

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 6월 3일 (03.06.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/107644 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/4412 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/016976

(22) 국제출원일:

2020년 11월 26일 (26.11.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0152827 2019년 11월 26일 (26.11.2019) KR

(71) 출원인: 주식회사 노브메타헬스 (NOVMETA-HEALTH CO., LTD.) [KR/KR]; 06050 서울시 강남구 언주로 727, 13층 (논현동, 트리스빌딩), Seoul (KR).

(72) 발명자: 박근규 (PARK, Keun Gyu); 42094 대구시 수성구 범어로 75, 101동 1301호, Daegu (KR). 이인규 (LEE, In Kyu); 42107 대구시 수성구 청호로 365, 305동 301호, Daegu (KR). 조성진 (CHO, Sung Jin); 41061 대구시 동구 동내로 88, Daegu (KR). 최연경 (CHOI, Yeon Kyung); 41944 대구시 수성구 달구벌대로 2435, Daegu

(KR). 김미진 (KIM, Mi Jin); 41735 대구시 동구 동내로 88, Daegu (KR). 진정욱 (CHIN, Jung Wook); 41061 대구시 동구 동내로 88, Daegu (KR). 전용현 (JEON, Yong Hyun); 41061 대구시 동구 동내로 88, Daegu (KR). 김진아 (KIM, Jin A); 41061 대구시 동구 동내로 88, Daegu (KR). 김동수 (KIM, Dong Su); 41061 대구시 동구 동내로 88, Daegu (KR). 정희윤 (JUNG, Hoe Yune); 37668 경상북도 포항시 남구 지곡로 394, 801호 (지곡동, 테크노빌), Gyeongsangbuk-do (KR).

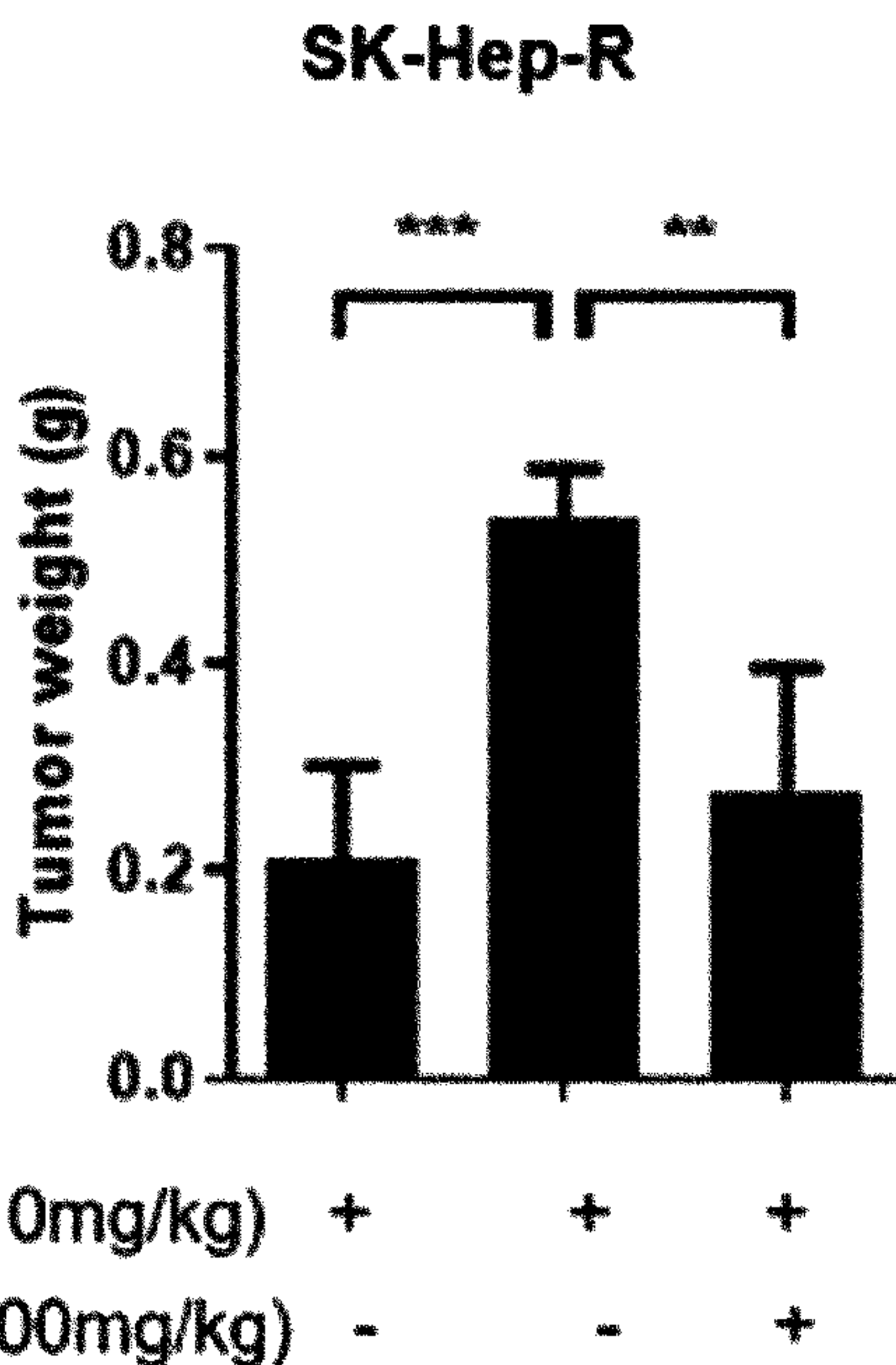
(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(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, IT, 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,

(54) Title: USE OF COMPOSITION FOR ENHANCING ANTICANCER EFFECT, COMPRISING ERR γ INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 항암 효과 증진을 위한 ERR γ 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도

[도6b]



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for inhibiting the resistance of liver cancer to sorafenib and enhancing an anticancer effect, comprising an Estrogen-related receptor γ (ERR γ) inhibitor as an active ingredient. The present invention can be effectively used as a pharmaceutical composition for treating sorafenib-resistant advanced liver cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 ERR γ (Estrogen-related receptor γ) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 소라페닙에 대한 간암의 내성 억제 및 항암 효과 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 소라페닙 내성 진행성 간암을 치료하기 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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), 유럽 (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))

명세서

발명의 명칭: 항암 효과 증진을 위한 $ERR\gamma$ 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도

기술분야

- [1] 항암 효과 증진을 위한 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소라페닙(Sorafenib)에 대한 간암의 내성 억제 및 항암 효과를 증진시키는 $ERR\gamma$ 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 및 이를 이용한 소라페닙 내성 간암의 치료방법을 제공하며, 나아가, $ERR\gamma$ 를 소라페닙 내성 간암 진단을 위한 바이오마커로서 활용하는 소라페닙 내성 간암 진단용 키트 및 이를 이용한 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

배경기술

- [2] 우리나라 국민의 가장 주요한 사망원인 중 하나는 악성신생물(malignant neoplasm, 암)에 의한 것으로, 통계청에서 발표한 사망원인 통계에 의하면 2016년 간암 사망률은 인구 10만 명당 21.5명으로서 폐암 사망률 다음으로 암 사망률 2위를 기록했다(간세포암종 진료 가이드라인, 대한간암학회, 2018).
- [3] 간암의 근본적 치료는 간절제술로, 간경변증이 없는 간에 국한된 단일 간세포암종 환자에서의 1차 치료법이며(Lang H., Liver resection for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver without underlying viral hepatitis. *Br J Surg*. 2005 Feb; 92(2):198-202), 간경변증이 있는 경우에도 잔존 간 기능이 충분하다고 예상되는 경우 우선적으로 고려해볼 수 있으나(Capussotti L, Muratore A, Massucco P, Ferrero A, Polastri R, Bouzari H Major liver resections for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: early and long-term outcomes.. *Liver Transpl*. 2004 Feb;10(2 Suppl 1):S64-8), 초기에 진단받은 30-40%만이 수술적 치료를 할 수 있다.
- [4] 국소림프절, 폐 등의 간 외 전이가 있거나 간혈관 침범이 있는 경우에는 다중 키나아제 저해제(kinase inhibitor)인 소라페닙(Sorafenib, Nexavar®) 치료를 하게 되는데, 임상에서의 생존 개선 정도가 기대 수준에 크게 못 미치고, 대부분 6개월 이내에 재발하여 이를 극복하기 위한 노력이 계속되고 있다(Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390).
- [5] 한편, 기존 항암제나 표적 치료제의 한계를 극복하고, 정상 세포와는 다른 암세포만의 특이적 대사 조절 연구를 통해 암의 대사적 특징을 타겟으로 하는 암대사 연구와 신약개발 연구가 이뤄지고 있다(Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:671-684).
- [6] [선행기술문헌]

- [7] [특허문헌]
 [8] (특허문헌 1) 대한민국등록특허 제10-1704533호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에 본 발명자들은 $ERR\gamma$ 의 억제제가 소라페닙에 대한 간암의 내성을 억제하고, 간암의 증식을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [10] 따라서, 본 발명의 목적은 $ERR\gamma$ 억제제를 유효성분으로 포함하는, 소라페닙 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 $ERR\gamma$ 억제제를 유효성분으로 포함하는, 간암의 소라페닙 내성 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 $ERR\gamma$ 억제제 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 후보 물질을 소라페닙 내성 간암 세포에 처리하는 단계; 상기 세포에서 $ERR\gamma$ 의 활성 또는 발현을 평가하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 치료 증진 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다:
- [16] (a) 소라페닙에 대해 내성을 나타내는지 확인하고자 하는 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [17] (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [18] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다:
- [20] (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [21] (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을

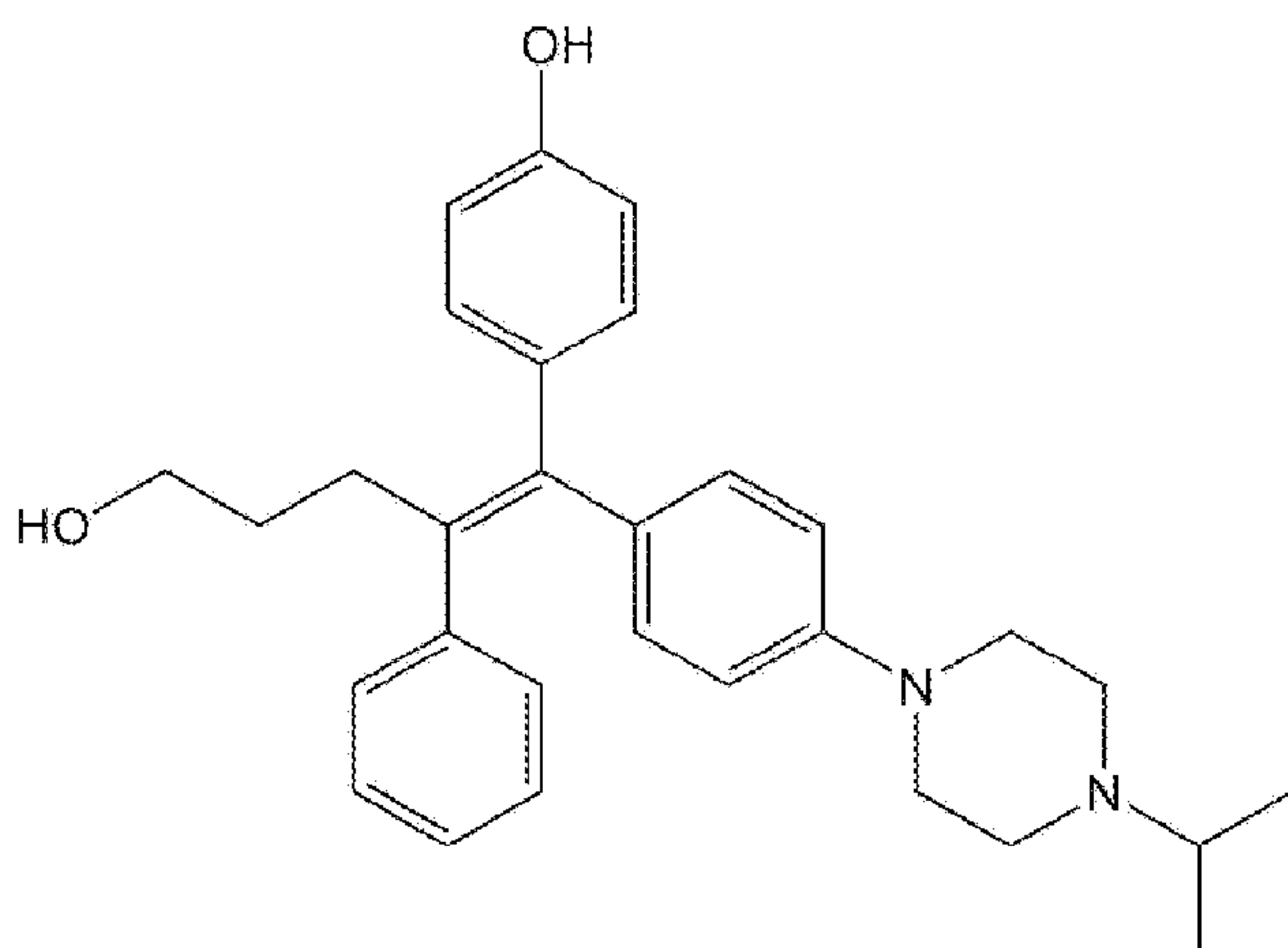
측정하는 단계; 및

- [22] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법을 제공하는 것이다:
- [24] (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [25] (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [26] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하고 소라페닙 이외의 다른 간암 치료제를 적용하는 단계.
- [27] 본 발명의 다른 목적은 $ERR\gamma$ 억제제를 소라페닙 내성 간암 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진방법을 제공하는 것이다.
- [28] 본 발명의 또 다른 목적은 $ERR\gamma$ 억제제를 소라페닙 내성 간암 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 간암의 소라페닙 내성 억제 방법을 제공하는 것이다.
- [29] 본 발명의 다른 목적은 $ERR\gamma$ 억제제 및 소라페닙을 간암 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 간암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [30] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [31] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소라페닙(Sorafenib) 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진에 사용하기 위한 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 제공한다.
- [32] 이와 관련하여, 본 발명은 상기 $ERR\gamma$ 억제제를 유효성분으로 포함하는, 소라페닙(Sorafenib) 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [33] 또한, 본 발명은 상기 $ERR\gamma$ 억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법을 제공한다.

[38]



[45] 이와 관련하여, 본 발명은 상기 ERR γ 억제제; 및 소라페닙을 유효성분으로

포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [46] 더욱이, 본 발명은 $ERR\gamma$ 억제제; 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [47] 뿐만 아니라, 본 발명은 $ERR\gamma$ 억제제; 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는 조성물의 간암에 대한 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공한다.
- [48] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 간암의 소라페닙에 대한 약물 감수성(susceptibility)을 증진시키거나, 또는 소라페닙의 간암에 대한 항암 효과를 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 소라페닙과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 또한, 본 발명은 후보 물질을 소라페닙 내성 간암 세포에 처리하는 단계; 상기 세포에서 $ERR\gamma$ 의 활성 또는 발현을 평가하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 치료 증진 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [51] 본 발명은 또한, $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트를 제공한다.
- [52] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [53] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [55] 나아가, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [56] (a) 소라페닙에 대해 내성을 나타내는지 확인하고자 하는 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [57] (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [58] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암

환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계.

