(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0147783
(43) 공개일자 2023년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4172 (2006.01) *A23L 33/175* (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4172 (2013.01)
A23L 33/175 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0046176
(22) 출원일자 2022년04월14일
심사청구일자 2022년04월14일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
(72) 발명자
이미수
경기도 성남시 분당구 중앙공원로 53, 108동 2802호(서현동, 시범단지삼성.한신아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

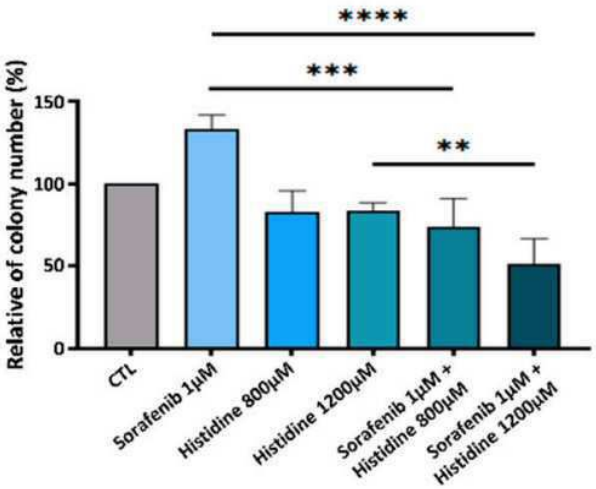
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **소라페닙 및 히스티딘을 포함하는 간암 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 대표적인 간암 치료제인 소라페닙의 내성을 극복하고 간암 환자의 소라페닙 약물 감수성을 현저히 향상시키기 위한 히스티딘과의 병용 투여 요법을 제공하고, 소라페닙과 히스티딘의 병용 투여에 적절한 환자군을 선별하기 위한 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도5b



(52) CPC특허분류
A61K 31/4412 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57438 (2019.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711145528
과제번호 2018R1C1B6003894
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 세포 대사 재프로그래밍을 통한 항암제 내성 극복 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 인천대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711153271
과제번호 2022R1A2C1007956
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업(과기정통부)(R&D)
연구과제명 엑소좀 유래 miRNA을 이용한 암 특이대사에 따른 종양미세환경 제어 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 인천대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

소라페닙 및 히스티딘을 포함하는 간암 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 소라페닙 및 히스티딘은 1 : 600 내지 1600 몰농도 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 간암은 소라페닙 내성 간암인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 간암은 LAT1의 발현 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

히스티딘을 유효성분으로 포함하는 간암 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 히스티딘은 소라페닙 치료 보조제인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 간암은 LAT1의 발현 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측하는 방법:

(a) 대상체 (subject)로부터 분리된 시료로부터 DNA 또는 단백질을 추출하는 단계;

(b) LAT1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 발현 수준이 대조군에 비해 증가한 경우, 소라페닙 및 히스티딘 병용 치료에 대한 감수성이 높은 것으로 예측하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 복수액 및 복막액으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 히스티딘 및 소라페닙을 포함하는 간암 치료용 조성물 및 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 간세포암종(HCC)은 전 세계적으로 암 관련 사망의 주요 원인 중 하나이며 일반적으로 바이러스 감염, 대사 증후군 또는 높은 알코올 섭취로 인한 만성 간 염증 환자에서 발생한다. 초기 단계의 간세포암종은 무증상이기 때문에 환자의 50% 이상이 중기 또는 상당히 진행된 단계에서 진단된다. 따라서 이들 환자는 이는 간세포암종 환자에서 장기 생존을 향상시킬 수 있는 외과적 절제 및 간 이식을 받을 수 없게 된다.

[0004] 소라페닙(Sorafenib, Nexavar@)은 타이로신 카이네이즈(tyrosine kinase) 수용체를 표적으로 하여 항혈관신생 및 항증식 효과를 발휘하는 경구용 멀티-카이네이즈 억제제(multi-kinase inhibitor)이다. 아시아 태평양 간 연구 협회(APASL)와 유럽 간 연구 협회(EASL)의 새로운 지침에 따르면, 소라페닙은 국소치료에 부적합한 진행성 간세포암종 환자의 1차 치료제로 권고된다. 또한 AASLD(American Association for the Study of Liver Diseases)에서도 소라페닙을 전신 제제로 권장하고 있다. 그러나 소라페닙은 약물 감수성의 급격한 감소와 종양 세포의 내성 획득으로 인해 단기적 항암 효과를 나타낸다. 일반적으로 소라페닙 치료를 받는 간세포암종 환자는 6개월 이내에 내성을 갖게 되며, 전체 생존 기간은 단 3개월 증가하게 된다. 종양 미세 환경, 상피에서 중간엽으로의 전이 및 암 줄기 세포와 같은 몇 가지 메커니즘이 소라페닙에 대한 낮은 종양 세포 민감도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Cancers 2020, 12, 1576; E Bio. Med. 2020, 51, 102610). 저산소증은 조절되지 않은 혈관 형성과 활발한 대사 활동으로 인해 발생하는데, 이는 간세포암종에서 HIF1α 및 핵 인자 카파 B(NF-κB)를 활성화시켜 소라페닙 내성의 주요한 종양 미세 환경을 만든다. 시험관 내 및 생체 내 동물 모델에서 소라페닙과 HIF1α 표적 치료제 또는 HIF1α 억제제의 조합이 여러 HCC 세포주에서 소라페닙 내성을 극복하는 것으로 입증되었다.

[0005] 암이 발생하면 암 대사가 변하게 되는데, 종양 성장 및 변화하는 종양 미세 환경에 적응하기 위한 생물 에너지 및 생합성이 요구된다. 간세포암종은 또한 포도당 대사 및 에너지 생산에서 아미노산 및 지방산 대사에 이르는 대사 과정에 상당한 변화를 특징으로 한다. 간세포암종에서 포도당 흡수의 증가가 종양 공격성과 열악한 임상 결과와 관련이 있다고 알려져 있다. 그러나 높은 해당 활성이 모든 간세포암종 종양 유형에서 보편적으로 관찰되는 것은 아니며, 정상 세포와 비교하여 영양소의 차등 이용과 조절되지 않는 영양소 수송 시스템과 같은 이질적인 대사 표현형이 간세포암종의 더 일반적인 특징이다. 최근 연구에서는 암의 시작과 진행을 위한 대체 에너지원으로서 아미노산이 중요하게 작용할 수 있음이 알려졌다. 이 중에서도 글루타민과 세린의 대사는 다양한 암에서 잘 보고되어 있지만 히스티딘과 같은 다른 아미노산에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

[0006] 소라페닙 내성과 관련된 암 대사의 변화에 대한 연구는 해당과정과 트리카르복실산 회로를 포함한 중심 탄소 대사에 초점이 맞추어져 있다. 본 발명자들은 간세포암에서 아미노산 대사에 대해 연구하던 중, 히스티딘이 저산소 조건의 간세포암종에서 소라페닙 내성을 극복하고, 히스티딘을 소라페닙의 병용 요법으로 사용하는 경우, 소라페닙 약물 감수성이 현저히 향상됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Cabral, L.K.D. et al., Cancers 2020, 12, 1576.

(비특허문헌 0002) Xia, S. et al., E Bio. Med. 2020, 51, 102610

(비특허문헌 0003) Zhu, Y.J. et al., Acta Pharmacol. Sin. 2017, 38, 614-622

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 간암 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 간암 치료 보조용 건강기능식품을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소라페닙 및 히스티딘을 포함하는 간암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 소라페닙 및 히스티딘은 1 : 600 내지 1600 몰농도 비로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 소라페닙 내성 간암인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 LAT1(Histidine transporter)의 발현 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한, 히스티딘을 유효성분으로 포함하는 간암 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 히스티딘은 소라페닙 치료 보조제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 LAT1의 발현 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측하는 방법을 제공한다:

[0020] (a) 대상체 (subject)로부터 분리된 시료로부터 DNA 또는 단백질을 추출하는 단계;

[0021] (b) LAT1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0022] (c) 상기 발현 수준이 대조군에 비해 증가한 경우, 소라페닙 및 히스티딘 벼용 치료에 대한 감수성이 높은 것으로 예측하는 단계.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 복수액 및 복막액으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에서는 대표적인 간암 치료제인 소라페닙의 내성을 극복하기 위하여 이미 안정성이 검증된 필수 아미노산인 히스티딘과의 병용 투여 요법을 제공함으로써, 간암 환자의 소라페닙 약물 감수성을 현저히 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명에서는 소라페닙과 히스티딘의 병용 투여에 적절한 환자군을 선별하여 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측함으로써 간암 치료 성공률을 현저히 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 HepG2 세포에 히스티딘 처리시 유전자 및 단백질 수준의 변화를 나타낸다.

도 1a는 상대적인 전사체 차이를 보여주기 위하여 생성된 RNA seq 데이터의 히트맵이다. 저산소 조건의 EBSS 배지에서 0 μM, 800 μM 및 1200 μM 히스티딘으로 처리 후 HepG2 세포의 유전자 발현 프로파일링에 의해 얻은 표시된 유전자의 배수 변화를 나타낸다.

도 1b 및 도 1c는 각각, 0 μM 히스티딘 처리 대비 800 μM(1b) 및 1200 μM(1c) 히스티딘 처리에 따라 HepG2 세포에서 차등적으로 발현된 유전자에 대한 GO 농축을 평가하기 위한 DAVID 기능 주석 분석 요약한 것이다.

도 1d는 저산소 상태(1% 산소)의 EBSS 배지에서 표시된 농도의 히스티딘과 함께 HepG2 세포를 배양하고, 24시간 후, GLUT1, hexokinase2(HK2) 및 β액틴 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 조사한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다.

도 1e는 도 1d와 동일한 조건에서 pSTAT3, STAT3, VEGFB, VEGFC, CD133, Snail/slug, β-actin의 단백질 수준을 웨스턴 블롯팅으로 조사한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다.

도 2는 해당 활성(glycolytic activity)의 차이가 있는 HCC 세포에서 LAT1의 발현을 비교한 결과이다.

도 2a는 Hep3B 세포를 스크램블된 siRNA(SC) 또는 HepG2 세포에서 LAT1(siLAT1)을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고, 24시간의 인큐베이션 후, 각각 1시간 및 6시간 동안 저산소증(1% 산소)하에 EBSS 배지에서 히스티딘(1200μM)으로 처리하였다. HAL(Histidine ammonia-lyase)의 mRNA 수준은 정량적 RT-PCR에 의해 평가되었다. 결과를 하우스키핑 유전자인 B2M으로 정규화하고 2-ΔΔCt 방법으로 평가하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD로 표시하였으며, 통계 분석은 GraphPad Prism을 사용하여 수행되고, 그룹 간의 비교는 쌍을 이루지 않은 t-검정을 사용하여 진행하였다. * $p < 0.05$.

도 2b 및 2c는 HepG2 및 Hpe3B에서 서 HK2(도 2b) 및 SLC7A5(도 2c)에 특이적인 프로브 세트를 사용하여 RT-PCR에 의해 HK2 및 SLC7A5의 mRNA 발현 수준을 평가한 결과이다. 표적 유전자의 발현은 2-ΔΔ방법을 사용하여 B2M(housekeeping gene)의 발현으로 정규화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD로 표시하였으며, 통계 분석은 GraphPad Prism을 사용하여 수행되고, 그룹 간의 비교는 쌍을 이루지 않은 t-검정을 사용하여 진행하였다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

도 2d는 HepG2 세포 및 Hep3B 세포에서 LAT1, HK2 및 β-액틴의 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 평가한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다. 데이터는 유사한 결과를 보이는 3회의 독립적인 실험의 대표 이미지를 표시하였다.

