

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 10월 7일 (07.10.2021) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2021/201657 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/004180

(22) 국제출원일: 2021년 4월 5일 (05.04.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0041158 2020년 4월 3일 (03.04.2020) KR

(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR). 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER) [KR/KR]; 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동), Gyeonggi-do (KR).

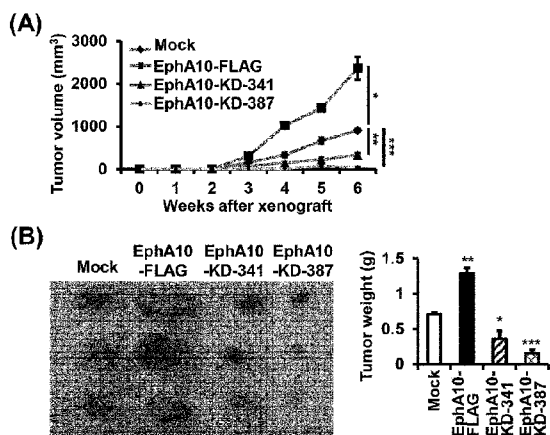
(72) 발명자: 이승택 (LEE, Seung Taek); 06547 서울시 서초구 반포대로 275, 124동 1602호 (반포동, 래미안퍼스티지아파트), Seoul (KR). 신원식 (SHIN, Won Sik); 03010 서울시 종로구 평창24길 18, 9동 203호 (평창동, 금강하이츠빌라), Seoul (KR). 이호 (LEE, Ho); 10415 경기도 고양시 일산동구 강릉로 195, 812동 401호 (마두동, 강촌마을8단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 박미경 (PARK, Mi Kyung); 07324 서울시 영등포구 여의동로3길 10, 101동 3202호 (여의도동, 여의도자이), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: COMPOSITION FOR CANCER DIAGNOSIS, PREVENTION OR TREATMENT, CONTAINING EPHA10 INHIBITOR, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: EPHA10 억제제를 포함하는 암 진단, 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for cancer prevention or treatment, containing an erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10 (EphA10) inhibitor. In addition, the present invention relates to a use for diagnosing cancer by detecting EphA10. Moreover, the present invention relates to a method for cancer prevention or treatment, comprising a step of administering, to a cancer patient, a composition containing an EphA10 inhibitor. The EphA10 is positively related to the tumorigenesis potential of pancreatic cancer cells, and thus can be used in pancreatic cancer diagnosis. Furthermore, the composition containing an EphA10 inhibitor, of the present invention, can significantly reduce the proliferation, migration, adhesion or invasion of pancreatic cancer cells, and thus is effective in the prevention or treatment of pancreatic cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다. 또한 본 발명은 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 검출을 통한 암 진단 용도에 대한 것이다. 또한 본 발명은 암 환자에 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법에 대한 것이다. 상기 EphA10은 췌장암 세포의 종양 형성 가능성과 양성적으로 관련이 있으므로 췌장암 진단에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 EphA10 억제제를 포함하는 조성물의 경우 췌장암 세포의 증식, 이동, 접착 또는 침습을 유의적으로 감소시킬 수 있어 췌장암 예방 또는 치료에 효과적이다.

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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

명세서

발명의 명칭: EPHA10 억제제를 포함하는 암 진단, 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 2020년 04월 03일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2020-0041158호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 본 발명은 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.
- [3] 또한 본 발명은 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 검출을 통한 암 진단 용도에 대한 것이다.
- [4] 또한 본 발명은 암 환자에 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법에 대한 것이다.

[5]

배경기술

- [6] Eph (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma) 수용체는 수용체 단백질 티로신 키나제(RPTK)의 가장 큰 패밀리아다. 수용성 리간드에 결합하는 RPTK 계열의 다른 구성원과 달리, Eph 수용체는 인접한 세포 표면에 존재하는 에프린(ephrins)으로 불리는 리간드와 상호 작용을 통해 접촉 의존적 세포-세포 통신을 매개한다. 14 개의 인간 Eph 수용체는 그들과 결합하는 에프린의 특이성에 기초하여 2 가지 그룹으로 나뉜다. 9 개의 EphA 수용체(EphA1-A8 및 EphA10)는 5 개의 GPI-연결된 에프린-A 리간드(ephrin-A1-A5)와 상호 작용을 하고, 5 개의 EphB 수용체(EphB1-B4 및 EphB6)는 3 개의 막 통과 에프린-B 리간드(ephrin-B1-B3)와 상호 작용을 한다. 단, EphA4는 에프린-B 리간드와도 결합할 수 있고, EphB2는 에프린-A5 리간드와도 결합할 수 있다. 에프린을 발현하는 세포와 이웃한 Eph 수용체를 발현하는 세포에서 에프린과 Eph 수용체의 결합은 수용체 올리고머화, 수용체 트랜스-인산화, 티로신 키나제의 활성화 및 Rho GTPase와 같은 하류 신호 단백질의 동원을 유도하는 정방향 신호 전달을 유도한다. 또한, Eph 수용체는 정방향 신호전달 뿐 아니라, 에프린-발현 세포에 에프린의 인산화 및/또는 신호 전달 단백질의 동원에 의해 역방향 신호 전달도 유도할 수 있다.
- [7] Eph 수용체 및 에프린은 발생 과정 및 성인 조직의 항상성에 관여한다. 따라서 Eph 수용체 및 에프린의 비정상적인 조절은 암을 포함한 다양한 질병에 연루되어 있다. 흥미롭게도, 특정 Eph 수용체의 상향 조절(up-regulation) 또는 하향 조절(down-regulation)은 상황에 따라 각각 종양 촉진 또는 억제와 관련될 수 있다. 이러한 불규칙한 현상은 인산화된 수용체와 세포 증식 및 생존 경로에

관여하는 세포 내 단백질들이 다양한 상호 작용을 하기 때문이다.

- [8] Eph 수용체 중 EphB6 및 EphA10은 티로신 키나제의 촉매 활성화에 기여하는 필수 모티프가 변화되어 촉매 활성화가 결여되어 있다. EphB6는 세포 유형 및 발현 정도에 따라 종양 억제 또는 종양 유전자로서 이중 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 유방암에서 EphB6의 상향 조절은 매트릭스 메탈로 프로테아제(MMP)-7 및 MMP-19의 발현을 감소시키고 TIMP-2의 발현을 증가시켜 침습성을 감소시키는 것으로 보고되었다. 유방암 세포에서 EphB4는 EphB6가 없을 때 침습성을 증가시키지만, EphB4 및 EphB6가 같이 있을 때에는 침습성을 억제한다. 그러나, 삼중 음성 유방암에서 EphB6는 종양 개시를 강화하고 종양 개시세포(종양 줄기세포) 집단의 유지를 촉진하며 약물 감수성을 증가시킨다. 또한, 대장 상피 세포에서 APC 유전자 돌연변이와 함께 EphB6 과발현은 증식, 침윤 및 전이를 증가시킨다.

- [9] EphB6과 달리 EphA10은 종양 유전자로만 제안되지만, 종양 유전자로서의 EphA10은 광범위하게 연구되지 않았다. 대한민국 공개특허 제 10-2008-0040631 호는 에프린 신호전달과 관련된 질환을 쿠프레독신으로 치료하기 위한 조성물과 방법에 대한 것으로서, 에프린(ephrin) 신호전달 체계를 간접하는 쿠프레독신(cupredoxin)을 이용하는 포유동물의 암 세포 성장 저해용 조성물 내지 방법을 제공한다.

- [10] 그러나, 에프린 수용체, 특히 EphA10와 췌장암과의 상관관계에 대한 연구 내지 기제는 개시된 바 없다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 이에 본 발명자들은, The Cancer Genome Atlas(TCGA) 데이터베이스를 사용하여 EphA10 발현이 높은 악성 종양들을 선별했으며, 이 중 치료가 어려운 췌장암을 대상으로 EphA10의 발암 연관성을 분석하였다. 배양한 췌장암 세포주 및 이의 이종 이식 마우스 모델에서 EphA10의 녹다운 및 과발현에 따른 발암성 표현형을 분석하였으며, 침습성 및 침습에 관여하는 젤라틴 용해성 효소의 발현에 EphA10의 역할을 평가했다. 마지막으로, EphA10 발현이 증식, 생존, 접착 및 침습에 관여하는 신호 전달 단백질의 활성화에 미치는 영향을 분석하였다. 종합적으로, 본 발명자들은 EphA10 이 췌장암의 진단 및 치료를 위한 중요한 표적임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [13] 따라서, 본 발명은 EphA10 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

- [14] 또한, 본 발명은 EphA10 검출을 통한 암 진단 용도를 제공하고자 한다.

- [15] 또한, 본 발명은 암 환자에 EphA10 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공하고자 한다.

[16]

과제 해결 수단

- [17] 본 발명은 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10 억제제는 EphA10의 발현 또는 기능 억제제인 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10의 발현 억제제는 EphA10을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, siRNA 및 shRNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10의 기능 억제제는 EphA10 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 암화 기능을 억제하는 EphA10 폴리펩티드의 중화항체인 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 유방암, 담관암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 위암 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [22] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 침습성 암(invasive carcinoma)인 것일 수 있다.
- [23] 또한 본 발명은 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10)을 검출하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에서 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [26] 본 발명은 암 환자에 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [27] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10 억제제는 EphA10의 발현 또는 기능 억제제인 것일 수 있다.
- [28] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10의 발현 억제제는 EphA10을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, siRNA 및 shRNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [29] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10의 기능 억제제는 EphA10 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 암화 기능을 억제하는 EphA10 폴리펩티드의 중화항체인 것일 수 있다.
- [30] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 유방암, 담관암, 폐암,

췌장암, 전립선암, 위암 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[31] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 침습성 암(invasive carcinoma)인 것일 수 있다.

[32]

[33] 본 발명의 “진단(diagnosis)”은 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 바람직하게는 암 및 이의 발병 위험성을 판단하는 것이다.

[34] 본 발명의 “siRNA (short interfering RNA)”는 20-25 bp 크기의 이중가닥 RNA 분자로서 RNA 간섭 경로(RNA interfering pathway)에 의해 해당 siRNA에 특이적인 유전자의 발현을 간섭하는 역할을 수행한다.

[35] 본 발명의 “shRNA (short hairpin RNA)”는 단일가닥 RNA로서 수소결합에 의해 이중가닥 부분을 형성하는 줄기(stem) 부분과 고리 형태를 띠는 루프(loop) 부분으로 구분되며 결국 Dicer 등의 단백질에 의해 프로세싱되어 siRNA로 변환되어 siRNA와 동일한 기능을 수행한다.

