

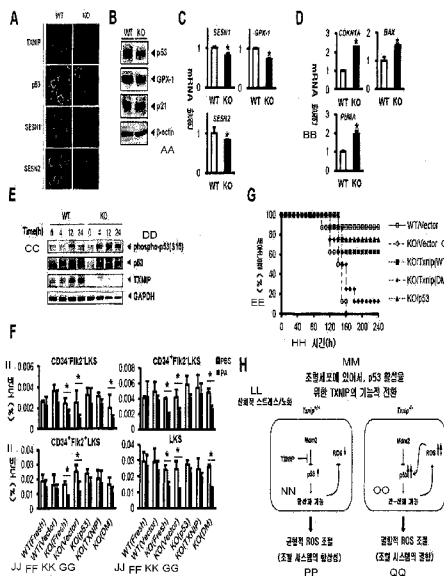


- (51) 국제특허분류: A61K 48/00 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003786
- (22) 국제출원일: 2014년 4월 29일 (29.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0067238 2013년 6월 12일 (12.06.2013) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCEINCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 최인표 (CHOI, In Pyo); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정해용 (JUNG, Haiyoung); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김미정 (KIM, Mi jung); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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 CONTAINING THIOREDOXIN-BINDING PROTEIN AS ACTIVE INGREDIENT AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 티오레독신-결합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a composition, containing thioredoxin-binding protein (TXNIP) as an active ingredient, for boosting immunity, inhibiting cancer metastasis, and preventing and treating blood diseases. More specifically, it is confirmed that the frequency of hematopoietic stem cells and myeloproliferative ability decrease in TXNIP-deficient mice, and that the myeloproliferative ability of marrow cells, which are derived from the TXNIP-deficient mice, decreases through bone-marrow transplantation. Additionally, it is confirmed that the level of reactive oxygen species increases and apoptosis is induced in TXNIP knockout mice and TXNIP-deficient cell strains, under oxidative stress conditions, and that the myeloproliferative ability of the cell strains derived from the TXNIP knockout mice decreases. Furthermore, it is confirmed that cancer metastasis increases and p53 expression decreases in the TXNIP knockout mice under oxidative stress conditions. Moreover, direct binding sites between TXNIP and p53 are identified, and it is confirmed that the binding increases under oxidative stress conditions, thereby enhancing p53-mediated transcriptional activities and p53-mediated antioxidant activities, such that a gene carrier, a cell or a TXNIP protein, which includes the TXNIP gene of the present invention, can be effectively used as a method or a composition for boosting immunity, inhibiting cancer metastasis and preventing and treating blood diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

AA ... β-actin
BB ... mRNA expression
CC, HH ... Time (h)
DD ... phospho-p53 (S15)
EE ... Survival rate (%)
FF ... WT/Vector
GG ... KO/Vector
II ... Frequency (%)
JJ ... WT (Fresh)
KK ... KO (Fresh)
LL ... Oxidative stress/aging
MM ... Functional conversion of TXNIP for p53 activity in hematopoietic cells
NN ... Antioxidant function
OO ... Pro-oxidant function
PP ... Balanced ROS regulation (homeostasis of hematopoietic system)
QQ ... Defective ROS regulation (defect of hematopoietic system)



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 티오레독신-결합 단백질(thioredoxin-binding protein; TXNIP)을 유효성분으로 포함하는 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, TXNIP 결핍 마우스에서 조혈모세포의 빈도가 감소하고, 골수증식 능력이 감소하며, 골수이식을 통해 TXNIP 결핍 마우스-유래 골수세포의 증식능력이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 산화적 스트레스 조건하의 TXNIP 녹아웃 마우스 및 TXNIP 결핍 세포주에서 활성산소의 수준이 증가하고, 세포사멸을 유도하며, 상기 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 세포주의 골수증식 능력이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 산화적 스트레스 조건하의 TXNIP 녹아웃 마우스에서 암 전이가 증가하는 것을 확인하였고, p53의 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, TXNIP 및 p53 사이에 직접적인 결합 위치를 확인하였고, 상기 결합이 산화적 스트레스 조건하에서 증가하며, 이로 인하여 p53-매개의 전사활성이 증가하고, 또한, p53-매개 항산화활성이 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명의 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질이 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환 예방 및 치료방법, 또는 이들의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

티오레독신-결합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 이의
용도

5

【기술분야】

본 발명은 티오레독신-결합 단백질(thioredoxin-binding protein; TXNIP)을
유효성분으로 포함하는 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환 예방 및 치료방법, 또
는 이들의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

10

【배경기술】

산화적 스트레스(oxidative stress) 세포 내에 활성산소(reactive oxygen
species; ROS)가 과도하게 축적 또는 항산화 방어 시스템(antioxidant defense
system)의 결핍으로 발행한다. 산화적 스트레스는 당뇨, 퇴행성 뇌질환 및 암과
15 같은 다양한 병리학적 질환을 유도하고(Hole et al., 2011; Sinha et al., 2013),
조혈작용에 있어서, 활성산소의 조절이 중요한 요소임이 확인되었다. 조혈세포
(hematopoietic cell)는 산화적 스트레스에 취약하고, 조혈조직(hematopoietic
tissue)의 악성화가 만성 산화적 스트레스 조건하에서 관찰되었다(Ghaffari, 2008).
조혈조직에 있어서, 산화환원 상태의 항상성 조절이 정상적인 조혈과정을 위해 중
20 요하다.

조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)는 숙주가 일생동안 생산해내는
조혈세포계(hematopoietic cell lineages)의 저장소이다. 상기 조혈모세포 풀은
골수세포(bone marrow; BM)에 있어서, 그들의 무활동(quiescence) 조절 및 자기재
25 생(self-renewal)을 유지한다(Abbas et al., 2010; Rathinam et al., 2011)

Scheller et al., 2008). 상기 조혈모세포는 낮은 세포 내 활성산소 수준을 유지하고 있고, 조혈모세포 풀을 유지하기 위하여 조혈모세포 내 산화적 스트레스의 적절한 조절이 요구된다(Blank et al., 2008; Naka et al., 2008). 최근의 몇몇 연구에 의하면 조혈모세포의 기능에 있어서, 활성산소의 유도를 통해 기능 결핍에 관여하는 동정하였다(Ito et al., 2004; Ito et al., 2006; Miyamoto et al., 2007).

티오레독신-결합 단백질(Thioredoxin-interacting protein; TXNIP)는 397개의 아미노산으로 구성된 50 kDa.의 단백질로 아레스틴과(arrestin family)에 포함된다. *Txnip*^{-/-} 마우스는 간세포암(hepatocellular carcinoma)의 높은 발생율을 나타내고(Jeong et al., 2009; Kwon et al., 2011; Lee et al., 2005; Song et al., 2003), TXNIP의 발현은 다양한 종류의 종양을 감소시키며, TXNIP의 과발현은 세포 주기 진행(cell-cycle progression)을 억제함으로써 종양의 성장을 억제한다(Han et al., 2003). *Txnip*^{-/-} 마우스의 골수세포에 있어서 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)의 수는 감소하고, 장기간 복원된 조혈모세포 집단은 고갈된 표현형(exhausted phenotype)을 나타내고, 빈도(frequency)도 감소하는 것이 확인되었다(Jeong et al., 2009; Lee et al., 2005).

종양 억제단백질인 p53은 유전적 스트레스(genotoxic stress)에 대한 반응으로 성장중지(growth arrest) 또는 세포사멸(apoptosis)을 통하여 비정상적 세포의 확장(expansion)을 제한하는 역할을 한다(Olovnikov et al., 2009; Sablina et al., 2005). p53 경로는 프로테오소말 분해(proteosomal degradation)를 위해서 p53 표적 단백질인 E3 유비퀴틴 리가아제(E3 ubiquitin ligase) 기능을 하는 MDM2(mouse double minute 2)에 의해서 조절된다(Sasaki et al., 2011). p53은 항-세포사멸 또는 항-산화 유전자의 발현 유도에 의해 강한 전-생존 경로(pro-survival pathway)에 작용한다(Bensaad and Vousden, 2007; Janicke et al., 2008).

이전 연구에 의하면 조혈세포 풀의 유지에 있어서, TXNIP의 항-노화(anti-aging) 효과에 대해 밝혀진바 있다(Jeong et al., 2009; Kim et al., 2007).

이에 본 발명자들은 항산화 스트레스를 억제함으로써 조혈세포에서 면역증
5 강 효과를 나타내는 약학적 조성물을 연구하던 중, TXNIP 결핍 마우스에서 조혈
모세포의 빈도가 감소하고, 골수증식 능력이 감소하며, 골수이식을 통해 TXNIP 결
핍 마우스-유래 골수세포의 증식능력이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 산화적
스트레스 조건하의 TXNIP 녹아웃 마우스 및 TXNIP 결핍 세포주에서 활성산소의 수
10 준이 증가하고, 세포사멸을 유도하며, 상기 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 세포주의 골
수증식 능력이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 산화적 스트레스 조건하의 TXNIP
녹아웃 마우스에서 암 전이가 증가하는 것을 확인하였고, p53의 발현이 감소함을
확인하였다. 또한, TXNIP 및 p53 사이에 직접적인 결합 위치를 확인하였고, 상기
결합이 산화적 스트레스 조건하에서 증가하며, 이로 인하여 p53-매개의 전사활성이
증가하고, 또한, p53-매개 항산화활성이 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완
15 성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 티오레독신-결합 단백질(thioredoxin-binding protein;
20 TXNIP)을 유효성분으로 포함하는 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환 예방 및 치
료방법, 또는 이들의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TXNIP(Thioredoxin-interacting
25 protein) 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 유효성분으

로 함유하는 면역증강용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 전이억제용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 *XNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 전이억제용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈액질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈액질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 면역 이상이 생긴 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역증강방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 전이된 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 억제 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 혈액질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈액질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자

전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈액질환 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 면역증강용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

5 또한, 본 발명은 암 전이 억제용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 암 전이 예방용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 혈액질환 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 혈액질환 예방용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

15 본 발명은 *TXNIP*(Thioredoxin-interacting protein) 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학적 조성물을 제공한다.

20 상기 TXNIP 유전자는 서열번호 29 및 30으로 구성된 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 유전자 전달체는 벡터 또는 재조합 바이러스인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것이 바람직하고, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로 구성된 군으로부터 선
25 택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 세포는 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)인 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 면역증강은 면역 시스템의 항상성 유지에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 또한, 이는 조혈모세포의 항상성 유지에 의한 것이 바람직하나
5 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 면역증강은 TXNIP 및 p53 사이의 상호작용(interaction)에 의한 항산화 활성화에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 TXNIP 녹아웃 마우스에서 조혈모세포의 빈도(frequency)가 감소하고(도 1A 참조), 전체 골수세포의 골수증식
10 능력이 감소하며(도 1C 참조), TXNIP 녹아웃 마우스로부터 골수이식을 받은 마우스에서도 전체 골수세포 및 조혈모세포의 빈도가 감소함을 확인하였다(도 1D 참조). 또한, 상기 결과는 골수이식을 2번 반복한 후에도 동일한 결과를 나타내었다(도 1E 및 1F 참조). 또한, TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포에서 활성산소의 수준이 증가하고(도 2A 내지 2C 참조), 이는 세포사멸을 유도함을 확인하였다(도 2D 참조).
15 또한, 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 골수증식 능력이 감소하고(도 3B 및 3C 참조), 상기 마우스 유래 골수세포의 집락형성-비장(colony forming unit-spleen; CFU-S)의 수가 감소하며(도 3D 참조), 이들 마우스는 낮은 생존율을 나타내는 것을 확인하였다(도 3E 참조). 또한, TXNIP 녹아웃 마우스로부터 분리된 조혈모세포의 골수증식 능력이 감소하고(도 3F 및 3G 참조), 산화적 스
20 트레스 조건하에서 상기 TXNIP 녹아웃 마우스의 생존율이 감소하며(도 4A 참조), 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포를 이식한 수여체의 생존율 또한 감소함을 확인하였다(도 4B 참조). 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 비장크기 및 세포질이 감소하고(도 4C 참조), 흉선에 손상이 발생하였으며(도 4E 참조), 상기 마우스에서 세포사멸이 증가하였고(도 4D), 암
25 전이가 증가하는 것을 확인하였다(도 4F 및 4G 참조). 또한, 골수세포에서 활성산

소 및 TXNIP 발현 수준 및 TXNIP 녹아웃 골수세포에서 p53 발현 및 활성산소의 수준이 역상관관계(inverse correlation)가 있음을 확인하였다(도 5A 내지 5D 참조). 또한, p53^{-/-} 조혈모세포에서 활성산소의 수준이 높고(도 5E 참조), p53을 억제하는 경우 TXNIP^{-/-} 조혈모세포에서 활성산소의 수준이 증가하며(도 5F 및 5G 참조), 산화적 스트레스 조건하에서도 p53^{-/-} 조혈모세포에서 활성산소의 수준이 증가하는 것을 확인하였다(도 5H 참조). 또한, 산화적 스트레스 조건하에서 p53^{-/-} 마우스 및 p53 억제제를 처리한 마우스의 생존율이 감소함을 확인하였다(도 5I 및 5J 참조). 또한, TXNIP 및 p53에서 상호작용하는 위치를 확인하고(도 6A 및 6B 참조), 산화적 스트레스 조건하에서 상기 TXNIP 및 p53의 상호작용이 증가하며(도 6C 참조), p53과 상호작용하는 TXNIP 부위에 돌연변이를 유발한 이중 돌연변이형 TXNIP는 세포 내에서 p53과 동일한 위치에 존재하지 않는 것을 확인하였다(도 6D 참조). 또한, TXNIP에 의해서 p53 및 MDM2(mouse double minute 2) 사이의 상호작용이 감소하고(도 6E 참조), TXNIP 및 p53의 상호작용에 의해서 p53-매개 전사활성이 증가함을 확인하였다(도 6F 참조). 또한, 조혈세포에서 p53 및 이의 표적 단백질의 발현을 확인하고(도 7A 및 7B 참조), TXNIP가 결핍된 경우, p53 표적 단백질의 발현이 감소하며(도 7C 참조), 상기 TXNIP 결핍 세포주에서 산화촉진 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 7D 참조). 또한, TXNIP의 발현변화에 따라서 p53의 활성화에 변화가 있고(도 7E 참조), TXNIP 결핍 골수세포 또는 마우스에 야생형의 p53 또는 TXNIP를 형질주입하였을 때, 조혈모세포의 빈도가 회복되고, 마우스의 생존율이 증가하는 것을 확인하였다(도 7F 및 7G 참조).

