



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0074223
(43) 공개일자 2021년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 2600/118 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0172257
(22) 출원일자 2020년12월10일
심사청구일자 2020년12월10일
(30) 우선권주장
1020190164836 2019년12월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한양대학교 에리카산학협력단
경기도 안산시 상록구 한양대로 55
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
채영규
경기도 안산시 상록구 해양1로 11, 604동 603호
(사동, 안산고잔6차푸르지오)
최해인
경기도 안산시 상록구 삼리로 24 (사동, 숲속마을 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

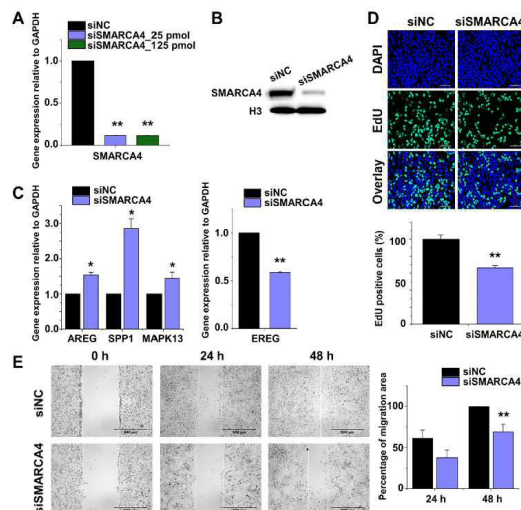
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 SMARCA4 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 SMARCA4의 발현을 억제하거나 그 활성을 저해하는 제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명은 간암 세포 치료의 새로운 타겟으로서 SMARCA4를 제공하고, BET 억제제의 새로운 간암 치료 용도를 제공하여 암의 증식, 성장, 및 전이를 억제하여 효과적인 항암제로 이용될 수 있으며, 전이 후 간암 치료 방법 연구에 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(71) 출원인

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

국립암센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

(72) 발명자

안가영

경기도 안산시 상록구 학사2길 4, 304호 (사동)

김락균

서울특별시 강남구 삼성로57길 42, 202호 (대치동, 라이프라인)

김태수

서울특별시 성북구 북악산로 844, 101동 1304호 (돈암동, 브라운스톤 돈암 아파트)

최선심

강원도 춘천시 영서로 2169, 104동 1604호(퇴계동, 퇴계이안아파트)

이연수

경기도 김포시 김포한강3로 290-16, 802동 401호(장기동, 고창마을 이니스터원)

이용선

경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 402호 (마두동, 백마마을1단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711105267

과제번호 2017M3A9G7073033

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업 원천기술개발사업

연구과제명 eRNomics 기반 간암 특이적 발병기전 연구 및 신규 바이오마커 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2020.02.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711083951

과제번호 2017R1A2B4012905

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 중견연구(총연구비1.5억초과~3억이하)

연구과제명 미세아교세포에서 신경염증 반응 유전자 발현에 관련된 enhancer RNA (eRNA)에 대한 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 한양대학교(ERICA캠퍼스)

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

SMARCA4의 발현을 억제하거나 그 활성을 저해하는 제제를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제제는 BET(bromodomain and extraterminal domain) 억제제인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 BET 억제제는 JQ1 및/또는 OTX-015인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제는 SMARCA4 mRNA의 전부 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하여 SMARCA4 mRNA와 혼성화(hybridization)될 수 있는 올리고뉴클레오티드(oligonuclotide)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 siRNA인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제제는 SMARCA4 mRNA의 전부 또는 일부 염기 서열 또는 이와 상보적인 서열을 포함하는 벡터; 또는 상기 벡터로 형질전환된 세포인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 암은 간암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

(가) SMARCA4 발현 세포를 준비하는 단계;

(나) 상기 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;

(다) 상기 세포에서 SMARCA4의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(라) 상기 (다) 단계의 측정 결과, SMARCA4의 발현량이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우 상기 후보 물질을 간암의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 물질 스크리닝 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (다) 단계의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 또는

실시간 중합효소 연쇄반응(real time polymerase chain reaction)으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 10

- (1) 간암 환자의 생물학적 시료로부터 SMARCA4의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (2) 상기 SMARCA4의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 SMARCA4의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 시료는 간 조직 샘플 또는 혈액인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 정보제공방법은 상기 (2) 단계 이후에 (3) 환자의 SMARCA4의 발현 수준이 정상 대조군의 SMARCA4의 발현량 보다 높은 경우 생존율이 낮거나 치료에 반응이 낮은 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 정보제공방법은 (3) 환자의 SMARCA4의 발현 수준이 정상 대조군의 SMARCA4의 발현량 보다 2배 이상 높은 경우 생존율이 낮은 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SMARCA4의 발현을 억제하거나 그 활성을 저해하는 제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간암 (Hepatocellular carcinoma, HCC)은 해마다 50만명이 사망하는, 세계에서 5번째로 위험한 종양이다. HCC 환자의 생존율은 지난 20년에 걸쳐 개선되지 않았고, 사망율과 거의 동일한 발병률을 지니고 있다 (Marrero, Fontana et al. 2005). B형 간염 바이러스 또는 C형 간염 바이러스에 감염되어 발병하는 만성 간염 및 아플라톡신 B1 (aflatoxin B1)과 같은 발암물질에의 노출은 HCC에 대한 주요 위험 인자로 알려져 있다 (Thorgeirsson and Grisham 2002).

[0004] 또한, 세포주기 기작에서 G1 단계로 진행되는 세포주기 조절물질들의 변화가 간암 형성에 관련되어 있다는 보고도 있다[Hui 등, Hepatogastroenterology 45:1635-1642, 1998]. 이외에도 DNA 돌연변이와 유전자 발현의 유전적 변화(genetic alteration)등이 간암 환자조직에서 확인된다고 보고되고 있다.

