

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 10 월 4 일 (04.10.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/133994 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005684
- (22) 국제출원일: 2011 년 8 월 2 일 (02.08.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0027472 2011 년 3 월 28 일 (28.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교, 120-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 송시영 (SONG, Si Young) [KR/KR]; 서울특별시 마포구 상암동 상암월드컵파크아파트 711 동 901 호, 121-270 Seoul (KR). 김선아 (KIM, Sun A) [KR/KR]; 서울특별시 구로구 오류 1 동 18-23 번지 LG아트빌 402 호, 152-101 Seoul (KR). 박수빈 (PARK, Soo Bin) [KR/KR]; 서울특별시 서초구 잠원동 한신 8 차 아파트 310 동 1006 호, 137-030 Seoul (KR).

- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

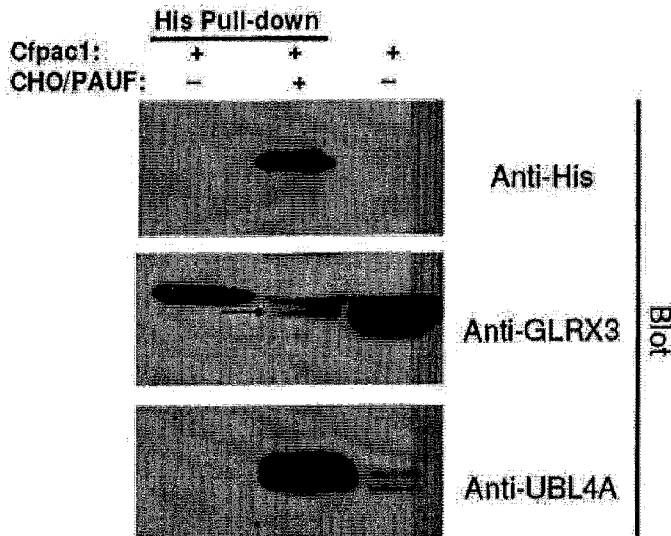
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR A CANCER TREATMENT AGENT USING THE INTERACTION BETWEEN PAUF AND A BINDING PARTNER THEREOF

(54) 발명의 명칭 : PAUF 및 그의 결합 파트너를 상호작용을 이용한 암 치료제의 스크리닝 방법

Fig. 2



(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening for a cancer treatment agent by contacting a test material with pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) and GLRX3, SNAPIN, or UBL4A as a binding partner for PAUF, and then analyzing whether or not the test material inhibits the binding of the PAUF and GLRX3, SNAPIN, or UBL4A serving as a binding partner therefor, thereby determining that the test material is a cancer treatment agent if the binding is inhibited. The invention also relates to a pharmaceutical composition containing the test material as an active ingredient for inhibiting and treating cancer. The pharmaceutical composition of the present invention, which contains, as an active ingredient, an inhibitor for inhibiting PAUF from binding with a binding partner, effectively inhibits PAUF signaling related to the onset of cancer, thus enabling various kinds of cancer (especially pancreatic cancer) to be treated.

(57) 요약서: 본 발명은 PAUF 와 (Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 에 시험물질을 접촉시켜, 상기 시험물질이 상기 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN

[다음 쪽 계속]



또는 UBL4A 의 결합을 억제하는지 여부를 분석하여 상기 시험물질이 상기 결합을 억제하면 암 치료제로서 판단하는 암 치료제의 스크리닝 방법 및 상기 시험물질을 유효성분으로 포함하는 암의 억제 및 치료의 약제학적 조성물에 관한 것이다. PAUF 와 결합파트너 사이의 결합 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 암의 발병과 관련된 PAUF 의 시그널링을 효과적으로 차단함으로써, 다양한 암(특히, 췌장암)을 치료할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

PAUF 및 그의 결합 파트너를 상호작용을 이용한 암 치료제의
5 스크리닝 방법

【기술분야】

본 발명은 PAUF 와 그의 결합 파트너의 상호작용을 이용한 암
치료제의 스크리닝 방법, 그리고 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에
10 관한 것이다.

【배경기술】

췌장암은 5 년 생존율이 1-4%, 중앙 생존기간이 5 개월에 이르는
치명적인 암으로 인체 암 중에서 가장 불량한 예후를 가진다. 췌장암
15 환자의 90% 정도는 이미 근치적 수술을 시행할 수 없는 상태에서 발견되기
때문에 예후가 인체 암 중에서 가장 불량하고 치료는 반응율이 20% 내외에
불과한 항암약물 요법에 의존할 수 밖에 없는 질환으로, 인체에서 발생하는
그 어떤 암 보다도 조기 진단법 개발이 가장 절실히 요망된다.

본 연구진은 인간 췌장암 및 위암 특이 유전자군 DNA 칩
20 데이터베이스로부터 유도된 전임상 후보 표적 유전자로 PAUF(Pancreatic
Adenocarcinoma Up-regulated Factor)를 췌장암의 발암에 관련된 신규
유전자임을 학술지에 보고하였으며 (*Cancer Science*, 100(5):826-836
(2009)), 이를 특허출원하였다(대한민국 특허 제 0954322 호).

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그
25 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.

【발명의 내용】

30 【해결하려는 과제】

PAUF 유전자의 유도과 저해에 따라 췌장암 세포주의 발암성이 증가
 혹은 감소됨을 확인하였으나, PAUF 단백질의 신호 전달 체계에 대해서는
 아직까지 알려진 것이 없다. 세포내외의 신호전달은 여러 단백질 간의
 상호결합에 의해 조절된다. 따라서, 본 발명자들은 PAUF 와 결합하는
 5 단백질을 찾아 PAUF 단백질의 신호전달 체계를 연구함으로써 PAUF 를
 타겟으로 하는 항암 기전에 대한 이해를 넓히고자 연구하였다. 그 결과, 본
 발명자들은 PAUF 의 결합 파트너로서 3 개의 단백질을 스크리닝 하였고,
 PAUF 와 이들 단백질 사이의 상호작용을 억제하는 경우에는 암(특히,
 췌장암) 치료에 대한 새로운 접근 방식을 제공할 수 있음을 규명함으로써,
 10 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데
 있다.

본 발명의 다른 목적은 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을
 제공하는 데 있다.

본 발명의 또는 다른 목적은 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데
 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명,
 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암
 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

(a) PAUF(Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와 그의
 결합파트너로서의 GLRX3(Glutaredoxin-3), SNAPIN(SNAP-associated
 25 protein) 또는 UBL4A(ubiquitin-like 4A)에 시험물질을 접촉시키는 단계;
 및

(b) 상기 시험물질이 상기 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3,
 SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는지 여부를 분석하는 단계, 상기
 시험물질이 상기 결합을 억제하면 암 치료제로서 판단하는 단계를 포함하는
 30 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

PAUF 유전자의 유도과 저해에 따라 췌장암 세포주의 발암성이 증가
 혹은 감소됨을 확인하였으나, PAUF 단백질의 신호 전달 체계에 대해서는
 아직까지 알려진 것이 없다. 세포내외의 신호전달은 여러 단백질 간의
 상호결합에 의해 조절된다. 따라서, 본 발명자들은 PAUF 와 결합하는
 5 단백질을 찾아 PAUF 단백질의 신호전달 체계를 연구함으로써 PAUF 를
 타겟으로 하는 항암 기전에 대한 이해를 넓히고자 연구하였다. 그 결과, 본
 발명자들은 PAUF 의 결합 파트너로서 3 개의 단백질을 스크리닝 하였고,
 PAUF 와 이들 단백질 사이의 상호작용을 억제하는 경우에는 암(특히,
 췌장암) 치료에 대한 새로운 접근 방식을 제공할 수 있음을 규명하였다.

10 본 발명의 방법에 따르면 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3,
 SNAPIN 또는 UBL4A 에 시험물질을 접촉시킨다.

본 명세서에서 용어 “PAUF” 는 본 발명자에 의해 처음으로 명명된
 단백질이다(대한민국 특허 제 0954322 호). 상기 단백질은 정상 췌장 조직과
 비교하여 췌장암 조직 내에 다르게 발현된다. 상기 PAUF 의 단백질 및
 15 핵산분자의 서열은 GeneBank 에 등록되어 있다(Accession number: EF067313).
 보다 바람직하게는 상기 PAUF 의 단백질 및 핵산분자의 서열은 서열목록
 제 1 서열을 포함하는 PAUF 이다.

본 명세서에서 용어 “GLRX3” 은 글루타레독신(glutaredoxin) 패밀리
 군의 하나이며, 글루타레독신은 산화환원효소로 글루타티온을
 20 보조인자(cofactor)로 사용하여 다양한 기질들을 환원시킨다. 보다
 바람직하게는 상기 GLRX3 은 서열목록 제 2 서열을 포함하는 GLRX3 이다.
 인코딩된 단백질은 아포토시스를 억제하고 세포 성장에 역할을 담당하며,
 이 단백질의 핵산분자의 발현은 암 마커로서의 역할을 담당한다.

본 명세서의 용어 “SNAPIN” 은 SNARE(Soluble NSF(N-ethylmaleimide
 25 sensitive fusion protein) Attachment Protein REceptor) 콤플렉스의
 구성요소의 하나로 시냅스 소포(synaptic vesicle)의 결합과 융합에 필요한
 단백질이다. 보다 바람직하게는 상기 SNAPIN 은 서열목록 제 3 서열을
 포함하는 SNAPIN 이다. 상기 단백질의 인산화 상태는 세포외 단백질 간의
 상호 작용 및 시냅스 소포의 세포외 작용(exocytosis)에 영향을 주는
 30 것으로 알려져 있다.

