(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0106935
(43) 공개일자 2021년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/145 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/145 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0109136(분할)
(22) 출원일자 2021년08월19일
심사청구일자 2021년08월19일
(62) 원출원 특허 10-2019-0133669
원출원일자 2019년10월25일
심사청구일자 2019년10월25일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
정재호
서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교(신촌동134) 연세대학교의료원
박기청
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동134) 연세대학교의료원
김석모
서울특별시 송파구 올림픽로 99 잠실엘스아파트 154-2102
(74) 대리인
파도특허법인(유한)

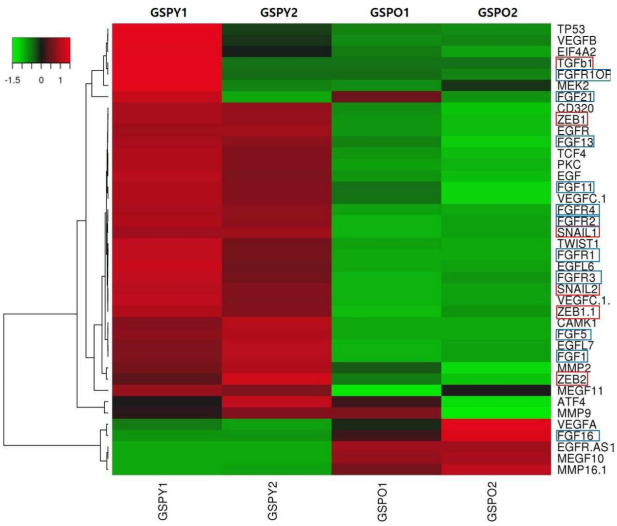
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 약학적 조성물을 이용하는 경우, 암 환자 중에서도 특히 만 20세 이하의 개체에서 발병하는 소아 암, 바람직하게는 소아 갑상선 암을 효과적으로 치료하고, 재발을 막을 수 있다. 유전적 정보에 근거하여 그에 맞는 맞춤형 항암제를 제시함으로써, 어린 암 환자에게 보다 효과적인 암 치료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465027723
과제번호 HI18C1188010019
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 보건산업진흥연구원
연구사업명 정부-보건복지부-한국보건산업진흥원-연구자 주도 질병극복연구-의료기술혁신 기반 연구
연구과제명 환자유래 줄기세포성 암세포의 칼슘 시그널링에 조절에 의한 항암제 저항 메커니즘에 기반하여 저항성을 극복할 수 있는 신규 약학 조성물 발굴 및 임상개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.30 ~ 2020.04.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345314714
과제번호 NRF-2017R1D1A1B03029716
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 재단법인 한국연구재단
연구사업명 한국연구재단-이공학개인기초연구지원사업(기본연구)
연구과제명 환자유래 줄기세포성 암세포에서의 EGFR과 FGFR 활성 기반 EMT 매개 항암제 내성 기전 규명과 환자 맞춤형 항암제 조성 발굴
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명 세 서

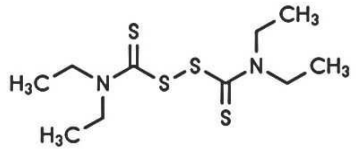
청구범위

청구항 1

TGFb1, ZEB1, SNAIL1, SNAIL2, ZEB1.1 및 ZEB2으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 단백질이 과발현(up-regulated)되거나 FGF16 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 단백질이 저발현(down-regulated)하는 것으로 진단된 개체에 대하여,

하기 화학식 1로 표시되는 디에틸카르바모티올설파닐 N,N-디에틸카르바모디티오에이트(diethylcarbamothioylsulfanyl N,N-diethylcarbamodithioate) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하여 상기 개체에 대한 갑상선암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 개체는 만 20세 이하의 개체인, 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 개체는 만 14세 이하의 개체인, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 갑상선암은 상피 중간엽 전이 아형(Epithelial mesenchymal transition; EMT)인, 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 갑상선암은 소아 갑상선암인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암 환자 중에서도 특히 만 20세 이하의 암 환자에서 발생하는 소아 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10 만 명 이상이 진단되고, 약 6 만 명 이상이 사망하고 있다.

[0003] 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암 세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.

[0004] 한편, 최근 폭발적인 갑상선 암의 증가로 2012년 중앙 암등록본부 발표에 의하면 전체 암 중에서 갑상선 암이 21.0% 로 가장 많이 발생하고 있다. 또한, 갑상선 암은 소아청소년기의 내분비암 중에서 가장 흔한 암으로, 14세 이하의 경우 발생률은 10 만 명당 0.6 명으로 그 빈도가 매우 적지만 전체 암 중에 4 번째로 높은 발생률을 보이고 있어 소아청소년기에서의 갑상선 암 발생에 대한 관심이 증가하고 있다. 이러한 갑상선 암은 내분비계의 가장 흔한 악성 종양으로 유두암 (Papillary carcinoma), 여포암 (Follicular carcinoma), 허들세포암 (Hurthle cell neoplasm, 여포 선암종), 역형성암 (Anaplastic carcinoma), 미분화 갑상선암(Undifferentiated thyroid cancer), 수질암 (Medullary thyroid carcinoma) 등이 포함된다. 같은 암종이라 할지라도 성인과 어린 환자의 유전적 발현에 차이가 있으며, 성인에 비하여 소아청소년의 갑상선피막침범, 림프절전이, 폐전이가 성인보다 훨씬 많아 어린 환자의 암종이 예후가 좋지 않고 악성암으로 진행될 가능성이 높다는 것이 현재 학계의 이론(Thyroid. 2010 Apr;20(4):375-80.)이다. 더 나아가 치료 예후도 좋지 않아 5년 및 10년 내 재발률이 성인에 비하여 더 높다.

[0005] 갑상선 암의 원인으로는 방사선 노출, 성 호르몬 등으로 알려져 있으나 아직 정확한 원인에 대한 규명은 이루어지지 않고 있다. 갑상선 암은 다른 암에 비해 발병률이 높지만, 진단이 조기에 이루어진다면 수술이 가능하여 다른 암종에 비해 생존률이 높은 편에 속한다. 하지만, 이미 진행된 암에 있어서는 방사능 요오드(RAI) 치료에 반응하지 않는 경우가 있어 치료가 어려운 문제점이 있다. 특히, 저분화 갑상선암 (Poorly differentiated thyroid cancer; PDTC), 미분화 갑상선암 (Undifferentiated thyroid cancer) 및 역형성암 (Anaplastic thyroid carcinoma; ATC)의 경우는 치료에 대한 내성 및 매우 공격적인 특성으로 인해 예후가 좋지 않다는 것이 많은 연구를 통하여 밝혀져 있다(Pan Afr Med J 21, 137., Case Rep Endocrinol 2015, 726085.). 이에 따라 최근 갑상선 암을 보다 효과적으로 치료하기 위한 방법들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 성인과 어린 환자에게서 각각 분리된 암세포로부터 획득된 유전적 정보에 근거하여 그에 맞는 맞춤형 항암제를 제시함으로써 효과적인 암 치료법을 제시하고자 한다.

