

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 3월 14일 (14.03.2019)



(10) 국제공개번호

WO 2019/050313 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

Kyeong-Eun); 13922 경기도 안양시 동안구 관악대로 135, 128동 2206호, Gyeonggi-do (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/010457

(74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP GROUP); 06626 서울시 서초구 강남대로 343, 11층, Seoul (KR).

(22) 국제출원일:

2018년 9월 7일 (07.09.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0115249 2017년 9월 8일 (08.09.2017) KR

(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

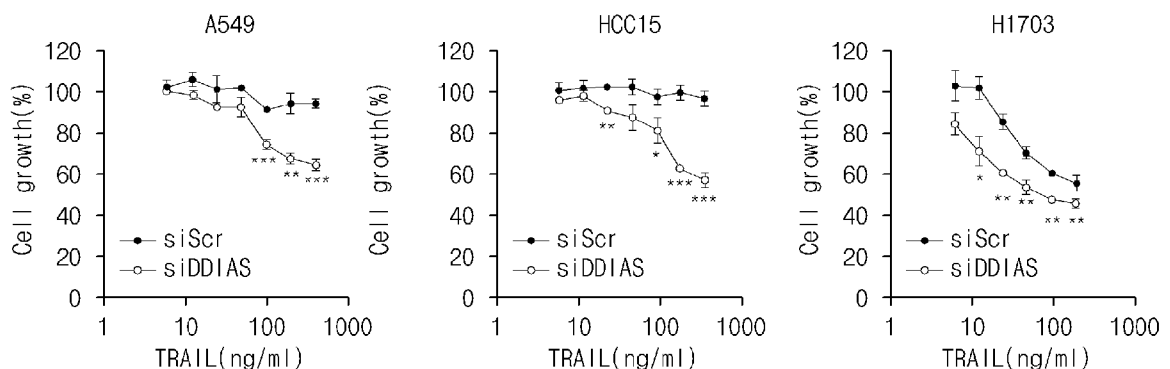
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(72) 발명자: 원미선 (WON, Mi Sun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 임주영 (IM, Joo-Young); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김보경 (KIM, Bo Kyung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 반현승 (BAN, Hyun Seung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정경은 (JUNG,

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER COMPRISING DDIAS INHIBITOR AND DEATH RECEPTOR LIGAND

(54) 발명의 명칭: DDIAS 억제제 및 사멸 수용체 리간드를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer comprising a DNA damage-induced apoptosis suppressor (DDIAS) inhibitor and a death receptor ligand as active ingredients. Since the DDIAS inhibitor of the present invention effectively inhibits the degradation promotion of caspase-8 and the formation of the death-inducing signaling complex (DISC) by means of an action of DDIAS, and exhibits an excellent synergistic effect of promoting apoptosis in cancer cells by acting together with the death receptor ligand, the DDIAS inhibitor can be variously used as a composition for prevention and treatment of cancer including lung cancer and liver cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 DDIAS 억제제는 DDIAS의 작용에 의한 카스파제(caspase)-8의 분해촉진 및 DISC (death-inducing signaling complex) 형성 억제를 효과적으로 저해하여, 사멸 수용체 리간드와 함께 작용해 암세포에서의 세포 사멸을 촉진하는 우수한 시너지 효과를 발휘함으로써, 폐암 및 간암을 포함한 암의 예방 및 치료용 조성물로 다양하게 활용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: DDIAS 억제제 및 사멸 수용체 리간드를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 종양 괴사 인자 관련 아폽토시스-유발 리간드(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)는 다양한 유형의 암세포에서 아폽토시스를 촉진하는 TNF 단백질 군의 구성원이다. TRAIL은 외부 수용체(DR) 4와 DR5에 결합하고 외인성 아폽토시스 경로에서 사멸 유도 신호 복합체(death-inducing signaling complex, DISC)를 모집하여 아폽토시스를 유도하는 것으로 알려져 있다. Fas-관련 단백질 사멸 도메인(Fas-associated protein death domain; FADD)이 먼저 DR과 상호 작용하고, 그 후 사멸 도메인(death domain; DD) 및 사멸 이펙터 도메인(death effector domain; DED)을 통해 프로카스파제(procaspase)-8과 상호 작용한다. DISC 형성을 통한 카스파제-8의 활성화는 카스파제-3 및 -7과 같은 다운 스트림 이펙터 카스파제의 절단 및 활성화를 유도하여 TRAIL-유도 아폽토시스를 유도하는 것으로 알려져 있으나, 일부 암세포는 TRAIL 수용체 조절 장애와 DISC 성분 결핍 등의 결과로 TRAIL에 내성을 갖게 되는 것으로 알려져 있다.
- [3] 카스파제-8은 TRAIL 내성 및 신호 전달에 관여하는 것으로 알려진 세포 단백질로서, 돌연변이, 후생학적 사일런싱(epigenetic silencing) 및 안정성으로 인한 카스파제-8의 발현 감소로 인해 TRAIL 저항성이 유발되고, 이로 인해 TRAIL-유도 아폽토시스가 방해를 받는 것으로 알려져 있다. 카스파제-8의 번역 후 변형, 특히 카스파제-8의 인산화는 안정성 및 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. P90 리보솜 S6 키나아제(P90 ribosomal S6 kinase; RSK) 2는 T263에서 카스파제-8을 인산화시켜 유비퀴틴화 및 프로테아좀 관련 분해를 유도하며, Src는 Y380에서 카스파제-8을 인산화시켜 효소 활성을 억제한다. 또한, 세포성 cFLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1 β converting enzyme-like inhibitory protein), PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes-15), DJ-1 또는 뮤신(MUC)-1과 같은 항-아폽토시스 단백질은 카스파제-8의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 단백질은 카스파제-8의 DISC로의 이동을 차단하여 DR-유도 아폽토시스를 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [4] DNA 손상-유도 아폽토시스 억제 유전자(DNA damage-induced apoptotic suppressor; DDIAS)는 활성화된 T 세포 1 (NFATc1)의 전사 인자 핵 인자의 표적

유전자로 EGF (epithelial growth factor)에 의해 유도되어 β -카테닌(catenin)을 안정화시킴으로써 암세포의 침윤을 적극적으로 조절하는 것으로 알려져 있다. DDIAS는 캄프토테신(camptothecin)이나 시스플라틴(cisplatin)과 같은 DNA 손상 시약으로부터 암세포를 보호하며, 핵 DDIAS는 DNA 폴리머라아제-프리마아제 복합체(polymerase-primase complex)의 보조 인자로서 DNA 중합 효소와 결합하여 간세포 암종(HCC)에서 종양 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있는 반면, EGF-유도 DDIAS는 세포질에 국한되어 HeLa 세포의 β -카테닌 안정성을 조절하는 것으로 알려져 있다.

- [5] 이러한 종래 연구들에 의해 DDIAS는 여러 경로를 통해 암세포의 생존을 조절할 가능성이 있을 것으로 여겨지고 있으나(대한민국 등록특허 제10-1168726호, 대한민국 등록특허 제10-1591278호), 암세포에서 아포토시스를 유도하는 TRAIL의 작용에 대한 DDIAS의 영향력에 관하여는 전혀 규명된 바가 없으며, 이를 이용하여 DDIAS 억제제 및 TRAIL을 포함하는 사멸 수용체를 병용함으로써 우수한 시너지 효과가 발휘되어 암을 효과적으로 예방하고 치료하는 방법에 관하여는 전혀 연구된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명은 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [8] 본 발명에서 사용되는 용어, "DDIAS"는 마우스 Noxin의 상동(homolog) 단백질로 인간 Noxin 유전자 hNoxin으로 보고되었다(GenBank 등록번호: NM_145018, C11orf82, FLJ25416, FLJ13936, UniProtKB/TrEMBL entry Q8IXT1). 최근, 인간 Noxin이 DNA가 손상된 세포의 세포 사멸을 억제한다는 사실에 근거하여 DNA 손상-유도 아포토시스 억제 유전자(DNA damage-induced apoptotic suppressor; DDIAS)로 명명되었다(Human Noxin is an anti-apoptotic protein in response to DNA damage of A549 non-small cell lung carcinoma. Int J Cancer. 2014 Jun 1;134(11):2595-2604).
- [9] 본 발명에서 DDIAS 억제제는 DDIAS 유전자의 발현을 억제하는 것이라면 특별한 제한 없이 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, DDIAS 억제제는 바람직하게는 DDIAS 유전자의 발현을 억제하는 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 shRNA로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [10] 본 발명에서 사용되는 용어, "siRNA (small interfering RNA)"는 RNA 간섭(RNA

interference; RNAi) 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 짧은 RNA를 의미하며, 대체로 약 20 뉴클레오타이드 내외의 크기를 갖는다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자 치료 방법으로 제공될 수 있다.

- [11] 본 발명에서 siRNA는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥이 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또는 자기-상보성 (self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.
- [12] 상기 siRNA는 RNA 끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(mismatch, 대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지 (bulge, 일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNA 간섭 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이라면 평활 (blunt) 말단 혹은 점착 (cohesive) 말단 모두 가능하다.
- [13] 본 발명에서 DDIAS 억제제로서의 siRNA는 DDIAS의 mRNA 중 하나의 표적 서열 위치에만 선택적으로 결합이 가능하도록 1 종의 siRNA만을 사용할 수도 있고, 한군데 이상의 표적 서열 위치에 결합이 가능하도록 2종 이상의 siRNA를 함께 사용할 수도 있다.
- [14] 본 발명에서 DDIAS에 대한 siRNA는 바람직하게는 DDIAS의 mRNA 서열 중, 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 표적 서열에 대한 siRNA일 수 있다. DDIAS에서 siRNA가 결합될 수 있는 구체적인 표적 서열은 하기 표 1에 나타낸다.

[15] [표 1]

[16]

서열번호	표적 서열	염기 서열
1	880-898	gattcatggagccttgttt
2	2673-2691	ctatcatttccctgatcaa
3	1153-1171	cagaagagatctgcatgtt

- [17] 본 발명에서 DDIAS에 대한 siRNA는 보다 바람직하게는 서열번호 4의 센스 서열 및 서열번호 5의 안티센스 서열을 갖는 siRNA; 서열번호 6의 센스 서열 및 서열번호 7의 안티센스 서열을 갖는 siRNA; 및 서열번호 8의 센스 서열 및 서열번호 9의 안티센스 서열을 갖는 siRNA로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다. DDIAS에 대한 siRNA의 구체적인 서열은 하기 표 2에 나타낸다.

[18] [표 2]

[19]

서열번호	센스 염기서열(5'-3')	DDIAS 표적서열
	안티센스 염기서열(5'-3')	
4	gauucauggagccuuguuu	880-898
5	aaacaaggcuccaugaauc	
6	cuaucuuucccugaucaa	2673-2691
7	uugaucagggaauugauag	
8	cagaagagaucugcauguu	1153-1171
9	aacaugcagaucucuucug	

[20] 본 발명에서 사용되는 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA, 또는 이들의 유도체를 의미하며, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다.

[21] 본 발명에서 DDIAS 억제제로서의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 DDIAS의 mRNA 중 하나의 표적 서열 위치에만 선택적으로 결합이 가능하도록 1 종의 안티센스 올리고뉴클레오타이드만을 사용할 수도 있고, 한군데 이상의 표적 서열 위치에 결합이 가능하도록 2종 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함께 사용할 수도 있다.

[22] 본 발명에서 DDIAS 억제제로서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 안티센스 RNA일 수 있다.

[23] 본 발명에서 사용되는 용어, "안티센스 RNA"는 표적 유전자에 대한 안티센스 서열로 이루어진 단일가닥 RNA를 의미하며, 표적 유전자에 결합하여 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 표적 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위해 구조 변형된 안티센스 RNA를 포함한다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 RNA를 합성하고 변형시킬 수 있다(European Journal of Biochemistry. 2003;270:1628-1644. Methods Enzymol.2000: 313, 3-45. 참조).

[24] 본 발명에서 DDIAS에 대한 안티센스 RNA는 바람직하게는 서열번호 5, 서열번호 7 및 서열번호 9로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다. DDIAS에 대한 안티센스 RNA의 구체적인 서열은 하기 표 3에 나타난다.

[25] [표 3]

[26]

서열번호	안티센스 염기서열(5'-3')	DDIAS 표적서열
5	aaacaaggcuccaugaauc	880-898
7	uugaucagggaaaugauag	2673-2691
9	aacaugcagaucucuucug	1153-1171

[27] 본 발명에서 사용되는 용어, "shRNA (short hairpin RNA)"는 siRNA 타겟 서열의 센스 및 안티센스 서열이 약 3개~10개의 염기 링커(루프 서열)로 연결된 구조를 갖는 짧은 헤어핀 구조의 RNA를 의미하는 것으로, siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위해 고안된 구조이다. shRNA는 아테노바이러스, 렌티바이러스, 플라스미드 발현 벡터 시스템 등을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 표적 유전자의 사일런싱을 유도할 수 있다.

[28] 본 발명에서 DDIAS 억제제로서의 shRNA는 DDIAS의 mRNA 중 하나의 표적 서열 위치에만 선택적으로 결합이 가능하도록 1 종의 shRNA만을 사용할 수도 있고, 한군데 이상의 표적 서열 위치에 결합이 가능하도록 2종 이상의 shRNA를 함께 사용할 수도 있다.

[29] 본 발명에서 DDIAS에 대한 shRNA는 바람직하게는 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군에서 선택되는 DNA 서열로 암호화된 것일 수 있다. DDIAS에 대한 shRNA의 구체적인 서열은 하기 표 4에 나타낸다.

[30] [표 4]

[31]

서열번호	염기서열(5'-3')
10	gattcatgga gccttgtttg agctcaaaca aggctccatg aatc
11	ctatcatttc cctgatcaag agctcttgat cagggaaatg atag
12	cagaagagat ctgcatgttg agotcaacat gcagatctct tctg

[32] 본 발명에서 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 shRNA와 같은 핵산 물질을 세포 내로 전달하는 효율을 높이기 위하여, 안전하고 효율적인 전달 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 siRNA는 안티센스 RNA, 또는 shRNA는 핵산 전달체(nucleic acid delivery system)와 함께 조성물 내에 포함될 수 있다.

[33] 본 발명에서 상기 핵산 전달체는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분할 수 있다. 가장 널리 이용되는 것은 바이러스 벡터 (viral vector)로 전달 효율이 높고 지속 시간이 길다는 이점이 있다. 여러 가지의 바이러스 벡터 중

레트로바이러스 벡터(retroviral vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 아데노 부속 바이러스 벡터(adenovirus-associated viral vector) 등이 주요하게 사용되고 있다. 비바이러스 벡터(nonviral vector)는 독성과 면역 반응이 적고, 반복적으로 투여가 가능하며, 리보핵산과의 복합체 형성이 간편하고, 대량 생산이 용이한 이점이 있다. 또한, 질환 세포나 조직부위에 특이적 리간드를 비바이러스성 벡터에 접합하여, 장기세포 선택적 핵산 전달을 가능하게 하는 이점이 있다. 비바이러스성 벡터로서는 리포솜, 양이온성 고분자를 비롯하여, 미셀, 에멀전, 나노입자 등의 다양한 제형이 사용될 수 있다. 핵산 전달체는 동물 세포 내에 목적하는 핵산의 수송 효율을 현저히 증강시킬 수 있으며 전달하고자 하는 핵산의 사용 목적에 따라 어떤 동물 세포로도 핵산 전달이 가능하다.

- [34] 본 발명에서 상기 핵산 전달체는 바람직하게 양이온성 리포솜 또는 양이온성 고분자 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 양이온성 리포솜, 양이온성 고분자 등의 제형을 갖는 핵산 전달체는 양하전을 띠기 때문에, 핵산 전달체의 양하전과 siRNA와 같은 핵산의 음이온성 하전에 의해 단순한 혼합(mix)에 의해 정전기 결합을 함으로써 핵산 전달체와 핵산 간의 복합체를 형성할 수 있다.
- [35] 본 발명에서 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 shRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터의 제조는 당분야에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개공보 제20040106567호 및 제20040086884호에는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘 뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/벡터를 제공하고 있다.
- [36] 본 발명에서 DDIAS 억제제로서 사용되는 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 shRNA의 구체적인 제조/입수 방법은 본 출원인의 선행특허인 대한민국 등록특허 제10-1168726호에서 실시한 방법과 동일하게 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명에서 DDIAS 억제제는 DDIAS의 작용에 의한 카스파제(caspase)-8의 분해 촉진을 효과적으로 저해할 수 있다.
- [38] 구체적으로 본 발명의 실시예에서, DDIAS 녹다운에 따른 카스파제-8 및 FADD의 발현 수준을 평가하였다. 그 결과, 카스파제-8의 단백질 수준은 DDIAS가 감소된 세포에서 증가하였으나(도 11a), DDIAS 녹다운은 카스파제-8의 mRNA 수준에는 영향을 미치지 않았다(도 11b). 또한, DDIAS 감소 하에서 EGF 및 사이클로헥시미드(cycloheximide; CHX)로 처리한 A549 세포에서 카스파제-8 단백질의 반감기를 조사한 결과, 반감기가 대조군 세포에 비해 안정적이었다(도 11c). 이를 통해, DDIAS의 억제제는 DDIAS의 카스파제-8 분해 촉진 작용을 억제하여, 카스파제-8의 불안정화를 저해하는 효과를 달성할 수 있다.
- [39] 본 발명에서 DDIAS 억제제는 DDIAS의 작용에 의한 사멸 유도 신호 복합체(death-inducing signaling complex, DISC)의 형성 억제를 효과적으로

저해할 수 있다.