[59] 뿐만 아니라, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[60] (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[61] (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[62] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계.

[63] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법을 제공한다:

[64] (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[65] (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[66] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하고 소라페닙 이외의 다른 간암 치료제를 적용하는 단계.

[67] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간 조직, 간 세포, 전혈, 혈장, 혈청 또는 혈액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[68] 본 발명에 의하면, $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 억제제는 소라페닙에 대한 항암제 감수성을 증가시키고, 소라페닙 내성 간암 세포의 증식을 억제하며, 간암의 크기를 현저히 감소시키는 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 소라페닙 내성 진행성 간암을 치료하기 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법을 통해, 간암 환자의 소라페닙에 대한 치료 반응성을 예측하고, 예측 결과를 바탕으로 환자 맞춤형으로 치료 전략을 수립할 수 있어 효과적으로 간암을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[69] 도 1a 내지 도 1c는 소라페닙에 내성을 나타내는 간암 세포주를 구축한 결과를

나타낸 도이다. (Huh7, 간암 세포주; Huh7-R, 소라페닙 내성 간암 세포주; SK-Hep, 간암 세포주; SK-Hep-R, 소라페닙 내성 간암 세포주).

[70] 도 2a 및 도 2b는 소라페닙 내성 간암 세포주인 Huh7-R (도 2a) 및 SK-Hep-R (도 2b)에서 고아 핵수용체 $ERR\gamma$ 가 증가하였음을 보여주는 도이다.

[71] 도 3a 및 도 3b는 $ERR\gamma$ 역작용제인 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙 내성 간암 세포주인 Huh7-R (도 3a) 및 SK-Hep-R (도 3b)에 처리한 결과, 각각의 소라페닙 내성 간암 세포주에서 ROS(Reactive Oxygen Species)가 증가하였음을 보여주는 도이다.

[72] 도 4a 및 도 4b는 소라페닙 단독 처리 시 항암 효과가 없었던 내성 간암 세포 Huh7-R (도 4a) 및 SK-Hep-R (도 4b)이 화학식 1의 화합물(DN200434)과 소라페닙의 동시 처리에 따라 세포 증식이 감소하였음을 보여주는 도이다.

[73] 도 5a는 소라페닙 내성 간암 세포주 Huh7-R 유래 동물모델(xenograft)에 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙과 병용 투여한 결과, 대조군(소라페닙 단독 투여군)에 비하여 종양의 크기가 현저히 감소하였음을 보여주는 사진이다.

[74] 도 5b는 소라페닙 내성 간암 세포주 Huh7-R 유래 동물모델에 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙과 병용 투여한 결과, 대조군(소라페닙 단독 투여군)에 비하여 종양의 무게가 현저히 감소하였음을 보여주는 그래프이다.

[75] 도 5c는 소라페닙 내성 간암 세포주 Huh7-R 유래 동물모델에 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙과 병용 투여한 결과, 대조군(Huh7-R-Con, 소라페닙 단독 투여군)에 비하여 종양의 부피가 현저히 감소하였음을 보여주는 도이다.

[76] 도 5d는 소라페닙 내성 간암 세포주 Huh7-R 유래 동물모델을 이용한 실험 결과, 그룹간 체중 변화가 없었음을 보여주는 도이다.

[77] 도 6a는 소라페닙 내성 간암 세포주 SK-Hep-R 유래 동물모델(xenograft)에 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙과 병용 투여한 결과, 대조군(소라페닙 단독 투여군)에 비하여 종양의 크기가 현저히 감소하였음을 보여주는 사진이다.

[78] 도 6b는 소라페닙 내성 간암 세포주 SK-Hep-R 유래 동물모델에 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙과 병용 투여한 결과, 대조군(소라페닙 단독 투여군)에 비하여 종양의 무게가 현저히 감소하였음을 보여주는 그래프이다.

[79] 도 6c는 소라페닙 내성 간암 세포주 SK-Hep-R 유래 동물모델에 화학식 1의 화합물(DN200434)을 소라페닙과 병용 투여한 결과, 대조군(Huh7-R-Con, 소라페닙 단독 투여군)에 비하여 종양의 부피가 현저히 감소하였음을 보여주는 도이다.

[80] 도 6d는 소라페닙 내성 간암 세포주 SK-Hep-R 유래 동물모델을 이용한 실험 결과, 그룹간 체중 변화가 없었음을 보여주는 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[81] 본 발명은 소라페닙(Sorafenib) 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진에 사용하기

위한 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 제공한다.

[82] 이와 관련하여, 본 발명은 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 소라페닙(Sorafenib) 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[83] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 간암의 예방 또는 치료 시 소라페닙의 내성 억제에 사용하기 위한 $ERR\gamma$ 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 제공한다.

[84] 이와 관련하여, 본 발명은 $ERR\gamma$ 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 간암의 소라페닙 내성 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[85] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 간암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 $ERR\gamma$ 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제; 및 소라페닙을 포함하는 조성물을 제공한다.

[86] 이와 관련하여, 본 발명은 $ERR\gamma$ 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제; 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[87] 본 명세서에서 사용된 용어, "간암"이란 간에서 일차적으로 발생한 원발성의 악성 종양을 의미하며, 병리학적(조직적)으로 원발성 간암에는 간세포암종과 담관상피암종, 간모세포종, 혈관육종 등 여러 종류가 있으며, 이중 간세포암종과 담관상피암종이 대부분을 차지한다.

[88] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 간세포암종(Hepatocellular carcinoma, HCC) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[89] 본 명세서에서 사용된 용어, "치료 증진"이란 간암의 소라페닙에 대한 내성 획득 후에 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 소라페닙 내성 간암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[90] 본 명세서에서 사용된 용어, "치료"란 간암의 소라페닙에 대한 내성 획득 전 또는 후에 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[91] 본 발명에 있어서, 본 발명의 약학적 조성물은 소라페닙에 대한 약물 감수성(susceptibility)을 증진시키거나, 또는 소라페닙의 간암에 대한 항암 효과를 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

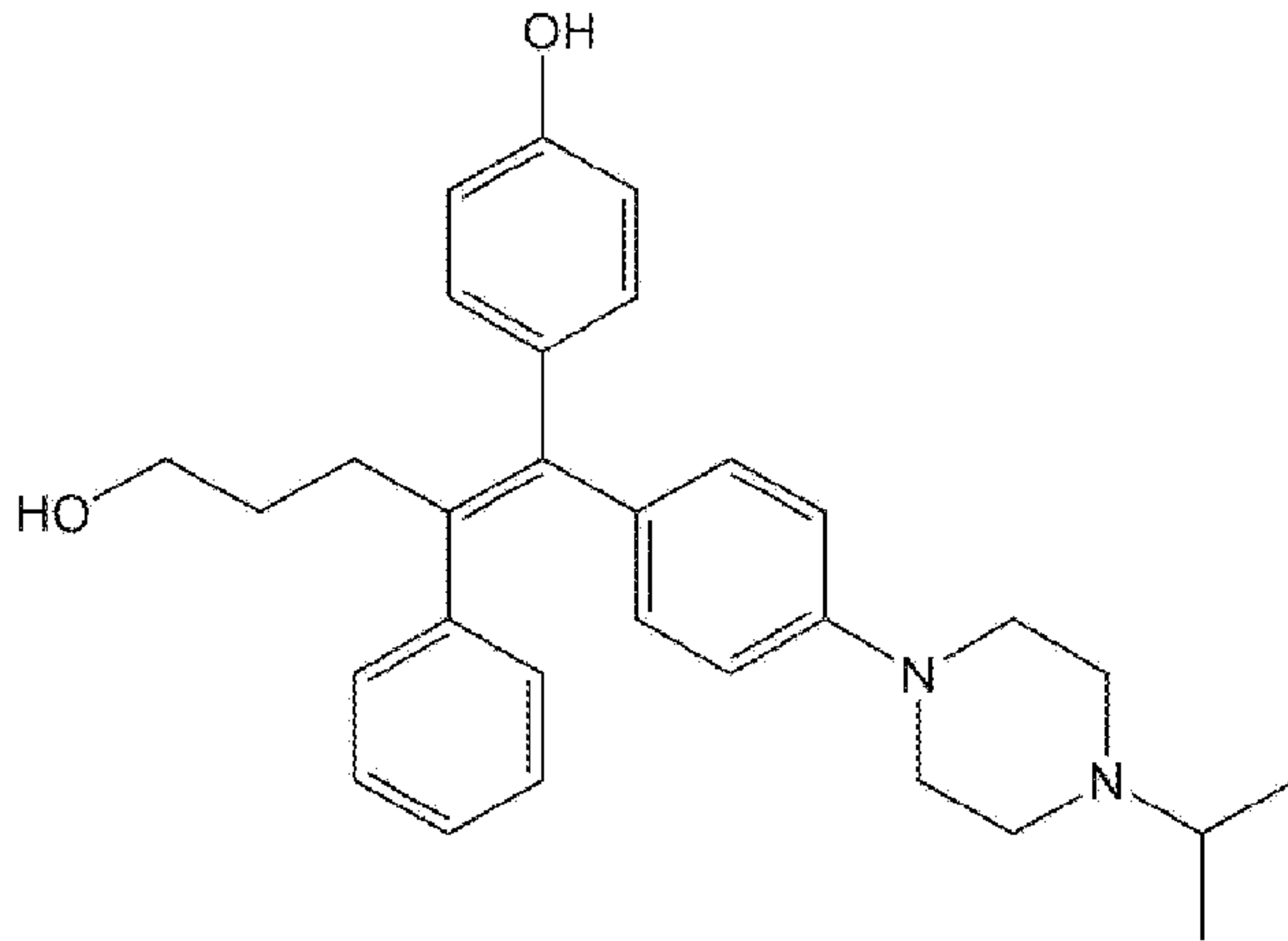
[92] 본 발명의 일 실시예에서는 소라페닙 내성 간암 세포주로 Huh7-SR 또는 SK-Hep-R 세포주를 구축하고, 상기 소라페닙 내성을 획득한 간암 세포주에서 고아 핵수용체 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ)가 현저하게 증가하였음을 확인하였다(실시예 1 참조).

[93] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 $ERR\gamma$ 역작용제인 상기 화학식 1로 표시되는

화합물(DN200434)을 소라페닙 내성 간암 세포에 처리한 결과, ROS가 증가함을 확인하였으며, 소라페닙 단독 처리 시 효과가 없었던 내성 간암 세포가 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과 소라페닙의 병용 처리로 인해 세포 증식이 감소하였음을 확인함으로써, 화학식 1로 표시되는 화합물이 $ERR\gamma$ 의 활성 억제를 통해 소라페닙에 대한 감수성을 증가시킴으로써 약제 내성 극복 효과를 나타냄을 확인하였다(실시예 2 참조).

- [94] 뿐만 아니라, 본 발명의 일 실시예에서는 소라페닙 내성 간암 동물모델에 소라페닙과 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 병용 투여한 뒤 형성된 종괴의 크기 변화를 측정한 결과, 대조군(소라페닙 단독 처리군)에 비하여 현저하게 간암의 크기가 감소하였음을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [95] 본 발명에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 단백질의 활성을 억제하는 제제는 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제(Inverse agonist) 또는 길항제(antagonist), 또는 $ERR\gamma$ 에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 본 명세서에서 사용된 용어, "역작용제(Inverse agonist)" 또는 "길항제(antagonist)"는 수용체의 생물학적 활성을 직접 또는 간접적으로 감소시킬 수 있는 분자를 의미하며, 수용체의 리간드와 함께 사용하는 경우에 상기 리간드의 작용을 감소시킬 수 있는 분자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [97] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [98] 본 명세서에서 사용된 용어, "앵타머(aptamer)"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있는데, 대체로 상기 앵타머를 구성하는 뉴클레오티드의 서열이 짧을수록 화학합성 및 대량 생산이 보다 용이하고, 비용면에서의 장점이 우수하며, 화학수식이 용이하고, 생체 내 안정성이 우수하며, 독성이 낮다고 알려져 있다.
- [99] 상기 역작용제 및 길항제는 화합물일 수 있다.
- [100] 본 발명에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [101] [화학식 1]

[102]



[103] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점이나 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체(예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 건전한 의학적 판단의 범위 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.

[104] 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다.

[105] 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다.

[106] 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 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, 부틴-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, β하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[107] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1의 화합물을 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올,

에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[108] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 상기 화학식 1의 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약 상 적합할 수 있다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[109] 본 발명의 화합물의 범위에는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 이성질체, 수화물 및 용매화물이 모두 포함될 수 있다.

[110] 본 발명에 있어서, 상기 ERR γ 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[111] 본 명세서에서 사용된 용어, "miRNA, siRNA 및 shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개하기 위하여 주로 목적 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여, 상기 mRNA의 해독을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 상기 miRNA, siRNA 및 shRNA는 표적 유전자의 발현을 해독수준에서 억제할 수 있기 때문에, 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법에 사용될 수 있다.

[112] 본 명세서에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타낼 수 있다.

[113] 한편, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적 조성물로 제조하기 위하여 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및/또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[114] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통

사용하는 촉진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다.

- [115] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여된다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [116] 본 발명에 있어서, 본 발명의 약학적 조성물은 소라페닙과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다.
- [117] 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있다.
- [118] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구 투여, 비강 내 투여, 경기관지 투여, 동맥 주사, 정맥 주사, 피하 주사, 근육 주사 또는 복강 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 일일 투여량은 하루 일회 내지 수회 나누어 투여할 수 있다.
- [119] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 $ERR\gamma$ 억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법을 제공한다.
- [120] 구체적으로, $ERR\gamma$ 억제제를 소라페닙 내성 간암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법을 제공한다.
- [121] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 $ERR\gamma$ 억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 소라페닙 내성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [122] 구체적으로, $ERR\gamma$ 억제제를 소라페닙 내성 간암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 소라페닙 내성 억제 방법을 제공한다.
- [123] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 $ERR\gamma$ 억제제 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [124] 구체적으로, $ERR\gamma$ 억제제 및 소라페닙을 간암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [125] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 간암은 소라페닙 내성 간암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [126] 본 명세서에서 사용된 용어, "개체"란 질병의 예방, 치료, 치료 증진 또는 내성 억제를 필요로 하는 대상을 의미한다. 예를 들어, 상기 개체는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 양 및 소를 포함하는 포유류일 수

있다.

