

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 1월 7일 (07.01.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/003231 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006855
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 3일 (03.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0083539 2014년 7월 4일 (04.07.2014) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 1층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 송시영 (SONG, Si Young); 121-270 서울시 마포구 백범로 205 마포펜트하우스 아파트 104 동 1106호, Seoul (KR). 장찬영 (JANG, Chan Young); 706-091 대구시 수성구 지산로 48 청구아파트 103 동 1501호, Daegu (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, 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, 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.

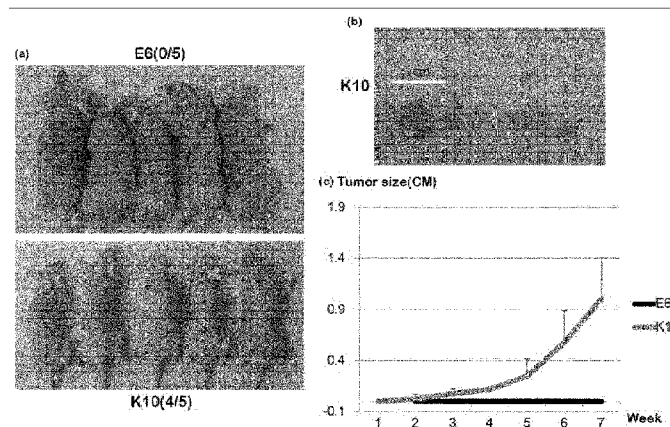
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING OR TREATING PANCREATIC CANCER USING KIAA1199

(54) 발명의 명칭: KIAA1199를 이용한 췌장암의 진단 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention provides a method for screening a material for preventing or treating pancreatic cancer using a novel molecule marker for pancreatic cancer stem cells and pancreatic cancer. The present invention provides a method for screening a material for preventing or treating pancreatic cancer using a novel molecule marker for pancreatic cancer stem cells and pancreatic cancer, a kit for detecting pancreatic cancer stem cells, a kit for analyzing the diagnosis or prognosis of pancreatic cancer, a composition for inhibiting the formation of pancreatic cancer stem cells, and a pharmaceutical composition for treating pancreatic cancer or inhibiting pancreatic cancer metastasis. A target for treating pancreatic cancer of the present invention is very useful in screening therapeutic agent candidate materials specifically acting on pancreatic cancer stem cells. In addition, the use of the present invention makes it possible to accurately analyze the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/003231 A1



본 발명은 췌장암 암 줄기세포 및 췌장암에 대한 신규한 분자 마커를 이용하여 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명은 췌장암 줄기세포 및 췌장암에 대한 신규한 분자 마커를 이용한 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법, 췌장암 줄기세포 검출용 키트, 췌장암 진단 또는 예후 분석용 키트, 췌장암 줄기세포 형성 억제용 조성물 및 췌장암 치료용 또는 전이 억제용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 췌장암 치료용 타겟은 췌장암 암 줄기세포에 특이적으로 작용하는 치료제 후보물질을 스크리닝 하는 데 매우 유용하다. 또한, 본 발명을 이용하면 췌장암의 진단 및 예후를 정확하게 분석할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: KIAA1199를 이용한 췌장암의 진단 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 KIAA1199를 이용한 췌장암의 진단 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 암 조직에도 일반 장기처럼 암 조직을 유지하고 재생하는 암 줄기세포(cancer stem cells or tumor initiating cells)가 존재하며, 이것이 암의 최초 시작에 관여할 것으로 추측되고 있을 뿐 아니라, 암 치료 후 줄어든 암세포를 재생하는 데 관여함으로써 암의 재발이나 전이 및 항암치료 내성 유발에 깊은 영향을 미친다고 보고된 바 있다(BB Zhou et al. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8:806-823(2009)). 따라서 암을 근본적으로 진단 및 치료하기 위해서는, 암 조직의 극히 일부만 차지하면서도 암의 발병과 유지, 재발에 핵심 구실을 하는 암 줄기세포에 초점을 맞추어야 하며, 암 줄기세포에 대한 더 많은 이해는 조기 진단을 위한 진단용 마커 개발에도 도움이 될 것이다.
- [4] 췌장암은 5년 생존율이 1-4%, 중앙생존기간 5개월에 이르는 치명적인 암으로 인체의 암 중에서 가장 불량한 예후를 보이고 있다. 80-90% 환자에서 진단시 완치를 기대하는 근치적 절제가 불가능한 상태에서 발견되기 때문에 예후가 불량하고 치료는 주로 항암요법에 의존하고 있으므로, 그 어떤 인체암보다도 조기 진단법 개발이 절실히 요망되고 있다.
- [5] 현재까지 췌장암에 효과가 있다고 알려진 5-플루오로유라실, 젬시타빈(gemcitabine), 타르세바(tarceva)를 포함한 몇 항암제의 치료 효과는 지극히 실망적이며, 항암치료에 대한 반응율은 15% 내외에 불과하고 이러한 사실은 췌장암 환자의 예후를 향상시키기 위해서는 보다 효과적인 조기 진단법 및 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있음을 시사한다. 암줄기세포는 자기재생(self-renewal) 능력이 있는 암세포를 지칭하며 최근들어 암 치료정복의 주요 타겟으로 떠오르고 있다. 또한 생체 각 기관에서 발생한 암들은 생성 기관에 따라 구별되는 분자적 패턴을 지니는 것으로 알려지고 있다. 같은 맥락에서, 각 기관에서 발생한 암줄기세포 또한 다른 기관과는 차별화 되는 분자적 표지자를 가지고 있다는 연구가 보고되고 있다.
- [6] 이에 본 발명자들은 명확한 분자적 표지자를 가지고 있지 않은 췌장암종에서 새로운 췌장암 줄기세포의 분자적 표지자를 보고하고 특성을 규명하였다.
- [7]
- [8] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이

표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 췌장암 줄기세포 특성에 기초한 췌장암의 치료용 타겟 및 췌장암 줄기세포에 대한 신규 바이오마커를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 췌장암 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 KIAA1199가 췌장암 치료용 분자 타겟이 될 수 있음을 발견하였다. 더불어, 본 발명자들은 발굴된 바이오 마커가 암 줄기세포 생물학적 특성에 근거하여 췌장암을 진단, 특히 조기 진단할 수 있고, 예후를 판정할 수 있는 마커 및 향후 치료표적에 사용할 수 있는 표지자임을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[11] 따라서, 본 발명의 목적은 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 췌장암 줄기세포 검출용 키트를 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 췌장암 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 췌장암 줄기세포 형성 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 췌장암 치료용 또는 전이 억제용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[16]

[17] 본 발명의 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

[18]

과제 해결 수단

[19] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[20] (a) 서열목록 제1서열의 단백질 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

[21] (b) 상기 단계 (a)에서의 상기 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드의 발현량을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 췌장암의 예방 또는 치료용 물질로 판정된다.

[22]

- [23] 본 발명자들은 췌장암 줄기세포 특성에 기초한 암의 치료용 타겟 및 암 줄기세포에 대한 신규 바이오마커를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 췌장암 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 KIAA1199가 췌장암 치료용 분자 타겟이 될 수 있음을 발견하였다. 더불어, 본 발명자들은 발굴된 바이오 마커가 암 줄기세포 생물학적 특성에 근거하여 췌장암을 진단, 특히 조기 진단할 수 있고, 예후를 판정할 수 있는 마커 및 향후 치료표적에 사용할 수 있는 표지자임을 규명하였다.
- [24] 본 발명은 췌장암 세포주로부터 분리된 췌장암 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 단백질을 췌장암의 치료 타겟이 될 수 있고, 이를 이용하면 췌장암을 조기에 매우 정확하게 진단 및 예후를 분석할 수 있다.
- [25] 본 발명의 상기 마커는 췌장암 줄기세포에서 특이적으로 발현된다. 더욱이, 상기 마커는 췌장암세포와 췌장암 줄기세포를 구별할 수 있는 능력, 즉 췌장암세포와 비교하여 췌장암 줄기세포에서 고발현되는 발현 패턴을 나타내는 마커이다.
- [26] 본 발명에서 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝을 위하여 사용되는 표현“세포 또는 조직”은 바람직하게는 췌장암 암 줄기세포 또는 췌장암 조직이다.
- [27] 본 발명에서 사용되는 용어 “췌장암(pancreatic cancer)”이란 췌장 세포에서 기원하는 암을 의미한다. 췌장암에는 여러 가지 종류가 있는데 췌관세포에서 발생한 췌관 선암종이 90% 정도를 차지하고 있어 일반적으로 췌장암이라고 하면 췌관 선암종을 의미한다. 그 외에 낭종성암(낭선암), 내분비종양 등이 있다. 췌장암 환자 중 약 5-10%는 유전 소인을 가지고 있는데, 췌장암 환자에서 췌장암의 가족력이 있는 경우는 약 7.8% 정도로 일반인에서의 췌장암 발생률 0.6%에 비해 빈도가 높다. 췌장암은 5년 생존율이 5% 이하로 예후가 매우 나쁜 암이다. 그 이유는 대부분 암이 진행된 후에 발견되기 때문에 발견 당시 수술 절제가 가능한 경우가 20% 이내이고, 육안으로 보기에 완전히 절제되었다 하더라도 미세 전이에 의해 생존율 향상이 적으며, 항암제 및 방사선 치료에 대한 반응이 낮기 때문이다. 따라서, 생존율을 향상시킬 수 있는 가장 중요한 방법은 증상이 없거나 비특이적일 때 조기 발견하여 수술하는 것이다.
- [28] 본 발명자들은 KIAA1199 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 경우, 췌장암세포와 비교하여 췌장암 줄기세포 내에서 그 발현이 현저히 증가한다는 사실을 발견하였다. 췌장암세포와는 달리 췌장암 줄기세포 내에서만 타겟 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 발현이 특이적으로 현저하게 증가한다는 것은 그것이 췌장암 줄기세포의 생존에 있어 필수적인 요소임을 지시하며, 이의 발현을 차단하는 물질은 췌장암 줄기세포의 성장 억제 및 사멸을 유도함으로써 췌장암의 근본적 치료에 도움이 되는 물질, 즉 췌장암 치료제로 판정된다.
- [29] 상기 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 동정되는 췌장암 치료제는 암 조직의

대부분을 차지하는 일반 채장암세포만을 타겟으로 하는 것이 아니라, 암 조직의 극히 일부만 차지하면서도 채장암의 발병과 유지, 재발에 핵심 구실을 하는 채장암 암줄기세포를 그 타겟으로 하므로, 채장암의 근본적인 치료를 가능하게 한다.

- [30] 상기 단계 (a)에서 사용되는 시료는 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.
- [31] 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [32]
- [33] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 채장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [34] (a) 서열목록 제1서열의 단백질을 준비하는 단계;
- [35] (b) 상기 단백질에 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및
- [36] (c) 상기 시험 물질이 상기 단백질에 결합하는지 여부 또는 시험물질이 상기 단백질의 기능을 억제하는지 여부를 분석하는 단계; 상기 시험물질이 상기 단백질에 결합하거나 또는 단백질의 기능을 억제하면 채장암의 예방 또는 치료용 물질로 판정된다.
- [37] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 서열목록 제1서열의 단백질과 시험 물질을 접촉시킨다.
- [38] 본 발명에서 이용되는 단백질은 세포 표면에 전시(displaying)되어 있는 형태, 바이러스(예컨대, 박테리오파아지) 표면에 전시되어 있는 형태, 분리된(isolated) 형태 또는 정제된(purified) 형태일 수 있다.
- [39] 세포 표면 또는 바이러스 표면에 전시되어 있는 단백질을 이용하는 경우,

스크리닝의 신속화 또는 자동화를 위하여 상기 세포 또는 바이러스는 고상의 기질에 고정화시키는 것이 바람직하다. 또한, 분리된(isolated) 또는 정제된(purified) 형태의 단백질도 고상의 기질에 고정화시키는 것이 바람직하다. 기질로서 이용가능 한 것은, 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 가능하며, 예를 들어, 폴리스틸렌과 폴리프로필렌과 같은 탄화수소 폴리머, 유리, 금속 및 젤을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 고상의 기질은 덤스틱, 마이크로타이터 플레이트, 입자(예컨대, 비드), 친화성 컬럼 및 면역블롯 막(예컨대, 폴리비닐리덴 플루오라이드 막)의 형태로 제공될 수 있다(참조: 미국 특허 제5,143,825호, 제5,374,530호, 제4,908,305호 및 제5,498,551호). 가장 바람직하게는, 상기 고상 기질은 마이크로타이터 플레이트이다.

[40] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.

[41] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 상기 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B),

TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

[42] 검출가능한 표지가 레이블링된 단백질 또는 시험물질을 이용하는 경우, 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

[43] 택일적으로, 시험물질과 단백질의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의

레이블링 없이 분석할 수도 있다.

- [44] 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 QP-C에 결합하는 지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 셀이 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 QP-C 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., Science 257:19061912(1992)).
- [45] 시험물질의 단백질과의 결합 능력은 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63:23382345(1991), and Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIAcore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.
- [46] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은 투-하이드리드 분석 또는 쓰리-하이드리드 분석 방법에 따라 실시할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., Cell 72, 223232, 1993; Madura et al., J. Biol. Chem. 268, 1204612054, 1993; Bartel et al., BioTechniques 14, 920924, 1993; Iwabuchi et al., Oncogene 8, 16931696, 1993; 및 W0 94/10300). 이 경우, 상기 단백질을 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, 상기 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이드리드 시스템은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사 인자(예컨대, GAL-4)의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, 분석 대상의 단백질(“프레이” 또는 “시료”)을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 베이트 및 프레이가 인 비보에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, LacZ)의 전사를 촉발하게 된다. 리포터 유전자의 발현을 검출할 수 있으며, 이는 분석 대상의 단백질이 상기 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 암의 예방 또는 치료용 물질로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [47] 본 발명에서 이용되는 시료는 상술한 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물 이외에, 펩타이드, 항체, 펩타이드 앵타머, 어드넥틴(AdNectin), 어피바디(affibody, 미국 특허 제5,831,012호), 아비머(Avimer, Silverman, J. et al, Nature Biotechnology 23(12):1556(2005)) 또는 쿠니쯔 도메인(Kunitz domain, Arnoux B et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58(Pt 7):12524(2002)), 및 Nixon, AE, Current opinion in drug discovery & development 9(2):2618(2006))을

포함한다.

[48]

[49] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 결합제 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 웨장암 줄기세포 검출용 키트를 제공한다.

[50]

본 발명에서 단백질에 특이적으로 결합하는 결합제는 예를 들어, 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 애평타머(aptamer)이다.

[51]

본 발명의 웨장암 줄기세포 검출용 키트는 인간의 웨장 세포 시료로부터 상기 마커 단백질 또는 이의 단백질을 각각 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 발현 수준을 측정하고, 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 또는 뉴클레오타이드 발현 수준과 비교하는 방법으로 실시할 수 있다.

[52]

상기 정상 대조군 시료란 암에 걸리지 않은 인간으로부터 채취한 웨장 세포, 암이 없는 정상 웨장 세포 또는 암줄기세포를 포함하지 않는 것으로 이미 확인된 시료로서, 예컨대 비 점착성 배양 조건 하에서 구를 형성하지 않는 등 암줄기세포를 포함하지 않는 것으로 확인된 웨장암 세포주 시료, 또는 악성이 아닌 것으로 확인된 웨장암 환자의 암 이외의 세포 시료 등을 포함하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 정상 대조군 시료 내 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 발현 수준도 상술한 바와 동일한 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

[53]

상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 발현량과 암줄기세포 검출 대상인 웨장암 환자에서의 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 발현량을 비교할 수 있으며, 상기 발현량의 유의한 변화 여부를 판단하여 웨장암 환자 시료 내 암줄기세포 포함여부를 진단할 수 있다.

[54]

구체적으로, 환자 시료에서 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오타이드 발현 수준이 정상 대조군 시료의 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 발현 수준의 150% 이상인 경우 웨장암 암줄기세포를 포함하는 것으로 판단한다.

[55]

[56]

본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 결합제 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 웨장암 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.

[57]

특히, 본 발명의 웨장암 진단 또는 예후 분석용 키트는 웨장암 줄기세포에 의해 유래되는 키트이다.

[58]

본 명세서에서 표현 “웨장암 진단 또는 예후 분석용 키트”는 웨장암의 진단

또는 예후 분석용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “체장암의 진단 또는 예후 분석용 키트”는 “체장암의 진단 또는 예후 분석용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다.

- [59] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [60] 본 발명에서 체장암을 진단하는데 있어서 사용되는 표현 단백질 발현 분석은 생물학적 시료에서 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 바람직하게는, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 상기 예에 의해 본 발명의 분석방법이 제한되는 것은 아니다.
- [61] 본 발명에서 단백질에 특이적으로 결합하는 결합제는 예를 들어, 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 애타머(aptamer)이다.
- [62] 본 발명에서 “항체”란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [63] 상기한 바와 같이 새로운 체장암 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.
- [64] 다클론 항체는 상기한 체장암 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.
- [65] 단일클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

- [66] 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [67] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라,
- [68] 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [69] 본 발명에서 효소의 활성형에 결합하는 앵타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [70] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 체장암 및/또는 체장암 줄기세포를 진단하기 위하여 상기 단백질과 각각 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)를 포함하며, 보다 바람직하게는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 키메라 항체이고, 보다 더 바람직하게는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체이며, 가장 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [71] 본 발명에서 상기 항체는 미소입자(micro particle)와 접합된 항체(conjugated antibody)인 것이 바람직하다.
- [72] 또한 상기 미소입자는 착색된 라텍스(colored latex) 또는 콜로이드성 금 입자(colloidal gold particle)인 것이 바람직하다. 본 발명에서, 상기 항체는 상기 서술한 마커에 대한 공지의 mRNA 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 어떠한 항체도 될 수 있으나, 바람직하게는, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트이며, 가장 바람직하게는 상기 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트이다.
- [73] 상기 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 및 엘라이자 키트는 상기 단백질에 대한 다클론 항체 및 단일클론 항체, 그리고 표지물질이 결합된 상기 다클론 항체와 단일클론 항체에 대한 2차 항체를 포함한다.
- [74] 본 발명에서 키트의 종류의 예로는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, 엘라이자 키트, 또는 면역학적 도트 키트등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 키트의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [75] 상기 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 추가적으로 포함할 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는

마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

- [76] 또한, 상기 키트는 복합마커를 동시에 분석하기 위하여 단백질 마이크로어레이를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 추가적으로 포함할 수 있다. 마이크로어레이 키트는 고체상에 결합된 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 단백질 마이크로어레이 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 단백질 마이크로어레이 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단, 효소(예: 항체와 융합됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 단백질 마이크로어레이를 이용하여 시료를 분석하는 방법은 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인함으로써 채장암 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

- [77] 루미넥스 어세이(Luminex Assay)는 소량(10-20 μl)의 환자 시료를 전 처리하지 않은 상태에서 최대 100종류의 어널라이트(analyte)를 동시에 측정할 수 있는 고용량(high-throughput) 정량분석방법으로서 감도가 좋고(pg 단위), 빠른 시간 내에 정량이 가능하여(3-4시간), 기존의 엘라자(ELISA)나 엘리스팟(ELISPOT)을 대체할 수 있는 분석방법이다. 상기 루미넥스 어세이(Luminex Assay)는 96-웰 플레이트(well plate)에 있는 각각의 웰에서 100가지 이상의 생물학적 시료를 동시에 분석할 수 있는 멀티플렉스 형광 마이크로플레이트(multiplexed fluorescent microplate) 분석방법으로 두 종류의 레이저 감지기(laser detector)를 사용하여 실시간으로 신호전달을 진행시킴으로 100개 이상의 다른 색깔 군의 폴리스티렌 비드(polystyrene bead)를 구별하여 정량한다.

- [78] 상기 100개의 비드는 다음과 같은 방법으로 구별되도록 구성된다. 한쪽은 붉은 형광 비드(red fluorescence bead)가 열 단계 이상으로 나뉘어 있고, 다른 한 쪽은 오렌지 형광 비드(orange fluorescence bead)가 열 단계로 나뉘어 강도(intensity)의 차이를 보이며 그 사이의 비드(bead)들은 레드(red)와 오렌지(orange)의 비율(ratio)이 각각 다른 비율로 섞여 있어 전체적으로 100개의 색-코드 비드 세트(color-coded bead set)를 구성하고 있다. 또한 각각의 비드에는 분석하고자 하는 단백질의 항체가 부착되어 있어 이를 이용한 면역항체반응으로 단백질 정량이 가능하다. 이 시료는 두개의 레이저(laser)를 사용하여 분석하는데,

하나의 레이저(laser)는 비드(bead)를 감지(detection)하여 비드 고유번호를 알아내고, 다른 레이저는 비드에 붙어 있는 항체와 반응한 시료 속의 단백질을 감지하게 된다. 따라서 한 웰에서 동시에 100가지의 생체 내 단백질 분석이 가능하다. 이 분석은 15 μ l 정도의 적은 시료로도 감지가 가능한 장점이 있다.