- [40] 본 발명에서 사용되는 용어, "사멸 유도 신호 복합체(death-inducing signaling complex, DISC)"는 아폽토시스를 유발하는 세포 수용체의 사멸 수용체(death receptor) 계열의 구성원에 의해 형성된 다중 단백질 복합체이다. 일 예로, 사멸 수용체 FasR에 이의 리간드인 RasL의 결합으로 삼량체화시 DISC를 형성할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 DISC는 사멸 수용체, FADD 및 카스파제-8로 구성될 수 있다.
- [41] 구체적으로 본 발명의 실시예에서, DDIAS가 외인성 아폽토시스 경로에서 DISC의 형성에 관여하는지 여부를 분석하였다. 그 결과, DDIAS의 녹다운은 TRAIL로 처리된 세포에서 FADD 및 카스파제-8의 DISC로의 이동을 향상시켰으나, DR5의 DISC로의 이동에 아무런 영향을 미치지 않았다(도 10b). 또한, DDIAS는 FADD와 상호작용, 구체적으로 FADD의 N-말단 영역과 상호작용을 하였고(도 10c 및 10d), FADD는 N-말단 영역을 포함하는 DDIAS와 상호작용을 하였다(도 10e). 또한, 과량의 DDIAS 첨가시 FADD와 카스파제-8의 결합이 감소되었다(도 10h). 이를 통해, DDIAS 억제제는 DDIAS와 FADD의 상호작용을 억제하고 및 상기 상호작용에 의한 FADD와 카스파제-8의 결합을 증가시킴으로써 DISC의 형성을 촉진하는 효과를 달성할 수 있다.
- [42] 본 발명에서 사멸 수용체 리간드는 바람직하게는 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TRAs (TRAIL receptor agonists), TNF- α 및 FasL (Fas ligand; CD95L, APO-1L)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 TRAIL일 수 있다.
- [43] 본 발명에서 사용되는 용어, "사멸 수용체 리간드"는 현재 알려진 사멸 수용체인 TNF receptor-1 (DR1, CD120a, p55, p60), Fas (CD95, DR2, APO-1), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), DR4 (TRAILR1, APO02), DR5 (TRAILR2, KILLER, TRICK2) 또는 DR6 (EDAR, NGFR)와 결합하여 세포사멸신호를 매개할 수 있는 리간드를 의미한다.
- [44] 본 발명에서 사용되는 용어, "TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)"은 다양한 유형의 암세포에서 세포 사멸을 촉진하는 TNF 단백질 군의 구성원으로서, 외부 수용체(DR) 4와 DR5에 결합하고 외인성 아폽토시스 경로에서 DISC를 모집하여 아폽토시스를 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [45] 본 발명에서 사용되는 용어, "TRAs (TRAIL receptor agonists)"는 TRAIL 수용체에 결합하여 TRAIL 매개 사멸신호전달을 수행할 수 있는 제조합 형태의 TRAIL, 또는 TRAIL-R1 또는 TRAIL-R2 특이적 항체일 수 있다. 구체적으로 제조합 형태의 TRAIL로는 둘라네르민(Dulanermin)을 포함할 수 있고, TRAIL-R1 특이적 항체로는 맵파투무맙(Mapatumumab), 이의 유도체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, TRAIL-R2 특이적 항체로는 드로지투무맙(Drozitumumab), 이의 유도체 또는 이의 항원-결합 단편; 코나투무맙(Conatumumab), 이의 유도체 또는 이의 항원-결합 단편;

렉사투무맙(Lexatumumab), 이의 유도체 또는 이의 항원-결합 단편;
티가투주맙(Tigatuzumab), 이의 유도체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는 LBY-135,
이의 유도체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, TRAIL 매개
사멸신호전달을 수행할 수 있는 다른 형태의 작용물질(agonist)이라면 제한없이
사용될 수 있다.

- [46] 본 발명에서 사용되는 용어, "TNF- α (tumor necrosis factor- α)"는 종양괴사 인자로서 활성화된 대식세포, 자연살생세포(natural killer cell; NK cell), 일부 T세포 또는 일부 종양세포로부터 생산되는 것으로 알려져 있다.
- [47] 본 발명에서 사용되는 용어, "FasL (Fas ligand; CD95L)"는 종양 괴사 인자(TNF) 계열에 속하는 제2형 막 관통 단백질로서, 그 수용체와의 결합에 의하여 아포토시스를 유도하는 것으로 알려져 있다. FasL/수용체간의 상호 작용은 면역계의 조절과 암의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [48] 본 발명에서 사멸 수용체 리간드로 TRAs, TNF- α 또는 FasL을 사용하는 경우에도 우수한 항암 효과가 발휘되나, 특히 TRAIL을 사용하는 경우, 카스파제-8의 불활성화 및 DISC 형성 억제를 효과적으로 저해하는 효능을 갖는 DDIAS 억제제와, 암세포에서의 세포 사멸을 유도하는 효능을 갖는 TRAIL이 함께 작용하여 보다 우수한 시너지 효과를 발휘함으로써, 암세포에서의 세포 사멸이 현저히 촉진되어 암의 예방 및 치료에 더욱 탁월한 효과를 나타내는 이점이 있다.
- [49] 본 발명의 실시예에서, DDIAS 녹다운에 의해 유도되는 암 세포 사멸을 향상시킬 수 있는 약물을 스크리닝하였다. 구체적으로, DDIAS에 대한 siRNA를 동시에 처리한 A549 세포에 대한 독소루비신(doxorubicin), 제피티닙(gefitinib), 라파마이신(rapamycin), BAY 11-7082 및 제조합 TRAIL을 포함한 총 20 가지 억제제의 성장 억제 능력을 실험하였다. 대조군(scramble siRNA)과 비교하여, TRAIL이 DDIAS siRNA로 형질감염된 A549, HCC15 및 NCI-H1703 NSCLC 세포의 성장을 현저하게 억제하였다(도 1a). 유사하게, DDIAS siRNA와 TRAIL을 병행 처리한 경우, HepG2, SK-HEP-1 및 Li-7 HCC 세포증식이 억제되었다(도 2a). 또한, 절단된 카스파제-8, 카스파제-3 및 PARP-1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1)의 발현은 TRAIL 투여량에 의존적으로 상향 조절되었다(도 1b 및 도 2b). DDIAS siRNA로 형질감염된 A549 세포에서 TRAIL은 카스파제-3/7 활성화 및 아포토시스를 강하게 유도하였다(도 1c 및 1d). 그러나 제피티닙 또는 소라페닙과 같은 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor; TKI)는 DDIAS 녹다운으로 인한 A549 또는 HepG2 세포의 성장 억제에 영향을 미치지 않았다(도 3). Fas 리간드(FasL) 또는 TNF- α 와 같은 사멸 수용체 리간드는 DDIAS siRNA로 형질감염된 HCC15 세포의 아포토시스 및 성장 억제를 현저하게 유도하였다(도 1e 및 도 4). 이를 통해, 사멸 수용체 리간드는 DDIAS 억제제와 함께 작용하여 암의 예방 및 치료에 있어 시너지 효과를 달성할 수 있다.

- [50] 본 발명에서 사용되는 용어, "암(cancer)"은 의학적으로 세포의 정상적인 분열, 분화 또는 사멸의 조절 기능에 문제가 발생하여 비정상적으로 과다 증식하여 주위 조직 또는 장기에 침윤하여 덩어리를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는 모든 상태를 의미한다. 암은 크게, 발생한 부위에 존재하는 원발암과 발생 부위로부터 신체의 다른 부위로 퍼져나간 전이암으로 구분된다.
- [51] 본 발명의 예방 또는 치료 대상 질환인 "암"은 의학적으로 암의 범주에 해당하는 한, 모두 포함되는 것으로 해석하며 구체적인 질환명이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 폐암, 간암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌종양, 전립선암, 담낭암, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 자궁암, 직장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암 및 요도암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 본 발명에서 암은 바람직하게는 TRAIL에 대하여 내성을 갖는 폐암, 간암, 뇌종양, 전립선암, 췌장암 또는 유방암일 수 있다.
- [52] 본 발명의 약학적 조성물은 DDIAS 억제제 및 사멸 수용체 리간드를 유효성분으로 포함하는 것 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [53] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [55] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, DDIAS 억제제 및 사멸 수용체 리간드는 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001 중량% 내지 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 90 중량%, 보다 바람직하게는 0.1 중량% 내지 70 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [56] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [57] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

- [58] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [59] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [60] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [61] 본 발명의 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.
- [62] 본 발명의 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.
- [63] 본 발명의 약학적 조성물을 연고, 크림, 도포용 파우더, 오일, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [64] 다른 양태로서, 본 발명은 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 동물에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [65] 본 발명에서 사용되는 용어, "동물"은 인간을 포함하는 포유동물을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [66] 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는

목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[67] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[68] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[69] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여, 피하 투여 또는 암조직 내 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[70] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용하여도 우수한 효과를 발휘할 수 있으나, 치료 효율을 증가시키기 위하여 추가적으로 호르몬 치료, 약물 치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[71] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 암이 유발된 개체에 처리 또는 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

[72] 본 발명의 한 실시예에 따르면, 상기 개체는 인간일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[73] 본 발명의 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제는 DDIAS의 작용에 의한 카스파제(caspase)-8의 분해 촉진 및 DISC (death-inducing signaling complex) 형성 억제를 효과적으로 저해하여, 사멸 수용체(death receptor) 리간드와 함께 작용해 암세포에서의 세포 사멸을 촉진하는 우수한 시너지 효과를 발휘함으로써, 폐암 및 간암을 포함한 암의 예방 및 치료용 조성물로 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[74] 도 1에서 (a)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr) (10 nM)로 48시간 동안 형질감염시키고, 24시간 동안 TRAIL로 처리한 NSCLC (A549, HCC15 및 NCI-H1703) 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 성장 백분율은 SRB 분석으로 결정되었다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균±SEM로 나타내었다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. (b)는 siDDIAS로 48시간 동안 형질감염시키고, 4시간 동안 TRAIL로 처리한 NSCLC 세포에서의

DDIAS 발현 및 PARP, 카스파제-8 및 -3 절단에 대한 면역블랏 분석 결과를 나타낸 것이다. GAPDH는 로딩 컨트롤로 사용하였다. (c)는 siDDIAS로 48시간 동안 형질감염시키고, 18시간 동안 TRAIL (100 ng/ml)로 처리한 A549 세포에서의 카스파제-3/7의 활성화 및 아넥신 V 염색 이미지를 나타낸 것이다. 스케일 바는 50 μ m를 나타낸다. (d)는 도 1(c)에서 카스파제-3/7의 활성화 및 아포토시스를 정량화한 것이다. (e)는 siDDIAS로 48시간 동안 형질감염시키고, 18시간 동안 FasL (100 ng/ml) 또는 TNF- α (10 ng/ml)로 처리한 HCC15 세포에서의 아넥신 V 염색에 기초한 아포토시스를 분석한 결과를 나타낸 것이다. *P < 0.05, **P < 0.01.

- [75] 도 2에서 (a)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr) (20 nM)로 48시간 동안 형질감염시키고 TRAIL로 24시간 동안 처리한 HCC 세포(HepG2, SK-HEP-1 및 Li-7)에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 성장 백분율은 SRB 분석으로 결정되었다. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001 (Student's t test). (b)는 siDDIAS 또는 siScr로 48시간 동안 형질감염시키고 TRAIL로 4시간 동안 처리한 HCC 세포에서의 DDIAS 발현 및 PARP, 카스파제-8 및 -3 절단을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [76] 도 3에서 (a)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (10nM)로 24시간 동안 형질감염시키고 제피티닙으로 48시간 동안 처리한 A549 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 성장 백분율은 SRB 분석으로 결정되었다. (b)는 siDDIAS 또는 siScr (20 nM)로 24시간 동안 형질감염시키고 소라페닙으로 48시간 동안 처리한 HepG2 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [77] 도 4는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (10 nM)로 48시간 동안 형질감염시키고 TRAIL, FasL 또는 TNF- α 로 24시간 동안 처리한 HCC15 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 성장 백분율은 SRB 분석으로 결정되었다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.
- [78] 도 5에서 (a)는 36시간 동안 Flag-DDIAS로 형질감염시키고, TRAIL로 24시간 동안 처리한 NCI-H1703 및 HepG2 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 성장 백분율은 SRB 분석으로 결정되었다. *P < 0.05, **P < 0.01. (b)는 36시간 동안 Flag-DDIAS로 형질감염시키고, TRAIL (50 ng/ml)로 4시간 동안 처리한 NCI-H1703 및 HepG2 세포에서의 Flag-DDIAS 발현 및 PARP, 카스파제-8 및 -3 절단에 대한 분석 결과를 나타낸 것이다. (c)는 36시간 동안 Flag-DDIAS로 형질감염시키고, TRAIL (50 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 HepG2 세포에서의 카스파제-3/7의 활성화를 나타낸 것이다. 스케일 바는 50 μ m를 나타낸다. (d)는 도 2(c)에서 아포토시스를 정량화한 것이다. **P < 0.01.
- [79] 도 6에서 (a)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr) (20 nM)로 72시간 동안 형질감염시킨 HepG2 세포에서의 단백질 어레이를 나타낸 것이다. (b)는 HepG2 세포를 20 nM siDDIAS로 48시간 동안

형질감염시키고 TRAIL로 4시간 동안 처리한 다음, 세포 용해물을 이용하여 p-p53 (S15), p-p53 (S392), DR4, DR5 및 DDIAS 수준에 대한 면역블랏 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다. GAPDH를 로딩 컨트롤로 사용하였다. (c, d)는 siDDIAS, p53에 대한 siRNA (sip53), 또는 siScr로 48시간 동안 형질감염시키고, TRAIL (100 ng/ml)로 4시간(면역블랏팅) 또는 24시간(세포 성장 분석) 동안 처리한 A549 세포에서의 PARP, 카스파제-8, DDIAS, p53 및 GAPDH (로딩 컨트롤)의 발현에 대한 세포 성장 분석 및 면역블랏 분석 결과를 나타낸 것이다. (e, f)는 siDDIAS로 48시간 동안 형질감염시키고, TRAIL로 4시간(면역블랏팅) 또는 24시간(세포 성장 분석) 동안 처리한 NCI-H1299 세포에서의 PARP, 카스파제-8 및 -3, DDIAS 및 GAPDH의 발현에 대한 세포 성장 분석 및 면역블랏 분석 결과를 나타낸 것이다. *P<0.05, **P<0.01.

[80] 도 7은 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (10nM)로 72시간 동안 형질감염된 A549 세포에서 DDIAS, DR4 및 DR5의 전사 수준을 정량적 실시간 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다. ***P<0.01.

[81] 도 8에서 (a)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr)로 48시간 동안 형질감염시키고, TRAIL (100 ng/ml)로 4시간 동안 처리한 A549 세포에서의 p-MKK4, p-MKK7, p-JNK, p-p38, p38 및 GAPDH의 수준에 대한 면역블랏 분석 결과를 나타낸 것이다. (b, c)는 siDDIAS로 48시간 동안 형질감염시키고 p38 MAPK 및 JNK 억제제(SB203580 또는 SP600125, 10 μ M)로 전처리한 후, TRAIL (100 ng/ml)로 24시간 동안 처리한 A549 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. (d)는 siDDIAS 및 카스파제-8에 대한 siRNA (siCasp8) 또는 카스파제-9에 대한 siRNA (siCasp9)로 48시간 동안 형질감염시킨 후, TRAIL (100 ng/ml)로 24시간 동안 처리한 A549 세포에서의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. ***P<0.01. (e)는 siDDIAS, siCASP8 또는 siCASP9로 48시간 동안 형질감염시킨 후, TRAIL (100 ng/ml)로 4시간 동안 처리한 A549 세포에서의 PARP, 카스파제-8, -3, DDIAS 및 GAPDH의 수준에 대한 면역블랏 분석 결과를 나타낸 것이다. (f)는 siDDIAS 또는 siCASP8로 48시간 동안 형질감염시킨 후, TRAIL (100 ng/ml)로 4시간 동안 처리한 A549 세포에서의 p-p53 (S15), p-JNK, p-p38 및 GAPDH의 발현에 대한 면역블랏 분석 결과를 나타낸 것이다.

[82] 도 9는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr)로 48시간 동안 형질감염시키고 TRAIL (10 ng/ml)로 4시간 동안 처리한 HepG2 세포에서의 p-MKK4, p-MKK7, p-JNK, p-p38, p38, DDIAS 및 GAPDH의 수준에 대한 면역블랏팅 분석 결과를 나타낸 것이다.

