



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0092551
(43) 공개일자 2016년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) A61K 31/245 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0692 (2013.01)
A61K 31/245 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0012625

(22) 출원일자 2015년01월27일

심사청구일자 2015년01월27일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

이재환

서울특별시 노원구 한글비석로8길 20 102동 401호 (중계동, 대림벽산아파트)

허은혜

경기도 용인시 수지구 용구대로 2742 108동 303호 (죽전동, 동성1차아파트)

(74) 대리인

김순웅

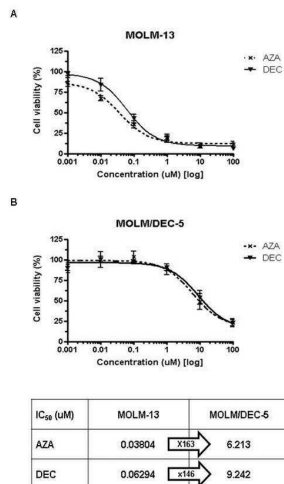
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 저메틸화제 내성세포주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 저메틸화제 내성세포주 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(기탁번호: KCTC18351P), 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법, 및 저메틸화제에 대한 내성 여부 판정 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(기탁번호: KCTC18351P)는 저메틸화제에 대한 내성 메커니즘을 연구하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 저메틸화제에 대해 내성을 갖는 암을 치료할 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해서도 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 암의 치료를 위해, 개개의 환자의 암에 대해 저메틸화제인 항암제에 대해 내성을 갖는 지 여부를 치료 개시 전에 판정함으로써 큰 치료 효과를 거둘 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/706 (2013.01)

C12Q 1/6844 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI10C2014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 임상연구인프라조성

연구과제명 국가지정 항암 선도기술 개발지원 센터

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2012.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(KCTC18351P).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 저메틸화제는 시티딘 유사체(cytidine analogs), 클라드리빈(cladribine) 및 프로카인(Procaine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 시티딘 유사체는 데시타빈(decitabine), 5-아자시티딘(5-azacytidine), 시타라빈(Cytarabine), 슈도이소시티딘(pseudoisocytidine), 5-플루오로-2'-디옥시시티딘(5-fluoro-2'-deoxycytidine), 겐시타빈(Gemcitabine), 5-아자-2'-디옥시-2',2'-디플루오로시티딘(5-aza-2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine), 5-아자-2'-디옥시-2'-플루오로시티딘(5-aza-2'-deoxy-2'-fluorocytidine), 제불라린(Zebularine), 엠트리바(Emtriva), 안시타빈(Ancitabine), 파자라빈(Fazarabine), 6-아자시티딘(6-azacytidine), 5,6-디히드로-5-아자시티딘(5,6-dihydro-5-azacytidine), 카페시타빈(Capecitabine), N⁴-옥타데실-시타라빈(N⁴-octadecyl-cytarabine), 및 엘라이드산 시타라빈(elaidic acid cytarabine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 암세포주는 급성골수성백혈병 세포주 MOLM-13로부터 유래된 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 암세포주는 게놈 내에서 복제 수 변화(copy number alteration, CNA)가 발생한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 복제 수 변화는 염색체 chr1:144,009,907-249,250,621; chr5:0-46,100,367; chr6:0-58,686,125; chr6:61,000,000-171,115,067; chr8:0-43,396,776; chr8:46,943,457-146,364,022; chr13:19,296,544-115,169,878; 및 염색체 chr20:0-25,904,169로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 획득(copy number gain)인 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 복제 수 변화는 염색체 chr9:20,414,808-21,925,193 및 염색체 chr14:72,033,418-107,349,540으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 손실(copy number loss)인 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 암세포주는 DNMT1(DNA methyltransferase 1, NM_001379), DNMT3a(NM_175629) 및 DNMT3L(NM_013369)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 유전자의 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 수준이, 급성골수성백혈병 세포주 MOLM-13에 비해 감소된 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 암세포주는 MDR 1(Multidrug Resistance 1, NM_000927) 유전자의 발현 수준; 또는 이

의 단백질의 발현 수준이, 급성골수성백혈병 세포주 MOLM-13에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 암세포주.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 암세포주에 후보 물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계의 암세포주의 성장 여부를 확인하는 단계.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 저메틸화제에 대한 내성 여부 판정 방법:

- (a) 대상으로부터 분리된 생체 시료의 게놈(genomic) DNA를 분리하는 단계;
- (b) 상기 게놈 DNA로부터 복제수(copy number)를 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 대상의 게놈 내에서 복제 수 변화(copy number alteration, CNA)가 발생하였는지 여부를 확인하는 단계.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 (c) 단계의 복제 수 변화는 제 1 항의 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(기탁 번호: KCTC18351P)로부터 유래된 정보인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 저메틸화제는 시티딘 유사체(cytidine analogs), 클라드리빈(cladribine) 및 프로카인(Procaine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 시티딘 유사체는 데시타빈(decitabine), 5-아자시티딘(5-azacytidine), 시타라빈(Cytarabine), 슈도이소시티딘(pseudoisocytidine), 5-플루오로-2'-디옥시시티딘(5-fluoro-2'-deoxycytidine), 겐시타빈(Gemcitabine), 5-아자-2'-디옥시-2',2'-디플루오로시티딘(5-aza-2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine), 5-아자-2'-디옥시-2'-플루오로시티딘(5-aza-2'-deoxy-2'-fluorocytidine), 제불라린(Zebularine), 엠트리바(Emtriva), 안시타빈(Ancitabine), 파자라빈(Fazarabine), 6-아자시티딘(6-azacytidine), 5,6-디히드로-5-아자시티딘(5,6-dihydro-5-azacytidine), 카페시타빈(Capecitabine), N⁴-옥타데실-시타라빈(N⁴-octadecyl-cytarabine), 및 엘라이드산 시타라빈(elaidic acid cytarabine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 (c) 단계의 복제 수 변화는 염색체 chr1:144,009,907-249,250,621; chr5:0-46,100,367; chr6:0-58,686,125; chr6:61,000,000-171,115,067; chr8:0-43,396,776; chr8:46,943,457-146,364,022; chr13:19,296,544-115,169,878; 및 염색체 chr20:0-25,904,169로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 획득(copy number gain)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 11 항에 있어서, 상기 (c) 단계의 복제 수 변화는 염색체 chr9:20,414,808-21,925,193 및 염색체 chr14:72,033,418-107,349,540으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 손실(copy number loss)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저메틸화제 내성세포주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골수형성이상증후군(myelodysplastic syndrome, MDS)는 몇몇 일반적인 임상적 특징을 공유하는 골수(BM) 부전 질환군이다. 이는 복제성 조혈작용의 존재, 골수의 형태학적 발육 이상, 말초 혈액의 혈구 감소증, 및 급성 골수성 백혈병(AML)으로 진행될 위험성 증가를 포함한다. MDS는 다양한 심각도 수준으로 존재 할 수 있고, 진단에 있어 유사한 특징을 갖는 환자는 자신의 질병이 시간이 어떻게 변화하는 지에 따라 상이한 임상 과정을 체험할 수 있기 때문에, MDS는 임상적으로 이질적인 양상을 나타낸다. MDS는 평균 연령 약 70 년인 노인성 질환이다. MDS는 동종 골수 이식으로만 치료 가능한 치명적인 질환이며, 치료법은 노화 관련 질환을 가진 노인에게 적용하는 것은 어렵다. 하기 3 종의 제제는 MDS에 대한 승인을 받은 바 있다: 저메틸화제(hypomethylating agents, HMA)인 아자시티딘(AZACITIDINE, AZA) 및 데시타빈(DECITABINE, DEC), 및 레나리도미드(lenalidomide). 이러한 약물, AZA 및 DEC 모두는 DNA-메틸트랜스퍼라제(DNA-methyltransferase) 억제제이며, "저메틸화" 제제로 불리고, 암에 있어서 후성유전적 치료(epigenetic therapy)의 첫번째 예 중 하나이다. 모두 널리 MDS의 치료에 현재 사용되며, 일반적으로 잘 허용된다. AZA를 투여한 환자에 대한 전체 생존 기간(OS)을 보여주는 최근 데이터는, 이 접근법이 질환의 자연 경과를 변화시킬 수 있다는 것을 제시한다. 그러나, 여전히 상당히 많은 MDS 환자들이 저메틸화제를 이용한 치료에 반응하지 않거나 치료 반응성이 진행되지 않는다. 이러한 조건에서 치료적인 선택이 제한되어 있기 때문에, 이는 환자 집단의 어려움을 나타내고, 연구의 중요한 영역을 구성한다.

[0003] 일반적으로, 실험실에서 약물에 대한 내성을 확인하기 위해, 변동 분석(fluctuation analysis)이 종양 세포를 포함하는 다수의 연구에 이용되었다. 가설은 약제에 의해 유도된 세포내 기능 변화가 아닌, 약제-내성 세포가 자발적으로 변이된 세포의 복제성 확장으로부터 벗어났다는 것을 의미한다. 변동 분석에 이용된 방법은 종양 세포에 처리된 약제의 돌연변이 비율을 평가하는 데 이용될 수 있다.

[0004] 약제-내성 세포주 모델은 항암제 내성의 임상적 시나리오로서 유용한 패러다임을 제공한다. 항암제에 대한 내성을 획득한 세포주 모델은 약제 내성을 기반으로 하는 메커니즘을 명확히 하는데 유용한 정보를 주었다.

[0005] 약제-내성 세포주 모델에 대한 추가적인 역할은 개발된 항암제의 신규한 작용 기전을 규명하는 것이다. 그의 약제-민감성 대조군과 비교하여 세포내 및/또는 분자적 변화를 나타내는 약제-내성 세포주는, 이러한 특정 변화의 존재에 의해 추론되는 약물 작용의 기전을 제안할 수 있다(Methods in Molecular Medicine, vol. 88: CNAcer Cell Culture: Methods and Protocols).

[0006] MDS 세포주는 31 개 이상이 있다. 몇몇 MDS 세포주는 진짜 MDS 세포에서 유래되지 않는다. DNA 프로파일링 결과 MDS 세포주의 일부가 백혈병 세포주와 교차-오염된 것으로 확인되었다. 나머지 세포주들은 백혈병 단계로부터의 세포주 및 MDS의 MDS 단계로부터 세포주로 구성된다. MDS 단계로부터의 세포주는 배양이 어렵다. 따라서, 본 발명자들은 백혈병 단계-유래 MDS 세포주를 일반적으로 이용하였다. MDS의 백혈병 단계로부터 확립된 세포주는 모 세포와 반복 염색체 재정렬(recurrent chromosomal rearrangement) 및 마이크로레이 유전자 발현 프로파일을 공유한다. 백혈병 단계-유래 MDS 세포주의 연구는 악성 변형의 메커니즘을 밝힐 수 있다.

[0007] HMA 민감도 및 내성의 이해에 대한 주요 장애물은 MDS를 임상적, 혈액학적으로 개선되도록 하는 각 메커니즘의 관여 정도, 즉, RNA, DNA, 또는 두 가지 모두로의 HMA의 도입이 아직 완전히 규명되지 않은 것이다.

