명세서

발명의 명칭: RIP3 발현촉진제를 유효성분으로 포함하는 항암보조용 조성물, RIP3 발현을 촉진하여 항암제 감수성을 증진시키는 항암 보조제 스크리닝 방법 및 항암제 감수성 모니터링 방법

기술분야

[1] 본 발명은 RIP3 발현촉진제를 유효성분으로 포함하는 항암보조용 조성물 및 항암제와의 병용투여 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 RIP3 발현을 촉진하여 항암제 감수성을 증진시키는 항암 보조제 스크리닝 방법 및 RIP3 발현 여부를 통한 항암제 감수성 모니터링 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 RIP3 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 항암제 감수성 진단용 바이오마커 조성물 및 항암제 감수성 예후 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

배경기술

[2] 수용체-작용 단백질 인산화효소-3(Receptor-interacting protein kinase-3; RIP3 또는 RIPK3)는 세포사멸에 중요한 단백질로서, 죽음수용체에 의한 세포사멸이나 다른 세포적 스트레스에 의한 세포사멸에서 그 역할을 수행한다. 이들 세포사멸 신호는 인산화나 탈아세틸화에 의존적인 RIP1과의 복합체 및 혼합 혈통 인산화효소 도메인-유사 단백질(Mixed lineage kinase domain-like protein; MLKL)과의 결합을 통해 이루어지며 미토콘드리아에 존재하는 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 신호 전달계의 조절된 기전이 사멸조절 단백질들에 의해 이루어져서 발생뿐만 아니라 혈액세포 (lymphocytes), 피부세포 (keratinocyte), 그리고 장내 상피세포의 세포사멸, 면역반응들을 조절하게 된다. 조절된 괴사(Regulated necrosis)는 퇴행성, 면역성, 그리고 감염질환과 허혈성 손상과 같은 많은 병인론적 과정에서 그 역할을 더하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[3] 본 발명의 목적은 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학조성물 및 이를 항암제와 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공하는데 있다.

[4] 본 발명의 목적은 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 발현을 촉진하여 항암제 감수성을 증진시키는 항암 보조제 스크리닝 방법 및 RIP3 발현 여부를 통한 항암제 감수성 모니터링 방법을 제공하는데 있다.

[5] 본 발명의 다른 목적은 RIP3 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을

포함하는 항암제 감수성 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[6] 본 발명의 또 다른 목적은 RIP3 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 항암제 감수성 진단용 키트 및 조직내 암을 예측진단할 수 있는 키트를 제공하는데 있다.

[7] 본 발명의 또 다른 목적은 암환자 시료로부터 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 예후 진단 및 항암제 반응성에 필요한 정보를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학조성물을 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제; 및 항암제를 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 암세포에서 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암 보조제 스크리닝 방법을 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 암세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 정상조직세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 상기 정상조직세포에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 대비 상기 암세포에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 또는 활성이 낮은 경우 항암제 저항성이 있다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 모니터링 방법을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 RIP3 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 암세포에 처리하는 단계; 상기 처리된 암세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 상기 처리 전 대조구 시료 대비 상기 처리 후 RIP3 단백질의 발현 또는 활성이 50 내지 100% 증가한 경우 항암제 감수성이 증진되었다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 증진방법을 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 RIP3 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 항암제 감수성 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다. 상기 바이오마커는 조직내 암을 예측진단할 수도 있다.

[14] 또한, 본 발명은 RIP3 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 항암제 감수성 진단용 키트를 제공한다. 또한, 상기 키트를 통해 조직내 암의 예측진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

