



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0052391
(43) 공개일자 2008년06월11일

(51) Int. Cl.

A61K 31/135 (2006.01) *A61K 31/12* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0122283

(22) 출원일자 2007년11월28일

심사청구일자 2007년11월28일

(30) 우선권주장

1020060124146 2006년12월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

재단법인서울대학교산학협력재단

서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

박기훈

경남 진주시 초전동 현대아파트 101동 1402호

이정원

서울시 노원구 중계본동 593 삼성APT 105동 1504호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

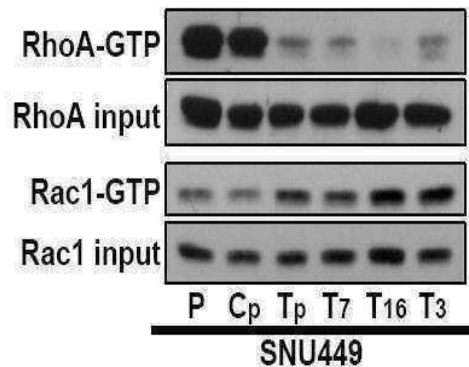
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) TM4SF5의 기능을 저해하는 항암물질의 스크리닝 방법및 칼콘계 화합물을 함유하는 항암조성물

(57) 요약

본 발명은 항암물질의 스크리닝 방법 및 상기 방법에 의해 스크린된 항암용 화합물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 서열번호 2의 폴리펩타이드를 발현하는 종양 단백질인 TM4SF5(Transmembrane 4 L6 family member 5)를 발현하는 암세포를 배양하여 항암 후보물질로 처리한 다음, 상기 TM4SF5의 발현과 관련된 여러가지 분자적 기전에 따른 제반현상에 기초하여 종양생성 및 전이에 대한 길항작용을 보이는 물질을 항암물질로 결정하는 방법에 관한 것이다. 또한 상기 방법으로 스크린한 항암물질, 특히 칼콘계 화합물을 유효성분으로 하는 암 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

류영배

경남 남해군 남면 죽전리 617번지 9/3

류형원

경남 마산시 구산면 수정리 대신빌라 401호

이신애

서울시 강서구 염창동 현대아이파크 1차 102동
1306호

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 항암물질의 스크리닝 방법:

(a) 서열번호 2의 폴리펩타이드를 발현하는 암세포를 배양한 다음, 항암 후보물질로 처리하는 단계;

(b) 상기 항암 후보물질로 처리된 암세포에 대하여 다음 중 어느 하나 이상을 수행하는 단계:

(i) FAK(focal adhesion kinase)를 이루는 아미노산 서열 중 577번 위치의 타이로신의 인산화 확인, (ii) FAK-RhoGAP(Rho-GTPase activating protein) 또는 FAK-GRAF(GTPase Regulator Associated with FAK)의 결합 측정, (iii) 세포질 내 p27^{Kip1}의 발현량 측정, (iv) RhoA의 활성 측정, 및 (v) Rac1의 활성 측정; 및

(c) 항암 후보물질로 처리하지 않은 경우와 비교하여 다음 경우의 항암 후보물질을 항암물질로 선택하는 단계:

(i) FAK의 577번 위치의 타이로신의 인산화 감소, (ii) FAK-RhoGAP 또는 FAK-GRAF의 결합 억제, (iii) 세포질 내 p27^{Kip1} 발현 감소, (iv) RhoA 활성 증가, 또는 (v) Rac1 활성 감소.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포질 내의 p27^{Kip1}은,

상기 p27^{Kip1}을 이루는 아미노산 서열 중 10번위치의 세린 잔기가 인산화된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (b)단계는, 세포의 형태 확인, 세포접촉 관련 단백질 발현 확인, 세포-세포간 접촉양상 또는 접촉생장 확인, SMA(α -smooth muscle actin) 단백질 또는 비멘틴(vimentin) 단백질의 발현 확인, 이-카드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현 확인, 및 상피세포-중배엽세포로의 전이현상(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 확인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 수행하고,

상기 (c)단계는, 세포의 형태가 로드(lod)타입에서 다각형으로 돌아가거나, 세포접촉 관련 단백질들의 발현이 감소하거나, 세포-세포간 접촉이 유지되거나, 세포접촉 생장저지 현상이 나타나거나, SMA(α -smooth muscle actin) 단백질 또는 비멘틴(vimentin) 단백질의 발현이 감소하거나, 이-카드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현증가하거나, 상피세포-중배엽세포로의 전이현상(EMT)이 감소되는 경우를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 세포접촉 관련 단백질은 E-카드헤린(E-cadherin), ZO1(zonula occludens-1), β -카테닌(β -catenin) 및 데스모플라킨(Desmoplakin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 세포접촉 생장저지 현상은 세포 수의 감소, 세포주기의 S기에 존재하는 세포군집의 감소 또는 다층 증식(multilayer growth)의 억제인 것을 특징으로 하는 방법..

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 세포 수의 감소 또는 세포주기의 S기에 존재하는 세포군집의 감소는 세포막단백질의 N-연결된 글리코실레이션(N-linked glycosylation)의 불활성에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 (b)단계는, 세포외기질 또는 세럼 (serum)의 존재하에 세포의 이동 확인, 세포외기질을 이루는 콜라겐 겔

(collagen gel) 속에서의 침윤 확인, 세포외기질 복합체를 이루는 매트릭젤(Matrigel) 속에서의 침윤 확인, 및 MMP(matrix metalloproteinase) 활성 측정으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 수행하고,

상기 (c)단계는, 세포외기질 또는 세럼 (serum)의 존재하에 세포의 이동이 감소하거나, 콜라겐 겔(collagen gel) 속에서의 침윤이 감소하거나, 매트릭젤(Matrigel) 속에서의 침윤이 감소하거나, 또는 MMP 활성이 감소되는 경우를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 MMP(matrix metalloproteinase)는 MMP-2 또는 MMP-9인 것을 특징으로 하는 방법.

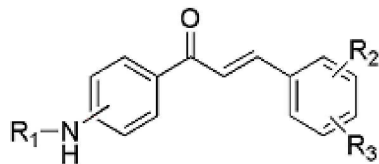
청구항 9

제1항에 있어서, 상기 암세포는 췌장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암, 유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 자궁암, 및 폐암으로 구성된 군에서 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

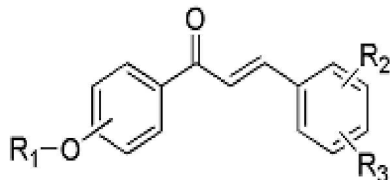
하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 항암용 칼콘계 화합물:

[화학식 1]



상기 식에서, R₁은 R₄SO₂- 이고; R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시기이며; 여기서 상기 R₄는 C₁ ~ C₅의 알킬 또는 수소, 할로젠, 니트로 및 C₁ ~ C₅의 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환기를 갖는 C₆ ~ C₁₀의 아릴이다;

[화학식 2]



상기 식에서, R₁은 R₄SO₂- 이고; R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시기이며; 여기서 상기 R₄는 C₁ ~ C₅의 알킬 또는 수소, 할로젠, 니트로 및 C₁ ~ C₅의 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환기를 갖는 C₆ ~ C₁₀의 아릴이다.

청구항 11

제8항에 있어서, 다음 화합물로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 항암용 칼콘계 화합물:

- 4' -(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-톨루엔설폰아미노)-3-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-톨루엔설폰아미노)-2-하이드록시칼콘;
- 3' -(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘;
- 2' -(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설폰아미노)-4-하이드록시칼콘;

4' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
 4' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
 2' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 2' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
 2' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
 4' -(p-플루오로벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(m-플루오로벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(o-플루오로벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-니트로벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(m-니트로벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(o-니트로벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-아미노벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(m-아미노벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(o-아미노벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(벤젠설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(메탄설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-톨루엔설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-플루오로벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(m-플루오로벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-니트로벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-아미노벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(메탄설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
 4' -(p-톨루엔설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;

- 4' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 3' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 2' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-플루오로벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-플루오로벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(o-플루오로벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-니트로벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-니트로벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(o-니트로벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-아미노벤젠설폰닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;

- 4' -(m-아미노벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(o-아미노벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(메탄설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-톨루엔벤젠설포닐아미노)-2-클로로-4-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-3-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-2-하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-3-하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-2-하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-2,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(p-하이드록시벤젠설포네이트)-2,5-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-3,4-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-2,3-디하이드록시칼콘;
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-2,4-디하이드록시칼콘; 및
- 4' -(m-하이드록시벤젠설포네이트)-2,5-디하이드록시칼콘.

청구항 12

제10항 또는 제11항의 칼콘 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 항암물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 특히, TM4SF5에 의한 종양의 형성과 발생 및 전이를 저해하는 화합물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 항암물질로 스크린된 칼콘계 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> Transmembrane 4 L6 family member 5 (TM4SF5 또는 L6H)는 종양 특이 항원인 TM4SF1(L6)와 상동성을 갖는 단백질로, 상기 TM4SF1(L6)은 transmembrane 4 L6 family에 속한다. transmembrane 4 L6 family에 속하는 단백질은 TM4SF1(L6) 이외에도 IL-TMP, L6D 등이 있다. 종양특이항원으로 알려진 상기 TM4SF1(L6)는 직장암, 폐암, 유방암 그리고 난소암 등에서 높게 발현되어 있는 것으로 알려져 있고, TM4SF1(L6)와 상동성을 갖는 단백질인 TM4SF5(L6H) 역시 췌장암, 위암, 직장암, 그리고 간암 등 여러 암세포에서 높게 발현된다고 당업계에서 보고되어 있다 (Muller-Pillasch, F., *et al.*, *Gene* 208:25, 1998; Pascual-Le Tallec, L. *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 87:501, 2002). 그리고, TM4SF1(L6)에 비해서 TM4SF5의 mRNA의 수준은 위암 조직에선 낮게 발현된 경우가 있지만, 간암 세포주와 위암 세포주에서는 높게 발현된 것으로도 보고되고 있다. (Kaneko, R *et al.*, *Am J Gastroenterol*. 96(12):3457, 2001).
- <3> 이러한 연구들에 기초하여, 최근 미국특허 US 6,350,581 B1에서 TM4SF5가 신규 발암유전자로서 등록되었고(TUAN

으로 표기), 본 발명자들에 의해서 Cos7 섬유아세포에 TM4SF5를 인위적으로 발현시킨 결과 액틴구조의 재구성과 초점 부착(focal adhesion)의 재생이 인테그린 $\alpha 2$ 와 FAK의 아미노산 타이로신 925번의 인산화를 통해 일어난다는 것과 이러한 현상은 세포성장인자들을 포함하는 세럼(serum)에 의해 저해, 조절된다는 연구결과를 보고한바 있다 (S.Y Lee, *et al. Exp Cell Res* 312:2983, 2006).

- <4> 하지만, 종양형성에 있어서의 TM4SF5의 분자적 기전은 거의 알려져 있지 않고 있는 실정이다. 즉, 분자적 수준에서의 TM4SF5 단백질의 기능 및 그 발암기능적 증거는 생화학적, 세포생물학적으로 전혀 알려져 있지 않고 있다.
- <5> 한편, 칼콘은 식용 식물에 풍부하게 존재하는 물질로서, 플라보노이드 또는 이소플라보노이드의 전구체로 알려져 있다. 이러한 칼콘의 유도체들은 식물의 황색 색소의 구성성분으로 식물의 색깔에 영향을 줄 뿐만 아니라, 유해한 자외선으로부터 식물을 보호하는 역할을 하기도 한다(천연물화학 연구법, 우원식 저, 서울대학교 출판부). 칼콘 유도체들은 국화과 식물인 코레옵시스(Coreopsis) 속에 많이 존재한다. 대표적인 칼콘류에는 2',6'-디히드록시-4'-메톡시칼콘, 카르타민 등이 있으며, 이들은 계피, 홍화, 후추 등과 같은 식물에 함유되어 있다. 디히드로 칼콘은 주로 장미과 및 진달래과 식물에 함유되어 있고, 사과에 존재하는 디히드로 칼콘인 플로리드진(phloridzin)은 사과의 병에 대한 저항력과 관계가 있다고 보고되어 있다.
- <6> 이러한 칼콘 유도체는 예를 들면, 항원충성(Liu, M. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 44:4443, 2001), 항염증성(Babu, M. A. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 10:4035, 2003), 면역조절(Barfod, L. *et al.*, *Int. Immunopharmacol.*, 2:545, 2002), 일산화질소 저해(Rojas, J. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:1951, 2002), 항암(Kumar, S. K. *et al.*, *J. Med. Chem.* 46:2813, 2003), 항HIV(Artico, M., *et al.*, *J. Med. Chem.* 41:3984, 1998) 활성 등 매우 다양한 약물학적 활성을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다.
- <7> 또한, 한국공개특허 10-2003-0036993호에는 상기 칼콘 화합물이 기저막 성분을 분해하는 매트릭스 메탈로프로테아제(Matrix metalloproteinase, MMP)의 활성을 저해하는 성질을 갖고 있음을 기재하고 있다(Park K.H. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:5514-5516, 2004).
- <8> 칼콘계 화합물 중에서도, 설포아미드 또는 설포네이트기가 치환된 칼콘계 화합물들은 자연에 존재하는 칼콘계 화합물들이 가지고 있지 않는 특이한 생물학적 특성이 보고되고 있다. 특히 본 발명자에 의해 설포아미드 칼콘계 화합물들이 높은 α -글루코시다아제 저해활성을 가지고 있음이 보고되었다(Park, K.H. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:5514-5516, 2004; 한국공개특허제 10-0751899호). 뿐만 아니라 본 발명자에 의해 설포네이트 칼콘계 화합물들이 선택적인 칼륨 이온 채널 저해 활성을 가지고 있음도 보고되었다(Park, K.H. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007).
- <9> 그러나, 상기 설포아미드 및 설포네이트 칼콘계 화합물들이 발암 유전자인 TM4SF5를 저해하는 기작을 통하여 항암 기능을 가지고 있다는 사실을 지금까지 전혀 밝혀진 바가 없다.
- <10> 이에 본 발명자들은, 사람의 암세포에서 나타나는 TM4SF5의 발암유전자로서의 기능은 EMT 현상 촉진, 세포접촉 성장저지(contact inhibition) 현상 소실로 인한 것이며, 이는 FAK(focal adhesion kinase)의 인산화 및 세포질내의 p27^{kip1} 단백질의 축적으로 인한 RhoA 단백질의 활성저해 및 세포형태의 변화로 이어지는 일련의 과정을 통해 이루어진다는 새로운 경로를 발견하고, 상기 제반현상들에 기초하여 TM4SF5의 발현에 따른 종양의 형성과 발생 및 전이를 저해하는 항암물질을 스크린하고자 예의 노력을 기울여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

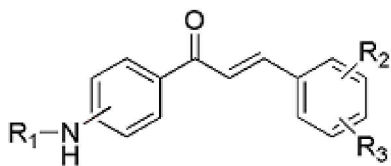
해결 하고자하는 과제

- <11> 본 발명의 목적은 TM4SF5에 의한 종양의 형성과 발생 및 전이를 저해하는 항암물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- <12> 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 스크린된 항암물질, 특히 설포아미드 및 설포네이트 칼콘계 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물을 제공하는 데 있다.

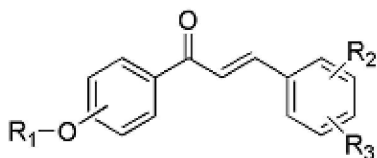
과제 해결수단

- <13> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이하의 단계를 포함하는, 항암물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

- <14> (a) 서열번호 2의 폴리펩타이드를 발현하는 암세포를 배양한 다음, 항암 후보물질로 처리하는 단계;
- <15> (b) 상기 항암 후보물질로 처리된 암세포에 대하여 다음 중 어느 하나 이상을 수행하는 단계:
- <16> (i) FAK(focal adhesion kinase)를 이루는 아미노산 서열 중 577번 위치의 타이로신의 인산화 확인, (ii) FAK-RhoGAP(Rho-GTPase activating protein) 또는 FAK-GRAF(GTPase Regulator Associated with FAK)의 결합 측정, (iii) 세포질 내 p27^{Kip1}의 발현량 및 세포질내 안정화 측정, (iv) RhoA의 활성 측정, 및 (v) Rac1의 활성 측정; 및
- <17> (c) 항암 후보물질로 처리하지 않은 경우와 비교하여 다음 경우의 항암 후보물질을 항암물질로 선택하는 단계:
- <18> (i) FAK의 577번 위치의 타이로신의 인산화 감소, (ii) FAK-RhoGAP 또는 FAK-GRAF의 결합 억제, (iii) 세포질 내 p27^{Kip1} 발현 감소 및 세포질내 안정화, (iv) RhoA 활성 증가, 또는 (v) Rac1 활성 감소.
- <19> 본 발명에 있어서,
- <20> 상기 (b)단계는, 세포의 형태 확인, 세포접촉 관련 단백질 발현 확인, 세포 간 접촉양상 또는 접촉생장 확인, SMA(α -smooth muscle actin) 단백질 또는 비멘틴(vimentin) 단백질의 발현확인, 이-카드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현확인 및 상피세포-중배엽세포로의 전이현상(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 확인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 수행하고,
- <21> 상기 (c)단계는, 세포의 형태가 로드(lod)타입에서 다각형으로 돌아가거나, 세포접촉 관련 단백질들의 발현이 감소하거나, 세포-세포간 접촉이 유지되거나, 세포접촉 생장저지 현상이 나타나거나, SMA(α -smooth muscle actin) 단백질 또는 비멘틴(vimentin) 단백질의 발현이 감소하거나, 이-카드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현 증가하거나, 상피세포-중배엽세포로의 전이현상(EMT)이 감소되는 경우를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <22> 본 발명에 따른 상기 스크리닝 방법은,
- <23> 상기 (b)단계는, 세포외기질 또는 세럼 (serum)의 존재하에 세포의 이동(migration 또는 motility) 확인, 세포 외기질을 이루는 콜라겐 겔(collagen gel)의 침윤 확인, 세포외기질 복합체를 이루는 매트릭겔(Matrigel)의 침윤 확인 및 MMP(matrix metalloproteinase) 활성 측정으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 수행하고,
- <24> 상기 (c)단계는, 세포외기질 또는 세럼 (serum)의 존재하에 세포의 이동이 감소하거나, 콜라겐 겔(collagen gel)속에서의 침윤이 감소하거나, 매트릭겔(Matrigel)속에서의 침윤이 감소하거나, 또는 MMP 활성이 감소되는 경우를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <25> 본 발명은 상기 방법에 의해 스크린된, 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 항암용 칼콘계 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물을 제공한다.
- <26> [화학식 1]



- <27>
- <28> 상기 식에서, R₁은 R₄SO₂⁻ 이고; R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시기이며; 이 때, 상기 R₄는 C₁~C₅의 알킬 또는 수소, 할로젠, 니트로 및 C₁~C₅의 알킬로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환기를 갖는 C₆~C₁₀의 아릴이다.
- <29> [화학식 2]



<30>

<31> 상기 식에서, R_1 은 $R_4SO_2^-$ 이고; R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시기이며; 이 때, 상기 R_4 는 $C_1 \sim C_5$ 의 알킬 또는 수소, 할로젠, 니트로 및 $C_1 \sim C_5$ 의 알킬로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환기를 갖는 $C_6 \sim C_{10}$ 의 아릴이다.

효 과

<32> 본 발명은 종양 형성에 있어서의 TM4SF5의 발현과 관련된 분자적 기전에 기초한 항암물질 스크리닝 방법으로서, 종양생성 및 전이에 대한 길항작용을 하는 치료 및 예방목적의 물질을 스크리닝하는데 유용하다. 또한, 상기 방법에 의해 스크리닝 칼론계 화합물을 함유하는 항암용 조성물은 체중의 감소, 간 및 비장(spleen) 장기에 대하여 외상적 이상을 초래하지 않으면서 독성반응 없이 항암효과를 나타내므로, 항암용 약제로 유용하게 사용할 수 있는 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<33> 본 발명은 일 관점에서, 종양유도 인자로 작용하는 TM4SF5(Transmembrane 4 L6 family member 5) 발현과 관련된 다양한 세포생물학적 및 생화학적 현상에 기초한, 항암물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

<34> 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드로부터 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드의 발현을 통해 형성되는 종양 단백질인 TM4SF5(Transmembrane 4 L6 family member 5)는 종양특이적 항원인 L6와 상동성을 갖는 단백질이다. 상기 TM4SF5는 비수용성의 단백질로서 세포막을 통과하는 4개의 영역과 세포밖에 존재하는 2개의 고리구조와 세포질에 존재하는 2개의 말단구조를 가지고 있고, 췌장암, 위암, 직장암, 간암 등 여러 암세포에서 높게 발현된다고 알려져 있다.

<35> TM4SF 단백질들은 인테그린(integrin) 같은 세포부착 분자들과 복합체를 형성하여 거대한 테트라스핀-웹(tetraspni-web)을 이루어, 세포의 부착, 증식 그리고 이동 같은 다양한 생물학적 기능에 기여하는 것으로 추정되고 있다. 단층으로 구성된 상피조직은 인접한 세포들 간의 세포-세포 접촉에 의한 것으로, E-카드헤린(E-Cadherin)과 같은 세포접촉에 관여하는 분자들 간의 강한 상호결합을 통하거나 인테그린 막수용체가 세포외기질이 되는 단백질과 결합함으로써 세포 기저부에 강하게 부착되어 존재한다. 강하게 연결된 단층조직의 와해는 상피세포로서의 기능을 잃어버리고 일차적인 종양 세포체로부터 종양세포들이 이탈되게 된다.

<36> 인테그린은 세포부착에 관련된 수용체 집단으로, 세포 부착이 인테그린과 세포외기질의 결합으로 일어날 경우, 다양한 세포내 신호전달 물질이 활성화되어 그 기능을 수행하며 액틴 필라멘트(actin filament)의 재구성에도 기여한다. 인테그린에 의한 세포 부착과 관련된 신호전달 물질들로 FAK(focal adhesion kinase) 및 RhoA GTPase(Rho-GTPase activating protein) 등이 존재한다.

<37> 본 발명자들은 SNU449(KCLB No.00449)간암 상피세포에서 TM4SF5는 인테그린에 의한 신호전달과 밀접하게 관련되어 있음을 확인하고, 이 연관성을 다음과 같은 관찰을 통해 추정하였다:

<38> (1) TM4SF5의 발현은 pY^{397} FAK이 아닌 pY^{577} FAK의 증가시킨다

<39> (2) Y^{577} FAK 돌연변이는 TM4SF5에 의한 FAK과 RhoGAP의 결합을 저해한다

<40> (3) TM4SF5의 발현은 FAK-p190RhoGAP 또는 FAK-GRAF 간의 상호작용에 의한 결합을 촉진함으로써 RhoA의 활성을 저해한다

<41> (4) 또한, 상기 기작과는 별개로, TM4SF5의 발현은 세포질 내에 존재하는 $p27^{kip1}$ 의 발현 증가 및 안정화에 기여하고, 이는 RhoA의 활성을 저해로 이어진다

<42> 즉, 본 발명자들은 상기 관찰 결과에 기초하여 예의 노력한 결과, TM4SF5의 분자적 수준에서의 상기 TM4SF5 단백질의 기능 및 그 발암기능을 생화학적 및 세포생물학적으로 규명하였다.

<43> Rho족 단백질의 특성

<44> 세포의 부착 및 탈착과 관련된 GTP-결합 단백질인 Rho족 단백질 중에서 대표적인 예로 RhoA 및 Rac1이 있는데, 이들은 GTP가 결합되면 생리적 활성을 나타내고, GDP가 결합되면 비활성형으로 그 기능을 중지한다. 일반적으로 상기 Rho족 단백질들은 낮은 GTPase 활성을 가지고 있으며, 세포의 부착시에 나타나는 초점 부착(focal adhesio, FA) 및 인테그린의 회합(assembly)과 해리에 중요한 역할을 한다. RhoA GTPase는 RhoA, Rac1 및

Cdc42로 이루어져 있으며, 그 하위 신호전달 매개분자들인 LIMK, PAK1, MLCK, mDia, ROCK 같은 단백질들에 의하여, 액틴 중합체 형성 및 마이오신 경사슬(myosin light chain) 인산화를 통해 액틴의 재구성에 중요한 역할을 한다.

<45> FA에 신호전달 성분들의 회합은 FAK(focal adhesion kinase)의 활성화에 의존하는데, 이는 FAK에 의한 단백질들의 인산화에 의해 다른 단백질들이 결합될 수 있는 자리가 노출되기 때문이다. 즉, FAK가 결합된 세포에서는 FA의 형성이 증가된다. 다시 말해, FAK 내 티로신의 인산화는 FA 형성을 촉진시키는 것이다. 또한, FAK는 세포의 운동성에도 관여하는데, FAK가 과발현되면 운동성이 증가되고 침투능이 증가된다.

<46> 이러한 FAK의 활성화는 RhoA단백질과 밀접하게 연관되어 있는데, FAK가 결합된 세포에서는 RhoA 활성화가 증가되어 있다. 이는 FAK의 C-말단에 결합하고 있는 RhoGAP(Rho-GTPase activating protein) 및 GRAF(GTPase Regulator Associated with FAK)가 FAK의 인산화에 의해 RhoGAP를 자극하여 RhoA의 활성을 저하시키기 때문이다.

<47> 그러나, Rho족 단백질 중에서 Rac1는 상기 RhoA의 작용과 반대이다. 즉 Rac1이 활성화되면 FA의 형성이 감소되고, 세포의 이동을 증진시킨다. 세포의 이동을 저해하는 FA 구조물이 해리되면 FA의 파괴를 유도하는 성장인자들의 자극에 의한 세포이동이 촉진되기 때문이다.

<48> TM4SF5의 발현에 따른 FAK의 인산화 및 RhoA의 활성 저하

<49> 본 발명자들은 TM4SF5의 발현은 pY³⁹⁷FAK이 아닌 pY⁵⁷⁷FAK를 증가시키고 FAK-p190RhoGAP 또는 FAK-GRAF 간의 상호작용에 의한 결합을 촉진시킨다는 사실을 발견하였다.

<50> pY⁵⁷⁷FAK는 FAK(focal adhesion kinase) 단백질을 이루는 아미노산 중 577번 위치에 있는 타이로신을 인산화시킨 것이다. 따라서, TM4SF5의 발현에 따른 pY⁵⁷⁷FAK의 증가는 FAK의 인산화 증가를 의미하는 것이고, 이는 RhoGAP 단백질을 자극하여 RhoGAP-FAK 또는 GRAF-FAK간 결합을 촉진하여, 결국 RhoA의 활성의 저하로 이어진다. 그러나, Rac1의 활성화는 증가한다. 본 명세서의 도 8에서 FAK-RhoA 간의 신호전달은 RhoGAP과 연결된다는 모식도를 나타내고 있다.

