



(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/001453

(22) 국제출원일: 2024년 1월 31일 (31.01.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0048846 2023년 4월 13일 (13.04.2023) KR
10-2023-0048932 2023년 4월 13일 (13.04.2023) KR

(71) 출원인: 한양대학교 에리카산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 임형신 (YIM, Hyung Shin); 06617 서울특별시 서초구 서초대로 385, 8동 604호, Seoul (KR). 박정원 (PARK, Jung Won); 08570 서울특별시 금천구 독산로 24길 19-3, B동 201호, Seoul (KR). 김다운 (KIM, Da

Eun); 15361 경기도 안산시 단원구 고잔로 116, 708호, Gyeonggi-do (KR).

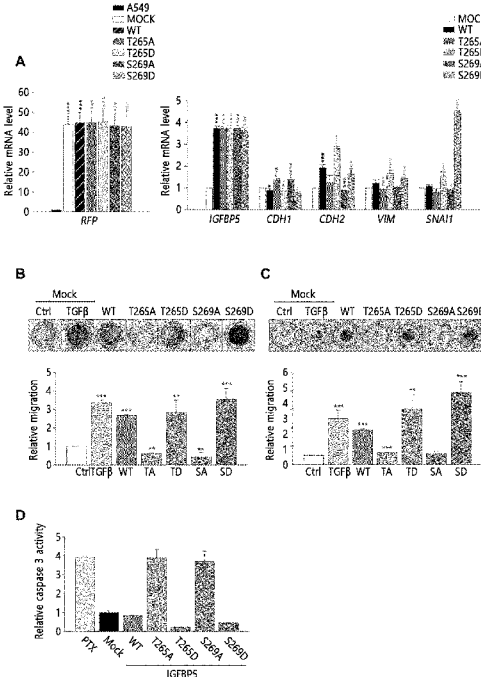
(74) 대리인: 특허법인 무한 (MUHANN PATENT & LAW FIRM); 06144 서울특별시 강남구 언주로 560, 8층, Seoul (KR).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

(54) Title: METHOD FOR PREVENTING OR TREATING CANCER BY BLOCKING EXCESSIVE PRODUCTION OF PHOSPHORYLATED IGFBP5

(54) 발명의 명칭: 인산화된 IGFBP5의 과도한 생성을 차단하여 암을 예방 또는 치료하는 방법



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to confirm that PLK1 induces tumor formation and cancer metastasis through IGFBP5 phosphorylation, and provide an IGFBP5 mutant in which a region phosphorylated by PLK1 is mutated and a vector expressing same. The IGFBP5 mutant of the present invention maintains a binding ability to PLK1, and thus binds to PLK1 overexpressed competitively with wild-type IGFBP5 in cancer cells, thereby making it possible to inhibit tumor formation and cancer metastasis, and the provision of a vector expressing the mutant in cancer cells can inhibit cancer mobility and invasiveness and inhibit tumor formation. The mutant of the present invention is safe because it does not affect the inherent function of IGFBP5 in normal cells, and thus can be useful in the treatment of various diseases caused by abnormal cell growth, especially degenerative diseases such as primary and metastatic solid cancer and leukemia.

(57) 요약서: 본 발명은 PLK1이 IGFBP5 인산화를 통해 종양의 형성과 암의 전이를 유도하는 것을 확인하고, PLK1에 의해 인산화되는 영역이 변이된 IGFBP5 돌연변이체 및 이를 발현하는 벡터를 제공하는 것이다. 본 발명의 IGFBP5 돌연변이체는 PLK1와의 결합력은 유지하고 있는 바 암세포에서 야생형 IGFBP5와 경쟁적으로 과발현된 PLK1과 결합하여 종양의 형성 및 암의 전이를 억제할 수 있으며, 암세포 내에서 상기 돌연변이체를 발현하는 벡터의 제공은 암의 이동성 및 침습성을 억제하고 종양의 형성을 저해할 수 있다. 본 발명의 돌연변이체는 정상세포에서 IGFBP5의 고유 기능에는 영향을 주지 않아 안전한 바 세포의 비정상적인 성장에 의한 각종 질환, 특히 원발성 및 전이성 고형암과 백혈병 등의 같은 퇴행성 질환 치료에 유용하게 사용될 수 있다.



TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 인산화된 IGFBP5의 과도한 생성을 차단하여 암을 예방 또는 치료하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 종양 단백질 키나제 효소 PLK1 이 IGFBP5 인산화를 통해 종양의 형성과 암의 전이를 유도하는 것을 확인하고, PLK1에 의해 인산화되는 영역이 변이된 IGFBP5 돌연변이체와 IGFBP5 발현 억제에 효과적인 shRNA 등을 제공하는 것이다. 구체적으로 본 발명의 IGFBP5 돌연변이체는 야생형 IGFBP5의 269번 세린 위치와 265번 트레오닌 위치에 아미노산이 치환된 돌연변이 단백질로서, 본 발명의 IGFBP5 돌연변이체와 IGFBP5 shRNA는 종양의 형성과 암의 이동성 및 침습성을 감소시킬 수 있다.

배경기술

- [2] IGFBP5는 IGF-I에 binding하여 IGF-1 signaling을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Firth SM et al., *Endocr Rev*, (2002) 23(2002), pp.824-854). IGF-1는 인슐린과 유사하며 조직의 성장, 발달 및 유지에 중요한 성장 인자이다 (Sahitya K Denduluri et al., *Genes and Disease*, 2 (2015), pp. 13-25). 모든 척추 동물에서 발견되는 IGFBP5는 인간의 2번 염색체에 위치해 있으며, 인간의 다양한 조직에서 발현되고 약 29 KDa의 단백질을 암호화한다. IGFBP5는 N-terminal domain, L-domain 및 C-terminal domain으로 구성되어 있으며, 세포외 기질(ECM)로 분비되도록 하는 signal peptide와 핵으로 이동하도록 하는 핵 국소화 서열(NLS)을 가지고 있다 (Mustafa Akkiprik et al., *Breast Cancer Res*, 212 (2008)). IGFBP5의 N-terminal domain과 C-terminal domain 모두 IGF-1 결합 부위를 가지고 있으며, C-terminal domain은 ECM 단백질과의 결합 site를 포함한다 (Hodgkinson SC et al., *J Mol Endocrinol*, 13 (1994), pp. 105-112). IGFBP5는 IGF-1 의존적 경로와 IGF-1 비의존적 경로, 2가지 경로를 통해 발암에 잠재적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Mustafa Akkiprik et al., *BMC cancer*, 103 (2009)). IGFBP5는 IGF-1에 결합하여 IGF-1의 반감기를 늘려주며, 조직에서 필요할 때 방출하기 위한 저장소 역할을 할 수 있다 (Mohan S et al., *J Endocrinol*, 175 (2002), pp.19-31). IGFBP-5는 세포 표면과 세포외 기질(ECM) 모두에 결합하는데, IGFBP-5가 ECM 또는 heparin에 결합하면 IGF-I에 대한 IGFBP-5 친화도가 8~17배 감소하고 세포에 대한 IGF-I의 생물학적 작용이 향상된다 (Jones JJ et al., *J Cell Biol*, 121 (1993), pp.679-87.). IGF-1 비의존적 경로에서는 IGFBP5가 추정되는 수용체와의 결합을 통해 세포질로 들어갈 수 있다. 다른 단백질과의 상호작용에 의한 IGFBP5의 세포질 축적은 anti-apoptosis 효과를 나타내고 전이를 자극하는 반면, Importin-β와의 결합을 통해 핵으로 들어간 IGFBP5는 apoptosis를 증가시킨다. 유방암 조직 표본에서 IGFBP5 mRNA가 검출되었으며, 인접한 정상 조직과 비교해 종양 표본에서 높은 발현을

보였다. 또한, IGFBP5 단백질이 세포질에 국한되어 있음이 관찰되었다 (Mustafa Akkiprik et al., Breast Cancer Res, 212 (2008)).

- [3] IGFBP5의 발현은 유방암 (Mustafa Akkiprik et al., Breast Cancer Res, 212 (2008)), 결장직장암 (Yu Deng et al., International Journal of General Medicine, 15 (2022), pp.6485-6497), 췌장암 (Sarah K et al., Molecular Carcinogenesis, 45 (2006), pp.814-827), 난소암 (Graeme Walker et al., Clinical Cancer Research, 13 (2007), pp.1438-1444), 교모세포종 (Vani Santosh et al., Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 19 (2010), pp.1399-1408), 비기능성 뇌하수체 선종(NEPA) (Francoise Galland, Endocrine-Related Cancer, 17 (2010), pp.361-371)을 비롯한 악성 종양에서 관찰된다.
- [4] 유방암의 clinical data에서 양성 유방 상피에 비해 T1 유방 암종에서 IGFBP5의 발현이 높았으며, T1NO 암종보다 T1N1에서 발현이 높음이 관찰됐다. IGFBP5가 T1 침윤성 유방에서 림프절 전이를 예측하는 마커 중 하나가 될 수 있으며 이는 IGFBP5 발현이 전이와 연관되어 있음을 시사한다고 알려졌지만 (Huamin Wang MD et al., The Breast journal, 14 (2008), pp.261-267), EMT를 매개하는데 있어서 그 역할은 정확하게 알려져 있지 않다.
- [5] Polo-like kinase 1(PLK1)은 발암의 원인 단백질 키나제 효소로 잘 알려져 있으며 (Barr et al., Nat Rev Mol Cell Biol 5 (2004) 429-440; Yim and Erikson, Mutation Research Reviews Mutation Research, 761 (2014) 31-39), 최근 연구에 따르면 전이를 유발하는 키나제 효소로도 그 기능이 밝혀져 (Cai et al., Am J Transl Res 8 (2016) 4172-4183; Wu et al., eLife 5 (2016) e10734; Shin et al., Oncogene, 39 (2020), pp.767-785), 암치료의 타겟 분자로 연구되고 있으며, 이를 기반으로 PLK1에 대한 억제제 개발을 통한 항암제 개발 연구가 다국적기업을 중심으로 경쟁적으로 진행되고 있다(J. Van den Bossche, 36 (2016), pp.749-786; Rosie Elizabeth Ann Gutteridge, Molecular Cancer Therapeutics, 15 (2016), pp.1427-1435; Yim, Anti-Cancer Drugs 24(2013) 999-1006; Yim and Erikson, Mutation Research Reviews Mutation Research, 761 (2014) 31-39). PLK1은 인산화효소 활성을 지닌 키나제 활성 도메인과 기질과 결합하는 폴로박스 도메인을 지니고 있으며, T210위치에서의 인산화가 PLK1의 활성화를 유발시킨다. 활성화된 PLK1 인산화 효소는 기질의 Ser/Thr 잔기를 인산화시키는 효소이다(Barr et al., Nat Rev Mol Cell Biol 5 (2004) 429-440). 기능적으로는 성장 및 분열하는 세포에서 발현이 증가되는데 특히 세포주기 중 세포분열기에서의 발현과 활성이 정점을 이루고 있다. 따라서 빠르게 성장하는 암세포에서 또한 그 발현율이 높은 것으로 알려져 있으며 (Yim, Anti-Cancer Drugs 24(2013) 999-1006; Yim and Erikson, Mutation Research Reviews Mutation Research, 761 (2014) 31-39), 암세포의 단계별 악성화 과정에서 많은 경우 그 발현이 증가되는 것이 실험적으로 보고되었다. 특히 비소세포 폐암, 두부경부암, 후두암, 유방암, 간암, 자궁내막암, 대장암, 난소암, 췌장암, 전립선암 등에서 악성 단계가 높을수록 그 발현이 증가되어 있음이 보고되었다(Yim,

Anti-Cancer Drugs 24(2013) 999-1006; Yim and Erikson, Mutation Research Reviews Mutation Research, 761 (2014) 31-39). 최근 연구보고와 본 발명자들의 연구에 의하면 활성화형의 PLK1이 암의 전이성을 증가시키는 데 관여하고 있음이 보고되었고(Cai et al., Am J Transl Res 8 (2016) 4172-4183; Wu et al., eLife 5 (2016) e10734; Shin et al., Oncogene, 39 (2020), pp.767-785), 이에 전이성 암을 치료하기 위한 분자 타겟으로써 PLK1에 대한 가치가 최근 부각되기 시작하였다. 따라서 PLK1의 인산화기질의 기능 조절을 타겟으로 하는 항암제의 경우 원발성 암뿐만 아니라 전이성 암의 치료에도 효과가 뛰어날 것으로 기대하고 있다.

- [6] 전이암은 암종에 따라 다른 차이를 보여주고는 있으나, 전체 암환자 사망의 90%까지 이를 수 있어 그 위험도를 가늠할 수 있다 (Valastyan, S. and Weinberg, R.A., Cell 147 (2011) 275-292; Khan, I. and Steeg, P.S., Lab Invest 98 (2018) 198-210). 항암치료에 있어 원발소 암을 치료한다고 하더라도, 전이를 막을 수 없다면 암의 재발 등에 의해서 생존률이 매우 낮아지는 것으로 알려져 있다 (Valastyan, S. and Weinberg, R.A., Cell 147 (2011) 275-292; Shibue, T. and Weinberg, Semin Cancer Biol 21 (2011) 99-106). 암의 치료에 있어, 암 세포의 증식 억제와 전이의 억제가 항상 같이 나타나는 효과가 아니다. 따라서, 암의 전이를 억제할 수 있는 치료법의 개발은 많은 암환자들의 생존율을 높여 암의 치료 효율이 비약적으로 개선될 수 있다는 면에서, 전이성 암의 치료를 위한 암의 전이 및 침윤을 효과적으로 억제하는 치료 타겟 또는 치료제의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 점 돌연변이를 포함하는 IGFBP5 단백질이 여러 조직에서 유래한 고형암에서의 전이성을 억제하며, IGFBP5 점 돌연변이를 포함하는 IGFBP5 단백질에 의해 비소세포폐암 세포에서 나타나는 암세포의 전이성, 침습성 및 선택적 종양형성에 대한 강력한 억제 작용을 이용한 전이성 암 치료제로서의 용도에 관한 것이다.
- [8] 또한 일반 고형암뿐만 아니라, 전이성 암세포에서 민감하게 세포 사멸을 유도하는 작용을 이용한 세포 사멸 유도제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 각종 고형암, 전이성 암을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [9] 이에, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 269 번째 세린 아미노산이 치환된 IGFBP5 돌연변이체와 이를 발현하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 265 번째 트레오닌 아미노산이 치환된 IGFBP5 돌연변이체와 이를 발현하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이체 또는 벡터를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [12] 또한, 본 발명은 IGFBP5 발현 억제제를 통해서 암세포의 전이성, 침습성 및 선택적 종양형성의 감소를 확인하고, IGFBP5 발현 억제에 효과적인 shRNA를 암의 예방 또는 치료 용도에 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 IGFBP5 shRNA 및 IGFBP 돌연변이 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [14] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 야생형 IGFBP5(insulin like growth factor binding protein 5)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질이고, 서열번호 5의 염기서열로 암호화된다.
- [16] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 IGFBP5에서 256 및/또는 269번째 아미노산 잔기가 트레오닌(Threonine)이 글리신(Glycine), 알라닌(Alanine), 발린(Valine), 루신(Leucine), 아이소루신(Isoleucine), 프롤린(Proline), 페닐알라닌(Phenylalanine), 메티오닌(Methionine) 또는 트립토판(Tryptophan)으로 치환된 IGFBP5 돌연변이 단백질을 제공한다.
- [17] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 돌연변이 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 돌연변이 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 3의 256번째 아미노산 잔기는 알라닌일 수 있다.
- [20] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 IGFBP5 돌연변이 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 4의 269 번째 아미노산이 알라닌일 수 있다.
- [22] 또한, 본 발명은 상기 IGFBP5 돌연변이체를 암호화하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터를 제공한다.
- [23] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 제조합 벡터는 바이러스 벡터(viral vector)일 수 있으며, 바람직하게는 렌티 바이러스 벡터일 수 있다.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 IGFBP5 돌연변이체 또는 제조합 벡터를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 상기 IGFBP5 돌연변이체 또는 제조합 벡터를 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [26] 본 발명은 IGFBP5 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [27] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 IGFBP5 발현 억제제는 IGFBP5 mRNA의 일부와 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 앵타머, siRNA, shRNA, 및 miRNA일 수 있다.
- [28] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 IGFBP5 발현 억제제는 서열번호 11, 서열번호 15, 또는 서열번호 19의 염기서열과 상보적인 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [29] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 IGFBP5 발현 억제제는 서열번호 6 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 shRNA일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 6의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 shRNA일 수 있다.
- [30] 또한, 본 발명은 상기 shRNA를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [31] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 암세포의 이동성 및 침습성을 감소시켜 암의 전이(Metastasis)를 억제하는 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 암은 고형암일 수 있고, 상기 고형암은 교모세포종, 난소암, 방광암, 비기능성 뇌하수체 선종, 식도암, 신장암, 유방암, 위암, 직장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 폐암, 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 암일 수 있으며, 상기 폐암은 비소세포폐암일 수 있으며, 상기 비소세포폐암은 특히 선암일 수 있다.
- [33] 또한, 본 발명은 상기 IGFBP5 돌연변이체 또는 재조합 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [34] 또한, 본 발명은 상기 IGFBP5 발현 억제제; 및/또는 IGFBP5 돌연변이체 돌연변이체 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터;를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [35] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 개체는 암의 예방 또는 치료가 필요한 인간일 수 있으며, 이미 암이 발생되어 치료 중에 있는 환자, 또는 암의 완치 후 전이를 예방하기 위한 환자일 수 있다.
- [36] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 IGFBP5 돌연변이체, 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 또는 IGFBP5 발현 억제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [37] 본 발명의 IGFBP5 돌연변이체는 PLK1와의 결합력은 유지하고 있는 바 암세포에서 야생형 IGFBP5과 경쟁적으로 과발현된 PLK1과 결합하여 종양의 형성 및 암의 전이를 억제할 수 있으며, 암세포 내에서 상기 돌연변이체를 발현하는 벡터의 제공은 암의 이동성 및 침습성을 억제하고 종양의 형성을 저해할 수 있다. 본 발명의 비인산화 점 돌연변이체는 정상세포에서 IGFBP5 고유 기능에는 영향을 주지 않아 안전한 바, 세포의 비정상적인 성장에 의한 각종 질환, 특히 원발성 및

전이성 고형암과 백혈병 등의 같은 퇴행성 질환 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1a 내지 도 1b는 선암종 환자를 대상으로 한 임상분석에서 PLK1과 IGFBP5 발현에 따른 생존율을 분석 결과이다.
- [39] 도 1a : KM plotter를 이용하여 폐선암종 단계별 환자에서 PLK1과 IGFBP5 발현에 따른 전체 생존률을 분석한 결과이다.
- [40] 도 1b : Heat map 분석을 통해 폐선암종 단계별 환자에서 PLK1과 IGFBP5 발현 증가를 분석한 결과이다.
- [41]
- [42] 도 2a 내지 도 2g는 TGF- β 에 의한 간엽이행과정에서 IGFBP5 발현 수준을 관찰한 결과이다.
- [43] 도 2a : A549 세포와 H358 세포에 5ng/ml TGF- β 를 처리한 후 EMT가 일어났을 때 IGFBP5 발현을 면역블롯을 이용하여 관찰한 결과이다. EMT가 잘 유도되었는지 확인하기 위하여 상피 마커 E-cadherin과 간엽 마커 N-cadherin, Vimentin, SNAI1의 발현 또한 관찰하였다.
- [44] 도 2b : A549 세포와 H358 세포에 5ng/ml TGF- β 를 처리한 후 EMT가 일어났을 때 IGFBP5 발현을 관찰한 면역블롯 데이터를 수치로 표현한 그래프이다.
- [45] 도 2c : A549 세포와 H358 세포에 5ng/ml TGF- β 를 처리한 후 EMT가 일어났을 때 IGFBP5 mRNA level을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용하여 관찰한 결과이다.
- [46] 도 2d : 면역블랏(Immunoblotting)을 이용하여 폐 섬유아세포 MRC5와 원발성 폐암 A549, 전이성 폐암 H460, H358, H1299에서 IGFBP5와 PLK1, p-PLK1의 발현을 분석한 결과이다.
- [47] 도 2e : 면역블랏(Immunoblotting)을 이용하여 폐 섬유아세포 MRC5와 원발성 폐암 A549, 폐선암 stage 별 cell line (H522, H1373, H2009)에서 IGFBP5와 PLK1, p-PLK1의 발현을 분석한 결과이다.
- [48] 도 2f : A549 세포와 H358 세포에 5ng/ml TGF- β 를 처리한 후 EMT가 일어났을 때 IGFBP5 발현을 면역블롯을 이용하여 관찰한 결과이다. EMT가 잘 유도되었는지 확인하기 위하여 상피 마커 E-cadherin과 간엽 마커 N-cadherin, Vimentin, SNAI1의 발현 또한 관찰하였다.
- [49] 도 2g : A549 세포와 H358 세포에 5ng/ml TGF- β 를 처리한 후 EMT가 일어났을 때 IGFBP5 발현을 관찰한 면역블롯 데이터를 수치로 표현한 그래프이다.
- [50]
- [51] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 임상 데이터에서 IGFBP5의 발현에 따른 고형암 환자의 생존율을 분석한 결과이다.

