(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 5 월 3 일 (03.05.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/057421 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/003091

(22) 국제출원일: 2011 년 4 월 27 일 (27.04.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0106309 2010 년 10 월 28 일 (28.10.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자; 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **강다원 (KANG, Da Won)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 주공그린빌 아파트 106 동 1503 호, 660-779 Gyeongsangnam-do (KR). **한재희 (HAN, Jae Hee)** [KR/KR]; 경상남도 진주시 초전동 805 번지 현대아파트 101 동 201 호, 660-784 Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공항타워 6 층 한얼국제특허사무소, 135-973 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

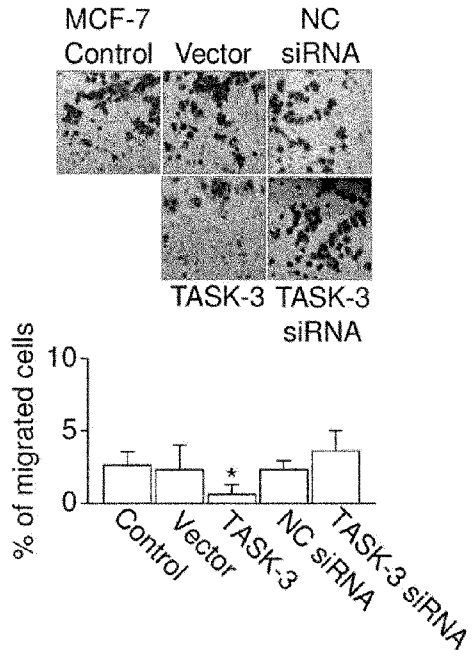
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: CANCER-METASTASIS SUPPRESSION BY MEANS OF INCREASED TASK-3 POTASSIUM CHANNEL EXPRESSION

(54) **발명의 명칭** : T A S K – 3 칼륨 채널의 발현증가에 의한 암전이 억제

[Fig. 2e]



(57) **Abstract**: The present invention relates to cancer-metastasis suppression by means of increased TASK-3 potassium channel expression. It has been confirmed that cancer-cell movement and invasion can be effectively controlled by regulating the level of TASK-3 expression; and provided is a new medical use for TASK-3 as a target molecule for cancer-metastasis suppression. Provided are: a pharmaceutical composition for suppressing cancer metastasis containing, as an active ingredient, a TASK-3 protein, a gene coding for a TASK-3 protein or a recombinant expression vector comprising the gene; a cancer-metastasis suppressing method using the same; a cancer-metastasis probability predicting kit; a method for selecting a cancer-metastasis risk group by using the kit; and a screening method for cancer-metastasis suppressing agents.

(57) **요약서**: 본 발명은 TASK-3 칼륨 채널의 발현증가에 의한 암전이 억제에 관한 것으로, TASK-3 발현수준의 조절을 통해 암세포의 이동 및 침습을 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하고 암전이 억제의 표적분자로서 TASK-3 의 새로운 의학적 용도를 제공한다. 이에 본 발명은 TASK-3 단백질, TASK-3 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물; 이를 이용한 암전이 억제방법; 암전이 가능성 예측 키트; 상기 키트를 이용한 암전이 위험군의 선별방법; 및 암전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

WO 2012/057421 A1

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: ＴＡＳＫ－３ 칼륨 채널의 발현증가에 의한 암전이 억제

기술분야

[1] 본 발명은 TASK-3 칼륨 채널의 발현증가에 의한 암전이 억제에 관한 것으로, 구체적으로 암전이 억제의 표적 분자로서 TASK-3 단백질, TASK-3 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물; 이를 이용한 암전이 억제방법; 암전이 가능성 예측 키트; 상기 키트를 이용한 암전이 위험군의 선별방법; 및 암전이 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 암은 세포가 무한히 증식해 정상적인 세포의 기능을 방해하는 질병으로, 증식과 억제가 조절되지 않는 비정상적인 세포들이 통제되지 못하고 과다하게 증식하며, 주위 조직이나 장기에 침입하여 정상 조직의 파괴를 초래한다. 암이 발생하는 부위는 제한되지 않으며, 암이 발생하는 원인은 아직도 정확히 밝혀진 바 없다. 지금까지 알려진 바에 따르면 정상적인 세포의 유전자에 돌연변이가 생겨서 나타난다고 알려져 있다. 유전자 발현의 이상은 모든 암의 공통적인 특징인 조절불능의 세포 성장 및 탈분화와 밀접하게 관련되어 있다. 다수의 암 연구에 따르면, 특정 암을 갖는 개체의 게놈에서는, 일반적으로 종양 억제유전자로 불리는, 정상적으로는 무분별한 세포의 분열과 과잉 성장을 억제하는 기능을 하는 열성유전자의 발현이 감소되며, 정상세포를 암세포로 변형시키는 능력을 갖는 종양유전자가 과다 발현된다. 따라서, 유전자 발현과 암의 발병 또는 진행과의 관계에 기초하여 정상세포 대비 암세포에서 특이적으로 과발현되거나 또는 그 발현이 억제되는 유전자를 탐색하면 암 진단이나 치료의 표적을 개발할 수 있다.

[4] 또한, 암의 가장 중요한 생물학적 특징 중 하나는 전이를 일으킬 수 있다는 것이며, 이는 암을 치료하는데 가장 큰 장애물로 여겨지고 있다. 실제로 모든 고형 종양 환자의 약 60%는 이미 원발종양 진단 시 미세하게나마 임상적으로 전이된 암을 가지고 있으며, 대부분의 암환자들의 주요 사망 원인이 암전이임은 이미 잘 알려져 있다. 대부분의 암전이는 다발성, 전신성이며, 그 존재 여부의 판정도 어렵기 때문에 현재의 암 치료방법으로는 치료효능이 만족스럽지 못하다. 하지만 암전이는 1차 종양을 구성하는 암세포의 극히 일부분만이 전이과정의 여러 단계를 성공적으로 마치고 전이암으로 되는 비효율적인 과정이다. 따라서, 전이 과정을 잘 이해하고, 임상적, 생물학적으로 유용한 치료표적의 발굴을 통해 이를 효과적으로 억제할 수 있는 방법을 개발한다면,

암전이에 의한 사망을 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.

[5] 이에 암 발생 및 암전이 억제와 관련하여 다양한 연구가 진행되고 있고, 이러한 연구의 일환으로, 암의 진행에서 중요한 역할을 담당하는 분자인 칼륨 채널에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[6] 칼륨 채널은 세포막 전위에 대한 이들의 영향으로 인해 다수의 생리학적 과정에서 중요한 역할을 하는 세포막 내에 존재하는 단백질 복합체로서, 칼륨의 세포막을 통한 흐름을 조절하여 막 전위를 조절한다. 이들은 또한 여러 유형의 암 진행에서 중요한 분자로 작용하며, 전압-의존성개폐(Kv), 칼슘-활성화(K_{Ca}), ATP-민감성(K_{ATP}), 이중-기공 도메인(K_{2P}) 칼륨채널 등이 있다. 이들 채널은 전립선, 결장, 폐, 유방 및 조직 유래의 다양한 암세포에서 발현되며, 암생성 및 악성종양의 성장과 연관되어 있음이 보고되었다. 칼륨 채널은 세포의 증식, 세포사멸 및 분화에 매우 중요한 역할을 담당한다. 일부 칼륨 채널 조정자는 암성장을 직접적으로 억제하거나 복합 치료에서 전형적인 항암제의 효능을 증진시킴으로써 항암효과를 나타낸다. 정상 상피세포가 암세포로 변하는 과정에서 칼륨 채널의 발현에 영향을 미칠 수 있거나 채널 활성에 변화를 야기할 수 있는 일련의 유전적 변이가 일어난다. 따라서, 이러한 비정상적인 이온채널의 발현수준과 활성을 조절하면 암세포의 증식 및 전이의 억제가 가능할 것이다. 암세포의 증식과 종양형성에 대한 Kv 채널의 영향에 대해서는 활발히 연구가 진행되고 있는 반면, K_{2P} 채널과 암과의 연관성에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다.

[7] 한편, K_{2P} 채널은 세포외로 흐르는 K^+ 전류의 주요 통로로 알려져 있는데, 이는 휴지 막 전위에 영향을 미쳐 신경 또는 근육 세포의 흥분도에 중요한 역할을 한다. K_{2P} 채널 중 TASK 채널은 K_{2P} 채널의 모든 특징을 가지고 있으며 세포의 산증에 의해 K^+ 전류의 흐름이 길항되며 pH에 매우 민감한 것으로 알려져 있다. 현재까지 TASK 채널은 TASK-1, TASK-2, TASK-3, TASK-4 및 TASK-5가 보고되어 있다. 이들 중 아미노산 동일성이 50% 이상인 TASK-1 및 TASK-3 채널이 가장 큰 동족관계를 형성한다. K_{2P} 채널의 이량체화는 총 4개의 세공 단위를 갖는 기능적 칼륨 채널을 형성하는데, 예를 들어, 2개의 TASK-1 또는 2개의 TASK-3 단백질의 동형 이량체화 이외에, TASK-1 및 TASK-3의 이형 이량체화가 가능하다.

[8] K_{2P} 채널을 포함한 다양한 칼륨 채널이 인간의 각종 암종 조직, 예를 들어, 유방암, 폐암, 결장암 및 전이성 전립선암에서 증폭되고 과발현됨이 보고되었다. 또한, TASK-3 상의 점 돌연변이는 채널 기능을 바꾸는 동시에 종양 형성을 제거하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 암 발생 및 성장을 감소시키는 TASK-3 길항제가 새로운 항암제로서 제시되고 있다. 그러나 TASK 채널의 거대한 생리학적 중요성에도 불구하고, 이들 채널의 약리학적 조절에 대해서는 거의 알려져 있지 않으며, 특히 암전이와 칼륨 채널(K_{2P})과의 연관성에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

[9] 이에 본 발명자들은 암전이와 칼륨 채널 발현수준의 연관성을 규명하고자 예의 연구노력한 결과, K_{2P} 채널의 하나인 TASK-3 발현이 비침습적 암세포의 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 증가하고, TASK-3의 과발현은 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 반면, 이의 사일런싱(silencing)은 암세포의 이동을 증가시킴을 확인하고, TASK-3의 발현 조절을 통해 암전이를 억제할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명의 목적은 암전이 억제의 표적 분자로서 TASK-3 단백질, TASK-3 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 암전이 억제용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 시험물질의 처리에 의한 TASK-3 발현수준의 변화를 분석하는 단계를 포함하는, 암전이 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 TASK-3 단백질에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 암조직 표본으로부터 TASK-3 발현수준을 분석하는 단계를 포함하는 암전이 위험군의 선별방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 TASK-3의 발현을 증가시키는 단백질 키나제 C(PKC) 억제제를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물 및 이를 이용하여 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[17]

과제 해결 수단

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 암전이 억제의 표적 분자로서 TASK-3 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[19] 본 발명에서 사용된 바와 같이 "암전이" 라는 용어는, 암세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 이동하여 증식하는 것을 말한다. 암이 신체의 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암조직이 성장하여 직접적으로 주위 장기를 침습하는 것과 멀리있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격전이를 하는

것으로 구분된다.