- [127] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 후보 물질을 소라페닙 내성 간암 세포에 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 $ERR\gamma$ 의 활성 또는 발현을 평가하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 치료 증진 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기와 같은 방법을 통해 소라페닙 내성 간암 세포에서 $ERR\gamma$ 의 활성 또는 발현을 억제할 수 있는 물질을 선별하고, 이를 소라페닙 내성 간암 치료의 증진제 내지는 보조제로 사용할 수 있다.
- [128] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 소라페닙 내성 간암 진단용 키트를 제공한다.
- [129] 구체적으로, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트는 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [130] 본 발명에서, 용어 “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여 소라페닙 내성 간암의 존재 또는 발생 여부를 확인하는 것이다.
- [131] 본 발명에서 용어, “ $ERR\gamma$ 의 mRNA 또는 이의 단백질 발현수준을 측정하는 제제”란 본 발명의 $ERR\gamma$ 유전자 또는 이들 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 바람직하게는 $ERR\gamma$ 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드이거나, 또는 $ERR\gamma$ 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [132] 본 발명에서, 용어 “프라이머”는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 카피를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명에서는 본 발명 마커 폴리뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 정도를 통해 소라페닙 내성 간암 환자를 스크리닝할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [133] 본 발명에서 용어, “프로브(probe)”란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오티드 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 본 발명의 $ERR\gamma$ 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 소라페닙 내성 간암 환자를 스크리닝할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [134] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법 또는

기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

- [135] 본 발명에서 이용되는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제의 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, $ERR\gamma$ 유전자에 특이적으로 결합하는 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 특정 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고(align), 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 정렬된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 동일성, 더욱 구체적으로 70%의 동일성, 더더욱 구체적으로 80%의 동일성, 가장 구체적으로 90%의 동일성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [136] 본 발명의 키트에 있어서, 용어 “항체” 및 “애타머”는 상기 약학 조성물에서 기술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [137] 본 발명의 키트는 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 이들 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현수준을 확인함으로써 소라페닙 내성 간암을 진단하거나, 소라페닙에 대한 치료 반응성을 예측하는데 사용할 수 있다.
- [138] 본 발명의 키트는 소라페닙에 대한 치료 반응성을 예측하는데 사용할 수 있다는 측면에서, 간암 환자의 예후를 예측하기 위한 용도로서 사용될 수도 있다.
- [139] 본 발명에 있어서, 용어 “예후 예측”은 의학적 귀추에 대하여 미리 헤아려 짐작하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 간암 환자의 소라페닙에 대한 내성을 미리 짐작하는 것을 의미한다.
- [140] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [141] 본 발명의 일 구현예에 따르면, $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [142] 본 발명의 키트에는 채액, 세포 또는 조직으로부터 핵산(예를 들면, 총 RNA)을 추출하기 위한 키트, 표지용 형광물질, 핵산 증폭용 효소 및 배지, 사용 설명서 등을 포함시킬 수 있다.

- [143] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 $ERR\gamma$ 를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [144] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 $ERR\gamma$ 에 의해 코딩된 단백질의 발현수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있으며, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [145] 본 발명의 키트는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 추가로 포함하여 구성될 수 있다.
- [146] 본 발명은 또 다른 양태로서, 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [147] 구체적으로, 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법은 (a) 소라페닙에 대해 내성을 나타내는지 확인하고자 하는 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계를 포함한다.
- [148] 본 발명에서, 용어 “생물학적 시료”는 소라페닙 내성 간암 마커인 $ERR\gamma$ 의 발현 및/또는 활성 수준이 차이나는 조직 (간 조직), 세포 (간 세포), 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 활액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 또는 파열된 진핵세포 등을 포함하며, 암의 원발 병소 뿐만 아니라 전이 병소에서 유래한 시료를 포함한다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태에서 $ERR\gamma$ 의 활성 또는 발현 수준을 확인할 수 있다.
- [149] 본 발명의 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법에 있어서, 상기 단계 (a)의 생물학적 시료는 당업자에게 공지된 특정 방법을 이용하여 수득할 수

있다. 예를 들어, 생물학적 시료는 척추동물, 특히 포유동물로부터 수득할 수 있고, 바람직하게는 소라폐넵에 대해 내성을 나타내는지 확인하고자 하는 간암 환자로부터 수득할 수 있다. 이때, 상기 간암 환자는 인간이다. 조직 생검은 종양 조직의 대표적인 조각을 얻기 위해 종종 사용된다. 대안적으로, 종양 세포는 관심 종양 세포를 함유하는 것으로 공지되어 있거나 그렇게 여겨지는 조직 또는 유체의 형태로 간접적으로 얻을 수 있다.

[150] 본 발명에 있어서, 용어, "mRNA 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(northern blotting) 또는 DNA 칩(DNA chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[151] 본 발명에 있어서, 용어, "단백질 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에서 발현된 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법(protein chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[152] 본 발명의 소라폐넵 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법에 있어서, 소라폐넵 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자는 소라폐넵 내성 간암을 나타내지 않는 간세포암종(Hepatocellular carcinoma, HCC) 또는 간 선암종(Hepatic adenocarcinoma) 환자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[153] 본 발명의 소라폐넵 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 유전자의 발현수준을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다. mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법 및 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법은 상기에서 설명한 바와 같다.

[154] 본 발명의 소라폐넵 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법을 통해, 간암 환자의 소라폐넵에 대한 치료 반응성을 예측하고, 예측 결과를 바탕으로 환자 맞춤형으로 치료 전략을 수립할 수 있어 효과적으로 간암을 치료할 수 있다.

[155] 이에, 본 발명은 또 다른 양태로서, 간암 환자로부터 분리한 생물학적 시료에서

ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [156] 구체적으로, 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법은 (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계를 포함한다.
- [157] 상기 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법에 따라, 간암 환자의 소라페닙에 대한 내성이 확인되는 경우, 소라페닙을 제외한 다른 공지의 간암 치료제를 적용하여 간암 치료 효과를 유도할 수 있다.
- [158] 이에 따라, 추가의 측면에서 본 발명은 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법을 제공한다.
- [159] 구체적으로, 본 발명에 따른 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법은 (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 일반 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 ERR γ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하고 소라페닙 이외의 다른 간암 치료제를 적용하는 단계를 포함한다.
- [160] 본 발명에 따른 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법 및/또는 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법에 대한 구체적인 내용은 전술한 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법과 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [161] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [162] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기

실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[163] [실시예]

[164] 일반적인 실험 방법

[165] 본 발명자들은 소라페닙 내성 간암 세포주 (Huh7-SR cell line, SK-Hep-R cell line)와 간암 세포주 유래 동물모델(xenograft)을 활용하여 실험을 수행하였다. $ERR\gamma$ 역작용제(inverse agonist)인 합성 화합물 DN200434가 간암 세포의 증식과 ROS에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포 계수(cell count)와 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 이용하여 ROS를 측정하였다. 마지막으로, 소라페닙 내성 간암 세포주를 흰쥐에 주입하여 소라페닙 내성 간암의 형성을 유도한 뒤, $ERR\gamma$ 역작용제 DN200434와 소라페닙을 주입한 그룹 및 대조약물을 주입한 그룹에서 간암의 크기 변화를 확인하였다.

[166] [실시예 1]

[167] 소라페닙 내성 간암 세포주 구축과 $ERR\gamma$ 발현 증가 확인

[168] 간암 세포주 [Huh7 cell (한국세포주은행 KCLB No. 60104), SK-Hep cell (ATCC® HTB-52™)]를 지속적으로 소라페닙에 노출시켜(10 μ M까지 점진적으로 증량), 소라페닙 내성 간암 세포주(Huh7-SR cell line, SK-Hep-R cell line))를 구축하였다. 먼저, FACS로 암세포 사멸 평가를 위해 암세포주를 FITC-결합 아넥신(Annexin) 및 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)에 15분간 배양 후, 유세포 분석(flow cytometry)로 아넥신과 PI 결합을 측정하여 BD accuri C6 유세포 분석기(BD biosciences)를 이용하여 데이터를 획득하였으며, Accuri C6 분석 프로그램(BD Biosciences)/FlowJo 소프트웨어(FlowJo, LLC.)로 분석하였다. 절단된 카스파제-3 항체 (Cleaved caspase-3 antibody) (Cell Signaling Technology)를 이용하여 암세포주 사멸을 평가하였는데, 도 1a 내지 도 1c에 나타난 바와 같이 소라페닙 내성 간암 세포주인 Huh7-SR 세포주와 SK-Hep-R 세포주는 모두 소라페닙에 의해 세포 사멸이 증가하지 않음을 확인하였다.

[169] 또한, Huh7-SR 세포주 및 SK-Hep-R 세포주에서 고아 핵수용체 $ERR\gamma$ 의 발현 양상을 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이 상기 2종의 소라페닙 내성 간암 세포주 모두에서 $ERR\gamma$ 의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다.

[170] [실시예 2]

[171] 고아 핵수용체 $ERR\gamma$ 가 소라페닙 내성 간암에 미치는 영향 규명

[172] $ERR\gamma$ 역작용제인 화학식 1로 표시되는 화합물 DN200434가 소라페닙 내성 간암 세포의 ROS 생성에 미치는 영향을 규명하기 위하여, ROS 프로브인 H2-DCF-DA(2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate; Invitrogen, 미국)를 사용하여 FACS로 측정하였다. 소라페닙(10 μ M)과 DN200434 화합물(12 μ M)을 약제 내성 세포에 24시간 처리한 후 10 μ M의 H2-DCF-DA를 세포에 첨가하여 30분간

배양하였으며, PBS로 세척 후 BD Accuri™ C6 유세포 분석기(BD Bioscience, 미국)를 사용하여 데이터를 수집하고, Accuri™ C6 분석 프로그램(BD Bioscience, 미국)을 사용하여 분석하였다. 세포 수를 평가는 소라페닙 내성 간암 세포주에 소라페닙(10 μ M)과 DN200434 화합물(12 μ M)을 병용 처리하여 트리판블루(Trypan blue)로 염색 후 세포계수기(Hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

- [173] 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이 소라페닙 내성 간암 세포주인 Huh7-SR 세포주 및 SK-Hep-R 세포주 둘 다에서 DN200434 화합물에 의해 ROS가 증가함을 확인하였으며, 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이 소라페닙 단독 처리시에는 효과가 없었던 내성 간암 세포가 상기 화학식 1로 표시되는 DN200434의 동시 투여로 인해 세포 증식이 유의하게 감소함을 확인하였다. 상기와 같은 결과를 통해 DN200434이 $ERR\gamma$ 활성을 억제하고, 소라페닙에 대한 감수성을 증가시킴으로써 약제에 대한 내성을 극복할 수 있음을 확인하였다.

[174] [실시예 3]

[175] 소라페닙 내성 간암 동물모델에서의 항암 효과 확인

- [176] 소라페닙 내성 간암 세포주 Huh7-R을 마우스에 주입하여 소라페닙 내성 간암 동물모델(xenograft)을 구축하고, 이후 $ERR\gamma$ 역작용제, DN200434(화학식 1)를 소라페닙과 병용 투여한 뒤 형성된 종괴의 크기 변화를 측정하였다. 이때, 소라페닙 내성 간암 동물모델에 소라페닙만을 처리한 군을 비교 대조군으로 이용하였다.

- [177] 그 결과, 도 5a 내지 도 5c에 나타난 바와 같이 소라페닙 내성 간암 세포주 Huh7-R 유래 동물모델에 $ERR\gamma$ 역작용제인 상기 화학식 1로 표시되는 DN200434 화합물을 소라페닙과 병용 투여한 군에서, 대조군과 비교하여 간암의 종양 크기, 종량 및 부피가 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 이때, 도 5d에서 확인되는 바와 같이 실험군과 대조군 간의 체중 변화는 차이를 보이지 않았다.

- [178] 상기와 동일한 방법으로, 소라페닙 내성 간암 세포주 SK-Hep-R 유래 동물모델을 확립하고, $ERR\gamma$ 역작용제인 상기 화학식 1로 표시되는 DN200434 화합물과 소라페닙의 병용 투여 효과를 확인하였다.

- [179] 마찬가지로, 도 6a 내지 6c에 나타난 바와 같이 소라페닙 내성 간암 세포주 SK-Hep-R 유래 동물모델에서도 DN200434 화합물과 소라페닙을 병용 투여한 군에서, 대조군과 비교하여 간암의 종양 크기, 종량 및 부피가 현저하게 감소하였음을 확인하였고, 도 6d에서 확인되는 바와 같이 실험군과 대조군 간의 체중 변화는 차이를 보이지 않았다.

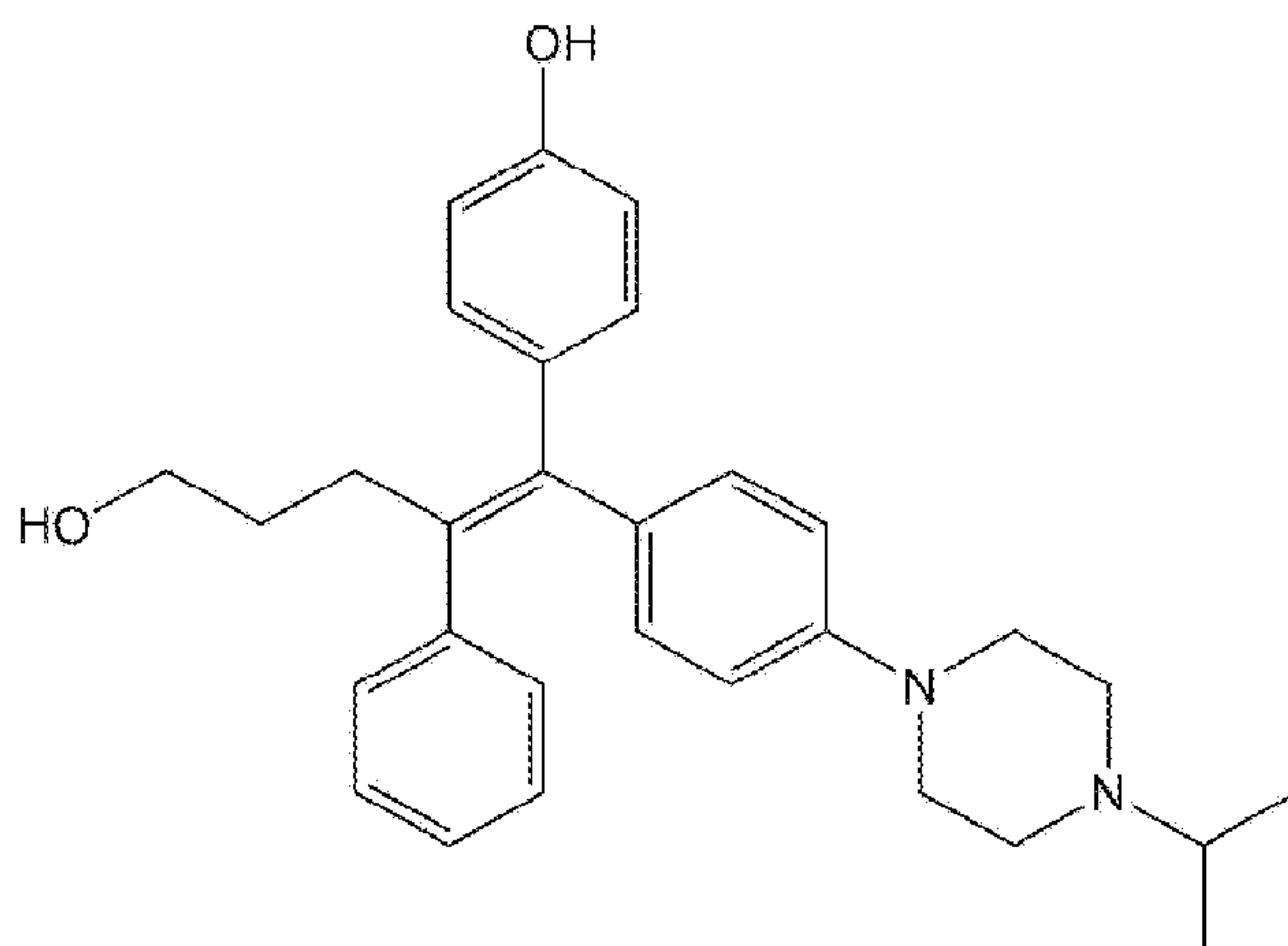
- [180] 상기 실시예 1 내지 실시예 3의 결과들을 종합하면, 소라페닙 내성 간암에서 $ERR\gamma$ 의 발현이 의미있게 증가함을 확인하였으며, 화학식 1로 표시되는 $ERR\gamma$ 역작용제, DN200434가 세포내 ROS를 증가시킴으로써 소라페닙 내성 간암 세포의 증식을 억제하고 소라페닙에 대한 감수성을 증가시킴을 세포실험에서 확인하였다. 또한, 소라페닙 내성 간암 세포주를 이용한 동물 실험에도 대조군에

비해 암 증식이 의미 있게 감소됨을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과는 $ERR\gamma$ 가 간암의 억제 내성에 있어 중요한 역할을 하고 있으며, $ERR\gamma$ 역작용제, DN200434를 이용하여 $ERR\gamma$ 의 활성을 억제하였을 때 억제 내성 진행성 간암 치료에 효과가 있음 증명한 것이다.