도 2e는 표시된 농도의 포도당으로 8시간 동안 배양한 후 HepG2 세포에서 HK2, GLUT1, LAT1 및 β-액틴의 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 평가한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다. 데이터는 유사한 결과를 보이는 3회의 독립적인 실험의 대표 이미지를 표시하였다.

도 2f는 표시된 농도의 포도당으로 8시간 동안 배양한 후 Hep3B 세포에서 HK2, GLUT1, LAT1 및 β-액틴의 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 평가한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다. 데이터는 유사한 결과를 보이는 3회의 독립적인 실험의 대표 이미지를 표시하였다.

도 2g는 HepG2 및 Hep3B 이종이식 모델의 포르말린 고정, 파라핀 포매 종양 조직을 GLUT1, HK2 및 LAT1 항체를 사용하여 이중 염색을 수행한 후 헤마톡실린으로 대조 염색을 수행한 결과이다. GLUT1 및 HK2는 갈색으로 표시되고 LAT1은 마젠타 핑크로 표시되었다. 스케일 바: 20 μm

도 3은 인간 HCC 종양 조직에서 LAT1, GLUT1, CD133 및 pSATA3의 발현 수준을 나타낸다.

도 3a는 HCC를 가진 인간 환자의 간 조직을 포르말린 고정, 파라핀 포매하고 GLUT1 및 LAT1 항체를 사용하여 이중 염색 면역조직화학을 수행하였다. GLUT1은 갈색으로 표시되고 LAT1은 마젠타 핑크로 표시된다. 단일 면역조직화학은 또한 CD133 및 pSTAT3 항체를 사용하여 수행하고, 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 스케일 바: 20μm.

도 3b는 LAT1 양성 영역과 GLUT1 양성 영역 간의 상관관계를 보여준다.

도 3c는 GLUT1 양성 영역과 CD133 양성 영역 간의 상관관계를 보여준다.

도 3d는 GLUT1 양성 영역과 pSTAT3 양성 영역 간의 상관관계를 보여준다.

Pearson의 상관 계수가 두 요인 간의 상관 관계를 계산하는 데 사용되었다. 스케일 바: 20μm.

도 4는 소라페닙과 히스티딘 병용요법의 항암효과를 보여준다.

도 4a는 HepG2 세포를 저산소 상태(1% 산소) 하에서 EBSS 배지에서 표시된 농도의 소라페닙과 히스티딘의 조합으로 처리하고 24시간 후, GLUT1, LAT1, HK2 및 β-액틴 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 평가한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다. 데이터는 유사한 결과를 보이는 3회의 독립

적인 실험의 대표 이미지를 표시하였다.

도 4b는 도 4a와 동일한 조건에서 STAT3, STAT3, VEGF B, VEGF C, CD133, Snail/slug, β-actin 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 평가한 결과이다. 액틴에 의해 정규화된 밴드 강도의 비율을 각 패널 아래에 표시하였다. 데이터는 유사한 결과를 보이는 3회의 독립적인 실험의 대표 이미지를 표시하였다.

도 5는 소라페닙과 히스티딘 병용요법의 항암효과를 보여준다.

도 5a는 EBSS 배지에서 1μM 소라페닙과 800μM 또는 1200μM L-히스티딘의 조합을 HepG2 세포에 처리하고 저산소 조건 (1% 산소)에서 24시간 동안 콜로니 형성 분석을 수행한 결과이다. 처리 후, 세포를 정상 성장 배지로 변경하였다. 3-4주 후에 세포를 고정하고 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 스케일 바: 1cm

도 5b는 상대적인 콜로니 수를 결정하기 위하여 정량 분석한 결과이다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD로 표시하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism을 사용하여 수행되었으며 그룹 간 비교는 Tukey의 다중 비교 테스트와 ANOVA를 사용하였다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

도 5c는 HepG2 세포로 마이그레이션 분석을 수행한 결과이다. 삽입된 HepG2 세포를 지시된 조건으로 처리하였다. 저산소 상태에서 24시간 배양 후 세포를 고정하고 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 스케일 바: 20μm.

도 5d의 막대 그래프는 상대적으로 마이그레이션 된 세포를 보여준다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD로 표시하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism을 사용하여 수행되었으며 그룹 간 비교는 Tukey의 다중 비교 테스트와 ANOVA를 사용하였다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0029] 소라페닙 내성을 극복하기 위하여 소라페닙을 다른 세포독성 화학요법제와 병용 투여하는 다양한 전략이 시도되었지만, 임상 시험에서 성공적인 사례는 아직 보고된 바 없다. 본 발명에서는 간세포암 (HCC) 세포에 히스티딘을 처리하면 종양 형성 및 종양 진행 관련 유전자 및 단백질의 발현 수준이 억제됨을 확인하였으며, 히스티딘을 간세포암종에 처리하면 간세포암종의 증식 및 이동을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명에서는 히스티딘을 간세포암 세포에 소라페닙과 함께 처리하는 경우, 소라페닙의 내성을 극복하고 소라페닙 약물 감수성을 현저히 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0031] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 소라페닙 및 히스티딘을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 소라페닙 및 히스티딘은 1 : 600 내지 1600 몰농도 비로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 1 : 800 내지 1200 몰농도비로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 소라페닙 내성 간암인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 LAT1의 발현 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 LAT1은 히스티딘 트랜스포터 또는 히스티딘 수용체로 지칭될 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 당 대사 비선호 간암인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0037] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈,

덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물에 포함된 상기 제제의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[0039] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다.

[0041] 본 발명의 용어 "개체" 또는 "대상체"란, 상기 간암이 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 간암을 치료할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어 "치료"란, 본 발명의 약학 조성물을 투여함으로써, 간암이 호전되거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 대상체에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 행위를 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0045] 본 발명의 용어, "내성"이란 항암제 치료 등에 대하여 극히 낮은 감수성을 나타내어 상기 치료법에 의하여 암의 증세가 호전, 완화, 경감 또는 치료증상을 나타내지 않는 암을 의미한다. 상기 내성암은 특정한 항암제 또는 방사선 치료에 대하여 처음부터 내성을 가질 수도 있고, 최초에는 내성을 나타내지 않았으나, 긴 시간의 치료로 인하여 암세포 내의 유전자가 변이 등이 되어 동일한 치료제에 대하여 더 이상 감수성을 나타내지 않게 되어 발생할 수도 있다.

[0047] 본 발명은 다른 관점에서, 히스티딘을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 히스티딘은 소라페닙 치료 보조제인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않

는다.

[0049] 즉, 본 발명에 있어서, 상기 히스티딘은 간암 환자에게 소라페닙을 투여하는데 내성에 의하거나 대상체에서 약물 민감도가 낮아 우수한 치료 효과가 발휘되지 않는 경우, 건강기능식품으로 함께 복용되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 LAT1의 발현 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0051] 본 발명에서 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0052] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0053] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0054] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 히스티딘을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0055] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분인 히스티딘을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 히스티딘을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0056] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 히스티딘과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0057] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 히스티딘과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0058] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0060] 한편, 다수의 간암 환자가 소라페닙 투여 및 치료에 있어 무반응자로 확인되어 치료를 시작하기 전에 치료 반응을 예측할 수 있는 방법 및 이를 확인할 수 있는 방법이 없었고, 신뢰성 있는 유전자마커 (biomarker)에 대한 연구가 부족하여 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여 적합한 약물투여를 하기가 매우 어려운 문제점이 있었다. 나아가, 아직까지 실질적으로 다수의 간암 환자에 대하여 적절한 소라페닙을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하여 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있도록, 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측할 수 있는 방법에 대한 연구가 부족하다는 문제점이 있었다.

[0061] 이에 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 간암 환자로부터 시료를 채취하여 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 영향을 끼치는 LAT1 유전자의 발현을 분석함으로써, 소라페닙과 히스티딘의 병용 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공하여 상술한 문제의 해결을 모색하였다.

[0062] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 다음 단계를 포함하는 소라페닙 및 히스티딘 병용치료에 대한 감수성을 예측하는 방법에 관한 것이다:

[0063] (a) 대상체 (subject)로부터 분리된 시료로부터 DNA 또는 단백질을 추출하는 단계;

[0064] (b) LAT1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0065] (c) 상기 발현 수준이 대조군에 비해 증가한 경우, 소라페닙 및 히스티딘 병용 치료에 대한 감수성이 높은 것으

로 예측하는 단계.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 복수액 및 복막액으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 LAT1 유전자는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0068] 서열번호 1: LAT1 유전자

