

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2020/218866 A1

2020 년 10 월 29 일 (29.10.2020) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/68* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/005418
- (22) 국제출원일: 2020 년 4 월 24 일 (24.04.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0048759 2019 년 4 월 25 일 (25.04.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 대웅제약 (DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [KR/KR]; 18623 경기도 화성시 향남읍 제약공단4길 35-14, Gyeonggi-do (KR). 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) [KR/KR]; 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김홍태 (KIM, Hong Tae); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 정희진 (CHUNG, Hee Jin); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 박기범 (PARK, Ki Beom); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 김동욱 (KIM, Dong Wook); 07345 서울시 영등포구 여의동로 213, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

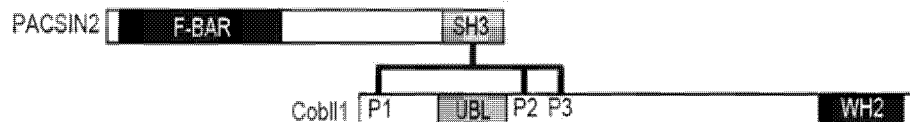
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: BIOMARKER FOR DIAGNOSIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

(54) 발명의 명칭: 만성 골수성 백혈병의 진단용 바이오마커



(57) Abstract: The present invention relates to Cobl1, PACSIN2, and SH3BP1 proteins, which are biomarkers for diagnosis of chronic myeloid leukemia (CML). More particularly, the present invention relates to a method in which a progression stage of CML is monitored through the individual actions of the biomarkers or through the interaction thereof and a diagnosis is made to determine whether or not a CML patient is resistant to tyrosine kinase inhibitors, which are conventional therapeutic agents for CML.

(57) 요약서: 본 발명은 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia; CML)의 진단용 바이오마커인 Cobl1, PACSIN2, SH3BP1 단백질에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 상기 바이오마커 각각 또는 이들의 상호작용을 통해 CML의 진행 단계를 진단하고, CML 환자가 기존 CML 치료제인 타이로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는지 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.



WO 2020/218866 A1

명세서

발명의 명칭: 만성 골수성 백혈병의 진단용 바이오마커 기술분야

- [1] 본 발명은 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia; CML)의 진단용 바이오마커인 Cobl11, PACSIN2, SH3BP1 단백질에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 상기 바이오마커 각각 또는 이들의 상호작용을 통해 CML의 진행 단계를 진단하고, CML 환자가 기존 CML 치료제인 타이로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는지 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 백혈병(leukemia)은 백혈구가 종양성으로 증식하는 질환을 총칭한다. 백혈병의 종류는 백혈병이 기원하는 백혈구에 따라 골수성 백혈병과 림프성 백혈병으로 나눌 수 있고, 진행속도에 따라 급성 백혈병과 만성 백혈병으로 나뉜다. 백혈병의 임상학적 양상은 질환의 유형과 침범한 세포의 성질에 따라 다양하다. 림프성 백혈병은 림프계 혈액세포가, 골수성 백혈병은 골수계 혈액세포가, 그리고 만성 골수성 백혈병은 변이가 생긴 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)의 악성 클론들에 의해서 발생한다.
- [4] 특히, 만성 골수성 백혈병은 조혈모세포가 골수 내에서 대량 증식하여 비정상적으로 증가한 각종 혈구 세포가 말초 혈액이나 기타 장기를 침습하는 악성 혈액 질환으로 성인에서 주로 발병하는 악성 혈액암이다. 만성 골수성 백혈병은 만성기(chronic phase; CP), 가속기(accelerated phase; AP) 및 급성기(blast crisis; BC)의 세 가지 임상 단계를 통해 진행된다. 만성 골수성 백혈병의 진단을 위한 가장 일반적인 방법은 염색체 검사를 통해서 필라델피아 염색체를 발견하는 것이다. 실제 만성 골수성 백혈병 환자의 95% 정도에서 9번 염색체와 22번 염색체 사이의 전좌가 발견되며, 상기 전좌는 9번 염색체의 q34 위치에 존재하는 abl(abelson oncogene) 유전자 일부가 22번 염색체 q11.2 위치에 존재하는 bcr(break point cluster region) 유전자로 전위되어 형성되는데, 이러한 재배열을 BCR-ABL1 재배열(BCR-ABL1 rearrangement)이라고 한다.
- [5] 일반적으로, BCR-ABL1 융합 유전자를 초래하는 전위는 CML의 개시의 주요 원인이며, BCR-ABL1 융합 유전자는 항상적으로 활성화된(constitutively active) 티로신 키나아제인 BCR-ABL1 융합 단백질을 암호화한다. 이매티닙(imatinib)은 BCR-ABL1을 표적으로 하는 최초의 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor; TKI)로서, CML 치료에 매우 효과적임이 밝혀졌다. 그러나 이매티닙은 이매티닙 치료에 대한 primitive CML 세포의 내성(resistance) 및 비감수성(insensitivity)으로 인해, CML 클론을 완전히 제거할 수 없다는 문제가 있다. 그 외에도, 닐로티닙(nilotinib)이 TKI으로서 CML 치료에 사용되고 있다.

ATP 및 allosteric 부위 억제제를 포함한 차세대 BCR-ABL TKI의 개발에도 불구하고 일부 환자는 급성기로의 진행 단계에서 여전히 TKI에 대한 내성을 나타낸다. 이러한 내성은 BCR-ABL1 키나아제 의존성이거나 또는 비의존성인 것으로 밝혀졌다. 대다수의 환자는 점 돌연변이(point mutation)나 증폭(amplification)과 같은 BCR-ABL1 키나아제 의존성 메커니즘을 통해 내성을 나타내는 반면, BCR-ABL1 비의존성 내성의 존재는 TKI 내성의 다른 메커니즘이 있음을 시사한다.

- [6] Cobll1(Cordon-bleu protein-like 1) 단백질은 세포사멸의 음성 조절인자(negative regulator)로 알려져 있으며 낮은 인슐린 내성과 관련되어 있다. 또한, Cobll1의 발현이 높은 CML 환자의 경우 임상 결과가 좋지 않다고 알려져 있다. 특히 Cobll1 단백질의 발현은 CML의 급성기에서 확연히 증가하여, Cobll1 단백질이 CML의 급성기로의 진행과 연관되어 있음이 확인된 바 있으며, 또한 Cobll1의 발현시 TKI에 내성을 갖는 것으로 연구된 바 있다(특허문헌 1). 나아가 Cobll1은 CML에서 NF- κ B 신호 전달 경로의 활성화를 통해 TKI 내성과 모세포 전환(blastic transformation)을 유도하는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 1).
- [7] PACSIN2(Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2)는 흔하게 발현되는 세포질 아답터 단백질(cytoplasmic adapter protein)이다. 이는 N-말단 F-BAR 도메인 및 C-말단 SH3 도메인을 보유하며, 척추동물에서 고도로 보존되어 있다. PACSIN2는 세포 이동, caveolae 형성, 및 수용체 내재화(receptor internalization) 작용을 하는 것으로 알려져 있다. PACSIN2는 SH3 도메인을 통해 dynamin-2, N-WASP 및 synaptojanin을 비롯한 여러 단백질과 상호작용하여 내포작용에 관여한다.
- [8] SH3BP1(SH3 Domain Binding Protein 1) 단백질은 Rac 신호를 조절하고 cytoskeletal dynamics, 세포 운동성 및 상피 접합체 형성 등에 관여한다. SH3BP1 단백질은 원형질막에 분비성 소포를 연결하는(tether) exocyst 복합체와 결합하여 세포 운동성에서 중요한 것으로 확인되었다. 상기 단백질은 사람의 간암 세포와 조직에서 전이를 촉진할 수 있다.
- [9] 그러나 현재까지 CML에서의 PACSIN2 및 SH3BP1 단백질의 기능, 특히, Cobll1, PACSIN2, SH3BP1 단백질 사이의 상호작용에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.
- [10]
- [11] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1820572호
- [12] (비특허문헌 0001) Han, S., et al. Cobll1 is linked to drug resistance and blastic transformation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 1532 (2017).
- [13]

발명의 상세한 설명
기술적 과제

- [14] 종래에는 BCR-ABL의 재배열을 확인하여 만성 골수성 백혈병을 진단하고 예후를 예측하고자 하는 많은 연구들이 활발히 진행되었다. 그러나 BCR-ABL1 유전자에서 돌연변이가 발생하지 않은 백혈병들이 빈번히 발생하고 있으며, 특히 만성 골수성 백혈병에서 급성기로 전환되는 기작 및 이를 위한 진단 방법들에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

[15]

과제 해결 수단

- [16] 본 발명에서는 만성 골수성 백혈병과 관련된 바이오마커 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 단백질의 발현 수준을 측정하여 만성 골수성 백혈병의 급성기로의 진행 여부를 효과적으로 진단하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 단백질의 발현 수준 또는 이들의 상호작용을 측정하여, 만성 골수성 백혈병 환자가 기존 만성 골수성 백혈병 치료제인 타이로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는지 여부를 효과적으로 진단하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[19]

발명의 효과

- [20] 본 발명에서는 Cobll1, PACSIN2, SH3BP1 단백질을 바이오마커로 이용함으로써, 만성 골수성 백혈병의 급성기로의 진행 여부, 기존의 타이로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성 등을 보다 효과적으로 진단할 수 있을 뿐 아니라, 기존의 BCR-ABL1 유전자 발현량 측정에 의하여 예측 및 진단되지 못했던 환자들을 진단하는데 사용될 수 있기 때문에, 만성 골수성 백혈병의 다양한 진행, 약제 저항성, 예후 예측 및 진단 등에 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[21]

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1 내지 26은 실시예 1의 실험 과정 또는 그의 결과를 보여주는 도면으로서, PACSIN2가 Cobll1의 새로운 결합 단백질을 보여준다.
- [23] 도 1은 정량 분석을 위한 질량 분광 분석법 및 효모 단백질 잡종법의 모식도이다.
- [24] 도 2 내지 4는 Cobll1 단백질의 질량 분광 분석법 또는 효모 단백질 잡종법으로 확인된 단백질을 나타낸다.
- [25] 도 5는 표지된 단백질 발현 벡터를 효모 AH109 세포로 공동 형질전환시키고, 성장하는 콜로니를 high stringent 배지에서 평가하였다. 선택 배지상의 청색 콜로니는 양성 상호작용을 나타낸다.
- [26] 도 6 및 7은 K562 세포에서 과발현 또는 내인성 Cobll1과 PACSIN2 사이의

상호작용을 나타낸다.

- [27] 도 8 및 10은 야생형 (WT) Cobll1 또는 PACSIN2 및 그 내부 결실 돌연변이의 모식도이다. 잔기 번호를 다이어그램 위에 표시하였다.
- [28] 도 9 및 11은 Cobll1과 PACSIN2의 상호작용하는 도메인을 동정한 결과를 보여준다.
- [29] 도 12 및 13은 Cobll1과 PACSIN2의 상호작용하는 도메인을 GST-pull down 분석을 통해 추가로 확인한 결과를 보여준다.
- [30] 도 14는 Cobll1의 예상되는 프롤린-풍부 영역을 나타낸다.
- [31] 도 15는 Cobll1의 프롤린-풍부 영역의 다이어그램을 나타낸다.
- [32] 도 16은 Cobll1의 프롤린-풍부 영역의 돌연변이의 요약이다. 주요 프롤린 잔기는 알라닌으로 돌연변이되었다. Cobll1-2A 및 -3A는 Cobll1의 2개 및 3개의 프롤린-풍부 모티프가 각각 돌연변이된 점 돌연변이를 나타낸다.
- [33] 도 17 내지 19는 GST-PACSIN2 SH3와 과발현 Cobll1-WT 또는 Cobll1-3A 돌연변이(3A) 사이의 상호작용을 나타낸다.
- [34] 도 20은 과발현 Cobll1-WT 또는 Cobll1-3A와 PACSIN2 사이의 상호작용을 나타낸다.
- [35] 도 21은 1H-15N PACSIN2 SH3 도메인의 HSQC 스펙트럼을 보여준다. Assigned resonance가 표기되었다.
- [36] 도 22 내지 24는 Cobll1에서 유래된 제2 프롤린-풍부 펩타이드의 존재하에 PACSIN2 SH3 도메인의 스펙트럼 변화를 나타낸다. 펩타이드 결합에 의해 크게 영향받는 잔기가 표시되어 있다.
- [37] 도 25는 3 개의 Cobll1 프롤린-풍부 펩타이드 (PACSIN2 SH3:프롤린-풍부 펩타이드 = 1:4)와의 결합시, PACSIN2 SH3 도메인의 화학적 변화(CSP, $\Delta\delta_{HN,N}$)의 값을 보여준다. 높은 CSP 값을 나타내는 잔기를 표시하였고, 사라진 잔기(N480)은 빨간색 별표로 강조 표시하였다.
- [38] 도 26은 Cobll1과 PACSIN2의 결합 도메인의 구조를 개략화한 것이다.
- [39] 도 27 내지 39는 실시예 2의 실험 과정 또는 그의 결과를 보여주는 도면으로서, PACSIN2가 K562 세포에서 닐로티닙 내성을 조절함을 보여준다.
- [40] 도 27 및 28은 PACSIN2의 knock-down은 K562 세포에서 닐로티닙에 의해 유발된 세포사멸을 약화시킴을 나타낸다. 도 27은 PACSIN2의 siRNA를 사용하여 K562 세포에서의 FACS 분석 결과를 나타낸다. 도 28은 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다.
- [41] 도 29 및 30은 PACSIN2 과발현이 K562 세포를 닐로티닙 유도 세포사멸에 대해 민감화(sensitize)하였음을 보여준다. 도 29는 표지된 유전자가 발현된 K562 세포에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸다. 도 30은 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다.
- [42] 도 31 내지 33은 K562 세포에서 siRNA-내성 Myc-PACSIN2의 발현이 닐로티닙 유도된 세포사멸을 회복(rescue)시킴을 나타낸다. 도 31은 Cobll1 siRNA-내성

Myc-PACSIN2 플라스미드의 다이어그램이다. 도 32는 표지된 유전자가 발현된 K562 세포에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸다. 도 33은 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다.

- [43] 도 34 및 35는 Cobll1의 N-말단 영역의 결손 돌연변이가 닐로티닙 감수성에 대한 PACSIN2의 효과를 회복(rescue)함에 있어서 중요함을 나타낸다. 도 34은 표지된 유전자가 발현된 K562 세포에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸다. 도 35는 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다.
- [44] 도 36 및 37은 PACSIN2의 SH3은 닐로티닙 감수성의 주요 도메인임을 나타낸다. 도 36은 표지된 유전자가 발현된 K562 세포에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸다. 도 37은 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다.
- [45] 도 38 및 39는 Cobll1의 프롤린-풍부 부위의 돌연변이는 닐로티닙 감수성에 대한 PACSIN2의 효과를 회복(rescue)하지 못함을 나타낸다. 도 38은 표지된 유전자가 발현된 K562 세포에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸다. 도 39는 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다.
- [46] 위 모든 그래프는 3회의 독립적인 실험의 평균을 나타내며, 오차 막대는 SEM을 나타낸다. Cobll1 및 PACSIN2의 발현은 웨스턴 블롯에 의해 확인되었다.
- [47] 도 40 내지 65는 실시예 3 및 4의 실험 과정 또는 그의 결과를 보여주는 도면으로서, SH3BP1가 PACSIN2의 새로운 결합 단백질이며, PACSIN2 단백질은 자신의 SH3 도메인을 통하여 SH3BP1 및 Cobll1와 경쟁으로 결합함을 나타낸다.
- [48] 도 40은 질량 분석을 위한 tandem affinity purification의 모식도이다.
- [49] 도 41은 질량 분광 분석법으로 확인된 단백질을 보여준다.
- [50] 도 42는 PACSIN2가 SH3 도메인을 통해 SH3BP1에 결합함을 보여준다.
- [51] 도 43은 내인성 SH3BP1과 PACSIN2 사이의 상호작용을 나타낸다.
- [52] 도 44는 GST-PACSIN2 SH3과 과발현된 SH3BP1 사이의 상호작용을 나타낸다.
- [53] 도 45 및 46은 예측된 프롤린-풍부 영역과 SH3BP1의 다이어그램을 나타낸다.
- [54] 도 47은 SH3BP1의 프롤린-풍부 영역의 돌연변이를 요약한 것이다. 주요 프롤린 잔기가 알라닌으로 돌연변이되거나 선택된 영역이 결실되었다. SH3BP1-DPD2는 SH3BP1의 5개의 프롤린-풍부 모티프가 모두 결실된 결실 돌연변이를 나타낸다.
- [55] 도 48 및 49는 SH3BP1 돌연변이에 따른 PACSIN2의 상호작용을 나타낸다.
- [56] 도 50은 과발현된 SH3BP1-WT 또는 SH3BP1-DPD2 돌연변이와 PACSIN2와의 상호작용을 나타낸다.
- [57] 도 51 및 52는 SH3BP1-CT (도 51) 및 Cobll1-NT (도 52)의 존재하에 PACSIN2 SH3 도메인의 HSQC 스펙트럼을 나타낸다. 인자가 많은 부분은 확대하였다. 영향을 많이 받는 잔기는 별도 표기하였고, 확장된(broadened) 잔기는 별표로 표시하였다.
- [58] 도 53은 SH3BP1-CT 및 Cobll1-NT와의 결합시 PACSIN2 SH3 도메인의 CSP 값을 나타낸다. SH3BP1-CT 및 Cobll1-NT 존재하에서 사라지는 잔기는 각각

파란색 별표와 빨간색 별표로 표시하였다.

- [59] 도 54는 SH3BP1 과발현이 K562 세포에서 닐로티닙 유도된 세포사멸을 약화시킴을 나타낸다.
- [60] 도 55는 SH3BP1의 knock-down이 K562 세포를 닐로티닙 유도된 세포사멸에 민감하게 하였음을 나타낸다.
- [61] 도 56은 Cobll1 발현 플라스미드로 형질감염되거나 또는 되지 않은 세포 용해물 및 GST-Rac1을 사용한 GST pull-down 분석을 보여준다.
- [62] 도 57은 Rac1의 과발현은 K562 세포에서 닐로티닙 유도된 세포사멸을 약화시킴을 보여준다.
- [63] 도 58은 PACSIN2 SH3 도메인과 Cobll1-NT-f 사이의 해리 상수를 보여준다.
- [64] 도 59는 PACSIN2 SH3 도메인과 SH3BP1-CT 사이의 해리 상수를 보여준다.
- [65] 도 60은 SH3BP1-CT (청색), Cobll1-NT (적색) 및 두 단백질(녹색)의 존재하의 PACSIN2 SH3 도메인의 HSQC 스펙트럼을 나타낸다.
- [66] 도 61 및 62는 PACSIN2에 대한 Cobll1과 SH3BP1의 경쟁적 결합을 보여준다.
- [67] 도 63은 PACSIN2에 대한 Cobll1과 SH3BP1의 경쟁적 결합에서의 PACSIN2 SH3 도메인의 화학적 이동의 변화를 나타낸다.
- [68] 도 64 및 65는 Cobll1의 전장 및 N-말단 영역은 PACSIN2와 SH3BP1 사이의 생체 내 결합을 억제함을 나타낸다.
- [69] 위 모든 그래프는 3회의 독립적인 실험의 평균으로서 세포사멸된 세포의 백분율을 나타내며, 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 단백질의 발현은 웨스턴 블롯에 의해 확인되었다.
- [70] 도 66 내지 73은 실시예 5에서의 실험 결과를 보여주는 도면으로서, PACSIN2-SH3BP1-Rac1a 경로는 제브라 피쉬의 정상적인 조혈에 필요하며, Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 신호전달 체계는 골수 형성을 조절함을 나타낸다.
- [71] 도 66은 *sh3bp1*과 *rac1a* 발현을 억제하는 antisense morpholinos (MOs)를 나타낸다.
- [72] 도 67은 *sh3bp1*-MO (상단 패널)과 *rac1a*-MO (하단 패널)가 주입된 28 hpf(수정 후 28 시간; hours post fertilization) 배아 및 대조군의 *mpx* WISH 이미지를 나타낸다.
- [73] 도 68은 미주입된 대조군과 비교하여, *sh3bp1* morphants (미주입 대조군, n = 25; *sh3bp1*-MO, n = 25; ** P value <0.01, 대조군과 유의한 차이가 있음, Student's t-test) 및 *rac1a* morphants (미주입 대조군, n = 12; *rac1a*-MO, n = 12; ** P value <0.01, 대조군과 유의한 차이가 있음, Student's t-test)의 *mpx*-양성 세포의 정량화된 그래프를 보여준다.
- [74] 도 69는 *pacsin2*-MO (상단 패널) 및 *pacsin2* mRNA (하단 패널)가 주입된 28 hpf 배아의 WISH 이미지를 나타낸다. 도 71은 *pacsin2* mRNA (상단 패널)가 주입되지 않은 것과 *pacsin2* mRNA (하단 패널)가 주입된 28 hpf 배아의 WISH 이미지를 나타낸다.

- [75] 도 70은 *pacsin2* morphants 주입 배아 (미주입 대조군, n = 20; *pacsin2*-MO, n = 20; n.s. P value > 0.05, 대조군과 유의한 차이가 없음, Student's t-test) 및 *pacsin2* mRNA 주입 배아 (미주입 대조군, n = 12; *pacsin2*-mRNA 주입군, n = 12; ** P 값 < 0.01, 대조군과 유의한 차이가 있음, Student's t-test)의 *mpx*-양성 세포의 정량화된 그래프를 보여준다.
- [76] 도 72는 28 hpf *cobll1b*-MO 주입된 배아 및 *cobll1b*-MO + *pacsin2*-MO가 함께 주입된 배아와, 미주입된 대조군의 *mpx* WISH 이미지를 나타낸다.
- [77] 도 73은 대조군과 비교하여, *cobll1b* morphants 및 *cobll1b* + *pacsin2* morphants으로부터의 *mpx*-양성 세포의 정량화된 그래프를 보여준다(미주입 대조군, n = 15; *cobll1b*-MO, n = 15; *cobll1b*-MO + *pacsin2*-MO, n = 15; *** P value < 0.001, 대조군 및 *cobll1b*-morphants와 유의한 차이가 있음, Student's t-test).
- [78] 도 74 내지 92는 실시예 6의 실험 결과를 보여주는 도면으로서, Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 발현의 임상적 상관 관계를 나타낸다.
- [79] 도 74 내지 83은 CP에서 BC로 진행되는 10명의 CML 환자 샘플에서 Cobll1, PACSIN2, SH3BP1의 세 단백질들의 발현을 확인한 결과를 보여준다.
- [80] 도 84 내지 86은 환자에서 Cobll1, PACSIN2, SH3BP1의 세 단백질들의 발현 양상을 분석한 결과이다.
- [81] 도 87은 Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 세 단백질의 발현이 Rac1 활성화를 조절하는지 여부를 실험한 결과를 나타낸다.
- [82] 도 88 내지 91은 Kaplan-Meier 생존 곡선을 사용하여 24명의 환자에서 Cobll1 / PACSIN2 / SH3BP1 발현에 따른 12 개월 전체 생존 확률을 나타낸다.
- [83] 도 92는 Cobll1 / PACSIN2 / SH3BP1 발현에 따른 CML의 약물 내성 및 진행에 대한 모식도를 나타낸다.

[84]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [85] 본 발명은 만성 골수성 백혈병 환자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 Cobll1 (Cordon-bleu protein-like 1), PACSIN2 (Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2), 및 SH3BP1 (SH3 Domain Binding Protein 1) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 단백질 발현 수준을 만성 골수성 백혈병의 만성기에서의 각 단백질의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 만성 골수성 백혈병의 급성기 진행의 진단 방법을 제공한다.
- [86] 일 실시태양에서, 상기 단백질은 Cobll1+/PACSIN2+/SH3BP1+, Cobll1+/PACSIN2-/SH3BP1+, Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1+, 및 Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1-로부터 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 발현 양상을 나타내낼 수 있고, 이 경우 만성 골수성 백혈병의 급성기 진행으로 진단할 수 있다. 상기 (+)는 단백질의 발현이 만성기의 단백질 발현 수준과 비교하여 증가한 것을 나타내고, (-)는 단백질의 발현이 만성기의 단백질

발현 수준과 비교하여 변화가 없음을 나타낸다.

- [87] 본 발명은 또한 개체로부터 분리한 생물학적 시료로부터 PACSIN2 또는 SH3BP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 상기 환자의 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성의 진단 방법을 제공한다.
- [88] 본원에서 "생물학적 시료(biological sample)"란, 체내의 위 단백질의 발현 정도를 확인할 수 있는 모든 시료를 의미한다. 구체적으로 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 머리카락, 소변 등일 수 있으며, 예를 들어 혈액, 골수세포 등 일 수 있다.
- [89] 상기 생물학적 시료는 개체로부터 분리된(isolated) 것일 수 있고, 구체적으로 만성 골수성 백혈병 혹은 이의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 것일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [90] 상기 "개체"는 만성 골수성 백혈병의 병기를 진단하거나, 티로신 키나아제 억제제의 내성 발생 여부를 진단하고자 하는 대상을 의미한다. 구체적으로는 만성 골수성 백혈병 환자일 수 있다.
- [91] 이때, 상기 개체는 포유동물 일 수 있고, 예를 들어 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이 등 제한없이 포함될 수 있다.
- [92] 만성 골수성 백혈병 환자의 급성기로의 진행은 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성 발생과 밀접한 관련성을 갖는바, 본 발명에서 "티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 진단"하는 것은 "만성 골수성 백혈병의 급성기 진행의 진단"일 수 있다.
- [93] 일 실시태양에서, PACSIN2 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가하였거나, 또는 SH3BP1 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 변화가 없는 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 감소시켜 티로신 키나아제 억제제에 감수성을 갖는 것으로 진단한다.
- [94] 또다른 실시태양에서, PACSIN2 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 변화가 없거나, 또는 SH3BP1 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가한 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 갖는 것으로 진단한다.
- [95] 또다른 실시태양에서, SH3BP1 단백질의 발현 수준이 증가한 경우; 또는 SH3BP1 단백질 및 PACSIN2 발현 수준이 변화하지 않은 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 내성을 갖는 것으로 진단한다.
- [96] 본 발명에서 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 억제제는 티로신 키나아제의 활성을 억제하는 물질로, 표적치료제로 사용되는 것일 수 있다. 예를 들어, 이매티닙(imatinib), 닐로티닙(nilotinib), 다사티닙(dasatinib), 보수티닙(bosutinib), 또는 포나티닙(ponatinib)일 수 있고, 구체적으로는 닐로티닙일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [97] 본 발명은 만성 골수성 백혈병 환자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질 중 둘 이상의 상호작용을 측정하는 단계를 포함하는, 상기 환자의 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성의 진단 방법을

제공한다.

- [98] 일 실시태양에서, Cobll1 단백질과 PACSIN2 단백질이 상호작용하여 서로 결합하는 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 갖는 것으로 진단한다. 이 때 Cobll1 단백질과 PACSIN2 단백질의 상호작용에 의한 결합은, Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역과 PACSIN2의 SH3 도메인의 결합에 의한 것일 수 있다. 상기 PACSIN2의 SH3 도메인은 서열번호 1의 430에서 486의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역은 서열번호 2의 1 내지 410의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 구체적으로는, 서열번호 2의 18에서 25의 아미노산 서열, 서열번호 2의 292에서 299의 아미노산 서열, 및 서열번호 2의 361에서 368의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 갖고, 보다 구체적으로는, 서열번호 2의 175에서 370의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [99] 또다른 실시태양에서, SH3BP1 단백질과 PACSIN2 단백질의 상호작용에 의한 결합은, SH3BP1 단백질의 C-말단의 프롤린 풍부 영역과 PACSIN2의 SH3 도메인의 결합에 의한 것일 수 있다. 이 때 SH3BP1 단백질의 C-말단의 프롤린 풍부 영역은 서열번호 3의 541에서 701의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [100]

[101] 서열번호 1: PACSIN2의 전체 아미노산 서열

MSVTYDDSVGVEVSSDSFWEVGNKRTVKRIDDGHRILCSDLNCLHERARIEKAYAQQLTEWARRWRQLV
EKG PQYGTVEKAWMAFMSEAERVSEHLLEV KASLMNDDFEKIKNWQKEAFHKQMMGGFKETKEAEDGFRK
AQK PWAKKLKEVEAAKKAHHAACKEEKLAI SREANSKADPSLNPEQLKKLQDKIEKCKQDVLKTKEKYEK
SLKELDQGT PQYMENMEQVFEQCQQFEERL RFFREVLLLEVQKHLDSL NVAGYKAIYHDLEQS IRAADAV
EDLRWFRANHGP MAMNWPQFEWSADLNRTL SRREKKKATDGVTLTG INQTGDQSLPSKPSSTLNVPSN
PAQSAQSQSSYNPFEDDDTGSTVSEKDDTKAKNVSSYEKTQSYPTDWSDDESNNPFSSTDANGDSNPFDD
DATSGTEVRVRALYDYGQEHDELSFKAGDELTKMEDEDEQGWCKGRLDNGQVGLYPANYVEAIQ

서열번호 2: Cobll1의 전체 아미노산 서열

MDGRTPRPQDAPARRKPKAKAPLPFAETKYTDVSSAADSVESTAFIMEQKENMIDKDVELSVVLPGLDIIK
STTVHGSKPMMDLLIFLCAQYHLNPSSYTIDLLSAEQNHIFKFPNTPIGMLEVEKVKILPKMKLDKKKPTP
I IPEKTVRVVINFKKTQKTI VRVSPHASLQELAPII CSKCFDPLHTLLKDYQSQEPLDLTKSLNDLGL
RELYAMDVNRESCQISQNLDIMKEKENKGFSSFFQRSKKKRDQTASAPATPLVNKHRPTFTRSNTISKPY
ISNTLPSDAPKKRRAPLPMPASQSV PQDLAHIQERPASCIVKSMSVDEADKSPCEAGRVRAGSLQLSSM
SAGNSSLRRTKRKAPSPPSKIPPHQSDENSRVTALQ PVDGVP PDSASEANSPEELSSPAGISSDYSLEEI
DEKEELSEVPKVEAENISPKSQDIPFVSTDIINTLKNPDSALGNGSGEFSQNSMEEKQETKSTDGQEPH
SVVYDTSNGKKVDSIRNLKSLGPNQENVVQNEIIVYPENTEDNMKNGVKKTEINVEGVAKNNNIDMEVE
RPSNSEAHETDTAISYKENHLAASSVPDQKLNQPSAEKTKDAAIQTTPSCNSFDGKHQDHNLSDSKVEEC
VQTSNNNISTQHSCLSSQDSVNTSREFRSQGTLIHSEDPLTVKDPICAHGNDLLPPVDRIDKNSTASY
LKNYPLYRQDYNPKPKPSNETREYIPKIGMTTYKIVPPKSLEISKDWQSETIEYKDDQDMHALGKKHHTH
ENVKETAIQTEDSAISESPEEPLPNLKPKNLRTEHQVPPSSVSSPDDAMVSPLKPAPKMTTRDTGTAPFAP
NLEEINNI LESKFKSRA SNAQAKPSSFFLQMQRVSGHYVT SAAAKSVHAA PNPAKELTNKEAERDMLP
SPEQTLSP LSKMPSVPQPLVEKTDDDVIGQAPAEASPPPIAPKPVTI PASQVSTQNLKTLETFGAPRPY
SSSGPSPFALAVKRSQSF SKERTESPSASALVQPPANTEEGKTHSVNKFVDIPQLGVSDKENNSAHNEQ
NSQIPTPTDGPSTVMRQSSLT FQSSDPEQMRQSLLTAIRSGEAAAKLRVTI PSNTISVNGRSRLSHSM
SPDAQDGH

서열번호 3: SH3BP1의 전체 아미노산 서열

MMKRQLHRMRQLAQTGSLGRTPETA EFLGEDLLQVEQRLEPAKRAAHNIHKRLQACLGQSGADMDKRVK
KLPLMALSTTMAESFKELDPDSMGKALEMSCAIQNQLARILAEFEMTLERDVLQPLSRLSEEELPAILK
HKKSLQKLVS DWN TLKSRLSQATKNSGSSQGLGGSPGSHSTTMANKVETLKEEEEELKRKVEQCRDEYL
ADLYHFVTKEDSYANYFIRLLEIQADYHRRSLSSLDTALAE LRENHGQADHSPSMTATHFPRVYGVSLAT
HLQELGREIALPIEACVMMLLSEGMKEEGLFRLAAGASVLKRLKQTMASDPHSLEEFCSDPHAVAGALKS
YLRELPEPLMTFDLYDDWMRAASLKEPGARLQALQEVC SRLPPENLSNLRYLKFLARLAE EQEVNKMTF
SNIAIVLGNLLWPPEKEGDQAQLDAASVSSIQVVG VVEALIQSADTLFPGDINFNVSGLFSAVTLQDTV
SDRLASEELPSTAVPTPATT PAPAPAPAPAPALASAATKERT ESEVPPRPASPKVTRSPPETAAPVED
MARRTKRPAPARPTMPP PQVSGSRSSPPAPPLPPGSGSPGTPQALPRRLVGSSLRAPTVPPLPPTPPQP
ARRQSRSPASPSASP GPASPSPVLSNPAQVDLGAATAEGGAPEAISGVPTPPAIPPPQPRPRSLASET
N

[102]

[103] 한편 본 발명에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 가지는', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는' 단백질 혹은 도메인으로

기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 구성된 단백질 혹은 도메인과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1의 세 단백질이 모두 존재하는 경우, PACSIN2 단백질은 그의 SH3 도메인을 통해 SH3BP1 또는 Cobll1과 경쟁적으로 결합한다. PACSIN2 SH3 도메인은 Cobll1과 우선적으로 상호작용하여 SH3BP1을 방출시킨다. 방출된 SH3BP1은 Rac1 신호 전달 경로를 활성화시켜 티로신 키나아제 억제제에 대한 내성을 유도한다.

- [104] 또다른 실시태양에서, 상기 진단 방법은 PACSIN2의 SH3 도메인; Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역; 및 SH3BP1 단백질의 SH3BP1 단백질의 C-말단의 프롤린 풍부 영역 중 2 이상의 상호작용을 측정하는 것일 수 있다.
- [105] 각 도메인 및 프롤린 풍부 영역, 이들의 상호작용에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [106] 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 방사능면역분석, 방사능면역침강법, 면역침강법, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 샌드위치 분석법(sandwich assay), 실시간-중합효소연쇄반응(real-time PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 또는 웨스턴 블롯팅(western blotting)일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [107] 또한 본 발명에서 단백질의 상호작용을 측정하는 방법은 효모 단백질 잡종법(yeast two hybrid), 면역침강법(immunoprecipitation), 동시-면역침강법(co-immunoprecipitation), 역 동시-면역침강법(reverse co-immunoprecipitation), GST 풀 다운(GST pull-down) 분석법, 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography), 파아지 디스플레이(phage display), 또는 면역조직화학(immunohistochemistry)일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [108]
- [109] 상기 "진단하는 방법"은 "진단에 필요한 정보를 제공하는 방법"과 동일한 의미로 사용될 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [110]
- [111] 본 발명은 또한 시료 중 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 만성 골수성 백혈병의 급성기 진행의 진단용 조성물을 제공한다. 이 때 상기 제제는 목적하는 단백질과 특이적으로 결합할 수 있고, 그의 수준을 용이하게 측정할 수 있는 제제일 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 또는 리간드일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [112] 본 발명은 또한 시료 중 PACSIN2 또는 SH3BP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성 진단용 조성물을 제공한다.
- [113] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 시료 중 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질 중 둘 이상의 상호작용을 측정하는 제제를 포함하는, 티로신 키나아제 억제제에

대한 치료 내성 진단용 조성물을 제공한다.

[114] 상기 조성물은 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 임의의 구성을 더 포함할 수 있다.

[115] 상기 조성물은 키트 형태로 제공되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[116] 상기 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질, 만성 골수성 백혈병의 급성기 진행의 진단, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성의 진단에 대해서는 전술한 바와 같다.

[117]

발명의 실시를 위한 형태

[118] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[119] 실시예 1: 새로운 Cobll1 결합 단백질로서의 PACSIN2의 동정

[120] Cobll1이 닐로티닙 감수성에 영향을 미치고 조혈을 조절함이 알려져 있다. Cobll1이 닐로티닙 감수성과 조혈에 미치는 영향을 연구하기 위해 Cobll1 항체를 사용하여 K562 세포 추출물의 tandem affinity purification을 수행하고, Cobll1을 bait으로하여 인간 골수 cDNA 라이브러리의 효모 단백질 잡종법(yeast two-hybrid system)을 수행하였다(도 1). 질량 분광 분석 결과, 몇 가지 결합 단백질 후보가 확인되었고, 4.5×10^6 개의 형질전환체에 대해 효모 단백질 잡종법을 수행하여 14개의 양성 클론을 회수하였다. proteomic 분석시 24 %의 펩타이드가 PACSIN2로부터 유래하였고(도 2), 효모 단백질 잡종법을 통해 14개 중 11개의 클론이 PACSIN2로부터 유래하였기에(도 3 및 4), PACSIN2가 가장 유망한 Cobll1-상호작용 단백질로서 확인되었다.

[121] 추가로 K562 세포에서 과발현 또는 내인성 단백질을 효모 단백질 잡종법 및 면역침강법(immunoprecipitation)을 사용하여 Cobll1과 PACSIN2 사이의 상호작용을 확인하였다(도 5 내지 7).

[122] Cobll1과 PACSIN2에서 필수 상호작용 도메인을 확인하기 위해, K562 세포에서 Cobll1과 PACSIN2 결실 돌연변이를 발현시키고, 동시-면역침강법(co-immunoprecipitation)에 의해 상호작용을 탐색하였다(도 8 및 10). Ubiquitin-like (UBL) 도메인을 포함하는 Cobll1의 아미노산 14-366의 결실은 PACSIN2와의 상호작용을 제거한다는 것을 발견하였다(도 9). 역 동시-면역침강법(reverse co-immunoprecipitation assay)은 SH3 도메인을 포함하는 PACSIN2의 아미노산 430-486 (아래 서열)이 Cobll1과의 상호작용에 중요하다는 것을 보여주었다(도 11).

[123] **RVRALYDYEKGQEHDELSFKAGDELTKMEDEDEQGWCKGRLDNGQVGL
YPANYVEAIQ**

[124] PACSIN2의 SH3 도메인과 Cobll1 사이의 상호작용은 정제된 GST-PACSIN2

SH3 단백질을 전장 Cobll1과의 GST-pull down 분석을 통해 추가로 확인하였다(도 12 및 13).