<51> FAK 단백질의 577번 아미노산인 타이로신을 인산화 (pY⁵⁷⁷FAK)한 경우 및 c-Src 단백질의 416번 아미노산인 타이로신을 인산화 (pY⁴¹⁶cSrc)한 경우에, Rac1과 RhoA의 활성을 조사한 결과, TM4SF5가 발현되는 세포들에서 Rac1의 활성화는 모두 증가하는 반면, RhoA의 활성화는 모두 감소됨을 확인하였다 (도 3 및 5). 이러한 TM4SF5에 의한 pY⁵⁷⁷FAK의 증가와 RhoA 활성저해 현상은 TM4SF5에 대한 siRNA를 이용하여 TM4SF5의 발현을 저해하면, 다시 반전되는 것으로 나타났다 (도 4 및 6).

<52> 나아가, TM4SF5가 발현되는 세포에서 그렇지 않은 모세포에 비해 FAK-p190RhoGAP 혹은 FAK-GRAF과의 결합이 강하게 결합하는 것으로 나타났고(도 9), FAK 단백질의 577번 아미노산 타이로신을 페닐알라닌으로 바꾼 돌연변이 단백질을 발현시킨 경우에는 TM4SF5에 의한 FAK-p190RhoGAP 또는 FAK -GRAF 간의 결합이 감소되는 결과를 보였다(도 10).

<53> 이를 통해, TM4SF5가 발현되는 세포에서는 FAK로부터 RhoA로 이어지는 일련의 신호전달 과정에서 pY⁵⁷⁷FAK이 중요한 역할을 짐작할 수 있고, 상기 결과를 토대로, pY⁵⁷⁷FAK 발현이 감소하거나, FAK-RhoGAP 또는 FAK-GRAF의 결합이 억제되거나, Rac1의 활성화가 감소되거나 RhoA 활성화가 촉진되는 경우는 상기 종양형성 단백질인 TM4SF5의 발현이 억제되는 경우임을 알 수 있다.

<54> TM4SF5의 발현에 따른 세포질 내 p27^{kip1} 단백질의 축적 및 RhoA의 활성 저하

<55> 본 발명자들은 TM4SF5가 발현되는 세포에서 p27^{kip1} 단백질이 현저하게 높은 농도로 존재하고, 이는 세포질 내에서의 p27^{kip1}mRNA 및 p27^{kip1} 단백질의 높은 안정화 때문임을 발견하였다(도 12). 반면, TM4SF5가 발현되지 않는 세포에서 p27^{kip1}는 그 양도 적지만 존재하는 대부분이 핵에 위치하고 있다(도 13).

<56> p27^{kip1}은 핵안에서 CDK(scyclin-dependent kinase)의 저해 인자로서 종양억제 기능을 한다고 알려져 있다. 상기 p27^{kip1}의 세포질로의 이동은 세포주기의 G0에서 G1으로 전이되는 동안에 10번 세린 잔기가 인산화됨에 따라 이

루어진다. 상기 $p27^{kip1}$ Ser¹⁰의 인산화는 KIS(Kinase Interacting with Stathmin) 및 PKB/Akt 단백질에 의해 이루어지거나, 또는, 성장이 정지되어 있는 세포 또는 in vitro 환경에서 Mirk/dyrk1B 및 Erk1/2에 의해 각각 이루어진다.

<57> 이러한 Ser10 위치의 인산화는 Thr187 또는 Thr157 위치에서보다 TM4SF5의 발현과 더 유의성 있게 잘 일어나며, $p27^{kip1}$ 단백질의 세포질 내로의 위치 이동 및 안정화에 기여한다. 즉, $pT^{157}p27^{kip1}$ 과 $pT^{187}p27^{kip1}$ 은 TM4SF5의 발현에 의한 제현상과 연관이 없다. 그러므로 TM4SF5이 발현되는 간암세포 등에 있어서 shRNA 등을 이용하여 TM4SF5의 발현을 저해하면, $p27^{kip1}$ 의 발현 및 세린 10번 잔기의 인산화가 감소되고, 나아가 세포질 내에 존재하는 $p27^{kip1}$ 단백질 역시 감소된다(도 19 및 20). 이는 최근에 보고된 $p27^{kip1}$ S10A 돌연변이 단백질이 발현되는 형질전환 생쥐에서 발암유전자 Ras에 의한 $p27^{kip1}$ 의 세포질로의 이동이 저해된다는 결과와 일치한다.

<58> 한편, 최근 보고에 의하면 세포질 내에 존재하는 $p27^{kip1}$ 단백질은, 직접결합하여 RhoA를 활성화할 수 있는 GTP 치환단백질 (GEF)의 결합을 억제함으로써, RhoA 신호전달 활성을 저해한다고 알려져 있다. 이러한 세포질 내의 $p27^{kip1}$ 축적에 의한 RhoA 신호전달 간의 관계를 규명하기 위해, Rho GTPase를 활성화 시켰을 때의 $p27^{kip1}$ 단백질의 세포 내 위치변화를 조사하였다. RhoA의 활성화시키거나, 그 하위전달 매개인자인 mDia를 활성화시키거나 RhoA의 활성인자인 LPA를 처리한 경우, 세포질내의 $p27^{kip1}$ 단백질 발현 수준도 다시 감소되는 결과를 나타냈다(도 27). 이는 RhoA 신호전달이 활성화되면, $p27^{kip1}$ 단백질이 더 이상 안정화되지 못하고 세포질이 아닌 핵 안에 위치하게 되기 때문이다. 즉, 세포질내의 $p27^{kip1}$ 과 Rho GTPase 사이에는 상호조절의 연결고리가 존재한다. 따라서, TM4SF5의 발현은 $p27^{kip1}$ 의 발현증가 및 세포질에서의 안정화에 기여하며, 이는 RhoA 단백질의 활성저해로 이어지게 된다.

<59> 그러나, TM4SF5에 의한 $p27^{kip1}$ 축적에 따른 RhoA활성 저해 현상과 TM4SF5에 의한 FAK/RhoGAPs 단백질간의 결합에 따른 RhoA활성 저해 현상은 별도로 일어나는 신호전달 경로이다. 왜냐면, Y577F FAK 돌연변이 단백질(타이로신 577번이 페닐알라닌으로 바뀐 변이체)을 과발현시키면, $p27^{kip1}$ 의 발현과 세린 10번 잔기의 인산화에는 아무런 영향을 주지 못하기 때문이다(도 18).

<60> 또한, $p27^{kip1}$ 의 세포질 내의 축적은, 상기 RhoA 활성과는 대조적으로 Rac1 단백질은 활성화 시킨다. 다시 말해, 활성화된 Rac1 및 그 하위전달 매개체인 PAK1의 발현은 $p27^{kip1}$ 단백질의 세포질내 축적을 야기한다(도 27 아래).

<61> TM4SF5에 의한 RhoA의 활성 저하에 따른 세포형태의 변화

<62> TM4SF5가 발현되지 않은 모세포인 간암세포(SNU449)의 액틴은 강한 섬유상의 구조로 넓게 퍼진 다각형의 세포형태를 유지하고 있고, TM4SF5가 발현된 세포(SNU449Tp)에서의 액틴은 비정상적인 다발들이 긴 로드(lod) 세포형태를 따라 형성되어 있다(도 2).

<63> 이러한 세포형태의 변화에 관여하는 신호전달을 매개하는 Rac1의 활성 및 RhoA의 활성에 대하여, TM4SF5가 발현되는 세포들에서 Rac1의 활성은 증가하는 반면 RhoA의 활성은 감소한다. 이는 TM4SF5에 대한 siRNA를 이용하여 TM4SF5의 발현을 저해함으로써 다시 반전된다. 즉, 상기 siRNA가 도입된 세포들은 모세포와 같은 강한 섬유상의 액틴 구조를 가지는 다각형의 세포형태로 회복되지만, 그렇지 않은 세포들은 여전히 TM4SF5 발현의 영향으로 비정상적인 다발들이 형성된 세포형태를이룬다(도 7).

<64> 또한, TM4SF5가 발현되는 세포들은 $p27^{kip1}$ 이 높게 발현되는 특징이 있기 때문에, $p27^{kip1}$ 단백질의 변화 역시 세포형태의 변화에 영향을 미친다. TM4SF5가 발현되지 않은 모세포에 $p27^{kip1}$ 을 과발현 시키면 세포의 형태가 길어지고(도 22), 반대로, TM4SF5가 발현되는 세포에서 $p27^{kip1}$ 의 발현저해 또는 세린 잔기의 인산화를 저해하는 돌연변이인 $p27^{kip1}$ S10A를 처리하면 세포의 모양도 다각형의 모세포와 같은 형태로 변화한다(도 23).

<65> 요컨대, 상기 세포질의 $p27^{kip1}$ 에 의한 세포형태의 변화와 Rho 신호전달 간의 관계와 관련하여, TM4SF5가 발현된 세포에서 Rho GTPase가 활성화(RhoA 활성화, mDia 활성화 또는 LPA 처리)되면, RhoA 신호전달의 활성화로 인해

p27^{kip1} 단백질이 더 이상 안정화되지 못하고 핵 안에 위치하게 되어 세포질에서의 p27^{kip1} 단백질 발현 수준이 감소하고, 긴 모양의 세포 형태가 모세포와 같은 다각형 형태로 돌아간다. 그러나, 이에 반하여 활성화된 Rac1 및 그 하위전달 매개체인 PAK1의 발현은 TM4SF5가 발현되지 않는 모세포의 형태를 길게 변화시키고 p27^{kip1} 단백질의 세포질내 축적을 야기한다(도 27).

<66> 그러므로, 결론적으로 세포질내의 p27^{kip1}과 Rho GTPase사이에는 상호조절의 연결고리가 존재하며, 세포질의 p27^{kip1}에 의한 Rho GTPase들의 활성화조절은 TM4SF5가 발현되는 세포형태의 변화를 유도한다는 것이다. 이러한 세포형태의 차이에 의하여 이하 설명하는 현상들과도 관련이 있다.

<67> **TM4SF5의 발현에 따른 EMT 현상 및 세포간 접촉**

<68> **(1) 세포간 접촉현상 감소 및 상피세포-중배엽 세포로의 전이과정 (EMT, epithelial-mesenchymal transition) 유도**

<69> 본 발명자는 TM4SF5 발현에 의한 세포질로의 p27^{kip1}의 축적은 세포-세포간 접촉 소실 및 EMT 현상을 유도함을 발견하였다.

<70> 세포간의 접촉에 있어서의 RhoA 단백질의 활성화변화는 세포의 종류와 그 신호전달의 특징에 따라 달라지는데, 앞서 설명한 TM4SF5에 의한 p27^{kip1} 단백질의 축적에 따른 RhoA의 활성화저해 현상은 세포 안의 액틴 구조의 변화를 가져오고, 이는 곧 cadherin/catenin 단백질 복합체들을 통한 세포-세포 접촉과도 연결된다.

<71> TM4SF5가 발현되지 않은 모세포에서는 E-cadherin, ZO1, 데스모플라킨(desmoplakin) 등의 세포접촉 단백질이 많이 발현하고 세포접촉부위에 잘 정렬되어 존재한다. 이에 반하여, TM4SF5가 발현되는 세포들에선 상기 세포접촉 단백질들의 발현은 감소되어 있을 뿐만 아니라, 세포간 접촉이 잘 이루어지지 않아 산발적인 발현 양상을 나타낸다(도 29). 하지만, E-cadherin의 발현 억제 전사인자인 snail1 또한 동시 발현감소됨으로써, snail1에 비의존적이며 TM4SF5에 의존적인 E-cadherin의 발현감소를 나타낸다(도 29).

<72> 이에 반하여, TM4SF5가 발현되는 세포들에는 상피세포-중배엽 세포로의 전이과정 (EMT, epithelial-mesenchymal transition)에 관여하는 SMA 단백질(도 28) 및 비멘틴(vimentin) 단백질이 높게 발현된다. 이러한 상피세포의 이동은 세포의 형태형성 및 상처치유 같은 생리적인 과정에 중요한 역할을 하며, 만성염증 및 종양전이 과정에 관여한다.

<73> TM4SF5에 의한 p27^{kip1} 단백질의 축적에 따른 RhoA의 활성화저해 현상은 액틴 필라멘트의 비정상적 재구성을 유도하기 때문에, 세포의 형태가 길어지게 되며, 이러한 세포형태 변화는 세포-세포간의 흡착이 와해되는 EMT 현상을 유도한다. 결국 TM4SF5에 의한 SMA 단백질의 발현과 EMT현상은 RhoA의 활성화저해를 통해 일어나며 세포형태의 길이 변화로 이어진다고 할 수 있다.

<74> 따라서, TM4SF5가 발현된 세포에서 p27^{kip1} 단백질의 발현을 저해하면, EMT 현상이 저지되면서 세포-세포 접촉이 유지된다. 이는 p27^{kip1}의 발현이 저해됨에 따라 p27^{kip1}이 세포질이 아닌 핵 안에 더 많이 축적됨으로써, 길게 신장되어 있던 세포의 형태가 모세포와 같은 다각형의 세포 형태로 변하기 때문이다. 이렇듯 p27^{kip1} 단백질의 세포 내에서의 위치, 즉 핵과 세포질에서의 위치 조절은 세포의 형태와 세포 간의 접촉 형성에 기여한다.

<75> 게다가, 내생성의 TM4SF5를 가지는 Huh7 간암세포주에 대하여 shRNA를 이용하여 그 발현을 저해하면, HGF에 의한 세포간의 접촉소실 현상이 저해되므로, 상기 TM4SF5는 어떤 신호전달 체계하에서 본질적으로 EMT를 유도하는 것으로 생각된다.

<76> **(2) 세포접촉 생장저지 현상의 소실**

<77> 본 발명자들은 TM4SF5가 발현되는 세포에서는 상기 EMT 현상으로 인하여 세포간에 고밀도로 서로 접촉되는 환경에서도 이웃세포의 존재를 인지 못하고 지속적으로 세포분열 및 증식을 유지하는, 즉 세포접촉에 의한 생장저지 현상이 소실됨을 확인하였다.

<78> 접촉생장저지현상은 세포가 근접한 다른 세포와 접촉하였을 때 더 이상 분열하지 않아 생장이 정지되는 현상을 의미한다. 이미 보고된 바에 의하면, E-cadherin에 의한 세포-세포 접촉은 세포의 증식과 종양생성을 억제한다고 알려져 있고, 최근 보고된 문헌에 의하면 접촉생장저지가 일어나는 동안 세포의 퍼짐 현상이 감소하고 곧 성

장이 정지된다는 것이다. 그러므로, EMT 현상 등에 의하여 세포들이 서로 접촉되어 있지 않다면 세포는 근접한 다른 세포를 인식하지 못할 것이고 지속적인 분열을 하게 되어 결국, 접촉 생장저지현상이 소실될 것이다.

<79> TM4SF5가 발현되지 않는 모세포는 다각형의 세포 형태를 띠기 때문에 증식하다가 시간이 지날수록 접촉 생장저지 현상에 의해 더 이상 자라지 않게 되는 포화곡선을 그리지만, TM4SF5가 발현되는 긴 형태의 세포들은 세포간 접촉 소실을 유도하기 때문에 핵이 겹쳐 존재할 정도로 세포가 밀집되어 있음에도 불구하고 지속적인 세포분열이 일어난다(도 33).

<80> 또한, TM4SF5가 발현되는 세포에서는 모세포에 비해 S-기에 존재하는 세포 군집이 더 많고(도 35), shRNA를 이용하여 TM4SF5의 발현을 저해하면 S기에 존재하는 이러한 세포군집이 줄어든다(도 36)

<81> 즉, TM4SF5의 발현에 따른 세포간 접촉현상 감소 및 EMT 현상은 접촉생장 저지현상을 소실시킨다. 도 57에서 이에 대한 모식도를 나타내고 있다. 도 57에 의하면, 발암유전자로 추정되는 TM4SF5의 과발현은 세포질 내의 p27^{kip1}의 발현 및 안정화를 야기하고, 이는 hKIS 또는 PKB/Akt에 의한 세린 10번 잔기의 인산화로 인한 것이며, TM4SF5에 의한 pY577FAK 과 FAK/RhoGAPs 결합으로 인해 RhoA의 활성이 저해된다. Rac1의 활성은 RhoA의 불활성화와 상반되는 관계로 존재하는데, RhoA 와 Rac1의 하위 신호전달 매개체인 mDia와 PAK은 actin의 구조변화와 세포내의 수축성을 조절하게 되어 세포 모양의 변화로 이어지게 되므로, 이러한 세포형태의 변화는 세포간 접촉 소실현상을 유도하여, 인접한 세포를 인식하지 못해 계속적으로 성장하게 되어 접촉 생장 저지 현상을 야기하게 되는 것이다.

<82> TM4SF5에 의한 세포이동, 침윤 및 암전이

<83> 앞서 언급한 바와 같이, TM4SF5의 발현과 관련이 있는 FAK가 과발현되거나, Rac1이 활성화되면 세포의 운동성이 증가하고, Rho 활성 및 EMT 현상에 따른 상피세포의 이동은 세포의 형태형성 및 상처치유 같은 생리적인 과정에 중요한 역할을 하며, 나아가 만성염증 및 종양전이 과정에 필수적이다.

<84> 따라서, TM4SF5가 발현되는 세포주의 경우가 발현되지 않는 세포주에 비해 이동성이 크다(도 58 및 59). 이러한 세포의 이동에 따라, 세포는 부착 부위로부터 분리되어 주위의 세포외기질 내로 침윤된다. TM4SF5가 발현되는 세포는 세포외기질을 이루는 콜라겐 겔(collagen gel)에 TM4SF5를 발현하지 않는 세포보다도 더 효과적으로 침윤할 뿐만 아니라(도 60), 다양한 세포의 기질 복합체인 매트릭겔(Matrigel)을 효과적으로 침윤한다(도 61).

<85> 상기 작용은 부분적으로 matrix metalloproteinase (MMPs)의 단백질 분해작용에 의해 이루어진다. MMPs는 Zn²⁺ 의존적인 펩타이드 분해 효소로서 세포의 기질을 분해하는 능력을 갖고 있다. 그 중 MMP-2 와 MMP-9는 젤라틴과 피브로넥틴 기질을 분해하는데, 이들은 TM4SF5가 발현되는 세포(SNU449Tp, T3, T7 및 T16 등) 내에서 그 활성이 높다(도 62). 특히, MMP-9는 효소활성뿐 아니라 유전자발현 활성까지 높다(도 62, 중간).

<86> 누드마우스 암전이 모델을 이용한 실시예 9에서 보여주는 바와 같이, TM4SF5를 발현하는 암세포에 있어서 상기 세포이동성 및 침윤성에서 비롯되는 암 전이성은 *in vivo*에서도 나타난다.

<87> 종합적으로 볼때, TM4SF5의 종양유도인자로서의 기능은 *in vitro* 세포와 *in vivo* 동물에서 모두 세포의 성장이 적절히 조절되지 않고 계속적으로 분열하게 하도록 하기 때문으로, 간암세포 등에서 TM4SF5의 발현은 FAK(focal adhesion kinase)의 인산화 증가 및 세포질내의 p27^{kip1} 단백질의 축적으로 인한 RhoA 단백질의 활성저해를 야기하여, 지속적인 세포성장, 현저한 세포주기 S기로의 진입, 세포형태의 변화 및 부착-비의존적인 성장을 일으키게 한다. 그리고 이 TM4SF5의 발현 세포주를 누드 마우스(*in vivo* 동물)에 주입하면 종양이 형성된다.

<88>

<89> 이에 본 발명자들은, 종양유도 인자로 작용하는 TM4SF5(Transmembrane 4 L6 family member 5) 발현과 관련된 상기의 다양한 세포생물학적 및 생화학적 현상에 기초하여 항암물질의 스크리닝 방법을 발명하였다.

<90> 본 발명에서 사용하는 "항암"이라는 용어는 암의 성장을 억제하거나 예방하는 것을 의미한다. "암의 성장을 억제하거나 예방한다"는 것은 치료하거나 처리하지 않았을 때와 비교시에 암의 성장 및 암전이를 감소시키는 것을 포함하는 개념이다. 상기 "암전이(metastasis)"는 종양(암) 세포가 신체의 멀리 떨어진 부분으로 확산되는 과정을 의미한다. 본 명세서에서 상기 용어는 전이 과정을 통하여 발생하는 암을 또한 포함한다.

<91> 본 발명의 방법에서는 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 발현하는 암세포를 배양한다. 상기 폴리펩타이드를 발현하는 대표적인 경우로 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

- <92> 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 발현하는 암세포는 TM4SF5 단백질을 발현하는 세포주로서, 일 구체예로서 상피세포에서 TM4SF5가 지속적으로 발현되는 SNU449 간암 세포주(KCLB No.00449)를 수립하고, 이를 배지에서 배양함으로써 실시할 수 있다. 상기 SNU449 세포 대신 SNU398세포(KCLB No.00398)를 사용해도 무방하다.
- <93> 본 발명에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드로부터 폴리펩타이드를 발현하는 암세포로서는, 예를 들면 췌장암세포, 위암세포, 간암세포, 대장암세포, 뇌암세포, 또는 폐암세포 또는 인위적으로 제조한 암세포 등을 들 수 있지만, TM4SF5 종양 단백질을 발현하는 세포라면 어느 것이든 사용가능하다. 상기의 「인위적으로 제조한 암세포」로서는, 예를 들면 유전자 조작을 포함하는 클론 기술에 의해 TM4SF5 종양 단백질을 발현하는 세포를 들 수 있다.
- <94> 본 발명의 방법은, 이어서 상기 공정에서 배양된 세포에 항암 후보물질로 처리하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, TM4SF5가 세포 내에서 특이적으로 유도하는 현상들을 조절할 것이라 예상되는 화합물들을 처리한다.
- <95> 마지막으로, 항암 후보물질로 처리하지 않은 경우와 비교하여, 상기 처리한 화합물이 이하에 설명하고 있는 항암기능들 중에서 하나 이상의 기능을 나타내는 물질을 항암물질로 결정한다.
- <96> 본 발명에서는 상기 물질의 항암 기능을 상술한 TM4SF5 발현과 관련된 다양한 세포생물학적 및 생화학적 현상을 기초로 하여 이하와 같이 정의한다.
- <97> (i) FAK의 577번의 타이로신 위치의 인산화가 감소
- <98> (ii) FAK-RhoGAP 혹은 FAK-GRAF와의 결합이 억제
- <99> (iii) 세포질 내 p27^{Kip1} 단백질 발현 감소
- <100> (iv) RhoA의 활성 증가
- <101> (v) Rac1의 활성 감소.
- <102> 상기의 방법에 있어서, TM4SF5 발현에 따른 세포의 형태 및 세포접촉 양상과 관련한 전술한 특징에 기초하여 이하에 추가로 설명하고 있는 항암기능들 중에서 하나 이상의 기능을 나타내는 물질을 항암물질로 결정한다.
- <103> (vi) 세포의 형태가 로드(lod)타입에서 다각형으로 돌아감
- <104> (vii) 세포접촉 관련 단백질들의 발현 감소
- <105> (viii) 세포-세포간 접촉이 유지됨
- <106> (ix) 세포접촉 성장저지 현상이 나타남
- <107> (x) SMA(α -smooth muscle actin) 단백질 또는 비멘틴(vimentin) 단백질의 발현 감소; 또는 E-cadherin 단백질의 발현 증가
- <108> (xi) 상피세포-중배엽세포로의 전이현상(EMT) 감소
- <109> 이 때, (vii)에서의 상기 세포접촉 관련 단백질은 E-카드헤린(E-cadherin), ZO1(zonula occludens-1), β -카테닌(β -catenin) 및 데스모플라킨(Desmoplakin)으로 구성된 군으로부터 선택되고, (ix)에서의 상기 세포접촉 성장저지 현상은 세포 수의 감소, 세포주기의 S기에 존재하는 세포군집의 감소 또는 다층 증식(multilayer growth)의 억제를 의미한다. 즉, 다층 증식이 억제되어 세포가 접촉이 이루어지면 단층(monolayer)으로만 자라고 더 이상 증식이 이루어지지 않는 것을 말한다. 또한, 상기 세포 수의 감소 또는 세포주기의 S기에 존재하는 세포군집의 감소는 상기 TM4SF5 및 그와 상호작용하는 막단백질의 N-연결된 글리코실레이션(N-linked glycosylation)의 불활성에 의해 이루어진다.
- <110> 뿐만 아니라, 상기의 방법들에 있어서, TM4SF5에 따른 세포의 이동성, 침윤성 증가와 관련한 전술한 특징에 기초하여 이하에 추가로 설명하고 있는 항암기능들 중에서 하나 이상의 기능을 나타내는 물질을 항암물질로 결정할 수도 있다.
- <111> (xii) 세포외기질 혹은 세럼 (serum)의 존재하에 세포의 이동 감소
- <112> (xiii) 세포외기질을 이루는 콜라겐 겔(collagen gel) 속에서의 침윤성 억제
- <113> (xiv) 세포외 기질 복합체인 매트릭셀(Matrigel) 속에서의 침윤성 억제

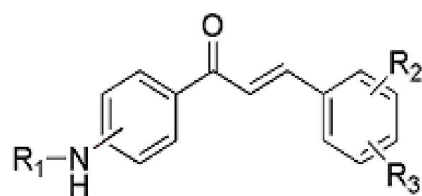
(xv) MMP(matrix metalloproteinase) 활성 감소(발현 감소).

이 때, 상기 MMP(matrix metalloproteinase)의 바람직한 예로, MMP-2 및 MMP-9를 들 수 있다.

다시 말해, 종양유도인자, 혹은 EMT유도인자 TM4SF5의 발현의 억제는 FAK의 인산화 또는 활성 변화 저해; 세포 질내의 p27^{Kip1} 발현 축적에 따른 RhoA 활성화 저해; Rac1 및 RhoA를 포함하는 Rho GTPase의 활성 변화에 따른 세포모양의 변화 저해; 상피-중배엽세포 전이[분화, EMT현상(Epithelial-Mesenchymal Transition) 또는 변환분화(Transdifferentiation)]의 유도 억제; S기(S-phase)로의 진행 억제; 접촉억제(contact inhibition)의 상실로 인하여, 결과적으로 다층증식(multilayer growth 혹은 proliferation)의 유도 억제; 흡착-비의존적 증식 또는 아가젤(soft agar)내에서의 증식 억제; 세포이동성 및 침윤성 저해; 누드마우스에서의 암유전자 발현 암 세포주입에 의한 종양형성 및 전이 억제 등의 제반 현상으로 확인할 수 있다.

