

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 8일 (08.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/150887 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/095 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002199
- (22) 국제출원일: 2017년 2월 28일 (28.02.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0026311 2016년 3월 4일 (04.03.2016) KR
- (71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 46241 부산시 금정구 부산대학교 63번길 2 (장전동, 부산대학교), Busan (KR).
- (72) 발명자: 문유석 (MOON, Yuseok); 50612 경상남도 양산시 물금읍 부산대학교 49, 의전원 704호, Gyeongsangnam-do (KR). 이승준 (LEE, Seung Joon); 50612 경상남도 양산시 물금읍 부산대학교 49, 의전원 704호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, 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, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

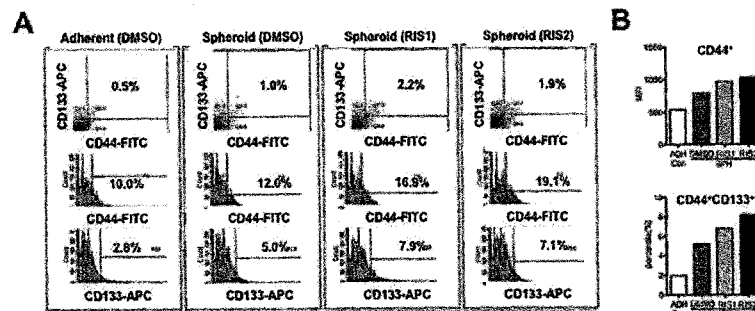
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR INDUCING DEDIFFERENTIATION INTO CANCER STEM CELLS, CONTAINING RIBOSOME INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT, AND ANTICANCER DRUG SCREENING PLATFORM ON BASIS THEREOF

(54) 발명의 명칭: 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물 및 이를 기반으로 하는 항암제 스크리닝 플랫폼

[도 2]



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for inducing dedifferentiation into cancer stem cells, containing a ribosome inhibitor as an active ingredient; and a method for inducing dedifferentiation from cancer cells into cancer stem cells by using the same, and it was ascertained that an increase in a colorectal cancer stem cell group to be induced by exposure to ribosome-inactivating stress is regulated by an ATF3 gene. The present invention can be applied to a method capable of predicting: a change in an ATF3 transcription factor-mediated signal to be induced by ribosome inhibition; and the severity of colorectal cancer. A cancer stem cell group representing the heterogeneity of cancer is readily ensured by a simple chemical exposure and can be applied as a platform for screening for a cancer stem cell-targeting anticancer drug and a medicine for overcoming resistance to an anticancer drug, and thus it is expected that potential industrial applicability can be ensured.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/150887 A1



본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법에 관한 것으로서, 리보솜 저해 스트레스 노출로 유도되는 대장암 줄기세포군의 증가가 ATF3 유전자에 의해 조절 받고 있음을 확인하였다. 이는 리보솜 저해로 유도되는 ATF3 전사인자 매개 신호 변화와 대장암의 중증도를 예측할 수 있는 방법으로 응용가능하다. 간단한 화학적 노출로 암의 비균질성을 대변하는 암 줄기세포군을 손쉽게 확보함으로써 암 줄기세포 표적 항암제 및 항암제 내성 극복 약물의 스크리닝을 위한 플랫폼으로 활용될 수 있어 잠재적 산업적 유용성을 확보할 수 있을 것으로 기대한다.

명세서

발명의 명칭: 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물 및 이를 기반으로 하는 항암제 스크리닝 플랫폼

기술분야

- [1] 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 대장암(Colorectal cancer; CRC)은 선진국에서 가장 흔하게 진단되는 암 중 하나로서, 높은 사망률을 나타낸다. 대장암은 다른 장기로 전이 가능성이 매우 높은 말기 암으로 진행될 수 있는데, 이는 대장암 환자들에 대한 수술적 절제, 화학치료 및 방사선 치료 등의 초기 치료가 중요한 원인 중 하나이다. 비록 전이성 대장암에 대한 가장 일반적이고 효과적인 치료 전략은 화학치료이지만, 항암제에 대한 화학내성은 성공적인 치료에 있어 걸림돌이 된다.
- [3] CRC는 환경적 질병으로서, 리보솜 저해 스트레스(ribosome-inactivating stress; RIS)를 포함하는 다양한 환경적 요인으로부터 축적된 상피 스트레스에 의해 주로 영향을 받는다. 위장 내 RIS에 대한 노출은 상피 중앙 세포의 악성화 및 항암제에 대한 반응에 영향을 미칠 것으로 추정된다. 한편, 스트레스로 유발되는 활성인자인 활성전사인자 3(activating transcription factor 3; ATF3) 전사인자는 MAPK 신호에 의존적이면서, 리보솜 저해 스트레스에 의해 증가하는 대표적인 스트레스 유발 전사인자이다. 또한, 암 줄기세포는 암의 진행, 전이, 재발, 항암제 내성을 유발하는 주요 원인으로 지목되고 있다.
- [4] 리보솜 불활성화는 급성 및 만성 점막 염증을 유발하고, IBD를 포함하는 인간 장내 상피 염증 질환의 병리 인자인 것으로 알려졌다. 리보솜 저해 스트레스 노출로 야기되는 암 줄기세포로의 탈분화와 ATF3와의 직접적인 관련성에 대한 연구는 미비한 실정이다.
- [5] 유도만능줄기세포(iPSC) 기술이 발명된 지 10년이 지난 현재, 세포배양 시장은 비약적인 성장추세에 있다. 또한 기존의 2차원 세포배양 및 동물시험 기반 항암제 스크리닝 플랫폼은 암의 비균질성과 생체 내 활성을 모사하기 어렵다는 점에서 인체 생리활성에 근접한 약물 스크리닝 플랫폼이 다양하게 개발되고 있다. 3D 스펜로이드 배양, 오가노이드(organoid) 배양, 랩온어칩(Lab-on-a-chip), 생체모방 장기칩(organ-on-a-chip) 이 주요한 예이다. 시장환경과 관련기술의 발전 추세를 고려할 때, 암 줄기세포 배양배지의 제품화는 충분한 시장성을 담보하고 있고, 리보솜 저해 스트레스로 유도된 암 줄기세포는 개발 중인 다양한 약물 스크리닝 플랫폼의 핵심 세포 공급원으로서 활용될 수 있으며, 본 발명에서

