



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0081304
(43) 공개일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57423 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2019-0175209
(22) 출원일자 2019년12월26일
심사청구일자 2019년12월26일
(30) 우선권주장
1020180169824 2018년12월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
차혁진
서울특별시 강남구 선릉로126길 22 104동 901호
권옥선
서울특별시 서대문구 통일로25길 30 101동 402호
(홍제동, 한양아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

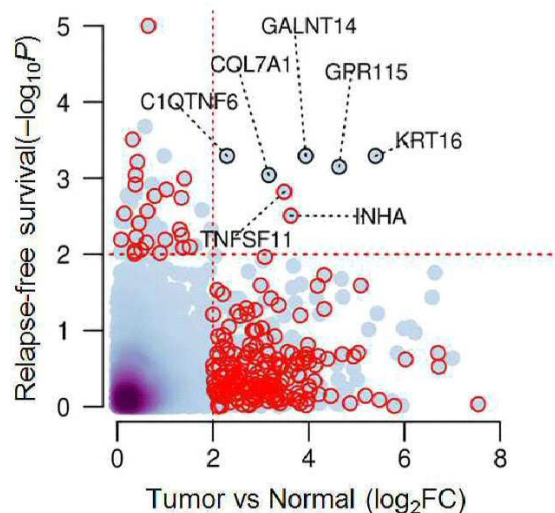
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 보르테조미프를 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 보르테조미프(Bortezomib)를 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 보르테조미프(Bortezomib: BTZ)은 GALNT14 유전자의 발현에 의해 발현이 증가되는 유전자 SMAD4 유전자의 발현을 억제하여 폐암의 전이를 억제할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/91125 (2013.01)
G01N 2800/54 (2013.01)

이해승

서울특별시 동대문구 이문로12길 3-11 래미안2차
 109동 2003호

(72) 발명자

김완규

서울특별시 송파구 올림픽로 99 109동 1801호 (잠
 실동, 잠실엘스아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M3C9A5028690
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업(학술진흥)(2017)-포스트게놈다부처유전체사업-기반산업화 인프라
연구과제명	시스템 생명정보 분석 기반 약물 작용점 발굴
기 여 율	1/1
주관기관	한국연구재단
연구기간	2017.05.01 ~ 2022.01.31

명세서

청구범위

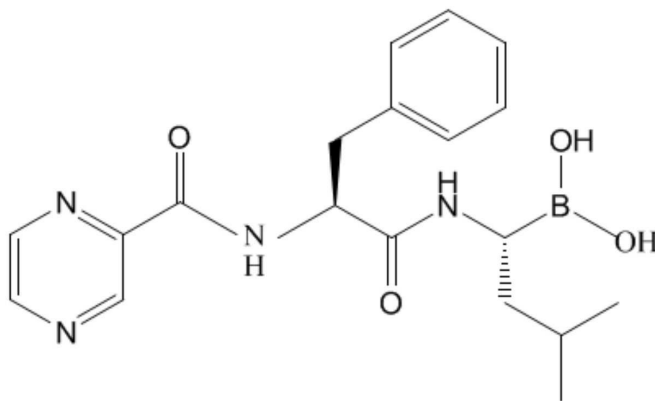
청구항 1

보르테조미프(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 보르테조미프(Bortezomib)은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 GALNT 14 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 TGF β 의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 SMAD4의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 폐암은 비소세포성 폐암(non small cell lung cancer)인 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 비소세포성 폐암은 대세포폐암(large cell lung carcinoma)인 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 약학적 조성물.

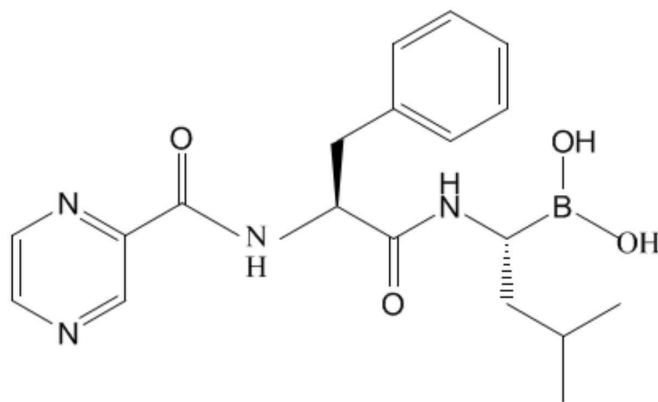
청구항 9

보르테조미프(Bortezomib)를 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 보르테조미프(Bortezomib)은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 11

제9항에 있어서, 상기 조성물은 GALNT 14 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 건강기능식품.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 조성물은 TGF β 의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 폐암 전이 억제용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 보르테조미프를 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐암은 세계적으로 암으로 인한 사망 중 가장 큰 원인이다. 폐암은 소세포 암(small cell lung cancer: SCLC)과 비소세포 암(non-small cell lung cancer: NSCLC)으로 구분되며, 비소세포암이 약 80%를 차지한다. 비소세포암

은 샘암종(adenocarcinoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinoma) 및 대세포암(large cell carcinoma)의 3 종류의 서브 타입으로 구성된다.

