

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 10월 3일 (03.10.2019) WIPO PCT



(10) 국제공개번호
WO 2019/190066 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 38/16 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/002527

(22) 국제출원일: 2019년 3월 5일 (05.03.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0035418 2018년 3월 27일 (27.03.2018) KR
10-2019-0024944 2019년 3월 4일 (04.03.2019) KR

(71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER)
[KR/KR]: 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 장현철 (JANG, Hyonchol); 07982 서울시 양천구 목동서로 100, 310동 107호, Seoul (KR). 이병일 (LEE, Byung Il); 10360 경기도 고양시 일산서구 일산로 487, 1808동 1401호, Gyeonggi-do (KR). 윤홍덕 (YOUN, Hong-Duk); 16507 경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85, 104동 1004호, Gyeonggi-do (KR). 송보민 (SONG,

Bomin); 10562 경기도 고양시 덕양구 원흥로 25, 1101동 1215호, Gyeonggi-do (KR).

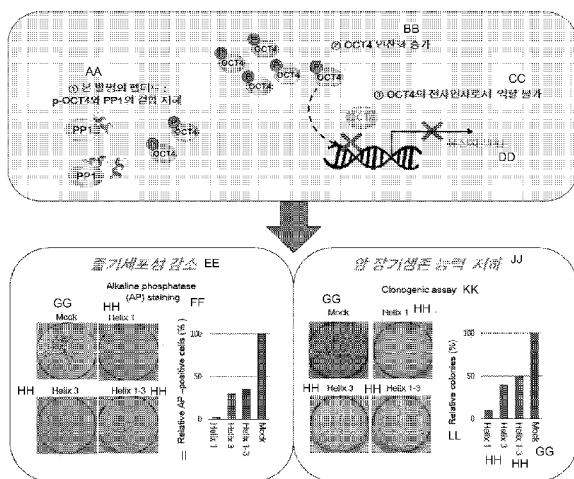
(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층, Seoul (KR).

(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, 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

(54) Title: STEMNESS-SUPPRESSING COMPOSITION COMPRISING OCT4 FUNCTION-INHIBITING PEPTIDE

(54) 발명의 명칭: OCT4 기능 저해용 펩티드를 포함하는 줄기세포성 억제용 조성물



AA ... ① Peptide of the present invention: inhibiting binding of p-OCT4 to PP1
BB ... ② Increase of OCT4 phosphorylation
CC ... ③ OCT4 unable to function as transcription factor
DD ... Gene expression
EE ... Stemness decrease
FF ... Alkaline phosphatase (AP) staining
GG ... Mock
HH ... Helix
II ... Relative AP-positive cells (%)
JJ ... Decrease of long-term survival capacity in cancer
KK ... Clonogenic assay
LL ... Relative colonies (%)

(57) Abstract: The present invention relates to a stemness-suppressing composition comprising an OCT4 function-inhibiting peptide and, more particularly, to a composition comprising a peptide as an effective ingredient for suppressing the stemness of various stem cells such as general stem cells, cancer stem cells, and the like, wherein the peptide inhibits the function of OCT4 by inducing the phosphorylation of OCT4. OCT4 function-inhibiting peptides of the present invention are expected to find applications in various fields through the suppressive activity thereof against stemness of stem cells.

(57) 요약서: 본 발명은 OCT4 기능 저해용 펩티드를 포함하는 줄기세포성 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 OCT4의 인산화를 유도함으로써 OCT4의 기능을 저해하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 일반 줄기세포, 암 줄기세포 등 다양한 줄기세포의 줄기세포성 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드들은 줄기세포의 줄기세포성 억제를 통한 다양한 분야에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

(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))

명세서

발명의 명칭: OCT4 기능 저해용 펩티드를 포함하는 줄기세포성 억제용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 OCT4의 기능을 저해하는 펩티드를 유효성분으로 포함하여 일반 줄기세포, 암 줄기세포 등 다양한 줄기세포의 줄기세포성을 억제할 수 있는 조성물, 방법 및 용도 등에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2018년 3월 27일에 출원된 한국특허출원 제10-2018-0035418호 및 2019년 3월 4일에 출원된 한국특허출원 제10-2019-0024944호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

배경기술

- [3] 최근에 활발히 개발되고 항암치료에 실질적으로 사용되고 있는 항암제들의 대부분은 빠르게 증식하는 암세포를 표적으로 하는 약물들이 대부분이다. 이러한 약물들을 이용한 항암 치료 경우에 초기에는 효과적으로 암 세포가 사멸되어 암이 치료되는 것으로 보여지지만, 결국 체내에 남아있는 암 줄기세포(cancer stem cell)가 제거되지 않아 암의 재발 및/또는 전이가 활발히 일어나며, 결국 기존의 항암요법에 대한 내성을 나타내는 문제점들이 종종 발생하고 있기 때문에 최근 암 줄기세포에 대한 관심이 높아지고 있다. 암 줄기세포는 일반적인 줄기세포와 유사하게 무제한의 재생능력을 가진 암세포로서 일반적인 암세포와 상이하게 천천히 증식하며, 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 암세포로서 기존에 알려져 있는 암세포들과 다른 기작(mechanism)들을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 한편, 최근 활발히 연구되고 있는 줄기세포 치료제의 경우 줄기세포의 증식, 생존 등을 조절하기 어렵기 때문에 이로 인한 부작용이 발생하고 있는 상황이다. 대표적인 부작용은 치료가 완료된 후, 미분화 줄기세포가 체내에 잔류하여 암화 됨으로써 발생할 수 있다.
- [4] 따라서, 암 줄기세포를 포함한 줄기세포의 줄기세포성을 조절할 수 있는 방법이 있다면 다양한 줄기세포 응용 분야에 안전하게 적용이 가능할 뿐만 아니라, 암의 치료 효과를 높여 암의 재발, 전이, 내성 등을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, OCT4의 기능을 저해하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는, 일반 줄기세포, 암 줄기세포 등 다양한 줄기세포의 줄기세포성을 억제할 수 있는 조성물, 방법 및

용도 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

- [6] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명, 예컨대 조성물에는 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함한다.
- [8] 상기 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 또는 13의 아미노산을 일부 또는 전체로 포함할 수도 있으며, 바람직하게는 1개 내지 10개의 아미노산을 부가, 치환, 또는 결실하여 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1 내지 5개의 아미노산을 부가, 치환, 또는 결실하여 포함할 수 있으며, 상기 추가, 변경 또는 대체는 펩티드의 전방, 후방, 또는 펩티드 내부에 포함될 수 있으며, OCT4의 기능을 억제할 수 있는 펩티드라면 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열의 기능성 동등물도 본 발명의 권리범위에 포함되며, 상기 기능적 동등물이란, 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 아미노산 서열과 적어도 60 % 이상, 바람직하게는 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로서, 상기 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 펩티드를 의미한다.
- [9] 또한, 상기 펩티드는 서열번호 4, 6, 8, 10 및 12로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 코딩된 것일 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드에는 폴리뉴클레오티드 변이체가 포함될 수 있다. 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드 변이체에는 서열번호 4, 6, 8, 10 및 12로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 염기서열과 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 더 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [10] 상기 펩티드는 바람직하게는 세포투과성 펩티드에 연결될 수 있으며, 상기 세포투과성 펩티드는 본 발명에 따른 펩티드의 OCT4의 기능을 억제하는 특성을

방해하지 않는 이상 당업계 공지된 다양한 세포투과성 펩티드가 제한되지않고 사용될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 막 투과성 폴리아르기닌 잔기(membrane-permeable polyarginine residues (11R))를 펩티드의 말단에 연결해 사용하였다. 이때 세포투과성 펩티드를 연결하면서, 당업계 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있고, 예컨대 링커(GGG 등) 등을 포함시킬 수 있고, 이에 제한되지않는다.

- [11] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 바람직하게는 OCT4(Octamer-binding transcription factor 4)와 PP1(protein phosphatase 1)사이의 결합을 저해하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간 OCT4의 236번째 아미노산인 세린, 마우스 OCT4의 229번째 아미노산 세린 또는 기타 다른 생물체의 대응하는 OCT4의 아미노산 세린의 인산화를 유지하는 것을 특징으로 할 수 있으나, OCT4의 기능을 억제할 수 있는 펩티드라면 이에 제한되지 않는다.
- [12] 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 줄기세포성 억제용 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 또는 13의 아미노산을 일부 또는 전체로 포함할 수도 있으며, 상기 펩티드는 서열번호 4, 6, 8, 10 또는 12의 염기서열을 일부 또는 전체로 포함하는 폴리뉴클레오티드가 코딩된 것일 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 생식세포, 암 줄기세포 등으로부터 선택될 수 있으나, OCT4 단백질이 발현되는 줄기세포의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 조성물은 바람직하게는 줄기세포의 줄기세포성을 억제하여 줄기세포의 증식, 생존 등을 억제할 수 있으며, 이를 통하여 줄기세포를 사용하는 모든 분야에서 줄기세포를 조절할 수 있는 방법으로 사용될 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [19] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 또는 13의 아미노산을 일부 또는 전체로 포함할 수도 있으며, 상기 펩티드는 서열번호 4, 6,

8, 10 또는 12의 염기서열을 일부 또는 전체로 포함하는 폴리뉴클레오티드가 코딩된 것일 수 있다.

- [20] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 펩티드는 바람직하게는 OCT4(Octamer-binding transcription factor 4)와 PP1(protein phosphatase 1) 사이의 결합을 저해하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간 OCT4의 236번째 아미노산인 세린 또는 마우스 OCT4의 229번째 아미노산인 세린의 인산화를 유지하는 것을 특징으로 할 수 있으나, OCT4의 기능을 억제할 수 있는 펩티드라면 이에 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 암은 바람직하게는 갑상선암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 직장암, 대장암, 혈액암 등으로 이루어질 수 있으며, 더욱 바람직하게는 위암, 대장암, 폐암, 간암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 자궁경부암, 난소암 등이나, OCT4와 연관된 암이라면 이에 제한되지 않는다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 항암제를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 항암제는 바람직하게는 독소루비신, 시스플라틴, 젬시타빈, 옥살리플라틴, 5-FU 등일 수 있으나, 항암제로 사용되고 있는 화합물이라면 이에 제한되지 않는다.
- [23] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 약학적 조성물은 바람직하게는 암 줄기세포의 줄기세포성을 억제하며, 이를 통하여 암의 증식, 생존, 전이, 재발, 항암제 내성 발생 등을 억제할 수 있으나, 암 줄기세포의 줄기세포성을 억제함으로써 발생할 수 있는 효과라면 이에 제한되지 않는다.
- [24] 또한, 본 발명은 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지하는 펩티드를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지하는 펩티드를 포함하는, 줄기세포성 억제용 조성물을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지하는 펩티드를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지하는 펩티드를 포함하는 조성물을 이용하여 줄기세포성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지하는 펩티드를 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료용도를 제공한다.
- [29] 본 발명의 구체예에 있어서, 상기 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지하는 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드일 수 있다.
- [30] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된

어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 및 세포 치료용 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제를 제공한다.

- [31] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 세포치료제는 치료용 줄기세포의 전이, 생존을 억제하여 줄기세포를 조절할 수도 있고, 치료 후 남아있는 치료용 줄기세포가 암화되어 암이 발생하는 것을 억제할 수도 있으나, OCT4의 기능을 억제함으로써 유도되는 효과라면 이에 제한되지 않는다.

- [32] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다: a) 인간 OCT4를 발현하는 세포에 PPI(protein phosphatase 1) 및 후보물질을 처리하는 단계; b) 상기 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화 여부를 확인하는 단계; 및 c) 상기 236번째 세린이 인산화가 유지된 경우, 상기 후보물질을 항암제로 선택하는 단계.

- [33] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다: a) 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 형광물질을 결합시키는 단계; b) 상기 형광물질이 결합된 펩티드에 PPI(protein phosphatase 1) 및 후보물질을 처리 및 반응시키는 단계; 및 c) 형광 편광(fluorescence polarization) 값을 측정하여 형광 값이 감소된 후보물질을 항암제로 선택하는 단계.

- [34] 상기 후보 물질은 뉴클레오티드, DNA, RNA, 아미노산, 압타머, 단백질, 화합물, 천연물, 천연추출물 등 항암제로 사용가능한 물질이라면 제한되지 않는다.

- [35] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포성 억제 방법을 제공한다.

- [36] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 줄기세포의 줄기세포성 억제 용도를 제공한다.

- [37] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.

- [38] 또한, 본 발명은 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

- [39] 또한, 본 발명은 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포성 억제 방법을 제공한다.

- [40] 또한, 본 발명은 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 줄기세포의 줄기세포성

억제 용도를 제공한다.

[41] 또한, 본 발명은 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.

[42] 또한, 본 발명은 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

[43] 본 발명에 따른 OCT4 기능 저해용 펩티드들은 다양한 줄기세포의 줄기세포성을 효과적으로 감소시킬 수 있기 때문에, 암의 증식 억제, 암의 재발 억제, 암의 전이 억제, 암의 항암제 내성 발생 억제 등에 효과적으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 일반 줄기세포에서도 줄기세포성을 감소시킬 수 있기 때문에 배아줄기세포의 특정 세포로의 분화에 있어서 시간은 단축시키고, 효율을 증대시킬 수 있다. 또한 배아줄기세포를 이용한 세포 치료에서, 본 발명의 조성물을 이용하게 되면, 치료 이후 남아있는 미분화된 배아줄기세포를 완전히 제거할 수 있으며, 따라서 암 발생의 부작용들을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 배아줄기세포를 이용한 세포치료요법의 안정성을 현저히 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[44] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주를 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[45] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주를 면역형광염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[46] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주의 줄기세포성을 알칼리성 인산가수분해효소 염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다,

[47] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주의 줄기세포성을 종양구 형성으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[48] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주의 유전자 발현 패턴을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[49] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주의 마우스 이종이식을 이용하여 종양 성장 곡선을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[50] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 세포주의 마우스 이종이식을 이용하여 최종 종양 크기를 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[51] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 마우스 이종이식 종양에서 조직면역염색법을 이용하여 염색의 정도를 비교 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

- [52] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 마우스 이종이식 종양에서 조직면역염색법을 이용하여 조직의 분화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [53] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 PP1과 OCT4 S236 인산화와의 연관관계를 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [54] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 PP1과 OCT4 S236 인산화와의 연관관계를 면역형광염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [55] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 PP1 발현 저해가 OCT4 S236 인산화를 증가시킴을 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [56] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 PP1 발현 저해가 OCT4 S236 인산화를 증가시킴을 면역형광염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [57] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 PP1 발현 저해가 줄기세포성을 감소시킴을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [58] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 OCT4 단백질의 3D 구조를 예측한 결과를 나타낸 도면이다.
- [59] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드들의 활성을 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [60] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드들의 활성을 면역형광염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [61] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드들의 줄기세포성 저해 및 암 장기 생존 능력 감소 활성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [62] 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드가 PP1에 결합함을 형광편광법으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [63] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드 서열 중 PP1에 결합하는 자세한 서열을 형광편광법으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [64] 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드 서열을 포함한 세포투과성 펩티드를 세포주에 처리함이 OCT4 S236 인산화를 증가시킴을 면역형광염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [65] 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드 서열을 포함한 세포투과성 펩티드를 세포주에 처리함이 줄기세포성을 감소시킴을 알칼리성 인산가수분해효소 염색법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [66] 암 사망의 주원인은 암 전이와 치료내성으로, 그 근본 원인이 줄기세포성을 띤 암 세포라는 사실이 최근 들어 엄밀히 증명되고 있다. 그래서 암 세포의 줄기세포성을 감소시키는 항암전략을 통해 암으로 인한 사망을 실질적으로

줄일 수 있을 것으로 기대한다.

