



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0122679
(43) 공개일자 2020년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/522 (2006.01) A61K 31/18 (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/522 (2013.01)
A61K 31/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0045667

(22) 출원일자 2019년04월18일

심사청구일자 2019년04월18일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이성진

경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22 한림대학교성심병원 내분비내과

김시형

경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22 한림대학교성심병원 내분비내과

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 10 항

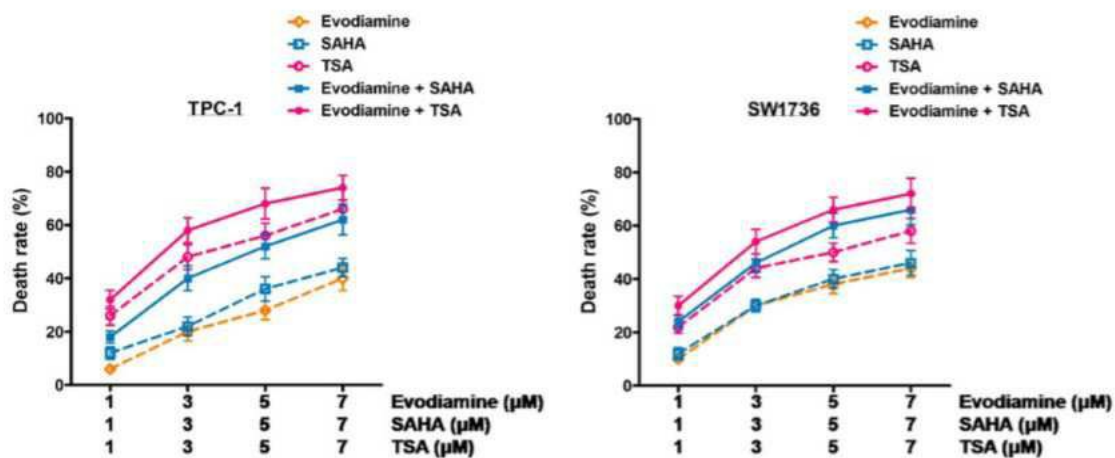
(54) 발명의 명칭 에보디아민과 히스톤 탈아세틸화효소 억제제를 포함하는 갑상선암 치료용 약학 조성물

(57) 요약

목적: 갑상선암 세포의 생존에 미치는 히스톤 탈아세틸화효소 억제제와 조합한 에보디아민의 영향을 확인하여 효과가 좋은 갑상선암 치료제를 제공하려는 것. 방법: 인간 갑상선암 세포 TPC-1 및 SW1736을 이용하였다. 결과: 에보디아민 및 PXD101의 조합 처리 후 세포 생존율, 생존 세포 비율과 Bcl2 단백질 수준이 감소했고, 세포 독성

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5a



활성, 아포토시스 세포의 비율 및 γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 절단된 PARP의 단백질 수준과 활성산소종 생산이 증가했다. 에보디아민과 PXD101을 함께 처리한 세포에서는 PXD101을 단독 처리한 세포에 비해 세포 생존율의 감소, 생존 세포 비율과 Bcl2 단백질 수준의 감소, 세포 독성 활성의 증가, 사멸 세포 비율의 증가가 유도되었다. γ H2AX의 단백질 수준 및 절단된 PARP, 활성산소종 생산이 증가했고 Bcl2/Bax 비율이 감소했다. 또한, 에보디아민과 PXD101의 조합 지수 값은 모두 1.0보다 낮았다. 결론: 본 발명의 결과는 에보디아민이 갑상선암 세포에서 생존 관련 단백질과 활성산소종을 조절함으로써 세포 독성을 유발하는 히스톤 탈아세틸화효소 억제제와 상승작용한다는 것을 보여준다. 또한, PI3K/Akt 신호의 억제는 갑상선암 세포에서 히스톤 탈아세틸화효소 억제제와 조합된 에보디아민의 세포 독성을 상승적으로 강화시킨다.

(52) CPC특허분류

A61K 33/243 (2019.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1D1A1B07044901
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	난치성 갑상선암의 새로운 치료모델 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

에보디아민 및 히스톤 탈아세틸화효소 억제제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 갑상선암은 고분화 갑상선암 및 미분화 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 갑상선암은 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 갑상선암은 방사성 요오드 (radioactive iodine) 치료에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

히스톤 탈아세틸화효소 억제제는 PXD101, SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) 및 TSA (trichostatin A) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

갑상선암에 효과를 나타내는 화학치료제를 더 포함함을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

화학치료제는 시스플라틴, 독소루비신 및 파클리탁셀 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

에보디아민 및 히스톤 탈아세틸화효소 억제제의 조합은 세포 생존율을 저하하고, 세포 독성 및 아포토시스를 증가시킴을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 9

에보디아민, 히스톤 탈아세틸화효소 억제제 및 PI3K (phosphoinositide-3 kinase) 억제제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

PI3K 억제제는 워트만닌임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에보디아민과 히스톤 탈아세틸화효소 억제제 (HDAC 억제제)를 포함하는 갑상선암 치료용 조성물에 관한 것으로서, 에보디아민은 생존 관련 단백질과 활성산소종에 관여하여 HDAC 억제제에 의한 세포 독성을 상승적으로 일으키고 PI3K/Akt 신호 억제가 에보디아민과 HDAC 억제제 사이의 상승 작용을 자극하여 갑상선암 세포에서 세포 독성을 유도함을 보여준다.

배경 기술

[0003] 여포세포 유래 갑상선암에서 갑상선 유두암 (papillary thyroid cancer; PTC)과 갑상선 여포암 (follicular thyroid cancer; FTC)을 포함한 고분화 갑상선암 (well differentiated thyroid cancer; WDTC)은 대개 예후가 좋으나, 전이성 병변 환자의 2/3에서 방사성 요오드 (radioactive iodine; RAI) 치료 효과가 없거나 미미하다 [1-3]. 역형성 갑상선암 (anaplastic thyroid cancer; ATC)을 포함하는 미분화 갑상선암 (undifferentiated thyroid cancer; UDTC)은 국소 침범, 갑상선 주변조직 침윤, 원격 전이 및 빠른 진행으로 치명적인 예후를 보인다 [1-3]. RAI 치료 저항성 WDTC 및 UDTC 환자는 고식적 치료에 거의 반응하지 않기 때문에 암세포에 대한 치료 효능을 향상시키는 새로운 패러다임이 필요하다 [1-3].

[0004] 에보디아민 (Evodiamine)은 오수유 (Wu-Zhu-Yu)라고도 불리는 에보디아 루테카르파 (Evodia rutaecarpa)에서 분리된 천연 인돌 알칼로이드이며, 다양한 생물학적 활성 스펙트럼을 지닌 다중 표적 화합물이다 [4]. 에보디아민은 전통적으로 복통, 구토, 설사, 두통 및 출산 후 출혈 치료에 사용되어 왔다 [4]. 에보디아민은 체온 조절, 통각, 염증, 심혈관 질환, 전염성 질환 및 알츠하이머 병에 유익한 활성을 나타내며 다양한 암세포에서 항암 효과를 발휘한다 [4, 5]. 항분열촉진 (antimitogenic) 활성에 대한 기작 중 하나로서, 암세포에서 에보디아민은 Bcl2 계열 단백질인 인산화 히스톤 H2A.X (γ H2AX)와 아세틸 히스톤 H3과 같은 생존 관련 단백질과 활성산소종의 조절을 통해, 그리고 PI3K/Akt 신호 전달을 포함한 다중 신호전달경로의 조절을 통해 세포 사멸을 일으킨다고 제안되었다 [6-14]. 화학치료제와 조합된 에보디아민의 효과 면에서, 에보디아민은 화학치료제 저항성 유방암 및 난소암 모델에서 유익한 효과를 발휘한다 [15-17]. 이와 관련하여 본 발명자들은 최근 갑상선암 세포에서 에보디아민 단독 또는 화학치료제와 병합 투여 시 생존 관련 단백질과 PI3K/Akt 신호 전달을 조절함으로써 세포 독성이 나타남을 보고한 바 있다 [18].

[0005] PXD101, SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), TSA (trichostatin A)와 같은 HDAC (Histone deacetylase) 억제제는 암세포에서 DNA 손상 반응을 활성화시키며, 활성산소종 및 PI3K/Akt 신호 조절을 통해 세포 생존에 부정적인 영향을 미친다 [19-23]. 갑상선암 세포에서 pan-HDAC 억제제인 PXD101 (belinostat)은 단일 및 복합 요법으로 PI3K/Akt 신호 전달의 억제를 통해 항암 작용을 나타낸다 [21-23]. 또한, SAHA는 단독으로 또는 화학치료제와 병용하여 세포 독성 활성을 유도하고, 비타민 D 유사체의 항증식 활성을 증가시킨다 [24, 25]. 또한,

TSA는 요오드 이용과 관련된 갑상선 특이적 유전자의 발현을 증가시킨다 [26]. 이와 관련하여 본 발명자들의 이전 연구에 따르면 ATC 세포에서 HDAC 억제제는 열 충격 단백질 90 (hsp90) 억제제와 함께 세포 독성을 유도함에 있어서 시너지 효과를 보였다 [22, 23].

