



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0098513
(43) 공개일자 2017년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0020521
(22) 출원일자 2016년02월22일
심사청구일자 2016년02월22일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
신윤용
서울특별시 서초구 반포대로 275, 122동 1401호 (반포동, 래미안퍼스티지아파트)
박소연
경기도 군포시 용호1로21번길 15, 108동 201호 (당동, 용호마을e편한세상)
(74) 대리인
안소영

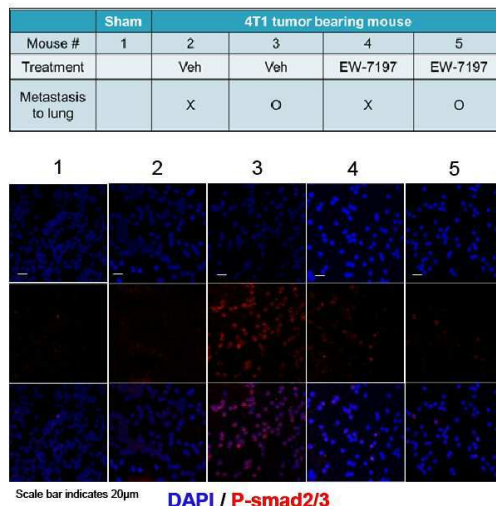
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 암 전이 진단 및 약물 효능 스크리닝을 위한 정보를 제공하는 방법

(57) 요약

본 발명은 암 전이 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 암 전이에 대한 후보 물질의 효능을 스크리닝하는 방법, 및 암 전이에 대한 약물의 효능을 확인하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의하면 핵 내의 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3를 현미경으로 확인 함으로써 세포의 형상 및 위치에 따른 발현양상을 확인할 수 있어, 신속하고 정확하게 암 환자에서 전이 여부 및 전이 정도를 확인할 수 있고, 암 전이를 억제하는 항암제 후보 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있으며, 암 환자에 투여된 약물이 암의 전이를 실제로 억제하는 효과가 있는지 확인할 수 있다. 따라서 본 발명은 암 진단 및 치료, 그리고 암 전이를 억제하는 항암제 스크리닝에 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 2333/4703 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

김민진

경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 305동 1502호
(일산동, 후곡마을3단지아파트)

박상아

광주광역시 남구 용대로74번길 11-1, 110동 301호
(봉선동, 골든트레빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3313010015

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-포스트게놈 다부처 유전체 사업

연구과제명 유전체 기반 혈중 암전이지표 기전연구 및 검증

기 여 율 70/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2015.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M2A2A7A01041499

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원자력연구개발사업-방사선기술개발사업-방사선의학기술개발(기초)

연구과제명 TGF- β 억제제를 활용한 방사선 치료 한계 극복방안 연구

기 여 율 30/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2015.08.10 ~ 2018.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리하는 단계;
- 2) 상기 분리된 말초혈액단핵세포를 슬라이드에 도말하고, 인산화된 Smad2(phosphorylated Smad2) 및 인산화된 Smad3(phosphorylated Smad3)를 면역염색하는 단계; 및
- 3) 상기 면역염색된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 현미경으로 검출하는 단계를 포함하는, 암의 전이를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

- 1) 후보 물질이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 검출하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 검출 결과를, 상기 1) 단계의 후보 물질이 투여되지 않은 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 검출된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 상기 1) 단계의 후보 물질이 투여되지 않은 암에 걸린 개체의 혈액에서보다 상기 1) 단계의 후보 물질이 투여된 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 검출된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준이 감소된 경우, 상기 후보 물질을 암 전이 억제제로 선별하는 단계를 포함하는, 암 전이 억제제의 스크리닝 방법으로서,

상기 1) 단계는

- a) 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리하는 단계;
- b) 상기 분리된 말초혈액단핵세포를 슬라이드에 도말하고, 인산화된 Smad2(phosphorylated Smad2) 및 인산화된 Smad3(phosphorylated Smad 3)를 면역염색하는 단계; 및
- c) 상기 면역염색된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 현미경으로 검출하는 단계를 포함하는, 암 전이 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 암 전이 억제제는 TGF- β 신호 억제제인, 암 전이 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 4