- [67] 암 세포가 줄기세포성을 획득하는 경로는 크게 두 가지로 요약할 수 있는데, 하나는 정상 줄기세포가 암세포화 된 경우이며, 또 다른 하나는 암세포가 역분화를 통해 줄기세포성을 획득한 경우이다. 암 환자에서는 특히 배아줄기세포 핵심인자들이 암세포의 줄기세포성 유지에 중요한 역할을 하고 있으며, 암의 악성화가 진행될수록 정상 조직줄기세포 관련 유전자가 아닌 배아줄기세포 관련 유전자군의 발현이 증가하는 것으로 보고되었다.

배아줄기세포의 줄기세포성을 유지하는 네트워크에서 Oct4, Sox2, Nanog의 세 전사인자가 중심에 있으며, 이 중에서도 OCT4(유전자 Pou5f1)가 암의 줄기세포성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

- [68] 본 발명에서는 인간 세포에서 PP1(protein phosphatase 1)이 인간 OCT4(Octamer-binding transcription factor 4)의 236번째 세린(마우스의 229번째 세린에 해당)의 탈인산화를 유도함을 밝히고, OCT4와 PP1의 기능을 저해하는 펩티드 서열을 동정하였다. PP1은 다양한 기질을 가진 탈인산화 효소로, 일반적인 PP1 저해는 OCT4 이외의 다른 많은 단백질들의 기능에도 영향을 주어, 여러 부작용을 초래할 수 있으나 본 발명의 펩티드는 PP1과 OCT4의 결합을 특이적으로 저해하여, 줄기세포성을 감소시킨다. 본 발명의 펩티드는 OCT4의 인산화를 유도함으로써 암 및 정상 줄기세포성을 감소시키고, 특히 항암 치료를 받은 환자의 재발을 억제하는 용도로 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

- [69] 본 발명의 OCT4 기능 저해 펩티드는 OCT4와 PP1의 결합을 저해하여 인간 OCT4의 236번째 세린의 인산화를 유지함으로써 OCT4 기능을 저해하여 OCT4 100% 결핍과 같은 수준의 효과를 나타낸다. 이로 인해 정상줄기세포는 줄기세포성을 잃고 분화하게 되며, 암세포는 줄기세포성을 잃어 장기 생존이 불가능해지고, 항암 치료 후 재발하지 못하게 된다. 이는 OCT4와 단백질 탈인산화 효소 PP1의 결합을 특이적으로 저해하는 펩티드에 의해 OCT4의 236번째 인산화가 유지되어, OCT4가 DNA에 결합하지 못함으로써 전사활성을 잃게 됨에 기인하는 것이다.

- [70] 본 명세서에 있어서, "줄기세포(stem cell)"란 여러 종류의 조직 세포로 분화할 수 있는 능력, 즉, 줄기세포성(stemness)을 가진 미분화 세포를 총칭하는 광의의 개념을 말한다. 이러한 줄기세포는 크게 배아를 이용하여 제조할 수 있는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 성체줄기세포(adult stem cell), 생식세포(gamete), 암 줄기세포(cancer stem cell) 등으로 나뉘며, 배아줄기세포는 수정 후 구체적 장기를 형성하기 이전의 세포 덩어리 단계를 말하며, 최근에는 역분화를 통하여 정상세포로부터 배아줄기세포를 제조하기도 한다. 따라서, 신체를 이루는 모든 세포와 조직으로 분화할 수 있는 세포라면 이에 제한되지 않는다. 성체줄기세포는 제대혈, 골수, 혈액 등으로부터 추출해 낸 것으로서 뼈, 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포를 의미한다. 생식세포란, 생식을 통해서 유전 정보를 다음 세대로 전달하는 세포로서,

인간에게는 정자와 난자가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 암 줄기세포란 줄기세포 특유의 능력인 줄기세포성인 자가재생이나 분화능력을 가지는 포괄적인 의미의 암세포를 의미한다. 암 줄기세포는 일반적으로 정상적인 종양성장 조건(세포 성장에 필요한 영양분(포도당)이 충분하고 종양미세환경의 성장여건이 풍족하여 세포 스트레스가 없는 상태를 지칭)에서 일반적인 암세포와 상이하게 느린 속도로 증식하거나 휴지기(dormant state) 상태를 유지하여 항암제에 대한 저항성을 가지고 있을 수 있으며, 예를 들어, PGC-1 α 등의 전사조절인자의 발현이 정상적인 종양세포와 달리 통제되어 주요 대사조절물질의 기능이 일반 암세포와 비교하여 상이할 수 있다. 이러한 상이한 대사조절 능력과 이에 기전적으로 연계된 세포신호전달계의 조절을 통해 영양 결핍 상태에서 세포 사멸(apoptosis)에 대하여 저항성을 획득한, 침윤 및 전이능이 있는 세포를 포괄적으로 지칭한다. 그러나 일반적인 암 세포로 분화할 수 있는 세포라면 이에 제한되지 않는다.

- [71] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암 등의 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [72] 본 발명에서 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암 등의 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [73] 본 발명에서 "개체"란 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.
- [74] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [75] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸

셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [76] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [77] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[78]

- [79] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[80]

[81] 실시예

[82] 실시예 1: OCT4 인산화와 줄기세포성과의 연관관계 확인

[83] 1.1. 외인성 OCT4를 발현하는 세포주 제작

- [84] OCT4(octamer-binding transcription factor 4) 단백질의 인산화와 줄기세포성(stemness)과의 연관관계를 확인하기 위하여, 우선 OCT4 S236 인산화 모방 돌연변이체인 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 세포주를 제작하였다. 세포 제작을 위하여 독시사이클린(doxycycline) 의존적으로 short hairpin RNA(shRNA, 서열번호 1) 및 퓨로마이신(puromycin) 내성 유전자를 발현시키는 렌티바이러스를 제작하여 일차적으로 암줄기세포주인 NCCIT(ATCC® CRL-2073™) 및 NTERA-2(ATCC® CRL-1973™)에 형질감염시켰다. 그리고 pCAG-Flag-B/S 벡터에 OCT4 야생형(wild type) 및 블라스티시딘(blasticidine) 내성 유전자, 또는 OCT4의 인산화 모방형인 236D로 치환된 OCT4 및 블라스티시딘 내성 유전자를 발현하도록 재조합된 플라스미드를 Lipofectamine

3000(Thermefisher)을 이용하여 상기 형질감염된 세포주에 2차적으로 형질주입하였다. 그리고 배지에 퓨로마이신 및 블라스티시딘을 처리하여 정상적으로 형질감염 및 형질주입된 세포주를 분리하였고, 분리된 세포주에 독시사이클린을 처리하여 내인성 OCT4의 발현이 저해되고 외인성 OCT4 단백질로 치환된 세포주를 제작하였다. 제작된 세포주는 웨스턴 블롯팅을 통하여 확인하였다. 독시사이클린을 처리하고 4일 내지 8일을 배양한 세포주를 인산염완충용액(phosphate buffered saline: PBS)을 이용하여 세척하고, 세포용해 완충용액(lysis buffer; 20mM Tris-Cl(pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1%(v/v) Triton X-100 and protease inhibitors)을 이용하여 세포를 용해시킨 후에 OCT4 항체(SantaCruz) 및 Flag 항체(Cell Signaling)를 이용하여 SDS-page 및 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. 대조군으로는 ACTB 항체(Abcam)를 사용하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

- [85] 도 1에 나타난 바와 같이, 야생형 OCT4 또는 236D로 치환된 OCT4가 정상적으로 형질전환되었으며, 독시사이클린 의존적으로 외인성 OCT4 단백질이 발현되는 것을 확인하였다.
- [86] 또한, 면역형광염색을 이용하여 외인성 OCT4 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 확인을 위하여, 독시사이클린을 처리하고 4일 내지 8일을 배양한 세포주를 인산염완충용액을 이용하여 세척한 후, 4% 포르말데히드(formaldehyde) 용액을 이용하여 세포를 고정시킨 후에 다시 인산염완충용액으로 세척하고, 0.5% 트리톤 X-100을 처리하여 세포막의 투과성을 높여주었다. 그리고 1% BSA(bovine serum albumin) 용액을 이용하여 블로킹시키고, OCT4 항체를 처리하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그리고 인산염완충용액으로 결합하지 않은 항체를 제거한 후 형광이 결합되어 있는 2차 항체(Thermo Fisher Scientific)를 처리하고 실온에서 1시간동안 반응시키고, 결합되지 않은 항체는 인산염완충용액을 이용하여 제거하고, 핵을 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Calbiochem)을 이용하여 염색하였다. 그리고 마운팅 용액(mounting solution)을 세포 위에 첨가한 후에 공초점현미경(confocal microscope)을 이용하여 단백질 발현 여부를 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.
- [87] 도 2에 나타난 바와 같이, 야생형 OCT4 또는 236D로 치환된 OCT4가 정상적으로 형질전환되었으며, 독시사이클린 의존적으로 외인성 OCT4 단백질이 발현되는 것을 확인하였다.

[88]

[89] **1.2. OCT4 인산화와 줄기세포성 연관관계 확인**

- [90] OCT4 단백질과 줄기세포성과의 연관관계를 확인하기 위하여, 실시예 1.1의 방법으로 제작된 외인성 OCT4를 발현하는 세포주를 트립신 처리를 통하여 단일 세포로 분리한 후에 6-웰 플레이트에 각 웰당 1,000개의 세포를 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 일주일 이상 배양한 후에 알칼리성 인산가수분해효소 분석

키트(Alkaline phosphatase assay kit, Medsource Ozone Biomedicals)를 이용하여 염색을 진행하고, 현미경으로 관찰하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

- [91] 도 3에 나타난 바와 같이, 야생형 OCT4를 발현하는 세포의 경우에는 대조군과 동일한 세포 형태를 유지하며, 줄기세포성이 유지되어 알칼리성 인산가수분해효소에 대해 양성 반응을 나타내는 반면에, 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 세포의 경우에는 세포 모양이 변이되어 응집하지 못하며, 알칼리성 인산가수분해효소에 대해 음성 반응을 나타내는 것을 확인하였다.

- [92] 또한, 종양구 형성 여부를 확인하였다. 종양구 형성을 위해서, 1mL의 B27(Invitrogen), 20ng/mL의 표피성장인자(Epidermal Growth Factor; EGF, Sigma), 20ng/ml 염기성 섬유아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor-2; bFGF2, Sigma), 및 4ug/ml heparin(Sigma)이 첨가된 DMEM/F12(Hyclone) 배지를 이용하여 96-well Ultra Low Attachment plates(Corning)에 각 웰당 10,000개의 세포를 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 이틀 동안 배양한 후에 동량의 배지를 첨가하였다. 그리고 3일 후에 1/10의 비율로 계대배양한 후에 다시 7일간 배양하고, Cytation3(BioTek)로 96-웰 전체 이미지를 촬영하고 직경이 10 μ m 이상인 회전 타원체를 계수하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

- [93] 도 4에 나타난 바와 같이, 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 세포의 경우에는 종양구의 형성이 현저히 감소된 것을 확인하였고, 이를 통하여, 236D로 치환된 OCT4의 경우에는 줄기세포성이 저해된 것을 확인할 수 있었다.

- [94] 또한, 실시예 1.1의 방법으로 제작된 외인성 OCT4를 발현하는 NCCIT 세포에 독시사이클린을 처리하고 배양한 세포와 처리하지 않고 배양한 세포를 RNeasy Purification Kit(Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 정제한 후 MacroGen에 의뢰하여 whole RNA-seq을 진행하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

- [95] 도 5에 나타난 바와 같이, 야생형 OCT4를 발현하는 형질전환 세포주의 경우에는 원 세포주와 유사한 유전자 발현 패턴을 나타내었고, 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 형질전환 세포주의 경우에는 OCT4가 제거된 세포주와 유사한 발현 패턴을 나타내는 것을 확인하였다.

- [96] 상기 결과들을 통하여, OCT4는 줄기세포성의 유지에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 특별히, OCT4의 236번째 아미노산을 D로 치환하여 S236의 인산화를 모방한 경우 줄기세포성이 현저히 저해되며, 이를 통하여 OCT4 S236 인산화가 줄기세포성에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.

[97]

[98] 실시예 2: 동물 모델에서 OCT4 인산화와 종양 성장 연관관계 확인

[99] 2.1 OCT4 인산화와 종양 성장 연관관계 확인

- [100] 실시예 1.1의 방법으로 제작된 외인성 OCT4를 발현하는 NTERA2 세포를 BALB/c-nu 쥐에 1x10⁷개를 이종이식하고 종양의 크기가 약 50-100mm³ 일 때 두 그룹으로 나누어 한 그룹에는 독시사이클린을 투약하고 다른 그룹에는 투약하지 않고 5주간 종양의 크기를 2-3일 간격으로 측정한 결과를 도 6에

나타내었다.

[101] 도 6에 나타난 바와 같이 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 세포의 경우에는 이종이식 된 종양의 생장이 현저히 감소된 것을 확인하였다.

[102] 또한 약 5주 후 종양을 쥐에서 박리하고 종양 무게를 측정하여 그래프로 나타내고, 실제 종양 이미지를 도 7에 나타내었다.

[103] 도 7에 나타난 바와 같이 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 세포의 경우에는 이종이식 된 종양의 크기가 현저히 작은 것을 확인하였다.

[104]

[105] **2.2 OCT4 인산화와 종양 조직의 분화 연관관계 확인**

[106] 실시예 2.1에서 박리한 종양을 포르말린에 고정 후 파라핀 블록을 제작하여 조직면역화학염색을 이용하여 생장표지자 Ki67 안티바디로 염색한 결과를 도 8에 나타내었다.

[107] 도 8에 나타난 바와 같이 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 종양 조직에서는 Ki67 염색율이 현저히 낮은 것을 확인하였다.

[108] 또한 종양 조직의 형태를 확대하여 도 9에 나타내었다.

[109] 도 9에 나타난 바와 같이 236D로 치환된 OCT4를 발현하는 종양 조직에서는 줄기세포성을 잃고 다양한 형태로 분화 경향성을 가진 조직을 확인하였다.

