



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0106315
(43) 공개일자 2019년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/718 (2006.01) *A61K 31/4375* (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/718 (2013.01)

A61K 31/4375 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0027616

(22) 출원일자 2018년03월08일

심사청구일자 2018년03월08일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이지연

서울특별시 성북구 화랑로 76, 8층 101-811호(하월곡동)

김재환

인천광역시 연수구 능허대로79번길 30, 106동 1803호(옥련동, 럭키송도아파트)

김은정

경기도 성남시 분당구 백현로 227, 509동 1105호(수내동, 푸른마을쌍용아파트)

(74) 대리인

특허법인 다해

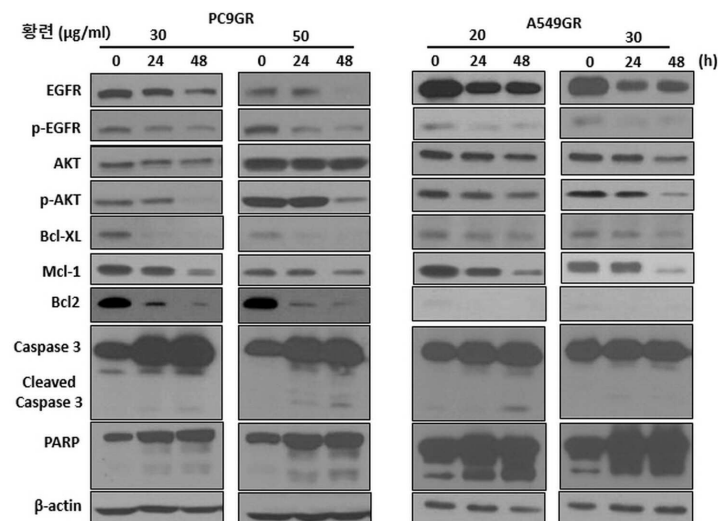
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 비소세포폐암의 표피성장인자 수용체 표적 항암제에 대한 민감성 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황련 추출물을 유효성분으로 포함하는, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR) 티로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도7a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014M3A9C4066487

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단-유전자동의보감사업단

연구사업명 바이오 · 의료기술개발사업

연구과제명 환자유래 1차 배양 뇌 암 세포 모델에서 MCMT 전략에 기반한 암 이형성과 항암치료 내성극복을 위한 암치료기술 개발 연구
환자유래 1차 배양 뇌 암 세포 모델에서 MCMT 전략에 기반한 암 이형성과 항암 치료 내성극복을 위한 암치료기술 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

항원 추출물을 유효성분으로 포함하는, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR) 티로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제는 제프티닙(Gefitinib), 에를로티닙 (Erlotinib), 아파티닙(Afatinib), 다코니닙(Dacotinib), 오시메르티닙(osimertinib), 세리티닙(Ceritinib), CI-1033(Canertinib), HKI-272(Neratinib) 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염인, 조성물

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 편평세포암, 대세포암 또는 선암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항원 추출물은 베르베린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

i) 항원 추출물; 및 ii) 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR) 티로신 키나아제 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 비소세포폐암의 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 내성 저해용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 i) 항원 추출물은 상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 비소세포폐암의 민감성을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는 비소세포폐암인 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제는 제프티닙 (Gefitinib), 에를로티닙 (Erlotinib) 아파티닙 (Afatinib), 다코니티닙(Daconitib), 오시메르티닙(osimertinib), 세리티닙(Ceritinib), CI-1033(Canertinib), HKI-272(Neratinib) 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염인, 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 편평세포암, 대세포암 또는 선암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 황련 추출물은 베르베린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비소세포폐암의 표피성장인자 수용체 표적 항암제에 대한 민감성 증진용 조성물에 대한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 황련 추출물을 유효성분으로 포함하는 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR) 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor: TKI)에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐암은 세계적으로 암 관련 사망의 주요 원인이다. 가장 일반적인 형태의 폐암은 비소세포폐암(non small cell lung carcinoma: NSCLC)으로 모든 폐암의 80%를 차지한다. 국내에서도 매년 발생 빈도와 사망률이 증가하고 있는 질환으로, 국가 암정보 센터에 의하여 발병률은 4위이나 사망률은 1위로 조사된다.

[0004] 폐암은 수술과 항암제 및 방사선 요법 등의 다양한 각도의 치료법 개발과 적용으로 생존률이 지난 30년 동안 2배로 증가하고 있음에도 불구하고, 폐암은 조기 발견이 어렵다는 문제점 때문에 5년 생존률이 15% 내외이고 그 예후가 매우 좋지 못하다. 따라서 폐암의 생물학적 기초지식과 더불어 예방 및 치료에 적극 활용할 수 있는 약물 및 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 현재 폐암에서는 다양한 표피성장인자수용체 (EGFR) 타이로신 키나아제 억제제(TKI)인 제프티닙(Gefitinib), 에를로티닙(Erlotinib), 아파티닙(Afatinib), 오시메르티닙(Osimertinib) 등이 개발되어, EGFR 유전자에 돌연변이를 갖는 폐암 환자들에게 치료에 획기적이 효과를 보여주고 있다.

[0006] 그러나 이러한 암의 초기 반응에도 불구하고 6개월에서 1년 내에 암세포가 치료에 저항성을 획득한다는 면에서 새로운 문제점을 극복해야하는 필요성이 제시되고 있다. 이러한 저항성의 획득 기전으로는 EGFR에 2차적인 돌연변이 획득, 다양한 세포내 다른 신호전달경로의 활성화, 세포사의 회피, 암 조직 내 미세 환경 변화 등 다양한 기전들이 규명되고 있다.

[0007] 이러한 저항성 기전을 극복하기 위한 치료법으로 시너지 효과를 보일 수 있는 약물을 조합하는 방법을 이용할 수 있다. 하지만, 종래 화학 약물의 조합은 암세포뿐만이 아니라 정상세포에도 독성이 높아져 암세포뿐만이 아니라 정상세포에도 영향을 미칠 수 있다.

[0008] 천연물은 정상세포에는 최소한의 독성을 가지지만 암세포 특이적으로 항암 효과를 나타낼 수 있다. 그리고 천연물은 그 자체로 단일물질이 아니면서 독성은 상대적으로 매우 약하기 때문에 약물 조합치료나 보조제로 사용할

경우 매우 효과적인 접근법이 될 수 있다.

