



- (51) 국제특허분류:
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005461
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 20일 (20.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0071735 2013년 6월 21일 (21.06.2013) KR
10-2014-0075104 2014년 6월 19일 (19.06.2014) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 140-893 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 남도현 (NAM, Do Hyun); 135-543 서울시 강남구 개포로 109길 69 LG 자이아파트 101동 2002호, Seoul (KR). 주경민 (JOO, Kyeung Min); 158-755 서울시 양천구 목동동로 350 목동신시가지아파트 510동 1401호, Seoul (KR). 이정일 (LEE, Jung Il); 138-788 서울시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수촌아파트 256동 510호, Seoul (KR). 정병창 (JUNG, Byong Chang); 135-808 서울시 강남구 언주로 101 쌍용개포아파트 802호, Seoul (KR). 이혜원 (LEE, Hye Won); 423-736

경기도 광명시 디지털로 63 철산 주공아파트 1214동 205호, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

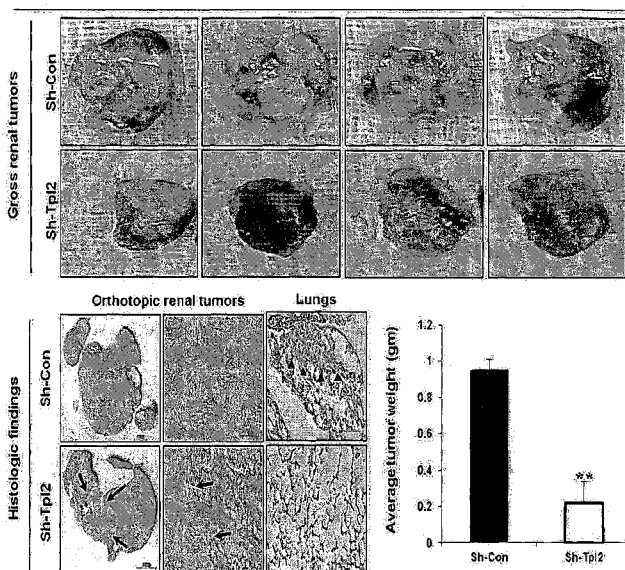
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING TP12 EXPRESSION INHIBITOR OR ACTIVITY INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING RENAL CELL CANCER

(54) 발명의 명칭 : Tpl2의 발현억제제 또는 활성억제제를 유효성분으로 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

Fig. 3



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing a Tpl2 expression inhibitor or an activity inhibitor as an active ingredient for preventing or treating renal cancer. When the expression or activity of Tpl2 according to the present invention is inhibited in renal cell cancer cells, the proliferation, anoikis resistance, cell adhesion capacity, cell migration capacity, and cell invasion capacity of cancer cells are degraded. When the Tpl2 expression-inhibited renal cell cancer cells are transplanted into a mouse, the tumor growth and tumor metastasis to the lungs are inhibited. Therefore, the Tpl2 expression inhibitor or activity inhibitor can be useful in preventing or treating renal cell cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 Tpl2의 발현억제제 또는 활성억제제를 유효성분으로 포함하는 신장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 Tpl2가 신세포암 세포에서 발현 또는 활성을 저해되는 경우, 암세포의 증식, 아노키스 저항성(anoikis resistance), 세포부착능, 세포의 이동능 및 침윤능력이 저해되고, 상기 Tpl2의 발현이 억제된 신세포암 세포를 마우스에 이식한 경우, 마우스의 신장에서 종양 성장 및 폐로의 전이가 억제됨으로써, Tpl2 발현 또는 활성 억제제는 신세포암에 대한 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

Tp12 의 발현억제제 또는 활성억제제를 유효성분으로 포함하는
신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HI12C-0388-020013에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “보건의료기술연구개발사업”,
10 연구과제명은 “난치성뇌암에 대한 유전자 재조합 자가 중간엽줄기세포의 임상적용을 위한 최종 단계의 전임상연구”, 주관기관은 서울대학교산학협력단, 연구기간은 2012.08.01 ~ 2014.07.31이다.

본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HI09C1552에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은
15 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “보건의료기술연구개발사업”, 연구과제명은 “선도형 난치암연구사업단”, 주관기관은 삼성서울병원, 연구기간은 2013.12.01 ~ 2014.11.30이다.

본 특허출원은 2013 년 6 월 21 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0071735 호에 대하여 우선권을 주장하며,
20 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 Tp12 의 발현억제제 또는 활성억제제를 유효성분으로 포함하는 신 세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

25 신세포암(Renal cell carcinoma; RCC)은 신장암 중 가장 일반적인 암으로, 최근 30 년 동안 발병률과 사망률이 꾸준히 증가하고 있다. 신세포암은 미국에서는 성인암의 3%를 차지하며, 연간 약 32000 명 정도의 새로운 환자가 발생하고 약 12000 명 정도가 신세포암으로 인해 사망하는 것으로 추정되고 있으며 전 세계적으로 매년 그 발생빈도가 증가하고 있다.
30 우리나라의 경우 2002 년 중앙암등록 자료에 따르면, 1,587 명의 환자가 새로 등록되어 전체 암발생의 1.6%를 차지하고 있습니다. 특히 남성이

여성에 비해 2 배 정도 많이 발생하는데, 2002 년에 남성에서 1104 명의 환자가 발생하여 남성암의장기별 등록분율 2.0%로 열 번째로 많이 발생하는 암이다. 현재까지 알려진 신세포암의 치료방법은 암의 진행도와 환자의 연령, 전신상태, 동반된 다른 질환의 유무 등에 따라 결정되는데, 일반적으로 방사선치료나 항암화학요법에 잘 반응하지 않아 현재로는 수술로 암을 제거하는 것이 최선이나, 출혈, 감염, 수술 후 통증과 함께 장폐색, 기흉, 색전증 등의 부작용이 발생할 수 있다. 면역화학요법 시행시에도면역억제제에 대한 과민반응, 오한 및 발열, 오심 및 구토, 전신 쇠약감, 식욕부진, 두통, 빈혈, 백혈구감소증 등이 발생할 수 있다.

10 한편, Tpl2(tumor progression locus 2)는 MAPK 및 JNK(c-Jun N-terminal Kinase) 경로를 자극하는 유일한 MAP3K8(mitogen activated protein kinase kinase kinase)이며, AP-1(activator protein 1)및 NF- κ B를 상향 조절한다. 상기 Tpl2 는 면역 시스템과 관련이 있음이 밝혀졌으며, Tpl2 는 다양한 종양에서 과발현되고, 형질전환 및 증식을
15 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한, Tpl2 는 다양한 종양 세포의 전이랑 관련이 있는 것으로 알려져 있어, 종양 형성 유전자(ongogene)의 일종으로 간주될 수 있으나, 신세포 암에서 Tpl2 의 정확한 기작은 아직 알려진 바가 없다.

이에 본 발명자들은 신세포 암세포인 Caki-1 세포에서 Tpl2 를 억제한 경우, 세포의 증식, 세포의 이동능력, 침윤능 및 부착능이 저해되고, 상기 Tpl2 가 억제한 Caki-1 세포를 마우스 모델에 이식하는 경우, 종양
20 성장 및 폐로의 전이가 억제됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명의 내용】

25 【해결하고자 하는 과제】

본 발명은 Tpl2 의 발현억제제 또는 활성억제제를 유효성분으로 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 상기 조성물의 치료적 유효량을 개체에 투여하는단계를 포함하는, 신세포암의 예방 또는 치료 방법을 제공하고자
30 한다.

또한, 본 발명은 후보물질을 생물학적 시료에 처리하여 Tpl2 의 발현양 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝방법을 제공하고자 한다.

5 【과제의 해결 수단】

본 발명은 Tpl2 의 발현억제제 또는 활성억제제를 유효성분으로 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 조성물의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신세포암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 후보물질을 생물학적 시료에 처리하여 Tpl2 의 발현양 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝방법을 제공한다.

【발명의 효과】

15 본 발명에 따른 Tpl2 가 신세포암 세포에서 발현 또는 활성이 저해되는 경우, 암세포의 증식, 아노이키스 저항성(anoikis resistance), 세포부착능, 세포의 이동능 및 침윤능력이 저해되고, 상기 Tpl2 의 발현이 억제된 신세포암 세포를 마우스에 이식한 경우, 마우스의 신장에서 종양 성장 및 폐로의 전이가 억제됨으로써, Tpl2 발현 또는 활성 억제제가
20 신세포암에 대한 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 신세포암과 Tpl2 의 연관성을 확인한 도이다(A:다양한 단계의 신세포암 환자에서 Tpl2 발현 수준 비교; B:Tpl2 의 발현과 생존률 관계를
25 나타냄)

도 2 는 웨스턴 블롯 및 정량적 RT-PCR(qRT-PCR)을 이용하여 Caki-1-sh-Tpl2 세포(Tpl2 에 대한 shRNA 가 형질도입된 세포)와 대조군의 Tpl2 발현양을 비교한 도이다.

도 3 는 Caki-1-sh-Tpl2 세포를 마우스에 이식한 경우, 종양의 성장을
30 확인한 도이다.

도 4 는 Caki-1-sh-Tp12 세포를 마우스에 이식한 경우, 폐로의 전이를 확인한 도이다.

도 5 는 Caki-1 세포에서 Tp12 억제제의 세포 신호 경로에 대한 영향을 확인한 도이다.

5 도 6 은 IL-1 β 를 Caki-1 세포에 처리한 경우, Tp12 억제제의 세포 신호 경로에 대한 영향을 확인한 도이다.

도 7 은 Caki-1 세포에서 shRNA 로 Tp12 를 억제한 경우, 세포의 증식능을 확인한 도이다.

10 도 8 은 Caki-1 세포에서 Tp12 키나아제억제제를 처리한 경우, 세포의 증식능을 확인한 도이다.

도 9 는 Caki-1 세포에서 Tp12 를 억제한 경우, 세포 주기의 변화를 나타난 도이다.

도 10 은 Caki-1 세포에서 shRNA 로 Tp12 를 억제한 경우, 클로니형성능을 확인한 도이다.

15 도 11 은 Caki-1 세포에서 Tp12 키나아제억제제를 처리한 경우, 클로니형성능을 확인한 도이다.

도 12 는 Caki-1 세포에서 Tp12 억제제와 아노이키스 저항성과 관련성을 확인한 도이다.

20 도 13 은 Caki-1 세포에서 Tp12 억제제와 세포 부착증과의 관련성을 확인한 도이다.

도 14 는 상처 치료 어세이(Wound healing assay)를 이용한 Caki-1 세포에서 shRNA 로 Tp12 를 억제한 경우, 세포의 이동능을 확인한 도이다.

도 15 는 상처 치료 어세이를 이용한 Caki-1 세포에서 Tp12 키나아제억제제를 처리한 경우, 세포의 이동능을 확인한 도이다.

25 도 16 은 트랜스-웰 이동 및 침윤 어세이(Trans-well migration and invasion assay)를 이용한 Caki-1 세포에서 shRNA 로 Tp12 를 억제한 경우, 세포의 이동 및 침윤능을 확인한 도이다.

30 도 17 은 트랜스-웰 이동 및 침윤 어세이를 이용한 Caki-세포에서 Tp12 키나아제억제제를 처리한 경우, 세포의 이동 및 침윤능을 확인한 도이다.

도 18 은 2 차원 배양을 이용한 Caki-1 세포에서 Tpl2 를 억제한 경우, 세포의 증식능을 확인한 도이다.

도 19 및 도 20 은 3 차원 배양 시스템에서 Caki-1 세포의 배양 결과를 나타낸 도이다.

5 도 21 은 3 차원 배양 시스템에서 Caki-1 세포의 Tpl2 가 억제된 경우, ERK 활성의 정도를 확인한 도이다.

도 22 는 Caki-1 세포에서 shRNA 로 Tpl2 를 억제하고 CXCL12 를 처리한 경우, CXCR4 매개 세포 신호 경로에 대한 영향을 확인한 도이다.

10 도 23 은 Caki-1 세포에서 Tpl2 키나아제억제제 및 CXCL12 를 처리한 경우, CXCR4 매개 세포 신호 경로에 대한 영향을 확인한 도이다.

도 24 는 Tpl2 가 억제된 Caki-1 세포에 CXCL12 를 처리한 경우, 세포의 이동 및 침윤능을 확인한 도이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

15 본 발명은 Tpl2(tumor progression locus 2)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

20 본 발명의 Tpl2 단백질의 발현 억제제는 Tpl2 유전자의 mRNA 에 상보적으로 결합하는 안티센스뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상 일 수 있고, 상기 Tpl2 단백질의 활성 억제제는 Tpl2 의 활성을 촉진억제하는 단백질 또는 Tpl2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 25 기질유사체, 앵타머, 천연추출물 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명에서 이용되는 Tpl2 발현억제제 또는 활성억제제는 신세포암의 증식, 아노이키스 저항성, 세포부착능, 세포의 이동능 및 침윤능력을 저해시킴으로써 종양의 성장 및 폐로의 전이를 억제한다.

30 본 명세서에서 용어 "안티센스뉴클레오타이드"란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의

유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA 의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 서열은 Tpl2 mRNA 에 상보적이고 Tpl2 mRNA 에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, Tpl2 mRNA 의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 단쇄알킬, 시클로알킬, 단쇄헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸모이어티, 옥타데실아민, 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제 5,138,045 호, 제 5,218,105 호 및 제 5,459,255 호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA 와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

안티센스올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I 를

5 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA 가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA 가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA 는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

10 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스올리고뉴클레오타이드의 디자인은 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다(Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Antisense RNA gene therapy for studying and

15 modulating biological processes. Cell. Mol. Life Sci., 55:334-358(1999).

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 Tpl2 발현억제제는 Tpl2 유전자에 상보적인 서열을 포함하는 shRNA 또는 siRNA 이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 Tpl2 발현억제제는

20 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 shRNA 를 포함한다.

본 발명에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA)” 는 견고한 헤어핀 턴을 만드는 RNA 의 서열을 나타내며, 이는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 사일런스시키는 데 이용될 수 있다. shRNA 는

25 세포 도입용 벡터를 이용하여 shRNA 를 발현할 수 있는 U6 프로모터를 주로 이용한다. 이러한 벡터는 항상 딸세포로 전달되어 유전자 사일런싱이 유전될 수 있도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작(machinery)인 siRNA 로 분해되어 RNA-유도 사일런싱 복합체(RNA-induced silencing complex)에 결합된다. 상술한 복합체는 이에 결합된 siRNA 에

30 상응하는(matched) mRNA 에 결합하여 분해시킨다. shRNA 는 RNA 폴리머라제 III 에 의해 전사되며, 포유동물 세포에서 shRNA 생산은 세포가 shRNA 를

바이러스 공격으로 인식하여 방어 수단을 찾는 것처럼 인터페론 반응을 야기시킬 수도 있다. 또한, shRNA 는 식물 및 다른 시스템에서도 이용될 수 있으며 U6 프로모터가 반드시 필요한 것은 아니다. 식물의 경우에는 매우 강력한 연속적인 발현 능력을 보유한 전통적인 프로모터인

5 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터가 이용될 수 있다.

본 발명에서 용어 “siRNA(small interference RNA)” 는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA 는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에

10 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA 는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA 를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(Degot S, et al. 2002; Degot S, et al. 2004; Ballut L, et al. 2005).

본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥과 안티센스 가닥이 서로

15 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 상보적은 100% 상보적인 경우 뿐만 아니라 불완전한 상보성도 포괄하는 의미이며, 바람직하게는 90%의 상보성, 보다 바람직하게는 98%의 상보성,

20 가장 바람직하게는 100%의 상보성을 의미한다. 본 명세서에서 100% 상보성을 표현하는 경우에는 완전 상보적(completely complementary)으로 특별하게 기재된다. siRNA 는 RNA 끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여

25 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 보다 더 바람직하게는 20 내지 70 염기이다.

상기 siRNA 는 Tpl2 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30 머(mer)의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열은

30 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 25 개의 염기로 구성되는 것이 바람직하다.

siRNA 말단 구조는 Tpl2 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' -말단 돌출 구조와 5' -말단 돌출 구조 모두 가능하다. 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프(stem-and-loop) 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi 를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 는 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 포함된 서열을 가진다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물의 유효성분인 Tpl2 유전자에 특이적으로 결합하는 RNAi(RNA interference) 분자는 유전자 캐리어에 삽입되어 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유전자 캐리어는 플라스미드, 재조합 아데노바이러스(Thimmappaya, B. et al., Cell, 31:543-551(1982); 및 Riordan, J. R. et al., Science, 245:1066-1073(1989)), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV)(LaFace et al., Virology, 162:483-486(1988), Zhou et al., Exp. Hematol. (NY), 21:928-933(1993), Walsh et al., J. Clin. Invest., 94:1440-1448(1994) 및 Flotte et al., Gene Therapy, 2:29-37(1995)), 레트로바이러스(Mann et al., Cell, 33:153-159(1983)), 렌티바이러스(Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Chamber R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415(1995)), 배시니아 바이러스(Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999)), 리포솜 또는 니오솜이며, 가장 바람직하게는 재조합 렌티바이러스이다.

본 발명에서 용어 "안티센스 뉴클레오타이드"란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA 의 단백질로의 번역을

저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스올리고뉴클레오타이드 서열은 Tpl2 mRNA 에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, Tpl2 mRNA 의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

5 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내 40 염기이다.

상기 안티센스올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은

10 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 단쇄알킬, 시클로알킬, 단쇄헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-

15 메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스올리고뉴클레오타이드는 상기 안티센스올리고뉴클레오타이드의

20 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨주게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸모이어티, 옥타데실아민, 핵실아미노-카르보닐-

25 옥시콜레스테롤모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제 5,138,045 호, 제 5,218,105 호 및 제 5,459,255 호). 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스

30 핵산과 표적 mRNA 와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

안티센스올리고뉴클레오타이드의 경우, 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I 를

5 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA 가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA 가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA 는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

10 상기 안티센스뉴클레오타이드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA 의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA 에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스뉴클레오타이드의 특성은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다.

15 안티센스뉴클레오타이드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스뉴클레오타이드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오타이드 화학 및 향상된 세포흡착, 표적결합의 친화도

20 및 뉴클레아제(nuclease) 내성을 나타내는 뉴클레오타이드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스뉴클레오타이드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.

상기 Tpl2 단백질의 활성 억제제는 Tpl2 의 활성을 촉진억제하는 단백질 또는 Tpl2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드

25 모방체, 기질유사체, 앵타머, 천연추출물 또는 항체이다.

본 발명에서 이용될 수 있는 Tpl2 단백질에 특이적으로 결합하는 활성을 갖는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. Tpl2 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European

30 Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제 4,816,56 호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature,

352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991 에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 Tpl2 단백질을 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

Tpl2 에 특이적으로 결합하여 Tpl2 의 활성을 억제할 수 있는 펩타이드는 당업계에 공지된 통상의 방법, 예를 들어 파아지 디스플레이 방식으로 얻을 수 있다(Smith GP, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". Science 228 (4705):13151317(1985); Smith GP, Petrenko VA, "Phage display". Chem. Rev. 97(2):391410(1997)).

