



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월02일

(11) 등록번호 10-2271671

(24) 등록일자 2021년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/09 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0101855

(22) 출원일자 2020년08월13일

심사청구일자 2020년08월13일

(56) 선행기술조사문헌

Korean J Physiol Pharmacol, vol.22(1),
pp.43~51(2018)*

PLOS ONE, vol.8(1), e54193(2012)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

사회복지법인 삼성생명공익재단

서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)

인제대학교 산학협력단

경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동,
인제대학교)

(72) 발명자

윤현욱

전라북도 진주시 덕진구 호성로 136, 206동 1101
호(호성동1가, 진흥더블파크2단지아파트)

김현수

서울특별시 강남구 일원로 81 삼성서울병원 암병
원2층 병리과(일원동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

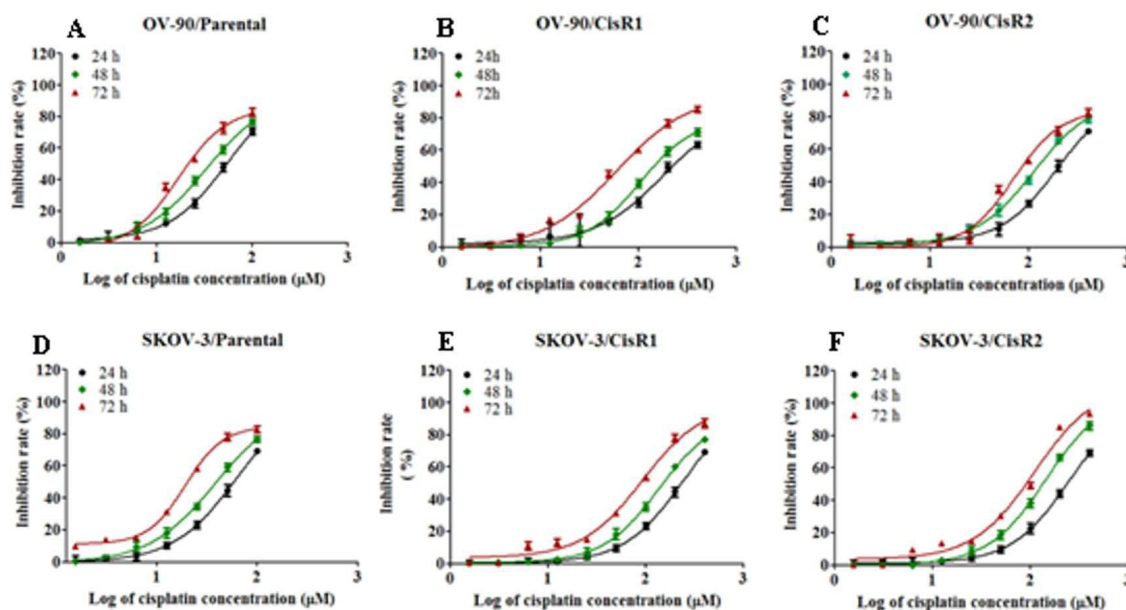
전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 특이 단백질의 발현이 증가된 시스플라틴 내성을 가지는 난소암 세포주 및 이의 임상적 활용

(57) 요약

본 발명은 특이 단백질의 발현이 증가된 시스플라틴 내성을 가지는 난소암 세포주 및 이의 임상적 활용에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 항암제 내성을 갖는 난소암 세포주를 제공하여 항암제의 약제내성 기전을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 항암제에 대한 내성을 갖는 암을 치료할 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해서도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류
C12N 2503/02 (2013.01)

엠디엔타즈바하

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 약학대
학 527호(가좌동)

(72) 발명자

김지예

경기도 고양시 일산서구 주화로 170 인제대학교 일
산백병원(대화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106165
과제번호	2019R1F1A1059148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	Cisplatin 내성 마커 발굴 및 인공지능 기반 제어 시스템 모델링
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345301767
과제번호	2016R1D1A1B03935584
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	BTG1 발현의 분자생물학적 조절 기전 연구를 통한 난소암의 항암제 내성 극복 기술

개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	삼성서울병원
연구기간	2019.07.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

