(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 8 월 21 일 (21.08.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/126436 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001275

(22) 국제출원일: 2014 년 2 월 17 일 (17.02.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0017072 2013 년 2 월 18 일 (18.02.2013) KR

(71) 출원인: **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-713 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **고제상 (KO, Je Sang)**; 150-918 서울시 영등포구 여의동로 3 길 10 101-2401, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 135-936 서울시 강남구 역삼로 3 길 11 광성빌딩 신관 5 층, Seoul (KR).

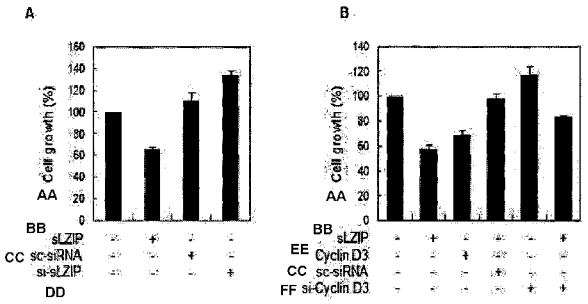
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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.

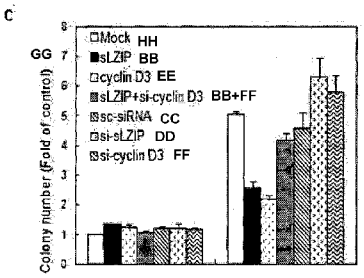
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING PROTEIN SLZIP FOR TREATING ANDROGEN-DEPENDENT PROSTATE CANCER

(54) **발명의 명칭** : sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물





AA ... Cell growth (%)
BB ... sLZIP
CC ... sc-siRNA
DD ... si-sLZIP
EE ... Cyclin D3
FF ... si-Cyclin D3
GG ... Colony number (Fold of control)
HH ... Mock

(57) **Abstract**: The present invention provides a pharmaceutical composition comprising protein sLZIP for treating androgen-dependent prostate cancer. With regard to androgen-dependent prostate cancer, protein sLZIP directly combines with an androgen receptor and inhibits the proliferation of a cancer cell, thereby treating androgen-dependent prostate cancer.

(57) **요약서**: 본 발명은 sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물을 제공한다. 안드로겐 의존성 전립선암에 있어서, sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체에 직접 결합하여 암세포의 증식을 억제시킴으로써 안드로겐 의존성 전립선암을 치료할 수 있다.

WO 2014/126436 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein; LZIP)은 염기성 DNA 결합 도메인, 추정적 막통과 도메인 및 류신 지퍼 도메인을 포함하는 bZIP 전사인자(Raggo C, et al., Mol Cell Biol 22:5639-5649, 2002)로서, 종양 억제, 세포 조절 등 다양한 역할이 제시되어 있다. 본 발명자들은 인간 LZIP 및 이의 용도에 관한 연구를 하던 중, 인간 LZIP의 신규한 아형, 즉 인간 작은 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein; sLZIP)을 확인하였다. 연구 결과에 따르면, 상기 sLZIP 단백질은 기존의 인간 LZIP과 달리 막통과 도메인(아미노산 229-245)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 핵 내에 위치한다. sLZIP 단백질은 글루코코르티코이드 유도성 글루코코르티코이드 수용체 전사 활성을 억제하는 특성을 가짐으로써, 스트레스 장애, 염증성 질환 및 면역 질환 등의 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힌 바 있다.

[4] 한편, 전립선암은 서구 사회에 발병률이 높은 암으로, 미국의 통계에 의하면 남성암 중 3번째로 높은 사망률로 한해 3만 명 정도가 전립선암으로 사망하며 미국 남성의 6 명 중 한 명은 평생 중에 전립선암으로 진단된다고 한다. 최근 우리나라도 식생활의 서구화, 평균수명의 증가, 진단방법의 발달로 인해 발병률이 지속적으로 증가추세를 보이고 있으며 세계보건기구 (WHO)는 25년 후 전립선암 환자 수가 현재보다 40% 증가할 것이라 예측하고 있다. 전립선암의 치료방법으로는 암세포 전이 이전의 초기 발견 시 기존의 일반적 암 치료 방법인 외과적 수술을 통한 적출술, 방사선 치료, 항암제 치료방법 등이 시도되고 있다. 최근에는 면역 치료방법 및 동위원소 직접주입방식 등의 새로운 치료기법 시도가 진행 중에 있다. 또한 전립선암 환자 생존율에 가장 크게 영향을 미치는 전이 암세포의 진행억제를 위해 고환절제술, 항 안드로겐 제제 사용을 통하여 전립선 암세포의 증식에 중요한 안드로겐 호르몬을 차단하는 방법을 실시하고 있다. 그러나 안드로겐과 안드로겐 수용체의 결합력 증가 등의 이유로 내성이 생기는 문제점이 있기 때문에 전립선 유래 전이 암세포 진행 억제를 위한 새로운 치료방법의 개발이 절실하며, 이를 위해 전립선 암세포의 증식, 특히 전이 암세포의 증식 억제 기능을 가지는 분자/세포학적 표적 단백질 발굴이 필요하다.

전립선암은 발병원인의 다양성과 발병기전의 복잡성으로 인해 현재까지도 정확한 발병 기전을 규명하지 못하고 있음은 물론 관련 표적 단백질의 발굴도 미비한 실정이며 최근에는 지노믹스, 프로테오믹스 등을 이용하여 전립선암에 관련 가능성이 있는 많은 표적 단백질을 스크리닝하여 연구가 진행 중이나 아직까지 정확하게 관련 기전과 기능이 밝혀진 표적 단백질은 없으며 가능성만 제시되고 있는 실정이다.

[5] 이에, 본 발명자들은 암세포의 증식과 성장, 전이에 관여하는 전사인자로 알려진 sLZIP 단백질의 안드로겐 의존적 전립선암의 성장에 관여하는 기전을 연구하여 sLZIP 단백질이 안드로겐 존재 하에서 안드로겐 의존적인 전립선 암세포의 증식을 억제시킴을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 따라서, 본 발명의 목적은 인간 류신 지퍼 단백질의 아형인 sLZIP 단백질을 이용한 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약의 제조를 위한 sLZIP 단백질의 용도, sLZIP 단백질을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암의 치료방법 및 sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[10] 본 발명의 한 구체예에서, sLZIP 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[11] 본 발명의 한 구체예에서, 조성물은 비경구 투여를 위한 제제일 수 있다.

[12] 본 발명의 한 구체예에서, 비경구 투여를 위한 제제는 비수성용제, 현탁제, 유제 또는 동결건조 제제일 수 있다.

[13] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 조성물은 제 2 전립선암 치료제와 병용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 제 2 전립선암 치료제는 도세탁셀, 아비라테론, 엔잘루타미드 및 비칼루타미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명의 sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체의 전사활성을 억제하는 특성을 가짐으로써 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1A는 sLZIP 단백질이 전립선암세포의 mRNA 및 단백질 수준에서 사이클린 D3의 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과를 보여준다. 도 1B는 사이클린 D3 프로모터에 대한 sLZIP 단백질의 가능한 결합부위에 대한 모식도를 나타낸 것이다. 도 1C는 sLZIP 단백질이 사이클린 D3 프로모터의 결합부위를 보여주며 도 1D는 sLZIP 단백질의 사이클린 D3 AP-1에의 결합력이 농도 의존적으로 증가함을 보여준다. 도 1E는 사이클린 D3 프로모터 내 결합 부위로의 sLZIP 단백질 모집(recruitment)을 평가한 결과, 도 1F는 sLZIP 단백질과 mock vector의 sLZIP 단백질 모집 비교실험 결과를 보여준다.

[18] 도 2A는 COS-7 및 LNCaP 세포에서, 사이클린 D3의 농도에 따른 안드로겐 수용체의 리간드 의존적 전사 활성 억제효과를 나타낸 결과를 보여준다. 도 2B는 DHT 존재 유무에 따라 sLZIP 단백질이 리포터 유전자 활성 및 리간드-의존적 안드로겐 수용체의 전사활성에 미치는 영향을 나타낸 결과를 보여준다. 도 2C는si-sLZIP 단백질에 의한 sLZIP 단백질 발현 억제 및 DHT 의존적 si-사이클린 D3가 안드로겐 수용체 전사 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

[19] 도 3A는 DHT 유무에 따라 sLZIP 단백질이 사이클린 D3, PSA 및 GAPDH의 mRNA 수준에서의 발현에 미치는 영향 및 도 3B는 단백질 수준에서의 영향을 보여준다. 도 3C는 DHT가 존재하는 경우에sLZIP 단백질의 knock-down이 사이클린 D3 및 PSA의 발현에 미치는 영향을 mRNA 및 단백질 수준에서 분석한 결과를 나타낸다. 도 3D는 sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체의 전사 활성을 억제하는지 실험한 결과를 보여준다. 도 3E 및 3F는 ChIP 분석을 이용하여 sLZIP 단백질이 내인성 안드로겐 수용체의 ARE-결합력을 억제하는지 실험한 결과를 보여준다.

[20] 도 4는 sLZIP 단백질과 안드로겐 수용체와의 상호작용을 실험한 결과로서, 도 4A는 DHT의 존재 하에, sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체와 공-면역침강을 하며 DHT 부재 하에서 약한 시그날을 나타냄을 보여준다. 도 4B는 LNCaP 세포에서 GST 풀-다운(pull-down) 어세이 결과를 나타낸다. 도 4C는 sLZIP 단백질 과발현시, sLZIP 단백질이 DHT 자극에 따라 안드로겐 수용체의 핵 이동(nuclear translacation)에 미치는 영향을 실험한 결과를 보여준다. 도 4D는 안드로겐 수용체와 결합하는 sLZIP 단백질 도메인을 분석한 결과를 보여준다. 도 4E 및 4F는 sLZIP 단백질에 의해 매개된 안드로겐 수용체 인산화 메커니즘을 분석한 결과를 보여준다. 도 4G는 안드로겐 수용체 Ser308A 변이체가 안드로겐 수용체 전사활성에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸다. 도 4H는 사이클린 D3/CDK11^{p58} 복합체에 의해 유도된 안드로겐 수용체 인산화와 sLZIP 단백질의 관련성을 실험한 결과를 보여준다. 도 4I는 sLZIP 단백질이 HDAC3와 관련성이 있는지 알아보기 위해 면역침강법을 수행한 결과를 나타낸다.

[21] 도 5A는 LNCaP세포에서 sLZIP 단백질과 DHT의 반응에 의한 사이클린 D3 발현을 시간에 따라 나타낸 것이다. 도 5B는 sLZIP 단백질의 AP-1 (-574/-563)에의 결합이 안드로겐 의존적인지 알아보기 위한 EMSA 결과를

보여준다. 도 5C는 안드로겐에 의해 유도된 사이클린 D3 프로모터로부터의 sLZIP 단백질의 해리가 안드로겐 수용체(androgen receptor; AR)-ARE(androgen receptor element) 결합력에 미치는 영향을 실험한 결과를 나타낸 것이다. 도 5D는 sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체와 상호작용함에 의해 AR-ARE 결합력을 조절하는지 알아보기 위해 면역침강법을 수행한 결과를 보여준다.

[22] 도 6A는 sLZIP 단백질이 과발현된 경우 및 si-sLZIP 단백질이 발현된 경우에 있어서, LNCaP 세포의 성장 속도를 보여주는 결과를 나타낸 것이다. 도 6B는 sLZIP 단백질, 사이클린 D3, si-사이클린 D3로 감염된 경우 및 sLZIP 단백질과 si-사이클린 D3에 동시에 감염된 경우에 있어서 세포 성장 속도를 보여준다. 도 6C는 콜로니 형성 어세이 결과를 보여준다.

