



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052454
(43) 공개일자 2017년05월12일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>A61K 31/44</i> (2006.01)
 <i>G01N 15/14</i> (2006.01) <i>G01N 33/15</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/574</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/44</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0105479
 (22) 출원일자 2016년08월19일
 심사청구일자 2016년08월19일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020150153875 2015년11월03일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 한국원자력의학원
 서울특별시 노원구 노원로 75 (공릉동)</p> <p>(72) 발명자
 이해준
 서울특별시 중랑구 동일로 932, 201동 2804호 (목동, 목동자이아파트)
 박수철
 서울특별시 서초구 서초대로1길 30, 105동 703호 (방배동, 방배1차현대아파트)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인태백</p> |
|--|---|

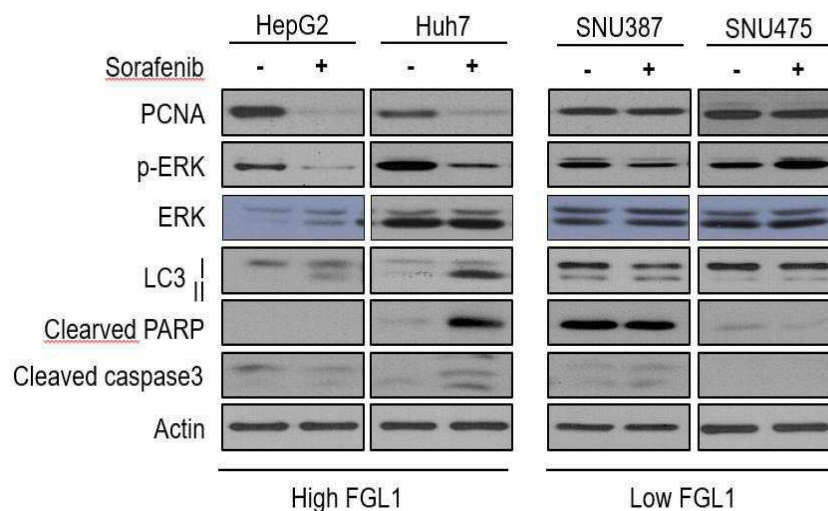
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물**

(57) 요약

본 발명은 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물에 관한 기술로, 더욱 상세하게는, 피브리노겐 유사 단백질 1(fibrinogen like protein 1, FGL1)의 발현이 높은 간세포암종에서 소라페닙에 대한 민감성이 높은 것을 확인함으로써, 피브리노겐 유사 단백질 1은 소라페닙 치료 반응성을 예측하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물로 응용되어 사용될 수 있다. 또한, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 키트를 제공할 수 있다. 또한, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제 및 소라페닙을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 활용될 수 있다. 또한, 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 소라페닙 민감성 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 15/14 (2013.01)

G01N 33/15 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

이윤진

서울특별시 마포구 성미산로 29 (성산동)

배상우

서울특별시 노원구 마들로 31, 118동 1901호 (월계동, 그랑빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711037363

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 방사선기술개발사업

연구과제명 타겟 지향적 방사선 치료 부작용 경감 핵심 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국원자력의학원

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

피브리노겐 유사 단백질 1(fibrinogen-like protein 1, FGL 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 증가는 소라페닙에 대해 민감성을 갖는 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 소라페닙은 암 치료를 위한 표적 항암제인 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 암은 간암, 갑상선암, 신장암, 식도암, 위암, 췌장암, 소장암, 대장암, 직장암, 폐암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암 및 뇌암으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 간암은 간세포암종, 담관상피암종, 간모세포종 및 혈관육종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능면역분석(radioimmunoassay), 면역조직화학(immunohistochemistry), 마이크로어레이(microarray), 웨스턴 블롯(western blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 9

피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 키트.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 제제는 프라이머, 프로브, 항체, 펩타이드 및 앵타머로 이루어지는 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 소라페닙 민감성 예측용 키트.

청구항 11

피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 증진용 약학 조성물.

청구항 12

피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제 및 소라페닙을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 소라페닙 민감성 예측을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물에 관한 기술로, 더욱 상세하게는, 피브리노겐 유사 단백질 1(fibrinogen like protein 1, FGL 1)의 발현량을 이용하여 소라페닙 치료 반응성을 예측하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암의 치료를 위해서는 수술 요법, 방사선 치료 요법 및 화학요법 등이 사용되고 있다. 오늘날에는 약 60여 종의 다양한 항암제가 사용되고 있으며, 암 발생 및 암 세포의 특성에 관한 지식이 많이 알려짐에 따라, 새로운 항암제 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나, 항암제들은 반복적으로 장기간 투여되거나 암이 재발된 경우에는 암세포가 항암제에 대한 내성을 획득함으로써 치료 효과를 상실하는 단점이 있다. 또한, 대부분의 항암제는 세포 내 핵산의 합성을 억제하거나 핵산에 직접 결합하여 그 기능을 손상시킴으로써 효과를 나타내는데, 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직 세포에도 손상을 입히기 때문에 골수 기능 저하, 위장관 점막 손상, 탈모 등 여러 부작용이 나타나는 단점이 있다.

