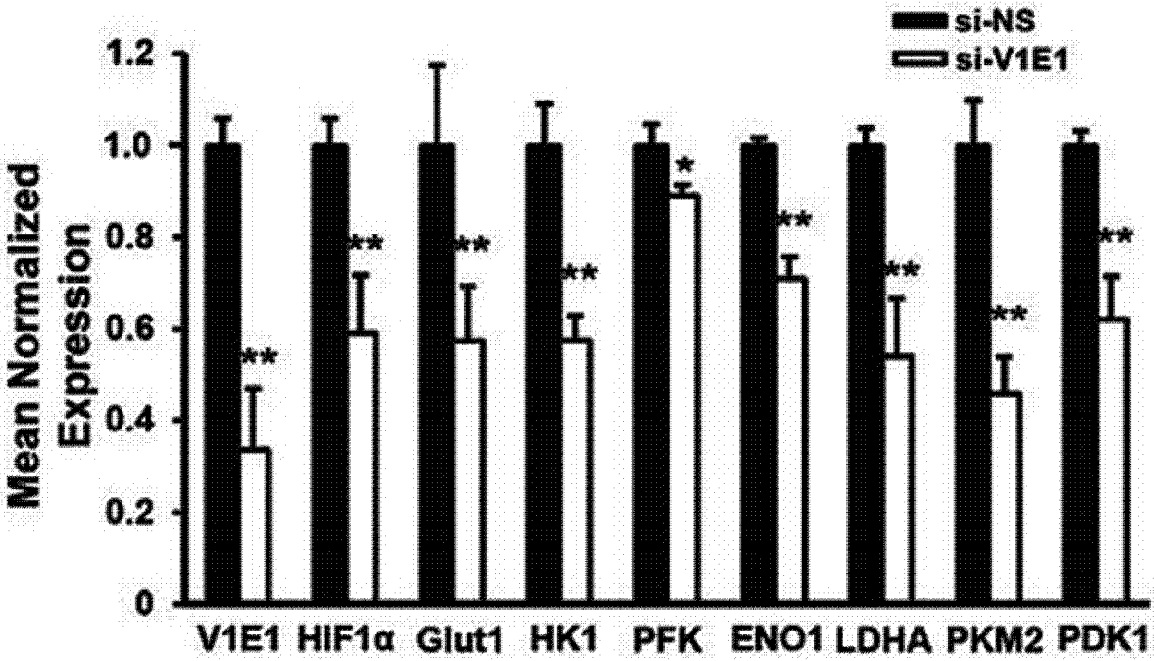
[도5b]



