



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0088771
(43) 공개일자 2011년08월04일

(51) Int. Cl.

C12N 5/09 (2010.01) *G01N 33/15* (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0008433

(22) 출원일자 2010년01월29일

심사청구일자 2010년01월29일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

조병철

서울특별시 서대문구 성산로 250(신촌동 134)

김선미

서울특별시 서대문구 신촌동 연세의료원 의과대학

(74) 대리인

특허법인다나

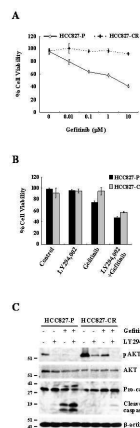
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 세록시맙과 제피티닙에 대한 교차내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주 및 이를 이용한 항암제의 스크리닝 방법

(57) 요약

세록시맙과 제피티닙에 대한 교차내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주 HCC827-CR는 이들 항암제에 대한 내성 메커니즘을 연구하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 항암제들에 대해 내성을 갖는 암을 치료할 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해서도 유용하게 이용될 수 있다. 또한, PI3K/Akt 저해제는 세록시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 갖는 암의 치료를 위해, 세록시맙 또는 제피티닙과 병용하여 사용함으로써 큰 치료 효과를 거둘 수 있다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

세특시맵과 제피티닙에 대한 교차내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주 HCC827-CR(KCLRF-BP-00224).

청구항 2

제1항의 세포주에 후보물질을 처리하고 세특시맵 또는 제피티닙에 대한 내성 극복 여부를 확인하는 것을 포함하는

세특시맵 또는 제피티닙에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 의약은 PI3K/Akt 저해제 인 암 치료용 의약의 스크리닝 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 암은 폐암, 유방암 또는 두경부암인 암 치료용 의약의 스크리닝 방법.

청구항 5

세특시맵 또는 제피티닙의 병용 사용을 위한 PI3K/Akt 저해제를 포함하는 항암용 의약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 암이 폐암, 유방암 또는 두경부암인 항암용 의약 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 PI3K/Akt 저해제가 PI3K 또는 Akt의 활성을 저해하는 화합물인 항암용 의약 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 PI3K/Akt 저해제가 PI3K 또는 Akt에 대한 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체인 항암용 의약 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

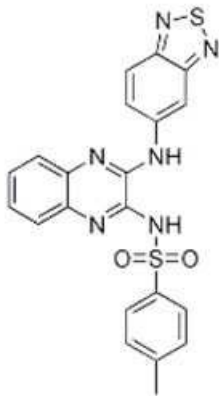
상기 PI3K/Akt 저해제가 PI3K 또는 Akt에 대한 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들 을 포함하는 벡터인 항암용 의약 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 PI3K/Akt 저해제가 하기 화학식 1의 화합물인 항암용 의약 조성물.

[화학식 1]



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세특시맵과 제피티닙에 대한 교차내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주, 이를 이용한 항암제의 스크리닝 방법 및 세특시맵 또는 제피티닙의 병용 사용을 위한 PI3K/Akt 저해제를 포함하는 항암용 의약 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 상피세포성장인자 수용체(EGFR)는 EGFR (HER1), HER2, HER3 및 HER4으로 구성되어 있는 HER 패밀리의 수용체 티로신 키나아제(RTKs)의 일원이다. EGFR의 세포외 도메인에 대한 리간드의 결합은 다른 ErbB 수용체와의 리셉터 호모- 또는 헤테로이량체화를 유도하며, 이는 특이적인 티로신 잔기의 세포내 자가인산화를 유발한다. EGFR 자가인산화는 세포 증식, 혈관신생 및 전이에 영향을 미치는 MAPK 및 PI3K/Akt 활성화를 포함한 다운스트림 신호전달 네트워크를 이끈다(Harari PM, et al., *J Clin Oncol.* Sep 10 2007;25(26):4057-65.; Yarden Y, et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb 2001;2(2):127-37.). EGFR 과발현, 유전자 증폭, 돌연변이, 또는 재배열은 여러종류의 인간 악성 종양에서 빈번히 관찰되며, 열악한 예후 및 나쁜 임상적 결과와 연관되어 있다. 그러므로, EGFR는 항암요법에 대한 매력적인 타겟이다 (Harari PM, et al., *J Clin Oncol.* Sep 10 2007;25(26):4057-65.; Hirsch FR, et al., *J Clin Oncol.* Oct 15 2003;21(20):3798-807.; Rubin Grandis J, et al., *J Natl Cancer Inst.* Jun 3 1998;90(11):824-32.).

[0003] 여러 EGFR-타겟팅 약물 중에서, 모노클로날 항체 (MoAbs) 및 소-분자 티로신 키나아제 저해제 (TKIs)는 가장 유망하며 잘 알려져 있다. 이들 약물은 동일한 리셉터를 타겟팅하나, 그들이 작용하는 매커니즘은 상이하다. 항-EGFR 모노클로날 항체는 EGFR의 세포외 도메인에 대해 리간드가 바인딩하는 것을 차단함으로써 리셉터 이량체화/활성을 저해하는 반면, TKIs는 리셉터의 티로신 키나아제 도메인(TKD)에서의 ATP-결합 부위에 결합함으로써, EGFR 자가인산화 및 다운스트림 신호전달 네트워크의 활성화를 저해한다 (Marshall J., *Cancer.* Sep 15 2006;107(6):1207-18.; Mendelsohn J, et al., *J Clin Oncol.* Jul 15 2003;21(14):2787-99.).

[0004] 세특시맵은 재조합 항-EGFR 인간/마우스 키메라 MoAb이며, 항체-의존성 세포 독성 및 화학요법 및 방사선요법에

대해 중앙 세포를 민감화시키는 것으로 알려져 있다 (Graham J, et al., *Nat Rev Drug Discov.* Jul 2004;3(7):549-50.; Kimura H, et al., *Cancer Sci.* Aug 2007;98(8):1275-80.; Kurai J, et al., *Clin Cancer Res.* Mar 1 2007;13(5):1552-61.; Dittmann K, et al., *Radiother Oncol.* Aug 2005;76(2):157-61.). 이러한 이점을 가져, 단독 요법 또는 화학요법 및/또는 방사선요법과의 병행 요법으로써 세특시맙을 이용하는 임상적 이점이 두부와 경부 암 및 전이성 결장 암에서 증명된 바 있다 (Marshall J. et al., *Cancer.* Sep 15 2006;107(6):1207-18.).