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) M. Molina-Vega et al., Endocrine 59, 395-401(2018)
- (비특허문헌 0002) B.R. Haugen et al., Thyroid 26, 1-133(2016)
- (비특허문헌 0003) R.C. Smallridge et al., Thyroid 22, 1104-1139(2012)
- (비특허문헌 0004) H. Yu et al., Molecules 18, 1826-1843(2013)
- (비특허문헌 0005) J. Jiang, C. Hu, Molecules 14, 1852-1859(2009)
- (비특허문헌 0006) Y. Takada et al., J. Biol. Chem. 280, 17203-17212(2005)
- (비특허문헌 0007) C. Wang et al., Toxicol. In Vitro 24, 898-904(2010)
- (비특허문헌 0008) F. Yang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 485, 54-61(2017)
- (비특허문헌 0009) M.C. Chen et al., J. Cell. Biochem. 110, 1495-1503(2010)
- (비특허문헌 0010) C.C. Chien et al., PLoS One 9, e99729(2014)
- (비특허문헌 0011) C. Fang et al., PLoS One 9, e115204(2014)
- (비특허문헌 0012) L. Lin et al., Mol. Med. Rep. 14, 2832-2838(2016)
- (비특허문헌 0013) Z.J. Meng et al., Oncol. Rep. 34, 1388-1396(2015)
- (비특허문헌 0014) W.T. Wei et al., Int. J. Biol. Sci. 8, 1-14(2012)
- (비특허문헌 0015) S. Wang et al., PLoS One 9, e97512(2014)
- (비특허문헌 0016) C.H. Liao et al., Carcinogenesis 26, 968-975(2005)
- (비특허문헌 0017) Z.F. Zhong et al., Sci. Rep. 5, 16415(2015)
- (비특허문헌 0018) S.H. Kim et al., Anticancer Res. 38, 6339-6352(2018)
- (비특허문헌 0019) P.A. Marks et al., Expert Opin. Investig. Drugs 14, 1497-1511(2005)
- (비특허문헌 0020) C. Robert et al., Adv. Cancer Res. 116, 87-129(2012)
- (비특허문헌 0021) S.F. Lin et al., PLoS One 8, e77684(2013)
- (비특허문헌 0022) S.H. Kim et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 100, E253-E261(2015)
- (비특허문헌 0023) S.H. Kim et al., Endocrine 51, 274-282(2016)
- (비특허문헌 0024) Q.T. Luong et al., Clin. Cancer Res. 12, 5570-5577(2006)
- (비특허문헌 0025) I. Clinckspoor et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 124, 1-9(2011)
- (비특허문헌 0026) R. Zarnegar et al., Surgery 132, 984-990(2002)
- (비특허문헌 0027) S. He et al., ACS Med. Chem. Lett. 6, 239-243(2015)
- (비특허문헌 0028) Y.L. Li et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 498, 481-486(2018)
- (비특허문헌 0029) M. Xing, Thyroid 20, 697-706(2010)
- (비특허문헌 0030) S.H. Kim et al., Anticancer Res. 34, 4829-4837(2014)

- (비특허문헌 0031) S.H. Kim et al., Endocrine 48, 886-893(2015)
- (비특허문헌 0032) S.H. Kim et al., Biomed. Pharmacother. 83, 22-32(2016)
- (비특허문헌 0033) S.H. Kim et al., Endocrine 59, 383-394(2018)
- (비특허문헌 0034) S.H. Kim et al., J. Endocrinol. Invest. 41, 677-689(2018)
- (비특허문헌 0035) Y.J. Kim et al., Anticancer Res. 38, 3515-3525(2018)
- (비특허문헌 0036) S.H. Kim et al., J. Endocrinol. Invest. 36, 1099-1104(2013)
- (비특허문헌 0037) S.H. Kim et al., Horm. Metab. Res. 45, 408-414(2013)
- (비특허문헌 0038) S.H. Kim et al., Anticancer Res. 35, 6529-6537(2015)
- (비특허문헌 0039) S. Cory et al., Nat. Rev. Cancer 2, 647-656(2002)
- (비특허문헌 0040) S. Cory et al., Cancer Cell 8, 5-6(2005)
- (비특허문헌 0041) R.E. Schweppe et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 4331-4341(2008)
- (비특허문헌 0042) Z. Lv et al., Int. J. Clin. Exp. Med. 9, 15216-15225(2016)
- (비특허문헌 0043) J.R. Testa et al., Oncogene 24, 7391-7393(2005)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 HDAC 억제제와 조합한 에보디아민이 갑상선암 세포의 생존에 미치는 영향을 평가하고 좀 더 효과적인 갑상선암 치료제를 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 위와 같은 과제를 해결하기 위하여 실험한 결과, 에보디아민은 생존 관련 단백질과 활성산소종에 관여하여 HDAC 억제제에 의한 세포 독성을 상승적으로 일으키고 PI3K/Akt 신호 억제가 에보디아민과 HDAC 억제제 사이의 상승 작용을 자극하여 갑상선암 세포에 세포 독성을 유도함을 보여준다.
- [0011] 본 발명은 갑상선암 세포에서 HDAC 억제제인 PXD101, SAHA 및 TSA와 병용 투여된 에보디아민이 Bcl2 계열 단백질, DNA 손상 반응 단백질 및 활성산소종 생산의 조절을 통해 세포 사멸에서 상승 효과를 일으키고, Akt의 불활성화가 병합 처리에 의한 세포 사멸을 좀 더 증가시키는 것을 밝혔다.
- [0012] 에보디아민은 호르몬에 민감한 유방암과 전립선암 세포를 포함한 다양한 암세포에서 항종양 효과를 나타낸다 [5]. 한편, Bcl2 계열의 단백질은 세포 수준에서 생존과 같은 항상성 (homeostasis)에 중요한 기능을 수행한다 [39]. 이와 관련하여 Bcl2/Bax 스위치라 불리는 친생존 단백질 Bcl2와 항생존 단백질 Bax 발현의 상대량은 암세포의 생존과 관련이 있다 [40]. 에보디아민이 Bcl2 계열 단백질을 비롯한 생존 관련 단백질에 미치는 영향과 관련하여 암세포에서 에보디아민은 Bcl2, Bcl-xL, 서바이빈 (survivin), 아포토시스 단백질 저해제 및 사이클로옥시제네이스-2를 억제함으로써 세포 사멸을 유도한다 [6]. 또한, 에보디아민은 흑색종 및 간암 세포에서 Bcl2 계열 단백질의 매개와 Bcl2/Bax 비율의 조작을 통하여 세포 사멸을 초래한다 [7, 8]. 앞서 에보디아민이 ATC 세포로 여겨지던 ARO 세포의 생존과 증식을 억제하였다는 보고가 있었으나, 나중에 이 세포는 대장암 세포로 확인되었다 [9, 41]. 최근 에보디아민은 K1 PTC 세포에서 Bcl-2, Bcl-xL, 절단된 캐스페이즈-3, 절단된 캐스페이즈-9 및 PARP의 과발현, Bax, 프로캐스페이즈-3, 프로캐스페이즈-9, 프로캐스페이즈-PARP, PI3K 및 인산화 Akt의 저발현을 통해 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다 [42]. 본 발명자들의 최근 연구에서 에보디아민은 단독 또는 화학치료제와 조합 투여 시 PTC 및 ATC 세포에서 Bcl2 계열 단백질을 비롯한 생존 관련 단백질의 조절을 통해 세포 분열 억제 및 세포 독성을 일으켰다 [18].
- [0013] PXD101, SAHA 및 TSA와 같은 HDAC 억제제는 핵 히스톤 단백질의 탈아세틸화를 억제하고 DNA 손상 반응을 자극하

여 약리 작용을 나타낸다 [19, 20]. 갑상선암 세포에 대한 HDAC 억제제의 단독 또는 조합 효과와 관련하여, PXD101 단독 또는 독소루비신 및 파클리탁셀과의 조합은 ATC 세포의 생존 및 성장을 억제한다 [21]. 또한, SAHA 단독 또는 독소루비신, 파클리탁셀 및 파라플라틴 (paraplatin)과의 조합 처리는 PTC 및 ATC 세포의 생존 및 성장을 억제하며 SAHA는 ATC 세포에서 비타민 D 유사체의 항증식 활성을 촉진한다 [24, 25]. TSA는 PTC, FTC 및 Hurtle 암종 세포에서 나트륨/요오드 수송체 및 펜드린의 mRNA 발현을 증가시켜서 RAI 치료에 대한 반응을 유도한다 [26]. 본 발명자들의 종래 연구에서, hsp90 억제제 NVP-AUY922와 조합한 PXD101은 세포 독성을 상승적으로 유도하였고, PXD101, SAHA 및 TSA는 ATC 세포에서 hsp90 억제제 SNX5422와 세포 독성에 대한 상승 작용을 보였다 [22, 23]. 에보디아민과 HDAC 억제제의 조합 효과에 있어서, 에보디아민 유도체와 SAHA로 구성된 하이브리드 분자는 일정 범위의 암세포에서 세포 사멸 및 항증식 작용을 나타낸다 [27]. 에보디아민은 저산소 상태의 간암 세포에서 HIF-1 α 의 불활성화를 통해 SAHA에 의한 세포 사멸을 증가시키는 것으로 보고되었지만 [28], HDAC 억제제와 조합한 에보디아민이 갑상선암 세포의 생존에 미치는 영향은 밝혀지지 않았다.