- 1) 난소암 모세포주 OV-90 또는 SKOV-3에 80~120 μ M의 시스플라틴(cisplatin)을 30분~4시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 15~25회 반복 수행하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 시스플라틴을 4~6시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 시스플라틴을 6~10시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;
- 4) 상기 단계 3)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 시스플라틴을 14~18시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;
- 5) 상기 단계 4)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 시스플라틴을 20~28시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주의 제조 방법으로서,

상기 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주는 난소암 모세포주에 비해 3~5배의 시스플라틴 내성을 가지며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-Cadherin 및 비멘틴(Vimentin) 단백질 발현이 난소암 모세포주에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주의 제조 방법.

청구항 5

- 1) 난소암 모세포주 OV-90 또는 SKOV-3에 5~15 μ M의 시스플라틴(cisplatin)을 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)에서 최종 선별한 세포에 15~25 μ M의 시스플라틴을 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)에서 최종 선별한 세포에 35~45 μ M의 시스플라틴을 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;
- 4) 상기 단계 3)에서 최종 선별한 세포에 70~90 μ M의 시스플라틴을 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계; 및
- 5) 상기 단계 4)에서 최종 선별한 세포에 90~110 μ M의 시스플라틴을 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주의 제조 방법으로서,

상기 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주는 난소암 모세포주에 비해 3~5배의 시스플라틴 내성을 가지며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1),

N/R-Cadherin 및 비멘틴(Vimentin) 단백질 발현이 난소암 모세포주에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주의 제조 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제4항 또는 제5항의 제조 방법으로 제조된 시스플라틴(cisplatin)에 내성을 가지는 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주로서,

상기 시스플라틴에 내성을 가지는 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주는 난소암 모세포주에 비해 3~5배의 시스플라틴 내성을 가지며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-Cadherin 및 비멘틴(Vimentin) 단백질 발현이 난소암 모세포주에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 시스플라틴에 내성을 가지는 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포주는 기탁번호가 KCTC18834P인 것을 특징으로 하는 시스플라틴(cisplatin)에 내성을 가지는 난소암 SKOV-3 세포주.

청구항 9

- 1) 제7항의 시스플라틴(cisplatin)에 내성을 가지는 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 후보 물질이 처리된 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주의 세포 생존율을 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)에서 측정한 세포 생존율 수준을 상기 후보 물질을 처리하지 않은 시스플라틴 내성 난소암 OV-90 또는 SKOV-3 세포주의 세포 생존율 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 시스플라틴 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 특이 단백질의 발현이 증가된 시스플라틴 내성을 가지는 난소암 세포주 및 이의 임상적 활용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소암은 한국의 여성 생식기암 가운데 자궁 경부암 다음으로 발생빈도가 높은 암으로서 부인암 중에서 가장 높은 사망률을 나타내는 암으로 잘 알려져 있다.

[0003] 난소암의 항암제 치료에 있어서 20~30%는 1차 항암제 치료에 저항성을 보이는데 이는 항암제에 대한 내성의 출현 때문이다. 따라서 항암제에 대한 치료 성공 여부는 항암제에 대한 내성에 따라 좌우된다고 하여도 과언이 아니다. 현재 1차 항암제 치료 후 재발된 난소암에 대하여 다양한 2차 항암제가 사용되고 있으나 표준화된 치료법이 아직 없고 치료 성과도 크게 만족스럽지 못한 상황이다. 또한 2차 항암제 치료에 대한 내성 기전에 대해서도 알려진 것이 매우 적다. 그러므로 1, 2차 항암제를 포함한 여러 약물에 대한 내성 즉, 다약물 내성(multi-drug resistance; MDR)은 난소암 환자에 대한 항암 치료에서 계속되는 걸림돌이라 할 수 있겠다.