[0008] 또한, HMA는 실온에서 매우 불안정하다. 일부 보고에서 식염수 내 2 mg/ml 용액일 때, 초기 농도의 90%에 도달할 때까지 분해되는 시간은 2.4 시간이었고, 물 중 5 % 텍스트로스에서는 3 시간이었다. 또한, 초기 농도의 90%에 도달할 때까지의 시간은 덜 농축된 용액일수록 짧아지는 것으로 보고하였다(Scott E Walker, Lauren F Charbonneau, Shirley Law, and Craig Earle. Stability of Azacitidine in Sterile Water for Injection. CNA J Hosp Pharm 2012;65(5):352-359).

[0009] 따라서, HMA-내성을 확인할 수 있는 보다 신속하고 민감도가 높은 방법의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 저메틸화제(HMA)-내성 세포주를 개발하기 위하여 예의 노력하였다. 그 결과, HMA-민감성 이차 AML 세포주인 MOLM-13으로부터 HMA의 임상적 투여량에 내성을 갖는 세포주를 확립하였고, 이들의 분자 및 세포

특성을 비교하여 HMA 활성 및 내성을 기반으로 하는 메커니즘을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(기탁번호: KCTC18351P)를 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 저메틸화제에 대한 내성 여부 판정 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(기탁번호: KCTC18351P)을 제공한다.

[0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "저메틸화제(Hypomethylation Agents)"는 DNA 메틸화를 저해하는 제제를 의미하며, DNA 탈메틸화제(demethylating agents)로도 불린다.

[0016] 본 발명의 저메틸화제는 DNA 메틸화를 저해할 수 있는 한, 어떠한 저메틸화제도 이용할 수 있으며, 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 저메틸화제는 시티딘 유사체(cytidine analogs), 클라드리빈(cladribine) 및 프로카인(Procaine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이고, 가장 바람직하게는 시티딘 유사체(cytidine analogs)이다.

[0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 시티딘 유사체는 5-아자시티딘(5-azacytidine), 데시타빈(decitabine), 시타라빈(Cytarabine), 슈도이소시티딘(pseudoisocytidine), 5-플루오로-2'-디옥시시티딘(5-fluoro-2'-deoxycytidine), 겐시타빈(Gemcitabine), 5-아자-2'-디옥시-2',2'-디플루오로시티딘(5-aza-2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine), 5-아자-2'-디옥시-2'-플루오로시티딘(5-aza-2'-deoxy-2'-fluorocytidine), 제불라린(Zebularine), 엠트리바(Emtriva), 안시타빈(Ancitabine), 파자라빈(Fazarabine), 6-아자시티딘(6-azacytidine), 5,6-디히드로-5-아자시티딘(5,6-dihydro-5-azacytidine), 카페시타빈(Capecitabine), N4-옥타데실-시타라빈(N4-octadecyl-cytarabine), 및 엘라이드산 시타라빈(elaidic acid cytarabine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이고, 보다 바람직하게는 5-아자시티딘(5-azacytidine), 데시타빈(decitabine), 시타라빈(Cytarabine), 슈도이소시티딘(pseudoisocytidine), 5-플루오로-2'-디옥시시티딘(5-fluoro-2'-deoxycytidine) 및 겐시타빈(Gemcitabine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이며, 보다 더욱 바람직하게는 5-아자시티딘(5-azacytidine) 또는 데시타빈(decitabine)이고, 가장 바람직하게는 5-아자시티딘(5-azacytidine)이다.

[0019] 또한, 본 발명의 암세포주는, 내성 효과를 나타내는 한, 임의의 시티딘 유사체에 대해서 교차-내성을 가질 수 있고, 바람직하게는 5-아자시티딘(5-azacytidine) 및 데시타빈(decitabine)에 대하여 교차 내성을 갖는다.

[0020] 본 발명자들은 데시타빈에 대한 획득 내성을 확인하기 위하여, 상기 세포주를 이용하여 내성과 관련된 분석을 실시한 결과, 데시타빈 내성이 5-아자시티딘에 대한 새로운 내성을 야기했음을 확인하였다. 이는 데시타빈에 대한 내성을 보이는 환자가 5-아자시티딘에 대해서도 교차 내성을 나타낼 가능성이 있음을 의미한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암세포주는 급성골수성백혈병 세포주 MOLM-13로부터 유래된 것이다.

[0022] MOLM-13에 데시타빈의 농도를 0.05 nM부터 시작하여 약제에 내성을 가지는 세포주를 선택하는 방법으로 데시타빈의 농도를 점진적으로 증가시켜서 1 μM에 내성을 갖는 내성 세포주를 확립하였고, 이를 2015년 01월 21일자로 미생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호: KCTC18351P).

[0023] 본 발명자들은 데시타빈에 대한 획득 내성의 메커니즘을 조사하기 위하여, 본 내성 세포주를 이용하여 aCGH(array comparative genomic hybridization) 및 유전자 복제 수 변화(copy number alteration, CNA)를 분석하였고, 그 결과, 본 내성 세포주는 게놈 내에서 복제 수 변화(copy number alteration, CNA)가 발생하였다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 복제 수 변화는, 본 내성 세포주의 염색체 chr1:144,009,907-249,250,621; chr5:0-46,100,367; chr6:0-58,686,125; chr6:61,000,000-171,115,067; chr8:0-43,396,776; chr8:46,943,457-146,364,022; chr13:19,296,544-115,169,878; 및 염색체 chr20:0-25,904,169로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 획득(copy number gain)이고, 보다 바람직하게는 본 내성 세포주의 염

색체 chr1:144,009,907-249,250,621; chr5:0-46,100,367; chr6:0-58,686,125; 및 chr6:61,000,000-171,115,067로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 획득(copy number gain)이며, 가장 바람직하게는 본 내성 세포주의 염색체 chr1:144,009,907-249,250,621; 및 chr5:0-46,100,367에서 복제 수 획득(copy number gain)이다.