[79] 본 발명의 루미넥스(Luminex) 어세이를 수행할 수 있는 루미넥스(Luminex) 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 루미넥스 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 루미넥스 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단, 효소(예: 항체와 접합됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 상기 항체는 미소입자(micro particle)와 접합된 항체(conjugated antibody)일 수 있으며, 또한 상기 미소입자는 착색된 라텍스(colored latex) 또는 콜로이드성 금 입자(colloidal gold particle)일 수 있다.

[80] 본 발명의 체장암 진단 또는 예후 분석용 키트에서 상기 체장암 진단용 면역크로마토그래피 스트립을 포함하는 체장암 진단 키트는 5분내 분석결과를 알 수 있는 래피드 테스트(Rapid test)를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. 상기 면역크로마토그래피 스트립은 (a) 시료가 흡수되는 샘플패드(sample pad); (b) 시료 내의 상기 유전자의 단백질과 결합하는 결합 패드(conjugate pad); (c) 상기 유전자의 단백질에 대한 단일클론 항체를 포함하는 반응선(test line) 및 대조선(control line)이 처리되어 있는 반응막(test membrane); (d) 잔량의 시료가 흡수되는 흡수패드(absorption pad); 및 (e) 지지체를 포함하는 것이 바람직하다. 또한 면역크로마토그래피 스트립 (Immunochromatographic strip)을 포함하는 래피드 테스트 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 래피드 테스트 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 테스트 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체가 고정된 나이트로셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수 패드와 샘플 패드 등 진단에 필요한 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[81] 본 발명에서 면역학적 도트 어세이에 의한 단백질 발현 수준의 측정은 (a) 막에 생물학적 시료를 점적(dotting)하는 단계; (b) 상기 유전자의 단백질에 특이적인 항체를 상기 점적된 막에 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 반응시킨 막에 표지체가 접합된 2차 항체를 첨가하고 발색시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 엘라이자 어세이는 (a) 상기 마커에 대한 염기서열을 갖는 유전자의 단백질에 특이적인 항체 1을 고상체에 흡착시키는 단계; (b) 상기 고상체에

흡착된 항체 1과 암 의심 환자의 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성하는 단계; (c) 표지물질이 결합된 상기 마커에 대한 염기서열을 갖는 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 항체 2를 처리하여 상기 복합체와 결합시키는 단계; 및 (d) 상기 표지물질을 검출하여 단백질의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 샌드위치 엘라자 어세이인 것이 바람직하며, 상기 단백질 마이크로어레이 어세이는 (a) 상기 마커 유전자의 단백질에 특이적인 다클론 항체를 칩에 고정시키는 단계; (b) 상기 고정된 다클론 항체 1을 암 의심 환자의 생물학적 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성하는 단계; (c) 표지물질이 결합된 상기 마커에 대한 염기서열을 갖는 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 단일클론 항체를 처리하여 상기 복합체와 결합시키는 단계; 및 (d) 상기 표지물질을 검출하여 단백질의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

- [82] 상기 분석 방법들을 통하여 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 췌장암 의심 환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 췌장암 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량의 증가 여부를 판단하여, 췌장암 의심 환자의 실제 췌장암 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [83] 본 발명에서 용어 항원-항체 복합체란 췌장암 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [84] 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [85] 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [86] 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, K4 W(CN)8, [Os(bpy) 3] 2+, [Ru(bpy) 3] 2+, [Mo(CN) 8] 4- 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 포함되며 이로

제한되지 않는다.

- [87] 단백질 발현수준 측정은 바람직하게는, ELISA법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 췌장암 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여 췌장암 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [88] 또한, 바람직하게는, 상기 췌장암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 췌장암 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 암이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.
- [89] 또한, 바람직하게는, 상기 췌장암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시하는 것이다. 정상 조직 및 췌장암으로 의심되는 조직을 채취 및 고정한 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체 중 선택된 1개와 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다.
- [90] 또한, 바람직하게는, 상기 췌장암 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여 암 발병 여부를 확인할 수 있다.

- [91] 본 발명에서의 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨를 의미하고, 바람직하게는 조직 또는 세포를 의미하며, 가장 바람직하게는 세포를 의미한다.
- [92] 본 발명에서 체장암을 진단하기 위하여 사용되는 표현 “폴리뉴클레오타이드 측정”은 생물학적 시료에서 본원 발명의 단백질 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 폴리뉴클레오타이드의 양을 측정하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [93] 본 발명에서 마커로 사용되는 상기 단백질을 코딩하는 염기서열은 이 서열과 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [94] 바람직하게는, 본 발명에서의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 mRNA의 단편을 의미한다.
- [95] 본 발명의 진단용 키트에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 폴리뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다.
- [96] 본 발명의 “프라이머”는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다.
- [97] 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다.
- [98] 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [99] 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.
- [100] 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속,

방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.

- [101] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [102] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [103]
- [104] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 체장암 줄기세포 형성 억제용 조성물을 제공한다.
- [105] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 체장암 치료용 또는 전이 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [106] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분,

아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [107] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [108] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.0001-10000 /kg 범위 내이다.
- [109] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [110] 본 명세서에서 이용되는 KIAA1199 단백질에 대한 항체 또는 KIAA1199의 발현 억제용 핵산분자는 스피어 및 콜로니 형성을 감소시키며, 암줄기세포의 증식을 및 이동능을 감소시킴으로써 결과적으로 암 발생의 초기 현상으로 인식되는 암줄기세포의 증식을 억제할 수 있다.
- [111] 본 발명에서 이용되는 KIAA1199 발현 억제용 핵산분자는 KIAA1199 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 shRNA 올리고뉴클레오타이드이다.
- [112] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 서열은 KIAA1199 mRNA에 상보적이고 KIAA1199 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, KIAA1199 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

- [113] 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.
- [114] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [115] 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다(Weiss, B. (ed.): *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., *Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55:334-358(1999)).
- [116] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, KIAA1199의 발현 억제용 핵산분자는

KIAA1199 유전자에 상보적인 서열을 포함하는 siRNA 또는 shRNA이다.

- [117] 본 발명에서 용어 "siRNA는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.
- [118] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다.
- [119] siRNA 말단 구조는 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.
- [120] 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-엔드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-엔드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.
- [121] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 siRNA는 서열목록 제2서열의 KIAA1199 유전자의 2137 번째 내지 2161 번째 뉴클레오타이드에 상보적인 서열, 보다 구체적으로는 서열목록 제3서열에 기재된 siRNA이며, 서열목록 제2서열의 KIAA1199 유전자의 3664 번째 내지 3688 번째 뉴클레오타이드에 상보적인 서열, 보다 구체적으로는 서열목록 제4서열에 기재된 siRNA이다.
- [122]
- [123] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 조성물을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 체장암 줄기세포 형성 억제 방법을 제공한다.
- [124]
- [125] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 조성물은 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 체장암의 치료 또는 전이 억제 방법을 제공한다.
- [126]

발명의 효과

- [127] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같습니다:
- [128] (a) 본 발명은 췌장암 암 줄기세포 및 췌장암에 대한 신규한 분자 마커를 이용하여 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [129] (b) 본 발명은 췌장암 암 줄기세포 및 췌장암에 대한 신규한 분자 마커를 이용한 췌장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법, 췌장암 암 줄기세포 검출용 키트, 췌장암 진단 또는 예후 분석용 키트, 췌장암 암 줄기세포 형성 억제용 조성물 및 췌장암 치료용 또는 전이 억제용 억제학적 조성물을 제공한다.
- [130] (c) 본 발명의 췌장암 치료용 타겟은 췌장암 암 줄기세포에 특이적으로 작용하는 치료제 후보물질을 스크리닝 하는 데 매우 유용하다.
- [131] (d) 또한, 본 발명을 이용하면 췌장암의 진단 및 예후를 정확하게 분석할 수 있다.
- [132]

도면의 간단한 설명

- [133] 도 1은 단백질 후보군의 선정을 위한 마이크로어레이(microarray) 리스트를 나타낸 도이다. Capan-1과 HPAC 세포주에서 부착세포와 원형세포형태를 만들고 이 둘 간의 유전자 패턴의 차이를 마이크로어레이를 통해 확인하였고, 이 마이크로어레이의 결과 중 일부를 나열하였다.
- [134] 도 2a는 AsPC-1, Capan-1, HPAC 및 Miapaca-2에서의 부착세포와 원형타원체
- [135] 세포에서 KIAA1199의 mRNA 수준을 나타낸 도이다.
- [136] 도 2b는 Capan-1, HPAC의 부착세포와 원형타원체 세포에서 KIAA1199의 mRNA 수준을 나타낸 도이다.
- [137] 도 2c는 Capan-1, HPAC의 부착세포와 중앙 원형체 세포에서 KIAA1199의 단백질 수준을 나타낸 도이다.
- [138] 도 2d는 췌장암환자의 암조직, 정상조직 및 KIAA1199의 면역조직염색 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [139] 도 3a는 Capan-1 세포주에 Flag가 태그된 KIAA1199 cDNA 벡터(K8, K9 및 K10)와 공벡터(E6 및 E9)의 웨스턴 블로팅 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [140] 도 3b는 E6 세포주와 K10 세포주의 세포 모양을 현광현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 도이다.
- [141] 도 3c는 E6 및 K10 세포주를 이용하여 이동 어세이와 침습 어세이를 나타낸 도이다.
- [142] 도 3d는 E6 및 K10 세포의 회복 양상을 나타낸 도이다.
- [143] 도 3e는 E6 및 K10 세포들의 분자적 패턴의 차이를 나타낸 도이다.
- [144] 도 4a는 KIAA1199에 특이적인 siRNA 변이체 #1 및 #2를 각각 K10 세포주(KIAA1199의 과발현 세포주)에 처리한 후의 KIAA1199의 발현 양상을 나타낸 도이다.

- [145] 도 4b는 나이브(naive) Capan1 세포와, E6, K10 및 K10 세포에 스크램블 올리고를 처리한 샘플, 그리고 K10 세포에 특이적인 siRNA를 처리한 후 KIAA1199 발현 수준을 나타낸 도이다.
- [146] 도 5a는 웨스턴 블로팅으로 E6, K10 및 K10+ 스크램블 올리고 및 K10+ siRNA 샘플에서의 각각의 분자의 발현 양상을 나타낸 도이다.
- [147] 도 5b는 qRT-PCR로 KIAA1199, 베타-카테닌, Dvl2, Wnt3, Wnt3a 및 Wnt7b의 mRNA 발현 양상을 나타낸 도이다.
- [148] 도 5c는 AsPC-1 세포주에서 스크램블과 siRNA를 각각 처리한 세포들로 qRT-PCR을 수행한 실험결과를 나타낸 도이다.
- [149] 도 5d는 cf/Lef 프로모터 서열이 있는 ORF(open reading frame)에 루시페레이즈(luciferase)가 태그된 TOP 플라스미드와 뮤테이션된 Tcf/Lef 프로모터 서열이 있는 ORF에 루시페레이즈가 태그된 FOP 플라스미드를 이용한 루시페레이즈 어세이(luciferase assay)의 실험결과를 나타낸 도이다.
- [150] 도 5e는 Capan1 세포주의 E6, K10 및 AsPC-1 세포주의 스크램블과 siRNA 처리한 4가지의 샘플에서 OCT4, Nanog 및 Sox-2의 mRNA 수준을 나타낸 도이다.
- [151] 도 5f는 K10 세포들을 초원심 세포분획법(subcellular fractionation)을 수행하여 세포질, 멤브레인, 핵 및 세포골격의 분획물에서의 KIAA1199의 단백질 발현 양상에 대한 웨스턴 블로팅 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [152] 도 5g는 KIAA1199가 핵에서 전사인자로 작용하는 지 확인하기 위한 ChIP 어세이 실험결과를 나타낸 도이다.
- [153] 도 5h는 분비성 Wnt3를 웨스턴 블로팅 실험결과를 나타낸 도이다.
- [154] 도 6a는 KIAA1199와 OCT4의 상호작용을 나타낸 도이다.
- [155] 도 6b는 OCT4와 SUMO-1으로 각각 면역침전시킨 후 수모일레이션 어세이(sumoylation assay)를 수행한 실험결과를 나타낸 도이다.
- [156] 도 7은 *in vivo* KIAA1199의 종양형성능을 검증한 실험결과를 나타낸 도이다.
- [157] 도 8a는 Capan-1 및 HPAC 세포주의 부착세포와 원형체 세포에서 Oct4, Nanog, Dvl2, Wnt3, Wnt3a의 mRNA 레벨을 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- [158] 도 8b는 Capan-1 및 HPAC 세포주의 부착세포와 원형체 세포에서 β -카테닌 및 Dvl2의 단백질 발현 레벨을 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- [159] 도 8c는 Capan-1 및 HPAC 세포주의 원형체 세포에서 β -카테닌과 KIAA1199의 상호작용을 β - 카테닌 항체를 이용한 면역침강법을 수행하여 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- [160] 도 8d는 Capan-1 및 HPAC 세포주의 부착세포와 원형체 세포에서 β -카테닌과 KIAA1199의 상호작용을 KIAA1199 항체를 이용한 면역침강법을 수행하여 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- [161] 도 8e는 β -카테닌과 KIAA1199이 OCT4와 Nanog 프로모터에 대하여 전사인자로 작용하는지 여부를 크로마틴 면역침강 어세이를 통해 측정된 결과를 나타낸 도이다.

- [162] 도 9는 췌장암 환자의 TMA 조직에 대하여 KIAA1199를 이용하여 IHC를 실시한 결과 및 환자들의 평균 생존율을 나타낸 도이다.
- [163] 도 10a-f는 E6 및 K10 세포에서 각각 이리노테칸(Irinotecan), 카보플라틴(Carboplatin), 5-FU, 젬시타빈(Gemcitabine), 에토포시드(Etoposide), 파크리탁셀(Paclitaxel)의 IC50 값을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [164] 도 10g는 E6와 K10 세포에 각각 스크램블 siRNA 또는 siKIAA1199를 처리 후 젬시타빈에 대한 생존율의 엔드 포인트를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[165]

발명의 실시를 위한 형태

- [166] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[167]

[168] 실시예

[169] 실험 재료 및 실험 방법

[170] 1. 종양 원형체 배양(sphere culture)

[171] 0.5% BSA, 0.5% FBS, 1xITS, bFGF 10 ng/mL 및 EGF 10 ng/mL을 포함한 배양 배지에서 1,000개 세포/mL의 농도를 유지하도록 5일 또는 7일 동안 배양하였다.

[172]

[173] 2. RT-PCR 및 qRT-PCR

[174] RNeasy 미니 키트(Quiagen)를 이용하여 종양원형체 세포 유래의 췌장암 세포 또는 췌장암 세포로부터 RNA를 추출하였다. Super Script II System(Invitrogen)를 이용하여 수득된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. Taq 폴리머레이즈(Takara) 및 SYBR 마스트 믹스(ABI)를 이용하여 타겟에 특이적인 프라이머로 RT-PCR 및 qRT-PCR을 각각 수행하였다.

[175]

[176] 3. 세포주, 항체 및 siRNA

[177] 인간 췌장암 세포주 AsPC-1, Capan-1 및 HPAC를 본 실험에 이용하였다. 웨스턴 블로팅(western blotting) 또는 다른 어세이를 위해 KIAA1199(abcam), nanog(CST), OCT4(CST), Snail(CST), Slug(CST), pAKT(CST), pmTOR(CST), pGSK3 β (CST), E-카데린(cadherin), N-cadherin, β -카데닌(catenin)(Santa cruz), IGFR1 α (Santa cruz), IGFR1 β (Santa cruz), SUMO-1(Santa cruz) 및 GAPDH(Santa cruz)에 특이적인 항체를 이용하였다. KIAA1199 유전자에 특이적인 siRNA는 Invitrogen(Stealth)으로부터 구입하였다.

[178]

[179] 4. 플라스미드 및 안정한 세포주 구축

- [180] 인간 KIAA1199 ORF(NM_018689)를 GenScript로부터 구입하였고 c-말단에 Flag로 태그된 pcDNA3.1(+) 플라스미드에 클로닝하였다. 상기 pcDNA3.1(+) 플라스미드 및 pcDNA3.1 플라스미드를 GENEIN 형질감염 시약(Gliostem)을 이용하여 Capan-1 세포주에 형질감염시켰다. 대조군 벡터를 갖는 안정화 세포주 E6 및 KIAA1199가 과발현된 안정화 세포주 K10을 구축하였다.
- [181]
- [182] **5. 이동(migration), 침윤(invasiveness) 및 상처 치유(wound healing) 어세이**
- [183] 2×10^5 또는 3×10^5 세포/mL의 세포를 트랜스 웰(3422, corning)에 분주하였다. 3일 후, 5% 글루타알데하이드로 10분 동안 세포를 고정한 다음 증류수로 3회 세척하였다. 크리스털 바이올렛을 이용하여 20-30분 동안 세포를 염색하였다. 상기 세포를 여러 번 증류수로 세척한 후, 건조하고 슬라이드에 마운팅 하였다.
- [184] 침윤 어세이를 위하여, 위쪽 면을 아가로오스로 코팅하였고 이후 동일한 수의 세포를 트랜스 웰의 인서트에 분주하였다. 이후 이동 어세이와 동일한 단계를 수행하였다.
- [185] 상처 치유 어세이를 위하여 90% 이상의 밀도를 갖는 E6 및 K10 세포의 배양 플레이트를 톱으로 긁어 스크래치를 내고 24 시간 동안 성장 배지에서 배양하였다.
- [186]
- [187] **6. 수모화 어세이(Sumoylation assay)**
- [188] 50 mM Tris-HCl(pH 6.7) 완충액, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 120 mM NaCl, 0.5% NP40 및 1x 프로테아제 억제제 각테일을 포함하는 IP 완충액을 이용하여 각각의 샘플(나이브(naive) 세포, E6 세포, K10 세포 및 siRNA를 처리한 세포)로부터 세포 용해물을 수득하였다. 용해물을 4°C에서 하룻밤 동안 적절한 항체와 반응시키고, 결합을 돕기 위해 2시간 동안 울트라 바이오링크 서포트 레진(ultra biolink support resin)을 처리하였다. 상기 레진은 원심분리하여 수집하고, 20 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA 및 0.5% NP40을 포함하는 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 상기 샘플을 이용하여 SDS-PAGE를 수행한 후 웨스턴 블로팅 분석을 실시하였다.
- [189]
- [190] **7. 자가재생 및 콜로니 형성 어세이(Self-renewal and colony formation assay)**
- [191] 췌장암 세포, 나이브 세포, 스크래블(scramble) siRNA로 형질감염된 세포 및 KIAA1199에 특이적인 siRNA로 형질감염된 세포의 종양 원형체를 단일 세포로 분리하였다. 세포를 줄기세포 배지에서 배양하였고 2세대 및 3세대 종양원형체를 수득하였다. 플로팅 종양원형체 및 전체 세포의 수를 광학현미경하에서 카운팅하였다. 콜로니 형성을 위해서, 분리된 단일 세포를 성장 배지가 포함된 0.3% 소프트 아가에서 웰당 100개의 세포의 밀도로 24웰 플레이트(24 well low attached dishes, Corning)에 분주하였다. 이후 콜로니가 보일 때까지 플레이트를 5% CO₂, 37°C 조건에서 14일 동안 배양하였다. 콜로니를

0.01% 크리스탈 바이올렛을 이용하여 염색하였고, 도립 현미경 하에서 콜로니 수를 카운팅 하였다.

[192]

[193] **8. Chip(chromatin immunoprecipitation) 어세이**

[194] E6, K10, AsPC-1 스크램블로 형질감염된 세포, AsPC-1 siKIAA1199로 형질감염된 세포, capan-1 유래 접착 및 원형체 세포, HPAC 유래 접착 및 원형체 세포를 ChIP 어세이에 이용하였다. 본 실험은 EZ ChIP kit(Up state) 프로토콜에 따라 수행하였다. IP에 이용된 항체는 웨스턴 블로팅에 이용된 것과 동일한 것이다.