- [52] A: KM PLOTTER 분석을 통해서 자궁경부암 (왼쪽 그래프), 자궁내막암 (가운데 그래프) 환자와 유방암 (오른쪽 그래프) 환자에서 IGFBP5 발현에 따른 생존율을 분석한 결과 그래프이다.
- [53] B: KM PLOTTER 분석을 통해서 경부 방광암 (왼쪽 그래프), 식도암 (가운데 그래프) 환자와 난소암 (오른쪽 그래프) 환자에서 IGFBP5 발현에 따른 생존율을 분석한 결과 그래프이다.
- [54] C: KM PLOTTER 분석을 통해서 신장세포암 (왼쪽 그래프) 환자와 위암 (가운데 그래프) 환자에서 IGFBP5 발현에 따른 생존율을 분석한 결과 그래프이다.
- [55]
- [56] 도 4는 PLK1과 IGFBP5의 상호작용과 PLK1 활성형에 의한 IGFBP5의 인산화 및 인산화 부위를 분석한 결과이다.
- [57] A : A549 세포에 5 ng/ml TGF- β 를 처리한 조건에서 PLK1 항체를 이용하여 면역침강법을 진행하여 IGFBP5와 PLK1이 상호작용함을 관찰한 결과이다.
- [58] B : H460 세포에 2.5 ng/ml TGF- β 를 처리한 조건에서 PLK1 항체를 이용하여 면역침강법을 진행하여 IGFBP5와 PLK1이 상호작용함을 관찰한 결과이다.
- [59] C : GST가 표지된 IGFBP5를 정제하기 위하여 GST가 tagging되어 있는 pGEX-4T-1 vector에 IGFBP5를 cloning한 결과이다.
- [60] D : GST purification을 이용하여 GST가 tagging된 IGFBP5를 정제한 결과이다.
- [61] E : GST가 표지된 IGFBP5를 이용하여 활성형 PLK1(PLK1 TD)와 함께 인산화 효소 반응법을 수행한 결과이다.
- [62]
- [63] 도 5a 내지 도 5d는 PLK1에 의해 인산화되는 IGFBP5의 site를 찾기 위해 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 결과이다.
- [64] 도 5a : 액체크로마토그래피 질량분석법을 통해서 PLK1에 의한 인산화된 IGFBP5 인산화 가능 후보 부위를 확인한 결과이다.
- [65] 도 5b : 인산화 효소 반응법을 수행하기 전, 부분 특이적 돌연변이 치환법을 이용하여 IGFBP5의 후보 부위를 비인산화 형태인 알라닌으로 치환한 결과이다.
- [66] 도 5c : 부분 특이적 돌연변이 치환법을 이용하여 IGFBP5의 인산화 후보 부위를 알라닌으로 치환한 비인산화 점 돌연변이체 단백질과 활성형 PLK1을 이용하여 인산화 효소 반응법을 수행한 결과이다.
- [67] 도 5d : 인간을 포함한 고등동물에서 265번 트레오닌과 269번 세린이 보존되어 있음을 확인하였다.
- [68]
- [69] 도 6는 렌티바이러스를 사용하여 Tet-On 3G inducible system을 통해 RFP-IGFBP5를 발현시킨 후 EMT marker들의 발현을 관찰한 결과이다.
- [70] A : 렌티바이러스를 만들기 위해 pLVX-TRE3G-eRFP vector에 IGFBP5를 cloning한 결과이다.

- [71] B : RFP-IGFBP5 발현을 위한 system인 Tet-On 3G inducible system을 설명한 그림이다.
- [72] C : 폐암세포 A549에 IGFBP5의 265번 트레오닌의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체와 269번 세린의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 후 IGFBP5 단백질 과발현 유무와 상피마커(E-cadherin), 중간엽이행 마커(Vimentin, N-cadherin) 변화를 면역블롯으로 관찰한 결과이다.
- [73]
- [74] 도 7는 폐암세포 A549에서 IGFBP5의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체의 과발현이 암세포의 이동성과 침습성에 미치는 영향을 측정한 실험이다.
- [75] A : 폐암세포 A549에 IGFBP5 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 후 RFP-IGFBP5 mRNA 과발현 유무와 상피마커(CDH1), 중간엽이행 마커(CDH2, VIM, SNAI1) mRNA 변화를 연쇄반응(Real-time PCR)을 통해 관찰한 결과이다.
- [76] B : IGFBP5 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 폐암세포 A549에서 인서트(inset)를 이용한 이동성 실험(migration assay)을 통해서 세포의 이동성 양상을 관찰한 결과이다.
- [77] C : IGFBP5 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 폐암세포 A549에서 matrigel과 인서트(inset)를 이용한 침습성 실험(invasion assay)을 통해서 세포의 침습성 양상을 관찰한 결과이다.
- [78] D : Caspase-3 assay를 이용하여 IGFBP5의 원형 또는 인산화 점 돌연변이체가 발현되는 total 암세포에서의 caspase-3 활성을 분석한 그래프이다.
- [79]
- [80] 도 8은 Tail-vein-injection 동물모델에서 베타-카테닌의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 암세포의 전이성을 확인한 실험이다.
- [81] A : IGFBP5 인산화 및 비인산화 점돌연변이체를 발현하는 폐암세포를 마우스 꼬리 정맥에 주사했을 때 마우스의 폐로의 전이성 암 생성 효과 및 IGFBP5 비인산화 점 돌연변이체 발현에 의한 전이 억제효과를 관찰한 결과이다.
- [82] B : IGFBP5 인산화 및 비인산화 점돌연변이체를 발현시킨 폐암세포를 정맥주사했을 때 마우스에서 전이성 암 발생효과 및 IGFBP5 비인산화 점돌연변이체 발현 폐암 모델에서의 전이성 암 발생 억제효과에 따른 암 생성 빈도를 수치로 나타낸 그래프이다.
- [83]
- [84] 도 9는 전이성 조건에서 IGFBP5 mRNA 발현 억제 물질인 IGFBP5 shRNA 처리에 의한 암세포의 전이성 억제 효과와 세포 생존에 미치는 효과를 확인한 결과이다.
- [85] A : 타겟 시퀀스에 따른 IGFBP5 shRNA의 IGFBP5 발현 억제 정도를 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용하여 측정한 그래프이다.
- [86] B : TGF- β 유도성 전이환경에서 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 단백질 수준의 상피간엽이행 마커 변화를 면역블롯법으로 관찰한 결과이다.

- [87] C: TGF- β 유도성 전이환경에서 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 단백질 수준의 상피간엽이행 마커 변화를 관찰한 면역블롯 데이터를 수치로 표현한 그래프이다.
- [88] D: TGF- β 유도성 전이환경에서 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 mRNA수준의 상피간엽이행 마커 변화를 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 통해 관찰한 결과이다.
- [89]
- [90] 도 10은 IGFBP5의 TGF- β 에 의해 유도된 전이환경에서 IGFBP5 mRNA 발현 억제 물질인 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 암세포의 이동성과 침습성에 대한 억제 효과 및 생존율 변화를 관찰한 결과이다. 또한, IGFBP5 인산화 점 돌연변이체에 의한 암세포의 이동성과 침습성을 관찰한 결과이다.
- [91] A: TGF- β 에 의해 유도된 전이환경에서 Transwell을 이용하여 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 세포의 이동성이 억제되는 효과를 관찰한 결과이다.
- [92] B: TGF- β 에 의해 유도된 전이환경에서 Transwell 및 matrigel을 이용하여 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 세포의 침습성이 억제되는 효과를 관찰한 결과이다.
- [93] C: TGF- β 유도성 전이환경에서 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 caspase-3 활성 변화를 Caspase-3 assay를 이용하여 분석한 그래프이다.
- [94] D: IGFBP5 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 폐암세포 A549에서 인서트(inset)를 이용한 이동성 실험을 통해서 세포의 이동성 양상을 관찰한 결과이다.
- [95] E: IGFBP5 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체를 발현시킨 폐암세포 A549에서 matrigel과 인서트(inset)를 이용한 침습성 실험을 통해서 세포의 침습성 양상을 관찰한 결과이다.
- [96]
- [97] 도 11은 폐암 이외의 고형암에서 IGFBP5 mRNA 발현 억제 물질인 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 암세포의 생존율 변화를 관찰한 결과이다.
- [98] A: 자궁경부암 세포인 HeLa 세포와 유방암 세포인 BT-20에 IGFBP5 shRNA를 처리한 후 IGFBP5 발현 억제 정도를 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용하여 측정한 그래프이다.
- [99] B: HeLa 세포와 BT-20 세포에서 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 caspase-3 활성 변화를 Caspase-3 assay를 이용하여 분석한 그래프이다.
- [100] C: TGF- β 에 의해 유도된 전이환경에서 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에 IGFBP5 shRNA를 처리한 후 IGFBP5 발현을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용하여 측정한 그래프이다.
- [101] D: HeLa 세포를 이용하여 TGF- β 유도성 전이환경에서 IGFBP5의 shRNA 처리에 의한 caspase-3 활성 변화를 Caspase-3 assay를 이용하여 분석한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [102] 본 발명자들은 PLK1(Polo-like kinase 1)에 관하여 연구하던 중 PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화가 암의 전이에 기여함을 확인하고, PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화 영역을 탐색하여 이에 돌연변이를 유도한 결과 암의 이동성과 침습성이 현저하게 감소함을 확인하였으며, IGFBP5 발현을 knock down시키는 경우 암의 이동성과 침습성이 현저하게 감소함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [103] 상기로부터, 본 발명자들은 IGFBP5 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [104] 본 발명에서 "IGFBP5 억제제"는 종양 조직에서 과발현된 IGFBP5를 정상 발현 수준으로 낮추는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 PLK1에 의해 인산화되는 IGFBP5를 정상 조직의 수준으로 낮추는 제제를 의미한다. 구체적으로 IGFBP5 억제제는 IGFBP5 mRNA의 발현 수준을 감소시키는 것일 수 있으며, 야생형 IGFBP5의 경쟁적 저해제로서 PLK1와 상호작용하되 인산화되지 않는 IGFBP5 돌연변이체일 수 있다.
- [105] PLK1은 다양한 암종에서 과발현되어 있음이 알려져 있으며, 암의 치료제 개발을 위한 타겟으로서 PLK1 분자에 관한 연구는 활발하게 진행되고 있다. 그러나, PLK1은 세포 주기(cell cycle) 등 다양한 신호전달계에 관여하는 인산화효소로서 PLK1의 억제는 종양의 성장 등을 억제하는 효과 이외에 다른 작용의 가능성을 배제하기 어려우며, 정상세포에서의 작용에 PLK1의 원래 기능을 수행이 원활하지 못하다는 문제가 있다.
- [106] PLK1은 IGFBP5와의 상호작용에 대한 연구내용은 전혀 보고되지 않았다.
- [107] 본 발명자들은 PLK1과 IGFBP5의 임상적 연관성을 검토하기 위하여 비소세포 폐암 환자에서 PLK1과 IGFBP5의 발현과 환자의 생존율을 확인하고자 TCGA 데이터에 기반한 KM plotter 자료를 분석한 결과, 비소세포폐암 환자의 암 진행 단계에 따라 PLK1과 IGFBP5의 발현이 증가되며 이는 환자의 생존율을 낮춘다는 임상적 유의성을 발견할 수 있었다. 또한, heat map을 통해 normal 조직 대비 tumor 조직에서 증가한 IGFBP5 발현을 갖는 환자수를 분석한 결과 stage가 높은 환자군에서 IGFBP5 발현이 높은 것을 확인할 수 있었다(실시예 1).
- [108] 또한 전이가 일어난 조건에서 IGFBP5에 양적 변화를 확인하고자 TGF- β 가 처리된 조건에서 IGFBP5 단백질 및 mRNA의 발현을 검토한 결과 EMT 마커와 함께 IGFBP5의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다(실시예 2). 상기로부터, 암의 진행과 상피간엽이행에 따라서 IGFBP5의 발현이 증가됨을 알 수 있다.
- [109] 한편, 폐암 이외의 고형암에서도 폐암에서와 동일한 IGFBP5의 발현 패턴을 나타내는지 확인한 결과, 자궁경부암, 자궁내막암, 유방암, 방광암, 식도암, 난소암, 신장암, 및 위암 환자에서 IGFBP5의 발현이 높은 경우 생존율이 낮음을 확인할 수 있었다(실시예 3).

- [110] 이어서, 본 발명자들은 PLK1이 암의 증식과 전이에 관여하는 기작에서 하위 분자를 표적으로 하고자 하였으며, 구체적으로, PLK1과 IGFBP5 간의 상호작용이 전이성 암을 유발하는 조건에서 유발되는 지 확인하기 위하여 TGF- β 로 전이성 폐암을 유도한 후 면역침강법을 수행하여 PLK1과 IGFBP5의 증가된 결합을 관찰할 수 있었다 (실시예 4).
- [111] 한편, IGFBP5은 IGF-I에 결합하여 IGF-I signaling을 조절한다. 본 발명자들은 정상세포에서 IGFBP5의 본래 기능은 유지하되 암의 발생과 전이 단계에서 작용만을 차단할 수 있는 방법을 강구하고자 하였다. 본 발명자들은 비소세포폐암, 특히 전이단계가 높을수록 PLK1과 IGFBP5이 과발현되어 있음을 임상결과로 관찰한 바, 암의 전이에 PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화가 필요조건으로 가정한다면 PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화만을 방지한다면 암의 전이를 억제할 수 있으므로, 본 발명자들은 PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화 영역을 탐색하여 인산화 후보 영역으로서 Ser269과 Thr265을 선정하였다 (실시예 4, 실시예 5).
- [112] 이어서, 본 발명자들은 269번 세린과 265번 트레오닌을 각각 알라닌(비인산화형) 또는 아스파르트(인산화형)으로 치환한 돌연변이체를 발현하는 렌티바이러스를 제작하고 상기 렌티바이러스를 이용하여 암세포를 형질전환(transformation)하고, 각 돌연변이체를 발현하는 암세포에서 EMT marker의 발현을 확인하였다. 그 결과, 269번 세린과 265번 트레오닌을 알라닌으로 치환된 돌연변이체를 발현하는 암세포에서 상피 마커의 발현이 증가하고 간엽마커의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었는 바, PLK1에 의한 인산화 차단을 위한 타겟으로서 IGFBP5의 269번 세린과 265번 트레오닌 효과적임을 알 수 있었다 (실시예 6).
- [113] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 IGFBP5의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체 각 단백질이 발현되는 A549 세포에서 암세포의 전이성을 관찰하기 위하여 암세포 이동성 실험(migration assay)을 진행하였다. 연구결과 IGFBP5의 인산화 점 돌연변이체가 발현되는 실험군에서는 양성대조군인 TGF- β (5ng/ml)처리에 의한 경우보다도 더 많이 암세포의 이동성이 증가되는 것을 관찰하였다. 이와 상반되게 비인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현하는 암세포의 이동성은 감소되었다 (실시예 7).
- [114] 또한, 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 IGFBP5의 인산화 점 돌연변이체와 비인산화 점 돌연변이체를 이용하여 암세포에서의 침습성 촉진 및 억제 효과에 대한 실험을 진행하였다. Matrigel을 이용한 침습성 분석(invasion assay)를 이용하여 암세포의 침습성을 관찰하고자 하였다. 먼저, 침습능을 평가하기 위하여 matrigel insert에 각각의 IGFBP5의 점 돌연변이체를 발현하는 세포를 혈청이 없는 배지와 함께 분주하고 실험플레이트에 혈청이 포함된 배지를 분주하여 5일 동안 배양한다. 침습된 암세포를 crystal violet으로 염색하여 관찰하고 DMSO로 녹인 후 590nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 연구결과, IGFBP5의 인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현하는 폐암세포군에서 대조군 대비 침습성이 증가됨

을 관찰하였다. 특히 IGFBP5의 인산화 점 돌연변이체에서 높은 암세포의 침습성을 관찰할 수 있었다. 반면에 IGFBP5의 비인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현하는 폐암세포군에서는 침습성이 감소됨을 관찰하였다. 따라서 폐암세포에서 IGFBP5의 인산화 점 돌연변이체에 의한 암세포에서의 침습성 촉진 효과 및 비인산화 점 돌연변이체에 의한 암세포의 침습성 억제 효과를 관찰할 수 있었다 (실시예 7).

[115] 본 발명은 구체적인 실험을 통해 동물모델에서 PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화와 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 단백질의 암전이를 알아보고자 BALB/c nude 마우스에 각각의 IGFBP5 돌연변이체 단백질을 과발현하고 있는 A549 세포를 꼬리 정맥 주사하여 15주 동안 사육하고 개복하여 장기에 암세포가 전이와 종양형성을 관찰하였다(도 6). IGFBP5의 인산화 점 돌연변이체를 발현하는 세포를 주입한 동물군의 폐에서 대조군, 원형, 그리고 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 세포에 비해 암전이 및 종양형성이 많이 관찰되었다. 반면 IGFBP5의 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 세포를 주입한 동물군의 폐에서는 종양형성 능력이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 IGFBP5의 PLK1에 의한 신규 인산화 부위에서의 인산화 점 돌연변이체 단백질에 의한 암세포의 종양형성을 촉진하는 효과를 관찰할 수 있었으며, IGFBP5의 비인산화 돌연변이체 단백질에 의한 암세포의 종양형성능 억제 효과를 관찰하였다(실시예 8).

[116] 따라서, 본 발명은 PLK1에 의한 IGFBP5의 인산화 차단 영역으로서 IGFBP5의 269과 265 번째 아미노산을 타겟으로 제공할 수 있다.

[117] 이어서, 본 발명자들은 IGFBP5의 발현 억제를 통해서 암의 전이 및 침습을 감소시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 이를 위해서 IGFBP5 mRNA 서열 중에서 443-463 또는 467-487 또는 674-694 위치의 뉴클레오티드 서열을 타겟으로 하는 shRNA를 설계 및 제작하여 각각의 IGFBP5 발현 억제 효능을 확인한 결과, 모든 shRNA가 IGFBP5의 발현을 억제하였으나 특히 IGFBP5 mRNA의 443-463 위치를 표적으로 하는 shRNA에서 높은 IGFBP5 발현 억제 활성을 확인할 수 있었다(실시예 9).

[118] 상기 IGFBP5의 발현을 효과적으로 억제하는 shRNA를 이용하여 IGFBP5의 발현 억제가 상피간엽이행의 진행을 억제할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 상기 shRNA 발현 벡터를 처리한 폐암 세포에서는 TGF- β 에 의한 전이 유도 환경에서도 상피간엽이행 진행이 감소함을 확인하였다(실시예 10). 또한, 상기 IGFBP5 shRNA는 전이 유도 환경에서도 암 세포의 이동성과 침습성을 현저하게 감소시킴을 확인하였다(실시예 11).

[119] 이어서, 본 발명자들은 IGFBP5의 발현이 증가되는 다른 고형암의 치료를 위하여 IGFBP5가타겟으로 이용될 수 있는지 확인하고자, 자궁경부암 세포에서 상기 shRNA를 발현하는 벡터를 처리한 결과 상기 shRNA 발현용 벡터는 암세포의 세포사멸을 촉진시킴을 확인하였으며, 이는 TGF- β 에 의한 전이 유도 환경에서도 동일하게 나타남을 확인하였다(실시예 12).