[36] 본 발명의 “miRNA”는 “microRNA”라고도 불리우며, 작은 비암호화 RNA 분자로서 유전자 발현의 전사 및 전사후 조절에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있고, 인간의 경우 게놈 내에 1,000개가 넘는 miRNA가 존재하는 것으로 알려지고 있다.

[37] 본 발명의 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)으로서, 생체 내 뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 사용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다. 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 당분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 모이어티의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[38] 본 발명의 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한

조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

[39] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[40] 본 발명의 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.

[41]

[42] EphA10은 대부분의 인간 성인 조직에서 매우 낮게 발현되거나 발현되지 않는다. 상기 기재한 바와 같이, 췌장암에서 EphA10의 상향 조절 및 발암성 역할에 대한 연구는 미비하다. 본 발명자들은 TCGA 데이터베이스를 사용하여 34 종 암 유형에서 EphA10 mRNA 수준을 분석하여, 유방암, 전립선암, 결장암, 위암, 췌장암 또는 폐암을 포함하는 17 종 암 유형에서 전체 암 조직의 EphA10 mRNA 수준의 평균보다 높은 EphA10 mRNA 수준을 보이는 것을 확인하였다. EphA10 발현이 높은 17 종의 암 유형 중에서 9 종의 암 유형에서 종양 조직과 정상 조직의 mRNA 자료를 분석하여, 9 종의 암 유형 중 7 종의 암 유형에서 정상 조직에 비해 종양 조직에서 EphA10 mRNA 수준은 더 높다는 것을 발견할 수 있었다(실시예 1). 따라서, 상기 7 종 암 유형에서는 EphA10의 발현이 암 발생, 성장 및 전이에 중요하다는 것을 추론할 수 있었다.

[43] 발병률이 높은 췌장암은 국소(local) 단계에서 5 년 생존율은 37.4%이지만, 국소 췌장암은 식별할 수 있는 증상이 없기 때문에 환자의 10.3% 만이 국소 단계에서 진단받는다. 국부(regional) 또는 먼(distant) 단계에서 췌장암의 진단이 더 빈번하다(최대 59%); 그러나 국부 단계에서 5 년 생존율은 12.4% 이고, 먼 단계로 가면 2.9% 로 더욱 낮아진다. 따라서 조기 진단과 함께, 췌장암의 확산을 억제하는 치료법 개발이 환자 치료에 중요하다.

[44] EphA10 mRNA 및 폴리펩티드의 발현은 유방암 MDA-MB-436 세포 및 흑색종

MDA-MB-435 세포와 비교하여 Panc-1, MIA PaCa-2 및 AsPC-1 췌장암 세포에서 더 높았다. 인간의 EphA10 mRNA에는 2 개의 주요 EphA10 이소형(isotype)이 알려져 있다: 1,008 개의 아미노산으로 구성된 전장 분자를 암호화하는 EphA10 mRNA(GenBank NM_001099439.2) 및 아미노 말단 283 개의 아미노산으로 구성된 에프린-결합 도메인을 암호화하는 가용성 EphA10 mRNA(GenBank NM_173641.2). 췌장암 세포의 웨스턴 블롯 분석에서, EphA10의 N-말단 영역을 인식하는 항체는 130 kDa에서 강한 신호를, 97 kDa에서 매우 약한 신호를 검출하였다(도 1D). 신호 펩티드가 결합된 성숙 EphA10 폴리펩티드는 106 kDa의 계산된 분자량을 가지며 Asn311 및 Asn486 잔기에서 2 개의 잠재적 글리코실화 부위를 함유하므로, 130 kDa 밴드는 전장 EphA10 폴리펩티드에 해당하는 것으로 예상되었다. 가용성 EphA10은 유선 상피 MCF-10A 세포에서 대략 40 kDa으로 검출되었다고 보고된 바 있으나, 시험한 췌장암 세포에서는 검출되지 않았다.

[45] 본 발명자들은 췌장 세포에서 EphA10 녹다운은 증식, 이동 및 접착을 모두 감소시키고, EphA10 과발현은 증식, 이동 및 접착을 모두 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, 마우스에 생성한 MIA PaCa-2 이종 이식편 종양 분석에서도, EphA10 과발현의 경우 이종 이식편 종양의 질량과 부피와 Ki-67-양성 증식 세포의 수가 대조군에 비하여 더 높았고, EphA10-침묵의 경우 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인하였다.

[46] 종양의 침습 및 전이는 밀접하게 관련되어 있는데, 생체 내에서 종양 세포와 숙주 세포의 세포외기질이 종양 세포의 이동, 증식 및 생존에 관여한다. 췌장암의 주요 특징 중 하나는 초기의 전신 전파에 이어서 빠르게 국소 종양이 성장한다는 점이다. 따라서 췌장암 세포의 침습과 전이에 관여하는 표적 분자의 식별은 임상적으로 중요하다. 본 발명에서 EphA10 과발현은 MIA PaCa-2 세포의 침습을 증가시키고; 반면 EphA10 녹다운은 침습을 감소시키는 것으로 나타났다. IV 형 콜라젠은 기저막의 주요 구성 성분이므로, 기저막의 안정성에 필수적이다. 고형 인간 종양에서 젤라틴 용해성 MMP인 MMP-2 및 MMP-9의 발현 증가는 기저막에서 IV 형 콜라젠을 분해하여 기저막 손실, 암세포의 침습과 전이에 관여한다. 본 발명에서는 MIA PaCa-2 세포에서 EphA10 발현이 젤라틴 분해 및 MMP-9 유도과 관련이 있음을 규명했다 또한, 마우스에서 MIA PaCa-2 이종 이식편 종양 조직의 IHC 염색을 통하여 EphA10 과발현 및 침묵이 각각 MMP-9 발현을 증가 및 감소시켰음을 확인하였다.

[47] ERK 및 JNK와 같은 MAP 키나아제의 활성화 및 AKT의 활성화는 세포 증식, 생존 및 이동을 촉진한다. FAK는 세포 부착, 이동 및 침입에 관여한다. 또한, NF- κ B는 세포 증식, 상피 간충직 전이, 기저막 붕괴를 촉진하여 침습 및 전이를 촉진한다. EphA10은 촉매 활성이 없지만, 세포내 단백질들의 티로신 인산화뿐만 아니라 ERK, JNK, AKT, FAK 및 NF- κ B를 포함한 신호 단백질의 인산화를 향상시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 EphA10이 촉매적으로 활성을 갖는

RPTK 구성원을 직접 또는 간접적으로 활성화시킨다는 것을 시사한다. 촉매적으로 비활성인 ERBB3 (HER3)은 ERBB2 (HER2)와 같은 ERBB 계열의 다른 활성 구성원에 결합하고 다운 스트림 발암 신호 전달 경로를 활성화한다. 또 다른 촉매적으로 결합이 있는 RPTK인 PTK7은 활성을 갖는 KDR 또는 FGFR1과 결합하여 각각 혈관신생 또는 발암 신호 전달 경로를 활성화한다. Eph 수용체는 종종 Eph 수용체 패밀리의 다른 구성원과 이종 이합체를 형성한다. 예를 들어, EphA10은 EphA7과 상호 작용하고, EphA10-EphA7 복합체는 종양-촉진 유전자의 발현을 유도한다. 종합적으로, EphA10은 촉매 활성을 갖는 Eph 수용체 패밀리의 다른 RPTK 패밀리의 구성원과 결합하여 하류 발암 신호 단백질의 인산화를 촉진하여 발암 유전자의 발현을 유도하는 것을 알 수 있다.

[48]

[49] 따라서, 본 발명은 EphA10 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[50] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10 억제제는 EphA10의 발현 또는 기능 억제제인 것일 수 있다.

[51] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10의 발현 억제제는 EphA10을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, siRNA 및 shRNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 EphA10의 발현 억제제는 EphA10을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 shRNA인 것일 수 있다.

[52] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 EphA10의 기능 억제제는 EphA10 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 암화 기능을 억제하는 EphA10 폴리펩티드의 중화항체인 것일 수 있다.

[53] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 유방암, 담관암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 위암 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 암은 췌장암일 수 있다.

[54] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 침습성 암(invasive carcinoma)일 수 있다.

[55]

[56] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제, 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[57] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은

식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[58] 본 발명의 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[59] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로스와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[60] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[61] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 EphA10 억제제를 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[62] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료

및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[63] 본 발명은 또한 EphA10 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10)을 검출하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[64] 상기 검출하는 제제는 EphA10 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[65] 또한, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공할 수 있다. 상기 키트는 해당 기술분야에서 단백질을 검출하는데에 통상적으로 사용되는 제제들을 추가적으로 포함할 수 있다.

[66] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에서 EphA10 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

[67] 상기 개체는 인간을 포함한 포유류 동물일 수 있으며, 상기 시료는 소변, 혈액, 체액 또는 세포일 수 있다.

[68] 또한, 본 발명은 암 환자에 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다.

[69]

발명의 효과

[70] EphA10은 췌장암 세포의 종양 형성 가능성과 양성적으로 관련이 있으므로 췌장암 진단에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 EphA10 억제제를 포함하는 조성물의 경우 췌장암 세포의 증식, 이동, 접착 또는 침습을 유의적으로 감소시킬 수 있어 췌장암 예방 또는 치료에 효과적이다.

[71]

도면의 간단한 설명

[72] 도 1은 다양한 암 조직에서 EphA10의 발현 수준을 나타낸다. (A) EphA10 mRNA 수준을 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터베이스에 있는 34 가지 암 유형의 종양 조직에서 검사하였다. 가로 점선은 시험된 모든 암 유형의 EphA10 mRNA 수준의 전체 평균값(12.33)을 나타낸다. (B) 평균값보다 높은 EphA10 mRNA 수준을 나타내는 17 가지 암 유형 중 정상(N) 및 종양(T) 조직의 비교가 가능한 9가지 암 유형에서 EphA10 mRNA 수준을 비교하였다. 정상 조직에 대하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (C 및 D) EphA10 발현 수준은 Panc-1, MIA PaCa-2 및 AsPC-1 췌장암 세포에서 평가되었다. 흑색종 MDA-MB-435 및 유방암 MDA-MB-436 세포를 양성 대조군으로 포함시켰다. RT-PCR (C) 및 웨스턴 블롯 (D)에 의해 발현을 분석하였다. 웨스턴 블롯으로 EphA10을 탐지하기 위한 일차 항체로 GeneTex (Hsinchu, Taiwan)사의 항-EphA10 항체를 사용하였다. GAPDH 및 β 액틴은 각각 RT-PCR 및 웨스턴 블롯에 대한 내인성 대조군으로서 사용되었다. RT-PCR (C)의 음성 대조군으로서 주형 불포함(No

template) 시료를 사용하였다. TCGA의 암 유형 약어: ACC, 부신피질 암종; BLCA, 방광 요로암종; BRCA, 유방 침윤성 암종; CCA, 담관암 종; CESC, 자궁 경부 편평 상피 세포 암종; COAD, 결장 선암종; DLBC, 림프성 신생물 확산성 거대 B 세포 림프종; ESCA, 식도 암종; GBM, 다형성 교모세포종; HNSC, 두경부 편평 세포 암종; KICH, 신장 비염색성(chromophobe) 세포 암종; KIRC, 신장 투명 세포 암종; LGG, 뇌 저급 신경 교종; LIHC, 간 세포 암종; LUAD, 폐 선암종; LUSC, 폐 편평 세포 암종; MESO, 중피종; NB, 신경 모세포종; OV, 난소 장액성 난선암종; PAAD, 췌장 선암종; PCPG, 갈색 세포종 및 부신경 교종; PRAD, 전립선 선암종; READ, 직장 선암종; SARC, 육종; SKCM, 피부 피부 흑색종; STAD, 위 선암종; TGCT, 고환 생식 세포 종양; THCA, 갑상선 암종; THYM, 흉선종; UCEC, 자궁 말초 자궁 내막 암종; UCS, 자궁암 육종; UVM, 포도막 흑색종; WT, 고위험 윌름스 종양.