- [125] SH3 도메인은 프롤린-풍부 모티프와 상호작용하는 것으로 알려져 있으므로, SH3 software, MoDPepInt (Modular Domain Peptide Interaction) Server를 이용하여 Cobll1의 프롤린-풍부 모티프를 분석하였다. Cobll1이 N-말단 영역에 3개의 프롤린-풍부 모티프를 갖는 것을 발견하였는데, 이들은 잠재적 PACSIN2 결합 부위를 형성할 수 있다(도 14 및 15).
- [126] 1개, 2개 또는 3개 모티프의 프롤린 잔기를 알라닌으로 돌연변이시켜 몇 가지 돌연변이를 제조하였다(도 16). 모든 프롤린 잔기가 돌연변이된 경우(Cobll1-3A 돌연변이), PACSIN2와의 상호작용이 거의 완전히 상실되었고, 2개의 모티프가 돌연변이된 경우(Cobll1-2A 돌연변이), 결합에 있어 작은 감소가 나타났으며, 오직 1개의 프롤린 모티프가 돌연변이된 경우(Cobll1-1A 돌연변이), 야생형 단백질의 결합과 비교하여 결합에 영향을 미치지 않았다(도 17 내지 19). 이는 프롤린-풍부 모티프 각각이 PACSIN2와의 상호작용에 기여함을 나타낸다.
- [127] Cobll1 야생형 또는 3A 돌연변이와 PACSIN2의 동시-면역침강법에 의해 PACSIN2와 결합하는 Cobll1 프롤린-풍부 모티프의 역할을 추가로 확인하였다(도 20). 원자 수준에서 PACSIN2 SH3 도메인과 Cobll1 프롤린-풍부 모티프 사이의 상호작용을 확인하기 위해 핵자기공명 (NMR) 분광법을 수행하였다. 하나의 프롤린 및 관찰되지 않은 잔기 (H442)를 제외하고는, PACSIN2 SH3 도메인의 백본 아미드(^1H 및 ^{15}N) 공명은 ^1H - ^{15}N heteronuclear single quantum correlation (HSQC) 스펙트럼에 모두 할당되었다(도 21). Cobll1의 잔기 18-25, 292-299 및 361-368을 포함하는 3개의 프롤린-풍부 모티프에 상응하는 펩타이드를 합성하고, 각각의 펩타이드를 다양한 몰 비율의 ^{15}N -표지된 PACSIN2 SH3 도메인에 첨가하였다. 도 22 내지 24에 나타난 바와 같이, PACSIN2 SH3 도메인에 Cobll1 프롤린-풍부 펩타이드를 첨가한 후에, 몇몇 잔기들은 화학적 시프트의 변화(chemical shift perturbation)를 나타내었다.
- [128] PACSIN2 SH3 도메인의 Y437, Q440, E441, D460, G463, A479, N480, V482 및 A484는 3개의 프롤린-풍부 펩타이드의 첨가에 의해 변경되었으나, 제1 펩타이드(잔기 18-25)의 효과는 제2 및 제3 펩타이드의 효과보다는 약하였다. 각각의 펩타이드에 결합시 PACSIN2 SH3 도메인에 대한 평균 화학적 시프트 변화(CSPs, $\Delta\delta$)를 도 25에 도시하였다. 이러한 결과는 Cobll1 프롤린-풍부 모티프 각각의 결합 강도가 다르더라도, PACSIN2 SH3 도메인에 대한 3 개의 Cobll1 프롤린-풍부 모티프의 전체적인 결합 모드는 유사하다는 것을 나타낸다(도 25).
- [129] 종합하면, 이 결과는 Cobll1이 프롤린-풍부 모티프를 통해 PACSIN2의 SH3 도메인에 강하게 결합한다는 것을 보여준다(도 26).
- [130]
- [131] 실시예 2: Cobll1과 PACSIN2 사이의 상호작용에 따른 널로티넵 내성 조절
- [132] PACSIN2와 Cobll1이 결합하는 것이 확인됨에 따라, 본 실시예에서는 널로티넵

내성에 대한 PACSIN2의 효과를 실험하였다.

- [133] 흥미롭게도 K562 세포에서 PACSIN2의 결핍은 닐로티닙 유도된 세포사멸을 감소시켰는데(도 27 및 28), 이는 PACSIN2가 종양 억제 인자로서 닐로티닙 내성을 부정적으로 조절(negatively regulate)함을 시사한다. 대조적으로, PACSIN2의 과발현은 닐로티닙 유도된 세포사멸을 약 2배 증가시켰으며, Cobll1 과발현은 닐로티닙 유도된 세포사멸을 감소시켰다(도 29 및 30). siRNA-내성 야생형 PACSIN2의 발현은 닐로티닙 감수성을 회복시켰으므로, PACSIN2 siRNA에 의한 세포사멸의 억제는 오프-타겟(off-target) 효과 때문이 아니었다(도 31 내지 33). 이러한 데이터는 PACSIN2와 Cobll1이 닐로티닙 내성에 대해 반대로 작용함을 시사한다.
- [134] 다음으로 Cobll1과 PACSIN2 사이의 상호작용이 어떻게 닐로티닙 내성에 영향을 미치는지 검토하였다. K562 세포에서 상호작용 결함이 있는 Cobll1 D1과 전장 PACSIN2의 과발현이 닐로티닙에 의해 유발된 세포사멸을 증가시킨다는 것을 발견하였다(도 34 및 35). 또한 상호작용이 결여된(interaction-defective) PACSIN2 D4 돌연변이는 닐로티닙 유도된 세포사멸을 억제하는 반면, Cobll1에 대한 상호작용 영역을 여전히 가지고 있는 PACSIN2 D1, D2, D3 돌연변이는 닐로티닙 유도된 세포사멸을 덜 효과적으로 억제하였다(도 36 및 37).
- [135] 또한 닐로티닙 내성은 전장 Cobll1과 PACSIN2의 과발현에 의해 회복(restore)되었으나, K562 세포에서 PACSIN2만 과발현된 경우에는 저해되었다. 대조적으로, 닐로티닙 내성은 PACSIN2와의 상호작용에 결함이 있는 Cobll1 P3A 돌연변이의 과발현에 의해서는 회복(restore)되지 않았다(도 38 및 39).
- [136] 이로부터 Cobll1/PACSIN2 상호작용은 닐로티닙 내성에 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.
- [137]
- [138] 실시예 3: 새로운 PACSIN2 결합 단백질로서의 SH3BP1의 동정
- [139] 닐로티닙 내성을 부여함에 있어 PACSIN2의 기능을 이해하기 위해, K562 세포에서 PACSIN2를 bait로 사용하여 tandem affinity purification을 통해 PACSIN2 결합 단백질을 검색하였다(도 40). 이를 통해 PACSIN2 자체, Cobll1, SH3BP1, ARHGAP17, TCOF1, DNM2 및 WIPF2를 포함한 몇 가지 PACSIN2 결합 단백질을 동정하였다(도 41). SH3BP1은 SH3 도메인에 결합할 수 있는 프롤린-풍부 영역을 포함하기 때문에, SH3BP1이 새로운 PACSIN2 결합 단백질 수 있다고 가정하였다. SH3BP1은 SH3 도메인의 D4 돌연변이가 아닌, 전장 PACSIN2에 의해 동시-면역침강(co-immunoprecipitate)되었는데, 이는 상호작용을 위해 PACSIN2의 SH3 도메인을 필요로 함을 시사한다(도 42). 내인성 PACSIN2의 면역침강 역시 유사하게 K562 세포에서 내인성 SH3BP1과의 상호작용을 나타냈다(도 43). 또한, 시험관 내 정제된 GST-PACSIN2 SH3 단백질은 SH3BP1과 강한 상호작용을 보였다(도 44).

- [140] SH3 도메인은 프롤린-풍부 모티프와 상호작용한다고 알려져 있으므로 SH3 software (MoDPepInt server), ELM (Eukaryotic Linear Motif) resource 및 BLAST 25,26을 사용하여 SH3BP1의 프롤린-풍부 모티프를 분석하였다. MoDPepInt (step size 10), ELM resource, 및 BLAST 분석 결과, SH3BP1에 각각 1개, 4개 (3개의 class 1 및 1개의 class II SH3 결합 도메인) 및 1개의 PACSIN2 SH3 결합 모티프가 생성되었다. 이로부터 SH3BP1이 PACSIN2 SH3 도메인과 상호작용할 수 있는 5개의 잠재적인 프롤린-풍부 모티프를 포함한다고 예측하였다(도 45 및 46). PACSIN2와 상호작용하는 SH3BP1의 프롤린-풍부 모티프를 확인하기 위해, 결실 및/또는 점 돌연변이 각각 또는 조합을 각 프롤린-풍부 모티프에 도입시키고(도 47), GST pull-down analysis를 수행하였다. 5개의 프롤린-풍부 모티프가 모두 돌연변이된 SH3BP1 DPD2 돌연변이는 PACSIN2 SH3 도메인과 약하게 상호작용하는 반면, 다른 모든 SH3BP1 돌연변이는 야생형 SH3BP1의 결합과 비교하여 완전하거나(PRM, PD2 및 PD4) 또는 대부분의 결합(PD1 및 PD3)을 보유하였다(도 48 및 49).
- [141] 이는 SH3BP1의 1개 또는 2개의 프롤린-풍부 모티프가 PACSIN2와의 상호작용에 충분함을 보여준다. GST pull-down 결과와 동일하게, PACSIN2는 야생형 SH3BP1과는 동시-면역침강하였으나, DPD2 돌연변이와는 그렇지 않았다. 이로부터 SH3BP1의 프롤린-풍부 모티프가 PACSIN2와의 상호작용에 중요하다는 것을 확인하였다(도 50).
- [142] NMR 분광법을 사용하여 SH3BP1과 PACSIN2 사이의 상호작용을 조사하기 위해, 모든 프롤린-풍부 모티프를 함유한 SH3BP1의 C-말단 부위(잔기 541-701; 이하, "SH3BP1-CT"라고 지칭함)를 정제하였다. 비 표지된(unlabeled) SH3BP1-CT를 다양한 몰 비율의 ¹⁵N-표지된 PACSIN2 SH3 도메인에 첨가시 큰 스펙트럼 변화를 나타내었다(도 51). SH3BP1-CT의 존재 하에 PACSIN2 SH3 도메인(L434, D443, A479, Y481 및 E483)의 5개의 resonance가 완전히 사라졌는데, 이는 이들 잔기가 SH3BP1 상호작용에 강력하게 관여함을 나타낸다(도 51 및 53).
- [143] 추가로 제2 및 제3 프롤린-풍부 모티프를 함유한 Cobll1의 N-말단 부위(잔기 175-370; 이하 "Cobll1-NT"라고 지칭함)를 정제하였다. 3개의 프롤린-풍부 펩타이드를 모두 포함하는 Cobll1의 크기는(> 40kDa) NMR 분석에 너무 크기 때문에, NMR 적정을 위해 제1 프롤린-풍부 모티프는 제외하였다. Cobll1의 제1 프롤린-풍부 모티프는 PACSIN2에 결합하는데 있어 다른 두 프롤린-풍부 모티프보다 덜 중요하다고 생각된다. 제1 프롤린-풍부 모티프에 돌연변이가 있는 Cobll1-1A 돌연변이는 야생형 Cobll1과 유사한 친화성(affinity)로 PACSIN2를 결합하였다(도 17 내지 19). 또한 제1 프롤린-풍부 모티프는 다른 두 모티프에 비해 PACSIN2와의 상호작용이 매우 약하였다(도 22 내지 24). PACSIN2 SH3 도메인의 대부분의 잔기는 Cobll1-NT 결합에 의해 크게 영향을 받았으며(도 52), 변형된 패턴은 SH3BP1-CT 결합시와 유사하였다. PACSIN2

SH3 도메인의 잔기에 대한 신호는 SH3BP1-CT 및 Cobll1-NT 결합에 의해 이동되고 넓어졌으며, 두 단백질의 결합에 의해 유도된 전체 화학적 이동 변화는 방향 및 거리에 있어 유사하였다(도 51 내지 53). 그러나, Cobll1-NT 결합은 SH3BP1-CT 결합에 비해 더 큰 CSP 값을 야기하였고, PACSIN2 SH3 도메인의 4개 이상의 잔기(D459, D460, Y477, 및 N480)와 SH3BP1-CT 결합으로 관찰된 나머지 5개 잔기(L434, D443, A479, Y481, E483)가 완전히 사라졌다(도 53). 이 결과는 SH3BP1 및 Cobll1은 모두 그들의 프롤린-풍부 모티프를 통해 PACSIN2의 SH3 도메인의 동일한 부위에 결합함을 나타낸다.

- [144] SH3BP1이 닐로티닙 내성에서 어떻게 작용하는지를 조사하기 위해, SH3BP1을 과발현 또는 siRNA에 의해 knock-down시켜 세포사멸에 대한 영향을 평가하였다. SH3BP1의 과발현은 K562 세포에서 닐로티닙 유도된 세포사멸을 약 3배 감소시켰다(도 54). 대조적으로, SH3BP1의 결핍은 닐로티닙 유도된 세포사멸을 약 2배 증가시켰다(도 55).
- [145] SH3BP1은 Rac1을 활성화시키고, Rac1의 억제제는 TKI에 내성인 CML blast-phase 적혈구 간세포의 증식을 감소시키는 것으로 알려져있다. SH3BP1 및 Cobll1은 모두 PACSIN2와 상호작용하기 때문에, Cobll1이 PACSIN2로부터 SH3BP1을 방출함으로써 Rac1 경로를 활성화시킨다는 가설을 세웠다. 실험 결과, 이 가설과 일치하여, Cobll1 과발현은 Rac1을 활성화시켰다(도 56). K562 세포에서 PACSIN2와 함께 야생형 Rac1의 과발현은 닐로티닙 내성을 회복시켰는데, 이는 PACSIN2 단독의 과발현으로 제거되었다(도 57). Rac1 과발현에 의한 닐로티닙 내성은 Rac1 (Rac1 V12)의 활성 형태의 과발현에 의해 악화되었다(도 57).
- [146]
- [147] **실시예 4: PACSIN2 단백질은 자신의 SH3 도메인을 통하여 SH3BP1 및 Cobll1과 경쟁으로 결합함**
- [148] PACSIN2 SH3 도메인은 SH3BP1 및 Cobll1 둘 다의 프롤린-풍부 모티프와 결합하기 때문에, 표면플라즈몬공명(surface plasmon resonance; SPR)과 핵자기공명(NMR) 연구를 통하여 세 단백질의 결합 친화력을 비교하였다.
- [149] SPR 분석을 위해, 3개의 프롤린-풍부 모티프를 포함하는 Cobll1의 N-말단 영역(잔기 1-410; 이하 "Cobll1-NT-f"라고 지칭함) 및 SH3BP1-CT를 사용하였다. SPR 실험 결과 PACSIN2 SH3 도메인과 Cobll1-NT-f 사이의 해리 상수 (Kd)는 25.8 nM이고, PACSIN2 SH3 도메인과 SH3BP1-CT 사이의 해리 상수 (Kd)는 2.2 μ M임을 확인되었다. 즉, PACSIN2 SH3 도메인과 Cobll1-NT-f와의 결합 친화력이 PACSIN2 SH3 도메인과 SH3BP1-CT 사이의 결합 친화력보다 85배 높음을 확인하였다(도 58 및 59).
- [150] 이러한 친화력 차이는 NMR 연구를 통하여 다시 한번 확인하였다. Cobll1-NT와 SH3BP1-CT의 같은 몰비하에서(즉, PACSIN2 SH3 : Cobll1-NT : SH3BP1-CT = 1 : 1 : 1) ^{15}N 으로 표지된 PACSIN2 SH3 도메인의 ^1H - ^{15}N HSQC 스펙트럼을 측정하고, 이 스펙트럼을 Cobll1-NT 또는 SH3BP1-CT 각각과 결합한 PACSIN2

SH3 도메인의 스펙트럼과 비교하였다(도 60). Cobll1-NT와 SH3BP1-CT는 PACSIN2 SH3 도메인에 대해 유사한 결합 패턴을 보여주었기 때문에, Cobll1-NT 또는 SH3BP1-CT의 존재 하에서 PACSIN2 SH3 도메인의 많은 피크들이 겹쳐서 나타났다. 그러나, 중첩되지 않은 잔기들을 분석한 결과, Cobll1-NT 및 SH3BP1-CT가 모두 존재하는 상태에서의 PACSIN2 SH3 도메인 스펙트럼(녹색)은, SH3BP1-CT 단독으로 존재할 때의 PACSIN2 SH3 도메인 스펙트럼(파란색)보다 Cobll1-NT 단독으로 존재할 때의 PACSIN2 SH3 도메인 스펙트럼(적색)에 가까운 것을 확인하였다. 이는 PACSIN2 SH3 도메인이 SH3BP1-CT보다 Cobll1-NT와 결합하는 것을 선호한다는 것을 시사한다(도 60).

[151] 추가로 replacement titration를 통하여 PACSIN2에 대한 Cobll1과 SH3BP1의 경쟁적 결합을 조사하였다. SH3BP1-CT를 ¹⁵N으로 표지된 PACSIN2 SH3 도메인 (PACSIN2 SH3 : SH3BP1-CT = 1 : 1)에 첨가 한 후, 다양한 몰비에서 Cobll1-NT의 적정을 수행하였다. 또한 반대의 실험도 수행하였다(도 61 및 62).

[152] 포화점(청색)에서 SH3BP1-CT에 결합된 PACSIN2 SH3 도메인의 Y435, K455, Q462 및 Q463 잔기의 화학적 이동은 Cobll1-NT 농도 증가에 의해 점진적으로 이동됨을 확인하였다(도 63 상부 패널). 반대로, Cobll1-NT-PACSIN2 SH3 복합체에 SH3BP1-CT를 첨가한 경우에는 화학적 이동의 변화가 없는 잔기(K455 및 Q462) 또는 더 작은 화학적 이동의 변화를 보이는 잔기(Y435 및 Q463)가 관찰되었다(도 63 하부 패널).

[153] 이러한 replacement titrations은 Cobll1-NT가 SH3BP1-CT에 비해 PACSIN2 SH3 도메인에 강하게 결합한다는 것을 보여주는 결과들과 일치하며, Cobll1-NT가 PACSIN2에서 SH3BP1을 대체할 수 있음을 보여준다.

[154] 또한 Cobll1의 전체 또는 N-말단 영역의 발현이 PACSIN2와 SH3BP1 사이의 결합을 억제한다는 것을 확인하였다(도 64 및 65).

[155] 이로부터, PACSIN2가 SH3 도메인을 통해 SH3BP1 또는 Cobll1가 경쟁적으로 결합하며, 평형 상태에서 PACSIN2 SH3 도메인이 Cobll1의 프롤린-펩부 모티프와 우선적으로 상호작용한다는 것을 보여준다.

[156]

[157] **실시예 5: Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 신호전달 체계는 골수 형성을 조절함**

[158] Zebrafish *cobll1b* 유전자가 정상적인 조혈세포 형성에 필수적임이 공지된 바 있다. 본 실시예에서는 Cobll1/PACSIN2/SH3BP1/Rac1의 신호전달 경로가 조혈세포 형성에 관여한다는 가설을 세운 뒤, Zebrafish 배아를 이용하여 골수 형성에 대한 *sh3bp1*, *rac1a* 및 *pacsin2*의 기능을 확인하였다.

[159] *sh3bp1*과 *rac1a* 발현을 억제하는 antisense morpholinos (MOs)를 사용하여(도 66) 골수에서 특이적으로 발현되는 *mpx1*의 패턴을 in situ hybridization (WISH)에 의해 확인하였다(도 67).

[160] 골수 세포의 수는 *sh3bp1*과 *rac1a* morphants 모두에서 대조군에 비해 감소하였다(도 68). 마찬가지로 mRNA 주입을 통한 *pacsin2*의 발현 증가는 *mpx*

양성 원시 골수 세포의 수를 감소시켰다. 반면에 배아 골수 형성은 *pacsin2* morphants에서 변화되지 않음을 확인하였다(도 69 내지 71).

[161] 이러한 결과들은 SH3BP1/Rac1a 신호전달 체계가 Zebrafish 배 발생 과정에서 골수 형성을 증가시키는 반면, PACSIN2는 골수 형성을 감소시킴을 나타낸다.

[162] *pacsin2*의 gain-of-function 데이터는 배아의 조혈세포 형성에 대한 PACSIN2의 부정적인 효과를 암시하는 반면, *pacsin2*의 loss-of-function 연구는 영향을 없음을 보여준다. 실시예 4를 통해 PACSIN2에 대한 Cobll1의 결합 친화도가 SH3BP1의 결합 친화도보다 매우 높다는 것을 증명하였기 때문에, 내인성 Cobll1b가 Zebrafish 골수 형성 동안 PACSIN2에 계속적으로 결합하여 SH3BP1/Rac1a 경로를 억제하는 Cobll1b의 기능을 차단한다는 가설을 세웠다. 이 가설을 검증하기 위해, *cobll1b*와 *pacsin2*의 발현을 줄이기 위하여 *cobll1b* 및 *pacsin2* MOs를 공동 주입하였다. 앞서 설명한 바와 같이, *cobll1b* MO를 주사하면 28 hpf에서 *mpx* 양성 세포의 수가 현저히 감소함을 확인하였다. 반대로, 동시에 *pacsin2*와 *cobll1b*의 발현을 감소시키면 골수 형성이 회복되는데, 이는 *cobll1b* 발현의 상실로 자유로워진 PACSIN2가 SH3BP1/Rac1a 경로를 억제하여 정상적인 조혈의 진행을 유도한다는 것을 의미한다(도 72 및 73). 이러한 결과들은 Cobll1b/PACSIN2/SH3BP1/Rac1a 경로의 조절 네트워크가 척추동물의 정상적인 배아 조혈세포 형성을 조절할 때 CML에서 닐로티닙 내성을 조절하는 동일한 메커니즘을 사용하여 한다는 것을 의미한다.

[163]

[164] 실시예 6: Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 발현의 임상적 상관 관계

[165] 상기 실시예들로부터, Cobll1의 발현이 BC 세포에서 높고, Cobll1이 CML 세포에서 PACSIN2와 SH3BP1 사이의 상호 결합을 조절함으로써 Rac1 경로를 활성화시킨다는 사실을 입증하였는바, 본 실시예에서는 CML 환자 샘플에서 Cobll1, PACSIN2, SH3BP1의 세 단백질들의 발현 정도와 Rac1 활성을 확인하였다.

[166] 10명의 환자들에서 3개의 유전자 발현 수준을 측정하여, CP에서 BC로 진행되는 시료를 수집한 뒤, 10 명의 환자들의 serial 샘플에서 Cobll1, PACSIN2, SH3BP1의 세 단백질들의 발현을 확인하였다. 흥미롭게도 세 단백질들 중 CP 샘플에서 발현된 단백질은 없었으나, BC 환자 10명 중 6명에서 Cobll1, PACSIN2 또는 SH3BP1 중 적어도 하나의 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 74 내지 83).

[167] 추가로 환자 집단에서 세 단백질의 발현 양상을 분석하였다(도 84 내지 86).

[168] 분석 결과 CP 샘플에서 발현된 단백질은 없었으나, BC 샘플에서 세 단백질들이 Cobll1+/PACSIN2+/SH3BP1+, Cobll1+/PACSIN2-/SH3BP1+, Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1+ 및 Cobll1-/PACSIN2+/SH3BP1-의 4 가지 발현 양상을 보임을 확인하였다.

[169]

[170] 또한 Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 세 단백질의 발현이 Rac1 활성화를

조절하는지를 환자 샘플에서 확인하였다. 그 결과 Cobll1 및 SH3BP1만이 발현되는 #1744 환자의 BC 세포에서 Rac1 활성이 증가되지만 #1744 환자의 CP 샘플에서는 증가되지 않음을 확인하였다. 반면에 세 단백질들 중 어느 것도 발현하지 않는 #1919 환자의 CP 및 BC 세포 모두에서는 Rac1 활성이 나타나지 않았다(도 87).

- [171] 33 명의 BC 환자의 생존율과 3개 단백질들의 4 가지 발현 양상 (Cobll1+/PACSIN2+/SH3BP1+, Cobll1+/PACSIN2-/SH3BP1+, Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1+ 및 Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1-)을 비교한 결과 3개 단백질들의 발현 양상이 환자의 생존율과 blast 비율에 중요함을 확인하였다(표 1). 9 명의 줄기 세포 이식 (SCT) 환자들을 제외한 24 명의 BC 환자의 생존율을 비교한 결과 Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1- 발현 양상을 보이는 환자의 생존율이 제일 높다는 것을 확인하였다 (도 88 내지 91). 이 결과들은 Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 단백질들의 발현이 각 환자마다 다르고 CML 진행 단계에서도 다름을 보여준다 (도 92).

[172] [표 1]

Table 1. Clinical characteristics		G1	G2	G3	G4	p value
Parameters	All (n=33)	Cob11(+), PACSIN2(+), SH3BP1(+) (n=6)	Cob11(+), PACSIN2(-), SH3BP1(+) (n=10)	Cob11(-), PACSIN2(-), SH3BP1(+) (n=2)	Cob11(-), PACSIN2(-), SH3BP1(-) (n=15)	
Age (years), median (range)	41(13-77)	39(20-61)	49.5(16-77)	51.5(50-53)	40(13-58)	0.430
Sex, male, n (%)	22 (67)	5 (83)	6 (60)	0 (0)	11 (73)	0.154
Disease phase at diagnosis, n (%)						
CP/AP/BP	26(79)/4(12)/3(9)	5(83)/1(17)/0(0)	9(90)/1(10)/0(0)	2(100)/0(0)/0(0)	10(67)/2(13)/3(20)	0.600
Transcript type, n (%)						
b2a2/b3a2/other (e1a2, b2a2+b3a2)	14(42)/19(58)/0(0)	2(33)/4(67)/0(0)	5(50)/5(50)/0(0)	0(0)/2(100)/0(0)	7(47)/8(53)/0(0)	0.568
Type of BP						
LyBP/MyBP/unclassified BP	14(42)/16(49)/3(9)	3(50)/3(50)/0(0)	4(40)/4(40)/2(20)	0(0)/2(100)/0(0)	7(47)/7(47)/1(6)	0.623
Blast (%), median (range)	67 (30-98)	97.5(84-98)	83.5(38-96)	40.5(30-51)	60(30-96)	0.002
BCR-ABL1 ^{IS} transcript (%), median (range)	82.54700 (13.80923-139.1845)	88.29956 (33.48214-95.10381)	94.46775 (55.31500-138.48806)	69.99318 (63.79953-76.13683)	74.47400 (13.80923-139.18450)	0.354
BCR-ABL1 mutation, n (%)						
yes/no	20(61)/13(39)	2(33)/4(67)	7(70)/3(30)	2(100)/0(0)	9(60)/6(40)	0.315
SCT, n (%)						
yes/no	9(27)/24(73)	2(33)/4(67)	3(30)/7(70)	0(0)/2(100)	4(27)/11(73)	0.825
Death, n (%)						
yes/no	28(85)/5(15)	5(83)/1(17)	8(80)/2(20)	2(100)/0(0)	13(87)/2(13)	0.899
Time from diagnosis to death (months), median (range) *	26.6 (6.7-95.4)	45.6(16.5-95.4)	23.2(6.7-36.8)	19.6(12.3-26.8)	46.9(9.6-92.5)	0.181
Time from BP progression to death (months), median (range) *	8.9 (1.3-53.0)	11.3(3.2-15.8)	4.0(1.3-11.8)	6.2(4.8-7.5)	18.9(3.1-53.0)	0.038

BP, blast phase; LyBP, lymphoid blast phase; MyBP, myeloid blast phase;
IS, international scale; SCT, stem cell transplantation.

* Nine patients (5 Cob11 positive and 4 Cob11 negative patients) who received stem cell transplantation were excluded in survival analysis.

[173] 상기 실시예들의 결과로부터, Cob11의 새로운 결합 단백질인 PACSIN2는 K562 세포의 넴로티닙 감수성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. PACSIN2의 SH3 도메인은 Cob11 단백질의 N-말단에 위치한 프롤린 풍부 영역에 결합하는데, 이 두 결합은 TKI 내성에 대한 길항 작용에 결정적인 역할을 한다. PACSIN2는 또한 SH3BP1와 동일한 SH3 도메인에서 결합한다. SH3BP1 단백질은 Cob11 단백질과 경쟁하는 PACSIN2와의 상호작용을 통해, Cob11 기능과 유사하게, CML의 넴로티닙에 대한 감수성을 감소시킨다. 마찬가지로, Cob11/PACSIN2/SH3BP1 세 단백질들 간의 이러한 경쟁적 상호작용은 zebrafish 배 발생 과정에서의 골수 형성 조절에 중요한 역할을 한다. 나아가 Cob11, PACSIN2 및 SH3BP1의 발현이 blast cell 비율과 상당한 관련이 있음을 33명의 BC-transformed CML 환자 세포를 통해 확인하였다. 이 세가지 단백질들의 발현은 CP 세포에는 관찰되지

않았지만, BC 환자에서는 4 가지의 다른 발현 양상이 관찰되었다:

Cobll1+/PACSIN2+/SH3BP1+, Cobll1+/PACSIN2-/SH3BP1+, Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1+, 및 Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1-. 이는 Cobll1, PACSIN2 및 SH3BP1 사이의 상호작용이 BC로의 전환, TKI 내성, 및 정상적인 조혈세포 형성에 중요함을 시사한다.

- [174] 최근의 연구결과들은 Rac1 활성화가 세포 수준에서 TKI 내성을 유도하고 HSC의 이동 및 자가 재생을 촉진하여 백혈병 발병 및 유지에 관여함을 밝힌바 있다. 더욱이, SH3BP1 단백질은 암 세포 행동을 조절하기 위해 Rac1을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서는 SH3BP1은 Rac1 신호 전달 경로를 활성화시키는 반면, PACSIN2는 SH3BP1과의 상호작용을 통해 Rac1 활성을 억제함을 확인하였다. 나아가, 본 발명에서는 Cobll1이 과발현된 PACSIN2와 우선적으로 결합하여, SH3BP1과 PACSIN2의 상호작용을 방해함을 보여준다. 이 결과로 자유로워진 SH3BP1은 Rac1 신호 전달 경로를 활성화시켜 TKI 내성과 배아 조혈세포 형성을 유도한다. CML 환자 샘플을 비교시, Cobll1 또는 SH3BP1 발현이 없는 BC 샘플 (# 1919)에 비해, Cobll1 및 SH3BP1 단백질의 발현이 높은 BC 샘플 (# 1744)에서 Rac1 활성이 더 강함을 보여준다. 이상의 실험 결과들은 Cobll1/PACSIN2/SH3BP1 발현에 의한 Rac1 활성화는 CML 형성과 정상적인 조혈세포 형성에 중요한 매개 변수임을 보여준다.

- [175] 본 발명에서는 PACSIN2와 SH3BP1이 CML의 TKI 내성 및 BC 변형의 새로운 조절인자임을 확인하였다. PACSIN2는 Cobll1의 이소성 발현(ectopic expression)에 의해 복원될 수 있는 SH3BP1/Rac1 경로의 기능을 억제함으로써 넬로티닙에 의한 세포사멸을 유도하는 새로운 종양 억제 인자이다. Rac1 활성을 조절하는 Cobll1/SH3BP1/PACSIN2 축은 CML의 새로운 바이오 마커일 뿐 아니라 질병 진행을 억제하는 치료 표적이 될 수 있다. 이에 따라 본 발명은 CML의 진단 및 치료 전략을 개발하기 위한 새로운 통찰력을 제공할 수 있다.

[176]

[177] 제조예

[178] **1. 환자 샘플 및 세포주**

- [179] 41 명의 CML 환자의 골수(BM)와 말초 혈액(PB)으로부터 총 66 개의 CML 샘플(26 CP, 1 AP, 39 BC)을 얻었다. 그 중 10 명은 CP와 BC에서 serial samples을 가지고 있었다. 단핵 세포(MCs)는 Ficoll-Paque (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) 밀도 구배 원심분리법으로 분리하였다. 샘플을 소 태아 혈청(Sigma-Aldrich)에서 10 % 디메틸 술폭사이드 (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 액체 질소에 저장하고 분석을 위해 해동하였다. 모든 인간 샘플은 한국 백혈병은행 (Korea Leukemia Bank)에서 얻었으며 프로토콜은 Institutional Review Board의 승인을 받았다. 환자의 동의는 헬싱키 선언에 따라 얻어졌다.

[180] **2. 세포 배양**

- [181] K562 세포주를 10 % 소태아 혈청 (Gibco, Franklin Lakes, NJ) 및 1 % 페니실린 / 스트렙토마이신(Gibco)이 첨가된 RPMI 배지에서 37°C, 5 % CO₂ 분위기에서 유지시켰다. 인간 배아 신장 293T (HEK293T) 세포주를 10 % 소태아 혈청 및 1 % 페니실린 / 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM에서 37°C, 5 % CO₂ 분위기에서 유지시켰다.
- [182] **3. 플라스미드**
- [183] Cobll1 (Clone ID : 30345650)의 전장 cDNA 클론은 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. PACSIN2 (클론 ID : hMU008023)에 대한 전장 cDNA 클론은 Korean Human Gene Bank로부터 구입하였다. Myc-PACSIN2, SFB-PACSIN2, Myc-SH3BP1 및 SFB-SH3BP1 내부 결실 돌연변이는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 생성되었다. Rac1 (클론 ID : hMU007586)에 대한 전장 cDNA 클론은 Korean Human Gene Bank로부터 구입하였다. 야생형 및 활성형 HA-Rac1의 형태는 PCR에 의해 생성되었다. GST-SH3은 PCR에 의해 생성되었다.
- [184] **4. 화학물질**
- [185] 닐로티닙(Sigma-Aldrich)을 DMSO에서 10 mM stock으로 재구성하고 -20°C에서 보관하였다.
- [186] **5. siRNA 및 형질감염**
- [187] Cobll1과 PACSIN2의 모든 siRNA 이중 가닥은 IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA)에서 구입하였다. 관련 서열은 다음과 같다.

- [188] Cobll1 siRNA1 sense: 5'-CUAUGAUGGACUUGUUGAUUU-3'
 Cobll1 siRNA1 antisense: 5'-AUCAACAAGUCCAUCAUAGUU-3'
 Cobll1 siRNA2 sense: 5'-GACUCAUUCUGUAAAUAAAUU-3'
 Cobll1 siRNA2 antisense: 5'-UUUAUUUACAGAAUGAGUCUU-3'
 PACSIN2 siRNA1 sense: 5'-CAAAUUAUGUGGAGGCGAUUU-3'
 PACSIN2 siRNA1 antisense: 5'-AUCGCCUCCACAUAUUUGUU-3'
 PACSIN2 siRNA2 sense: 5'-GGAGAAGCUGGCUAUCUCACGAGAAUU-3'
 PACSIN2 siRNA2 antisense: 5'-UUCUCGUGAGAUAGCCAGCUUCUCCUU-3'
 SH3BP1 siRNA1 sense: 5'-UCAUGAUGCUGCUUUCUGAUU-3'
 SH3BP1 siRNA1 antisense: 5'-UCAGAAAGCAGCAUCAUGAUU-3'
 SH3BP1 siRNA2 sense: 5'-GACAUCAACUUCAACGUGUUU-3'
 SH3BP1 siRNA2 antisense: 5'-ACACGUUGAAGUUGAUGUCUU-3'
- [189] 모든 siRNA와 플라스미드를 전기영동을 사용하여 세포 내로 형질감염시켰다. 구체적으로, Neon Transfection System (MPK10096, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 K562 세포 (6x10⁶ 또는 2x10⁶ 세포)를 전기 천공시켰다. 총 20 µg의 플라스미드 DNA 또는 200 nM siRNA를 세포에 첨가하고 사용자의 프로토콜에 따라 전기천공하고 (2 펄스에서 15 ms 동안 1450V), 형질 감염된 세포를 48 시간 동안 10 % FBS가 보충된 prewarmed RPMI 배지에서 배양하였다.
- [190] **6. 면역침강법(immunoprecipitation) 및 웨스턴 블롯(western blot)**
- [191] (1) K562 세포에 표시된 단백질을 발현 플라스미드들로 transfection함.
- [192] (2) 24 시간 후, transfection된 세포에 500 µl의 NETN buffer (150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.5 % NP-40)를 첨가함.
- [193] (3) 얼음 위에서 20분 동안 세포를 용해시킴.
- [194] (4) 용해되지 않은 세포추출물은 4°C에서 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거함.
- [195] (5) 상층액은 streptavidin-coated beads or protein A-agarose-conjugated 1차 항체를 첨가하여 4°C 에서 1시간 동안 배양함.
- [196] (6) 생성된 면역복합체를 NETN buffer로 3회 세척하고 SDS-PAGE를 수행함.
- [197] (7) Western blotting을 항체를 사용하여 수행함.
- [198] **7. GST pull-down**

- [199] (1) GST 및 GST 융합 단백질을 대장균에서 발현시킴.
- [200] (2) GST 및 GST 융합 단백질을 대장균 세포에 5 ml의 PBS-T buffer를 첨가함.
- [201] (3) 얼음 위에서 20 분 동안 대장균 세포를 용해시킨 후 초음파분쇄기를 이용하여 대장균 세포를 완전히 용해시킴.
- [202] (4) 용해되지 않은 세포추출물은 4°C에서 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거함.
- [203] (5) 상층액은 glutathione-Sepharose 4B beads를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 배양함.
- [204] (6) 생성된 bead-단백질 복합체를 PBS-T buffer로 3회 세척하고 GST pull-down을 수행함.
- [205] (7) HEK293T 세포에 표시된 단백질을 발현하는 플라스미드로 transfection함.
- [206] (8) 24시간 후, transfection된 세포에 500 ul의 NETN buffer (150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.5 % NP-40)를 첨가함.
- [207] (9) 얼음 위에서 20분 동안 세포를 용해시킴.
- [208] (10) 용해되지 않은 세포추출물은 4°C에서 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거함.
- [209] (11) 상층액은 GST 융합단백질 또는 GST와 함께 4°C에서 1시간 동안 배양함.
- [210] (12) 생성된 복합체를 NETN buffer로 3회 세척하고 SDS-PAGE를 수행함.
- [211] (13) Western blotting을 항체를 사용하여 수행함.
- [212] **8. 세포사멸 분석**
- [213] (1) K562 세포에 표시된 단백질을 발현 플라스미드들 또는 siRNA로 transfection함.
- [214] (2) 48 시간 후, 표시된 농도의 넴로티닙을 transfection된 세포에 첨가하고 48시간 동안 배양함.
- [215] (3) 세포를 제조자의 프로토콜에 따라 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience, 556547, San Jose, CA, USA)를 사용하여 세포사멸에 대해 분석하였음.
- [216] (4) 세포사멸은 FACS (fluorescence-activated cell sorting) (BD Bioscience)로 분석하였음.
- [217] **9. 항체 및 희석 배수**
- [218] 웨스턴 블롯 분석을 위한 다양한 항체의 희석은 다음과 같다: 이전에 공지된 바와 같은 anti-Cobll1 1 : 200; anti-PACSIN2 (Sigma-Aldrich, SAB1300127), 1 : 1000; anti-FLAG (Sigma-Aldrich, F3165), 1:2000; anti-Myc (Roche, 11814150001) (Roche, Basel, Switzerland), 1 : 2000; anti-HA (Roche, 12013819001), 1 : 2000; anti-β-actin (Sigma-Aldrich, A5316), 1:5000; anti-GFP (Clontech 632380) (Clontech, Mountain View, CA, USA), 1:2,000; anti-SH3BP1 (Proteintech, 20541-1-AP), 1:1000. 토끼 (Sigma-Aldrich, A0545) 또는 마우스 (Sigma-Aldrich, A9917) IgG에 특이적인 Horseradish peroxidase-컨쥬게이트 2차 항체를 1 : 2000로 희석시켜 사용하였다.

[219] **10. Zebrafish husbandry**

[220] AB* 군주의 야생형 Zebrafish는 UNIST Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 지침에 따라 28.5 °C에서 자동 순환 시스템 (Genomic-Design)으로 양육되고 유지되었다. (IACUC 승인 번호 : UNISTIACUC-15-15). 수정 및 주입된 배아는 고정 될 때까지 E3 fish water (0.57 g NaCl, 25.3 mg KCl, 96.6 mg CaCl₂·2H₂O, 163.3 mg MgSO₄·7H₂O, 증류수 2ℓ 중)에서 유지시켰다.

[221] **11. MO 및 mRNA 주입**

[222] (1) *cobll1b*, *pacsin2*, *sh3bp1* 및 *rac1a*에 대한 모든 MO (Gene Tools, Philomath, OR, USA)를 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 물에 25 ng/nl 농도로 희석하였음.

