



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0081306
(43) 공개일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57484 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0175244
(22) 출원일자 2019년12월26일
심사청구일자 2019년12월26일
(30) 우선권주장
1020180169790 2018년12월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
차혁진
서울특별시 강남구 선릉로126길 22 104동 901호
권옥선
서울특별시 서대문구 통일로25길 30 101동 402호
(홍제동, 한양아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

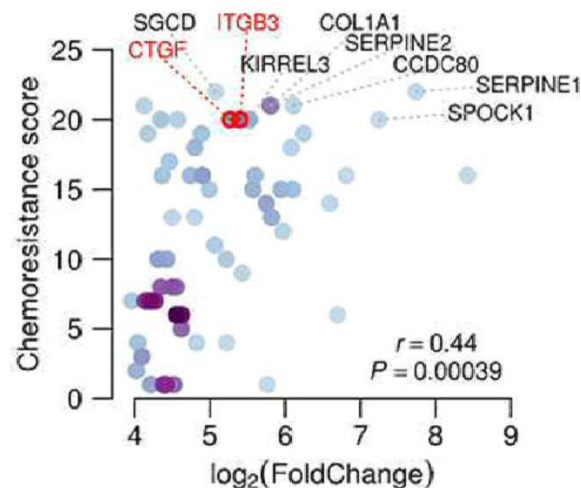
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 ITGB3 단백질을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 ITGB3 단백질을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 항암제 내성이 있는 중간엽 폐암 세포주에 ITGB3 발현을 억제한 세포주를 제조한 후 독소루비신을 처리한 경우 ITGB3가 발현되는 세포주에 비해 세포사멸이 더 많이 일어남을 확인한 바, ITGB3 단백질은 항암제 내성 진단용도로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 아토바스타틴은 ITGB3 발현을 억제한 항암제 내성을 가진 세포주에 독소루비신과 함께 처리한 경우 caspase 3의 잘려진 형태가 증가하고, NFkB 활성이 억제하는 바, 항암제 내성 억제용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/70557 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

이해승

서울특별시 동대문구 이문로12길 3-11 래미안2차
109동 2003호

(72) 발명자

김완규

서울특별시 송파구 올림픽로 99 109동 1801호 (잠
실동, 잠실엘스아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3C9A5028690
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)(2017)-포스트게놈다부처유전체사업-기반산업화 인프라
연구과제명 시스템 생명정보 분석 기반 약물 작용점 발굴
기 여 율 50/100
주관기관 한국연구재단
연구기간 2017.05.01 ~ 2022.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 370C-20180036
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 교내지원사업
연구과제명 Bortezomib에 의한 폐암 전이 억제 in vivo 유효성 평가
기 여 율 45/100
주관기관 서울대학교
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3C9A5028691
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 폐암세포 모델의 NGS 기반 전사체 분석을 통한 신규 약물 작용점 발굴
기 여 율 5/100
주관기관 서울대학교
연구기간 2018.02.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

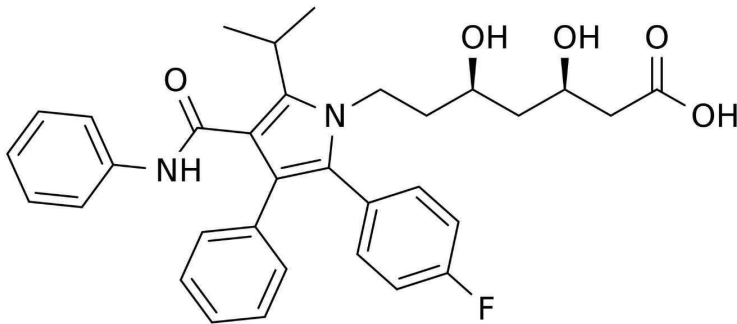
청구항 1

아토바스타틴(Atorvastatin)을 유효성분으로 함유하는 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아토바스타틴(Atorvastatin)은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 아토바스타틴(Atorvastatin)은 ITGB3 단백질을 억제하는 것을 특징으로 하는, 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는, 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에를로티닙(erlotinib), 셀라스트롤(celastrol), 시스플라틴(cisplatin), 도세탁셀(docetaxel), 타그리소(tagrisso), 택솔(taxol), 페메트렉시드(Pemetrexed) 및 타목시펜

(tamoxifen)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 항암제에 대한 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴(Atorvastatin)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 항암 보조제.

청구항 8

ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴(Atorvastatin)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 암질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 9

ITGB3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 올리고핵타이드 또는 PNA(Peptide nucleic acid), 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 폐암의 항암제 내성 진단용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에를로티닙(erlotinib), 셀라스트롤(celastrol), 시스플라틴(cisplatin), 도세탁셀(docetaxel), 타그리소(tagrisso), 탁솔(taxol), 페메트렉시드(Pemetrexed) 및 타목시펜(tamoxifen)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 항암제에 대한 내성을 갖는 것을 특징으로 하는, 폐암의 항암제 내성 진단용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는, 폐암의 항암제 내성 진단용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 면역분석(immunoassay)용 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트인 것을 특징으로 하는, 폐암의 항암제 내성 진단용 키트.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 키트는 마이크로어레이 또는 유전자 증폭 키트인 것을 특징으로 하는, 폐암의 항암제 내성 진단용 키트.

청구항 14

폐암의 항암제 내성 진단에 대한 정보를 제공하기 위하여,

상기 진단이 필요한 대상체의 시료를 제공하는 단계;

상기 시료에서 ITGB3 바이오마커를 검출하는 단계; 및

상기 검출결과, 상기 대상체의 시료에서 내성을 나타내지 않는 대조군과 비교하여 상기 ITGB3 바이오마커의

발현이 증가한 경우, 상기 대상체의 시료를 항암제에 대한 내성시료로 판단하는, 폐암의 항암제 내성을 진단하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ITGB3 단백질을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근의 진단 및 암 치료법의 발전에도 불구하고, 최신 분자 타겟팅 약물 또는 면역 요법으로는 제한된 수의 환자만을 치료할 수 있기 때문에 기존의 화학 요법은 대부분의 폐암 환자에게 중요한 첫 번째 치료법으로 아직도 남아있다. 하지만, 항암 화학 요법을 지속적으로 사용하는 경우 항암제 내성 암세포가 발생할 수 있다는 점에서 항암제 내성의 분자적 기전을 이해하고, 이를 바탕으로 분자적 타겟을 설정하기 위한 시도가 지속적으로 이뤄지고 있다.

