

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일

2020 년 9 월 24 일 (24.09.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호

WO 2020/190071 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 35/17 (2014.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/003818

(22) 국제출원일:

2020 년 3 월 20 일 (20.03.2020)

(25) 출원언어:

한국어

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0032218 2019 년 3 월 21 일 (21.03.2019) KR

(71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR];

34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 이창훈 (LEE, Chang Hoon); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).

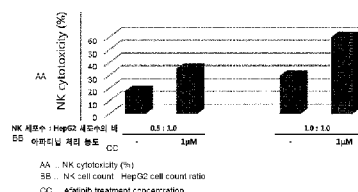
(74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 35209 대전시 서구 한밭대로 809, 10층, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF CANCER AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for prevention or treatment of cancer, the composition comprising: (a) afatinib and (b) isolated natural killer (NK) cells, a cytokine promoting in vivo NK cells, or a combination thereof, and a use thereof. As afatinib increases the sensitivity of cancer cells to NK cells to raise the cytotoxicity of NK cells against cancer cells, the composition of the present invention exhibits a synergistic effect of greatly increasing an anticancer activity from the combined use of (a) afatinib and (b) NK cells, a cytokine promoting in vivo NK cells, or a combination thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 (a) 아파티닙 및 (b) 분리된 NK(Natural killer) 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 상기 아파티닙이 암세포의 NK 세포에 대한 감수성을 증가시켜, NK 세포의 암세포에 대한 세포독성이 증가하는 바, 본 발명의 조성물은 (a) 아파티닙과 (b) NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합의 병용 처리에 의해 항암 효과가 크게 증가하는 시너지 효과가 나타난다.

WO 2020/190071 A1

명세서

발명의 명칭: 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 (a) 아파티닙(Afatinib) 및 (b) 분리된 NK(Natural killer) 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 현재 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로서, 암 발생 연령은 점차 낮아지고 있는 반면 평균 수명은 점차 연장되어가고 있어 암 발생률은 더욱 증가할 것으로 전망되고 있다.
- [3] 대표적인 암 치료 방법으로는 항암화학요법이 있으나, 이는 암세포뿐만 아니라 정상세포 중 빠르게 분열증식하는 세포에도 손상을 가할 수 있어 암세포에 대한 표적성이 낮고, 항암화학요법 후 빈혈, 백혈구 및 혈소판 수의 감소, 구토, 오심, 및 설사 등의 부작용이 발생할 수 있다.
- [4] 따라서, 보다 적은 양으로도 항암 효과가 뛰어난 화학치료제에 대한 필요성이 대두되고 있다.
- [5] 본 발명자들은 보다 항암 효과가 뛰어난 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, (a) 아파티닙 및 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합의 병용 처리시 항암 효과가 시너지적으로 크게 증가하고, 아파티닙이 암세포에서 NK 세포의 항암활성에 중요한 활성화 수용체인 NKG2D에 대한 리간드의 발현을 증가시켜, 암세포의 NK 세포에 대한 감수성을 증가시킴을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [6] (특허문헌1)한국 공개 특허 제10-2015-0135796호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 (a) 아파티닙 및 (b) 분리된 NK(Natural killer) 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 아파티닙을 포함하는, 암세포의 NK 세포에 대한 민감성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 아파티닙을 포함하는, 암세포 및 NK 세포의 결합 증진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 억제학적 조성물을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 억제학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 (a) 아파티닙(Afatinib); 및 (b) 분리된 NK(Natural killer) 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명에서 사용되는 용어 "아파티닙(Afatinib)"은 도 1에 나타난 화학식을 가지는 화합물로서, 항암제로서 사용된다. 그러나, 본 발명자들은 아파티닙이 암세포에서 NK 세포의 항암활성에 중요한 활성화 수용체인 NKG2D에 대한 리간드의 발현을 증가시켜, 암세포의 NK 세포에 대한 감수성을 증가시킴을 처음으로 규명하였다. 또한, 본 발명자들은 (a) 아파티닙 및 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합의 병용 처리시 항암 효과가 시너지적으로 크게 증감함을 처음으로 규명하였다. 특히, 본 발명의 억제학적 조성물은 아파티닙의 암세포 살상능력과 NK 세포의 암세포 살상능력이 병합되어 항암 효과가 나타나는 것뿐만 아니라, 아파티닙이 암세포의 NK 세포에 대한 민감성을 증진시켜 NK 세포의 살상능력을 현저히 증가시킴으로써 항암 효과가 시너지적으로 크게 증가함을 처음으로 규명하였다.
- [14] 본 발명의 조성물은 아파티닙 대신 또는 아파티닙과 함께 아파티닙의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [16] 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 억제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.
- [17] 본 발명의 조성물은 아파티닙의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라