[223] (2) 10 ng의 *cobll1b*-MO, 1 ng의 *pacsin2*-MO, 2.5 ng의 *sh3bp1*-MO 및 2.5 ng의 *rac1a*-MO를 단일 세포 단계의 야생형 배아에 주입하였음.

[224] (3) *pacsin2*의 cDNA는 야생형 zebrafish 배아 RNA를 사용하여 합성되어, PCS2 + 벡터에 삽입되었음. 전장 *pacsin2*는 in vitro transcription (mMESSAGE mMACHINE Kit, Ambion)를 통해 합성되었음.

[225] (4) *Pacsin2* mRNA는 단일 세포 단계의 야생형 배아에 주입되었음. Microinjection은 Femtojet 4i microinjector (Eppendorf)를 사용하여 수행하였음.

[226] **12. Whole-mount WISH**

[227] (1) 배아는 4°C에서 4% 파라포름알데히드를 포함한 PBS에서 하룻밤 동안 배양하여 고정시켰음.

[228] (2) 고정된 배아는 -20°C 에서 메탄올로 밤새 탈수시켰음.

[229] (3) 탈수된 배아를 PBS-0.1% Tween-20 (PBT) 용액으로 재수화하고 -20°C 에서 아세톤을 사용하여 투과성을 획득하였음.

[230] (4) 투과성을 획득한 배아는 68°C 에서 hybridization buffer (50% formamide, 5XSSC, 500 µg/ml torula yeast tRNA, 50 µg/ml heparin, 0.1% Tween-20, and 9 mM citric acid (pH 6.5))에서 1 시간 동안 prehybridization 되었음.

[231] (5) 68°C에서 hybridization buffer에서 digoxigenin (DIG)-labeled antisense RNA probe for *mpx*와 3 일 동안 hybridization 되었음.

[232] (6) Hybridization buffer, 2XSSC, 0.2X SSC, and PBT solution으로 세척 후, 4°C에서 alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibodies (1:4000) (Roche, Mannheim, Germany)와 24 시간 동안 배양시켰음.

[233] (7) 그 후 샘플을 PBT 용액으로 6회 세척하고 NBT/BCIP 기질 (Promega, Madison, USA)을 포함한 AP buffer (100 mM Tris, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl 및 0.1 % Tween-20)에 배양하여 WISH 신호를 확인하였음.

[234] **13. 단백질 정제**

[235] *Cobll1*의 N-말단 영역(1-410 및 175-370)을 포함한 염기 서열은 pGEX-6P-2 벡터에 클로닝되었다. PACSIN2의 SH3 도메인(430-486)과 SH3BP1의 C-말단

영역(541-701)은 각각 pGEX-4T-1과 pET-21a 벡터에 클로닝되었다. 재조합된 벡터는 E.coli BL21-CodonPlus (DE3) 세포에 형질전환시켰고 형질전환된 세포는 LB medium에서 배양하였고, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 대량발현시켰다. 수거된 E. coli cell들은 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2 % NP40, 0.4 mM TCEP, 1 mM EDTA, pH7.0)에 녹여 sonicator를 이용해 파쇄시켰다. GST fusion 단백질들(Cobll1과 PACSIN2 SH3 도메인)은 GST 컬럼을 이용하여 elution buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5% Glycerol, 10 mM DTT, 0.2 mM TCEP, 1 mM EDTA, 10 mM glutathione, pH 7.0)로 분리 정제하였다. GST-tag은 PreScission protease (Thermo Fisher Scientific) 또는 Thrombin을 이용하여 제거한 후 염을 증가시키며(1 M NaCl까지) 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 그 이후 final buffer (50 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 6.3) 조건에서 Hiload 16/600 Superdex 75/200 prep grade column (GE Healthcare)을 이용하여 정제하였다. Poly-histidine tag이 융합된 단백질(SH3BP1)의 경우 imidazole의 농도를 증가시키며 (1 M imidazole까지) Ni column을 이용하여 분리 정제하였다. 그 이후 Hiload 16/600 Superdex 75 prep grade column (GE Healthcare)를 이용하여 정제하였다.

[236] **14. 표면 플라즈몬 공명(SPR)**

[237] 모든 SPR 실험은 25도에서 PBS buffer (10 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 및 2.7 mM KCl, pH 7.4) 조건으로 수행되었다. PACSIN2 SH3 도메인은 Reichert SR 7500DC system의 amine coupling 방법으로 PEG chip에 고정되었다. PACSIN2 SH3를 고정시킬 때의 유속은 10 µl/min이며 20 µg의 PACSIN2 SH3 단백질이 sample channel에 사용되었다. Cobll1의 N-말단 영역(1-410)과 SH3BP1의 C-말단 영역(541-701)은 3분의 association time 후 10분 동안 dissociation 되었다. Cobll1과 SH3BP1의 결합은 각각 0.0390625, 0.078125, 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 µM과 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 µM 조건에서 수행되었다. Sensor 표면은 100 mM의 NaOH를 이용하여 regeneration 시켰다. Binding curves은 Scrubber2 소프트웨어를 (BioNavis) 사용하여 분석되었다.

[238] **15. 핵자기공명(NMR)**

[239] ¹⁵N 또는 ¹⁵N, ¹³C로 표지된 PACSIN2 SH3 도메인을 ¹⁵N-enriched ammonium chloride 또는 ¹³C-enriched glucose를 이용한 M9 최소 배지를 이용하여 발현시켰고, 표지하지 않은 PACSIN2 SH3 도메인과 같은 방법으로 정제하였다. Bruker AVANCE II 600 MHz spectrometer를 이용하여 298K 조건에서 PACSIN2 SH3 도메인의 ¹H-¹⁵N HSQC와 HNCACB를 측정하였고, 이를 분석하여 backbone assignment를 수행하였다. ¹H-¹⁵N HSQC NMR titration 실험은 298K 조건에서 Bruker AVANCE II 800 MHz spectrometer를 이용하여 수행하였다. 합성된 Cobll1 유래 프롤린-풍부 펩타이드(AKAPLPPEAETK, 제1 프롤린-풍부 펩타이드; RRAPLPMPAS, 제2 프롤린-풍부 펩타이드; RKAPSPPSKIP, 제3 프롤린-풍부 펩타이드)들은 ANYGEN에서 구입하였고 final buffer (50 mM sodium phosphate,

100 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 6.3)에 9 mM로 녹여 사용하였다. 제2 프롤린-풍부 펩타이드는 100 μ M의 ^{15} N-PACSIN2 SH3 도메인에 다양한 비율로 titration 실험을 진행하였다(PACSIN2 SH3 도메인: 제2 프롤린-풍부 펩타이드 = 1:0, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4). PACSIN2 SH3 도메인 : 제1 또는 제3 프롤린-풍부 펩타이드의 비율은 다음과 같다: 제1 프롤린-풍부 펩타이드의 경우, 1:0.5, 1:2, 1:8 ; 제3 프롤린-풍부 펩타이드의 경우, 1:0.5, 및 1:2.

- [240] Cobll1-NT(175-370) 및 SH3BP1-CT의 titration과 replacement titration 실험은 표지하지 않은 Cobll1-NT 및 SH3BP1-CT를 각각 정제한 후 1 mM에서 2.2 mM의 농도로 final buffer (50 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 6.3) 상태에서 실험하였다. 두 단백질들은 50 μ M의 ^{15} N-PACSIN2 SH3 도메인 단백질에 다양한 비율 (PACSIN2 SH3 도메인:Cobll1-NT 또는 SH3BP1-CT = 1:0, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2)로 titration 실험을 수행하였다. Replacement titration 실험에서는, 표지하지 않은 Cobll1-NT를 ^{15} N-PACSIN2 SH3 도메인 단백질과 SH3BP1을 존재 하에서 다양한 비율(PACSIN2 SH3 도메인: SH3BP1-CT:Cobll1-NT = 1:1:0.1, 1:1:0.25, 1:1:0.5, 1:1:0.75, 1:1:1, 1:1:2)로 첨가하였다(Cobll1-NT와 SH3BP1의 위치를 바꾼 조건에서도 동일하게 수행). 모든 NMR 스펙트럼은 NMRpipe를 이용하여 분석되었고 NMRViewJ 소프트웨어를 사용하여 데이터화하였다.

[241]

청구범위

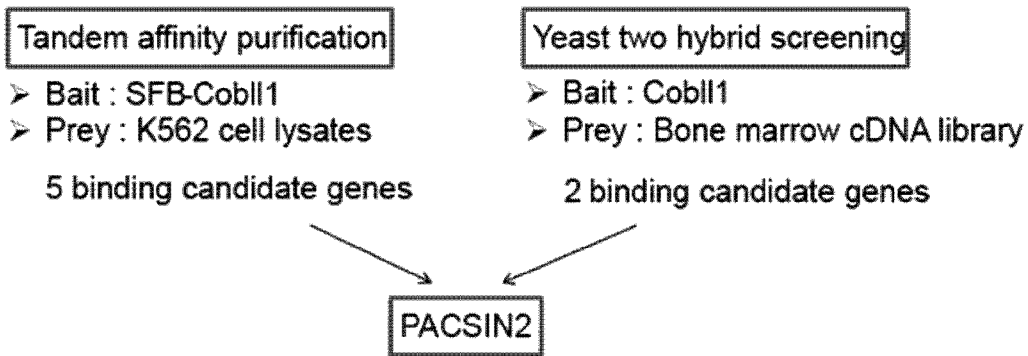
- [청구항 1] 만성 골수성 백혈병 환자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 Cobll1 (Cordon-bleu protein-like 1), PACSIN2 (Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2), 및 SH3BP1 (SH3 Domain Binding Protein 1) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
상기 측정된 단백질 발현 수준을 만성 골수성 백혈병의 만성기에서의 각 단백질의 발현 수준과 비교하는 단계
를 포함하는, 만성 골수성 백혈병의 급성기 진행의 진단 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단백질은 Cobll1+/PACSIN2+/SH3BP1+, Cobll1+/PACSIN2-/SH3BP1+, Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1+, 및 Cobll1-/PACSIN2-/SH3BP1-로부터 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 발현 양상을 나타내며, 이 때 (+)는 단백질의 발현이 만성기의 단백질 발현 수준과 비교하여 증가한 것을 나타내고, (-)는 단백질의 발현이 만성기의 단백질 발현 수준과 비교하여 단백질 발현이 변화되지 않음을 나타내는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 3] 만성 골수성 백혈병 환자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 PACSIN2 또는 SH3BP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 상기 환자의 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성의 진단 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, PACSIN2 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가하였거나, 또는 SH3BP1 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 변화되지 않은 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 감소시켜 티로신 키나아제 억제제에 감수성을 갖는 것으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, PACSIN2 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 변화되지 않았거나, 또는 SH3BP1 단백질의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가한 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 갖는 것으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 6] 만성 골수성 백혈병 환자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질 중 둘 이상의 상호작용을 측정하는 단계를 포함하는, 상기 환자의 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성의 진단 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, Cobll1 단백질과 PACSIN2 단백질이 상호작용하여 서로 결합하는 경우, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성을 갖는 것으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, Cobll1 단백질과 PACSIN2 단백질의 상호작용에 의한 결합은, Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역과 PACSIN2의 SH3 도메인의 결합에 의한 것임을 특징으로 하는, 진단 방법.

- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 PACSIN2의 SH3 도메인은 서열번호 1의 430 내지 486의 아미노산 서열을 갖는 것이고, 상기 Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역은 서열번호 2의 1 내지 410의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역은 서열번호 2의 18 내지 25의 아미노산 서열, 서열번호 2의 292 내지 299의 아미노산 서열, 및 서열번호 2의 361 내지 368의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 Cobll1 단백질의 N-말단의 프롤린 풍부 영역은 서열번호 2의 175 내지 370의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 12] 제6항에 있어서, SH3BP1 단백질과 PACSIN2 단백질의 상호작용에 의한 결합은, SH3BP1 단백질의 C-말단의 프롤린 풍부 영역과 PACSIN2의 SH3 도메인의 결합에 의한 것임을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 PACSIN2의 SH3 도메인은 서열번호 1의 430 내지 486의 아미노산 서열을 갖는 것이고, 상기 SH3BP1 단백질의 C-말단의 프롤린 풍부 영역은 서열번호 3의 541 내지 701의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 14] 제6항에 있어서, Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1의 세 단백질이 모두 존재하는 경우, PACSIN2 단백질은 그의 SH3 도메인을 통해 SH3BP1 또는 Cobll1과 경쟁적으로 결합하며, 이 때 PACSIN2 SH3 도메인은 Cobll1과 우선적으로 상호작용하여 SH3BP1을 방출시킴으로써 티로신 키나아제 억제제에 대한 내성을 유도하는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 방출된 SH3BP1은 Rac1 신호 전달 경로를 활성화시켜 티로신 키나아제 억제제에 대한 내성을 유도하는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 16] 제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 또는 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 17] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 방사능면역분석, 방사능면역침강법, 면역침강법, ELISA, 샌드위치 분석법(sandwich assay), 실시간-중합효소연쇄반응(real-time PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 18] 제6항에 있어서, 상기 단백질의 상호작용은 효모 단백질 잡종법(yeast two hybrid), 면역침강법(immunoprecipitation),

동시-면역침강법(co-immunoprecipitation), 역 동시-면역침강법(reverse co-immunoprecipitation), GST 풀 다운(GST pull-down) 분석법, 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography), 파아지 디스플레이(phage display), 및 면역조직화학(immunohistochemistry)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상에 의해 측정되는 것을 특징으로 하는, 진단 방법.

- [청구항 19] 제3항 또는 제6항에 있어서, 상기 티로신 키나아제 억제제는 이매티닙(imatinib), 닐로티닙(nilotinib), 다사티닙(dasatinib), 보수티닙(bosutinib), 또는 포나티닙(ponatinib)인 것을 특징으로 하는, 진단 방법.
- [청구항 20] 시료 중 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 만성 골수성 백혈병의 급성기 진행의 진단용 조성물.
- [청구항 21] 시료 중 PACSIN2 또는 SH3BP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성 진단용 조성물.
- [청구항 22] 시료 중 Cobll1, PACSIN2, 및 SH3BP1 단백질 중 둘 이상의 상호작용을 측정하는 제제를 포함하는, 티로신 키나아제 억제제에 대한 치료 내성 진단용 조성물.
- [청구항 23] 제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 또는 리간드인 것을 특징으로 하는 것인, 진단용 조성물.

[도1]



[도2]

Cobll1 purification

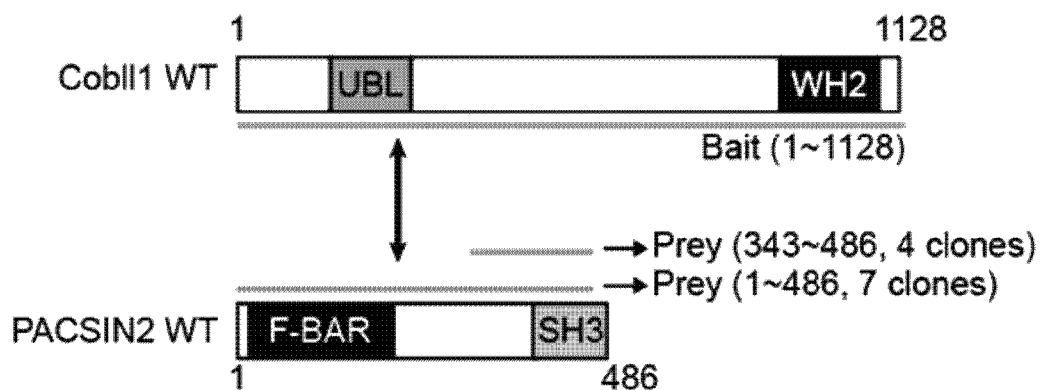
Protein	# of Peptides	Coverage (%)
Cobll1	14	28
PACSIN2	11	24
HSP70	7	10
HSP90	1	1.7
GAPDH	1	5.1
KERATIN	1	2.9

[도3]

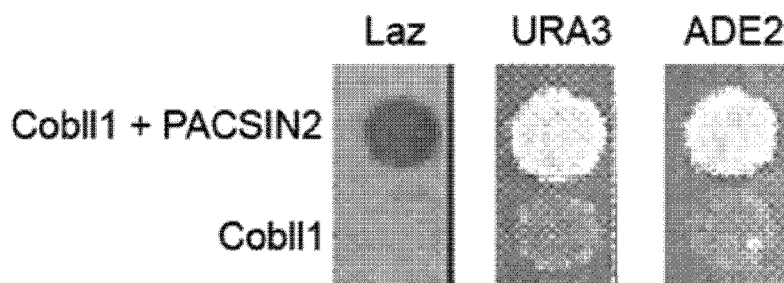
Yeast two hybrid assay

Protein	Clone	# of clones
PACSIN2	Full length	7
	C-terminus (343~486 a.as)	4
FHL3	Full length	3

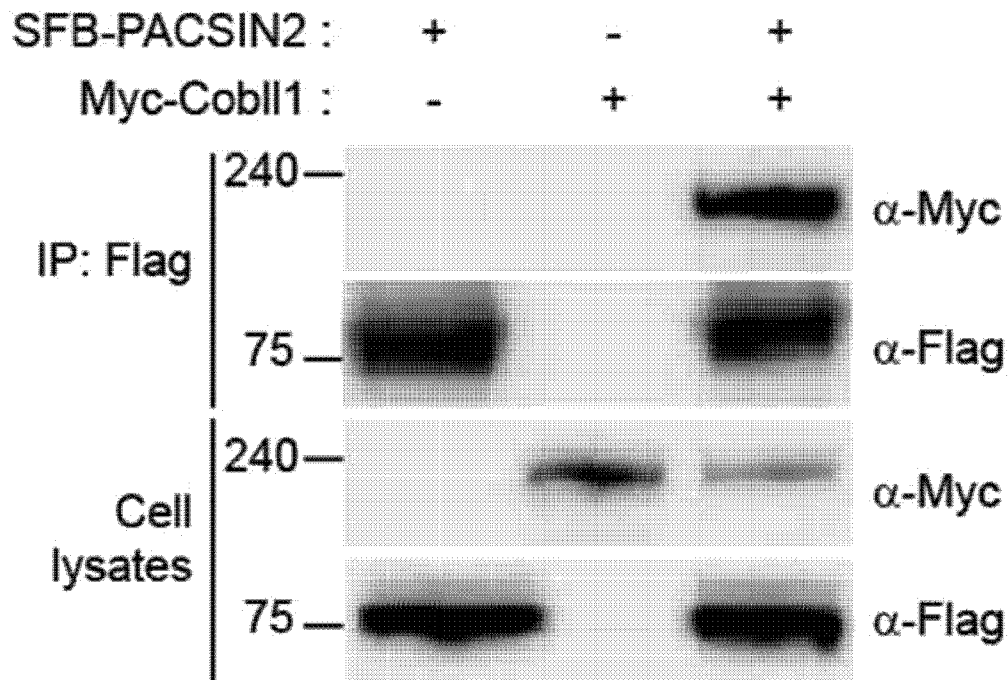
[도4]



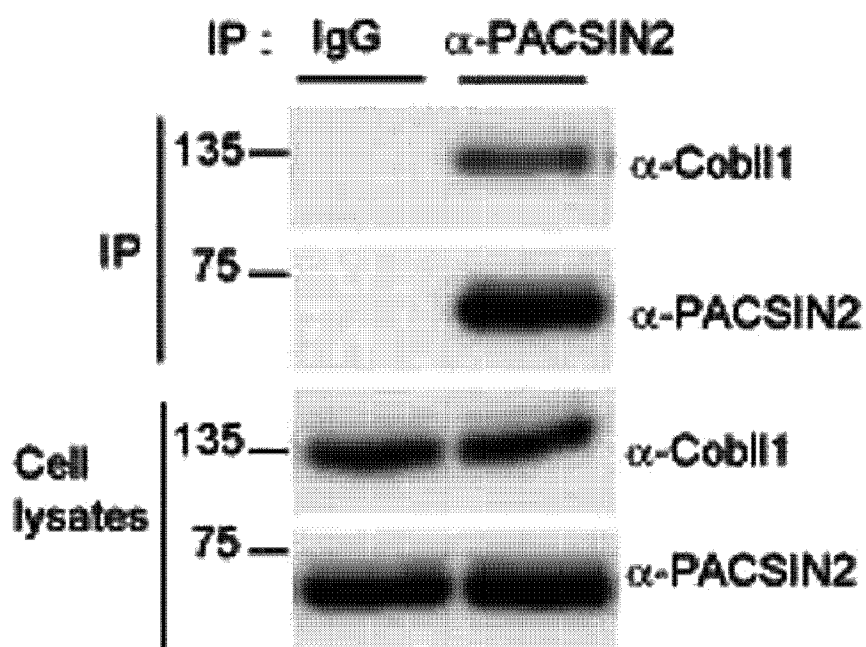
[도5]



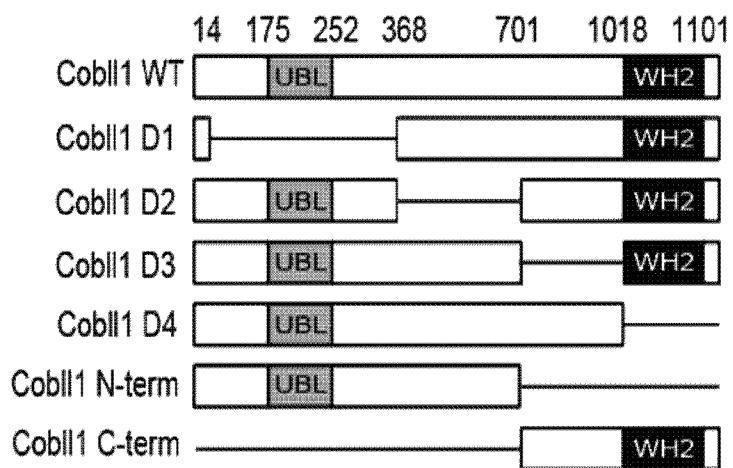
[도6]



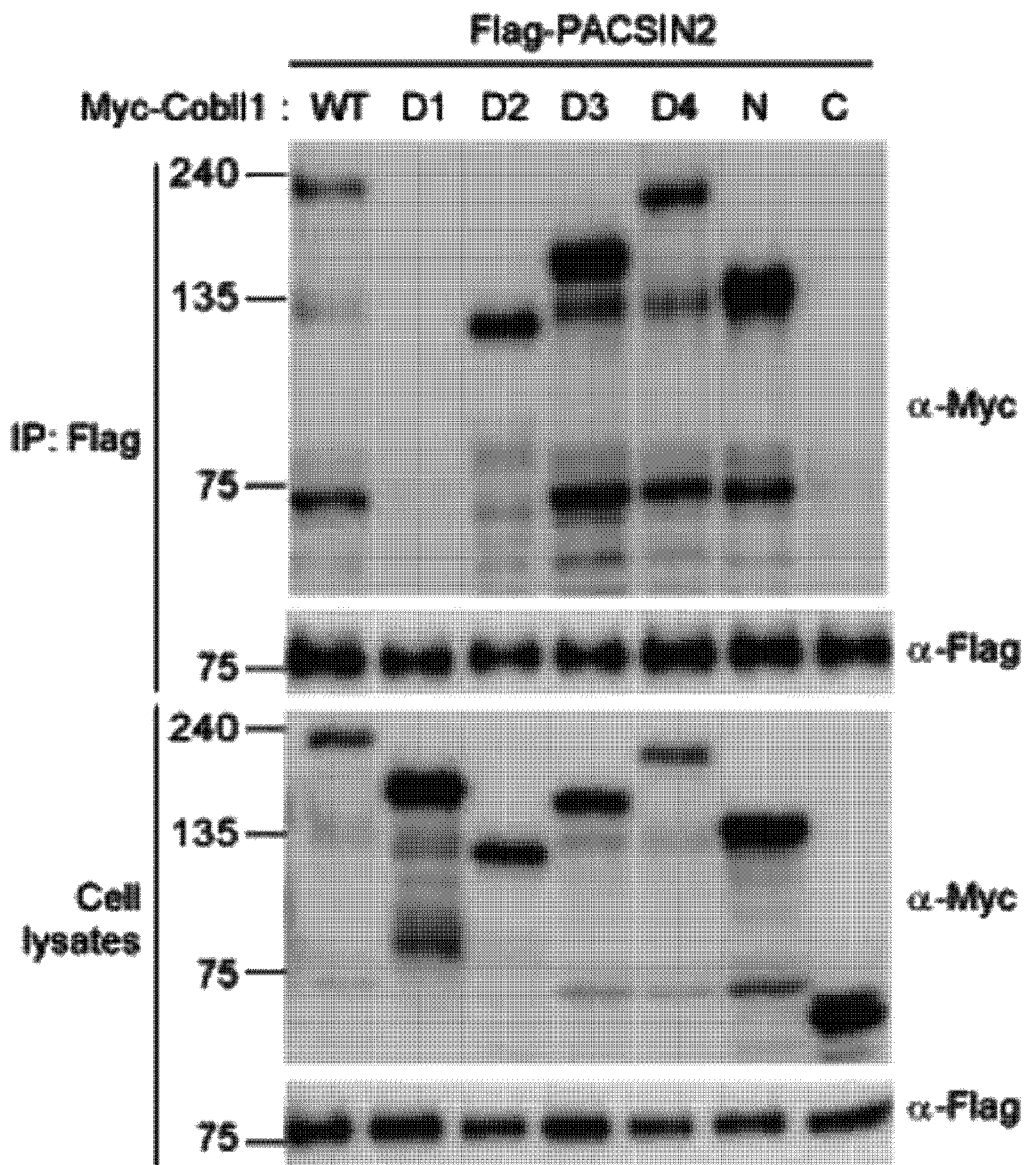
[도7]



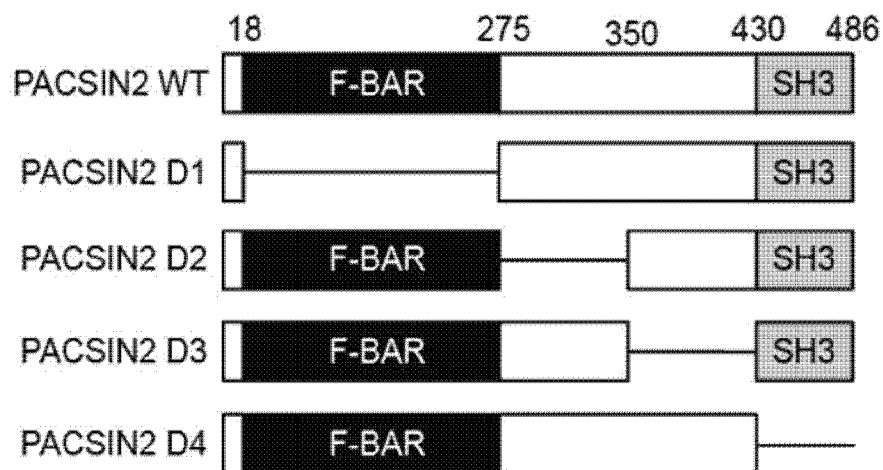
[도8]



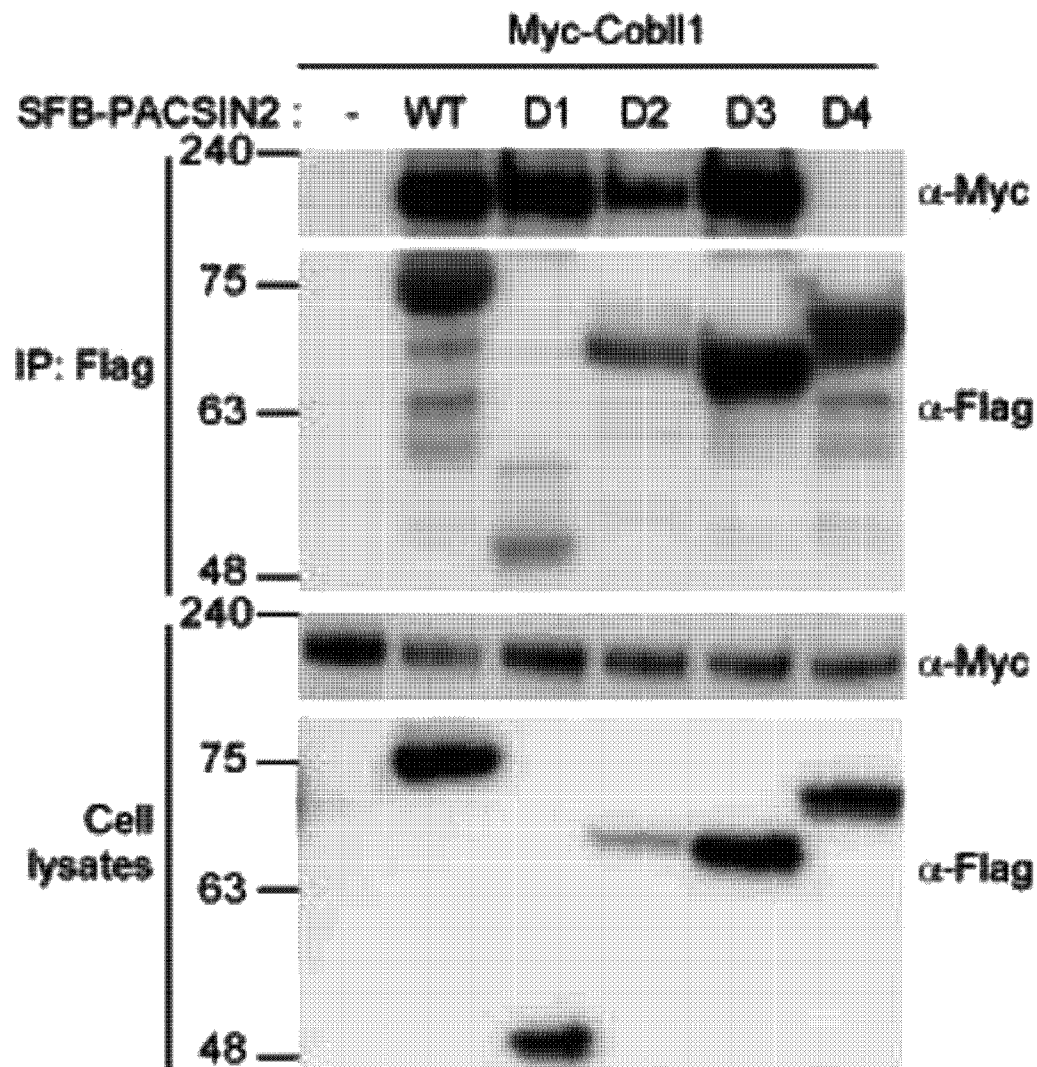
[도9]



[도10]



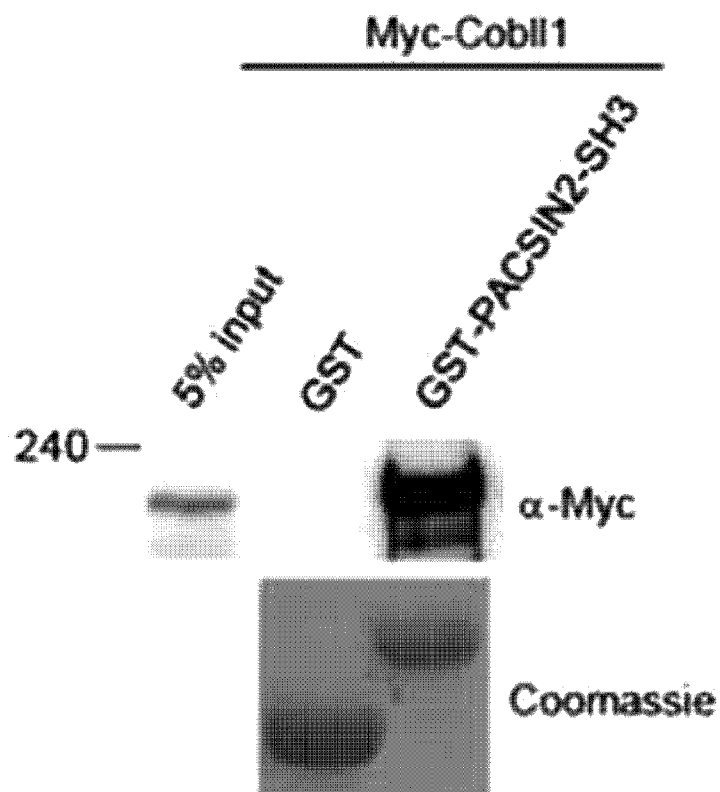
[도11]



[도12]



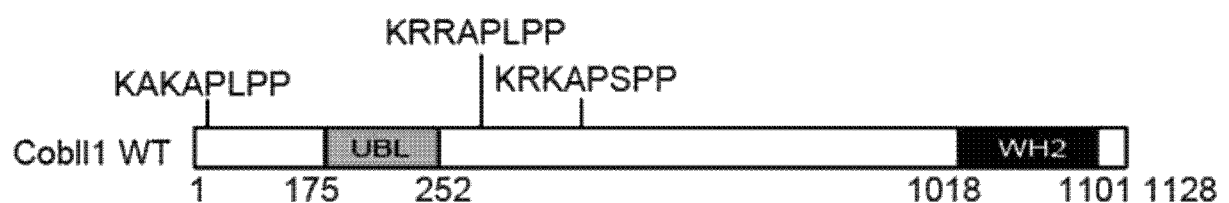
[도13]



[도14]

Search Tools	Residue	Sequence	Probability
MoDPeplnt	18-25	KAKAPLPP	high
MoDPeplnt	292-299	KRRAPLPP	high
MoDPeplnt	361-368	KRKAPSPP	high

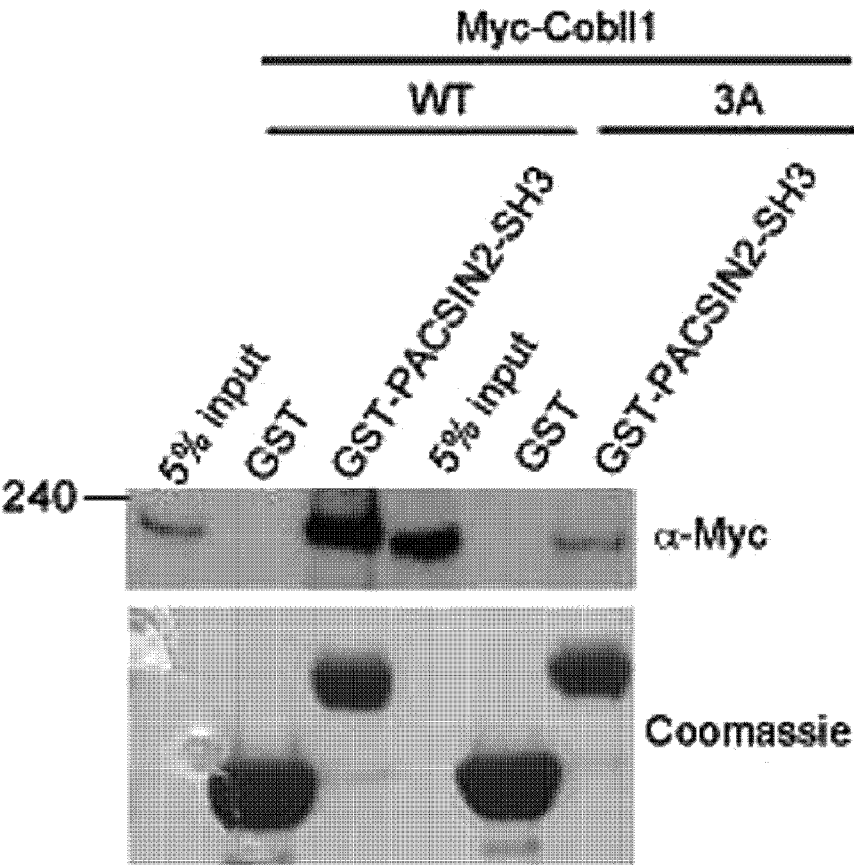
[도15]



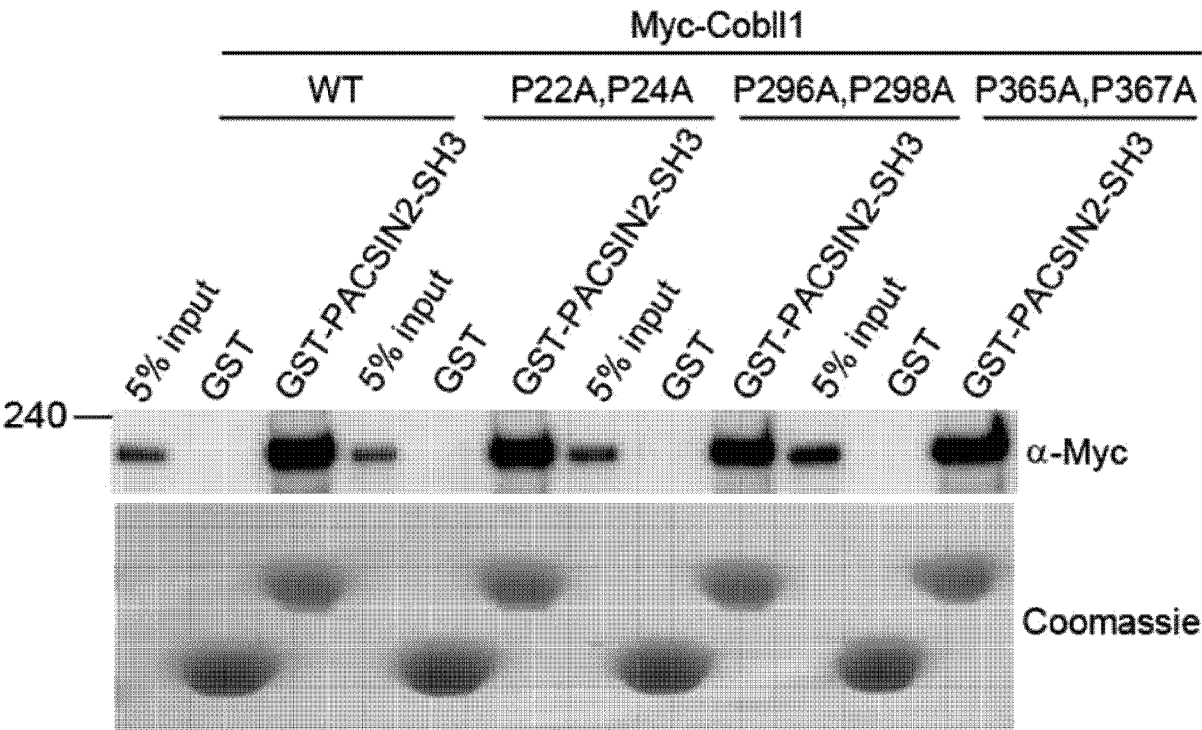
[도16]

Name of clone	Mutation(s)
CobII1-P22A,P24A	P22, P24
CobII1-P296A,P298A	P296, P298
CobII1-P365A,P367A	P365, P367
CobII1-2A-1	P22, P24, P296, P298
CobII1-2A-2	P296, P298, P365, P367
CobII1-2A-3	P22, P24, P365, P367
CobII1-3A	P22, P24, P296, P298, P365, P367