[0009] 천연물인 황련(*Coptis chinensis*) 미아재비과에 속하며 성질이 차고 맛은 쓰며 독이 없다. 눈을 밝게 하고 눈물이 나오는 것을 멎게 하며, 간을 진정시키고 열독을 제거한다. 눈이 붉어지면서 잘 보이지 않고 아플 때 눈에 넣는다. 놀라서 가슴이 두근거리는 것과 번조를 치료하고 담을 도와주며 입이 허는 것을 치료하고 소아의 감병(마르는 병)을 없앤다고 동의보감 본초문에 적혀있다. 주요성분으로 알카로이드 (베르베린), 페놀산, 클로로겐산 등이 포함되어 있다고 알려져 있다. 이러한 황련 추출물은 알러지나 염증 치료, 피부노화 개선, 그리고 호흡기 질환이나 예방효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0011] 이에 본 발명자는 EGFR 표적 항암제에 내성이 생긴 폐암의 약물 민감성을 증진시키기 위해 연구를 계속하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 한국 특허출원 제10-2013-0070782호
(특허문헌 0002) 한국 특허출원 제10-2008-0055537호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 비소세포폐암의 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 내성 저해용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 황련 추출물을 유효성분으로 포함하는, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR) 티로신 키나아제 억제제에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 용어, "비소세포폐암"은 폐의 상피 세포(epithelial cells)로부터 발생하는 악성 종양(malignant cell)으로서, 현미경 하에서 관찰자, 예를 들면, 조직병리학자(histopathologist)에 의하여 관찰된 종양 세포의 크기 및 모양에 따라 분류된 것이다.

[0019] 본 발명에서 용어, "표피성장인자 수용체(EGFR)"는 비소세포폐암(NSCLC, non small cell lung carcinoma)의 약 50~80%에서 과발현되며, 과발현이 있는 경우 예후가 불량하다.

[0020] 본 발명에서 용어 "EGFR 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor) (EGFR-TKI)"는 EGFR 표적 항암제로, EGFR 세포내 도메인(intracellular domain)의 티로신 키나아제에 선택적으로 결합하여 ATP가 결합하는 것을 억제함으로써 하위 신호경로를 차단한다.

[0021] 상기 용어들은 모두 본 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 "EGFR-TKI에 내성을 나타내는 비소세포폐암"이란, 비소세포폐암 세포가 EGFR-TKI에 대한 저항성 혹은 내성(resistance)을 나타내어(EGFR-TKI-R) EGFR-TKI이 더 이상 치료 효과를 나타내지 못하는 비소세포 폐암을 의미한다.

- [0024] 본 명세서에서 본 발명에서 상기 “EGFR-TKI에 내성을 나타내는 비소세포폐암”은 EGFR-TKI-R 비소세포폐암 또는 EGFR-TKI-R 폐암으로 기재하기도 한다.
- [0025] 상기 EGFR-TKI는 이 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 포함될 수 있다. 구체적으로, 제프티닙(Gefitinib), 에를로티닙(Erlotinib) 아파티닙(Afatinib), 다코니팁(Daconitib), 오시메르티닙(osimertinib), 세리티닙(Ceritinib), CI-1033(Canertinib), HKI-272(Neratinib) 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염이 포함될 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 비소세포폐암은 편평세포암, 대세포암 또는 선암일 수 있다.
- [0027] 상기 황련 추출물은 베르베린(berberine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 상기 베르베린은 황련 추출물에서 분리된 성분으로 알려진 화합물이다.
- [0029] 다른 측면에서, 본 발명은 i) 황련 추출물; 및 ii) 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR) 티로신 키나아제 억제제((tyrosine kinase inhibitor: TKI) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 비소세포폐암의 EGFR 티로신 키나아제 억제제(EGFR-TKI)에 대한 내성 저해용 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 비소세포폐암, EGFR-TKI의 의미 및 종류는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0033] 상기 i) 황련 추출물은, 상기 ii) EGFR-TKI에 대한 비소세포폐암의 민감성을 증가시키는 물질이다.
- [0034] 본 발명에서 상기 용어 “EGFR-TKI 민감성(sensitivity) 증가”란, EGFR-TKI에 대해 비소세포폐암 세포를 민감화 시킴으로써, 항암제(EGFR-TKI)에 대한 암세포의 저항성을 줄이고 항암제의 효과를 높이는 것을 의미한다. 이를 통해 EGFR-TKI 치료제 치료 효율을 상승시킬 수 있으므로, 암 치료시 병행처리하면 암세포의 EGFR-TKI 민감성이 증진되어 기존의 EGFR-TKI의 사용량을 감소시키면서 암세포의 살상 효과 및 증식 억제 효과를 낼 수 있게 된다.
- [0036] 상기 비소세포폐암은 EGFR-TKI에 내성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0038] 상기 황련 추출물은 베르베린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.
- [0039] 비소세포폐암에 돌연변이 등이 생기면 EGFR-TKI에 대한 저항성을 나타내어(내성), EGFR-TKI이 폐암 치료에 더 이상 유효하지 않다. 본 발명은 이러한 내성을 나타내는 비소세포폐암의 치료를 위해, EGFR-TKI 치료 효과를 상승적으로 향상시킬 수 있는 황련 추출물을 함께 사용하였다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 i) 황련 추출물 및 ii) EGFR-TKI를 동일한 용기에 포함하거나, 또는 각각 별개의 용기에 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 황련 추출물은 EGFR-TKI에 내성이 있는 폐암 세포에서 EGFR의 인산화에 의한 활성 (pEGFR)을 억제하여 EGFR의 하위 신호전달체인 AKT/pAKT의 활성을 저해하여 세포의 생존력을 저해할 뿐만 아니라 세포의 이동성과 침윤성 역시 효과적으로 저해한다.
- [0043] 또한, 본 발명의 황련 추출물은 세포사멸을 유도하는데, 이 항세포사멸 (antiapoptotic) 단백질인 Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xl의 발현을 저해하여 caspase 3, PARP의 분해(cleavage)를 통하여 세포사멸을 효과적으로 유도하는 것을 확인하였다.
- [0045] 이러한 결과들은 황련 추출물이 비소세포폐암 및 EGFR-TKI에 내성이 있는 비소세포폐암(EGFR-TKI-R 비소세포폐암) 세포주 특이적으로 효과적인 항암 효과를 보임을 알 수 있다. 또한 상기 황련 추출물은 폐암 및/또는 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 치료제 혹은 EGFR-TKI의 보조 치료제로 적용이 가능함을 보여준다.