[0005] 이와 같이, 간암의 발생과 진행은 몇몇 특정 유전자들에 의해 이루어지는 것이 아니라 암의 악성화가 진행되면서 발생하는 세포내 다양한 신호전달과 조절기작에 관여하는 많은 유전자들의 복합적인 상호작용에 의한 것임을 알 수 있는데, 이러한 간암의 유전적 이질성(genomic heterogeneity)이 간암의 치료에 장애물로 작용한다. 따라서, 몇몇 특정한 유전자들에 중점을 두고 간암의 형성 기작을 연구하는 것 보다 정상 간세포와 간암 세포주들 사이의 다량의 유전자 발현정도를 비교 분석하여 간암에 관련된 새로운 유전자들을 발굴하는 연구는 매우 중요한 의미가 있다.

[0006] 또한, 간세포 암종 치료에 사용되는 소라페닙 등의 약물은 일부 환자에게서 효과가 있으나, 내성으로 인해 효과

가 떨어지는 것이 알려져 있다. 이에 새로운 패러다임의 후성유전학적 조절을 통한 간암 치료 연구를 진행하였다.

[0007] 한편, BRD1~4는 BET(bromodomain and extraterminal domain)의 subfamily로서, 간암 세포에서 BRD4(bromodomain-containing protein 4)가 과발현이 보고된 바 있으며, BET 억제제인 JQ1가 타액선에 발생한 선양낭성암(salivary adenoid cystic carcinoma: SACC)과 전립선암 등에서 세포 이동을 억제함이 확인된바 있다. 또한, BET 억제제인 OTX-015는 백혈병과 NUT 암에서 임상적으로 효과가 있음이 알려져 있다. 그러나, JQ1과 OTX-015의 간암에서의 효과는 제한적이다. BRD4 활성 사이트는 BD1 및 BD2의 두 도메인으로 구성되며, JQ1과 OTX-015 같은 BET 억제제는 주로 BD1 도메인을 표적으로 한다. 이러한 BET 억제제는 독성이 심하며 임상 용도가 제한적인 단점이 있다.

[0008] 본 발명자들은 BET 억제제가 BRD4 관련 및 세포 이동 관련 유전자를 약화시키는 것을 확인하였다. 주로 SMARCA4에 의해 조절되는 세포 이동 관련 유전자는 BET 억제제 처리된 HCC 세포에서 감소되었으며, 상기 결과는 BET 억제제가 HCC의 세포 이동 효과를 조절하고 SMARCA4를 통해 세포 이동 관련 유전자의 발현을 선택적으로 억제함을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명은 SMARCA4의 발현 억제 또는 그 활성을 억제하는 제제를 이용하여 암, 바람직하게는 간암, 더욱 바람직하게는 간암의 전이를 예방 또는 치료하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Faivre EJ, McDaniel KF, Albert DH, Mantena SR, Plotnik JP, Wilcox D, Zhang L, Bui MH, Sheppard GS, Wang L, Sehgal V, Lin X, Huang X, et al. Selective inhibition of the BD2 bromodomain of BET proteins in prostate cancer. Nature. 2020; 578: 306-10. doi: 10.1038/s41586-020-1930-8.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 간암세포에서 JQ1과 OTX-015의 세포증식 및 이동 억제 효과를 확인하고, JQ1 및 OTX-015의 분자적 기전을 연구하여 SMARCA4과 간암과의 관련성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 간암 치료를 위한 신규 타겟으로서 SMARCA4을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명은 SMARCA4의 발현 수준에 따라 간암 환자의 생존가능성이 결정됨을 확인하고, 간암 환자의 생존가능성 예측을 위한 정보제공방법을 제공하고자 한다.

[0015] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 SMARCA4의 발현을 억제하거나 그 활성을 저해하는 제제를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제제는 BET(bromodomain and extraterminal domain) 억제제일 수 있으며, 상기 공지의 BET 억제제일 수 있으나, 바람직하게는 BET 억제제는 JQ1 및/또는 OTX-015일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 제제는 SMARCA4 mRNA의 전부 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하여 SMARCA4 mRNA와 혼성화(hybridization)될 수 있는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)일 수 있으며, 상기 올리고뉴클레오티드는 siRNA로서 서열번호 1의 염기서열로 이루어지거나 이를 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 제제는 SMARCA4 mRNA의 전부 또는 일부 염기 서열 또는 이와 상보적인 서

열을 포함하는 벡터; 또는 상기 벡터로 형질전환된 세포일 수 있다.

- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 암은 간암일 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 전이 예방에 제공될 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 물질 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0023] (가) SMARCA4 발현 세포를 준비하는 단계;
- [0024] (나) 상기 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;
- [0025] (다) 상기 세포에서 SMARCA4의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0026] (라) 상기 (다) 단계의 측정 결과, SMARCA4의 발현량이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우 상기 후보 물질을 간암의 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계.
- [0027] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (다) 단계의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 또는 실시간 중합효소 연쇄반응(real time polymerase chain reaction)으로 수행되는 것일 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0029] (1) 간암 환자의 생물학적 시료로부터 SMARCA4의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0030] (2) 상기 SMARCA4의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 SMARCA4의 발현 수준과 비교하는 단계.
- [0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 시료는 간 조직 샘플 또는 혈액일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 정보제공방법은 상기 (2) 단계 이후에 (3) 환자의 SMARCA4의 발현 수준이 정상 대조군의 SMARCA4의 발현량 보다 높은 경우 생존율이 낮은 것으로 판정하는 단계를 포함할 수 있으며, 구체적으로 환자의 SMARCA4의 발현 수준이 정상 대조군의 SMARCA4 발현량 보다 2배 이상 높은 경우 생존율이 낮은 것으로 판정할 수 있다. 또한, 본 발명은 SMARCA4의 발현을 억제하거나 그 활성을 저해하는 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은 간암 세포 치료의 새로운 타겟으로서 SMARCA4를 제공하고, BET 억제제의 새로운 간암 치료 용도를 제공하여 암의 증식, 성장, 및 전이를 억제하여 효과적인 항암제로 이용될 수 있으며, 전이 후 간암 치료 방법 연구에 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 BET 억제제 처리에 따른 간암 세포의 생존력 감소와 증식감소를 확인한 도면이다. A: WST-1 분석 결과, B Edu 분석 결과, $**p < 0.01$
- 도 2는 BET 억제제 처리에 따른 간암 세포의 차등발현 유전자 및 각 BET 억제제 유도의 전사체 데이터 세트 비교 도면이다. A: 파란색 원은 하향 조절된 유전자를 나타내며 빨간색 원은 상향 조절된 유전자를 나타낸다. B: 중첩 영역은 JQ1- 및 OTX-015가 공통적으로 간암세포의 발현 변화를 유도하는 유전자를 나타낸다. C: BET 억제제 처리에 따라 발현 수준이 변화하는 상위 50개 유전자를 나타내는 히트맵이다[$(p \text{ adjusted} < 0.05, \log_2\text{-fold change} \geq 2, \log_2\text{-fold change} \leq -2)$]. D: Upstream regulator analysis. E: 빨간색 선은 JQ1- 및 OTX-015 처리된 HepG2 세포의 공통 유전자를 나타낸다. F: qPCR 분석을 통해 DMSO 처리군과 BET 억제제가 처리된 간암세포에서 차별 발현된 유전자 확인 결과이다[$**p < 0.01$].
- 도 3은 JQ1 또는 OTX-015 처리된 간암세포에서 IPA 소프트웨어를 이용한 네트워크 분석결과이다. A: Ingenuity® Bioinformatics 경로 분석 결과. B: 대체 유전자의 생체기능 분석 결과. C: 세포 이동과 관련된 차등발현 유전자.
- 도 4는 BET 억제제 처리에 따라 하향 조절된 세포 이동 관련 유전자 분석 도면이다. A: 히트맵. B: UCSC genome

