



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0115894
(43) 공개일자 2017년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57426 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0043691

(22) 출원일자 2016년04월08일

심사청구일자 2016년04월08일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

가톨릭대학교 산학협력단

서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균
관대학교내)

(72) 발명자

김동욱

서울특별시 영등포구 여의동로 213, A동 2301호
(여의도동, 여의도금호리첸시아)

김수현

서울특별시 구로구 경인로 382, 121동 2101호 (개
봉동, 한마을아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 정안

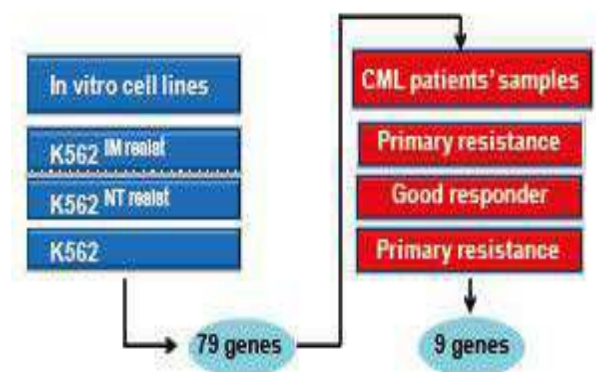
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 만성골수성백혈병에 관한 정보 제공 방법

(57) 요약

본 발명은 GCA(Granulocytin)를 이용한 만성골수성백혈병에 관한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 만성골수성백혈병 초기단계에서 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성, 저항성에 따른 초기 병기진행에 대한 예측, 약물저항성과 병기진행에 대한 분자적 기작 등과 같은 다양한 정보를 동시에 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 기존의 단순한 BCR-ABL1 유전자 측정에 의해 예측되지 못했던 환자들의 새로운 측정법을 제시함으로써 만성골수성백혈병 초기 약제내성, 병기진행, 분자적기작 등 다양한 예측 및 진단이 가능할 것이라 기대된다. 또한, 본 발명의 GCA mRNA 특이적인 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCA의 발현을 억제할 경우, 초기 약제 내성을 가진 만성골수성백혈병 환자가 병기진행을 하지 못하도록 막음으로써, 현재 만성골수성백혈병 치료에 문제가 되고 있는 약제내성 극복에 획기적인 역할을 할 것이라 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

김홍태

경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 1204호
 (평촌동, 꿈마을건영아파트)

한승훈

경기도 수원시 장안구 하륜로30번길 51-10, 203호
 (천천동, 한빌)

정희진

경기도 용인시 기흥구 흥덕2로 46, 405동 1304호
 (영덕동, 휴먼시아 흥덕마을4단지)

이주용

대전광역시 유성구 어은로 57, 102동 905호 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013M3A9B8031236
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업 연구소제지원사업
연구과제명	한국백혈병은행
기 여 율	1/3
주관기관	가톨릭대학교
연구기간	2013.04.01 ~ 2018.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	IBS-R015-D1
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	기초과학연구원
연구사업명	IBS 연구단 사업
연구과제명	뇌과학 이미징 연구단
기 여 율	1/3
주관기관	성균관대학교
연구기간	2013.07.07 ~ 2021.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	NRF-2012M3A9C6050087
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	세포재생기술개발사업
연구과제명	중간엽줄기세포를이용한 심혈관계 및 근골격계 질병의 세포치료최적화를 위한 대사제어연
기 여 율	1/3
주관기관	성균관대학교
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.09.30

구

명세서

청구범위

청구항 1

환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GCA(Grancalcin)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 만성골수성 백혈병의 초기로의 진행에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 초기로의 진행에 관한 정보를 제공하는 방법은 GCA의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가하였을 때 초기로의 진행을 진단하는, 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 초기로의 진행에 관한 정보를 제공하는 방법은 정상 대조군과 비교하여 NF- κ B의 활성이 GCA 발현과 연관성 있게 증가하였을 때 초기로의 진행을 진단하는, 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 머리카락 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 GCA의 발현 수준을 측정하는 방법은 바람직하게는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzymelinked immunosorbent assay), 샌드위치 분석법(sandwich assay), 실시간-중합효소 연쇄반응(real-time PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR) 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 6

GCA 단백질에 특이적인 결합분자, 또는 GCA에 대한 상보적인 프로브(probe) 세트 또는 GCA에 대한 상보적인 프라이머(primer) 세트를 포함하는, 만성골수성백혈병의 초기 진행 진단용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 결합분자는 항체(antibody), 압타머(aptamer) 또는 리간드(ligand)인, 진단용 조성물.

청구항 8

제 6항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는, 만성골수성백혈병의 초기 진행 진단용 키트.

청구항 9

환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GCA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 만성골수성백혈병 환자의 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 저항성에 관한 정보를 제공하는 방법은 GCA의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가하였을 때 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성을 가지는 것을 예측하는, 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 저항성에 관한 정보를 제공하는 방법은 정상 대조군과 비교하여 NF- κ B의 활성이 GCA 발현과 연관성 있게 증가하였을 때 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성을 가지는 것을 예측하는, 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서,

상기 타이로신 카이네이즈 억제제는 이마티닙(imatinib) 및 닐로티닙(nilotinib)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 13

제 9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 머리카락 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 14

제 9항에 있어서,

상기 GCA의 발현 수준을 측정하는 방법은 바람직하게는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzymelinked immunosorbentassay), 샌드위치 분석법(sandwich assay), 실시간-중합효소 연쇄반응(real-time PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR) 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 15

GCA 단백질에 특이적인 결합분자, 또는 GCA에 대한 상보적인 프로브(probe) 세트 또는 GCA에 대한 상보적인 프라이머(primer) 세트를 포함하는, 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성 진단용 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 결합분자는 항체, 압타머 또는 리간드인, 진단용 조성물.

청구항 17

제 15항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는, 만성골수성백혈병의 초기 진행 진단용 키트.

청구항 18

GCA의 mRNA에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 내성을 가지는 환자를 대상으로 하는 만성골수성백혈병 치료용 약학 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드는 siRNA(silencing RNA), miRNA(miRNA) 또는 shRNA(shorthairpinRNA)인, 약학 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 3 내지 6의 염기서열 중 하나 이상을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 약학 조성물은 GCA 단백질의 발현을 억제하여 만성골수성백혈병의 약제 내성을 극복하는, 약학 조성물.

청구항 22

제 20항에 있어서,

상기 약학 조성물은 과발현된 GCA 단백질의 발현을 억제하여 초기 만성골수성백혈병의 병기진행을 억제하는, 약학 조성물.

청구항 23

GCA의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는, 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 내성을 가지는 환자를 대상으로 하는 만성골수성백혈병 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 만성골수성백혈병에 관한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 백혈병(leukemia)은 백혈구가 종양성으로 증식하는 질환을 총칭한다. 백혈병의 종류는 백혈병이 기원하는 백혈구에 따라 골수성 백혈병과 림프성 백혈병으로 나눌 수 있고, 진행속도에 따라 급성백혈병과 만성백혈병으로 나뉜다. 백혈병의 임상학적 양상은 질환의 유형과 침범한 세포의 성질에 따라 다양하다. 림프성 백혈병은 림프계 혈액세포, 골수성 백혈병은 골수계 혈액세포, 그리고 만성골수성백혈병은 변이가 생긴 조혈모세포(pluripotent hematopoietic stem cell)의 악성 클론들에 의해서 발생한다.

