



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0045827
(43) 공개일자 2019년05월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4725 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4725 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0114120
- (22) 출원일자 2018년09월21일
심사청구일자 2018년09월21일
- (30) 우선권주장
1020170138481 2017년10월24일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
국립암센터
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
김수열
경기도 고양시 일산서구 주화로 211, 103동 1304호 (대화동, 장성마을1단지아파트)
- 라선영
서울특별시 종로구 비봉2길 73(구기동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인이룸리온

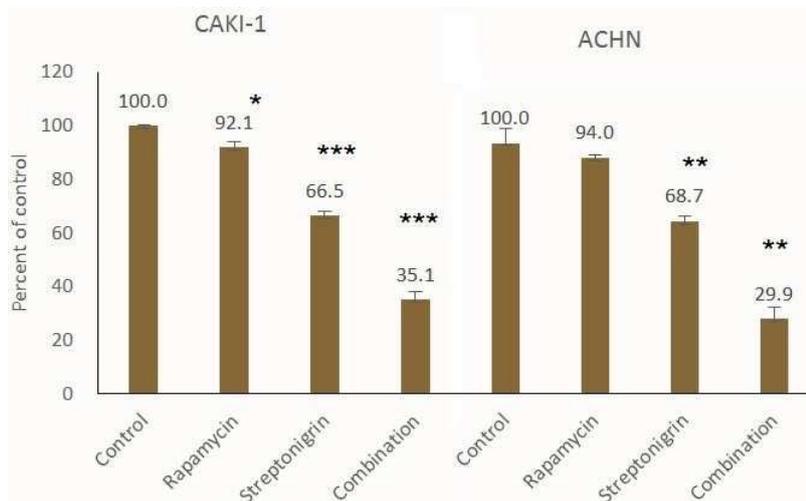
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토니그린 및 라파마이신을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 mTOR 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 스트렙토니그린 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관 신생 억제용 조성물에 관한 것이다. TGase2 억제제인 스트렙토니그린을 mTOR 억제제인 라파마이신과 함께 신장암 세포주에 병용 처리하였을 때, 각각을 단독으로 암세포에 처리하는 경우보다 상승된 암세포 사멸 효과를 나타낼 수 있으며, 이는 mTOR 억제제에 대한 내성이 유발된 암세포에서도 동일한 시너지 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/506 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

범승훈

서울특별시 강서구 화곡로13길 107, 145동 1304호
(화곡동, 화곡푸르지오)

조남훈

서울특별시 강남구 논현동 130길 30, 103동 301호

권우선

경기도 고양시 일산동구 숲속마을로 68, 602동
1002호(풍동, 숲속마을6단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 14102804

부처명 국립암센터

연구관리전문기관 국립암센터

연구사업명 목적과제/신약개발

연구과제명 트란스글루타미나제 2를 표적으로 하는 암치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립암센터

연구기간 2014.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

스트렙토니그린(streptonigrin) 및 라파마이신(rapamycin)을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스트렙토니그린 및 라파마이신은 1:0.01 내지 1:100의 몰비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 암은 mTOR 억제제에 대해 내성이 유발되는 암종인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 mTOR 억제제에 대해 내성이 유발되는 암은 신장암, 유방암, 대장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항의 약학적 조성물에 항암제를 추가로 더 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

스트렙토니그린 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관 신생 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 VEGF 억제제는 파조파닙(pazopanib)인 것을 특징으로 하는, 혈관 신생 억제용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 스트렙토니그린 및 VEGF 억제제는 $1:1 \times 10^{-5}$ 내지 $1:1 \times 10^5$ 의 몰비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 혈관 신생 억제용 조성물.

청구항 9

제6항의 조성물을 포함하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 암은 신장암, 유방암, 대장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 mTOR 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 스트렙토니그린 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관 신생 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암이란 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제를 할 수 있는 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래하는 난치병이다. 의학의 발전에도 불구하고, 국내 암환자 발생자수는 지속적으로 증가하여 최근 10년간 약 44%가 증가하였으며, 국제적으로도 항암제 시장 역시 증가하여 연간 약 1000억 달러의 규모를 가지는 것으로 보고된 바 있다.

[0004] 항암치료에는 1세대 항암제인 화학항암제, 2세대 항암제인 표적항암제가 있으며, 이들의 부작용을 극복하고자 3세대 항암제로서 면역항암제가 개발된 이후 계속적으로 연구가 진행되고 있다. 그러나, 암 치료의 가장 큰 문제는 재발에 있으며, 암 돌연변이의 다양성으로 인해 암 특정 표적이 부재하여, 치료 과정에서 암이 항암제 내성으로 발전하여 항암 치료에 어려움을 겪거나, 원발암을 치료한 이후에도 전이 및 재발한 암에 의해 환자가 사망하는 경우가 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라, 항암제의 효과를 증진시키기 위해, 항암제를 혼합하여 병용치료하고자 하는 전략이 제시되고 있다.

[0006] 트랜스글루타미나제(Transglutaminase 2, TGase2)는 특이 펩티드에 결합된 글루타민 잔기의 γ -카르복사미드기와 다양한 아민들 사이의 결합을 촉진하는 효소로, 일차적으로는 손상의 예방과 방어 및 복구를 촉진하는데 있어서 주요한 역할을 하는 것으로 알려졌으나, 최근 연구에 의하면 비정상적으로 과도한 발현이 나타나면 신경퇴행성 질환, 죽상동맥경화증, 염증성 질환, 및 자가면역 질환과 같은 질병의 발생에 원인을 제공할 수 있는 것으로 보고된 바 있다. 특히, TGase2의 발현이 p53을 중합화하고 불안정하게 하여 소멸시킨다는 것이 보고되었으며, 이에 따라 TGase2의 억제를 통해 TGase2가 과발현된 신장암에 대한 항암 효과를 나타낼 수 있음이 보고된 바 있다(특허문헌 1).

