



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098191
(43) 공개일자 2018년09월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/573 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/436 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/573 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2018-0098026(분할)
(22) 출원일자 2018년08월22일
심사청구일자 2018년08월22일
- (62) 원출원 특허 10-2016-0135006
원출원일자 2016년10월18일
심사청구일자 2016년10월18일
- (30) 우선권주장
1020150153296 2015년11월02일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
- (72) 발명자
전상민
경기도 수원시 팔달구 권광로 246, 112동 1801호
(인계동, 래미안 노블클래스)
- (74) 대리인
특허법인태백

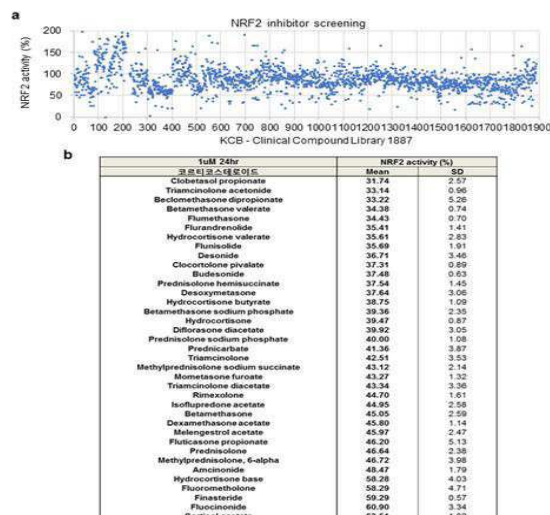
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 비소세포성 폐암 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 글루코코르티코이드 계열 화합물, 글루코코르티코이드 계열 화합물 및 mTOR 억제제, 또는 글루코코르티코이드 계열 화합물 및 AMPK 억제제를 유효성분으로 포함하는 폐암 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 글루코코르티코이드 계열 화합물들은 KEAP1 돌연변이 폐암 또는 KEAP1 및 LKB1 돌연변이 폐암에서 NRF2 억제를 통해 암세포 성장을 억제하며, 상기 mTOR 억제제와 병용 시 더 강화된 항암 효과를 보이므로, 돌연변이 폐암의 항암제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한 중앙미세환경의 특징 중 하나인 저영양 환경은 KEAP1 및 LKB1 정상 폐암에서 NRF2 및 AMPK의 활성화를 유발하고, 상기 글루코코르티코이드 계열 화합물은 KEAP1 및 LKB1 정상 폐암에서 AMPK 억제제와 병용처리 시 저영양 상태에서 강력한 항암 시너지 효과를 보이므로, KEAP1 정상 폐암의 항암제로도 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/436 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465020563

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 국립암센터

연구사업명 암정복추진 연구개발사업

연구과제명 폐암에서 발견되는 LKB1/KEAP1 유전자 돌연변이 조합에 의해 조절되는 신호전달 네트워크
및 대사 변화를 이용한 새로운 환자 맞춤형 항암 전략 개발

기 여 율 50/100

주관기관 아주대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711036173

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(신진)

연구과제명 암에서 발견되는 LKB1의 모순적인 양면성에 관한 연구 및 이를 인용한 새로운 항암 전략
개발

기 여 율 50/100

주관기관 아주대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시노론 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate) 및 데스옥시메타손(desoxymetasone)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 폐암 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 치료용 약학 조성물.

청구항 3

암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시노론 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate) 및 데스옥시메타손(desoxymetasone)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 조성물은 클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시노론 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate) 및 데스옥시메타손(desoxymetasone)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 라파마이신(rapamycin), 템시로리무스(temsirolimus), 에버롤리무스(Everolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), AZD-8055, AZD-2014, OSI-027, INK128, PP242, NVP-BEZ235, XL765, BGT226 및 PF-04691502로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 폐암 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 폐암은 KEAP1 돌연변이 폐암 또는 KEAP1 및 LKB1 돌연변이 폐암인 것을 특징으로 하는 폐암 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 글루코코르티코이드계 화합물 1 내지 50 중량% 및 mTOR 억제제 50 내지 99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 치료용 약학 조성물.

청구항 9

클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부테소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate) 및 데소옥시메타손(desoxymetasone)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 라파마이신(rapamycin), 템시로리무스(temsirolimus), 에버롤리무스(Everolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), AZD-8055, AZD-2014, OSI-027, INK128, PP242, NVP-BEZ235, XL765, BGT226 및 PF-04691502로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부테소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate) 및 데소옥시메타손(desoxymetasone)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 인 비트로(In vitro)에서 NRF2(핵 인자(에리트로이드 2)-유사인자 2)의 활성 억제용 시약 조성물.

청구항 12

사람을 제외한 동물에서, 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부테소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate) 및 데소옥시메타손(desoxymetasone)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 NRF2(핵 인자(에리트로이드 2)-유사인자 2)의 활성 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폐암의 치료를 위한 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐암(lung cancer)은 남녀 모두의 성별에서 두 번째로 흔히 발생하는 암으로, 모든 암에서 15%를 차지한다. 2011년 미국 암 학회(American cancer society)의 보고에 따르면 한 해 22만 환자 이상이 폐암으로 진단을 받으며 이중 약 70%가 사망에 이르는데, 이는 전체 암 사망 환자의 27%를 차지한다.

[0003] 이러한 폐암 중에서도 비소세포성 폐암(non small lung cancer)은 상피성 암(carcinoma)의 일종으로 소세포성 폐암(small lung cancer)이 아닌 모든 상피성 폐암(epithelial lung cancer)을 일컬으며, 폐암 전체의 약 85% 내지 90%를 차지한다. 비소세포성 폐암의 증상은 지속적인 기침, 흉부 통증, 체중감소, 손톱 손상, 관절 통증,

호흡의 단기화(shortness of breath) 등이 있으나, 비소세포성 폐암은 일반적으로 천천히 진행되기 때문에 초기에는 그 증상을 거의 나타내지 않아 조기 발견 및 치료가 어렵고, 뼈, 간, 소장 및 뇌 등 전신에 전이된 후에야 발견될 가능성이 높다.

[0004] 소세포성 폐암에 비해 상대적으로 화학요법(chemotherapy)에 덜 민감한 비소세포성 폐암은 TNM 분류법에 기초하여 다음과 같이 암의 단계를 나눌 수 있다: 종양의 크기(the size of tumor), 국소 림프절(regional lymph node)로의 암 확산 정도 및 암 전이(metastasis)의 유무.

[0005] 비소세포성 폐암 중 초기의 비전이성(non-metastatic) 비소세포성 폐암의 경우, 화학요법 및 방사선에 대한 민감도가 매우 낮기 때문에 일반적으로 백금을 함유하는 시스플라틴(xisplatin)과 관련된 보조적인 화학요법(ancillary chemotherapy)과 함께 수술을 하게 된다. 반면에 초기 단계를 지나 전이성 비소세포성 폐암으로 발달한 경우에는 다양한 화학 요법 및 방사선 치료가 이루어진다.

[0006] 또한, 비소세포성 폐암은 암세포의 크기, 모양 및 화학적 구성에 따라 몇 가지 하위 종류로 나뉘며, 대표적으로는 선암(adenocarcinoma), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 대세포암(large cell carcinoma) 등이 있다. 선암은 전체 폐암의 40% 이상을 차지할 정도로 가장 높은 빈도로 발생하는 폐암으로, 폐의 바깥 부위(outer region)에서 발견되며 다른 폐암보다 천천히 진행되는 경향이 있으나, 초기 높은 전이 경향 및 방사선 저항성을 나타낸다. 편평상피암은 전체 폐암의 25%-30%를 차지하는 비소세포성 폐암의 한 종류로서, 기도(airway)를 이루고 있는 세포의 초기 단계(early version)에서 시작되며, 상기 암은 주로 흡연자에서 높은 발병률을 나타낸다. 또한, 전체 폐암의 10%-15% 정도를 차지하는 대세포암은 폐의 어느 부위에서나 발병할 수 있으며, 그 진행 속도가 소세포성 폐암(small cell lung cancer)과 유사할 만큼 빠르다. 하지만 이러한 높은 발병률과 사망률에도 불구하고 아직까지 비소세포성 폐암을 극복할 수 있는 어떤 약물 또는 치료 방법도 개발되지 못한 실정이다.

[0007] 한편, 1970년대 내지 1980년대 종양 유발 및 억제 유전자가 처음 발견된 이후, 새로운 종양 특이적 변이 유전자의 발굴 및 이를 통한 신호전달 경로를 타겟으로 한 표적 항암 치료가 활발히 시도되어 왔으며 최근에는 이러한 항암 표적 치료 전략의 일환으로 미국과 영국을 중심으로 대규모 종양 유전체 프로젝트(TCGA, ICGC, CGP)가 진행되어 왔다. 그 결과, 특이적인 신호전달 과정을 표적으로 한 상피 성장 인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, EGFR), 혈관 표피 성장인자(vascular endothelia growth factor, VEGF(R)), mTOR(라파마이신의 기전적 표적, mechanistic target of rapamycin) 억제제 등이 많은 기대를 받으며 개발되어 왔으나 예상만큼 큰 효과를 거두지 못했는데, 이의 원인으로 종양 유전체 프로젝트를 통해 확인된 다양하고 이질적인 돌연변이와 이를 통한 비정상적인 신호전달 경로의 다양성과 이질성 때문일 것으로 예상하고 있다.

