(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월21일
(11) 등록번호 10-1830594
(24) 등록일자 2018년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A61K 31/575* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 31/575 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0086273
(22) 출원일자 2017년07월07일
심사청구일자 2017년07월07일
(56) 선행기술조사문헌
International Conference & Exhibition on Cancer Science & Therapy, 15-17, 2011.
Cancer Letters, 189, 11-16, 2003.
Oncology Reports, 36, 1180-1186, 2016.

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이성진
경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22 한림대학교성심병원 내분비내과
김시형
경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22 한림대학교성심병원 내분비내과
(74) 대리인
강성혜

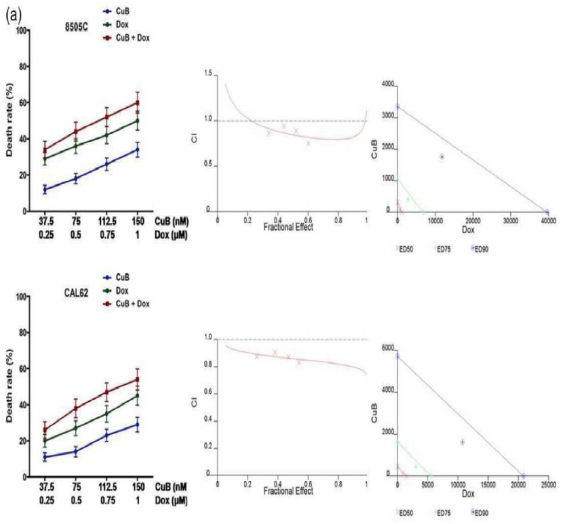
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **독소루비신과 큐커비타신 B를 모두 포함하는 갑상선암 치료제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 독소루비신과 큐커비타신 B를 모두 포함하는 미분화 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것으로서, 미분화 갑상선암 세포의 세포독성 유도에 독소루비신이 Bcl-2 패밀리 단백질들, 서바이빈, 그리고 활성산소종을 매개로 하고 JAK2/STAT3과 ERK1/2를 조절하여 큐커비타신 B와 상승작용을 함을 처음으로 밝혔다.

대 표 도 - 도2a



(52) CPC특허분류
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A2A2A01003589
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)
연구과제명 항암제 저항성 갑상선암의 새로운 치료 플랫폼 구축
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

독소루비신과 큐커비타신 B를 유효성분으로 포함하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 갑상선암은 미분화 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

독소루비신은 0.1 내지 1 μM 범위임을 특징으로 하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

큐커비타신 B는 25 내지 200 nM 범위임을 특징으로 하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

독소루비신과 큐커비타신 B의 조합은 Bcl-2 패밀리 단백질들과 서바이빈에 의해 매개되어 갑상선암 세포사멸 상승작용을 나타냄을 특징으로 하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

독소루비신과 큐커비타신 B의 조합은 JAK2/STAT3 및 ERK1/2 조절을 통해 갑상선암 세포사멸 상승작용을 나타냄을 특징으로 하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

독소루비신과 큐커비타신 B의 조합은 활성산소종 의존적 기작으로 갑상선암 세포사멸 상승작용을 나타냄을 특징으로 하는 갑상선암 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 독소루비신과 큐커비타신 B를 모두 포함하는 미분화 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것으로서, 미분화 갑상선암 세포의 세포독성 유도에 독소루비신이 Bcl-2 패밀리 단백질들, 서바이빈, 그리고 활성산소종을 매개로 하고 JAK2/STAT3과 ERK1/2를 조절하여 큐커비타신 B와 상승작용을 함을 처음으로 밝혔다.

배 경 기 술

[0002] 미분화 갑상선암 (Anaplastic thyroid carcinoma; ATC)은 갑상선으로부터 발생하는 매우 공격적인 악성종양으로서, 갑상선 외부로의 침입, 혈액 전이 및 통상적인 치료법에 대한 저항성을 나타낸다 (1). 미분화 갑상선암에서, 수술, 화학요법 및 방사선 치료를 포함하는 여러 가지 치료 방법은 강력한 효과를 나타내지 못하여 종양 세포에 대한 효율을 개선하는 새로운 치료 전략이 필요하다 (1). 안트라사이클린 (anthracycline) 기반 DNA 인터칼레이터인 독소루비신 (Doxorubicin; Dox)은 DNA 폴리머레이즈, DNA 토포아이소머레이즈 II 및 DNA 메틸트랜스퍼레이즈를 억제함으로써 항암 활성을 발휘하여 암세포에 세포독성을 초래한다 (2). 독소루비신은 암세포에서 Bcl-2 (B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2)의 조절을 통하여 세포독성을 나타낸다. 반면, IAP (inhibitor of apoptotic protein)의 일종인 서바이빈 (survivin)은 IAP와의 상호작용을 통해 세포사멸을 억제하며, 그리하여 화학치료제에 대한 저항인자로 여겨진다 (3). 서바이빈은 독소루비신에 내성을 나타내는 암세포에서 상향조절된다 (4). 활성산소종에 대해서는 독소루비신은 활성산소종을 생성하여 연쇄적 신호전달을 활성화하여 암세포에서 생존, 성장 및 침입을 담당하는 단백질의 인산화를 변화시킨다 (5). 아르테수네이트 (Artesunate)와 N,N-다이메틸피토스핑고신 (N,N-dimethyl phytosphingosine)은 활성산소종을 이용하여 암세포가 독소루비신-유도 세포독성에 민감해지도록 한다 (6,7). 미분화 갑상선암 환자에서, 독소루비신은 단일요법에 사용된 바 있으나, 낮은 반응률을 나타내었다 (8~10). 독소루비신이 미분화 갑상선암 세포에서 유래한 암 줄기세포를 없애지 못함을 고려하여 (11) 미분화 갑상선암 환자의 치료에서는 암세포를 독소루비신에 민감해지도록 하는 것이 필수적이다.