[0069] 1 acgcagctgc gggcggcggg cggcgcgcac actgctcgct gggccgcggc tcccgggtgt

[0070] 61 cccaggcccg gccggtgcgc agagcatggc gggtgcgggc ccgaagcggc gcgcgctagc

[0071] 121 ggcgccggcg gccgaggaga aggaagaggc gcgggagaag atgctggccg ccaagagcgc

[0072] 181 ggacggctcg gcgccggcag gcgagggcga gggcgtgacc ctgcagcgga acatcacgct

[0073] 241 gctcaacggc gtggccatca tcgtggggac cattatcggc tcgggcatct tcgtgacgcc

[0074] 301 cacgggcgtg ctcaaggagg caggctcgcc ggggctggcg ctggtggtgt gggccgcgtg

[0075] 361 cggcgtcttc tccatcgtgg gcgcgctctg ctacgcggag ctcggcacca ccatctccaa

[0076] 421 atcgggcggc gactacgcct acatgctgga ggtctacggc tcgctgcccg ccttcctcaa

[0077] 481 gctctggatc gagctgctca tcatccggcc ttcatcgcag tacatcgtgg ccctggtctt

[0078] 541 cgccacctac ctgctcaagc cgctcttccc cacctgcccg gtgcccgagg aggcagccaa

[0079] 601 gctcgtggcc tgcctctgcg tgctgctgct cacggccgtg aactgctaca gcgtgaaggc

[0080] 661 cgccacccgg gtccaggatg cctttgccgc cgccaagctc ctggccctgg ccctgatcat

[0081] 721 cctgctgggc ttcgtccaga tcgggaaggg tgatgtgtcc aatctagatc ccaacttctc

[0082] 781 atttgaaggc accaaactgg atgtggggaa cattgtgctg gcattataca gcggcctctt

[0083] 841 tgcctatgga ggatggaatt acttgaattt cgtcacagag gaaatgatca acccctacag

[0084] 901 aaacctgccc ctggccatca tcatctccct gcccatcgtg acgctggtgt acgtgctgac

[0085] 961 caacctggcc tacttcacca ccctgtccac cgagcagatg ctgtcgtccg aggccgtggc

[0086] 1021 cgtggacttc gggaactatc acctgggcgt catgtcctgg atcatccccg tcttcgtggg

[0087] 1081 cctgtcctgc ttcggctccg tcaatgggtc cctgttcaca tcctccaggc tcttcttcgt

[0088] 1141 ggggtcccgg gaaggccacc tgccctccat cctctccatg atccacccac agctcctcac

[0089] 1201 ccccgtgccg tccctcgtgt tcacgtgtgt gatgacgctg ctctacgcct tctccaagga

[0090] 1261 catcttctcc gtcatcaact tcttcagctt cttcaactgg ctctgcgtgg ccctggccat

[0091] 1321 catcggcatg atctggctgc gccacagaaa gcctgagctt gagcggccca tcaaggtgaa

[0092] 1381 cctggccctg cctgtgttct tcatcctggc ctgcctcttc ctgatcgccg tctccttctg

[0093] 1441 gaagacaccc gtggagtgtg gcatcggctt caccatcatc ctcagcgggc tgcccgtcta

[0094] 1501 cttcttcggg gtctggtgga aaaacaagcc caagtggctc ctccagggca tcttctccac

[0095] 1561 gaccgtcctg tgtcagaagc tcatgcaggt ggtcccccag gagacatagc caggaggccg

[0096] 1621 agtggctgcc ggaggagcat gcgcagaggc cagttaaagt agatcacctc ctcgaaccca

[0097] 1681 ctccggttcc ccgcaaccca cagctcagct gcccatccca gtccctcgcc gtccctccca

[0098] 1741 ggtcgggcag tggaggctgc tgtgaaaact ctggtacgaa tctcatccct caactgaggg

[0099] 1801 ccagggaccc aggtgtgcct gtgctcctgc ccaggagcag cttttggtct ccttgggccc

[0100] 1861 tttttccctt ccctcctttg tttacttata tatatatttt ttttaaactt aaattttggg

[0101] 1921 tcaacttgac accactaaga tgatttttta aggagctggg ggaaggcagg agccttcctt

[0102] 1981 tctcctgccc caagggccca gaccctgggc aaacagagct actgagactt ggaacctcat

[0103] 2041 tgctaccaca gacttgcact gaagccggac agctgcccag acacatgggc ttgtgacatt

[0104] 2101 cgtgaaaacc aaccctgtgg gcttatgtct ctgccttagg gtttgcagag tggaaactca

[0105] 2161 gccgtagggt ggcactggga gggggtgggg gatctgggca aggtgggtga ttcctcccag

[0106] 2221 gaggtgcttg aggccccgat ggactcctga ccataatcct agccccgaga caccatcctg

[0107] 2281 agccagggaa cagccccagg gttgggggggt gccggcatct cccctagctc accaggcctg

[0108] 2341 gcctctgggc agtgtggcct cttggctatt tctgtgtcca gttttggagg ctgagttctg

[0109] 2401 gttcatgcag acaaagccct gtccttcagt cttctagaaa cagagacaag aaaggcagac

[0110] 2461 acaccgcggc caggcaccca tgtgggcgcc caccctgggc tccacacagc agtgtcccct

[0111] 2521 gccccagagg tcgcagctac cctcagcctc caatgcattg gcctctgtac cgcccggcag

[0112] 2581 ccccttctgg ccggtgctgg gttcccactc ccggcctagg cacctccccg ctctccctgt

[0113] 2641 cacgctcatg tcctgtcctg gtcctgatgc ccgttgtcta ggagacagag ccaagcactg

[0114] 2701 ctcacgtctc tgccgcctgc gtttggaggc ccctgggctc tcacccagtc cccacccgcc

[0115] 2761 tgcagagagg gaactagggc acccccttgtt tctgttgttc ccgtgaattt ttttcgctat

[0116] 2821 gggaggcagc cgaggcctgg ccaatgcggc ccactttcct gagctgtcgc tgcctccatg

[0117] 2881 gcagcagcca gggacccccca gaacaagaag accccgcagg atccctcctg agctcggggg

[0118] 2941 gctctgcctt ctcaggcccc gggcttccct tctccccagc cagaggtgga gccaagtggt

[0119] 3001 ccagcgtcac tccagtgctc agctgtggct ggaggagctg gcctgtggca cagccctgag

[0120] 3061 tgtcccaagc cgggagccaa cgaagccgga cacggcttca ctgaccagcg gctgctcaag

[0121] 3121 ccgcaagctc tcagcaagtg cccagtggag cctgccgccc ccgcctgggc accgggaccc

[0122] 3181 cctcaccatc cagtgggccc ggagaaacct gatgaacagt ttggggactc aggaccagat

[0123] 3241 gtccgtctct cttgcttgag gaatgaagac ctttattcac ccctgccccg ttgcttcccg

[0124] 3301 ctgcacatgg acagacttca cagcgtctgc tcataggacc tgcatccttc ctggggacga

[0125] 3361 attccactcg tccaagggac agcccacggt ctggaggccg aggaccacca gcaggcaggt

[0126] 3421 ggactgactg tgttgggcaa gacctcttcc ctctgggcct gttctcttgg ctgcaaataa

[0127] 3481 ggacagcagc tggtgcccca cctgcctggt gcattgctgt gtgaatccag gaggcagtgg

[0128] 3541 acatcgtagg cagccacggc cccgggtcca ggagaagtgc tccctggagg cacgcaccac

[0129] 3601 tgcttcccac tggggccggc ggggcccacg cacgacgtca gcctcttacc ttcccgcctc

[0130] 3661 ggctaggggt cctcgggatg ccgttctgtt ccaacctcct gctctgggac gtggacatgc

[0131] 3721 ctcaaggata cagggagccg gcggcctctc gacggcacgc acttgcctgt tggctgctgc

[0132] 3781 ggctgtgggc gagcatgggg gctgccagcg tctgttgtgg aaagtagctg ctagtgaaat

[0133] 3841 ggctggggcc gctggggtcc gtcttcacac tgcgcaggtc tcttctgggc gtctgagctg

[0134] 3901 gggtgggagc tcctccgcag aaggttggtg gggggtccag tctgtgatcc ttggtgctgt

[0135] 3961 gtgccccact ccagcctggg gaccccactt cagaaggtag gggccgtgtc ccgcggtgct

[0136] 4021 gactgaggcc tgcttccccc tccccctcct gctgtgctgg aattccacag ggaccagggc

[0137] 4081 caccgcaggg gactgtctca gaagacttga tttttccgtc ccttttttctc cacactccac

[0138] 4141 tgacaaacgt ccccagcggt ttccacttgt gggcttcagg tgttttcaag cacaacccac

[0139] 4201 cacaacaagc aagtgcattt tcagtcgttg tgctttttg ttttgtgcta acgtcttact

[0140] 4261 aatttaaaga tgctgtcggc accatgttta tttatttcca gtggtcatgc tcagccttgc

[0141] 4321 tgctctgcgt ggcgcaggtg ccatgcctgc tccctgtctg tgtcccagcc acgcagggcc

[0142] 4381 atccactgtg acgtcggccg accaggctgg acaccctctg ccgagtaatg acgtgtgtgg

[0143] 4441 ctgggacctt ctttattctg tgttaatggc taacctgtta cactgggctg ggttgggtag

[0144] 4501 ggtgttctgg ctttttgtg gggtttttat ttttaaagaa acactcaatc atccta

[0146] 본 발명에 있어서, 상기 LAT1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0147] 서열번호 2: LAT1 단백질

[0148] MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIV

[0149] GTIIGSGIFVTPTGVLKEAGSPGLALVVWAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYM

[0150] LEVYGSLPAFLKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLKPLFPTCPVPEEAAKLVACLCVL

[0151] LLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAAKLLALALIILLGFVQIGKGDVSNLDPNFSFEGTKLDV

[0152] GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPLAIIISLPIVTLVYVLTNLAYFTTL

[0153] STEQMLSSEAVAVDFGNYHLGVMSWIIPVFVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP

[0154] SILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIIGMIWLRH

[0155] RKPELERPIKVNLALPVFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWWKN

[0156] KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET

[0158] 본 발명에 있어서, 상기 발현 수준은 대조군에 비해 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게는 30% 이상, 가장 바람직하게는 50% 이상 증가한 경우, 소라페닙 및 히스티딘 병용 치료에 대한 감수성이 높은 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0159] 본 발명에 있어서, 상기 대조군은 간암이 발병하지 않은 개체를 의미할 수 있다.

[0160] 본 발명은 다른 관점에서 LAT1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 간암 환자의 소라페닙 치료에 대한 감수성 예측용 조성물에 관한 것이다.

[0161] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 LAT1 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 LAT1 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0162] 상기 조성물은 또한, 시료의 DNA를 증폭시킬 수 있는 증폭수단을 더 포함할 수 있고, 또한 선택적으로 검체로부터 유전자를 추출하는 수단을 포함할 수도 있다. 상기 PCR을 이용하여 시료의 DNA를 증폭시키는 방법 및 검체로부터 유전자를 추출하는 방법은 당업계에 공지되어 있으므로, 본 명세서에서는 이에 관한 자세한 설명은 생략한다.

[0163] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트 (template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리

머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0164] 본 발명에서 용어, "프로브" 란 mRAN와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다.

[0165] 프로브는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0166] 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, 포스소트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0167] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 LAT1 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0168] 본 발명에서 단백질 수준에서의 정성적 또는 정량적 검출/측정 방법으로는 예를 들면 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사선면역분석, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 용액/현탁액 중에서 표지된 항체와의 결합, 질량분석 또는 항체를 이용한 단백질 어레이 등을 이용한 방법이 사용될 수 있다.

[0169] 이러한 방법에 사용되는 시약 또는 물질은 공지된 것으로서, 예를 들면 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 핵산 또는 펩타이드 앱타머, 또는 상기 마커와 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 리간드 또는 보조인자 등이 사용될 수 있으며, 단백질에 특이적 결합이 가능한 항체, 항체 단편, 앱타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)를 포함한다.

[0170] 본 발명의 LAT1 단백질 검출은 LAT1 단백질과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머와 LAT1 단백질의 복합체를 검출하는 방법에 기초한다. 복합체의 검출을 용이하게 하기 위해 본 발명의 LAT1 단백질과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 형광물질, 예를 들어 플루오레세인 (fulorescein) Cy3 또는 Cy5, 방사성물질 또는 화학물질, 예를 들어 비오틴 (biotin)으로 표지되거나 1차 아민 (primary amine)으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0171] 본 발명의 LAT1 단백질과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머는 예를 들어, 비오티닐화 (biotinylated) 될 수 있고, 이는 스트랩트아비딘 (streptavidin)이 코팅된 well상에 성공적으로 고정시킬 수 있다. well상에 고정화된 본 발명의 LAT1 단백질과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머는 LAT1 단백질이 결합될 수 있으며, 이와 같이 well 고정 DNA 앱타머에 결합된 LAT1은 다시 LAT1 단백질과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 이용하여 포획 유무를 시각화할 수 있다.

[0172] 본 발명에서 용어, "예측"이란 환자가 화학요법 등 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 환자의 치료, 예를 들어 특정 치료제, 및/또는 원발성 종양의 수술로 제거, 및/또는 암 재발 없이 특정 시기 동안 화학요법으로 치료된 후 생존할 여부 및/또는 가능성과 관련된다. 본 발명의 예측 방법은 간암 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 예측 방법은 환자가 예를 들어 소정 치료제 또는 조합물, 외과적 개입, 화학요법 등의 투여를 비롯한 소정 치료 처방과 같은 치료 처방에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존이 가능한지 여부를 예측할 수 있다.