- [0004] 폐암은 다른 암종에 비해 전이가 잘 되는 암종으로서, 진단 당시 이미 다른 장기로 전이가 없더라도, 여러 차례의 치료에도 불구하고 다른 장기로 전이되어 재발되는 경우가 빈번하다. 폐암의 재발의 원인은 폐암의 전이와 밀접한 연관이 있으므로 폐암 환자에 있어서 암의 재발을 억제 또는 저해하기 위해서 폐암 세포의 전이와 관련되는 바이오 마커 유전자를 발굴하고 이 바이오 마커 유전자를 이용하여 암의 재발을 예측하고, 더 나아가 폐암 세포의 전이를 억제 또는 저해할 수 있는 약물을 발굴하는 것이 필요하다.
- [0005] 폐암환자에 있어서 암의 재발을 예측하기 위하여 임상 및 병리적 조건에 근거한, TNM 단계 시스템이 폐암의 재발 예측에 사용되고 있으나, 그 유용성에 한계가 있다. TNM 병기 구분법 (staging system)이 폐암의 병기 분류에 널리 이용되고 있다. T는 Tumor의 약자로, 종양이 해당 위치에서 얼마나 커졌는지를 보는 것으로서, 폐의 경우에는 크기와 중요 구조와의 거리 등을 기준으로 4개의 T 카테고리 (T1-T4)로 구분한다. N은 Lymph Node에서 Node의 앞글자로, 부위 림프절(Regional lymph node) 전이가 얼마나 있는지를 보는 것으로서, 3개의 N 카테고리(N1-N3)로 구분한다. M은 Metastatic spread의 약자로, 원격전이가 이뤄졌는지를 보는 것으로서, 폐 부위 림프절이 아닌 다른 곳의 림프절에 전이가 이뤄진 경우 원격전이(M1)가 이뤄졌다고 본다.
- [0006] 최근에는, 마이크로어레이와 같은, 유전자 발현 프로파일링 연구를 통하여 밝혀진 유전적 변이를 이용하여 폐암의 예후를 예측하는 방법이 연구되고 있다(Pollack JR. The American journal of pathology 2007;171(2):375-85, Sun Z, Yang P. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(11):2063-8., Gandara DR, Lara PN, Lau DH, Mack P, Gumerlock PH. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 2001;34 Suppl 3:S75-80, Yang P, Sun Z, Aubry MC, et al. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 2004;46(2):215-26).
- [0007] 그러나, 이러한 종래 폐암 재발 예측 방법은, 예측 결과가, 재발에 걸리는 시간 또는 생존 기간과 같은, 시간 의존적 연속 변수 (time-dependent continuous variable)가 아니고, 생존/사망, 또는 재발/비재발과 같은 단순한 이진 사건(binary event)로 표시되는 문제로 인해서 임상에서 잘 적용되지 않고 있다.
- [0008] 한편, 보르테조밍은 (Bortezomib, PS-341)은 디펩티드 보론산 유도체로, Ki가 0.6 nmol/L인 고도로 선택적인 강력한 가역성 프로테아솜 저해제이다(Adams, et al., Semin. Oncol., 28(6): 613-619 (2001)). 내셔널 캔서 인스티튜트의 인비트로 스크린(in vitro screen)으로 관찰한 바에 따르면, 보르테조밍은 일련의 종양주에 대하여 세포독성을 나타내고, 인간 전립선에서 항종양 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Furankel et al., Clin. Cancer Res., 6(9): 3719-3728, 2000). 또한, 보르테조밍의 항암 활성 이외에도, 백혈병과 신생혈관 질환에 대한 억제 활성이 공지되어 있으나, 보르테조밍의 폐암 전이 억제용도에 대해서는 공지된 바 없는 실정이다.
- [0009] 본 발명자들은 폐암 환자의 재발 위험을 임상에서 적용할 수 있을 정도로 효과적으로 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴할 수 있다면 폐암 환자의 재발가능성을 조기에 탐지하여 재발을 예방하는 적절한 치료법 수립에 활용이 가능할 것이라고 생각하고, 바이오 마커 개발에 연구 노력한 결과, 폐암환자에게서 많이 발현되는 GALNT14 유전자가 TGF β 신호를 활성화하여, 폐암세포의 전이를 촉진하고, 종양형성을 촉진하는 것을 확인하였고, 보르테조밍(bortezomib: BTZ)이 GALNT14 유전자의 발현에 의해 발현이 증가되는 유전자 SMAD4 유전자의 발현을 억제하여 세포의 전이와 침윤을 억제하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 보르테조밍(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 보르테조밍(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 보르테조밍(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용

약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 보르테조미프(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 보르테조미프(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 보르테조미프(Bortezomib)은 GALNT14 유전자의 발현에 의해 발현이 증가되는 유전자 SMAD4 유전자의 발현을 억제하여 폐암세포에서 전이능과 침윤능을 억제하므로, 폐암의 전이 억제용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 공개된 폐암 환자의 전사체 및 임상 데이터(The Cancer Genome Atlas)에서 관측된 폐암의 재발과 연관성이 높은 후보 유전자 리스트이다. X축은 정상 조직 대비 종양에서 발현이 증가된 정도(배수, Fold change)를 나타내고, Y축은 환자의 비재발 생존 기간(relapse-free survival, 1차 치료후 암이 재발 되지 않고 생존한 기간)과 음의 상관관계 유의성($-\log(p\text{-value})$)을 나타낸다.

도 2는 GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포를 마우스 동물 모델의 꼬리 정맥에 주입한 경우 폐로의 전이가 억제됨을 확인한 결과이다.

도 3은 GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포주를 주입한 마우스는 대조구 세포주를 주입한 마우스와 비교해 볼 때 피하지방에서 종양이 형성되지 않음을 확인한 결과이다.

도 4는 DEX는 세포의 이동성을 억제하지 못하는 반면 BTZ 는 세포의 이동성(운동성)을 억제함을 확인한 결과이다.

도 5는 BTZ 약물 처리 후 세포의 침윤능(침투력) 변화를 확인한 결과이다.

도 6은 BTZ 약물을 처리했을 때 나타나는 암세포의 전이 억제가 세포의 생존능력의 저해를 통해 발생하는 것이 아님을 확인한 결과이다.

도 7은 BTZ 약물 처리에 의한 전이능 억제가 프로테아좀 저해활성과는 별개임을 확인한 결과이다.

도 8은 BTZ 또는 CFZ를 처리한 후 프로테아좀 저해제를 처리하고 two chamber invasion assay를 수행하여 세포의 침윤능을 확인한 결과이다.

도 9는 GALNT14의 발현이 억제되었을 때와 BTZ 처리한 경우 모두 TGF β 신호(signaling)에 관련된 유전자들의 발현이 유의미하게 변화됨을 확인한 결과이다.

도 10은 CFZ 약물을 처리하는 경우 TGF β 신호의 활성을 억제하지 못하였지만, BTZ 약물을 처리하는 경우 TGF β 신호의 활성을 억제함을 확인한 결과이다.

도 11은 TGF β 신호 경로의 하위에 있는 SMAD4 유전자의 발현을 억제후 세포의 침윤 정도를 확인한 결과이다.

도 12는 GALNT14 단백질에 의해 발현이 증가된 유전자와 BTZ 약물 처리에 의해 발현이 감소된 유전자의 공통 유전자중에서 TGF β 신호에 존재하는 하위 유전자를 선별하여 TGF β 활성 점수(activity score)를 산출하여 분석한 결과이다.

도 13는 TGF β 신호에 의해 발현이 조절되는 유전자 중에서 GALNT14 단백질에 의해서 발현이 조절되고 BTZ 약물 처리시 감소되는 유전자들은 폐암 환자의 생존율에 부정적(negative) 효과가 있음을 확인한 결과이다.

도 14은 CFZ 약물 처리와는 달리 BTZ 약물만이 폐암 세포의 전이를 억제할 수 있음을 확인한 결과이다.