따라서, 본 발명자들은 TXNIP가 생체 내에서 p53과의 상호작용을 통해 항산화 활성을 나타냄으로써, 면역증강, 암 전이 억제 및 혈액질환 치료용 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다.

본 발명의 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백

질을 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올

레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 구체적으로 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg일 수 있고, 구체적으로 0.001 ~ 1 g/kg일 수 있으며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강식품을 제공한다.

본 발명의 건강식품은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육

류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는
 5 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연
 10 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산
 15 화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

20 본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 전이억제용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 *XNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 전이억제용 건강식품을 제공한다.

상기 암은 유방암, 간암, 위암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암,
 25 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁

내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반암종 및 중추신경계 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 폐암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

5

본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈액질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈액질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

10 상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 15 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 면역 이상이 생긴 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역증강방법을 제공한다.

상기 면역증강은 면역 시스템의 항상성 유지에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 또한, 이는 조혈모세포의 항상성 유지에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 면역증강은 *TXNIP* 및 p53 사이의 상호작용 20 (interaction)에 의한 항산화 활성화에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 전이된 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 억제 방법을 제공한다.

25 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자

전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 예방 방법을 제공한다.

상기 암은 유방암, 간암, 위암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁
5 내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종 및 중추신경계 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 폐암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

10 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 혈액질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈액질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈액질환 예
15 방 방법을 제공한다.

상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

20 또한, 본 발명은 면역증강용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

상기 면역증강은 면역 시스템의 항상성 유지에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 또한, 이는 조혈모세포의 항상성 유지에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 면역증강은 TXNIP 및 p53 사이의 상호작용
25 (interaction)에 의한 항산화 활성화에 의한 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

또한, 본 발명은 암 전이 억제용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 암 전이 예방용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유
5 전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

상기 암은 유방암, 간암, 위암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁 내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종 및 중추신경계 종양으로 이루어진 군으로부터
10 터 선택되는 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 폐암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

또한, 본 발명은 혈액질환 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 혈액질환 예방용 약학적 조성물로 사용하기 위한, TXNIP
15 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 제공한다.

상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

20

또한, 본 발명의 TXNIP mRNA 또는 단백질은 이의 발현수준은 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환을 진단하는데 사용할 수 있고, 아울러, 이들 발현수준을 조절하는 후보약물을 선별하기 위한 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환 후보약물의 스크리닝에 사용될 수 있다.

25

【유리한 효과】

본 발명의 TXNIP가 산화적 스트레스 조건하에서 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)의 골수증식 능력을 조절하고, 생체 내에서 항산화 활성을 나타내며, 조혈세포(hematopoietic cell)에서 p53과 결합하여 활성산소를 조절함으로써 면역증강, 암 전이억제, 및 혈액질환 예방 및 치료방법, 또는 이들의 예방 및 치료 용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1A는 늙은 TXNIP 녹아웃(knock-out) 마우스에서 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)의 빈도(frequency)가 감소하는 것을 나타내는 도이다.

Young: 어린 마우스, 및

Old: 늙은 마우스.

도 1B는 경쟁적 골수증식(competitive repopulation assay) 및 단계적 골수 이식(serial bone marrow transplantation assay; serial BMT assay)의 실험방법을 나타내는 도이다.

도 1C TXNIP 녹아웃 마우스에서 골수증식 능력이 감소하는 것을 나타내는 도이다.

WT-Y: 야생형 어린 마우스,

20 WT-O: 야생형 늙은 마우스,

KO-Y: TXNIP 녹아웃된 어린 마우스, 및

KO-O: TXNIP 녹아웃된 늙은 마우스.

도 1D는 TXNIP 녹아웃 마우스로부터 수여받은 전체 골수세포의 재생능력이 감소하는 것을 나타내는 도이다.

25 WT: 야생형,

KO: TXNIP 녹아웃,

Young: 어린 마우스, 및

Old: 늙은 마우스.

도 1E는 공여체-유래 골수세포의 증식능력이 TXNIP 녹아웃 마우스 유래한
5 수여체에서 감소하는 것을 나타내는 도이다.

WT: 야생형,

KO: TXNIP 녹아웃,

1st: 첫번째 골수이식 후, 및

2nd: 두번째 골수이식 후.

10 도 1F는 골수이식 후 조혈모세포 및 전구세포(progenitor)의 집단이 TXNIP
녹아웃 마우스에서 감소하는 것을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 2A는 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포에서 활성산소 수준이 현저히
15 증가하는 것을 나타내는 도이다.

WT-Y: 야생형 어린 마우스,

WT-O: 야생형 늙은 마우스,

KO-Y: TXNIP 녹아웃된 어린 마우스, 및

KO-O: TXNIP 녹아웃된 늙은 마우스.

20 도 2B는 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포를 이식한 마우스에서 활성산소
의 수준이 높은 것을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 2C는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포에
25 서 활성산소의 수준이 높은 것을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 2D는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포의 세포사멸(apoptosis)이 증가함을 나타내는 도이다.

5 WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 3A는 경쟁적 골수증식, 집락형성단위-비장(colony forming unit-spleen; CFU-S) 및 방사선보호 분석(radioprotection assay)의 실험방법을 나타내는 도이다.

도 3B 및 3C는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수
10 세포의 골수증식 및 조혈모세포 빈도가 감소함을 나타내는 도이다.

WT-PBS: 야생형 대조군 마우스,

WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트(paraquat)를 처리한 군,

KO-PBS: TXNIP 녹아웃 대조군 마우스, 및

KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군.

15 도 3D는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포의 집락형성단위-비장 수가 감소하는 것을 나타내는 도이다.

WT: 야생형,

KO: TXNIP 녹아웃 마우스,

PBS: PBS를 처리한 군, 및

20 PA: 파라콰트를 처리한 군.

도 3E는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포의 생존율이 낮음을 나타내는 도이다.

WT-PBS: 야생형 대조군 마우스,

WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트를 처리한 군,

25 KO-PBS: TXNIP 녹아웃 대조군 마우스, 및

KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군.

도 3F 및 3G는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 LKS 세포주가 수여체에서 골수증식 및 조혈모세포 빈도가 감소함을 나타내는 도이다.

WT-PBS: 야생형 대조군 마우스,

5 WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트를 처리한 군,

KO-PBS: TXNIP 녹아웃 대조군 마우스, 및

KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군.

도 4A는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 생존율이 감소함을 나타내는 도이다.

10 WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트를 처리한 군,

KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군, 및

KO-PA+NAC: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트 및 항산화제를 처리한 군.

도 4B는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수이식한 마우스의 생존율이 감소함을 나타내는 도이다.

15 CD45.1(WT): 야생형 골수를 수여받은 야생형 CD45.1 마우스, 및

CD45.1(KO): TXNIP 녹아웃 골수를 수여받은 야생형 CD45.1 마우스.

도 4C는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 비장크기 및 세포질이 감소함을 나타내는 도이다.

WT: 야생형,

20 KO: TXNIP 녹아웃 마우스,

PBS: PBS를 처리한 군, 및

PA: 파라콰트를 처리한 군.

도 4D는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스에서 세포사멸이 증가함을 나타내는 도이다.

25 WT: 야생형,

KO: TXNIP 녹아웃 마우스,

PBS: PBS를 처리한 군, 및

PA: 파라콰트를 처리한 군.

5 도 4E는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 흉선에 손상이 발생함을 나타내는 도이다.

WT-PBS: 야생형 대조군 마우스,

WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트를 처리한 군,

KO-PBS: TXNIP 녹아웃 대조군 마우스, 및

KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군.

10 도 4F는 산화적 스트레스 조건하의 TXNIP 녹아웃 마우스에서 암 전이가 증가함을 나타내는 도이다.

WT-PBS: 야생형 대조군 마우스,

WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트를 처리한 군,

KO-PBS: TXNIP 녹아웃 대조군 마우스, 및

15 KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군.

도 4G는 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 전체 골수세포를 수여받은 마우스에서 폐 전이가 증가함을 나타내는 도이다.

WT-PBS: 야생형 대조군 마우스,

WT-PA: 야생형 마우스에 파라콰트를 처리한 군,

20 KO-PBS: TXNIP 녹아웃 대조군 마우스, 및

KO-PA: TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 처리한 군.

도 5A 및 5B는 골수세포에서 활성산소 및 TXNIP 수준이 역상관관계(inverse correlation)에 있음을 나타내는 도이다.

25 도 5C는 TXNIP 녹아웃 골수세포에서 p53의 발현이 감소함을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 5D는 TXNIP 녹아웃 골수세포에서 활성산소의 수준이 증가함을 나타내는 도이다.

5 WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 5E는 $p53^{-/-}$ 조혈모세포 및 전구세포에서 활성산소의 수준이 높음을 나타내는 도이다.

WT: 야생형,

10 Txnip $^{-/-}$: TXNIP 결핍,

p53 $^{-/-}$: p53 결핍.

도 5F 및 5G는 p53을 억제한 경우 TXNIP $^{-/-}$ 조혈모세포 및 전구세포에서 활성산소의 수준이 증가함을 나타내는 도이다.

Control: 대조군,

15 Txnip shRNA: 야생형 또는 TXNIP 녹아웃 LKS 세포에 Txnip에 대한 shRNA를 처리한 군,

p53 shRNA: 야생형 또는 TXNIP 녹아웃 LKS 세포에 p53에 대한 shRNA를 처리한 군,

WT: 야생형 마우스,

20 WT/PFT- α : 야생형에 p53 억제제를 처리한 군,

KO: TXNIP 녹아웃 마우스, 및

KO/PFT- α : TXNIP 녹아웃 마우스에 p53 억제제를 처리한 군.

도 5H는 산화적 스트레스 조건하에서 $p53^{-/-}$ 마우스의 조혈모세포 및 면역세포의 활성산소 수준이 증가함을 나타내는 도이다.

25 WT: 야생형, 및

p53^{-/-}: p53 결핍.

도 5I는 산화적 스트레스 조건하에서 p53^{-/-} 마우스의 생존율이 감소함을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

5 p53^{-/-}: p53 결핍.

도 5J는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스에 p53 억제제를 처리한 경우 마우스의 생존율이 감소함을 나타내는 도이다.

WT: 야생형,

KO: TXNIP 녹아웃 마우스, 및

10 KO/PFT- α : TXNIP 녹아웃 마우스에 p53 억제제를 처리한 군.

도 6A는 p53에 결합하는 TXNIP의 위치를 확인한 도이다.

도 6B는 TXNIP와 결합하는 p53의 도메인(domain)을 확인한 도이다.

도 6C는 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 및 p53 사이의 결합이 증가함을 나타내는 도이다.

15 도 6D는 TXNIP의 C247S 및 C267S 돌연변이는 p53과 결합하지 못하여 동일한 위치에 존재하지 않음을 나타내는 도이다.

도 6E는 TXNIP에 의해서 p53 및 MDM2 사이의 결합이 감소함을 나타내는 도이다.

Vector: 대조군,

20 TXNIP(WT): 야생형 TXNIP, 및

TXNIP(DW): TXNIP의 이중 돌연변이.

도 6F는 TXNIP 및 p53 사이의 결합에 의해서 세포 내 p53-매개 전사활성이 증가함을 나타내는 도이다.

25 도 7A 및 7B는 조혈세포에서 p53 및 이의 표적 단백질의 발현을 확인한 도이다.

도 7C는 TXNIP 결핍 세포주에서 p53 표적 단백질의 발현이 감소함을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

5 도 7D는 TXNIP 결핍 세포주에서 산화촉진 유전자 mRNA의 발현이 증가함을 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

10 도 7E는 산화적 스트레스 조건하의 TXNIP 결핍 세포주에서 p53의 활성변화를 나타내는 도이다.

WT: 야생형, 및

KO: TXNIP 녹아웃.

도 7F는 야생형 TXNIP 또는 p53을 형질주입한 골수세포를 골수이식한 마우스에서 조혈모세포의 빈도가 회복되는 것을 나타내는 도이다.

15 WT(Fresh): 야생형 골수세포,

WT(Vector): 야생형 골수세포에 벡터만을 형질주입한 군,

KO(Fresh): TXNIP 결핍 골수세포,

KO(Vector): TXNIP 결핍 골수세포에 벡터만을 형질주입한 군,

KO(p53): TXNIP 결핍 골수세포에 p53을 형질주입한 군,

20 KO(TXNIP): TXNIP 결핍 골수세포에 야생형 TXNIP를 형질주입한 군, 및

KO(DM): TXNIP 결핍 골수세포에 이중 돌연변이형 TXNIP를 형질주입한 군.

도 7G는 야생형 TXNIP 또는 p53을 형질주입한 골수세포를 골수이식한 마우스의 생존율이 증가함을 나타내는 도이다.