[0025] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 복제 수 변화는, 본 내성 세포주의 염색체 chr9:20,414,808-21,925,193 및 염색체 chr14:72,033,418-107,349,540로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상에서의 복제 수 손실(copy number loss)이고, 가장 바람직하게는 염색체 chr14:72,033,418-107,349,540에서의 복제 수 손실(copy number loss)이다.

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암세포주는 DNMT1(DNA methyltransferase 1, NM_001130823), DNMT3a(DNA methyltransferase 3a, NM_022552) 및 DNMT3L(DNA methyltransferase 3L, NM_013369)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 유전자의 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 수준이, 급성골수성백혈병 세포주 MOLM-13에 비해 감소된다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암세포주는 MDR 1(Multidrug Resistance 1, NM_000927.4) 유전자의 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 수준이, 급성골수성백혈병 세포주 MOLM-13에 비해 증가된다.

[0028] 본 발명의 상기 복제 수 변화 및 유전자들의 발현 수준 변화는 바이오 마커로서 항암제인 저메틸화제에 대한 감수성의 지표가 될 수 있으며, 저메틸화제에 대한 감수성 마커로서의 정확성 및 신뢰도도 탁월하므로 암의 발생, 발전 및/또는 전이의 치료에 이용될 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감수성"은 개개의 환자의 암에 대하여 특정약물이 효과를 나타내는 지 여부를 의미하며, 본 명세서에서 내성과 혼용된다.

[0030] 예컨대, 상기 특정약물은 주로 항암제인 저메틸화제이며, 이들 항암제에는 암의 종류에 따라 효과를 나타내는 경우와 효과를 나타내지 않는 경우가 있다. 또한, 유효한 것으로 인정되고 있는 종류의 암이어도, 개개의 환자에 따라 효과를 나타내는 경우와 효과를 나타내지 않는 경우가 있는 것이 알려져 있다. 이와 같은 개개의 환자의 암에 대해 항암제가 효과를 나타내는 지 여부를 항암제 감수성이라고 한다. 따라서, 본 발명에 따라 치료 개시 전에 효과를 기대할 수 있는 환자(반응자)와, 효과를 기대할 수 없는 환자(무반응자)를 예측할 수 있으면, 유효성과 안전성이 높은 화학 요법이 실현될 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0032] (a) 상기 암세포주에 후보 물질을 처리하는 단계; 및

[0033] (b) 상기 (a) 단계의 암세포주의 성장 여부를 확인하는 단계.

[0034] 본 발명의 암세포주에 후보 물질을 처리하고 상기 암세포주의 성장 여부를 확인함으로써, 저메틸화제에 대한 내성 극복 여부를 확인할 수 있다.

[0035] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 스크리닝 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 항암 효과를 갖는 것으로 1차 스크리닝된 후보물질들에 대한 2차 스크리닝 방법으로서 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이러한 단계를 거쳐 스크리닝된 후보물질은 항암 효과를 가지면서도 저메틸화제(바람직하게는 5-아자시티딘 및 데시타빈)에 대한 내성을 나타내지 않을 것이므로, 저메틸화제와 함께 병용 사용함으로써 효과적으로 암을 치료할 수 있게 된다. 이러한 암 치료용 의약은 이에 제한되는 것은 아니나, 저메틸화제(바람직하게는 5-아자시티딘 및 데시타빈)에 대한 내성을 나타내는 암, 예컨대, 백혈병에 대한 항암제일 수 있다. 본 발명에 있어서, "저메틸화제에 대한 내성을 나타내는 암"은 예컨대, 실제 5-아자시티딘이나 데시타빈을 사용하였으나 내성을 나타낸 암뿐만 아니라 내성을 나타낼 것으로 예상되는 암을 포함한다.

[0036] 본 발명의 방법은 상술한 암세포주를 이용하여 내성 극복 여부를 판정하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 저메틸화제에 대한 내성 여부 판정 방법을 제

공한다:

- [0038] (a) 대상으로부터 분리된 생체 시료의 게놈(genomic) DNA를 분리하는 단계;
- [0039] (b) 상기 게놈 DNA로부터 복제 수(copy number)를 측정하는 단계; 및
- [0040] (c) 상기 대상의 게놈 내에서 복제 수 변화(copy number alteration, CNA)가 발생하였는지 여부를 확인하는 단계.
- [0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 (c) 단계의 복제 수 변화는 상술한 본 발명의 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(KCTC18351P)로부터 유래된 정보이다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생체 시료"는 해당 대상 개체로부터 획득되는 모든 생물학적 시료, 예컨대, 타액(saliva), 생검(biopsy), 혈액, 혈청, 혈장, 피부 조직, 액체 배양물, 분변 및 소변으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이며, 특별히 이에 제한되지 않고, 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.
- [0043] 상기 (b) 단계의 복제 수의 측정은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 예컨대, 비교 유전체 보합법(comparative genomic hybridization, CGH), 핵형분석(karyotyping), 형광 인사이츄 하이브리다이제이션(fluorescent in-situ hybridization, FISH), 다중 PCR 및 이형접합소실 분석(loss of heterozygosity, LOH)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 상기 방법에 있어서, 상기 (c) 단계의 CNA의 확인은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0045] 본 발명자들은 저메틸화제에 의한 유전체 변이를 확인하기 위하여, 비교 유전체 보합법(Comparative Genomic Hybridization, CGH)을 이용한 분석을 실시하여 DNA 복제수의 변이(copy number variant)를 알아보았다. 그 결과, 염색체의 총 10 개의 부위에서 DNA 복제수의 변이가 나타났다. 8 개의 부위는 DNA 복제수가 증가하였고, 2 개의 부위는 DNA 복제수가 감소하였다. 또한, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b 및 Mdr1 유전자의 발현 수준도 변화되었다.
- [0046] 따라서, 본 발명의 방법은 저메틸화제에 대한 내성 여부를 확인하고자 하는 시료에서 내성 여부를 판정하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 방법은 상술한 암세포주로부터 획득된 바이오마커를 이용하여 내성이 있는 것으로 판정하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0048] 본 발명에 따르면, 저메틸화제에 대한 내성을 갖는 암세포주(KCTC18351P)는 저메틸화제에 대한 내성 메커니즘을 연구하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 저메틸화제에 대해 내성을 갖는 암을 치료할 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해서도 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 암의 치료를 위해, 개개의 환자의 암에 대해 저메틸화제인 항암제에 대해 내성을 갖는 지 여부를 치료 개시 전에 판정함으로써 큰 치료 효과를 거둘 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 데시타빈 내성 세포주의 확립을 보여준다.
- 도 2는 aCGH 결과를 보여준다.
- 도 3은 SNP 마이크로어레이 결과를 보여준다.
- 도 4는 데시타빈 내성 세포주의 특성을 보여준다.
- 도 5는 이중 이식 마우스 모델로서 MOLM/DEC-5 세포주의 확립을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [0051] **실험 방법 및 재료**
- [0052] 세포배양
- [0053] MOLM-13과 MOLM/AZA-1세포주의 배양 조건은 다음과 같다. 10% 소태아혈청, 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신)를 포함한 RPMI-1640배지에서 5% 이산화탄소가 포함된 37°C 배양기에서 배양한다.
- [0054] 시약
- [0055] AZA의 구매는 Sigma Aldrich에서 구매하였다. CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay는 Promega사의 것을 구매하여 세포성장증식률을 제조사의 지시에 따라 시행하였다.
- [0056] AZA 획득 내성세포주 구축
- [0057] 모세포 MOLM-13에 0.5 pM에서 5 nM의 AZA를 순차적 용량증가법을 사용하여 내성을 유도하였다. AZA에 대해 세포 증식억제 민감도가 감소된 세포주를 단일세포로 분리하여 계대배양을 통한 세포주로 구축하였고, 이를 2015년 01월 21일자로 미생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호: KCTC18351P).
- [0058] aCGH(array comparative genomic hybridization) 및 유전자 복제 수 변화
- [0059] Agilent technologies사의 인간 CGH 마이크로어레이 180K를 사용하여 DNA복제수 프로파일링을 수행하였다. 프로브맵핑은 UCSC 게놈 브라우저(Human NCBI37/hg19)를 토대로 분석하였다. RankSegmentation 분석 알고리즘은 NEXUS 소프트웨어 버전 7.5(Biodiscovery사)을 사용하였다.
- [0060] SNP 마이크로 어레이 및 유전자 복제 수 변화
- [0061] 게놈-확대 SNP 유전자 분석은 Affymetrix사의 743,304 SNP마커와 1,953,246 유전자 복제마커를 포함한 CytoScanHD 마이크로어레이를 사용하였다.
- [0062] 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응
- [0063] TRIzol(Invitrogen사)을 이용하여 RNA를 분리한 후 RevertAid premium reverse transcriptase(Thermo scientific사)를 이용하여 complementary DNA를 합성한다. SYBR green master mix(Roche사)를 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 한다.
- [0064] 이중 이식 모델의 확립
- [0065] 5×10^6 개의 MOLM/AZA-1세포를 matrigel(BD Bioscience사)과 동량으로 섞어 BALB/c nu/nu mice에 피하 주입하였다. 종양의 크기는 캘리퍼를 사용하여 가로와 세로 직경을 측정하여 $1/2(\text{세로} \times \text{가로}^2)$ 의 수식에 넣어 종양크기를 산출한다.
- [0066] **실시예 1: MOLM/DEC-5 세포주의 HMA에 대한 교차-내성 확인**
- [0067] HMA 내성에 대한 더 나은 메커니즘적 기준을 정의하기 위해, 본 발명자들은 MDS로부터 유래된 MOLM-13에서 데시타빈 내성 세포주를 조사하였다.
- [0068] 본래 MOLM-13 세포주는 데시타빈에 민감하다. 본 발명자들은 연속적으로 데시타빈의 농도를 증가시켜가며 MOLM-

13 세포를 노출시켰고, 그 결과 데시타빈 내성 세포주인 MOLM/DEC-5을 확립할 수 있었다. MOLM-13 및 MOLM/DEC-5 간의 아자시티딘 및 데시타빈(decitabine)의 IC₅₀은 도 1에 나타내었다.

[0069] 모세포주인 MOLM-13에서의 데시타빈의 IC₅₀이 0.06294 μ M인 것에 비해(도 1A), MOLM/DEC-5에서 데시타빈의 IC₅₀은 9.242 μ M이었고(도 1B), 이는 데시타빈에 대한 내성이 146 배가 증가된 것이다.

[0070] 또한, 모세포주인 MOLM-13에서의 아자시티딘의 IC₅₀이 0.03804 μ M인 것에 비해(도 1A), MOLM/DEC-5에서 아자시티딘의 IC₅₀은 6.213 μ M이었고(도 1B), 이는 아자시티딘에 대한 내성이 163 배가 증가된 것이다.

[0071] 따라서, MOLM/DEC-5은 성공적으로 데시타빈 및 아자시티딘-내성 세포주로 확립되었음을 알 수 있다.