[0014] 본 발명에서 발명자들은 각각 PTC와 ATC 세포로 인증된 TPC-1과 SW1736 세포를 사용했다 [41]. 에보디아민, PXD101, SAHA 및 TSA 처리 결과 세포 생존율 및 생존 세포의 비율이 감소하였고, 세포 독성 활성 및 아포토시스 세포의 비율이 증가하였다. PXD101, SAHA 또는 TSA 단독 처리와 비교하여 에보디아민과 PXD101, SAHA 또는 TSA를 함께 처리한 세포에서 세포 생존율 및 생존 세포의 비율 감소뿐만 아니라 세포 독성 활성과 아포토시스 세포의 비율 증가가 현저하게 나타났다. 에보디아민과 PXD101, SAHA 또는 TSA의 병합 투여 시, 조합 분석에서 세포 사멸율의 CI 값은 모두 1.0보다 낮았고, 이는 조합 처리의 시너지 효과를 의미한다. 에보디아민, PXD101, SAHA 및 TSA는 Bcl2 단백질 수준을 감소시키는 반면 Bax 단백질 수준은 변화시키지 않아서 Bcl2/Bax 비율을 감소시켰다. 또한, PXD101, SAHA 또는 TSA 단독 투여에 비해 PXD101, SAHA 또는 TSA와 병합 투여된 에보디아민은 Bcl2/Bax 비율을 감소시켰다. 이러한 결과는 갑상선암 세포에서 에보디아민이 PXD101, SAHA 및 TSA에 의해 유도된 세포 사멸을 상승시키고 동시에 Bcl2/Bax 비율을 감소시키는 것을 보여준다. 또한, 이러한 결과는 갑상선암 세포에 대한 세포 독성을 유도하는 데 있어서 에보디아민과 HDAC 억제제 사이의 상승 작용이 Bcl2 계열 단백질의 조절과 관련이 있음을 시사한다. 종합하면, HDAC 억제제와 병용되는 에보디아민은 표준 치료법에 반응하지 않는 갑상선암에 대한 효과적인 치료제가 될 수 있다.

[0015] 에보디아민은 갑상선암 세포에서 γ H2AX 단백질 수준을 증가시키며 대장암 및 폐암 세포에서 산화 스트레스를 통해 세포 사멸을 유도한다 [10-12, 18]. 한편, HDAC 억제제는 암세포에서 DNA 손상 반응과 산화 스트레스를 강화시켜 세포 사멸을 초래한다 [19-21]. 본 발명자들의 선행 연구에서, PXD101은 ATC 세포에서 DNA 손상 관련 단백질의 활성화와 함께 hsp90 억제제에 의해 유발된 세포 독성 활성을 상승적으로 증가시켰다 [22, 23]. 본 발명에서는 에보디아민과 PXD101을 함께 처리하였을 때, γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 절단된 PARP의 단백질 수준이 증가하였다. 에보디아민과 PXD101을 함께 처리한 세포에서는 PXD101을 단독 처리한 세포에 비해 γ H2AX와 절단된 PARP의 단백질 수준이 증가하였던 반면, 아세틸 히스톤 H3 단백질 수준은 변화하지 않았고, 이러한 변화는 에보디아민과 SAHA 또는 TSA를 함께 처리한 세포에서도 유사하였다. 에보디아민, PXD101, SAHA 및 TSA를 처리하였을 때 활성산소종 생산량이 증가했으며 PXD101, SAHA 또는 TSA 단독 투여에 비해 에보디아민 및 PXD101, SAHA 또는 TSA 병합 투여 시 활성산소종 생산량이 증가했다. 이러한 결과는 갑상선암 세포에서 에보디아민, PXD101, SAHA 및 TSA가 γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 활성산소종의 개입을 통하여 세포 사멸을 일으킨다는 것을 나타낸다. 또한, 이는 갑상선암 세포에서 DNA 손상 반응과 산화 스트레스가 세포 독성을 유도하는데 있어서 에보디아민과 HDAC 억제제 병합 투여의 상승 작용에 대한 주요 기작일 수 있음을 의미한다.

[0016] PI3K/Akt 신호 전달은 정상 세포에서 생존을 위한 세포 내 과정을 조절한다 [43]. 본 발명자들의 이전 연구에서 비정상적인 PI3K/Akt 신호 전달은 갑상선 여포세포의 종양 형성에 관여하고 갑상선암 세포의 생존에 필수적이라는 것이 밝혀졌다 [18, 22, 23, 29-38]. 에보디아민-유도 세포 독성에서 PI3K/Akt 신호 전달의 역할과 관련하여, 에보디아민은 간암 세포 및 골육종 세포에서 PI3K/Akt 신호 전달의 불활성화를 통해 세포 생존 및 증식을 억제한다 [8, 13]. 또한, 젬시타빈 (gemcitabine)과 조합된 에보디아민은 췌장암 모델에서 PI3K/Akt 신호 전달을 억제함으로써 치료 효과를 증가시킨다 [14]. 본 발명자들의 최근 연구에서 에보디아민은 Akt의 인산화를 방해하여 갑상선암 세포에서 세포 독성을 유도했다 [18]. HDAC 억제제에 의해 유발된 세포 독성에서 PI3K/Akt 신호 전달의 역할과 관련하여, PXD101은 PI3K/Akt 신호 전달을 억제하고 갑상선암 세포의 사멸을 유도한다 [21-23]. 본 발명자들의 이전 연구에서 hsp90 억제제와 결합된 HDAC 억제제는 갑상선암 세포에서 PI3K/Akt 신호 전달의 억제를 통해 상승적인 세포 독성을 나타냈다 [22, 23].

[0017] 본 발명에서 에보디아민과 PXD101은 총 Akt 단백질 수준의 변화 없이 인산화 Akt 단백질 수준을 감소시켰다. 또한, PXD101 단일 처리와 비교하여 에보디아민과 PXD101 동시 처리 시 총 및 인산화 Akt 단백질 수준에는 변화가

없었다. 에보디아민과 PXD101을 함께 처리한 세포에서 PI3K 억제제인 워트만닌은 세포 생존율과 생존 세포의 비율을 감소시켰고, 세포 독성 활성화와 아포토시스 세포의 비율을 증가시켰으며, 활성산소종 생산에는 변화가 없었다. 이러한 결과는 갑상선암 세포에서 에보디아민과 PXD101을 조합하였을 때 Akt의 억제가 세포 사멸을 증가시킨다는 것을 뒷받침한다. 또한, 이러한 결과는 갑상선암 세포에서 PI3K/Akt 신호 전달의 불활성화가 PXD101과 조합된 에보디아민의 세포 독성을 상승적으로 촉진시킨다는 것을 의미한다. 갑상선암 세포에서 Akt 억제제가 다양한 약제의 세포 독성을 강화시킨다는 이전의 연구들을 고려할 때, 이러한 결과는 Akt의 억제가 에보디아민과 HDAC 억제제 사이의 상승 작용을 자극하여 갑상선암 세포의 세포 독성을 더욱 증폭시킨다는 것을 의미한다 [36-38].

- [0018] 결론적으로 본 발명의 결과는 에보디아민이 갑상선암 세포에서 생존 관련 단백질과 활성산소종의 관여를 통해 세포 독성을 유도하며 HDAC 억제제와 상승 작용을 일으킴을 시사한다. 또한, 갑상선암 세포에서 PI3K/Akt 신호 전달의 억제는 HDAC 억제제와 조합한 에보디아민의 상승적인 세포 독성을 강화한다. 본 발명은 기존의 치료법에 저항성이 있는 갑상선암 환자에서 HDAC 억제제와 조합된 에보디아민이 매력적인 처방이 될 가능성을 제시하고 있다.
- [0020] 본 발명은 에보디아민 및 히스톤 탈아세틸화효소 억제제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 고분화 갑상선암 및 미분화 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 방사성 요오드 (radioactive iodine) 치료에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 히스톤 탈아세틸화효소 억제제가 PXD101, SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) 및 TSA (trichostatin A) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 갑상선암에 효과를 나타내는 화학치료제를 더 포함함을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 화학치료제가 시스플라틴, 독소루비신 및 파클리탁셀 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 에보디아민 및 히스톤 탈아세틸화효소 억제제의 조합이 세포 생존율을 저하하고, 세포 독성 및 아포토시스를 증가시킴을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 에보디아민, 히스톤 탈아세틸화효소 억제제 및 PI3K (phosphoinositide-3 kinase) 억제제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 PI3K 억제제가 워트만닌임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 에보디아민과 히스톤 탈아세틸화효소 억제제 조합 또는 에보디아민, 히스톤 탈아세틸화효소 억제제 및 화학치료제의 조합을 유효성분으로 함유하는 갑상선 미분화암 치료제 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0031] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하 또

는 복강 내 투여할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따르면, 에보디아민은 HDAC 억제제와 조합하여 갑상선암 세포에서 생존 관련 단백질과 활성산소종의 관여를 통해 세포 독성을 유도함으로써 갑상선암 치료제로 유용하다. 이 치료제는 기존 치료법에 저항을 나타내는 갑상선암 환자에게 더욱 유용할 것으로 예상된다.