[195]

[196] **9. *In vivo* 이종이식**

[197] 5마리의 Balb/C 누드 마우스는 각 실험군에 이용하였다. E6 및 K10 세포를 5×10^5 세포/마우스의 비율로 주입하였고, 7일 후 마우스를 희생시켰다.

[198]

[199] **10. TMA(Tissue Microarray) 및 면역조직화학염색(IHC)**

[200] 췌장암 환자의 암조직 및 인접한 정상 조직을 포함하는 TMA에 대하여 KIAA1199 항체(Sigma-Aldrich)를 이용하여 면역조직화학염색(IHC)을 실시하였다. 면역조직화학염색은 다음 방법으로 실시하였다: 슬라이드에 도말되어 있는 조직들을 60°C에서 30분 배양한 후, 100% 에탄올에서 시작하여 70%, 50%, 30% 등의 희석된 알코올에 담가 조직으로부터 파라핀을 제거하였다. 곧 이어 PBS로 3회 세척하고, 퍼록시다아제 퀀칭 용액(100% 메탄올 및 30% 과산화수소 혼합액)에 20분간 담근 후, PBS로 3회 세척한 후 끓인 10 mM 구연산 나트륨 용액(pH 6.0)에 슬라이드를 3분간 담갔다. 수돗물을 슬라이드에 10분 정도 흘려보낸 후, PBS로 3회 세척하고 10% 노말 당나귀 혈청을 상온에서 1시간 처리했다. PBS로 3회 세척한 후, KIAA1199 단백질에 특이적인 항체(Sigma-Aldrich)와 4°C에서 24시간 동안 반응시키고 PBS로 세척하였다. DAKO사의 Envision kit 용액을 처리한 다음 20분 동안 챔버에 정치하였다. PBS와 증류수로 각 3회 세척한 다음, 헤마톡실린을 1분간 처리하고 증류수로 3회 세척하여 건조한 후 퍼마운트를 올리고 커버 슬라이드를 덮어 현미경으로 관찰하였다. 암 조직의 면역반응성은 염색 강도에 따라 발현하지 않음, 약하게 발현, 중간 정도로 발현 및 강하게 발현으로 구분하였다. 각각에 대한 점수를 매기기 위해서는 저배율 필드(low-power field)(100x) 하에서 세포의 50% 이상이 면역반응성에 대해 해당하는 정도를 나타내야 한다. OS는 진단 날짜와 사망일 사이의 간격으로 정의하였다. RFS(Recurrence-free survival)는 사망일과 재발일 또는 마지막 내원일 사이의 간격으로 정의하였다.

[201]

[202] **11. MTT 어세이**

[203] E6 및 K10 세포를 96웰 플레이트에 2,500 세포/웰로 시딩하였다. 24시간 후,

5-FU, 겐시타빈(Gemcitabine), 이리노테칸(Irinotecan), 에토포시드(Etoposide), 카보플라틴(Carboplatin) 및 파크리탁셀(Paclitaxel)을 지시하는 농도별로 각 플레이트에 처리하였다. 72시간 동안 배양한 후, 세포를 PBS로 세척하고 성장배지에 희석한 MTT 용액(Amresco)을 3시간 처리하였다. 그 다음, ELISA 기기를 이용하여 570 nm 파장에서 형광을 측정하였다.

[204]

[205] **12. 통계학적 분석**

[206] 모든 통계학적 분석은 Windows version 18.0(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)의 SPSS를 이용하여 실시하였다. 생존 곡선은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 작성하였으며, 곡선들 사이의 차이는 로그 랭크 테스트를 이용하여 평가하였다. P-값 <0.05는 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[207]

[208] **실험 결과**[209] **1. 마이크로어레이(Microarray)를 통한 단백질 후보군의 선정**

[210] 인간 췌장암 세포주인 CAPAN-1와 HPAC에서 암줄기세포 배양방법인 종양 원형체 배양(sphere culture)을 통해 각 세포주의 종양 원형체(spheroid) 세포들을 배양하고, 대조군인 부착 세포(adherent cell)를 이용하여 마이크로어레이칩에 의한 분석을 수행하였다. 상기 결과를 도 1에 나타내었다.

[211] 도 1은 부착 세포 대비 종양 원형체 세포들에서의 배수 변화(fold change) 값(FC_HS와 FC_CS)을 나타낸다. 도 1에 기재된 리스트에 있는 후보들 중, 연구 타겟으로 KIAA1199를 선별하였다.

[212]

[213] **2. 세포주에서의 KIAA1199 단백질의 발현 수준의 검증**

[214] 인간 췌장암 세포주인 AsPC-1, Capan-1 및 HPAC 및 Miapaca-2에서 종양 원형체 배양을 통해 각 세포주의 종양 세포를 배양하고, 대조군인 부착세포를 이용하여 KIAA1199의 mRNA 수준을 확인하기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 도 2a에서 보는 바와 같이 각 세포주의 종양 원형체형태에서 부착세포보다 KIAA1199의 mRNA가 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[215] 또한, 인간 췌장암 세포주인 Capan-1, HPAC의 부착세포와 종양 원형체 세포에서 KIAA1199의 단백질 수준을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, 두 세포주의 부착세포보다 종양 원형체 세포에서 KIAA1199의 mRNA가 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 2b).

[216] 인간 췌장암 세포주인 Capan-1, HPAC의 부착세포와 종양 원형체 세포에서 KIAA1199의 단백질 수준을 확인하기 위하여 웨스턴 블로팅을 수행한 결과, 두 세포주의 부착세포보다 종양 원형체 세포에서 KIAA1199의 단백질이 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 2c).

[217] 췌장암환자의 암조직, 정상조직 및 KIAA1199 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 면역조직염색을 수행한 결과, 췌장암 환자의 정상조직보다

암조직에서 KIAA1199 단백질이 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 2d).

[218]

[219] **3. Flag-KIAA1199가 과발현된 안정한 세포주의 확립 및 특성 검증**

[220] Capan-1 세포주에 Flag가 태그된 KIAA1199-cDNA 벡터(K8, K9 및 K10 세포)와 공벡터(E6 및 E9 세포)를 형질감염시킨 후 선택성 약물인 G418로 선별하였다. 각각의 클론의 Flag-KIAA1199 단백질의 발현 양상은 Flag에 특이적인 항체를 이용해 웨스턴 블로팅으로 검증하였다. 상기 결과는 도 3a에 나타냈다.

[221] E6 세포주와 K10 세포주의 세포 모양을 형광현미경으로 관찰한 결과, E6와는 달리 K10 세포주의 모양이 가지(branch)가 있는 형태의 세포모양으로 변화한 것을 확인할 수 있었다(도 3b).

[222] E6 및 K10 세포주에 대하여 이동 어세이(migration assay) 및 침투 어세이(invasion assay)를 수행한 결과, K10 세포주에서 이동(migration)되거나 침습(invasiveness)이 큰 세포 수가 많았다(도 3c).

[223] 또한, 24웰 플레이트 디쉬에 E6 및 K10 세포를 분주 및 유지한 후, 팁으로 스크래치를 내고 24시간 후 회복 양상을 관찰한 결과, K10 세포주에서의 회복 정도가 빨랐음을 확인하였다(도 3d).

[224] 한편, E6 및 K10 세포들의 분자적 패턴의 차이를 웨스턴 블로팅으로 확인한 결과, EMT 관련 분자, IGF-1 신호전달 관련 분자, 자가재생을 조절한다고 알려져 있는 OCT4, Nanog 및 Wnt 신호전달의 주요 분자인 베타-카테닌(beta-catenin)의 발현양상이 변화되어 있었음을 확인하였다(도 3e).

[225]

[226] **4. KIAA1199의 기능 검증**

[227] KIAA1199의 기능을 알아보기 위해 KIAA1199에 특이적인 siRNA 변이체 #1 및 #2를 각각 K10 세포주(KIAA1199의 과발현 세포주)에 처리하고 발현 양상을 확인하였다. 도 4a에서 보는 바와 같이, 변이체 #1 보다 #2가 효율적으로 KIAA1199의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 K10에서 증가되어 있던 OCT4나 IGF1R과 같은 분자들도 함께 감소하는 것을 확인하였다.

[228] 나이브(naive) Capan1 세포, E6, K10 세포; K10 세포에 스크램블 올리고를 처리한 군; 및 K10 세포에 특이적인 siRNA를 처리한 군에서 KIAA1199 발현 수준을 확인하였다(도 4b).

[229] E6, K10 세포, 스크램블 올리고를 처리한 K10 세포 및 KIAA1199 특이적 siRNA 처리한 K10 세포에서 종양 원형체 형성 및 콜로니 형성 실험을 수행한 결과, E6에 비해 K10 및 K10 세포에 스크램블 올리고를 처리한 세포에서는 형성된 종양 원형체와 콜로니의 수가 증가하였고, K10에 KIAA1199 특이적 siRNA를 처리한 세포는 종양 원형체 및 콜로니 형성능이 떨어지는 것을 확인하였다(도 4c).

[230] 또한, AsPC-1 세포에 스크램블 또는 KIAA1199 특이적 siRNA를 처리한 후, 웨스턴 블로팅을 수행한 결과, Capan-1 세포에서 만들어진 K10 세포주와 유사한

분자적 변화 양상이 확인되었다(도 4d).

[231]

[232] **5. KIAA1199의 Wnt 신호전달(signaling)과의 관련성 검증**

[233] 베타-카테닌의 발현양상이 KIAA1199 발현 정도에 따라 변화하는 것을 확인하였고, Wnt 신호전달과의 관련성을 검증하였다.

[234] 웨스턴 블로팅으로 E6, K10 및 K10+ 스크램블 올리고 및 K10+ siRNA 샘플에서의 각 분자 발현 양상을 측정하였으며, qRT-PCR로 KIAA1199, 베타-카테닌, Dvl2, Wnt3, Wnt3a 및 Wnt7b의 mRNA 발현 양상을 측정하였다. 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, 전형적인 Wnt 신호전달에 관련된 분자들인 베타-카테닌, Dvl2, Wnt3, Wnt3a의 mRNA 수준이 KIAA1199의 수준에 상응하게 변화하는 것을 확인하였다. 그러나, 비전형적인 Wnt 신호전달 관련 분자인 Wnt7b mRNA 수준은 KIAA1199의 수준과 반대로 나타나는 것을 확인하였다.

[235] AsPC-1 세포주에서 스크램블과 siRNA를 각각 처리한 세포들로 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 전형적인 Wnt 신호전달에 관련되어 있는 Dvl2, Wnt3 및 Wnt3a의 mRNA 수준이 KIAA1199의 mRNA 수준에 따라 변화하는 것을 확인하였다(도 5c).

[236] 베타 카테닌이 주요 분자로 작용하는 전형적인 Wnt 신호전달에 KIAA1199가 작용하는지 확인하기 위해 베타 카테닌이 핵으로의 이동 후, 결합하는 Tcf/Lef 프로모터 서열이 있는 ORF(open reading frame)에 루시퍼레이즈(luciferase)가 태그된 TOP 플라스미드와 뮤테이션된 Tcf/Lef 프로모터 서열이 있는 ORF에 루시퍼레이즈가 태그된 FOP 플라스미드를 이용해 루시퍼레이즈 어세이(luciferase assay)를 수행하였다. 그 결과, KIAA1199가 과다발현되어 있는 K10 세포에서는 TOP/FOP 비율이 증가했고, 나머지 세포주들에게서 siRNA로 KIAA1199 발현을 감소시킨 샘플에서는 TOP/FOP 비율이 감소하였다(도 5d).

[237] Capan1 세포주의 E6, K10 및 AsPC-1 세포주의 스크램블과 siRNA 처리한 4가지의 샘플에서 전형적인 Wnt 신호전달의 타겟으로 알려져 있는 OCT4, Nanog 및 Sox-2의 mRNA 수준을 확인한 결과, 두 세포주 모두 KIAA1199 레벨에 따라 각 세 가지의 분자 mRNA 발현 수준이 변화하는 것을 확인하였다(도 5e).

[238] K10 세포들을 초원심세포분획법(subcellular fractionation)을 수행하여 세포질, 멤브레인, 핵 및 세포골격의 분획물을 수득하고 각각의 분획물에서 KIAA1199의 단백질 발현 양상을 웨스턴 블로팅으로 확인하였다. 그 결과, 핵에서 KIAA1199가 발현되는 것을 확인하였다(도 5f).

[239] KIAA1199가 핵에서 전사인자로 작용하는지를 확인하기 위하여 ChIP 어세이를 수행한 결과, 베타 카테닌은 KIAA1199 단백질 발현 수준이 증가됨에 따라 타겟 프로모터와의 결합이 증가하였고(도 5g의 패널 a), KIAA1199 단백질 발현 수준이 감소함에 따라 타겟 프로모터와의 결합이 감소하였다(도 5g의 패널 e). 또한, OCT4, Nanog 프로모터에 KIAA1199가 결합하는 것을 확인하였다(도

5g의 패널 b, c, d).

- [240] E6 및 K10 세포의 배지를 걷어서 버리고, 아세톤으로 침전시킨 후 분비성 Wnt3를 웨스턴 블로팅으로 확인한 결과, K10 세포에서 분비성 Wnt3가 증가하였다(도 5h).

[241]

[242] **6. OCT4와의 관련성 검증**

- [243] KIAA1199가 증가함에 따라 OCT4가 변형되어 있는 밴드의 강도가 강해지는 것을 확인하였기 때문에, KIAA1199와 OCT4의 관련성을 조사하였다. 상기 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.

- [244] 도 6a에 나타낸 바와 같이, 110 kDa의 KIAA1199 단백질이 OCT4와 관련성이 있다는 것을 확인하였다.

- [245] 또한, OCT4의 변형된 밴드를 확인하기 위해 수모화 어세이(sumoylation assay)를 수행하였다. Capan1의 K10 세포주와 AsPC-1 세포주에 스크램블과 KIAA1199 특이적 siRNA를 처리한 후, OCT4와 SUMO-1으로 각각 면역침강시킨 후 수모일레이션 어세이를 수행한 결과, KIAA1199의 단백질 발현양에 따라 OCT4의 수모일레이션의 정도가 변화함을 확인하였다(도 6b).

[246]

[247] **7. *in vivo* KIAA1199의 종양형성능 검증**

- [248] 5×10^5 개의 E6 및 K10 세포를 각 5마리씩의 누드 Balb/C 마우스의 오른쪽 다리 위 피하지방에 주입한 후 7주 뒤 마우스를 희생시켰다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, E6를 주입한 5 마리의 마우스 중에 종양이 발생한 마우스는 전혀 없었음을 확인하였다. 그러나, K10 세포를 주입한 마우스 5마리 중 4마리에서 종양이 발생하였음을 확인하였다.

[249]

[250] **8. 부착세포와 종양 원형체를 대상으로 기본 WNT 시그널링과 KIAA1199의 관련성을 재확인**

- [251] Capan-1과 HPAC 세포주를 이용해 부착세포와 원형체 세포를 만들고 거기서 Oct4, Nanog, Dvl2, Wnt3, Wnt3a의 mRNA 레벨을 확인하였다. mRNA 레벨 확인에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: Wnt3 정방향, 5'-GCG TGT TAG TGT CCA GGG AGT T-3'; Wnt3 역방향, 5'-TGA GGT GCA TGT GGT CCA GGA T-3'; Wnt3a 정방향, 5'-ATG AAC CGC CAC AAC AAC GAG G-3'; Wnt3a 정방향, 5'-GTC CTT GAG GAA GTC ACC GAT G-3'; Oct4 정방향, 5'-CCT GAA GCA GAA GAG GAT CAC C-3', Oct4 역방향, 5'-AAA GCG GCA GAT GGT CGT TTG G-3'; Nanog 정방향, 5'-CTC CAA CAT CCT GAA CCT CAG C-3'; Nanog 역방향, 5'-CGT CAC ACC ATT GCT ATT CTT CG-3'; Dvl2 정방향, 5'-TCC ATA CGG ACA TGG CAT CGG T-3'; Dvl2 역방향, 5'-CGT GAT GGT AGA GCC AGT CAA C-3'. 두 세포주에서 β -카테닌 및 Dvl2에 대한 항체(Santa cruz)를 이용하여 단백질 레벨을 확인하였다. 그 결과, 두 세포주 모두 원형체 세포에서 각각의

mRNA 레벨 및 단백질 레벨이 증가하였다(도 8a-b).

- [252] 두 세포주의 원형체 세포에서 β -카테닌과 KIAA1199의 상호작용을 면역침강법을 이용하여 확인하였고, β -카테닌과 KIAA1199의 OCT4와 Nanog 유전자에 대한 전사 활성을 크로마틴 면역침강 어세이를 통해 확인하였다(도 8c-d). 또한, Upstate 사의 EZ Chip Kit를 이용하여 OCT4와 Nanog의 전사인자로 알려져 있는 β -카테닌과 마찬가지로 KIAA1199 또한 OCT4와 Nanog 프로모터에 전사인자로서 작용하고 있는 것을 확인하였다(도 8e). 이러한 결과로부터 부착세포에 비해 세포 원형체에서 KIAA1199가 OCT4와 Nanog 프로모터에 대한 전사인자로 작용한다는 것을 확인하였다.

[253]

- [254] **9. TMA(Tissue microarray) 분석을 이용한 KIAA1199와 췌장암환자들의 생존률 분석**

- [255] 췌장암 TMA 조직 30개를 대상으로 KIAA1199에 특이적인 항체(Sigma-Aldrich)로 IHC를 수행하였다. 그 결과, 40%의 암조직은 거의 염색되지 않거나 약한 염색 정도를 보였고, 60%의 암조직은 중간 정도거나 강한 염색 정도를 보였다(도 9). 거의 염색이 되지 않거나 약한 염색 정도를 보인 조직의 환자들의 평균 총 생존일은 1,847일인 반면, 중간 정도거나 강한 염색 정도를 보인 조직의 환자들의 평균 총 생존일은 226일로 차이가 났다. 이 분석은 SPSS 프로그램을 Windows version 18.0에서 시행했고 생존곡선은 Kaplan-Meier 방법으로 얻었고, p-값은 0.018이다. 분석 결과, KIAA1199의 발현이 강할수록 환자들의 평균 생존일이 줄어든다는 것을 확인하였다.

[256]

- [257] **10. 항암제제에 대한 민감도 테스트**

- [258] 각 항암제를 그래프 x축의 최대 농도에서 10분의 1씩 희석하여 MTT 어세이를 수행하고, 3일 배양 후 생존률의 엔드 포인트를 측정하였다. KIAA1199를 적게 발현하는 E6 세포에서보다 KIAA1199를 많이 발현하는 K10 세포에서 췌장암 항암제로 사용되고 있는 5-FU, 젬시타빈(Gemcitabine), 이리노테칸(Irinotecan), 에토포시드(Etoposide), 카보플라틴(Carboplatin)에 대한 IC50 값이 증가되는 것으로 나타났다(도 10a-e). 반면, 파클리탁셀(Paclitaxel)에 대해서는 반대의 결과가 나타났다(도 10f). 또한 E6와 K10 세포에 각각 스크램블 siRNA 또는 siKIAA1199를 처리 후 젬시타빈에 대한 생존률의 엔드 포인트를 측정한 결과 KIAA1199가 녹다운된 샘플에서 IC50 값이 감소하였다(도 10g).