상기 Tpl2 의 활성을 촉진억제하는 단백질 또는 Tpl2 에 특이적으로 결합하는 화합물은 Tpl2 키나아제 억제제가 바람직하고, 보다 더 바람직하게는, 4-(3-클로르-4-플루오로페닐아미노)-6-(피리딘-3-일-메틸아미노)-3-시아노-1,7-나프티리딘, 8-브로모-4-(3-클로르-4-플루오로페닐아미노)-6-[(1-메틸-1 H-이미다졸-4- 일)메틸아미노]퀴놀린-3-카르보니트릴, 4-(시클로헥실아미노)-6-(피리딘-3-일-메틸아미노)-3-시아노-[1,7]-나프티리딘, [1,7]나프티리딘-3-카르보니트릴 및 퀴놀린-3-카르보니트릴을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 펩티드 모방체(Peptide mimetics)는 Tpl2 단백질의 결합 도메인을 억제하여 Tpl2 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 펩티드 모방체는 펩티드 또는 비펩티드일 수 있고, psi 결합(Benkirane, N., et al. J.Biol. Chem., 271:33218-33224, 1996)과 같은, 비펩티드 결합에 의해

결합된 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, "구조적으로 강제된(conformationally constrained)" 펩티드, 사이클릭모방체(cyclic mimetics), 적어도 하나의 엑소사이클릭 도메인(exocyclic domain), 결합 부분(결합 아미노산) 및 활성 부위를 포함하는 사이클릭모방체일 수 있다.

- 5 펩티드 모방체는 UBAP2(Ubiquitin-Associated Protein 2) 단백질의 이차구조 특성과 유사하게 구조화되고 항체(Park, B. W. et al. Nat Biotechnol 18, 194-198, 2000) 또는 수용성 수용체(Takasaki, W. et al. Nat Biotechnol 15, 1266-1270, 1997)와 같은 거대한 분자의 억제 특성을 모방할 수 있으며, 천연의 길항제와 동등한 효과로 작용할 수 있는 신규한
- 10 소분자일 수 있다(Wrighton, N. C. et al. Nat Biotechnol 15, 1261-1265, 1997).

상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고 뉴클레오티드 (oligonucleotide) 라이브러리를 이용한

15 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다(C. Tuerand L. Gold, Science 249, 505 - 510, 2005; A. D. Ellington and J. W. Szostak, Nature 346, 818 - 822, 1990; M. Famulok, et. al., Acc. Chem. Res. 33, 591 - 599, 2000; D. S. Wilson and Szostak, Annu. Rev. Biochem. 68, 611 - 647, 1999). 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적의 기능을 차단할 수 있다.

20 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적의 기능을 차단할 수 있다.

상기 항체는 Tpl2 에 특이적이고 직접적으로 결합하여 Tpl2 의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 Tpl2 에 특이적으로 결합하는 항체로는 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 모노클로날(monoclonal) 항체를

25 사용하는 것이 바람직하다. 상기 Tpl2 에 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작하여도 무방하며, 상업적으로 알려진 Tpl2 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 상기 항체는 당업자에게 알려진 종래 방법에 따라 면역원인 Tpl2 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 랫트, 양, 토끼와 같은

30 포유동물을 포함한다. 면역원은 근육 내, 복강 내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께

투여할 수 있다. 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 형성된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하여 항체를 분리할 수 있다.

본 발명에 따른 Tpl2 의 발현 또는 활성 억제제는 Tpl2 의 발현 또는 활성을 억제하는 효과를 우수하게 나타냄으로써, 신세포암의 예방 또는
5 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 Tpl2 의 발현 또는 활성 억제 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1 종 이상 함유할 수 있다.

또한, 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에
10 적용) 할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 체질 특이성, 제제의 성질 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 Tpl2 의 발현 또는 활성 억제제의 일일 투여량은 약 0.001~1000mg/kg, 바람직하게는 약 0.1~500mg/kg 이나, 임상실험결과에 따라 가감될 수 있으며, 하루 일회 내지
15 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여 여러 가지 제제로 제형화될 수 있으며, 부형제를 첨가하여 다양한 형태로 제형화될 수 있다. 상기 부형제는 비독성이고 불활성인 약제학적으로 적합한 고상, 준고상 또는 액상의 모든 유형의 제형 보조물로서, 예를 들면, 충전제, 중량제, 결합제,
20 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면활성제 또는 희석제 등을 들 수 있다.

본 발명의 상기 약학적 조성물은 투약 단위 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들면, 상기 제형화된 투약 단위는 상기 유효 화합물의 1 일 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4 배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4 배를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 개별 투약량은 유효 화합물이 1 회에 투여되는
25 양을 함유하며, 이는 통상 1 일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4 배에 해당한다.

본 발명의 상기 약학적 조성물은 정제, 피복 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 좌약, 액제, 현탁액제 및 에멀전제, 페이스트제 (pastes), 연고제, 겔제, 크림제, 로션제, 산제 또는 분무제로 제형화될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 조성물의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 신세포암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

본 발명의 치료방법은 본 발명의 항암 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1 일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

또한, 경우에 따라, 본 발명의 조성물과 함께 공지의 항암제를 병용 투여하여 항암 효과를 증대시킬 수 있다.

본 발명은 Tpl2 를 발현하는 암에 걸린 임의의 포유동물에 적용가능하며, 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

20

한, 본 발명은

1)후보물질을 생물학적 시료에 처리하는 단계;

2)상기 제 1)단계의 생물학적 시료에서 Tpl2 의 mRNA 또는 단백질 발현양의 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

25

상기 시료는 암에 걸린 동물의 혈액, 소변, 타액, 조직을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

상기 Tpl2 의 mRNA 발현양 변화를 측정하는 방법은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA;

30

RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩을 포함한다.

상기 Tpl2 단백질의 발현양 변화를 측정하는 방법은 웨스턴 블롯팅, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)을 포함한다.

본 발명의 다른 일 양태에 따르면 다음 단계를 포함하는 신세포암의 진단방법을 제공한다:

(a) 생물학적 시료로부터 Tpl2 의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 측정 결과를 분석하는 단계로서 측정된 Tpl2 의 발현양 또는 활성이 정상 대조구 시료의 것보다 높을 경우 증가된 신세포암 위험도를 갖는 것으로 판단한다.

본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

본 명세서에서 용어 “(Tpl2의 발현양 또는 활성) 증가”는 건강한 사람들에 비해 Tpl2의 발현양 또는 활성이 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 바람직하게는 70% 이상 증가된 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 30% 이상 증가된 것을 의미한다.

생물학적시료중의Tpl2 유전자의발현수준은 mRNA 또는이단백질양을확인함으로써알수있으며, 생물학적시료에서 mRNA와단백질을분리하는과정은공지의공정을이용하여수행할수있으며, mRNA와 단백질의양은다양한방법으로측정할수있다.

본발명에서 "생물학적시료"란간단히채취하여Tp12유전자의 mRNA 또는이의단백질수준의차이를검출할수있는체액즉, 뇨, 타액, 혈액, 혈장, 혈청등을포함한다.

본발명에서 "mRNA

5 수준측정"이란Tp12유전자를검출하기위하여생물학적시료에서Tp12 유전자들의 mRNA 존재여부와발현정도를확인하는과정으로 mRNA의양을측정한다. 이를위한분석방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase보호분석법(RNase protection assay), 노던블랏팅(Nothernblotting), DNA 칩등이있으나이로제한되는것은아니다.

10 상기검출방법들을통하여정상대조군에서의 mRNA 발현량과신세포암 의심환자에서의 mRNA 발현량을비교할수있고, Tp12 유전자에서 mRNA로의유의한발현량의증가여부를판단하여신세포암의심환자의실제신세포암 발명 여부를진단할수있다.

mRNA 수준을 RT-PCR로측정하기위해서는

15 Tp12유전자에대한특이적인각각의프라이머쌍을이용한다. 프라이머는각마커유전자의핵산서열에특이적인서열을가지는뉴클레오타이드로서, 약 7 내지 50bp의길이, 좀더바람직하게는약 10 내지 30bp의길이이다. 또한, 대조군유전자의핵산서열에특이적인프라이머를포함할수있다. 그외 RT-PCR 키트는테스트튜브또는다른적절한컨테이너, 반응완충액, 20 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈및역전사효소와같은효소, DNase, RNase억제제 DEPC수(DEPC water), 멸균수등을포함할수있다. "프라이머"는짧은자유 3' 말단수산화기(free 3' hydroxyl group)를가지는핵산서열로상보적인템플레이트와염기쌍을형성할수있고템플레이트가닥복사를위한시작지점으로기능하는짧은핵산서열을의미한다.

25 프라이머는적절한완충용액및온도에서중합반응을위한시약및상이한네가지뉴클레오타이드 3인산의존재하에서 DNA 합성을개시할수있다. 프라이머는 DNA 합성의개시점으로작용하는프라이머의기본성질을변화시키지않는추가특징을 혼입할수있다.

프라이머는포스포르아미다이트 고체지지체방법또는기타널리공지된방법을사용하여화학적으로합성할수있다.

30 이러한핵산서열은또한당해분야에공지된많은수단을이용하여변형시킬수있다.

본발명에서

"단백질수준측정"이란 생물학적 시료에서 Tpl2 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로서 바람직하게는 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인한다.

"항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다.

- 5 본 발명의 목적상 항체는 Tpl2 신세포암 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 폴리클론 항체, 모노클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

항체를 이용하여 단백질 수준을 측정하는 분석 방법으로는 웨스턴 블랏,

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), RIA (Radioimmunoassay), 방사면역 확산법 (Radioimmunodiffusion), 오크틸로니 (Ouchterlony)

- 10 면역 확산법, 로켓 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석 (Immunoprecipitation), 보체 고정 분석 (Complement fixation assay), FACS, 단백질 칩 등이 있으며, 기재된 방법으로 제한되는 것은 아니다.

위와 같은 분석 방법을 통하여 정상 대조군의 항원-

항체 복합체의 형성량과 신세포암의 심환자의 항원-항체 복합체의

- 15 형성량을 비교할 수 있고, Tpl2 단백질의 유의한 발현량 증가 여부를 판단하여 신세포암의 심환자의 실제 신세포암 여부를 진단할 수 있다.

"항원-

항체 복합체"란 Tpl2 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-

- 20 항체 복합체의 형성량은 검출 라벨 (detection label)의 신호 크기를 통하여 정량적으로 측정할 수 있다. 검출 라벨은 효소, 형광 물질, 리간드, 발광 물질, 미소 입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 상기기재된 물질로 제한되는 것은 아니다.

- 25 검출 라벨로 효소를 사용하는 경우 이용할 수 있는 효소로는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸 콜린 에스터라아제, 글루코스 옥시다아제, 헥소키나아제 등이 있으며,

- 30 상기기재된 범위로 제한되지 않는다. 형광 물질로는 플루오레신, 피코시아닌, 플루오레스카민 등이 있고, 상기기재된 물질로 제한되는 것은 아니다. 리간드로는 바이오 틴 유도체 등이 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

발광물질로는루시페린등이있고, 이에제한되지는않는다.
 미소입자로는콜로이드금등이있고, 이에제한되는것은아니다.
 레독스분자로는퀴논, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논등이있고,
 이에제한되는것은아니다. 방사선동위원소에는 ^3H , ^{14}C 등이 포함되며,
 5 이에제한되는것은아니다.

단백질발현수준측정은바람직하게는 ELISA를이용한다.
 ELISA로는고체지지체에부착된항체와항원의복합체에서항원을인지하는표지된
 또다른항체를이용하는직접적샌드위치 ELISA, 고체지지체에부착된항체와
 항원의복합체에서항원을인지하는또다른항체와반응시킨후이항체를인지하는표
 10 지된 2차항체를이용하는간접적샌드위치 ELISA 등다양한 ELISA
 방법을포함한다.

좀더바람직하게는고체지지체에항체를부착시키고시료를반응시킨후항원-
 항체복합체의항원을인지하는표지된항체를부착시켜효소적으로발색시키거나,
 항원-항체복합체의항원을인지하는항체에대해표지된
 15 2차항체를부착시켜효소적으로발색시키는샌드위치 ELISA
 방법에의해서검출한다.

Tp12신세포암마커단백질과항체의복합체형성정도를확인하여신세포암발병
 여부를확인할수있는것이다.

또다른방법으로Tp12에대한하나이상의항체가기판위정해진위치에배열되
 20 어고밀도로고정화되어있는단백질칩을이용할수있다.

단백질칩을이용하여시료를분석하는방법은시료에서단백질을분리하고,
 분리한단백질을단백질칩과혼성화시켜항원-
 항체복합체를형성시키고이를판독하여단백질의존재
 또는발현정도를확인하여신세포암발병여부를확인할수있다.

또다른방법으로Tp12에대한항체를이용하여웨스턴블랏팅을하는것이다.
 시료에서전체단백질을분리하고,
 이것을전기영동하여단백질을크기에따라분리한다음나이트로셀룰로오스막으로이
 동시켜항체와반응시킨다. 생성된항원-
 항체복합체의양을표지된항체를이용하여확인함으로써신세포암발병여부를확인
 30 할수 있다.

위와같은검출방법들은정상대조군의Tp12유전자발현량과신세포암발병세

포에서의Tp12유전자의발현량을비교하는단계를포함한다. mRNA
또는단백질의수준은Tp12단백질의절대적또는상대적차이로나타낼 수있다.

본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 Tp12 에특이적으로
5 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 신세포암 진단용 키트를 제공한다.

본 발명의 신세포암 진단용 키트는 면역분석(immunoassay)용
키트이다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다.
10 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는
것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1]

신세포암(RCC; renal cell cancer)과 Tp12의 연관성 확인

15 신세포암과 Tp12의 임상적 관련성을 확인하기 위하여, 신세포암에서
Tp12의 발현 양상을 확인하였다. TCGA(<http://cancergenome.nih.gov>)의
mRNA 서열 데이터를 이용하여, 936명의 RCC 환자의 임상적 결과 및 Tp12의
발현을 비교하였다. 이의 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1의 A에 나타난 바와 같이, 전이 단계 IV의 RCC(n=157)환자의
20 경우, 전이 단계 I 및 전이 단계 II(n=542)의 RCC 환자보다 Tp12 발현
수준이 유의적으로 높음을 확인하였다.

또한, 도 1의 B의 카플란-마이어(Kaplan-Meier)그래프에 나타낸
바와 같이, RCC 환자에서 Tp12의 발현이 높은 경우, 전체적인 생존률이
유의적으로 감소하였다.

25 따라서, 본 발명의 Tp12는 신세포암 진행과정에 관련이 있음을
확인하였다.

[실시예 2]

Caki-1 세포의 동소 이식 및 폐 전이 모델에서 Tp12 침묵의 효과확인.

30 1. Tp12를 억제하는 shRNA를 발현하는 Caki-1 세포 구축

인간의 RCC 세포주인 Caki-1 세포를 ATCC(American Type culture collection; Manassas, Va, USA)에서 얻었다. 상기 세포를 10%의 소 태아혈청(FBS/RPMI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 첨가된 RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)로 37℃에서 5%의 CO₂ 를 포함하는
 5 건조된 배양기에서 배양하였다. 문헌(Huynh H, Ong RW, Li PY, et al. Targeting receptor tyrosine kinase pathways in hepatocellular carcinoma. Anticancer Agents Med Chem 2011;11:560-75)에 제시된 방법으로, 상기 세포에 pGIPZ 및 pLKO.1-TRC 렌터바이러스 벡터를 이용하여 sh-Tp12(서열목록 제 1 서열) 또는 비-표적화된 shRNA(서열목록 제 2 서열)
 10 를 형질도입하여, 비-표적화된 shRNA 를 발현하는 Caki-1 세포(이하, caki-1-sh-Con 이라 함) 또는 sh-Tp12 를 발현하는 Caki-1 세포(이하, caki-1-sh-Tp12 라 함)를 구축하였다. 상기 형질도입된 세포를 푸로마이신 2 µg/ml, Gibco)을 48 시간 동안 처리하여, 선별하여 하기의 실험들에 사용하였다.

2. Caki-1 세포에서 Tp12 shRNA 를 통한 Tp12 침묵(silencing) 확인

신세포암에서 Tp12 의 역할을 확인하기 위하여, 실시예 2-1 에서 구축한 Caki-1 sh-Tp12 또는 caki-1-sh-Con 세포에서, qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 Tp12 녀다운의 효율성을 검증하였다.

우선, qRT-PCR 을 하기와 같이 수행하였다. 상기 세포들에서 RNeasy
 20 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였다. 이 후, SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix(Invitrogen)을 이용하여 RT PCR 을 수행하였고, 상기 RT PCR 을 통하여 얻은 cDNA 를 SYBR Green PCR Master Mix 및 하기 표 1 의 Tp12 의 프라이머를 이용하여 qPCR 을 수행하였다.

【표 1】

프라이머	서열	타겟 유전자
Tp12 정방향프라이머	5'-CAAGTGAAGAGCCAGCAGTTT-3'	Tp12
Tp12 역방향 프라이머	5'-GCAAGCAAATCCTCCACAGTTC-3'	Tp12
GAPDH 정방향프라이머	5'-CATCATCTCTGCCCCCTCT-3'	GAPDH
GAPDH 역방향 프라이머	5' -GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT-3'	GAPDH

또한, 웨스턴 블롯은 하기와 같이 수행하였다. 상기 세포들을 RIPA 용해 완충액(15mM NaCl, 1%의 NP-40, 0.5%의 sodium deoxycholate, 0.1%의 SDS, 50mMTris(pH 8.0))를 이용하여 용해시킨 후, 5 분 동안 10,000 x g 로 원심분리하고, 상층액을 수득하였다. BCA 단백질 어세이 키트(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질 농도를 분석하였고, SDS(sodium dodecyl sulfate)-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 전기영동을 100V 에서 2 시간 수행하여 30 μ g 의 단백질을 분리시켰다. 상기 겔 상의 단백질을 100V 에서 1 시간동안 PVDF 막(polyvinylidene fluoride; Whatman, Piscataway, NJ, USA)에 옮겼다. 이 후, 항-Tp12 및 항-GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 항체를 처리하였다.

넉다운의 효율성을 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 검증하였고, 이를 도 2에 나타내었다.

도 2에 나타난 바와 같이, sh-Tp12를 렌티 바이러스를 이용하여 형질도입한 경우, Caki-1에서 Tp12의 발현이 저해됨을 확인하였다.