[0004] 따라서 현재 다약물 내성을 억제시키고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항암제 내성 세포주를 이용하여 항암제 내성 연구와 신약 개발이 절실히 필요한 상황이다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1532999호에는 '수니티닙 내성을 가진 신장암 세포주'에 대해 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2011-0088771호에는 '세록시맙과 제피티닙에 대한 교차내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주 및 이를 이용한 항암제의 스크리닝 방법'에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 '특이 단백질의 발현이 증가된 시스플라틴 내성을 가지는 난소암 세포주 및 이의 임상적 활용'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 시스플라틴 비내성 모세포주인 OV-90 및 SKOV-3에 시스플라틴을 처리한 후 생존하는 세포들을 선별하는 과정을 반복 수행하여 최종적으로 시스플라틴 내성을 가지는 OV-90 난소암 세포주 2종과 SKOV-3 난소암 세포주 2종을 확립하였으며, 상기 확립된 시스플라틴 내성 난소암 세포주들은 모세포주에 비해 시스플라틴에 대한 내성이 3~5배 증가되었으며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-카드헤린(N/R-Cadherin) 및 비멘틴(Vimentin) 단백질의 발현이 현저하게 증가된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 (a) 난소암 모세포주에 플래티늄(platinum) 계열 항암제의 처리농도를 점진적으로 증가시키거나, 또는 항암제의 처리시간을 점진적으로 증가시키며 처리하는 단계; 및

[0008] (b) 상기 처리 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 포함하는, 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법으로 제조된 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 1) 상기 플래티늄(platinum) 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 후보 물질이 처리된 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율을 측정하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)에서 측정한 세포 생존율 수준을 상기 후보 물질을 처리하지 않은 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 플래티늄(platinum) 계열 항암제 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 난소암 모세포주에 비해 3~5배의 시스플라틴 항암제 내성을 가지며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-Cadherin 및 비멘틴(Vimentin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현이 난소암 모세포주에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 1) 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 후보 물질이 처리된 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율을 측정하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)에서 측정한 세포 생존율 수준을 상기 후보 물질을 처리하지 않은 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 시스플라틴 항암제 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 항암제 내성을 갖는 난소암 세포주를 제공하여 항암제의 약제내성 기전을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 항암제에 대한 내성을 갖는 암을 치료할 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해서도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 시스플라틴 내성 난소암 세포주 4종(OV-90/CisR1, OV-90/CisR2, SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2)과 시스플라틴 비내성 모세포주 2종(OV-90/parental 및 SKOV-3/parental)의 IC₅₀ 값을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 시스플라틴 내성 난소암 세포주(CisR1 및 CisR2)와 시스플라틴 비내성 모세포주(Parental, OV-90)에서

XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1) 및 PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1) 단백질의 발현 양상을 확인한 웨스턴 블롯(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. Beta actin: 로딩 컨트롤.

도 3은 시스플라틴 내성 난소암 세포주(CisR1 및 CisR2)와 시스플라틴 비내성 모세포주(Parental, OV-90)에서 Twist, N/R-카드헤린(N/R-Cadherin) 및 비멘틴(Vimentin) 단백질의 발현 양상을 확인한 웨스턴 블롯(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. Beta actin: 로딩 컨트롤.

도 4는 시스플라틴 내성 난소암 세포주(CisR1 및 CisR2)와 시스플라틴 비내성 모세포주(Parental, SKOV-3)에서 XRCC1 및 PARP1 단백질의 발현 양상을 확인한 웨스턴 블롯(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. Beta actin: 로딩 컨트롤.