[0003] 특히, 만성골수성백혈병(Chronic myeloid leukemia; CML)은 조혈모세포가 골수 내에서 대량 증식하여 비정상적으로 증가한 각종 혈구 세포가 말초 혈액이나 기타 장기를 침습하는 악성 혈액 질환으로 성인에서 주로 발병하는 악성 혈액암이다. 만성골수성백혈병의 진단을 위한 가장 일반적인 방법은 염색체 검사를 통해서 필라델피아 염색체를 발견하는 것으로, 실제 만성골수성백혈병환자의 95% 정도에서 9번 염색체와 22번 염색체 사이의 전좌가 발견되며, 전기 전좌는 9번 염색체의 q34 위치에 존재하는 abl(abelson oncogene) 유전자 일부가 22번 염색체 q11.2 위치에 존재하는 bcr(break point cluster region) 유전자로 전위되어 형성되는데, 이러한 재배열을 BCR-ABL1 재배열(BCR-ABL1 rearrangement)이라고 한다(국내출원특허 10-2012-002466). 이로 인하여 BCR-ABL1의 재배열 됨을 확인하여 만성골수성백혈병을 진단하고 예후를 예측하고자 하는 많은 연구들이 활발히 일어나고 있다. 그러나 BCR-ABL1 유전자에서 돌연변이가 발생하지 않은 백혈병들이 빈번히 발생하고 있으며, 특별히 만성골수성백혈병에서 급성백혈병(Acute myeloid leukemia; AML 및 Acute lymphoid leukemia; ALL)으로 전환되는 기작 및 이를 위한 진단 방법들에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

[0004] 또한, 과거에는 만성골수성백혈병의 일차 치료법이 골수이식이라 불리는 조혈모세포이식이었지만 최근에는 각종 타이로신 카이네이즈 억제제(tyrosine kinase inhibitor; TKI)를 이용하여 BCR-ABL1 암 단백질을 억제하는 방법이 일반적인 치료 방법으로 사용된다. 그러나 일부 환자들은 처음부터 또는 치료 과정 중에 이에 대한 저항성을 가지게 된다. 이는 BCR-ABL1 카이네이즈 영역(domain)에 발생한 돌연변이가 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 일부 환자들에게는 이에 대한 돌연변이가 관찰되지 않으며, 여전히 저항성을 가지는 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

[0005] 이와 같이, BCR-ABL1과는 독립적인 만성골수성백혈병의 진단, 진행, 약제 내성 및 예후를 예측할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, GCA(Granulocytin)를 이용한 만성 골수성백혈병의 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 내성진단, 병기진행가능성 예측, 병기진행과정에서의 구체적 역할과 같은 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0009] 본 명세서에 있어서 "생물학적 시료(biological sample)"란, 체내의 GCA 유전자의 발현 정도를 확인할 수 있는 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 머리카락, 소변 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 혈액, 골수세포 등 일 수 있으나, GCA 단백질, GCA mRNA 등 GCA 유전자의 발현을 측정할 수 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.
- [0010] 본 명세서에 있어서 "발현 수준(expression level) 측정"이란, 만성골수성백혈병의 정보를 확인하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자로부터 코딩(coding)된 mRNA 또는 단백질의 존재 여부 및/또는 발현량을 확인하는 과정으로 마커 유전자의 mRNA에 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브 세트를 이용하여 mRNA의 양을 측정하거나, 마커 유전자의 단백질에 특이적으로 결합하는 결합분자를 이용하여 단백질의 양을 확인함으로써 측정할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(Rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석 (immunoprecipitation assay), 보체고정분석(complete fixation assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 마커 유전자의 mRNA 또는 마커 유전자의 단백질을 확인할 수 있는 방법이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0011] 본 명세서에 있어서 "항체"란, 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 GCA 유전자로부터 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 보다 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 본 발명에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0012] 본 명세서에 있어서 "키트(kit)"란, GCA 유전자의 발현 여부를 확인 및/또는 측정하여 만성골수성백혈병에 관한 정보를 확인할 수 있는 검진용 기기를 의미하며, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GCA의 발현 여부를 확인할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 바람직하게는 GCA mRNA에 특이적이며 상보적인 서열을 가지는 프로브

(probe) 또는 프라이머(primer) 세트를 포함할 수 있으며, 또는 GCA 단백질에 특이적으로 결합하는 항체(antibody), 압타머(aptamer), 리간드(ligand) 등을 포함하는 형태일 수 있으나, GCA 유전자의 발현 여부를 확인 및/또는 측정할 수 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.

- [0013] 본 명세서에 있어서 "정보를 제공하는 방법"이란, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GCA의 발현 수준을 측정하여 만성골수성백혈병에 관한 정보를 제공하는 방법으로서, 바람직하게는 만성골수성백혈병에서 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성, GCA 발현과 급성기로의 병기진행에 대한 연관성, 그에 따른 분자적 기작 등의 만성골수성백혈병에 관한 정보를 제공하는 방법이나, GCA 유전자의 발현 정도를 측정하여 확인될 수 있는 정보라면 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GCA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 만성골수성백혈병의 초기로의 진행에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 만성골수성백혈병의 초기로의 진행에 관한 정보를 제공하는 방법은 GCA의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가하였을 때 초기로 진행되었음을 진단하는데 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 만성골수성백혈병의 초기로의 진행에 관한 정보를 제공하는 방법은 정상 대조군과 비교하여 NF- κ B의 활성이 GCA 발현과 연관성 있게 증가하였을 때 초기로 진행되었음을 진단하는데 사용될 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 GCA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 만성골수성백혈병 환자의 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 저항성에 관한 정보를 제공하는 방법은 GCA의 발현이 정상 대조군과 비교하여 증가하였을 때 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성을 가지는 것을 예측하는데 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 저항성에 관한 정보를 제공하는 방법은 정상 대조군과 비교하여 NF- κ B의 활성이 GCA 발현과 연관성 있게 증가하였을 때 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성을 가지는 것을 예측하는데 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 타이로신 카이네이즈 억제제는 이마티닙(imatinib) 및 닐로티닙(nilotinib) 등, 타이로신 카이네이즈의 활성을 억제하여 만성골수성백혈병의 치료제로 사용되는 약물일 수 있으나, 만성골수성백혈병의 치료에 사용되는 치료제라면 면역요법, 조혈모세포이식 등 어떠한 치료 방법이라도 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 생물학적 시료는 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 머리카락, 소변 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 혈액, 골수세포 등 일 수 있으나, GCA 단백질, GCA RNA 등 GCA의 발현을 측정할 수 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 GCA의 발현 수준을 측정하는 방법은 바람직하게는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzymelinked immunosorbent assay), 샌드위치 분석법(sandwich assay), 실시간-중합효소 연쇄반응(real-time PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 웨스턴 블롯팅(western blotting) 등 일 수 있으나 GCA 단백질, GCA RNA 등 GCA의 발현을 측정할 수 있는 방법이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또한, 본 발명은 GCA 단백질에 특이적인 결합분자, 또는 GCA에 대한 상보적인 프로브(probe) 세트 또는 GCA에 대한 상보적인 프라이머(primer) 세트를 포함하는, 만성골수성백혈병의 초기 진행 진단용 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는 만성골수성백혈병의 초기 진행 진단용 키트를 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 GCA 단백질에 특이적인 결합분자, 또는 GCA에 대한 상보적인 프로브 세트 또는 GCA에 대한 상보적인 프라이머 세트를 포함하는, 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성 진단용 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성 진단용 조성물 키트를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 결합분자는 바람직하게는 항체, 압타머, 리간드 등일 수 있으며, GCA 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명은 GCA의 mRNA에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 내성을 가지는 환자를 대상으로 하는 만성골수성백혈병 치료용 약학 조성물을

제공한다.

- [0029] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 siRNA(silencing RNA), miRNA(miRNA), shRNA(short hairpin RNA) 등 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 3 내지 6의 염기서열 중 하나 이상을 포함하는 siRNA일 수 있으나, GCA의 mRNA에 결합하여 단백질의 과발현을 막는 것을 의미하며, 광범위하게는 GCA 단백질의 기능을 억제하여 만성골수성백혈병의 억제 내성, 병기진행을 극복하는 모든 치료방법을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학 조성물은 GCA 단백질의 발현을 억제하여 만성골수성백혈병의 억제 내성을 극복하는데 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학 조성물은 과발현된 GCA 단백질의 발현을 억제하여 초기 만성골수성백혈병의 병기진행을 억제하는데 사용될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 GCA의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 내성을 가지는 환자를 대상으로 하는 만성골수성백혈병 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 있어서 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료의 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0034] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 투여가 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정직, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명에 따른, GCA를 이용한 만성골수성백혈병에 관한 정보제공 방법은 만성골수성백혈병 초기 단계에서의 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성에 대한 예측 가능, 저항성에 따른 초기 병기진행에 대한 예측 가능, 약물 저항성과 병기진행에 대한 분자적 기작 등과 같은 다양한 정보를 동시에 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 기존의 BCR-ABL1 유전자 발현량 측정에 의하여 예측 및 진단되지 못했던 환자들을 진단하는데 사용될 수 있기 때문에, 만성골수성백혈병의 BCR-ABL1 유전자 독립적인 억제 저항성, 병기진행 예측에 사용될 수 있을 것으로 기