[0003] 따라서 상기와 같은 항암제는 내성이 발생하는 특성 때문에 다양한 종류의 약품 개발이 지속적으로 요구되고 있으며, 특히 환자들의 부작용을 최소화할 수 있는 항암제의 선별적 치료가 필요한 실정이다.

[0004] 화학요법의 단점을 극복하기 위하여 개인별 SNP(single nucleotide polymorphism)를 분석하여 이에 따라 적합한 항암제를 선별 투여하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 또한, 새로운 항암제 개발 트렌드는 표적항암제, 바이오 의약품, 예방 백신 및 진단제 개발 비중이 높아지는 양상이며, 암환자의 복약 순응도를 높이기 위해 경구제 형태의 항암제 개발 비중이 높아지는 추세이다.

[0005] 표적항암제는 암세포를 죽이지는 못한다. 대신 암세포가 자라는데 필요한 요소를 억눌러서 암세포의 증식과 성장을 방해하는 약물이다. 때문에 암을 완전히 뿌리 뽑기 어려운 환자라 할지라도 표적항암제를 통해 암의 진행을 늦추면서 생존기간을 연장할 수 있다. 또한, 이론적으로는 정상세포에 작용하는 독성이 없기 때문에 고통스러운 부작용도 적을 뿐만 아니라 삶의 질 면에서도 기존 항암제보다 우수한 효과가 기대되고 있다.

[0006] 소라페닙(sorafenib)은 종양세포나 종양혈관에 과발현할 것으로 예상되는 수용체 티로신 키나아제(tyrosine kinase)인 혈관 내피 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈소판 유래 수용체(platelet derived growth factor receptor, PDGFR)와 더불어 신호전달 경로의 세린/트레오닌 키나아제(serine/threonine kinase)인 RAF 키나아제(RAF kinase)를 동시에 저해하는 다중 키나아제 억제제(multiple kinase inhibitor)로 암세포와 암세포에 영양을 공급하는 혈관 내피 세포만을 공격해 암을 치료하는 경구용 표적항암제(oral multikinase inhibitor)이며, FDA에서 최초로 승인된 약제이다.

[0007] 소라페닙은 유럽, 미주 지역을 중심으로 이루어진 위약대조 3상 연구에서 암 환자의 생존율을 2.8개월 연장시켜 통계적으로 유의한 결과를 보인 바 있으며, 진행성 간세포암종에서 표적치료제인 소라페닙이 1차 치료제로 권장되고 있다. 진행성 간세포암종은 치료가 매우 어려워 전신항암요법 등 여러 가지 치료가 시도되고 있으나 아직까지 무작위대조군 임상연구에서 전체 생존율의 향상이 입증된 약제는 없다.

[0008] 또한, 소라페닙은 다양한 고형 종양에 대해 임상연구가 진행되고 있는데, 신세포암종에서 이미 표적항암제로 사용 중이며, 진행 간세포암종에 대한 임상연구가 진행되어 최근 미국 식약청은 절제수술이 불가능한 간세포암종의 치료제로 승인하기도 하였다. 소라페닙은 2013년 상반기 3억 7,300만 유로의 매출을 올렸으며, 현재 간암과 신장암 치료제로서 승인을 획득한 바 있고, 최근 미국 FDA에서 넥사바의 갑상선암 치료제의 승인을 한 바 있다.

[0009] 그러나, 다수의 환자가 소라페닙 투여 및 치료에 있어 무반응자로 확인되어 치료를 시작하기 전, 치료 반응을 예측할 수 있는 방법 및 이를 확인할 수 있는 방법이 없고, 신뢰성 있는 바이오마커에 대한 연구가 부족하여 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여 적합한 약물투여를 하기가 매우 어려운 문제점이 있다. 나아가, 아직까지 실질적으로 다수의 간암 환자에게 적절한 소라페닙을 투여하여 최적의 치료효과를 달성함으로써 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있도록 하는 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측할 수 있는 방법에 대한 연구가 부족하다는 문제점이 있다.

