

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 5월 15일 (15.05.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/073740 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/010659
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 7일 (07.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0125565 2012년 11월 7일 (07.11.2012) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 구성동 373-1, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 조광현 (CHO, Kwang Hyun); 305-330 대전시 유성구 노은동로(지족동) 234 번길 6, Daejeon (KR). 최민수 (CHOI, Min Soo); 545-765 전라남도 광양시 금호동 사랑아파트 9-505, Jeollanam-do (KR). 주시 (JUE, Shi); 홍콩 구룡통 구룡 홍콩 배티스트 대학교 물리학부, Kong (CN).
- (74) 대리인: 한윤호 (HAN, Yun-Ho) 등; 137-876 서울시 서초구 사임당로 28 나이스빌딩 2층 율민국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

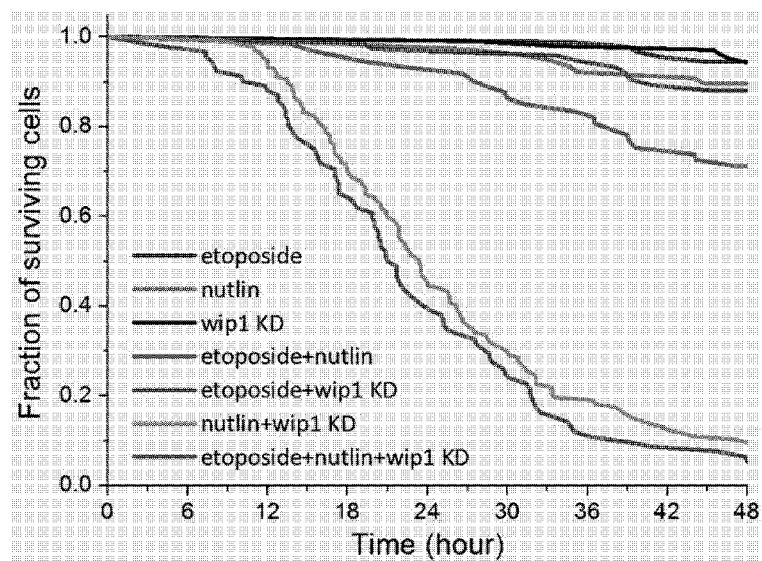
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ANTI-CANCER DRUG AND TREATMENT METHOD FOR TREATING TUMORS HAVING MULTIDRUG RESISTANCE

(54) 발명의 명칭 : 다제내성 종양 치료를 위한 항암제 및 치료방법



(57) Abstract: The present invention provides an anti-tumor drug comprising, as active ingredients, Wip1 inhibitors and Mdm-2/p53 interaction inhibitors so as to effectively treat malignant tumors.

(57) 요약서: 본 발명은 악성종양의 효과적인 치료를 위하여, Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 종양 치료제를 제공한다.

WO 2014/073740 A1

명세서

발명의 명칭: 다제내성 종양 치료를 위한 항암제 및 치료방법 기술분야

- [1] 본 발명은 항암제에 관한 것으로서, 더 상세하게는 다제내성 종양 치료를 위한 항암제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 항암제를 이용한 화학요법의 가장 큰 걸림돌은 암세포가 Mdm-2와 같은 약제내성 유전자(drug resistance gene)의 작용을 통해 항암제를 세포 바깥으로 배출함으로써 해당 항암제가 제대로 작동하지 않는 다제내성(multidrug resistance)을 갖게 된다는 점이다.
- [3] 이에, 다제내성 종양을 치료하기 위한 다양한 접근법이 연구되고 있는데, 주로 다제내성과 관련된 표적 단백질을 탐색하고 이들의 기능을 저해하는 방법이 연구되고 있다. 이러한 방법으로는 다제내성 백혈병을 대상으로 한 p-글리코단백질 ATP-결합 카세트 수송체(p-glycoprotein ATP-binding cassette transporter, PUP)를 표적으로 하는 항암치료방법에 관한 US2010-0204263A1, US6703400B2, US6372780B2 등 많은 선행기술이 존재한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 그러나 이러한 종래의 치료방법은 다제내성 기전에 대한 정확한 이해를 기반으로 한 것이 아니기 때문에 치료효과가 제한적이라는 문제점이 있었다.
- [5] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 다제내성 종양의 치료를 위한 항암제 및 그를 이용한 다제내성 종양 치료방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 일 관점에 따르면, Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 종양 치료제가 제공된다.
- [7] 상기 종양 치료제에 의해 치료가 가능한 암종은 유방암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 급성골수성백혈병, 만성림프구성백혈병, 췌장암, 담낭암, 신장암, 고환암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 피부암, 골육종, 흑색종, 식도암 또는 비장암일 수 있다.
- [8] 상기 종양 치료제는 다제내성 종양에 효과적일 수 있다.
- [9] 상기 다제내성 종양은 Mdr-1 유전자의 과발현에 의해 유발된 것일 수 있으며, 예컨대, 소세포폐암, 비소세포폐암, 골수종, 급성골수성백혈병, 비소세포폐암, 유방암, 난소암, 전립선암, 부신피질암 또는 골수이형성신드롬(myelodysplastic syndrome, MDS)일 수 있다(Szakmón et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(3):219-234,

- 2006).
- [10] 상기 종양 치료제에 있어서, 상기 Wip1 저해제는 Wip1의 발현 및/또는 기능을 저해할 수 있는 모든 물질을 포함하는데, 상기 Wip1 저해제는 Wip1의 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 저해하는 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), miRNA, siRNA 및 shRNA와 같은 핵산분자, Wip1의 기능, 특히 Wip1과 ATM의 상호작용을 저해하는 앵타머(aptamer), 펩티드 미메틱스(peptide mimetics), 길항 항체(antagonizing antibody) 또는 작은 화합물(small compound)일 수 있다. 상기 핵산분자로 US7,456,268B에 개시된 것을 사용할 수 있고, 작은 화합물로는 CCT007093(Tan *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2269-2280, 2009), Belova 등이 보고한 화합물(Belova *et al.*, *Cancer Biol. Ther.*, 4(10): 1154-1158, 2005) 또는 Bang 등이 개발한 환형 펩타이드 저해제(cyclic peptide inhibitors, Bang *et al.*, *ChemMedChem*, 3(2): 230-232, 2008)를 사용할 수 있다.
- [11] 상기 종양 치료제에 있어서, 상기 Mdm-2/p53 상호작용 저해제는 nutlin(Vassilev *et al.*, *Science*, 303: 844-848, 2004), MI-219(Shangary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 3933-3938, 2008), TPD222669(Johnson & Johnson), PXN727(Priaxon AG) 또는 PXN822(Priaxon AG)일 수 있고, 상기 nutlin은 nutlin-1, nutlin-2 또는 nutlin-3일 수 있으며, 상기 nutlin-3는 nutlin-3a 또는 nutlin-3b일 수 있다.
- [12] 아울러, 상기 종양 치료제에는 DNA 손상 유도제(DNA damage-inducing agent)가 추가적으로 포함될 수 있다. 상기 DNA 손상 유도제는 알킬화제(alkylating agents) 또는 토포이소머라제 저해제(topoisomerase inhibitor)일 수 있고, 상기 알킬화제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(Nedaplatin), 사트라플라틴(Satraplatin), 트리플라틴 테트라니트레이트(triplatin tetranitrate), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin) 또는 부숄판(Busulfan)일 수 있으며, 상기 토포이소머라제 저해제는 토포이소머라제 I 저해제 또는 토포이소머라제 II 저해제일 수 있고, 상기 토포이소머라제 I 저해제는 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 캄프토테신(camptothecin), 라멜라린 D(lamellarin D)일 수 있고, 토포이소머라제 II 저해제는 암사크린(amsacrine), 에토포사이드(etoposide), 인산화에토포사이드(etoposide phosphate), 독소루비신(doxorubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 엘립티신(ellipticine), 오린트리카르복실산(aurintricarboxylic acid), HU-331, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin) 또는 테니포사이드(teniposide)일 수 있다.
- [13] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제가 결합된 화합물을 유효성분으로 함유하는 종양 치료제가 제공된다. Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 병용 투여하는 방법도 있으나,

필요에 따라서, Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 공유결합에 의해 연결하여 단일 화합물로 제조한 후 투여할 수 있다. 상기 Wip1 저해제와 Mdm-2/p53 상호작용 저해제는 상술한 바와 같으며, Wip1 저해제와 Mdm-2/p53 상호작용 저해제의 결합은 공지된 다양한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, Wip1 저해제를 글루타르산무수물(glutaric anhydride, GA)와 같은 산무수물과 피리딘 존 재하에 반응시켜 가교를 형성한 후, 촉매의 존 재하에 Mdm-2/p53 상호작용 저해제와 반응시킴으로써 양 화합물을 공유결합시킬 수 있다(Aryal *et al.*, *Small*, 6(13): 1442-1448, 2010). 더 나아가, PEG, PLGA, PGA, PLA, 콜라겐, 메틸셀룰로오스와 같은 생분해성 폴리머에 상기 Wip1 저해제와 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 동시에 결합시키는 방식으로 상기 화합물을 제조할 수 있다. 아울러, 다양한 마이크로입자 또는 나노입자 표면에 형성된 기능기에 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 연결함으로써, 약물전달체 형태로 제조할 수 있다. 특히 나노입자의 경우 종양조직에 대한 표적지향성을 나타내기 때문에 보다 적합한 제형일 수 있다.

- [14] 상기 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제는 상술한 바와 같다.
- [15] 한편, 상기 화합물에는 추가적으로 DNA 손상 유도제가 결합될 수 있다. 상기 DNA 손상 유도제는 상술한 바와 같다.
- [16] 상기 종양 치료제에 의해 치료 가능한 암종은 유방암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 급성골수성백혈병, 만성림프구성백혈병, 췌장암, 담낭암, 신장암, 고환암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 피부암, 골육종, 흑색종, 식도암 또는 비장암일 수 있다.
- [17] 상기 종양 치료제는 다제내성 종양에 효과적일 수 있고, 상기 다제내성 종양은 Mdr-1 유전자의 과발현에 의해 유발된 것일 수 있으며, 예컨대, 소세포폐암, 비소세포폐암, 골수종, 급성골수성백혈병, 비소세포폐암, 유방암, 난소암, 전립선암, 부신피질암 또는 골수이형성신드롬(myelodysplastic syndrome, MDS)일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에 따른 종양 치료제는 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 비경구 투여시 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 조사, 종양내(intratatumoral) 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 실시예에 따른 각각의 조성물은 약제약상 허용되는 담체를 비롯한 불활성 성분을 추가로 포함한다.
- [20] 실제 사용에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 통상적인 제약 조제 기술에 따른 제약 담체와 조합될 수 있다. 담체는, 예를 들어 경구 또는 정맥내 투여를 비롯한 비경구 투여에 바람직한 제조에 따라 광범위하게 다양한 형태를 지닐 수 있다.
- [21] 아울러, 본 발명의 일 실시예에 따른 종양 치료제는 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg의

투여량으로 투여된다. 한편, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.

- [22] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제 또는 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제가 결합된 화합물을 암환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법이 제공된다.

- [23] 상기 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제는 상술한 바와 같고, 상기 종양 치료방법에 의해 치료가 가능한 암종은 유방암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 방광암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 급성골수성백혈병, 만성림프구성백혈병, 췌장암, 담낭암, 신장암, 고환암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 피부암, 골육종, 흑색종, 식도암 또는 비장암일 수 있다.

- [24] 상기 암환자는 다제내성 종양을 보유하고 있을 수 있고, 상기 다제내성 종양은 Mdr-1 유전자의 과발현에 의해 유발된 것일 수 있으며, 예컨대, 소세포폐암, 비소세포폐암, 골수종, 급성골수성백혈병, 비소세포폐암, 유방암, 난소암, 전립선암, 부신피질암 또는 골수이형성신드롬(myelodysplastic syndrome, MDS)일 수 있다(Szakmocs *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(3):219-234, 2006).

- [25] 또한, 상기 종양 치료방법에 있어서, 환자에게 치료적으로 유효한 양의 DNA 손상 유도제를 투여하는 단계가 추가적으로 포함될 수 있다. 상기 DNA 손상 유도제는 상술한 바와 같다.