- [120] 따라서, 본 발명은 IGFBP5 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [121] 본 발명에서 "IGFBP5 발현 억제제"는 IGFBP5 mRNA의 일부와 상보적인 염기서열을 포함하는 올리고 뉴클레오티드로서, IGFBP5 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 앵타머(aptamer), siRNA, shRNA, 및 miRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [122] 본 발명에서 "안티센스 올리고 뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 할 수 있다. 안티센스 올리고 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 IGFBP5 서열에 상보적이고, 상기 서열에 결합할 수 있는 DAN 또는 RNA 서열을 의미한다. 일 예로, 서열번호 3과 4의 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 서열에 상보적인 서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 안티센스 올리고 뉴클레오티드의 길이는 5 내지 100 염기, 또는 8 내지 60 염기, 또는 10 내지 40 염기, 또는 10 내지 30 염기 일 수 있다. 상기 안티센스 올리고 뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여되거나, 생체 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오티드가 합성되는 형태로 투여될 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오티드를 합성하는 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 생물/화학적인 방법에 의하여 합성될 수 있다. 또한, 생체 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오티드가 합성되도록 하는 형태는 상기 안티센스 올리고 뉴클레오티드를 발현시키는 재조합백터 등을 이용하여 실현할 수 있고, 이러한 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 따라서, 본 발명의 안티센스 올리고 뉴클레오티드의 디자인은 서열번호 1의 염기서열을 참조하여, 본 발명의 기술분야에서 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다. 일 예로, 안티센스 올리고 뉴클레오티드는 서열번호 3 또는 4의 서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열에 상보적인 염기서열을 포함하는 것 일 수 있다.
- [123] 본 발명에서 "앵타머(aptamer)"는 단일가닥 올리고 뉴클레오티드로, 20 내지 60 뉴클레오티드 정도의 크기이며, 소정의 표적에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 서열에 따라 다양한 3 차원 구조를 가지며, 항원-항체 반응처럼 특정 물질과 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적에 결합함으로써, 소정의 표적의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 바람직하게 상기 앵타머는 IGFBP5 mRNA에 결합하여 IGFBP5의 발현 또는 활성을 저해하는 역할을 할 수 있다. 이와 같은 앵타머는 서열번호 1의 IGFBP5의 서열로부터 당업자가 공지의 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [124] 본 발명에서 용어, "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있

기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀(hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이서(dicer)에 의해 절단되면서 8 내지 30 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 IGFBP5에 특이적으로 작용하여 IGFBP5 mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 IGFBP5을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [125] 본 발명에서 "miRNA(micro RNA)"는 세포 내에서 자연적으로 존재하는 물질로, RNAi 현상을 유도하여 특정한 유전자의 조절에 관여하는 물질을 의미한다. 본 발명의 IGFBP5의 발현 또는 작용을 억제할 수 있는 miRNA라면 그 종류에 한정되지 않고 본 발명에 포함된다.
- [126] 또한, 본 발명은 S269 및/또는 T265 아미노산이 치환된 IGFBP5 돌연변이체를 암의 예방 및 치료 용도에 제공할 수 있다.
- [127] 한편, PLK1은 구조적으로 인산화효소 활성을 지닌 효소활성 도메인과 기질과 결합하는 폴로박스 도메인을 포함하고 있는바, S269과 T265 위치에 아미노산이 치환된 IGFBP5 돌연변이체는 PLK1과 결합력은 그대로 유지한다. 따라서, 상기 인산화 영역 아미노산(269 및/또는 265번 아미노산)이 치환된 돌연변이체는 야생형 IGFBP5과 경쟁적으로 PLK1과 결합하게 되고, 따라서 돌연변이체 농도 의존적으로 야생형 IGFBP5의 인산화가 감소할 수 있다.
- [128] 본 발명의 IGFBP5 돌연변이체는 S269와 T265이 PLK1에 의해 인산화될 수 없는 아미노산, 구체적으로 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 아이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 또는 트립토판으로 치환된 것일 수 있으며, 본 발명자들은 알라닌으로 치환한 돌연변이체를 이용하여 그 효과를 확인하였다.
- [129] 본 발명의 IGFBP5 돌연변이체는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바람직하게는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비-바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 바이러스 운반 메커니즘은 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스

(adenovirus), 허피스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비-바이러스성 운반 메커니즘은 지질 매개 트랜스펙션, 리포솜, 면역리포솜, 리포펙틴, 양이온성 표면 양친매물질 및 이의 조합물을 포함할 수 있다. 본 발명에서 IGFBP5 shRNA 및 돌연변이체 전달을 위한 바이러스 벡터(viral vector)로서 이용한 렌티바이러스는 레트로바이러스의 일종으로 핵공(nucleopore)이나 완전한 핵막으로의 능동 도입을 가능하게 하는 사전-통합 복합체(바이러스"셸(shell)")의 친핵성으로 인해 분열 세포뿐만 아니라 미분열 세포도 감염시킬 수 있는 특징이 있다.

[130] 이에, 본 발명은 상기 IGFBP5 돌연변이를 암호화한 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하며, 상기 벡터는 바이러스 벡터로 제공되어 유전자 치료 기반의 항암제로 이용될 수 있다.

[131] 본 발명에서 돌연변이체는 IGFBP5 단백질을 구성하는 하나 이상의 아미노산이 치환(substitution)된 것을 의미하고, 다른 말이 없다면, 본 명세서에서 암 세포의 이동성 및 침습성을 감소시키고 암세포의 세포사멸을 촉진시켜 항암 효과를 갖는 돌연변이체는 IGFBP5의 S269 및/또는 T265 아미노산이 치환된 것을 의미한다.

[132] 본 명세서에서 사용되는 용어 '항암'은 암세포의 증식을 억제하거나 사멸하는 작용 및 암세포의 전이를 억제하거나 차단하는 작용을 의미하는 것으로, 암의 예방 및 치료 모두를 의미하고 이와 혼용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 '예방'은 조성물의 투여로 암 형성을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하는 것이며, '치료'란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하는 것이다.

[133] 본 발명의 항암제는 상술한 IGFBP5 발현 억제제와 IGFBP5 돌연변이체 이외에 IGFBP5의 인산화를 억제하거나 이의 발현을 감소시키는 것으로 알려진 여타의 물질, 예를 들어 화합물, 천연물, 신규 단백질 등을 추가로 포함할 수 있다.

[134] 본 발명의 IGFBP5 발현 억제제, IGFBP5 돌연변이체, 및/또는 이를 발현하는 벡터를 포함하는 항암제는 특히, IGFBP5의 발현이 과다한 다양한 결장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 방광암, 식도암, 신장암, 위암, 난소암, 유방암 및 췌장암 등의 각종 고형암 등의 예방 및 치료에 이용될 수 있으며, 또한 일차암에서 전이되어 유발된 전이성 고형암의 예방 및 치료에도 이용될 수 있으며, 전이암의 예방을 위하여 이용될 수 있다.

[135] 본 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제 또는 향미제 등을 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제 및 기타 액제로 제제화될 있다. 구체적으로, 본 발명의 세포사멸 활성화제는 경구 투여를 위해서, 예를 들면 알약(troches), 정제(lozenge), 수용성 또는 유성 현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)로 제제화될 수 있다. 이때, 정제 및 캡슐로 제제화하기 위해서는 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙

틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 첨가할 수 있다. 또한, 캡슐제로 제제화할 경우, 상기에서 언급된 물질 이외에도 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 약제학적으로 허용 가능한 담체로는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 하나의 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액 및 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화할 수 있으며, 표적 세포에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 세포에 특이적인 항체 또는 기타 리간드를 상기의 담체와 함께 결합시켜 사용할 수 있다. 덧붙여, 당해 기술분야의 적정한 방법 또는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 게재되어 있는 방법 등을 이용하여 각 질환 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [136] 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구로 투여할 경우, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식에 의해 투여하는 것이 바람직하다. 비경구 투여용으로 제제화하기 위해서는 상기 세포사멸 촉진 항암제를 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조할 수 있고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제화할 수 있다.
- [137] 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 선택하는 것이 바람직하며, 본 발명의 암세포사멸 촉진 항암제는 성인의 체중 1kg 당 1 내지 100 mg, 바람직하게는 1 내지 10 mg의 투여량으로 매일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [138] 본 발명에서는 아미노산 서열을 IUPAC-IUB 명명법에 따라 아래와 같이 약어를 혼용하여 기재하였다.
- [139] 아르기닌(Arg, R), 라이신(Lys, K), 히스티딘(His, H), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 글루타민(Gln, Q), 아스파라진(Asp, N), 메티오닌(Met, M), 루신(Leu, L), 이소루신(Ile, I), 발린(Val, V), 페닐알라닌(Phe, F), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y), 알라닌(Ala, A), 글리신(Gly, G), 프롤린(Pro, P), 시스테인(Cys, C), 아스파르트산(Asp, D) 글루탐산(Glu, E), 노르루신(Nle)
- [140]
- [141] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한

구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

발명의 실시를 위한 형태

[142] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[143] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[144]

[145] [실시예]

[146] <실시예 1> 임상 데이터를 통한 선암종에서 **PLK1**과 **IGFBP5** 발현 수준과 생존율과의 상관관계 확인

[147] 선암종 환자를 대상으로 한 임상분석에서 **PLK1**과 **IGFBP5** 발현에 따른 생존율을 분석하였다 (도 1a). 단계가 높은 선암종 환자일수록 **PLK1**과 **IGFBP5** 발현이 높은 환자와 낮은 환자간의 생존율 차이가 크게 나타났다. Heat map 분석을 통해 normal 조직 대비 tumor 조직에서 증가한 **IGFBP5** 발현을 갖는 환자수를 분석하였다 (도 1b). Stage가 높은 환자군에서 **IGFBP5**와 **PLK1**의 발현이 높은 것을 확인했다. 상기 결과로부터 두 인자 모두 전이와 상관성이 있는 것을 알 수 있다.

[148]

[149] <실시예 2> NSCLC 세포에서 **IGFBP5** 발현 확인 및 **TGF-β** 처리에 의해 유도된 EMT 조건에서 **IGFBP5** 발현 수준 확인

[150] **TGF-β**처리하여 암전이를 유도한 폐암세포주 A549와 H358에서 면역블롯법을 통하여 **IGFBP5** 발현이 증가하는 것을 관찰하였다 (도 2a-도 2b). **TGF-β**를 처리하였을 때 **IGFBP5**의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. Real-time PCR을 수행하여 **TGF-β** 처리하여 암전이를 유도한 폐암세포주 A549와 H358에서 **IGFBP5**와 EMT marker들의 mRNA level을 확인하였다 (도 2c). mRNA 변화는 단백질 변화와 유사한 패턴을 보였다. 상기 결과로부터 **TGF-β** 처리로 유도된 상피간엽이행 동안 **IGFBP5**의 발현 수준이 증가함을 알 수 있다.

[151] 이어서, 비소세포폐암 세포에서 면역블롯을 통해 **IGFBP5**와 **PLK1**, p-**PLK1**의 발현을 관찰하였다. 정상 섬유아세포 **MRC5**와 원발성 폐암 세포인 A549, 전이성 폐암 세포 H460, H358, H1299에서 발현을 관찰한 결과, **MRC5**와 비교하여 비소세포폐암 세포에서 **IGFBP5**와 **PLK1**, p-**PLK1**의 발현이 높은 것을 확인하였다(도 2d). 정상 섬유아세포, 원발성 폐선암 세포 A549, stage 2 폐선암 세포 H522, stage 3A 폐선암 세포 H1373, stage 4 폐선암 세포 H2009에서 **IGFBP5**, **PLK1**, p-**PLK1**의 발현을 관찰하였다. 면역블롯을 통해 관찰한 결과, A549, H1373에서 **IGFBP5** 발현이 가장 높았으며, **IGFBP5**의 발현이 높을 때 **PLK1**, p-**PLK1**의 발현 또한 높은 것을 확인하였다(도 2e). A549, H358에 **TGF-β**를 처리하여 EMT를 유도한 후 **IGFBP5**의 발현을 관찰하였다. EMT가 잘 유도되었는지 확인하기 위하여 EMT marker들의 발현도 같이 확인하였다. EMT가 잘 유도된 것을 확인 후 **IGFBP5** 발

현을 확인하였고 EMT가 일어날 때 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 2f). 면역블롯 데이터를 수치로 표현하여 그래프로 나타내었다(도 2g).

[152]

[153] <실시예 3> 폐암 이외의 고형암 환자에서 **IGFBP5**의 발현 수준과 생존율과의 상관관계 확인

[154] 폐암 외의 다른 고형암 환자에서 **IGFBP5**의 임상적 연관성을 확인하기 위해서 **IGFBP5**의 발현량에 따른 환자의 전체 생존율을 빅데이터 분석을 통해서 확인하였다(도 3). 자궁경부암, 자궁내막암 그리고 유방암에서 **IGFBP5** 발현이 높은 환자의 생존율은 **IGFBP5** 발현이 낮은 환자의 생존율에 비해 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다 (도 3에 A). 또한, 방광암, 식도암 그리고 난소암 환자의 생존율을 분석하였을 때 **IGFBP5** 발현이 높을 때 환자의 생존율이 낮은 것을 확인하였다 (도 3에 B). 신장암과 위암 환자의 생존율을 분석하였을 때 다른 고형암과 비슷한 경향을 보이는 것을 확인하였다 (도 3에 C).

[155]

[156] <실시예 4> **TGF- β** 에 의해 유도한 전이성 폐암세포에서 활성형 **PLK1**에 의한 **IGFBP5**의 인산화 확인

[157] **TGF- β** 처리에 의해서 유도된 상피간엽이행 조건에서 **PLK1**과 **IGFBP5**의 상호작용을 탐구하기 위하여 면역침강법을 수행하였다. Agarose beads와 **PLK1** 항체로 **PLK1** 단백질을 침강하였으며 면역블롯법을 통해서 분석하였다. A549 세포에서는 **TGF- β** 에 의해 암전이를 유도한 실험군에서만 **IGFBP5**가 **PLK1**과 결합하였다. H460 세포에서 **IGFBP5**는 대조군에서도 **PLK1**과 결합하였고, **TGF- β** 에 의해 암전이를 유도한 실험군에서는 **PLK1**과 **IGFBP5**의 결합이 증가되었다 (도 4에 A-B). 상기 결과는 전이 과정에 암세포에서 **PLK1**과 **IGFBP5**의 상호작용이 보다 활발함을 시사한다.

[158] 다음으로 두 단백질의 상호작용 방법을 분석하기 위하여 인산화효소 반응법을 수행하였다. 인산화효소 반응법을 수행하기 위해 GST가 tagging된 **IGFBP5**를 얻기 위해 pGEX-4T-1 vector에 **IGFBP5**를 cloning 하였다 (도 4에 C). GST-purification을 통해 GST-**IGFBP5**를 정제하였다 (도 4에 D). 세린/트레오닌 인산화효소인 **PLK1**이 **IGFBP5**를 기질로서 인산화 시키는지 증명하는 방법으로 정제된 **IGFBP5** 원형(wild)과 활성형 **PLK1-T210D**을 방사선이 표지된 γ -³²P-ATP을 함께 처리하여 반응시키고 분석하였다. **IGFBP5**은 양성대조군인 TCTP보다 더 강하게 활성형 **PLK1-TD**에 의해 인산화 되었다 (도 4에 E).

[159]

[160] <실시예 5> **PLK1**에 의하여 인산화되는 **IGFBP5**의 잔기 확인

[161] **PLK1**에 의하여 인산화되는 **IGFBP5**의 잔기를 확인하기 위하여 액체크로마토그래피 질량분석을 수행하였다. 본 분석법으로 **IGFBP5**의 Ser-179, Thr-265, Ser-269가 **PLK1**에 의해 인산화되는 부분으로 예측되었다 (도 5a). 예측된 **IGFBP5**의 인산화 부분 3곳과 **IGFBP5** 단백질 서열을 분석하여 **PLK1** 인산화

motif와 유사한 부분 3곳을 부분 특이적 돌연변이 치환법을 이용하여 알라닌으로 치환된 비인산화 돌연변이체로 제작하였다 (도 5b).

- [162] 상기 제작된 돌연변이체를 GST가 표지된 단백질로 생산하였고 정제하여 인산화 효소 반응법을 진행하였다. IGFBP5의 인산화 예측 부위 3가지 중에서 Thr-265와 Ser-269의 알라닌 돌연변이가 원형과 비교했을 때 인산화 정도가 두드러지게 감소하였다 (도 5c). 상기 결과로부터 PLK1이 IGFBP5 Thr265과 Ser269의 인산화반응을 통하여 상호작용한다는 것을 알 수 있었다. 여러 종에서 IGFBP5의 Thr265와 Ser269을 확인한 결과, 인간을 포함한 고등동물에서 IGFBP5의 Thr265와 Ser269이 보존되어 있는 것을 확인하였다 (도 5d).

[163]

- [164] <실시예 6> IGFBP5의 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이형 발현을 위한 렌티 바이러스 시스템 구축. 렌티바이러스를 이용한 IGFBP5의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체 유전자 발현 세포 선별 후 상피간엽이행 효과 평가

- [165] 본 발명자들은 IGFBP5의 인산화 및 비인산화 유전자 발현을 위한 lentivirus system 구축을 위하여 pLVX-TRE3G-eRFP 에, Not1과 EcoR1으로 cutting 후, IGFBP5 원형(WT) 플라스미드를 5' - ATAAGAATGCGGCCGCATGGTGTGCT CACC -3'(forward primer, 서열번호 9)와 5' - CGGAATTCTCACTCAACGTTG CTGCTGTC -3'(reverse primer, 서열번호 10)의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시킨 후 이를 Not1과 EcoR1으로 절단(cutting) 후, 벡터 pLVX-TRE3G-eRFP에 서브클로닝 하였다 (도 6에 A). 렌티 바이러스 시스템을 구축하기 위해서 pCMV-VSV.G와 pCMV-Δ8.2, pLVX-TRE3G-eRFP-Target 또는 pLVX-Tet3G DNA를 HEK293 cells에서 발현시키고자 transfection 하여 렌티 바이러스를 발현시켜 바이러스를 모은 후 이를 암세포에 사용하고자 하였다. Transfection 후 바이러스 배양액은 12시간 간격으로 72시간까지 모았으며, 0.2 μm 필터로 배양액을 필터하고 17000 rpm, 4°C, 90분 동안 원심분리하였다. 상등액은 버리고 TNE Buffer로 모아진 바이러스를 모은 후 4°C에 보관하여 다음날부터 암세포 감염에 사용하였다.

- [166] A549에서 RFP-IGFBP5 단백질은 렌티 바이러스를 사용하여 Tet-On 3G inducible system을 통해 발현되었다 (도 6에 B). 점 돌연변이를 포함하는 IGFBP5 단백질의 암세포 상피간엽이행 조절효과를 검토하기 위하여, 폐암세포에 IGFBP5의 인산화 및 비인산화 점 돌연변이체가 발현시키는 렌티바이러스를 감염시키고자 다음과 같이 암세포를 배양하였다.

- [167] 폐암 세포인 A549에 IGFBP5의 원형 및 인산화와 비인산화 점 돌연변이체를 발현시키는 안정화된 세포주를 구축하기 위해서 먼저 pLVX-Tet3G 발현성 렌티바이러스를 감염시키고 G418을 5일 동안 처리하여 감염된 세포를 선별하였다. 이렇게 선별된 A549Tet3G 세포에 IGFBP5의 원형 및 인산화 점 돌연변이체 (T265D, S269D)와 비인산화 점 돌연변이체(T265A, S269A)을 발현시키는 렌티바이러스를 감염시킨 후 푸로마이신(puromycin)을 48시간 동안 처리하여 안정화된 세포주를 구축하였다. 구체적으로 폐암세포 A549를 5×10^4 개의 세포를 분주 후

다음날 2ug pCMV-VSV.G, 4ug pCMV-Δ8.2, 4ug pLVX-TRE3G-eRFP-IGFBP5를 transfection 하여 IGFBP5 과발현 세포를 구축하였다. 구축된 세포에 2ug/ml 독시사이클린 (doxycycline)을 처리하여 IGFBP5의 원형 및 인산화와 비인산화 점 돌연변이체의 발현을 유도 후 각각의 IGFBP5의 점 돌연변이체가 잘 발현되었는지 mRNA 발현량과 단백질 발현량을 확인하였다. 비교를 위해 대조군(Mock; 목적 유전자가 발현되지 않는 렌티바이러스 처리군), IGFBP5 단백질 발현되는 A549 폐암세포주 투여군(WT), 인산화 점 돌연변이체 IGFBP5 단백질 발현되는 A549 폐암세포주 투여군(T265D, S269D), 비인산화 점 돌연변이체 IGFBP5 단백질 발현되는 A549 폐암세포주 투여군(T265A, S269A)에 대해서 EMT marker 변화를 관찰하였다. 도 6에 C-및 도 7에 A에서와 같이, IGFBP5의 원형 및 각각의 점 돌연변이형이 잘 발현되고 있는 것을 mRNA 발현량과 단백질 발현량을 통해서 확인하였다. 면역블롯을 통해 인산화 점 돌연변이체의 IGFBP5이 발현되는 폐암세포와 비인산화 점 돌연변이체 IGFBP5를 발현하고 있는 세포에서 EMT marker의 발현을 확인하였다. IGFBP5의 Thr265 인산화 점 돌연변이체의 IGFBP5이 발현되는 폐암세포에서 비인산화 점 돌연변이체 IGFBP5를 발현하고 있는 세포에 비해 E-cadherin의 발현이 감소하였고 Vimentin 및 N-cadherin의 발현이 증가하였다 (도 6에 C). IGFBP5의 Ser269 인산화 점 돌연변이체의 IGFBP5이 발현되는 폐암세포에서 비인산화 점 돌연변이체 IGFBP5를 발현하고 있는 세포보다 Vimentin, N-cadherin의 발현이 증가하였고, E-cadherin의 발현이 감소하는 것을 관찰하였다 (도 6에 C).