대된다. 또한, 본 발명의 GCA mRNA에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 GCA 단백질 발현을 억제하면, 효과적으로 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성을 억제함으로써, 만성골수성백혈병 초기단계에서의 약제내성을 극복할 수 있고, 궁극적으로 만성골수성백혈병의 치료에 사용할 수 있을 것으로 예상되기에, GCA 단백질 기능을 억제하는 치료법의 개발에 사용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 만성골수성백혈병의 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성과 각종 유전자들의 발현을 세포주와 환자에서 유전자의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 내성 K562 세포주를 만든 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 만성골수성백혈병 환자의 타이로신 카이네이즈 억제제 내성 유무에 따라 발현이 증가하는 유전자 9개를 재확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 도 3의 결과를 만성골수성백혈병의 병기에 따라 발현양상을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 환자에서 GCA mRNA 발현차이를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 만성골수성백혈병 환자에서 BCR-ABL1의 mRNA 발현 양상을 타이로신 카이네이즈 억제제에 내성을 가지는 환자, 가지지 않는 환자에서 확인한 결과를 나타낸 도면이다

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 도 4와 5에서 발견된 유전자 9개 중, 만성골수성백혈병의 약제 내성을 가진 환자에서 발현이 크게 증가된 3개의 유전자를 세포주에 과발현시켜 이매티닙에 대한 감수성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 증가된 세포에서 아매티닙에 대한 감수성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA siRNA가 GCA의 발현을 줄이는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 억제된 세포에서 이매티닙에 대한 감수성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 내부결손 돌연변이 제작을 통해 세포에 과발현시킨 후, 이매티닙에 대한 감수성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 분자적 기전을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 억제된 세포에서 NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 억제된 세포에서 TNF- α 를 처리한 후, NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA siRNA에 저항성을 가지는 플라스미드를 제작한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 도 15에서 제작된 플라스미드를 통해 NF- κ B 활성화가 회복하는 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 증가된 세포에서 NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 증가된 세포에서 TNF- α 를 처리한 후, NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 발현이 억제된 세포에서 TNF- α 를 처리한 후, I κ B α 의 감소를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 GCA 단백질의 내부결손 돌연변이 제작을 통해 세포에 과발현시킨 후, NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 실시예에 따른 만성골수성백혈병 억제내성 유무 환자에서, NF- κ B 활성의 지표로 알려진 TNF- α 의 mRNA의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 실시예에 따른 만성골수성백혈병 억제내성 유무 환자에서, NF- κ B 활성의 지표로 알려진 IL-8의 mRNA의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 실시예에 따른 NF- κ B를 활성화시키는 IKK complex 단백질들과 GCA 단백질이 NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 실시예에 따른 GCA 단백질과 IKK β 여러 돌연변이 단백질이 NF- κ B의 활성화에 영향 미친다는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명의 실시예에 따른 IKK complex 단백질이 GCA단백질의 단백질변역 후 변형에 영향을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 26은 본 발명의 실시예에 따른 IKK β 단백질과 GCA 단백질이 과발현된 세포용해물(cell lysate)에 γ -인산가수분해효소를 처리함으로써, IKK β 단백질이 GCA 단백질을 인산화시킴을 확인한 결과를 나타낸 도면이다

도 27은 본 발명의 실시예에 따른 IKK β 단백질이 GCA 단백질 인산화에 영향을 주는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 28은 본 발명의 실시예에 따른 GCA 내부결손 돌연변이 단백질과 IKK β 단백질을 과발현시켜, GCA 단백질의 인산화 부위를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 29는 본 발명의 실시예에 따른 GCA 단백질을 질량분석법(mass spectrometry)을 통해 인산화 부위를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 30은 본 발명의 실시예에 따른 도 29의 질량분석법 데이터를 첨가한 것이다.

도 31은 본 발명의 실시예에 따른 프로그램을 통해 GCA 단백질 인산화 부위를 예측한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0040] 실시예

[0041] 실시예 1: 만성골수성백혈병 초기 억제내성에 연관되어 있는 유전자들의 확인

[0042] BCR-ABL1 단백질과 독립적으로 약물에 대한 저항성 및 만성골수성백혈병의 병기진행에 관련되는 유전자를 알아보기 위해, DNA microarray(지노칩)를 이용하여 타이로신 카이네이즈 억제제(tyrosine kinase inhibitor; TKI)에 대한 저항성을 가지고 있는 K562 CML BP 세포주와 저항성을 가지지 않는 K562 원세포주의 유전자 발현을 비교하였다. 타이로신 카이네이즈 억제제에 저항성을 가지는 K562 CML BP 세포주가 제대로 구축된 것을 확인한 결과는 도 2에 나타내었다. 그 결과 79개의 유전자에서 발현변화를 관찰하였고, 이를 약제를 처방받고 6개월 후, 초기 만성골수성백혈병 환자에 적용해본 결과 7개의 유전자가 발현이 증가함을 확인하였다. 이 과정은 도 1에서 간략하게 나타내었고, 7개의 유전자의 변화는 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0043] 도 3과 도 4에서 나타낸 바와 같이, GCA, MAP7, SLC04C1, PAK1, SYK, AIM2, DACH1, JAG1 및 LAMA4의 유전자 발현이 타이로신 카이네이즈 억제제에 저항성을 가진 K562 세포주 및 만성골수성백혈병 억제내성 환자에서도 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 환자의 검체를 이용한 실험에서 타이로신 카이네이즈 억제제에 저항성에 연관된 유전자가 증가되고, 이러한 발현의 증가가 타이로신 카이네이즈에 대한 저항성이 연관성이 있다는 것을 확인하였다. 또한, 만성골수성백혈병의 초기 병기진행은 만성골수성백혈병의 치료제로 사용되는 타이로신 카이네이즈 저항성을 가지게 되면서 시작된다. 상기 결과를 통해, 만성골수성백혈병에서 유전자 발현이 증가된 7개의 유전자가 타이로신 카이네이즈 억제제에 대한 저항성과 만성골수성백혈병 초기 병기진행에 연관되어 있다는 것을 예측할 수 있었다.

[0044] 상기 7개의 유전자 중, 발현이 가장 많이 증가한 GCA가 실제로 발현이 증가하는가를 재확인하기 위하여, 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 6개월 후 약물 내성을 가지지 않는(CCyR: complete cytogenetic response) #156,

#566, #530, #50 환자 및 약물 내성을 가지는(Resist: primary resistance) #869, #749, #904, #756, #735 환자의 진단 당시(D.x) 및 6개월 시 말초혈액(peripheral blood) 세포에서 유전자의 발현 정도를 quantitative real-time RT-PCR을 통하여 확인하였다. qRT-PCR을 위하여 1mL Trizol reagent 및 0.2mL의 클로로포름(chloroform)을 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA에 0.5mL의 이소프로필알콜(isopropyl alcohol)을 첨가하고 12,000Xg에서 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켜 분리하였다. 그리고 정해진 프로토콜에 따라 분리된 RNA를 Reverse Transcription System(Promega)을 이용하여 역전사시킨 후, TaqMan® universal PCR master mix를 이용하여 RT-PCR(50℃에서 2분, 95℃에서 20초 동안 반응시킨 후에 95℃에서 3초, 60℃에서 30초를 45회 반복)을 실시하였다. 태켄 프로브(TaqMan Probe)와 GCA 및 GAPDH(대조군) 프라이머(primer)는 Applied Biosystems에서 구입하여 사용하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0045] 도 5에서 분석된 환자 시료에서 BCR-ABL1 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0046] 도 4와 도 5에 나타난 바와 같이, GCA 유전자는 타이로신 카이네이즈 억제제에 내성을 가지는 만성골수성백혈병 초기환자에서 급격히 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 도 6의 결과를 통해 GCA 유전자의 발현은 BCR-ABL1 유전자의 발현과 상관관계를 가질 것으로 생각된다. GCA 유전자는 기능이 많이 알려지지 않은 유전자로써, 현재까지는 호중구의 부착성에 영향을 준다는 것이 알려져 있다. 상기 결과를 통하여, 호중구의 부착성 외에도 GCA 유전자가 타이로신 카이네이즈 억제제에 저항성을 가지게 함으로써, 만성골수성백혈병의 초기 병기진행에 중요한 역할을 할 것으로 예측할 수 있었다.