본 발명은 다른 관점에서 상기 방법에 의하여 스크린된, TM4SF5에 대한 항암기능을 갖는 화합물들을 항암물질에 관한 것이다. 'TM4SF5에 대한 항암기능'이라 함은 전술한 바와 같다. 바람직하게는 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 칼콘계 화합물을 항암물질로 결정한다.

화학식 1



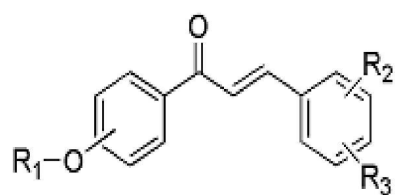
상기 식에서,

R₁은 R₄SO₂- 이고;

R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시기이고;

여기서, 상기 R₄는 C₁~C₅의 알킬 또는 수소, 할로젠, 니트로 및 C₁~C₅의 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환기를 갖는 C₆~C₁₀의 아릴이며, 바람직하게는 메틸, 벤질, p-톨루일, p-니트로페닐 또는 p-플루오로페닐이다.

화학식 2



상기 식에서,

R₁은 R₄SO₂- 이고;

R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시기이고;

여기서, 상기 R₄는 C₁~C₅의 알킬 또는 수소, 할로젠, 니트로 및 C₁~C₅의 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환기를 갖는 C₆~C₁₀의 아릴이며, 바람직하게는 메틸, 벤질, p-톨루일, p-니트로페닐 또는 p-플루오로페닐이다.

본 발명의 항암물질은, 더욱 바람직하게는 이하 표 1에 기재하고 있는 칼콘계 화합물들이다. 표1의 화합물들 중에서 화합물1로 기재한 TSAHC[4'-(p-toluenesulfonylamino)-4-hydroxy chalcone]가 대표적인 화합물이다.

표 1

<129>

화합물	구조	화합물	구조
1		15	
2		16	
3		17	
4		18	
5		19	
6		20	
7		21	
8		22	
9		23	
10		24	
11		25	
12		26	
13		27	
14		28	
29		43	
30		44	

31		45	
32		46	
33		47	
34		48	
35		49	
36		50	
37		51	
38		52	
39		53	
40		54	
41		55	
42		56	
57		71	
58		72	
59		73	
60		74	

61		75	
62		76	
63		77	
64		78	
65		79	
66		80	
67		81	
68		82	
69		83	
70		84	
85		92	
86		93	
87		94	
88		95	
89		96	
90		97	
91			

- <130> 상기 표1에 기재된 화합물 1 내지 97는 각각 이하와 같다.
- <131> 4' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <132> 4' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <133> 4' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <134> 3' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <135> 2' -(p-톨루엔설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <136> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <137> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <138> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <139> 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <140> 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <141> 3' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <142> 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <143> 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <144> 2' -(p-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <145> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <146> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <147> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <148> 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <149> 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <150> 3' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <151> 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <152> 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-3-하이드록시칼콘;
- <153> 2' -(m-하이드록시벤젠설폰닐아미노)-2-하이드록시칼콘;
- <154> 4' -(p-플루오로벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <155> 4' -(m-플루오로벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <156> 4' -(o-플루오로벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <157> 4' -(p-니트로벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <158> 4' -(m-니트로벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <159> 4' -(o-니트로벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <160> 4' -(p-아미노벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <161> 4' -(m-아미노벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <162> 4' -(o-아미노벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <163> 4' -(벤젠설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;
- <164> 4' -(메탄설폰닐아미노)-4-하이드록시칼콘;

- <165> 4' -(p-톨루엔설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <166> 4' -(p-플루오로벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <167> 4' -(m-플루오로벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <168> 4' -(p-니트로벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <169> 4' -(p-아미노벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <170> 4' -(벤젠설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <171> 4' -(메탄설포네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <172> 4' -(p-톨루엔설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <173> 4' -(p-톨루엔설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <174> 4' -(p-톨루엔설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <175> 4' -(p-톨루엔설포닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <176> 3' -(p-톨루엔설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <177> 2' -(p-톨루엔설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <178> 4' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <179> 4' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <180> 4' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <181> 4' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <182> 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <183> 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <184> 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <185> 3' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <186> 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <187> 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <188> 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <189> 2' -(p-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <190> 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <191> 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <192> 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <193> 4' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <194> 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <195> 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <196> 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <197> 3' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <198> 2' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <199> 2' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <200> 2' -(m-하이드록시벤젠설포닐아미노)-2,4-디하이드록시칼콘;

- <201> 2' -(m-하이드록시벤젠설폰아미노)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <202> 4' -(p-플루오로벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <203> 4' -(m-플루오로벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <204> 4' -(o-플루오로벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <205> 4' -(p-니트로벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <206> 4' -(m-니트로벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <207> 4' -(o-니트로벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <208> 4' -(p-아미노벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <209> 4' -(m-아미노벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <210> 4' -(o-아미노벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <211> 4' -(벤젠설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <212> 4' -(메탄설폰아미노)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <213> 4' -(p-톨루엔벤젠설폰아미노)-2-클로로-4-하이드록시칼콘;
- <214> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <215> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-3-하이드록시칼콘;
- <216> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-2-하이드록시칼콘;
- <217> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-4-하이드록시칼콘;
- <218> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-3-하이드록시칼콘;
- <219> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-2-하이드록시칼콘;
- <220> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <221> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <222> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-2,4-디하이드록시칼콘;
- <223> 4' -(p-하이드록시벤젠설폰네이트)-2,5-디하이드록시칼콘;
- <224> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-3,4-디하이드록시칼콘;
- <225> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-2,3-디하이드록시칼콘;
- <226> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-2,4-디하이드록시칼콘; 및
- <227> 4' -(m-하이드록시벤젠설폰네이트)-2,5-디하이드록시칼콘.
- <228> 한국공개특허 10-2003-0036993호에는 칼콘계 화합물이 기저막 성분을 분해하는 매트릭스 메탈로프로테아제(Matrix metalloproteinase, MMP)의 활성을 저해하는 성질을 갖고 있음을 기재하고 있으나, 칼콘계 화합물의 항암기능에 대해서는 전혀 언급하고 있지 않을 뿐만 아니라 본 발명의 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 칼콘계 화합물은 그 구조상 설폰기(SO₃⁻) 또는 설폰아미드기(SO₂NH-)를 함유하고 있는 것을 특징으로 하고 있다. 즉, 칼콘계 화합물의 TM4SF5에 대한 항암활성(기능)은 상기 설폰기(SO₃⁻)로부터 비롯되는 것이다.
- <229> 특히, 본 명세서 실시예 12에 있어서, 칼콘(chalcone)의 A-ring(왼쪽 링)에 OH, NH₂, 또는 OCH₃를 치환기로서 가지고 있는 경우에는, TM4SF5의 기능을 통한 다층구조(multilayer)로 자라는 현상을 저해하는 함암성이 관찰되지 않으나, 본 발명의 칼콘계 화합물에서와 같이 sulfonyl기가 도입된 설폰아미드 칼콘(sulfonamide chalcone) 또는 설폰네이트 칼콘(sulfonate chalcone)에서는 TM4SF5 기능 저해를 통한 항암활성이 관찰됨을 보여주고 있다. 즉, 칼콘 화합물에 있어서, "설폰기(sulfonyl)"의 도입은 현재 알려진 칼콘 유도체와는 전혀 다른 독특한 항암활성을 나타나게 한다.

- <230> 본 발명의 실시예에서는 이 중 대표적인 화합물인 TSAHC[4'-(p-toluenesulfonylamino)-4-hydroxy chalcone] (표1의 1번 화합물)를 사용하여 항암 기능을 확인하였다.
- <231> 상기 칼콘계 화합물들은 TM4SF5에 의한 현상들을 특이적으로 저해하는 길항제로 기능한다.
- <232> TM4SF5가 발현되는 세포주에, 상기 TSAHC를 포함하는 칼콘계 화합물들 중에 하나 이상을 처리하면, 지속적인 성장곡선이 칼콘계 화합물의 농도, 처리 시간에 따라 의존적으로 감소하고(도 43, 오른쪽), 세포주기 S기로의 진입(도 44), 및 세포간의 접촉이 되살아난다(도 45). 반면, 본 발명의 칼콘계 화합물 약물의 효과는 TM4SF5가 발현되지 않는 세포에서는 전혀 효과가 없는 것으로 나타났다(도 43, 왼쪽).
- <233> 게다가, TM4SF5에 의한 $p27^{kip1}$, $pS^{10}p27^{kip1}$, $pY^{577}FAK$ 의 발현 정도 및 SMA 또는 비멘틴의 발현에 있어서도, 상기 칼콘계 화합물에 의해 효과적으로 감소하고(도 46), TM4SF5가 발현된 SNU449세포주인 SNU449Tp 세포주에 본 발명의 칼콘계 화합물을 처리하면 세포질에 존재하는 $p27^{kip1}$ 이 더 이상 안정화되지 못하고 감소한다(도 47).
- <234> 본 발명의 칼콘계 화합물, 특히 TSAHC는 종양유도인자 TM4SF5 및 그와 상호작용하는 막단백질의 N-연결된 글리코실레이션(N-linked glycosylation) 활성화에 영향을 주어, TM4SF5가 세포막에서 (혹은 tetraspanin-web) 인테그린 등을 포함한 다른 단백질들과의 결합을 통하여 발암 기능을 수행하는데 있어 방해 혹은 억제 효과를 초래한다.
- <235> 이러한 측면은, TSAHC를 처리시에 TM4SF5의 N-linked glycosylation 된 부분의 FNGase F에 대한 감수성의 향상으로 확인할 수 있다(도 50). 그러므로, 본 발명의 TSAHC 등의 칼콘계 화합물은 TM4SF5 자체를 공격하여 N-linked glycosylation 작용의 구조적 면에 변화를 주어 TM4SF5의 단백질-단백질 결합(tetraspanin-web 내에서의 결합)에 영향을 줌으로써, TM4SF5에 의한 발암 기능을 억제한다고 유추할 수 있다.
- <236> 이 외에도, 본 발명의 칼콘계 화합물은 TM4SF5가 발현되는 세포에서의 RhoA의 활성화저해 현상을 복구시키고(도 48), 길게 변화되었던 세포의 형태에서 다각형 형태로 돌아가게 한다(도 49). 이는 TM4SF5가 발현에 따른 제현상을 억제하고 있음을 보여주는 결과로서, TM4SF5에 대해 길항제로 작용하는 본 발명의 칼콘계 화합물에 대하여 TM4SF5에 의한 종양형성의 치료 약물로서의 효능을 예측할 수 있게 한다.
- <237> 또한, TM4SF5에 의한 세포의 이동, 침윤현상 역시 본 발명의 칼콘계 화합물, 예를 들어 TSAHC에 의해 효율적으로 저해된다. 즉, TM4SF5가 발현되는 세포주는 TSAHC를 처리함에 따라 세포의 이동성(도 65), 콜라겐 젤에서의 침윤성(도 66) 및 매트릭셀(Matrigel)에서의 침윤성(도 67) 모두 효과적으로 저해된다. 이는 본 발명의 칼콘계 화합물이 세포의 이동성에 관여하는 MMPs의 효소활성을 저해함을 의미하고(도 68), 이는 TSAHC가 TM4SF5에 의한 종양유도 뿐 아니라 종양세포의 전이과정 역시 효과적으로 저해할 수 있음을 시사하고 있다.
- <238> 본 발명은 또다른 관점에서, 상기 칼콘계 화합물들 중에서, 바람직하게는 상기 표1에 기재하고 있는 화합물들 중 하나 혹은 그 이상을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물을 포함한다. 본 명세서의 실시예 8에서는 표 1에 있는 화합물 중에 1개(TSAHC)만 처리하여도 항암 기능을 나타내는 것을 확인하였다.
- <239> 본 발명에 따른 상기 칼콘계 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태인 칼콘 유도체의 형태로 사용할 수 있다.
- <240> 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 즉, 상기 칼콘 유도체는 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 산부가염으로 형성될 수 있다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산, 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레인산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 칼륨투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산등을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.
- <241> 또한, 본 발명에 따른 상기 칼콘 유도체는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물을 모두 포함할 수 있다.
- <242> 임상적 사용을 위해, 본 발명에 따른 상기 칼콘계 화합물 또는 그들의 염 형태 등은 단독으로 투여될 수 있으나, 부형제, 결합제, 활택제, 분해제, 코팅 물질, 유화제, 현탁제, 용매, 안정화제, 흡수 촉진제 및/또는 연고 기제를 혼합함으로써 특정 사용 및 바람직한 목적에 적당하도록 제형화된 약제학적 혼합물의 형태로 일반적으로 투여될 수 있다. 상기 혼합물은 경구용, 주사용, 직장용 또는 외용 투여용으로 사용될 수 있다.

- <243> 더욱 상세하게는, 앞서 언급한 바와 같이, 상기 칼콘계 화합물 또는 그들의 염을 함유하는 상기 약제학적 항암용 조성물은 경구적으로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 정제, 코팅 정제, 드라지(dragees), 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐제, 액제, 유화제 또는 현탁제 같은 제형일 수 있다. 투여는 또한 직장으로 투여, 예를 들어, 좌제를 사용하여 투여될 수 있으며; 국소적 또는 경피적으로 투여, 예를 들어, 연고, 크림, 겔 또는 액제로 사용하여 투여될 수 있으며; 또는 비경구적으로 투여, 예를 들어, 주사용 용액을 사용하여 투여될 수 있다.
- <244> 정제, 코팅 정제, 드라지(dragees), 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐제의 제조를 위해, 본 발명의 칼콘계 화합물은 약제학적으로 불활성인 무기 또는 유기 부형제(약제학적으로 허용되는 담체)와 함께 혼합될 수 있다. 정제, 코팅 정제, 드라지(dragees), 경질 젤라틴 캡슐제에 적당한 부형제의 예에는 락토오스, 메이즈(maize) 전분 또는 그들의 유도체, 탈크 또는 스테아르산 또는 그들의 염들이 포함된다. 연질 젤라틴 캡슐제에 사용되는 적당한 부형제에는 예를 들어 식물성 오일, 왁스, 지방, 반-고형(semi-solid) 또는 액체 폴리올 등이 포함된다. 그러나 활성 성분의 성질에 따라 연질 젤라틴 캡슐제에 어떠한 부형제도 필요하지 않는 경우가 있을 수 있다. 액제 및 시럽제의 제조를 위해, 사용될 수 있는 부형제에는 예를 들어, 물, 폴리올, 사카로오스, 전화당(invert sugar) 및 글루코오스가 포함된다. 주사용 용액의 제조를 위해, 사용될 수 있는 부형제는 예를 들어, 물, 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일이 포함된다. 좌제 및 국소 또는 경피 적용용의 제조를 위해, 사용될 수 있는 부형제에는 예를 들어, 천연 오일 또는 경화유, 왁스, 지방 및 반-고형 또는 액체 폴리올이 포함된다.
- <245> 상기 약제학적 조성물은 또한 보존제, 용해제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 감미제, 색소, 방향제, 삼투압 조절용 염, 완충제, 코팅제 또는 항산화제를 포함할 수 있고, 그들은 또한 다른 치료학적으로 가치있는 약제를 포함할 수도 있다.
- <246> 결과적으로, 경구 투여용 약제학적 제형은 과립제, 정제, 당 코팅 정제, 캡슐제, 환제(pill), 현탁제 또는 유화제일 수 있으며, 비경구용 제형으로 예를 들어, 정맥내, 근육내 또는 피하 제형용으로는 멸균 수용액의 제형이 사용될 수 있으며 이는 등장성용액을 만들기 위하여 다른 물질 예를 들어, 염들 또는 글루코오스를 포함할 수 있다. 항 종양제는 또한 좌제 또는 페서리(pessary)의 제형으로 투여될 수 있으며, 또는 로션, 용액, 크림, 연고 또는 더스팅 파우더(dusting powder)의 형태로 외용적으로 적용될 수 있다.
- <247> 본 발명의 칼콘계 화합물 1일 용량 수준은 경구 또는 비경구용으로 투여될 때 5 내지 2000 mg이다. 1 회 투여 또는 적 절한 2 회 이상의 분할투여가 가능하다. 그러나, 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

실시예

- <248> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <249> 특히, 하기 실시예에서는 간암 세포주만을 사용하고 있으나, 이 밖에도 췌장암세포, 위암세포, 간암세포, 대장암세포, 뇌암세포, 유방암세포, 전립선암세포, 자궁암세포, 식도암, 방광암, 또는 폐암세포 등의 인간 유래의 다양한 종류의 암조직 및 암세포주를 사용할 수 있는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <250> **실시예 1 : TM4SF5에 의한 암세포 배양**
- <251> (1) 세포주 수립
- <252> TM4SF5 (GenBank No.: NM-003963)가 지속적이고 안정적으로 발현되는 세포주를 수립하기 위해, 사람의 간암세포인 SNU449 세포(KCLB No.00449)에 대조군 벡터인 pLNCX(Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA)와 TM4SF5가 들어가 있는 pLNCX를 가진 레트로바이러스를 감염시켰다.
- <253> TM4SF5 발현 레트로바이러스를 만들기 위해, 플라스미드 pLNCX에 Huh7(JCRB No.0403) 세포의 cDNA 풀(pool)로부터 PCR방법을 통하여 얻은 *Hind* III/*Cla* I 제한효소 제작체(construct)로 cDNA를 삽입한 후, PT67 세포(ATCC CRL-12284)에 트랜스펙션하여 안정적으로 TM4SF5를 발현하는 세포를 얻어 배양함으로써 TM4SF5를 발현하는 레트로바이러스를 제작하였다 (Experimental Cell Research, 2006, 312:2983-2999). 이하, 상기 대조군 벡터를 삽입한 SNU449 세포는 SNU449Cp(또는 Cp)로 표기하고, TM4SF5가 발현시킨 되는 SNU449 세포는 SNU449Tp

(또는 Tp)로 표기한다.

<254> TM4SF5 발현 레트로바이러스를 SNU449 세포에 감염 시킨 후 형성된 세포군집들을 모두 모은 세포주 (SNU449Cp 및 SNU449Tp)와 단일 세포군집을 분리하여 수립한 세포주 (TM4SF5가 발현되는 T3, T7, T11 및 T16 세포)를 수립하였다.

<255> 그리고, TM4SF5의 발현이 억제되는 Huh7 세포주를 만들기 위해, TM4SF5에 대한 shRNA를 트랜스펙션한 후, G418 (500 μ g/ml)을 이용하여 shTM4SF5가 발현되는 세포만을 선택적으로 분리하였다. 이 세포주들에 대하여 10% FBS, 0.25 μ g/ml 젠타마이신(gentamycin)을 첨가한 다음, 200 μ g/ml의 G418이 첨가되거나 그렇지 않은 RPMI-1640 배지에서 5% CO₂ 및 37°C 의 배양기로 배양하여 사용하였다.

<256> (2) 재료 및 방법

<257> ① TM4SF5 항체 제작

<258> pGEX-5X2 벡터(Pharmacia Biotech.)에 TM4SF5의 c-말단 부위 (아미노산 229에서 594번 까지 제한 효소 *EcoRI*을 이용하여 절단)를 삽입 제작하여 그 염기서열을 확인하였다. DH5 α 박테리아로부터 IPTG로 유도된 재조합 단백질을 얻기 위해 0.3% SDS와 단백질분해효소 저해제가 들어있는 PBS를 이용하였다. 단백질 추출 후, 전기 영동된 SDS 겔로부터 항원을 추출하여 생쥐에게 면역하였다. 총 세 차례의 면역반응을 유도한 후 생쥐로부터 혈청을 얻어 재조합 단백질과 동물세포 추출물에 대한 면역 반응성을 검사하였다.

<259>

<260> ② 단백질 분리 및 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

<261> 다양한 실험 조건에서 얻어진 세포 용해물을 여러 조건에 처한 세포를 PBS 용액으로 씻어낸 후, RIPA 완충요액을 이용하여 준비하였다. 특정 경우, 명시된 발현 벡터를 트랜스펙션하거나, TM4SF5에 대한 shRNA를 발현시키거나 또는 p27^{kip1}에 대한 siRNA를 발현하는 아데노바이러스를 감염시키는 조건의 세포들이 이용되었다.

<262> 이외에도, 10 μ M의 cycloheximide를 명시한 시간 동안 처리한 세포도 이용되었다. 이러한 용해물의 단백질은 정량화하여 동일한 양이 사용되었으며, phospho-Y⁵⁷⁷FAK, phospho-Y⁴¹⁶Src, c-Src, RhoA, p120^{ctn}, β -catenin, pS¹⁰p27^{kip1}, FAK, E-cadherin, ZO1, Rac1, p190RhoGAP, p27^{kip1}, GRAF, hKIS, Desmoplakin, α -tubulin, α -catenin, 그리고 α -smooth muscle actin (SMA)에 대한 항체들을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

<263> ③ 면역형광염색법 분석

<264> 세포내의 단백질을 형광면역염색 하기 위해, 세포들을 10% FBS/RPMI-1640 으로 미리 코팅해둔 커버글라스 위에 올리고, 세포의 모양이 갖춰지고 완전히 부착될 때 까지 37°C 에서 하루 동안 배양하였다. 세포에 언급된 특정 유전자를 도입시키거나 다양한 바이러스를 감염시키는 경우에는 위에 명시된 시간 동안 배양한 후 사용하거나, 10 mM 리소포스파티드 산(lysophosphatidic acid, LPA)를 처리한 세포는 커버글라스에 부착시킨 후 1시간 동안 처리한 후 사용하였다. 형광면역염색법은 해당 단백질의 1차 항체를 반응시킨 후, 잉여의 항체를 씻어낸 후, 형광물질이 부착된 2차 항체과 반응시키고 다시 씻어내어 형광분석 가능 슬라이드를 만들었고, 액틴의 염색법은 로다민이 부착된 팔로이딘을 반응시켜 수행되었다.

<265> 사용된 항체는 E-카드헤린(E-cadherin), β -카테닌(catenin), FLAG, DAPI(4'-6-Diamidino-2-phenylindole), BrdU(5-bromo-2'-deoxy-uridine), p27^{kip1}, 그리고 ZO1(zonula occludens-1) 등이 사용되었다. 형광면역염색이 이루어진 커버글라스는 관찰을 위해 슬라이드에 올려 형광 현미경 또는 공초점 레이저 현미경으로 관찰하였다.

<266> ④ RT-PCR

<267> P27^{kip1}의 mRNA 수준을 조사하기 위해 RT-PCR을 TM4SF5 비발현 혹은 발현 세포주에 actinomycin D를 처리하고서 다양한 시간에 세포로부터 총 RNA를 추출하여 그로부터 mRNA를 얻은 후, p27^{kip1}에 대한 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 수행하였다. 사용된 프라이머는 센스 (5'-taa ccc ggg act tgg aga ag-3': 서열번호 3)와 안티센스 (5'-gct tct tgg gcg tct gct c-3': 서열번호 4)가 사용되었다.

<268> ⑤ p27^{kip1}의 세포질 단백질 총과 핵 단백질 총의 분획화

TM4SF5가 발현되는 SNU449Tp 세포와 T16 세포에서의 P27^{kip1}의 세포질 발현과 핵 내 발현량을 조사하기 위해 Liang (2002, Nature Medicine, 8;1153-1160)등이 제시한 방법에 의해 분획화가 이루어졌다.

⑥ 소프트 아가 어세이(Soft agar assay)

60 mm 배양접시에 0.7% agar 와 10% FBS가 포함된 배양액을 미리 깔아두어 굳힌 뒤, 그 위에 10⁶개의 세포를 0.3% agar와 10% FBS가 포함된 세포배양액과 함께 투입하였다. 이러한 배양접시들은 5% CO₂가 제공되는 37℃ 배양기에서 25 일간 배양되었으며, 이틀에 한번 200 µg/ml G418과 10% FBS가 포함된 배양액으로 교체하여 주었다. 형성된 세포군집들은 디지털 카메라가 장착된 현미경으로 관찰, 기록하였다.

⑦ 통계 분석

데이터의 의미 있는 차이를 얻기 위해 평균값들의 비교를 스튜던트 t-test로 수행하였다. p 값이 0.05 이하인 경우 그 차이는 의미가 있다고 할 수 있다.

실시예 2 : TM4SF5에 의한 pY⁵⁷⁷ FAK단백질 발현 및 RhoA의 활성화

(1) TM4SF5가 발현되는 세포의 형태학적 특성

상기 실시예 1에서 수립한, TM4SF5가 발현되지 않은 SNU449 모세포(SNU449p 또는 p), 대조군 백터가 지속적으로 발현되는 SNU449Cp 세포 및 TM4SF5를 발현하는 세포주들(SNU449Tp, T3, T7, 및 T16)에 대한 각 세포들의 형태를 광학현미경을 이용하여 확인하고, 나아가 TM4SF5에 대한 항체 및 α-tubulin에 대한 항체를 이용하여 Western blot 을 수행하였다.

그리고, TM4SF5의 발현여부에 따른 세포의 다양한 actin 구조를 알아보기 위하여, 대조군 세포(SNU449Cp) 및 TM4SF5가 발현되는 세포(SNU449Tp)를 유리 커버슬립 위에 키운 뒤, phalloidin이 부착된 rhodamine으로 염색하였다.

그 결과, 클론들에서 유래된 T3, T7, T16 및 Tp는 TM4SF5가 발현되지 않은 모세포인 SNU449p 세포와 비교하였을 때, 세포형태 측면에서 그 길이의 신장이 일어난 것을 확인되었다(도 1). 그리고, SNU449 세포의 actin을 형광 염색법으로 염색하여 관찰한 결과 강한 섬유상의 구조로 넓게 퍼진 다각형의 세포형태를 유지하고 있었으며, TM4SF5가 발현되는 SNU449Tp 세포에서 액틴은 비정상적인 다발들이 긴 세포형태를 따라 형성되어 있었다 (도 2).

(2) pY⁵⁷⁷ FAK 발현에 따른 효과

상술한 세포형태의 변화에 관여하는 신호전달을 조사하기 위해, 실시예 1에서 수립한 TM4SF5를 발현하는 세포주들(SNU449Tp, T3, T7, 및 T16)에 있어서, FAK 단백질의 577번 아미노산인 타이로신이 인산화된 pY⁵⁷⁷ FAK 단백질 발현정도, c-Src 단백질의 416번 아미노산인 타이로신이 인산화된 pY⁴¹⁶ cSrc 단백질 발현정도, Rac1 활성화 및 RhoA 활성을 조사하였다. 상기 전체 세포 용해물을 모아, 도 3 및 5에 표기된 단백질에 대한 항체들을 이용하여 Western blot 분석을 하거나 시험관 내에서 RhoA와 Rac1을 pulling-down하여 그 활성을 분석하였다.