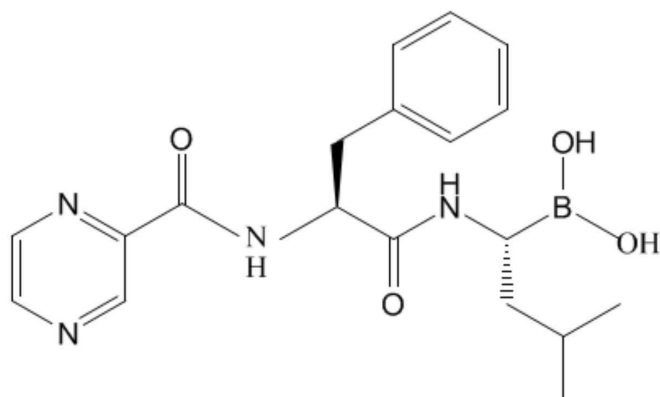
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 일측면은 보르테조밐(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 보르테조밐(Bortezomib)은 하기 화학식 1의 구조로 나타내어지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0027] 상기 보르테조밐은 폐암의 전이를 억제할 수 있다.

[0028] 상기 폐암은 비소세포성 폐암(non small cell lung cancer)일 수 있고, 상기 비소세포성 폐암은 대세포폐암(large cell lung carcinoma)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0029] 상기 조성물은 GALNT 14 유전자의 발현을 억제할 수 있고, TGF β 의 활성을 억제할 수 있으며, SMAD4 유전자의 발현을 억제하여 폐암세포에서 전이능과 침윤능을 억제할 수 있다.

[0030] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설포산, 4-톨루엔설포산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등이 있다.

[0031] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0032] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0033] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물 전체 중량에 대하여 유효성분인 보르테조밐 또는 이들의 약학적으로 허용

가능한 염을 10 내지 95 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내에 전달하는데 적합한 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 예로서, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합한 것일 수 있다. 이때, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

[0035] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0036] 본 발명의 조성물은 경구제제 또는 비경구제제로 제형화 될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 첨가될 수 있다. 한편, 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 여기에는 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 부형제가 포함될 수 있다.

[0037] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제 등의 주사제가 포함될 수 있다.

[0038] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식중 선택될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여된다. 이는 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물 등에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 병용 투여시, 투여는 순차적 또는 동시일 수 있다.

[0041] 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함되는 유효성분의 양은 0.001 내지 10,000 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 5 g/kg일 수 있다. 상기 투여는 하루에 1회일 수 있고, 수회로 나눌 수도 있다.

[0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 폐암의 재발 원인 유전자를 발굴하기 위해서 The Cancer Genome Atlas(TCGA)를 이용하여 분석한 결과, GALNT14를 폐암의 재발 원인 유전자 후보로 선정하였다(도 1 참조). 또한, 폐암의 재발의 원인 유전자인 GALNT14의 발현이 폐암의 전이에 미치는 영향을 확인하기 위해서 실험을 수행한 결과, GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포를 마우스 동물 모델의 꼬리 정맥에 주입한 경우 폐로의 전이가 억제됨을 확인할 수 있었고, 이를 통해 GALNT14 유전자가 폐암의 전이를 촉진하는 역할을 함을 확인하였다(도 2 참조). GALNT14 유전자의 폐암 종양형성능 조절을 확인한 결과, GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포주를 주입한 마우스는 대조구 세포주를 주입한 마우스와 비교해 볼 때 피하지방에서 종양이 형성되지 않음을 확인하였고, 이를 통해 GALNT14 유전자의 발현이 폐암 세포의 종양형성능을 촉진함을 확인하였다(도 3 참조).

[0043] 또한, 본 발명자들은 Connectivity Map (CMap)을 활용하여 GALNT14 유전자의 발현에 의해 촉진되는 전이능을 억제하는 약물로 보르테조미프(Bortezomib)를 선별하고, 상기 보르테조미프를 이용하여 폐암세포 이동 억제 효과와 폐암세포 침윤능 억제를 확인한 결과, 보르테조미프가 폐암세포 이동을 억제하고 폐암세포의 침윤능이 억제됨을 확인하였다(도 4 및 도 5 참조). 상기 보르테조미프를 처리한 경우 세포의 생존능력을 확인한 결과, 양성 대조구와 비교하여 암세포의 전이 억제가 세포의 생존능력의 저해를 통해 발생하는 것이 아님을 확인하였다(도 6 참조). 또한, 상기 폐암의 전이 억제가 프로테아좀 저해에 의해 매개되는지 여부를 확인하기 위해 실험을 수행한 결과, BTZ와 CFZ가 동일 농도에서 유사한 정도의 프로테아좀 억제효능을 나타내었으나(도 7 참조), BTZ 또는 CFZ를 처리한 후 프로테아좀 저해제를 처리하고 two chamber invasion assay를 수행하여 세포의 침윤능을 확인한 결과, CFZ는 세포의 침윤을 억제하지 못하는 반면 BTZ는 세포의 침윤을 억제하는 것을 통해 BTZ에 의한 세포의 침윤 억제는 프로테아좀 억제와 무관함을 확인하였다(도 8 참조).

[0044] 또한, 본 발명자들은 보르테조미프에 의한 전이능 억제 기전을 확인한 결과, GALNT14의 발현이 억제되었을 때와

BTZ를 처리하였을 때 공통적으로 변화된 유전자들이 TGF β 신호(signaling)에 속해있음을 확인하였고(도 9 참조), BTZ 약물을 처리하는 경우 TGF β 의 활성을 억제함을 확인하였다(도 10 참조). BTZ 약물 처리에 의한 전이능 억제가 TGF β 신호의 활성 조절에 의한 것인지 여부를 확인한 결과, TGF β 신호 경로의 하위에 있는 SMAD4 유전자의 발현이 억제됨에 따라 세포의 침투력이 감소함을 확인하여 BTZ 약물 처리에 의한 전이능 억제가 TGF β 신호의 활성 조절에 의한 것임을 확인하였다(도 11 참조). TGF β 활성 점수를 이용한 GALNT14 단백질과 TGF β 신호의 관계 확인한 결과, 산출된 TGF β 활성 점수가 높은 환자일 수록 폐암 환자의 비재발 생존률이 낮음을 확인하였고(도 12 참조), GALNT14 단백질과 TGF β 신호의 관계 폐암 환자 데이터베이스를 이용하여 확인한 결과, TGF β 활성 점수와 GALNT14 단백질의 발현 정도는 양의 상관관계를 나타냄을 확인하였다(도 13 참조).

[0045] 또한, 본 발명자들은 보르테조미의 폐암 전이 억제능을 확인하기 위해서 H460 폐암 세포주를 마우스의 꼬리 정맥에 주입 후 1달 후 암세포의 폐 전이를 확인한 결과, 대조구 또는 CFZ 약물을 처리한 그룹과는 달리 BTZ 약물을 처리한 그룹에는 폐에 종양이 관찰되지 않았고, 이를 통해 BTZ만이 폐암 세포의 전이를 억제할 수 있음을 확인하였다(도 14 참조).