[20] 본 발명에서 사용된 바와 같이 "TASK-3"이라는 용어는 다양한 칼륨 채널 중 이중-기공 도메인 K^+ 채널의 한 아부류로서 KCNK9 또는 $K_{2P}9.1$로 표시된다. 이 채널은 산성 pH에서 억제되고, 알칼리성 pH에서 활성화된다. 본 발명에서 TASK-3의 발현조절에 의해 암세포의 이동 및 침습이 억제될 수 있는 암종으로는 전이를 유발할 수 있는 암이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 유방암, 폐암, 결장암, 전립선암 등이 있다.

[21] 본 발명에서는 암전이에 있어서 이중-기공 도메인 $K^+(K_{2P})$ 채널의 역할을 규명하기 위해, K_{2P} 채널 유전자/단백질 수준과 세포 이동의 연관성을 침습적 암세포와 비-침습적 암세포에서 확인하였다. 구체적으로, 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 비-침습성 MCF-7 유방암세포와 침습성 MDA-MB-231 유방암세포에서의 TASK-3 발현정도를 RT-RCR, 실시간 PCR, 웨스턴 블롯 및 면역조직화학적 염색을 통해 비교하였다(도 1a 내지 1e 참고). 그 결과, MDA-MB-231 세포에 비해 MCF-7 세포에서 TASK-3의 mRNA 및 단백질 수준이 높게 발현됨을 확인하였다. 또한, TASK-3 발현이 유방암세포의 이동에 미치는 영향을 2-D 및 3-D 이동성 분석으로 조사한 결과, 상기 두 세포 모두에서 TASK-3의 과발현은 세포의 이동 및 침습을 감소시키는 반면, TASK-3의 사일런싱은 이들 세포의 이동을 증가시킴을 확인하였다(도 2a 내지 2f 참고). PKC 활성화와 TASK-3 발현의 연관성을 조사한 결과, PKC 활성화제인 포볼이리스테이트 아세테이트(PMA)에 의해 TASK-3의 발현이 억제되고, 그에 따라 세포 이동능력이 증가하는 것을 확인하였다(도 3a 내지 3d 참고). 그러나, PMA에 의해 유도된 TASK-3 발현의 감소는 PKCδ 억제자인 로틀레린(rottlerin) 처리에 의해 회복되었다. 상기 결과는 TASK-3 발현수준이 암세포의 이동 및 침습과 연관되어 있고, PKC 활성화를 통해 TASK-3 발현수준을 조절할 수 있음을 나타낸다. 이를 토대로 본 발명은 TASK-3 발현조절을 통해 암세포의 전이를 조절할 수 있음을 제안한다.

[22] 본 발명은 PKC 활성화에 의해 조절될 수 있는, TASK-3 발현수준이 인간 암세포의 이동 침습과 관련되어 있음을 최초로 규명한 것이다. 지금까지, TASK-3의 역할은 발현수준의 조절에 의해서가 아닌 채널 활성의 조절에 의해 암세포에서 세포 증식 및 세포사멸과 관련되어 연구되었다. TASK-3 유전자는 유방암, 결장암, 폐암, 위장암, 흑색종암, 및 전립선암을 포함하는 다수의 인간 암종에서 과발현됨이 보고되었으나, 이의 발현수준과 암세포 전이와의 연관성에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다. 본 발명은 TASK-3 발현수준이 암전이의 결정적인 과정인 세포 이동 및 침습과 관련되어 있음을 밝히고, 암전이 억제를 통한 암 치료의 새로운 표적 분자로서 TASK-3의 용도를 제안한 것이다.

[23] 이에 본 발명은 TASK-3 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은 상기 암전이 억제용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법을 제공한다.

[25] 본 발명에서 용어, "대상"은 본 발명의 약학적 조성물을 투여하여 암전이가 억제될 수 있는 질환을 가진 포유류 동물로서, 바람직하게는 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등을 의미한다.

[26] 본 발명에서 TASK-3 단백질은 서열번호: 21의 TASK-3 단백질 또는 이들과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 단백질을 말한다. 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 단백질에는 서열번호: 21의 TASK-3 단백질과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.

[27] 상기 "기능적 동등물"에는 서열번호: 21의 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로 서열번호: 21의 TASK-3 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.

[28] 상기 "기능적 유도체"는 TASK-3 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형이 가해진 단백질로서, 서열번호: 21의 TASK-3 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 의미한다.

[29] 본 발명에서 TASK-3 유전자는 상기 TASK-3 단백질 또는 이의 기능적 동등물을 코딩하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 염기서열에는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함한다. 바람직하게는 TASK-3 유전자는 서열번호: 22의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열로 표시되며, 가장 바람직하게는 서열번호: 22의 염기서열로 표시된다.

[30] 본 발명에서 TASK-3 단백질은 DNA 재조합 기술을 사용하여 제조될 수 있으며 이를 위하여 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로 TASK-3 단백질은 상기 TASK-3 유전자를 사용하여 세균, 효모, 식물 세포주 및 동물 세포주 내에서 재조합 방식으로 주입하는 유전공학 방법에 의해 제조될 수 있다.

[31] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 유전자 치료용 발현벡터는 상기 TASK-3 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터를 말하며, 이에 한정되지는 않지만, 바람직하게는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 TASK-3 유전자를 pcDNA3.1 벡터에 삽입하여 TASK-3 유전자를 발현하고 재조합 발현벡터 TASK-3/pcDNA3.1를 제조하였다.

[32] 본 발명에서 "유전자 치료(gene therapy)"라는 용어는 유전자 이상에 의하여 유발되는 각종 유전병과 암 등을 치료하기 위하여, 질병과 관련이 있는 유전자를 환자의 체내에 직접적으로 주입하고 상기 유전자를 세포 내에서 발현시켜 그의 기능을 정상화시키는 방법을 일컫는다. 따라서 본 발명에서 유전자 치료용 발현벡터는 TASK-3 유전자를 체내에 직접적으로 전달하여 발현시킴으로써 암세포의 이동 및 침습을 억제할 수 있는 발현벡터를 의미한다.

[33] 본 발명에 따른 상기 발현벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 도입할 수 있다. 예를 들어, 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다.

[34] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 pcDNA3.1 벡터에 서열번호: 22의 TASK-3 유전자를 삽입하여 발현벡터를 제조하고 이를 'TASK-3/pcDNA3.1'로 명명하였다. 상기 제조된 발현벡터를 MCF-7 또는 MDA-MB-231 세포 내로 형질감염시켜 상기 발현벡터로부터 TASK-3 단백질이 성공적으로 발현됨을 확인하였다.

[35] 본 발명에 따른 상기 발현벡터에 의하여 생산된 TASK-3 단백질은 암세포의 이동과 침습을 저해하는 특징이 있어 암전이를 효과적으로 억제할 수 있다. 따라서 상기 발현벡터 또는 TASK-3 단백질은 암전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다.

[36] 또한, 본 발명에 따르면 PKC 활성화제의 처리에 의해 TASK-3의 발현이 억제되고, 이렇게 억제된 TASK-3 발현은 PKC 억제제의 처리에 의해 회복됨이 확인되었는데, 이는 TASK-3의 발현이 PKC 활성화의 조절을 통해 이루어질 수 있음을 제시하는 것이다.

[37] 이에, 본 발명은 TASK-3의 발현을 유도하는 PKC 억제제를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법을 제공한다.

[39] 본 발명에서 "단백질 키나제 C(PKC)"라는 용어는 다중 신호전달 경로와 관련된 지질-활성화된 Ser/Thr 키나제의 슈퍼패밀리(superfamily)를 지칭한다. 세포내 신호전달 분자, 예컨대 다이아실글리세롤, 인지질 및 칼슘에 의한 조절작용에 따라 분류되는 13가지 PKC-동형체가 확인되었다. 단백질 키나제 C는 편재성 인지질-의존성효소로, 일반적으로 세포 증식, 분화, 대사 및 아폽토시스(apoptosis)와 관련되고, 아폽토시스를 수반하는 방사선-유도성 세포 반응에서 많은 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 본 발명에서는 PKC의 활성화를 조절함으로써 암세포의 이동 및 침습을 억제하는데 중요한 작용을 하는 TASK-3의 발현을 조절할 수 있음을 확인한다.

[40] 본 발명에서 "PKC 억제제"라는 용어는 단백질 키나제 C뿐만 아니라 그의 동종효소를 표적하거나, 이의 활성을 감소시키거나 억제하는 물질을 지칭한다. 본 발명에서 PKC 억제제는 PKC 활성을 억제하여 TAKS-3의 과발현을 유도하거나, PKC 활성화제, 예컨대 포볼 미리스테이트 아세테이트에 의해

감소된 TASK-3 발현을 회복시키는 물질을 의미한다.

[41] 본 발명에 적합한 PKC 억제제로는 당업계에 PCK의 활성을 감소시키거나 억제하는 것으로 알려진 모든 물질이 사용될 수 있으며, 그의 예로는 1-H-피롤로-2,5-디온, 3-[1-[3-(다이메틸아미노)프로필]-1H-인돌-3-일]-4-(1H-인돌-3-일); 비스인돌릴말레이미드 IX; 스핀고신; 스타우로스포린 및 그의 유도체; 티르포스틴 51; 히페리신; UCN-01; 사핀골; BAY 43-9006; 브라이오스타틴 1; 페리포신; 일모포신(llmofosine); RO 318220 및 RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531/LY379196; 로틀레린(Rottlerin)등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[42] 본 발명에 따른 암전이 억제용 약학적 조성물 및 이를 이용한 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법이 적용되어 효과적으로 암전이가 억제될 수 있는 암으로는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 뇌종양(Brain Tumor), 양성성상세포종(Low- grade astrocytoma), 악성성상세포종(High-grade astrocytoma), 뇌하수체 선종(Pituitary adenoma), 뇌수막종(Meningioma), 뇌림프종(CNS lymphoma), 핍지교종(Oligodendroglioma), 두개내인종(Craniopharyngioma), 상의세포종(Ependymoma), 뇌간종양(Brain stem tumor), 두경부 종양(Head & Neck tumor), 후두암(Larygeal cancer), 구인두암(Oropgaryngeal cancer), 비강/부비동암(Nasal cavity/PNS tumor), 비인두암(Nasopharyngeal tumor), 침샘암(Salivary gland tumor), 하인두암(Hypopharyngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 구강암(Oral cavity tumor), 흉부종양(Chest tumor), 소세포성 폐암(Small cell lung cancer), 비소세포성 폐암(NSCLC), 흉선암(Thymoma), 종격동 종양(Mediastinal tumor), 식도암(Esophageal cancer), 유방암(Breast cancer), 남성유방암(Male breast cancer), 복부종양(Abdomen-pelvis tumor), 위암(Stomach cancer), 간암(Hepatoma), 담낭암(Gall bladder cancer), 담도암(Billiary tract tumor), 췌장암(pancreatic cancer), 소장암(Small intestinal tumor), 대장(직장)암(Large intestinal tumor), 항문암(Anal cancer), 방광암(Bladder cancer), 신장암(Renal cell carcinoma), 전립선암(Prostatic cancer), 자궁경부암(Cervix cancer), 자궁내막암(Endometrial cancer), 난소암(Ovarian cancer), 자궁육종(Uterine sarcoma), 피부암(Skin Cancer) 등이 포함된다. 바람직하게는, 상기 암은 유방암, 전립선암, 결장암 및 폐암이다.