[0004] 최근 마우스 모델에서의 연구에 의하면 전이의 주요 원인인 상피-중간엽 변이(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)가 항암제 내성과 밀접하게 관련되어 있고, 시험관내 세포 모델에서의 연구에서도 상피-중간엽 변이가 항암제 내성과 강한 상관 관계가 있음이 보고되었다. 그러나, 지금까지 알려진 항암제 내성과 밀접하게 관련된 상피-중간엽 변이와 연관된 분자적 타겟(예를 들어 ZEB1/2, SNAI2, SOX4 등)들은 전사인자(Transcription factor)이기 때문에, 이에 대한 특이적인 저해제를 만들기 어려워 약으로 개발할 수 없는 것으로 알려져 있다.

[0005] 한편, 스타틴은 전 세계적으로 가장 많이 처방되는 약물 중 하나로 관상동맥 내의 염증을 낮추고(Hs-CRP), 혈전을 안정화(plaque stability)시킴으로써 관상동맥 내 죽상경화(atherosclerosis)를 억제하는 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 혈관의 수축작용을 억제함으로써 고혈압을 비롯한 심혈관질환에도 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 스타틴 계열 약물들 중 아토바스타틴(atorvastatin)은 혈관내피세포의 염증반응을 억제하여 노화성 난청 마우스모델의 청력기관 내이의 기능을 유지시켜 난청을 지연 또는 억제하는 것으로 알려져 있으며, 저용량의 아토바스타틴 (5 mg/kg)이 소음성 난청 랫드모델에서 통계적으로 유의하게 난청억제 효과가 있음이 보고된 바 있다(The International Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2016). 유방암 세포 이중이식모델에서아토바스타틴은 종양 스트레스단백질 마커인 JNK 활성을 증가시키며, ERK와 AKT 단백질 활성을 저하시켜 종양의 성장과 전이를 억제하는 것으로 보고되었다. 또한 아토바스타틴은 비만 C57 마우스에서 췌장베타세포 소포체 스트레스를 완화시키고 세포성장을 촉진하여 비만을 통해 유도되는 제2형 당뇨병을 억제하는 것으로 보고되었다. 이밖에 심바스타틴 (simvastatin)은 약물이 분자생물 스트렙토조토신 (streptozotocin)으로 제1형 당뇨병 유도 마우스모델에서 췌장베타세포 염증반응을 억제하여 기능을 유지시킴으로써 당뇨병을 억제 또는 지연시키는 것으로 보고된 바 있다 (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2007).

[0006] 아토바스타틴의 용도와 관련된 선행 특허로는, 아토바스타틴을 유효성분으로 함유하는 당뇨병개성 난청의 예방 또는 치료용 조성물에 관해 개시하고 있는 대한민국 등록특허 제10-1831947호가 있으며, 아토바스타틴을 유효성분으로 포함하는 항체의 종양 침투력 증진용 조성물에 대해 개시하고 있는 대한민국 공개특허 제 10-2016-0038524호가 있으나, 아토바스타틴의 항암제 내성 억제 용도에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 항암제 내성이 있는 중간엽 폐암 세포주에서 특이적으로 발현이 높은 ITGB3를 선별하고, ITGB3가 중간엽 폐암 세포주에서 항암제 내성을 유발함을 실험적으로 검증하여 항암제 내성 여부를 판별할 수 있는 바이오마커를 개발하였다. 또한, ITGB3 유전자에 의해 유도된 항암제 내성을 저해하는 약물로 아토바스타틴을 선별하고, 항암제 내성이 극복되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 ITGB3 단백질을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ITGB3 단백질을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 ITGB3 단백질을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 항암제 내성이 있는 중간엽 폐암 세포주에 ITGB3 발현을 억제한 세포주를 제조한 후 독소루비신을 처리한 경우 ITGB3가 발현되는 세포주에 비해 세포사멸이 더 많이 일어남을 확인한 바, ITGB3 단백질은 항암제 내성 진단용도로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 아토바스타틴은 ITGB3 발현을 억제한 항암제 내성을 가진 세포주에 독소루비신과 함께 처리한 경우 caspase 3의 잘려진 형태가 증가하고, NFkB 활성이 억제하는 바, 항암제 내성 억제용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 다양한 암세포주(>20 조직)의 유전자 발현 패턴과 항암제 감수성 패턴을 비교하여 항암제 내성과 유전자 발현과 양의 상관관계가 높은 유전자 ITGB3를 선별한 것을 나타낸다.
- 도 2는 ITGB3 유전자의 발현을 감소시킨 항암제 내성을 가진 중간엽성 폐암 세포주를 제작하여 ITGB3에 의해서 항암제 내성이 유발되는지 여부를 확인한 결과이다.
- 도 3은 ITGB3 발현 억제 항암제 내성을 가진 세포주에 독소루비신(doxorubicin)을 처리했을 때 대조군에 비해서 세포사멸이 더 많이 일어남을 확인한 결과이다.
- 도 4는 ITGB3 발현 억제 항암제 내성을 가진 세포주에서 ITGB3 발현을 회복시킨 경우 ITGB3 발현 억제에 의해서 증가했던 세포사멸 정도가 다시 감소하는 것을 확인한 결과이다.
- 도 5는 항암제 내성을 갖고 있지 않은 세포주에 ITGB3를 과발현시키면 세포사멸 정도가 감소함을 확인한 결과이다.
- 도 6은 ITGB3 발현 억제가 변화되는 세포내 신호전달 경로를 확인한 결과이다.
- 도 7은 ITGB3 발현 억제 세포주에서는 NFkB 활성이 낮아져 있음을 p65 단백질의 핵내 위치를 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 8은 ITGB3 발현 억제 세포주는 NFkB 활성이 낮음을 발광효소분석(luciferase assay)으로 확인한 결과이다.
- 도 9는 ITGB3에 의한 항암제 내성을 저해하는 약물 후보로 아토바스타틴(atorvastatin)을 선별한 결과이다.
- 도 10은 아토바스타틴(atorvastatin)을 처리한 경우 독소루비신(doxorubicin)에 대한 항암제 내성이 극복됨을

caspase 3 의 잘려진 형태가 증가함을 통해 확인한 결과이다.

도 11은 아토바스타틴(atorvastatin)을 처리한 경우 독소루비신(doxorubicin)에 대한 항암제 내성이 극복됨을 세포의 생존능력을 통해 확인한 결과이다.