WT/Vector: 야생형 골수세포에 벡터만을 형질주입한 군,

25 KO/Vector: TXNIP 결핍 골수세포에 벡터만을 형질주입한 군,

KO/Txnip(WT): TXNIP 결핍 골수세포에 야생형 TXNIP를 형질주입한 군,

KO/Txnip(DM): TXNIP 결핍 골수세포에 이중 돌연변이형 TXNIP를 형질주입한 군, 및

KO/p53: TXNIP 결핍 골수세포에 p53을 형질주입한 군.

5

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

10

<실시예 1> TXNIP 결핍이 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)에 미치는 영향 확인

<1-1> 실험동물의 준비

TXNIP 녹아웃(knockout; KO) 마우스는 공지된 방법대로 제조하였고(Lee et al., 2005), 유사유전자형의(congenic) CD45.1⁺ C57BL/6 마우스 및 *p53*^{-/-} 마우스 (B6.129S2-Trp53^{tm1Tyj}/J)는 잭슨 연구소(Jackson Laboratory, 미국)에서 구입하였다. 모든 마우스는 12시간 간격으로 빛-어둠이 반복되는 무균 동물시설에서 사육되었고, 8 내지 12주의 어린 마우스 및 22 내지 23개월의 늙은 마우스가 실험에 사용되었다. *p53*^{-/-}, *Txnip*^{-/-}(KO) 및 야생형(wild type; WT) 마우스에 파라콰트(paraquat) 40, 50 또는 80 mg/kg, 및 N-아세틸-시스테인(N-acetyl-cysteine; NAC, Sigma-Aldrich, 미국) 100 mg/kg 또는 PFT- α (Sigma, 미국) 5 mg/kg을 복강 내에 주사하였다. 모든 실험은 실험동물연구소(institute for laboratory animal research)의 실험동물의 관리 및 사용을 위한 가이드(guide for the care and use of laboratory animals)에 준수하여 수행되었다.

25

<1-2> TXNIP 결핍에 의한 조혈모세포의 빈도(frequency) 감소효과 확인

TXNIP 결핍이 조혈작용에 미치는 영향을 확인하기 위하여 어리거나(12주) 늙은(22 내지 23개월) *Txnip*^{+/+}(WT) 및 *Txnip*^{-/-}(KO) 마우스로부터 조혈모세포(hematopoietic stem cell)의 빈도(frequency)를 분석하였다.

- 5 구체적으로, 조혈줄기세포를 분석하기 위하여 쥐의 대퇴골, 경골과 좌골을 분리한 후, 막자사발을 이용하여 뼈로부터 골수세포를 분리하고 RPMI1640 배지에 현탁시킨 다음 원심분리하여 배지를 제거하고, 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 세포를 현탁시켜 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 그리고나서 다시 한 번 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 재현탁한 후 세포의 수를 결정하고 10⁷ 개의 세포
- 10 를 분주하였다. 리니지⁺(Lineage⁺) 세포를 염색하기 위하여 바이오틴(biotin)이 붙어 있는 Mac-1, Gr-1, Ter119, NK1.1, CD2 및 B220을 넣고, c-Kit(PE-Cy7), Sca-1(PE), CD150(PE-Cy5), CD48(APC-Cy7), CD34(FITC), CD135(APC)를 같이 첨가하여 25분간 4℃에서 반응시켰으며, 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 세포를 씻어내고 스트렙타비딘(streptavidin)이 붙어있는 BD Horizon V450으로 25분간 4℃에서 반응
- 15 시켜 리니지⁺ 세포를 염색하였다. 상기 염색된 세포의 분석은 FACSanto II(BD Biosciences)를 사용하였다.

그 결과, 도 1A에 나타난 바와 같이, 늙은 야생형 마우스에서 HSC 빈도가 현저히 높고, 반면에 어린 녹아웃 마우스에서는 상대적으로 HSC 빈도가 감소한 것을 확인하였다(도 1A).

20

<실시예 2> TXNIP 결핍에 의한 경쟁적 골수중식 능력(competitive repopulation capacity) 감소효과 확인

<2-1> 골수(bone marrow; BM) 세포의 준비

- 전체 골수 세포는 2% FBS가 포함된 RPMI-1640 배지(WelGENE, 대한민국)에서
- 25 배양된 마우스의 대퇴골(femurs), 경골(tibias), 무명골(hipbones) 및 견갑골

(shoulder bone)의 조직을 갈아서 분리하였고, 적혈구(red blood cell; RBC)는 ACK 완충액[0.15 M NH_4Cl , 1.0 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA(pH 7.0)]을 이용하여 용해되거나, 용해되지 않았다. 또한, 상기 세포는 여과기를 이용하여 여과되었다. 골수 세포는 당업계의 당업자에게 잘 알려진 방법으로 염색되었고(Jeong et al., 2009),
 5 FACSanto II를 이용하여 분석되었으며, Lineage⁻c-Kit⁺Sca⁺(LKS) 세포는 FACSaria 세포 선별기(sorter)로 각각 분리되었다. Lineage⁻c-kit⁺(LK) 세포의 준비를 위해서는 MACS 정제 방법을 사용하였다.

<2-2> TXNIP 결핍에 의한 경쟁적 골수증식 능력을 감소효과 확인

10 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 준비된 세포주를 이용하여 골수증식 능력을 확인하기 위하여 골수이식(bone marrow transplantation; BMT)을 수행하였다.

구체적으로, 어리거나 늙은 야생형 또는 TXNIP 녹아웃 마우스(CD45.2^+) 또는 이의 유사유전자형의 마우스(CD45.1^+)로부터 수득한 전체 골수세포(whole bone marrow; WBM) 2.0×10^6 또는 LSK 세포 5.0×10^3 개를 잘 섞어 혼합물을 제조하고,
 15 상기 혼합물을 방사능을 조사한(9 Gy) 야생형인 유사유전자형(CD45.1^+) 수여체(recipient)의 정맥 내로 주사하였다. 공여체(donor)-유래 세포의 골수증식은 표면 마커에 대한 항체를 이용하여 꼬리 혈관(tail vein) 및 골수 세포에 PB 염색을 통해 관찰되었다. 비-경쟁적 이식을 위해서, 야생형 또는 TXNIP 녹아웃 마우스의 전체 골수세포 2.5×10^6 개를 방사능 조사한(9 Gy) 야생형인 유사유전자형
 20 (CD45.1^+) 수여(recipient) 마우스의 정맥 내로 주사하였고, 8주 후에 분석을 수행하였다. 또한, PB 염색은 꼬리 정맥으로부터 혈액을 채취하여 ACK 용액(0.15 M NH_4Cl , 1.0 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 7.4)를 처리하여 적혈구를 제거하고 CD45.1 (FITC) 및 CD45.2 (APC) 항체로 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 세포를 현탁하여 4°C에서 20분간 염색한 후, 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 세포를 세척
 25 하고, 다시 현탁하여 유세포 분석기로 분석하였다.

그 결과, 도 1C에 나타난 바와 같이 늙은 야생형 마우스의 LKS 및 전체 골수세포의 골수증식 능력은 약간 변화를 나타냈으나, 반면 늙은 TXNIP 녹아웃 마우스의 LKS 및 전체 골수세포의 골수증식 능력은 현저히 감소함을 확인하였다(도 1C). 또한, 도 1D에 나타난 바와 같이 젊거나 늙은 TXNIP 녹아웃 마우스로부터 수여받은 수여체의 전체 골수세포는 조혈모세포의 빈도 및 야생형 마우스로부터 수여된 전구세포(progenitor)에 비하여 현저히 감소함을 확인하였다(도 1D).

<2-3> TXNIP 결핍에 의한 공여체-유래 골수 세포의 감소효과 확인

상기 실시예 <2-2>에서 수행된 골수이식을 2번 반복하여 공여체-유래 골수 세포의 증식 능력을 확인하기 위하여 단계적 BMT 검사(serial BMT assay)를 수행하였다.

구체적으로, 공여체(CD45.2)로부터 분리된 골수세포(2.0×10^6) 및 수여체(CD45.1)로부터 분리된 골수세포(1.0×10^6)를 잘 섞어주고 방사선을 조사한(9 Gy) 수여체(CD45.1)의 꼬리 정맥에 투여한 후, 16주 후에 공여체 및 수여체의 세포가 섞여있는 수여체의 골수세포(2.0×10^6)을 분리하여 다시 방사선을 조사한(9 Gy) 수여체(CD45.1)의 꼬리 정맥에 투여한 후, 16주 후에 수여체에서 PB 및 골수세포를 분석하였다.

그 결과, 도 1E 및 1F에 나타난 바와 같이 공여체-유래 골수 세포의 증식능력이 TXNIP 녹아웃 마우스 유래한 수여체에서 현저히 감소하고(도 1E), 또한, 골수에 존재하는 조혈모세포 또는 전구세포를 확인한 결과, TXNIP 녹아웃 마우스 유래한 수여체에서 현저히 감소함을 확인하였다(도 1F).

<실시예 3> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP의 조혈세포 활성산소 조절효과 확인

<3-1> TXNIP 녹아웃 마우스에서 유래한 골수세포의 활성산소 수준 증가 확

골수이식 후, 초기 조혈모세포의 고갈이 활성산소의 축적에 의한 것인지 확인하기 위하여 세포 내 활성산소의 수준을 측정하였다.

구체적으로, 어리거나 늙은 야생형 또는 TXNIP 마우스로부터 유래한 세포에서 세포 내 활성산소의 양을 측정하기 위하여 유세포분석기(flow cytometry)를 사용하였고, 이때, 활성산소-특이적 형광 탐침(ROS-specific fluorescent probe)인 DCF(C6827) 및 DHE(D11347)(Invitrogen, 미국)가 사용되었다. 실험에 사용될 세포를 분리하자마자 2% FBS를 포함하는 PBS에 최종농도가 각각 5 μ M DFC 또는 2.5 μ M DHE가 되도록 제조된 용액을 첨가하여 37°C 배양기에서 15분 동안 반응시켜주었다. 활성산소-특이적 형광탐침 반응을 하기 전 조혈줄기세포를 분석하기 위하여 쥐의 대퇴골, 경골과 좌골을 분리한 후 막자사발을 이용하여 뼈로부터 골수세포를 분리하고 RPMI1640 배지에 현탁시킨 다음, 원심분리하여 배지를 제거하고 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 세포를 현탁시켜 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 다시 한번 2% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 현탁시킨 후 세포의 수를 결정하고 10^7 개의 세포를 분주하였다. 상기 방법으로 조혈줄기세포를 염색하고 2% FBS를 포함하는 PBS에 최종농도가 각각 5 μ M DFC 또는 2.5 μ M DHE가 되도록 제조된 용액을 첨가하여 37°C 배양기에서 15분 동안 반응시킨 후, 2% FBS를 포함하는 PBS로 상기 세포를 세척하고 유세포 분석기를 이용하여 세포분석을 수행하였다.

그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이 늙은 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포가 야생형 대조군과 비교하여 활성산소의 수준이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 2A).

〈3-2〉 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포 이식 마우스에서 활성산소 수준 증가 확인

TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포를 유지하는데 있어서 증가한 활성산소의 영향을 확인하기 위하여 전체 골수세포(CD45.2⁺)를 방사선을 조사한 야생의 유

사유전자형(CD45.1⁺) 수여체에 이식하고 9개월 후, 세포 내 활성산소의 수준을 상
기 실시예 <2-1>의 방법을 이용하여 측정하였다.

그 결과, 도 2B에 나타난 바와 같이 TXNIP 녹아웃 유래 골수세포에 있어서
활성산소의 수준이 현저히 높음을 확인하였다(도 2B). 이는 본 발명의 TXNIP가 공
5 지된 바와 같이 티오레독신(thioredoxin)을 억제하는 산화촉진제(pro-oxidant)로서
의 기능(Lee et al., 2005; Patwari et al., 2006; Schulze et al., 2002)외에 다
른 메카니즘에 의해서 활성산소로부터 조혈세포를 보호하는 것을 나타낸다.

<실시예 4> 조혈세포에서 TXNIP에 의한 항산화 활성 확인

10 <4-1> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP의 결핍에 의한 활성산소 증가 유 도효과 확인

산화적 스트레스하의 조혈세포에서 TXNIP의 항산화 기능을 확인하기 위하여
어린 마우스에서 활성산소의 수준을 측정하였다.

구체적으로, 강한 산화적 스트레스 유도물질(inducer)인 파라콰트
15 (paraquat)를 어린 마우스의 복강 내에 주사한 뒤, 세포 내 활성산소의 수준을 상
기 실시예 <2-1>의 방법으로 측정하였다.

그 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이 TXNIP 녹아웃 마우스 유래한 골수세포
에서 활성산소의 수준이 유의적으로 높은 것을 확인하였다(도 2C).

20 <4-2> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP의 결핍에 의한 세포사멸 (apoptosis) 유도효과 확인

TXNIP 결핍이 산화적 스트레스에 의한 활성산소를 증가시키고, 또한 이에
따른 세포사멸을 유도하는지 확인하였다.

구체적으로, 강한 산화적 스트레스 유도물질(inducer)인 파라콰트(paraquat,
25 40 mg/kg)를 어린 마우스의 복강 내에 주사한 뒤 마우스로부터 골수세포를 분리하

고, 조혈줄기세포를 염색한 후 결합(binding) 용액에 현탁한 세포에 Annexin V(BD Bioscience)를 5 μ l 첨가하여 빛이 차단된 상온(25℃)에서 15분간 반응시킨 뒤, 결합 용액을 적당히 추가하여 유세포 분석기를 사용하여 세포를 분석하였다.