[23]

발명의 실시를 위한 형태

[24] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[25] 본 발명은 sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[26] 상기 sLZIP 단백질은 인간 류신 지퍼 단백질(LZIP)의 371개의 아미노산 서열에서 229-245 부위의 아미노산이 결핍된 LZIP의 아형으로서 특허출원 제 2009-0101278호에 기술된 바에 따라 획득할 수 있다.

[27] 안드로겐 의존성 전립선암의 초기 단계에서는 안드로겐에 의존적으로 암세포가 성장하나, 암이 진행됨에 따라 안드로겐 의존적 성장에서 안드로겐 비의존적 과정으로 진행되는 경향이 있다. 본 발명의 조성물은 안드로겐 의존성 전립선암이 안드로겐 비의존성 암으로 진행되기 전의 단계, 즉 안드로겐 농도에 의존적으로 암세포가 성장하는 전립선암에 있어서 암 세포의 성장 또는 증식을 억제하여 암을 치료하는 효과가 있다.

[28] 안드로겐 의존성 전립선암에 있어서, 안드로겐 수용체는 전립선 세포 및 전립선 암세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 하는 전사인자로서 다양한 표적 유전자의 발현 조절에 관여한다. 본 발명자들은 전사인자로 알려진 sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체의 활성에 관여하여 결과적으로 의존성 전립선암의 성장에 관여하는지 알아보기 위해 연구하였다.

[29] 한편, 전립선암세포에서 사이클린 D3는 안드로겐 자극에 따라 유도되며(Knudsen et al, 1999; Olshavsky et al, 2008; Xu et al, 2006) 안드로겐 수용체 활성을 억제하는 능력을 가진 것으로 알려져 있다 (Olshavsky et al, 2008; Zong et al, 2007).

[30] 따라서 본 발명자들은 sLZIP 단백질과 사이클린 D3 및 안드로겐 수용체의 관련성을 중점으로 하여 연구하였다. 연구 결과, sLZIP 단백질은 사이클린 D3의 전사활성을 촉진 시키고(도 1) 리간드 의존적으로 안드로겐 수용체의 전사활성을 억제함을 확인 하였다(도 2). 이들 결과를 토대로 sLZIP 단백질이

사이클린 D3 및 안드로겐 수용체와 구체적으로 어떠한 기전을 통하여 안드로겐 의존성 전립선암의 성장 및 증식에 영향을 미치는지 하기 실시예에 기술한 바와 같은 실험을 통하여 알아보았고 그 결과 sLZIP 단백질의 안드로겐 의존성 전립선암 억제효과의 새로운 기전을 밝혔다. 구체적으로, sLZIP 단백질은 안드로겐 의존적으로 사이클린 D3 프로모터의 두번째 AP-1 영역 (-574/-563)에 결합하여 사이클린 D3 전사를 유도하고 사이클린 D3는 AR-ARE 결합활성을 억제한다. 또한 sLZIP 단백질은 DHT와 반응하여 사이클린 D3 프로모터로부터 해리되고 sLZIP 단백질 C도메인이 안드로겐 수용체 결합하여 사이클린 D3/CDK11^{p58} 복합체에 의해 유도된 안드로겐 수용체의 인산화를 증가시킴으로써 AR-ARE 결합활성을 억제함을 알 수 있었다. 결과적으로 sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체와 ARE의 결합활성을 억제함으로써 안드로겐 의존성 전립선암의 증식 및 성장을 억제한다(도 6). 따라서 본 발명은 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약의 제조를 위한 sLZIP 단백질의 용도, sLZIP 단백질을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암의 치료방법 및 sLZIP 단백질을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[31] 본 발명의 한 구체예에서, sLZIP 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[32] 서열번호 1:

[33] MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSEVPSDWEVD
DLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTP
QHMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRKIRNK
RSAQESRRKKKVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKL
QAMVIEISNKTSSSSMYSSDTRGSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQS
EVPKDSTHQWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLSSEPL
CRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG

[34] 본 발명의 한 구체예에서, 조성물은 비경구 투여를 위한 제제일 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 비경구 투여를 위한 제제는 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 예를 들어, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 또는 동결건조 제제일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 제제의 경우에는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 직장, 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[35] 비경구 투여를 위한 제제는 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 수성 조성물로 제조될 수 있다. 일반적으로, 그러한 조성물은 주사가능한 제형, 예를 들어, 용액 또는 현탁액; 마이크로 또는 나노입자와 같이 주사 전에 재구성 매질의 추가시 용액 또는 현탁액으로 제조되도록 사용하기에 적합한 고체 형태; 유중수(w/o) 에멀젼, 수중유(o/w) 에멀젼과 같은 에멀젼, 및 이의 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 에멀좀으로 제조될 수 있다.

[36] 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 하나 이상의 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액상 폴리에틸렌 글리콜), 오일(예: 식물성 오일(예: 땅콩유, 옥수수유, 참기름 등)), 및 이의 조합을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 레시틴과 같은 코팅물을 사용하거나 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 또는 계면활성제를 사용함으로써 적합한 유동성이 유지될 수 있다. 또한, 설탕 또는 염(예: 염화나트륨)의 등장화제를 포함할 수 있다.

[37] 활성 화합물들의 유리 산 또는 유리 염기 또는 약제학적으로 허용되는 염으로서의 용액 또는 분산액은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 적절히 혼합된 물 또는 다른 용매 또는 분산 매질 중에 제조될 수 있다. 부형제는 예를 들어, 계면활성제, 분산제, 유화제, pH 조절제 및 이의 조합을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[38] 적합한 계면활성제는 음이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 비이온성 표면 활성제일 수 있다. 적합한 음이온성 계면활성제는, 카복실레이트, 설포네이트 및 설페이트 이온을 함유하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 음이온성 계면활성제의 예는 나트륨 도데실벤젠 설포네이트와 같은 장쇄 알킬 설포네이트 및 알킬 아릴 설포네이트의 나트륨, 칼륨, 암모늄; 나트륨 도데실벤젠 설포네이트와 같은 디알킬 나트륨 설포숙시네이트; 나트륨 비스-(2-에틸티옥실)-설포숙시네이트 와 같은 디알킬 나트륨 설포숙시네이트; 및 나트륨 라우릴 설페이트와 같은 알킬 설페이트를 포함한다. 양이온성 계면활성제는 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄, 브롬화세트리모늄, 스테아릴 디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 폴리옥시에틸렌 및 코코넛 아민과 같은 4차 암모늄 화합물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비이온성 계면활성제의 예는 에틸렌 글리콜 모노스테아레이트, 프로필렌 글리콜 미리스테이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 폴리글리세릴-4-올레에이트, 소비탄 아실레이트, 수크로스 아실레이트, PEG-150 라우레이트, PEG-400 모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌 모노라우레이트, 폴리소르베이트, 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르, PEG-1000 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 트리데실 에테르, 폴리프로필렌 글리콜 부틸 에테르, 폴록사머401, 스테아로일 모노이소프로판올아미드 및 폴리옥시에틸렌 수소화된 탈로우 아미드를 포함한다. 양쪽성 계면활성제의 예는 미리스토암포아세테이트, 라우릴 베타인 및 라우릴 설포베타인을 포함한다.

[39] 또한, 제제는 미생물의 성장을 억제하는 방부제를 함유할 수 있다. 적합한 방부제로, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티메로살을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 제형은 또한 활성 성분(들)의 분해를 방지할 수 있는 항산화제를 함유할 수 있다.

[40] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 조성물은 제 2 전립선암 치료제와 병용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 제 2 전립선암 치료제는 전립선암 치료 효과가 있는 약물로서, 본 발명의 sLZIP 외의 다른 성분을 유효성분으로 함유하는 공지된

어떤 약물도 포함한다. 상기 조성물과 제 2 전립선암 치료제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[41] 본 발명의 한 구체예에서, 제 2 전립선암 치료제는 도세탁셀, 아비라테론, 엔잘루타미드 및 비칼루타미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[42]

[43] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[44]

[45] <실시예 1>

[46] sLZIP 단백질의 전립선암 세포 내 사이클린 D3 발현 조절

[47] 전립선암과 관련하여 sLZIP 단백질의 표적 분자를 확인하기 위해, 마이크로어레이 분석법을 이용하여 안드로겐 수용체 발현 전립선암 세포주 LNCaP 내 차등 유전자 발현 프로파일을 실시했다. sLZIP 단백질에 의해 유도되는 유전자 중에서, 사이클린 D3가 전립선암세포의 증식에 중요한 역할을 하기 때문에 사이클린 D3에 초점을 맞추었다. 사이클린 D3 발현에 대한 sLZIP 단백질의 영향을 조사하기 위해서, 안드로겐 수용체 발현 전립선암 세포주 LNCaP, DU145, 및 PC3의 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 수행했다. LNCaP, DU145 및 PC3 세포를 mock 또는 소정의 양의 GFP-sLZIP 단백질 플라스미드로 감염시켰다. 총 RNA를 분리하고 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 사이클린 D3 및 sLZIP 단백질의 mRNA 수준을 정량하였다. GAPDH 를 내부 컨트롤로 사용하였다. 정량적 real-time PCR 어레이를 위하여 sLZIP 단백질 및 사이클린 D3의 상대적 mRNA의 수준을 인간 전립선 cDNA 어레이(조직 스캔 PCaq PCR 어레이 패널 I 및 II, Origene, Rockville, MD)로 분석하였다. 조직 스캔 전립선 PCR 어세이는 전립선 비대증(BPH) 및 정상 전립선 조직에서 추출한 것으로서, 다른 진행 단계에 있는 전립선암으로부터 준비한 노말라이즈된 양의 cDNA (β-액틴에 대하여 노말라이즈된 2 ng의 cDNA)를 함유한다. 패널 I은 전립선 비대증의 30개 샘플과 함께 7개의 정상 조직, 7개의 2기 및 3개의 3기 암 조직을 함유하고 패널 II는 8개의 정상 조직, 18개의 2기, 19개의 3기 및 2개의 4기 암 조직을 함유한다. 암의 진행단계를 포함하여 샘플의 상세한 병리학 보고 및 HE 염색에 관한 것은 Origene s 웹사이트에서 알 수 있다. 승인된 sLZIP 단백질 및 사이클린 D3 프라이머와 Origene (Rockville, MD)으로부터 획득한 컨트롤 β-액틴 프라이머를 갖는 SYBR Green Master Mix (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 제조사의 추천에 따라 Light Cycler 480으로 sLZIP 단백질 및 사이클린 D3의 발현을 측정하였다. 총 세포 용해물을 모아 항-GFP 및 항-사이클린 D3 항체에 대한 웨스턴 블롯팅을 수행했다. α-튜불린을 내부 컨트롤로 사용하였다. 그 결과 sLZIP 단백질은 전립선암세포의 사이클린 D3의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서 농도 의존적으로 증가시킴을 알 수 있었다(도 1A). 그 다음 사이클린