browser 이미지. C: qPCR 분석을 통해 DMSO 처리군과 BET 억제제가 처리된 간암세포에서 차별 발현된 유전자 확인 결과(** $p < 0.01$). D: wound healing assay 결과(* $p < 0.05$).

도 5는 BET 억제제 처리시 HepG2 세포의 이동과 관련된 유전자를 분석한 도면이다. A: 히트맵. B: UCSC genome browser image. C: qPCR 분석 결과. D: wound healing assay 결과(** $p < 0.01$). E: BET 처리에 따른 AREG, EREG, SPP1, 및 MAPK13 유전자 발현 변화.

도 6은 SMARCA4가 간암세포주의 증식과 이동에 관여함을 확인한 도면이다. A: 히트맵. B: UCSC genome browser images. C: qPCR 분석 결과. D: SMARCA4 처리에 따른 EREG, AREG, SPP1, 및 MAPK13 유전자 발현 변화. E: wound healing assay.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명은 간암세포주에서 BET 억제제가 작용하는 경로와 관련 유전자의 네트워크를 분석하여 SMARCA4가 간암세포주에서 세포의 증식 및 이동에 관여하고, SMARCA4의 발현 감소는 간암세포의 증식 및 이동을 억제함을 확인하여 완성되었다.
- [0038] 구체적으로, 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 HepG2 세포에 JQ1 또는 OTX-015 처리에 의해 발현 수준에 변화가 유도된 유전자(DEG)에서 60~70% 동일함을 확인하였으며, IPA 기반 분석을 통해 각 BET 억제제에 의한 DEG가 BRD4의 감소와 관련이 있음을 확인하였다. 또한, IPA 네트워크 분석 결과 JQ1 및 OTX-015는 세포 이동과 관련된 유전자의 발현 감소를 통해 HepG2 세포의 전이를 억제할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0039] 간암의 치료에는 종양의 크기와 전이에 따라 전략을 달리한다. 한편, 간암 전이에 사용할 수 있는 치료방법은 굉장히 제한적인데, 본 발명은 BET 억제제 처리에 따라 BRD4 억제를 유도하여 세포 이동을 감소시킴으로써 전이 치료가 가능함을 확인하였다.
- [0040] SMARCA4는 Brahma-related gene-1 (BRG1)라고도 불리우며, Brahma (BRM)과 함께 (SWI/SNF complex (a large ATP-dependent chromatin remodeling complex)을 구성하고, 다양한 암종에서 돌연변이가 알려졌다. 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 siRNA를 이용한 SMARCA4 녹다운 간암세포에서 EREG 유전자의 발현 감소와 세포 증식 및 이동의 현저한 감소를 확인할 수 있었다. 따라서, SMARCA4 발현 억제제는 BET 억제제와 마찬가지로 전이 치료에 이용될 수 있다.
- [0041] 한편, 본 발명자들은 Kaplan-Meier 생존 곡선 분석을 통하여 SMARCA4 고발현 간암 환자는 저발현 환자와 비교하여 생존 가능성이 낮음을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 간암 환자의 SMARCA4 발현 수준을 측정하여 간암 환자의 예후 예측하는 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 “예후”란 간암의 재발, 전이성 확장, 및 약물 내성 등을 비롯하여 간암-기인성 사망 등의 병의 경과와 완치 여부를 포함하지만, 바람직하게는 간암 발병 후의 생존 예후를 의미한다.
- [0043] 또한, 본 발명에서 “예측”이란 환자가 예를 들어 소정 치료제 또는 조합물, 외과적 개입, 화학요법 등의 투여를 비롯한 소정 치료 처방과 같은 치료 처방에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존이 가능한지 여부를 예측하는 것을 의미한다.
- [0045] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0047] [실험 방법 및 재료]
- [0048] 1. 세포 배양 및 BET 억제제 준비
- [0049] 간암세포주(HepG2 및 Huh7)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank: KCLB)에서 구입하였다. HepG2 세포는 최소필수배지, 필수배지에서 배양하였으며, Huh7 세포는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 모든 배지에는 10 % 소태아혈청 (fetal bovine serum: FBS) 및 penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 mg/ml) (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)이 첨가되었으며, 배지는 3~4일 마다 교체하였다. 세포는 5% CO₂, 37 °C 조건 하의 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

[0050] JQ1 및 OTX-015는 Tocris Bioscience (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, 각각 10mM의 농도로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고, -20°C에서 보관하여 사용하였다.

