

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0057178

(43) 공개일자 2025년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/496 (2024.01)

A61K 31/713 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61K 31/496 (2024.01)

(21) 출원번호 10-2023-0139723

(22) 출원일자 2023년10월18일

심사청구일자 2023년10월18일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

충남대학교병원

대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)

(72) 발명자

구본석

대전광역시 중구 서문로 96, 202동 1604호 (문화동, 센트럴파크2단지아파트)

정승남

대전광역시 서구 도안동로 77, 1807동 1004호 (도안동, 도안18단지리플하우스)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

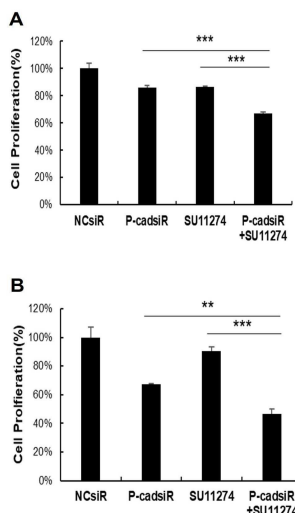
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 P-캐드헤린 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase Met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 두경부암 세포주 및 동물모델에서 세포부착 단백질인 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제인 SU11274를 병용 처리하였을 때, P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 각각 단독 처리한 것에 비해 두경부암세포의 성장, 이동 및 침윤 정도가 현저하게 감소되므로, 두경부암의 예방 또는 치료용 의약품의 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

장재원

대전광역시 유성구 상대복용로29번길 52, 104동
2101호 (상대동, 대전아이파크시티 1단지)

원호륜

서울특별시 마포구 토정로32길 11, 102동 1001호
(토정동, 한강삼성아파트)

임미애

대전광역시 중구 서문로 96, 210동 1604호 (문화동, 센트럴파크2단지아파트)

오찬

전라북도 익산시 동서로61길 41, 102동 504호 (어양동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181927

과제번호 2019R1A2C1084125

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 두경부암 유전체 분석 기반 치료저항성 분자표지자 패널 개발 및 환자유래 오가노이

드 기반 치료반응 예측 플랫폼 확립

기 여 율 4/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711192245

과제번호 2021R1C1C1014142

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 두경부암 줄기세포를 억제하는 구강 마이크로비옴 유래 세포 외 소포체 발굴에 관한

연구

기 여 율 2/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711184133

과제번호 2022R1C1C1008265

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 두경부암의 개인별 정밀 맞춤 치료를 위한 액체 생검 기반 마이크로 RNA 표적 개발

및 유효성 검증

기 여 율 1/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465040029

과제번호 HR22C1734040023

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원육성

연구과제명 Centennial-care Ubiquitous Hospital (CNUH) 플랫폼

기 여 율 3/10

과제수행기관명 충남대학교병원

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 P-캐드헤린 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 c-MET 억제제는 SU11274{(3Z)-N-(3-chlorophenyl)-3-[[[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-yl]methylidene]-N-methyl-2-oxo-1H-indole-5-sulfonamide}인 것을 특징으로 하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제는 두경부암 세포의 증식, 이동 및 침윤을 저해시키는 것을 특징으로 하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 두경부암은 비강암, 부비동암, 구강암, 비인두암, 구인두암, 하인두암, 후두암, 경부 식도암, 침샘암, 타액선암 및 설암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 암인 것을 특징으로 하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 9