[0034] 또한, 본 발명에 따르면, 갑상선암 세포에서 PI3K/Akt 억제제는 HDAC 억제제와 조합한 에보디아민의 상승적인 세포 독성을 강화하므로, 에보디아민과 HDAC 억제제 및 PI3K/Akt 억제제를 포함하는 조성물은 갑상선암 치료제로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 갑상선암 세포의 생존에 대하여 PXD101과 조합한 에보디아민의 영향을 나타낸다. a, b) TPC-1과 SW1736 세포를 에보디아민과 PXD101 각각 1, 3, 5 및 7 μ M로 24시간 동안 동시에 처리하였다. 세포 생존율은 CCK-8 분석법을 사용하여 측정하였고, 사멸율은 100 - 세포 생존율 (%)로 계산하였다. 조합지수(CI)와 아이소볼로그그램을 얻었다. CI = 1.0에서 수평 점선이 그려진다. c-g) TPC-1 및 SW1736 세포를 에보디아민 및 PXD101 5 μ M에서 24시간 동안 처리한 후, 세포 생존율, 생존 세포의 백분율, 세포 독성 활성 및 아포토시스 세포의 백분율을 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. *p<0.05는 각각 대응된 대조군과 비교한 값. †p<0.05는 PXD101을 단독 처리한 세포와 비교한 값이다.

도 2는 갑상선암 세포에서 생존 관련 단백질의 발현에 대한 PXD101과 병용 투여된 에보디아민의 영향을 나타낸다. a, b) TPC-1과 SW1736 세포를 에보디아민과 PXD101 5 μ M로 24시간 처리한 후 Bcl2, Bax, γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 절단된 PARP의 단백질 수준을 측정하였다. Bcl2와 Bax의 단백질 수준은 농도계로 정량하였고, Bcl2/Bax 비율을 계산하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 각 점은 독립적인 실험을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. *p<0.05는 각각 대응된 대조군과 비교한 값. †p<0.05는 PXD101을 단독 처리한 세포와 비교한 값이다.

도 3은 갑상선암 세포에서 에보디아민과 PXD101의 병용과 활성산소종 생산의 관계를 나타낸다. TPC-1과 SW1736 세포를 에보디아민과 PXD101 5 μ M로 24시간 처리한 후 활성산소종 생성을 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. *p<0.05는 각각 대응된 대조군과 비교한 값. †p<0.05는 PXD101을 단독 처리한 세포와 비교한 값이다.

도 4는 갑상선암 세포에서 에보디아민과 PXD101을 조합하였을 때 PI3K(phosphoinositide-3 kinase)/Akt 신호 전달의 역할을 나타낸다. a) TPC-1 및 SW1736 세포를 1, 3 및 5 μ M의 에보디아민 또는 PXD101로 24시간 처리한 후, 총 및 인산화 Akt 단백질 수준을 측정하였다. b) TPC-1 및 SW1736 세포를 5 μ M의 에보디아민 및 PXD101로 24시간 처리한 후, 총 및 인산화 Akt 단백질 수준을 측정하였다. c-g) TPC-1과 SW1736 세포를 에보디아민과 PXD101 5 μ M로 24시간 함께 처리하기 전 24시간 동안 PI3K 억제제인 워트만닌 1.5 μ M을 처리하였고, 세포 생존율, 생존 세포의 비율, 세포 독성 활성, 아포토시스 세포의 비율 및 활성산소종 생산을 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 각 점은 독립적인 실험을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. *p<0.05는 PXD101을 단독 처리한 세포와 비교한 값, †p<0.05는 PXD101 및 에보디아민을 함께 처리한 세포와 비교한 값이다.

도 5는 갑상선암 세포의 생존에 미치는 SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) 및 TSA (trichostatin A)와 에보디아민 병합 효과를 나타낸다. a) TPC-1 및 SW1736 세포를 에보디아민과 SAHA 또는 TSA 1, 3, 5 및 7 μ M로 24시간 동안 함께 처리하였다. 세포 생존율은 CCK-8 분석법을 사용하여 측정하였고, 사멸율은 100 - 세포 생존율 (%)로 계산하였다. 조합지수 (CI)와 아이소볼로그그램을 얻었다. CI = 1.0에서 수평의 점선이 그려진다. b-f) TPC-1 및 SW1736 세포를 에보디아민과 SAHA 또는 TSA 5 μ M로 24시간 동안 처리한 후, 세포 생존율, 생존 세포의 백분율, 세포 독성 활성, 아포토시스 세포의 백분율 및 활성산소종 생성을 측정하였다. g, h) TPC-1과

SW1736 세포를 에보디아민과 SAHA 또는 TSA 5 μ M로 24시간 동안 처리한 후, Bcl2, Bax, 아세틸 히스톤 H3 및 절단 PARP의 단백질 수준을 측정하였다. Bcl2와 Bax의 단백질 수준은 농도계로 정량하였고, Bcl2/Bax 비율을 계산하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 각 점은 독립적인 실험을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. * $p < 0.05$ 는 각각 대응된 대조군과 비교한 값. † $p < 0.05$ 는 SAHA 또는 TSA를 단독 처리한 세포와 비교한 값이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0039] 시약

[0040] RPMI1640, 우태혈청 (fetal bovine serum; FBS), L-글루타민 그리고 스트렙토마이신/페니실린은 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 에보디아민, HDAC 억제제들인 PXD101, SAHA 및 TSA는 BioVision (Linda, CA, USA)에서 구입하여 DMSO (dimethylsulfoxide)에 용해하여 사용하였고, DMSO는 허용 농도 내에서 대조군에게 제공되었다. 대조군의 DMSO 최종 농도는 모든 실험에서 0.1%를 넘지 않았다. Bcl2, Bax, γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 절단 PARP에 대한 일차 항체는 Cell Signaling Biotechnology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 총 및 인산화-Akt (Ser473)에 대한 일차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, β -액틴에 대한 일차 항체는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 다른 모든 시약은 달리 명시하지 않는 한 Sigma에서 구입하였다.

[0042] 세포 배양

[0043] 실험을 위해 박영주 교수 (서울대학교 의과대학 내분비대사내과)로부터 TPC-1 인간 갑상선 유두암 세포를 얻었고, 10% 열처리 불활성화 FBS와 1% 스트렙토마이신/페니실린이 첨가된 RPMI1640에서 배양시켰다. SW1736 인간 역형성 갑상선암 세포를 Cell Lines Service (CLS GmbH, Eppelheim, Germany)에서 구입하여 2 mM L-글루타민, 10% 열처리 불활성화 FBS와 1% 스트렙토마이신/페니실린이 첨가된 RPMI1640에서 배양시켰다. 일정한 시간 간격으로 신선한 배지를 세포에 보충하였다. 처리 및 실험은 70% 용적률 상태에서 수행하였다.

[0045] CCK-8 분석

[0046] 세포 생존율은 CCK-8 분석 키트 (Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan)로 측정하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세포 (5×10^3 /100 μ l)를 밤새 배양한 후, 37°C에서 추가로 4시간 동안 작용제로 처리하였다. 흡광도는 Glomax™ Discover System GM3000 (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0048] 다중 세포 독성 분석

[0049] 세포 (5×10^3 /100 μ l)를 96-웰 플레이트에 접종하고, 제조사의 프로토콜에 따라 처리한 후 Multitox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay Kit (Promega)의 시약을 세포에 첨가하였다. 형광값 및 발광값은 Glomax™ Discover System GM3000 (Promega)을 사용하여 측정하였다. 생존율은 생존세포/사멸세포 비율로 계산하였고, 비처리 세포에 대한 백분율로 나타내었다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0051] 세포 독성 분석

[0052] 세포 독성은 LDH 세포독성 분석 키트 (BioVision, Linda, CA, USA)로 측정 하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세포 (5×10^3 /100 μ l)를 배양한 후, 250 g로 10분 동안 원심분리하였다. 100 μ l의 상청액을 투명한 96-웰 플레이트에 옮겼다. 반응 혼합물 (2.5 μ l 촉매 용액이 함유된 112.5 μ l 염료 용액)을 첨가한 후, 세포를 상

온에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도는 Glomax™ Discover System GM3000 (Promega)을 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0054] FACS 분석

[0055] 아포토시스 세포를 Annexin V-FITC 아포토시스 검출 키트 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)로 분석하였다. 6-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세포 (1×10^5 /ml)를 배양, 수확한 후, 제조사의 프로토콜에 따라 고정시켰다. FITC 아넥신 (annexin) V 및/또는 프로피디움 요오드화물 (propidium iodide; PI)이 든 $1 \times$ 결합 완충액을 실온에서 15분간 첨가한 후 CytoFLEX™ Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) 및 CytExpert 소프트웨어 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0057] 활성산소종 생성 측정

[0058] 활성산소종 생성은 ROS-Glo™ H₂O₂ Assay Kit (Promega)로 측정하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰 내에 세포 (1×10^4 /ml)를 배양하였고, H₂O₂ 기질 용액 (25 μ M/well)으로 처리한 후, 37℃에서 배양하였다. ROS-Glo™ 탐지 용액 (100 μ l/well)을 추가한 후, 상온에서 20분 동안 배양하였다. 흡광도는 Glomax™ Discover System GM3000 (Promega)로 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0060] 웨스턴 블롯팅