- [26] 아울러, 상기 종양 치료방법에 있어서, 환자의 환부에 대하여 방사선을 조사하는 단계 또는 방사성 핵종을 투여하는 단계가 추가적으로 포함될 수 있다. 상기 방사선은 X-선, 감마선, 전자선, 양성자선 또는 중성자선일 수 있고, 선량은 환자의 상태, 환부의 위치, 종양의 종류 등에 따라 종래에 기술된 바와 같이 적절히 조절될 수 있으나, 종양세포에서 DNA 손상을 유발할 수 있는 선에서 최소의 선량을 조사되는 것이 바람직할 수 있다. 상기 방사성 핵종은 Tc-99, Y-90, Re-188, Ho-166, Dy-165, Au-198, I-131, Sm-153, P-32, Sr-89, Er-169 또는 I-125일 수 있다.

발명의 효과

- [27] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 종래의 항암제로 치료가 거의 불가능하였던, 악성종양, 예컨대 다제내성 종양을 효과적으로 치료할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 부울리언 네트워크의 일 예를 나타낸 것이다.

- [29] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라, 다양한 실험적 증거를 통합한 결과를 이용한 p53 조절 네트워크를 부울리언 네트워크의 형태로 모델링하여 나타낸 것이다.

- [30] 도 3a는 도 2에 나타낸 p53 조절 네트워크에 있어서, 본 발명을 적용하여 밝혀낸, 암세포의 사멸에 중요한 역할을 하는 5개의 노드 및 이 노드들 간의 링크를 강조하여 나타낸 것이다.
- [31] 도 3b는, 도 2에 나타낸 p53 조절 네트워크를 이용하여, 정상세포에 DNA 손상이 발생한 경우와 손상이 발생하지 않은 경우에 있어서의 세포 상태를 표로서 나타낸 것이다.
- [32] 도 3c는 도 2에서 정상세포에 DNA 손상이 발생하지 않은 경우에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.
- [33] 도 3d는 도 2에서 정상세포에 DNA 손상이 발생한 경우에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.
- [34] 도 4a는 도 2에 나타낸 p53 조절 네트워크를 이용하여, MCF7 유방암세포에 DNA 손상(damage)이 발생하지 않은 경우 p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊거나(nutlin-3 처리 모사) Wip1 노드를 억제하거나 또는 두 가지를 모두 처리하였을 때의 세포 상태를 시뮬레이션한 결과를 표로서 나타낸 것이다.
- [35] 도 4b는 MCF7 유방암 세포에서 DNA 손상(damage)이 발생한 경우, p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊거나(nutlin-3 처리 모사) Wip1 노드를 억제하거나 또는 두 가지를 모두 처리하였을 때의 세포 상태를 시뮬레이션한 결과를 표로서 나타낸 것이다.
- [36] 도 5a는 MCF7 유방암세포에서 DNA 손상(damage)이 발생하지 않은 경우에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.
- [37] 도 5b는 MCF7 유방암세포에서 DNA 손상(damage)이 발생한 경우에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.
- [38] 도 6a 내지 6c는 MCF7 유방암 세포에서 DNA 손상(damage)이 발생한 경우, p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊거나(nutlin-3 처리 모사, 도 6a) Wip1 노드를 억제하거나(도 6b) 또는 두 가지를 모두 처리한 경우(도 6c)에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.
- [39] 도 7은 DNA 손상과 관련된 어트랙터 및 각 어트랙터에서의 p53 단백질의 활성화 양상 및 카스파제(Caspase)의 활성화 양상을 설명한 것이다.
- [40] 도 8은 Wip1 억다운용 siRNA 처리에 의해 MCF7 유방암 세포주에서 Wip1의 발현이 저해된 결과를 나타내는 웨스턴블랏 분석 결과이다.
- [41] 도 9a는 MCF7 유방암 세포주에, Wip1의 발현을 저해하기 위한 Wip1 억다운 처리와 p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊기 위한 nutlin 처리를 조합하였을 때의 p53의 활성화 수준을 나타낸 것이다.
- [42] 도 9b는 다양한 생화학적 처리에 따른 MCF7 유방암 세포의 생존율을 시간에 따라 나타낸 그래프이다.
- [43] 도 9c는 다양한 생화학적 처리에 따른 MCF7 유방암 세포의 표현형의 비율을 나타낸 것이다:
- [44] E: 에토포사이드 단독처리;

- [45] E+N: 에토포사이드 + nutlin-3 병용 처리;
- [46] E+Wip1 KD: 에토포사이드 + Wip1 녹다운 병용 처리;
- [47] N+Wip1 KD: nutlin-3 + Wip1 녹다운 병용 처리; 및
- [48] E+N+Wip1 KD: 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 녹다운 삼중 처리.
- [49] 도 10a는 USOS 골육종 세포주에 대한 에토포사이드, Wip1 녹다운 및/또는 nutlin-3 처리시의 p53의 활성화 양상을 나타낸 그래프이다:
- [50] E: 에토포사이드 단독처리;
- [51] E+N: 에토포사이드 + nutlin-3 병용 처리;
- [52] E+Wip1 KD: 에토포사이드 + Wip1 녹다운 병용 처리; 및
- [53] E+N+Wip1 KD: 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 녹다운 삼중 처리.
- [54] 도 10b는 USOS 골육종 세포주에 대한 에토포사이드, Wip1 녹다운 및/또는 nutlin-3 처리시의 세포생존도를 나타낸 그래프이다.
- [55] 도 11a는 A549 폐암 세포주에 대한 에토포사이드, Wip1 녹다운 및/또는 nutlin-3 처리시의 p53의 활성화 양상을 나타낸 그래프이다:
- [56] E: 에토포사이드 단독처리;
- [57] E+N: 에토포사이드 + nutlin-3 병용 처리;
- [58] E+Wip1 KD: 에토포사이드 + Wip1 녹다운 병용 처리; 및
- [59] E+N+Wip1 KD: 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 녹다운 삼중 처리.
- [60] 도 11b는 A549 폐암 세포주에 대한 에토포사이드, Wip1 녹다운 및/또는 nutlin-3 처리시의 세포생존도를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [61] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.
- [62] 본 문서에서 사용되는 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [63] 본 문서에서 사용되는 "펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)"는 표적 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드로서 표적 단백질의 활성을 억제하는 것이다.

- [64] 본 문서에서 사용되는 "miRNA(microRNA)"는 진핵생물의 세포 내에서 발견되는 전 사후 발현조절자로서 표적 mRNA 상에 상보 서열에 결합함으로써 표적 mRNA의 분해 및 유전자침묵을 유발하는 것으로 알려져 있다.
- [65] 본 문서에서 사용되는 "siRNA(small interfering RNA)"는 센스 RNA와 안티센스 RNA가 이중가닥 RNA 분자를 형성하고, 이때 센스 RNA가 표적 단백질을 암호화하는 mRNA 중 일부의 연속 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 핵산 서열을 포함하는 siRNA 분자인 것이 바람직하다. 상기 siRNA 분자는 표적 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열 내에서 선택되는 10개 내지 30개의 염기로 구성되는 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 표적 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열을 대상으로 상보적으로 결합할 수 있는 센스 서열을 가진 이중가닥 RNA 분자라면 모두 사용 가능하다. 상기 안티센스 서열은 센스 서열과 상보적인 서열을 가지는 것이 가장 바람직하다.
- [66] 본 문서에서 사용되는 "shRNA(short hairpin RNA)"는 siRNA의 일종으로서 분자내의 상보적인 서열 사이에 형성된 줄기(stem)와 루프(loop) 구조로 이루어진 단일 가닥 RNA 분자로서 표적 mRNA의 분해와 유전자침묵을 유발하는 점에서 miRNA 그리고 siRNA와 유사하다.
- [67] 본 문서에서 사용되는 "길항 항체(antagonizing antibody)"는 표적 단백질의주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 다클론 항체는 상기 표적 단백질을 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 속주로부터 만들어질 수 있다. 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G *et al.*, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor D *et al.*, *J Immunol Methods* 81:31-42, 1985; Cote RJ *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2026-2030, 1983; 및 Cole SP *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 62: 109-120, 1984). 또한, 상기 표적 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다(Huse WD *et al.*, *Science*, 254: 1275-1281, 1989). 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은

예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.

- [68] 본 문서에서 사용되는 "앱타머(Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산) 또는 펩타이드이다. 앱타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 앱타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., *Nature*, 346: 818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앱타머들이 계속해서 발굴되어 왔다. 앱타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 자주 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [69] 본 문서에서 사용된 "작은 화합물(small compound)"은 세포막을 통과할 수 있을 정도로 작은 크기를 가지며 표적 분자의 기능을 저해할 수 있는 활성을 가진 분자이다. 이러한 작은 화합물은 화합물 라이브러리(compound library)로부터 대용량 스크리닝(high throughput screening)을 통해 선별될 수도 있고, 표적분자의 활성부위(active site)의 3차원 구조를 이용한 컴퓨터-기반 구조-활성 관계 분석(computorial structure and activity relationship analysis)를 통해 새롭게(de novo) 고안될 수 있다(Wendoloski *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 60(2): 169-183, 1993).
- [70] 본 문서에서 사용된 "약제약상 허용된 담체"란 조성물, 구체적으로 의약 조성물의 활성 물질을 제외한 성분을 지칭하는 용어이다. 제약상 허용되는 담체의 예로는 결합제, 붕해제, 희석제, 충전제, 활택제, 가용화제 또는 유화제 및 염이 포함된다.
- [71] 본 문서에서 사용된 "어트랙터 랜드스케이프(attractor landscape)"는 가능한 모든 어트랙터 베이신의 상태를 3차원 공간으로 도시한 그래프이다. 그래프 상에서 잠재적 에너지가 가장 낮은 점은 포인트 어트랙터 상태에 해당되며, 바닥면에서 특정 어트랙터 베이신 상태의 순환을 나타내면 바로 사이클릭 어트랙터 상태에 해당된다.
- [72] 본 발명자들은 생물학적 현상을 설명하는 생화학적 경로를 네트워크로 간주하고, 상기 네트워크를 하나 이상의 상태값을 가질 수 있는 복수개의 노드 및 하나 이상의 제어타입을 가질 수 있는 복수개의 링크로 정의하였다. 그런 후 상기 네트워크가 갖는 상태를, 하나의 상태로 수렴하는 '포인트 어트랙터 상태', 일정한 상태들을 순환하는 '사이클릭 어트랙터 상태' 및 '논-어트랙터 상태'로 구분하였다. 상기 네트워크는 '논-어트랙터 상태' 중 시간이 흐름에 따라 상기 '포인트 어트랙터 상태'에 도달하는 모든 상태를 포함하는 집합인 '포인트 어트랙터 베이신', 및 상기 '논-어트랙터 상태' 중 시간이 흐름에 따라 상기 '사이클릭 어트랙터' 상태로 수렴하는 모든 상태를 포함하는 집합인 '사이클릭

어트랙터 베이신'을 포함하는 특징을 갖는다. 한편, '베이신의 크기'는 특정 '베이신'에 속한 모든 상태의 개수로 정의된다. 상기 부울리언 네트워크 모델은 본 출원의 선출원인 대한민국 특허출원 제2012-0098296호에 상세히 기재되어 있으며, 상기 특허출원 명세서 전체는 본 출원 명세서에 참조로 포함된다.

- [73] 본 발명자들은 모델 시스템으로서 p53을 둘러싼 DNA 손상 회복 및 세포사멸(apoptosis)과 관련된 생화학적 경로를 대입한 부울리언 네트워크 분석을 통해 상기 생화학적 경로에서 Wip1 및 Mdm-2/p53 상호작용의 링크를 동시에 끊을 경우, 종양세포가 세포사멸 경로에 이르는 포인트 어트랙터 상태로 향함을 알 수 있었으며(도 2 내지 8 참조), 이를 Wip1 특이적인 siRNA와 Mdm-2/p53 상호작용 저해제인 nutlin-3을 이용한 시험관내(*in vitro*) 실험을 통해 확증하였다(도 10a 내지 10c 참조).
- [74] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [75] 실시예 1: 부울리언 네트워크의 설정
- [76] 본 발명자들은 부울리언 네트워크를 통해 생물학적 상태의 예측이 가능한지 여부를 확인하기 위해 일단 예시적인 부울리언 네트워크를 구성하였다.
- [77] 상기 네트워크는 한 개 이상의 상태값을 가질 수 있는 N개의 노드 및 한 개 이상의 제어타입을 가질 수 있는 M개의 링크를 포함한다. 이 때, N, M은 2이상의 정수이다. 그리고 각각의 링크는 선단(front end) 및 후단(back end)의 두 개의 단자만을 가질 수 있다.
- [78] 상기 각각의 노드는, 상기 M개의 링크 중 L개의 링크에 의하여 상기 N개의 노드 중 L개의 노드에 연결될 수 있다(L은 자연수). 즉, 다른 노드에 연결되지 않는 노드는 이 네트워크의 구성 노드가 아닌 것으로 간주할 수 있다.
- [79] 상기 M개의 링크 중 임의의 제1링크의 후단에 연결된 제1노드의 상태값은 상기 제1링크의 선단에 연결된 제2노드의 과거의 상태값 및 상기 제1링크의 제어타입에 의해 결정될 수 있다. 여기서 '제어타입'은, 예컨대 도 1에 나타난 화살표-머리 연결선(11)에 따른 제1타입과 막대-머리 연결선(12)에 따른 제2타입을 가질 수 있다. 제어 타입과 관련하여 영향을 미치는 노드는 왼쪽(선단)에 있고 이에 의해 영향을 받는 노드는 오른쪽(후단)에 있다고 할 수 있다. 각 노드는 상호간에 화살표 혹은 막대로 제어 타입(제1타입 또는 제2타입)을 가지는 링크에 의해 연결함으로써, 조절관계를 표시할 수 있다. 즉, 제1타입(화살표-머리 연결선)은 링크를 중심으로 선단에 있는 노드가 후단에 있는 노드를 활성화시키는 관계를 나타내고, 제2타입(막대-머리 연결선)은

링크를 중심으로 선단에 있는 노드가 후단에 있는 노드를 억제시키는 관계를 나타낸다.

