

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 5월 9일 (09.05.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/088683 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A23L 33/13 (2016.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/013071

(22) 국제출원일: 2018년 10월 31일 (31.10.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0143422 2017년 10월 31일 (31.10.2017) KR
10-2018-0131286 2018년 10월 30일 (30.10.2018) KR

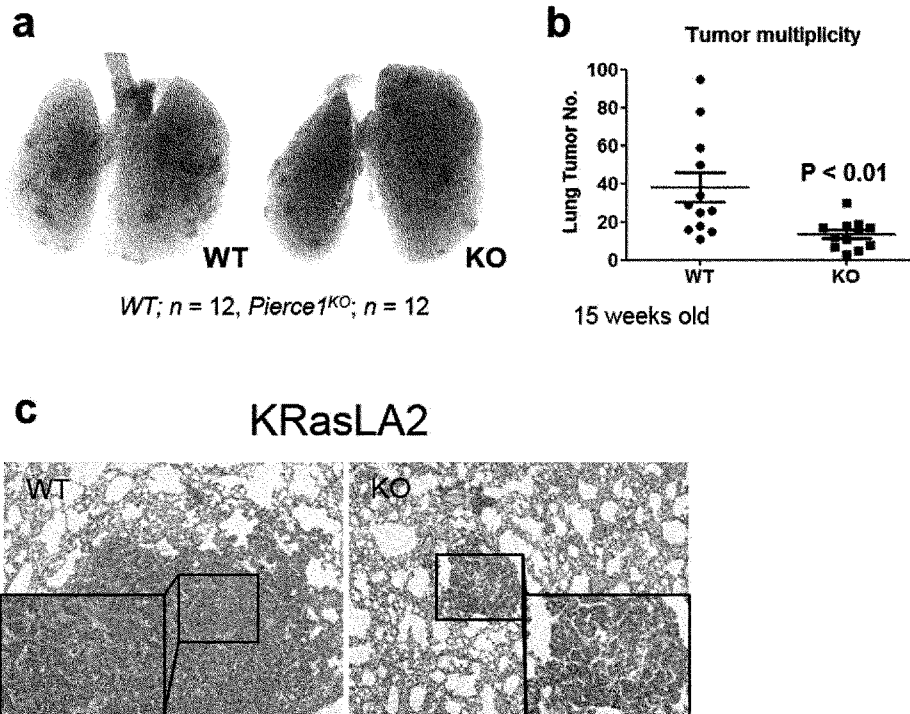
(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY**) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이한웅 (**LEE, Han Woong**); 04637 서울시 중구 소월로2길 30, 704호 (남대문로5가, 남산트라펠리스), Seoul (KR). 성영훈 (**SUNG, Young Hoon**); 01169 서울시 강북구 도봉로47길 26, 401 (미아동, 오봉예체플안), Seoul (KR). 노재일 (**ROH, Jae Il**); 03706 서울시 서대문구 성산로 269, 101호 (연희동), Seoul (KR). 박완제 (**PARK, Wan Je**); 16527 경기도 수원시 영통구 동탄원천로1109번길 37, 105동 808호 (매탄동, 한국아파트), Gyeonggi-do (KR). 하나영 (**HA, Na Yeong**); 10516 경기도 고양시 덕양구 행당로 34-20, 101동 1304호 (행신동, 벽산아파트), Gyeonggi-do (KR). 김유진 (**KIM, Yu Jin**); 58125 전라남도 화순군 화순읍 광덕로 155, 202동 1107호 (화순부영2차아파트), Jeollanam-do (KR). 오자현 (**OH, Ja Hyun**); 59017 전라남도 해남군 계곡면 흑석로 432, Jeollanam-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION, TREATMENT OR METASTASIS INHIBITION OF CANCER CONTAINING EXPRESSION OR ACTIVITY INHIBITOR FOR PIERCE1 AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 피어스 1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for treating cancer which contains an expression or activity inhibitor for a Pierce1 protein as an active ingredient. A Pierce1 gene (*Pierce1*) has increased expression in cancer cells, and when the Pierce1 gene (*Pierce1*) is inhibited, it is possible to significantly inhibit the formation of cancer cells and tumors. Thus, an agent for inhibiting expression of the Pierce1 gene; inhibiting expression of the Pierce1 protein; or inhibiting activity of the Pierce1 protein can be usefully used as an active ingredient of a functional health food for cancer prevention and amelioration.

[다음 쪽 계속]

WO 2019/088683 A1

(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, 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 국내 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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 피어스 I(Piercel) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 치료용 조성물에 관한 것으로, 피어스 I 유전자(Piercel)는 암 세포에서 발현 증가하여 있으며, 이를 억제하였을 때 암세포 및 종양의 형성을 유의적으로 억제할 수 있으므로, 피어스 I 유전자의 발현 억제; 피어스 I 단백질의 발현 억제; 또는 피어스 I 단백질의 활성 억제제는 암 예방 및 개선용 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 피어스 1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 피어스 1(Pierce1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 치료용 또는 암 전이 억제용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 암이란 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제를 할 수 있는 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래하는 난치병이다. 의학의 발전에도 불구하고, 국내 암환자 발생자 수는 지속적으로 증가하여 최근 10년간 약 44%가 증가하였으며, 국제적으로도 항암제 시장 역시 증가하여 연간 약 1000억 달러의 규모를 가지는 것으로 보고된 바 있다.

- [4] *Retinoblastoma*(Rb) 및 p53 유전자는 대부분의 암에서 돌연변이 또는 비활성화로 나타나 관련 유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 그 중 피어스 1(Pierce1) 유전자는 Rb가 결여된 세포에서 과발현되어 p53의 전사적 타겟이 될 수 있어, p53에 의해 피어스 1의 프로모터가 활성화될 수 있는 것으로 알려져 있다. 즉, Rb 및 p53의 결여/활성화에 따라 피어스 1의 전사적 활성이 영향을 받을 수 있으나, 이로 인해 피어스 1 유전자의 전사 또는 피어스 1 단백질의 활성 조절을 통해 암 발생을 조절할 수 있는지 여부에 대하여는 알려진 바 없다.

[5]

- [6] 이에, 본 발명자들은 피어스 1 유전자의 신규한 용도를 발굴하기 위해 노력한 결과, 피어스 1 유전자를 억제한 세포 및 마우스모델군에서 암세포의 성장 및 이주능뿐 아니라 종양의 성장 및 암 전이능이 유의적으로 억제하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 피어스 1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 암 예방, 암 치료 또는 암 전이 억제용 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 상술한 바와 같이, 피어스 1 유전자가 암종양유전자인 p53에 의해 전사 조절될 수 있음이 알려져 있음에도 불구하고, 피어스 1 유전자를 통해 직접적인

항암효과 또는 암 전이억제 효과에 대하여 알려진 바가 없었다.

[9]

[10] 따라서, 본 발명의 목적은 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또다른 목적은 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 피어스 1(Pierce1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 피어스 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[15] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 피어스 1 단백질은 서열번호 1의 아미노산으로 구성되는 것일 수 있다.

[16] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 피어스 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 피어스 1을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 뉴클레오티드(antisense nucleotide), siRNA, shRNA 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[17] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 피어스 1의 발현 또는 활성 억제제는 피어스 1 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체(peptide mimetics), 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[18] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 암은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[19]

[20] 또한, 본 발명은 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[21] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 스크리닝 방법은 하기 단계로 이루어질 수 있다:

[22] i) 피어스 1 단백질을 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

[23] ii) 상기 단계 i)에서 처리된 세포주에서 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

[24] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA의 발현 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 감소하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.

- [25] 본 발명의 또다른 바람직한 일실시예에서, 상기 스크리닝 방법은 하기 단계로 이루어질 수 있다:
- [26] i) 피어스 1 단백질을 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [27] ii) 상기 단계 i)에서 처리된 세포주에서 피어스 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [28] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 피어스 1 단백질의 활성 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 감소하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.
- [29] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 암은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [30] 다른 측면에서, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 억제방법을 제공한다.
- [32] 또한, 본 발명은 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 과증식성 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포사멸 촉진 또는 세포이동 억제 방법을 제공한다.
- [33] 또 다른 측면에서, 본 발명은 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방, 치료 또는 전이 억제 용도를 제공한다.
- [34] 또한, 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 과증식성 세포사멸 촉진 또는 세포이동 억제 용도를 제공한다.

[35]

발명의 효과

- [36] 따라서, 본 발명은 피어스 1의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방, 암 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [37] 본 발명의 피어스 1 유전자를 세포 수준에서 억제하였을 때 암세포의 성장 속도 및 이주능이 감소하고, 마우스 모델 수준에서 암 전이 및 종양 성장이 억제되는 것을 확인하였으므로, 피어스 1 유전자의 발현 또는 피어스 1 단백질의 활성을 억제할 수 있는 물질은 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 피어스 1 유전자의 발현 또는 피어스 1 단백질의 활성을 마커로 하여 항암제 후보물질을 스크리닝할 수 있다.
- [38]

도면의 간단한 설명

- [39] 도 1은 다양한 조직의 암에서 피어스 1의 발현 수준을 정상 조직과 비교한 결과를 보여준다.
- [40] 도 2는 폐암 환자에서 피어스 1의 발현 수준이 높은 환자와 발현 수준이 낮은 환자 간의 생존곡선을 비교한 결과를 보여준다.
- [41] 도 3은 폐암 환자에게서 얻은 조직과 정상 조직에서 피어스 1 발현 수준을 비교한 결과를 보여준다.
- [42] 도 4는 다양한 유형의 폐암 환자에서 피어스 1 유전자의 발현 수준을 확인한 도면으로,
- [43] 도 4a와 b는 폐암 환자를 stage I 및 II로 나누거나, 대세포성 폐암 (large) 및 폐선암종(LA)으로 나누어, 피어스 1의 발현수준을 비교한 결과를 보여주고,
- [44] 도 4c와 d는 폐암 환자를 KRAS 변이 여부에 따라 정상군(No value), KRAS 야생형군(KRAS WT) 및 KRAS 변이군(KRAS Mut)으로 나누어 피어스 1의 발현 수준을 비교한 결과를 보여준다.
- [45] 도 5는 다양한 폐암 세포주에서 피어스 1 발현수준 및 세포 성장 효과를 비교한 도면으로,
- [46] 도 5a는 에이치라스(HRas^{G12V})를 과발현하는 세포주(hoeflich Cell Line)에서 피어스1의 발현 수준을 확인한 결과를 보여주고,
- [47] 도 5b는 KRAS 변이성 폐암세포(KRas^m) 및 정상(WT) 폐암세포에서 피어스 1 발현 억제에 따른(siPrc#1과 #3) 세포성장 억제 효과를 대조군(siCTL)과 비교한 결과를 보여준다.
- [48] 도 6은 케이라스 변이(KRas^{G12D})를 갖는 폐암 세포주에서 피어스 1 발현 억제에 따른 암세포 성장 억제 효과를 확인한 도면이다.
- [49] 도 7은 폐암유발 마우스 모델에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(*in vivo*) 폐암 병변의 수 감소 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [50] 도 8은 케이라스 변이(KRas^{G12D})에 의한 폐암 마우스 모델에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(*in vivo*) 종양성장 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [51] 도 9는 다양한 암에서 피어스 1의 변이 유형 분석, 특히 전이성 전립선 암에서의 피어스1의 유전자 변이를 분석한 결과를 보여준다.
- [52] 도 10은 여러 종류의 암조직 및 전립선 암 조직에서 원발성 암과 전이성 암에 따른 피어스 1의 발현 수준을 비교 분석한 결과를 보여준다.
- [53] 도 11은 고전이성 흑색종 세포에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 세포의 변화를 확인한 도면으로,
- [54] 도 11a는 피어스 1 억제에 따라 펼쳐지지 않고 좁은 면적에서 배양되는 것을 확인한 것이고,
- [55] 도 11b는 전이성 마커인 F-ACTIN의 발현 위치가 변하는 것을 확인한 것이다.
- [56] 도 12는 고전이성 흑색종 세포에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 세포성장 억제

효과를 확인한 결과를 보여준다.

- [57] 도 13은 고전이성 흑색종 세포에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 세포 이동능력 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [58] 도 14는 세포 증식 억제제를 처리한 고전이성 흑색종 세포에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 세포 이동능력 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [59] 도 15는 고전이성 흑색종 세포에서 아노이키스 분석(anoikis assay)을 통해 피어스 1 억제에 따른 전이성 암세포의 사멸 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [60] 도 16은 실험동물에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(*in vivo*) 암 전이 억제 효과를 확인한 도면으로 피어스 1 녹다운 세포를 주입한 마우스와 피어스 1 발현 세포를 주입한 마우스에서 폐로의 전이 여부 및 생존곡선을 비교한 결과를 보여준다.
- [61] 도 17은 다양한 유형의 유방암에서 피어스 1 유전자의 발현 수준을 비교한 결과를 보여준다.
- [62] 도 18은 다양한 유형의 유방암 환자에서 피어스 1의 발현 수준에 따른 생존률을 비교한 결과를 보여준다.
- [63] 도 19는 ER 양성 유방암 세포주(MCF7)에서 피어스 1 발현 억제에 따른 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [64] 도 20은 ER 양성 유방암 세포주에서 피어스 1 발현 억제에 따른 세포 이동능력 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [65] 도 21은 전이성 유방암 실험동물에서 피어스 1 억제에 따른 유방암의 폐로의 전이 억제 효과를 확인한 결과를 보여준다.
- [66] 도 22는 삼중음성유방암 환자에서 피어스 1 발현에 따른 환자의 무전이 생존률(*metastasis-free survival*)을 비교한 결과를 보여준다.
- [67] 도 23은 삼중음성 유방암 세포(MDA-MB-231)에서 피어스 1 억제에 따른 대조군, 2종류의 피어스 1 녹다운 세포(KD#2, #3)의 이동능력 억제 효과 비교한 결과를 보여준다.

[68]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [69] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [70] 상술한 바와 같이, 피어스 1 유전자가 암종양 유전자인 p53에 의해 전사 조절될 수 있음이 알려져 있음에도 불구하고, 피어스 1 유전자의 직접적인 항암효과에 대하여 알려진 바가 없었다.
- [71]
- [72] 본 발명의 피어스 1 유전자를 세포 수준에서 억제하였을 때 암세포의 성장 속도 및 이주능이 감소하고, 마우스 모델 수준에서 암 전이 및 종양 성장이 억제되는 것을 확인하였으므로, 피어스 1 유전자의 발현 또는 피어스 1 단백질의 활성을 억제할 수 있는 물질은 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 조성물의 유효성분으로

유용하게 사용될 수 있으며, 상기 피어스 1 유전자의 발현 또는 피어스 1 단백질의 활성을 마커로 하여 항암제 후보물질을 스크리닝할 수 있다.

[73]

[74] 따라서, 본 발명은 피어스 1(Pierce1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[75]

본 발명의 "피어스 1"는 서열번호 1의 아미노산으로 구성되는 것이 바람직하다.

[76]

본 발명의 "피어스 1의 발현 또는 활성 억제제"는 피어스 1을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 뉴클레오티드(antisense nucleotide), siRNA, shRNA 및 리보자임으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[77]

상기 shRNA는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열로 구성되는 뉴클레오티드인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 화학적 합성, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 요구되는 뉴클레오타이드 서열의 증폭, 또는 제조합 합성에 의해 이미 존재하는 siRNA를 정제하는 등 당업계에 siRNA 제조 방법으로서 공지된 방법으로 제조된 것이라면 어떤 것을 사용하여도 좋다.

[78]

본 발명의 "피어스 1의 발현 또는 활성 억제제"는 피어스 1 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체(peptide mimetics), 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[79]

본 발명의 "암"은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하며, 구체적으로 폐암, 유방암, 전립선암 및 흑색종으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[80]

[81]

본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 다양한 조직의 암 환자를 대상으로 하여 피어스 1의 발현 수준을 확인한 결과, 직장암, 대장암, 난소암 및 신장암 등의 환자 조직에서 피어스 1의 발현 수준이 유의적으로 높은 것을 확인하였다(도 1).

[82]

또한, 본 발명자들은 폐암에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 항암 효과를 확인한 결과, 다양한 유형의 폐암 환자, 폐암 세포주 및 폐암 마우스 모델에서 피어스 1의 발현을 억제하였을 때 세포 성장 속도가 저하되며, 생체 내에서 종양 형성 또한 감소되는 것을 확인하였다(도 2 내지 도 7과 8).

[83]

또한, 본 발명자들은 다양한 전이성 암에서 피어스 1의 발현 수준이 유의적으로 증가되어 있으며, 특히 전이성 전립선 암에서 피어스 1의 발현이 높은 수준으로 나타나 있는 것을 확인하였다(도 9 및 10).

- [84] 또한, 본 발명자들은 전이성 흑색종에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 암 성장 억제 및 암 전이 억제 효과를 확인한 결과, 고전이성 흑색종 세포에서 피어스 1을 녹아웃 하였을 때 세포 증식능, 세포 이주능이 감소하고, 전이성 암세포의 사멸이 증가되는 것을 확인하였다(도 12 내지 도 15). 이와 함께, 고전이성 흑색종 세포주를 주입한 마우스 모델의 폐에서 종양이 형성되는 반면, 피어스 1을 녹아웃한 흑색종 세포를 주입한 마우스 모델에서는 폐 종양 조직의 형성이 억제되어 생존율이 증가하는 것을 확인하였다(도 16).
- [85] 또한, 본 발명자들은 유방암에서 피어스 1의 발현 억제에 따른 암 성장 억제 및 암 전이 억제 효과를 확인한 결과, 대부분의 유방암 종류에서 피어스 1의 발현 수준이 증가하여 있으며(도 17), 특히 HER2 발현성 유방암의 경우 피어스 1 발현이 낮을 때 생존율이 높음을 보이며, 유방암 세포, 유방암 환자 및 전이성 유방암 실험동물에서 피어스 1의 발현을 억제하였을 때, 암 세포의 성장 및 이주능이 억제되는 것을 확인하였다(도 19 내지 23).
- [86]
- [87] 따라서, 본 발명의 피어스 1 유전자(*Pierce1*)는 암 세포에서 발현 증가하여 있으며, 이를 억제하였을 때 암세포 성장과 종양형성을 억제할 뿐 아니라, 암의 전이를 유의적으로 억제할 수 있으므로, 피어스 1 유전자의 발현 억제; 피어스 1 단백질의 발현 억제; 또는 피어스 1 단백질의 활성 억제제는 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [88]
- [89] 본 발명의 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥일 수 있으며,
- [90] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고, 스템-루프(stem-loop)의 구조를 이루는 헤어핀 구조를 가질 수 있는데, 이를 특히 shRNA(short hairpin RNA)라 지칭한다. 한편, 상기 이중사슬 또는 스템 부위는 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수도 있다. 전체 길이는 10 내지 80 염기, 바람직하게는 15 내지 60 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 염기이다. 또한, 상기 루프 영역은 서열에 특별한 의미가 없으며, 단지 센스서열과 안티센스서열을 적당한 간격으로 연결하기 위하여 3-10 정도의 염기를 가지고 있으면 한정되지 않고 사용할 수 있다.
- [91] siRNA 말단 구조는 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조(protruding structure)와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하고 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의

돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[92]

[93] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[94]

경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

[95]

또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[96]

비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[97]

본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 목강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

- [98] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [99]
- [100] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [101] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 곡류 추출물을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여 시는 본 발명의 조성물을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [102] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [103]

- [104] 또한, 본 발명은 피어스 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [105] 본 발명의 "피어스 1"는 서열번호 1의 아미노산으로 구성되는 것이 바람직하다.
- [106] 본 발명의 "피어스 1의 발현 또는 활성 억제제"는 피어스 1을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 뉴클레오티드(antisense nucleotide), siRNA, shRNA 및 리보자임으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [107] 상기 shRNA는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열로 구성되는 뉴클레오티드인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 화학적 합성, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 요구되는 뉴클레오타이드 서열의 증폭, 또는 제조합 합성에 의해 이미 존재하는 siRNA를 정제하는 등 당업계에 siRNA 제조 방법으로서 공지된 방법으로 제조된 것이라면 어떤 것을 사용하여도 좋다.
- [108] 본 발명의 "피어스 1의 발현 또는 활성 억제제"는 피어스 1 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체(peptide mimetics), 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [109] 본 발명의 "암"은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 직장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하며, 구체적으로 폐암, 유방암, 전립선암 및 흑색종으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [110]
- [111] 본 발명의 피어스 1 유전자(*Pierce1*)는 암 세포에서 발현 증가하여 있으며, 이를 억제하였을 때 암세포 및 종양의 형성과 함께 암의 전이를 유의적으로 억제할 수 있으므로, 피어스 1 유전자의 발현 억제; 피어스 1 단백질의 발현 억제; 또는 피어스 1 단백질의 활성 억제제는 암 예방 및 개선용 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [112]
- [113] 본 발명에 따른 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 본 발명의 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한,

건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 본 발명의 조성물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물과 대사성 질병의 예방 및 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[114]

[115] 본 발명의 조성물을 건강음료로 이용하는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 0.03 g 이다.

[116]

[117] 또한, 본 발명의 조성물은 암 예방 및 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 암 예방 및 개선 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다. 본 발명의 식품 조성물은 암 예방 및 개선에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

[118]

[119] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[120]

[121] 또한, 본 발명은 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA를 마커로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[122] 본 발명의 스크리닝 방법은 하기 단계로 구성될 수 있다:

[123] i) 피어스 1 단백질을 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

[124] ii) 상기 단계 i)에서 처리된 세포주에서 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

[125] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA의

발현 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 감소하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.

- [126] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 상기 단계 ii)의 측정은 역전사 PCR (Reverse Transcription PCR), 실시간 PCR(real time RT-PCR), 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학 검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 피어스 1 단백질의 발현 유전자의 발현 수준은 역전사 PCR, 실시간 PCR 또는 노던 블랏을 수행하여 측정하는 것이 바람직하며, 피어스 1 단백질의 발현 수준은 웨스턴블랏, 면역조직화학 염색법, 면역침강 및 면역형광법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않고, 당업계에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하기 위해 사용하는 검출 방법은 어떤 것을 사용하여도 무방하다.

[127]

- [128] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은 하기 단계로 구성될 수 있다:

[129] i) 피어스 1 단백질을 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

[130] ii) 상기 단계 i)에서 처리된 세포주에서 피어스 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및

[131] iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 피어스 1 단백질의 활성 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 감소하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계.

- [132] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 상기 단계 ii)의 측정은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 당업계에서 단백질의 활성을 측정하기 위해 알려진 방법이라면 어떤 것을 사용하여도 무방하다.

[133] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 전립선암, 간암 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[134]

[135] 본 발명의 피어스 1 유전자(*Pierce1*)는 암 세포에서 발현 증가하여 있으며, 이를 억제하였을 때 암세포 및 종양의 형성을 유의적으로 억제할 수 있으므로, 피어스 1 유전자 또는 피어스 1 단백질은 항암제 후보물질의 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[136]

[137] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에

의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[138]

[139] **[실시예 1]**

[140] **다양한 유형의 암에서 피어스 1 발현 수준의 변화 확인**

[141] 피어스 1(PIERCE 1)의 발현에 따른 암 발병과의 상호관계를 분석하였다.

[142] 온코마인(oncomain) 분석을 수행하여, 직장암(Rectal adenoma) 및 대장암(colon adenocarcinoma), 환자로부터 암 조직을 수득하여, 피어스 1 유전자의 발현 수준을 비교하였다.