[0007] 본 발명의 일 목적은 암 환자 중에서도 특히 만 20세 이하의 암 환자에 대하여 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 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

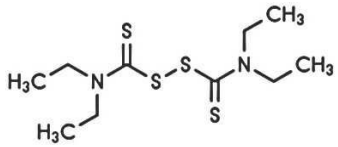
[0009] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 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.

[0010] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0011] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 디에틸카르바모티올설파닐 N,N-디에틸카르바모디티

오에이트(diethylcarbamothioylsulfanyl N,N-diethylcarbamodithioate) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다:

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 약제학적으로 허용 가능한 염은 산 또는 염기의 부가염, 및 이의 입체화학적 이성질체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 유기산 또는 무기산의 부가염의 형태로 있을 수 있다. 염은 환자에 투여되었을 때에 환자에서 바람직한 효과를 갖는 것으로, 그들의 모화합물의 활성을 유지하는 임의의 염들을 포함하지만, 이에 특별히 한정되는 것은 아닐 수 있다. 이러한 염들은 무기염 및 유기염, 예컨대 아세트산, 질산, 아스파트산, 술폰산, 설퓨릭산, 말레산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스테아르산, 락트산, 비카르본산, 비설퓨릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘 이데트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이데트산, 톨루엔술폰산, 푸마르산, 글루셉트산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸질산, 말론산, 염산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄술폰산, 헥사믹산, 판토테닉산, 모노히드로겐인산, 디히드로겐인산, 살리실산, 술파민산, 술파닐린산, 메탄술폰산의 염 등을 포함할 수 있다. 염기의 부가염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속의 염, 예컨대 암모늄, 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등의 염; 유기 염기를 갖는 염, 예컨대 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 등의 염; 및 아미노산을 갖는 염, 예컨대 아르기닌, 리신 등을 포함할 수 있다. 또한, 이들 염들은 적정 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리된 형태로 전환될 수 있다.

[0015] 본 발명의 약학적 조성물은 소아의 개체에서 발병하였거나 발병 가능성이 있는 암의 예방 또는 치료 효과가 현저히 뛰어난 것에 특징이 있다.

[0016] 본 발명에서 상기 "개체"는 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 상기 "소아"는 만 20세 이하 또는 이보다 더 넓은 연령 범위에 속하는 임의의 연령 범위 내의 인간 환자를 의미할 수 있다. 비제한적인 예에서, 소아 환자는 만 1세 내지 20세, 만 1세 내지 14세, 만 1세 내지 10세, 만 1세 내지 8세, 만 1세 내지 6세, 만 1세 내지 4세, 만 2세 내지 20세, 만 2세 내지 14세, 만 2세 내지 10세, 만 2세 내지 8세, 만 2세 내지 6세, 만 2세 내지 4세, 만 3세 내지 20세, 만 3세 내지 14세, 만 3세 내지 10세, 만 3세 내지 8세, 3세 내지 6세, 만 4세 내지 20세, 만 4세 내지 14세, 만 4세 내지 10세, 만 4세 내지 8세, 또는 만 4세 내지 6세일 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학적 조성물에서 예방 또는 치료의 대상이 되는 질환으로, 소아의 개체에서 발병 되었거나 발병될 가능성이 있는 암은 성인 개체에서 발병 되었거나 발병될 가능성이 있는 암에 비하여 FGFR10P, FGF21, FGF13, FGF11, FGFR4, FGFR2, FGFR1, FGFR3, FGF5 및 FGF1 중 적어도 하나는 과발현되거나, FGF16의 발현은 저발현되는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학적 조성물에서 예방 또는 치료의 대상이 되는 질환으로, 소아의 개체에서 발병 되었거나 발병될 가능성이 있는 암은 상피 중간엽 전이 아형(Epithelial mesenchymal transition; EMT)일 수 있다.

[0020] 본 발명의 상기 "상피 중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT)"란, 상피세포가 중간엽 세포로 변하는 과정을 말한다. 즉 상피세포의 모습을 잃어버리고 중간엽 세포의 특징을 가지게 되는 변이 과정으로 개체 형성 발달에 중요한 과정으로 알려져 있으며, 암 세포의 생장, 약물 저항성, 암 세포의 침윤 및 전이 등과 관련되어 있다.

[0021] 본 발명의 일 구체 예에서 상기 EMT 아형은 TGFb1, ZEB1, SNAIL1, SNAIL2, ZEB1.1 및 ZEB2으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 단백질이 과발현(up-regulated) 또는 저발현(down-regulated)된 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 TGFb1, ZEB1, SNAIL1, SNAIL2, ZEB1.1 및 ZEB2으로 구

성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩된 단백질이 과발현(up-regulated)된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 또한, 본 발명의 다른 구체 예에서, 상기 EMT 아형은 상피 중간엽 전이 특징적 시그니처 유전자(BMC Medical Genomics 4, January 20, 2011)의 발현 수준을 측정하는 방법(Nature Medicine 21, May 2015)을 통해 분류된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 상피 중간엽 전이 특징적 시그니처 유전자는 과발현 유전자 및 저발현 유전자 중 어느 하나 이상일 수 있다(하기 표 1 및 표 2).

[0023] 단, 본 발명에서 상기 "상피 중간엽 전이 특정 스코어(signature score)"란, 목적하는 개체에서 상피 중간엽 전이 과발현 유전자의 발현 수준 평균값에서 상피 중간엽 전이 저발현 유전자의 발현 수준 평균값의 차이를 통하여 계산되는 값으로(Nature Medicine 21, May 2015), 상기 값을 통하여 목적하는 개체를 EMT 아형과 EMT 아형이 아닌 군으로 분류할 수 있다.