[0052] 2. 세포 증식능 분석 (Cell proliferation assay)

[0053] 2-1. WST-1(tetrazolium salt-1) 분석

[0054] 제조사의 프로토콜에 따라 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (MK400, Takara)을 이용하여 세포 증식을 분석하였다. 세포를 각 웰에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 0, 12, 또는 48 시간 동안 JQ1 또는 OTX-015로 처리하였다. 배양 후 WST-1을 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 추가 배양하였다. 이어서, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석은 총 3회 진행하였다.

[0056] 2-2. EdU(Ethynyl Deoxyuridine) 분석

[0057] 제조사의 프로토콜에 따라 EdU Cell Proliferation Assay kit (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 세포 증식을 분석하였다. 이어서, 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 포함하는 마운팅 용액(Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 옮겨 현미경으로 이미지화하였다(Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japan). JQ1 또는 OTX-015가 처리된 간암세포주에서 EdU-양성 세포의 함량은 ImageJ (Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 사용하여 백분율로 분석하였다. 분석은 총 3회 진행하였고 각 결과를 독립적으로 표시하였다.

[0059] 3. 전사체 분석(Transcriptome analysis)

[0060] RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan) 및 Qiagen RNeasy Mini 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. Ribosomal RNA (rRNA)는 RiboMinus Eukaryote 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제거하였다. RNA 라이브러리는 Illumina (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)의 NEBNext Ultra™ directional RNA library preparation kit로 제작하였다. RNA 라이브러리 시퀀싱은 Illumina HiSeq2500 플랫폼 (Macrogen, 서울, 한국)에서 수행하였다. 전사체 시퀀싱은 DMSO (3개 샘플), JQ1 (3개 샘플) 또는 OTX-015(3개 샘플)을 처리한 HepG2 세포에서 얻은 독립적인 RNA 샘플에 대해 수행하였다. Trimmomatic을 이용하여 RNA-seq의 FASTQ 파일과 어댑터를 잘라 내고, 저품질 염기서열을 제거하였다. 상기 FASTQ 파일은 UCSC hg38와 STAR (version 2.7.1) 소프트웨어를 사용하여 맵핑하였다. 그리고, 디폴트 매개변수(default parameter)와 DESeq2를 이용하여 차등 유전자 발현을 분석하였다. log₂-fold change의 절대값이 2보다 큰 경우 JQ1 또는 OTX-015 처리에 다른 DEGs(Differentially Expressed Genes)로 선정하였다(p-value <0.05). 수집된 데이터는 Gene Expression Omnibus database에 보관하였다(GSE158552).

[0062] 4. 네트워크 및 경로 맵핑

[0063] Ingenuity의 Knowledge Base Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Mountain View, CA)를 이용하여 RNA-seq 데이터 베이스를 분석하여 네트워크와 경로를 맵핑하였다. log₂-fold change의 절대값이 2보다 큰 경우 DEG로 선정하였고, DEG의 생물학적 기능, 질병, 및 업스트림 조절기의 네트워크 분석과 관련 유전자를 IPA software를 이용하여 확보하였다.

[0065] 5. 정량적 PCR (quantitative PCR, qPCR)

[0066] 간암세포의 총 RNA를 RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하고, PrimeScript 역전사 효소 (Takara, Shiga, Japan)을 이용하여 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 하기 표 1의

프라이머를 이용하여 SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara, Shiga, Japan)로 증폭하였다. 프라이머는 Primer Bank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)을 이용하여 설계하였다. qPCR은 TBGreen Premix Ex Taq™ II (Takara, Shiga, Japan)으로 수행하였다. 내부 대조군으로는 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)을 사용하였다. 각 데이터는 독립적인 3회의 실험 결과를 나타낸다(n=3). PCR 수행 이후 결과는 ABI 7500 소프트웨어(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 ΔC_T (critical threshold)과 $\Delta \Delta C_T$ (comparative critical threshold) 방법으로 분석하였다.

표 1

qPCR	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
FOS	CGGGCTTCAACGCAGACTA	GGTCCGTGCAGAAGTCCTG
ACSL5	CTCAACCCGTCTTACCTCTCT	GCAGCAACTTGTAGGTCATTG
SLC38A5	GCTACAGCAAGAACGTGAGG	ATTCCAAACGATGCTCTCCCC
ICAM2	CGGATGAGAAGGTATTCGAGGT	CACCCACTTCAGGCTGGTTAC
AS1C1	ATGGAAAGTGCTACACGTTCAA	GTTTCATCCTGACTATGGTTCTGC
CD9	AGCCATCCACTATGCGTTGA	ATGGCATCAGGACAGGACTTC
SSTR5	TGTTTGC GGATGTTGGCT	CTGTTGGCGTAGGAGAGGA
VAV3	AGAGAAACGGACCAATGGACT	GGTGGTGTCCAGAATAGTTCC
SMARCA4	AATGCCAAGCAAGATGTCGAT	GTTTGAGGACACCATTGACCATA
AREG	GTGGTGCTGTCGCTCTTGATA	CCCCAGAAAATGGTTCACGCT
EREG	GTGATTCCATCATGTATCCAGG	GCCATTCATGTCAGAGCTACACT
SPP1	ACTCGAACGACTCTGATGATGT	GTCAGGTCTGCGAAACTTCTTA
MAPK13	TGAGCCGACCCTTTCAGTC	AGCCCAATGACGTTCTCATGC

6. wound-healing assay

제조사의 프로토콜에 따라 wound-healing assay를 수행하였다(Ibidi, Martinsried, Germany). 구체적으로, 세포를 각 웰에 시딩하고 24시간 동안 배양한 후 JQ1 또는 OTX-015를 24시간 동안 처리하거나 스크램블 siRNA 또는 SMARCA4 siRNA를 48시간 동안 형질감염시키고, Wound field를 형성시켰다. 세포를 세척하고 10% FBS 함유 성장 배지에 이동하고 24 시간 또는 48시간 동안 배양하고, JuLi BR real-time cell history recorder (NanoEnTek, Seoul, Korea)로 시각화하였다.