[0005] 최근, 화학요법에 세특시맙을 추가하는 것이 진전된 비-소세포 폐암 (NSCLC)의 1차 치료에서 단독의 화학요법과 비교하여 생존율에 있어서 이점을 나타냈다 (Pirker R, et al., *Lancet.* May 2 2009;373(9674):1525-31.). 세특시맙으로의 1차 요법의 실패 이후, 소분자 TKI 인 제피티닙은 진전된 NSCLC의 2차 치료를 위한 잘 확립된 대안이다(Kim ES, et al., *Lancet.* Nov 22 2008;372(9652):1809-18.). 여러 연구에서, 제피티닙에 대한 임상적 반응은 EGFR TKD의 ATP-binding cleft에서의 EGFR 돌연변이의 존재에 매우 의존적이다. 이들 돌연변이는 증가된 EGFR 신호전달을 이끌고 TKI에 대한 감수성을 부여한다. 그 결과, 돌연변이 EGFR은 TKI에 의해 야생형 EGFR 보다 10 배 내지 100 배 더 효과적으로 저해한다 (Pao W, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 7 2004;101(36):13306-11.). 두 개의 가장 흔한 EGFR 돌연변이는 엑손 19 결실 및 L858R 미스센스 돌연변이를 포함한다. 이들은 NSCLC 에서 확인된 모든 EGFR 돌연변이의 대략 85%에 대해 책임이 있다(Janne PA, et al., *J Clin Oncol.* May 10 2005;23(14):3227-34.). 그러나, NSCLC 세포에서의 이들 EGFR 돌연변이가 세특시맙에 대한 민감성과 연관되어 있지는 않다(15). 세특시맙과 제피티닙이 EGFR 의 차단에 상이한 메커니즘을 가지며 두 약물 간의 교차-내성을 제시하는 증거는 제시된 적이 없다.

[0006] 항암제들에서의 유의한 발전에도 불구하고, 많은 환자들이 약물에 대한 획득 내성을 나타내기 때문에 암의 장기 간의 제어는 달성하기가 어렵다. 그러므로, 계속적인 치료를 합리적으로 디자인하기 위한 수단으로서 이들 약물에 대해 발생하는 내성의 메커니즘을 확인하는 것이 필수적일 것이다 (Engelman JA, et al., *Clin Cancer Res.* May 15 2008;14(10):2895-9.; Cho BC, et al., *J Clin Oncol.* Jun 20 2007;25(18):2528-33.). 현재까지, 세특시맙에 대한 두 가지 주요 메커니즘의 획득 내성이 밝혀져 있다. EGFR 유비퀴틴화/분해 및 Src 활성화는 DiFi 결장암 세포에서 세특시맙에 대한 내성 메커니즘으로서 확인되었다(Lu Y, et al., *Cancer Res.* Sep 1 2007;67(17):8240-7.). 최근에는, H226 NSCLC 세포에서의 세특시맙에 대한 획득 내성이 EGFR 상향조절 및 HER3 의 계속적인 EGFR-의존성 활성화에 의해 수반됨이 확인되었다(Wheeler DL, et al., *Oncogene.* Jun 26 2008;27(28):3944-56.).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 많은 환자들에서 나타나는 항암제에 대한 획득 내성의 메커니즘을 연구할 수 있는, 항암제에 대한 획득 내성을 나타내는 세포주를 제공하고자 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 세포주를 이용하여 항암제에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 세특시맙 또는 제피티닙의 병용 사용을 위한 PI3K/Akt 저해제를 포함하는 항암용 의약 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

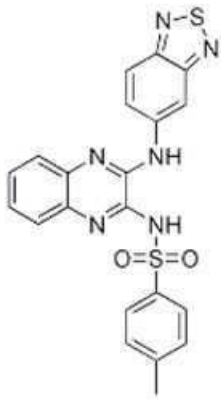
[0010] 본 발명은 세특시맙과 제피티닙에 대한 교차 내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주 HCC827-CR를 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 세특시맙에 대한 획득 내성의 추가적인 메커니즘을 조사하기 위하여, EGFR의 엑손 19에서의 결실 돌연변이를 갖는 세특시맙-내성 NSCLC (HCC827-CR) 세포주를 확립하고, 이를 2009년 10월 23일자로 한국세포주 은행에 기탁하였으며, 2009년 10월 30일자로 기탁번호 KCLRF-BP-00224를 부여받았다. HCC827-CR 세포주를 이용하여 세특시맙에 대한 획득 내성의 메커니즘을 조사하는 과정에서, 예기치 않게도 상기 HCC827-CR 세포에서 세특시맙 내성이 제피티닙에 대한 새로운 내성을 야기했음을 확인할 수 있었다. 이는 세특시맙에 대한 내성을 보이는 환자가 제피티닙에 대해서도 교차 내성을 나타낼 가능성이 있음을 의미하므로 임상적으로 중요한 의미를

갖는다.