- 1) 약물이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리하는 단계;
- 2) 상기 분리된 말초혈액단핵세포를 슬라이드에 도말하고, 인산화된 Smad2(phosphorylated Smad2) 및 인산화된 Smad3(phosphorylated Smad 3)를 면역염색하는 단계; 및
- 3) 상기 면역염색된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 현미경으로 검출하는 단계를 포함하는, 투여된 약물의 암 전이 억제 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 암은 유방암인, 투여된 약물의 암 전이 억제 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 전이 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 암 치료제 후보 물질의 효능을 스크리닝하는 방법, 및 암 전이에 대한 약물의 효능을 확인하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로, 암의 생존율은 전이 여부에 따라 크게 달라진다. 예컨대 유방암의 경우, 2014년 12월 보건복지부 중앙암등록본부 발표자료에 따르면, 유방암의 병소가 원발 부위에 국한된 경우(Localized)에 발견하여 치료한 경우 5년 상대생존율은 97.7%에 달하고, 주변으로만 퍼진 경우(국소, Regional)에 발견하여 치료한 경우 90%에 달한다. 그러나 원발 부위로부터 먼 곳까지 림프관을 통해 전이된 경우(원격, Distant) 5년 상대생존율은 35.9%로 현저히 저하된다. 즉 전이 여부를 조기에 진단하는 것이 매우 중요하다.

[0003] Smad는 TGF- β (transforming growth factor β) 수퍼패밀리의 세포내 신호를 전달하는 단백질이다. Smad 중 Smad2 및 Smad3은 인산화를 통해 TGF- β 의 신호를 전달하고, 이는 유방암, 간암, 및 그 외 다양한 암의 전이와 관련이 있다고 알려져 있다(Front Biosci (Landmark Ed). 2012 Jan 1;17:1281-93).

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Samantha D, Datta PK, Alterations in the Smad pathway in human cancers., Front Biosci (Landmark Ed). 2012 Jan 1;17:1281-93.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 암의 전이 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

[0006] 본 발명은 후보 물질이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 검출하고, 이를 상기 후보 물질이 투여되지 않은 경우와 비교하여 인산화된 Smad2 및 Smad3의 발현 수준과 비교하여 감소되었는지 여부를 확인하는, 암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명은 약물이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 투여된 약물의 암 전이 억제 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2(phosphorylated Smad2) 및 인산화된 Smad3(phosphorylated Smad 3)의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 암의 전이 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은

[0010] 1) 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리하는 단계;

[0011] 2) 상기 분리된 말초혈액단핵세포를 슬라이드에 도말하고, 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3를 면역염색하는 단계; 및

[0012] 3) 상기 면역염색된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 현미경으로 검출하는 단계를 포함한다.

[0013] 상기 1) 단계에서, 암에 걸린 개체의 혈액을 원심분리하고 적혈구를 용혈시킴으로써 적혈구가 포함되지 않은 백혈구 펠렛을 수득함으로써 말초혈액단핵세포를 분리할 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 "말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell)"은 단일구형의 핵을 가지고

있는 백혈구를 총칭하는 용어이다.