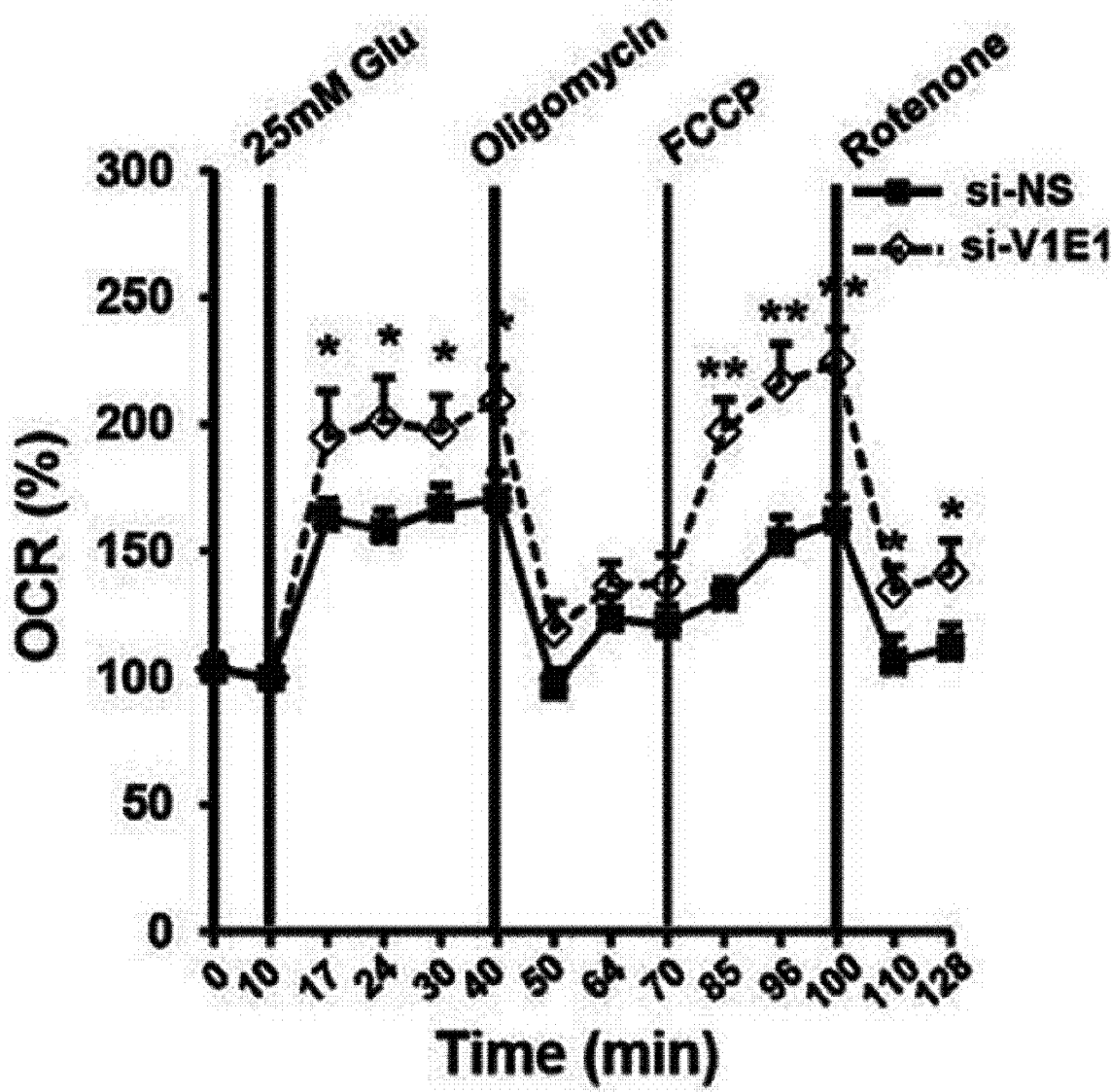
[도6a]



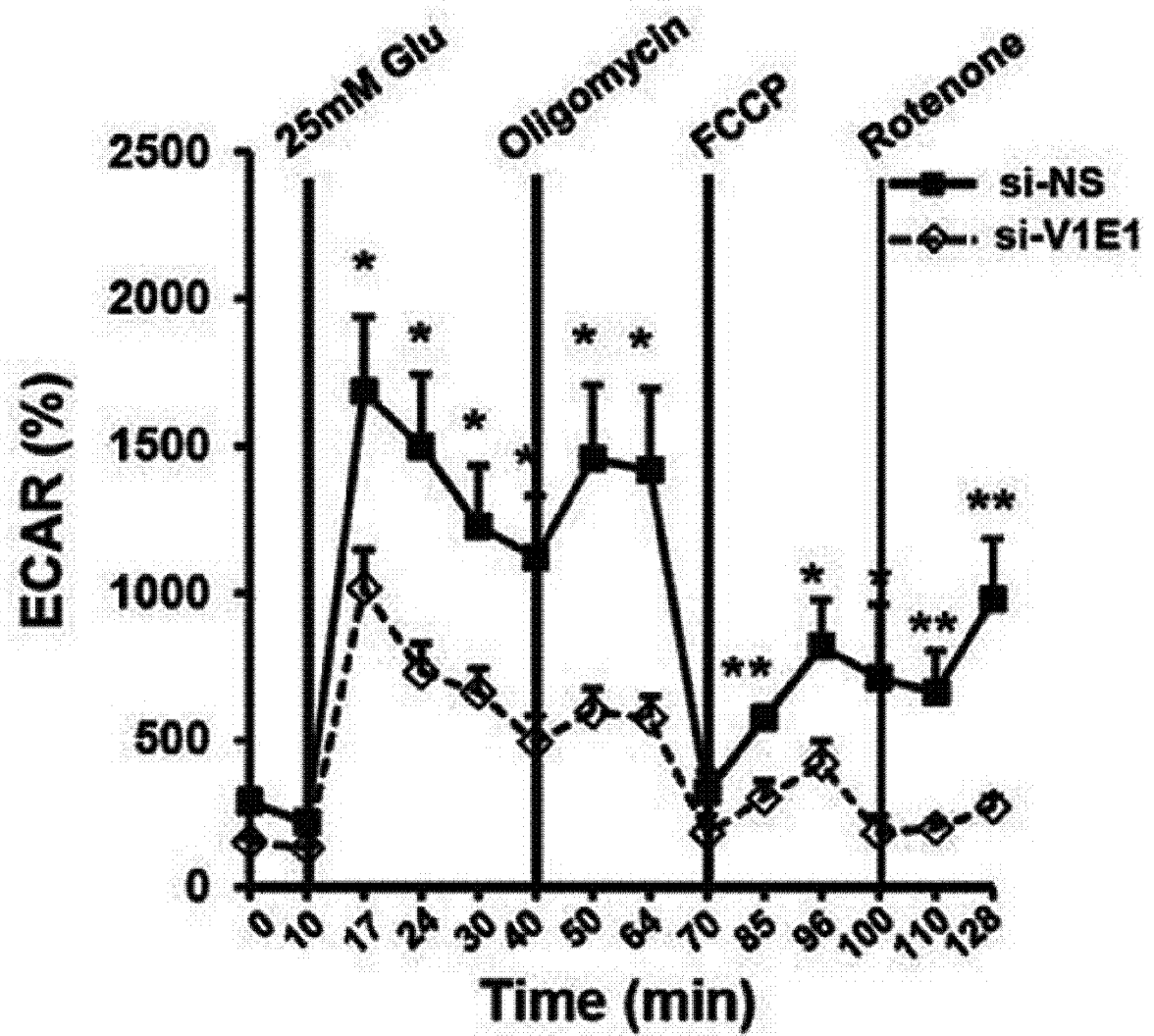
[도6b]