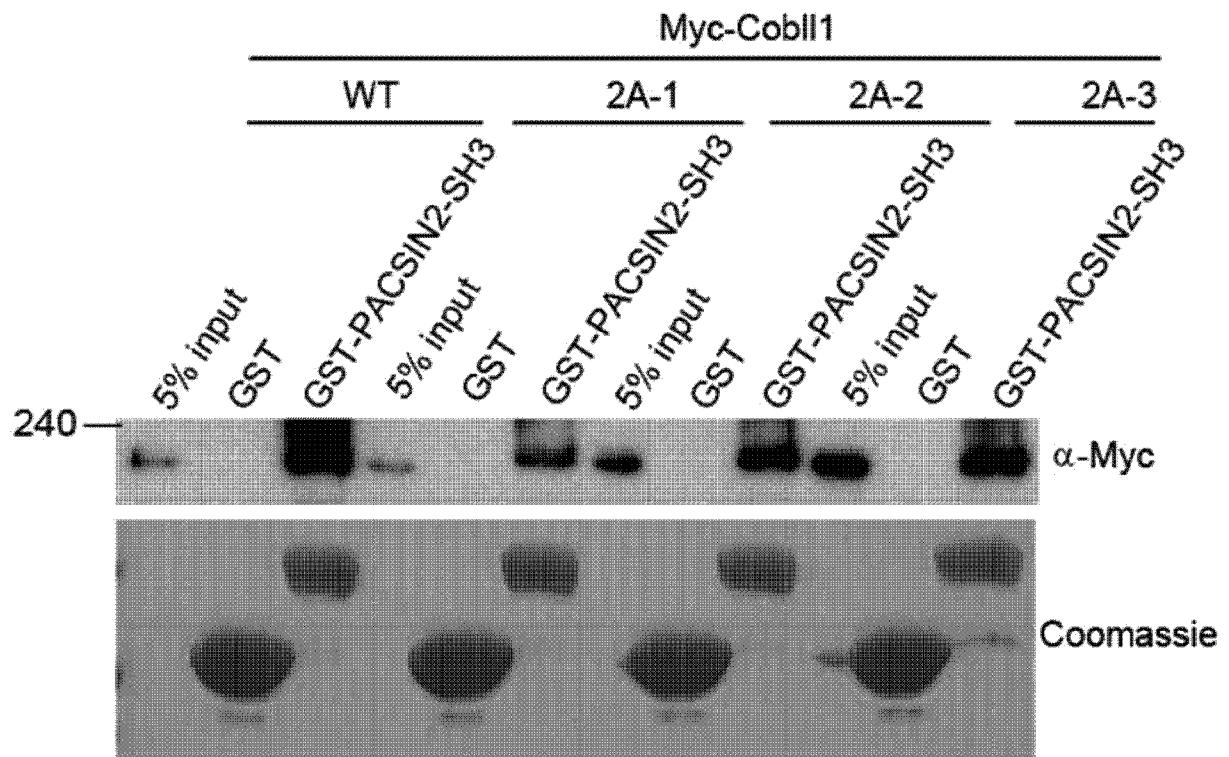
[도17]



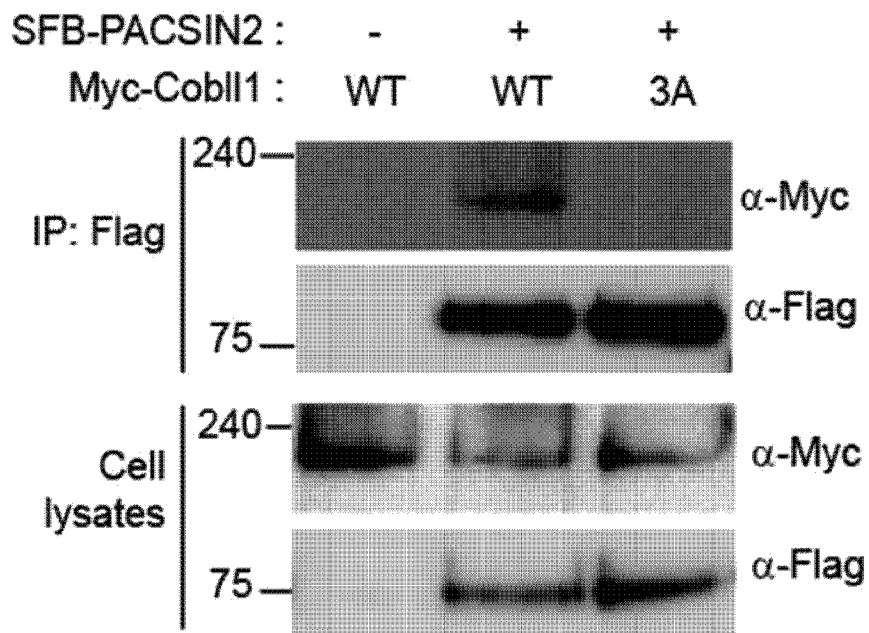
[도18]



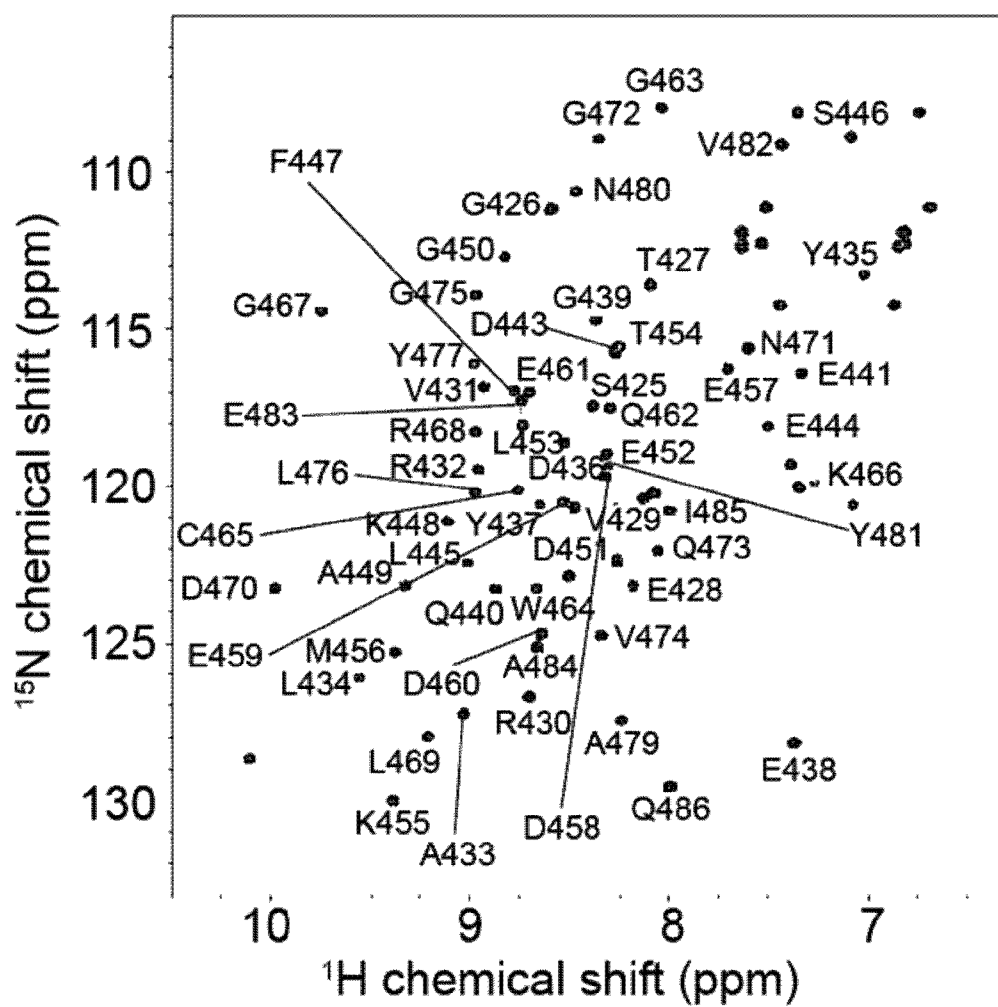
[도19]



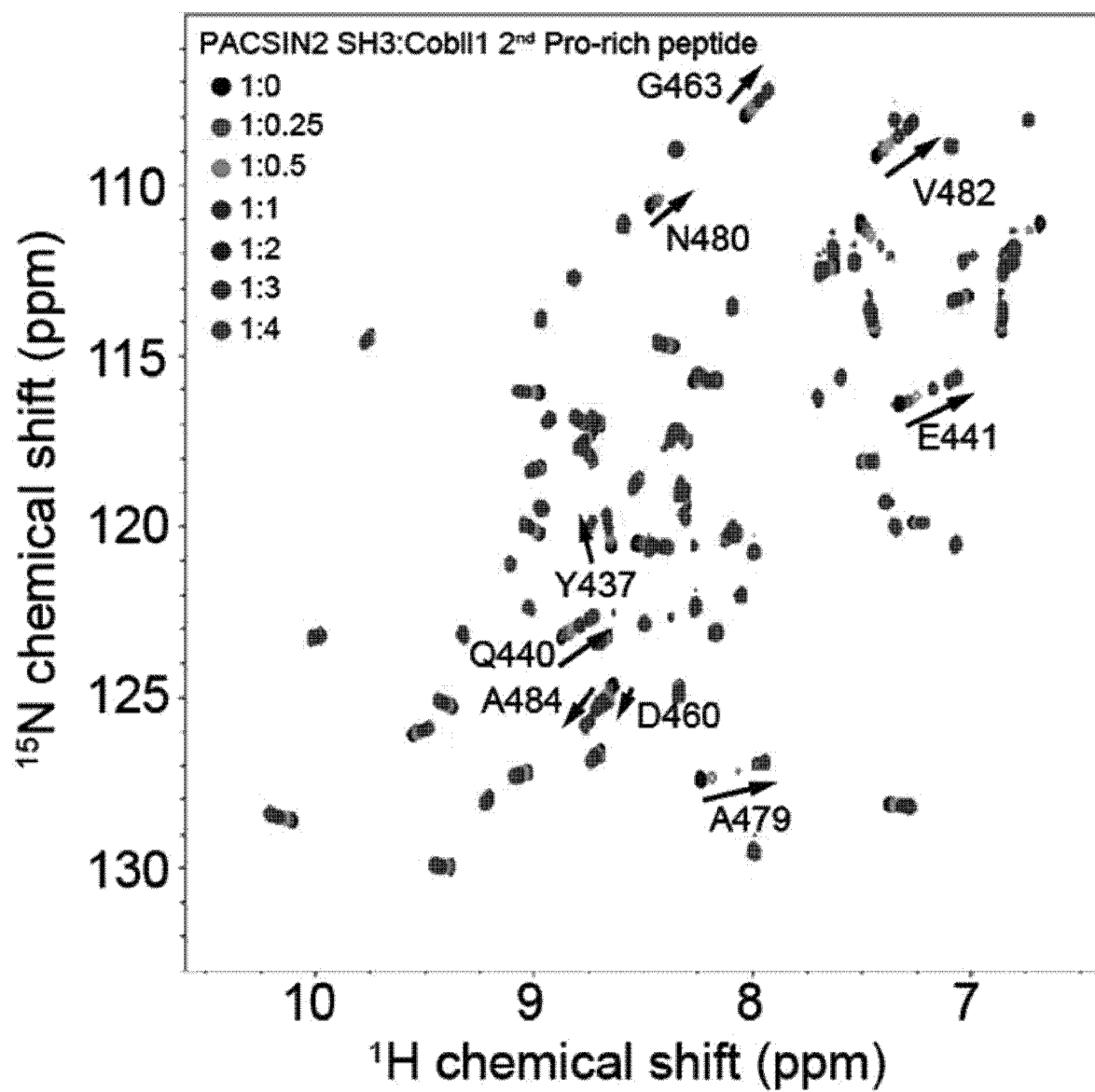
[도20]



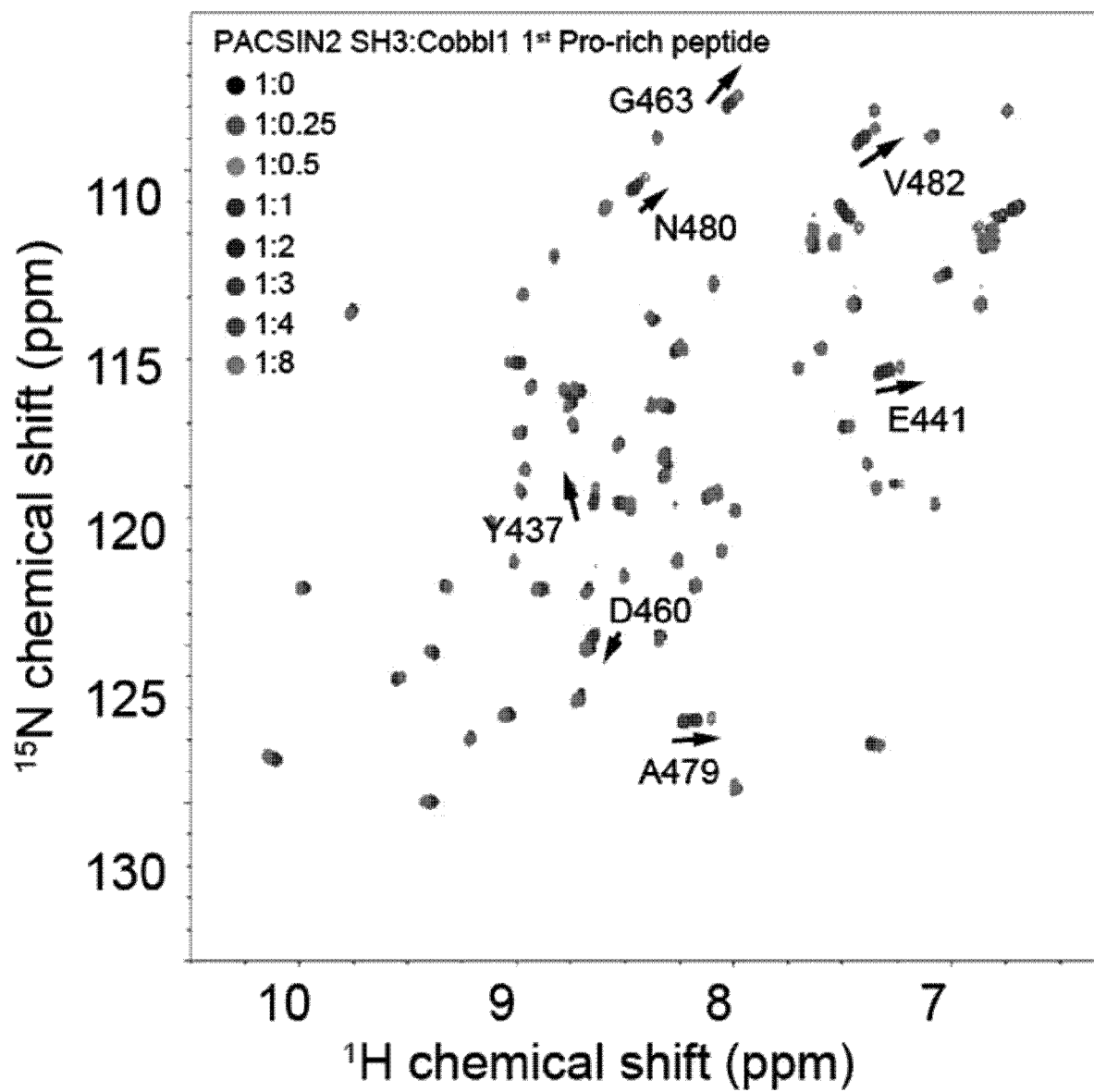
[도21]



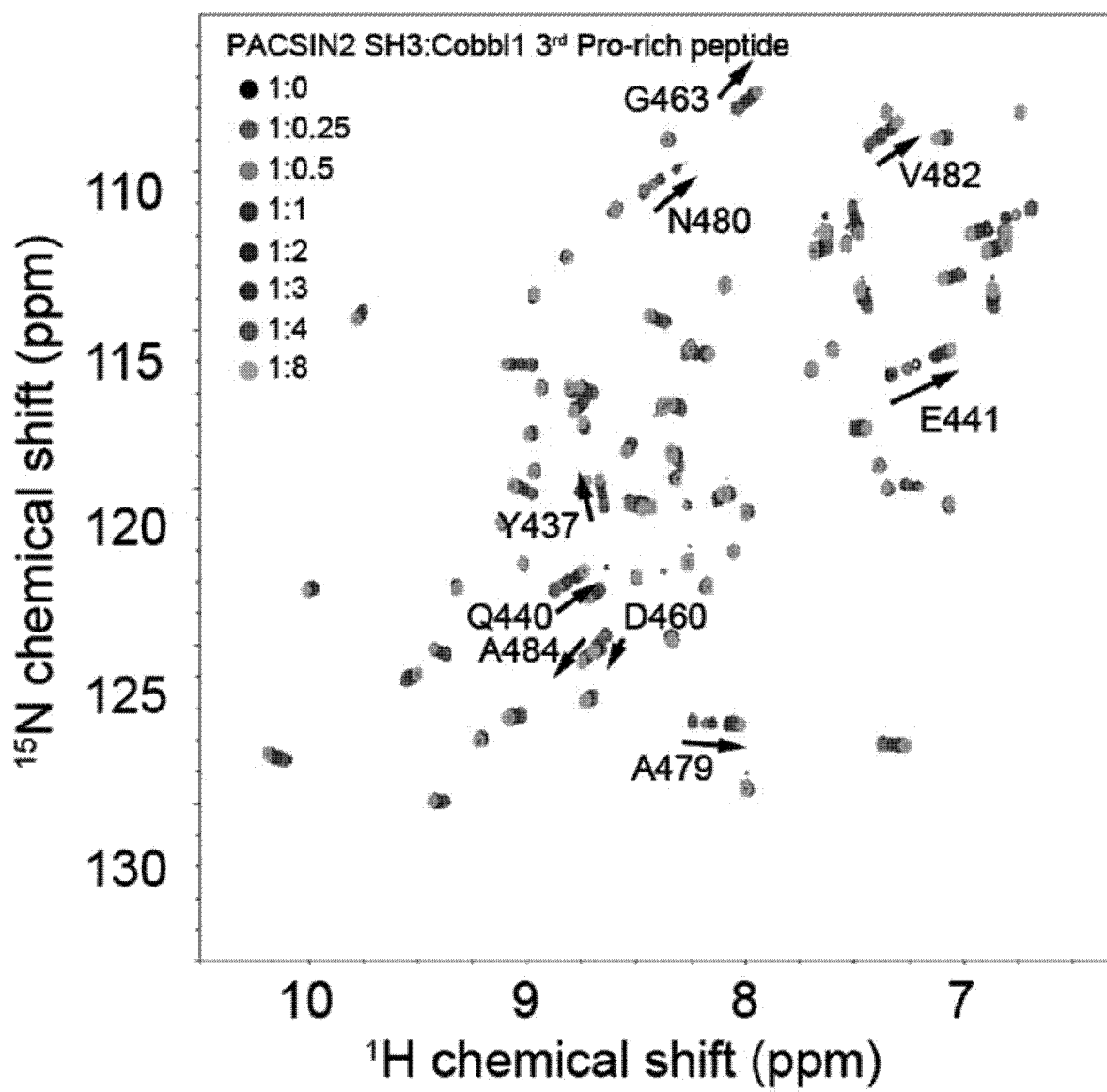
[도22]



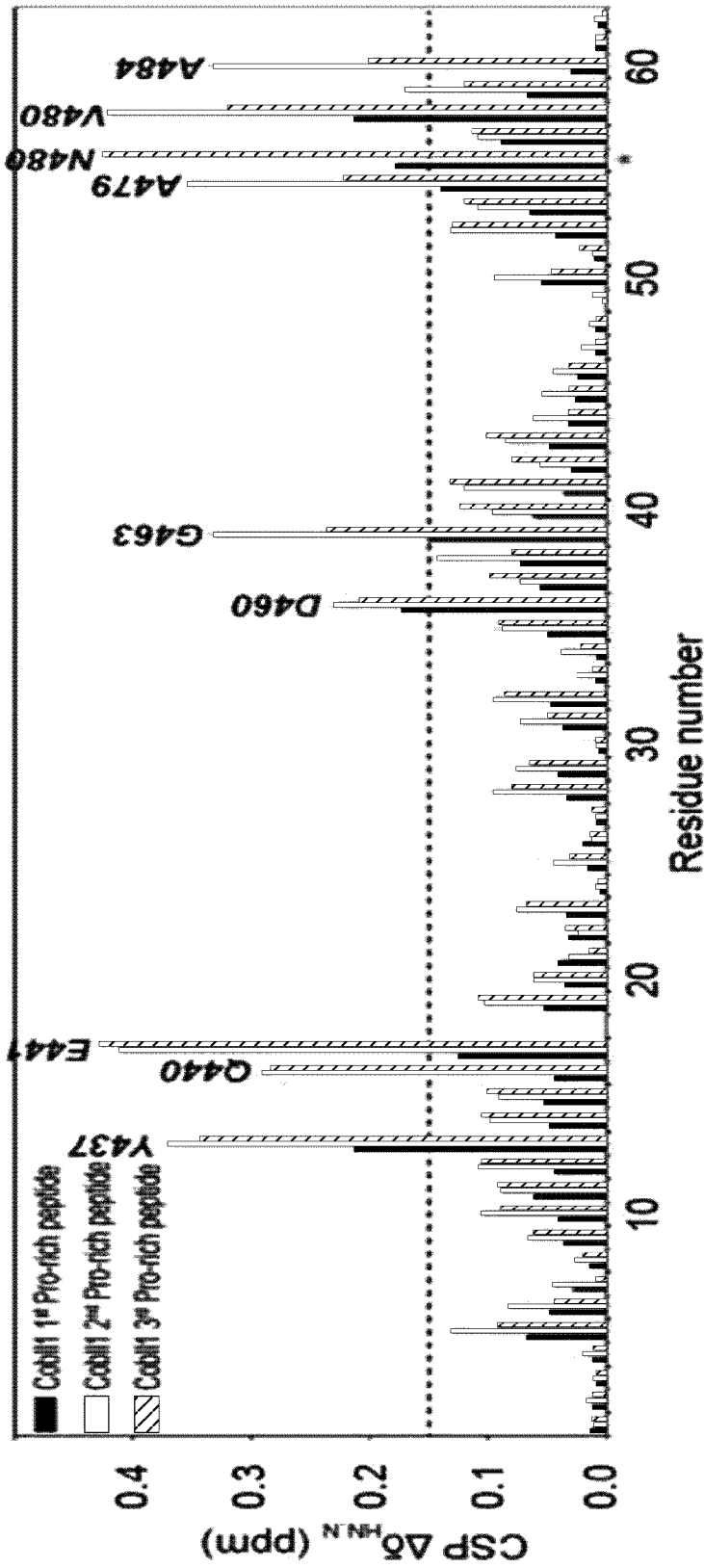
[도23]



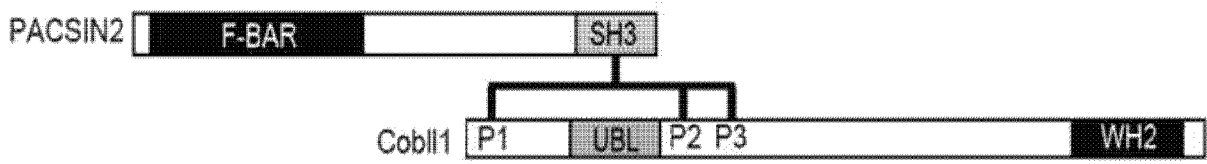
[도24]



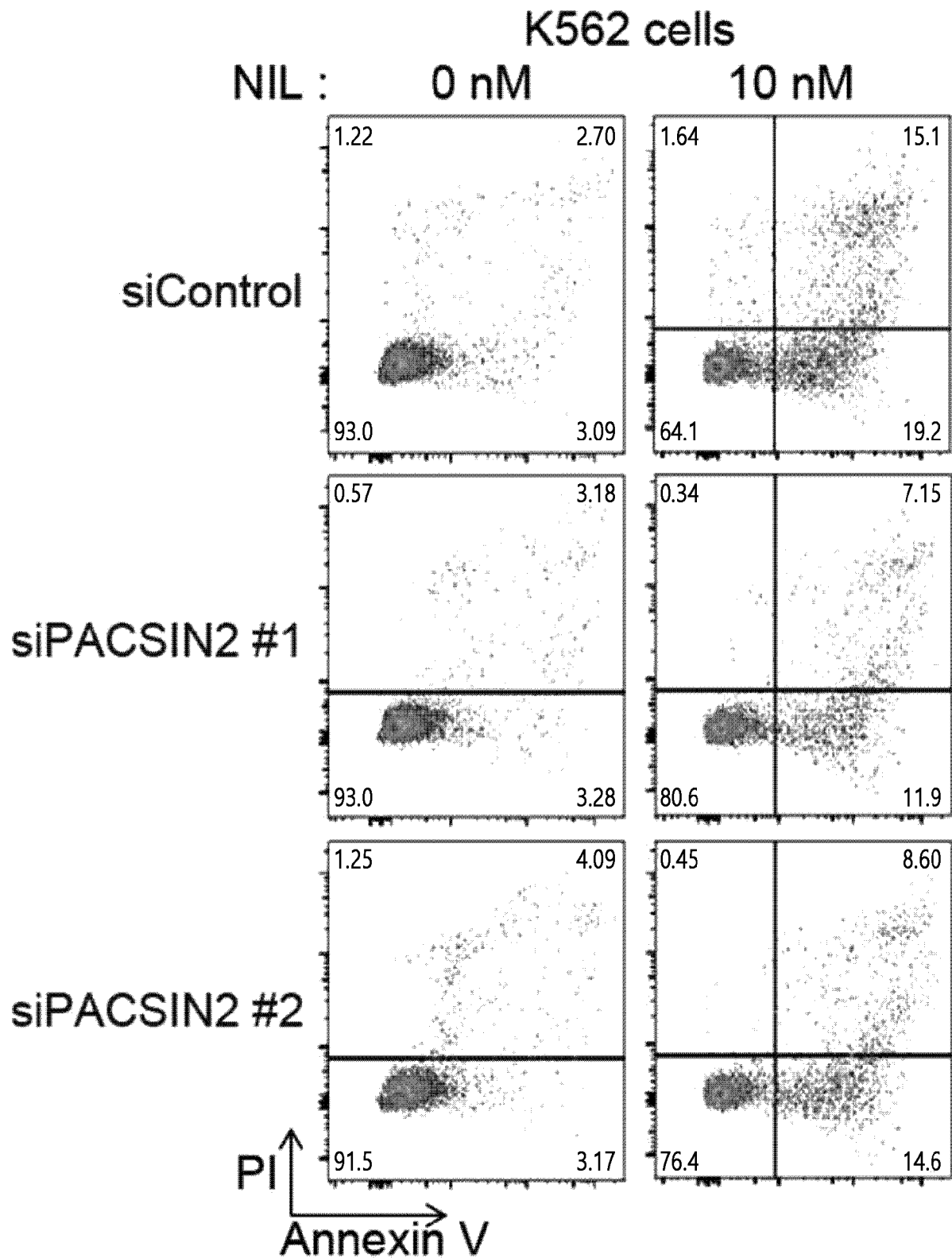
[도25]



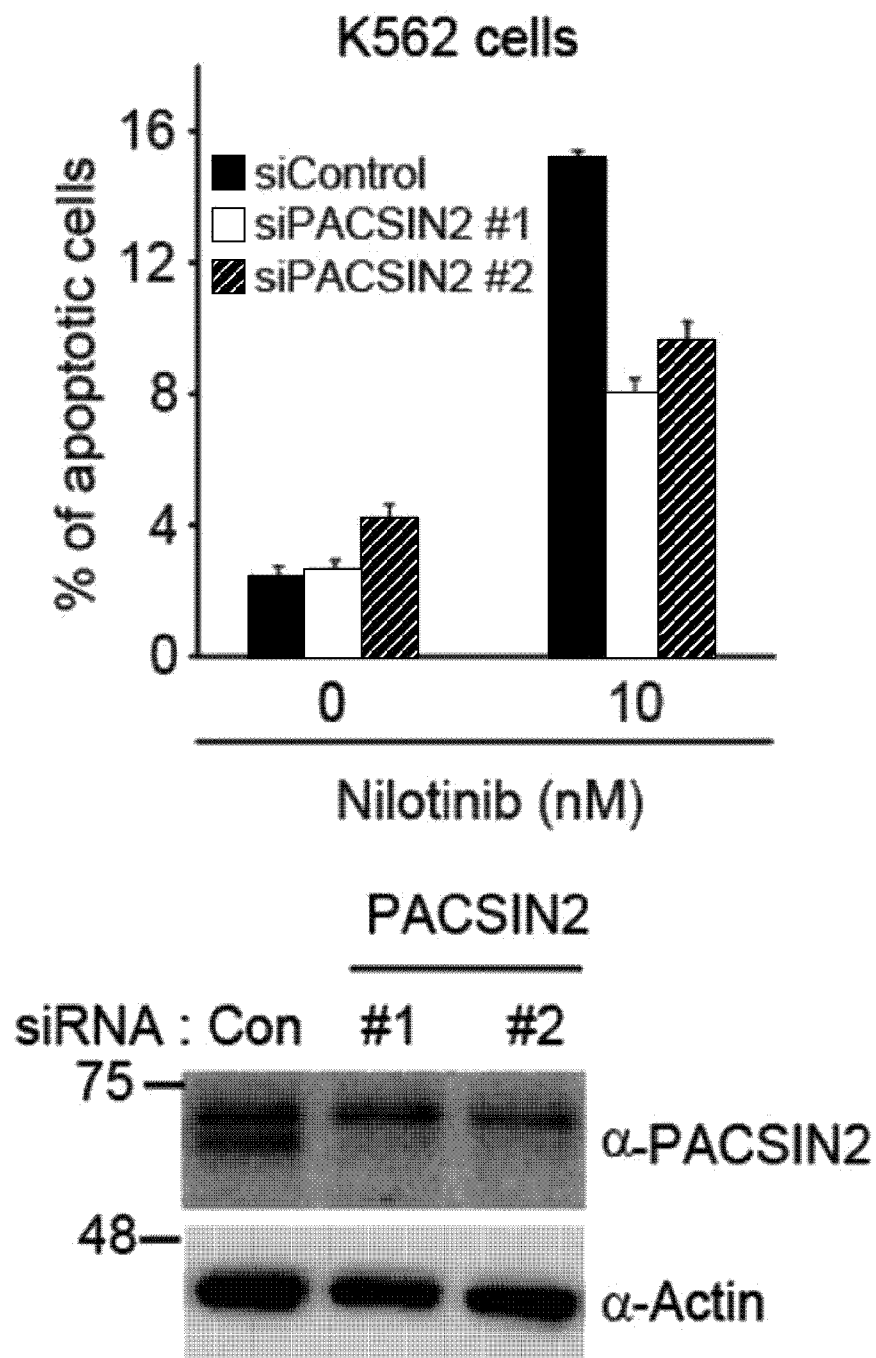
[도26]



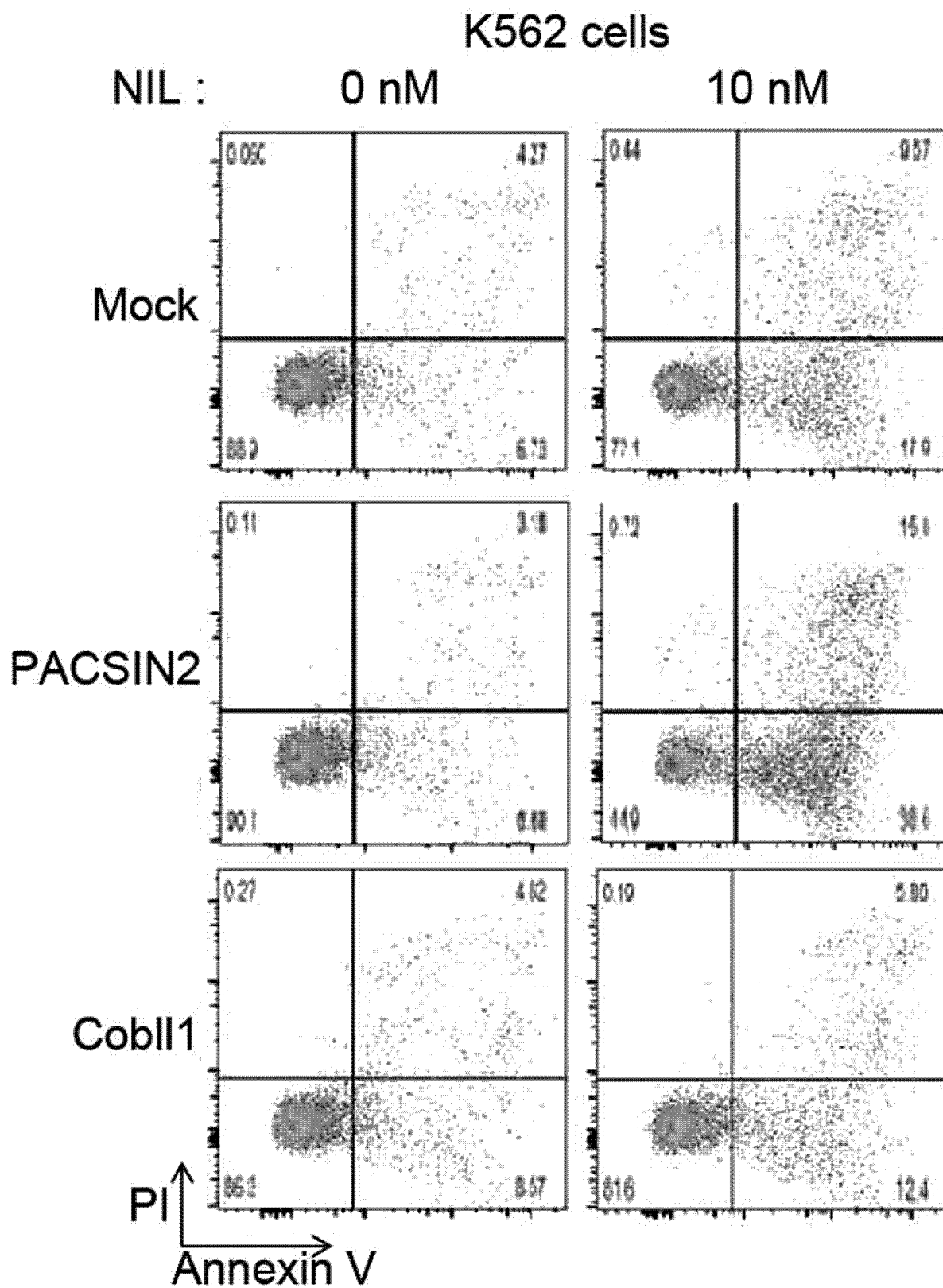
[도27]



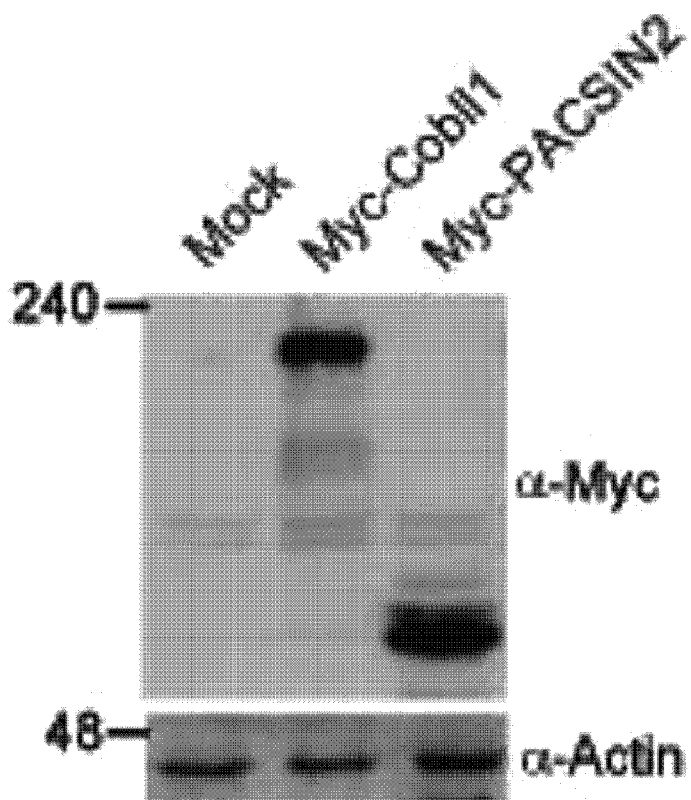
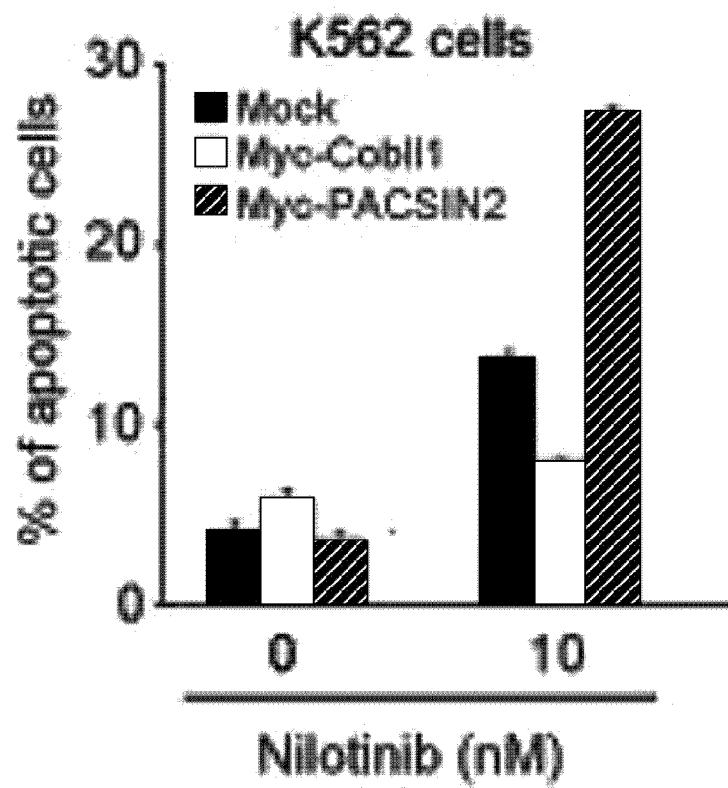
[도28]



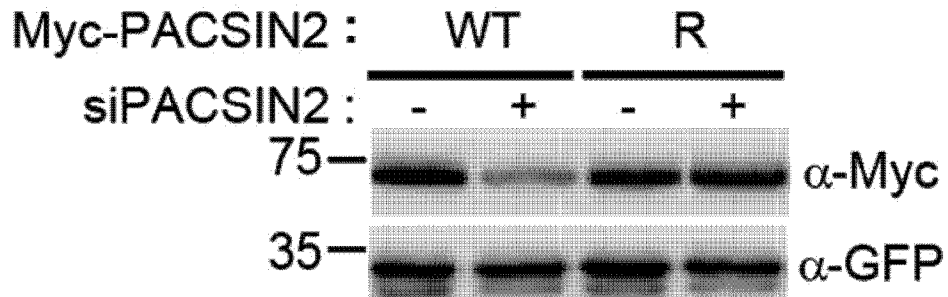
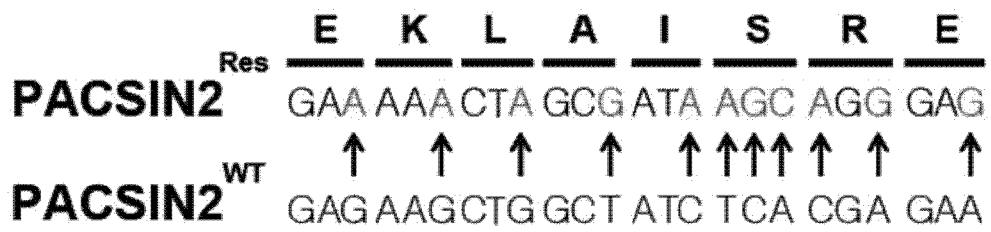
[도29]