[0174] **실시예**

[0176] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적

으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0178] **실시예 1. 실험방법**

[0179] **1-1. 시료**

[0180] Sorafenib(Santa Cruz(Dallas, TX, USA))을 DMSO(dimethyl sulfoxide)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹여 10mM 농도의 스톡 용액을 만들고 -80℃에서 보관하였다. L-히스티딘 및 D-포도당은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 이들을 각각 100mM 및 1M이 되도록 순수한 물에 용해시켰다.

[0182] **1-2. 세포 배양 및 처리**

[0183] 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 입수한 HepG2 세포는 RPMI-1640(Gibco, Thermo Inc., Wilmington, DE, USA)에서 배양하였고, 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 입수한 Hep3B 세포는 10% 태아 소 혈청(FBS, Hyclone, Marlborough, MA, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco, Thermo Inc.)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle 배지(DMEM)(Gibco, Thermo Inc.)에서 배양하였다. 모든 세포는 인큐베이터(37℃, 5% CO_2)에서 배양하였다. 정기적인 마이코플라스마 검사를 통해 세포 오염을 확인하였다.

[0184] 1% O_2, 5% CO_2 및 94% N_2에서 저산소 챔버(Billups-Rothenberg, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 저산소 조건을 생성하였다. 8 시간의 인큐베이션 후, 추가 분석을 위해 세포를 수확하였다.

[0185] HepG2 세포에서 SLC7A5를 침묵시키기 위해 제조사의 지시에 따라 Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 두 개의 siSLC7A5(Bioneer, Daejeon, Korea)의 혼합물로 형질감염시켰다. Scrambled siRNA를 음성 대조군으로 사용하였다. 인간 SCL7A5를 표적으로 하는 siRNA의 서열은 다음과 같다: (i) sense: 5'-CUGAUCGCCGUCUCCUUCUtt-3'; antisense: 5'-AGAAGGAGACGGCGAUCAGtt-3'; (ii) sense: 5'-GUUUUGUGCUAACGUCUUAtt-3'; antisense: 5'-UAAGACGUUAGCACAAAACtt-3'.

[0187] **1-3. 웨스턴 블롯팅**

[0188] 총 단백질을 추출하기 위하여 프로테아제 억제제(Roche, Basel, Switzerland) 및 포스파타제 억제제(GenDEPOT, Katy, TX, USA)가 포함된 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 용해 완충액(1% SDS, 60mM Tris-HCl)을 사용하였다. 웨스턴 블롯팅은 이전 보고된 방법(Clin. Exp. Metastasis 2017, 34, 251-260)과 같이 진행하였다. 사용된 1차 항체는 다음과 같다: hexokinase 2 (HK2, ab209847, EPR20839, 1:500), glucose transporter 1(GLUT1, ab652, 1:2000), L-type amino acid transporter 1 (LAT1, ab208776, EPR17573, 1:1000), vascular endothelial growth factor B (VEGFB, ab110649, EPR4555, 1:1000), VEGFC (ab135506, 1:2000), CD133 (ab19898, 1:1000), Snail/Slug (ab180714, 1:1000)은 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였고, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3, #9139, 1:1000), pSTAT3 (#9145, D3A7, 1:2000)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, β-actin-HRP (sc-47778, C4, 1:5000)는 Santa Cruz Biotechnology (Dalla, TX, USA)에서 구입하였다. 화학 발광 웨스턴 블롯팅의 디지털 시각화를 위해 ChemiDoc XRS(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)가 사용되었다. 이들 실험은 비슷한 결과로 최소 3번 반복되었으며, ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 및 BioRad Image Lab 6(Bio-Rad)을 밴드 정량에 사용하였다.

[0190] **1-4. RNA 시퀀싱 및 Real-Time PCR (RT-PCR)**

[0191] 총 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 추출하였다. RNA는 ND-2000 분광광도계(Thermo Inc.)를 사용하여 정량하였다. 저산소 조건에서 히스티딘 처리 후 HepG2 세포에서 총 RNA를 추출하였다 (Sci. Rep. 2020, 10, 15219 참조). RNA 시퀀싱 및 데이터 분석은 EBIOGEN Inc(서울, 한국)에서 평가하였다. 정량적 RT-PCR을 위해 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix(TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 생성하고 C1000™Thermal Cycler(Bio-Rad)를 사용하여 유전자 발현을 측정하였다. 각 실험에 대해 mRNA의 발현 수준을 3회 측정하였다. 유전자 발현 수준은 통계 분석 전에 하우스키핑 유전자인 베타-2 마이크로글로불린(B2M)의 mRNA 발현 수준으로

정규화되었다. 다음 프라이머(Bioneer)가 사용되었다: HK2 (Forward 5'-AAGGTAGAAATGGAGCGAGGT-3', reverse 5'-CCCGGAAATTTGTTCCTCCAA-3'), SLC7A5 (Forward 5'-CCTCCATCCTCTCCATGATCC-3', reverse 5'-AGCCAGTTGAAGAAGCTGAAG-3'), 및 B2M (Forward 5'-TTACTCACGTCATCCAGCAGA-3', reverse 5'-AGAAAGACCAGTCCTTGCTGA-3').

[0193] **1-5. 세포 이동 및 세포 생존 분석**

[0194] 24웰 BioCoat(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)를 사용하여 세포이동 분석을 수행하였다. 1% FBS와 소라페닙, 히스티딘 또는 소라페닙과 히스티딘의 조합을 포함하는 EBSS 배지의 HepG2 세포(2 x 10^5 cells/well)를 삽입물에 추가하였다. 하부 웰은 10% FBS가 보충된 EBSS로 채워졌다. 24시간 후, 이동된 세포를 4% 파라포름알데히드(PFA)에 20분 동안 고정하고 시각화를 위해 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 상기 분석은 3개로 샘플을 복제하여 3회의 독립적인 실험으로 수행하였다. ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 이동된 세포를 계산하였다. 세포 생존율은 WST-1 비색 분석법(Roche, Mannheim, Germany)에 의해 소라페닙 또는 소라페닙과 800 μM 히스티딘 조합 처리 후 측정되었다. 6개로 샘플을 복제하여 3회의 독립적인 실험으로 수행하였다. 콜로니 형성 분석을 위해 HepG2 세포(1000개 세포/웰)를 6웰 플레이트에 플레이팅하고 EBSS 배지에서 소라페닙, 히스티딘 또는 소라페닙과 히스티딘의 조합으로 처리하였다. 24시간 후, 배지는 3주 동안 3-4일마다 교체되었으며, 세포를 4% PFA로 고정하고 크리스탈 바이올렛(PBS 중 0.1% v/v)으로 염색하였다. 상기 분석은 3개로 샘플을 복제하여 3회의 독립적인 실험으로 수행하였다. 콜로니 카운팅은 ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0196] **1-6. 면역염색**

[0197] 모든 동물 실험은 인천대학교 동물연구소 동물관리위원회의 승인을 받았다(승인번호: 2019-13). 암컷 BALB/c 누드 마우스 (4-5주령)는 DBL(서울, 한국)에서 구입하였다. Matrigel(100 μL, Sigma Aldrich)과 혼합된 HepG2 및 Hep3B 세포(1 x 10^6 세포)를 BALB/c 누드 마우스에 피하 주사하였다. 종양 크기가 1000 mm^3에 도달했을 때, 마우스를 심장 천자로 안락사시키고 종양을 10% 포름알데히드(Sigma Aldrich)로 고정시켰다. 29명의 환자로부터 얻은 37개의 인간 간세포암종 조직이 이 연구에 사용되었다. 본 발명에서 조사된 환자의 특징은 표 1에 요약되어 있다.

표 1

Characteristics	
Age, year	
Mean ± SD	57.4±10.01
Range	39-74
Sex	
Male	72.4%
Female	29.6%
Tumor size (cm)	
Mean ± SD	3.43±1.18
Range	1.7-5.6
AFP (ng/ml)	
Mean ± SD	357.06±758.7
Range	1.47-3150.32

[0199] .

[0201] 상기 인간을 대상으로 하는 연구는 연세대 세브란스 병원(서울, 한국)의 기관 심사 위원회의 승인을 받았다. 모든 실험은 관련 지침 및 규정에 따라 수행되었다 (Yonsei IRB number: 4-2015-0904). 모든 환자는 본 연구에 대한 자세한 정보를 받은 후 구두 및 서면 동의를 제공하고 데이터 수집에 동의하였다. 인간 환자와 동물의 파라핀 슬라이드를 사용하여 이전에 보고된 바와 같이 면역 염색을 수행하였다 (Acta Neuropathol. 2013, 126, 137-150). 사용된 1차 항체는 다음과 같다: pSTAT3 (#9145; Cell Signaling Technology; dilution 1:300), LAT1 (ab208776; Abcam; 1:300), GLUT1(ab115730; Abcam;1:500), CD133 (ab19898; Abcam;1:2000), 및 HK2 (ab104836; Abcam; 1:500). Olympus BX53 현미경을 사용하여 이미지를 획득하고 Olympus Cell Sens(Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 양성 종양 영역을 정량화하였다.

[0203] **1-7. 통계분석**

[0204] GraphPad Prism(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 통계 분석에 사용하였다. 데이터는 쌍을 이루지 않은 t-검정 또는 Tukey의 다중 비교 검정을 사용한 일원 분산 분석(ANOVA)으로 분석되었다. Pearson의 상관계수는 두 요인 간의 상관 관계를 계산하는 데 사용되었다. 모든 데이터는 평균 ± SD(표준편차)로 표시되며 통계적 유의성은 $p < 0.05$로 설정되었다.

[0206] **실시예 2. HepG2 세포에 대한 외인성 히스티딘 처리의 효과**

[0207] 저산소 미세 환경은 간세포암종에서 소라페닙 내성을 유발한다. 소라페닙 내성에 대한 히스티딘의 효과를 조사하기 위하여, 저산소 조건에서 세포외 히스티딘 처리 후 HepG2 세포를 사용하여 전체 유전자 발현 프로파일을 평가하였다 (도 1a).

[0208] 총 729개 및 869개 유전자는 처리되지 않은 세포의 수준과 비교하여 각각 800 μM 및 1200 μM에서 히스티딘 처리 후 HepG2 세포에서 발현량이 변화하였다 (0 μM 히스티딘 대비 배수 변화 > 1.5, $p < 0.05$). 발현량이 변화되는 유전자의 생물학적 의미를 규명하기 위해 DAVID GO 온라인 분석 툴(https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp,

2021년 11월 30일 분석)이 사용되었다. 히스티딘 처리 후 발현량이 변화된 유전자는 당분해 과정(glycolytic process), 해당 과정(glycolysis), 염증 및 저산소증과 관련이 있는 Gene Ontology (GO)가 확인되었다 (도 1b, 1c). 유전자 발현 분석 결과를 확인하기 위하여 GO 분석에 포함된 유전자가 코딩하는 단백질에 대해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0209] 해당 작용 관련 단백질 GLUT1 및 HK2의 발현 수준은 히스티딘 처리 후 용량 의존적 방식으로 하향 조절되었다 (도 1d). 염증의 핵심 인자인 인산화 STAT(pSTAT)의 감소된 수준도 관찰되었다. 또한, VEGFB 및 VEGFC(혈관신생 마커), CD133(줄기 세포 마커) 및 Snail/slug (전이 마커)의 발현 수준은 히스티딘 처리 후 하향 조절되었다 (도 1e). 전체적으로 히스티딘 처리는 HCC 세포에서 항종양 효과를 유도하였다.