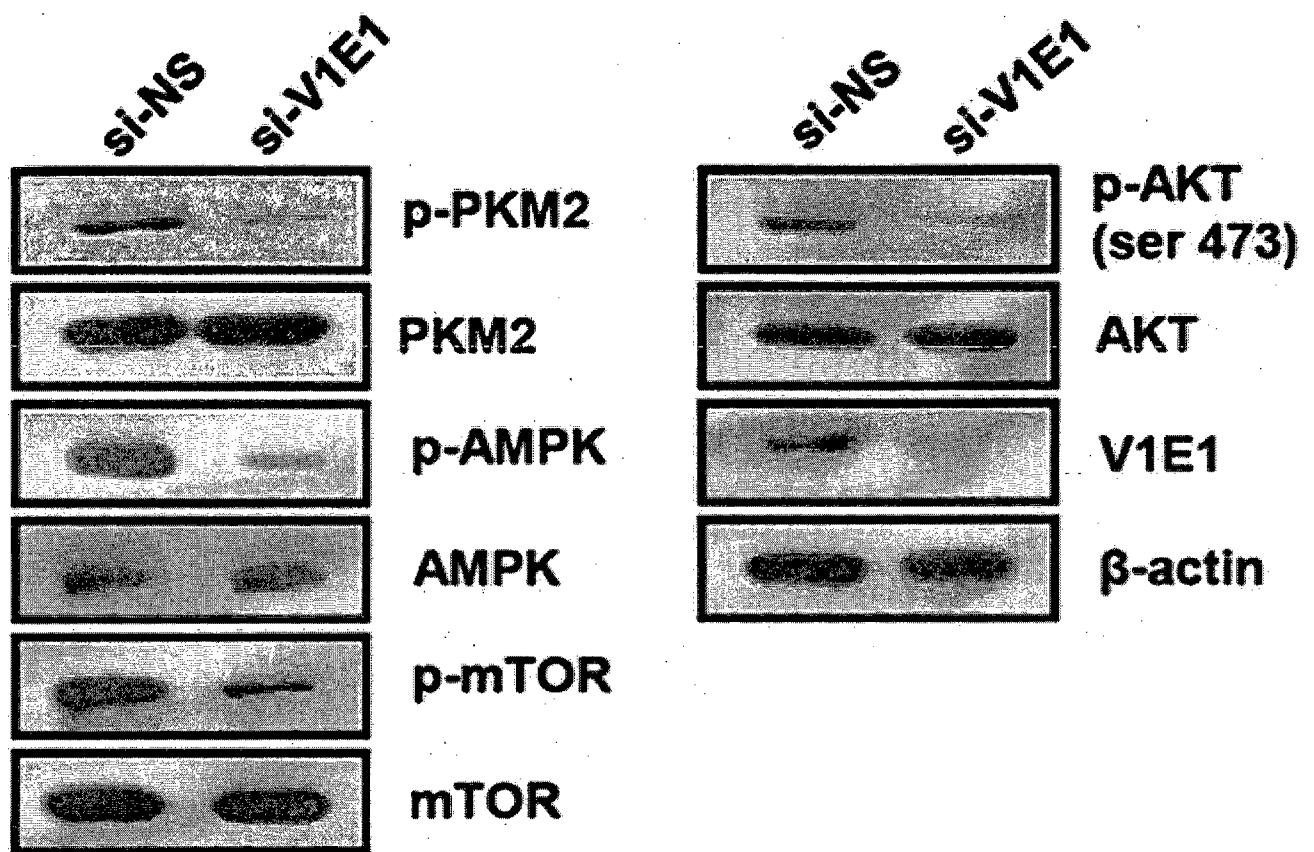
[도7a]