[259]

- [260] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 체장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법:
 (a) 서열목록 제1서열의 단백질 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
 (b) 상기 단계 (a)에서의 상기 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드의 발현량을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 감소시키는 경우에는 상기 시료는 체장암의 예방 또는 치료용 물질로 판정된다.
- [청구항 2] 다음의 단계를 포함하는 체장암 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법:
 (a) 서열목록 제1서열의 단백질을 준비하는 단계;
 (b) 상기 단백질에 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및
 (c) 상기 시험 물질이 상기 단백질에 결합하는지 여부 또는 시험물질이 상기 단백질의 기능을 억제하는지 여부를 분석하는 단계; 상기 시험물질이 상기 단백질에 결합하거나 또는 단백질의 기능을 억제하면 체장암의 예방 또는 치료용 물질로 판정된다.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 단백질은 세포 표면 또는 바이러스 표면에 존재하거나, 또는 분리된 형태(isolated form)로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 결합제 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 체장암 줄기세포 검출용 키트.
- [청구항 5] 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 결합제 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 체장암 진단 또는 예후 분석용 키트.
- [청구항 6] 제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 7] 제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 키트는 유전자 증폭 또는 마이크로어레이용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 8] 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 체장암 줄기세포 형성 억제용 조성물.
- [청구항 9] 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 체장암 치료용 또는 전이 억제용 약제학적 조성물.
- [청구항 10] 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로

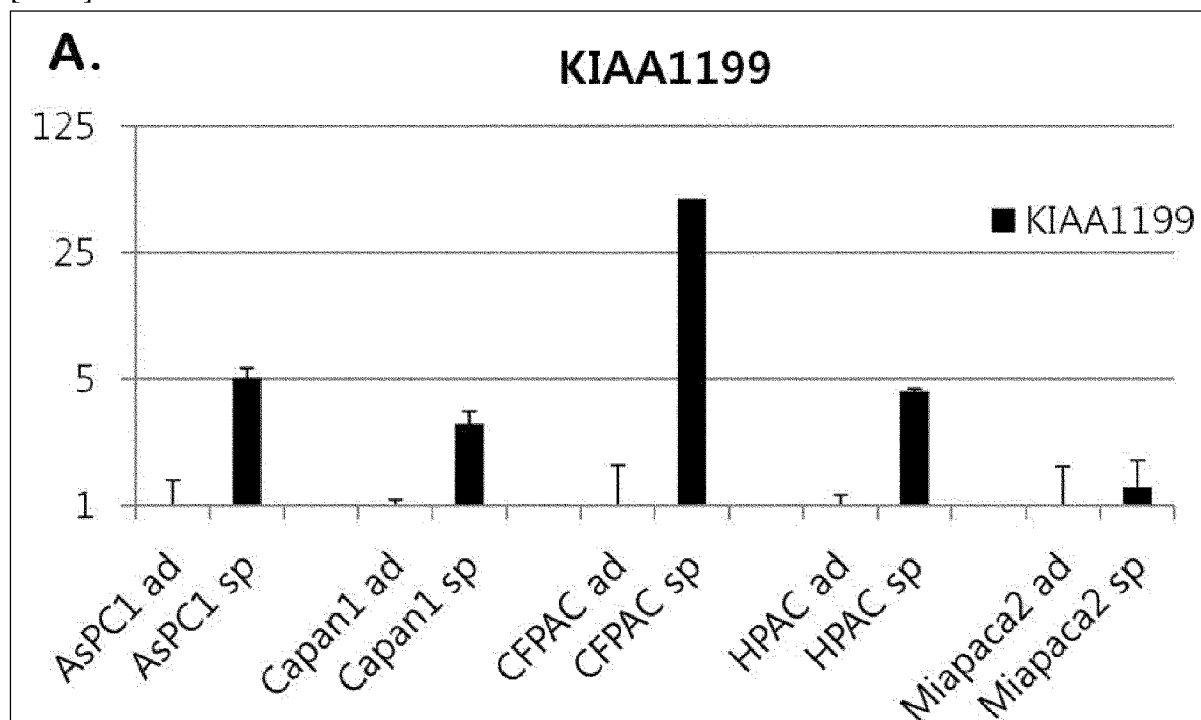
포함하는 조성물을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 체장암 줄기세포 형성 억제 방법.

- [청구항 11] 서열목록 제1서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 서열목록 제2서열의 폴리뉴클레오타이드의 발현 억제용 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 조성물은 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 체장암의 치료 또는 전이 억제 방법.

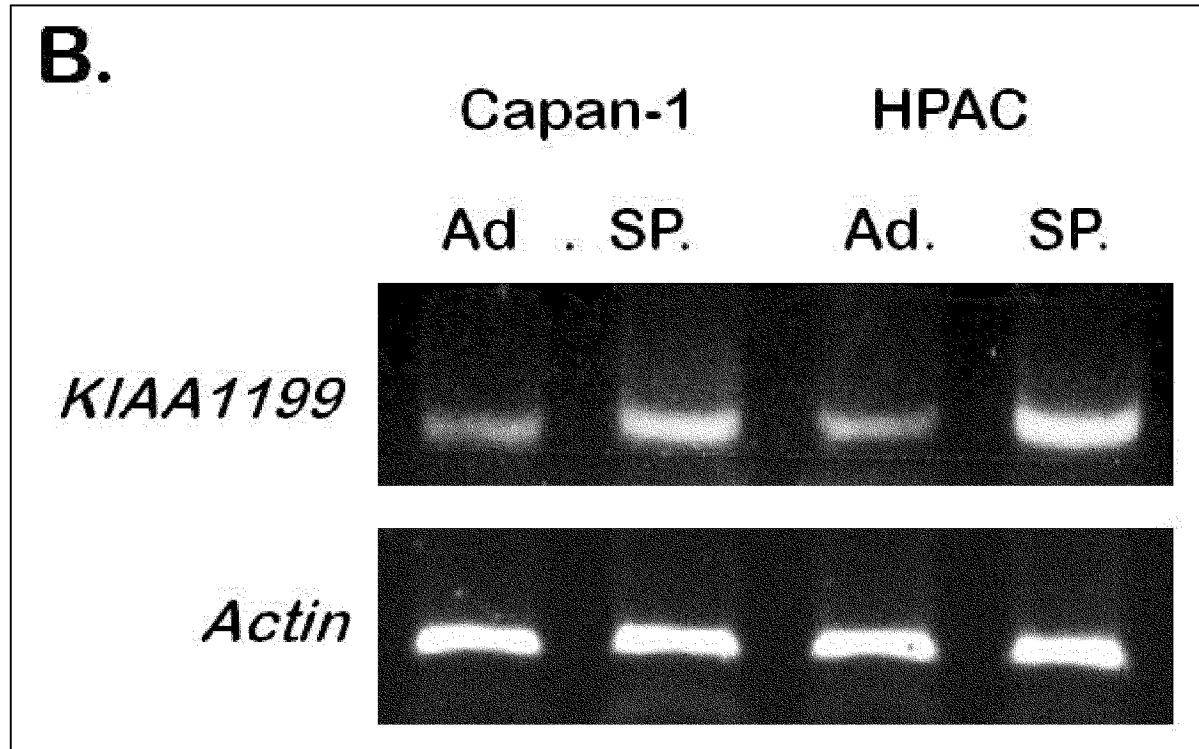
[도1]

Gene Symbol	Probe Set ID	FC_HS	FC_CS
ALDH6A1	221589_s_at	2.00106	1.453166
KIAA1199	212942_s_at	2.696376	1.408934
LGR6	227819_at	1.724781	1.387165
NOX1	207217_s_at	1.880391	2.311431
prominin 2	1552797_s_at	4.078862	2.044351
S100P	204351_at	1.582516	2.961011
SERPINB3	209720_s_at	9.710072	1.865523

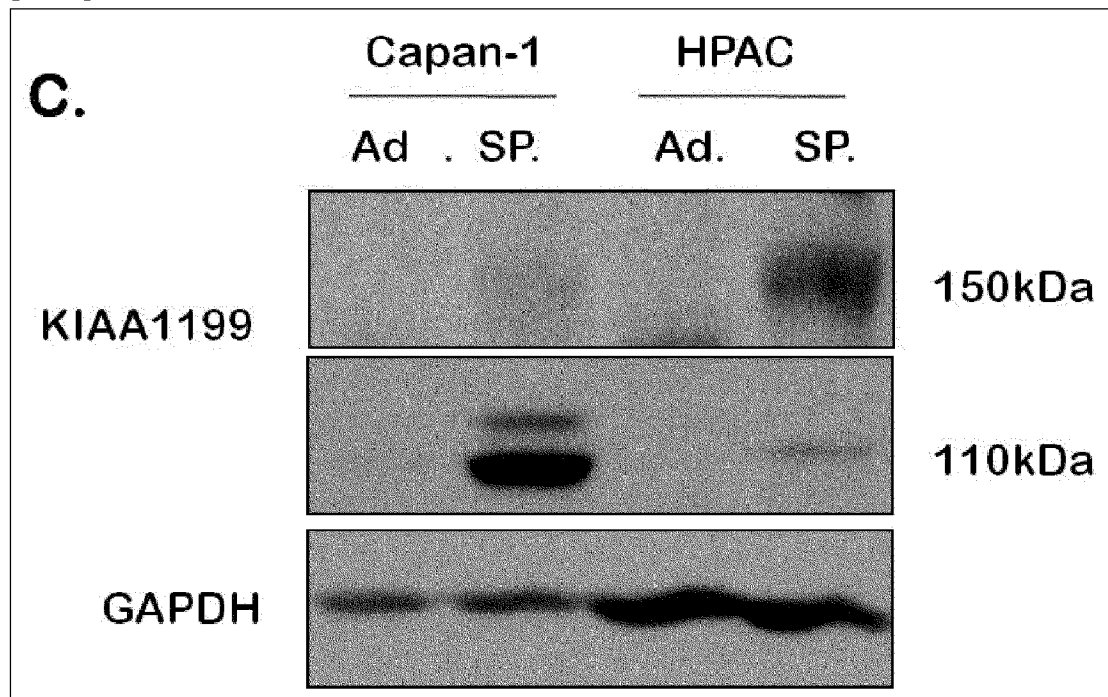
[도2a]



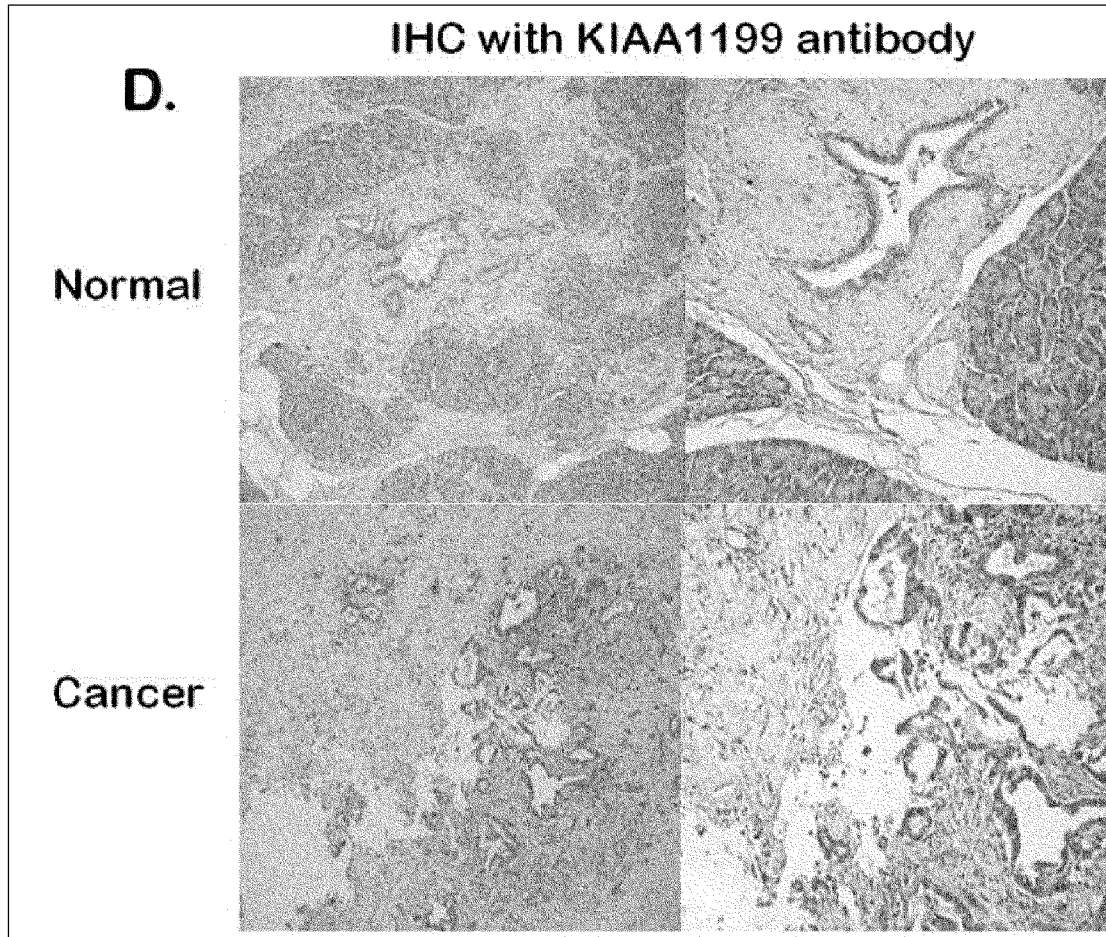
[도2b]



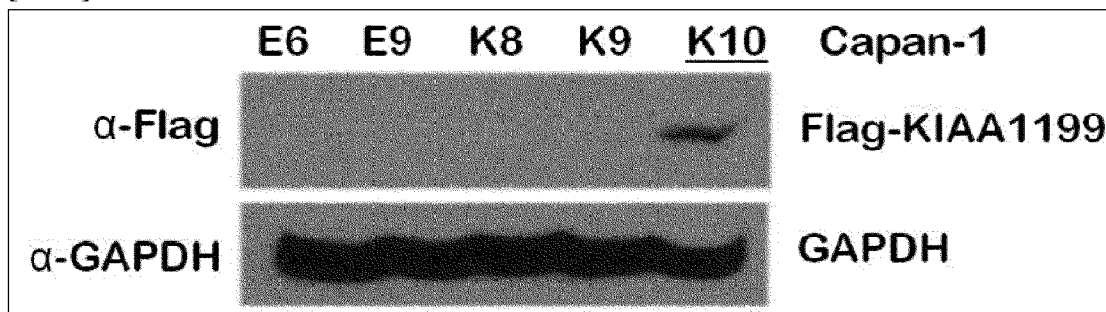
[도2c]



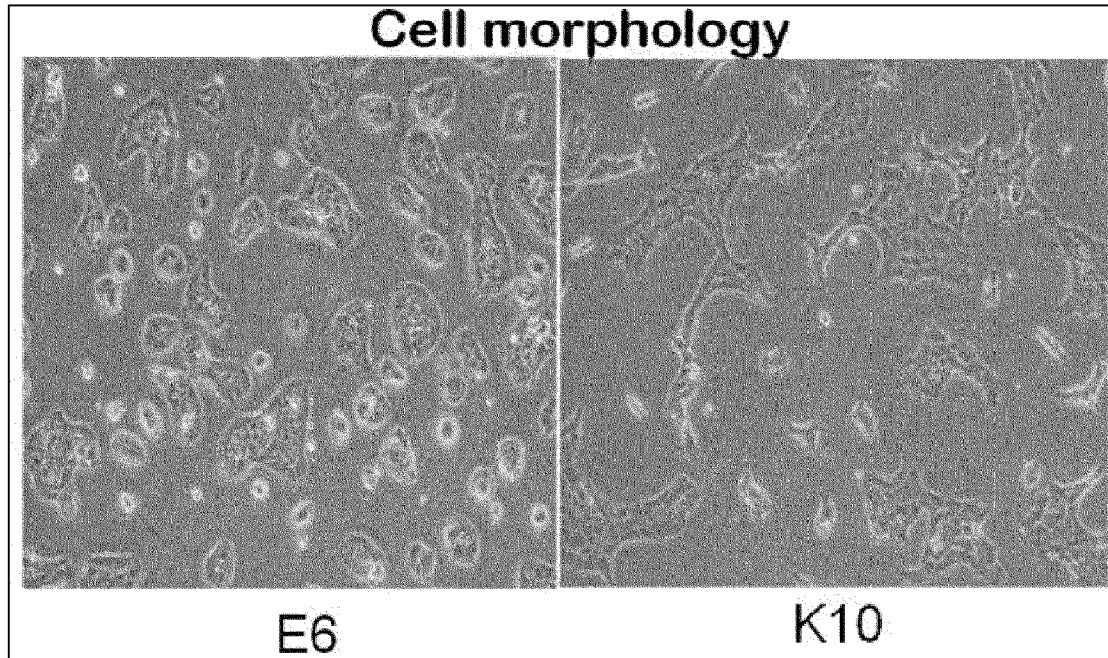
[도2d]



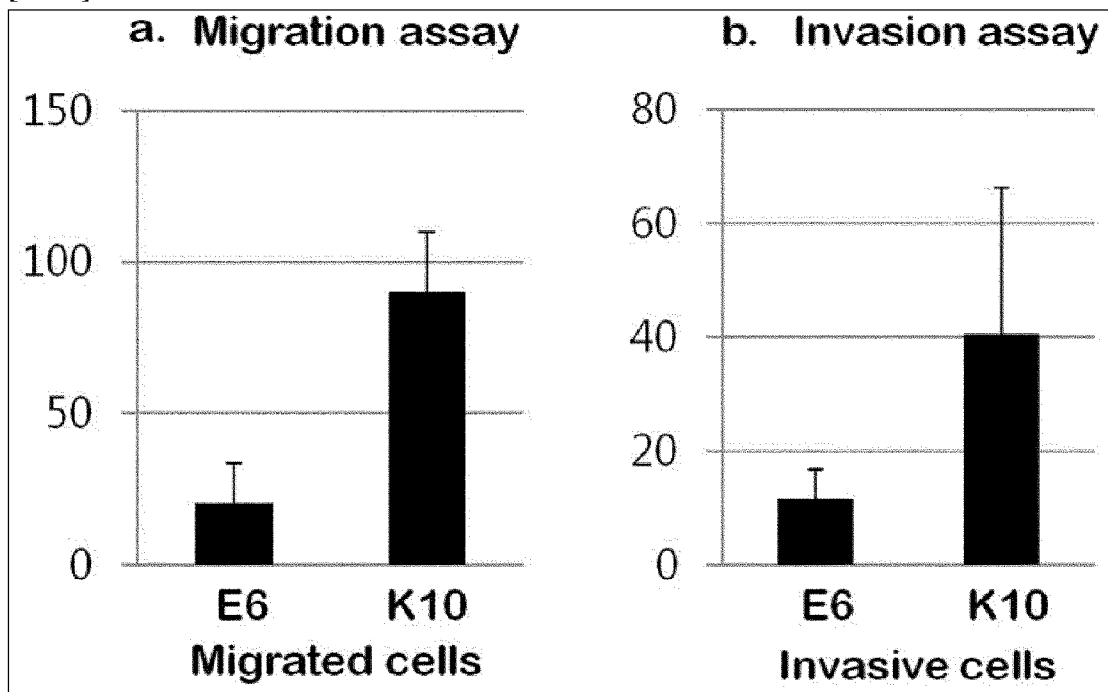
[도3a]



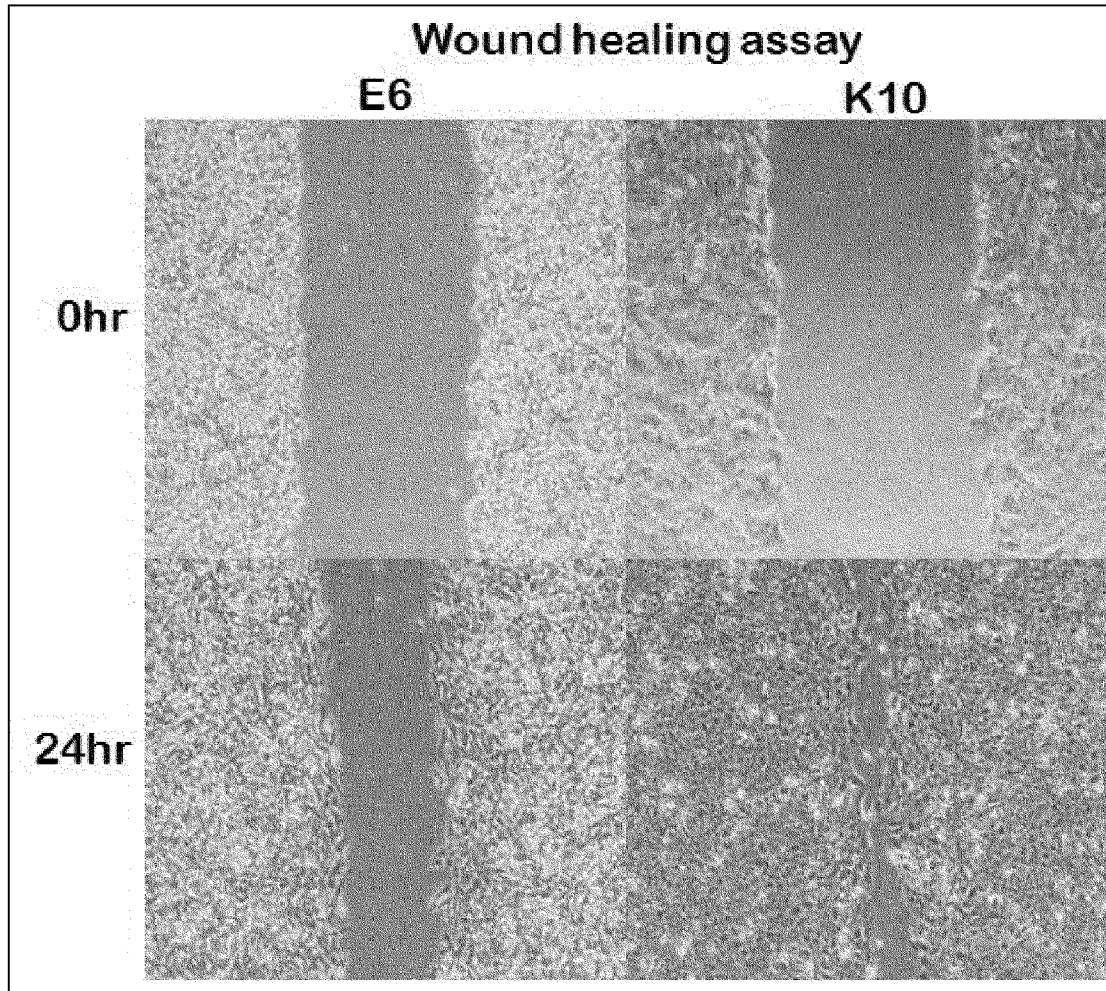
[도3b]