[143] 그 결과, [도 1]에서 나타난 바와 같이 직장암 및 대장암에서 피어스 1의 발현 수준이 정상 조직에 비해 증가한 것을 확인하였으며, 이를 통해 암 발병에 피어스 1이 다양한 암의 발병과 관련되어 있을 것으로 예상하였다. 또한, 대장암의 종양 크기에 따라 피어스 1의 발현 수준을 분석하였을 때, 대장암 종양의 크기가 커짐에 따라 피어스 1의 발현 수준이 보다 증가하는 것으로 확인하여, 암의 발병뿐 아니라 진행에 있어서도 피어스 1의 발현이 직접적인 영향을 줄 수 있을 것으로 예상하였다(도 1).

[144]

[145] **[실시예 2]**

[146] **폐암에서 피어스 1 발현 억제에 따른 종양성장 억제 효과 확인**

[147] **<2-1> 폐암 환자에서 피어스 1의 발현 수준에 따른 생존 곡선 분석**

[148] 암 환자에서 피어스 1의 발현 수준이 증가하여있음을 확인하여, 피어스 1 발현 수준에 따라 폐암 환자에서도 예후 양상의 차이를 나타내는지 확인하였다. Kaplan-Meiers 생존 곡선 분석을 통해 피어스 1의 발현 수준에 따른 전체 생존률(overall survival) 및 암 무진행 생존률(progression free survival)을 확인하였다.

[149] 그 결과, [도 2]에서 나타난 바와 같이 피어스 1의 발현 수준이 낮은 군에 속한 환자들에서 전체 생존률 및 암 무진행 생존률이 모두 높은 수준으로 나타나는 것으로 확인하였다(도 2).

[150]

[151] **<2-2> 폐암 환자의 조직에서 피어스 1의 발현 수준 확인**

[152] 사람의 폐암에서 피어스 1의 발현 수준을 확인하기 위해 151명의 폐암 환자에서 얻은 조직 및 정상 조직에서 피어스 1의 발현을 확인하였다.

[153] 먼저 폐암 면역항체화학법을 통해 폐암 조직에 있는 피어스 1의 발현을 확인하였고(도 3a), 정상세포에서 확인되는 피어스 1을 low, 폐암 조직 중 20-40%를 middle, 그리고 41%이상을 high로 봤을 때 피어스 1이 71명의 환자에서 middle로, 그리고 55명의 환자에서 high로 발견되었으며, 총 126명의 폐암 조직에서 피어스 1이 과발현된 것을 확인하였다(도 3b).

[154]

[155] <2-3> 다양한 유형의 폐암 환자에서 피어스 1의 발현 수준 확인

[156] KRAS 변이는 폐암 유발의 주요 유전자 중 하나로, 전체 폐암 발병 원인 중 약 25%를 차지한다. 피어스 1 유전자의 발현이 암세포 관련 유전자에 의해 영향을 받을 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 먼저 폐암 환자를 stage I과 stage II, 대세포와 선암세포, 및 KRAS 성 변이 여부에 따라 정상군(No value), KRAS 야생형군(KRAS WT) 및 KRAS 변이군(KRAS Mut)으로 나누어, 피어스 1 발현 수준을 확인하였다.

[157] 그 결과, [도 4]에서 나타난 바와 같이, 폐암 환자 중 stage II 폐암 및 선암세포에서 피어스 1의 발현이 증가되어 있었으며, 특히 선암세포 내 KRAS 변이군에서 KRAS 야생형군에 비해 피어스 1의 발현 수준이 유의적으로 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[158]

[159] 이와 함께, KRAS 뿐 아니라 HRAS 발현에 있어서도 피어스 1 발현과의 연관성을 확인하고자, HRas^{G12V}를 과발현시킨 세포에서 피어스 1의 발현 정도를 확인하였다.

[160] 그 결과, [도 5a]에서 나타난 바와 같이 Hoefflich 연구에서 수행한 마이크로어레이를 분석한 결과, HRas^{G12V}변이체가 과 발현 후에 피어스 1의 발현 정도를 확인한 결과, 암세포 내에서 HRas^{G12V} 변이체가 증폭되었을 때, 피어스 1의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 5a).

[161]

[162] 또한 추가적인 KRAS 변이성 폐암 2종과 KRAS 정상 폐암 5종에서 피어스 1 발현에 따른 세포 성장 변화 정도를 확인하였다. 먼저 세포를 12 well dish에 배양 후 피어스 1 및 대조군에 대한 siRNA를 lipofectamine RNAiMAX로 transfection한 뒤 72시간 후 crystal violet으로 세포를 염색하였다.

[163] 그 결과, [도 5b]에서 나타난 바와 같이 모든 KRAS 변이(KRasm) 폐암에서 피어스 1 발현 저하에 따른 성장 억제가 관찰되었으며, KRAS 정상세포(WT)에서는 5종 중 3종에서 피어스 1 억제에 따른 성장 지연 효능을 확인하였다(도 5b).

[164]

[165] <2-4> 폐암 세포주에서 피어스1 발현 억제에 따른 암세포 성장 억제 효과 확인

[166] 폐암세포에서 피어스 1의 발현 수준에 따라 콜로니 형성 수준과 관련성이 있는지를 확인하기 위하여, KRas 변이를 가지는 암세포주인 A549 폐 중앙세포를 적절히 조작하여 실험에 사용하였다.

[167] 피어스 1 발현 저하 암세포주를 제작하기 위해, 피어스 1 발현을 억제시킬 수 있는 shRNA (sigma) 시퀀스(서열번호 2 또는 3)를 사용하여 293T cell 에 PEI 로 Transfection 한 후 24시간 간격으로 상층액을 회수하여 렌티바이러스를 만들었다. 이를 원하는 A549 폐 중앙세포주에 polybrene과 같이 넣어 접종을 시키고, puromycin을 이용하여 피어스 1 녹다운 세포주를 선택하였다. 위의

세포를 60 mm 크기의 배양접시에 5×10^4 세포/배양접시의 밀도로 분주하고 배양하여 피어스 1의 발현이 정상인 세포군과 저하된 세포군으로 나누어 콜로니 형성(Colony Formation) 실험을 수행하였다. 각 배양접시의 세포들을 10 mM PBS (pH7.2)로 세척하고 10% 포르말린(Formalin)으로 고정시킨 뒤 크리스탈 바이올렛(Crystal Violet)으로 염색하여 콜로니 수를 측정하였다.

- [168] 그 결과, [도 6]에서와 같이, shRNA로 피어스 1의 발현을 억제한 폐암 세포에서 대조군에 비해 피어스 1의 mRNA 발현 수준이 억제되는 것을 확인하였다(도 6a). 또한, A549 폐 종양세포의 콜로니 형성이 피어스 1의 발현이 저하 되었을 시 감소되었으며 이는 세포의 성장 속도가 감소하였기 때문인 것으로 확인하였다(도 6b 및 도 6c).

[169]

- [170] **<2-5> 폐암유발 마우스 모델에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(in vivo) 종양성장 억제 효과 확인**

- [171] 세포 수준에서 피어스 1의 발현을 억제하면 암세포의 성장 속도가 감소하는 것을 확인하였으므로, 생체 내(in vivo)에서도 피어스 1 발현 억제에 의해 종양 형성이 억제될 수 있는지 확인하였다.

- [172] 먼저, 우레탄(Urethane)에 의한 폐암 형성에서의 피어스 1의 발현 저하에 따른 효과를 확인하기 위해서 FVB 배경의 1 개월령 정상 마우스(n=7)와 피어스 1 녹아웃(n=9) 마우스에 1 g/kg 우레탄을 1주일에 한 번씩 4번 투여하여 폐암 마우스모델을 제조하였다. 제조된 마우스모델은 3개월 동안 사육한 다음, 희생하여 마우스의 폐를 관찰하였다.

- [173] 그 결과, [도 7]에서와 같이, 피어스 1 녹아웃 마우스의 경우에 정상 마우스 대비하여 폐암 병변의 수가 줄어 들었으며 조직검사 결과를 기반으로 평가 시에도 발병률이 상당히 약화되었음을 확인하였다(도 7).

[174]

- [175] **<2-6> KRAS변이 마우스 모델에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(in vivo) 종양성장 억제 효과 확인**

- [176] KRas^{G12D} 변이에 의한 폐암 마우스 모델에서의 피어스 1 발현 저하 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

- [177] 케이라스-엘에이2(KRas-LA2) 마우스 모델과 피어스 1 녹아웃 마우스 모델을 교배시켜 태어난 마우스 중에서, KRas-LA2 및 피어스 1의 발현 여부를 확인하였다. 확인 후, Kras-LA2(KI/+), Pierce1(+/-)인 마우스는 대조군(n=12)으로 사용하였고, Kras-LA2 (KI/+), Pierce1(-/-)인 마우스는 실험군(n=12)으로 사용하였다. 각각 대조군 또는 실험군으로 나눈 마우스 모델을 동일 환경에서 사육하고, 15주령일 때 마우스를 희생하여 폐를 비교 관찰하였다.

- [178] 그 결과, [도 8]에서와 같이, 피어스 1 녹아웃 마우스의 경우에 대조군 대비하여 병변의 수와 크기에 있어서 현저하게 줄어들었으며 이는 통계학적으로 매우 유의성이 있는 결과를 얻었다(도 8a 및 8b). 동시에 각 마우스에서 얻어진 폐암

샘플을 가지고 H&E 염색을 통해 40x, 100x 의 배율로 관찰한 결과에서도 상기의 결과를 일치함을 확인하였다(도 8c).

[179]

[180] **[실시예 3]**

[181] **전이성 암에서 피어스 1의 변이 유형 및 발현 수준의 변화 확인**

[182] **<3-1> 다양한 암에서 피어스 1의 변이 유형 분석 및 전이성 암에서의 복제 양상 분석**

[183] 다양한 암에서 피어스 1의 변이 유형을 씨바이오포탈(C bioportal) 및 온코마인 데이터베이스를 통해 분석하였으며 특히 전이성 전립선 암에서의 피어스 1의 복제 양상에 대해 분석을 수행하였다.

[184] 그 결과, [도 9]에서 나타난 바와 같이, 전립선 암과 같은 대부분의 암에서 2% 미만으로 피어스 1 유전자에 변형이 나타남을 확인하였다. 이 중 전이성 전립선 암에서 피어스 1이 20% 이상 증폭 되어 있으며, 이는 여러 전이성 암에서 피어스 1이 과 발현되어 있는 온코마인 데이터베이스 분석과 상응하는 결과로 볼 수 있었다. 반면에 비전이성 전립선 암에서는 큰 차이를 볼 수 없었다. 이는 전이성 암에서 피어스 1이 중요하게 작용할 수 있으며, 이러한 암 전이를 억제하는데 중요한 타겟이 될 수 있음을 시사한다(도 9).

[185]

[186] **<3-2> 전이성 암에서 피어스 1의 발현 수준 확인**

[187] 원발성 암조직에서 피어스 1의 발현 수준이 증가하는 바와 더불어, 전이성 암에서 피어스 1이 암 전이 억제 타겟이 될 수 있음을 확인하였으므로, 실제 전이성 암에서 피어스 1의 발현 수준을 확인하였다.

[188] 온코마인(oncomain) 분석을 수행하여, 여러 종류의 암조직(multi cancer) 및 전립선 암조직에서 원발성 암(primary cancer) 및 전이성 암에 따른 피어스 1의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

[189] 그 결과, [도 10]에서 나타난 바와 같이 여러 종류의 암 및 전립선 암에서 원발암보다 전이성 암에서 피어스 1의 mRNA 발현 수준이 높은 것으로 확인하였다(도 10a 및 도 10b). 특히, 전립선 암을 비교 분석한 결과, 전립샘(prostate gland)에서 피어스 1의 발현 수준은 원발성 암보다 높은 반면, 전이성 암보다 낮은 것을 확인하여(도 10c), 전이성 암에서 피어스 1의 발현 수준이 보다 높은 것으로 확인하였다.

[190]

[191] **[실시예 4]**

[192] **전이성 흑색종에서 피어스 1 발현 억제에 따른 종양성장 억제 및 전이 억제 효과의 확인**

[193] **<4-1> 고전이성 암에서 피어스 1 발현 억제에 따른 세포 특징 확인**

[194] 전이성 암에서 피어스 1의 발현 수준이 높은 수준으로 나타나는 것을 확인하였으므로, 피어스 1의 발현을 억제하여 전이성 암세포주의 특징을

확인하였다. 고전이성 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 shRNA(shP1)을 처리하여 피어스 1의 발현 저하를 유도한 뒤, 세포를 배양하면서 형태를 관찰하였다. 그런 다음, B16F10 세포를 계대 배양하고 2일 뒤 파라포름알데하이드로 세포를 고정시킨 후, 항-F-ACTIN 항체 및 항-paxillin 항체를 이용하여 세포를 면역 염색하여, 세포 내 F-ACTIN 및 paxillin 단백질의 발현 수준을 확인하였다.

- [195] 그 결과, [도 11a]에서 나타난 바와 같이 대조군 세포인 Ctrl의 B16F10 세포가 퍼져서 자라는 형태를 나타내는 것에 비해, 피어스 1의 발현이 저하되면서 세포움직임 저하에 따른 세포가 뭉치는 현상을 나타내는 것으로 확인하였다(도 11a). 또한, 세포 내 전이성 마커의 발현을 확인한 결과, [도 11b]에서 나타난 바와 같이 대조군 세포에서는 F-ACTIN이 줄기처럼 세포 전체에 형성되어 있으며, F-ACTIN 밑에 paxillin이 위치해 있는 것으로 확인되는 반면, 피어스 1의 발현이 저하된 세포에서는 F-ACTIN이 사라지는 것으로 확인하여, 세포의 움직임이 저하되는 것을 분자수준에서 확인하였다(도 11b).

[196]

[197] **<4-2> 피어스 1 발현 저하에 의한 전이성 흑색종 세포성장 억제 효과 확인**

- [198] 피어스 1의 발현을 저하하였을 때 B16F10세포 증식 수준의 변화를 확인하였다. B16F10 세포에 shRNA(shP1)을 처리하여 피어스 1의 발현 저하를 유도한 실험군 세포 및 대조군 세포를 1×10^5 세포씩 배지가 포함된 6-웰 플레이트에 접종하여 배양하면서, 하루에 한번씩 세포 수를 계수하였다. 이와 함께, 세포 성장 및 콜로니 형성능(colony forming activity)을 확인하기 위해 6-웰 및 60 mm 플레이트에 실험군 세포 또는 대조군 세포를 1×10^5 세포 및 1×10^4 세포씩 분주하고 배양하여, 5일 및 7일 후에 세포를 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 관찰하였다. 모든 실험은 동일한 조건에서 독립적으로 3 회 반복하여 실험을 수행하였다(대조군명: shCTL; 실험군명: shP#3, shP#4 및 shP#5).

- [199] 그 결과, [도 12]에서 나타난 바와 같이 피어스 1의 발현이 저하됨에 따라 전이성 흑색종 세포주의 증식 속도가 감소하는 것을 통해 세포 분열 속도가 감소하는 것을 확인하였다(도 12a). 또한, 세포 성장 및 콜로니 형성능을 크리스탈 바이올렛 염색하여 확인하였을 때 역시, 피어스 1 녹다운에 의해 세포 성장 및 콜로니 형성이 대조군 세포에 비해 감소되는 것을 확인하였다(도 12b 및 도 12c).

[200]

[201] **<4-3> 피어스 1 발현 저하에 의한 전이성 흑색종 세포 이동능력 억제 효과의 확인**

- [202] 피어스 1의 발현을 저하하였을 때 세포 이동능이 저하하는지 확인하기 위해 wound healing 분석을 수행하였다. B16F10 세포에 shRNA(shP1)을 처리하여 피어스 1의 발현 저하를 유도한 실험군 세포 및 대조군 세포를 각각 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포씩 접종하여 무혈청 배지(serum-free media)에서 배양을

개시하고, 다음날 200 μl 팁으로 스크래치를 낸 후, 하루를 추가 배양하여 세포의 스크래치된 영역으로의 세포 이동을 관찰하였다.

- [203] 또한, 트랜스웰 플레이트의 위쪽 챔버에 혈청 배지를 가하고, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 매트릭젤(matrigel) 또는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 피브로넥틴(fibronetic)의 농도로 37°C에서 코팅하였다. 다음날 아래쪽 챔버에는 혈청 배지를 가하고, 매트릭젤 또는 피브로넥틴이 코팅된 위쪽 챔버에는 무혈청 배지와 함께 10^4 세포의 피어스 1 발현 억제 세포 및 대조군 세포를 접종하여 2 일 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 크리스탈 바이올렛으로 세포를 염색하여 관찰하였다.
- [204] 세포 증식 억제에 따른 세포이동 억제와 비슷한 현상이 발생하므로 세포의 성장과 별개로 이주능 변화 연구를 위해 세포 증식을 억제한 환경에서 이주능 연구가 필요하다. 세포 증식을 억제한 환경에서 세포 이주능을 확인하기 위해, 피어스 1의 발현 저하를 유도한 실험군 세포 및 대조군 세포에 DNA 중합 억제제인 시스테인 β -D-아라비노푸라노시드(Cytosine β -D-arabinofuranoside)을 10 μM 농도로 처리하여 세포 증식을 억제한 후, 위와 동일한 방법으로 wound healing 분석을 수행하였다.
- [205] 그 결과, [도 13]에서 나타난 바와 같이 Wound healing 분석을 통해 피어스 1의 발현 저하를 통해 전이성 세포의 움직임이 저하되어 스크래치로 세포 이동이 늦춰지는 것을 확인하였다(도 13a 및 도 13c). 이와 함께 매트릭젤 또는 피브리노겐을 코팅한 플레이트에서 B16F10 세포를 배양하였을 때, 피어스 1 발현 저하에 의해 매트릭젤에 대한 침범(invasion) 및 피브로넥틴에 대한 이주가 저하되는 것을 확인하였다(도 13b 및 도 13d). 또한, [도 14]에서 나타난 바와 같이 세포 증식을 억제하고 세포 이주능을 분석하였을 때, 피어스 1의 억다운에 의해 세포 증식뿐 아니라 세포 이주능 또한 억제되는 것으로 확인하였다(도 14).
- [206]
- [207] **<4-4> 피어스 1 발현 저하에 의한 전이성 흑색종 세포사멸 효과 확인**
- [208] 이와 함께, 아노이키스 분석(anoikis assay)으로 세포가 바닥에 부착배양하지 못하는 조건에서 피어스 1의 발현 억제를 유도한 B16F10 세포 또는 대조군 세포 1×10^4 개를 3일 동안 배지에서 유지시켜 세포 사멸을 유도한 다음, 2 μM 의 Calcein-AM 및 4 μM EthD-1 용액을 각각의 세포에 가하고 30 분간 배양한 뒤 형광현미경으로 관찰하여 생존 세포 및 사멸 세포의 여부를 관찰하였다.
- [209] 그 결과, [도 15]에서 나타난 바와 같이 피어스 1의 발현이 억제됨에 따라 B16F10 세포가 서로 뭉치는 양상을 나타내며, 뭉쳐진 세포의 중앙 부위에서 세포 사멸이 활발히 유도되는 것을 확인하여(도 15), 피어스 1의 발현을 억제하는 것을 통해 전이성 암을 효과적으로 사멸 유도할 수 있을 것으로 확인하였다.
- [210]
- [211] **<4-5> 실험동물에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(in vivo) 암 전이 억제 효과의 확인**
- [212] 시험관 내 수준에서 피어스 1의 발현을 억제하여 전이성 암의 증식 및 이주능을

억제할 수 있을 것으로 확인하여, 생체 내에서 피어스 1의 발현 수준 억제에 따른 암 전이 억제 효과를 확인하였다.

[213] 3주령의 B6 마우스의 꼬리 정맥에 피어스 1의 발현을 억제한 B16F10 세포 또는 대조군 세포 2×10^5 개를 주입하여 5 주 동안 마우스를 정상 조건에서 사육하였다. B16F10 세포를 주입하고 5 주 뒤, 마우스의 사멸율을 확인한 후 마우스를 희생하여 폐를 적출하였다. 적출한 폐에서 암 조직의 형성을 관찰하고, 폐 조직 시료를 hematoxylin & Eosin 염색하여 종양 조직에서의 종양 세포의 형성 여부를 확인하였다.

[214] 그 결과, [도 16]에서 나타난 바와 같이 피어스 1의 발현을 억제하지 않은 B16F10 세포를 주입한 대조군 마우스는 세포 주입 후 4 내지 5주 사이에 죽는 반면, 피어스 1의 발현이 억제된 B16F10 세포를 주입한 실험군 마우스에서는 5주가 경과하여도 마우스가 생존할 수 있음을 확인하였다(도 16a). 또한, 폐 조직을 관찰한 결과 대조군 마우스의 폐 조직에서는 B16F10 세포의 이동에 의해 종양 조직이 형성되는 반면, 실험군 마우스의 폐 조직에서는 피어스 1의 발현 저하로 인해 폐로의 전이가 10 배 이상 억제되는 것으로 확인하였다(도 16b 및 도 16c). 아울러, 대조군 및 실험군의 폐 조직을 염색하여 관찰한 결과, 대조군 마우스의 폐 조직에서는 종양 부위가 뚜렷하게 형성됨을 확인하였으나, 실험군 마우스의 폐 조직에서는 피어스 1 발현이 저하됨에 따라 종양 조직의 크기가 매우 작거나 형성되지 않음을 확인하였다(도 16d).

[215]

[216] **[실시예 5]**

[217] 유방암에서 피어스 1 발현 억제에 따른 종양성장 억제 및 전이 억제 효과의 확인

[218] **<5-1> 다양한 유형의 유방암에서 피어스 1 유전자의 발현 수준 분석**

[219] 피어스 1의 발현 양상이 폐암뿐 아니라 다른 암에서도 연관성을 가지는 것을 확인하고자 하였다. 유방암은 크게 루미날 A(Luminal A), 루미날 B(Luminal B), HER2 양성, 삼중음성유방암(TNBC)의 4 종류로 나눌 수 있다. 이에, 유방암 종류와 에스트로젠 리셉터(ER) 발현 유무에 따른 피어스 1 유전자의 발현 양상을 온코마인 데이터베이스(Oncomine Database)를 통해서 비교 분석하였다.

[220] 그 결과, [도 17]에서 나타난 바와 같이, 대부분의 유방암 종류에서 피어스 1의 발현이 증가되어 있으며(도 17a) 특히, 에스트로젠 리셉터가 양성인 유형의 유방암에서 피어스 1의 발현 억제는 유방암 치료에 효과를 지니고 있을 것으로 예상하였다(도 17b).

[221]

[222] **<5-2> 다양한 유형의 유방암 환자에서 피어스 1의 발현 수준에 따른 생존 곡선 분석**

[223] 이와 함께, Kaplan-Meiers 생존 곡선 분석을 수행하여 유방암의 종류 및 피어스 1의 발현 수준에 따른 환자의 생존 여부와의 상관 관계를 분석하였다.