[0008] 최근, 이러한 표적 항암 치료 전략의 한계점을 극복하기 위해 효과적인 병용 화학요법의 개발에 대한 시도가 많이 이루어지고 있다. 이를 위해 암에서 흔히 함께 발견되는 유전자 돌연변이 조합을 규명하기 위한 연구가 진행되어 왔고, 최근 연구에서 비소세포성 폐암에서 KEAP1(켈히-유사 ECH 연관 단백질 1, kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 돌연변이와 LKB1(간 키나아제 B1, Liver kinase B1) 돌연변이가 흔히 함께 발생한다는 것이 보고되었다. KEAP1 돌연변이는 NRF2(핵 인자(에리트로이드 2)-유사인자 2, Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2)의 활성화를 유도하고, KEAP1 돌연변이 폐암에서 NRF2의 발현을 억제하였을 때 암세포의 성장이 효과적으로 억제됨이 보고되어, NRF2 억제제의 개발에 대한 요구가 큰 상황이다. 그러나 천연물 스크리닝을 통해 발견된 몇 가지 NRF2 억제제가 보고되긴 했지만 그 효과가 미미하고 일관성이 없어 아직까지 임상적으로 개발 중인 약물은 없는 실정이다. 한편 LKB1 돌연변이는 mTORC1의 활성화를 유도하고, 현재 mTORC1의 억제제로 라파마이신을 비롯한 여러 가지 약물이 개발되어 있다. 따라서, KEAP1과 LKB1이 함께 돌연변이 되어 있는 비소세포성 폐암에서 활성화 되는 NRF2와 mTORC1을 함께 억제하는 병용 항암 전략이 매우 효과적일 것으로 기대되고 있으나, 아직 이에 대한 연구도 구체적으로 이루어지지 않은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2008-0018150호.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 폐암에서 흔히 활성화되어 있는 NRF2 활성을 억제하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 목적은 폐암에서 흔히 활성화되어 있는 NRF2 활성을 억제하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세트나이드(triamcinolone acetone), 부테소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 메렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세트나이드(triamcinolone acetone), 부테소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 메렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 포함하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 더불어 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세트나이드(triamcinolone acetone), 부테소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트

(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시놀론(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시놀론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 메렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 AMPK 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시놀론 아세토나이드(triamcinolone acetone), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시놀론(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시놀론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 메렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시놀론 아세토나이드(triamcinolone acetone), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시놀론(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시놀론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 메렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0017] 더욱이 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide),

베클로메타손 디프로피오네이트(beclo-methasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시놀론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluciclonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 AMPK 억제제를 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018]

본 발명에 따르면, 클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclo-methasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시놀론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluciclonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물은 KEAP1 돌연변이 폐암 또는 KEAP1 및 LKB1 돌연변이 폐암에서 NRF2 억제를 통해 세포 성장을 억제하며, mTOR 억제제와 병용 시 더 강화된 항암 효과를 나타내므로, KEAP1 돌연변이를 포함한 폐암의 치료 또는 개선에 유용하게 사용할 수 있다. 또한 KEAP1, LKB1 유전자 정상 폐암에서도 종양미세환경의 특징 중 하나인 영양 부족상태에 처하면 NRF2가 활성화되는 한편 LKB1에 의해 AMPK도 함께 활성화됨을 확인하였고, 이 폐암에서 글루코코르티코이드계 화합물은 AMPK 억제제와 병용 시 항암 시너지 효과를 나타내므로, KEAP1 정상 폐암의 치료 또는 개선에도 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 NRF2 억제제 스크리닝을 위한 루시페라아제 활성 측정 시스템의 정확성 및 유효성을 검증한 것이다.

도 2 및 도 3은 1887 임상 화합물 라이브러리를 이용하여 KEAP1-돌연변이 폐암 세포주에서 NRF2 억제 효과가 있는 화합물을 스크리닝한 결과를 나타낸 것이다.

도 4 및 도 5는 KEAP1-돌연변이 폐암 세포주에서 글루코코르티코이드(Glucocorticoids, GCs) 계열 약물 중 가장 효과가 큰 클로베타솔 프로피오네이트에 의한 NRF2 억제 기전을 확인한 것이다.

도 6은 KEAP1-돌연변이 세포주에 클로베타솔 프로피오네이트에 의한 NRF2 타겟 발현 억제효과 및 그로 인한 활성산소 증가 효과를 확인한 것이다.

도 7 및 도 8은 KEAP1-돌연변이 또는 KEAP1-돌연변이/LKB1-돌연변이 폐암 세포주에 클로베타솔 프로피오네이트 단독 및 mTOR 억제제인 라파마이신과 병용 처리 시 나타나는 항암 시너지 효과를 각각 in vitro 및 in vivo에서

확인한 것이다.

도 9는 KEAP1-정상/LKB1-정상 폐암 세포주에서 종양미세환경의 특징 중 하나인 영양소 부족상태에서 NRF2와 AMPK(AMP 활성화 단백질 키나아제, AMP-activated protein kinase)가 함께 활성화됨을 확인한 것이며, 이 폐암 세포주를 저영양 상태에서 배양 시 클로베타솔 프로피오네이트와 AMPK억제제인 수니티닙(sunitinib)과의 병용 처리에 의해 나타나는 항암 시너지 효과를 in vitro에서 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명의 발명자들은 이전 수행했던 연구(발표하지 않음) 결과와 종래 공지된 연구(J Thorac Oncol, 2014, Jun;9(6):794-804 ; Cancer Discov, 2015, Aug;5(8):860-77)에서 실제 폐암에서 돌연변이 되어 있는 유전자 조합을 조사한 결과 및 KEAP1(켈히-유사 ECH 연관 단백질 1, kelch-like ECH-associated protein 1)과 LKB1(간 키나아제 B1, Liver kinase B1)이 흔히 함께 돌연변이 되어 있다고 보고한 결과를 기반으로, LKB1/KEAP1 돌연변이에 의해 활성화되는 신호전달 표적으로 알려진 mTOR(라파마이신의 기전적 표적, mechanistic target of rapamycin)과 NRF2(핵 인자(에리트로이드 2)-유사 인자 2, Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2)를 동시에 억제하는 항암 전략을 수립하였다. 또한 KEAP1/LKB1 유전자 정상 폐암세포에서도 종양미세환경의 특징 중 하나인 영양소 부족 상태에 처하면 NRF2가 활성화되는 한편, LKB1에 의해 AMPK(AMP 활성화 단백질 키나아제, AMP-activated protein kinase)도 함께 활성화됨을 확인하여, NRF2와 AMPK를 동시에 억제하는 항암 전략도 함께 수립하였다.
- [0021] 이를 위하여 한국화학물은행에서 제공받은 임상화합물 라이브러리 1887종 중 NRF2 억제 효과가 있는 약물을 스크리닝하여 50% 이상 억제효과가 있는 글루코코르티코이드 계열 화합물 13종을 발굴하였고, 이중 가장 효과가 탁월한 클로베타솔 프로피오네이트를 이용하여 항암 효과를 확인하였다. 먼저 KEAP1 돌연변이 폐암 세포에서 세포 성장 억제 효과를 확인하였고, 특히 KEAP1/LKB1이 함께 돌연변이 되어 있는 폐암 세포에서 mTOR 억제제인 라파마이신(rapamycin)과의 병용 시 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 또한 KEAP1/LKB1 유전자 정상 폐암 세포를 저 영양 상태에서 배양시 클로베타솔 프로피오네이트와 AMPK 억제제인 수니티닙(sunitinib)과의 병용처리 하였을 때 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 상기 KEAP1은 E3 유비퀴틴 리가아제 복합체(E3 ubiquitin ligase complex)에 존재하는 것으로 전사인자인 NRF2 단백질과 결합하여 분해를 유도함으로써 그 기능을 억제한다. 만약 암세포에서 KEAP1 유전자가 돌연변이 되면 (폐암에서 20~30%), NRF2 단백질의 양이 증가하여 타겟 유전자의 전사를 증가시키고, 이에 따라 주로 NRF2의 타겟인 항산화 관련 효소들의 활성이 증가한다.
- [0023] 상기 LKB1은 STK11(Serine/Threonine Kinase 11)으로도 알려져 있는 세린/트레오닌 키나아제로서 폐암(20~30%)을 비롯하여 자궁암 및 대장암 등에서 흔히 돌연변이 되거나 발현이 억제되어 기능이 상실되어 있는 종양 억제 유전자로 알려져 있다. LKB1의 기질로는 현재 12가지 정도가 밝혀져 있으며 이 중 AMPK의 활성화를 통한 mTORC1 억제 신호전달 경로가 바로 LKB1의 종양 억제 기능을 나타내는 것으로 제시되고 있다. 하지만 LKB1에 의한 AMPK의 활성화는 세포의 에너지 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 수행하며, 이는 영양소 부족상태인 종양 미세환경에서 암세포의 생존에 매우 중요하기 때문에 종양 촉진 기능을 나타내기도 한다. 따라서 LKB1-AMPK 경로는 상황에 따라 종양억제와 종양촉진 기능을 모두 수행하는 것으로 알려져 있다.
- [0024] 따라서 본 발명은 클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate), 데소옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프레드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로

코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluciclonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 이때, 상기 폐암은 KEAP1 돌연변이 폐암 또는 KEAP1 및 LKB1 돌연변이 폐암일 수 있다.

[0026] 또한, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 돌연변이된 KEAP1/LKB1 신호전달에 의해 활성화되는 타겟인 mTOR의 억제제를 더 포함할 수 있다.

[0028] 따라서 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate), 데소옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluciclonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 포함하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0029] 이때, 상기 mTOR 억제제는 라파마이신(rapamycin), 템시로리무스(temsirolimus), 에버롤리무스(Everolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), AZD-8055, AZD-2014, OSI-027, INK128, PP242, NVP-BEZ235, XL765, BGT226 및 PF-04691502로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 라파마이신이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 또한 상기 폐암은 KEAP1 돌연변이 폐암 또는 KEAP1 및 LKB1 돌연변이 폐암일 수 있다.

[0031] 더욱이, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있다.

[0032] 상기 약학 조성물은 글루코코르티코이드계 화합물 1 내지 50 중량% 및 mTOR 억제제 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있는 바, 이러한 범위 내에서 가장 효과적으로 NRF2와 mTOR을 억제하여 폐암의 치료효과를 나타낼 수 있으므로 바람직하다.