[15] 또한, 본 발명은 암환자 시료에서 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계; 정상 대조구 시료에서 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 정상 대조구 시료에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 수준 대비 상기 암환자 시료에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 수준이 낮은 경우 항암제 저항성이 있다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 예후 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[16] 본 발명은 RIP3 발현촉진제를 유효성분으로 포함하는 항암보조용 조성물 및 항암제와의 병용투여 방법에 관한 것으로서, 현재 암치료에 있어 문제가 제기되는 Triple negative (ER, PR, Her2 음성) 환자의 경우 90%에서 낮은 RIP3 발현을 확인할 수 있는데, 같은 환자의 정상조직에 비해 암조직에서의 현저한 RIP3 발현저하는 RIP3가 종양의 발생과 성장 동안 선택적으로 결여되는 것을 암시하고 있다 할 수 있으므로, RIP3의 발현이 결여된 환자의 경우 탈메틸화제를 전처치하여 RIP3의 발현을 유도한 후, 컨벤션한 화학요법제를 쓰는 것이 효과적 치료전략이 될 수 있을 것으로 예상된다. 또한 본 발명은 RIP3 발현을 촉진하여 항암제 감수성을 증진시키는 항암 보조제 스크리닝 방법 및 RIP3 발현 여부를 통한 항암제 감수성 모니터링 방법에 관한 것으로서, 현재 암치료에 있어 문제가 제기되는 Triple negative (ER, PR, Her2 음성) 환자의 경우 90%에서 낮은 RIP3 발현을 확인할 수 있는데, RIP3 발현 조절이 암세포의 항암제 저항성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 RIP3 발현이 억제되는 경우 암세포가 항암제에 내성을 가져 항암제의 활성이 억제되는 반면, RIP3가 발현되는 경우 항암제 농도 의존적으로 암세포의 사멸이 증가 되는 것을 확인하였다. 이는 항암치료에 있어서 항암제의 감수성을 모니터링하고, 항암제 감수성을 증진시키는 항암 보조제를 스크리닝하는데 효과적 전략이 될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 정상 유방 및 유방암 세포주에서의 RIP3 발현 분석 결과이다.

[18] 도 2는 탈메틸화제인 5-아자-2'-데옥시사이티딘(5-aza-2'-deoxycytidine; 5-AD)에 의한 RIP3 발현 결과이다.

[19] 도 3은 탈메틸화제인 5-아자사이티딘(5-azacytidine; 5-AZA)에 의한 RIP3 발현 결과이다.

[20] 도 4는 탈메틸화제(5-AD)와 항암제의 병합처리에 의한 암세포주 사멸 감작 결과이다.

[21] 도 5는 탈메틸화제(5-AD 및 5-AZA)와 항암제의 병합처리에 의한 암세포주 사멸 감작 결과이다.

[22] 도 6은 RIP3 발현 억제에 의한 탈메틸화제(5-AD)의 암세포주 사멸 감작 효과의 억제 결과이다.

[23] 도 7은 대표적인 정상 유방 조직과 유방암 조직의 RIP3의 면역염색 사진이다.

[24] 도 8 및 도 9는 정상 유방 조직과 유방암 조직의 RIP3의 면역염색에 대한 대표적인 H-score 도식 결과이다.

[25] 도 10은 RIP3의 발현이 억제된 세포에서 항암제의 농도별 처리에 따른 HT-29 생존율 결과이다.

[26] 도 11은 RIP3의 발현이 억제된 세포에서 항암제의 농도별 처리에 따른 T47D의 생존율 결과이다.

[27] 도 12는 1,166명의 유방암 환자의 10년 동안 전이 재발 없는 생존율(metastatic relapse-free survival) 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] 이에, 본 발명자들은 RIP3-의존적 세포사멸이 화학요법제에서의 세포독성에 효과를 줄 수 있다는 것을 확인하였다. 많은 암세포주에서 RIP3의 발현이 억제되어 있으며, 이러한 RIP3 발현 저해가 죽음수용체에 의한 세포사멸에 대한 저항성 뿐만 아니라 화학요법제, 특히 DNA 손상 약물이나 탁산(taxanes)과 같은 다양한 스텐다드 항암요법제에 대한 저항성을 주는 것을 확인할 수 있었다. 본 발명에서 사용한 탈메틸화제인 5-아자-2'-데옥시사이티딘(5-aza-2'-deoxycytidine; 5-AD)에 의한 RIP3의 발현이 복귀되었으며 화학요법제에 대한 감수성이 증가된 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 RIP3의 발현이 결여된 환자의 경우 탈메틸화제를 전처치하여 RIP3의 발현을 유도한 후, 컨벤션한 화학요법제를 쓰는 것이 효과적 치료전략이 될 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[29] 또한, 본 발명자들은 RIP3 발현 조절이 암세포주의 항암제에 대한 저항성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 RIP3 발현이 억제되는 경우 항암제에 대해 암세포가 내성을 가져 항암제의 활성이 억제되는 반면, RIP3가 발현되는 경우 항암제 농도 의존적으로 암세포의 사멸이 증가되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[30] 본 발명은 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학조성물을 제공한다.