[0008] 이에, 본 발명자들은 TGase2 억제제를 이용한 항암 치료에서 보다 효과적인 항암 효과를 얻기 위해 노력한 결과, TGase2 억제제로서 항암제로 사용될 수 있음이 확인된 스트렙토니그린과 함께, mTOR 억제제인 라파마이신(rapamycin)을 병용 처리하였을 때, 각각을 단독 처리하는 경우보다 항암 활성의 시너지 효과를 나타낼 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-1643459 B1(2016.07.21).

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Feng, Qiyu, et al. Nature Communications 8 (2017).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 당업계에서 TGase2의 억제제를 통해 TGase2가 과발현된 신장암에 대한 항암 효과를 나타낼 수 있음이 보고된 바 있으나, 항암제를 통한 암 치료 과정에서 암이 항암제 내성으로 발전하여 항암 치료에 어려움을 겪는 등 다양한 부작용이 나타날 수 있어, 항암제의 효과를 증진시키기 위해 항암제를 혼합하여 병용치료하고자 하는 전략이 제시되고 있다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 TGase2 억제제 및 mTOR 억제제를 유효성분으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또다른 목적은 TGase2 억제제 및 VEGF 억제제를 유효성분으로 하는 혈관 신생 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 라파마이신(rapamycin)을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물에 항암제를 추가로 더 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 스트렙토니그린 및 라파마이신은 1:0.01 내지 1:100의 몰비율로 혼합되는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 암은 mTOR 억제제에 대해 내성이 유발되는 암종인 것일 수 있으며, 구체적으로 신장암, 유방암, 대장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 스트렙토니그린 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관 신생 억제용 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 혈관 신생 억제용 조성물을 포함하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 VEGF 억제제는 파조파닙(pazopanib)인 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또다른 바람직한 일실시예에서, 상기 스트렙토니그린 및 VEGF 억제제는 $1:1 \times 10^{-5}$ 내지 $1:1 \times 10^5$ 의 몰비율로 혼합되는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또다른 바람직한 일실시예에서, 상기 암은 신장암, 유방암, 대장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에서는 TGase2 억제제인 스트렙토니그린을 mTOR 억제제인 라파마이신과 함께 신장암 세포주에 병용 처리하였을 때, 유의적인 암세포 사멸 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였으며, 이는 스트렙토니그린 및 라파마이신을 각각 단독으로 암세포에 처리하는 경우보다 상승된 암세포 사멸 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 또한, TGase2가 과발현된 유방암 세포주에서 mTOR 억제제에 대한 내성을 나타내나, 스트렙토니그린 및 라파마이신을 병용 처리하였을 때 라파마이신에 대한 내성을 극복하여 유의적인 암세포 사멸 효과를 나타낼 수 있는 것으로 확인하였다.
- [0028] 아울러, 본 발명에서는 TGase2 억제제인 스트렙토니그린이 종양 조직 주변의 신생 혈관 형성을 억제할 수 있음을 확인하였으며, 이를 VEGF 억제제와 함께 병용 처리하였을 때, 각각 단독으로 처리하는 경우보다 상승된 혈관 신생 억제 효과 및 암세포 사멸 효과를 나타내는 것으로 확인하였다.
- [0029] 따라서, 본 발명은 TGase2 억제제인 스트렙토니그린 및 mTOR 억제제인 라파마이신을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 스트렙토니그린 및 VEGF 억제제를 포함하는 혈관 신생 억제용 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 mTOR 저항성을 가지는 신장암 세포에서 라파마이신(Rapamycin)의 처리 시간 또는 농도에 따른 TGase2(TG2) 및 관련 인자의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 라파마이신을 처리하는 시간 또는 농도가 증가할수록 TG2 및 관련 인자의 발현 역시 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 웨스턴 블롯의 발색시간을 길게 (long) 할수록 TG2 밴드가 강하게 나타났다.
- 도 2는 신장암 세포주에서 스트렙토니그린(Streptonigrin) 또는 라파마이신의 처리에 따른 암세포 사멸 효과를 확인한 결과를 나타낸다. 스트렙토니그린 또는 라파마이신을 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 병용하여 처리하는 경우 신장암 세포주의 사멸이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 ACHN 신장암 세포주에 대한 효과가 유의적으로 증가하였다.
- 도 3은 독시사이클린(Doxycycline; Dox)을 처리하여 TGase2(TG2)을 과발현 시킴으로써 라파마이신 저항성이 유발된 유방암 세포주에, 스트렙토니그린 또는 라파마이신의 처리에 따른 항암 활성의 시너지 효과를 확인한 결과이다. Dox를 처리하지 않은 경우에 비하여 Dox를 처리한 경우, 스트렙토니그린 또는 라파마이신을 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 병용하여 처리하는 경우 유방암 세포주의 사멸이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- 도 4는 TGase2 발현의 억제에 따른 혈관 생성의 억제 효과를 나타낸다. siTG2를 처리하는 경우 혈관 세포(인간 제정맥 상피세포)의 증식 및 이주가 억제되고, 혈관의 생성 역시 유의적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 혈관 성장 촉진인자인 VEGF를 처리하여도 동일하게 나타났다.