- [73] 도 2는 췌장암 세포주 MIA PaCa-2 및 AsPC-1 세포에서 EphA10 녹다운에 의한 발암 특성의 감소를 나타낸다. 대조군(KD 벡터) 및 EphA10 녹다운 shRNA (EphA10-KD-341 및 EphA10-KD-387)를 발현하는 렌티 바이러스로 감염된 MIA PaCa-2 (A) 및 AsPC-1 (B) 세포에서의 EphA10 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 대조군 및 EphA10 녹다운 MIA PaCa-2 (C) 및 AsPC-1 (D) 세포의 증식을 3 일 동안 분석하였다. 대조군 및 EphA10 녹다운 MIA PaCa-2 (E) 및 AsPC-1 (F) 세포를 가하고 1 시간 후에 세포 접착을 분석하였다. 대조군 및 EphA10 녹다운 MIA PaCa-2 (G) 및 AsPC-1 (H) 세포를 가하고 24 시간 후에 세포 이동을 분석하였다. 각 막대는 세 개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 0 일 (C 및 D) 또는 대조군 벡터 (E-H)에 대하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.
- [74] 도 3은 MIA PaCa-2 세포에서 EphA10 과발현에 의한 발암 특성의 증가를 나타낸다. (A) 대조군(OE Vector) 또는 EphA10-FLAG을 발현하는 렌티 바이러스로 감염된 췌장암 MIA PaCa-2 세포에서의 EphA10 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 대조군 및 EphA10-과발현 MIA PaCa-2 세포의 증식(B), 접착(C) 및 이동(D)을 녹다운 세포에서와 동일한 방법을 사용하여 분석하였다. 각 막대는 세 개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 0 일(B) 또는 대조군 벡터(C 및 D)에 대하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.
- [75] 도 4는 이종 이식 모델에서 종양 성장에 대한 EphA10의 과발현 및 녹다운의 효과를 나타낸다. 마우스에 모의(mock) 형질감염 또는 EphA10을 과발현(EphA10-FLAG) 및 침묵(EphA10-KD-341 및 -387) 시킨 MIA PaCa-2 세포를 주사하였다. (A) 종양 부피는 6 주 동안 측정하였다. (B) 주사 6 주 후 마우스로부터 얻은 종양의 사진과 중량(g)의 그래프를 나타낸다.
- [76] 도 5는 이종 이식 모델에서 Ki-67 및 MMP-9 발현에 대한 EphA10의 과발현 및 녹다운의 효과를 나타낸다. 각 실험군 마우스에서 EphA10, Ki-67 및 MMP-9에 대한 IHC 염색과 H & E 염색의 대표적인 이미지를 나타낸다(스케일 바 = 50 μ m).

Ki-67 및 MMP-9 염색의 상대 강도를 그래프로 나타내었다. 각 막대는 3 마리 마우스의 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 모의 형질감염된 세포에 대하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

- [77] 도 6은 MIA PaCa-2 세포에서 침습, 젤라틴 분해 및 젤라틴 용해성 MMP 발현에 대한 EphA10 과발현 및 녹다운의 효과를 나타낸다. MIA PaCa-2 세포를 대조군(OE 벡터) 및 EphA10 과발현(EphA10-FLAG)하는 렌티 바이러스로 감염시켰고(왼쪽 패널), 대조군(KD 벡터) 및 EphA10 녹다운 shRNA(EphA10-KD-341 및 -387)하는 렌티 바이러스로 감염시켰다(오른쪽 패널). (A) Matrigel-코팅된 Boyden 챔버에 EphA10을 과발현 또는 침묵시키는 MIA PaCa-2 세포를 가하고 24 시간 후 세포 침습. (B) 세포를 FITC-젤라틴이 코팅된 커버 유리(cover glass) 상에 플레이팅하고 37 °C에서 48 시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 로다민-팔로이딘(rhodamine-phalloidin) 및 DAPI로 염색하고 형광 현미경(x100)으로 분석하였다. 상대적 젤라틴 분해는 대조군 세포와 비교하여 EphA10-과발현 또는 -침묵 세포에서 DAPI 강도로 정규화된 FITC-젤라틴 분해 정도로 나타내었다. (C) 분비된 젤라틴 용해성 MMP(MMP-2 및 MMP-9)의 수준 및 EphA10의 수준을 각각 배양한 배지 및 세포 용해물에서 젤라틴 지모그래피 및 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. HT-1080 세포의 배지를 MMP-2 및 MMP-9의 예상 위치를 나타내기 위해 양성 대조군으로 사용하였다. 각 막대는 세 개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 벡터 대조군에 대하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

- [78] 도 7은 MIA PaCa-2 세포에서 신호 전달 분자의 활성화에 대한 EphA10의 과발현 및 녹다운의 효과를 나타낸다. 세포 단백질의 티로신 인산화 및 ERK, JNK, AKT, FAK 및 NF- κ 의 인산화를 대조군(OE 벡터) 및 EphA10 과발현(EphA10-FLAG)하는 렌티 바이러스로 감염된 MIA PaCa-2 세포(A)와 대조군(KD 벡터) 및 EphA10 녹다운 shRNA (EphA10-KD-341 및 -387)를 발현하는 렌티 바이러스로 감염된 MIA PaCa-2 세포(B)에서 웨스턴 블롯팅으로 조사하였다.

[79]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[80] [실시예 1]

[81] 다양한 암종에서의 EphA10 발현

[82] The Cancer Genome Atlas(TCGA) 데이터베이스의 RNA-seq 데이터를 사용하여 다양한 암 유형의 EphA10 mRNA 수준을 분석했다.

[83] 인간 췌장 선암종 PANC-1, MIA PaCa-2 및 AsPC-1 세포; 유방암 MDA-MB-436 세포; 흑색종 MDA-MB-435 세포는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. SV40 T 항원(HEK293T)을 발현하는 HEK 293 세포는 박종배 박사(National Cancer Center, Ilsan, Korea)로부터 제공받았다. HEK293T 세포는

10% 소 혈청(BS)을 포함하는 DMEM 배지(HyClone, Logan, UT, USA)에서, 다른 모든 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS)을 포함하는 DMEM 배지에서 성장시켰고, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 보충되었다. 모든 세포를 5% CO₂에서 37 °C로 유지시켰다.

- [84] RNA 분리는 TRIzol 시약(Ambion, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 배양된 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 제조업자의 지시에 따라 올리고(dT)15 프라이머 및 AMV RT 시스템(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 총 RNA로부터 제 1 가닥 cDNA를 합성하였다. 역전사(RT)-PCR 분석에 사용한 프라이머 쌍 서열은, 인간 EphA10 cDNA 에 대하여는 5'-GAGTGAGGTCCCAGAATCCGTTGG-3' (GenBank NM_001099439.1의 5251-5275, 서열번호 1) 및 5'-GGCTTGCAGCCCACCTCTGTC-3' (GenBank NM_001099439의 5389-5369, 서열번호 2)이고, 인간 GAPDH cDNA에 대하여는 5'-ACTGCTTAGCACCCCCTGGCCA-3' (GenBank BC023632의 488-508, 서열번호 3) 및 5'-TTGGCAGTGGGGACACGGAAG-3' (GenBank BC023632의 740-720, 서열번호 4)이다(표 1). PCR 증폭 조건은 다음과 같다: 94 °C에서 30 초 동안 초기 변성 및 94 °C에서 30 초 동안 변성, 55 °C에서 60 초 동안 어닐링 및 72 °C에서 30 초 동안 연장의 30 사이클. PCR 생성물을 폴리 아크릴 아미드 겔 전기영동(PAGE)으로 분석하였다.

[85]

[86] [표1]

명칭	서열		서열번호
인간 EphA10 cDNA	정방향	5'-GAGTGAGGTCCCAGAATCCGTTGG-3'	1
	역방향	5'-GGCTTGCAGCCCACCTCTGTC-3'	2
인간 GAPDH cDNA	정방향	5'-ACTGCTTAGCACCCCCTGGCCA-3'	3
	역방향	5'-TTGGCAGTGGGGACACGGAAG-3'	4

- [87] TCGA 데이터베이스에서 20,165 개 표본의 전처리된 RNA-seq 카운트 매트릭스는 Genomic Data Commons(GDC; <https://gdc.cancer.gov/>)의 UCSC Xenabrowser(<https://xenabrowser.net/>)에서 얻었다. 유전자 발현은 RNA-Seq-기반 발현 정규화 방법인 백만 맵핑된 판독 상한 사분위수(FPKM-UQ) 당 전사체의 킬로베이스 당 단편으로서 정량화되었다. EphA10 mRNA 수준은 log₂(FPKM-UQ + 1)로 도시되었다. 정상 및 종양 조직의 mRNA 자료가 이용 가능한 특정 유형의 암에 대해서는 EphA10 mRNA 수준에 대해 쌍으로 분석을 수행하였다.