- [0012] 상기 HCC827-CR 세포주는 세톡시맙이나 제피티닙에 대한 내성 또는 이들에 대한 교차 내성의 메커니즘을 조사하기 위해 이용될 수 있다. 뿐만 아니라 세톡시맙과 제피티닙에 대한 교차 내성을 갖는 HCC827-CR 세포주는 이들 항암제에 대한 내성을 갖고 있는 암 세포를 사멸시킬 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해 이용될 수 있다.
- [0013] 따라서 본 발명은 또한 HCC827-CR 세포주에 후보물질을 처리하고 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성 극복 여부를 확인하는 것을 포함하는 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝 방법 및 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 갖는 암 치료용 의약의 스크리닝을 위한 HCC827-CR 세포주의 용도를 제공한다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 스크리닝 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 항암 효과를 갖는 것으로 1차 스크리닝된 후보물질들에 대한 2차 스크리닝 방법으로서 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이러한 단계를 거쳐 스크리닝된 후보물질은 항암 효과를 가지면서도 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 나타내지 않을 것이므로 세톡시맙 또는 제피티닙과 함께 병용 사용함으로써 효과적으로 암을 치료할 수 있게 된다. 이러한 암 치료용 의약은 이에 제한되는 것은 아니나, 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 나타내는 암, 특히, 예컨대, 폐암, 유방암 또는 두경부암에 대한 항암제일 수 있다. 본 발명에 있어서, "세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 나타내는 암"은 실제 세톡시맙이나 제피티닙을 사용하였으나 내성을 나타낸 암뿐만 아니라 내성을 나타낼 것으로 예상되는 암을 포함한다.
- [0014] 한편, 본 발명자들은 상기 HCC827-CR 세포를 이용하여 세톡시맙에 대한 획득 내성 메커니즘을 연구하는 과정에서 증가된 PTEN 불안정성-매개된 PI3K/Akt 활성화가 HCC827-CR 세포에서 세톡시맙에 대한 획득 내성 메커니즘에서 중요한 역할을 수행함을 확인할 수 있었다.
- [0015] 따라서, 한 구체예에서, 상기 방법을 통해 스크리닝된 의약은 PI3K/Akt 저해제일 수 있다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이 PI3K/Akt 저해제를 사용할 경우 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 극복할 수 있으므로, HCC827-CR 세포를 이용하여 스크리닝된 물질은 PI3K/Akt 저해제인 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명은 또한 세톡시맙 또는 제피티닙의 병용 사용을 위한 PI3K/Akt 저해제를 포함하는 항암용 의약 조성물, 세톡시맙 또는 제피티닙의 병용 사용을 위한 항암제의 제조를 위한 PI3K/Akt 저해제의 용도, 세톡시맙 또는 제피티닙과 동시에 또는 순차적으로 PI3K/Akt 저해제를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다. 앞서 설명한 바와 같이, PI3K/Akt 저해제는 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 극복할 수 있으므로, 세톡시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 보이는 암 환자 또는 그러한 가능성을 갖고 있는 암 환자의 경우 PI3K/Akt 저해제와 함께 세톡시맙 또는 제피티닙을 병용 사용함으로써 암, 예컨대, 폐암, 유방암, 두경부암 등을 효과적으로 치료할 수 있게 된다.
- [0017] 본 발명에 있어서 PI3K/Akt 저해제는 PI3K/Akt 신호전달경로의 활성화를 차단할 수 있는 물질은 모두 포함한다. 상기 PI3K/Akt 저해제는 공지된 스크리닝 방법을 통해 선정될 수 있다. 예를 들어, 이러한 스크리닝 방법으로는 단백질-단백질, 단백질-화합물, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물, RNA-단백질, RNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) Idbf 유전자와 후보 물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현을 측정하는 방법, Idbf 단백질과 후보 물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), Idbf 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화합물 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.
- [0018] 한 구체예에서, 상기 PI3K/Akt 저해제는 PI3K 또는 Akt의 활성을 저해하는 화합물일 수 있다. 이러한 화합물로는 현재 EXELIXIS사에서 경구투여가능한 PI3K 저해제로서 임상 시험중인 하기 화학식 1의 화합물(XL147)을 예로 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] 다른 구체예에서, 상기 PI3K/Akt 저해제는 PI3K 또는 Akt에 대한 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 이러한 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 제작 방법을 통해 제작하여 사용될 수 있다.

[0022] 또 다른 구체예에서, 상기 PI3K/Akt 저해제는 PI3K 또는 Akt에 대한 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 '벡터'는 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 내로 삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명과 관련된 벡터는 Idbf 유전자를 코딩하는 핵산 서열 이 게놈 내로 삽입된 벡터로서, 이들 벡터는 DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 효모 벡터, 또는 바이러스 벡터를 예로 들 수 있다.

[0024] 본 발명의 의약 조성물은 예를 들어 항암제로서 공지된 추가의 유효 성분을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 PI3K/Akt 저해제가 화합물인 경우 PI3K/Akt 저해제는 제피티닙과 함께 제제화될 수도 있다.

[0025] 본 발명의 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0027] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0028] 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0029] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0030] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 암의 예방 또는 치료를 이루는데 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 있다. 예컨대, 성인의 경우, PI3K/Akt 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, PI3K/Akt 저해제가 화합물인 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 단백질의 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg, 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg의

용량으로 투여할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, '대상체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0032]

발명의 효과

[0033] 세록시맙과 제피티닙에 대한 교차내성을 갖는 비소세포성 폐암 세포주 HCC827-CR는 이들 항암제에 대한 내성 메커니즘을 연구하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 항암제들에 대해 내성을 갖는 암을 치료할 수 있는 새로운 항암제의 스크리닝을 위해서도 유용하게 이용될 수 있다. 또한, PI3K/Akt 저해제는 세록시맙 또는 제피티닙에 대한 내성을 갖는 암의 치료를 위해, 세록시맙 또는 제피티닙과 병용하여 사용함으로써 큰 치료 효과를 거둘 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 HCC827-CR 세포가 HCC827-P 세포와 비교하여 세록시맙에 대한 내성을 가짐을 보여주는 도면이다.
 도 2는 HCC827-CR 세포에서, 세록시맙에 의한 EGFR 저해 및 EGF-유도된 세포 표면 EGFR의 내재화가 HCC827-P 세포와 유사함을 보여주는 도면이다.
 도 3은 HER 패밀리를 포함한 다른 수용체 티로신 키나아제들이 HCC827-CR 세포에서의 세록시맙에 대한 획득 내성에 관여하지 않음을 보여주는 도면이다.
 도 4는 세록시맙에 대한 획득 내성에 있어서 구조적 Akt 활성화가 중요한 역할을 함을 보여주는 도면이다.
 도 5는 증가된 PTEN 불안정화가 HCC827-CR 세포에서의 구조적 Akt 활성화를 매개함을 보여주는 도면이다.
 도 6은 NEDD4-1d1 HCC827-CR 세포에서의 PTEN 불안정성과 연관되어 있지 않음을 보여주는 도면이다.
 도 7은 HCC827-CR 세포가 제피티닙에 대한 *de novo* 내성을 가짐을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0036] [실시예]

[0037] 1. 획득 세록시맙-내성 세포주의 확립

[0038] American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 구매한 HCC827 세포들을 10% 우태아혈청을 함유한 RPMI 1640 HyClone (Logan, UT) 중에서 37℃, 5% CO₂ 습윤 대기 조건 하에서 배양하였다. 세록시맙-내성 세포주의 확립을 위해, HCC827 세포들을 6개월 동안 증가하는 농도의 세록시맙(IMC-225, Erbitux[®], ImClone System Inc (New York, NY)) (10-100 nM)에 노출시켜 세록시맙-내성 HCC827 NSCLC 세포주(HCC827-CR)를 확립하였다. 세포가 내성을 획득했는지를 검증하기 위하여, 세포 생존율을 세록시맙 농도가 증가하였을 때마다 MTT 어세이에 의해 시험하였다. 세포들을 1X10⁴ cells/well의 밀도로 96-웰 컬처 플레이트에 씨딩하고, 24시간동안 인큐베이션하였다. 세포들을 세록시맙에 72시간 동안 노출시킨 후, 0.5 mg/ml의 MTT(Amresco (Solon, OH))를 웰 내 배지에 가하였다. 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션한 후, 살아있는 세포들 내의 포마잔 결정을 100 µl DMSO로 용해시켰다. MTT 포마잔 산물의 광학 밀도는 마이크로플레이트 리더기로 565 nm에서 측정했다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 그 결과, HCC827 모세포(HCC827-P)는 1 nM 세록시맙에 대한 노출시 세포 생존율의 약 80% 저해를 나타냈다. 대조적으로, HCC827-CR 세포는 세록시맙에 대한 고려할만한 내성을 나타냈다.