그 결과, 도 2D에 나타난 바와 같이 TXNIP 녹아웃 마우스 유래한 골수세포에서 세포 사멸이 현저히 증가하였고(도 2D), 이는 TXNIP 녹아웃 조혈모세포가 활성산소에 더욱 민감함을 나타낸다.

<실시예 5> TXNIP가 산화적 스트레스 조건하에서 조혈모세포의 골수증식 능력을 조절

<5-1> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 골수증식 능력 감소 확인

조혈모세포의 골수증식 능력에 있어 산화적 스트레스의 영향을 확인하기 위하여 경쟁적 골수증식 검사(competitive repopulation assay)를 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 수행하였다.

그 결과, 도 3B 및 3C에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포는 골수증식 능력 및 조혈모세포 빈도가 감소한 것을 확인하였다(도 3B 및 3C)

<5-2> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 비장에서의 집락 형성단위 감소확인

산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포가 비장에서 집락형성을 확인하기 위하여 집락형성단위-비장(colony forming unit-spleen; CFU-S)을 수행하였다.

구체적으로, 방사선 조사(9 Gy)한 야생형의 유사유전자형(CD45.1⁺) 수여체에 야생형 또는 TXNIP 녹아웃 마우스에 산화적 스트레스를 유발하기 위해 파라콰트

를 처리한 1×10^5 개의 골수세포를 정맥에 주사하였다. 이때 대조군 마우스에는 PBS를 처리해 주었다. 상기 마우스에서 비장을 분리하여 카르노이 용액(Carnoy's solution)[60% 에탄올, 30% 클로로포름, 10% 아세트산(V/V)]에 고정하고, 7일 후 미세한 콜로니(microscopic colonies)의 수를 세었다.

- 5 그 결과, 도 3D에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포의 집락형성단위-비장 수가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 3D).

<5-3> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 생존율 감소 확

10 인

산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 생존율을 확인하기 위하여 방사선보호 분석(radioprotection assay)을 수행하였다.

- 구체적으로, 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 골수이식을 수행한 뒤, 야생형 골수세포의 생존율이 60% 이상이 되도록 수를 조절하였다. 적혈구(red blood cell; RBC)는 공여체의 전체 골수세포로부터 분리되었고, 야생형에 PBS를 처리한 마우스, 야생형에 파라콰트를 처리한 마우스, TXNIP 녹아웃에 PBS를 처리한 마우스 및 TXNIP 녹아웃에 파라콰트를 처리한 마우스로부터 분리한 각각의 골수세포 1.5×10^5 개를 방사선 조사된(9 Gy) 유사유전자형(CD45.1⁺) 수여체에 주사하였다. 상기 실험의 결과는 정상적인 혈액생성 과정으로 인해서 공여체 골수세포로부터 충분한 양의 조혈모세포를 받은 마우스는 골수이식 후에 생존이 가능할 수 있는 이유를 나타낸다. 또한, 수여체 생존율은 매일 기록되었고, 카플란-메이어 생존곡선(Kaplan-Meier survival curve)로 표시되었다.

- 그 결과, 도 3E에 나타난 바와 같이 야생형과 비교하여, 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수세포는 낮은 생존율을 나타내었다(도 3E).

<5-4> TXNIP 녹아웃 마우스로부터 분리된 조혈모세포의 골수증식 능력 감소 확인

직접적으로 조혈모세포의 골수증식 능력을 확인하기 위하여 마우스로부터
5 LKS 세포(CD45.2+)를 분리하고, 경쟁적 골수증식 분석을 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 수행하였다.

그 결과, 도 3F 및 3G에 나타난 바와 같이, 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래된 LKS 세포주가 수여체에서 골수증식 능력 및 조혈모세포 빈도에 있어서 현저히 감소함을 확인하였다(도 3F 및 3G).

10 따라서, 상기 결과는 TXNIP가 산화적 스트레스 조건하에서 활성산소의 수준을 조절함으로써 조혈모세포의 골수증식 능력을 유지함을 나타낸다.

<실시예 6> 생체 내에서 TXNIP의 항산화 효과 확인

<6-1> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 생존을 감소 확인

조혈모세포 유지에서 TXNIP의 역할에 기초하여, 본 발명자들은 TXNIP 결핍이 조혈계(hematopoietic system)에 미치는 영향을 생체 내 산화적 스트레스에 대한 방어적인 면에서 확인해 보았다.

구체적으로, 산화적 스트레스 환경을 유도하기 위하여 40 mg/kg의 파라콰트를
20 마우스에 주입하였고, 실험은 상기 실시예 <5-3>의 방법으로 수행되었다.

그 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이 모든 TXNIP 녹아웃 마우스는 160 시간 내에 죽었으며, 그러나 야생형 마우스는 상기 시간 내에 죽지 않았고, 2개월 이상 생존하였다. 또한, 항산화제인 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine, NAC)을 처리한 군에서는 TXNIP 녹아웃 마우스임에도 불구하고 약 70%의 회복율을 나타냈다(도

25 4A)

<6-2> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 골수를 이식한 수여체의 생존율 감소 확인

다른 조직에 있어서 독성효과의 가능성을 배제하고, 산화적 스트레스에 대한 조혈세포의 진성반응(intrinsic response)을 결정하기 위하여 골수이식을 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 수행하였고, 8주 후, 산화적 스트레스 환경을 유도하기 위하여 40 mg/kg의 파라콰트를 마우스에 주입하였다.

그 결과, 도 4B에 나타난 바와 같이 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 전체 골수세포를 받은 마우스는 150 시간 내에 죽었으나, 야생형 마우스 유래 전체 골수세포를 받은 마우스는 70%가 생존하였다(도 4B).

<6-3> 산화적 스트레스 조건이 TXNIP 녹아웃 마우스의 비장 및 흉선(thymus)에 미치는 영향 확인

상기 실시예 <6-3>의 실험에 사용된 마우스에서 비장을 분리하여 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스 및 야생형 마우스의 비장을 관찰하였다.

구체적으로, 8주령의 야생형 마우스 및 TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 40 mg/kg으로 복강에 투여하고, 96시간 후에 마우스로부터 비장 및 흉선을 꺼내어 바로 사진 촬영하였다.

그 결과, 도 4C에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스에 노출된 TXNIP 녹아웃 마우스의 비장 크기 및 세포질이 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 4C). 또한, 상기 마우스의 흉선을 관찰한 결과, 도 4E에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스에 노출된 TXNIP 녹아웃 마우스에 있어서, 흉선에 유의적인 손상이 발생함을 확인하였다(도 4E).

<6-4> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 세포사멸 증가

확인

산화적 스트레스 하에서 TXNIP 녹아웃 마우스의 비장에서 세포사멸 (apoptosis)의 발생을 확인하기 위해서 TUNEL 분석 및 아넥신 V 염색(annexin V staining)을 수행하였다.

- 5 구체적으로, 8주령의 야생형 마우스 및 TXNIP 녹아웃 마우스에 파라콰트를 40 mg/kg으로 복강에 투여하고, 96시간 후에 마우스로부터 비장 및 흉선을 꺼내어 비장의 세포 수를 측정하고, 세포사멸을 측정하기 위하여 아넥신 V(Annexin V)를 염색하여 유세포 분석기로 확인하였으며, 일부는 10% 포르말린 용액에 고정하여 비
- 10 장의 H&E 염색 및 세포사멸을 확인하기 위하여 TUNEL 염색을 당업계의 당업자에게 잘 알려진 방법으로 수행하였다.

그 결과, 도 4D에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스에 노출된 TXNIP 녹아웃 마우스에서 세포사멸이 현저히 증가함을 확인하였다(도 4D).

<실시예 7> 산화적 스트레스 조건하에서 폐암 전이 증가 확인

- 15 숙주의 면역 시스템에 있어서, 산화적 스트레스의 영향을 확인하기 위하여 폐암의 전이를 측정하였다.

- 8-12주령의 야생형 마우스와 TXNIP 녹아웃 마우스에 B16-F10 흑색종 세포주 (melanoma cell)를 PBS 용액으로 현탁하여 마우스 한 마리당 5×10^5 세포를 꼬리 정맥으로 주사하고 이를 뒤부터 2일 간격으로 두 번 파라콰트를 20mg/kg으로 복강
- 20 주사하였다. 8일 후에 쥐의 폐를 분리하여 전이된 흑색종을 촬영하였다.

그 결과, 도 4F에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스에 노출된 TXNIP 마우스에서 암 전이가 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 4F).

<실시예 8> TXNIP의 결핍에 의한 암 전이 증가 확인

- 25 골수세포 이식을 통해서 면역세포의 항-전이 반응(anti-metastasis

response)을 확인하기 위하여 폐암 세포를 이용하였다.

구체적으로, 야생형 및 TXNIP 녹아웃 공여 마우스로부터 골수세포(CD45.2) 2.5×10^6 개를 분리하여 9 Gy의 방사선을 조사한 수여 마우스(CD45.1)의 꼬리 정맥에 세포를 주입하고 8주 후, 상기 <실시예 7>의 방법으로 실험을 수행한 뒤, 13일
5 뒤에 폐를 분리하여 사진 촬영을 하였다.

그 결과, 도 4G에 나타난 바와 같이 TXNIP 녹아웃 마우스 유래 전체 골수세포를 수여받은 마우스에서 폐 전이가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 4G).

따라서, TXNIP 녹아웃 마우스에 있어서 파라콰트의 독성효과를 확인하였고, TXNIP 녹아웃 마우스는 산화적 스트레스 조건하에서 기능적인 면역 시스템을 유지
10 하지 못하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 결과는 면역세포 및 조혈모세포를 포함하는 전체 조혈세포에 있어서 TXNIP가 활성산소를 조절하는 항산화 단백질 역할을 하는 것을 나타낸다.

<실시예 9> 골수세포에서 TXNIP 단백질, 활성산소 및 p53 수준의 상관관계 확인

15 <9-1> 골수세포에서 활성산소 및 TXNIP 발현 수준의 관련성 확인

골수세포에서 활성산소 및 TXNIP 발현 수준 사이에 관련성을 확인하기 위하여 상기 실시예 <3-1>의 방법을 사용하여 세포 내 활성산소 및 TXNIP 수준을 확인하였다.

그 결과, 도 5A 및 5B에 나타난 바와 같이 골수세포에 있어서, 활성산소 및
20 TXNIP 수준 사이에 역상관관계(inverse correlation)가 있음을 확인하였다(도 5A 및 5B).

<9-2> 골수세포에서 활성산소 및 TXNIP의 발현 수준의 관련성 확인

최근 공지된 바에 의하면 종양 억제 단백질(tumor suppressor protein)인
25 p53이 항산화 기능을 하고, 조혈모세포에서 과발현하는 것이 확인되었다. 따라서,

골수세포에서 TXNIP 및 p53 사이의 관련성을 확인하기 위하여 p53을 염색하여 그 수준을 확인하였고, 활성산소 수준은 상기 실시예 <3-1>의 방법을 사용하여 측정되었다.

8 - 12 주령의 야생형 및 TXNIP 녹아웃 마우스로부터 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 골수세포를 분리하고, 조혈줄기세포의 마커(Lin-c-KitSca-1)를 붙였으며, BD Cytofix/Cytoperm 용액으로 얼음 위에서 30분 동안 고정하였다. 그리고나서 BD Perm/Wash 용액으로 세포를 씻어내고, Cytoperm Plus 용액으로 현탁 후 얼음에서 10분 동안 방치하였으며, 다시 한 번 BD Perm/Wash 용액으로 세포를 씻어주고, BD Cytofix/Cytoperm 용액으로 얼음 위에서 5분 동안 고정한 뒤 BD Perm/Wash 용액으로 세포를 씻어주었다. 상기 세포를 2% FBS가 포함된 PBS 용액으로 현탁하고 FITC가 붙어있는 p53 항체를 넣어 30분 동안 상온에서 반응시킨 후, 2% FBS가 포함된 PBS용액으로 세포를 씻어주고, 재현탁하여 유세포 분석기로 세포분석을 수행하였다.

그 결과, 도 5C 및 5D에 나타난 바와 같이 TXNIP 녹아웃 골수세포에서 p53의 발현이 유의적으로 감소하고(도 5C), 활성산소의 수준은 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 5D).

따라서, 상기 결과는 TXNIP, p53의 발현, 및 활성산소의 조절에 관련성이 있음을 나타내고, 또한, 야생형 골수세포와 비교하였을 때 TXNIP 녹아웃 골수세포에서 p53의 수준차는 적으나, 활성산소의 수준은 높은 차이를 나타냄을 확인하였다. 이는 TXNIP 녹아웃 골수세포에서 활성산소가 p53에 의해서만 조절되지 않음을 나타내고, TXNIP가 없을 때 p53의 수준 변화가 더욱 민감함을 확인하였다.

<실시예 10> 조혈세포의 활성산소 조절에 있어서 p53의 기능 확인

<10-1> p53^{-/-} 조혈모세포 및 전구세포(progenitor)에서 활성산소 수준 증가 확인

조혈세포의 활성산소 조절에 있어서 p53의 기능을 확인하기 위하여, p53^{-/-}

조혈모세포 및 전구세포의 활성산소 수준을 상기 실시예 <3-1>의 방법을 사용하여 측정하였다.

그 결과, 도 5E에 나타난 바와 같이 p53^{-/-} 조혈모세포 및 전구세포가 야생형 조혈모세포 및 전구세포에 비해서 활성산소 수준이 높은 것을 확인하였다(도 5E).

<10-2> TXNIP 및 p53의 더블녹다운(double knock-down)에 의한 활성산소의 증가효과 확인

TXNIP의 발현이 억제된 세포에 p53의 발현을 억제시켜 더블녹다운(double-knock-down)을 시켜 활성산소의 수준을 측정하였다.