또한, TM4SF5에 대한 shRNA(shTM4SF5)를 이용하여 TM4SF5의 발현을 저해하는 경우의 변화를 관찰하였다. 모세포인 SNU449p, 대조군세포인 SNU449Cp 및 TM4SF5가 발현되는 각종 세포에 있어서, 초록형광단백질(GFP)에 대한 shRNA, 무작위적인 염기서열을 가지는 shRNA 및 TM4SF5에 대한 shRNA를 transfection 한 후 세포들을 수거하여 Western blot 분석과 RhoA 활성분석을 수행하였다.

그 결과, TM4SF5가 발현되는 상기 세포들에서는 pY⁵⁷⁷ FAK 단백질과 pY⁴¹⁶ cSrc 단백질 발현 및 Rac1 활성화는 증가되어 있었으나, RhoA 활성화는 감소되어 있음을 확인하였다(도 3 및 5). 그리고, TM4SF5에 의한 상기 pY⁵⁷⁷ FAK의 증가와 RhoA 활성화저해 현상은 TM4SF5의 발현을 저해함으로써 다시 반전되는 것으로 나타났다 (도 4 및 6).

그리고, SNU449Tp 세포에 pEGFP 와 shTM4SF5를 함께 transfection하여 24시간 후 커버슬립위에 올리고, 24시간의 배양시간이 지난 후, phalloidin이 부착된 rhodamine과 DNA 염색을 위한 DAPI를 함께 형광 염색한 결과, 상기 shTM4SF5가 도입된 세포들은 대조구에 속하는 SNU449 세포와 같은 강한 섬유상의 액틴 구조를 가지는 다각형의 세포형태로 회복되지만, 그렇지 않은 이웃한 세포들은 여전히 TM4SF5 발현의 영향으로 세포형태의 변화가 나

타나지 않음을 확인하였다 (도 7).

<284> (3) RhoA 활성화제

<285> 더불어 RhoGAP 단백질들을 통한 RhoA의 불활성화 과정에서 pY^{577} FAK의 역할을 조사하였다. Cp 세포와 Tp 세포로부터 얻어진 세포용해물에 대하여 FAK에 대한 항체를 이용하여 면역침강법을 수행하고, 면역침강된 혼합물은 p190RhoGAP, GRAF, FAK 항체를 이용하여 Western blot 분석을 하였다. 또한, 상기 SNU449Tp 세포에 (HA)3-tagged FAK 야생형 단백질과 Y577F 돌연변이 단백질을 일시적으로 과다발현 시켜, 2일 후 세포 용해물을 면역침강법을 수행하여 도 10에서 표기하고 있는 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다.

<286> 그 결과, FAK-p190RhoGAP 혹은 FAK-GRAF과의 결합이 TM4SF5가 발현되는 세포에서 그렇지 않은 SNU449Cp 세포에 비해 강하게 결합하는 것으로 나타났다 (도 9). 그리고 이러한 TM4SF5에 의한 FAK-p190RhoGAP 혹은 FAK-GRAF 간의 결합은 FAK 단백질의 577번 아미노산 타이로신을 페닐알라닌으로 바꾼 돌연변이 단백질을 발현시킴으로써 감소되는 결과를 보여(도 10), TM4SF5가 발현되는 세포에서 RhoA로 이어지는 일련의 신호전달 과정에서 pY^{577} FAK이 중요한 역할을 짐작할 수 있었다.

<287> 또, FAK과 관련된 GTPase 조절인자인 GRAF에 대하여, 대조군 세포에 FLAG-tagged GRAF를 일시적으로 과다발현하여 24시간 후 앞서 언급한 방법대로 커버슬립 위에 올리고, 하루 동안 배양한 후 actin과 FLAG 항체를 이용하여 형광면역염색법을 수행한 결과, TM4SF5가 발현되지 않는 대조군 세포에서의 GRAF 또는 p190RhoGAP의 일시적 발현은 세포형태의 변화를 유발함을 확인하였다 (도 11).

<288> 따라서, 결론적으로 SNU449 세포에서 발현되는 TM4SF5는 RhoA의 활성을 저해시하여 세포길이의 신장을 유도하며, 이는 FAK-p190RhoGAP 혹은 FAK-GRAF 단백질을 간의 상호작용에 의한 것임을 알 수 있었다.

<289> 실시예 3 : TM4SF5에 의한 세포질 내의 $p27^{kip1}$ 의 축적 효과

<290> (1) TM4SF5의 발현에 따른 $p27^{kip1}$ 의 발현증가

<291> TM4SF5에 의한 RhoA 활성화제 현상이 $p27^{kip1}$ 에 의한 효과인지 알아보기 위해, SNU449Cp와 SNU449Tp 세포를 $p27^{kip1}$ 에 대한 항체와 DAPI를 이용하여 형광면역염색하였다. 그리고, 상기 세포들의 핵과 세포질을 실시예 1의 5)에서 말한 방법대로 분획화하여 $p27^{kip1}$ 에 대한 항체와 α -tubulin에 대한 항체를 이용하여 Western blot 분석을 하였다

<292> 그 결과, TM4SF5가 발현되는 세포에서 $p27^{kip1}$ 단백질이 현저하게 높은 농도로 세포질에 위치함을 알 수 있었다 (도 12). 반면, TM4SF5가 발현되지 않는 대조군 세포에서는 적지만 대부분이 핵에 위치하고 있었다(도 13).

<293> TM4SF5에 의한 $p27^{kip1}$ 발현수준과 Ser10 인산화의 관계를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수립한 다양한 세포주 용해물을 얻어 도 14에 표기된 항체들을 이용하여 Western blot 분석을 수행한 결과, 이러한 $p27^{kip1}$ 단백질의 세포질에서의 존재는 hKIS (human Kinase-Interacting with Stathmin) 단백질과 활성화된 PKB/Akt 단백질에 의해서 아미노산 10번 세린의 인산화를 통해 이루어짐을 확인하였다 (도 14).

<294> 또, actinomycin D (10 mg/ml, Act D)가 처리된 세포로부터 RNA를 분리하여, $p27^{kip1}$ 및 GAPDH를 RT-PCR 분석하였고, cycloheximide (10 mM, CHX)를 처리한 세포의 용해물을 얻어 $p27^{kip1}$ 에 대한 항체를 이용하여 Western blot 분석을 한 후, 그 결과 밴드의 강도를 측정하여 대조군이 되는 밴드의 강도에 대한 증감을 그래프로 나타내었다(도 16).

<295> 그 결과, TM4SF5가 발현되는 세포에서 $p27^{kip1}$ 단백질 발현이 현저하게 증가되는 것은 $p27^{kip1}$ mRNA와 단백질의 높은 안정화 때문인 것으로 확인되었고(도 15), 이러한 현상은 TM4SF5에 대한 siRNA를 이용하여 그 발현을 저해하였을 때, 세포형태의 변화가 TM4SF5가 발현되지 않는 SNU449 세포의 모양으로 되돌아가고, 세포질에서 $p27^{kip1}$ 단백질 발현 수준도 감소됨과 동시에 세린잔기의 인산화 역시 일어나지 않는 결과로부터 더욱 명백해 졌다 (도 17).

<296> 또한, TM4SF5가 세포질의 $p27^{kip1}$ 단백질의 안정화에 관여한다는 가설은 TM4SF5가 내생적으로 발현되는 다양한

간암세포들에서도 유효한 것으로 나타났다.

- <297> 내생적으로 TM4SF5를 발현하고 있는 간암세포주에 대하여, GFP의 shRNA, 무작위적인 염기서열(Scr)을 가진 shRNA 및 TM4SF5에 대한 shRNA를 도입하여, 48 시간 후에 얻은 전체세포 용해물 및 SNU449Cp와 SNU449Tp 세포의 용해물에 도 18에 표기된 항체를 이용하여 Western blot 분석을 한 결과, 내생적으로 발현되는 TM4SF5의 발현의 저해는 p27^{kip1} 발현 및 Ser10의 인산화 수준을 감소시켰고(도 18), SNU449Tp 세포에 (HA)-tagged FAK 야생형 단백질과 Y577F 돌연변이를 과발현시킨 후, 표시된 항체로 Western blot 분석을 한 결과, Y577F FAK 돌연변이 단백질은 p27^{kip1}의 발현수준이나 Ser10의 인산화에는 영향을 미치지 못하였다(도 19). 또한, Huh7 간암세포주에 Scr 또는 shTM4SF5와 함께 pEGFP를 transfection하여 p27^{kip1}과 DAPI를 면역형광염색법으로 염색한 결과, 내생적으로 발현되는 TM4SF5의 저해는 세포질에 존재하는 p27^{kip1}을 감소시킴을 확인하였다(도 21).
- <298>
- <299> 이러한 결과들은 TM4SF5의 발현이 p27^{kip1}의 발현증가 및 세포질에서의 안정화에 기여하며, 이는 곧 RhoA 단백질의 활성화로 이어짐을 증명하고 있다. 특히, 도 19의 결과는 p27^{kip1}의 발현과 FAK 단백질의 인산화는 서로 연관이 없음을 시사하며, 이는 TM4SF5에 의한 p27^{kip1} 단백질 및 RhoA활성 저해 현상과 TM4SF5에 의한 FAK/RhoGAPs 결합에 의한 RhoA활성 저해 현상은 별개의 신호전달 기작에서 기여된 것임을 알 수 있다.
- <300> **(2) 세포질의 p27^{kip1} 축적에 따른 세포형태 변화**
- <301> 실시예 2에서 확인한 바와 같이 TM4SF5가 발현되는 세포들은 세포형태가 길고, 상기 실시예 3-(1)에서 확인한 바와 같이 TM4SF5가 발현되는 세포들은 p27^{kip1}이 높게 발현되는 특징이 있기 때문에, 이러한 p27^{kip1} 단백질의 변화가 세포형태의 변화에 어떠한 영향을 주는지를 조사하였다.
- <302> 실시예 1에서 수립한 SNU449Cp 세포에 FLAG-tagged p27^{kip1} 야생형 단백질을 과발현시키고 48시간 후, 상기 세포를 DAPI, phalloidin이 부착된 rhodamine, 및 FLAG에 대해 면역형광염색을 수행하여 공초점현미경으로 관찰한 결과, TM4SF5가 발현되지 않는 모세포에 p27^{kip1}을 과발현 시켰을 때 세포의 형태가 길어짐을 확인하였다 (도 22).
- <303> 그리고, 상기 SNU449Tp 세포를 siRNAp27^{kip1} 아데노바이러스를 이용하여 24 시간 동안 감염시키고, FLAG-tagged p27^{kip1} S10A를 transfection하여 24시간 동안 배양한 후, 면역형광염색을 수행하고, 수득한 세포 용해물을 도 24에 명시된 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다
- <304> 그 결과, 이처럼 TM4SF5가 발현되는 세포에서 p27^{kip1}의 발현저해와 함께 세린 10번이 알라닌으로 바뀌어 그 잔기의 인산화가 일어날 수 없는 돌연변이체인 p27^{kip1} S10A를 함께 트랜스펙션시키어 발현시키면, 세포질로의 이동이 저해되고 세포의 모양도 다각형의 SNU449 혹은 SNU449Cp 세포와 같은 형태로 변화된 것을 확인할 수 있었다 (도 23, 24).
- <305> 상기 SNU449Tp 세포들을 pEGFP와 활성화된 형태의 RhoA 63L 돌연변이 벡터를 함께 transfection 하여 actin의 구조를 면역 염색한 결과 역시, 활성화된 RhoA에 의해 세포형태 변화의 반전이 일어나 다각형의 형태를 이루고 있었다(도 25)
- <306> 세포질의 p27^{kip1}에 의한 세포형태의 변화와 RhoA 신호전달 간의 관계를 규명하기 위해, Rho GTPase를 활성화시켰을 때의 세포형태의 변화와 p27^{kip1} 단백질의 세포 내 위치변화를 조사하였다.
- <307> 우선, SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포를 커버슬립 위에 배양한 후, Rho GTPase를 활성화 시키는 인자인 LPA(lysophosphatidic acid) 10 mM를 1시간 동안 처리하여 DAPI와 p27^{kip1}을 면역 염색하였다. 그 결과, SNU449Tp 세포에서 LPA (lysophosphatidic acid)는 세포질의 p27kip1을 감소시켰다(도 26).
- <308> 또한, SNU449Tp 세포에 pEGFP와 mDia 활성화형 돌연변이를, SNU449Cp 세포에 pEGFP와 활성화형의 Rac1 (Rac1 61L) 또는 PAK1 (PAK1-caax)를 도입하여 면역형광염색 분석을 수행하였다. 그 결과, 흥미롭게도 RhoA의 하위전달 매

개인자인 mDia의 활성화가 세포의 모양을 SNU449 혹은 SNU449Cp 세포와 같은 다각형의 형태로 돌아가는 결과를 보였고, 세포질내의 p27^{kip1} 단백질 발현 수준도 다시 감소되는 결과를 나타냈다 (도 27).

<309> 이것은 RhoA 신호전달의 활성화로 인해 p27^{kip1} 단백질이 더 이상 안정화되지 못하고, 핵 안에 위치하게 되기 때문이라고 짐작할 수 있다 (도 26, 27 위). 반면, 활성화된 Rac1과 그의 하위전달 매개체인 PAK1의 발현은 TM4SF5가 발현되지 않는 세포임에도 불구하고, 세포의 형태를 길게 변화시키고 p27^{kip1} 단백질의 세포질내 축적을 야기하였다 (도 27 아래).

<310> 이러한 결과들로 미루어, 세포질내의 p27^{kip1}과 RhoA 및 Rac1을 포함하는 Rho GTPase들 사이에는 상호조절의 연결고리가 존재하며, 세포질의 p27^{kip1}에 의한 Rho GTPase들의 활성조절은 TM4SF5가 발현되는 세포형태의 변화를 유도함을 알 수 있었다.

<311> 실시예 4 : TM4SF5에 의한 EMT 현상

<312> TM4SF5가 세포-세포간 접촉의 조절에도 영향을 미치는지를 조사하였다.

<313> 먼저, TM4SF5가 발현되는 세포들과 그렇지 않은 대조군 세포들의 용해물로 세포-세포 접촉형성에 관여하는 단백질들의 발현 수준을 면역블롯(immunoblotting) 방법을 이용하여 확인하였다.

<314> 그 결과, TM4SF5 비발현 세포주들에선 E-카드헤린, Z01, 데스모플라킨 등의 세포접촉 단백질의 발현이 눈에 띄게 증가되어 있었으나, TM4SF5가 발현되는 세포들에선 그 발현이 감소되어 있었다. 그러나, 상피 세포-중배엽 세포로의 전이과정 (EMT, epithelial-mesenchymal transition) 에 관여하는 SMA 단백질은 높게 발현되어 있었다 (도 28).

<315> 또, 고밀도로 배양한 SNU449Cp 세포와 SNU449Tp 세포를 커버슬립 위에 올린 뒤 E-cadherin, β -catenin, Z01 단백질들의 발현양상을 면역염색법을 이용하여 조사한 결과, TM4SF5를 발현하지 않는 SNU449 세포와 SNU449Cp 세포에선 세포접촉부위에 잘 정렬되어 존재하던 E-카드헤린, β -카테닌, Z01 등이 TM4SF5가 발현되는 세포에선 세포간 접촉이 잘 이루어지지 않아 산발적으로 분포하는 발현 양상을 보였다 (도 29).

<316> SNU449Tp 세포에 p27^{kip1}에 대한 shRNA 아데노바이러스를 실시예 1에서 설명한 대로 감염시킨 후, E-cadherin, β -catenin, Z01 단백질의 면역염색한 결과, p27^{kip1}의 발현이 저해되자 E-카드헤린, β -카테닌, Z01 단백질이 규칙적인 형태로 재배열되고(도 30), SMA 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

<317> 또한, 내생적으로 발현되는 TM4SF5가 EMT 현상의 조절에 있어 어떠한 역할을 하는지 규명하기 위해, shRNA 및 shTM4SF5를 발현하는 Huh7 세포에 대해 TM4SF5와 α -tubulin의 발현을 조사하고(도 31), HGF (100 ng/ml)을 24 시간 동안 처리한 후 Z01을 면역염색한 결과를 관찰하였다

<318> Huh7 세포주는 TM4SF5 발현 유무에 상관없이 군집을 이루어 성장하는 특성이 있기 때문에, 세포간 접촉 양상이 상당히 양호하다. 따라서 HGF (hepatocyte growth factor)를 이용하여 EMT 현상을 유도시킨 후, TM4SF5가 세포-세포 접촉형성에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, HGF에 의한 Huh7 세포의 분산현상 (혹은 접촉 와해)이 TM4SF5가 저해된 Huh7 세포에선 줄어들 수 있었다. 따라서 TM4SF5가 세포-세포간 접촉 소실을 야기하고 있음을 알 수 있었다 (도 32).

<319> 실시예 5 : TM4SF5에 의한 세포접촉 생장저지 현상의 소실

<320> SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포를 커버슬립 위에서 배양한 후, DNA 와 actin 구조를 DAPI로 염색한 결과를 도 33 및 34에 도시하였다.

<321> 화살표로 표시된 부분은 세포분열과 핵이 중첩된 부분을 나타내고, 세포가 더 이상 자랄 공간이 없음에도 불구하고 계속적으로 분열하고 있음을 나타낸다. 또 이들 세포들의 생장속도를 측정하기 위해 6 well 배양접시에 5×10^4 개의 세포를 시작으로 12 시간 마다 그 수를 세어 기록한 결과를 그래프로 나타내었다. 실제로 TM4SF5가 발현되는 449Tp 세포주의 생장곡선은 계속적으로 증가하는 양상을 보였고, 대조군 세포인 449Cp 세포주는 시간이 지날수록 증식하다가 접촉 생장저지 현상에 의해 더 이상 자라지 않게 되는 포화곡선을 그리고 있었다. 이러한 특징은 세포가 저밀도로 존재하는 상황에서도 나타났다. 즉, 저밀도의 세포들 중에서도 TM4SF5 발현하는 세포들은 핵이 중첩되어 세포분열등을 이루며 증식을 하나, TM4SF5를 발현하지 않는 SNU449 세포와 SNU449Cp 세

포는 고밀도로 서로 접촉되는 환경에서는 더 이상 성장하지 않는 특징을 보였다(도 34).

<322> 또한, TM4SF5가 발현되는 다양한 세포주들 (T7, T16, 및 T3)의 세포주기의 S기 분포를 조사한 결과, TM4SF5를 발현하지 않는 SNU449 세포와 SNU449Cp 세포 세포에 비해 TM4SF5가 발현되는 세포에서 S-기에 존재하는 세포 군집이 더 많게 조사되었다 (도 35). SNU449Cp 세포와 SNU449Tp 세포에 대조군 shRNA와 shTM4SF5를 도입한 후, propidium iodide로 DNA를 염색하여 유속세포분석기를 이용해 세포주기를 분석한 결과, shRNA를 이용하여 TM4SF5의 발현을 저해하였을 때, S기에 존재하는 세포군집이 줄어들음을 확인하였다 (도 36).

<323> BrdU 침투면역염색법을 이용한 조사에서도, TM4SF5가 발현되는 세포는 그렇지 않은 세포에 비해 DNA 합성중인 S-기의 세포분율이 현저히 높게 존재하는 것으로 나타났다 (도 37). 이러한 현상은 LPA에 의한 RhoA의 활성화나 (도 38), p27^{kip1}의 발현저해 (도 39) 그리고 E-카드헤린의 재발현 (도 40)등을 통해서 특이적으로 DNA 합성중인 S-기의 세포분율이 저해되는 것으로 나타났다.

<324> 특히, E-카드헤린 단백질의 발현을 다시 높이는 SNU449T16m 세포(SNU449T16 세포에서 유래하였으므로 SNU449T16m 이라 명한다)는 TM4SF5가 발현됨에도 불구하고, 세포간의 접촉이 TM4SF5 비발현 세포와 같은 양상으로 나타나고 (도 42), SMA 단백질의 발현이 감소하는 결과를 보였다 (도 41).

<325> 따라서, 이러한 결과들로 볼 때 TM4SF5가 발현되는 세포에 E-카드헤린의 발현을 다시 증가시킴으로써, TM4SF5는 EMT 현상을 통하여 세포접촉 성장저지현상을 소실시키고, 이는 세포간의 접촉과 접촉에 의한 성장저지현상 사이에서 긴밀한 기능의 관련성이 있음을 시사하고 있다.

<326> 실시예 6 : TM4SF5에 의한 형성된 종양 조직의 특징

<327> TM4SF5에 의한 종양발생 효과를 두 가지 방법으로 접근하였다.

<328> 먼저, TM4SF5가 발현되거나 그렇지 않은 다양한 세포들을 부착-비의존적인 성장 환경에 처하도록 하였다. 27일간 soft agar에서 배양한 후 관찰하였다. 실시예 1의 6)에서 언급한 방법에 따라서 SNU449 세포주들을 가지고 soft agar assay를 수행하고, Soft agar 배양접시에 세포들을 배양한지 27일 째, 위상차 현미경으로 세포군집의 모습을 관찰, 기록하였다.

<329> 그 결과, TM4SF5가 발현되는 세포들은 그렇지 않은 세포들에 비해 세포군집이 현저하게 많이 생존해 있는 것으로 나타났다. 그러나, TM4SF5가 발현되는 세포에 E-cadherin을 재발현 시킨 449T3m, T16m 세포들에선 세포군집의 형성이 현저히 줄어들었다. 따라서 TM4SF5에 의한 EMT현상은 세포부착-비의존적인 성장과 연결된다는 것을 추정할 수 있었다(도 52).

<330> 다음으로는, TM4SF5를 발현하거나 발현하지 않는 다양한 SNU449 세포주들을 누드마우스에 주입하였다. 누드마우스는 BALB/cAnNCrJbgi-nu를 (Orient. Co. Ltd)를 기본종으로, 모두 생후 4 ~ 5주, 체중이 약 20 g의 암컷만을 사용하였다. 멸균 소독된 쥐장에서 멸균된 물과 사료를 공급하였고, 층판기류(lamina flow)를 지속적으로 유지한 크린벤취 속에 두어 청정한 환경을 유지하였으며, 모든 술식 또한 크린벤취 속에서 시행하였다.

<331> 누드마우스의 주야간 생물학적 주기를 위하여 실내등을 12시간은 조영하고, 12시간은 점멸하였다. SNU 세포주를 기본 세포주로 하여, SNU449Cp, SNU449Tp, SNU449T16, SNU449T16m 세포의 부유액을 원심 분리하여 세포를 농축하고 hemocytometer로 세포수를 1×10^7 cells / 200 μ l로 산정하여 준비된 세포를 26게이지의 주사바늘을 이용하여 1 cc 주사기로 누드마우스 등(flank)에 피하주사 접종하였다. 주사 후 실험동물은 서울대학교 전임상 실험실 동물 사육법에 따라 유지되었고, SNU449Tp 세포에 의한 종양형성을 관찰, 기록하였다.

<332> TM4SF5가 발현되는 세포주들은 종양형성이 우수했으나, 모세포 (449p)와 대조군 세포(449Cp), 449T3m, T16m 세포들은 눈에 띄는 종양이 형성되지 않았다 (도 53).

<333> 그리고, SNU449Cp와 SNU449Tp 세포를 주사한 쥐로부터 얻어진 종양조직을 H&E (헤마톡실린과 에오신) 염색법으로 염색하여 그 조직형태를 관찰하고, p27^{kip1} 과 pS10p27^{kip1} 발현 양상을 면역조직화학염색법으로 분석하였다. 면역화학 조직염색법으로 TM4SF5가 유도한 종양조직의 중앙부위는 사멸한 세포집단이 눈에 띄게 나타났으며, 세포질에 존재하는 p27^{kip1} 과 세린10번 잔기의 인산화도 증가되어 나타났다 (도 54). 게다가, 상기 조직으로부터 얻어진 단백질을 용해물을 이용하여 Western blot 분석을 수행한 결과, TM4SF5에 의한 종양조직은 그렇지 않은 세포에 의한 조직과 비교하였을 때 p27^{kip1}의 발현수준과 인산화 수준이 높게 나타났다 (도 55).

실시예 7 : TM4SF5에 의한 세포의 이동성 증가

(1) 세포의 이동성 (migration) 분석

Boyden transwell chamber 24 well plates(Costar, Cambridge, MA)를 사용하였다. Polycarbonate filter(8 μ m porosity)위의 chamber에 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포를 5×10^4 cell/well 씩 하루 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 혈청이 없는 RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 배지로 배양한 다음, 24시간 후 insert chamber 위쪽 membrane을 면봉으로 잘 닦아내고 70% 메탄올에 약 7분간 담가두어 멤브레인 아래쪽에 있는 세포를 고정하였다.

이처럼 SNU449Cp, SNU449Tp 세포를 고밀도가 되도록 배양한 후 적당한 두께의 wound를 만들어 준 뒤 시간이 경과함에 따라 wound가 채워지는 정도를 관찰하고 광학현미경으로 기록하였다. 그 결과, TM4SF5가 발현되는 세포주인 경우 그렇지 않은 세포주에 비해 상처회복 속도가 증가되는 것을 확인하였다 (도 58).

또한, 상기 SNU449Cp, Tp 세포주를 transwell의 inset well에 혈청이 없는 배지로 배양하고, insert 아래 chamber에는 10%의 혈청 또는 무혈청 배지를 넣어 시간에 따른 세포의 이동 정도를 관찰하기 위해, 0.005% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 1분 간 염색한 후, PBS로 세 번 세척하여 광학 현미경으로 상기 염색된 세포를 관찰하였다 (도 59의 위쪽 사진). 상기 염색약을 용해하여 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 도표화하였다(도 59의 아래 그래프). 그 결과, TM4SF5가 발현되는 세포주인 경우 그렇지 않은 세포주에 비해 세포이동성이 증가되는 것을 확인하였다 (도 59).

(2) Zymography 분석

분비된 MMPs의 기질 분해 활성을 측정하기 위해 gelatin zymography를 수행하였다.