P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 두경부암(Head and Neck Cancer)은 전세계적으로 매년 600,000명 정도 발생하는 전체 암 중에 6번째로 흔한 암으로 알려져 있다. 두경부란 뇌 아래에서 가슴 윗 부분 사이를 말하고, 두경부에는 비강, 혀, 입, 후두, 침샘 등 음식을 먹거나 목소리를 내는 등의 기능을 하는 기관이 많이 있으며 이런 기관에 생긴 암을 두경부암이라고 통틀어 말한다. 두경부암은 타 장기의 암보다 안면과 목이라는 특수성 때문에 치료상의 제약이 많고 진행 시 치명적이고 치료 후 기능상 또는 외견상 장애가 많이 나타나는 곳이기도 하다. 발생하는 병의 병리적 기원도 다양하고 동일병리의 병이라고 하더라도 발생위치에 따라 전혀 다른 예후를 보이는 특징을 가지고 있다. 인구의 노령화와 음주와 흡연이 증가하면서 두경부암의 발생률도 증가 추세여서, 전체 암의 4~5%를 차지하며, 통계적으로 볼 때 장기별 암 발생기준으로 7위, 남자환자 기준으로 5위에 해당하는 비교적 흔한 암에 속한다. 두경부암의 종류를 구체적으로 살펴보면, 크게 비강 및 부비동암, 구강암, 비인두암, 구인두암, 하인두암, 후두암, 경부 식도암, 침샘암, 타액선암, 악성 림프종, 악성 흑색종, 각종 연부조직 암 등이 있다.
- [0003] 두경부암의 치료 방법으로는 수술, 방사선 치료 및 항암화학요법을 주로 사용한다. 진행성 암이 많은 두경부암은 두 가지 이상의 병합치료를 병행하게 된다. 수술 후 방사선 치료 혹은 항암 방사선 치료를 추가하는 것이 일반적이나 최근 후두 등의 주요 장기의 희생으로 수술 후 기능 장애가 심각할 것으로 예상되는 경우에는 항암화학요법 후 종양의 치료반응 정도에 따라 수술이나 방사선 치료를 다시 선택하거나 항암 방사선요법을 먼저 시행하고 추후 수술여부를 결정하는 기관보존개념의 치료법이 사용되고 있다. 즉, 두경부암 치료에서 가장 중요한 점은 암을 완전히 없애 생존율을 높이는 것이지만 구강과 혀, 후두의 중요한 기능은 목소리를 보전하는 것 역시 치료 후 환자 삶의 질에 있어 큰 부분을 차지하는 만큼 중요하게 고려된다. 최근 두경부암의 치료분야의 괄목할 만한 성장을 이루었지만, 치료기술의 발달에도 불구하고 최근 30년 동안 두경부암의 생존율은 뚜렷한 향상을 보이지 않고 있다.
- [0004] 두경부암 관련 선행기술로는 한국공개특허 제2021-0129789호에 '모스카틸린을 유효성분으로 함유하는 두경부암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물'이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2023-0039230호에 '두경부암 치료를 위한 멜라토닌과 베르테포르핀의 병용 투여용 약학조성물'이 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 'P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 조성물'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase Met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상세하게는 두경부암 세포주 및 동물모델에서 세포부착 단백질인 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제인 SU11274를 병용 처리하였을 때, P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 각각 단독 처리한 것에 비해 두경부암세포의 성장, 이동 및 침윤 정도가 현저하게 감소된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase Met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 두경부암 세포주 및 동물모델에서 세포부착 단백질인 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제인 SU11274를 병용 처리하였을 때, P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 각각 단독 처리한 것에 비해 두경부암세포의 성장, 이동 및 침윤 정도가 현저하게 감소되는 효과가

있다.

도면의 간단한 설명

[0010]

도 1은 하인두암세포(SNU1041)(A) 및 후두암세포(SNU1076)(B)에 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리하였을 때, WST-1 분석을 통해 세포 증식 억제 효과를 확인한 결과이다. NCsiR은 음성 대조군이고, P-cadsir은 P-캐드헤린 siRNA를 단독 처리한 군이며, SU11274는 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제인 SU11274를 단독 처리한 군이고, P-cadsir+SU11274는 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군이다. **, ***은 P-캐드헤린 siRNA 단독 또는 SU11274 단독 처리군에 대비하여 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군의 세포 증식능이 통계적으로 유의미하게 더 감소하였다는 것으로, **은 $p<0.01$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이다.

도 2는 하인두암세포(SNU1041)(A) 및 후두암세포(SNU1076)(B)에 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리하였을 때, 콜로니 형성 분석(colony formation assay)을 통해 세포 증식 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 하인두암세포(SNU1041)에 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리하였을 때, 세포의 이동 정도를 확인한 결과이다. A는 광학현미경으로 촬영한 사진이고 B는 이를 정량화한 그래프이다. *, ***은 P-캐드헤린 siRNA 단독 또는 SU11274 단독 처리군에 대비하여 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군의 이동된 세포 비율이 통계적으로 유의미하게 더 감소하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이다.