- [0047] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물 중에서 선택된 다양한 형태로 제공될 수 있다
- [0048] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물인 경우, 상기 약제학적 조성물은 황련 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제시에 통상적으로 이용되는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 솔비톨, 만니톨, 전분, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스 등을 포함할 수 있다. 하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 감미제, 윤향제, 습윤제, 향미제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 약제학적 조성물은 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 일반적으로는 국소 투여 방식이 추천된다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중, 투여경로등의 조건에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 부터 수회까지 투여할 수 있다.
- [0050] 상기 약제학적 조성물은 생쥐, 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막, 직장 또는 뇌혈관 내주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0051] 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 과립제, 정제, 경고제, 엑스제, 분말제, 로션제, 연고제 등의 형태일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성 현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘렉시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐등의 제형으로 제제화하기 위해서는 락토오스, 솔비톨, 사카로오스, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤향유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제등의 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 치료관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명의 조성물이 기능성 식품 조성물인 경우, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다.
- [0057] 본 발명의 황련 추출물이 EGFR-TKI과 병용 투여될 경우, 상기 황련 추출물은 치료적으로 유효한 양이 EGFR-TKI과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0058] 상기 치료적으로 유효한 양은 EGFR-TKI에 대해 암세포 내의 종양의 민감성을 효과적으로 증진시키는 양을 의미한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 및 조사되는 방사선량을 비롯한 다양한 인자와 의학분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 방사선민감성 증진용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.0001-100 mg/kg일 수 있다.

발명의 효과

- [0060] 본 발명의 조성물은 EGFR TKI에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료 효과를 제공한다. 또한 본 발명의 조성물은 EGFR TKI에 내성을 나타내는 비소세포폐암의 예방 또는 치료를 위한 황련 추출물 및 EGFR TKI의 병용 제제 및 병용 용법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 EGFR-TKI에 저항성(내성)이 있는(EGFR-TKI-R) 비소세포폐암 세포의 MTT 분석 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 EGFR-TKI-R 비소세포폐암 세포의 이동성이 억제되고(A) 침윤성이 감소된(B) 결과는 나타난 것이다.
- 도 3 내지 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 EGFR-TKI-R 비소세포폐암 세포의 세포사멸이 유도된 결과이다.
- 도 8 및 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 황련 추출물과 EGFR-TKI를 병용 처리한 경우의 상승 효과를 확인한 결과이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 베르베린을 처리한 경우의 MTT 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하 본 발명의 바람직한 실시를 보다 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 다수의 상이한 형태로 구현될 수 있고, 기술된 실시 예에 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 하기에 설명되는 본 발명의 실시 예는 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위한 것임에 유의하여야 한다.

[0065] 실시예 1: 실험 방법 및 재료

[0066] 1-1: 황련 추출물의 제조

- [0067] 동국대학교 일산병원(Kyunggi-do, South Korea)에서 구입하여 동국대학교 김은정 교수(한의학전공)의 감정 하에 선별된 황련을 정선하여 사용하였다. 황련 10g을 환류 냉각관을 부착한 3L 원형 플라스크에 담고 10배수(w/v)의 용매(물, 에탄올)를 가하여 실온에 24시간 두어 추출한 후, 4시간 동안 끓는점 이하의 온도(열수 추출은 90℃, 에탄올 추출은 70℃)에서 추출하였다. 추출액은 0.2μm 포어 크기의 와트만 페이퍼를 이용하여 여과하고, 여과액은 회전식 진공농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압농축하였다. 이후 동결건조기(EYELA, Japan)를 사용하여 동결건조하여 시료로 사용하였다. 얻어진 추출물의 무게와 수율은 에탄올용매 1.26g/12.6% 이었다.

[0069] 1-2: 시약

- [0070] EGFR-TKI, 제프티닙 (Gefitinib)은 Selleck chemical로부터 구입하였다. EGFR, AKT, p-AKT, Caspase 3, PARP에 대한 항체는 Cell signaling technology로부터 구입하였다. p-EGFR, MET, BCL2, MCL-1, BCL-xl과 β-actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. 2차 항체인 고트 항-마우스 IgG와 고트 항-토끼 IgG는 Santa Cruz biotechnology로부터 구입하였다.

[0072] 1-3: 세포 배양

- [0073] 인간 정상 폐 상피세포주인 BEAS-2B 및 인간 비소세포폐암 세포주 PC9, PC9GR, A549, A549GR은 각각 울산대학교 아산병원 노진경 박사로부터 제공받았다. 여기서 PC9GR 및 A549GR세포는 각각 차례대로 PC9G 저항성 세포주 및 A549 저항성 비소세포폐암 세포주이다. 베르베린은 시그마로부터 구입하였다. 10% FBS (fetal bovin serum, Welgene)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)이 첨가된 RPMI 배지 (Welgene)에서 5% CO2

배양기로 37℃에서 세포를 유지하며 배양하였다.

[0075] 1-4: 세포 생존 및 약물의 독성 분석

[0076] 세포 생존률은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 분석을 이용하여 수행하였다. 세포 (1×10^3)를 96웰 세포배양 플레이트에 접종하여 하루 밤을 배양한 후 해당하는 시약인 EGFR-TKI (제프티닙) 또는 황련 추출물 또는 베르베린을 처리 또는 처리하지 않는다. 세포배양 시작 72시간 후에 50 μ L의 MTT 용액 (0.5mg/ml) (Sigma-aldrich)를 첨가한다. 추가로 4시간 배양한 후에 MTT용액을 제거하고 dimethyl Sulfoxide (DMSO)를 추가하였다. 마이크로 플레이트 리더 (SpectraMax Plus 384)를 이용하여 570nm의 흡광도를 측정하였다. 약물 조합효과는 CompuSyn Software(www.combosvn.com)를 이용하여 Fa(fraction affected)와 CI (combinatin index) 값을 구하여 측정되었다. CI 값이 <1 경우 상호보완 (시너지) 효과, 1인 경우 추가 (addicitive), >1인 경우 반대 (antagonism)를 의미한다.