[0061] 전체 단백질은 $1 \times$ 단백질 분해효소 저해제 각테일과 $1 \times$ 포스파타제 저해제 각테일 세트 V (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 함유한 RIPA 완충액 (Sigma)으로 추출하였다. 웨스턴 블롯팅은 특이적 1차 항체와 퍼옥시다아제-결합 항-토끼 또는 항-마우스 2차 항체를 사용하여 수행하였다. ECL Plus Western Blotting Detection System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 밴드를 검출하였다. 단백질 수준은 ImageJ 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 정량하였고 β -액틴 단백질 수준으로 보정하였다. β -액틴 단백질 수준에 대한 단백질의 상대적 수준을 구하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0063] 약물 조합 분석

[0064] CalcuSyn 프로그램 버전 2.11 (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK)을 이용하여 조합 지수 (Combination index; CI) 및 아이소볼로그래 (isobologram)를 계산하였고, 약물 상호 작용의 영향을 정량적으로 분석하였다. 1.0 미만, 1.0 및 1.0 초과 CI 값은 각각 시너지 효과, 가산성 및 길항 효과를 나타낸다. 아이소볼로그래는 x 축과 y 축에 50% 억제 (ED₅₀)에 필요한 각 약제의 용량을 표시하고 점들을 연결하여 ED₅₀ 아이소볼로그래 선을 그린다. 선분 상, 아래 및 위의 조합 데이터 점은 각각 가산성, 시너지 효과 및 길항 효과를 나타낸다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0066] 통계 분석

[0067] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차 (S.E)로 표현되었다. 자료는 unpaired Student's t-test 또는 ANOVA로 적절하게 분석하였다. 0.05 미만의 p 값은 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다. 모든 분석은 SPSS 프로그램 버전 24.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0069] 결과 1: 에보디아민은 갑상선암 세포에서 PXD101과 함께 상승적인 세포 독성을 나타낸다.

[0070] TPC-1과 SW1736 세포에서 HDAC 억제제 PXD101과 조합한 에보디아민의 영향을 조사하기 위해 에보디아민과 PXD101을 함께 처리한 후 Chou-Talalay 방정식을 사용하여 CI를 얻음으로써 상호 작용을 해석하였다. 이때 CI <

1.0은 시너지 효과, CI = 1.0은 가산성, CI > 1.0은 길항 효과를 나타낸다 (도 1a, 1b, 표 1). 세포 생존율은 CCK-8 분석법을 이용하여 측정하였고, 사멸율은 100 - 세포 생존율 (%)로 계산하였다. 조합 처리 시, 모든 CI 값이 1.0보다 낮았고, 조합 데이터 점들은 ED₅₀에서 아이소볼로그그램 선 아래에 위치하였다. 이는 에보디아민을 PXD101과 조합하였을 때 감상선암 세포의 사멸을 유도함에 있어서 상승효과를 나타냄을 의미한다.

[0071] 다음으로, 세포 독성을 유도함에 있어서 에보디아민과 PXD101의 상승 작용을 더 확인하기 위해 세포를 에보디아민과 PXD101 5 μ M로 24시간 동안 처리한 후 다중 세포 독성 분석법을 이용하여 생존 세포의 비율 (도 1c, 1d), 세포 독성 분석법을 이용하여 세포 독성 활성 (도 1e), 그리고 FACS 분석을 이용하여 아포토시스 세포의 백분율 (도 1f, 1g)을 측정하였다. 에보디아민 또는 PXD101을 단독 처리하였을 때 세포 생존율과 생존 세포의 비율은 감소하였고 세포 독성 활성과 아포토시스 세포의 비율은 증가하였다. PXD101을 단독 처리한 세포와 비교하여 에보디아민과 PXD101을 함께 처리한 세포에서 세포 생존율과 생존 세포의 비율이 감소했을 뿐만 아니라 세포 독성 활성과 아포토시스 세포의 비율이 증가하였다.

[0073] **결과 2: 감상선암 세포에서 세포 독성 활성을 유도하는 에보디아민과 PXD101의 상승작용은 생존 관련 단백질과 연관되어 있다.**

[0074] 생존 관련 단백질의 발현에 대한 에보디아민과 PXD101 조합의 효과를 평가하기 위하여 세포를 5 μ M의 에보디아민과 PXD101로 24시간 동안 처리한 다음, Bcl2, Bax, γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 절단 PARP 단백질 수준을 측정하였다 (도 2a). 에보디아민과 PXD101 단독 처리 시 γ H2AX, 아세틸 히스톤 H3 및 절단 PARP의 단백질 수준은 증가하였고, Bax 단백질 수준의 변화 없이 Bcl2 단백질 수준은 감소하였다. PXD101 단독 처리와 비교하여 에보디아민과 PXD101의 조합 처리 시 γ H2AX 및 절단 PARP의 단백질 수준이 증가하였고, Bax 및 아세틸 히스톤 H3 단백질 수준의 변화 없이 Bcl2 단백질 수준이 감소하였다. 더욱이, Bcl2/Bax 비는 에보디아민 또는 PXD101 단독 처리 시 감소하였고, 이는 에보디아민과 PXD101 조합 처리 시 더욱 감소하였다 (도 2b).

[0076] **결과 3: 감상선암 세포에서 에보디아민은 활성산소종 생성을 통해 PXD101 유도 세포 독성을 상승시킨다.**

[0077] 에보디아민과 PXD101 조합이 활성산소종 생성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 세포를 에보디아민과 PXD101 5 μ M로 24시간 동안 처리한 세포에 대하여 활성산소종 생성을 측정하였다 (도 3). 에보디아민 또는 PXD101 단독 처리 시, 활성산소종 생성은 증가하였고, 활성산소종 생성 증가는 두 가지 약제의 조합에 의해 촉진되었다.

[0079] **결과 4: Akt의 억제제는 감상선암 세포에서 에보디아민과 PXD101의 세포 독성 활성 상승작용을 강화시킨다.**

[0080] PI3K/Akt 신호 전달의 비정상적인 활성화는 감상선 여포세포의 종양 형성에 관여하고 감상선암 세포의 생존에 결정적인 역할을 한다 [18, 22, 23, 29-38]. 에보디아민과 PXD101에 노출된 감상선암 세포의 생존에서 PI3K/Akt 신호 전달의 역할과 관련하여 에보디아민과 PXD101은 PI3K/Akt 신호 전달의 억제를 통해 세포 사멸을 일으킨다고 보고되었다 [18, 21-23]. 또한, HDAC 억제제는 PI3K/Akt 신호의 억제를 통해 hsp90 억제제와 상승작용하였다 [22, 23]. 본 발명에서는 에보디아민과 PXD101의 조합에서 PI3K/Akt 신호 전달의 역할을 평가했다.

[0081] 1, 3 및 5 μ M의 에보디아민 또는 PXD101로 24시간 동안 세포를 처리했을 때, 인산화 Akt 단백질 수준은 감소하였던 반면, 총 Akt 단백질 수준은 변화가 없었다 (도 4a). 에보디아민과 PXD101 5 μ M로 24시간 처리한 세포에서 PXD101을 단독 처리한 세포와 비교하여 총 및 인산화 Akt 단백질 수준에 변화가 없었다 (도 4b).

[0082] 다음으로, 에보디아민과 PXD101 5 μ M를 24시간 조합 처리하기 전 PI3K 억제제인 워트만닌을 처리한 세포에서 세포 생존율 (도 4c), 생존 세포 비율 (도 4d), 세포 독성 활성 (도 4e), 아포토시스 세포 비율 (도 4f) 및 활성산소종 생성 (도 4g)을 측정하였다. 에보디아민과 PXD101을 조합 처리한 세포에서, 워트만닌은 세포 생존율과 생존 세포 비율을 감소시켰고, 세포 독성 활성 및 아포토시스 세포 비율을 증가시켰고, 활성산소종 생성은 변화가 없었다.

[0084] **결과 5: HDAC 억제제와 조합한 에보디아민은 감상선암 세포의 세포 독성에서 상승작용을 나타낸다.**

[0085] HDAC 억제제인 SAHA 및 TSA와 조합을 이룬 에보디아민의 영향을 분석하기 위하여 세포를 에보디아민과 SAHA 또

는 TSA로 동시에 처리하였다 (도 5a, 표 2). 동시 처리 후 모든 CI 값은 1.0보다 낮았고, 조합 데이터 점들은 모두 ED₅₀에서 아이소볼로그래프 선 아래에 위치하였다. 이는 갑상선암 세포의 사멸을 유도함에 있어서 에보디아민과 HDAC 억제제 사이의 상승효과를 시사한다.

[0086] 세포를 SAHA 또는 TSA 5 μ M로 24시간 처리했을 때 세포 생존율과 생존 세포의 비율이 감소하였고 세포 독성 활성, 아포토시스 세포와 활성산소종 생산 비율이 증가하였다 (도 5b-f). 또한, 아세틸 히스톤 H3과 절단 PARP의 단백질 수준은 증가하였고 Bcl2 단백질 수준은 감소하였으나 Bax 단백질 수준은 변화하지 않아 Bcl2/Bax 비율이 감소하였다 (도 5g, 5h). SAHA 또는 TSA 단독 처리한 세포와 비교하여 에보디아민과 SAHA 또는 TSA를 5 μ M로 24시간 동안 처리한 세포에서는 세포 생존율과 생존 세포의 비율이 감소하였고 세포 독성 활성, 아포토시스 세포와 활성산소종 생산 비율이 증가하였다. 또한, 절단 PARP 단백질 수준은 증가하였고, Bcl2 단백질 수준은 감소하였으나 Bax 및 아세틸 히스톤 H3의 단백질 수준은 변화하지 않아 Bcl2/Bax 비율이 감소하였다.