[168] 이상의 결과로, 폐암세포에서 IGFBP5의 인산화가 상피간엽이행을 촉진하는 효과를 시사하며 비인산화 점 돌연변이체에 의해 억제됨을 시사하였다.

[169]

[170] <실시예 7> IGFBP5의 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 암세포의 전이성과 침습성 비교 확인

[171] Real-time PCR을 통해 인산화 점 돌연변이체의 IGFBP5이 발현되는 폐암세포와 비인산화 점 돌연변이체 IGFBP5를 발현하고 있는 폐암세포에서 EMT marker의 발현을 확인하였다. RFP와 IGFBP5의 발현을 확인하여 모든 돌연변이체에서 RFP-IGFBP5의 발현이 비슷함을 확인하였다 (도 7에 A). IGFBP5 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 세포에 비해 IGFBP5 인산화 점 돌연변이체를 발현하는 세포에서 CDH2, VIM, SNAI1의 발현이 증가하였고 CDH1의 발현이 감소하였음을 확인하였다.

[172] IGFBP5 원형, 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현시키는 폐암세포 A549에서 이들 점 돌연변이체가 암세포의 이동성에 미치는 효과를 관찰하기 위해 세포 이동성 실험(migration assay)을 실시하였다.

[173] 구체적으로, 각각의 IGFBP5 원형, 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현시키는 폐암세포 A549를 5×10^4 개의 세포를 8.0 μ m, 24 well insert에 분주하고 24 well plate에 10% 혈청(FBS)이 포함된 배지를 분주한 뒤 inset

를 넣어 주었다. 양성 대조군의 경우, 5 ng/ml TGF- β 가 포함된 RPMI 1640(10% FBS)를 0.5 ml 분주하여 사용하였다. 세포 분주 48시간 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 500 μ l를 분주하고 1XPBS로 3회 세척하여 0.05% crystal-violet 용액으로 5분간 염색하였다. 5분 후 1XPBS로 5회 세척하였고, 염색된 정도(intensity)를 Odyssey infrared imaging system을 이용하여 측정하였다. 대조군의 염색된 정도(intensity)를 1이라고 할 때 각 실험군에서의 상대적 염색된 정도를 산출하여 그래프를 표시하였다.

- [174] 연구 결과, IGFBP5 인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현시킨 실험군에서 양성 대조군인 TGF- β 처리군과 유사하거나 더 높게 염색강도(intensity) 수치가 대조군 대비 5.5배까지 증가하였으며, 상대적으로 IGFBP5 인산화 점 돌연변이체에 비해 비인산화 점 돌연변이체 실험군은 염색강도가 낮은 것을 관찰할 수 있었다 (도 7에 B). 이상의 결과로 IGFBP5 인산화 점 돌연변이체는 폐암세포의 이동성을 촉진하며, 반면에 IGFBP5 비인산화 점 돌연변이체는 폐암세포의 이동성을 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [175] IGFBP5 원형, 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현시키는 폐암 세포 A549에서 이들 점 돌연변이체가 암세포의 침습성에 미치는 효과를 관찰하기 위해 매트릭젤(matrigel)을 이용한 침습성 실험(invasion assay)을 실시하였다.
- [176] 구체적으로, 4°C에서 16~20시간동안 matrigel을 완전히 녹인 후 matrigel을 1 mg/ml이 되도록 차가운 serum free RPMI 1640(4°C)으로 희석하였다. 이를 8.0 μ m 24 well 인서트(insert)에 100 μ l의 matrigel mixture(1 mg/ml)를 넣고 37°C 배양기에서 12-20시간 동안 굳혀주었다. 굳은 matrigel insert에 각각의 IGFBP5 원형, 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현시키는 폐암세포 A549들을 2X10⁴ cells/well의 세포수로 serum free RPMI 1640 (36°C)에 희석하여 각 insert에 분주하였다. 여기에 36°C의 따뜻한 RPMI 1640 (10% FBS)을 0.5 ml/well씩 분주하였다. 양성 대조군의 경우 5 ng/ml TGF- β 가 포함된 36°C RPMI 1640(10% FBS)를 0.5 ml 분주하여 사용하였다. 이 후 3일에 한 번씩 배지를 교환해주고 침습되는 정도를 관찰하였으며, 암세포의 침습이 충분히 일어난 것으로 관찰된 5일 차에 배지를 제거하고 1XPBS로 세척한 후, insert 안쪽의 cell들을 면봉으로 긁어 내었고, 1XPBS로 세척하여 insert 내부에 cell과 matrigel의 잔여물이 남지 않도록 제거하였다. Insert 바깥 면이 있는 24 well에 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 500ul를 분주하고 5분간 실온에서 incubation한 후 1XPBS로 3회 세척하여, 0.05% crystal-violet 용액으로 5분간 염색하였다. 5분 후 1XPBS로 5회 세척하였고, 염색된 정도를 DMSO로 녹인 후 590nm에서 파장을 측정하였다. 대조군의 흡광도를 1이라고 할 때 각 실험군에서의 상대적 흡광도를 산출하여 그래프를 표시하였다.
- [177] 연구 결과, IGFBP5 인산화 점 돌연변이체 단백질을 발현시킨 실험군에서 대조군 대비 5.7배에서 8배까지 증가하였으며 상대적으로 IGFBP5 비인산화 점 돌연변이체 실험군은 IGFBP5 인산화 점 돌연변이체에 비해 상대적 흡광도가 더 낮아

진 것을 관찰할 수 있었다 (도 7에 C). 따라서 IGFBP5 비인산화 점 돌연변이체는 폐암세포의 이동성과 침습성을 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

- [178] IGFBP5 인산화 또는 비인산화 점 돌연변이체를 발현하는 세포에서 caspase-3 assay를 통해 세포 생존율을 관찰하였다. Thr265와 Ser269 비인산화 점 돌연변이체에서 caspase-3 활성이 크게 증가하였고 세포 생존율이 감소하였다 (도 7에 D). 상기 결과로부터 IGFBP5의 Thr265와 Ser269이 인산화되었을 때 세포 생존을 증가시키는 반면에 IGFBP5 비인산화 점 돌연변이체는 caspase-3 활성화에 따른 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[179]

- [180] <실시예 8> 동물모델에서 IGFBP5의 인산화부위 및 비인산화 점 돌연변이를 포함하는 단백질에 의한 암세포의 전이성 평가

- [181] 본 발명자들은 동물모델에서 암세포의 종양 형성능을 관찰하기 위해 IGFBP5의 인산화 및 비인산화 점 유전자가 발현되는 암세포를 이용하여 암세포의 종양 형성 촉진 및 억제 효과를 평가하고자 하였다.

- [182] 구체적으로, 점 돌연변이를 포함하는 IGFBP5 단백질이 안정적으로 발현되는 A549 폐암세포(2×10^6 세포수)를 PBS에 넣어 마우스 꼬리 정맥에 주사하여, 15주 동안 사육하고, 개복하여 장기에서 암세포의 전이를 관찰하였다. 비교를 위해 대조군(Mock; 목적유전자가 발현되지 않는 렌티바이러스 처리군), IGFBP5 단백질이 발현되는 A549 폐암세포주 투여군(WT), 인산화 점 돌연변이체 IGFBP5 단백질 발현되는 A549 폐암세포주 투여군(T265D, S269D), 비인산화 점 돌연변이체 IGFBP5 단백질 발현되는 A549 폐암세포주 투여군(T265A, S269A)에 대해서 암세포 전이 여부를 관찰하였다. 각 실험군 마다 6마리의 마우스에 대하여 실험을 실시하고, 폐에서의 전이성 암인 종양형성 빈도수를 측정하여 그래프로 표시하였다(도 8).

- [183] 도 8에 나타낸 바와 같이, 대부분의 종양은 폐에 생성되었고, 따라서 본 실험도 폐를 중심으로 분석하였다. 대조군(Mock)과 IGFBP5 원형 대비 인산화 점 돌연변이를 포함하는 IGFBP5 단백질이 발현되는 A549 세포를 투여한 실험군에서는 종양형성능이 비교적 높은 것을 관찰하였다. 특히 IGFBP5 인산화 점 돌연변이체 중 T265D, S269D 실험군에서는 생성된 종양의 수를 관찰했을 때 가장 높은 종양형성능을 확인할 수 있었다. 반대로 비인산화 점 돌연변이를 포함하는 IGFBP5 단백질이 발현되는 A549 세포를 투여한 실험군에서는 종양형성능이 비교적 낮은 것을 관찰하였다(도 8에 A-B).

[184]

- [185] <실시예 9> IGFBP5 shRNA 선정

- [186] IGFBP5의 mRNA 발현 억제 효과를 확인하기 위해서, shRNA 및 이를 포함하는 렌티바이러스를 제작하였다. 구체적으로 IGFBP5의 mRNA 발현을 억제하기 위하여 사람의 IGFBP5 mRNA(Human IGFBP5 mRNA [NM_000599.4], 서열번호 5)서열 중 443-463 또는 467-487 또는 674-694 위치의 뉴클레오티드 서

열을 타겟으로 하는 shRNA를 만들고자 프라이머를 제작하였다. 443-463 뉴클레오티드 타겟 서열 센스 부위(sense region)로는 5'- AGG CTG AAG CAG TGA AGA AGG -3'(서열번호 11)를, 안티센스 부위(antisense region)로는 5'- CCT TCT TCA CTG CTT CAG CCT -3'(서열번호 12)부위를 이용하여 이를 기반으로 pLKO-puro.1 벡터를 이용한 pLKO-puro.1-IGFBP5 플라스미드를 제작하였다. 포워드 프라이머로 5'- CCGG - AGGCTGAAGCAGTGAAGAAGG - CTCGAG - CCTTCTTCACTGCTTCAGCCT - TTTTGTG -3'(서열번호 13)를 사용하였고, 리버스 프라이머로 5'- AATTCAAAAA - AGGCTGAAGCAGTGAAGAAGG - CTCGAG - CCTTCTTCACTGCTTCAGCCT -3'를 사용하였다. 467-487 뉴클레오티드 서열을 타겟으로 하는 shRNA의 센스 부위(sense region)로는 5'- GCA GAA AGA AGC TGA CCC AGT -3'를, 안티센스 부위(antisense region)로는 5'- ACT GGG TCA GCT TCT TTC TGC -3'부위를 이용하여 이를 기반으로 pLKO-puro.1 벡터를 이용한 pLKO-puro.1-IGFBP5 플라스미드를 제작하였다. 포워드 프라이머로 5'-CCGG - GCAGAAAGAAGCTGACCCAGT-CTCGAG-ACTGGGTCAGCTTCTTTCTGC-TTTTGTG -3'(서열번호 17)를 사용하였고, 리버스 프라이머로 5'-AATTCAAAAA-GCAGAAAGAAGCTGACCCAGT-CTCGAG- ACTGGGTCAGCTTCTTTCTGC -3'(서열번호 18)를 사용하였다. 674-694 뉴클레오티드 서열을 타겟으로 하는 shRNA의 센스 부위(sense region)로는 5'- ACA AGA GAA AGC AGT GCA AAC -3'(서열번호 19)를, 안티센스 부위(antisense region)로는 5'- GTT TGC ACT GCT TTC TCT TGT -3'(서열번호 20)부위를 이용하여 이를 기반으로 pLKO-puro.1 벡터를 이용한 pLKO-puro.1-IGFBP5 플라스미드를 제작하였다. 포워드 프라이머로 5'-CCGG - ACAAGAGAAAGCAGTGCAAAC-CTCGAG-GTTTGCACTGCTTTCTCTTGT-TTTTGTG -3'(서열번호 21)를 사용하였고, 리버스 프라이머로 5'-AATTCAAAAA-ACAAGAGAAAGCAGTGCAAAC-CTCGAG- GTTTGCACTGCTTTCTCTTGT -3'(서열번호 22)를 사용하였다. 루프서열은 5'-CTCGAG-3'(서열번호 23)이고, 프라이머에 포함된 형태로 shRNA를 제작하였다. 이를 pHR'-CMV-VSVG, pHR'-CMV-deltaR8.2와 함께 HEK293 세포 형질감염을 통해 발현시킨 후, 세포의 배양 배지를 모아 렌티 바이러스를 생산하였다. 원심분리기를 이용하여 상기 렌티 바이러스를 농축시켰다. 바이러스 발현 확인을 위하여 A549 세포를 5×10^4 개/ml로 배양한 후, 다음 날 감염 버퍼(Infection Buffer; 10mM HEPES(Sigma-Aldrich, USA), 1 mg/ml 폴리브렌(Sigma-Aldrich, MO, USA))에 렌티바이러스를 20 ml/well로 첨가하여 암세포를 감염시켰다. 24시간이 지난 후 푸로마이신(puromycine; Sigma-Aldrich, MO, USA)을 48시간동안 처리하여 죽지 않고 살아있는 감염된 세포를 선별하였고, 선별한 세포의 RNA를 취하여 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 통해 IGFBP5의 발현이 억제되었음을 관찰하였다.

- [187] 도 9에 A에 나타낸 바와 같이 shIGFBP5에 감염된 폐암세포 A549는 대조군 shRNA (shCtrl)에 감염된 세포에 비하여 IGFBP5의 mRNA의 발현이 감소하였고,

이는 IGFBP5의 발현이 억제되었음을 보여준다. 제작된 세 개의 shRNA 중 억제 효과가 가장 큰 #443 site를 targeting 한 shRNA를 이용하여 후속 실험을 진행하였다.

[188]

[189] <실시예 10> IGFBP5 shRNA에 의한 상피간엽이행 진행 억제 확인

[190] 다음으로 본 발명자는 IGFBP5의 발현 억제에 따른 상피간엽이행 감소 평가를 위하여 TGF- β 처리한 전이성 세포에서 IGFBP5 shRNA를 이용하여 IGFBP5의 발현을 억제하고 상피간엽이행 마커를 단백질 수준에서 관찰하였다.

[191] 구체적으로, 폐암 세포 A549를 5×10^4 cells/ml로 배양하고 대조군 바이러스(shCtrl) 또는 shIGFBP5를 감염시킨 다음, 푸로마이신(puromycine; Sigma-Aldrich, MO, USA)을 48시간동안 처리하여 죽지 않고 살아있는 세포를 선별하고 다시 5×10^4 cells/ml 분주하고 다음날 5 ng/ml TGF- β 48시간 처리 후 세포를 수취하였다. 수취한 세포는 100 μ l의 분쇄 용액(0.5% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM beta-glycerophosphate, 25 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin A, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml antipain)을 처리한 후 단백질 정량 하였다. 정량한 단백질을 SDS-PAGE를 통해 전기영동시킨 후 상피간엽이행 마커 항체를 이용하여 면역블랏(immunoblot)을 수행하여 상피간엽이행 과정의 감소를 확인하였다(도 9에 B-C). 또한 수취한 세포에서 mRNA를 정제하고 cDNA를 합성하여 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 수행하였고, mRNA 수준에서의 상피간엽이행 마커 N-cadherin을 비롯한 Vimentin, SNAI1 등 간엽이행 마커들이 감소, E-Cadherin은 증가하는것을 관찰함으로써 IGFBP5 shRNA가 TGF- β 에 의한 전이환경에서 상피간엽이행 과정을 감소시킨다는 것을 확인하였다(도 9에 D).

[192]

[193] <실시예 11> 전이환경에서 IGFBP5 shRNA에 의한 이동성과 침습성에 대한 억제 효과와 인산화 점 돌연변이체에 의한 이동성과 침습성 증가 효과 평가

[194] 또한 본 발명자는 IGFBP5 shRNA가 전이환경에서 인서트(Insert)를 이용하여 세포의 이동성을 억제하는 효과를 증명하였다.

[195] 구체적으로 폐암 세포 A549에 대조군 shRNA(shCtrl) 또는 IGFBP5 shRNA(shIGFBP5) 바이러스를 감염시켰다. 감염시킨 세포를 24 well 인서트(Insert)에 5×10^4 cells/well의 세포수로 혈청프리 RPMI(36°C)에 희석하여 인서트에 분주하였다. 인서트 밖의 24 well에는 RPMI(10% FBS 포함)을 0.5 ml/well씩 분주하고 48시간 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 500 μ l를 분주하고 1XPBS로 3회 세척하여 0.05% crystal-violet 용액으로 5분간 염색하였다. 5분 후 1XPBS로 5회 세척하였고, 염색된 정도를 590nm에서 파장을 측정하였다. 대조군의 흡광도를 1이라고 할 때 각 실험군에서의 상대적 흡광도를 산출하여 그래프를 표시하였다(도 10에 A).

- [196] 그 결과, 도 10에 A에 나타낸 바와 같이, 대조군 바이러스(shCtrl)를 감염시킨 세포와 비교하여 shIGFBP5를 감염시켜 IGFBP5의 발현을 억제시키자 세포의 이동성이 크게 감소하였다. TGF- β 처리 후 이동성을 관찰하였을 때도 유사한 경향을 보였다 (도 10에 A).
- [197] 다음으로, 본 발명자는 IGFBP5 shRNA가 전이환경에서 마트리젤(Matrigel)을 이용하여 세포의 침습성을 억제하는 효과를 증명하였다.
- [198] 본 발명을 위하여 4°C에서 16~20시간동안 마트리젤(Matrigel)을 완전히 녹인 후 마트리젤(Matrigel)을 1 mg/ml이 되도록 차가운 혈청 프리 MEM(4°C)으로 희석하였다. 이를 8.0 mm 24 well 인서트(insert)에 1 ml의 마트리젤(Matrigel) 혼합물(1 mg/ml)을 넣고 37°C 배양기에서 12-20시간 동안 굳혀주었다. 굳은 마트리젤 인서트(Matrigel insert)에 각각 shRNA(shCtrl) 또는 IGFBP5 shRNA(shIGFBP5) 바이러스를 감염시킨 세포를 2×10^5 cells/well의 세포수로 혈청프리 RPM1(36°C)에 희석하여 인서트에 분주하였다. 여기에 36°C의 따뜻한 RPM1(10% FBS 포함)을 0.5 ml/well씩 분주하였다. 이 후 3일에 한 번씩 배지를 교환해주고 침습되는 정도를 관찰하였으며, 암세포의 침습이 충분히 일어난 것으로 관찰된 7일 차에 배지를 제거하고 1XPBS로 세척한 후, 인서트 안쪽의 세포들을 면봉으로 긁어 내었고, 1XPBS로 세척하여 인서트 내부에 세포와 마트리젤(Matrigel)의 잔여물이 남지 않도록 제거하였다. 인서트 바깥 면이 있는 24 well에 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 500 μ l를 분주하고 5분간 실온에서 인큐베이션한 후 5분에 1XPBS로 3회 세척하여, 0.05% crystal-violet 용액으로 5분간 염색하였다. 5분 후 1XPBS로 5회 세척하였고, 염색된 정도를 590nm에서 파장을 측정하였다. 대조군의 흡광도를 1이라고 할 때 각 실험군에서의 상대적 흡광도를 산출하여 그래프를 표시하였다 (도 10에 B).
- [199] 그 결과, 도 10에 B에 나타낸 바와 같이, 대조군 바이러스(shCtrl)를 감염시킨 세포와 비교하여 shIGFBP5를 감염시켜 IGFBP5의 발현을 억제시키자 세포의 침습성이 크게 감소하였다 (도 10에 B).
- [200] 폐암 세포 A549를 5×10^4 cells/ml으로 배양하고 대조군 바이러스(shCtrl) 또는 shIGFBP5를 감염시킨 다음, 푸로마이신(puromycine; Sigma-Aldrich, MO, USA)을 48시간동안 처리하여 죽지 않고 살아있는 세포를 선별하고 다시 5×10^4 cells/ml 분주하고 다음날 5 ng/ml TGF- β 48시간 처리 후 세포를 수취하였다. 수취한 세포는 100 μ l의 분쇄 용액(0.5% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM beta-glycerophosphate, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin A, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml antipain)을 처리한 후 단백질 정량 하였다. 정량한 단백질에서 caspase-3 assay를 통해 caspase-3 활성을 관찰하였고 shIGFBP5를 감염시킨 세포에서 caspase-3 활성이 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 10에 C).