[0033] 더욱이, 본 발명의 약학 조성물은 KEAP1/LKB1 정상 폐암세포의 신호전달 과정에서 활성화되는 타겟인 AMPK의 저해제를 더 포함할 수 있다.

[0034] 즉, 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate), 데소옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate),

acetate), 메렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(flucinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 AMPK 억제제를 포함하는 폐암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [0035] 이때, 상기 AMPK 억제제는 수니티닙(sunitinib) 및 도르소모르핀(Dorsomorphin, compound C)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 수니티닙일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 폐암은 KEAP1 및 LKB1 정상 폐암일 수 있는 바, 본 발명에 따른 약학 조성물은 이러한 폐암에서 가장 우수한 치료효과를 나타낼 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있다.
- [0038] 한편, 상기 약학 조성물은 글루코코르티코이드계 화합물 1 내지 50 중량% 및 AMPK 억제제 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있는 바, 이러한 범위 내에서 가장 효과적으로 AMPK를 억제하여 폐암의 치료효과를 나타낼 수 있으므로 바람직하다.
- [0039] 상기 약학조성물은 상기 글루코코르티코이드계 화합물, mTOR 억제제 및 AMPK 억제제 외에 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 갈슘 포스페이트, 갈슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 약학조성물은, 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.
- [0042] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 갈슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [0043] 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.
- [0044] 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.
- [0045] 본 발명에 따른 약학조성물의 유효성분인 글루코코르티코이드계 화합물 또는 이와 mTOR 억제제 혼합의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0047] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0049] 더불어 본 발명은 클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide),

베클로메타손 디프로피오네이트(beclo-methasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0050] 또한 본 발명은 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclo-methasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 mTOR 억제제를 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0051] 이때, 상기 mTOR 억제제는 라파마이신(rapamycin), 템시로리무스(temsirolimus), 에버롤리무스(Everolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), AZD-8055, AZD-2014, OSI-027, INK128, PP242, NVP-BEZ235, XL765, BGT226 및 PF-04691502로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 라파마이신일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명은 또한, 클로베타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 암시노나이드(amcinonide), 베타메타손 발레레이트(betamethasone valerate), 히드로코르티손 발레레이트(hydrocortisone valerate), 플루니솔라이드(flunisolide), 플루르안드레놀라이드(flurandrenolide), 플루메타손(flumethasone), 데소나이드(desonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclo-methasone dipropionate), 트리암시논 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 부데소나이드(budesonide), 모메타손 퓨로에이트(mometasone furoate), 데스옥시메타손(desoxymetasone), 클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate), 프리드니솔론 헤미석시네이트(prednisolone hemisuccinate), 하이드로코르티손 뷰티레이트(hydrocortisone butyrate), 베타메타손 소듐 포스페이트(betamethasone sodium phosphate), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 프레드니솔론 소듐 포스페이트(Prednisolone sodium phosphate), 프레드니카베이트(prednicarbate), 트리암시논(triamcinolone), 메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트(methylprednisolone sodium succinate), 트리암시논론 디아세테이트(triamcinolone diacetate), 리멕솔론(rimexolone), 이소플루프레돈 아세테이트(isoflupredone acetate), 베타메타손(betamethasone), 텍사메타손 아세테이트(dexamethasone acetate), 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 플루티카손 프로피오네이트(fluticasone propionate), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸프레드니솔론 6-알파(methylprednisolone 6-alpha), 하이드로코르티손 베이스(hydrocortisone base), 플루오로메톨론(fluorometholone), 피나스테라이드(finasteride), 플

루오시노나이드(fluocinonide) 및 코르티솔 아세테이트(cortisol acetate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 글루코코르티코이드계 화합물 및 AMPK 억제제를 포함하는 폐암 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0053] 이때, 상기 AMPK 억제제는 수니티닙(sunitinib) 및 도르소모르핀(Dorsomorphin, compound C)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 수니티닙일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 글루코코르티코이드계 화합물, mTOR 억제제 또는 AMPK 억제제 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0055] 상기 건강기능식품에 함유된 글루코코르티코이드계 화합물, 이와 mTOR 억제제 혼합물 또는 이와 AMPK 억제제 혼합물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0056] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0060] <준비예 1>

[0061] 실험에 사용하기 위하여, 유전자 정상 비소세포 폐암 세포주(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)인 H1299(KEAP1-정상, LKB1-정상) 및 KEAP1 돌연변이인 비소세포 폐암 세포주들(H2228(KEAP1-돌연변이, LKB1-정상), A549(KEAP1-돌연변이, LKB1-돌연변이), H460(KEAP1-돌연변이, LKB1-돌연변이))을 한국세포주은행에서 구입하고, 10%의 소태아혈청(FBS, Invitrogen), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% HEPES가 보충된 둘베코의 수정 이글 배지(DMEM, HyClone Laboratories, USA)에서 5% CO₂, 37℃로 배양하였다. 또한 이후 실험에서 스크리닝을 위하여 96-웰 플레이트에 A549-ARE 세포를 높은 밀도로 시딩한 후 1887 임상 화합물 라이브러리(한국화학물은행)를 처리하였다. 클로베타줄 프로피오네이트(CP)는 Sigma-Aldrich(St.Louis, USA)에서 구입하였다. 이외에 기타 실험에 필요한 물질들은 Sigma(CT99021, GSK3 억제제), EMD Millipore(MG132), LC laboratories(라파마이신)에서 구입하였고, 웨스턴 블롯에 사용될 항체들은 GeneTex(ME1, IDH1, G6PD, PGD, GCLM, GCR, NRF2), Cell Signaling Technology(NRF2, LKB1, p-AMPK, AMPK, pGSK-3, GSK3, p-p70S6K, p70S6K, α-tubulin), Sigma(KEAP1), Proteintech(SRXN1)에서 구입하였다.

[0063] <실시예 1> NRF2 억제제 스크리닝

[0064] (1) NRF2 활성 측정을 위한 ARE-luciferase 세포주 확립

[0065] 효과적인 NRF2 억제제를 스크리닝하기 위하여, 도 1a와 같이 NRF2 활성을 모니터링할 수 있는 루시페라아제/녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP) 듀얼 산화 방지제 반응 요소(antioxidant responsive element, ARE)-DNA 염기서열(CACCGTGACTCAGCAATTx3) 시스템(Luciferase/GFP dual ARE-receptor cell line system)을 NRF2 활성이 높은 A549(LKB1 정상/KEAP1 돌연변이) 비소세포성 폐암 세포에 확립하였다.

[0066] A549 세포주에서 높은 활성을 나타내는 루시페라아제 및 GFP 시그널이 NRF2 활성에 특이적임을 증명하기 위해, 하기 <표 1>과 같이 서로 다른 서열을 가진 3개의 독시사이클린(doxycyclin)-유도성 NRF2-shRNA를 제작하였다. Tet-유도성 shRNA 발현 시스템을 구축하기 위해, tet-pLKO-pyro vector(Dmitri Wiederschain: Addgene plasmide #21915)에 하기 shRNA들을 삽입한 후, 형질도입을 통하여 독시사이클린 유도성 NRF2-shRNA를 발현하는 A549-ARE 세포주를 확립하였다.

[0067] 이후, NRF2-shRNA 발현을 유도하기 위해 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 독시사이클린(doxycycline, DOX; Clontech)를 배지에 매 2일마다 처리해주었다. 그 후 NRF2 발현 억제 효율을 웨스턴 블롯, 루시페라아제 활성 측정 및 형광 현미경을 이용한 GFP 발현 측정을 통해 검증하였다.

표 1

shRNA	서열	서열번호
NRF2sh-1	CCGGAGTTGAGCTTCATTGAACTGCCTCGAGGCAGTTCAATGAAGCTCAACTTTTTTG	1
NRF2sh-2	CCGGGCTCCTACTGTGATGTGAAATCTCGAGATTTACATCACAGTAGGAGCTTTTTG	2
NRF2sh-3	CCGGAGAGCAAGATTTAGATCATTTCTCGAGAAATGATCTAAATCTTGCTCTTTTTTG	3

[0070] 구체적으로, 웨스턴블롯을 위해, Tet-pLKO-NCshRNA(음성 대조군) 및 3종류의 Tet-pLKO-NRF2 shRNA를 발현하는 A549 세포에 독시사이클린을 3일, 6일 동안 처리 후 단백질을 분리하였다. 분리된 각 10 μg 의 단백질을 8% 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)에 로딩하여 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스(Nitrocellulose, NC) 멤브레인에 이동시키고 NRF2 항체(Cell signaling, 1:1000)와 액틴(actin) 항체(SCBT, 1:1000)를 5% 탈지유(skim milk)를 함유한 TBST(Tris-Buffered Saline with tween 20) 버퍼에 희석하여 4℃에서 밤새 반응시켰다. 그 후, 2차 항체를 1시간 동안 반응시키고 TBST로 세척한 후, ECL(Enhanced chemiluminescence)을 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

[0071] 또한, 먼저 A549-ARE 세포를 96 웰 플레이트에 웰당 5×10^3 개로 분주하고, 24시간이 지난 후 농도별(1 μm 또는 5 μm)로 각 임상 화합물을 처리하였다. 처리하고 24시간 지난 후 용혈 버퍼(Lysis buffer) 30 μl 를 넣어주고, 4℃에서 로커(Rocker)를 이용하여 40분 동안 용해시켰다. 용해된 생성물을 20 μl 씩 96 웰 화이트 플레이트(96 well white plate)에 넣어주고, 하기 조성과 같은 루시페라아제 기질 버퍼(Luciferase substrate buffer) 100 μl 를 넣어주고 플레이트 리더를 이용하여 루시페라아제 활성을 측정하였다.