[0047] **실시예 2: GCA 단백질과 약물 저항성과의 연관관계 확인**

[0048] 실시예 1에서 예측한 결과를 토대로, GCA 단백질이 약물 저항성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 일차적으로 앞선 도 3과 도 4에서 발현이 증가한 유전자 중 GCA, MAP7, AIM2 단백질을 K562 세포주에서 과발현시켰다. GCA, MAP7, AIM2 단백질을 과발현하기 위한 플라스미드는 GCA(Clone ID: hMU009399), MAP7(Clone ID: hMU003963), AIM2(Clone ID: hMU010440)로서, 한국인간유전자은행에서 구입하여 사용하였고, 형질전환을 위하여 구입한 플라스미드는 Neon Transfection System(Invitrogen)의 정해진 프로토콜에 따라 세포 내로 주입하였다. 과발현된 K562 세포주에 타이로신 카이네이즈 억제제인 이매티닙(Imatinib)을 처리하고 정해진 프로토콜에 따라 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BC science)을 이용하여 세포사멸(apoptosis)을 확인하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0049] 도 7에서 나타난 바와 같이, GCA 단백질이 과발현된 세포의 경우, 이매티닙에 의해 유도된 세포사멸이 감소하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 GCA 단백질이 과발현되면 이매티닙에 대한 감수성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0050] GCA 단백질 과발현이 이매티닙 감수성에 영향을 주는지 재확인하기 위하여, GCA 단백질을 과발현시킨 K562 세포주에 이매티닙을 농도 의존적(dose-dependent)으로 처리해보았다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0051] 또한, GCA 단백질의 발현 정도와 약물에 대한 저항성의 연관관계를 확인하기 위하여, 우선적으로 GCA에 대한 siRNA를 이용하여 K562 세포주에서 GCA 단백질 발현을 억제하였다. siRNA는 IDT에서 구매하여 사용하였다 (SiRNA1 sense(서열번호 3): 5'-CCAGCAUAUUCAGACACUUU-3', SiRNA1 antisense(서열번호 4): 5'-AAGUGUCUGAAUAGCUGGUU-3', SiRNA2 sense(서열번호 5): 5'-GCAACAAGGUCUGCGAAUUU-3', SiRNA2 antisense(서열번호 6): 5'-AUUCGACAGCCUUGUUGCUU-3'). 그리고 GCA 단백질의 발현이 감소됨을 실시예 1과 동일한 방법을 통해 qRT-PCR로 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다. 그리고 GCA 단백질 발현이 억제된 세포에 이매티닙을 처리하고 세포사멸을 확인하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0052] 도 10에 나타난 바와 같이, GCA 단백질의 발현이 억제된 세포의 경우에는 이매티닙에 의한 세포사멸이 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 GCA 단백질의 발현이 억제되면 이매티닙에 대한 감수성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0053] GCA 단백질의 이매티닙 저항성에 영향을 주는 영역을 알아보기 위하여 GCA단백질의 내부결손 돌연변이를 제작하였다. GCA 단백질의 내부결손 돌연변이는 EF-hand 영역에 따라 D1(아미노산 서열 48 내지 83번 결손), D2(아미노산 서열 89 내지 120번 결손), D3(아미노산 서열 121 내지 154번 결손), D4(아미노산 서열 155 내지 180번 결손)로 제작하였다. 제작된 내부결손 돌연변이를 K562 세포주에 과발현시킨 후, 이매티닙에 의한 세포사멸 정도를 확인하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

[0054] 도 11에 나타난 바와 같이, GCA 단백질이 과발현되는 세포주의 경우에는 이매티닙에 의한 세포사멸이 줄어드는 것을 확인하였으며, GCA 단백질 4개의 영역이 이매티닙에 대한 저항성에 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

상기 결과를 통하여, GCA 단백질이 타이로신 카이네이즈 억제제 약물에 대한 저항성에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 실시예 3: 만성골수성백혈병에서 GCA 단백질의 분자적 기작: NF- κ B 신호전달 활성화 확인

[0056] 최근 연구에 따르면 만성골수성백혈병 환자에서 NF- κ B와 AP-1 신호전달이 활성화 되어있고, 이는 타이로신 카이네이즈 억제제 저항성에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져있다. 상기 밝혀진 결과에 의해, GCA 단백질이 NF- κ B 또는 AP-1 신호전달을 활성화함으로써, 만성골수성백혈병에서 이매티닙에 대한 저항성 획득에 중요한 역할을 할 것이라 생각되었다. 만성골수성백혈병에서 GCA 단백질의 기능을 알아보기 위해, GCA 단백질을 과발현한 K562 세포주에서 NF- κ B, AP-1, NFAT, CRE 및 SRE 프로모터의 활성을 측정하였다. 프로모터의 활성측정은 정해진 프로토콜에 따라 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)을 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[0057] 도 12에 나타난 바와 같이, GCA 단백질을 NF- κ B 특이적인 프로모터의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 GCA 단백질이 NF- κ B 신호전달을 활성화함으로써 이매티닙 저항성을 획득할 것이라는 예측할 수 있었다.

[0058] GCA 단백질이 NF- κ B 신호전달을 활성화한다는 것을 증명하기 위해, GCA에 대한 siRNA를 이용하여 K562 세포주에서 GCA 발현을 억제한 후 NF- κ B 신호전달 활성정도를 측정해보았다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.

[0059] 또한, GCA 단백질 발현이 억제된 세포주에서 NF- κ B 신호전달의 가장상위 신호전달에 관여하며, NF- κ B의 활성을 유도하는 TNF- α 를 농도 의존적으로 처리한 후, GCA 단백질 발현의 억제가 TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달의 활성화에 영향을 주는지 알아보았다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.

[0060] 도 13 및 도 14에서 나타난 바와 같이, GCA 단백질의 발현이 억제될 경우, 기저수준의 NF- κ B 신호전달이 감소하는 것을 확인하였으며, TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달 역시 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 이는 GCA 단백질이 NF- κ B 신호전달의 활성화에 있어 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 추가적으로 GCA 단백질의 발현이 NF- κ B 신호전달에 중요하다는 것을 확인하기 위하여, GCA siRNA에 저항성을 가지는 플라스미드를 제작하였다(플라스미드 제작에 필요한 primer는 forward(서열번호 1) 5'-gatggatactctgggctgttacctgatacatattcctcagctggtg-3', reverse(서열번호 2) 5'-caccagctgaggaatatgtatcactgtaagcaggccagagtatccatc-3'이다). GCA 단백질 발현을 siRNA를 통해 억제하고, GCA siRNA에 저항성을 가지는 플라스미드를 K562 세포주로 주입하여 NF- κ B 신호전달 회복실험을 실시하였다. 각 시료에서 GCA 단백질의 발현은 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 웨스턴 블롯팅의 과정은 다음과 같다. 세포를 PBS(phosphate buffer saline)완충용액을 이용해 한 번 세척하고, NETN 완충용액을 이용하여 세포를 용해시켜 단백질을 분리하였으며, 분리된 단백질을 이후 실험을 위해 bradford assay를 통하여 단백질의 양을 측정하였다. 획득한 단백질을 7~10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 분리하고, 전기를 이용하여 PVDF 막(membrane)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 PVDF막은 1% 또는 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 30분 동안 처리한 후에, 알맞은 1차 항체(primary antibody)와 함께 실온에서 1시간 반응시켰다. 항체와 반응시킨 PVDF 막은 TBST 용액을 이용하여 세 번 세척과정을 거침으로써 결합하지 않은 1차 항체를 제거하고 HRP가 결합되어 있는 2차 항체(secondary antibody)와 실온에서 1시간 동안 추가 반응시켰다. 반응이 완료된 후에 TBST 용액을 이용하여 세 번 세척과정을 거쳐 결합하지 않은 2차 항체를 제거하고 ECL 용액을 1분 동안 반응시킨 후에 Lass로 현상하였다. 웨스턴 블롯팅을 위한 항체 중 Anti-Myc은 Roche에서, Anti- β -actin, Anti-Flag 및 HRP-conjugated secondary antibody는 Sigma-Aldrich에서, Anti-I κ B α 및 Anti-Ser/Thr은 cell signaling에서 구입하여 사용하였으며, 사용시에는 1:2000으로 희석하여 사용하였다. 그 결과는 도 16에 나타내었다.

[0062] GCA 단백질의 발현이 NF- κ B 신호전달에 중요하다는 것을 재확인하기 위하여, GCA 단백질을 농도 의존적으로 과발현한 후, NF- κ B 신호전달의 활성화를 확인하였다. 그 결과는 도 17에 나타내었다.

[0063] 또한, GCA 단백질을 농도 의존적으로 과발현한 K562 세포주에서 TNF- α 를 농도 의존적으로 처리한 후, GCA 단백질의 과발현과 TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달의 활성화의 관계에 대해 확인하였다. 그 결과는 도 18에 나타내었다.