[0211] **실시예 3. 해당과정의 차이를 보이는 HCC 세포주에서 SLC7A5/LAT1의 발현**

[0212] 히스티딘 처리가 해당과정 마커를 하향 조절하는 것을 관찰한바, 히스티딘의 사용이 HCC 세포의 해당과정과 관련이 있는지 여부를 추가로 평가하였다. SLC7A5/LAT1은 APC 슈퍼패밀리에 속하며 히스티딘을 포함한 중성 필수 아미노산의 세포 내 유입을 매개한다. LAT1 녹다운된 HepG2 세포에 히스티딘 처리 후 히스티딘 암모니아-분해효소 (HAL) 발현이 감소되었으며, 이는 세포외 히스티딘 흡수가 LAT1에 의해 부분적으로 매개됨을 시사한다 (도 2a).

[0213] 다음으로, 해당과정의 차이가 있는 HCC 세포주에서 SLC7A5/LAT1 발현이 유전자 및 단백질 수준에서 평가되었다. HK2/HK2의 발현이 낮은 HepG2 세포는 Hep3B 세포보다 SLC7A5/LAT1의 더 높은 발현 수준을 보여주었다(도 2b - 2d). HCC 세포에서 LAT1 발현은 포도당 유도 해당과정 후 현저하게 하향 조절되었다 (도 2e, 2f). 마지막으로, HepG2 및 Hep3B 세포로 이종이식 모델을 생성하고 HK2(갈색) 및 LAT1(마젠타 핑크)과 GLUT1(갈색) 및 LAT1(마젠타 핑크)의 이중 면역염색을 수행하였다. HK2 및 GLUT1의 낮은 발현을 갖는 HepG2-이종이식 모델의 HCC 조직이 HK2 및 GLUT1의 높은 발현을 갖는 Hep3B-이종이식 모델의 HCC 조직과 비교하여 LAT1의 더 높은 발현을 나타내었다(도 2g). 따라서 LAT1는 해당과정의 HCC 세포에서 하향 발현된다.

[0215] **실시예 4. 간세포암종 환자에서 SLC7A5/LAT1 발현**

[0216] 상기 결과를 다시 한 번 확인하고자, 인간 HCC 종양 조직에서 LAT1 발현을 평가하였다 (n=37). 세포주 및 동물 모델을 사용하여 얻은 결과와 유사하게, GLUT1(갈색)의 발현이 감소된 종양 영역은 LAT1(마젠타 핑크)의 증가된 발현을 보였고 그 반대도 마찬가지였다 (도 3a). 정량적 분석은 LAT1- 및 GLUT1-양성 영역($r = -0.1264$, $p = 0.0308$) 사이의 음의 상관관계를 보여주었다 (도 3b).

[0217] 또한 CD133 및 pSTAT3과 같은 소라페닙 내성 관련 단백질의 발현 수준을 평가한 결과, CD133과 GLUT1 발현($r = 0.1085$, $p = 0.0465$) (도 3c)과 pSTAT3과 GLUT1 발현($r = 0.1057$, $p = 0.0496$) 사이에는 양의 상관관계가 확인되었다 (도 3d). 전체적으로, LAT1 발현은 소라페닙 내성을 유도하는 것으로 알려진 GLUT1, CD133 및 pSTAT3의 높은 발현과 함께 HCC 종양 영역에서 하향조절되었다.

[0219] **실시예 5. 소라페닙과 히스티딘 병용 투여 후 항암 효과 증가**

[0220] 소라페닙 내성 간세포암종 세포는 해당작용, 중간엽, 줄기세포 특성을 나타낸다. 세포외 히스티딘 처리가 소라페닙의 항암 효과를 향상시킬 수 있는지 알아보고자, 히스티딘과 소라페닙의 조합을 HepG2 세포에 처리하였다. 해당 작용 관련 단백질 GLUT1 및 HK2의 발현 수준은 병용 처리 후 감소하였다 (도 4a). 또한 병용 처리 후 HepG2 세포에서 pSTAT3, VEGF, CD133 및 Snail/slug의 하향 조절을 관찰하였다 (도 4b). 히스티딘과 소라페닙의 상승적인 항암 효과를 평가하기 위해 HepG2 세포에서 세포 생존력 및 집락 형성 분석을 수행한 결과, 소라페닙과 히스티딘 병용 처리 후 세포 생존율의 감소는 단일 소라페닙 치료 후보다 훨씬 더 높게 나타났다 (데이터 미도시). 콜로니 수는 소라페닙 내성 세포의 형성으로 인해 대조군보다 1μM 소라페닙 단일 처리 후 더 높았다 (대조군 대비 +33%). 그러나, 히스티딘과 소라페닙을 병용 처리한 후 각각의 단일 투여 후와 비교한 결과, 콜로니 수가 감소하였다 (소라페닙 처리 대비 -60%) (도 5a, 5b).

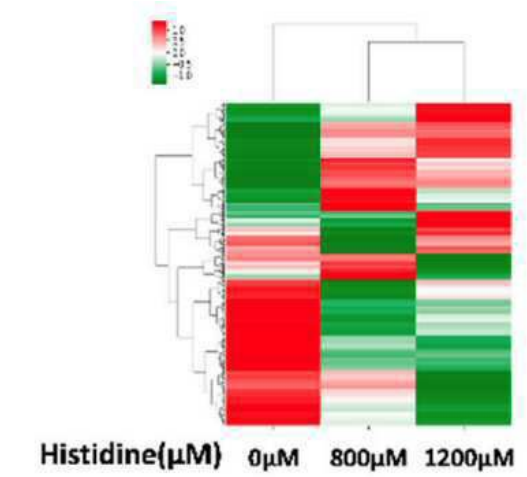
[0221] 다음으로, 병용 치료의 증가된 항암 효과를 확인하기 위해 소라페닙과 히스티딘 처리 후 세포 이동을 측정하였다 (도 5c). 이동된 HepG2 세포의 수는 단일 제제로 처리한 후보다 병용 처리 후에 현저히 더 낮았다 (도 5d).

[0222] 상기와 같은 결과로부터, HepG2 세포에서 소라페닙 처리 후 항종양 효과를 확인할 수 있었다.

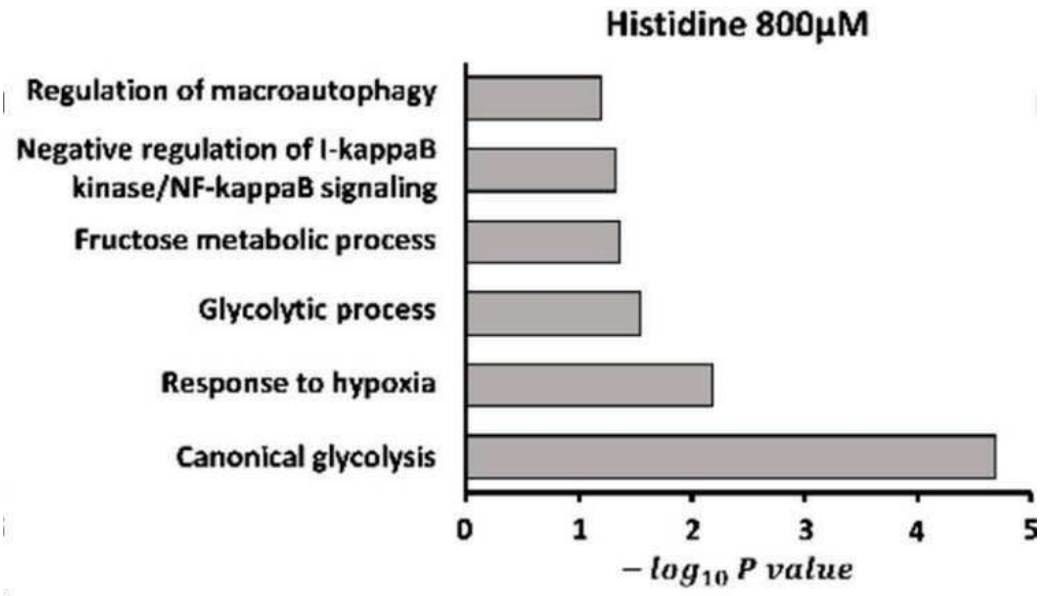
[0224] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