확립된 암 줄기세포 표적 및 내성 극복 항암제 스크리닝 플랫폼은 개발되고 있는 다양한 약물 스크리닝 플랫폼과 융합되어 응용될 수 있는 잠재력을 갖고 있다(도 1).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물 및 리보솜 작용 저해제를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법에 관한 것으로서, 리보솜 저해 스트레스 노출로 유도되는 대장암 줄기세포군의 증가가 ATF3 유전자에 의해 조절 받고 있음을 확인하였다. 이는 리보솜 저해로 유도되는 ATF3 전사인자 매개 신호 변화와 대장암의 중증도를 예측할 수 있는 방법으로 응용가능하다. 간단한 화학적 노출로 암의 비균질성을 대변하는 암 줄기세포군을 손쉽게 확보함으로써 암 줄기세포 표적 항암제 및 항암제 내성 극복 약물의 스크리닝을 위한 플랫폼으로 활용될 수 있어 잠재적 산업적 유용성을 확보할 수 있을 것으로 기대한다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 리보솜 저해 스트레스 유발 대장암 줄기세포군 배양 기술 및 이에 기반한 약물 스크리닝의 핵심 개념도이다.
- [11] 도 2는 리보솜 저해 스트레스 유발 대장암 줄기세포군의 증가 결과를 나타낸다.
- [12] 도 3은 ATF3가 저해된 암세포에서 리보솜 저해 스트레스 유도 암 줄기세포 불활성화 결과를 나타낸다.
- [13] 도 4는 리보솜 저해 스트레스 노출로 야기된 암세포의 암줄기세포로의 탈분화과정의 생체 내 활성 결과를 나타낸다.
- [14] 도 5는 반복적 리보솜 저해 스트레스 유발 대장암 줄기세포군의 지속적 증가 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [15] 이에, 본 발명자들은 리보솜 작용 저해 스트레스에 노출된 암세포가 탈분화하여 암 줄기세포군이 증가되는 것을 확인하였다. 리보솜 작용 저해제를

활용한 간단한 화학적 노출을 통해 대장암의 진행, 전이, 재발, 항암제 내성의 잠재적 요인이 되는 암 줄기세포로의 탈분화 유도 방법을 개발하고 본 발명을 완성하였다.

[16]

[17] 본 발명은 리보솜 작용 저해 스트레스에 노출된 상피성 암세포를 탈분화시켜 순도, 수득률, 생존률 면에서 개선된 암 줄기세포를 쉽게 획득하는 방법과 인체생리활성에 근접한 비균질적인 암세포 기반 약물 스크리닝 플랫폼 제안에 관한 것이다. 구체적인 내용은 다음과 같다.

[18] 첫째, 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암 줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물을 확립하여 암 줄기세포 배양 최적환경의 제품화(배양배지, 배양접시, 배양 첨가물)하고 암 줄기세포를 검증하기 위해 고안한 유효성 검증 시험법 최적화에 관한 것이다.

[19] 둘째, 본 기술은 다수의 암 줄기세포가 포함된 비균질적인 실제 암세포군을 모사하여, 암 줄기세포 기반 약물 스크리닝 플랫폼으로 활용가능하다. 암 줄기세포 기반 약물 스크리닝 플랫폼은 항암제 내성, 암의 전이 및 재발의 주요 원인으로 지목되는 암 줄기세포를 표적으로 하기 때문에, 암 줄기세포 표적 항암제 개발 및 내성 극복 항암제 개발 플랫폼으로 응용가능하다.

[20] 셋째, 본 발명에 사용된 리보솜 저해 스트레스는 비발암성, 비유전독성을 담보하고 가역적으로 작용하며, 일상생활에서 식이적으로 노출되는 대표적인 자극이다. 인간과 가축에게 제공되는 대부분의 곡물이 직간접적으로, 발명에 사용된 리보솜 저해 스트레스에 노출되어 있다는 점에서, 식이환경 및 패턴과 같은 환경적 요인이 크게 작용하는 질병(소화기계통 암, 특히 대장암을 비롯한 다양한 암)에 대한 치료제 개발 플랫폼으로 활용될 수 있다. 이는 맞춤형 의료 시장에 진입할 수 있는 잠재성을 시사한다.