[110]

[111] **실시예 3: PP1과 OCT4 인산화의 연관관계 확인**

[112] **3.1. PP1과 OCT4 인산화의 연관관계 확인**

[113] PP1(protein phosphatase 1)과 OCT4의 연관관계를 확인하기 위하여, PP1의 저해제로 알려져 있는 오카다산(Okadaic acid)을 NCCIT 및 NTERA-2 세포주에 처리하고, 실시예 1.1과 동일한 방법으로 웨스턴블롯팅 및 면역형광염색법을 실시하였다. OCT4 S236 인산화 항체는 GenScript사에 의뢰하여 제작한 항체를 사용하였다(ref. eLIFE2016). 그 결과는 도 10 및 도 11에 각각 나타내었다.

[114] 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이, PP1를 저해시킨 경우 OCT4의 인산화가 증가되는 것을 확인하였다.

[115]

[116] **3.2. PP1 발현 저해 조절용 세포주 제작**

[117] 또한, PP1 발현 저해 조절용 세포주를 제작하기 위하여, 독시사이클린 의존적으로 서열번호 2 또는 서열번호 3의 shRNA를 발현시키는 렌티바이러스를 제작하고 NCCIT 세포주에 형질감염시켜, 독시사이클린을 통하여 PP1의 발현을 조절할 수 있는 세포주를 제작하였다. 그리고 실시예 2.1과 동일한 방법으로 웨스턴블롯팅 및 면역형광염색법을 실시하였다. 그 결과는 도 12 및 도 13에 각각 나타내었다.

[118] 도 12 및 도 13에 나타난 바와 같이, 독시사이클린을 이용하여 PP1의 발현을 억제시킨 경우 인산화된 OCT4가 증가되는 것을 확인하였다.

[119]

- [120] **3.3. PP1 저해로 인한 OCT4 인산화의 증가가 줄기세포성에 미치는 영향 확인**
- [121] PP1 저해로 인한 OCT4 인산화의 증가가 줄기세포성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실시예 1.2와 동일한 방법으로 알칼리성 인산가수분해효소 염색법 및 종양구 형성 여부를 확인하였다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.
- [122] 도 14에 나타난 바와 같이, 독시사이클린을 처리하여 PP1의 발현을 억제시킨 경우 알칼리성 인산가수분해효소에 의하여 염색되지 않으며, 역시 종양구의 형성도 현저히 감소되는 것을 확인하였다.
- [123] 상기 결과들을 통하여, PP1을 억제시키면 OCT4의 인산화가 증가되고, 이로 인하여 줄기세포성이 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

[124]

[125] **실시예 4: OCT4의 구조 분석**

[126] **4.1. 인간 OCT4 구조 예측**

- [127] 인간의 OCT4(octamer-binding transcription factor 4)의 구조 예측을 위하여, 현재 일부 구조가 알려져 있는 마우스의 OCT4 X-선 결정구조(PDB ID: 3L1P)를 대조군으로 이용하여 PP1과의 결합에 관여할 것으로 예상하는 부위의 구조를 예측하였다. 그 결과는 도 15에 나타내었다.
- [128] 도 15에 나타난 바와 같이, PP1과의 결합에 관여할 것으로 예상되는 부위의 경우 인간의 OCT4와 마우스 OCT4의 아미노산 서열이 매우 유사하며, 이를 통하여 해당 부위의 인간 OCT4 단백질의 구조는 알파-나선 1(α -helix 1), 알파-나선 2(α -helix 2) 및 알파-나선 3(α -helix 3)으로 구성되어 있는 3D(삼차원) 구조를 가지고 있음을 예측할 수 있었다.

[129]

[130] **실시예 5: OCT4 기능 저해용 펩티드 제작**

- [131] 실시예 4의 구조 분석을 통하여, OCT4와 PP1과의 결합을 감소시켜 OCT4의 기능을 저해할 수 있는 OCT4 기능 저해용 펩티드를 제작하기 위하여, 서열번호 4의 나선 1-3(Helix 1-3), 서열번호 6의 나선 1(Helix-1), 서열번호 8의 나선 2(Helix-2), 및 서열번호 10의 나선 3(Helix-3)의 염기서열을 제작하였다. 그리고 제작된 염기서열들은 각각 pCAG-F-puro vector(Addgene)에 삽입하여 제조합 벡터를 제작하였다.

[132]

[133] **실시예 6: OCT4 기능 저해용 펩티드 활성 확인**

[134] **6.1. OCT4 기능 저해용 펩티드의 줄기세포성 저해 활성 확인**

- [135] 실시예 5의 방법으로 제작된 벡터를 NCCIT 세포주에 lipofectamine 3000을 이용하여 삽입하여 형질전환시킨 후에 36시간 내지 48시간 동안 배양한 후에, 실시예 2.1과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 웨스턴 블롯팅의 정량화는 ImageJ를 이용하여 분석하였다. 그 결과는 도 16에 나타내었다.
- [136] 도 16에 나타난 바와 같이, 실시예 5의 방법으로 제작된 OCT4 기능 저해용 펩티드들은 모두 NCCIT 세포주 내에서 OCT4의 인산화를 증가시켰으며, 특히,

- 나선 1 및 나선 1-3의 효과가 가장 높은 것을 확인하였다.
- [137] 또한, 실시예 5의 방법으로 제작된 벡터를 NCCIT 및 NTERA-2 세포주에 lipofectamine 3000을 이용하여 삽입하여 형질전환시킨 후에 36시간 내지 48시간 동안 배양한 후에, 실시예 2.1과 동일한 방법으로 면역형광염색법을 실시하여 그 결과를 도 17에 나타내었다.
- [138] OCT4-PP1 결합저해 펩티드에 의해, 줄기세포성이 감소되는지 확인하기 위하여, 실시예 5의 방법으로 제작된 벡터를 lipofectamine 3000을 이용하여 마우스의 배아줄기세포(mouse embryonic stem cell, mESC), NCCIT 및 NTERA-2 세포주에 각각 형질전환시킨 후에 2일 동안 배양하고, 푸로마이신(puromycin)을 처리하고 2일 동안 추가로 배양하여 벡터가 삽입된 형질전환 세포주만을 분리하였다. 그리고 실시예 1.2와 동일한 방법으로 알칼리성 인산가수분해효소 분석 및 암세포의 생존 능력(clonogenic assay)을 실시하였다. 그 결과는 도 18에 나타내었다.
- [139] 도 18에 나타난 바와 같이, OCT4 기능 저해용 펩티드가 처리된 세포의 경우에는 줄기세포성이 감소되어 세포 모양이 변이되어 응집하지 못하며, 알칼리성 인산가수분해효소에 대해 음성 반응을 나타내고 암세포의 생존 능력 또한 감소되는 것을 확인하였다.
- [140] 실시예 4의 나선 1(Helix-1), 나선 2(Helix-2) 나선 3(Helix-3)에 FITC가 결합된 펩티드를 합성하였다.
- [141] 펩티드를 최종 20nM로 형광편광반응 완충용액(10mM HEPES pH7.5, 50mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.0025% Tween 20)에 균일하게 분주하고, 정제된 PP1 단백질을 추가한 후 30분 동안 반응시키고, 형광편광을 TECAN infinite F200 pro를 이용하여 측정한 결과를 도 19에 나타내었다.
- [142] 도 19에 나타난 바와 같이, PP1 단백질 추가시 형광편광값이 현저히 증가하여, PP1과 나선 3 펩티드가 결합함을 확인할 수 있었다.
- [143] 19개의 아미노산으로 구성된 나선 3(Helix-3) 서열 (서열번호 11) 중 PP1과의 결합에 관여하는 서열을 좁혀, 나선 3-1 (서열번호 14), 나선 3-2 (서열번호 15), 나선 3-3 (서열번호 13)과 나선 3의 결합력을 비교해 보았다. 그 결과, 최종적으로 12개 아미노산으로 구성된 나선 3-3(Helix-3-3) (서열번호 13)이 나선 3(Helix-3)과 동일한 결합력을 가짐을 보여주는 결과를 도 20에 나타내었다.
- [144] 또한, 나선 3-3(Helix-3-3)의 서열을 연결한 세포투과성 펩티드(11R-GGG-VVRVWFCNRRQK)를 제작하였으며 10uM 의 농도로 세포배양액에 추가하여 2일 이상 처리하였다. 처리 후 OCT4의 인산화를 증가를 면역형광염색으로 확인한 결과를 도 21에 나타내었다.
- [145] 또한, 실시예 1.2와 동일한 방법으로 알칼리성 인산가수분해효소 분석 및 암세포의 생존 능력(clonogenic assay)을 실시하였다. 그 결과는 도 22에 나타내었다.
- [146] 도 21 및 도 22에 나타난 바와 같이, OCT4 기능 저해용 펩티드가 처리된 세포의

경우에는 OCT4 인산화에 의하여 줄기세포성이 감소되어 세포 모양이 변이되어 응집하지 못하며, 알칼리성 인산가수분해효소에 대해 음성 반응을 나타내고 암세포의 생존 능력 또한 감소되는 것을 확인하였다.

[147]

[148] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드들은 OCT4와 PP1과의 결합을 효과적으로 억제하여, 인간 OCT4의 236번째 아미노산인 세린의 인산화를 유지하여 OCT4의 기능을 저해하여 OCT4가 DNA에 결합하지 못함으로써 전사활성을 잃게 되고, 최종적으로는 암 줄기세포의 줄기세포성을 감소시켜 암의 증식 억제, 암의 재발 억제, 암의 전이 억제, 암의 항암제 내성 발생 억제 등에 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라, 일반 줄기세포에서도 줄기세포성을 감소시킬 수 있기 때문에 배아줄기세포의 특정 세포로의 분화에 있어서 시간은 단축시키고, 효율을 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라, 배아줄기세포를 이용한 세포 치료에서, 이후 남아있는 미분화된 배아줄기세포로 인한 암 발생의 부작용들을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 본 발명의 OCT4 기능 저해용 펩티드들은 줄기세포의 줄기세포성 억제를 통한 다양한 분야에 적용이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

[149]

[150] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[151] 본 발명에 따른 OCT4 기능 저해용 펩티드들은 다양한 줄기세포의 줄기세포성을 효과적으로 감소시킬 수 있기 때문에, 암의 증식 억제, 암의 재발 억제, 암의 전이 억제, 암의 항암제 내성 발생 억제 등에 효과적으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 일반 줄기세포에서도 줄기세포성을 감소시킬 수 있기 때문에 배아줄기세포의 특정 세포로의 분화에 있어서 시간은 단축시키고, 효율을 증대시킬 수 있다. 또한 배아줄기세포를 이용한 세포 치료에서, 본 발명의 조성물을 이용하게 되면, 치료 이후 남아있는 미분화된 배아줄기세포를 완전히 제거할 수 있으며, 따라서 암 발생의 부작용들을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 배아줄기세포를 이용한 세포치료요법의 안정성을 현저히 증대시킬 수 있다. 따라서, 산업상 이용가능성 면에서 가치가 우수하다.

서열목록 Free Text

[152] 서열번호 1: OCT4의 shRNA

[153] 5'-TCATTCACCTAAGGAAGGAATT-3'

[154] 서열번호 2: PP1의 shRNA #1

- [155] 5'-GCGAATTATGCGACCAACTGA-3'
- [156] 서열번호 3: PP1의 shRNA #2
- [157] 5'-ACATTTGGTGCAGAAGTGGTTCT-3'
- [158] 서열번호 4: Helix 1-3의 DNA 서열
- [159] AACCGAGTGAGAGGCAACCTGGAGAATTTGTTTCCTGCAGTGCCCGAAAC
CCACACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAG
GATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCAGAAGGGCAAGCGATC
A
- [160] 서열번호 5: Helix 1-3의 아미노산 서열
- [161] NRVRGNLENLFLQCPKPTLQQISHIAQQLGLEKDVVRVWFCNRRQKGKRS
- [162] 서열번호 6: Helix 1의 DNA 서열
- [163] AACCGAGTGAGAGGCAACCTGGAGAATTTG
- [164] 서열번호 7: Helix 1의 아미노산 서열
- [165] NRVRGNLENL
- [166] 서열번호 8: Helix 2의 DNA 서열
- [167] CTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGG
- [168] 서열번호 9: Helix 2의 아미노산 서열
- [169] LQQISHIAQQLG
- [170] 서열번호 10: Helix 3의 DNA 서열
- [171] AAGGATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCAGAAGGGCAAGC
GATCA
- [172] 서열번호 11: Helix 3의 아미노산 서열
- [173] KDVVRVWFCNRRQKGKRSS
- [174] 서열번호 12: Helix 3-3의 DNA 서열
- [175] GTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCAGAAGGGCAAG
- [176] 서열번호 13: Helix 3-3의 아미노산 서열
- [177] VVRVWFCNRRQK
- [178] 서열번호 14: Helix 3-1의 아미노산 서열
- [179] KDVVRVWFCN
- [180] 서열번호 15: Helix 3-2의 아미노산 서열
- [181] CNRRQKGKRSS

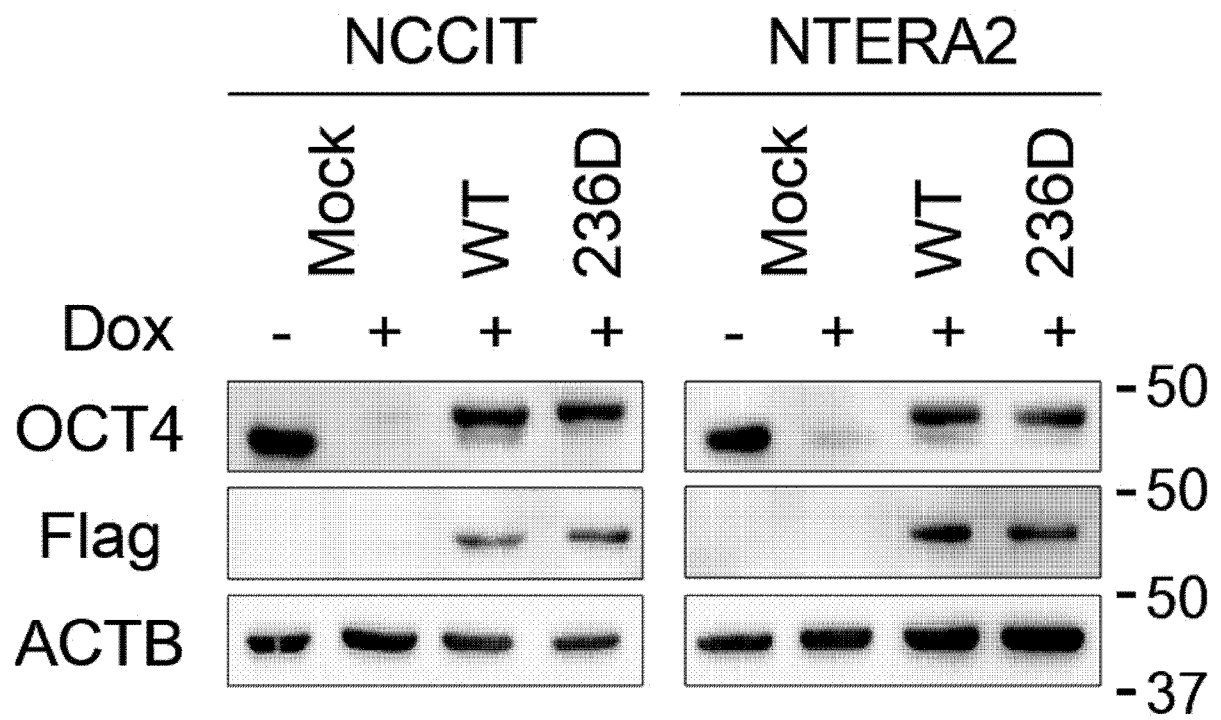
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 줄기세포성 억제용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 펩티드는 OCT4(Octamer-binding transcription factor 4)와 PP1(protein phosphatase 1) 사이의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 줄기세포는 배아줄기세포, 생식세포, 및 암 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 줄기세포의 증식, 또는 생존을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 펩티드는 OCT4(Octamer-binding transcription factor 4)와 PP1(protein phosphatase 1) 사이의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 5항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 암의 증식, 생존, 전이, 재발 또는 항암제 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린을 인산화시키는 또는 인산화를 유지하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포성 억제용 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 11] 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서,
상기 펩티드는 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터