도 62에 표시된 세포주들을 60 mm 배양접시에서 둔 다음, 18시간 후에 혈청을 제거한 배양액으로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 분비된 MMPs 단백질을 얻기 위해 배양만을 취하여 농축하였다. MMPs의 기질이 되는 gelatin을 SDS-PAGE의 running gel에 첨가한 후 reducing 조건에서 전기영동한 다음 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성시킨 후, 효소 반응 완충용액 (10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl와 50 mM Tris-HCL, pH 7.5)으로 37°C에서 18시간 반응시켰다. 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음 10% acetic acid, 30% methanol에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색하였다.

그 결과, MMP-2 와 9은 젤라틴과 피브로넥틴 기질을 분해하는데 TM4SF5가 발현되는 SNU449Tp, T3, T7, 그리고 T16세포에서 그 활성이 높아져 있음을 확인하였다. 즉, TM4SF5에 의해 MMPs 효소활성의 증가됨을 확인하였다(도 62).

그리고, SNU449P 세포에 MMP-2 luciferase 와 MMP-9 luciferase를 다양한 농도의 pcDNA3.1-MycHis-TM4SF5과 함께 트랜스펙션한 후, 36시간 뒤에 luciferase 활성을 측정하여, 각 MMP 유전자 프로모터의 전사활성을 비교한 결과, MMP-9는 효소활성뿐 아니라 유전자발현 활성까지 높은 것을 확인하였다(도 63). 따라서, TM4SF5는 MMPs 유전자 발현 활성에도 영향을 미침을 알 수 있다.

(3) 3D collagen 을 이용한 세포의 침윤성 분석

세포의 침윤성을 분석하기 위해 Cytodex-3 microcarrier를 이용하였다. SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포를 세포를 microcarrier bead에 부착하여 배양한 다음, 혈청과 배지성분이 들어간 콜라겐 젤에 섞어 37°C 에서 배양한 후 시간이 경과함에 따라 나타나는 현상을 관찰한 결과, TM4SF5가 발현되는 SNU449Tp 세포가 콜라겐 젤 속으로 침윤하는 현상을 광학현미경으로 관찰하였다(도 60).

또, 상기 SNU449Tp 세포의 침윤성을 분석하기 위해 실시예 7-(1)에서 언급한 Boyden transwell chamber 24 well plates의 insert에 matrigel을 넣어 37°C에서 굳힌 뒤, 앞에서 언급된 방법으로 세포를 배양하여 24시간 후 insert 위쪽 membrane을 면봉으로 잘 닦아내고 36시간 뒤 membrane 아래쪽으로 침윤된 세포를 염색하여 관찰하였다. 그 결과, 상기 SNU449Tp 세포가 다양한 세포의 기질 복합체인 Matrigel을 효과적으로 침윤하는 것을 확인하였다(도 61)

실시예 8 : TM4SF5 기능을 저해하는 항암물질(길항제)의 선택

TM4SF5가 세포 내에서 특이적으로 유도하는 현상들을 조절할 것이라 예상되는 화합물들 중에서, 상기 표 1에 나타난 칼콘계 화합물들을 본 발명의 방법에 따라 스크리닝 하였다. 도 69에 기재하고 있는 칼콘 화합물들 역시

항암 후보물질로 사용하였다.

- <349> 전술한 항암기능을 나타내는 후보물질을 본 발명의 항암 물질로 결정하였는데, 스크리닝 된 대표적인 화합물을 상기 표 1에 기재하였다.
- <350> 상기 항암 물질들의 항암기능을 보다 확실히 조사하기 위하여, 표1의 화합물들 중에서 TSAHC[4'-(p-toluenesulfonylamino)-4-hydroxy chalcone]을 사용하였다.
- <351> TM4SF5가 발현되는 세포주에 TSAHC를 처리하였을 때, 지속적인 생장곡선이 TSAHC의 농도, 처리 시간에 따라 의존적으로 감소하는 것을 관찰하였으며 (도 43, 오른쪽), 세포주기 S기로의 진입 (도 44), 그리고 세포간의 접촉이 되살아나는 것을 확인하였다 (도 45).
- <352> 반면, TSAHC 약물의 효과는 TM4SF5가 발현되지 않는 세포에서는 전혀 효과가 없는 것으로 나타났다 (도 43, 왼쪽). 게다가 TM4SF5에 의한 $p27^{kip1}$, $pS^{10}p27^{kip1}$, $pY^{577}FAK$ 의 높은 발현이나 정도 그리고 SMA의 발현은 TSAHC에 의해 효과적으로 감소되는 것으로 나타났다 (도 46). 또, 449Tp 세포주에 TSAHC를 처리하였더니 세포질에 존재하는 $p27^{kip1}$ 이 감소하는 것으로 보아(도 47) TSAHC가 TM4SF5에 대한 길항작용을 함으로써 $p27^{kip1}$ 단백질이 더 이상 안정화되지 못함을 알 수 있었다. 이 외에도, TM4SF5가 발현되는 세포에서의 RhoA의 활성화해 현상을 복구시키고 (도 48), 길게 변화되었던 세포의 형태가 다각형의 TM4SF5가 발현되지 않는 대조군 세포주와 같은 형태로 돌아감을 확인할 수 있었다 (도 49).
- <353> 또한, TSAHC를 처리시에 TM4SF5의 *N*-linked glycosylation 된 부분의 FNGase F에 대한 감수성이 향상되는 것을 확인되었다(도 50). 상기 결과로부터 TSAHC는 TM4SF5 자체를 공격하여 *N*-연결된 글리코실레이션(*N*-linked glycosylation)의 구조적 측면에 변화를 주어 TM4SF5의 단백질-단백질 결합 (tetraspanin-web내에서의)에 영향을 줌으로써, TM4SF5에 의한 기능을 억제할 수가 있을 것으로 추정할 수 있다.
- <354> 또한, TSAHC의 처리는 내생적으로 TM4SF5를 발현하는 세포는 세포의 생장 혹은 증식을 억제하였으나, 발현하지 않는 세포주는 근본적으로 아무런 영향을 미치지 않았다 (도 51). 따라서, 이러한 결과들로 미루어 보아 TM4SF5에 대해 길항제로 작용하는 칼콘계 화합물들이 TM4SF5에 의한 종양형성의 예방 및 치료효과가 있음을 확인하였다.
- <355> 칼콘계 화합물이 나타내는 TM4SF5 저해율 (IC_{50})을 [표] 2에 나타내었다.

표 2

화합물	농도 (IC_{50} , mM)	화합물	농도 (IC_{50} , mM)
1	4.6	22	50.4
2	7.5	23	65.4
3	10.1	24	25.3
4	13.7	25	12.6
5	14.9	26	17.5
6	26.8	27	16.2
7	30.2	28	8.9
8	33.4	29	28.6
9	58.2	30	11.9
10	44.4	31	10.5
11	70.5	32	8.4
12	87.7	33	19.2
13	67.8	34	33.7
14	83.1	35	26.8
15	49.1	36	24.8
16	66.3	37	15.3
17	53.4	38	17.3
18	50.3	39	9.3
19	40.2	40	32.5
20	53.4	41	15.3

21	72.3	
----	------	--

실시예 9 : 본 발명의 칼콘 유도체의 인체 암세포주에 대한 시험관내 세포독성

본 발명의 화합물 칼콘 유도체들의 인체암세포주에 대한 시험관내 세포독성을 조사하기 위하여, 1989년 미국의 국립 암 연구소 (NCI : National Cancer Institute)에서 개발한 숄포르다민 B (sulforhodamin, SRB) 방법을 사용하였다.

본 실험에 사용한 인체암세포주로 HCT15 (colon adenocarcinoma, 결장암;ATCC No.CCL-225), PC-3 (prostate adenocarcinoma, 전립선암;ATCC No.CRL-1435), A-549 (lung carcinoma, 폐암;ATCC No.CCL-185)이며, 위 암세포들은 모두 생명 공한 연구소에서 계대배양 중인 것을 사용하였다.

상기 인체암세포주들은 10% 송아지혈청이 포함된 RPMI 1640 배지 (김코사 카탈로그 제 31800번)를 사용하여 37℃, 5 % 이산화탄소 배양기에서 배양하였으며, 계대는 1주일에 2회 실시하였다.

세포들을 부착면으로부터 분리할 때에는 0.25 % 트립신 (시그마사 제조) 및 3 mM EDTA (1,2-시클로헥산 디아민 테트라아세트산, 시그마사 제조)를 염수가 함유된 인산염 완충 용액 (시그마사 제조)에 용해시킨 용액을 사용하였다.

검색용 시료들(표1에 기재된 칼콘 화합물 유도체들)은 소량의 DMSO (디메틸설폭사이드, 시그마사 제조)에 녹여 실험에 필요한 농도까지 실험용 배지로 희석하여 최종 DMSO의 농도가 0.5 % 이하가 되도록 하고, 몇 단계 (최종 농도: 30, 10, 3, 1, 0.3 $\mu\text{g/mL}$)로 희석된 시료 용액은 암세포에 가하기 전에 0.22 μm 마이크로필터 (밀리포어사 제조)로 여과하여 무균 상태로 하였다. 이어서, 통상의 SRB법으로 인체 암세포주에 대한 세포독성을 측정하였다.

본 발명의 화합물 칼콘 유도체들의 인체 암세포주에 대한 세포 독성 (ED_{50} , $\mu\text{g/mL}$)을 하기 [표 3] 에 나타내었다.

표 3

화합물	HCT-15	A-549	PC-3	화합물	HCT-15	A-549	PC-3
1	35	38	37	50	9	10	9
2	37	36	39	51	6	13	11
3	40	35	37	52	7	6	5
4	38	34	37	53	8	7	8
5	42	40	47	54	7	9	9
6	37	41	33	55	6	7	12
7	33	30	37	56	5	3	6
8	30	31	34	57	9	7	10
9	24	40	31	58	11	12	10
10	30	30	32	59	9	13	20
11	39	38	41	60	4	7	8
12	37	35	37	61	12	10	10
13	38	36	41	62	7	12	8
14	38	31	29	63	8	10	14
15	33	43	41	64	4	3	7
16	37	33	47	65	9	4	13
17	32	33	44	66	11	11	13
18	33	31	39	67	7	14	15
19	38	47	53	68	6	8	10
20	40	35	39	69	7	8	16
21	31	39	43	70	8	9	11
22	28	27	45	71	12	7	24

23	35	31	37	72	10	11	8
24	55	50	51	73	7	11	8
25	54	51	57	74	8	11	14
26	22	20	28	75	8	14	15
27	41	34	47	76	12	11	17
28	54	59	57	77	10	11	12
29	29	37	21	78	5	10	7
30	52	50	59	79	7	8	15
31	24	34	27	80	13	11	23
32	47	45	41	81	14	28	24
33	47	45	42	82	12	17	22
34	54	74	64	83	15	11	14
35	51	47	57	84	32	38	22
36	48	41	39	85	29	33	28
37	34	37	27	86	26	30	34
38	52	57	47	87	19	20	21
39	39	37	38	88	21	32	28
40	31	30	39	89	24	37	33
41	42	49	48	90	6	4	8
42	7	10	18	91	7	10	14
43	12	18	14	92	8	9	7
44	8	10	16	93	6	8	14
45	11	12	14	94	7	11	16
46	9	13	8	95	9	9	11
47	8	11	17	96	8	7	24
48	7	8	11	97	11	6	8
49	8	6	14				

<365> 상기 결과는 본 발명의 칼콘계 화합물들이 인체 암세포주에 대한 세포 독성을 나타내기 때문에 항암제로서 사용할 수 있음을 시사한다.

<366> **실시예 10 : TSAHC의 종양 형성 억제효과**

<367> **(1) TSAHC 투여**

<368> 상기 실시예 6에 따라 준비한 누드 마우스에 대하여, 형성된 종양의 길이와 너비를 caliper로 2일에 한 번씩 측정하여 다음의 공식($\text{Volume}(\text{mm}^3) = \text{Length} \times \text{width}^2 \times 1/2$, Length : 장경, Width : 단경)으로 종양의 부피를 산출하였다.

<369> 누드마우스에 유발된 종양의 부피가 200mm^3 의 크기로 착상(implantation)된 후 임의로 두 군으로 나누어 (5 mg/kg 와 50 mg/kg) 생리식염수에 TSAHC를 현탁시켜 2일에 1회씩 3주 동안 26게이지 주사바늘을 이용하여 복강 내 주사하는 방법으로 투여하였다.

<370> **(2) 종양조직의 면역조직화학검사와 웨스턴 블롯 분석**

<371> 누드 마우스는 SNU449Tp 세포를 주입한지 6주째에 또는 TSAHC를 투약한지 3주째에 경추탈구의 방법으로 희생하였고, 면역조직화학검사를 위해 종양조직을 절개한 후 포름알데히드로 고정한 후 파라핀표본으로 만들었다. 조직의 단백질 발현수준을 웨스턴 블롯으로 분석하기 위해 추출한 종양조직은 바로 액체질소를 이용하여 동결표본으로 만들어 0.1% SDS가 포함된 RIPA 완충용액에 용해시켜 단백질혼합물을 얻어 분석하였다. 준비된 6 μm 두께의 파라핀절편은 H&E (hematoxylin and eosin) 염색과 면역조직화학검사를 시행하였다.

<372> 그 결과, TM4SF5가 발현되는 세포를 이식한 마우스의 종양 (개체수=6)은 지속적으로 커지는 반면, TSAHC를 5mg/Kg, 혹은 50mg/Kg 농도로 복강 주사한 마우스의 종양은 각각 45%, 88% 가량 그 크기가 감소됨을 확인하였다

(도 56).

<373> 실시예 11 : TSAHC의 암전이 억제효과

<374> (1) 암전이 실험 동물 모델 수립

<375> 암전이 실험 동물 모델의 준비는 앞서 설명한 종양유도 모델과 같은 방법으로 수행되었다(실시예 6 참조). SNU449Cp, SNU449Tp 세포의 부유액을 원심 분리하여 세포를 농축하고 hemocytometer로 세포수를 1×10^7 개로 산정하여 준비된 세포를 1cc 주사기 및 29게이지의 인슐린 주사바늘을 이용하여 누드마우스 꼬리의 정맥(tail vein)에 혈관주사 (intravenous injection)하여 접종하였다. 3주 간 방치한 후 쥐를 희생하여 폐 조직을 적출하여 포르말린으로 고정하여 H&E (hematoxylin and eosin) 염색을 시행하였다.

<376> 그 결과 TM4SF5가 발현되는 세포의 경우 폐조직에 종괴가 형성되었음을 확인하였다(도 64). 도 64에서 화살표로 표시한 곳이 종괴 부위로 세포가 밀집되어 있는 곳이다.

<377> (2) TSAHC의 TM4SF5에 의한 세포의 이동성 및 침윤성 억제 효과

<378> SNU449Cp 세포와 SNU449Tp 세포를 6-well 배양접시에 두어, 24시간 후에 TSAHC 20 μ M를 처리하여 18시간 배양한 다음 transwell chamber의 insert well로 옮겼다. 18시간 후 이동한 세포를 고정, 염색하여 광학현미경으로 관찰하고 그 수를 세어 그래프화하였다(도 65). 그 결과 TM4SF5에 의한 세포의 이동성이 TSAHC에 의해 저해됨을 확인하였다.

<379> 또, SNU449Cp 세포와 SNU449Tp 세포를 microcarrier bead에 부착하여 TSAHC 20 μ M과 함께 18시간 동안 배양하였다. Bead-세포를 혈청과 배지성분이 들어있는 콜라겐 젤에 섞어서 배양을 표기된 시간 동안하며 관찰, 기록한 결과, TM4SF5에 의한 세포의 침윤성이 TSAHC에 의해 저해됨을 확인하였다(도 66).

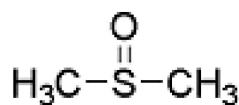
<380> 위와 같은 방법으로 Matrigel이 두껍게 코팅된 transwell chamber를 이용하여 24시간 동안 배양한 다음, Matrigel을 통과한 침윤성의 세포 수를 세어 그래프화한 결과, Matrigel에서의 침윤성 역시 효과적으로 저해되는 것을 확인하였다(도 67).

<381> 그리고, Cp 세포와 Tp 세포에 TSAHC 20 μ M을 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후, 혈청을 제거한 배지로 교환한 후 18시간 동안 배양한다. 배양액을 취하여 농축한 후, 앞서 언급한 방법대로 zymography를 수행한 결과, TM4SF5에 의한 MMPs 효소활성이 TSAHC에 의해 저해됨을 확인하였다(도 68).

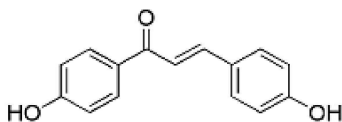
<382> 상기 결과는 TSAHC가 TM4SF5에 의한 종양유도 뿐 아니라 종양세포의 전이과정 역시 효과적으로 저해할 수 있음을 시사하고 있다.

<383> 실시예 12 : TSAHC 유사체와의 효과 비교

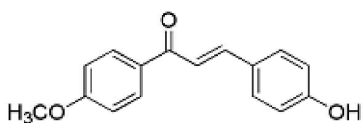
<384> 마지막으로 TM4SF5가 관여하는 현상들에 있어서 TSAHC와 구조적으로 유사한 유도체들의 효과를 관찰하였다. 이때, 사용한 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 및 칼콘 유사체의 화학구조는 하기와 같다.



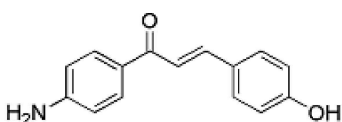
DMSO



4,4'-디하이드록시칼콘



4'-메톡시-4-하이드록시칼콘



4'-아미노-4-하이드록시칼콘

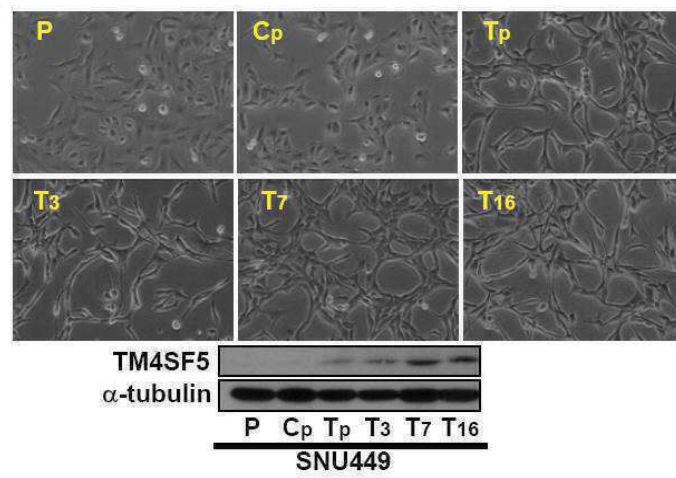
- <389> SNU449Cp 세포와 SNU449Tp 세포를 6-well 배양접시에 깔아, 상기 그림에 표기된 약물을 20 μ M 씩 24시간 동안 처리한 뒤, 광학현미경을 이용하여 세포의 형태변화를 관찰, 기록하였다
- <390> 그 결과, 도 69에 나타나 있는 바와 같이, TSAHC와 구조가 거의 유사하나 서로 다른 R기로 치환된 약물은, 동일 농도 조건 (20 μ M로 24 시간 처리) 하에서 TSAHC는 효과적으로 TM4SF5가 발현되는 세포의 성장을 multilayer로 자라지 않고 monolayer로 자라게 하며 동시에 세포의 형태를 TM4SF5가 발현하지 않는 SNU449 대조군 세포처럼 변화시키는 것을 확인하였다. 이로서 TM4SF5에 의한 세포 성장저해 효과는 TSAHC 화합물의 특정 R기에 의해 조절됨을 유추할 수 있다.
- <391> 상기 TSAHC 유사체들은 상기 화학구조식들에 나타나 있듯이 칼콘(chalcone)의 A-ring(왼쪽 링)에 OH, NH₂, 또는 OCH₃를 치환기로서 가지고 있는데, 이 경우에는 TM4SF5의 기능을 통한 multilayer로 자라는 현상을 저해하는 함 암성이 관찰되지 않았으나, TSAHC와 같이 sulfonyl기가 도입된 sulfonamide chalcone에서는 TM4SF5 기능 저해를 통한 항암활성이 관찰되었다. 즉, sulfonyl의 도입으로 현재 알려진 chalcone 유도체와는 전혀 다른 독특한 항암활성을 관찰할 수 있었다.
- 도면의 간단한 설명**
- <392> 도 1은 SNU449p, SNU449Cp, Tp, T3, T7, T16 세포들의 사진 및 웨스턴 블롯(Western blot) 결과이다.
- <393> 도 2는 SNU449Cp와 SNU449Tp에 대하여 로다민(rhodamine)-팔로이딘(phalloidin)으로 염색한 액틴 사진이고, 도 3은 표기된 단백질에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.
- <394> 도 4는 RhoA와 Rac1에 대하여 *in vitro* 시험관 침강(pulling-down)에 따른 활성 분석 결과이다.
- <395> 도 5는 SNU449p, SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과이고, 도 6은 그들의 RhoA 활성분석 결과이다.
- <396> 도 7은 SNU449Tp 세포에 pEGFP 와 shTM4SF5를 함께 트랜스펙션하여 24시간의 배양후, 로다민-팔로이딘 및 DAPI 의 형광 염색한 사진이다.
- <397> 도 8은 FAK-RhoA 간의 신호전달에 대한 모식도이다.
- <398> 도 9는 SNU449Tp 세포에서의 p190RhoGAP, GRAF, FAK 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석결과이다.
- <399> 도 10은 SNU449Tp 세포에 (HA)3-tagged FAK 야생형 단백질과 Y577F 돌연변이 단백질을 과다발현 한 후의 웨스턴 블롯 분석결과이다.
- <400> 도 11은 대조군 세포에 FLAG-tagged GRAF를 단백질을 과다발현 한 후의 형광면역염색 사진이다.
- <401> 도 12는 SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포에 대한 형광면역염색한 사진이다.
- <402> 도 13은 핵과 세포질을 분획화한 후 p27^{kip1} 단백질에 대한 항체와 알파-튜블린(tubulin)에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석결과이다.
- <403> 도 14는 p27^{kip1} 단백질 발현수준과 Ser10 인산화에 대하여 표기된 항체들을 이용한 웨스턴 블롯 분석결과이다.
- <404> 도 15는 p27^{KIP1}의 세린 10번 아미노산 잔기의 인산화와 관련한 SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포에 대한 형광면역염색 한 사진이다
- <405> 도16은 p27^{kip1} 또는 GAPDH의 유전자들의 mRNA로의 전사를 확인하기 위한 RT-PCR 분석 결과 및 웨스턴 블롯 결과이다.
- <406> 도 17은 SNU449Tp 세포를 pEGFP와 shTM4SF5를 함께 트랜스펙션한 후 p27^{kip1} 단백질과 DAPI로 세포핵을 면역형광 염색법으로 염색한 사진이다.
- <407> 도 18은 도면에 표기된 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석한 결과이다.
- <408> 도 19는 SNU449Tp 세포에 (HA)-tagged FAK 단백질과 Y577F 돌연변이체를 과다발현시킨 후의 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

- <409> 도 20은 간암세포주 Huh 7에 대해, 다양한 shRNA를 도입한 후의 웨스턴 블롯 분석 결과이고, 도 21은 면역형광염색법으로 염색한 사진이다.
- <410> 도 22는 SNU449Cp 세포에 FLAG-tagged p27^{kip1} 단백질을 과발현시킨 후 면역형광염색법에 따른 공초점현미경 사진이다.
- <411> 도 23은 SNU449Tp 세포에서 p27^{kip1}의 발현을 저해한 후의 면역형광염색 사진이다.
- <412> 도 24는 도면에 표시된 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석한 결과이다.
- <413> 도 25는 SNU449Tp 세포들을 활성화형 RhoA 63L 돌연변이 벡터를 트랜스펙션한 후의 액틴 구조를 면역 염색한 사진이다.
- <414> 도 26은 SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포에 LPA를 처리한 후의 면역염색사진이다.
- <415> 도 27은 SNU449Tp 세포에 mDia 활성화형의 돌연변이체, 활성화형의 Rac1 (Rac1 61L) 및 활성화형의 PAK1 (PAK1-caax)를 도입한 후 면역형광염색 분석을 수행한 사진이다.
- <416> 도 28은 세포접촉과 관련된 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석한 결과이다.
- <417> 도 29는 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 대한 E-카드헤린, β -카테닌, Z01 단백질들의 면역염색 분석 결과이다.
- <418> 도 30은 SNU449Tp 세포에서 p27^{kip1} 발현을 저해한 경우 E-카드헤린, β -카테닌, Z01 단백질의 면역염색 분석 결과이다.
- <419> 도 31은 shRNA와 shTM4SF5를 발현하는 Huh7 세포에서의 웨스턴 블롯 분석결과이고, 도 32는 상기 수립된 세포주에 HGF (100 ng/ml)을 24시간 동안 처리한 후, Z01의 위치를 면역 염색한 사진이다.
- <420> 도 33은 SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포에 대하여 DAPI로 세포핵을 염색한 사진(화살표: 세포분열과 핵이 중첩된 부분) 및 12 시간 마다 측정한 세포수의 그래프이다.
- <421> 도 34는 SNU449Tp 세포가 중첩되어 세포분열 모습을 나타내는 염색사진이다(화살표: 세포분열 중에 있는 핵의 모습).
- <422> 도 35는 SNU449Cp 세포와 TM4SF5가 발현되는 T7, T16, 및 T3의 세포주기의 S기 분포를 조사하여 정리한 그래프이다.
- <423> 도 36은 SNU449Cp 세포 및 SNU449Tp 세포에 shRNA와 shTM4SF5를 도입한 후, 유속세포분석기를 이용해 S 세포주기를 분석한 그래프이다.
- <424> 도 37은 SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포에 대하여, 도 38은 LPA를 처리한 SNU449Tp 세포에 대하여, 도 39는 p27^{kip1} shRNA 아테노바이러스를 감염시킨 SNU449Tp 세포에 대하여, 도 40은 SNU449T16 세포에 E-cadherin을 재발현 시킨 SNU449T16m 세포에 대하여 BrdU 침투 면역염색법을 이용한 S기로 진입된 세포의 분포를 분석한 결과이다.
- <425> 도 41은 SNU449Cp (Cp), SNU449T16 (T16), 및 SNU449T16m (T16m) 세포들에 대하여 표기된 분자들의 발현수준에 대한 조사결과이다.
- <426> 도 42는 SNU449T16 (T16) 및 SNU449T16m (T16m) 세포에 대하여 β -카테닌, Z01, 또는 E-카드헤린을 면역염색한 사진이다.
- <427> 도 43은 SNU449Cp 세포와 SNU449Tp 세포에 대하여 DMSO 또는 TSAHC (4'-(p-toluenesulfonylamino)-4-hydroxy chalcone)를 표기된 농도들로 각기 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 세어 기록한 그래프이다.
- <428> 도 44는 SNU449Tp 세포에 DMSO 또는 20 μ M TSAHC를 처리하고 BrdU를 24 시간 동안 침투시킨 후 형광염색법으로 확인한 사진이다.
- <429> 도 45는 SNU449Tp 세포에 대해 DMSO 또는 20 μ M TSAHC를 처리한 후, E-카드헤린 또는 β -카테닌 면역염색사진이고, 도 46은 표기된 단백질들의 웨스턴 블롯 분석결과이고, 도 47은 p27^{kip1}의 형광면역염색분석 결과이며, 도 48은 *in vitro* RhoA 활성 분석 결과이며, 도 49는 DNA와 액틴의 면역염색사진이다.
- <430> 도 50은 SNU449Cp 와 SNU449Tp 세포에 대해 PNGase F 및 Endo H 효소를 처리한 후의 웨스턴 블롯 결과이다.

