(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 2 월 5 일 (05.02.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/016475 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/004822

(22) 국제출원일: 2014 년 5 월 30 일 (30.05.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0090748 2013 년 7 월 31 일 (31.07.2013) KR

(71) 출원인: **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-713 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **김찬화 (KIM, Chan Wha)**; 140-744 서울시 용산구 이촌로 87 길 21 103-402, Seoul (KR). **정제시카윤선 (JUNG, Jessica Yoonsun)**; 132-773 서울시 도봉구 해등로 195 101 동 1509 호, Seoul (KR). **한기연 (HAN, Gi-Yeon)**; 403-775 인천시 부평구 경원대로 1269 102 동 1301 호, Incheon (KR).

(74) 대리인: **특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 135-936 서울시 강남구 역삼로 3 길 11 광성빌딩 신관 5 층, Seoul (KR).

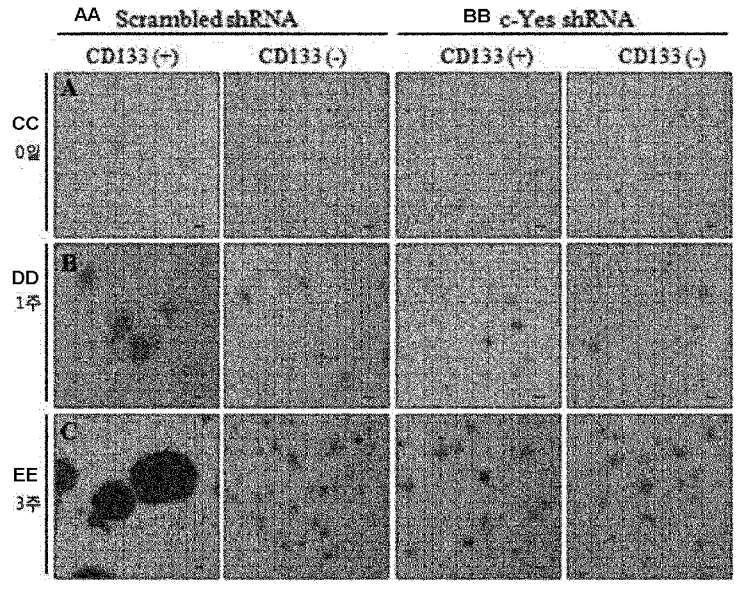
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL USE OF C-YES FOR DIFFERENTIATION THERAPY OF CANCER STEM CELLS

(54) 발명의 명칭 : 암 줄기세포의 분화치료를 위한 c-Yes 의 약제학적 용도



AA ... Scrambled shRNA
BB ... c-Yes shRNA
CC ... Day 0
DD ... Week 1
EE ... Week 3

(57) **Abstract**: The present invention relates to the pharmaceutical use of c-Yes for differentiation therapy of cancer stem cells. More specifically, c-Yes has a remarkably high expression amount in CD133-positive cancer stem cells when compared with CD133-negative cancer stem cells, promotes the differentiation of cancer stem cells upon depletion of the c-Yes, and suppresses the proliferation of cancer stem cells so as to suppress resistance to chemotherapy or radiation therapy, or recurrence of cancer, thereby preventing or treating CD133-positive cancer.

(57) **요약서**: 본 발명은 암 줄기세포의 분화치료를 위한 c-Yes 의 약제학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는, c-Yes 는 CD133 음성 암 줄기세포 대비 CD133 양성 암 줄기세포에서 발현 양이 현저히 높고, c-Yes 고갈 시 암 줄기세포의 암세포로의 분화를 촉진하고, 암 줄기세포의 증식을 억제하여 항암약물치료 또는 방사선 치료에 대한 내성 또는 재발을 억제하여 CD133 양성 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

WO 2015/016475 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 암 줄기세포의 분화치료를 위한 c-Yes의 약제학적 용도

기술분야

[1] 본 발명은 암 줄기세포의 줄기세포성을 줄이는 c-Yes 고갈을 이용한 암 줄기세포의 분화치료에 관한 것이다.

배경기술

[2] 대장암은 선진국의 주요 사망원인 중 하나이다. 최근의 연구에서 종양형성의 개시와 재발, 전이를 일으키는 종양세포 일부가 존재하고 있음이 밝혀지고 있다. 이 세포들은 정상 줄기세포와 유사한 형질이 있어 암 줄기세포 (cancer stem cell, (CSCs)) 라고 불린다.

[3] 암 줄기세포는 전이를 촉진하는 한편, 종양 형성을 유지하고 개시할 수 있는 좀 더 큰 능력이 있는 종양세포의 작은 부분이다. 그들은 정상 줄기세포와 다른 특성들, 예컨대 발암성, 약물 내성, 긴 수명, 다능성 (pluripotency), 자기-복제 (renewal) 등의 특성이 있는 것으로 알려져 있다. CSCs는 독특한 표현형과 종양을 유발하고 유지하도록 하는 기능적인 특징들이 있다.

[4] 단일 마커, CD133 (prominin 1)은 뇌암, 대장암, 조혈모 줄기, 내피 전구 세포, 아교 모세포종, 신경 세포 및 교세포 줄기 세포, 각종 소아 뇌종양 또는 췌장암 등에서 나타나는 막투과 당단백질 (trans membrane glycoprotein)의 일종으로 발암성 종양줄기세포의 지표로서 사용되고 있다. 이들 당 단백질은 Src-패밀리 키나아제 (Src-family kinsases)에 의해 인산화되어 있는 것으로 보인다. 다수의 증거에서, CD133 세포의 비 (ratio)는 종양의 공격성 (tumor aggressiveness), 전이 및 뿐만 아니라 화학요법과 방사선요법에 대한 그들의 내성과 관계가 있음을 시사하고 있다.

[5] CSCs는 표준 항암치료에 대해 상당한 내성이 있기 때문에, 문제의 원인을 차단하기 위해 이들 세포를 표적화하는 것은 새로운 패러다임인 것 같다.