도 12는 아토바스타틴(atorvastatin)과 독소루비신(doxorubicin)을 함께 처리하면 아토바스타틴(atorvastatin)에 의해 NFkB 활성이 억제됨으로써 항암제 내성이 극복됨을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명의 일측면은 ITGB3(Integrin beta 3) 단백질을 유효성분으로 함유하는 암세포의 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 있어서 ITGB3(Integrin beta 3)는 CD61로도 불리며, 인테그린은 알파 사슬과 베타 사슬로 구성된 통합 세포 표면 단백질이다. 인테그린 베타 3는 혈소판에서 알파 IIb 사슬과 함께 발견된다. 인테그린은 세포-표면 매개 신호 전달뿐만 아니라 세포 접착에 참여하는 것으로 알려져 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서 ITGB3는 그 유전자 및 단백질 서열이 공지된 것으로 인간 서열은 NM_000212, NP_000203로 공지되어 있다.
- [0023] 상기 암세포는 폐암일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에를로티닙(erlotinib), 셀라스트롤(celastrol), 시스플라틴(cisplatin), 도세탁셀(docetaxel), 타그리스소(tagrisso), 탁솔(taxol), 페메트렉시드(Pemetrexed) 및 타목시펜(tamoxifen)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 항암제에 대한 내성을 갖는 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 일 측면은 ITGB3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 올리고펩타이드 또는 PNA(Peptide nucleic acid), 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암세포의 항암제 내성 진단용 키트를 제공한다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 표현, “폐암의 항암제 내성 진단용 키트”는 “폐암의 항암제 내성 진단용 조성물”이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “폐암의 항암제 내성 진단용 키트”는 “폐암의 항암제 내성 진단용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어, “진단”은 항암제에 대한 폐암의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 발병한 폐암이 항암제 내성을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 또는 항암제 내성 폐암의 예후(prognosis)(예컨대, 항암 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 상기 진단에 대한 정보를 제공하는 것을 포함한다.
- [0029] 본 발명자들은 본 발명의 마커를 사용하면, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 폐암의 항암제 내성 획득 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 용어, “진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)”란 항암제 내성 폐암 세포를 판별할 수 있는 물질로, 항암제에 대하여 내성을 획득한 폐암 세포에서 증가 양상을 보이는 유기 생체 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 폐암 내성 진단 마커는 ITGB3 단백질 및 이를 코딩하는 핵산분자(DNA 또는 mRNA)를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트, 즉 면역분석 방식(항원-항체 반응)으로 ITGB3 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인할 수 있는 키트이며, 예를 들어, 상기 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트이다.
- [0032] 본 발명의 키트는 ITGB3 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 측정하기 위한 ITGB3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

- [0033] 본 발명에서 항체란, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [0034] 상기한 바와 같이 새로운 폐암 내성 진단용 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.
- [0035] 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein(1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J Mol Biol, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 항체는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab')₂, F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0037] 본 발명의 키트는 통상적인 면역 분석 방법을 통하여 폐암의 항암제 내성을 진단하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0038] 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E T Maggio, ed, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W, Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol 1, Walker, JM ed, Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0039] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵)로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0040] 예를 들어, 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물 또는 세포 배양물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 이차항체로서의 마커에 대한 항체와 상기 세포 분해물 또는 세포 배양물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0041] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0042] ELISA 방법을 포함한 면역분석 방법에서, 최종적인 효소의 활성 측정 또는 ELISA 방법을 포함한 면역분석 방법에서, 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 본 발명의 마커의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오 틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검

출할 수 있다.

- [0043] 다른 한편으로, 본 발명의 키트는 마커 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏에 이용될 수 있다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동 하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 대장암의 내성 여부를 확인할 수 있다.
- [0044] 또 다른 한편으로, 본 발명의 키트는 상기 마커 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색에 이용될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 키트에는, 항체 대신에 본 발명의 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함할 수 있다. 앵타머는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al, Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine" J Mol Med 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library" Proc Natl Acad Sci USA 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0046] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 콤팩트먼트로 제작될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 마이크로어레이 또는 유전자 증폭 키트이다. 본 발명의 키트가 마이크로어레이인 경우에는, 마이크로어레이의 고상 표면에 프로브가 고정화 되어 있으며, 본 발명의 키트가 유전자 증폭 키트인 경우에는 프라이머를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 진단용 키트에 포함된 프로브 또는 프라이머는 ITGB3 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 사용된 용어, "상보적(complementary)"은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서, 용어 "상보적"은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0049] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만, 전형적으로 15-30 뉴클레오티드이다. 이러한 프라이머의 디자인은 ITGB3의 뉴클레오티드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브"는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하고, 타겟 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0051] 프라이머 또는 프로브 제작시 참조하여야 하는 본 발명 마커의 뉴클레오티드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있으며, 이 서열을 참조하여 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다.
- [0053] 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA 또는 mRNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0054] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민

(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중 금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트랩타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0055] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 생시료는, 예를 들어, 대장암 세포 또는 이의 배양액, 대장암 조직, 혈액, 혈청 및 혈장이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

[0056] 상기 "유전자 증폭 키트"를 언급하면서 사용한 용어, "증폭"은 핵산분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd ed Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H I(WO 89/06700) 및 Davey, C 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification; TMA, WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication, WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences, 미국등록특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction(CP-PCR), 미국등록특허 제 4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR), 미국등록특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification(NASBA), 미국등록특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)와 같은 다양한 증폭 반응들이 당업계에 알려져 있다.

[0057] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 공개된 데이터 베이스로부터 항암제 약물 감수성 패턴을 비교하여 ITGB3를 항암제 내성을 유발하는 유전자로 선별하고(도 1 참조), ITGB3에 의해 항암제 내성 유발여부를 ITGB3 발현 억제 항암제 내성 세포주를 제작하여 확인하였으며(도 2 참조), 웨스턴 블롯 분석을 통해 ITGB3 발현을 억제한 항암제 내성을 가진 폐암 세포주에서 독소루비신 처리한 경우 세포사멸이 더 많이 일어남을 확인하였다(도 3, 도 4 및 도 5 참조).

[0058] 또한, 본 발명자들은 ITGB3에 의한 항암제 내성 획득 기전을 확인한 결과, ITGB3 발현 억제 세포주에서는 핵 내의 p53가 거의 존재하지 않는 것으로 보아 NFkB 활성이 억제되어 있음을 확인하여 이를 통해 항암제 내성을 획득하는 것을 제시하였다(도 6 내지 도 8 참조).