본 명세서의 용어 “UBL4A”는 인간 유전자 UBL4A에서 인코딩되는 단백질로 그 기능이 밝혀지지 않고 하우스키핑 유전자 정도로 알려졌으나, 최근 ER(endoplasmic reticulum)막으로 이동하기 위한 과도기적 상태에 필요한 Bat3 콤플렉스의 한 구성원으로 밝혀졌다(*Nature*, 466(26):1120-1124 (2010)). 보다 바람직하게는 상기 UBL4A는 서열목록 제 4 서열을 포함하는 UBL4A이다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, PAUF는 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A와 세포 내에서, 특히 암 세포 내에서 결합을 한 상태로 발견된다.

이에, PAUF, GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A에 결합을 하여, PAUF와 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A와의 결합에서 경쟁관계에 있는 것으로 판정된 시험물질은 PAUF와 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A과의 결합을 억제시킬 수 있는 특징을 갖는다.

본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험 물질은 단일 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 항체 또는 펩타이드이다. 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.

시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스블 패러렐 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.

본 명세서에서, 용어 “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미하며, 통상적으로 아미노산 잔기 4-40 개를 포함한다.

본 발명의 PAUF 와 그의 결합 파트너 사이의 결합 억제제로서의 펩타이드는 당업계에서 통상적으로 사용하는 고체상(solid-phase) 합성 방법에 의해 제조된다 (Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963), Kaiser, E., Colescot, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I., *Anal. Biochem.*, 34:595-598 (1970)). 즉, α -아미노 및 측쇄 작용기가 보호화된 아미노산을 레진에 결합시킨 후, α -아미노 보호기를 제거하고 남은 α -아미노 및 측쇄 작용기가 보호화된 아미노산을 원하는 순서로 단계적으로 커플링하여 중간체를 얻는다. 상기 본 발명의 PAUF 억제제 펩타이드를 제조하기 위한 아미노산 서열은 종래의 방법을 참조하였다(Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW, Mochly-Rosen D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 11114-9 (2001); Phillipson A, Peterman EE, Taormina P Jr, Harvey M, Brue RJ, Atkinson N, Omiyi D, Chukwu U, Young LH., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, 898-907 (2005); 및 Wang J, Bright R, Mochly-Rosen D, Giffard RG., *Neuropharmacology.*, 47, 136-145 (2004)).

본 명세서에서, 용어 “천연 추출물”은 천연물의 다양한 기관 또는 부분 (예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 가지, 껍질 및 과실 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하며, 천연 추출물은 (a) 물, (b) 탄소수 1-4 의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 1,3-부틸렌글리콜, (h) 헥산 (i) 디에틸에테르를 추출 용매로 하여 얻을 수 있다.

본 발명에서 시험물질로서 항체가 이용될 수도 있다. 상기 항체는 PAUF, GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 와 특이적으로 결합하는 항체이다. 또는,

본 발명에서 시험물질로서 이용되는 항체는 이중특이성 항체(bispecific antibody)를 포함한다. 예컨대, PAUF 와 GLRX3 에 이중적으로 특이성을 갖는 항체가 이용될 수 있다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.

- 5 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제 4,816,56 호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597 (1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체
- 10 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991 에 상세하게 기재되어 있으며, 상기
- 15 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의
- 20 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

- 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 는 세포 외(*in vitro*) 하나의 용액에 포함되어 있다. 즉, 본 발명의 방법은 인
- 25 *비트로*에서 하나의 반응용액으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 정제된 PAUF 및 GLRX3 단백질과 시험물질을 포함하는 반응용액을 이용하여 본 발명의 분석을 할 수 있다.

- 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 는 세포 내(*in vivo*)에 포함되어 있다. 즉, 본 발명의 방법은 세포내에서의 반응을 이용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, PAUF 및 GLRX3 단백질을
- 30 발현하는 세포에 시험물질을 처리하여 세포 내에서 PAUF 와 GLRX3 의 결합이 억제되는 지 분석한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서

이용되는 세포는 암 세포이다. 암 세포의 경우 PAUF 와 고발현 되어 있어 본 발명의 분석을 용이하게 하는 환경을 제공한다. 상기 사용되는 암 세포는 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 5 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암의 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 암 세포는 췌장암 세포이다.

본 발명에서 PAUF 의 결합파트너로서 규명된 단백질은 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 이다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에서 이용되는 PAUF 의 10 결합파트너는 GLRX3 이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 방법에서 이용되는 PAUF 의 결합파트너는 GLRX3 의 티오레독신 도메인인 것을 특징으로 한다. GLRX3 은 크게 N-말단의 티오레독신 도메인과 C-말단의 2 개의 글루타레독신으로 이루어져 있다. 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 각각의 티오레독신 도메인을 제거한 돌연변이(GLRX3C) 및 2 개의 15 글루타레독신 도메인을 제거한 돌연변이(GLRX3N)를 구축하여 인 비보 공동면역침강을 하는 경우, 티오레독신 도메인만으로 구성된 구조(GLRX3N)에서 PAUF 와 공동면역침강 된다. 반면에, 티오레독신 도메인이 제거된 돌연변이에서는 PAUF 와 공동면역침강 되지 않는다.

PAUF, 그의 결합파트너 및 시험물질을 접촉시킨 다음, 상기 20 시험물질이 PAUF 와 그의 결합파트너 사이의 결합을 억제하는지 여부를 분석한다.

이러한 결합 분석은, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b)는 투-하이브리드 방법, 공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation assay), 공동-국소화 25 분석(co-localization assay), 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay: SPA), UV 또는 화학적 가교 결합 방법, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis: BIA), 질량 분석법(mass spectrometry: MS), NMR(nuclear magnetic resonance) 또는 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays, FPA)에 의해 실시된다.

본 명세서에서의 용어, “투-하이브리드 방법”은 분할 가능한 DNA- 30 결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 이

경우, 베이트(bait)로서 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 가 이용되고
 프레이(pre)로서 PAUF 가 이용될 수 있다. 또한, 이와 반대로 컨스트럭션을
 만들 수도 있다. 이 방법에 따르면, PAUF 와 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의
 상호작용을 억제하는 물질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 시스템은
 5 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대,
 하나의 컨스트럭트에서, GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A-코딩
 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사 인자(예컨대, GAL-4)의 DNA 결합
 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, PAUS
 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을
 10 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 베이트 및 프레이가 인
 회에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화
 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, LacZ)의 전사를
 촉발하게 된다. 시험물질이 PAUF 와 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의
 상호작용을 억제한다면, 리포터 유전자의 발현을 방해할 것이며,
 15 결론적으로 암 억제제로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다. 상기 투-
 하이브리드 방법 외에 쓰리-하이브리드 방법을 따라서도 실시할 수
 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., *Cell* 72, 223-232, 1993;
 Madura et al., *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel et al.,
BioTechniques 14, 920-924, 1993; Iwabuchi et al., *Oncogene* 8, 1693-
 20 1696, 1993; 및 WO 94/10300).

본 명세서에서의 용어, “공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation
 assay, Co-IP)” (Harlow and Lane, Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*,
 Cold Spring Harbor Laboratory (1988))에 따르면, 배양세포가 생산하는
 항원성 물질을 측정할 때, 미량이라 직접 측정이 불가능하면, 우선
 25 배양액에 ³H-라이신 등을 첨가하여 표적물질을 표지하여 배양 상층액을
 취한다. 이 상층액에 특이항체와 항원항체복합물이 형성될 수 있는 동일한
 농도의 비표지표적물질을 첨가하여 침강반응을 일으키면, 배양액 내의 미량
 표지된 표적물질도 침강물에 함께 공동침강반응이 일어나기 때문에
 침강물의 방사활성으로 표적물질을 측정할 수 있다. 단백질의 큰 복합체의
 30 일원으로 알려진 공지의 단백질을 표적으로 하는 항체를 선별하고, 상기
 항체를 가지고 알려진 복합체를 표적으로 하여 총 단백질 콤플렉스를

용액에 침전시켜 상기 복합체의 알려지지 않은 단백질을 동정한다. 이는 알려지지 않은 물질이 미량인 경우에 직접 측정이 불가능하므로 배양액에 표적물질로 표지하여 배양상층액을 취하고, 상기 상층액에 특이 항체와 단백질복합체가 형성될 수 있는 동일 농도의 비표지표적물질을 첨가하여

5 침강반응을 일으키도록 하면, 미량 표지된 표적물도 같이 공동 침강 반응이 일어나게 된다. 용액 밖으로 단백질복합체가 빠져 나온다는 개념 때문에 풀다운(pull-down)이라고 언급된다. 공동면역 침강법은 단백질-단백질 상호작용을 분석하기 위해 널리 이용된다.

본 명세서에서의 용어, 공동-국소화 분석(co-localization assay)은

10 형광염색법을 이용하여, 형광 현미경에서 두 개 그 이상의 다른 각각의 차별화된 방출 파장을 가지는 형광 라벨 사이에 공간적 오버랩을 관찰하여, 세포의 같은 공간에 위치하거나 다른 세포와 매우 근접한 위치에 있는 다른 표적을 관찰하는데 이용되는 분석법이다. 다른 2 가지의 형광으로 염색한 단백질들을 컨포컬 현미경으로 스캐닝하고, 특정 위치에 나타난 색깔을

15 측정하여 2 가지 단백질의 위치가 한 곳에 위치하고 있음을 규명할 수 있으며, 이 단백질들이 상호작용을 하고 있음을, 즉 기능적으로도 결합하고 있다는 점도 유추할 수 있는 장점을 가진다(Manders et al , *Journal of Microscopy* 169:375-382 (1993); Pawley JB, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, (2006)).