- [224] 그 결과, [도 18]에서 나타난 바와 같이 HER2 양성 유방암 환자 및 기저 유사성 2형(basal-like 2 type)의 유방암 환자에서 피어스 1 발현 수준이 낮은 환자가, 피어스 1 발현 수준이 높은 환자에 비해 장기간 생존하는 것을 확인하였다(도 18a 및 도 18b). 이와 반대로, HER2 음성 유방암 환자 혹은 루미날 A 형의 환자에서는 피어스 1 발현 수준이 높은 환자에서 피어스 1 발현 수준이 낮은 환자에 비해 장기간 생존하는 경향을 나타내는 것으로 확인하였다(도 18c).
- [225]
- [226] <5-3> 유방암 세포주에서 피어스 1 발현 억제에 따른 암세포 성장 억제 효과 확인
- [227] 피어스 1의 발현을 저하하였을 때 ER 양성 유방암 세포주인 MCF7 세포의 증식 수준의 변화를 확인하였다. MCF7 세포에 shRNA를 처리하여 피어스 1의 발현 저하를 유도한 실험군 세포 및 대조군 세포를 2×10^5 세포씩 배지가 포함된 6-웰 플레이트에 접종하여 배양하면서, 3일에 한번씩 세포 수를 계수하였다. 그런 다음, 배양 개시 9일 후에 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 관찰하였다.
- [228] 그 결과, [도 19]에서 나타난 바와 같이, MCF7 세포에서 피어스 1의 발현을 억제함에 따라 세포 증식 속도가 대조군에 비해 절반 수준으로 억제되는 것을 확인하였다(도 19).
- [229]
- [230] <5-4> 유방암 세포주에서 피어스 1 발현 억제에 따른 세포 이동능력 억제 효과 확인
- [231] ER 양성의 MCF7 세포주에서 피어스 1 발현 억제에 따른 세포 이주능을 확인하기 위해 wound healing 분석을 수행하였다. 실험군(2종류의 PIERCE1 낙다운(KD) 세포주) 및 대조군 세포(MCF7 세포)를 각각 2×10^5 세포씩 6-웰 플레이트에 분주하여 부착 배양한 후, 스크래치를 넘과 동시에 증식을 최소화시키기 위해 0.5% 혈청 배지로 배지를 교환하고, 세포를 배양하였다. 세포를 배양하면서, 이틀에 한번씩 스크래치된 영역으로 세포가 이동하는 것을 관찰하여 세포 이주능을 확인하였다.
- [232] 그 결과, 피어스 1의 발현이 억제되면, 대조군 보다(con) 전이능 마커인 wound closure 속도가 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 20).
- [233]
- [234] <5-5> 실험동물에서 피어스 1 발현 억제에 따른 생체 내(in vivo) 유방암 전이 억제 효과 확인
- [235] 생체 내에서 피어스 1의 발현 수준에 따른 암 전이 억제 효과를 확인하기 위하여, MMTV-PyMT 과발현 마우스와 PIERCE1 KO마우스를 교배하여 유방암을 유도하였고, 이들의 폐 전이를 관찰하였다.
- [236] polyoma virus의 middle T antigen인 PyMT 단백질이 MMTV 프로모터에 의해 유방 특이적으로 발현되는 마우스 모델인 MMTV-PyMT 유방암 마우스 모델에서, 피어스 1 유전자를 야생형(정상 대조군, WT), 이형접합성

변이(heterozygous mutation, Het) 및 발현 억제(knockout, KO)된 마우스 모델 군을 각각 준비하였다. 그런 다음, 마우스를 14-16 주령까지 사육하고 희생하여 폐로 전이된 유방암의 수를 측정하였다. 희생한 마우스의 유방암 종양 조직을 수득하고, 균질화하여 세포 단위로 분리하였다. 분리 및 수득한 유방암 조직 유래의 세포로부터 mRNA를 추출하여 유전자형 별로 피어스 1의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

- [237] 그 결과, [도 21a]에서 나타난 바와 같이 유방암 조직 유래 세포에서 피어스 1 mRNA 발현 수준을 확인하였을 때, 이형접합성 변이 마우스군에서는 야생형 대조군과 유사한 수준으로 피어스 1 mRNA 발현 수준이 유지되나, KO 마우스군에서는 피어스 1 mRNA가 현저히 낮은 수준으로 발현되는 것을 확인하였다. 또한, [도 21b]에 나타난 바와 같이 피어스 1 유전자를 발현 억제를 유도한 마우스군에서 이형접합성 변이 및 야생형의 대조군에 비해 유방암 전이가 감소한 것을 확인하였다.

[238]

- [239] **<5-6>삼중음성 유방암에서 피어스 1 발현 억제에 따른 전이 억제 효과의 확인**

[240] 다양한 유방암 환자에서 피어스 1 발현 수준에 따른 생존 곡선 분석

- [241] Kaplan-Meiers 생존 곡선 분석을 수행하여 유방암의 종류 및 피어스 1의 발현 수준에 따른 환자의 생존 여부와 상관 관계를 분석하였다.

- [242] 그 결과, [도 22]에 나타난 바와 같이 피어스 1의 발현이 높은 삼중음성 유방암환자에서 피어스 1이 낮은 환자보다 암 전이가 높은 것을 확인하였다(도 22).

[243]

[244] 피어스 1 발현 저하에 의한 삼중음성 유방암 세포 이동능력 억제 효과의 확인

- [245] 먼저 삼중음성 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포 대조군, 및 2종류의 PIERCE1 낙다운(KD) 세포주를 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포씩 분주하고 다음 날 200 ul 팁으로 스크래치를 낸 후 이틀 뒤 성장 억제제 처리가 없거나 있는 상황에서 관찰하였고, 이에 대한 wound area를 counting하였다.

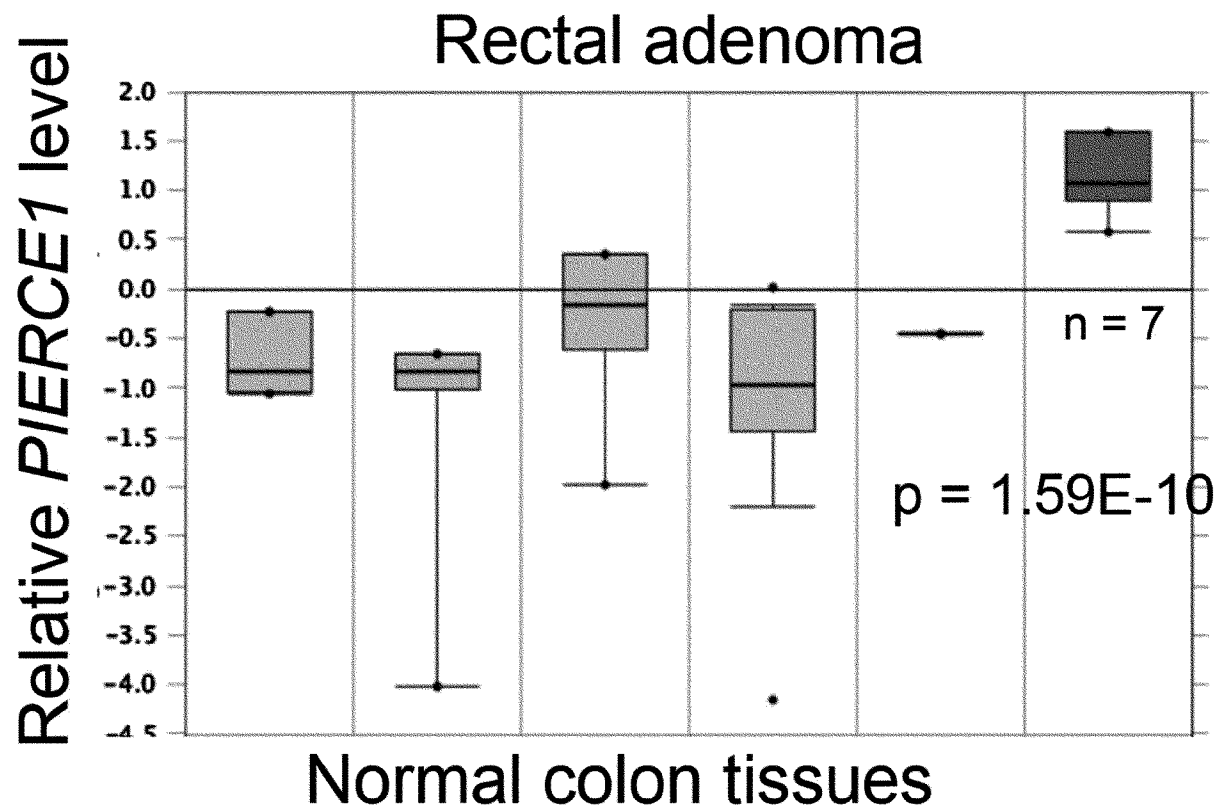
- [246] 그 결과, [도 23]에 나타난 바와 같이, 피어스 1의 발현이 억제되면, 삼중음성 유방암세포에서 대조군 보다(CTL) 전이능 마커인 wound closure 속도가 현저히 줄어들며, 이는 세포 성장 억제 환경에서도 동일하게 관찰되는 것을 확인하였다(도 23 a 및 도23b).

청구범위

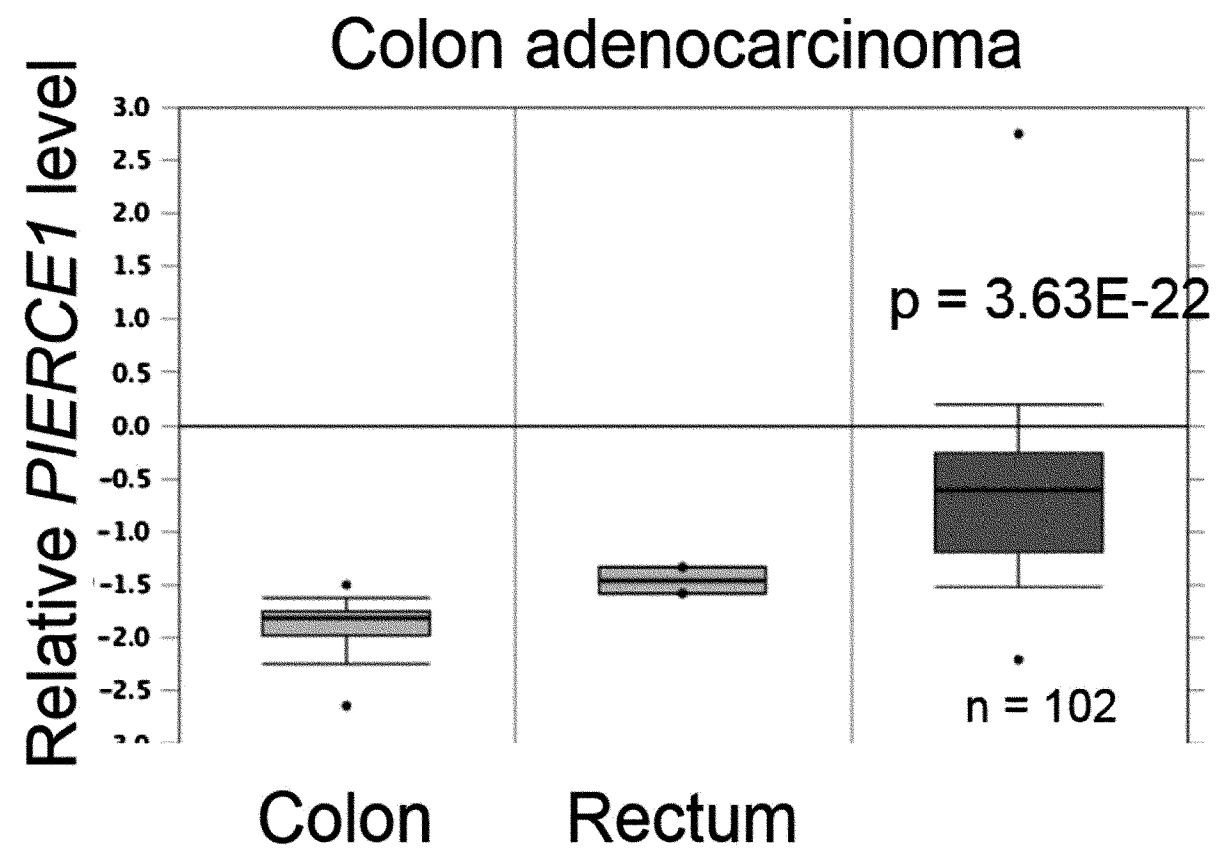
- [청구항 1] 피어스 1(Pierce1) 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 피어스 1 단백질은 서열번호 1의 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 피어스 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제는 피어스 1을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 뉴클레오티드(antisense nucleotide), siRNA, shRNA 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 피어스 1의 발현 또는 활성 억제제는 피어스 1 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체(peptide mimetics), 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 암은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 및 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 피어스 1 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 개선용 건강기능식품.
- [청구항 7] i) 피어스 1 단백질을 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
ii) 상기 단계 i)에서 처리된 세포주에서 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA의 발현 정도를 측정하는 단계; 및
iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 피어스 1 단백질 또는 이의 발현 유전자 mRNA의 발현 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 감소하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 단계 ii)의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time RT-PCR), 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학 검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법.

- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 암은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 및 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법.
- [청구항 10] i) 피어스 1 단백질을 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
 ii) 상기 단계 i)에서 처리된 세포주에서 피어스 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
 iii) 상기 단계 ii)에서 측정한 피어스 1 단백질의 활성 수준이, 피검물질을 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해 감소하도록 하는 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 단계 ii)의 측정은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 암은 직장암, 대장암, 난소암, 신장암, 자궁경부암, 폐암, 유방암, 전립선암, 간암, 및 흑색종 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 후보물질 스크리닝 방법.
- [청구항 13] 약학적으로 유효한 양의 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.
- [청구항 14] 약학적으로 유효한 양의 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 억제방법.
- [청구항 15] 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 과증식성 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포사멸 촉진 또는 세포이동 억제 방법.
- [청구항 16] 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방, 치료 또는 전이 억제 용도.
- [청구항 17] 피어스 1(Pierce1) 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 과증식성 세포사멸 촉진 또는 세포이동 억제 용도.

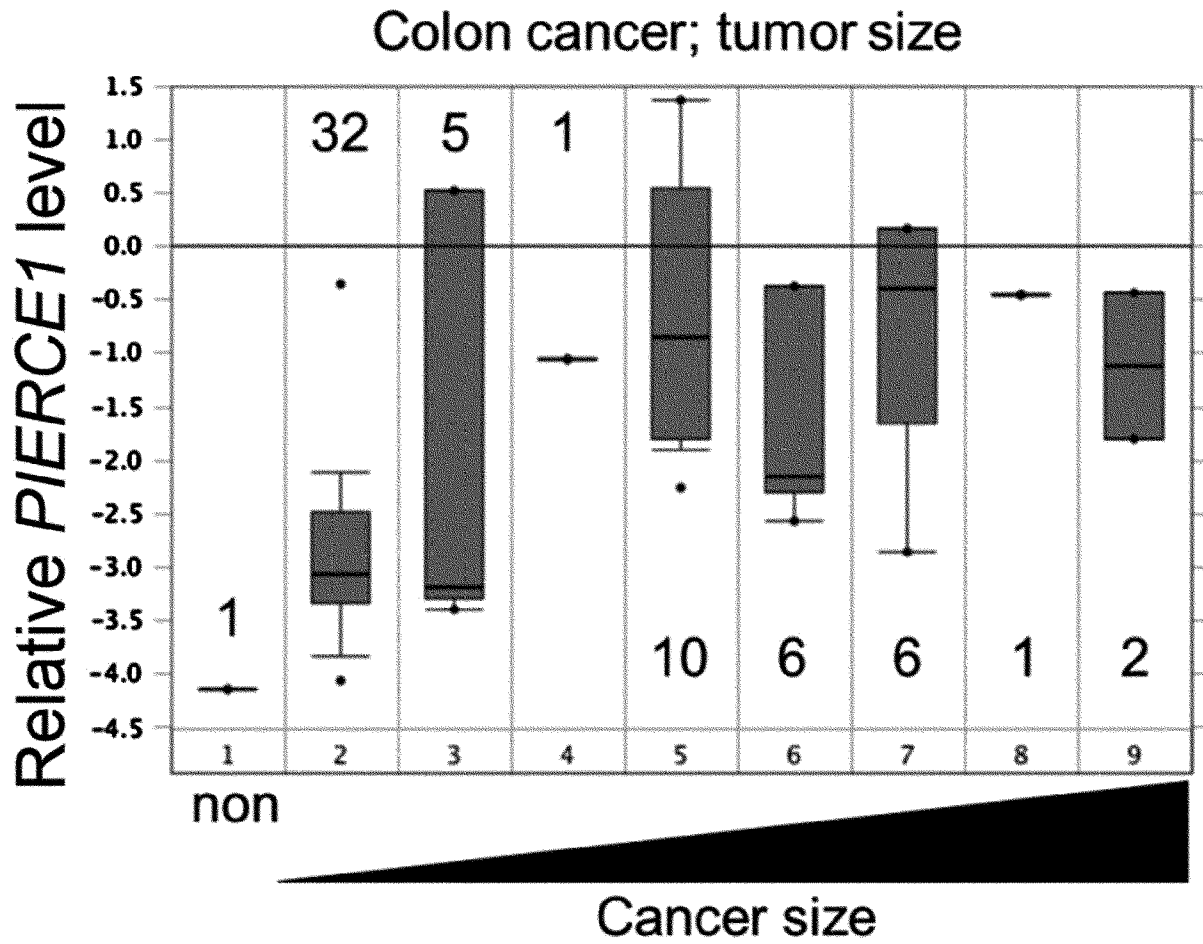
[도1a]



[도1b]



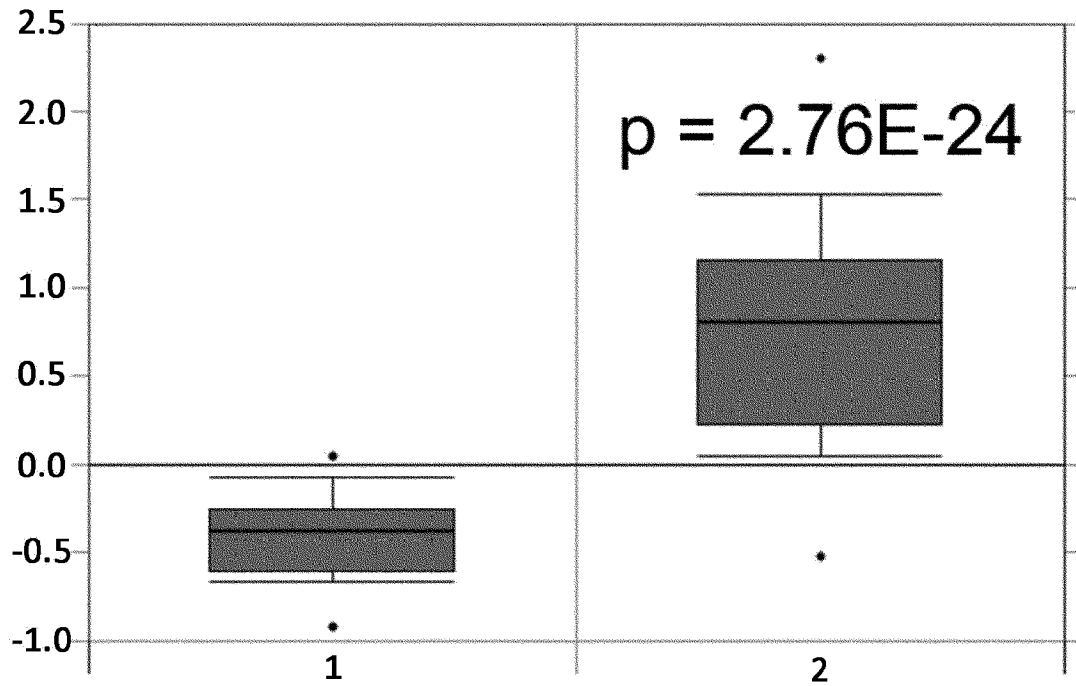
[도1c]



[도1d]

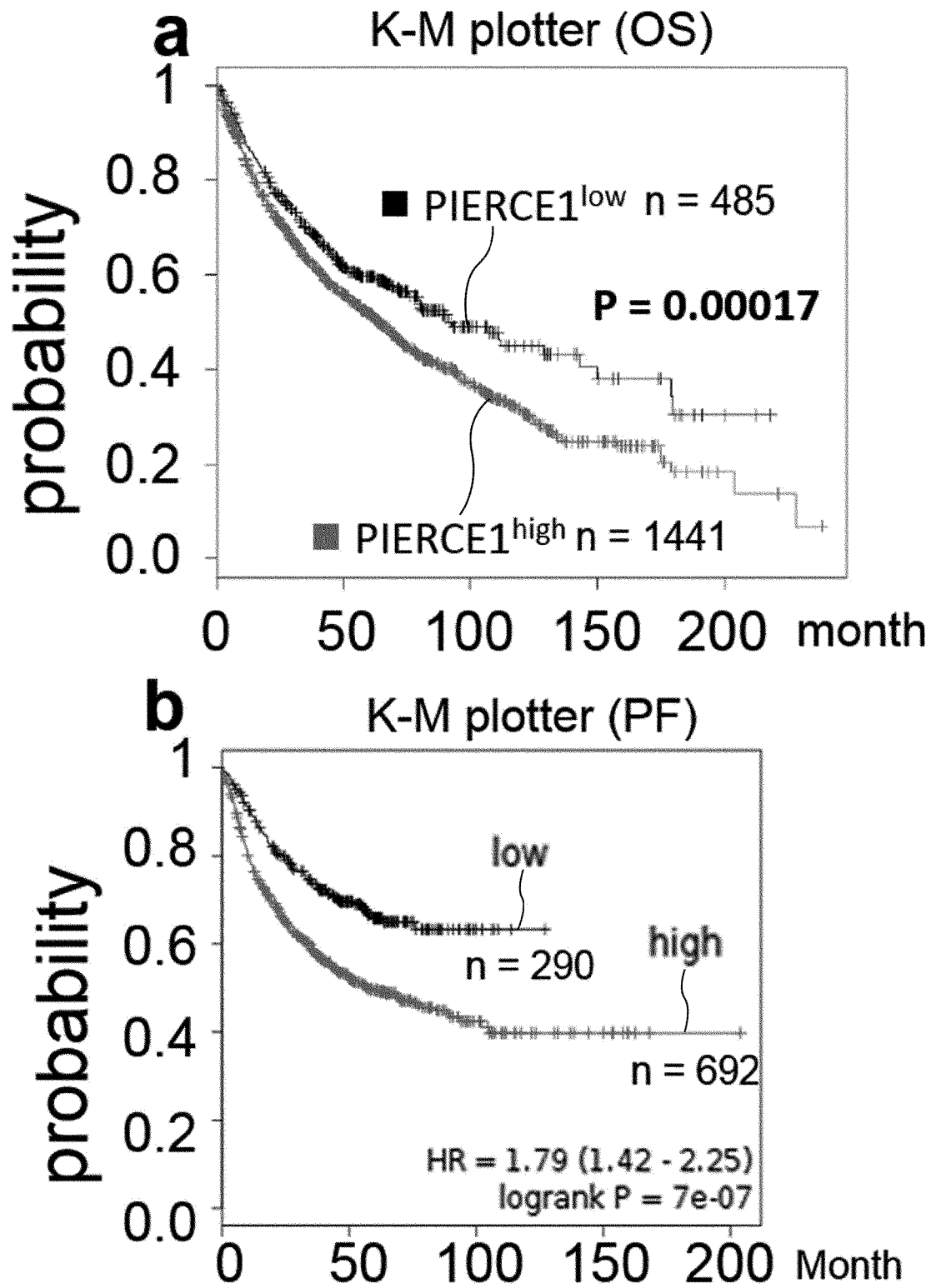
Relative *PIERCE1* level

Rectal adenocarcinoma



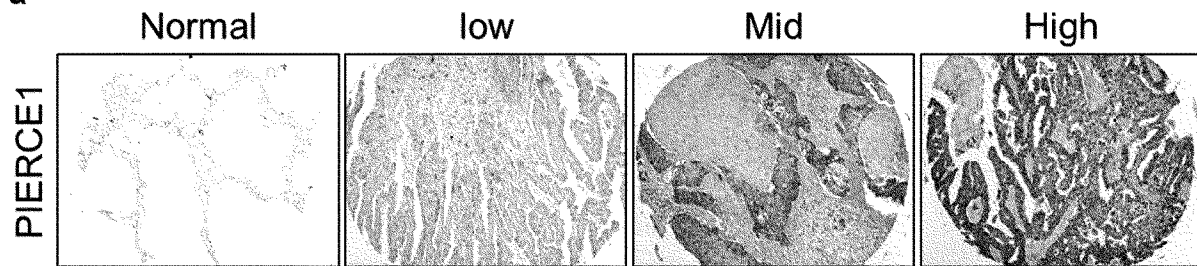
Rectum

[도2]