- [0015] 상기 2) 단계에서, 백혈구 펠렛을 최대한 single cell로 현탁한 후 슬라이드에 도말할 수 있다. 또한 인산화된 Smad2에 특이적으로 결합하는 일차 항체 및 인산화된 Smad3에 특이적으로 결합하는 일차 항체를 슬라이드에 처리하고, 이차 항체를 처리함으로써 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3를 면역염색할 수 있다.
- [0016] 상기 3) 단계에서 면역염색이 일어난 슬라이드를 현미경으로 관찰하여, 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 직접적으로 검출할 수 있다. 본 발명의 방법에 의하면 핵 내의 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3를 현미경으로 확인 함으로써 세포의 형상 및 위치에 따른 발현양상을 확인할 수 있어, 세포를 용해시켜 확인하는 ELISA 등의 방법에 의해 발현수준을 확인하는 기존의 방법보다 정확하면서도 간편하게 암 전이 여부 및 암 전이 정도를 확인할 수 있다.
- [0017] 상기 방법에 있어서, 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준이 높게 나타날수록 암이 많이 전이되어 있는 것으로 판단할 수 있다.
- [0018] 한편 암 환자에서 본 발명의 방법과 같이 말초혈액단핵세포에서 면역염색 및 현미경으로 확인된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준에 대한 기지의 데이터 또는 기타 통상적인 진단 방법에 의해 전이 정도가 파악된 암 환자에서 확인되는 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준과, 본 발명의 방법을 적용한 암 환자에서의 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 비교함으로써, 본 발명의 방법을 적용한 암 환자의 상대적인 전이 정도 또는 병기를 파악하는 것도 가능하다.
- [0019] 또한 본 발명은 1) 후보 물질이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 검출하는 단계;
- [0020] 2) 상기 1) 단계의 검출 결과를, 상기 1) 단계의 후보 물질이 투여되지 않은 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 검출된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- [0021] 3) 상기 2) 단계에서 상기 1) 단계의 후보 물질이 투여되지 않은 암에 걸린 개체의 혈액에서보다 상기 1) 단계의 후보 물질이 투여된 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 검출된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준이 감소된 경우, 상기 후보 물질을 암 전이 억제제로 선별하는 단계를 포함하는, 암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은
- [0023] a) 후보 물질이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리하는 단계;
- [0024] b) 상기 분리된 말초혈액단핵세포를 슬라이드에 도말하고, 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3를 면역염색하는 단계; 및
- [0025] c) 상기 면역염색된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 현미경으로 검출하는 단계를 포함하고, 상기 검출된 발현 수준을 후보 물질이 투여되지 않은 경우와 비교하여 후보 물질이 투여된 경우에 더 낮은지 확인하여 수행될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 스크리닝 방법에 의하여, 암에 걸린 개체에 후보 물질을 투여한 후 채취된 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 관찰할 수 있다. 만약 후보 물질의 투여에 의해 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 농도가 상기 후보 물질을 투여하지 않은 경우보다 감소된 것으로 확인되었다면, 상기 후보 물질은 TGF- β 신호전달 경로를 억제하는 효능이 있다고 볼 수 있으므로, 암 전이를 억제하는 항암제로 개발될 수 있는지 연구될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 후보 물질은 임의의 물질이 될 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 후보 물질은 기타 스크리닝 방법에 의해 암 전이 억제 효과가 있을 것으로 어느 정도 예상되는 물질이 될 수 있다. 이 경우 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 상기 물질이 실제로 암 전이 억제 효과가 있는지 여부를 확실히 확인할 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명은 약물이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 분리된 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 투여된 약물의 암 전이 억제 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은

- [0030] a) 약물이 투여된, 암에 걸린 개체의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리하는 단계;
- [0031] b) 상기 분리된 말초혈액단핵세포를 슬라이드에 도말하고, 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3를 면역염색하는 단계; 및
- [0032] c) 상기 면역염색된 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준을 현미경으로 검출하는 단계를 포함하고, 검출 결과를 상기 약물이 투여되지 않은 경우와 비교하여 수행될 수 있다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 약물이 투여된 경우에 상기 약물이 투여되지 않은 경우보다 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현 수준이 감소되는 경우, 투여된 약물이 암 전이를 억제하는 것으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 약물은 본 발명자들이 발명한 암 전이 억제제인 EW-7197(N-[[4-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl)-5-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]methyl]-2-fluoroaniline)이 될 수 있다. 그러나 약물의 종류는 이에 제한되지 않으며, 암 전이 억제 활성을 갖는 것으로 알려져 암 환자들에게 투여되는 임의의 약물이 될 수 있다.
- [0035] 상기 방법에 의하여, 약물의 투여에 의해 암에 걸린 개체에서 암의 전이가 억제되었는지 여부를 확인할 수 있다. 만약 약물의 투여에 의해 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 농도가 감소된 것으로 확인되었다면, 상기 약물은 상기 개체에서 암의 전이를 억제하는 효능이 있는 것이므로, 투여를 지속하거나 또는 늘리는 방안을 고려할 수 있다. 항암제 약물은 환자에 따라 효과 발휘 여부가 매우 다양하게 나타나는데, 일반적으로 항암제 약물은 독성이 매우 강하여 실제로 효과가 없는데도 계속 투여하게 되면 부작용만 나타날 뿐 아니라, 다른 효과가 있을 수도 있는 약물을 적절한 시기에 투여할 기회를 박탈당하게 된다. 따라서 본 발명의 방법을 이용하면 그 약물 투여에 의해 암의 전이가 실제로 억제되는지 여부를 확인한 후 약물 투여 지속 여부 및 투약 요법을 결정할 수 있다는 장점이 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 "암에 걸린 개체"는 암에 이환된 개체를 의미한다. 상기 개체에서 암의 진행 단계, 즉 병기(stage)에는 제한이 없으나, 본 발명은 조기 진단에서 큰 의의가 있으므로, 예컨대 초기, 즉 0기 또는 1기 암에 걸린 개체가 될 수 있다. 한편 암의 병기에 대한 분류는 당업계에 알려진 모든 종류의 분류에 따를 수 있으나, 예를 들어 국가암정보센터에서 제공하는 각 암의 진행 단계에 대한 정보에 따른 분류일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 "전이"란 암이 원발부위를 넘어서 다른 곳까지 병소가 퍼진 것을 의미한다. 예를 들어 상기 암이 유방암인 경우, 폐 전이 및 골 전이가 일어나는 것이 가장 흔하나, 전이의 종류 및 정도에는 제한이 없다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 "암"은 TGF- β 억제 신호에 의해 전이가 억제되는 임의의 암을 의미하며, 예를 들어 유방암, 자궁경부암, 신경교종, 뇌암, 흑색종, 피부암, 폐암, 방광암, 전립선암, 백혈병, 신장암, 간암, 대장암, 췌장암, 위암, 담낭암, 난소암, 임파종, 골육종, 자궁암, 구강암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 피부암, 혈액암, 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 "혈액"은 전혈, 혈병, 그 외 혈구들을 의미한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 "개체"는 인간을 포함하는 임의의 동물이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 "개체"는 인간이 될 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 "개체"는 임의의 실험동물, 예컨대 마우스, 랫트, 기니픽, 토끼, 돼지, 원숭이, 영장류 등이 될 수 있다. 본 발명의 개체가 실험동물인 경우, 상기 실험동물은 암에 대한 다양한 동물 모델(형질전환 동물 모델, 이종이식 동물 모델, 동종동계이식 동물모델 등)이 될 수 있다. 그러나 본 발명의 방법의 개체는 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 방법을 이용하면 신속하고 정확하게 암 환자에서 전이 여부 및 전이 정도를 확인할 수 있다. 또한 본 발명의 방법을 이용하여 암 전이를 억제하는 항암제 후보 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있고, 암 환자에 투여된 약물이 암의 전이를 실제로 억제하는 효과가 있는지 확인할 수 있다. 따라서 본 발명은 암 진단 및 치료, 그리고 암 전이를 억제하는 항암제 스크리닝에 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 본원에서 4T1 종양 모델 마우스 I 에 위액 또는 유방암 전이 억제제를 투여한 스케줄을 나타낸 도이다.