7. Kaplan-Meier plotter analysis

Kaplan-Meier plotter (KM plotter; <http://kmplot.com/analysis/>)mf 이용하여 간암 세포주에서 EREG, AREG, SPP1 및 MAPK13 유전자의 survival value를 분석하였다. 364명의 환자 데이터를 사용하였으며, FDR (false discovery rate) cutoff 는 1%로 설정하였다.

8. SMARCA4 유전자 녹다운(knockdown)

세포를 시딩하고 RNAiMax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 제조사의 프로토콜에 따라 이용하여 SMARCA4 siRNA 또는 스크램블 siRNA를 세포에 도입하였다. SMARCA4 siRNA (ID numbers 4677; 5'-GCAUUUCAAGGAAUAUCActt-3')과 Silencer™ Negative Control siRNA (AM4611)는 Thermo Fisher Scientific에서 구입하여 사용하였으며, 각 siRNA는 10nM의 농도로 48시간 동안 배지에 처리하였다.

9. 웨스턴 블롯 (Western blotting)

NE-PER Nuclear Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 제조사의 프로토콜에 따라 이용하여 세포의 핵 및 세포질 단백질을 분리하였다. 핵 단백질을 SDS(sodium dodecyl sulfate) 폴리 아크릴 아마이드겔로 분리하여 polyvinylidene difluoride membranes (Schleicher & Schuell Bioscience, Inc., Keene, NH, USA)에 옮기고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 내부 대조군으로 히스톤 단백질 H3을

이용하였고, SMARCA4 및 histone H3의 항체는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하여 사용하였다(ab110641, ab1791).

[0080] 10. 통계 분석

[0081] 데이터는 SPSS 17.0 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 일원 분산 분석을 사용한 후 Tukey의 HSD test를 이용하여 분석하였으며($p < 0.05$), 결과는 평균 $\pm$ S.D로 나타내었다.

[0083] [실험 결과]

[0084] **실시예 1. BET 억제제 처리에 따라 간암 세포주의 증식 감소 확인**

[0085] BET 억제제가 HCC 성장에 미치는 영향을 연구하기 위해 BET 억제제 (JQ1 또는 OTX-015)를 다양한 농도 (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 5.0 μ M 및 10 μ M) 및 다양한 시간(6, 24, 및 48 시간) 동안 HCC 세포주 (HepG2 및 Huh7)에 처리하였다.

[0086] 그 결과, BET 억제제는 처리 24시간 후 농도 의존적으로 HCC 세포주의 증식을 현저하게 감소시켰다(도 1a). 또한, Edu 분석 결과로부터 BET 억제제가 간암 세포주의 증식을 감소시키는 것을 재확인하였다(도 1b).

[0088] **실시예 2. BET 억제제 처리에 따라 간암 세포주에서 차등 발현되는 유전자(DEG) 확인**

[0089] 상술한 실시예 1의 결과를 기반으로 BET 억제제 (JQ1 또는 OTX-015; 5 μ M)를 24시간 동안 처리한 HepG2의 전사체 분석을 수행하였다. 구체적으로, 전사체 시퀀싱은 DMSO (3개 샘플), JQ1 (3개 샘플) 또는 OTX-015(3개 샘플)을 처리한 HepG2 세포에서 얻은 독립적인 RNA 샘플에 대해 수행하였다. 전사체 분석 결과에서 DEG 선정을 위하여 1% FDR, $p < 0.05$, fold change $\log_2$ -fold change ≥ 2 , $\log_2$ -fold change ≤ -2 을 상향 또는 하향 조절에 이용하였고, JQ1 처리군에서 627 개 유전자와 OTX-015 처리군에서 606 개 유전자가 차별적으로 조절되었다. 그중 474 개와 447 개 유전자가 유의하게 상향 조절된 반면, 153 개와 158 개 유전자가 각각 JQ1- 또는 OTX-015 처리군에서 통계적으로 하향 조절되었으며, 24 시간 후 대조군 HepG2 세포에 비해 상대적으로 하향 조절되었다(도 2a).

[0090] 이어서, JQ1 처리군과 OTX-015 처리군의 전사체를 비교하여 BET 억제제 처리에 의한 공통적인 상향/하향 조절 유전자를 확인하고자 하였다. 그 결과, JQ1 처리군과 OTX-015 처리군은 전사체에서 유사성을 나타내었으며, 구체적으로, 양 실험군에서 공통적으로 하향 조절된 322개의 유전자와 상향 조절된 96개 유전자가 확인되었다(도 2b 및 2c).

[0091] 이어서, BET 억제제 처리에 따라 HepG2 세포의 기능적 변화를 확인하기 위하여, IPA 소프트웨어를 이용하여 상향 조절된 DEG를 분석하였다. 그 결과, 18개의 상향 조절된 regulator 중에서 IFNG, MAPK1, IFNL1 및 BRD4가 가장 높이 상향 조절되었으며 (도 2d), BRD4가 BET 억제제가 처리된 HepG2 세포에서 하향 조절된 유전자와 직간접적인 네트워크를 형성함이 확인되었다(도 2e). 또한, GAPDH를 대조군으로 하여 qPCR 수행 결과 FOS 유전자는 상향 조절되고, ACSL5, SLC38A5 및 ICAM2 유전자는 하향 조절됨을 확인하였다(도 2f).

[0093] **실시예 3. BET 억제제 처리에 따라 간암 세포주에서 차등 발현된 유전자의 네트워크 분석**

[0094] IPA 소프트웨어를 이용하여 BET 억제제가 처리된 HepG2 세포에서 상호작용하는 유전자 관련 경로의 네트워크를 제작하였다(도 3).

[0096] **실시예 4. BET 억제제 처리에 따라 간암 세포주에서 차등 발현된 유전자의 생체 기능 분석**

[0097] BET 억제제가 처리된 HepG2 세포에서 차등 발현된 유전자의 생체 기능을 결정하였다. JQ1 또는 OTX-015 처리에 의해 활성화된 유전자 기능은 일반적으로 세포사멸, ROS 및 세포 부착과 관련이 있었다. 한편, JQ1 또는 OTX-015 처리에 의해 비활성화된 유전자 기능은 일반적으로 세포 이동과 관련이 있었다(도 3c).