- [181] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

- [청구항 1] $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 소라페닙(Sorafenib) 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 단백질의 활성을 억제하는 제제는 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제(Inverse agonist) 또는 길항제(antagonist), 또는 $ERR\gamma$ 에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [화학식 1]



- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 간암의 소라페닙에 대한 약물 감수성(susceptibility)을 증진시키거나, 또는 소라페닙의 간암에 대한 항암 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 소라페닙과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 간암의 소라페닙

내성 억제용 약학적 조성물.

- [청구항 8] $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제; 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는, 간암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함하는, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인, 소라페닙 내성 간암 진단용 키트.
- [청구항 13] 다음의 단계를 포함하는 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법:
(a) 소라페닙에 대해 내성을 나타내는지 확인하고자 하는 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
(b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 간 조직, 간 세포, 전혈, 혈장, 혈청 또는 혈액인, 소라페닙 내성 간암의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 15] $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 $ERR\gamma$ 단백질의 활성을 억제하는 제제는 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제(Inverse agonist) 또는 길항제(antagonist), 또는 $ERR\gamma$ 에

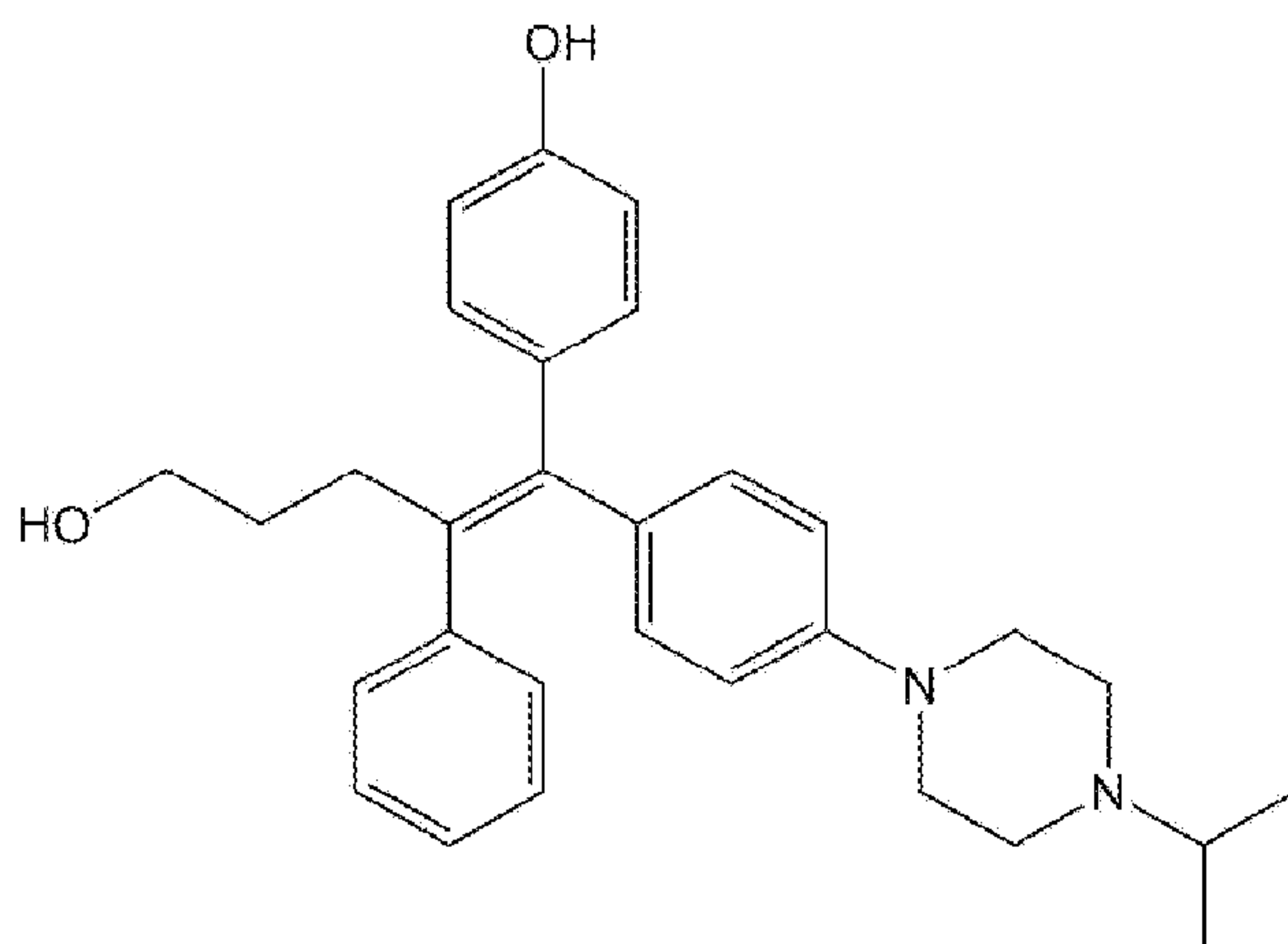
특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법.

[청구항 17]

제16항에 있어서,

상기 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 것을 특징으로 하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법.

[화학식 1]



[청구항 18]

제15항에 있어서,

상기 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법.

[청구항 19]

제15항에 있어서,

상기 제제는 간암의 소라페닙에 대한 약물 감수성(susceptibility)을 증진시키거나, 또는 소라페닙의 간암에 대한 항암 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법.

[청구항 20]

제15항에 있어서,

상기 제제는 소라페닙과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 소라페닙 내성 간암의 예방 또는 치료 증진 방법.

[청구항 21]

$ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간암의 소라페닙 내성 억제 방법.

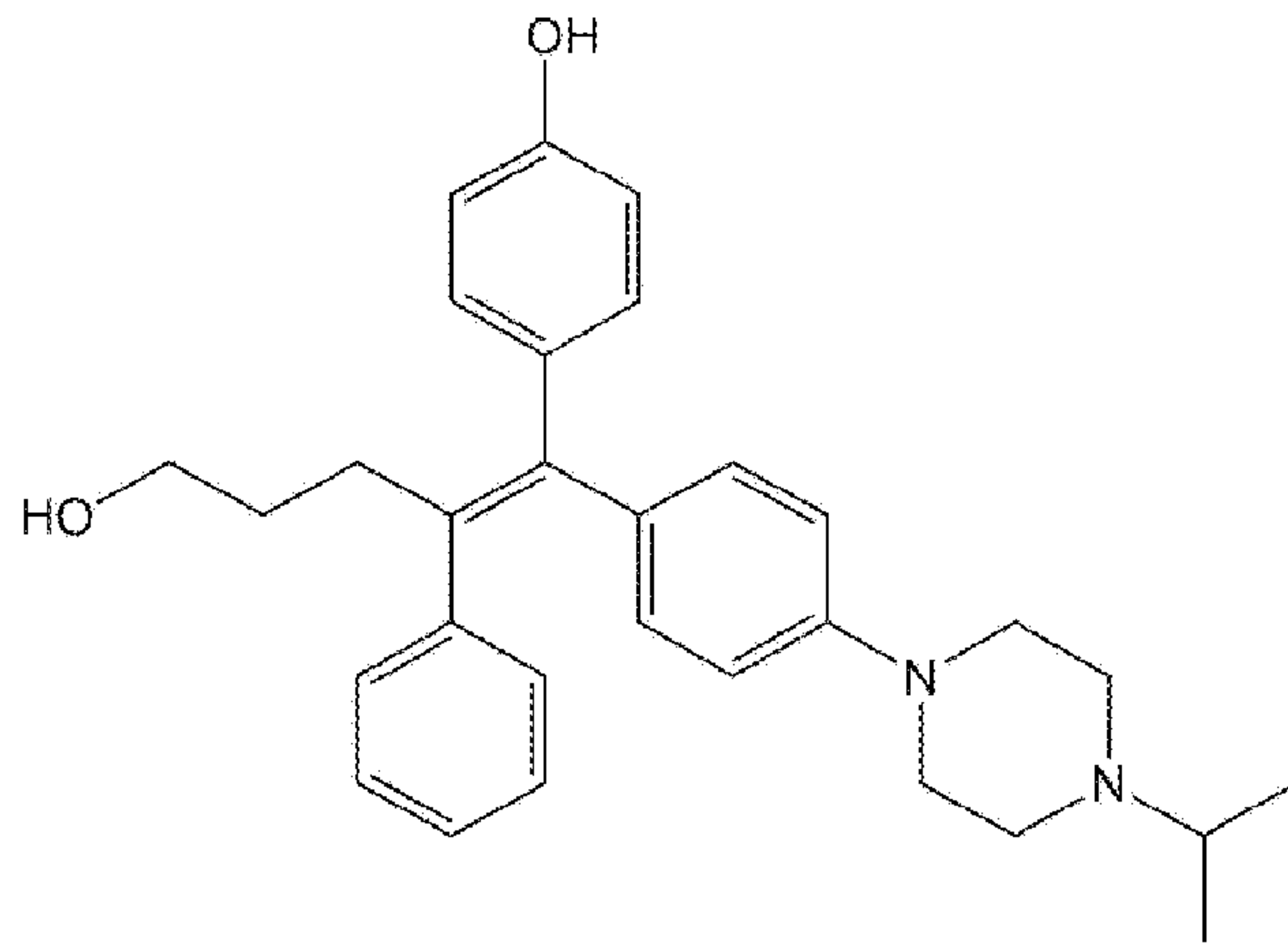
[청구항 22]

$ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제; 및 소라페닙을 유효성분으로 포함하는, 간암의 예방 또는 치료방법.

[청구항 23]

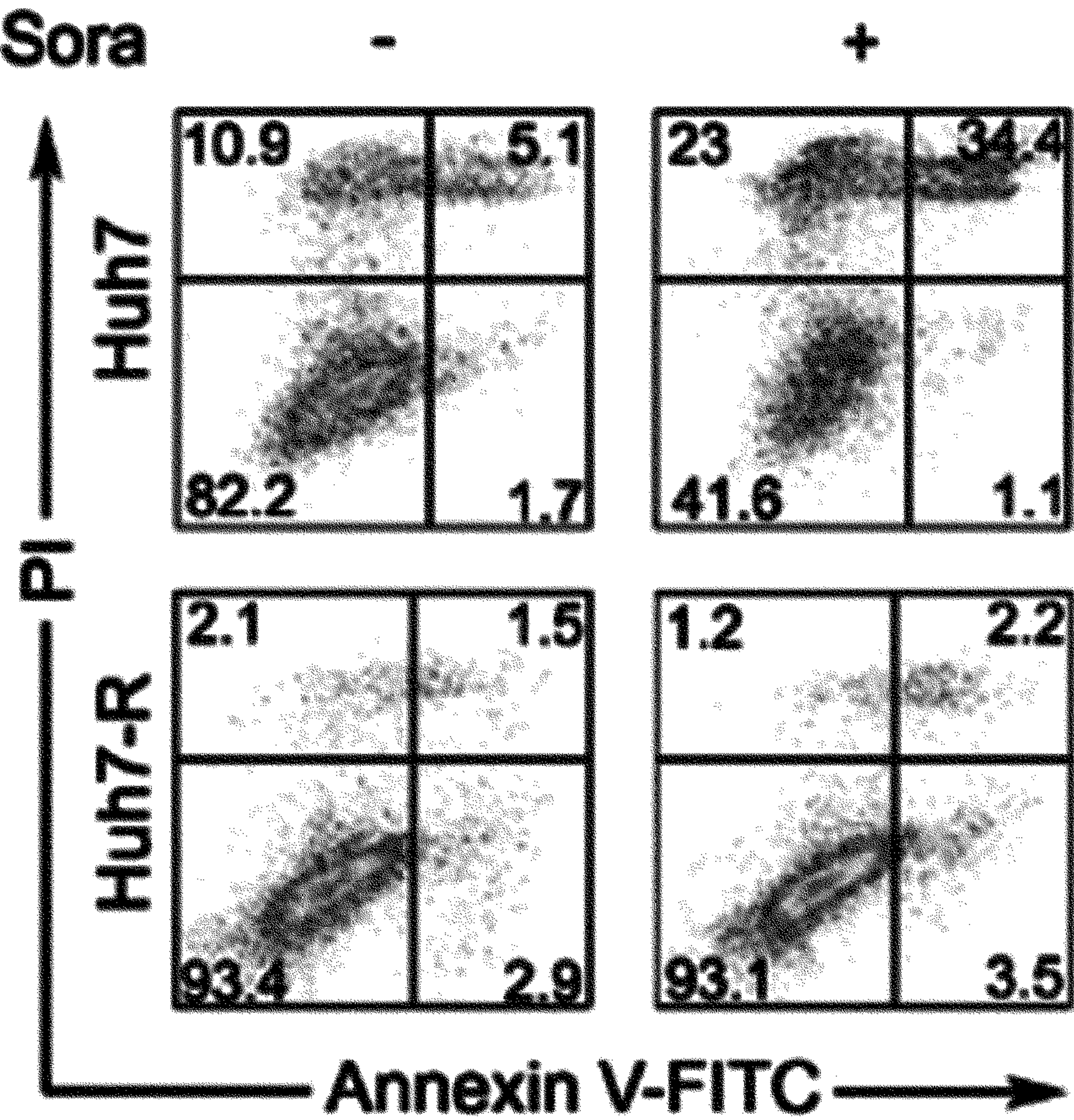
다음의 단계를 포함하는 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법:

- (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하는 단계.
- [청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간 조직, 간 세포, 전혈, 혈장, 혈청 또는 혈액인, 간암 환자의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 25] 다음의 단계를 포함하는 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법:
- (a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 소라페닙 내성 간암이 아닌 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 상기 단계 (b)에서 측정된 $ERR\gamma$ 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 단계 (a)의 간암 환자를 소라페닙 내성 간암 환자로 판단하고 소라페닙 이외의 다른 간암 치료제를 적용하는 단계.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간 조직, 간 세포, 전혈, 혈장, 혈청 또는 혈액인, 소라페닙 내성 간암의 진단 및 치료방법.
- [청구항 27] 소라페닙(Sorafenib) 내성 간암의 예방용 또는 치료 증진에 사용하기 위한 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제.
- [청구항 28] 제27항에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 단백질의 활성을 억제하는 제제는 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제(Inverse agonist) 또는 길항제(antagonist), 또는 $ERR\gamma$ 에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 제제.
- [청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 $ERR\gamma$ 에 대한 역작용제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 것을 특징으로 하는, 제제.
- [화학식 1]