[0003] 큐커비타신 (Cucurbitacins)은 박과 (Cucurbitaceae) 및 십자화과 (Cruciferae)에서 분리된 고도로 산화된 4원환 트리테르페노이드이며, 구조적 특징에 따라 12가지로 분류된다 (12~14). 원칙적으로 큐커비타신은 암세포에서 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)를 억제하여 세포독성에 이르게 한다 (12~14). 큐커비타신 중 큐커비타신 B (CuB)는 췌장암세포에서 JAK2 (Janus kinase 2)/STAT3의 불활성화를 통해 세포사멸을 일으킨다 (15). CuB는 후두암 세포에서 ERK (extracellular signal-regulated kinase)를 자극하는 반면, 백혈병과 뇌종양 세포에서는 ERK를 억제한다 (16~18). CuB는 단독으로 또는 화학요법제와 조합하여 암세포에서 사멸 관련 단백질 및 활성산소종을 조절함으로써 세포독성을 나타낸다 (14~22). 큐커비타신은 암세포에서 독소루비신 유도 세포독성을 증대시킨다 (23,24). 이런 점에서 큐커비타신 D는 독소루비신 저항성 인간 유방암세포에서 STAT3를 억제하여 세포사멸로 이끈다 (23). 또한, 큐커비타신 E는 자궁육종 세포에서 독소루비신의 발산을 저해하여 세포 사멸을 강화한다 (24). 갑상선암 세포에서 큐커비타신의 치료적 의미와 관련해서는 CD133+ ATC 세포에서 독소루비신, 시스플라틴 (cisplatin), 5-플루오로우라실 및 방사선 치료에 의한 세포 독성을 큐커비타신 I가 강화한다는 결과를 보고한 단 하나의 연구만 알려져 있으나 (25), 큐커비타신 B 단독 또는 다른 화학치료제와 조합하여 세포 생존율에 미치는 영향에 관해서는 갑상선암세포에서 밝혀진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Haghpanah V. et al., Tumor Biol 2016; 37: 1299-1308.

(비특허문헌 0002) Tacara O. et al., J Pharm Pharmacol 2013; 65: 157-170.

(비특허문헌 0003) Altieri D.C. Biochem J 2010; 430: 199-205.

(비특허문헌 0004) Zhang Z. et al.,Int J Clin Exp Med 2015; 8: 18032-18040.

(비특허문헌 0005) Minotti G. et al. Pharmacol Rev 2004;56: 185-229.

(비특허문헌 0006) Efferth T. et al., PLoS ONE 2007; 2: e693.

(비특허문헌 0007) Kim BM et al., Apoptosis 2010; 15: 982-993.

(비특허문헌 0008) Haddad RI et al., Natl Compr Canc Netw 2015; 13: 1140-1150.

(비특허문헌 0009) Giuffrida D. et al. Ann Oncol 2010; 11: 1083-1089.

(비특허문헌 0010) Haigh PI et al.,Curr Treat Options Oncol 2000; 1: 353-357.

(비특허문헌 0011) Zheng X. et al., Int J Oncol 2010; 37: 307-315.

(비특허문헌 0012) Jayaprakasam B. et al., Cancer Lett 2003; 189: 11-16.

(비특허문헌 0013) Chen JC et al., Nat Prod Rep 2005; 22: 386-399.

(비특허문헌 0014) Chen X et al., Anticancer Drugs 2012; 23: 777-787.

(비특허문헌 0015) Thoennissen NH et al., Cancer Res 2009; 69: 5876-5884.

(비특허문헌 0016) Liu T et al., Eur J Pharmacol 2008; 587: 78-84.

(비특허문헌 0017) Chan KT et al., Cancer Lett 2010; 289: 46-52.

(비특허문헌 0018) Yin D et al., Int J Cancer 2008; 123: 1364-1375.

(비특허문헌 0019) Zhang T et al., Autophagy 2012; 8: 559-576.

(비특허문헌 0020) Yasuda S et al., Mol Nutr Food Res 2010; 54: 559-565.

(비특허문헌 0021) Zhang M et al., Pancreas 2010; 39: 923-929.

(비특허문헌 0022) Zhang M et al., Cancer Chemother Pharmacol 2009; 63: 635-642.

(비특허문헌 0023) Ku JM et al., Mol Cell Biochem 2015; 409: 33-43.

(비특허문헌 0024) Sadzuka Y et al., Int J Pharm 2010; 383: 186-191.

(비특허문헌 0025) Tseng LM et al., J Pharmacol Exp Ther 2012; 341: 410-423.

(비특허문헌 0026) Caja L et al., Cancer Res 2009; 69: 7595-7602.

(비특허문헌 0027) Tirro E et al., Cancer Res 2006; 66: 4263-4272.

(비특허문헌 0028) Kim SH et al., J Clin Endocrinol Metab 2015; 100: E253-E261.

(비특허문헌 0029) Kim SH et al., Endocrine 2015; 48: 886-893.

(비특허문헌 0030) Gross A et al., Genes Dev 1999; 13: 1899-1911.

(비특허문헌 0031) Cory S et al., Cancer Cell 2005; 8: 5-6.

(비특허문헌 0032) Pannone G et al., Thyroid 2014; 24: 511-519.

(비특허문헌 0033) Kim DW et al., J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 4070-4076.

(비특허문헌 0034) Brzezianska E et al., Front Biosci 2011; 16: 422-439.