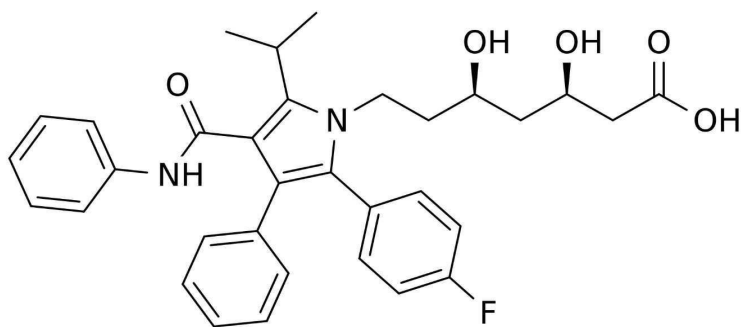
[0059] 상기와 같은 결과를 통해 ITGB3가 항암제 내성을 유발하는 유전자임을 확인하였는 바, ITGB3는 암세포의 항암제 내성 진단용 바이오마커 조성물로 사용될 수 있으며, ITGB3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 올리고펩타이드 또는 PNA(Peptide nucleic acid), 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머 또는 프로브는 폐암의 항암제 내성 진단용 키트로 유용하게 사용될 수 있다.

[0061] 본 발명의 또 다른 일 측면은 항암제 내성 진단에 대한 정보를 제공하기 위하여, 상기 진단이 필요한 대상체의 시료를 제공하는 단계; 상기 시료에서 ITGB3 바이오마커를 검출하는 단계; 및 상기 검출결과, 상기 대상체의 시료에서 내성을 나타내지 않는 대조군과 비교하여 상기 ITGB3 바이오마커의 발현이 증가한 경우, 상기 대상체의 시료를 항암제에 대한 내성시료로 판단하는, 항암제 내성을 진단하는 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명의 또 다른 일 측면은 ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴(Atorvastatin)을 유효성분으로 함유하는 암의 항암제 내성 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0064] 상기 아토바스타틴(Atorvastatin)은 하기 화학식 1의 구조로 나타내어지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0065] [화합식 1]



[0066]

[0067]

상기 아토바스타틴은 암의 항암제 내성을 억제할 수 있다.

[0068]

상기 암은 폐암일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0069]

상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에를로티닙(erlotinib), 셀라스트롤(celastrol), 시스플라틴(cisplatin), 도세탁셀(docetaxel), 타그리소(tagrisso), 탁솔(taxol), 페메트렉시드(Pemetrexed) 및 타목시펜(tamoxifen)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0070]

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설포산, 4-톨루엔설포산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등이 있다.

[0071]

본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0072]

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0073]

상기 약학적 조성물은 약학적 조성물 전체 중량에 대하여 유효성분인 보르테조미브 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 10 내지 95 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.

[0074]

본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내에 전달하는데 적합한 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 예로서, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 이들 성분 중 1 성분 이상

을 혼합한 것일 수 있다. 이때, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

- [0075] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0076] 본 발명의 조성물은 경구제제 또는 비경구제제로 제형화 될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 첨가될 수 있다. 한편, 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 여기에는 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 부형제가 포함될 수 있다.
- [0077] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제 등의 주사제가 포함될 수 있다.
- [0078] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식중 선택될 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여된다. 이는 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물 등에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 병용 투여시, 투여는 순차적 또는 동시일 수 있다.
- [0081] 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함되는 유효성분의 양은 0.001 내지 10,000 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 5 g/kg일 수 있다. 상기 투여는 하루에 1회일 수 있고, 수회로 나눌 수도 있다.
- [0082] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 ITGB3에 의한 항암제 내성을 억제하는 약물을 스크리닝하기 위해 데이터 베이스인 Cmap을 이용하여 선별한 결과, 아토바스타틴(Atorvastatin)을 선별하였다(도 9 참조). 상기 선별된 아토바스타틴의 항암제 내성 극복 효과를 확인하기 위한 실험을 수행한 결과, ITGB3 발현 억제 세포주에 아토바스타틴을 처리한 후 독소루비신 처리한 경우 caspase 3의 잘려진 형태가 증가하고(도 10 및 도 11 참조), NFkB 활성이 억제됨을 확인하였는 바(도 12 참조), ITGB3에 의해 유도된 항암제 내성 아토바스타틴(atorvastatin)과 독소루비신(doxorubicin)을 함께 처리하면 아토바스타틴(Atorvastatin)에 의해 NFkB 활성이 억제됨으로써 항암제 내성이 극복됨을 알 수 있었다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 일 측면은 ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴(Atorvastatin)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 항암 보조제를 제공한다.
- [0086] 본 발명의 또 다른 일 측면은 ITGB3 단백질을 억제하는 아토바스타틴(Atorvastatin)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 암질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0087] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 함량은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다.
- [0088] 또한, 상기 건강기능식품의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 건강기능식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스와 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르트암과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

- [0090] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.
- [0092] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0093] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0095] <실시예 1-1> 항암제 내성이 있는 중간엽성 폐암 세포주(A549TD)의 제조
- [0096] 항암제 내성이 있는 중간엽성 폐암 세포주 (A549TD)를 제조하기 위해 A549 폐암 세포주에 TGF β (CYT-716, PROSPEC)을 2ng/ml의 농도로 3일마다 처리하여 총 60일동안 유지하여 확립한 후, 분주하여 frozen stock으로 보관하였다. 실험에 사용할 시에는 상기 확립된 세포주에 3일마다 추가적으로 2ng/ml의 TGF β 를 처리한 후 30일 정도 사용하였다.
- [0098] <실시예 1-2> 항암제 내성을 유발하는 유전자 선별
- [0099] 공개된 데이터 소스(<https://portals.broadinstitute.org/ctdp/>)로부터 폐, 간, 유방 외 20가지 이상의 조직에서 유래된 803 암세포주의 유전자 발현 패턴과 항암제 약물 감수성 패턴을 비교하여 유전자 별로 발현이 항암제 내성과 연관이 높은 정도를 항암제 내성점수(Chemoresistance score)로 정의하였다. 항암제 내성점수가 높으며, 상기 실시예 1-1에서 제조한 항암제 내성이 있는 중간엽성 폐암 세포주(mesenchymal-type lung cancer cells, A549TD, PMID:27015122, 27085460)에서 특이적으로 발현이 높은 ITGB3를 항암제 내성을 유발하는 후보 유전자로 선별하였다(도 1).
- [0101] <실시예 2> ITGB3에 의한 항암제 내성 유발여부 확인
- [0102] 2-1. ITGB3 발현 억제 항암제 내성 세포주를 이용한 ITGB3에 의한 항암제 내성 유발여부 확인
- [0103] ITGB3가 항암제 내성을 유발하는 유전자인지 확인하기 위해서 실시예 1에서 사용한 항암제 내성을 가진 중간엽성 폐암 세포주(A549TD)에 ITGB3 유전자의 발현을 감소시키는 shRNA#3(서열번호 1, Sigma Aldrich, SHCLNG-NIM_000212) 또는 shRNA#4(서열번호 2, Sigma Aldrich, SHCLNG-NIM_000212)를 형질전환시켜 ITGB3 발현 억제 세포주를 제조한 후, 상기 세포주에 1 μ M 독소루비신(Doxorubicin)을 24시간 처리하고 현미경으로 세포의 생존능력을 확인하였다.
- [0104] ITGB3 유전자의 발현을 감소시키는 것의 대조군 세포를 제작하기 위해서는 중간엽성 폐암 세포주(A549TD)에 shRNA 염기서열이 포함되지 않은 공백터(shCont)를 형질전환시켰다.
- [0105] 그 결과 도 2에 나타난 것과 같이, ITGB3 발현 억제 세포주 모두(sh β 3 #3, sh β 3 #4) 독소루비신(doxorubicin: Doxo)을 처리했을 때 ITGB3가 발현되는 세포주에 독소루비신(Dox)을 처리했을 때보다 세포사멸이 더 많이 일어남을 확인하였다.
- [0107] 2-2. ITGB3에 의한 항암제 내성 유발여부 웨스턴 블롯 분석
- [0108] ITGB3가 항암제 내성을 유발하는 유전자인지 확인하기 위해서 실시예 2-1과 같은 방법으로 제작한 ITGB3 발현 억제 세포주에 독소루비신(doxorubicin)을 1, 2, 또는 3일동안 처리하고 C.PARP 항체(Cell Signaling Technology, #5625), C.caspase3 항체(Cell Signaling Technology, #9664), 및 C.caspase9 항체(Cell Signaling Technology, #9505)를 이용하여 세포 사멸의 마커 단백질의 발현을 측정하였다. ITGB3 단백질의 발현 정도를 확인하기 위해서는 ITGB3 항체(cell signaling, cat:#4702)를 사용하였고, α -Tubulin 단백질의 발현 정도를 확인하기 위해서는 α -Tubulin 항체(Santa cruz, sc-8035)를 사용하였다.