도 4는 후두암세포(SNU1076)에 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리하였을 때, 세포의 이동 정도를 확인한 결과이다. A는 광학현미경으로 촬영한 사진이고 B는 이를 정량화한 그래프이다. *, **은 P-캐드헤린 siRNA 단독 또는 SU11274 단독 처리군에 대비하여 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군의 이동된 세포 비율이 통계적으로 유의미하게 더 감소하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이고, **은 $p<0.01$ 이다.

도 5는 하인두암세포(SNU1041)(A) 및 후두암세포(SNU1076)에 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리하였을 때, 세포의 침윤 정도를 광학현미경을 통해 확인한 결과이다.

도 6은 이종이식(xenograft) 모델에서 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리하였을 때, 두경부암 세포의 성장 억제 효과를 확인한 결과이다. A는 마우스에 루시페라제-발현 FaDu(FaDu-Luc) 세포를 주입한 후 IVIS(In Vivo Optical Imaging System)로 추적한 종양 이미지이고, B는 종양의 ROI(Region of interest)의 발광 광도를 정량화한 그래프이며, C는 종양 크기를 측정한 사진이고, D는 종양 부피를 18일 동안 3일마다 측정하여 나타낸 그래프이다. *, **, ***은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군(NCsiR) 대비 P-캐드헤린 siRNA 단독 처리군; SU11274 단독 처리군; 또는 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리군;의 종양의 총 광도(total flux) 또는 종양 부피가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이고, **은 $p<0.01$ 이며, ***은 $p<0.001$ 이다. #, ##, ###은 P-캐드헤린 siRNA 단독 처리군; 또는 SU11274 단독 처리군; 대비 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274를 병용 처리군의 총 광도 또는 종양 부피가 통계적으로 유의미하게 더 감소하였다는 것으로, #은 $p<0.05$ 이고, ##은 $p<0.01$ 이며, ###은 $p<0.001$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012]

본 발명의 두경부암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에서, 상기 P-캐드헤린 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0013]

본 발명에서 사용되는 'siRNA(small interfering RNA)'는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는, 유전자 치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0014]

본 발명에 따른 siRNA에서, 센스 RNA 가닥 및/또는 안티센스 RNA 가닥은 이의 당 부분, 뉴클레오베이스 부분 또는 인트뉴클레오타이드 구조 내에 최소한 1개의 화학적 변형을 포함하는 것이 가능하다. 이러한 변형은 생체 내에서 뉴클레아제에 의해 siRNA의 파괴를 저해하는 것을 가능하게 할 수 있다. 본 발명에 따른 siRNA의 안정성과 생체 적합성을 생체 내에서 향상시킬 수 있는 모든 화학적 변형이 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명에 따른 siRNA는 "분리된 것"이며, 이는 자연 상태에 있지 않은 것을 의미하지만 인간의 개입과 관련된 모든 수단에 의

해 얻어질 수 있는 것을 의미한다. 특히, 본 발명에 따른 siRNA는 화학적 합성, 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의한 요구되는 뉴클레오타이드 서열의 증폭, 또는 재조합 합성에 의해 이미 존재하는 siRNA를 정제함으로써 얻어질 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 siRNA는 센스 및/또는 안티센스 RNA 가닥에 추가적으로 2 내지 4개 뉴클레오타이드의 3' 오버행(overhang) 단편을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 표현 "2 내지 4개 뉴클레오타이드의 3' 오버행 단편"은 한가닥의 3' 원위 말단에 있는 상보적 가닥과 쌍을 이루지 않는 2 내지 4개 뉴클레오타이드의 RNA 듀플렉스의 최소한 한 개의 가닥에 존재하는 것으로 이해된다. 3' 오버행 단편에 사용된 뉴클레오타이드는 자연상태의 뉴클레오타이드(리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드), 또는 리보오스의 2' 및 4' 포지션 사이에 메틸렌 브릿지를 포함하는 LNA(Locked Nucleic Acid)와 같은 변형된 뉴클레오타이드가 될 수 있다. 또한, 3' 오버행 단편은 본 발명에 따른 siRNA의 센스 RNA 가닥 및/또는 안티센스 RNA 가닥에 관한 문단에서 기술된 모든 형태의 화학적 변형을 가질 수 있다. 3' 오버행 단편에 대한 바람직한 서열은 T(여기서 T는 데옥시티미딘) 또는 U(여기서 U는 우라실)의 연속적인 서열로 이루어지며, 바람직하게는 T의 연속적인 서열이다. 또한 3' 오버행 단편의 서열 길이는 연속적인 2개의 뉴클레오타이드 염기이며, 바람직하게는 "TT" 또는 "UU"(여기서 U는 우라실)이다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 siRNA의 상보적 가닥 모두는 3' 오버행 단편을 포함한다. 이 경우, 2개의 3' 오버행 단편의 길이와 서열은 동일하거나 다를 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 siRNA의 상보적 가닥 모두는 서열 "TT"를 가진 2개 뉴클레오타이드의 동일한 3' 오버행 단편을 포함할 수 있다. 상기와 같은 3' 오버행 단편은 타겟 서열과의 결합을 방해하지 않으면서, cell conjugation에 유리한 추가구성이 된다.