[0024] 보다 구체적으로, 상기 상피 중간엽 전이 특징적 과발현 유전자는 ADAM23, ADAMTS1, AFF3, AK5, AKAP12, ALPK2, ANGPTL2, ANKRD1, ANTXR1, ANXA6, AOX1, AP1S2, ARMCX1, ATP8B2, ATP8B3, AXL, BDNF, BICC1, BNC2, BVES, FAM171A1, ZCCHC24, C16orf45, C1S, GLIPR2, CAP2, CCL2, CDH11, CDH2, CDH4, CHN1, CLDN11, CLIP3, CMTM3, COL12A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL6A1, CPA4, CTGF, CYBRD1, DAB2, DFNA5, DIO2, DKK3, DLC1, DOCK10, DPYSL3, EDIL3, ELOVL2, EML1, EMP3, EPB41L5, EPDR1, EVI2A, F2R, FAM101B, FAT4, FBN1, FGF2, FGF5, FGFR1, FHL1, FLRT2, FSTL1, GFPT2, GLIPR1, COLGALT2, GNB4, GNG11, GPC6, GPR176, GREM1, HAS2, HEG1, HS3ST3A1, HTRA1, IGFBP7, IL13RA2, JAM3, KIRREL, LAMA4, LEPREL1, LGALS1, LHFP, LIX1L, LOX, MAP1B, MMP2, MRAS, MSRB3, NAP1L3, NAV3, NDN, NEGR1, NEXN, NID1, NRG1, NUDT11, PAPPA, PDE7B, PLAGL1, PMP22, PNMA2, POPDC3, POSTN, PRKD1, PRR16, PTGIS, PTRF, PTX3, RBM24, RBMS3, RBPMS2, RECK, RFTN1, SNAIL1, SNAIL2, SERPINE1, SIRPA, SLC2A3, SLC47A1, SPARC, SRGN, SRPX, ST3GAL2, SUSD5, SYDE1, TBXA2R, TCF4, TGFb1, TGFB2, TMEM158, TMEM47, TMSB15A, TNFRSF19, TRPA1, TTC28, TTLL7, TUB, TUBA1A, UCHL1, VIM, WIPF1, WNT5B, ZFPM2, ZEB1, ZEB1.1, ZEB2 및 ZNF788 로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 상기 상피 중간엽 전이 특징적 저발현 유전자는 ACPP, AGR3, ALDH3B2, ANK3, ANKRD22, ANXA9, AP1M2, AQP3, ARHGAP8, ARHGDIB, PRR15L, ATP2C2, B3GNT3, BLNK, BSPRY, C11orf52, MISP, C1orf106, C1orf116, C1orf210, TTC39A, CCDC64B, CD24, CDH1, CDH3, CDS1, CEACAM5, CEACAM6, CGN, CKMT1B, CLDN4, CLDN7, CNKSR1, CNTNAP2, CTAGE4, DAPP1, DENND2D, DMKN, DSC2, DSP, EHF, ELF3, ELF5, EPN3, EPPK1, ERBB3, ERP27, FA2H, FAAH2, FAM110C, FAM83A, FAM84A, FAM84B, FBP1, FGD2, FGFBP1, FUT1, FUT3, FXYD3, GALNT3, GCNT3, GJB6, GOLT1A, GPR110, GPR87, GPX2, GRAMD2, GRHL1, GRHL2, HOOK1, HS3ST1, HS6ST2, IL1RN, ILDR1, INPP4B, IRF6, ITGB6, KLK10, KLK5, KLK6, KLK8, KRT16, KRT19, KRT5, KRTCAP3, LAMA3, LAMB3, LAMC2, LCN2, LCP1, LIPG, MAL2, MAP7, MAPK13, MARVELD2, MARVELD3, MB, MBNL3, MPP7, MUC20, MYH14, MYO5B, NPNT, OR2A4, OVOL2, PAK6, PKP3, PLA2G10, POU2F3, PPL, PPP1R14C, PROM2, PRR15, PRSS8, PTAFR, PVRL4, RAB25, RAPGEF5, RASEF, RASGEF1B, ESRP1, ESRP2, S100A14, S100A8, S100A9, S100P, SCEL, SCNN1A, SERPINB5, SH2D3A, SH3YL1, SLC6A14, SLPI, SORBS2, SPINK5, SPINT1, SPINT2, SPRR1A, SPRR1B, SPRR3, ST14, STEAP4, STX19, SYK, SYT7, TMC4, TMC5, TMEM125, TMEM30B, TMEM45B, TMPRSS11E, TMPRSS13, TMPRSS4, TOX3, TRIM29, TSPAN1, TTC22, TTC9, VTCN1, WDR72, 및 WFDC2으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 상피 중간엽 전이 특징적 과발현 유전자 및 저발현 유전자와 그 서열번호 Entrez ID는 각각 하기 표 1 및 표 2와 같다.

표 1

[0027]

과발현 유전자		과발현 유전자		과발현 유전자	
유전자	서열번호 (Entrez ID)	유전자	서열번호 (Entrez ID)	유전자	서열번호 (Entrez ID)
ADAM23	NM_8745	EDIL3	NM_10085	PAPPA	NM_5069
ADAMTS1	NM_9510	ELOVL2	NM_54898	PDE7B	NM_27115
AFF3	NM_3899	EML1	NM_2009	PLAGL1	NM_5325
AK5	NM_26289	EMP3	NM_2014	PMP22	NM_5376
AKAP12	NM_9590	EPB41L5	NM_57669	PNMA2	NM_10687
ALPK2	NM_115701	EPDR1	NM_54749	POPDC3	NM_64208

ANGPTL2	NM_23452	EVI2A	NM_2123	POSTN	NM_10631
ANKRD1	NM_27063	F2R	NM_2149	PRKD1	NM_5587
ANTXR1	NM_84168	FAM101B	NM_359845	PRR16	NM_51334
ANXA6	NM_309	FAT4	NM_79633	PTGIS	NM_5740
AOX1	NM_316	FBN1	NM_2200	PTRF	NM_284119
AP1S2	NM_8905	FGF2	NM_2247	PTX3	NM_5806
ARMCX1	NM_51309	FGF5	NM_2250	RBM24	NM_221662
ATP8B2	NM_57198	FGFR1	NM_2260	RBMS3	NM_27303
ATP8B3	NM_148229	FHL1	NM_2273	RBPMS2	NM_348093
AXL	NM_558	FLRT2	NM_23768	RECK	NM_8434
BDNF	NM_627	FSTL1	NM_11167	RFTN1	NM_23180
BICC1	NM_80114	GFPT2	NM_9945	SNAIL1	NM_ 6615
BNC2	NM_54796	GLIPR1	NM_11010	SNAIL2	NM_ 6591
BVES	NM_11149	COLGALT2	NM_23127	SERPINE1	NM_5054
FAM171A1	NM_221061	GNB4	NM_59345	SIRPA	NM_140885
ZCCHC24	NM_219654	GNG11	NM_2791	SLC2A3	NM_6515
C16orf45	NM_89927	GPC6	NM_10082	SLC47A1	NM_55244
C1S	NM_716	GPR176	NM_11245	SPARC	NM_6678
GLIPR2	NM_152007	GREM1	NM_26585	SRGN	NM_5552
CAP2	NM_10486	HAS2	NM_3037	SRPX	NM_8406
CCL2	NM_6347	HEG1	NM_57493	ST3GAL2	NM_6483
CDH11	NM_1009	HS3ST3A1	NM_9955	SUSD5	NM_26032
CDH2	NM_1000	HTRA1	NM_5654	SYDE1	NM_85360
CDH4	NM_1002	IGFBP7	NM_3490	TBXA2R	NM_6915
CHN1	NM_1123	IL13RA2	NM_3598	TCF4	NM_6925
CLDN11	NM_5010	JAM3	NM_83700	TGFb1	NM_7040
CLIP3	NM_25999	KIRREL	NM_55243	TGFB2	NM_7042
CMTM3	NM_123920	LAMA4	NM_3910	TMEM158	NM_25907
COL12A1	NM_1303	LEPREL1	NM_55214	TMEM47	NM_83604
COL1A2	NM_1278	LGALS1	NM_3956	TMSB15A	NM_11013
COL3A1	NM_1281	LHFP	NM_10186	TNFRSF19	NM_55504
COL4A1	NM_1282	LIX1L	NM_128077	TRPA1	NM_8989
COL5A1	NM_1289	LOX	NM_4015	TTC28	NM_23331
COL5A2	NM_1290	MAP1B	NM_4131	TTLL7	NM_79739
COL6A1	NM_1291	MMP2	NM_4313	TUB	NM_7275
CPA4	NM_51200	MRAS	NM_22808	TUBA1A	NM_7846
CTGF	NM_1490	MSRB3	NM_253827	UCHL1	NM_7345
CYBRD1	NM_79901	NAP1L3	NM_4675	VIM	NM_7431
DAB2	NM_1601	NAV3	NM_89795	WIPF1	NM_7456
DFNA5	NM_1687	NDN	NM_4692	WNT5B	NM_81029
DIO2	NM_1734	NEGR1	NM_257194	ZFPM2	NM_23414
DKK3	NM_27122	NEXN	NM_91624	ZNF788	NM_388507
DLC1	NM_10395	NID1	NM_4811	ZEB1	NM_6935
DOCK10	NM_55619	NRG1	NM_3084	ZEB2	NM_9839
DPYSL3	NM_1809	NUDT11	NM_55190		