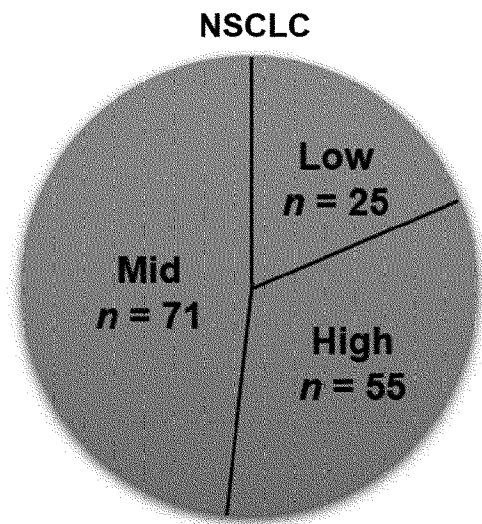


[도3]

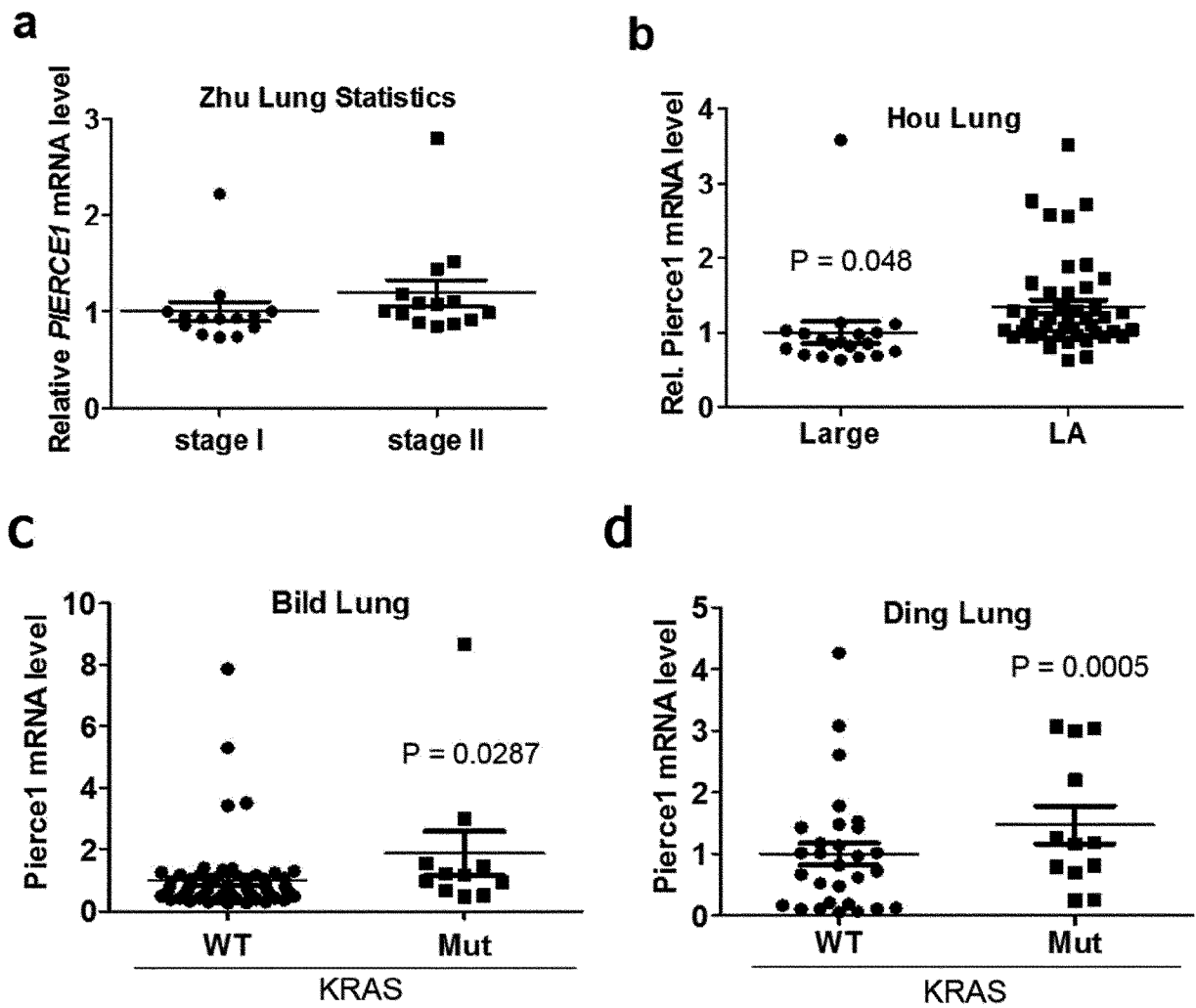
a



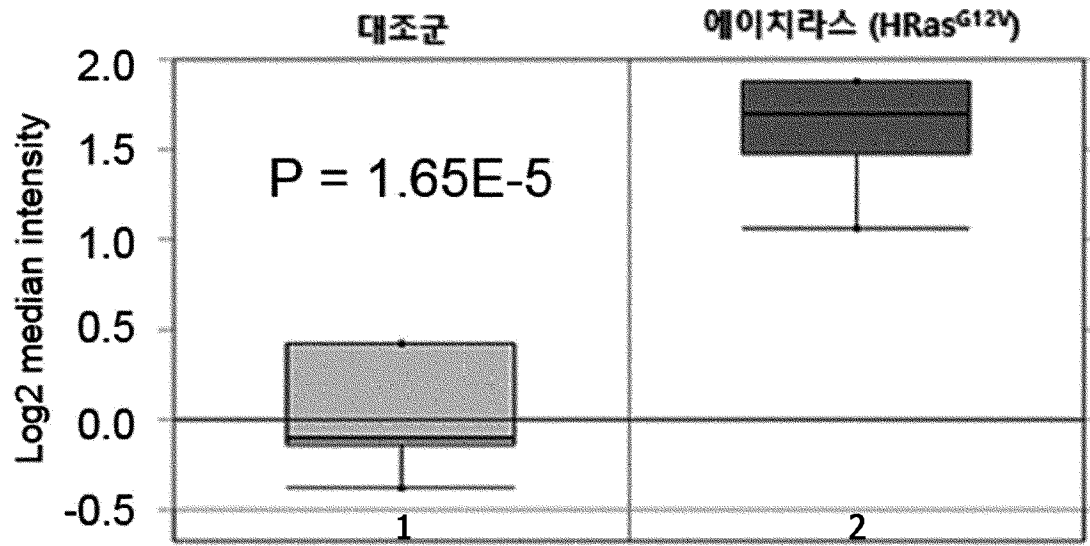
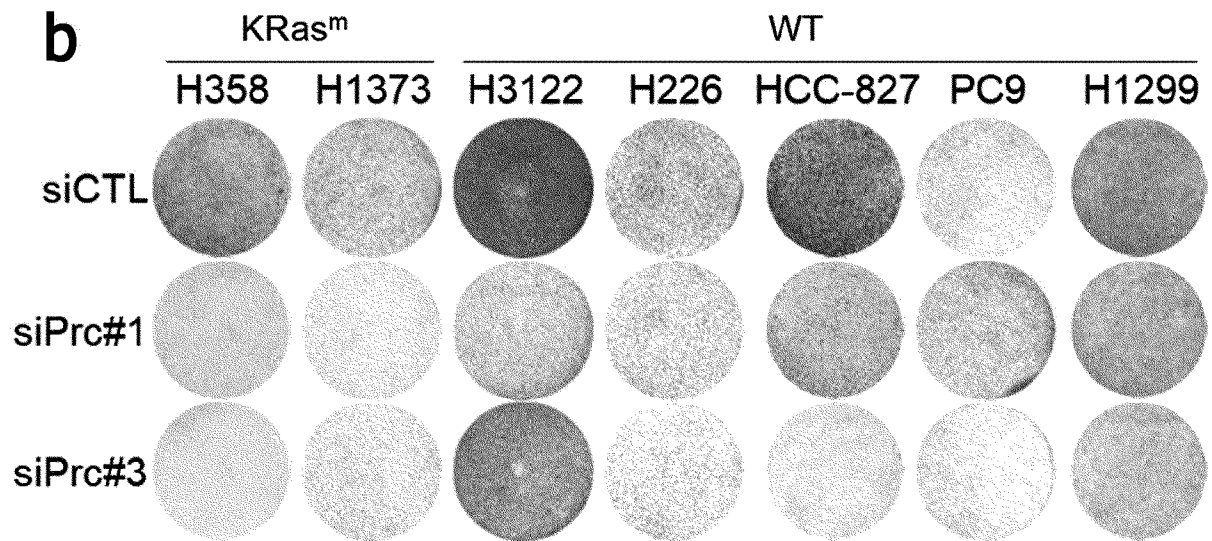
b



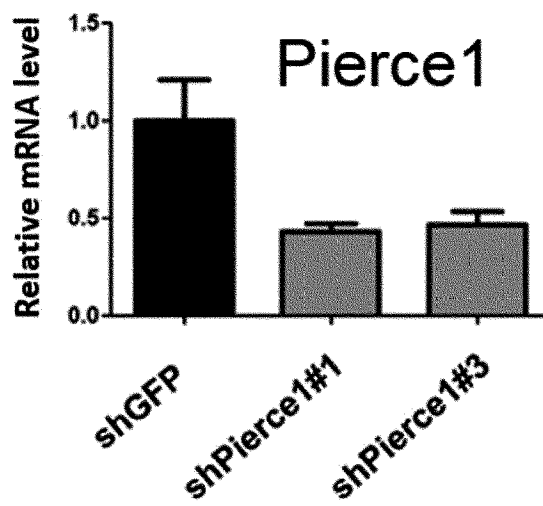
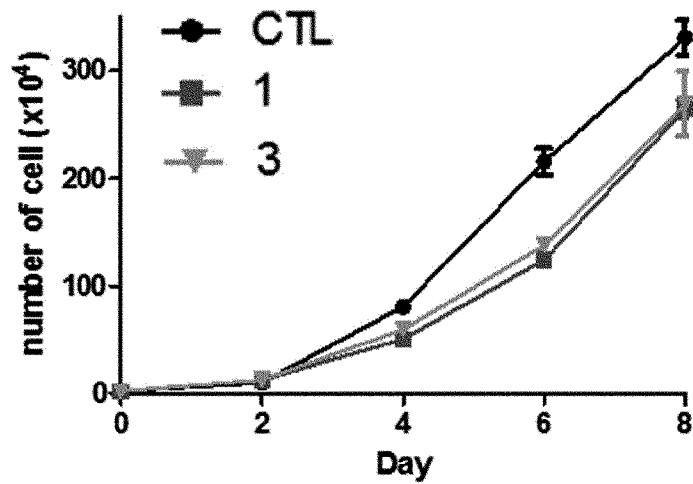
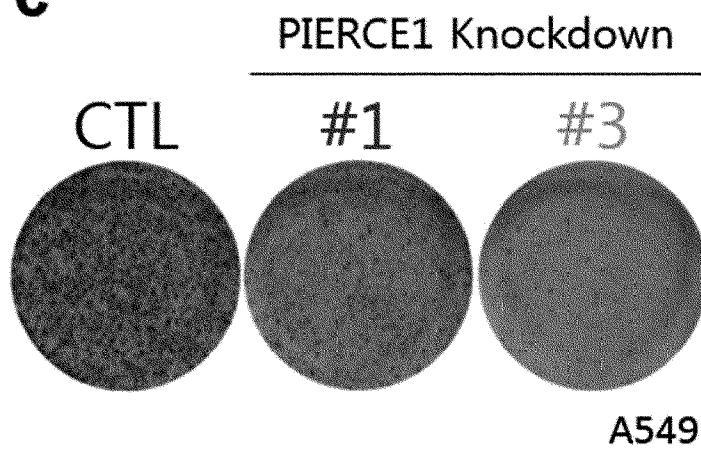
[도4]



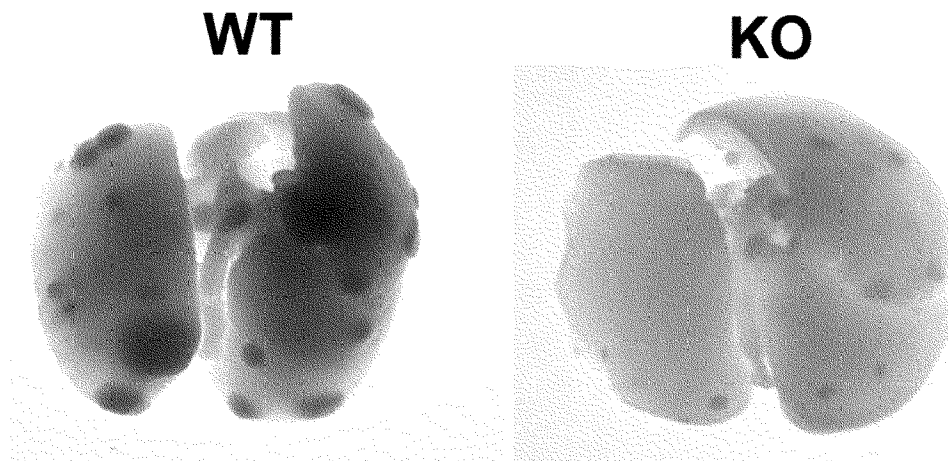
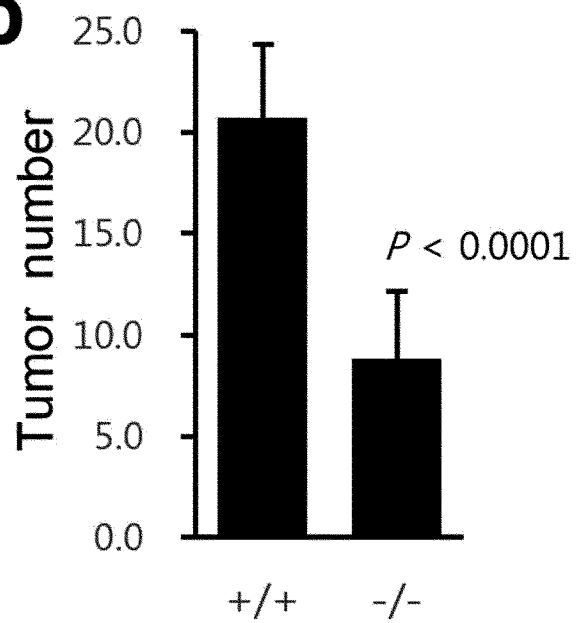
[도5]

a**b**

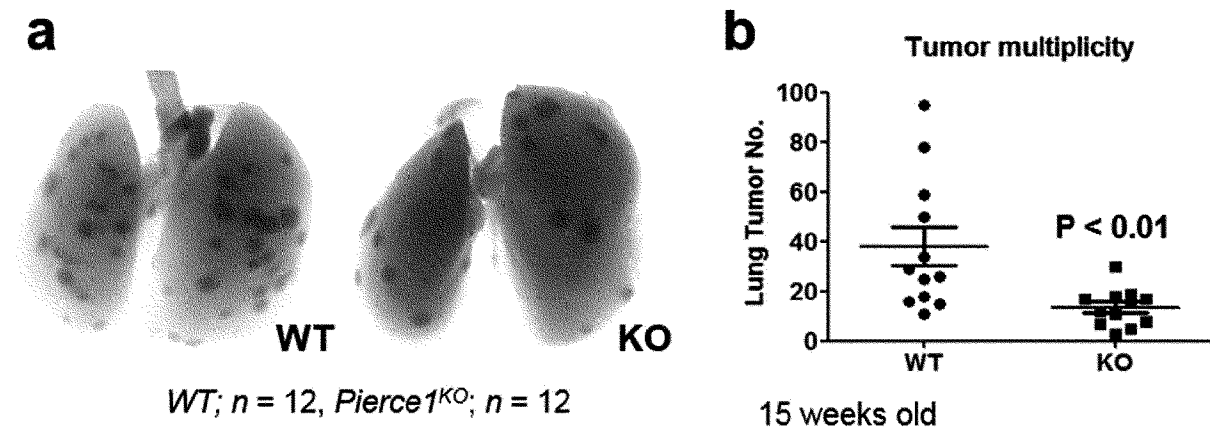
[도6]

a**b****c**

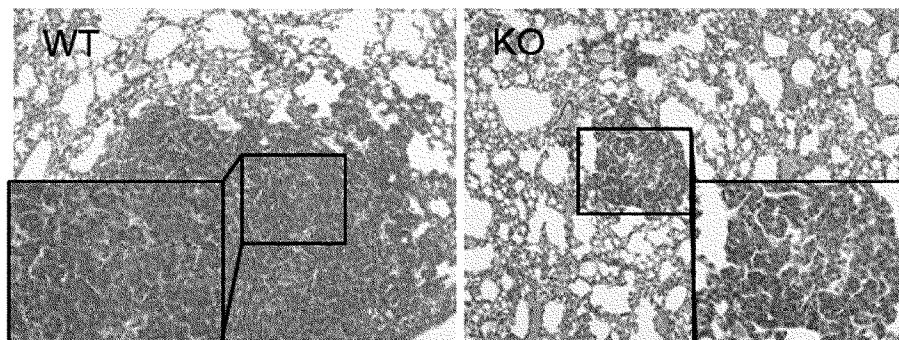
[도7]

a**b**

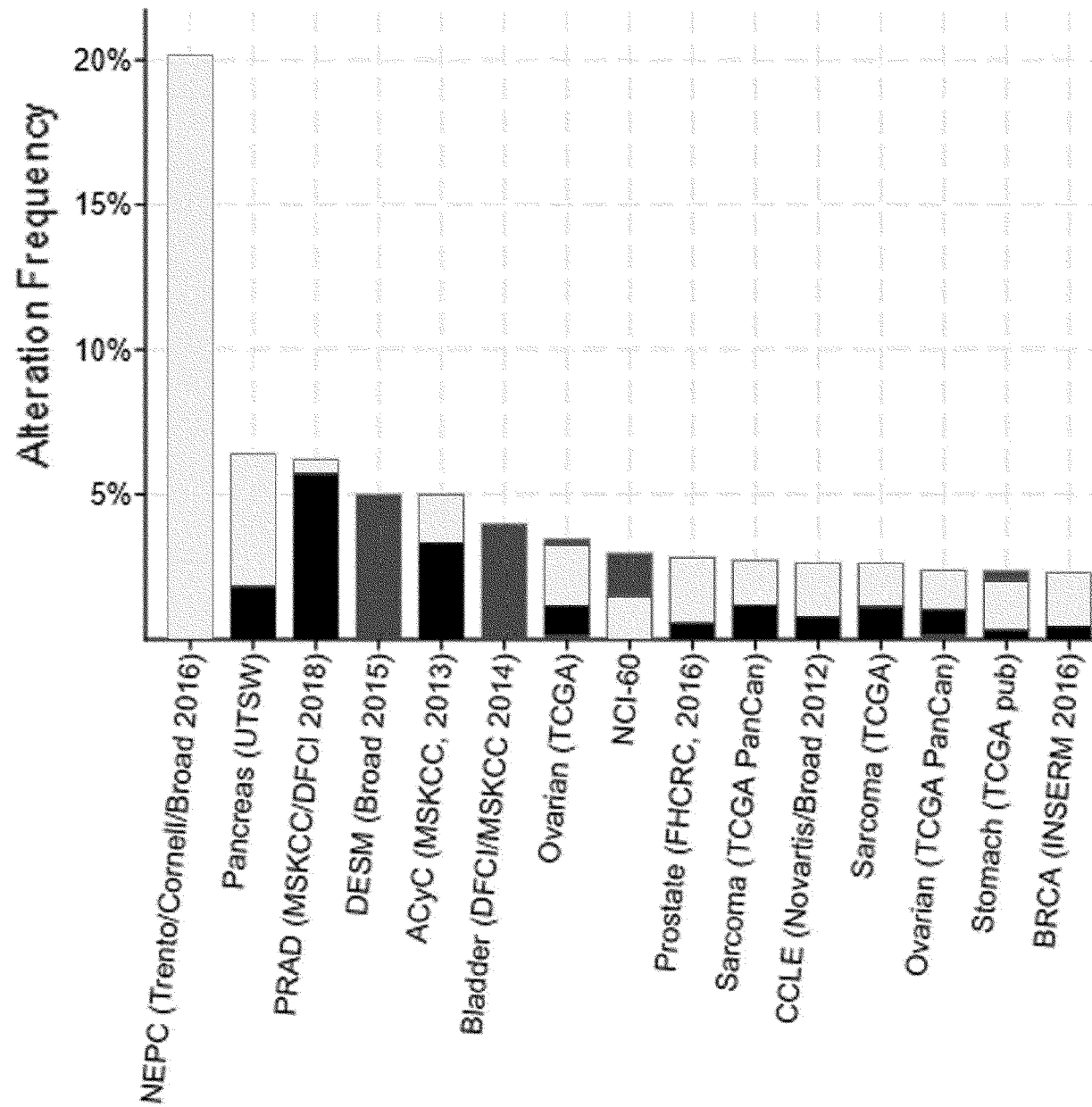
[도8]