- 도 5는 siCTL, siTG2 또는 VEGF의 처리에 따른 혈관 세포(인간 제정맥 상피세포)의 이주(Migration)를 나타낸다. siTG2를 처리하는 경우 혈관세포의 이주가 유의적으로 억제되고, 이는 혈관 성장 촉진인자인 VEGF를 처리하여도 동일하게 나타났다.
- 도 6은 siCTL, siTG2 또는 VEGF의 처리에 따른 혈관 생성을 나타낸다. siTG2를 처리하는 경우 혈관 생성이 유의적으로 억제되고, 이는 혈관 성장 촉진인자인 VEGF를 처리하여도 동일하게 나타났다.
- 도 7은 TGase2 억제제인 스트렙토니그린 처리에 따른 종양 혈관 생성 억제 효과를 확인한 결과이다. 신장암 세포주(CAKI-1)를 이종이식(xenograft)한 마우스에 스트렙토니그린을 처리하는 경우, 농도 의존적으로 혈관 특이적 표지자인 CD31 양성세포의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- 도 8는 신장암 세포주에서 스트렙토니그린 또는 파조파닙(Pazopanib)의 처리에 따른 암세포 사멸효과를 나타낸다. 스트렙토니그린 또는 파조파닙을 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 병용하여 처리하는 경우 신장암 세포주의 사멸 효과가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- 도 9는 신장암 세포주(CAKI-1)를 이종이식(xenograft)한 마우스에 스트렙토니그린 또는 라파마이신 처리하는 경우 종양의 성장 억제 효과를 나타낸다. 스트렙토니그린 또는 라파마이신을 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 병용하여 처리하는 경우 종양의 부피 및 중량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0034] 본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 라파마이신(rapamycin)을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물에 항암제를 추가로 더 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 "스트렙토니그" 및 "라파마이신"을 병용 투여하는 것을 통해, 암 세포 증식 억제 및 사멸 유도 효과에 있어서 유의적인 시너지 효과를 얻을 수 있다. 이 때, 스트렙토니그린 및 라파마이신은 1:0.01 내지 1:100의 몰비율로 혼합되는 것이 바람직하며, 구체적으로 1:0.1 내지 1:10의 몰비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하다. 본 발명의 약학적 조성물을 통해 적은 농도의 항암제를 사용하여 유의적으로 항암 효과를 얻고자 하는 관점에서, 상기 스트렙토니그린 및 라파마이신은 1:0.5 내지 1:5의 몰비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 "암" 은 mTOR 억제제에 대해 내성이 유발되는 암종일 수 있다. 이 때, mTOR를 억제하는 mTOR 억제제에 대하여, 세포 내에서 높은 수준으로 발현된 TGase2가 상기 mTOR 억제제를 표적하여 활성을 차단하면, mTOR 억제제에 대한 내성암으로 진행될 수 있다. 본 발명에서는 mTOR 억제제의 활성을 차단하는 TGase2의 활성을 억제하는 TGase2 억제제를 mTOR 억제제와 병용 처리하여 증가된 항암 효과를 나타낼 수 있다. 이에, 본 발명의 약학적 조성물은 TGase2가 발현되어 mTOR 억제제에 대하여 내성이 유발될 수 있는 암종에 대하여 유의적인 항암 효과를 나타낼 수 있다. 구체적으로 본 발명에서 대상으로 하는 암종은 신장암, 유방암, 대장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 신장암인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 mTOR 억제제에 대하여 내성을 나타낼 수 있는 신장암에서, 라파마이신을 처리함에 따라 mTOR 관련 인자의 발현 수준 및 활성 수준이 감소하고, TGase2의 발현이 증가함을 확인하였다(도 1).
- [0040] 이에, 본 발명자들은 TGase2의 발현이 증가함에 따라 mTOR에 대한 내성이 유발될 수 있을 것으로 판단하고, mTOR 억제제인 라파마이신 및 TGase2 억제제인 스트렙토니그린을 혼합하여 신장암 세포주에 병용 처리하였다. 그 결과, 라파마이신 및 스트렙토니그린을 병용 처리한 신장암 세포주에서 단독 처리군에 비해 유의적으로 증가된 암세포 사멸 및 종양 성장 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다([도 2] 및 [도 9]).
- [0041] 또한, 본 발명자들은 유방암 세포주에 독시시클린(doxycycline, Dox)을 처리하여 TGase2의 과발현을 유도하였을 때, 라파마이신에 대한 내성이 나타나 라파마이신을 단독으로 처리한 세포에서 유의적인 암세포 사멸 효과를 나타내지 못하는 것으로 확인한 반면, 라파마이신 및 스트렙토니그린을 병용 처리하였을 때에는 암세포 사멸 효과가 현저히 증가하는 것으로 확인하였다(도 3).
- [0043] 따라서, 본 발명의 스트렙토니그린 및 라파마이신은 병용 처리하는 것을 통해 각각의 항암제를 단독으로 투여하는 경우보다 유의적으로 증가된 암세포 사멸 효과를 나타낼 수 있으므로, 본 발명의 약학적 조성물은 암 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에는 항암제를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 때, 추가로 사용 가능한 항암제는 스트렙토니그린과 같이 TGase2의 활성을 억제할 수 있는 저해제로서 알려져 당업계에서 사용되고 있는 항암제 및 라파마이신과 같이 mTOR를 표적으로 하는 저해제로서 알려져 당업계에서 사용되고 있는 항암제 중 어느 하나 또는 둘 다의 약물일 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되어 상승된 항암 활성을 나타낼 수 있는 것으로 용이 적용될 수 있는 범위의 항암제라면 제한없이 사용될 수 있다.