- [80] 상기 네트워크는 상기 N 개의 노드가 갖는 N 개의 상태값의 조합에 의하여 정의되는 최대 2^N 개의 상태 중 어느 하나의 상태를 가질 수 있다. 이때, 상기 네트워크가 갖는 상태는, '포인트 어트랙터 상태', '사이클릭 어트랙터 상태', 및 '논-어트랙터 상태'를 포함하는 상태분류기준에 의하여 분류될 수 있다.
- [81] 이때 '포인트 어트랙터 상태'는 시간이 흐름에도 불구하고 다른 상태로 천이하지 않는 상태이다.
- [82] 상기 '사이클릭 어트랙터 상태'는, 시간의 흐름에 따라, 다른 K 개(K 는 자연수)의 상태를 거쳐 다시 상기 '사이클릭 어트랙터 상태'로 되돌아오는 상태이다. 이때, 위의 K 개의 상태 역시 '사이클릭 어트랙터 상태'이다.
- [83] 상기 '논-어트랙터 상태'는 시간의 흐름에 따라 다른 상태로 천이되지만, 다시 상기 '논-어트랙터 상태'로 되돌아오지 않고 상기 '포인트 어트랙터 상태' 또는 상기 '사이클릭 어트랙터 상태'에 도달하게 되는 상태이다. '논-어트랙터 상태'는 상술한 베이신에 속한 임의의 상태를 의미할 수 있다.
- [84] 상기 네트워크는, 상기 N 개의 노드 및 상기 M 개의 링크에 의하여, 상기 '논-어트랙터 상태' 중 시간이 흐름에 따라 상기 '포인트 어트랙터 상태'에 도달하는 모든 '논-어트랙터 상태'를 포함하는 집합인 '포인트 어트랙터 베이신'이 정의될 수 있는 특징을 갖는다.
- [85] 또한, 상기 네트워크는, 상기 '논-어트랙터 상태' 중 시간이 흐름에 따라 상기 '사이클릭 어트랙터 상태'로 수렴하는 모든 '논-어트랙터 상태'를 포함하는 집합인 '사이클릭 어트랙터 베이신'이 정의될 수 있는 특징을 갖는다.
- [86] 그 다음, 상기 복수개의 노드 및 상기 복수개의 링크 중 하나 이상의 제어대상을 선택하여, 상기 하나 이상의 제어대상의 동작특성을 제어함으로써(즉, 섭동함으로써), 상기 제1네트워크로부터 변형된 제2네트워크에 대한 데이터가 생성된다. 이어, 상기 제2네트워크가 갖는 '포인트 어트랙터', '포인트 어트랙터 베이신', '사이클릭 어트랙터', 또는 '사이클릭 어트랙터 베이신'에 대한 데이터가 산출된다. 위에서 산출된 결과는 위의 제1네트워크의 특성을 분석하는데 유용한 자료가 된다.
- [87] **실시예 2: p53 경로를 대상으로 한 부울리언 네트워크 분석**
- [88] 생물의 유전자 발현 시스템에 있어서, 임의의 유전자 또는 단백질의 발현여부를 발현 및 미발현이라는 두 가지 상태로 정의할 수 있다. 이 때 임의의 유전자 또는 단백질의 발현 여부는 하나 이상의 다른 유전자 또는 단백질의 발현 여부에 의하여 결정될 수 있다. 이와 같은 특성으로 인해, 생물의 유전자 발현 시스템을 상술한 부울리언 네트워크로 모델링할 수 있음을 쉽게 이해할 수 있다.
- [89] 이에 본 발명자들은 상기 부울리언 네트워크 모델을 DNA 손상 정도에 따라 DNA 복구 또는 세포 사멸 여부를 결정하는 생화학적 경로인 p53 조절 경로에 적용시켰다.

- [90] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라, 다양한 실험적 증거를 통합한 결과를 이용한 p53 경로를 나타낸 것이다. p53 단백질은 인체 내에서 TP53 유전자에 의해 암호화되는 단백질로서, 세포주기(cell cycle)를 조절하며 암을 방지하는 종양억제 단백질로서 기능할 수 있다. 도 2에는 16개의 유전자 또는 단백질(ATM, p53, Mdm-2, Mdmx, Wip1, Cyclin G, PTEN, p21, AKT, Cyclin E, pRb, E2F1, ARF, Bcl2, Bax, Caspase)을 나타내는 16개의 노드와 이들 노드 사이를 연결하는 여러 개의 피드백 루프가 표시되어 있다. 각 노드에 대응하는 유전자 또는 단백질의 활성화 수준(activation level)이 임계치를 넘은 경우에 해당 노드가 '1'의 값을 갖고, 임계치보다 작은 경우에 해당 노드가 '0'의 값을 갖는 것으로 모델링할 수 있다. 또한 도 2의 각 노드를 연결하는 링크는 각 단백질끼리 영향을 주고받는 과정을 나타낸다. 구체적으로 상기 피드백 루프에 있어서 화살표 머리 연결선($\rightarrow$)는 활성화 관계를, 막대머리 연결선($\perp$)은 저해관계를 나타낸다. 따라서, 도 2에 나타낸 네트워크는 도 1에 나타낸 부울리언 네트워크와 동일한 특성을 나타낸다.
- [91] 도 3a는, 도 2에 나타낸 p53 조절 네트워크를 이용하여, 정상세포에 DNA 손상(damage)이 발생한 경우와 손상이 발생하지 않은 경우, 그리고 DNA 손상이 발생한 경우 Wip1 노드 또는 cyclin G 노드를 저해한 경우에 있어서의 세포 상태를 표로서 나타낸 것이다.
- [92] 도 3a에는 16개의 유전자 또는 단백질(ATM, p53, Mdm-2, Mdmx, Wip1, Cyclin G, PTEN, p21, AKT, Cyclin E, pRb, E2F1, ARF, Bcl2, Bax, Caspase)이 갖는 상태가 상기 유전자 또는 단백질 순서대로 '0(white)' 또는 '1(black)'로 표시되어 있다. 예컨대, 정상세포에 DNA 손상이 발생하지 않은 경우(DNA damage_condition = 0_normal)에, 이 정상세포는 '0010000011010100' 이라는 포인트 어트랙터 상태(Type = Point)로 수렴한다. 이러한 상태값은 p53 경로와 관련된 방대한 선행 연구결과를 토대로 설정된 것이다.
- [93] 상술한 바와 같이 이 세포가 '0010000011010100' 이라는 포인트 어트랙터 상태로 수렴하는 경우, 이 포인트 어트랙터의 베이신의 크기는 2^{16} 으로서 65536이 된다(다르게는, 베이신의 크기를 $65536-1=65535$ 로 정의할 수도 있다). 이때 이 포인트 어트랙터의 베이신의 크기는 모든 가능한 상태의 개수 $2^{16}=65536$ 의 100%에 해당하며, 이때 세포는 세포 분열을 진행하는 상태에 있기 때문에 세포 증식(proliferation, P) 상태에 이르게 된다.
- [94] 이와 반대로 정상세포에 DNA 손상이 발생한 경우에, 이 세포의 상태는 '1010000011011000', '1000000011011100', '1100000011001100', '110011111100100', '0111111100110100', '0011111100010000', '0011000000010000' 이라는 7개의 상태를 순환하는 사이클릭 어트랙터 상태(Type = Cyclic)로 수렴하게 되며, 이때 이 사이클릭 어트랙터의 베이신의 크기는 마찬가지로 2^{16} 으로서 65536이 된다(다르게는, 베이신의 크기를 $65536-7=65529$ 로 정의할 수도 있다). 이 때 이 사이클릭 어트랙터의 베이신의

크기는 모든 가능한 상태의 개수 $2^{16}=65536$ 의 100%에 해당하며, 이때 세포는 손상된 DNA를 복구하기 위해 세포주기 중지(arrest, A) 상태에 있게 된다.

정상세포가 세포주기 중지 상태에 있는 경우 세포의 분열주기는 정지된다.

[95] 이에 본 발명자들은 도 2에 나타난 링크 및 노드의 특성을 다양하게 조절하는 시뮬레이션을 수행한 결과, 도 2에 나타난 여러 개의 노드 중 p53, Cyclin G, Wip1, ATM, 및 Mdm-2를 나타내는 5개의 노드와 이 노드들 사이의 링크들이 세포의 사멸에 중요한 역할을 한다는 것을 발견하였다.

[96] 도 3a는 도 2에 나타난 p53 조절 네트워크에 있어서, 본 발명을 적용하여 밝혀낸, 세포의 사멸에 중요한 역할을 하는 5개의 링크(화살표 및 막대머리선) 및 두 개의 노드(적색 문자)를 강조하여 나타낸 것이다.

[97] 이에 본 발명자들은 상술한 5개의 노드와 2개의 링크 중 Wip1 노드 및/또는 p53와 Mdm-2 사이의 링크를 접동시킬 경우의 정상세포와 MCF7 유방암세포의 상태에 대한 시뮬레이션을 수행하였다.

[98] 정상 세포에서 Wip1 노드를 억제시킬 경우 세포 상태는 '1110011100010011'의 단일 상태로 수렴하게 되며 세포는 사멸 상태(death, D)로 천이하게 되며, cyclin G 노드를 억제할 경우 '1100000011011001', '1100101111000010', '1111101100110010', '1010101100110011', '1000000000010001'의 5개의 상태를 순환하는 사이클릭 어트랙터 상태(베이신 크기 59797)로 수렴하여, 세포주기 중지 상태에 있거나 낮은 빈도(8.8%)로 '1110101100010011'의 포인트 어트랙터(베이신 크기 5744)로 수렴하여 세포사멸에 이르게 된다.

[99] 도 3c는 도 3a에서 정상세포에 DNA 손상이 발생하지 않은 경우(DNA damage_condition = 0_normal)에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프(attractor landscape)를 나타낸 것이다.

[100] 도 3c의 3차원 공간에 표시된 각 점들은 도 2에 도시한 부울리언 네트워크가 갖는 16개의 노드에 의해 정의될 수 있는 각각의 세포 상태(네트워크 상태)를 나타낸다. z축에 표시한 '잠재적 에너지(Potential Energy)'는 세포 상태 간의 천이관계를 나타낸 것으로서, 예컨대 총 $2^{16}=65536$ 개의 세포 상태 중 제1의 세포 상태에서부터 제2의 세포 상태로 천이되는 경우, 제1의 세포 상태가 제2의 세포 상태보다 높은 'Potential Energy'를 가지고 있는 것으로 정의할 수 있다. 따라서, 도 3b에서 '봉우리'에 위치한 세포 상태는 결국 '골짜기'에 위치한 세포 상태로 천이될 수 있다. 세포 상태가 도 3c에 도시한 포인트 어트랙터(Point) 상태에 도달하면 세포는 세포 증식(proliferation) 상태에 있는 것으로 이해할 수 있다.

[101] 도 3d는 도 3a에서 정상세포에 DNA 손상이 발생한 경우(DNA damage_condition = 1_normal)에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.

[102] 도 3d의 랜드스케이프에 따르면, DNA 손상이 발생한 정상세포의 경우 한 개의 사이클릭 어트랙터(Cycle) 상태로 수렴할 수 있음을 알 수 있다. 세포 상태가 도 3d에 도시한 사이클릭 어트랙터(Cycle) 상태에 도달하면 세포는 세포주기

중지(Cell cycle arrest) 상태에 있는 것으로 이해할 수 있다.