[6] 원암성 유전자 (proto-oncogene)인 c-Yes (v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1)는 다양한 신호전달경로에 관여하는 중요한 비-수용체 티로신 키나아제 (non-receptor tyrosine kinase)인 Src-패밀리 키나아제의 서브 패밀리이다. Src-패밀리 키나아제는 티로신 잔기를 인산화하여 다양한 신호전달 기전을 유도하며, c-Yes를 포함하여 Src 패밀리 키나아제는 대장암에서 활성화되어 종양의 발병과 진행에 영향을 준다. 정상 줄기세포에서는 자기-복제를 제어하는 것으로 알려져 있다. 사람의 암에서 바이러스 상동체와 더불어 c-Yes의 잦은 활성화는 그들이 악성 표현형을 개시 또는 진행하는데 관여함을 시사한다. 또한, c-Yes는 정상세포 대비 암세포에서 상향조절되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명의 목적은 c-Yes의 암 줄기세포의 증식 또는 분화 조절에서의 역할을 규명함으로써, 암 줄기세포의 분화치료를 위한 약제학적 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 분열 또는 분화 조절제로, c-Yes 또는 이의 저해제를 포함하는 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물을 제공한다.

[9] 본 발명은 또한 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 인간의 암세포 시료에 있는 c-Yes의 발현 수준을 측정하여 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[10] 본 발명은 또한 c-Yes 저해제를 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[11] 본 발명은 또한 c-Yes 유전자를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 촉진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[12] 본 발명은 또한 c-Yes 단백질을 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[13] 본 발명에 따르면, c-Yes는 CD133 음성 암 줄기세포 대비 CD133 양성 암 줄기세포에서 발현 양이 현저히 높고, c-Yes 고갈 시 암 줄기세포의 암세포로의 분화를 촉진하고, 암 줄기세포의 증식을 억제하여 줄기세포로서의 특성을 상실함으로써 항암약물치료 또는 방사선 치료에 대한 내성 또는 재발을 억제하여 CD133 양성 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1 및 2는 암 줄기세포가 포함된 암세포의 치료 전략을 도시한 것이다.

[15] 도 3은 무작위적인 서열의 shRNA (scrambled shRNA) 또는 c-Yes shRNA 중 어느 하나로 트랜스펙션된 $CD133^+$ 대장암세포 또는 $CD133^-$ 대장암세포의 세포 배양 중 나타나는 형태적 변화를 도시한 사진도이다.

[16] 도 4는 무작위적인 서열의 shRNA 또는 c-Yes shRNA 중 어느 하나로 트랜스펙션된 $CD133^+$ 대장암세포 또는 $CD133^-$ 대장암세포에서 형성된 400㎛ 이상의 종양 구의 수를 측정한 결과이다.

[17] 도 5는 무작위적인 서열의 shRNA 또는 c-Yes shRNA 중 어느 하나로

트랜스펙션된 CD133+ 대장암세포 또는 CD133- 대장암세포에서 암 줄기세포 및 암세포 마커들의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과이다.

[18] 도 6은 무작위적인 서열의 shRNA 또는 c-Yes shRNA 중 어느 하나로 트랜스펙션된 CD133+ 대장암세포 또는 CD133- 대장암세포의 시간별 세포 생존능 실험 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[19] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[20] 일반적으로 암세포는 암 줄기세포를 포함하고 있고 암 줄기세포는 표준 항암치료, 예컨대, 항암약물치료 (화학요법) 또는 방사선치료 (방사선요법)에 대한 내성이 강하여 암세포의 사멸에도 암 줄기세포는 살아남아 증식을 통해 암 재발의 원인이 된다 (도 1 및 2 참조). 따라서, 본 발명자들은 항암 치료 시 재발의 원인이 되는 암 줄기세포를 대상으로 암 줄기세포의 분화치료를 위한 약물 표적 단백질을 규명하고, 상기 약물 표적 단백질을 억제함으로써 종양 분화를 억제하는 것으로 알려진 표적을 조사하고자 하였다. 이를 위해 암세포 및 암 줄기세포에서 c-Yes의 발현 수준의 차이를 동정하고, c-Yes의 발현을 억제함에 따른 증식 및 분화 유도를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[21] 따라서, 본 발명은 분열 또는 분화 조절제로, c-Yes 또는 이의 저해제를 포함하는 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 양성 줄기세포 단일 마커, CD133를 포함하는 CD133+ 암세포는 분화 조건에서도 암 줄기세포의 증식에 의해 400 ㎛ 이상의 종양 구를 형성한다. 그러나, c-Yes가 고갈된 CD133 양성 암세포에서는 종양 구가 형성되지 않아 암 줄기세포의 증식이 억제됨을 알 수 있다 (도 3 및 4 참조). 또한, 줄기세포성 및 분화된 암세포를 나타내는 마커의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과, CD133+ 세포에서 줄기세포의 특징적인 마커인 CD133, Nanog 및 Oct4는 상향조절되어 있는 반면, 암세포의 특징적인 마커인 CK-20은 CD133- 세포에서 유의적으로 상향조절되어 있다. 또한, c-Yes의 고갈을 통해 CD133+ 세포에서 암세포의 특징적인 마커인 CK-20의 발현이 유도된다 (도 5 참조). 아울러, c-Yes의 고갈은 중앙체 (midbody)를 연장시키고, 증식 더블 타임 (proliferation doubling time)을 증가시킨다 (도 6 참조). 이는 염색체가 분열되는 동안 미세소관 (microtubule)의 탈 통제 (misregulation)에 의한 이수성 (aneuploidy)을 발생시키는 것으로 추측된다. 이것은 c-Yes가 종양의 발암성 (tumorigenic property)을 개시하고 유지하는 데에 중요한 역할을 하는 것을 나타낸다.

[23] 요약하면, c-Yes 유전자 또는 단백질의 억제 (또는 고갈)는 암 줄기세포의 분열을 억제하고 분화를 유도할 수 있다. 반대로 c-Yes의 유전자 발현 증가 또는 단백질의 상향 조절은 암 줄기세포의 분열을 촉진하고, 분화를 억제할 수 있어 암 줄기세포의 분열 또는 분화조절인자임을 알 수 있다.

[24] 따라서, c-Yes 또는 이의 저해제는 암 줄기세포의 분열 또는 분화조절제로 사용할 수 있다.

[25] 본 발명의 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물은 천연형 또는 재조합 c-Yes, 이들과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 c-Yes 단백질, 또는 c-Yes 저해제를 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질에는 천연형/재조합 c-Yes와 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.

[26] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질의 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 C-YES과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.

[27] "기능적 유도체"는 상기 c-Yes 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 c-Yes와 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.