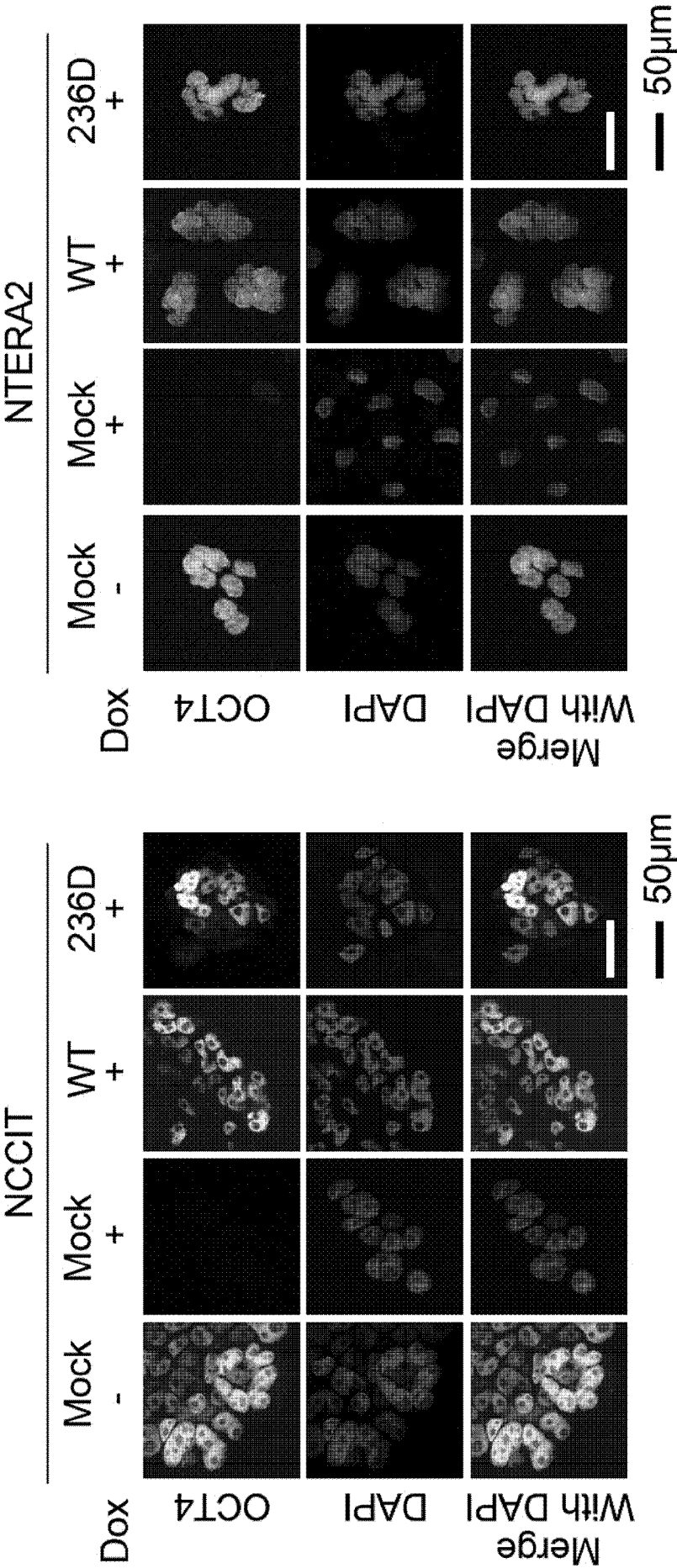
- 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제 1항, 제 5항, 제 9항 및 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 세포투과성 펩티드에 연결되는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 14] 제 1항, 제 5항, 제 9항 및 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 4, 6, 8, 10 및 12로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 코딩된 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 15] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 및 세포 치료용 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 세포 치료제.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,
상기 펩티드는 OCT4(Octamer-binding transcription factor 4)와 PP1(protein phosphatase 1) 사이의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는, 세포치료제.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서,
상기 세포치료제는 치료용 줄기세포의 전이, 생존, 또는 암화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 세포치료제.
- [청구항 18] 제 15항에 있어서, 상기 펩티드는 세포투과성 펩티드에 연결되는 것을 특징으로 하는, 세포치료제.
- [청구항 19] 제 15항에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 4, 6, 8, 10 및 12로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 코딩된 것을 특징으로 하는, 세포치료제.
- [청구항 20] 하기 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법:
a) 인간 OCT4를 발현하는 세포에 PPI (protein phosphatase 1) 및 후보물질을 처리하는 단계;
b) 상기 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화 여부를 확인하는 단계; 및
c) 상기 236번째 세린이 인산화가 유지된 경우, 상기 후보물질을 항암후보물질로 선택하는 단계.
- [청구항 21] 하기 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법:
a) 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 형광물질을 결합시키는 단계;
b) 상기 형광물질이 결합된 펩티드에 PPI(protein phosphatase 1) 및 후보물질을 처리 및 반응시키는 단계; 및
c) 형광 편광(fluorescence polarization) 값을 측정하여 형광 값이 감소된 후보물질을 항암제로 선택하는 단계.
- [청구항 22] 제 21항에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 4, 6, 8, 10 및 12로 이루어진

- 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 코딩된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 23] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포성 억제 방법.
- [청구항 24] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 줄기세포의 줄기세포성 억제 용도.
- [청구항 25] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.
- [청구항 26] 서열번호 5, 7, 9, 11 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 27] 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포성 억제 방법.
- [청구항 28] 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 줄기세포의 줄기세포성 억제 용도.
- [청구항 29] 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.
- [청구항 30] 인간 OCT4의 아미노산 서열에서 236번째 세린의 인산화를 유지시키는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 암 예방 또는 치료 용도.

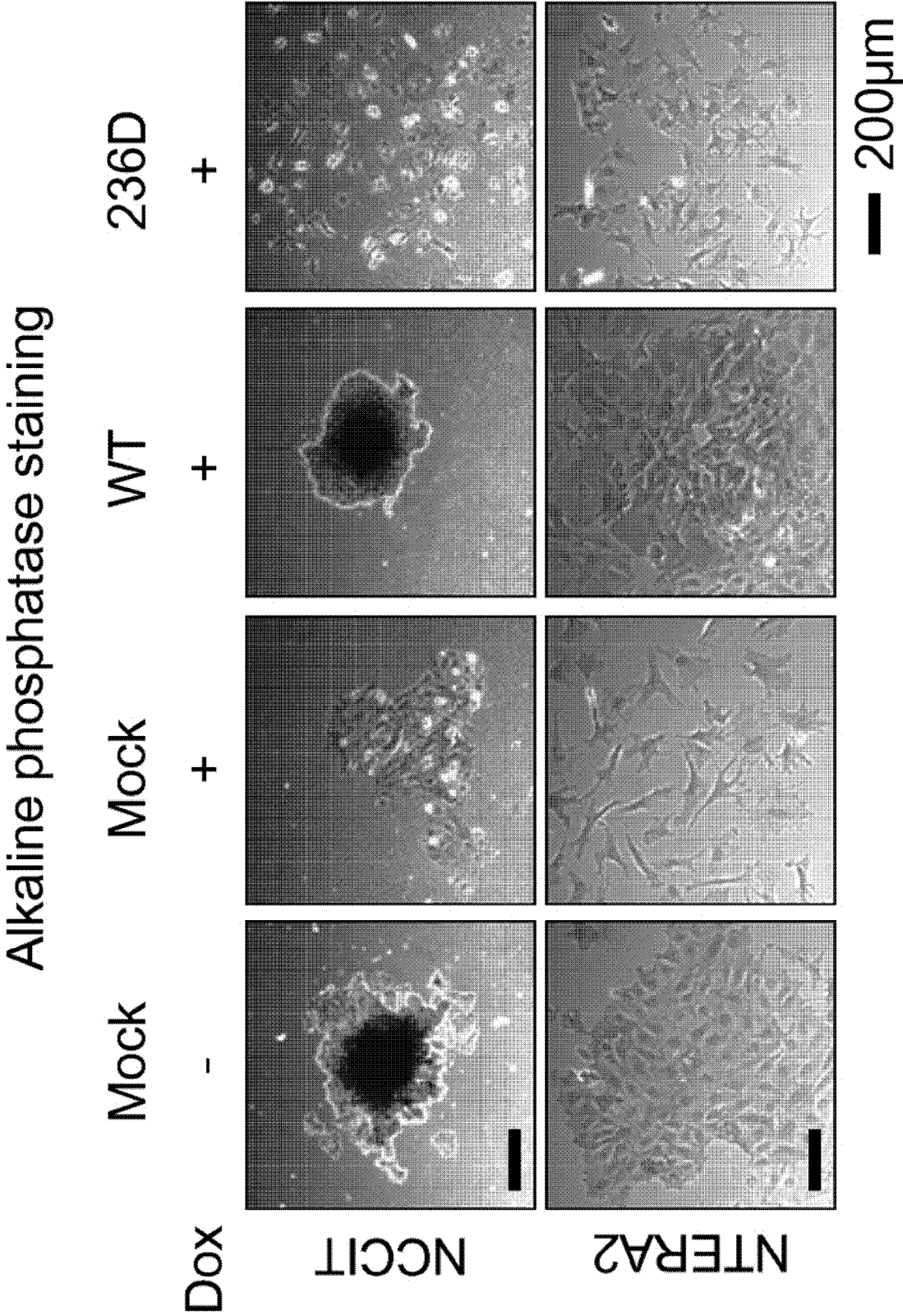
[도1]



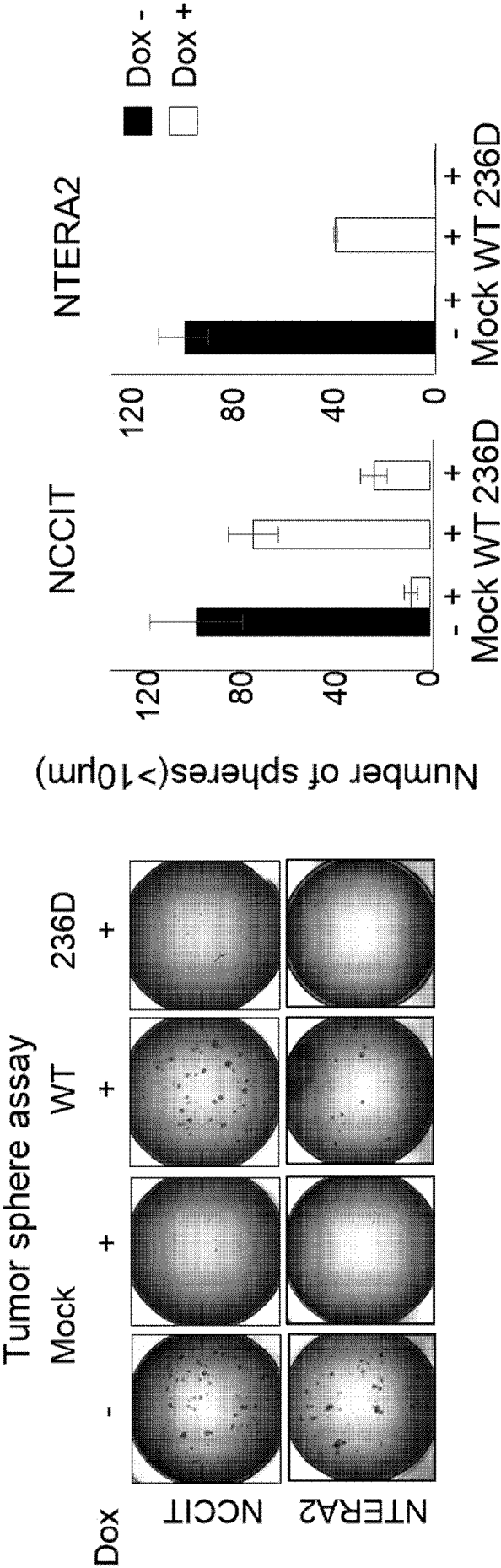
[도2]



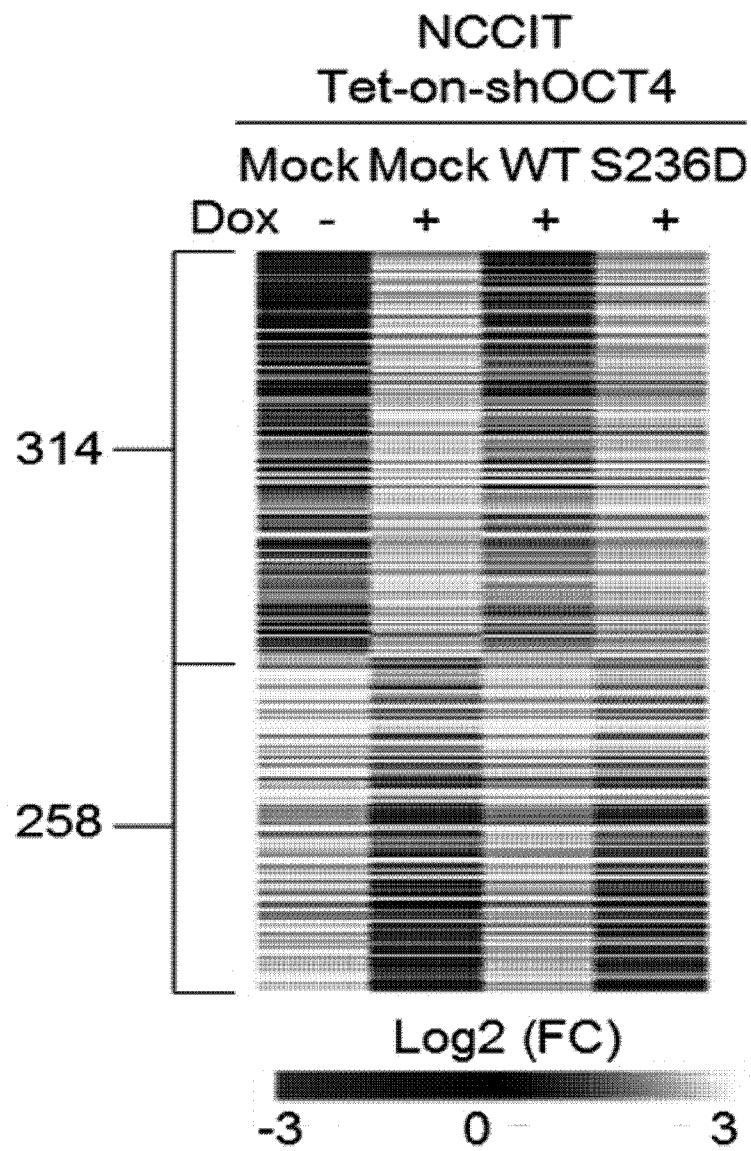
[도3]