[0039] 또한, 세특시맵에 72시간 노출시킨 상기 세포주들에 대해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 세포들을 RIPA 버퍼로 용해시킨 후, BCA 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 분획하고, 니트로셀룰로소막(BioRAD, Richmond, CA)으로 옮겼다. 5% 탈지유 함유가 함유된 PBS+0.1% Tween 20으로 블로킹한 후, 상기 막을 적당한 1차 항체로 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 단백질을 HRP-컨쥬게이션된 2차 항체 및 ECL 화학발광 탐지 시스템(Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 이용하여 탐지하였다. 그 결과, 세특시맵은 HCC827-P 세포에서 세포사멸의 마커인 카스파제-3 및 PARP의 절단을 유도하였으나, HCC827-CR 세포에서는 그러하지 않았다 (도 1B).

[0040] 2. 세특시맵에 대한 획득 내성의 메커니즘 확인

[0041] (1) 세특시맵에 대한 획득 내성과 EGFR 내재화와의 상관 관계 조사

[0042] 세특시맵에 대한 획득 내성의 메커니즘을 조사하기 위하여, 우리는 우선 HCC827-CR 세포가 HCC827-P 세포와 비교하여 EGFR의 TKD에서 추가적인 돌연변이를 갖는지를 결정하고자 하였다. 시퀀싱 결과, HCC827-CR 세포주에서의 EGFR의 TKD에서의 추가적인 돌연변이는 없었다 (데이터 미도시).

[0043] 세특시맵은 EGFR 내재화/분해의 유도를 통해 EGFR 신호전달 경로를 차단하는 것으로 알려져 있다 (Graham J, et al., *Cetuximab. Nat Rev Drug Discov.* Jul 2004;3(7):549-50.). 그러므로, 우리는 세특시맵에 대한 손상된 결합 또는 EGFR의 손상된 내재화가 세특시맵의 획득 내성에 연관되어 있을 것으로 가설을 세웠다. 이 가설을 시험하기 위해, 우리는 EGF-유도된 EGFR 활성화에 대한 세특시맵의 효과를 테스트하고, HCC827-P 및 HCC827-CR 세포에서의 EGF-유도된 EGFR 내재화의 패턴을 분석하였다.

[0044] HCC827-P 세포 및 HCC827-CR 세포를 10nM의 세특시맵과 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 세포들을 50ng/ml의 EGF로 자극하고, 세포를 수확한 후, EGFR 인산화 및 총 EGFR 단백질 수준을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 그 결과, HCC827-CR 세포의 기초적인 EGFR 활성화는 HCC827-P 세포 처리에 비해 낮았다. EGFR 활성화는 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포 모두에서 유도되었다. 세특시맵의 처리 후, EGF-유도된 EGFR 활성화는 저해되었으며, EGFR 단백질 수준은 양쪽 세포주 모두에서 감소되었다 (도 2A).

[0045] 그리고 나서 우리는 유세포 분석에 의해 EGF-유도된 EGFR 내재화를 측정하였다. 세포 표면 EGFR의 수준을 측정하기 위해, 세포들을 0.5% 혈청 조건에서 18시간 동안 혈청 결핍시킨 후, 50 ng/ml의 EGF (R&D Systems, Minneapolis, MN)로 처리하였다. 그런 다음, 세포들을 차가운 PBS 로 세척하고, 트립신처리에 의해 수확하였다. 0.2% BSA 함유 PBS로 세척 후, 세포들을 BSA 함유 PBS 중에서 PE-컨쥬게이션된 대조군 IgG 또는 PE-컨쥬게이션된 항-EGFR 항체와 함께 1시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포들을 0.2% BSA 함유 PBS로 3회 세척하고, 유세포 분석을 수행하였다. 모든 항체들을 Abcam (Cambridge, MA)으로부터 구매하였다. 데이터는 WinMDI program (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA)으로 분석하였다. 그 결과, HCC827-P 세포에서, EGFR은 EGF 자극에 반응하여 6시간 이내에 신속하게 내재화되는 것으로 확인되었다. HCC827-CR 세포에서, EGF-유도된 EGFR 내재화는 HCC827-P과 유사하였다 (도 2B). 이들 데이터는 HCC827-CR 세포가 세특시맵에 대한 손상된 결합 또는 EGFR의 손상된 내재화를 갖지 않으며, 다른 메커니즘이 세특시맵 내성과 연관되어 있을 것임을 제시한다.

[0046] (2) 세특시맵에 대한 획득 내성과 RTKs의 활성화와의 상관 관계 조사

[0047] 이전의 연구들은 EGFR 경로를 우회하는 대안적인 RTKs의 활성화가 항-EGFR 약물에 대한 획득 내성과 연관되어 있음을 밝혔다(Wheeler DL, et al., *Oncogene.* Jun 26 2008;27(28):3944-56.; Jones HE, et al., *Endocr Relat Cancer.* Dec 2004;11(4):793-814.; Engelman JA, et al., *Science.* May 18 2007;316(5827):1039-43.). 세특시맵에 대한 획득 내성에서의 다른 RTKs의 연관성을 조사하기 위해, 우리는 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포에서 phospho-RTK 어레이를 수행하였다. 제조사의 지시에 따라 Phospho-RTK 어레이(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하였다. 요약하면, 처리 후, 세포들을 단백질분해효소 저해제, 1 mM NaF, 1 mM 소듐 오르소바나테이트(sodium orthovanadate), 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF의 존재 하에서 RIPA 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1 mM EGTA, 1.0 mM EDTA, 0.1% SDS)로 용해시켰다. 총 150 µg의 신선한 단백질 분해물을 phospho-RTK 어레이 멤브레인으로 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 결합된 phospho-RTKs를 HRP가 컨쥬게이션된 팬 항포스포티로신 항체(pan antiphosphotyrosine antibody)로 화학발광을

이용하여 탐지하였다. 실험 결과, HCC827-CR 세포에서, HER 패밀리를 포함한 대부분의 RTKs의 기초 활성은 HCC827-P 세포에서보다 낮았으며, 100 nM 세톡시맙의 처리시에도 변화하지 않았다 (도 3A).