D3 발현에 있어서 sLZIP 단백질의 조절 기전을 조사했다. Transcription Element Search System (TESS) 및 MOTIF 소프트웨어를 이용하여 사이클린 D3 프로모터(-1017 bp)를 조사했다. 사이클린 D3 프로모터에 대한 sLZIP 단백질의 가능한 결합부위에 대한 모식도를 도 1B에 나타내었다. 사이클린 D3 프로모터 내의 다양한 요소에 대한 sLZIP 단백질의 DNA 결합 능력을 평가하기 위해, 정제된 His-sLZIP 단백질을 이용하여 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)를 수행했다. EMSA를 위하여 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제 (Promega, Madison, WI)를 이용하여 올리고뉴클레오티드의 5'-말단을 [γ-^{32}P]ATP (Perkin Elmer, Waltham, MA)로 표지하였다. 표지되지 않은 뉴클레오티드는 제조사의 설명서에 따라 Bio-Gel P-6 스핀 컬럼(Bio-Rad, Inc., Hercules, CA)을 통과시켜 제거하였다. 정제된 His-sLZIP 단백질 또는 핵 추출물을 실온에서 40분 동안 DNA-결합 반응 버퍼[10 mMTris-HCl, 500 mMKCl, 10 mM EDTA, 50 % 글리세롤, 20 mM DTT, 1 $\mu g/\mu \ell$ poly(dI-dC)-poly(dI-dC)] 및 방사선 표지된 프로브로 인큐베이트하고 단백질-DNA 복합체를 6% 네이티브 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동에 의해 프리(free) 프로브로부터 분리하였다. 로딩에 앞서 겔을 30분 동안 0.5×TBE에서 pre-전기영동하고 1시간 동안 180V에서 전기영동을 계속하였다. 그 결과를 오토라디오그래피에 의해 기록했다. 경쟁 시험을 위하여, 방사선 표지된 올리고뉴클레오티드를 가하기 전에 결합반응을 40분 동안 50-배 몰 과량의 표지되지 않은 AP-1 또는 ARE 결합 올리고뉴클레오티드로 인큐베이트하였다. 슈퍼시프트 어세이를 위하여, 얼음 중에서 항체를 30분 동안 반응 혼합물에 가하였다. EMSA에 사용된 프로브는 다음과 같다; 사이클린 D3 내의 sLZIP 단백질-결합 사이트를 함유한 올리고뉴클레오티드 (-464/-457 AP-1, 5'-AAGAAACTGATTCAATGAGAA-3' -574/-563 AP-1, 5'-GATGTAGTGAGTCATTACATC-3' -999/-993 AP-1, 5'-GAATGAATAAGTGAATGAATG-3' -660/-652 CEBP, 5'-AGAATCTGCAGCAAGAAGGCC-3'가 프로브로 사용되었다. 컨센서스 안드로겐 수용체 반응 성분(ARE) 올리고뉴클레오티드(5'-GTCTGGTACAGGGTGTTCTTTTT-3'를 합성하였다. His-sLZIP 단백질 (2 μg)을 AP-1 및 C/EBP를 포함하는 컨센서스 결합 모티프를 함유하는 γ-^{32}P-표지된 올리고뉴클레오티드로 인큐베이트하였다. 그 결과 sLZIP 단백질은 사이클린 D3 프로모터의 두번째 AP-1 영역 (-574/-563)에 결합함을 알 수 있었다(도 1C). 그러나, sLZIP 단백질은 사이클린 D3 프로모터의 첫번째 AP-1 (-464/-457), 세번째 AP-1 (-999/-993), 또는 C/EBP (-660/-652) 영역에는 결합하지 않았다(도 1C). 이 결과는 sLZIP 단백질이 사이클린 D3 프로모터의 두번째 AP-1 영역 (-574/-563)를 통하여 사이클린 D3 전사를 유도함을 의미한다. 정제된 His-sLZIP 단백질의 양을 증가시키면서 γ-^{32}P-표지된 올리고뉴클레오티드를 인큐베이트하였다. 화살표는 His-sLZIP 단백질-DNA 복합체의 이동을 나타낸다. sLZIP 단백질의 사이클린 D3 프로모터 내의 두번째 AP-1 (-574/-563) 영역로의

DNA 결합력은 농도 의존적으로 증가했다(도 1D). sLZIP 단백질의 AP-1 (-574/-563)에 대한 결합 특이성을 측정하기 위해, 분류되지 않은 AP-1 프로브의 50-배 초과량이 복합체와 경쟁적으로 사용되었다. 슈퍼시프트 어세이의 결과 sLZIP 단백질 복합체가 항-His-sLZIP 단백질 항체를 처리한 후 슈퍼시프트 되었음을 보여주었는데 이는 sLZIP 단백질이 AP-1 (-574/-563)에 특이적으로 결합함을 의미한다(도 1D). 그리고 나서 사이클린 D3 프로모터 내 AP-1 (-574/-563) 결합 영역으로의 sLZIP 단백질 모집을 평가하기 위하여 비염색질 면역침강법 (ChIP)을 수행했다. ChIP 실험을 위하여, 샘플당 약 1×10^7 세포를 어세이하였다. 세포를 PBS로 세척하고 25 ℃에서 10분 동안 1% 포름알데히드를 처리한 후 10분 동안 최종 농도가 0.125 M 가 되도록 글라이신을 가하였다. 그리고 나서 세포를 PBS로 스크랩하고 4 ℃ 에서 1,000×g으로 5분간 원심분리 하였다. 내부 컨트롤로서 항-HA 또는 항-AR 항체 및 항-래빗 IgG으로 DNA-단백질 복합체를 공-면역 침강함으로써 ChIP 어세이를 수행하였다. 준비된 DNA 샘플로부터 다음의 프라이머 쌍을 이용하여 사이클린 D3의 프로모터 영역인 -718 내지 -480(절편 사이즈 238bp) 을 증폭하였다: forward 5'-GACAGGTCTGGGATCACAGT-3' 및 reverse 5'-AGCAGCCGGTGAAGTAG-3' PSA 프로모터 및 인핸서 영역 프라이머는 다음과 같다: ARE I (프로모터 내 -250 내지 -39에 위치) forward 5'-TCTGCCTTTGTCCCCTAGAT-3' 및 reverse 5'-AACCTTCATTCCCCAGGACT-3' ARE II (프로모터 내 -406 내지 -164에 위치) forward 5'-AGGGATCAGGGAGTCTCACA-3' 및 reverse 5'-GCTAGCACTTGCTGTTCTGC-3' ARE III(인핸서 내 -4170 내지 -3978에 위치) forward 5'-CCTCCCAGGTTCAAGTGATT-3' 및 reverse 5'-GCCTGTAATCCCAGCACTT-3' HA-표지된 sLZIP 단백질 발현 벡터로 LNCaP 세포를 감염시켰다. PCR에 의해 HA-sLZIP 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 ChIP 어세이를 수행하였다. 면역침강의 시작물질에 대조군으로 인풋 크로마틴을 PCR 하였다. 그 결과 사이클린 D3 프로모터 내 AP-1 (-574/-563) 결합 영역으로 sLZIP 단백질이 모여드는 것을 알 수 있었다(도 1E). 또한 ChIP 어세이로부터의 샘플을 이용하여 real-time PCR을 수행했다. sLZIP 단백질로 감염된 세포에서 sLZIP 단백질이 AP-1 (-574/-563)로 모여드는 것은 mock vector로 감염된 세포보다 기저수준에서 대략 6-배 더 높다는 것을 알았다(도 1F). 이 결과는 sLZIP 단백질이 전립선암 세포 내 사이클린 D3 프로모터에 직접적으로 결합함에 의해 사이클린 D3 전사를 상향-조절한다는 것을 의미한다.

[48]

[49] <실시예 2>

[50] sLZIP 단백질의 안드로겐수용체의 리간드-의존적 전사활성 억제 효과

[51] 안드로겐 수용체 활성을 억제 능력을 조사하기 위해, 안드로겐 수용체 네거티브 세포주 COS-7 및 안드로겐 수용체 발현 세포주 LNCaP 세포를 10% 차콜-스트립트 배지(charcoal-stripped medium)의 12-웰 디쉬에 24시간 동안

시딩하였다. COS-7 및 LNCaP 세포를 사이클린 D3의 존재 하에 안드로겐 수용체 (0.25 ㎍), pMMTV-Luc (0.5 ㎍), 및 β-갈락토시다아제 (0.1 ㎍) 로 일시적으로 공-감염시켰다(도 2A). COS-7 및 LNCaP 세포를 sLZIP 단백질 발현 플라스미드의 양을 증가하면서 안드로겐 수용체 (0.25 ㎍), 및 pMMTV-Luc (0.5 ㎍)로 일시적으로 감염시켰다(도 2B). LNCaP 세포를 sLZIP 단백질, 사이클린 D3, si-sLZIP 단백질 및/또는 si-사이클린 D3로 감염시켰다(도 2C). sLZIP 단백질, 사이클린 D3, 및 AR에 대한 프라이머를 이용하여 스크램블 컨트롤, 인간 sLZIP 단백질 및 사이클린 D3에 대한 siRNA를 만들었다. sLZIP 단백질에 대한 siRNA의 서열은 5'-CGUCGUUGAACAUUCUCAG-3'(센스) 및 5'-CUGAGAAUGUUCAACGACG-3'(안티센스)이다. 사이클린 D3를 타겟으로 하는 siRNA 의 서열은 5'-CUGGAUCGCUACCUGUCUU-3'(센스) 및 5'-AAGACAGGUAGCGAUCCAG-3'(안티센스)이다. AR에 대한 siRNA의 서열은 5'-CACAAGUCCCGGAUGUACAdTdT-3' (센스) 및 5'-UGUACAUCCGGGACUUGUGdTdT-3'(안티센스)이다. RNA 간섭 실험을 위하여, 6-웰 플레이트에 세포를 각 웰당 5×10^5 세포의 세포 밀도로 플레이팅했다. 24시간 후에, 세포를 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사의 설명에 따라 siRNA로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 10% 차콜-스트립트 배지(charcoal-stripped medium)의 세포에 10nM DHT(디하이드로테스토스테론) 또는 ETOH를 24시간 동안 처리하고 루시퍼라아제 어세이를 위해 회수하였다. 루시퍼라아제 활성은 β-갈락토시다아제 활성으로 노말라이즈된다. 각 실험을 세 번 수행하여 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. one-way ANOVA 를 이용하여 통계적 평가를 수행하였다. 데이터는 $p < 0.05$인 경우 통계적으로 유의한 것으로 고려되었다. 모든 통계학적 분석을 컴퓨터 프로그램 Prism (Graph Pad Software, La Jolla, CA)으로 수행하였다. 이하, 모든 통계적 분석에도 동일하게 적용된다.

[52] 실험 결과, COS-7 및 전립선암 세포주 LNCaP 세포에서, 사이클린 D3는 농도 의존적으로 안드로겐 수용체의 리간드 의존적 전사 활성을 억제함을 알 수 있었다(도 2A). 안드로겐 수용체의 리간드인 DHT(디하이드로테스토스테론)의 존재 유무에 따라 sLZIP 단백질은 리포터 유전자 활성 및 리간드-의존적 안드로겐 수용체의 전사활성에 영향을 미쳤다(도 2B). DHT 부재 하에서는 sLZIP 단백질의 과발현은 리포터 유전자 활성에 영향을 미치지 않은 반면에 리간드 의존적 안드로겐 수용체 전사활성이 sLZIP 단백질의 용량에 비례하여 80%까지 억제되었다. 내인성 sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체 전사활성과 관련이 있는지 여부를 알아보기 위하여 sLZIP 단백질에 대한 siRNA (si-sLZIP) 및 사이클린 D3에 대한 siRNA(si-cyclin D3)를 이용하였다. LNCaP 세포 내에서 si-sLZIP 단백질에 의한 sLZIP 단백질 발현의 억제가 안드로겐 수용체의 전사활성을 증강시켰다. 이와 유사하게, DHT 의존적으로 si-사이클린 D3은 안드로겐 수용체의 전사활성을 증강시켰다(도 2C). 이 결과는 sLZIP 단백질이 안드로겐

수용체의 전사활성을 음성적으로 조절함을 나타낸다.