[83] 도 10에서 (a)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr)로 60분 동안 형질감염시키고 Flag-TRAIL로 30분 동안 처리한 HepG2 세포에서 DISC 형성 여부를 확인한 것이다. 세포 용해물을 항-Flag 아가로오스를 사용하여 면역침강시키고 면역 침전물을 지시된 항체로 프로빙하였다. (b)는 FADD와

DDIAS의 내인성 결합을 나타낸 것으로, HepG2 세포 용해물을 항-DDIAS 항체로 면역침강시키고, 항-FADD, 카스파제-8 및 -DDIAS 항체로 면역블랏팅한 결과를 나타낸 것이다. (c)는 HA-FADD 및 Flag-DDIAS로 형질감염시킨 293T 세포에서의 HA-FADD 및 Flag-DDIAS의 결합을 나타낸 것으로, 세포 용해물을 항-Flag 아가로오스 또는 항-HA 비드를 사용하여 면역침강시키고, 면역침전물을 지시된 항체로 프로빙하였다. (d, e)는 293T 세포를 Flag-DDIAS 및 HA-FADD의 결실 돌연변이체로 지시된 조합으로 형질감염시킨 것으로, 세포 용해물을 항-Flag 아가로오스 또는 항-HA 비드를 사용하여 면역침강시키고, 면역 침전물을 항-HA 또는 -Flag 항체로 프로빙한 결과를 나타낸 것이다. (f)는 A549 세포 용해물을 항-FADD 항체로 면역침강시키고 항-DDIAS, -카스파제-8 및 -FADD 항체로 프로빙한 결과를 나타낸 것이다. (g)는 A549 세포 용해물을 항-카스파제-8 항체로 면역침강시키고 면역 침전물을 항-DDIAS 및 -카스파제-8 항체로 프로빙한 결과를 나타낸 것이다. (h)는 FADD/카스파제-8 결합을 분석한 것으로, NCI-H1299 세포를 HA-FADD, Myc-카스파제-8 및 Flag-DDIAS로 36시간 동안 형질감염시키고, 세포 용해물을 항-HA 아가로오스로 면역침강시킨 다음, 면역 침전물을 항-Myc, -Flag 및 -HA 항체로 프로빙한 결과를 나타낸 것이다.

- [84] 도 11에서 (a, b)는 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr)로 60시간 동안 형질감염시킨 세포에서의 카스파제-8, FADD 및 DDIAS의 발현에 대하여 지시된 항체로 면역블랏팅한 결과(a) 및 정량적 실시간 PCR을 수행한 결과(b)를 나타낸 것이다. GAPDH는 내부 컨트롤로 사용되었다. (c)는 siDDIAS로 48시간 동안 형질감염시키고 EGF (100 ng/ml) 및 사이클로헥시미드(CHX; 20 μ M)로 지시된 시간 동안 처리한 세포에서의 카스파제-8의 발현을 나타낸 것이다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (d)는 siDDIAS로 60시간 동안 형질감염시키고 EGF (100 ng/ml)로 지시된 시간 동안 처리한 세포에서의 RSK2의 인산화를 나타낸 것으로, 세포 용해물을 지시된 항체로 면역블랏팅한 결과를 나타낸 것이다. (e)는 siDDIAS로 60시간 동안 형질감염시키고 EGF (100 ng/ml) 및 MG132 (10 μ M)로 처리한 세포에서의 카스파제-8의 유비퀴틴화를 나타낸 것으로, 세포 용해액을 항-카스파제-8 항체로 면역침강시키고 지시된 항체로 면역블랏팅한 결과를 나타낸 것이다. (f)는 DDIAS siRNA 및 Myc-RSK2를 48시간 동안 공동-형질감염시킨 세포에서의 카스파제-8의 발현을 나타낸 것이다.

- [85] 도 12는 DDIAS-매개 카스파제-8 조절 모델을 나타낸 것이다. 정상 조건 하에서 DDIAS는 FADD와 상호 작용하고 RSK2를 인산화시켜 카스파제-8의 프로테오좀 관련 분해를 촉진한다. TRAIL의 존재 하에, FADD는 DDIAS로부터 해리되어 외인성 아포토시스 경로에서 DISC를 형성한다. DDIAS 녹다운 및 TRAIL의 존재 하에 카스파제-8은 안정화되고 DISC 형성이 촉진되어 TRAIL-매개하는 아포토시스가 유도된다.

- [86] 도 13은 DDIAS에 대한 siRNA (siDDIAS) 또는 스크램블 siRNA (siScr) (10

nM)로 48시간 동안 형질감염시키고, 24시간 동안 TRAIL로 처리한 뇌종양 세포(T98G, U-87MG), 췌장암 세포(Panc1, AsPC1), 유방암 세포(MCF7, Hs578T) 및 전립선암 세포(DU145, PC3)의 세포 성장 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 성장 백분율은 SRB 분석으로 결정되었다.

발명의 실시를 위한 형태

- [87] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [88]
- [89] 통계 분석
- [90] 본 명세서의 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 그룹간의 차이는 Newman-Keuls test에 의한 분산 분석을 통해 two-tailed Student's t test로 평가되었다. $P < 0.05$ 는 유의한 것으로 간주되었다.

[91]

[92] <재료 및 방법>

[93] 실시예 1: 재료 및 시약 준비

- [94] 재조합 인간 TRAIL 및 플래그-태그된(Flag-tagged) TRAIL은 각각 Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) 및 Enzo Life Science (New York, NY, USA)로부터 입수하였다. 재조합 인간 FasL, TNF- α , EGF, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK 및 프로테오 프로파일러 인간 아포토시스(Proteome Profiler Human Apoptosis) 어레이 키트는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. SB203580 및 SP600125는 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 소라페닙(sorafenib) 및 제피티닙(gefitinib)은 Selleckchem (Houston, TX, USA)로부터 입수하였다. 사이클로헥시미드(cycloheximide), MG132 및 DAPI는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. DDIAS에 대한 siRNA는 ST pharm으로부터 입수하였으며(Siheung, Korea), p53, 카스파제(caspase)-8 및 카스파제-9에 대한 siRNA는 Bioneer (Daejeon, Korea)로부터 입수하였다. 사용된 항체는 다음과 같다: 항-Mc, -HA, -PARP 및 -p53 (모두 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA로부터 입수함); 항-카스파제-3, -카스파제-8, -카스파제-9, -FADD, -포스포-(p-)MKK4, -pMKK7, -MKK4, -MKK7, -p-p38, 항-p-JNK, -p38, -JNK, -p-p53(S46), -p-p53(S392), -DR4, -DR5, -p-RSK2 (S227), -p-Src (Y416), -Src 및 -RSK2 (모두 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA로부터 입수함); 항-글리세롤알데하이드-3-인산탈수소효소(GAPDH) (AbFrontier, Seoul, Korea); 항-플래그(Sigma-Aldrich); 및 항-DDIAS (Atlas Antibodies, 스톡홀름, 스웨덴).

[95]

[96] 실시예 2: DNA 구조체 준비

- [97] 인간 FADD cDNA (GenBank accession no. NM_003824)는 Korea Human Gene Bank (Daejeon, Korea)로부터 입수하였다. DYK-태그된 인간 카스파제-8은 GeneScript (Piscataway, NJ, USA)로부터 입수하였다. 인간 RSK2 cDNA (GenBank accession no. NM_004586)는 A549 cDNA로부터 수득하였다. 이들 클론을 PCR에 의해 증폭시키고 HA 또는 Myc 태그를 갖는 pcDNA3.1에 삽입하였다. Flag-DDIAS의 전장(full-length) 및 결실 돌연변이는 이미 보고된 바 있다(Won KJ et al. Cell Death Dis 2017; 8(1): e2554). FADD의 결실 돌연변이를 HA-태그된 융합 플라스미드로 서브 클로닝하였다. 모든 구조가 서열화되었다.
- [98]
- [99] **실시예 3: 세포 배양 및 형질감염**
- [100] 293T 세포, NSCLC 세포(A549, NCI-H1299 및 NCI-H1703), HCC 세포(HepG2, SKHEP-1 및 Li-7), 뇌종양 세포(T98G, U-87MG), 췌장암 세포(Panc1, AsPC1), 유방암 세포(MCF7, Hs578T) 및 전립선암 세포(DU145, PC3)를 10% 소태아혈청, 50 U/ml 페니실린 및 50 µg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유하는 각각의 Dulbecco's modified Eagle's 배지 및 Roswell Park Memorial Institute-1640 배지에서 37°C 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 상기 세포를 제조자의 지시에 따라 전기천공법(electroporation) (Neon transfection system, Invitrogen)을 통해 siRNA로 형질감염시켰다. 사용된 표적 서열은 다음과 같다:
- [101] DDIA5, 5'-CAGAAGAGAUCUGCAUGUU-3' (서열번호 8);
- [102] p53, 5'-CACUACAACUACAUGUGUA-3' (서열번호 13);
- [103] 카스파제-8, 5'-GCAAUCUGUCCUUCCUGAA-3' (서열번호 14);
- [104] 카스파제-9, 5'-CAGUAUCGCUCAUAGAUA-3' (서열번호 15); 및
- [105] 스크램블(대조군), 5'-CCUACGCCACCAAUUUCGU-3' (서열번호 16).
- [106]
- [107] **실시예 4: 세포 생존력, 세포 사멸 및 카스파제-3/7 분석**
- [108] 세포 생존력은 종래 알려진 설향로다민 B (sulforhodamine B; SRB) 분석을 이용해 평가하였다(Kim BK et al. Biochim Biophys Acta 2014; 1839(5): 364-73). 세포 기질에 결합된 SRB 염료의 양을 분광 광도계를 사용하여 파장 530 nm에서 측정하였다. 아포토시스는 CellPlayer 시약 기반 아넥신 V (annexin V) 및 카스파제-3/7 분석(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA)을 이용해 분석하였다. 종래 알려진 IncuCyte Zoom 시스템(Essen Bioscience)을 사용하여 2시간 간격으로 세포 이미지를 촬영하였다(Kim BK et al. Biochim Biophys Acta 2014; 1839(5): 364-73). 녹색 또는 적색 형광을 세포 밀집도(cell confluence)로 나누어 상대 형광으로 나타내었다. 이미지를 사용하여 DDIA5 또는 TRAIL에 대한 siRNA, 또는 스크램블된 대조군 siRNA의 형질감염으로 인한 형태학적 변화를 확인하였다.

[109]

[110] **실시예 5: 정량적 실시간 PCR**

[111] TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 세포로부터 총 RNA를 추출하고, TOPscript RT DryMIX (dT18) (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 2 µg을 cDNA로 역전사시켰다. 정량적 실시간 PCR은 Rotor-Gene 6000 시스템(Corbett/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 수행하였다. 사이클링 조건은 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 30초로 수행하였다. 사용한 프라이머는 아래 표 5와 같다.

[112] [표 5]

[113]

종류		염기 서열(5'-3')
DDIAS	forward	CTTGCAGCAGTTGTTACGAA : 서열번호 17
	reverse	GTGACCAAGCACTTCGAGTT : 서열번호 18
GAPDH	forward	TCATGACCACAGTCCATGCC : 서열번호 19
	reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA : 서열번호 20
DR4	forward	P166162
	reverse	P166162
DR5	forward	P195586
	reverse	P195586
caspase-8	forward	P169836
	reverse	P169836
FADD	forward	P162725
	reverse	P162725

[114] DR4 (P166162), DR5 (P195586), 카스파제-8 (P169836) 및 FADD (P162725)에 대한 프라이머는 Bioneer (Daejeon, Korea)로부터 입수하였다.

[115]

[116] **실시예 6: 면역침강(Immunoprecipitation) 및 면역블랏팅(immunoblotting) 분석**

[117] 세포를 1 mM Na₃VO₄, 1 mM 불화나트륨, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF) 및 프로테아제 억제제 콕테일(Roche, Basel, Switzerland)을 함유하는 1×PBS (phosphate-based saline)에 0.5% Nonidet (N) P-40로 용해시켰다. 상기 용해물 내 단백질 농도는 bicinchoninic acid assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정하였다. 상기 용해물을 FLAG M2 친화성 겔, HA-아가로오스(Sigma-Aldrich) 또는 Myc-아가로오스(Santa Cruz Biotechnology)와 함께 배양하고, 특정 항체로 면역블랏팅을 수행하였다. 면역 복합체는 enhanced chemiluminescence kit (Millipore)로 검출하였다. 내인성 결합을 위해 용해물을 2 µg의 대조군 IgG 또는 DDIAS, FADD, Caspase-8 항체와

함께 4°C에서 밤새 배양한 후, 4°C에서 1시간 동안 IgG 아가로오스와 함께 배양하였다. 침전물을 특정 항체로 면역블랏팅 하였다. 단백질 어레이를 위하여, HepG2 세포를 DDIAS siRNA로 72시간 동안 형질감염시킨 다음, 제조사의 프로토콜에 따라 프로테옴 프로파일 어레이로 분석하였다.

[118]

[119] **실시예 7: DISC (death-inducing signaling complex) 분석**

[120] 세포를 100 ng/ml Flag-TRAIL 및 1 µg/ml 리간드 인헨서로 수회 자극한 다음, 즉시 PBS로 세척하고 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.2% NP-40, 10% 글리세롤 및 완전한 프로테아제 저해제 콕테일 (Roche)로 구성된 1 ml 용해 버퍼에서 15분 동안 얼음에서 용해시켰다. 상기 용해물을 12,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 2회 분리하였다. 상기 용해성 분획물을 4°C에서 2시간 동안 20 µl의 Sepharose-6B (Sigma-Aldrich)로 미리 분리해낸 후, 4°C에서 20 µl의 항-플래그-아가로오스(Sigma-Aldrich)로 면역침강시켰다. 원심분리에 의해 비드를 회수하고 500 µl의 용해 버퍼로 4회 세척하였다. 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 면역블랏팅으로 단백질을 분리하기 전에 샘플 버퍼를 첨가하고 비드를 5분간 가열하였다.

[121]

[122] **<결과>**

[123] **<1> 암세포의 TRAIL-유도 아폽토시스 민감성에 대한 DDIAS 녹다운 효과 확인**

[124] 본 발명자들은 DDIAS의 siRNA(siDDIAS)에 의한 DDIAS 녹다운으로 유도되는 암 세포 사멸을 향상시킬 수 있는 약물을 스크리닝하였다. 서열번호 8의 DDIAS에 대한 siRNA를 동시에 처리한 A549 세포에 대한 독소루비신(doxorubicin), 제피티닙(gefitinib), 라파마이신(rapamycin), BAY 11-7082 및 제조합 TRAIL을 포함한 총 20 가지 억제제의 성장 억제 능력을 실험하였다. 그 결과, 대조군(scramble siRNA, siScr)과 비교하여, TRAIL이 DDIAS siRNA로 형질감염된 A549, HCC15 및 NCI-H1703 세포의 성장을 현저하게 억제함을 확인하였다(도 1a). 유사하게, siDDIAS 및 TRAIL의 병행 처리시, HepG2, SK-HEP-1 및 Li-7 HCC 세포증식이 억제되었다(도 2a). 또한, 절단된 카스파제-8, 카스파제-3 및 PARP-1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1)의 발현은 TRAIL 투여량에 의존적으로 상향 조절되었다(도 1b 및 도 2b). 나아가, siDDIAS로 형질감염된 A549 세포에서 TRAIL은 카스파제-3/7 활성 및 아폽토시스를 강하게 유도하였다(도 1c 및 1d).

[125] 그러나 제피티닙 또는 소라페닙과 같은 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor; TKI)는 DDIAS 녹다운으로 인한 A549 또는 HepG2 세포의 성장 억제에 영향을 미치지 않았다(도 3). 이는 TRAIL에 의해 유도된 아폽토시스에서 DDIAS의 특이적 기능을 암시하는 것이다.

[126] Fas 리간드(FasL) 또는 TNF-α와 같은 사멸 수용체 리간드는 siDDIAS로

형질감염된 HCC15 세포의 아포토시스 및 성장 억제를 현저하게 유도하였다(도 1e 및 도 4). 이는 DDIAS가 사멸 신호에 의해 유도된 아포토시스에서 결정적인 역할을 수행함을 보여주는 것이다.

- [127] 이러한 관찰 결과에 부합하여, DDIAS의 과발현은 TRAIL-처리된 NCI-H1703 및 HepG2 세포에서 세포 사멸의 증가 및 카스파제 또는 PARP-1의 절단을 억제하여(도 5a-d), DDIAS가 사멸 수용체 리간드에 의해 유도되는 아포토시스를 억제함을 확인하였다.

[128]

- [129] **<2> DDIAS 녹다운에 의해 증가된 TRAIL 민감성에 있어서 p53 신호의 무관성 확인**

- [130] TRAIL에 의해 유도된 아포토시스에서 DDIAS의 기능을 규명하기 위해 단백질 어레이 분석을 수행하였다. 그 결과, S15 및 S392에서의 p53 인산화는 DDIAS가 감소된 세포에서 증가함을 확인하였다(도 6a). 또한, siDDIAS로 형질감염된 HepG2 세포에서 S15 및 S392에서의 p53 인산화가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(도 6b).