[43] 본 발명의 약학적 조성물은 암세포의 이동 및 침습을 특이적으로 저해하여 암전이를 효과적으로 억제하므로, 암세포의 성장 및 증식을 억제하는 것으로 알려진 다른 항암제와 병용투여하는 경우 항암 및 암전이 억제효과 모두를 달성할 수 있어 항암치료에 있어 획기적인 진전을 가져올 수 있다.

[44] 본 발명의 약학적 조성물과 병용 투여될 수 있는 항암제에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)로 메클로르에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard),

사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 마이토잔트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신(mitomycin) 및 C 블레오마이신(C Bleomycin); 및 식물 알카로이드(plant alkaloid)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등을 예시할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[45] 본 발명의 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제"라는 용어는, 생물체를 자극하지 않고 함께 투여된 유효성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제 또는 희석제를 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[46] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[47] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[48] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[49] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 효과적인 암전이 억제를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[50] 또한, 본 발명은 TASK-3에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트를 제공한다.

[51] 본 발명에서 용어, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 TASK-3 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 적합한 항체는 단클론성 항체인 것이 바람직하고, 인간화 단클론성 항체인 것이 더욱 바람직하다.

[52] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 유리 3'-말단 수산화기(free 3'-terminal hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 작용하는 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형의 복사를 위한 개시 지점으로서의 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트라이포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에서는 TASK-3 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 시행함으로써, 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 TASK-3 단백질의 발현수준을 분석할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 본 발명에 적합한 프라이머 쌍은 TASK-3을 코딩하는 유전자를 특이적으로 인식하여 증폭시킬 수 있는 것이라면 어느 것이나 제한없이 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호: 5 내지 8로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.

[53] 본 발명에서의 용어, "키트"란, 표적분자인 TASK-3 유전자의 mRNA 발현수준 또는 단백질 발현수준을 확인하여 암전이 여부를 예측할 수 있는 도구를 의미한다. 본 발명의 암전이 가능성 예측 키트에는 암전이 진단을 위한 표적 분자로서 TASK-3 발현수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[54] 또한, 본 발명은 상기 암전이 가능성 예측 키트를 사용하여 암전이 위험군을 선별하는 방법을 제공한다.

[55] 본 발명에 따른 선별방법은,

[56] 1) 암조직 표본으로부터 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 검출용 시료를 준비하는 단계;

[57] 2) 상기 검출용 시료로부터 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 검출하는 단계; 및

[58] 3) 검출된 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 수준을 정상조직의 수준과 비교하여 암전이 가능성을 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

[59] 상기 단계 1)에서 검출용 시료는 이로 한정되는 것은 아니나, 암조직 표본으로부터 얻은 박리표본, 파쇄액 또는 총 RNA일 수 있다.

[60] 단계 2)는 TASK-3에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 암조직 표본으로부터 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 검출하는 단계로, 본 발명에 따른 암전이 가능성 예측 키트를 사용하여 수행할 수 있다. 이 단계에서 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 검출은, 이로 한정되는 것은 아니나, 노던 블롯(northern blot), 웨스턴 블롯(western blot), 면역조직화학적 염색(immunohistochemical staining), 인 시추 혼성화(in situ hybridization), 역전사효소 중합반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 실시간 정량적 RT-PCR(real-time quantitative RT-PCR), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[61] 단계 3)은 암전이 가능성을 판정하는 단계로, 단계 2)에서 검출된 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 수준이 정상조직의 수준보다 낮은 경우에는 암전이 가능성이 높은 것으로 판정하고, 정상조직의 수준보다 높은 경우에는 암전이 가능성이 낮은 것으로 판정한다.

[62] 본 발명은 또한 TASK-3 단백질을 표적으로 하여 암전이 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[63] 본 발명에 따른 스크리닝 방법은,

[64] 1) TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

[65] 2) 시험물질 처리 전과 후의 세포 내 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 분석하여 이를 증가시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함한다.

[66] 단계 1)에서 시료는 암환자의 종양조직 또는 혈액, 림프액 등의 체액으로부터 박리된 암세포일 수 있다. 상기 시료에 암전이 억제제인지 여부를 확인하고자 하는 시험물질을 처리한다. 본 발명에서의 용어 "시험물질"은 TASK-3의 발현수준을 증가시킬 수 있는 물질로, 올리고뉴클레오티드, 단백질, 화합물 등을 제한 없이 포함한다.

[67] 단계 2)에서 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준은 노던 블롯, 웨스턴 블롯, 면역조직화학적 염색, 인 시추 혼성화 방법, 역전사효소

중합반응(RT-PCR), 실시간 정량적 RT-PCR, ELISA 등의 방법을 이용하여 검출할 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 검출된 발현수준을 시험물질 처리 전과 비교하여 처리 전에 비해 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 현저히 증가시킨 시험물질을 암전이 억제제로 선발한다.

[68]

발명의 효과

[69] 본 발명은 TASK-3 발현수준의 증가를 통해 암세포의 이동 및 침습을 억제함으로써 암전이를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인한다. 따라서, 본 발명의 TASK-3은 암전이 억제를 위한 표적분자로서 유용하게 사용될 수 있다.

[70]

도면의 간단한 설명

[71] 도 1a는 비-침습성 유방암 세포인 MCF-7 세포 및 침습성 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포에서 칼슘-활성화 칼륨 채널(BK_{Ca}) mRNA의 RT-PCR 증폭 결과이다. 역전사효소 부재 하의 RT 반응에서는 BK_{Ca}의게놈 DNA가 발견되지 않았다. 가운데 레인은 1 kb DNA 마커이다. 오른쪽 화살표는 BK_{Ca} 밴드의 예상되는 위치를 가리키며, PCR 반응물의 서열을 분석하였다.

[72] 도 1b 및 1c는 TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 mRNA 발현을 각각 반-정량적 PCR 및 실시간 PCR로 측정한 결과이다.

[73] 도 1d 및 1e는 각각 TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 웨스턴 블롯 및 면역조직화학적 분석 결과이다. 도 1b 내지 1e에서, 형광이미지를 채널-특이적 항체 및 FITC-접합 항-토끼 IgG 항체로 표지하였다. 핵을 PI로 염색하여 광학 레이저 현미경으로 관찰하였다. 스케일 바는 20 ㎛을 나타내고, IF는 면역형광을 나타낸다. 각각의 바는 3 내지 5회의 독립적인 실험의 평균±SD를 나타낸다. 별표는 각각 상응하는 대조군과의 유의미한 차이를 나타낸다($p< 0.05$). mRNA와 단백질 발현수준은 각각 GAPDH와 β-엑틴으로 표준화하였다.

[74] 도 2a는 인간 유방암세포의 이동에 있어서 TASK-3의 역할에 대한 것이다. MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포에 상처를 낸 후, 0, 9 및 24시간 후에 상처부위를 위상차 현미경으로 관찰한 결과이다. 막대그래프는 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포의 이동능력을 보여준다.

[75] 도 2b는 이동하는 세포의 대표적인 현미경 이미지이다. MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포를 트랜스웰 배양 삽입체에 접종하여 37℃에서 6시간 동안 배양하였다.

[76] 도 2c 및 3d는 MDA-MB-231 세포의 이동에 대한 TASK-3의 영향을 각각 2-D 및 3-D 이동성 분석으로 확인한 결과이다. TASK-3가 과발현된 MDA-MB-231 세포에서의 이동성 감소 및 TASK-3를 TASK-3 siRNA로 녹-다운(knock-down)시킨 세포에서의 이동성 증가를 분석하였다. 스케일 바는

500 ㎛를 나타낸다.

[77] 도 2e는 TASK-3가 과발현되면 MCF-7 세포의 이동이 차단됨을 보여준다. 모든 이동된 세포를 계수하고, 그 결과를 초기 접종된 세포수와 비교하여 이동된 세포의 %로 나타내었다.

[78] 도 2f는 TASK-3가 과발현되거나 녹-다운된 MDA-MB-231 세포의 침습분석(invasion assay) 결과를 나타낸다. 멤브레인 바닥에서 침습된 세포를 염색하였다. 모든 침습성 세포를 계수하고, 그 결과를 초기에 접종된 세포수와 비교하여 침습된 세포의 %로 나타내었다. 각각의 바는 4 내지 5회의 독립적인 실험의 평균±SD를 나타낸다. 별표는 각각 상응하는 대조군과의 유의미한 차이를 나타낸다($p< 0.05$).

[79] 도 3a는 MDA-MB-231 세포의 세포증식에 대한 TASK-3 채널 차단제의 효과를 보여준다.

[80] 도 3b는 MDA-MB-231 세포의 세포이동에 대한 TASK-3 채널 차단제의 효과를 보여준다. 웰당 15,000개의 세포를 트랜스 웰 배양 삽입체에 접종하고 채널 차단제와 함께 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. Bupi는 부피바카인을 나타낸다.

[81] 도 3c는 PMA에 의해 하향 조절된 TASK-3 발현을 웨스턴 블롯으로 측정한 것이다. a. PMA(500 nM)의 처리가 TASK-3 발현을 억제하였다. b. PKC 활성화 전에 1시간 동안 비스인돌 말레이미드 I(1 μM)과 로틀레린(1 μM)으로 미리 처리하였다. 10 nM의 PMA로 20시간 동안 세포를 자극한 후, PKC 활성화와 TASK-3 발현을 측정하였다. 동일한 양(30 ㎍)의 총 단백질을 각 레인에 로딩하고, 분자량을 블롯의 오른쪽에 표시하였다.

[82] 도 3d는 MDA-MB-231 세포에서 PMA에 의해 세포이동이 촉진되었음을 보여준다. 각각의 바는 3 내지 5회의 독립적인 실험의 평균±SD를 나타낸다. 별표는 각각 상응하는 대조군과의 유의미한 차이를 나타낸다($p< 0.05$).