[0010] 소라페닙의 치료효과를 높이기 위해, 병행치료, 저항성 인자 및 기전연구, 반응성 마커 연구 등이 계속 진행되고 있지만 아직까지 임상에서 검증된 소라페닙의 치료효과 예측방법은 없다. 따라서, 소라페닙 내성을 억제하고, 치료효율을 높이기 위해서는 소라페닙 민감성을 예측할 수 있는 바이오마커의 개발이 절실하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1598122호 (2016. 02. 22. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 피브리노겐 유사 단백질 1(fibrinogen-like protein 1, FGL 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 키트를 제공하는 데에 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 증진용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제 및 소라페닙을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 소라페닙 민감성 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1(fibrinogen-like protein 1, FGL 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제 및 소라페닙을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 소라페닙 민감성 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현량이 높은 간세포암종은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현이 낮은 간세포암종에 비해 동일 용량의 소라페닙에 민감성을 나타냈다. 또한, 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현량이 높은 간세포암종에 인위적으로 피브리노겐 유사 단백질을 낮추면 소라페닙에 대한 민감성이 감소되는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1 또는 이를 코딩하는 유전자를 소라페닙의 치료 반응성을 예측하는 바이오마커 조성물로 응용하여 사용할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준을 검출할 수 있는 재제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 키트를 제공할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 증진용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제 및 소라페닙을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 소라페닙 민감성 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 간세포암종 세포주에서 내재성 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현량을 비교한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 2A는 MTT 분석을 이용하여 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 생존율을 분석한 것으로, 소라페닙을 농도별로 처리한 후 소라페닙에 의한 간세포암종의 생존을 억제 효과를 확인한 결과이다.
- 도 2B는 도 2A의 간세포암종 세포주의 생존율 분석 중 소라페닙을 10 μ M 농도로 처리하였을 때의 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 세포 사멸 효과를 비교한 유세포 분석 결과이다.
- 도 4는 간세포암종 세포주에 따른 세포 증식 및 세포 사멸 관련 단백질의 발현량을 비교한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 5A는 소라페닙을 처리하지 않았을 때의 간세포암종 세포주의 집락형성 생존 분석 결과에 관한 실험으로 세포 군집 수를 나타낸 것이다.
- 도 5B는 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 집락형성 생존 분석에 관한 실험으로 세포 군집의 형성을 백분율로 나타낸 것이다.
- 도 6은 siRNA를 이용하여 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현을 억제한 후, 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 집락형성 생존 분석에 관한 실험으로 세포 군집의 형성을 백분율로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명에서 사용된 용어 “피브리노겐 유사 단백질 1(Fibrinogen-like protein 1)”은 hepassocin 또는 HFREP1(hepatocyte-derived fibrinogen related protein) 등의 용어로 불리기도 한다. 현재까지 폐, 심장, 소장, 신장 등 간 이외의 다른 조직에서의 발현은 보고된 바 없으며, 최근 일부 지방세포에서의 발현이 보고된 바 있다. 피브리노겐 유사 단백질 1은 간에서 간 실질세포(hepatocyte) 특이적으로 발현되며 동형 이합체(homodimer) 구조로 분비된다. 또한 간 절제술 후 간이 재생하는 동안 높은 발현량을 보여 간 재생에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 예상되고 있지만 아직까지 정확한 이론은 정립되지 않았다. 또 다른 보고에 의하면 악성 간 종양세포에서 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현량이 낮게 조절되어 종양세포 분화에 연관성이 있을 것으로 예상된다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어 “소라페닙”은 혈관 내피 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈소판 유래 수용체(platelet derived growth factor receptor, PDGFR)와 더불어 신호전달 경로의 세린/트레오닌 키나아제(serine/threonine kinase)인 RAF 키나아제(RAF kinase)를 동시에 저해하는 다중 키나아제 억제제(multiple kinase inhibitor)로 암세포와 암세포에 영양을 공급하는 혈관 내피 세포만을 공

격해 암을 치료하는 경구용 표적항암제(oral multikinase inhibitor)이며, FDA에서 최초로 승인된 약제이다.