[0046] 따라서, 상기와 같은 실험 결과에 따라 본 발명의 보르테조미를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 폐암 전이 억제용도로 유용하게 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 일측면은 보르테조미(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 폐암 전이 억제용 건강기능식품을 제공한다.

[0049] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 함량은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다.

[0050] 또한, 상기 건강기능식품의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있다.

[0051] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 건강기능식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0052] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.

[0054] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0055] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0057] <실험예 1> 폐암의 재발 원인 유전자 발굴

[0058] 폐암의 재발 원인 유전자를 발굴하기 위해서 공개된 폐암환자의 유전자 발현 프로파일 및 임상 정보 데이터베이스인 The Cancer Genome Atlas(TCGA)를 활용하여 다음과 같은 방법으로 분석을 수행하였다.

[0059] 구체적으로, TCGALUAD 코호트에서 516명의 폐암 환자로부터 전사체 데이터 및 임상 정보를 모았다. 상기 데이터에서 i) 환자의 정상조직 대비 종양조직에서 4배 이상 발현이 증가 되어있는 유전자를 선별; ii) 유전자 발현과 환자의 비재발 생존기간(relapse-free survival, 1차 치료후 암이 재발 되지 않고 생존한 기간)간에 로그순위검정(logrank test)을 수행하여 유의수준(0.01) 이하로 상관관계가 높은 유전자를 선별하였다.

[0060] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, GALNT13, COL7A1, GPR115, C1QTNF6, KRT16, INHA 및 TNFSF11 7개의 유전자

의 발현이 암의 진행, 재발 및 전체 생존과 유의하게 관련되어 있음을 확인하였고, i)과 ii) 방법에서 공통적으로 선별된 유전자인 GALNT14를 폐암의 재발 원인 유전자 후보로 선정하였다.

[0062] <실험예 2> GALNT14 유전자의 발현이 폐암의 전이에 미치는 영향 확인

[0063] 폐암은 다른 암종에 비해 진단 당시 이미 다른 장기로 전이하였거나, 전이가 없더라도 여러 차례의 치료에도 불구하고 다른 장기로 전이되어 재발되는 경우가 빈번하므로, 폐암의 재발을 억제 또는 저해하기 위해서 폐암의 전이를 억제 또는 저해할 수 있는 약물을 발굴하는 것이 필요하다.

[0064] 이에, 폐암의 재발의 원인은 폐암의 전이와 밀접한 연관이 있을 것으로 예상하고, 폐암의 재발의 원인 유전자인 GALNT14의 발현이 폐암의 전이에 미치는 영향을 확인하기 위해서 H460 폐암 세포주(KCLB)에 GALNT14 유전자의 발현을 감소시키는 shRNA(서열번호 1)를 포함하는 벡터(pLK0.1-TRC, addgene)를 형질전환시켜 GALNT14 유전자 발현 억제 세포주를 제조하거나 H460 세포주에 shRNA 염기서열이 포함되지 않은 공벡터(shCont, pLK0.1-TRC, addgene)를 형질전환시켜 대조구 세포주를 제조하였다. 상기 제조한 세포 2X10⁶ 개를 마우스의 꼬리 정맥에 주입하고 30일 후, 마우스를 희생하여 폐를 H&E 염색하여 폐암의 전이 정도를 확인하였다.

[0065] 그 결과 도 2에 나타난 것과 같이 GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포를 마우스 동물 모델의 꼬리 정맥에 주입한 경우 폐로의 전이가 억제됨을 확인하였고, 이를 통해 GALNT14 유전자가 폐암의 전이를 촉진하는 역할을 함을 확인하였다.

[0067] <실험예 3> GALNT14 유전자의 폐암 종양형성능 조절 확인

[0068] GALNT14 유전자가 폐암 종양형성능을 조절하는지 여부를 확인하기 위해서 실험예 2와 같은 방법으로 제작한 GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포주와 대조구 세포주 1X10⁷ 개를 각각 마우스의 피하지방에 주입한 후, 종양이 발생하는지 여부(종양형성능)를 관찰하였다.

[0069] 그 결과 도 3에 나타난 것과 같이 GALNT14 유전자의 발현을 억제한 세포주를 주입한 마우스는 대조구 세포주를 주입한 마우스와 비교해 볼 때 피하지방에서 종양이 형성되지 않음을 확인하였고, 이를 통해 GALNT14 유전자의 발현이 폐암 세포의 종양형성능을 촉진함을 확인하였다.

[0071] <실험예 4> GALNT14 유전자의 발현에 의해 촉진되는 전이능을 억제하는 약물 선별

[0072] GALNT14 유전자의 발현에 의해 촉진되는 암세포의 전이능을 억제하는 약물을 선별하기 위해 2만여 약물에 대한 약물 유도 유전자 발현 프로파일을 제공하는 데이터베이스 Connectivity Map (CMap)을 활용하였다. 실험예 2에서 제조한 GALNT14 유전자 발현 억제 세포주의 유전자 발현 변화 패턴과 CMap 에서 제공하는 각 약물에 의해 유도된 유전자 발현 변화 패턴간의 자카드 유사도(Jaccard similarity)를 공지된 방법을 통해 계산하여 가장 유사한 효과를 나타내는 약물로서 보르테조미프(Bortezomib:BTZ)을 선별하였다.

[0074] <실험예 5> 보르테조미프(Bortezomib)의 폐암세포 이동 억제 효과 확인

[0075] 덱사메타손(Dexamethasone: DEX) 또는 보르테조미프(Bortezomib: BTZ) 약물이 폐암세포의 전이능을 억제하는지 확인하기 위해서 H460 폐암 세포주에 각각 DEX와 BTZ를 0, 25, 또는 50 nM 처리하고 43 시간 후 상처 치유 분석(wound healing assay)을 수행하여 세포의 이동성을 측정하였다.

[0076] 그 결과 도 4에 나타난 것과 같이 DEX는 세포의 이동을 억제하지 못하는 반면 BTZ는 세포의 이동을 억제함을 확인하였다. 상기 결과를 통해 BTZ만이 GALNT14 유전자의 발현에 의해 촉진되는 전이를 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0077] <실험예 6> 보르테조미프(Bortezomib)의 폐암세포의 침윤능 억제 확인

[0079] 보르테조미프(Bortezomib: BTZ)의 전이 억제 능력을 확인하기 위해서 H460 폐암 세포주에 20 nM BTZ를 24시간 처

리 후 two chamber invasion assay를 수행하여 세포가 ECM을 통과하여 이동할 수 있는 침윤능을 조사하였다.