3. Caki-1 세포 동소 이식 모델(orthotopic) 구축 및 상기 모델을 이용한 Tp1-2 침묵의 효과 확인.

RCC 동물 모델에 1×10^6 의 caki-1-sh-Tp12(n=9) 또는 caki-1-sh-Con(n=9)를 신장에 투여하여, Caki-1 세포 동소 이식 모델을 구축하였다.

보다 구체적으로, 이하 진행할 모든 동물에 대한 실험은 삼성 메디컬 센터(Institutional Review Boards; Seoul, Korea)에 허가를 받아 NIHFCUA(National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; NIH publication No. 80-23, Revised in 1996)에 따라 수행하였다. 우선, 40 μ L Hank's Balanced salt solution(HBSS, Gibco)에 1×10^6 의 caki-1-sh-Tp12(n=9) 또는 caki-1-sh-Con(n=9)를 혼합하여 6 내지 8 주령의 BALB/c-nu 마우스의 왼쪽 신장의 피막 아래에 투여하였다. 이식 4 주 후, 신장 및 폐를 추출하여 종양의 무게를 측정하였고, 종양 무게를 종양세포가 이식된 왼쪽 신장의 무게에서 오른쪽 정상 신장의 무게를 빼서

측정하였고, 오른쪽 신장의 무게가 왼쪽 신장의 무게보다 무거우면 종양의 무게를 0 으로 하였다.

또한, 2×10^5 의 caki-1-sh-Tp12(n=9) 또는 caki-1-sh-Con(n=9)를 6 내지 8 주령의 BALB/c-nu 마우스의 꼬리 정맥에 투여하였고, 이식 4 주 후, 폐의 흑의 숫자를 현미경 또는 현미경 없이 계산하였다. 추출한 기관을 파라핀에 고정시켜 H&E(hematoxylin and eosin)으로 염색하여 폐암으로 전이된 종양 또는 신장의 종양의 존재를 확인하였다.

caki-1-sh-Tp12 를 BALB/c-nu 마우스의 왼쪽 신장의 피막 아래 투여한 경우의 신장의 종양 또는 폐의 종양의 성장에 대한 결과를 도 3 에 나타내었고, BALB/c-nu 마우스의 꼬리 정맥에 투여한 경우 폐로 전이가 일어났는지 확인한 결과를 도 4 에 나타내었다.

도 3 에 나타난 바와 같이, Tp12 를 넉다운시킨 경우(caki-1-sh-Tp12 를 이식한 경우), Caki-1 세포의 일차 종양 성장이 유의적으로 억제됨을 확인하였다. 또한, Tp12 을 넉다운시킨 그룹에서는 폐로의 전이가 전혀 발생하지 않았지만, 다른 그룹에서 폐로의 전이가 관찰되었다.

도 4 에 나타난 바와 같이, Tp12 를 넉다운시킨 경우, 폐로 전이된 흑(lung metastatic foci)이 유의적으로 감소함을 확인하였고, 폐의 무게가 증가함을 확인하였다.

상기 결과에 의해, Tp12 가 RCC 의 종양 형성 및 진행과정에서 매우 중요함을 확인하였다.

[실시예 3]

Tp12 저해에 의한 RCC 세포의 부착능, 증식능, 클론형성능, 아노이키스(anoikis)-저항성 확인

1. Tp12 억제제의 세포 신호 경로에 대한 영향 확인.

Tp12 의 결실의 효과를 확인하기 위하여, Tp12 의 일차 기능은 인터루킨-1 자 극에 반응하여, MAPK 하위단계(downstream)를 활성화 시킴을 이용하여, ERK, JNK 및 p38 을 포함하는 MAPK 의 인산화를 측정하였다.

보다 구체적으로, caki-1-sh-Con, caki-1-sh-Tp12 세포 또는 일반 Caki-1 세포에 Tp12 억제제를 처리한 후, 항-ERK, 항-p-ERK, 항 p-JNK, 항-

JNK, 항-P38 및 항-p-P38, 항-GAPDH 및 항- α -튜블린 항체를 이용하여, 실시예 2와 같이 웨스턴 블롯을 수행하였다.

상기 웨스턴 블롯 결과를 도 5에 나타내었고, 100ng/ml의 IL-1 β 를 처리한 후, 웨스턴 블롯 결과를 도 6에 나타내었다.

5 도 5에 나타난 바와 같이, caki-1-sh-Tp12 세포 또는 Tp12 키나아제억제제를 처리한 경우, Tp12-매개 MAPK 하위단계 신호경로의 활성화를 억제함을 확인하였다.

10 도 6에 나타난 바와 같이, Caki-1 세포에서 IL-1 β -유도한 후, ERK, JNK 및 p38 MAPK의 경우, caki-1-sh-Tp12 또는 Tp12 억제제를 처리한 경우, ERK 활성이 억제됨을 확인하였으나, JNK 및 p38의 인산화는 영향을 받지 않음을 확인하였다.

2. Tp12 억제의 종양세포의 증식능에 대한 영향 확인

(1) 증식능 확인

15 증식능을 확인하기 위하여, caki-1-sh-Tp12 또는 caki-1-sh-Con 세포를 96-웰 플레이트에 100 μ L의 10% FBS/RPMI와 함께 1×10^5 cell/ml의 농도로 접종하였다. 이 후, 1시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 후의, 세포의 생존성을 제조사의 메뉴얼에 따라 EZ-Cytox 세포 생존성어세이 키트(Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 이용하여 결정하였다.

20 또한, 일반 Caki-1 세포에 72시간 동안 Tp12 키나아제억제제인 4-(3-클로르-4-플루오로페닐아미노)-6-(피리딘-3-일-메틸아미노)-3-시아노-1,7-나프틸리딘[4-(3-chlor-4-fluorophenylamino)-6-(Pyridin-3-yl-methylamino)-3-cyano-1,7-naphthyridine; Calbiochem, San Diego, CA, USA]를 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M 또는 10 μ M로 처리한 후, 세포 생존성을
25 측정하였다.

상기의 결과를 도 7(caki-1-sh-Tp12) 및 도 8(Tp12 키나아제억제제 처리)에 나타내었다.

도 7에 나타난 바와 같이, caki-1-sh-Tp12 세포의 증식이 caki-1-sh-Con과 비교하여 유의적으로 감소함을 확인하였다.

도 8 에 나타난 바와 같이, Tpl2 키나아제 억제제를 처리하는 경우, Tpl2 억제제의 농도 의존적으로 증식력이 억제됨을 확인하였다($2.5\mu\text{M}$ 에서 $P=0.021$; $5\mu\text{M}$ 에서 $P=0.0004$; 및 $10\mu\text{M}$ 에서 $P=0.0002$).

(2)세포 주기 분석

우선 caki-1-sh-Tpl2 또는 caki-1-sh-Con 세포를 70%의 에탄올로 4°C 에서 30 분동안 고정시켰다. 이 후, RNage($100\mu\text{g/mL}$) 및 PI(propidiumiodide; $40\mu\text{g/mL}$, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)에서, 37°C 로 30 분 동안 염색하였고, FACS-Calibur(BD Biosciences)를 이용하여 세포 주기를 분석하여 도 9 에 나타내었다.

도 9 에 나타난 바와 같이, caki-1-sh-Tpl2 세포의 경우, G1 기의 세포 비율은(caki-1-sh-Tpl2=54.2%, caki-1-sh-Con=37.8%) 증가하였고, S 기의 세포 비율은 감소(Sh-Tpl2=35.4%, Sh-Con=46.4%)함을 확인함으로써, 상기의 증식능이 억제됨은 세포 주기의 진행을 유의적으로 지연시키는 것과 함께 수반됨을 확인하였다.

3.Tpl2 억제의 클로니형성능에 대한 효과 확인

caki-1-sh-Con, caki-1-sh-Tpl2 세포를 300 cell/well 로 6 웰 플레이트에 접종하였고, 10%의 FBS/RPMI 를 Tpl2 키나아제억제제와 함께($0\mu\text{M}$, $2.5\mu\text{M}$ 또는 $5\mu\text{M}$) 웰 플레이트에 3 주 동안 처리하였다. 0.2% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색한 후, 웰 당 생존한 클로니의 숫자를 계산하였다. 이의 결과를 도 10(caki-1-sh-Con 세포 및 caki-1-sh-Tpl2 세포) 및 도 11(Tpl2 키나아제억제제 처리)에 나타내었다.

도 10 에 나타난 바와 같이, Caki-1 세포들의 클로니형성(clonogenicity)은 caki-1-sh-Tpl2($P=0.005$)에서 caki-1-sh-Con 세포와 비교하여 현저히 감소함을 확인하였다.

또한, 도 11 에 나타난 바와 같이, Tpl2 키나아제 억제제를 처리한 경우($2.5\mu\text{M}$ 에서 37% 감소, $P=0.008$; $5\mu\text{M}$ 에서 83% 감소 $P=0.002$), 클로니형성이 유의적으로 감소함을 확인하였다.

4. Tpl2 억제와 아노이키스 저항성(anoikis resistance)과 관련성 확인

Tp12 활성의 세포의 전이에 대한 역할을 밝히기 위하여, 탈부착(detachment)후 세포 생존률을 평가하였다. 보다 구체적으로, 아노이키스에 의하여 세포사를 겪은 세포를 확인하고, 제조사의 메뉴얼에 따라 CytoSelect™ 24-웰 아노이키스어세이 키트(anoikis Assay kit; Cell
5 Bioloabs, San Diego, Ca, USA)를 이용하여 상기 세포를 정량화 하였고, 이의 결과를 도 12 에 나타내었다.

도 12 에 나타난 바와 같이, caki-1-sh-Tp12 세포는 caki-1-Sh-Con 세포에 비하여 탈부착 24 시간 후, 유의적으로 아노이키스 저항성(anoikis resistance)을 억제하였다.

10

5. Tp12 억제와 세포 부착능과 관련성 확인

세포의 혈관 내 침투(intravasation) 및 혈관 외로 유출(extravasation)동안 암의 전이에서 요구되는 표현형인 세포 부착능을 평가하기 위하여, 96-웰-플레이트에서 각각의 웰을 10 µg/mL 의
15 피브로넥틴(Millipore, Billerica, MA, USA)을 코팅하였고, 1×10⁵ 의 caki-1-sh-Con 또는 caki-1-sh-Tp12 세포를 접종한 후, 1 시간 동안 배양하였다. PBS 로 3 번 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포들을 0.1%의 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후, 2% SDS(150 µL/well)를 이용하여 용해시킨 후, 550nm 에서 흡광도를 측정하였고,
20 이의 결과를 도 13 에 나타내었다.

도 13 에 나타난 바와 같이, Tp12 의 억제는 세포의 피브로넥틴에 대한 부착능을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

6. 결론

25 상기의 결과들은 Tp12 는 MAPK 하위 신호 경로의 활성을 조절함으로써, RCC 세포에서 세포 주기의 진행, 세포 증식, 클로니형성, 아노이키스 저항성 및 부착능에 관여함을 나타낸다.

[실시예 4]

30 RCC 세포의 이동(migration) 및 침윤(invasion)에서 Tp12 의 역할 확인.

1. 상처 치료 어세이(Wound healing assay)를 통한 RCC 세포의 이동능 확인

암의 전이에서 세포의 증식과 비의존적으로, 세포의 증가된 이동능 및 침윤능은 국소적 침윤, 혈관내 침투, 혈관 외 유출과정에서 요구된다. 따라서, 암세포의 이동능과 Tpl2 의 관련성을 확인하기 위하여, 상처 치료 어세이(wound healing assay)를 수행하였다.

보다 구체적으로, caki-1-sh-Tpl2, caki-1-sh-Con 세포 또는 일반 Caki-1 세포를 10% FBS/RPMI 가 포함된 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 콘플루언트 세포 단일층(confluent cell monolayer)에 200- μ L pipette tip 을 이용하여 상처를 내었다. 상처 라인의 넓이를 24 시간 동안 사진을 찍어 확인하였다. 이의 결과를 도 14 및 도 15(Tpl2 키나아제억제제 투여한 경우)에 나타내었다.

도 14 에 나타난 바와 같이, caki-1-sh-Tpl2 세포의 경우, caki-1-sh-Con 세포와 비교하여, 상처의 봉합(wound closure)비율이 현저히 낮음을 확인하였다.

또한, 도 15 에 나타난 바와 같이, Tpl2 키나아제 억제제를 처리하는 경우, 상처 봉합 비율이 처리하지 않은 경우와 비교하여 현저히 낮음을 확인하였다.

따라서, Tpl2 가 억제된 세포에서는 대조군 세포에 비하여, 세포의 이동이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다.

2. 트랜스-웰 이동(trans-well migration) 및 침윤 어세이를 통한 RCC 세포의 이동능과 침윤능 확인

트랜스-웰 이동 및 침윤 어세이를 수행하기 위하여, 300 μ L 의 세럼-결핍 RPMI 배지 내의 1×10^5 의 caki-1-sh-Tpl2 또는 caki-1-sh-Con 세포를 24-웰 미소화학유인물질 챔버(24-well microchemotaxis chamber; Costar, Corning, NY, USA)의 상부 투입구(top insert)에 로딩하였다. 이 후, 200ng/ml 의 CXCL12 가 첨가된 세럼-결핍 RPMI 또는 10%의 FBS/RPMI 를 화학유인물질(chemoattractant)로 하부 챔버(bottom chamber)에 가하였다. 상기 세포들을 8- μ m 공극의 폴리카르보네이트 필터를 통하여 24 시간 동안 이동시켰고, 100 μ g 의 매트릭셀(BD Bioscience)로 코팅된 필터를 통하여

48 시간 동안 침투시켰다. 필터 막을 H&E 로 염색시켰고, 막의 윗부분을 스크랩하여, 이동 또는 침윤하지 않은 세포를 면봉(cotton swab)으로 제거하였다. 세포 이동 및 침윤의 정도를 각각의 웰의 세포 수를 카운트하여 측정하였다.

5 이의 결과를 도 16(caki-1-sh-Tp12) 및 도 17(Tp12 키나아제억제제 투여 세포)에 나타내었다.

도 16 에 나타난 바와 같이, Tp12 을 침투시킨 세포에서, 대조세포에 비하여, 코팅되지 않은 막으로 이동 또는 매트릭스로 코팅된 막으로의 이동 및 침윤이 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다(도 4B P=0.0005).

10 도 17 에 나타난 바와 같이, Tp12 키나아제 억제제를 Caki-1 세포에 가하는 경우, 농도 의존적으로 이동 및 침윤능력을 감소시킴을 확인하였다.

그러므로, Tp12 의 억제는 RCC 세포의 이동 및 침윤능력을 억제함을 알 수 있다.

15 [실시예 5]

Caki-1 세포를 3 차원 배양하는 경우, Tp12 침투의 효과 확인

신세포암에서 Tp12 의 종양 형성 및 전이능에 대한 효과를 확인하기 위하여, 세포 증식, 구형성, 및 침윤능을 3 차원 배양 시스템에서 평가하였다.

20 보다 구체적으로, 3D 배양은 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. Nature 2011;472:51-6.에서 제시한 방법으로 수행하였다. 간략히, caki-1-sh-Con 또는 Caki-1-sh-Tp12 세포(2×10^3 cell/well)를 10% FBS/RPMI 내의 지질-기반의 낮은-세포-부착 96-웰 플레이트(Lipidure, NOF Corporation, Tokyo, Japan)에 접종하였다. 이 후, 0, 1, 3, 6 및 9 일 후의 구형성을 관찰하였고, 상기 구형을 Accumax 완충액(Millipore)을 이용하여 단일 세포로 분리시켰다. 이 후, 세포를 카운트하였다, 구형세포 카운팅어세이(spheroid cell counting assay)를 위하여, 3 일 후, 배양배지를 10% FBS/RPMI 배지를 포함하는 2%의 매트릭셀(BD Bioscience)로 교체하였다. 2 차 구형성의 숫자를 9 일 후, 카운트하였다. 또한, 웨스턴 블롯을 통하여 ERK 의 활성을 관찰하였다.

25

30

2 차원 세포 증식 어세이 결과를 도 18 에 나타내었고, 3 차원 배양시스템에서 배양 결과를 도 19 및 20 에 나타내었고, 3 차원 배양에 따른 ERK 활성의 정도를 도 21 에 나타내었다.

도 18 에 나타난 바와 같이, 2 차원 배양 시스템에서는 Tpl2 침묵은 Caki-1 세포 증식에 유의적인 효과가 없음을 확인하였다.

도 19 에 나타난 바와 같이, 3 차원 배양 시스템에서 caki-1-sh-Con 세포와 caki-1-sh-Tpl2 세포는 방사형(branching structures)구조 없이 구를 형성하였다. 이 후, caki-1-sh-Con 세포는 순차적으로 형태적 변화가 일어나고, 방사형 구조가 형성되거나, 구에서 세포가 탈부착됨을 확인하였다.

이에 반해, caki-1-sh-Tpl2 세포는 구에서 세포의 탈부착이 거의 일어나지 않고, 상기 탈부착이 지연됨을 확인하였다.

도 20 에 나타난 바와 같이, caki-1-sh-Tpl2 세포가 탈부착 후, 이차 구형성이 억제됨을 확인하였다.

도 21 에 나타난 바와 같이, ERK 활성의 증가는 이차 구형성을 유발하고, 상기 ERK 활성이 억제됨으로써, 2 차 구형성이 억제됨을 확인하였다.

[실시예 6]

Tpl2 침묵의 CXCL12 에 의하여 유도된 신호 경로 및 화학주성(chemotaxis)/화학침윤(chemoinvasion)에 대한 영향 확인

CXCL12-CXCR4 신호는 RCC 의 진행과정에서 밀접히 연관되어 있으므로, CXCR4-매개 하향 신호 경로에서, caki-1-sh-Tpl2 또는 caki-1-sh-Con 세포에서 CXCL4 를 처리한 경우 효과를 실시예 2 와 같은 방법으로 웨스턴 블롯을 통해 확인하여 도 22 에 나타내었고, Tpl2 키나아제 억제제의 효과를 도 23 에 나타내었다. 또한, 상기 세포에 CXCL12 처리 후, 실시예 5 와 같은 방법으로 세포의 이동 및 잠재적인 침윤능력을 확인하여, 이의 결과를 도 24 에 나타내었다.

도 22 및 도 23 에 나타난 바와 같이, CXCR4 리간드인 CXCL12(100ng/ml)에 의하여 유도된 ERK1/2 및 AKT 의 활성은 caki-1-sh-Tpl2

세포 또는 Caki-1 세포에 Tpl2 키나아제억제제를 처리하는 경우, 현저히 감소하였다.

도 24 에 나타난 바와 같이, CXCR4 의존적인 caki-1-sh-Tpl2 세포의 이동 및 세포의 침윤은 caki-1-sh-Con 세포와 비교하여 현저히 감소함을 5 확인하였다.