표 2

[0028]

저발현 유전자		저발현 유전자		저발현 유전자	
유전자	서열번호 (Entrez ID)	유전자	서열번호 (Entrez ID)	유전자	서열번호 (Entrez ID)
ACPP	NM_55	FGFBP1	NM_9982	PPP1R14C	NM_81706
AGR3	NM_155465	FUT1	NM_2523	PROM2	NM_150696
ALDH3B2	NM_222	FUT3	NM_2525	PRR15	NM_222171
ANK3	NM_288	FXYD3	NM_5349	PRSS8	NM_5652
ANKRD22	NM_118932	GALNT3	NM_2591	PTAFR	NM_5724
ANXA9	NM_8416	GCNT3	NM_9245	PVRL4	NM_81607

AP1M2	NM_10053	GJB6	NM_10804	RAB25	NM_57111
AQP3	NM_360	GOLT1A	NM_127845	RAPGEF5	NM_9771
ARHGAP8	NM_23779	ADGRF1	NM_266977	RASEF	NM_158158
ARHGDIB	NM_397	GPR87	NM_53836	RASGEF1B	NM_153020
PRR15L	NM_79170	GPX2	NM_2877	ESRP1	NM_54845
ATP2C2	NM_9914	GRAMD2	NM_196996	ESRP2	NM_80004
B3GNT3	NM_10331	GRHL1	NM_29841	S100A14	NM_57402
BLNK	NM_29760	GRHL2	NM_79977	S100A8	NM_6279
BSPRY	NM_54836	HOOK1	NM_51361	S100A9	NM_6280
C11orf52	NM_91894	HS3ST1	NM_9957	S100P	NM_6286
MISP	NM_126353	HS6ST2	NM_90161	SCEL	NM_8796
C1orf106	NM_55765	IL1RN	NM_3557	SCNN1A	NM_6337
C1orf116	NM_79098	ILDR1	NM_286676	SERPINB5	NM_5268
C1orf210	NM_149466	INPP4B	NM_8821	SH2D3A	NM_10045
TTC39A	NM_22996	IRF6	NM_3664	SH3YL1	NM_26751
CCDC64B	NM_146439	ITGB6	NM_3694	SLC6A14	NM_11254
CD24	NM_100133941	KLK10	NM_5655	SLPI	NM_6590
CDH1	NM_999	KLK5	NM_25818	SORBS2	NM_8470
CDH3	NM_1001	KLK6	NM_5653	SPINK5	NM_11005
CDS1	NM_1040	KLK8	NM_11202	SPINT1	NM_6692
CEACAM5	NM_1048	KRT16	NM_3868	SPINT2	NM_10653
CEACAM6	NM_4680	KRT19	NM_3880	SPRR1A	NM_6698
CGN	NM_57530	KRT5	NM_3852	SPRR1B	NM_6699
CKMT1B	NM_1159	KRTCAP3	NM_200634	SPRR3	NM_6707
CLDN4	NM_1364	LAMA3	NM_3909	ST14	NM_6768
CLDN7	NM_1366	LAMB3	NM_3914	STEAP4	NM_79689
CNKSR1	NM_10256	LAMC2	NM_3918	STX19	NM_415117
CNTNAP2	NM_26047	LCN2	NM_3934	SYK	NM_6850
CTAGE4	NM_100128553	LCP1	NM_3936	SYT7	NM_9066
DAPP1	NM_27071	LIPG	NM_9388	TMC4	NM_147798
DENND2D	NM_79961	MAL2	NM_114569	TMC5	NM_79838
DMKN	NM_93099	MAP7	NM_9053	TMEM125	NM_128218
DSC2	NM_1824	MAPK13	NM_5603	TMEM30B	NM_161291
DSP	NM_1832	MARVELD2	NM_153562	TMEM45B	NM_120224
EHF	NM_26298	MARVELD3	NM_91862	TMPRSS11E	NM_28983
ELF3	NM_1999	MB	NM_4151	TMPRSS13	NM_84000
ELF5	NM_2001	MBNL3	NM_55796	TMPRSS4	NM_56649
EPN3	NM_55040	MPP7	NM_143098	TOX3	NM_27324
EPPK1	NM_83481	MUC20	NM_200958	TRIM29	NM_23650
ERBB3	NM_2065	MYH14	NM_79784	TSPAN1	NM_10103
ERP27	NM_121506	MYO5B	NM_4645	TTC22	NM_55001
FA2H	NM_79152	NPNT	NM_255743	TTC9	NM_23508
FAAH2	NM_158584	OR2A4	NM_79541	VTCN1	NM_79679
FAM110C	NM_642273	OVOL2	NM_58495	WDR72	NM_256764
FAM83A	NM_84985	PAK6	NM_56924	WFDC2	NM_10406
FAM84A	NM_151354	PKP3	NM_11187		
FAM84B	NM_157638	PLA2G10	NM_8399		
FBP1	NM_2203	POU2F3	NM_25833		
FGD2	NM_221472	PPL	NM_5493		

[0030] 본 발명에서 상기 예방 또는 치료의 대상이 되는 질환으로 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징 지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 본 발명에서 상기 암은 갑상선암, 부갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암,

연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 갑상선암일 수 있고, 보다 바람직하게는 갑상선 유두암(Papillary thyroid cancer)일 수 있다.

[0031] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 암 증상을 차단하거나, 암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 암 세포에 대한 성장 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다.