본 명세서에서의 용어, 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay: SPA)은 에너지를 가지는 전자에 의해 형광작용을 일으키는 폴리비닐-톨루엔 플라스틱 신틸레이터 비드(scintillator beads)에 항체를 부착하고, 수용액 상에서 쉽게 에너지를 잃거나 소멸되는 낮은 에너지의 전자를 방출하는 방사성 핵종을 비드(beads)에 부착된 항체에 선택적으로

25 결합하는 항원에 표지하여 항원-항체 결합의 정도를 발생하는 형광 측정을 통해 관찰하는 방식을 말한다(Alouani, *Methods Mol. Biol.* 138:135-41 (2000)) . 이 방식을 이용하면 일반적으로 방사 면역측정법이 가지는 단점인 결합분획과 유리분획의 분리과정이 필요하여 불편적인 시스템의 구축이 어려운 점을 극복가능하고, 민감도가 높고 분리 과정이 필요 없다는

30 특징을 가진다. 방사성 핵종이 표지된 항원과 비드상에 부착된 항체간의 결합이 이루어지면, 항원에 표지된 방사성 핵종이 방출하는 낮은 에너지의

전자가 비드에 도달하여 에너지를 전달하고, 에너지를 받은 비드는 형광을 방출하게 된다. 이 방출된 형광은 액체섬광계수기로 항체-항원의 결합 양에 따른 비례를 보이며 증가되는 것을 측정할 수 있다.

본 명세서에서의 용어, 화학적 가교 결합 방법(chemical cross-linking)은 단백질이나 핵산 등의 생체 고분자에 대하여 가교 시약을 이용하여 화학적인 공유결합을 형성시켜, 단백질의 소유닛 구조, 단백질-핵산의 상호작용, 단백질-단백질 상호작용의 해석 등 분자 간 반응에 의해 기능을 발휘되는 특성을 분석하는데 이용되는 방식을 말한다(Fancy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:28-33 (2000)). 또한 단백질 분자의 고정화, 항체의 효소 표식과 같은 공유결합에 의한 단백질 접합체 구조의 안정화에 이용된다. 가교 시약은 일반적으로 동일 분자내 아민기(-NH₂), 티올기(-SH) 및 카복시산기(-COOH) 등의 작용기에 특이적을 반응하거나, 광조사에 의한 활성화가 일어날 수 있는 작용기를 양단에 갖는 2 가성 가교시약을 이용한다. 단백질 간의 상호 작용을 관찰하기에는 너무 그 결합력이 매우 약하거나 일시적이지만, 화학적 가교결합 방식을 이용하면 단백질 간의 상호결합을 캡처시켜 분석하는데 용이하다는 장점을 가진다.

본 명세서에서의 용어, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis: BIA)은 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있는 방식을 말한다(예컨대, BIAcore™)(Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:2338-2345(1991), and Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705(1995)). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

본 명세서에서의 용어, 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays, FPA)은 C 반응성 단백질(C reactive protein, CRP)에 형광색소인 플루오레세인을 결합시킨 트레서와 CRP 에 특이적으로 결합하는 항체를 혼합한 용액에, 측정 대상물로서의 CRP 를 포함하는 체액(특히, 혈액)을 첨가하는 방법으로, 혼합 용액 중의 항체에 대한 트레서와 CRP 의 결합에 근거하여, CRP 를 측정하는 방식을 말한다(Degterev, et al., *Nature Cell Biology* 3:173-182 (2001)).

질량 분석법에 의한 방식(McLafferty et al., *Science* 284:1289-1290 (1999) and Degterev, et al., *Nature Cell Biology* 3:173-182 (2001)), 또는 핵 자기 공명법에 의한 방식(Shuker et al., *Science* 274:1531-1534 (1996), Hajduk et al., *J. Med. Chem.* 42:2315-2317 (1999), and Chen and Shapiro, *Anal. Chem.* 71:669A-675A (1999))을 이용하여 미지의 시료의 구조를 분석하는데 이용된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 의해 스크리닝된 암 치료제는 다양한 암의 치료에 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 의해 스크리닝된 암 치료제는 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암의 치료, 가장 바람직하게는 췌장암의 치료에 이용될 수 있다.

본 명세서에서 특히 PAUF 는 췌장암 세포에서 고발현되는 세포이므로, 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 과의 결합시킬 때 그에 의한 결합량이 높다. 이에 상기 시험물질이 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하게 되면, 암 치료제로서 판단할 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 PAUF(Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 억제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공한다.

본 발명의 억제학적 조성물은 상기 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하기 때문에, 이 둘 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

본 발명의 조성물이 억제학적 조성물인 경우, 본 발명의 조성물은 (i) 본 발명의 PAUF(Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와

그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 와의 결합 억제제의 유효량; 및 (ii) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 명세서에서 용어 “유효량”은 상술한 본 발명의 치료 효능을 발휘하는 데 충분한 양을 의미한다.

5 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물 (예: 락토스, 아밀로스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름 (예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 10 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 15 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.

 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 등으로 투여할 20 수 있다.

 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 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 25 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 적합한 1 일 투여량은, 0.0001-100 mg/kg(체중)이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다.

 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 30 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수

있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물에서, 유효성분으로 이용되는 PAUF 와
5 결합파트너 사이의 결합 억제제는 다양한 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 유효성분은 단일 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 항체 또는 펩타이드를 포함한다.

본 발명에서 이용되는 유효성분은 PAUF 와 결합파트너 사이의 결합을 억제하여, 암의 발병과 관련된 PAUF 의 시그널링을 효과적으로 차단함으로써,
10 다양한 암(특히, 췌장암)을 치료할 수 있다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명에 따르면, 시험 물질이 PAUF 와 그의 결합파트너로서의
15 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는지 여부를 분석하여 암 치료제를 스크리닝 한다.

(b) PAUF 와 결합파트너 사이의 결합 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 암의 발병과 관련된 PAUF 의 시그널링을 효과적으로 차단함으로써, 다양한 암(특히, 췌장암)을 치료할 수 있다.

20

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 HeLa 세포 cDNA 라이브러리에서 이스트 투 하이브리드 결과 얻어진 PAUF 단백질로 아데닌, 히스티딘, 류신, 트립토판이 배제되고, X-gal 이 포함된 배지에서 자란 PAUF 결합 단백질 후보들을 보여주는 그림이다.

25 도 2 는 His-PAUF 단백질을 프레이로 이용한 췌장암 세포주 Cfpac-1 세포 추출물에서의 GLRX3 및 UBL4A 의 풀다운 결과로 His-PAUF 를 Ni-NTA 레진에 고정시킨 후, Cfpac-1 단백질 추출물과 반응시킴. Ni-NTA 레진과 함께 면역침강된 단백질 추출 후 SDS-PAGE 로 분리 후 항-His, 항-GLRX3 및 항-UBL4A 항체로 웨스턴 블롯 분석을 수행시킨 결과를 나타낸 겔 사진이다.

30 도 3 은 H13, H14 및 H32-FLAG 을 각각 발현시키는 플라스미드와 His-PAUF 를 발현시키는 플라스미드를 HeLa 세포주에서 공동 발현시킨 후, 세포

단백질 추출물을 Ni-NTA 레진과 반응시켜 결합 침전물을 분리하고, 분리된 결합 침전물에 대한 웨스턴 블롯 수해를 나타낸 *인 비보* 실험 겔 사진이다.

도 4 는 패널 (a)는 GLRX3 의 PAUF 결합 도메인 중 구축된 GLRX3 의 돌연변이 구조를 보여주며, 패널 (b)는 돌연변이 GLRX3 구조 및 PAUF 간의 *인 비보* 결합 시험이다.

도 5 는 GLRX3 mRNA 와 단백질의 발현을 보여주는 것으로 패널 (a)는 인체췌장암 세포주에서의 GLRX3 mRNA 발현을 보여주며, 패널 (b)는 인체췌장암 세포주에서의 GLRX3 단백질의 발현을 보여주는 겔 사진이다.

도 6 은 췌장암 환자 조직에서의 GLRX3 mRNA 와 단백질의 발현을 면역조직화학 방법으로 확인 하는 사진으로 상단 사진은 정상 췌장 조직 사진이며, 하단 사진은 췌장암 조직 사진을 보여준 현미경 사진이다.

도 7 은 PAUF 단백질을 이용하여 UBL4A 단백질 및 UBQL4 단백질 펩타이드 서열을 보여주는 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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.

실시예

실험 재료 및 실험 방법

세포배양

8 종의 췌장암 세포주(AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, HPAC, MIAPaCa-2 및 PANC-1), 자궁경부암 세포주(HeLa)와 중국 햄스터 난소 세포주 (Chinese hamster ovary: CHO)는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)으로부터 구입하였다. CHO/PAUF 세포주는 pcDNA3.1(+)-PAUF-Myc/His plasmid 를 CHO 세포주에 이입하여 구축하였다(Sun A. Kim, et al., *Cancer Sci.* 100(5):828-836(2009)). 모든 세포는 5% CO₂, 37℃ 조건에서 배양하였다.

플라스미드 구성

- 이스트 투 하이브리드 분석을 위해, “먹이” 단백질로 PAUF 발현 서열을 *NcoI* 과 *EcoRI* 제한효소를 이용하여 pGBKT7 벡터(Clontech)에 넣어 pGBKT7-PAUF 플라스미드를 확립하였다. 포유류에서의 발현을 위해, PAUF 유전자가 삽입된 pcDNA3.1(+)-Myc/His 벡터(Invitrogen), pcDNA3.1(+)-PAUF-Myc/His 플라스미드(Sun A. Kim, et al., *Cancer Sci.* 100(5):828-836(2009))를 사용하였다. GLRX3(H14)와 결손 돌연변이(GLRX3N 및 GLRX3C) 발현을 위해, H14 가 들어가 있는 이스트 플라스미드 pGADT7Rec-H14(clontech)를 주형으로 하여 각각의 프라이머(표 1)를 이용해 단백질 코딩 서열을 증폭하고, 제한효소 *NotI* 와 *BamHI* 를 이용하여 3xFLAG-CMV14 벡터(Sigma)에 넣었다. H13(SNAPIN) 과 H32(UBL4A) 단백질 코딩 서열은 표 1 의 프라이머를 이용해 증폭시킨 후(pGADT7Rec-H13 및 pGADT7 Rec-H32 를 주형으로 사용함), 제한효소 *HindIII* 와 *BamHI* 을 이용하여 3xFLAG-CMV14 벡터에 넣었다. 구성된 모든 플라스미드는 시퀀싱으로 확인하였다.