[0064] 도 17과 도 18에서 나타난 바와 같이, K562 세포주에서 GCA 단백질을 과발현시킬 경우, 기저수준의 NF- κ B 신호전달이 증가하는 것을 확인하였으며, TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달 역시 GCA 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해, GCA 단백질이 NF- κ B 신호전달의 활성화에 있어 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

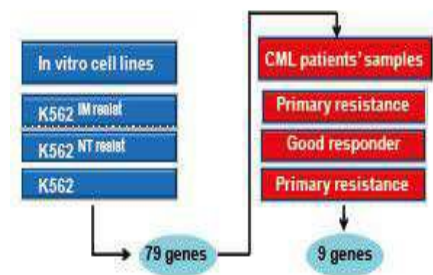
- [0065] NF- κ B는 활성화되지 않을 때에는 κ B억제자(Inhibitor of κ B; I κ B)와 복합체를 이루어 세포질에 존재한다. 하지만 NF- κ B 신호전달의 활성화가 일어나게 되면 I κ B가 분해되고, NF- κ B가 세포질에서 핵으로 이동하면서 NF- κ B 관련 유전자의 전사를 일으키게 된다. 앞서 GCA 단백질이 NF- κ B 신호전달에 중요하다는 점을 확인한 것을 토대로 GCA 단백질 발현을 억제한 후, TNF- α 처리 상황에서 I κ B α 의 분해와 회복 정도를 시간별로 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 19에 나타내었다.
- [0066] 도 19에서 나타난 바와 같이, GCA 단백질이 억제되었을 때, TNF- α 에 의한 I κ B α 의 분해 정도는 대조군에 비해 감소하는 것이 확인하였으며, I κ B α 의 회복 또한 대조군에 비해 빠르다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 GCA 단백질이 TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달에 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0067] GCA 단백질의 NF- κ B 신호전달에 영향을 주는 영역을 알아보기 위하여 GCA단백질의 내부결손 돌연변이를 K562 세포주에 과발현시킨 후 NF- κ B 활성을 확인하였다. 또한 각 시료에서 GCA 단백질의 발현은 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 20에 나타내었다.
- [0068] 상기의 결과들을 통해, GCA 단백질이 CML BP K562 세포주에서 NF- κ B 신호전달을 활성화하는 것을 확인하였고, 이 현상이 만성골수성백혈병 환자에서도 나타나는지 확인할 필요성이 있었다. NF- κ B 신호전달의 활성화가 일어날 시, NF- κ B 신호전달 관련 유전자의 발현이 증가하는데 대표적인 것이 TNF- α 와 IL-8이 있다. 이 점에 착안하여, 상기 도 6에서 분석된 약제 내성 유무 만성골수성백혈병환자에서 TNF- α 와 IL-8의 발현의 변화가 일어나는지를 확인하였다. 그 결과는 도 21과 도 22에 나타내었다.
- [0069] 도 6, 도 21과 도 22에 나타난 바와 같이, GCA 유전자가 높게 발현된 약제 내성을 가진 만성골수성백혈병 환자에서도, NF- κ B 신호전달 관련 유전자의 발현이 높아지는 것을 확인하였다. 즉, GCA 유전자의 발현과 NF- κ B 신호전달 관련 유전자의 발현에 상관성이 있는 것을 확인하였다. 이는 GCA 유전자 또는 단백질의 발현이 만성골수성백혈병 세포주와 실제 환자에서도 NF- κ B 신호전달을 활성화 시킨다는, GCA 단백질과 NF- κ B 신호전달의 연관성을 확인할 수 있었다.
- [0070] 상기 결과들을 통하여, GCA 단백질의 발현량의 변화에 따라 NF- κ B 신호전달, 즉 TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달체계 활성화의 변화를 일으킨다고 할 수 있었다. 이는 만성골수성백혈병 세포주와 실제 만성골수성백혈병 질환이면서 약제내성을 가지는 환자에서도 적용될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0071] **실시예 4: GCA 단백질의 IKK β 매개 NF- κ B 신호전달 활성화 및 IKK β 에 의한 인산화 확인**
- [0072] 실시예 3을 통해 GCA 단백질이 세포주 및 만성골수성백혈병 약제내성 환자에서, TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달체계 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. NF- κ B 신호전달체계의 활성화에 있어서, 앞서 기술한 도 19에서 확인한 I κ B의 분해는 중요한 의미를 가진다. TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달체계의 활성화는 IKK complex 중 IKK β 의 인산화를 유도하고, 인산화된 IKK β 가 I κ B를 인산화시키고 분해되면, NF- κ B가 핵으로 이동한다. 이는 GCA 단백질과 IKK complex, 특히 IKK β 와의 연관성에 초점을 맞추어볼 필요성이 있다는 것을 제시하였다. IKK complex는 3가지 단백질로 구성되는데, IKK α , IKK β 그리고 IKK γ 에 의해 구성된다. 그렇기에 GCA 단백질과 IKK complex의 각각의 3가지 단백질을 통해, GCA 단백질과 IKK complex 단백질 간의 NF- κ B 신호전달에서의 연관성을 알아보았다. 그 결과는 도 23에 나타내었다.
- [0073] 도 23에 나타난 바와 같이, IKK β 단백질이 과발현된 세포주에서 GCA 단백질을 동시에 과발현하면, NF- κ B의 활성도는 6배 정도 증가함을 확인하였다. 이는 GCA 단백질이 IKK β 매개 NF- κ B 신호전달을 활성화한다는 점을 확인하였다.
- [0074] GCA 단백질이 IKK β 매개 NF- κ B 신호전달을 활성화한다는 것을 재확인하기 위하여, IKK β 단백질의 점돌연변이를 통해 NF- κ B 신호전달을 재확인해보았다. IKK β 단백질의 점돌연변이는 활성화형(constitutive active(CA); S177E, S181E), 비활성화형(Constitutive inactive(CI); S177A, S181A)를 사용하였다. 그 결과는 도 24에 나타내었다.
- [0075] 도 24에 나타난 바와 같이, GCA 단백질은 IKK β 단백질의 야생형, 점돌연변이 활성화형에서 NF- κ B 신호전달을 더욱 활성화 시킨다는 점을 확인하였다. 도 23과 도 24의 결과에서 GCA 단백질이 IKK β 매개 NF- κ B 신호전달을 활성화한다는 점을 확인하였다.
- [0076] 도 23와 도 24의 웨스턴 블롯팅 결과에서 흥미로운 점을 확인하였다. 다른 시료들과 비교했을 때, IKK β 단백질과 GCA 단백질이 동시에 발현될 경우, GCA 단백질의 밴드가 쉬프트업(shift-up) 되어있는 있는 현상을 확인하였다. 이는 GCA 단백질이 IKK β 단백질에 의해 변형되는 것을 암시한다. 이를 확실히 하기 위하여, GCA 단백질과

IKK complex 단백질을 함께 과발현하고 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 25에 나타내었다.