[28] 본 발명의 c-Yes 단백질은 포유동물, 바람직하게는 인간, 생쥐, 랫트, 금화조, 닭, 제브라다니오, 개구리, 큰가시고기 등으로부터 기원하는 단백질이며, 예컨대, GenBank accession no. NP_005424.1, XP_001148240.1, XP_001087926.1, NP_001003239.1, NP_001094530.1, NP_033561.1, NP_150640.1, NP_990632.1, NP_001013288.2 등의 공지된 서열을 갖는 단백질을 말한다.

[29] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명에 사용된 c-Yes는 GenBank accession no. NP_005424.1 등으로부터 당업자에 공지된 유전공학적 방법으로 제조할 수 있다.

[30] 천연형의 c-Yes는 유전자 재조합 방법에 의하여 단백질을 제조하는 경우 대장균(*E. coli*)이나 곤충 세포를 이용하는 것보다 포유동물 세포를 이용하는 경우가 단백질의 활성도나 용해성 측면에서 천연형의 것과 유사할 것으로 여겨진다.

[31] 상기 재조합 c-Yes 단백질은 통상의 컬럼 크로마토그라피 방법 등을 이용하여 분리할 수 있다. 또한 단백질의 정제 정도는 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE))등으로 확인할 수 있다.

[32] 상기 c-Yes의 저해제는 c-Yes 유전자에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이를 포함하는 벡터; 또는, c-Yes 단백질에 특이적인 항체 중 어느 하나일 수 있다.

[33] 본 발명의 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물은 시험관내(*in vitro*)에서 암 줄기세포 배양 시 분열 또는 분화 조절 인자로 첨가될 수 있다. 예컨대, 암 줄기세포의 분열 또는 분화 유도 배양 시 천연형 또는 재조합 c-Yes 또는 이의 저해제를 부가하여 이들의 양적 변화를 통해 줄기세포 분열의 증감을 조절하거나, 암세포의 수를 조절할 수 있다.

[34] 본 발명의 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물은 상기 c-Yes 외에 암 줄기세포의 분화를 유도하는 공지의 분화유도인자를 더 포함할 수 있다. 예컨대,

ciliary neurotrophic factor(CNTF), bone morphogenetic proteins(BMPs), transforming growth factor(TGFα) 또는 neuregulin-1 (Nrg1)/glial growth factor-2(GGF2) 등을 사용할 수 있다.

[35]

[36] 본 발명은 또한 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 인간의 암세포 시료에 있는 c-Yes의 발현 수준을 측정하여 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[37] 상기 용어, "암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암"이란 암 줄기세포의 양성 마커인 CD133을 발현하는 암 종을 말한다. 즉, 암세포 내에 암 줄기세포가 포함되어 있어 항암약물치료 또는 방사선치료 시 내성 및 재발 가능성이 있는 암 종을 말한다. 그러한 예로, 뇌암, 대장암, 또는 췌장암 등이 있다.

[38] 또한, 상기 용어, "암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단 마커"란 $CD133^+$ 암 줄기세포를 $CD133^-$ 암 줄기세포 또는 암세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 암 줄기세포의 양성 마커인 CD133을 발현하는 암이 암세포 또는 $CD133^-$ 암 줄기세포 대비 $CD133^+$ 암 줄기세포에서 고발현 수준을 갖는 c-Yes를 발현하고 있어 c-Yes의 mRNA 발현 수준 또는 c-Yes 단백질의 양을 암 진단 마커로 사용할 수 있다.

[39] 상기 발현 수준은 c-Yes에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드, 예컨대, c-Yes mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 핵산 프로브나, c-Yes 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 측정할 수 있다.

[40] 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건 (즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 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 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 좋다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소연쇄반응 (PCR), 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR), 리가아제 연쇄반응 (LCR), 전자 중재 증폭 (TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭 (NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[41] 상기 핵산 프로브는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄 (linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며,

자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm *et al.*, *Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[42] 상기 c-Yes에 특이적인 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체를 사용할 수 있다.

[43] 상기 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(Zapata *et al., Protein Eng*. 8 (10):1057-1062(1995)); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체 등이 포함된다.

[44] 항체를 파파인 (papain)으로 분해하면 2개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 단일 항원 결합 부위가 있는 각 "Fab" 단편, 및 그 나머지인 "Fc" 단편이 생성된다. 펩신을 처리하면, 2개의 항원 결합 부위가 있으며 여전히 항원에 교차결합할 수 있는 F(ab ')2 단편이 생성된다. Fv는 완전한 항원인식 및 결합 부위를 포함하는 최소한의 항체 단편이다. 이 부위는 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역의 이합체로 구성되며 비공유결합으로 단단히 결합되어 있다.

[45] 폴리클로날 항체의 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 포유동물에 1회 이상 면역화제를 주입, 필요한 경우 면역보강제와 함께 주입하여 제조할 수 있다. 통상, 면역화제 및(또는) 면역보강제는 포유동물에 피하주사 또는 복강내 주사로 수 회 주입된다. 면역화제는 본 발명의 단백질 또는 이의 융합 단백질일 수 있다. 면역화되는 포유동물에 면역원성이 있는 것으로 공지된 단백질과 함께 면역화제를 주사하는 것이 효과적일 수 있다.

[46] 본 발명에 따른 모노클로날 항체는 문헌 (Kohler *et al.,Nature*, 256:495 (1975))에 기재된 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국특허 제4,816,576호 참조)으로 제조할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어, 문헌 (Clackson *et al., Nature*,352:624-628 (1991) 및 Marks *et al., J.*

Mol. Biol., 222:581-597 (1991))에 기재된 기술을 이용하여 파지항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[47] 본 발명에서의 모노클로날 항체는 구체적으로, 목적하는 활성을 발휘한다면 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이 있지만, 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래된 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 또는 그러한 항체의 단편과 동일하거나 상동성이 있는 "키메라" 항체를 포함한다(Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 81:6851-6855 (1984)).

[48] 비-인간 (예를 들어, 쥐과 동물) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')2 또는 항체의 다른 항원 결합 서열) 이다. 대부분의 경우 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기를 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 인간 이외의 종 (공여자 항체)의 CDR 잔기로 치환시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체, 또는 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 일반적으로 둘 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 영역에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 영역에 해당한다. 또한, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간면역글로불린 영역의 일부를 포함한다 (Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)).