도 5는 시스플라틴 내성 난소암 세포주(CisR1 및 CisR2)와 시스플라틴 비내성 모세포주(Parental, SKOV-3)에서 Twist, N/R-카드헤린 및 비멘틴 단백질의 발현 양상을 확인한 웨스턴 블롯(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. Beta actin: 로딩 컨트롤.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0016] (a) 난소암 모세포주에 플래티늄(platinum) 계열 항암제의 처리농도를 점진적으로 증가시키거나, 또는 항암제의 처리시간을 점진적으로 증가시키며 처리하는 단계; 및
- [0017] (b) 상기 처리 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 포함하는, 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주의 제조 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주의 제조 방법에서, 상기 (a)단계의 난소암 모세포주에 플래티늄(platinum) 계열 항암제의 처리시간을 점진적으로 증가시키는 단계는
- [0019] 1) 난소암 모세포주에 80~120 μ M의 항암제를 30분~4시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 15~25회 반복 수행하는 단계;
- [0020] 2) 상기 단계 1)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 항암제를 4~6시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;
- [0021] 3) 상기 단계 2)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 항암제를 6~10시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;
- [0022] 4) 상기 단계 3)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 항암제를 14~18시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계; 및
- [0023] 5) 상기 단계 4)에서 최종 선별한 세포에 80~120 μ M의 항암제를 20~28시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 4~6회 반복 수행하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주의 제조 방법에서, 상기 (a)단계의 난소암 모세포주에 플래티늄(platinum) 계열 항암제의 처리농도를 점진적으로 증가시키는 단계는
- [0025] 1) 난소암 모세포주에 5~15 μ M의 항암제를 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;
- [0026] 2) 상기 단계 1)에서 최종 선별한 세포에 15~25 μ M의 항암제를 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;
- [0027] 3) 상기 단계 2)에서 최종 선별한 세포에 35~45 μ M의 항암제를 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;
- [0028] 4) 상기 단계 3)에서 최종 선별한 세포에 70~90 μ M의 항암제를 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계; 및
- [0029] 5) 상기 단계 4)에서 최종 선별한 세포에 90~110 μ M의 항암제를 46~50시간 동안 처리한 후 생존한 세포를 선별하는 단계를 5~15회 반복 수행하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 또한, 상기 플래티늄(platinum) 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플

라틴(oxaliplatin) 중에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 시스플라틴일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0031] 또한, 상기 난소암 세포주는 OV-90(ATCC CRS-11732TM) 또는 SKOV-3(ATCC HTB-77TM)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주의 제조 방법에서, 상기 (b)단계는 난소암 모세포주에 비해 3~5배의 플래티늄 계열 항암제 내성을 가지며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-Cadherin 및 비멘틴(Vimentin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현이 난소암 모세포주에 비해 증가된 플래티늄 계열 항암제 내성 난소암 세포주를 선별하는 단계일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명은 또한, 상기 제조 방법으로 제조된 플래티늄(platinum) 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주를 제공한다. 상기 세포주는 기탁번호가 KCTC18834P인 것을 특징으로 한다.
- [0034] 본 발명의 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주에서, 상기 플래티늄 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주는 플래티늄 계열 항암제 비내성 모세포주에 비해 시스플라틴에 대한 내성이 3~5배 증가되었으며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-카드헤린(N/R-Cadherin) 및 비멘틴(Vimentin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현이 플래티늄 계열 항암제 비내성 모세포주에 비해 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 상기 단백질의 발현 변화는 당분야에 알려진 통상의 방법을 이용하여 확인할 수 있으며, 예컨대 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 마이크로어레이(microarray) 등과 같은 방법을 이용하여 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명은 또한, 1) 상기 플래티늄(platinum) 계열 항암제에 내성을 가지는 난소암 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계;
- [0037] 2) 상기 단계 1)의 후보 물질이 처리된 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율을 측정하는 단계; 및
- [0038] 3) 상기 단계 2)에서 측정한 세포 생존율 수준을 상기 후보 물질을 처리하지 않은 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 플래티늄(platinum) 계열 항암제 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 사용된 용어 "후보 물질"은 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 항암제 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법에서, 상기 세포주는 기탁번호가 KCTC18834P인 것을 특징으로 한다.
- [0041] 또한, 상기 단계 2)에서 확인한 후보 물질이 처리된 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율이 상기 후보 물질을 처리하지 않은 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 항암제 내성 난소암 치료용 물질로 판단할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 또한 난소암 모세포주에 비해 3~5배의 시스플라틴 항암제 내성을 가지며, Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-Cadherin 및 비멘틴(Vimentin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현이 난소암 모세포주에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주를 제공한다. 상기 세포주는 기탁번호가 KCTC18834P인 것을 특징으로 한다.
- [0043] 본 발명은 또한, 1) 상기 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주에 후보 물질을 처리하는 단계;
- [0044] 2) 상기 단계 1)의 후보 물질이 처리된 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율을 측정하는 단계; 및
- [0045] 3) 상기 단계 2)에서 측정한 세포 생존율 수준을 상기 후보 물질을 처리하지 않은 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 시스플라틴 항암제 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 시스플라틴 항암제 내성 난소암 치료제의 스크리닝 방법에서, 상기 세포주는 기탁번호가 KCTC18834P

인 것을 특징으로 한다.