[31] 상세하게는, 상기 RIP3 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제는 RIP3의 유전자 발현조절 부위에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머, 항체 및 천연물일 수 있다. 상세하게는, 상기 조성물은 RIP3 단백질의 탈메틸화를 유도할 수 있다.

[32] 바람직하게는, 상기 암은 유방암, 자궁경부암, 간암 또는 대장암일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[33] 바람직하게는, 상기 RIP3 단백질은 사람, 소, 염소, 양, 돼지, 마우스, 토끼 등의 포유류를 포함하는 RIP3을 가지는 모든 진핵 생물 유래의 단백질일 수 있으며, 예를 들어 인간 RIP3(NCBI accession no. NP_006862.2)일 수 있다.

[34] 본 발명에서 용어 "펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)"는 RIP3 활성을 이끄는

RIP3 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다.

[35] 본 발명에서 용어 "앱타머(Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앱타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.

[36] 본 발명의 "항체"는 RIP3 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 다클론 항체는 상기 RIP3을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있다.단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.

[37] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 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. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 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.

[38] 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. 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. 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을

의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[39] 또한, 본 발명은 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제; 및 항암제를 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[40] 상세하게는, RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 암세포에 처리하는 단계; 및 상기 처리된 암세포에 항암제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[41] 바람직하게는, 상기 암세포는 유방암세포, 자궁경부암세포, 간암세포 또는 대장암세포일 수 있고, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin) 또는 에토포사이드(etoposide)일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[42] 본 발명은 암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 암세포에서 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암 보조제 스크리닝 방법을 제공한다.

[43] 바람직하게는, 상기 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44] 상세하게는, 상기 항암 보조제는 항암제의 감수성을 증진시킬 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에토포사이드(etoposide) 또는 탁솔(taxol)이 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[46] 또한, 본 발명은 암세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 정상조직세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계;

및 상기 정상조직세포에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 대비 상기 암세포에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 또는 활성이 낮은 경우 항암제 저항성이 있다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 모니터링 방법을 제공한다.

[47] 바람직하게는, 상기 암세포는 유방암세포, 자궁경부암세포, 간암세포 또는 대장암세포일 수 있고, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에토포사이드(etoposide) 또는 탁솔(taxol)일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 또한, 본 발명은 RIP3 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 암세포에 처리하는 단계; 상기 처리된 암세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 상기 처리 전 대조구 시료 대비 상기 처리 후 RIP3 단백질의 발현 또는 활성이 50 내지 100% 증가한 경우 항암제 감수성이 증진되었다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 증진방법을 제공한다.

[49] 또한, 본 발명은 RIP3 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 항암제 감수성 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[50] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[51] 또한, 본 발명은 RIP3 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 항암제 감수성 진단용 키트를 제공한다.

[52] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[53] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[54] 상기 2차 항체 접합체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline

phosphatase), 콜로이드 골드(coloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein), 및 색소(dye) 등이 사용될 수 있다.

[55] 또한, 본 발명은 암환자 시료에서 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계; 정상 대조구 시료에서 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 정상 대조구 시료에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 수준 대비 상기 암환자 시료에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 수준이 낮은 경우 항암제 저항성이 있다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 예후 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[56] 상세하게는 상기 RIP3의 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정될 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 항원-항체 반응은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 효소 면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유체 세포측정법 (flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57] 본 명세서에서 용어 "환자 시료"란 항암제 감수성 진단용 바이오 마커인 RIP3의 발현수준에 있어서 정상 대조구와 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[58] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[59]

[60] **< 실험예 >**

[61] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[62]

[63] 1. 시약

[64] RIP3 항체는 Abcam으로부터 구입하였다. Actin 항체, 독소루비신(Doxorubicin), 에토포사이드(etoposide), 5-AD, 5-AZA는 Sigma-Aldrich로부터 구했다.