[103] 도 4a는 도 2에 나타난 p53 조절 네트워크를 이용하여, MCF7 유방암세포에 DNA 손상(damage)이 발생하지 않은 경우 p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊거나(nutlin-3 처리 모사) Wip1 노드를 억제하거나 또는 두 가지를 모두 처리하였을 때의 세포 상태를 시뮬레이션한 결과를 표로서 나타낸 것이다.

[104] 도 4b는 MCF7 유방암 세포에서 DNA 손상(damage)이 발생한 경우, p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊거나(nutlin-3 처리 모사) Wip1 노드를 억제하거나 또는 두 가지를 모두 처리하였을 때의 세포 상태를 시뮬레이션한 결과를 표로서 나타낸 것이다.

[105] 암세포는 정상세포와 달리 돌연변이(mutation)가 존재하기 때문에 네트워크의 구조가 달라진다. 이러한 네트워크의 변화에 따라 상태 공간(state space)도 달라진다.

[106] MCF 유방암세포에 DNA 손상이 발생하지 않은 경우(DNA damage_condition = 0_MCF7)에, 이 세포의 상태는 '0010010011010100' 이라는 제1 포인트 어트랙터 상태(DNA damage_condition = 0_MCF7, Type = Point)로 수렴하게 되며, 이때 이 제1 포인트 어트랙터의 베이신의 크기는 65536이 된다(다르게는, 베이신의 크기를 $65536-1=65535$ 로 정의할 수도 있다). 이때 이 제1 포인트 어트랙터의 베이신의 크기는 모든 가능한 상태의 개수 $2^{16}=65536$ 의 100%에 해당하는 값이다. 그리고 이 때 세포는 세포 증식(proliferation, P) 상태에 있게 된다. 이때, p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊을 경우, MCF7 유방암세포는 '0110110011010100', '0110110110010011', '0110110011010011', '0110110110010100' 및 '0110110110010110'의 5개의 포인트 어트랙터 상태(베이신 크기는 각각, 45925, 10187, 9127, 154 및 143)로 수렴하게 되는데 상기 포인트 어트랙터의 세포 상태는 각각 노화(senescence, S), 사멸, 사멸, 노화 및 노화 상태가 된다. Wip1 노드를 억제할 경우 세포는 '0010010011010100'의 포인트 어트랙터 상태로 수렴하며(베이신 크기는 65536), 세포 상태는 증식(proliferation, P) 상태이다. nutlin-3 처리와 Wip1 저해를 동시에 수행하는 것을 모사할 경우, '0110010011010011', '0110010011010100', '0110010110010011', '0110010110010100' 및 '0110010110010110'의 5개의 포인트 어트랙터 상태로 수렴하며(베이신 크기는 각각 29120, 26582, 9267, 154 및 143), 이때 세포 상태는 각각 사멸, 노화, 사멸, 노화 및 노화상태였다. 흥미롭게도 상기 결과는 nutlin-3 처리 및 Wip1의 저해에 의해 DNA 손상이 없는 조건에서도 MCF7 유방암 세포를 사멸시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

[107] 이와 반대로 MCF7 유방암세포에 DNA 손상이 발생한 경우에, 이 세포의 상태는 사이클릭 어트랙터 상태로 수렴하는 것으로 나타났다(도 4b). 상기 사이클릭 어트랙터 상태는 '1010010011010100', '1000010011010100', '1101010011110100', '1101110111110100', '0111110110110100', '0011110110010100', '0011010010010100' 이라는 7개의 상태를 순환하게 된다.

이때 이 사이클릭 어트랙터의 베이신의 크기는 65536이 되며, 세포는 중지(arrest, A) 상태에 있게 된다. 암세포는 손상된 DNA를 복구하기 위해 중지 상태에 빠지더라도 손상된 DNA가 복구되면 다시 분열상태로 천이할 수 있다. 다만 암세포는 일부 유전자에 돌연변이가 존재하기 때문에 비정상적인 세포 분열 상태를 보인다.

[108] MCF7 유방암 세포에 DNA 손상이 유발된 경우 상기와 마찬가지로 Wip1 노드 및/또는 p53과 Mdm-2 사이의 링크를 억제했을 때의 세포 상태를 시뮬레이션하였다. 그 결과 p53과 Mdm-2 사이의 링크만 억제하였을 때(1_MCF7_nutlin-3), 세포는 '1010010011010100', '1100010011010100', '110111011110100', '0111110110110100', '0011110110010100' 및 '0011010010010100'이라는 6개의 상태를 순환하는 사이클릭 어트랙터 상태로 수렴하거나(베이신 크기 27179), '0110110110010011', '0110110011010011', '0110110011010100', '0110110110010100' 및 '0110110110010110'이라는 5개의 포인트 어트랙터 상태로 수렴하는 것으로 나타났고(베이신 크기는 각각 18662, 9284, 8828, 1387, 202), 상기 사이클릭 어트랙터 상태의 경우 세포상태는 세포주기 중지(A)이고, 상기 포인트 어트랙터들의 경우 사멸 또는 노화 상태였다. Wip1 노드 저 해시에는 상기 nutlin-3 처리 모사와 유사하게, '1101010011110100', '1101010111110100', '1101010110110100', '1111010110110100', '1010010110110100' 및 '1000010010110100'이라는 5개의 상태를 순환하는 사이클릭 어트랙터 상태(베이신 크기 62538)로 수렴하거나, 5개의 포인트 어트랙터 상태로 수렴하는 것으로 나타났고, 상기 사이클릭 어트랙터의 경우 세포 상태는 세포주기 중지이고 포인트 어트랙터의 경우 세포 상태는 사멸 또는 노화였다.

[109] 반면, Wip1 저해 및 p53과 Mdm-2 사이의 링크의 저해 두 가지를 모두 처리한 경우에는 '1110010110010011', '1110010110110100', '1110010011010011', '1110010011010100' 및 '1110010110110110'의 5개의 포인트 어트랙터 상태로 수렴했고(베이신 크기는 각각 35581, 11870, 11192, 6495 및 398), 세포 상태는 각각 사멸, 노화, 사멸, 노화 및 노화였다.

[110] 상기 시뮬레이션 결과를 볼 때, MCF7 세포에 DNA 손상을 가하는 조건(예컨대, 방사선 치료시)에서 nutlin-3의 처리(p53과 Mdm-2 사이의 링크 저해) 및 Wip1의 저해를 통해 유방암세포를 효율적으로 사멸시킬 수 있음을 알 수 있다.

[111] 도 5a는 MCF7 유방암세포에서 DNA 손상(damage)이 발생하지 않은 경우에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.

[112] 도 5a의 어트랙터 랜드스케이프에 따르면, DNA 손상이 발생하지 않은 MCF7 유방암세포의 경우 한 개의 포인트 어트랙터(Point) 상태로 수렴할 수 있음을 알 수 있다. 세포 상태가 도 5a에 도시한 포인트 어트랙터(Point) 상태에 도달하면 세포는 세포 증식(proliferation) 상태에 있는 것으로 이해할 수 있다.

[113] 도 5b는 MCF7 유방암세포에서 DNA 손상이 발생한 경우(DNA

damage_condition = 1_MCF7)에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다.

[114] 도 5b의 랜드스케이프에 따르면, DNA 손상이 발생한 MCF7 유방암세포의 경우 한 개의 사이클릭 어트랙터(Cycle) 상태에 수렴하며 세포 상태가 도 5b에 도시한 사이클릭 어트랙터(Cycle) 상태에 도달하면 세포는 세포주기 정지(Cell cycle arrest) 상태에 있는 것으로 이해할 수 있다.

[115] 도 6a 내지 6c는 MCF7 유방암 세포에서 DNA 손상(damage)이 발생한 경우, p53과 Mdm-2 사이의 링크를 끊거나(nutlin-3 처리 모사, 도 6a) Wip1 노드를 억제하거나(도 6b) 또는 두 가지를 모두 처리한 경우(도 6c)에 대응하는 어트랙터 랜드스케이프를 나타낸 것이다. 도 6a에서 나타나 듯, DNA 손상을 가한 MCF7 세포에서 p53과 Mdm-2 사이의 링크를 억제할 경우 세포는 하나의 사이클릭 어트랙터 상태와 5개의 포인트 어트랙터 상태로 수렴하고 상기 사이클릭 어트랙터에 수렴한 세포는 세포주기 중지 상태에, 5개의 포인트 어트랙터 중 2개는 세포 사멸 상태 그리고 3 개는 세포 노화 상태에 이르는 것을 알 수 있다. 이는 nutlin-3 만으로는 암세포의 사멸이 쉽지 않음을 시사하는 것이다. 마찬가지로 도 6b에 나타난 바와 같이, Wip1만 저해한 경우 세포는 하나의 사이클릭 어트랙터와 5개의 포인트 어트랙터로 수렴하는데, 상기 사이클릭 어트랙터로 수렴한 세포는 세포주기 중지 상태에, 그리고 포인트 어트랙터 중 2개는 세포 사멸, 그리고 나머지 3개는 세포 노화상태에 놓이게 된다. 반면, 도 6c에 나타난 바와 같이, Wip1 저해 및 p53과 Mdm-2 사이의 링크를 동시에 저해할 경우 세포는 5개의 포인트 어트랙터로 수렴하는데 이중 베이신 사이즈가 가장 큰 포인트 어트랙터에 수렴한 세포는 세포사멸 상태로 나머지 네 개의 포인트 어트랙터에 수렴한 세포는 세포노화 상태에 놓이게 되어 종국에는 세포사멸 상태에 놓이게 된다. 이는 DNA 손상 조건에서 Wip1 저해 및 p53과 Mdm-2 사이의 링크의 저해(nutlin의 처리)의 병용처리에 의해 유방암 세포의 효율적인 세포사멸을 유도할 수 있음을 보여주는 것이다.

[116] 도 3b 내지 도 6c에서 확인할 수 있듯이, DNA 손상 없는 정상세포, DNA 손상이 발생한 정상세포, DNA 손상 없는 MCF7 유방암세포, 및 DNA 손상이 발생한 MCF7 유방암세포는 모두 서로 다른 어트랙터 랜드스케이프(상태 공간)를 가지며, 이들 세포 내에서 증식 및 세포사멸 등 세포주기와 관련된 주요 노드와 링크를 섭동할 경우 제각각 다른 세포 상태로 수렴함을 시뮬레이션을 통해 알 수 있었다. 본 발명의 일 실시예에 따른 네트워크 특성 분석방법을 사용하여, 즉, 도 2에 나타난 링크 및 노드 중 적어도 하나 이상의 특성을 인위적으로 제어함으로써(혹은 섭동함으로써) p53 조절 네트워크의 상태 공간을 바꿀 수 있다.

[117] 도 7은 DNA 손상과 관련된 어트랙터 및 각 어트랙터에서의 p53 단백질의 활성화 양상 및 카스파제(Caspase)의 활성화 양상을 설명한 것이다. 일반적으로, DNA 손상이 낮은 수준으로 발생하여 세포의 치료가 가능한 경우(repairable),

세포는 사이클릭 어트랙터 상태로 수렴할 수 있고, 이때, p53 단백질은 활성상태와 비활성상태로 진동(oscillation)하는 활성화 양상을 가질 수 있으며, 카스파제는 비활성상태로 될 수 있다. 그 결과, 결국 p53 단백질이 세포를 생존하게 하는 기능을 수행할 수 있다. 반대로, DNA 손상이 높은 수준으로 발생하여 세포의 치료가 불가능한 경우, 세포는 포인트 어트랙터 상태로 수렴할 수 있고, 이때, p53 단백질이 항상 활성상태에 있을 수 있으며, 카스파제 역시 활성상태로 될 수 있다. 그 결과, 결국 p53 단백질이 세포를 사멸하게 하는 기능을 수행할 수 있다.

[118] 상술한 바와 같이, p53을 나타내는 노드와 Mdm-2를 나타내는 노드 사이의 링크를 끊기 위한 생화학적 제1처리(예컨대, nutlin의 처리)와, Wip1을 나타내는 노드를 끊기 위한 생화학적 제2처리(Wip1 억제를)를 조합한다면, MCF7 유방암세포의 사멸을 유도할 수 있을 것으로 예측할 수 있다.

[119] 실시예 3: Wip1 억제를 및 Mdm-2/p53 상호작용의 억제의 동시 수행

[120] 3-1: MCF7 유방암 세포의 세포사멸

[121] 본 발명자들은 상기 부울리언 네트워크 시뮬레이션의 결과를 바탕으로, 실제 Wip1의 저해와 Mdm-2/p53 상호작용의 저해를 병행하였을 때, 약제내성 종양세포에 대한 세포사멸효과에 있어서 상승작용이 일어나는지 여부를 확인하기 위하여 MCF7 유방암 세포에 Wip1 억제를(knockdown)을 위한 siRNA와 대표적인 Mdm-2/p53 상호작용 저해제인 nutlin-3을 동시에 처리하였다.