[0078] 1-5: 세포 이동 분석

[0079] 세포 이동은 창상치유(wound healing) 분석을 이용하여 수행하였다. 세포 (5×10^5)를 6 웰 플레이트에 접종한 후 24 시간 배양한 후, 멸균된 마이크로파이펫 팁으로 단층인 세포를 긁는다. 세포를 PBS로 씻어낸 후 정해진 양의 약물(실시예1-1의 황련 추출물)을 첨가한다. 이 시점을 기준으로 하여 정해진 시간 동안 창상이 치유되는 정도를 현미경으로 관찰한 후, 창상이 치유되는 정도를 비교하였다.

[0081] 1-6: 세포 침윤 분석

[0082] Polycarbonate nucleopore membrane (Costar)을 가진 트랜스웰 챔버(transwell chambers)를 이용하여 침윤 분석을 수행하였다. 미리 코팅된 필터 [6.5mm in diameter, 8- μ m pore size, Matrigel (100 μ g/cm²)]는 100 μ L 배지로 재수화하였다. 다음으로, 1×10^5 세포를 각 챔버의 상단에 접종한 반면, 하단에는 상기 배지 600 μ L를 채웠다. 37℃에서 24 시간 동안 배양한 후, 필터 상단 표면상의 비침습된 세포는 면봉으로 긁어냈고, 필터 하단 표면상의 침습된 세포는 고정시켰으며, 헤마톡실린/에오신 염색하였다. 침습성은 웰 당 5개 임의의 현미경 영역에서 세포를 계수하여 측정하였고, 침습 범위는 현미경 영역 당 세포의 평균 개수로 나타났다.

[0084] 1-7: 유세포 분석

[0085] 세포 주기 분포를 시험하기 위해서, 단일세포로 해리된 세포들은 75% 에탄올로 고정시켰고, 적어도 1시간 이상 -20℃에서 반응시켰으며, PBS로 세 번 씻어냈다. 그 후, 0.1 mg/mL RNase-A, 50 mg/mL 프로피디움 이오다이드(propidium iodide) 및 0.05% Triton X-100이 포함된 PBS에 상온에서 40분 동안 재현탁하였고, PBS로 씻어낸 후, FACS Canto 2 (Becton Dickinson)로 분석하였다.

[0087] 1-8: 세포 사멸 분석

[0088] 세포 사멸은 말단 디옥시뉴클레오타이드 전이효소 dUTP Nick-말단 표지(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) 분석에 의해서 수행되었다. 완전배지가 함유된 커버슬라이드에 세포를 접종하였고, 황련 추출물을 첨가 또는 미첨가하였다. 배양 24, 48시간 후, 세포들을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 4℃에서 10분 동안 고정시켰고, 상온에서 PBS로 2번 씻어냈다. 그 후, 세포들을 PBS에 녹인 0.2% Triton X-100으로 상온에서 5분 동안 투과시켰고, PBS로 2번 씻어냈다. 염색된 세포들은 제조사의 프로토콜에 따라 형광 현미경으로 확인하였다(DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System; Promega).

[0090] 1-8: 역전사-중합효소 연쇄반응

[0091] 총 RNA(1 μ g/ μ L)는 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol (Molecular Research Center)을 이용하여 세포로부터 분

리하였다. 상보적 DNA (Complimentary DNA; cDNA) 는 cDNA 합성 키트 (Applied biosystmes)를 이용하여 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열은 다음과 같다:

- [0092] BCL2 sense: 5' -AAGGGGGAACACCAAGATC-3' (서열번호 1),
- [0093] BCL2 antisense: 5' -ATCCTTCCCAGAGGAAAAGC-3' (서열번호 2);
- [0094] MCL-1 sense: 5' -TGCTGGAGTAGGAGCTGGTT-3' (서열번호 3),
- [0095] MCL-1antisense: 5' -CCTCTTGCCACTTGCTTTTC-3' (서열번호 4),
- [0096] Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense: 5' -GCCATCGTCACCAACTGGGAC-3' (서열번호 5),
- [0097] GAPDH antisense: 5' -CGATTTCCTCGGCCGTGG-3' (서열번호 6).

[0099] 1-8: 웨스턴 블랏 분석

[0100] 세포는 1×RIPA 버퍼 [50mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 5mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 0.5% Nonidet P-40 및 protease inhibitor cocktail tablet (Roche)]에 용해시켰고, Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad)로 단백질의 농도를 측정하였다. 총 단백질 분주물 (aliquot) (30mg protein/lane)은 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)으로 분리하였고, 100 V에서 2시간 동안 니트로셀룰로스 멤브레인 (Millipore)으로 전기이동시켰다. 멤브레인은 TBST [20mM Tris-HCl (pH 7.6), 137mM NaCl, and 0.01% Tween 20]에 녹인 5% BSA로 1시간 동안 상온에서 차단한 후, 1차 항체로 밤새도록 4℃에서 반응시켰다. 멤브레인을 TBST을 이용하여 집중적으로 씻어낸 후, 멤브레인을 과산화효소(horseradish peroxidase)로 접합된 2차 항체로 상온에서 1시간 동안 탐침 (probe)시켰다. TBST로 15분 동안 세 번 씻어낸 후, 멤브레인은 제조사의 프로토콜에 따라 화학발광 (Amersham)에 의해 가시화되었다.

[0102] 1-9: 통계 분석

[0103] 통계 분석은 독립 표본 t-test을 이용하여 수행하였다. 편차는 $P < 0.05$ 에서 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

[0105] **실시예 2: 결과**

[0106] 2-1: 황련 추출물에 의한 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 생존력 및 이동성 억제

[0107] 본 발명자들은 우선 폐암, EGFR-TKI-R 폐암 세포 및 정상 기관지 상피 세포의 생존력, 이동성과 침윤성에 대한 황련 추출물의 효과를 시험하였다. 세포의 생존력을 특정하기 위한 방법으로는 잘 알려진 MTT 분석을 이용하여 IC50(half maximal inhibitory concentration) 값을 측정하였다. 정상 기관지 상피 세포에서는 100mg/ml의 농도에도 약 80%의 세포가 생존하는 반면 (IC50:178u/ml 이상), 폐암 세포주 각각의 IC50 는 70ug/ml과 30ug/ml 이었고, 이 폐암 세포주를 이용하여 구축된 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 IC50는 각각 33ug/ml, 20ug/ml로 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 생존 억제능이 가장 효과적임을 확인하였다(도 1).