- [0047] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 스트렙토니그린 및 라파마이신을 포함하는 약학적 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 스트렙토니그린 및 라파마이신을 포함하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 스트렙토니그린 및 라파마이신을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명의 스트렙토니그린 및/또는 라파마이신의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 스트렙토니그린 및 라파마이신, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 경구 투여제제를 제공할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 경구 투여제제는 스트렙토니그린 및 라파마이신을 60 일 이상의 상승적 치료효과를 나타낼 수 있다. 구체적으로, 스트렙토니그린 또는 라파마이신을 단독 투여하였을 때는 그 약리 효과의 지속 기간이 짧아 반복적 투여를 통한 항암효과를 기대하여야 하는 반면, 스트렙토니그린 및 라파마이신을 병용 투여하는 경우에는 상기 단독 투여시에 비해 종양 성장 억제 및 암 치료 효과를 지속적으로 나타낼 수 있어, 반복적인 약물 투여에 비해 효과적일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 경구 투여제제는 서방성 또는 제어방출성 제제일 수 있다. 서방성 제제의 경우에는 스트렙토니그린 및 라파마이신이 동시 방출될 수 있으며, 제어방출성 제제의 경우에는 스트렙토니그린 및 라파마이신, 또는 라파마이신 및 스트렙토니그린이 순차적으로 방출될 수 있도록 조절될 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 스트렙토니그린 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관 신생 억제용 조성물을 제공한다.
- [0057] 또한, 본 발명은 상기 혈관 신생 억제용 조성물을 포함하는, 암 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 "VEGF 억제제"는 파조파닙(pazopanib)이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않고, 신생 혈관 유도 인자인 VEGF의 발현 또는 활성을 억제하여 혈관 신생을 억제하는 것으로 당업계에 알려진 약물이라면 당업자의 재량에 따라 변경 적용될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 "스트렙토니그린" 및 "VEGF 억제제"를 병용 투여하는 것을 통해, 종양 조직 주변의 혈관 신생을 효과적으로 억제할 수 있고, 이에 따른 암 세포 증식 억제 및 사멸 유도 효과에 있어서 유의적인 시너지 효과를 얻을 수 있다. 이 때, 스트렙토니그린 및 VEGF 억제제는 1:1×10⁻⁵ 내지 1:1×10⁵의 몰비

율로 혼합되는 것이 바람직하며, 구체적으로 $1:1 \times 10^{-4}$ 내지 $1:1 \times 10^4$ 의 몰비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하다. 본 발명의 약학적 조성물을 통해 적은 농도의 항암제를 사용하여 유의적으로 혈관 신생 억제 효과 및 항암 효과를 얻고자 하는 관점에서, 상기 스트렙토니그린 및 VEGF 억제제는 $1:2 \times 10^{-4}$ 내지 $1:5 \times 10^3$ 의 몰비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하다.

[0060] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 "암"은 mTOR 억제제에 대해 내성이 유발되는 암종일 수 있다. 구체적으로 본 발명에서 대상으로 하는 암종은 신장암, 유방암, 대장암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 신장암인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0062] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 TGase2의 발현 내지 활성을 억제하는 경우, 종양 혈관의 생성을 억제할 수 있는지 확인한 결과, TGase2에 대한 siRNA 또는 스트렙토니그린으로 TGase2의 발현 내지 활성을 억제하였을 때, 혈관 세포의 발달 내지 암 세포 주변의 혈관생성이 억제되는 것을 확인하였다([도 4] 내지 [도 7]). 또한, 스트렙토니그린과 VEGF 억제제인 파조파닙을 병용하여 처리하는 경우 신장암 세포주에 대한 사멸효과가 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0064] 따라서, 본 발명의 스트렙토니그린은 종양 조직의 혈관 신생을 유의적으로 억제할 수 있으며, 이에 따라 VEGF 억제제와 함께 혼합하는 경우 보다 시너지 효과를 나타내면서 종양 조직의 혈관 신생을 억제하고, 암 치료 및 전이 억제 효과를 나타낼 수 있다. 그러므로, 스트렙토니그린 및 VEGF 억제제를 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 혈관 신생 억제, 암 예방, 암 치료 또는 암 전이 억제를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0068] TGase2 및 mTOR 내성암과의 관계 확인

[0069] 본 발명자들은, 선행연구를 통해 TGase2의 과발현이 암 성장을 촉진하고, 항암제 및 방사선 치료에 대한 내성을 유발하며, 암 혈관 생성을 촉진하고, 암세포의 사멸을 억제하는 것으로 확인하였으며, 이에 따라 TGase2의 활성을 억제하는 억제제가 암 재발을 억제할 수 있음을 확인하였다(특허문헌 1). 또한, 다양한 항암제 내성이 mTORC2 및 NF- κ B의 활성화에 의해 유발될 수 있으므로, 본 발명에서는 mTOR 억제제로 알려진 라파마이신(rapamycin)을 암세포에 처리하였을 때 TGase2(TG2)의 발현 및 활성화 수준이 변화하는지 여부를 확인하였다.

[0070] 구체적으로, 신장암(renal cancer cell, RCC) 세포주인 ACHN 세포 및 CAKI-1 세포(국립암센터 제공)를 각각 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에 접종하여 배양한 다음, 라파마이신을 처리한 후 추가로 배양하였다. 이때, 라파마이신의 처리 시간에 따른 TGase2의 변화를 확인하기 위해서는 10 nM 농도의 라파마이신 처리 개시후 0, 3, 6, 12 및 24 시간에 각각의 세포를 수득하였으며; 라파마이신의 처리 농도에 따른 TGase2의 변화를 확인하기 위해서 0, 1, 10 및 100 nM의 농도로 각각 처리하고 추가로 24시간 배양한 후 세포를 수득하였다. 상기 수득한 각각의 세포들을 파쇄하여 수득한 상층액을 단백질 추출물로서 수득한 다음, 웨스턴블롯을 수행하여 목적 단백질의 발현 수준을 확인하였다. 웨스턴블롯을 수행하기 위한 1차 항체로서, 항 p-mTOR(Ser2448) 항체, 항-mTOR 항체, 항-p-p70 S6k(Thr389) 항체, 항-p70 S6k 항체, 항-p-AKT(Ser473) 항체, 항-p-AKT 항체, 항-p-p65(Ser276) 항체, 항-p65 항체, 항-TGase2 항체 및 항- β -actin 항체를 각각 사용하여 목적 단백질의 발현을 확인하였다.