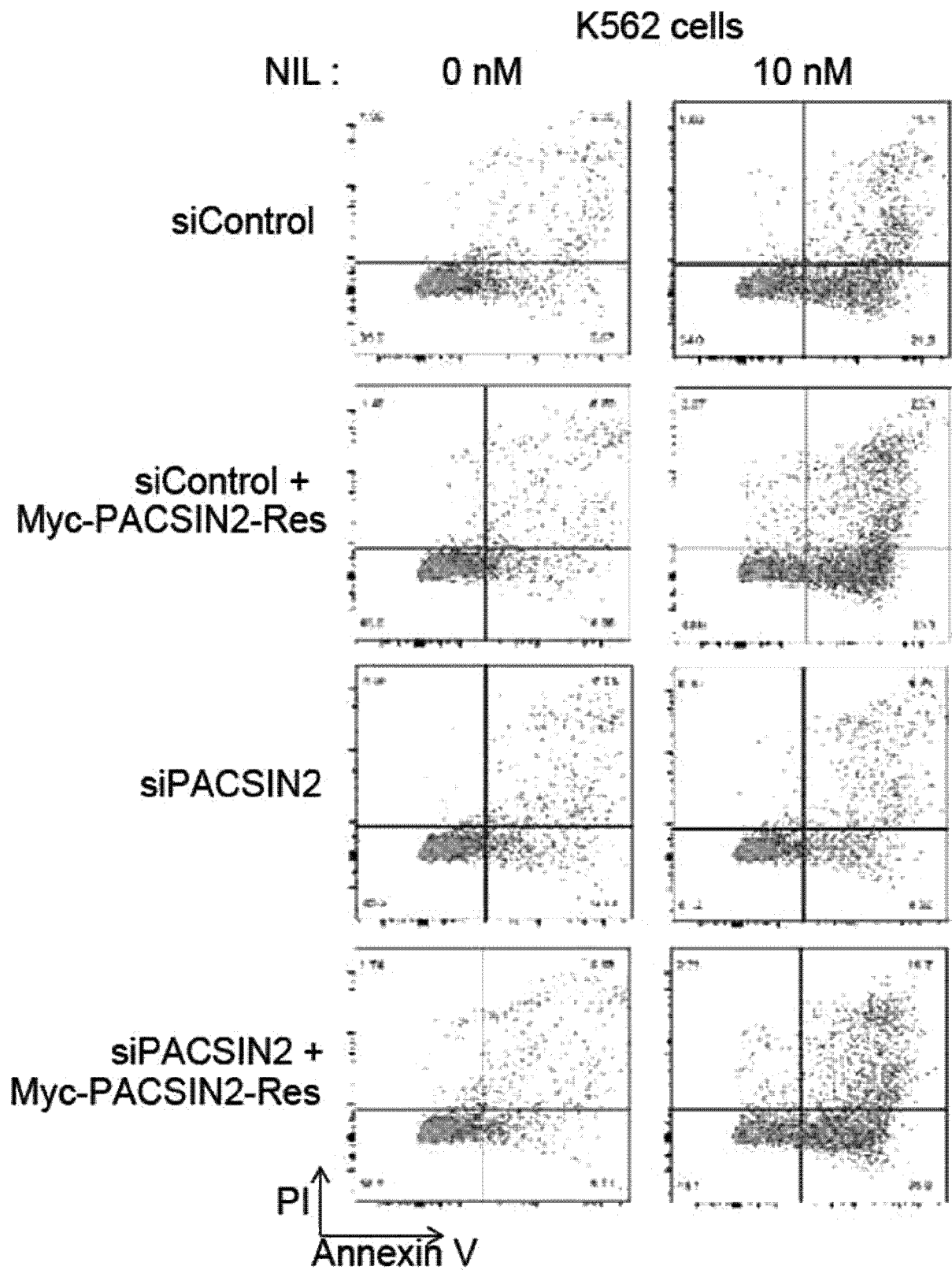
[도30]



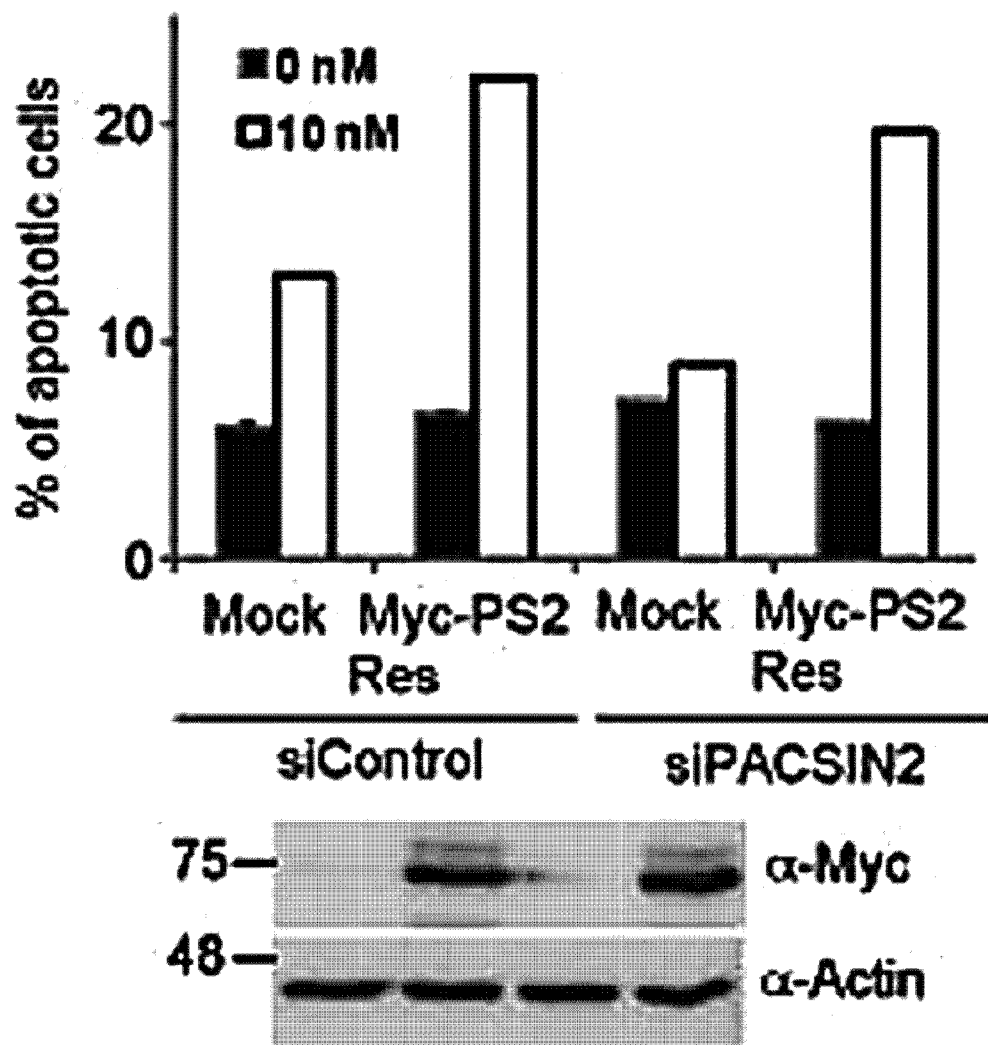
[도31]



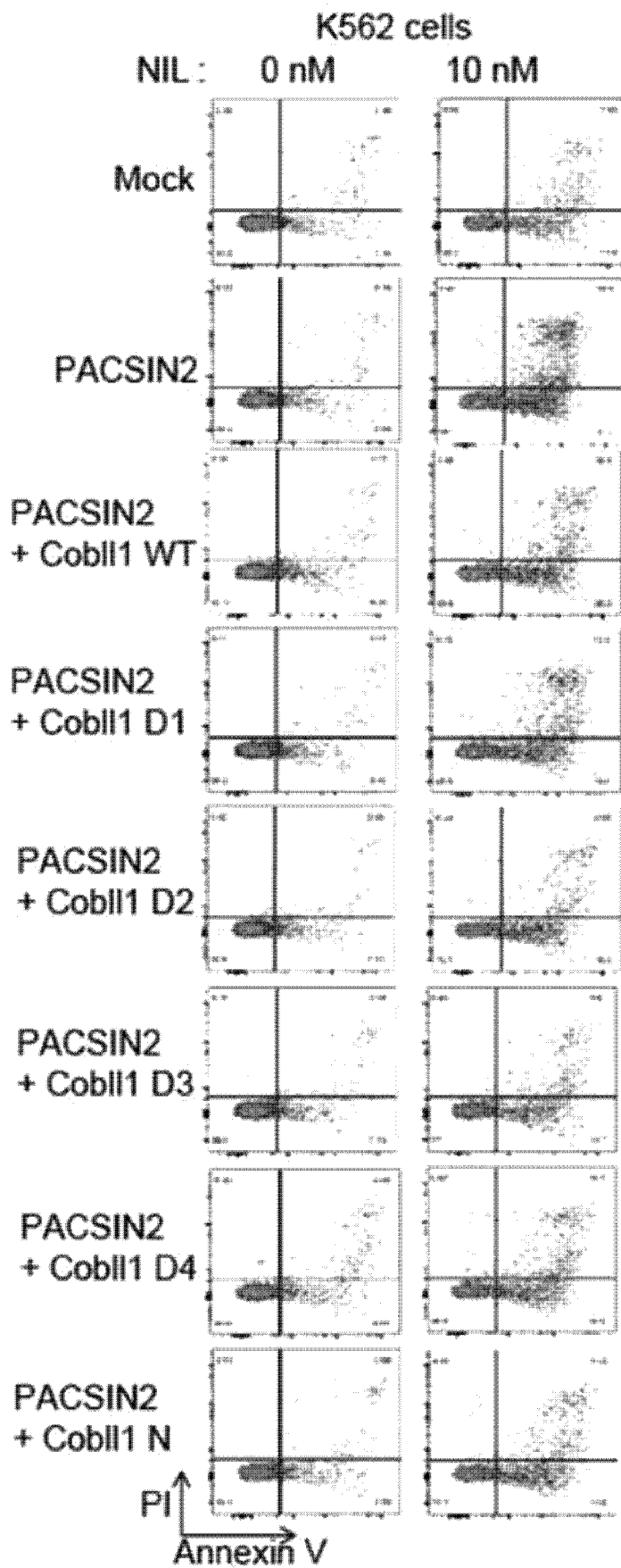
[도32]



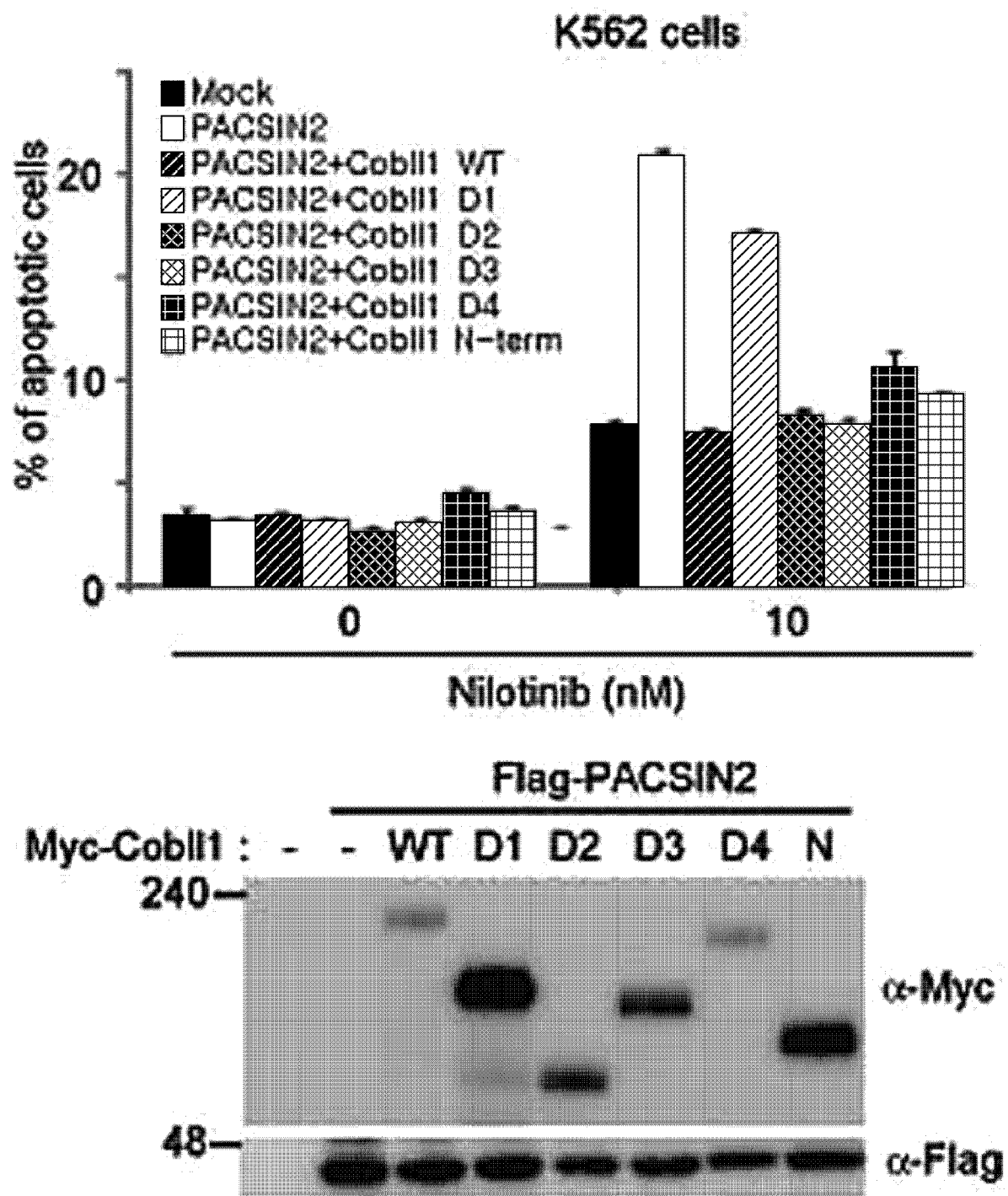
[도33]



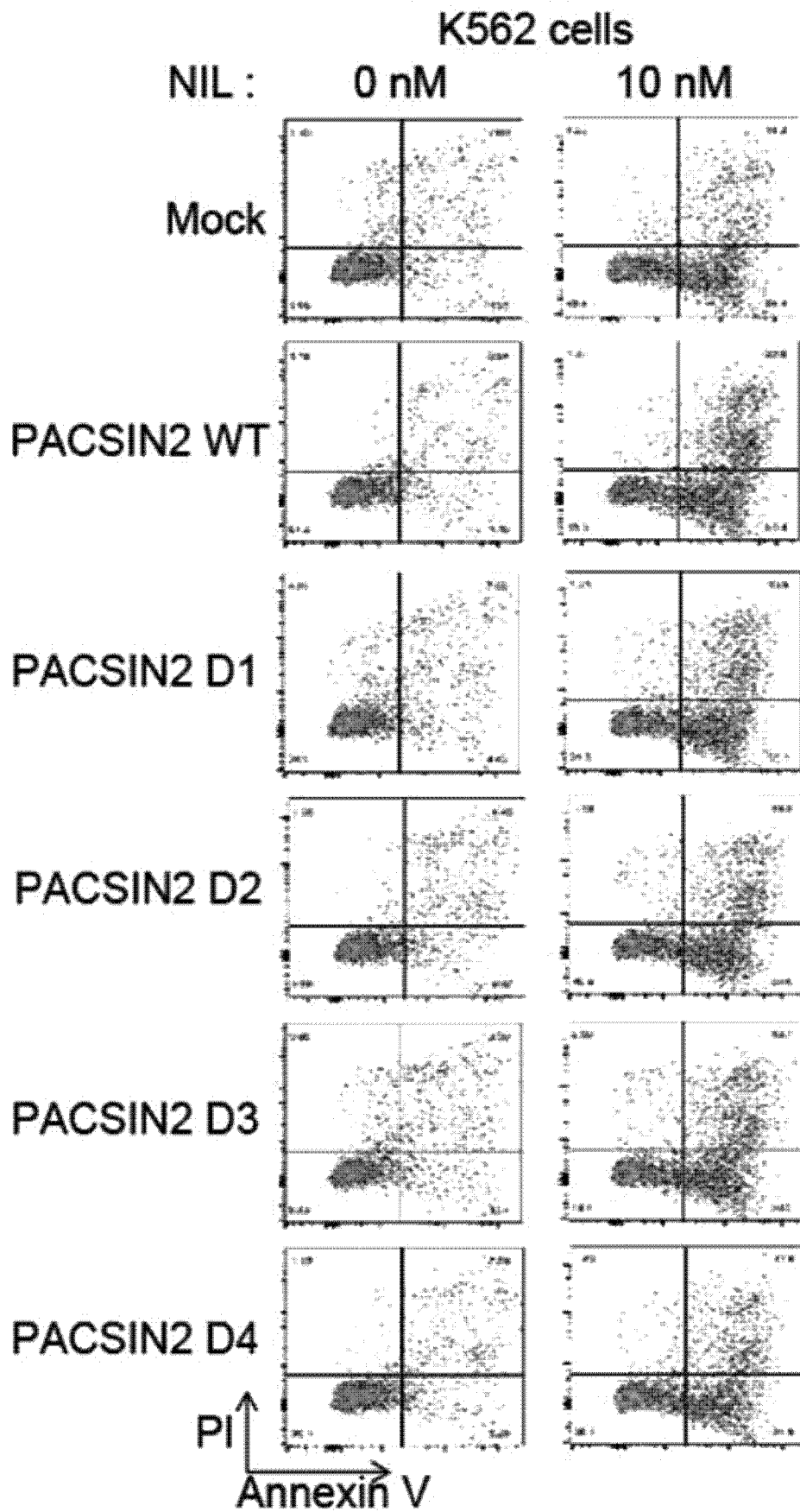
[도34]



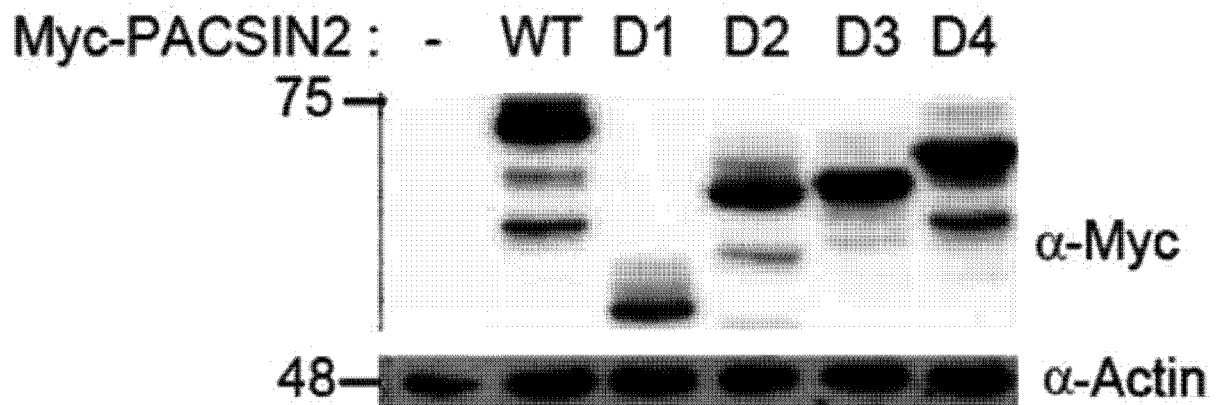
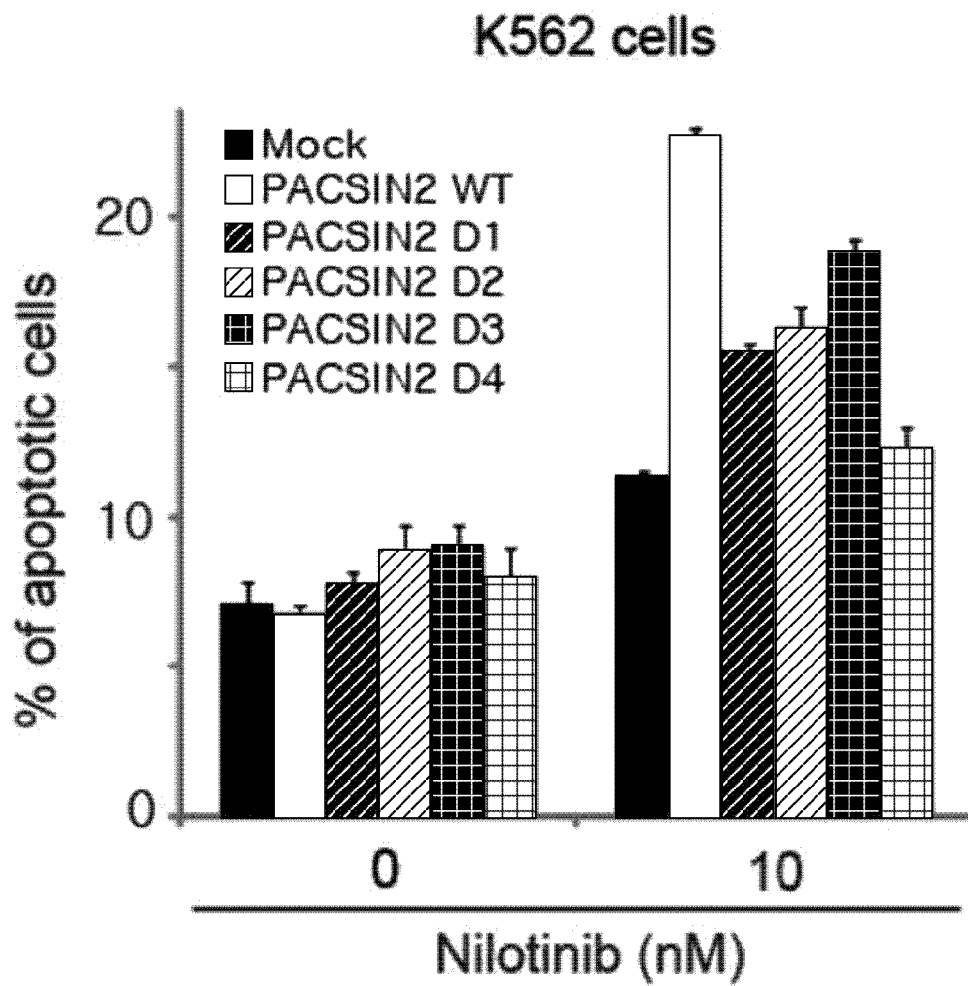
[도35]



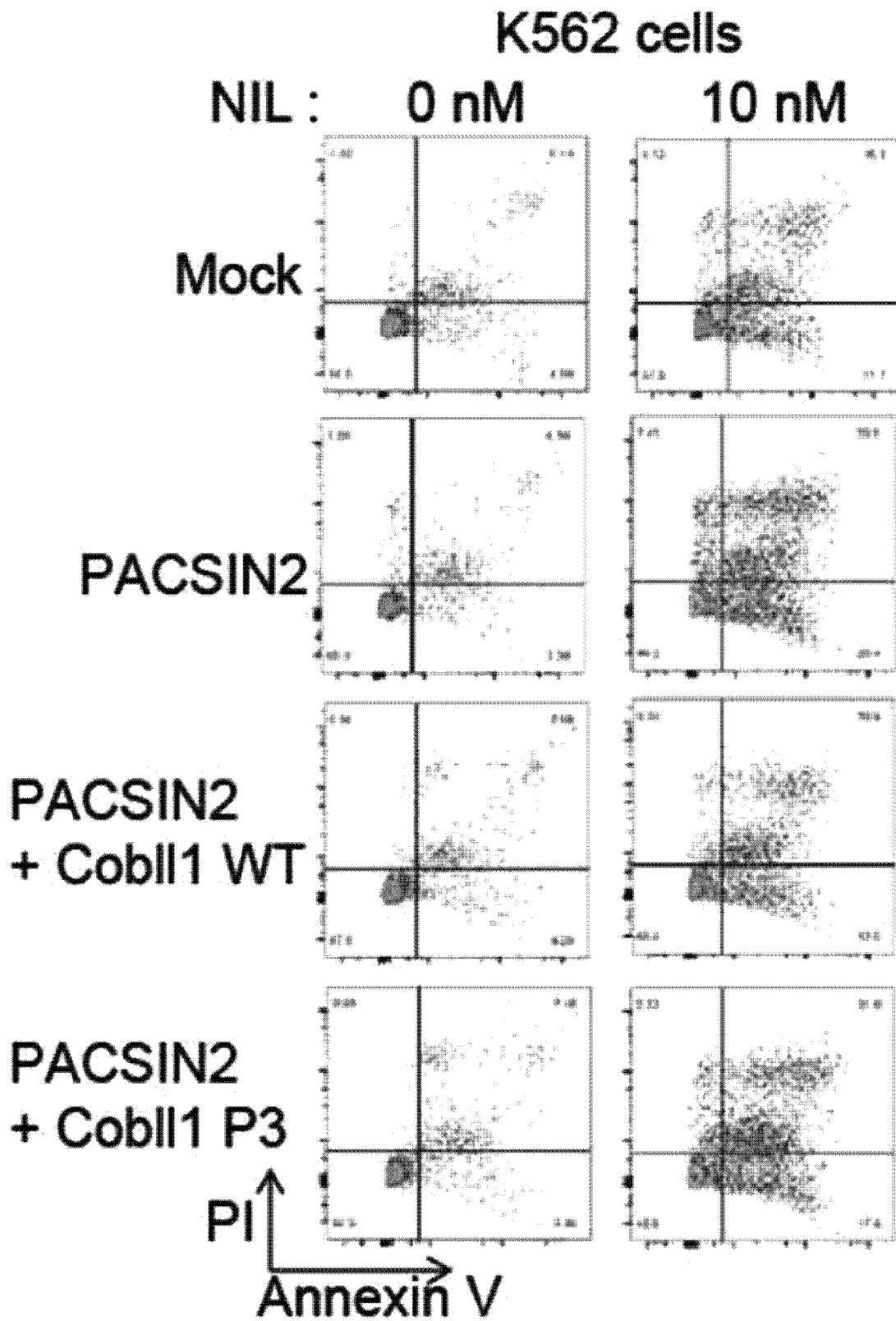
[도36]



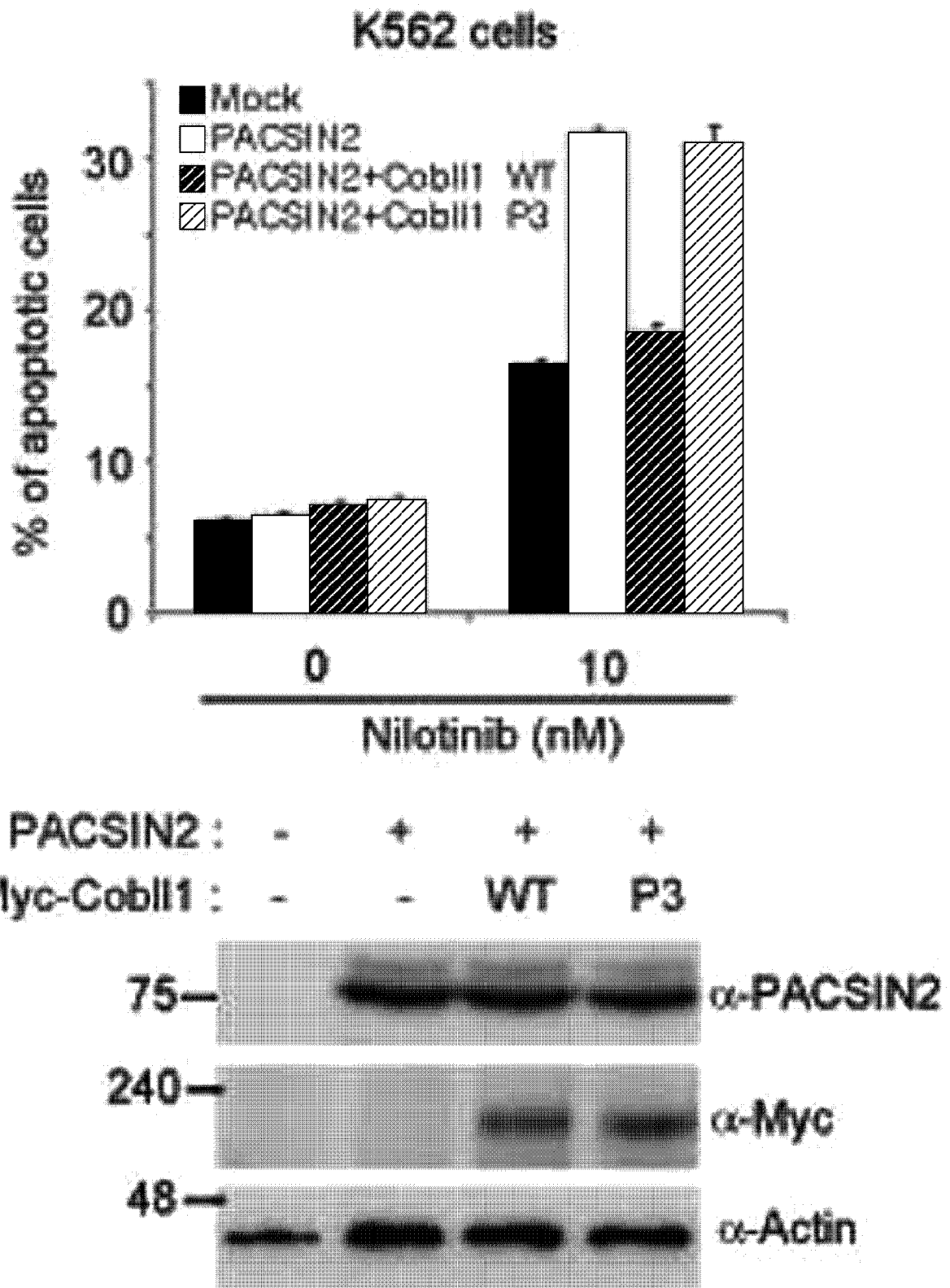
[도37]



[도38]



[도39]



[540]

Tandem affinity purification

- Bait : SFB-PACSN2
- Prey : K562 cell lysates

6 binding candidate genes

[541]

PACSIN2 purification

Protein	# of Peptides	Coverage (%)
PACSIN2	16	39
SH3BP1	3	5.4
ARHGAP17	3	5.9
TCOF1	3	2.4
DNM2	2	2.8
WIPF2	2	5.9
Cobll1	2	2.2

[도42]

SFB-PACSIN2 :

WT

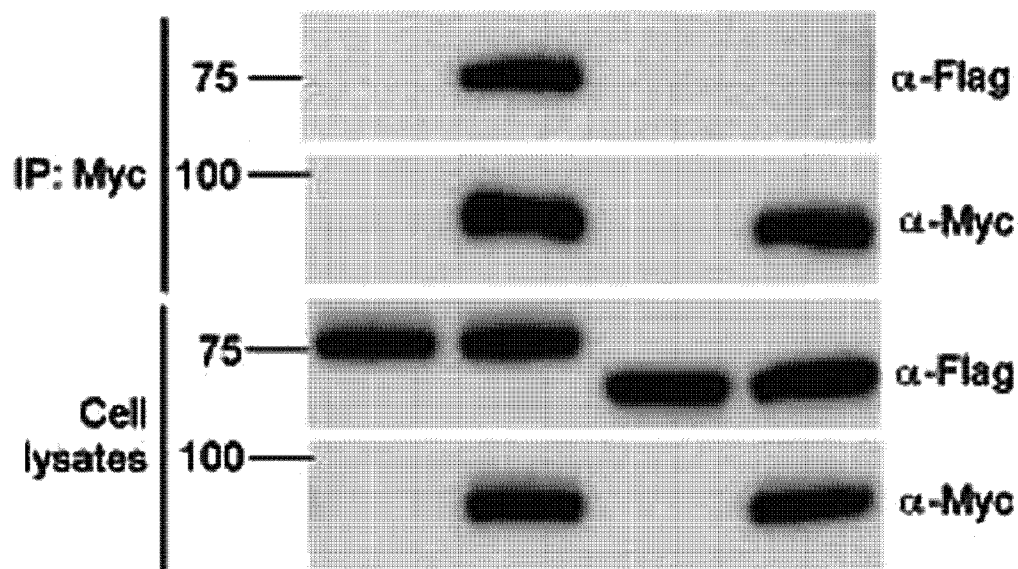
D4

Myc-SH3BP1 :

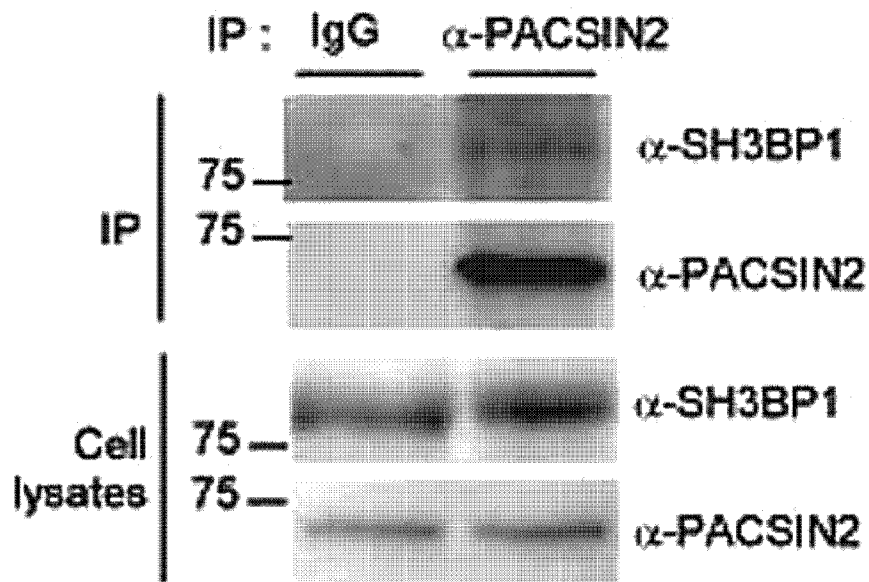
—

+

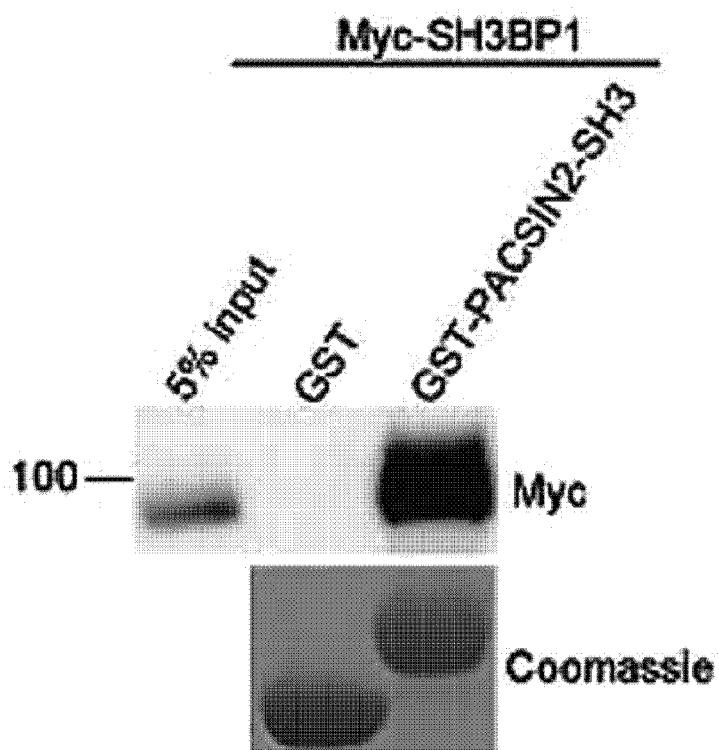
→

 $+$ 

[도43]



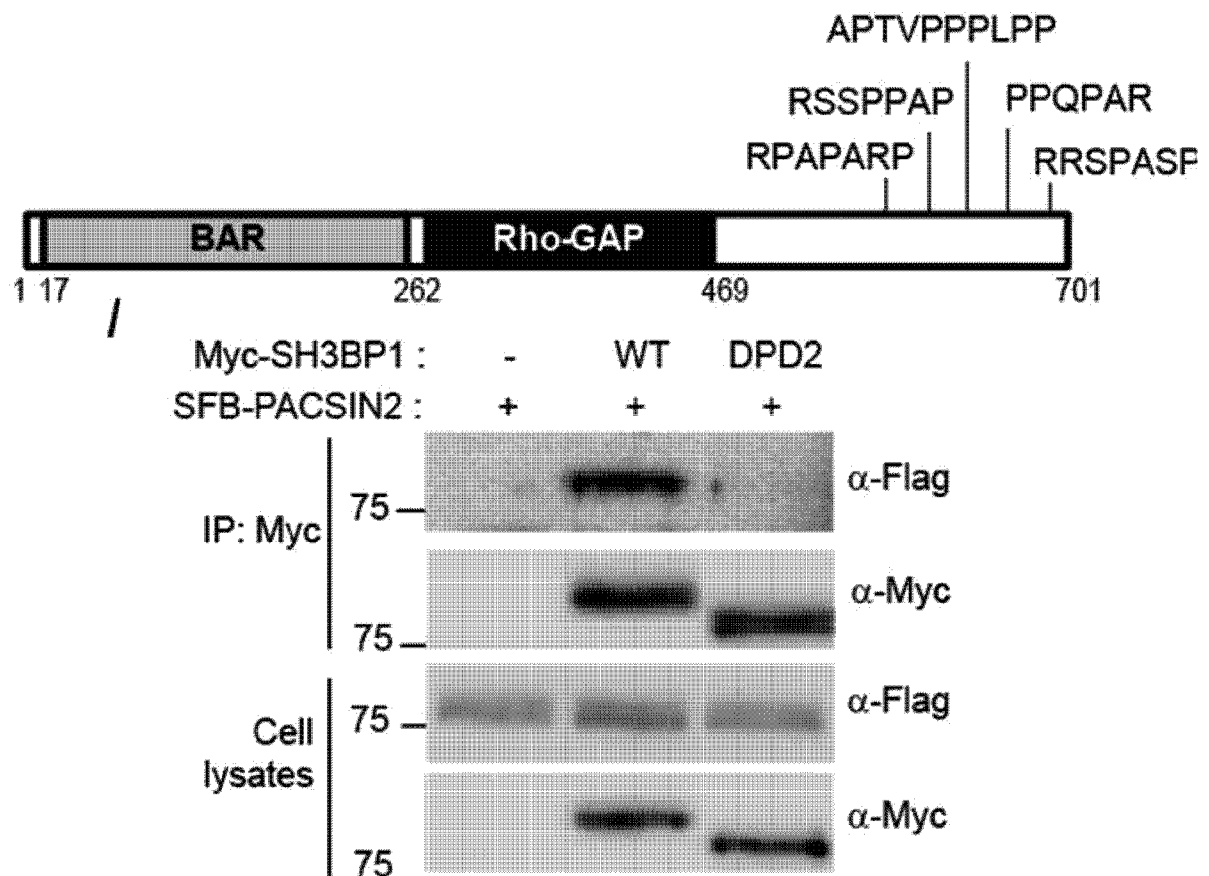
[도44]



[도45]

Search Tools	Residue	Sequence	Probability
MoDPepInt, ELM resource	567-573	RPAPARP	high
ELM resource	584-590	RSSPPAP	high
BLAST	616-625	APTVPPPLPP	high
ELM resource	636-642	RRSPASP	high
ELM resource	627-632	PPQPAR	high