- [88] 그 결과, 분석된 34 종의 암 유형 중 EphA10 mRNA의 중간 수준은 모든 암 조직의 전체 평균 [$\text{Log}_2(\text{FPKM-UQ} + 1) = 12.33$]보다 17 종의 암 유형에서 더 높았다(도 1A). 쌍을 이룬 EphA10 mRNA 수준이 높은 17 종의 암 유형 중 9 가지에서 정상 및 종양 조직의 쌍으로 mRNA 데이터가 이용 가능했다(도 1B). 이상의 9 종의 암 유형 중 유방 침습성 암종, 담관암 종, 폐 선암종, 췌장 선암종, 전립선 선암종, 위 선암종 및 갑상선 암종을 포함하는 7 종의 암 유형에서 정상 조직보다 종양 조직에서 EphA10 mRNA 수준이 더 높았다(도 1B). 이들 데이터는 EphA10 발현이 특정 암 유형에서 상향 조절됨을 확인시켜 준다. 또한, mRNA 및 단백질 수준에서 EphA10을 발현하는 것으로 알려진 유방암 MDA-MB-436 및 흑색종 MDA-MB-435 세포주에 비해 AsPC-1 및 MIA PaCa-2 세포주 등의 췌장 암종 세포주에서 EphA10의 발현이 더 높은 것을 확인할 수 있었다(도 1C 및 D).
- [89]
- [90] **[실시예 2]**
- [91] 췌장암 세포의 증식, 이동 및 접착에 **EphA10**의 녹다운의 영향
- [92] 췌장암 세포의 발암 특성에 대한 EphA10 하향 조절의 영향을 조사하기 위해 EphA10을 녹다운하여 인간 EphA10 폴리펩티드의 발현이 크게 감소한 췌장 암종 세포를 구축하였다.
- [93] EphA10 녹다운 벡터(pLKO.1-shRNA-EphA10-341 및 387)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. EphA10 녹다운 렌티 바이러스는 10 μg 의 EphA10 녹다운 벡터(pLKO.1-shRNA-EphA10-341 또는 387) 또는 10 μg 의 녹다운 대조군 벡터(pLKO.1-control)와 7.4 μg 의 패키징 벡터(psPAX2)(Addgene, Cambridge, MA, USA) 및 2.6 μg 의 엔벨로프 벡터(pMD2.G)(Addgene)의 공동 형질 감염에 의해 HEK293T 세포에서 생성되었다. EphA10 녹다운 렌티 바이러스로 감염된 췌장암 세포를 14 일 동안 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신 포함 배지에서 배양하여 푸로마이신-내성 EphA10-녹다운 세포들을 혼합 배양하였다.
- [94] 세포 증식 분석은 세포(0.1 ml, 3×10^4 세포/ml)를 평평한 바닥의 96-웰 세포 배양 플레이트(SPL, Pocheon, Korea)에 10% FBS가 보충된 DMEM을 가하여 1 내지 3 일 동안 배양하였다. 살아있는 세포의 수를 측정하기 위해, 세포를 인산 완충 식염수(PBS; 8.06 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.6 mM KCl; pH 7.4)로 세척하고 0.5 mg/ml MTT를 함유하는 0.1 ml DMEM을 가하여 4 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, 세포를 PBS로 세척하고 0.1 ml DMSO로 가용화시켰다. SpectraMax M3 마이크로 플레이트 리더(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [95] 세포 접착 분석은, 분리된 세포 현탁액(1×10^4 세포/0.1 ml)을 랫트 꼬리 I 형 콜라겐 (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)으로 코팅된 96-웰 플레이트에 로딩하고 90분 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 PBS 중 3.7% 파라 포르름 알데히드로 고정시키고 0.005% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 염색된 세포를 1% SDS로 용해시키고, 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [96] 화학 주성(chemotactic) 이동 분석은, 하부 표면을 10 μ l의 0.1% 젤라틴으로 미리 코팅한 트랜스 웰(Corning, Tewksbury, MA, USA)에 분리된 세포 현탁액(1×10^5 세포/0.2 ml)을 트랜스 웰의 상부 구획에 로딩하였다. 각 웰의 하부 구획에는 화학 유인 물질로서 10% FBS가 있는 0.6 ml DMEM을 충전하였다. 챔버를 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 트랜스 웰의 하부 표면으로 이동한 세포를 PBS 중 3.7% 파라포름 알데히드로 15 분 동안 고정시키고 0.005% 크리스탈 바이올렛으로 5 분 동안 염색하였다. 면봉으로 트랜스 웰의 상부 표면에 남아 있는 세포를 제거한 후, 하부 표면에 염색된 세포를 1% SDS로 가용화하고 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [97] 그 결과, EphA10 shRNA를 암호화하는 렌티 바이러스(EphA10 shRNA)를 감염시켜 배양한 췌장암 MIA PaCa-2 및 AsPC-1 세포에서 EphA10이 녹다운되었다(EphA10-KD-341 및 -387). EphA10-KD-341 및 -387에 의한 EphA10 녹다운은 MIA PaCa-2 세포에서의 EphA10 발현을 각각 30% 및 10%, 및 AsPC-1 세포에서 각각 20% 및 5%로 감소시켰다 (도 2A 및 B). EphA10-KD-341 및 -387에 의한 EphA10 녹다운은 배양 3 일째의 대조군 벡터와 비교하여 MIA PaCa-2 세포에서 세포 증식을 각각 78% 및 56%로 그리고 AsPC-1 세포에서 75% 및 65%로 감소시켰다(도 2C 및 D). 또한, EphA10 녹다운은 콜라겐으로 코팅된 표면에 대한 세포 접착성을 대조군 세포와 비교하여 MIA PaCa-2 세포에서 67-78%로 그리고 AsPC-1 세포에서 70-80%로 감소시켰다(도 2E, F). 대조군 벡터와 비교하여, EphA10 녹다운은 젤라틴으로 코팅된 보이든 챔버를 사용하여 측정된 세포 이동을 MIA PaCa-2 세포에서 70-81%로 그리고 AsPC-1 세포에서 55-81%로 감소시켰다(도 2G 및 H). 따라서, EphA10 녹다운은 MIA PaCa-2 및 AsPC-1 세포의 증식, 이동 및 접착을 감소시켜 췌장암 세포의 종양원성 잠재력을 실질적으로 감소시켰다.
- [98]
- [99] [실시예 3]
- [100] 췌장암 세포에서 증식, 이동 및 접착에 EphA10의 과발현의 영향
- [101] EphA10 녹다운은 췌장암 세포의 발암성 표현형을 손상시키는 것으로 밝혀졌기 때문에, 췌장암 세포(MIA PaCa-2 세포)의 발암 특성에 대한 EphA10 상향 조절의 영향을 조사하기 위해 인간 EphA10 폴리펩티드를 과발현하는 췌장암종 세포를 구축하고자 하였다.
- [102] EphA10를 발현하는 포유 동물 발현 벡터를 구축하기 위해, EphA10 폴리펩티드를 코딩하는 EphA10 cDNA 및 C-말단 FLAG-태그를 PCR에 의해 증폭시켰다. 유방암 MDA-MB-436 세포의 올리고(dT)15-프라임 cDNA 혼합물을 주형으로 사용하고 PrimeSTAR GXL DNA 중합 효소(TaKaRa, Kusatsu, Japan)를 사용하여 DNA 생성물을 합성하였다. 이에 사용한 상류 프라이머(5'-CCCAAGCTTGCCACCATGGAGACCTGCGCCGG-3', 서열번호 5)는 HindIII부위(밑줄) 및 EphA10 cDNA의 시작 코돈(굵게) 주위에 있는 20 개의

뉴클레오티드(NM_001099439.1의 84-103)를 포함한다. 하류 프라이머(5'-CCGCTCGAGTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCACCTGCA CCCCCGGGGCCC-3', 서열번호 6)는 EphA10 cDNA의 정지 코돈 앞의 19 개 뉴클레오티드(NM_001099439.1의 3110-3092), FLAG- 태그 코딩 서열(기울기), 종결 코돈(굵게) 및 XhoI 부위(밑줄)를 포함한다. PCR 생성물을 HindIII 및 XhoI 제한효소로 절단시키고, 포유 동물 발현 벡터인 pcDNA3.1의 HindIII 부위 사이에 삽입하였다. 생성물인 pcDNA3.1-EphA10-FLAG는 PCR 오류를 피하기 위해 양방향으로 시퀀싱되었다.

- [103] EphA10 발현을 위한 렌티 바이러스 전달 벡터를 구축하기 위해, 주형으로서 pcDNA3.1-EphA10-FLAG 벡터 및 PrimeSTAR GXL DNA 폴리머라제를 사용하여 EphA10-FLAG-코딩 서열을 포함하는 DNA 단편을 PCR에 의해 증폭시켰다. 상류 프라이머(5'-GATCTCGACGCGGCCGCTACGACTCACTATAGGGAGACCCAAG CT-3', 서열번호 7)는 pHRST-IRES-eGFP (nt. 2839-2855)에서 NotI 부위(밑줄)를 포함하는 17 개 뉴클레오티드 및 pcDNA3.1 (nt. 866-893; 기울기)의 28 개 뉴클레오티드를 포함한다. 하류 프라이머(5'-GGGCGGAATTGGATCCGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAG-3', 서열번호 8)는 pHRST-IRES-eGFP (nt. 2871-2856)에서 BamHI 부위(밑줄)를 포함하는 16개 뉴클레오타이드 및 pcDNA3.1의 24 개 뉴클레오티드(nt. 1037-1014; 기울기)를 포함한다. PCR 생성물을 In-fusion HD 클로닝 키트(Takara)를 사용하여 pHRST-IRES-eGFP 벡터의 NotI 및 BamHI 부위에 결합시켰다. 생성물인 pHRST-EphA10-FLAG-IRES-eGFP는 PCR 오류를 피하기 위해 양방향으로 시퀀싱되었다.

- [104] EphA10 발현 렌티 바이러스는 13 μ g의 EphA10 과발현 벡터(pHRST-EphA10-FLAG-IRES-eGFP) 또는 10 μ g의 과발현 제어 벡터(pHRST-IRES-eGFP)와 7.4 μ g의 패키징 벡터(psPAX2)(Addgene, Cambridge, MA, USA) 및 2.6 μ g의 엔벨로프 벡터(pMD2.G)(Addgene)의 공동 형질 감염에 의해 HEK293T 세포에서 생성되었다. EphA10-과발현 렌티 바이러스로 감염된 체장암 세포를 발암성 분석에 사용하였다.

- [105] 세포의 증식, 접착 및 이동 분석은 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 수행하였다.

- [106] 그 결과, MIA PaCa-2 세포에 EphA10-FLAG 렌티 바이러스의 감염은 EphA10 수준을 200%로 증가시켰다(도 3A). EphA10의 과발현은 대조군 벡터와 비교하여, 배양 1 일 및 2 일에 각각 세포 성장을 152% 및 176%로 증가시켰다(도 3B). 대조군 벡터와 비교하여, EphA10 과발현은 또한 MIA PaCa-2 세포의 접착 및 이동을 각각 148% 및 234% 증가시켰다(도 3C, D). 이들 결과는 EphA10의 녹다운 및 과발현에 따라 체장암 세포의 종양 형성 가능성이 각각 감소 또는 증가하는 효과를 가진다는 것을 증명하며, EphA10이 체장암 세포의 증식, 이동 및 접착을 증가시켜 종양 유전자로 작용한다는 것을 입증한다.