[53]

[54] <실시예 3>

[55] sLZIP 단백질의 안드로겐에 의해 유도된 사이클린 D3 및 전립선 특이적 항원 발현의 조절

[56] D-타입 사이클린이 전립선암세포의 안드로겐 의존적 성장에 중요하고 안드로겐 자극은 사이클린 D 집단의 유전자 발현을 증가시킨다(Knudsen et al, 1999; Xu et al, 2006). 루시퍼레이즈 리포터 어세이를 위해서, 리간드 의존적으로, 내인성 사이클린 D3 및 안드로겐에 반응하는 전립선 특이적 항원(PSA)의 발현에 sLZIP 단백질이 미치는 영향을 알아보았다. LNCaP 세포를 소정의 양의 sLZIP 단백질로 감염시키고 10% 차콜-스트립트 배지에서 24시간 동안 ETOH 또는 10 nM DHT로 처리하였다. 세포로부터 총 RNA를 추출한 후에, RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅으로 사이클린 D3, AR 및 PSA의 mRNA (도 3A) 및 단백질 수준(도 3B)을 분석하였다. GAPDH 및 α-튜불린을 내부 컨트롤로 사용하였다. sLZIP 단백질은 사이클린 D3의 발현을 리간드 의존적으로 증가시켰다. 그러나, DHT-의존성 PSA 유도를 관찰결과, sLZIP 단백질은 DHT 존재 하에서 PSA의 발현을 mRNA 수준에서 억제하였다(도 3A). 다양한 양의 sLZIP 단백질 존재 하에서 사이클린 D3 및 PSA의 mRNA 수준에서의 발현 또한 측정하였다. 그 결과 사이클린 D3 및 PSA의 발현에 있어서 sLZIP 단백질의 영향은 용량 의존적이었다(도 3A). 단백질 수준에서의 결과도 확인하였다. sLZIP 단백질의 PSA 발현 억제효과를 DHT 존재 하에 단백질 수준에서 관찰하였다(도 3B). 그 결과 sLZIP 단백질은 용량 의존적으로 단백질 수준에서의 PSA 발현 또한 억제함을 확인할 수 있었다(도 3B). DHT가 존재하는 경우에 sLZIP 단백질의 넉-다운이 사이클린 D3 및 PSA의 발현에 미치는 영향을 mRNA 및 단백질 수준에서 분석하였다(도 3C). LNCaP 세포를 si-sLZIP 단백질로 감염시키고 10% 차콜-스트립트 배지에서 24시간 동안 10 nM DHT 또는 ETOH를 처리하였다. RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅으로 mRNA 및 단백질 수준을 분석하였다. 내부 컨트롤로 스크램블된(sc) siRNA를 사용하였다. 그 결과 sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체 전사활성의 음성적 조절을 통하여 리간드 의존적으로 내인성 PSA의 발현을 억제함을 알 수 있었다.

[57] sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체의 DNA 결합력을 직접적으로 방해함으로써 안드로겐 수용체의 전사 활성을 억제하는지 실험하였다(도 3D). LNCaP 세포를 sLZIP 단백질, 사이클린 D3, 및/또는 si-사이클린 D3로 감염시키고 10% 차콜-스트립트 배지에서 24시간 동안 10 nM DHT로 자극하였다. 핵 추출을 준비하고 γ-^{32}P-표지된 15-bp 팔린드로믹 ARE 시퀀스로 인큐베이트하였다. 50배 몰 과량의 표지되지 않은 ARE를 이용하여 경쟁 어세이를 수행하였다. 슈퍼시프트 어세이를 위하여, 얼음 중에서 추가의 40분 동안 항-안드로겐 수용체 항체를 반응 혼합물에 부가하였다. 화살표는 AR-ARE 복합체의 위치 이동을

나타낸다. 안드로겐 수용체의 DNA 결합 활성은 DHT에 의해 유도되는데 안드로겐 수용체의 결합력은 50-배 과량의 표지되지 않은 ARE 올리고뉴클레오티드에 의해 파괴되었다. AR-ARE 복합체 형성은 sLZIP 단백질의 존재 및 DHT와 반응한 si-사이클린 D3의 존재 하에서 억제되었는데 이는 DHT 존재 하에서 sLZIP 단백질의 과발현이 안드로겐 수용체의 DNA 결합력을 억제함을 나타낸다. 사이클린 D3 및 sLZIP 단백질이 DHT와 반응하여 복합체 형성에 미치는 영향을 슈퍼 시프트 어세이를 이용하여 확인하였다. 그 결과 사이클린 D3 및 sLZIP 단백질 둘 다 복합체 형성을 억제함을 알 수 있었다.

[58] ChIP 분석을 이용하여 sLZIP 단백질이 내인성 안드로겐 수용체의 ARE-결합력을 억제하는지 실험하였다(도 3E 및 3F). LNCaP 세포를 HA-mock 또는HA-sLZIP 단백질 플라스미드로 감염시키고 6시간 동안 10 nM DHT를 처리하였다. 가용성 크로마틴을 준비하고 항-안드로겐 수용체 항체 또는 음성 대조군으로 IgG를 이용하여 면역침강하였다. 침강된 DNA를 RT-PCR로 정량하였다(도 3E). 안드로겐 수용체의 PSA프로모터에 대한 상대적 모집(recruitment)을 농도계로 분석하였다(도 3F). DHT는 안드로겐 수용체와 내인성 ARE의 결합을 촉진시켰다. 그러나, sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체의 PSA 프로모터(ARE I 및 ARE II) 및 인핸서(ARE III)으로의 모집(recruitment)을 감소시켰다(도 3E 및 3F). 이는 sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체-매개 전사활성을 억제하는 기존에 알려지지 않은 메커니즘에 해당한다.

[59]

[60] <실시예 4>

[61] sLZIP 단백질의 안드로겐 수용체와의 상호작용 및 안드로겐 수용체 공-억제자로서의 역할

[62] 안드로겐 수용체 조절에 있어서 sLZIP 단백질의 잠재적 역할을 알아보기 위해 sLZIP 단백질 및 안드로겐 수용체 사이의 상호작용에 대해 실험하였다. HEK 293T 세포를 안드로겐 수용체(AR), mGST-mock 또는 mGST-sLZIP 단백질 플라스미드로 감염시켰다. 항-안드로겐 수용체 항체를 이용하여 세포 용해물로 면역침강을 수행하고 침강된 비드를 웨스턴 블롯팅하였다. DHT의 존재 하에, sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체와 공-면역침강을 하며 DHT 부재 하에서 약한 시그날을 나타내었다(도 4A). LNCaP 세포에서 GST 풀-다운(pull-down) 어세이를 수행하였다(도 4B). LNCaP 세포를 mGST-sLZIP 단백질로 감염시켰다. 세포를 24시간 동안 10 nM DHT로 감염시켰다. 세포 용해물을 글루타치온 비드를 이용하여 풀다운 시켰다. 비드에 결합된 단백질을 10% SDS-PAGE로 분석한 다음 면역 블롯팅하였다(도 4B). DHT 부재 하에서는 약한 신호가 검출된 반면에 DHT의 존재 하에서 내인성 안드로겐 수용체는 sLZIP 단백질과 상호작용 하였다(도 4B).

[63] sLZIP 단백질 과발현시, sLZIP 단백질이 DHT 자극에 따라 안드로겐 수용체의 핵 이동(nuclear translocation)에 미치는 영향을 실험하였다(도 4C).

면역조직화학을 위하여 Super Bio Chips Laboratories (서울, 한국)으로부터 입수한 조직 어레이 키트를 이용하여 수행하였다. 항-sLZIP 단백질 및 항-사이클린 D3 항체에 대한 면역염색을 위하여 40개의 종양 조직 및 10개의 정상 조직 시료를 함유하는 인간 전립선 조직 어레이를 사용하였다. 포르말린에 고정되거나 파라핀 포매되거나 조직검사를 위하여 섹션된 샘플을 사용하였다. 병변의 조직병리학적 특성을 평가하기 위해 헤마톡실린 에오신 염색된 섹션을 시험하였다.

[64] HEK 293T 세포를 GFP-sLZIP 단백질 및 HA-AR로 감염시켰다. 24시간 후에, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 1시간 동안 항-안드로겐 수용체 항체로 인큐베이트하였다. 그리고 나서 1시간 동안 텍사스 레드(Texas Red)가 컨쥬게이트된 항-래빗 항체로 인큐베이트하였다. 그 후, 제조물을 세척하고 DAPI로 대비 염색하였다. 리간드를 처리하지 않은 경우, sLZIP 단백질은 핵 안에만 존재한 반면에 안드로겐 수용체는 세포질 및 핵 모두에 존재하였다(도 4C). 리간드 자극에 따라, 안드로겐 수용체는 핵 내에 농축되었고 과발현된 sLZIP 단백질은 안드로겐 수용체와 함께 핵 내에 co-localized 되었다 (도 4C). 그 결과 sLZIP 단백질이 리간드 의존적으로 안드로겐 수용체와 상호작용함을 알 수 있었다.

[65] 안드로겐 수용체와 결합하는 sLZIP 단백질 도메인을 분석하였다(도 4D). 야생형 및 sLZIP 단백질의 다양한 결실 변이체를 만들고 안드로겐 수용체 결합 도메인을 GST 풀 다운 실험을 하여 분석하였다. 야생형 및 sLZIP 단백질 N (1-228), sLZIP 단백질 C (229-354), 및 sLZIP 단백질 CC (297-354)를 포함하는 다양한 결실 변이체를 293T 세포 내에 HA-표지된 안드로겐 수용체로 발현시켰다. sLZIP 단백질 N, C 및 CC는 sLZIP 단백질의 서브도메인을 나타낸다. 야생형 및 mGST-sLZIP 단백질의 결실 변이체를 293T 세포로 일시적으로 감염시켰다. mGST-sLZIP 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다(도 4D). sLZIP 단백질 N 및 sLZIP 단백질 CC는 그렇지 않은 반면에 sLZIP 단백질 C 도메인은 야생형 sLZIP 단백질과 유사하게 안드로겐 수용체와 상호작용하기 위한 능력을 보유하였다. 이는 sLZIP 단백질 C도메인이 안드로겐 수용체 결합과 관련되어 있음을 나타내었다.

[66] sLZIP 단백질이 안드로겐 수용체를 인산화하는 메커니즘을 규명하기 위해 연구하였다. HA-표지된 안드로겐 수용체와 두 가지 변이체 HA-AR Ser308D (사이클린 D3/CDK11^{p58} 복합체에 의해 유도된 활성 인산화형) 및 HA-AR Ser308A (네거티브 인산화형) 를 293T 세포 내에서 GST-sLZIP 단백질 야생형 플라스미드로 발현시켰다. HEK 293T 세포를 mGST-sLZIP 단백질, HA-표지된 AR, HA-AR S308D 또는 HA-AR S308A로 감염시켰다. 24시간 동안 세포에 10 nM DHT를 처리하였다. 총 단백질로 면역침강을 수행하였다(도 4E). AR Ser308A 변이체는 sLZIP 단백질과 결합하지 않은 반면에 야생형 안드로겐 수용체 및 AR Ser308D 변이체는 sLZIP 단백질과 상호작용하였다(도 4E). 형광 현미경 분석을

위하여 24시간 동안 세포에 10 nM DHT를 처리하였다. sLZIP 단백질로 HEK 293T 세포를 일시적으로 감염시키고 안드로겐 수용체를 커버 슬립에서 성장시켰다. 감염 5시간 후에, 10% 차콜-스트립트 FBS를 함유한 RPMI1640에서 세포를 성장시켰다. 배지를 교환하고 24시간 후에, 세포를 10 nMDHT로 처리하거나 처리하지 않았다. 24시간 후, 세포를 10분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정하고 5분 동안 0.2% 트리톤-X 100으로 투과시켰다. 1시간 동안 1% BSA로 세포를 인큐베이트하고 1시간 동안 폴리클로날 항-GFP, 항-AR 및 항-HA 항체를 인큐베이트하였다. PBS로 세척한 후, 1시간 동안 텍사스 레드가 컨쥬게이트된 항-래빗 또는 항-마우스 항체 (Santa Cruz, CA)로 세포를 인큐베이트하였다. 커버 슬라이드를 PBS로 세척, 계수하고 Axiovert 100 (Carl Zeiss, Jena, 독일)를 이용하여 실험하였다. 제조물을 세척하고 DAPI로 대비 염색하였다. 안드로겐 수용체 변이체 및 sLZIP 단백질의 세포 내 위치(subcellular localization)를 형광-현미경을 이용하여 관찰하였다. 야생형 AR, AR Ser308D 및 AR Ser308A 변이체는 sLZIP 단백질과 함께 핵 내에 위치하였다(도 4F).