[0071] 그 결과, [도 1]에서 나타난 바와 같이 신장암 세포에서 라파마이신 처리 시간에 따라 mTOR 관련 인자들의 활성 수준이 변화하는 것을 확인하였다. 라파마이신을 처리하여 p-mTOR가 감소하였고, p-p70 S6k가 억제되는 반면, p-AKT 및 p-p65는 증가하여 활성화되는 것을 확인하였다. 이와 함께, 라파마이신을 처리함에 따라 p-p65(NF- κ B)가 활성화되며, TG2 또한 증가되는 것으로 확인하였다. 또한, 라파마이신의 처리 농도에 의존적으로 TG2의 발

현 내지 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 웨스턴 블롯 과정에서 발색시간을 길게 할수록 TG2 밴드가 진하게 발색되었다. 이를 통해, TGase2는 mTOR 저항성을 유발하는 원인이 될 수 있음을 알 수 있다.

실시예 2

TGase2 억제제 및 mTOR 억제제 병용 처리에 따른 암세포주 사멸 효과의 확인

<2-1> 스트렙토니그린 및 라파마이신의 병용 처리에 따른 신장암 세포주 사멸 효과 확인

TGase2가 암세포에서 mTOR 저항성을 유발하는 원인이 될 수 있음을 확인하여, TGase2 억제제 및 mTOR 억제제를 병용 처리하였을 때 항암 효과가 증가될 수 있는지를 확인하기 위해 TGase2 억제제인 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 mTOR 억제제인 라파마이신을 혼합하여 암세포에 처리하였다.

구체적으로, 신장암 세포주인 ACHN 세포 및 CAKI-1 세포(국립암센터 제공)를 각각 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에 접종하여 배양한 다음, 10 nM 라파마이신 및/또는 10 nM 스트렙토니그린을 단독 또는 병용으로 처리한 후, 추가로 48 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각각의 세포에 0.4% 트립판 블루(trypan blue)를 처리하여 세포를 염색하여, 생존 세포와 사멸 세포를 분류 및 계수하였다. 계수한 세포의 수는 라파마이신 및 스트렙토니그린을 처리하지 않은 미처리 대조군(control)의 생존 세포수를 기준으로 하여 상대적인 생존 세포수의 비율을 계산하였다.

그 결과, [도 2]에서 나타난 바와 같이 스트렙토니그린 및 라파마이신을 혼합하여 병용 처리한 신장암 세포에서 유의적으로 증가된 암세포 사멸 수준을 확인하였다. 항암제를 처리하지 않은 미처리 대조군에 비해, 라파마이신을 단독으로 처리한 신장암 세포주는 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었고, 스트렙토니그린을 단독으로 처리한 신장암 세포주는 65% 이상의 세포 생존율을 나타내는 것으로 확인하였다. 이에 반해, 라파마이신 및 스트렙토니그린을 병용 처리하였을 때 CAKI-1 세포 및 ACHN 세포에서 각각 약 35% 및 약 30%의 세포 생존율을 나타내어, 라파마이신 및 스트렙토니그린을 단독으로 투여한 실험군에 비해 현저히 증가한 세포 사멸 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

<2-2> 라파마이신 저항성 유발 암세포주에 대한 스트렙토니그린과의 시너지 항암 효과 확인

신장암 세포주에는 TGase2가 다른 세포에 비해 높은 수준으로 발현되어있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 신장암 세포주에서 스트렙토니그린 및 라파마이신을 병용 투여하였을 때 항암 활성의 시너지 효과를 나타낼 수 있는 것으로 확인하였다. 이에 mTOR 내성으로 인해 라파마이신 저항성이 유발된 암세포주에서 TGase2 억제제 처리에 따른 항암 효과의 변화를 나타낼 수 있는지 확인하였다.

구체적으로, 유방암 세포주인 MCF7 세포(국립암센터 제공)를 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에 접종하여 배양한 다음, 10 nM 독시사이클린(Doxycycline, Dox)을 처리하여 TGase2의 과발현을 유도하였다. TGase2의 과발현은 항-TGase2 항체를 이용한 웨스턴블롯을 수행하여 Dox 처리 여부에 따른 TGase2 과발현을 확인하였다. 그런 다음, TGase2 과발현이 유도된 MCF7 세포와 Dox를 처리하지 않은 MCF7 세포에 10 nM 라파마이신 및/또는 10 nM 스트렙토니그린을 단독 또는 병용으로 처리한 후, 추가로 48 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각각의 세포에 0.4% 트립판 블루(trypan blue)를 처리하여 세포를 염색하여, 생존 세포와 사멸 세포를 분류 및 계수하였다. 계수한 세포의 수는 라파마이신 및 스트렙토니그린을 처리하지 않은 미처리 대조군(control)의 생존 세포수를 기준으로 하여 상대적인 생존 세포수의 비율을 계산하였다.

그 결과, [도 3]에서 나타난 바와 같이 Dox를 처리한 유방암 세포주(MCF7 cell)에서 TGase2가 유의적으로 과발현되는 것을 확인하였다. 먼저, Dox를 처리하지 않은 MCF7 세포에서 단독으로 라파마이신을 처리하였을 때 유의적인 암세포 사멸 효과를 나타내는 반면, Dox를 처리한 MCF7 세포에서는 TGase2의 과발현과 함께 라파마이신에 대한 내성이 유발되어 라파마이신을 처리하였을 때 유의적으로 암세포 사멸 효과를 나타내지 않았다. 스트렙토니그린을 단독 투여하는 경우에는, Dox의 처리 유무와 관계없이 유사한 수준의 세포 사멸 효과를 나타내는 것으로 확인하여, TGase2의 과발현 여부와 관계없이 유사한 수준을 나타내는 것으로 확인하였다. 이에 비해, 라파마이신 및 스트렙토니그린을 병용 투여하는 경우, TGase2 과발현을 유도하지 않은(Dox를 처리하지 않은) MCF7 세포군에서보다 TGase2 과발현 유도를 통해 라파마이신 저항성이 생긴 MCF7 세포군에서 현저히 증가된 암세포 사멸 효과를 나타내는 것으로 확인하였다.