(비특허문헌 0035) Singh B et al. J Surg Res 2008; 147: 240-246.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 미분화 갑상선암에 좀 더 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 미분화 갑상선암 세포에서 Dox와 CuB의 조합이 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, 본 발명자들은 미분화 갑상선암 세포에서 Bcl-2 패밀리 단백질들, 서바이빈 및 활성산소종의 매개와 JAK2/STAT3과 ERK1/2의 조절을 통한 세포독성 유도에 있어서 Dox가 CuB와 시너지 효과를 나타냄을 밝혔다. 실험에는 8505C 및 CAL62 인간 미분화 갑상선암 세포를 이용하였다. 세포 생존율, 생존세포

백분율 및 세포독성 활성은 각각 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드 {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide} 분석법, 복합적 세포독성 시험 (multiplexed cytotoxicity assay) 및 세포독성 시험으로 분석하였다. 활성산소종 생성도 측정하였다. 실험 결과, 독소루비신과 큐커비타신 B는 독소루비신 단독 처리에 비하여 투여량 의존적 및 처리시간 의존적 방식으로 세포 생존율을 감소시켰다. 모든 조합지수 값은 1.0 미만으로서, 세포독성 유도에서 독소루비신과 큐커비타신 B 간의 상승작용을 나타낸다. 독소루비신 단독 처리한 세포와 비교하여 독소루비신과 큐커비타신 B를 모두 처리한 세포에서는 절단된 폴리 ADP 폴리머레이즈와 사이클로옥시제네이즈 2의 단백질 수준과 활성산소종 생성이 증가하였다. 반면, B-세포 만성 백혈병/림프종 2 (B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2)과 서바이빈 및 B-세포 만성 백혈병/림프종 2/B-세포 만성 백혈병/림프종 2 관련 x 단백질 비는 감소하였다. JNK2 (Janus kinase 2)와 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 단백질 수준은 감소한 반면, 전체 ERK 1/2 단백질 수준의 변화 없이 인산화된 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2 단백질 수준은 감소하였다.

[0007] 이러한 결과들은 미분화 갑상선암 세포에서 세포독성 유도에 독소루비신과 큐커비타신 B가 상승작용을 나타냄을 말해준다. 이뿐만 아니라, 미분화 갑상선암 세포에서 독소루비신과 큐커비타신 B의 세포독성 상승작용은 B-세포 만성 백혈병/림프종 2 패밀리 단백질들, 서바이빈 및 활성산소종에 의해 매개되며, JNK2/STAT3 및 ERK 1/2에 의해 조절된다.

[0009] 본 발명은 독소루비신과 큐커비타신 B를 모두 포함하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 독소루비신과 큐커비타신 B를 유효성분으로 함유하는 갑상선암 치료제 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0011] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0012] 나아가, 본 발명은 상기 독소루비신과 큐커비타신 B를 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 갑상선암 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 미분화 갑상선암임을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 독소루비신과 큐커비타신 B 조합에서 독소루비신 농도가 0.1 내지 1 μM 범위임을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 독소루비신과 큐커비타신 B 조합에서 큐커비타신 B 농도가 25 내지 200 nM 범위임을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 독소루비신과 큐커비타신 B 조합이 는 Bcl-2 패밀리 단백질들과 서바이빈에 의해 매개되어 갑상선암 세포 사멸 상승효과를 나타냄을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 독소루비신과 큐커비타신 B 조합이 JAK2/STAT3 및 ERK1/2 조절을 통해 갑상선암 세포 사멸 상승효과를 나타냄을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기독소루비신과 큐커비타신 B 조합이 활성산소종 의존적 기작으로 갑상선암 세포 사멸 상승작용을 나타냄을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에서 갑상선암 치료에 사용된 적이 있는 독소루비신은 임상적 효능과 민감성이 만족스럽지 못하였고, 나아가 ATC 세포에서 유래한 암 줄기세포를 근절하는데 실패했다고 보고되었으나, 큐커비타신 B와 조합하여 투여한 경우 우수한 상승효과를 나타내고, 세포의 독소루비신에 대한 민감성을 회복시켜 갑상선암, 특히 미분화 갑상선암의 치료에 유용할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 ATC 세포의 생존율에 대한 Dox와 CuB의 효과를 나타낸다. (a, b) 8505C 및 CAL62 세포를 (a) 0.25, 0.5, 1, 2 및 4 μM의 Dox로 24시간, 48시간 처리한 것과 (b) 37.5, 75, 150, 300 및 600 nM의 CuB로 24시간, 48시간 처리한 것이다. 세포생존율은 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

도 2는 ATC 세포에서 CuB와 조합한 Dox의 효과를 나타낸다. (a) 8505C와 CAL62 세포를 0.25, 0.5, 0.75 및 1 μM의 Dox와 37.5, 75, 112.5 및 150 nM의 CuB로 48시간 동안 처리하였다. 세포생존율은 MTT 분석법을 이용하여 측정하였고, 세포 사멸율은 100 - 세포생존율 (%)과 같이 계산하였다. 조합 지수 (Combination index; CI)와 아이소볼로그램 (isobologram)을 계산하였다. CI = 1.0에서 수평 점선을 그렸다. (b, c) 8505C 세포를 Dox 1 μM과 CuB 150 nM로 48시간 동안 처리했고, (b) 생존 세포 백분율을 다중 세포독성 분석법으로 측정하였으며, (c) 세포독성 활성은 세포독성 분석법으로 측정하였다. 모든 실험은 세 번씩 진행했다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. $*p < 0.05$.

도 3은 ATC 세포에서 Bcl-2 패밀리 단백질들과 서바이빈의 발현에 대한 Dox와 CuB 조합의 효과를 나타낸다. (a, b) 8505C 세포를 Dox 1 μM과 CuB 150 nM로 48시간 동안 처리하고, (a) Bcl-xL, Bcl-2, Bax, Bid 및 절단된 PARP의 단백질 수준을 측정하였다. (b) Bcl-2와 Bax의 단백질 수준은 밀도계로 정량하고 Bcl-2/Bax 비를 계산하였다. (c) 8505C 세포를 Dox 1 μM로 24시간 및 48시간 동안 처리하고, Dox 0.5, 1 및 5 μM로 48시간 동안 처리하였다. 8505C 세포를 CuB 200 nM로 24시간 및 48시간 처리하고, 100, 200 및 1000 nM의 CuB로 48시간 동안 처리하였다. 서바이빈 단백질 수준을 측정하였다. (d) 8505 세포를 Dox 1 μM과 CuB 150 nM로 동시에 48시간 동안 처리하였다. 서바이빈 단백질 수준을 밀도계로 측정하였다. 모든 실험은 세 번 진행하였다. 각 점은 독립적인 실험을 나타낸다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. $*p < 0.05$.