상기 결과는 내재적 Tpl2 는 RCC 의 잠재적인 CXCR4-의존성 전이를 조절하는 것을 나타낸다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

Tp12(tumor progression locus 2)의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는, 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 Tp12 활성 억제제 또는 발현 억제제는 암세포의 증식 또는 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 Tp12 활성 억제제는 Tp12 의 활성을 촉진하는 단백질 또는 Tp12 에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 앵타머, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 Tp12 발현억제제는, Tp12 유전자 또는 Tp12 의 발현을 촉진하는 유전자의 mRNA 에 상보적으로 결합하는 안티센스뉴클레오티드, siRNA, shRNA 및 리보자임으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

제 3 항에 있어서, 상기 Tp12 의 활성을 촉진하는 단백질 또는 Tp12 에 특이적으로 결합하는 화합물은 Tp12 키나아제 억제제인 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 Tp12 키나아제억제제는 4-(3-클로르-4-플루오로페닐아미노)-6-(피리딘-3-일-메틸아미노)-3-시아노-1,7-

나프티리딘[4-(3-chlor-4-fluorophenylamino)-6-(Pyridin-3-yl-methylamino)-3-cyano-1,7-naphthyridine]인 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

5 【청구항 7】

제 1 항의 조성물의 치료적 유효량을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 신세포암의 예방 또는 치료방법.

【청구항 8】

10 제 7 항에 있어서, 상기 개체는 돼지, 소, 개, 말, 고양이, 원숭이 및 양으로 이루어진 군중 선택된 1 종 이상의 개체인 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 9】

15 1)후보물질을 생물학적 시료에 처리하는 단계;
2)상기 제 1)단계의 생물학적 시료에서 Tpl2(acid sphingomyelinase)의 mRNA 또는 단백질의 발현양 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법.

20 【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 신세포암에 걸린 동물의 혈액, 소변, 타액, 조직으로 이루어진 군중 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법.

25 【청구항 11】

제 9 항에 있어서, 상기 Tpl2 의 mRNA 발현양 변화는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로
30 이루어진 군 중 선택된 1 종 이상의 방법을 이용하여 측정하는 것을 특징으로하는, 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법.

【청구항 12】

제 9 항에 있어서, 상기 Tpl2 단백질의 발현양 변화는 웨스턴 블롯팅, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)로 이루어진 군 중에서 선택된 1 종 이상의 방법을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는, 신세포암의 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법.

【청구항 13】

다음 단계를 포함하는 신세포암의 진단방법:

(a) 생물학적 시료로부터 Tpl2 의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 측정 결과를 분석하는 단계로서 측정된 Tpl2 의 발현양 또는 활성이 정상 대조구 시료의 것보다 높을 경우 증가된 신세포암 위험도를 갖는 것으로 판단한다.

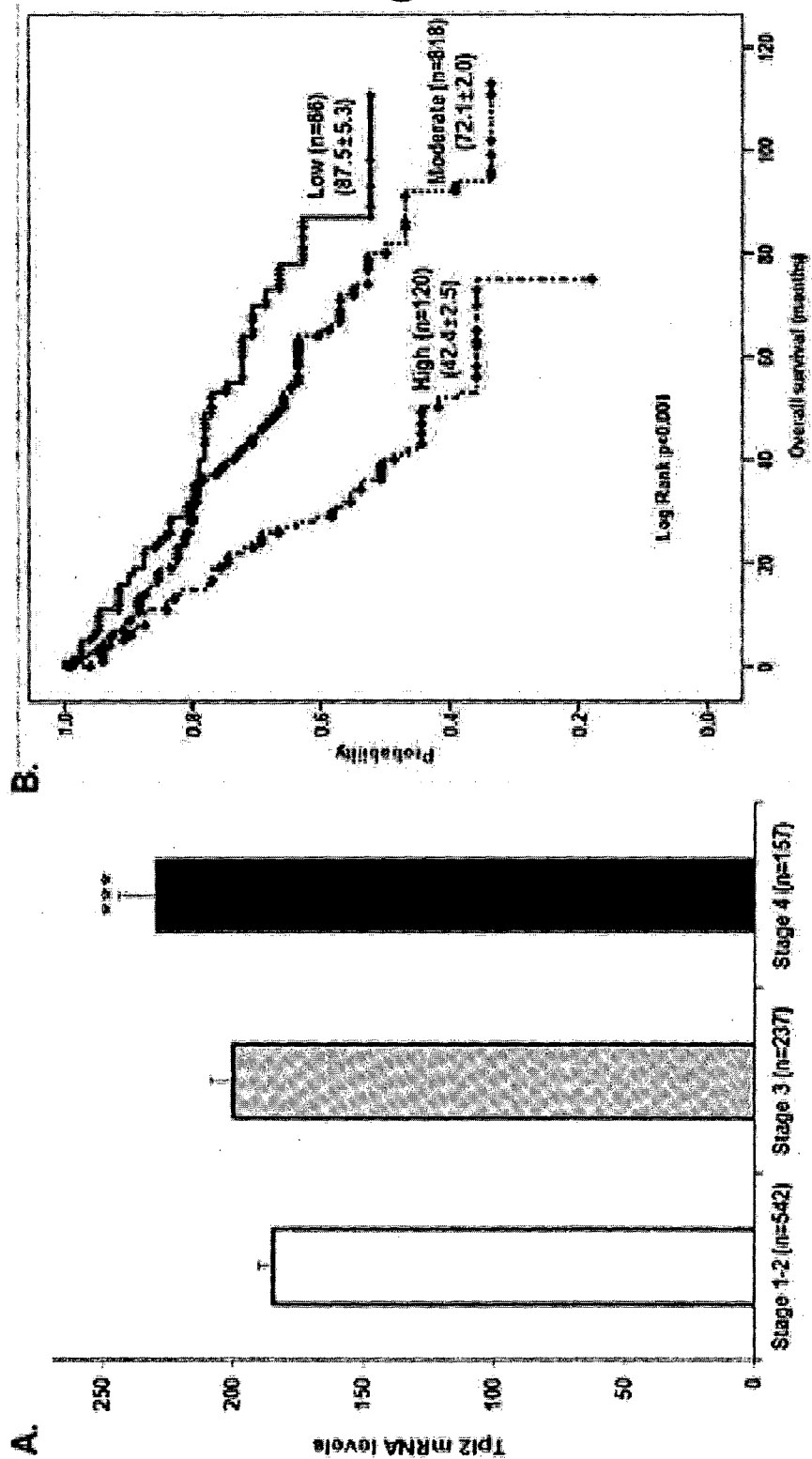
【청구항 14】

Tpl2 에특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 신세포암 진단용 키트.

【청구항 15】

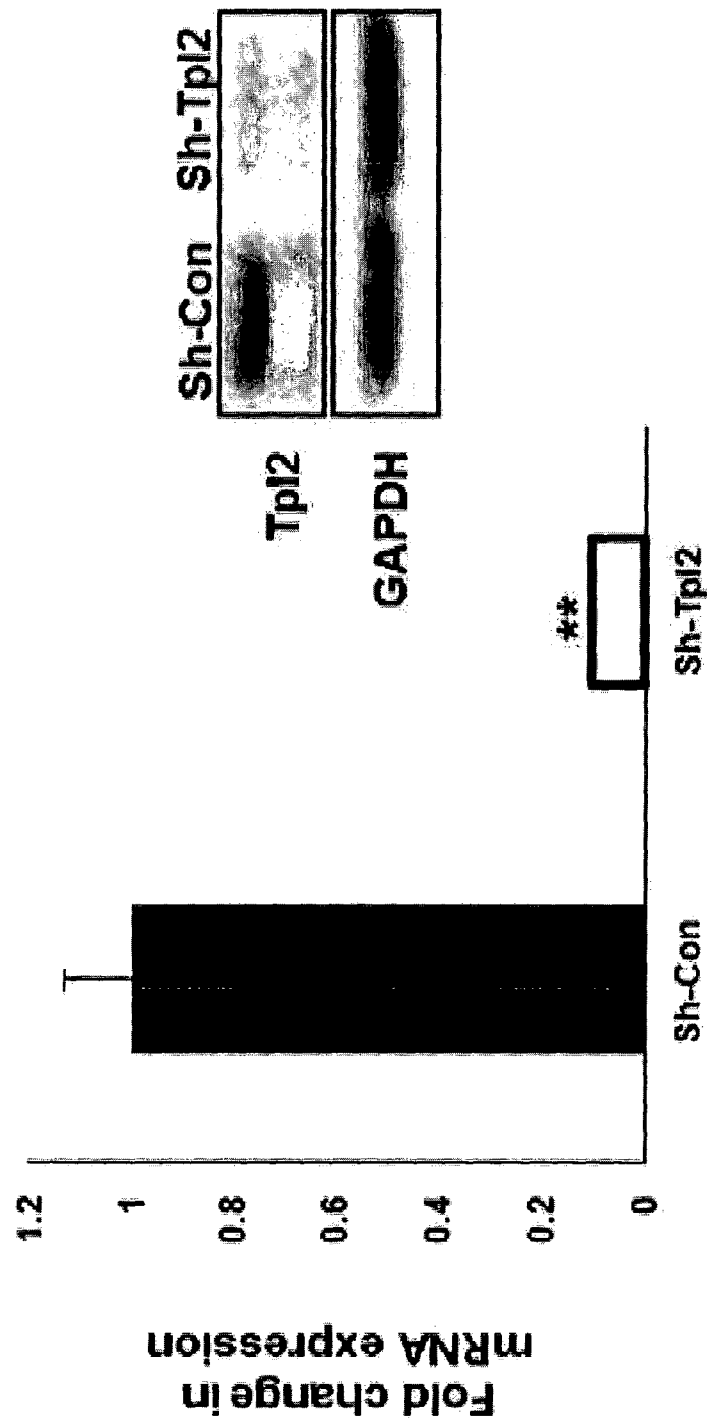
제 14 항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