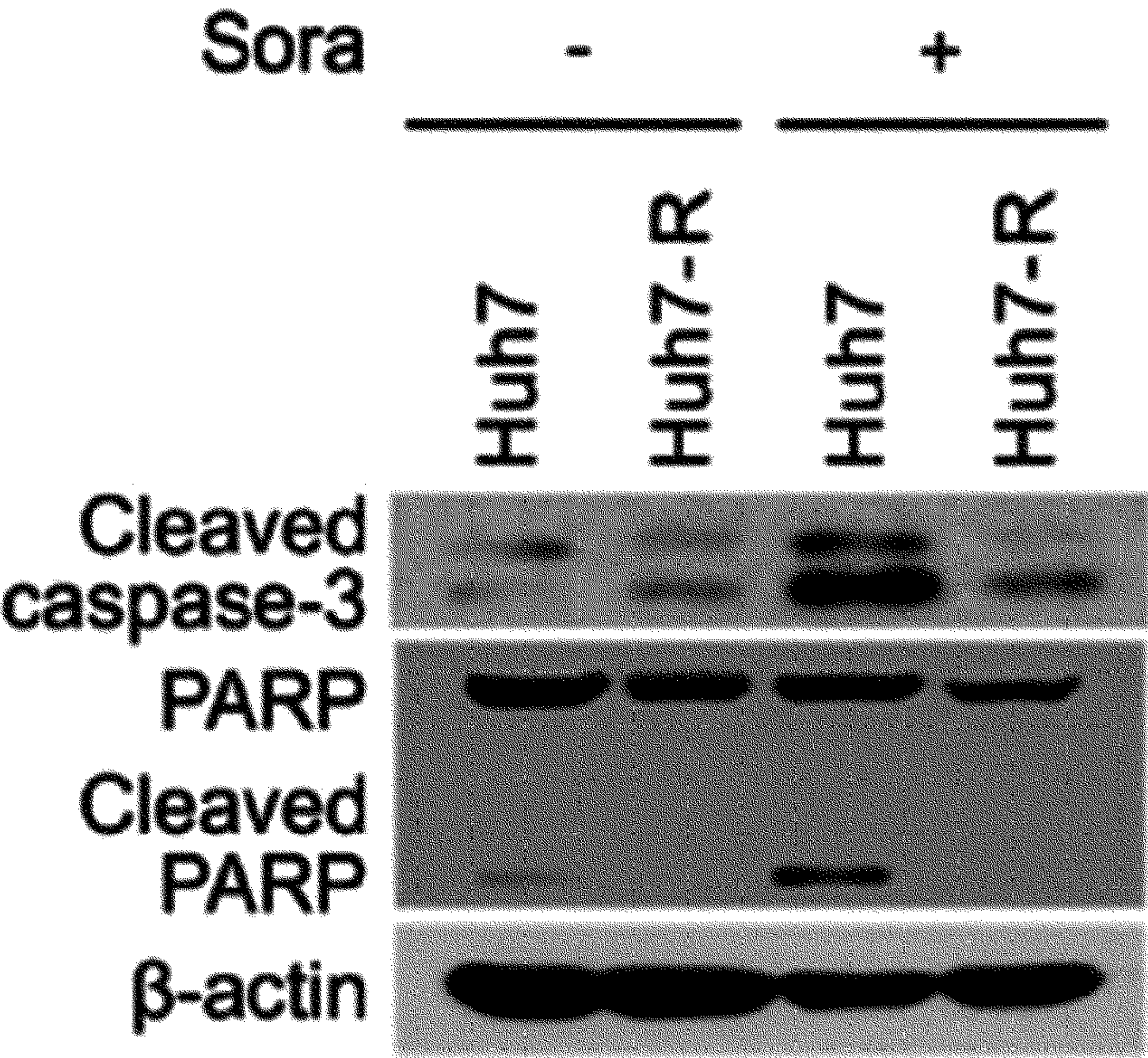


- [청구항 30] 제27항에 있어서,
상기 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제하는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 제제.
- [청구항 31] 제27항에 있어서,
상기 제제는 간암의 소라페닙에 대한 약물 감수성(susceptibility)을 증진시키거나, 또는 소라페닙의 간암에 대한 항암 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는, 제제.
- [청구항 32] 제27항에 있어서,
상기 조성물은 소라페닙과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 제제.
- [청구항 33] 간암의 소라페닙 내성 억제에 사용하기 위한 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성화 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제.
- [청구항 34] 간암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 $ERR\gamma$ (Estrogen-related receptor γ) 단백질의 활성화 또는 $ERR\gamma$ 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제; 및 소라페닙을 포함하는 조성물.

[도1a]



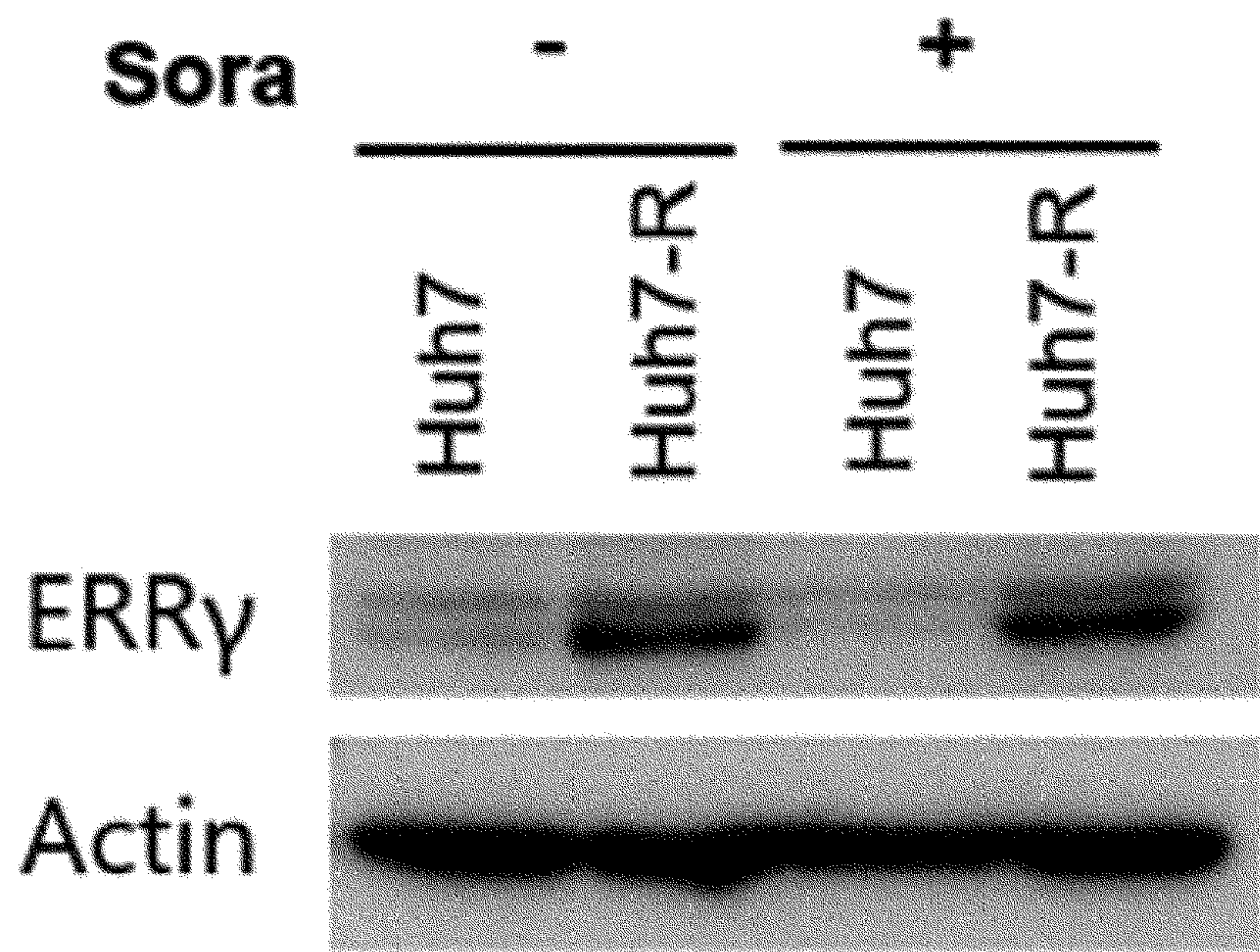
[도1b]



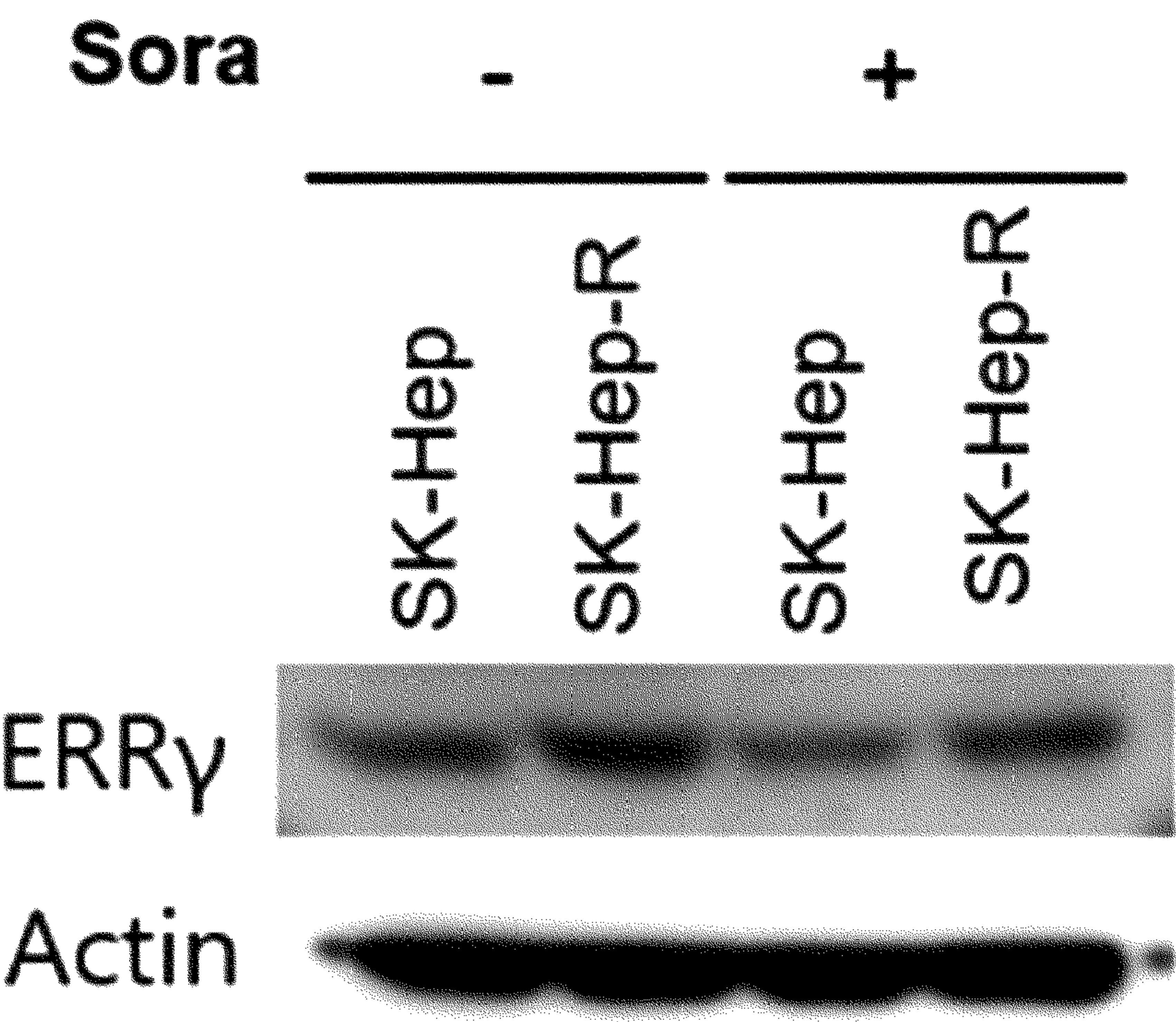
[도1c]



[도2a]

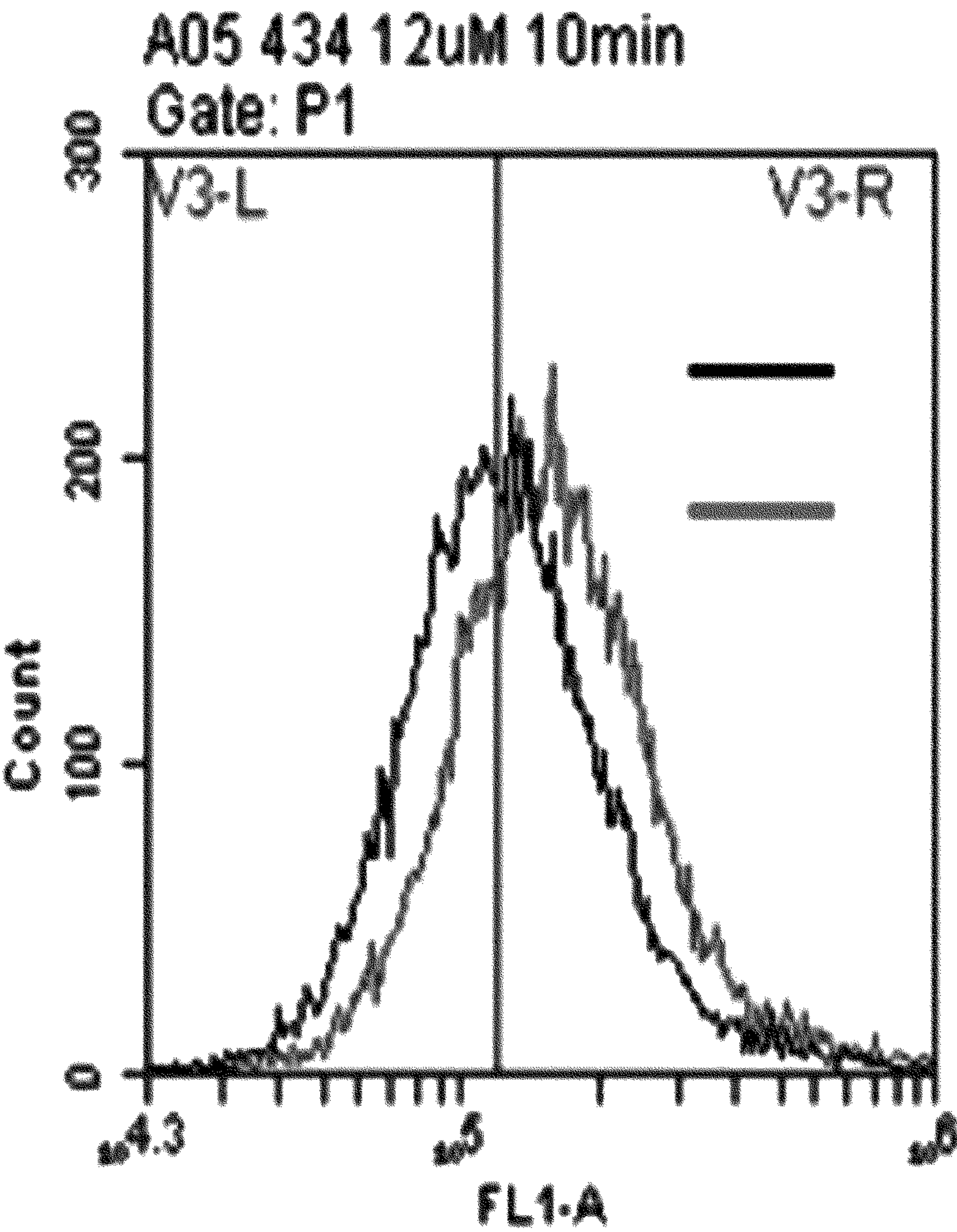


[도2b]