- [131] 이전 연구를 통해 화학 요법 제제에 의한 p53의 활성화가 비소세포 폐암에서 DR4/5 발현이 유도됨이 보고된 바 있다. 본 발명자들은 이것이 DDIAS가 감소된 세포에서 발생한 것인지 여부를 조사하였다. 그 결과, p53이 활성화되었음에도 불구하고, DR4/5의 mRNA 및 단백질 수준은 DDIAS 녹다운에 의해 영향이 미치지 않음을 확인하였다(도 6b 및 도 7).

- [132] 한편, S15 및 S392에서의 p53의 인산화는 DDIAS-감소/TRAIL-처리된 A549 세포에서 증가하였다(도 6b). 본 발명자들은 p53 신호 전달이 DDIAS-감소된 세포에서 TRAIL 민감성에 관여하는지를 조사한 결과, DDIAS 녹다운은 A549 세포에서 p53 녹다운과 관계없이 아포토시스를 증가시킴을 확인하였다(도 6c 및 6d). 또한, TRAIL-처리된 NCI-H1299 (p53-null) 세포에서 DDIAS 녹다운은 PARP-1 및 카스파제의 절단뿐만 아니라 세포 사멸을 증가시킴을 확인하였다(도 6e 및 6f).

- [133] 이러한 결과는, DDIAS는 p53 상태와 무관하게 TRAIL 민감도를 조절함을 나타내는 것으로, p53 및 DR의 변화는 DDIAS 녹다운/TRAIL-유도 아포토시스와 관련이 없음을 확인하였다.

[134]

- [135] **<3> DDIAS 녹다운에 의해 유도된 TRAIL 민감성에 있어서 카스파제-8 활성화의 필요성 확인**

- [136] TRAIL에 의해 유도된 아포토시스에 있어서 p38 MAPK, JNK, MKK4 및 카스파제-8의 영향을 확인하기 위하여 면역블랏을 수행하였다.

- [137] 그 결과, DDIAS 녹다운/TRAIL-처리된 A549 및 HepG2 세포에서 TRAIL에 의해 유도된 아포토시스를 매개하는 것으로 알려진 p38 MAPK 및 JNK 뿐만 아니라 MKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4)의 인산화가 강하게 증가함을

확인하였다(도 8a 및 도 9). 그러나 각각 p38 MAPK 및 JNK의 억제제인 SB203580 또는 SP600125로 처리하는 경우, A549 세포에서 DDIAS 녹다운/TRAIL-처리에 의해 유도된 세포 사멸 효과에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 8b). 이는 p38 MAPK 및 JNK 활성화는 DDIAS 녹다운/TRAIL-처리에 의해 유도된 세포 사멸에 관련되지 않음을 시사한다. 반면, 판-카스파제(pan-caspase) 억제제인 Z-VAD-FMK (carbobenzoxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone)로 처리하는 경우, DDIAS 녹다운/TRAIL-처리에 의한 세포 사멸이 거의 일어나지 않음을 확인하였다(도 8b).

[138] 또한, 카스파제-8 억제제인 Z-IETD-FMK

(Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)fluoromethylketone)을 처리하는 경우, DDIAS 녹다운/TRAIL에 의해 유도된 아포토시스를 저해하는 반면, 카스파제-9 억제제인 ZLEHD-FMK (Z-Leu-Glu(O-Me)-His-Asp(O-Me))을 처리하는 경우 아포토시스 저해 효과가 나타나지 않음을 확인하였다(도 8c). 카스파제-9가 아닌, 카스파제-8의 감소는 감소된 카스파제 및 PARP-1 절단의 결과로서 DDIAS-감소 세포가 TRAIL-유도 아포토시스를 극복할 수 있음을 확인하였다(도 8d 및 8e). 나아가, 카스파제-8의 억제에 의해 DDIAS 녹다운/TRAIL 처리에 의한 p53, p38 MAPK 및 JNK 인산화가 전혀 일어나지 않았다(도 8f).

[139] 이러한 결과는 DDIAS 녹다운이 내재성 미토콘드리아 경로와 무관하게 TRAIL-매개 아포토시스를 촉진한다는 것을 보여주는 것으로, 카스파제-8의 활성화는 DDIAS 녹다운으로 유도된 TRAIL의 감작(sensitization)에 필요함을 알 수 있었다.

[140]

[141] **<4> FADD와의 상호작용을 통한 DDIAS의 DISC 생성 억제 효능 확인**

[142] DDIAS가 외인성 아포토시스 경로에서 DISC의 형성에 관여하는지 여부를 분석하였다. 그 결과, DDIAS가 아닌 Flag-TRAIL의 처리시 30분 이내에 DR5, FADD 및 카스파제-8에 의한 DISC를 형성함을 확인하였다(도 10a). 또한, DDIAS의 녹다운은 TRAIL로 처리된 세포에서 FADD 및 카스파제-8의 DISC로의 이동을 향상시킴을 확인하였다(도 10a). 그러나 DDIAS 녹다운은 DR5의 DISC로의 이동에 아무런 영향을 미치지 않았다(도 10a).

[143] 나아가, 항-DDIAS 항체를 사용하는 상호-면역침강(co-immunoprecipitation) 실험에서 DDIAS가 FADD 또는 카스파제-8과 상호작용을 하는지 여부를 조사한 결과, 내인성 DDIAS는 내인성 카스파제-8이 아닌, 내인성 FADD와 상호-면역침강을 한다는 것을 확인하였다(도 10b).

[144] DDIAS와 FADD 사이의 상호작용에 대해 추가로 검증하기 위하여, HEK293T 세포에서 TRAIL의 부재 하에 상호-면역침강 실험을 수행하였다. 그 결과, HA-FADD는 Flag-DDIAS가 항-Flag 항체로 면역침강될 때 검출되었고, DDIAS와 FADD 사이의 상호작용은 항-HA 항체를 사용하는 역 상호-면역침강(reverse co-immunoprecipitation)을 통해 확인하였다(도 10c).

- [145] DDIAS와 상호작용하는 FADD의 영역을 확인하기 위하여, DED(아미노산 1-80) 또는 DD(아미노산 81-208) 중 하나를 포함하는 HA-FADD 결실 구조를 생성하였다(도 10d). 실험 결과, DDIAS는 DED를 포함하는 FADD N-말단 영역과 상호작용하는 반면, DD를 포함하는 C-말단 영역과는 상호작용하지 않음을 확인하였다(도 10d). 또한, HA-FADD는 F(아미노산 1-998) 및 N(아미노산 1-400)을 포함하는 Flag-DDIAS와 상호-면역침강됨을 확인하였다(도 10e). 특히, TRAIL의 부재 시에는 정상 조건 하에서 FADD와 DDIAS 두 단백질이 물리적으로 상호작용을 할 수 있으나, TRAIL의 처리시에는 FADD와 DDIAS 사이의 결합이 감소됨을 확인하였다(도 10f). 이와 대조적으로, DDIAS는 TRAIL 처리 또는 정상 조건에 관계없이 카스파제-8에 결합하지 않음을 확인하였다(도 10g).
- [146] 프로카스파제-8의 N-말단 DED가 FADD의 N-말단 DED와 결합한다는 관찰 결과를 바탕으로, DDIAS가 FADD와 카스파제-8 사이의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 경쟁적 결합 분석을 수행하였다. 구체적으로, 세포를 고정된 양의 Myc-카스파제-8 및 HA-FADD와 증가하는 양의 Flag-DDIAS로 형질감염시킨 후 실험을 수행하였다. 그 결과, Myc-카스파제-8에 결합된 항-HA 아가로오스를 포함하는 면역침전물에 있어서 FADD와 카스파제-8의 결합은 더 많은 양의 DDIAS를 첨가함으로써 감소됨을 확인하였다(도 10h). 이러한 결과는 DDIAS가 FADD와의 상호 작용을 통해 DISC 형성을 억제한다는 것을 시사한다.
- [147]
- [148] **<5> DDIAS의 유비퀴틴화(ubiquitination) 증가 및 카스파제-8 분해 촉진 효능 확인**
- [149] DDIAS 녹다운에 따른 카스파제-8 및 FADD의 발현 수준을 분석하였다. 그 결과, 카스파제-8의 단백질 수준은 DDIAS가 감소된 세포에서 증가한 반면, 카스파제-8의 mRNA 수준에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 11b). 또한, DDIAS 감소 하에서 EGF 및 사이클로헥시미드(cycloheximide; CHX)로 처리한 A549 세포에서 카스파제-8 단백질의 반감기를 조사한 결과, 반감기가 대조군 세포(siScr)에 비해 안정적임을 확인하였다(도 11c).
- [150] 종래 RSK2가 카스파제-8을 인산화시켜 유비퀴틴화 및 프로테아좀 관련 분해(proteasomal degradation)를 촉진시키는 것으로 보고된 바 있다. 이에 본 발명자들은 A549 세포에서 EGF의 존재 하에 Src 또는 RSK2의 활성화에 대한 DDIAS 감소의 효과를 조사하였다. 그 결과, DDIAS 녹다운은 EGF의 존재 하에서 S227에서의 RSK2 인산화를 완전히 차단한 반면, Src 활성화에는 영향을 주지 않음을 확인하였다(도 11d). 또한, EGF 처리는 프로테아좀 억제제 MG132의 존재 하에서 카스파제-8의 유비퀴틴화를 유도하였으나, DDIAS 녹다운에 의해서는 전혀 발생하지 않음을 확인하였다(도 11e). 이는 카스파제-8의 프로테아좀 관련 분해가 S227에서 RSK의 DDIAS-매개 인산화에 의해

유도되었음을 의미한다.

[151] 나아가, RSK2의 과발현은 DDIAS 녹다운-매개 카스파제-8의 안정화를 억제함을 확인하였다(도 11f). 이러한 결과는 DDIAS가 S227에서 RSK2의 인산화를 촉진하여 프로테아좀 관련 분해에 대한 카스파제-8의 유비퀴틴화를 유도하고 세포를 아포토시스로부터 보호한다는 것을 의미한다.

[152]

[153] **<6> 다양한 암세포에서 TRAIL 처리 및 DDIAS 녹다운의 효과 확인**

[154] 본 발명자들은 TRAIL 및 siDDIAS의 병행 처리가 다양한 암세포에서도 세포증식 억제 효과를 나타내는지 확인하였다. 구체적으로, 뇌종양 세포인 T98G, U-87MG, 췌장암 세포인 Panc1, AsPC1, 유방암 세포인 MCF7, Hs578T 및 전립선암인 DU145, PC3에 대한 세포증식 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 대조군(scramble siRNA, siScr)과 비교하여 DDIAS siRNA로 형질감염된 상피 세포에 TRAIL의 처리시 세포증식이 현저히 억제됨을 확인하였다(도 13). 이러한 결과는 DDIAS 억제제 및 사멸 수용체 리간드가 다양한 암에 대해서 세포증식 억제 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

[155] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

[156]

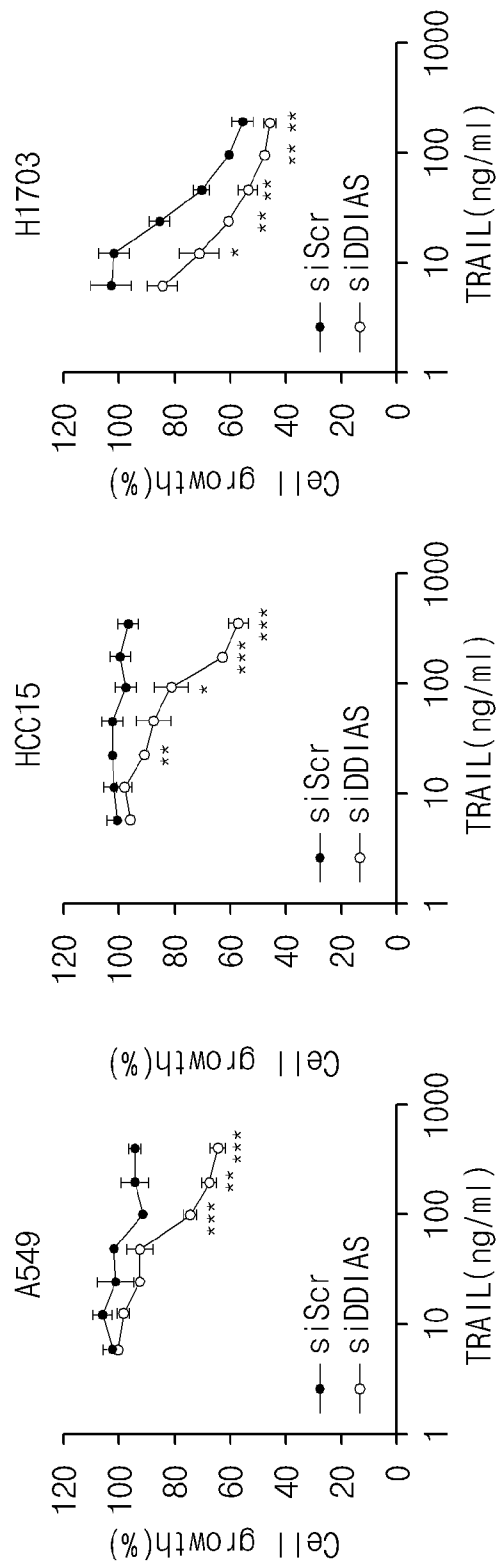
[157]

청구범위

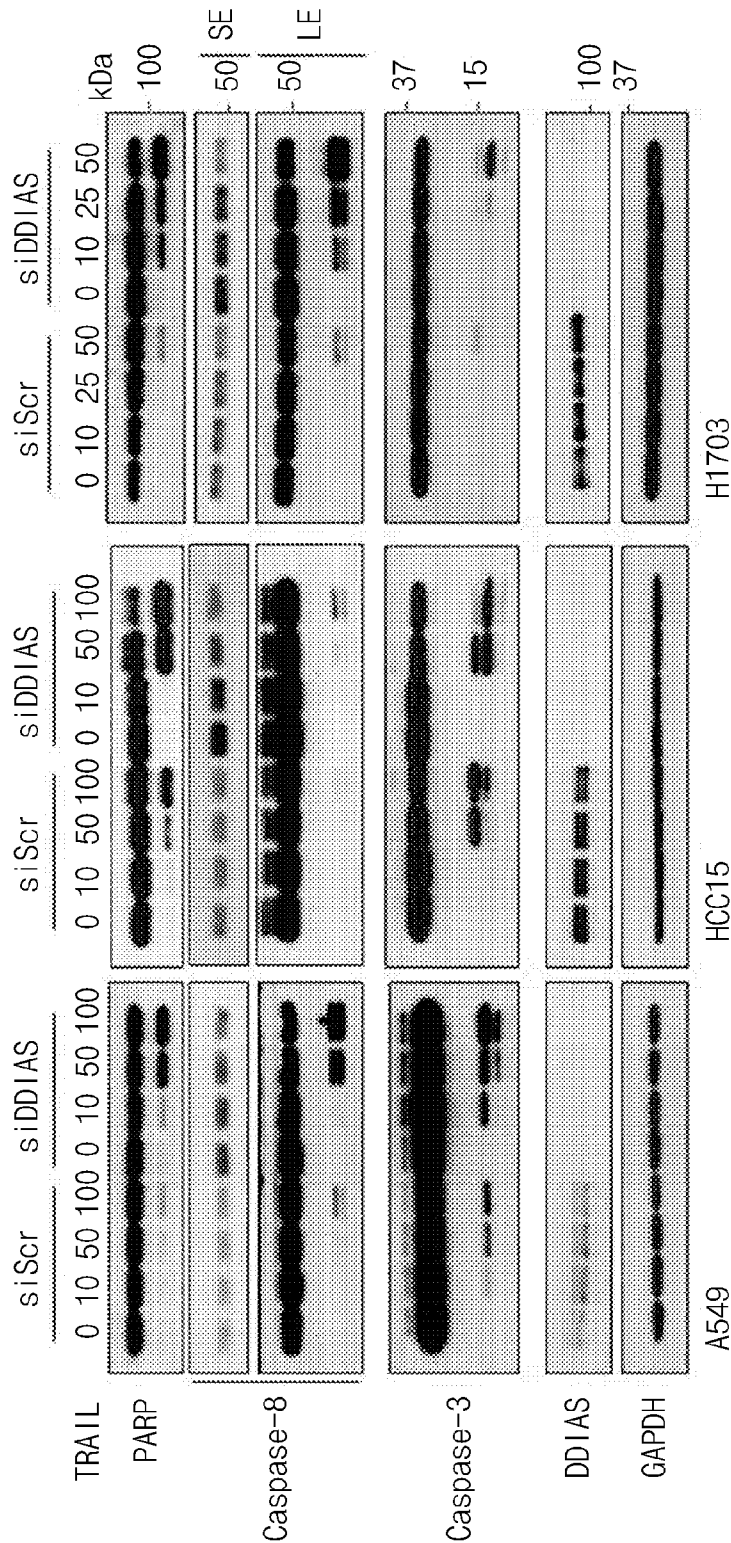
- [청구항 1] DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 DDIAS 억제제는 DDIAS 유전자의 발현을 억제하는 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 shRNA로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 siRNA는,
서열번호 4의 센스 서열 및 서열번호 5의 안티센스 서열을 갖는 siRNA;
서열번호 6의 센스 서열 및 서열번호 7의 안티센스 서열을 갖는 siRNA; 및
서열번호 8의 센스 서열 및 서열번호 9의 안티센스 서열을 갖는 siRNA로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 RNA이며, 상기 안티센스 RNA는 서열번호 5, 서열번호 7 및 서열번호 9로 이루어진 군에서 선택되는 서열을 갖는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군에서 선택되는 DNA 서열로 암호화된 것인 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 사멸 수용체 리간드는 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TRAs (TRAIL receptor agonists), TNF- α 및 FasL (Fas ligand; CD95L)로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 사멸 수용체 리간드는 TRAIL 또는 TRAs인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 DDIAS 억제제는 카스파제(caspase)-8의 불활성화를 저해하는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 DDIAS 억제제는 사멸 유도 신호 복합체(death-inducing signaling complex, DISC)의 형성을 촉진하는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 간암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌종양, 전립선암, 담낭암, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 자궁암, 직장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암 및 요도암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 암은 폐암, 간암, 췌장암, 전립선암, 유방암 또는 뇌종양인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 12] 약학적으로 유효한 양의 DDIAS (DNA damage-induced apoptosis suppressor) 억제제 및 사멸 수용체(death receptor) 리간드를 암이 유발된

개체에 처리 또는 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법.
[청구항 13] 청구항 12에 있어서,
상기 개체는 인간인 암의 치료 방법.