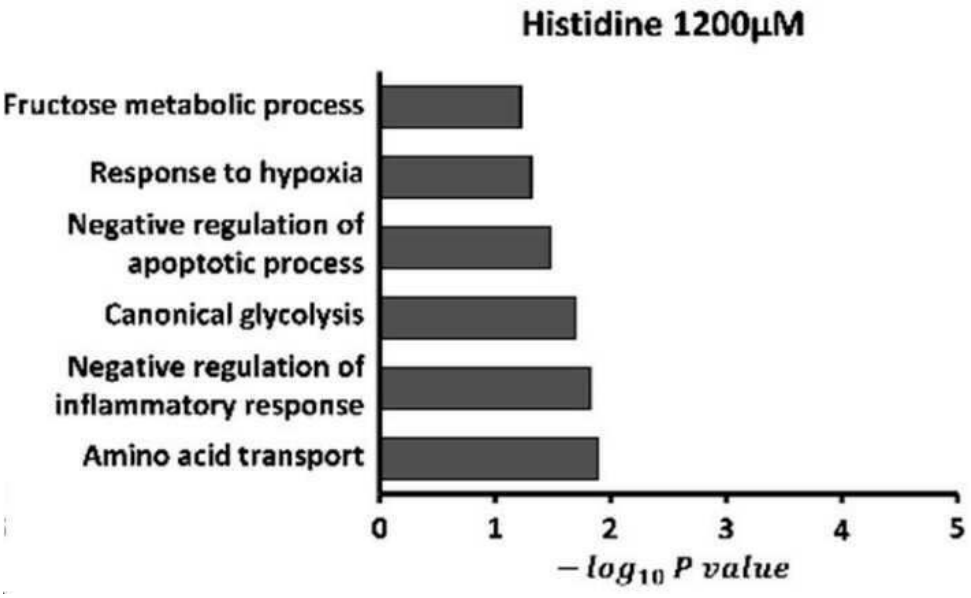
도면1a



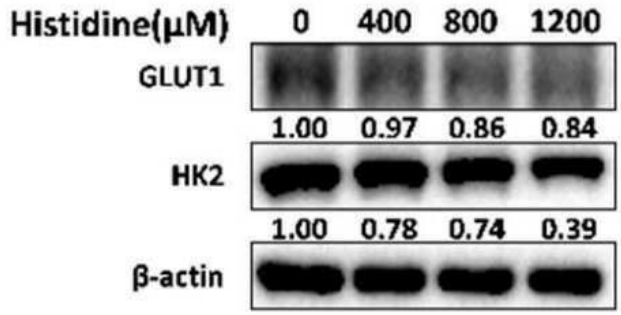
도면1b



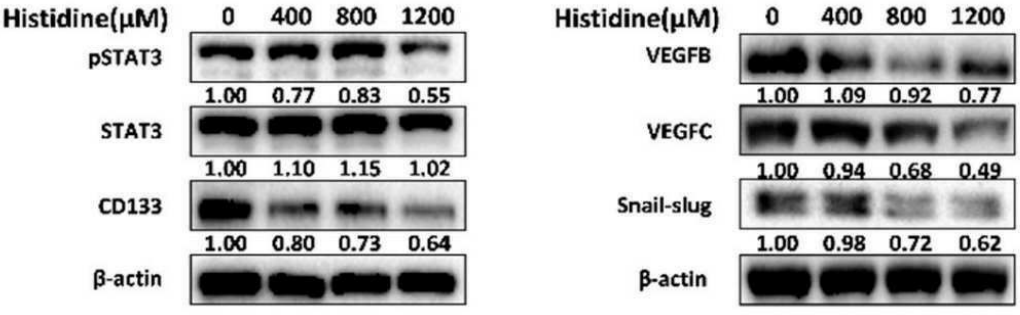
도면1c



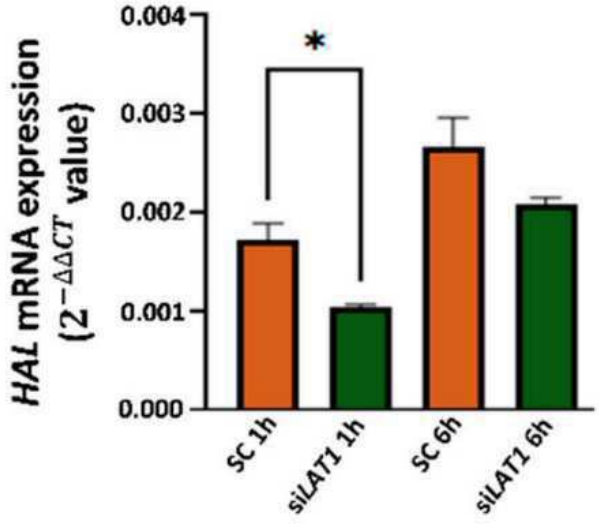
도면1d



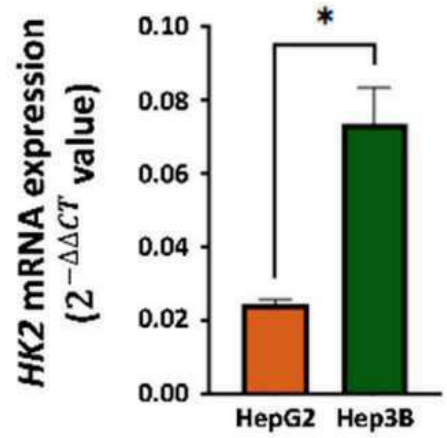
도면1e



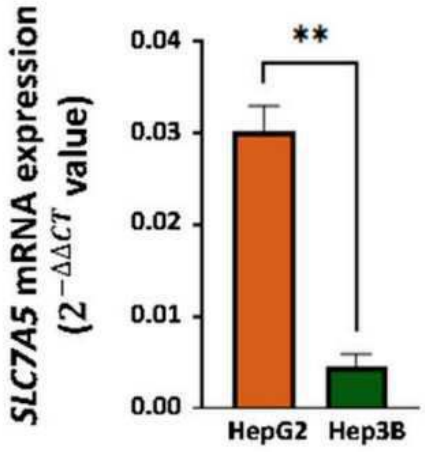
도면2a



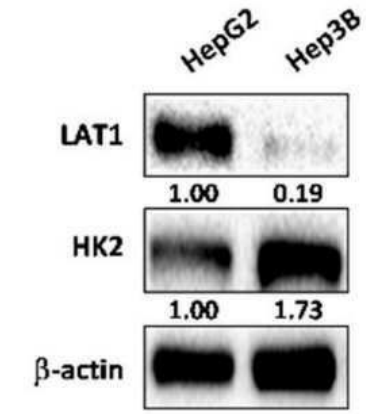
도면2b



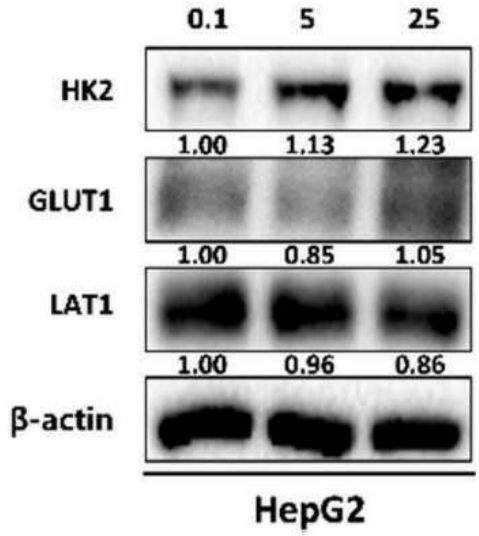
도면2c



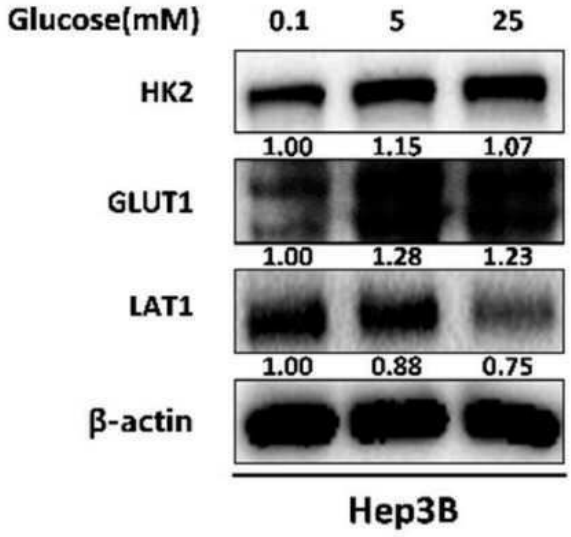
도면2d



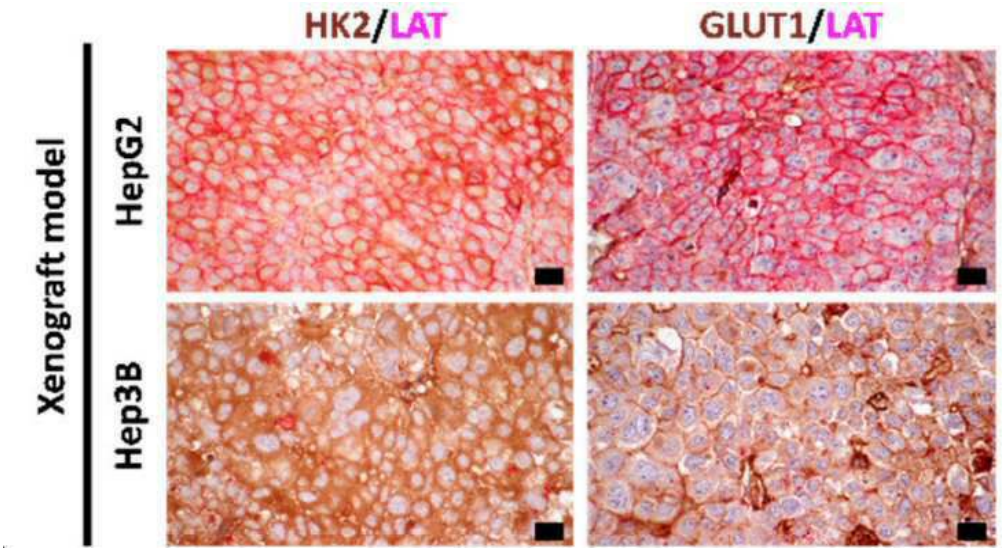
도면2e



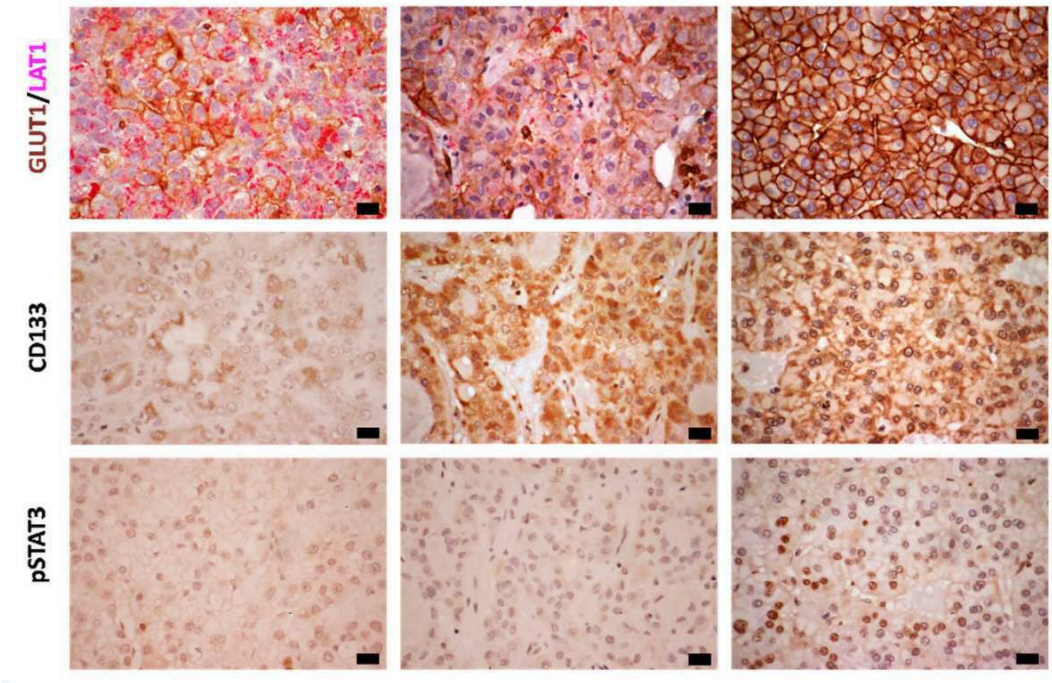
도면2f



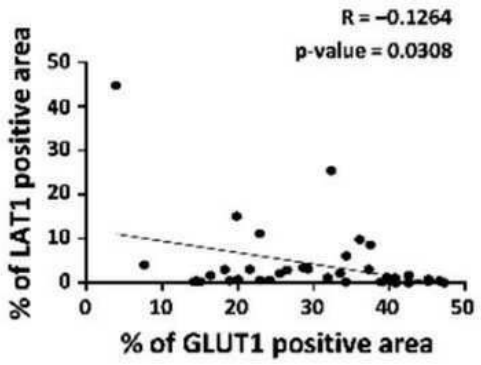
도면2g


HK2/LAT
GLUT1/LAT
Xenograft model
HepG2
Hep3B

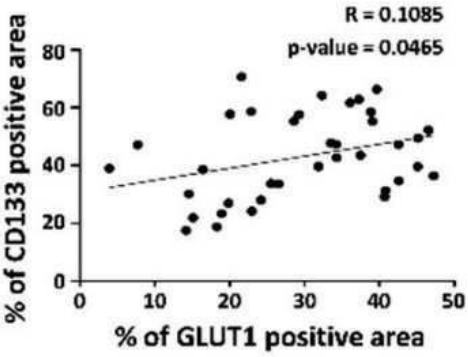
도면3a


GLUT1/LAT1
CD133
pSTAT3

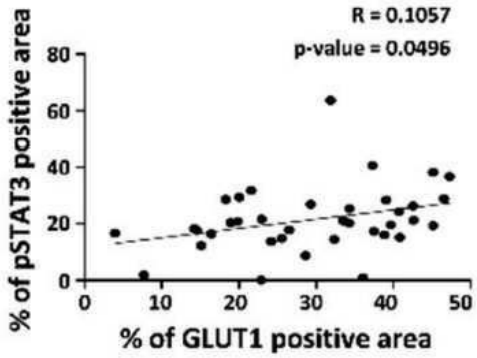
도면3b



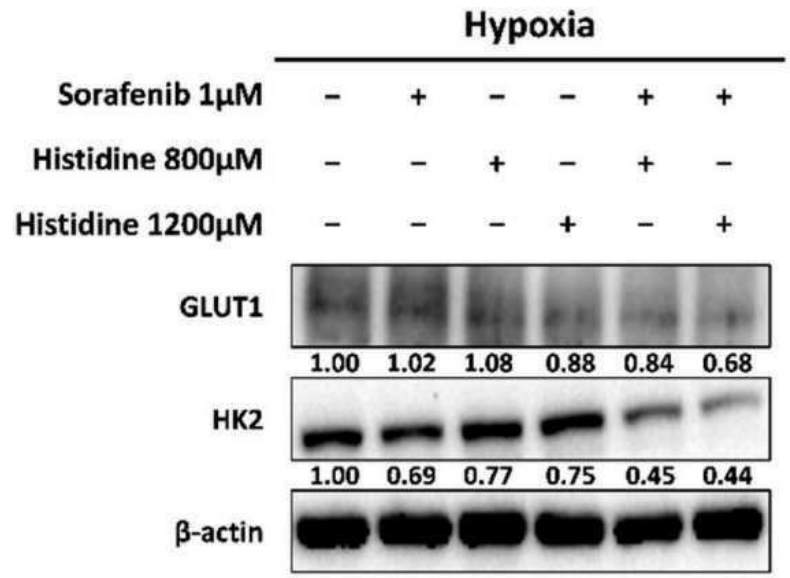
도면3c



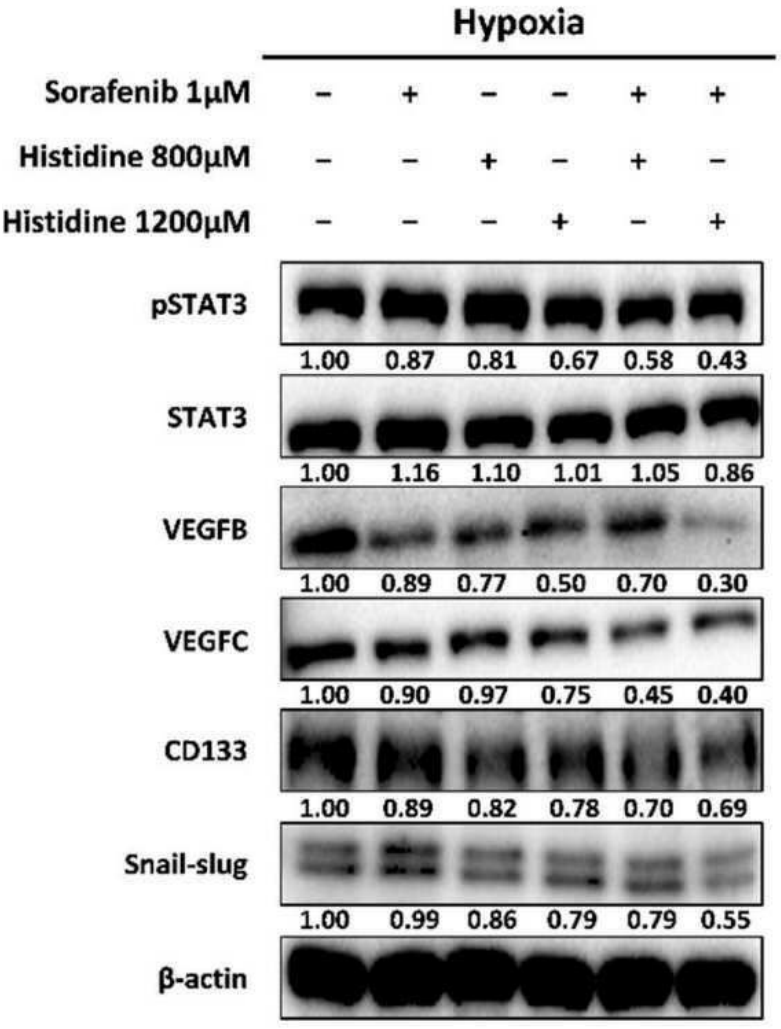
도면3d



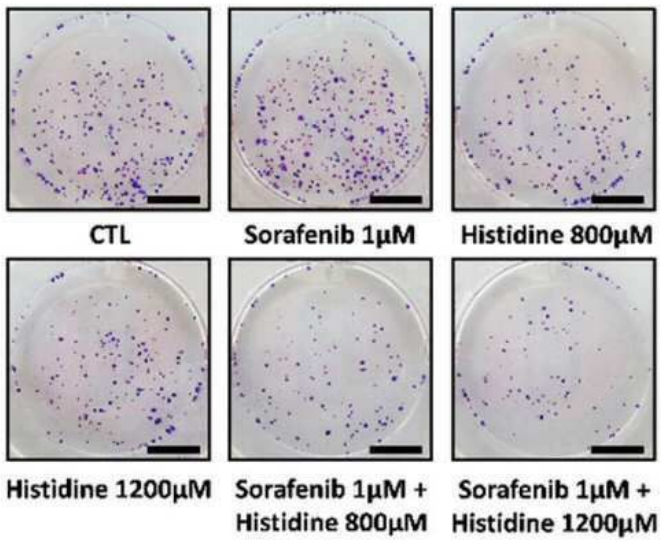
도면4a


Hypoxia
Sorafenib 1μM