[107]

[108] [실시예 4]

[109] 생체 내 체장암 세포의 종양 형성에 EphA10의 영향

[110] <4-1> 생체 내 체장암 세포의 종양 형성에 EphA10의 과발현 및 녹다운의 영향 분석

[111] 구체적으로, 모의, EphA10-FLAG, EphA10-KD-341, 또는 EphA10-KD-387 MIA PaCa-2 세포를 성장-인자-감소 매트릭셀(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 재현탁시키고 4-5 주령 수컷 면역 결핍 무 흥선 누드(Balb/c nu/nu; Orient Bio Inc; Gyeonggi, Republic of Korea) 마우스의 등에 이식(1×10^6 세포/사이트)하였다. 캘리퍼를 사용하여 매주 종양 부피를 측정하였다(길이×폭×깊이/2). 모든 동물 실험은 국립암센터 실험동물실 운영 지침에 따라 진행되었다.

[112] 그 결과, 이종 이식 후 관찰 기간 동안, 종양 부피는 모의 대조군과 비교하여 EphA10 과발현에 의해 유의하게 증가하고 EphA10 녹다운에 의해 유의적으로 감소하였다(도 4A). 이식 6 주 후, 동물을 희생시키고 종양 중량을 기록하였다. 종양 질량의 무게는 모의 대조군과 비교하여 EphA10 과발현 세포를 이식한 종양에서 260%로 증가하였고 EphA10 침묵 세포를 이식한 종양에서 4-36%로 감소되었다(도 4B).

[113]

[114] <4-2> 세포 형태 및 증식 평가

[115] 상기 실시예 <4-1>의 MIA PaCa-2 세포를 이식한 마우스에서 6 주 후 이종 이식 종양을 회수하여 종양 중량을 측정하고 파라핀 조직 블록을 제조하였다. 구체적으로, 종양 조직을 15 시간 동안 10% 중성 완충 포르말린(Sigma-Aldrich)에 고정시키고 HistoCore Pearl 조직 프로세서(Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)에서 70% 에탄올, 95% 에탄올, 100% 에탄올, 자일렌 및 파라핀으로 처리하였다. 종양 조직을 파라핀에 포매하고, 회전식 마이크로톰 마이크로톱 HM355S(Thermo Scientific, Walldorf, Germany)에 의해 4 μ m 섹션으로 절단하고, 실란-코팅된 유리 슬라이드(MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan)에 장착하였다.

[116] 본 발명자들은 종양 섹션에서 EphA10 및 Ki-67에 대한 면역 조직 화학(IHC) 염색과 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 염색을 수행하였다. 면역 조직 화학 염색은 파라핀 제거 및 탈수 후, 조직 섹션을 메탄올 중 3% H₂O₂로 20 분 동안 처리하고 10 분 동안 따뜻한 10mM 시트레이트(citrate) 완충 용액(pH 6)으로 배양했다. PBS로 세척한 후, 섹션을 1 시간 동안 실온에서 습한 챔버에서 1 차 항체(항-EphA10(GeneTex; Hsinchu City, Taiwan), 항-Ki-67(Abcam; Cambridge, UK), 항-MMP-9(Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA))와 함께 배양하였다. 이어서, 섹션을 PBS로 세척하고, 실온에서 15 분 동안 HRP 중합체 접합체와 함께 배양하고, 실온에서 5 분 동안 DAB Chromogen (ScyTek Laboratory, West Logan, USA)으로 염색하였다. 이종 이식편 종양 조직에서 세포

형태를 검출하기 위해, 탈 파라핀한 섹션을 헤마톡실린 및 에오신(H & E)으로 염색하였다.

- [117] 그 결과, EphA10 염색은 모의 대조군과 비교하여 EphA10 수준이 EphA10-FLAG 종양에서 상승되었고 EphA10-KD-341 및 -387 종양에서 감소되었음을 확인하였다(도 5). 중요하게도, 본 발명자들은 증식 마커인 Ki-67 염색이 EphA10-과발현 종양에서 더 강하고 대조군 종양과 비교하여 EphA10-녹다운 종양에서 약하다는 것을 확인하였다(도 5). 이러한 결과는 EphA10이 세포 배양 수준뿐만 아니라 생체 내에서도 췌장암과 관련된 중요한 종양 유전자임을 확인시켜 준다.

[118]

[119] [실시예 5]

[120] MIA PaCa-2 세포에서 침습 증가 및 MMP-9 분비 유도에 EphA10의 연관성

[121] EphA10이 췌장암 세포의 침습성에 관여하는지 여부, EphA10 의존성 세포 침습에 젤라틴 용해성 효소가 관련되는지 여부 및 EphA10-매개 젤라틴 분해에 관여하는 젤라티나제를 분석하기 위해, EphA10을 과발현 또는 녹다운시킨 MIA PaCa-2 세포에서 화학 주성 침습 분석 및 형광 젤라틴 분해 분석을 수행하였다.

[122] 화학 주성(chemotactic) 침습 분석은 트랜스 웰의 상부 표면에 25 μ g의 성장 인자-감소된 매트릭스 젤(Corning)을 코팅하고 48 시간 동안 배양한다는 점을 제외하고, 상기 <실시예 2>의 화학 주성 이동 분석과 동일하게 수행하였다.

[123] 형광 젤라틴 분해 분석을 위하여, 산-세척된 유리 커버 슬립을 37 °C에서 2 시간 동안 20 μ g/ml FITC-젤라틴으로 코팅하였다. 커버 슬립을 PBS로 세척하고, 0.5% 글루타르알데히드로 15 분 동안 가교시킨 다음, 25 °C에서 3 분 동안 5 mg/ml 소듐 보로하이드라이드로 퀸칭(quenching)하였다. 커버 슬립을 24-웰 플레이트에 놓고, PBS로 세척하고, 37 °C에서 1 시간 동안 5% FBS가 포함된 DMEM에서 배양하였다. 분리된 세포(4×10⁴ 세포 / 0.5 ml)를 24-웰 플레이트에 로딩하고 37 °C에서 48 시간 동안 배양하였다. 커버 슬립상의 세포를 3.7% 파라포름 알데히드를 포함하는 PBS로 고정시키고 0.5% Triton X-100으로 투과시켰다. 액틴 필라멘트 및 핵은 각각 로다민-팔로이딘(500 ng/ml) 및 DAPI (250 ng/ml)로 염색하였다. 면역 형광 염색은 Axio 형광 현미경(Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다. FITC-젤라틴이 분해된 영역을 ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 측정하고, 젤라틴 분해의 정량화를 위해 DAPI 강도로 정규화하였다.

[124] 젤라틴 지모그래피(zymography)를 수행하기 위하여, 충만 상태로 배양된 세포를 무 혈청 배지에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 배지를 2,000 g에서 5 분 동안 원심분리하여 수집하고, 상층액에 차가운 트리클로로 아세트산(TCA; Sigma-Aldrich)을 가하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 0.1% 젤라틴을 함유하는 7.5% SDS 겔에 로딩하였다. 전기영동 후, 겔을 리폴딩 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2.5% Triton X-100)에서 1 시간 동안 실온에서

배양한 후, 반응 버퍼(50mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM CaCl₂)에서 37 °C에서 16 시간 동안 배양 하였다. 이어서, 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 염색하였다.

- [125] 그 결과, EphA10의 과다 발현은 MIA PaCa-2 세포의 침습을 대조군의 306%로 유의하게 증가시켰다; 반면, EphA10의 녹다운은 침습을 대조군의 71-81%로 현저히 감소시켰다(도 6A). 또한, EphA10 과발현은 FITC-표지된 젤라틴의 분해를 대조군의 171%로 증가시켰고, EphA10 녹다운은 젤라틴 분해를 대조군의 23-53%로 감소시켰다(도 6B). EphA10-매개 젤라틴 분해에 관여하는 젤라티나제를 확인하기 위해, EphA10을 과발현 또는 녹다운시킨 MIA PaCa-2 세포의 배양 배지를 수득하여 젤라틴 지모그래피로 분석하였다. MMP-9 분비는 EphA10 과발현에 의해 유의하게 증가하고 EphA10 녹다운에 의해 감소된 반면, MMP-2 분비는 MIA PaCa-2 세포의 배양 배지에서 검출되지 않았다(도 6C). 더욱이, MIA PaCa-2 이종 이식편 종양의 IHC 분석에서 MMP-9 염색이 모의 대조군보다 EphA10-과발현 이종 이식 종양에서 더 강하고 EphA10-녹다운 이종 이식 종양에서 약하다는 것을 밝혀냈다(도 5). 이 결과는 EphA10이 MIA PaCa-2 세포의 침습을 향상시키며, MMP-9 발현 유도가 침습에 관여한다는 것을 입증한다.

[126]

[127] [실시예 6]

[128] 세포의 발암 관련 신호 전달 단백질의 활성화에 **EphA10**의 역할

[129] 발암 표현형의 중요 지표인 세포 증식, 생존, 이동, 접착 및 침습에는 MAP 키나제, PI3-키나제/AKT 및 FAK 경로를 포함한 다양한 신호 전달 경로의 활성화를 동반한다. 또한, MMP-9 발현의 전사 활성화는 전사 인자 NF- κ 및 AP-1의 활성화가 필요하며, NF- κ ERK 및 JNK의 인산화에 의해 쉽게 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 EphA10이 과발현 또는 침묵된 MIA PaCa-2 세포에서 상기 신호 단백질의 인산화를 조사 하였다. 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)의 항-포스포-ERK, 항-NF- κ p65, 항-FAK 및 항- β 액틴; Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)의 항-포스포-AKT(Ser473), 항-AKT, 항-포스포-JNK, 항-JNK 및 항-포스포-NF- κ p65(Ser536); Merck Millipore(Burlington, MA, USA)의 항-포스포-티로신(클론 4G10) 및 항-포스포-FAK(Tyr397); Bioss (Boston, MA, USA)의 항-ERK2; 및 KOMA Biotech(Seoul, Korea)의 겨자 과산화효소-접합 염소 항-마우스 IgG 및 토끼 IgG이다.

[130] 그 결과, 세포 단백질들의 티로신 잔기의 총 인산화 수준과 ERK, JNK, AKT, FAK 및 NF- κ 의 인산화 수준은 EphA10 과발현에 의해 명확하게 증가하고 EphA10 녹다운에 의해 감소되었다(도 7). 이는 EphA10이 세포 증식, 생존, 이동, 접착 및 침입에 대한 신호 전달 경로를 활성화시켜 췌장암 등 EphA10 양성 세포의 종양 형성을 증가시킴을 의미한다.