[65]

[66] 2. 세포 배양

[67] 다양한 암세포주는 ATCC에서 제시하는 배지에서 배양하였다. DLD1, HeLa, MCF7은 10 % 우태아혈청(fetal bovine serum), 2 mM 글루타민(glutamine), 100

U/mL 페니실린(penicillin) 및 100ug/mL 스트렙토마이신(streptomycin)이 첨가된 DMEM에서 배양되었다. HCC1937, BT-549, MDA- MB231, MDA-MB468, SK-BR3, ZR75-1, T47D는 10 % 우태아혈청(fetal bovine serum), 2 mM 글루타민(glutamine), 100 U/mL 페니실린(penicillin) 및 100/mL 스트렙토마이신(streptomycin)이 첨가된 RPMI에서 배양되었다.

[68]

[69] 3. 정상 인간 세포

[70] 유방 상피세포(mammary epithelial cells; HME)는 Clonetics Corp. (San Diego, CA)로부터 얻었다. HMLE는 정상 유방 상피세포인데, hTERT로 불사화(immortalized)되었으며, 또한 SV40 large 및 small T 항원으로 레트로바이러스에 의해 감염되었다.

[71]

[72] 4. 인간 유방암 조직 제조

[73] 인간 유방암 및 비교 정상 샘플은 연세대학교 의과대학(서울, 대한민국)으로부터 얻었다. 모든 케이스에 있어서, 모든 참가자로부터 동의서를 받았고, 본 연구는 연세대학교 기관윤리심의위원회(Institutional Review Board; IRB)의 승인을 받았다

[74]

[75] 5. 렌티바이러스(Lentiviral) shRNA 실험

[76] hRIP3 mRNA (NM_006871)의 코딩 부위 또는 3' UTR을 표적으로 하는 MISSION short-hairpin RNA (shRNA) 플라스미드 및 비-표적 대조군 서열 (NM-027088)은 Sigma-Aldrich로부터 구했다. 렌티바이러스 플라스미드는 리포펙타민 2000 (Invitrogen, 11668019)을 이용하여 293T cells (System Biosciences, LV900A-1)로 형질감염시켰다. 위바이러스성 입자(Pseudoviral particles)는 렌티바이러스 플라스미드 형질감염 2일 후 수집되었고, 폴리브린(polybrene) (10 μg/mL) 존재하에서 여러 암세포로 감염시켰다. 감염 2일 후, 퓨로마이신(puromycin)으로 감염 세포는 선별하였고, RIP3 녹다운(knockdown)은 면역블랏팅으로 확인하였다. 기존에 내재성 RIP3를 발현하지 않는 세포는 추후 4일 동안 5-AD를 처리하였고, 그 후 면역블랏팅으로 분석하였다.

[77]

[78] 6. 웨스턴 블랏 분석(면역블랏팅)

[79] 세포들은 M2 완충액에서 용해되었다. 동량의 세포 추출물을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 통해 분석하여, 증가된 화학발광(enhanced chemiluminescence; ECL, Amersham)으로 가시화하였다.

[80]

[81] 7. 세포독성 분석

[82] 세포사멸은 tetrazolium dye colorimetric test [MTT Assay]을 사용하여

측정하였고, 570nm에서 측정하였다.

[83]

[84] 8. 면역조직화학(Immunohistochemistry) 분석

[85] 면역조직화학 분석은 제조사의 지시에 따라 UltraVision LP Detection System TL-060-HD (Thermo Scientific, Bioanalytica)를 이용하였다. 얇은 파라핀 부분(4.5 μm)은 자일렌으로 제거되었고, 여러 농도의 에탄올 수용액에서 다시 수화되었다. 항원 회복은 10 mM 시트레이트(citrate) 완충액 (pH 6.0)에서 전자렌지로 15분 동안 슬라이드를 가열하여 수행하였다. TBS에 녹인 3% 과산화수소에 10분 동안 반응시킴으로써 내인성 퍼록시다제(peroxidase) 활성을 차단시켰고, 1:300으로 희석된 항-RIP3 항체로 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 크로모겐(chromogen)은 3, 3'-디아미노벤지딘(3, 3'-diaminobenzidine) (TL-015-HD, Thermo Scientific, Bioanalytica, Greece) 용액으로 5분 동안 반응시켰고, Meyer's hematoxylin으로 대비염색하였다. 면역조직화학 염색은 염색된 세포 비율 및 면역염색 세기를 기초로 측정하였다. 본 발명은 H-score를 사용하였는데, 이는 염색된 세포 비율(%) 및 염색 세기[0(음성), 1(약함), 2(중간) 또는 3(강함)]를 곱하여 구했다. H-score는 0 내지 300의 범위를 가진다. 종양 및 정상 조직에서 각 샘플당 동일한 시간으로 염색을 수행하였다. 염색 결과는 임상 데이터에 대해서는 알지 못하는 전문 병리학자에 의해 해석되었다.