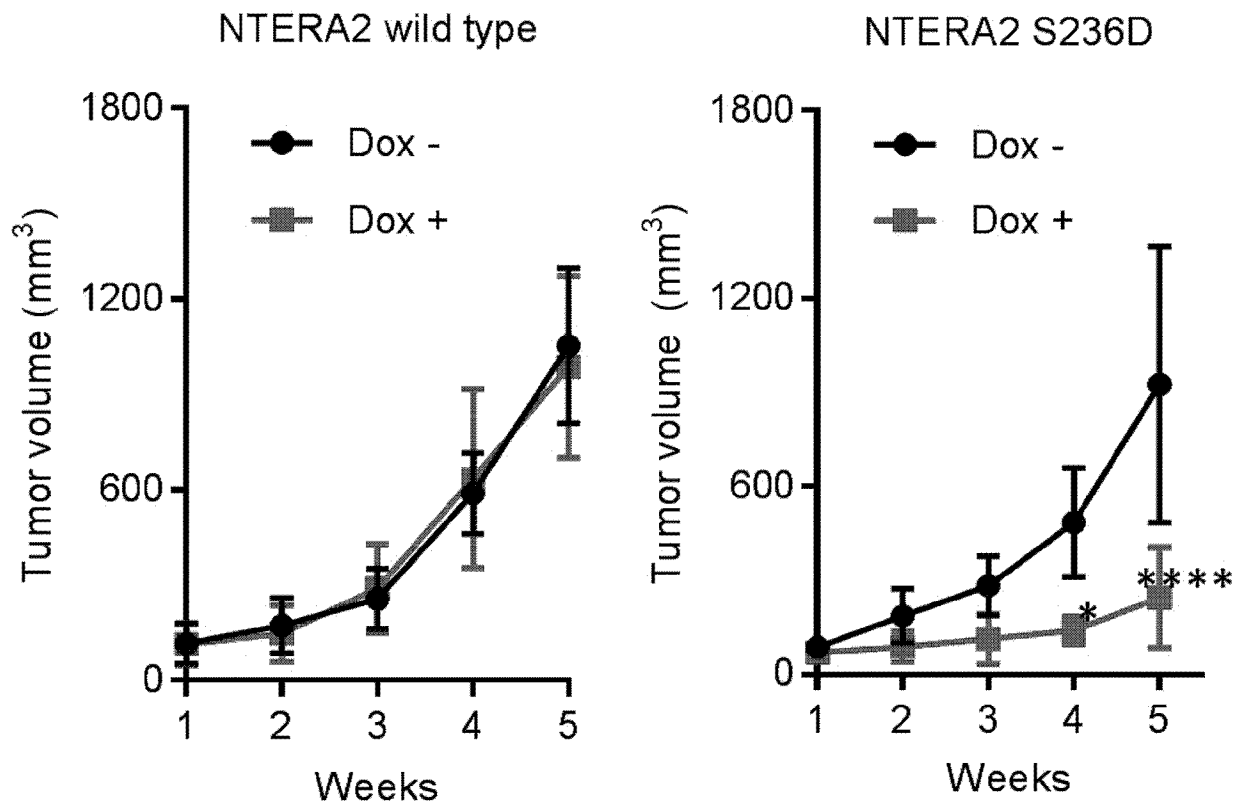
[도4]



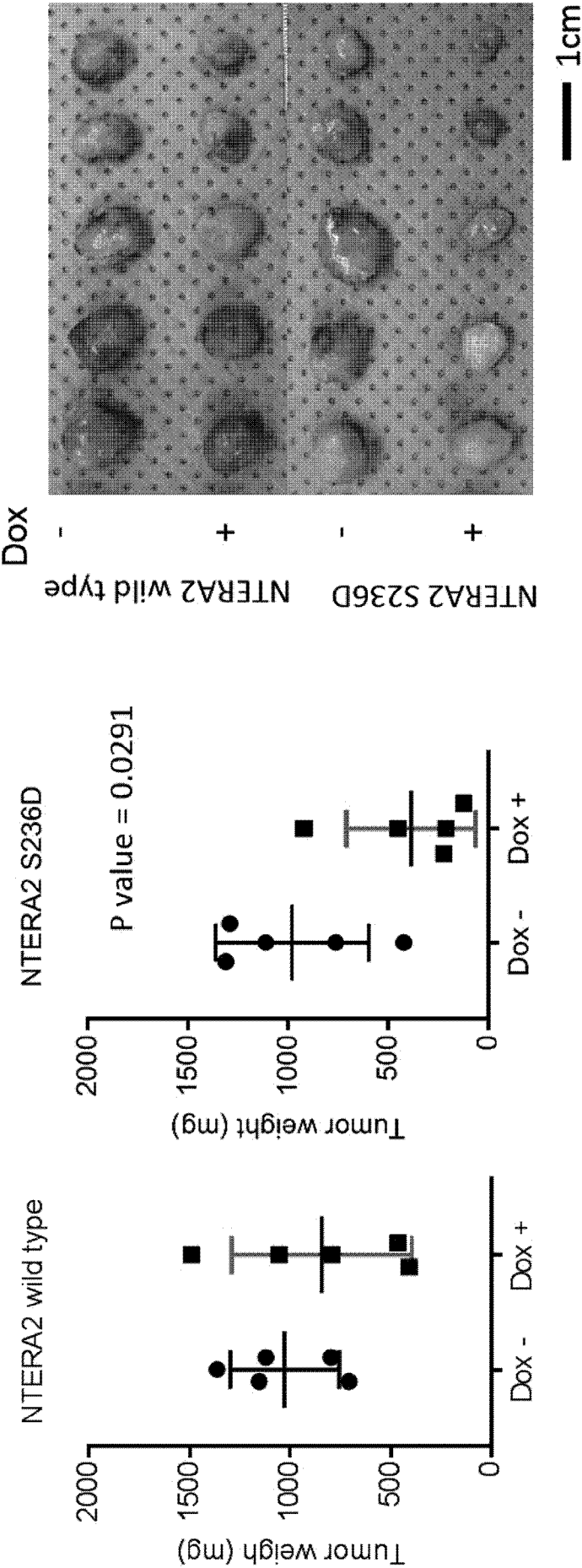
[도5]



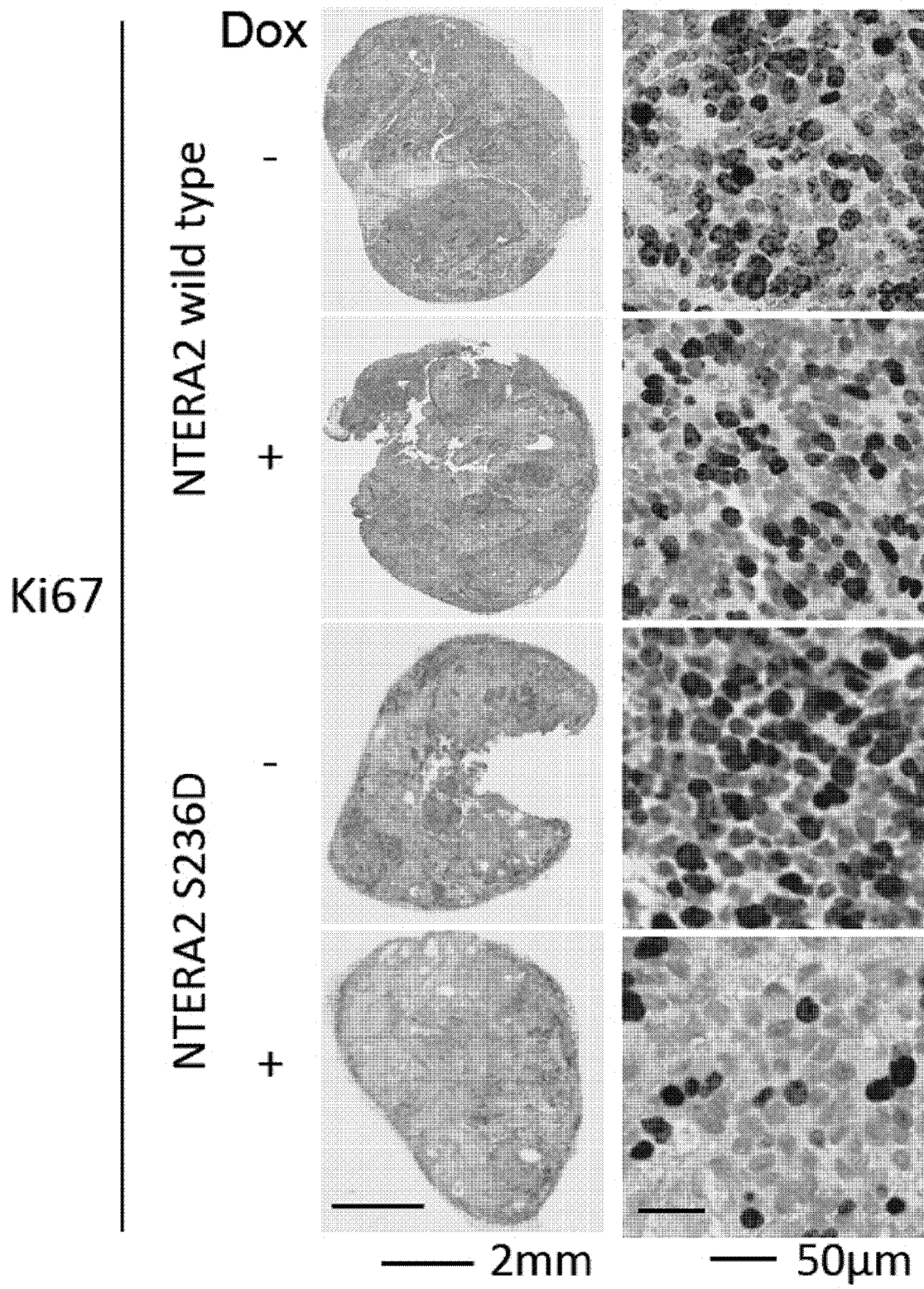
[도6]



[도7]



[도8]

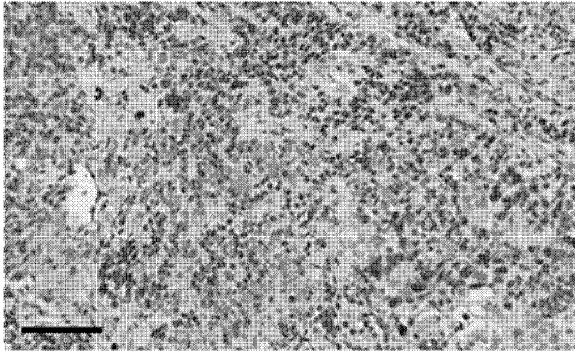


[도9]