[49] 상기 c-Yes의 발현 수준을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.

[50] 상기 생물학적 시료는 CD133 양성 암의 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있다.

[51] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블럿 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[52] 상기 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 상기 c-Yes 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체

복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성양은 검출 라벨 (detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블럿, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[53] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양과 CD133 양성 암 의심환자에서의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현 양의 정도를 대조군과 비교함으로써 CD133 양성 암의 진단 마커를 검출할 수 있다. 즉, c-Yes의 발현 수준이 증가한 경우 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암임을 알 수 있는 것이다.

[54]

[55] 본 발명은 또한 c-Yes 저해제를 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[56] 본 발명에 따르면, c-Yes는 CD133 양성 암 줄기세포에서 상향 조절되어 있고, c-Yes 저해제를 사용할 경우 암 줄기세포에서 c-Yes가 고갈되어 암 줄기세포의 증식이 억제되고, 암세포로의 분화가 촉진된다. 따라서, 본 발명의 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물은 암 줄기세포의 분화치료 (differentiation therapy)에 사용할 수 있다. 즉, c-Yes 저해제 처리 시 암 줄기세포는 약물 내성 및 암 재발 등의 특정 암 줄기세포 특성을 상실하기 때문에 항암약물치료 또는 방사선치료와 병용 사용할 경우 암의 약물 내성 및 재발이 억제되어 치료적 효과를 높일 수 있다.

[57] 상기 c-Yes 저해제는 c-Yes 유전자의 mRNA 발현 또는 이의 단백질의 발현을 감소시키거나, 기능 또는 활성을 감소시키는 제제를 포함할 수 있다.

[58] 상기 c-Yes 단백질 저해제는 c-Yes 단백질과 결합하여 암 줄기세포 내 c-Yes를 고갈하는 펩타이드 또는 화합물 등일 수 있다. 이러한 저해제는 단백질 구조 분석 등의 하기 예시된 스크리닝 방법을 통해 선정될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 설계될 수 있을 것이다.

[59] 또한, 상기 단백질 저해제는 c-Yes 단백질에 대한 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체를 사용할 수 있고, 상기 항체의 정의는 상술한 바와 같다.

[60] 상기 항체를 이용하여 암 줄기세포 내 c-Yes를 고갈시켜 암세포로의 분화를 촉진하고, 암 줄기세포의 증식을 억제함으로써 항암약물치료 또는 방사선치료와 병용 사용할 경우 약물 내성 및 재발을 방지할 수 있어 CD133 양성 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

[61] 본 발명의 c-Yes 단백질의 기능 또는 활성 저해제는 리포솜, 바이러스, 유전자

건(gene gun), 폴리머(polymer), 초음파, 전기충격을 이용해 전달될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[62] 상기 c-Yes 유전자는 이들을 코딩하는 DNA 또는 이로부터 전사되는 mRNA일 수 있다. 따라서, 상기 유전자에 대한 저해제는 유전자 자체에 결합하여 전사를 방해하거나 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여 mRNA의 해독을 방해하는 저해제일 수 있다.

[63] 따라서, 상기 c-Yes 유전자의 저해제는 c-Yes 유전자의 발현을 저해하는 저해제를 모두 포함한다. 예컨대, 이러한 저해제는 상기 유전자에 결합하는 펩타이드, 핵산 또는 화합물 등일 수 있다. 이러한 저해제는 세포 기반 스크리닝 등의 하기 예시된 스크리닝 방법을 통해 선정될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 설계될 수 있을 것이다.

[64] 한 구체예에서, 상기 저해제는 c-Yes 유전자에 대한 상보적인 서열을 포하는 안티센스-올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터일 수 있다. 이러한 안티센스-올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제작할 수 있다.

[65] 본 명세서에서 "siRNA"는 표적 유전자의 mRNA의 절단을 통해 RNA 간섭현상을 유도하는 이중사슬 RNA를 의미하며, 표적 유전자의 mRNA와 같은 서열을 가지는 센스서열의 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 서열의 RNA 가닥으로 구성된다.

[66] 상기 siRNA는 시험관내에서 합성한 siRNA 자체 또는 siRNA를 코딩하는 염기서열을 발현벡터에 삽입하여 발현되는 형태를 포함할 수 있다.

[67] 본 발명에 있어서, 상기 "벡터"는 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 내로 삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[68] 본 발명과 관련된 벡터는 상기 유전자를 저해하는 핵산 서열이 게놈 내로 삽입된 벡터로서, 이들 벡터는 DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 효모 벡터, 또는 바이러스 벡터를 예로 들 수 있다.

[69] 또한, 상기 안티센스는 c-Yes 유전자 또는 그의 단편으로부터 전사되는 mRNA 서열 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 지니고, 상기 mRNA와 결합하여 상기 c-Yes 유전자 또는 단편의 발현을 억제할 수 있다.

[70] 또한, 상기 shRNA(short hairpin RNA)는 인간 또는 생쥐상의 shRNA 공통 염기서열 부위를 표적으로 하여 통상의 방법에 따라 제작된 것을 사용할 수 있다.

[71] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[72] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인

글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[73] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[74] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[75] 본 발명의 조성물은 전신계 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지의 기술로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.

[76] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. 또한, 유효량의 c-Yes 저해제를 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등에 적합한 형태로 식염수 또는 완충액에 투여 직전에 용액으로 제제화하여 투여할 수도 있다.

[77] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방, 억제 또는 경감 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다.

[78] 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[79]

[80] 본 발명은 또한 c-Yes 유전자를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 촉진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[81] 또한 본 발명은 c-Yes 단백질을 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기

후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[82] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 먼저 상기 유전자 또는 단백질을 포함하는 CD133 양성 암 세포 또는 암 줄기세포에 분석하고자 하는 후보물질을 접촉시킬 수 있다.

[83] 상기 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 c-Yes 유전자 염기서열에서 mRNA, 단백질로의 전사, 번역을 촉진하거나 억제하는 물질 또는 c-Yes 단백질의 기능 또는 활성을 증진하거나 억제하는 의약으로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 펩타이드, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

[84] 이후, 후보물질이 처리된 세포에서 상기 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, 상기 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 증가 또는 감소되는 것이 측정되면 상기 후보물질은 CD133 양성 암을 치료 또는 예방할 수 있는 물질로 판단할 수 있다.