[21]

[22] 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물을 제공한다.

[23] 바람직하게는, 상기 리보솜 작용 저해제는 애니소마이신(anisomycin; ANS) 또는 디옥시니발레놀(deoxynivalenol; DON)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[24] 바람직하게는, 상기 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화는 활성화전사인자 3(activating transcription factor 3; ATF3)에 의해 매개될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[25] 바람직하게는, 상기 암은 대장암(colorectal cancer; CRC)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[26]

[27] 또한, 본 발명은 리보솜 작용 저해제를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법을 제공한다.

[28] 바람직하게는, 상기 리보솜 작용 저해제는 애니소마이신(anisomycin; ANS) 또는 디옥시니발레놀(deoxynivalenol; DON)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[29] 바람직하게는, 상기 암은 대장암(colorectal cancer; CRC)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[30] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[31]

[32] <실시예 1> 리보솜 저해 스트레스 노출에 의한 대장암 줄기세포군의 증가

[33] HCT-8 대장암 세포주는 세포주 분양회사인 ATCC(Manassas, 미국)로부터 구입하였다. 세포주 배양은 RPMI(웰진, 대구, 대한민국)에 소 배아혈청(fetal bovine serum, FBS) 10%, 혼합 항생제(50 units/mL 페니실린, 50mg/mL 스트렙토마이신) 5%가 포함된 배양액을 기본으로 5% CO₂, 37°C 항습 배양기에서 배양하였다. 스페로이드 배양과 리보솜 저해 스트레스 노출의 접목을 위해서 부착저해 배양접시(ultra low attachment 6-well plate, Costar, 미국)에 HCT-8 대장암 세포주(2.5x10⁵)를 분주하고, 리보솜 저해 스트레스 유도 인자인 애니소마이신(anisomycin, ANS; Sigma, 미국) 50 ng/mL 또는 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON; Sigma, 미국) 500 ng/mL을 24시간 동안 전처리하였다. 정상 RPMI 배양배지로 3번 씻어 주고, 형성된 스페로이드 세포가 균일하게 분산되도록 유지하면서 6일간 정상 RPMI 배양배지에서 배양하였다(도 2A). 소 배아혈청 기반 RPMI 배양배지 대신 B27(ThermoFisher Scientific), 20 ng/mL EGF(BD), 20 ng/mL bFGF(PEPROTECH, #100-18B), 1% 항생제가 포함된 DMEM/F12 배양배지(줄기세포 배양배지)를 활용하여 높은 수득률과 순도를 지닌 암 줄기세포 획득할 수 있었다(도 2B). 형성된 스페로이드 세포에 비균질적으로 존재하는 암 줄기세포를 대장암 줄기세포 표지인자인 CD44 및 CD133 항체로 확인하였다. 우선 배양한 스페로이드 세포를 트립신 처리하여 단일 세포단위로 분리한 후 인산염완충용액으로 씻어준다. FITC가 결합된 CD44 항체(BD pharmingen) 및 APC가 결합된 CD133 항체(MACS, Miltenyi Biotec)로 15분간 면역염색시킨 후 유세포 분석기(Becton Dickinson FACS Canto II BD Bioscience, San Joes, CA, 미국)로 분석 및 정량화하였다. 리보솜 저해 스트레스에 노출된 대장암 스페로이드 세포의 경우, 암 줄기세포군으로 대변되는 CD44 및 CD133 양성 세포가 대조구에 비해 의미있는 증가를 보였다(도 2A 및 도 2B). 도 2B에서 보듯이 암 줄기세포 적정 배지로 개선하면서 기본적인 암줄기세포 구성율이 증가되고, 또한 리보솜 저해

스트레스의 노출 시 암세포가 암 줄기세포로 탈분화하여 이들세포 비율이 더욱 증가하였다. 이는 리보솜 저해 유발 물질의 화학적 노출 시 암세포가 암 줄기세포로 탈분화할 수 있음을 시사하는 것이다.

[34]

[35] <실시예 2> 리보솜 저해 스트레스 노출에 의한 대장암 줄기세포로의 탈분화를 조절하는 ATF3 유전자

[36] 스트레스로 유발되는 활성인자인 ATF3 전사인자는 MAPK 신호에 의존적이면서, 리보솜 저해 스트레스에 의해 증가하는 대표적인 스트레스 유발 전사인자이다. 리보솜 저해 스트레스 노출로 야기되는 암 줄기세포로의 탈분화와 ATF3와의 직접적인 관련성을 확인하기 위해, ATF3 결여 HCT-8 대장암 세포주를 스페로이드 배양하면서, 리보솜 저해 스트레스에 노출시켰다. CD44 및 CD133 특이적 항체에 의해 검출되는 대장암 줄기세포를 유세포 분석기를 통해 분석 정량하였다. ATF3 유전자가 결여된 세포의 경우, 리보솜 저해 스트레스 노출에도 불구하고 암 줄기세포로 탈분화한 세포군의 유의미한 증가가 관찰되지 않았다(도 3). 이는 리보솜 저해 스트레스에 의한 암 줄기세포로의 탈분화 과정에 ATF3 전사인자가 중요한 조절 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