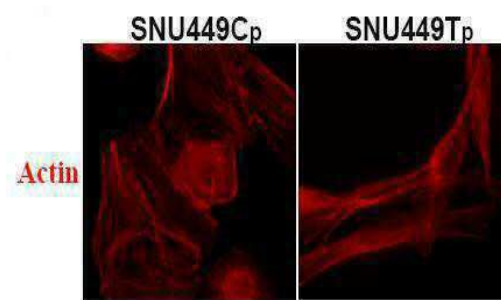
- <431> 도 51은 TM4SF5를 발현하는 세포 및 발현하지 않는 세포에 대하여 TSAHC의 처리에 따른 생장/증식의 변화를 나타낸 그래프이다.
- <432> 도 52는 SNU449 세포주들의 소프트 아가 어세이(soft agar assay)를 수행한 결과이다.
- <433> 도 53은 SNU449Cp, SNU449Tp, 및 SNU449T16m 세포에 의한 종양형성 결과와 TSAHC에 의한 종양생성의 저하정도를 관찰한 결과이다.
- <434> 도 54는 종양조직에 대한 H&E (헤마톡실린과 에오신) 염색 결과 및 면역조직화학염색법으로 분석한 결과이다.
- <435> 도 55는 TM4SF5에 의해 형성된 종양조직에서의 p27^{kip1}, pS10p27^{kip1} 및 TM4SF5 단백질에 대한 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다.
- <436> 도 56은 TSAHC의 복강 주사에 의한 종양의 부피 및 동물의 체중을 측정한 결과 그래프이다.
- <437> 도 57은 TM4SF5에 의한 세포접촉 생장저지 소실현상의 모식도이다.
- <438> 도 58은 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 있어서, 상처가 채워지는 정도에 대한 광학현미경 관찰 사진이다.
- <439> 도 59는 SNU449Cp 및 Tp 세포에 있어서 세포의 이동 정도를 나타내는 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염색 후, 광학현미경 사진 및 그 염색을 녹여 내 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 결과 그래프이다.
- <440> 도 60은 SNU449Tp 세포의 콜라겐 젤 상으로 침윤하는 현상을 광학현미경으로 관찰한 사진이다.
- <441> 도 61은 SNU449Tp 세포의 매트릭셀(Matrigel)상으로 침윤한 세포들을 광학현미경으로 관찰한 사진 및 그 세포수의 그래프이다.
- <442> 도 62는 SNU449Tp, T3, T7, 및 T16세포에서의 MMPs 효소활성 관련 젤라틴 지모그래피(gelatin zymography) 결과 및 MMP9와 알파-튜불린 단백질의 발현정도를 면역블롯으로 확인한 결과이다.
- <443> 도 63은 SNU449P 세포에 있어서, MMP-2 luciferase 및 MMP-9 luciferase의 분석을 이용한 각 유전자의 프로모터의 전사기능 활성을 비교한 그래프이다.
- <444> 도 64는 TM4SF5가 발현되는 각종 세포를 쥐의 꼬리 정맥에 주입 후, 폐조직에 형성된 종괴 사진 및 전이암의 존재를 나타내는 H&E 염색사진이다.
- <445> 도 65는 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 TSAHC 처리 유무의 조건에서 이동한 세포의 염색 사진 및 세포 수에 대한 그래프이다.
- <446> 도 66은 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 TSAHC 처리 유무의 조건에서 콜라겐 젤에 속에서의 침윤성 현상에 대한 사진이다.
- <447> 도 67은 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 TSAHC 처리 유무의 조건에서 매트릭셀에 있어서의 침윤성에 대한 그래프이다.
- <448> 도 68은 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 TSAHC 처리 유무의 조건에서 MMP2 및 9 zymography를 수행한 결과이다.
- <449> 도 69는 SNU449Cp 및 SNU449Tp 세포에 대하여 도면에 표시된 화합물들을 처리한 후의 상기 세포의 형태변화에 관한 광학현미경 사진이다.

도면

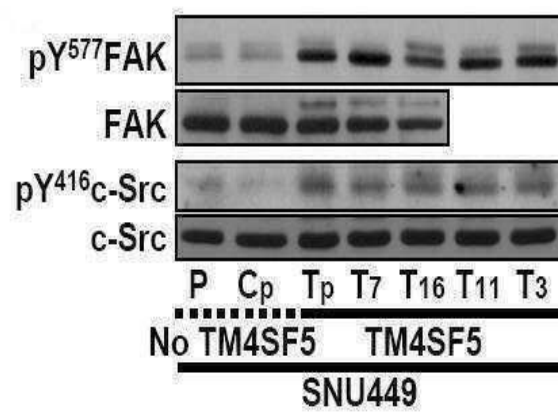
도면1



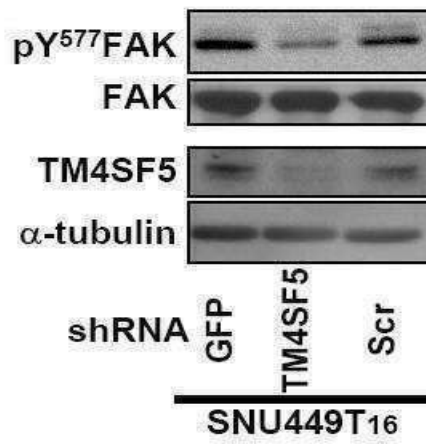
도면2



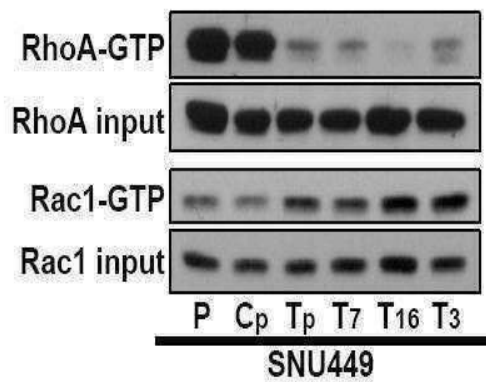
도면3



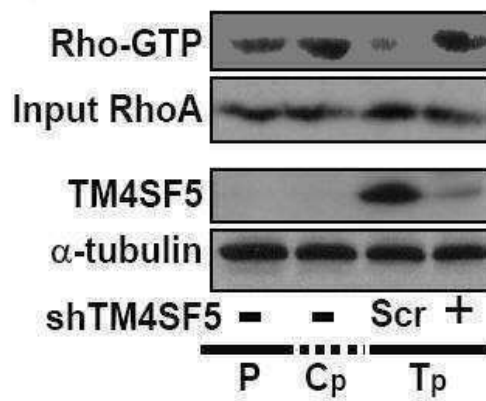
도면4



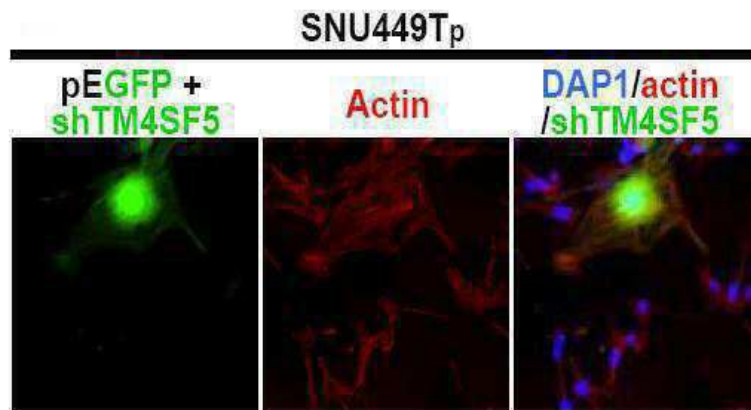
도면5



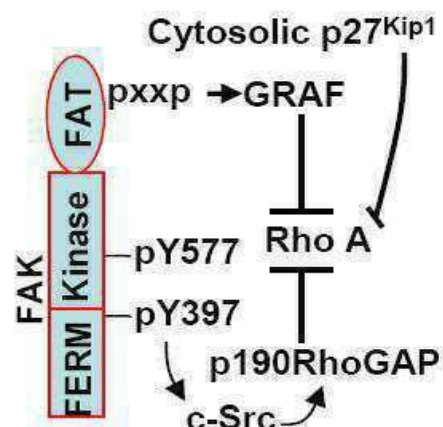
도면6



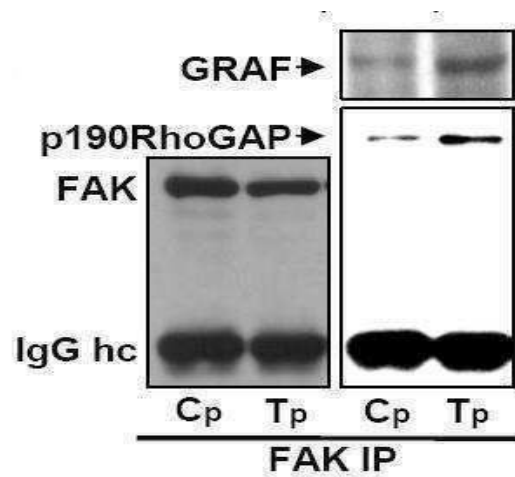
도면7



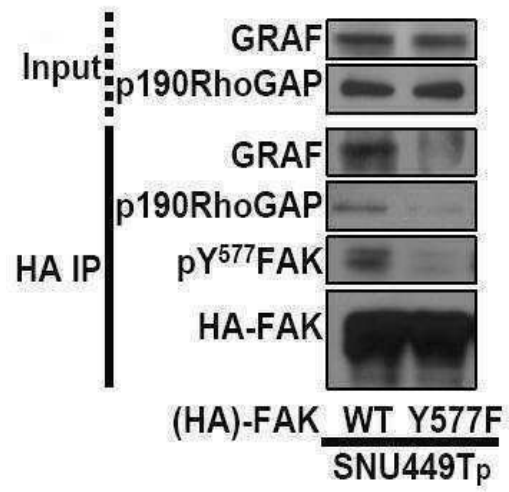
도면8



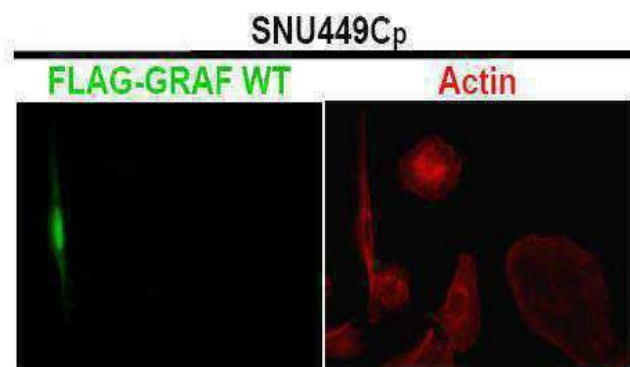
도면9



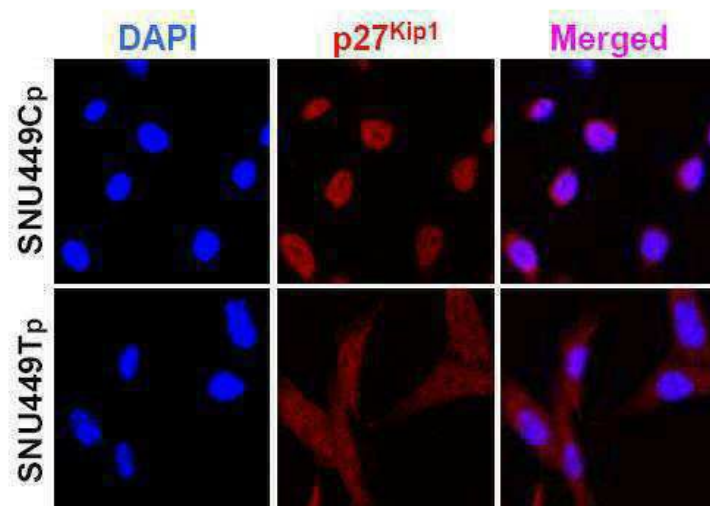
도면10



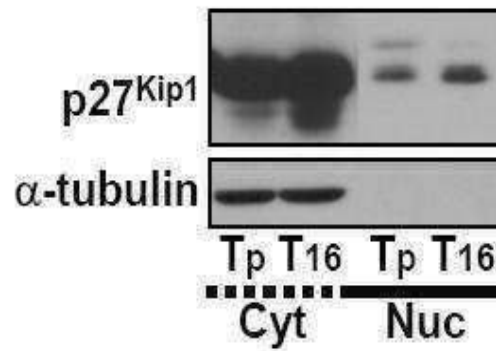
도면11



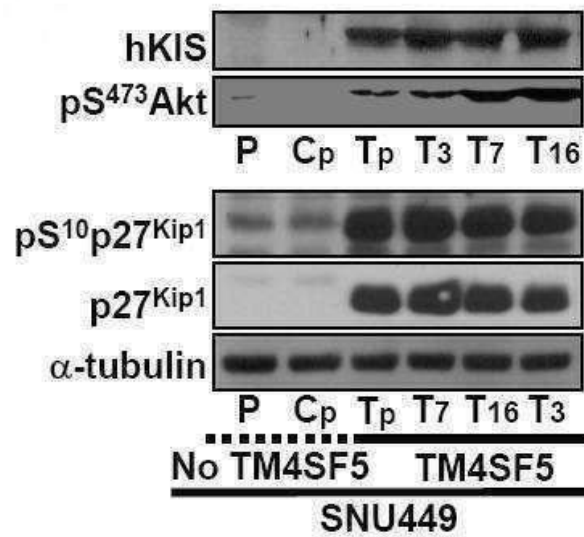
도면12



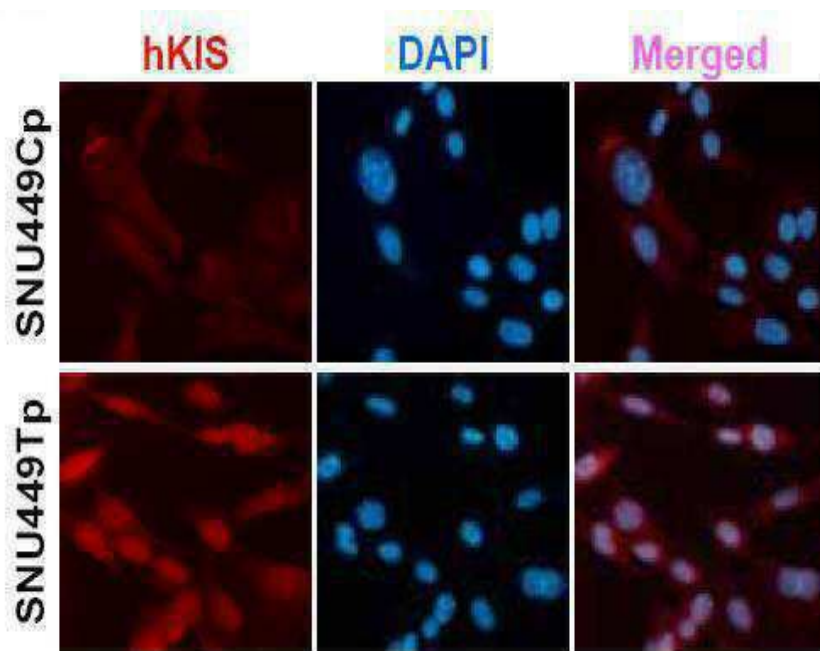
도면13



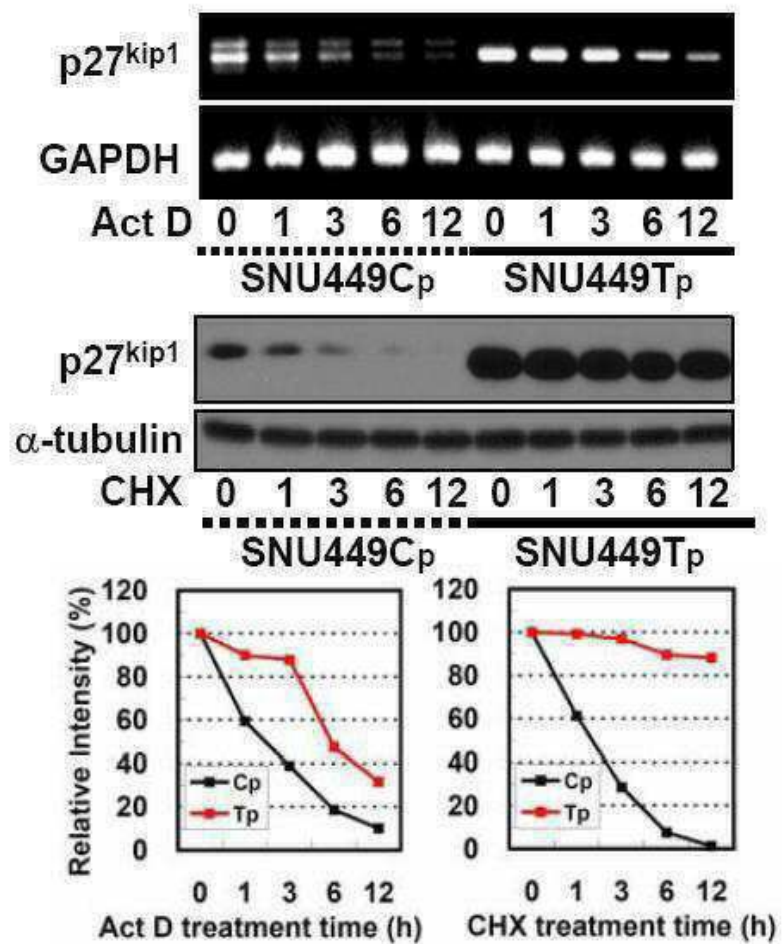
도면14



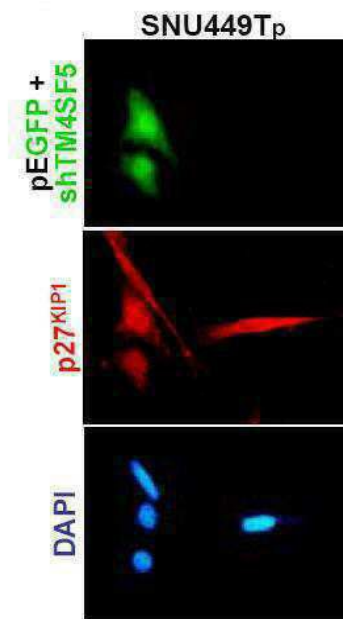
도면15



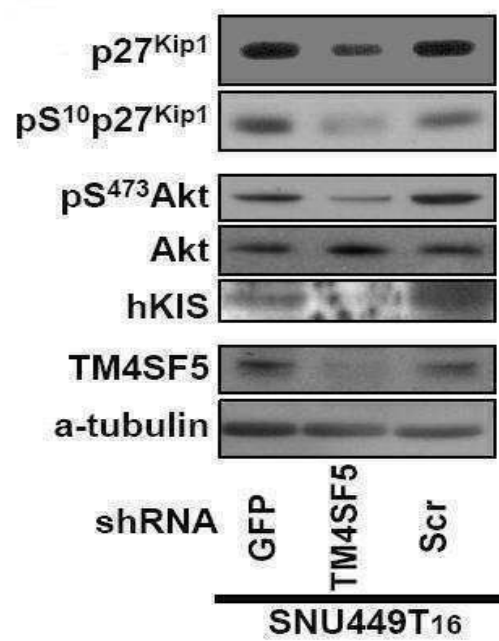
도면16



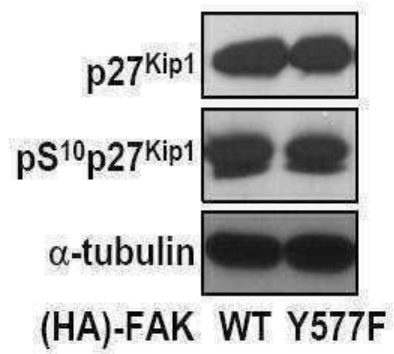
도면17



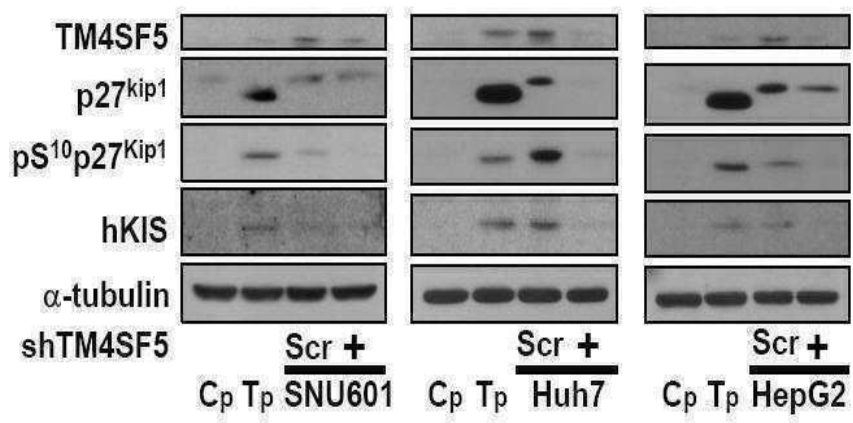
도면18



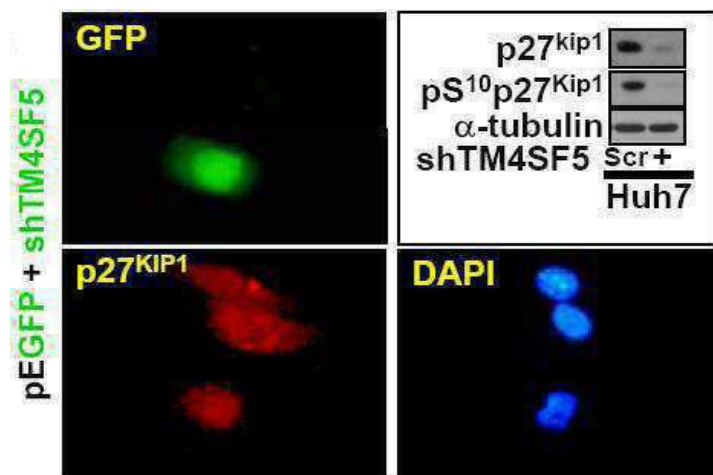
도면19



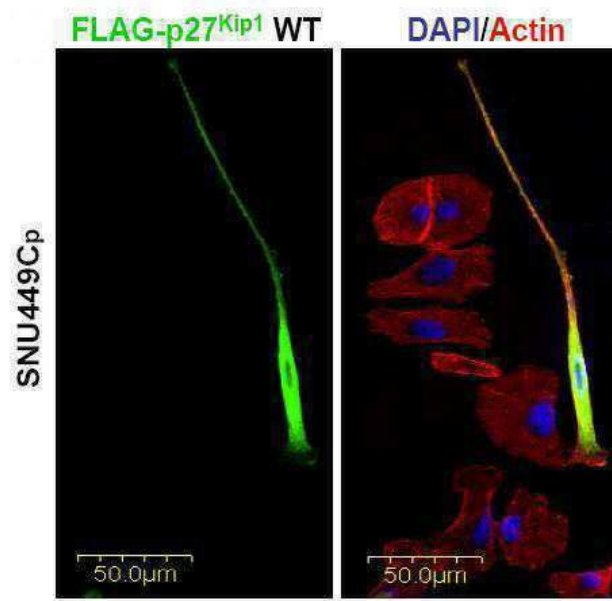
도면20



도면21

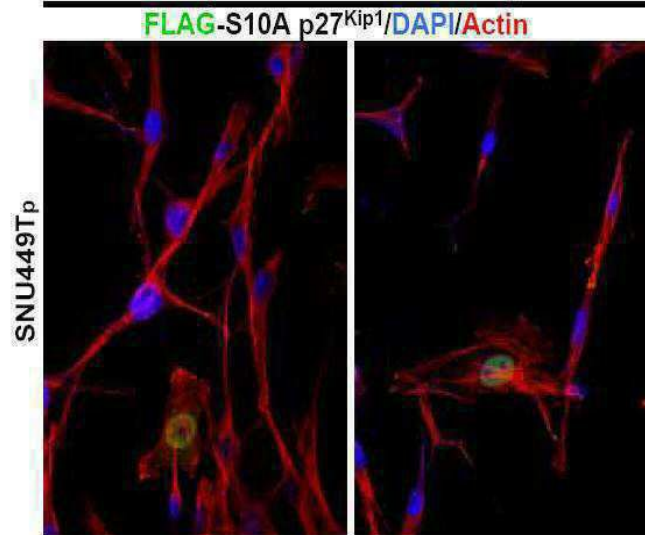


도면22

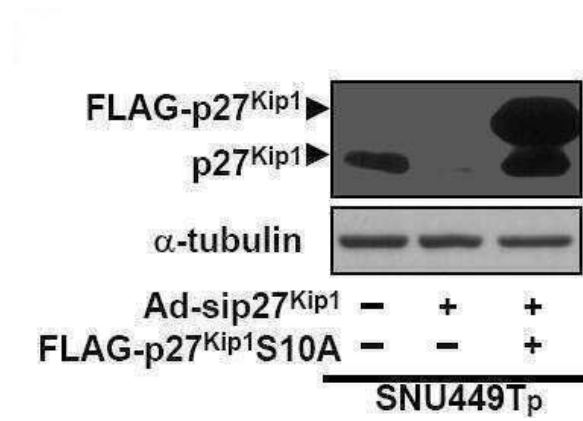


도면23

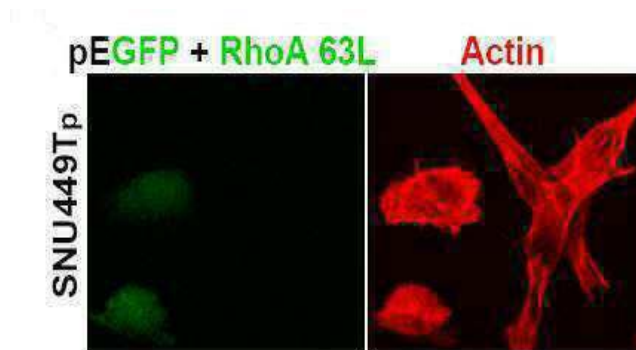
siRNAp27^{Kip1}-adenovirus infection
→ electroporation of FLAG-S10A p27^{Kip1}