[0047] 또한, 상기 단계 2)에서 확인한 후보 물질이 처리된 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율이 상기 후보 물질을 처리하지 않은 시스플라틴 항암제 내성 난소암 세포주의 세포 생존율 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 시스플라틴 항암제 내성 난소암 치료용 물질로 판단할 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 재료 및 방법

[0050] 1. 시스플라틴 내성 세포주 구축

[0051] (1) OV-90/CisR1 및 SKOV-3/CisR1 구축법

[0052] SKOV-3 및 OV-90 난소암 세포주(1×10^4 cells/well)에 100 μ M의 시스플라틴(cisplatin)을 2시간 동안 노출시킨 후, 살아있는 세포만 모아 배양한 다음 다시 100 μ M의 시스플라틴을 2시간 동안 노출시키기를 20회 반복하였다. 이후에, 100 μ M의 시스플라틴을 4시간 동안 노출시킨 후 살아있는 세포를 모아 배양시킨 후, 다시 100 μ M의 시스플라틴을 4시간 동안 노출시키기를 5회 반복하였다. 그런 다음, 100 μ M의 시스플라틴을 8시간 동안 노출시키기를 5회, 100 μ M의 시스플라틴을 16시간 동안 노출시키기를 5회, 100 μ M의 시스플라틴을 24시간 동안 노출시키기를 5회 걸쳐 내성 세포주를 구축하여 난소암 세포주 SKOV-3/CisR1 및 난소암 세포주 OV-90/CisR1이라 명명하였다.

[0053] (2) OV-90/CisR2 및 SKOV-3/CisR2 구축법

[0054] SKOV-3 및 OV-90 난소암 세포주(1×10^4 cells/well)에 10 μ M의 시스플라틴을 넣어 세포 배양기에 넣어두었다가 살아있는 세포만을 선별하여 다시 10 μ M의 시스플라틴을 처리하는 방식으로 10회 반복하였다. 이후에, 살아남은 세포주에 20 μ M의 시스플라틴을 10회 처리하고, 40 μ M의 시스플라틴을 10회, 80M의 시스플라틴을 10회, 100 μ M의 시스플라틴을 10회 처리하여 살아남은 세포주를 획득하여 내성 세포주를 구축하여 난소암 세포주 SKOV-3/CisR2 및 난소암 세포주 OV-90/CisR2이라 명명하였으며, 난소암 세포주 SKOV-3/CisR2를 한국생명공학연구원(KCTC)에 기탁번호가 KCTC18834P로 2020년 07월 23일에 기탁하였다.

[0055] 2. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)

[0056] 단백질을 추출을 위해 protease inhibitor cocktail(#P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), phosphatase inhibitor cocktail 2(#P5726, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 및 phosphatase inhibitor cocktail 3(#P0044, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)을 포함한 Pro-Prep protein extraction solution(#17081, iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 세포들을 추출하였고 11,000 $\times$ g으로 15분간 원심분리한 후, SMART BCA(bicinchoninic acid) 분석 키트(#21071, iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 정량하였다. 8~15% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 겔을 이용하여 단백질을 분리하였고 iBlot 2 dry blotting system(Invitrogen; Life Technology; Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 0.2 μ M의 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(#IB24001, Invitrogen; Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA)에 단백질을 이동시켰다. iBind solution kits(#INV-SLF1020, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 1차와 2차 항체를 iBind Western Device(Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)에서 배양시켰다. 1차 항체들은 마우스 단일클론 항-XRCC1(#MA5-12071, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), 마우스 단일클론 항-PARP-1(#SC-8007, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 마우스 단일클론 항-N/R-cadherin(#SC-81417, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 마우스 단일클론 항-twist(#SC-8426, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 마우스 단일클론 항-vimentin(#SC-8426, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 마우스 단일클론 항- β -actin(#A5441, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)이다. 2차 항체는 Goat-anti-mouse HRP conjugate(Cat #115035003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA)이다. 발현된 단백질은 EZ-Western Lumi Plus solution in EZ-Capture ST(#WSE-7120L, ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 이용하여 시각화하였으며, 단백질량은 Image J 소프트웨어로 측정하였다.