[0109] 그 결과, 도 3에 나타난 것과 같이 ITGB3 발현 억제 세포주에 1 uM 독소루비신(doxorubicin)을 처리했을 때 ITGB3가 발현되는 에 비해서 세포사멸이 더 많이 일어남을 확인할 수 있었다.

[0111] 2-3. ITGB3에 의한 항암제 내성 유발여부 웨스턴 블롯으로 확인

[0112] ITGB3가 항암제 내성을 유발하는 유전자인지 확인하기 위해서 실시예 2-1에서 제작한 ITGB3 발현 억제 세포주(shRNA #3)에 ITGB3단백질을 발현시킬 수 있는 유전자(accession number: NM_000212)를 포함하는 벡터(Addgene, cat:#27289)를 형질전환시키고, 1 uM Doxorubicin을 24시간 처리한 후 2-2와 같은 방법으로 ITGB3 항체(cell signaling, cat:#4702), C.caspase3 항체, C.caspase9 항체, 및 β -Actin 항체(Santa cruz, sc-47778)를 이용하여 ITGB3, C.caspase3, C.caspase9, 및 β -Actin 단백질의 발현을 측정하였다.

[0113] 그 결과 도 4에 나타난 것과 같이, ITGB3 발현 억제에 의해서 증가했던 세포사멸 정도가 ITGB3 발현 억제 세포주에서 ITGB3 발현을 회복시킨 경우 다시 감소하는 것을 확인하였고, 이를 통해 ITGB3의 발현 정도가 항암제 내성 획득에 기여함을 알 수 있었다.

[0115] 2-4. ITGB3에 의한 항암제 내성 유발여부 웨스턴 블롯으로 확인

[0116] ITGB3가 항암제 내성을 유발하는 유전자인지 확인하기 위해서 항암제 내성을 갖고 있지 않은 것으로 알려진 A549 세포주에 실시예 2-3과 같은 방법으로 ITGB3의 발현을 유도한 후 항암제인 80 uM Etoposide를 24시간 처리한 후 실시예 2-3과 같은 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 세포사멸 정도를 확인 (C.caspase3, C.caspase9)하였다.

[0117] 그 결과 도 5에 나타난 것과 같이, 항암제 내성을 갖고 있지 않은 세포주에 ITGB3를 과발현시키면 세포사멸 정도가 감소하였고, 이를 통해 ITGB3 단백질이 항암제 내성 획득에 기여함을 확인할 수 있었다.

[0119] <실시예 3> ITGB3에 의한 항암제 내성 획득 기전 확인

[0120] 3-1. ITGB3 발현 억제가 변화되는 세포내 신호전달 경로 확인

[0121] ITGB3 발현 억제가 발현이 감소하는 유전자와 관련된 세포내 신호전달 경로(pathway)를 공지된 방법을 이용하여 KEGG pathway분석을 수행하였고, 그 중 경로 내 유전자 발현이 높을수록 폐암환자의 사망과 연관성(Hazard ratio)이 높은 NFkB 신호전달(signaling) 경로를 확인하였다(도 6). Hazard ratio는 공지된 수식에 적용하여 산출하였다.

[0123] 3-2. ITGB3 단백질의 발현과 NFkB 활성과의 관계 확인

[0124] ITGB3 단백질의 발현과 NFkB 활성의 관계를 확인하기 위해서, 실시예 2-1에서 사용한 ITGB3 유전자의 발현이 억제된 세포를 공지된 방법을 이용하여 각각 세포의 세포질과 핵으로 분리하고 NF-kB subunit p65 항체(Santa cruz, sc-372)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 p65의 세포내 위치를 확인(PARP: 핵 마커, α -tubulin: 세포질 마커)하였다.

[0125] 그 결과 도 7에 나타난 것과 같이, ITGB3 발현 억제 세포주에서는 핵 내의 p65가 거의 존재하지 않는 것으로 보아 NFkB 활성이 억제되어있음을 확인 할 수 있었다.

[0128] 3-3. ITGB3 단백질의 발현과 NFkB 활성과의 관계 확인

[0129] ITGB3 단백질의 발현과 NFkB 활성의 관계를 확인하기 위해서, ITGB3 발현 억제 세포주에서 NFkB 활성 정도를 luciferase assay kit(Promega, cat:#E1980)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라서 분석하였다.

[0130] 그 결과 도 8에 나타난 것과 같이, ITGB3 발현 억제 세포주 모두(sh β 3 #3, sh β 3 #4) NFkB 활성이 낮음을 확인할 수 있었다.