[0080] 그 결과 도 5에 나타난 것과 같이 BTZ 약물 처리 후 세포의 침윤능이 억제됨을 확인하였고, 이는 BTZ 약물이 GALNT14 유전자의 발현에 의해 촉진되는 전이를 억제할 수 있음을 제시한다.

[0082] <실험예 7> 보르테조미프(Bortezomib) 처리 시 세포의 생존능력 확인

[0083] 보르테조미프(Bortezomib) 처리 시 세포의 생존능력의 변화 여부를 확인하기 위해서 H460 폐암 세포주에 BTZ를 각각 농도별로 처리 후 세포의 생존능력을 Annexin V/7AAD(BD Bioscience, cat:559763) 염색후 FACS(BD Bioscience)를 통해서 확인하였다.

[0084] 한편, 세포사멸을 유도한 양성대조구(p.c., positive control)는 H460 세포주에 5ug/ml puromycin을 24시간 처리하여 제조하였다.

[0085] 그 결과 도 6에 나타난 것과 같이 양성 대조구와 비교하여 BTZ를 처리했을 때 Annexin V/7AAD dual positive population이 거의 없는 것을 통해 BTZ를 처리했을 때 나타나는 암세포의 전이 억제가 세포의 생존능력의 저해를 통해 발생하는 것이 아님을 확인하였다.

[0087] <실험예 8> 보르테조미프(Bortezomib) 처리에 의한 전이능 억제가 프로테아좀 저해에 의해 매개되는지 여부 확인

[0088] 8-1. 보르테조미프(Bortezomib) 처리에 의한 전이능 억제가 프로테아좀 저해에 의해 매개되는지 여부 웨스턴 블롯으로 확인

[0089] 프로테아좀 저해제로 기능함이 알려진 보르테조미프(Bortezomib) 처리에 의한 폐암세포의 전이능 억제가 프로테아좀(proteasome) 저해활성에 의해 매개되는지 여부를 확인하기 위해서 다른 프로테아좀 저해제 (proteasome inhibitor)인 카필조미프(Carfilzomib, selleckchem, cat:52853)과 보르테조미프의 효능을 비교분석하였다. H460 폐암 세포주에 보르테조미프(Bortezomib: BTZ) 또는 카필조미프(carfilzomib: CFZ)을 각각 20nM 24시간 처리 후 프로테아좀에 의해 분해되는 단백질로 알려진 β -catenin, cyclin D1, 및 p27의 단백질 양을 β -Actin 항체(Santa cruz, sc-47778), CyclinD1 항체(Santa cruz, sc-718), 및 p27 항체(Santa cruz, sc-528)를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0090] 그 결과 도 7에 나타난 것과 같이 보르테조미프(BTZ)과 카필조미프(CFZ)이 동일 농도에서 유사한 정도의 프로테아좀 억제효능을 나타냄을 확인하였다.

[0092] 8-2. 보르테조미프(Bortezomib) 처리에 의한 침윤능 억제가 프로테아좀 저해에 의해 매개되는지 여부 확인

[0093] 보르테조미프 처리에 의한 전이능 억제가 프로테아좀 저해에 의해 매개되는지 여부를 확인하기 위해서 실시예 8-1과 같은 방법으로 보르테조미프 또는 카필조미프를 처리한 후 프로테아좀 저해제를 처리하고 two chamber invasion assay를 수행하여 세포의 침윤능을 확인하였다.

[0094] 그 결과 도 8에 나타난 것과 같이 카필조미프(CFZ)은 세포의 침윤을 억제하지 못하는 반면 보르테조미프(BTZ)은 세포의 침윤을 억제함을 알 수 있었다. 이는 보르테조미프(BTZ)에 의한 세포의 침윤 억제는 프로테아좀 억제와 무관함을 제시한다.

[0096] <실험예 9> 보르테조미프(Bortezomib)에 의한 전이능 억제 기전 확인

[0097] 보르테조미프에 의한 전이능 억제 기전을 확인하기 위해서 다음과 같은 방법으로 신호전달 경로 분석을 수행하였다:

[0098] i) 실시예 2에서 제작한 GALNT14 유전자의 발현을 감소시키는 H460 폐암 세포주(shGALNT14)에서 하향 차등 발현된 유전자를 선별; ii) H460 폐암 세포주에 BTZ 약물을 처리에 의해 하향 차등 발현된 유전자를 선별; iii) i)과 ii)에서 선별된 유전자 중 공통된 101개 유전자를 폐암 전이 억제를 위해 하향 조절되어야 할 유전자로 정의함; iv) 공개된 신호전달 경로 유전자 데이터베이스(KEGG)로부터 200여 가지 신호전달 경로에 속하는 알려진 유전자 리스트와 iii)에서 정의한 유전자 리스트 간의 Fisher 정확검정을 수행하여 가장 공통된 유전자가 높은 신호전

달 경로 5개를 선별; 및 v) 실시예 1에서 사용된 폐암 환자의 임상 데이터베이스를 활용하여, 각 경로 내 유전자의 발현값이 비재발 생존기간과 상관관계(Hazard Ratio)를 계산함.

[0099] 그 결과 도 9에 나타난 것과 같이 GALNT14의 발현이 억제되었을 때와 보르테조밍(BTZ)을 처리하였을 때 공통적으로 변화된 유전자들이 TGF β 신호(signaling)에 속해있음을 알 수 있었고, 이는 보르테조밍(BTZ)에 의한 전이능 억제가 TGF β 신호에 의해서 매개됨을 제시한다.

[0101] <실험예 10> 보르테조밍(Bortezomib) 처리 후 TGF β 신호의 변화 여부 확인

[0102] 보르테조밍(BTZ) 처리 후 TGF β 의 활성 변화를 확인하기 위해서 실시예 8-1과 같은 방법으로 보르테조밍(BTZ) 또는 카필조밍(CFZ) 약물 처리 후 TGF β 의 활성 정도를 luciferase assay(Promega, cat:E1980)를 통해서 확인하였다.

[0103] 그 결과 도 10에 나타난 것과 같이 카필조밍(CFZ)을 처리하는 경우 TGF β 의 활성을 억제하지 못하였지만, 보르테조밍(BTZ)을 처리하는 경우 TGF β 의 활성을 억제함을 확인하였다.

[0105] <실험예 11> 보르테조밍(Bortezomib) 약물 처리에 의한 전이능 억제가 TGF β 신호의 활성 조절에 의한 것인지 확인

[0106] 보르테조밍(Bortezomib) 처리에 의한 전이능 억제가 TGF β 신호의 활성 조절에 의한 것인지 여부를 확인하기 위해서 TGF β 신호 경로의 하위에 있는 SMAD4 유전자의 발현을 siRNA(Bioneer, cat:4089-1)로 억제한 후 세포의 침윤 정도를 확인하였다.