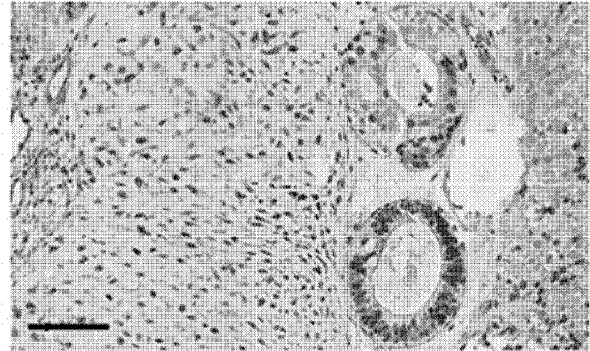
histology

NTERA2 S236D Dox+

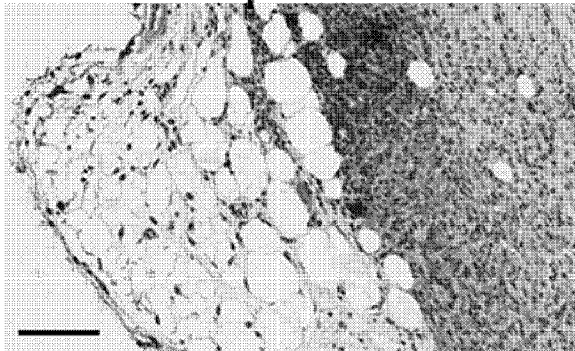
Cancer



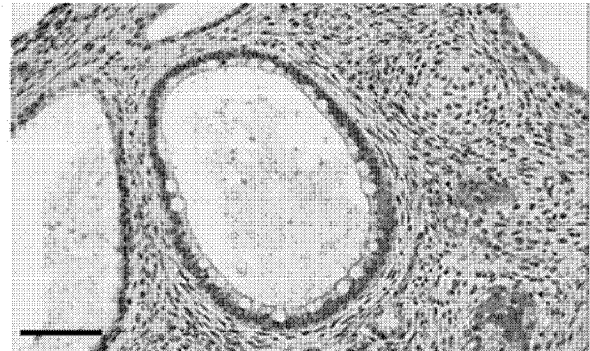
Chondroma



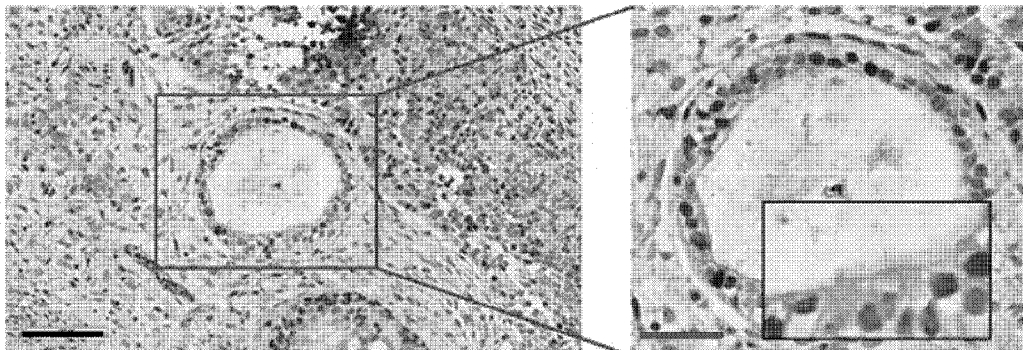
Lipoma



Gland



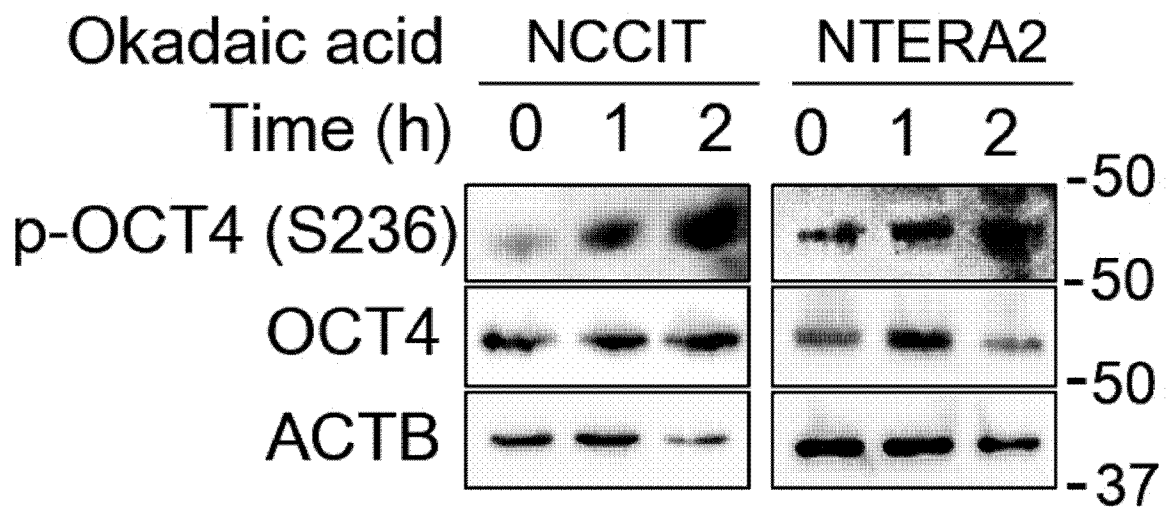
Gland with microvilli



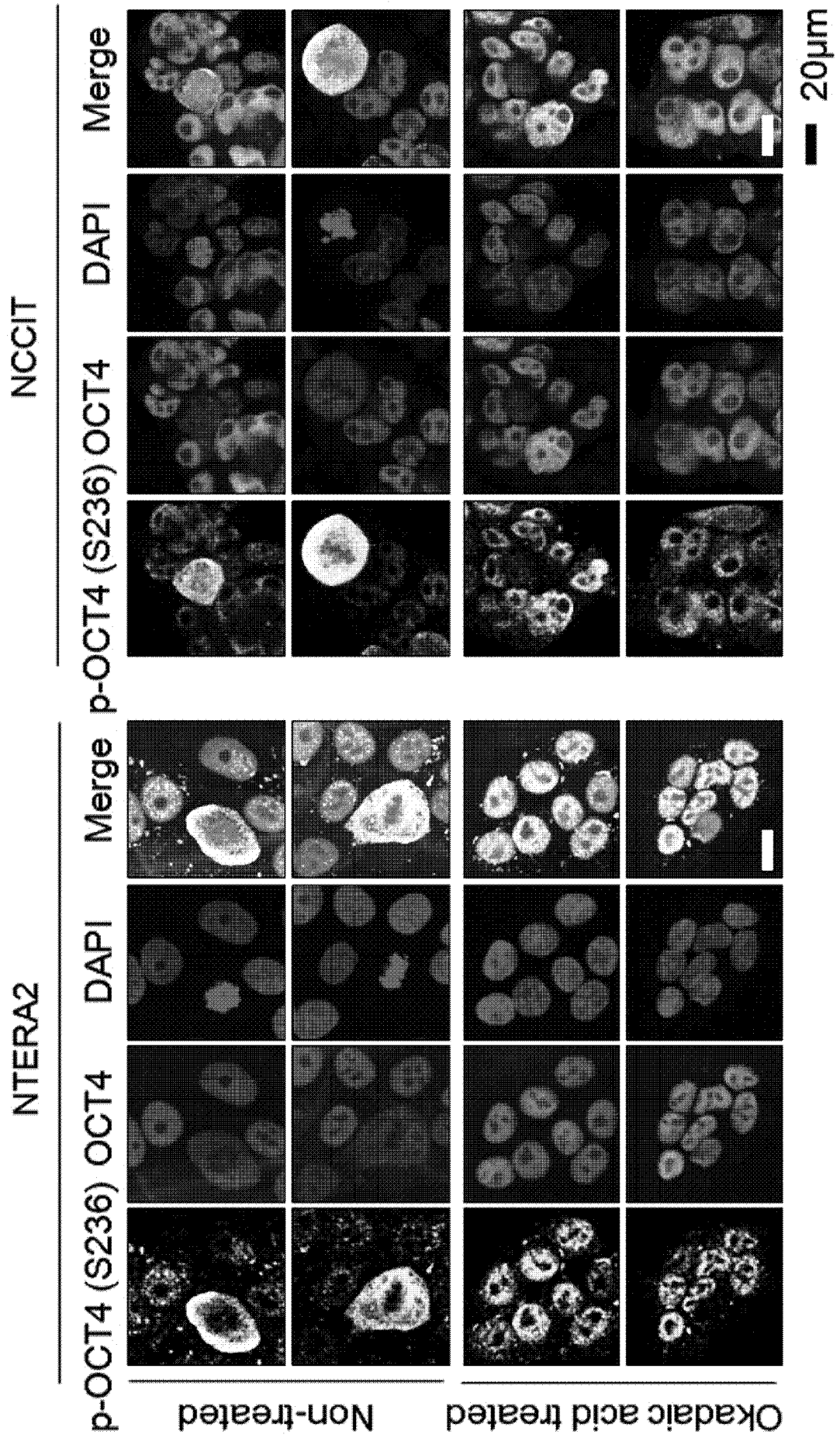
100μm

50μm

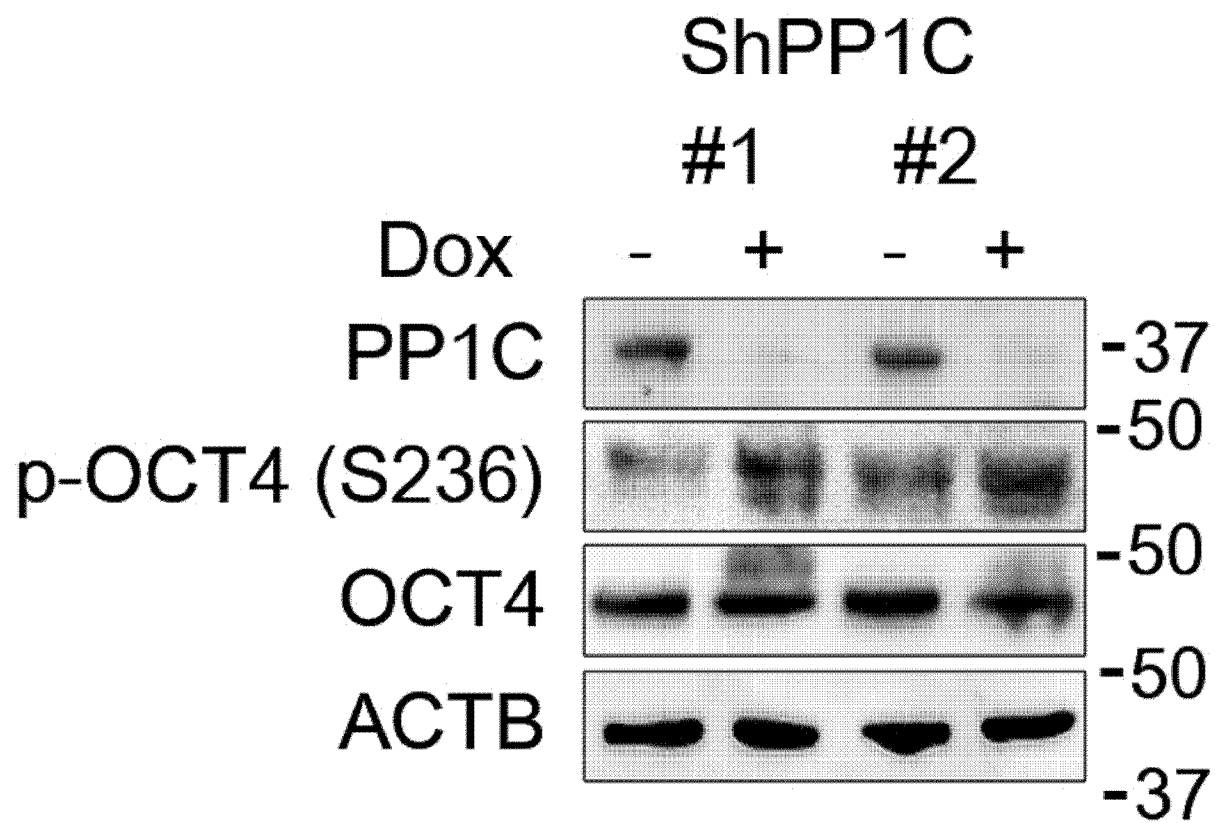
[도10]



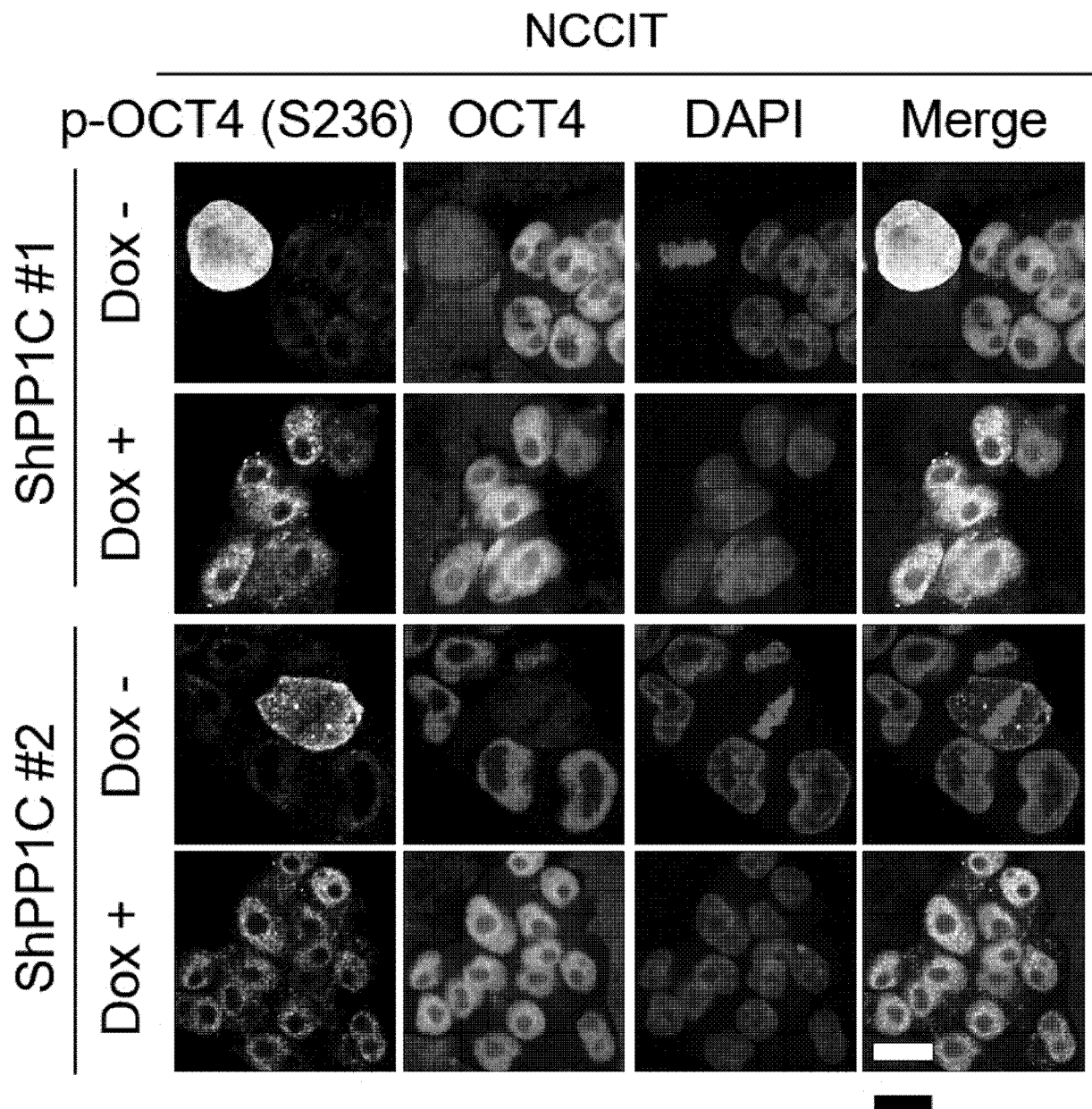
[도11]



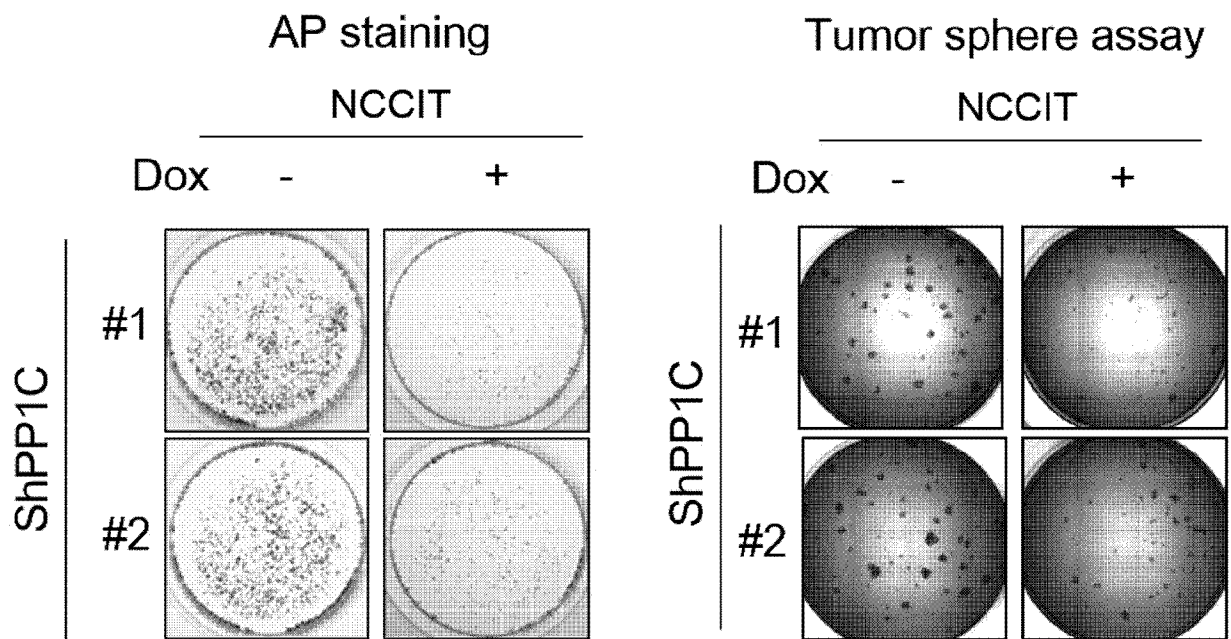
[도 12]