【표 1】

construct	프라이머 시퀀스 (정방향/역방향)
pGBKT7-PAUF	5'-CCCGCCATGGCGATGTGGAGGGTGCC-3' 5'-GCCCCGAATTCGCGACCCACGGGTGAGT-3'
3xFLAG-CMV14/H13 (SNAPIN)	5'-CCCAAGCTTGGGATGGCGGGGGCTGGTTCC-3' 5'-CGCGGATCCGCGTTTGCCTGGGGAGCCAGGG-3'
3xFLAG-CMV14/H14 (GLRX3)	5'-AATGCGGCCGCGAGCATGGCGGGGGGGC-3' 5'-CGCGGATCCGCGATTTTCTCCTCTCAGTATAGGCAGC-3'
3xFLAG-CMV14/H14N (GLRX3N)	5'-AATGCGGCCGCGAGCATGGCGGGGGGGC-3' 5'-CGCGGATCCGCGAGGGGGCAGCATGAGTCAATT-3'
3xFLAG-CMV14/H14C (GLRX3C)	5'-AATGCGGCCGCGATGAACCTTCGCTTGAAGAAATTGACTC-3' 5'-CGCGGATCCGCGATTTTCTCCTCTCAGTATAGGCAGC-3'
3xFLAG-CMV14/H32 (UBLAA)	5'-CCCAAGCTTGGGATGCAGCTGACGGTGAAA-3' 5'-CGCGGATCCGCGTTTGGAGAAGCCCTTCTCCA-3'

이스트 투 하이브리드 스크리닝

이스트 투 하이브리드 스크리닝은 MATCHMAKER two-hybrid system(Clontech) 을 이용하여 수행하였다. 먹이 플라스미드 pGBKT7-PAUF 를 이스트 균주 AH109 에 형질전환시켰고, 형질전환된 AH109 는 선형질전환된 HeLa 세포 cDNA 라이브러리(Clontech)와 교배하였다. 교배된 이스트 세포들은 아데닌, 히스티딘, 루이신 및 트립토판이 배제된 최소 선택배지(QDO paltres)에서 자란 세포들에서 1 차 선택하였고, 잠정적인 양성 클론들은 β -갈락토시다아제 시험에서 LacZ 활성을 보이는 것으로 선택하였다. 최종적으로 선택된 41 개의 양성 클론에서 플라스미드를 추출하여 박테리아로 이입시킨 후 증식배양 하였다. 박테리아에서 뽑은 플라스미드를 시퀀싱하여 BLAST 프로그램에서 일치하는 시퀀스를 찾아내었다.

In vitro 결합 시험 (His Pull-down)

His 풀다운 실험을 위해, 농축한 CHO/PAUF-His 세포배양액을 Ni-NTA 레진(Novagen, Madison, WI)과 10 mM 이미다졸이 함유된 Ni-NTA 결합 완충액 하에서 4℃에서 반응시켰다. 밤새 배양시킨 Ni-NTA 레진을 20 mM 이미다졸이 포함된 Ni-NTA 결합버퍼로 3 회 세척 후, Cfpac-1 800 μ g 전단백질과 4 시간 동안 반응 시킨다. 4 시간이 지난 후 레진을 Ni-NTA 결합버퍼로 5 회 세척하고, 레진에 결합되어 있는 단백질을 SDS 샘플 버퍼에 녹여내서 SDS-PAGE 분석을 하고 웨스턴 블롯을 수행하였다.

In vivo 결합 시험

적절한 플라스미드 조합을 Lipofectamine Plus(Invitrogen)를 이용하여 HeLa 세포에 이입하였다. 이입 후 48 시간이 지나서, 세포 용해 버퍼(10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF 및 프로테아제 억제자 카테일(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany))로 용해시켜 총단백질을 얻었다. 분비단백질 준비를 위해, 플라스미드 이입 후 24 시간 되었을 때 배양액을 혈청이 없는 배양액으로 교체시키고, 다시 24 시간 배양 후 배양액을 모았다. 모인 배양액은 원심분리 하여 세포 부산물들을 분리하였다. His-태그된 단백질에 대한

면역침강을 위해, 300 μ g의 총단백질과 배양액을 Ni-NTA 레진과 함께 4°C에서 5 시간 동안 반응시켰다. 5 시간 후 세척 버퍼(50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl 및 0.5% Triton X-100)로 5 회 세척 후 레진에 붙어있는 단백질을 SDS 샘플 버퍼에 녹여내서 SDS-PAGE 와 웨스턴 블롯을 수행하였다.

단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석

세포 총단백질은 세포 용해 버퍼(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 25 mM β -glycerophosphate, 25 mM NaF, 0.5 M EDTA, 1% NP-40, 0.1 mM PMSF, and 1% 프로테아제 억제자 각테일(Roche))를 이용하여 추출하였다. 분비단백질 준비를 위해, 혈청이 없는 조건에서 배양한 세포배양액을 원심분리하여 세포 부산물들을 제거하고, microcon centrifugal filters(10 kDa cutoff; Amicon, Houston, TX)를 이용하여 농축하였다. 세포 총단백질 및 배양액은 SDS-PAGE 로 분리하고 PVDF 막 (Millipore, Billerica, MA)으로 옮긴다. 단백질이 블로팅 된 막은 5%(w/v) 저지방 우유로 비특이적 반응을 막은 후 His 에 대한 항체(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 혹은 PAUF 에 대한 항체(*Cancer Science*, ,100(5):826-836(2009))를 반응시켰다. 면역반응이 있는 단백질은 West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientici, Rockford, IL)로 가시화 하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

체장암 세포주의 GLRX3 mRNA 발현을 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 중합효소 연쇄 반응의 조건은 95°C 30 초- 55°C 30 초- 72°C 30 초로 총 28 주기를 수행하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머는 다음과 같다; *GLRX3* 정방향, 5' -GGGCGGCTGAGGCAGCT-3' ; *GLRX3* 역방향, 5' -GCAGGGGGCAGCATGAGTC-3' ; *ACTB* 정방향, 5' -ggcatcctcaccctgaagta-3' ; 그리고 *ACTB* 역방향, 5' -ggggtgttgaaggtctcaaa-3' .

면역화학염색

- 5 체장암 조직과 인접한 비암성 조직은 수술적 절제 방법으로 얻었다.
 파라포름알데하이드로 고정시킨 파라핀 포매 조직 섹션을 자일렌과 단계별
 에탄올을 거쳐 파라핀을 제거하였다. 내생적인 퍼옥시다아제 활성은
 0.3%(v/v) 과산화수소로 막고, 시트레이트 완충액(0.01 M, pH 6.0)하에
 10 전자레인지에서 3 분간 끓여 항원을 끌어내었다. 비특이적 반응을 막기 위해
 10% 정상 당나귀 혈청을 처리해 준 후, GLRX3 에 대한 단일클론 항체(1:500,
 Abnova, Taipei, Taiwan)과 반응 시켰다. 바이오틴화 링크 유니버설 &
 스트렙타비딘-HRP 컨쥬게이트(DakoCytomation, Ft. Collins, CO)로 반응 후
 크로모젠으로 발색하였고, Harris 헤마토자일린 용액(Sigma)으로 상대염색
 하였다.

실험결과

*PAUF 결합 단백질 도출; HeLa 세포 라이브러리 스크리닝을 통해 3 개의 PAUF
결합단백질 후보자 선정*

- 15 인간 HeLa 세포 cDNA 라이브러리에서의 이스트 투 하이브리드 방법을
 통해 PAUF 단백질과 결합하는 41 개 클론들을 찾아내었고(도 1), 각 클론에
 대해 DNA 스퀀싱 방법을 통해 동정하였다(표 2 및 표 3).

이들 중, x-gal 활성이 높은 H13(SNAPIN), H14(GLRX3) 와 H32(UBL4A)
 단백질을 대상으로 추가적인 PAUF 결합에 대한 실험을 진행하였다.