[37]

[38] <실시예 3> 리보솜 저해 스트레스 노출에 의한 대장암 줄기세포로의 탈분화 과정의 생체 활성 확인

[39] 암 줄기세포는 암의 진행, 전이, 재발, 항암제 내성을 유발하는 주요 원인으로 지목되고 있다. 리보솜 저해 스트레스 노출로 생성된 암 줄기세포의 생체 내 활성을 탐색하기 위해, 암 줄기세포의 성질을 대변하는 생체 내 표현형인 상피간엽이행(epithelial mesenchyme transition, EMT) 현상을 검증하였다. 암 줄기세포의 생체 내 활성은 상피세포 표지인자인 E-카드헤린(E-cadherin)의 감소와 간엽세포 표지인자인 N-카드헤린(N-cadherin) 및 비멘틴(vimentin) 단백질 발현의 증가로 검증되는 상피간엽이행 정도로 가늠할 수 있다. 이를 위해 암세포의 동종이식 분석법(allograft)을 활용한 생체 실험을 수행하였다. CMT-93 마우스 대장암 세포주를 소 배아혈청(fetal bovine serum, FBS) 10%, 혼합 항생제(50 units/mL 페니실린, 50mg/mL 스트렙토마이신) 5%가 포함된 DMEM(웰진, 대구, 대한민국) 배양배지를 기본으로, 5% CO₂, 37°C 항습 배양기에서 배양하였다. DON (500 ng/mL)을 24시간 전처리한 CMT-93 세포(5x10⁶)를 200 µL 인산염 완충용액에 재현탁한 후, 14 주령 수컷 C57BL/6 마우스의 피하에 주입하였다. 7일 후 100 mg/mL 항암제 5-FU를 복강 주사하고 24시간 뒤에 생성된 고형 종양을 외과적 수술로 적출하였다. 고형 종양은 E-카드헤린(E-cadherin)(1:200, BD Science), N-카드헤린(N-cadherin)(1:200, BD Science), 비멘틴(vimentin)(1:200, Cell signaling) 특이적 항체를 이용한 면역조직화학염색(immunohistochemistry)을 통해 분석하였다. 적출한 고형

종양을 4% 파라포름알데히드에서 고정한 후 파라핀에 포매하고, 박절하여 절편 슬라이드 표본을 제작한다. 탈수과정과 항체 결합과정을 거친 후, 3,3-디아미노벤지딘(3,3-diaminobenzidine; DAB) 기질 반응으로 조직 내 단백질 발현의 공간적 발현을 조사하고, 헤마톡실린(hematoxylin) 양성 세포 대비 DAB의 상대적 발현을 조직 분석 소프트웨어(HistoQuest, TissueGnotics)로 정량 분석하였다. 도 4에서 보듯이, DON에 노출된 세포로부터 비롯된 고형 종양의 경우, 상피세포 표지자인 E-카드헤린(E-cadherin)이 감소하였고, 간엽세포 표지자인 N-카드헤린(N-cadherin) 및 비멘틴(vimentin) 단백질의 발현이 현저히 증가하였다. 이 결과는 리보솜 저해 스트레스 노출로 야기되는 암세포의 암 줄기세포로의 탈분화 현상이 생체 내 활성을 가지고 있음을 보여주는 결과이다.

[40]

[41] <실시예 4> 반복적 리보솜 저해 스트레스 노출에 의한 대장암 줄기세포군 증가 검증법 확립

[42] 리보솜 저해 스트레스(RIS1, RIS2)가 상피성 암세포의 탈분화를 유도하는 핵심인자인지 재확인하기 위하여 리보솜 저해 스트레스에 1회 노출시킨 후 24시간 후 줄기세포배양 배지에서 6일 간 스페로이드 배양한 후 3회 계대배양한 실험군과 계대배양 마다 암 줄기세포 적정 배지상에서 리보솜 저해 스트레스에 노출 시켜 계대배양한 실험군(총 3회 노출)을 CD44, CD133을 표지인자로 유세포분석을 통해 암 줄기세포를 정량 비교하였다. 도 5에서 보듯이 리보솜 저해 스트레스에 최초 노출 후(temporary exposure) 암 줄기세포가 지속적으로 유지됨을 확인할 수 있었고, 반복적으로 노출하여 계대배양 시(chronic exposure) CD44, CD133 양성 암 줄기세포군의 증가율이 더욱 증가하였다.