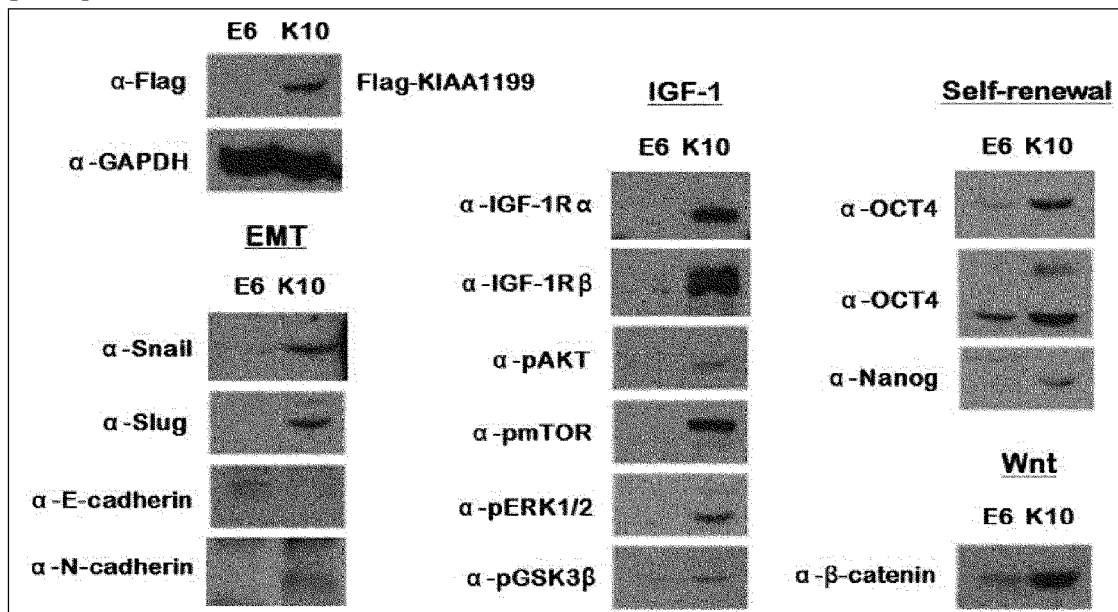
[도3c]



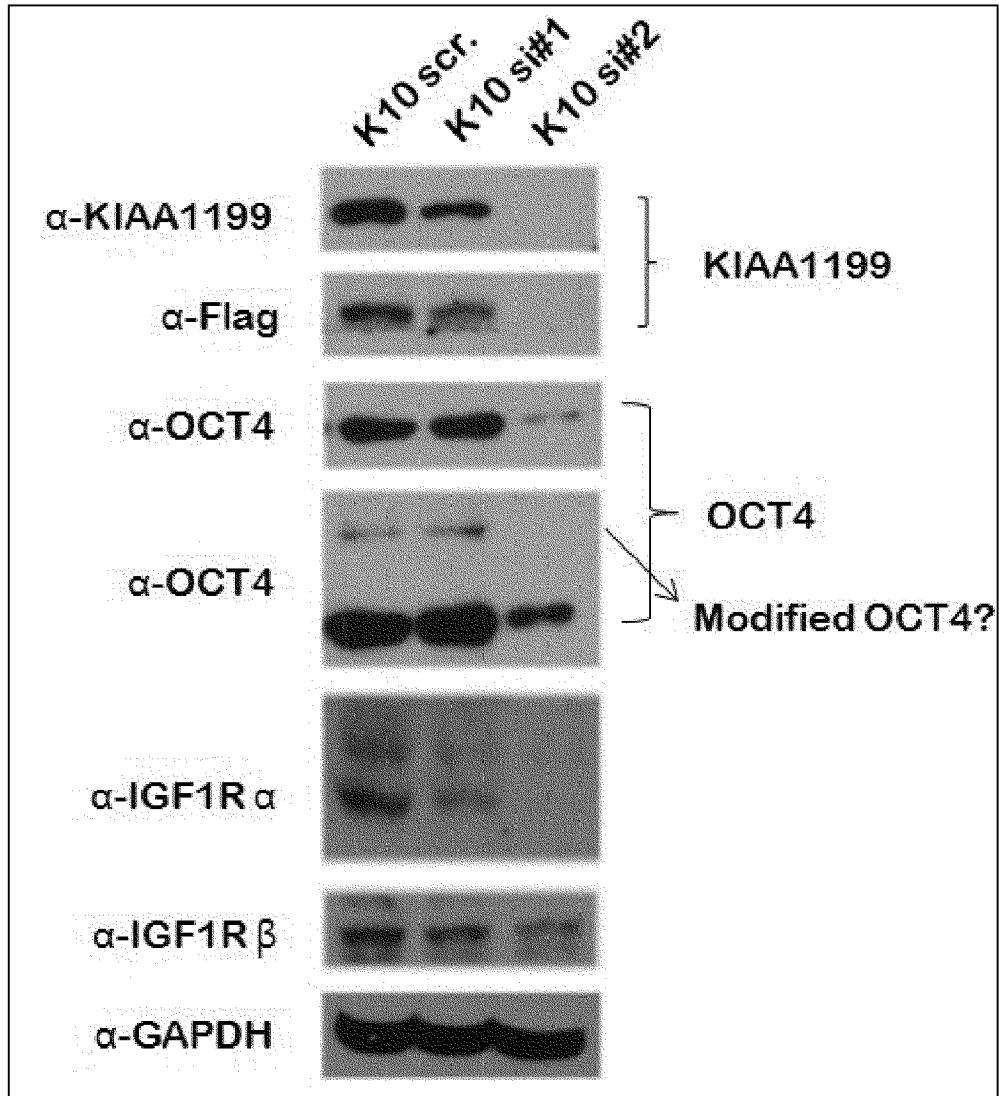
[도3d]



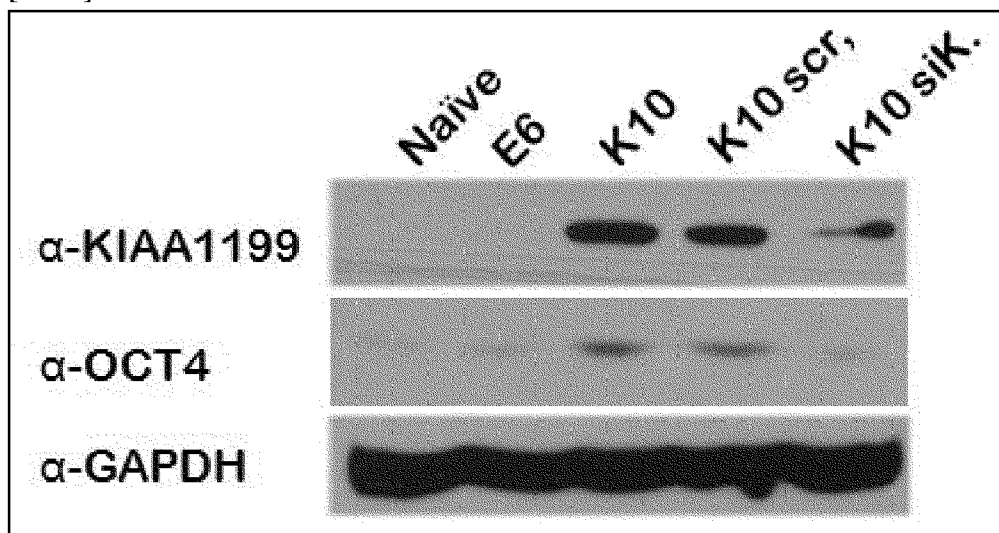
[도3e]



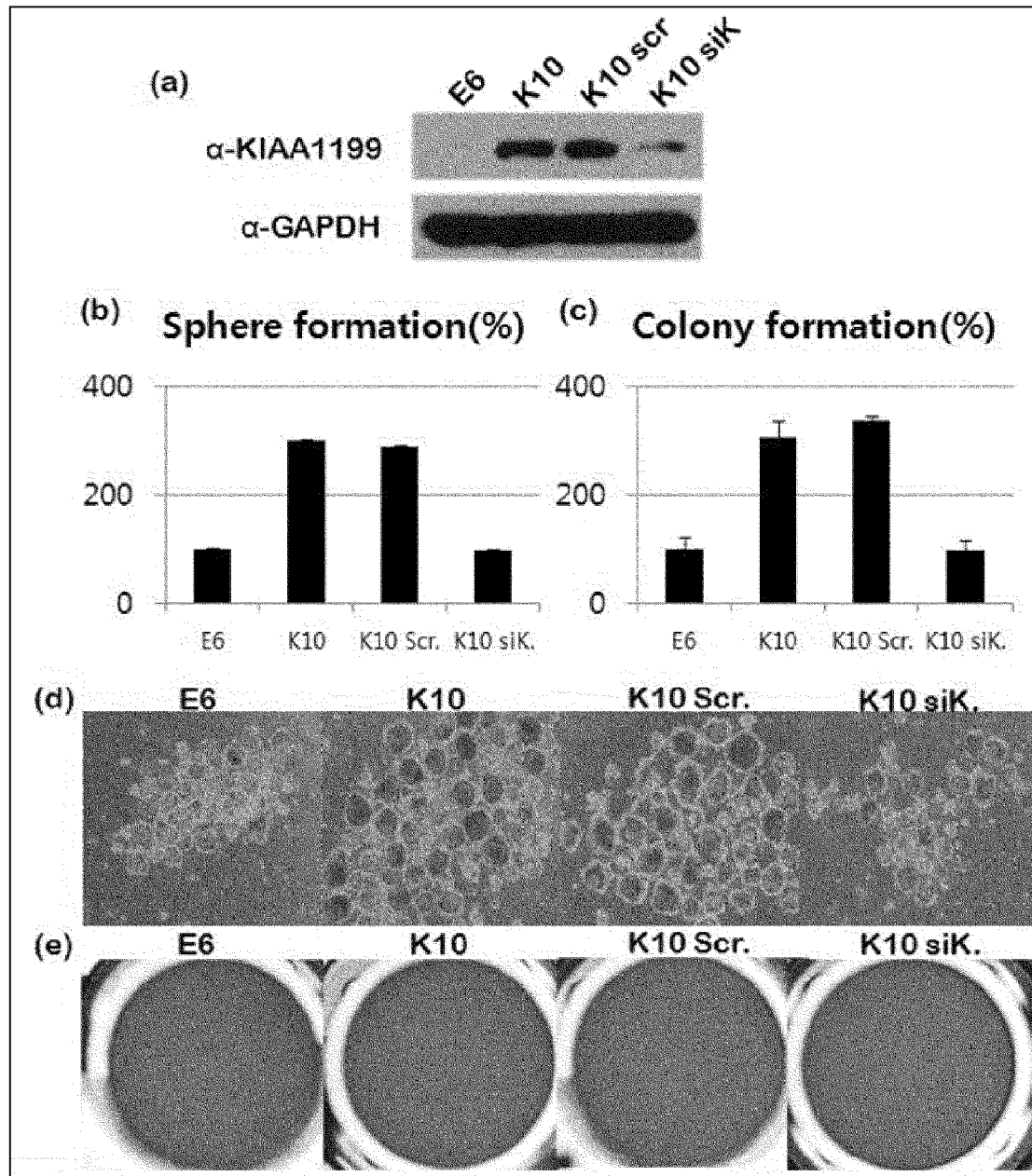
[도4a]



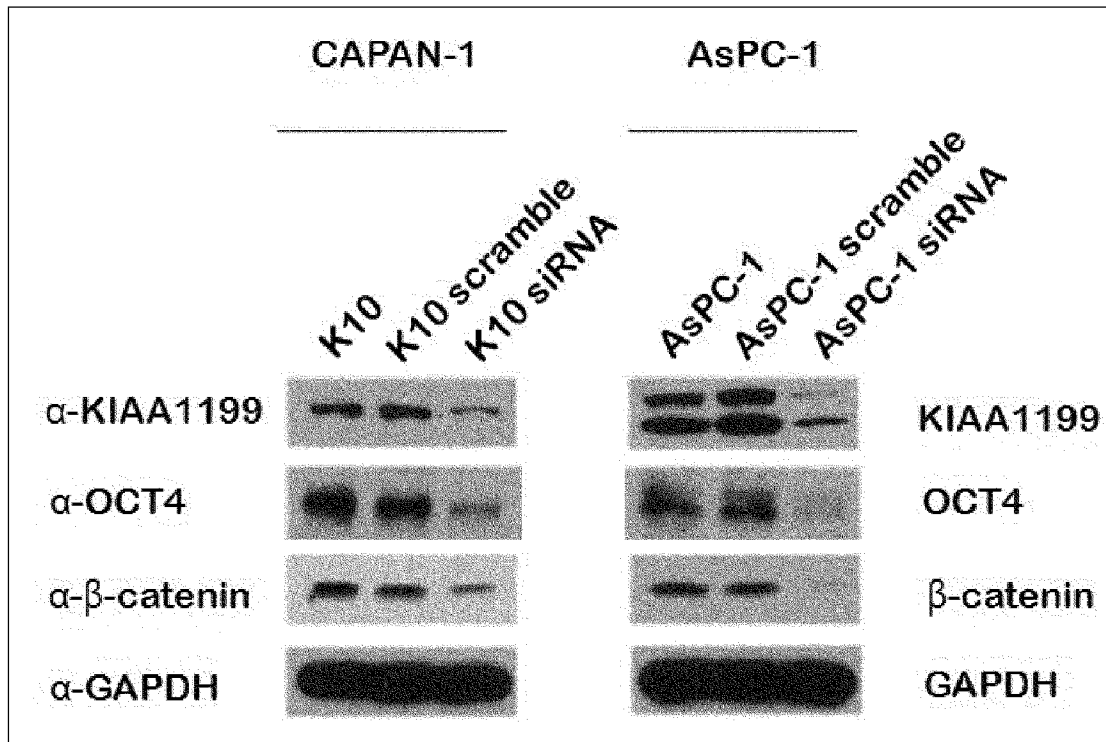
[도4b]



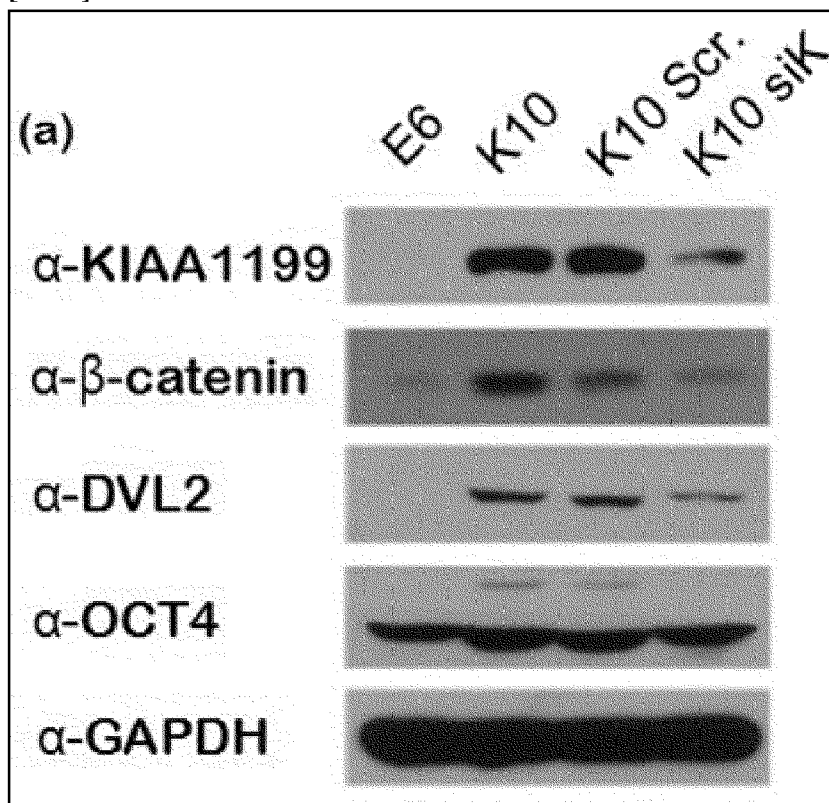
[도4c]



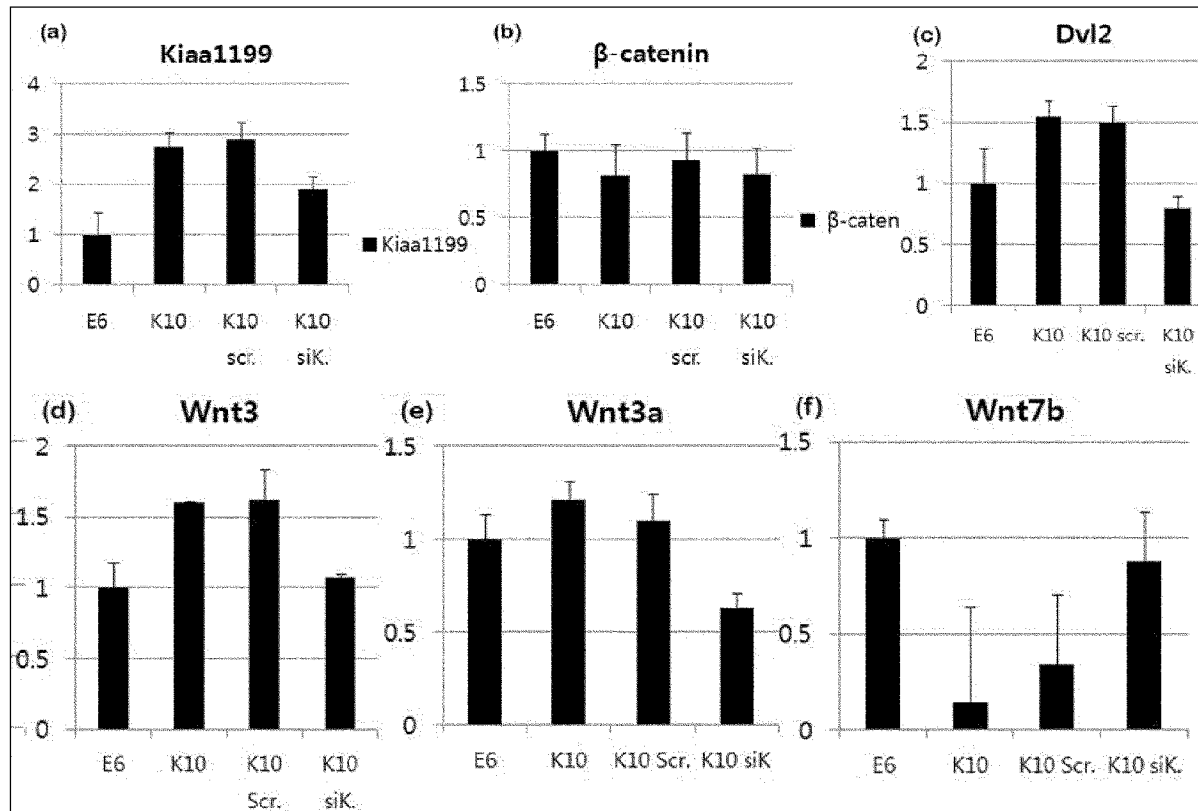
[도4d]