도 4는 ATC 세포에서 JAK2/STAT3 및 ERK1/2에 대한 Dox와 CuB 조합의 효과를 나타낸다. (a) 8505C 세포를 Dox 1 μM로 24시간 및 48시간 처리, 그리고 0.5, 1 및 5 μM의 Dox로 48시간 동안 처리했다. 8505C 세포를 CuB 200 nM로 24시간 및 48시간 처리하고, 100, 200 및 1000 nM의 CuB로 48시간 처리했다. JAK2, STAT3, 그리고 총 ERK1/2와 인산화-ERK1/2의 단백질 수준을 측정했다. (b) 8505C 세포를 Dox 1 μM과 CuB 150 nM로 함께 48시간 처리하고, JAK2, STAT3, 그리고 총 ERK1/2와 인산화-ERK1/2의 단백질 수준을 측정했다. 모든 실험은 세 번 진행하였다. 각 점은 독립적인 실험을 나타낸다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

도 5는 ATC 세포에서 CuB와 조합한 Dox의 영향을 나타낸다. (a, b) 8505C 세포를 Dox 1 μM 및 CuB 150 nM로 함께 48시간 처리하고, (a) 활성산소종 생성을 측정하였다. (b) COX2 단백질 수준을 측정하고 밀도계로 정량하였다. 모든 실험은 세 번 진행하였다. 각 점은 독립적인 실험을 나타낸다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. $*p < 0.05$.

도 6은 ATC 세포에서 Dox와 CuB 간의 상승작용의 기작에 관해 제시한 모델이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0022] **재료**

[0023] DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (fetal bovine serum) 및 스텝토마이신/페니실린은 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 독소루비신 및 큐커비타신 B는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이들은 DMSO (dimethylsulfoxide)에 용해하고, 이는 허용되는 농도 내에서 대조군에 제공되었다. 대조군에서 담체 DMSO의 최종 농도는 모든 처리에서 0.1%를 초과하지 않았다. Bcl-xL (B-cell leukemia/lymphoma x), Bcl-2, Bax (Bcl-2-associated x protein), Bid (BH3-interacting domain death agonist), 절단 PARP (poly(adenosine diphosphate (ADP)-ribose) polymerase), 서바이빈, JAK2, STAT3,

Thr402/Tyr404 (phospho-ERK1/2) 및 COX2(cyclooxygenase 2)의 1차 항체는 Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. β-액틴에 대한 1차 항체는 Sigma로부터 얻었다. 다른 모든 시약은 달리 명시하지 않는 한 Sigma에서 구입하였다.

[0024] **세포 배양**

[0025] 실험에는 8505C 및 CAL62 인간 미분화 갑상선암 세포를 사용하였다. 8505C 및 CAL62 세포는 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany)에서 구입하여, 10%의 불활성화 FBS, 1%의 스트렙토마이신/페니실린을 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포는 일정한 시간 간격으로 신선한 배지로 교환하였다.

[0026] **3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 분석**

[0027] 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT)분석을 사용하여 세포 생존능력을 측정하였다. 96-웰 플레이트상의 각 웰에 있는 세포 (5×10^3/100 μL)를 하룻밤 배양하고 독소루비신 및 큐커비타신 B로 처리하였다. 다음으로, MTT (1 mg/mL)를 37℃에서 추가 4시간 동안 배지에 투여하였고, MTT를 함유하는 배지를 제거하고, DMSO를 첨가하여 생존 세포에 의해 생성된 포마잔 결정을 용해하였다. 상온에서 30분 후, GloMax™ Discover System GM3000 (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

[0028] **다중 세포독성 분석**

[0029] 세포 (5×10^3/100 μL)를 96-웰 플레이트에 시딩하고, MultiTox-Glo Multiplex 세포독성 분석 키트 (Promega)의 시약은 제조사의 지시에 따라 처리 후 세포에 첨가하였다 (26). 형광 및 발광 값은 GloMaxTM Discover System GM3000 (Promega)을 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

[0030] **세포독성 분석**

[0031] 세포독성 활성은 LDH 세포독성 분석 키트 (BioVision, Linda, CA, USA)로 측정하였다. 96-웰 플레이트 상의 각 웰에서 세포 (5×10^3/100 μL)를 배양하고, 10분 동안 250g에서 원심분리하였다. 100 μL의 상층액을 깨끗한 96-웰 플레이트로 옮겼다. 반응 혼합물 (112.5 μL의 안료 용액에 2.5 μL의 촉매 용액이 들어있음)을 추가한 후, 세포를 실온에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도는 GloMax™ Discover System GM3000 (Promega)를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

[0032] **활성산소종 생성량 측정**

[0033] 활성산소종 생성량은 ROS-Glo H_2O_2 분석 키트 (Promega)로 측정하였다. 96-웰 플레이트 상의 각 웰 중에서 세포 (1×10^4/㎖)를 배양하고 H_2O_2 기질 용액으로 처리 (25 μM/웰)하고, 37℃에서 배양하였다. ROS-Glo 검출 용액 (100μL/웰)을 첨가한 후, 세포를 상온에서 20분 동안 배양하였다. 흡광도는 GloMax™ Discover System GM3000 (Promega)를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

[0034] **약물 조합 분석**

[0035] CalcuSyn 프로그램 버전 2.11 (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK)을 이용하여 조합지수 (Combination index; CI) 및 아이소볼로그램을 계산하고, 약물 상호 작용의 효과를 정량적으로 결정하였다. 1.0 미만의 CI 값은 상승 효과, CI 값 1.0은 단순 합계 (additivity), 그리고 CI>1.0은 길항작용 (antagonism)을 나타낸다. 아이소볼로그램은 x 축과 y 축 상에 각 약물이 50% 저해될 때 필요한 투여량 (ED50)을 도시하고 이를 연결하여 선분을 그림으로써 만들어지는데 이것이 ED50 아이소볼로그램이다. 선분 상, 선분 아래, 그리고 선분 위의 조합 데이터 포인트는 각각 단순 합계, 상승 효과, 그리고 길항작용을 나타낸다. 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