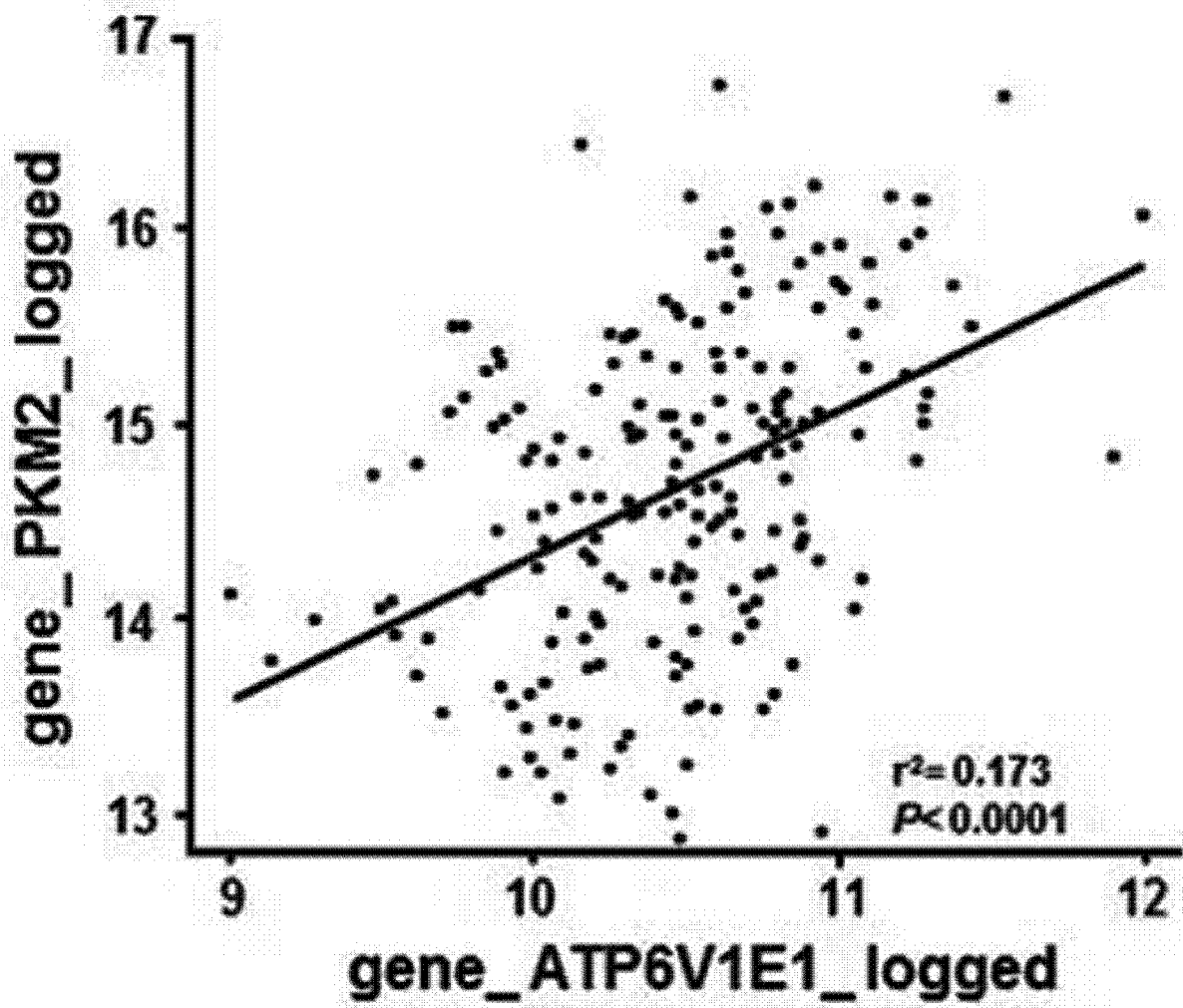
[도7b]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002882**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 39/395(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; A61K 39/395; C12N 15/09; A61K 31/713; A61K 31/7088; G01N 33/50; G01N 33/574