[0072] **실시예 2: aCGH(array comparative genomic hybridization) 및 유전자 복제 수 변화(copy number alteration, CNA)**

[0073] 본 발명자들은 레퍼런스로서 정상 게놈(pooled normal genomes)의 MOLM-13 및 MOLM/DEC-5 세포주의 마이크로레이-기반 복제 수 프로파일링을 실시하였다. 도 2A는 MOLM-13에서의 염색체 변화(chromosomal alterations)의 게놈-전체 프로파일을 보여주며, 도 2B는 MOLM/DEC-5에서의 염색체 변화(chromosomal alterations)의 게놈-전체 프로파일을 보여준다. X 축은 각각의 염색체를 나타내고, Y 축은 LOG2 스케일에 대한 시그널 강도 비(각 세포주 게놈/정상 게놈(pooled normal))의 신호 강도 비를 나타낸다.

[0074] MOLM-13 게놈에서 6p, 6q, 8p, 8q, 13q, 19p, 19q, 및 20p의 복제 수 획득(gain), 9q21.3에서 복제 수 손실(loss)된 것으로 확인되었다(도 2A, 표 2). 표 2에 MOLM 및 MOLM/DEC-5 게놈 내 복제 수 변화를 나타내었다. CNA의 글로벌 프로파일(염색체 6, 8, 및 13의 획득 포함)은 이전 연구(Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y, Kimura G, Fujii N, Omoto E, Harada M, Orita K. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with inter clonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23).Leukemia. 1997;11(9):1469-77)와 대부분 일치했다.

[0075] 또한, 총 10 CNA가 MOLM/DEC-5 게놈에서 확인되었다(도 2B, 표 2). 참고로, 3 부위 (region)는 MOLM-13 게놈에 비해 뚜렷한 CNA 패턴을 보였다. 예를 들어, 1q21.1-q44 과 5p15.33-p11의 복제 수 획득은, MOLM 게놈이 아닌, MOLM/DEC-5 게놈에서 확인되었다. 14q24.2-q32.33의 복제 수 손실은 MOLM/DEC-5 게놈에서만 검출되었다.

[0076] 확인된 CNA의 유효성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 혼성화에 대한 레퍼런스로서 MOLM-13 세포로부터의 게놈 DNA로 aCGH를 반복하였다. 따라서, 모든 확인된 CNA는 약제-내성 특이 CNA로 해석될 수 있다. 반복된 aCGH을 통해, 모든 약제-내성 특이 CNA는 성공적으로 검증되었다. 특히, MOLM/DEC-5 게놈 내 19p의 24 Mb 크기의 부위는 MOLM-13 게놈과 비교하여 상대적인 복제 수 손실을 보여준다. *TPM3*, *STK11*, *ZNF331* 및 *RUNX1*와 같은 여러 암-관련 유전자들은 약제-내성 특이 CNA 내에 위치하였다.

[0077] RT-PCR에 의하여 각각 증폭된 데시타빈 내성 후보 유전자에 대한 프라이머 서열을 표 1에 나타내었다.

표 1

Gene	NM number	Primer sequence-forward	Primer sequence-forward
<i>DNMT1</i>	NM_001379	5'-CCGGCCCCGGTTCTT-3'	5'-GGACCATGGAGCGCTTGA-3'
<i>DNMT3a</i>	NM_175629	5'-CGCTGAGCTCGTTTTGCA-3'	5'-GTAGATGGCTTTGCGGTACATG-3'
<i>DNMT3L</i>	NM_013369	5'-ACGGCGGATCCTTGCA-3'	5'-GTGCCTGCTGCTCCTTATGG-3'
<i>MDR</i>	NM_000927	5'-CCAAGAAGCCCTGGACAAAG-3'	5'-GGACAGGCGGTGAGCAAT-3'
<i>β-actin</i>	NM_001101	5'-CCATCGTCCACCGCAAA-3'	5'-TCAAGAAAGGGTGTAAACGCAACTA-3'

표 2

Table 2. Copy number alterations in MOLM and MOLM/DEC-5 genomes.

Chromosome Region	Samples	Event	Cytoband	Validated by*	CancerGeneCensus
chr1:144,009,907-249,250,621	MOLM/DEC-5	Gain	q21.1 - q44	R, S	PDE4DIP, BCL9, ARNT, TPM3, MUC1, PRCC, NTRK1, SDHC, FCGR2B, PBX1, ABL2, TPR, MDM4, ELK4, SLC45A3, H3F3A, FH
chr5:0-46,100,367	MOLM/DEC-5	Gain	p15.33 - p11	R, S	IL7R, LIFR
chr6:0-58,686,125	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Gain	p25.3 - p11.2	R, S	IRF4, DEK, HIST1H41, TRIM27, POU5F1, DAXX, HMGAI, FANCE, PIM1, TFEB, CCND3
chr6:61,000,000-171,115,067	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Gain	q11.1 - q27	R, S	PRDM1, ROS1, GOPC, STL, MYB, TNFAIP3, ECT2L, EZR, FGFR1OP, MLLT4
chr8:0-43,396,776	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Gain	p23.3 - p11.1	R, S	PCM1, WRN, WHSC1L1, FGFR1, HOOK3
chr8:46,943,457-146,364,022	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Gain	q11.1 - q24.3	R, S	TCEA1, PLAG1, CHCHD7, NCOA2, HEY1, COX6C, EXT1, MYC, NDRG1, RECQL4
chr9:20,414,808-21,925,193	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Loss	p21.3	R, S	MLLT3
chr13:19,296,544-115,169,878	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Gain	q11 - q34	R, S	CDX2, FLT3, BRCA2, LHFP, LCP1, RB1, ERCC5
chr14:72,033,418-107,349,540	MOLM/DEC-5	Loss	q24.2 - q32.33	R, S	TSHR, TRIP11, GOLGA5, DICER1, TCL6, TCL1A, BCL11B, AKT1, IGH@
chr19:0-24,340,741	MOLM-13	Gain	P13.3 - p12	R, S	FSTL3, STK11, TCF3, GNA11, SH3GL1, MLLT1, DNMT2, SMARCA4, LYL1, BRD4, TPM4, JAK3, ELL
chr19:28,272,497-59,042,827	MOLM-13	Gain	q11 - q13.43	R, S	CCNE1, CEBPA, AKT2, CD79A, CIC, BCL3, CBLC, ERCC2, KLK2, PPP2R1A, ZNF331, IFIT
chr20:0-25,904,169	MOLM-13, MOLM/DEC-5	Gain	p13 - p11.1	R, S	