도 2는 4T1 종양 모델 마우스 I에서 폐로 전이가 일어난 정도를 확인한 도이다.

도 3은 본원에서 4T1 종양 모델 마우스 II에서 원암종 부피의 평균과 표준편차를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 방법에서 슬라이드상에 혈액을 도말한 방법을 나타낸 모식도이다.

도 5는 4T1 종양 모델 마우스 I에서 유방암의 폐 전이와 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현을 현미경으로 확인한 도이다.

도 6은 4T1 종양 모델 마우스 II에서 유방암 전이 억제제 투여 후 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현을 현미경으로 확인한 도이다.

도 7은 4T1 종양 모델 마우스 II에서 유방암 전이 억제제 투여 후 말초혈액단핵세포에서 인산화된 Smad2 및 인산화된 Smad3의 발현을 그래프로 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하에서 언급된 saline-coated micro slides 는 Muto Pure Chemicals(Tokyo, Japan)로부터 구입한 것이다. 그 외 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 모두 BD FACS LysingTM Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로부터 구입한 것이다.

[0044] Smad 경로에 의해 조절되는 TGF- β 신호 전달은 임의의 다양한 암의 전이에 관여하는 것으로 널리 알려져 있다 (*Journal of Cellular Biochemistry* 98:1380-1390 (2006)(Yubin Kang, Pro-Metastasis Function of TGF β Mediated by the Smad Pathway, 및 *Cell Research* (2009) 19:89-102, David Padua and Joan Massague, Roles of TGF β in metastasis 참조). 본 발명의 실시예는 유방암 세포 및 동물 모델에서 확인된 것이나, 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 암은 유방암에 제한되지 않고 그 외 Smad-TGF- β 신호 전달에 의해 전이가 억제되는 임의의 암이 될 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1. 혈중 말초혈액단핵세포에서의 p-Smad2/3 측정**

[0047] **1-1. 실험동물 준비**

[0048] **(1) 4T1 종양 모델 마우스 I(4T1 tumor bearing mouse mode I) 준비**

[0049] 투여된 약물이 유방암의 전이를 억제하는 효능이 있는지 확인하기 위하여, 아래와 같이 동물 모델을 준비하였다.