1/24

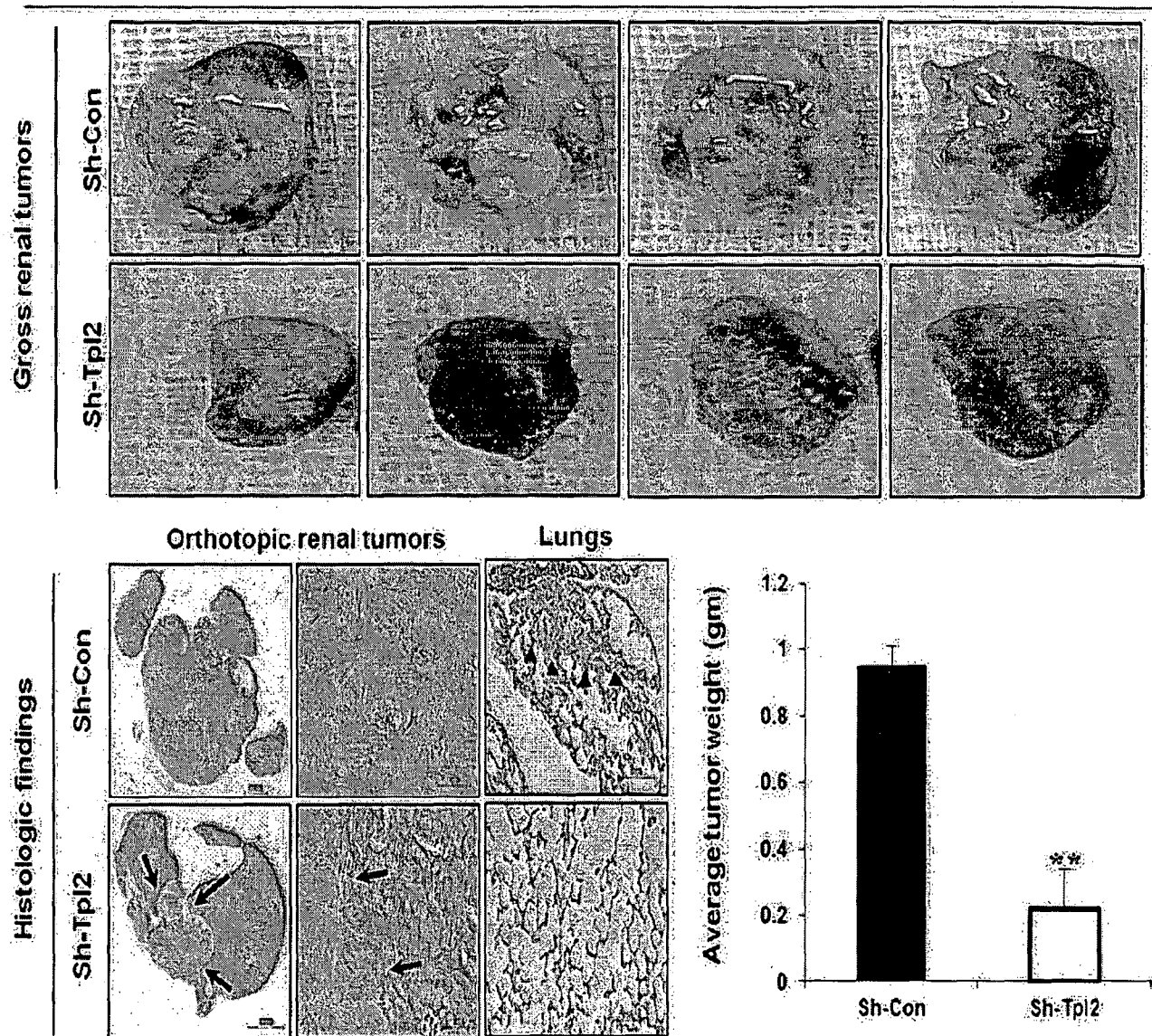
Fig. 1

2/24

Fig. 2

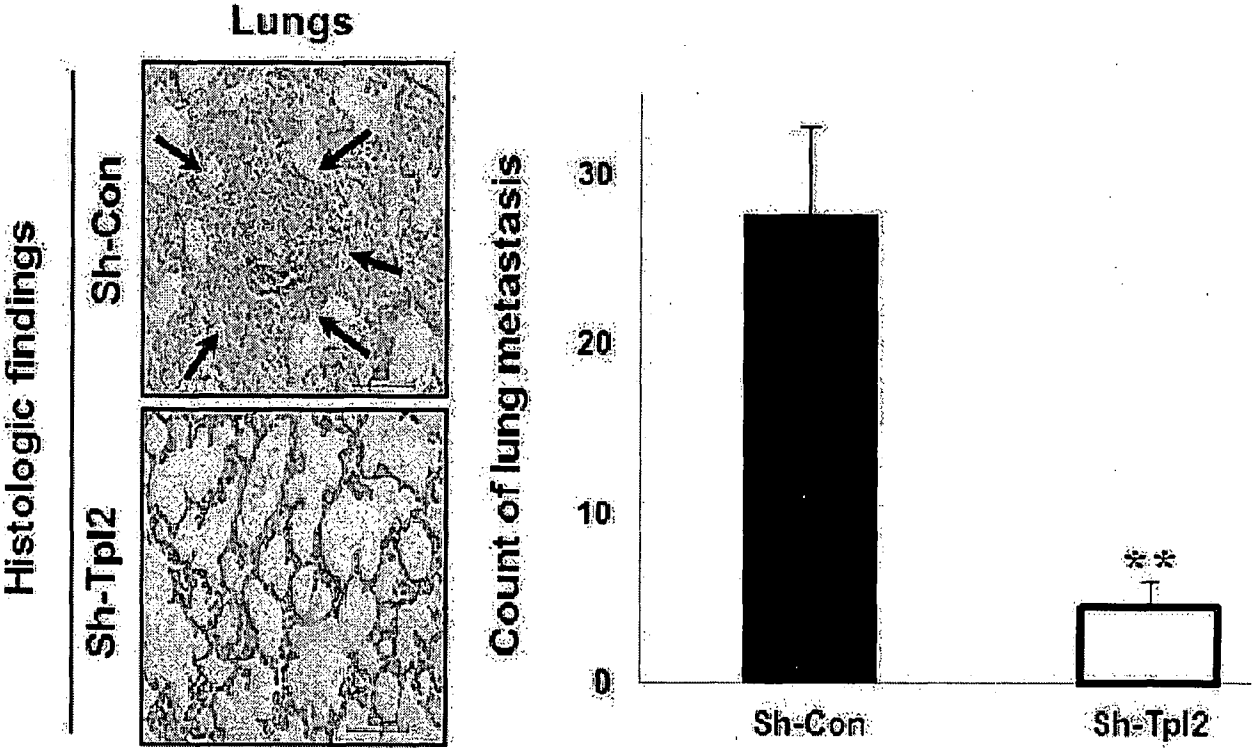


3/24

Fig. 3

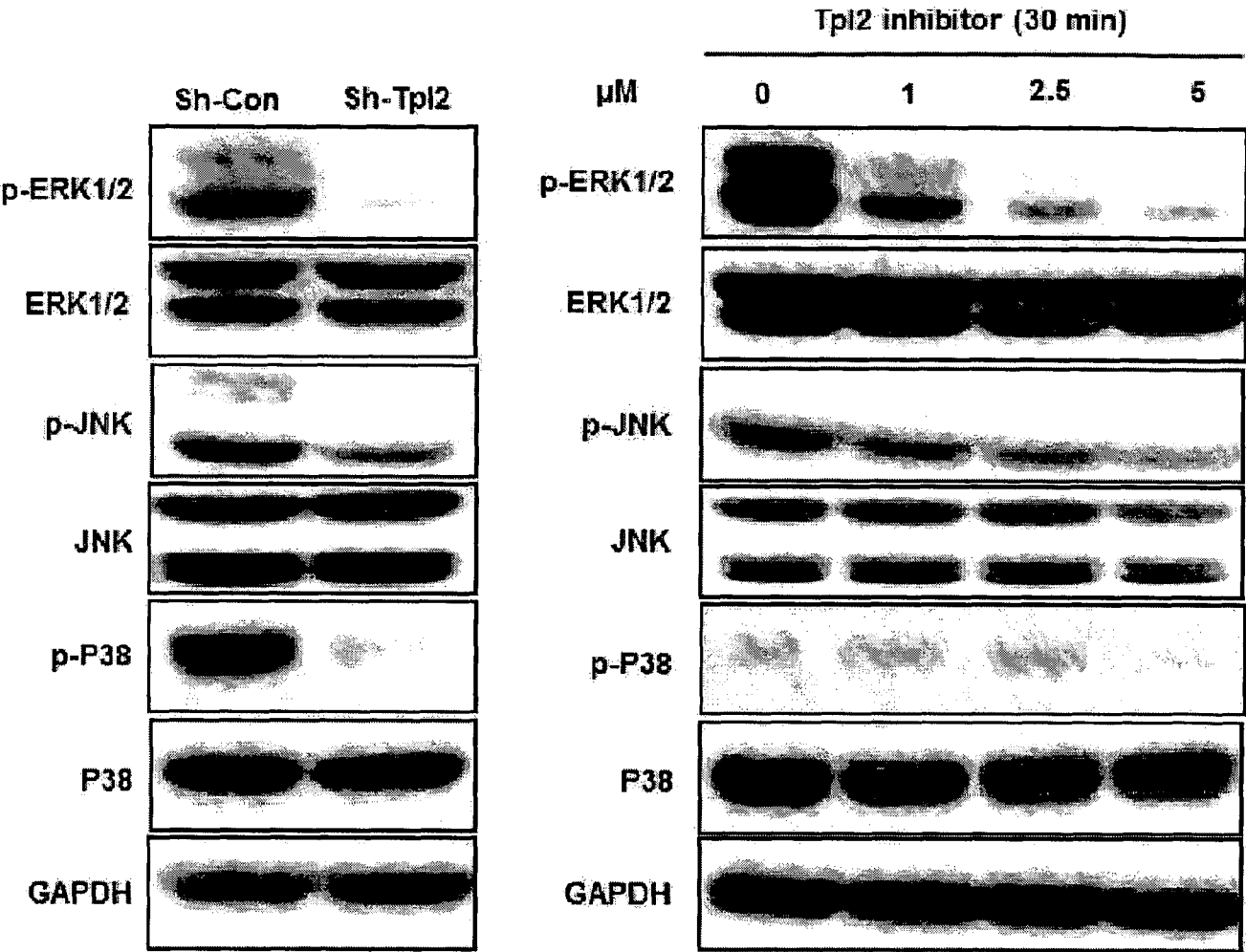
4/24

Fig. 4



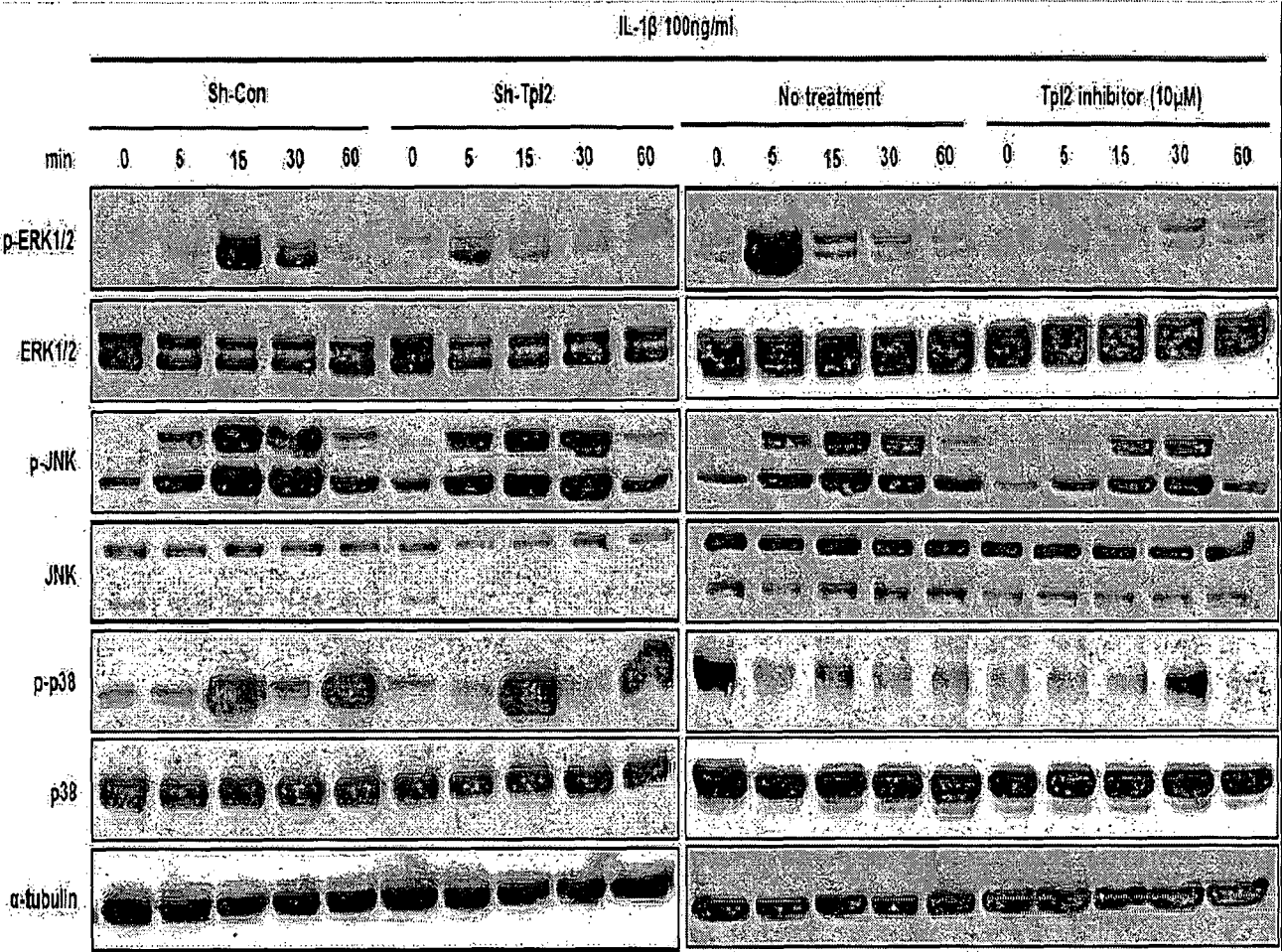
5/24

Fig. 5

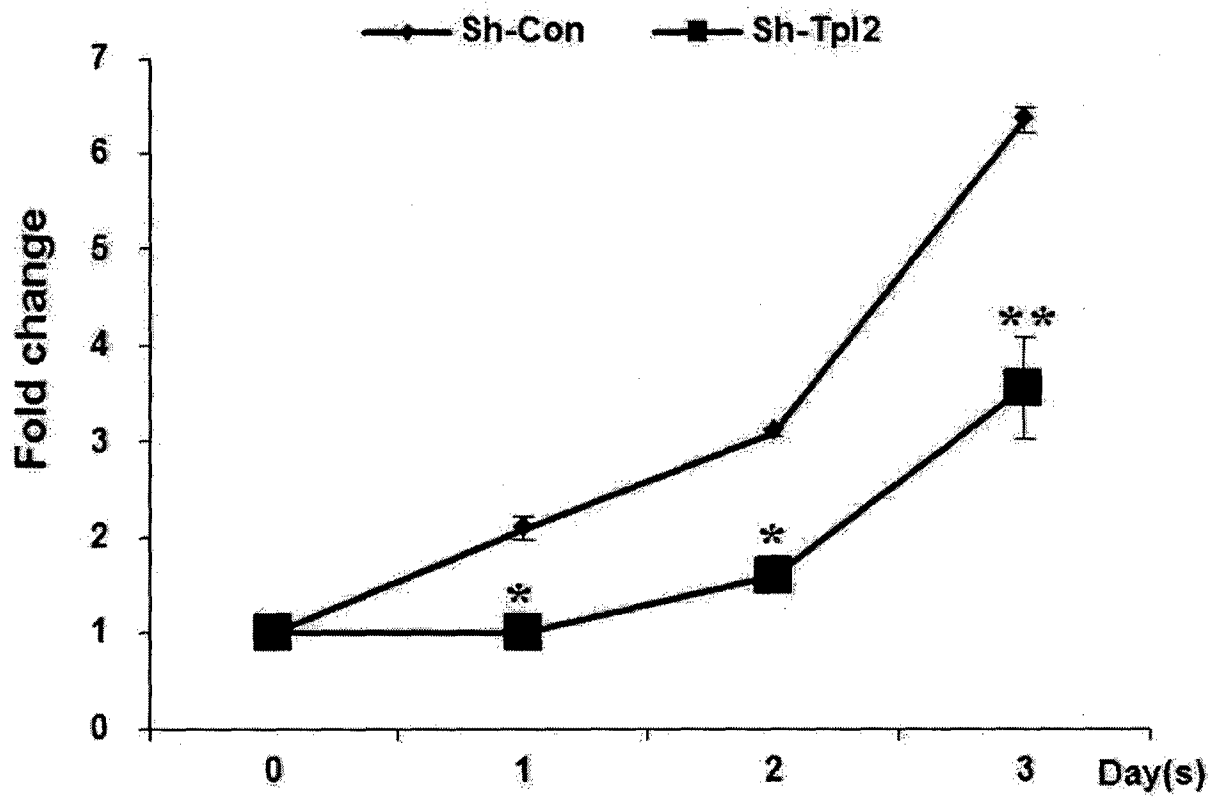


6/24

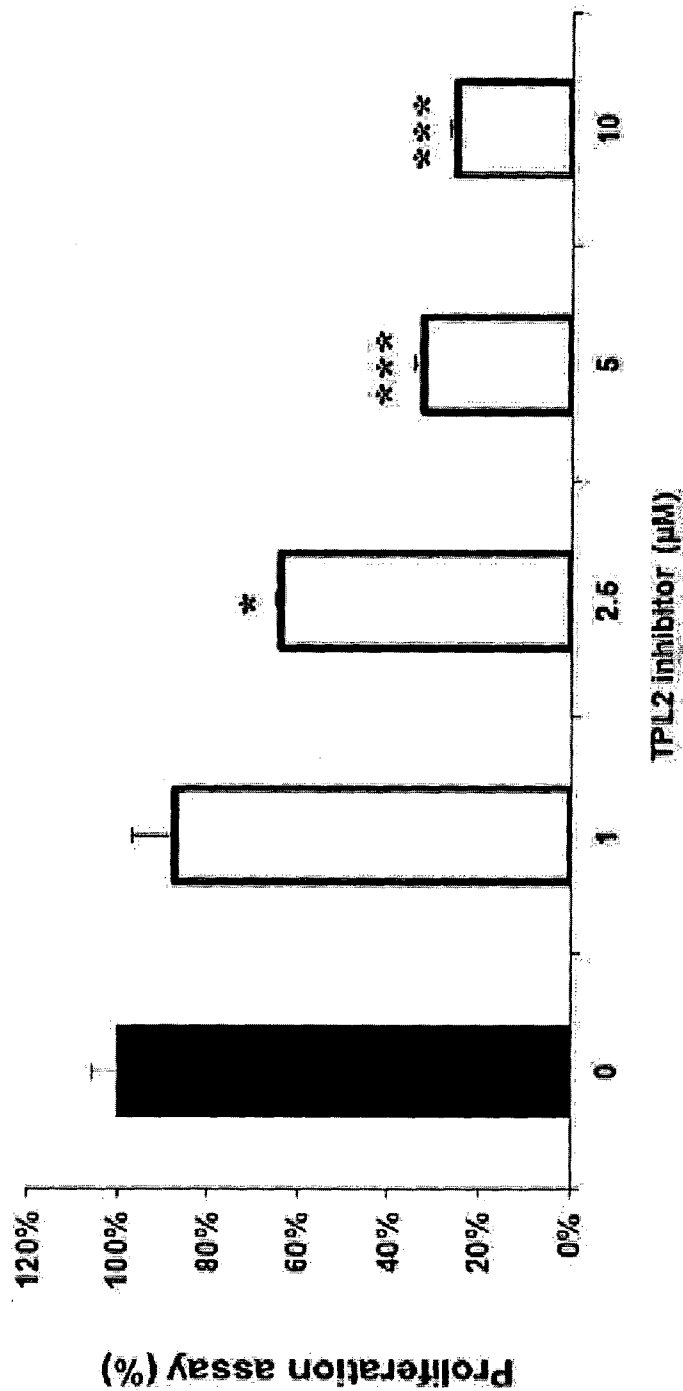
Fig. 6



7/24

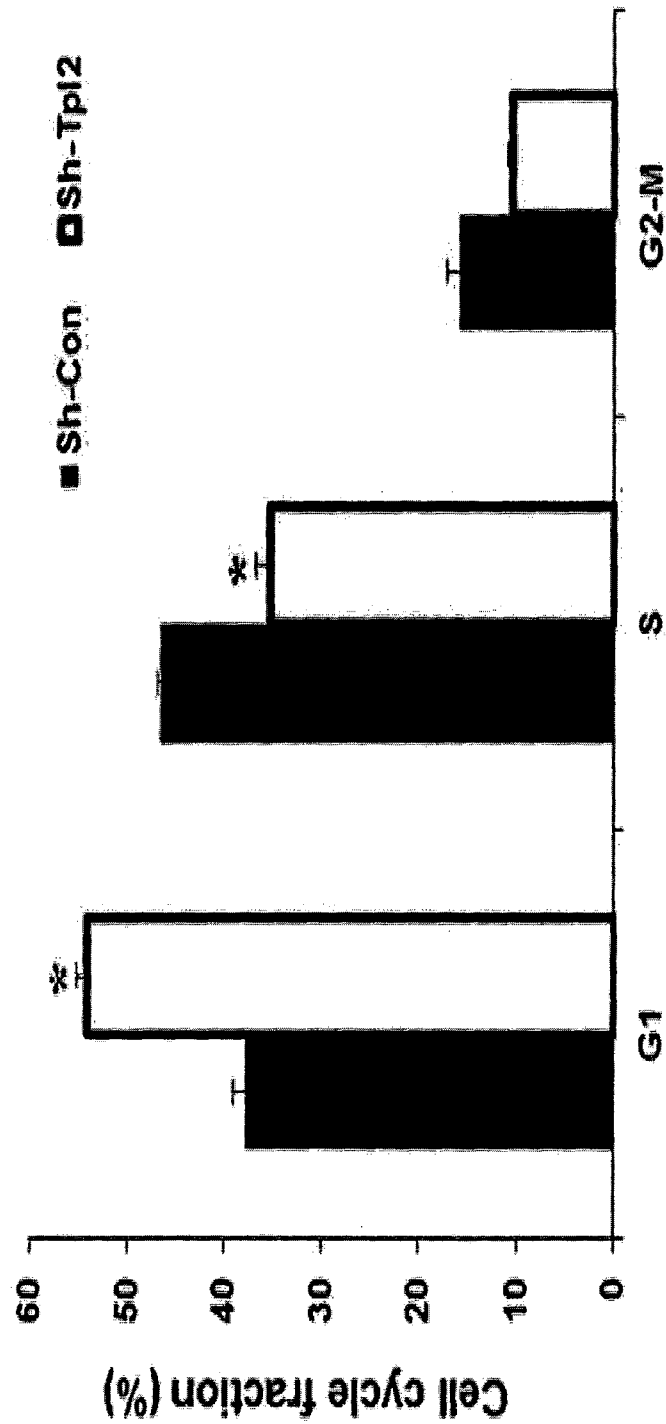
Fig. 7

8/24

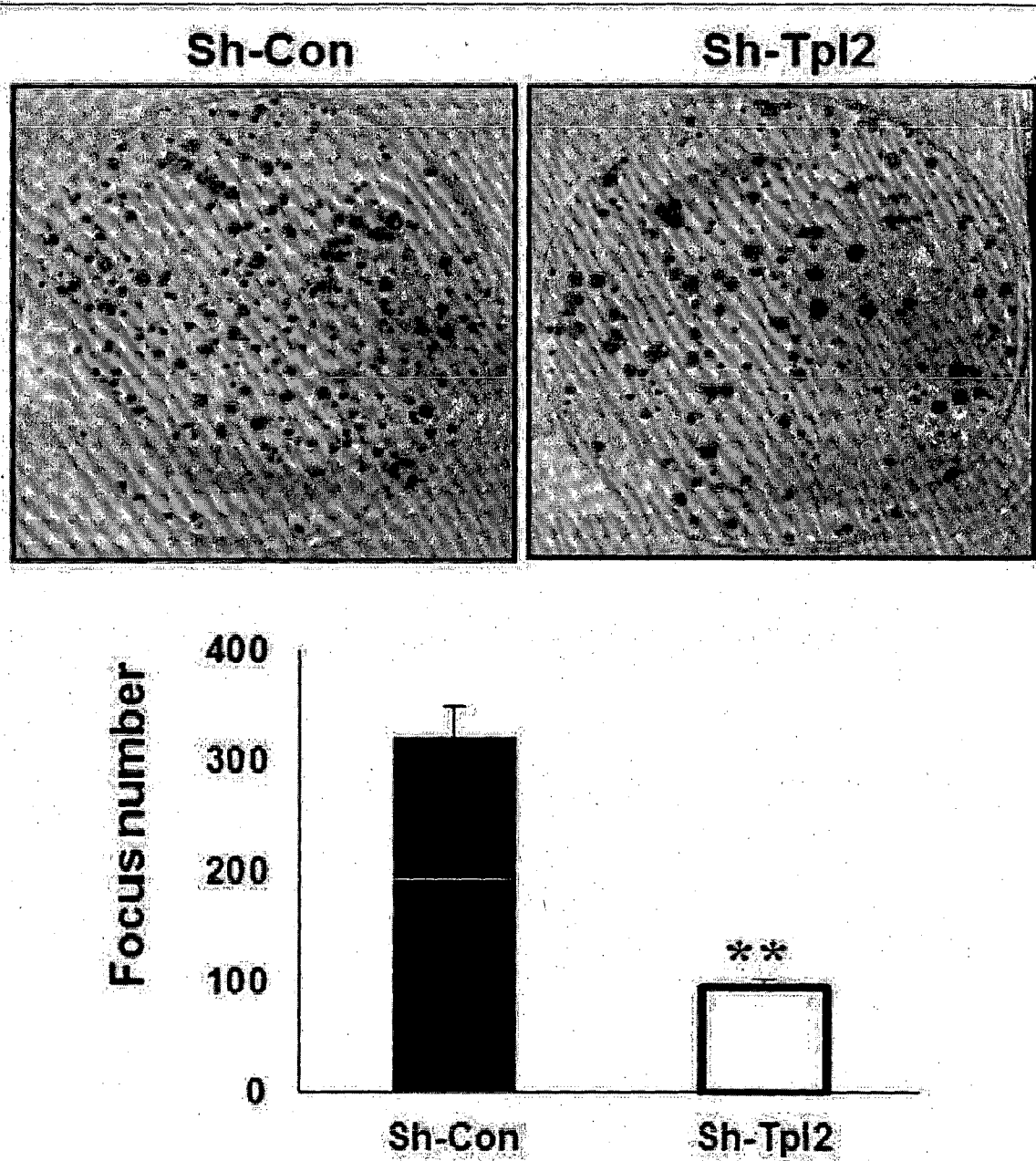
Fig. 8

9/24

Fig. 9

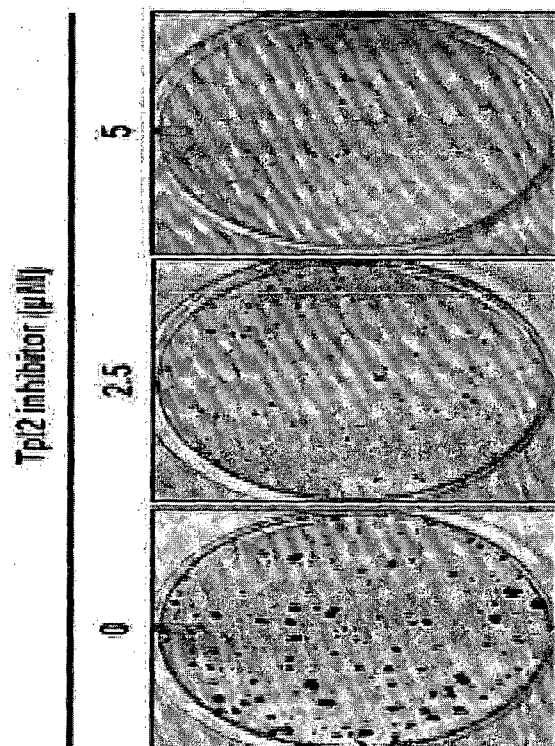
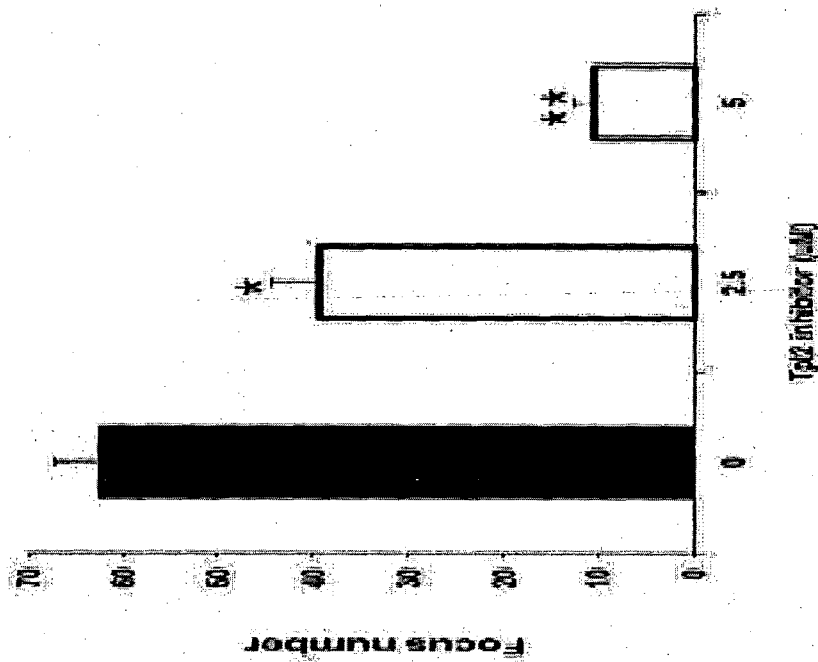