표 1

Cells	EVO (μ M)	PXD101 (μ M)	CI
			EVO+PXD101
TPC-1	1	1	0.892
	3	3	0.849
	5	5	0.807
	7	7	0.828
SW1736	1	1	0.910
	3	3	0.838
	5	5	0.794
	7	7	0.908

CI values <1.0, 1.0, and >1.0 indicate synergism, additivity, and antagonism, respectively

CI combination index, EVO evodiamine

[0088]

표 2

Cells	EVO (μ M)	SAHA (μ M)	TSA (μ M)	CI	
				EVO+SAHA	EVO+TSA
TPC-1	1	1	1	0.896	0.894
	3	3	3	0.887	0.823
	5	5	5	0.917	0.861
	7	7	7	0.860	0.881
SW1736	1	1	1	0.812	0.905
	3	3	3	0.887	0.847
	5	5	5	0.832	0.794
	7	7	7	0.896	0.807

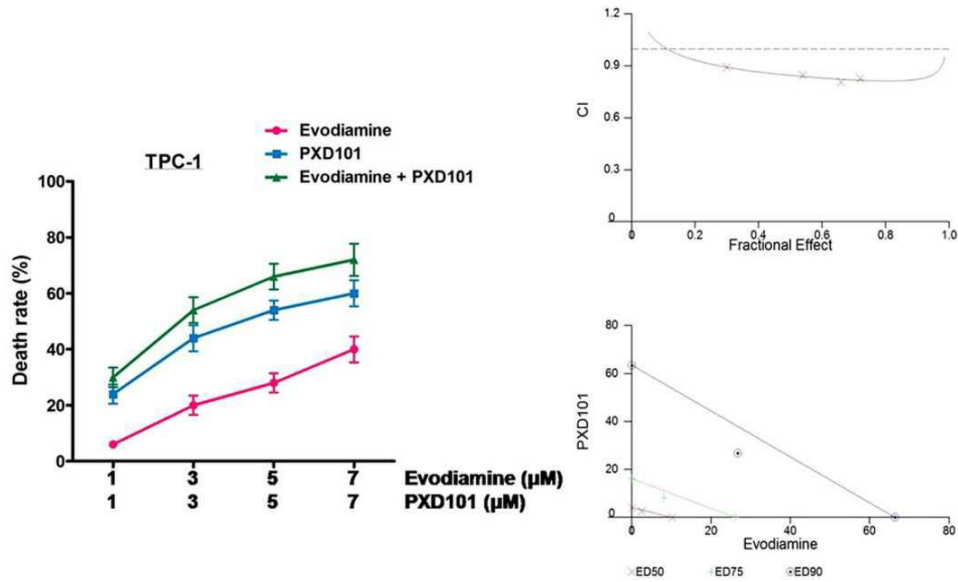
CI values <1.0, 1.0, and >1.0 indicate synergism, additivity, and antagonism, respectively

CI combination index, EVO evodiamine, SAHA suberoylanilide hydroxamic acid, TSA trichostatin A

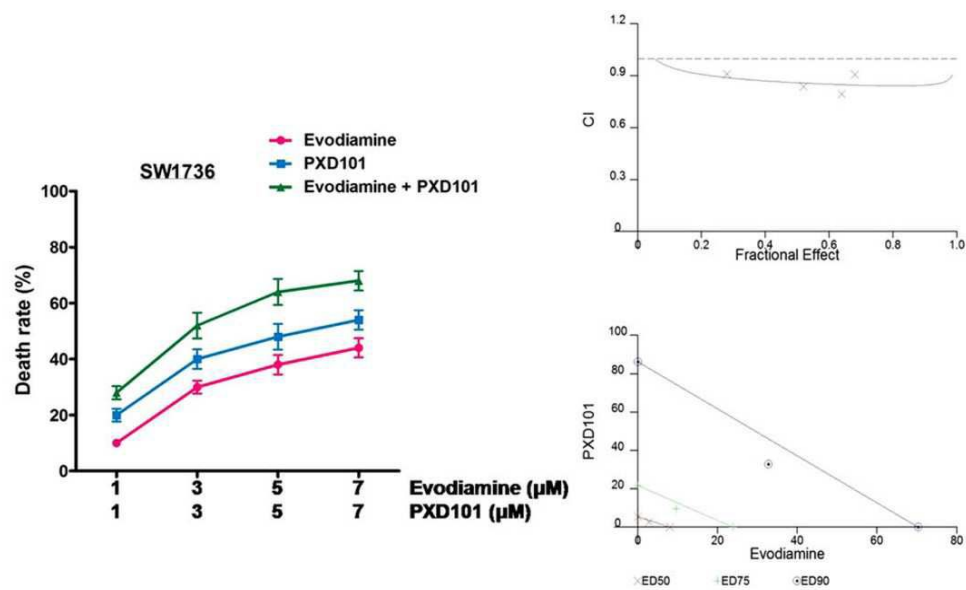
[0089]