【표 2】

Blue background : x-gal activity

Clone #	Identified protein
2/36	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa (EIF3S5)
21	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa (EIF3S8)
15/25	PREDICTED: Pan troglodytes similar to Sorcin (22 kDa protein) (CP-22) (V19) (LOC463518)
17	Homo sapiens SNF8, ESCRT-II complex subunit, homolog (S.cerevisiae), mRNA (cDNA clone MGC:47686 IMAGE:3900806) / EAP30 subunit of ELL complex
38	Homo sapiens actinin, alpha 4 (ACTN4), mRNA Length=3893
31	Homo sapiens integrator complex subunit 1 (INTS1)
18	Homo sapiens mediator complex subunit 12 (MED12)
5	Homo sapiens mesothelin, transcript variant 1
11	Homo sapiens ribosomal protein, large, P2 (RPLP2)
34	P68 RNA replicase
37	Homo sapiens dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR)
41/39	Homo sapiens prosaposin (PSAP), transcript variant 3
4	Homo sapiens estrogen-related receptor alpha (ESRRα)

【표 3】

Clone #	Identified protein
16/20/29	Human RNA for HLA-Bw72 antigen
30	Homo sapiens (clone pMF18) MHC class I HLA-Bw62
27	HLA-C major histocompatibility complex, class I, C
10	Homo sapiens TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 1 (E.coli) (TRUB1)
33	Homo sapiens ribosomal protein S28
19	Homo sapiens peroxiredoxin 5 (PRDX5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3
22	Homo sapiens valyl-tRNA synthetase (VARS)
23	Homo sapiens required for meiotic nuclear division 5 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (RMND5B)
28	Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 10 (DHRS10)
1	Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome) (HPRT1)
3	Homo sapiens chromosome 19 clone LLNL-FOS_33C4, complete sequence Length=22624/Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_1103279181064)Length=3790315 Features in this part of subject sequence: protease, serine-like 1
7/40	Homo sapiens ferritin, light polypeptide
26/35	Homo sapiens BAC clone RP11-753F4 from 2
6/24	Homo sapiens BAC clone RP11-762N20 from 2
8/9	Homo sapiens ACN9 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)

In vitro 결합 시험

- 5 PAUF 를 과발현 하는 CHO/PAUF 세포주로부터 PAUF-His 단백질만을 Ni-NTA 레진에 결합시킨 후(PAUF-His/Ni-NTA)를 웨장암 세포주 Cfpac-1 총단백질과 결합을 유도하였다. PAUF 가 결합되어 있는 Ni-NTA 레진에는 GLRX3 단백질과 UBL4A 단백질이 각각 결합하는 것을 확인한 반면, PAUF 가 결합되어 있지 않은 Ni-NTA 레진 자체에는 GLRX3 와 UBL4A 가 결합하지 않는 것을 확인하였다(도 2). 이는 GLRX3 혹은 UBL4A 단백질과 PAUF 와의 결합이 특이적인 결과임을 보여주는 것이다.
- 10

In vivo 결합시험; 공동-면역침강법

Pull-down 어세이 방법은 서로 다른 세포에서 유래시킨 단백질간의 결합을 보여주는 것이므로, 생체내 결합과는 차이를 보일 수 있다. 이러한 단점을 극복하고자, PAUF, GLRX3 및 UBL4A 각 단백질을 코딩하는 유전자를 벡터에 넣어 HeLa 세포에 이입시킨 후 공동-면역침강을 수행하여 각 단백질을 세포내에서 발현시킨 상황에서 단백질 간의 결합을 확인하고자 하였다. 그 결과 PAUF 와 GLRX3, PAUF 와 UBL4A 를 발현시킨 세포에서는 두 단백질간의 결합을 확인할 수 있었다(도 3). 이에 비해 대조군으로 PAUF 와 BAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)를 이입시킨 세포에서는 PAUF 와 BAP 간의 결합을 나타내지 않았다.

GLRX3 의 N-말단 도메인이 PAUF 와의 결합에 포함됨.

PAUF 결합 단백질 중 하나인 GLRX3 단백질은 N-말단의 티오레독신 도메인과 C-말단의 2 x 글루타레독신 도메인으로 구성되어 있다(도 4의 패널 a). 두 개의 도메인 중 어느 것이 PAUF 와 결합하는 부분인지 규명하기 위해 아래 그림과 같이 두 가지 형태의 GLRX3 돌연변이 구조(GLRX3N 과 GLRX3C)를 만들어서 *in vitro* 공동면역침강 실험을 수행하였다. 그 결과 GLRX3 와 GLRX3 의 티오레독신 도메인만으로 구성된 구조(GLRX3N)는 PAUF 는 공동면역침강 되지만, GLRX3 의 C-말단 도메인만으로 구성된 구조(GLRX3C)는 PAUF 와 공동면역침강 되지 않았다. 이 결과는 GLRX3 의 N-말단의 티오레독신 도메인이 PAUF 와 결합하는 부분임을 보여준다(도 4의 패널 b).

췌장암 세포주와 환자조직에서의 *GLRX3* 발현 분포

GLRX3 mRNA 발현 정도를 췌장암 세포주와 정상 췌관 세포주(HPDE), 자궁경부암 세포주(HeLa)에서 확인한 결과, 모든 췌장암 세포주와 HeLa 에서 GLRX3 mRNA 가 발현하는 것을 확인한 반면, 정상 췌관 세포주 HPDE 세포주에서는 GLRX3 의 mRNA 발현이 미미하였다(도 5의 패널 a). GLRX3 단백질은 거의 모든 췌장암 및 정상 췌관 세포에서 발현함을 확인하였고, 발현된 GLRX3 단백질은 세포외로 분비되는 것을 확인하였다(도 5의 패널 b). 또한 환자 조직에서의 면역 염색을 통해, GLRX3 단백질이 정상 조직 보다

췌장암 조직의 세포질에서 더 많이 발현하는 반면 정상 췌관 세포와 세엽(acinar) 세포에서는 발현되지 않음을 확인하였다(도 6).

토의 사항

5 GLRX3 는 면역 관련 신호 전달에 관여할 것으로 알려지고 있으나, 활성화에 필요한 시퀀스가 없는 효소이기에 이에 결합하는 단백질에 의해 기능적으로 작용을 할 것으로 예측되고 있다. GLRX3 의 발현은 인체 췌장암과 폐암 조직에서 증가되어 있음이 보고된바 있고(Cancer Epidemiology 2009, Proteomics 2008), 유방암 세포주에서 GLRX3 발현을
10 저해하면 반응성 산소종(ROS) 레벨 증가와 NF- κ B 활성화 저해를 유발시켜 그 결과 세포의 증식을 억제한다는 보고가 있다. 또한 유방암 환자의 전이 및 생존률과도 밀접한 관계가 있다고 보고되었다(Journal of clinical investigation, 2010). 그러나 GLRX3 가 ROS 를 저해하는 정확한 메커니즘에 대해서는 밝혀지지 않았다.

15 세포내 산물인 산소 분자나 ROS 는 세포내 단백질 간의 이황화 결합을 형성하고 이러한 구조는 단백질의 안정성에 영향을 준다. 세포내에서 이와 같은 이황화 결합을 환원시키는 두 가지 주된 경로로 티오레독신과 글루타레독신 경로가 있다. GLRX3 는 해독 관련 효소로 최근 보고되고 있다.

암세포의 경우 정상 세포에 비해 대사활성 높아 그 결과 ROS 수준이
20 증가되어 있다. 또한, 많은 암세포들은 산화 환원 상태를 유지하고 아토포시스를 억제하기 위해 상대적으로 강화된 항산화 방어 메커니즘을 가지고 있다. 이러한 현상은 암세포가 더 많은 악성 행동과 억제 내성을 가지게 하는데 일조할 것이다.

이를 종합해 볼 때, 암세포에서 발현이 증가되어 있는 PAUF 와
25 GLRX3 는 서로 결합함으로써 ROS 를 제거하는데 관여할 것으로 예측된다.

UBL4A 단백질은 그 기능이 밝혀지지 않고 단순히 하우스키핑 유전자 정도로 알려졌으나 최근, 합성된 단백질들이 ER(endoplasmic reticulum)막으로 정확히 이동하기 위한 과도기적 상태에 필요한 Bat3 컴플렉스의 한 구성원으로 밝혀졌다(Nature, 466(26):1120-1124(2010)).

30 PAUF 의 기능이 밝혀지기 전, PAUF 의 다른 이름 중 하나인 ZG16B(zymogen granule protein 16 monolog B)와 UBQLN4(Ubiquilin-4)라는

단백질이 상호작용 하는 것으로 보고된바 있다(*Cell*, 125(4):801-14(2006)). 이 보고에서는 UBQLN4 와 PAUF;ZB16B 와의 결합사이트를 UBQLN4 전체 염기서열로 보고하였으나, 본 연구에서 PAUF 결합 단백질로 찾아진 UBL4A 단백질과 UBQL4 의 단백질의 펩타이드 서열과 비교한 결과 두 단백질은
 5 ubiquitin-유사도메인을 공유하는 것으로 나타났다(도 7). 따라서 UBL4A 의 ubiquitin-유사도메인이 PAUF 와 결합하는 도메인이라는 것을 예측할 수 있다.

Dial 단백질은 Rho 신호 전달계의 하위 단계로 종양 세포의 이동(migration)시 역할을 한다고 밝혀졌다(*Cell metastasis review*,
 10 28:65-76 (2009)). Rho 신호 전달계는 종양 세포의 전이와 침윤에 역할이 있고, 3 가지 Rho 단백질 (RhoA, RhoB 및 RhoC) 중 RhoC 단백질은 췌장암 환자 조직, 특히 비-악성보다는 종양에서, 일차 종양보다는 전이조직(metastatic lesions)에서 과발현되어 있으며, RhoC 발현과 환자의 전이 및 나쁜 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다(*Br J Cancer* ,77:147-152 (1998)). 췌장암 세포주는 PAUF 과발현 혹은 저해에 따라 세포의 전이와 침윤의 증가 혹은 억제효과를 보이는데, Dial 단백질이
 15 이 과정에 관련되어 있을 것으로 예측된다.

SNAPIN 단백질은 신경세포에서 시냅스 소포 exocytosis 에 관여하는 단백질로 보고되었고(Z.H. Sheng et al., *Nat. Neurosci.*, 2(2):119-124
 20 (1999)) 비신경 포유동물 세포에서도 SNARE(soluble N-ethymaleimide-sensitive fusion protein attachemant protein receptors)컴플렉스가 규명되었다(W. Antonin et al., *EMBO J.*, 19:6453-6464 (2000)).