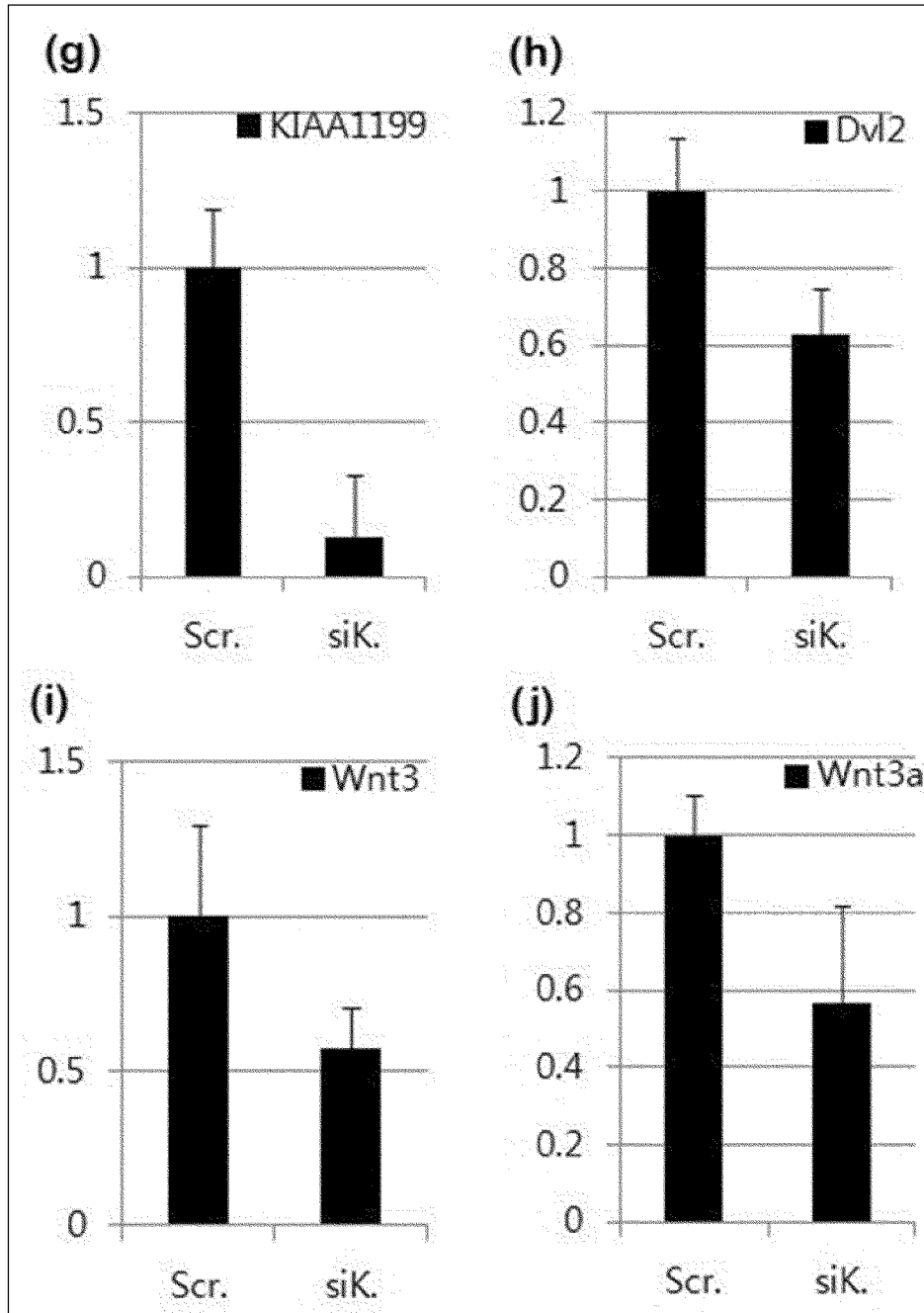
[도5a]



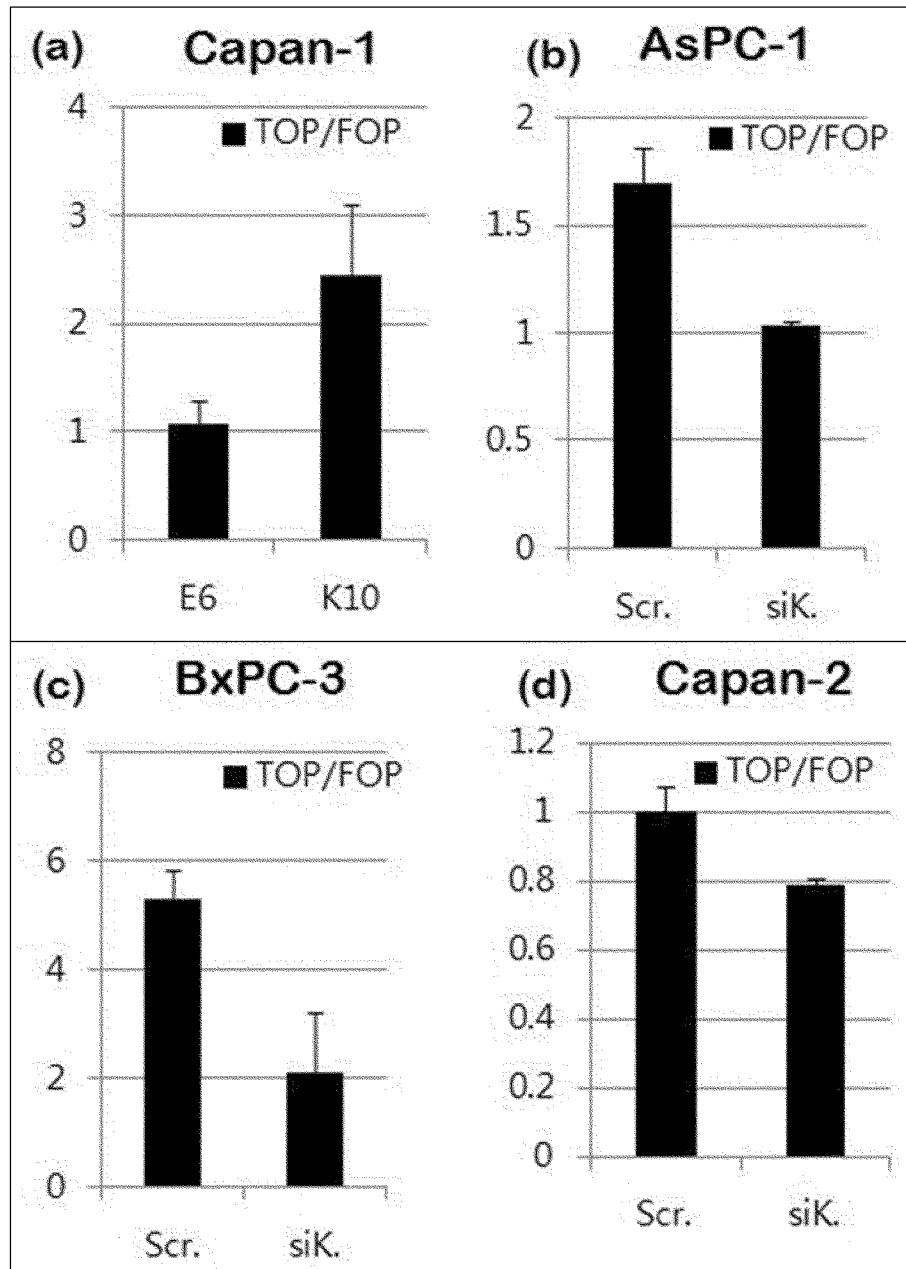
[도5b]



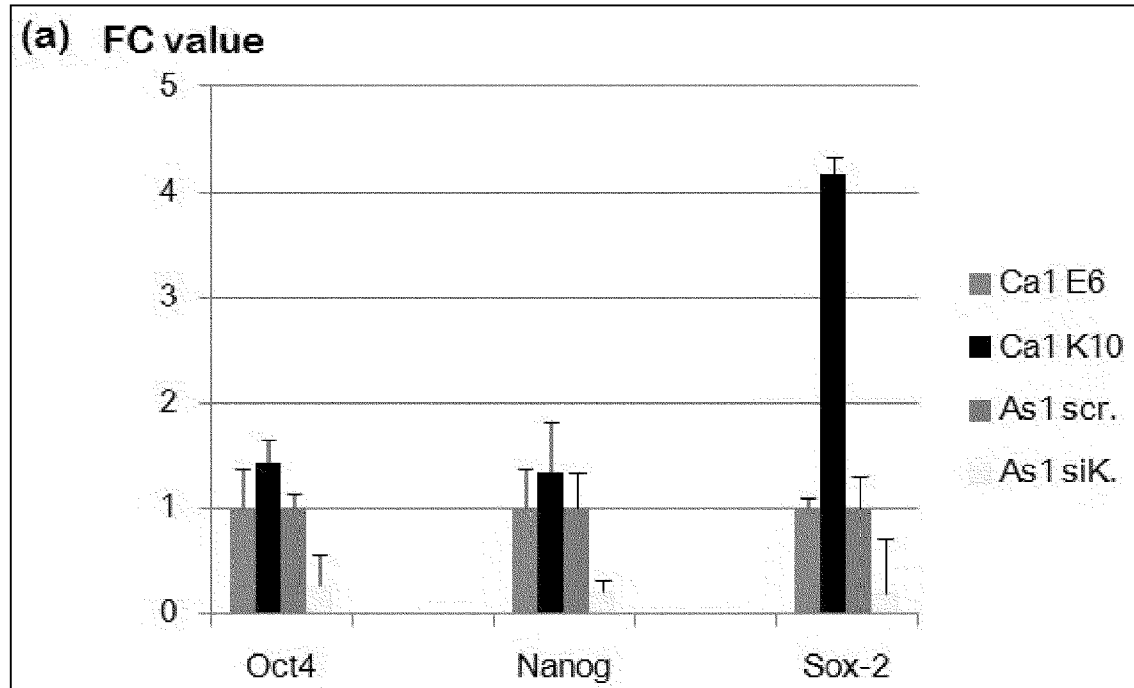
[도5c]



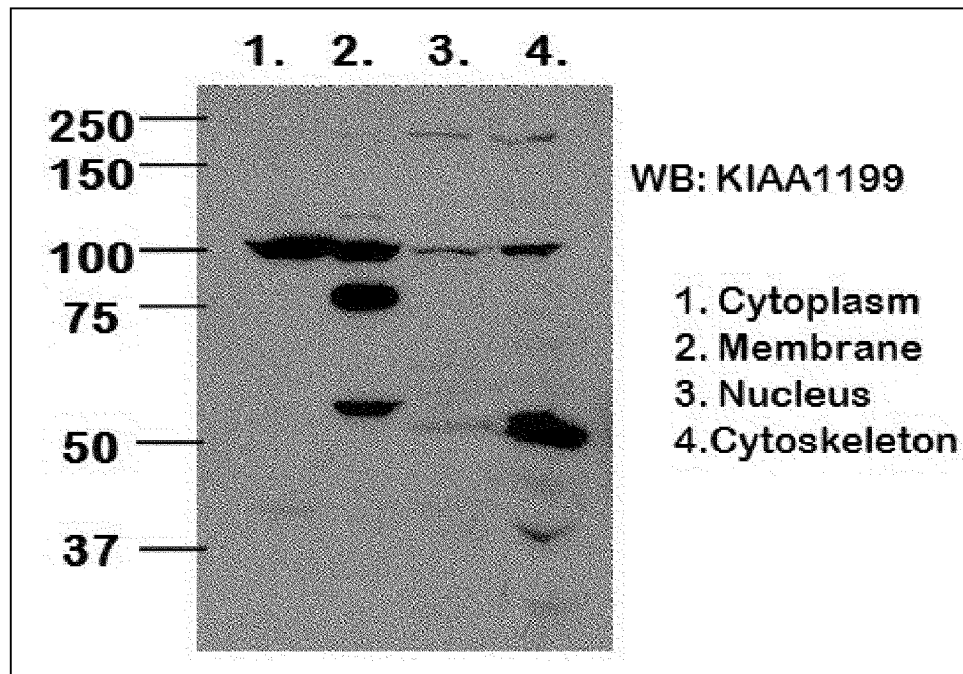
[도5d]



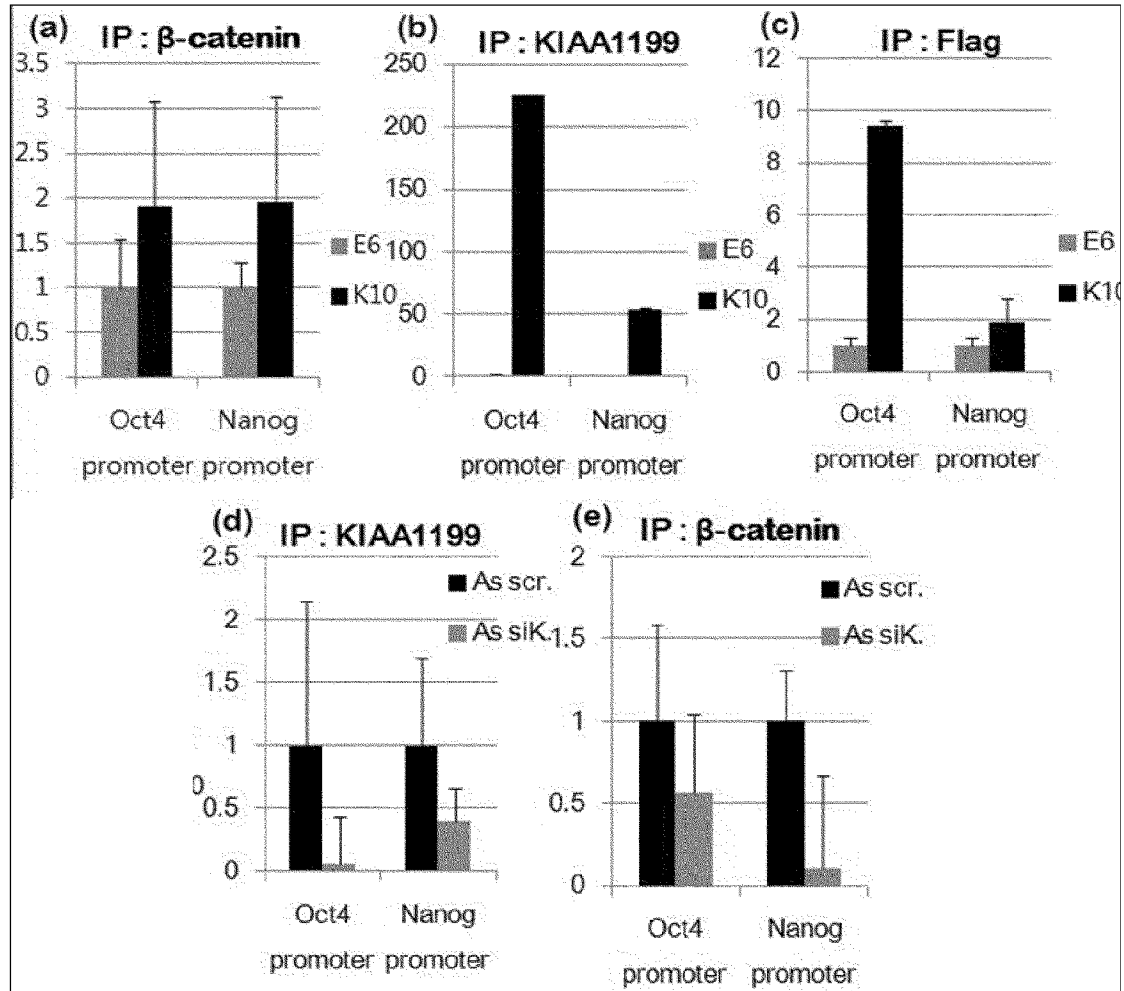
[도5e]



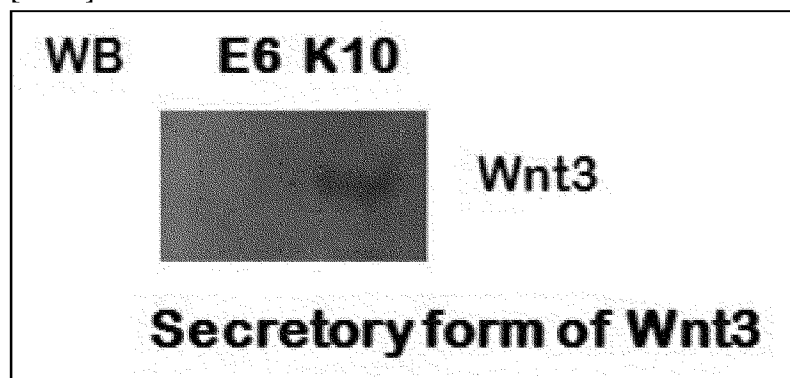
[도5f]



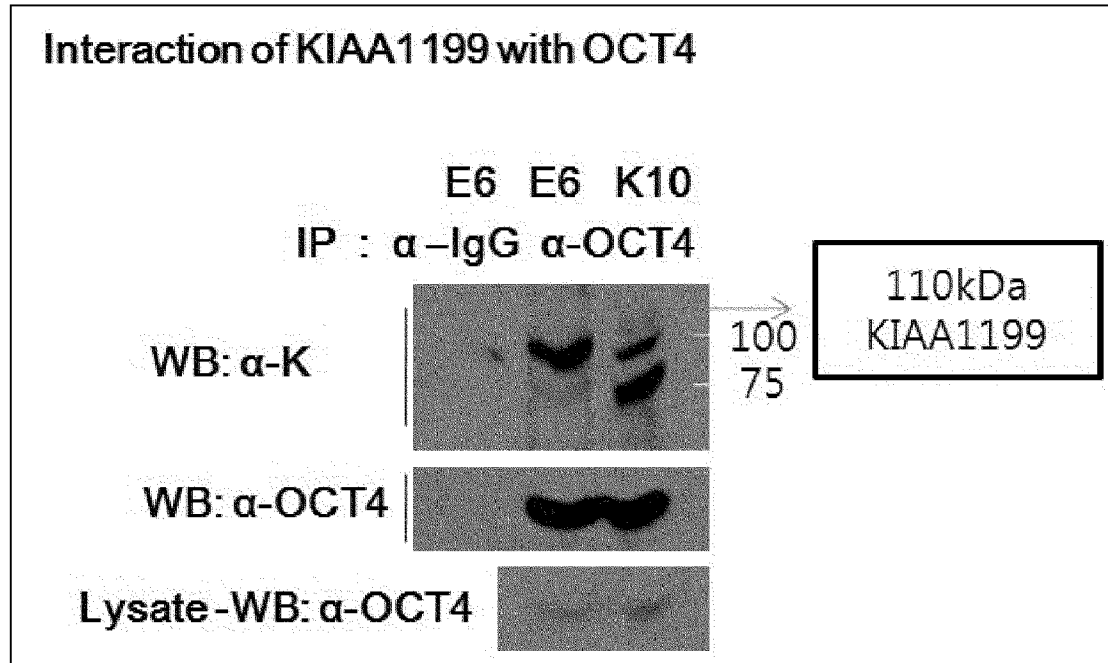
[도5g]