[67] AR Ser308A 변이체가 안드로겐 수용체 전사활성에 미치는 영향을 분석하였다(도 4G). COS-7 세포를 sLZIP 단백질, HA-AR 또는 HA-AR S308A로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 세포를 10% 차콜-스트립트 배지에서 10 nM DHT 또는 ETOH 로 24시간 동안 처리하고 루시퍼라아제 어세이를 위해 회수하였다. AR Ser308A 변이체에서는 sLZIP 단백질의 안드로겐 수용체 전사활성 억제효과가 관찰되지 않았다(도 4G). 이 결과는 sLZIP 단백질이 야생형 AR 및 AR 변이체와 함께 핵 내에 co-localized함을 의미한다. 그러나, 안드로겐 존재 하에서, sLZIP 단백질은 특이적으로 야생형 안드로겐 수용체 및 AR Ser308D 변이체와 상호작용하였다.

[68] 사이클린 D3/CDK11^{p58} 복합체에 의해 유도된 안드로겐 수용체 인산화와 sLZIP 단백질의 관련성을 실험하였다(도 4H). LNCaP 세포를 mGST-sLZIP 단백질로 감염시키고 항-CDK11^{p58} 항체를 이용하여 세포 용해물로 면역침강을 수행하였다. 앞서 기술한 바와 같이 인 비트로 키나아제 어세이를 수행하였다(도 4H). CDK11^{p58} 키나아제 어세이 결과, sLZIP 단백질은 DHT 존재 또는 부존재 하에서 안드로겐 수용체의 인산화를 증가시켰다 (도 4H).

[69] 사이클린 D3는 직접적으로 AR 및 HDAC3 (Olshavsky et al, 2008)에 결합하는 것으로 알려져 있다. sLZIP 단백질이 HDAC3와 관련성이 있는지 알아보기 위해 면역침강을 수행하였다(도 4I). LNCaP 세포를 mGST-sLZIP 단백질로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 24시간 동안 세포를 10 nM DHT로 처리하였다. 세포 용해물로 면역침강을 수행하였다. 그 결과 sLZIP 단백질은 DHT의 부재 하에서 HDAC3에 결합하고 DHT의 존재 하에서 DHT와 반응함으로써 상기 결합력이 향상됨을 알 수 있었다(도 4I). 이 결과는 sLZIP 단백질이 HDAC3 및 사이클린 D3/CDK11^{p58}-인산화된 안드로겐 수용체와 상호작용함으로써 공-억제자로서 기능을 함을 나타낸다.

[70]

[71] <실시예 5>

[72] sLZIP 단백질의 안드로겐 의존적 사이클린 D3 프로모터에의 결합

[73] 사이클린 D3 발현은 mTOR 활성을 통한 DHT 자극에 의해 증가한다(Xu et al, 2006). 사이클린 D3 발현에 대한 sLZIP 단백질의 영향의 메커니즘을 알아보기 위해서 LNCaP세포에서, DHT에 반응하여 sLZIP 단백질에 의한 시간에 따른 사이클린 D3의 발현을 실험하였다. LNCaP 세포를 mGST-mock 또는 mGST-sLZIP 단백질 (2 μg)으로 감염시켰다. 24시간 후, 차콜-스트립트 배지 내의 세포를 소정의 기간 동안 10 nMDHT로 처리하였다. 총 세포를 회수하고 웨스턴 블롯팅을 수행했다. DHT와 반응한 사이클린 D3 발현은 시간에 따라 증가했고 DHT의 부재 하에서는 sLZIP 단백질이 사이클린 D3의 발현을 유도했다(도 5A). 그러나, sLZIP 단백질에 의해 유도된 사이클린 D3 발현 정도는 DHT 처리 시간에 의해 영향을 받지 않았다(도 5A). DHT의 영향에 대해 실험하기 위한 양성 대조군으로 PSA를 사용하였다. sLZIP 단백질의 AP-1 (-574/-563)에의 결합이 안드로겐 의존적인지 알아보기 위한 EMSA를 수행하였다. 핵 추출을 준비하고 사이클린 D3 프로모터 내의 AP-1 모티프를 함유한 방사선 표지된 올리고뉴클레오티드로 인큐베이트했다. 50배 몰 초과량의 표지되지 않은 AP-1을 이용하여 경쟁반응을 수행했다. 그 결과 sLZIP 단백질이 안드로겐 의존적으로 사이클린 D3 발현을 조절한다는 것을 알았다(도 5B). 안드로겐에 의해 유도된 사이클린 D3 프로모터로부터의 sLZIP 단백질의 해리가 AR-ARE 결합력에 미치는 영향을 실험하였다. 핵 추출물을 회수하고 γ-^{32}P-표지된 ARE 프로브를 이용하여 EMSA를 수행하였다. 50배 몰 초과량의 표지되지 않은 ARE를 이용하여 경쟁반응을 수행하였다(도 5C). sLZIP 단백질이 AR과 상호작용함에 의해 AR-ARE 결합력을 조절하는지 알아보기 위해 면역침강법을 수행하였다. 항-안드로겐 수용체 항체를 이용하여 세포 용해물로 면역침강을 수행하였다. 10% SDS-PAGE 에 의해 비드에 결합된 단백질을 분석하고 항-GST 항체를 이용하여 면역블롯팅 하였다. (도 5D). 이들 결과, sLZIP 단백질이 DHT와 반응하여 사이클린 D3 프로모터로부터 해리되고 공-억제자로서 사이클린 D3/CDK11^{P58}복합체에 결합함으로써 AR-ARE 결합활성을 억제함을 알 수 있었다(도 5C 및 도 5D).

[74]

[75] <실시예 6>

[76] sLZIP 단백질의 안드로겐 의존적 전립선암세포의 증식 억제효과

[77] 사이클린 D3 발현 및 안드로겐 수용체와의 상호작용을 통해서 sLZIP 단백질이 안드로겐 의존적 전립선암세포의 성장에 영향을 미치는지 조사하였다. 세포 증식 어세이는 MTT법을 기본으로 하였다. 플라스미드의 감염 후에, 세포를 1 $\times 10^3$ 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 72시간 동안 세포를 10 nM DHT로 처리하거나 처리하지 않았다. MTT를 가하고, 1시간 동안

인큐베이트하고 포르마잔 결정을 용해시키기 위해 디메틸설폭사이드 가하였다. 마이크로플레이트 오토리더 (Bio-Rad)를 이용하여 595 nM에서 흡수를 측정하였다. 각 실험을 세 번씩 반복하였고 통계적 분석은 앞서 기술한 바와 같다.

[78] LNCaP 세포를 sLZIP 단백질, si-sLZIP 단백질, 사이클린 D3 또는 si-사이클린 D3으로 감염시켰다. 10% 차콜-스트립트 배지의 세포를 소정의 기간 동안 10 nM DHT 로 처리하거나 처리하지 않고 MTT 어세이를 통하여 세포 생존능을 평가했다(도 6A 및 B). sLZIP 단백질이 과발현된 경우 및 si-sLZIP 단백질이 발현된 경우에 있어서, LNCaP 세포의 성장 속도에 대해 실험하였다(도 6A). DHT 존재 하에서 sLZIP 단백질이 과발현되는 LNCaP 세포는 대조군과 비교하여 성장속도가 감소했다(도 6A). 그러나, si-sLZIP 단백질을 발현하는 세포는 세포 성장 속도가 증가하였다. sLZIP 단백질, 사이클린 D3, si-사이클린 D3로 감염된 경우 및 sLZIP 단백질과 si-사이클린 D3에 동시에 감염된 경우에 있어서 세포 성장 속도에 대하여 실험하였다(도 6B). DHT 존재 하에서, 사이클린 D3는 LNCaP 세포의 성장을 억제했고 si-사이클린 D3는 세포 성장을 회복시켰다(도 6B). sLZIP 단백질 및 si-사이클린 D3로 공-감염된 경우에는 안드로겐 의존적 전립선암 세포의 성장이 부분적으로 회복되었다(도 6B). 이들 결과는 콜로니 형성 어세이(colony forming assay) 및 세포 성장 어세이를 수행하여 확인할 수 있었다(도 6C). LNCaP 세포를 sLZIP 단백질, si-sLZIP 단백질, 사이클린 D3 또는 si-사이클린 D3로 감염시켰다. 콜로니 형성 어세이를 위하여, 세포를 6-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 밀도로 시딩하고 부착을 위해 24시간 보관하였다. 그리고 나서 세포를 10 nM DHT로 처리하거나 처리하지 않았다. 10일 후에, 실온에서 10분 동안 콜로니를 고정액(메탄올: 아세트산 = 3:1)으로 고정하고 0.01% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다(도 6C). 이로써 sLZIP 단백질이 안드로겐 의존적 전립선암 세포의 성장에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

[79]

청구범위

[청구항 1] 인간 작은 류신 지퍼 단백질(sLZIP)을 포함하는 안드로겐 의존성 전립선암 치료용 의약 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 인간 작은 류신 지퍼 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것인 의약 조성물.