이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성체도 포함할 수 있다. 또한 상기 아파티닙의 용매화물, 수화물 및 입체이성체는 통상적인 방법들을 사용하여 제조할 수 있다.

- [18] 본 발명에서 사용되는 용어 "NK(Natural killer) 세포"는 체내 면역 시스템에 중요한 역할을 하는 세포독성 림프구(cytotoxic lymphocyte)를 의미한다. 본 발명의 목적상 NK 세포는 개체 외부에서 투여되는 분리된 NK 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, NK 세포는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 개체로부터 분리하거나, 배양하는 등의 통상적인 방법에 따라 얻을 수 있다.
- [19] 본 발명에서 사용되는 용어 "사이토카인(Cytokine)"은 면역 세포가 분비하는 단백질로서, 체내의 방어체계를 제어하고 자극한다. 또한, 사이토카인은 체내 NK 세포를 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있다(Oncotarget, 2017, 8(2), 2731-2744; Curr Opin Immunol., 2016, 44, 1-6).
- [20] 상기 사이토카인은 체내 NK 세포를 촉진할 수 있는 한 제한되지 않으나, 구체적으로 IL(Interleukin)-2, IL-15, IL-21, M-CSF(macrophage colony-stimulating factor) 또는 이들의 조합일 수 있다. 본 발명에서 분리된 NK 세포 대신 체내 NK 세포를 촉진할 수 있는 사이토카인을 아파티닙과 병용 투여하여, 아파티닙과 NK 세포의 병용 투여 효과를 얻을 수 있다.
- [21] 본 발명의 약제학적 조성물은 암세포에서 NK 세포의 활성화 수용체에 대한 리간드의 발현을 증가시킬 수 있다. 상기 활성화 수용체는 NK 세포의 활성화 및 세포독성과 관련된 수용체로서, 구체적으로 NKG2D일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 리간드는 NK 세포의 활성화 수용체와 결합할 수 있는 한 제한되지 않으나, 구체적으로 ULBP(UL16 binding protein)1, ULBP2 또는 ULBP3일 수 있다.
- [22] 본 발명의 목적상 (a) 아파티닙과 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합은 동시, 순차적, 또는 역순으로 병용 투여될 수 있다.
- [23] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 약제학적 조성물의 투여로 암 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [24] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 약제학적 조성물의 투여로 암 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [25] 상기 암은 간암, 폐암, 췌장암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [26] 상기 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 제조에 통상적으로

- 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.
- [27] 구체적으로, 상기 약제학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [28] 본 발명의 다른 하나의 양태는 아파티닙을 포함하는, 암세포의 NK 세포에 대한 민감성 증진용 조성물을 제공한다.
- [29] 상기 아파티닙, NK 세포 및 암은 전술한 바와 같다.
- [30] 본 발명에서 사용되는 용어 "NK 세포에 대한 민감성 증진"이란 암세포의 민감성을 증진시키는 것을 의미한다. 구체적으로, "NK 세포에 대한 민감성 증진"이란 암세포에 대한 NK 세포의 세포독성을 활성화시킬 수 있도록, NK 세포의 항암활성에 중요한 활성화 수용체(예들 들어, NKG2D)에 대한 리간드의 발현을 암세포에서 증가시키는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [31] 상기 리간드는 NK 세포의 활성화 수용체와 결합할 수 있는 한 제한되지 않으나, 구체적으로 ULBP(UL16 binding protein)1, ULBP2 또는 ULBP3일 수 있다.
- [32] 본 발명에서 "민감성"은 "감수성"과 혼용된다.
- [33] 본 발명의 다른 하나의 양태는 아파티닙을 포함하는, 암세포 및 NK 세포의 결합 증진용 조성물을 제공한다.