[85] 상기에서 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[86] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, c-Yes 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 후보물질은, CD133 양성 암 치료제 후보물질이 될 수 있다. 또한, 상기 후보물질은 암 줄기세포 내 c-Yes를 고갈시켜 암 줄기세포의 증식을 억제하고, 암세포로의 분화를 유도할 수 있다.

[87] 이와 같은 CD133 양성 암 치료제 후보물질은 이후의 CD133 양성 암 치료제 개발과정에서 선도물질 (leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 c-Yes 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능을 촉진 또는 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 CD133 양성 암 치료제를 개발할 수 있다.

[88] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌 (Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 실시를 위한 형태

[89] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[90]

[91] <실시예 1> 시료준비

[92] (세포 배양)

[93] 사람 대장암 세포주 HT-29는 한국 세포주 은행 (Korean cell bank (Seoul Korea)에서 구입하였다. 2.05mM 글루코오스, 25mM HEPES, 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum (FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 RPMI-1640 (GIBCO, CA, USA)에서 세포를 배양하였다. 세포는 5% CO_2 농도에서 37℃의 온도 조건에서 배양하였다. 세포가 80% 컨플루언시에 도달할 때, 0.05% 트립신 및 0.53mM EDTA을 사용하여 세포를 탈착시키고, 새로운 플라스크에 씨딩하였다.

[94]

[95] (Fluorescence activated cell sorting (FACS))

[96] HT-29 세포는 TE (0.05% 트립신 및 0.53mM EDTA)로 탈착시키고, 제조업체의 설명서에 따라 BD FACS를 위해 준비하였다. 세포를 1차 CD133/1PE 항체 (Miltenyi Biotic)로 표지하고, 대조군으로 표지되지 않은 세포를 이용하여 분류하였다. 데이터는 상기 시스템에서 제공된 BD FACS 아시아 소프트웨어에 따라 분석하였다.

[97]

[98] (c-Yes 트랜스펙션/선별)

[99] FACS 분류된 $CD133^+$ 및 $CD133^-$ HT-29 세포는 shRNA 플라스미드 트랜스펙션 시약 (Santacruz)을 사용하여 c-Yes shRNA 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 6-웰 플레이트에 항생제가 없는 배지를 넣고 세포를 플레이팅하였다. 세포를 70% 컨플루언시까지 배양하고, 1ng/㎕의 농도를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션은 제조업체의 설명서에 따라 수행하였다. shRNA로 인큐베이션 하고 48시간 후, 푸로마이신 (puromycin, 1ng/㎕)을 사용하여 5일 동안 선별하였다.

[100]

[101] (RT-PCR)

[102] 1mL의 TRIzol TRIzol (Invitrogen, Rockville, MD, USA)을 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 총 RNA를 분리하였다. cDNA는 제조업체의 설명서에 따라 Superscript III First Strand Synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 합성하였다. PCR에 사용하는 프라이머는 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 표적 영역을 증폭하고, 2% 아가로오스 젤에서 전기영동하여 PCR 산물을 분리하고, BioRad Molecular Imager®GelDoc™ XR을 사용하여 EtBr

시스템에서 검출하였다.

[103]

[104] (세포 생존능 분석)

[105] 트랜스펙션된 세포를 96-웰에 웰 당 3×10^3 개의 세포를 씨딩하고, 24시간 동안 부착시켰다. 각 웰에 CCK-8 (10㎕)를 부가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 마이크로플레이트 리더를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식 및 세포독성을 분석하였다.

[106]

[107] (종양 구 형성 분석)

[108] 분류된 c-Yes 고갈된 세포를 6웰 플레이트에 구 형성을 촉진하도록 설계된 무혈청 RPMI에 1mL 당 1×10^3개의 세포의 밀도로 씨딩하였다. 상기 배지에 10ng/mL 섬유아세포 성장인자, 10ng/mL의 상피세포 성장인자 및 2.75ng/mL 셀레늄(인슐린-트랜스페린-셀레늄 용액)을 보충하였다. 매주 세포에 새로운 배지를 보충하였다. 21일째에 60㎛ 이상의 구를 측정하였다.

[109] 도 3은 $CD133^+$ 또는 $CD133^-$ 중 어느 하나로 분류된 대장암세포를 무작위적인 서열의 shRNA (scrambled shRNA) 또는 c-Yes shRNA 중 어느 하나로 트랜스펙션시킨 후 상기 세포들의 형태적 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 4는 400㎛ 이상의 종양 구를 측정 및 정량한 결과로, 3주째에 $CD133^+$ 대장암세포에서 유의적인 종양 구가 형성되었다. 또한, CD133 양성이지만 c-Yes가 고갈된 대장암세포에서는 종양 구가 형성되지 않았다. 이는 줄기세포 같은 세포의 수가 수적으로 유의하게 감소되고, c-Yes의 고갈이 암 줄기세포의 분화를 유도함을 시사하는 것이다.

[110] 다음으로, 상기 무작위적인 서열의 shRNA 또는 c-Yes shRNA 중 어느 하나로 트랜스펙션된 대장암세포의 RNA와 단백질을 분리한 다음, 줄기세포성 및 분화된 HT-29 세포를 나타내는 마커의 mRNA 발현 수준을 측정하였다.

[111] 도 5에 나타난 바와 같이, $CD133^-$ 대장암세포와 비교하여, $CD133^+$ 대장암세포에서 CD133, Nanog 및 Oct4는 상향조절되어 있는 반면, CK-20은 $CD133^-$ 대장암세포에서 유의적으로 상향조절되어 있다. 이로부터, CD133, Nanog 및 Oct4는 줄기세포를 나타내는 특이 마커인 반면, CK-20은 분화된 대장암세포의 특징적인 마커임을 알 수 있다. 또한, c-Yes가 고갈된 $CD133^+$ 대장암세포에서 줄기세포 마커인 CD133, Nanog 및 Oct4의 발현 수준이 유의적으로 감소하였고, 분화된 대장암세포의 마커인 CK-20은 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 상기 결과로부터 c-Yes 고갈은 암 줄기세포의 암세포로의 분화를 유도함을 알 수 있었다.

[112] 도 6은 c-Yes 또는 무작위적인 서열의 shRNA로 트랜스펙션된 대장암세포에서 수행된 세포 생존능 측정 결과로, 24시간 및 48시간째에 OD 값을 측정하였다.