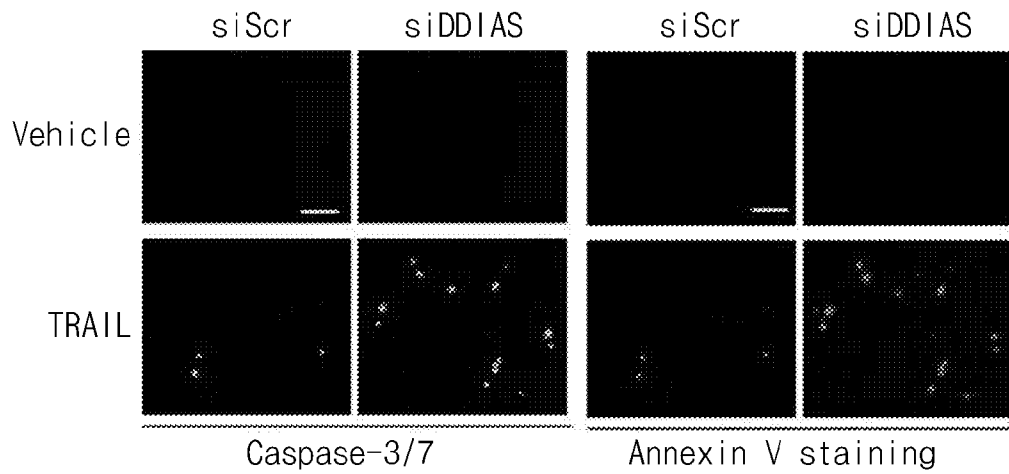
[Figure 1a]



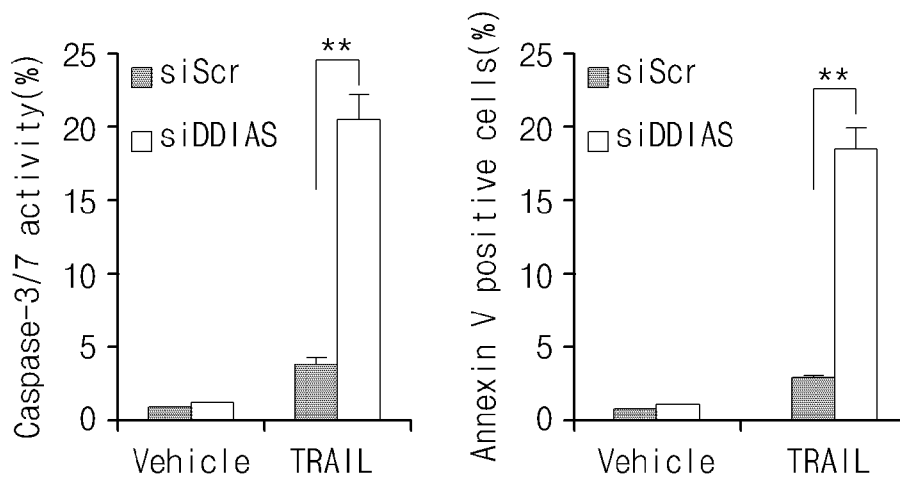
[도1b]



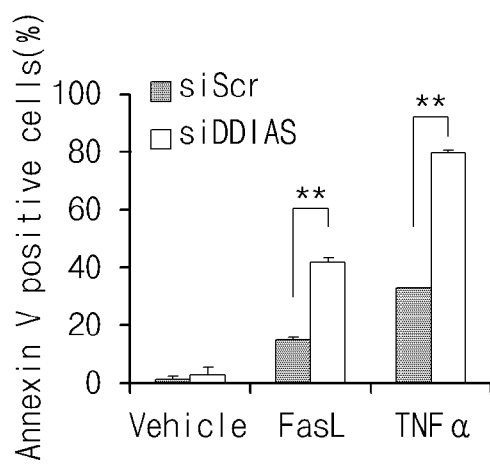
[도1c]



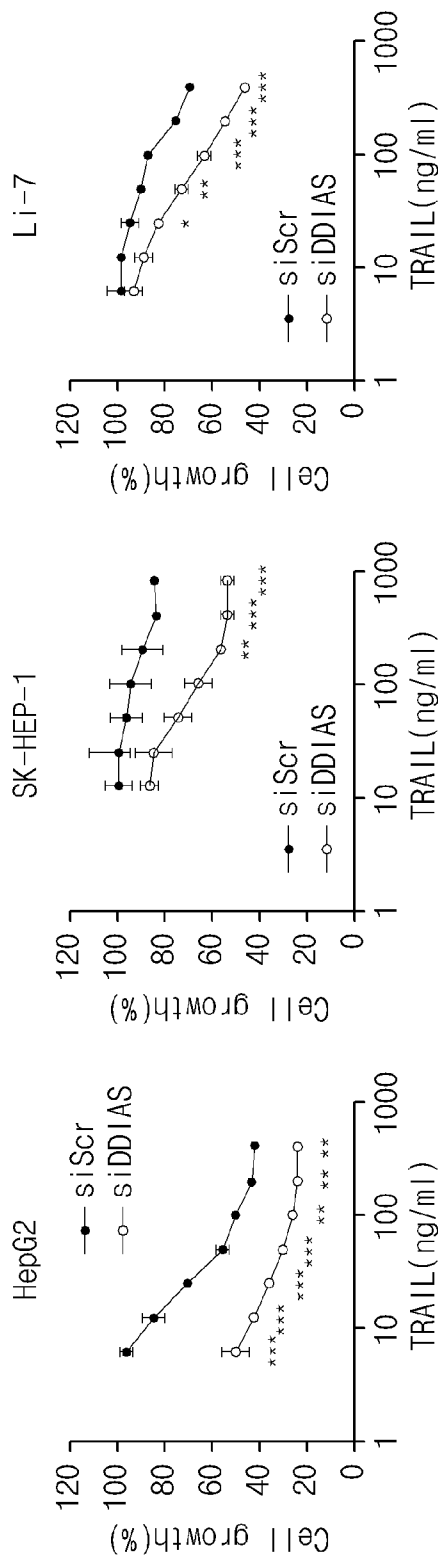
[도1d]



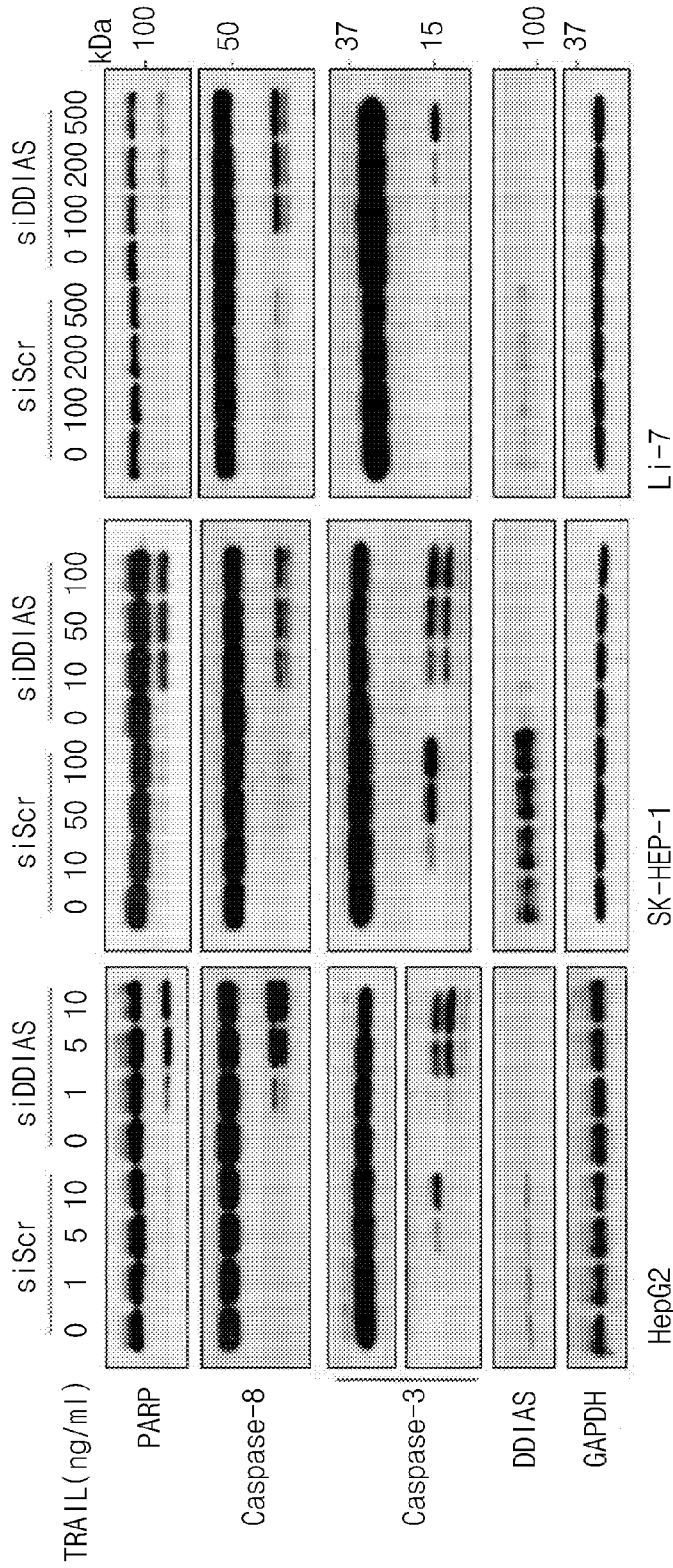
[도1e]



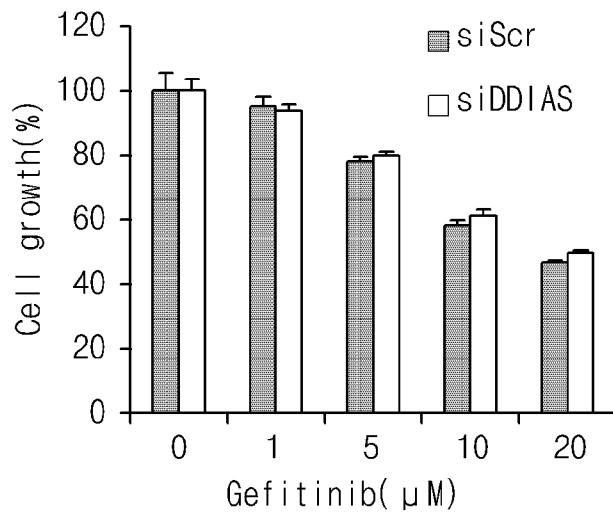
[도2a]



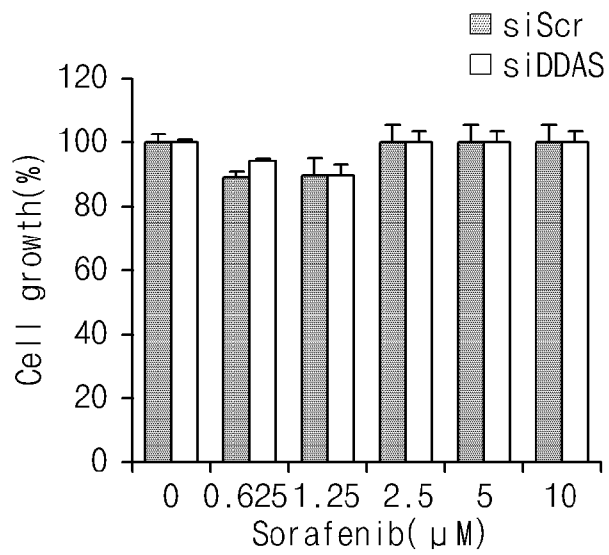
[도2b]



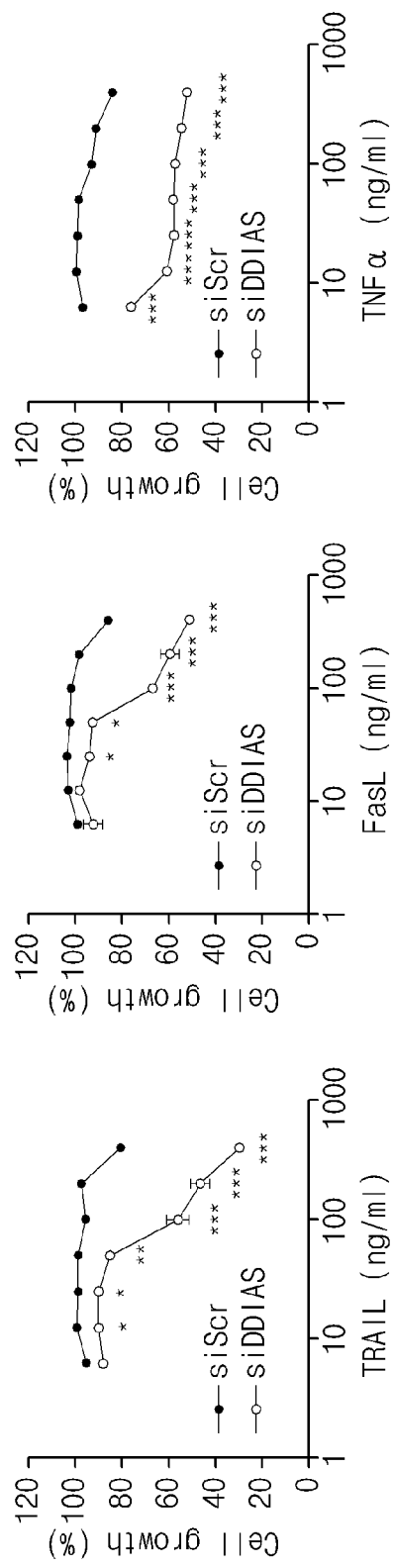
[도3a]



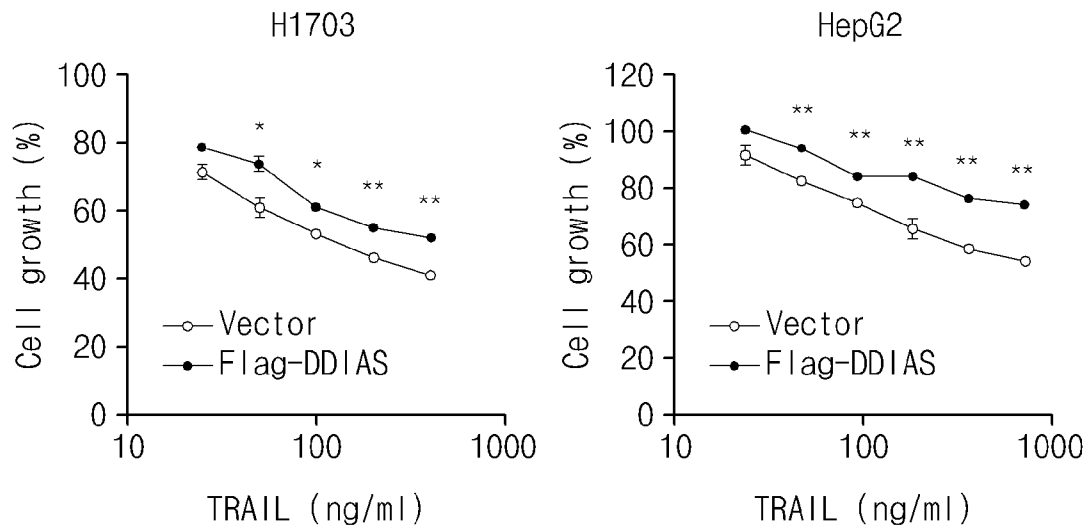
[도3b]