도면

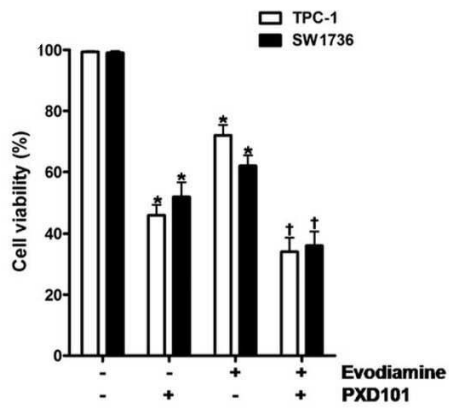
도면1a



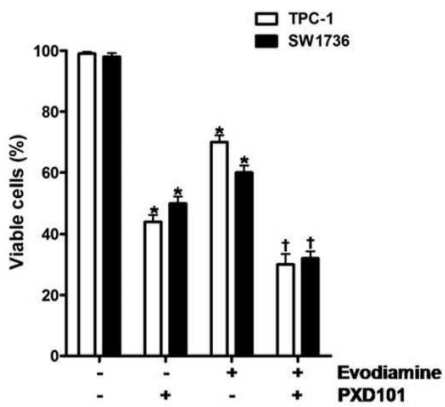
도면1b



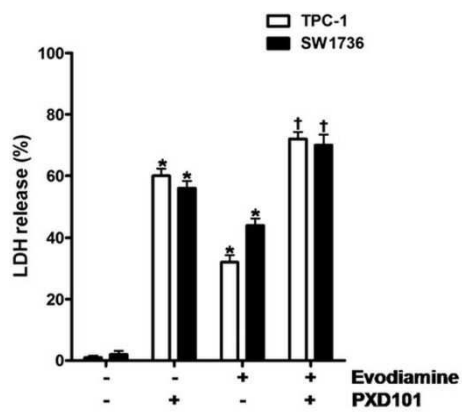
도면1c



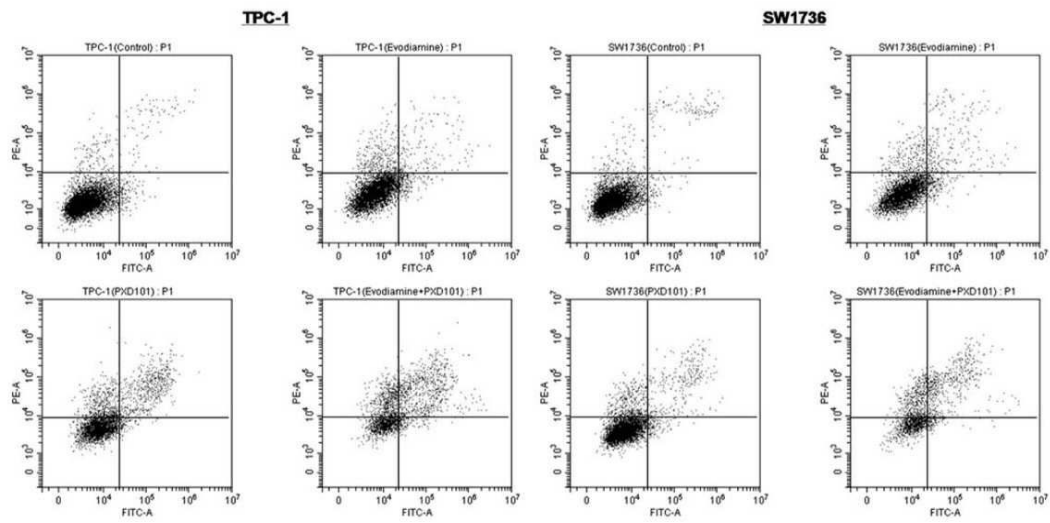
도면1d



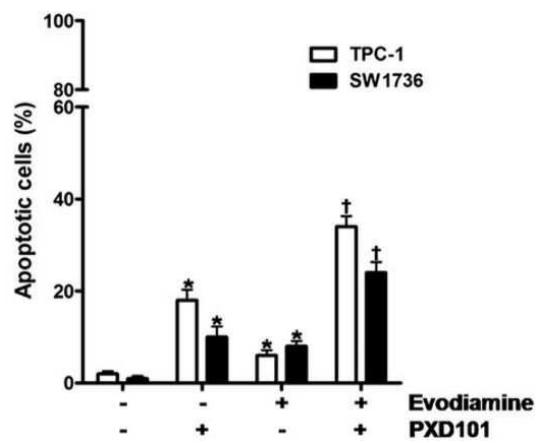
도면1e



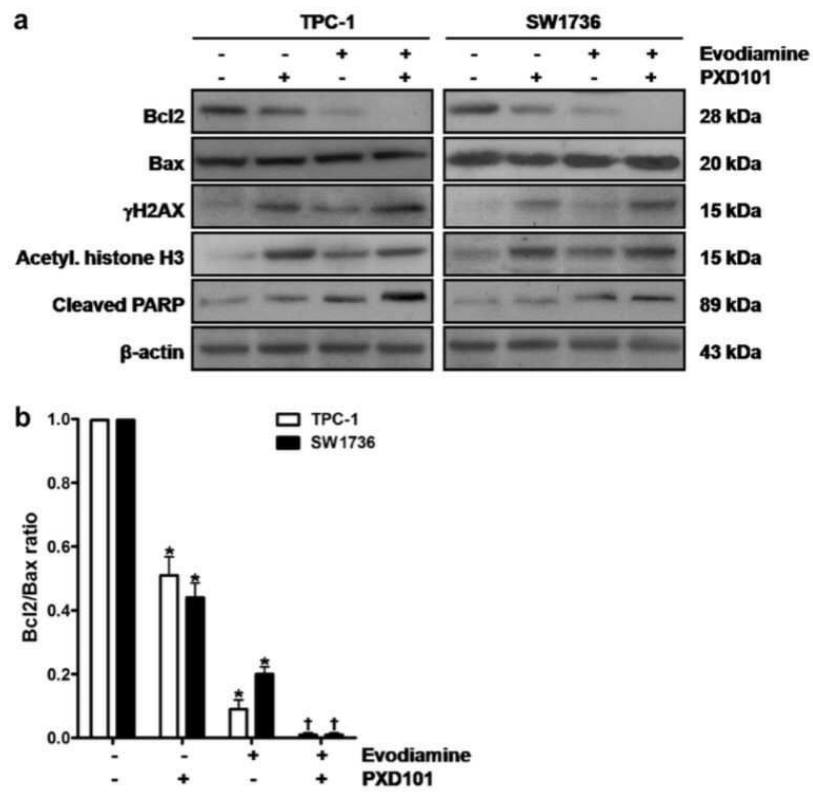
도면1f



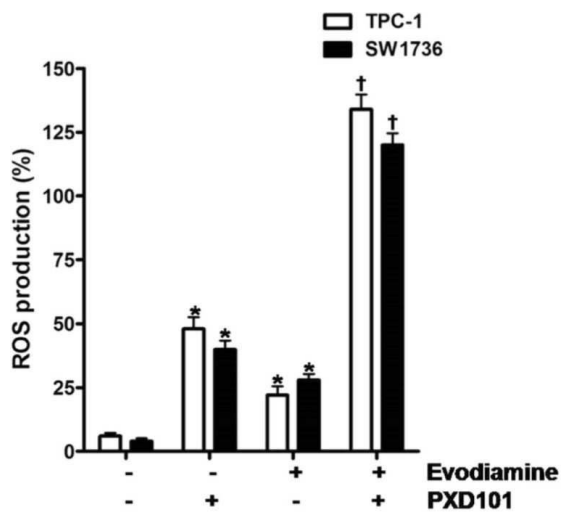
도면1g



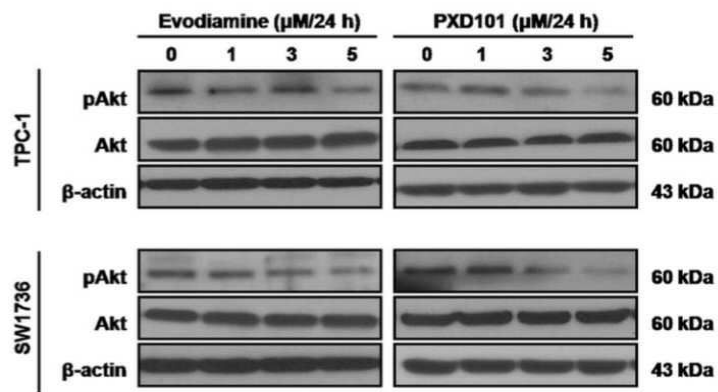
도면2



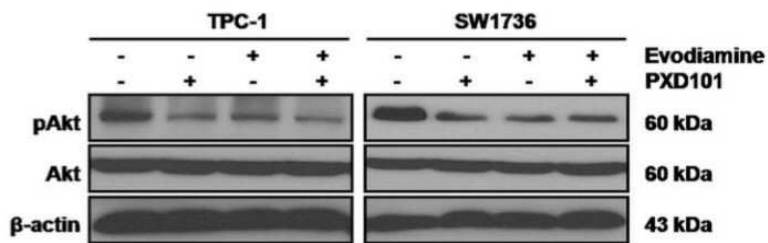
도면3



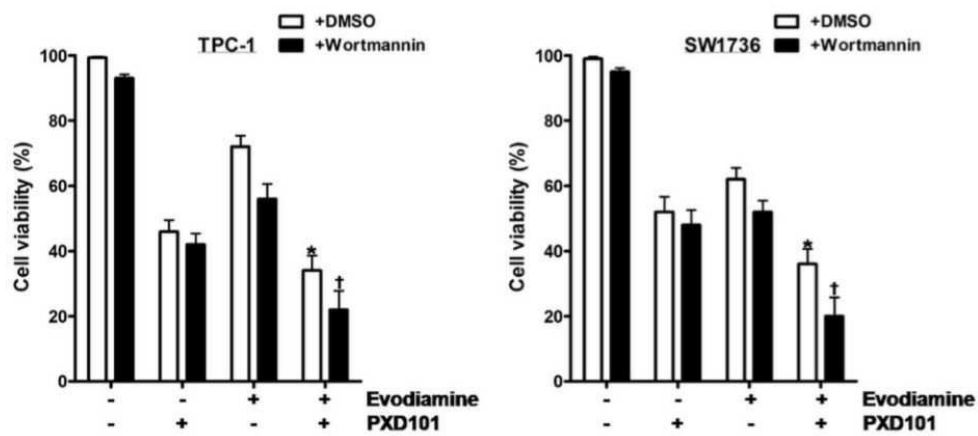
도면4a



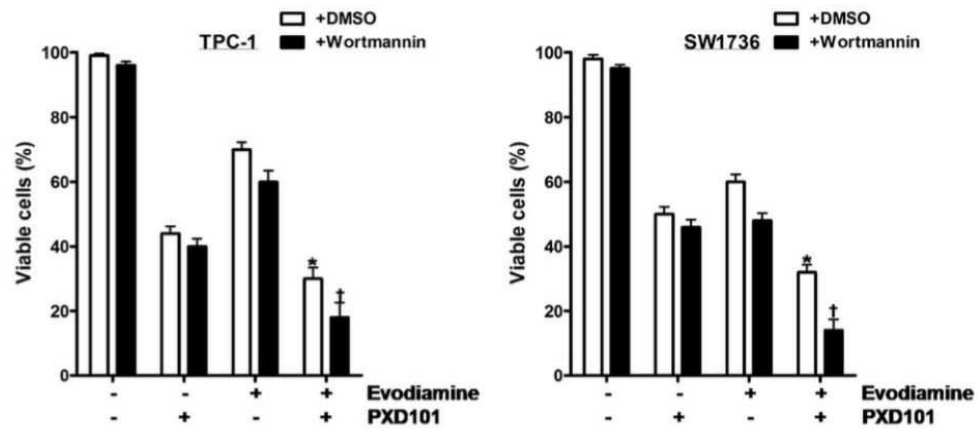