[0108] 또한 황련 추출물이 암세포의 특징인 세포의 이동성 및 침윤성을 억제하는 효과가 있는지를 측정하기 위한 방법으로는 창상치유 (wound healing) 분석과 침윤성 분석을 이용하였다. 세포의 이동성은 황련 추출물의 농도 의존적 그리고 처리 시간 의존적으로 상황이 치유되는 속도가 느려짐을 통하여 세포의 이동성이 억제됨을 확인하였다(도 2A). 또한, 황련의 농도 의존적으로 EGFR-TKI-R 폐세포의 침윤성 역시 감소함을 확인하였다(도 2B). 이러한 결과는 황련 추출물이 폐암과 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 생존력, 이동성 및 침윤성을 효과적으로 억제한다는 것을 나타낸다.

[0110] 2-2: 황련 추출물은 EGFR-TKI-R 폐암 세포주기 중 G2/M기를 정지 (arrest)시키며 세포사멸을 유도

[0111] 본 발명자들은 황련 추출물이 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 사멸을 유도하는지 시험하였다. 세포주기 분석 결과, 황

련 추출물의 처리가 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 시간 의존적으로 subG1의 분획이 증가하였다(도 3). 광학현미경 하에서 황련추출물을 처리한 후 관찰한 결과, 황련 추출물을 처리하지 않은 세포에 비하여 황련 추출물을 처리한 세포가 죽어가는 것을 확인하였다(도 4a 및 4b). 이러한 결과를 면역세포화학 분석으로 확인한 결과, 황련 추출물은 말단 디옥시뉴클레오티딜 전이효소 dUTP Nick-말단 표지 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling)-양성 세포의 수를 향상시킨 것으로 나타났다 (도 5). 이러한 결과는 황련 추출물이 적어도 부분적으로는 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 세포사멸을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0113] 2-3: 황련 추출물은 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 EGFR-AKT 신호전달계와 항세포사멸 (antiapoptotic protein)인 Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xl 발현 억제하여 세포의 생존을 억제하고 세포사멸을 유도

[0114] 황련 추출물에 의한 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 생존 억제와 세포사멸을 유도하는 근본적인 분자 기작을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 세포 생존과 세포사멸과 관련된 중요한 신호 분자들의 발현 패턴을 조사하였다. 먼저, 모 폐암세포(PC9 ALC A549)와 비교하여 EGFR-TKI-R 폐암 세포(PC9GR 및 A549GR)에서 발현이 변화한 인자를 웨스턴 블롯으로 조사하였더니 EGFR 신호전달계의 하위 신호전달 인자인 AKT, AKT의 활성화 상태인 인산화된 pAKT와 항세포사멸분자인 bcl-2 family중 Mcl-1이나 Bcl-2의 발현이 증가한 것을 관찰 하였다(도 6). 황련 추출물을 EGFR-TKI-R 폐암 세포에 처리 하였더니 시간 및 농도 의존적으로 EGFR 및 AKT 신호전달계의 인자와 그 활성인자인 pEGFR과 pAKT의 발현을 억제하여 세포 생존을 억제하였고, EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 증가한 Mcl-1과 Bcl-2 뿐만이 아니라 bcl-xl의 발현을 억제하여 caspase 3와 PARP의 cleavage form을 증가시키면서 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다 (도 7).

[0116] 2-4: 황련 추출물은 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 EGFR-TKI의 상호보완적으로(synergically) 민감도를 증가시킴

[0117] 황련 추출물이 EGFR-TKI-R 폐암 세포의 생존을 억제하고 특히 세포사멸을 유도하기 때문에, 폐암 세포가 저항성을 보이는 약물인 EGFR-TKI에 대한 민감도를 증가시킬 수 있는지 시험하였다. 본 발명자들은 황련 추출물과 EGFR-TKI를 선별된 농도에서 단일 혹은 조합하여 처리하여 세포의 생존능을 MTT 분석에 의하여 관찰한 결과, 조합하여 처리한 경우에 훨씬 더 세포의 생존능이 감소하는 것을 확인 하였다. 또한 이러한 생존능 저하가 EGFR/AKT 신호전달계인자와 항세포사멸인자의 Mcl-1, Bcl-2의 감소를 유도하는 것을 웨스턴 블롯으로 확인하였다(도 8). 이러한 약물의 조합이 상호 보완적인지(synergeical) 검증하기 위하여 Fa-CI Plot (Chu-Talalay Plot; www.combosyn.com) 중앙 효과(median effect) 분석을 시행하였다. 이러한 분석을 통하여 조합 인덱스(combination index)를 산출한 결과 1보다 적은 것을 통하여 황련 추출물과 EGFR-TKI의 조합은 시너지 효과가 있음을 확인하였다 (도 9).

[0119] 2-5: 황련 추출물 중 알킬레이팅 물질인 베르베린(berberin)의 항암효과

[0120] 황련 추출물 중 유효성분으로 생각되는알킬레이팅 물질인 베르베린의 세포 생존 억제 효과를 MTT를 이용하여 분석한 결과 폐암 세포의 생존을 억제하는 것을 확인하였다(도 10). 특히 베르베린은 일반 폐암 세포주 뿐만 아니라 EGFR-TKI-R 폐암 세포주에서도 세포 생존 억제능이 뛰어남을 알 수 있다.

[0122] 본 발명은 황련 추출물 및 베르베린이 폐암 세포 및 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 암세포 특이적으로 항암 효과를 보이는지 확인한 결과, 정상 기관지 상피 세포에서는 세포를 죽이는 효과가 매우 미비하지만, 폐암 및 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 특이적으로 EGFR/AKT 신호전달계의 활성을 억제하여 세포생존을 억제하고 Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL의 발현을 억제하여 세포사멸 경로를 유도하는 것을 확인하였다. 또한, EGFR-TKI와 황련 추출물을 동시에 처리하였을 경우 상호 보완 시너지)효과가 있음을 확인하였다. 따라서, 황련 추출물은 폐암 및 EGFR-TKI-R 폐암 세포에서 EGFR-TKI의 민감성 증진을 위하여 EGFR-TKI 와 병행하여 사용될 수 있다.