[83]

발명의 실시를 위한 형태

[84] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[85]

[86] 모든 화합물은 시그마에서 구매하였다. PMA(phorbol myristate acetate; 12.5 mM, Calbiochem, Darmstadt, Germany), BSM I(bisindolymaleimide I; 2.42 mM, Calbiochem) 및 로틀레린(rottlerin; 5 mM)의 저장용액은 DMSO를 이용해 제조하였다. 부피바카인(Bupivacaine; 100 mM), RR(ruthenium red; 20 mM) 및 $ZnCl_2$(100 mM)은 증류수에 용해시켰다. 상기 용액들은 배양 배지를 이용해 사용 농도로 희석하였다. DMSO를 용매로 사용할 때, 동일 농도의 DMSO를 함유하는 용액을 대조군으로 사용하였다. PMA, BSM I 및 로틀레인의 최종 DMSO 농도는

~0.1% v/v이다.

[87] 인간 유방암 세포주로서 비-침습성 세포인 MCF-7 세포와 침습성 세포인 MDA-MB-231 세포는 한국세포주은행에서 입수하였으며, 37℃, 95% 공기/5% CO_2에서 5% FBS, 100 U/ml 페니실린, 100 ㎍/ml 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 배지는 2일에 한 번씩 새로운 배지로 바꿔주었다.

[88]

[89] **실험예 1: 형질감염**

[90] 인간 TASK-3 유전자(GenBank™ accession number NM 016601)를 클로닝한 후 pcDNA 3.1 벡터에 서브클로닝하여 재조합 발현벡터 TASK-3/pcDNA3.1를 제조하였다. MCF-7 또는 MDA-MB-231 세포를 24웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 세포의 농도로 접종하고 24시간 동안 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에서 배양하였다. MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포를 마그네토펙션 시스템(Magnetofection™ system)을 사용하여 상기 재조합 발현벡터 TASK-3/pcDNA3.1로 형질감염시켰다. 폴리MAG(Chemicell GmbH, Berlin, Germany) 1 ㎕에 1 ㎍의 DNA를 혼합하여 실온에서 20분간 배양하였다. 500 ㎕의 무혈청 배지가 포함된 각 웰에 상기 혼합물을 첨가하였다. 웰 플레이트를 실온에서 20분간 마그네토 팩토 플레이트 24 장치(MagnetoFACTOR plate 24 device)에 넣어둔 후, 새로운 배지로 교체하고, 37℃, 95% 공기/5% CO_2에서 배양하였다. 형질전이 유전자의 발현은 이틀 후에 관찰하였다.

[91]

[92] **실험예 2: 세포생존능 분석**

[93] 세포생존능을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약을 사용하여 비색적으로 결정하였다. 대수증식기의 세포를 96웰 플레이트에 1×10^4세포/웰의 밀도로 접종하였다. 세포에 화학물질을 처리하고 24시간 후 0.05 mg/ml의 MTT 용액 10 ㎕를 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 흡입하여 제거하고 각 웰 내에 형성된 포르마잔 결정을 37℃에서 30분간 100 ㎕의 DMSO에 용해시켰다. 각 웰의 흡광도 값을 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다.

[94]

[95] **실험예 3: 역전사-중합효소(RT-PCR) 분석**

[96] RT-PCR용 수퍼스크립트 합성 시스템(SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포의 전체 RNA로부터 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. 첫 번째 가닥 cDNA를 PCR 증폭의 주형으로 사용하고, 각 K_{2P} 채널에 특이적인 프라이머와 Taq 중합효소(Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 하기 표 1에 각 K_{2P} 채널의 발현을 검출하기 위해 사용된 프라이머의 DNA 서열을 나타내었다. PCR 조건은 94℃에서 4분간 초기 변성과정을 거쳐, 94℃에서 30초, 58℃에서 30초 및 72℃에서 60초의 증폭과정을 30주기 반복한 후, 마지막으로

72℃에서 10분간 신장과정을 수행하였다. 이렇게 RT-PCR로 얻은 DNA 단편의 서열을 ABI 프리즘 분석기(ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA, USA)를 이용해 분석하였다.

[97] 표 1

[Table 1]

채널명	GenBank 승인번호	서열번호	프라이머 서열(5'→3')	적용실험
TASK-1	NM_002246	1	Sense: CGTGTGCACCTTCACCTACC	RT-PCR
		2	Antisense: CCTCACCAAGGTGTTGATGC	
		3	Sense: GTCGTGCTGCGCCTCAAGCC	Real-timePCR
		4	Antisense: GCCCGTAGCCGATGGTGGTG	
TASK-3	NM_016601	1	Sense: CTACGTGGCCTTTAGCTTTA	RT-PCR
		2	Antisense: GTCGGTAAAGCTGTGTAACC	
		3	Sense: GGCTCCTTCTACTTTGCGAT	Real-timePCR
		4	Antisense: CGGCGTAGAACATGCAGA	
TREK-1	NM_014217	1	Sense: GGTGGTTGTCCTCTATCTGA	RT-PCR
		2	Antisense: AAGAAGGAACTTCCCAAATC	
		3	Sense: GCTTGCTTACTTTGCTGCTG	Real-timePCR
		4	Antisense: AGCGTGTGCTCTGAACTCTC	

TREK-2	NM_138317	1	Sense: GTCATTACGACCATAGGGTATGG	RT-PCR
		2	Antisense: TCACCAAAGCCCACCGTGGTCAG	
		3	Sense: AGCCAGAAGAATACCATCGC	Real-timePCR
		4	Antisense: CAAGAGCATGCTGGATCAAC	
TRAAK	NM_033310	1	Sense: ACCCAGAAACCAACTCGACC	RT-PCR
		2	Antisense: AGCTTGCTCCAGTCCTCCTA	
		3	Sense: GACCCAGAAACCAACTCGAC	Real-timePCR
		4	Antisense: CATAGCCGATGGTGGTGAT	

[98]

[99] **실험예 4: 실시간 PCR 분석**

[100] 라이트사이클로 시스템(LightCycler System, LightCycler 2.0 instrument, Roche)을 사용하는 신속 개시 DNA 마스터 SYBR 그린 I(FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 이용하여, RT-PCR에 의해 확인된 K_{2P} 채널의 발현을 정량하였다. 각 K_{2P} 채널의 mRNA 발현수준을 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 표준화하였다. 실시간 PCR에 사용된 프라이머 서열을 상기 표 1에 나타내었다. PCR 조건은 다음과 같다: 95℃에서 10분간 초기 변성과정; 95℃에서 7초, 56℃에서 7초 및 72℃에서 10초의 증폭과정을 50주기 반복; 65℃에서 시작하여 0.1℃/sec의 전이속도(transition rate)로 최대 95℃까지의 단계주기를 포함하는, 95℃에서는 0초 및 65℃에서 60초의 용융주기; 및 40℃에서 30초의 냉각주기(cooling cycle). 용융-곡선 분석을 수행하여 각 생성물의 균질성을 확인하였고, 생성물을 1.2%(w/v) 아가로스 겔에서 전기영동하였다.

[101]

[102] **실험예 5: 웨스턴 블로팅 분석**

[103] MCF-7과 MDA-MB-231 세포를 50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM

다이티오트레이톨(DTT), 0.5% NP-40, 1% 트리톤 X-100, 1% 데옥시콜레이트, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 μM 류펩틴, 1 μM 펩스타틴 A, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF) 및 0.1 μM 아프로티닌을 함유하는 단백질 추출용액(PRO-PREP™, iNtRON Biotechnology Inc, Seongnam, Korea) 내에서 균질화하였다. 이어서 균질화 혼합물을 간헐적인 볼텍스 하에서 얼음 중에 60분간 인큐베이션하였다. 수득된 추출물을 4℃에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리(16,600×g, Micro 17TR, Hanil, Korea)하여 분획하였다. 이렇게 얻은 상층액의 단백질을 10% SDS-폴리아크릴 아미드겔을 사용하여 분리한 후 세미-드라이 트랜스퍼(Bio-Rad, CA, SUA)를 통해 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 이 멤브레인을 5% 탈지분유를 이용해 차단한 후, K_{2P} 채널 다중클론 일차항체(1:200 희석), β-액틴 및 α-튜불린 단일클론 항체(1:10000 희석)와 인큐베이션하였다. 이때, TASK-3 및 TREK-1에 대한 일차항체(Chemicon, Billerica, MA, USA), TASK-1 및 TRAAK에 대한 일차항체(Abcam, Cambridge, UK), TREK-2에 대한 일차항체(Alomone Labs, Jerusalem, Israel), 및 Phospho-PKCδ에 대한 일차항체(Cell Signaling, Danvers, MA, USA)를 사용하였다. 이어서 퍼옥시다아제-접합 항-토끼 또는 항-마우스 이차항체(1:10000 희석)와 인큐베이션한 후, 면역-양성 밴드를 ECL 키트(ECL Plus kit, ELPIS, Taejon, Korea)를 사용하여 관찰하였다.

[104]

[105] **실험예 6: 암세포의 면역염색**

[106] 폴리-L-라이신으로 코팅된 둥근 커버슬라이드에서 배양된 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포를 0.1 M 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 4% 파라포름알데하이드로 30분간 고정시켰다. 이어서 샘플을 세척하고, 1% 정상혈청 및 0.1% 트리톤 X-100이 함유된 차단용액 중에서 가볍게 흔들어 주면서 2시간 동안 배양하였다. 세포를 각각 TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK 단백질에 대한 다중클론 항체와 인큐베이션한 후, 81% 젤라틴, 0.05% NaN3 및 1% BSA 함유 PBS로 희석하고, 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, PBS로 3회 세척한 세포를 FITC-접합 항-토끼 IgG 이차항체(1:400 희석)와 어두운 곳에서 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 이 세포에 PI(propidium iodide)를 처리하여 핵을 염색하였다. 음성 대조군(NC)은 일차항체 결합을 생략한 세포이고, 양성 대조군(PC)은 플라스미드 DNA가 형질감염된 세포이고, 경쟁 대조군은 2배 과량의 항원성 펩타이드에 미리 흡착시킨 것이다. 음성 대조 또는 경쟁 대조군 세포에서는 녹색 형광의 염색이 관찰되지 않았고, 단지 PI 염색만이 관찰되었다. 염색된 세포를 광학-레이저 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[107]

[108] **실험예 7: 이동성 분석**

[109] 상처-치유(2-D) 이동성 분석을 위해, 세포를 24웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰의

밀도로 접종하였다. 세포를 멸균된 파이펫 팁을 이용하여 긁어낸 후, 신선한 배지로 교체하고 마이토마이신(8 ㎍/㎖)으로 2시간 동안 처리하여 세포증식을 억제하였다. 0, 9, 24시간의 인큐베이션 후, 세포들을 수확하고 현미경(Axiovert 40C, Carlzeiss MicroImaging, Germany)으로 사진을 찍었다. 상대적 세포이동 거리는 현미경 상에서 단층의 상처 깊이의 측정에 의해 결정한 후 최초의 값(최초 0시의 상처깊이)을 제하여 나타내었다. 각 데이터는 각 웰에서 3번의 상처로부터 얻은 것이며, 이것은 주어진 시간에서 상처 거리의 퍼센트로 환산하여 나타내었다.