- [0030] 본 발명에서 사용된 용어 “바이오마커”는 암이 발생한 조직 또는 세포를 정상 세포 또는 적절한 암 치료를 받은 조직 또는 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 검체에 비하여 질환이 발생한 조직이나 부위에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 단백질 또는 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0031] 본 발명에서 사용된 용어 “간세포암종”은 일반적으로 간세포에서 기원하는 암을 의미한다. 간에서 발생하는 악성종양의 약 90%는 간세포암이고 약 10%는 담관세포암이며 그 외 아주 일부가 기타 암이다. 간세포암이 가장 흔하므로 흔히 ‘간암’이라고 하면 간세포암을 지칭한다. 간암에는 처음부터 간에서 생기는 원발성 간암과 다른 조직에서 발생한 암이 간에 전이되어 발병하는 전이성 간암이 있다. 원인은 대부분 불분명하나, 간경변이 있는 경우가 많으며, 간경변이 있는 환자와 만성 활동성 B형 간염, 또는 B형 간염 보균자에서 간암이 잘 발생하는 것으로 밝혀지고 있다. 본 발명자들은 본 발명의 자가항체 마커를 사용하는 경우, 개체로부터 간암의 발병 여부에 대해 높은 수준의 민감도 및 특이도를 가지고 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0032] 본 발명에서 사용된 용어 “민감성”은 질병이 있는 개체를 양성으로 검출하는 비율을 의미하며, 진단법을 사용하였을 때 실제로 이에 해당하는 개체를 얼마나 잘 찾아내는지의 기준이 된다.
- [0033] 본 발명에서 사용된 용어 “예방”은 피브리노겐 유사 단백질 1 또는 이를 코딩하는 유전자에 의해 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 본 발명에서 사용된 용어 “치료”는 피브리노겐 유사 단백질 1 또는 이를 코딩하는 유전자에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 사용된 용어 “프라이머”는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용된 용어 “프로브”는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수 백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용된 용어 “항체”는 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미하며, 본 발명에서의 항체는 피브리노겐 유사 단백질 1에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프(epitope)와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미하며, 또한, 인간화 항체 등 특수 항체도 포함한다.
- [0038] 또한, 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “펩타이드”는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용된 용어 “애포타머(aptamer)”는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 애포타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 “화학 항체”라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.

- [0042] 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1(fibrinogen-like protein 1, FGL 1) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0043] 바람직하게는, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0044] 바람직하게는, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0045] 바람직하게는, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 증가는 소라페닙에 대해 민감성을 가질 수 있다.
- [0046] 바람직하게는, 상기 소라페닙은 암 치료를 위한 표적 항암제로, 상기 암은 간암, 갑상선암, 신장암, 식도암, 위암, 췌장암, 소장암, 대장암, 직장암, 폐암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암 및 뇌암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다. 더욱 상세하게는, 상기 간암은 간세포암종, 담관상피암종, 간모세포종 및 혈관육종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0047] 바람직하게는, 상기 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능면역분석(radioimmunoassay), 면역조직화학(immunohistochemistry), 마이크로어레이(microarray), 웨스턴 블롯(western blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0049] 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 예측용 키트를 제공한다.
- [0050] 바람직하게는, 상기 제제는 프라이머, 프로브, 항체, 펩타이드 및 앵타머로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0052] 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 소라페닙 민감성 증진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0054] 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성 촉진제 및 소라페닙을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학 조성물은 첨가제 및 보조제로서 촉진제, 중량제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 붕해제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 방향제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0057] 상기 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수용성유제, 유제, 동결건조제, 좌제 및 멸균 주사용액으로 제형화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 흉골내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여, 국소 투여, 경구 투여 및 흡입을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0058] 상기 약학 조성물은 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 통상적으로는 국소 투여 방식이 바람직하다. 또한, 상기 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의

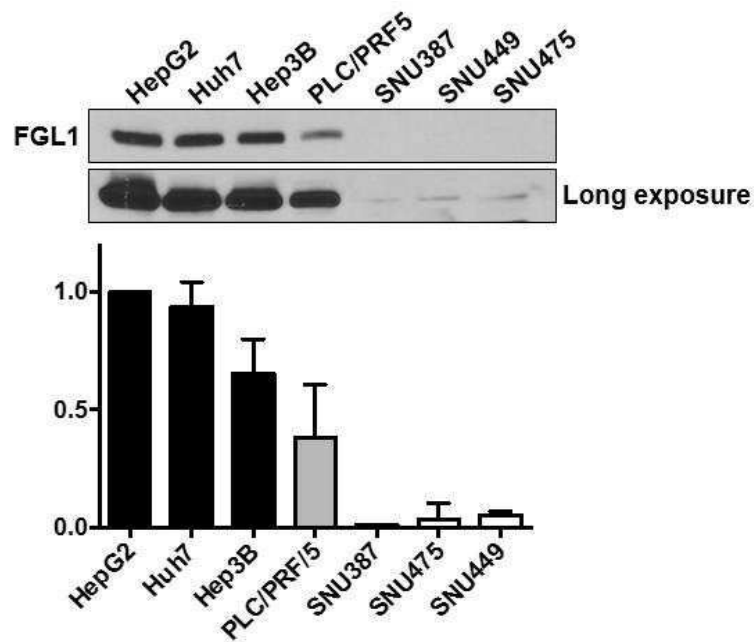
종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