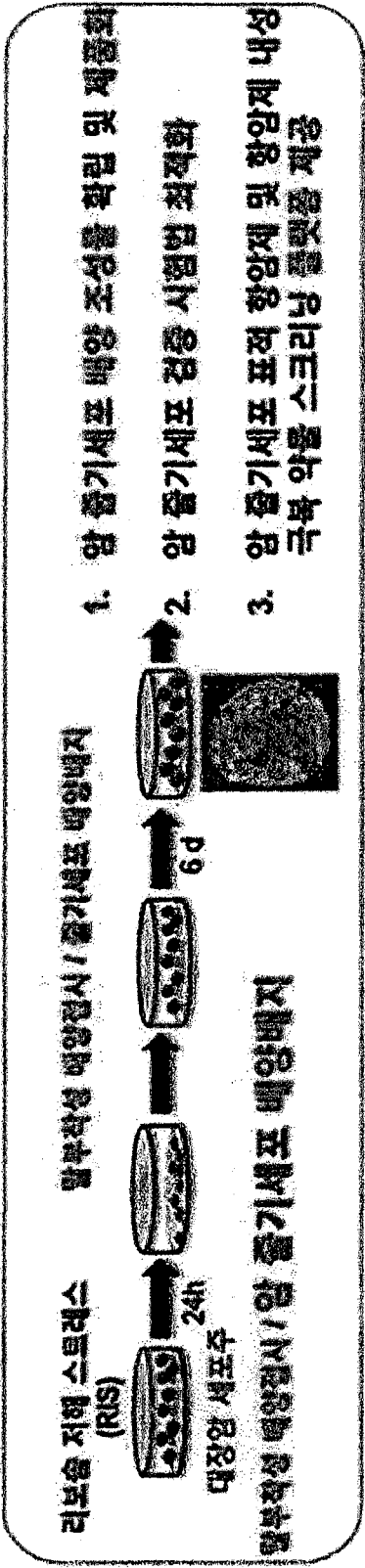
[43]

[44] 이상으로 본 발명을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

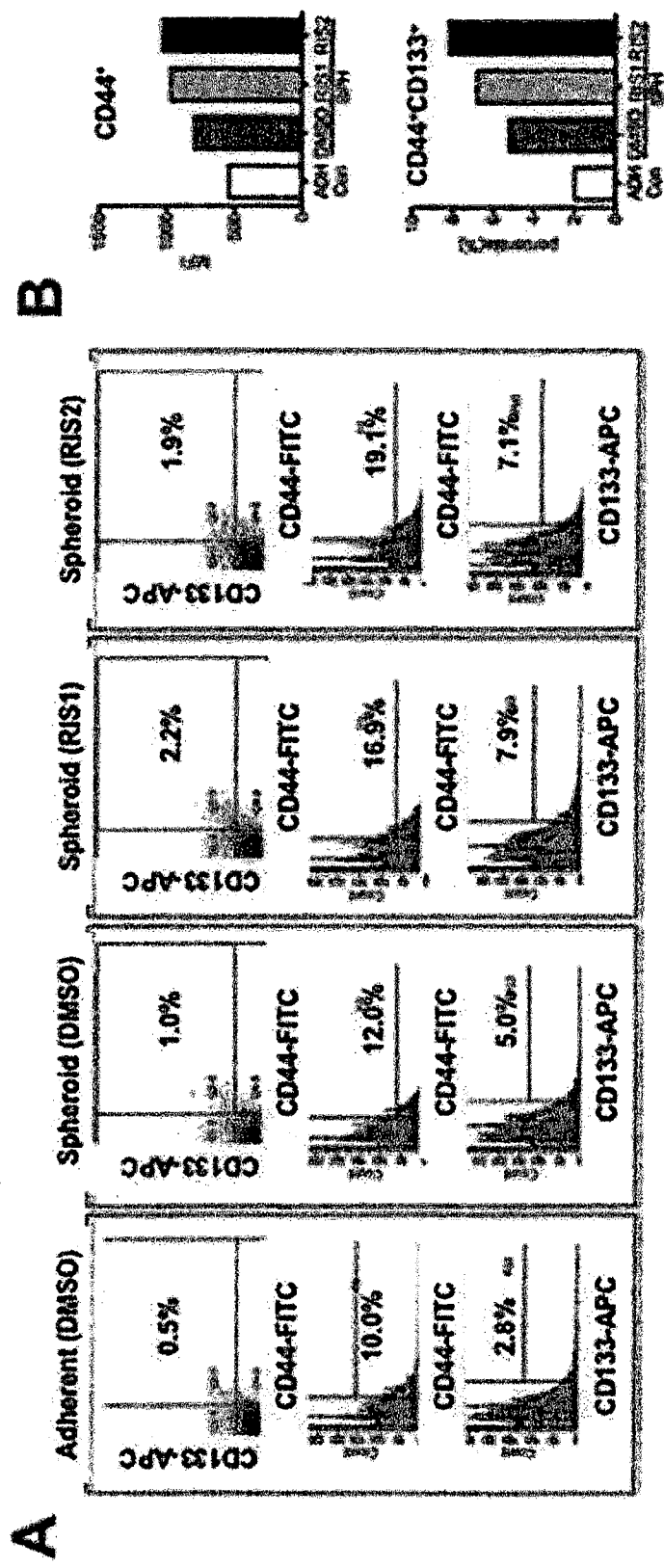
청구범위

- [청구항 1] 리보솜 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 리보솜 작용 저해제는 애니소마이신(anisomycin; ANS) 또는 디옥시니발레놀(deoxynivalenol; DON)인 것을 특징으로 하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화는 활성전사인자 3(activating transcription factor 3; ATF3)에 의해 매개되는 것을 특징으로 하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 대장암(colorectal cancer; CRC)인 것을 특징으로 하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도용 조성물.
- [청구항 5] 리보솜 작용 저해제를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 리보솜 작용 저해제는 애니소마이신(anisomycin; ANS) 또는 디옥시니발레놀(deoxynivalenol; DON)인 것을 특징으로 하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 암은 대장암(colorectal cancer; CRC)인 것을 특징으로 하는 암세포로부터 암줄기세포로의 탈분화 유도방법.