구체적으로, shRNA를 발현할 수 있는 레트로바이러스를 생산하기 위하여 Platinum-E retroviral packaging 세포주(Cell Biolabs, 미국)를 사용하였고, shRNA는 HuSH-29 shRNA(OriGene, 미국)를 이용하였다. 상기 세포주로부터 얻어진 바이러스를 8 내지 12 주령의 야생형 및 TXNIP 녹아웃 마우스로부터 분리한 LKS 세포에 3일 동안 3회 감염시켜 유전자의 발현을 실시간 PCR(real-time PCR)로 확인하고, 활성산소의 수준을 확인하였다. 실험의 사용된 shRNA의 서열은 하기에 나타난 바와 같다:

mTXNIP(서열번호 1): 5'-GATTCTAAGGTGATGTTCTTAGCACTTTA-3', 및

mp53(서열번호 2): 5'-TGGCCATCTACAAGAAGTCACAGCACATG-3'.

또한, p53 억제제인 PFT- α (Sigma, 미국)는 마우스에 5 mg/kg으로 복강주사한 뒤, 48시간 후에 상기 실시예 <3-1>의 방법을 사용하여 활성산소의 수준을 측정하였다.

그 결과, 도 5F 및 5G에 나타난 바와 같이 p53 shRNA를 처리하거나, p53 특이 억제제인 PFT- α 를 처리한 경우, TXNIP^{-/-} 조혈모세포 및 전구세포에서 활성산소

의 수준이 더욱 증가한 것을 확인하였다(도 5F 및 5G).

<10-3> 산화적 스트레스 조건하에서 p53의 항산화 효과 확인

산화적 스트레스 조건하에서 p53의 항산화 효과를 확인하기 위해서 p53^{-/-}

5 마우스에 파라콰트를 처리한 뒤, 상기 실시예 <3-1>의 방법을 사용하여 활성산소의 수준을 측정하였다.

그 결과, 도 5H에 나타난 바와 같이 산화적 스트레스 조건하에서 p53^{-/-} 조혈모세포 및 면역세포의 활성산소 수준이 증가하는 것을 확인하였다(도 5H).

10 <10-4> 산화적 스트레스 조건하에서 p53^{-/-} 마우스의 생존율 감소 확인

p53^{-/-} 마우스에 파라콰트 50 mg/kg를 주사하여 산화적 스트레스 환경을 만들어주고, 마우스의 생존율을 상기 실시예 <5-3>의 방법을 이용하여 확인하였다.

그 결과, 도 5I에 나타난 바와 같이 야생형의 마우스와 비교하여, 산화적 스트레스 환경하에서 p53^{-/-} 마우스의 생존율이 현저히 감소함을 확인하였다(도 5I).

15

<10-5> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 녹아웃 마우스에 p53 억제제 처리에 따른 마우스의 생존율 감소 확인

산화적 스트레스 환경을 유도하기 위하여 파라콰트 40 mg/kg를 야생형 마우스, *Txnip*^{-/-} 마우스 및 PFT-α를 처리한 *Txnip*^{-/-} 마우스에 주사한 후, 마우스들의
20 생존율을 상기 실시예 <5-3>의 방법을 이용하여 확인하였다.

그 결과, 도 5J에 나타난 바와 같이 PFT-α를 처리한 *Txnip*^{-/-} 마우스가 산화적 스트레스에 가장 민감한 것으로 확인되었다(도 5J).

따라서, 상기 결과는 조혈모세포 및 면역세포 모두에 있어서 활성산소의 수준을 조절하기 위해 TXNIP가 p53과 결합함을 나타낸다.

25

<실시예 11> TXNIP 및 p53의 직접적인 상호작용(interaction) 확인

<11-1> TXNIP의 순차적 돌연변이체 제작

p53과 결합하는 TXNIP 단백질의 결합부위를 확인하기 위하여, TXNIP의 순차적 돌연변이를 제작하였다.

- 구체적으로, 인간 GST-TXNIP 및 FLAG-TXNIP 컨스트럭트(construct)를 TXNIP 돌연변이체(mutant)의 부위 특이적 돌연변이 유도(site-directed mutagenesis)를 위하여 주형으로 사용하였고, 상기 돌연변이체의 제작을 위해서 QuickChange II site-directed mutagenesis kit(Stratagene, 미국)를 제조사의 사용설명서대로 사용하였다. 또한, 상기 돌연변이 컨스트럭트의 제작을 위해 사용한 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

【표 1】

프라이머 이름	서열(5'→3')	서열번호
human TXNIP(C247S)_F	CTCAGGGACATCCGCATCATGGCGTGGC	3
human TXNIP(C247S)_R	GCCACGCCATGATGCGGATGTCCCTGAG	4
human TXNIP(C267S)_F	CTTCTATCCTGGGCTCCAACATCCTTCGAG	5
human TXNIP(C267S)_R	CTCGAAGGATGTTGGAGCCCAGGATAGAAG	6
human TXNIP(C333S)_F	GAAGCTCCTCCCTCCTATATGGATGTC	7
human TXNIP(C333S)_R	GACATCCATATAGGAGGGAGGAGCTTC	8
human TXNIP(C384S)_F	GAGGTGGATCCCTCCATCCTCAACAAC	9
human TXNIP(C384S)_R	GTTGTTGAGGATGGAGGGATCCACCTC	10

<11-2> p53과 결합하는 TXNIP의 결합부위 확인

- 상기 실시예 <11-1>의 방법으로 제작한 컨스트럭트를 사용하여 p53과의 결합부위를 확인하기 위하여 GST 풀다운(pull-down)을 수행하였다.

구체적으로, 상기 컨스트럭트를 세포에 주입한 후, 48시간 뒤에 세포의 용해물(lysate)을 얻었다. 500 μ g에 해당하는 용해물을 분주하고, 각각 GST-4B 비드

(bead)를 넣었으며, 4℃에서 4시간 동안 반응시켜 비드를 침강시키고, 용해(lysis) 용액으로 3회 세척한 뒤 SDS 로딩(loading) 용액을 처리하고 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 후, PVDF 막(membrane)에 옮겨 당업자에게 잘 알려진 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였다.

- 5 그 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이 TXNIP의 247 및 267 위치의 시스테인(cystein) 잔기가 p53과의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다(도 6A).

<11-3> p53의 결실 돌연변이체(deletion mutant) 제작 및 TXNIP와의 결합부위 확인

- 10 이번에는 TXNIP와 결합하는 p53의 부위를 확인하기 위해서 두 개의 결실 돌연변이체를 제작하였다.

구체적으로 C-말단 또는 N-말단 p53 DNA-결합 도메인(DNA binding-domain; DBD)의 결실 돌연변이를 제작하기 위하여 pfu polymerase mix(바이오니아, 대한민국)을 이용하여 p53 단편을 증폭하였고, pCMV-Flag 벡터의 해당 제한효소 자리에
15 클로닝을 수행하였다. 이때, 사용된 프라이머는 하기에 나타내었다. TXNIP와의 결합부위를 확인하기 위하여 상기 실시예 <11-2>의 방법으로 GST 풀다운을 수행하였다.

DBD(*EcoRI/XhoI*)forward(서열번호 11): 5'-GCGAATTCTTCTTGCATTCTGGGACA-3',

DBD(*EcoRI/XhoI*)reverse(서열번호 12): 5'-GCCTCGAGGCGGAGATTCTCTTCCTC-3',

- 20 DBD-N(*EcoRI/XhoI*)forward(서열번호 13): 5'-GCGAATTCTTCTTGCATTCTGGGACA-3',

DBD-N(*EcoRI/XhoI*)reverse(서열번호 14): 5'-GCCTCGAGCAAATTCCTTCCACTCG-3',

- 25 DBD-C(*EcoRI/XhoI*)forward(서열번호 15): 5'-GCGAATTCCTGTGGAGTATTTGGAT-3',

DBD-C(*EcoRI/XhoI*)reverse(서열번호 16): 5'-GCCTCGAGGCGGAGATTCTCTTCCTC-3'.

그 결과, 도 6B에 나타난 바와 같이 TXNIP가 5개의 시스테인 잔기를 포함하는 p53의 C-말단 DNA-결합 도메인 부위와 상호작용하는 것을 확인하였다(도 6B).

5

<11-4> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 및 p53의 결합 증가 확인

산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 및 p53의 결합이 어떻게 변하는지 확인하기 위하여 면역침강법(immunoprecipitation)을 수행하였다.

구체적으로, 세포에 H_2O_2 를 처리한 후, 세포의 용해물을 수득하였다. 상기 용해물의 단백질을 정량하여 $500 \mu g$ 이 되도록 각각 분주한 뒤, 토끼-TXNIP(rabbit-TXNIP) 항체를 첨가하고 $4^\circ C$ 에서 1시간 동안 반응시켰고, 상기 1차 항체와 결합할 수 있는 단백질 G-아가로스 비드(protein G-agarose bead, Roche, 미국)을 첨가하여 4시간 동안 추가로 반응시켰다. 모든 반응이 끝난 후, 용해 용액으로 상기 비드를 3회 세척하고, SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 당업계에 잘 알려진 방법으로 수행하였다.

15

그 결과, 도 6C에 나타난 바와 같이 H_2O_2 를 처리하여 산화적 스트레스 환경으로 만들어 주었을 경우 TXNIP 및 티오레독신(thioredoxin; TRX) 사이의 결합이 해리(dissociation)되고, TXNIP 및 p53 사이의 결합이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 6C).

20

<11-5> TXNIP 이중 돌연변이 및 p53의 세포 내 위치 확인

산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP의 C247S 및 C267S 돌연변이 및 p53 사이의 결합을 확인하기 위하여 면역염색(immunostaining)을 수행하였다.

구체적으로, 10% FBS 및 마우스 IL-3 ng/ml 이 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양된 뮤린 골수-유래 프로-B 세포주(murine bone marrow-derived pro-B cell)인

25

Baf3 세포주에 야생형 TXNIP 또는 이중 돌연변이(double mutation; DM) TXNIP를 과 발현시켜 면역염색에 사용하였다. 상기 세포주를 Cytofix/Perm 용액(BD Biosciences, 미국)을 이용하여 고정(fixed) 및 투과화(permeabilized)한 후, 2% FBS를 포함하는 PBS에서 p53 1차 항체(Santa Cruz, 미국)를 첨가하여 1시간 동안
 5 반응시킨 후, PBS로 3번 세척하고 Alexa Fluor 488 또는 546(Invitrogen, 미국)의 2차 항체를 처리하여 반응시켰으며, 염색 결과는 LSM510 공초점 현미경(Carl Zeiss, 독일)으로 관찰하였다.

그 결과, 도 6D에 나타난 바와 같이 TXNIP의 C247S 및 C267S 돌연변이는 p53과 결합을 하지 못해, 세포 내에서 p53의 발현을 증가시키지 않음을 확인하였다
 10 (도 6D).

<11-6> TXNIP에 의한 p53 및 MDM2 사이의 결합 감소효과 확인

p53의 안정성은 유비퀴틴화-의존적 프로테오솜의 분해(ubiquitination-dependent proteosomal degradation)를 통해 MDM2에 의해 조절되는 것이 공지되어
 15 있다(Sasaki et al., 2011). 이에, TXNIP가 p53 및 MDM2의 결합에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 면역침강을 상기 실시예 <11-4>의 방법으로 수행하였고, 이때, 항-MDM2(Santa Cruz, 미국), 항-p53(Santa Cruz, 미국) 및 항-TXNIP(Invitrogen, 미국) 1차 항체를 사용하였다.

그 결과, 도 6E에 나타난 바와 같이 TXNIP에 의해서 p53 및 MDM2의 결합이
 20 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 6E).

<11-7> TXNIP 및 p53 결합-매개 전사활성의 증가 확인

p53 및 TXNIP의 결합에 의해서 p53의 기능에 어떤 영향을 미치는지 확인하
 기 위해서 리포터 분석(reporter assay)을 수행하였다.

구체적으로, 10% FBS 및 마우스 IL-3 ng/ml이 포함된 RPMI-1640 배지에서

배양된 뮌헨 골수-유래 프로-B 세포주인 Baf3 세포주에 TXNIP 또는 TXNIP(이중 돌연변이체)를 p53-Luc 리포터 및 pRL-CMV 플라스미드 벡터와 리포펙타민-플러스(lipofectamine-plus)를 사용하여 제조사의 사용설명서대로 형질감염(transfection)하였다. 루시페라제 활성(luciferase activity)은 p53-Luc 리포터를 사용하여 관찰되었고, 레닐라(renilla) 루시페라제-발현 벡터(luciferase-expression vector, Promega, 미국)를 함께 형질감염하여 형질감염의 효율(efficiency)을 확인하였다. 파이어플라이(firefly) 및 레닐라 루시페라제 활성은 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega, 미국)을 사용하여 측정하였다.

그 결과, 도 6F에 나타난 바와 같이 TXNIP 및 p53 사이의 결합에 의해서 세포 내에서 p53-매개 전사 활성이 유의적으로 증가하였다(도 6F).

따라서, 상기 결과들은 TXNIP가 p53 및 MDM2 사이의 결합을 방해하여 p53 안정성을 증가시키고, p53의 전사 활성을 유도함을 나타낸다.

<실시예 12> 생체 내에서 TXNIP가 p53의 항산화 효과 매개 확인

<12-1> 조혈세포에서 p53 및 이의 표적 단백질의 발현 확인

TXNIP가 p53-의존적 항산화 유전자의 발현을 통해서 p53의 항산화 활성을 조절할 수 있는 가능성을 확인하기 위하여 야생형의 LKS 및 LK 세포주에서 p53 및 이의 표적 유전자인 SESN1, SESN2, GPX-1, p21 등의 발현을 확인하기 위하여 면역염색 및 웨스턴 블랏을 수행하였다.