[0016] 상기 c-MET 억제제는 SU11274{(3Z)-N-(3-chlorophenyl)-3-[[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-yl]methylidene]-N-methyl-2-oxo-1H-indole-5-sulfonamide}일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 상기 P-캐드헤린 siRNA 및 c-MET 억제제는 두경부암 세포의 증식, 이동 및 침윤을 저해시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 상기 두경부암은 비강암, 부비동암, 구강암, 비인두암, 구인두암, 하인두암, 후두암, 경부 식도암, 침샘암, 타액선암 및 설암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 암일 수 있으며, 바람직하게는 하인두암 및 후두암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0020] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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.

[0021] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화

학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 유효성분으로 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 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, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 향응집제, 운환제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 P-캐드헤린(P-cadherin) siRNA 및 c-MET(tyrosine-protein kinase met) 억제제를 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 두경부암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0027] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] [재료 및 방법]

[0029] 1. 세포 배양

[0030] 인간 두경부편평상피세포암(HNSCC; Head and neck squamous cell carcinomas) 세포주인 SNU1076(후두암) 및 SNU1041(하인두암) 세포주는 한국세포주은행에서 구입하였다. SNU1076 및 SNU1041 세포주는 RPMI 1640 배지(WELGENE Inc., 한국)에 배양하였다. 모든 세포주는 10% FBS(fetal bovine serum, HyCloneTM, USA) 및 100 U/ml의 페니실린-스트렙토마이신(HyCloneTM, USA)을 첨가하고, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0031] 2. P-캐드헤린 siRNA(Small-interfering RNA) 트랜스펙션

[0032] siRNA 트랜스펙션은 LipofectamineTM RNAi MAX(Thermo-Fisher Scientific, USA)를 이용하여 실시하였다. SNU1076(후두암) 및 SNU1041(하인두암) 세포주에 LipofectamineTM RNAi MAX를 이용하여 50nM의 P-캐드헤린 siRNA(표 1; Bioneer, Cat # 1001-1) 및 음성 대조군(NCsiRNA; #SN-1003, Bioneer, 대한민국)을 트랜스펙션 하였다.

표 1

[0033] P-캐드헤린에 대한 siRNA 서열

	siRNA	서열(5'→3')	서열번호
P-캐드헤린	sense	CUC UCU GGA AUG GAA CCU U	1
	antisense	AAG GUU CCA UUC CAG AGA G	2

[0034] 3. 세포 증식 분석

[0035] 96-웰 플레이트에 웰당 1×10^4 세포를 접종하고 24시간 후, SNU1076(후두암) 및 SNU1041(하인두암) 세포에 P-캐드헤린 siRNA(50nM) 단독; c-MET 억제제인 SNU1076(CAS no. 658084-23-2, 5μM) 단독; 또는 P-캐드헤린

siRNA(25nM) 및 SNU1076(2.5 μ M)의 병용; 처리하여 48시간 동안 배양하고, WST-1(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) 분석법을 사용하여 SNU1076 및 SNU1041의 세포 생존율을 측정하였다. 상기 WST-1 분석법은 살아있는 세포 내의 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소인 WST(Tetrazolium Salt)에서 포르마잔(formazan)이라는 발색물질을 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 것이다. 포르마잔(Formazan) 생성물은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하여 450nm에서 정량적으로 측정하였다.