[122] 본 발명자들은 실험을 위해, MCF7 세포를 37°C에서 5% CO₂의 대기상태로 10% 우태아혈청(Gibco, USA), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 배지에(Gibco, USA)서 배양하였다. 암세포로 하여금 형광을 나타내도록 하기 위해, 본 발명자들은 상기 MCF7 세포를 p53-Venus 컨스트럭트(Zhang et al., Anal. Biochem., 331: 138-146, 2004)를 포함하는 렌티바이러스(lentivirus)로 감염시켰다. 상기 p53-Venus 컨스트럭트는 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP)에 융합된 야생형(wild-type) p53 단백질로 구성되어 있는데 하버드 의과대학의 시스템생물학과 Galit Lahav 박사의 호의로 분양받았으며, 종래 연구 결과 내재적 p53과 유사하게 행동하는 리포터 컨스트럭트로 확인된 바 있다. 본 발명자들은 본 연구를 수행하기 위해 모 세포주와 거의 유사한 행동을 나타내는 MCF7 p53 세포주의 동질유전자형 클론(isogenic clone)을 선별하였다. MCF7에 DNA 손상을 가하기 위한 약물로는 에토포사이드(etoposide)를 Sigma사(USA)로부터 구입하여 사용하였고(10 µM), Mdm-2/p53 상호작용의 억제제로는 nutlin-3을 Tocris사(UK)로부터 구매하여 사용하였다. Wip1의 억제를을 위한 siRNA(서열번호 1: 5'-UUG GCC UUG UGC CUA CUA A-3')는 Dharmacon사(USA)에 의해 주문합성하여 사용하였다. 한편 Dharmacon사의 On-Target plus siControl(#D-001810-01)을 비-표적 siRNA 대조군으로 사용하였다. 두 siRNA는 모두 20 nM의 최종 농도로 사용하였고 siRNA 형질감염은 HiPerFect(Qiagen, USA)을 이용하여 제조사의 지시에 따라

수행하였다. 실험은 48시간의 유전자 침묵 후 수행되었다. 상기 siRNA에 의한 Wip1의 억다운 효율은 일반적으로 95%를 초과하였다(도 8).

- [123] 본 발명자들은 상기 동질유전자형 클론 MCF7 p53 세포주에 DNA 손상 유도제인 에토포사이드만의 단독처리, nutlin-3만의 단독처리, Wip1 억다운 단독처리, 에토포사이드 + nutlin-3의 조합처리, 에토포사이드 + Wip1 억다운 조합처리, nutlin-3 + Wip1 억다운 조합처리, 그리고 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 억다운의 삼중 조합처리 후 시간의 경과에 따른 상기 세포의 p35 발현 양상(도 9a) 및 세포 사멸 정도(도 9b)를 측정하였다.

- [124] p53 발현 양상은 형광단백질의 형광세기로 간접 측정하였는데 도 9a에 나타난 바와 같이 에토포사이드 단독처리 및 에토포사이드 + Wip1 억다운 조합처리의 경우 85%를 초과하는 MCF7 세포가 종래에 감마선 조사를 통해 보고된 바와 같이 일련의 p53 펄스를 나타내었다. 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리에 의해 대부분 단일 p53 펄스(분석 대상 세포의 약 60% 정도)가 활성화되었는데 이는 종래 연구결과에서의 UV 처리와 유사한 것이었다(Batchelor, E. *et al.*, *Mol. Syst. Biol.* 7:488, 2011). nutlin-3 + Wip1 억다운 조합처리 및 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 억다운의 삼중 조합처리시에는 명확하게 구분되는 다른 p53 역학(dynamics), 즉, 75% 정도의 MCF7 세포에서의 일관된 상승을 유도하였는데, 이는 상기 실시예 2의 부울리언 네트워크 모델을 통해 이론적으로 예측한 것과 일치하는 것이었다.

- [125] 세포 사멸 정도는 35 mm imaging dish(m-dish, ibidi, Germany)에 도말된 MCF7 p53-리포터 세포를 간헐 현미경 촬영(time-lapse microscopy)함으로써 관찰하였다. 세포 이미지는 37°C의 습윤 챔버(humidified chamber) 내에 설치된 Nikon TE2000-PFS 도립현미경(inverted microscope)은 이용하여 48시간 동안 전동 스테이지 및 20배 대물렌즈를 이용하여 10분 간격으로 촬영하였으며, 이미지는 MetaMorph 소프트웨어(Molecular Dynamics, USA)를 통해 분석하였다. 분석결과, 도 9b에 나타난 바와 같이, 상기 7가지 처리조건 중 유의한 세포사멸을 나타낸 것은 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리(처리 후 48시간 후에 약 25%의 세포사멸), nutlin-3 + Wip1 억다운 조합처리(약 90% 세포사멸) 및 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 억다운 삼중 조합처리(약 90% 세포사멸)의 경우뿐이었다. 더욱 중요한 것은, 상기 세포사멸 정도가 부울리언 네트워크 모델을 통해 예측된 바와 같이, p53의 맥동(pulsing)은 일반적으로 세포주기 중지와 생존에 수반하고, p53의 일관된 상승은 대부분 세포사멸을 초래함으로써(도 9c), p53 역학과 강한 상관관계를 나타냈다는 점이다. 흥미롭게도, 본 발명자들에 의한 시뮬레이션과 실험결과는 DNA 손상이 없는 경우에도 nutlin-3 + Wip1 억다운 조합처리만으로도 MCF7 세포를 사멸시킬 수 있음을 보여주었다(도 4a 및 도 9c). 이는 많은 DNA 손상 신호에 의존하는 것으로 여겨지는 p53 번역후 수식과 독립적인 기전으로, 충분히 높은 수준으로의 p53의 상향조절만으로도 세포사멸을 촉발할 수 있는 것으로 여겨진다. 종합적으로 볼 때, 본 발명자의

실험결과는 랜드스케이프 분석에 의해 예측된 세포 사멸 정도가 실제 관찰된 실험결과보다 약간 낮기는 했으나, 이론적 예측과 잘 일치하였다. 따라서, 본 발명자들은 nutlin-3 처리와 Wip1 저해의 조합처리가 DNA 손상 화학요법제의 의해 촉발된 세포사멸을 강력하게 증진할 수 있음을 확인하였다.

[126] **3-2: U2OS 골육종 세포주의 세포사멸**

[127] 본 발명자들은 U2OS 세포에 대하여도 상기 실시예 3-1과 동일한 실험을 수행하였다. 구체적으로, U2OS 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Korea)로부터 구입하였고, 37°C에서 5% CO₂의 대기상태로 10%

우태아혈청(Gibco, USA), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 배지에(Gibco, USA)서 배양하였다.

[128] U2OS 세포를 p53-Venus 컨스트럭트(Zhang *et al.*, *Anal. Biochem.*, 331: 138-146, 2004)를 포함하는 렌티바이러스(lentivirus)로 감염시켜 제조한 동질유전자형 클론을 제조한 후, 이에 대하여 에토포사이드 단독처리, nutlin-3 단독처리, Wip1 억제제 단독처리, 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리, 에토포사이드 + Wip1 억제제 조합처리 및 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 억제제 삼중 조합처리를 수행하였다(도 10a 및 10b).

[129] 우선 p53 발현 양상은 도 10a에 나타난 바와 같이 에토포사이드 단독처리 및 에토포사이드 + Wip1 억제제 조합처리의 경우 75%를 초과하는 USOS 세포가 종래에 감마선 조사를 통해 보고된 바와 같이 일련의 p53 펄스를 나타내었다. 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리에 의해 거의 대부분의 세포가 일관되게 상승한 p53 수준을 보여주었으나, 세포사멸에 이른 세포는 50%를 약간 상회한 정도였다. 반면, 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 억제제 삼중 조합처리시에는 세포사멸에 이른 세포가 90% 정도를 나타내어, nutlin-3 및 Wip1 저해의 조합처리시 상승작용을 나타냄을 알 수 있었다.

[130] 시간에 따른 세포 사멸정도를 비교한 결과, 도 10b에 나타난 바와 같이, 에토포사이드만 처리한 경우에는 세포 사멸이 거의 없었고, nutlin-3 단독처리, Wip1 억제제 단독처리 및 에토포사이드 + Wip1 억제제 조합처리시의 세포사멸정도는 20% 미만의 미미한 정도에 불과하였다. 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리시 48시간 경과후 세포사멸 정도는 50%를 상회하였다. 그러나, 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 억제제 삼중 조합처리시 세포 사멸율을 90%에 육박함을 알 수 있었다.

[131] **3-3: A549 폐암 세포주의 세포사멸**

[132] 본 발명자들은 A549 폐암 세포주에 대하여도 상기 실시예 3-1과 동일한 실험을 수행하였다.

[133] 구체적으로, A549 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Korea)로부터 구입하였고, 37°C에서 5% CO₂의 대기상태로 10% 우태아혈청(Gibco, USA), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 배지에(Gibco, USA)서 배양하였다.

- [134] A549 세포를 p53-Venus 컨스트럭트(Zhang *et al.*, *Anal. Biochem.*, 331: 138-146, 2004)를 포함하는 렌티바이러스(lentivirus)로 감염시켜 제조한 동질유전자형 클론을 제조한 후, 이에 대하여 에토포사이드 단독처리, nutlin-3 단독처리, Wip1 녹다운 단독처리, 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리, 에토포사이드 + Wip1 녹다운 조합처리 및 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 녹다운 삼중 조합처리를 수행하였다(도 11a 및 11b).
- [135] 우선 p53 발현 양상은 도 11a에 나타난 바와 같이 에토포사이드 단독처리시에는 거의 모든 세포가 p53 펄스를 나타내었고, 에토포사이드 + Wip1 녹다운 조합처리의 경우 30% 정도의 세포는 사멸하였으나, 50%를 초과하는 A549 세포가 종래에 p53 펄스를 나타내었다. 에토포사이드 + nutlin-3 조합처리에 의해 80% 정도의 세포가 사멸되었으나, 일부는 높은 p53 수준에도 불구하고 세포주기가 중지된 상태에 놓였다. 반면, 본 발명의 일 실시예에 따라 에토포사이드 + Wip1 녹다운 + nutlin-3 삼중 조합처리시에는 모든 세포가 사멸됨을 알 수 있었다.
- [136] 시간에 따른 세포 사멸정도를 비교한 결과, 도 11b에 나타난 바와 같이, 에토포사이드만 처리한 경우와 nutlin-3 단독 처리시에는 세포 사멸이 거의 없었고, Wip1 녹다운 단독처리시에는 48시간 경과 후 약 30% 정도의 세포만 사멸되었고 및 에토포사이드 + Wip1 녹다운 조합처리시의 세포사멸정도는 80% 정도로 높은 편이었다. 그러나, 에토포사이드 + nutlin-3 + Wip1 녹다운 삼중 조합처리시 모든 세포가 사멸함을 알 수 있었다.
- [137] 상술한 MFC7 유방암 세포주는 대표적인 다제내성 암세포이며, A549 폐암 세포주 및 U2OS 세포주는 다제내성 암세포는 아니나 MDR-1 유전자의 과발현시 다제내성을 획득하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 항암 조성물은 일반 악성종양은 물론 유방암이나 폐암과 같은 다제내성 종양의 치료에 매우 효율적임을 알 수 있다.
- [138] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

산업상 이용가능성

- [139] 본 발명의 일 실시예의 조성물 및 방법에 따르면, 항암제에 대한 내성을 보이는 난치성 암의 치료에 매우 효율적으로 사용될 수 있다.

서열목록 Free Text

- [140] 서열번호 1은 Wip1 저해를 위해 사용된 siRNA의 핵산서열이다.