[113] 그 결과, 24시간 후 대조군 대비 c-Yes 고갈된 대장암세포에서 OD 값이 더 낮았다. 이는 c-Yes의 고갈에 의한 불완전한 분열이 총 세포 수 및 분열 속도에

영향을 준 것으로 생각된다. 이러한 차이는 48시간 후에 더 두드러졌다. HT-29 세포의 더블 타임은 약 22시간인 것으로 알려져 있으나, c-Yes가 고갈된 세포에서 중앙체 (midbody)를 연장시키고, 세포의 더블 타임은 이의 두 배 정도로 증가된다 (48시간 정도). 이는 염색체가 분열되는 동안 미세소관 (microtubule)의 탈 통제 (misregulation)에 의한 이수성 (aneuploidy)을 발생시키는 것으로 추측된다. 이것은 c-Yes가 종양의 발암성 (tumorigenic property)을 개시하고 유지하는 데에 중요한 역할을 하는 것을 나타낸다.

산업상 이용가능성

[114] 본 발명은 CD133 양성 암 진단, 예방 또는 치료 분야에서 사용할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 분열 또는 분화 조절제로, c-Yes 또는 이의 저해제를 포함하는 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
c-Yes 저해제는 c-Yes 유전자에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이를 포함하는 벡터; 또는, c-Yes 단백질에 특이적인 항체 중 어느 하나인 암 줄기세포의 분열 또는 분화 조절용 조성물.

[청구항 3] 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 인간의 암세포 시료에 있는 c-Yes의 발현 수준을 측정하여 암 줄기세포를 가지는 CD133 양성 암 진단 마커를 검출하는 방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
CD133 양성 암은 뇌암, 대장암, 소아 뇌종양 또는 췌장암을 포함하는 방법.

[청구항 5] c-Yes 저해제를 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
CD133 양성 암은 뇌암, 대장암, 소아 뇌종양 또는 췌장암을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 7] 제5항에 있어서,
c-Yes 저해제는 c-Yes 유전자에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스-올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이를 포함하는 벡터; 또는, c-Yes 단백질에 특이적인 항체 중 어느 하나인 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 8] 제5항에 있어서,
상기 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물은 암 줄기세포의 분화치료 (differentiation therapy)에 사용하는 것인 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 9] 제5항에 있어서,
상기 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물은 항암약물치료제 또는 방사선치료제의 병용투여제로 사용하는 것인 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 10] c-Yes 유전자를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 촉진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
c-Yes 유전자의 발현을 감소시키면 암의 예방 또는 치료제로 판정하고, 상기 치료제는 암 줄기세포의 증식을 억제하고, 분화를 유도하는 것인 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
CD133 양성 암은 뇌암, 대장암, 소아 뇌종양 또는 췌장암을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

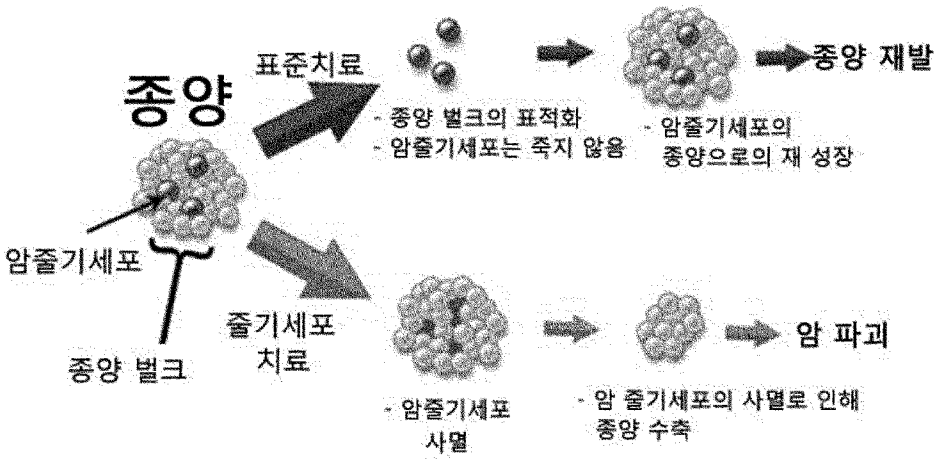
[청구항 13] c-Yes 단백질을 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증진하는지 또는 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
c-Yes 단백질의 기능 또는 활성을 억제하면 암의 예방 또는 치료제로 판정하고, 상기 치료제는 암 줄기세포의 증식을 억제하고, 분화를 유도하는 것인 CD133 양성 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
CD133 양성 암은 뇌암, 대장암, 소아 뇌종양 또는 췌장암을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

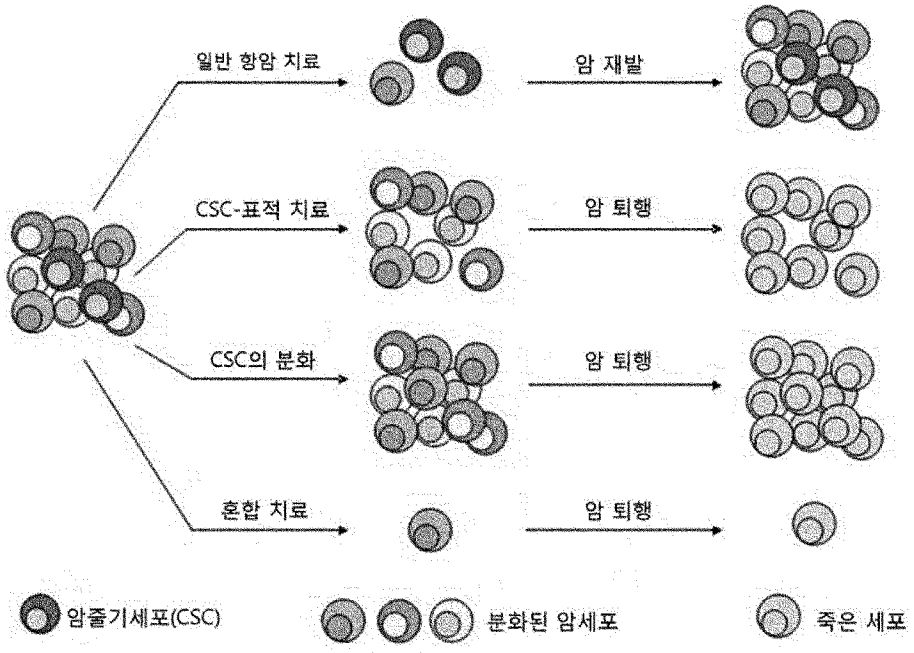
WO 2015/016475 PCT/KR2014/004822

[Fig. 1]