[0072] *** 기질을 위한 버퍼(Buffer for Substrate)**

[0073] **1. 버퍼 A(Buffer A)**

[0074] 1mM D-루시페린(D-Luciferin, pH 6.1 - 6.4 (황색 빛, yellow light) -20℃에서 보관)

[0075] **2. 버퍼 B(Buffer B)**

[0076] 40 mM 트리신(Tricin, MW 179.2)

[0077] 2.14 mM (MgCO_3)₄ Mg(OH)₂ 5H₂ O(MW 485.7)

[0078] 5.34 mM MgSO₄ 7H₂ O(MW 246.48)

[0079] 66.6 mM 디티오프레이톨(dithiothreitol, DTT, MW 1542)

[0080] 1.06 mM 아데노신삼인산(Adenosine triphosphate, ATP, MW 551)

[0081] 0.54 mM 코엔자임(Coenzyme, MW 767.5)

[0082] 0.2 mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Stock 0.5M EDTA, pH 7.8, -20℃에 보관)

[0083] **3. 제조한 분석 혼합물(Make a Assay Mixture, 1 : 1) = 기질 버퍼(substrate buffer)**

[0084] - 용해 버퍼(Lysis Buffer)

[0085] 0.1M 포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer), pH 7.8

[0086] (1M K₂ HPO₄ , 1M KH₂ PO₄)

[0087] 1% 트리톤 X-100(1% Triton X-100)

[0088] 1 mM DTT

- [0089] 2 mM EDTA
- [0091] 남은 용해 생성물은 증류수(distilled water, DW)로 5배 희석하여 브래드포드 어세이(Bradford assay; BioRad) 방법으로 단백질 농도(protein concentration)를 측정하였다. 구체적으로, 브래드포드 시약(쿠마시 브릴리언트 블루 G-250) 원액을 증류수로 5배 희석한 용액 200 μ l를 남은 용해 생성물 5 μ l와 반응시킨 후 595 nM에서 흡광도를 측정하였다. 표준 단백질로 BSA 용액을 이용하여 동일하게 실험하여 용해 생성물의 단백질 농도를 계산하였다. 이렇게 측정된 단백질 농도로 위에서 측정한 루시페라아제 값을 나누어 루시페라아제 값을 보정하였다.
- [0092] 그 결과, 도 1b, 1c 및 1d에 나타난 바와 같이, NRF2sh-2가 가장 효과적으로 NRF2 단백질 발현, 루시페라아제 활성 및 GFP 신호를 억제하였으며, 이로부터 A549에서 높게 나타나는 루시페라아제 활성 및 GFP 신호가 NRF2에 특이적임을 알 수 있었다.
- [0093] **(2) 1887 임상 화합물 라이브러리를 이용한 스크리닝**
- [0094] 도 2a에 나타난 바와 같이, 상기 루시페라아제/GFP 듀얼 ARE-수용체 세포주 시스템을 이용하여 한국화학물은행에서 제공받은 1887종의 임상화합물 라이브러리 중 NRF2 억제 효과가 있는 화합물을 스크리닝하였다. 즉, 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 A438-ARE 세포를 이용하여 루시페라아제 어세이를 수행하였다.
- [0095] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 임상 화합물 중 글루코코르티코이드(Glucocorticoid, GCs) 계열 약물이 NRF2 억제 효과를 보였으며, 대부분의 GCs 계열 약물들이 1 μ M 농도의 24시간 처리에 의해 50% 이상의 뛰어난 억제 효과를 나타냈다.
- [0096] **(3) 글루코코르티코이드 계열 약물의 NRF2 억제효과**
- [0097] 상기에서 얻은 결과에서 효과가 우수한 13종의 GCs 계열 약물을 선정하고, 상기에서 실시한 방법대로 루시페라아제 어세이를 수행하여 13종의 GCs 계열 약물의 농도별로 NRF2 억제 효과를 비교하였다.
- [0098] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 대부분 10 nM 수준부터 우수한 억제효과가 나타났으며, 특히 클로베타솔 프로피오네이트(Clobetasol propionate)의 경우 1 nM에서부터 우수한 효과를 보였고, 1 μ M에서도 가장 뛰어난 억제 효과를 보였다.
- [0100] **<실시예 2> 클로베타솔 프로피오네이트에 의한 NRF2 억제 기전 확인**
- [0101] **(1) 클로베타솔 프로피오네이트의 억제 기전 확인**
- [0102] 글루코코르티코이드는 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor, GC receptor, GCR)로 알려진 핵 수용체 서브 패밀리 3(nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1)의 리간드로 작용한다. 글루코코르티코이드가 GCR에 결합하면 GCR은 염증이나 대사와 같은 생체 내의 다양한 기능과 관련된 많은 유전자의 전사촉진 또는 전사 억제를 유도한다. 이러한 사실들이 알려져 있는 것을 바탕으로, 글루코코르티코이드, 즉 클로베타솔 프로피오네이트의 NRF2 억제 효과가 GCR과 관련된 것인지를 확인하기 위해, GCR-shRNA를 이용하여 GCR 발현을 억제한 후 상기 웨스턴 블롯과 루시페라아제 어세이를 수행하였다.
- [0103] 먼저 GCR-shRNA가 포함된 벡터를 이용하여 형질도입시킨 A549-tet-on 세포를 확립한 후 독시사이클린과 클로베타솔 프로피오네이트를 처리 후 웨스턴 블롯을 수행하기 위해 프로테아제 저해제 콕테일(EMD millipore)이 보충된 세포 용혈 버퍼(Cell signaling technology)로 용혈시켜 단백질 추출물을 준비하였다. 이후 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때, 단백질의 농도는 실시예 1에서 실시한 방법대로 브래드포드 어세이를 수행하여 결정하였다. 또한 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 루시페라아제 어세이를 수행하였다.
- [0104] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, GCR 발현억제는 클로베타솔 프로피오네이트에 의한 NRF2 억제를 완전히 방지하였다. 즉, 클로베타솔 프로피오네이트는 NRF2 단백질의 레벨과 활성을 현저히 감소시키는데, 이것은 GCR의 발현 억제에 의해 차단되었다. 이러한 사실은 클로베타솔 프로피오네이트, 즉 글루코코르티코이드의 NRF2 억제 효과가 GCR과 관련된 것임을 명확히 보여준다.
- [0105] **(2) 농도별 클로베타솔 프로피오네이트의 효과**

[0106] 또한, 농도에 따른 클로베타줄 프로피오네이트의 효과를 명확히 확인하기 위해, 클로베타줄 프로피오네이트를 100 nM 또는 1 μ M를 처리하고 8시간, 24시간, 48시간 후의 세포를 대상으로 실시예 1에서 수행한 방법대로 루시퍼라아제 어세이를 수행하여, NRF2의 활성을 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 4c 및 4d에 나타난 바와 같이 클로베타줄 프로피오네이트에 의한 NRF2 활성 억제에는 100 nM 농도에서 적어도 48시간 동안 유지되었고, 이러한 결과는 감소한 NRF2 단백질의 양과 일치했다. 이는 글루코코르티코이드가 그 단백질 발현을 감소시킴으로써 NRF2를 저해한다는 것을 의미한다.

[0108] (3) NRF2 mRNA 및 단백질 분해에 대한 영향 측정

[0109] 지금까지 축적된 연구 결과에 따르면 NRF2 단백질 레벨은 mRNA 전사, 또는 프로테아좀 관련 분해에 의해 조절될 수 있다. 이에, mRNA 전사억제를 통해 NRF2를 억제하는지, 프로테아좀 관련 분해를 촉진하여 NRF2를 억제하는지 확인하기 위하여, 상기 세포를 대상으로 real-time PCR을 수행하였고, 프로테아좀 저해제인 MG132를 처리한 후, 상기 실시예 1에서 수행한 것과 동일하게 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0110] 구체적으로, Real-time PCR을 위해, A549 세포에서 총 RNA를 Trizol(Invitrogen)을 사용하여 추출하였다. 이후, 총 RNA 1 μ g을 올리고 dT 프라이머 및 SuperScript II Reverse Transcriptase를 이용하여 제조자의 지시사항(Invitrogen)에 따라 cDNA로 역전사시켰다. 이후, PCR은 HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix을 이용하여 제조자의 지시사항(Affymetrix)에 따라 수행되었다. PCR에 사용된 NRF2 및 β -액틴의 프라이머는 하기 <표 2>와 같았다.

표 2

유전자	종류	서열	서열번호
NRF2	정방향	CGGTATGCAACAGGACATTG	4
	역방향	ACTGGTTGGGGTCTTCTGTG	5
β -actin	정방향	TGCCATCCTAAAAGCCAC	6
	역방향	TCAACTGGTCTCAAGTCAGTG	7

[0113] 그 결과 도 4e 내지 4f에 나타난 바와 같이, 클로베타줄 프로피오네이트는 NRF2의 mRNA 레벨 자체에는 영향을 미치지 않았으나, 반대로 MG132를 처리하자 클로베타줄 프로피오네이트에 의해 저해되었던 NRF2 단백질의 양이 회복되었다. 즉, 이러한 결과를 토대로, 클로베타줄 프로피오네이트 화합물이 GCR 의존적인 프로테아좀 관련 분해를 유도하여 NRF2를 억제한다는 것을 알 수 있었다.

[0114] (4) NRF2 단백질 분해 기전 확인

[0115] 일반적으로 NRF2 단백질의 프로테아좀 분해는 도 5a에 나타난 바와 같이 크게 두 가지 경로, 즉, KEAP1에 의한 경로와 GSK3- β -TrCP를 통한 경로로 이루어진다. 상기에서 얻은 결과를 토대로, 글루코코르티코이드 화합물이 둘 중 어떤 경로를 조절하여 NRF2를 억제하는지 확인하기 위하여, 상기 준비예에서 준비한 KEAP1 돌연변이 A549 세포에 GSK3 억제제 및 클로베타줄 프로피오네이트를 투여하고 상기 실시예 1에서 수행한 루시퍼라아제 어세이 및 웨스턴 블롯을 수행하였다. 또한, β -TrCP shRNA가 포함된 벡터를 이용하여 형질도입시킨 A549-tet-on 세포를 확립한 후 독시사이클린으로 β -TrCP 유전자를 녹다운 시킨 세포를 대상으로 동일하게 웨스턴 블롯 및 루시퍼라아제 어세이를 수행하였다.