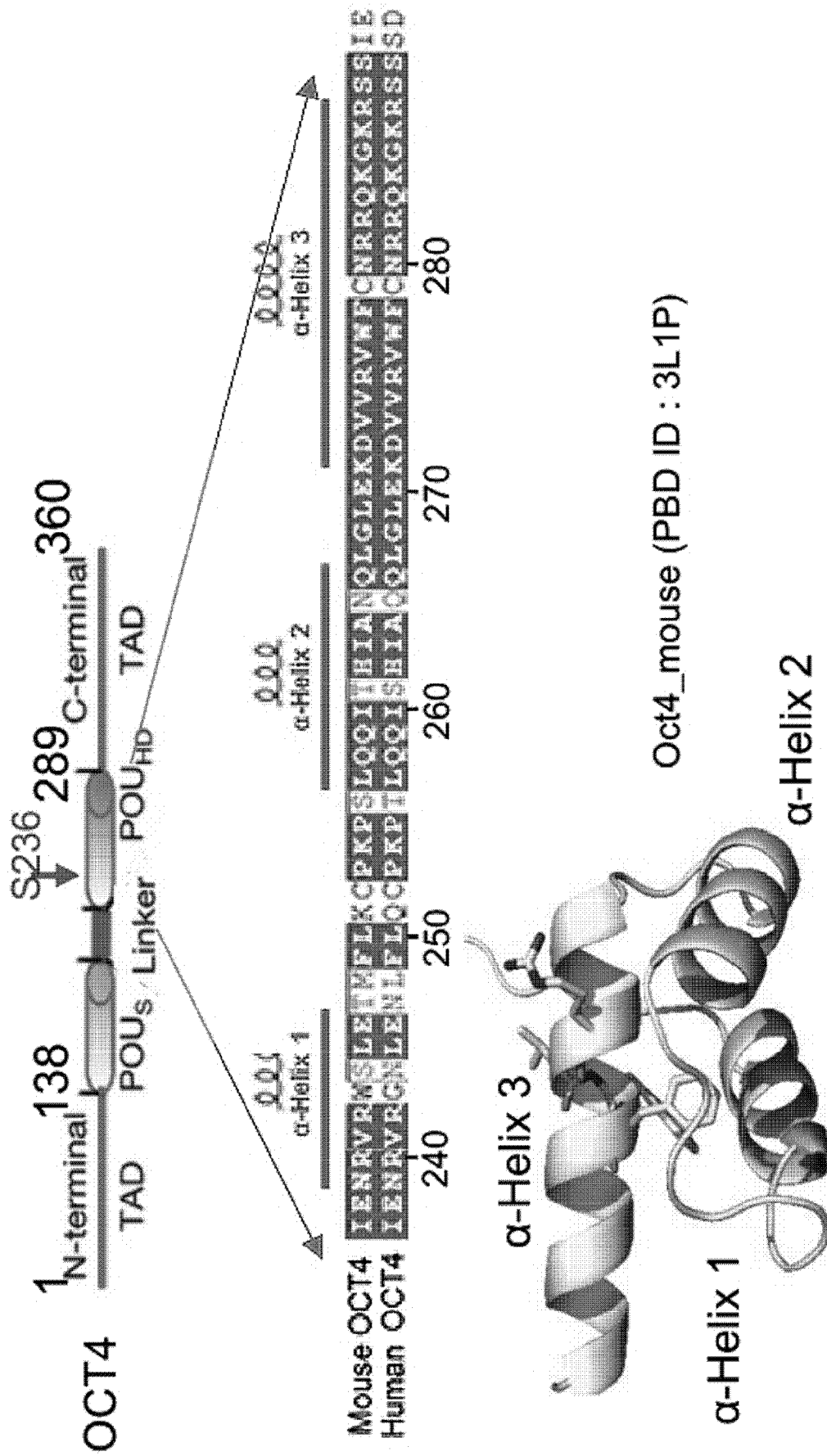
[도13]



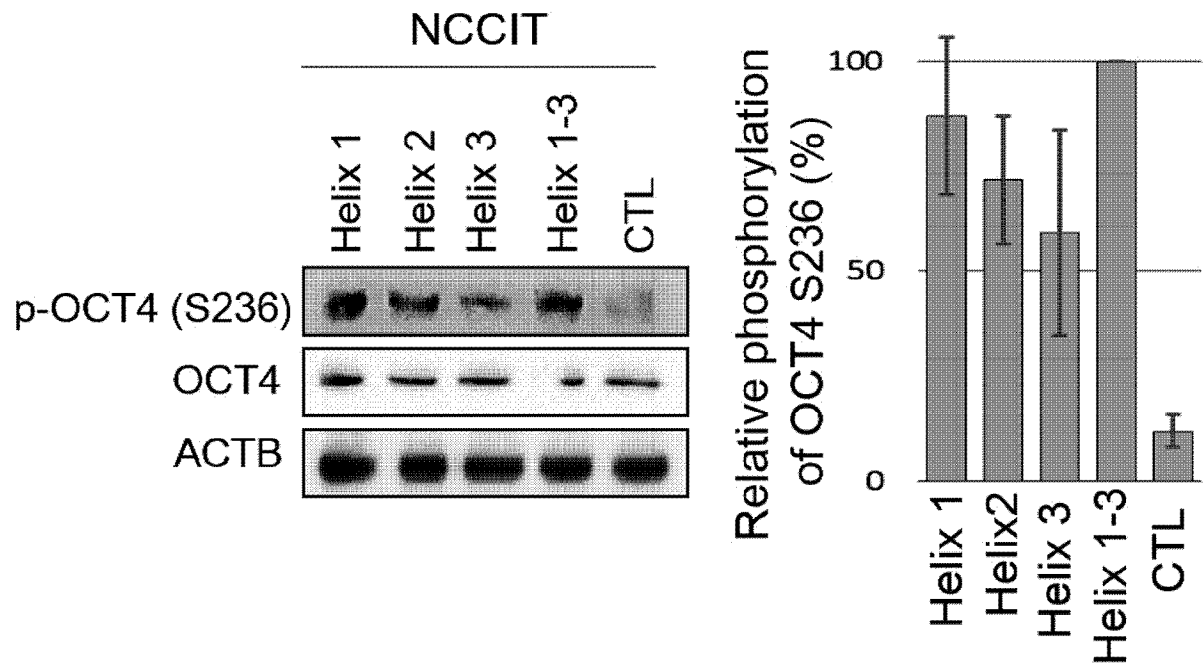
[도14]



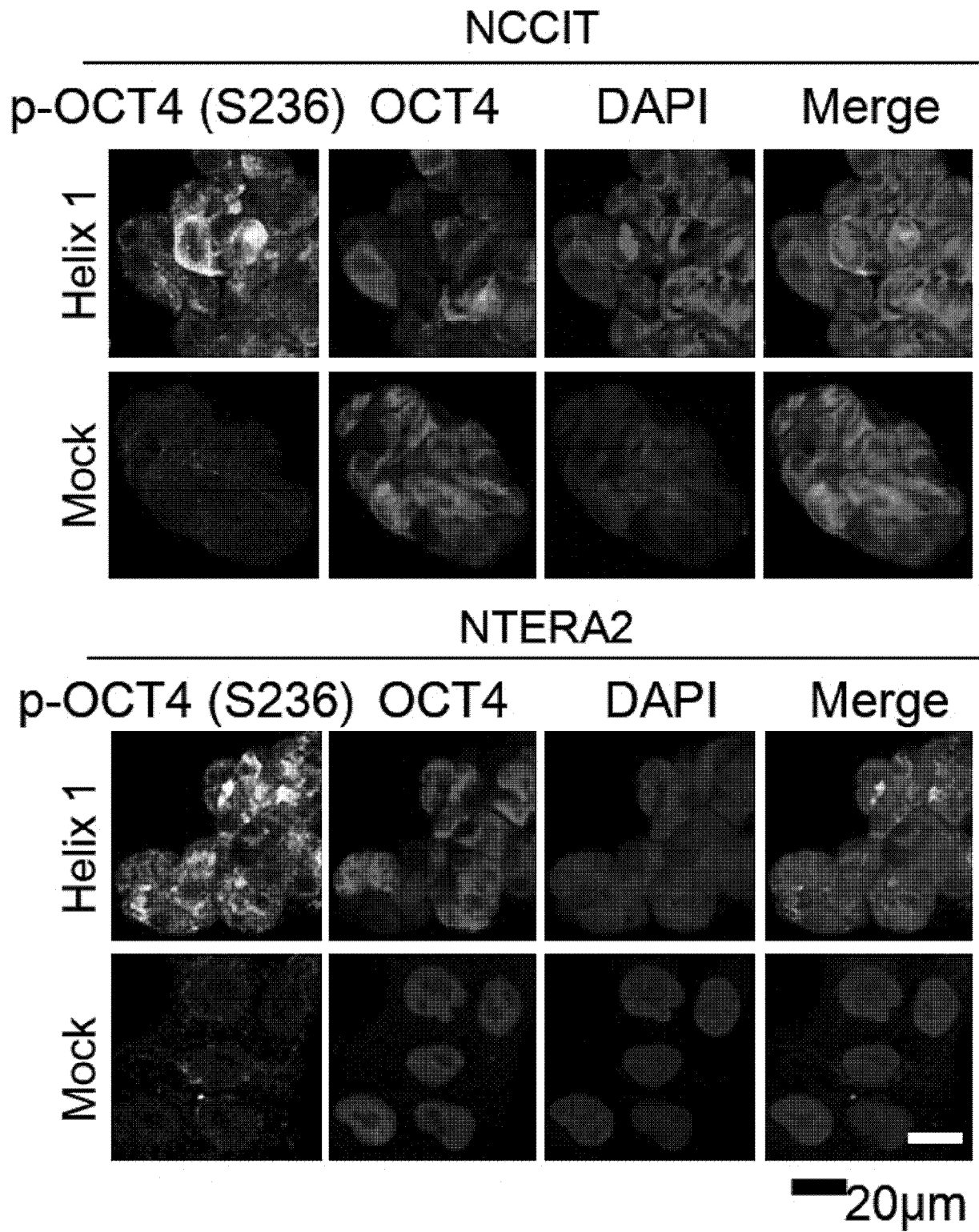
[도15]



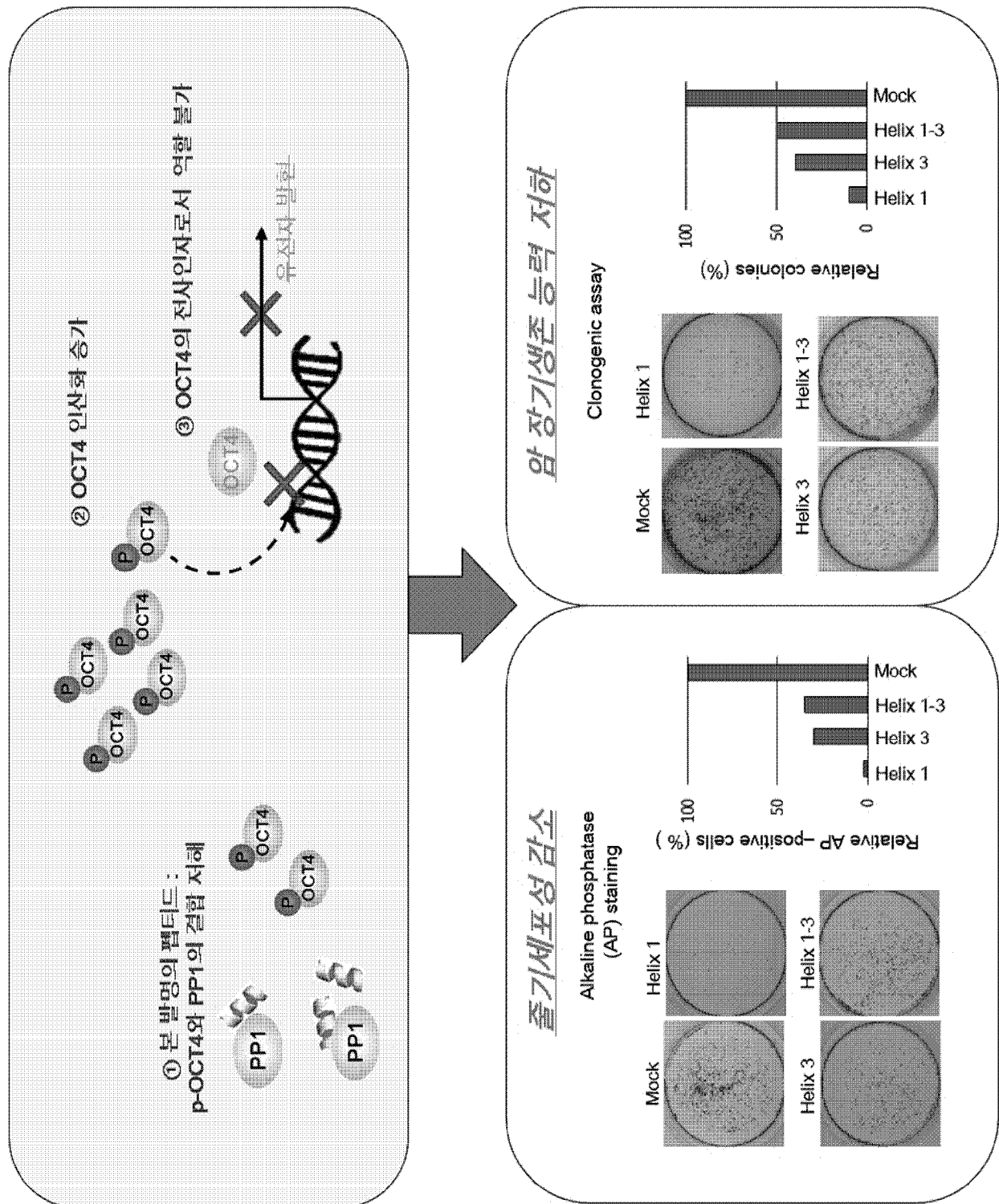
[도16]