[131]

[132] **[통계 분석]**

[133] 통계 분석은 공개 데이터베이스 분석을 위해 Graphpad Prism 5(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하고 다른 모든 분석을 위해서는 Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행했다. 스튜던트 t-검정을 사용하여 통계적 유의성을 분석하였다. 모든 시험에서, 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[134]

산업상 이용가능성

[135] EphA10은 채장암 세포의 종양 형성 가능성과 양성적으로 관련이 있으므로 채장암 진단에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 EphA10 억제제를 포함하는 조성물의 경우 채장암 세포의 증식, 이동, 접착 또는 침습을 유의적으로 감소시킬 수 있어 채장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 효과적으로 활용될 수 있어 산업상 이용가능성이 크다.

[136]

서열목록 Free Text

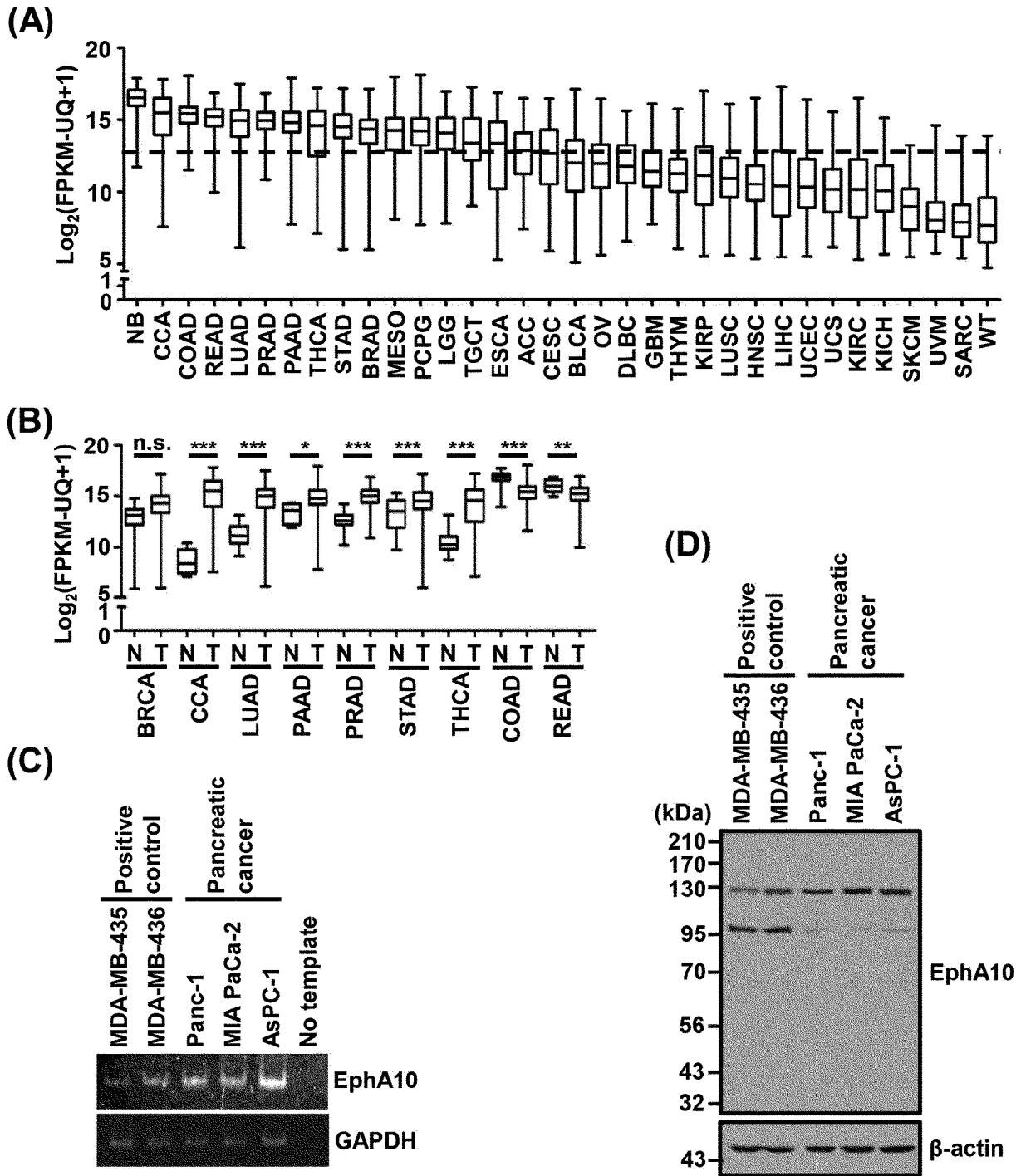
- [137] 서열번호 1 은 인간 EphA10 cDNA에 대한 정방향 프라이머 서열을 나타낸다.
[138] 서열번호 2 는 인간 EphA10 cDNA에 대한 역방향 프라이머 서열을 나타낸다.
[139] 서열번호 3 은 인간 GAPDH cDNA에 대한 정방향 프라이머 서열을 나타낸다.
[140] 서열번호 4 는 인간 GAPDH cDNA에 대한 역방향 프라이머 서열을 나타낸다.
[141] 서열번호 5 는 발현 벡터의 상류 프라이머 서열을 나타낸다.
[142] 서열번호 6 은 발현 벡터의 하류 프라이머 서열을 나타낸다.
[143] 서열번호 7 은 발현 벡터의 상류 프라이머 서열을 나타낸다.
[144] 서열번호 8 은 발현 벡터의 하류 프라이머 서열을 나타낸다.

청구범위

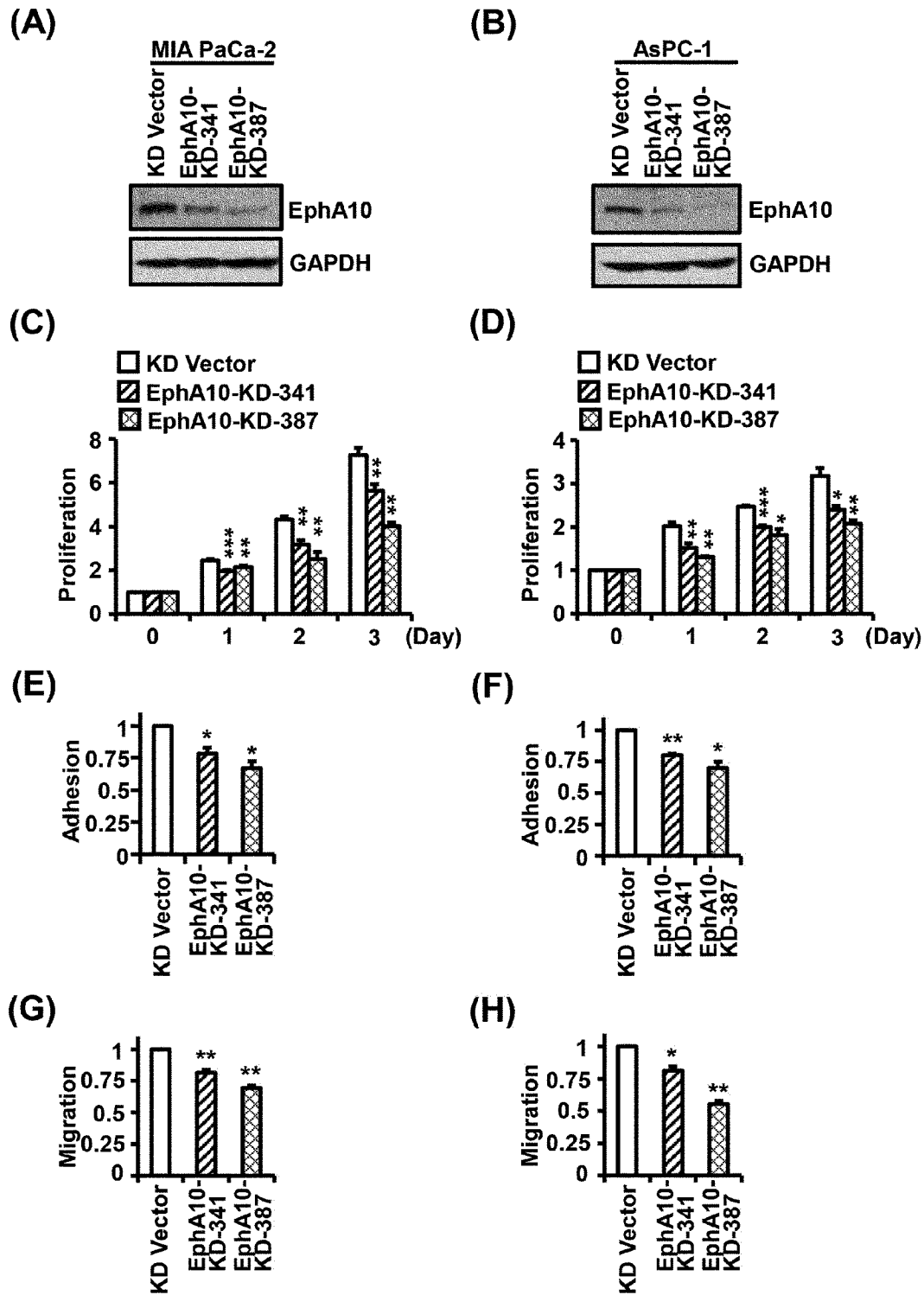
- [청구항 1] EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 EphA10 억제제는 EphA10의 발현 또는 기능 억제제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 EphA10의 발현 억제제는 EphA10을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, siRNA 및 shRNA 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 EphA10의 기능 억제제는 EphA10 폴리펩티드에 특이적을 결합하여 암화 기능을 억제하는 EphA10 폴리펩티드의 중화항체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 담관암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 위암 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 암은 침습성 암(invasive carcinoma)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 7] EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10)을 검출하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물.
- [청구항 8] 제7항의 조성물을 포함하는 암 진단용 키트.
- [청구항 9] 개체로부터 분리된 시료에서 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 10] 암 환자에 EphA10(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A10) 억제제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 EphA10 억제제는 EphA10의 발현 또는 기능 억제제인 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 EphA10의 발현 억제제는 EphA10을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, siRNA 및 shRNA 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 EphA10의 기능 억제제는 EphA10 폴리펩티드에 특이적을 결합하여 암화 기능을 억제하는 EphA10 폴리펩티드의 중화항체인 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료방법.
- [청구항 14] 제10항에 있어서, 상기 암은 유방암, 담관암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 위암 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을

특징으로 하는 예방 또는 치료방법.
[청구항 15] 제10항에 있어서, 상기 암은 침습성 암(invasive carcinoma)인 것을
특징으로 하는 예방 또는 치료방법.