- [0060] 본 발명은 피브리노겐 유사 단백질 1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 소라페닙 민감성 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0062] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0064] **실시예 1 : 간세포암종 세포주 배양 및 소라페닙 구입**
- [0065] 사람의 간세포암종 세포주(HepG2, Hep3B, Huh7, PLC/PRF/5, SNU387, SNU449 및 SNU475)는 ACTT 및 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 간세포암종을 배양하기 위해 제공된 배양 방법을 참고하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.
- [0066] 소라페닙은 셀렉켄(Selleckchem)에서 1 ml 디메틸 설펡시드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 녹여있는 10 mM의 소라페닙을 구입하여 실험 직전 배지에 희석하여 사용하였다.
- [0068] **실시예 2 : 간세포암종 세포주에 따른 내재성 FGL 1 단백질 발현량 분석**
- [0069] 세포 내 내재성 FGL 1 단백질의 발현량을 분석하기 위해, 간세포암종 각 세포주에 소라페닙을 농도 별로 처리한 다음, 세포 용해 시약(RIPA lysis solution)을 이용하여 세포를 용해시킨 뒤, 단백질을 정량하였다. 일정량의 단백질을 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 포함된 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분자량 별로 분리하였다. 단백질들은 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)에 옮긴 다음 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 해당 단백질의 발현량을 분석하였다.
- [0070] 그 결과, 도 1을 참조하여 보면, 7개의 간세포암종에서 내재성 FGL 1의 발현량이 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 7개의 세포주는 각각 내재성 FGL 1 단백질이 높게 발현되는 세포주군(검정; HepG2, Hep3B 및 Huh7), 내재성 FGL 1 단백질이 약하게 발현되는 세포주(회색; PLC/PRF/5) 및 내재성 FGL 1 단백질이 거의 발현되지 않은 세포주군(흰색; SNU387, SNU449 및 SNU475)으로 분리하였다.
- [0072] **실시예 3 : 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 증식율(proliferation) 분석**
- [0073] 소라페닙에 의한 간세포암종 증식의 억제 활성을 확인하기 위해, 간세포암종 각 세포주를 96 웰 플레이트(96 well plate)에 칸 다음, 소라페닙을 0, 2.5, 5, 10, 25 및 50 μM로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 세포에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 처리하고 2시간 동안 반응시킨 다음, 50 μl의 디메틸 설펡시드(DMSO)를 첨가하여 세포를 용해시키고 마이크로플레이트 리더기(ELISA reader)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군과 비교한 세포 생존율은 백분율(%)로 나타내었다.
- [0074] 그 결과, 도 2를 참조하여 보면, 소라페닙 10 μM 처리시 내재성 FGL 1의 발현이 거의 없는 세포주군(흰색; SNU387, SNU449 및 SNU475)이 내재성 FGL 1의 발현을 보이는 세포주군(HepG2, Hep3B, Huh7 및 PLC/PRF/5)에 비해 20~50% 이상의 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였고, 내재성 FGL 1의 발현을 보이는 세포주군은 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다.
- [0076] **실시예 4 : 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 세포 사멸 효과 분석**