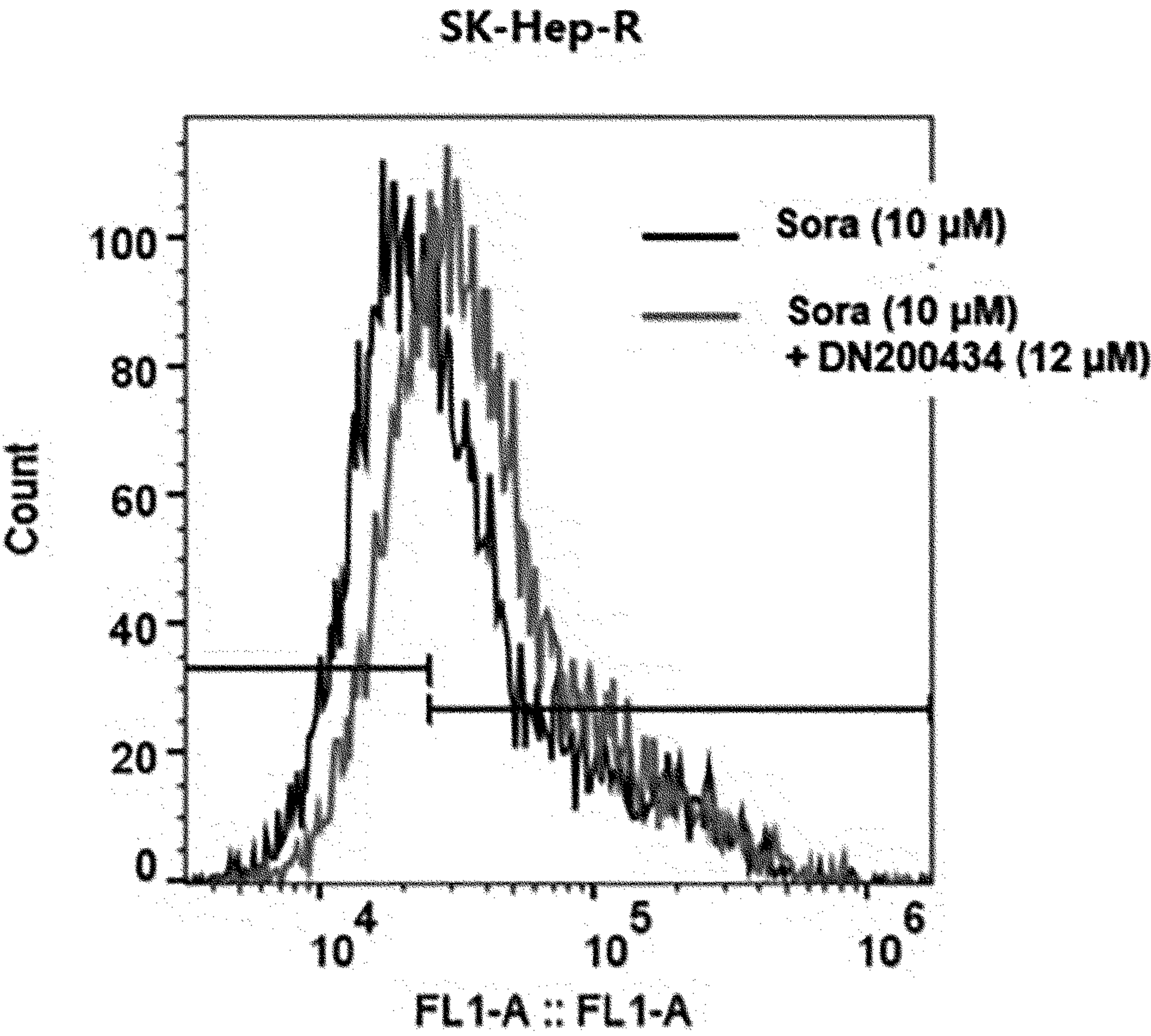


[도3a]

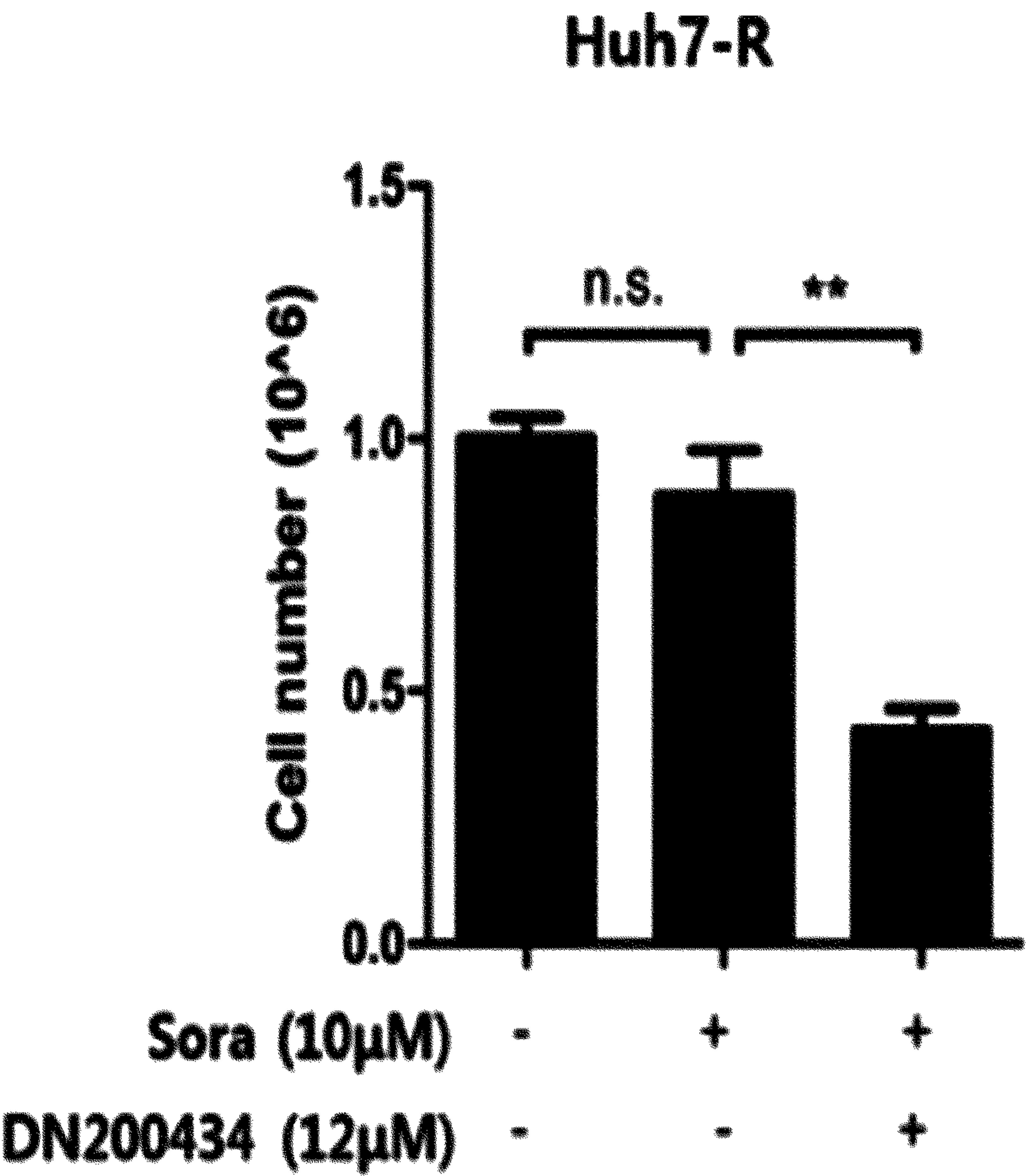
Huh7-R



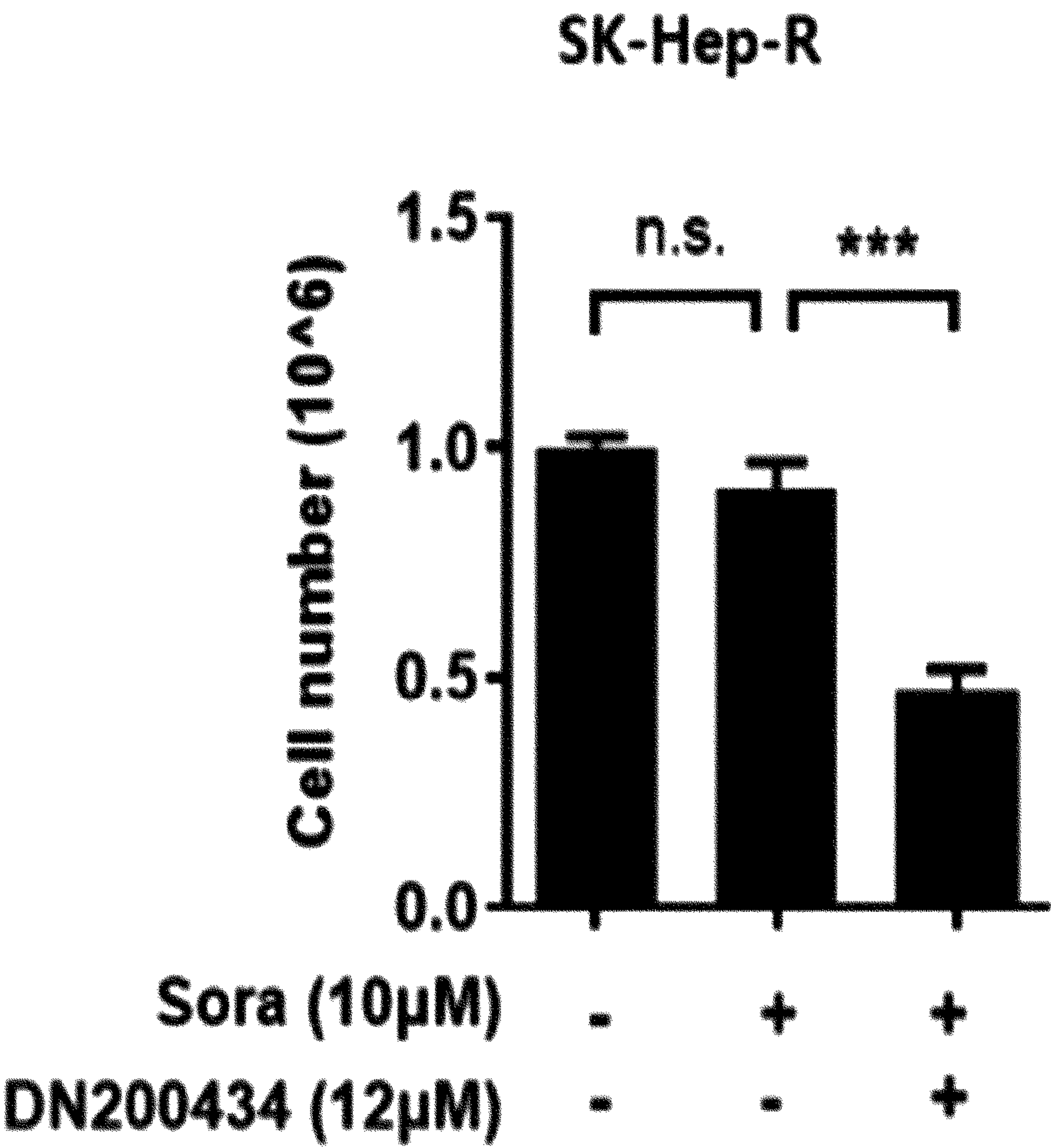
[도3b]



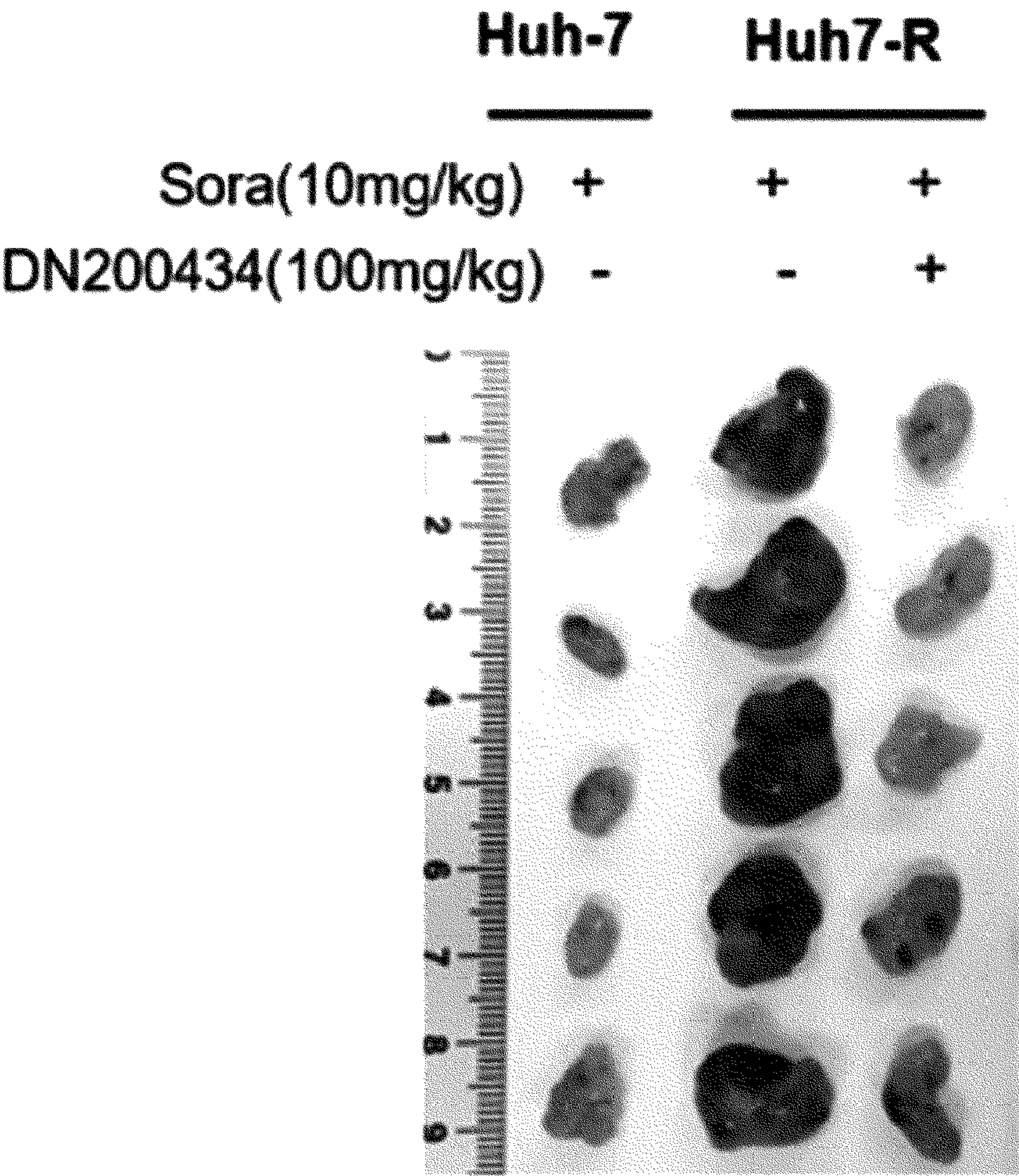
[도4a]