[110] 트랜스 웰(3-D) 이동성 분석은 폴리카르보네이트 막 삽입체를 포함하는 세포이동 분석 키트(CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit, Cell Biolabs, Inc., CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 간단하게 설명하면, 무혈청 배지에 1×10^5 세포/㎖ 농도의 세포 부유물 300 ㎕를 각 삽입체의 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버는 10% FBS가 함유된 배지를 포함하고 있어 트랜스 웰 배양 삽입체의 하부 표면으로의 세포이동을 가능케 하였다. 세포를 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션한 후, 트랜스 웰 배양 삽입체의 내부 면에서 이동하지 않은 세포를 면봉으로 훔쳐서 제거하였다. 바닥면으로 이동된 세포를 세포-염색 용액(0.5% 메틸렌블루)으로 10분간 염색하였다. 현미경으로 세포의 사진을 찍은 후, 이동된 세포수을 계수하였다. 염색된 삽입체를 세척하고, 추출용액(트리톤 X-100)으로 용해시켜서 10분간 인큐베이션하였다. 각 샘플을 96웰 마이크로타이터 플레이트로 옮겨서 560 nm에서 플레이트판독기(Infinite F200, Tecan, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[111]

[112] **실험예 8: 침습 분석**

[113] MCF-7과 MDA-MB-231 세포의 침습성은 정량적 세포 침습분석 키트(Quantitive CytoSelect™ 96-Well Cell Invasion Assay Kit, Cell Biolabs)을 사용하여 측정하였다. 구체적으로, 침습분석은 조직배양 웰 내에 위치한 세포배양 삽입체로 구성된 침습 챔버를 이용하였다. 이 삽입체는 건조 기저막 기질용액의 단일층으로 코팅된 8㎛ 기공 크기의 폴리카보네이트 막을 갖는다. 무혈청 배지에 2.3×10^5 세포/ml 밀도로 부유된 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포를 각각 배양 삽입체에 접종하였다. 12시간 동안 세포가 기저막층으로 침습하도록 방치한 후, 막을 통해 침습된 세포를 세포-염색 용액(0.5% 크리스탈 바이올렛)으로 염색하고, 막의 상부 표면에서 비-침습성 세포를 제거한 후 현미경으로 관찰하였다.

[114]

[115] **실험예 9: siRNA를 이용한 인간 TASK-3 채널의 유전자 사일런싱**

[116] MCF-7와 MDAMB-231 세포를 DharmaFECT 3 형질감염 시약을 사용하여, 100 nM의 NC(ON-TARGET Non-targeting Pool, Thermo Pflugers Archiv-European Journal of Scientific Dharmacon, Lafayette, CO, USA) 및 PC(siGLO Lamin A/C

siRNAs, Dharmacon) 또는 무혈청 배지 내 인간 TASK-3 ON-TARGETplus SMARTpool siRNA(Dharmacon)로 형질감염시켰다. TASK-3의 표적 서열은 서열번호: 23, 서열번호: 24, 서열번호: 25 및 서열번호: 26의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드이다. 6시간 인큐베이션 후, 세포를 새로운 배지로 갈아주고 추가로 1일간 성장시켰다. 유전자 사일런싱의 효과를 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석으로 결정하였다. 100 nM의 siRNA가 형질감염된 세포에서는 TASK-3 mRNA와 단백질이 형질감염 2일 후 90%까지 감소되었음을 알 수 있다. 양성 대조군은 형광-표지된 siRNA를 사용하여 형질감염 효율의 시각적 확인을 위해 사용하였다.

[117]

[118] **실험예 10: 정량적 PCR 및 웨스턴 블롯의 데이터 분석**

[119] 발광 이미지 분석기인 LAS-4000(Fujifilm corp, Tokyo, Japan)로 아가로스 겔 및 웨스턴 블롯의 이미지를 포착하였다. RT-PCR과 웨스턴 블롯 분석으로부터 입수된 밴드를 시그마 겔 이미지 분석 소프트웨어(Sigma Gel image analysis software, version 1.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 또는 퀀터티 원 소프트웨어(Quantity One software, version 4.6.3) 을 이용하여 정량하였다. 라이트 사이클러 소프트웨어(Light Cycler Software 4.0, Roche, Mannheim, Germany) 및 플루오뷰(Fluoview, FV1000, Ver. 1.5, Olympus)를 각각 사용하여 실시간 PCR 데이타와 면역형광 분석 데이터를 입수하였다. 상대적인 mRNA와 단백질 수준을 GAPDH 및 β-엑틴의 양을 기준으로 계산하였다.

[120]

[121] **실시예 1: MCF-7 및 MDA-MB231 유방암세포에서 이중-기공 도메인 칼륨 채널의 발현** 패턴의 비교

[122] 먼저, 비-침습성 MCF-7 세포와 침습성 MDA-MB-231 세포간의 칼슘-활성화 칼륨 채널의 mRNA 발현수준을 정량적인 RT-PCR로 비교하였다. 이때, MCF-7 세포에서 발현되는 전도력이 높은 칼슘-활성화 칼륨 채널(BK_{ca})을 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 이들 세포 모두에서 BK_{ca} 채널의 mRNA 발현수준이 유사함을 확인하였다.

[123] 이어서, MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포에서 K_{2P}채널(TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK)의 mRNA와 단백질 발현수준을 정량적 RT-PCR과 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 비교하였다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 정량적인 RT-PCR 분석결과를 보면, MDA-MB-231 세포에서 TASK-3, TREK-1 및 TREK-2의 mRNA 발현수준이 MCF-7 세포에 비해 현저히 낮은 수준임을 알 수 있다($p<0.05$, n=5). TASK-1과 TRAAK의 mRNA 발현수준은 다른 유전자들과는 달리 MCF-7 세포 및 MDA-MB-231 세포에서 모두 미미하였다. TASK-3과 TREK-2 발현은 정량적 PCR과 실시간 PCR 사이에서 양성적 상관관계를 나타내었다(도 1c). 검사된 K_{2P} 채널에서, TASK-3만이 MDA-MB-231 세포에서 ~20% 정도 유의미하게 하향-조절된 단백질 발현을 나타내었는데($p<0.05$,

n=4)(도 1d), 이는 세포 내에서 mRNA 발현수준의 변화가 필연적으로 mRNA의 단백질로의 번역을 의미하는 것은 아님을 나타낸다.

[124] 면역염색 결과, 검사된 모든 채널 단백질이 세포의 모든 영역에서 발현되었음을 확인하였다. MDA-MB-231 세포에서 발현된 TASK-3의 면역형광 강도는 MCF-7 세포에서 보다 낮았는데, 이는 정량적 PCR 및 웨스턴 블럿 분석의 결과와 관련이 있다(도 1e). 그러나, PCR 및 웨스턴 블럿 분석 결과와는 달리, 면역조직화학적 분석 결과는 MCF-7 세포에서 TRAAK가 매우 강력하게 발현됨을 나타내었다. 또한 TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 면역강도는 MDA-MB-231 세포보다 MCF-7 세포에서 상대적으로 높게 나타난 반면, TASK-1 발현수준은 MDA-MB-231 세포보다 MCF-7 세포에서 낮게 나타났다. 상기 결과는 TASK-3이 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포에서 다르게 발현됨을 강력히 시사하는 것이다. 이에 이후의 실험은 TASK-3 채널에 초점을 맞추어 수행하였다.

[125]

[126] **실시예 2: TASK-3 과발현에 의한 세포이동 억제**

[127] MDA-MB-231 세포의 세포 이동능력은 매우 잘 알려져 있는 특징 중의 하나이다. 이에 비-침습성 세포인 MCF-7 세포와 침습성 세포인 MDA-MB-231 세포 사이의 TASK-3 발현수준의 차이가 이러한 세포의 특성에 관여하는지 여부를 조사하기 위해 하기 실험을 진행하였다.

[128] 먼저, MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포의 이동능력을 2-D 및 3-D 이동성 분석(migration assay)으로 조사하였다. MCF-7 및 MDA-MB-231 세포 각각을 멸균된 피펫 팁으로 긁어 상처를 낸 후, 0, 9 및 24시간 경과시점에서 세포를 수확하였다. 그 결과, MCF-7 세포에서는 9 및 24시간째에 각각 8.4±4.4% 및 13.4±6.6%의 이동성이 나타났고, MDA-MB-231 세포에서는 9 및 24시간째에 각각 59.2±10.0% 및 86.8±2.8%의 이동성이 나타났다(도 2a). 이러한 이동능력을 3-D 이동성 분석으로 평가한 결과, MDAMB-231 세포의 이동능력이 MCF-7 세포보다 더욱 높게 나타났다(도 2b).

[129] TASK-3 발현이 세포 이동능력을 조정하는지 여부를 조사하기 위해, 공 벡터(empty vector), TASK-3, NC siRNA 및 TASK-3 siRNA를 MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 그 결과, MDA-MB-231 세포에서는 TASK-3의 과발현에 의해 세포이동이 감소한 반면, 공 벡터 또는 NC siRNA가 형질감염된 세포에서는 비형질감염 대조군 세포와 비슷한 수준의 세포 이동 및 침습이 확인되었다(도 2c). 3-D 이동성 분석에서, TASK-3 과발현은 MDA-MB-231 세포의 이동을 38% 정도 감소시킨 반면, TASK-3 siRNA은 대조군에 비해 35% 증가된 세포이동을 나타내었다(도 2d). 2-D 및 3-D 이동성 분석 결과, 세포이동에 대한 TASK-3의 억제효과에 양성적인 상관관계가 있음을 확인하였다. 다른 K_{2P} 채널들(TREK-1, TREK-2 및 TRAAK)은 MDA-MB-231 세포의 세포이동에 별다른 영향을 미치지 않았다. 또한, MCF-7 세포에서

TASK-3의 과발현은 세포 이동능력을 현저히 감소시켰고($p<0.05$, n=5)(도 2e), siRNA에 의한 TASK-3의 녹-다운은 세포 이동능력이 향상되는 경향을 나타내었지만, 유의미한 차이는 없었다($p>0.05$, n=5).

[130] MDA-MB-231 세포의 침습성은 또한 TASK-3 과발현에 의해 감소된 반면(공벡터로 형질감염된 세포에서 4.5±1.2% 대 TASK-3로 형질감염된 세포에서 0.8±0.1%), TASK-3의 녹-다운에 의해 증가됨을 확인하였다(NC siRNA에서 4.4±0.5% 대 TASK-3 siRNA 내 8.9±0.3%(도 2f).

[131] 상기 결과는 TASK-3 발현수준이 MDA-MB-231 세포에서 세포의 이동 및 침습을 조절할 수 있음을 증명하는 것이다.