[0034] 여기서, 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리툭시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조밉, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세툭시맙, 비스쿰알붐, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겜투주맵오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레불린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀뮴 키토산, 젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토푸린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토락톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 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 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 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 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 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.

[0037] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0039] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 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 한번 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 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명의 약학적 조성물을 이용하는 경우, FGFR 시그널링을 억제하여 EMT 단백질의 발현을 억제시킴으로써 암 환자 중에서도 특히 만 20세 이하의 개체에서 암, 바람직하게는 갑상선 암 특히 갑상선 유두암을 보다 효과적으로 치료하거나 그 발병을 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 효과적인 암 치료를 위해서 각 개인의 유전적 정보에 맞는 맞춤형 항암제 제시가 필요한 이유를 제시한 도이다.

도 2는 성인과 어린 환자 유래 유두 갑상선 암 세포의 마이크로 어레이(microarray)에 기초한 유전자 발현 분석한 결과이다.

도 3은 성인과 어린 환자 유래 유두 갑상선 암 세포의 인비트로(in vitro)상에서 측정한 단백질 수준(protein expression)을 확인한 결과이다.

도 4 내지 도 7은 성인과 어린 환자 유래 유두 갑상선 암 세포에 각 약물(무처리, 소라페닙(Sorafenib), 또는 디설피람(Disulfiram))을 처리한 후 세포의 수의 변화를 그래프로 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 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 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0045] **실시예 1: 유두 갑상선 암(papillary thyroid carcinoma, PTC) 환자군 모집**

[0046] **1.1 환자군 모집**

[0047] 본 발명에 사용된 종양 조직은 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 치료 받은 갑상선 유두암(papillary thyroid carcinoma, PTC) 환자의 원발성 및 전이성 암 병변으로부터 외과적으로 절제하여 수득하였다. 모든 실험은 연세대학교 의과대학 평가위원회 (Institutional Review Board, IRB)의 승인을 얻어 수행하였다.

[0048] **1.2 환자의 선별**

[0049] 본 실험을 위하여 상기 치료를 받은 갑상선 유두암(PTC) 환자로부터 암의 아형에 따라 유전자 발현이 연령에 크게 의존한다는 것을 고려하여 성인 환자 2명, 어린 환자 2명을 선별하였다. 각 환자의 정보는 하기 표 3에 기재된 바와 같다.

표 3

[0050]

	GSPY1	GSPY2	GSP01	GSP01
진단시 연령	4	13	52	47
성별	여성	여성	여성	여성
1차 질병부위	갑상선	갑상선	갑상선	갑상선
암의 병기(stage)	IV기	IV기	IV기	IV기
1차 병변	PTC	PTC	PTC	PTC
배양에 사용된 표본	Fresh tumor	Fresh tumor	Fresh tumor	Fresh tumor
제공처	강남세브란스병원	강남세브란스병원	강남세브란스병원	강남세브란스병원

[0052] **1.3 통계학적 분석**

[0053] 통계학적 분석에 사용된 프로그램은 GraphPad Software (La Jolla, CA, USA) 사의 GraphPad Prism 6.0 버전이 사용되었으며, 하기 실시예에서의 실험 데이터는 ANOVA에 이은 Bonferroni post-hoc test를 수행하여 분석하였다. 데이터 값은 평균에 ±오차범위를 포함하여 표현하였으며, 유의한 관련성이 보이는 경우는 p value < 0.05로 보았다.

[0055] **실시예 2: 종양 세포 분리 및 1차 배양**

[0056] 암 종양의 절제 후, 항진균제 및 항생제를 사용하여 상기 종양을 정상 식염수로 유지하고 실험실로 옮겼다. 정상적인 조직 및 지방을 제거하고 조직을 1x 행크 밸런스드 염 용액(Hank's Balanced Salt Solution)으로 세척하였다. 1mg / ml 콜라게나아제 타입 IV 형 (Sigma, St. Louis, MO; C5138)이 포함된 20 % 소 태아 혈청을 갖는 DMEM / F12를 함유하는 해리 배지의 튜브에서 종양을 분쇄하였다. 상기에서 분쇄하여 현탁된 종양 세포를 70-마이크론 폴 (70-micron pores, BD Falcon) 갖는 멸균 나일론 세포 스트레이너를 통해 여과하고, 50 ml의 1x 행크 밸런스드 염 용액 (Hank's Balanced Salt Solution)으로 헹구고, 220 g을 5 분 동안 원심 분리하였다. 세포를 10 % 소 태아 혈청 (Hyclone) 및 2 % 페니실린 / 스트렙토 마이신 용액 (Gibco, Grand Island, NY, USA)과 함께 RPMI-1640 (UTC, UT, South Logan, UT) 배지에 재현탁 시켰다. 트리판블루 염료 제거 방법(trypan blue dye exclusion method)을 사용하여 세포 생존력(cell viability)을 확인하였다.

[0058] **실시예 3: 세포 배양 및 세포 생존력 분석(cell viability assay)**

[0059] 환자 유래 PTC 세포를 10 % 소 태아 혈청(fetal bovine serum)을 갖는 RPMI-1640 배지에서 단리하고 배양하였다 (세포는 짧은 주기로 반복하여 확보하였으며, 핵형 분석 및 이소효소 분석(isoenzyme analysis)을 통하여 확인). MTT 분석을 사용하여 세포 증식 정도를 측정하였다. 세포를 한 웰당 6 x 10^3 개 세포로 96 웰 플레이트에 파종하고 80 %의 셀 컨플루언시(ctpell confluency)가 되도록 밤새 인큐베이션 하였다. 세포를 인큐베이션한 후 제조사의 프로토콜 (Roche, Basel, Switzerland; 11465007001)에 따라 MTT 시약을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다. 이때, 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 트립판블루 염료 제거 방법을 통하여 생존 세포를 계수하였다. 데이터는 미처리된 세포(vehicle-treated cells)인 대조군에서 관찰된 신호의 백분율로 표현하였으며, 3 회 실험의 평균 ± 오차 범위(SEM)로 나타내었다.