- [0077] 간세포암종 각 세포주를 10 cm^2 배양용기 칸 다음, 소라페닙을 $10\text{ }\mu\text{M}$ 농도로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 트립신(trypsin)/EDTA을 처리하여 세포를 모으고 원심 분리하여 남은 세포 펠렛(pellet)을 단일 세포(single cell)로 만들어 분석하였다. 세포 핵을 염색하기 위해 PI(propidium iodide)를 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 뒤 유세포 분석(flow cytometry)에서 사멸된 세포 수를 측정하였고 정상 대조군과 비교한 세포 사멸율을 백분율(%)로 나타내었다.
- [0078] 그 결과, 도 3을 참조하여 보면, 내재성 FGL 1 발현이 거의 없는 세포주군(흰색; SNU387, SNU449 및 SNU475)이 내재성 FGL 1의 발현을 보이는 세포주군(HepG2, Hep3B, Huh7 및 PLC/PRF/5)에 비해 15% 이상 세포사멸이 감소하는 것을 확인하였고, 내재성 FGL 1의 발현을 보이는 세포주군은 세포 사멸이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0080] **실시예 5 : 간세포암종 세포주에 따른 세포 증식 및 세포 사멸 관련 단백질의 발현량 분석**
- [0081] 간세포암종 세포주에 따른 세포 증식 및 세포 사멸 관련 단백질의 발현량을 분석하기 위해, 간세포암종 각 세포주에 소라페닙을 $10\text{ }\mu\text{M}$ 농도로 처리한 다음, 세포 용해 시약(RIPA lysis solution)을 이용하여 세포를 용해시킨 뒤, 단백질을 정량하였다. 일정량의 단백질을 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 포함된 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분자량 별로 분리하였다. 단백질들은 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)에 옮긴 다음 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 해당 단백질의 발현량을 분석하였다.
- [0082] PCNA와 p-ERK는 세포증식에 관련되며, LC3(II form의 증가), cleaved PARP 및 cleaved caspase 3는 세포사멸에 관련되는 단백질이다. 도 4를 참조하여 보면, FGL 1의 발현이 높은 간세포암종 세포주군(HepG2 및 Huh7)에서 소라페닙 처리는 ERK의 인산화를 억제하고, 자가소화포의 축적을 유도하는 것을 확인하였다.
- [0084] **실시예 6 : 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 집락형성 생존 분석(clonogenic survival assay)**
- [0085] 간세포암종 각 세포주를 6 cm^2 의 배양용기에 칸 다음, 소라페닙을 0, 2, 5 μM 로 처리하고 10일 동안 배양하였다. 10일 후 세포 군집(colony)이 형성되면 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척한 다음, 메탄올과 아세톤을 2:3(부피비)으로 섞은 고정액으로 고정시켰다. 그 후, 0.4% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색한 뒤, 증류수로 두 번 세척하여 세포 군집 수를 확인하였다.
- [0086] 그 결과, 도 5A는 각 동일 개수의 세포를 배양용기에 칸 후 10일째에 형성된 세포 군집의 수를 나타낸 결과이며, 도 5B는 각 세포주에 대해 소라페닙을 처리한 후 생성된 세포 군집의 형성을 대조군과 비교하여 백분율로 나타낸 결과이다. FGL 1의 발현이 거의 없는 세포주군(SNU387, SNU449 및 SNU475)에서 FGL 1 발현이 높은 세포주군(HepG2, Hep3B 및 Huh7)에 비해 소라페닙에 대한 저항성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.
- [0088] **실시예 7 : siRNA에 의한 FGL 1 발현 억제 후, 소라페닙에 의한 간세포암종 세포주의 집락형성 생존 분석**
- [0089] FGL 1의 siRNA(small interfering RNA)는 IDT에서 구입하였으며, 리포펙타민 2000(lipofectamin 2000)을 이용하여 내재성 FGL 1의 발현이 높은 간세포암종 Hep3B 세포 내에 주입하여 FGL 1의 발현을 감소시켰다. 그 후, 0, 2 μM 의 소라페닙을 처리하고 집락형성 생존 분석을 비교하였다.
- [0090] 그 결과, 도 6을 참조하여 보면, FGL 1의 siRNA는 Hep3B의 집락형성 생존율을 증가시켰으며, 소라페닙에 대한 저항성도 유의적으로 증가시켰다. 이를 통해 FGL 1의 발현량이 소라페닙의 저항성과 긴밀하게 관련되는 것을 확인하였다.
- [0092] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 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.
- [0093] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