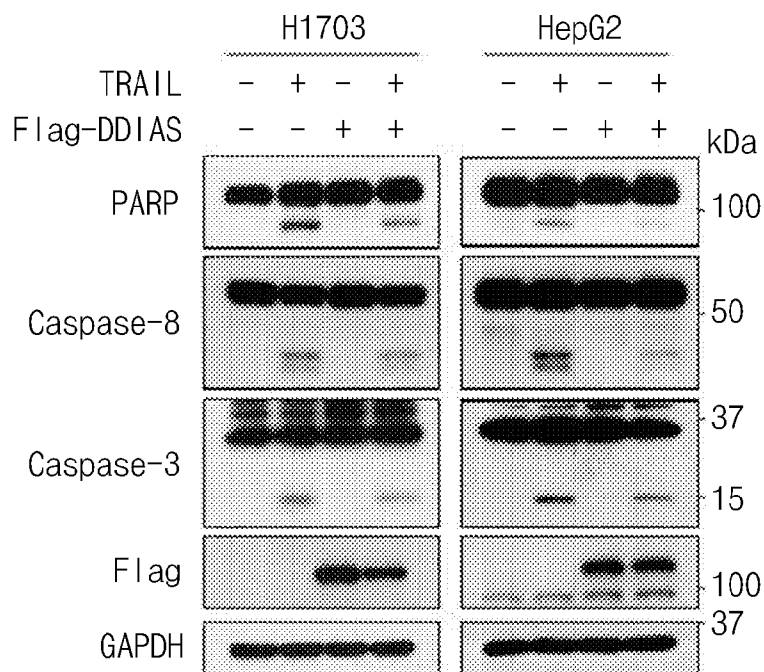
[도4]



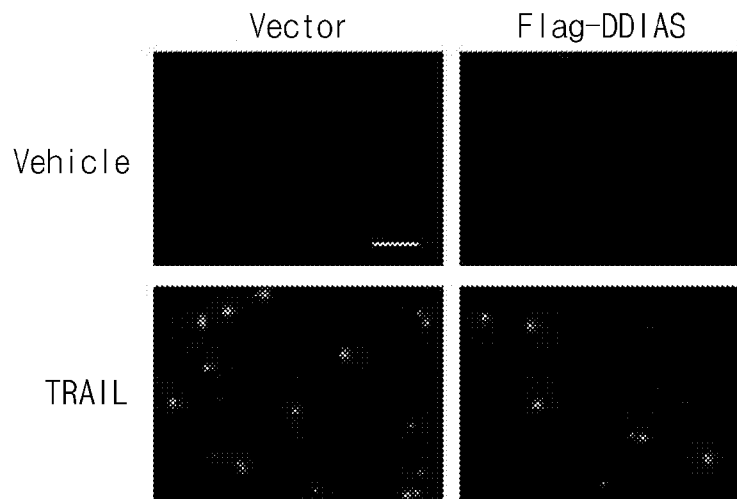
[도5a]



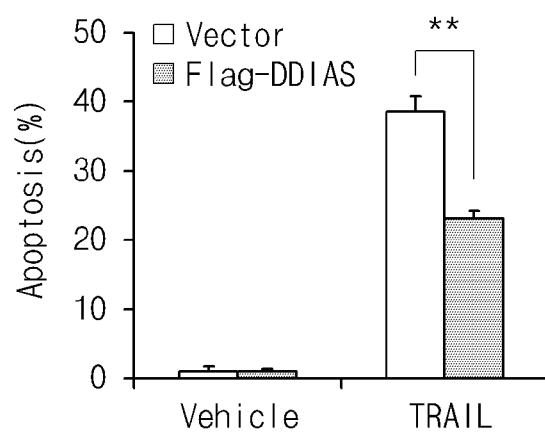
[도5b]



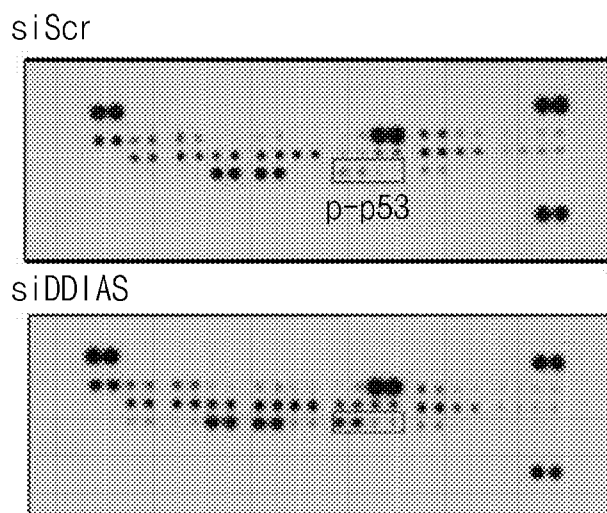
[도5c]



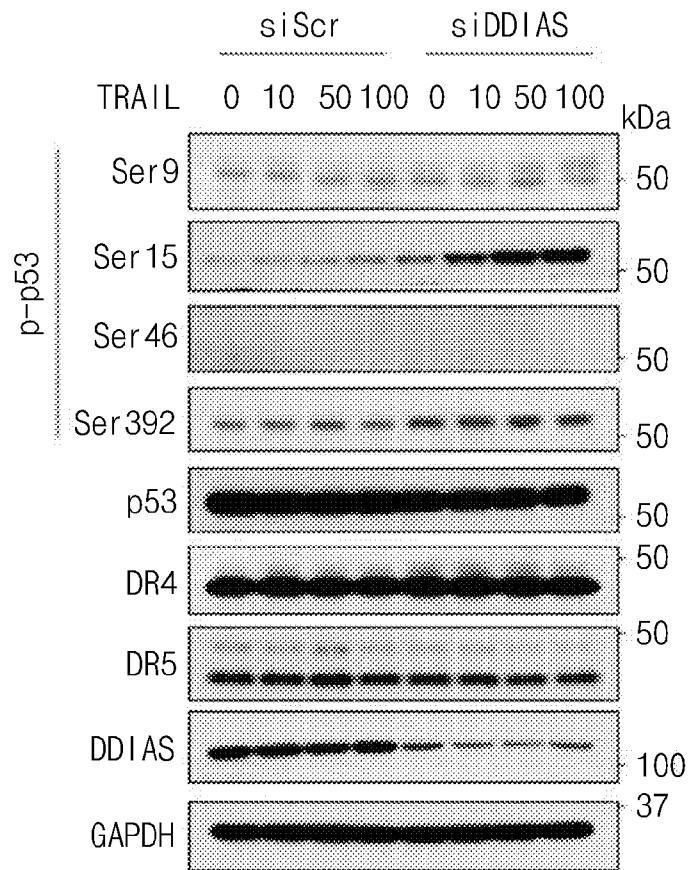
[도5d]



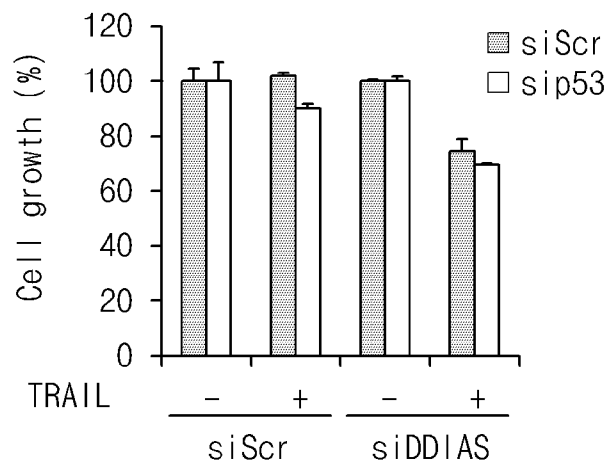
[도6a]



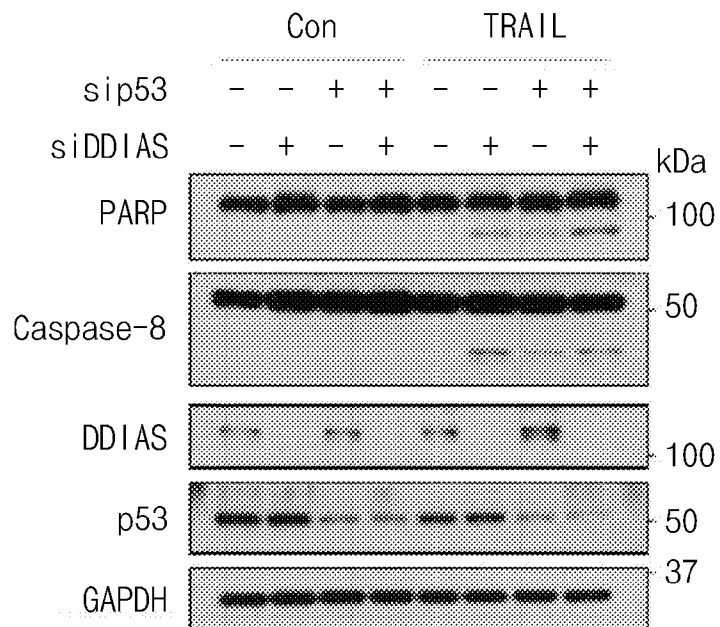
[도6b]



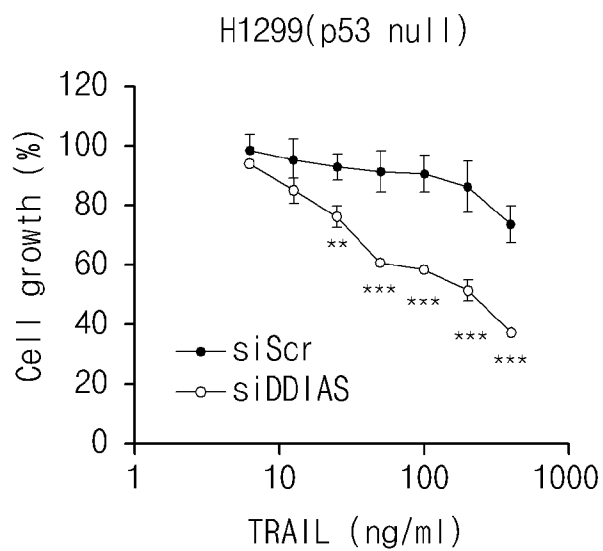
[도6c]



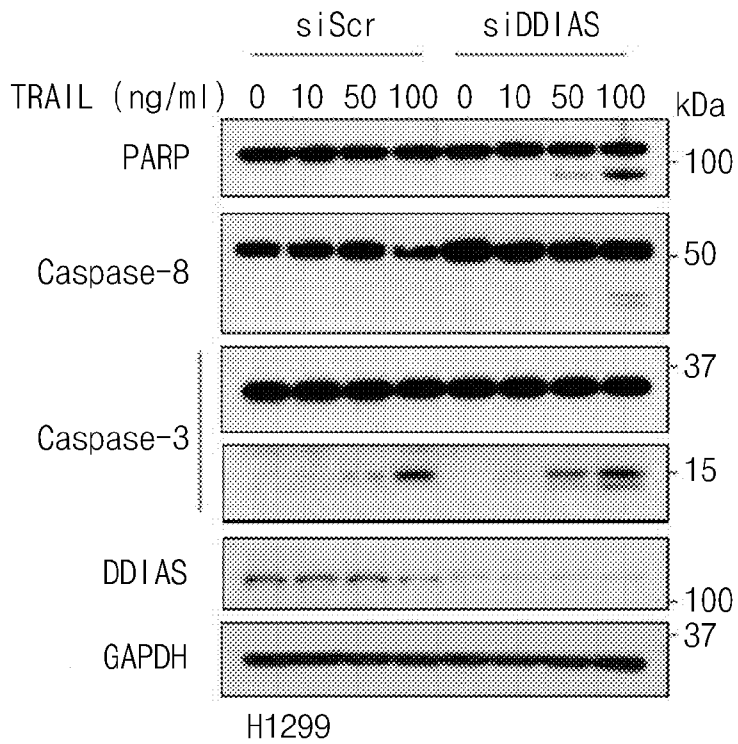
[도6d]



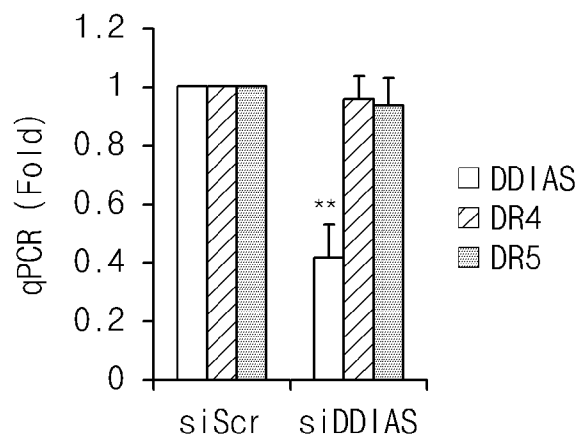
[도6e]



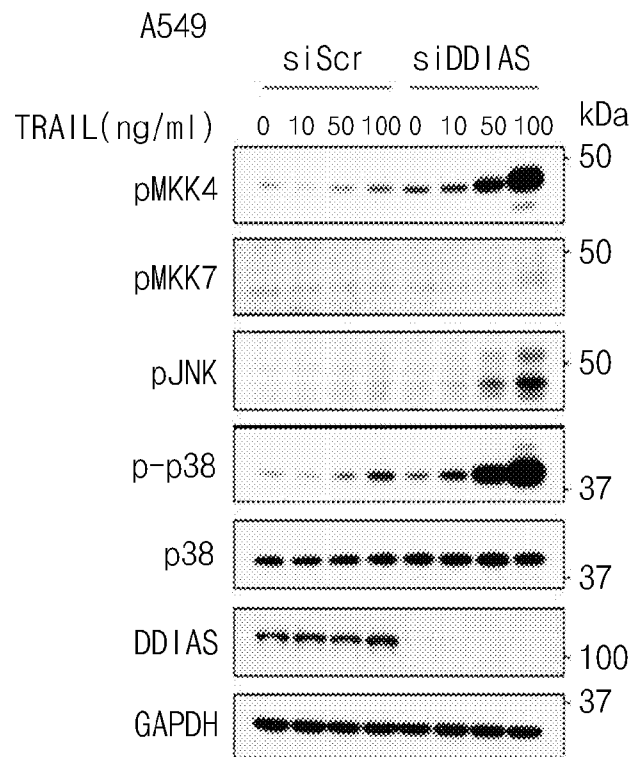
[도6f]



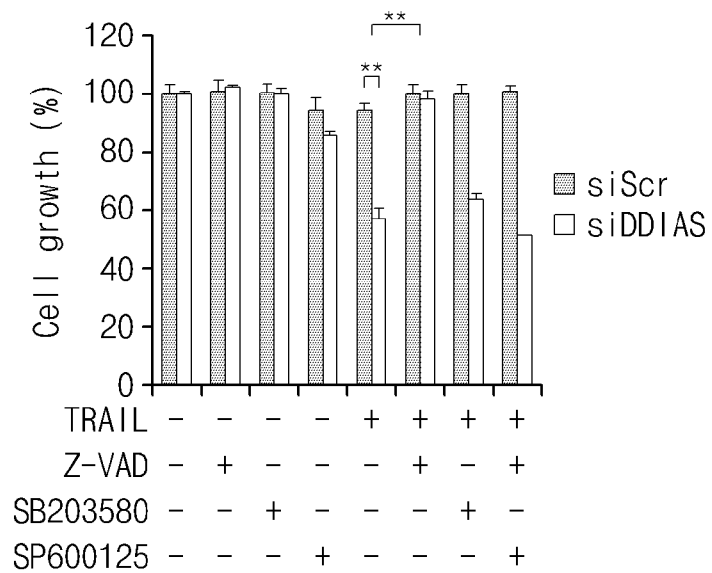
[도7]



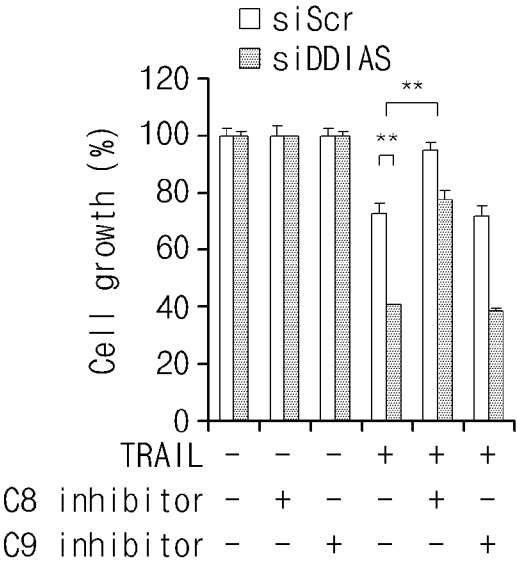
[도8a]