[0107] 그 결과 도 11에 나타난 것과 같이 SMAD4의 발현이 억제됨에 따라 세포의 침투력이 감소함을 확인하였다. 이는 보르테조밍(BTZ) 처리에 의한 전이능 억제가 TGF β 신호의 활성 조절에 의한 것임을 제시한다.

[0109] <실험예 12> GALNT14 단백질과 TGF β 신호의 관계 확인

[0110] 12-1. TGF β 활성 점수를 이용한 GALNT14 단백질과 TGF β 신호의 관계 확인

[0111] 실시예 9에서 정의한 101개 유전자 중 TGF β 신호 경로에 존재하는 하위 7개의 유전자의 발현 순위를 KS(Kolmogorov-Smirnov) 검정값으로 TGF β 활성 점수(activity score)로 정의하고, TGF β 활성 점수가 높은 환자와 낮은 환자를 구분하여 비재발 생존율(1차 치료후 암이 재발 되지 않고 생존한 환자 비율)을 확인하였다.

[0112] 그 결과 도 12에 나타난 것과 같이 산출된 TGF β 활성 점수가 높은 환자일 수록 폐암 환자의 비재발 생존율이 낮음을 확인할 수 있었다. 이는 GALNT14 발현 억제와 보르테조밍(BTZ)에 의해 공통적으로 영향을 받는 유전자 중 TGF β 의 하위유전자들이 환자의 비재발생존율을 낮춤을 알 수 있다.

[0114] 12-2. GALNT14 단백질과 TGF β 신호의 관계 폐암 환자 데이터베이스를 이용하여 확인

[0115] GALNT14 단백질과 TGF β 신호의 관계를 확인하기 위해서 실시예 1에서 사용한 폐암 환자 데이터베이스(TCGA)를 이용하여 실시예 12-1에서 구한 TGF β 활성 점수가 높은 환자들의 GALNT14 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

[0116] 그 결과 도 13에 나타난 것과 같이 실시예 12-1에서 얻은 TGF β 활성 점수와 GALNT14 단백질의 발현 정도는 양의 상관관계를 나타냄을 확인할 수 있었고, 실시예 12-1에서 구한 TGF β 활성점수가 높은 환자군이 비재발 생존율이 낮으며, 이러한 환자군에서 GALNT14의 발현이 높음을 확인할 수 있었다.

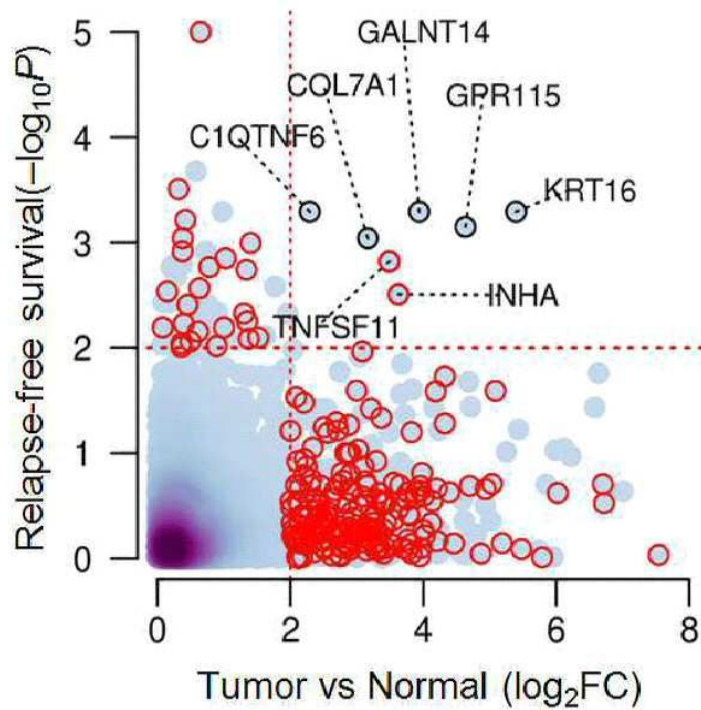
[0118] <실험예 13> 보르테조밍(Bortezomib)의 폐암 전이 억제능 확인

[0119] 보르테조밍(BTZ)의 폐암 전이 억제능을 확인하기 위해서 H460 폐암 세포주를 마우스의 꼬리 정맥에 주입 후 BTZ(0.1mg/kg) 약물 또는 CFZ(0.5mg/kg) 약물을 각각 일주일에 2번씩 쥐의 꼬리 정맥에 주입하고, 1달 후 암세포의 폐 전이를 확인하였다.

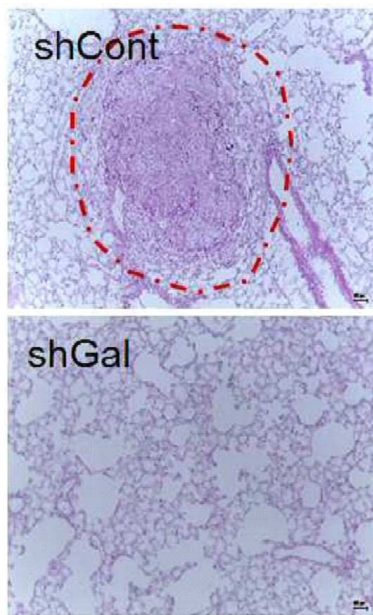
- [0120] 대조구는 H460 폐암 세포주를 마우스의 꼬리 정맥에 주입 후 식염수(100 μ l)를 한번 처리한 것을 사용하였다.
- [0121] 그 결과 도 14에 나타난 것과 같이 대조구 또는 CFZ 약물을 처리한 그룹과는 달리 BTZ 약물을 처리한 그룹에는 폐에 종양이 관찰되지 않았고(화살표), 이를 통해 BTZ만이 폐암 세포의 전이를 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0123] 따라서, 상기와 같은 실험 결과에 따라 본 발명의 보르테조밐을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 폐암 전이 억제용으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면