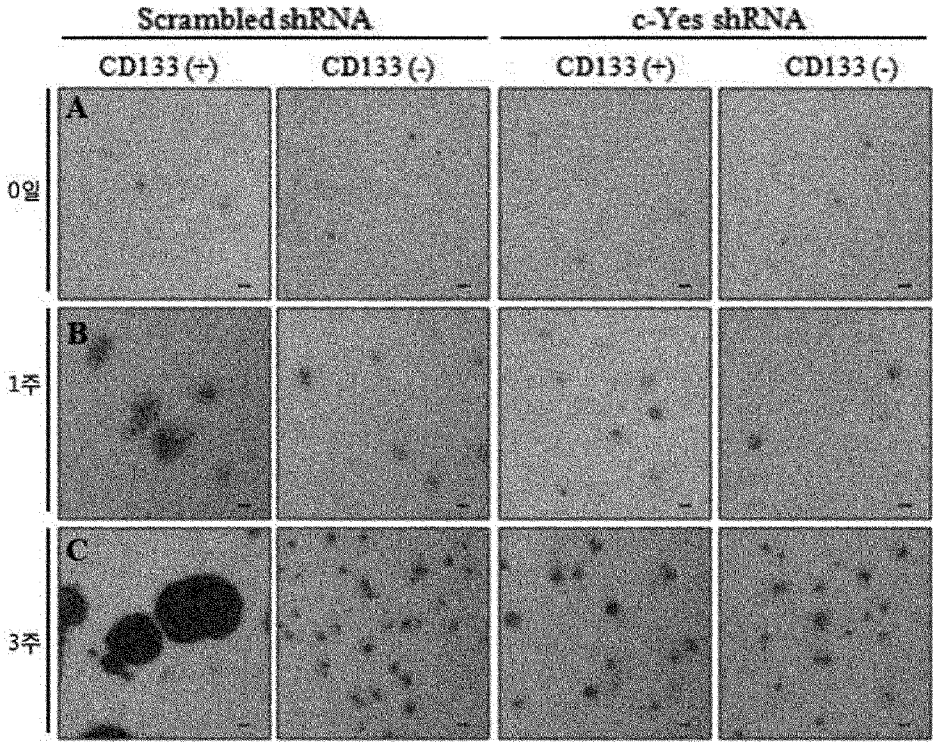
<http://stemline.com/csc.asp 참조>

[Fig. 2]

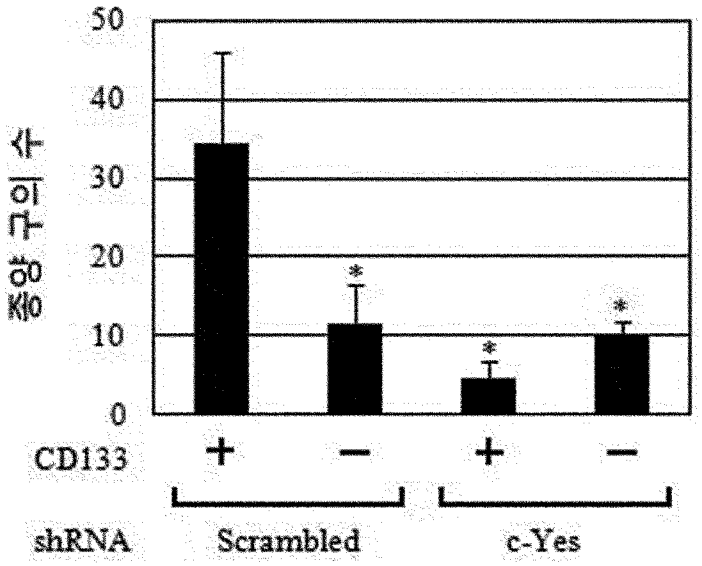


<Lu Han et al., "Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy" Acta Pharmaceutica Sinica B, vol.3(2), pp.65-75, 2013.04 참조>

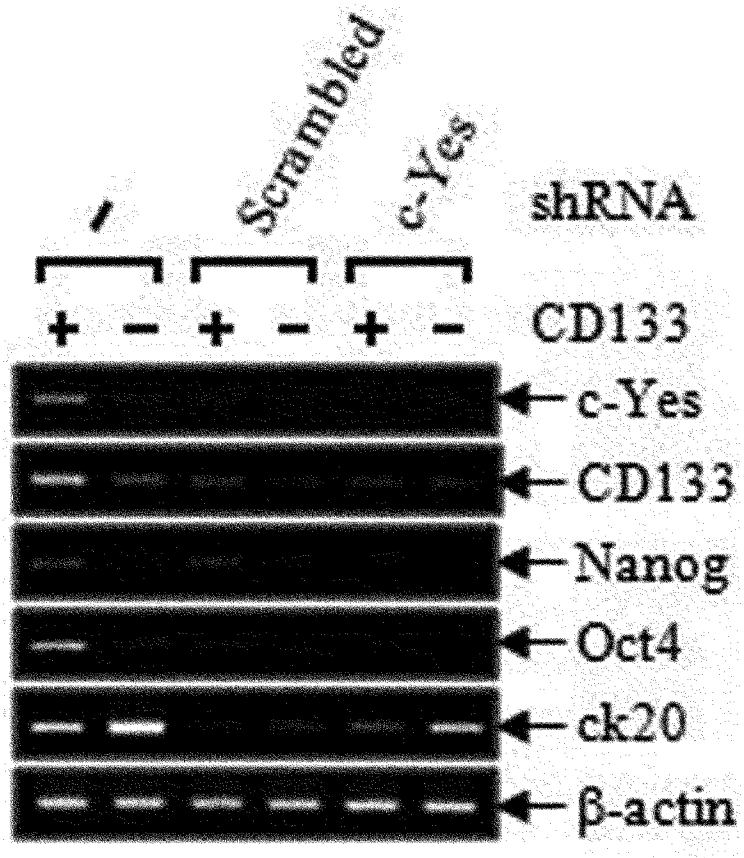
[Fig. 3]