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)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: esophageal cancer, ATP1E1, inhibitor, diagnosis, prognosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-039052 A (HIROSHIMA UNIV.) 26 February 2009 See paragraphs [0009], [0053] and claims 1, 4-5, 11, 16-17.	1-23,25-26
Y	ZHAO et al., "Comparative Proteomics Analysis of Barrett Metaplasia and Esophageal Adenocarcinoma Using Two-dimensional Liquid Mass Mapping", Molecular & Cellular Proteomics, vol. 6, no. 6, pages 987-999 (E-pub. 08 July 2006) See abstract and table 3.	1-23,25-26
Y	NCBI, GenBank accession no. CU013231.1 (07 October 2008) See the entire document.	2,5,11
Y	NCBI, GenBank accession no. NP_001687.1 (13 February 2016) See the entire document.	3,6,12
Y	WO 2015-098112 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL INNOVATION) 02 July 2015 See paragraph [0198] and 1, 11, 24, 30, 39.	1-23,25-26
PX	KR 10-1657033 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 13 September 2016	1-23,25-26



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

"T" 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

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JULY 2017 (10.07.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002882

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.: 24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 24 pertains to a method for treatment of the human body by administration, and thus pertains 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/KR2017/002882

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2009-039052 A	26/02/2009	JP 5114796 B2	09/01/2013
WO 2015-098112 A1	02/07/2015	US 2017-0066836 A1	09/03/2017
KR 10-1657033 B1	13/09/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 39/395; C12N 15/09; A61K 31/713; A61K 31/7088; G01N 33/50; G01N 33/574

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))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 식도암, ATPV1E1, 억제제, 진단, 예후

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	JP 2009-039052 A (HIROSHIMA UNIV.) 2009.02.26 단락 [0009], [0053] 및 청구항 1, 4-5, 11, 16-17 참조.	1-23, 25-26
Y	ZHAO 등, "Comparative proteomics analysis of barrett metaplasia and esophageal adenocarcinoma using two-dimensional liquid mass mapping" Molecular & Cellular proteomics, 6권, 6호, 페이지 987-999 (전자 공개 2006.07.08) 초록 및 표 3 참조.	1-23, 25-26
Y	NCBI, GenBank accession no. CU013231.1 (2008.10.07) 전체 문헌 참조.	2, 5, 11
Y	NCBI, GenBank accession no. NP_001687.1 (2016.02.13) 전체 문헌 참조.	3, 6, 12
Y	WO 2015-098112 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL INNOVATION) 2015.07.02 단락 [0198] 및 1, 11, 24, 30, 39 참조.	1-23, 25-26
PX	KR 10-1657033 B1 (성균관대학교산학협력단) 2016.09.13	1-23, 25-26

☐ 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

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



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: 24
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
제24항은 투여에 의한 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 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 관련됩니
다. 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 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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

JP 2009-039052 A

2009/02/26

JP 5114796 B2

2013/01/09

WO 2015-098112 A1

2015/07/02

US 2017-0066836 A1

2017/03/09

KR 10-1657033 B1

2016/09/13

없음