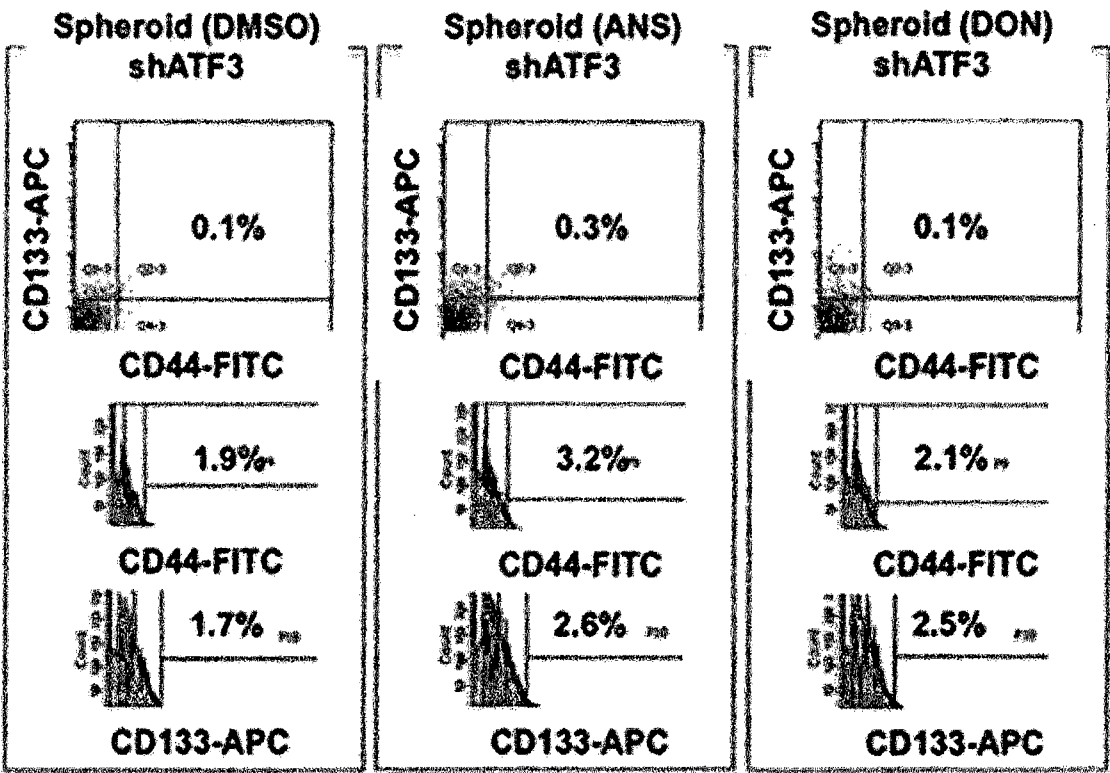
[도 1]