[도 1]

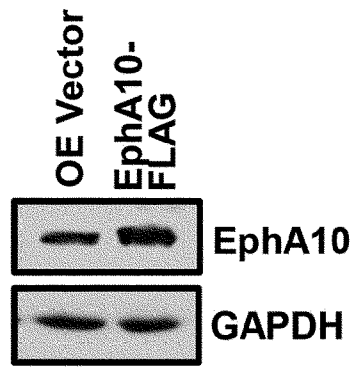


[도2]

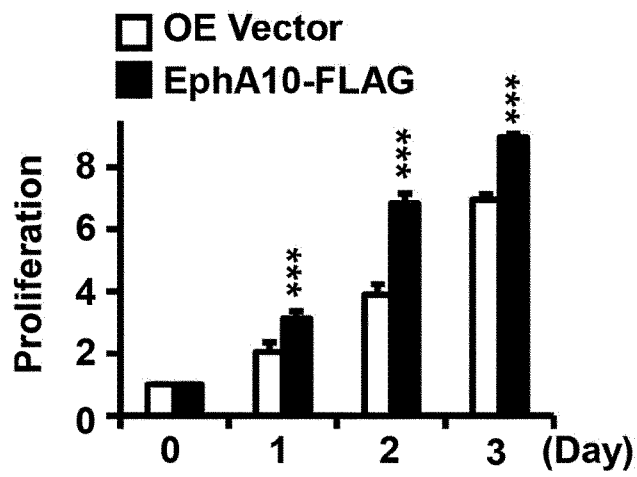


[도3]

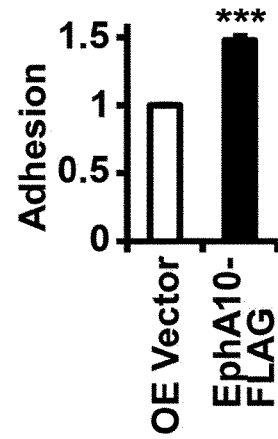
(A)



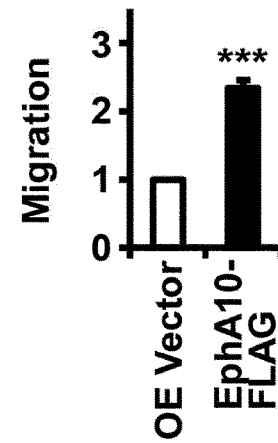
(B)



(C)

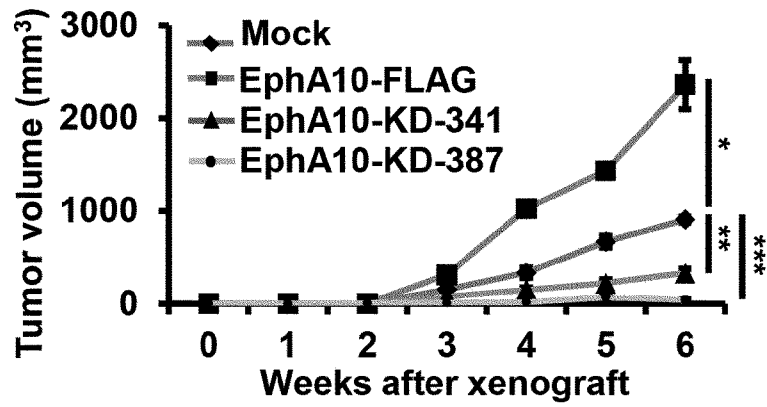


(D)

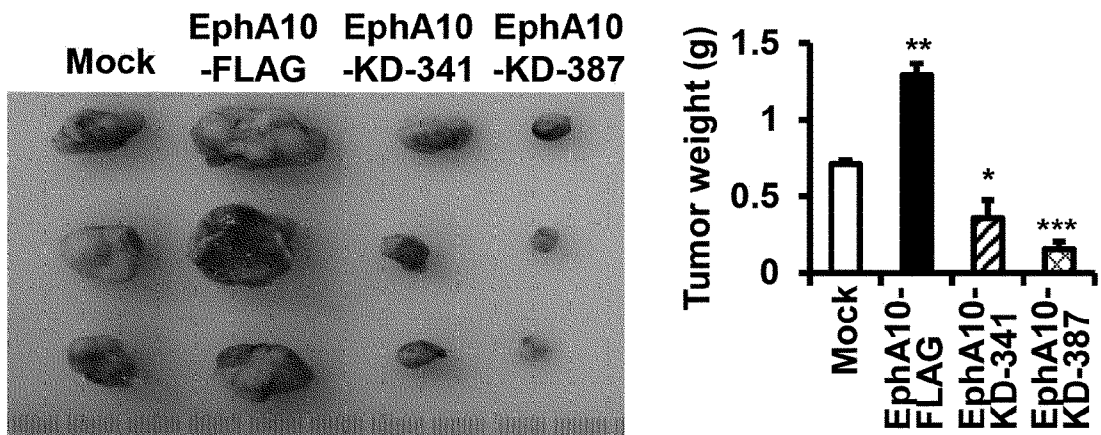


[도4]

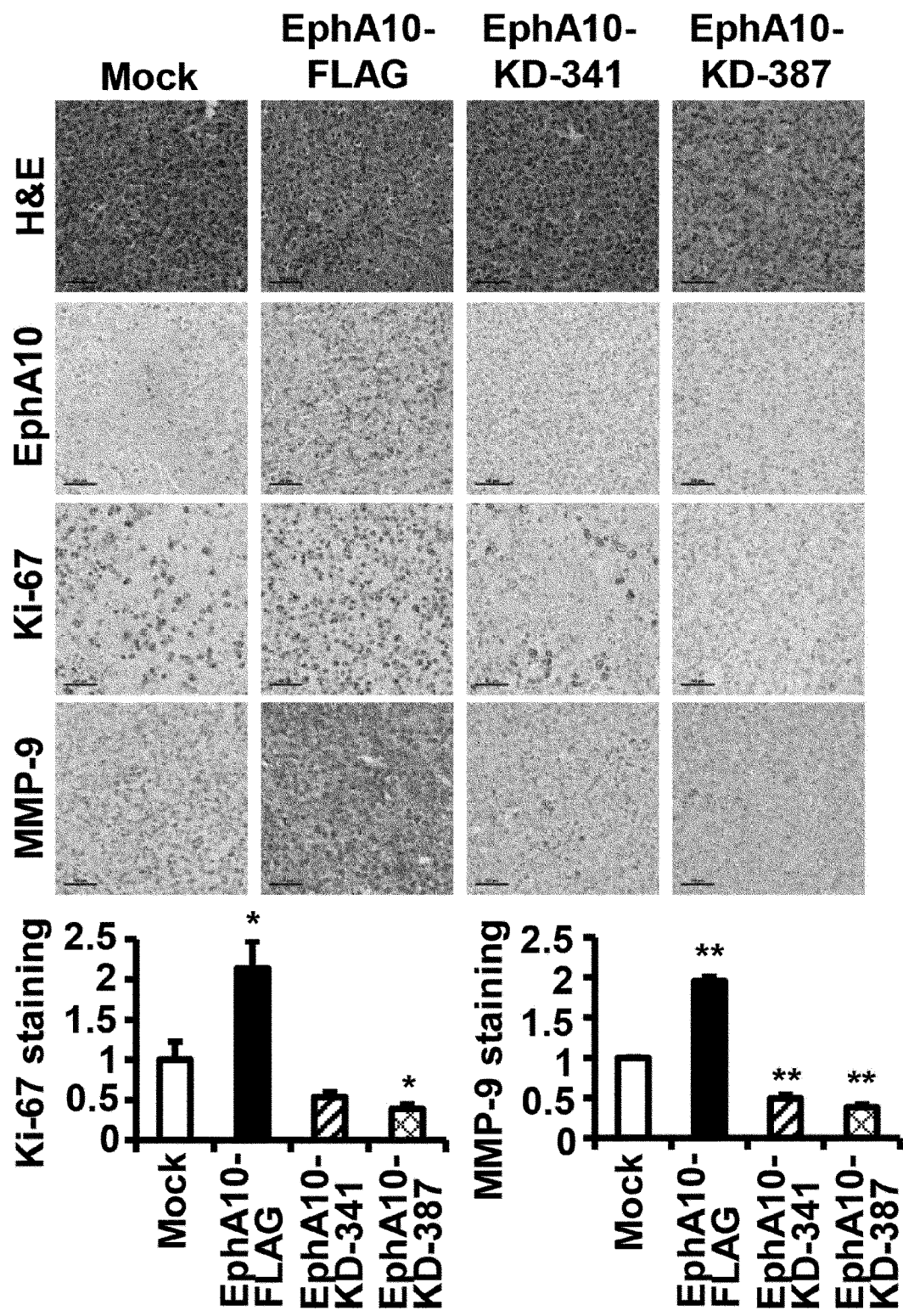
(A)



(B)

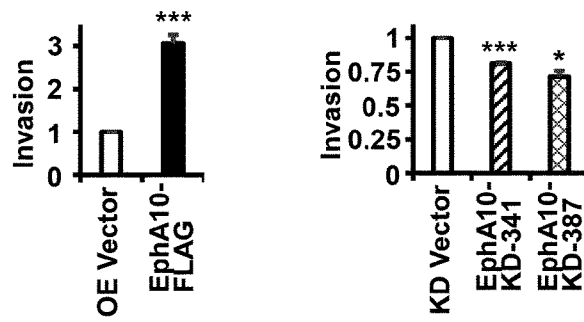


[도5]

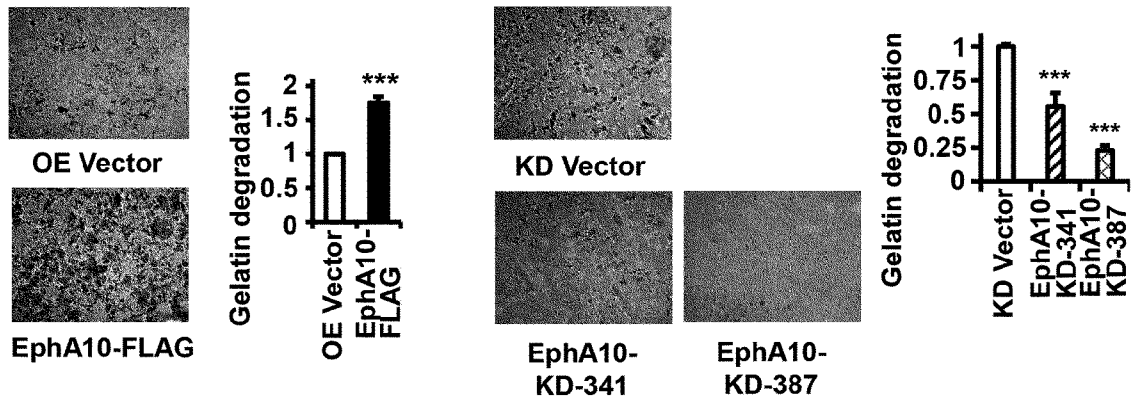


[도6]