[0050] 5주령 BALB/c 마우스의 4번 유방에 4T1 세포(1.2×10^3 cells/50 μ l)를 주입하고 1주 후부터 대조군은 위액 (Veh, artificial gastric fluid)을, 실험군은 EW-7197(N-[[4-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl)-5-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]methyl]-2-fluoroaniline, 본 발명자들이 발명한 유방암 전이 억제 활성을 갖는 ALK-5 키나아제 화합물, Sheen YY *et al.*, EW-7197, a novel ALK-5 kinase inhibitor, potently inhibits breast to lung metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2014 Jul;13(7):1704-16)을 위액에 희석한 것을 각각 10mg/kg으로 주 5회씩 총 3주간 경구 투여하였다(도 1). 4주 째에 마우스를 부검하여 인디아 잉크(india ink) 염색 방법을 통해, 유방암의 폐로의 전이를 확인하였다(도 2).

[0051] **(2) 4T1 종양 모델 마우스 II(4T1 tumor bearing mouse mode II) 준비**

[0052] 유방암 전이를 억제하는 약물 투여시 시간 경과에 따라 Smad 2/3의 인산화 정도에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 아래와 같이 동물 모델을 준비하였다.

[0053] 5주령 BALB/c 마우스의 4번 유방에 4T1 세포(1.2×10^3 cells/50 μ l)를 주입하고 약 2주 후 원암종 부피가 약 70~100 mm³가 된 마우스들을 분리하여 다시 그룹핑하여 부피 평균을 일정하게 맞추었다. 도 3은 원암종 부피의 평균과 표준오차를 나타낸 것이다. 대조군은 위액을, 실험군은 EW-7197 10 mg/kg 단회 투여한 후 각각 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8시간 후에 부검하여 혈액을 채취하였다.