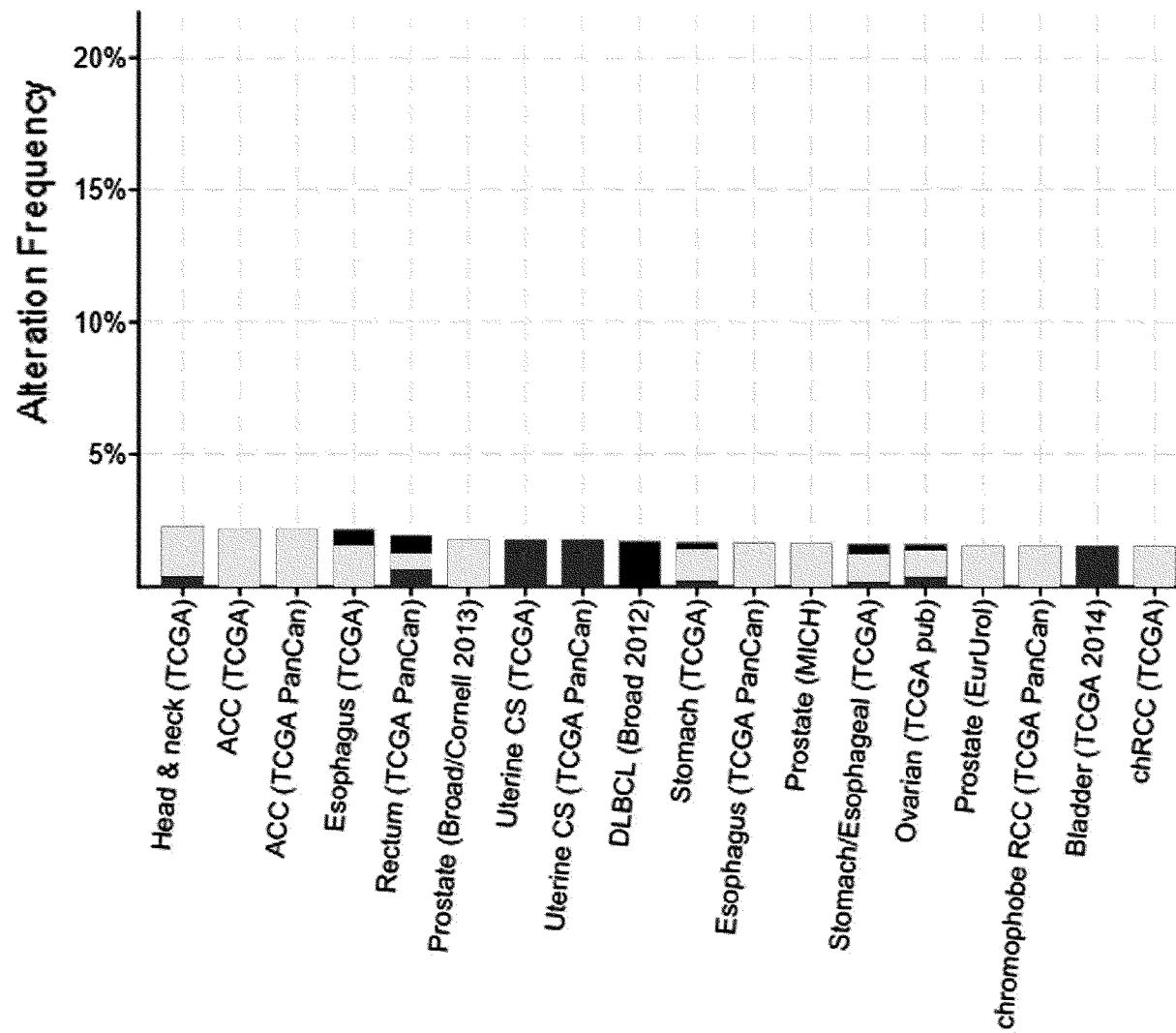
c KRasLA2



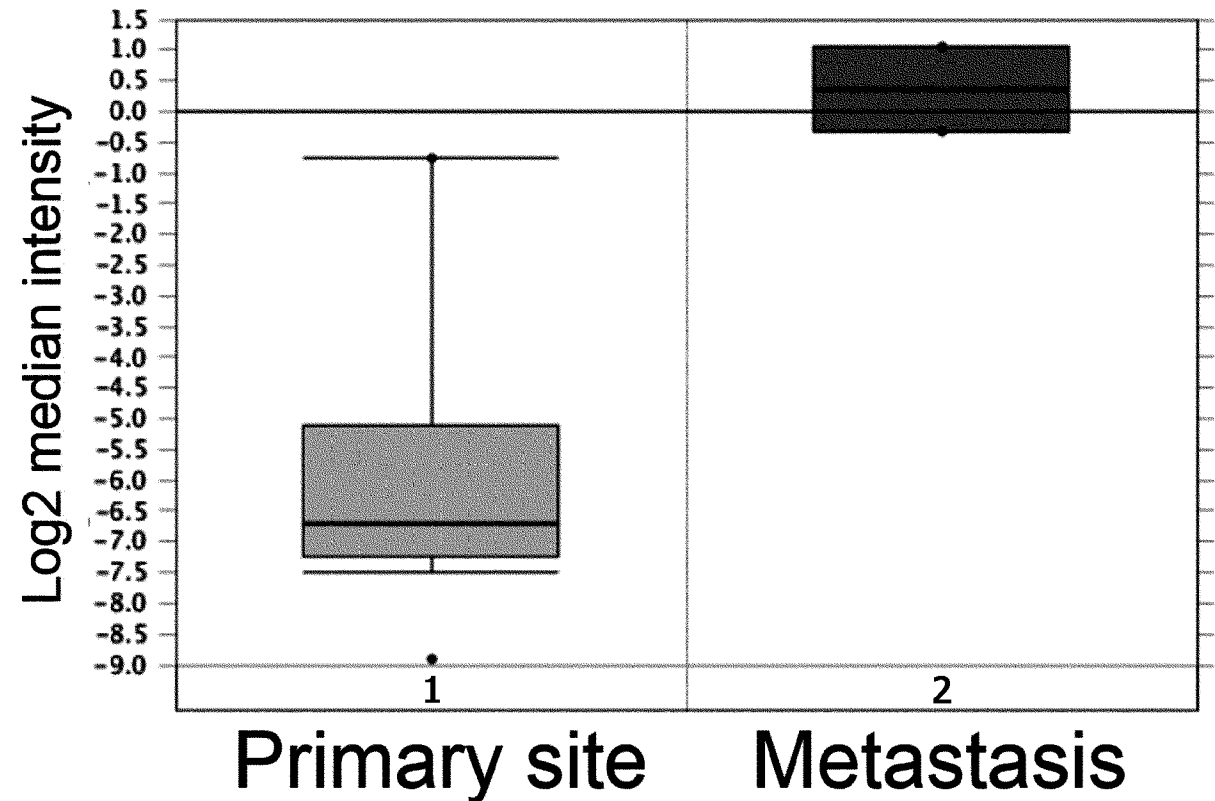
[도9a]



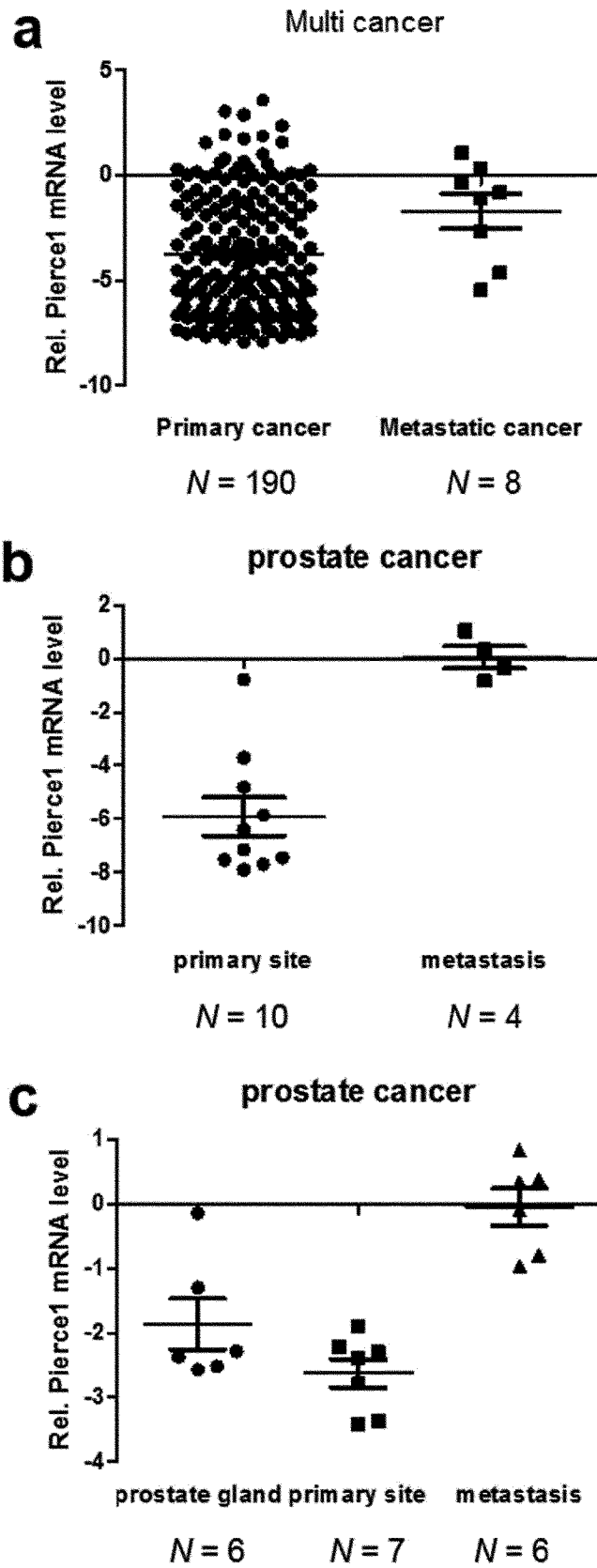
[도9b]



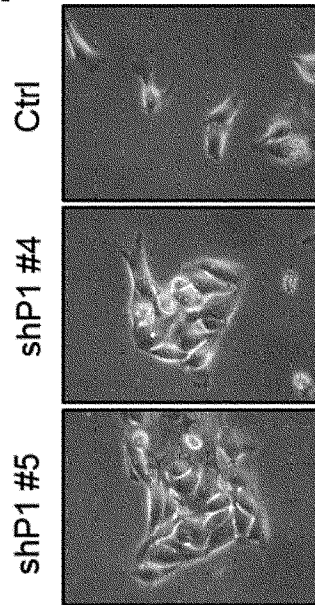
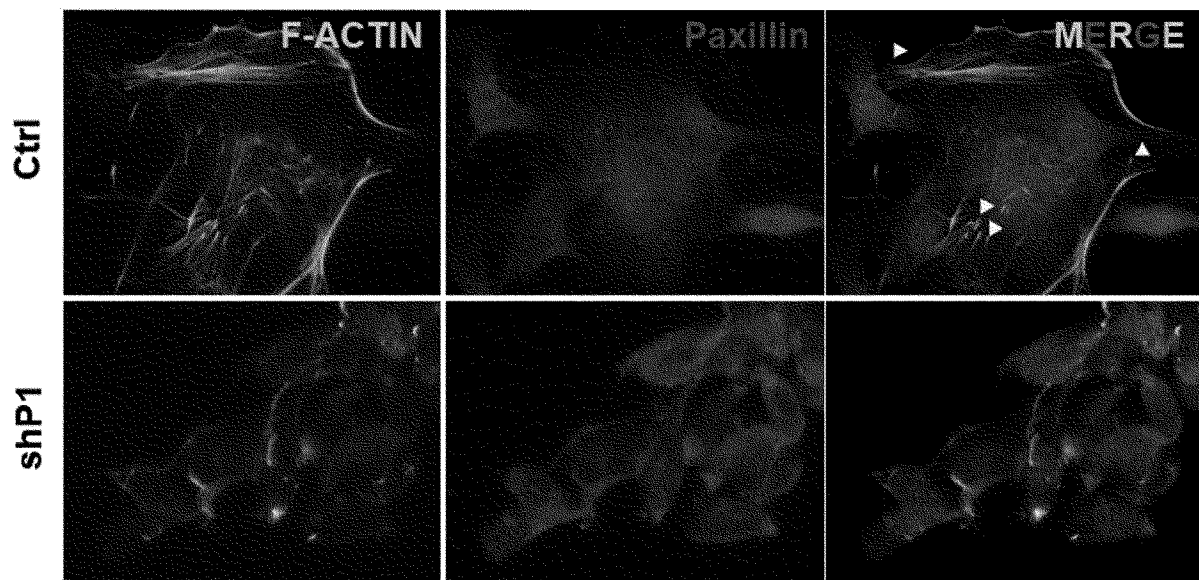
[도9c]



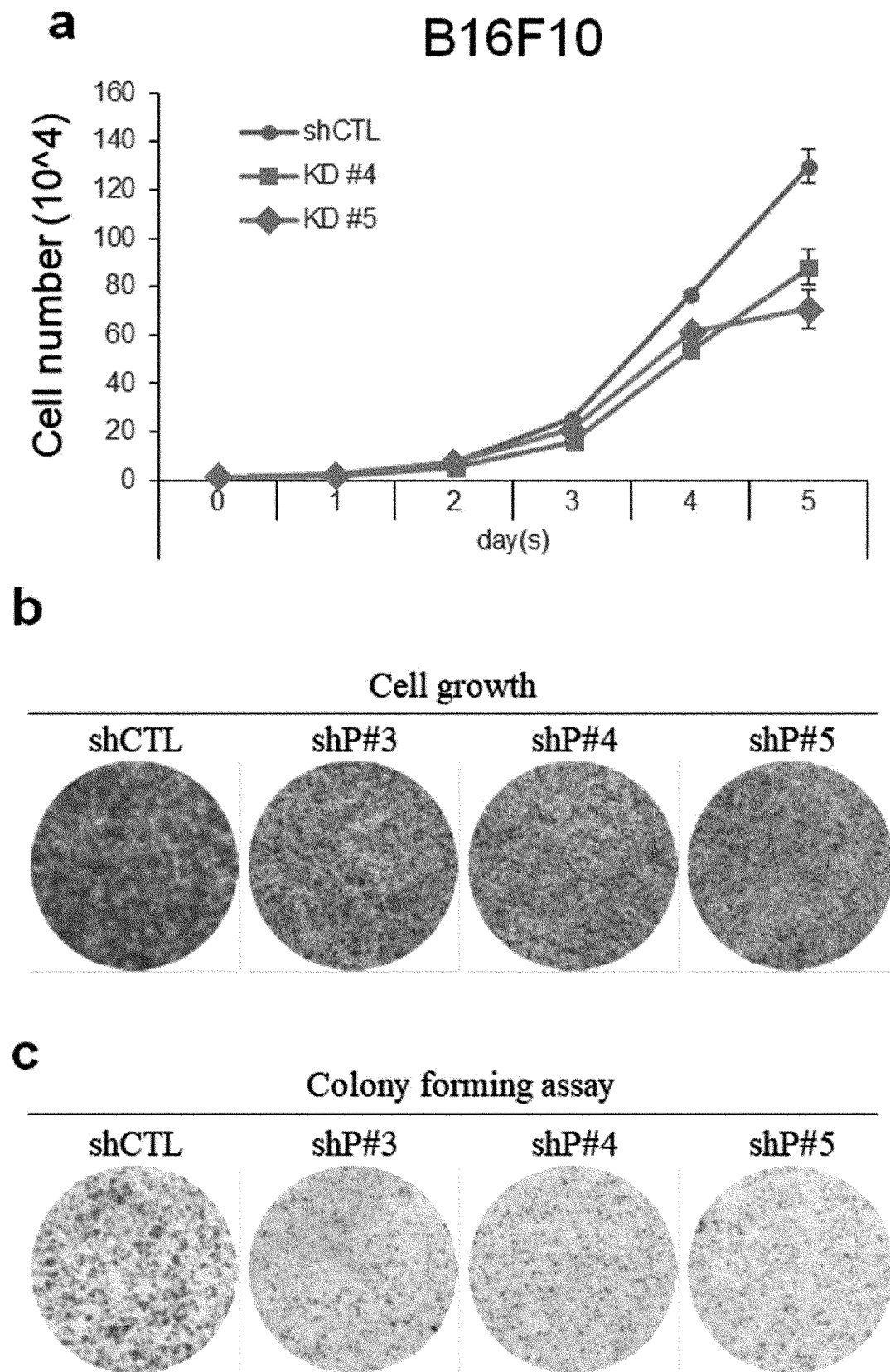
[도10]



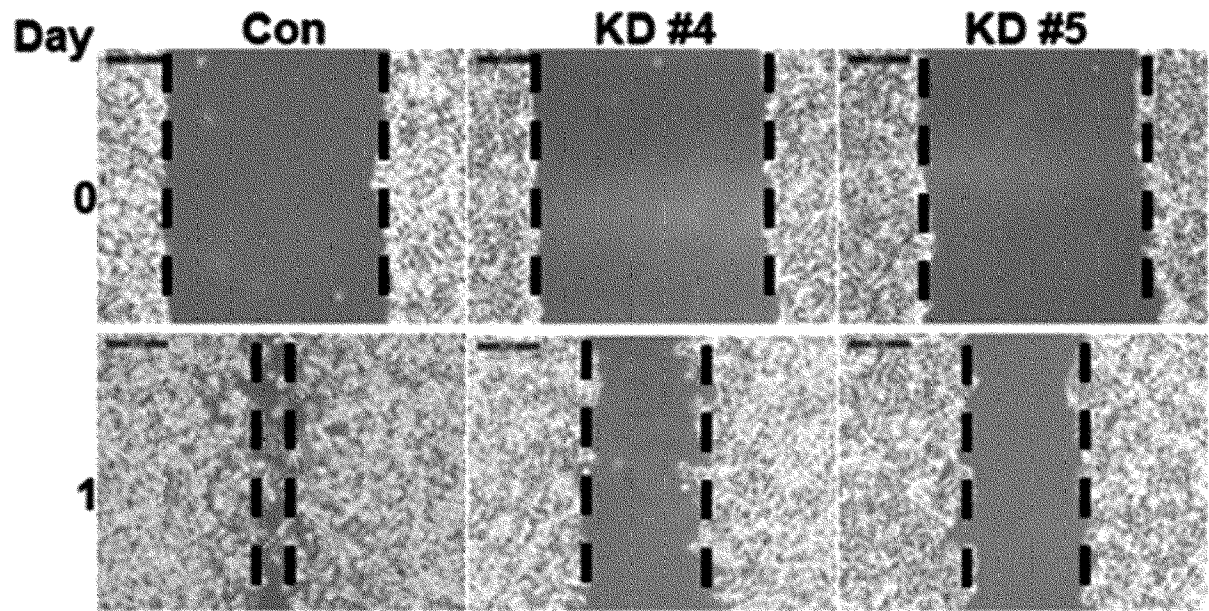
[도11]

a**b**

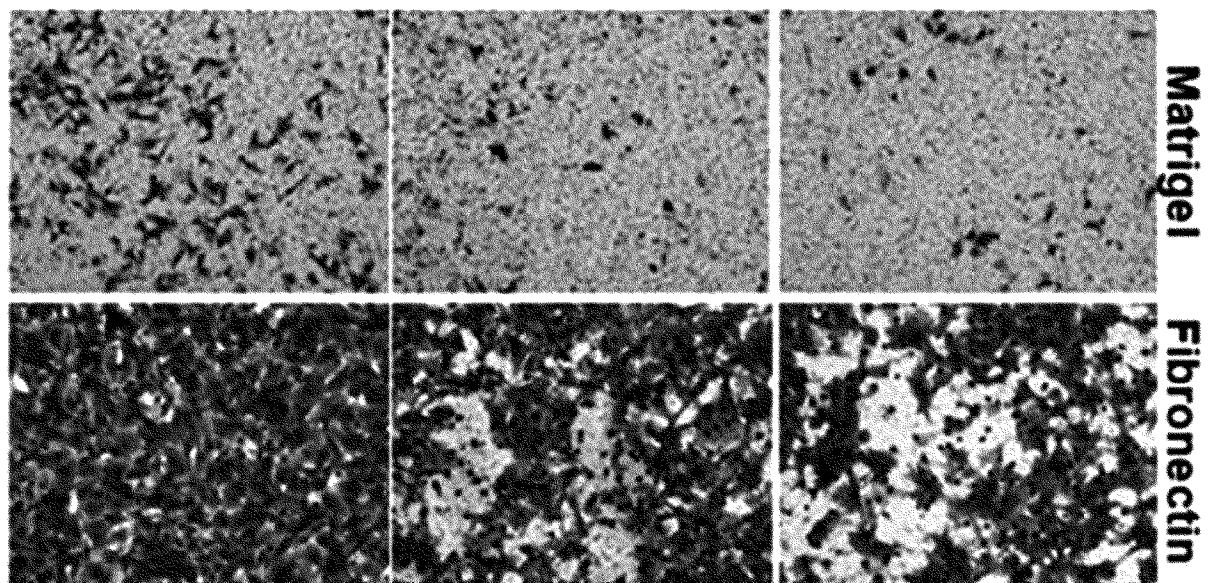
[도12]



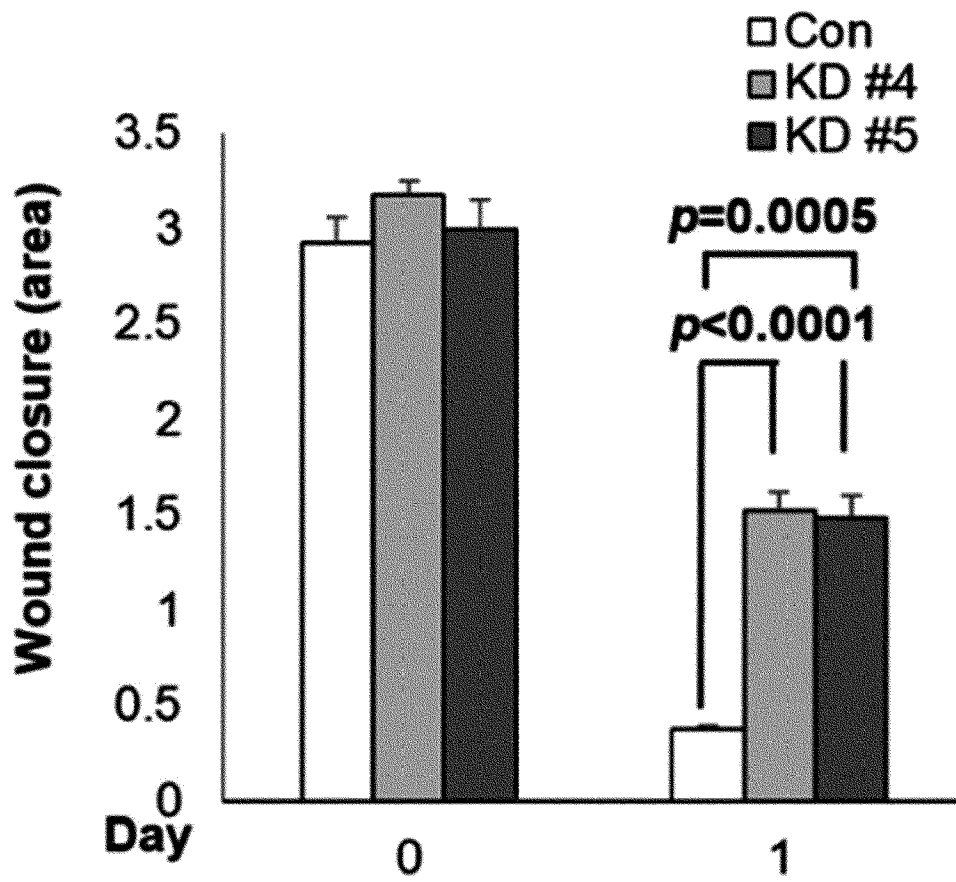
[도13a]



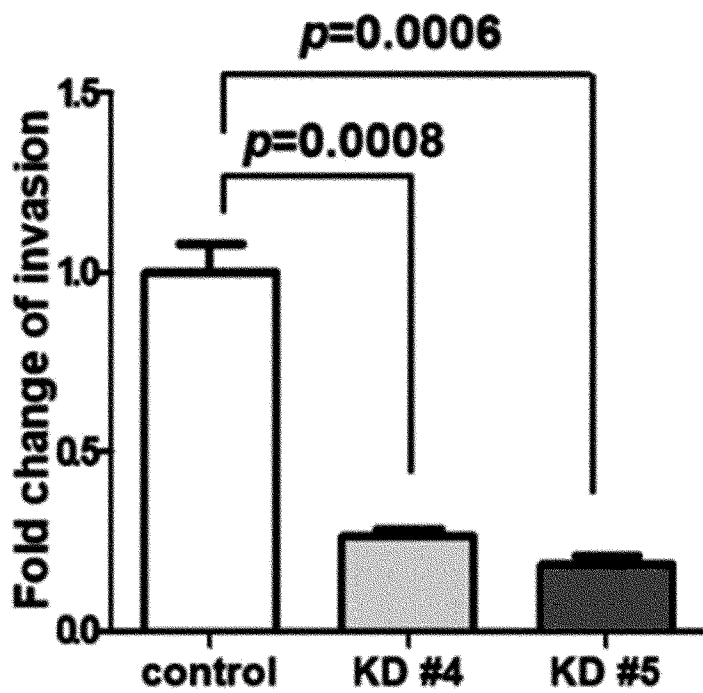
[도13b]