Scrambled shRNA
c-Yes shRNA
CD133 (+)
CD133 (-)
CD133 (+)
CD133 (-)
A
B
C
0일
1주
3주

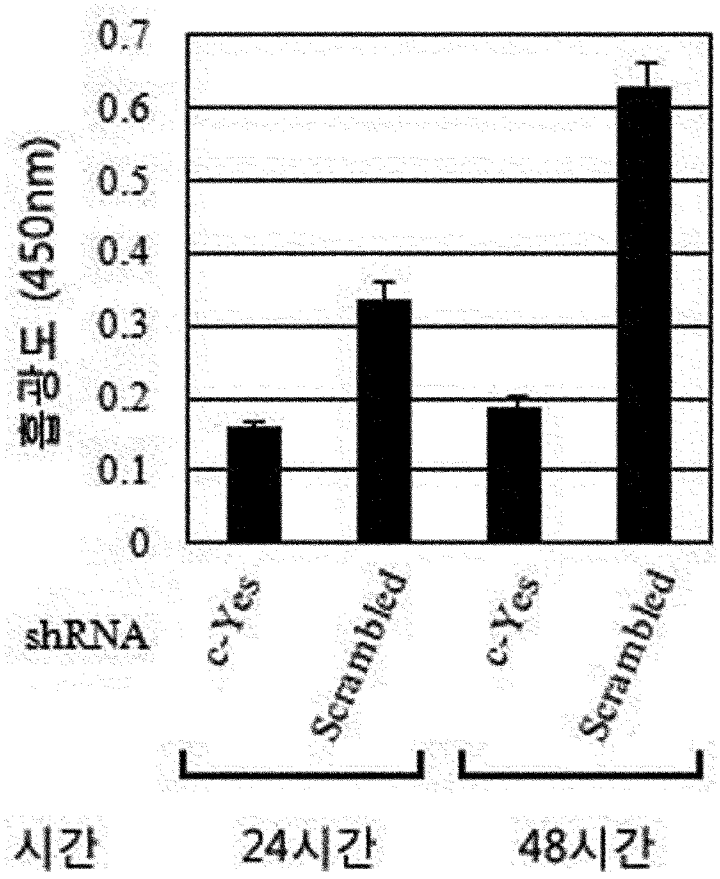
[Fig. 4]


50
40
30
20
10
0
세포 수
CD133
+
−
+
−
shRNA
Scrambled
c-Yes
*
*
*

[Fig. 5]


/
Scrambled
c-Yes
shRNA
+ − + − + −
CD133
c-Yes
CD133
Nanog
Oct4
ck20
β-actin

[Fig. 6]


0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
흡광도 (450nm)
shRNA
c-Yes
Scrambled
c-Yes
Scrambled
시간
24시간
48시간

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/004822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; C12N 5/095; G01N 33/15; G01N 33/68; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), google, pubmed & Keywords: c-Yes, CD133, stem cell, cancer treatment, diagnosis of cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Xiang Xiao et al., "c-Src and c-Yes are Two Unlikely Partners of Spermatogenesis and their Roles in Blood-testis Barrier Dynamics", Adv Exp Med Biol., vol. 763, pages 295-317 (Published 2012) See abstract, page 300 lines 13-33, page 304 lines 22-43	1,5,6,8,9
Y		2,7,8
A		3,4,10-15
X	Florence Sancier et al., "Specific Oncogenic Activity of the Src-Family Tyrosine Kinase c-Yes in Colon Carcinoma Cells", PLOSONE, vol. 6(2), e17237 (Published 2011) See abstract, page 2 right column line 46 to page 3 right column line 2	5,6,7,9
Y		2,7,8
A		1,3,4,10-15
X	MOHAMMAD AMINUR RAHMAN et al., "The cysteine-cluster motif of c-Yes, Lyn and FAK as a suppressive module for the kinases", ONCOLOGY REPORTS, vol. 19, pages 975-980 (Published 2008) See abstract	5,6,9
Y		7,8
A		1-4,10-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 SEPTEMBER 2014 (25.09.2014)	**25 SEPTEMBER 2014 (25.09.2014)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/004822

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0118945 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 02 November 2011 See the entire document	1-15
A	KR 10-2013-0007674 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 21 January 2013 See the entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/004822

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0118945 A	02/11/2011	KR 10-1240199 B1	06/03/2013
KR 10-2013-0007974 A	21/01/2013	KR 10-1360409 B1	11/02/2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/004822

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

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

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; C12N 5/095; G01N 33/15; G01N 33/68; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), goole, pubmed & 키워드: c-Yes, CD133, 줄기세포, 암 치료, 암진단

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Xiang Xiao 외 3명, "c-Src and c-Yes are Two Unlikely Partners of Spermatogenesis and their Roles in Blood-testis Barrier Dynamics", Adv Exp Med Biol., Vol. 763, pages 295-317 (2012년 공개) 요약, 300면 13-33행, 304면 22-43행 참고	1,5,6,8,9
Y		2,7,8
A		3,4,10-15
X	Florence Sancier 외 15명, "Specific Oncogenic Activity of the Src-Family Tyrosine Kinase c-Yes in Colon Carcinoma Cells", PLOSONE, Vol. 6(2), e17237 (2011년 공개) 요약, 2면 오른쪽컬럼 46행 내지 3면 오른쪽컬럼 2행 참고	5,6,7,9
Y		2,7,8
A		1,3,4,10-15
X	MOHAMMAD AMINUR RAHMAN 외 9명, "The cysteine-cluster motif of c-Yes, Lyn and FAK as a suppressive module for the kinases", ONCOLOGY REPORTS, Vol. 19, pages 975-980 (2008년 공개) 요약 참고	5,6,9
Y		7,8
A		1-4,10-15

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 09월 25일 (25.09.2014)	2014년 09월 25일 (25.09.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
정의준
전화번호 +82-42-481-8148

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/004822

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0118945 A (고려대학교 산학협력단) 2011.11.02 전문 참고	1-15
A	KR 10-2013-0007974 A (연세대학교 산학협력단) 2013.01.21 전문 참고	1-15

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/004822

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0118945 A	2011/11/02	KR 10-1240199 B1	2013/03/06
KR 10-2013-0007974 A	2013/01/21	KR 10-1360409 B1	2014/02/11