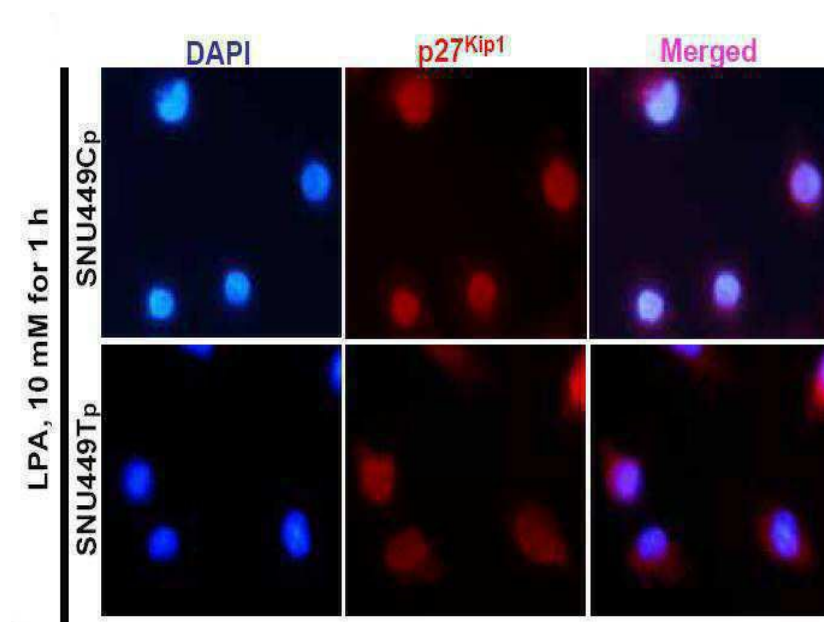
도면24



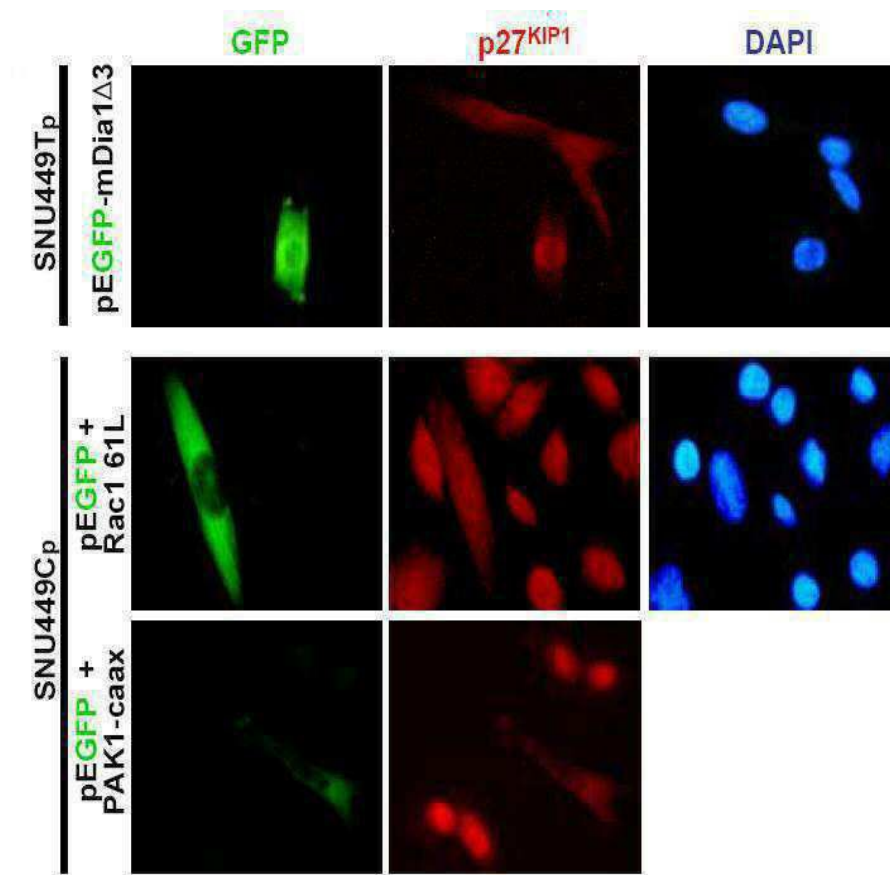
도면25



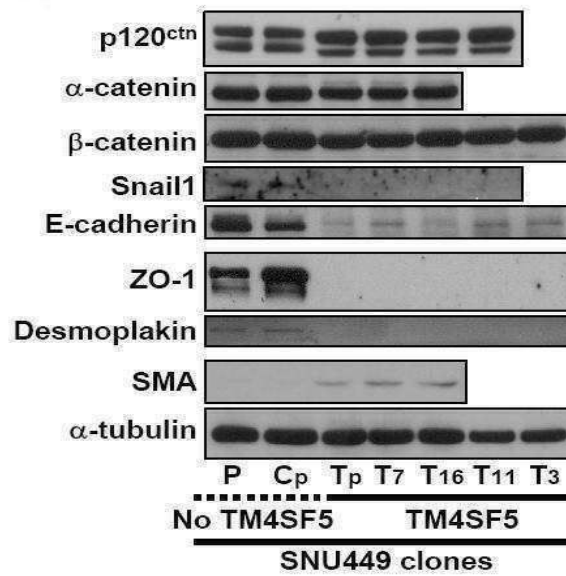
도면26



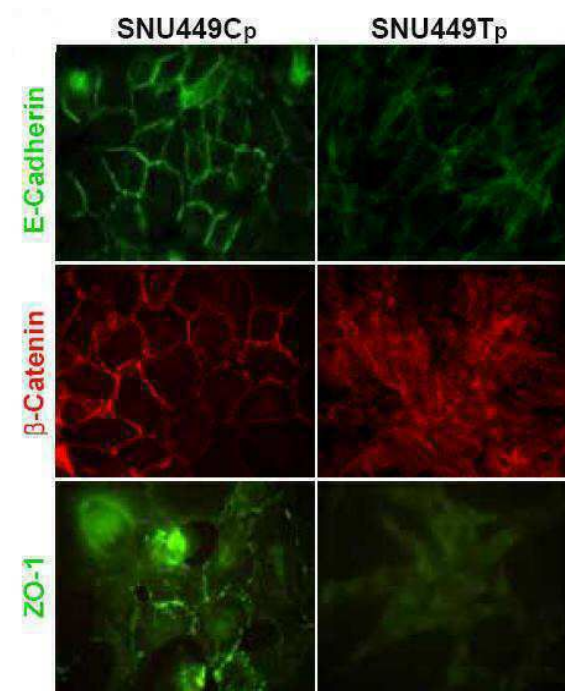
도면27



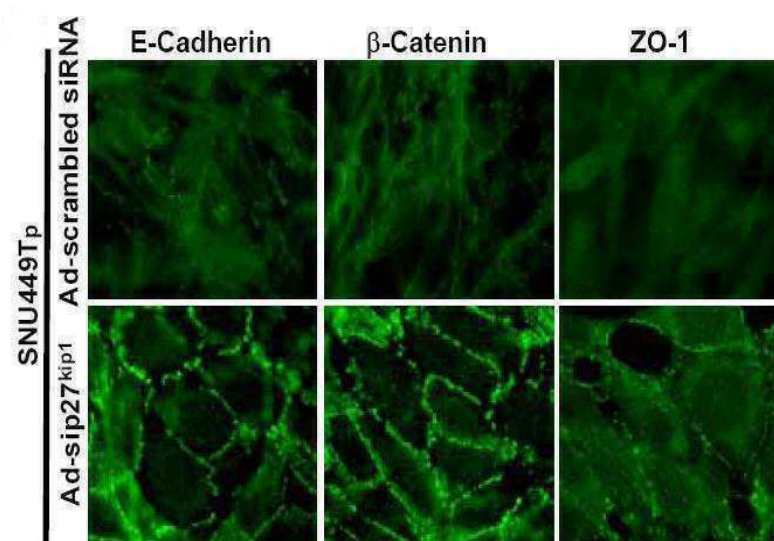
도면28



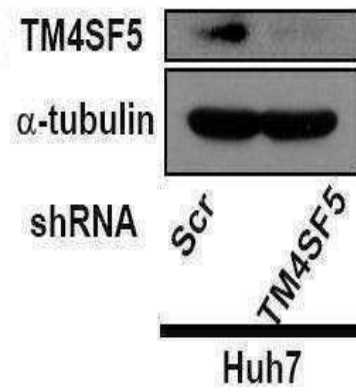
도면29



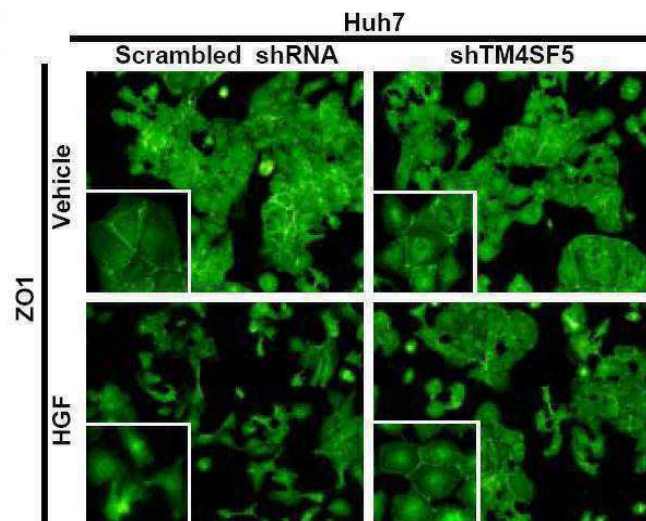
도면30



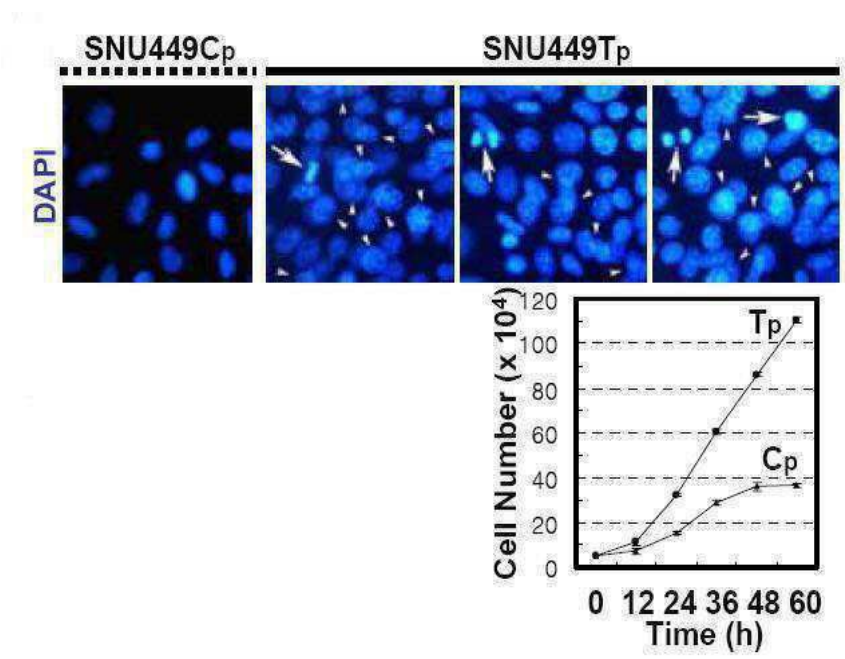
도면31



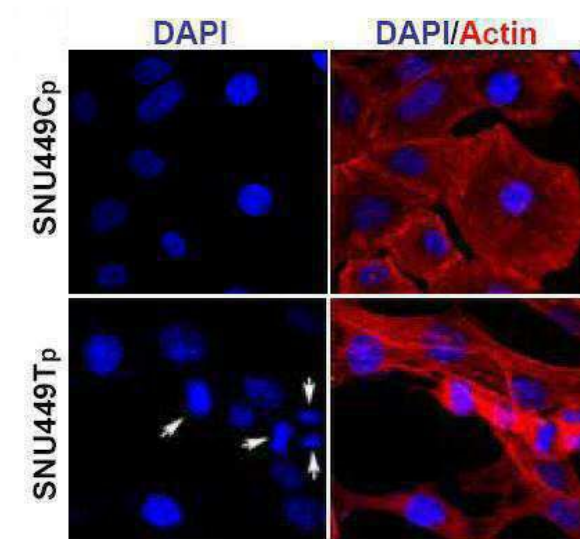
도면32



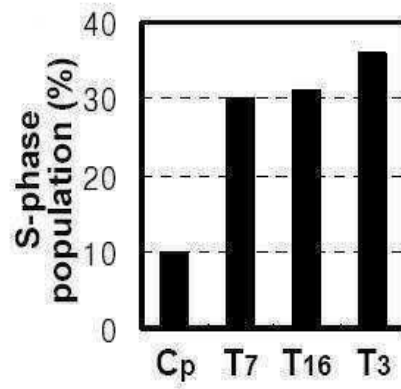
도면33



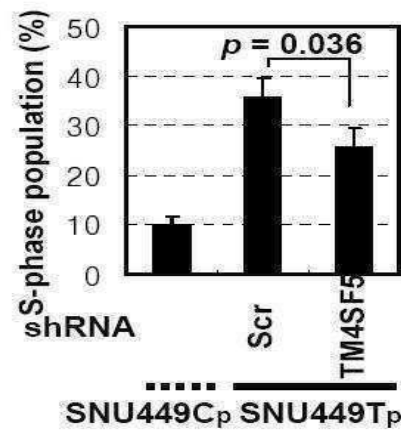
도면34



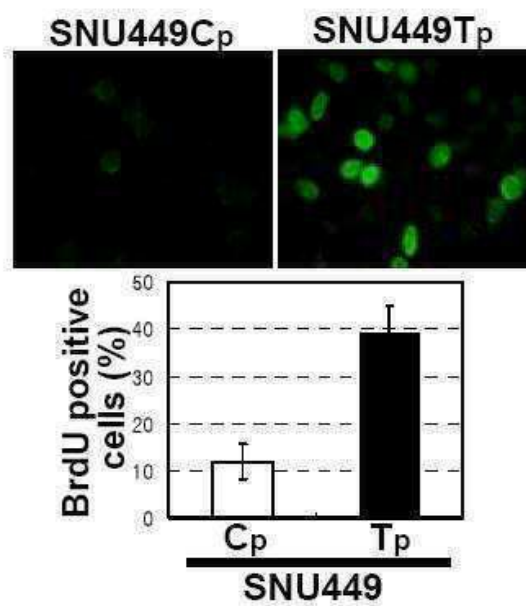
도면35



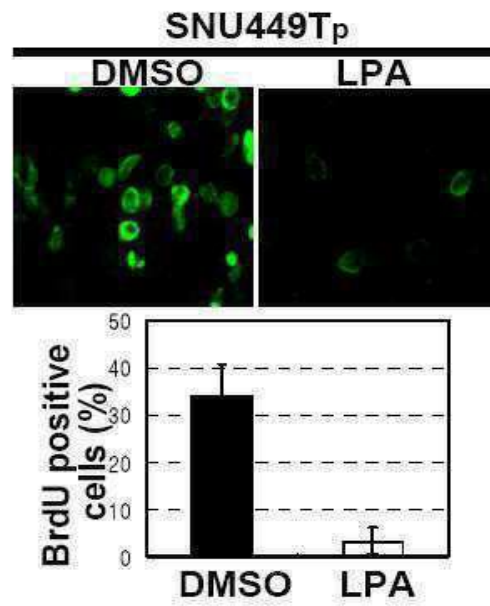
도면36



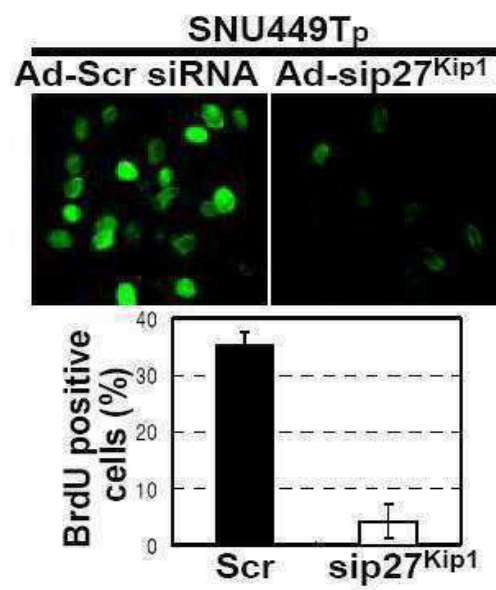
도면37



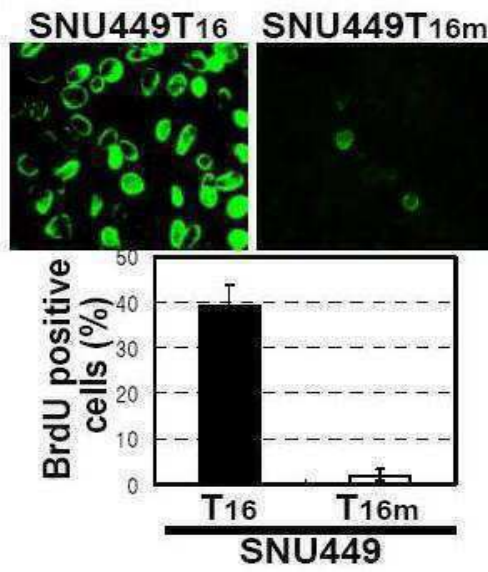
도면38



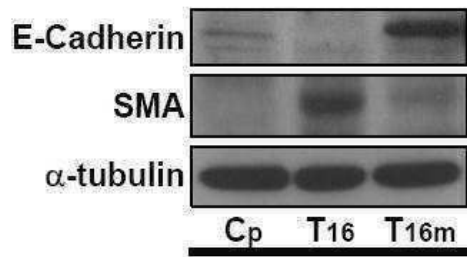
도면39



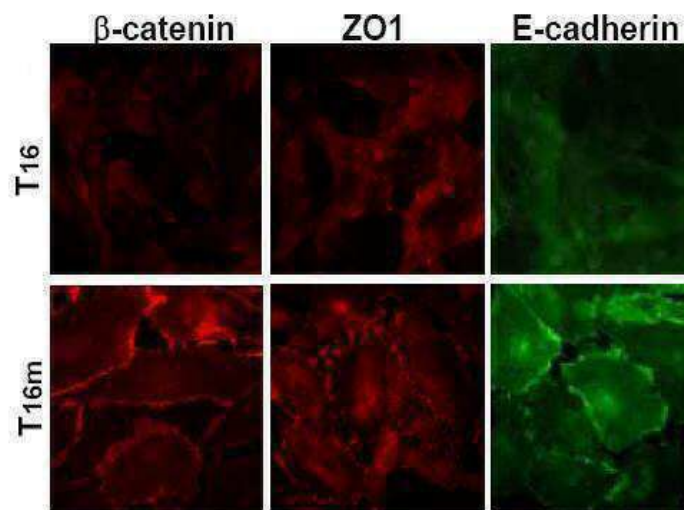
도면40



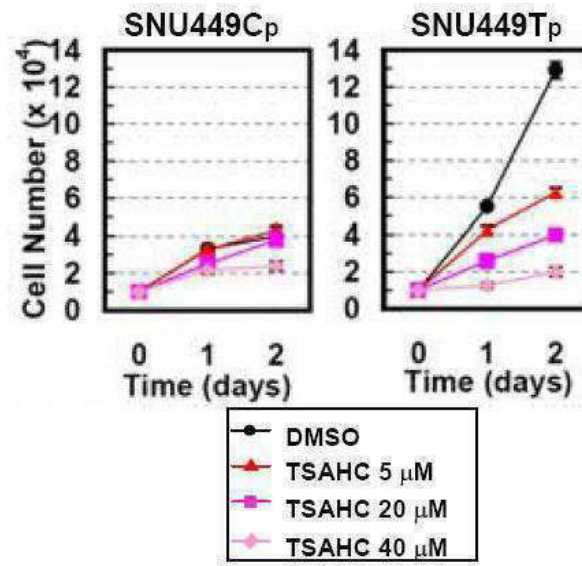
도면41



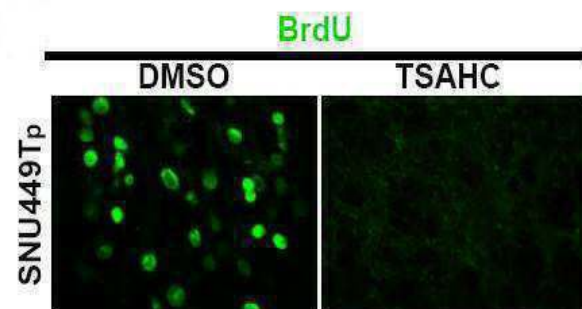
도면42



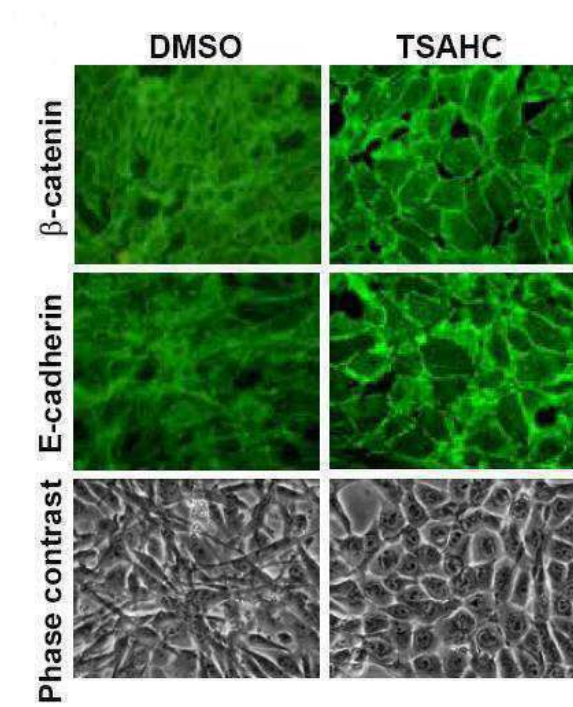
도면43



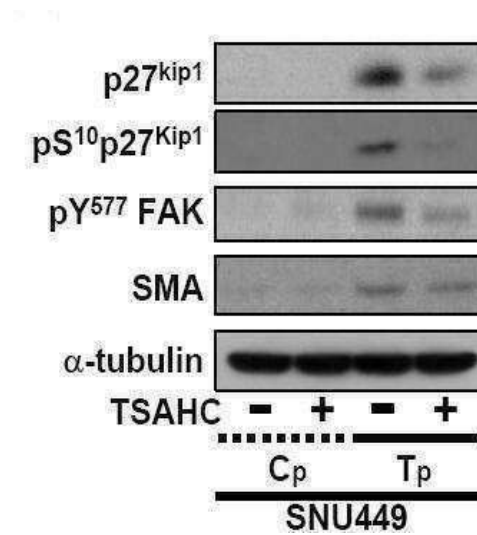
도면44



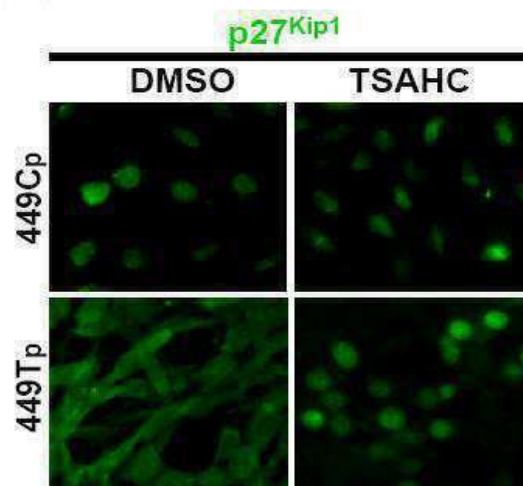
도면45



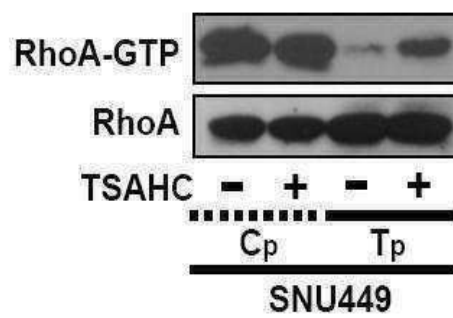
도면46



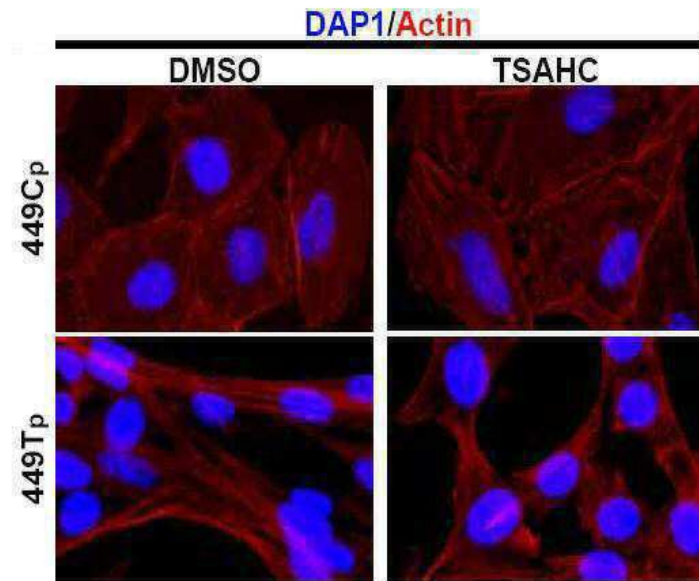
도면47



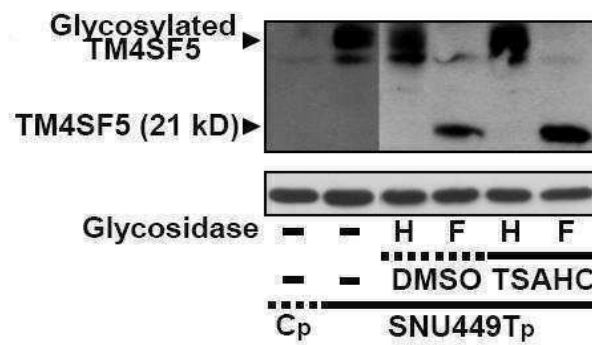
도면48



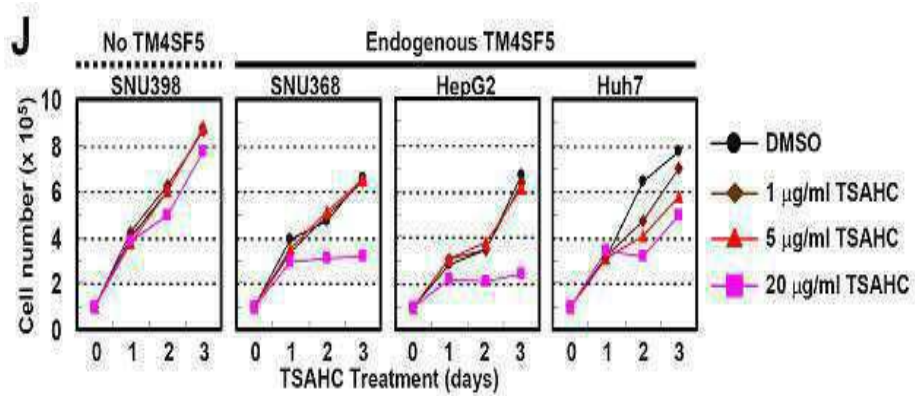
도면49



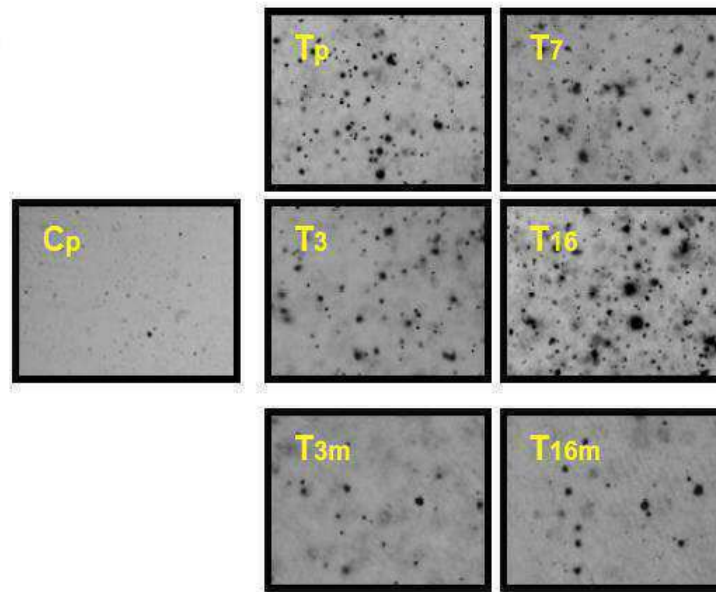
도면50



도면51



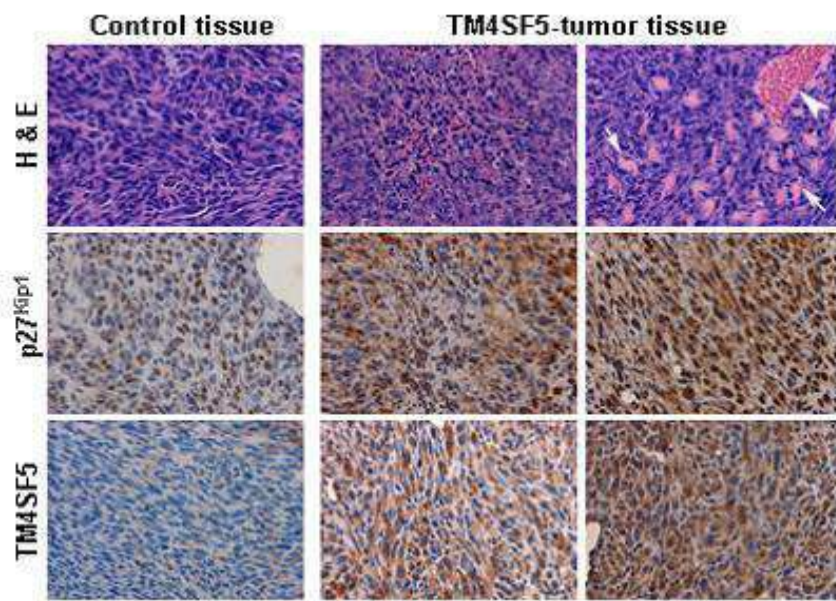
도면52



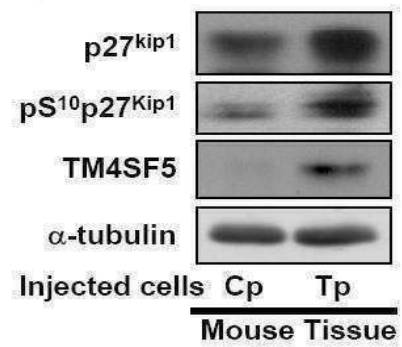
도면53



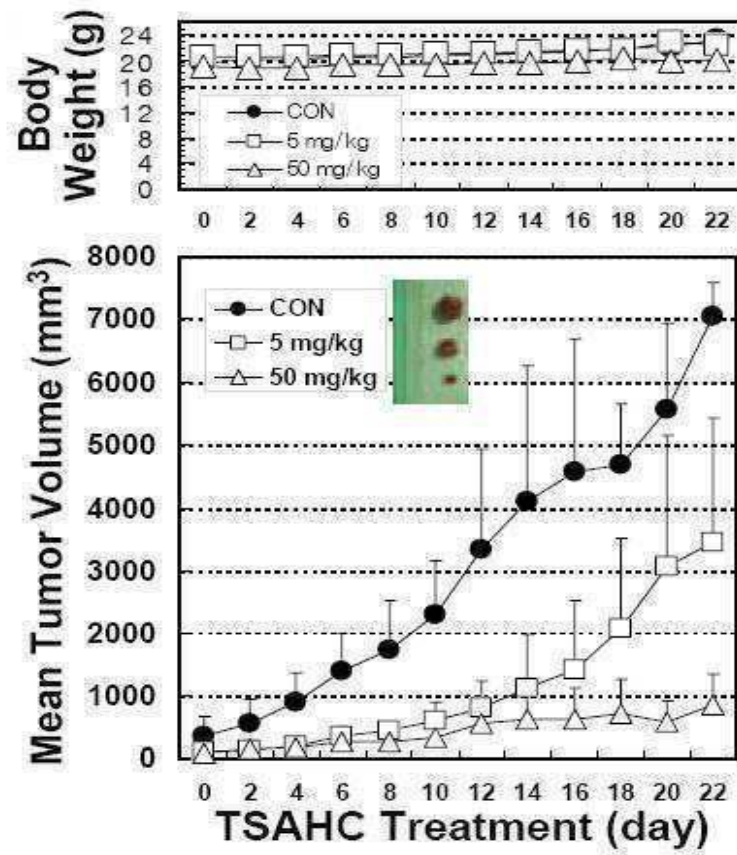
도면54



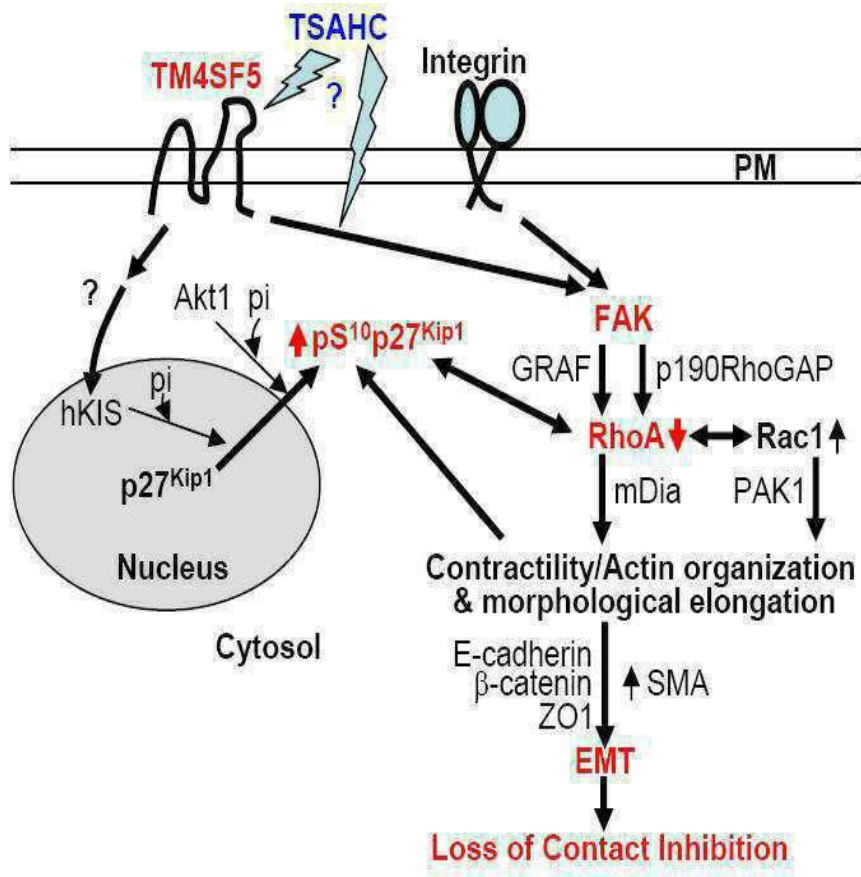
도면55



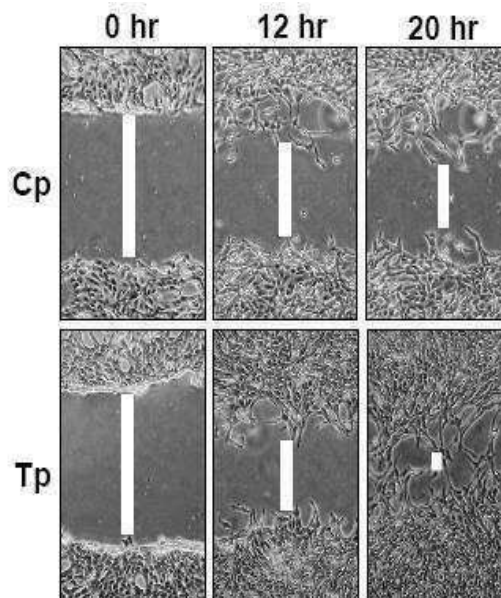
도면56



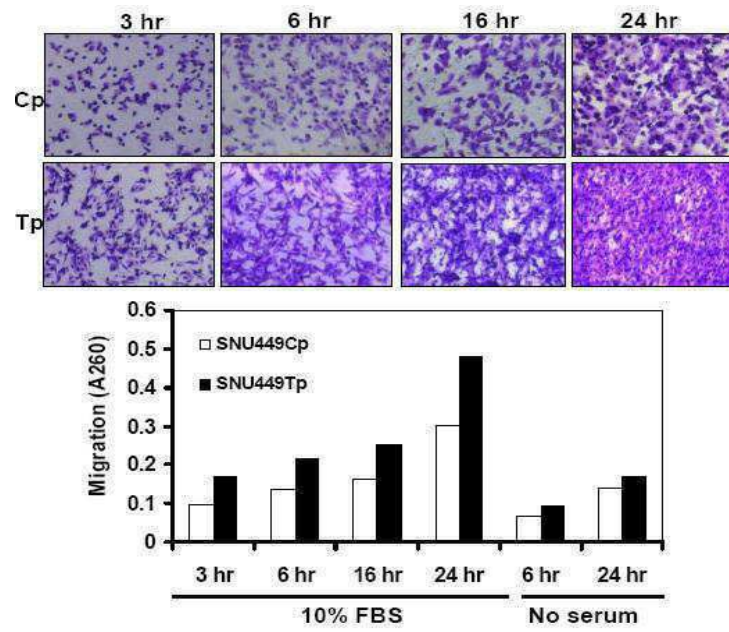
도면57



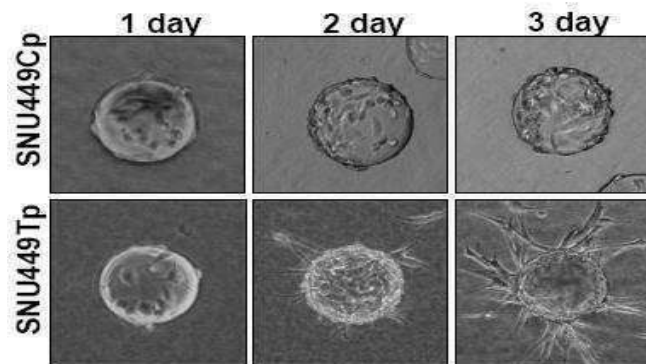
도면58



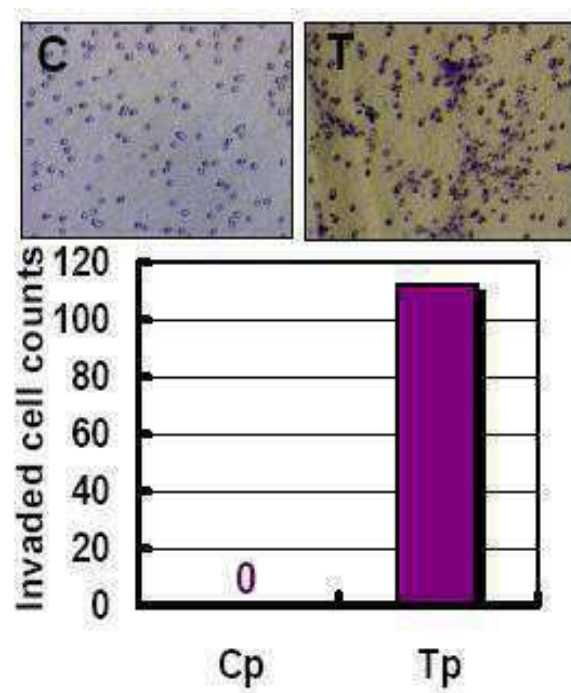
도면59



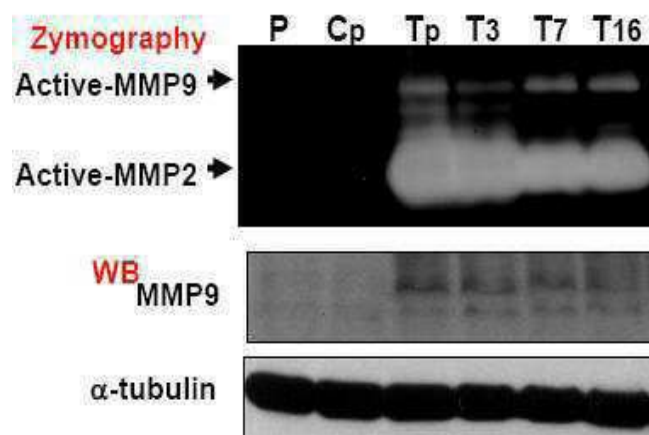
도면60



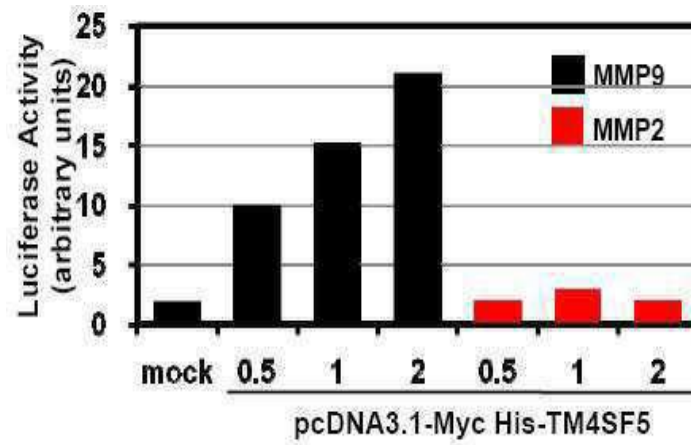
도면61



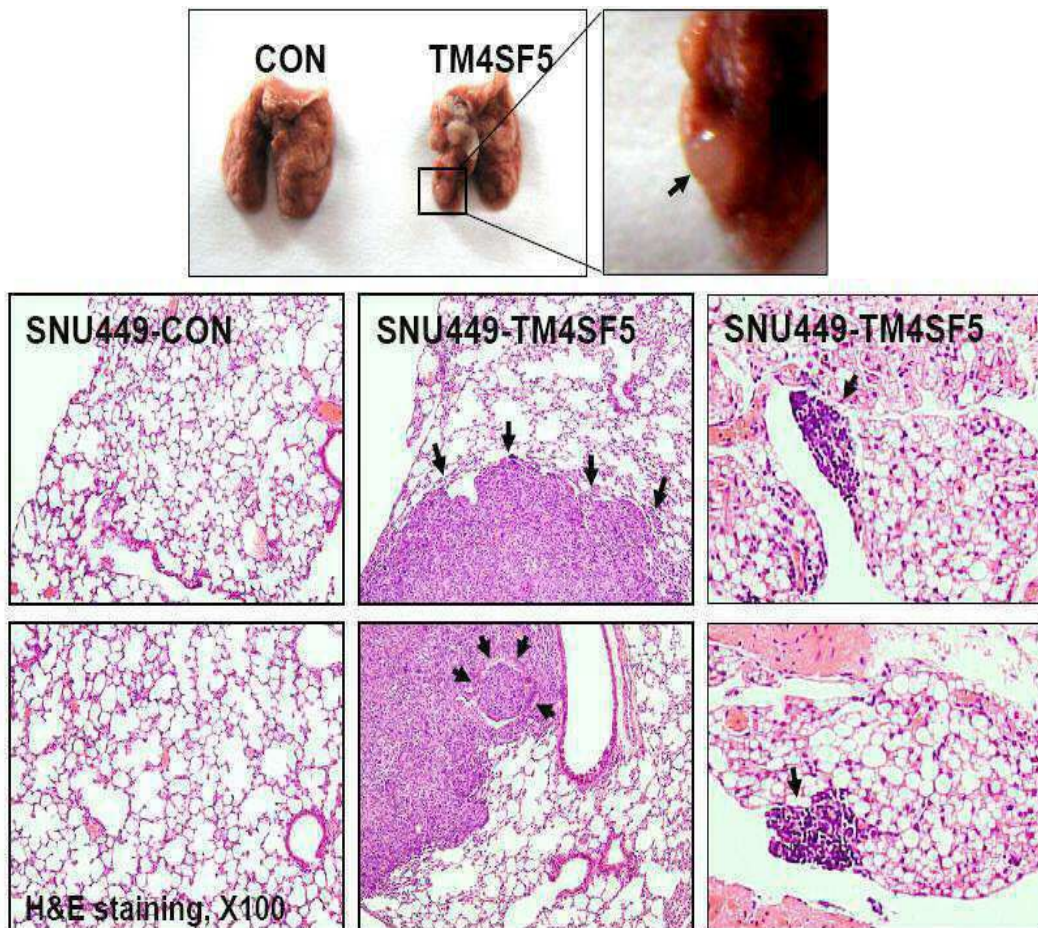
도면62



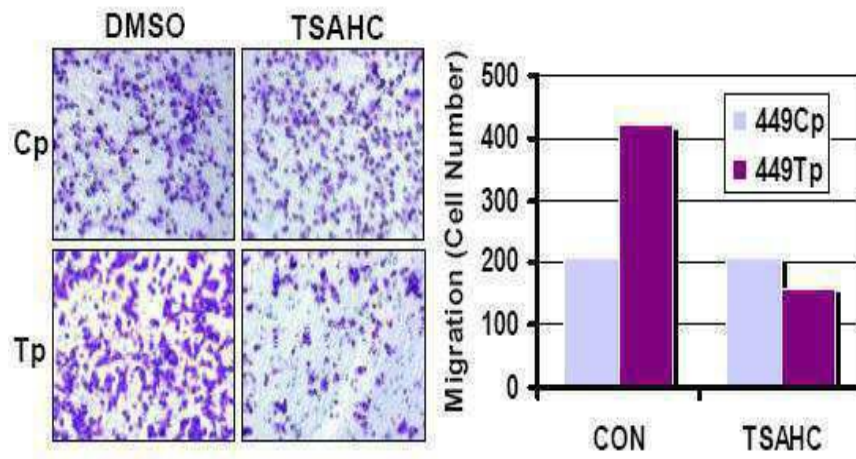
도면63



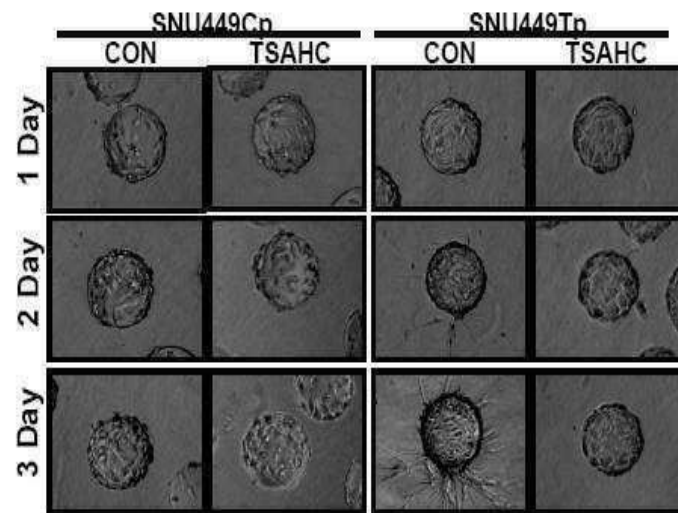
도면64



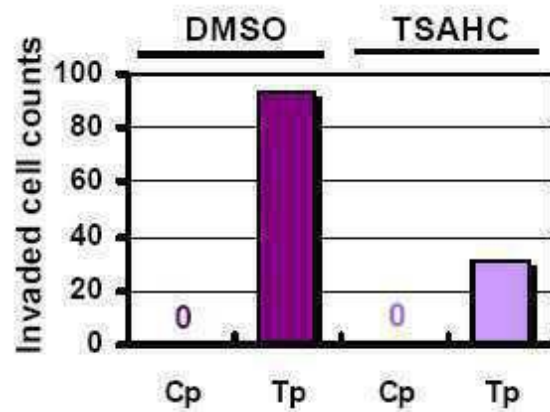
도면65



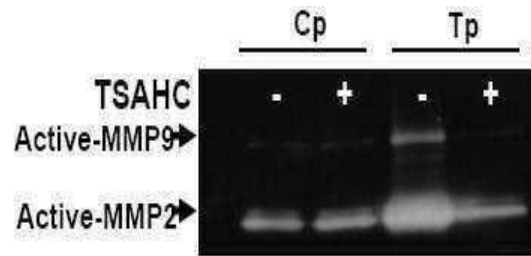
도면66



도면67



도면68



도면69

Compounds	cells	SNU449Cp	SNU449Tp
DMSO			
 TSAHC			
 (4,4'-Dihydroxychalcone)			
 (4'-Methoxy-4-hydroxychalcone)			
 (4'-Amino-4-hydroxychalcone)			

서열목록

<110> Seoul National University Industry Foundation

Gyeongsang National University Industry Foundation
<120> Method for Screening Anti-cancer chemical inhibiting functions of