[0048] 최근에는, Wheeler 등이 HER 패밀리가 NSCLC에서의 세톡시맙에 대한 획득 내성에서 중요한 역할을 수행함을 보고한 바 있다 (Wheeler DL, et al., *Oncogene*. Jun 26 2008;27(28):3944-56.). 우리의 세톡시맙-내성 세포에서 HER 패밀리의 감소된 활성을 확인하고자, 우리는 phospho-HER 패밀리에 대한 이뮤노블롯 분석을 수행하였다. phospho-RTK 어레이의 결과와 일치하게도, HCC827-CR 세포에서의 EGFR, HER2 및 HER3의 활성은 HCC827-P 세포에서보다 낮았다 (도 3B). 이들 데이터는 다른 RTKs의 활성화가 HCC827-CR 세포에서의 세톡시맙에 대한 획득 내성에서 아무런 역할을 하지 못함을 제시한다.

[0049] (3) 세톡시맙에 대한 획득 내성과 PI3K/Akt 경로와의 상관 관계 조사

[0050] 내성의 또다른 흔한 분자적 메커니즘은 EGFR의 다운스트림 이펙터의 구조적인 활성화이다 (Janmaat ML, et al., *Clin Cancer Res*. Jun 2003;9(6):2316-26.; Normanno N, et al., *J Cell Physiol*. May 2006;207(2):420-7., 23). 그러므로 우리는 특정 신호전달 분자가 HCC827-CR 세포에서 활성화되는지를 조사하였다. EGFR의 두 개의 주요한 다운스트림 이펙터인 Akt 및 ERK의 활성을 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포에서 이뮤노블롯 분석에 의해 시험하였다. HCC827-CR 세포에서의 ERK 활성은 HCC827-P 세포에서와 유사하였다. Src 활성화는 대장암 세포에서 세톡시맙에 대한 획득 내성을 매개하는 것으로 보고된 바 있기 때문에 (Lu Y, et al., *Cancer Res*. Sep 1 2007;67(17):8240-7.), 우리는 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포에서의 Src 활성을 분석하였다. 세포들을 0.5% FBS-함유 RPMI1640 배지 중에서 100nM의 세톡시맙과 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. Akt, ERK 및 Src의 활성화를 웨스턴 블롯 분석에 의해 조사하였다. 그 결과, HCC827-CR 세포에서의 Src 활성은 HCC827-P 세포에서와 유사했다. HCC827-P 세포에서, Akt의 인산화는 100 nM 세톡시맙에 반응하여 감소하였다. HCC827-P 세포와는 대조적으로, HCC827-CR 세포에 세톡시맙의 처리시 Akt는 강력하게 활성화되고 유지되었다 (도 4A).

[0051] Akt의 과활성화가 세톡시맙 내성과 관련이 있는지를 조사하기 위하여, 우리는 PI3K/Akt 경로의 차단이 HCC827-CR 세포에서의 세톡시맙 민감성을 회복시키는지를 시험하였다. 이를 위해 세포들을 비히클 또는 20 μ M LY294,002으로 1시간 동안 처리한 후, 비히클 또는 100nM 세톡시맙과 함께 인큐베이션하였다. 72시간 후, 세포 생존율을 MTT 어세이로 분석하였다. 그 결과, 20 μ M LY294,002 (PI3K/Akt 저해제)의 존재 하에서, 세톡시맙은 HCC827-CR 세포에서의 세포 생존율을 감소시켰다 (도 4B). 한편, 24시간 후, 세포들을 수확하여 웨스턴 블롯 분석을 한 결과, 세톡시맙-처리된 HCC827-CR 세포에서, 케스파제-3의 절단은 오직 LY294,002의 존재시에만 유도되었다 (도 4C). 종합하면, 이러한 발견들은 PI3K/Akt 경로의 활성화가 HCC827-CR 세포에서의 세톡시맙 내성에 기여함을 제시한다.

[0052] (4) Akt 활성화와 PTEN의 불활성화와의 상관관계 조사

[0053] 증가된 Akt 활성화에 대한 주요한 기저 메커니즘은 PTEN의 불활성화로 알려져 있다(Maehama T, et al., *J Biol Chem*. May 29 1998;273(22):13375-8.). HCC827-CR 세포에서의 구조적인 Akt 활성화의 메커니즘을 조사하기 위해, 우리는 우선 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포에서의 PTEN의 mRNA 및 단백질 수준을 분석하였다.

[0054] HCC827-P 및 HCC827-CR 세포들을 세톡시맙의 부재 하에 웰에 씨딩하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 수확한 후 RT-PCT 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0055] PTEN의 RT (역전사)-PCR 분석은 다음과 같이 수행하였다. 먼저, RNeasy mini kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany)를 이용하여 전체 RNA를 세포로부터 분리하였다. Nanodrop Spectrophotometer ND-100로 RNA 농도를 결정한 후, 1 μ g의 전체 RNA를 Super Script III 역전사효소(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA로 전환시켰다. PTEN 특이적 cDNA는 PTEN 특이적 프라이머 쌍을 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰으며, 1% 아가로즈 겔 러닝으로 탐지하였다. GAPDH를 PTEN의 내부 대조군으로 이용하였다. 상기 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0056] PTEN

[0057] 센스 5'-ATGACAGCCATCATCAAAGAG-3'

[0058] 안티센스 5'-GTGCCACTGGTCTATAATCCAG-3';