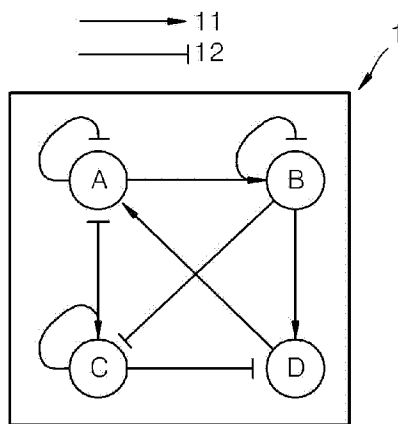
청구범위

- [청구항 1] Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 종양 치료제.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
다제내성 종양의 치료에 효과적인, 종양 치료제.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 Wip1 저해제는 Wip1의 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 저해하는 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), miRNA, siRNA 및 shRNA와 같은 핵산분자, Wip1의 기능, 특히 Wip1과 ATM의 상호작용을 저해하는 앵타머(aptamer), 펩티드 미메틱스(peptide mimetics), 길항 항체(antagonizing antibody) 또는 작은 화합물(small compound)인, 종양 치료제.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 Mdm-2/p53 상호작용 저해제는 nutlin, MI-219, TPD222669, PXN727 또는 PXN822인, 종양 치료제.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 nutlin은 nutlin-1, nutlin-2 또는 nutlin-3인, 종양 치료제.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
DNA 손상 유도제를 추가적으로 포함하는, 종양 치료제.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 DNA 손상 유도제는 알킬화제(alkylating agent) 또는 토포이소머라제 저해제(topoisomerase inhibitor)인, 종양 치료제.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 알킬화제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(Nedaplatin), 사트라플라틴(Satraplatin), 트리플라틴 테트라니트레이트(triplatin tetranitrate), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin) 또는 부숄판(Busulfan)인, 종양 치료제.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 토포이소머라제 저해제는 토포이소머라제 I 저해제 또는 토포이소머라제 II 저해제인, 종양 치료제.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 토포이소머라제 I 저해제는 이리노테칸(irinotecan),

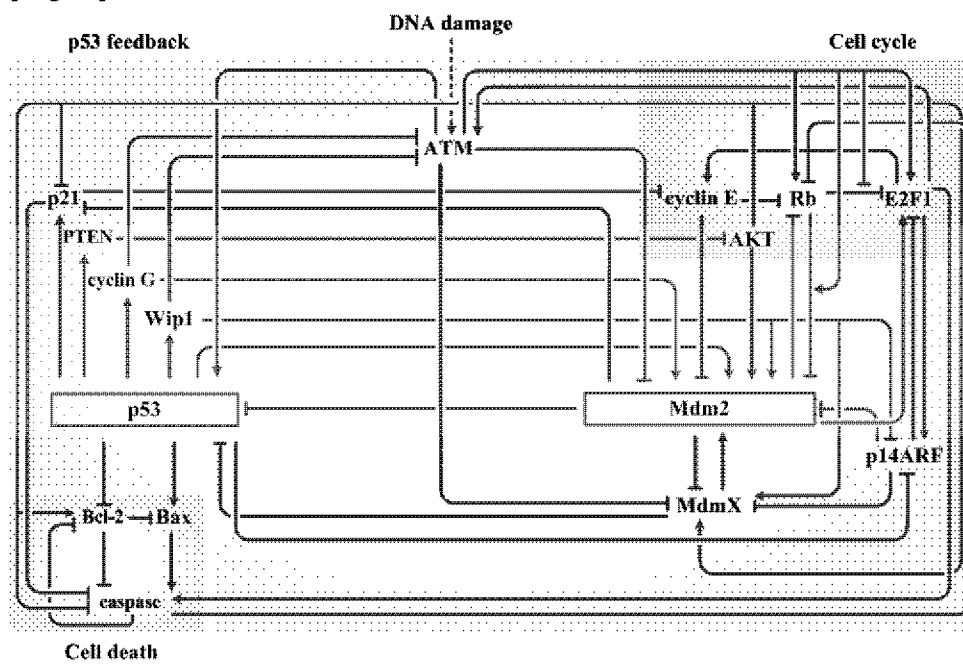
- 토폠테칸(topotecan), 캄프토테신(camptothecin) 또는 라멜라린 D(lamellarin D)인, 종양 치료제.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 토포이소머라제 II 저해제는 암사크린(amsacrine), 에토포사이드(etoposide), 인산화에토포사이드(etoposide phosphate), 독소루비신(doxorubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 엘립티신(ellipticine), 오린트리카르복실산(aurintricarboxylic acid), HU-331, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin) 또는 테니포사이드(teniposide)인, 종양 치료제.
- [청구항 12] Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제가 결합된 화합물을 유효성분으로 함유하는 종양 치료제.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
다제내성 종양의 치료에 효과적인, 종양 치료제.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 Wip1 저해제는 Wip1의 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 저해하는 안티센스 뉴클레오티드(antisense nucleotide), miRNA, siRNA 및 shRNA와 같은 핵산분자, Wip1의 기능, 특히 Wip1과 ATM의 상호작용을 저해하는 앵타머(aptamer), 펩티드 미메틱스(peptide mimetics), 길항 항체(antagonizing antibody) 또는 작은 화합물(small compound)인, 종양 치료제.
- [청구항 15] 제12항에 있어서,
상기 Mdm-2/p53 상호작용 저해제는 nutlin, MI-219, TPD222669(Johnson & Johnson), PXN727 또는 PXN822인, 종양 치료제.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 nutlin은 nutlin-1, nutlin-2 또는 nutlin-3인, 종양 치료제.
- [청구항 17] 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 화합물은 DNA 손상 유도제가 추가적으로 결합된 것인, 종양 치료제.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 DNA 손상 유도제는 알킬화제(alkylating agent) 또는 토포이소머라제 저해제(topoisomerase inhibitor)인, 종양 치료제.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 알킬화제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(Nedaplatin), 사트라플라틴(Satraplatin), 트리플라틴 테트라니트레이트(triplatin tetranitrate), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 우라무스틴(uramustine),

- 멜팔란(melphalan)), 클로람부실(chlorambucil),
 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine),
 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin) 또는
 부술피판(Busulfan)인, 종양 치료제.
- [청구항 20] 제18항에 있어서,
 상기 토포이소머라제 저해제는 토포이소머라제 I 저해제 또는
 토포이소머라제 II 저해제인, 종양 치료제.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
 상기 토포이소머라제 I 저해제는 이리노테칸(irinotecan),
 토포테칸(topotecan), 캄프토테신(camptothecin) 또는 라멜라린
 D(lamellarin D)인, 종양 치료제.
- [청구항 22] 제20항에 있어서,
 상기 토포이소머라제 II 저해제는 암사크린(amsacrine),
 에토포사이드(etoposide), 인산화에토포사이드(etoposide
 phosphate), 독소루비신(doxorubicin), 미톡산트론(mitoxantrone),
 엘립티신(ellipticine), 오린트리카르복실산(aurintricarboxylic
 acid), HU-331, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin) 또는
 테니포사이드(teniposide)인, 종양 치료제.
- [청구항 23] 치료적으로 유효한 양의 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용
 저해제, 또는 Wip1 저해제 및 Mdm-2/p53 상호작용 저해제가
 결합된 화합물을 암환자에게 투여하는 단계를 포함하는 종양
 치료방법.
- [청구항 24] 제23항에 있어서,
 상기 암환자는 다제내성 종양을 갖고 있는, 종양 치료방법.
- [청구항 25] 제23항에 있어서,
 환자에게 치료적으로 유효한 양의 DNA 손상 유도제를 투여하는
 단계를 추가적으로 포함하는, 종양 치료방법.
- [청구항 26] 제23항에 있어서,
 환자의 환부에 대하여 방사선을 조사하거나 방사성 핵종을
 투여하는 단계를 추가적으로 포함하는, 종양 치료방법.
- [청구항 27] 제26항에 있어서,
 상기 방사선은 X-선, 감마선, 전자선, 양성자선 또는 중성자선인,
 종양 치료방법.
- [청구항 28] 제26항에 있어서,
 상기 방사성 핵종은 Tc-99, Y-90, Re-188, Ho-166, Dy-165, Au-198,
 I-131, Sm-153, P-32, Sr-89, Er-169 또는 I-125인, 종양 치료방법.

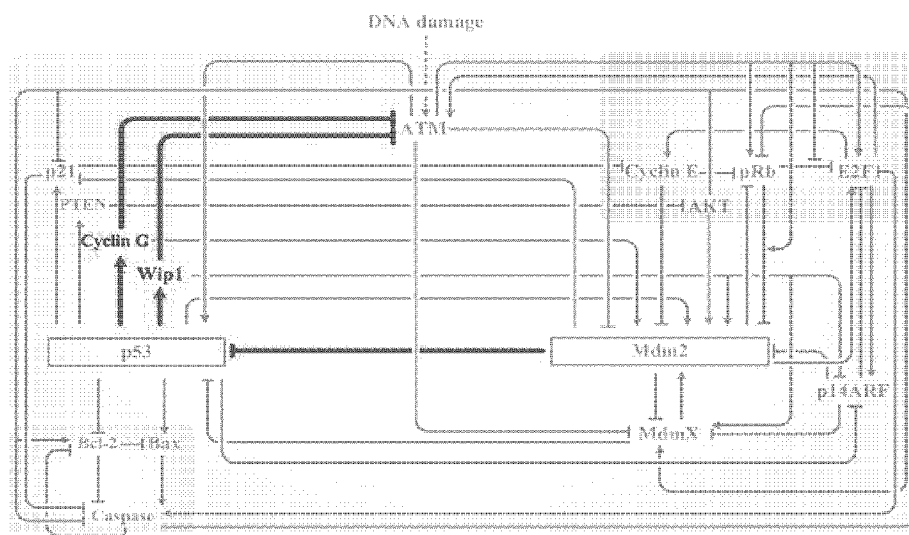
[Fig. 1]



[Fig. 2]



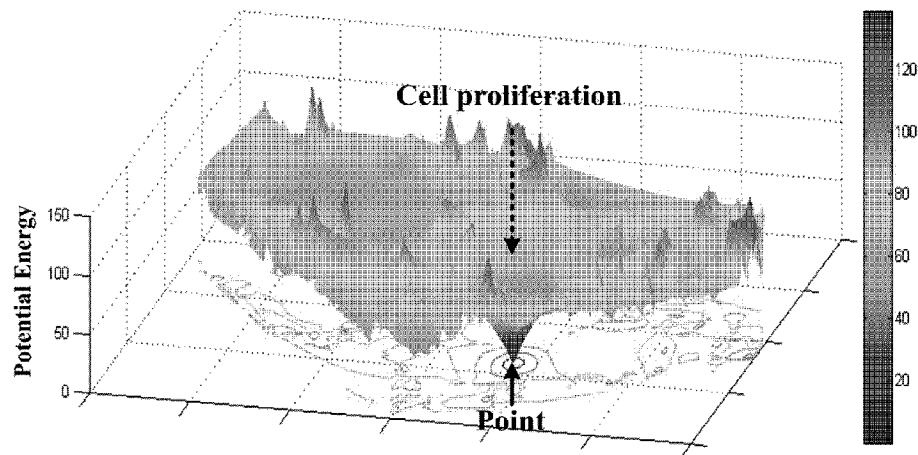
[Fig. 3a]



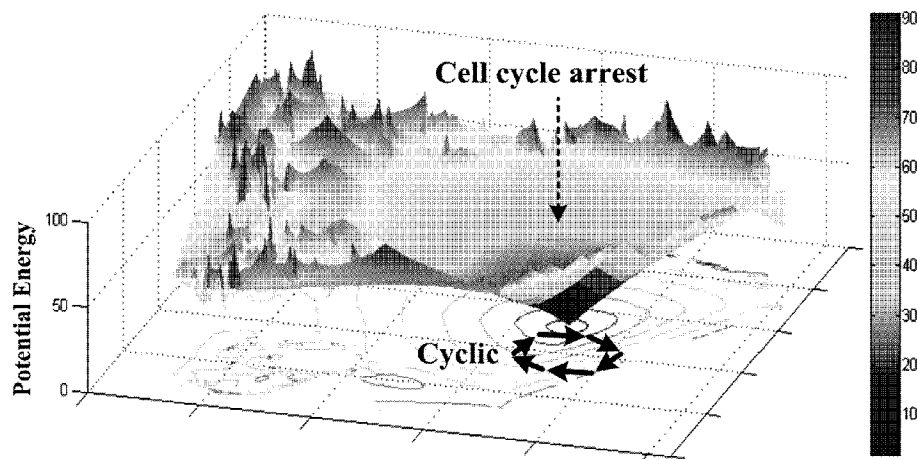
[Fig. 3b]

DNA damage condition	Type	ATM	p53	Mdm2	Mdmx	Wip1	cyclin G	PTEN	p21	AKT	cyclin E	Rb	E2F1	PL40RF	Bcl-2	Bax	Caspase	Basin size (Ratio)	Cell state
0_normal	Point																	65536(1)	P
1_normal	Cyclic																	65536(1)	A
1_normal Wip1 inhibition	Point																	65536(1)	D
1_normal cyclin G inhibition	Cyclic																	59792(0.912)	A
	Point																	5744(0.088)	D