[0054] **1-2. 혈중 백혈구 분리**

- [0055] 1-1에서 준비한 4T1 종양 모델 마우스 I 및 II를 Zoletil:Rumpun:PBS(2:1:3)(Zoletil; 버박코리아, Rumpun; 바이엘코리아)으로 마취하고 복대정맥에서 혈액을 채취하였다(600 μ l~1 ml/마리).
- [0056] 채취된 혈액을 헤파린나트륨(항립제약)으로 처리된 마이크로 원심분리 튜브(1.5 ml)에 담고 진탕기(shaker)로 잘 흔들어 항응고된 혈액을 형성한 후, 원심분리하여(1500 g, 15분, 4℃) buffy coat를 형성시켰다. 혈장은 다른 튜브로 분리하고, buffy coat를 피펫으로 거두어 다른 1.5 ml 원심분리 튜브로 옮겼다(200 μ l~400 μ l/마리). 옮긴 양의 2배의 1×FACS LYSIS BUFFER(BD Bioscience)를 넣고 교반(stirring)하고 5분간 방치하여 백혈구를 고정시키고, 적혈구를 용혈(lysis)시켰다. 그 결과 고정된 백혈구는 튜브 바닥에 가라앉아 흰색의 펠렛을 형성하고 적혈구는 터져서 붉은 상등액이 생겼다(튜브에 따라 적혈구가 너무 많이 혼입되어 펠렛 내에 적혈구가 섞여 붉은 색을 띠는 경우도 있었는데, 이 경우에는 다시 펠렛의 약 2배 양의 1×FACS LYSIS BUFFER(BD Bioscience)를 넣고 교반한 후, 흰 색의 펠렛을 수득할 때까지 상기 과정을 반복하였다). 피펫으로 상등액을 최대한 제거하고, 1×PBS(phosphate buffered saline) 20 μ l 넣고 펠렛을 현탁하였다. 이 때 최대한 single cell을 얻도록 피펫하였다.
- [0057] **1-3. 백혈구 세포 도말 및 p-smad2/3 면역형광염색**
- [0058] 상기 1-2에서 얻은 백혈구 세포의 현탁액을 saline-coated micro slide(MUTOPURE CHEMICALS CO.)에 도말(smearing)하였다. 한 슬라이드에 5~8 μ l 정도씩 도말하였고, 한 마리에서 채취된 혈액을 4개의 슬라이드에 나누어 도말하였다. 도말 방법의 모식도는 도 4에 나타내었다(Cytopath Limited. 사의 홈페이지에서 인용). 도말 후 각 슬라이드를 37℃ 오븐에서 10분간 건조시킨 후 -70℃ 저온 냉동고에 보관하였다.
- [0059] 그 다음 슬라이드를 냉동고에서 꺼내어, 1% BSA(GenDepot), 0.1% Triton $\times$ 100 (sigma) in TBST(Tris buffered saline + 0.1% Tween 20)를 처리(실온, 1시간)하여 슬라이드상에 고정된 백혈구를 투과(permeation) 및 블로킹(blocking)하였다. 1×TBST로 세척한 후, 항 p-smad2/3 일차 항체를 처리하였다. 구체적으로, P-smad2(Cell signaling Technology)와 P-smad3(Cell signaling Technology) 항체를 1×TBST(Tris buffered saline + 0.1% Tween 20), 1% BSA(GenDepot), 및 0.1% Triton $\times$ 100 (sigma) 용액에 각각 1:100으로 희석하여 제조하고, 4℃에서 밤새(overnight, 12시간) 처리하였다.
- [0060] 1×TBST로 세척한 후, 2차 항체를 처리하였다. 2차 항체는 항-토끼 IgG Alexa555 또는 488 항체를 1×TBST(Tris buffered saline + 0.1% Tween 20), 1% BSA(GenDepot), 및 0.1% Triton $\times$ 100 (sigma) 용액에 각각 1:1000으로 희석하여 제조하고, 실온에서 20분간 처리하였다. 그 다음 1×TBST로 세척하고 DAPI(0.8 μ g/ml)를 20초간 상온에서 처리하여 세포 핵을 대조염색하였다.
- [0061] 그 후 흐르는 물에 슬라이드를 세척하고 Vecta mount(VECTOR)로 커버 슬립(cover slip)을 덮고 Carl Zeiss confocal Meta 현미경으로 400배 배율에서 촬영하였다.
- [0062] **1-4. 결과**
- [0063] 상기 1-3의 p-smad2/3 면역형광염색 결과는 하기와 같이 나타났다.
- [0064] **(1) 4T1 종양 모델 마우스 I(4T1 tumor bearing mouse mode I)에서의 결과**
- [0065] 4T1 종양 모델 마우스 I에서, 유방암의 폐 전이가 일어난 마우스와, 폐 전이가 일어나지 않은 마우스 간에 혈중 백혈구의 smad 2/3의 인산화 정도에 차이가 있는 것으로 나타났다. 즉, 유방암의 폐 전이가 일어난 마우스에서는 혈중 백혈구의 smad 2/3의 인산화가 많이 일어났으며, 인산화된 smad 2/3, 즉 p-smad2/3이 핵으로 이동한 것으로 확인되었다. 반면 폐 전이가 일어나지 않은 마우스의 혈중 백혈구에서는 smad 2/3의 인산화가 거의 나타나지 않았는데, 이는 종양 세포를 주입하지 않은 Sham 마우스와 유사한 경향으로 나타났다. 또한 본 발명자들이 개발하여 보고한 바 있는 TGF- β 신호 억제제인 EW-7197을 투여한 마우스는 폐 전이가 일어난 경우 및 폐 전이가 일어나지 않은 경우 모두 혈중 백혈구의 smad 2/3의 인산화가 억제된 것을 확인하였다(도 5).
- [0066] 상기 결과로부터, 상기 1-2 및 1-3의 방법에 따라 측정된 혈중 백혈구의 smad 2/3의 인산화 정도가 유방암의 전이에 대한 지표가 될 수 있고, 또한 EW-7197을 비롯한 TGF- β 신호 억제제의 다양한 항암 효능에 대한 지표 역시 될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0067] **(2) 4T1 종양 모델 마우스 II(4T1 tumor bearing mouse mode II)에서의 결과**
- [0068] 4T1 종양 모델 마우스 II에서, EW-7197을 투여한 후 시간 경과에 따라 혈중 백혈구의 smad 2/3 인산화 정도가 변화하는 것으로 확인되었다. 4T1 종양 모델 마우스 II의 혈중 백혈구 smad 2/3 인산화는 정상 마우스(sham)에

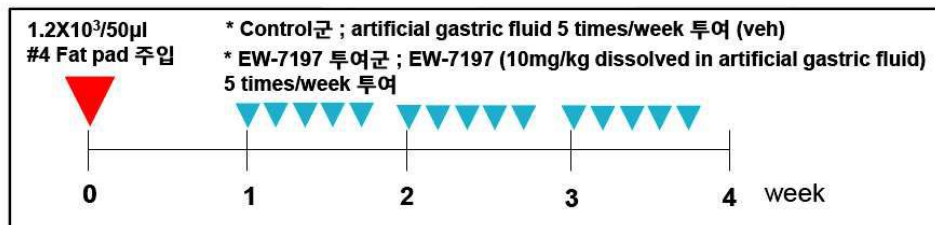
비해 크게 증가된 것으로 나타났으나, EW-7197 투여 1시간 후 감소되는 것으로 나타났으며, EW-7197 투여 8시간 후에는 감소되었던 혈중 백혈구 smad 2/3 인산화가 다시 회복되는 것으로 나타났다(도 6 및 도 7).