[0116] 그 결과, 도 5b 및 5c에 나타난 바와 같이, 클로베타줄 프로피오네이트 유도의 NRF2 단백질 분해 및 활성 억제가 GSK3 억제제 처리에 의해 억제되었다. 또한, 도 5d에 나타난 바와 같이, β -TrCP가 녹다운 되었을 때도 클로베타줄 프로피오네이트가 유도한 NRF2의 단백질 분해를 억제했다. 즉, 이러한 결과는 글루코코르티코이드 화합물은 GSK3- β -TrCP를 통한 경로를 이용하여 NRF2 단백질을 분해한다는 것을 의미한다.

[0117] 더욱이, 지금까지 알려진 바에 따르면, GSK3은 NRF2의 핵으로의 이동을 억제한다. 이를 증명하기 위해, MG132 처리 하에서 GSK3 억제제 및 클로베타줄 프로피오네이트를 처리한 세포를 핵과 세포질로 분획한 후 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0118] 그 결과, 도 5e에 나타난 바와 같이, 클로베타줄 프로피오네이트 처리에 의해 NRF2의 핵으로의 이동이 억제되었고, 이러한 효과는 GSK3 억제제에 의해 완벽히 차단되었다. 이러한 결과는, 도 5f 및 5g에 나타난 것과 같이,

MG132처리 또는 β -TrCP 억제에 의해 NRF2 단백질 분해 억제만으로는 글루코코르티코이드에 의한 NRF2 활성 억제를 회복시키지 못한다는 결과를 뒷받침 해 준다. 즉, 글루코코르티코이드 화합물은 GSK3을 활성화함으로써 NRF2를 분해할 뿐만 아니라 또한 NRF2의 핵으로의 이동을 억제함으로써 NRF2를 억제한다는 것을 의미한다.

[0119] 따라서 상기 결과들을 종합하면, 도 5h에 나타난 바와 같이, 글루코코르티코이드는 NRF2의 핵으로의 이동 억제 및 β -TrCP-의존적 분해를 촉진하는 GSK3 활성화를 통해 NRF2를 억제한다는 것을 알 수 있다.

[0121] <실시예 3> 클로베타졸 프로피오네이트에 의한 NRF2 타겟 단백질 발현 억제 및 활성 산소 증가 확인

[0122] (1) 비세포 폐암 세포주에서 NRF2 발현량 측정

[0123] 일반적으로 NRF2는 KEAP1 돌연변이 세포에서 많이 발현되며, p-AMPK는 LKB1 돌연변이 세포에서 발현이 낮은 것으로 알려져 있다. 이를 확인하기 위해 네 가지 세포에 웨스턴 블롯을 수행하였다. 구체적으로, KEAP1 돌연변이 세포인 H2228(KEAP1-돌연변이, LKB1-정상), A549(KEAP1-돌연변이, LKB1-돌연변이), H460(KEAP1-돌연변이, LKB1-돌연변이) 및 정상 유전자 세포인 H1299(KEAP1-정상, LKB1-정상)의 KEAP1 및 LKB1 돌연변이 유무를 검증하고자 실시예 1에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 NRF2와 p-AMPK 발현 정도를 확인하였다.

[0124] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, H2228, A549, H460 세포주에서는 NRF2 발현량이 높았으므로 이를 통해 KEAP1 돌연변이를 가지고 있음을 확인하였고, A549 및 H460 세포주의 AMPK의 활성이 낮은 것을 토대로 LKB1 돌연변이를 가지고 있음을 확인하였다.

[0125] (2) 클로베타졸 프로피오네이트의 효과 확인

[0126] 이렇게 NRF2의 활성이 높은 세포에 글루코코르티코이드가 미치는 영향을 확인하기 위해, KEAP1 돌연변이 세포 (A549 및 H2228)세포에 클로베타졸 프로피오네이트를 2일, 4일 또는 5일 동안 처리하고 상기에서 수행한 웨스턴 블롯 방법으로, 산화환원 조절과 관련된 주요 NRF2 타겟 단백질(G6PD, PGD, ME1, GCLM, AKR1B10, AKR1C3)의 발현을 측정하였다. 대조군으로는 H2228 세포주에 NRF2-shRNA를 형질전환시켜 NRF2 발현을 억제한 세포를 사용하였다.

[0127] 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이, H2228 세포주에 NRF2-shRNA를 형질전환한 대조군과 클로베타졸 프로피오네이트를 처리한 경우 모두, 항산화 작용을 주로 하는 NRF2 타겟 단백질 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로, 도 6c에 나타난 바와 같이, A549 세포주에 클로베타졸 프로피오네이트를 처리한 경우 또한 NRF2 타겟 단백질 발현이 효과적으로 억제되었다.

[0128] 또한, ME1, GCLM 단백질은 과산화수소 해독작용을 하는 단백질들인 바, 이의 변화를 확인하기 위해 상기 클로베타졸 프로피오네이트를 처리한 이후의 과산화수소 양을 다음과 같이 측정하였다: 상기 A549 및 H2228 세포주를 5 μ m CMH2DCF-DA(Invitrogen)으로 30분간 배양한 후, 배양된 세포를 포스페이트 인산완충식염수(phosphate buffered saline)으로 두번 세척하고 어둠 속에서 40분 동안 90% 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 10% PBS로 배양하며 형광 다이를 방출시켰다. 배양 후, 배양액의 상층액을 96-웰 플레이트에 분주하고 480/530 nm에서 형광량을 측정하였다. 측정된 형광량의 표준화를 위해, 상층액 제거 및 PBS 세척 후 남은 세포를 크리스탈 바이올렛 용액(20% 메탄올 및 0.5% 크리스탈 바이올렛)으로 10분 간 상온에서 염색하였다. 이후 3번 세척하고 1% SDS 용액에서 가용화를 위해 배양된 후 570 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

[0129] 그 결과, 도 6d에 나타난 바와 같이, A549 및 H2228에 클로베타졸 프로피오네이트를 처리한 경우 활성산소가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 즉, 클로베타졸 프로피오네이트와 같은 글루코코르티코이드는 NRF2의 항산화 기능을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 증명해준다.

[0131] <실시예 4> 클로베타졸 프로피오네이트 단독 항암 효과 및 라파마이신과의 병용 항암 시너지 효과 확인

[0132] (1) in vitro 실험

[0133] LKB1/KEAP1 정상 폐암 세포주인 H1299, KEAP1 돌연변이 세포주인 H2228, LKB1/KEAP1 돌연변이 폐암 세포주인 A549, H460에 클로베타졸 프로피오네이트 단독 처리 시 또는 mTOR 억제제인 라파마이신과 병용 처리 시 나타나는 항암 시너지 효과를 소프트 아가 분석(soft agar assay)를 통해 확인하였다. 또한 클로베타졸 프로피오네이트

트의 종양 억제 효과가 NRF2 억제로 인한 것인지를 확인하기 위하여 상기 실시예 2에서 사용하였던 NRF2-shRNA-2를 이용하여 NRF2를 녹다운시킨 폐암 세포주에서의 종양 억제 효과와 비교하였다.

[0134] 구체적으로, 12 웰 플레이트에 0.7% 아가를 함유한 DMEM 배지 50 μ l를 넣고 굳힌 후(bottom agar), 3×10^3 세포와 0.35% 아가를 함유한 DMEM 배지 300 μ l를 굳힌 아가 배지 위에 넣고 굳혔다(top agar+/- Docycucline). 다 굳은 후에, DMEM 배지(+/- Doxyxycline) 250 μ l를 넣고 CO₂ 배양기에서 2주 정도 배양 후 형성된 콜로니(colony)의 수를 파악하였고, 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0135] 그 결과, 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이, KEAP1 돌연변이 세포주인 A549, H2228은 클로베타졸 프로피오네이트 처리 및 NRF2 녹다운에 의해 세포 성장이 강력히 억제되었지만, KEAP1 정상 세포주인 H1299에서는 클로베타졸 프로피오네이트 처리 및 NRF2 녹다운이 세포 성장에 크게 영향을 미치지 못했다. 이러한 결과는 글루코코르티코이드의 항종양 효과는 NRF2의 억제 의존적이라는 것을 보여준다.

[0136] (2) LKB1 돌연변이 세포주 H460에 대한 클로베타졸 프로피오네이트 및 라파마이신의 효과

[0137] 위의 결과와는 달리 H460 세포주는 도 7a, 7b에서 나타난 바와 같이 KEAP1 돌연변이 세포주임에도 불구하고 클로베타졸 프로피오네이트 처리 및 NRF2 녹다운에 의한 세포성장 억제 효과가 미미하였다. 최근 연구에 의하면 대부분의 KEAP1 돌연변이는 보통 LKB1 돌연변이와 함께 나타나며(A549, H460 세포주) LKB1 돌연변이는 mTORC1의 활성화를 통해 암 세포의 성장을 유도한다는 사실을 보고했다. 따라서 이러한 종래의 연구 결과 및 상기 결과를 토대로, 도 7c에 나타난 바와 같이, H460 세포주에서 클로베타졸 프로피오네이트의 효과가 저하된 이유는 H460 세포주가 KEAP1 돌연변이와 LKB1 돌연변이를 가지고 있어서 NRF2 및 mTORC1가 함께 활성화되어 있기 때문이라고 가설을 세웠고, NRF2 및 mTORC1을 모두 억제할 수 있다면 항암 시너지 효과가 날 것이라고 예상하였다.