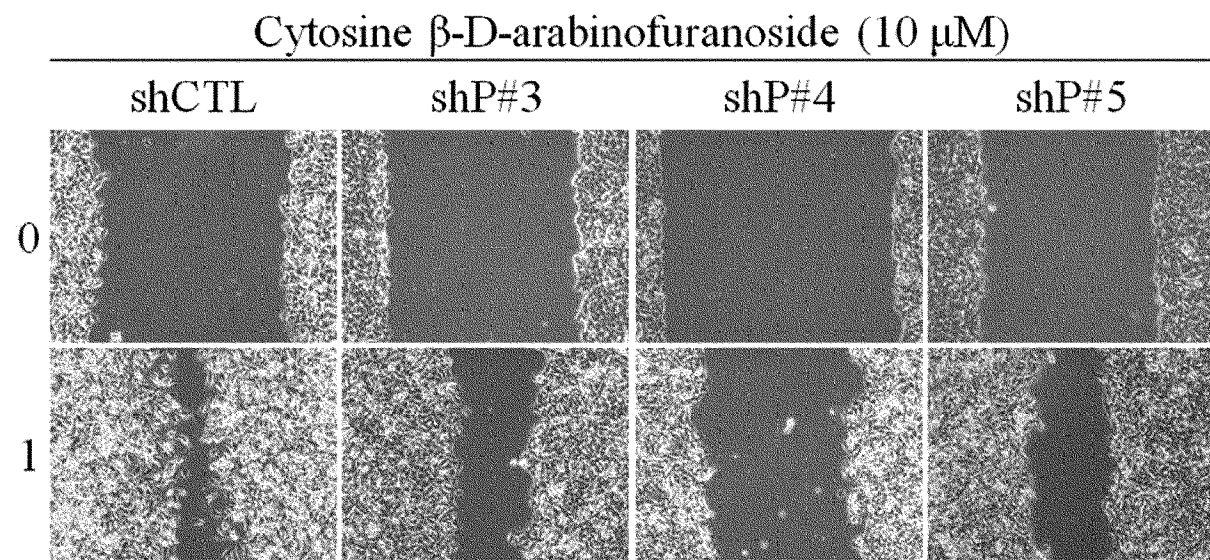
[도13c]



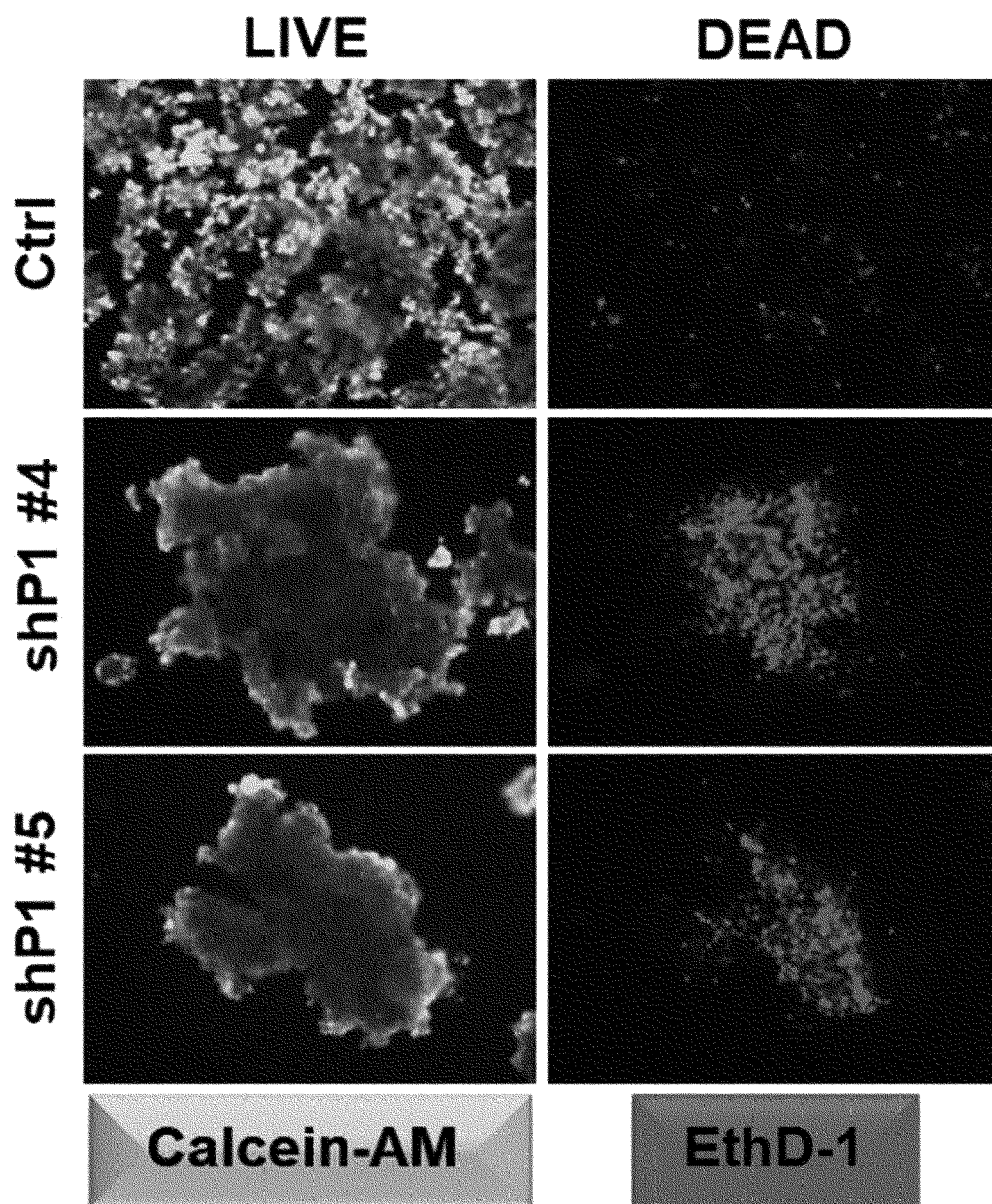
[도13d]



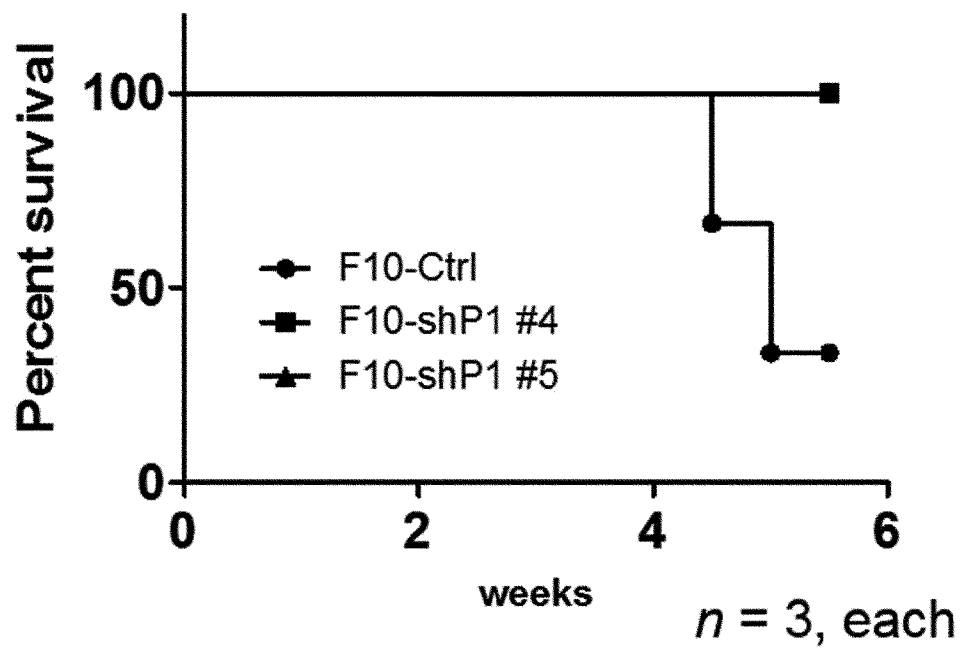
[도14]



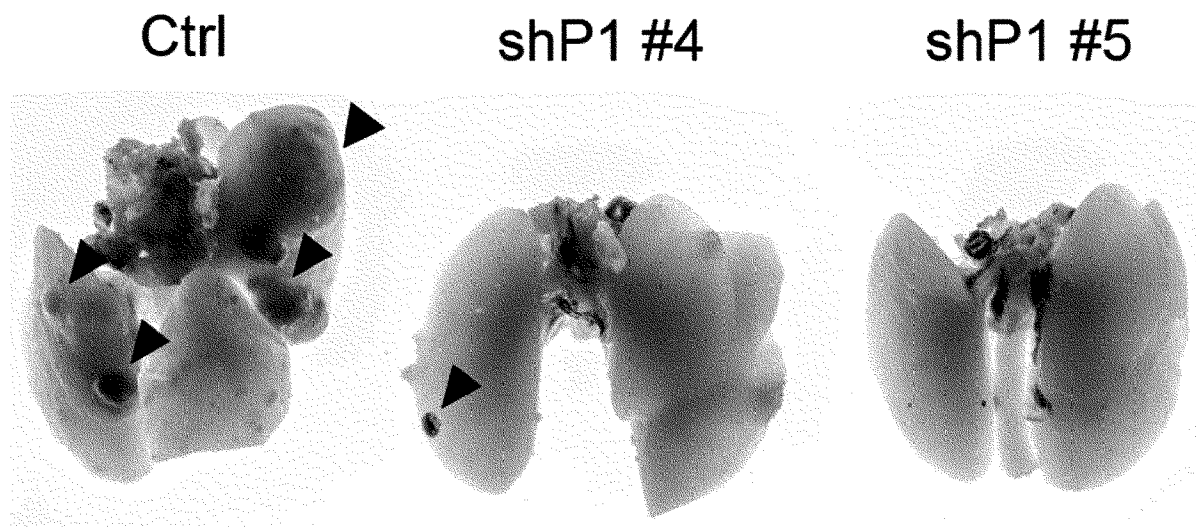
[도15]



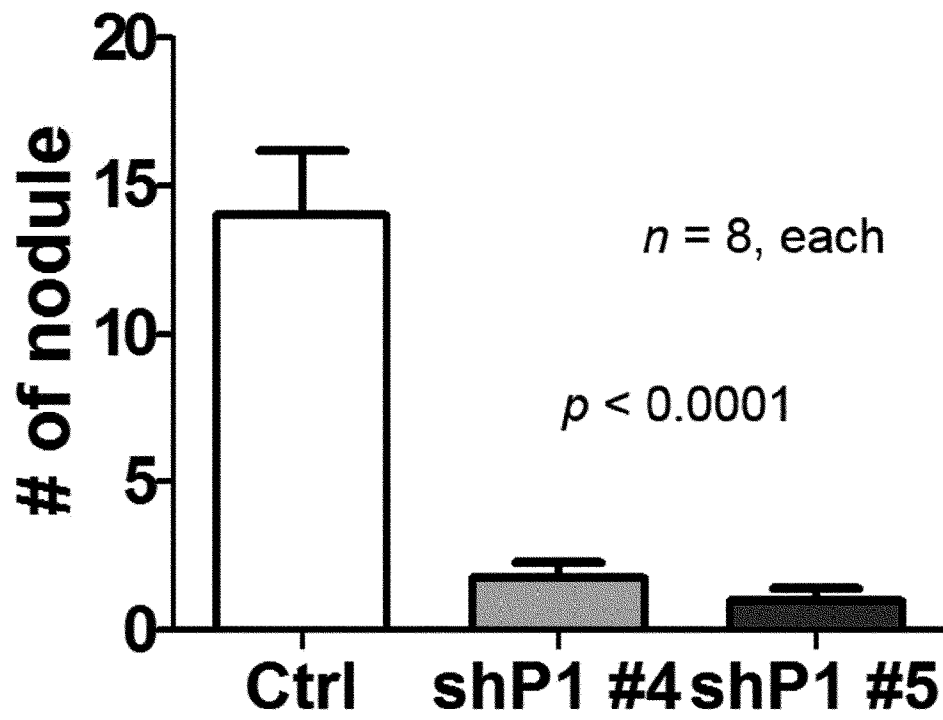
[도16a]



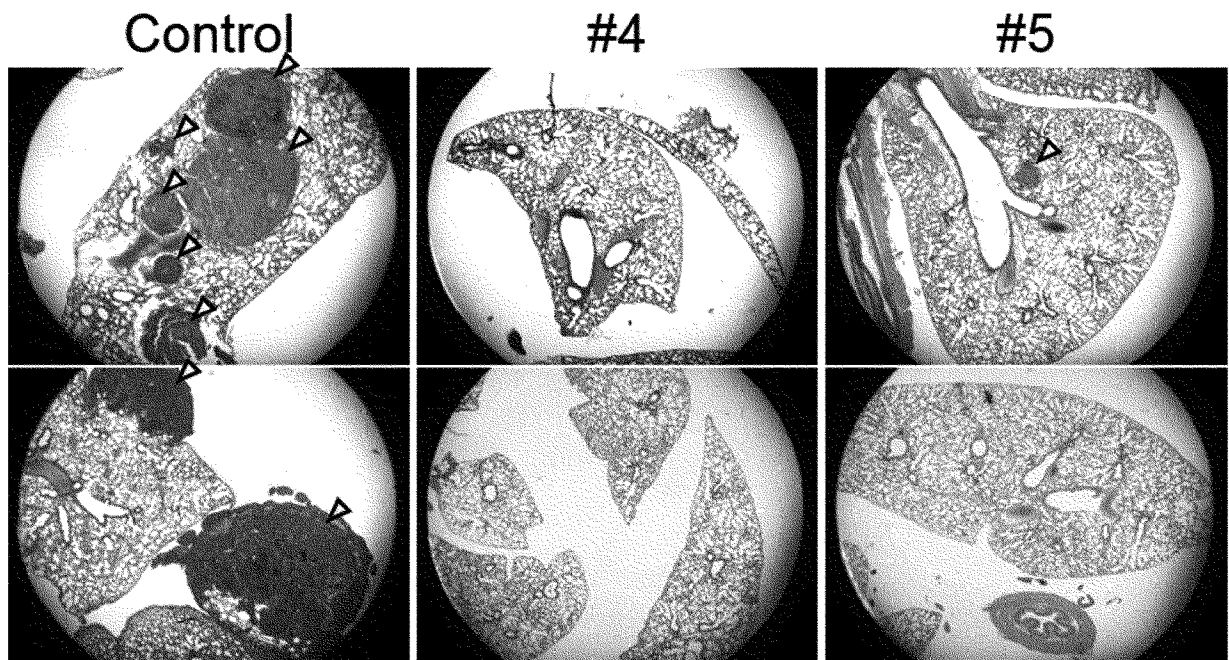
[도16b]



[도16c]

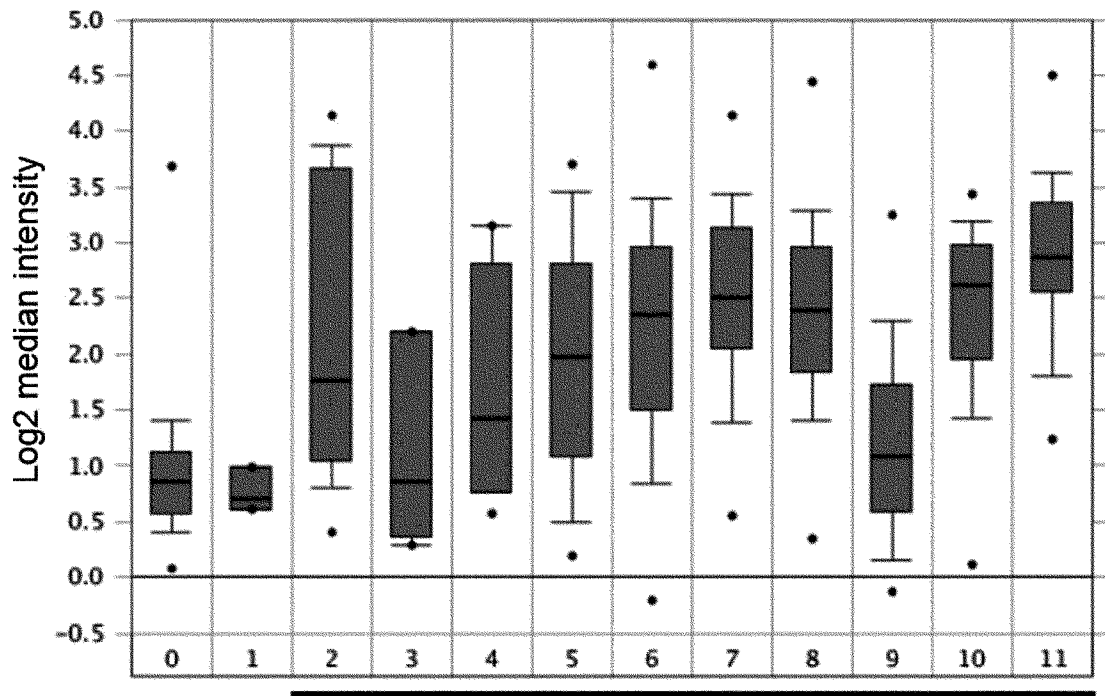


[도16d]



[도17a]

Breast cancer

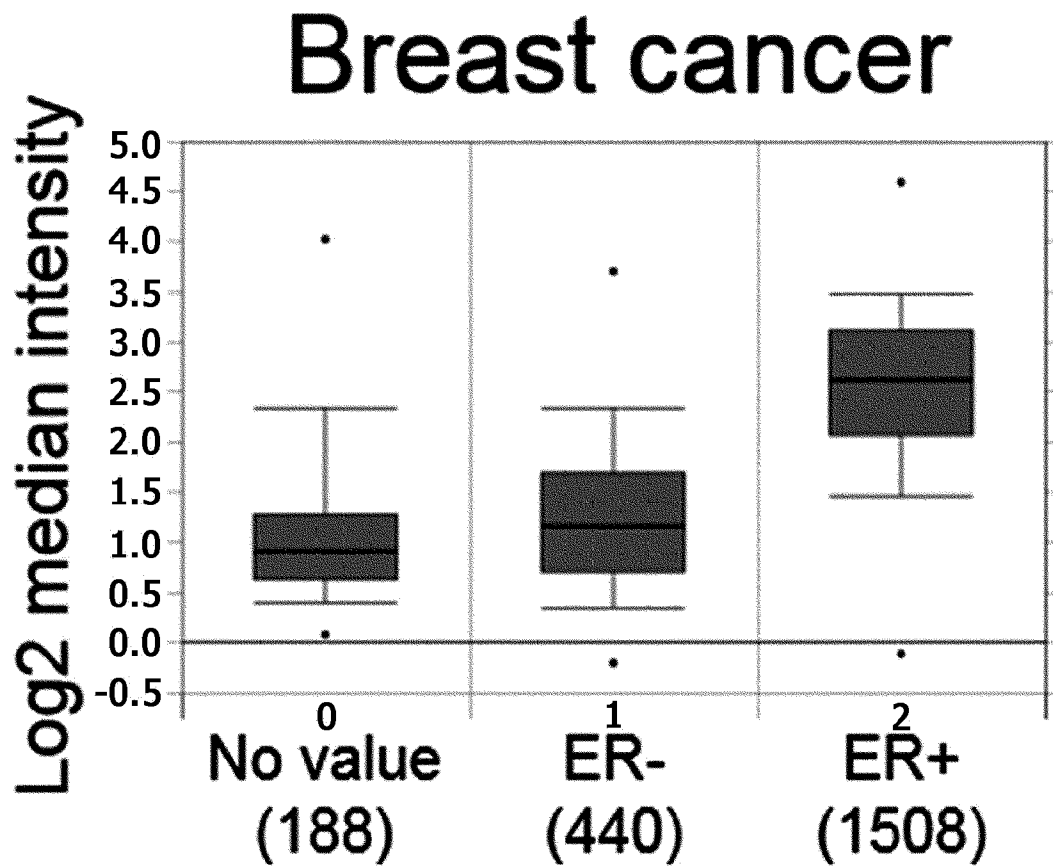


Legend

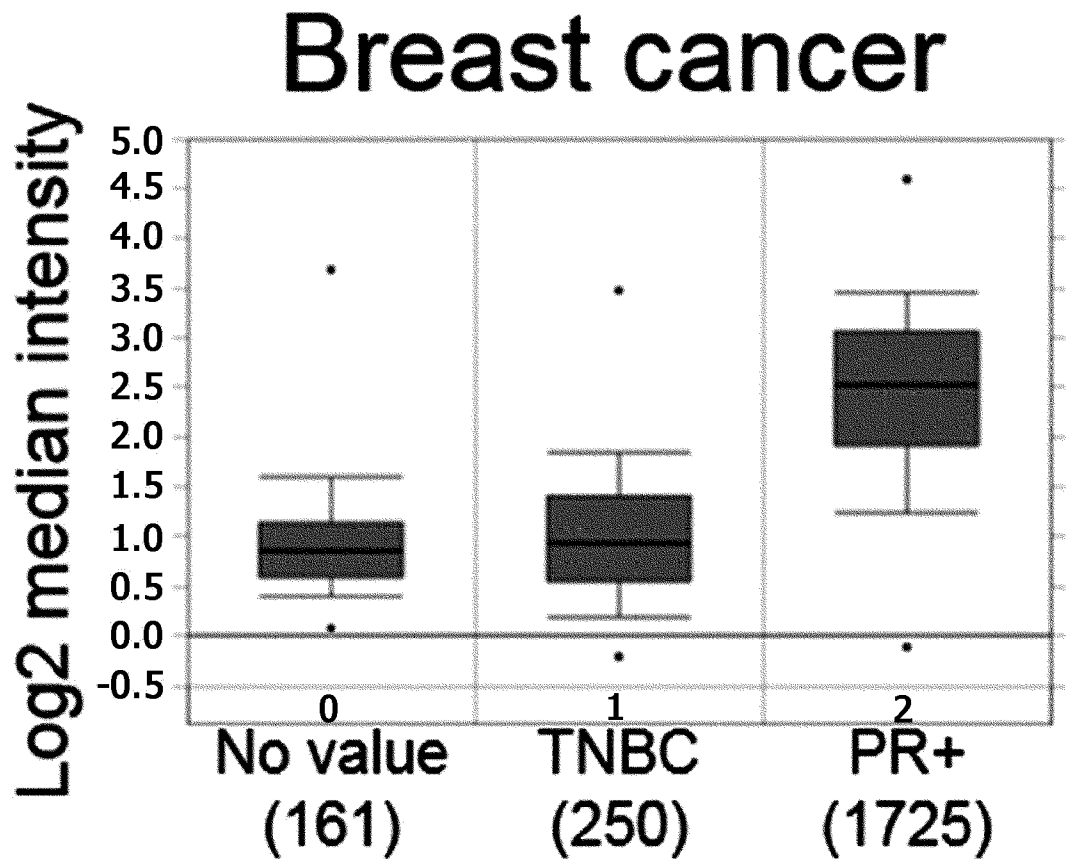
Breast cancer types

- | | |
|---|---|
| 0. No value (144) | 6. Invasive Ductal Breast Carcinoma (1,556) |
| 1. Benign Breast Neoplasm (3) | 7. Invasive Ductal and Invasive Lobular Breast Carcinoma (90) |
| 2. Breast Carcinoma (14) | 8. Invasive Lobular Breast Carcinoma (148) |
| 3. Breast Phyllodes Tumor (5) | 9. Medullary Breast Carcinoma (32) |
| 4. Ductal Breast Carcinoma in Situ (10) | 10. Mucinous Breast Carcinoma (46) |
| 5. Invasive Breast Carcinoma (21) | 11. Tubular Breast Carcinoma (67) |