[0069]

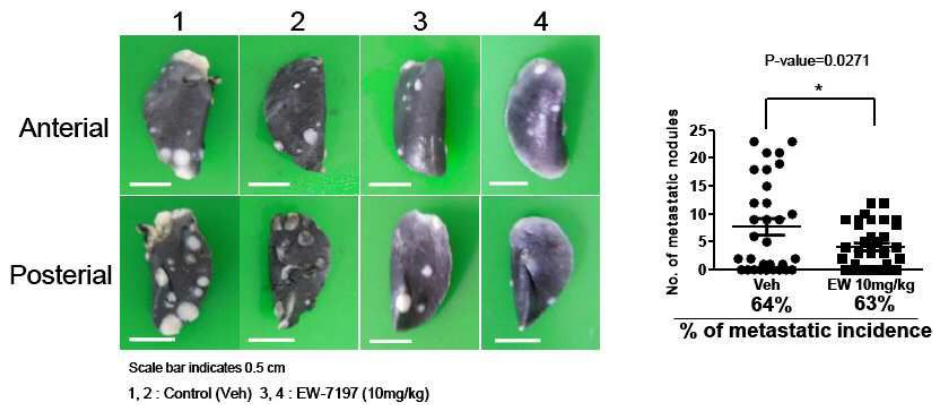
따라서 EW-7197을 비롯한 TGF- β 신호 억제제의 약리학 및 약물동력학의 신호의 혈중 지표가 될 수 있을 것으로 생각하였다.