- [201] IGFBP5가 억제되었을 때와 더불어 IGFBP5가 인산화 되었을 때 폐암 세포의 이동성과 침습성을 증가시키는 효과를 증명하였다. 위와 같은 조건으로 인서트 (Insert)와 매트릭젤(Matrigel)을 이용하여 MOCK, IGFBP5 WT, 인산화 점 돌연변이체, 비인산화 점 돌연변이체의 이동성과 침습성을 평가한 결과, WT과 비인산화 점 돌연변이체와 비교하였을 때 인산화 점 돌연변이체에서 세포의 이동성과 침습성이 증가하는 것을 확인하였다(도 10에 D-E).
- [202] 도 10의 결과를 종합하였을 때, 전이 환경에서 IGFBP5 shRNA를 이용하여 폐암 세포에서 IGFBP5의 발현을 억제하였을 때에 상피간엽이행이 감소되며, 세포의 이동성과 침습성 또한 감소하는 것을 증명하였다. IGFBP5의 발현이 감소함에 따라 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 IGFBP5가 세포 생존에 영향을 미치는 것을 증명하였다. 또한, IGFBP5가 인산화 되었을 때 세포의 이동성과 침습성을 증가시키는 것을 증명하였다.
- [203]
- [204] <실시예 12> 고형암에서 IGFBP5 shRNA에 의한 세포 생존율 감소 효과 평가
- [205] 자궁경부암 세포 HeLa 세포를 2×10^4 cells/ml으로, 유방암 세포 BT-20 세포를 4×10^4 cells/ml으로 배양하고 대조군 바이러스(shCtrl) 또는 shIGFBP5를 감염시킨 다음, 푸로마이신(puromycine; Sigma-Aldrich, MO, USA)을 48시간동안 처리하여 죽지 않고 살아있는 세포를 선별하고 다시 HeLa 세포는 2×10^4 cells/ml, BT-20 세포는 4×10^4 cells/ml로 분주하고 다음날 5 ng/ml TGF- β 48시간 처리 후 세포를 수취하였다. 수취한 세포는 100 μ l의 분쇄 용액(0.5% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM beta-glycerophosphate, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin A, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml antipain)을 처리한 후 단백질 정량 하였다. 도 11에 A에 나타난 바와 같이 shIGFBP5에 감염된 자궁경부암 세포 HeLa와 유방암 세포 BP-20에서 대조군 shRNA (shCtrl)에 감염된 세포에 비하여 IGFBP5의 mRNA의 발현이 감소하였고, 이는 IGFBP5의 발현이 억제되었음을 보여준다 (도 11에 A). 정량한 단백질로 caspase-3 assay를 통해 caspase-3 활성을 관찰하였고 positive control로 사용된 paclitaxel이 처리된 세포의 caspase-3 활성이 증가하는 조건에서 shIGFBP5를 감염시킨 HeLa 세포, BT-20 세포에서 caspase-3 활성이 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 11에 B). 이를 통해 IGFBP5가 자궁경부암 세포의 생존에 영향을 미치는 것을 증명하였다.
- [206] TGF- β 처리에 의해 유도된 전이환경에서도 shIGFBP5 처리에 의한 생존율 변화가 있는지 관찰하였다. 6C에 나타난 바와 같이 shIGFBP5에 감염된 자궁경부암 세포 HeLa 세포는 대조군 shRNA (shCtrl)에 감염된 세포에 비하여 IGFBP5의 mRNA의 발현이 감소하였고, shRNA (shCtrl)에 감염된 후 TGF- β 가 처리된 세포에서 IGFBP5의 mRNA의 발현 증가하였다 (도 11에 C). 정량한 단백질로 caspase-3 assay를 통해 caspase-3 활성을 관찰하였고 shIGFBP5를 감염시킨 세포

에서 caspase-3 활성이 크게 증가하는 것을 확인하였고 TGF- β 처리하였을 때도 shIGFBP5를 감염시킨 세포에서 caspase-3 활성이 크게 증가하는 것을 확인하였다 (도 11에 D). 이를 통해 전이환경에서도 IGFBP5가 자궁경부암 세포의 생존에 영향을 미치는 것을 증명하였다. 상기 내용을 통해 폐암 세포, 자궁 경부암 세포, 유방암 세포에서 IGFBP5 발현이 감소함에 따라 생존율이 감소하는 것을 확인하였다.

[207]

[208] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[209] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

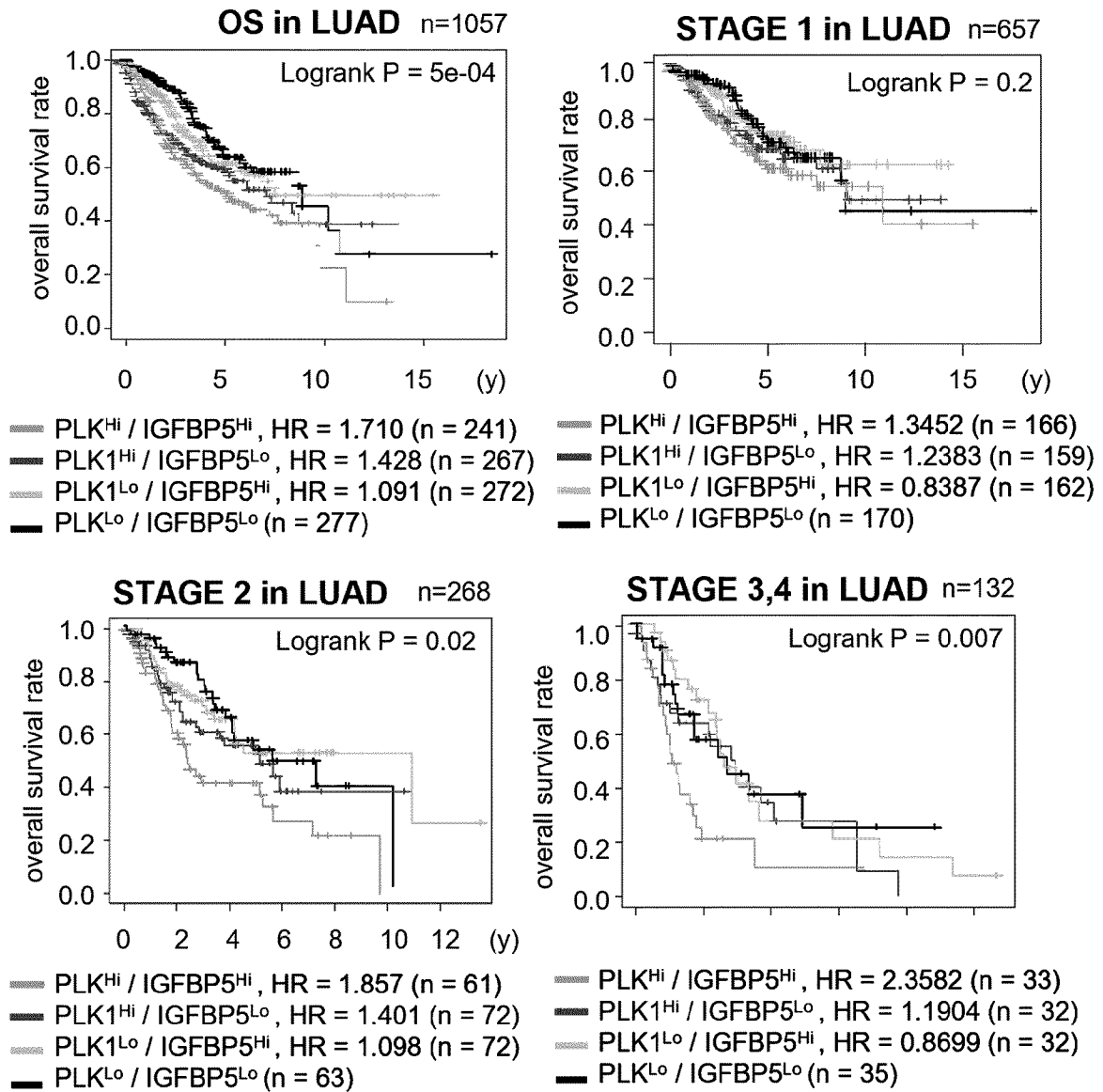
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 IGFBP5에서 256 및/또는 269번째 아미노산 잔기가 트레오닌(Threonine)이 글리신(Glycine), 알라닌(Alanine), 발린(Valine), 루신(Leucine), 아이소루신(Isoleucine), 프롤린(Proline), 페닐알라닌(Phenylalanine), 메티오닌(Methionine) 또는 트립토판(Tryptophan)으로 치환된 IGFBP5 돌연변이 단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 IGFBP5 돌연변이 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, IGFBP5 돌연변이 단백질.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 IGFBP5 돌연변이 단백질은 서열번호 3 아미노산 서열을 포함하는 것인, IGFBP5 돌연변이 단백질.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 서열번호 3의 256 번째 아미노산이 알라닌(Alanine)인 것을 특징으로 하는, IGFBP5 돌연변이 단백질.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 IGFBP5 돌연변이 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, IGFBP5 돌연변이 단백질.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 서열번호 4의 269 번째 아미노산이 알라닌(Alanine)인 것을 특징으로 하는, IGFBP5 돌연변이 단백질.
- [청구항 7] 제1항의 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 벡터는 렌티 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 9] 제1항의 IGFBP5 돌연변이 단백질 또는 제6항의 벡터를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 조성물은 암세포의 이동성 및 침습성을 감소시켜 암의 전이(Metastasis)를 억제하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 암은 고형암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 고형암은 교모세포종, 난소암, 방광암, 비기능성 뇌하수체 선종, 식도암, 신장암, 유방암, 위암, 직장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 췌장암, 난소암, 교모세포종, 비기능성 뇌하수체 선종, 및 폐암, 및 췌장암으로 이루

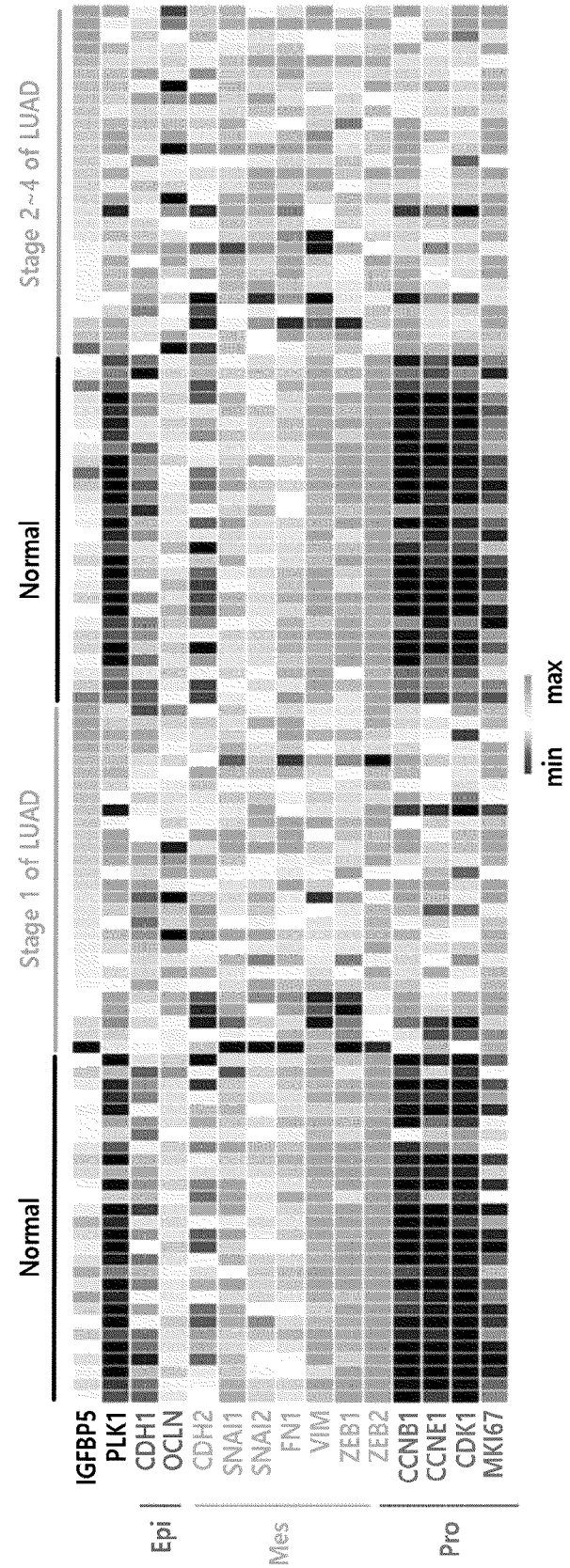
어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 폐암은 비소세포폐암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 비소세포폐암은 선암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제9항에 있어서,
상기 조성물은 IGFBP5 발현 억제용 RNA 또는 상기 RNA를 발현하는 벡터를 추가로 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 16] IGFBP5 발현 억제용 RNA 또는 상기 RNA를 발현하는 벡터를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 IGFBP5 발현 억제용 RNA는 앵타머, siRNA, shRNA, 및 miRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종이고,
상기 IGFBP5 발현 억제용 RNA는 서열번호 11, 서열번호 15, 또는 서열번호 19의 염기서열과 상보적인 염기서열을 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제16항에 있어서,
상기 IGFBP5 발현 억제용 RNA는 shRNA이고,
상기 shRNA는 서열번호 6 내지 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

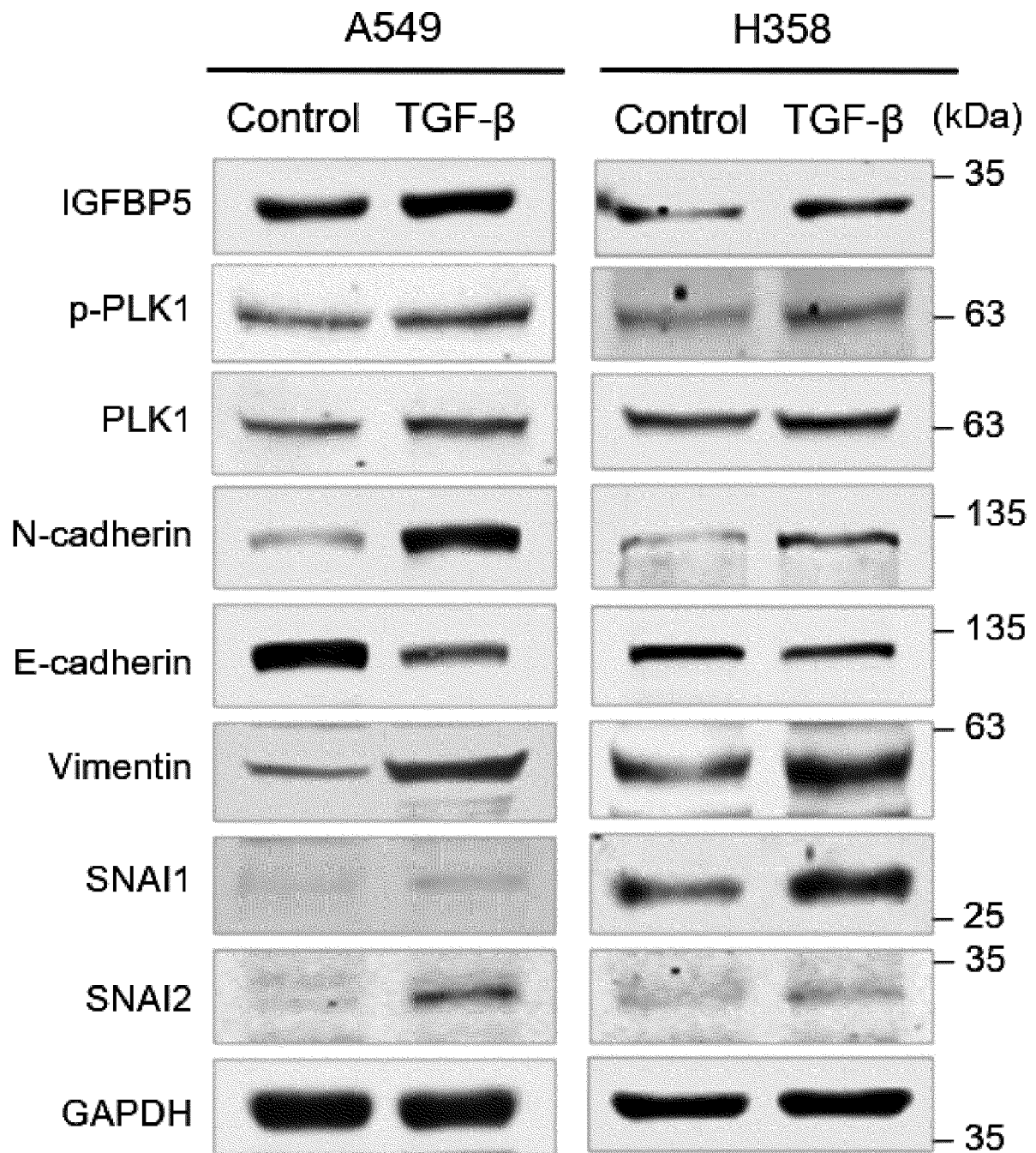
[도 1a]



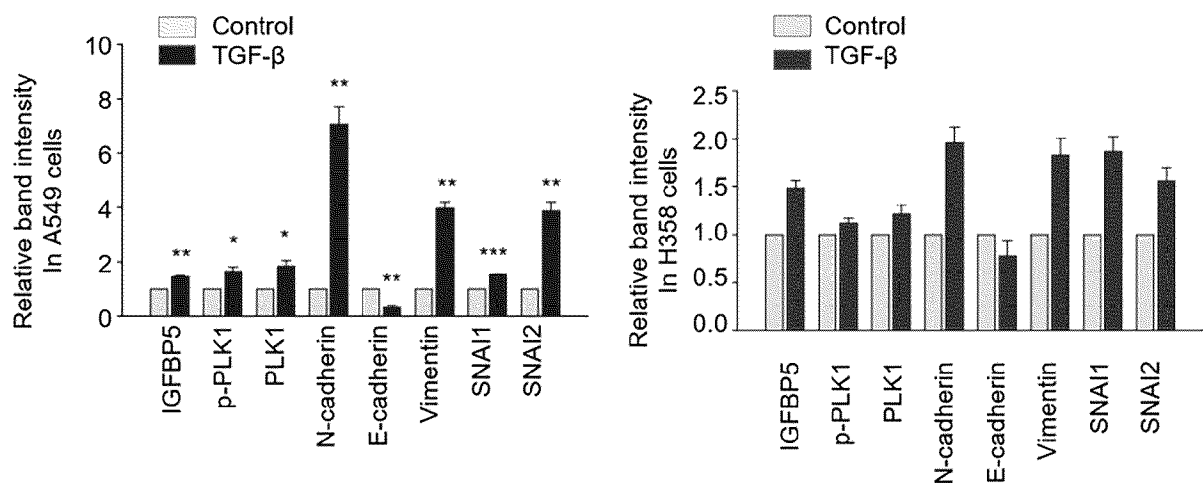
[도 1b]



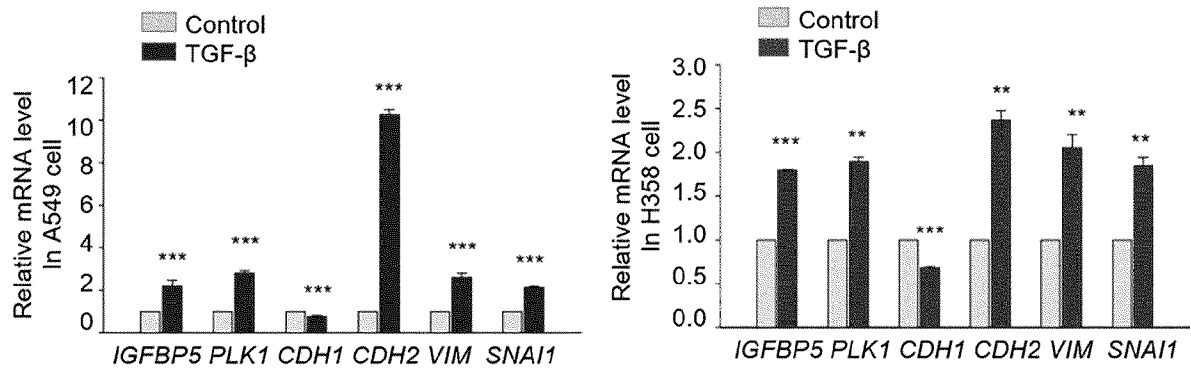
[도2a]