- [34] 상기 아파티닙, NK 세포 및 암은 전술한 바와 같다.
- [35] 본 발명에서 사용되는 용어 "암세포 및 NK 세포의 결합 증진"이란 암세포에 대해 NK 세포가 세포독성을 나타낼 수 있도록, 암세포와 NK 세포의 결합을 증진시키는 것을 의미한다.
- [36] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 억제학적 조성물을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [37] 상기 억제학적 조성물, 암, 예방 및 치료는 전술한 바와 같다.
- [38] 본 발명의 키트는 그 종류가 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 형태의 키트를 사용할 수 있다.
- [39] 본 발명의 키트는 (a) 아파티닙 및 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합이 각각 개별 용기에 담긴 형태, 또는 하나 이상의 구획으로 나누어진 한 개의 용기 내에 담긴 형태로 포장되어 있을 수 있으며, 상기 (a) 성분 및 (b) 성분은 각각 1회 투여 용량의 단위 용량 형태로 포장되어 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [40] 상기 키트 내의 (a) 성분 및 (b) 성분은 투여 대상 개체의 건강 상태 등에 따라 적절한 시기에 개별적으로 병용 투여될 수 있다. 또한, (a) 성분 및 (b) 성분은 동시, 순차적, 또는 역순으로 개체에게 병용 투여될 수 있다.
- [41] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 억제학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [42] 상기 억제학적 조성물, 암, 예방 및 치료는 전술한 바와 같다.
- [43] 본 발명의 용어, "개체"란, 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적으로 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에서 개체는 인간이 제외될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [44] 본 발명의 용어, "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다. 구체적으로, 본 발명의 억제학적 조성물을 이용하여 (a) 아파티닙 및 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합이 동시, 순차적, 또는 역순으로 개체에게 병용 투여될 수 있다.
- [45] 본 발명의 억제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [46] 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두

고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [47] 본 발명의 조성물을 투여하는 투여 경로 및 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 조성물을 포함하는 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 그 투여 경로의 비제한적인 예로는, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내 또는 흡입 등을 통하여 투여되는 것을 들 수 있다.

- [48] 또한, 본 발명의 암 예방 또는 치료 방법은 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응조절제를 사용하는 방법들과 병용될 수 있다.

발명의 효과

- [49] 아파티닙이 암세포의 NK 세포에 대한 감수성을 증가시켜, NK 세포의 암세포에 대한 세포독성이 증가하는바, 본 발명의 조성물은 (a) 아파티닙과 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합의 병용 처리에 의해 항암 효과가 크게 증가하는 시너지 효과가 나타난다.