[0098] 이어서, JQ1와 OTX-015가 공통적으로 발현 변화를 유도하는 유전자를 확인하기 위하여 RNA-seq 데이터를 사용하여 JQ1 처리군과 OTX-015 처리군의 전사체를 비교분석하였다. 그 결과, JQ1가 발현 변화를 유도한 유전자 중에서 26개는 OTX-015 처리시 발현에 변화를 보이지 않은 것이었으며, OTX-015가 발현 변화를 유전자 중에서 23개는 JQ1 처리시에는 발현에 변화를 보이지 않았다. 그리고 44개 유전자는 JQ1과 OTX-015가 공통적으로 발현 변화를 유도하였다(도 3D).

[0100] 실시예 5. BET 억제제 처리에 따른 간암 세포주에서 세포 이동과 관련 유전자의 발현 감소 확인

[0101] 일반적으로 세포 이동과 관련된 것으로 알려진 유전자 중 BET 억제제 처리에 따라 발현 변화가 나타난 44개 유전자를 확보하였다(도 4A). RNA-seq 분석 결과 세포 이동과 관련된 AOC3, CCR6, SSTR5 및 SCL7A11 유전자가 BET 억제제 처리에 따라 발현 감소됨을 확인하였다(도 4B). 또한, RNA-seq 결과를 검증하기 위해 qPCR 분석을 수행한 결과, ASIC1, CD9, SSTR5 및 VAV3 mRNA의 수준이 BET 억제제 처리시 간암세포주에서 감소되었다(도 4C). 또한, wound healing assay에서 BET 억제제 처리시 Huh7 세포의 이동이 대조군과 비교하여 현저하게 낮음을 확인하였다(도 4D). 상기 결과로부터 BET 억제제는 세포 이동 반응과 관련이 있음을 알 수 있다.

[0103] 실시예 6. SMARCA4 유전자와 세포 증식 및 이동과의 관련성 분석

[0104] 생물정보분석 결과 많은 유전자가 SMARCA4에 의해 조절됨을 알 수 있었다(도 5A). Kaplan-Meier 생존 곡선 분석은 SMARCA4의 고발현 간암 환자는 저발현 환자와 비교하여 생존가능성이 낮음을 시사하였다(도 5B). 또한, qPCR 결과 BET 억제제 처리된 간암세포주에서는 SMARCA4가 상당히 하향 조절됨을 확인할 수 있었다(도 5C).

[0105] 나아가, AREG, SPP1, MAPK13 및 EREG 유전자는 세포 이동과 관련된 것으로 알려져 있으며, SMARCA4에 의해 발현이 조절된다. Kaplan-Meier 생존 곡선을 분석 결과 AREG, SPP1, MAPK13 및 EREG 유전자 고발현 환자는 저발현 환자와 비교하여 낮은 생존율을 나타내었다(도 5D). 또한, qPCR 결과 BET 억제제 처리된 간암세포주에서는 AREG, SPP1, MAPK13 및 EREG 유전자의 발현이 상당히 하향 조절됨을 확인할 수 있었다(도 5E).

[0107] 실시예 7. SMARCA4 유전자 녹다운(Knock-down)

[0108] 나아가, SMARCA4가 세포 증식 및 이동에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. Huh7 세포에 서로 다른 농도의 SMARCA4 siRNA(siSMARCA4)를 처리하였고, 음성 대조군으로 scrambled siRNA (siNC)를 처리하였다. siSMARCA4 처리시 감소된 SMARCA4 단백질 발현을 확인하였다(도 6A). 또한, siSMARCA4 처리시 EREG 유전자 발현이 감소됨을 확인하였다(도 6B). 그러나, AREG, SPP1 및 MAPK13 유전자는 siSMARCA4 처리시 발현이 증가되었다(도 6C). 상기 결과로부터 SMARCA4가 EREG 유전자 발현을 직접 조절함을 알 수 있다.

[0109] 이어서, siSMARCA4 또는 siNC를 처리한 Huh7 세포의 증식을 분석하였다. 그 결과, SMARCA4 녹다운은 EdU 양성 세포의 비율을 감소시켰으며, Huh7 세포의 증식을 감소시켰다(도 6D). 또한, wound healing assay 결과 SMARCA4 녹다운은 Huh7 세포의 이동을 감소시킴을 확인하였다(도 6E). 상기 결과로부터, SMARCA4가 간암세포주의 증식 및 이동을 조절하는 것임을 알 수 있다.

[0111] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

[0113] HCC (Hepatocellular carcinoma)

BRD4 (Bromodomain-containing proteins 4)

SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a,

member 4)

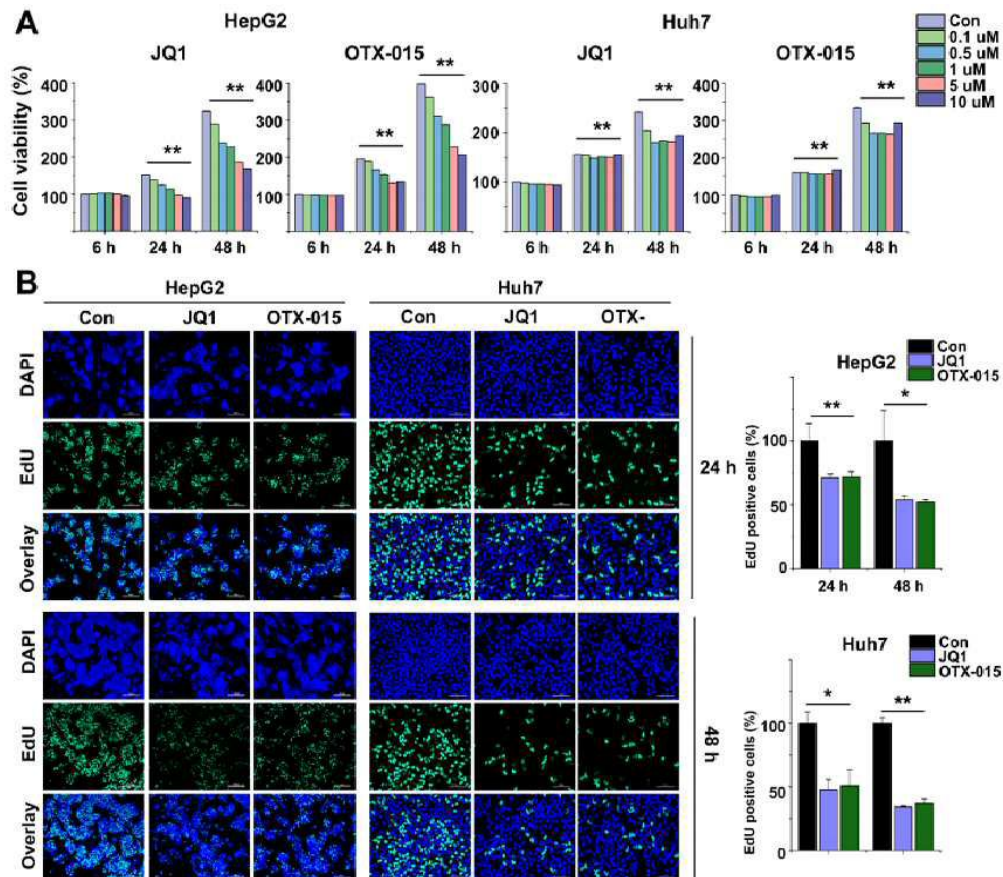
DEG (Differentially expressed genes)

qPCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)

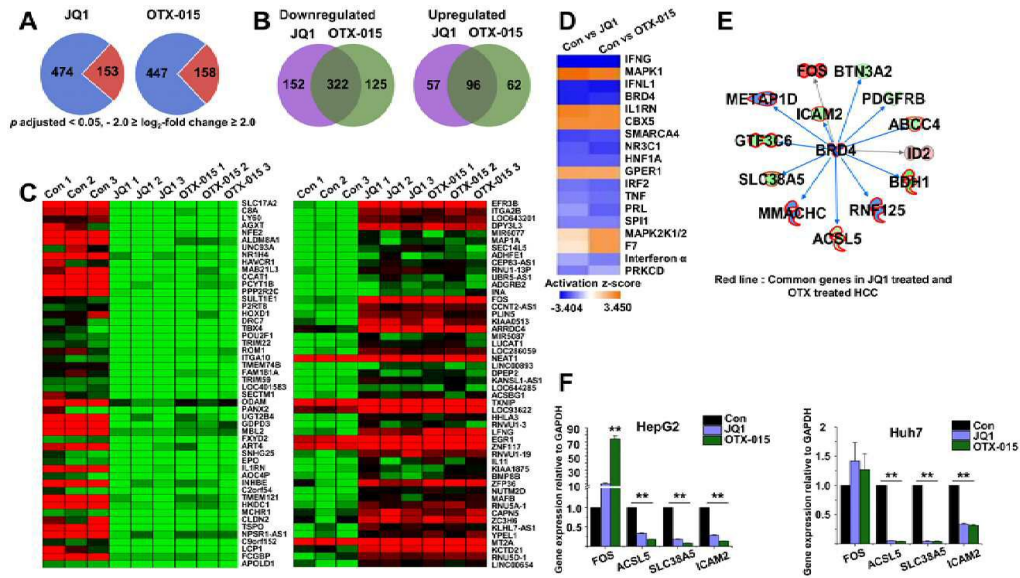
RNA-seq (RNA-sequencing)