[도4b]

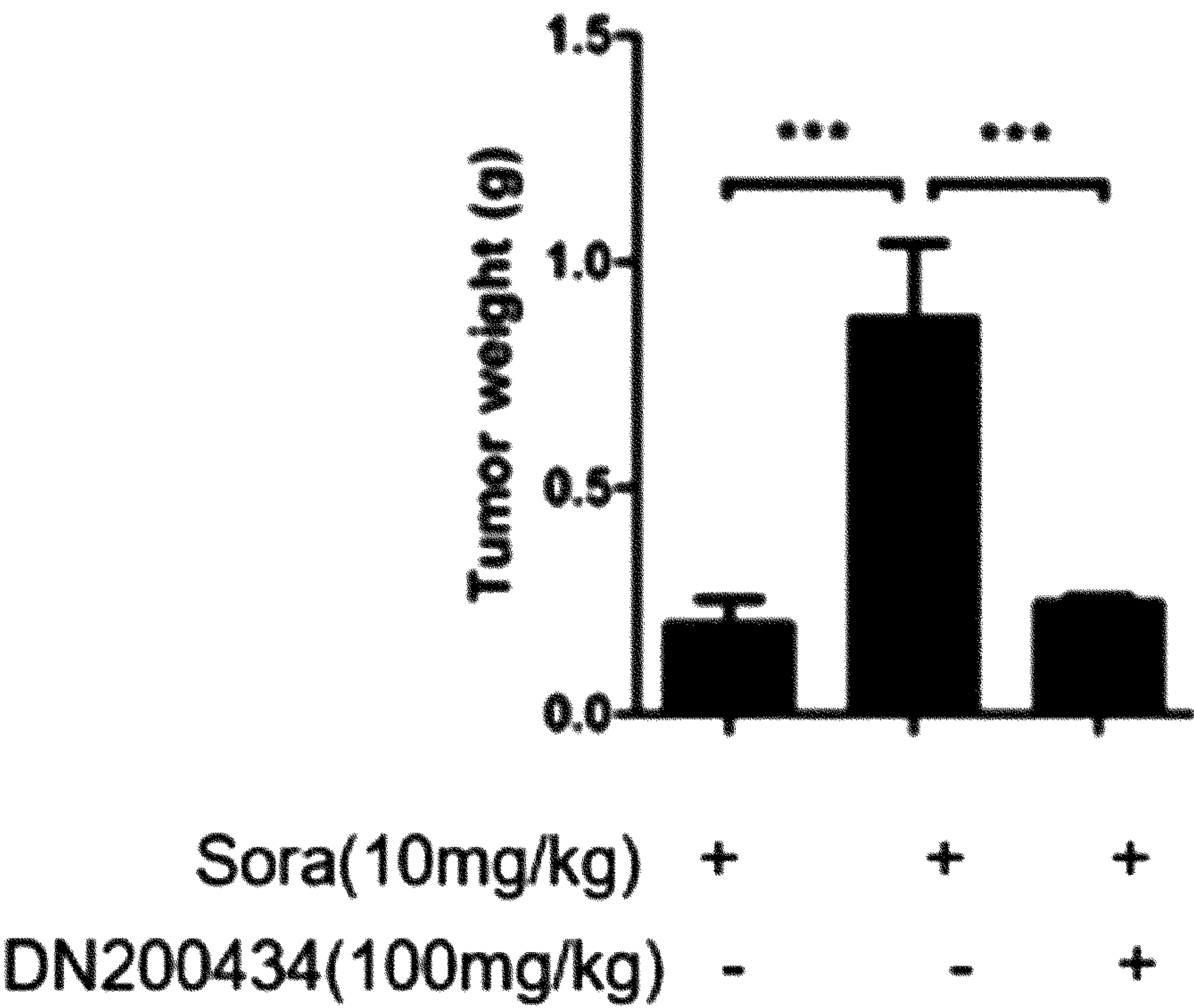


[도5a]

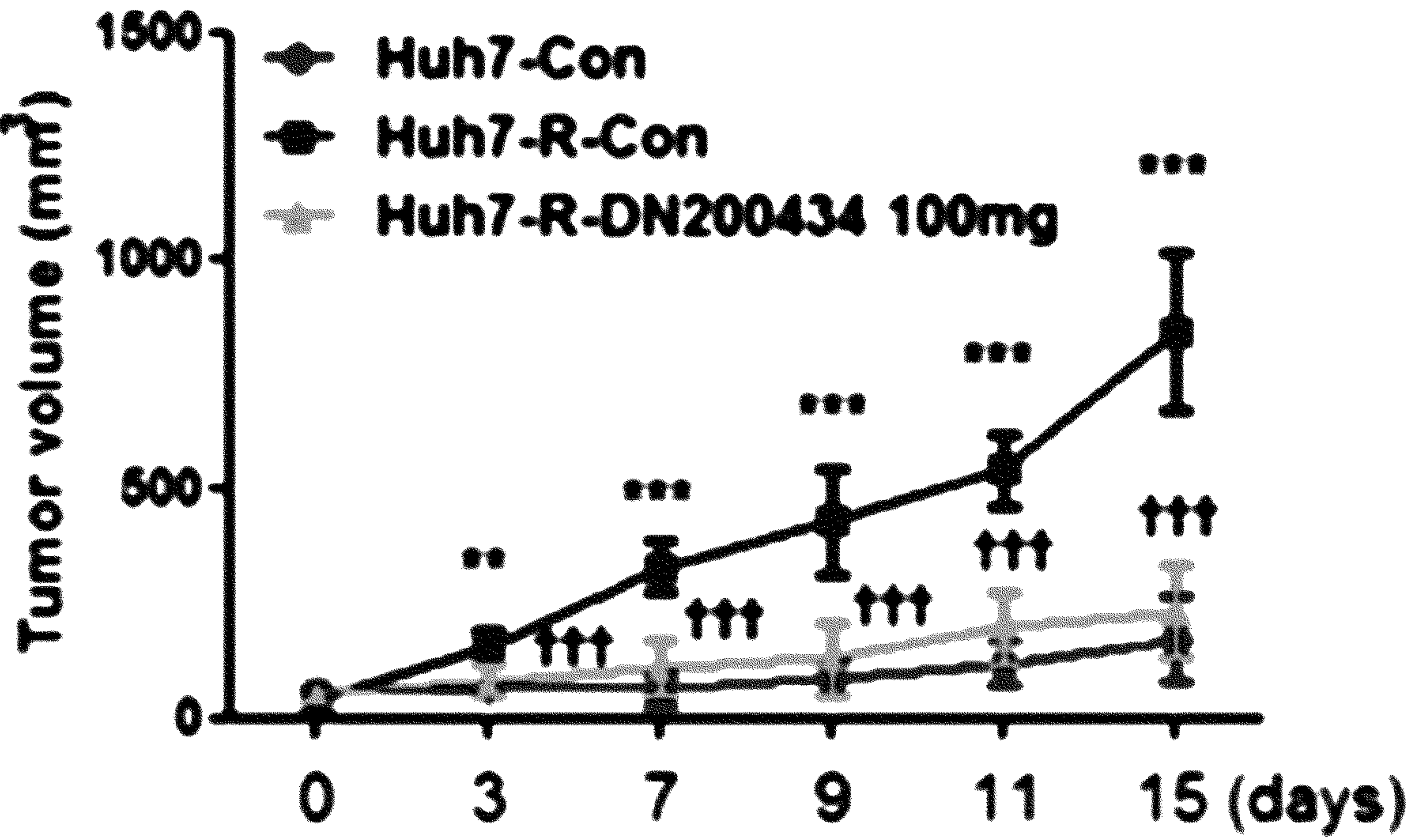


[도5b]

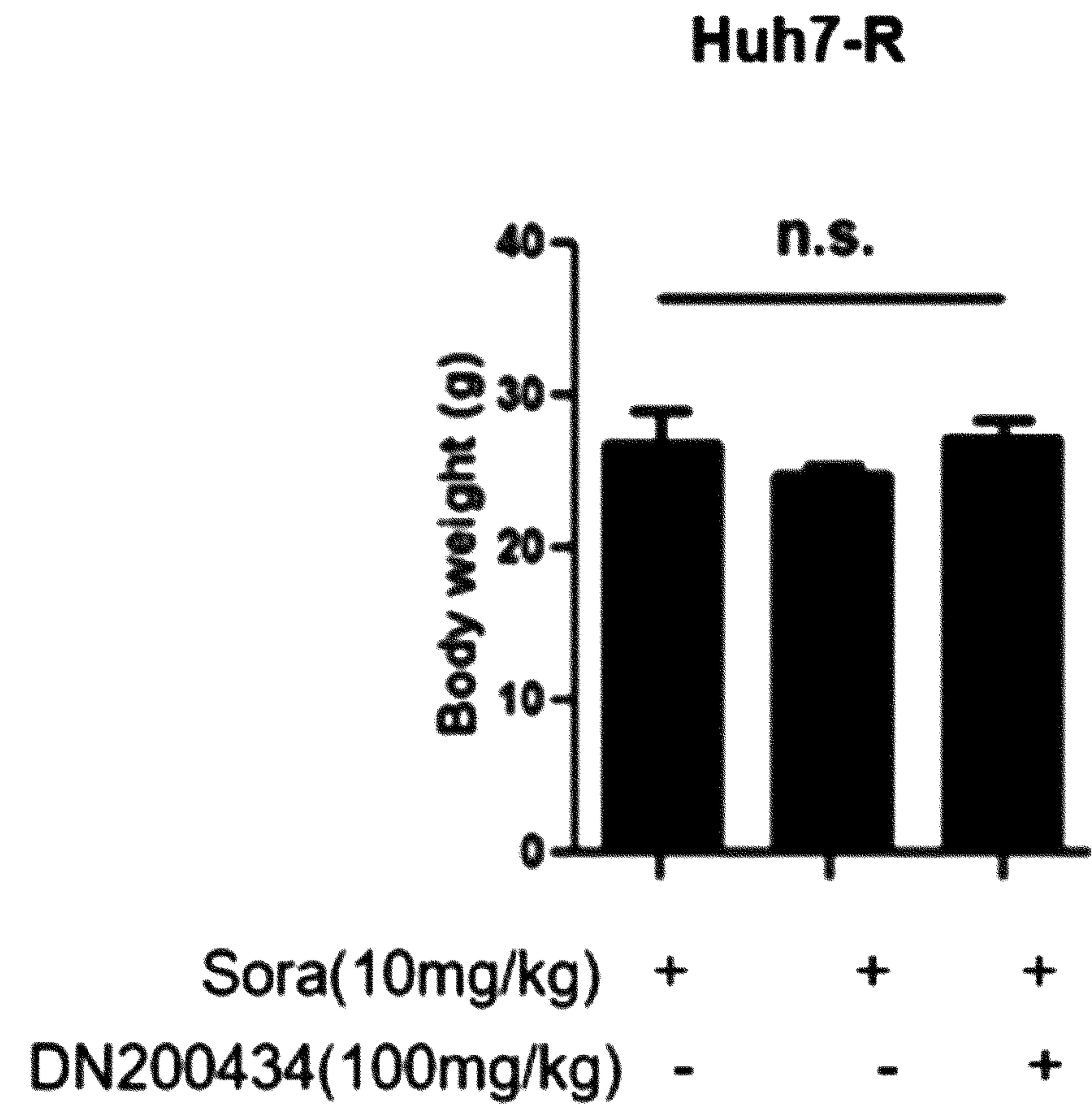
Huh7-R



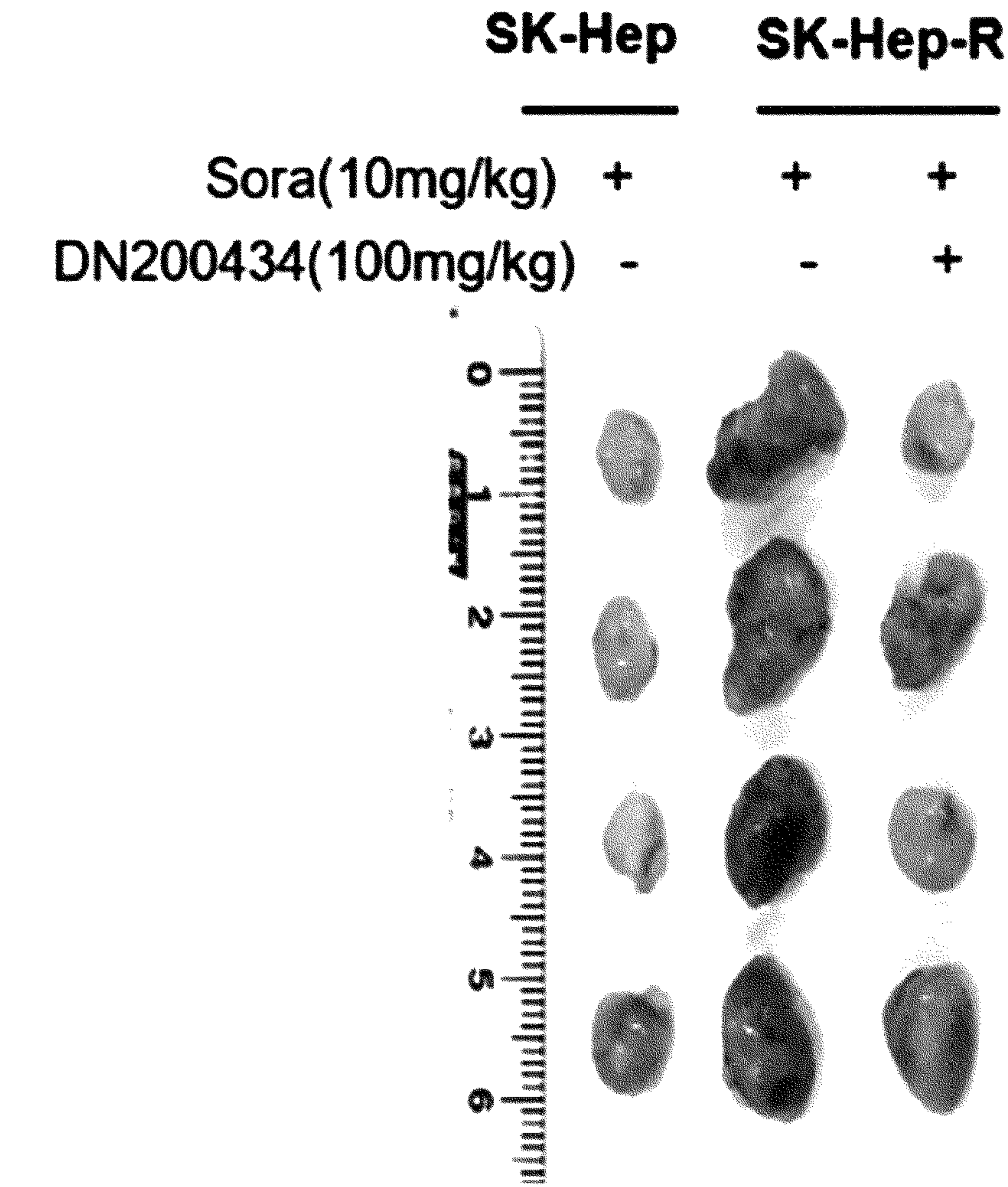
[도5c]