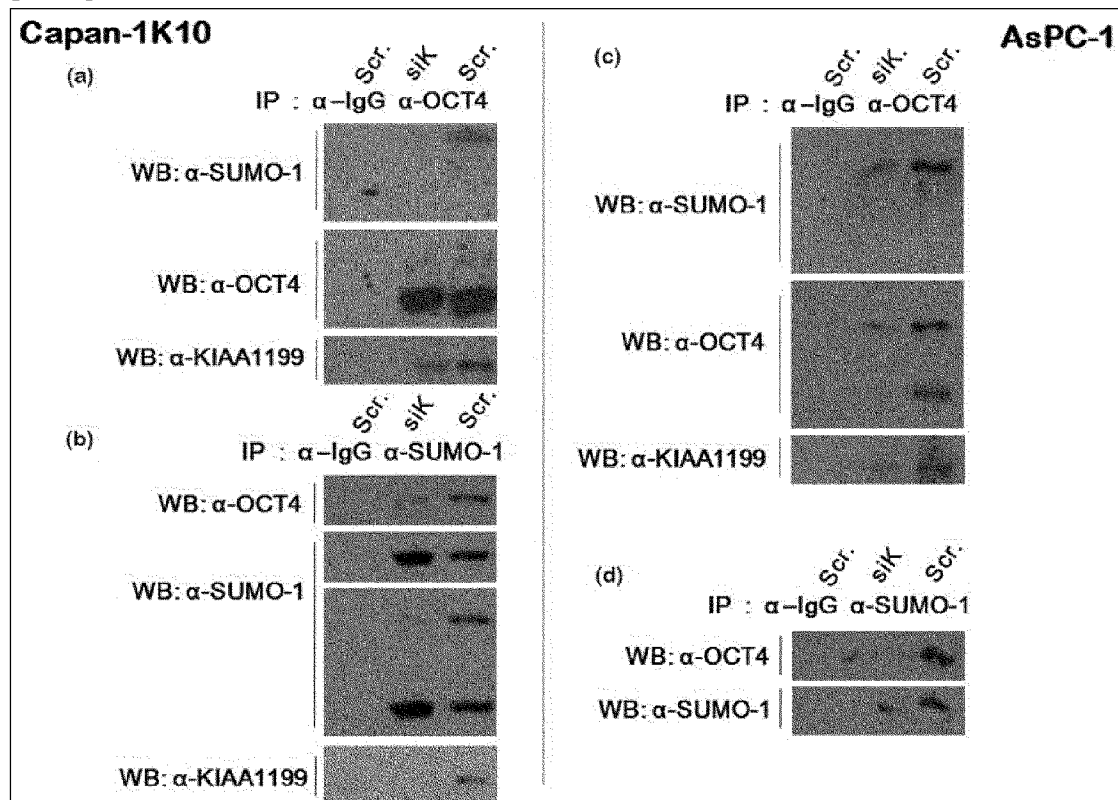
[도5h]



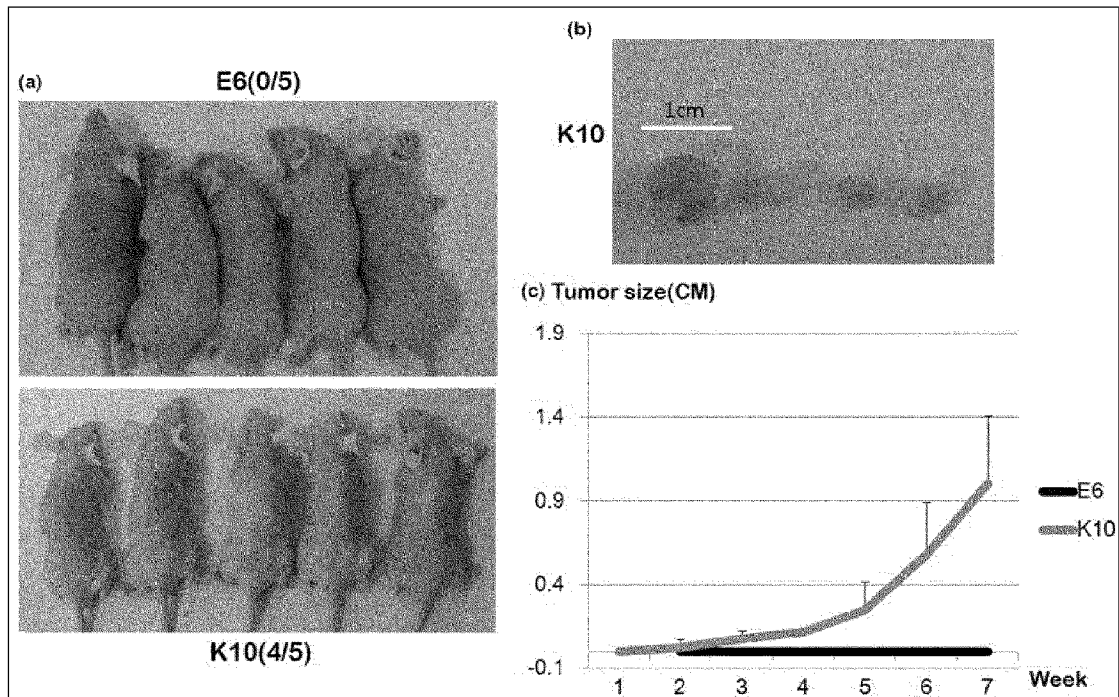
[도6a]



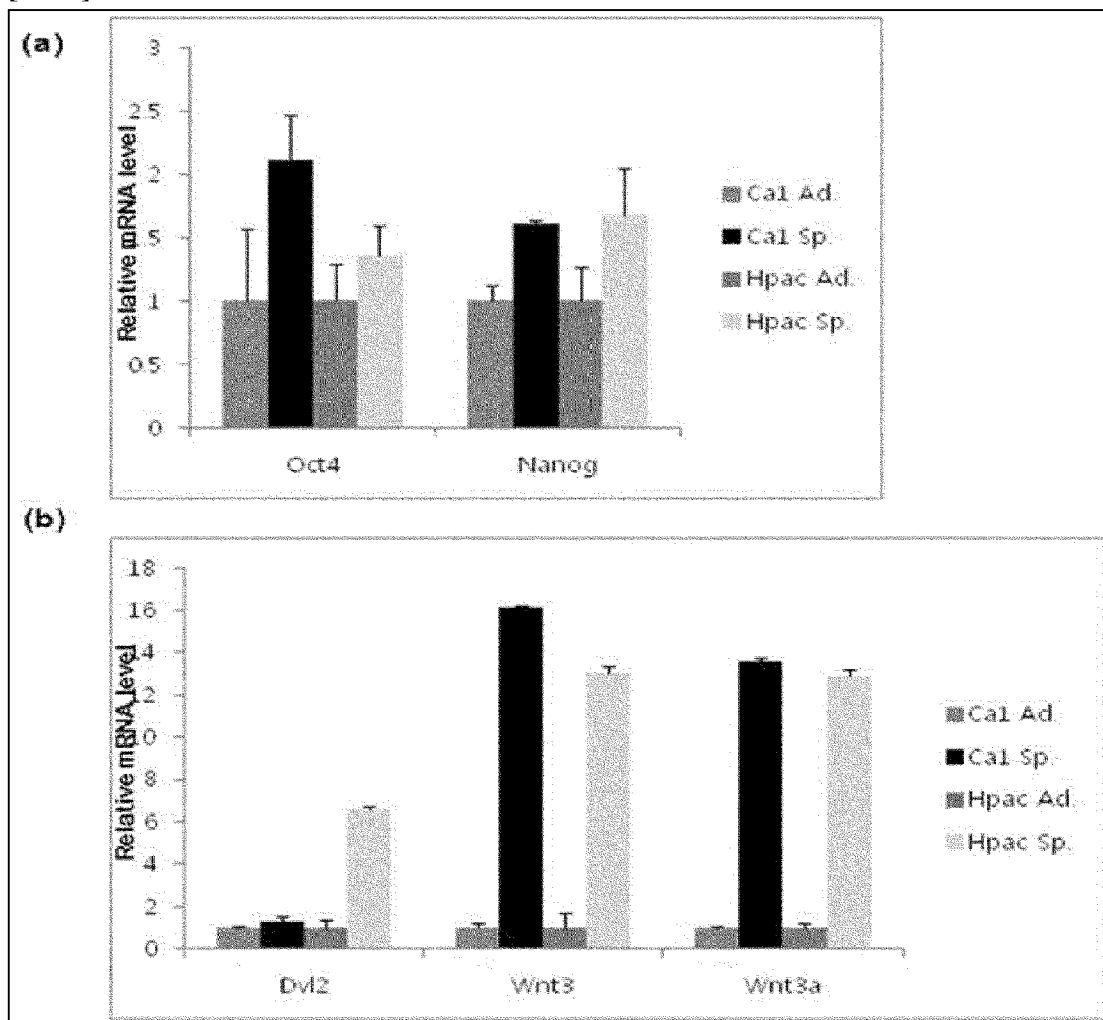
[도6b]



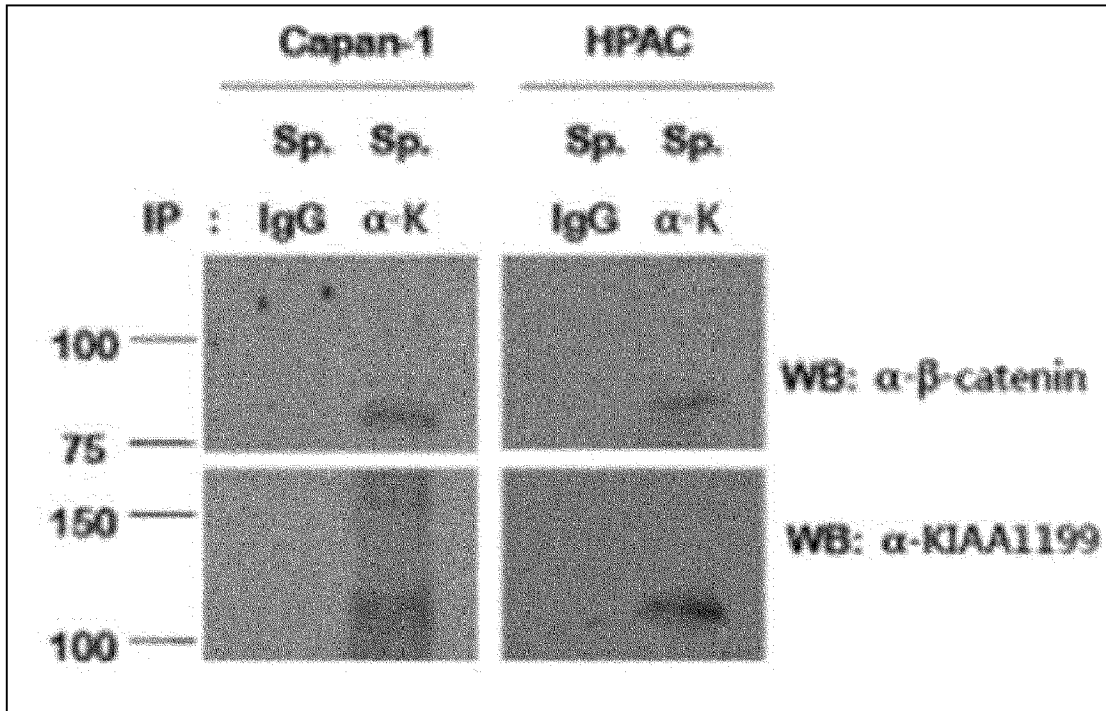
[도7]



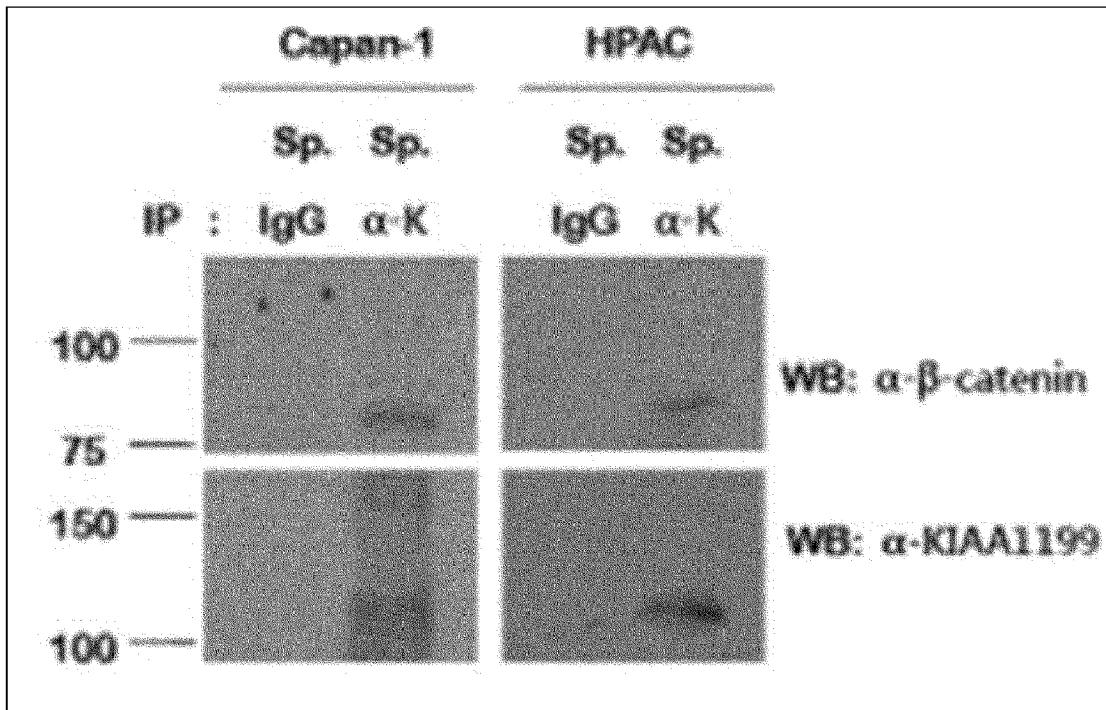
[도8a]



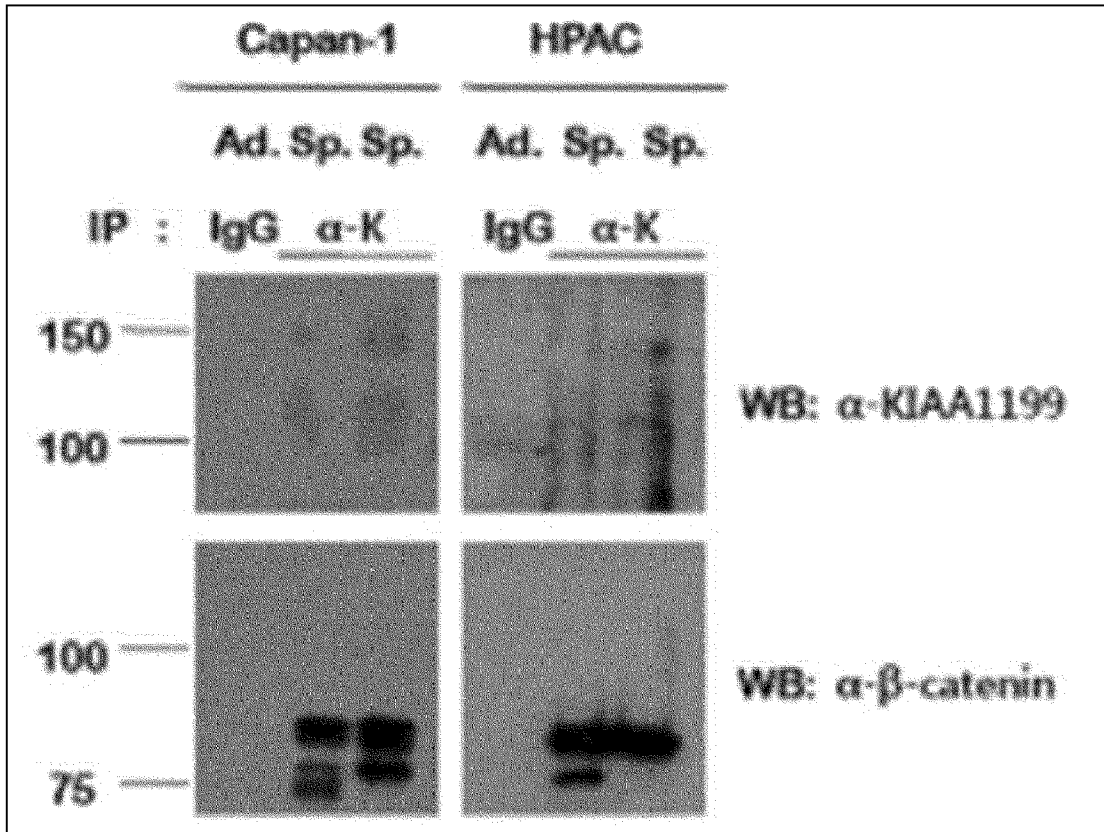
[도8b]



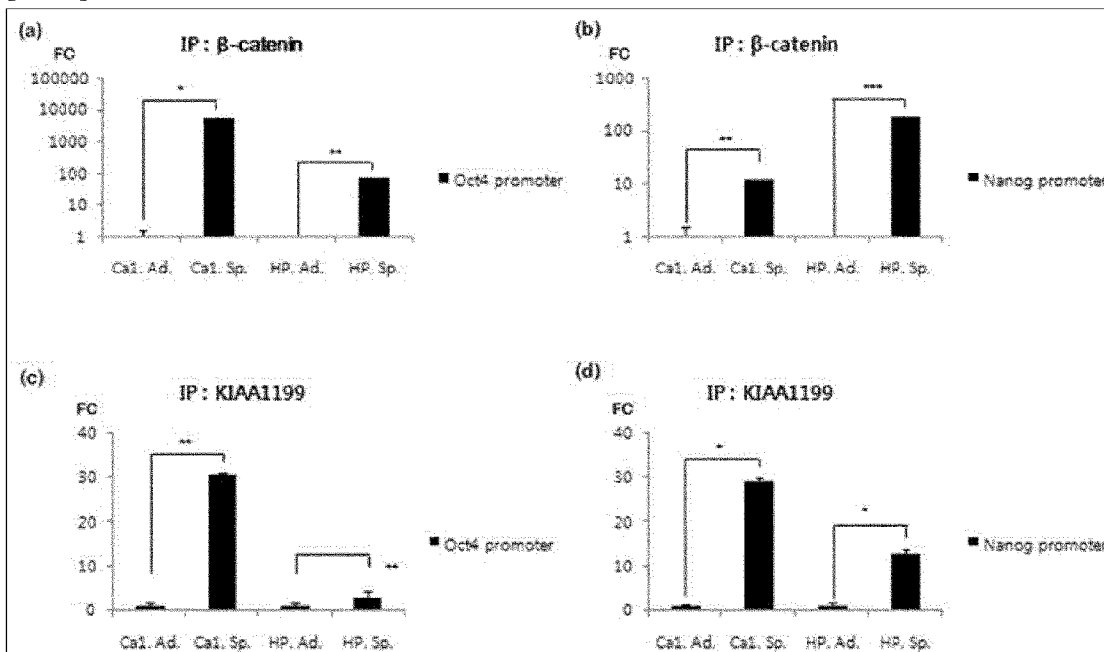
[도8c]



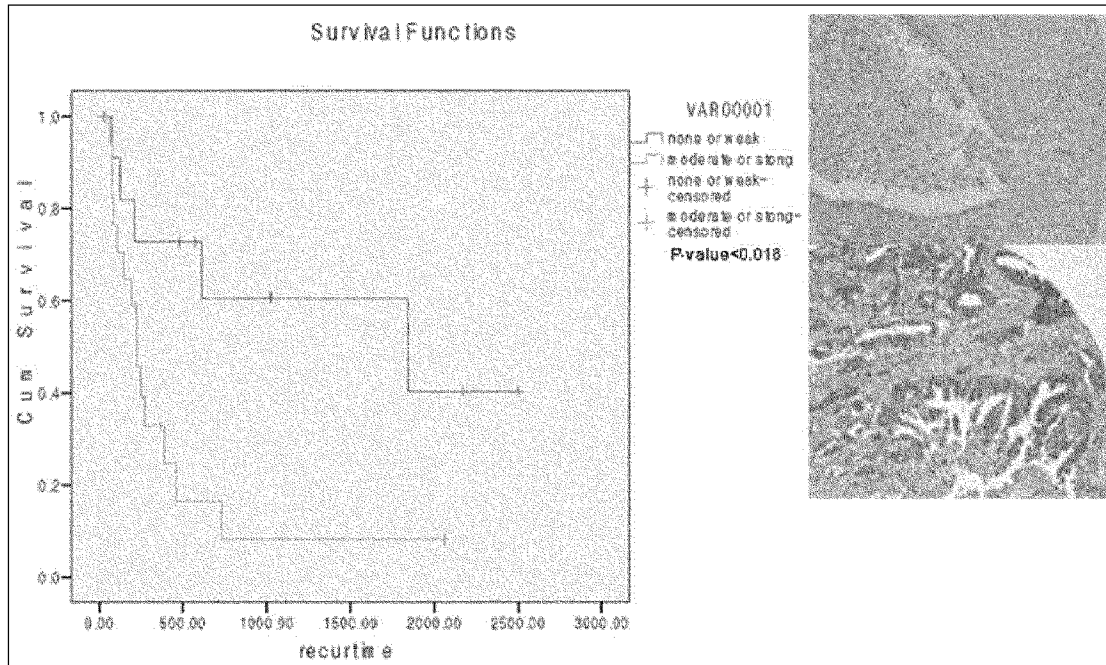
[도8d]