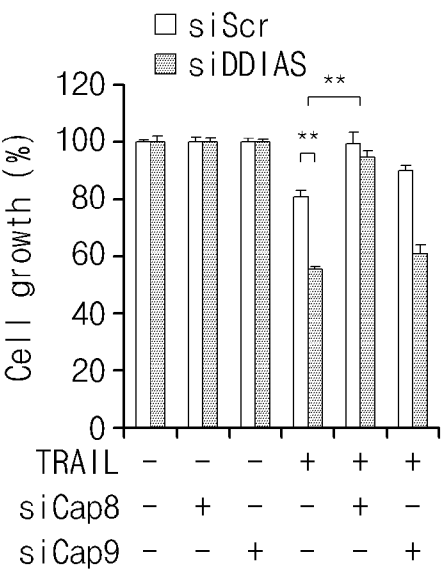
[도8b]



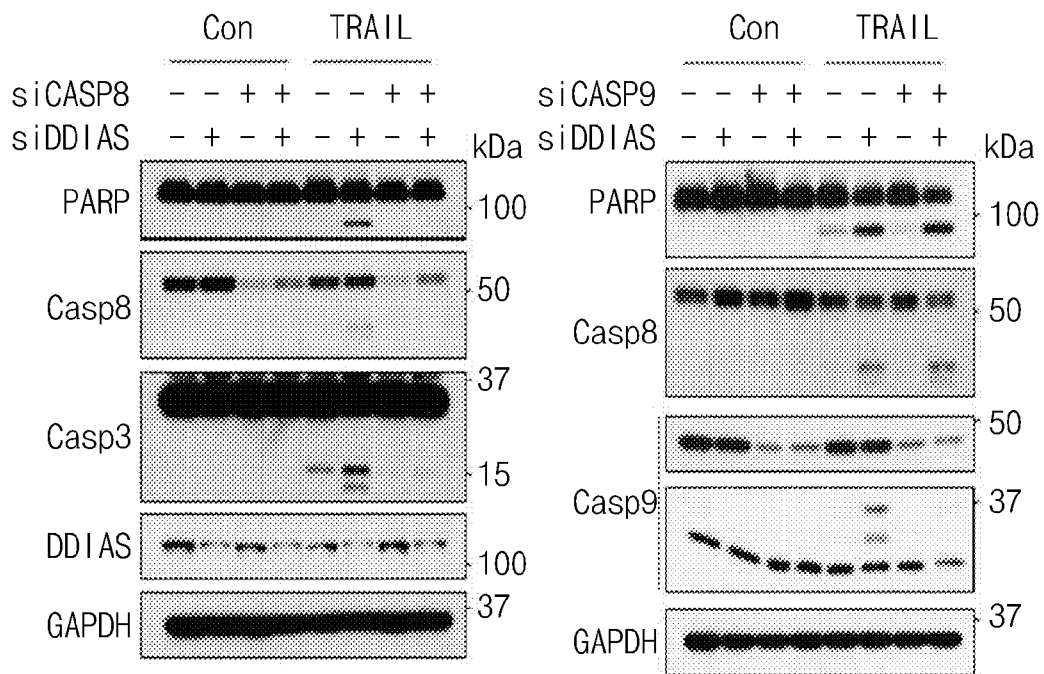
[도8c]



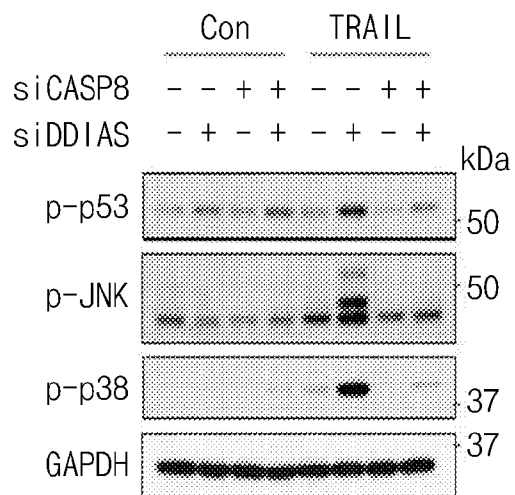
[도8d]



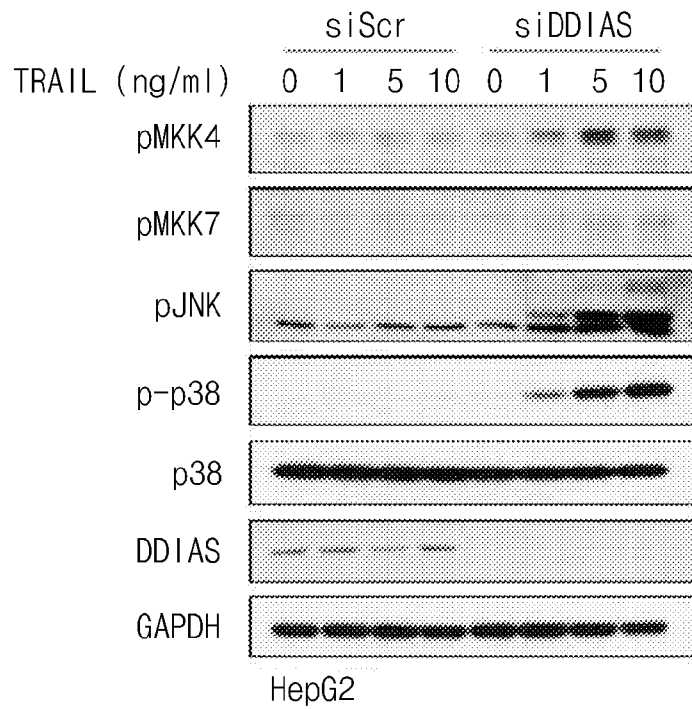
[도8e]



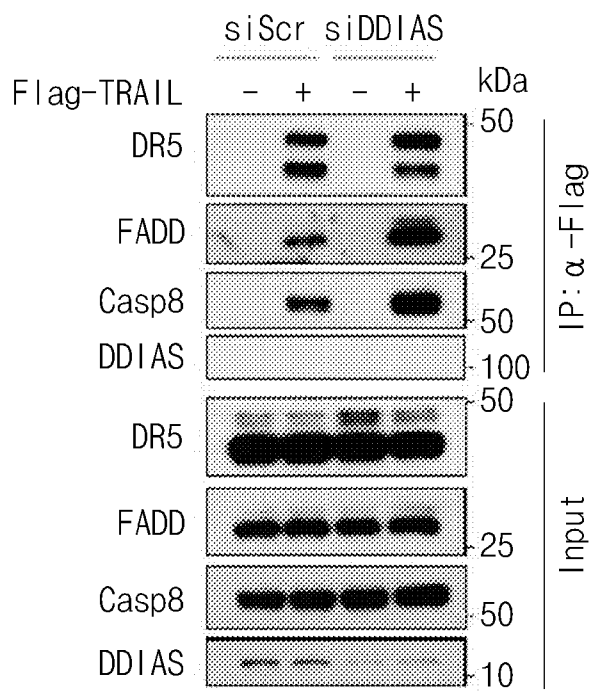
[도8f]



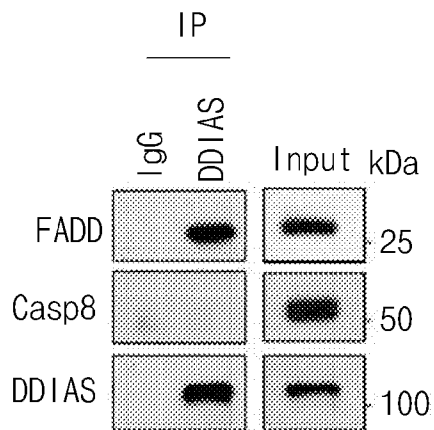
[도9]



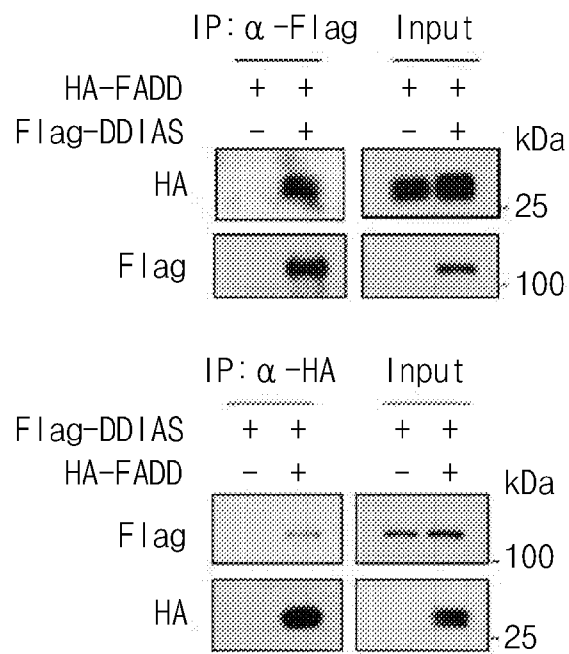
[도10a]



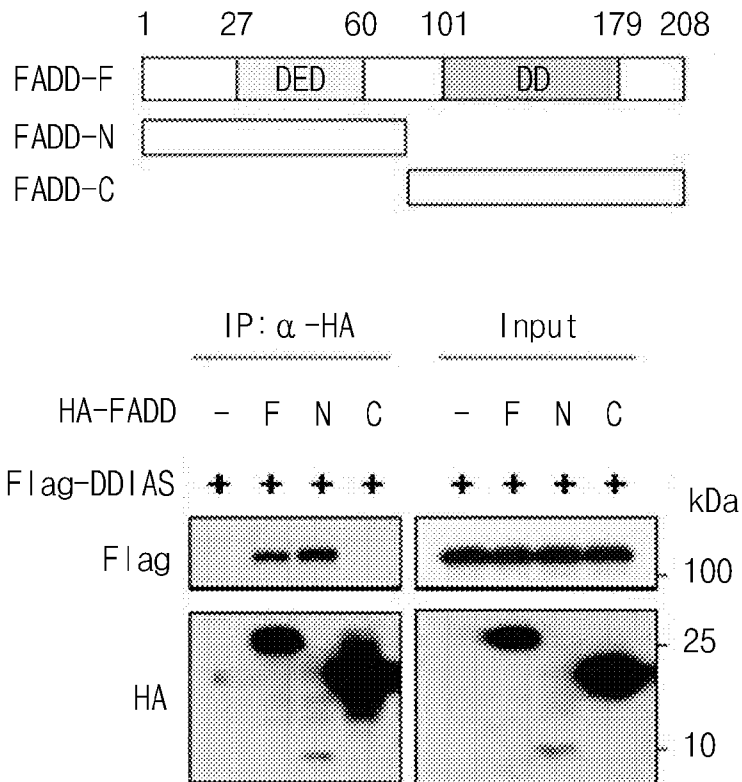
[도10b]



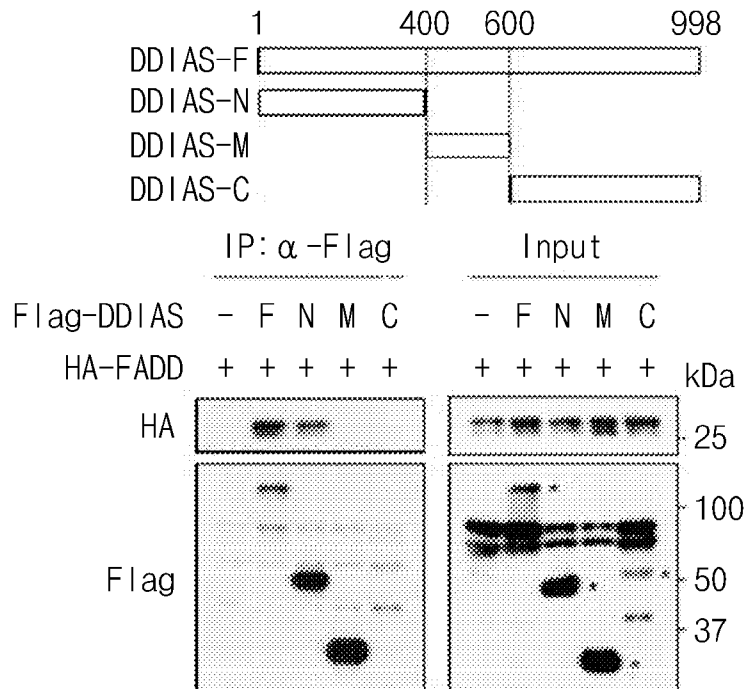
[도10c]



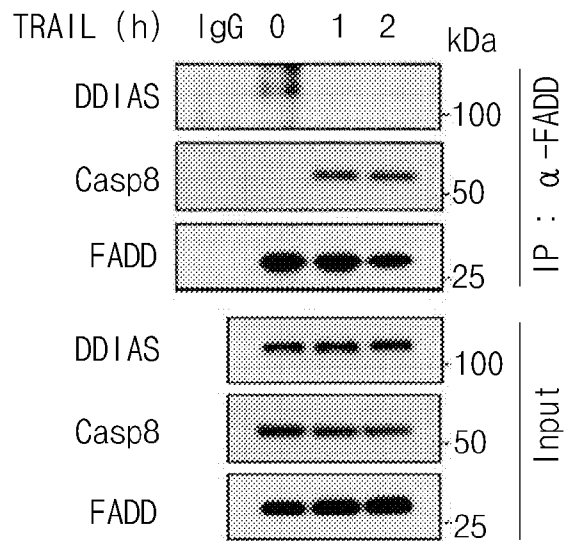
[도10d]



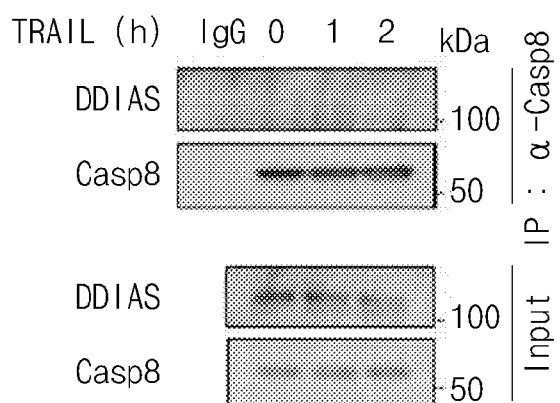
[도10e]



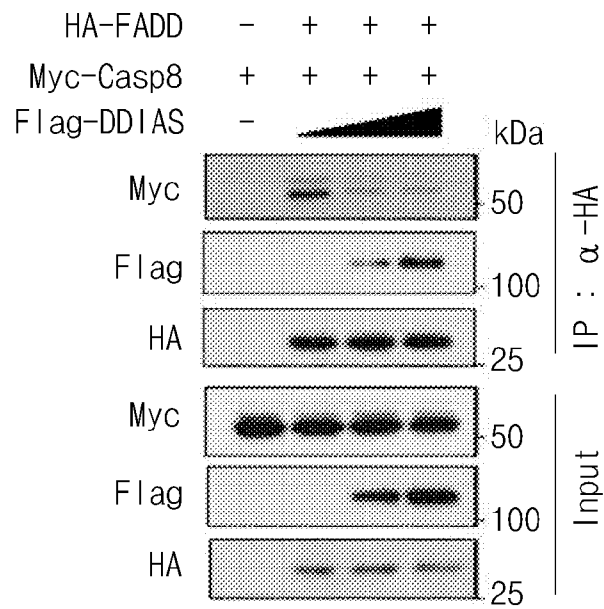
[도10f]



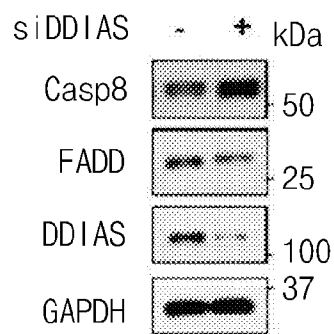
[도10g]



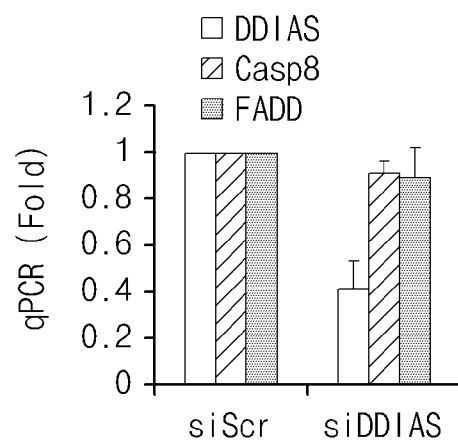
[도10h]



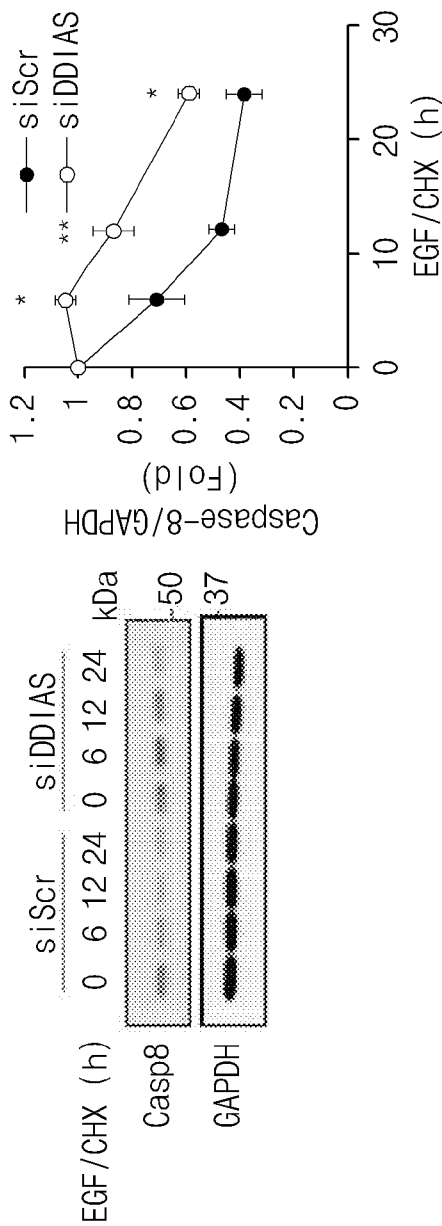
[도11a]