[132]

[133] **실시예 3: PKC 활성화에 의한 TASK-3 발현의 조정**

[134] TASK-3 채널 활성의 조정이 MDA-MB-231 세포의 증식과 이동을 조절하는지 여부를 조사하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[135] TASK-3 차단제로 10 μM 부피바카인(bupivacaine), 10 μM RR 및 10 μM $ZnCl_2$를 세포가 포함된 배양 배지에 첨가하여 세포생존능 분석을 수행한 결과, 이들 TASK-3 차단제는 MDA-MB-231 세포의 증식에 유의미한 효과를 미치지 않는 반면(도 3a), 세포 이동능력은 증진시킴을 확인하였다(도 3b). 부피바카인과 RR은 각각 세포 이동을 59% 및 156% 증가시켰고, $ZnCl_2$는 MDA-MB-231 세포의 이동에 아무런 효과를 나타내지 않았다. 이에 본 발명자들은 다시 TASK-3 발현에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다. PKC의 억제가 MDA-MB-231 세포의 이동을 억제함이 보고된 바 있고, PKC는 유전자 발현의 조절자로서, 특히 PKCδ는 세포 이동과 관련된 세포골격(cytoskeleton)과 연관된 것으로 나타난 유일한 PKC의 아형이다. 이러한 사실을 근거로 PKC 활성화와 TASK-3 발현수준의 연관성을 조사하였다.

[136] 그 결과, 도 3c 및 3d에 나타난 바와 같이, MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포에서 PKC 활성화제인 PMA 처리(10 내지 500 nM)는 TASK-3 발현을 감소시키는 반면, PKCδ의 억제제인 로틀레린(rottlerin: 1 μM) 처리는 감소 없이 TASK-3 발현수준을 유지 하였다. 그러나 PKC 억제제인 BSM I(bisindolymaleimide I: 1 μM)의 처리는 이러한 효과를 나타내지 않았다. 상기 결과는 PKCδ가 TASK-3 발현수준의 조절에 관여할 수도 있음을 나타내는 것이다.

[137] PKC 활성화가 MDA-MB-231 세포의 이동능력에 실제로 관여하는지 여부를 조사하기 위하여, PMA, BSM I 및 로틀레린을 트랜스 웰의 상부 챔버에 처리하였다. 그 결과, 10 nM의 PMA가 처리된 MDA-MB-231 세포에서 세포이동이 18% 정도 유의미하게 증가한 반면, BSM I 및 PMA를 함께 처리한 경우에는 MDA-MB-231 세포에서 PMA에 의해 유도된 세포이동의 증가를 반전시켰다. 또한, PMA와 로틀레린을 함께 처리한 경우에는 MDA-MB-231 세포에서 PMA에 의해 유도된 세포이동의 증가가 감소되었는데, 이는 PKCδ가

MDA-MB-231 세포의 이동 및 증식과 연관되어 있음을 나타내는 것이다. 또한, 세포 이동능력은 PMA 무처리 대조군보다 낮은 수준으로 감소하였다. 상기 결과는 PKC 활성화가 TASK-3 발현의 억제를 유도하며, 낮은 TASK-3 발현으로 세포이동이 촉진됨을 나타내는 것이다.

[138]

산업상 이용가능성

[139] 본 발명은 TASK-3 발현수준의 증가를 통해 암세포의 이동 및 침습을 억제함으로써 암전이를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인한 것으로, 본 발명의 TASK-3은 암전이 억제를 위한 표적분자로서 유용하게 사용될 수 있다.

[140]

[141]

청구범위

[청구항 1] TASK-3 단백질, TASK-3 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 발현벡터를 유효성분으로 함유하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 TASK-3 단백질이 서열번호: 21로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 TASK-3 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호: 22로 기재되는 염기서열을 갖는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터가 서열번호: 21로 기재되는 염기서열을 갖는 TASK-3 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물이 항암제를 추가로 포함하는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 항암제가 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)로 메클로르에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 마이토잔트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신(mitomycin) 및 C 블레오마이신(C Bleomycin); 및 식물 알카로이드(plant alkaloid)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 암전이 억제용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법.

[청구항 8] TASK-3 단백질에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는

유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 암전이 가능성 예측 키트.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 항체가 단클론성 항체 또는 다클론성 항체인 것인, 암전이 가능성 예측 키트.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 프라이머 쌍이 서열번호: 5 내지 8로 기재되는 염기서열을 갖는 것인, 암전이 가능성 예측 키트.

[청구항 11] 1) 암 조직 표본으로부터 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 검출용 시료를 준비하는 단계;

2) 상기 검출용 시료로부터 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 검출하는 단계; 및

3) 검출된 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 수준을 정상조직의 수준과 비교하여 암전이 가능성을 판정하는 단계를 포함하는, 암전이 위험군의 선별방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 단계 1)에서 검출용 시료가 암조직 표본으로부터 분리된 박리표본, 파쇄액 또는 총 RNA인 것인, 암전이 위험군의 선별방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 단계 2)에서 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 TASK-3에 특이적인 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 검출되는 것인, 암전이 위험군의 선별방법.

[청구항 14] 제13항에 있어서, 단계 2)에서 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 제7항에 따른 암전이 가능성 예측 키트를 사용하여 검출되는 것인, 암전이 위험군의 선별방법.

[청구항 15] 제11항에 있어서, 단계 2)에서 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 검출이 노던 블롯(northern blot), 웨스턴 블롯(western blot), 면역조직화학적 염색(immunohistochemical staining), 인 시추 혼성화(in situ hybridization), 역전사효소 중합반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 실시간 정량적 RT-PCR(real-time quantitative RT-PCR) 및 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 구성된 군으로부터 선택된 방법에 의해 이루어지는 것인, 암전이 위험군의 선별방법.

[청구항 16] 제11항에 있어서, 단계 3)이 단계 2)에서 검출된 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 수준이 정상조직의 수준보다 낮은 경우에는 암전이 가능성이 높은 것으로 판정하고, 정상조직의 수준보다 높은 경우에는 암전이 가능성이 낮은 것으로 판정하는 것인, 암전이 위험군의 선별방법.

[청구항 17] 1) TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 시료에 시험물질을 처리하는 단계; 및

2) 시험물질 처리 전과 후의 세포 내 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 분석하여 이를 증가시킨 시험물질을 선발하는 단계를 포함하는, 암전이 억제제의 스크리닝 방법.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 단계 1)에서 세포 시료가 암환자의 종양조직, 혈액 또는 림프액으로부터 박리된 암세포인 것인, 암전이 억제제의 스크리닝 방법.

[청구항 19] 제17항에 있어서, 단계 2)에서 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준이 노던 블롯, 웨스턴 블롯, 면역조직화학적 염색, 인 시추 혼성화, 역전사효소 중합반응, 실시간 정량적 RT-PCR 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택된 방법에 의해 이루어지는 것인, 암전이 억제제의 스크리닝 방법.

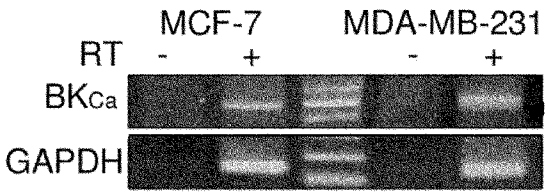
[청구항 20] 제17항에 있어서, 단계 2)에서 분석된 발현수준을 시험물질 처리 전과 비교하여 처리 전에 비해 TASK-3 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 현저히 증가시킨 시험물질을 암전이 억제제로 선발하는 것인, 암전이 억제제의 스크리닝 방법.

[청구항 21] TASK-3의 발현을 증가시키는 PKC 억제제를 유효성분으로 함유하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암전이 억제용 약학적 조성물.

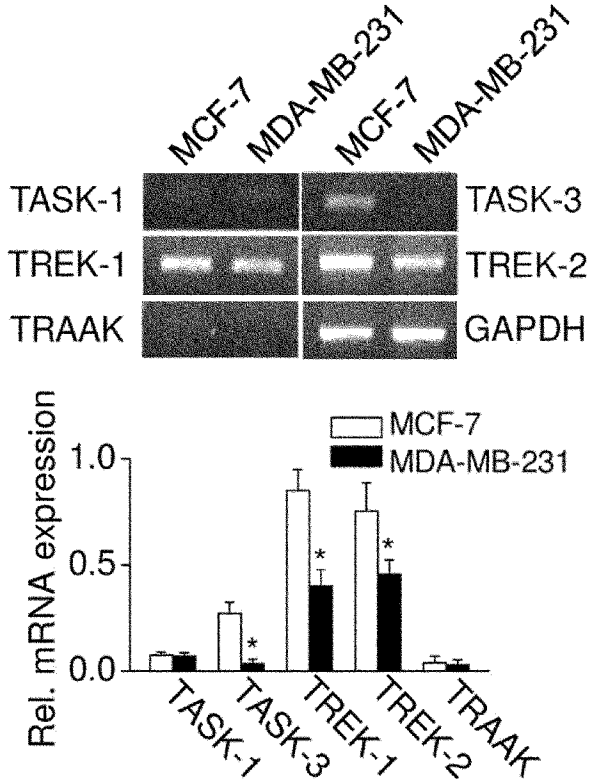
[청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 PKC 억제제가 1-H-피롤로-2,5-디온, 3-[1-[3-(다이메틸아미노)프로필]-1H-인돌-3-일]-4-(1H-인돌-3-일); 비스인돌릴말레이미드 IX; 스핀고신; 스타우로스포린 및 그의 유도체; 티르포스틴 51; 히페리신; UCN-01; 사핀골; BAY 43-9006; 브라이오스타틴 1; 페리포신; 일모포신(llmofosine); RO 318220 및 RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531/LY379196; 로틀레린(Rottlerin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 암전이 억제용 약학적 조성물.

[청구항 23] 제21항 또는 제22항에 따른 암전이 억제용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암세포의 이동 및 침습을 억제하는 방법.