* R, repeated aCGH; S, SNP microarray

실시예 3: SNP 마이크로 어레이 및 유전자 복제 수 변화

반복된 aCGH 분석 외에, 본 발명자들은 Affymetrix CytoSCNAHD 마이크로어레이를 이용하여 MOLM-13 및 MOLM/DEC-5 세포주의 게놈에 대한 전체 게놈 SNP 유전자형 분석을 실시하여 식별된 CNA에 보다 신뢰성 있는 해석을 획득하였다.

도 3A는 MOLM-13에서의 염색체 변화(chromosomal alterations)의 게놈-전체 프로파일을 보여주고, 도 3B는 MOLM/DEC-5에서의 염색체 변화(chromosomal alterations)의 게놈-전체 프로파일을 보여준다. X 축은 각각의 염색체를 나타내고, Y 축은 LOG2 스케일에 대한 시그널 강도 비(각 세포주 게놈/정상 게놈(pooled normal))의 신호 강도 비를 나타낸다.

SNP 마이크로 어레이를 통해, aCGH에 의해 검출된 모든 약제-내성 특이 CNA들이 성공적으로 검증되었다. 또한, MOLM/DEC-5에서 어레이-CGH에 의해 확인된 1번 염색체 상의 복제 수 획득된 105 Mb 크기의 부위는, SNP 마이크로어레이에 의해 검출되었고, 대립 유전자 피크 플롯(allele peak plot) 내 SNP 마커들의 두 개의 이형 클러스터들(heterozygous clusters)을 명확하게 보여준 반면, MOLM-13 게놈에서는 어떠한 복제 수 획득 또는 SNP 마커들의 이형 클러스터들도 검출되지 않았다(도 3). 또한, MOLM/DEC-5의 5번 염색체 상의 복제 수 획득된 46 Mb 크기의 부위는, MOLM-13 게놈에서는 검출되지 않은 대립 유전자 피크 플롯 내 SNP 마커들의 두 개의 이형 클러

스터들(heterozygous clusters)을 보여주었다(도 3).

[0084] **실시예 4: MOLM/DEC-5에서의 시그널 전달 및 다중-약제 내성 유전자의 평가**

[0085] 일반적으로 임상 실험에 사용되는 메틸트랜스퍼라제 억제제들은 종양 세포 사멸을 촉진하지만, 이들의 세포 독성 작용은 아직 완전히 알려져 있지 않다. 그것의 세포사멸(apoptosis)-유도 메커니즘과 DNA 메틸트랜스퍼라제(DNA methyltransferases, DNMTs) DNMT1, DNMT3a 및 DNMT3b와의 상호 작용에 대한 지식은 낮은 세포 독성과 함께 보다 효과적인 약제를 디자인을 할 수 있도록 한다. DEC은 cytosine nucleoside analog로 DNA내로 삽입이 되어 DNA메틸화를 억제함으로써 탈메틸화와 사일런싱된(silenced) 유전자의 재활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0086] 본 발명자들은 RQ-PCR을 실시하여 DNMT1(도 4A), DNMT3a(도 4B), DNMT3L (도 4C), MDR(도 4D) 유전자의 발현 수준을 정량하였다. 결과는 베타-액틴의 mRNA 발현 수준에 대하여 상대적으로 표시하였고, 값은 3번의 독립적인 실험에 대한 평균값.D이다. (***) p 값 <0.0001 paired t 시험)

[0087] 본 발명자들은 DNMT1, DNMT3a 및 DNMT3L의 유전적 이상과 mRNA 발현을 검증하기 위하여 RQ-PCR을 실시하였다(도 4A, 4B 및 4C).

[0088] 흥미롭게도, MOLM-13에서보다 MOLM/DEC-5에서 *DNMT1* 및 *DNMT3a* mRNA 발현 수준이 크게 감소하였다. 그러나, *DNMT3L* 은 그렇지 않았다(도 4C).

[0089] 인간 세포에서의 다중-약물 내성은 *Mdr1*(P-당단백질) 유전자의 증가된 발현으로 인한 것이다. 다중-약제 내성 유전자 조절의 효능은 RQ-PCR에 의한 MDR 타겟 유전자를 직접 측정하여 확인하였다(도 4D). 이러한 결과는 DEC 처리 후 내성이 유도된 *Mdr1*의 증가 사이에 상관 관계가 있음을 나타낸다.

[0090] **실시예 5: MOLM/DEC-5 이중 이식 모델의 확립**

[0091] 본 발명자들은 MOLM/DEC-5 세포주의 종양 성장을 이용하였다. *인 비보* 종양 모델을 확립하기 위하여, MOLM-13 및 MOLM/DEC-5 세포주를 Balb/c nu/nu 마우스의 피하에 이식하였다(도 5). 종양 부피가 직경 2 mm가 될 때까지 2 회/주 동안 모니터링하였다. 도 5A의 그래프는 종양 부피의 변화를 나타낸다. 동물의 수는 그룹당 3 마리의고, 데이터는 평균값.E이다(N=3). 도 5B는 분리된 종양의 크기를 나타낸다.