[0061] **실시예 4: 마이크로어레이(Microarray)를 통한 차등 발현된 유전자의 분석**

[0062] RNA 순도 및 무결성은 ND-1000 분광 광도계 (NanoDrop) 및 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)를 사용하여 측정되었다. RNA 표지 및 하이브리드화는 Agilent 1색 마이크로어레이에 기초한 유전자 발현 분석 프로토콜 (Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol, Agilent Technology, V 6.5, 2010)을 사용하여 수행되었다. 각 샘플로부터 100 ng의 토탈 RNA를 선형으로 증폭시키고 Cy3-dCTP로 표지하였고, 표지된 cRNA를 RNAeasy Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 표지된 cRNA (pmol Cy3 / μg cRNA)의 농도 및 특이적 활성은 NanoDrop ND-1000을 사용하여 측정되었다. 이어, 5μl 10x 블로킹 에이전트 (blocking agent) 및 1μl의 25x 단편화 버퍼(fragmentation buffer)를 첨가하여 각각의 표지된 cRNA 600 ng을 단편화한 다음, 60 ℃에서 30분 동안 가열하였다. 마지막으로, 25μl의 2x GE 하이브리드화 버퍼를 첨가하여 표지된 cRNA를 희석시켰다. 하이브리드화 용액(Hybridization solution) 40 μl를 슬라이드(gasket slide)에 분배하고 Agilent SurePrint G3 Human GE 8X60K, V3 Microarrays (Agilent®)에 처리하였다. 로데이터(raw data)는 Agilent Feature Extraction Software (v11.0.1.1)를 이용하여 확보하였고, 그 후 각 유전자에 대한 로데이터를 Agilent 추출 프로토콜(Agilent feature extraction protocol)로 파일을 생성하여 각 유전자에 대한 발현 정보를 확인할 수 있었다. 중요한 프로브 목록에 대한 유전자 및 기능 분석은 온톨로지 및 유전자 게놈에 대한 교토 백과사전(KEGG) 분석을 이용하여 수행되었으며, 차등 발현된 유전자의 모든 정보에 대한 분석 및 시각화는 R 3.1.2을 통해 수행되었다(도 2 참조).

[0063] 도 2를 참조하면 성인 환자와 어린 환자의 유전자가 차등적으로 발현이 된 모습을 확인할 수 있다. 도 2의 붉은색은 많이 발현하는 것, 녹색은 적게 발현하는 것을 의미하여 성인과 어린 환자에게서 극명한 대조를 보이는 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여 어린 환자의 경우 성인 환자보다 FGF 또는 FGFR 매개한 EMT 활성이 더 지배적인 모습을 확인하였다. 즉, 다시 말하면 어린 환자의 경우 성인 환자에 비하여 도 2의 파란색 스퀘어로 표시한 FGF 또는 FGFR 관련 유전자인 FGFR1OP, FGF21, FGF13, FGF11, FGFR4, FGFR2, FGFR1, FGFR3, FGF5,또는 FGF1의 발현은 상대적으로 높게, FGF16의 발현은 상대적으로 낮게 나타났으며, 빨간색 스퀘어로 표시한 EMT 관련 유전자의 발현으로 TGFb1, ZEB1, SNAIL1, SNAIL2, ZEB1.1 및 ZEB2의 발현 또한 상대적으로 높게 나타난 것을 알 수 있다.

[0065] **실시예 5: 면역 블로팅(Immunoblot Analysis) 분석**

[0066] 상기 실시예 4에서 나타난 효과가 실제 단백질의 수준에서도 같게 나타나는지를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다(도 3 참조).

[0067] 세포를 차가운 PBS로 2 회 세척하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 단백질 추출 완충제 (Pro-Prep, iNtRON Biotechnology)로 얼음상에서 용해시켰다. 단백질 농도는 BCA 분석 (Pierce Biotechnology)에 의해 결정되었다. 동일한 양의 단백질 (20 μg)을 8 내지 10 % 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔에서 분리하였다. 분해된 단백질을 폴리 비닐리덴 플루오라이드 막 (Millipore) 상에 전기를 걸어주었다. 이어, 막을 실온에서 1 시간 동안 TBS-T 중 5 % 무지방 우유(nonfat milk)로 블로킹하고, PKC, MEK, Snail, Zeb1,2 (Abcam 사) 및 p-ERK 1/2, ERK 1/2, Bcl-2, β- 액틴 (Santa Cruz Biotechnology) 에 대해 최적의 농도로 적절히 희석한 일차 항체와 함께 4 ℃ 에서 밤새 인큐베이션 하였다. 이어서 막을 TBST로 3 내지 5 회 세척하고 실온에서 1 시간 동안 홀스라디시 퍼옥시다아제(horse radish peroxidase, Santa Cruz)에 상응하는 2 차 항체를 접합시켰다. 세척 후 ECL 시약 (Pierce)으로 블롯을 디벨롭하고 Kodak X-OMAT AR Film (Eastman Kodak)을 사용하여 3 내지 5 분간 노출시켰다. 그 결과 실제 단백질 수준에서도 실시예 4에서의 차등적 유전자 발현과 동일한 패턴을 보이는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0069] **실시예 6: 약물 처리 후 사멸된 세포(Apoptotic Cell Death)의 분석**

[0070] 6.1 약물 처리

[0071] 상기 실시예 2에서 획득한 환자 유래 암 세포로써 어린 환자와 성인 환자의 암 세포에 각 약물에 따른 치료 반응성을 관찰하기 위하여 4-[4-[[[[4-클로로-3-(트리플루오르메틸)페닐]아미노]카르복실]아미노]페녹시]-N-메틸-2-피리딘카르복사미드(이하, 소라페닙(Sorafenib)), 또는 디에틸카르바모티올설파닐 N,N-디에틸카르바모디티오에이트(이하, 디설피람(Disulfiram))의 약물을 처리하였다. 실험은 in vitro 상에서 수행되었으며, 하기 표 4와 같은 약물의 최적 농도 범위 내에서 처리하거나 위약 대조군으로 아무런 약도 처리하지 않고 관찰하였으며, 일정 기간의 간격을 두고 암 세포 사멸의 정도를 알아보고자 하였다.

표 4

[0072]

환자 (cell line)	암 병변 (Hisopathology)	적정 농도(cell proliferation IC_{50} - half maximal inhibitory concentration)	
		소라페닙(Sorafenib, μM)	디설피람(Disulfiram,nM)
GSPY1	Thyroid cancer; Papillary	17.24 (± 0.5)	305.27 (± 0.2)
GSPY2	Thyroid cancer; Papillary	20.25 (± 0.1)	304.38 (± 0.4)
GSPO1	Thyroid cancer; Papillary	9.84 (± 0.5)	219.54 (± 0.3)
GSPO1	Thyroid cancer; Papillary	10.12 (± 0.2)	209.66 (± 0.5)

[0074] 6.2 약물 처리 후 세포의 분석

[0075] 세포를 48 시간 동안 4 % 파라 포름 알데히드 용액으로 고정시킨 후, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 dUTP 닉 엔드 라벨링(TUNEL) 키트(Promega, USA)를 사용하여 분석하였다. 사멸 세포(형광 녹색) 및 총 세포의 수를 형광 현미경을 이용하여 계수하고, 공 초점 현미경 (LSM Meta 700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 이미지를 획득하고, Zeiss LSM Image Browser 소프트웨어 버전 4.2.0121으로 분석하였다.