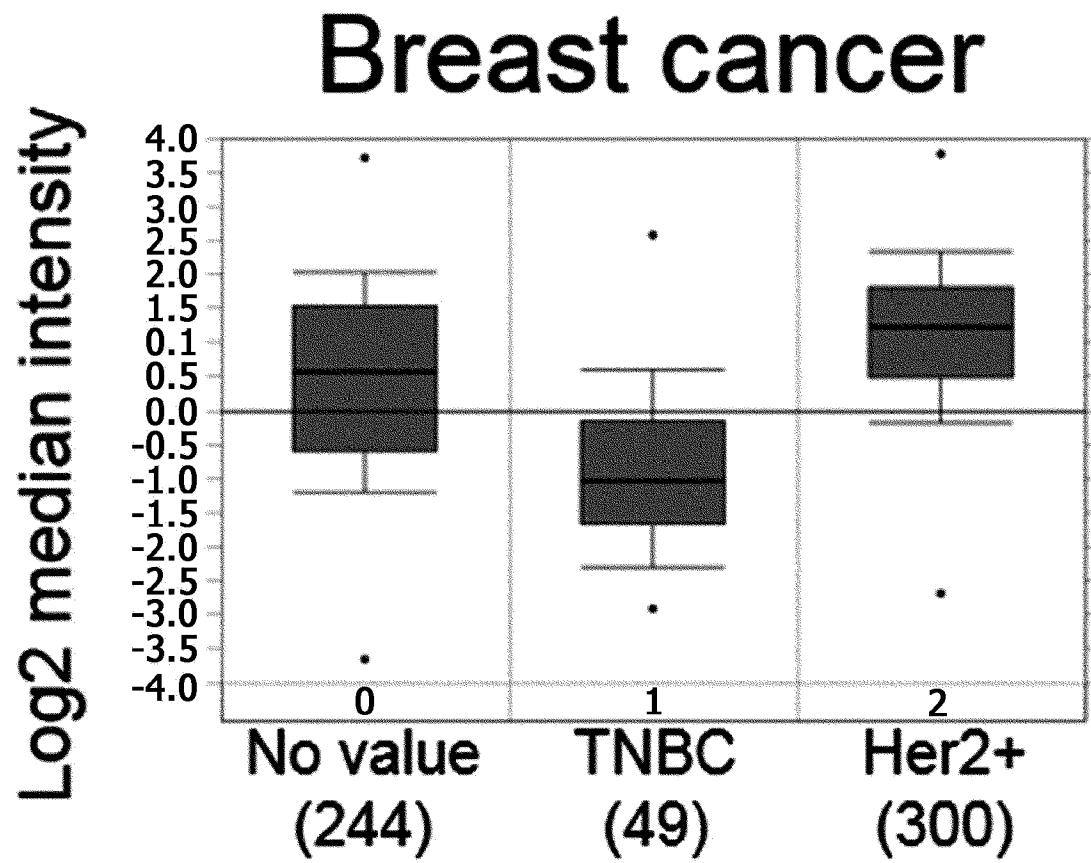
[도17b]



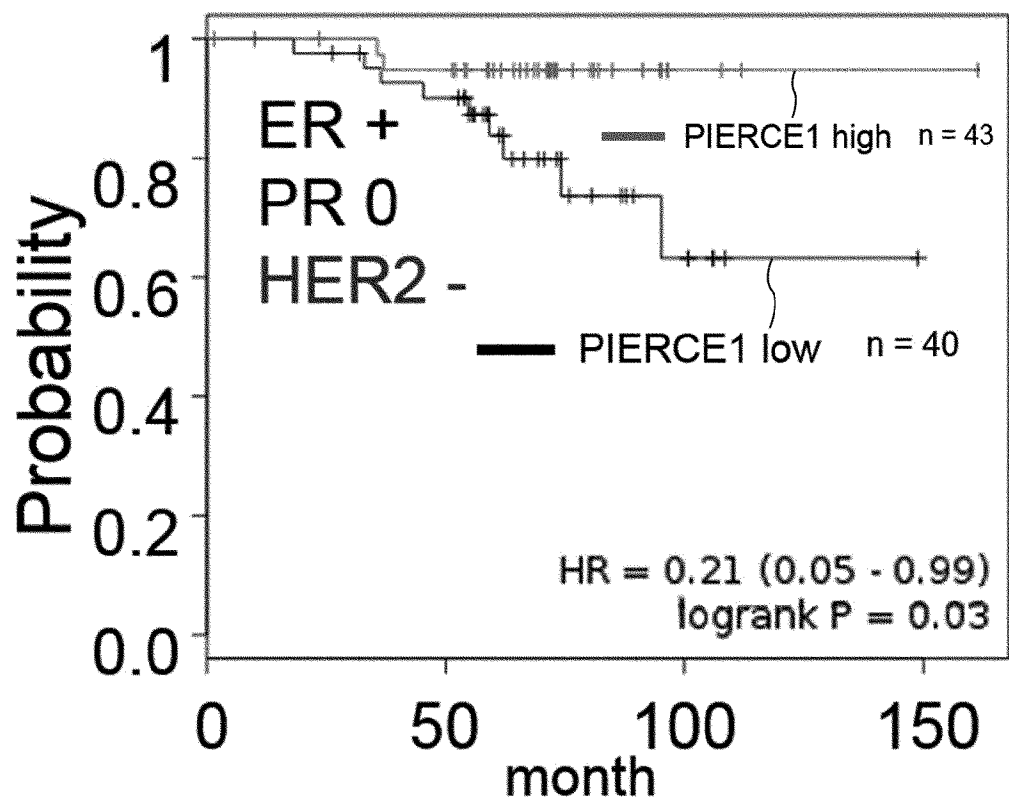
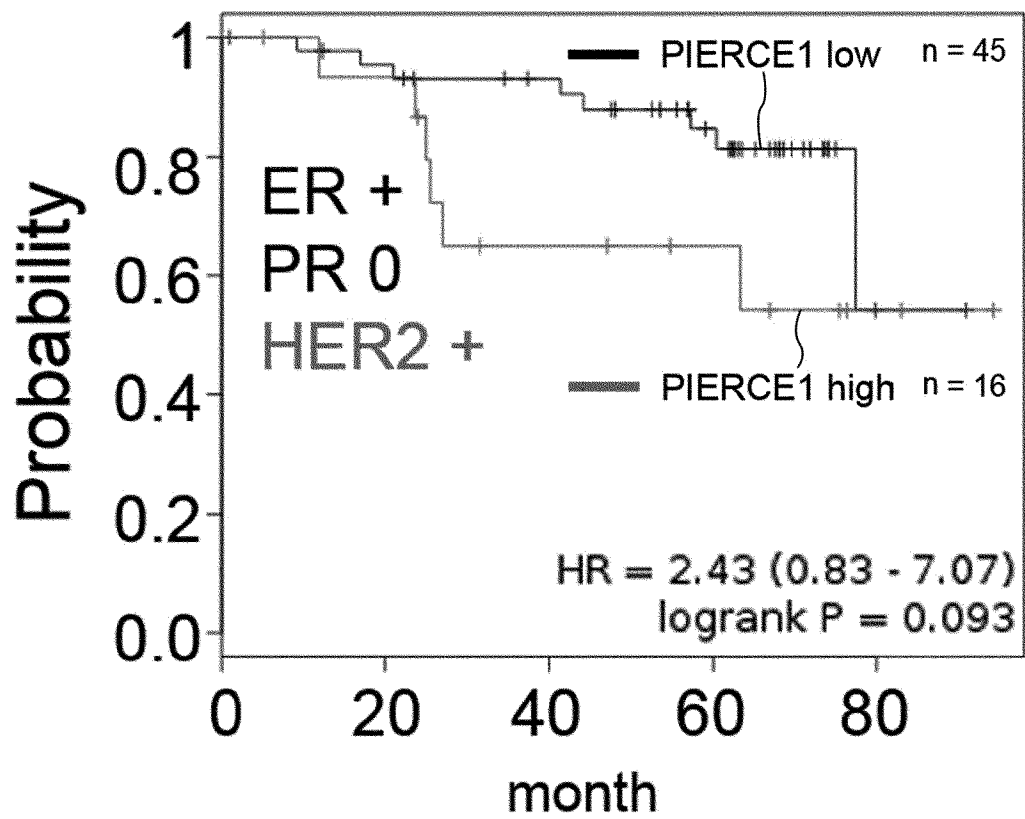
[도17c]



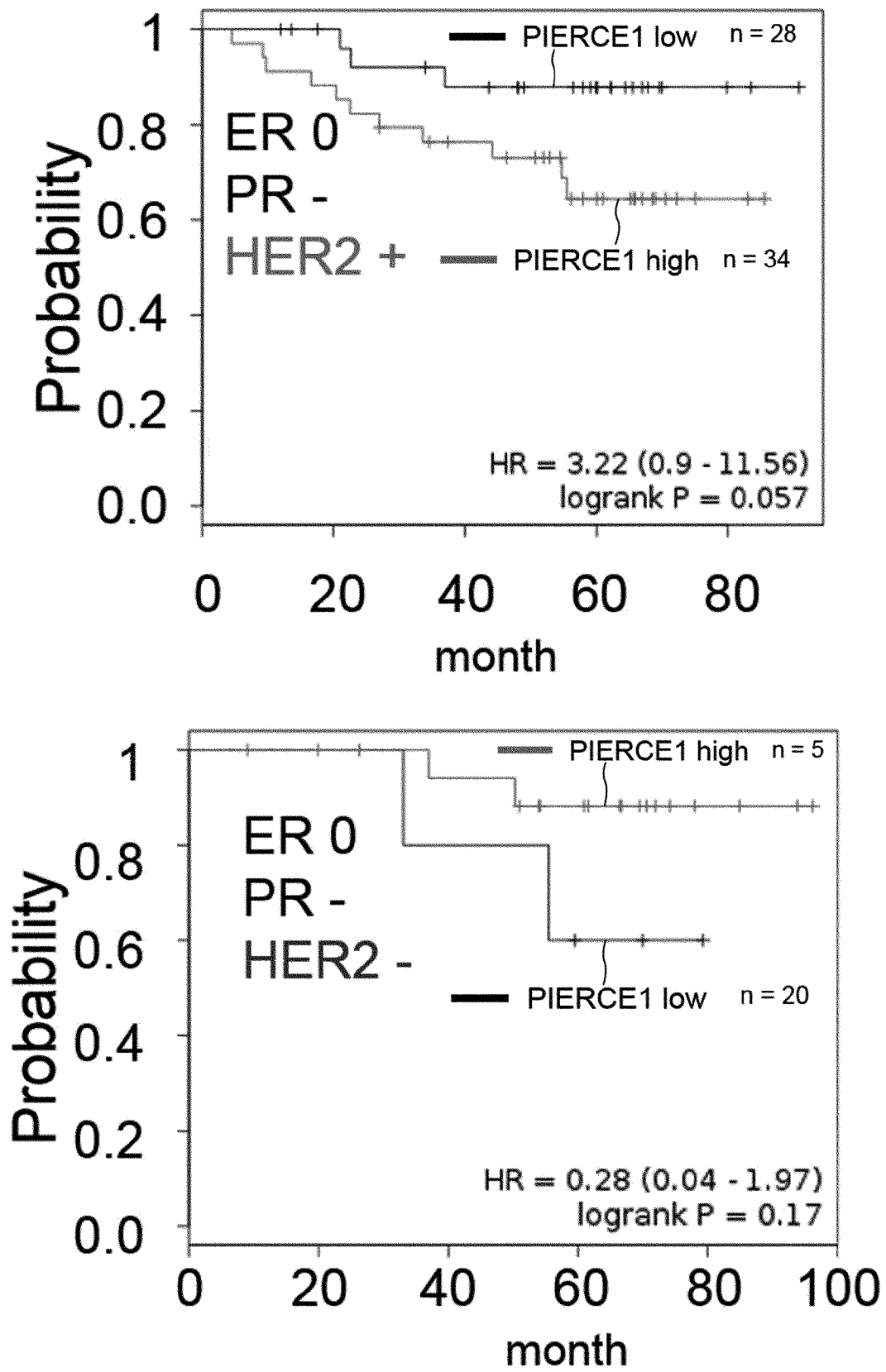
[도17d]



[도18a]

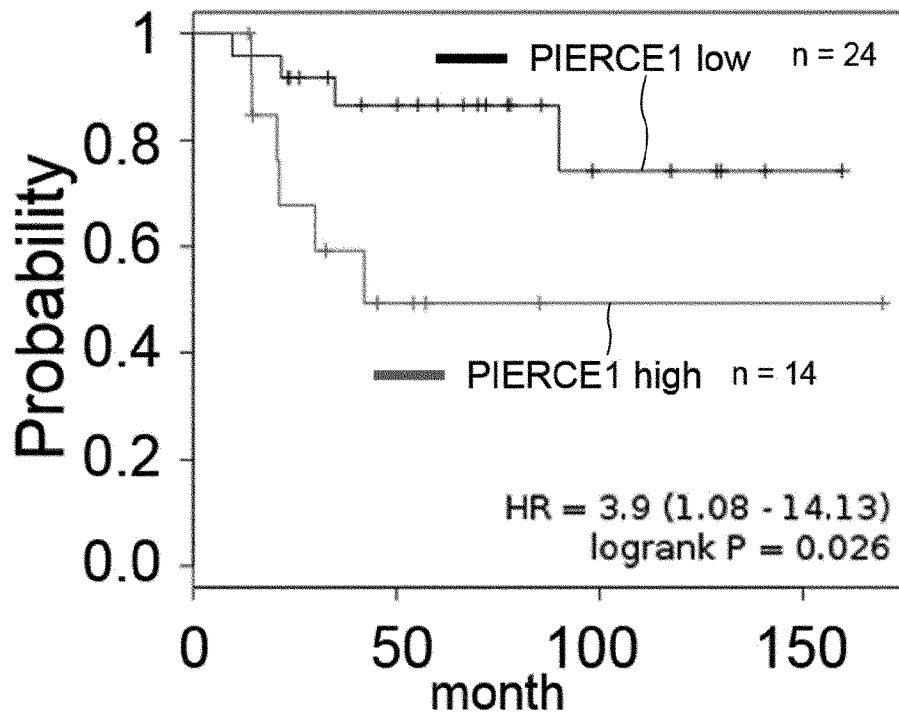


[도18b]

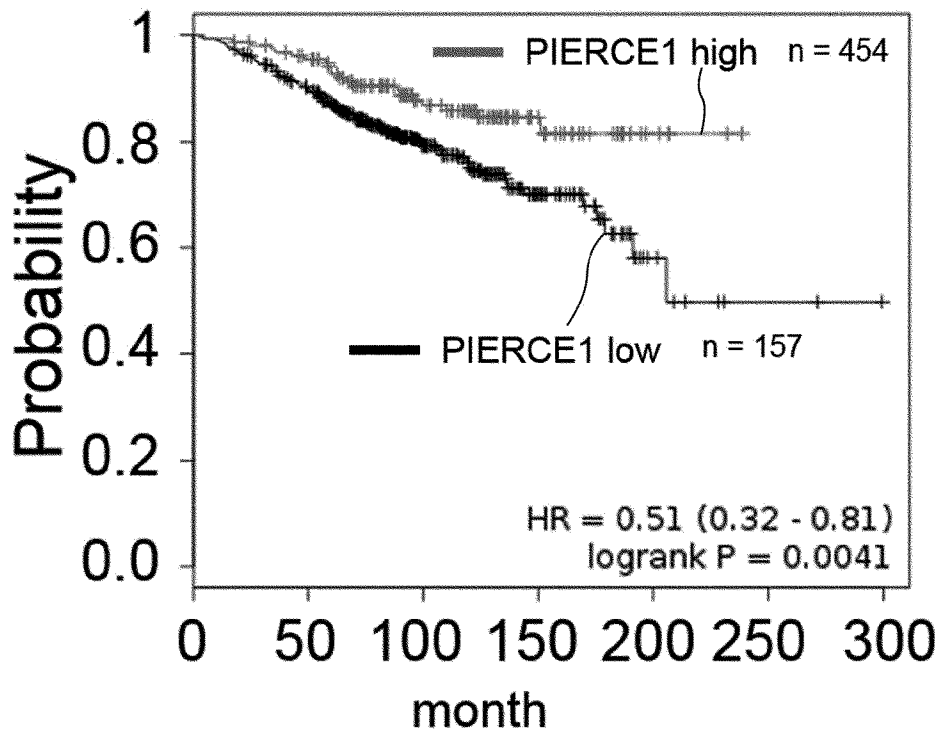


[도18c]

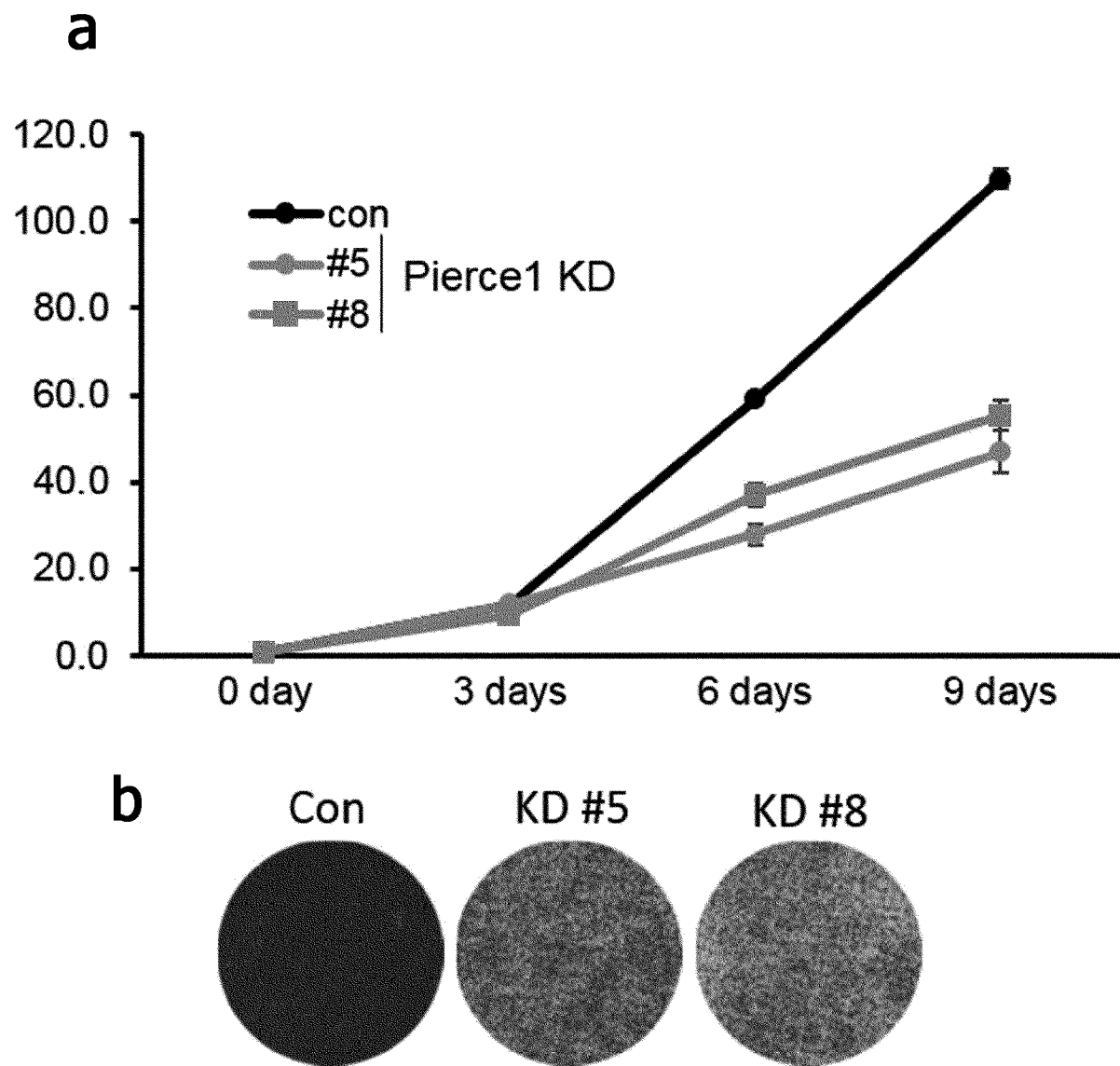
Pietenpol subtype : Basal-like 2



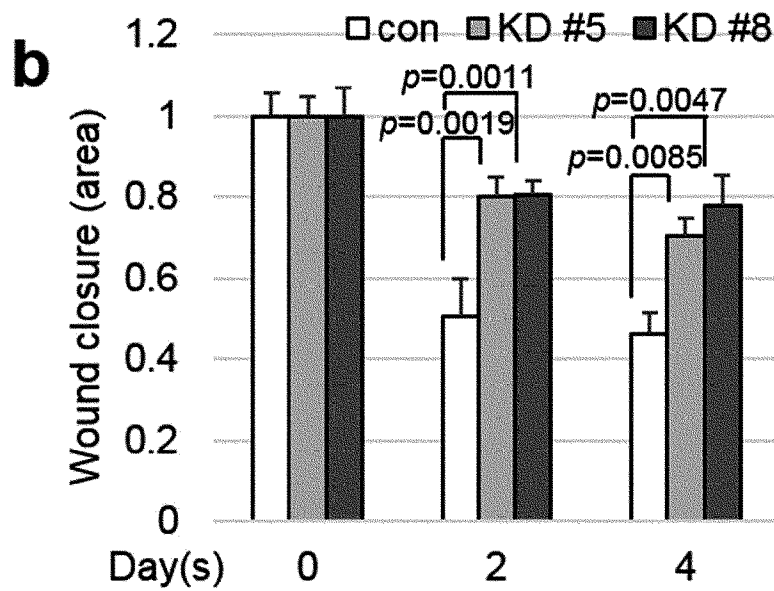
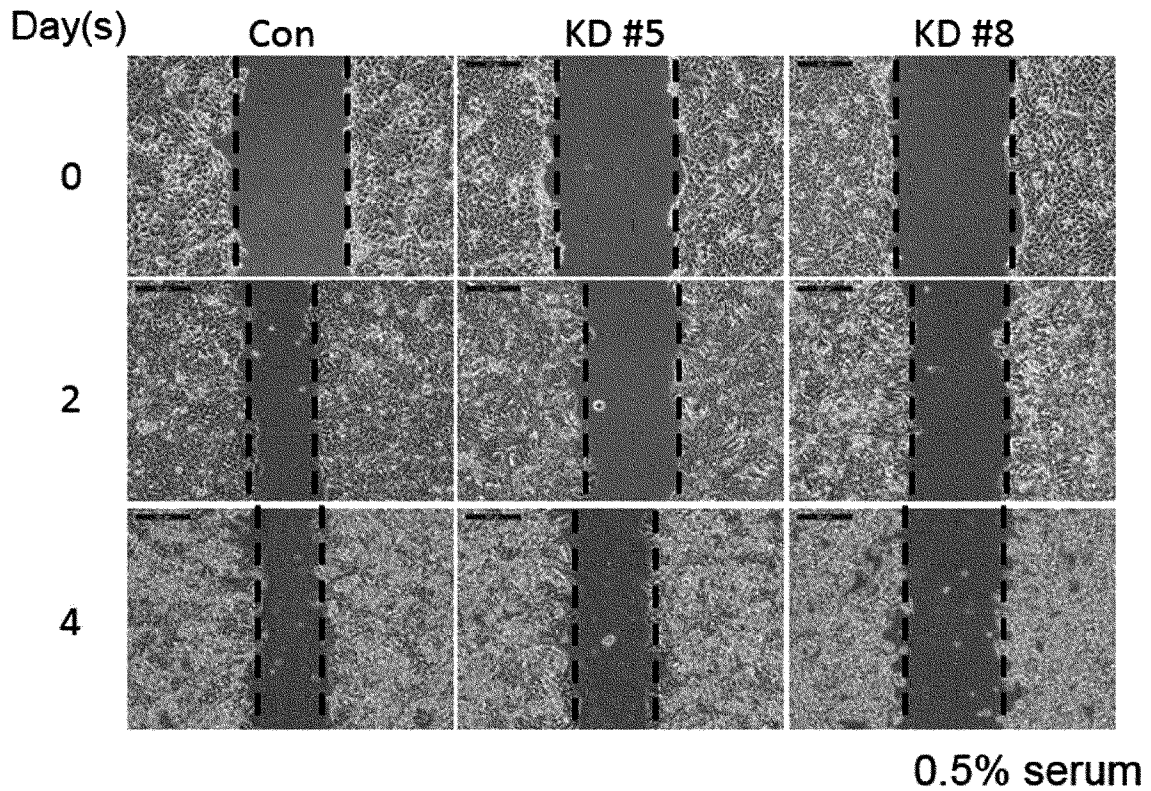
Intrinsic subtype : luminal A