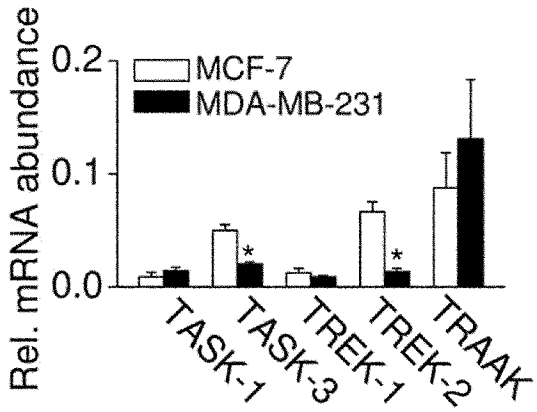
[Fig. 1a]



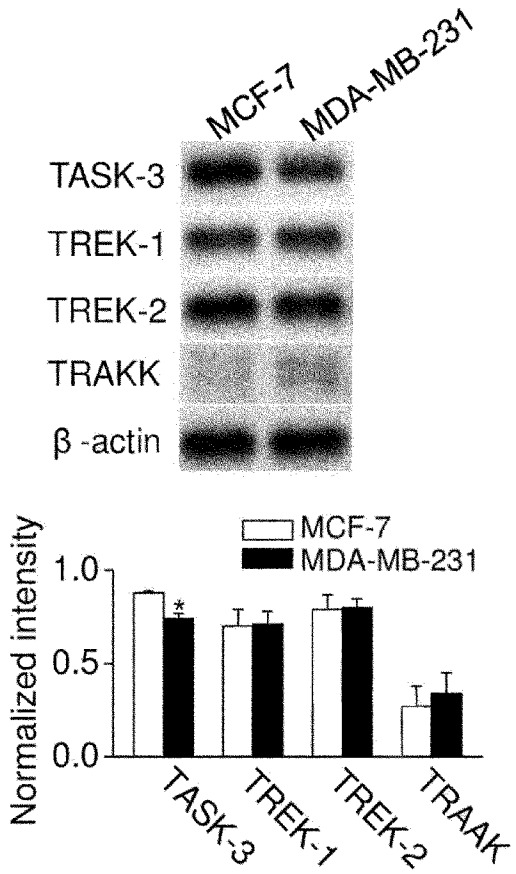
[Fig. 1b]



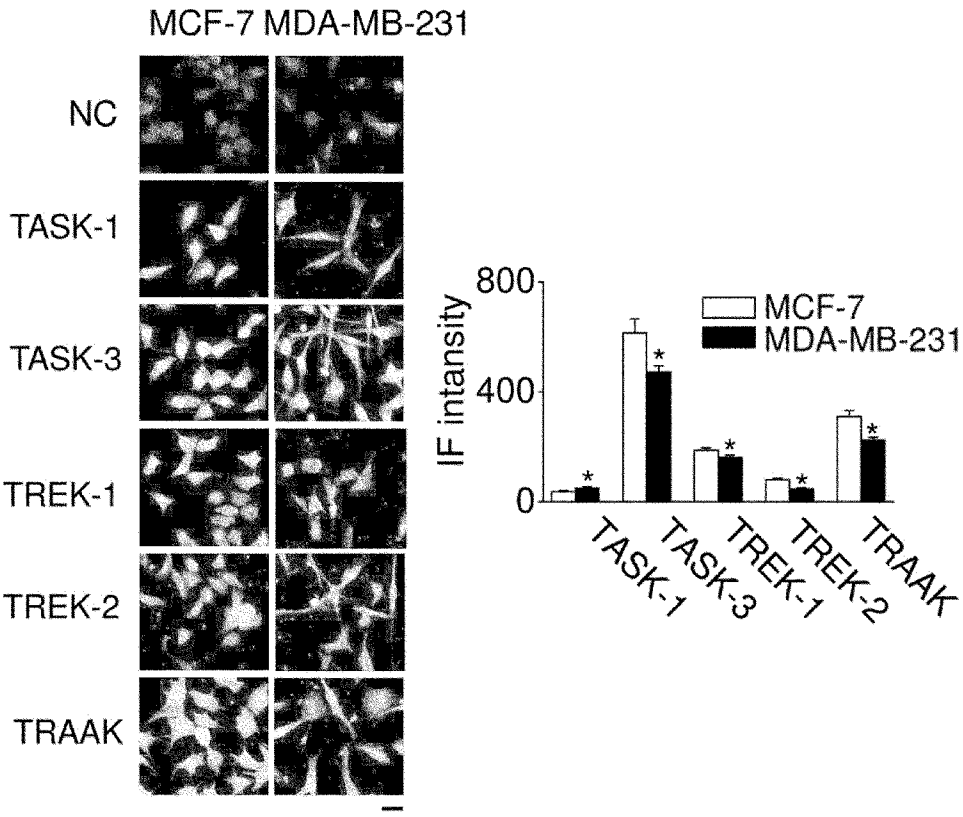
[Fig. 1c]



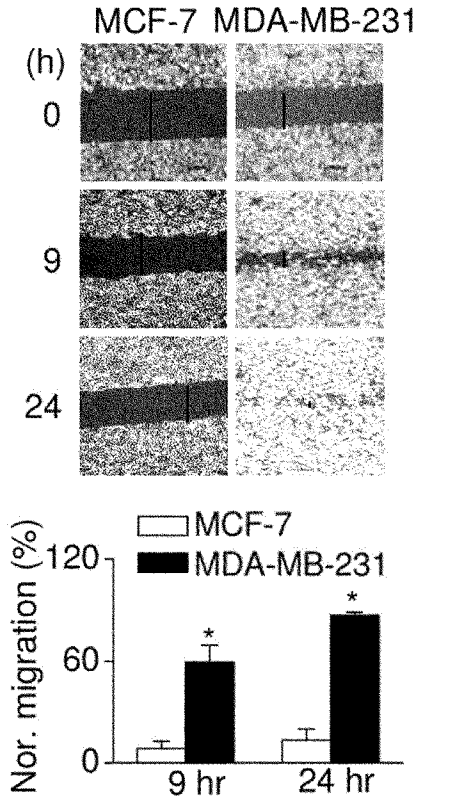
[Fig. 1d]


MCF-7
MDA-MB-231
TASK-3
TREK-1
TREK-2
TRAKK
β -actin
Normalized intensity
1.0
0.5
0.0
MCF-7
MDA-MB-231
TASK-3
TREK-1
TREK-2
TRAAK

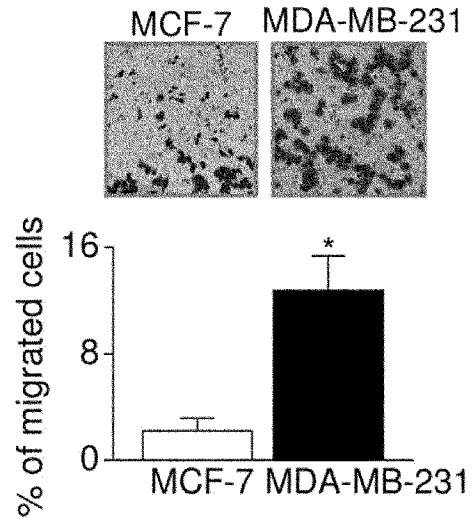
[Fig. 1e]


MCF-7 MDA-MB-231
NC
TASK-1
TASK-3
TREK-1
TREK-2
TRAAK
IF intansity
800
400
0
MCF-7
MDA-MB-231
TASK-1
TASK-3
TREK-1
TREK-2
TRAAK

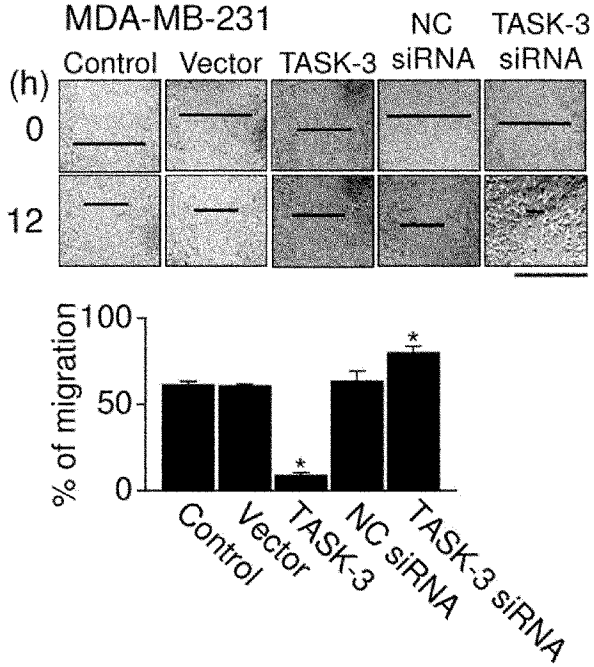
[Fig. 2a]


MCF-7
MDA-MB-231
(h)
0
9
24
MCF-7
MDA-MB-231
Nor. migration (%)
120
60
0
*
*
9 hr
24 hr

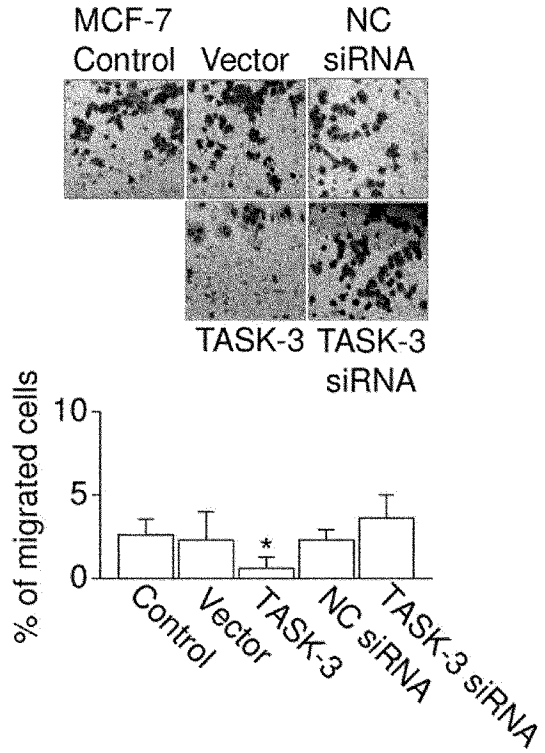
[Fig. 2b]


MCF-7
MDA-MB-231
% of migrated cells
16
8
0
*
MCF-7
MDA-MB-231

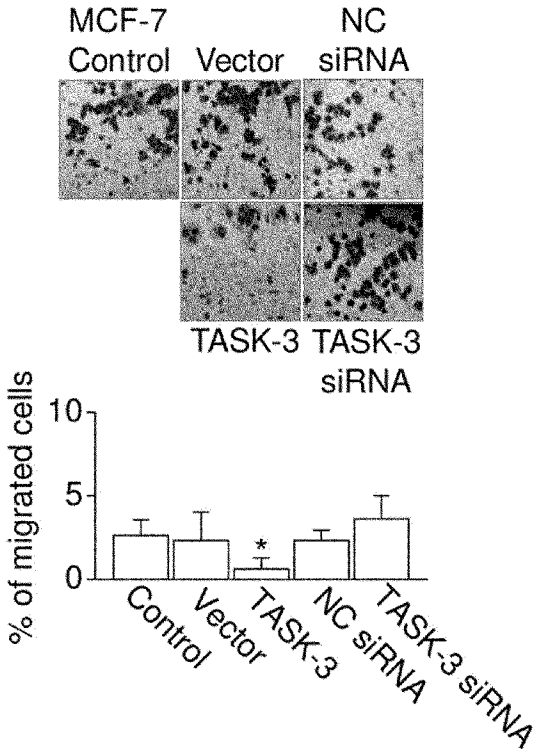
[Fig. 2c]


MDA-MB-231
Control
Vector
TASK-3
NC siRNA
TASK-3 siRNA
(h)
0
12
% of migration
100
50
0
*
*
Control
Vector
TASK-3
NC siRNA
TASK-3 siRNA