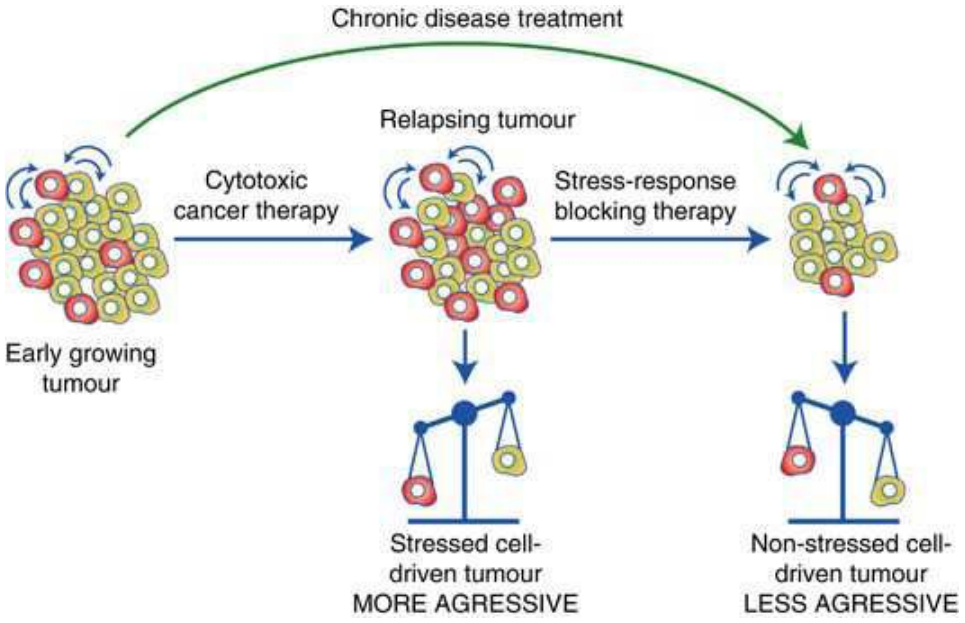
[0076] 상기 약물들을 각각 처리한 후 7 일 동안 세포의 수를 계수한 결과, 성인 환자와 어린 환자의 세포의 수를 나타내는 그래프의 기울기가 상이하게 나타난 점을 확인하였다(도 4 내지 도 7 참조). 도면을 살펴보면 소라페닙(Sorafenib)과 달리 디설피람(Disulfiram)의 경우 어린 환자에게서 더 효과적으로 암의 증식을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 4 내지 도 7 참조). 이에 반하여 성인 환자의 경우는 두 가지 약물에 대한 반응성의 차이를 확인할 수 없었다. 이를 통하여 어린 환자 유래 암 세포주에 소라페닙의 약물은 FGFR을 기반으로 하는 EMT 단백질 발현에 영향을 주지 않는 반면, 디설피람 약물의 경우 FGFR 시그널링(예를 들면, PKC, MEK, p-ERK 등)을 억제하여 EMT 단백질의 발현(예를 들면, Snail, Zeb1 등)을 억제(down-regulated)시킴으로써 암 증식이 제한되는 것을 검증하였다.

[0077] 상기 결과를 종합하면 이는 FGFR 신호 전달 경로 차단으로 EMT 관련된 단백질 발현 저해 효과가 어린 환자의 경우 성인보다 더 우세하게 나타난 것을 의미하며, 어린 암 환자(만 20세 이하의 환자) 치료에 있어 보다 적합한 항암 약물을 선택함으로써 현저하게 개선된 항암 치료 효과를 기대할 수 있음을 시사한다.

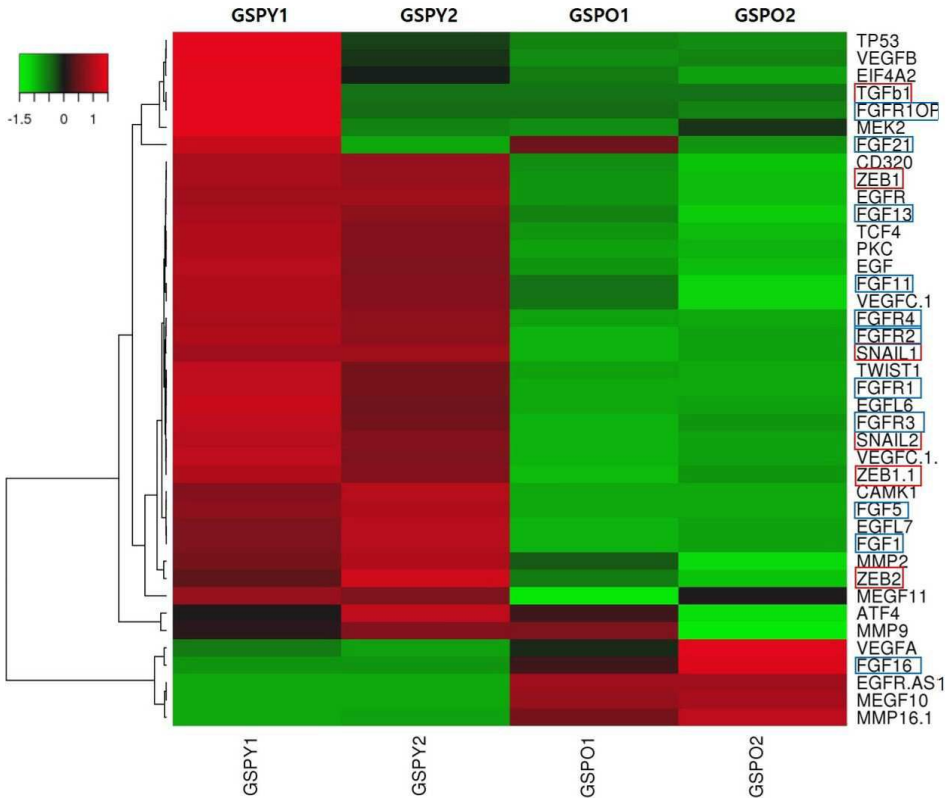
[0079] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