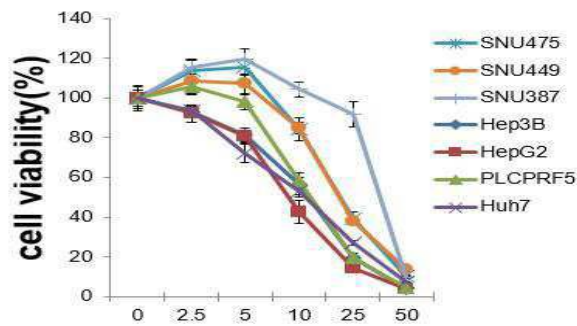
도면

도면1

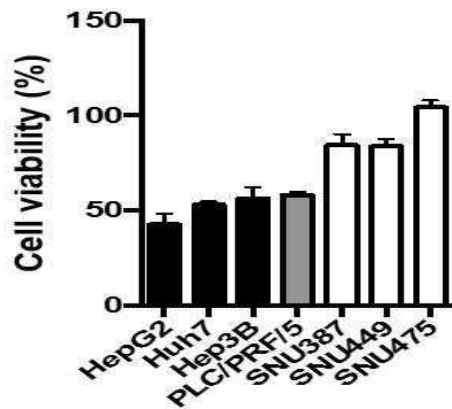


도면2

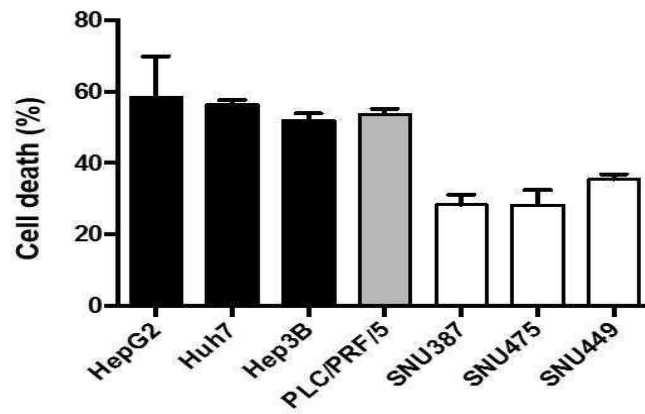
A



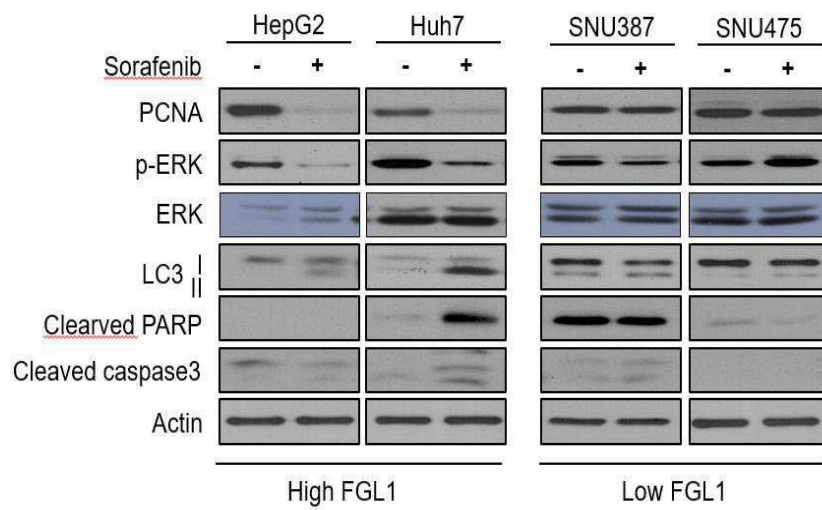
B



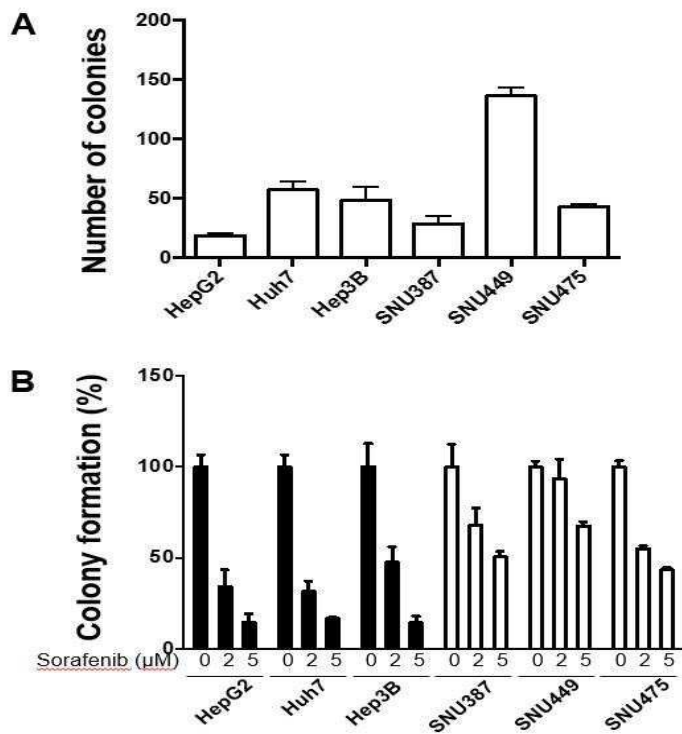
도면3



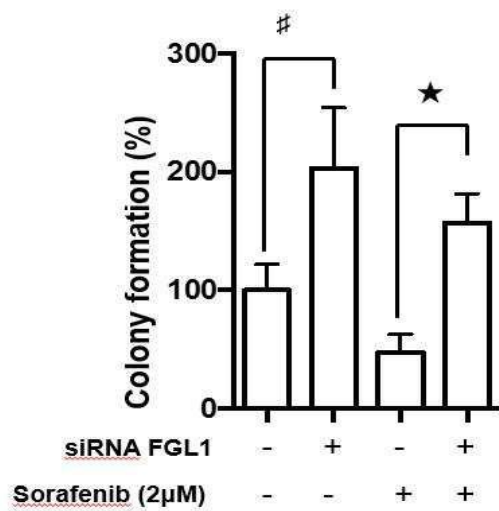
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES
- <120> Biomarker composition for predicting sensitivity of sorafenib
- <130> ADP-2016-0062
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 312