[0138] 먼저, H460 세포주와 LKB1-cDNA를 형질도입으로 발현시킨 H460 세포주에서 mTORC1의 활성화를 비교하기 위해 poly-HEMA(Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)로 코팅한 플레이트에 세포를 시딩한 후 CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 현탁 배양(suspension culture)후 상기 실시예 1과 동일하게 웨스턴 블롯을 수행하여 mTORC1의 활성을 측정하였다.

[0139] 그 결과, 도 7d에 나타난 바와 같이, H460 세포를 현탁 배양할 경우 LKB1 발현을 시킨 상태보다 LKB1 발현이 없는 상태에서 mTORC1의 기질인 p70S6K의 인산화가 증가함을 확인하였다. 즉, 이로부터 H460 세포의 mTORC1 활성이 높음을 알 수 있었다.

[0140] 이후, 클로베타졸 프로피오네이트와 라파마이신을 동시에 처리하거나, NRF2를 NRF2-shRNA를 이용하여 녹다운시킨 후 라파마이신을 처리했을 때 항암 시너지 효과가 나타나는지를 확인하였다.

[0141] 그 결과, 도 7e에 나타나 있듯이, 클로베타졸 프로피오네이트와 라파마이신을 병용 처리한 경우 또는 라파마이신을 처리하고 NRF2 발현을 억제한 조합 모두 H460 세포의 성장을 강력하게 억제하였다.

[0142] (3) in vivo 실험

[0143] 한편, A549 세포주를 이용하여 제노그raft 어세이(xenograft assay)를 수행하였다. 구체적으로, Balb/c-nu 마우스(6-8 주령, Orient Bio, 성남, 한국)가 종양 제노그raft를 수행하기 위해 준비되었고, A549-luc-C8 세포(Perkin Elmer, 5.0×10^6 /head)가 상기 마우스의 피하에 주입되었다. 2주 후 종양의 크기가 50-100 mm³에 도달했을 때, 마우스들을 6개의 그룹, 즉, 비이클(vehicle; 1.2% DMSO, 0.25% PEG400 및 0.25% tween 80을 포함하는 PBS 200 μ l)만을 투여한 대조군, 클로베타졸 프로피오네이트 0.5 mg/kg을 투여한 그룹, 클로베타졸 프로피오네이트 1 mg/kg을 투여한 그룹, 라파마이신 1mg/kg을 투여한 그룹 및 병용 1(CP 0.5 mg/kg + rapamycin 1 mg/kg) 그룹 및 병용 2(CP 1 mg/kg + rapamycin 1 mg/kg)그룹으로 나누었다. 이후 40일간 비이클과 라파마이신(n=그룹 당 5)은 매일(1주당 5일) 복강 내에 주사하였고, 클로베타졸 프로피오네이트는 2일에 한 번(1주에 3일) 복강 내에 주사하였다.

[0144] 일차 종양 크기와 체중은 매 3-4일마다 각각 칼리퍼(caliper)와 발란스(balance)를 통해 측정되었고, 종양의 부피는 $V(\text{mm}^3) = (A \times B^2) / 2$ (V는 부피, A는 장직경(long diameter), B는 단직경(short diameter)이다)의 식으로 계산되었다.

[0145] 이후, 마우스들은 7.5%의 CO₂ 챔버에서 희생되었고, 추가 분석을 위해 종양들을 획득하였다. 이 연구들은 국립

암센터 연구소의 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 받았다.

[0146] 그 결과, 도 8a 내지 8c에 나타난 바와 같이, 클로베타졸 프로피오네이트(0.5 mpk, 1 mpk)와 라파마이신(1 mpk) 단독 처리 시에 뚜렷한 항암 효과가 있음을 확인하였고, 특히 병용 처리 시 종양이 사라지는 매우 강력한 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에, 도 8d에 나타난 바와 같이 마우스의 체중에는 큰 변화가 없는 것으로 보아, 뚜렷한 부작용은 없는 것으로 파악되었다.

[0147] 따라서 LKB1/KEAP1 돌연변이 조합의 폐암 세포주에서 라파마이신과 클로베타졸 프로피오네이트의 병용 요법은 부작용 없이 강한 항암 시너지 효과를 낸다는 것을 in vivo에서 확인할 수 있었다.

[0149] <실시예 5> 저영양 상태에서 클로베타졸 프로피오네이트와 수니티닙과의 병용 항암 시너지 효과 확인

[0150] (1) 저포도당 상태에서의 정상 세포의 NRF2 발현량 측정

[0151] 상기 실시예 3에서, 일반적으로 세포 배양 시, 즉 영양이 충분한 상태에서 KEAP1 정상세포(H1299)는 NRF2 발현이 매우 낮게 유지됨을 확인하였다(도 6a). 이에, 실제 종양 미세 환경의 대표적인 특징 중 하나인 영양소 부족 상태(저포도당 상태)에서는 어떤 변화가 있는지를 확인하기 위해 웨스턴 블롯과 루시퍼라아제 실험을 상기 실시예 1에서 수행한 방법과 동일하게 수행하였다.

[0152] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에 나타난 바와 같이 KEAP1 정상 세포에서도 NRF2의 발현과 활성이 증가함을 확인하였다.

[0153] (2) 저포도당 상태에서의 NRF2 및 AMPK 발현 억제 효과

[0154] 도 9a에 나타난 바와 같이 LKB1 정상 세포는 저영양 상태에서 AMPK를 활성화시키고(AMPK의 기질인 ACC의 인산화 증가), AMPK의 활성화는 저영양 상태에서 암세포의 생존을 증가시킨다는 것이 알려져 있으므로, NRF2와 AMPK를 함께 억제할 경우 강력한 항암 시너지 효과가 나타날 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여 H1299 세포주에 AMPKa 및 NRF2에 대한 shRNA를 포함한 tet-on 벡터를 형질 도입한 세포주를 확립한 후 저영양 상태(포도당 2mM)에서 콜로니 형성 실험을 수행하였다. 즉, 12웰 플레이트에 세포를 매우 낮은 농도로 시딩 한 후 2주간 2mM 포도당을 함유한 배지로 배양한 후 상기 실시예 3에서 수행했던 크리스탈 바이올렛 염색 방법으로 콜로니 형성 정도를 관찰하여 항암효과를 확인하였다.

[0155] 그 결과, 도 9c에 나타난 바와 같이, AMPK와 NRF2 발현을 동시에 억제하였을 때 매우 강력한 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0156] (3) 저포도당 상태에서의 클로베타졸 프로피오네이트 및 수니티닙의 병용 효과

[0157] 현재까지 임상적으로 사용되는 AMPK 억제제는 없지만, 최근 연구에서 위장관 기질 종양 치료에 사용되는 티로신 키나제 억제제(주로 VEGFR 억제)인 수니티닙(Sunitinib)의 오프 타겟(off target) 효과로 AMPK를 억제한다는 것이 밝혀졌다. 따라서 본 실험에서 수니티닙과 클로베타졸 프로피오네이트를 함께 처리하여 저영양 상태(포도당 2mM)에서 상기 실험과 동일한 콜로니 형성 실험을 수행하여 항암효과를 관찰하였다.

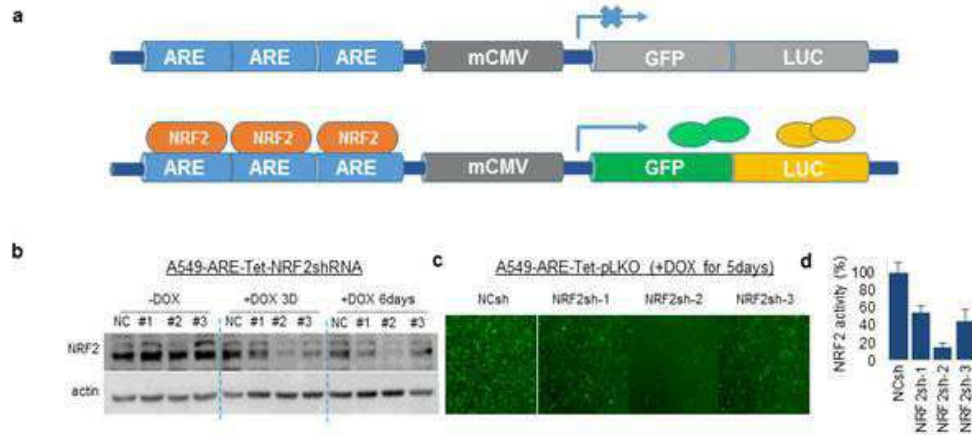
[0158] 그 결과, 도 9d에 나타난 바와 같이, 수니티닙과 클로베타졸 프로피오네이트를 병용한 경우 강한 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0159] 따라서 도 9e에 나타난 바와 같이, 상기의 결과를 통해 KEAP1과 LKB1 모두 정상인 세포에서 저영양 상태인 실제 종양 미세 환경에서는 NRF2와 AMPK 둘 다 활성화되는 바, 클로베타졸 프로피오네이트, 즉 글루코코르티코이드와 AMPK 억제제와의 병용 투여는 매우 효과적인 치료 방법임을 알 수 있었다.