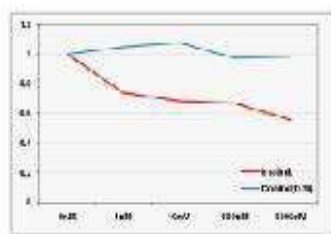
- [0077] 도 25에 나타난 바와 같이, GCA 단백질은 IKK complex 단백질들 중, IKK β 에서 변형이 일어난다는 것을 확인하였다.
- [0078] IKK β 단백질은 대표적인 세린-트레오닌인산화효소이므로, 도 25에서의 GCA 단백질의 변형은 인산화에 의해 일어난 변형이라는 것을 예측할 수 있었다. 이를 확인하기 위하여, IKK β 단백질과 GCA 단백질을 함께 발현시킨 세포추출액에 γ -인산가수분해효소를 첨가하였다. 그 결과는 도 26에 나타내었다.
- [0079] 또한 GCA 단백질이 IKK β 단백질에 의해 인산화되는 것을 재확인하기 위하여, 인산화가 일어난 세린-트레오닌 아미노산을 인지하는 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 인산화를 확인하였다. 그 결과는 도 27에 나타내었다.
- [0080] 도 26과 도 27에서 나타난 바와 같이, 인산가수분해효소의 처리와 인산화가 일어난 세린-트레오닌 아미노산을 인지하는 항체를 이용하여 GCA 단백질의 변형을 확인해본 결과, GCA 단백질은 IKK β 단백질에 의해 세린 또는 트레오닌 아미노산에 인산화가 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0081] IKK β 단백질에 의해 GCA 단백질의 인산화가 일어나는 영역을 알아보기 위해서, GCA 단백질의 내부결손 돌연변이와 IKK β 단백질을 K562 세포주에 과발현시킨 후, 웨스턴 블롯팅을 통해 인산화 영역을 확인하였다. 그 결과는 도 28에 나타내었다.
- [0082] 도 28에 나타난 바와 같이, GCA 단백질의 IKK β 단백질에 대한 인산화는 GCA 단백질 내부결손 돌연변이 D1, D4에서 일어나지 않는다는 것을 확인하였다. 이는 GCA 단백질의 인산화가 아미노산 서열 48 내지 83번 또는 100 내지 180번에서 일어남을 확인하였다.
- [0083] GCA 단백질의 인산화 부분을 확실히 알아보기 위해, GCA 단백질을 질량분석법(Mass spectrometry)을 통해 인산화 부위를 구체적으로 분석하였다. 또한 인산화 부위 예측 프로그램을 통하여, GCA 단백질 인산화 부위를 예측하였다. 그 결과는 도 29, 도 30 및 도 31에 나타내었다.
- [0084] 도 29, 도 30 및 도 31에 나타난 바와 같이, 질량분석법을 통해 GCA 단백질의 아미노산 서열 29번째 트레오닌, 59번째 세린, 78번째 트레오닌, 80번째 세린, 93번째 트레오닌, 130번째 트레오닌에서 인산화가 일어난다는 것을 확인하였고, 인산화 예측을 통해 GCA 단백질 아미노산 서열 48번째 세린, 49번째 세린에서 인산화가 일어난다는 것을 확인하였다.
- [0085] 상기 결과들을 통하여, GCA 단백질의 발현은 만성골수성백혈병에서 약물에 대한 저항성을 증기시키는데 중요한 역할을 함으로써, 만성골수성백혈병 초기단계의 약물 내성 및 병기진행에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 만성골수성백혈병 초기단계에서 GCA 단백질의 발현을 억제하면 약물에 대한 저항성을 감소시켜 만성골수성백혈병의 치료에 사용이 가능할 뿐만 아니라, 약물 저항성을 통해 병기진행이 일어나는 환자의 치료에 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명자들은 추가적인 실험을 통하여 GCA 단백질이 TNF- α 매개 NF- κ B 신호전달의 활성화 시키는 것을 확인할 수 있었으며, GCA 단백질과 IKK β 단백질의 상호작용, GCA 단백질 인산화 등을 통해 NF- κ B 신호전달을 조절할 수 있다는 가능성을 제시하였다.
- [0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



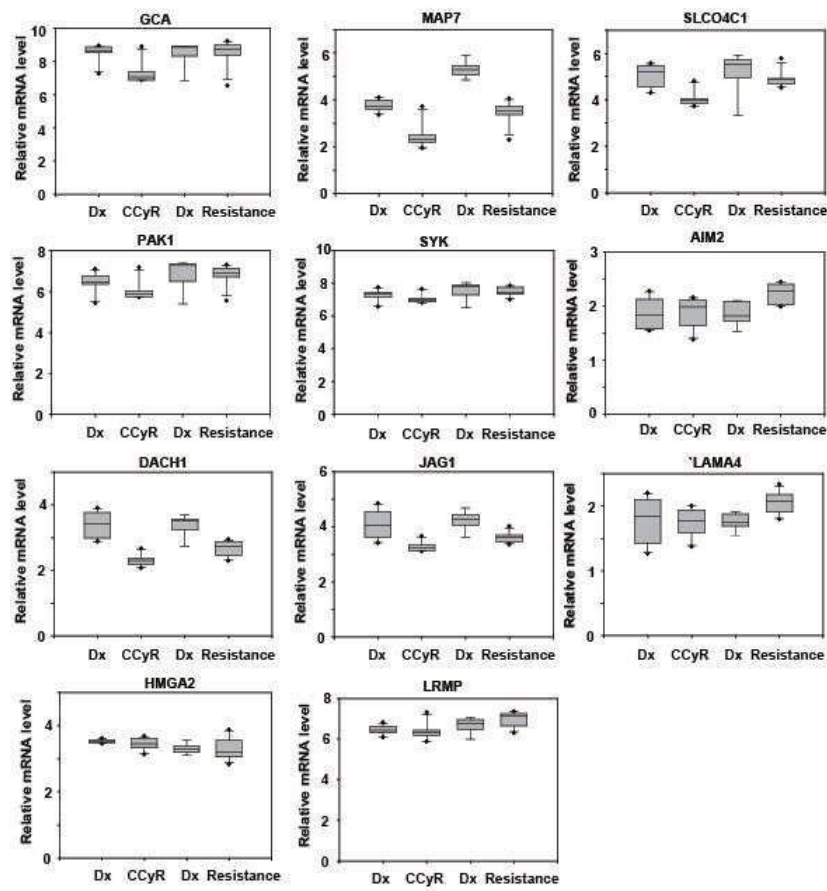
도면2



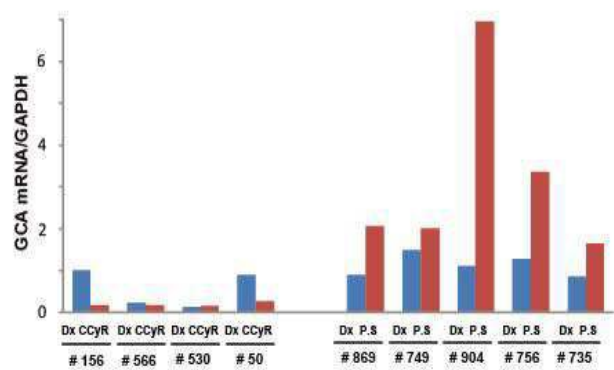
도면3

Gene	Name	fold in Resis to optimal	P-value
GCA	Grancalcin EF-hand calcium protein	2.16	0.036
MAP7	Microtubule-associated protein 7	1.92	0.018
SLCO4C1	Solute carrier organic anion transporter family, member 4	1.80	0.003
PAK1	p21 protein-activated kinase 1	1.64	0.046
SYK	Spleen tyrosine kinase	1.35	0.027
AIM2	Absent in melanoma 2	1.28	0.042
DACH1	Dachshund homolog 1	1.27	0.018
JAG1	Jaged 1	1.26	0.016
LAMA4	Laminin, alpha 4	1.25	0.026
HMGA2	High mobility group AT-hook 2	0.70	0.013
Cobll1	Cobll-like 1	0.59	0.036
LRMP	Lymphoid-restricted membrane protein	1.46	0.055
PTPRC	Protein tyrosine phosphase, receptor type C	1.48	0.058