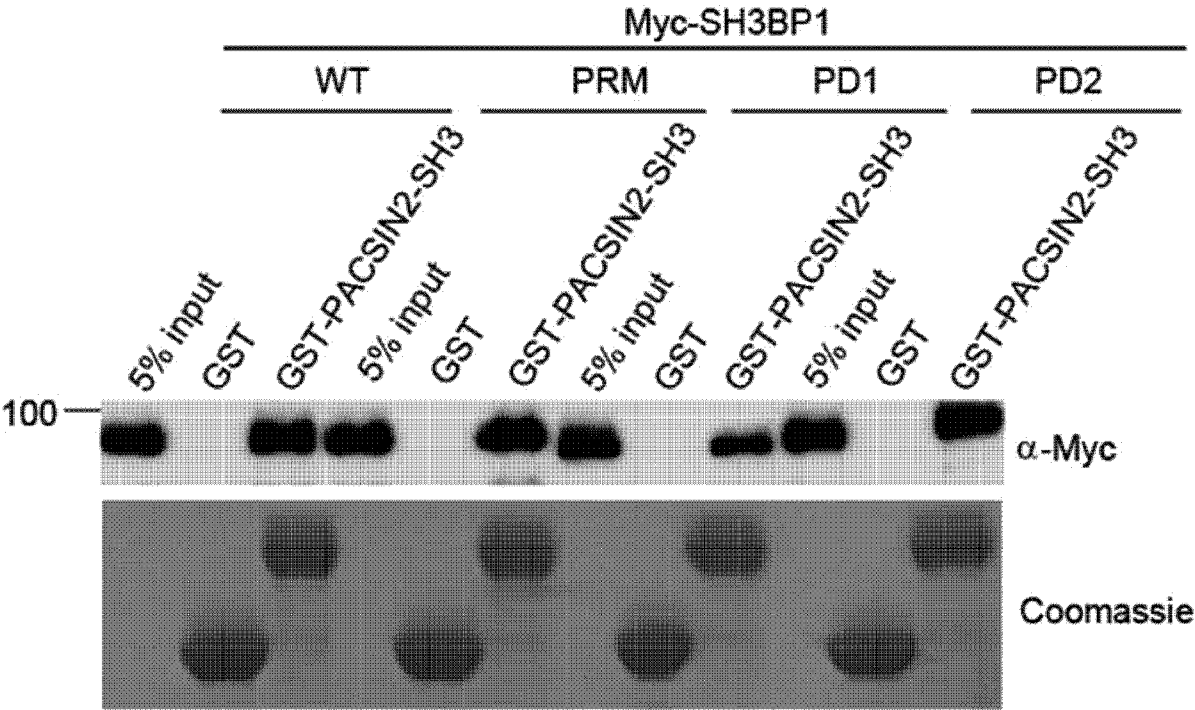
[도46]



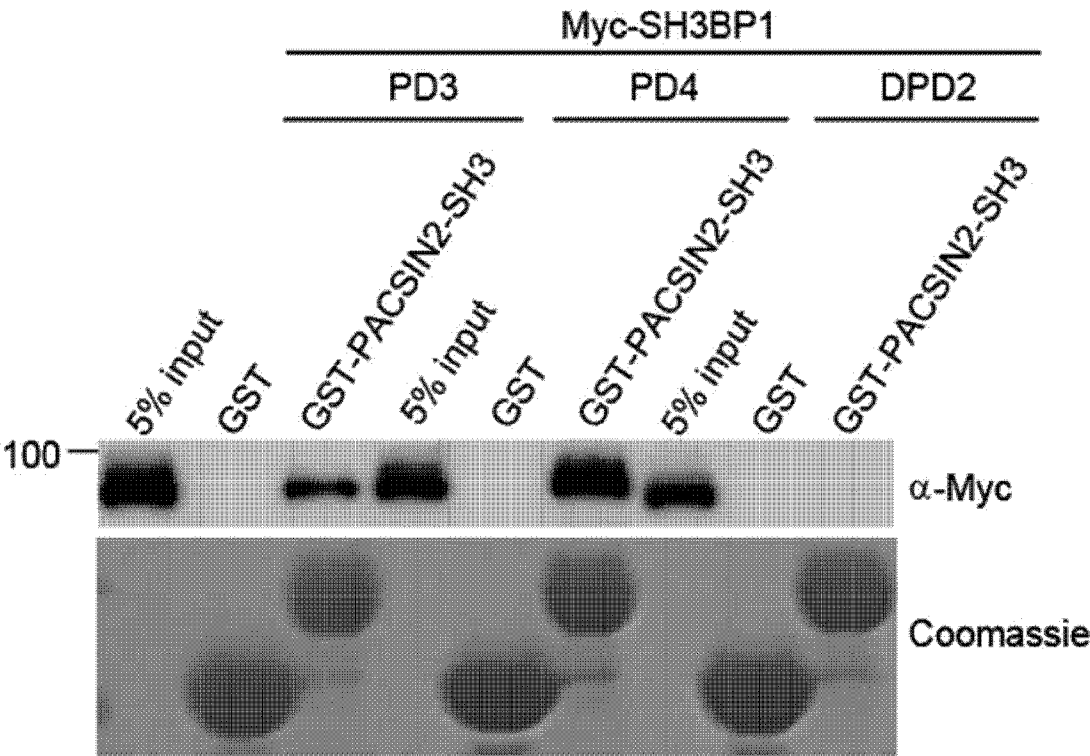
[도47]

Name of clone	Mutation(s)
SH3BP1-PRM	P620A, P621A, P622A, P624A
SH3BP1-PD1	Deletion of 567-590 a.a
SH3BP1-PD2	Deletion of 627-642 a.a
SH3BP1-PD3	Deletion of 567-590 a.a & P620A, P621A, P622A, P624A
SH3BP1-PD4	Deletion of 627-642 a.a & P620A, P621A, P622A, P624A
SH3BP1-DPD2	Deletion of 567-590 a.a, 627-642 a.a & P620A, P621A, P622A, P624A

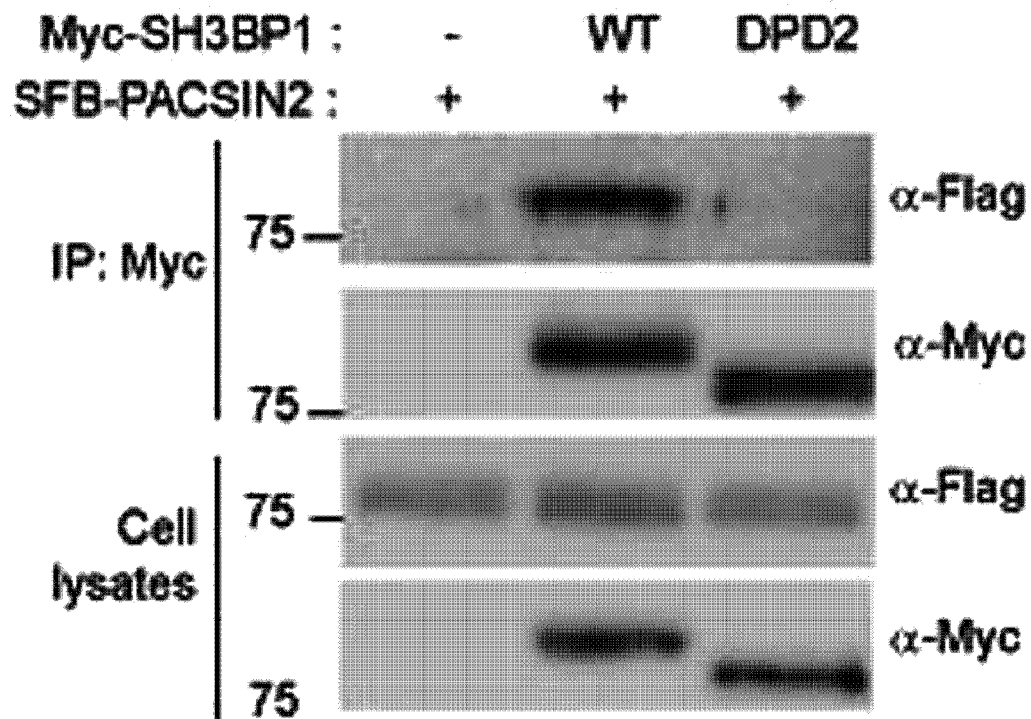
[도48]



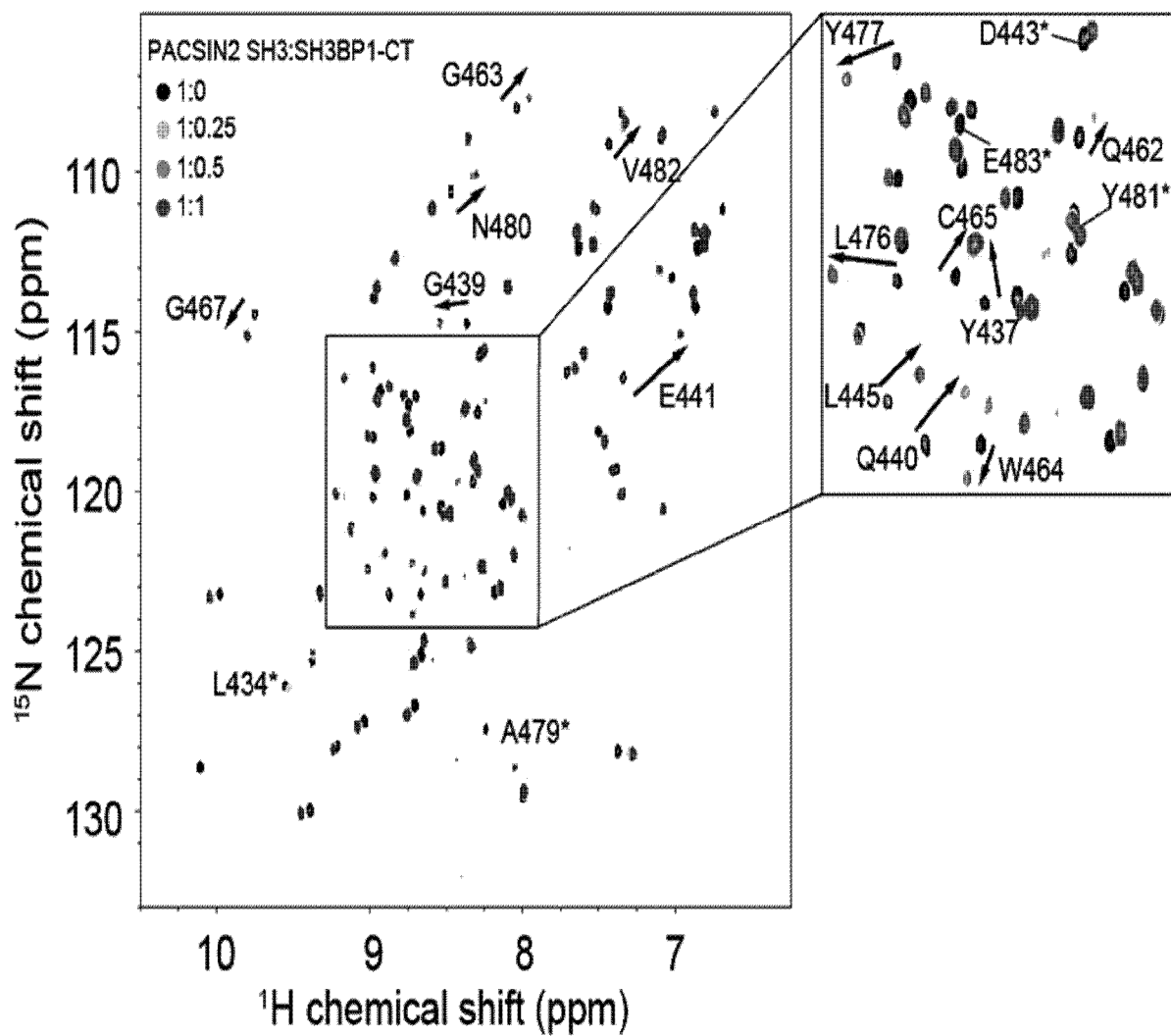
[도49]



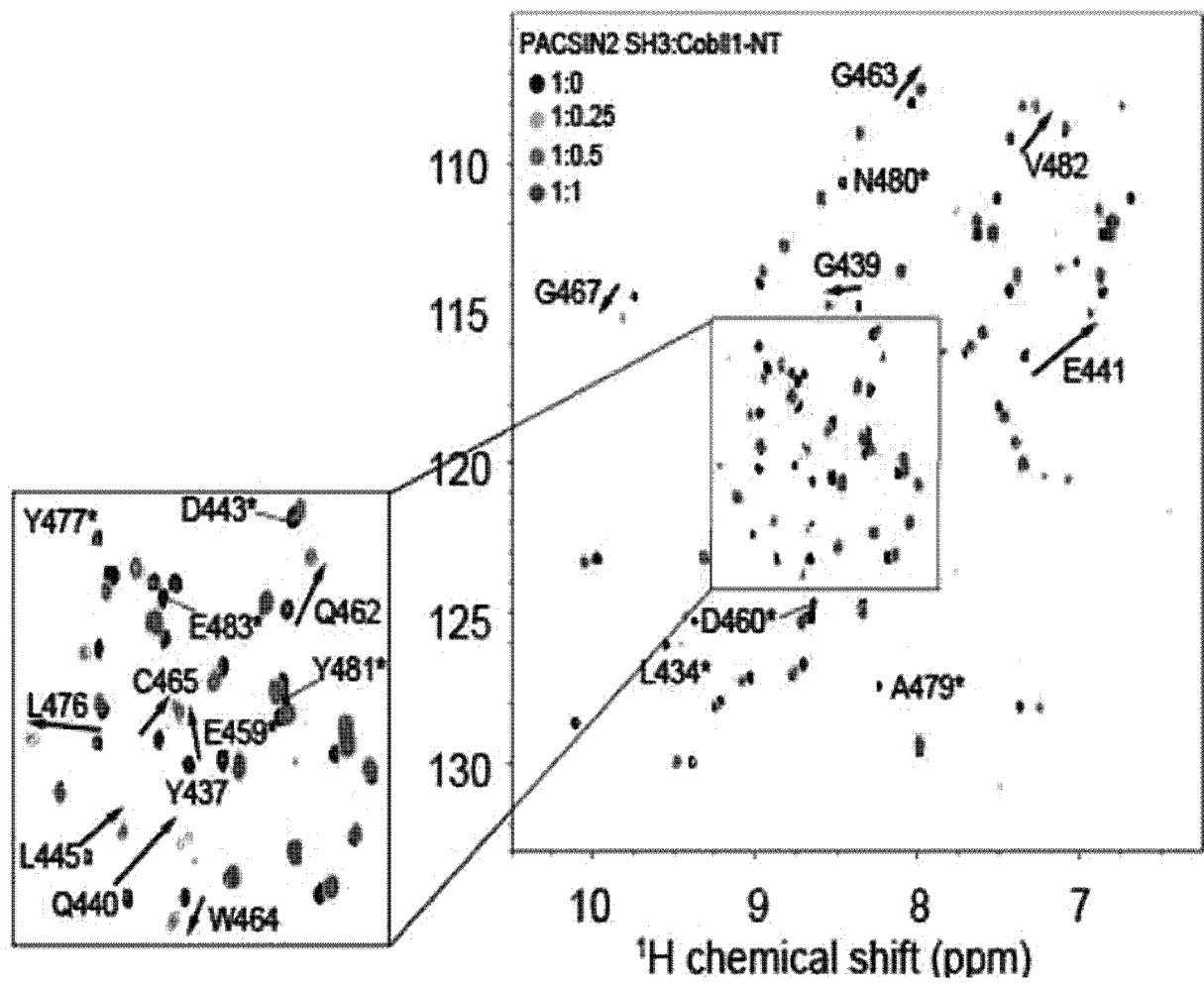
[도50]



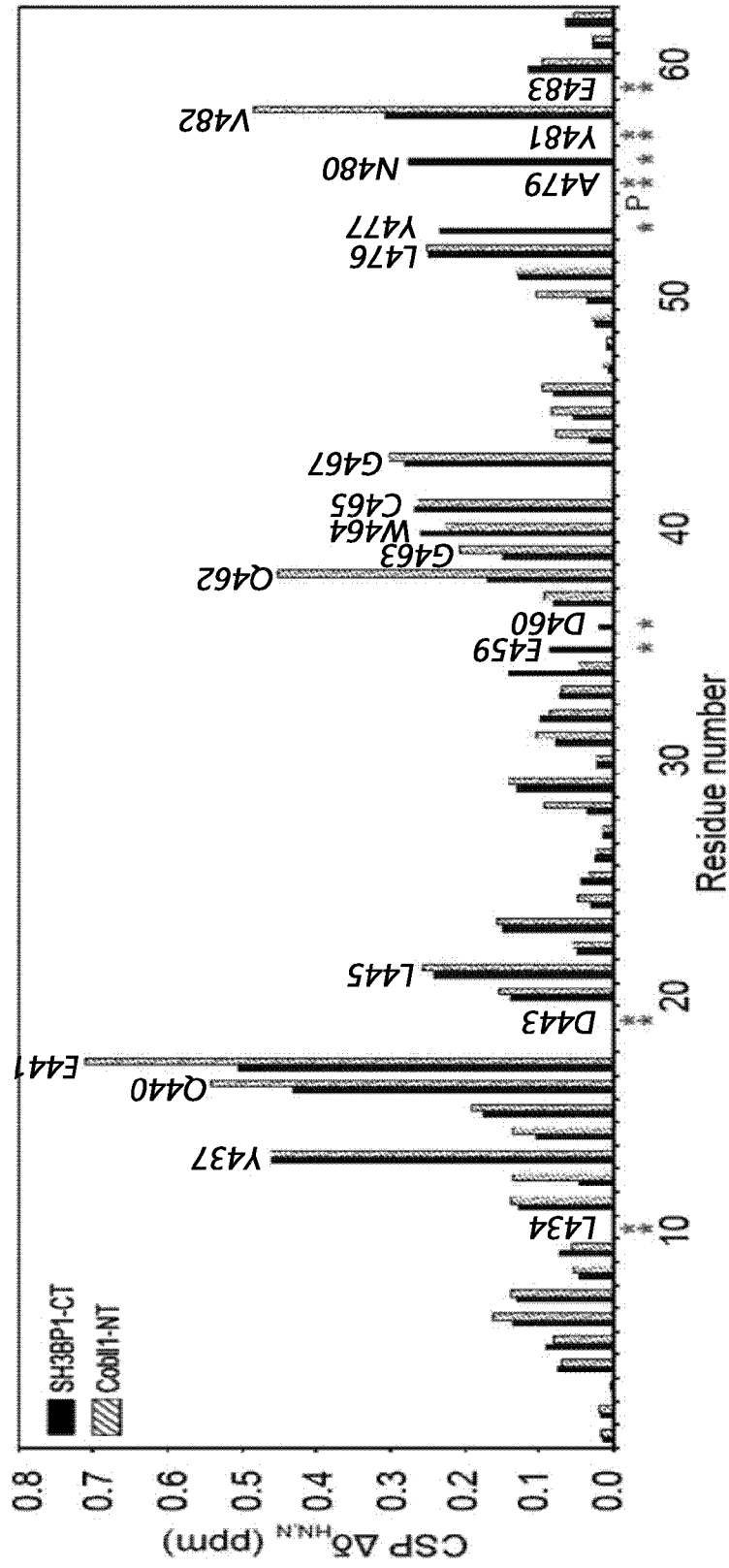
[도51]



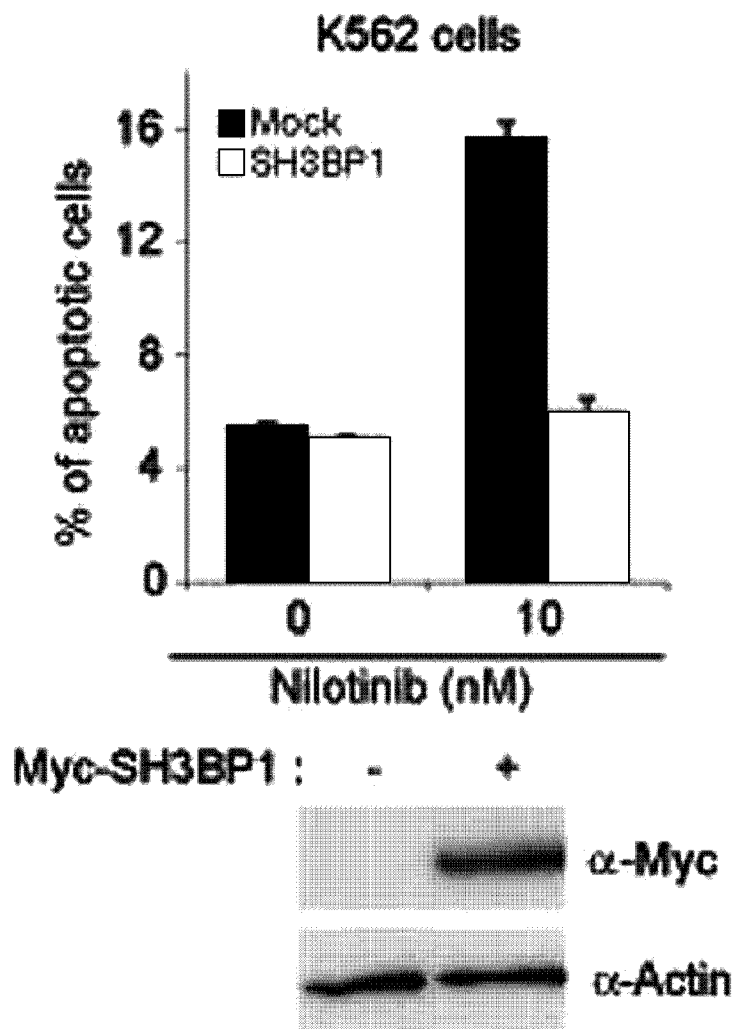
[도52]



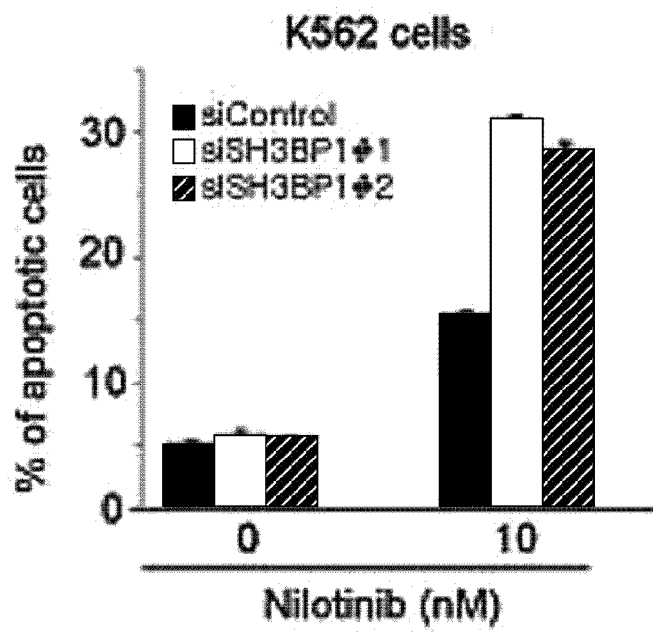
[53]



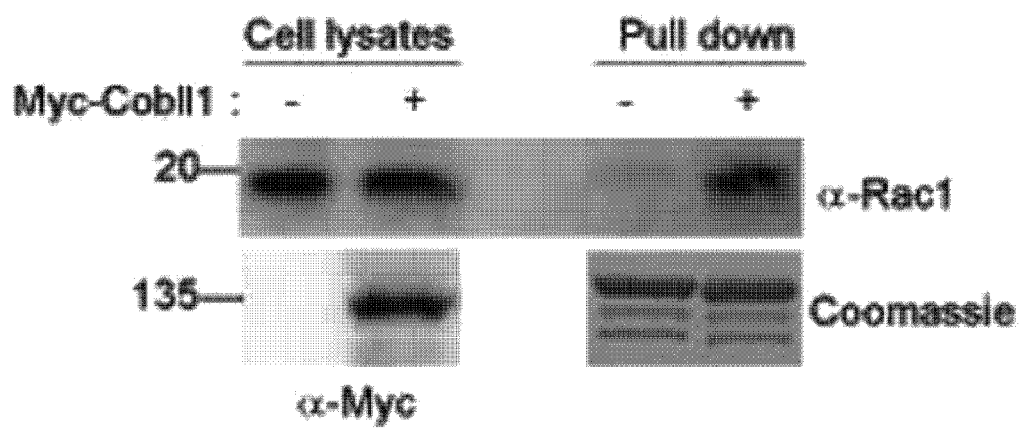
[도54]



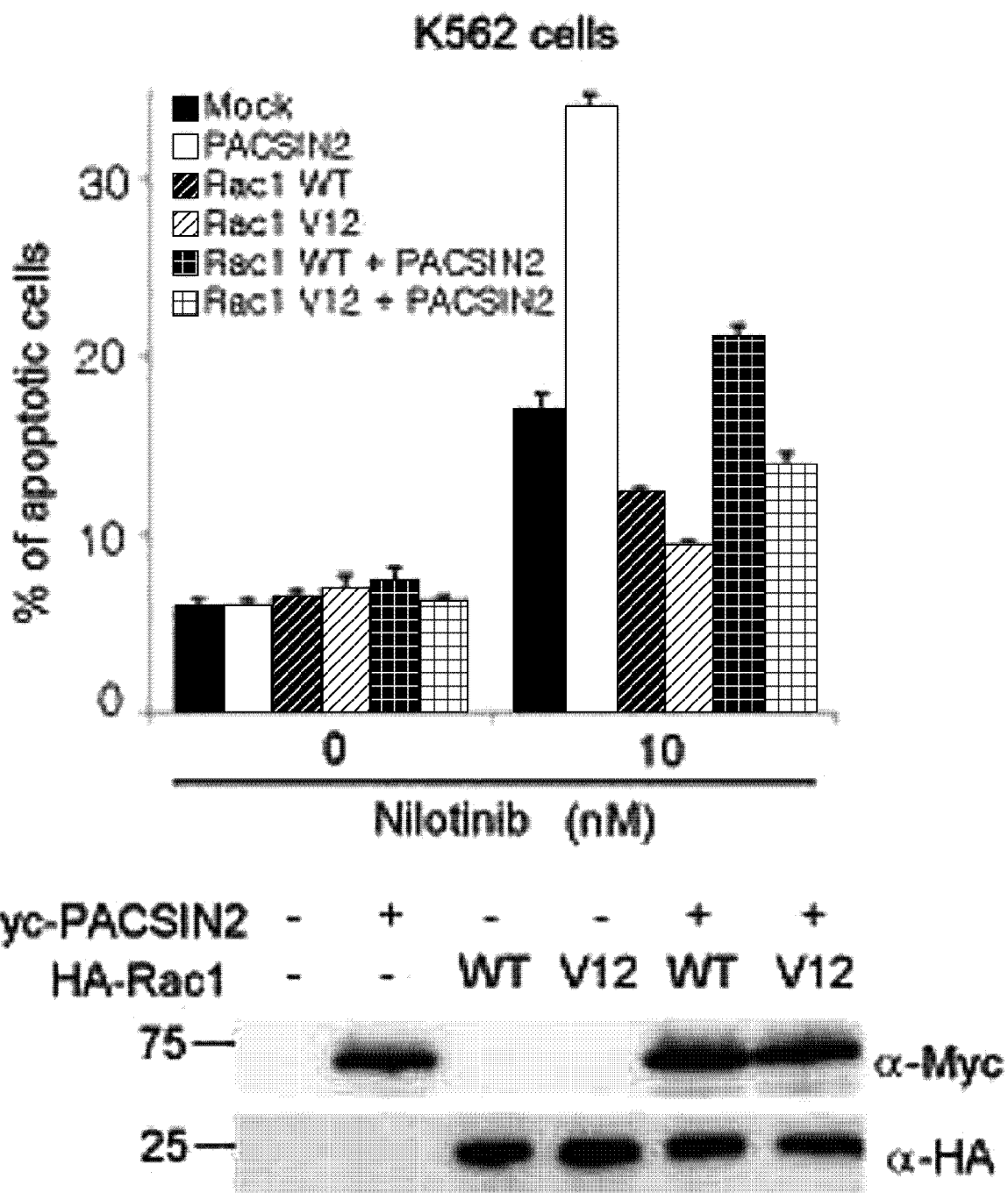
[도55]



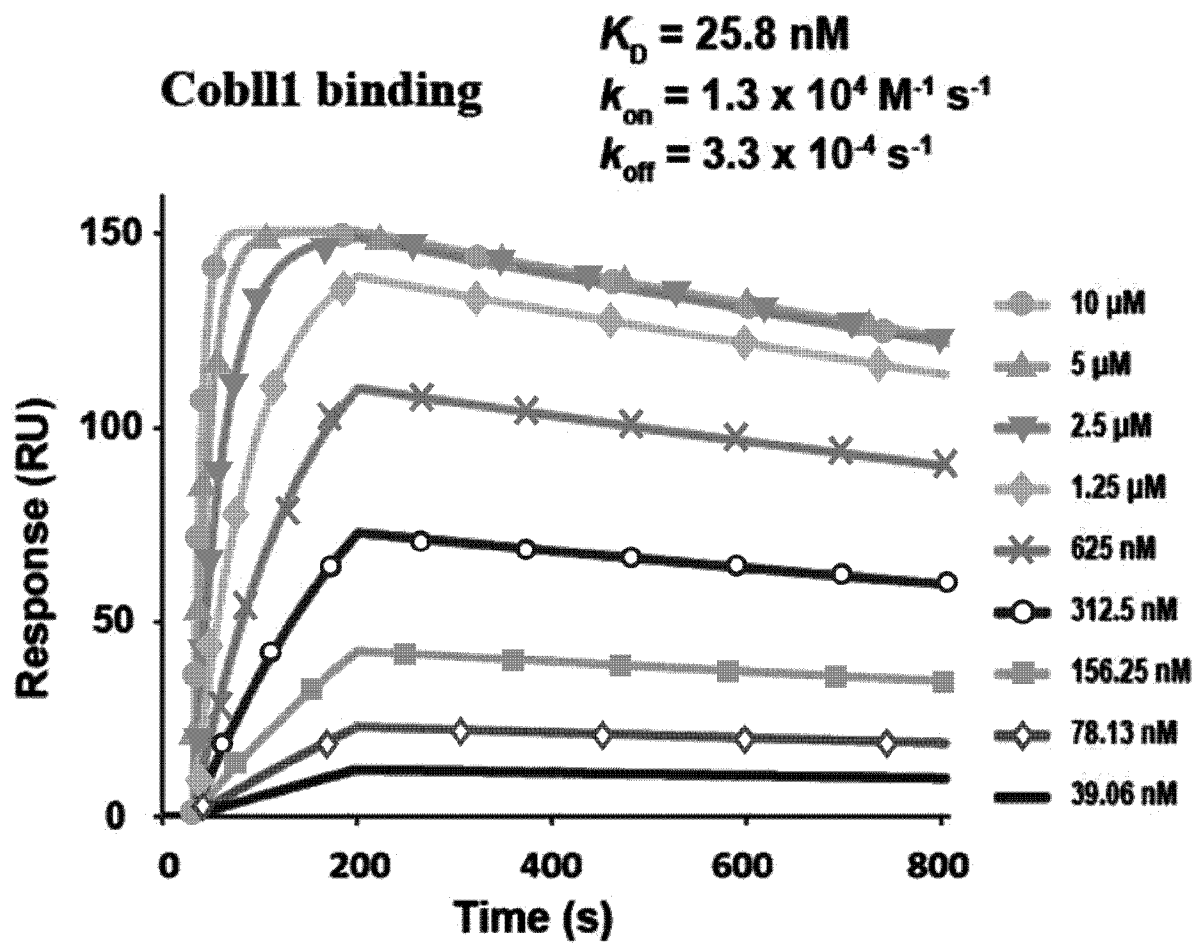
[도56]



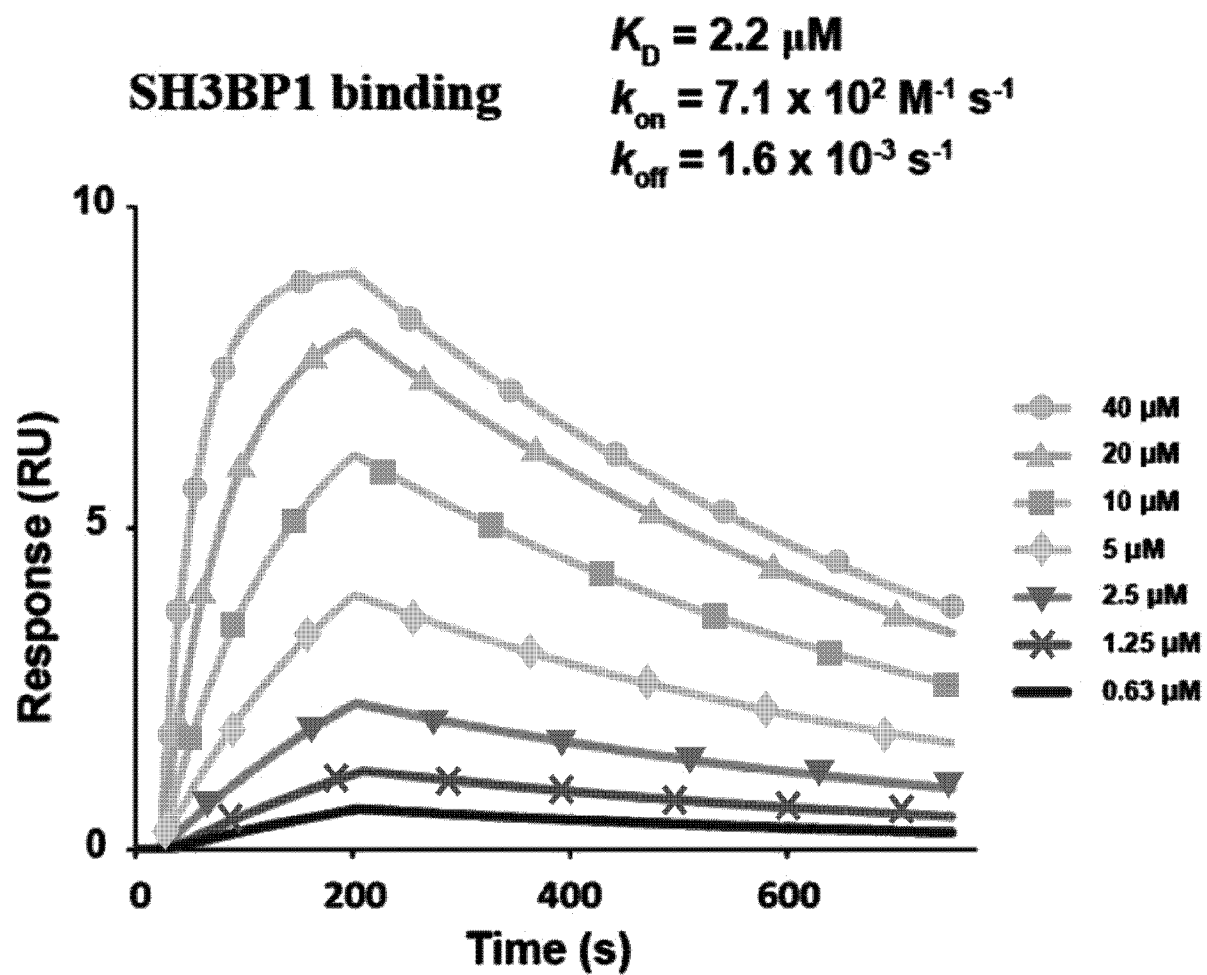
[도57]



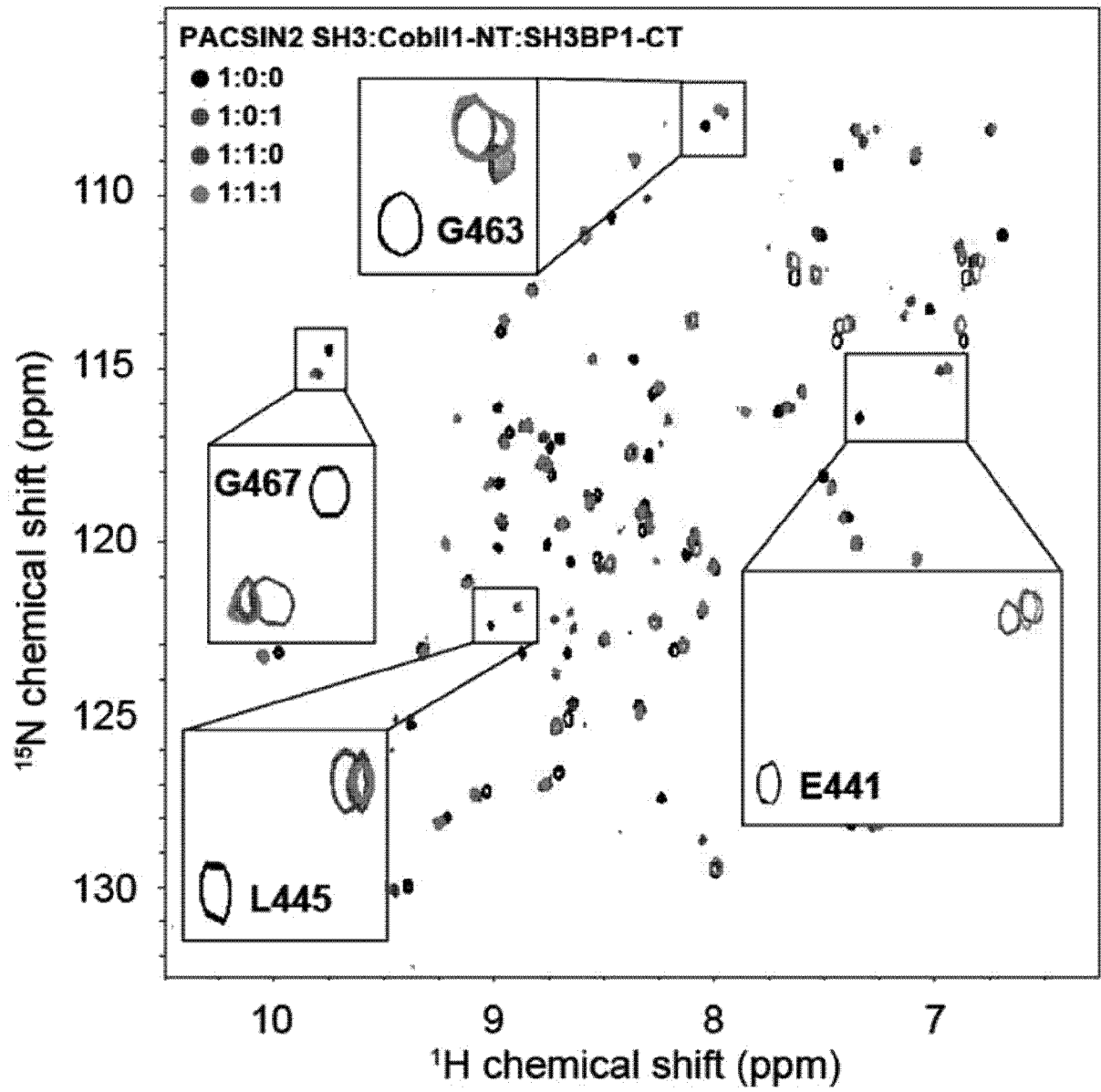
[도58]