[0123] 본 발명자들은 황련 추출물이 EGFR-TKI-R 폐암 세포 특이적으로 항암 효과가 있는지와 기존에 사용하고 있는 EGFR-TKI와 동시 사용시 EGFR-TKI의 효과를 증진시킬 수 있는지를 조사하여 본 발명을 완성하였다. 본 발명자들은 황련 추출물이 정상 기관지 상피세포의 생존에는 거의 영향을 미치지 않고 폐암과 EGFR-TKI-R 폐암 세포 특이적으로 세포생존을 억제하고 세포사멸을 유도하여 항암 효과를 나타내며, EGFR-TKI와 동시에 사용하였을 경우

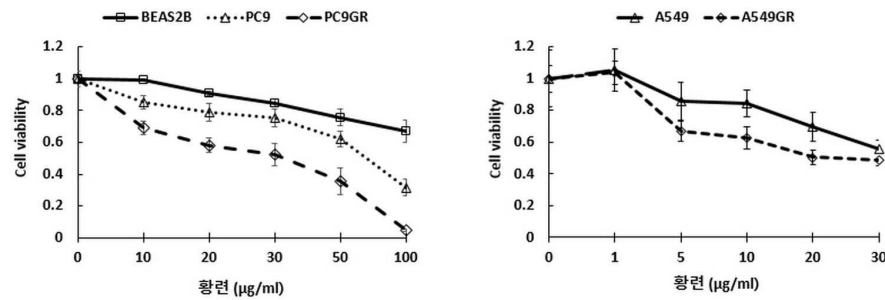
EGFR-TKI의 효능을 증진시키는 것을 확인하였다.

[0125]

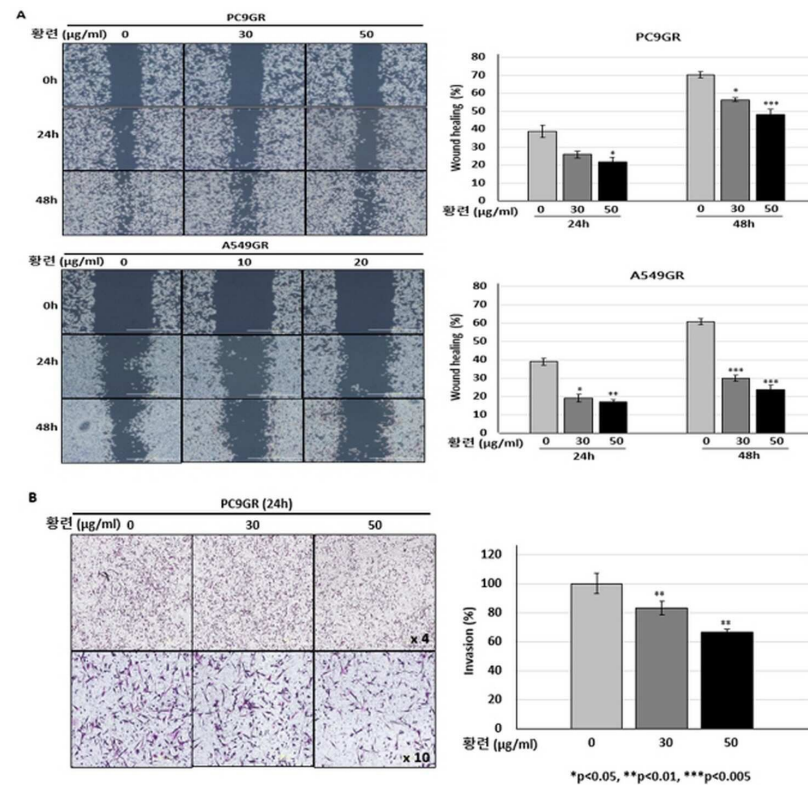
이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 도시하고 설명하였지만, 본 발명은 상술한 특정의 실시예에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형 실시가 가능한 것은 물론이고, 이러한 변형 실시들은 본 발명의 기술적 사상이나 전망으로부터 개별적으로 이해되어져서는 안될 것이다.