[86]

[87] 9. 통계 분석

[88] 데이터는 평균 ± S.D로 나타냈다. 통계분석은 ANOVA 및 unpaired Student's t-test를 사용하여 수행하였다. 0.01 또는 이보다 낮은 *P*-value의 경우, 통계학적 유의성이 있는 것으로 판단되었다. 통계학적 계산은 Windows Version 12.0의 SPSS software를 사용하여 수행하였다(SPSS, Chicago, IL).

[89]

[90] **< 실시예 1 > 유방암 세포주에서의 RIP3 발현 분석**

[91] 암세포주를 용해(lysis)하여 단백질을 분리한 후, SDS-PAGE를 이용하여 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 실시하였다. 유방암 세포주의 RIP3 발현 패턴을 분석한 결과, 60% 이상의 세포주에서 RIP3가 발현하지 않음을 확인하였다. RIP3가 암세포주에서는 특정 메커니즘에 의해서 억제되어 있음을 확인하였다(도 1).

[92]

[93] **< 실시예 2 > 탈메틸화제에 의한 RIP 발현 분석**

[94] 암세포주를 10~20% 밀도로 배양한 후, 4일 동안 2회에 걸쳐서 5-AD를 처리한 후, 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 기법을 이용하여 RIP3 발현 패턴 분석하였다. RIP3가 발현하지 않는 3가지 암세포주(HeLa, MDA-MB231, BT549)에 탈메틸화제(5-AD, 2uM)를 처리하였을 경우, RIP3의 발현이 유도됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 암세포주에서는 메틸화에 의해서 RIP3의 발현이

억제되고 있음을 의미한다(도 2).

[95] 또한, 암세포주를 10~20% 밀도로 배양한 후, 4일 동안 2회에 걸쳐서 5-AZA를 처리한 후, 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 기법을 이용하여 RIP3 발현 패턴 분석하였다. RIP3가 발현하지 않는 DLD-1 대장암 세포주에 5AD와 유사한 계열의 5-AZA를 농도별로 처리하였을 경우, RIP3의 발현이 유도됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 RIP3가 메틸화에 의해서 암세포주에서 발현이 억제되고 있음을 반증하는 것이다(도 3).

[96]

[97] **< 실시예 3 > 탈메틸화제와 항암제의 병합 처리에 의한 암세포주 사멸 감작**

[98] 암세포주를 10~20% 밀도로 초기 배양한 후, 4일 동안 2회에 걸쳐서 5-AD 또는 5-AZA를 처리하여 RIP3의 발현을 유도하였다. 약물을 처리하지 않은 동일한 HeLa 암세포주와 동일한 개수를 배양한 후, 동일한 농도의 항암제를 처리하여 탈메틸화제에 의한 감작효과를 분석하였다.

[99] 5-AD에 의한 RIP3의 발현을 유도한 후, 항암제와 병합처리할 경우 암세포주의 사멸이 감작되는 효과를 확인함으로써, RIP3가 항암제에 의한 암세포주 사멸이 관련 있음을 확인하였다(도 4).

[100] 또한, 5-AD 외에 RIP3의 발현을 유도하는 5-AZA의 경우도 RIP3의 발현을 유도한 후, 항암제와 병합처리하였을 경우 암세포주의 감작 효과를 확인하였다(도 5).