SNAPIN 결합 단백질로 여러 단백질들이 보고된 바 있다. 비신경세포에서 SNAP23 단백질과 결합한다고 보고되었다(P.Buxton et al.,
 25 *Biochem. J.* ,375:433-440 (2003)). 제 2 형 당뇨병 중 MODY3(maturity-onset diabetes of the young 3)는 nepatocute nuclear factor (HNF)-1a 의 돌연변이 결과에 기인하는데, HNF-1a 와 상호작용 하는 단백질로 신장특이 유전자 컬렉트린이라는 것이 밝혀졌고, 컬렉트린은 SNAPIN 과 상호작용 하여 SNARE 컴플렉스의 기전을 통해 인슐린 세포의유출을 조절한다고
 30 보고되었다(K.Fukui 및 K. Yamagata et al., *Cell metabolism* ,2:373-384 (2005)). X.Yuan 및 Y. Cong et al.은 G-CSF(granulocyte colony-

stimulating factor) 수용체 (GCSF-R)와 SNAPIN 이 상호작용 한다고 보고하였고(Cytokine, 33:219-255 (2006)), Exo70 과 SNAPIN 과 결합하여 GLUT4 vesicle trafficking 을 조절한다고 보고되었다 (*JBC*, 283(1), 324-331 (2008)).

- 5 췌장암 세포주에서 PAUF 의 분비 여부를 조사한 결과(선행 연구), 세포주마다 PAUF 분비 여부가 다르게 나타나고 있었다. mRNA 시퀀스 분석 결과 PAUF 단백질의 분비를 코딩하는 시그널 시퀀스 상에는 세포주간에 차이를 보이지 않았다. 따라서 분비단백질을 세포외로 이동시키는 과정에 관여하는 단백질이 PAUF 의 분비 여부에 기여할 것으로 예측되고, 그 해당
- 10 단백질로 SNAPIN 이 작용할 가능성이 크다고 여겨진다.

- 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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
- 15 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

다음 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법:

5 (a) PAUF(Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와 그의
결합파트너로서의 GLRX3(Glutaredoxin-3), SNAPIN(SNAP-associated
protein) 또는 UBL4A(ubiquitin-like 4A)에 시험물질을 접촉시키는 단계;
및

10 (b) 상기 시험물질이 상기 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3,
SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는지 여부를 분석하는 단계, 상기
시험물질이 상기 결합을 억제하면 암 치료제로서 판단한다.

【청구항 2】

15 제 1 항에 있어서, 상기 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3,
SNAPIN 또는 UBL4A 는 세포 외에 하나의 용액에 포함되어 있는 것을
특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

20 제 1 항에 있어서, 상기 PAUF 와 그의 결합파트너로서의 GLRX3,
SNAPIN 또는 UBL4A 는 하나의 세포 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는
방법.

【청구항 4】

25 제 3 항에 있어서, 상기 세포는 암 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

 제 1 항에 있어서, 상기 PAUF 의 결합파트너는 GLRX3 인 것을
특징으로 하는 방법.

30 **【청구항 6】**

제 5 항에 있어서, 상기 PAUF 의 결합파트너는 GLRX3 의 티오레독신 도메인인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

5 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 투-하이브리드 방법, 공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation assay), 공동-국소화 분석(co-localization assay), 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay: SPA), UV 또는 화학적 가교 결합 방법, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis: BIA), 질량 분석법(mass spectrometry: MS),
10 NMR(nuclear magnetic resonance) 또는 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays, FPA)에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 암은 췌장암인 것을 특징으로 하는 방법.
15

【청구항 9】

PAUF(Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와 그의 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
20

【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 상기 PAUF 의 결합파트너는 GLRX3 인 것을 특징으로 하는 조성물.

25 【청구항 11】

제 9 항에 있어서, 상기 암은 췌장암인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 12】

PAUF(Pancreatic Adenocarcinoma Up-regulated Factor)와 그의
30 결합파트너로서의 GLRX3, SNAPIN 또는 UBL4A 의 결합을 억제하는 물질을

유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법.

【청구항 13】

- 5 제 12 항에 있어서, 상기 PAUF 의 결합파트너는 GLRX3 인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

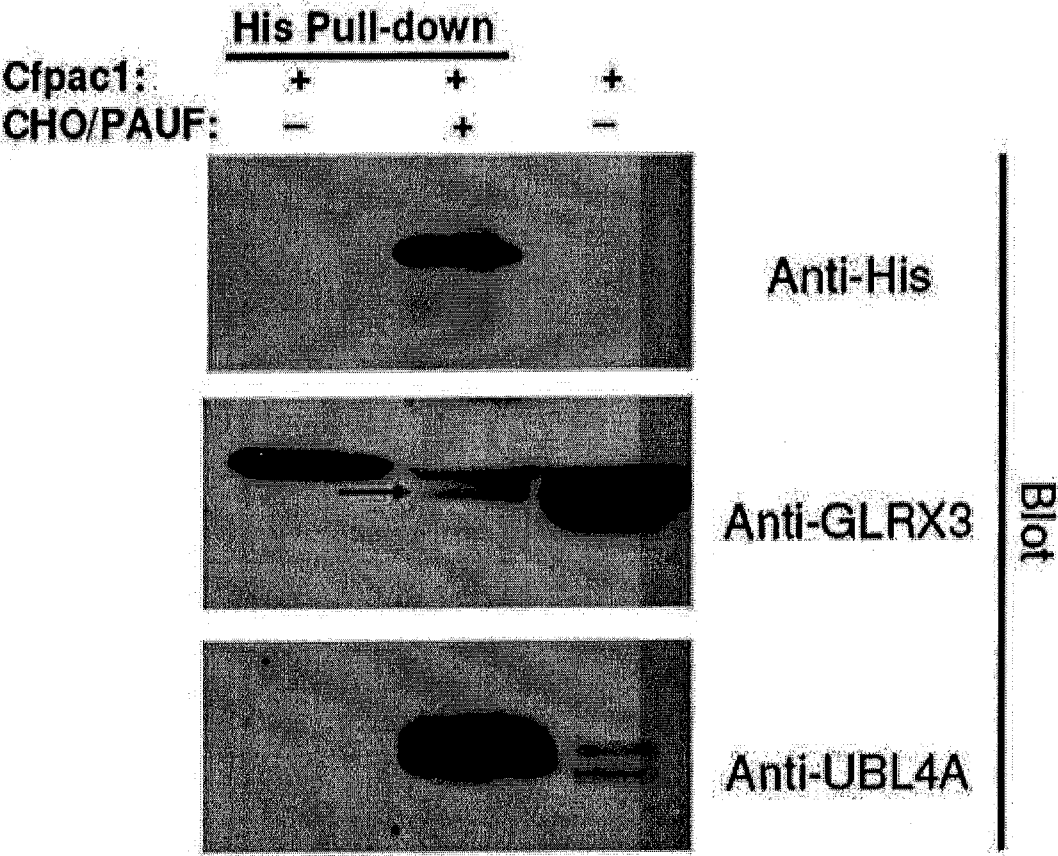
제 12 항에 있어서, 상기 암은 췌장암인 것을 특징으로 하는 방법.