[0059] GAPDH

- [0060] 센스 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
- [0061] 안티센스 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'.
- [0062] 또한, 웨스턴 블롯 분석을 위해, 세포들을 용해시키고 PTEN 및 β -액틴에 대해 SDS-PAGE 상에서 분획하였다. 실험 결과, HCC827-P 및 HCC827-CR 세포 간의 PTEN mRNA 수준(도 5A 상단)에서의 주목할만한 차이점은 없었으나, HCC827-CR 세포에서의 PTEN 단백질 수준은 HCC827-P 세포에서보다 현저히 낮았다(도 5A 하단).
- [0063] 두 개의 세포주로부터의 PTEN mRNA의 유사한 수준이 사용된 증폭 시스템의 포화에 기인한 것이었는지를 명확히 하기 위해, PCR 증폭을 다양한 사이클 수로 반복하였다. 두 개의 세포주로부터의 PTEN mRNA의 유사한 수준이 반복적으로 탐지되었다(데이터 미도시). 그러므로 우리는 낮은 PTEN 단백질 수준이 HCC827-CR 세포에서의 증가된 유비퀴틴-매개 프로테오솜성 분해에 기인한 것이라고 가설을 세웠다.
- [0064] 이 가설을 시험하기 위하여, HCC827-CR 세포를 프로테오솜 저해제인 MG-132로 처리하고, PTEN 단백질 수준을 이뮤노블롯 분석에 의해 측정하였다. 먼저 HCC827-CR 세포들을 10% FBS 함유 배지 중에서 1 μ M MG-132와 함께 24 시간 동안 인큐베이션한 후, 세포 용해물에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 1 μ M MG-132의 처리 후, PTEN 단백질 수준은 증가하였으며, 폴리유비퀴틴화된 단백질의 특징적인 사다리 패턴을 나타냈다. 이 때, Akt 활성은 급격하게 감소했다(도 5B).
- [0065] HCC827-CR 세포에서의 증가된 PTEN 불안정성을 확인하기 위하여, 야생형 PTEN을 일시적으로 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포에서 과발현시키고, 그 후 24시간 간격으로 이뮤노블롯 분석에 의해 분석하였다.
- [0066] 구체적으로, 세포들을 대조군 벡터(MOCK) 또는 야생형 PTEN(WT-PTEN)을 발현하는 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 24, 48 및 72 시간에서 세포들을 수확하고 PTEN 단백질 발현 수준의 확인을 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, HCC827-P 세포에서, 과발현된 PTEN 수준은 72시간 동안 지속되었다. 대조적으로, HCC827-CR 세포에서 과발현된 PTEN 수준은 48시간 동안 유지되었으며, 72시에 급격하게 감소하였다(도 5C).
- [0067] HCC827-CR 세포에서 과발현된 PTEN 단백질 수준의 감소가 단백질 합성의 감소에 기인한 것이 아니라 단백질 분해의 결과임을 명확히 하기 위해서, 우리는 위와 같은 방법으로 PTEN 과발현을 유도하고, 트랜스펙션 후 24시간 후에 단백질 생합성의 저해제인 사이클로헥시미드(CHX)를 50 μ g/ml 처리하였다. CHX의 처리 후, 세포들을 0, 3, 6, 9, 12h에서 수확하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 도 5D에서 볼 수 있는 바와 같이, HCC827-P 세포에서, 과발현된 PTEN 수준은 CHX의 존재하에서 12 h까지 지속되었다. 그러나, HCC827-CR 세포에서, 과발현된 PTEN 수준은 CHX의 존재하에서 3 h 후 감소하였으며, 12 h에는 거의 탐지되지 않았다. CHX의 존재하에서, Akt 활성은 PTEN 과발현된 HCC827-CR 세포에서 저해되었다. CHX의 처리 후, 과발현된 PTEN 단백질 수준이 감소됨에 따라, Akt 활성은 PTEN 과발현된 HCC827-CR 세포에서 회복되었다. 이들 데이터는 HCC827-CR 세포에서, PTEN 불안정성이 증가된 유비퀴틴-매개 프로테오솜성 분해, 그에 따른 Akt의 구조적인 활성화가 유도되는 것에 기인하는 것임을 제시한다.
- [0068] PTEN 단백질 수준을 감소시키는 메커니즘이 잘 이해되지 못한 상태로 남겨지긴 했으나, PTEN의 c-말단은 PTEN 안정성을 유지하는데 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Torres J, et al., *J Biol Chem.* Jan 12 2001;276(2):993-8.). 이러한 이유로 우리는 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포로부터 PTEN cDNA의 전체 서열을 분석했다. 그러나, 어떠한 세포주에서도 PTEN에서의 돌연변이는 탐지되지 않았다(데이터 미도시).
- [0069] 최근 연구에서, E3 유비퀴틴 리가아제인 NEDD4-1은 유비퀴틴화에 의해 PTEN 안정성을 음성적으로 조절함이 보고된 바 있다(Wang X, et al., *Cell.* Jan 12 2007;128(1):129-39.; Wang X, et al., *Biochem J.* Sep 1 2008;414(2):221-9.). HCC827-CR 세포에서의 증가된 PTEN 불안정성에서의 NEDD4-1의 역할을 확인하기 위해, 우리는 HCC827-P 및 HCC827-CR 세포 사이의 NEDD4-1 단백질 수준을 비교했다. HCC827-P 및 HCC827-CR 세포를 씨당하고 세록시랍의 부재 하에서 24시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수확하고 웨스턴블롯을 수행하였다. 그 결과, HCC827-P 및 HCC827-CR 세포 간의 NEDD4-1 수준에 있어서 주목할만한 차이는 없었다(도 6A). 또한, NEDD4-1의 전사 수준의 변화가 PTEN 단백질 수준에 영향을 미치는지를 확인하고자 HCC827-CR 세포에 NEDD4-1 특이적 siRNA 또는 대조군 siRNA를 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 후 48h에서 세포들을 수확하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, NEDD4-1의 siRNA-매개 억제된 HCC827-CR 세포에서의 PTEN 단백질 수준에 영향을 미치지 않았다(도 6B). 이들 데이터는 NEDD4-1이 HCC827-CR 세포에서의 증가된 PTEN 불안정성에 대해 없어도 되는 것임을 보여준다.

[0070] (5) HCC827-CR 세포의 제피티닙에 대한 교차 내성 확인

[0071] 최근 연구에서, HER 패밀리의 활성화가 주요한 세특시맵-내성 메커니즘이기 때문에, EGFR TKIs로의 EGFR 활성화의 저해가 세특시맵-획득 내성의 극복을 위한 효과적인 치료 전략일 수 있음이 제시된 바 있다 (Wheeler DL, et al., *Oncogene*. Jun 26 2008;27(28):3944-56.). PTEN 불안정성-매개된 Akt 활성화는 EGFR-비의존적인 세포내 현상이기 때문에, HCC827-CR 세포는 EGFR TKIs에 반응하지 않을 수 있다.

[0072] EGFR TKIs에 대한 민감성을 시험하기 위해, 우선 HCC827-CR 세포를 10% FBS 함유 배지 중에서 0, 0.01, 0.1, 1 μ M의 제피티닙으로 72시간 동안 처리하였다. 그런 다음 MTT 어세이에 의해 세포 생존율을 측정하고 미처리된 대조군 세포에 비한 세포 생존율을 퍼센테이지로 플로팅하였다. 그 결과, HCC827-CR 세포는 높은 농도에서도 제피티닙에 대해 내성을 나타냈다 (10 μ M) (Fig. 7A).