도면의 간단한 설명

- [50] 도 1은 아파티닙(Afatinib)의 구조를 나타낸 도이다.
- [51] 도 2는 NK 세포와 아파티닙을 병용 처리한 경우 간암세포(HepG2)에 대한 세포독성이 매우 크게 증가하는 것을 보여주는 도이다.
- [52] 도 3은 NK 세포와 아파티닙을 병용 처리한 경우 폐암세포(A549) 및 췌장암세포(PC1)에 대한 세포독성이 매우 크게 증가하는 것을 보여주는 도이다.
- [53] 도 4는 아파티닙에 의해 간암세포에서 NK 세포의 활성화 및 세포독성에 있어 중요한 인자들인 ULBP1, ULBP2, ULBP3의 발현량이 증가하는 것을 보여주는 도이다.
- [54] 도 5는 아파티닙과 NK 세포의 병용 처리에 의해 항암 활성이 증가하는 기작을 보여주는 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [55] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [56] 실시예 1. 분리된 NK 세포와 아파티닙의 병용 처리에 의한 항암 효과 분석
- [57] NK 세포와 아파티닙의 병용 처리에 의한 항암 효과를 확인하기 위해, 분리된 NK 세포와 아파티닙의 병용 처리에 따른 암세포에 대한 세포독성을 분석하였다. 구체적으로, 0.1 μ M 아파티닙을 96 well plate의 well당 5×10^4 개의 HepG2 간암세포에 처리하여 2일 동안 배양한 후 세포수를 계수하여, 살아 남은 HepG2 간암세포에 인간 혈액에서 분리한 NK 세포를 0.5:1과 1:1(NK 세포수:HepG2 세포수)로 처리한 다음 4시간 동안 추가 배양하였다. 그 후 간암세포에 대해 MTT 분석법을 수행하여 세포독성을 측정하였다.

- [58] 그 결과, NK 세포와 아파티닙을 병용 처리한 경우 NK 세포만을 처리한 경우보다 간암세포에 대한 세포독성이 약 150 ~ 200% 가량으로 매우 크게 증가함을 확인하였다(도 2). 또한, 아파티닙과 병용 처리되는 NK 세포의 양이 증가할수록 간암세포에 대한 세포독성이 증가함을 확인하였다(도 2).
- [59] 이를 통해, NK 세포와 아파티닙을 병용 처리하는 경우 NK 세포 단독 처리하는 경우에 비해 항암 효과가 매우 크게 증가함을 확인하였는 바, NK 세포 또는 체내 NK 세포를 증가시키는 IL-2, IL-15, IL-21, M-CSF 등의 사이토카인(cytokine)과 함께 아파티닙을 병용 처리하는 경우 NK 세포 또는 아파티닙을 단독 처리하는 경우보다 매우 우수한 항암 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [60] 실시예 2. 다양한 암에 대한 NK 세포와 아파티닙의 병용 처리 효과 분석
- [61] 다양한 암에 대한 NK 세포와 아파티닙의 병용 처리에 따른 항암 효과를 확인하기 위해, 다양한 암에 대한 NK 세포와 아파티닙의 병용 처리에 따른 세포독성을 분석하였다. 구체적으로, 5 μ M 아파티닙을 96 well plate의 well당 5×10^4 개의 폐암세포주(A549) 혹은 96 well plate의 well당 5×10^4 개의 췌장암세포주(PC1)에 처리하여 2일 동안 배양한 후 세포수를 계수하여, 살아남은 암세포에 인간 혈액에서 분리한 NK 세포를 암세포와 1:1로 처리한 다음 추가 배양하였다. 그 후 각 암세포에 대해 MTT 분석법을 수행하여 세포독성을 측정하였다.
- [62] 그 결과, 폐암세포 및 췌장암세포 모두에서 NK 세포와 아파티닙을 병용 처리한 경우 NK 세포만을 처리한 경우보다 암세포에 대한 세포독성이 매우 크게 증가함을 확인하였다(도 3).
- [63] 이를 통해, NK 세포 또는 체내 NK 세포를 증가시키는 IL-2, IL-15, IL-21, M-CSF 등의 사이토카인과 함께 아파티닙을 병용 처리하는 경우 다양한 암에 대해 매우 우수한 항암 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [64] 실시예 3. 아파티닙과 NK 세포의 병용 처리에 의해 항암 활성 증가 기작 확인
- [65] 아파티닙을 HepG2 간암세포에 처리한 후 간암세포에서 NK 세포의 활성화 및 세포독성에 있어 중요한 인자들인 ULBP1, ULBP2, ULBP3의 발현량을 real time PCR방법을 활용하여 측정하였다. 측정방법은 다음과 같다. 먼저, HepG2 세포에 아파티닙(1 μ M)을 처리한 후 1일간 혹은 2일간 배양한다. 그 후 total RNA를 Trizol을 사용하여 추출한 후 cDNA를 합성한 다음, ULBP1,2,3에 각각 특이적인 PCR probe를 이용한 정량적인 분석인 real time PCR을 수행하여 ULBP1, ULBP2, ULBP3의 양을 측정하였다. 측정된 각각의 발현량을 아파티닙을 처리하지 않은 경우를 기준으로 상대적으로 나타내었다.
- [66] 그 결과, 아파티닙의 처리에 따라 간암세포에서 ULBP1, ULBP2, ULBP3의 발현이 매우 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 4).
- [67] 이를 통해, 암세포에서 아파티닙이 NK 세포의 항암활성에 중요한 활성화 수용체인 NKG2D에 대한 리간드(ULBP1, ULBP2, ULBP3)의 발현을 증가시킨 결과, 암세포는 증가된 리간드로 인해 NK 세포에 대한 감수성이 증가됨을 알 수