도면

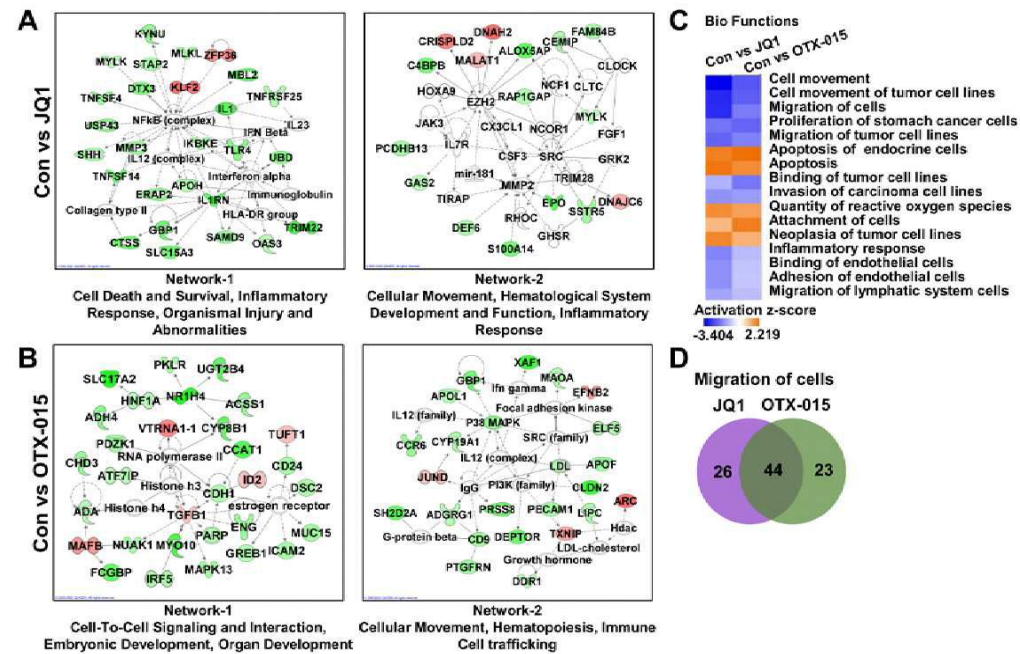
도면1



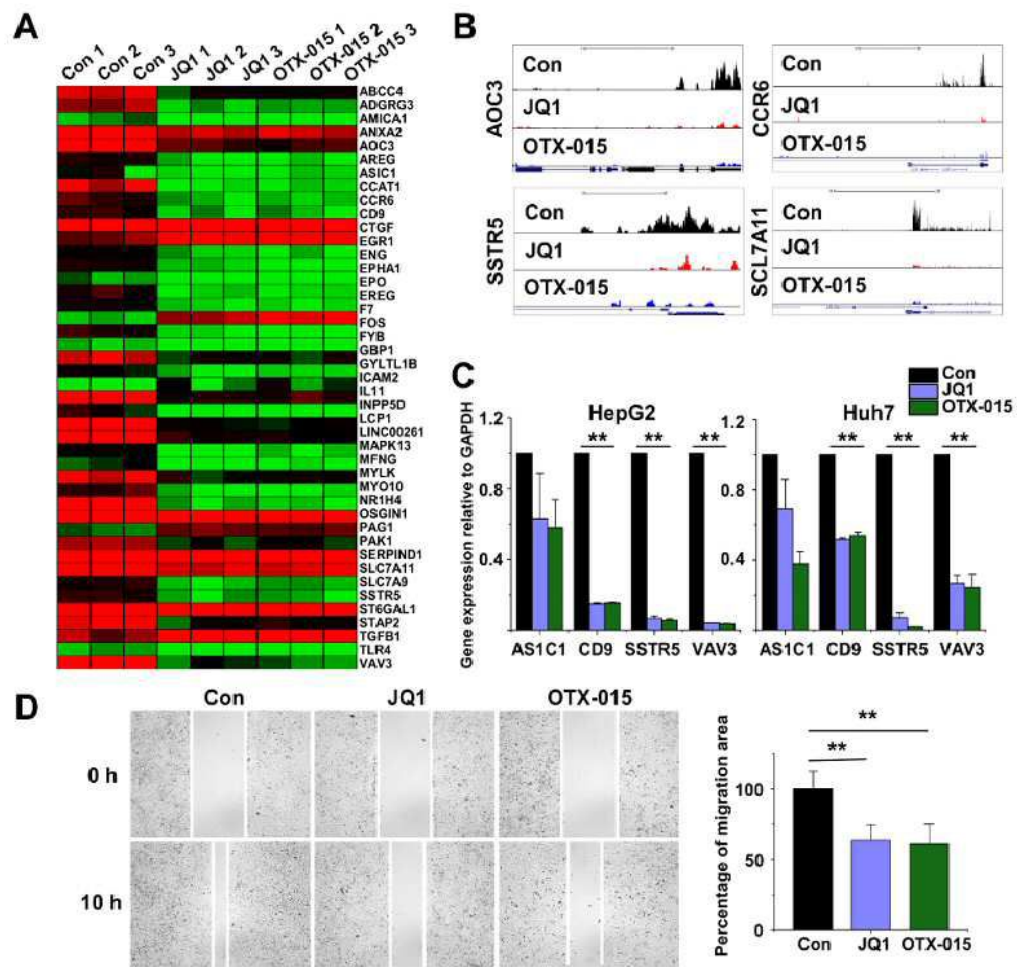
도면2



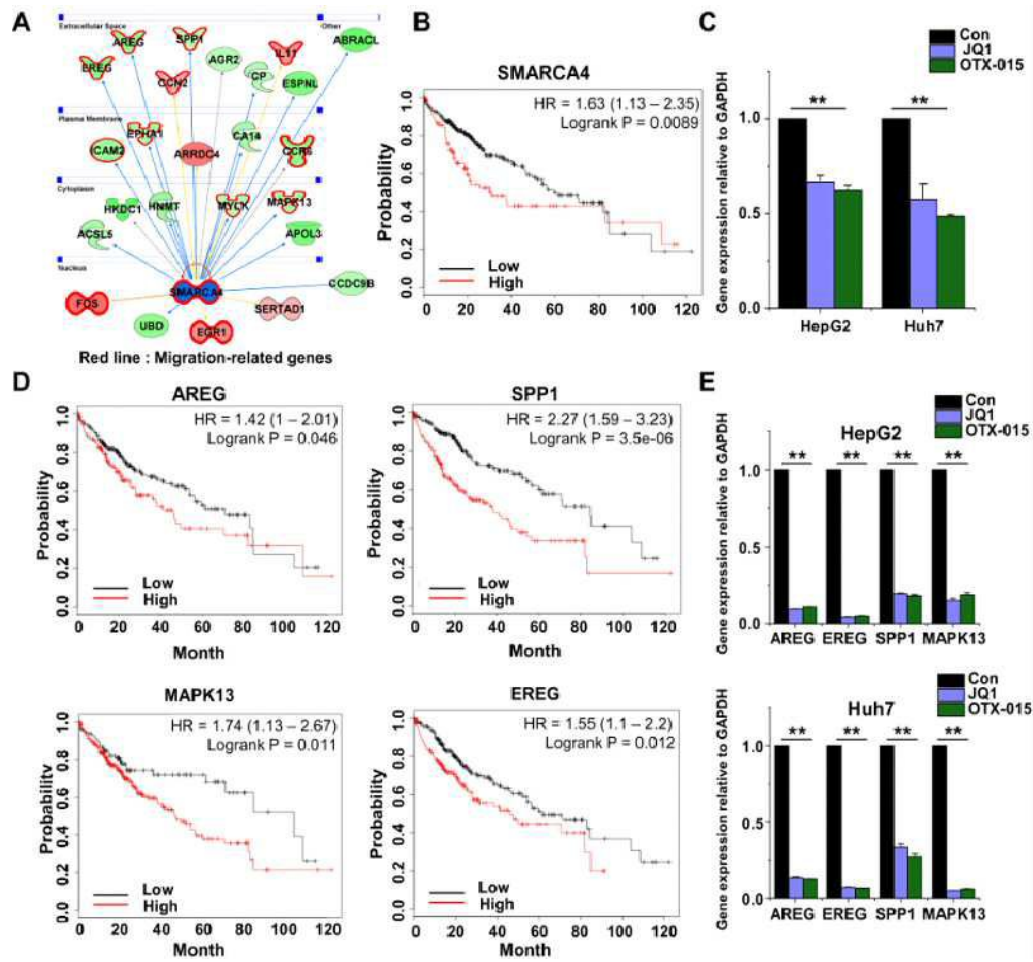
도면3



도면4



도면5



도면6