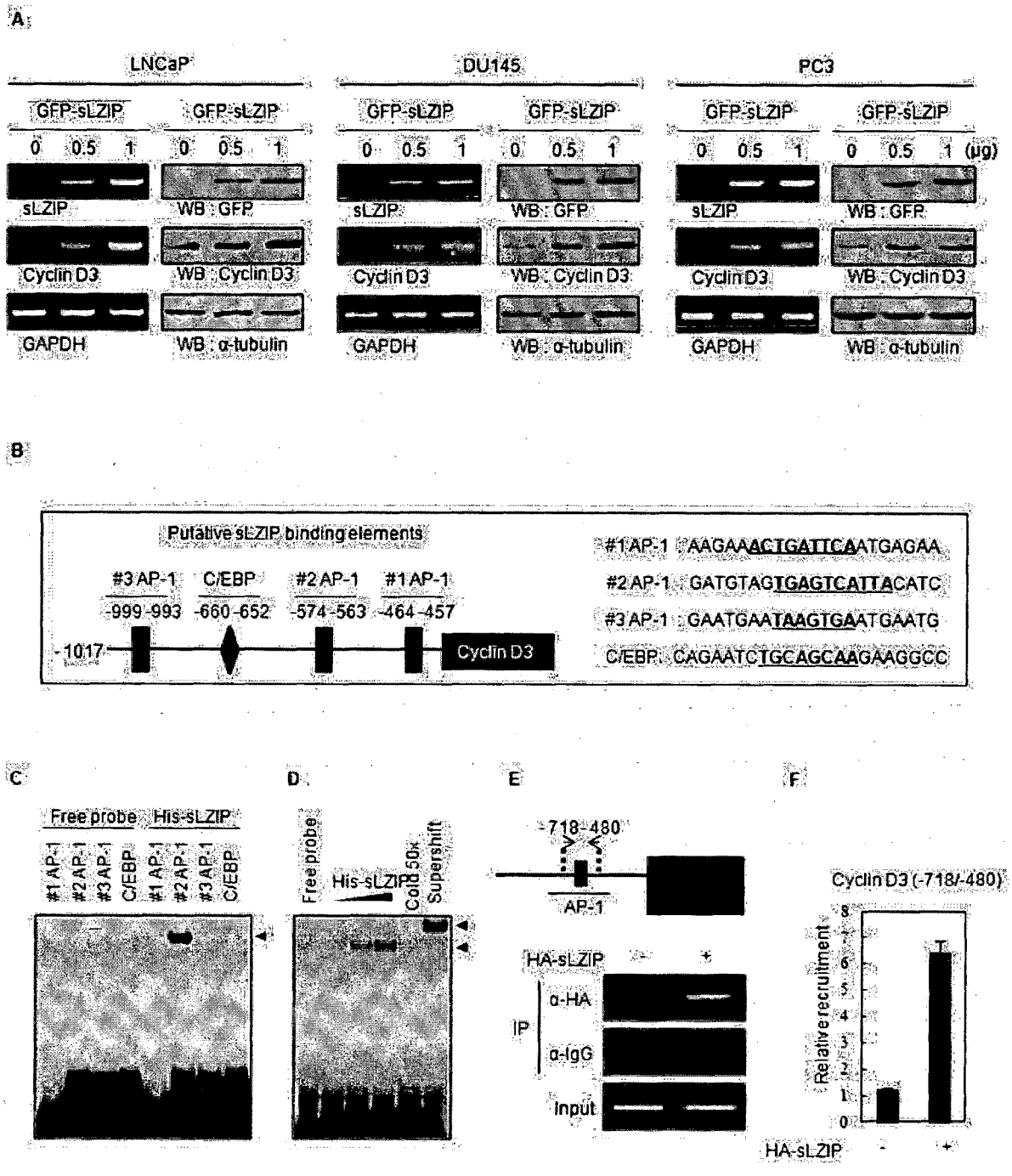
[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 의약 조성물은 비경구 투여를 위한 제제인 것인 의약 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 제제는 비수성용제, 현탁제, 유제 또는 동결건조 제제인 의약 조성물.

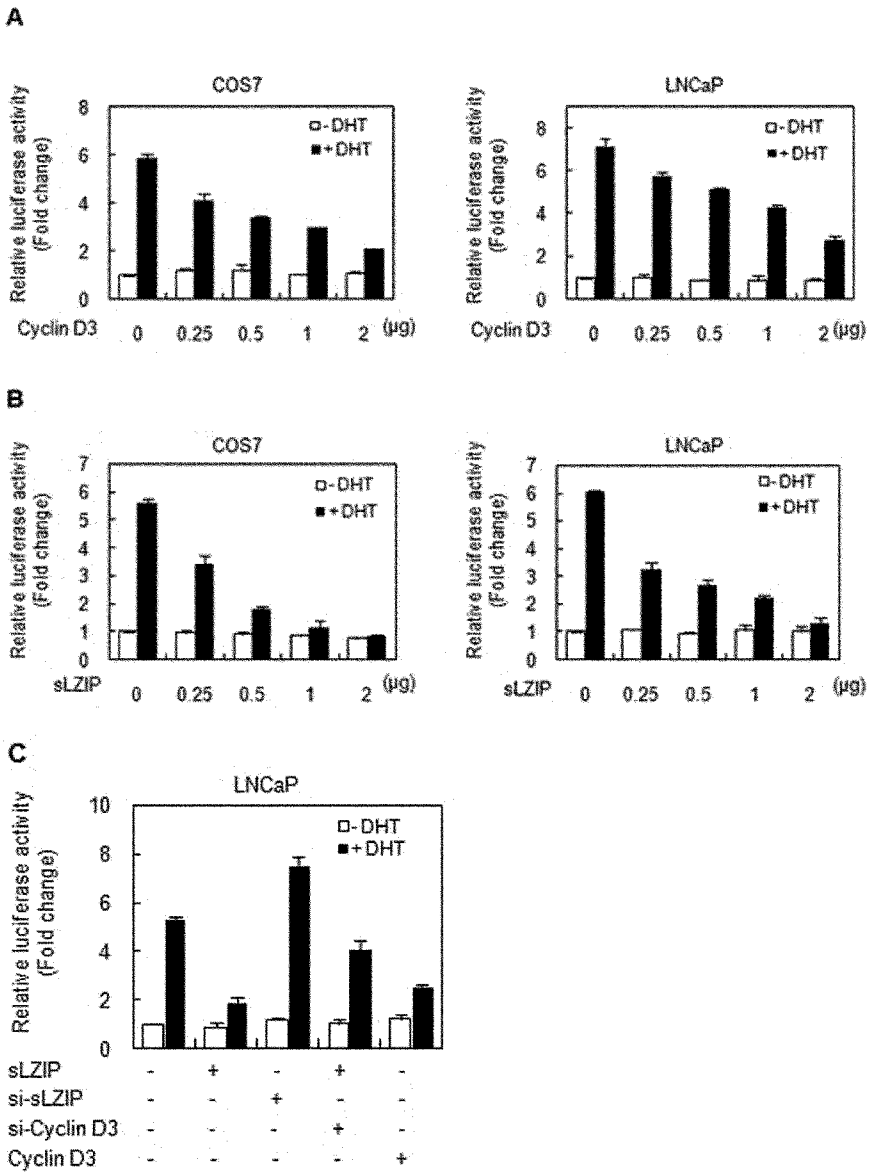
[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 의약 조성물은 제 2 전립선암 치료제와 병용하는 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 제 2 전립선암 치료제는 도세탁셀, 아비라테론, 엔잘루타미드 및 비칼루타미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 의약 조성물.

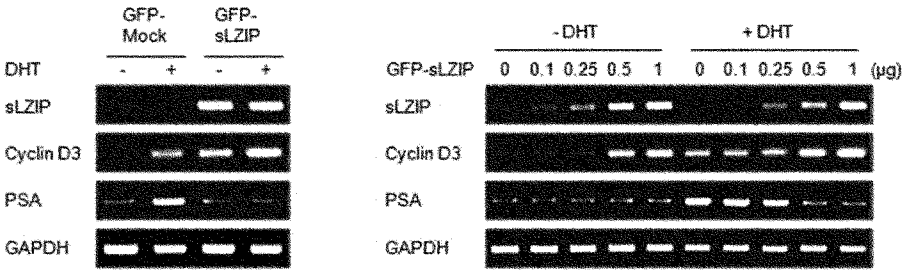
[Fig. 1]


A
LNCaP
DU145
PC3
GFP-sLZIP
0 0.5 1 (μg)
sLZIP
WB : GFP
Cyclin D3
WB : Cyclin D3
GAPDH
WB : α-tubulin
B
Putative sLZIP binding elements
#3 AP-1
C/EBP
#2 AP-1
#1 AP-1
-999 -993
-660 -652
-574 -563
-464 -457
-1017
Cyclin D3
#1 AP-1 AAGAAACTGATTCAATGAGAA
#2 AP-1 GATGTAGTGAGTCATTACATC
#3 AP-1 GAATGAATAAGTGAATGAATG
C/EBP CAGAATCTGCAGCAAGAAGGCC
C
Free probe
His-sLZIP
#1 AP-1
#2 AP-1
#3 AP-1
C/EBP
D
Free probe
His-sLZIP
Cold 50×
Supershift
E
-718 -480
AP-1
HA-sLZIP
IP
α-HA
α-IgG
Input
F
Cyclin D3 (-718/-480)
Relative recruitment
HA-sLZIP

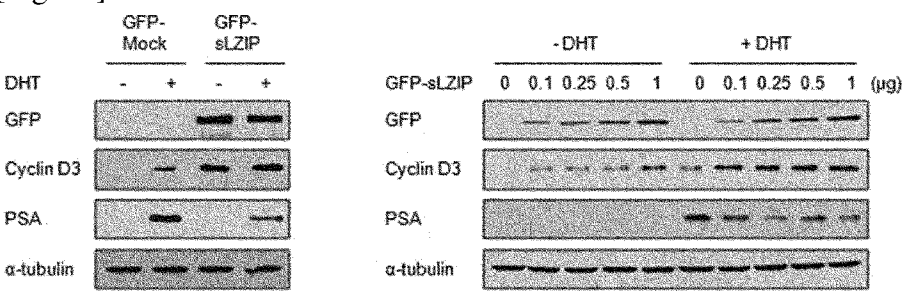
[Fig. 2]



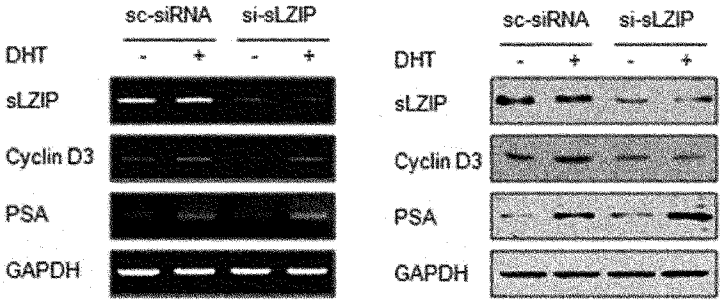
[Fig. 3a]



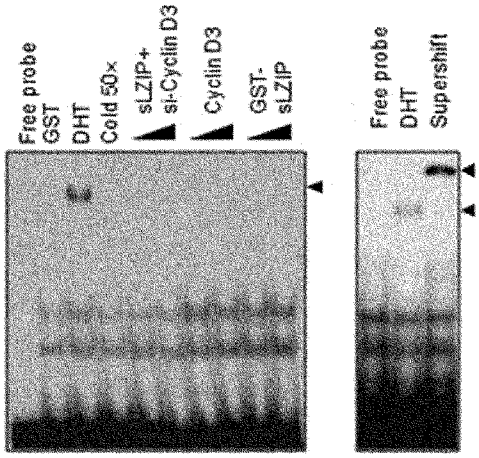
[Fig. 3b]



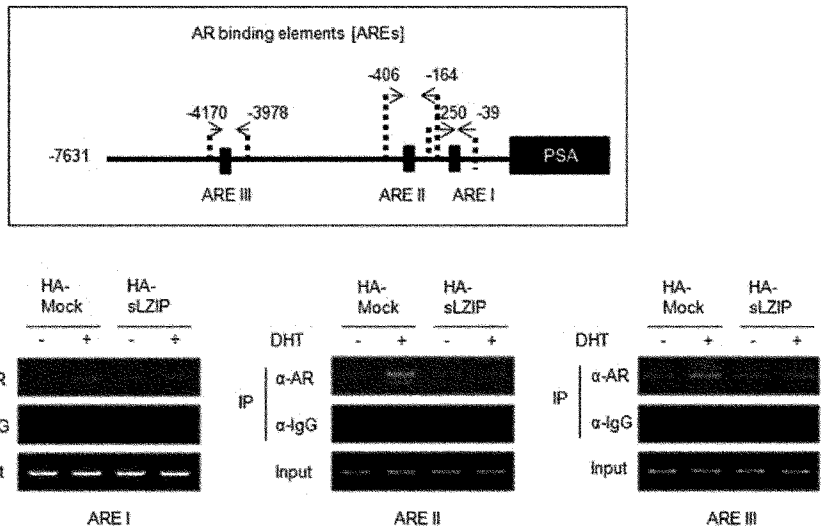
[Fig. 3c]