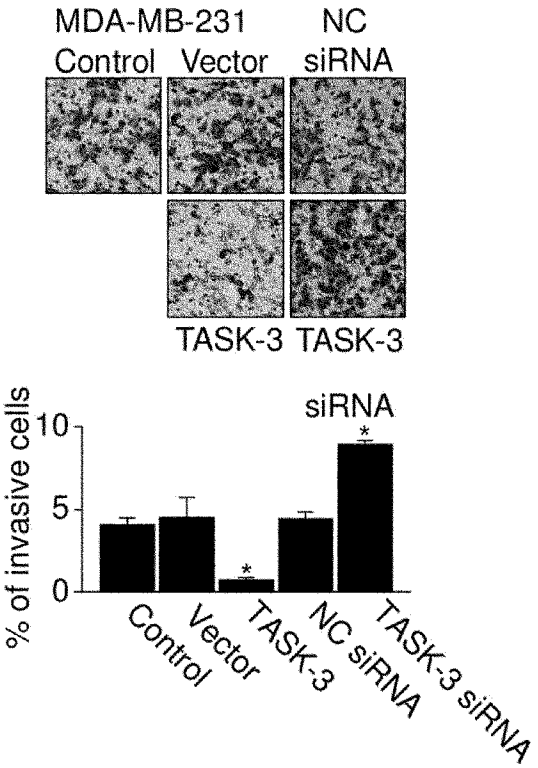
[Fig. 2d]


MCF-7
Control
Vector
NC siRNA
TASK-3
TASK-3 siRNA
% of migrated cells
10
5
0
*
Control
Vector
TASK-3
NC siRNA
TASK-3 siRNA

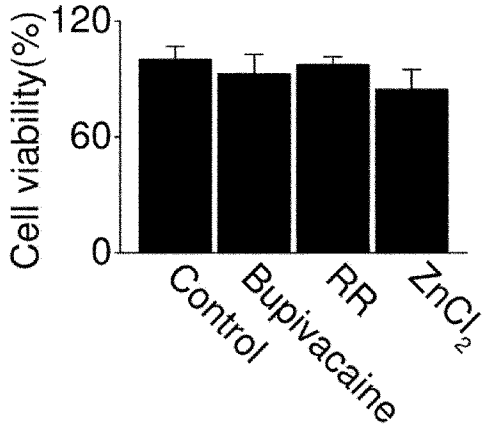
[Fig. 2e]


MCF-7
Control
Vector
NC siRNA
TASK-3
TASK-3 siRNA
% of migrated cells
10
5
0
*
Control
Vector
TASK-3
NC siRNA
TASK-3 siRNA

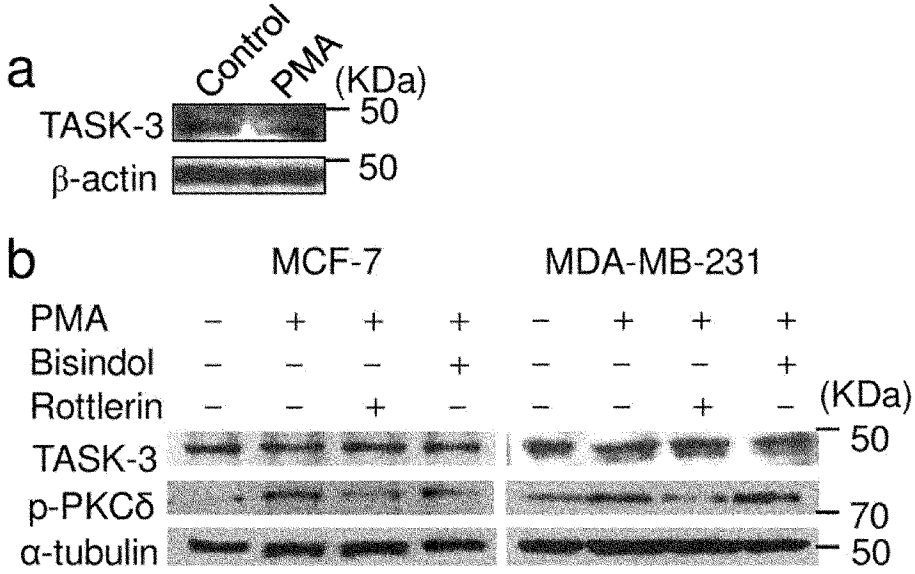
[Fig. 2f]


MDA-MB-231
Control
Vector
NC siRNA
TASK-3
TASK-3 siRNA
% of invasive cells
10
5
0
*
*
Control
Vector
TASK-3
NC siRNA
TASK-3 siRNA

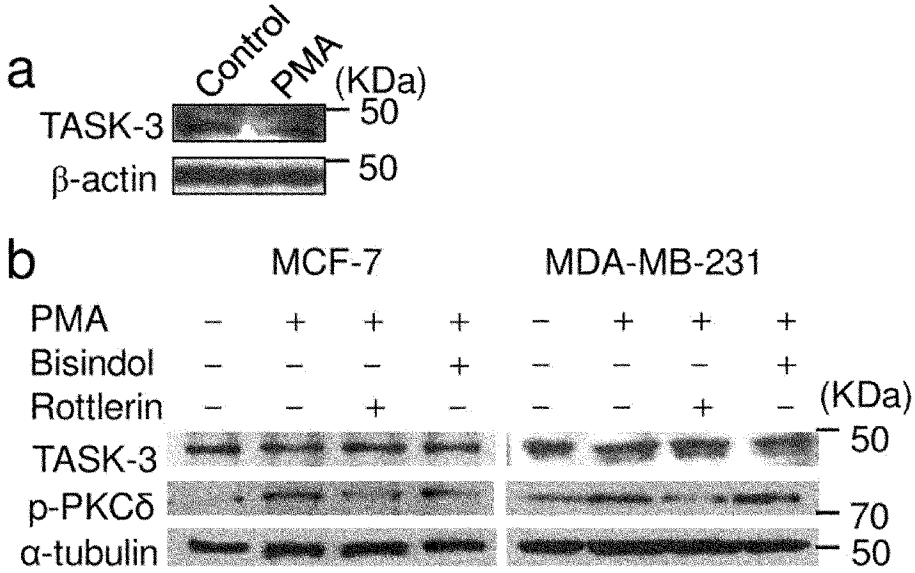
[Fig. 3a]



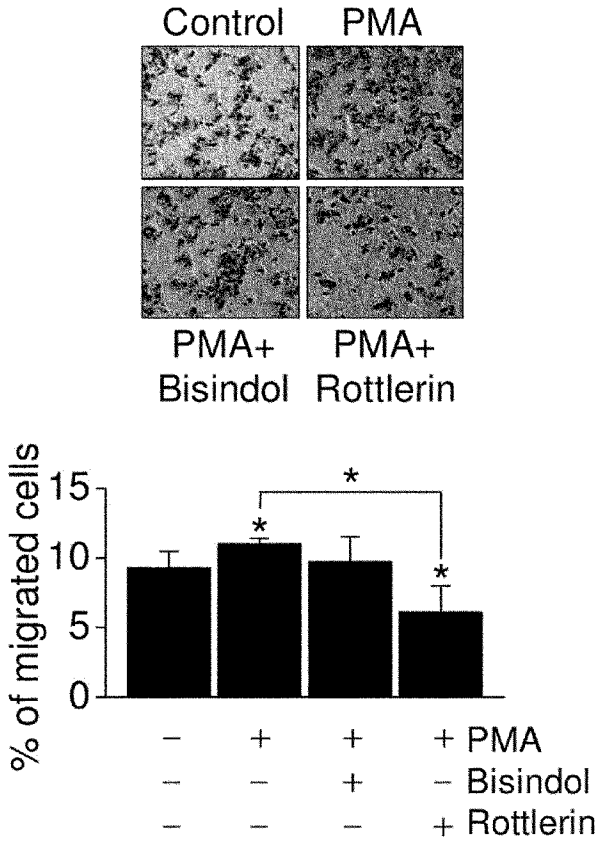
[Fig. 3b]



[Fig. 3c]



[Fig. 3d]


Control
PMA
PMA+
Bisindol
PMA+
Rottlerin
% of migrated cells
15
10
5
0
*
*
*
− + + + PMA
− − + − Bisindol
− − − + Rottlerin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/003091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, C12N 15/63(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)

A61K 38/16; A61K 31/00; A61K 35/00; A61K 31/352; C07K 14/705

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), PubMed ,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, C. J. et al., Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers, Acta Pathologica, Microbiologica et immunologica scandianvica, September 2004, Vol. 112, Issue 9 pages 588-594 See abstract, table 2, discussion.	1-6,8-22
A	MU, D. et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene, Cancer Cell, March 2003, Vol. 3, pages 297-302 See abstract, table 1, figures 2-4, discussion.	1-6,8-22
A	WO 2005-075510 A1 (BAYER HEALTHCARE AG) 18 August 2005 See figures 8-15, figures 29-33, figure 50, figures 58-60, the claims.	1-6,8-22
X	WO 2005-065666 A1 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 21 July 2005 See claims 1-5; paragraphs [0008], [0114], [0025].	21-22

☐ 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	Date of mailing of the international search report
19 JANUARY 2012 (19.01.2012)	**19 JANUARY 2012 (19.01.2012)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2011/003091

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.: **7, 23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7 and 23 pertain to a method for treatment of the human body, and thus relate to a subject matter for which the International Searching Authority is not required to search under 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/KR2011/003091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2005-075510 A1	18.08.2005	NONE	
WO 2005-065666 A1	21.07.2005	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/003091

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 38/16; A61K 31/00; A61K 35/00; A61K 31/352; C07K 14/705

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), PubMed ,

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, C. J. 외 9명, Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers, Acta Pathologica, Microbiologica et immunologica scandianvica, 2004.09, Vol. 112, Issue 9 pages 588-594 초록, 표2, 토의 참조.	1-6,8-22
A	MU, D. 외 18명, Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene, Cancer Cell, 2003.03, Vol. 3, pages 297-302 초록, 표1, 그림 2-4, 토의 참조.	1-6,8-22
A	WO 2005-075510 A1 (BAYER HEALTHCARE AG) 2005.08.18 8-15면, 29-33면, 50면, 58-60면, 청구범위 참조.	1-6,8-22
X	WO 2005-065666 A1 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2005.07.21 청구항 1-5; 문단 [0008], [0114], [0025] 참조.	21-22

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2012년 01월 19일 (19.01.2012)	**2012년 01월 19일 (19.01.2012)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
이수정
전화번호 82-42-481-8466

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/003091

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **2**의 계속**)**

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

1. ☒ 청구항: 7, 23
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
제7항, 제23항은 사람을 대상으로 하는 치료방법에 관한 발명이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 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.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **3**의 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.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/003091

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2005-075510 A1	2005.08.18	없음	
WO 2005-065666 A1	2005.07.21	없음	