[0036] **4. 콜로니 형성 분석**

[0037] 6-웰 플레이트에 웰당 1×10^3 세포를 접종한 후, 세포에 P-캐드헤린 siRNA(50nM) 단독; c-MET 억제제인 SNU1076(CAS no. 658084-23-2, 5 μ M) 단독; 또는 P-캐드헤린 siRNA(25nM) 및 SNU1076(2.5 μ M)의 병용; 처리하여 48시간 동안 배양하고, 3일마다 배지를 교체하고 12일 동안 생장시켰다. 콜로니들은 4% 포르말데히드로 고정시키고, 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후 이미지로 촬영하여 계수하였다.

[0038] **5. 세포 이동(migration) 및 침윤(invasion) 분석**

[0039] 6.5mm 직경의 폴리카보네이트 필터(8 μ m 기공 크기)가 있는 트랜스웰 챔버(Corning Coster, Cambridge, MA)를 사용하여 세포의 이동 및 침윤 정도를 분석하였다. 간략하게, 침윤 분석을 위해, 트랜스웰 멤브레인을 매트릭젤(Matrigel, BD Biosciences)로 37°C에서 6시간 동안 코팅하고, 이동 분석을 위해, 매트릭젤 없이 코팅하였다. 상부 챔버에 100 μ l의 무혈청 배지에 들어있는 2×10^5 세포를 첨가하였고, 하부 챔버에 10% FBS를 포함한 700 μ l의 배지를 첨가하였다. 이후, 세포에 P-캐드헤린 siRNA(50nM) 단독; c-MET 억제제인 SNU1076(CAS no. 658084-23-2, 5 μ M) 단독; 또는 P-캐드헤린 siRNA(25nM) 및 SNU1076(2.5 μ M)의 병용; 처리하고, 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 면봉을 이용하여 이동 또는 침윤되지 않은 세포를 제거하고, 하부 챔버(이동 또는 침윤 세포)에 부착된 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 광현미경(200배 배율) 하에서 4개의 대표적인 영역에서 계수하였다.

[0040] **6. 이종이식 *in vivo* 종양 모델(Xenograft *in vivo* tumor model)**

[0041] 마우스는 특정 병원체 무균 조건에서 유지시켰으며, 충남대학교 기관동물관리위원회의 지침에 따라 사용되었으며, 기관동물관리위원회로부터 동물 연구 프로토콜(프로토콜 번호: CNUH-020-A0036-1)을 승인받았다. 6주령의 BALB/c-nude 마우스(20마리)는 (주)오리엔트 바이오로부터 구입하였으며, 마우스들은 무작위로 4개의 실험군(n=5마리)으로 나누었다: 음성 대조군(NCsiR); P-캐드헤린 siRNA 단독 처리군(P-cadsiR, 2mg/100 μ l); SU11274 단독 처리군(SU11274, 0.4mg/100 μ l); 및 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군(1mg의 P-cadsiR + 0.2mg의 SU11274/100 μ l). 루시페라제 발현 FaDu(FaDu-luc) 세포(1×10^6)를 BALB/c-nude 마우스의 우측 아래쪽 옆구리 부위에 피하 접종하였다. 접종 7일 후 종양의 직경이 약 50mm 크기에 도달하였을 때, 18일 동안 각 처리군 100 μ l를 3일 간격으로 한번씩 종양 내 주사(intratatumoral injection)하였다. 마지막 주입 후, 안락사시킨 마우스에서 종양을 적출하여 조직학적 분석에 사용하였다.