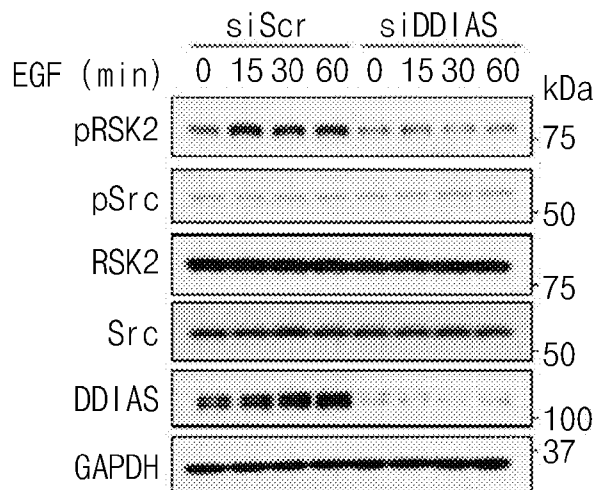
[도11b]



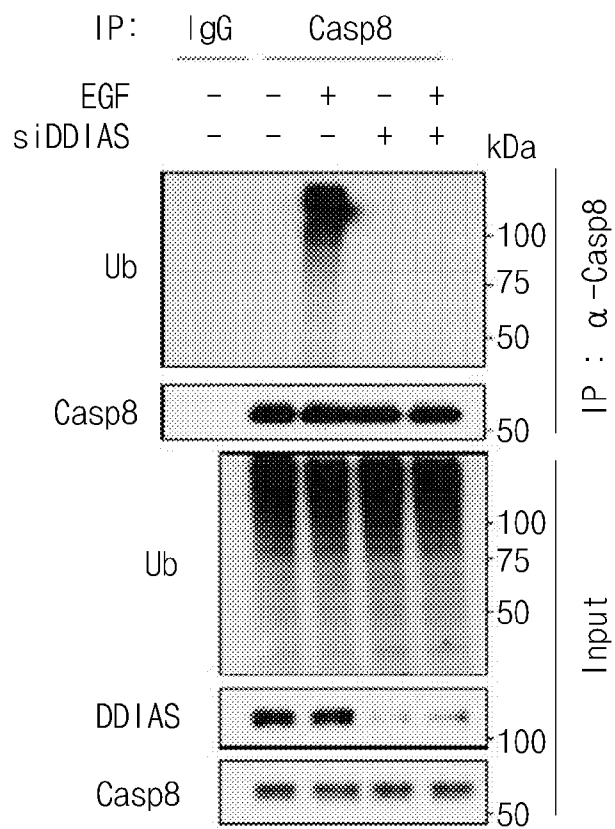
[도11c]



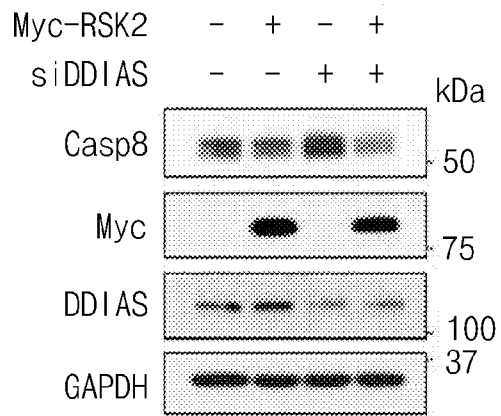
[도11d]



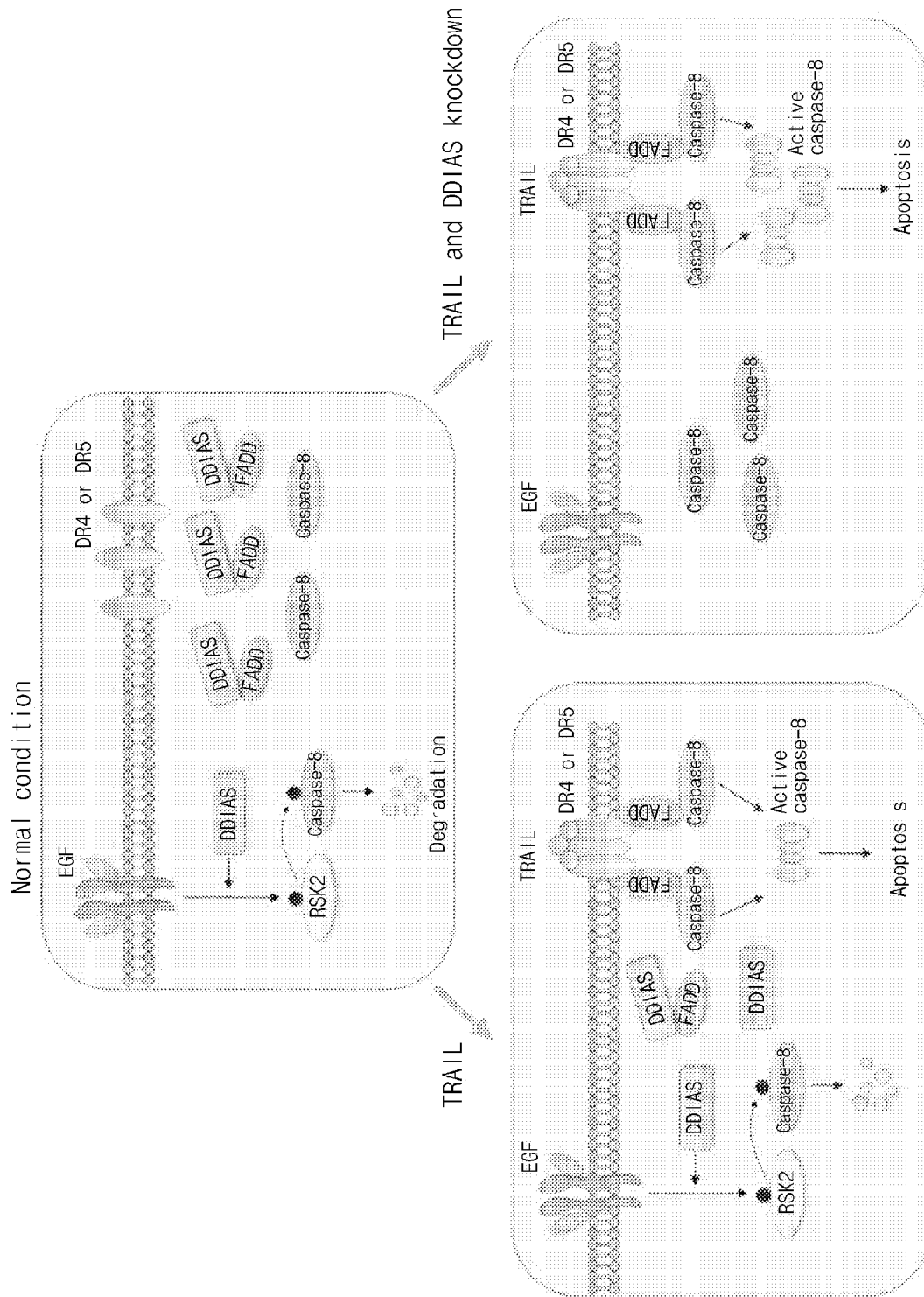
[도11e]



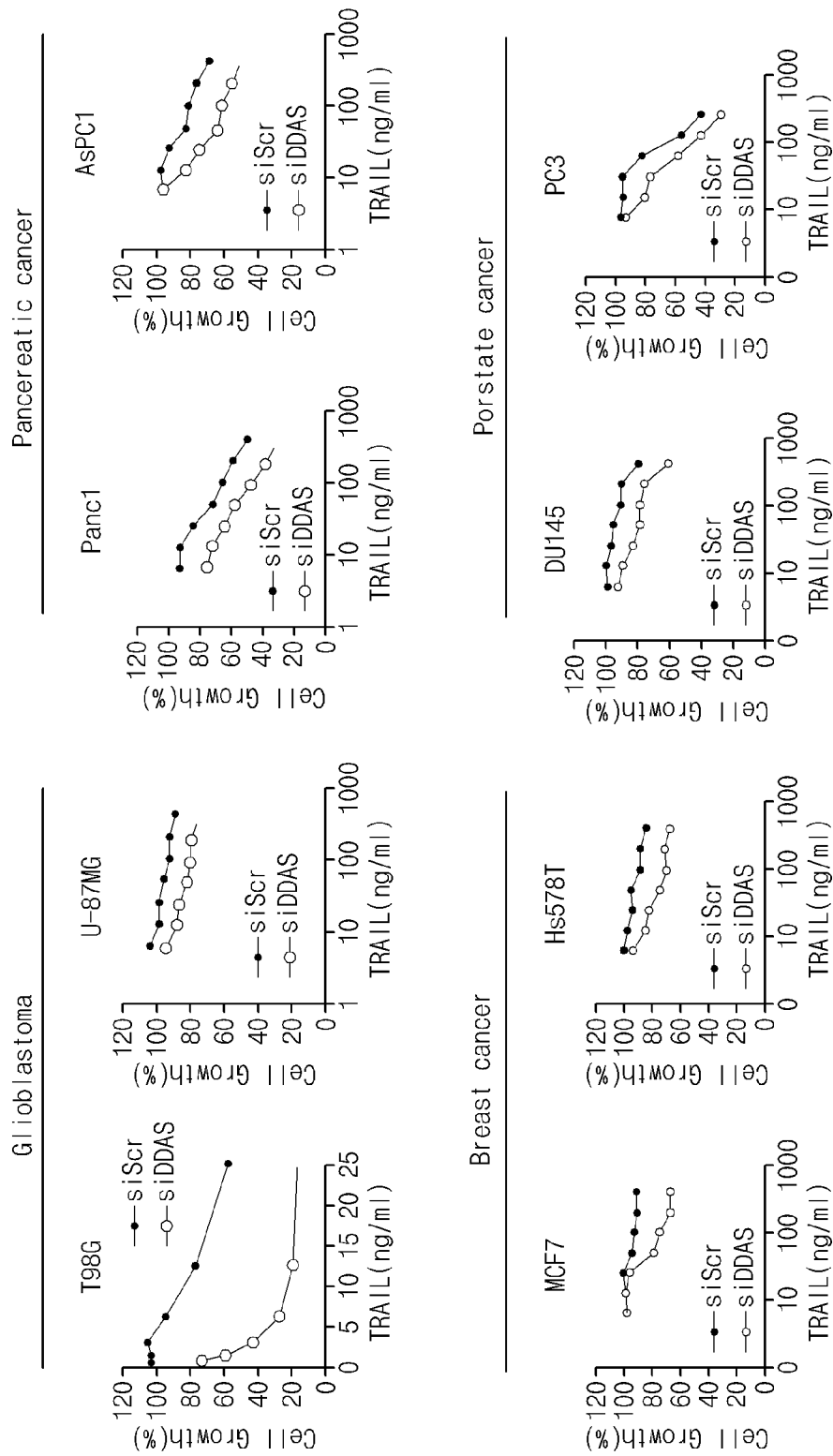
[도11f]



[도12]



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/19(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; A61K 31/35; A61K 31/7105; A61K 31/711; A61K 38/17; A61K 39/395; C12N 15/113; C12N 15/12; C12N 5/16; C12Q 1/68; A61K 38/19

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: DDIAS(DNA damage-induced apoptosis suppressor), inhibitor, death receptor ligand, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1168726 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 30 July 2012 See claims 1-4, 8; paragraph [0028].	1-11
Y	KR 10-2012-0067715 A (DONG-EUI EDUCATIONAL, FOUNDATION) 26 June 2012 See abstract; claims 1-9.	1-11
Y	US 2008-0044421 A1 (ASHKENAZI, A. J.) 21 February 2008 See claim 1; paragraph [0127].	1-11
Y	KR 10-2009-0060183 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 11 June 2009 See abstract; claims 5-19.	1-2,6-11
Y	KR 10-1591378 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 03 February 2016 See abstract; claim 1; paragraphs [0051], [0054]-[0055].	1-2,6-11



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

28 DECEMBER 2018 (28.12.2018)

Date of mailing of the international search report

28 DECEMBER 2018 (28.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010457

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.: **12-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12-13 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus 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.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/010457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1168726 B1	30/07/2012	KR 10-2011-0060209 A US 2013-0028957 A1 US 2014-0371300 A1 US 8846630 B2 US 9217149 B2 WO 2011-065677 A2 WO 2011-065677 A3	08/06/2011 31/01/2013 18/12/2014 30/09/2014 22/12/2015 03/06/2011 03/11/2011
KR 10-2012-0067715 A	26/06/2012	NONE	
US 2008-0044421 A1	21/02/2008	AU 2005-282440 A1 BR P10515615 A CA 2577823 A1 CN 101048424 A EP 1791864 A2 IL 181316 A JP 2008-513367 A KR 10-2007-0050950 A MX 2007002855 A NO 20071790 A NZ 553174 A RU 2007112929 A US 2009-0317384 A1 WO 2006-029224 A2 WO 2006-029224 A3 ZA 200701571 B	16/03/2006 29/07/2008 16/03/2006 03/10/2007 06/06/2007 04/07/2007 01/05/2008 16/05/2007 27/04/2007 05/06/2007 26/03/2010 20/10/2008 24/12/2009 16/03/2006 08/09/2006 25/02/2009
KR 10-2009-0060183 A	11/06/2009	KR 10-1083562 B1 US 2011-0008370 A1 US 8486905 B2 WO 2009-072831 A2 WO 2009-072831 A3	14/11/2011 13/01/2011 16/07/2013 11/06/2009 20/08/2009
KR 10-1591378 B1	03/02/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; A61K 31/35; A61K 31/7105; A61K 31/711; A61K 38/17; A61K 39/395; C12N 15/113; C12N 15/12; C12N 5/16; C12Q 1/68; A61K 38/19

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: DDIAS(DNA damage-induced apoptosis suppressor), 억제제, 사멸 수용체 리간드, 암

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1168726 B1 (한국생명공학연구원) 2012.07.30 청구항 1-4, 8; 단락 [0028] 참조.	1-11
Y	KR 10-2012-0067715 A (학교법인 동의학원) 2012.06.26 요약; 청구항 1-9 참조.	1-11
Y	US 2008-0044421 A1 (ASHKENAZI, A. J.) 2008.02.21 청구항 1; 단락 [0127] 참조.	1-11
Y	KR 10-2009-0060183 A (한국생명공학연구원 등) 2009.06.11 요약; 청구항 5-19 참조.	1-2, 6-11
Y	KR 10-1591378 B1 (한국생명공학연구원) 2016.02.03 요약; 청구항 1; 단락 [0051], [0054]-[0055] 참조.	1-2, 6-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 12월 28일 (28.12.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 12월 28일 (28.12.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

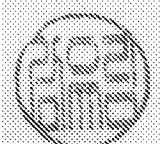
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 12-13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12-13은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약
규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1168726 B1	2012/07/30	KR 10-2011-0060209 A US 2013-0028957 A1 US 2014-0371300 A1 US 8846630 B2 US 9217149 B2 WO 2011-065677 A2 WO 2011-065677 A3	2011/06/08 2013/01/31 2014/12/18 2014/09/30 2015/12/22 2011/06/03 2011/11/03
KR 10-2012-0067715 A	2012/06/26	없음	
US 2008-0044421 A1	2008/02/21	AU 2005-282440 A1 BR PI0515615 A CA 2577823 A1 CN 101048424 A EP 1791864 A2 IL 181316 A JP 2008-513367 A KR 10-2007-0050950 A MX 2007002855 A NO 20071790 A NZ 553174 A RU 2007112929 A US 2009-0317384 A1 WO 2006-029224 A2 WO 2006-029224 A3 ZA 200701571 B	2006/03/16 2008/07/29 2006/03/16 2007/10/03 2007/06/06 2007/07/04 2008/05/01 2007/05/16 2007/04/27 2007/06/05 2010/03/26 2008/10/20 2009/12/24 2006/03/16 2006/09/08 2009/02/25
KR 10-2009-0060183 A	2009/06/11	KR 10-1083562 B1 US 2011-0008370 A1 US 8486905 B2 WO 2009-072831 A2 WO 2009-072831 A3	2011/11/14 2011/01/13 2013/07/16 2009/06/11 2009/08/20
KR 10-1591378 B1	2016/02/03	없음	