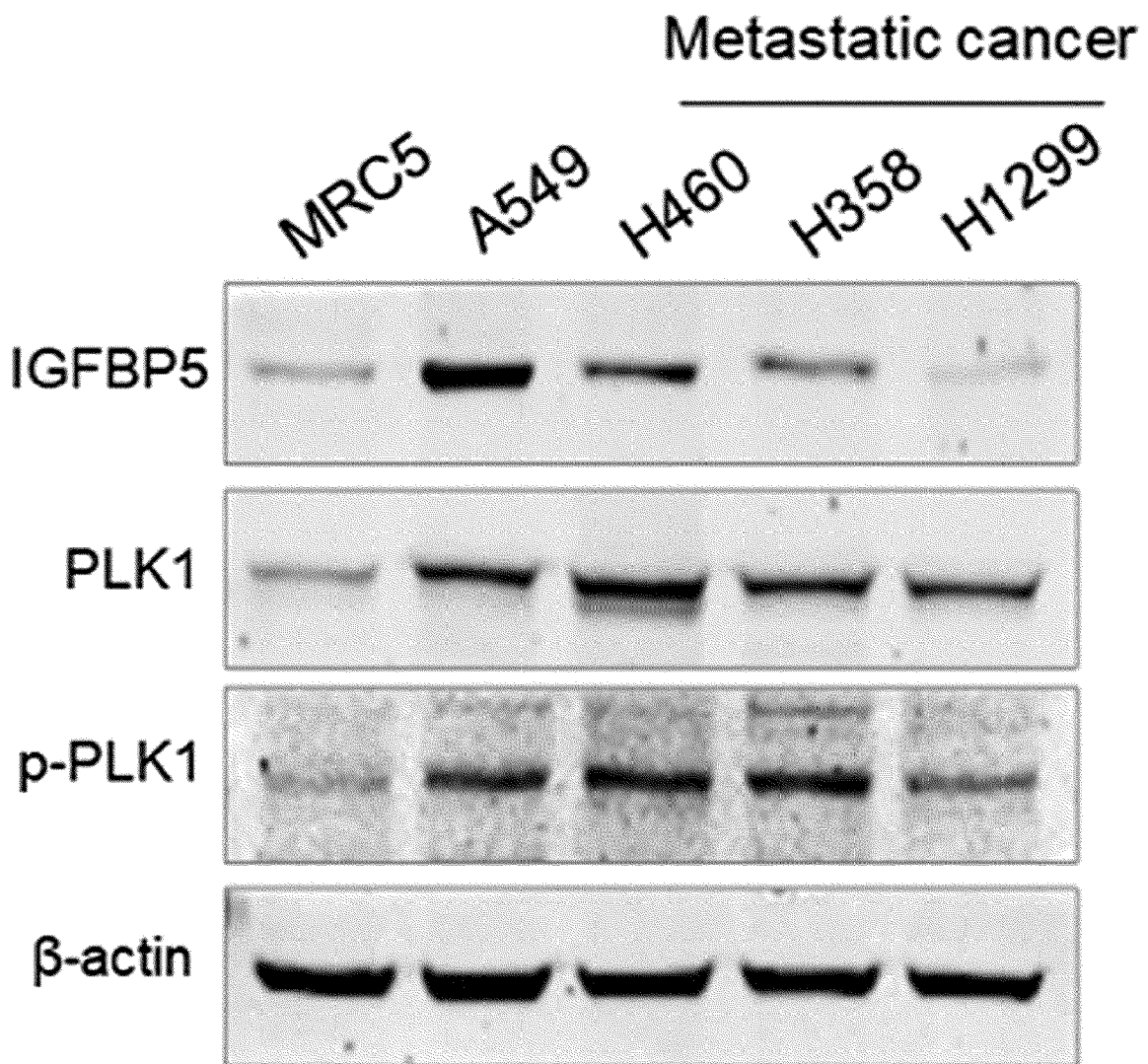
[도2b]



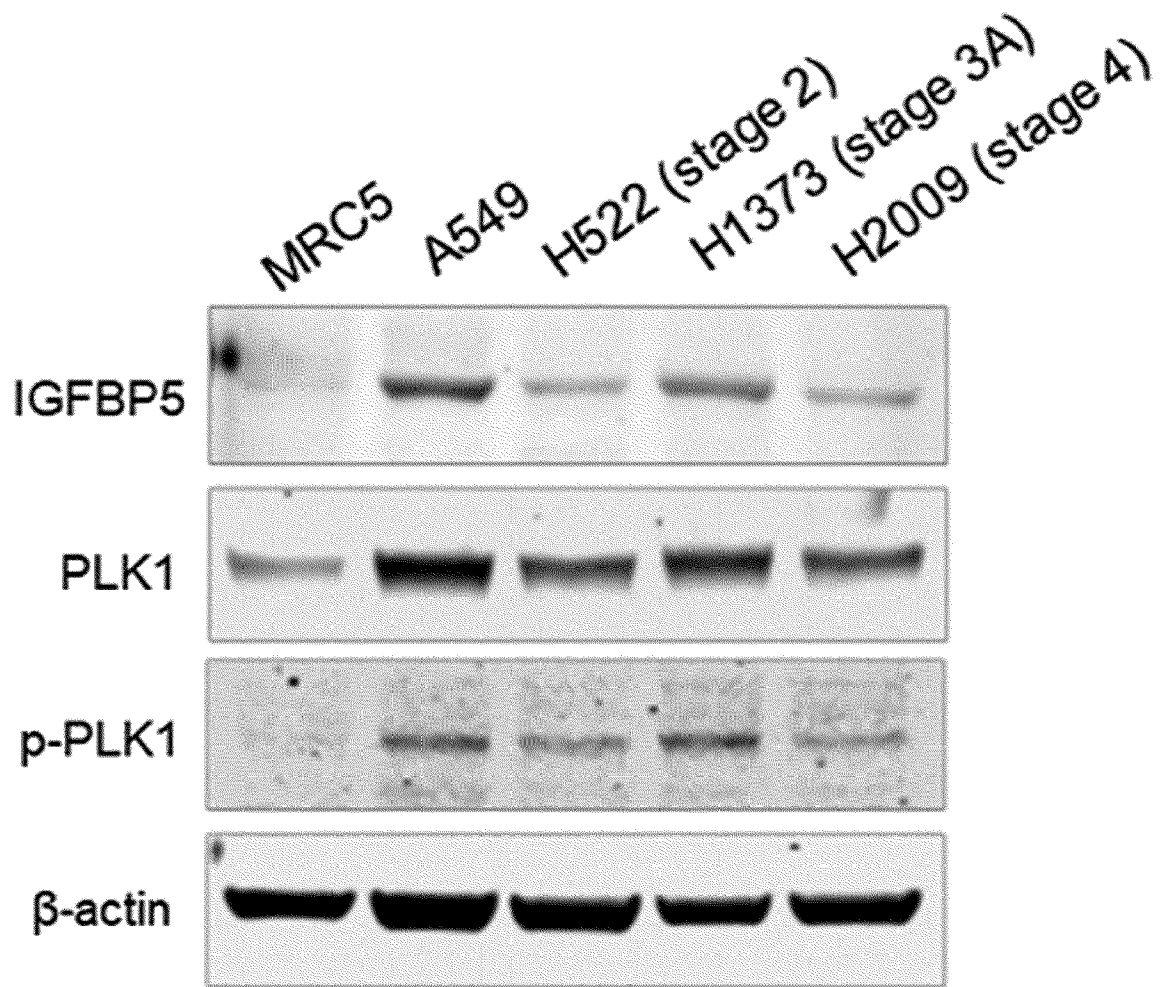
[도2c]



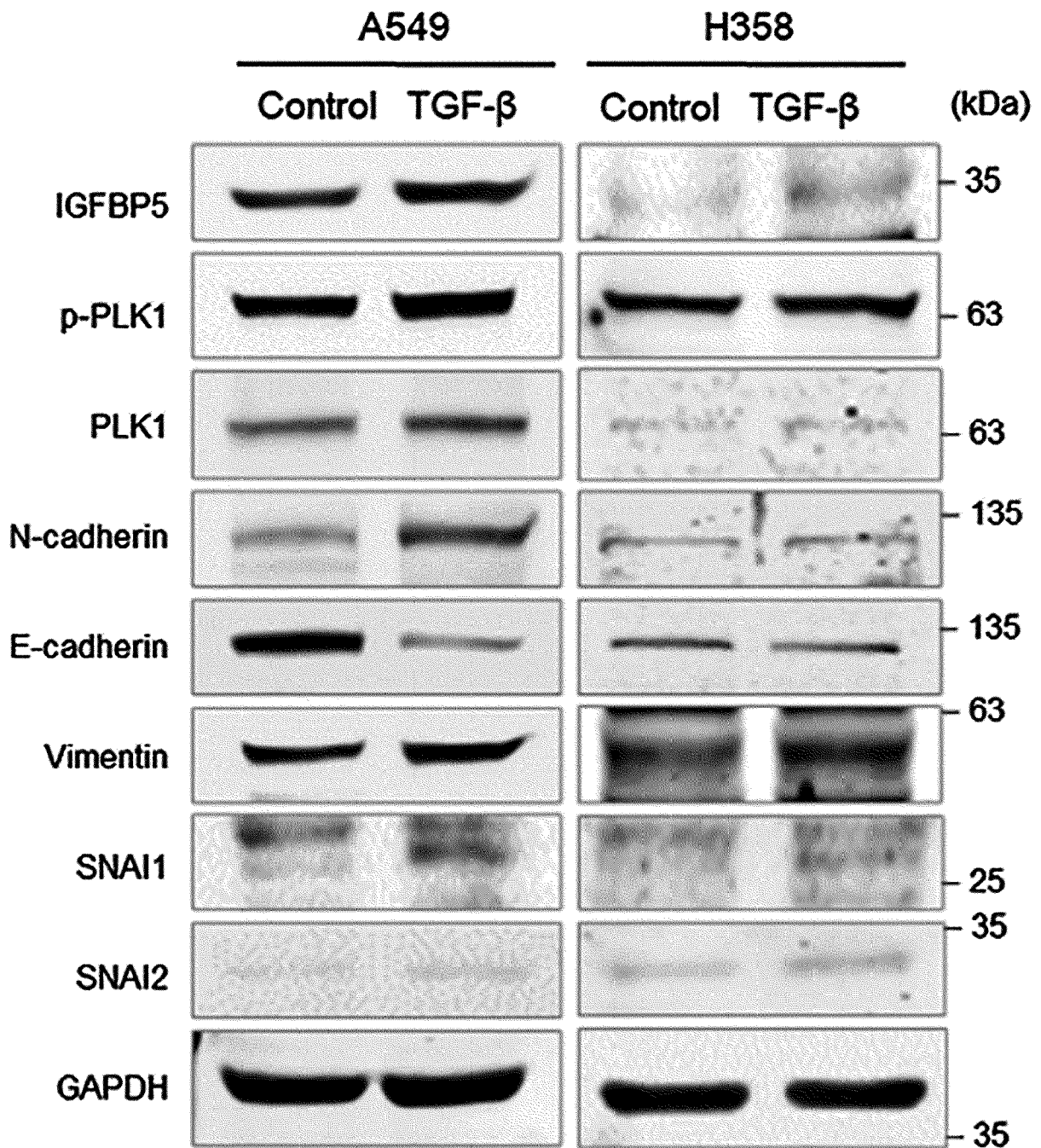
[도2d]



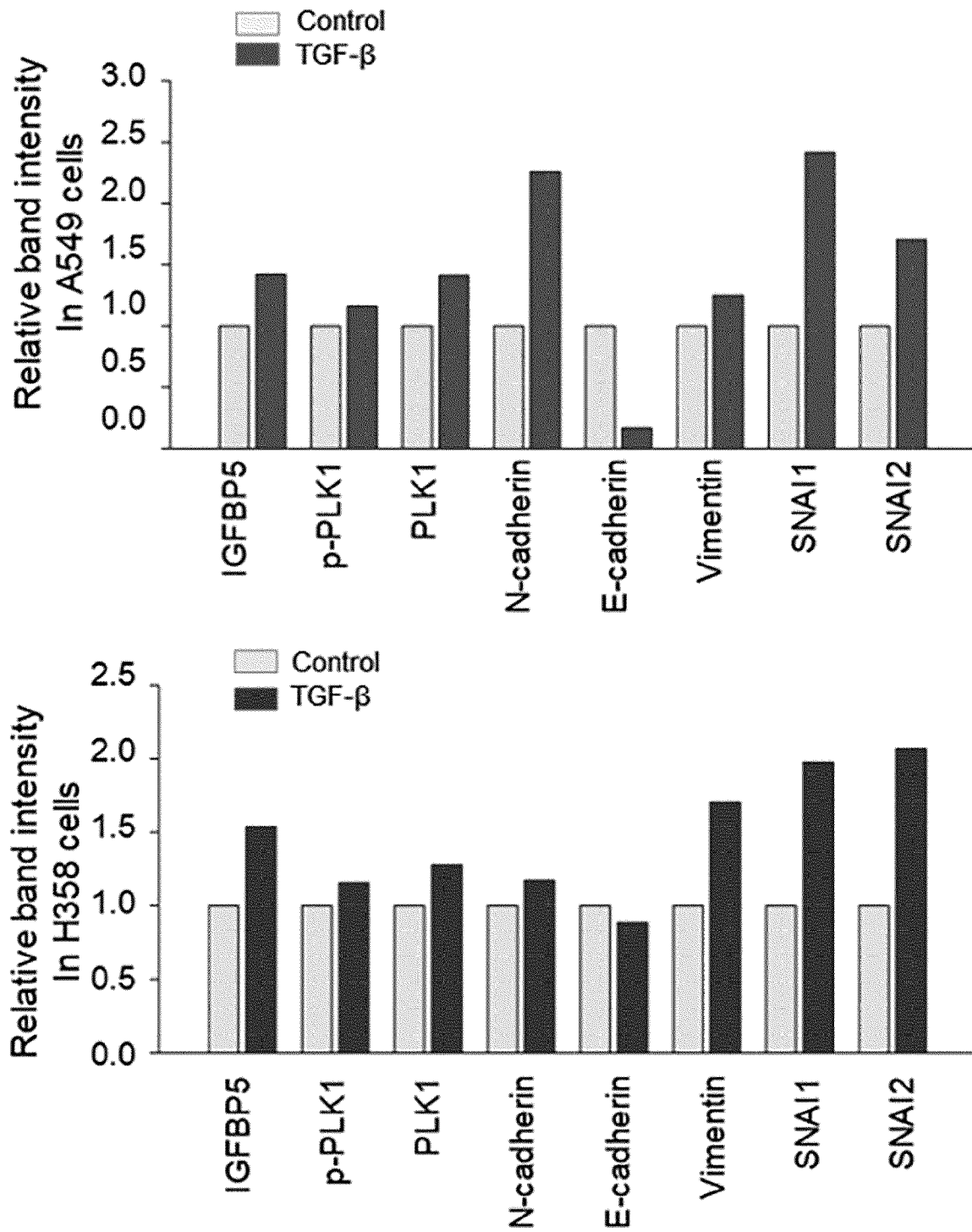
[도2e]



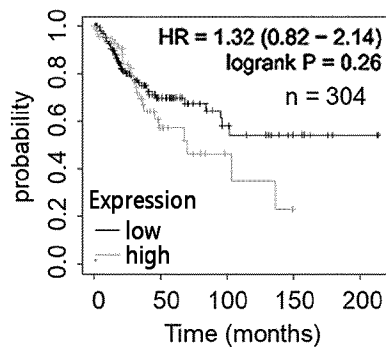
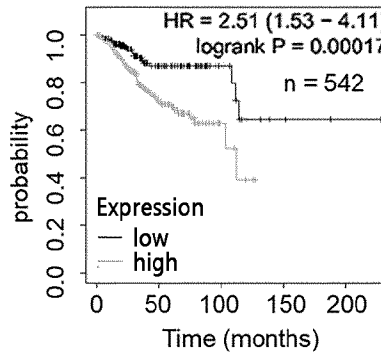
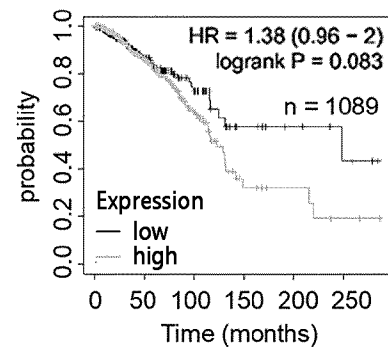
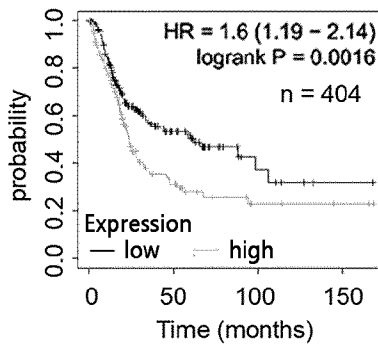
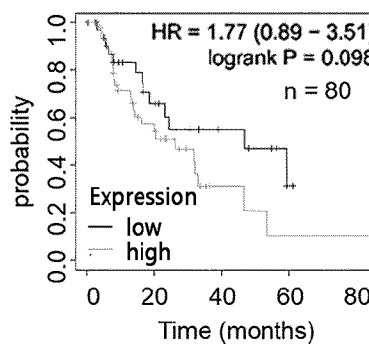
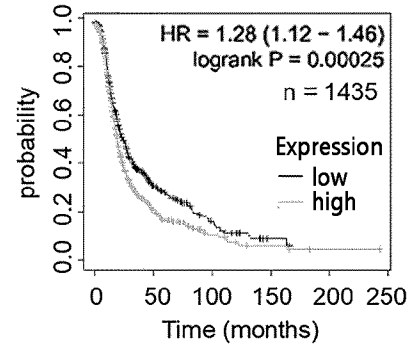
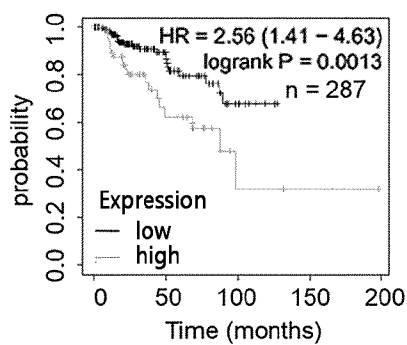
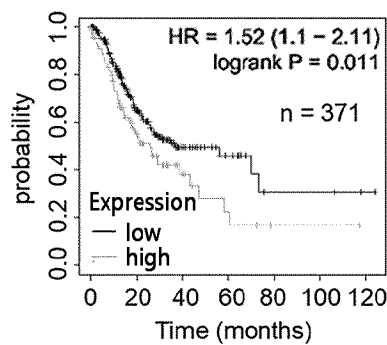
[도2f]



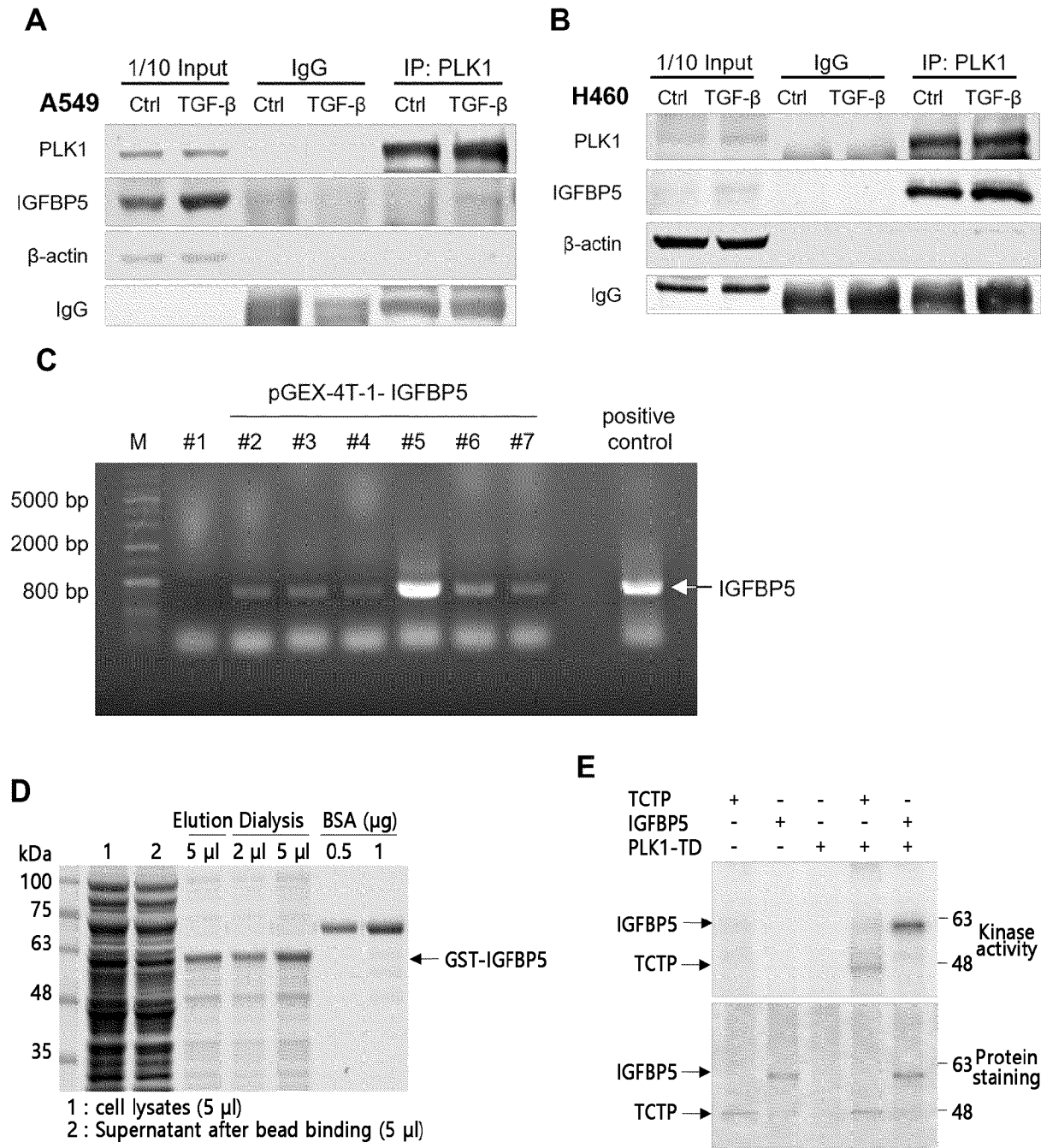
[도2g]