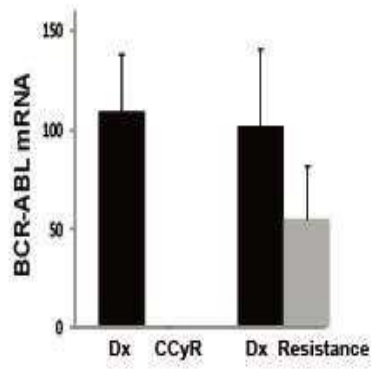
도면4



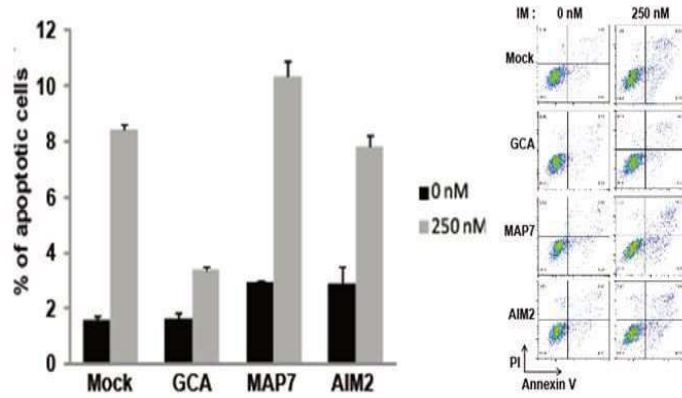
도면5



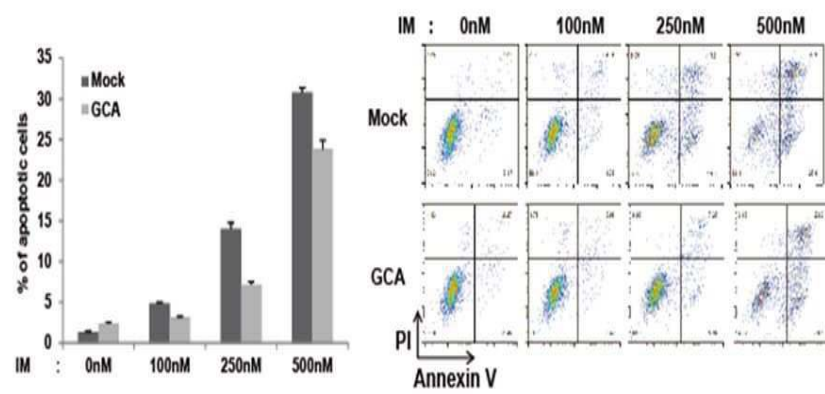
도면6



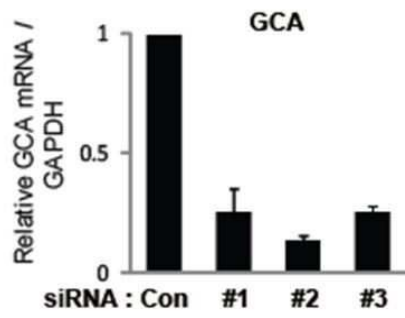
도면7



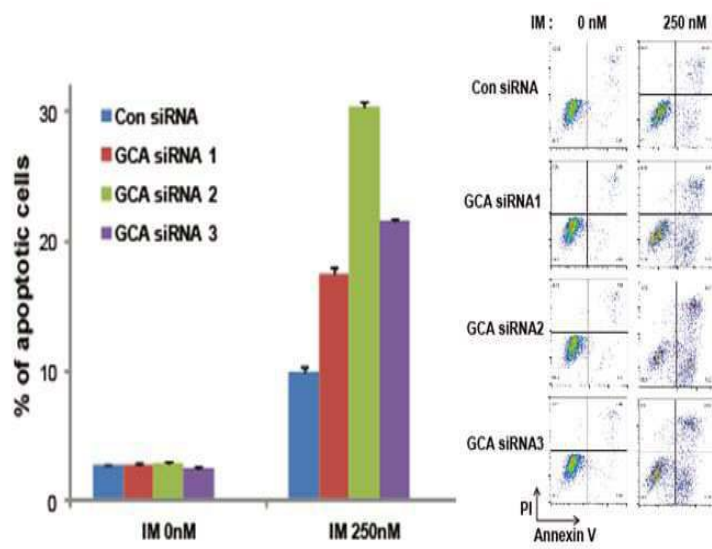
도면8



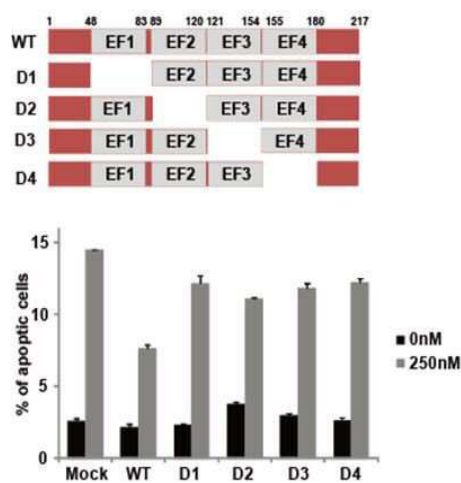
도면9



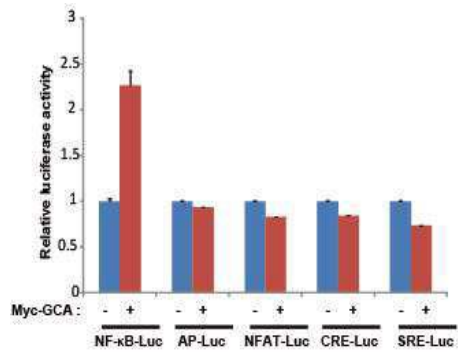
도면10



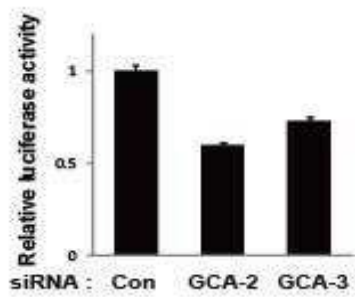
도면11



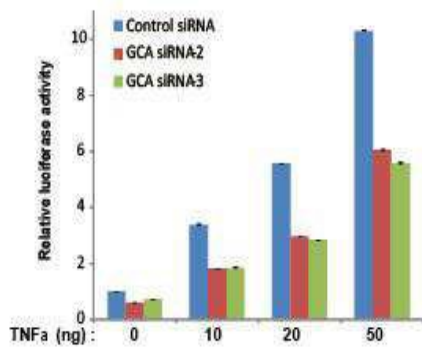
도면12



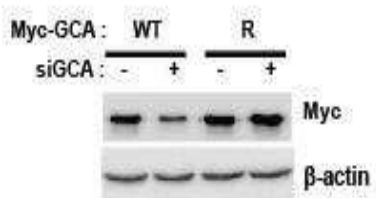
도면13



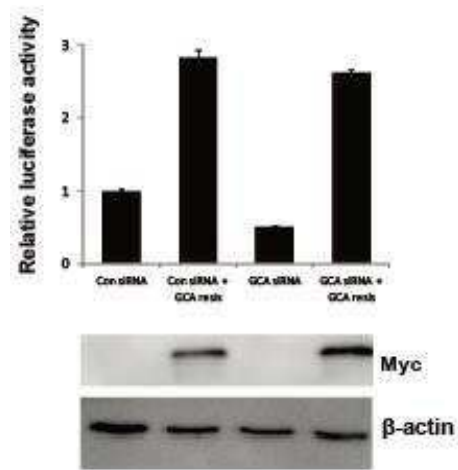
도면14



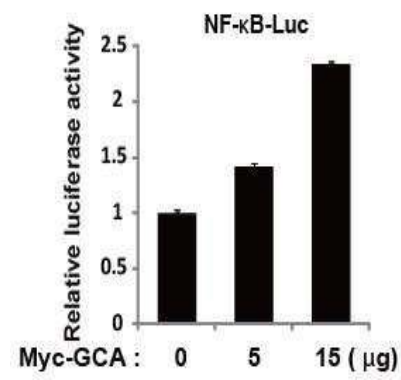
도면15



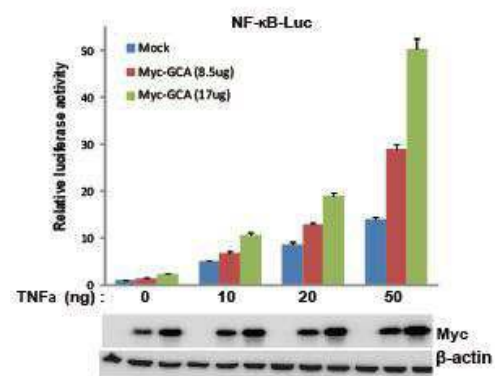
도면16



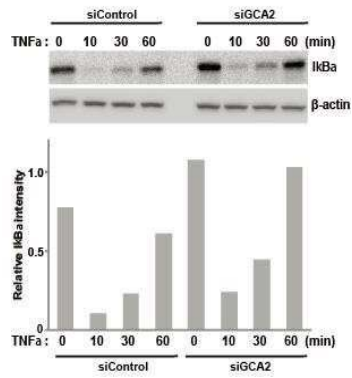
도면17



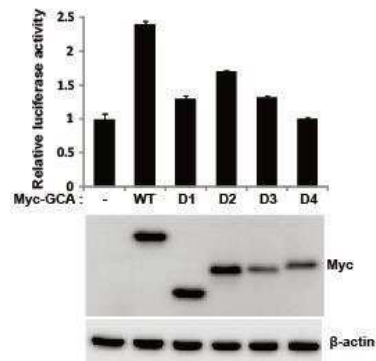
도면18



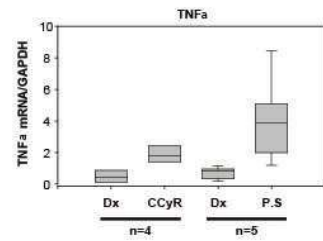
도면19



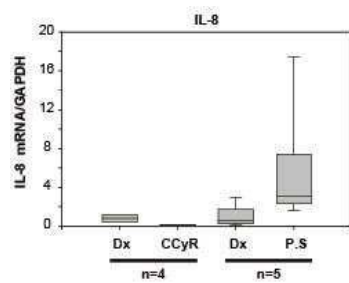
도면20



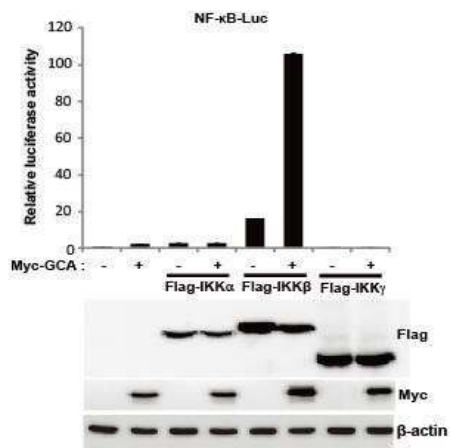
도면21



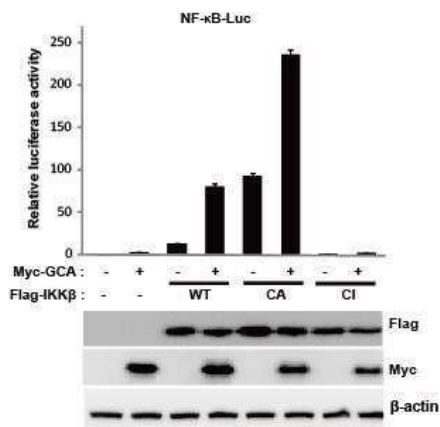
도면22



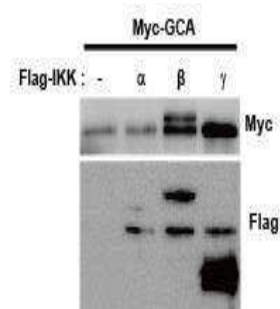
도면23



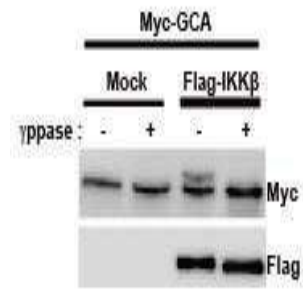
도면24



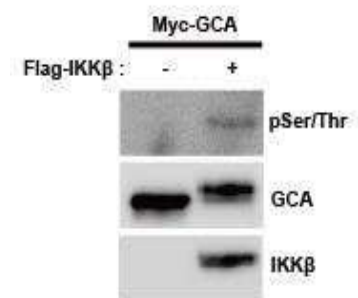
도면25



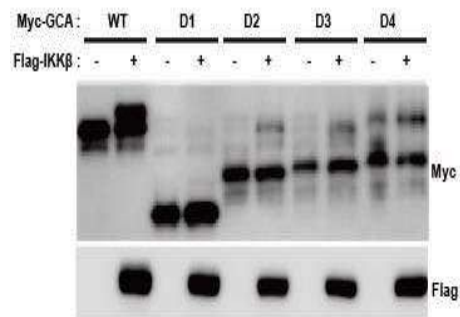
도면26



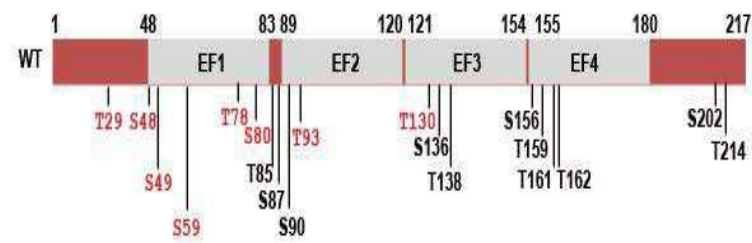
도면27



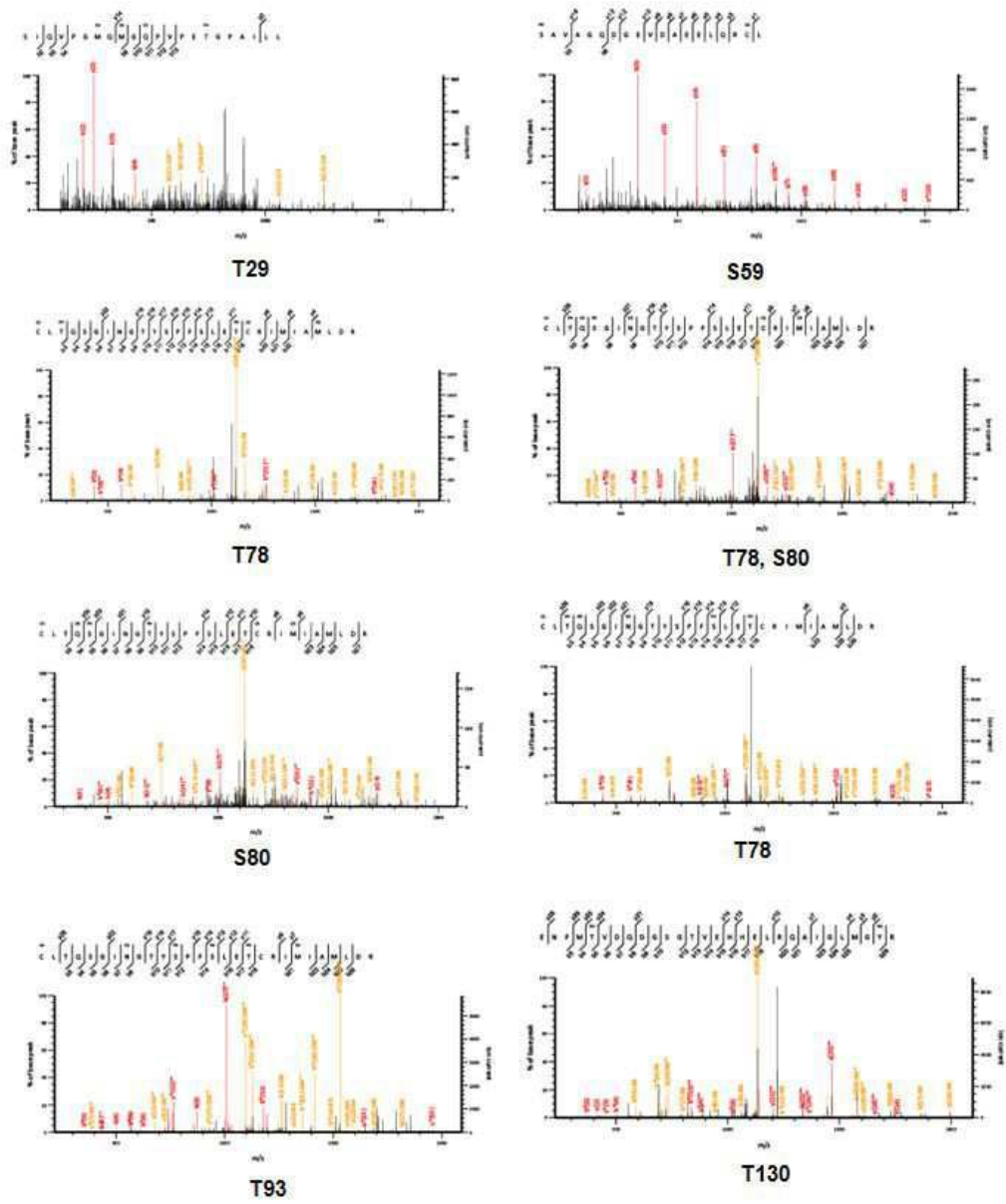
도면28



도면29



도면30



도면31

Locations(AA)	Phosphorylated sites	SVM score	Catalytic kinases
44	GPAYSDTYS	0.668855	IKK
48	SDTYSAGD	0.534906	IKK
49	DTYSAGDS	0.614987	IKK
80	CLTQSGING	0.646851	IKK
90	YSPFLETC	0.5	IKK