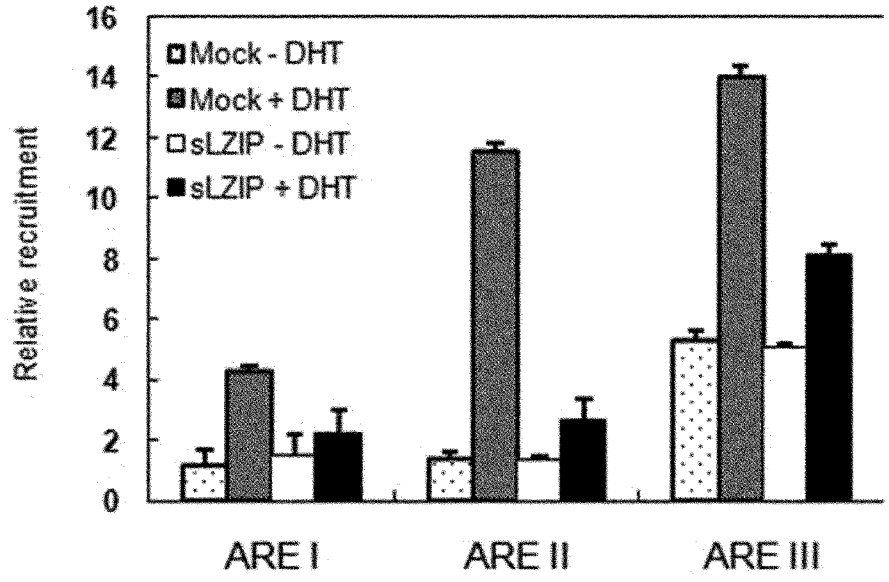
[Fig. 3d]



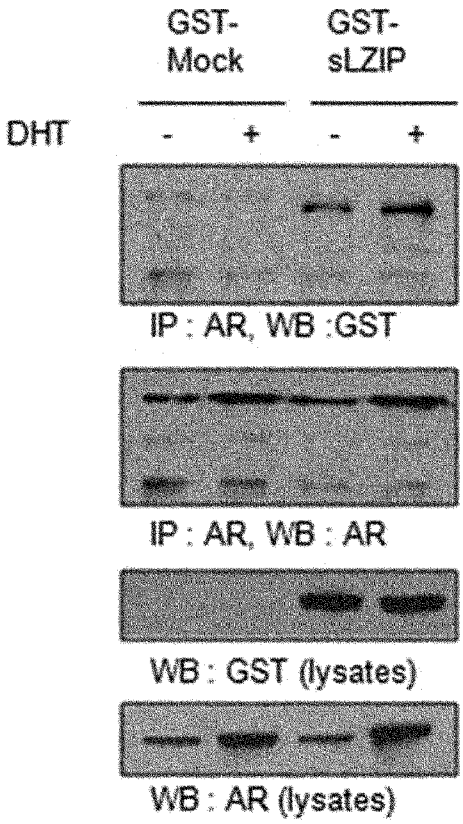
[Fig. 3e]



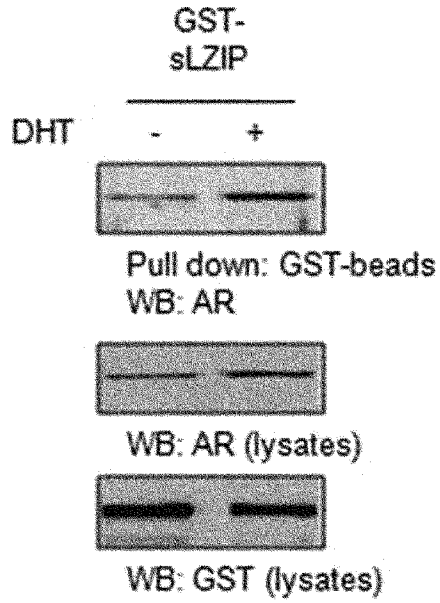
[Fig. 3f]


16
14
12
10
8
6
4
2
0
Relative recruitment
Mock - DHT
Mock + DHT
sLZIP - DHT
sLZIP + DHT
ARE I
ARE II
ARE III

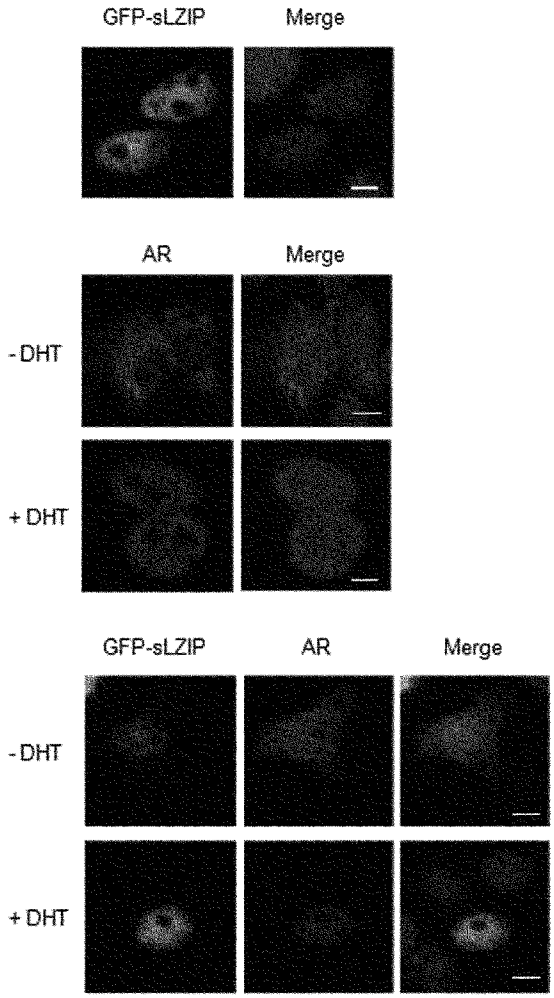
[Fig. 4a]


GST-
Mock
GST-
sLZIP
DHT
-
+
-
+
IP : AR, WB :GST
IP : AR, WB : AR
WB : GST (lysates)
WB : AR (lysates)

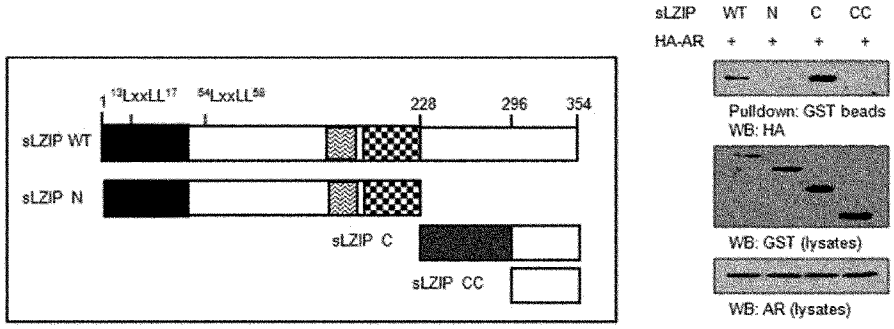
[Fig. 4b]


GST-
sLZIP
DHT
-
+
Pull down: GST-beads
WB: AR
WB: AR (lysates)
WB: GST (lysates)

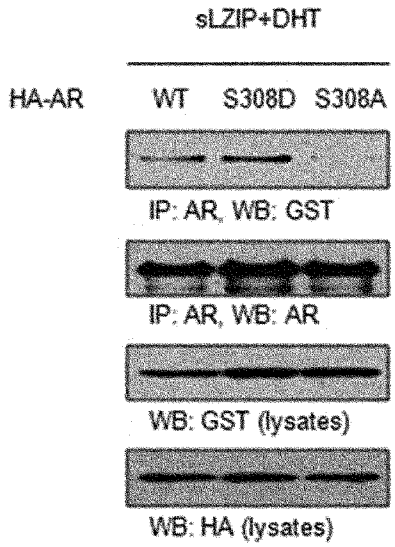
[Fig. 4c]


GFP-sLZIP
Merge
AR
Merge
- DHT
+ DHT
GFP-sLZIP
AR
Merge
- DHT
+ DHT

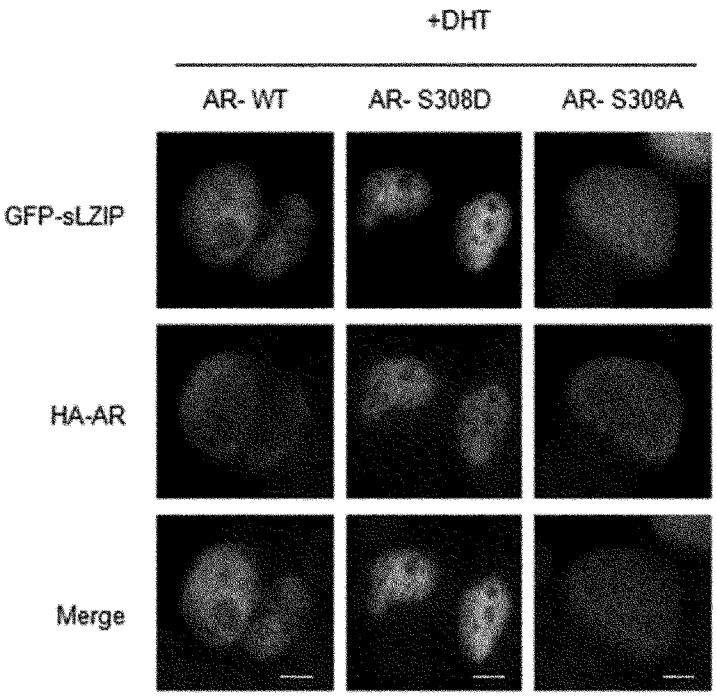
[Fig. 4d]



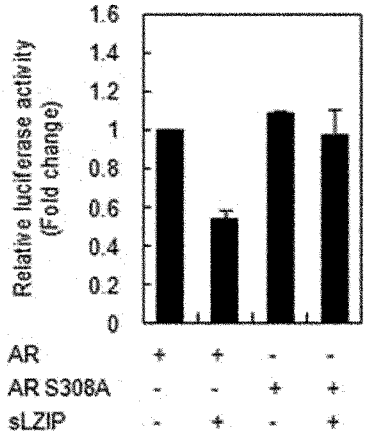
[Fig. 4e]



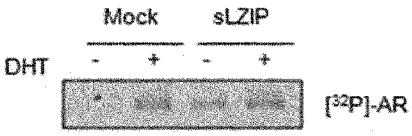
[Fig. 4f]



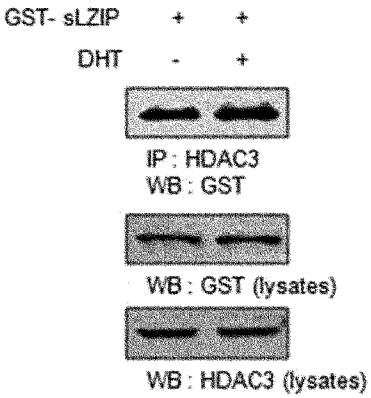
[Fig. 4g]