[101]

[102] **< 실시예 4 > RIP3 발현 억제에 의한 탈메틸화제의 암세포주 사멸 감작 효과의 억제**

[103] 렌티 바이러스 시스템(Lenti-virus system)을 사용하여 자궁경부암 세포주(HeLa 세포주)에서 지속적으로 RIP3의 발현을 억제하는 안정적인 세포(stable cell)을 만들었다. 비-표적(Non-target)과 반대로 shRIP3 세포주의 경우, 5-AD를 처리함에도 불구하고 shRNA에 의해서 RIP3의 발현이 억제된다. 그러므로 항암제와 탈메틸화제의 병합처리에 의한 감작효과에서 RIP3의 기능을 확인할 수 있었다. 비-표적(Non-target) 세포주와 shRIP3 세포주를 10~20% 밀도로 초기배양한 후, 4일 동안 2회에 걸쳐서 5-AD를 처리하여 RIP3의 발현 유무를 판별하였다. 그리고 동일한 개수를 배양한 항암제와의 병합처리에 의한 감작효과에 대해 세포사멸 실험(MTT assay)을 이용하여 분석하였다(도 6).

[104] 탈메틸화제(5-AD, 5-AZA)는 특정 단백질에 특이적인 약물이 아니기 때문에, RIP3 외에 다양한 단백질의 발현을 야기할 수 있다. 그러므로 항암제와 탈메틸화제의 병합처리에 의한 세포사멸 감작 효과가 RIP3가 아닌 다른 단백질에 의한 효과 유무인지를 판별하기 위해서 특이적으로 RIP3의 발현을 억제하는 shRIP3 세포주를 사용하여 실험을 진행하였다. 비-표적(non-target) 세포주에서는 5-AD를 처리할 경우, RIP3의 발현에 의해서 항암제와의 병합처리에서 감작효과가 발생하지만, 특이적으로 RIP3의 발현을 억제한

shRIP3 세포주에서는 5-AD를 처리하더라도 shRNA system에 의해서 RIP3가 발현되지 않는다. 이러한 결과를 토대로 세포사멸 실험을 진행하였을 때 RIP3가 발현하지 않는 shRIP3 세포주의 경우, 감작효과가 억제되는 결과를 통해서 탈메틸화제와 항암제와의 병합처리에서의 감작 효과는 RIP3가 중요한 분자임을 확인할 수 있으며, RIP3의 발현을 촉진시킴으로써 암세포주의 사멸을 증가시킬 수 있는 새로운 항암전략을 제시한다.

[105]

[106] **< 실시예 5 > 정상 유방 조직 및 유방암 조직의 면역 염색 분석**

[107] 132명의 유방암 환자에서 종양(Tumor) 조직과 비-종양(non-Tumor) 조직을 분리하여 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 4.5㎛의 두께로 박절 후 슬라이드에 도말시켜 사용하였다. 자일렌(Xylene)으로 탈파라핀화와 에탄올-물 농도별 수용액으로 함수과정을 거친 후 과산화수소로 비특이적 효소 반응을 제거 후 시트르산 용매를 이용해 숨겨진 항원을 해체한다. 다음으로 희석된 정상 혈청을 20분간 반응시켜 비특이적인 반응을 차단 후 RIP3를 (1:300)으로 24시간 반응시킨다. 수세 후 바이오티닌이 결합된 2차 항체를 30분간 반응 후 수세한다. 아비딘-바이오틴(Avidin-biotin) 복합체로 30분간 반응 후 수세과정을 거치고 DAB 발색제를 사용하여 5분간 발색시킨 후 헤마톡실린(Hematoxylin)으로 핵을 염색 후 수세를 거쳐 봉입과정을 거친다.

[108] DAB으로 발색된 정도 세기를 0 (발색없음), 1 (약한발색), 2 (중간), 3 (강한발색)으로 기준을 정하였으며 염색된 범위와 세기를 곱한 값을 H-score로 나타내었으며, 염색 결과 분석은 병리과 전문의를 통해 감수하였다.

[109] 실험 결과는 대표적인 정상 유방 조직과 유방암 조직의 RIP3의 면역염색 사진을 나타내었으며, 그 결과를 H-score로 도식화하였다(도 7, 도 8 및 도 9). 정상 유방조직에 비해 암조직에서 RIP3의 발현이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

[110]

[111] **< 실시예 6 > RIP3의 발현이 억제된 세포에서 항암제의 농도별 처리에 따른 HT-29의 생존율 분석**

[112] HT-29 세포들(American Tissue Culture Collection)은 페니실린-스트렙토마이신(10IU/ml)과 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 37℃ 인큐베이터에서 배양하였다. 본 발명에서 사용한 shRNAi 이중 나선은 Sigma-Aldrich에서 상업적으로 합성되었다. 본 발명에서 사용된 shRNA는 human RIPK3 mRNA 서열의 코딩 영역의 타겟을 위해 디자인되었다(NCBI Reference sequence NM_006871).