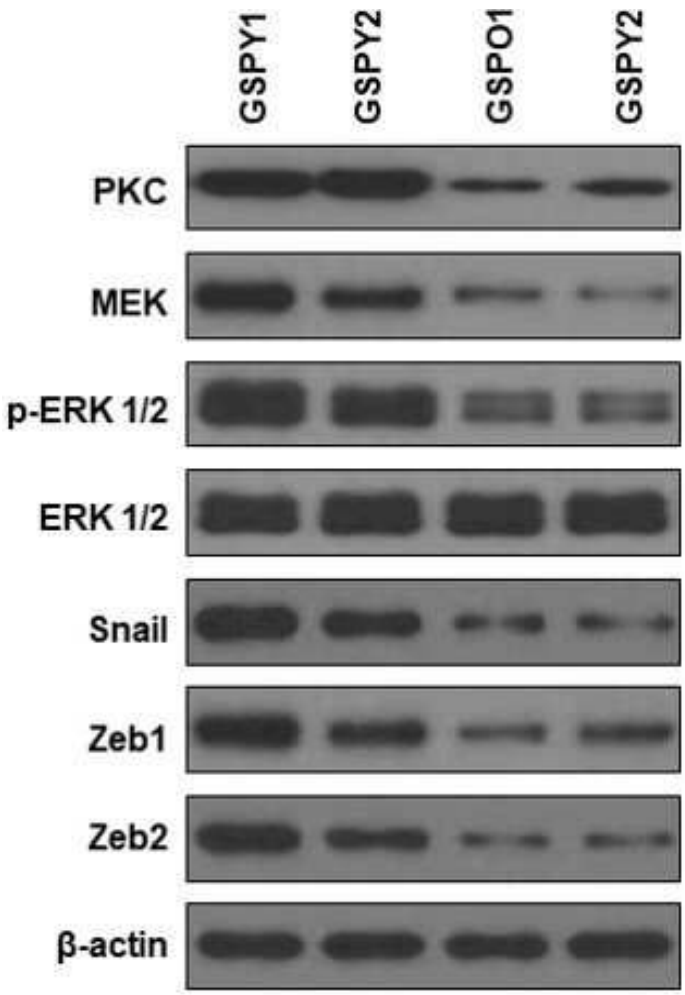
도면1



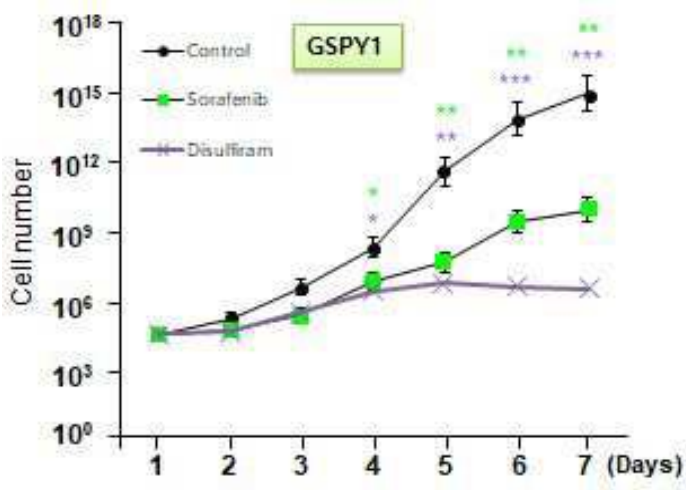
도면2


GSPY1
GSPY2
GSPO1
GSPO2
-1.5
0
1
TP53
VEGFB
EIF4A2
TGFb1
FGFR1OP
MEK2
FGF21
CD320
ZEB1
EGFR
FGF13
TCF4
PKC
EGF
FGF11
VEGFC.1
FGFR4
FGFR2
SNAIL1
TWIST1
FGFR1
EGFL6
FGFR3
SNAIL2
VEGFC.1.
ZEB1.1
CAMK1
FGF5
EGFL7
FGF1
MMP2
ZEB2
MEGF11
ATF4
MMP9
VEGFA
FGF16
EGFR.AS1
MEGF10
MMP16.1
GSPY1
GSPY2
GSPO1
GSPO2

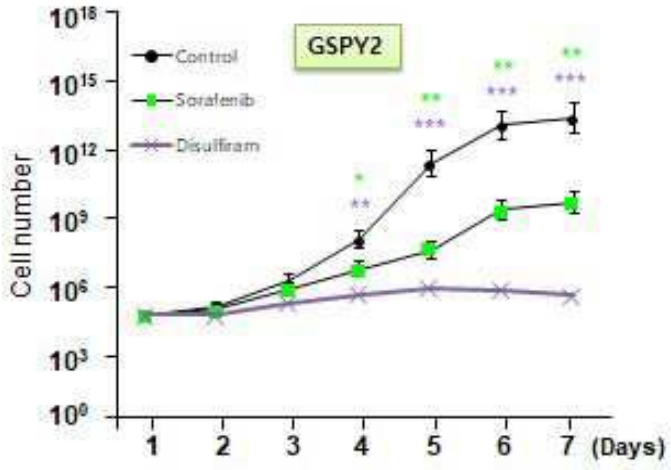
도면3


GSPY1
GSPY2
GSPO1
GSPY2
PKC
MEK
p-ERK 1/2
ERK 1/2
Snail
Zeb1
Zeb2
β-actin

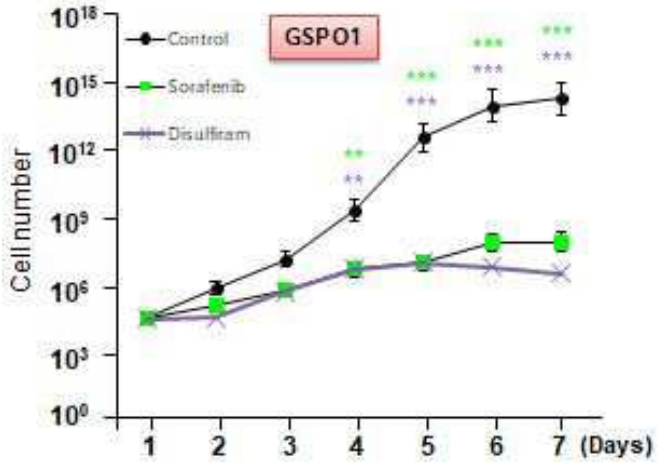
도면4


GSPY1
Control
Sorafenib
Disulfiram
Cell number
10^18
10^15
10^12
10^9
10^6
10^3
10^0
1
2
3
4
5
6
7
(Days)

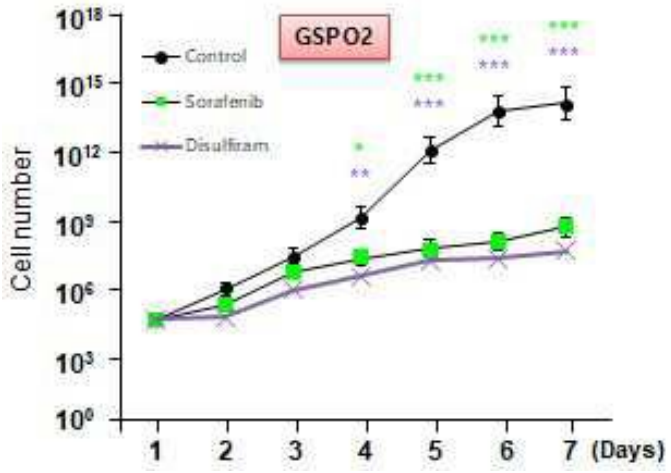
도면5


GSPY2
Control
Sorafenib
Disulfiram
Cell number
10^{18}
10^{15}
10^{12}
10^{9}
10^{6}
10^{3}
10^{0}
1 2 3 4 5 6 7 (Days)

도면6


GSPO1
Control
Sorafenib
Disulfiram
Cell number
10^{18}
10^{15}
10^{12}
10^{9}
10^{6}
10^{3}
10^{0}
1 2 3 4 5 6 7 (Days)

도면7


GSPO2
Control
Sorafenib
Disulfiram
Cell number
10^{18}
10^{15}
10^{12}
10^{9}
10^{6}
10^{3}
10^{0}
1 2 3 4 5 6 7 (Days)