[0042] **7. 면역조직화학(Immunohistochemistry) 분석**

[0043] 조직 샘플들은 4% 포르말린 용액으로 고정시키고 파라핀에 포매하였다. 헤마토실린과 에오신(H&E) 염색의 경우, 조직 절편을 자일렌에서 탈파라핀화하고 알코올 용액에서 수화시키고 H&E로 염색하였다. 샘플들은 장착된 후 자동 디지털 슬라이드 스캐너(Pannoramic MIDI; 3DHISTECH, HU)에서 샘플을 검사하였다. 면역조직화학(immunohistochemistry)을 위해, 조직 절편은 자일렌으로 탈파라핀화시키고, 알코올 용액에 수화시키고, 항원 회수를 위해 항원 회수 시트라 용액(pH 6.0)에서 100°C에서 15분 동안 가열하였다. 단일 면역염색의 경우, 내인성 과산화효소(peroxidase) 활성을 0.3% Triton X-100이 포함된 인산염 완충 식염수(PBS)으로 희석한 1%(v/v) 과산화수소 용액(Sig-ma-Aldrich, USA)에서 상온에서 30분 동안 차단시켰다. 절편은 표시된 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양한 후, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 함께 배양하였다. 마지막으로, 3,3'-다아미노벤지딘(3,3'-diaminobenzidine; DAB, USA)를 사용하여 표시된 항체들을 검출하고, 핵은 헤마톡실린으로 염색하였다. PBS로 세척한 후 시료들은 자동 디지털 슬라이드 스캐너를 사용하여 분석하였다.

[0044] **8. 통계처리**

[0045] 통계 분석은 SPSS for Windows 통계 소프트웨어(버전 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다. 모든 실험은 3회 반복하였고, 그룹 간 비교는 unpaired Student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였고, $p < 0.05$ 는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

[0046] **실시예 1. P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274의 병용 처리에 따른 두경부암세포의 성장 억제 효과**

[0047] 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274(c-Met 억제제)를 하인두암(SNU1041) 및 후두암(SNU1076) 세포에 병용 처리하였을 때, WST-1 및 콜로니 형성 분석을 통해 세포 증식능을 측정하였다.

[0048] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이, P-캐드헤린 siRNA(P-cadsiR) 및 SU11274 단독 처리군 각각에 대비하여 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA(P-cadsiR) 및 SU11274 병용 처리군에서 하인두암 및 후두암 세포의 증식능이 통계적으로 유의미하게 감소되었다. 또한, 콜로니 형성 분석 결과도 마찬가지로, 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA(P-cadsiR) 및 SU11274 병용 처리군에서 단독 처리군에 비해 콜로니 수가 감소된 것을 알 수 있었다(도 2).

[0049] **실시예 2. P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274의 병용 처리에 따른 두경부암세포의 이동 및 침윤 억제 효과**

[0050] 본 발명의 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274(c-Met 억제제)를 하인두암(SNU1041) 및 후두암(SNU1076) 세포에 병용 처리하였을 때 암세포의 이동 및 침윤 억제능을 측정하기 위해, 매트릭셀 코팅 챔버(matrigel coating chamber)를 이용한 분석을 수행하였다.

[0051] 그 결과, 도 3 및 도 4에 개시한 바와 같이 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군은 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274의 단독 처리군 각각에 대비하여 하인두암 및 후두암 세포의 이동 정도가 통계적으로 유의미하게 감소되었고, 암세포의 침윤 억제 효과도 마찬가지로 단독 처리군에 비해 P-캐드헤린 siRNA(P-cadsiR) 및 SU11274 병용 처리군에서 효과가 더 우수한 것을 확인하였다(도 5).

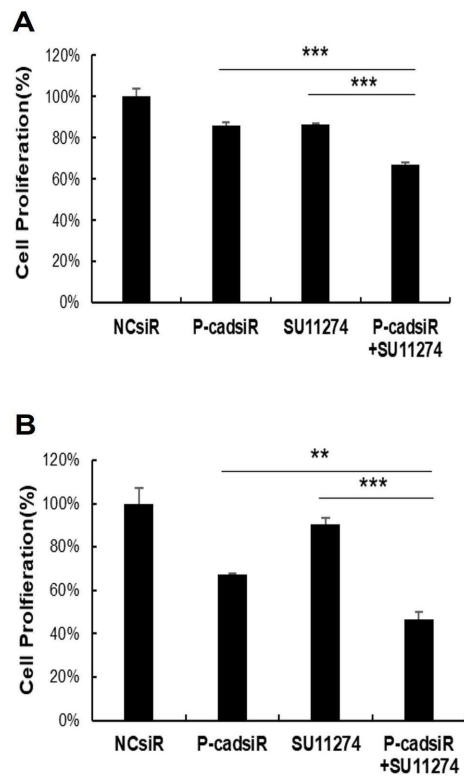
[0052] **실시예 3. 이종이식(xenograft) 모델에서 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274의 병용 처리에 따른 두경부암세포의 성장 억제 효과**