[0083] 즉, Dox를 처리하여 TGase2 과발현이 유도된 유방암 세포주에서는 라파마이신에 대한 저항성이 유발되었음에도 불구하고, 라파마이신 및 스트렙토니그린을 병용 투여하였을 때 항암 활성의 시너지 효과를 나타내어 암세포 사멸 효과가 현저히 증가하는 것으로 확인하였다.

실시예 3

[0085] **TGase2 억제제 및 VEGF 억제제 병용 처리에 따른 종양 혈관생성 억제 효과 확인**

[0086] **<3-1> TGase2 발현 억제에 따른 혈관 생성 억제 여부 확인**

[0087] 보고된 연구에 따르면, TGase2는 혈관 생성을 촉진하여 종양의 성장 및 전이를 촉진할 수 있는 역할을 할 수 있다(비특허문헌 1). 이에, 본 발명자들은 본 발명의 TGase2 억제제가 종양 혈관의 생성을 억제하는 역할을 할 수 있는지 여부를 확인하고자, 먼저 TGase2 발현 억제에 따른 혈관 생성 억제 여부를 확인하고자 하였다.

[0088] 구체적으로, 인간 제정맥 상피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)를 배지에 접종하여 배양한 다음, siCTL 또는 siTGase2(siTG2)의 siRNA 및 혈관 성장 촉진 인자로서 VEGF를 배지에 처리한 후 추가 배양하였다. siRNA 및 VEGF를 처리한 세포를 배양한 후, 배지에 다시 브로모데옥시우리딘(Bromodeoxyuridine, BrdUrd)을 처리하고 BrdUrd 표지 분석(BrdUrd labelling assay)을 수행하였다. 정량을 위해서, 배지에 증식된 세포 중 BrdUrd 양성 세포를 계수하였다. 계수한 세포는 siCTL 처리 및 VEGF 미처리군의 BrdUrd 양성 세포수를 기준으로 하고, 각각의 실험군의 BrdUrd 세포수를 상대적 백분율로 구하였다.

[0089] 이와 함께, 혈관 생성 분석을 함께 수행하였다. HUVEC 세포를 매트리지(Matrigel)-코팅 웰에 접종하여 세포를 웰 표면에 부착시켜 배양하였다. 배지에 VEGF 및 각각의 siRNA를 첨가하여 추가 배양한 다음, 혈관생성 분석 키트(angiogenesis assay kit)를 사용하여 형성된 관 분절을 계수하였다.

[0090] 그 결과, [도 4] 내지 [도 6]에서 나타난 바와 같이 대조군으로 사용된 siCTL 처리 세포의 경우, 혈관신생유도 인자인 VEGF를 함께 처리하였을 때 세포의 증식, 이주 및 혈관 생성 정도가 모두 급증하였다. 반면에 siTG2를 처리한 세포에서는 대조군에 비하여 세포의 증식, 이주 및 혈관 생성 정도가 유의적으로 감소하였으며, 특히 VEGF 처리로 인해 세포의 증식, 이주 및 혈관 생성이 증가한 정도가 대조군에 비해 50% 이상 감소된 것을 확인할 수 있었다. 상기 데이터들은 TGase2의 발현을 억제하는 경우 세포군에서 혈관 생성을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0092] **<3-2> 스트렙토니그린 처리에 따른 종양 혈관 생성 억제 효과의 확인**

[0093] TGase2의 발현을 억제하였을 때 혈관 생성이 억제될 수 있음을 확인하여, TGase2 억제제인 스트렙토니그린을 처리하였을 때 암 세포 주변의 혈관 생성이 억제될 수 있는지 확인하였다.

[0094] 구체적으로, 신장암 세포주인 CAKI-1 세포주를 마우스에 이종이식(xenograft)하여 마우스 모델을 제조하였다. 그런 다음, 마우스 모델에 스트렙토니그린을 0.1 mg/kg 또는 0.2 mg/kg의 투여량으로 투여하고, 마우스를 사육하여 종양 형성을 관찰하였다. 이종이식 후, 종양 부위를 절제하여 생검 조직 시료를 수득하고, 시료를 면역조직화학 염색하여 혈관 특이적 표지자인 CD31 양성 세포의 발현수를 확인하였다.

[0095] 그 결과, [도 7]에서 나타난 바와 같이 스트렙토니그린의 투여량이 증가함에 따라 CD31 양성 세포수의 수준이 감소하여, 0.2 mg/kg 투여량으로 스트렙토니그린을 투여한 실험군에서 스트렙토니그린 미투여 대조군에 비해 CD31 양성 세포의 수준이 약 20%로 나타나는 것을 확인하였다. 이를 통해, 스트렙토니그린을 처리하여 TGase2의 활성이 억제됨에 따라, 신장암 조직에서 유의적으로 항 신생혈관 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0097] **<3-3> 스트렙토니그린 및 파조파닙의 병용 처리에 따른 종양 혈관 생성 억제 효과의 확인**

[0098] 상기 실시예 <3-2>에서 TGase2의 억제제인 스트렙토니그린을 처리하는 경우 암세포 주변의 혈관 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 이에 VEGF 억제제, 그 중에서 파조파닙(Pazopanib)을 병용하여 처리하는 경우 혈관 생성 억제효과가 증가하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0099] 구체적으로, 파조파닙 5 μM 및 스트렙토니그린 2nM을 이용하여 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 상대적인

생존 세포수의 비율을 계산하였다.