Histidine 800μM
Histidine 1200μM
GLUT1
1.00 1.02 1.08 0.88 0.84 0.68
HK2
1.00 0.69 0.77 0.75 0.45 0.44
β-actin

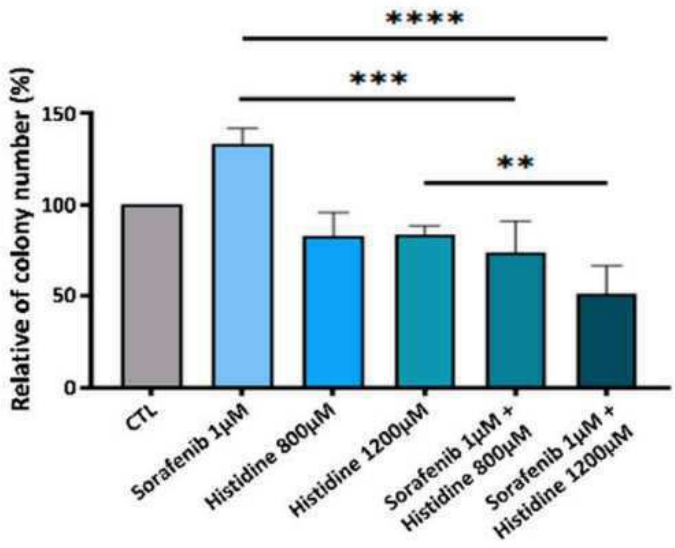
도면4b


Hypoxia
Sorafenib 1μM
Histidine 800μM
Histidine 1200μM
pSTAT3
1.00 0.87 0.81 0.67 0.58 0.43
STAT3
1.00 1.16 1.10 1.01 1.05 0.86
VEGFB
1.00 0.89 0.77 0.50 0.70 0.30
VEGFC
1.00 0.90 0.97 0.75 0.45 0.40
CD133
1.00 0.89 0.82 0.78 0.70 0.69
Snail-slug
1.00 0.99 0.86 0.79 0.79 0.55
β-actin

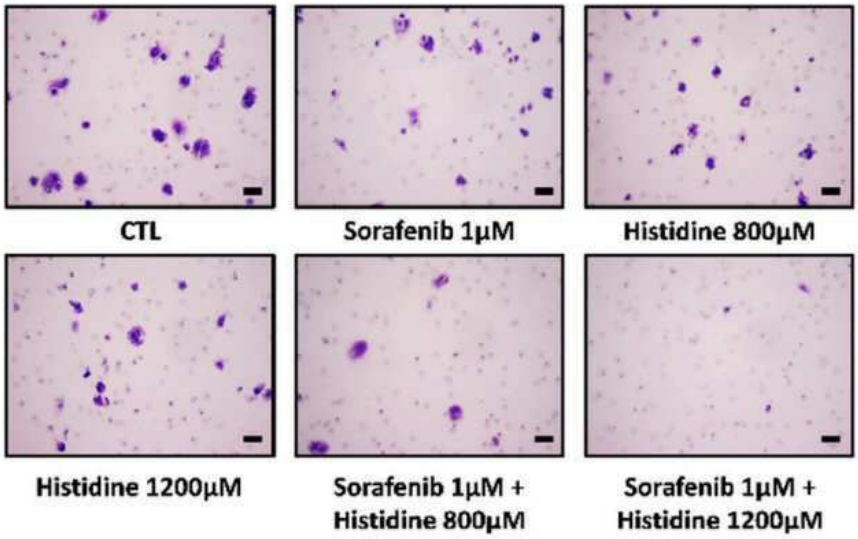
도면5a


CTL
Sorafenib 1μM
Histidine 800μM
Histidine 1200μM
Sorafenib 1μM + Histidine 800μM
Sorafenib 1μM + Histidine 1200μM

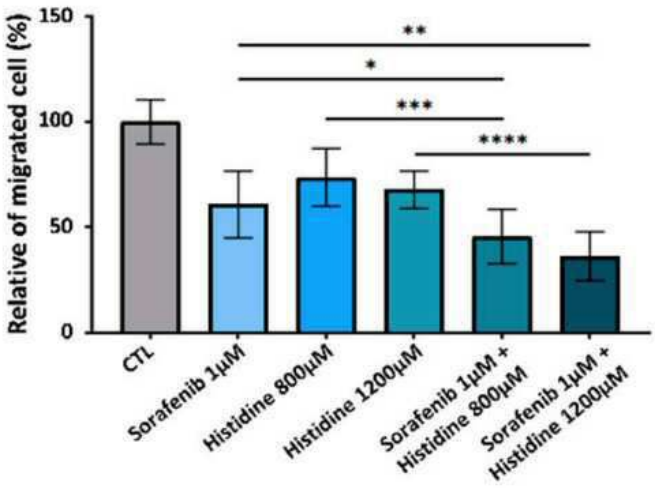
도면5b


****
***
**
Relative of colony number (%)
150
100
50
0
CTL
Sorafenib 1μM
Histidine 800μM
Histidine 1200μM
Sorafenib 1μM + Histidine 800μM
Sorafenib 1μM + Histidine 1200μM

도면5c



도면5d



서 열 목 록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH and BUSINESS FOUNDATION