[0053] 체내(*in vivo*)에서, P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274의 병용 처리가 암의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 루시페라제-발현 FaDu(FaDu-Luc) 세포를 6주령의 BALB/c 누드 마우스에 피하 접종하고 7일 후 종양의 직경이 약 50mm 크기일 때, P-캐드헤린 siRNA 단독; SU11274 단독; 또는 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리를 2일에 한번씩 주입하였다.

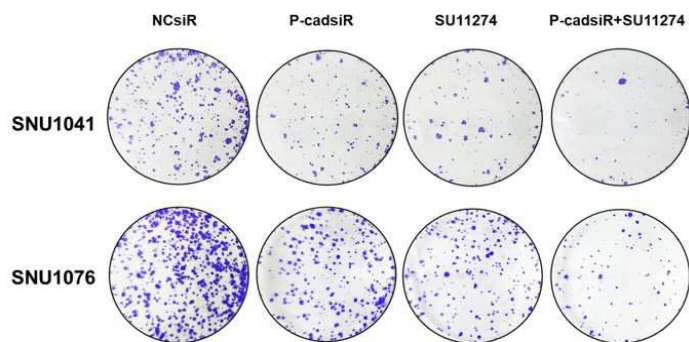
[0054] 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274의 단독 처리군에 대비하여 P-캐드헤린 siRNA 및 SU11274 병용 처리군에서 종양의 크기 및 부피가 통계적으로 유의미하게 더 감소하였다.