도면4b



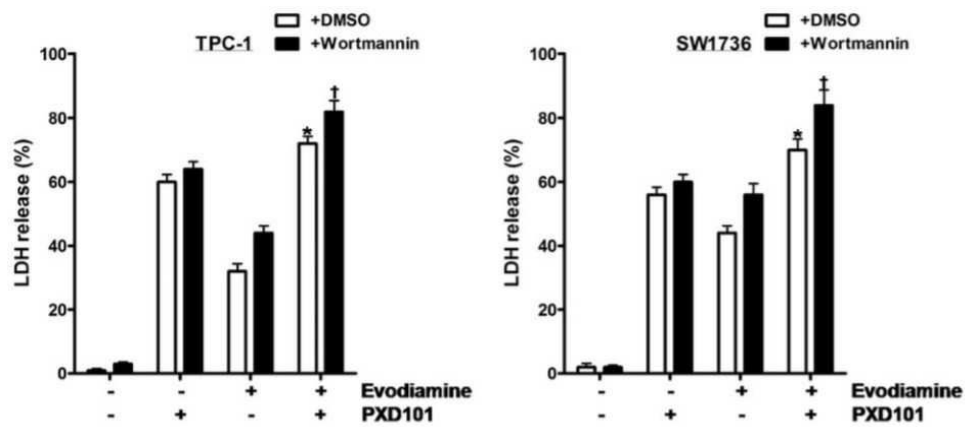
도면4c



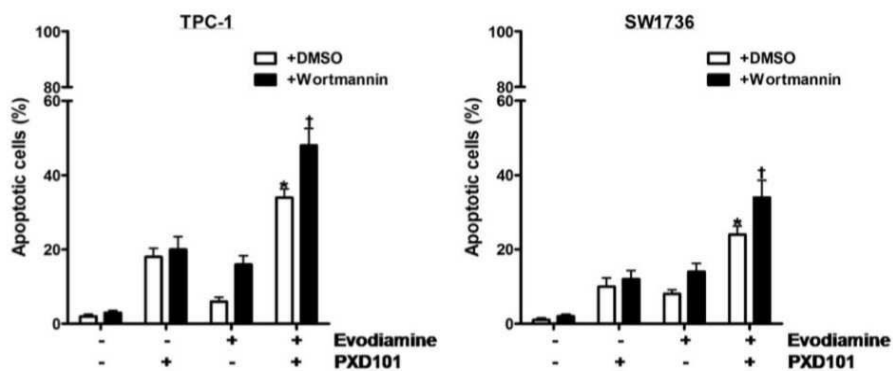
도면4d



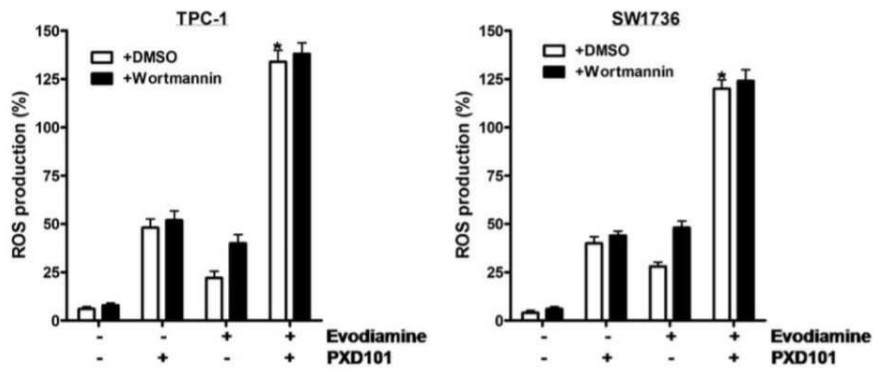
도면4e



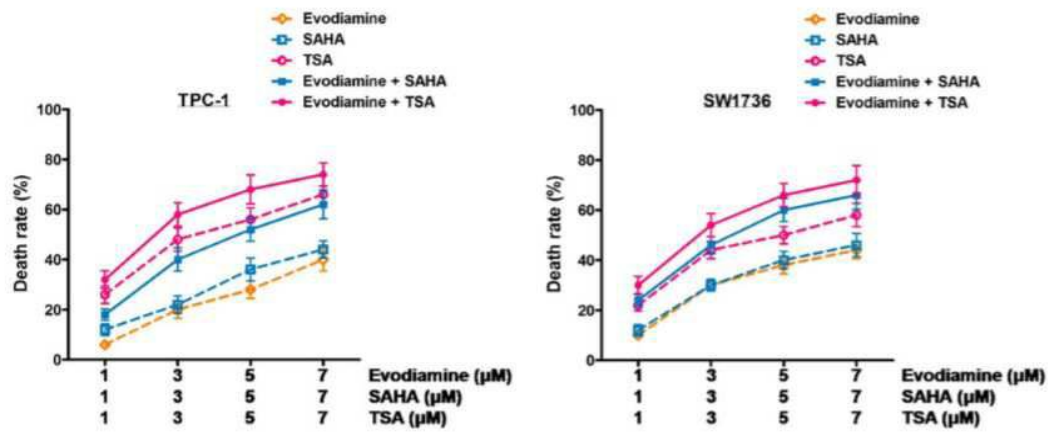
도면4f



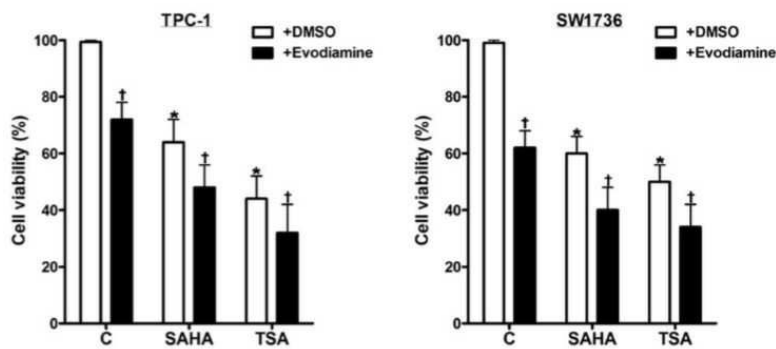
도면4g



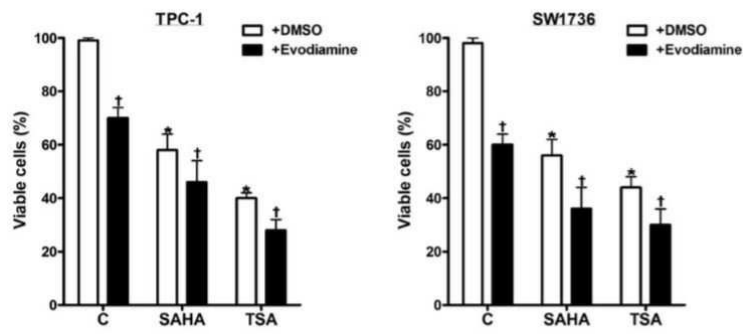
도면5a



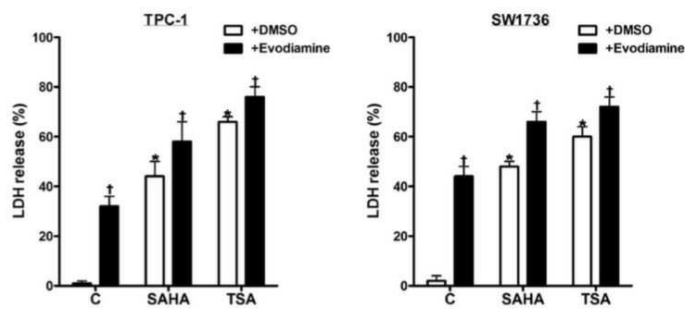
도면5b



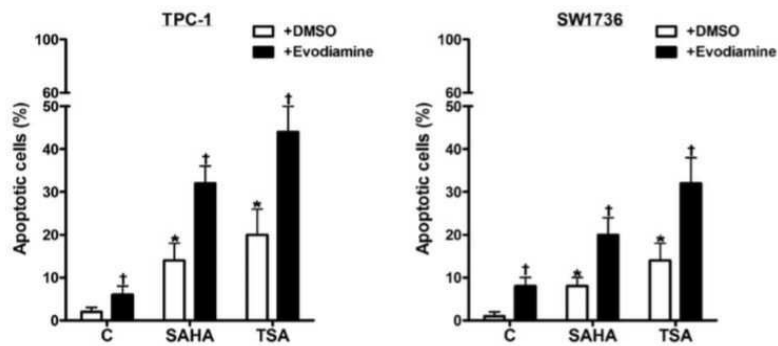
도면5c



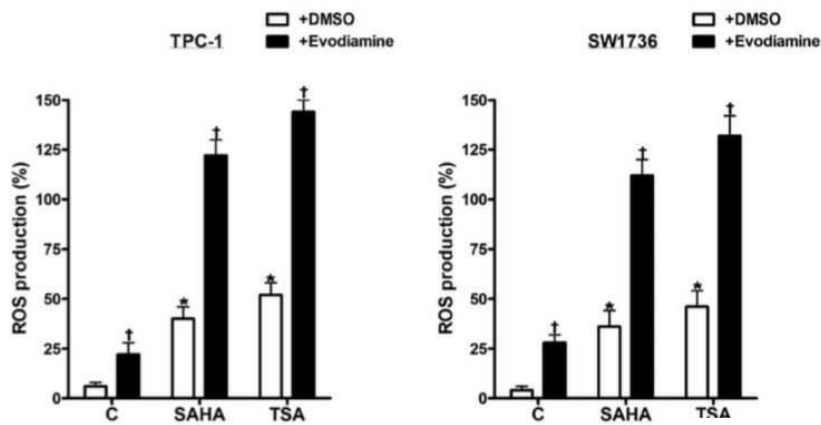
도면5d



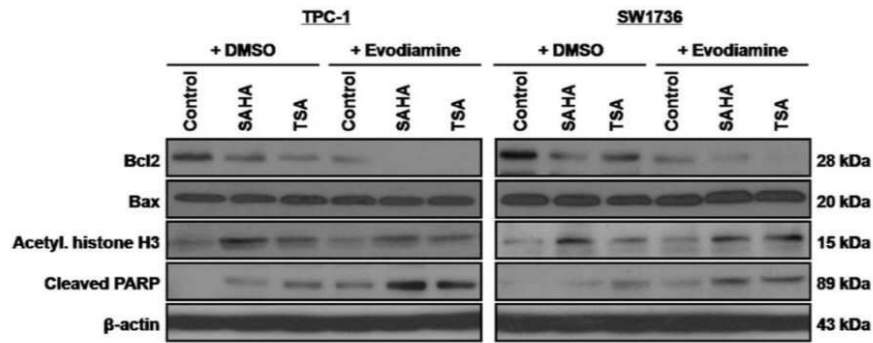
도면5e



도면5f



도면5g



도면5h