[0132] <실시예 4> ITGB3에 의한 항암제 내성을 저해하는 약물 확인

[0133] 4-1. ITGB3에 의한 항암제 내성을 저해하는 약물 선별

[0134] ITGB3에 의한 항암제 내성을 저해하는 약물을 스크리닝하고자 77가지 암세포주에 약 2만여 약물 처리에 의해 변화된 유전자 발현 프로파일을 제공하는 데이터 소스(<https://clue.io/cmap>)로부터 실시예 2-1에서 사용한 ITGB3 유전자의 발현이 감소된 세포주와 유사한 발현 패턴을 갖는 약물을 조사하였다. 위에서 선별된 약물 중, NFkB 신호전달 경로내 유전자의 발현의 저해를 유도하는 약물을 추가적으로 선별하였다. 이로써 ITGB3유전자 발현 억제 효과를 보이며, NFkB 신호전달 경로를 저해할 것이라 예측된 약물 아토바스타틴(Atorvastatin: ATV)을 ITGB3에 의한 항암제 내성을 저해하는 약물 후보로 선별하였다 (도 9).

[0136] 4-2. 아토바스타틴(Atorvastatin) 처리에 의한 항암제 내성 억제

[0137] 아토바스타틴(Atorvastatin)의 항암제 내성 극복 효능을 확인하기 위해서 실시예 2-1에서 사용한 ITGB3 발현 억제 세포주에 atorvastatin(ATV)을 농도별로 처리하고 12시간 후에 1 uM 독소루비신(doxorubicin)을 24시간 처리하고 웨스턴 블롯을 수행하여 세포 사멸 정도를 확인하였고, 실시예 2-1에서 사용한 ITGB3 발현 억제 세포주에 1 uM 아토바스타틴(atorvastatin)을 12시간 처리하고, 그리고 나서 1uM 독소루비신(doxorubicin)을 24시간 처리한 후 세포의 생존능력을 현미경으로 확인하였다.

[0138] 그 결과 도 10에 나타난 것과 같이, caspase 3의 잘려진 형태가 증가하는 것을 통해 아토바스타틴(atorvastatin)을 처리한 경우 독소루비신(doxorubicin)에 대한 항암제 내성이 극복됨을 확인할 수 있었고, 도 11에 나타난 것과 같이, 아토바스타틴(atorvastatin)을 처리한 경우 독소루비신에 대한 항암제 내성이 극복됨을 세포 사진으로 확인할 수 있었다.

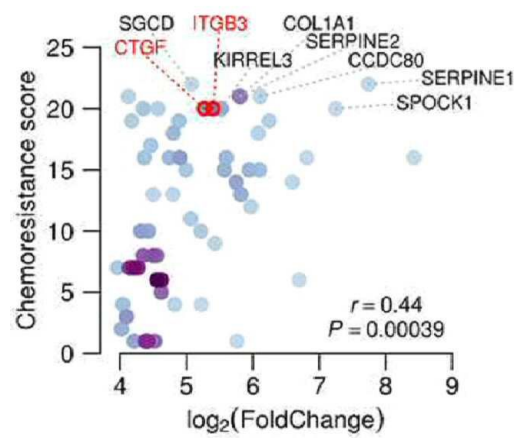
[0140] 4-3. 아토바스타틴(Atorvastatin) 처리에 의한 NFkB 활성 확인

[0141] 아토바스타틴(Atorvastatin) 처리에 의한 NFkB 활성의 변화를 확인하기 위해서 실시예 2-1에서 사용한 ITGB3 발현 억제 세포주에 아토바스타틴(atorvastatin)을 농도별로 처리 후 발광효소분석(luciferase assay)을 수행하였다.

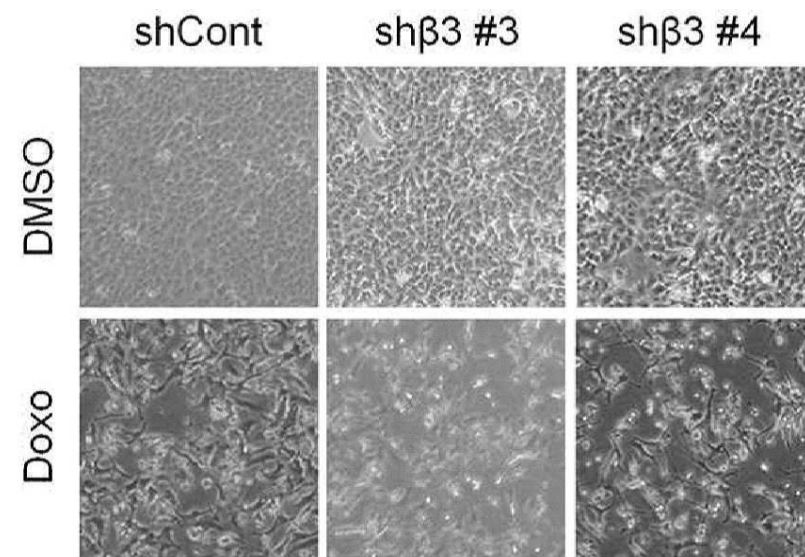
[0142] 그 결과 도 12에 나타난 것과 같이, 아토바스타틴(atorvastatin)을 처리하면 NFkB 활성이 억제되었고, 도11에서 아토바스타틴(Atorvastatin)과 독소루비신(doxorubicin)을 함께 처리하면 항암제 내성이 극복됨을 확인한 결과와 상기 도 12의 결과를 종합하면 아토바스타틴(atorvastatin)과 독소루비신(doxorubicin)을 함께 처리하면 아토바스타틴(Atorvastatin)에 의해 NFkB 활성이 억제됨으로써 항암제 내성이 극복됨을 알 수 있었다.