도면

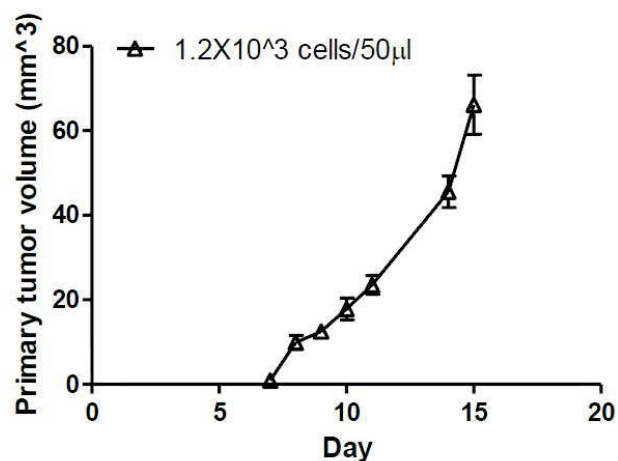
도면1



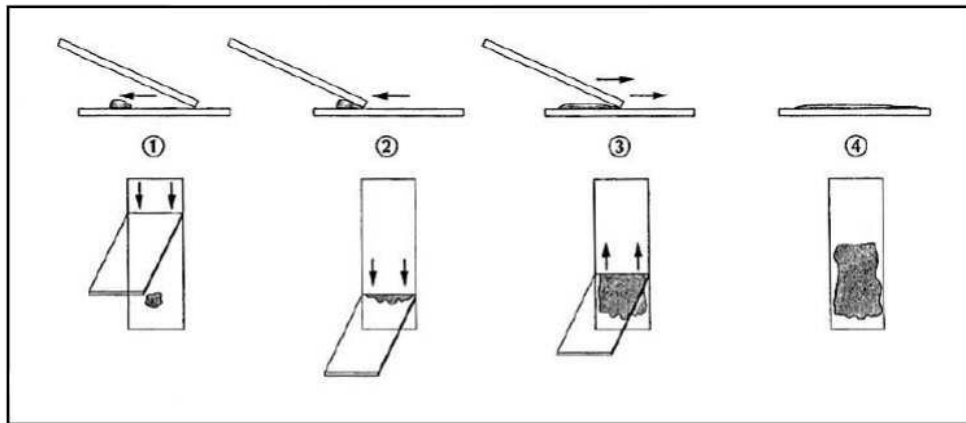
도면2



도면3

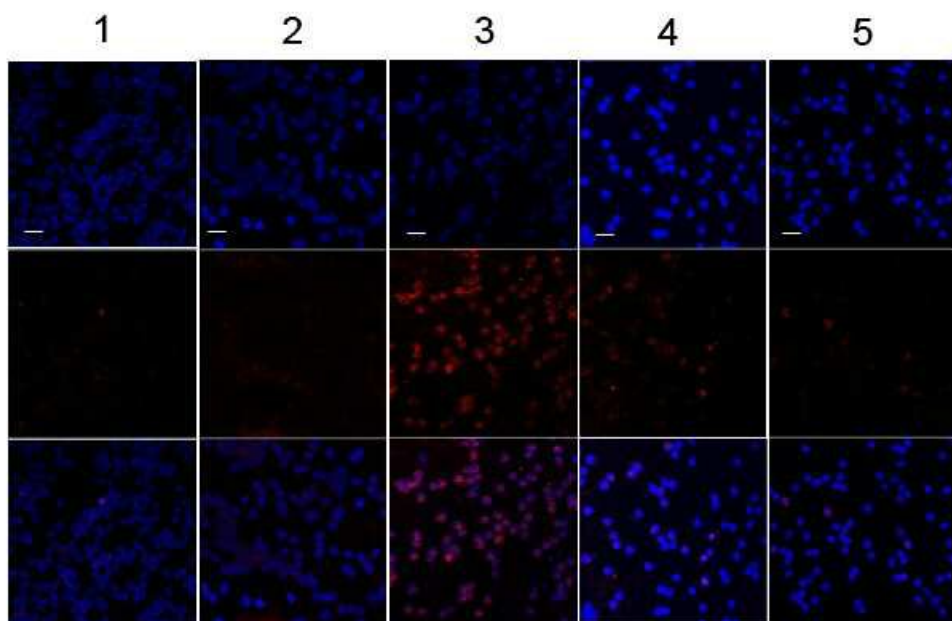


도면4



도면5

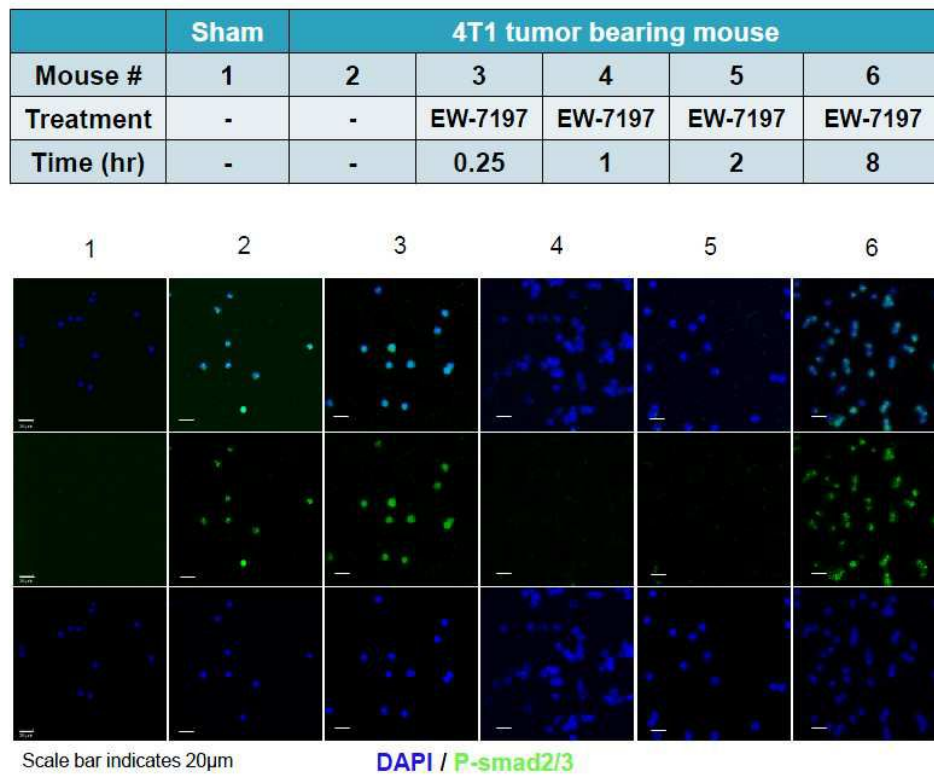
	Sham	4T1 tumor bearing mouse			
Mouse #	1	2	3	4	5
Treatment		Veh	Veh	EW-7197	EW-7197
Metastasis to lung		X	O	X	O



Scale bar indicates 20μm

DAPI / P-smad2/3

도면6



도면7