[0036] **웨스턴블랏 분석**

[0037] 총 단백질은 1X 프로테아제 억제제 칵테일 및 1X 포스파타아제 억제제 칵테일 세트 V (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 함유하는 RIPA 완충액 (Sigma)에 의해 추출되었다. 웨스턴블랏 분석은 특정 1차 항체와 2차 항체로서 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 항-토끼 또는 항-마우스 항체를 사용하여 수행하였다. ECL Plus Western

Blotting Detection System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)으로 밴드를 검출하였다. 목표 단백질 수준은 ImageJ 소프트웨어 (National Institutes of Health (NIH))를 사용한 밀도계로 정량하고, β-액틴 단백질 수준에 대해 정상화하였다. β-액틴 단백질에 대한 표적 단백질의 상대적 수준을 계산하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

[0038] **통계 분석**

[0039] 모든 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시하였다. 데이터는 student ' t-test 분석법 및 분산 분석법 (ANOVA)을 이용하였다. $p<0.05$일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 모든 분석은 SPSS 프로그램 버전 23.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0041] **결과 1: 미분화 갑상선암 세포의 사멸 유도에 있어서 독소루비신과 큐커비타신 B의 상승작용**

[0042] 독소루비신이 ATC 세포에서 암 줄기세포를 제거하지 못하는 반면, 큐커비타신 B는 단독 또는 화학요법 치료제와 조합하여 암세포에 세포독성을 일으킨다 (11,14). 본 발명에서는 8505C 및 CAL62 ATC 세포에서 세포 생존율에 미치는 Dox와 CuB 조합의 효과를 시험하였다.

[0043] 첫째, 각 약제의 효과를 규명하기 위해 세포를 각각 다른 양의 Dox와 CuB로 24시간 및 48시간 동안 처리하고 세포 생존율을 MTT 분석법으로 측정하였다 (도 1(a) 및 (b)). 처리 결과, 세포 생존율은 투여량-의존적 및 처리시간-의존적으로 감소하였다.

[0044] 둘째, 두 약제의 조합의 효과를 확인하기 위하여 세포에 Dox와 CuB를 모두 처리하고 Chou-Talalay 방정식으로 조합지수 (combination index; CI)를 계산하여 두 약제의 상호작용을 평가하였다 (도 2(a), 표 1). 여기에서 CI < 1.0이면 상승작용, CI = 1.0이면 단순 합계 (additivity), 그리고 CI > 1.0은 길항작용을 나타낸다. 두 약제를 조합하여 처리한 후 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였고, 사멸율은 100-세포생존율 (%)로 계산하였다. Dox와 CuB의 모든 조합지수 (CI) 값은 1.0보다 작았다. 아이소볼로그램 (isobologram) 분석에서 조합 데이터 포인트는 모두 ED50에서 아이소볼로그램 선보다 아래 위치했고, 이는 ATC 세포에서 세포독성 유도에 Dox와 CuB 간의 상승작용을 말해준다.

[0045] 세포사멸 유도에서 Dox와 CuB의 상승효과를 확인하기 위해 세포를 Dox 1 μM 및 CuB 150 nM으로 48시간 동안 처리하고 다중 세포독성 분석법을 이용하여 생존세포 백분율을 측정하였고 (도 2(b)), 세포독성 분석법으로 세포독성 활성을 측정하였다 (도 2(c)). Dox 단독 처리와 비교하여 두 약제를 함께 처리한 경우 생존세포 백분율은 감소하였고, 세포독성 활성은 상승하였다. 종합하면, 이러한 결과들은 ATC 세포의 사멸 유도에서 Dox가 CuB와 함께 상승효과를 나타냄을 말해준다.

[0046] **결과 2: ATC 세포에서 세포 사멸 유도에 대한 Dox와 CuB의 상승작용은 Bcl-2 패밀리 단백질들과 서바이빈에 의해 매개된다.**

[0047] 독소루비신은 암세포에서 Bcl-2 패밀리 단백질들의 발현을 낮추고 Bcl-2/Bax 비를 감소시켜 세포 사멸을 일으키는 반면, 서바이빈의 발현을 증가시켜 갑상선 암세포에서 내성 획득에 기여한다 (2,27).

[0048] 한편, 큐커비타신 B는 암세포에서 Bcl-2 및 서바이빈을 저하조절하여 세포 사멸을 일으킨다 (21,22). ATC 세포에서 서바이빈의 역할과 관련하여 본 발명자들은 ATC 세포에서 서바이빈 억제를 통하여 HSP90 저해제인 NVP-AUY922 및 17-알릴아미노-17-디메톡시젤다나마이신 (17-allylamino-17-demethoxygel danamycin)이 세포독성을 유도함을 밝힌 바 있다 (28,29).

[0049] 본 발명에서는 ATC 세포에서 Dox와 CuB는 세포사멸을 유도하는데 있어서 상승효과를 나타내며, 그리하여 세포독성 유도에서 Dox와 CuB 간의 상승작용에 Bcl-2 패밀리와 서바이빈이 관여함을 밝혔다.

[0050] 첫째, 세포를 Dox 1 μM와 CuB 150 nM로 48시간 동안 처리하고, Bcl-xL, Bcl-2, Bax, Bid 및 절단된 PARP 단백질 수준을 측정하였다 (도 3(a)). 동시 처리 결과, Dox 단독 처리에 비하여 절단된 PARP 단백질 수준은 증가한 반면 Bcl-2 단백질 수준은 감소하였고, Bcl-xL, Bax 및 Bid의 단백질 수준은 변화가 없었다. 도 3(b)와 같이, Dox 단독 처리의 경우와 비교할 때 Dox와 CuB 동시 처리로 Bcl-2/Bax 비가 감소하였다.