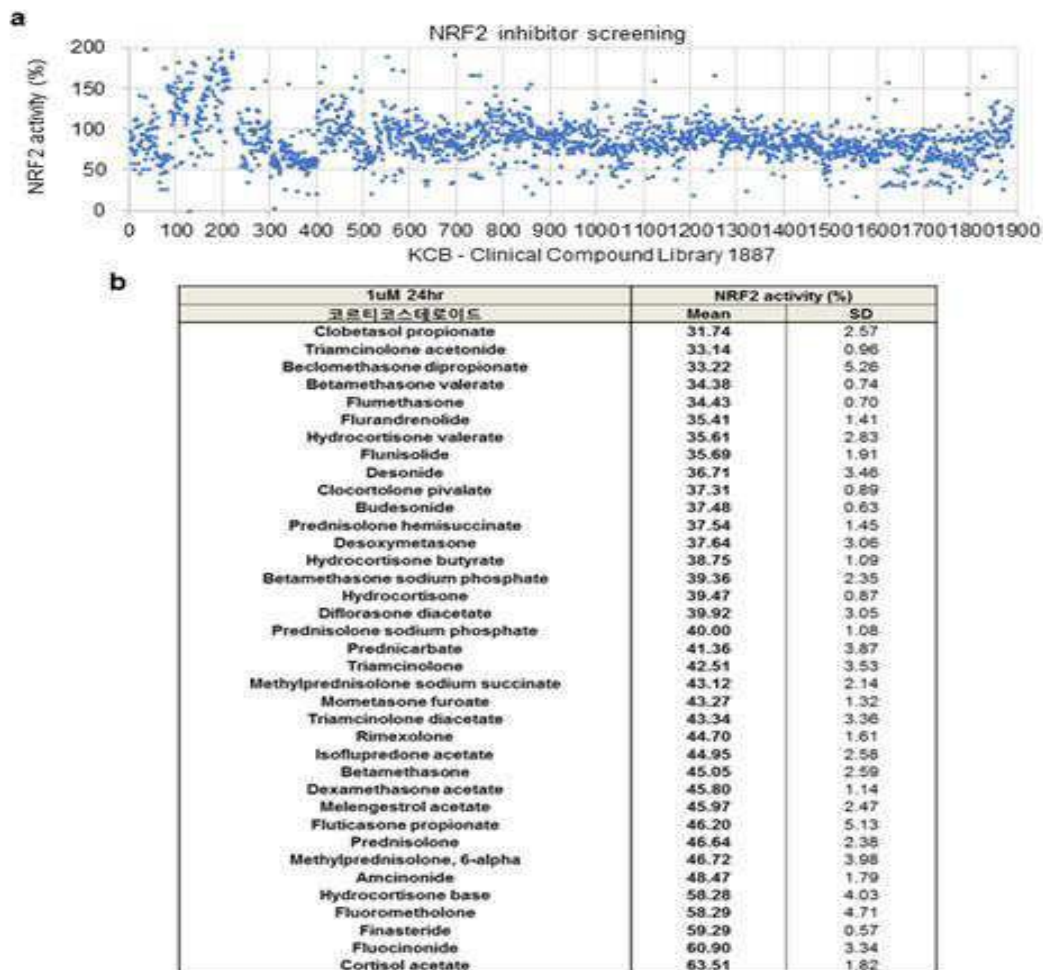
[0161] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 즉 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