[Fig. 3c]

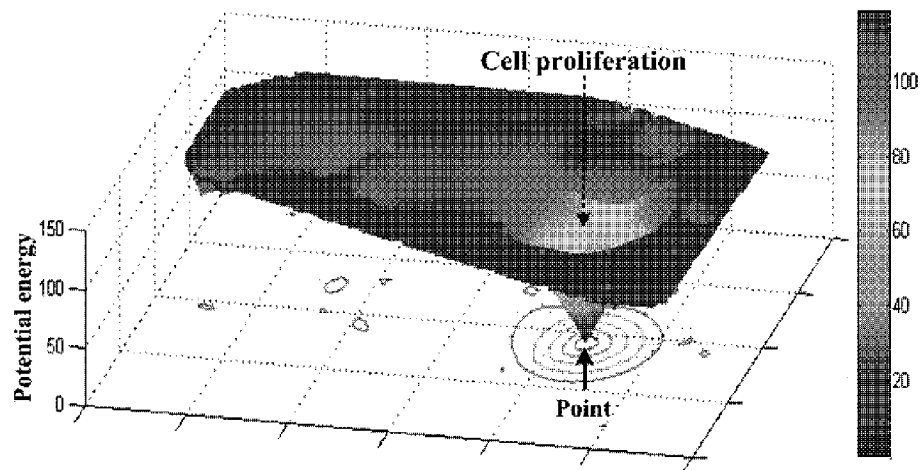


[Fig. 3d]

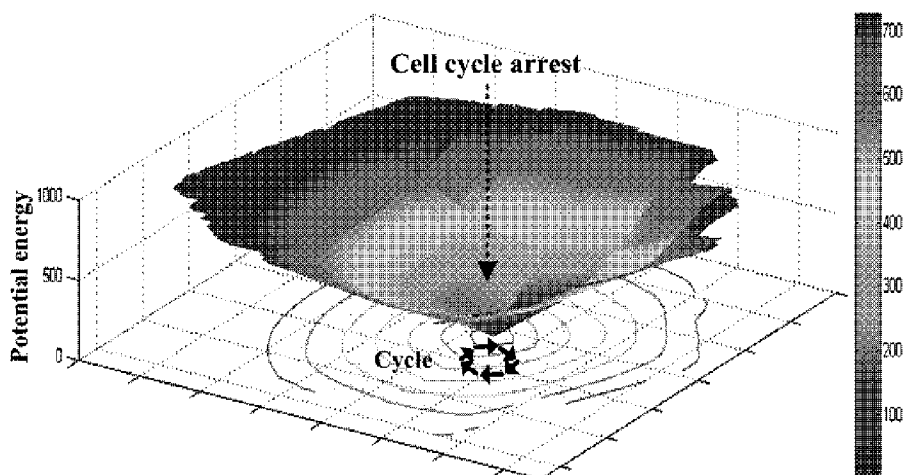


[illegible]

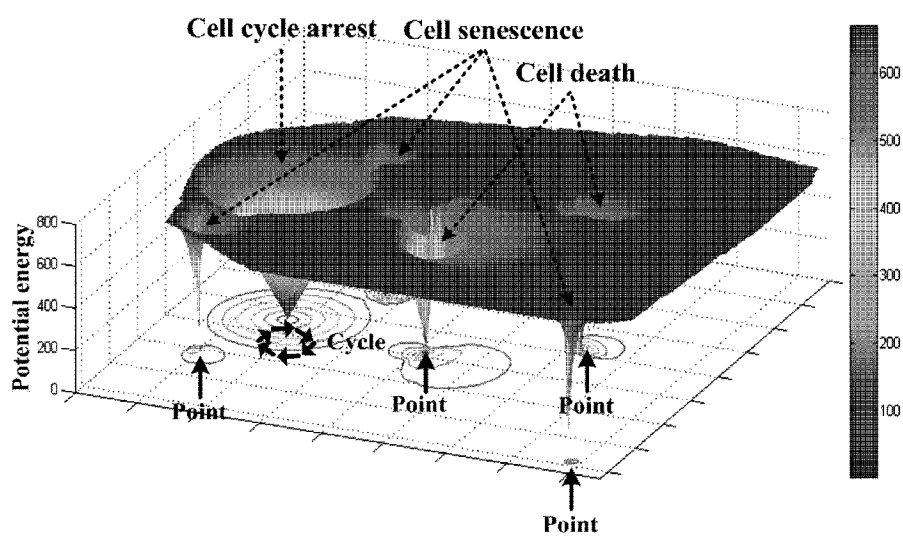
[Fig. 5a]



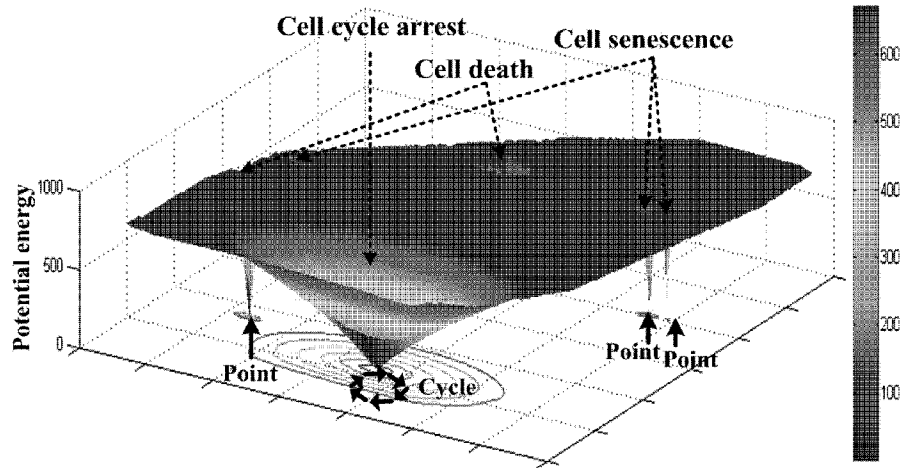
[Fig. 5b]



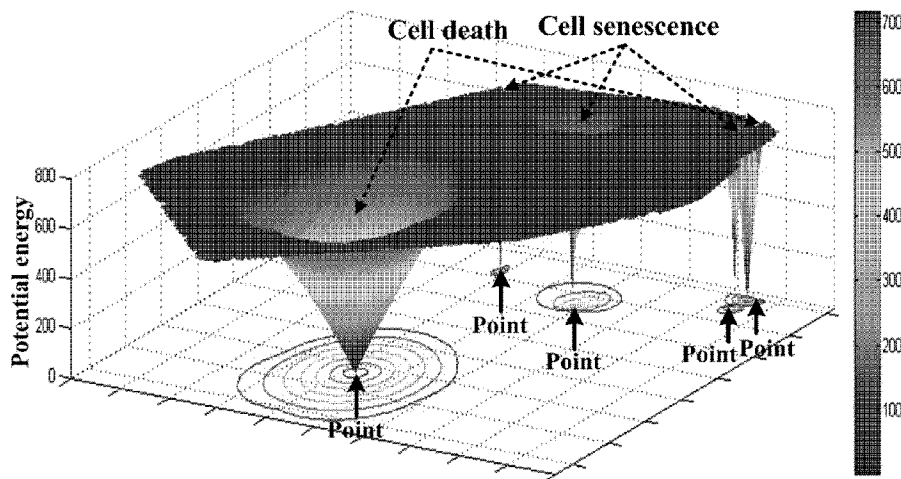
[Fig. 6a]



[Fig. 6b]



[Fig. 6c]



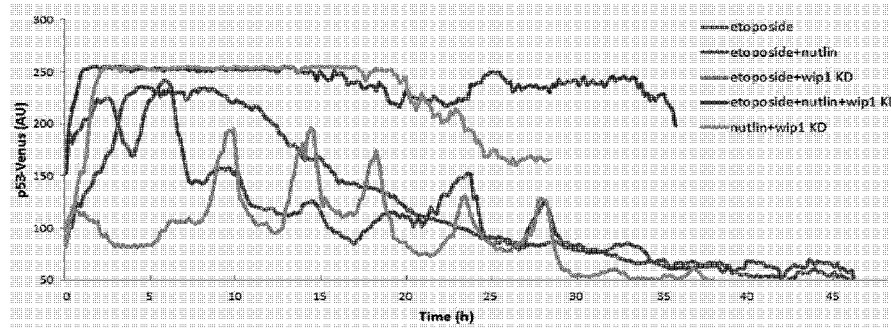
[Fig. 7]

	회복 가능	회복 불가능
DNA 손상 정도	낮음	높음
어트랙터 유형	사이클릭 어트랙터	포인트 어트랙터
p53 (활성화 양상)		
카스파제 (활성화 양상)	or	
p53 기능	세포 생존	세포 사멸

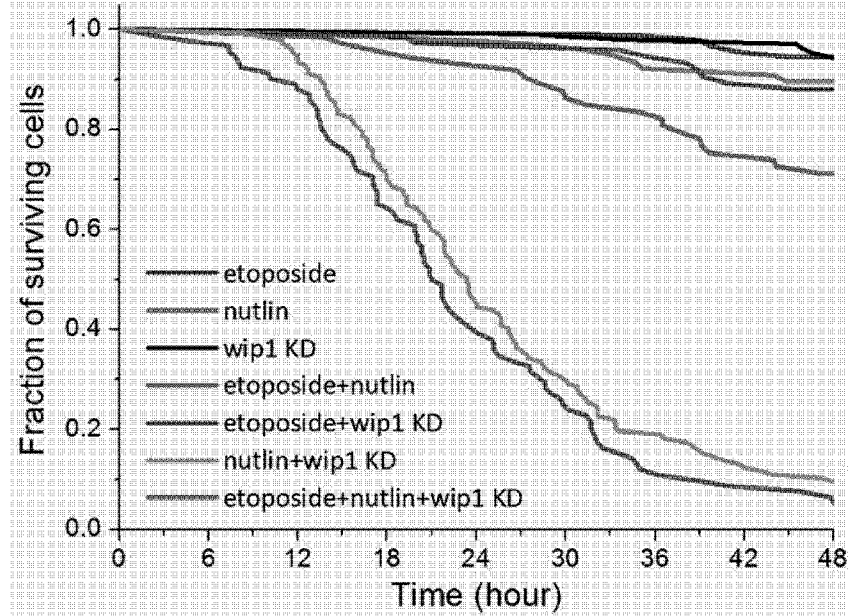
[Fig. 8]



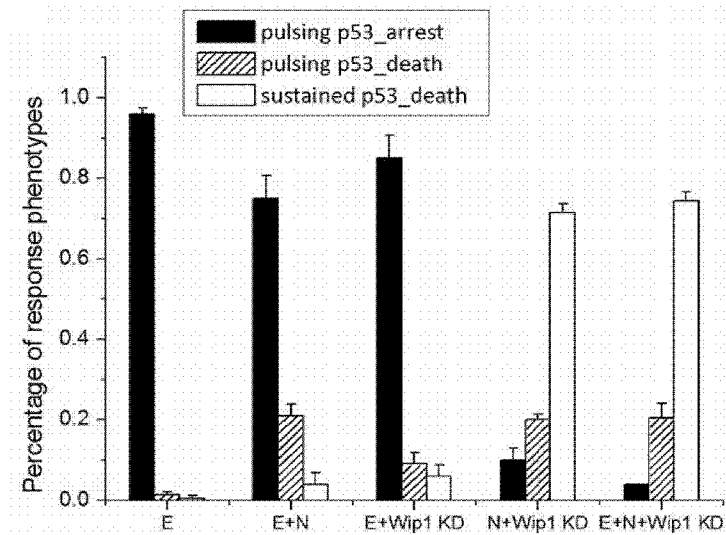
[Fig. 9a]



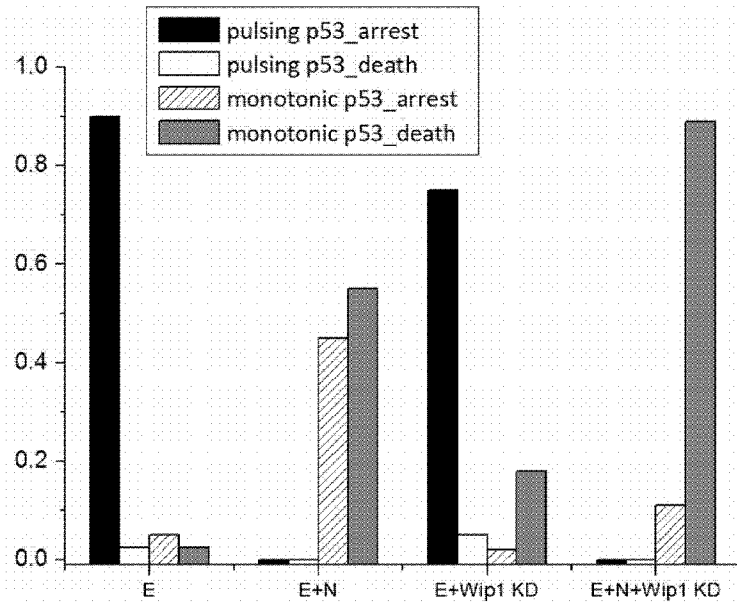
[Fig. 9b]