도면

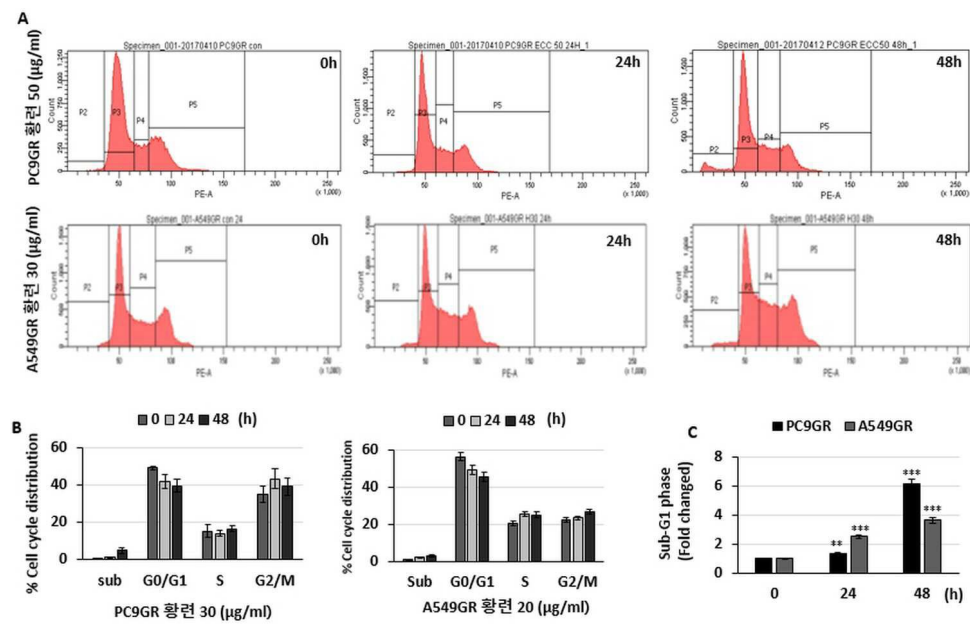
도면1



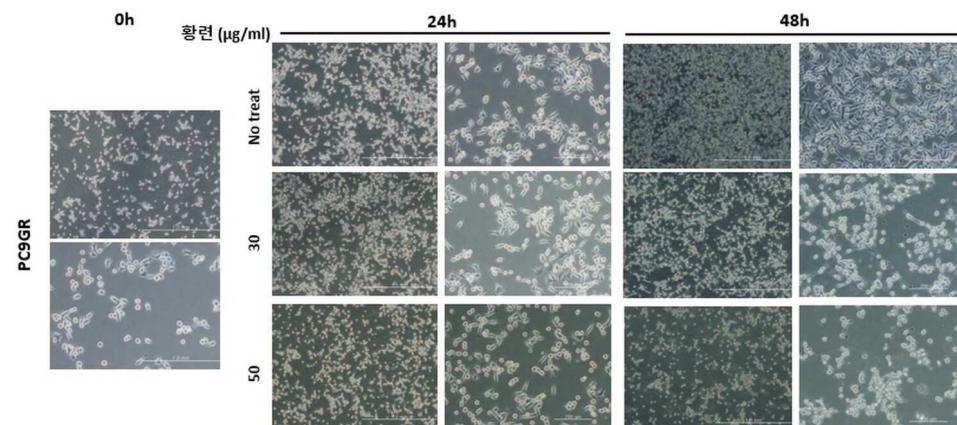
도면2



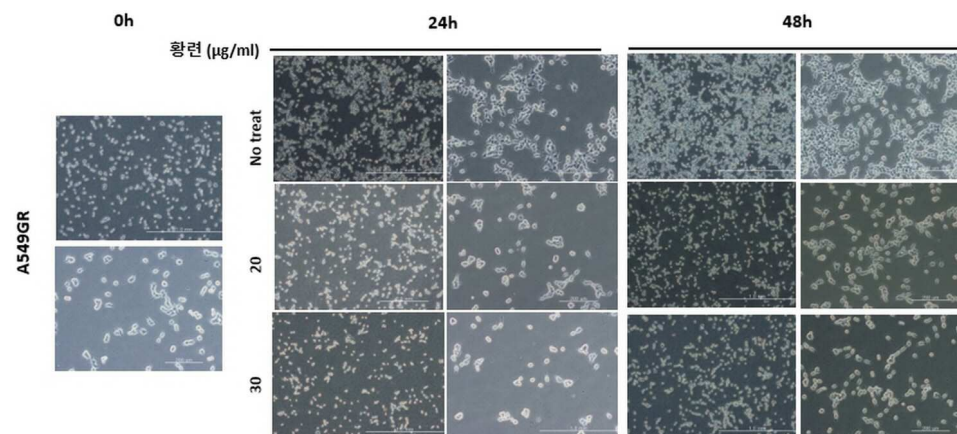
도면3



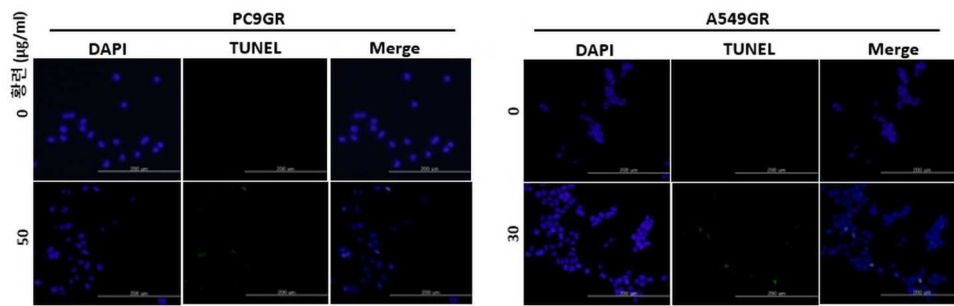
도면4a



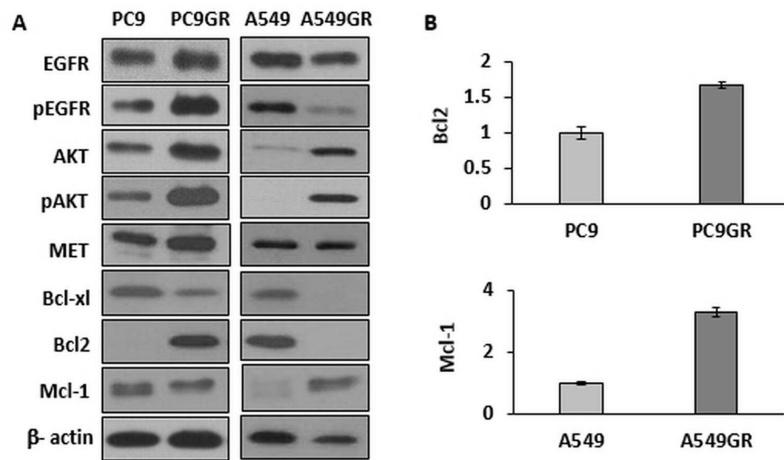
도면4b



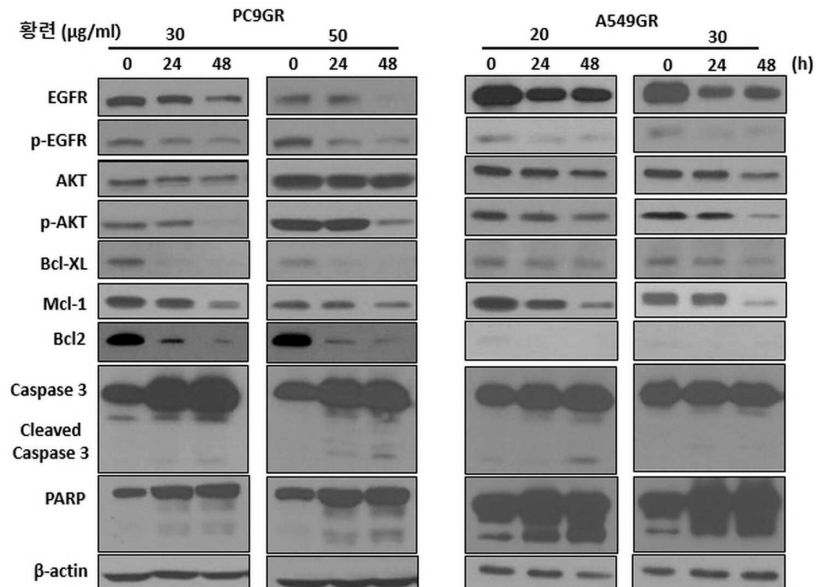
도면5



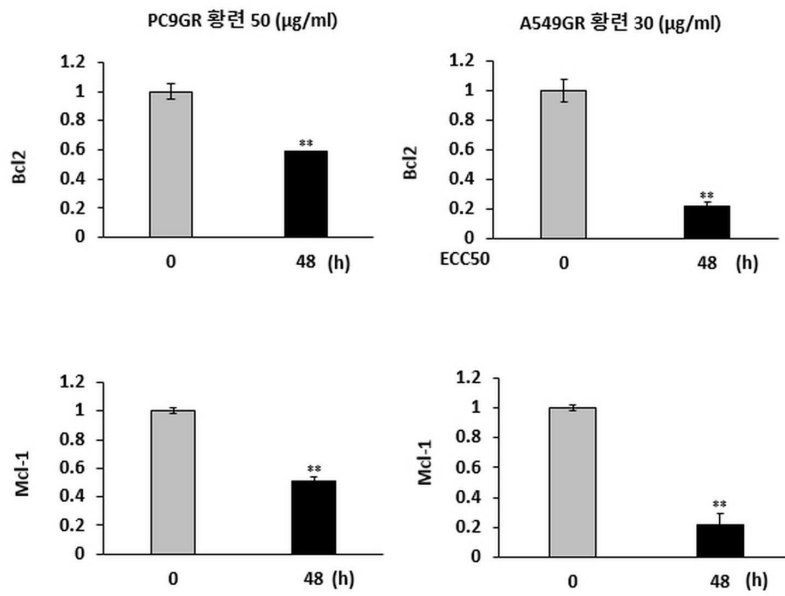
도면6



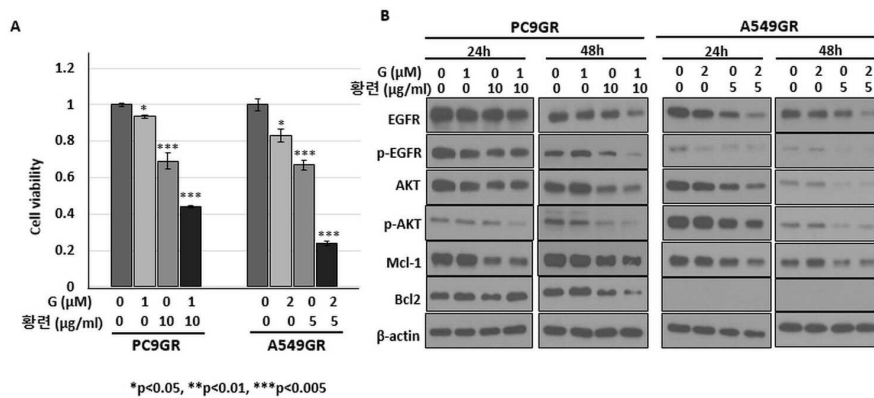
도면7a



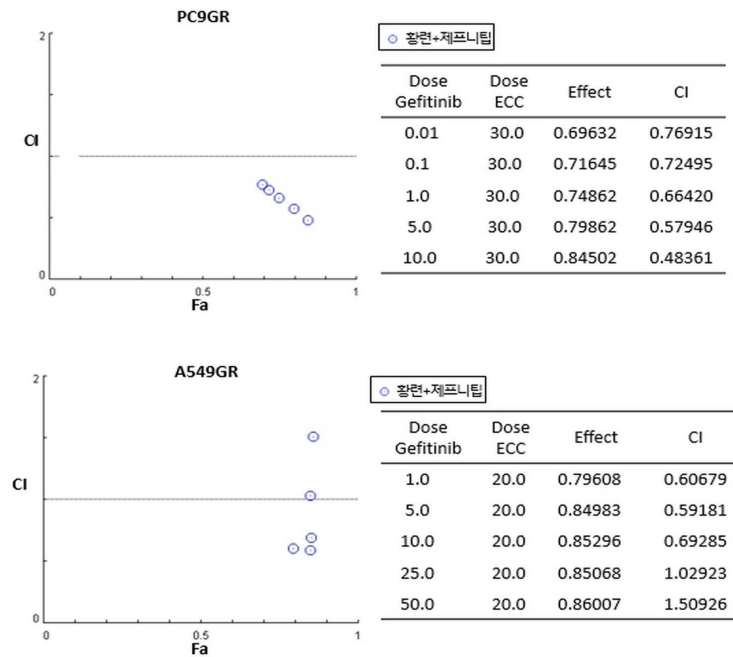
도면7b



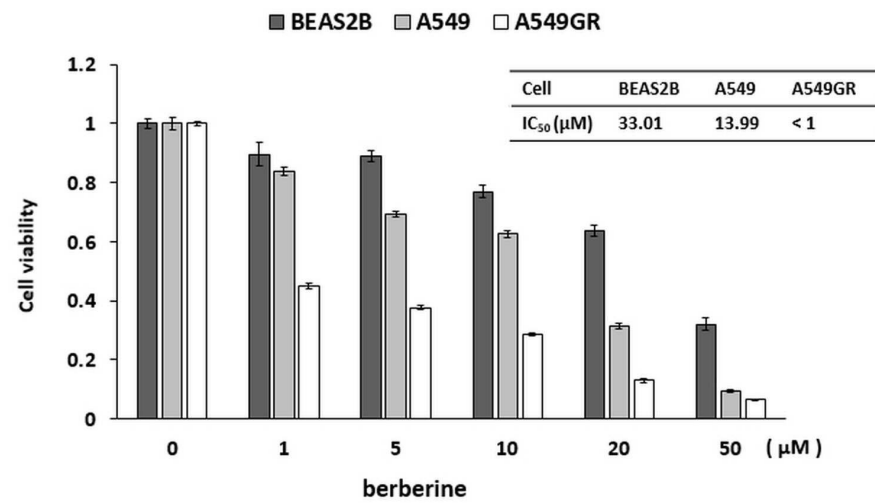
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for enhancing EGFR-TKI sensitivity for non small cell lung carcinoma including extract of Coptis chinensis
- <130> DHP17-425
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCL2 sense

<400> 1

aagggggaaa caccagaatc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCL2 antisense

<400> 2

atccttccca gaggaaaagc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCL-1 sense

<400> 3

tgctggagta ggagctgggtt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCL-1antisense

<400> 4

cctcttgcca cttgcttttc 20

<

210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense

<400> 5

gccatcgtca ccaactggga c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH antisense

<400> 6

cgatttcccg ctcggccgtg g

21