[0100] 그 결과, [도 8]에 나타나는 바와 같이, 과조과립 또는 스트렙토니그린을 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 양자를 병용하여 처리하는 경우 신장암 세포주의 사멸 효과가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 ACHN 신장암 세포주에서 유의적으로 증가하였다.

실시예 4

[0102] **TGase2 억제제 및 mTOR 억제제 병용 처리에 따른 종양 성장 억제 효과 확인**

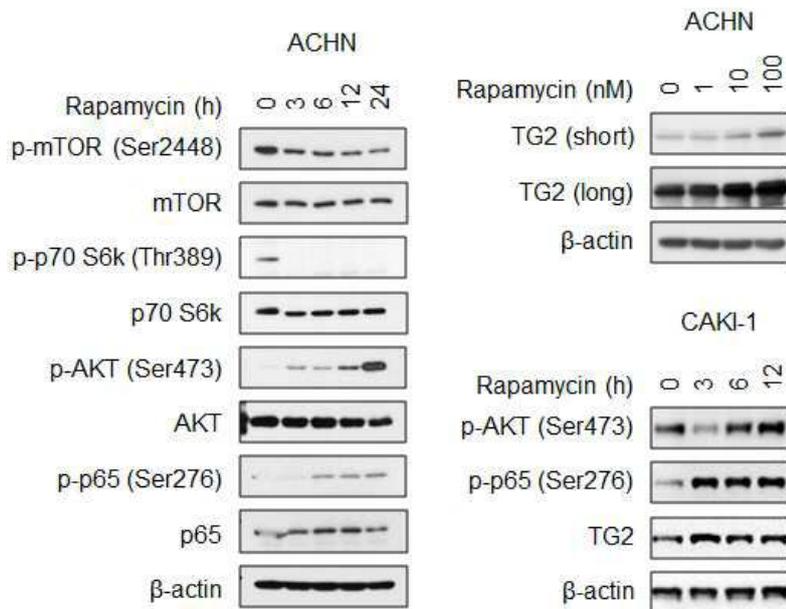
[0103] 상기 [실시예 2]에서 확인한 바와 같이 TGase2 억제제인 스트렙토니그린과 mTOR 억제제인 라파마이신을 병용하여 암세포에 처리하는 경우 그 사멸효과가 유의적으로 증가하였다. 이에 스트렙토니그린과 라파마이신을 병용하여 종양에 처리하는 경우 그 성장이 억제되는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0104] 구체적으로, 특정 병원균이 없는 6주령 암컷 BALB/c-누드 마우스(성남, 한국)의 머리에 피하 접종으로 CAKI-1 신장암 세포주(5×10^6)를 이종이식(xonograft)하였다. 종양의 크기가 100mm³에 도달하면 상기 마우스에 라파마이신 0.5 mg/kg(복강주사, 1일 1회, 5일/1주) 및/또는 스트렙토니그린 0.05mg/kg(경구투여, 1일 1회, 5일/1주)을 처리하여 사육하였다. 대조군(Control)으로는 용매를 사용하였다. 초기 종양의 부피는 캘리퍼(caliper)를 사용하여 3~4일 간격으로 측정하였으며, 종양의 중량은 $V=(A \times B^2)/2$ 의 식으로 계산하였다(V=부피(mm³), A=긴 직경(mm), B=짧은 직경(mm)). 마우스는 7.5% CO2 챔버에서 희생시켜 종양을 수득하였으며, 수득한 종양의 사진을 찍었다.

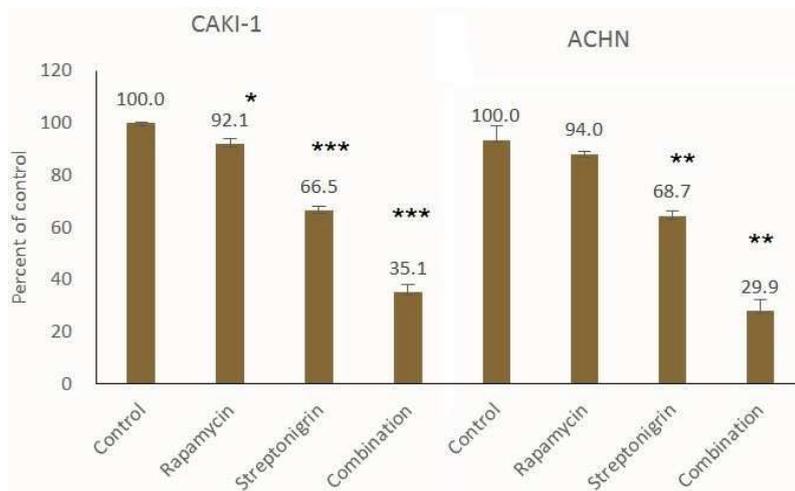
[0105] 그 결과, [도 9]에서 나타나는 바와 같이, 라파마이신 또는 스트렙토니그린을 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 병용하여 처리하는 경우, 신장암 종양의 부피 및 중량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 라파마이신과 스트렙토니그린의 병용처리는 종양의 성장을 유의적으로 억제한다는 것을 의미한다.