[0057] 3. IC₅₀ 측정

[0058] 시스플라틴(cis-Dichlorodiammine platinum (II), # P4394, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)의 IC₅₀ 값(시스플라틴에 내성을 가지는 난소암 세포주의 증식을 50% 억제하는 시료의 농도)을 결정하기 위해, EZ-cytox 세포생존 분석 키트(#DLS-1906, DoGenBioCo.Ltd.)를 이용하여 세포 증식률을 측정하였다. 구체적으로, 세포(1×10⁴ cell/well)를 96-웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양한 후 세포에 각각 다른 농도의 시스플라틴(SKOV-3/parental 및 OV-90/parental의 경우 0~100 μM, OV-90/CisR 및 SKOV-3/CisR의 경우 0~400 μM)을 처리하고 추가로 72시간 동안 배양하였다. 그 후, EZ-cytox 세포생존 분석 키트에서 제시한 절차 방법에 따라 EZ-cytox 세포생존 분석 키트를 사용하여 세포 증식률을 측정하였으며, IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 소프트웨어(버전 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA)를 사용하여 분석하였다.

[0059] **실시예 1. 시스플라틴 내성 난소암 세포주 구축 확인**

[0060] 상기 구축 방법으로 제조된 시스플라틴 내성 난소암 세포주 4종(OV-90/CisR1, OV-90/CisR2, SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2)과 시스플라틴 비내성 난소암 세포주 2종(OV-90/parental 및 SKOV-3/parental)의 IC₅₀ 값을 측정하였다. 그 결과, 하기 표 1 및 도 1에 개시한 바와 같이 OV-90/parental 세포주에서는 시스플라틴 24시간 노출시 IC₅₀ 값이 57.55 μM인 반면, OV-90/CisR1 및 OV-90/CisR2 세포주에서는 IC₅₀ 값이 각각 180.2 μM 및 198.6 μM이었으며, SKOV-3/parental 세포주에서는 시스플라틴 24시간 노출시 IC₅₀ 값이 63.7 μM인 반면, SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2 세포주에서는 IC₅₀ 값이 각각 243.2 μM 및 248.6 μM인 것을 확인하였다.

[0061] 시스플라틴 내성 난소암 세포주인 OV-90/CisR1 및 OV-90/CisR2 세포주는 각각 시스플라틴 비내성 난소암 세포주인 OV-90/parental 세포주와 비교하였을 때 24시간 동안 시스플라틴 처리시 OV-90/parental 세포주와 같은 IC₅₀ 값을 나타내기 위해, 시스플라틴 처리 용량을 각각 313% 및 345% 증량해야 하며, SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2 세포주는 각각 SKOV-3/parental 세포주와 비교하였을 때 24시간 동안 시스플라틴 처리시 SKOV-3/parental 세포주와 같은 IC₅₀ 값을 나타내기 위해, 시스플라틴 처리 용량을 각각 381% 및 477% 증량해야 한다는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 제조 방법으로 제조된 OV-90/CisR1, OV-90/CisR2, SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2 세포주가 시스플라틴에 대해 내성을 가진다는 것을 증명하였다.

표 1

[0062] 시스플라틴 처리시 시스플라틴 내성 난소암 세포주의 IC₅₀(μM) 측정 결과

세포주	시스플라틴 처리시간에 따른 IC ₅₀ (μM) 값		
	24h	48h	72h
OV-90/Parental	57.55±2.67	32.60±4.83	16.75±0.83
OV-90/CisR1	180.20±11.88	103.20±4.51	59.08±2.89
OV-90/CisR2	198.60±11.53	111.90±9.61	70.14±5.99
SKOV-3/Parental	63.70±3.17	38.1±6.27	19.18±0.91
SKOV-3/CisR1	243.2±18.75	136.2±10.52	91.59±8.47
SKOV-3/CisR2	248.6±23.41	143.3±18.24	109.6±4.47