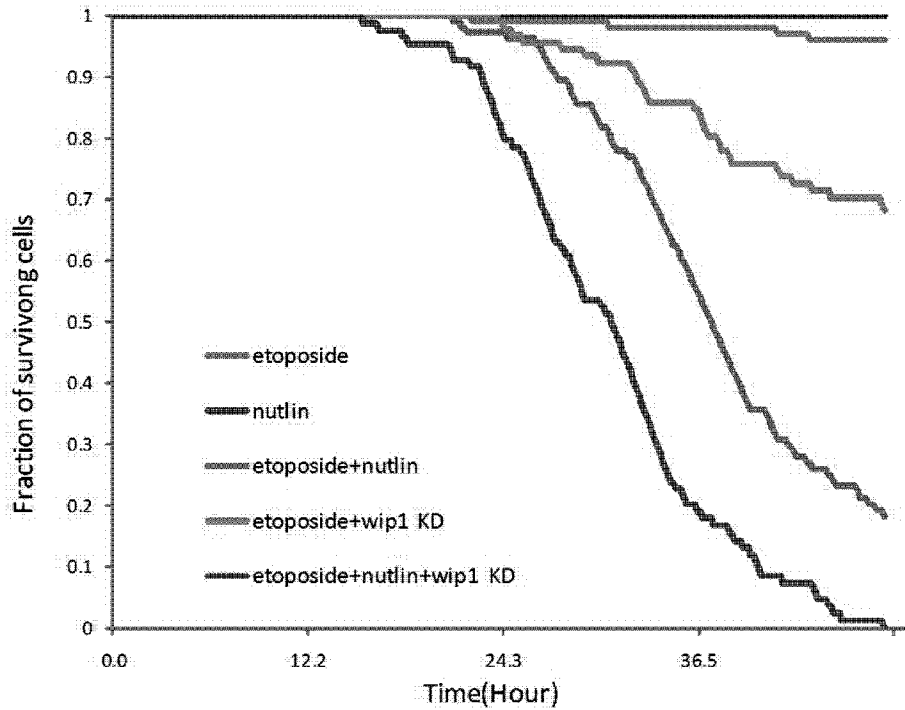
[Fig. 9c]



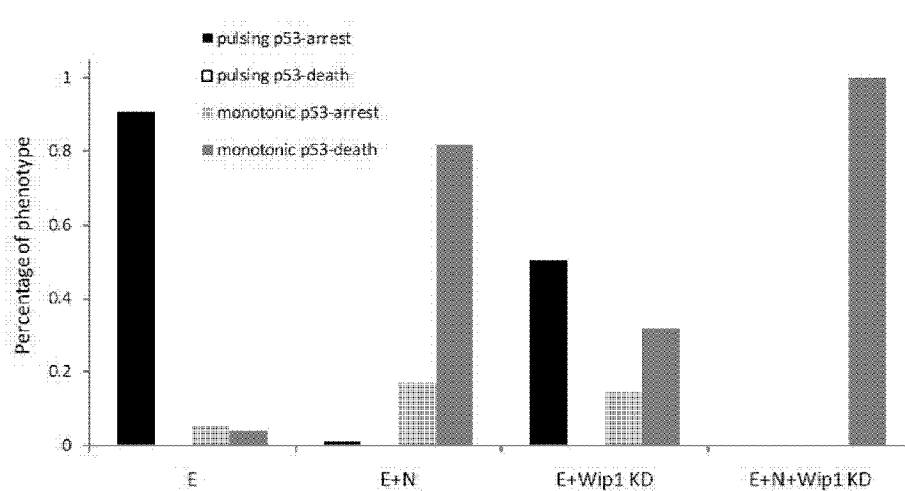
[Fig. 10a]



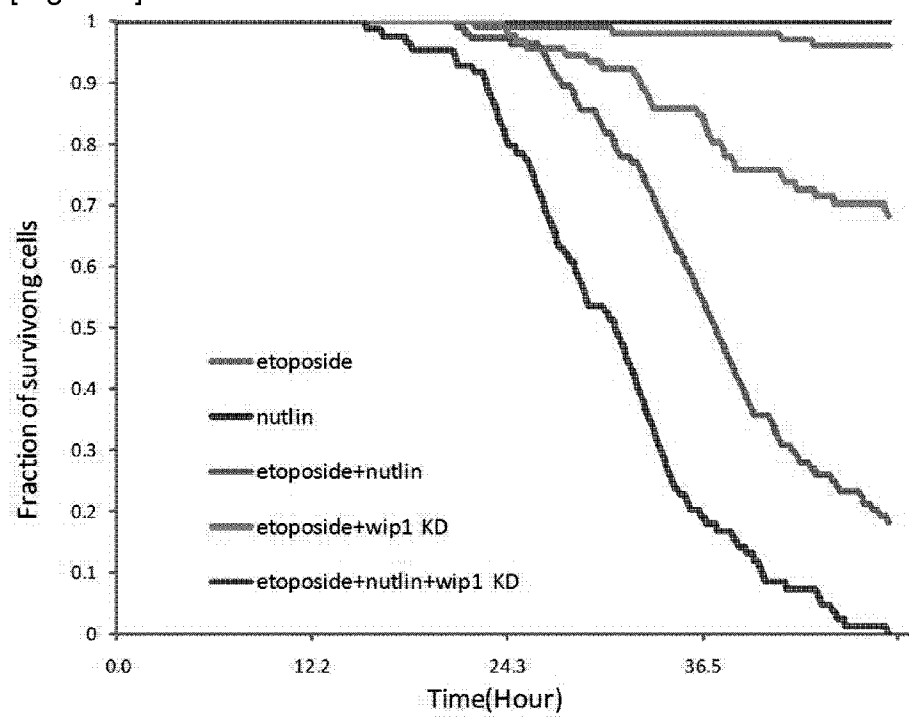
[Fig. 10b]



[Fig. 11a]



[Fig. 11b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/010659

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.: **23-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23 to 28 pertain to a method for treatment of the human, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/010659**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/7105(2006.01)i, A61K 31/7088(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 31/7105; A61K 31/443; A61K 31/47

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: Wip1, Mdm2, tumor, antitumor, DNA damage-inducing agent

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUSS, M. C. et al., "HDM2 promotes WIP1-mediated medulloblastoma growth", Neuro-Oncology, 29 February 2012(E-pub.), vol. 14, no. 4, pages 440-458. See abstract; pages 452, 453 and 455.	1-5,12-16
Y		6-11,17-22
Y	US 7834016 B2 (LACRAMPE, J. F. A. et al.) 16 November 2010 See column 1; claims 1, 17 and 18.	6-11,17-22
A	SPINNLER, C. et al., "Abrogation of Wip1 expression by RITA-activated p53 potentiates apoptosis induction via activation of ATM and inhibition of HdmX", Cell Death and Differentiation, 2011, vol. 18, pages 1736-1745. See abstract; pages 1743 and 1744.	1-22
A	ZHANG, X. et al., "Phosphorylation and degradation of MdmX is inhibited by Wip1 phosphatase in the DNA damage response", Cancer Res., 2009, vol. 69, no. 20, pages 7960-7968. See abstract and pages 7963-7965.	1-22
A	LU, X. et al., "The Wip1 phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop", Cancer Cell, 2007, vol. 12, pages 342-354. See abstract and pages 350-352.	1-22



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

30 MAY 2013 (30.05.2013)

Date of mailing of the international search report

30 MAY 2013 (30.05.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/010659

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7834016 B2	16.11.2010	AP 200703947 D	30.04.2007
		AR 053412 A1	09.05.2007
		AT 474833 T	15.08.2010
		AU 2005-286525 A1	30.03.2006
		AU 2005-286525 B2	16.06.2011
		BR P10515594 A	29.07.2008
		CA 2579915 A1	30.03.2006
		CA 2579915 C	22.06.2010
		CN 101023074 A	22.08.2007
		CR 9081 A	24.11.2008
		DE 602005022472 D1	02.09.2010
		DK 1809622 T3	08.11.2010
		EA 012452 B1	30.10.2009
		EA 200700699 A1	31.08.2007
		EP 1809622 A1	25.07.2007
		EP 1809622 B1	21.07.2010
		ES 2349358 T3	30.12.2010
		HR 20100561 T1	30.11.2010
		IL 182009 D	24.07.2007
		JP 2008-513532 A	01.05.2008
		JP 5156378 B2	06.03.2013
		KR 10-2007-0058622 A	08.06.2007
		MX 2007003375 A	07.05.2007
		MY 136800 A	28.11.2008
		NO 20072058 A	23.04.2007
		NZ 553646 A	30.07.2010
		SG 155941 A1	29.10.2009
		SI 1809622 T1	30.11.2010
		US 2008-0039472 A1	14.02.2008
		US 2011-0053937 A1	03.03.2011
		US 8404683 B2	26.03.2013
		WO 2006-032631 A1	30.03.2006
		ZA 200702341 A	29.09.2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7105(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7105; A61K 31/443; A61K 31/47

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: Wip1, Mdm2, 종양, 항종양, DNA 손상 유도제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	BUSS, M. C. 외 4명, "HDM2 promotes WIP1-mediated medulloblastoma growth", Neuro-Oncology, 2012년 02월 29일(E-pub.), 14권, 4호, 페이지 440-458. 초록; 페이지 452, 453 및 455 참조.	1-5,12-16
Y		6-11,17-22
Y	US 7834016 B2 (LACRAMPE, J. F. A. 외 10명) 2010.11.16. 컬럼 1; 청구항 1, 17 및 18 참조.	6-11,17-22
A	SPINNLER, C. 외 8명, "Abrogation of Wip1 expression by RITA-activated p53 potentiates apoptosis induction via activation of ATM and inhibition of HdmX", Cell Death and Differentiation, 2011년, 18권, 페이지 1736-1745. 초록; 페이지 1743 및 1744 참조.	1-22
A	ZHANG, X. 외 6명, "Phosphorylation and degradation of MdmX is inhibited by Wip1 phosphatase in the DNA damage response", Cancer Res., 2009년, 69권, 20호, 페이지 7960-7968. 초록 및 페이지 7963-7965 참조.	1-22
A	LU, X. 외 5명, "The Wip1 phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop", Cancer Cell, 2007년, 12권, 페이지 342-354. 초록 및 페이지 350-352 참조.	1-22



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

“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

2013년 05월 30일 (30.05.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 05월 30일 (30.05.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 82-42-481-8740



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: 23-28
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 제23 내지 제28항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7834016 B2	2010.11.16	AP 200703947 D	2007.04.30
		AR 053412 A1	2007.05.09
		AT 474833 T	2010.08.15
		AU 2005-286525 A1	2006.03.30
		AU 2005-286525 B2	2011.06.16
		BR PI0515594 A	2008.07.29
		CA 2579915 A1	2006.03.30
		CA 2579915 C	2010.06.22
		CN 101023074 A	2007.08.22
		CR 9081 A	2008.11.24
		DE 602005022472 D1	2010.09.02
		DK 1809622 T3	2010.11.08
		EA 012452 B1	2009.10.30
		EA 200700699 A1	2007.08.31
		EP 1809622 A1	2007.07.25
		EP 1809622 B1	2010.07.21
		ES 2349358 T3	2010.12.30
		HR 20100561 T1	2010.11.30
		IL 182009 D	2007.07.24
		JP 2008-513532 A	2008.05.01
		JP 5156378 B2	2013.03.06
		KR 10-2007-0058622 A	2007.06.08
		MX 2007003375 A	2007.05.07
		MY 136800 A	2008.11.28
		NO 20072058 A	2007.04.23
		NZ 553646 A	2010.07.30
		SG 155941 A1	2009.10.29
		SI 1809622 T1	2010.11.30
		US 2008-0039472 A1	2008.02.14
		US 2011-0053937 A1	2011.03.03
		US 8404683 B2	2013.03.26
		WO 2006-032631 A1	2006.03.30
		ZA 200702341 A	2010.09.29