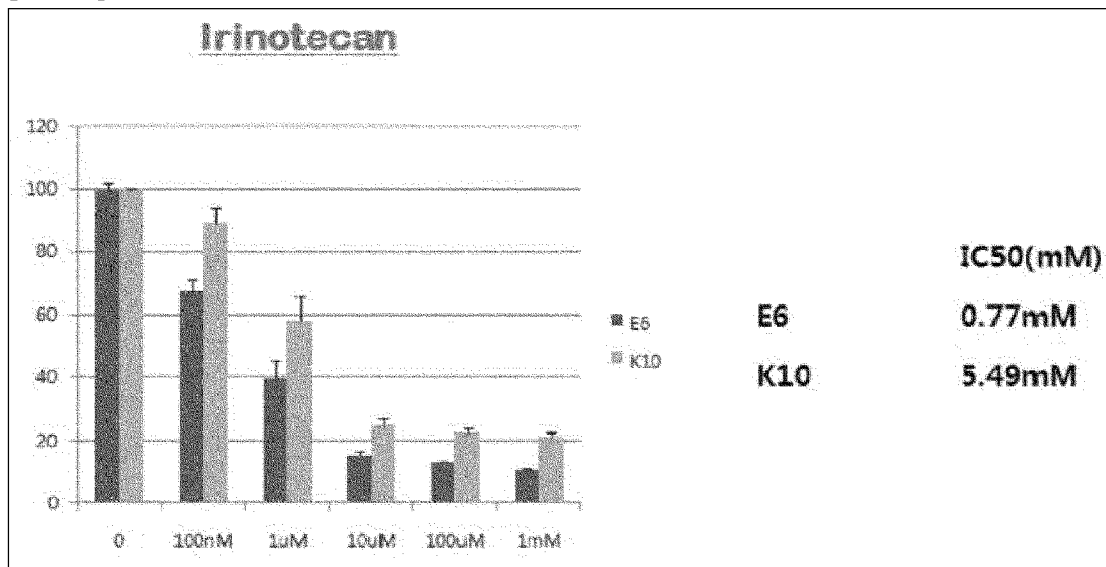
[도8e]



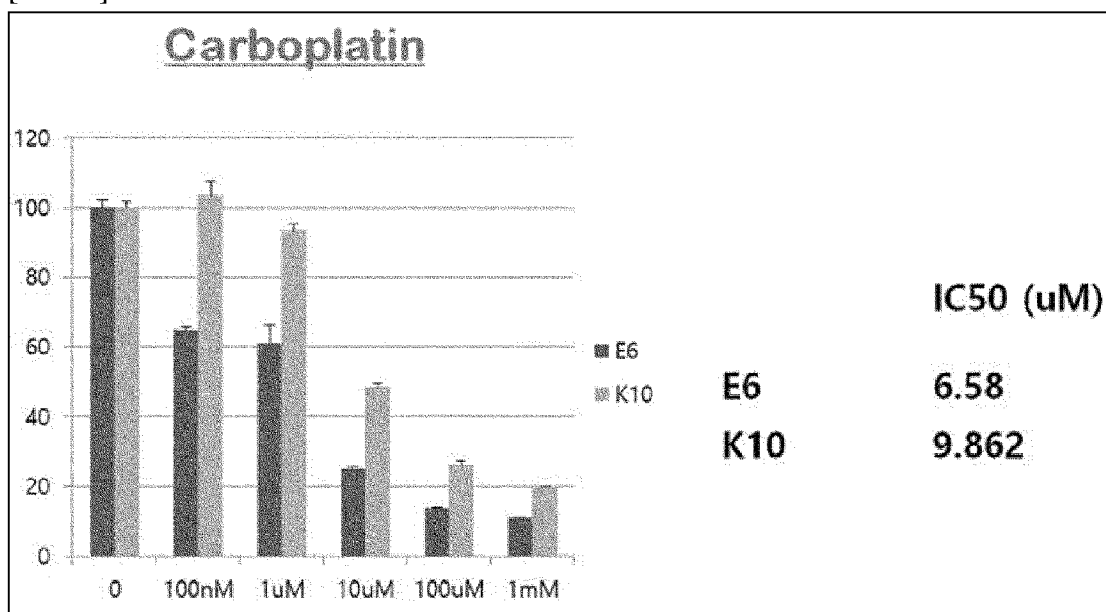
[도9]



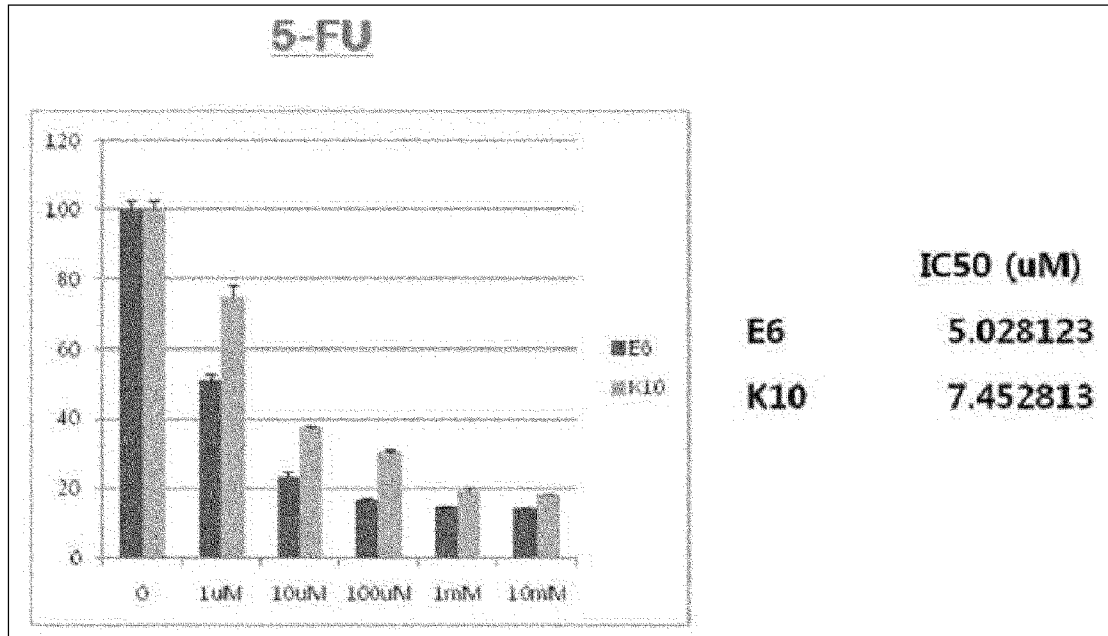
[도10a]



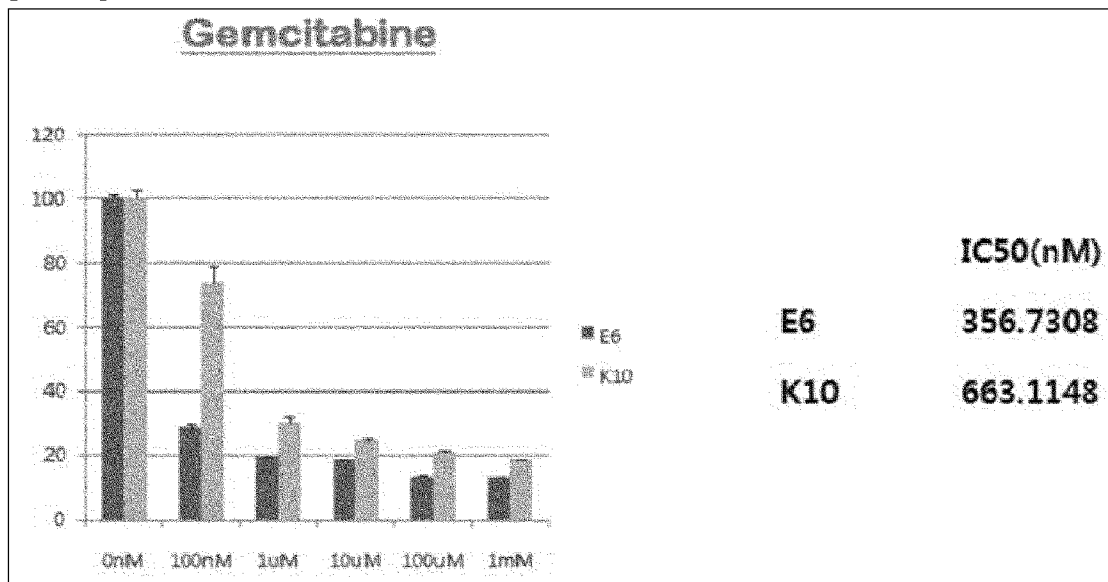
[도10b]



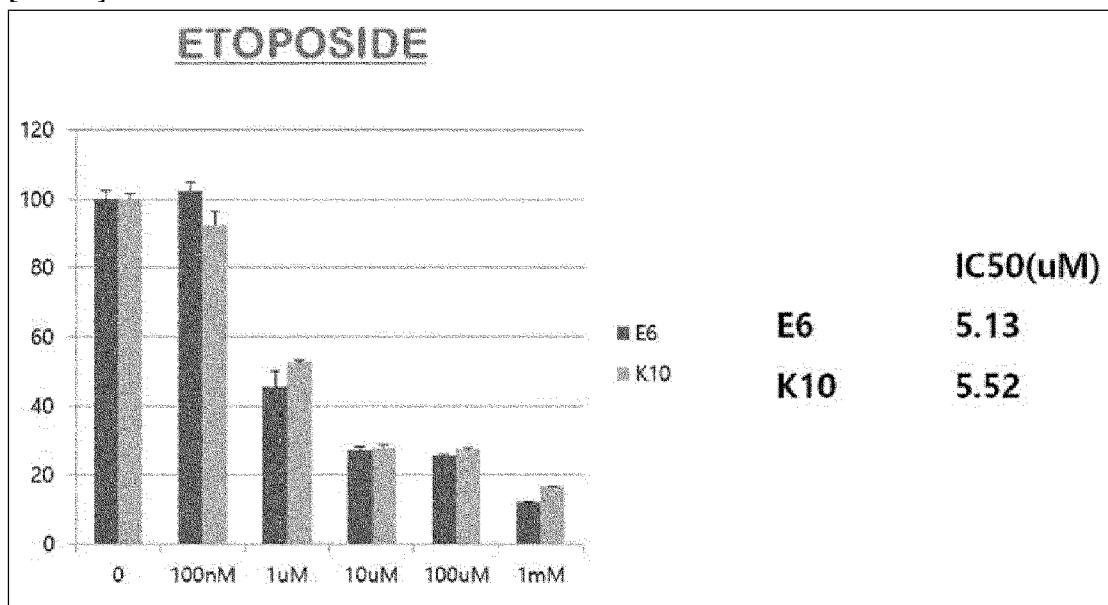
[도10c]



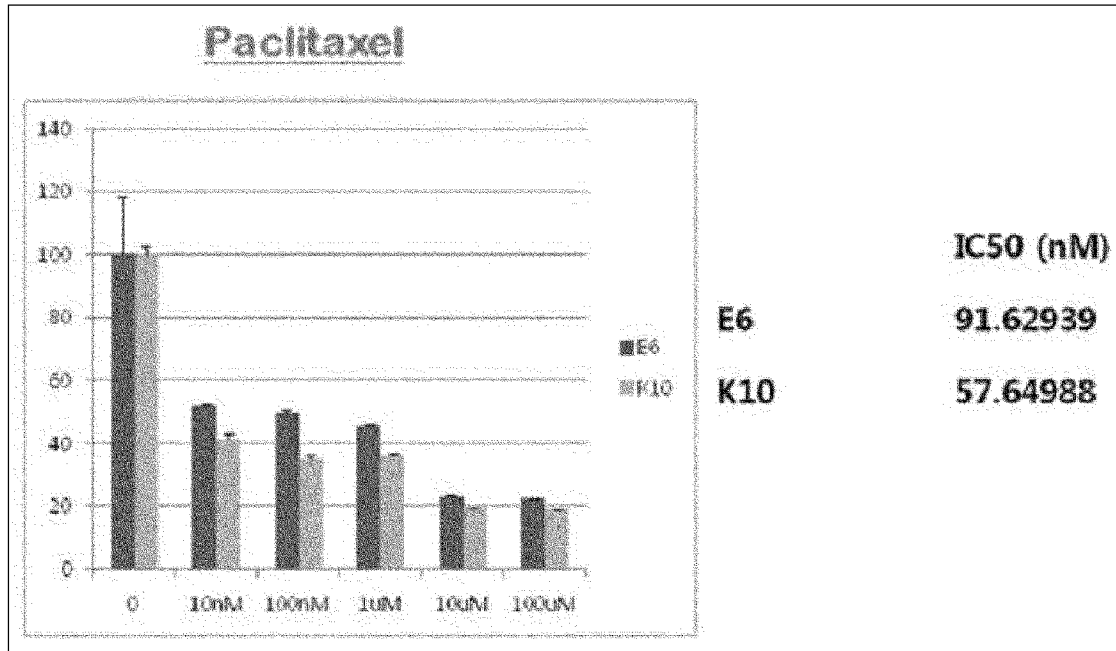
[도10d]



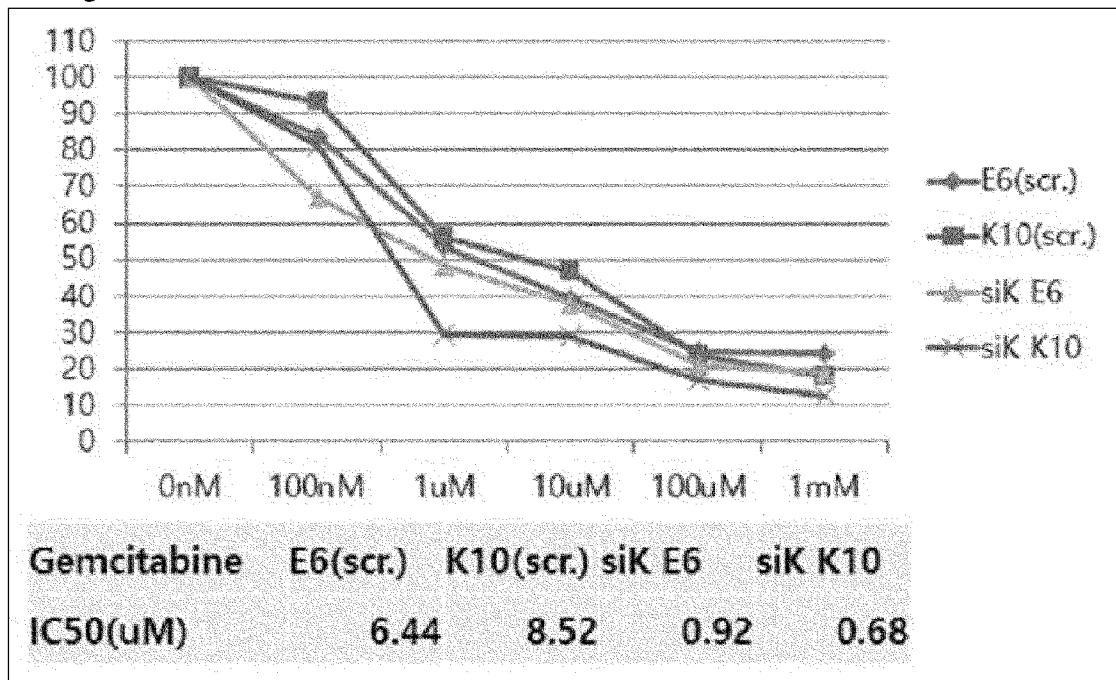
[도10e]



[도 10f]



[도 10g]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006855**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A61K 31/7105(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)

C12Q 1/68; C12M 1/00; A61K 31/7105; A61P 35/00; A61K 48/00; C07K 14/82; G01N 33/574; C12N 15/11

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: KIAA1199, pancreatic cancer, pancreatic cancer, pancreatic cancer stem cell**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003-0180747 A1 (HRUBAN et al.) 25 September 2003 See figure 1B, paragraph [0050], example 2, claims 1, 4, 18, 26, 29, 32, 42, 54.	1-3,5-7,9
A		4,8
A	KR 10-2014-0057361 A (ONCOCYTE CORPORATION) 12 May 2014 See the entire document.	1-9
A	WO 2010-064702 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO et al.) 10 June 2010 See the entire document.	1-9
A	JP 2009-276153 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 26 November 2009 See the entire document.	1-9
A	KR 10-2009-0040391 A (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 23 April 2009 See the 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

"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

08 OCTOBER 2015 (08.10.2015)

Date of mailing of the international search report

08 OCTOBER 2015 (08.10.2015)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006855**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, 11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 and 11 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus pertain to 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/006855

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2003-0180747 A1	25/09/2003	AU 2002-342053 A1 WO 03-030725 A2 WO 03-030725 A3	22/04/2003 17/04/2003 09/10/2003
KR 10-2014-0057361 A	12/05/2014	CA 2840946 A1 CA 2844793 A1 CN 103890587 A EP 2723924 A1 EP 2751570 A2 JP 2014-525584 A US 2014-0141996 A1 US 2014-0206574 A1 WO 2012-178128 A1 WO 2013-033609 A2 WO 2013-033609 A3	27/12/2012 07/03/2013 25/06/2014 30/04/2014 09/07/2014 29/09/2014 22/05/2014 24/07/2014 27/12/2012 07/03/2013 07/03/2013
WO 2010-064702 A1	10/06/2010	WO 2010-064702 A1	10/06/2010
JP 2009-276153 A	26/11/2009	NONE	
KR 10-2009-0040391 A	23/04/2009	CA 2660516 A1 CN 101528926 A EP 2059593 A2 JP 2010-501161 A WO 2008-020596 A2 WO 2008-020596 A3	21/02/2008 09/09/2009 20/05/2009 21/01/2010 21/02/2008 12/06/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C12M 1/00; A61K 31/7105; A61P 35/00; A61K 48/00; C07K 14/82; G01N 33/574; C12N 15/11

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: KIAA1199, 췌장암, pancreatic cancer, 췌장암 줄기세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2003-0180747 A1 (HRUBAN 등) 2003.09.25 도1B, 식별번호[0050], 실시예2, 청구항1, 4, 18, 26, 29, 32, 42, 54 참조.	1-3,5-7,9
A		4,8
A	KR 10-2014-0057361 A (온코사이트 코퍼레이션) 2014.05.12 전문 참조.	1-9
A	WO 2010-064702 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO 등) 2010.06.10 전문 참조.	1-9
A	JP 2009-276153 A (SUMITOMO BAKELITE CO LTD) 2009.11.26 전문 참조.	1-9
A	KR 10-2009-0040391 A (온코세라피 사이언스 가부시카가이샤) 2009.04.23 전문 참조.	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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 08일 (08.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 08일 (08.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

문동현

전화번호 +82-42-481-3482



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, 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10항, 제11항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 또는 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1 (iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2003-0180747 A1	2003/09/25	AU 2002-342053 A1 WO 03-030725 A2 WO 03-030725 A3	2003/04/22 2003/04/17 2003/10/09
KR 10-2014-0057361 A	2014/05/12	CA 2840946 A1 CA 2844793 A1 CN 103890587 A EP 2723924 A1 EP 2751570 A2 JP 2014-525584 A US 2014-0141996 A1 US 2014-0206574 A1 WO 2012-178128 A1 WO 2013-033609 A2 WO 2013-033609 A3	2012/12/27 2013/03/07 2014/06/25 2014/04/30 2014/07/09 2014/09/29 2014/05/22 2014/07/24 2012/12/27 2013/03/07 2013/03/07
WO 2010-064702 A1	2010/06/10	WO 2010-064702 A1	2010/06/10
JP 2009-276153 A	2009/11/26	없음	
KR 10-2009-0040391 A	2009/04/23	CA 2660516 A1 CN 101528926 A EP 2059593 A2 JP 2010-501161 A WO 2008-020596 A2 WO 2008-020596 A3	2008/02/21 2009/09/09 2009/05/20 2010/01/21 2008/02/21 2008/06/12