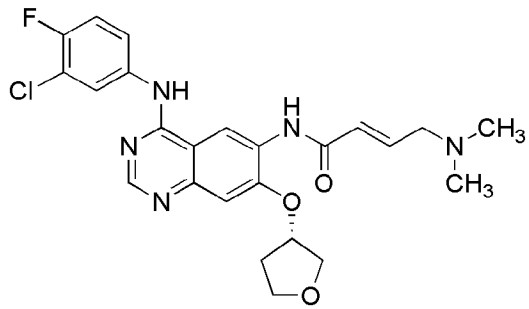
있었다(도 5). 즉, 아파티닙이 암세포의 NK 세포에 대한 감수성을 증가시킨 결과, NK 세포의 암세포에 대한 세포독성이 증가하는 바, 아파티닙과 NK 세포의 병용 처리에 의해 항암 효과가 시너지적으로 크게 증가함을 알 수 있었다.

- [68] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

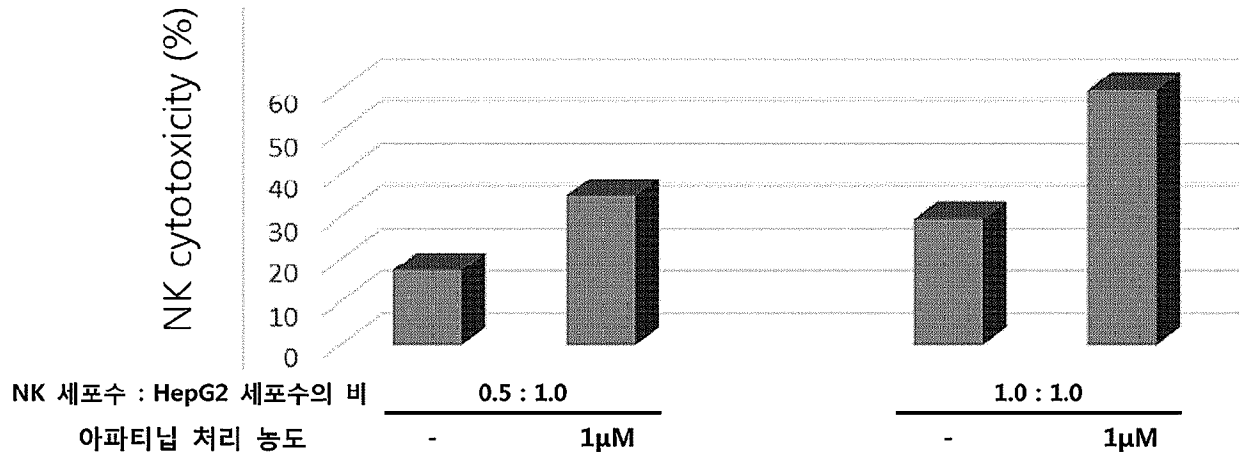
청구범위

- [청구항 1] (a) 아파티닙(Afatinib); 및
(b) 분리된 NK(Natural killer) 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합;을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 사이토카인은 IL(Interleukin)-2, IL-15, IL-21, M-CSF(macrophage colony-stimulating factor) 또는 이들의 조합인 것인, 억제학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 억제학적 조성물은 암세포에서 NK 세포의 NKG2D 수용체에 대한 리간드의 발현을 증가시키는 것인, 억제학적 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 억제학적 조성물은 (a)성분 및 (b)성분이 동시, 순차적, 또는 역순으로 병용 투여되는 것인, 억제학적 조성물.
- [청구항 5] 아파티닙을 포함하는, 암세포의 NK 세포에 대한 민감성 증진용 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 조성물은 암세포에서 NK 세포의 NKG2D 수용체에 대한 리간드의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.
- [청구항 7] 아파티닙을 포함하는, 암세포 및 NK 세포의 결합 증진용 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 조성물은 NK 세포의 살상능력을 증진시키는 것인, 조성물.
- [청구항 9] 제 1항 내지 제 4항에서 선택되는 어느 한 항에 따른 억제학적 조성물을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 키트.
- [청구항 10] 제 1항 내지 제 4항에서 선택되는 어느 한 항에 따른 억제학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 암 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 투여하는 단계는 (a) 아파티닙; 및 (b) 분리된 NK 세포, 체내 NK 세포를 촉진하는 사이토카인, 또는 이들의 조합;을 동시, 순차적, 또는 역순으로 병용 투여하는 것인, 방법.

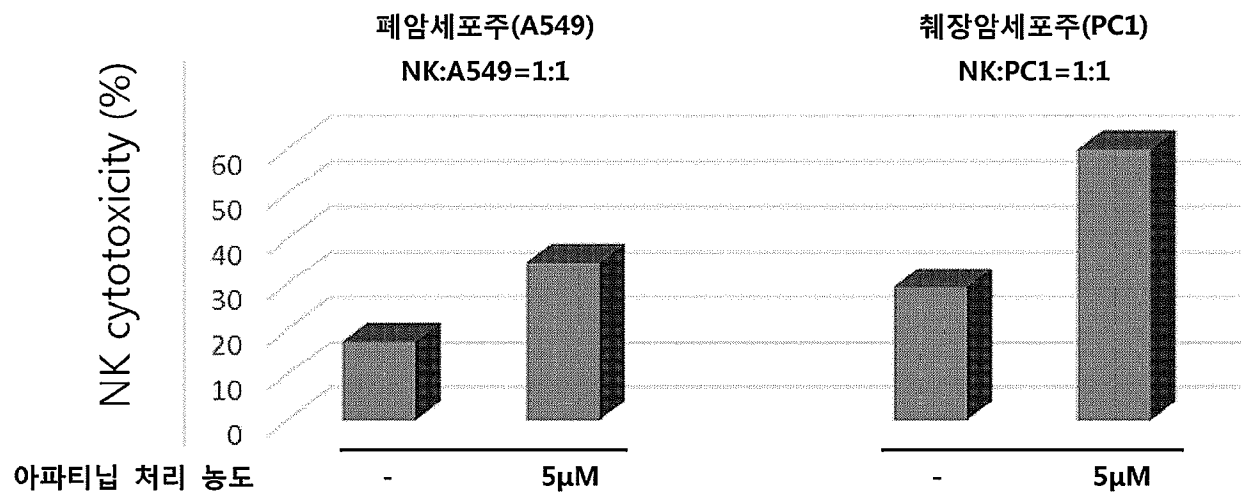
[도1]