10/24

Fig. 10

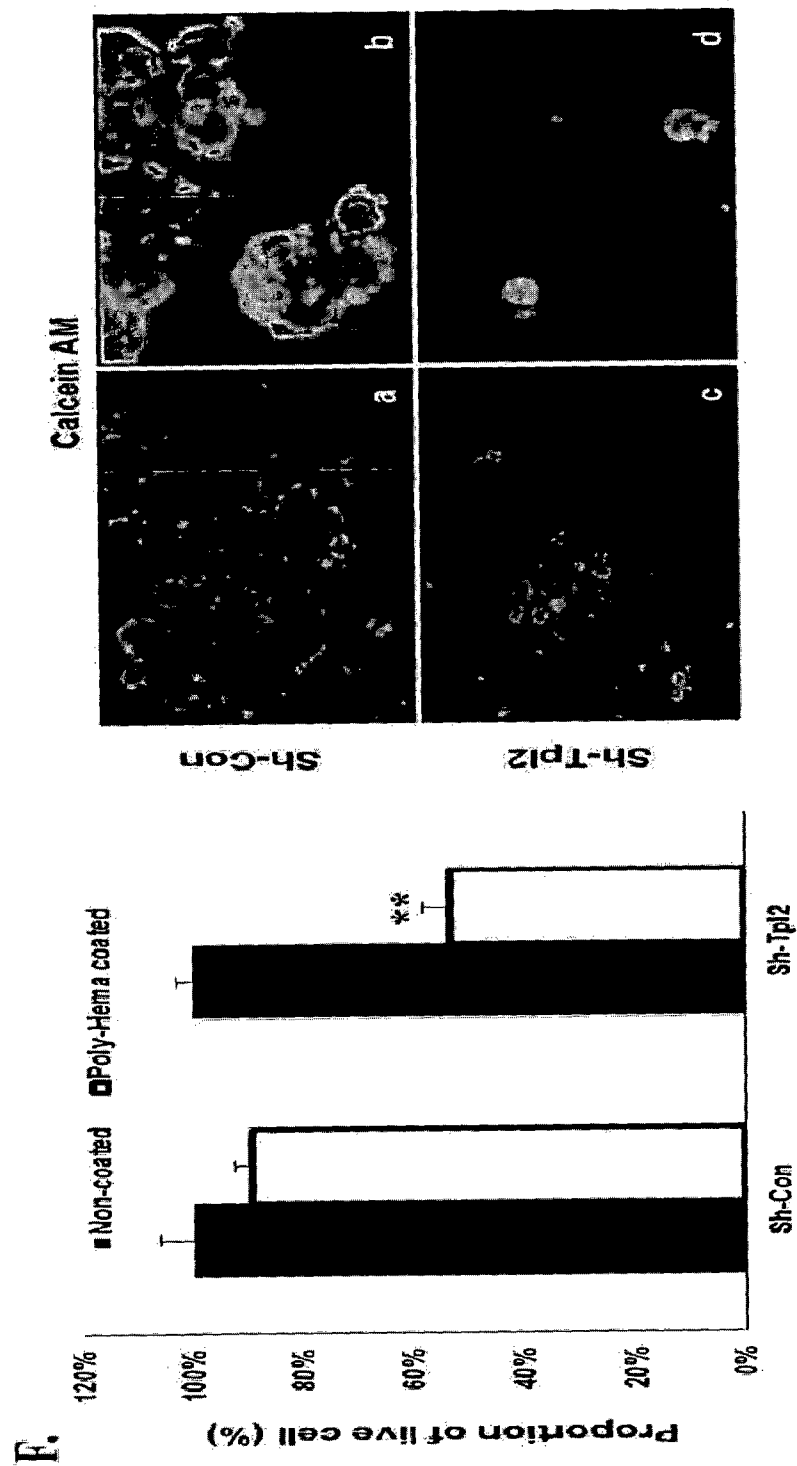
11/24

Fig. 11

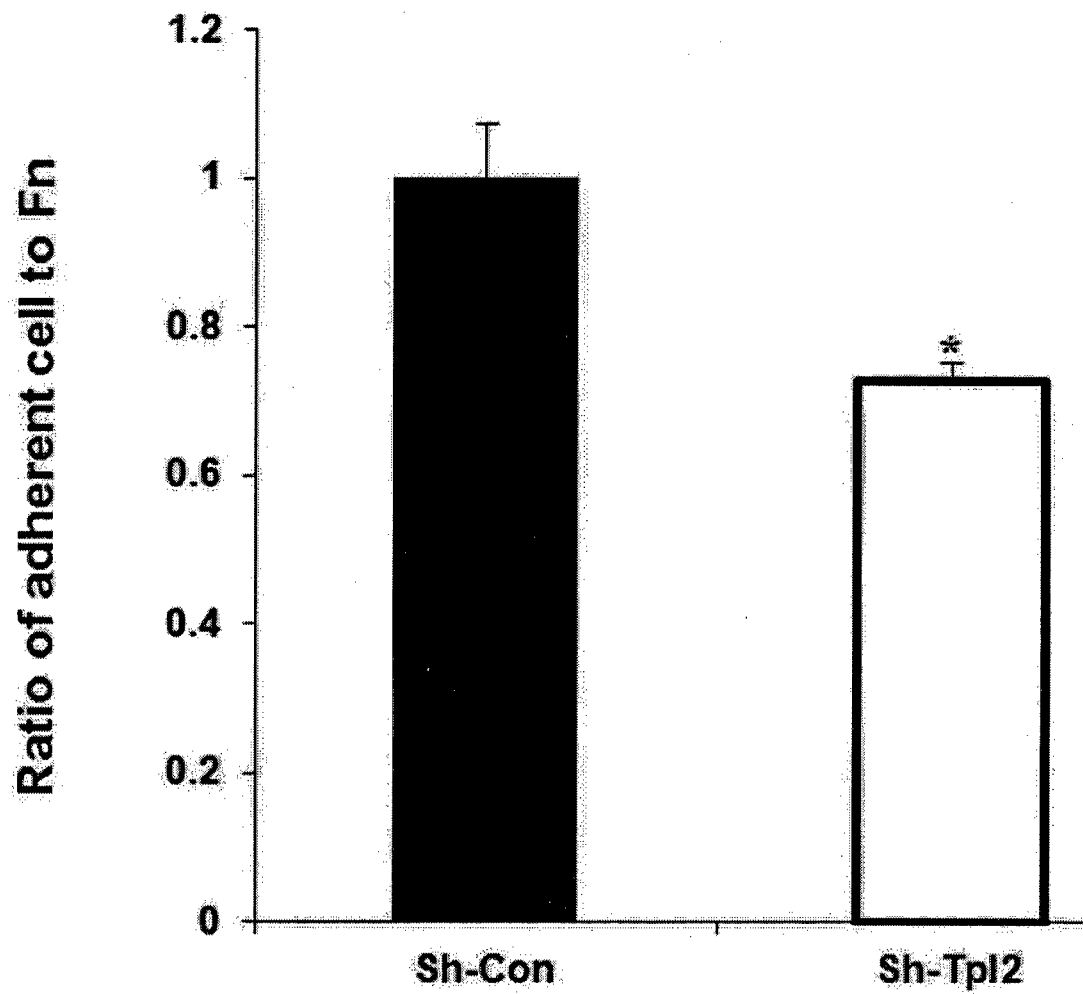


12/24

Fig. 12

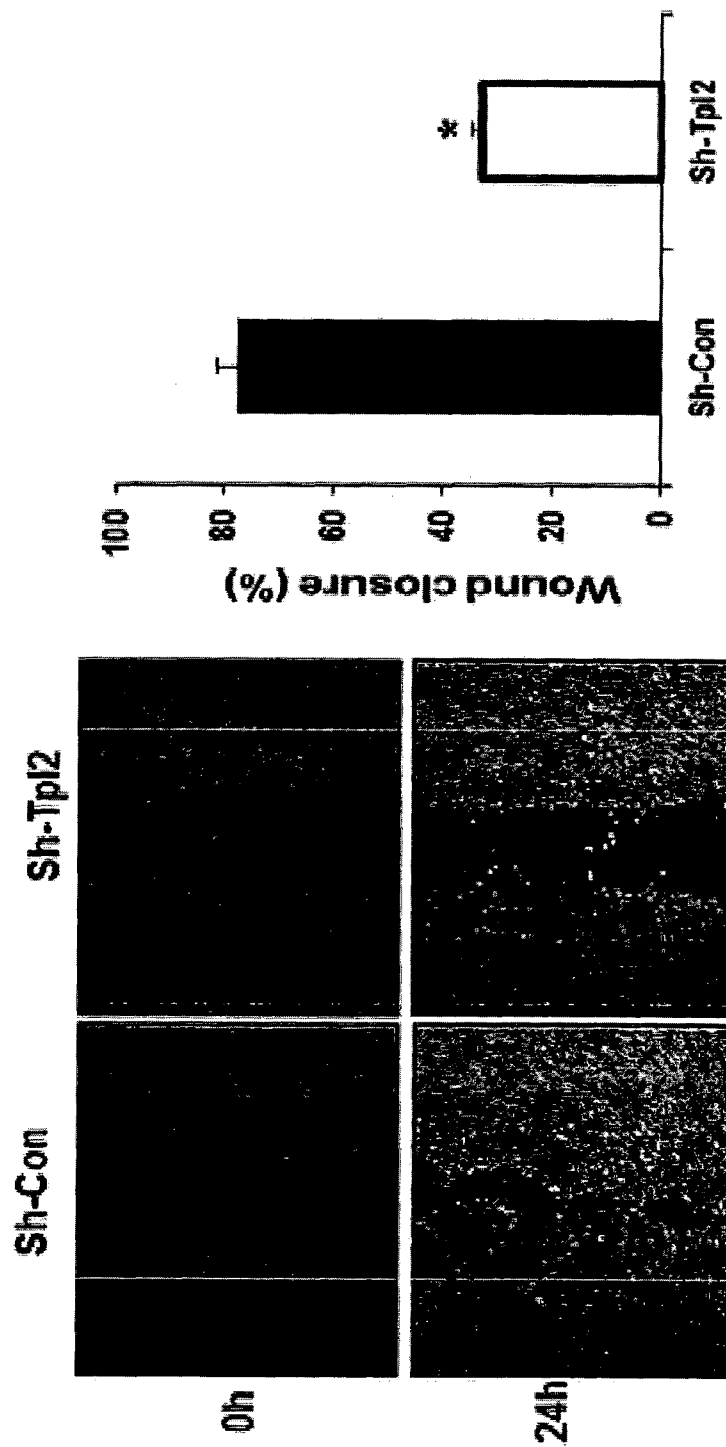


13/24

Fig. 13

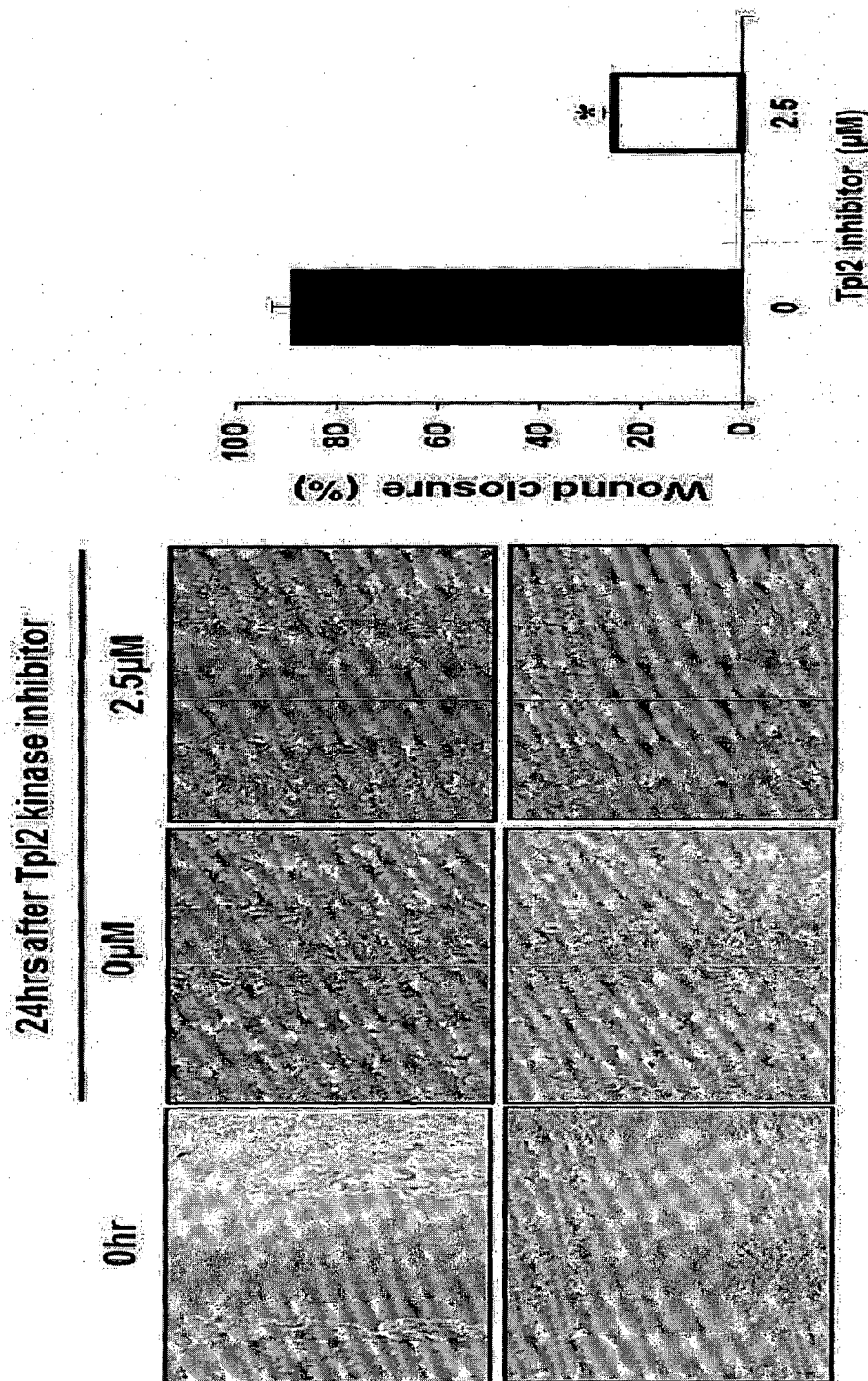
14/24

Fig. 14

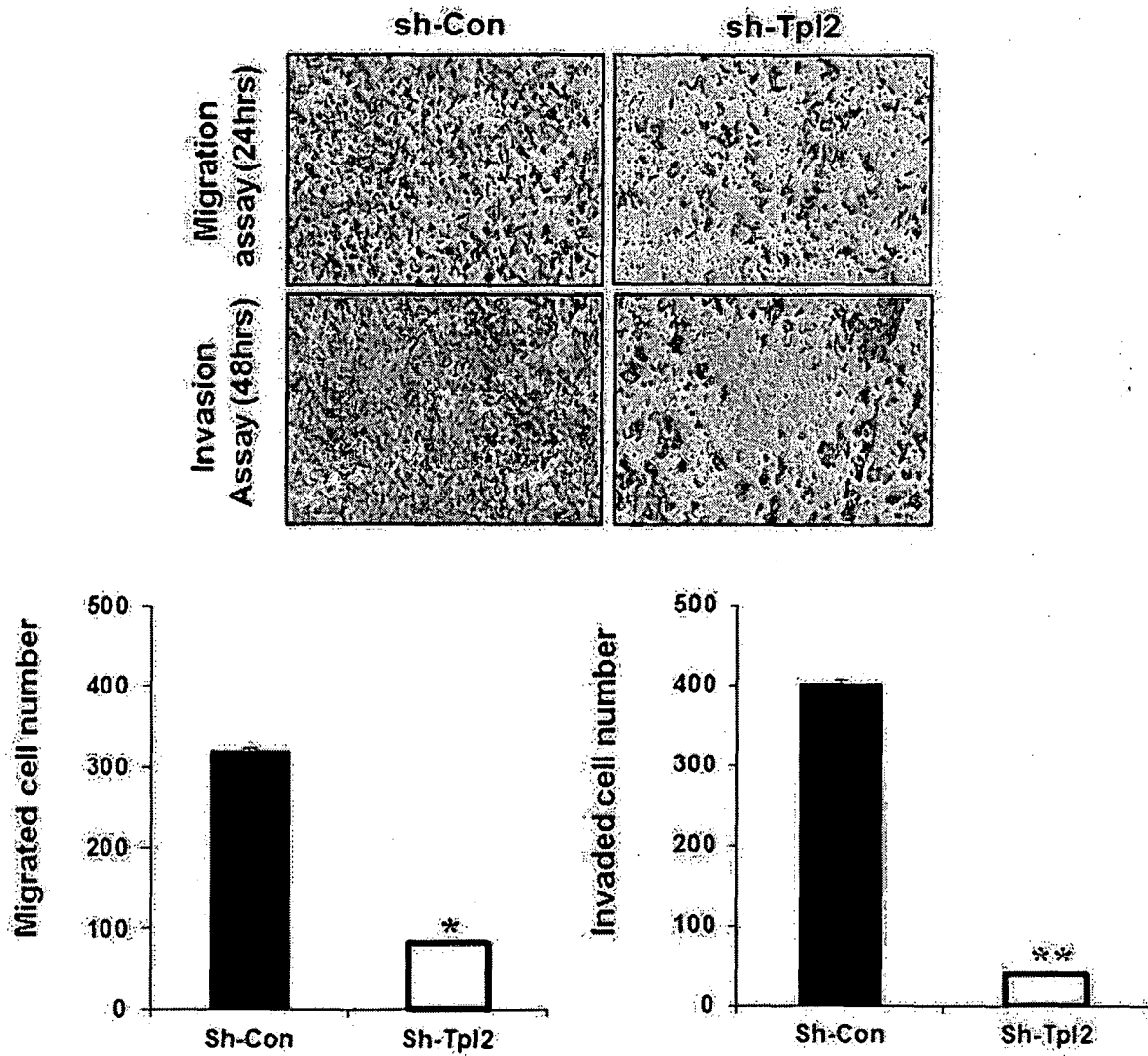


15/24