[0092] 흥미롭게도, MOLM/DEC-5군은 종양 부피가 크게 증가했으나, MOLM-13군은 그렇지 않았다.

수탁번호

[0093]

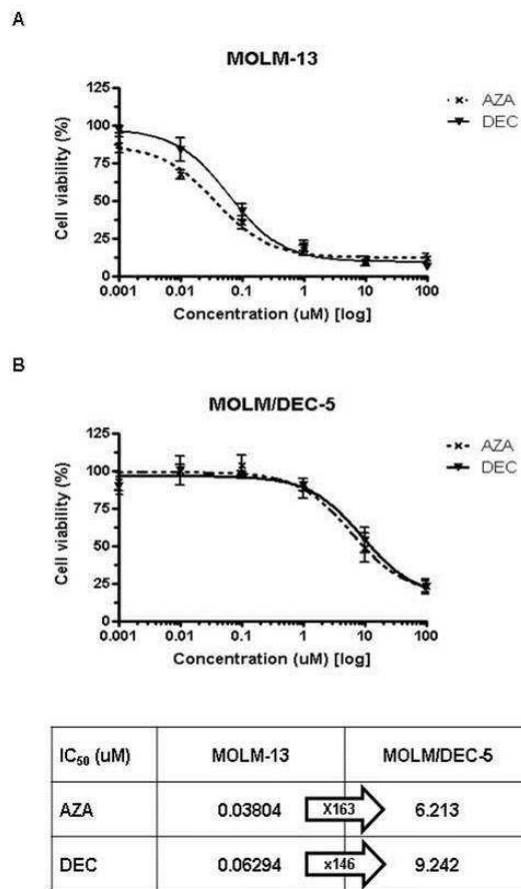
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18351P

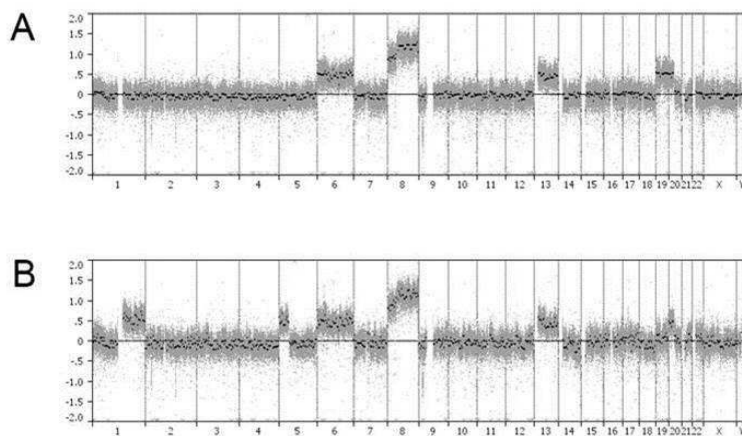
수탁일자 : 20150121

도면

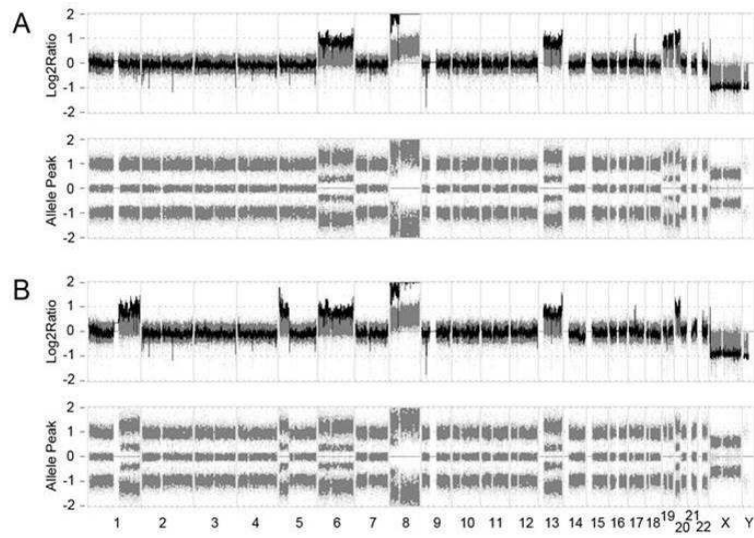
도면1



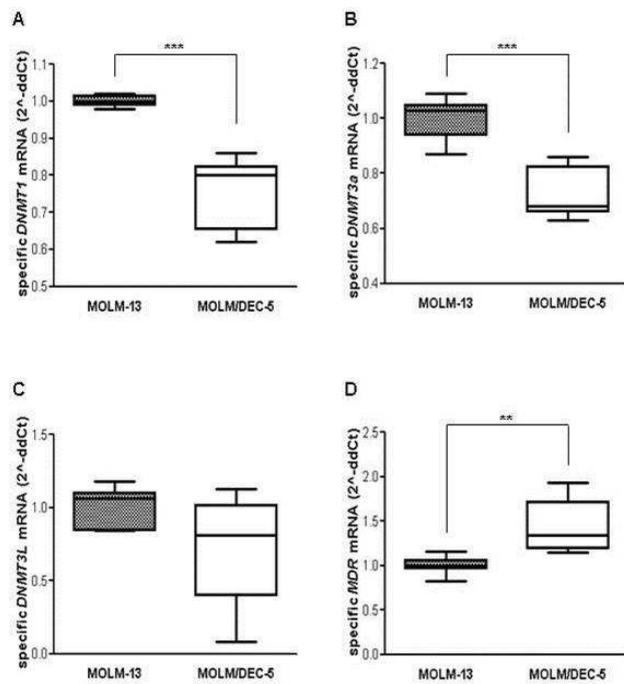
도면2



도면3



도면4



도면5