1/7

Fig. 1

2/7

Fig. 2



3/7

Fig. 3

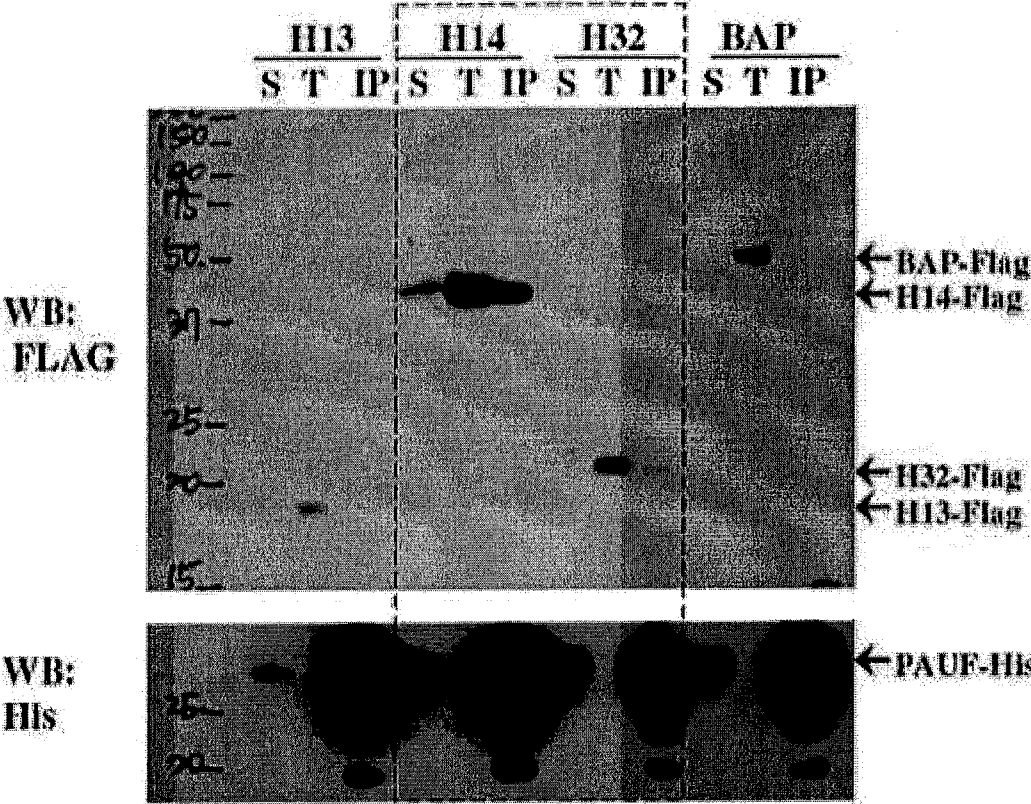
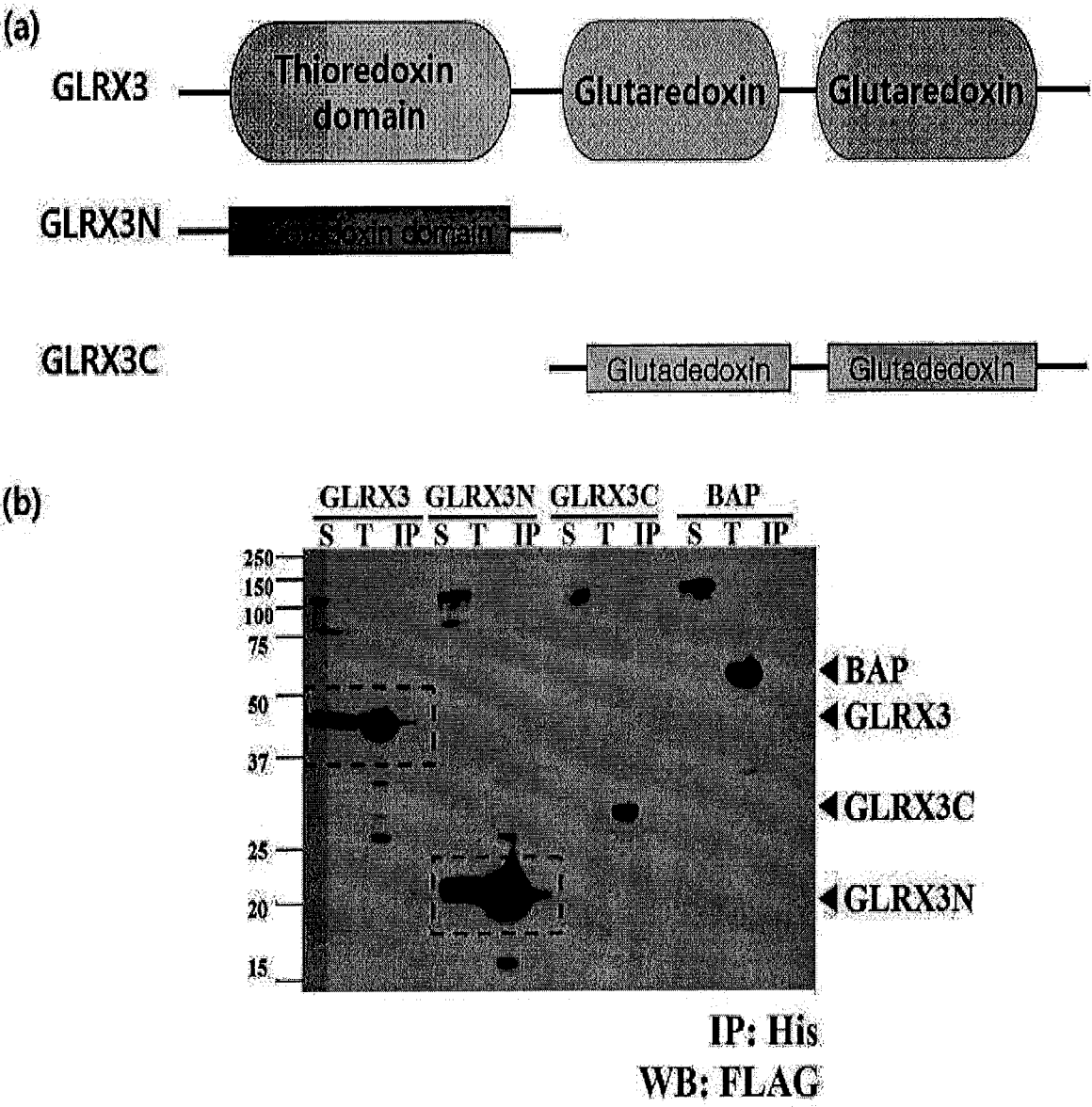
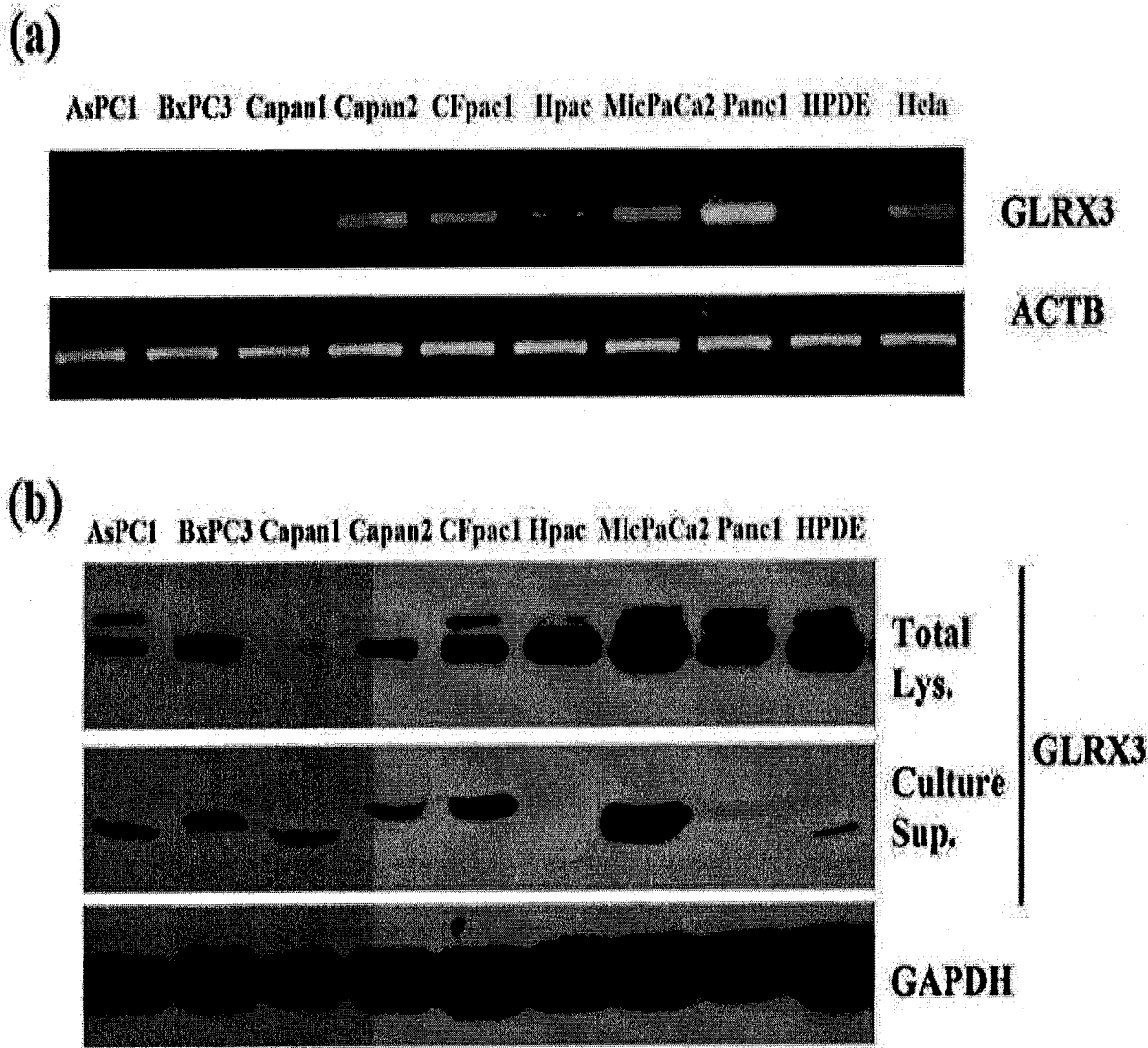