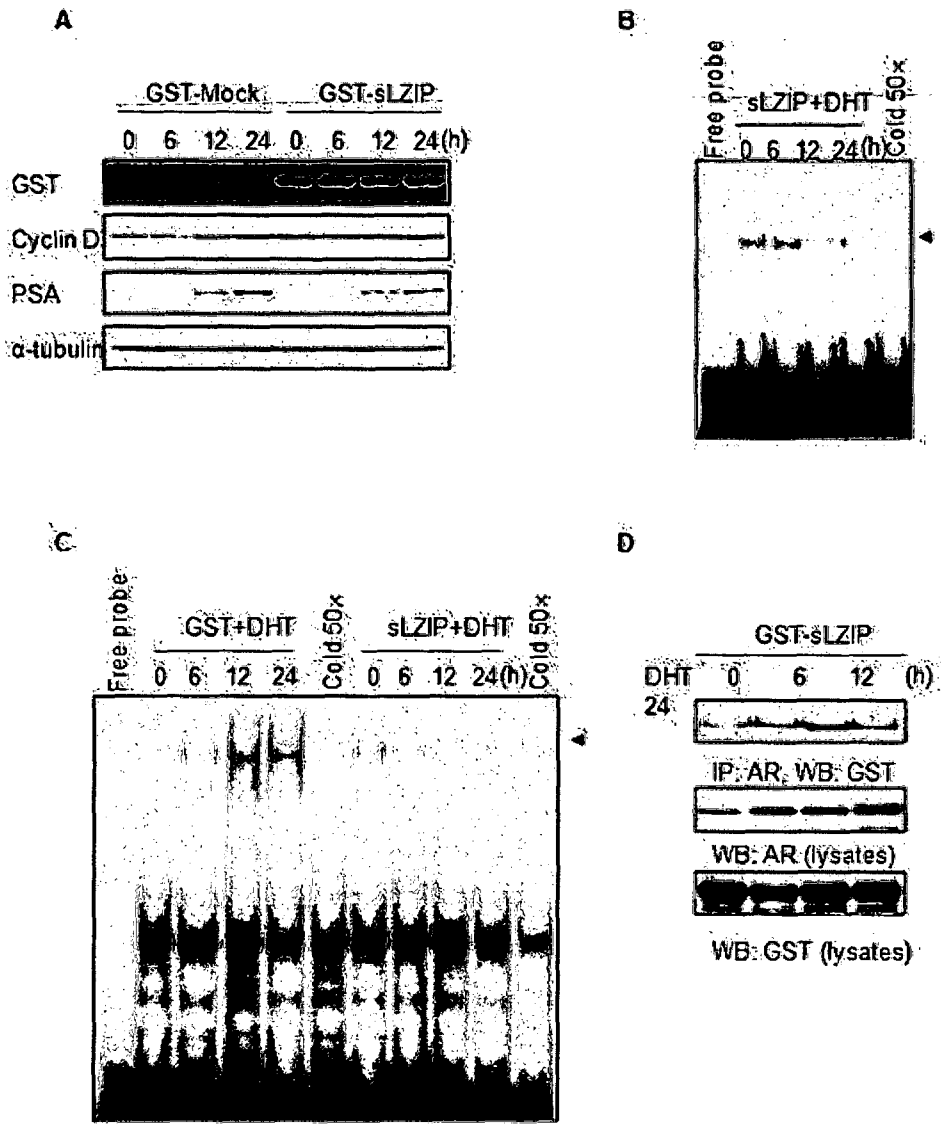
[Fig. 4h]



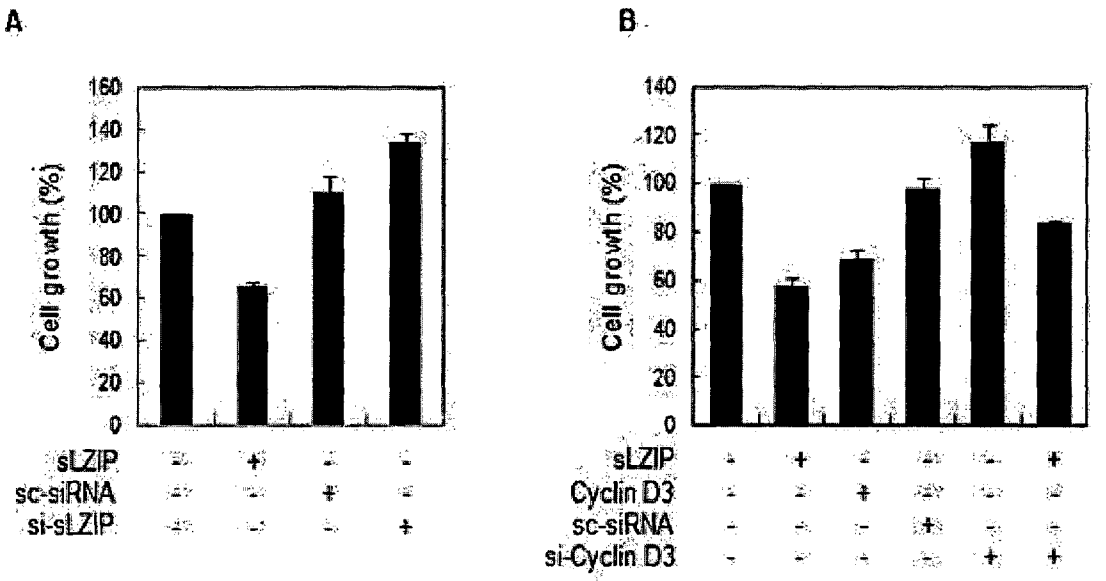
[Fig. 4i]

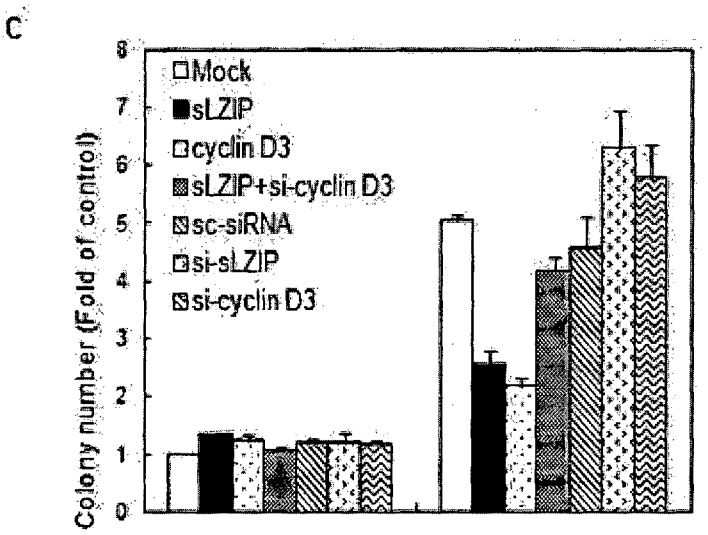


[Fig. 5]


A
GST-Mock
GST-sLZIP
0 6 12 24 0 6 12 24(h)
GST
Cyclin D
PSA
α-tubulin
B
Free probe
sLZIP+DHT
Cold 50×
0 6 12 24(h)
C
Free probe
GST+DHT
Cold 50×
sLZIP+DHT
Cold 50×
0 6 12 24 0 6 12 24(h)
D
GST-sLZIP
DHT
0 6 12 (h)
24
IP: AR, WB: GST
WB: AR (lysates)
WB: GST (lysates)

[Fig. 6]


A
Cell growth (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
sLZIP
sc-siRNA
si-sLZIP
B
Cell growth (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
sLZIP
Cyclin D3
sc-siRNA
si-Cyclin D3


C
Colony number (Fold of control)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Mock
sLZIP
cyclin D3
sLZIP+si-cyclin D3
sc-siRNA
si-sLZIP
si-cyclin D3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 48/00(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 38/17; A61K 39/395; A61P 31/00; C07K 16/30; C12Q 1/68; A61K 38/16; A61K 48/00; 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: prostate cancer, small leucine zipper protein (sLZIP)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Yun Seo, "The role of human small leucine zipper protein in prostate cancer" Doctoral thesis, Korea University Graduate School of Life Sciences and Biotechnology (December 2012)	1,3-6
Y	See abstract and page 99, lines 2-5, page 105, lines 11-13.	2
Y	NCBI, GenBank accession no. ACN32251.1 (03 November 2009) See the entire document.	2
A	US 2006-0257880 A1 (REES et al.) 16 November 2006 See claims 1, 21.	1-6
A	SELLS et al., "Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis" Molecular and Cellular Biology, vol. 17, no. 7, pages 3823-3832 (July 1997) See page 3824, right column.	1-6
A	US 2009-0087432 A1 (SLIWKOWSKI) 02 April 2009 See claim 1.	1-6

☐ 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	Date of mailing of the international search report
29 APRIL 2014 (29.04.2014)	**01 MAY 2014 (01.05.2014)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/001275

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0257880 A1	16/11/2006	CA 2537140 A1	10/03/2005
		EP 1660526 A1	31/05/2006
		US 2010-0297136 A1	25/11/2010
		WO 2005-021588 A1	10/03/2005
US 2009-0087432 A1	02/04/2009	AT 355079 T	15/03/2006
		AU 2001-499200 A	31/01/2001
		AU 779209 B2	13/01/2005
		BR 0012195 A	23/07/2002
		CA 2383493 A1	04/01/2001
		CA 2383493 C	10/08/2010
		CN 100381172 C	16/04/2008
		CN 1379684 A	13/11/2002
		DE 60033658 D1	12/04/2007
		DE 60033658 T2	22/11/2007
		DK 1189634 T3	25/06/2007
		EP 1189634 A1	27/03/2002
		EP 1189634 B1	28/02/2007
		ES 2282120 T3	16/10/2007
		IL 147017 D0	14/08/2002
		JP 04579471 B2	10/11/2010
		JP 2003-503361 A	28/01/2003
		JP 2009-269928 A	19/11/2009
		MX PA01013395 A	04/09/2003
		PT 1189634 E	06/06/2007
		US 2006-0083739 A1	20/04/2006
		WO 01-00238 A1	04/01/2001
		ZA 200110088 A	26/08/2002

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001275

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17; A61K 39/395; A61P 31/00; C07K 16/30; C12Q 1/68; A61K 38/16; A61K 48/00; 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: 전립선암(prostate cancer), 인간 작은 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein (sLZIP))

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	김윤서, `The role of human small leucine zipper protein in prostate cancer' 박사학위논문, 고려대학교 생명과학화 대학원 (2012.12.) 요약 및 페이지 99, 라인 2-5, 페이지 105, 라인 11-13 참조.	1,3-6
Y		2
Y	NCBI, GenBank accession no. ACN32251.1 (2009.11.03.) 전체 문헌 참조.	2
A	US 2006-0257880 A1 (REES 외) 2006.11.16 청구항 1, 21 참조.	1-6
A	SELLS 외, `Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis' Molecular and Cellular Biology, 17권, 7호, 페이지 3823-3832 (1997.07.) 페이지 3824, 컬럼 오른쪽 참조.	1-6
A	US 2009-0087432 A1 (SLIWKOWSKI) 2009.04.02 청구항 1 참조.	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 04월 29일 (29.04.2014)	2014년 05월 01일 (01.05.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001275

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

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

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

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

3. 추가 의견:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/001275

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0257880 A1	2006/11/16	CA 2537140 A1	2005/03/10
		EP 1660526 A1	2006/05/31
		US 2010-0297136 A1	2010/11/25
		WO 2005-021588 A1	2005/03/10
US 2009-0087432 A1	2009/04/02	AT 355079 T	2006/03/15
		AU 2001-499200 A	2001/01/31
		AU 779209 B2	2005/01/13
		BR 0012195 A	2002/07/23
		CA 2383493 A1	2001/01/04
		CA 2383493 C	2010/08/10
		CN 100381172 C	2008/04/16
		CN 1379684 A	2002/11/13
		DE 60033658 D1	2007/04/12
		DE 60033658 T2	2007/11/22
		DK 1189634 T3	2007/06/25
		EP 1189634 A1	2002/03/27
		EP 1189634 B1	2007/02/28
		ES 2282120 T3	2007/10/16
		IL 147017 D0	2002/08/14
		JP 04579471 B2	2010/11/10
		JP 2003-503361 A	2003/01/28
		JP 2009-269928 A	2009/11/19
		MX PA01013395 A	2003/09/04
		PT 1189634 E	2007/06/06
		US 2006-0083739 A1	2006/04/20
		WO 01-00238 A1	2001/01/04
		ZA 200110088 A	2002/08/26