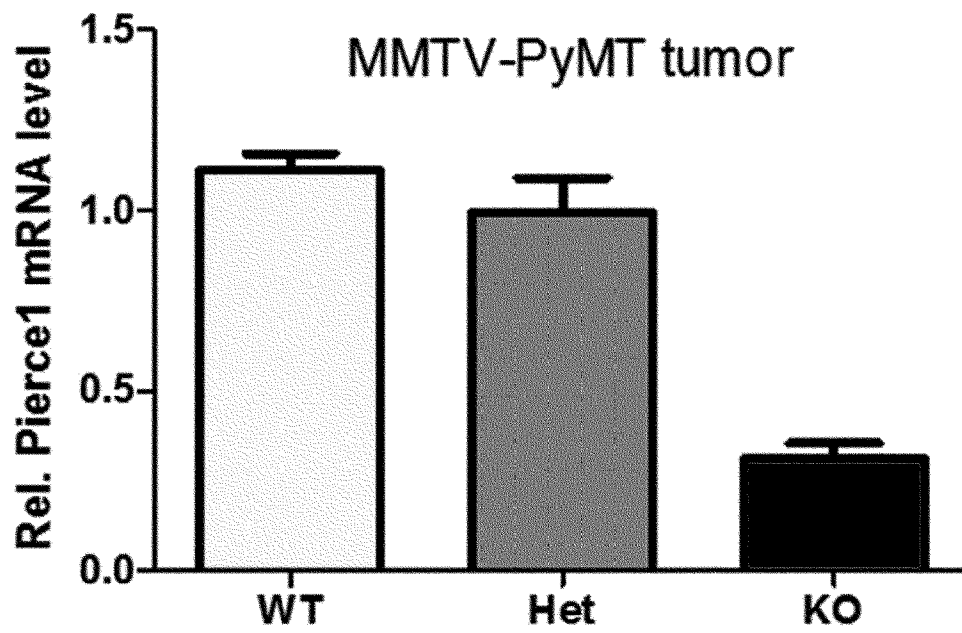
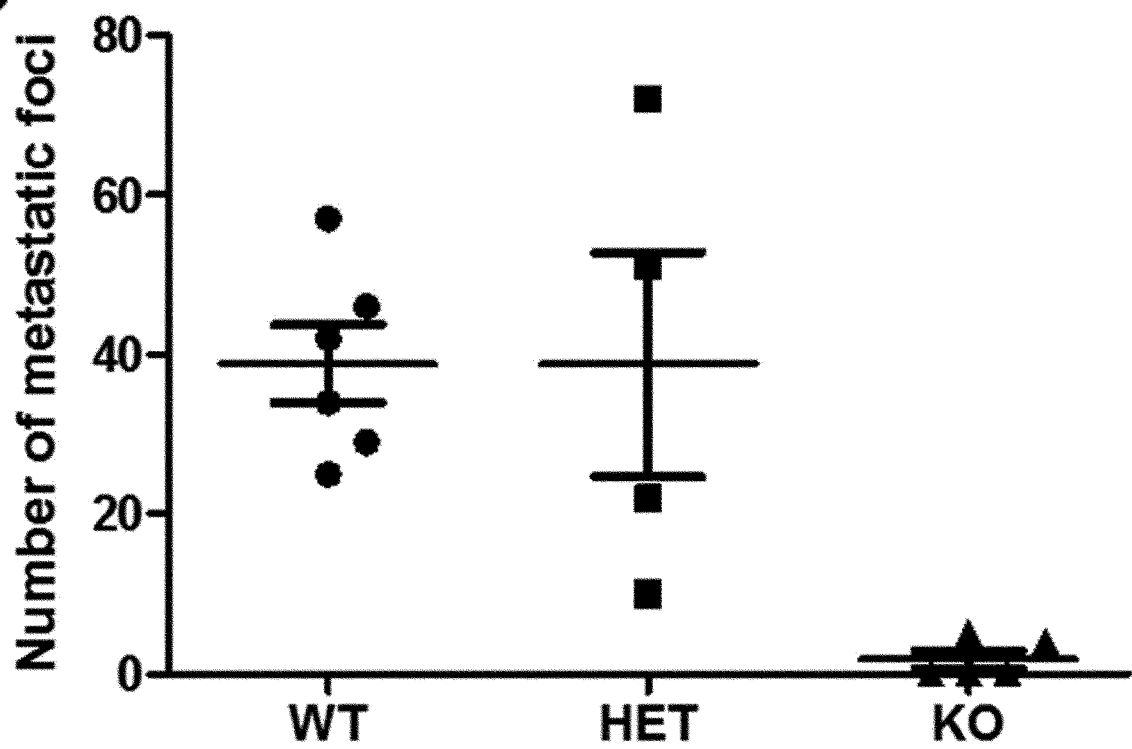
[도19]



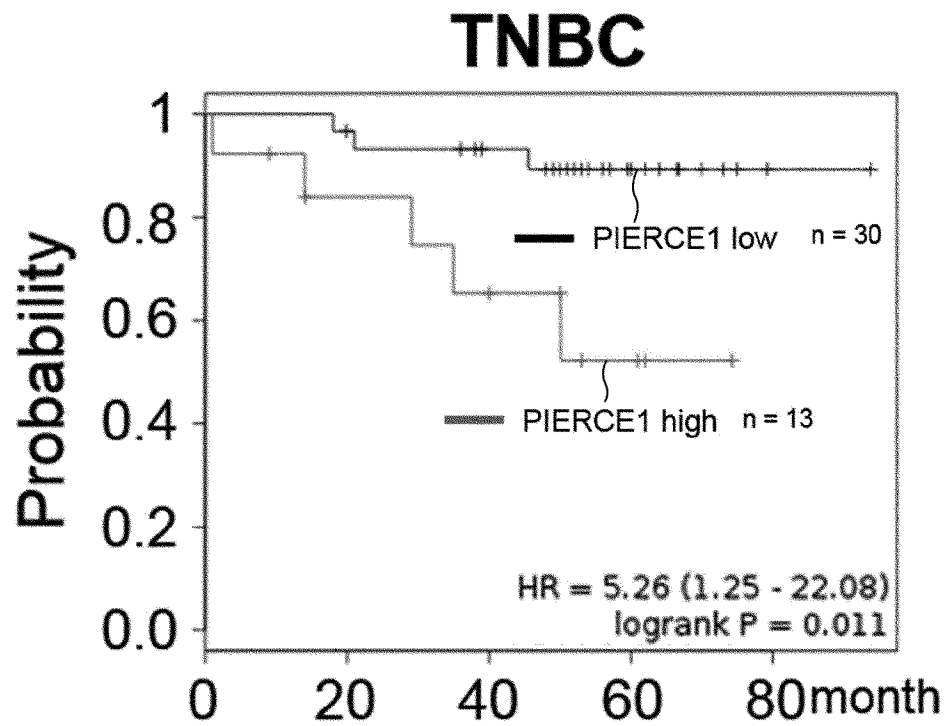
[도20]

a

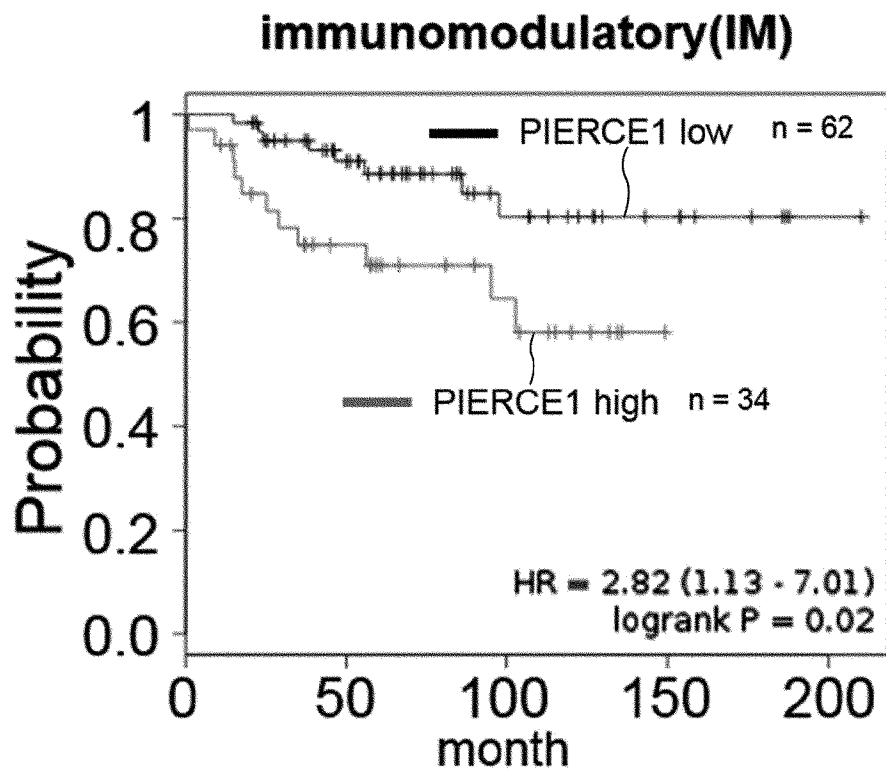
[도21]

a**b**

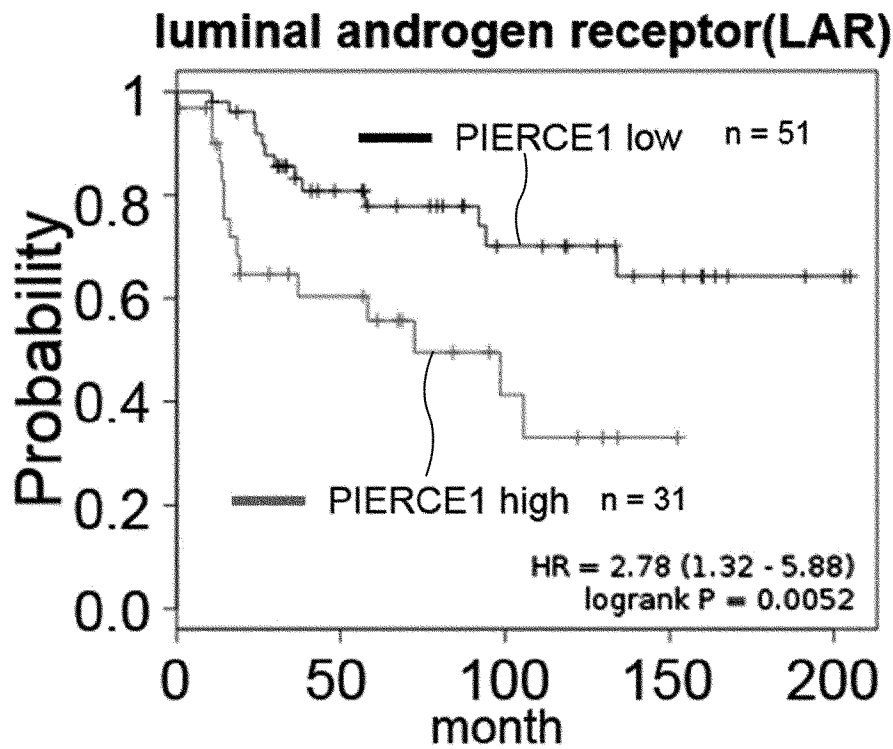
[도22a]



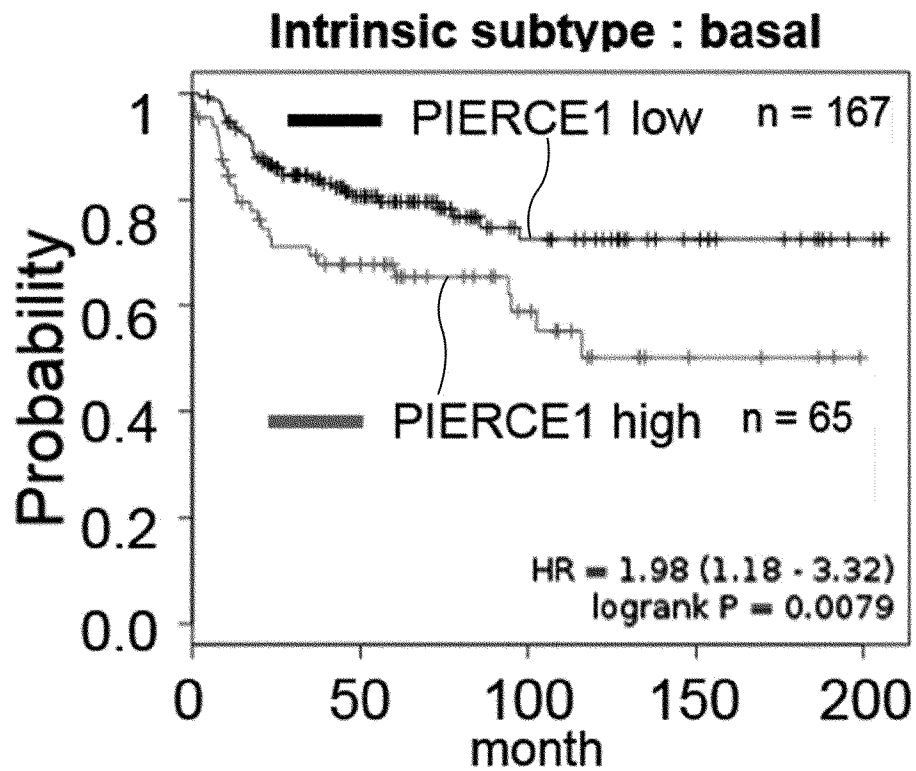
[도22b]



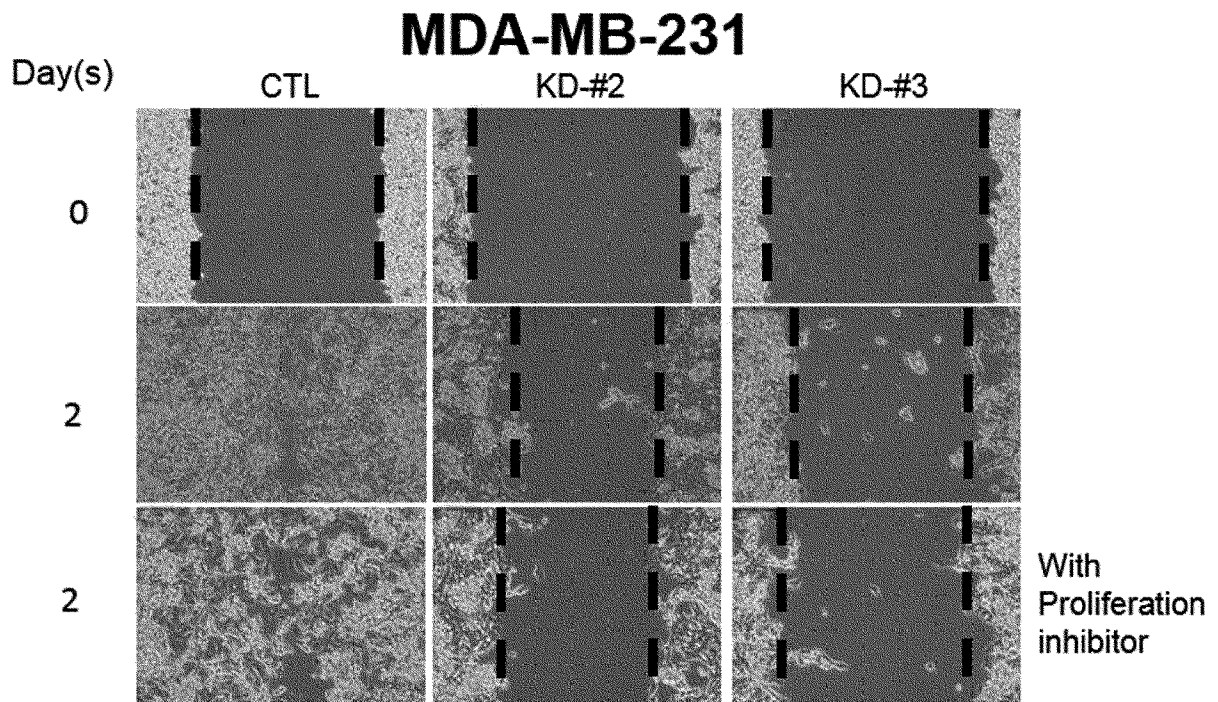
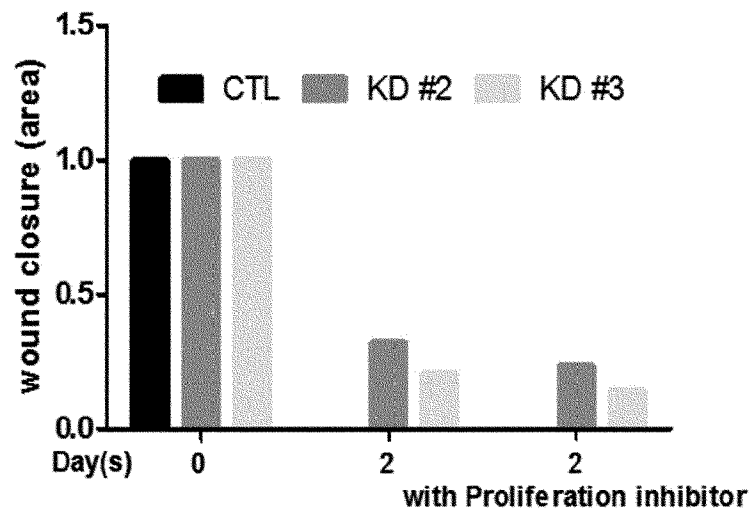
[도22c]



[도22d]



[도23]

a**b**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/013071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A23L 33/13(2016.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, 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)

A61K 48/00; C07K 14/47; C12N 15/12; A61K 39/395; A23L 33/13; G01N 33/50; G01N 33/68; 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: pierce1, inhibitor, cancer prevention

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Han Ung, "In Vivo Studies on the Regulatory Mechanisms of Tumorigenesis through a Novel p53 Target Gene, Pierce1", Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University Final Report, May 2013, pages 1-28 See pages 5, 8, 18 and 19.	1,3-12,15-17
Y		2
Y	NCBI Reference Sequence: NP_001041730.1 (02 October 2017) See aminoacid sequence.	2
X	KIM, Dae Hyeon, "In Vivo Studies on the Effect of Lung Tumorigenesis through a p53 Target Gene, Pierce1", Master's Thesis, Graduate School of Yonsei University Department of Biochemistry, 2012, pages 1-39 See korean language abstract; pages 22 and 23.	1,3-12,15-17
A	SUNG, Y. H. et al., "Pierce1, a Novel p53 Target Gene Contributing to the Ultraviolet-induced DNA Damage Response", Cancer Research, 15 December 2010, vol. 70, no. 24, pages 10454-10463 See the entire document.	1-12,15-17
A	SUNG, Y. H. et al., "PIERCE1 is Critical for Specification of Left-right Asymmetry in Mice", Scientific Reports, 16 June 2016, vol. 6, article no. 27932, pages 1-8 See the entire document.	1-12,15-17



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

14 FEBRUARY 2019 (14.02.2019)

Date of mailing of the international search report

15 FEBRUARY 2019 (15.02.2019)

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

International application No.

PCT/KR2018/013071

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106754950 A (HENAN NORMAL UNIVERSITY et al.) 31 May 2017 See the entire document.	1-12,15-17
PX	OH, J.-H., "The Role of PIERCE1 in Cancer Metastasis", Master's Thesis, Graduate School, Yonsei University Department of Biochemistry, February 2018, pages 1-30 See abstract; pages 10-21, 25 and 26.	1,3-12,15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/013071

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.: **13, 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 and 14 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to a 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/KR2018/013071

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 106754950 A	31/05/2017	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A23L 33/13(2016.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; C07K 14/47; C12N 15/12; A61K 39/395; A23L 33/13; G01N 33/50; G01N 33/68; 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: 피어스1, 억제제, 암 예방

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	이한웅, '새로운 p53 표적유전자인 Pierce1에 의한 생체 내 발암 조절 기작에 대한 연구', 연세대학교 산학협력단 최종보고서, 2013.05, 페이지 1-28 페이지 5, 8, 18 및 19 참조.	1,3-12,15-17
Y		2
Y	NCBI Reference Sequence: NP_001041730.1 (2017.10.02) 아미노산 서열 참조.	2
X	김대현, 'p53의 표적유전자인 Pierce1이 생체 내 Lung tumor의 형성에 미치는 영향에 관한 연구', 연세대학교 대학원 생화학 및 석사학위논문, 2012, 페이지 1-39 국문 요약; 페이지 22 및 23 참조.	1,3-12,15-17
A	SUNG, Y. H. 등, 'Pierce1, a novel p53 target gene contributing to the ultraviolet-induced DNA damage response', Cancer Research, 2010.12.15, 제70권, 제24호, 페이지 10454-10463 전체 문헌 참조.	1-12,15-17
A	SUNG, Y. H. 등, 'PIERCE1 is critical for specification of left-right asymmetry in mice', Scientific Reports, 2016.06.16, 제6권, 아티클 번호 27932, 페이지 1-8 전체 문헌 참조.	1-12,15-17

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 02월 14일 (14.02.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 02월 15일 (15.02.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



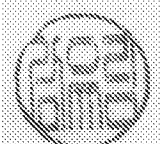
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CN 106754950 A (HENAN NORMAL UNIVERSITY 등) 2017.05.31 전체 문헌 참조.	1-12, 15-17
PX	OH, J.-H., 'The role of PIERCE1 in cancer metastasis', 석사학위논문, Graduate School, Yonsei University Department of Biochemistry, 2018.02, 페이지 1-30 초록; 페이지 10-21, 25 및 26 참조.	1, 3-12, 15-17

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: 13, 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13 및 14는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 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

CN 106754950 A

2017/05/31

없음