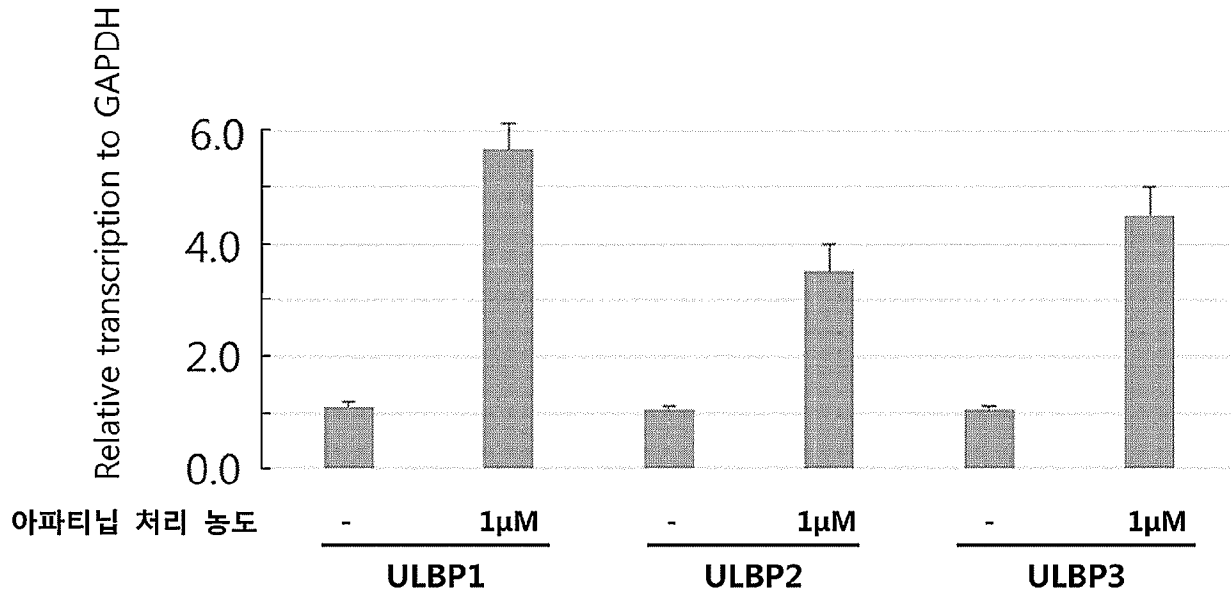
[도2]



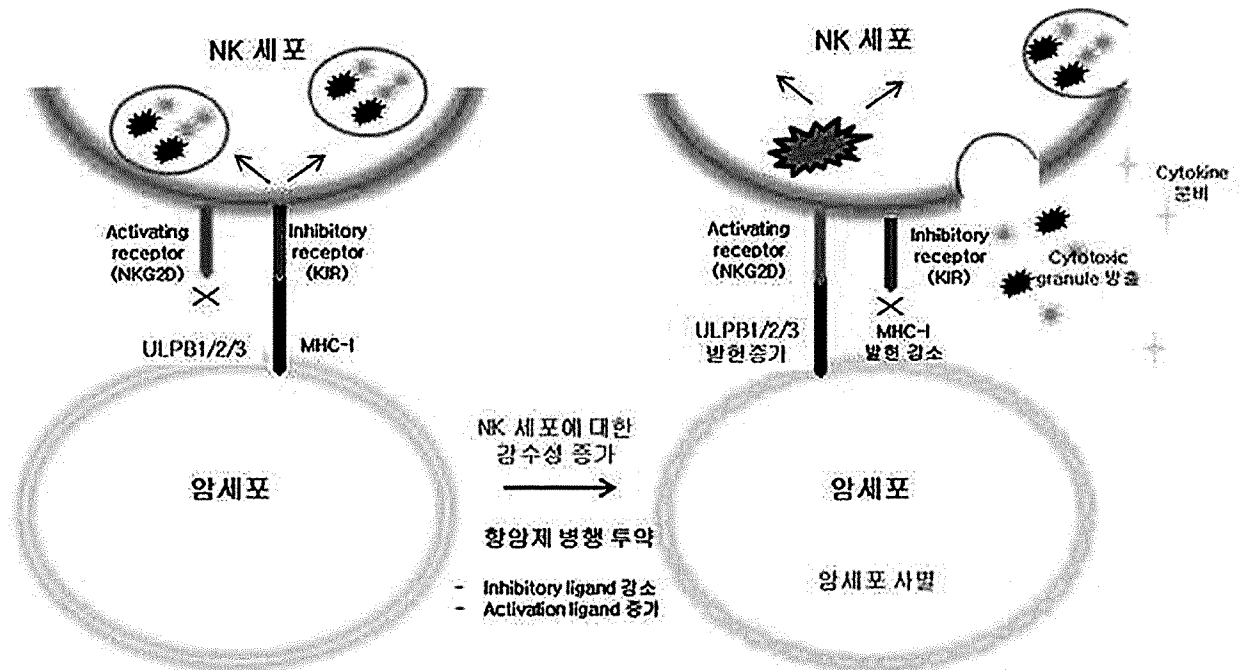
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/444(2006.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 38/20(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/444; A61K 35/13; A61K 35/17; A61K 38/20; A61K 38/19; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cancer, afatinib, NK cell(natural killer cell), cytokine, NKG2D, receptor, ligand, expression, sensitivity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1824205 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 01 February 2018 See claims 1-4, 6-10; and paragraph [0008].	1-11
Y	KIM, H. et al. EGFR Inhibitors Enhanced the Susceptibility to NK Cell-mediated Lysis of Lung Cancer Cells. <i>J. Immunother.</i> 2011, vol. 34, pages 372-381 See abstract; and page 374.	1-11
Y	ZHANG, S. et al. Afatinib increases sensitivity to radiation in non-small cell lung cancer cells with acquired EGFR T790M mutation. <i>Oncotarget.</i> 21 January 2015, vol. 6, no. 8, pages 5832-5845 See abstract; and pages 5832, 5833.	1-11
Y	KR 10-1824197 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 31 January 2018 See claims 1-4, 6-10; and paragraph [0008].	1-11
Y	KR 10-1828997 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 13 February 2018 See claims 1-4, 6-10; and paragraph [0008].	1-11
Y	KR 10-1825637 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 06 February 2018 See claims 1-4, 6-10; and paragraph [0008].	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 JULY 2020 (02.07.2020)