도면

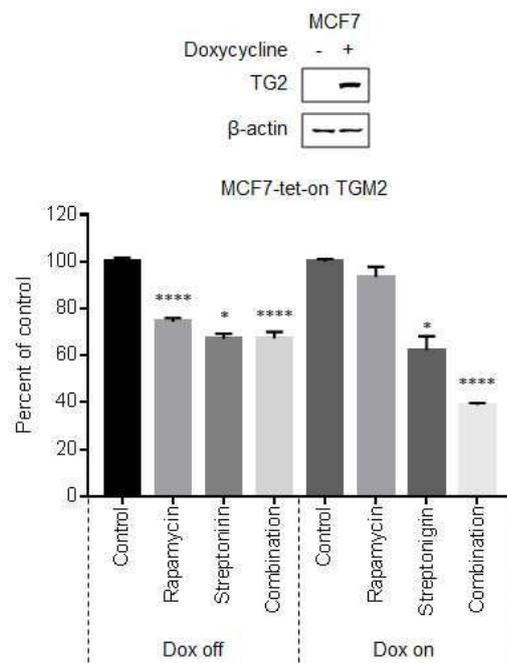
도면1



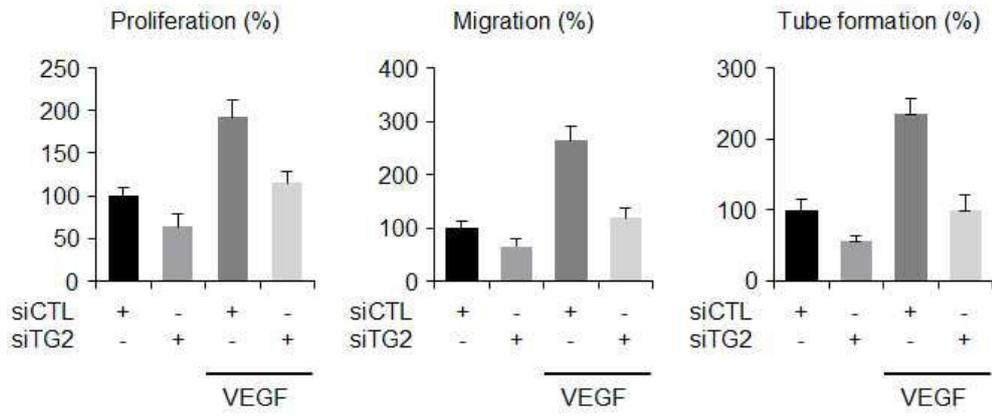
도면2



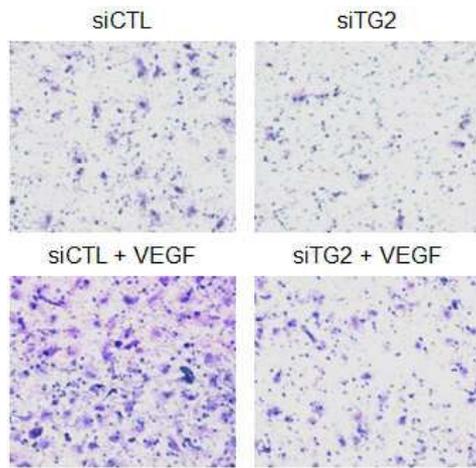
도면3



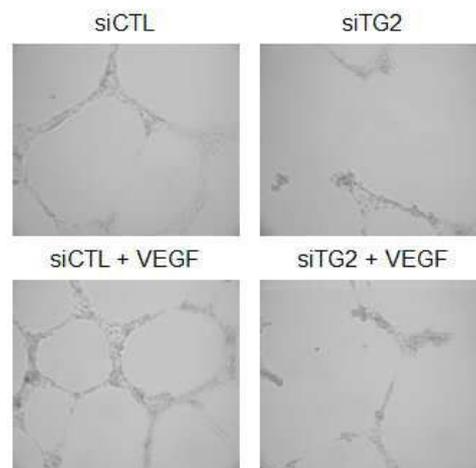
도면4



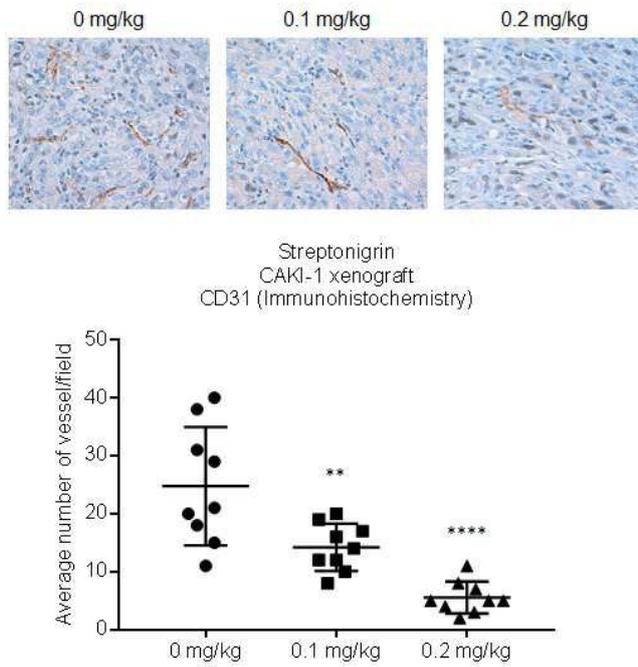
도면5



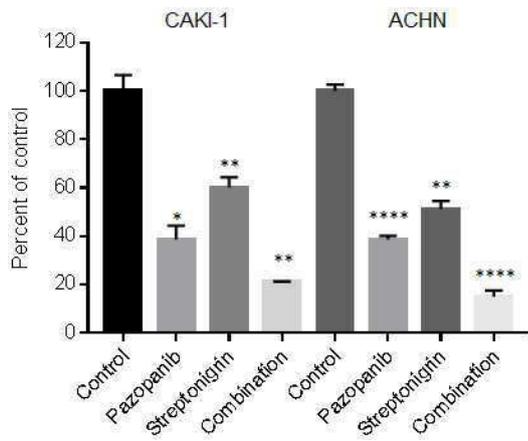
도면6



도면7



도면8



도면9



CAKI-1 xenograft