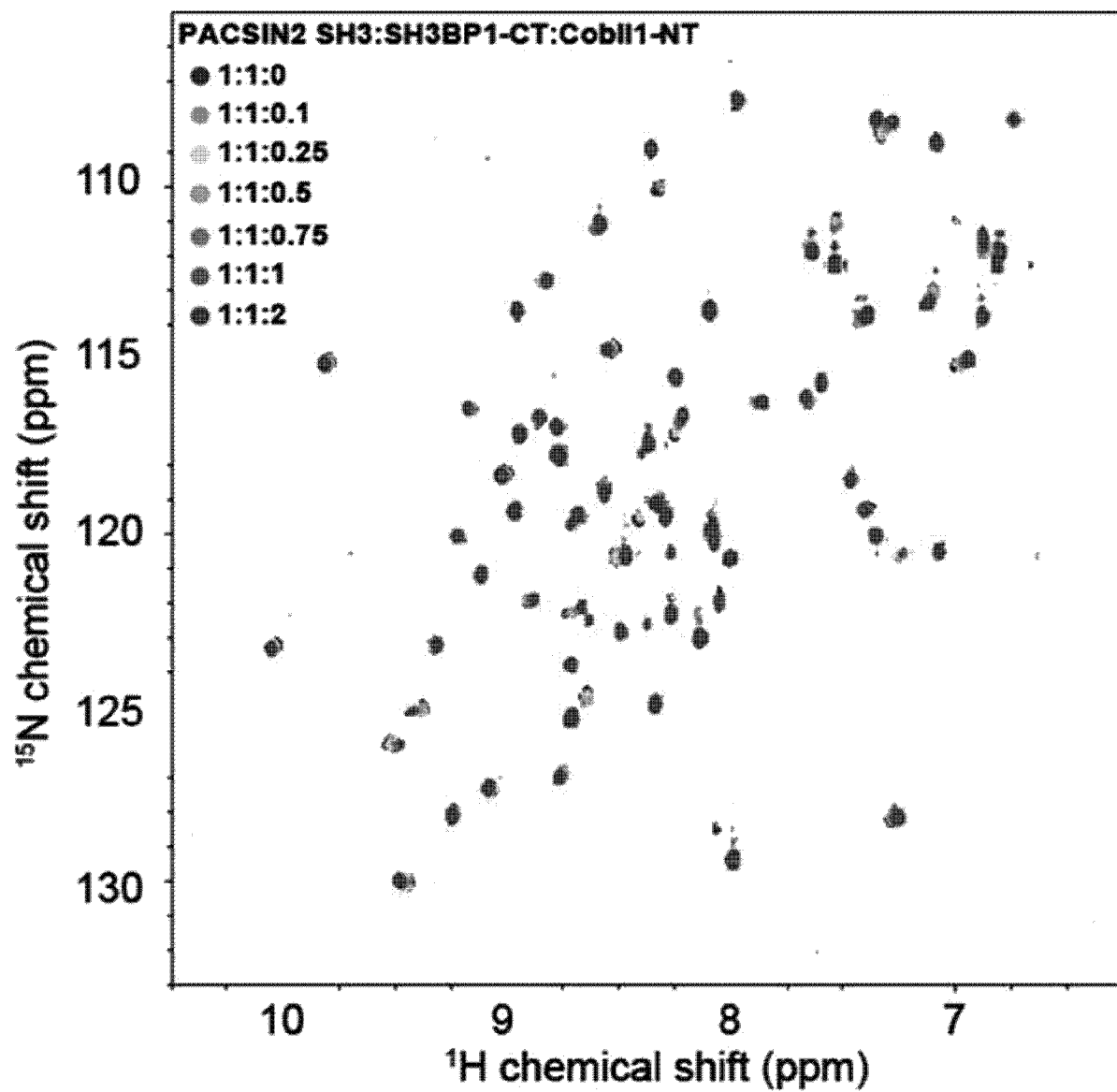
[도59]



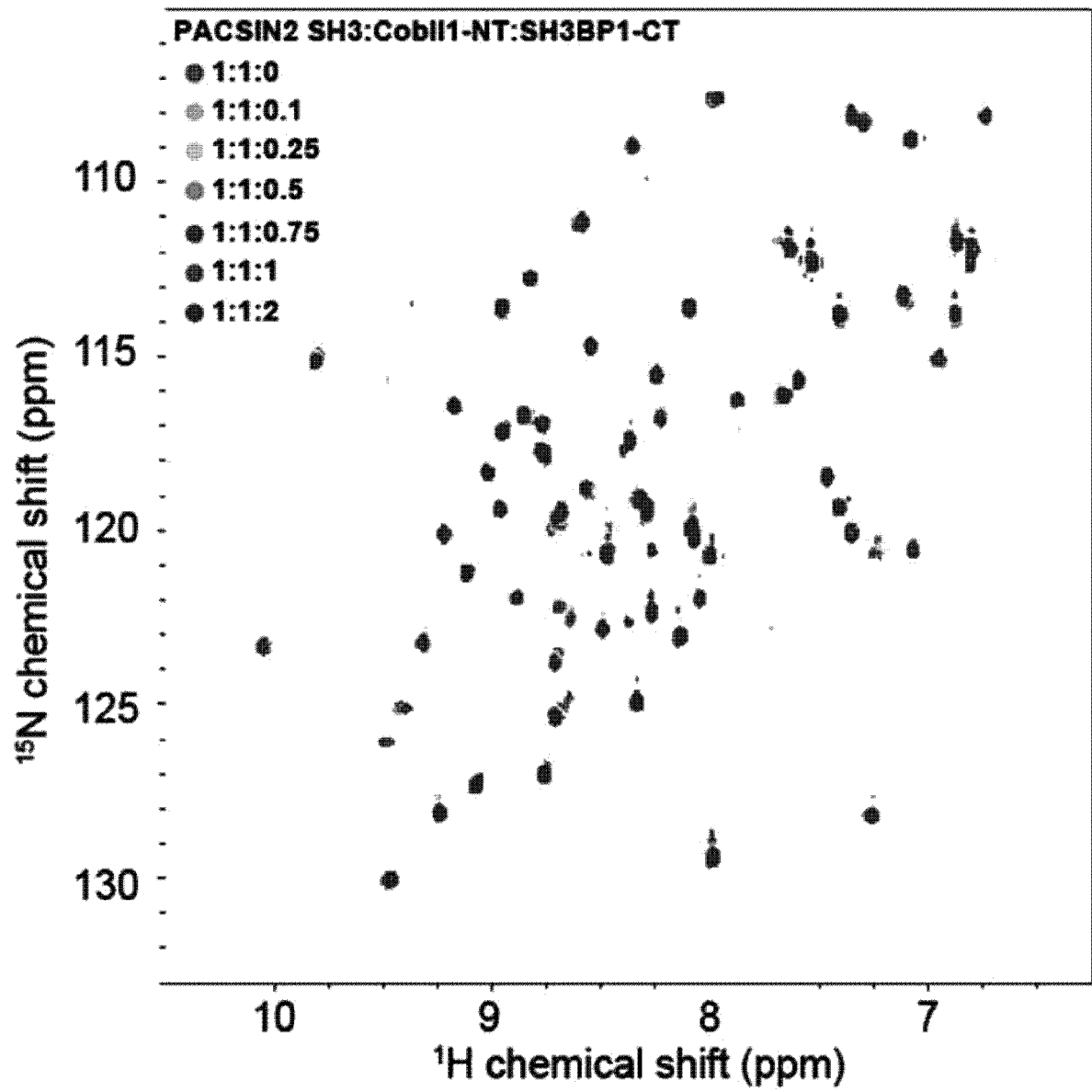
[도60]



[도61]



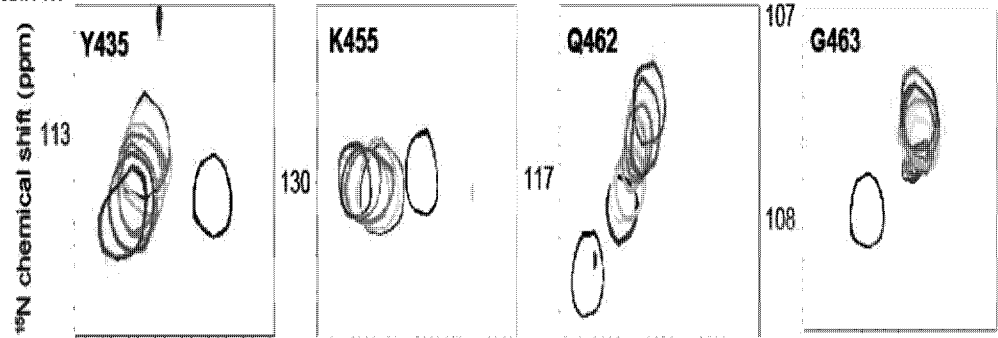
[도62]



[도63]

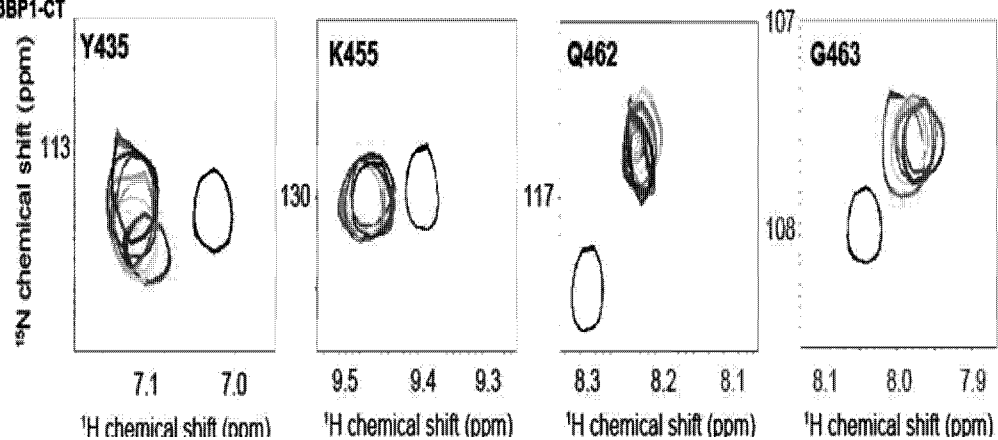
PACSIN2 SH3:SH3BP1-CT:CobII1-NT

1:0:0
1:1:0
1:1:0.1
1:1:0.25
1:1:0.5
1:1:0.75
1:1:1
1:1:2



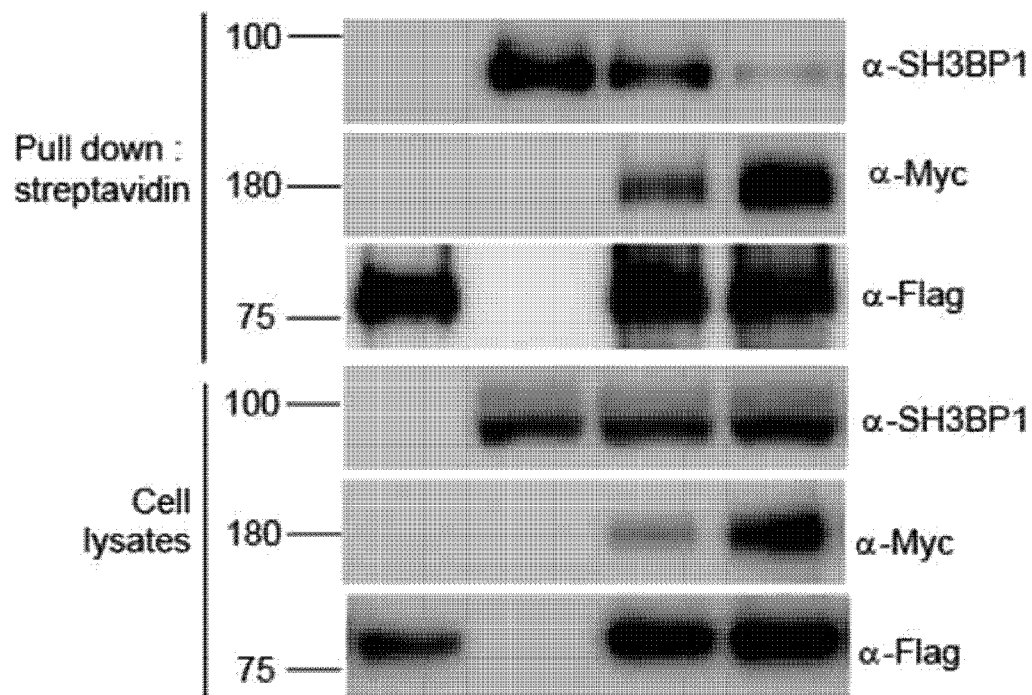
PACSIN2 SH3:CobII1-NT:SH3BP1-CT

1:0:0
1:1:0
1:1:0.1
1:1:0.25
1:1:0.5
1:1:0.75
1:1:1
1:1:2

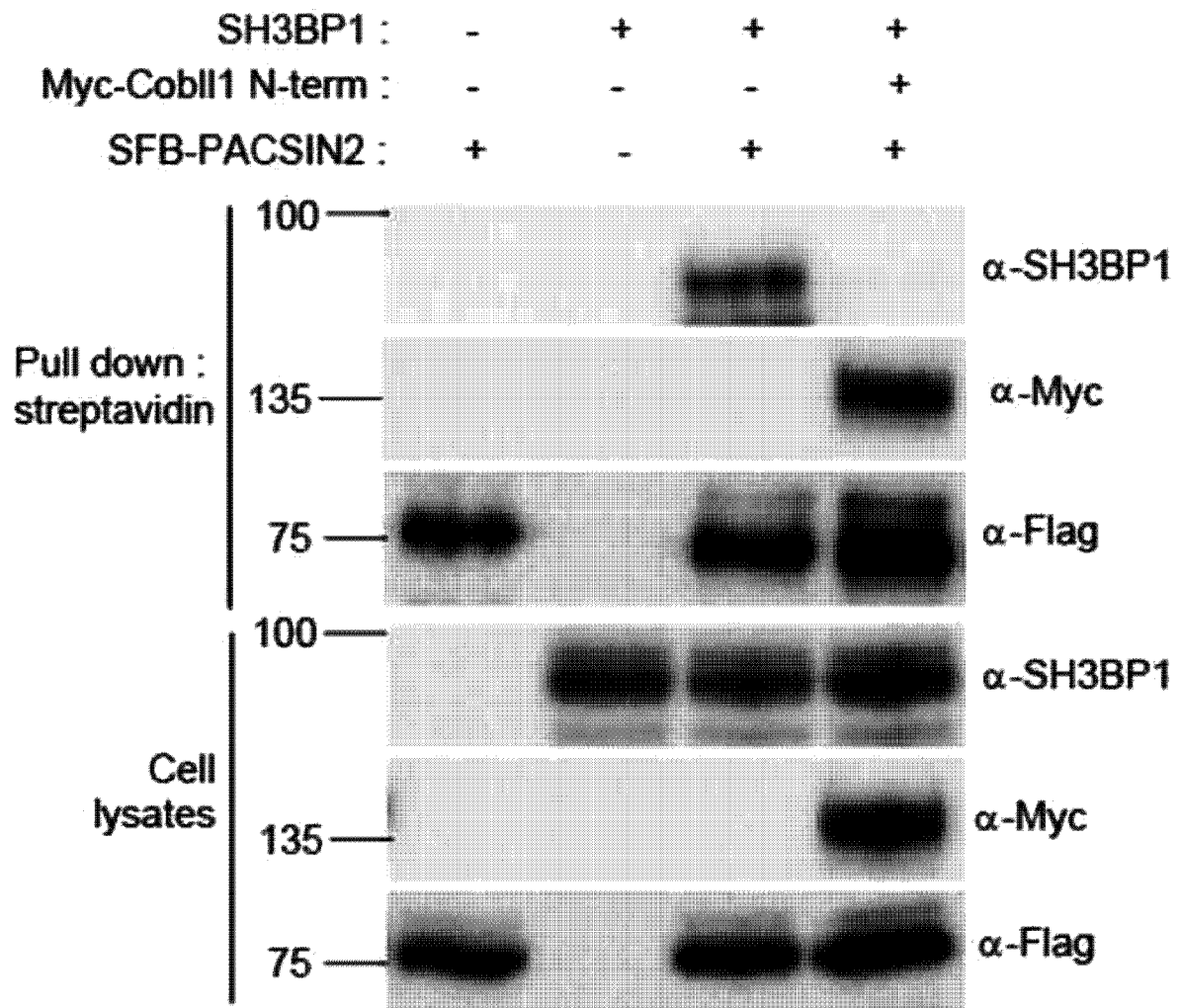


[도64]

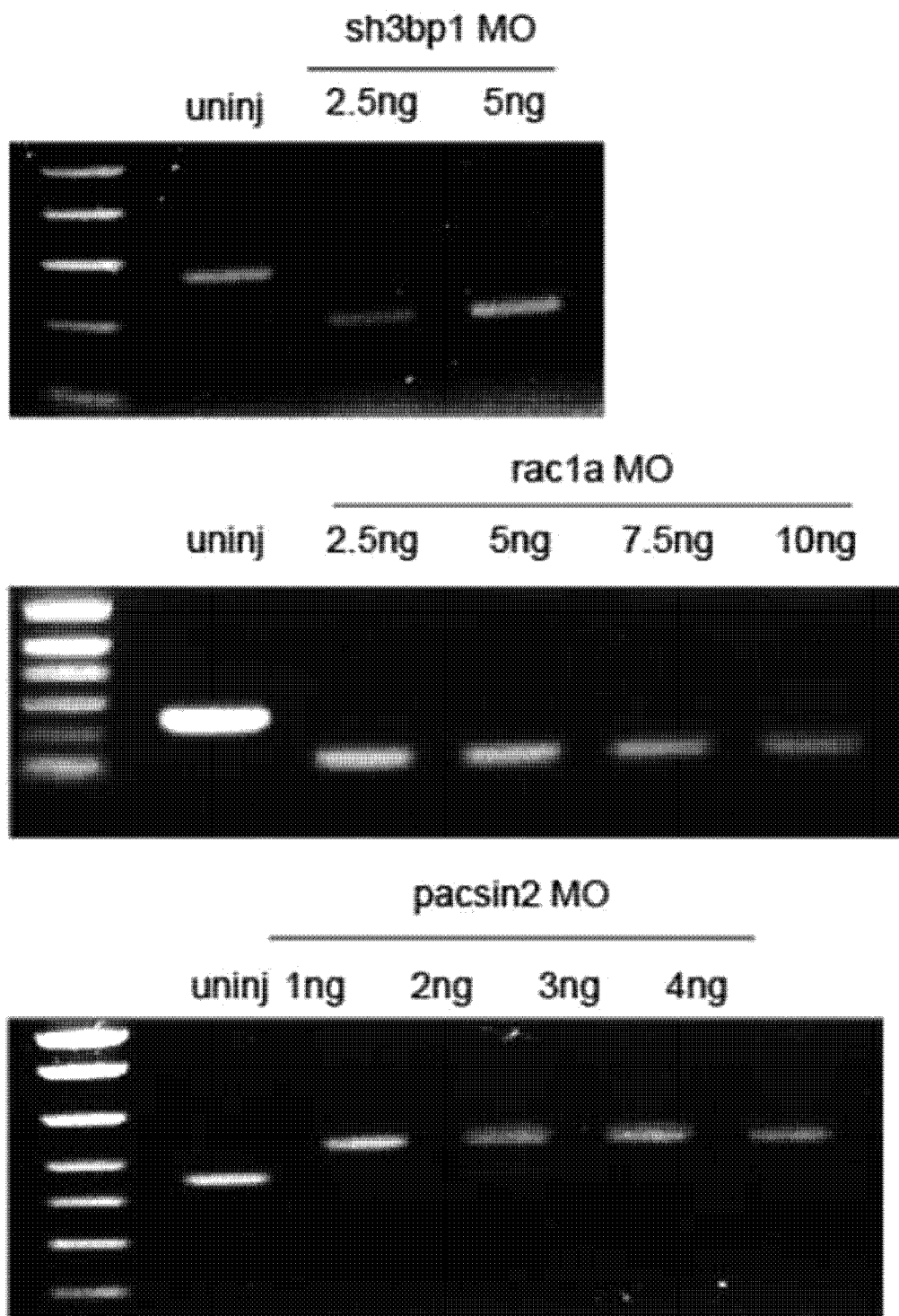
SH3BP1 :	-	+	+	+
Myc-CobII1 :	-	-	-	+
SFB-PACSIN2 :	+	-	+	+



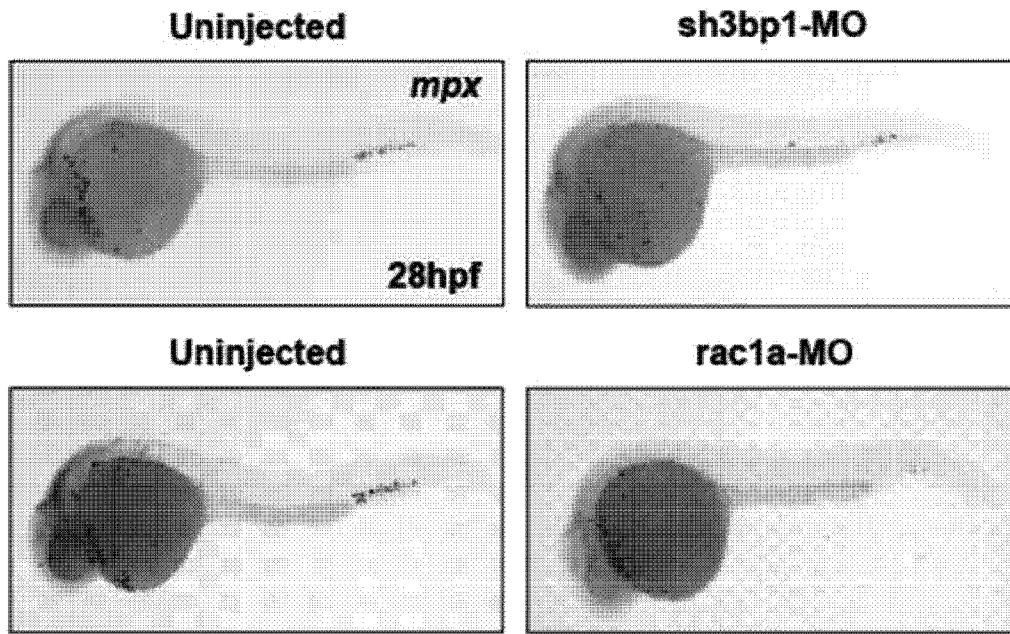
[도65]



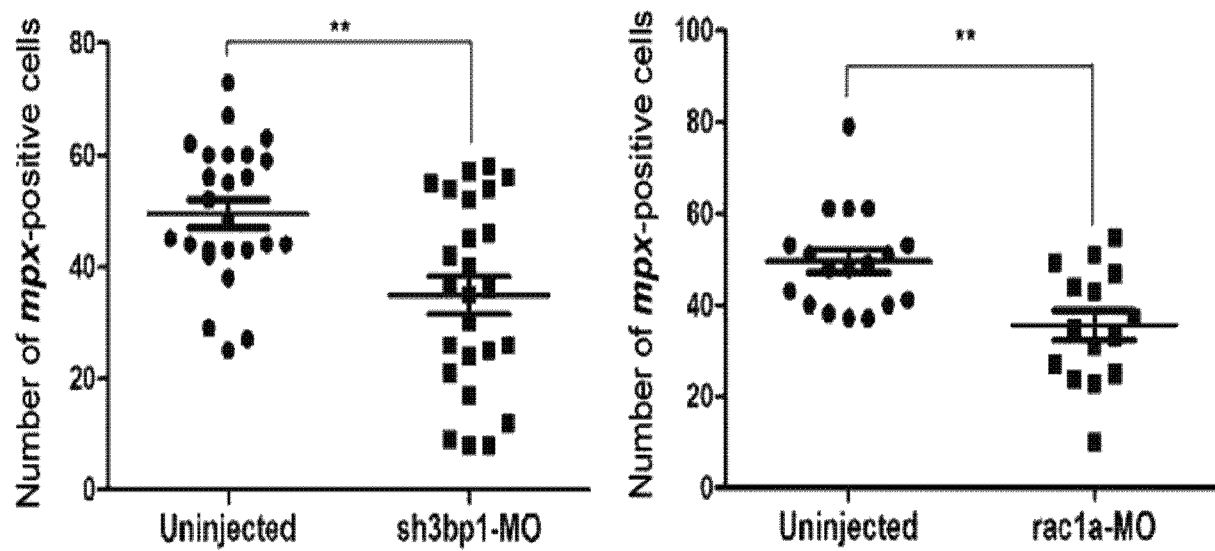
[도66]



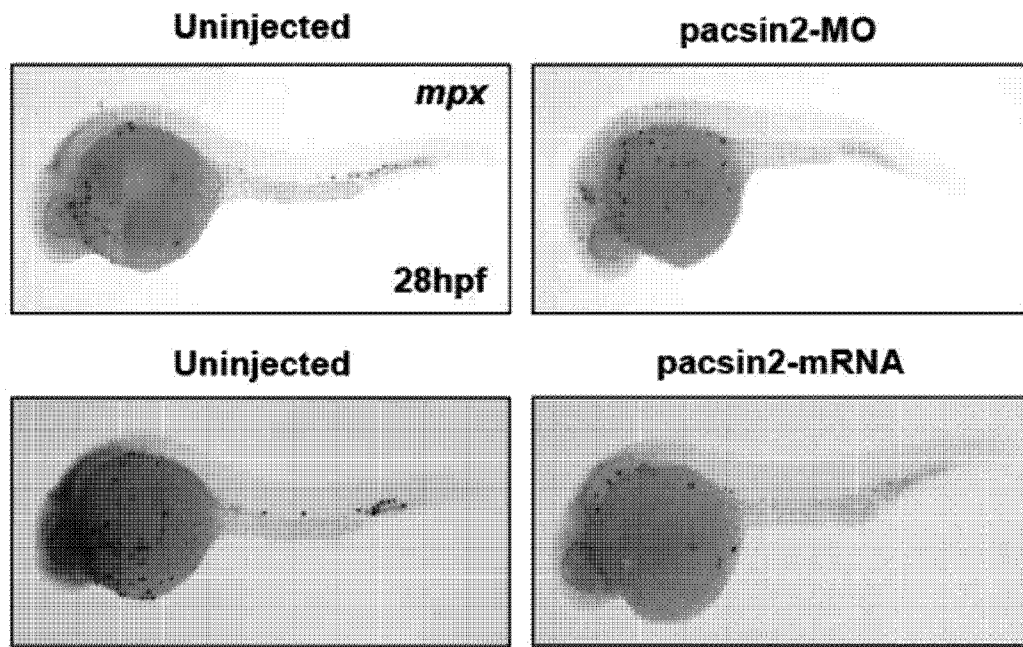
[도67]



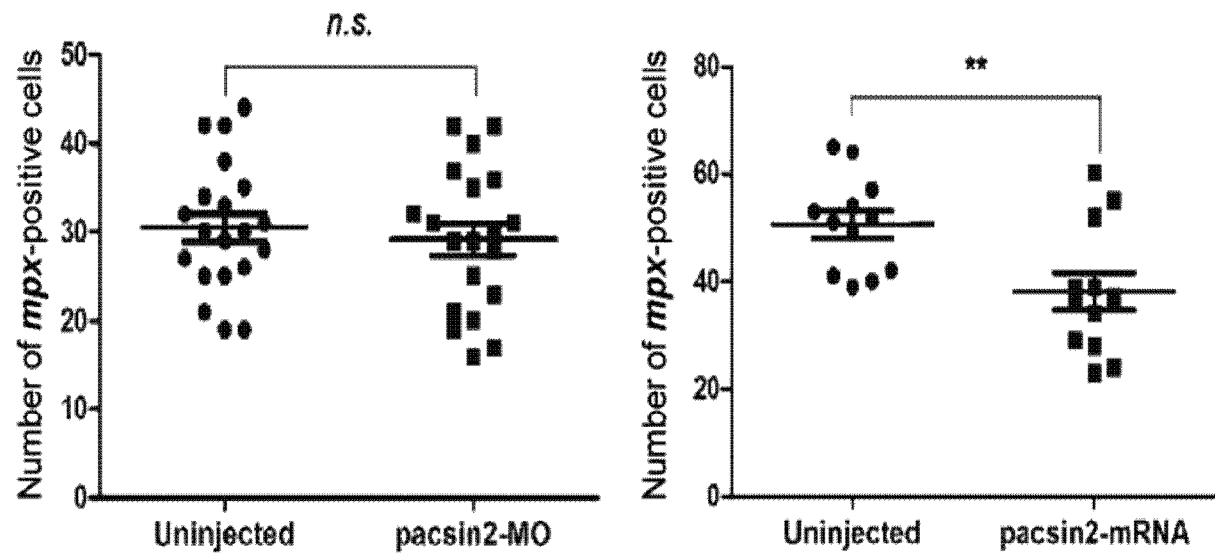
[도68]



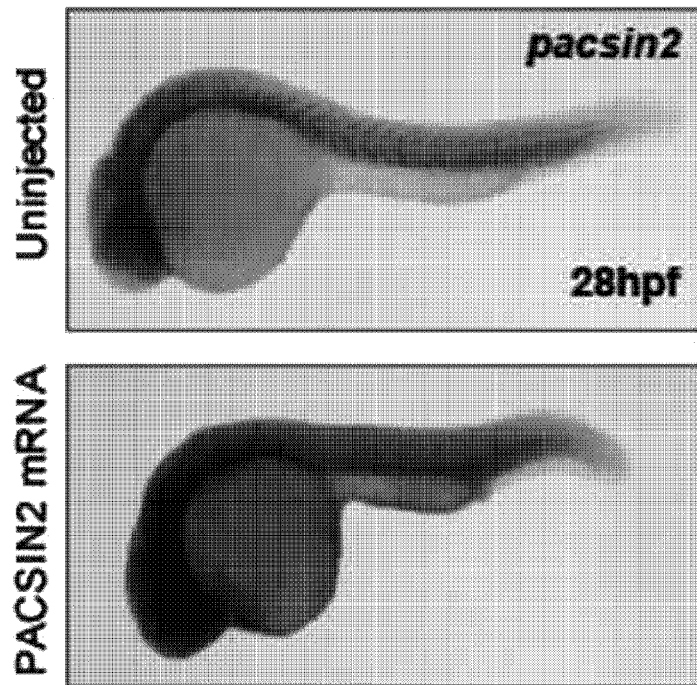
[도69]



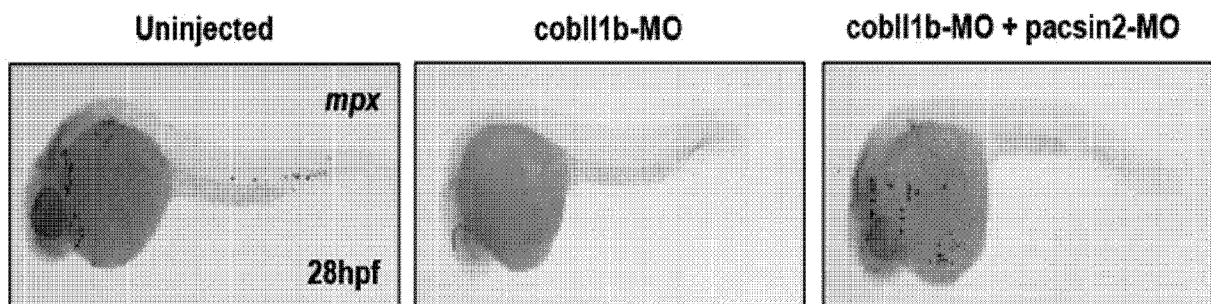
[도70]



[도71]

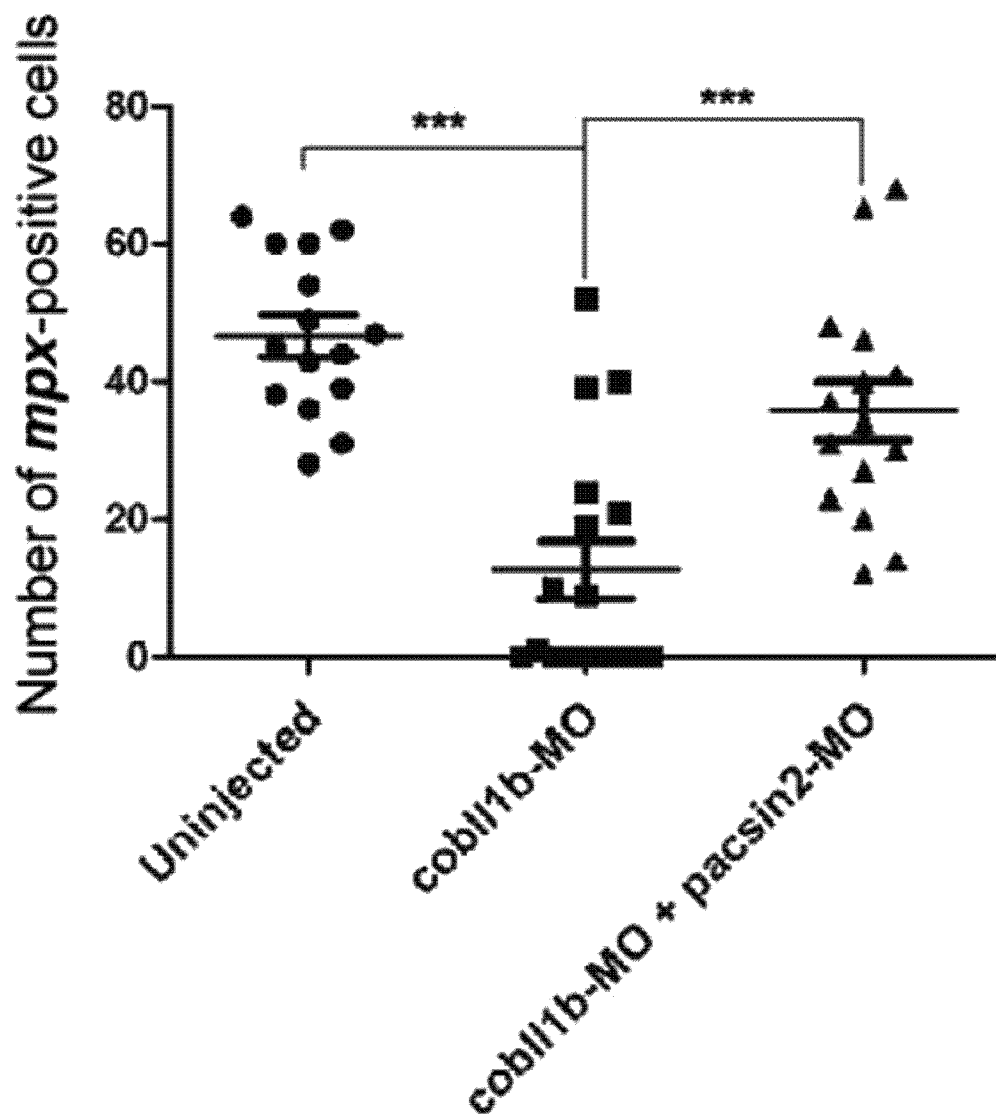


[도72]

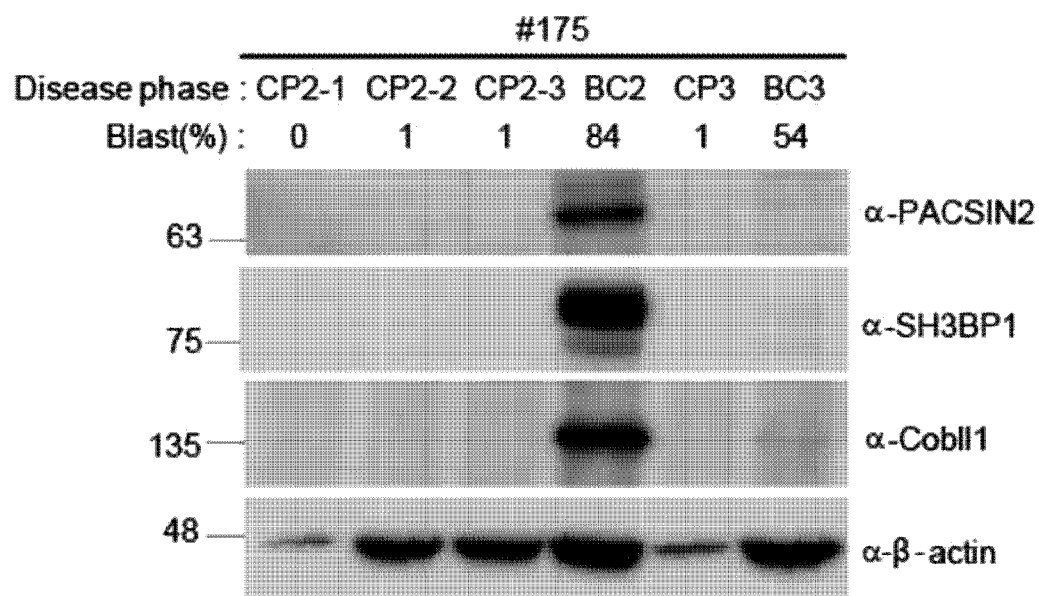


47/57

[도73]



[574]



Disease phase : CP2-1 CP2-2 CP2-3 BC2 CP3 BC3

Blast(%): 0 1 1 84 1 54

Western blot analysis showing the expression of PACSIN2, SH3BP1, and Cobll1 in various cell lines. The blots are probed with antibodies against each protein. Molecular weight markers are indicated on the left (63, 75, 135, and 48 kDa). The right side of the blots indicates the protein being detected: α -PACSIN2, α -SH3BP1, α -Cobll1, and α - β -actin. The lanes are numbered 1 through 6 at the top.