도면

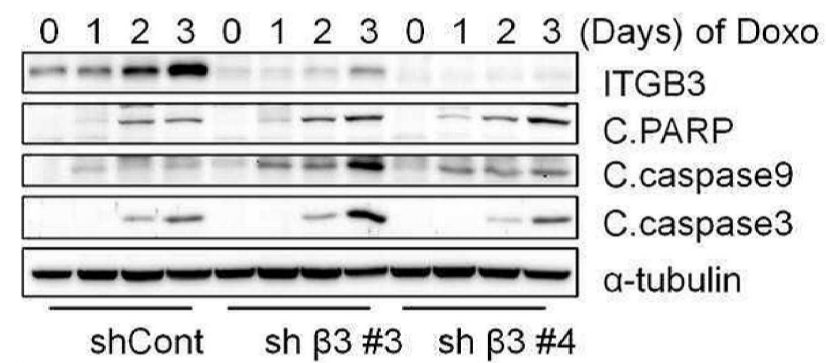
도면1



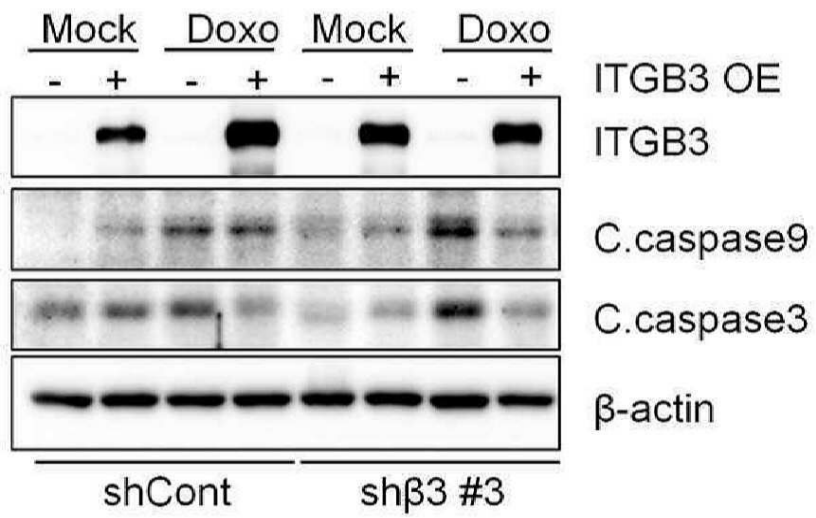
도면2



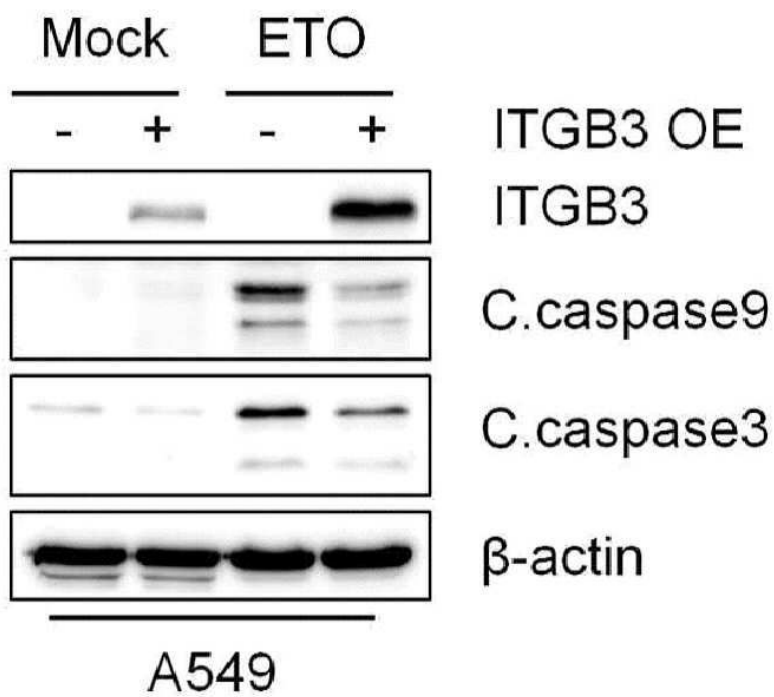
도면3



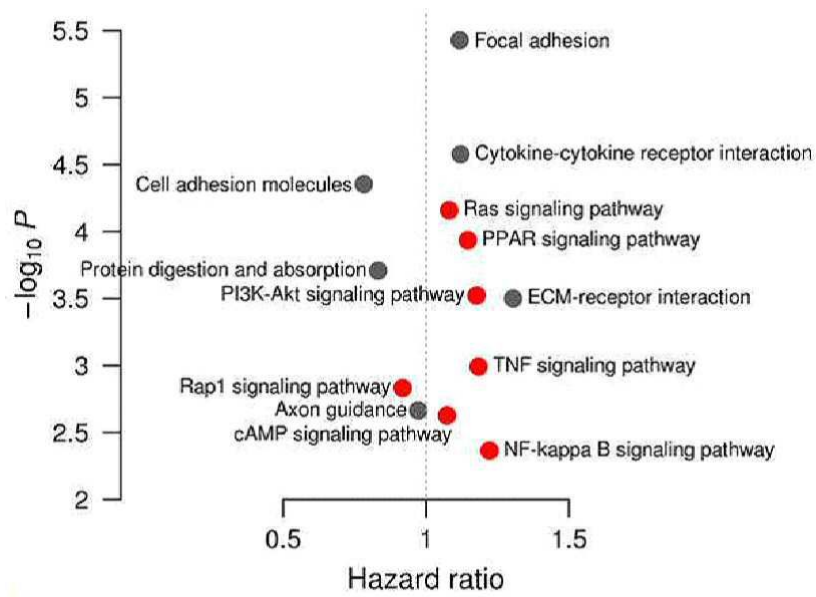
도면4



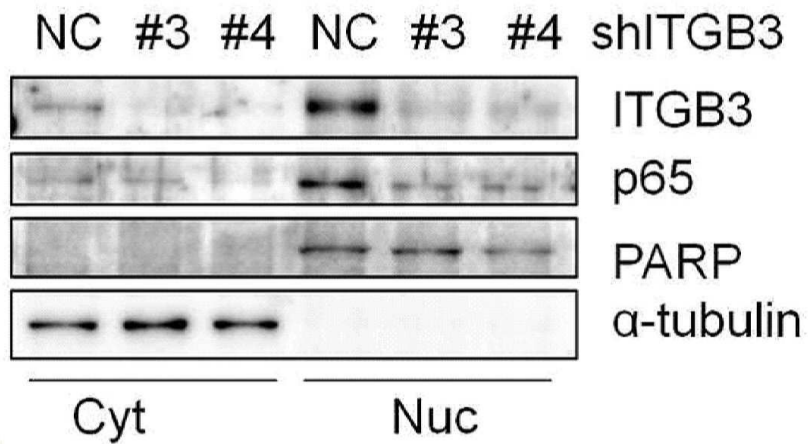
도면5



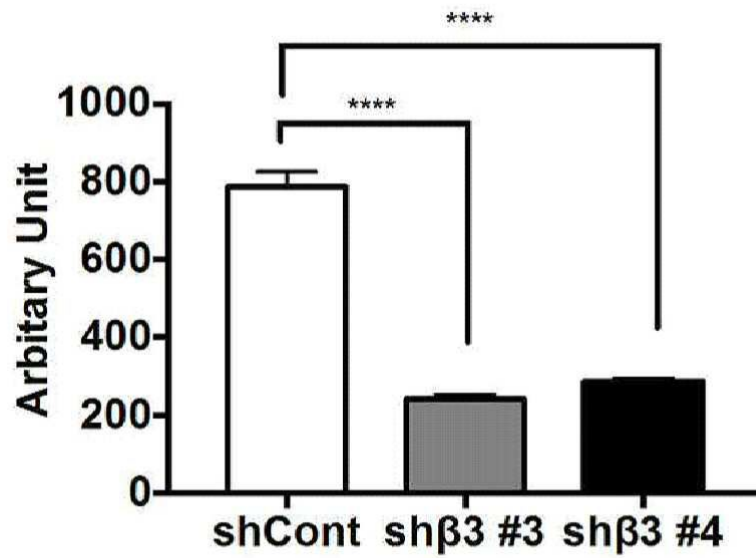
도면6



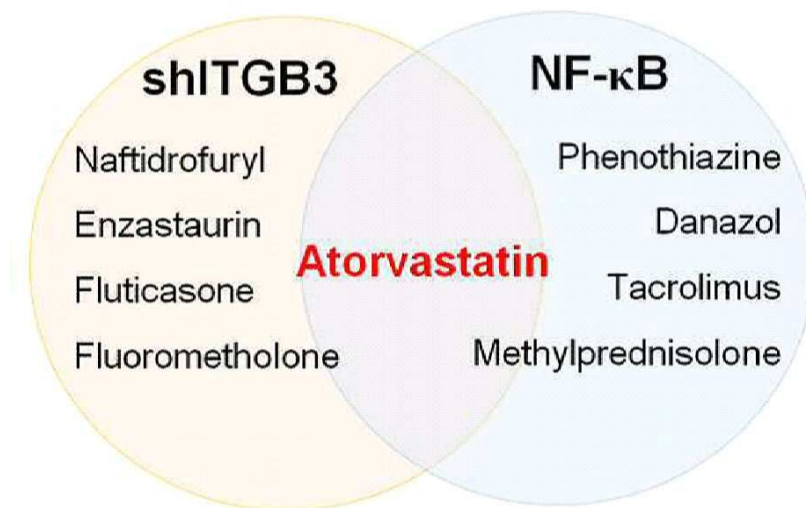
도면7



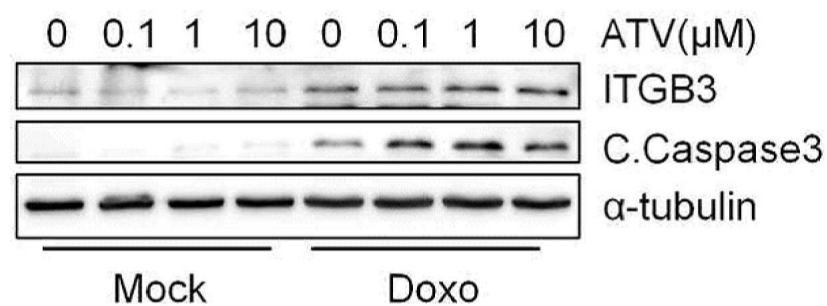
도면8



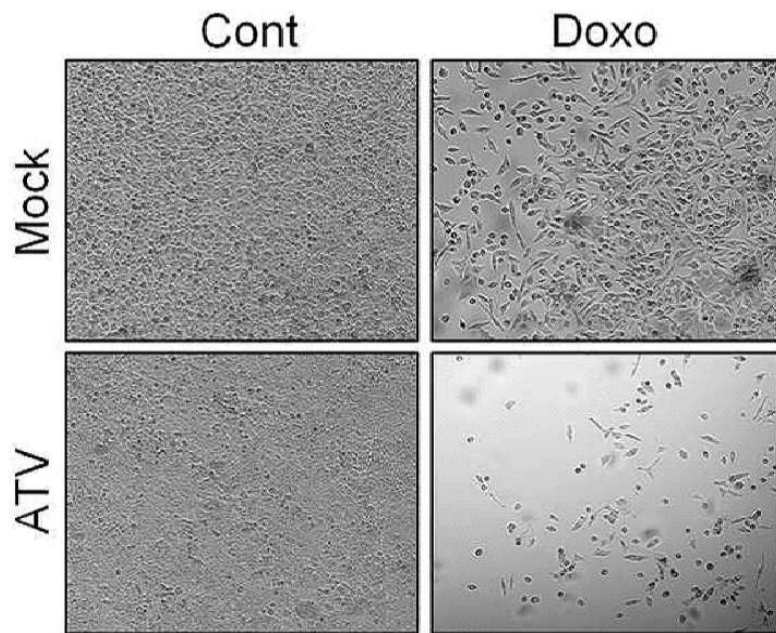
도면9



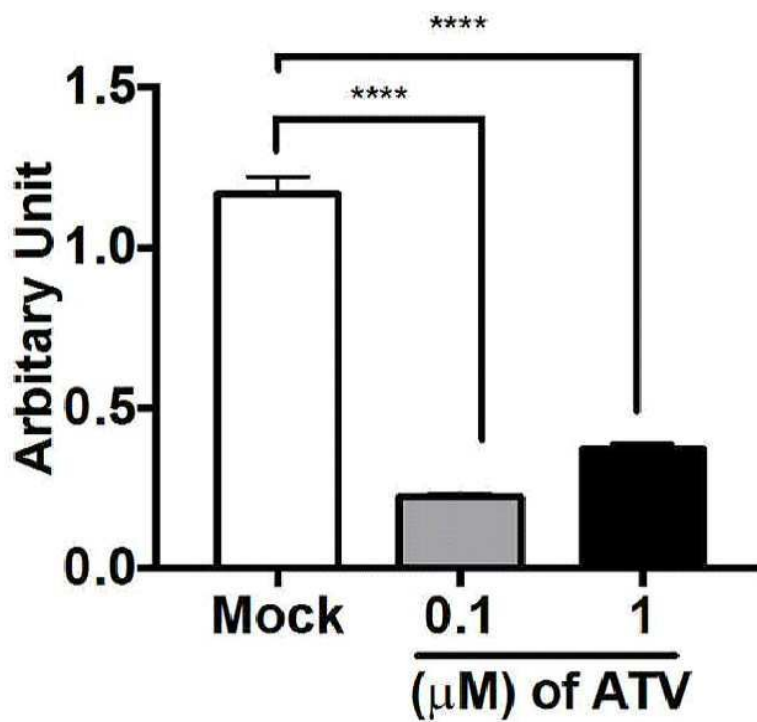
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Anti-cancer drug resistance diagnostic biomarker composition
comprising ITGB3 protein

<130> 2019p-10-002

<150> KR 10-2018-0169790

<151> 2018-12-26

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> No1

<400> 1

ccggccacgt ctaccttcac caatactcga gtattggtga aggtagacgt ggTTTT 57

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> No2

<400> 2

ccgggtcgtc agattccagt actatctcga gatagtactg gaatctgacg actTTTT 57