[0051] 다음으로, 세포를 Dox 1 μM로 24시간 및 48 시간, 그리고 각각 0.5, 1 및 5 μM로 48시간 동안 처리한 결과, 서바이빈 단백질 수준은 증가하였다 (도 3(c)). 이와 대조적으로 CuB 200 nM로 24시간 및 48시간, 그리고 100, 200 및 1000 nM로 48시간 동안 처리한 결과, 서바이빈 단백질 수준은 감소하였다. Dox 단독 처리와 비교하여 Dox 1 μM 및 CuB 150 nM를 48시간 처리하였을 때 서바이빈 단백질 수준은 감소하였다 (도 3(d)). 종합하면,

이 결과는 ATC 세포의 사멸 유도에서 Dox와 CuB의 상승 활성이 Bcl-2 패밀리 단백질의 조절 및 서바이빈의 억제와 관련이 있음을 분명히 해준다.

[0052] **결과 3: ATC 세포의 사멸 유도에서 Dox와 CuB는 JAK2/STAT3 및 ERK1/2 조절을 통해 상승효과를 나타낸다.**

[0053] CuB는 암세포에서 JAK2/STAT3을 억제함으로써 세포사멸을 일으킨다 (15). 뿐만 아니라, CuB는 암세포 사멸 유도에서 단독으로 또는 도세탁셀 (docetaxel)과 조합하여 STAT3 및 ERK의 매개를 통해 항암 활성을 발휘한다 (16-18). 본 발명에서는 ATC 세포의 사멸 유도에서 JAK2/STAT3 및 ERK와 관련하여 Dox가 CuB와 상승 작용을 하는지를 연구하였다.

[0054] 세포에 투여량과 반응 시간을 달리하여 Dox와 CuB를 처리하고 JAK2, STAT3 및 총 ERK1/2과 인산화-ERK1/2의 단백질 수준을 측정하였다 (도 4(a)). Dox와 CuB 처리 결과, STAT3 단백질 수준은 감소한 반면, 총 ERK1/2 단백질 수준의 변화 없이 인산화-ERK1/2 단백질 수준은 증가하였다. 흥미롭게도, JAK2 단백질 수준은 Dox에 의해 증가하지만, CuB에 의해 감소한다. Dox 1 μM과 CuB 150 nM로 48시간 동안 처리한 다음, Dox 단독 처리와 비교한 결과, JAK2와 STAT3의 단백질 수준은 감소한 반면, 총 ERK1/2 단백질 수준은 변화가 없고 인산화-ERK1/2 단백질 수준은 증가하였다 (도 4(b)).

[0055] 종합하면, 이러한 결과들은 ATC 세포 사멸 유도에서 Dox와 CuB 간의 상승작용이 JAK2/STAT3 불활성화 및 ERK1/2의 활성화와 관련되어 있음을 설명해준다.

[0056] **결과 4: ATC 세포 사멸 유도에서 Dox는 활성산소종 의존적 기작으로 CuB와 상승 작용을 나타낸다.**

[0057] 암세포에서 아르테수네이트 (Artesunate)와 N,N-다이메틸피토스핑고신 (N,N-dimethyl phytosphingosine)은 활성산소종 매개 경로를 통하여 암세포가 독소루비신-유도 세포 사멸에 민감해지도록 하며, CuB는 활성산소종 생성을 조절하여 세포 사멸에 이르도록 한다 (6,7,19,20). 본 발명에서는 ATC 세포의 사멸 유도에서 Dox와 CuB 간의 상승작용이 활성산소종과 관련이 있는지를 시험하였다.

[0058] 세포를 Dox 1 μM와 CuB 150 nM로 48시간 동안 처리하여 활성산소종 생성과 COX2 단백질 수준을 측정하였다 (도 5(a)와 (b)). 그 결과, Dox는 활성산소종 생성을 증가시킨 반면, CuB는 그렇지 않았다. Dox 단독 처리와 비교하여 Dox와 CuB 조합 처리는 활성산소종 생성과 COX2 단백질 수준을 더 증가시켰다. 요약하면, 이 결과들은 ATC 세포 사멸 유도에 있어서 Dox와 CuB의 상승작용은 활성산소종 및 COX2와 관련되어 있음을 나타낸다.

[0059] **결론**

[0060] 본 발명은 미분화 갑상선암 세포의 세포독성 유도에 Dox가 Bcl-2 패밀리 단백질들, 서바이빈, 그리고 활성산소종을 매개로 하고 JAK2/STAT3과 ERK1/2를 조절하여 CuB와 상승작용을 함을 처음으로 밝혔다. 비록 Dox가 최근 미분화 갑상선암 환자의 치료에 이용되고 있으나, 임상적 효능과 민감성은 만족스럽지 못하였다 (8-10). 나아가 Dox는 ATC 세포에서 유래한 암 줄기세포를 근절하는데 실패했다고 보고되었다 (11). 따라서, 미분화 갑상선암 세포를 Dox에 민감해지도록 하는 것은 ATC 환자의 치료에서 긴급한 치료적 난제가 되고 있다. 본 발명에서는 미분화 갑상선암 세포에서 Dox를 CuB와 조합 처리하면 약제조합분석에서 모든 조합지수 값이 1.0 미만으로 나타나 ATC 세포에 독성을 유도함에 있어서 Dox가 CuB와 상승효과를 나타냄을 말해준다. 이뿐만 아니라, Dox 단독 처리의 경우와 비교하여 생존세포 백분율 데이터 (다중 세포독성 분석) 및 세포독성 활성 (세포독성 분석)에 기반한 Dox와 CuB 조합 처리는 상승작용에 대한 부가적인 증거를 제공한다. 이를 모두 종합하면, 이 데이터들은 ATC 세포 사멸 유도에 있어서 Dox가 CuB와 상승작용을 나타냄을 말해주며, 그리하여 Dox와 CuB 조합 요법은 미분화 갑상선암에서 탁월한 치료법이 될 수 있음을 제시한다.