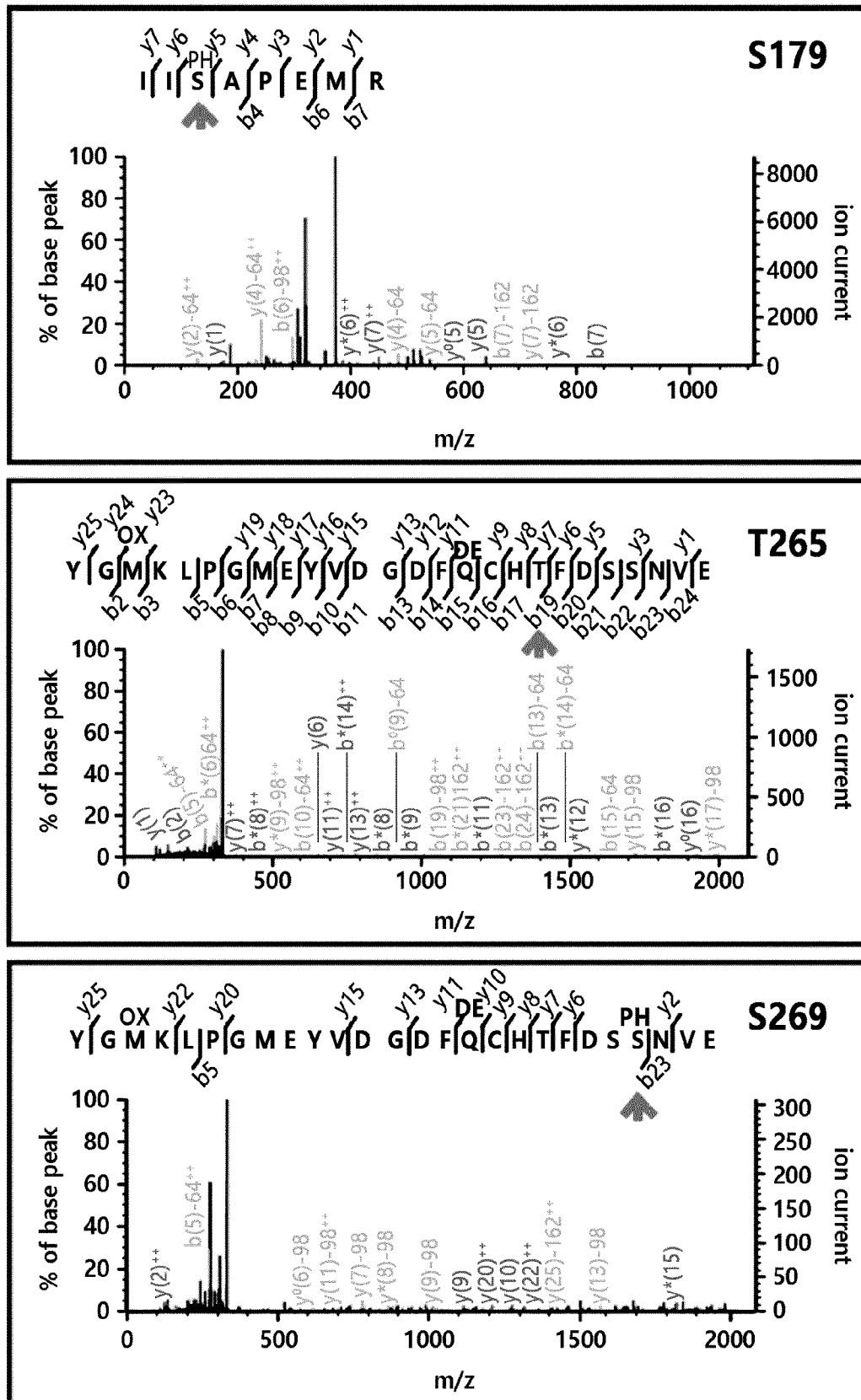
[도3]

A OS in Cervical squamous cell carcinoma**OS in Uterine corpus endometrial carcinoma****OS in Breast cancer****B OS in Bladder cancer****OS in Esophageal adenocarcinoma****OS in Ovarian cancer****C OS in Kidney renal papillary cell carcinoma****OS in stomach adenocarcinoma**

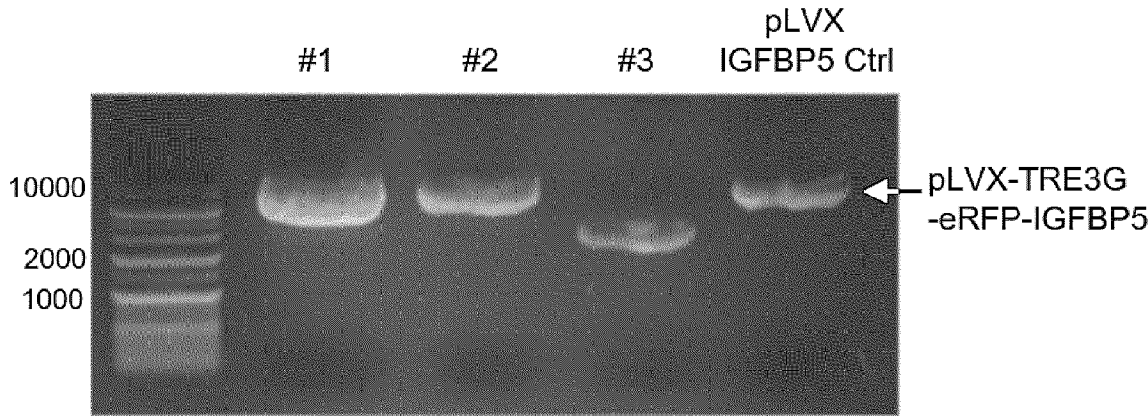
[도4]



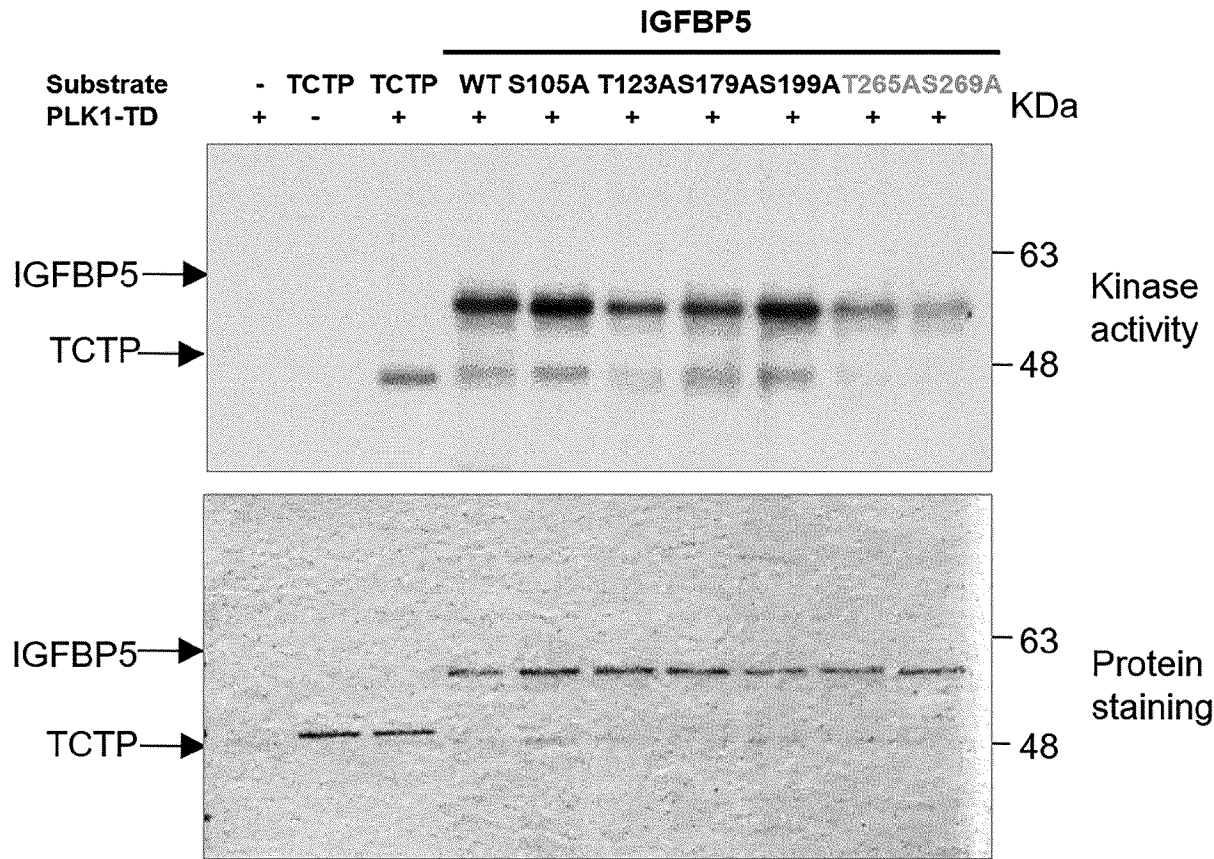
[도5a]



[도5b]



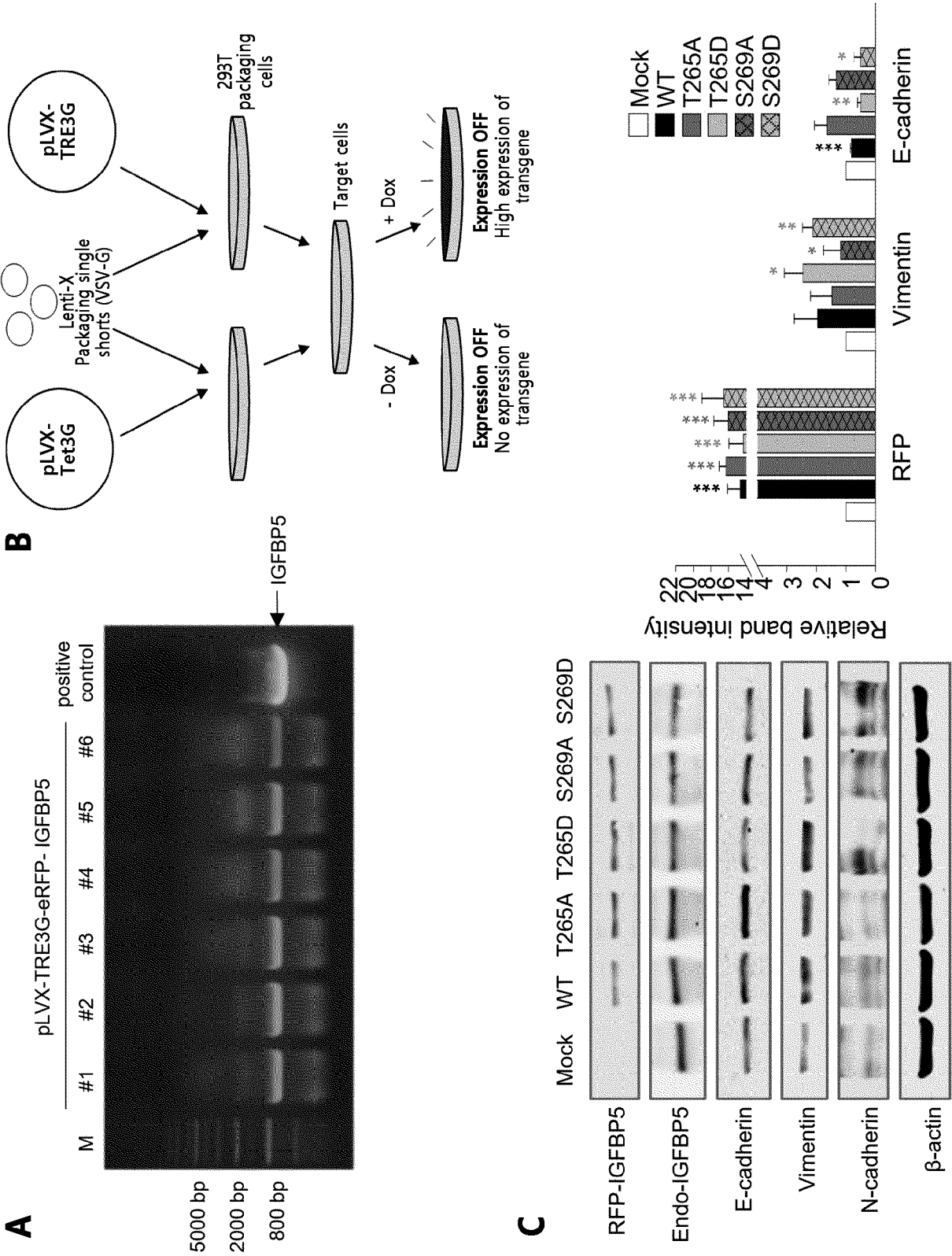
[도5c]



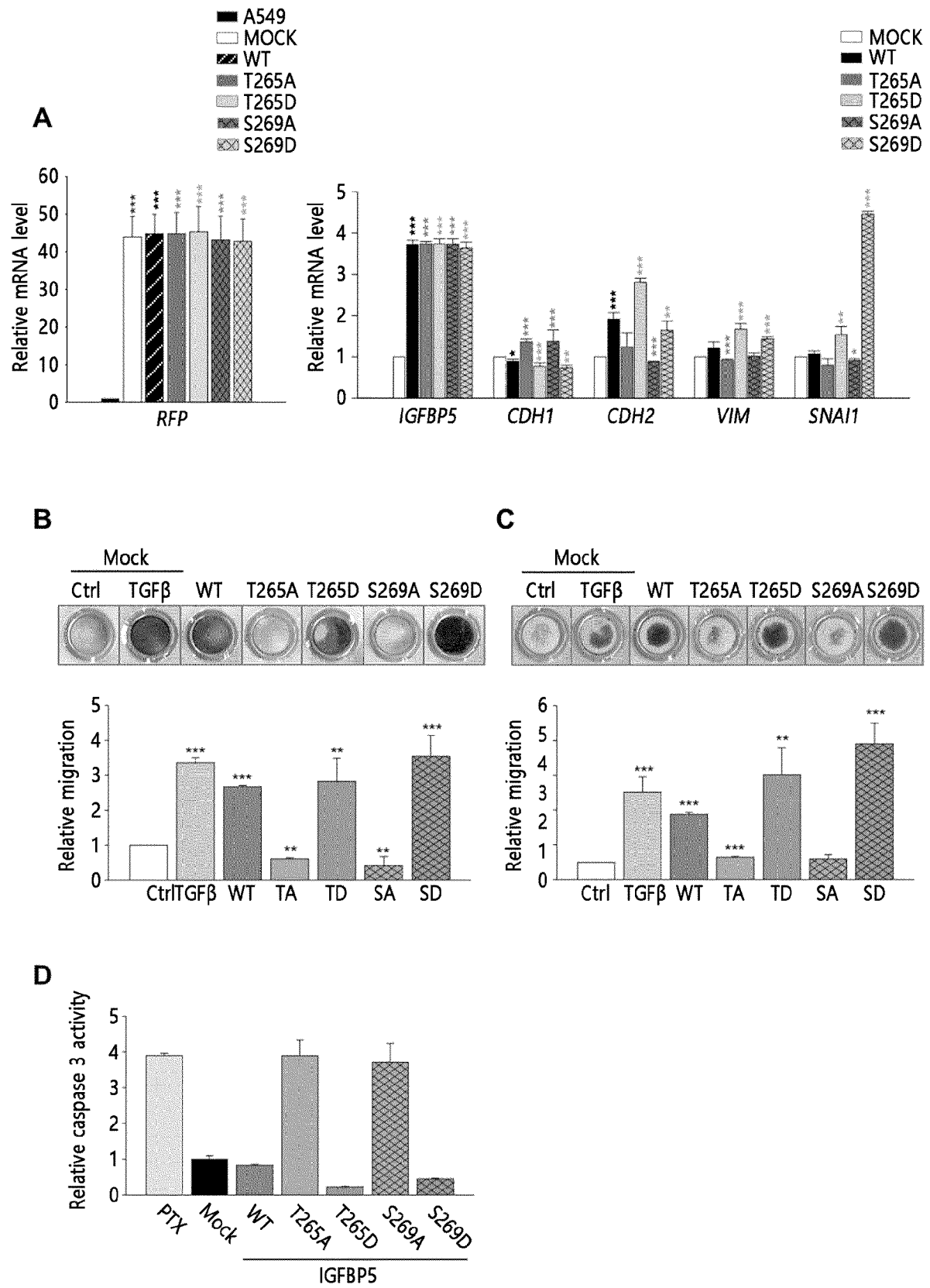
[도5d]

<i>Homo sapiens</i>	GMEYVDGDFQCH ²⁶⁵ TFDS ²⁶⁹ SNVE
<i>Pan troglodytica</i>	GMEYVDGDFQCH ²⁶⁵ TFDS ²⁶⁹ SNVE
<i>Papio Anubis</i>	GMEYVDGDFQCH ²⁶⁵ TFDS ²⁶⁹ SNVE
<i>Bos taurus</i>	GMEYVDGDFQCH ²⁶⁵ TFDS ²⁶⁹ SNVE

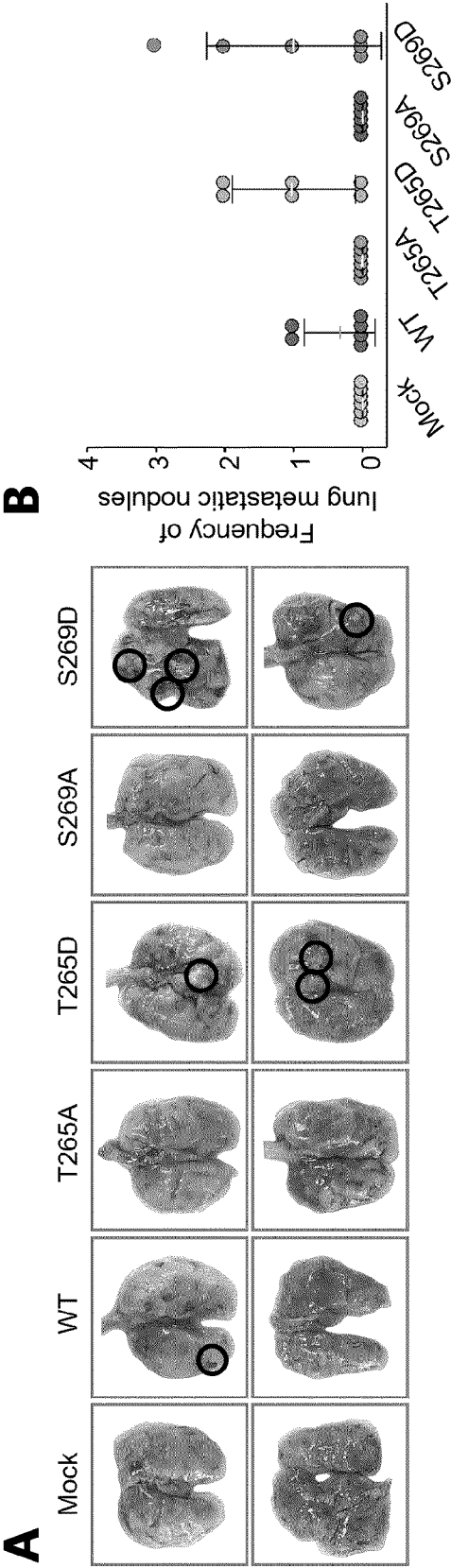
[56]