136	DQDGGTVE	0.600164	IKK

Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff
49	S	IKK	AVSDTYSAG	5.734	4.573
80	S	IKK	LQRCLTQSGI	5.532	4.573
87	S	IKK	SGINGTYSFSS	6.013	4.573
56	T	IKK/IKK β	SAGDSWTF	4.909	4.132
46	T	IKK/IKK β /IKK γ	SGPAYSDTYS	7.032	6.297

서열 목록

<110> THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> METHOD FOR PROVIDING THE INFORMATION FOR CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

<130> DPB156188

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer forward

<400> 1

Gly Ala Thr Gly Gly Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys

1 5 10 15

Cys Thr Gly Cys Thr Thr Ala Cys Ala Gly Thr Gly Ala Thr Ala Cys

20 25 30

Ala Thr Ala Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr

35 40 45

Gly

<210> 2

<211> 49
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer reverse
 <400> 2
 Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly Cys Ala
 20 25 30
 Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Cys Cys Ala Thr
 35 40 45
 Cys

<210> 3
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA1 sense
 <400> 3
 ccagcauauu cagacacuuu u 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA1 antisense
 <400> 4
 aagugucuga auaugcuggu u 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA2 sense
 <400> 5

gcaacaaggg ucugcgaaau u	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA2 antisense	
<400> 6	
auucgcagac ccuuguugcu u	21