<212> PRT

<213> fibrinogen like 1

<400> 1

Met Ala Lys Val Phe Ser Phe Ile Leu Val Thr Thr Ala Leu Thr Met

1 5 10 15

Gly Arg Glu Ile Ser Ala Leu Glu Asp Cys Ala Gln Glu Gln Met Arg

20 25 30

Leu Arg Ala Gln Val Arg Leu Leu Glu Thr Arg Val Lys Gln Gln Gln

35 40 45

Val Lys Ile Lys Gln Leu Leu Gln Glu Asn Glu Val Gln Phe Leu Asp

50 55 60

Lys Gly Asp Glu Asn Thr Val Ile Asp Leu Gly Ser Lys Arg Gln Tyr

65 70 75 80

Ala Asp Cys Ser Glu Ile Phe Asn Asp Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Phe

85 90 95

Tyr Lys Ile Lys Pro Leu Gln Ser Pro Ala Glu Phe Ser Val Tyr Cys

100 105 110

Asp Met Ser Asp Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg Arg Ser Asp

115 120 125

Gly Ser Glu Asn Phe Asn Arg Gly Trp Lys Asp Tyr Glu Asn Gly Phe

130 135 140

Gly Asn Phe Val Gln Lys His Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Lys Asn

145 150 155 160

Leu His Phe Leu Thr Thr Gln Glu Asp Tyr Thr Leu Lys Ile Asp Leu

165 170 175

Ala Asp Phe Glu Lys Asn Ser Arg Tyr Ala Gln Tyr Lys Asn Phe Lys

180 185 190

Val Gly Asp Glu Lys Asn Phe Tyr Glu Leu Asn Ile Gly Glu Tyr Ser

195 200 205

Gly Thr Ala Gly Asp Ser Leu Ala Gly Asn Phe His Pro Glu Val Gln

210 215 220

Trp Trp Ala Ser His Gln Arg Met Lys Phe Ser Thr Trp Asp Arg Asp

225 230 235 240
His Asp Asn Tyr Glu Gly Asn Cys Ala Glu Glu Asp Gln Ser Gly Trp

245 250 255
Trp Phe Asn Arg Cys His Ser Ala Asn Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Ser

260 265 270
Gly Pro Tyr Thr Ala Lys Thr Asp Asn Gly Ile Val Trp Tyr Thr Trp

275 280 285
His Gly Trp Trp Tyr Ser Leu Lys Ser Val Val Met Lys Ile Arg Pro

290 295 300
Asn Asp Phe Ile Pro Asn Val Ile

305 310

<210> 2

<211> 939

<212> DNA

<213> fibrinogen like 1

<400> 2

atggcaaagg tgttcagttt catccttggt accaccgtc tgacaatggg cagggaatt 60
tcggcgctcg aggactgtgc ccaggagcag atgcggctca gagcccaggt ggcctgctt 120
gagacccggg tcaaacagca acaggtcaag atcaagcagc ttttcagga gaatgaagtc 180
cagttccttg ataaaggaga tgagaatact gtcattgac tttgaagcaa gaggcagtat 240
gcagattgtt cagagatttt caatgatggg tataagctca gtggatttta caaatcaaa 300
cctctccaga gccagcaga atttctgtt tattgtgaca tgtccgatgg aggaggatgg 360

actgtaattc agagacgac tgatggcagt gaaaacttta acagaggatg gaaagactat 420
gaaaatggct ttggaaattt tgtccaaaaa catggtgaat attggctggg caataaaaat 480
cttacttct tgaccactca agaagactac actttaaaaa tcgaccttgc agattttgaa 540
aaaaatagcc gttatgcaca atataagaat ttcaaagttg gagatgaaaa gaatttttac 600
gagttgaata ttgggaata ttctggaaca gctggagatt cccttgcggg gaattttcat 660
cctgaggtgc agtgggtggc tagtcaccaa agaatgaaat tcagcacgtg ggacagagat 720
catgacaact atgaaggga ctgcgcagaa gaagatcagt ctggctggtg gtttaacagg 780

tgtcactctg caaacctgaa tgggtgtatac tacagcggcc cctacacggc taaaacagac 840
aatgggattg tctggtacac ctggcatggg tgggtgtatt ctctgaaatc tgtggttatg 900

aaaattaggc caaatgattt tattccaaat gtaatttaa

939