Date of mailing of the international search report

03 JULY 2020 (03.07.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003818

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1824205 B1	01/02/2018	None	
KR 10-1824197 B1	31/01/2018	None	
KR 10-1828997 B1	13/02/2018	None	
KR 10-1825637 B1	06/02/2018	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/444(2006.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 38/20(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/444; A61K 35/13; A61K 35/17; A61K 38/20; A61K 38/19; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 암(cancer), 아파티닙(afatinib), NK 세포(natural killer cell), 사이토카인(cytokine), NKG2D, 수용체(receptor), 리간드(ligand), 발현(expression), 민감성(sensitivity)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1824205 B1 (한국화학연구원) 2018.02.01 청구항 1-4, 6-10; 및 단락 [0008]	1-11
Y	KIM, H. 등, `EGFR Inhibitors Enhanced the Susceptibility to NK Cell-mediated Lysis of Lung Cancer Cells`, J. Immunother., 2011, 34권, 페이지 372-381 초록; 및 페이지 374	1-11
Y	ZHANG, S. 등, `Afatinib increases sensitivity to radiation in non-small cell lung cancer cells with acquired EGFR T790M mutation`, Oncotarget, 2015.01.21, 6권, 8호, 페이지 5832-5845 초록; 및 페이지 5832, 5833	1-11
Y	KR 10-1824197 B1 (한국화학연구원) 2018.01.31 청구항 1-4, 6-10; 및 단락 [0008]	1-11
Y	KR 10-1828997 B1 (한국화학연구원) 2018.02.13 청구항 1-4, 6-10; 및 단락 [0008]	1-11
Y	KR 10-1825637 B1 (한국화학연구원) 2018.02.06 청구항 1-4, 6-10; 및 단락 [0008]	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 07월 02일 (02.07.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 07월 03일 (03.07.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1824205 B1

2018/02/01

없음

KR 10-1824197 B1

2018/01/31

없음

KR 10-1828997 B1

2018/02/13

없음

KR 10-1825637 B1

2018/02/06

없음