[0073] 다음으로, 우리는 PI3K/Akt 신호전달 경로의 차단이 또한 HCC827-CR 세포에서의 제피티닙 내성을 극복할 수 있는지에 대해 시험하였다. HCC827-CR 세포를 비히클 또는 20 μ M LY294,002로 1시간 동안 처리하고, 비히클 또는 10nM의 제피티닙과 함께 인큐베이션하였다. 72시간 후, 세포 생존율을 MTT 어세이에 의해 분석하였다. 그 결과, 20 μ M LY294,002의 존재하에서, 세포 생존율은 HCC827-CR 세포에서 10 nM 제피티닙에 의해 유의하게 감소했다 (Fig. 7B). 또한, 위와 같이 처리된 HCC827-CR 세포를 24h에서 수확하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, Akt 활성이 HCC827-CR 세포에서 10 nM 제피티닙에 의해 부분적으로 감소하였음에도 불구하고, 그것은 HCC827-P 세포에서의 기초 Akt 활성화에 비해 약간 더 높았다. 20 μ M LY294,002 및 10 nM 제피티닙의 배합처리만이 HCC827-CR 세포에서의 Akt 활성화의 완전한 저해를 유도

[0074] 했다. 캐스파제-3의 절단 또한 20 μ M LY294,002 및 10 nM 제피티닙의 복합 처리에 의해 HCC827-CR 세포에서 탐지되었으며, 제피티닙 단독으로는 그러하지 않았다 (Fig. 7C). 이들 데이터는 HCC827-CR 세포가 세특시맵 뿐만 아니라 제피티닙에 대한 새로운 내성을 획득하였으며, 제피티닙에 대한 내성은 PI3K/Akt 신호전달 경로의 저해에 의해 극복될 수 있음을 제시한다.

수탁번호

[0075]