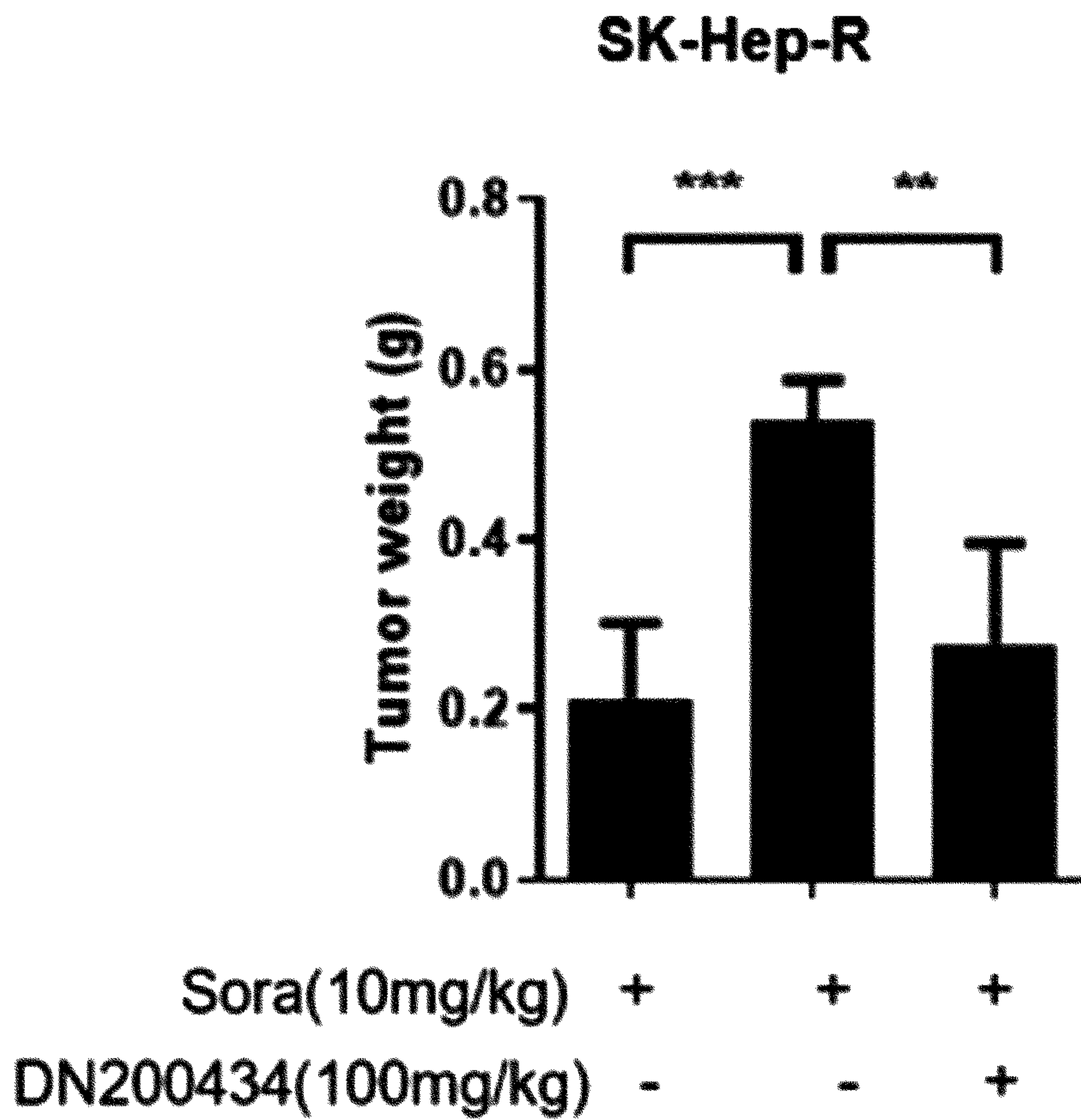
[도5d]



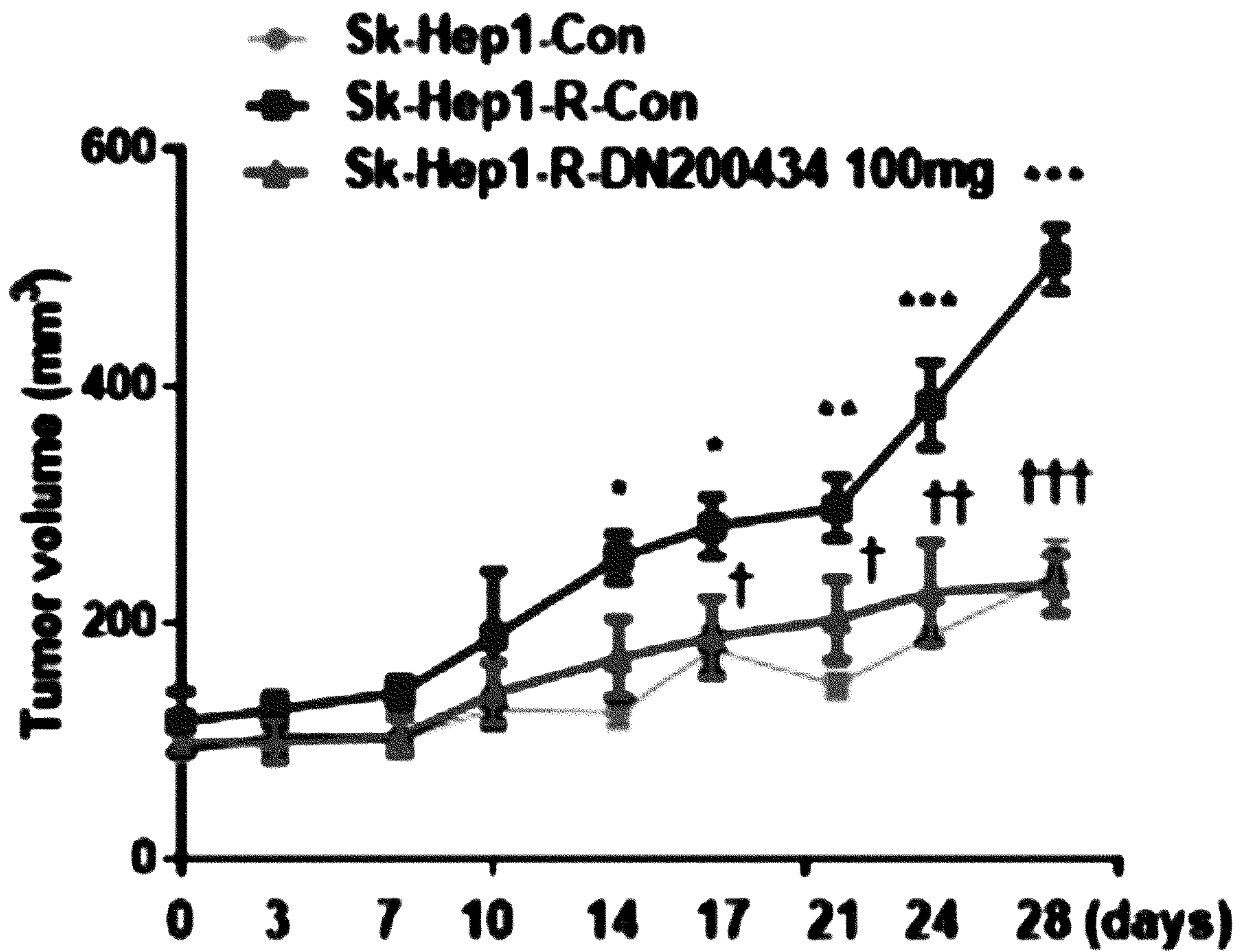
[도6a]



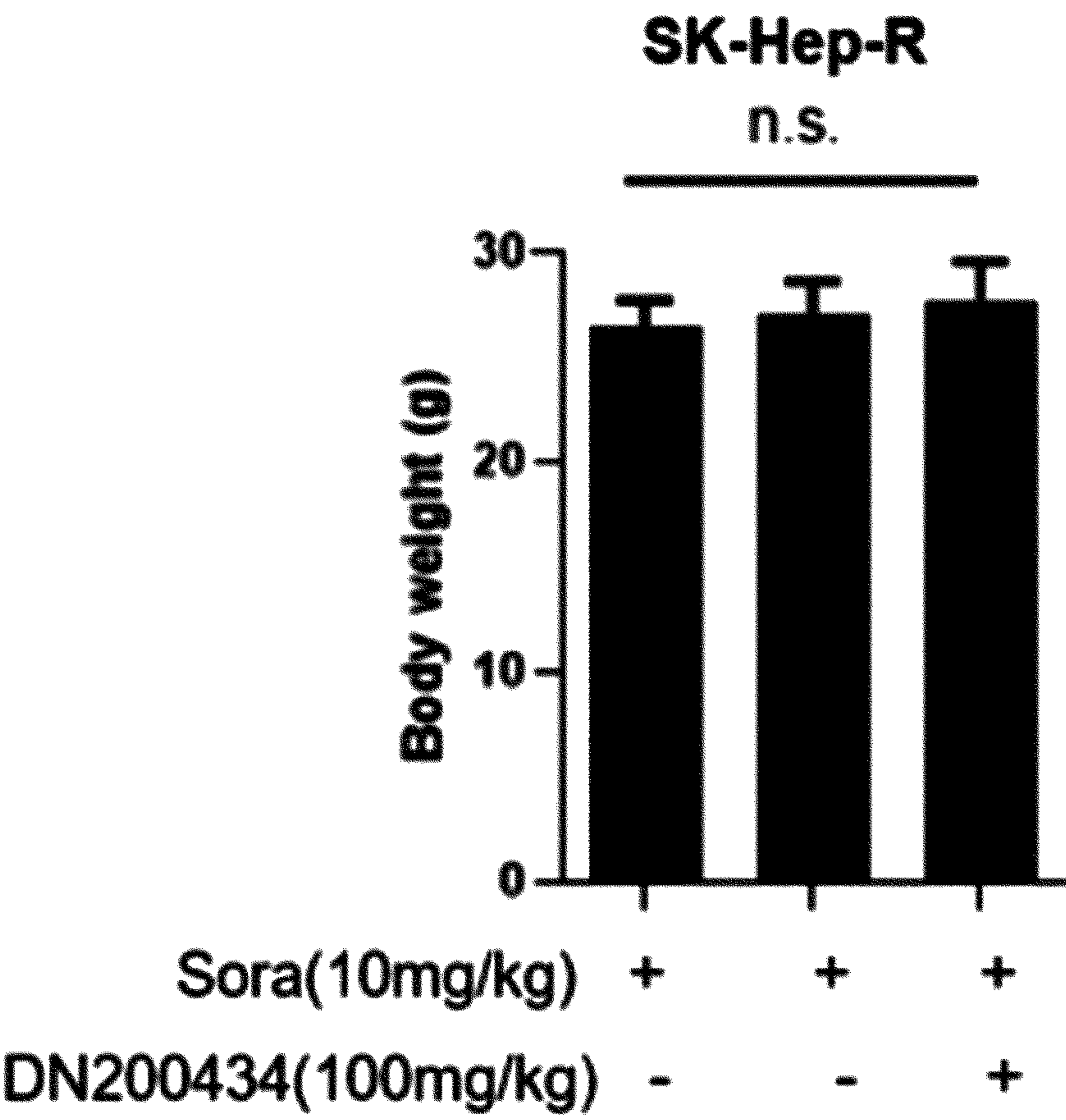
[도6b]



[도6c]



[도6d]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/495(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 31/4412(2006.01)i; A61P 35/00(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 31/495(2006.01); A61K 31/18(2006.01); A61K 31/215(2006.01); A61K 31/44(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/53(2006.01)

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: ERRγ(estrogen-related receptor γ), 소라페닙(sorafenib), 역작용제(inverse agonist), 약물 감수성(susceptability), 간암 (hepatocellular carcionma), 내성(resistance)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, Ji-Hyun et al. Estrogen-related receptor γ is upregulated in liver cancer and its inhibition suppresses liver cancer cell proliferation via induction of p21 and p27. Experimental & Molecular Medicine. 2016, vol. 48, article no. e213, inner pp. 1-7. See abstract; and inner pages 1-7.	1-14,23,24,27-34
A	KR 10-2016-0043419 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 21 April 2016 (2016-04-21) See abstract; and claims 1-12.	1-14,23,24,27-34
A	SINGH, Thoudam Debraj et al. A novel orally active inverse agonist of estrogen-related receptor gamma (ERRγ), DN200434, a booster of NIS in anaplastic thyroid cancer. Clinical Cancer Research. 22 April 2019 (online publication date), vol. 25, no. 16, pp. 5069-5081. See abstract; and pages 5069-5081.	1-14,23,24,27-34
A	KR 10-2017-0079128 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 10 July 2017 (2017-07-10) See abstract; and claims 1-7.	1-14,23,24,27-34

☒ 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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

15 March 2021

Date of mailing of the international search report

15 March 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016976

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0042370 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 24 April 2019 (2019-04-24) See abstract; and claims 1-10.	1-14,23,24,27-34

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.: **15-22,25,26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15-22, 25 and 26 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/016976

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2016-0043419	A	21 April 2016	KR	10-1704533	B1	09 February 2017
KR	10-2017-0079128	A	10 July 2017	KR	10-1901001	B1	20 September 2018
KR	10-2019-0042370	A	24 April 2019	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/495(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 31/4412(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/495(2006.01); A61K 31/18(2006.01); A61K 31/215(2006.01); A61K 31/44(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/53(2006.01) 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: ERR γ (estrogen-related receptor γ), 소라페닙(sorafenib), 역작용제(inverse agonist), 약물 감수성(susceptability), 간암 (hepatocellular carcionma), 내성(resistance)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, JI-HYUN 등, 'Estrogen-related receptor γ is upregulated in liver cancer and its inhibition suppresses liver cancer cell proliferation via induction of p21 and p27', Experimental & Molecular Medicine, 2016년, 48권, 아티클 e213호, 내부페이지 1-7 요약; 및 내부페이지 1-7	1-14,23,24,27-34
A	KR 10-2016-0043419 A (경북대학교병원) 2016.04.21 요약; 및 청구항 1-12	1-14,23,24,27-34
A	SINGH, THOUDAM DEBRAJ 등, 'A novel orally active inverse agonist of estrogen-related receptor gamma (ERR γ), DN200434, a booster of NIS in anaplastic thyroid cancer', Clinical Cancer Research, 22 April 2019 (온라인 게재일), 25권, 16호, 페이지 5069-5081 요약; 및 페이지 5069-5081	1-14,23,24,27-34
A	KR 10-2017-0079128 A (경북대학교 산학협력단 등) 2017.07.10 요약; 및 청구항 1-7	1-14,23,24,27-34
A	KR 10-2019-0042370 A (한국과학기술원 등) 2019.04.24 요약; 및 청구항 1-10	1-14,23,24,27-34
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년03월15일(15.03.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년03월15일(15.03.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0043419 A	2016/04/21	KR 10-1704533 B1	2017/02/09
KR 10-2017-0079128 A	2017/07/10	KR 10-1901001 B1	2018/09/20
KR 10-2019-0042370 A	2019/04/24	없음	

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: **15-22,25,26**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 15-22, 25 및 26은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.