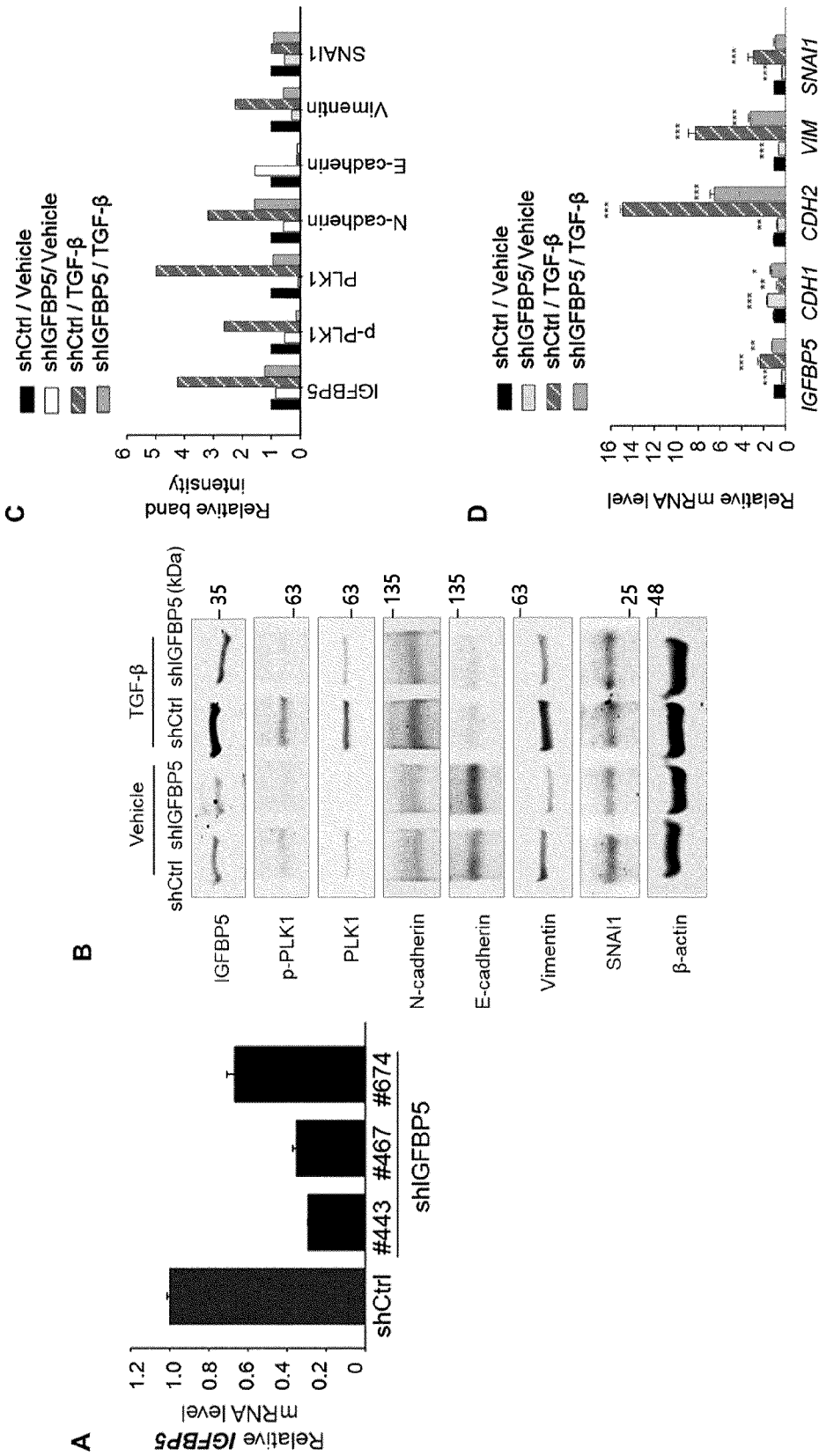
[도7]



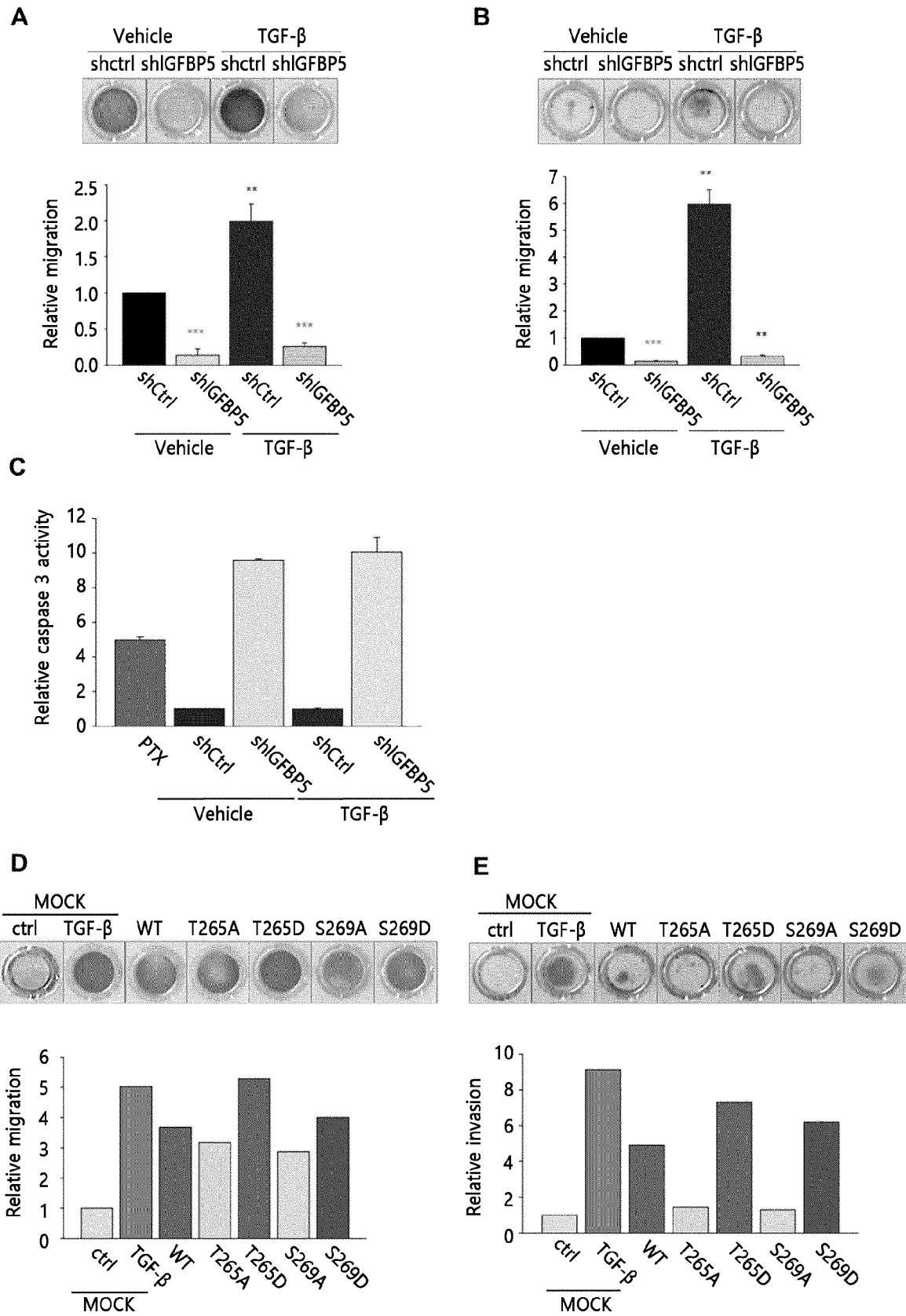
[도8]



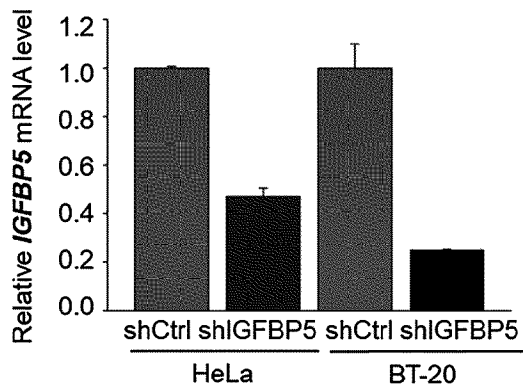
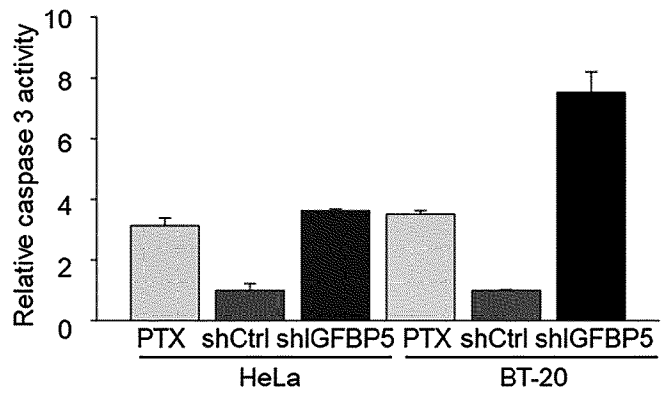
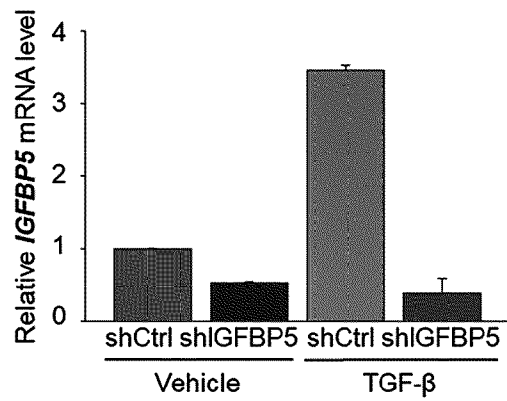
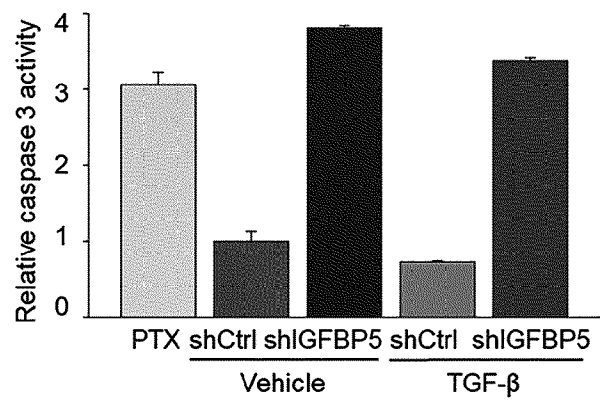
[도9]



[도 10]



[도11]

A**B****C****HeLa****D**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; **A61K 31/7105**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C07K 14/47**(2006.01)i; **A61P 35/04**(2006.01)i;
C12N 15/86(2006.01)i; **A61K 38/00**(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 48/00(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 38/30(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C12N 15/11(2006.01);
G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

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: IGFBP5(insulin-like growth factor-binding protein 5), 돌연변이(mutation), 단백질
(protein), 서열(sequence), 치환(substitution), 암세포(cancer cell), RNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0078465 A (KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES) 10 July 2013 (2013-07-10) See abstract; claims 20-21; and paragraphs [0088] and [0093].	16
A		1-15,17-18
A	WO 2004-018676 A2 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA et al.) 04 March 2004 (2004-03-04) See entire document.	1-18
A	KR 10-2002-0033735 A (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 07 May 2002 (2002-05-07) See entire document.	1-18
A	KR 10-2014-0030188 A (HYTEST LTD.) 11 March 2014 (2014-03-11) See entire document.	1-18



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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 April 2024

Date of mailing of the international search report

01 May 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001453

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0045896 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 17 April 2014 (2014-04-17) See entire document.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001453

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/001453

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2013-0078465	A	10 July 2013	EP	2799546	A1	05 November 2014
				EP	2799546	A4	01 July 2015
				EP	2799546	B1	12 July 2017
				KR	10-1358810	B1	11 February 2014
				US	2014-0357517	A1	04 December 2014
				WO	2013-100273	A1	04 July 2013
WO	2004-018676	A2	04 March 2004	AU	2003-258426	A1	11 March 2004
				AU	2003-258426	B2	10 April 2008
				EP	1532249	A2	25 May 2005
				EP	2263679	A2	22 December 2010
				EP	2263679	A3	12 October 2011
				EP	2263679	B1	08 October 2014
				IL	166658	A	15 January 2006
				IL	197159	A	31 July 2011
				JP	2006-500958	A	12 January 2006
				JP	2010-193908	A	09 September 2010
				JP	2011-036267	A	24 February 2011
				JP	2013-150624	A	08 August 2013
				JP	4717633	B2	06 July 2011
				JP	5171887	B2	27 March 2013
				JP	5662766	B2	04 February 2015
				KR	10-1117673	B1	07 March 2012
				KR	10-1212512	B1	26 December 2012
				KR	10-1238701	B1	05 March 2013
				KR	10-2005-0042483	A	09 May 2005
				KR	10-2010-0135335	A	24 December 2010
				KR	10-2011-0122883	A	11 November 2011
				NO	20051423	L	20 May 2005
				NO	20051426	A	12 May 2005
				NO	20121038	L	20 May 2005
				NO	333254	B1	22 April 2013
				NO	334573	B1	14 April 2014
				NO	337130	B1	25 January 2016
				NZ	552872	A	30 November 2007
				US	2004-0096882	A1	20 May 2004
				US	2006-0178329	A1	10 August 2006
				US	2008-0274996	A1	06 November 2008
				US	2011-0009472	A1	13 January 2011
				US	2012-0202873	A1	09 August 2012
				US	7820635	B2	26 October 2010
				US	7964717	B2	21 June 2011
				US	8252918	B2	28 August 2012
				US	8759308	B2	24 June 2014
				US	9487777	B2	08 November 2016
KR	10-2002-0033735	A	07 May 2002	AT	E393220	T1	15 May 2008
				AU	6144500	A	05 February 2001
				AU	772480	B2	29 April 2004
				CA	2375467	A1	25 January 2001
				CA	2375467	C	29 October 2013
				DE	60038680	T2	07 May 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/001453

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 1200579 A2	02 May 2002
		EP 1200579 B1	23 April 2008
		HU 228465 B1	28 March 2013
		HU P0201868 A2	28 December 2002
		JP 2003-504418 A	04 February 2003
		JP 5121106 B2	16 January 2013
		KR 10-0779752 B1	27 November 2007
		KR 10-0856475 B1	08 September 2008
		KR 10-2007-0036180 A	02 April 2007
		NO 20020259 L	17 January 2002
		NO 332388 B1	10 September 2012
		NZ 516701 A	26 November 2004
		US 7297684 B1	20 November 2007
		WO 01-05435 A2	25 January 2001
		WO 01-05435 A3	22 March 2001
KR 10-2014-0030188 A	11 March 2014	CN 103703373 A	02 April 2014
		EP 2697654 A1	19 February 2014
		EP 2697654 B1	27 May 2020
		JP 2014-515824 A	03 July 2014
		US 10191066 B2	29 January 2019
		US 2014-0017714 A1	16 January 2014
		WO 2012-140327 A1	18 October 2012
KR 10-2014-0045896 A	17 April 2014	KR 10-1482708 B1	14 January 2015
		KR 10-1578624 B1	18 December 2015
		KR 10-2014-0142202 A	11 December 2014
		US 2014-0100160 A1	10 April 2014
		US 9072707 B2	07 July 2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 38/30(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C12N 15/11(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01)		
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: IGFBP5(insulin-like growth factor-binding protein 5), 돌연변이 (mutation), 단백질(protein), 서열(sequence), 치환(substitution), 암세포(cancer cell), RNA		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	KR 10-2013-0078465 A (한국원자력의학원) 2013.07.10 요약; 청구항 20-21; 단락 [0088], [0093]	16 1-15,17-18
A	WO 2004-018676 A2 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA 등) 2004.03.04 전체 문헌	1-18
A	KR 10-2002-0033735 A (더 유니버시티 오브 브리티쉬 콜롬비아) 2002.05.07 전체 문헌	1-18
A	KR 10-2014-0030188 A (휘테스트 리미티드) 2014.03.11 전체 문헌	1-18
A	KR 10-2014-0045896 A (성균관대학교산학협력단) 2014.04.17 전체 문헌	1-18
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2024년04월30일(30.04.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년05월01일(01.05.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0078465 A	2013/07/10	EP 2799546 A1	2014/11/05
		EP 2799546 A4	2015/07/01
		EP 2799546 B1	2017/07/12
		KR 10-1358810 B1	2014/02/11
		US 2014-0357517 A1	2014/12/04
		WO 2013-100273 A1	2013/07/04
WO 2004-018676 A2	2004/03/04	AU 2003-258426 A1	2004/03/11
		AU 2003-258426 B2	2008/04/10
		EP 1532249 A2	2005/05/25
		EP 2263679 A2	2010/12/22
		EP 2263679 A3	2011/10/12
		EP 2263679 B1	2014/10/08
		IL 166658 A	2006/01/15
		IL 197159 A	2011/07/31
		JP 2006-500958 A	2006/01/12
		JP 2010-193908 A	2010/09/09
		JP 2011-036267 A	2011/02/24
		JP 2013-150624 A	2013/08/08
		JP 4717633 B2	2011/07/06
		JP 5171887 B2	2013/03/27
		JP 5662766 B2	2015/02/04
		KR 10-1117673 B1	2012/03/07
		KR 10-1212512 B1	2012/12/26
		KR 10-1238701 B1	2013/03/05
		KR 10-2005-0042483 A	2005/05/09
		KR 10-2010-0135335 A	2010/12/24
		KR 10-2011-0122883 A	2011/11/11
		NO 20051423 L	2005/05/20
		NO 20051426 A	2005/05/12
		NO 20121038 L	2005/05/20
		NO 333254 B1	2013/04/22
		NO 334573 B1	2014/04/14
		NO 337130 B1	2016/01/25
		NZ 552872 A	2007/11/30
		US 2004-0096882 A1	2004/05/20
		US 2006-0178329 A1	2006/08/10
		US 2008-0274996 A1	2008/11/06
		US 2011-0009472 A1	2011/01/13
		US 2012-0202873 A1	2012/08/09
		US 7820635 B2	2010/10/26
		US 7964717 B2	2011/06/21
		US 8252918 B2	2012/08/28
		US 8759308 B2	2014/06/24
		US 9487777 B2	2016/11/08
KR 10-2002-0033735 A	2002/05/07	AT E393220 T1	2008/05/15
		AU 6144500 A	2001/02/05
		AU 772480 B2	2004/04/29
		CA 2375467 A1	2001/01/25
		CA 2375467 C	2013/10/29
		DE 60038680 T2	2009/05/07

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 1200579 A2	2002/05/02
		EP 1200579 B1	2008/04/23
		HU 228465 B1	2013/03/28
		HU P0201868 A2	2002/12/28
		JP 2003-504418 A	2003/02/04
		JP 5121106 B2	2013/01/16
		KR 10-0779752 B1	2007/11/27
		KR 10-0856475 B1	2008/09/08
		KR 10-2007-0036180 A	2007/04/02
		NO 20020259 L	2002/01/17
		NO 332388 B1	2012/09/10
		NZ 516701 A	2004/11/26
		US 7297684 B1	2007/11/20
		WO 01-05435 A2	2001/01/25
		WO 01-05435 A3	2001/03/22
KR 10-2014-0030188 A	2014/03/11	CN 103703373 A	2014/04/02
		EP 2697654 A1	2014/02/19
		EP 2697654 B1	2020/05/27
		JP 2014-515824 A	2014/07/03
		US 10191066 B2	2019/01/29
		US 2014-0017714 A1	2014/01/16
		WO 2012-140327 A1	2012/10/18
KR 10-2014-0045896 A	2014/04/17	KR 10-1482708 B1	2015/01/14
		KR 10-1578624 B1	2015/12/18
		KR 10-2014-0142202 A	2014/12/11
		US 2014-0100160 A1	2014/04/10
		US 9072707 B2	2015/07/07