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

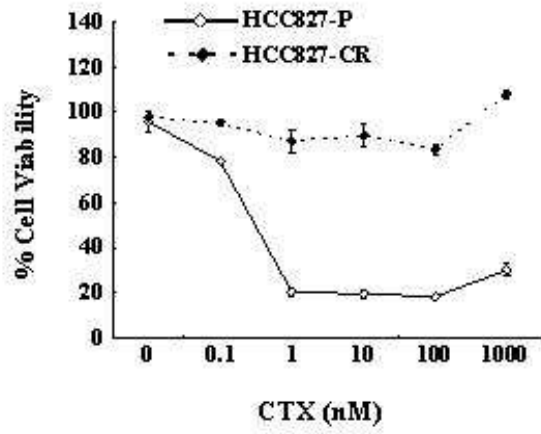
수탁번호 : KCLRFBP00224

수탁일자 : 20091023

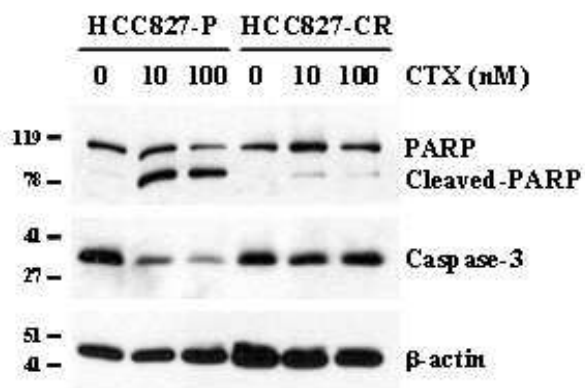
도면

도면1

A

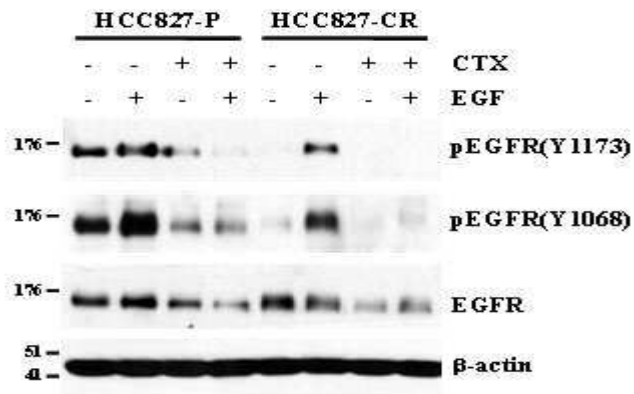


B

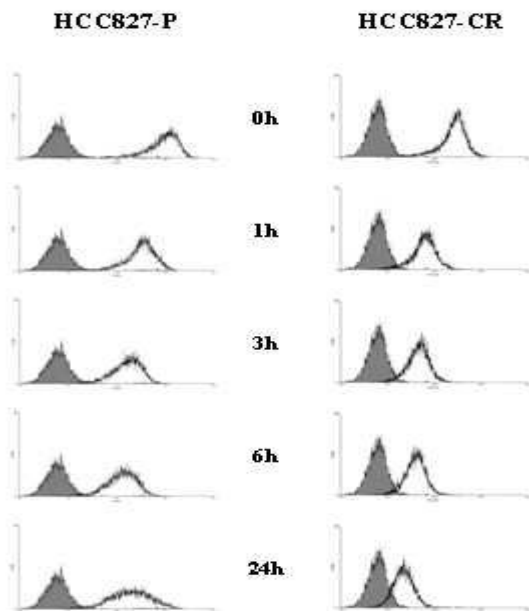


도면2

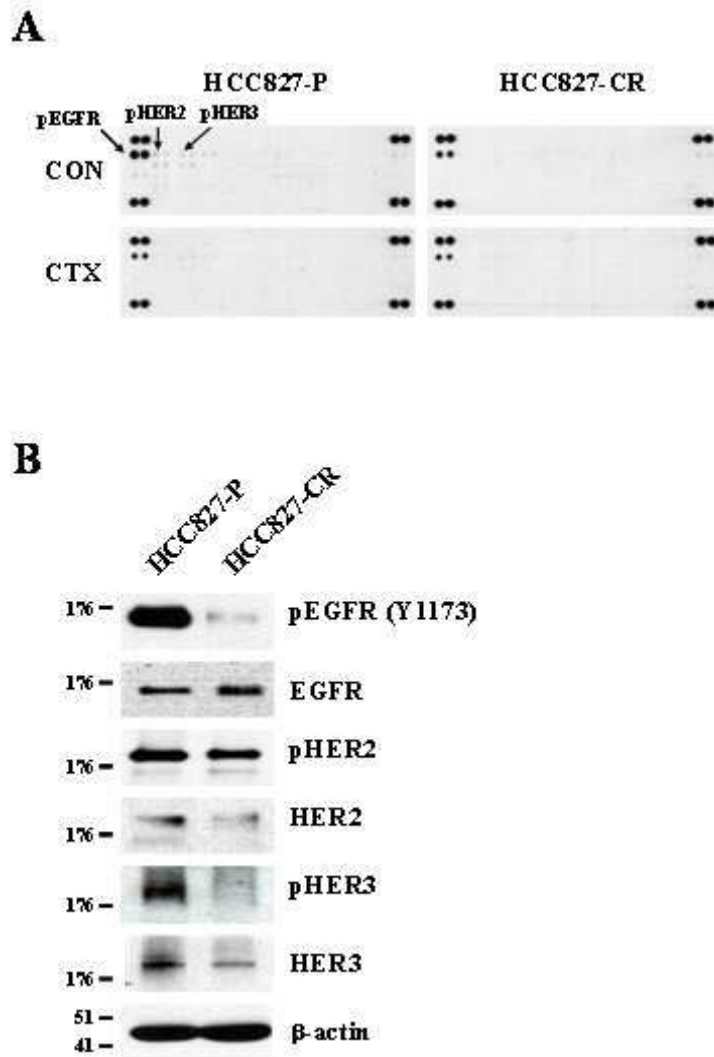
A



B

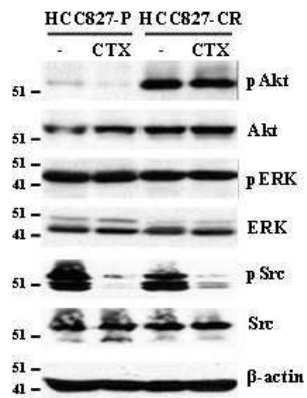


도면3

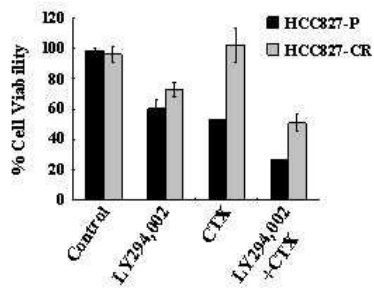


도면4

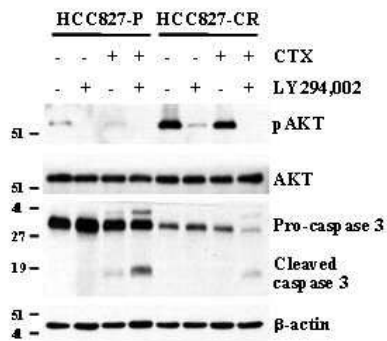
A



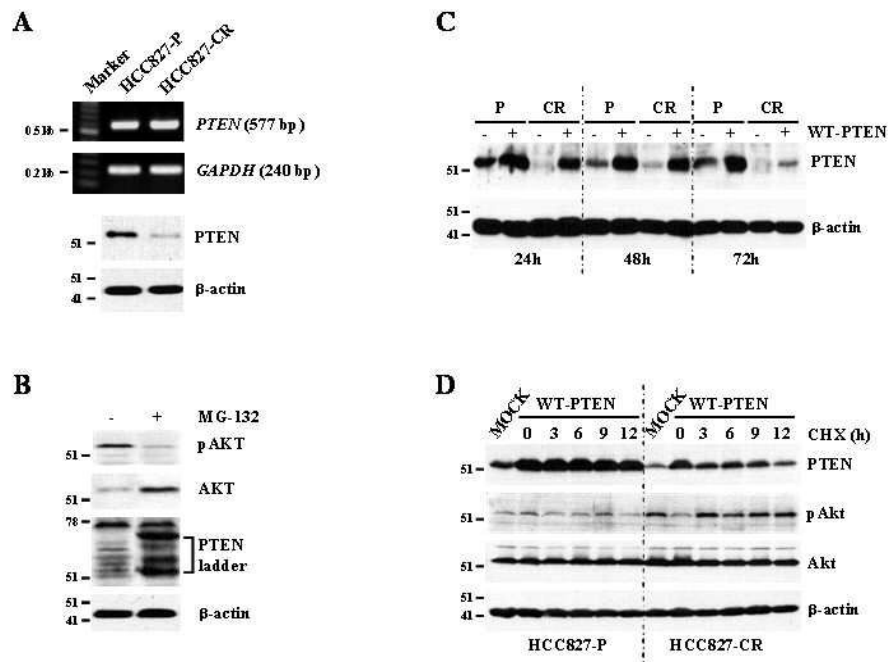
B



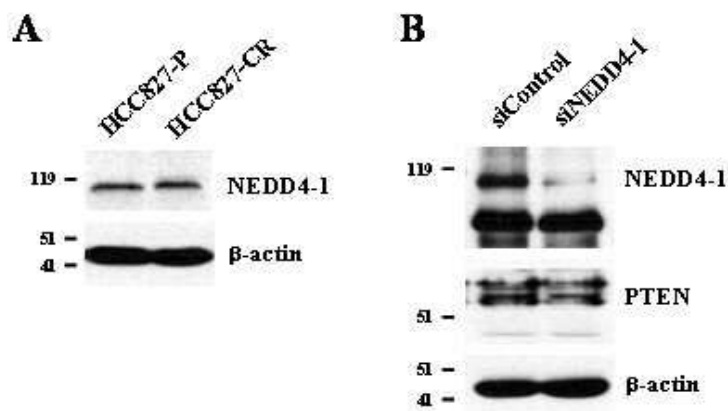
C



도면5

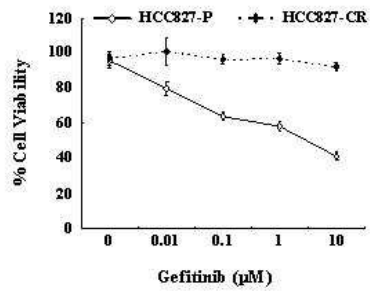


도면6

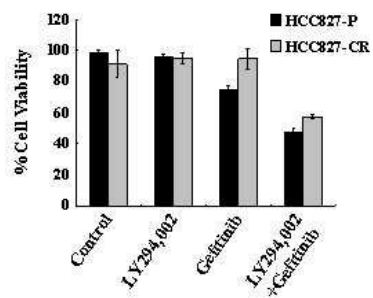


도면7

A



B



C