구체적으로, 면역염색은 상기 실시예 <11-5>의 방법대로 수행되었다. 또한, 웨스턴 블랏을 수행하기 위하여 세포주를 PBS로 세척하고, 0.1% Nonidet P-40, 10 mg/ml 아프로티닌(aprotinin), 10 mg/ml 류펩틴(leupeptin), 10 mM 불화나트륨(sodium fluoride), 2 mg/ml α -1-안티트립신(α -1-antitrypsin), 2 mM 피로인산나트륨(sodium pyrophosphate), 25 mM β -글리세로인산 나트륨(sodium β -glycerophosphate), 1 mM 나트륨 오르토바나데이트(sodium orthovanadate) 및 1 mM

PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)가 첨가된 용해 용액[20 mM Hepes(pH 7.9), 10 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.3 M NaCl] 1 x RIPA 완충액을 첨가하여 세포를 용균시켰다. 상기 용균된 세포에서 추출한 단백질은 원심분리를 수행하여 상층액을 수득하였고, BCA 방법을 이용하여 상층액의 단백질 농도를 정량하였다. 그리고나서, 동

5 량의 단백질을 PAGE 전기영동법으로 SDS 러닝 완충액(running buffer)을 사용하여 분리하고, 이를 PVDF 막으로 이동시켜 0.1% 트윈 20(tween 20) 및 5% 무지방 우유(skim milk)가 첨가된 PBS로 전처리를 하였다. 그리고 p53, GPX-1, p21 및 β -액틴에 대한 1차 항체를 처리하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고, PBS로 세척한 뒤 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 막은 ECL(Pierce, 미국)

10 용액을 사용하여 현상하였다.

그 결과, 도 7A 및 7B에 나타난 바와 같이 p53 및 이의 표적 유전자인 SESN1, SESN2, GPX-1 및 p21 단백질의 발현을 확인할 수 있었다(도 7A 및 7B).

<12-2> TXNIP 결핍 세포주에서 p53 표적 유전자의 발현 감소 확인

15 야생형 및 TXNIP가 결핍된 LKS 세포주에서 p53 표적 유전자의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위하여 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR) 및 RT-PCR을 수행하였다.

구체적으로, LKS 세포로부터 TRIzol 및 RNeasy Micro kit(Qiagen, 미국)을 사용하여 전체 RNA를 분리하였고, 정량적 PCR은 SYBR Premix ExTaq(Takara Bio, 일

20 본) 및 Thermal Cycler Dice Real-Time System TP800(Takara Bio, 일본)을 이용하여 수행되었다. RT-PCR은 Maxime PCR premix kit(Intron biotechnology, 대한민국)를 사용하여 제조사의 사용설명서대로 수행하였으며, 이때 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타난 바와 같다.

【표 2】

프라이머 이름	서열(5'→3')	서열번호
---------	-----------	------

BAX_F	ATGCGTCCACCAAGAAGCTG	17
BAX_R	CCCCAGTTGAAGTTGCCATC	18
PUMA_F	CTGTATCCTGCAGCCTTTGC	19
PUMA_R	ACGGGCGACTCTAAGTGCT	20
CDKN1A_F	GGAACATCTCAGGGCCGAA	21
CDKN1A_R	TGGGCACTTCAGGGTTTCT	22
GPX-1_F	CCAAGTACATCATTTGGTCT	23
GPX-1_R	CATTAGGTGGAAGGCATCG	24
SESN1_F	CCAGGACGAGGAAGTTGG	25
SESN1_R	CCAGGTAGGAACACTGATGC	26
SESN2_F	CTCACAGCTGGTCTGTGTG	27
SESN2_R	CCTCCGTGTGGCAATACC	28

그 결과, 도 7C에 나타난 바와 같이 야생형 LKS 세포주와 비교하여 TXNIP 결핍 세포주에서는 항산화 효과를 나타내는 p53 표적 단백질의 발현이 감소한 것을 확인하였다(도 7C).

5

<12-3> TXNIP 결핍 세포주에서 산화촉진 유전자(pro-oxidant gene)의 발현 증가 확인

TXNIP 결핍 세포주에서 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 산화촉진 유전자의 발현 변화를 확인하기 위해서 상기 실시예 <12-3>의 방법으로 mRNA의 발현 수준을
10 확인하였으며, 이때 사용된 프라이머는 상기 표 2에 나타내었다.

그 결과, 도 7D에 나타난 바와 같이 TXNIP 결핍 세포주에서 산화촉진 유전자인 CDKN1A, BAX 및 PUMA의 mRNA 발현 수준이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 7D). 따라서, 상기 결과는 TXNIP 녹아웃 마우스에서 활성산소의 수준이 현저히 증가하는 것이 p53 활성화와 연관이 있을 것을 나타낸다.

<12-4> 산화적 스트레스 조건하에서 TXNIP 발현 변화에 따른 p53 활성 변화 확인

산화적 스트레스 환경에 노출 시간에 따라 TXNIP의 발현 변화 및 이에 따른
 5 p53의 활성변화를 상기 실시예 <12-1>의 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였고, 이때
 phospho-p53(S15)(Cell signaling, 미국), p53(Santa Cruz, 미국),
 TXNIP(Invitrogen, 미국) 및 GAPDH(Santa Cruz, 미국)에 대한 1차 항체를 사용하였
 다.

그 결과, 도 7E에 나타난 바와 같이 리니지⁻(lineage⁻) 세포주에 있어서, 산
 10 화적 스트레스 환경에서 TXNIP의 발현이 증가하고, p53 활성의 다른 동력학
 (kinetics)을 나타냄을 확인하였다(도 7E).

<12-5> 생체 내에서 TXNIP 및 p53의 상호작용에 의한 항산화 활성 확인

TXNIP 및 p53의 상호작용에 의한 항산화 활성을 직접적으로 확인하기 위해
 15 서 야생형의 TXNIP, 이중 돌연변이체 TXNIP 또는 p53 유전자를 TXNIP 녹아웃 마우
 스 유래 골수세포에 형질주입하였고, 이들 세포를 상기 실시예 <2-2>의 방법으로
 유사유전자형(CD45.1⁺) 수여체에 골수이식을 수행하였다. 골수이식 8주 후, 상기
 수여체에 파라콰트(paraquat) 40 mg/kg을 투여하고, 상기 실시예 <1-2>의 방법으로
 조혈모세포의 빈도(frequency) 및 상기 실시예 <5-3>의 방법으로 생존율을 측정하
 20 였다.

그 결과, 도 7F에 나타난 바와 같이 야생형 TXNIP 또는 p53을 형질주입한
 세포를 골수이식한 마우스의 경우 조혈모세포의 빈도가 회복되었고(도 7F), 또한,
 도 7G에 나타난 바와 같이, 상기 마우스의 생존율이 증가하는 것을 확인하였다(도
 7G).

25 따라서, 상기 결과는 생체 내에서 p53과의 상호작용을 통하여 TXNIP가 항산

화 효과가 있음을 나타낸다(도 7H).

【청구의 범위】**【청구항 1】**

TXNIP(Thioredoxin-interacting protein) 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학적 조성물.

5

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 *TXNIP* 유전자는 서열번호 29 및 30으로 구성된 염기 서열로 기재된 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

10 **【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 유전자 전달체는 벡터 또는 재조합 바이러스인 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

【청구항 4】

15 제 3항에 있어서, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

【청구항 5】

20 제 1항에 있어서, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

【청구항 6】

25 제 1항에 있어서, 상기 세포는 조혈모세포 또는 수지상 세포인 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 면역증강은 면역 시스템의 항상성 유지에 의한 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

5

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 상기 면역증강은 조혈모세포(hematopoietic stem cell)의 항상성 유지에 의한 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

10 **【청구항 9】**

제 1항에 있어서, 상기 면역증강은 TXNIP 및 p53 사이의 상호작용(interaction)에 의한 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

15 **【청구항 10】**

TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강식품.

【청구항 11】

20 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 전이억제용 약학적 조성물.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 암 전이억제용 약
25 학적 조성물.

【청구항 13】

TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 암 전이억제용 건강식품.

5

【청구항 14】

TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈액질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

10 **【청구항 15】**

제 14항에 있어서, 상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 혈액질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

15 **【청구항 16】**

TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈액질환 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 17】

20 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 면역 이상이 생긴 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역증강방법.

【청구항 18】

25 약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또

는 TXNIP 단백질을 전이된 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 억제 방법.

【청구항 19】

5 제 18항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 암 전이 억제 방법.

【청구항 20】

10 약학적으로 유효한 양의 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 전이 예방 방법.

【청구항 21】

제 20항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 암 전이 예방 방법.

15

【청구항 22】

약학적으로 유효한 양의 TXNIP 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 TXNIP 단백질을 혈액질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈액질환 치료 방법.

20

【청구항 23】

제 22항에 있어서, 상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 혈액질환 치료 방법.

25

【청구항 24】

약학적으로 유효한 양의 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈액질환 예방 방법.

5 **【청구항 25】**

제 24항에 있어서, 상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 혈액질환 예방 방법.

10 **【청구항 26】**

면역증강용 약학적 조성물로 사용하기 위한, *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

【청구항 27】

15 암 전이 억제용 약학적 조성물로 사용하기 위한, *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

【청구항 28】

20 암 전이 예방용 약학적 조성물로 사용하기 위한, *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

【청구항 29】

제 27항 또는 제 28항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

【청구항 30】

혈액질환 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

5 **【청구항 31】**

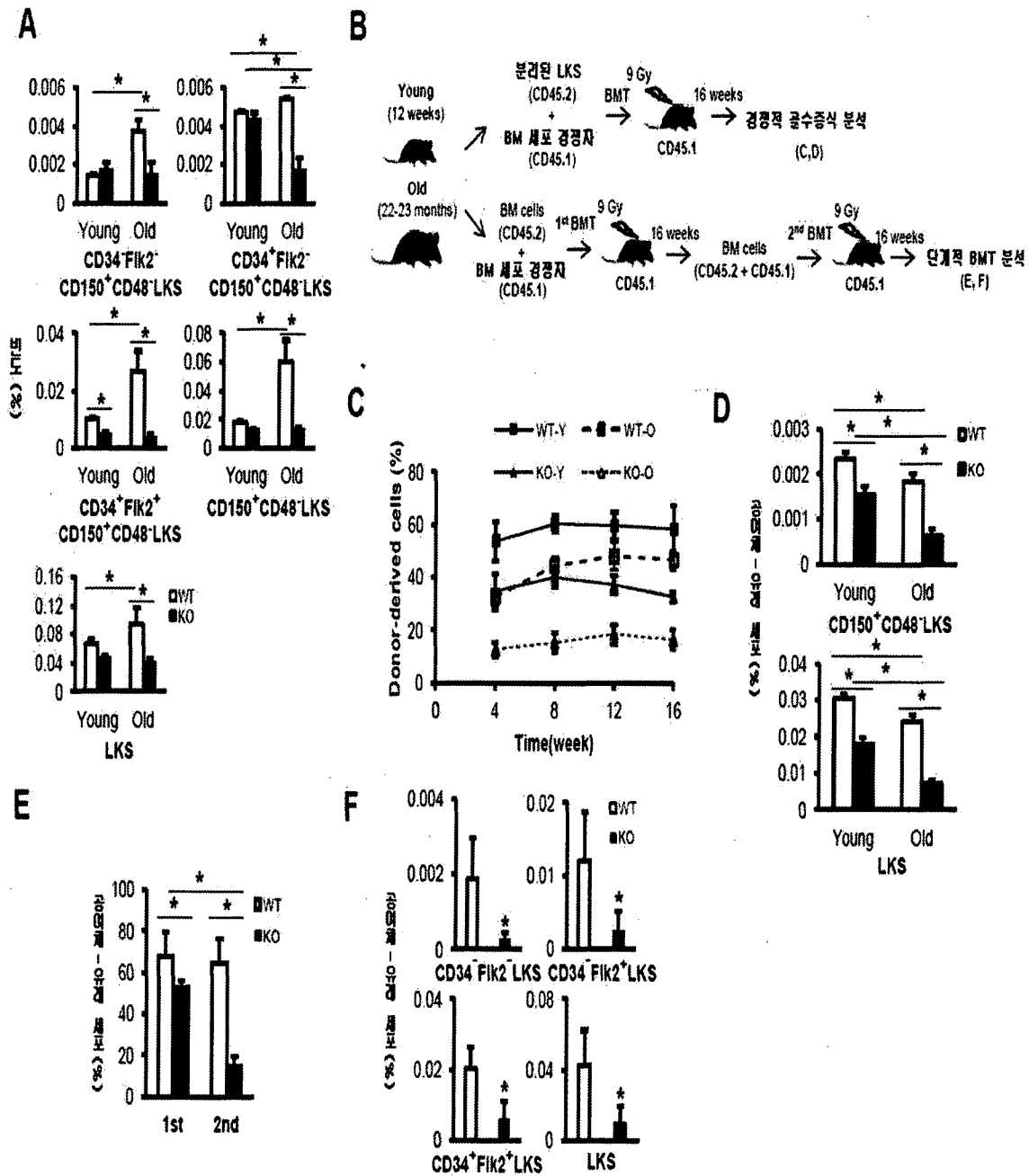
혈액질환 예방용 약학적 조성물로 사용하기 위한, *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

【청구항 32】

10 제 30항 또는 제 31항에 있어서, 상기 혈액질환은 빈혈, 다혈증, 백혈병, 골수이형성증, 골수 섬유증, 혈소판 감소증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 *TXNIP* 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 *TXNIP* 단백질.