[113] 먼저 배양된 HT-29 세포를 35mm Dish에 2×10^5 분주하였다. 다음날 프로토콜의 지시에 따라 상기세포를 폴리브린(polybrene) (10ug/ml)과 함께 shRNA particle을 이용하여 형질전환시켰다. 대조군은 특정 단백을 타겟하지 않는 shRNA를 이용하였다(NCBI Reference sequence NM_027088).

[114] 상기 제조된 형질전환 세포내에서 생성되는 RIP3 단백질양을 측정하기 위하여, 먼저 PBS를 이용하여 형질전환된 HT-29세포를 세척한 후 용해 버퍼를 처리하여 상등액을 수득한 다음 BIO-RARD 사의 Western Blot KIT을 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 적정 항체와 반응을 한 후 (항-β-액틴 (1:5,000, Sigma), 항-RIP3 (1:1,000, Abcam) 및 2차 HRP-컨주게이트 항체 (Jackson) HRP는 Immunobilon Western Chemiluminescent HRP substrate KIT (Thermo)를 이용하여 검출하였다.

[115] 그 결과 도 10에 나타난 바와 같이, RIP3 shRNA로 형질전환된 HT-29 세포내 RIP3 단백질이 거의 검출되지 않은 것으로 나타났으며, 이를 통해 형질전환된 RIP3 shRNA가 RIP3 유전자를 효과적으로 넉다운(Kncok-down) 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[116] 본 발명자들은 RIP3 유전자가 항암제 감수성과 관련이 있는 지를 확인하기 위해 RIP3 shRNA로 형질전환된 HT-29에 독소루비신(Doxorubicin)과 에토포사이드 (Etoposide)를 농도별로 처리한 후 상기 암세포의 세포 생존율을 측정하였다. 자세하게는 RIP3 shRNA로 형질전환된 HT-29 세포들은 독소루비신(Doxorubicin) 2.5uM, 5uM 과 에토포사이드 (Etoposide) 50uM, 100uM 처리 한 후 48시간 동안 배양하였으며, 테스트는 0.1mg의 MTT(3-([4,5-dimethylthiazol-2-yl0]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 포함하는 신선한 배지로 교체된 후 2시간 동안 더 배양한다. 살아있는 세포가 용해된 테트라졸리움염을 자주색의 포마잔(formazan) 결정으로 환원시켜 만든 침전물에 대해 색상 분석(colormatric)을 사용하여 행해진다. 그 후, 배지는 제거하고 생성된 포마잔 결정은 DMSO 500ul로 용해하여 ELISA reader (at 570nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 100% 생존율로 정의된 대조군에 따른 상대 퍼센트로 나타내었다.

[117] 그 결과, 도 10(오른쪽)에서 나타낸 바와 같이 대조군은 독소루비신(Doxorubicin) 및 에토포사이드 (Etoposide)의 농도에 의존하여 세포 생존율이 감소되는 반면, shRNA를 이용하여 RIP3를 넉다운시킨 실험군은 대조군에 비해서 세포생존율이 증가되어 있음을 확인하였다.

[118]

[119] **< 실시예 7 > RIP3의 발현이 억제된 세포에서 항암제의 농도별 처리에 따른 T47D의 생존율 분석**

[120] RIP3가 유방암세포에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RIP3가 발현하는 T47D 세포를 이용하였다. 먼저 < 실시예 6 >에 기술한 동일한 방법으로 RIP3를 형질전환시켰다.

[121] 웨스턴 블랏팅 방법을 통해, RIP3 shRNA로 형질전환된 T47D에서 RIP3 단백질이 거의 검출되지 않은 것으로 나타났으며, RIP3 유전자는 효과적으로 넉다운시킨 것을 확인할 수 있었다(도 11). RIP3가 유방암세포 T47D에서 항암제 감수성을 증가시키는지 확인하기 위하여 MTT 분석을 시행하였다. 대조군과

RIP3 넉다운된 실험군에 독소루비신과 에토포사이드, 탁솔을 도 11(오른쪽)에 나타난 농도별로 48시간 반응하였다. MTT 분석에 의하면 대조군에서는 항암제의 농도에 따라 사멸한 반면 RIP3가 형질전환된 세포주는 특히, 에토포사이드를 처리한 실험군에서 대조군에 비해 항암제 저항성이 현저히 증가하였다.