[0063] **실시예 2. 시스플라틴 내성 난소암 세포주에서 특이 단백질의 발현 증가**

[0064] 시스플라틴 비내성 난소암 세포주(OV-90/parental 및 SKOV-3/parental)와 시스플라틴 내성 난소암 세포주(OV-90/CisR1, OV-90/CisR2, SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2)의 Twist, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase 1), XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1), N/R-카드헤린(N/R-Cadherin) 및 비멘틴(Vimentin) 단백질의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 시스플라틴 내성 난소암 세포주인 OV-90/CisR1 및 OV-90/CisR2의 경우에 시스플라틴 비내성 난소암 세포주인 OV-90/Parental에 비해 XRCC1 단백질 발현이 각각 5.4배 및 6.7배 증가하였고 PARP1 단백질 발현이 각각 15.8배 및 16.3배 증가하였으며(도 2), Twist 단백질 발현이 각각 2.3배 및 2.7배 증가하였고 N/R-카드헤린 단백질 발현이 각각 2.7배 및 2.9배 증가하였으며 비멘틴 발현이 각각 1.9배 및 2.1배 증가하였다(도 3).

[0065] 또한, 시스플라틴 내성 난소암 세포주인 SKOV-3/CisR1 및 SKOV-3/CisR2의 경우에 시스플라틴 비내성 난소암 세포주인 SKOV-3/Parental에 비해 XRCC1 단백질 발현이 각각 11배 및 11.5배 증가하였고 PARP1 단백질 발현이 각

각 4.22배 및 4.23배 증가하였으며(도 4), Twist 단백질 발현이 각각 1.7배 및 2.2배 증가하였고 N/R-카드헤린 단백질 발현이 각각 6.1배 및 6.3배 증가하였으며 비멘틴 발현이 각각 2.2배 및 3.5배 증가하였다(도 5).

수탁번호

[0066]

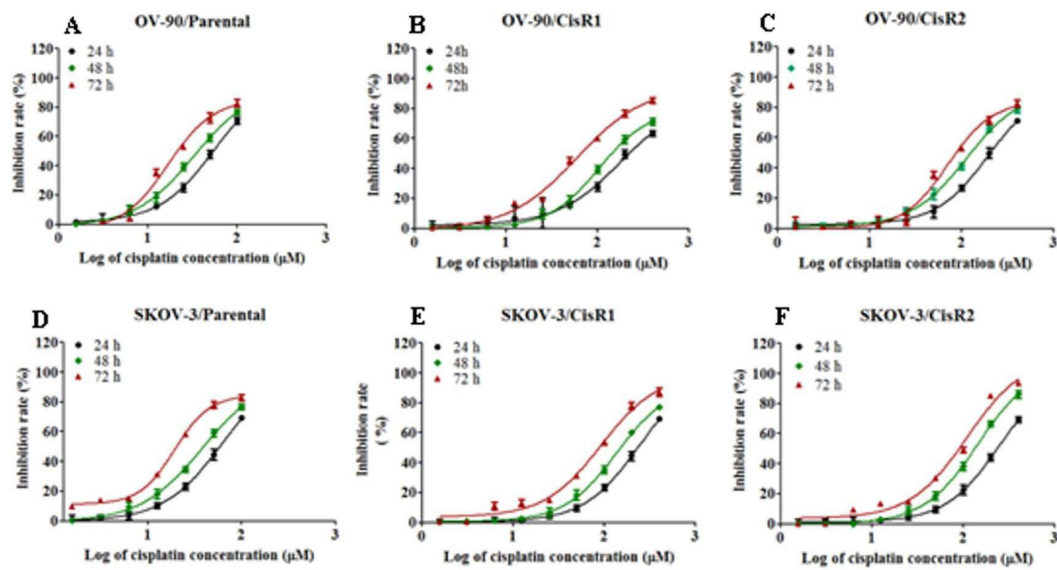
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18834P