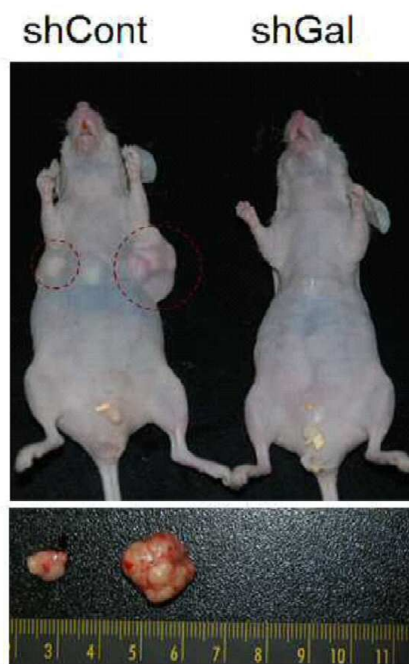
도면1



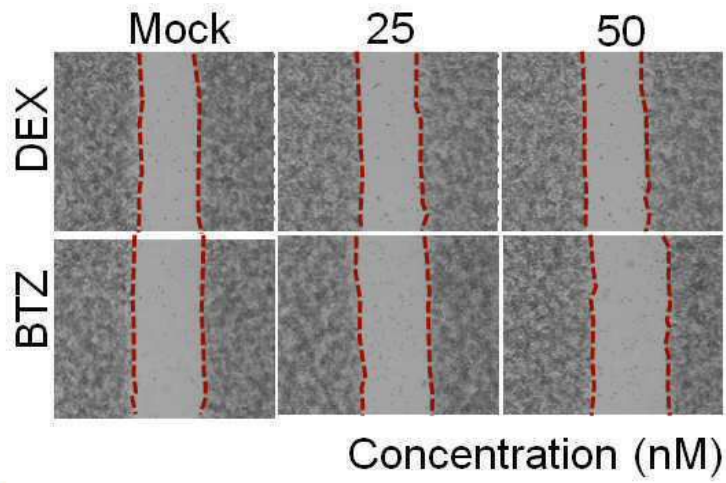
도면2



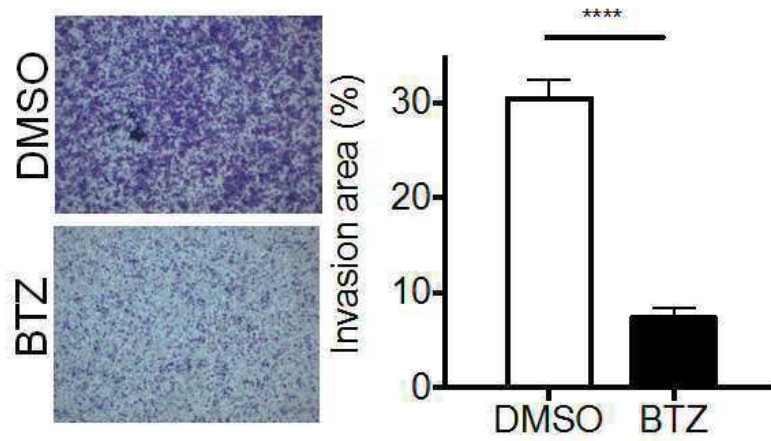
도면3



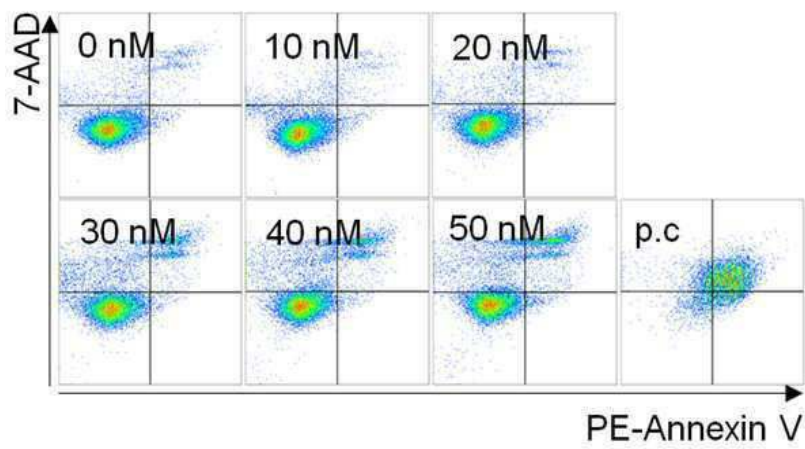
도면4



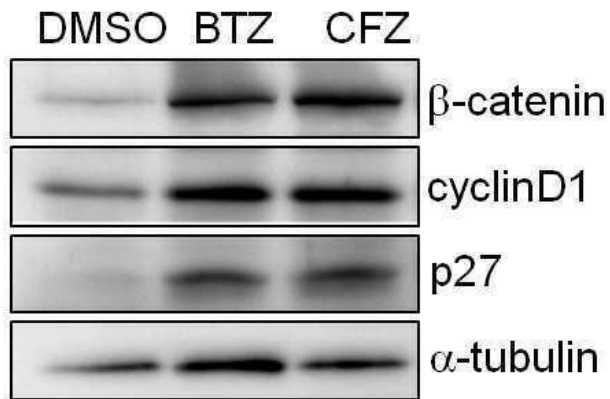
도면5



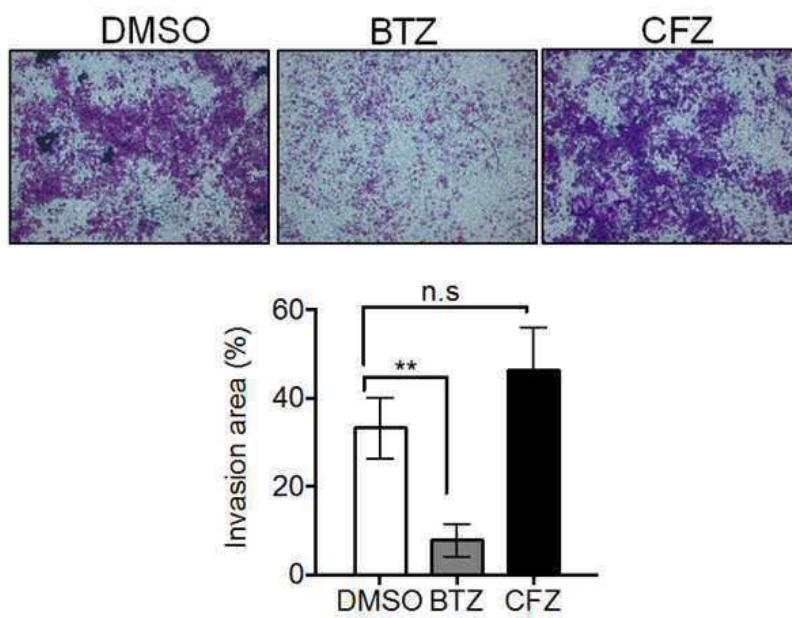
도면6



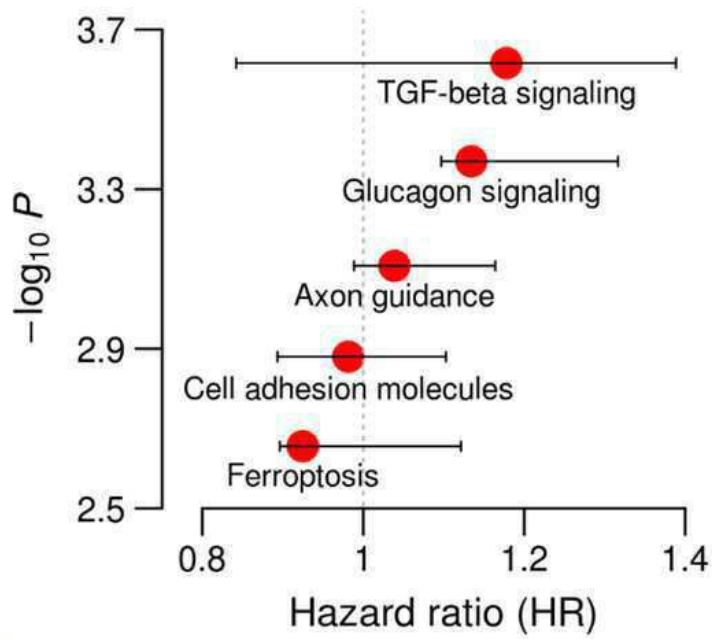
도면7



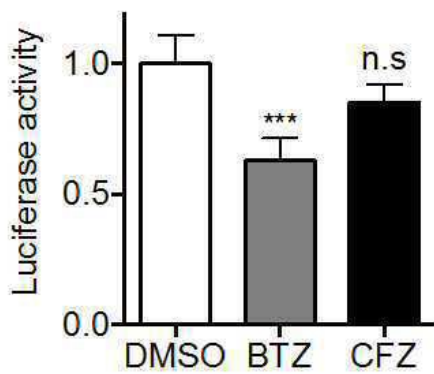
도면8



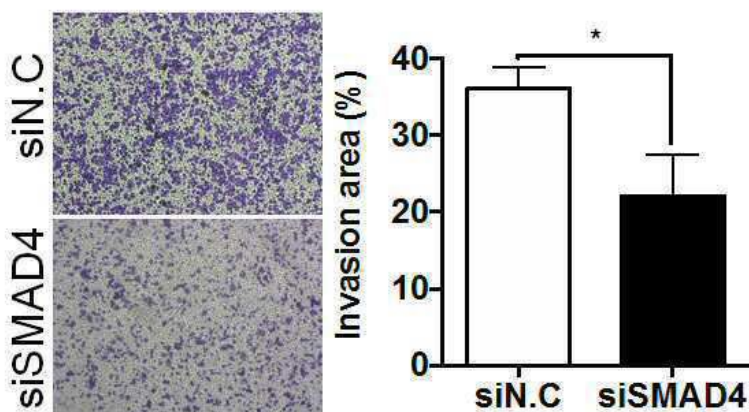
도면9



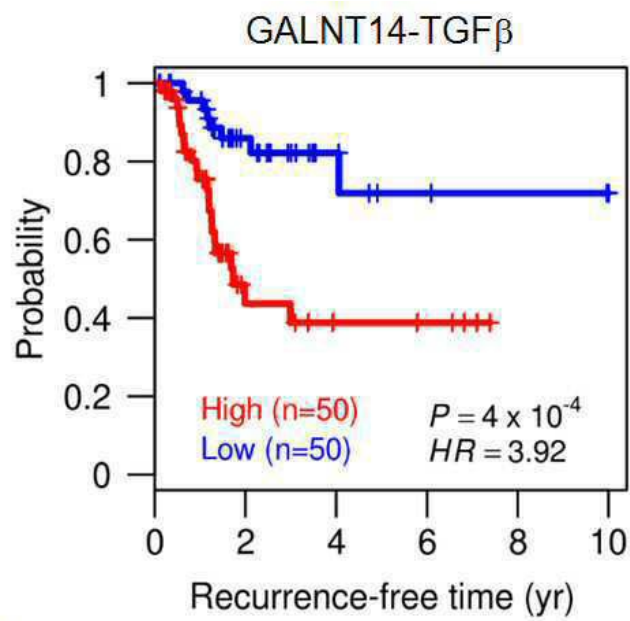
도면10