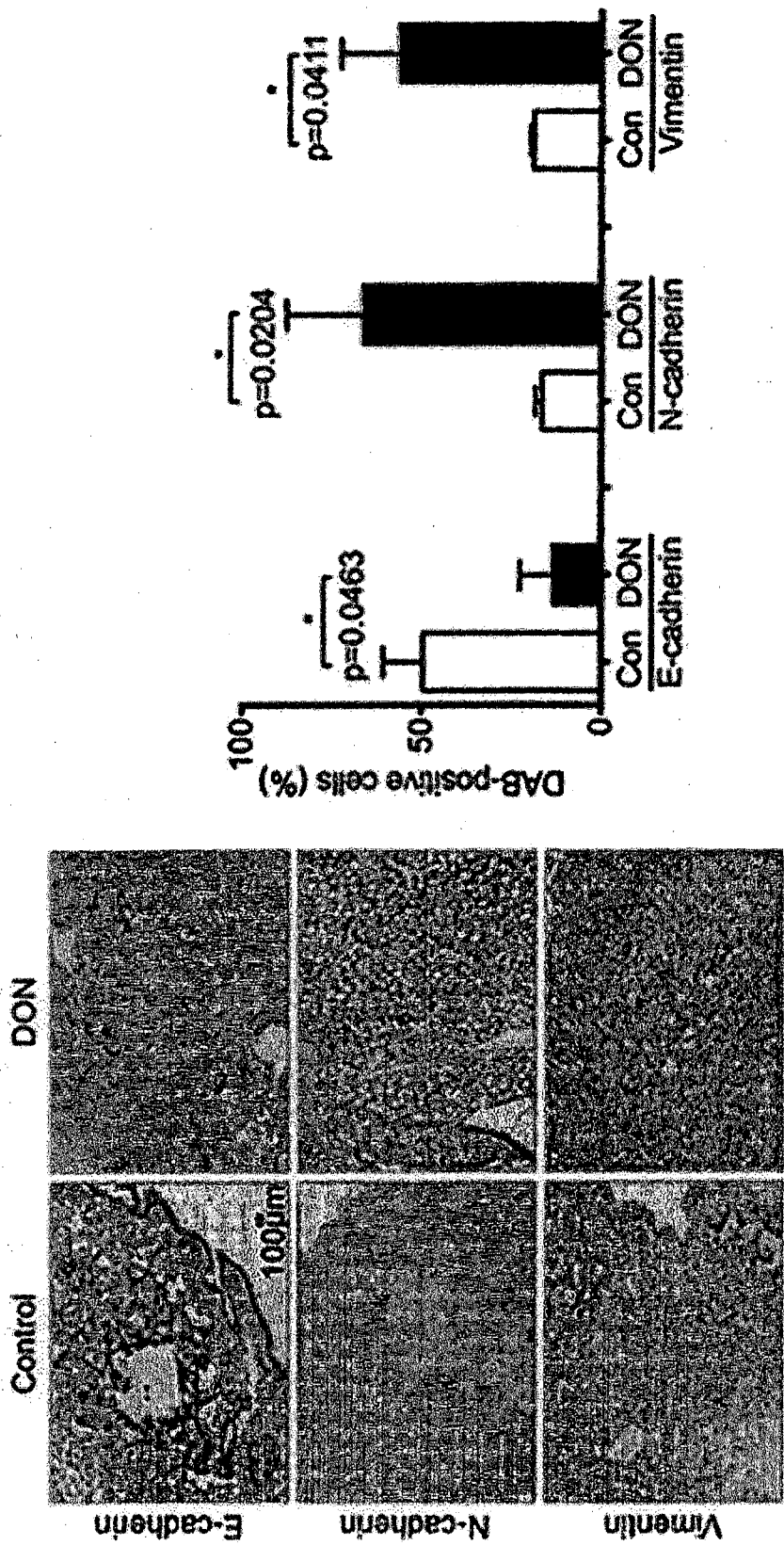
[도 2]



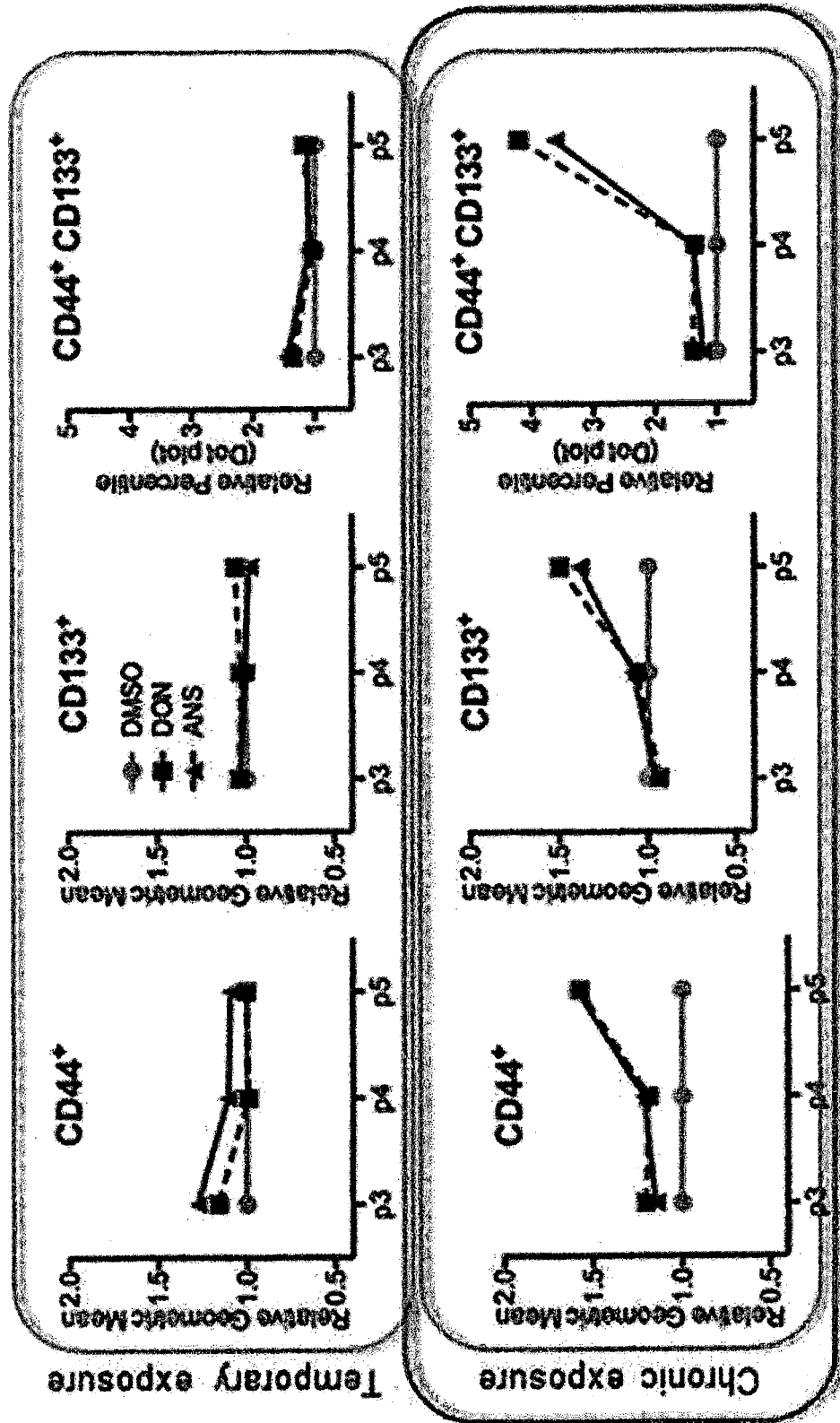
[도 3]