<120> Composition for treating liver cancer comprising sorafenib and histidine

<130> 1070893

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 4556

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

acgcagctgc gggcggcggg cggcgcgcac actgctcgct gggccgcggc tcccgggtgt 60

cccaggcccg gccggtgcgc agagcatggc gggtgcgggc ccgaagcggc gcgcgctagc 120

ggcgccggcg gccgaggaga aggaagaggc gcgggagaag atgctggccg ccaagagcgc 180

ggacggctcg gcgccggcag gcgagggcga gggcgtgacc ctgcagcgga acatcacgct 240

gctcaacggc gtggccatca tcgtggggac cattatcggc tcgggcatct tcgtgacgcc 300

cacgggcgtg ctcaaggagg caggctcgcc ggggctggcg ctggtggtgt gggccgcgtg 360

cggcgtcttc tccatcgtgg gcgcgctctg ctacgcggag ctcggcacca ccatctccaa 420

atcgggcggc gactacgcct acatgctgga ggtctacggc tcgctgcccg ccttcctcaa 480

gctctggatc gagctgctca tcatccggcc ttcatcgcag tacatcgtgg ccctggtctt 540

cgccacctac ctgctcaagc cgctcttccc cacctgcccg gtgcccgagg aggcagccaa 600

gctcgtggcc tgcctctgcg tgctgctgct cacggccgtg aactgctaca gcgtgaaggc 660

cgccacccgg gtccaggatg cctttgccgc cgccaagctc ctggccctgg ccctgatcat 720

cctgctgggc ttcgtccaga tcgggaaggg tgatgtgtcc aatctagatc ccaacttctc 780

atttgaaggc accaaactgg atgtggggaa cattgtgctg gcattataca gcggcctctt 840

tgcctatgga ggatggaatt acttgaattt cgtcacagag gaaatgatca acccctacag 900

aaacctgccc ctggccatca tcatctccct gcccatcgtg acgctggtgt acgtgctgac 960

caacctggcc tacttcacca ccctgtccac cgagcagatg ctgtcgtccg aggccgtggc 1020

cgtggacttc gggaactatc acctgggcgt catgtcctgg atcatccccg tcttcgtggg 1080

cctgtcctgc ttcggctccg tcaatgggtc cctgttcaca tcctccaggc tcttcttcgt 1140

ggggtcccgg gaaggccacc tgccctccat cctctccatg atccacccac agctcctcac 1200

ccccgtgccg tccctcgtgt tcacgtgtgt gatgacgctg ctctacgcct tctccaagga 1260

catcttctcc gtcatcaact tcttcagctt cttcaactgg ctctgcgtgg ccctggccat 1320

catcggcatg atctggctgc gccacagaaa gcctgagctt gagcggccca tcaaggtgaa 1380

cctggccctg cctgtgttct tcatcctggc ctgcctcttc ctgatcgccg tctccttctg 1440

gaagacaccc gtggagtgtg gcatcggctt caccatcatc ctcagcgggc tgcccgtcta 1500

cttcttcggg gtctggtgga aaaacaagcc caagtggctc ctccagggca tcttctccac 1560

gaccgtcctg tgtcagaagc tcatgcaggt ggtcccccag gagacatagc caggaggccg 1620

agtggctgcc ggaggagcat gcgcagaggc cagttaaagt agatcacctc ctcgaaccca 1680

ctccggttcc ccgcaaccca cagctcagct gcccatccca gtccctcgcc gtccctccca 1740

ggtcgggcag tggaggctgc tgtgaaaact ctggtacgaa tctcatccct caactgaggg 1800

ccagggaccc aggtgtgcct gtgctcctgc ccaggagcag cttttggtct ccttgggccc 1860

ttttt ccctt ccctcctttg tttacttata tatatatttt ttttaaactt aaattttggg 1920

tcaacttgac accactaaga tgatttttta aggagctggg ggaaggcagg agccttcctt 1980

tctcctgccc caagggccca gaccctgggc aaacagagct actgagactt ggaacctcat 2040

tgctaccaca gacttgcact gaagccggac agctgcccag acacatgggc ttgtgacatt 2100

cgtgaaaacc aaccctgtgg gcttatgtct ctgccttagg gtttgcagag tggaaactca 2160

gccgtagggt ggcactggga gggggtgggg gatctgggca aggtgggtga ttcctcccag 2220

gaggtgcttg aggccccgat ggactcctga ccataatcct agccccgaga caccatcctg 2280

agccagggaa cagccccagg gttgggggggt gccggcatct cccctagctc accaggcctg 2340

gcctctgggc agtgtggcct cttggctatt tctgtgtcca gttttggagg ctgagttctg 2400

gttcatgcag acaaagccct gtccttcagt cttctagaaa cagagacaag aaaggcagac 2460

acaccgcggc caggcaccca tgtgggcgcc caccctgggc tccacacagc agtgtccccct 2520

gccccagagg tcgcagctac cctcagcctc caatgcattg gcctctgtac cgcccggcag 2580

ccccttctgg ccggtgctgg gttcccactc ccggcctagg cacctccccg ctctccctgt 2640

cacgctcatg tcctgtcctg gtcctgatgc ccgttgtcta ggagacagag ccaagcactg 2700

ctcacgtctc tgccgcctgc gtttggaggc ccctgggctc tcacccagtc cccacccgcc 2760

tgcagagagg gaactagggc acccccttgtt tctgttgttc ccgtgaattt ttttcgctat 2820

gggaggcagc cgaggcctgg ccaatgcggc ccactttcct gagctgtcgc tgcctccatg 2880

gcagcagcca gggacccccca gaacaagaag accccgcagg atccctcctg agctcggggg 2940

gctctgcctt ctcaggcccc gggcttccct tctccccagc cagaggtgga gccaagtggt 3000

ccagcgtcac tccagtgctc agctgtggct ggaggagctg gcctgtggca cagccctgag 3060

tgtcccaagc cgggagccaa cgaagccgga cacggcttca ctgaccagcg gctgctcaag 3120

ccgcaagctc tcagcaagtg cccagtggag cctgccgccc ccgcctgggc accgggaccc 3180

cctcaccatc cagtgggccc ggagaaacct gatgaacagt ttggggactc aggaccagat 3240

gtccgtctct cttgcttgag gaatgaagac ctttattcac ccctgccccg ttgcttcccg 3300

ctgcacatgg acagacttca cagcgtctgc tcataggacc tgcatccttc ctggggacga 3360

attccactcg tccaagggac agcccacggt ctggaggccg aggaccacca gcaggcaggt 3420

ggactgactg tgttgggcaa gacctcttcc ctctgggcct gttctcttgg ctgcaaataa 3480

ggacagcagc tggtgcccca cctgcctggt gcattgctgt gtgaatccag gaggcagtgg 3540

acatcgtagg cagccacggc cccgggtcca ggagaagtgc tccctggagg cacgcaccac 3600

tgcttcccac tggggccggc ggggcccacg cacgacgtca gcctcttacc ttcccgcctc 3660

ggctaggggt cctcgggatg ccgttctgtt ccaacctcct gctctgggac gtggacatgc 3720

ctcaaggata cagggagccg gcggcctctc gacggcacgc acttgcctgt tggctgctgc 3780

ggctgtgggc gagcatgggg gctgccagcg tctgttgtgg aaagtagctg ctagtgaaat 3840

ggctggggcc gctggggtcc gtcttcacac tgcgcaggtc tcttctgggc gtctgagctg 3900

gggtgggagc tcctccgcag aaggttggtg gggggtccag tctgtgatcc ttggtgctgt 3960

gtgccccact ccagcctggg gaccccactt cagaaggtag gggccgtgtc ccgcggtgct 4020

gactgaggcc tgcttccccc tccccctcct gctgtgctgg aattccacag ggaccagggc 4080

caccgcaggg gactgtctca gaagacttga tttttccgtc ccttttttctc cacactccac 4140

tgacaaacgt ccccagcggt ttccacttgt gggcttcagg tgttttcaag cacaacccac 4200

cacaacaagc aagtgcattt tcagtcgttg tgctttttg ttttgtgcta acgtcttact 4260

aatttaaaga tgctgtcggc accatgttta tttatttcca gtggtcatgc tcagccttgc 4320

tgctctgcgt ggcgcaggtg ccatgcctgc tccctgtctg tgtcccagcc acgcagggcc 4380

atccactgtg acgtcggccg accaggctgg acaccctctg ccgagtaatg acgtgtgtgg 4440

ctgggacctt ctttattctg tgttaatggc taacctgtta cactgggctg ggttgggtag 4500

ggtgttctgg ctttttgtg gggtttttat ttttaaagaa acactcaatc atccta 4556

<210> 2

<211> 507

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser Ala
20 25 30

Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln Arg
35 40 45

Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val Gly Thr Ile Ile
50 55 60

Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val Leu Lys Glu Ala Gly
65 70 75 80

Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala Ala Cys Gly Val Phe Ser
85 90 95
Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu Leu Gly Thr Thr Ile Ser Lys

100 105 110
Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu Pro
115 120 125
Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser Ser
130 135 140
Gln Tyr Ile Val Ala Leu Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro Leu
145 150 155 160
Phe Pro Thr Cys Pro Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val Ala Cys
165 170 175

Leu Cys Val Leu Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val Lys Ala
180 185 190
Ala Thr Arg Val Gln Asp Ala Phe Ala Ala Ala Lys Leu Leu Ala Leu
195 200 205
Ala Leu Ile Ile Leu Leu Gly Phe Val Gln Ile Gly Lys Gly Asp Val
210 215 220
Ser Asn Leu Asp Pro Asn Phe Ser Phe Glu Gly Thr Lys Leu Asp Val
225 230 235 240
Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Tyr Gly Gly

245 250 255
Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met Ile Asn Pro Tyr Arg
260 265 270
Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro Ile Val Thr Leu Val
275 280 285
Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr Leu Ser Thr Glu Gln
290 295 300
Met Leu Ser Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe Gly Asn Tyr His Leu
305 310 315 320

Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe Val Gly Leu Ser Cys Phe

325 330 335

Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr Ser Ser Arg Leu Phe Phe Val

340 345 350

Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro Ser Ile Leu Ser Met Ile His Pro

355 360 365

Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro Ser Leu Val Phe Thr Cys Val Met Thr

370 375 380

Leu Leu Tyr Ala Phe Ser Lys Asp Ile Phe Ser Val Ile Asn Phe Phe

385 390 395 400

Ser Phe Phe Asn Trp Leu Cys Val Ala Leu Ala Ile Ile Gly Met Ile

405 410 415

Trp Leu Arg His Arg Lys Pro Glu Leu Glu Arg Pro Ile Lys Val Asn

420 425 430

Leu Ala Leu Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ile Ala

435 440 445

Val Ser Phe Trp Lys Thr Pro Val Glu Cys Gly Ile Gly Phe Thr Ile

450 455 460

Ile Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly Val Trp Trp Lys Asn

465 470 475 480

Lys Pro Lys Trp Leu Leu Gln Gly Ile Phe Ser Thr Thr Val Leu Cys

485 490 495

Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr

500 505

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCL7A5 siRNA sense

<400> 3

cugaucgccg ucuccuucut t 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCL7A5 siRNA antisense

<400> 4

agaaggagac ggcgaucagt t 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCL7A5 siRNA sense

<400> 5

guuuugugcu aacgucuuat t 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCL7A5 siRNA antisense

<400> 6

uaagacguua gcacaaaact t 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HK2 forward primer

<400> 7

aaggtagaaa tggagcgagg t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HK2 reverse primer

<400> 8

cccggaaatt tgttcctcca a 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLC7A5 forward primer

<400> 9

cctccatcct ctccatgatc c 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SLC7A5 reverse primer

<400> 10

agccagttga agaagctgaa g 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B2M forward primer

<400> 11

ttactcacgt catccagcag a 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B2M reverse primer

<400> 12

agaaagacca gtccttgctg a 21