TM4SF5 and Composition containing Chalcone compounds for treating
and preventing cancer diseases

<130> P06-B238

<140> 10-2006-0124146

<141> 2006-12-07

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 708

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
actcaccgcc tgccttcct gacacctcac catgtgtacg ggaaaatgtg cccgctgtgt 60

ggggctctcc ctattaccc tctgcctcgt ctgcattgtg gccaacgccc tctgctggt 120

acctaattggg gagacctcct ggaccaacac caaccatctc agcttgcaag tctggctcat 180

gggcggcttc attggcgggg gcctaattgt actgtgtccg gggattgcag ccgttcgggc 240

agggggcaag ggctgctgtg gtgctgggtg ctgtggaac cgctgcagga tgctgcgctc 300

ggtctttctc tggcgcttcg ggggtgcttg tgccatctac tgcctctcgg tgtctggagc 360

tgggctccga aatggacceca gatgcttaat gaacggcgag tggggctacc acttcgaaga 420

cacgcggga gcttacttgc tcaaccgcac tctatgggat cgggtgcgagg cggccctcgc 480

cgtgggtccc tggaatgtga cgctcttctc gctgctgggt gccgcctcct gcctggagat 540

agtactgtgt gggatccagc tggatgaacgc gaccattggt gtcttctgcg gcgattgcag 600

gaaaaaacag gacacacctc actgaggctc cactgaccgc cgggttacac ctgctccttc 660

ctggacgctc actcccttgc tcgctagaat aaactgcttt gcgctctc

708

<210> 2
<211> 197
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Cys Thr Gly Lys Cys Ala Arg Cys Val Gly Leu Ser Leu Ile Thr
1 5 10 15

Leu Cys Leu Val Cys Ile Val Ala Asn Ala Leu Leu Leu Val Pro Asn
20 25 30

Gly Glu Thr Ser Trp Thr Asn Thr Asn His Leu Ser Leu Gln Val Trp
35 40 45

Leu Met Gly Gly Phe Ile Gly Gly Gly Leu Met Val Leu Cys Pro Gly
50 55 60

Ile Ala Ala Val Arg Ala Gly Gly Lys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Cys
65 70 75 80

Cys Gly Asn Arg Cys Arg Met Leu Arg Ser Val Phe Ser Ser Ala Phe
85 90 95

Gly Val Leu Gly Ala Ile Tyr Cys Leu Ser Val Ser Gly Ala Gly Leu
100 105 110

Arg Asn Gly Pro Arg Cys Leu Met Asn Gly Glu Trp Gly Tyr His Phe
115 120 125

Glu Asp Thr Ala Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Arg Thr Leu Trp Asp Arg
130 135 140

Cys Glu Ala Pro Pro Arg Val Val Pro Trp Asn Val Thr Leu Phe Ser
145 150 155 160

Leu Leu Val Ala Ala Ser Cys Leu Glu Ile Val Leu Cys Gly Ile Gln
165 170 175

Leu Val Asn Ala Thr Ile Gly Val Phe Cys Gly Asp Cys Arg Lys Lys

	180	185	190	
Gln Asp Thr Pro His				
195				
<210>	3			
<211>	20			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	3			
taaccggga cttggagaag				20
<210>	4			
<211>	19			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	4			
gcttcttggg cgctgctc				19