1/7

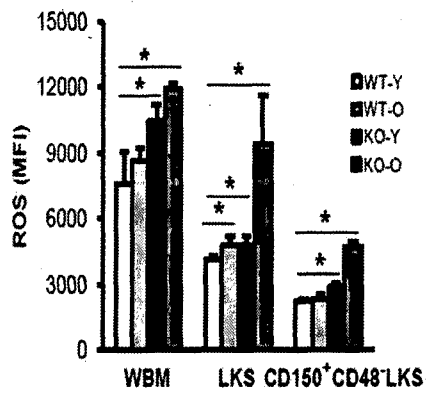
[도 1]



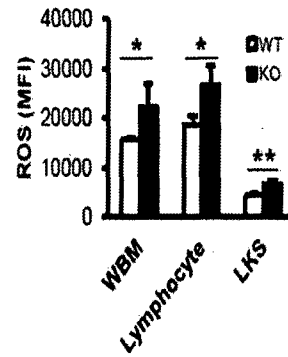
2/7

[도 2]

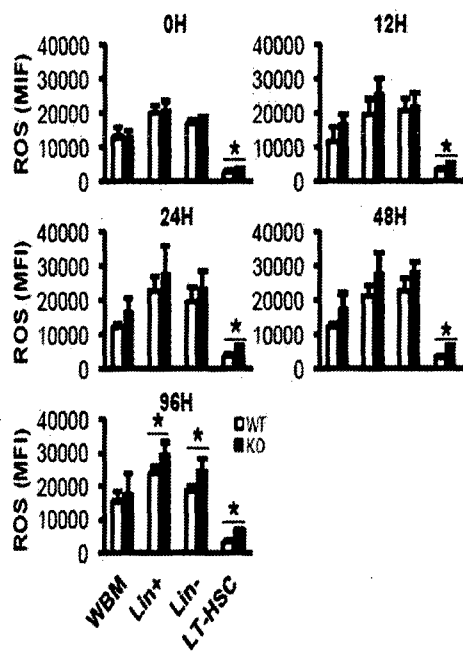
A



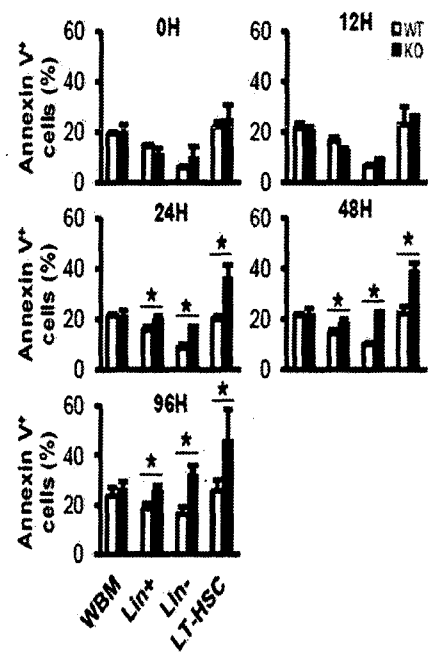
B



C

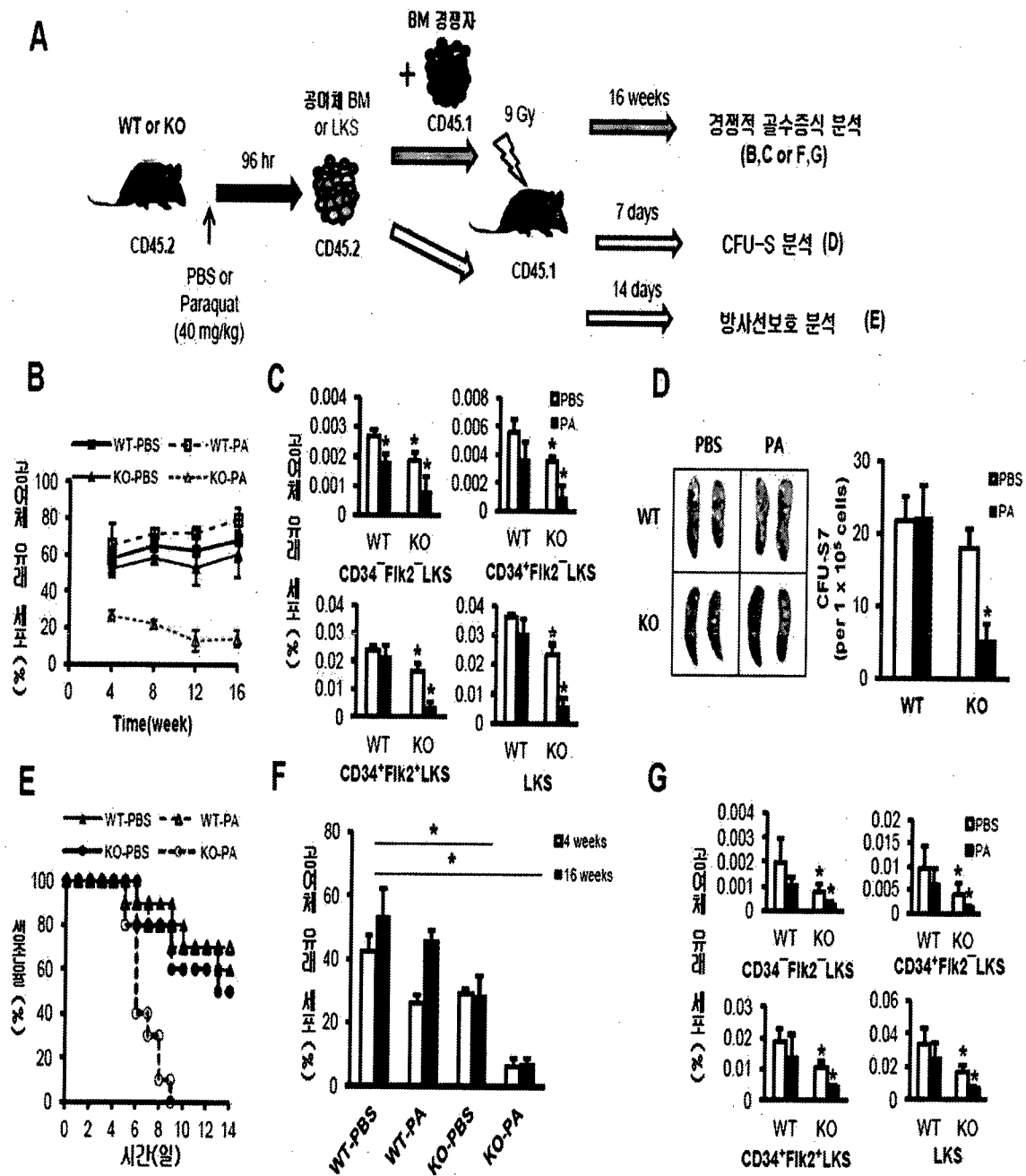


D



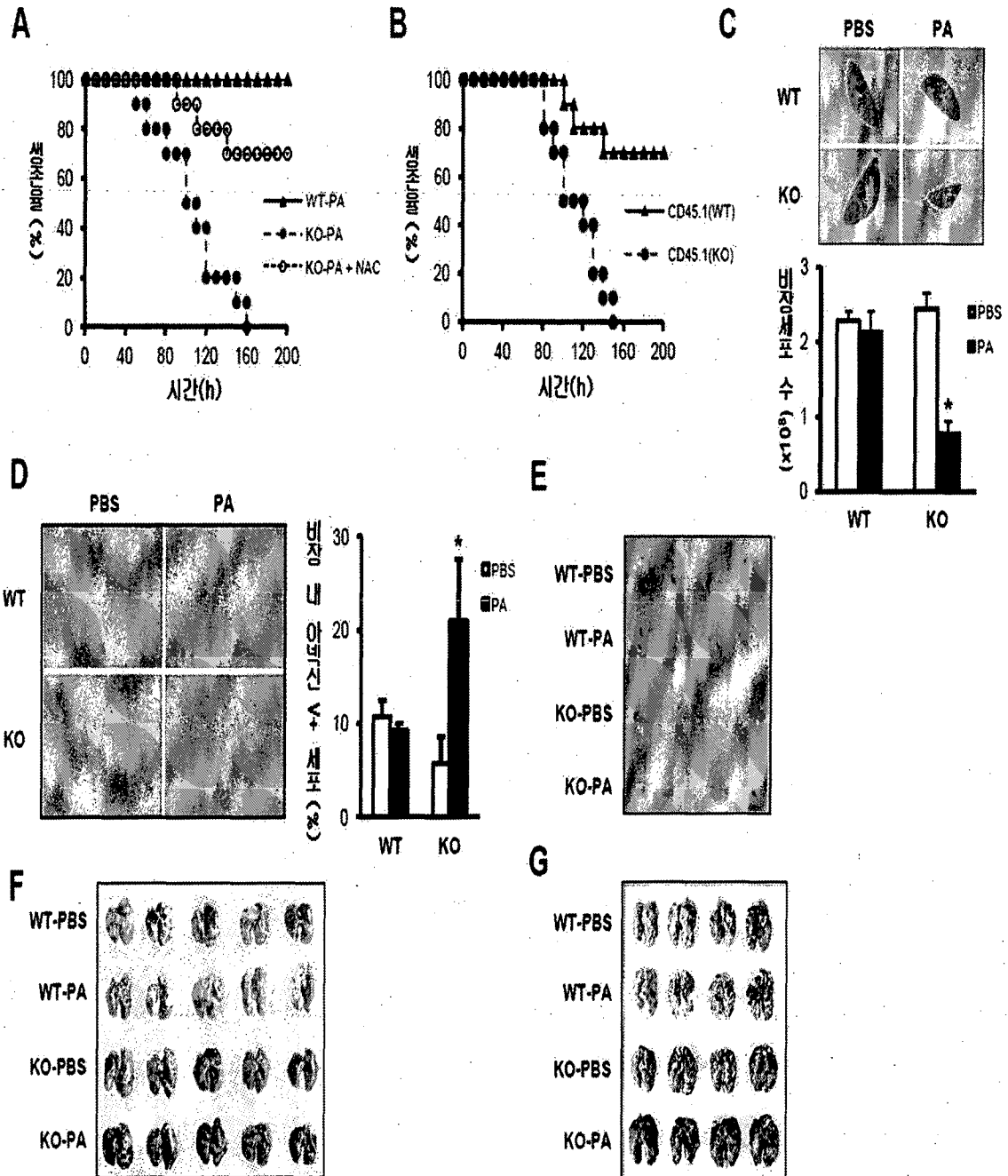
3/7

[도 3]



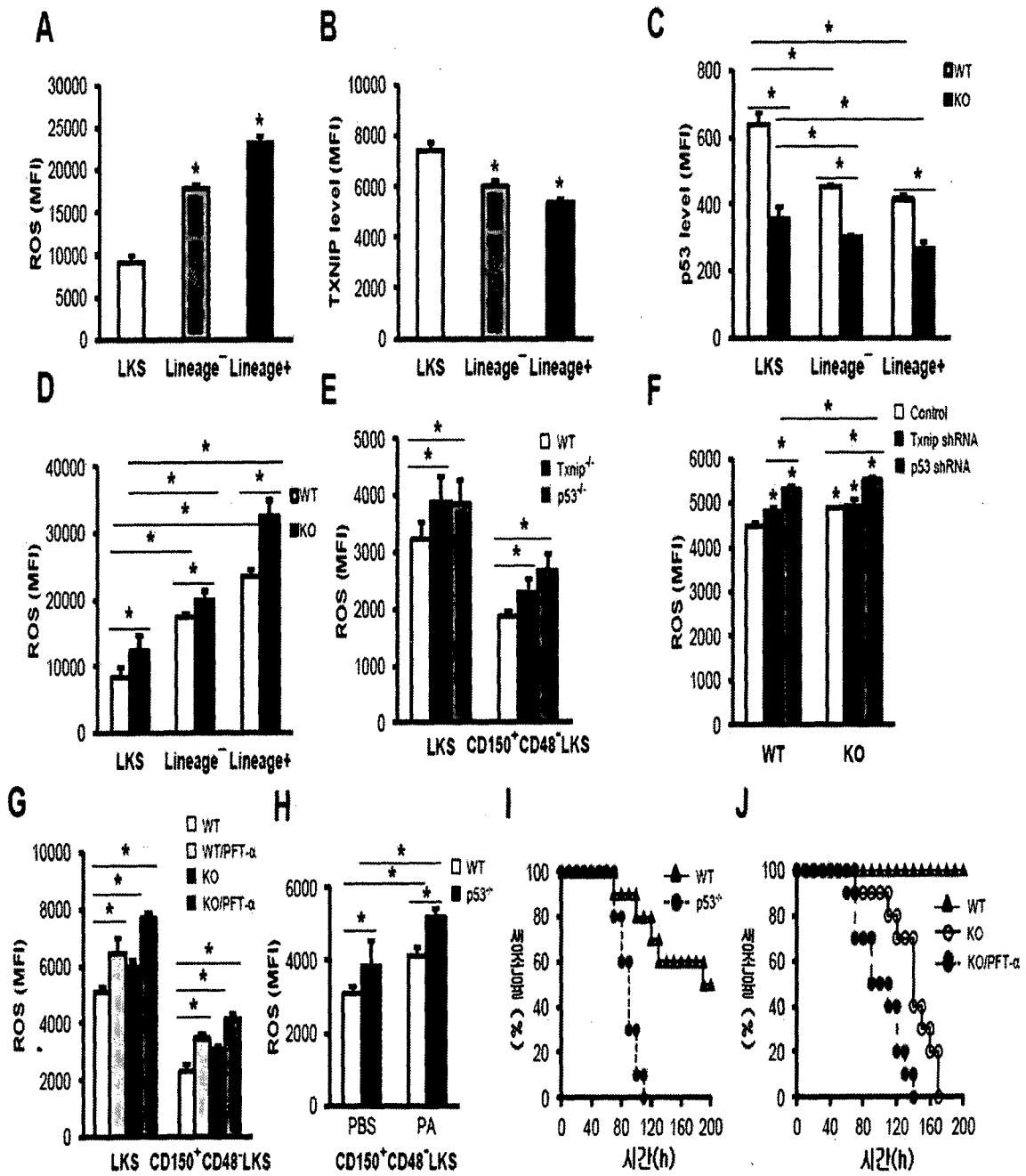
4/7

[도 4]