Fig. 4



5/7

Fig. 5



6/7

Fig. 6

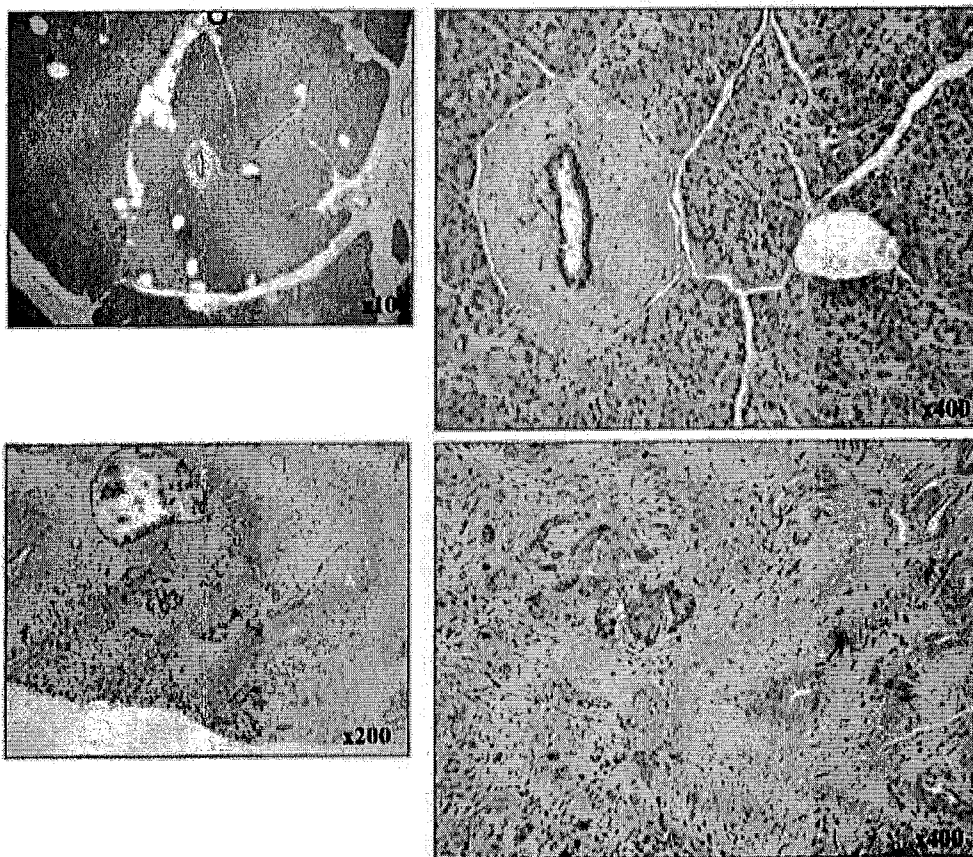
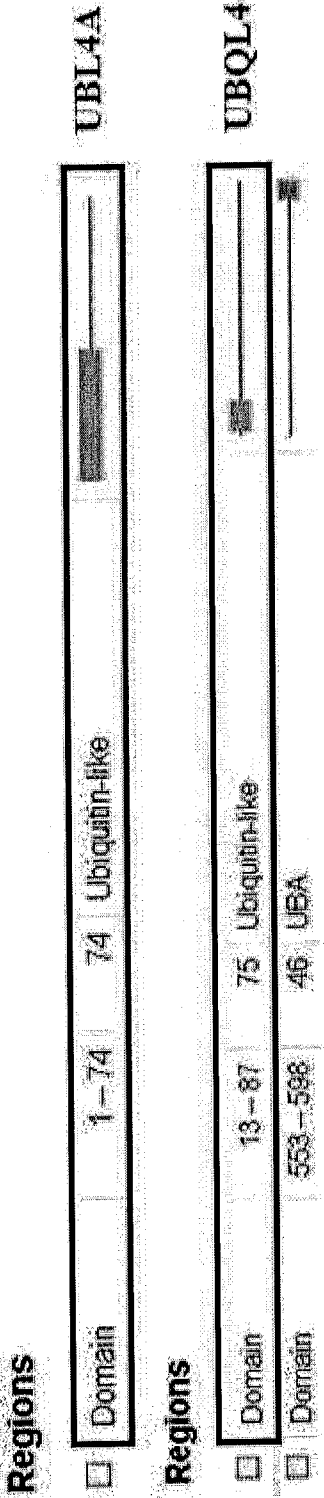


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/005684**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/15(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)

G01N 33/574; C07H 21/04; C12N 15/12; C12N 15/10; C12N 15/09; G01N 33/53; 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: PAUF, GLRX3, SNAPIN, UBL4A, cancer medicine, screening, pancreatic cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2007-0119250 A (LG LIFE SCIENCES LTD.) 20 December 2007 See the entire document.	1-11
A	KR 10-2010-0111897 A (PAICHAH UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 18 October 2010 See abstract.	1-11
A	US 05840870 A (GOOLD RICHARD D. et al.) 24 November 1998 See the entire document.	1-11
A	US 05998165 A (GOOLD RICHARD D. et al.) 07 December 1999 See abstract.	1-11
A	LEE Y. et al. PAUF functions in the metastasis of human pancreatic cancer cells and upregulates CXCR4 expression. Oncogene. 2010, Vol. 29, No. 1, figures 56-67 See the entire document.	1-11
A	FUJIOKA S. et al. Function of nuclear factor kB in pancreatic cancer metastasis. Clinical Cancer Research. 2003, Vol. 9, figures 346-54 See abstract.	1-11



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

19 MARCH 2012 (19.03.2012)

Date of mailing of the international search report

20 MARCH 2012 (20.03.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2011/005684**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/005684

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.: **12-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12 to 14 pertain to a method for treatment of the human by surgery or therapy, 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/KR2011/005684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2007-0119250 A	20.12.2007	AU 2007-259576 A1 CA 2655213 A1 CN 101495634 A EP 2024500 A1 JP 2009-539400 A US 2009-0188000 A1 WO 2007-145466 A1	21.12.2007 21.12.2007 29.07.2009 18.02.2009 19.11.2009 23.07.2009 21.12.2007
KR 10-2010-0111897 A	18.10.2010	US 2012-0015847 A1 WO 2010-123159 A1	19.01.2012 28.10.2010
US 05840870 A	24.11.1998	NONE	
US 05998165 A	07.12.1999	AU 1997-14211 B2 AU 1998-98041 A1 CA 2283690 A1 CN 1145098 A0 EP 0748390 A1 EP 0870021 A1 EP 0870021 A1 EP 0941313 A1 EP 0941313 A1 EP 0972035 A1 EP 1023443 A1 JP 09-503921 A JP 11-501741 A JP 2000-502902 A JP 2001-504333 A JP 2001-517942 A JP 2001-520015 A KR 10-1997-0700777 A US 05786148A A US 05840484A A US 05840870A A US 05849899A A US 05892016A A US 05922321A A US 06114114A A US 2002-0064792 A1 US 2002-0091249 A1 US 2002-0146712 A1 US 2003-0040615 A1 US 2003-0099988 A1 US 6184357 B1 US 6303297 B1 US 6472508 B1 WO 95-20681 A1 WO 96-23078 A1 WO 97-24437 A1	17.08.2000 03.05.1999 24.09.1998 12.03.1997 28.01.2004 14.10.1998 29.12.2004 15.09.1999 16.03.2005 19.01.2000 02.08.2000 22.04.1997 09.02.1999 14.03.2000 03.04.2001 09.10.2001 30.10.2001 12.02.1997 28.07.1998 24.11.1998 24.11.1998 15.12.1998 06.04.1999 13.07.1999 05.09.2000 30.05.2002 11.07.2002 10.10.2002 27.02.2003 29.05.2003 06.02.2001 16.10.2001 29.10.2002 03.08.1995 01.08.1996 10.07.1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/005684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 98-20117 A1	14.05.1998
		WO 98-41632 A1	24.09.1998
		WO 99-19487 A1	22.04.1999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574; C07H 21/04; C12N 15/12; C12N 15/10; C12N 15/09; G01N 33/53; 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: PAUF, GLRX3, SNAPIN, UBL4A, 암치료제, 스크리닝, 체장암		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2007-0119250 A (주식회사 엘지생명과학) 2007.12.20 전문 참조.	1-11
A	KR 10-2010-0111897 A (배재대학교 산학협력단) 2010.10.18 요약 참조.	1-11
A	US 05840870 A (GOOLD RICHARD D. 외 2명) 1998.11.24 전문 참조.	1-11
A	US 05998165 A (GOOLD RICHARD D. 외 3명) 1999.12.07 요약 참조.	1-11
A	LEE Y. 등. PAUF functions in the metastasis of human pancreatic cancer cells and upregulates CXCR4 expression. Oncogene. 2010년, 29권, 1호, 56-67면 전문 참조.	1-11
A	FUJIOKA S. 등. Function of nuclear factor kB in pancreatic cancer metastasis . Clinical Cancer Research. 2003년, 9권, 346-54면 요약 참조.	1-11
☐ 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 2012년 03월 19일 (19.03.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 03월 20일 (20.03.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 문동현 전화번호 82-42-481-8298

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐

서면

☒

전자적 형태

b. 제출시기

☒

출원시 국제출원에 포함

☐

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

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

3. 추가 의견:

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

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

1. ☒ 청구항: 12-14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제12 내지 제14항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 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
KR 10-2007-0119250 A	2007. 12. 20	AU 2007-259576 A1 CA 2655213 A1 CN 101495634 A EP 2024500 A1 JP 2009-539400 A US 2009-0188000 A1 WO 2007-145466 A1	2007. 12. 21 2007. 12. 21 2009. 07. 29 2009. 02. 18 2009. 11. 19 2009. 07. 23 2007. 12. 21
KR 10-2010-0111897 A	2010. 10. 18	US 2012-0015847 A1 WO 2010-123159 A1	2012. 01. 19 2010. 10. 28
US 05840870 A	1998. 11. 24	없음	
US 05998165 A	1999. 12. 07	AU 1997-14211 B2 AU 1998-98041 A1 CA 2283690 A1 CN 1145098 A0 EP 0748390 A1 EP 0870021 A1 EP 0870021 A1 EP 0941313 A1 EP 0941313 A1 EP 0972035 A1 EP 1023443 A1 JP 09-503921 A JP 11-501741 A JP 2000-502902 A JP 2001-504333 A JP 2001-517942 A JP 2001-520015 A KR 10-1997-0700777 A US 05786148A A US 05840484A A US 05840870A A US 05849899A A US 05892016A A US 05922321A A US 06114114A A US 2002-0064792 A1 US 2002-0091249 A1 US 2002-0146712 A1 US 2003-0040615 A1 US 2003-0099988 A1 US 6184357 B1 US 6303297 B1 US 6472508 B1 WO 95-20681 A1 WO 96-23078 A1 WO 97-24437 A1	2000. 08. 17 1999. 05. 03 1998. 09. 24 1997. 03. 12 2004. 01. 28 1998. 10. 14 2004. 12. 29 1999. 09. 15 2005. 03. 16 2000. 01. 19 2000. 08. 02 1997. 04. 22 1999. 02. 09 2000. 03. 14 2001. 04. 03 2001. 10. 09 2001. 10. 30 1997. 02. 12 1998. 07. 28 1998. 11. 24 1998. 11. 24 1998. 12. 15 1999. 04. 06 1999. 07. 13 2000. 09. 05 2002. 05. 30 2002. 07. 11 2002. 10. 10 2003. 02. 27 2003. 05. 29 2001. 02. 06 2001. 10. 16 2002. 10. 29 1995. 08. 03 1996. 08. 01 1997. 07. 10

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 98-20117 A1

1998.05.14

WO 98-41632 A1

1998.09.24

WO 99-19487 A1

1999.04.22