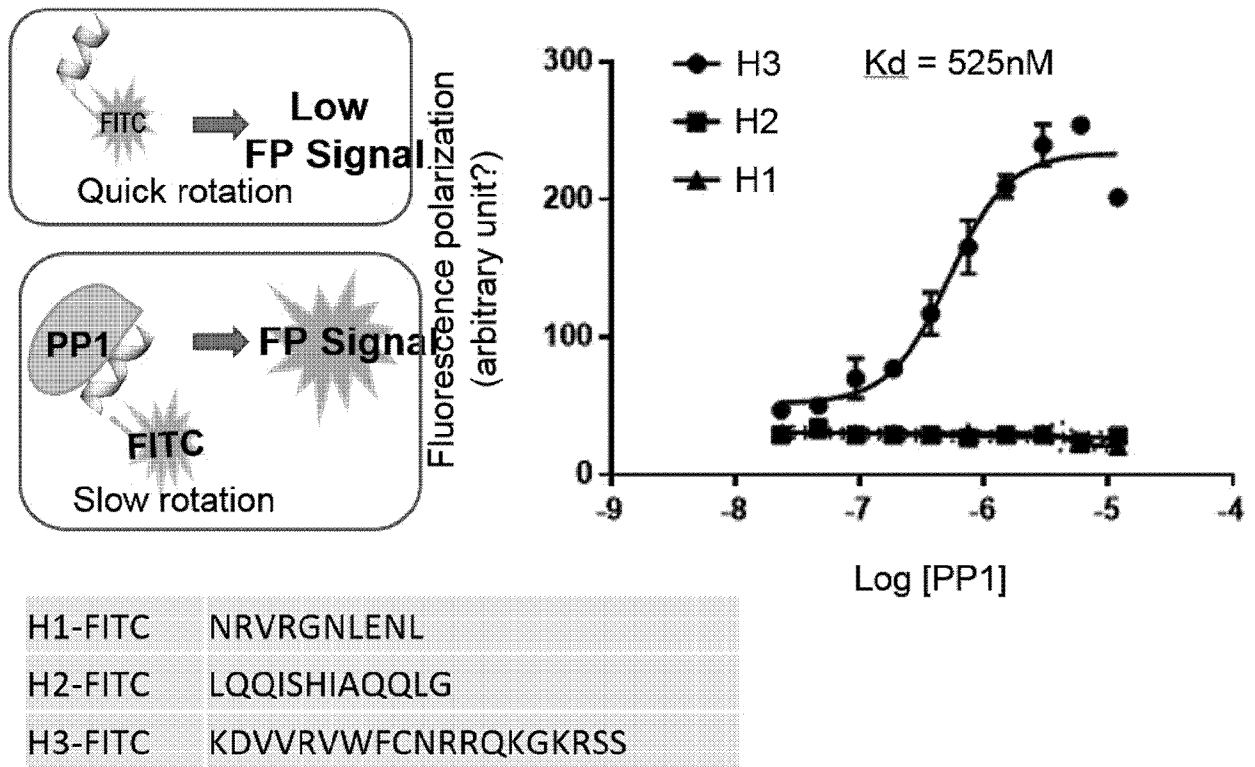
[도17]



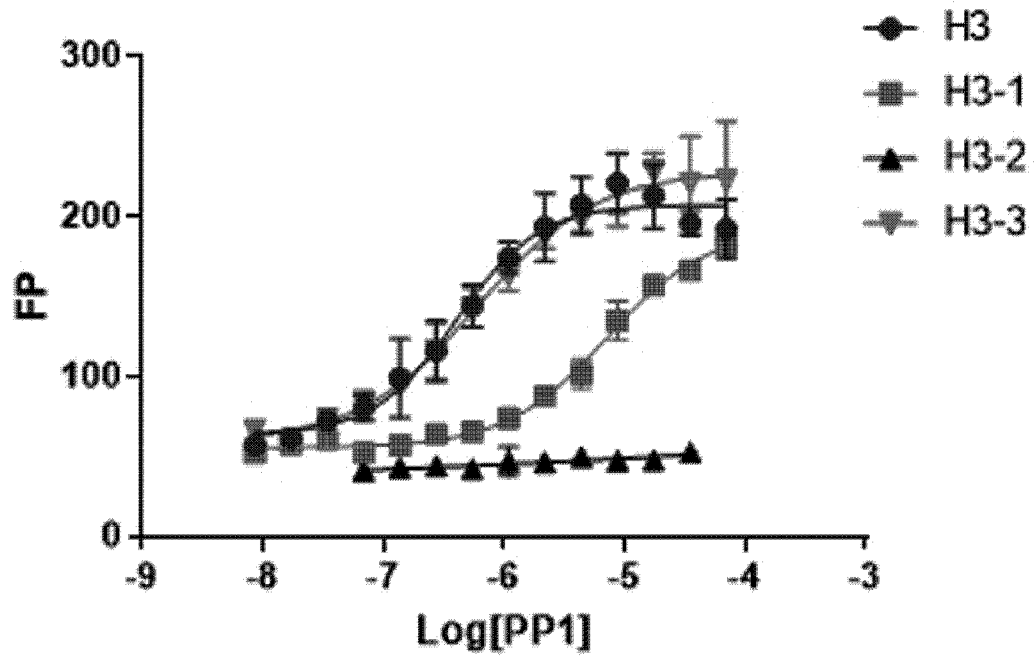
[도18]



[도19]

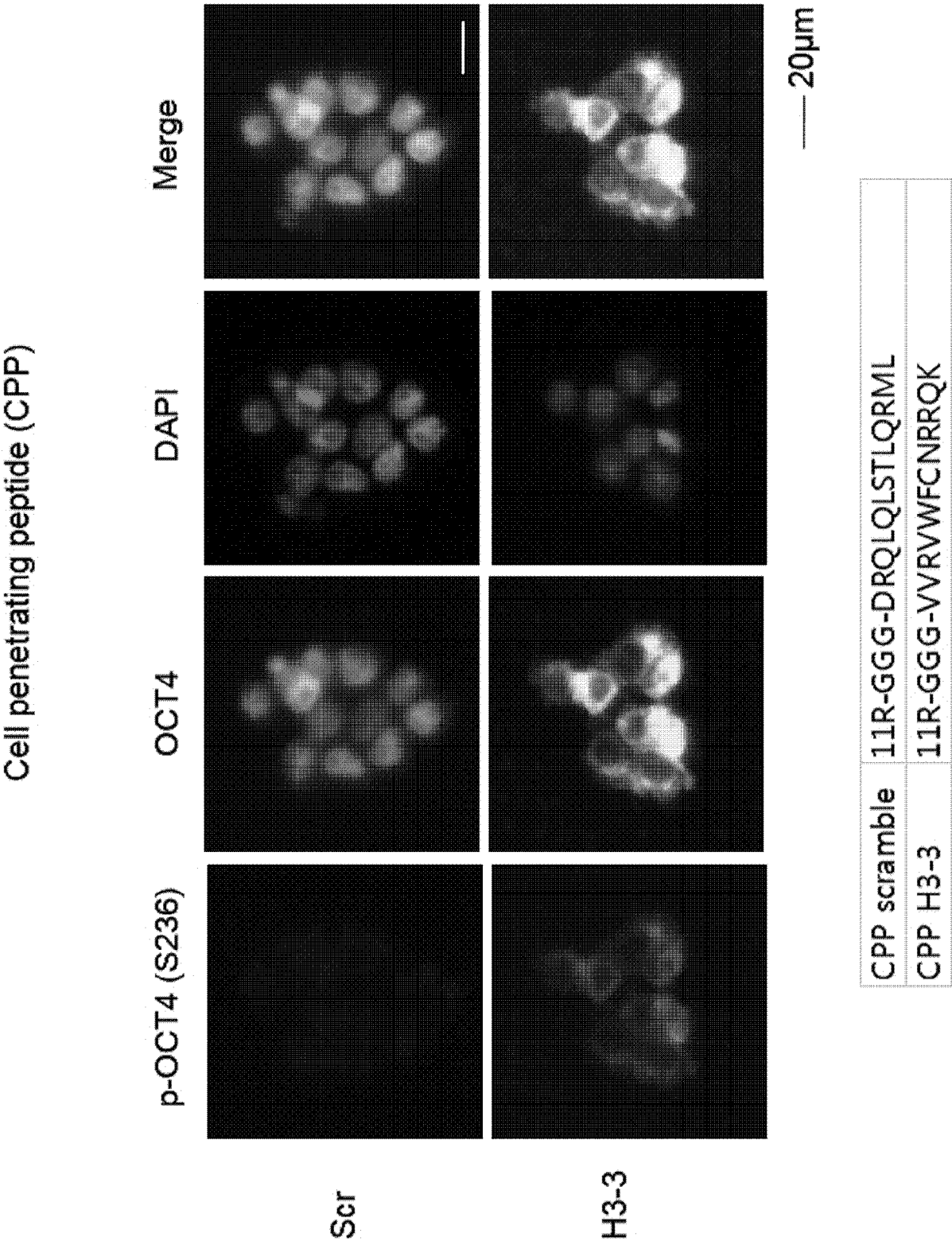


[도20]



H3-FITC	KDVVRVWFCNRRQKGKRSS		
H3-1 FITC	KDVVRVWFCN		
H3-2 FITC	CNRRQKGKRSS		
H3-3 FITC	VVRVWFCNRRQK		

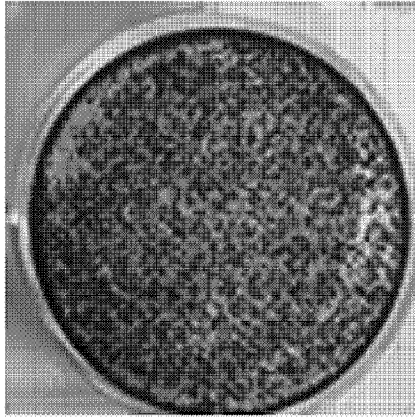
[도21]



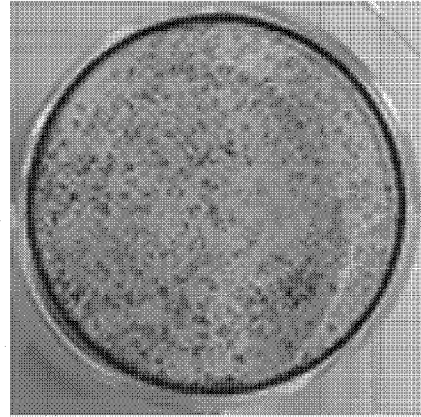
[도22]

Cell penetrating peptide (CPP)

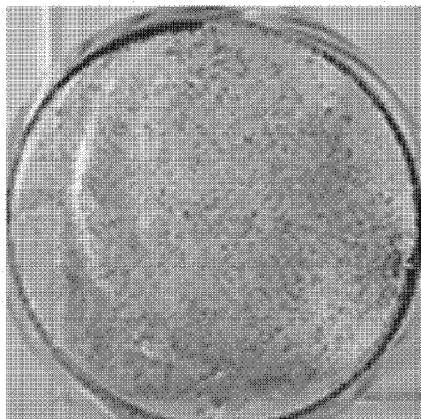
Scr



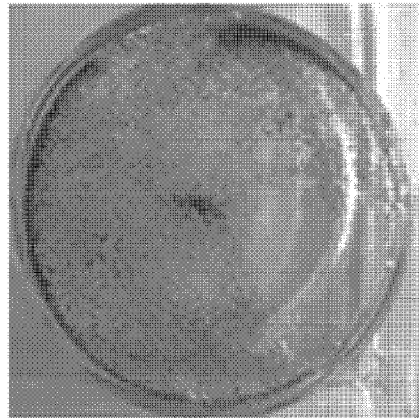
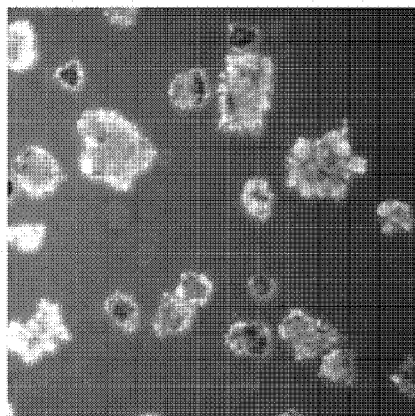
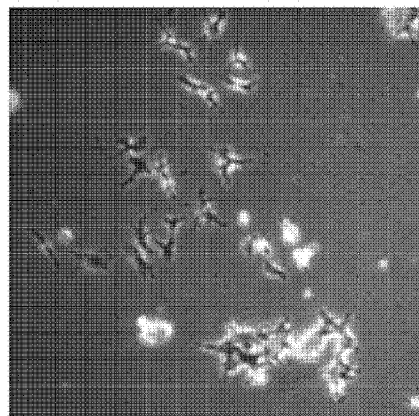
H3-3



Scr



H3-3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002527

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.: 23, 25, 27, 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23, 25, 27 and 29 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

International application No.

PCT/KR2019/002527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; C12N 5/00; C12N 5/02; A61K 38/08; A61K 38/10; G01N 33/50; G01N 33/574; A61P 35/00

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: OCT4, Ser236, phosphorylation, stem cell, cancer, inhibition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIN, Jihoon et al. Aurkb/PP1-mediated resetting of Oct4 during the cell cycle determines the identity of embryonic stem cells. eLIFE. 2016, vol. 5, e10877, pages 1-21 See abstract; page 15; and figures 3, 8.	1-22,24,26,28,30
A	LIN, Yuanji et al. Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. Molecular Cell. 2012, vol. 48, pages 627-640 See the entire document.	1-22,24,26,28,30
A	SHIN, Jihoon et al. Oct4 resetting by Aurkb-PP1 cell cycle axis determines the identity of mouse embryonic stem cells. BMB Reports. 2016, vol. 49, no. 10, pages 527-528 See the entire document.	1-22,24,26,28,30
A	MALAK, Peter N et al. Novel AKT phosphorylation sites identified in the pluripotency factors OCT4, SOX2 and KLF4. Cell Cycle. 2015, vol. 14, no. 23, pages 3748-3754 See the entire document.	1-22,24,26,28,30
A	WO 2009-061837 A1 (NOVOSTEM THERAPEUTICS INC.) 14 May 2009 See the entire document.	1-22,24,26,28,30



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

24 JUNE 2019 (24.06.2019)

Date of mailing of the international search report

24 JUNE 2019 (24.06.2019)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-061837 A1	14/05/2009	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; C12N 5/00; C12N 5/02; A61K 38/08; A61K 38/10; G01N 33/50; G01N 33/574; A61P 35/00

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: OCT4, Ser236, 인산화(phosphorylation), 줄기세포(stem cell), 암(cancer), 억제(inhibition)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SHIN, JIHOON 등, 'Aurkb/PP1-mediated resetting of Oct4 during the cell cycle determines the identity of embryonic stem cells', eLIFE, 2016, 5권, e10877, 페이지 1-21 요약; 페이지 15; 및 도면 3, 8 참조.	1-22, 24, 26, 28, 30
A	LIN, YUANJI 등, 'Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells', Molecular Cell, 2012, 48권, 페이지 627-640 전체 문헌 참조.	1-22, 24, 26, 28, 30
A	SHIN, JIHOON 등, 'Oct4 resetting by Aurkb-PP1 cell cycle axis determines the identity of mouse embryonic stem cells', BMB Reports, 2016, 49권, 10호, 페이지 527-528 전체 문헌 참조.	1-22, 24, 26, 28, 30
A	MALAK, PETER N 등, 'Novel AKT phosphorylation sites identified in the pluripotency factors OCT4, SOX2 and KLF4', Cell Cycle, 2015, 14권, 23호, 페이지 3748-3754 전체 문헌 참조.	1-22, 24, 26, 28, 30
A	WO 2009-061837 A1 (NOVOSTEM THERAPEUTICS INC.) 2009.05.14 전체 문헌 참조.	1-22, 24, 26, 28, 30

☐ 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 06월 24일 (24.06.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 06월 24일 (24.06.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



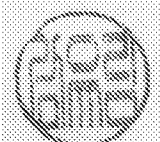
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



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: 23, 25, 27, 29
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 23, 25, 27 및 29는 치료에 의한 사람의 치치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2009-061837 A1

2009/05/14

없음