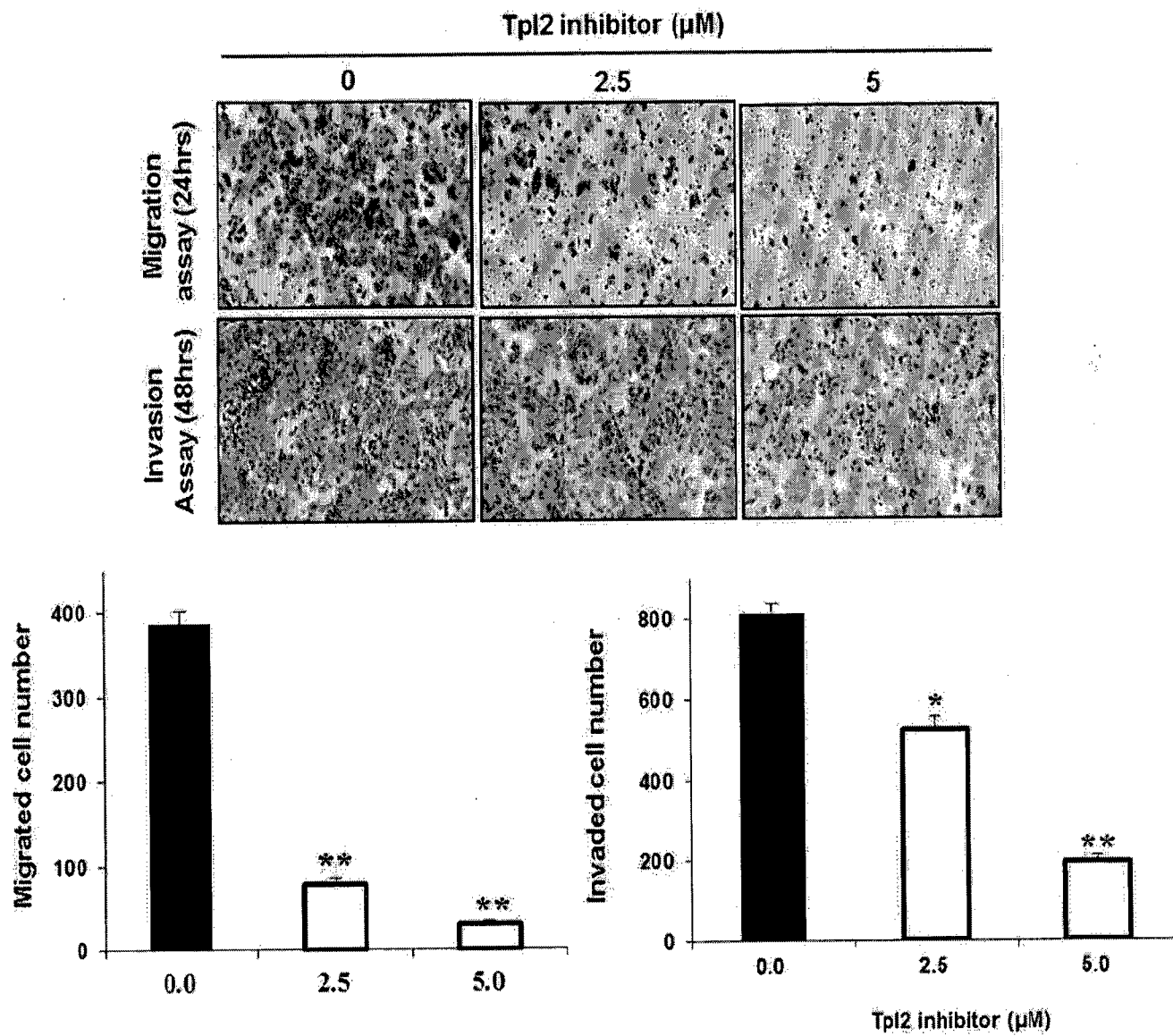
Fig. 15



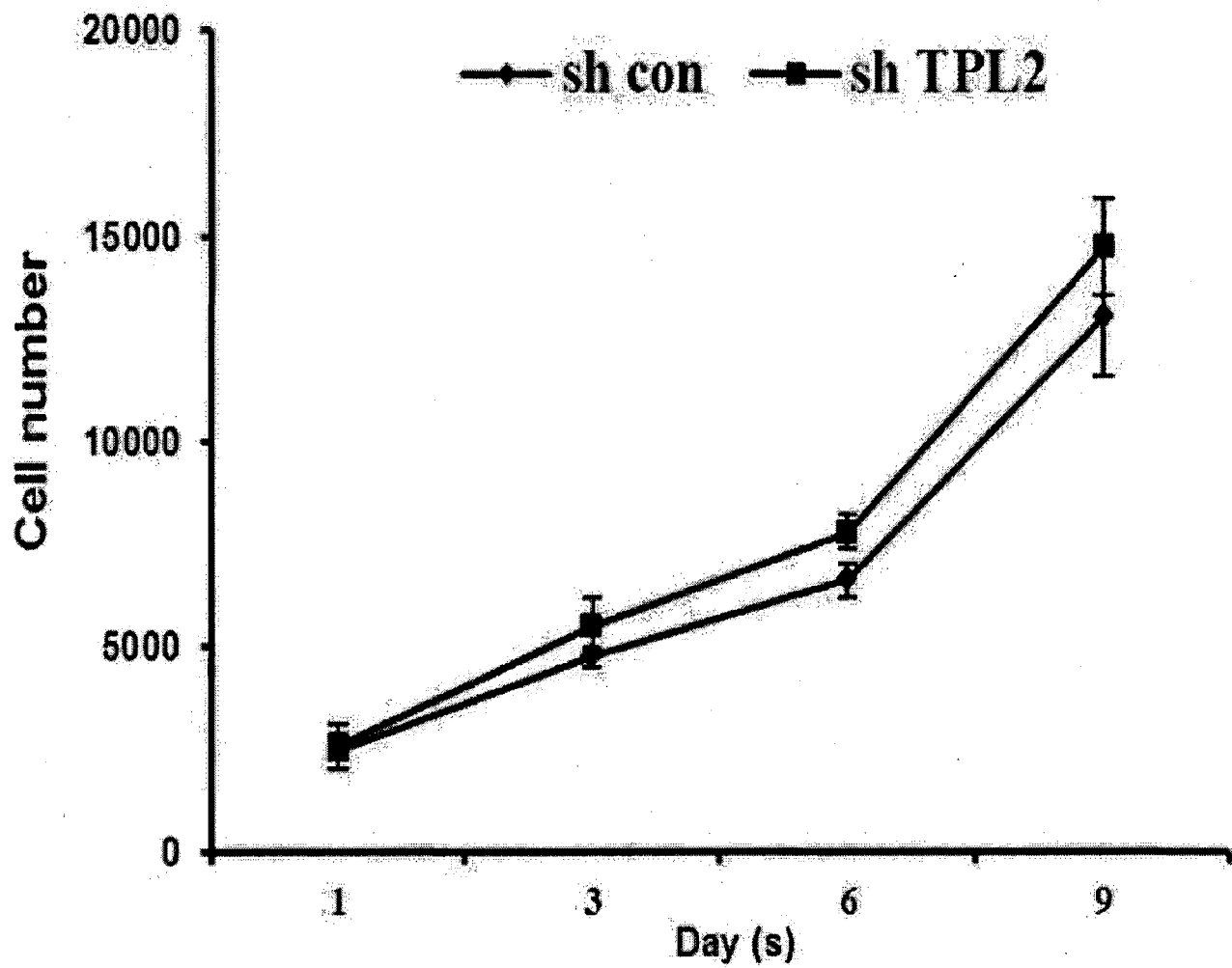
16/24

Fig. 16

17/24

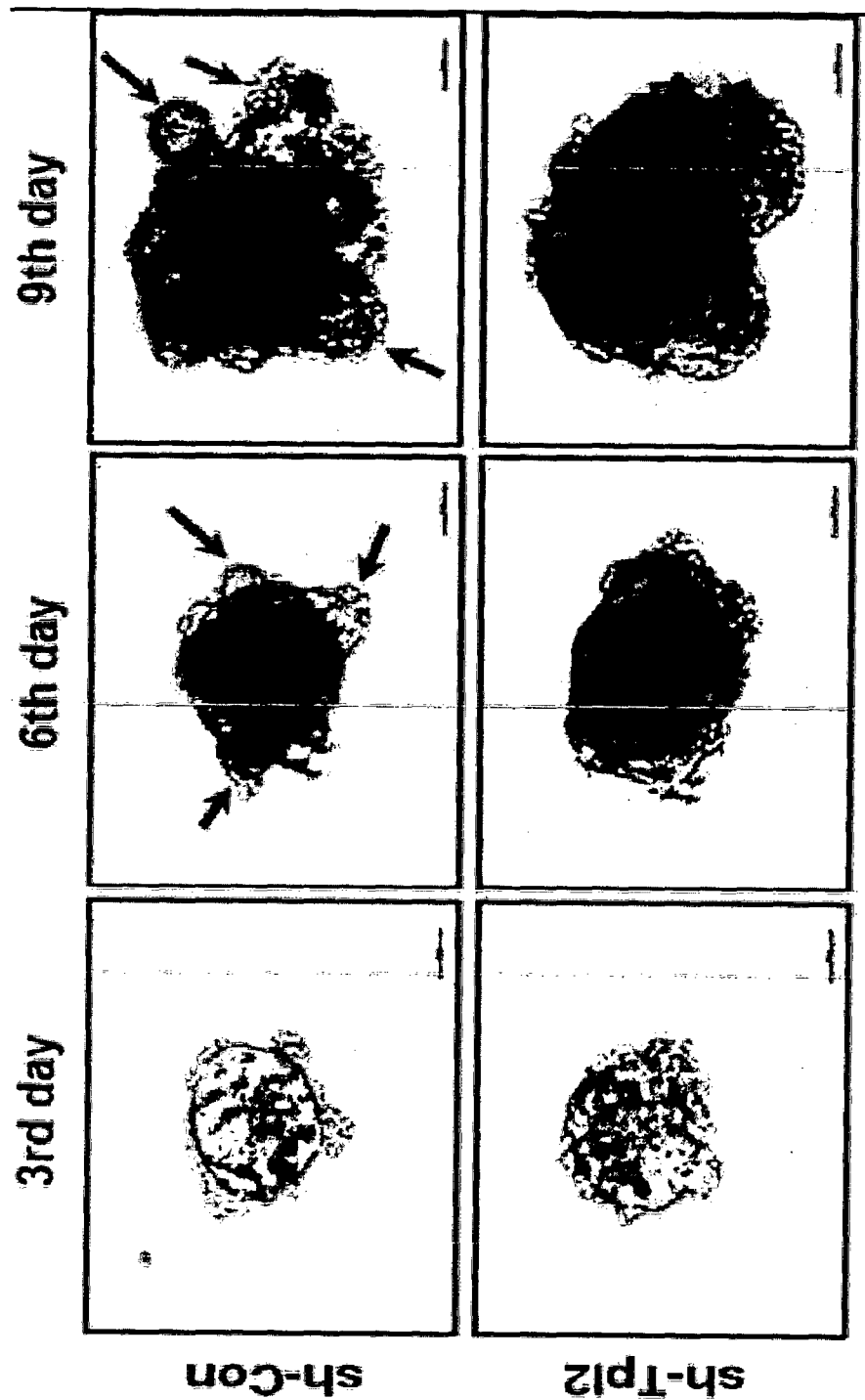
Fig. 17

18/24

Fig. 18

19/24

Fig. 19



20/24

Fig. 20

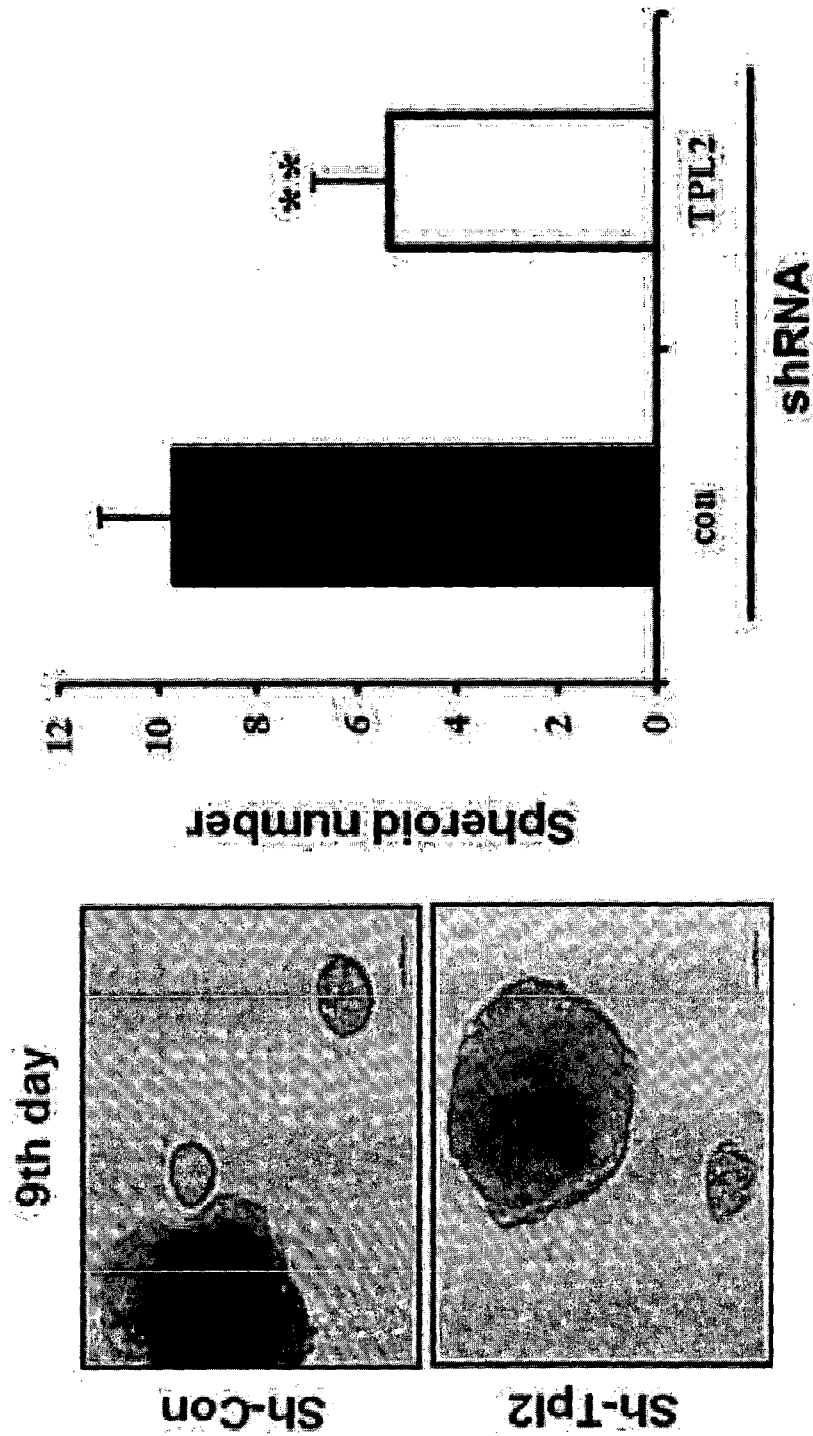
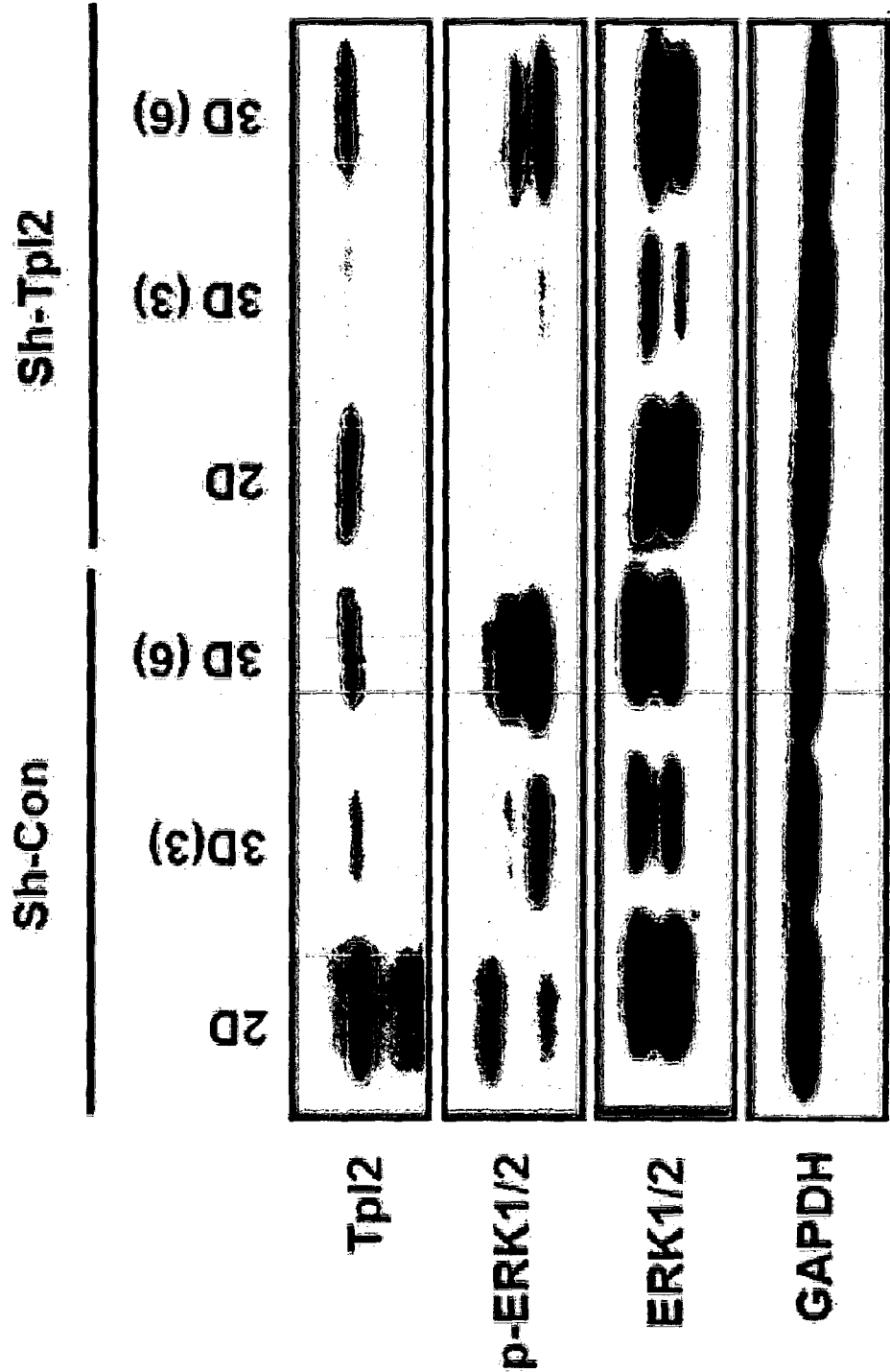