도면

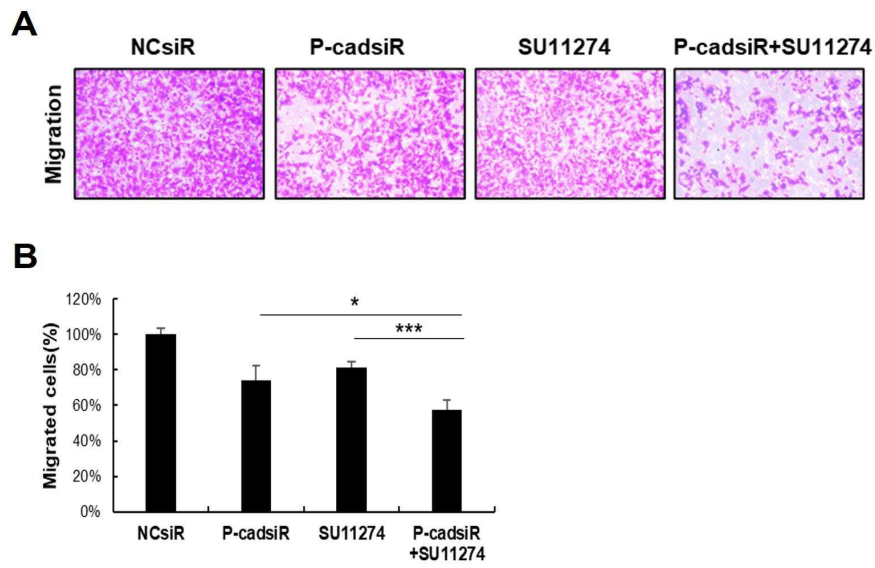
도면1



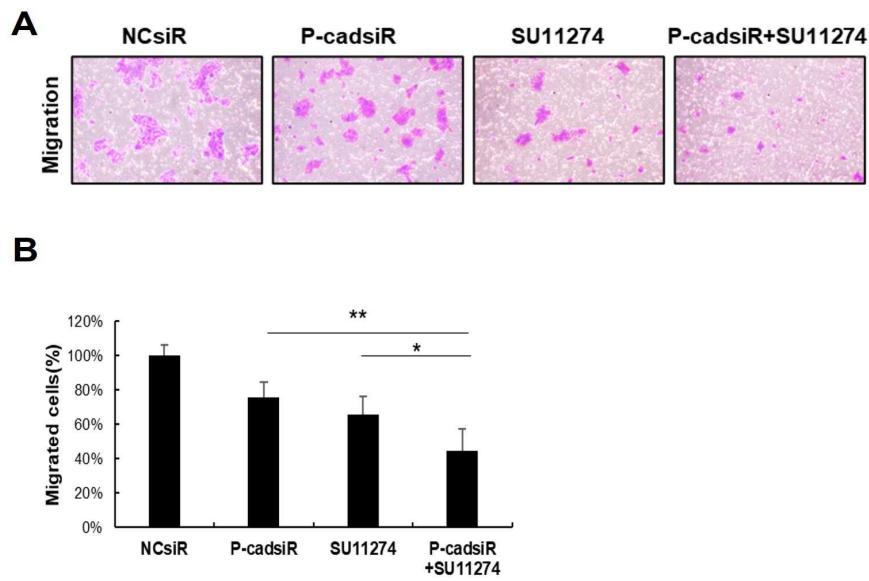
도면2



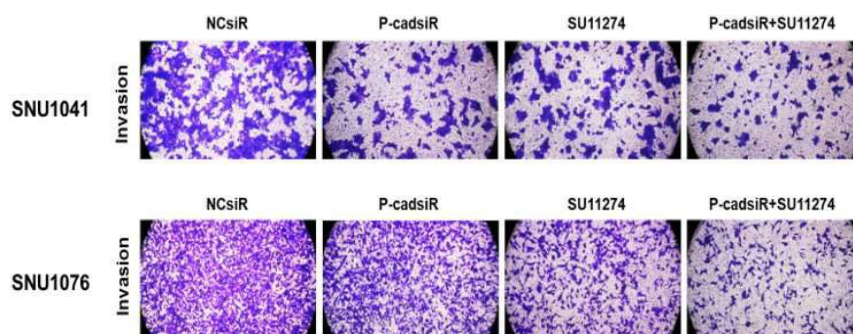
도면3



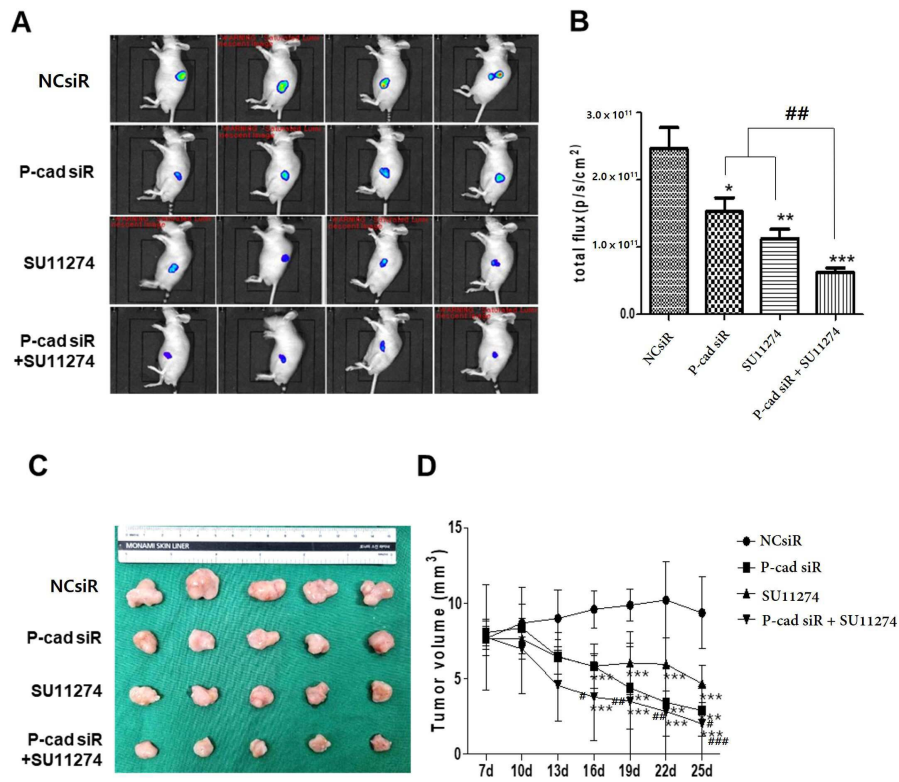
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.