[0061] Bcl-2 패밀리 단백질들은 세포 과정에서 중대한 조절인자이다 (30). 친생존 단백질인 Bcl-2와 항생존 단백질인 Bax의 상대적 발현량은 Bcl-2/Bax 스위치라고 불리는데, 이것은 암세포의 운명에 영향을 미친다 (31). 악성 종양세포에서, Dox는 Bcl-2 패밀리 단백질들의 조절과 Bcl-2/Bax비 감소를 통해 세포독성을 일으키는 반면, CuB는 Bcl-2의 발현 저하를 통해 세포독성을 일으킨다 (2,21,22). 한편으로, 서바이빈은 화학치료제 저항인자로 여겨지며, Dox 내성 암세포에서 과발현된다 (3,4). 또한, 서바이빈은 췌장암과 간암 세포에서 CuB 유도 세포독성을 저해한다 (21,22). 이런 점에서 서바이빈 발현은 잘 분화된 갑상선암에서보다 미분화 갑상선암에서 더 높으며 Dox에 의해 과발현되어 갑상선암 세포에서 내성의 획득에 기여한다 (27,32). 그뿐만 아니라, 본 발명자들은 선행 연구 결과, 열충격 단백질 90 (HSP90) 저해제인 NVP-AUY922 및 17-알릴아미노-17-디메톡시젤다나마이신 (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)이 ATC 세포에서 서바이빈을 억제하여 세포독성을 유도했다고 보고한 바 있다 (28,29). 본 발명에서는 ATC 세포에서 Dox와 CuB의 상승작용에 관한 분자적 기작을 밝히기 위하여 ATC 세포에서 Bcl-2 패밀리 단백질들과 서바이빈이 Dox와 CuB 상승작용에 관여하는지를 연구하였다. Dox 단독 처리와

비교하여 Dox와 CuB 조합 처리한 세포에서는 Bcl-xL, Bax 및 Bid 단백질 수준은 변하지 않았던 반면, Bcl-2 단백질 수준과 Bcl-2/Bax 비는 감소하였다. 나아가, 서바이빈 단백질 수준이 Dox에 의해 상승했고, 이 상승은 CuB와의 조합에 의해 감소하였다는 사실은 종래 연구보고와 일맥상통한다 (27). 종합하면, 이 결과들은 ATC 세포에서 Dox와 CuB 간의 상승작용은 Bcl-2 패밀리 단백질의 조절과 서바이빈의 억제와 관련이 있음을 의미한다 (도 6). 갑상선암 세포에서 STAT3과 ERK는 생존, 성장 및 증식에 중추적인 역할을 한다 (33,34). 암세포에서 STAT3 및 ERK에 대한 CuB의 저해효과와 관련하여 STAT3에 대한 효과는 universe하고, ERK에 대한 효과는 다양하다. 본 발명에서는 암세포에서 CuB 단독 또는 화학치료제와의 조합이 JAK2/STAT3 및 ERK의 조절을 통하여 항암 활성을 발휘함 (14)을 고려할 때 ATC 세포에서 JAK2/STAT3 및 ERK와 연관되어 Dox가 CuB와 상승작용을 일으키는지를 시험하였다. Dox와 CuB는 STAT3 단백질 수준을 감소시킨 반면, 총 ERK1/2 단백질 수준의 변화 없이 인산화-ERK1/2 단백질 수준을증가시켰다. 흥미롭게도 Dox는 JAK2 단백질 수준을 증가시키는 반면, CuB는 JAK2 단백질 수준을 감소시켰다. Dox 단독 처리와 비교할 때 Dox와 CuB 공동처리는 JAK2와 STAT3 단백질 수준을 감소시키고, 인산화-ERK1/2 단백질 수준을 증가시켰다. 이 결과들은 ATC 세포에서 Dox와 CuB의 세포독성 상승작용이 JAK2/STAT3 억제 및 ERK1/2 자극과 관련이 있음을 의미한다.

[0062] 활성산소종은 매우 반응성이 높은 분자로서 암세포에서 산화 손상을 일으킬 수 있다 (6,7,19,20). 악성 종양세포에서 아르테수네이트 (artesunate)와 N,N-다이메틸피토스핑고신 (N,N-dimethylphytosphingosine)은 활성산소종 조절을 통해 세포가 Dox-유도 세포독성에 민감해지도록 하며, CuB는 활성산소종-의존적 기작으로 세포독성을 유도한다 (6,7,19,20). 이 점과 관련하여, COX2 과발현은 유방암 세포에서 유전체 불안정성, Bcl-2 발현 및 Dox에 대한 내성을 일으키는 것으로 나타났다 (35). 본 발명에서는 활성산소종 생성이 Dox에 의해 증가하는 반면, CuB에 의해서는 그렇지 않음을 밝혔다. Dox 단독 처리와 비교하여 Dox와 CuB 조합 처리한 세포에서는 활성산소종 생성과 COX2 단백질 수준이 좀 더 증가하였다. 이러한 결과들은 ATC 세포에서 Dox와 CuB 간의 상승작용이 활성산소종 및 COX2와 관련되어 있음을 의미한다. 결론적으로 본 발명의 결과들은 미분화 갑상선암 세포에서 세포독성 유도에 Dox와 CuB가 상승작용을 하며, 이 상승작용은 Bcl-2 패밀리 단백질들, 서바이빈 및 활성산소종이 매개하며 JAK2/STAT3 및 ERK1/2에 의해 조절됨을 제시한다. 이 발명은 통상적인 화학치료제에 내성이 생긴 미분화 갑상선암 환자들에게 Dox와 CuB 조합이라는 매력적인 치료 방법을 제공할 것이다.