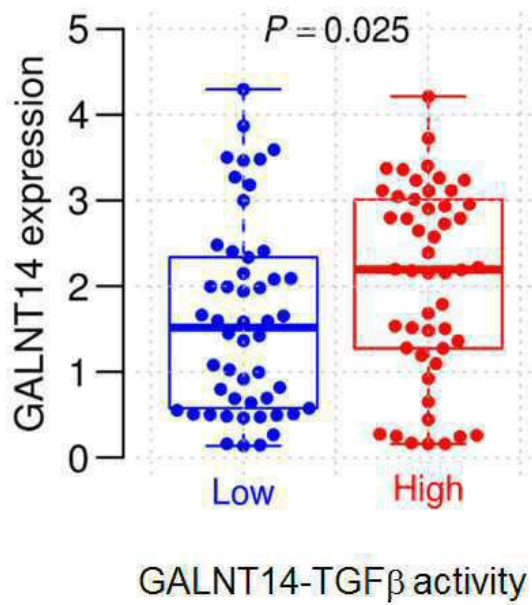
도면11



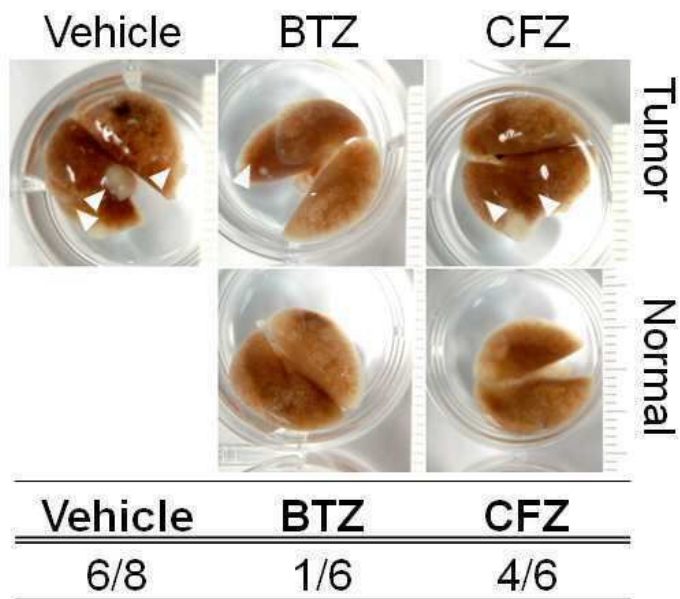
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Pharmaceutical composition containing a bortezomib for inhibiting
the metastasis of lung cancer
- <130> 2019p-10-001
- <150> KR 10-2018-0169824
- <151> 2018-12-26
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 59
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> No1
- <400> 1

ccggcatgtt ctcaaggccg ttaagctcga gcttaacggc cttgagaaca tgttttttg

59