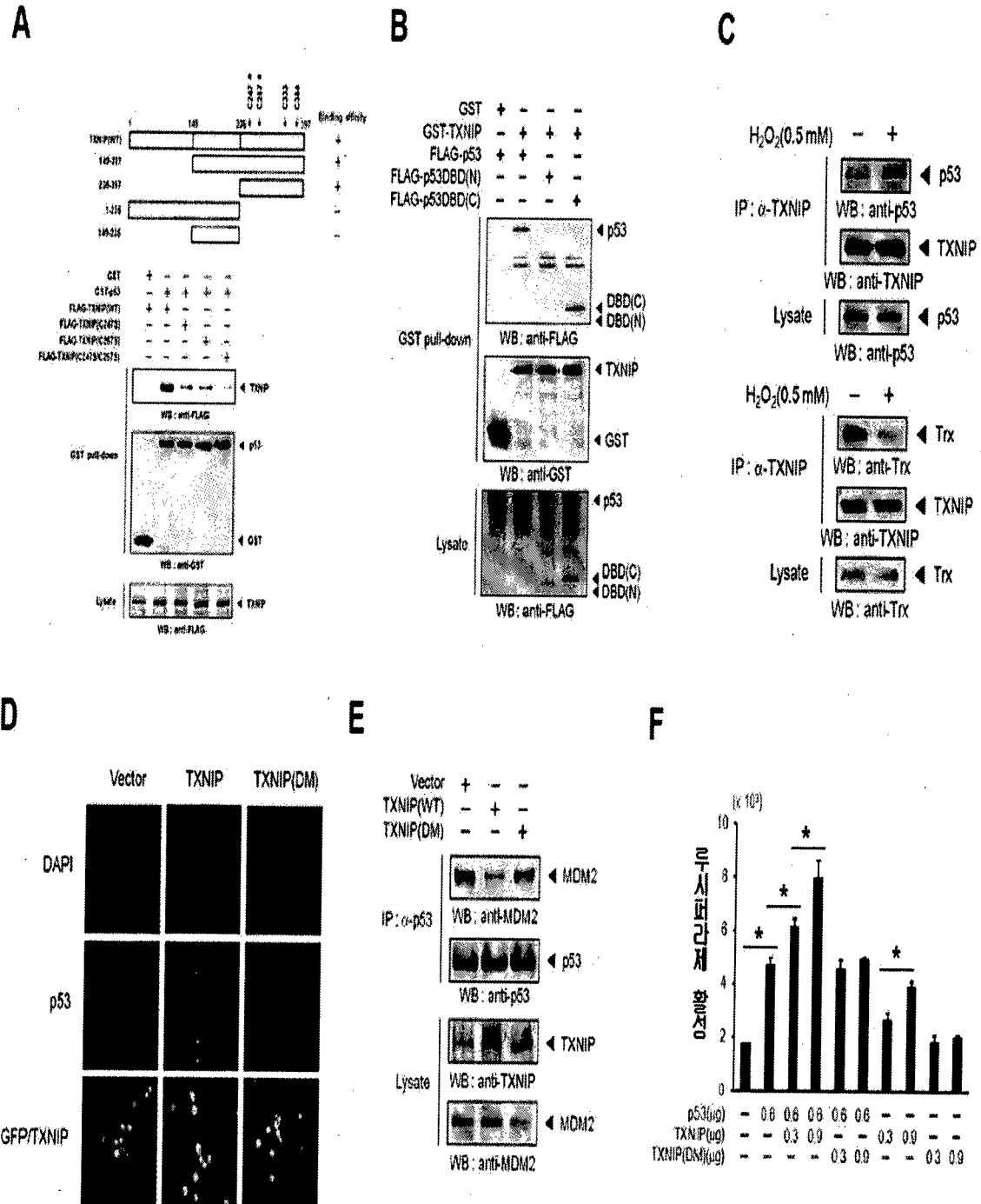
5/7

[도 5]



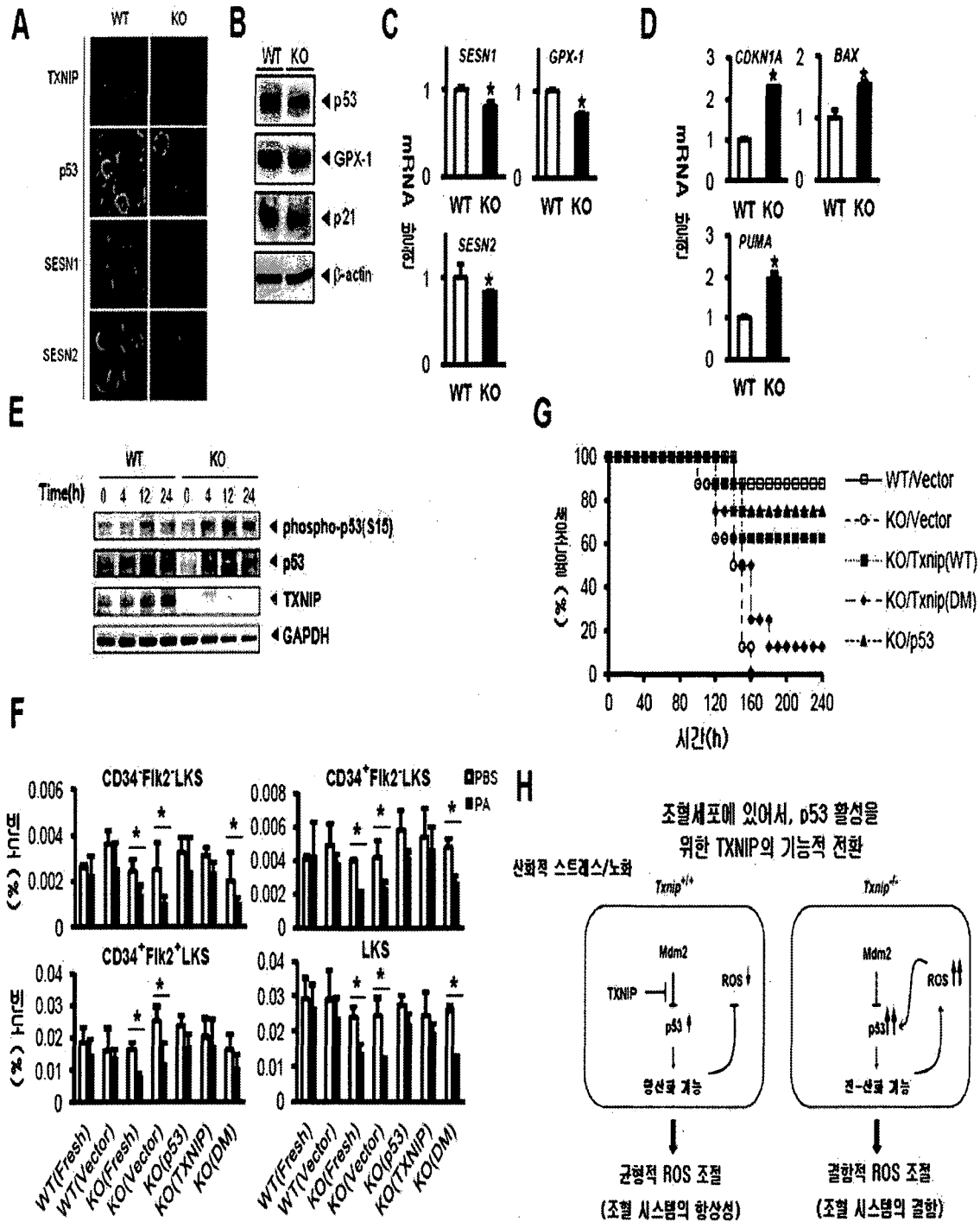
6/7

[도 6]



7/7

[도 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; C07K 14/705; A61K 38/16; A61K 47/48

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: TXNIP, VDUP1, immunological enhancement, cancer metastasis suppression, blood-related disease, anemia, lung cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-0860081 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 24 September 2008 See abstract, claims 1, 2, 5, 6, paragraphs [0029], [0032], [0046] to [0047], [0065] to [0066], [0080] to [0082]	11-12,13-16,26-32
X	Steven F. Goldberg et al., "Melanoma Metastasis Suppression by Chromosome 6: Evidence for a Pathway Regulated by CRSP3 and TXNIP", Cancer Research, vol. 63, pages 432-440 (published on 15 January 2003) See page 433 right column lines 25 to 32, pages 437 to 439	11-12,13,26-32
A	Z.Chen et al., "Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) regulates T-cell sensitivity to glucocorticoid during HTLV-I-induced transformation", LEUKEMIA, vol. 25, pages 440-448 (published on 10 December 2010) See the entire document	11-16,26-32
A	Yumiko Nishinaka et al., "Loss of Thioredoxin-Binding Protein-2/Vitamin D3 Up-Regulated Protein 1 in Human T-Cell Leukemia Virus Type I-Dependent T-Cell Transformation: Implications for Adult T-Cell Leukemia Leukemogenesis", Cancer Research, vol. 64, pages 1287-1292 (2004) (published on 15 February 2004) See the entire document	11-16,26-32



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

21 AUGUST 2014 (21.08.2014)

Date of mailing of the international search report

21 AUGUST 2014 (21.08.2014)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003786

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.: **17-25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17 to 25 claim an immune stimulating method, a cancer metastasis suppression method, a cancer metastasis prevention method, a blood dyscrasia treatment method, and a blood dyscrasia prevention method, and the claims include a step for injecting medicine into the body, and to a method for treatment of the human body. The claims pertain to 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.: **1-10**
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:
Claims 1 to 10 claim a medical use or functional food, however, the medical use or the use of the functional food are specified only by function or property such as "for stimulating immunity." The medical effect or function of the claims cannot be supported by the detailed description of the invention.
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/KR2014/003786

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	K.N.Lee et al., "VDUP1 Is Required for the Development of Natural Killer Cells", IMMUNITY, vol. 22, pages 195-208 (22 February 2005) See the entire document	11-16,26-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/003786

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0860081 B1	24/09/2008	KR 20080043162 A	16/05/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00; C07K 14/705; A61K 38/16; A61K 47/48 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: TXNIP, VDUP1, 면역증강, 암전이 억제, 혈액질환, 빈혈, 폐암		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-0860081 B1 (한국생명공학연구원) 2008.09.24 요약, 청구항 1,2,5,6, 단락번호 [0029], [0032], [0046] 내지 [0047], [0065] 내지 [0066], [0080] 내지 [0082] 참고	11-12, 13-16, 26-32
X	Steven F. Goldberg 외 6명, "Melanoma Metastasis Suppression by Chromosome 6: Evidence for a Pathway Regulated by CRSP3 and TXNIP", Cancer Research, Vol. 63, pages 432-440 (2003.1.15. 공개) 433면 오른쪽 컬럼 25 내지 32행, 437 내지 439면 참고	11-12, 13, 26-32
A	Z.Chen 외 7명, "Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) regulates T-cell sensitivity to glucocorticoid during HTLV-I-induced transformation", L EUKEMIA, Vol. 25, pages 440-448 (2010.12.10. 공개) 전문참고	11-16, 26-32
A	Yumiko Nishinaka 외 9명, "Loss of Thioredoxin-Binding Protein-2/Vitamin D3 Up-Regulated Protein 1 in Human T-Cell Leukemia Virus Type I-Dependent T-Cell Transformation: Implications for Adult T-Cell Leukemia Leukemogenesis", Cancer Research, Vol. 64, pages 1287-1292 (2004) (2004.2.15. 공개) 전문참고	11-16, 26-32
☒ 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 특허문헌 "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 2014년 08월 21일 (21.08.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 08월 21일 (21.08.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 정의준 전화번호 +82-42-481-8148 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	K.N.Lee 외 15명, "VDUP1 Is Required for the Development of Natural Killer Cells", IMMUNITY, Vol. 22, pages 195-208 (2005.2.22) 전문참고	11-16, 26-32

제2기제란 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: 17-25
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 17 내지 25는 면역증강방법, 암전이 억제방법, 암전이 예방방법, 혈액질환 치료방법 및 혈액질환 예방방법을 청구하고 있고, 상기 청구항들은 약물을 인체에 투여하는 단계를 포함하고 있으며, 이는 인간의 치료 방법에 관한 것이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☒ 청구항: 1-10
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 1-10은 의약품 또는 기능성 식품을 청구하고 있음에도 불구하고, 의약품 또는 기능성 식품의 용도를 '면역증강용'과 같이 기능적 또는 속성으로만 특정하고 있으므로, 상기 청구항들은 약리효과 또는 기능성이 발명의상세한 설명에 의해 뒷받침되는 것으로 볼 수 없습니다.
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2014/003786

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0860081 B1	2008/09/24	KR 20080043162 A	2008/05/16