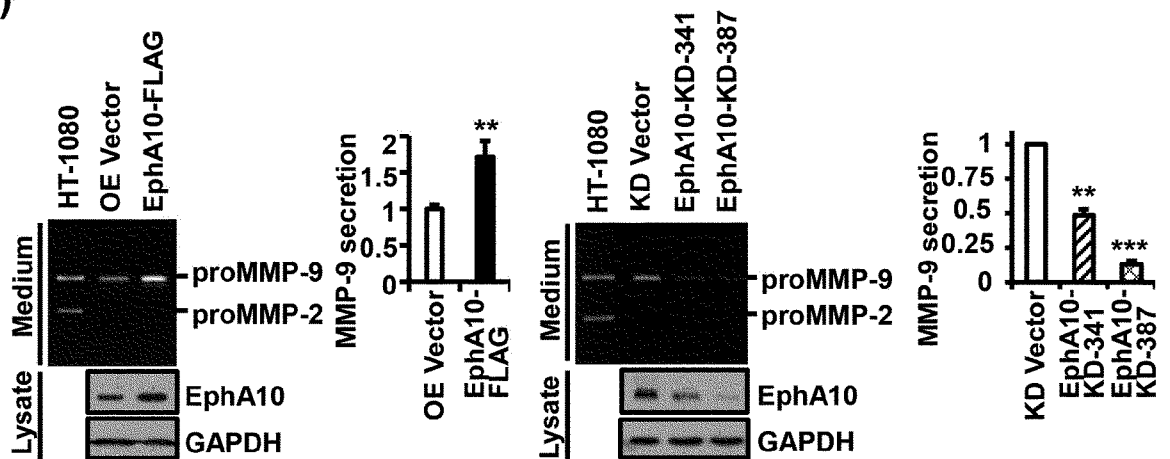
(A)



(B)

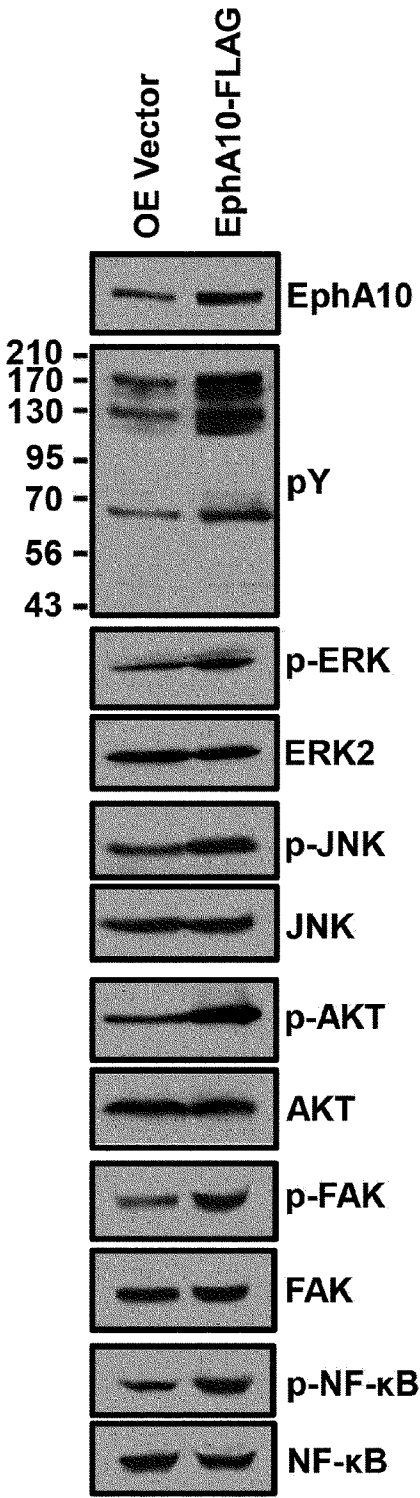


(C)

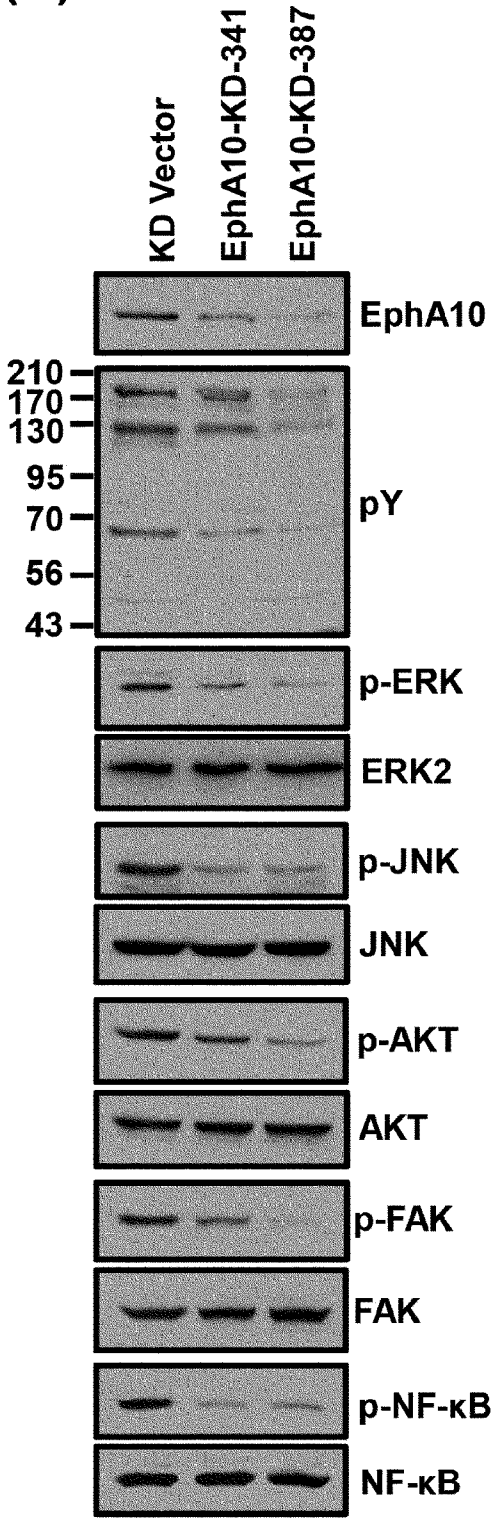


[도7]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/004180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61K 31/713**(2006.01)i; **A61K 39/395**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i;
G01N 33/68(2006.01)i; **G01N 33/574**(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); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/13(2016.01); C07K 16/28(2006.01); C12Q 1/68(2006.01);
G01N 33/574(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: EphA10, 억제제(inhibitor), 항체(antibody), 발현(expression), 기능(function), 암(cancer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-047083 A1 (OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD.) 21 April 2011 (2011-04-21) See abstract; claims 1, 16 and 17; and paragraphs [0001], [0324], [0325], [0352], [0353], [0365] and [0350].	1-9
X	JP 2010-216826 A (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUNDATION) 30 September 2010 (2010-09-30) See claims 1-8; example 3; and figure 5.	1-9
A	KR 10-2017-0071724 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 26 June 2017 (2017-06-26) See entire document.	1-9
A	NAGANO, K. et al. Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2014, vol. 450, pp. 545-549. See entire document.	1-9
A	KR 10-2060728 B1 (THE ASAN FOUNDATION et al.) 30 December 2019 (2019-12-30) See entire document.	1-9



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

19 July 2021

Date of mailing of the international search report

19 July 2021

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/KR2021/004180

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/004180

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10-15 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/004180

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2011-047083	A1	21 April 2011	EP	2470569	A1	04 July 2012
				US	2012-0231004	A1	13 September 2012
JP	2010-216826	A	30 September 2010	None			
KR	10-2017-0071724	A	26 June 2017	None			
KR	10-2060728	B1	30 December 2019	AU	2015-384339	A1	12 October 2017
				AU	2015-384339	B2	09 August 2018
				BR	112017018329	A2	07 August 2018
				CA	2977939	A1	01 September 2016
				CA	2977939	C	29 December 2020
				CN	107530446	A	02 January 2018
				CN	107530446	B	05 March 2021
				EP	3263134	A1	03 January 2018
				EP	3263134	B1	05 May 2021
				JP	2018-507912	A	22 March 2018
				JP	6467583	B2	13 February 2019
				KR	10-2017-0123665	A	08 November 2017
				MX	2017010958	A	14 March 2018
				NZ	735710	A	22 February 2019
				RU	2680527	C1	22 February 2019
				SG	11201707008	A	28 September 2017
				WO	2016-137037	A1	01 September 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/13(2016.01); C07K 16/28(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/574(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: EphA10, 억제제(inhibitor), 항체(antibody), 발현(expression), 기능(function), 암(cancer)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2011-047083 A1 (OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD.) 2011.04.21 요약; 청구항 1, 16, 17; 및 단락 [001], [0324], [0325], [0352], [0353], [0365], [0350]	1-9
X	JP 2010-216826 A (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUNDATION) 2010.09.30 청구항 1-8; 실시예 3; 및 도면 5	1-9
A	KR 10-2017-0071724 A (연세대학교 산학협력단) 2017.06.26 전체 문헌	1-9
A	NAGANO, K. 등, 'Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy', Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 450권, 페이지 545-549 전체 문헌	1-9
A	KR 10-2060728 B1 (재단법인 아산사회복지재단 등) 2019.12.30 전체 문헌	1-9
☐ 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 2021년07월19일(19.07.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년07월19일(19.07.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 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. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

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

1. ☒ 청구항: **10-15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10-15는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-047083 A1	2011/04/21	EP 2470569 A1	2012/07/04
		US 2012-0231004 A1	2012/09/13
JP 2010-216826 A	2010/09/30	없음	
KR 10-2017-0071724 A	2017/06/26	없음	
KR 10-2060728 B1	2019/12/30	AU 2015-384339 A1	2017/10/12
		AU 2015-384339 B2	2018/08/09
		BR 112017018329 A2	2018/08/07
		CA 2977939 A1	2016/09/01
		CA 2977939 C	2020/12/29
		CN 107530446 A	2018/01/02
		CN 107530446 B	2021/03/05
		EP 3263134 A1	2018/01/03
		EP 3263134 B1	2021/05/05
		JP 2018-507912 A	2018/03/22
		JP 6467583 B2	2019/02/13
		KR 10-2017-0123665 A	2017/11/08
		MX 2017010958 A	2018/03/14
		NZ 735710 A	2019/02/22
		RU 2680527 C1	2019/02/22
		SG 11201707008 A	2017/09/28
		WO 2016-137037 A1	2016/09/01