Fig. 21



22/24

Fig. 22

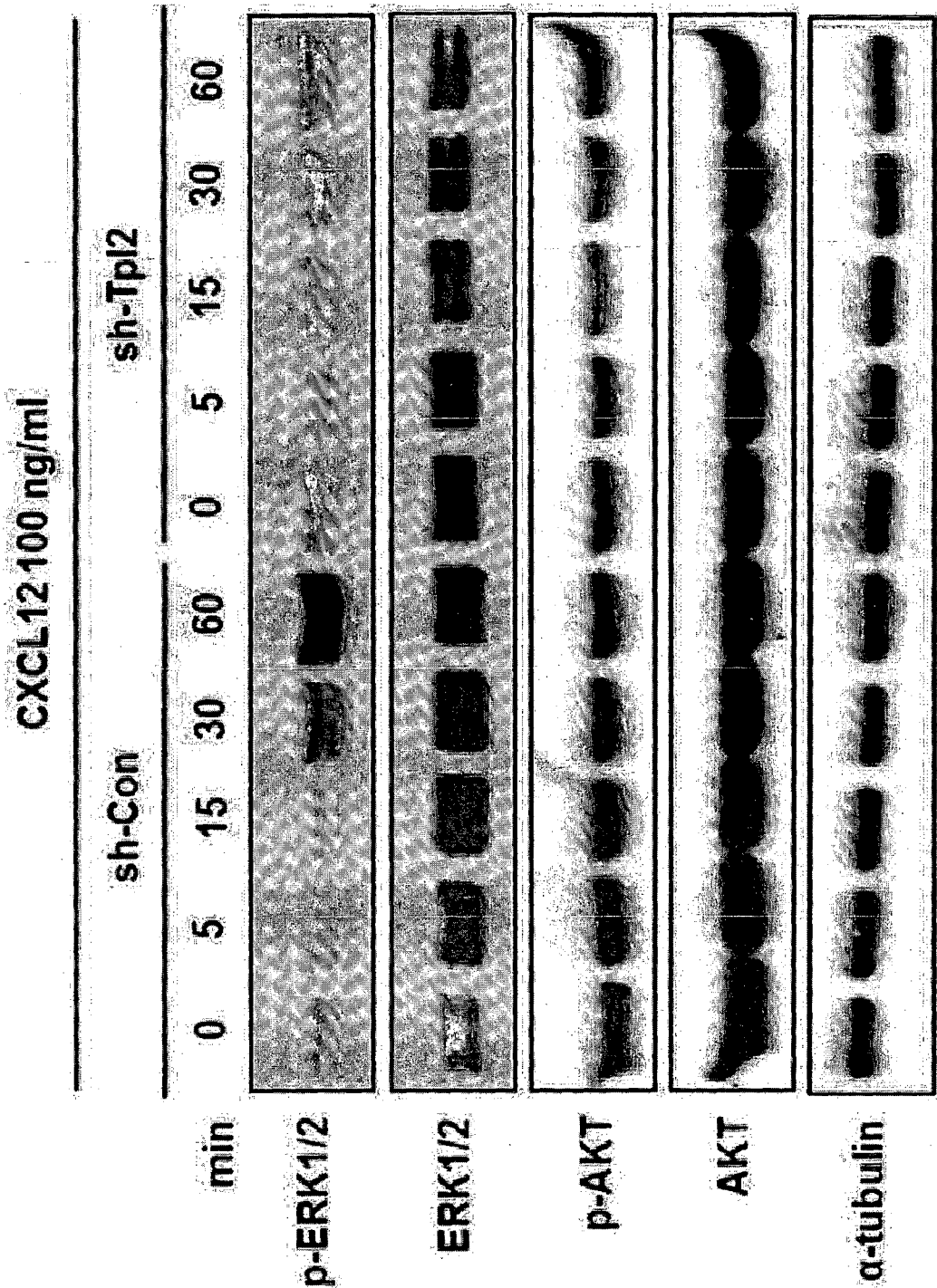
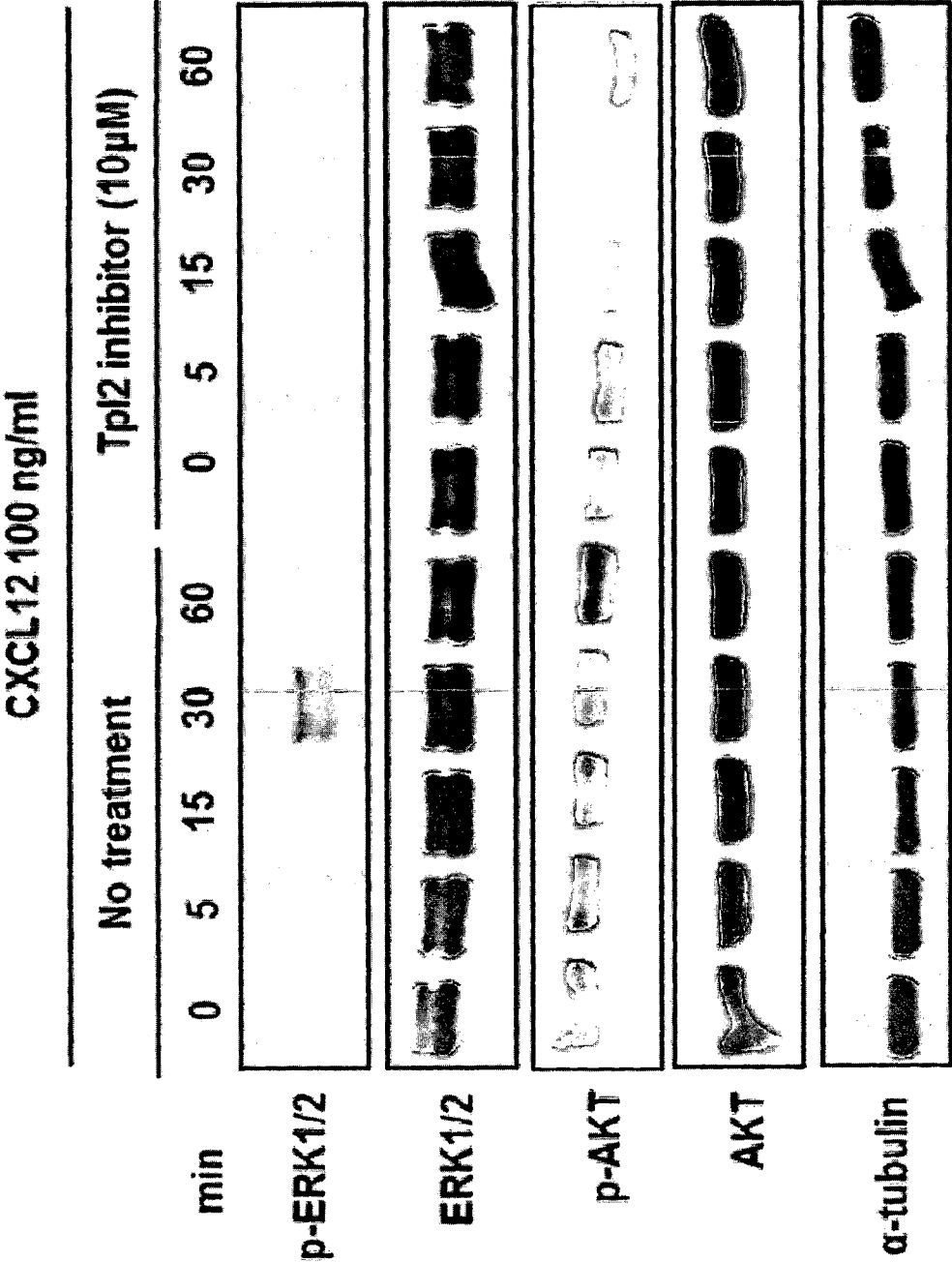
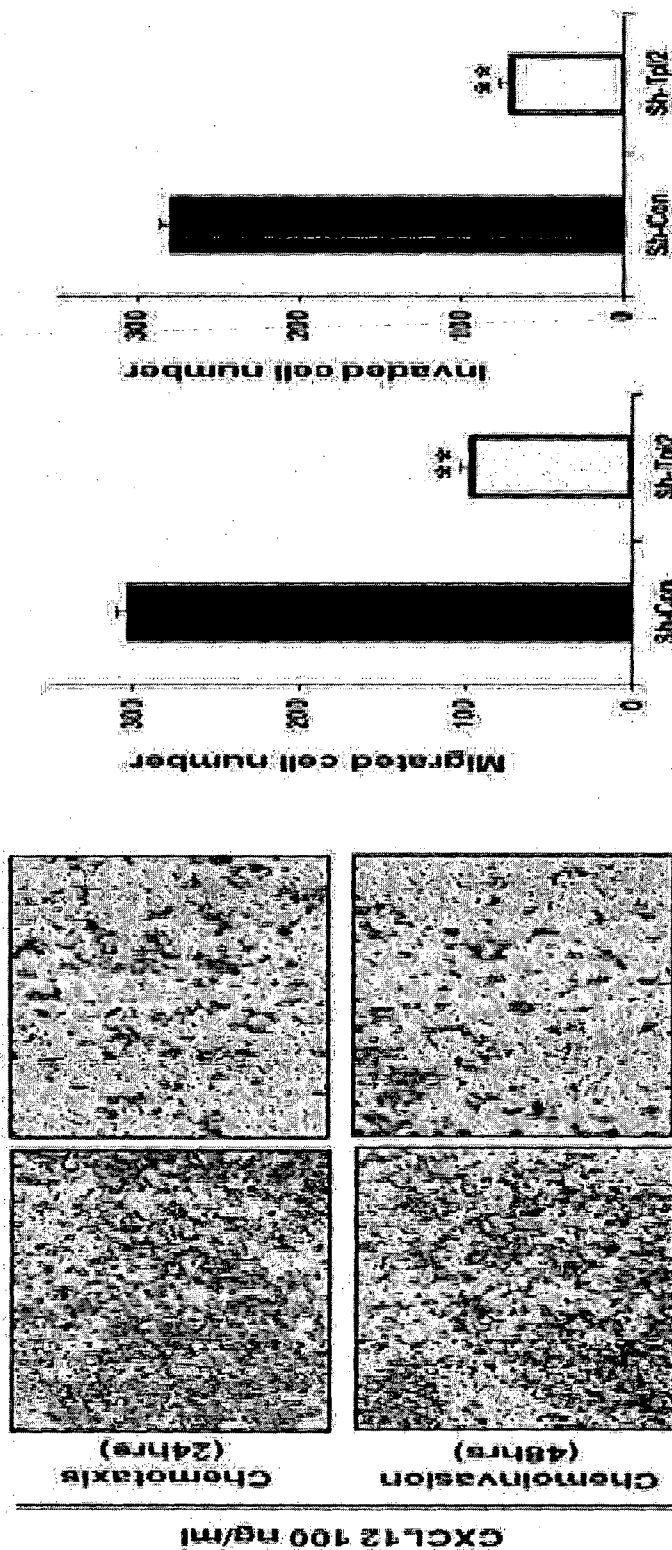


Fig. 23



24/24

Fig. 24



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/395; C07D 471/02; C07D 215/38; A61K 31/4709; A61K 31/4745; A61K 31/437; C40B 30/04; A61K 48/00; A61P 35/00

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: 4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-6-(pyridin-3-yl-methylamino)-3-cyano-1,7-naphthyridine, tumor progression locus 2, renal cell carcinoma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, H. W. et al., "Tumor progression locus 2 (Tpl2) protein kinase contributes tumor growth and metastasis of renal cell carcinoma", Cancer Research, 01 February 2013, vol. 73, no. 3(Edition), abstract no. C53 See abstract.	1-2,4,7-15
Y		3,5-6
Y	US 2006-0276498 A1 (GREEN, N. J. et al.) 07 December 2006 See abstract; and paragraphs [0070], [0094].	3,5-6
A	US 2006-0264460 A1 (GREEN, N. J. et al.) 23 November 2006 See abstract; and paragraphs [0084], [0111].	1-15
A	US 2013-0059851 A1 (GARRAWAY, L. A. et al.) 07 March 2013 See abstract; and paragraphs [0054]-[0055], [0074].	1-15
A	KAILA, N. et al., "Identification of a novel class of selective Tpl2 kinase inhibitors: 4-Alkylamino-[1,7]naphthyridine-3-carbonitriles", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, vol. 15, pp. 6425-6442 See abstract; page 6426; and tables 2-3.	1-15



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

26 SEPTEMBER 2014 (26.09.2014)

Date of mailing of the international search report

26 SEPTEMBER 2014 (26.09.2014)

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/KR2014/005461

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0276498 A1	07/12/2006	AU 2006-247315 A1	23/11/2006
		BR P10611521A2	14/09/2010
		CA 2608362 A1	23/11/2006
		CN 101223170 A	16/07/2008
		EP 1881981 A1	30/01/2008
		JP 2008-540667 A	20/11/2008
		MX 2007014258 A	22/01/2008
		US 7432279 B2	07/10/2008
		WO 2006-124944 A1	23/11/2006
US 2006-0264460 A1	23/11/2006	AU 2006-247520 A1	23/11/2006
		BR P10609928 A2	11/05/2010
		CA 2608540 A1	23/11/2006
		CN 101223143 A	16/07/2008
		EP 1888529 A2	20/02/2008
		JP 2008-540656 A	20/11/2008
		MX 2007014261 A	22/01/2008
		WO 2006-124692 A2	23/11/2006
		WO 2006-124692 A3	12/04/2007
US 2013-0059851 A1	07/03/2013	AU 2011-224410 A1	20/09/2012
		CA 2791247 A1	15/09/2011
		CN 103038364 A	10/04/2013
		EA 201290883 A1	30/04/2013
		EP 2545187 A1	16/01/2013
		JP 2013-526843 A	27/06/2013
		KR 10-2012-0139767 A	27/12/2012
		MX 2012010420 A	30/11/2012
		WO 2011-112678 A1	15/09/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 39/395(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 39/395; C07D 471/02; C07D 215/38; A61K 31/4709; A61K 31/4745; A61K 31/437; C40B 30/04; A61K 48/00; A61P 35/00 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: 4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-6-(pyridin-3-yl-methylamino)-3-cyano-1,7-naphthyridine, tumor progression locus 2, renal cell carcinoma		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE, H. W. 외., 'Tumor progression locus 2 (Tpl2) protein kinase contributes tumor growth and metastasis of renal cell carcinoma', Cancer Research, 2013.02.01., 73권, 3호(증보), 초록 번호 C53 See abstract.	1-2,4,7-15
Y		3,5-6
Y	US 2006-0276498 A1 (GREEN, N. J. 외) 2006.12.07 초록; 및 단락 [0070], [0094] 참조.	3,5-6
A	US 2006-0264460 A1 (GREEN, N. J. 외) 2006.11.23 초록; 및 단락 [0084], [0111] 참조.	1-15
A	US 2013-0059851 A1 (GARRAWAY, L. A. 외) 2013.03.07 초록; 및 단락 [0054]-[0055], [0074] 참조.	1-15
A	KAILA, N. 외., 'Identification of a novel class of selective Tpl2 kinase inhibitors: 4-Alkylamino-[1,7]naphthyridine-3-carbonitriles', Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15권, 페이지 6425-6442 초록; 페이지 6426; 및 표 2-3 참조.	1-15
☐ 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 2014년 09월 26일 (26.09.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 09월 26일 (26.09.2014)
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 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0276498 A1	2006/12/07	AU 2006-247315 A1 BR PI0611521A2 CA 2608362 A1 CN 101223170 A EP 1881981 A1 JP 2008-540667 A MX 2007014258 A US 7432279 B2 WO 2006-124944 A1	2006/11/23 2010/09/14 2006/11/23 2008/07/16 2008/01/30 2008/11/20 2008/01/22 2008/10/07 2006/11/23
US 2006-0264460 A1	2006/11/23	AU 2006-247520 A1 BR PI0609928 A2 CA 2608540 A1 CN 101223143 A EP 1888529 A2 JP 2008-540656 A MX 2007014261 A WO 2006-124692 A2 WO 2006-124692 A3	2006/11/23 2010/05/11 2006/11/23 2008/07/16 2008/02/20 2008/11/20 2008/01/22 2006/11/23 2007/04/12
US 2013-0059851 A1	2013/03/07	AU 2011-224410 A1 CA 2791247 A1 CN 103038364 A EA 201290883 A1 EP 2545187 A1 JP 2013-526843 A KR 10-2012-0139767 A MX 2012010420 A WO 2011-112678 A1	2012/09/20 2011/09/15 2013/04/10 2013/04/30 2013/01/16 2013/06/27 2012/12/27 2012/11/30 2011/09/15