[122] 이를 통해 RIP3 발현 조절이 항암제 암세포주에 대한 저항성에 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 RIP3 발현이 억제되는 경우 항암제에 대해 암세포가 내성을 가져 항암제의 활성이 억제되는 반면, RIP3가 발현되는 경우 항암제 농도 의존적으로 암세포의 사멸이 증가 되는 것을 알 수 있었다.

[123]

[124] **< 실시예 8 > 유방암 환자의 10년 동안 전이 재발 없는 생존율(metastatic relapse-free survival) 분석**

[125] 도 12은 1,166명의 유방암 환자의 10년 동안 전이 재발 없는 생존율(metastatic relapse-free survival) 그래프를 나타낸다. RIP3의 유전자 발현 정도를 50% 이상 및 50% 이하로 하여 생존율을 분석한 결과, 통계적으로 $p<0.0085$ 의 의미 있는 차이를 보임이 나타나 RIP3 의 발현 정도가 환자의 생존율에 영향을 미침을 증명하였다. 결과는 Jezequel et al.(Breast Cancer Research and Treatment 2012;131:765-75)에 의해 디자인된 Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.0 software를 이용하여 분석하였다.

[126]

[127] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 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.

[128]

청구범위

[청구항 1] RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 RIP3 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제는 RIP3에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항암 보조용 약학조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 RIP3 단백질의 탈메틸화를 유도하는 것을 특징으로 하는 항암 보조용 약학조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 자궁경부암, 간암 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 항암 보조용 약학조성물.

[청구항 5] RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제; 및 항암제를 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서, RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 암세포에 처리하는 단계; 및 상기 처리된 암세포에 항암제를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 암세포는 유방암세포, 자궁경부암세포, 간암세포 또는 대장암세포인 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

[청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin) 또는 에토포사이드(etoposide)인 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

[청구항 9] 암세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
상기 시험물질을 접촉한 암세포에서 RIP3(Receptor-interacting protein kinase-3) 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
대조구 시료와 비교하여 상기 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암 보조제 스크리닝 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 항암 보조제 스크리닝 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 암세포는 유방암세포, 자궁경부암세포, 간암세포 또는 대장암세포인 것을 특징으로 하는 항암 보조제 스크리닝 방법.

[청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 항암 보조제는 항암제의 감수성을 증진시키는 것을 특징으로 하는 항암 보조제 스크리닝 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에토포사이드(etoposide) 또는 탁솔(taxol)인 것을 특징으로 하는 항암 보조제 스크리닝 방법.

[청구항 14] 암세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계;
정상조직세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
상기 정상조직세포에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 대비 상기 암세포에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 또는 활성이 낮은 경우 항암제 저항성이 있다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 모니터링 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 암세포는 유방암세포, 자궁경부암세포, 간암세포 또는 대장암세포인 것을 특징으로 하는 항암제 감수성 모니터링 방법.

[청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에토포사이드(etoposide) 또는 탁솔(taxol)인 것을 특징으로 하는 항암제 감수성 모니터링 방법.

[청구항 17] RIP3 단백질 발현 촉진제 또는 활성화제를 암세포에 처리하는 단계;
상기 처리된 암세포에서 RIP3 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
상기 처리 전 대조구 시료 대비 상기 처리 후 RIP3 단백질의 발현 또는 활성이 50 내지 100% 증가한 경우 항암제 감수성이 증진되었다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제 감수성 증진방법.

[청구항 18] RIP3 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 항암제 감수성 진단용 바이오마커 조성물.

[청구항 19] RIP3 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 항암제 감수성 진단용 키트.

[청구항 20] 암환자 시료에서 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계;
정상 대조구 시료에서 RIP3의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
상기 정상 대조구 시료에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 수준 대비 상기 암환자 시료에서 측정된 RIP3 단백질의 발현 수준이 낮은 경우 항암제 저항성이 있다고 판단하는 단계를 포함하는 항암제

감수성 예후 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 RIP3의 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는 항암제 감수성 예후 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.