α-PACSIN2

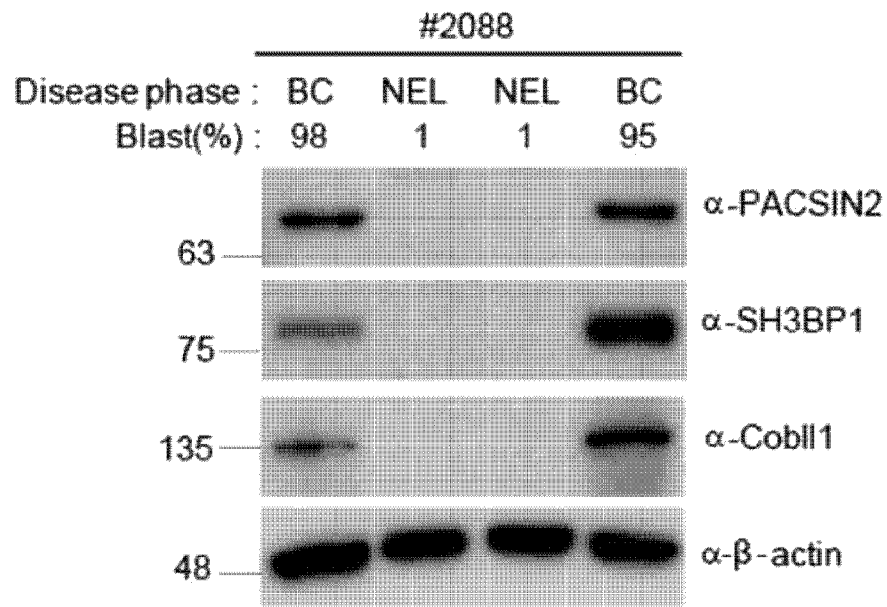
α -SH3BP1

α -Cobll1

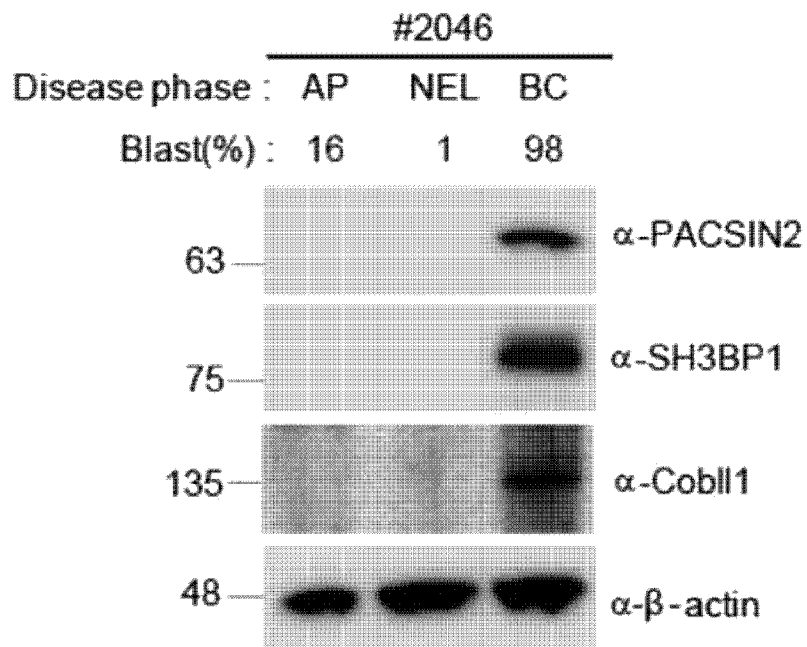
Western blot analysis showing α-β-actin expression. The blot displays a single band for α-β-actin in each lane, with a molecular weight marker of 48 kDa indicated on the left. The lanes are labeled as follows: 1. 293T cells transfected with empty vector; 2. 293T cells transfected with pCMV-β-actin; 3. 293T cells transfected with pCMV-β-actin + pCMV-β-actin; 4. 293T cells transfected with pCMV-β-actin + pCMV-β-actin; 5. 293T cells transfected with pCMV-β-actin + pCMV-β-actin; 6. 293T cells transfected with pCMV-β-actin + pCMV-β-actin. The bands are of similar intensity, indicating equal expression levels of α-β-actin across all lanes.

α - β -actin

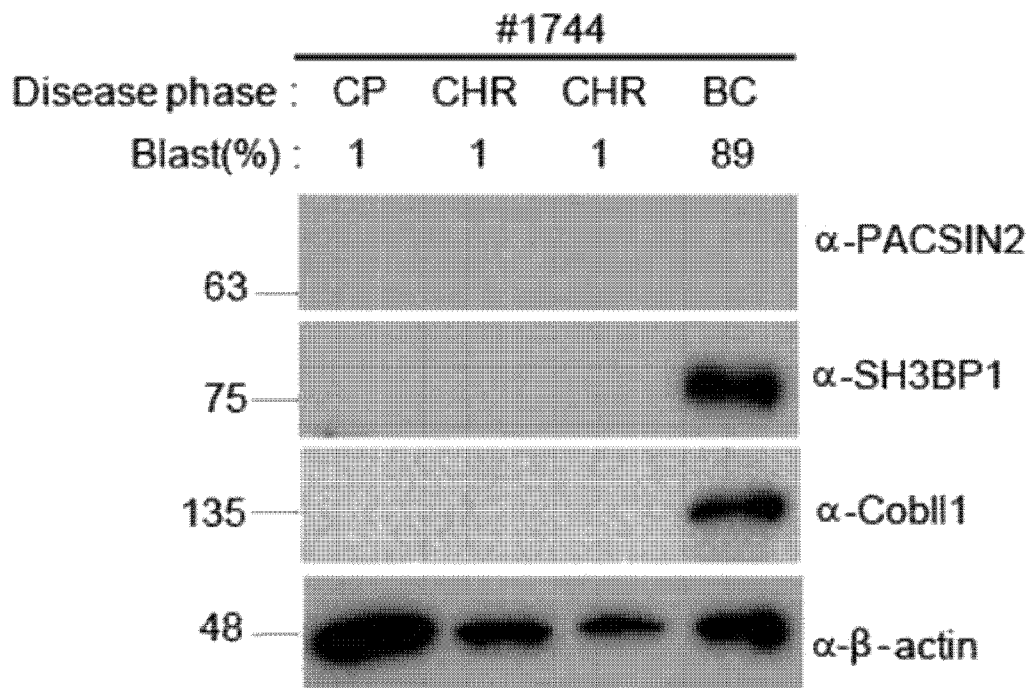
[도75]



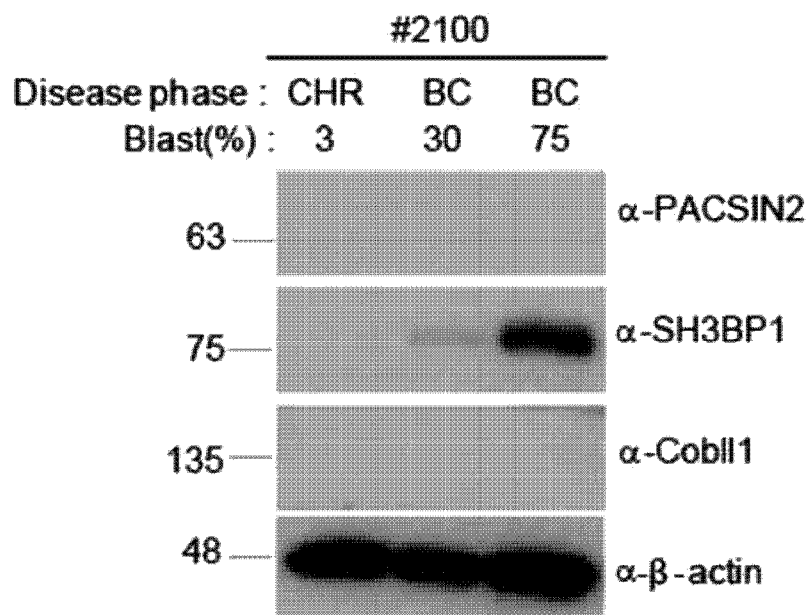
[도76]



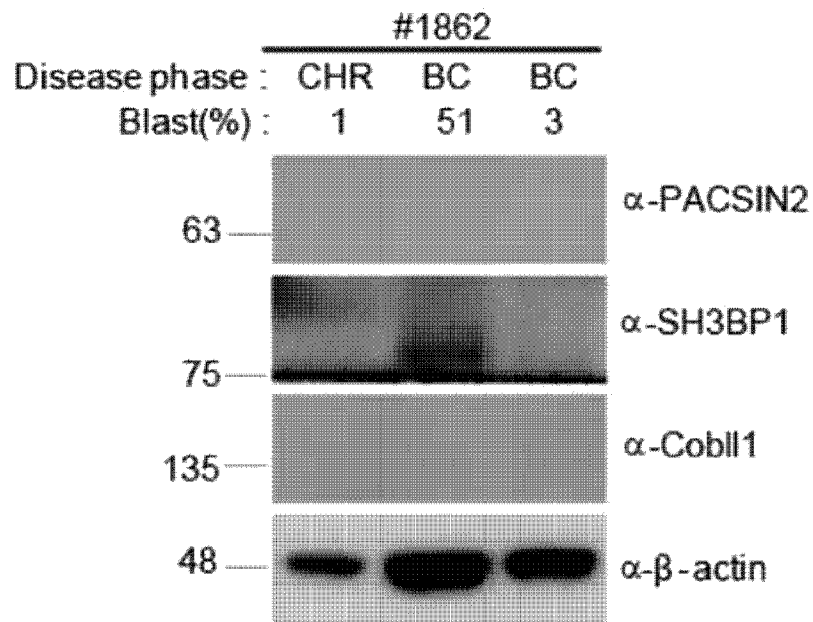
[도77]



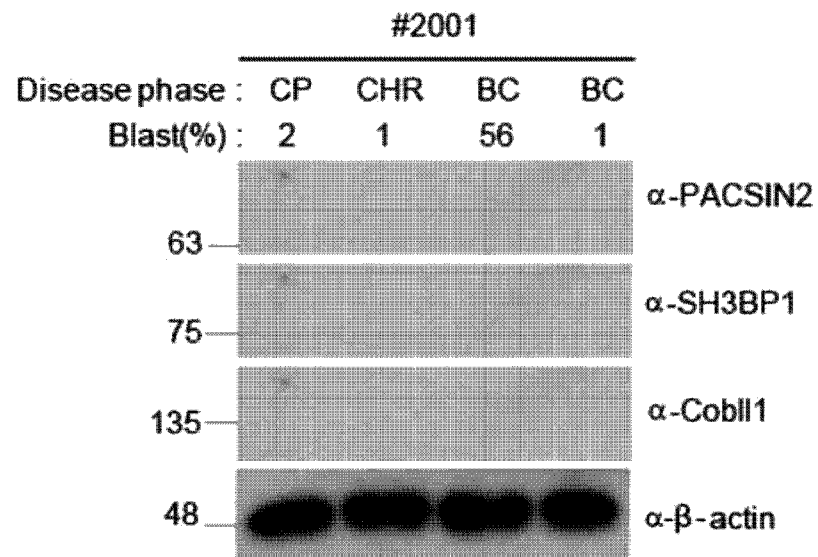
[도78]



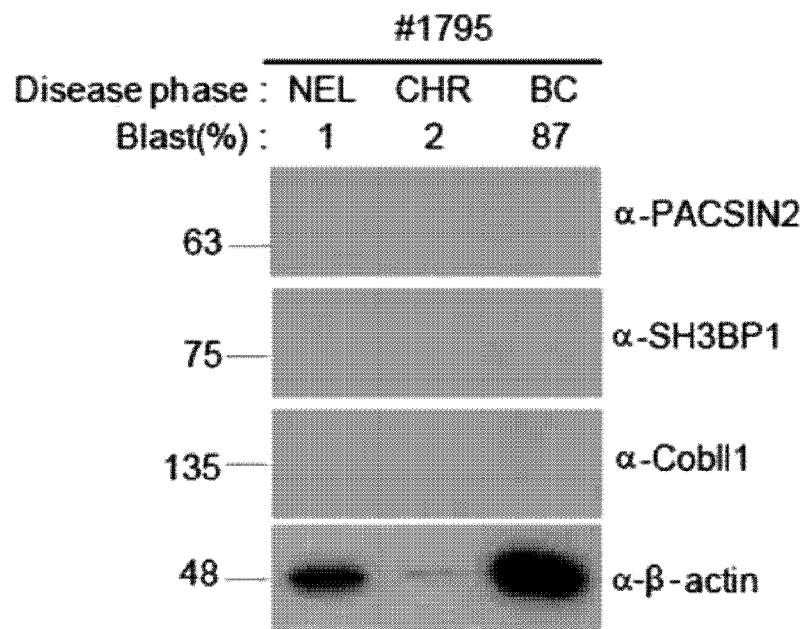
[도79]



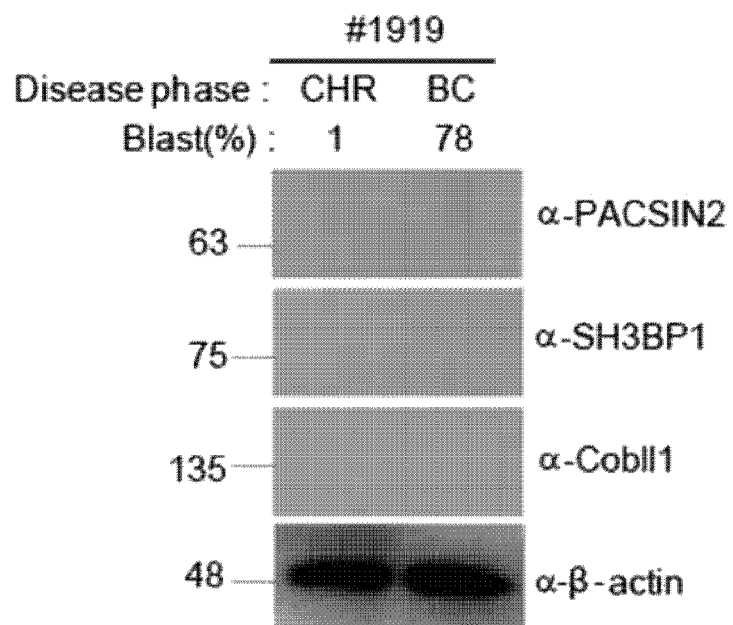
[도80]



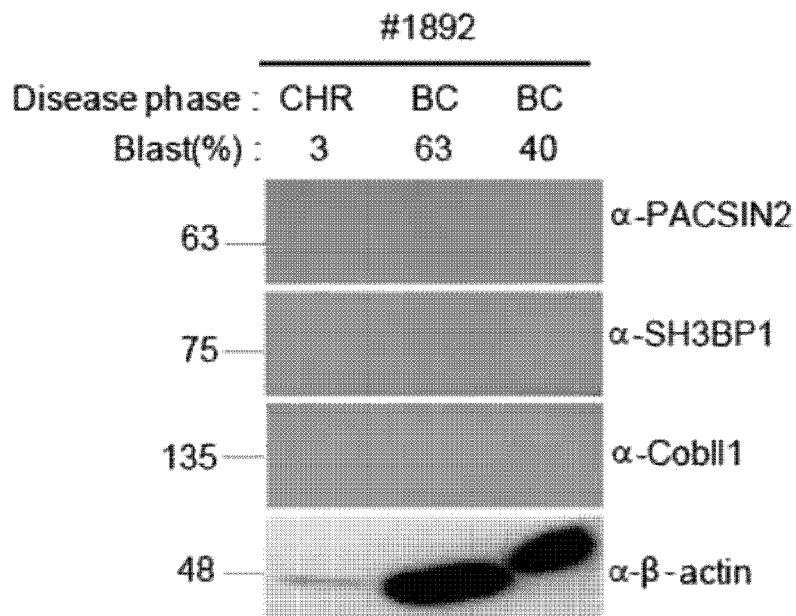
[도81]



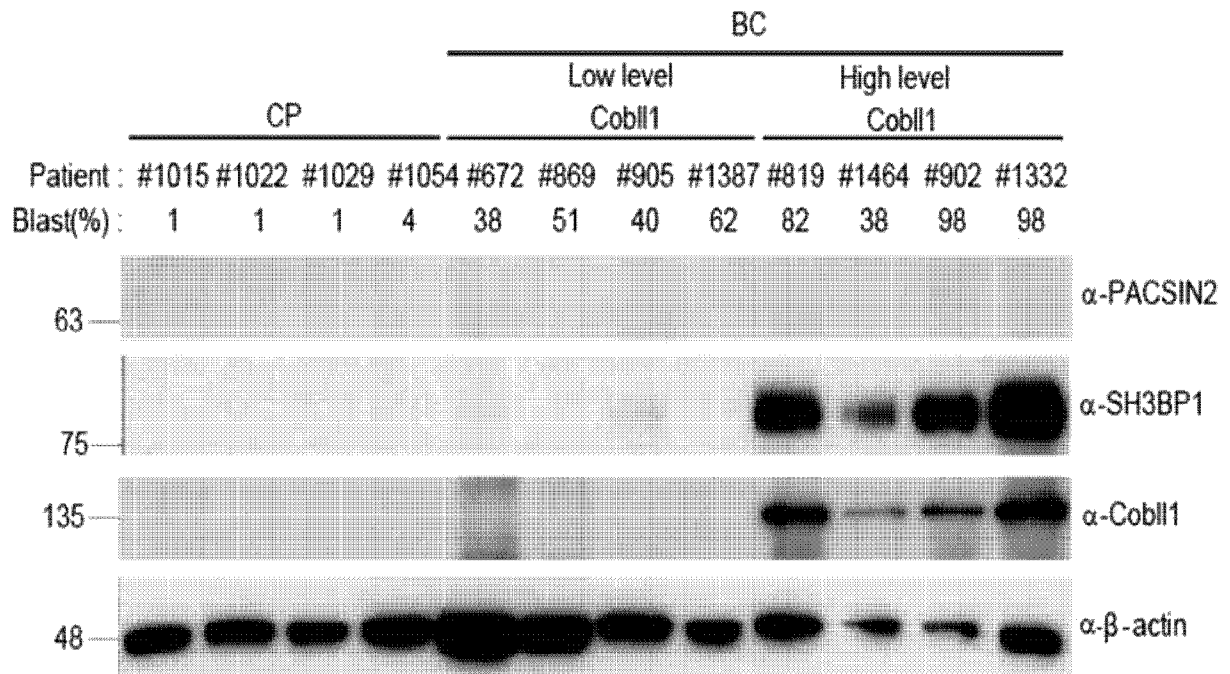
[도82]



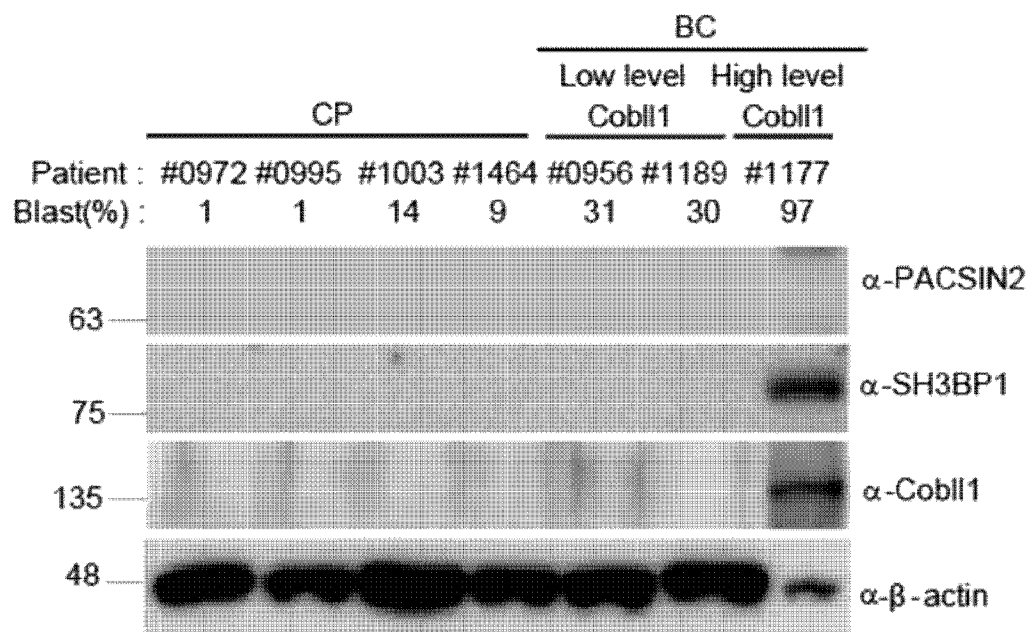
[도83]



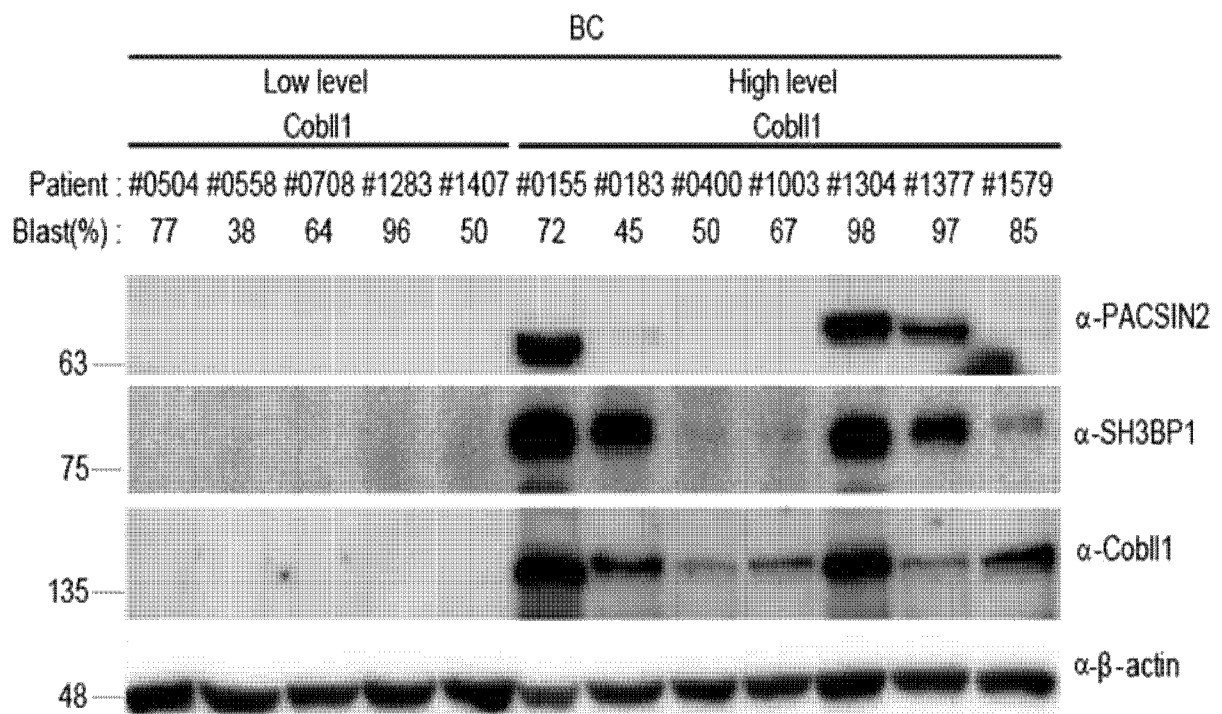
[도84]



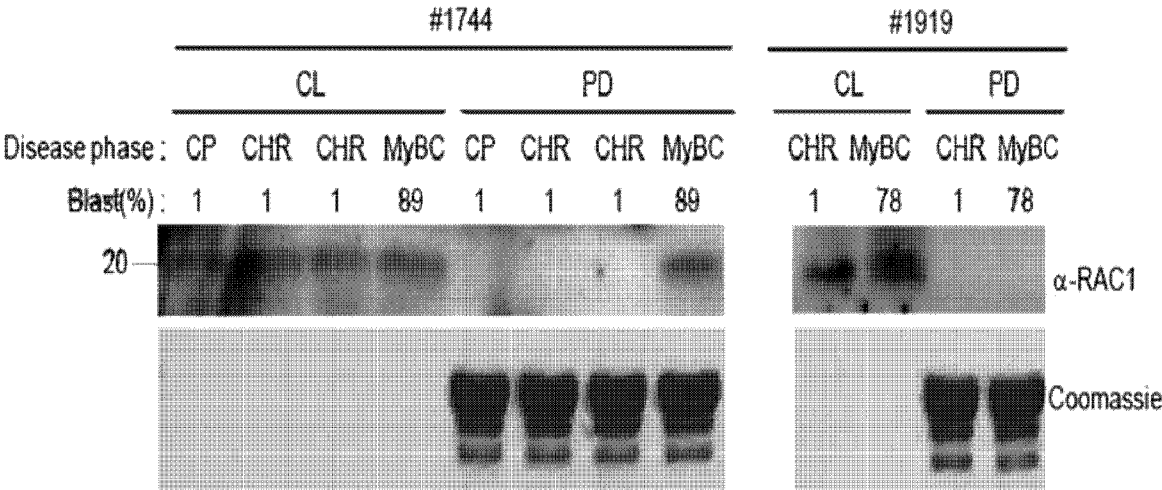
[도85]



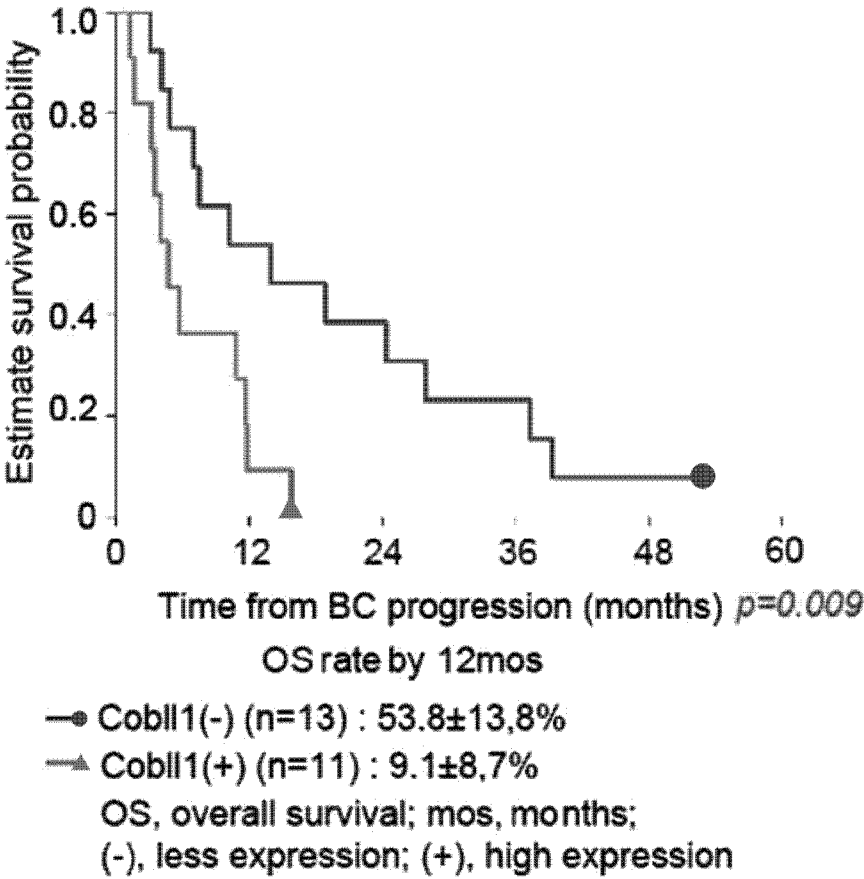
[도86]



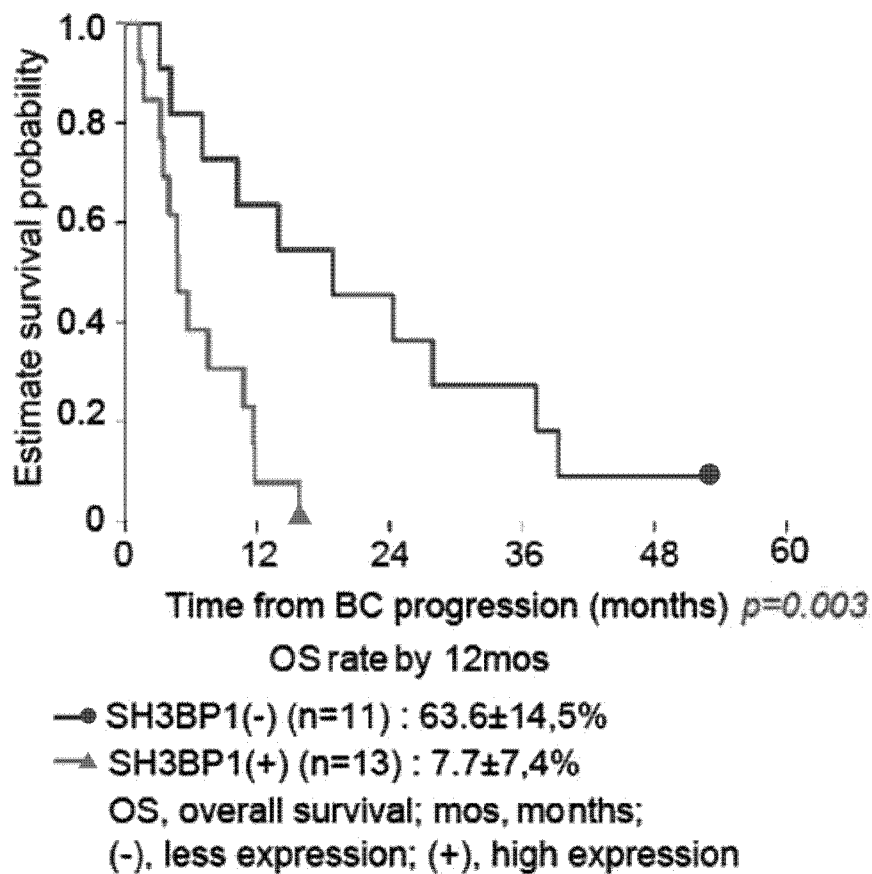
[도87]



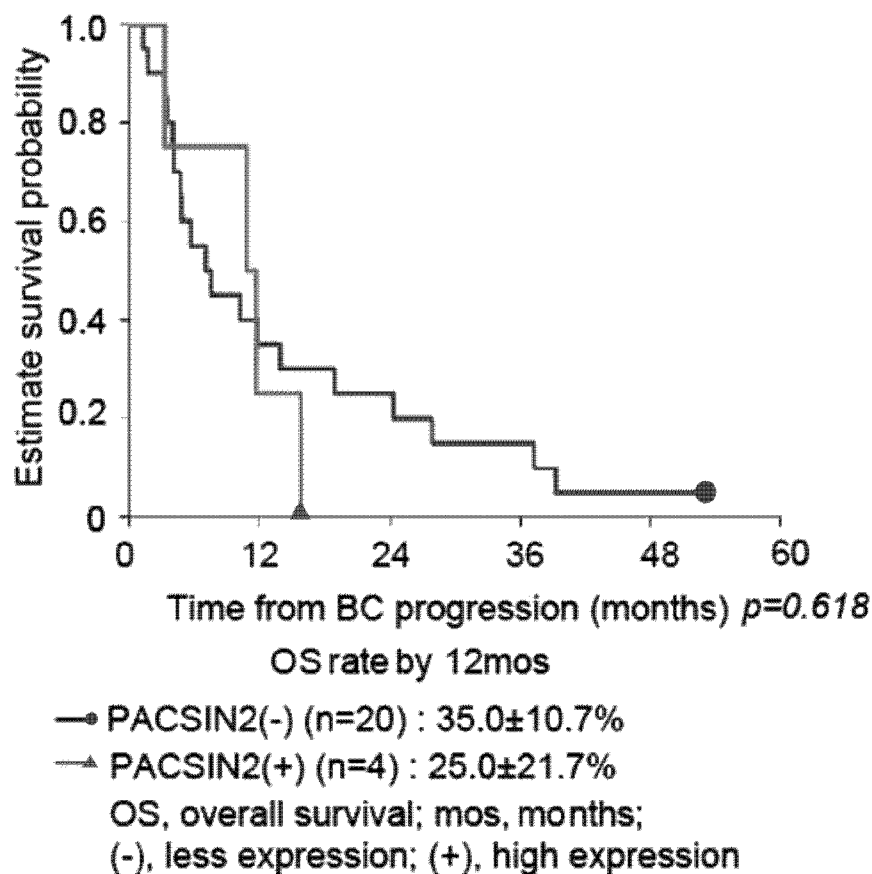
[도88]



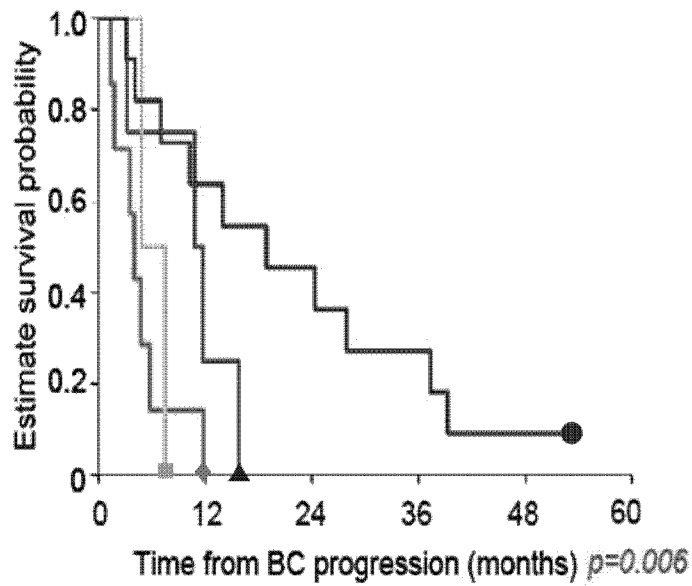
[도89]



[도90]



[도91]



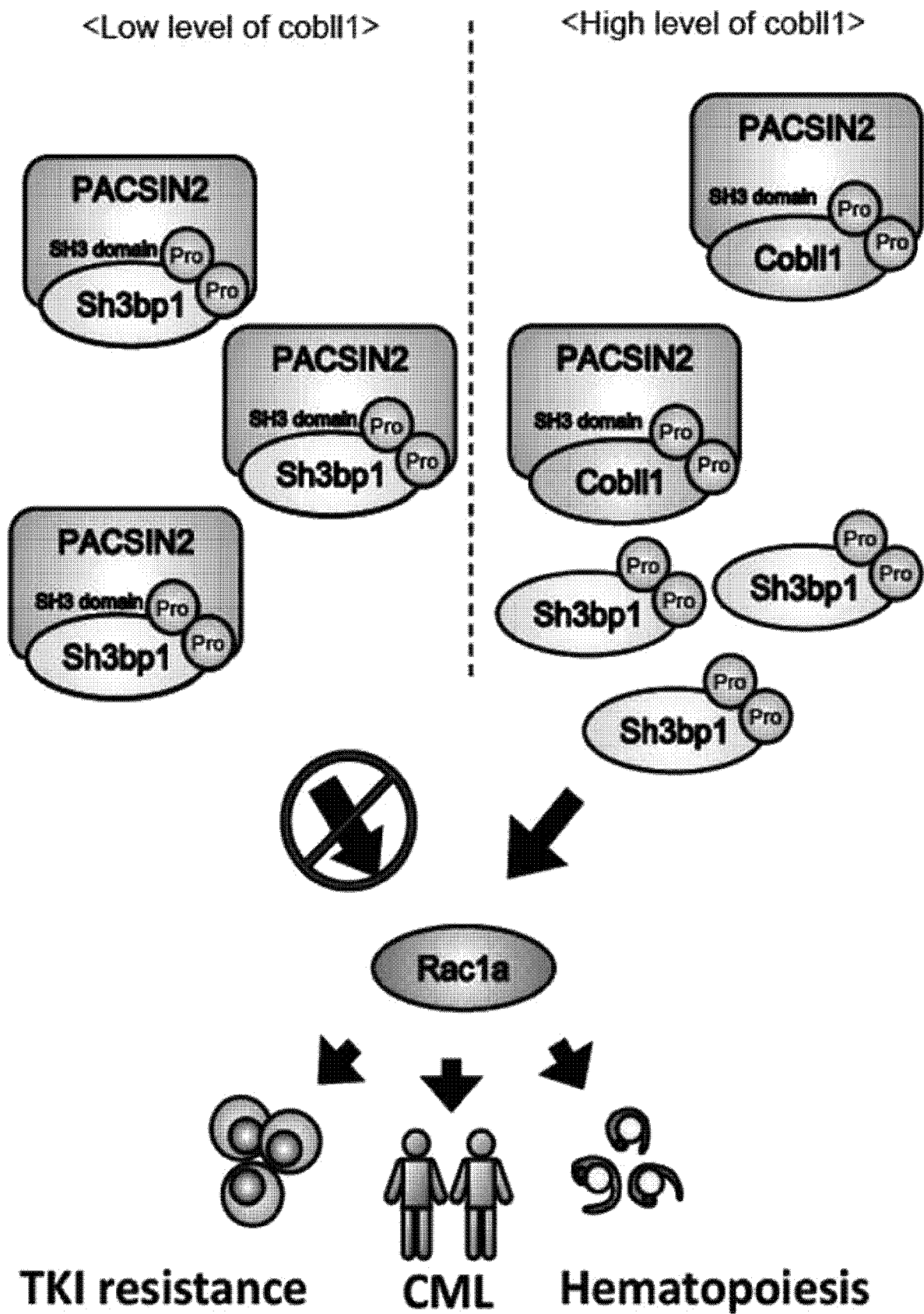
OS rate by 12mos

● Cobll1(-)/PACSIN2(-)/SH3BP1(-) (n=11) : $63.6 \pm 14.5\%$	$p=0.130$	$p=0.002$	$p=0.099$
▲ Cobll1(+)/PACSIN2(+)/SH3BP1(+) (n=4) : $25.0 \pm 21.7\%$	$p=0.186$		
◆ Cobll1(+)/PACSIN2(-)/SH3BP1(+) (n=7) : $53.8 \pm 13.8\%$	$p=0.533$		
■ Cobll1(-)/PACSIN2(-)/SH3BP1(+) (n=2) : $53.8 \pm 13.8\%$		$p=0.207$	

OS, overall survival; mos, months;

(-), less expression; (+), high expression

[도92]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/005418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68; A61K 31/7105; C12N 15/12; C12Q 1/68; C40B 30/04; C40B 40/08; G01N 33/574

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: Cobll1(cordon-bleu protein-like 1), PACSIN2(protein kinase C and casein kinase substrate in neuron protein 2), SH3BP1(SH3 domain binding protein 1), expression, chronic myeloid leukemia(CML), tyrosine kinase inhibitor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2017-0019635 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 22 February 2017 See abstract; claims 1-32.	1-23
A	HAN, Sh et al. Cobll1 is linked to drug resistance and blastic transformation in chronic myeloid leukemia. leukemia. 2017, vol. 31, pages 1532-1539 See abstract; figures 1-3.	1-23
A	KR 10-2012-0095722 A (KIM, Hyun Kee) 29 August 2012 See claims 1-6.	1-23
A	KR 10-1865198 B1 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY et al.) 08 June 2018 See the entire document.	1-23
A	US 2011-0190157 A1 (KIPPS, T. J. et al.) 04 August 2011 See the entire document.	1-23



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

26 AUGUST 2020 (26.08.2020)

Date of mailing of the international search report

26 AUGUST 2020 (26.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/005418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0019635 A	22/02/2017	EP 3336548 A1 KR 10-1820572 B1 WO 2017-026843 A1	20/06/2018 19/01/2018 16/02/2017
KR 10-2012-0095722 A	29/08/2012	KR 10-1380971 B1	07/04/2014
KR 10-1865198 B1	08/06/2018	KR 10-2017-0115894 A	18/10/2017
US 2011-0190157 A1	04/08/2011	WO 2010-019921 A2 WO 2010-019921 A3	18/02/2010 15/04/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; A61K 31/7105; C12N 15/12; C12Q 1/68; C40B 30/04; C40B 40/08; G01N 33/574

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: Cobl11(cordon-bleu protein-like 1), PACSIN2(protein kinase C and casein kinase substrate in neuron protein 2), SH3BP1(SH3 domain binding protein 1), 발현(expression), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia: CML), 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0019635 A (가톨릭대학교 산학협력단 등) 2017.02.22 요약; 청구항 1-32	1-23
A	HAN, SH 등, 'Cobl11 is linked to drug resistance and blastic transformation in chronic myeloid leukemia', leukemia, 2017, 31권, 페이지 1532-1539 초록; 도면 1-3	1-23
A	KR 10-2012-0095722 A (김현기) 2012.08.29 청구항 1-6	1-23
A	KR 10-1865198 B1 (충남대학교산학협력단 등) 2018.06.08 전체 문헌	1-23
A	US 2011-0190157 A1 (KIPPS, T. J. 등) 2011.08.04 전체 문헌	1-23

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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

2020년 08월 26일 (26.08.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 08월 26일 (26.08.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0019635 A	2017/02/22	EP 3336548 A1 KR 10-1820572 B1 WO 2017-026843 A1	2018/06/20 2018/01/19 2017/02/16
KR 10-2012-0095722 A	2012/08/29	KR 10-1380971 B1	2014/04/07
KR 10-1865198 B1	2018/06/08	KR 10-2017-0115894 A	2017/10/18
US 2011-0190157 A1	2011/08/04	WO 2010-019921 A2 WO 2010-019921 A3	2010/02/18 2010/04/15