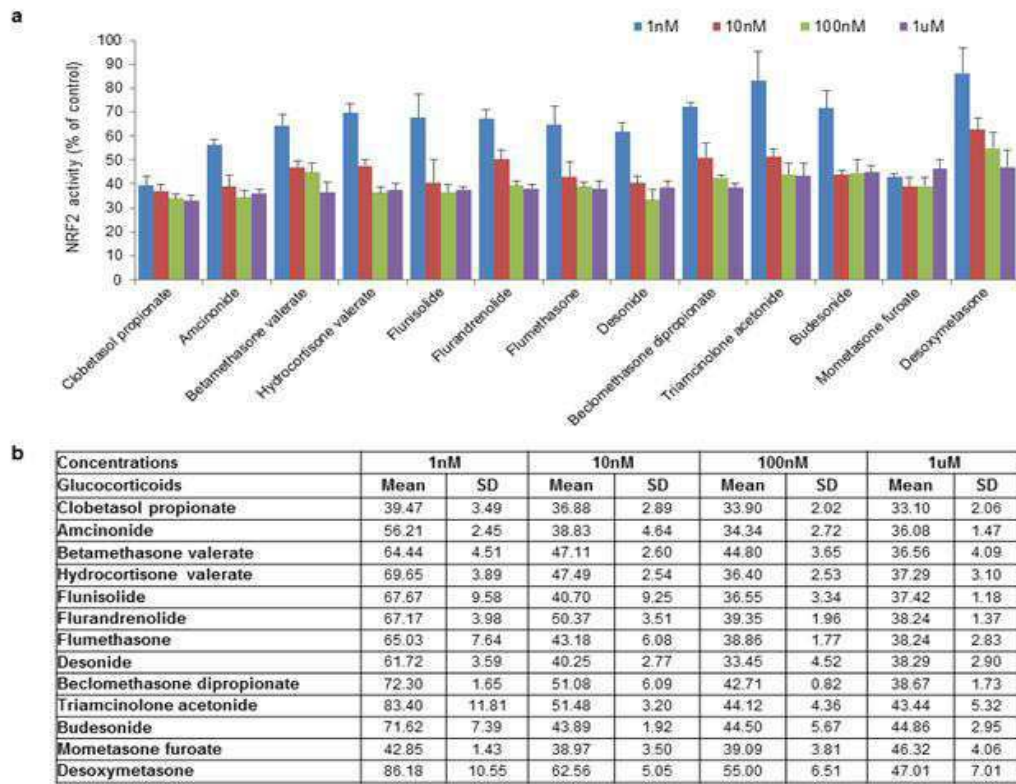
도면1



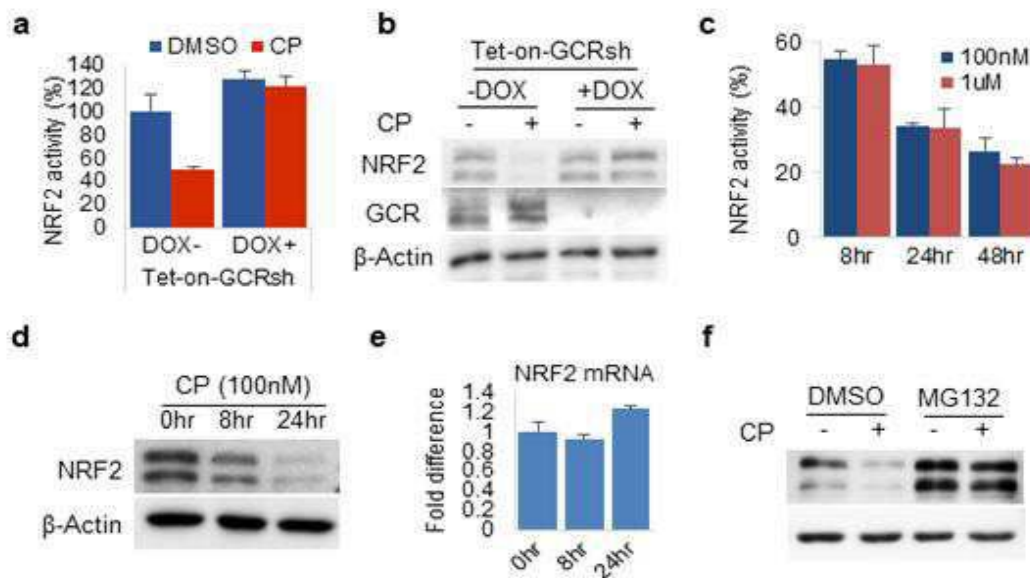
도면2



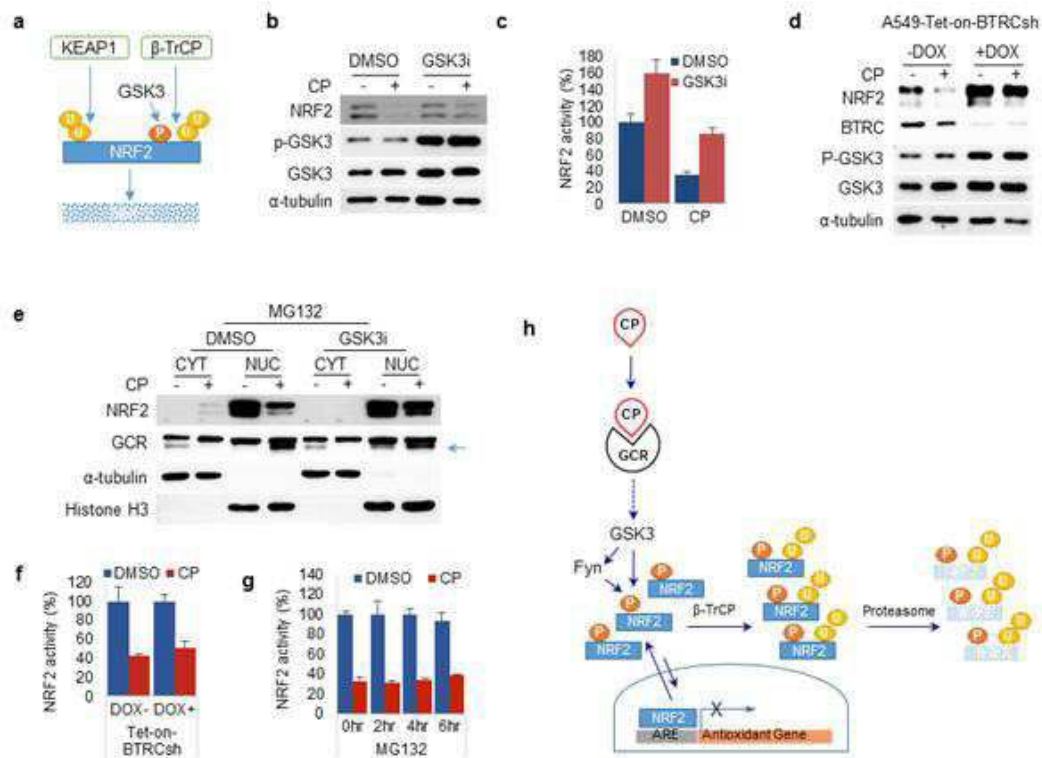
도면3



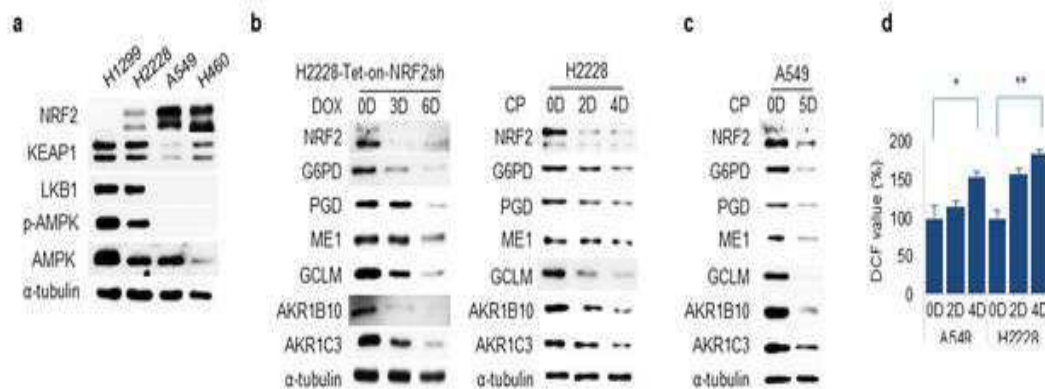
도면4



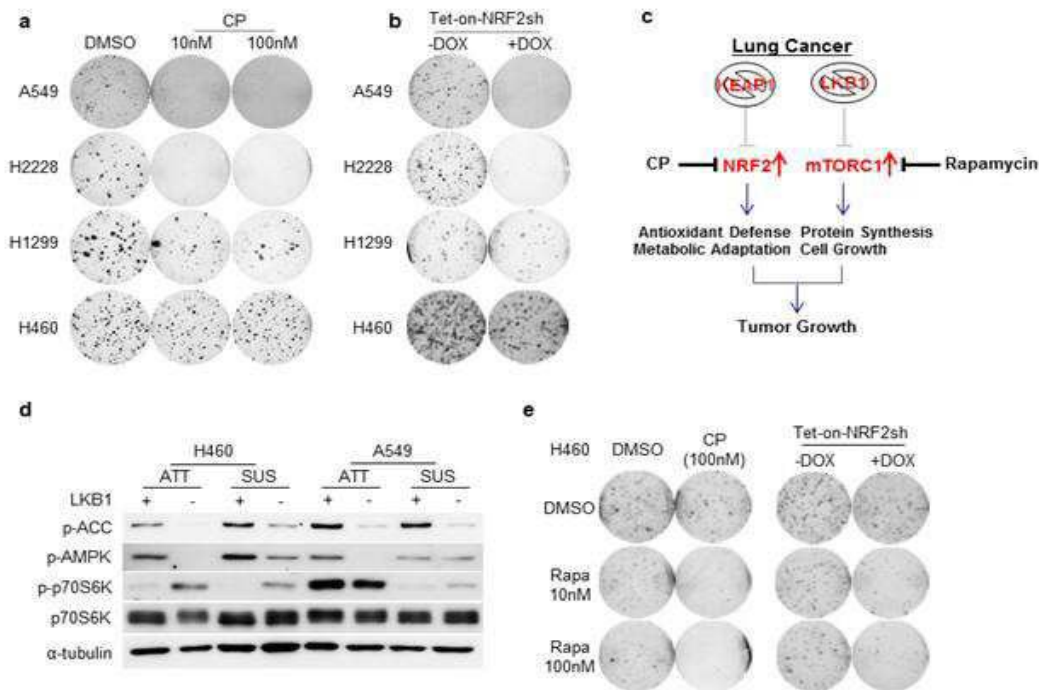
도면5



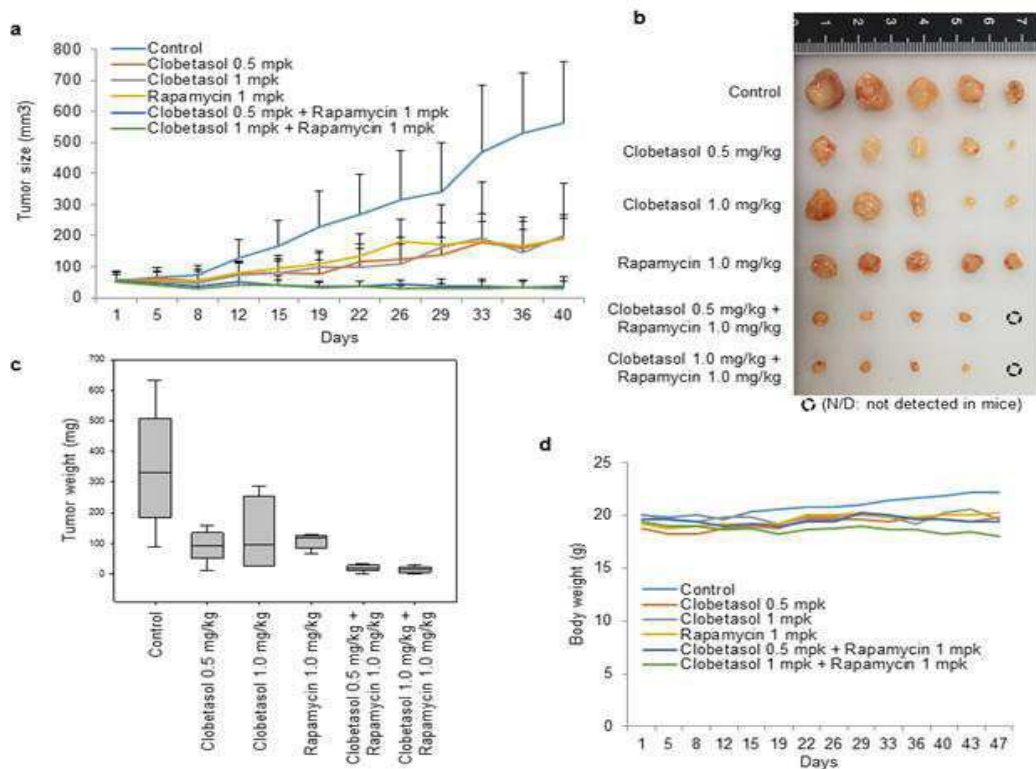
도면6



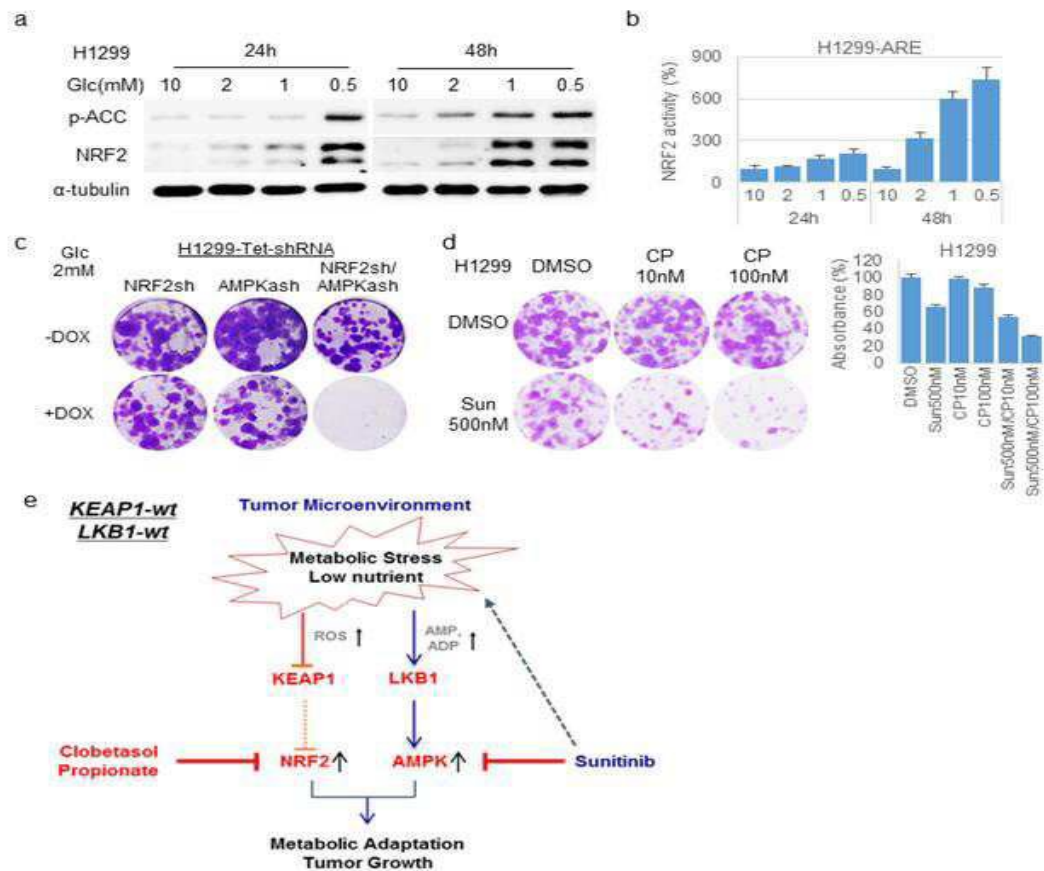
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Pharmaceutical Composition for Treating Non-small Cell Lung Cancer Comprising Glucocorticoids
- <130> ADP-2018-0314
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 58
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> shRNA
- <400> 1
- ccggagtgtga gcttcattga actgcctcga ggcagttcaa tgaagctcaa cttttttg
- <210> 2
- <211> 58
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA

<400> 2

ccgggctcct actgtgatgt gaaatctcga gatttcacat cacagtagga gctttttg 58

<210> 3

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA

<400> 3

ccggagagca agatttagat catttctcga gaaatgatct aaatcttgct cttttttg 58

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA

<400> 4

cggtatgcaa caggacattg 20

<210> 5

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA

<400> 5

actggttggg gtcttctgtg 20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA

<400> 6

tgccatccta aaagccac 18

<210> 7

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA
<400> 7

tcaactggtc tcaagtcagt g

21