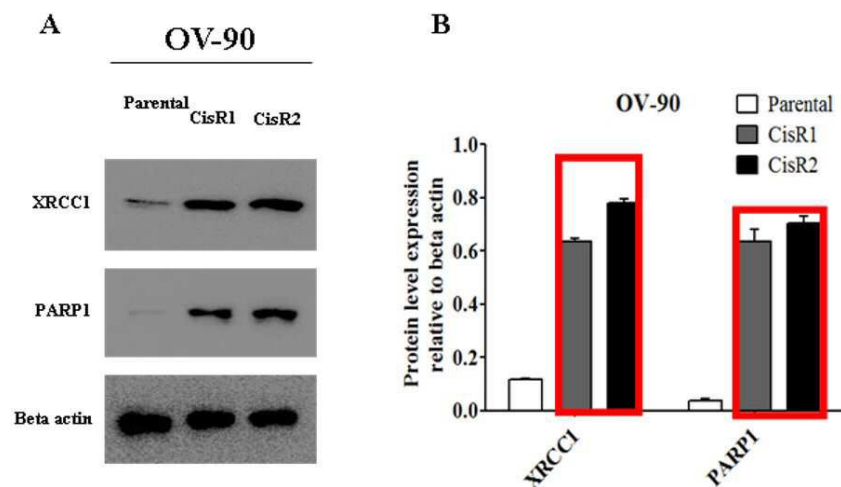
수탁일자 : 20200723

도면

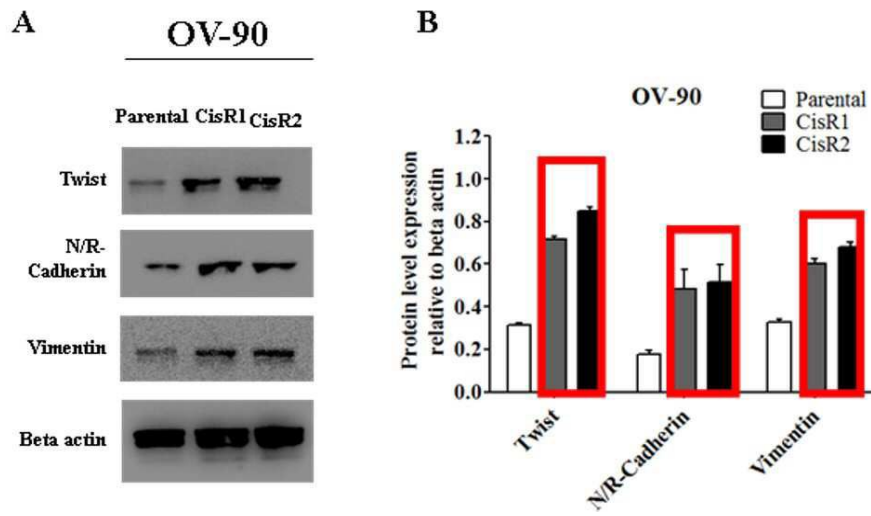
도면1



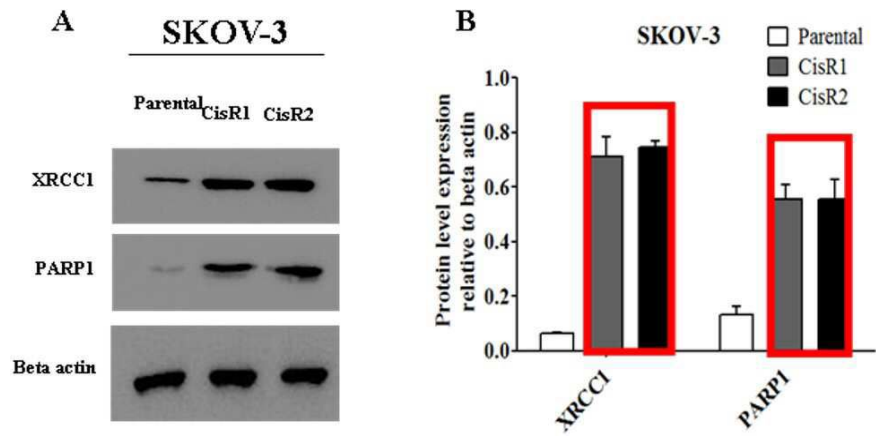
도면2



도면3



도면4



도면5