[도 4]



[도 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/095(2010.01)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)

C12N 5/095; C12N 5/07

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: ribosome action inhibitor, cancer cell, cancer stem cell, dedifferentiation, anisomycin, deoxynivalenol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DUAN, Xinrui et al., "Discrimination of Colon Cancer Stem Cells Using Nonecanonical Amino Acid", Chemical Communications, 2012, vol. 48, pages 9035-9037 See abstract; page 9035, right column, second paragraph-page 9036, left column, fourth paragraph; figure 3	1-7
Y	STEDMAN, A. et al., "Ribosome Biogenesis Dysfunction Leads to p53-mediated Apoptosis and Goblet Cell Differentiation of Mouse Intestinal Stem/progenitor Cells", Cell Death and Differentiation, 2015, vol. 22, pages 1865-1876 See page 1871, left column, third paragraph.	1-7
A	HE, Kaiyu et al., "Targets and Intracellular Signaling Mechanisms for Deoxynivalenol-induced Ribosomal RNA Cleavage", Toxicological Sciences, 2012, vol. 127, no. 2, pages 382-390 See the entire document.	1-7
A	JIANG, Xiaojing et al., "Potential Dual Role of Activating Transcription Factor 3 in Colorectal Cancer", Anticancer Research, February 2016, vol. 36, pages 509-516 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search

15 JUNE 2017 (15.06.2017)

Date of mailing of the international search report

15 JUNE 2017 (15.06.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002199

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0054728 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 20 May 2015 See claims 1-3.	1-7
PX	OH, Chang-Kyu et al., "Acquisition of Chemoresistance and Other Malignancy-related Features of Colorectal Cancer Cells are incremented by Ribosome-inactivating Stress", Journal of Biological Chemistry, (Electronic publishing) 09 March 2016, vol. 291, no. 19, pages 10173-10183 See abstract; page 10179, right column, second paragraph-page 10180, right column; figures 1-4.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/002199

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0054728 A	20/05/2015	KR 10-1539205 B1	24/07/2015
		KR 10-1543863 B1	11/08/2015
		KR 10-2014-0061277 A	21/05/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/095(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/095; C12N 5/07

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: 리보솜 작용 저해제, 암세포, 암줄기세포, 탈분화, 애니소마이신, 디옥시리발레놀

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	DUAN, XINRUI 등, 'Discrimination of colon cancer stem cells using noncanonical amino acid', Chemical Communications, 2012, 제48권, 9035-9037 페이지 초록; 페이지 9035, 우컬럼, 두 번째 단락-페이지 9036, 좌컬럼, 네 번째 단락; 도면 3 참조.	1-7
Y	STEDMAN, A. 등, 'Ribosome biogenesis dysfunction leads to p53-mediated apoptosis and goblet cell differentiation of mouse intestinal stem/progenitor cells', Cell death and Differentiation, 2015, 제22권, 1865-1876 페이지 페이지 1871, 좌컬럼, 세 번째 단락 참조.	1-7
A	HE, KAIYU 등, 'Targets and intracellular signaling mechanisms for deoxynivalenol-induced ribosomal RNA cleavage' Toxicological Sciences, 2012, 제127권, 제2호, 382-390 페이지 전체 문헌 참조.	1-7
A	JIANG, XIAOJING 등, 'Potential dual role of activating transcription factor 3 in colorectal cancer', Anticancer Research, 2016.02, 제36권, 509-516 페이지 전체 문헌 참조.	1-7

☒ 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

2017년 06월 15일 (15.06.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 06월 15일 (15.06.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



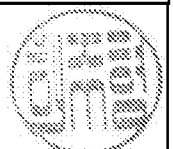
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0054728 A (성균관대학교산학협력단) 2015.05.20 청구항 1-3 참조.	1-7
PX	OH, CHANG-KYU 등, 'Acquisition of chemoresistance and other malignancy- related features of colorectal cancer cells are incremented by ribosome- inactivating stress' , Journal of Biological Chemistry' , (전자공개)2016.03.09, 제291권, 제19호, 10173-10183 페이지 초록; 페이지 10179, 우컬럼, 두 번째 단락-페이지 10180, 좌컬럼; 도면 1-4 참조	1-7

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2015-0054728 A

2015/05/20

KR 10-1539205 B1

2015/07/24

KR 10-1543863 B1

2015/08/11

KR 10-2014-0061277 A

2014/05/21