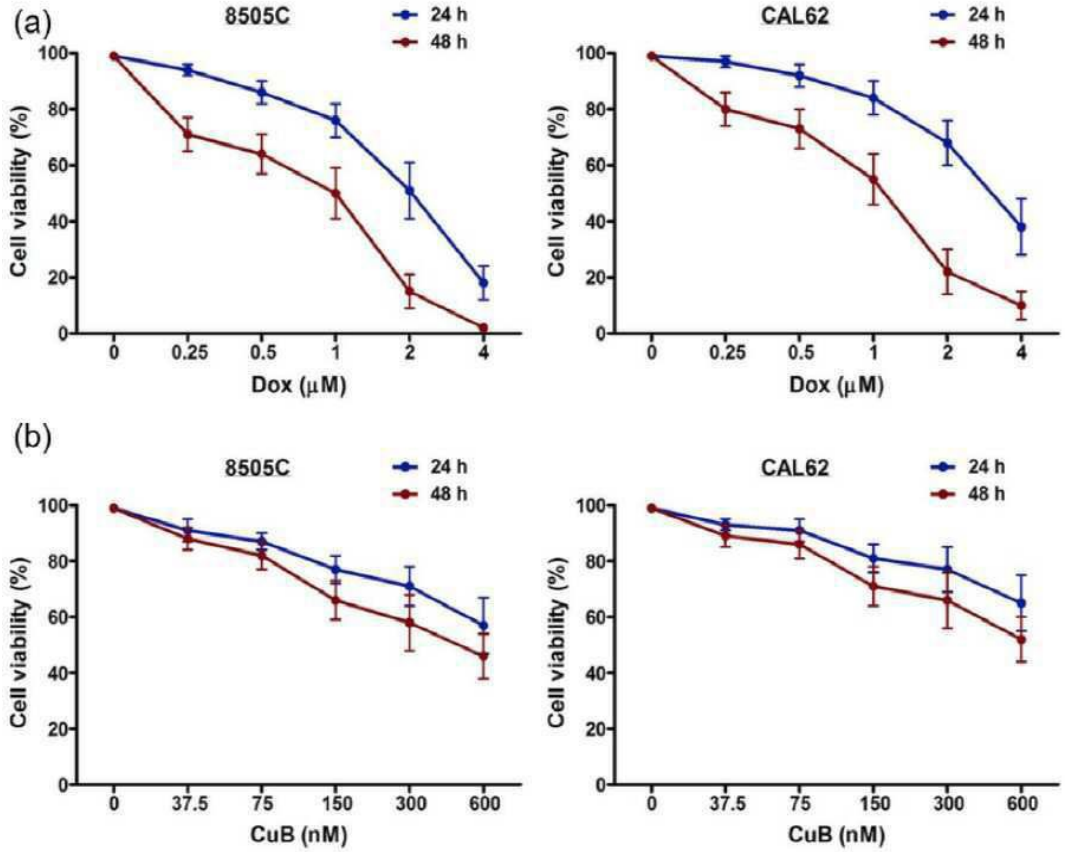
표 1

Dox (μM)	CuB (nM)	Dox + CuB	
		8505C	CAL62
0.25	37.5	0.869	0.876
0.5	75	0.940	0.904
0.75	112.5	0.891	0.874
1	150	0.752	0.834

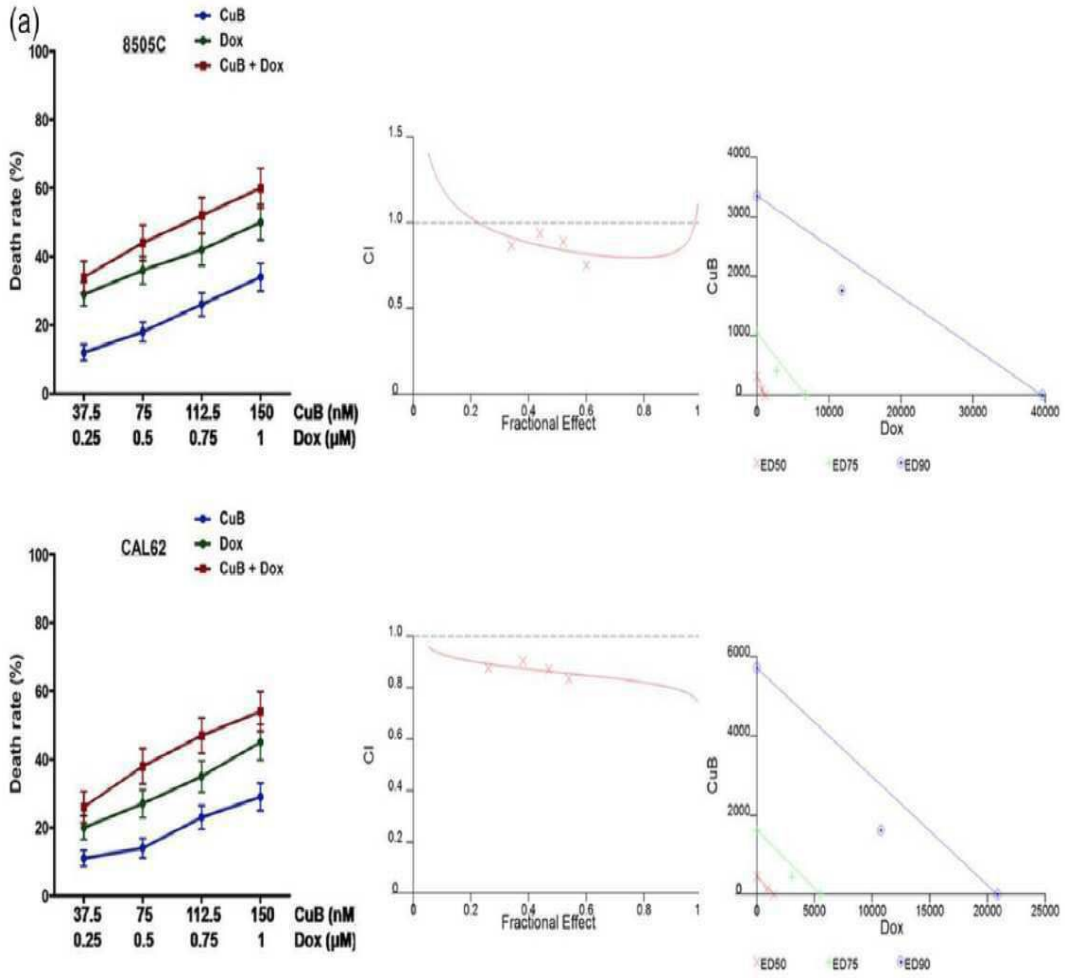
[0063]

도면

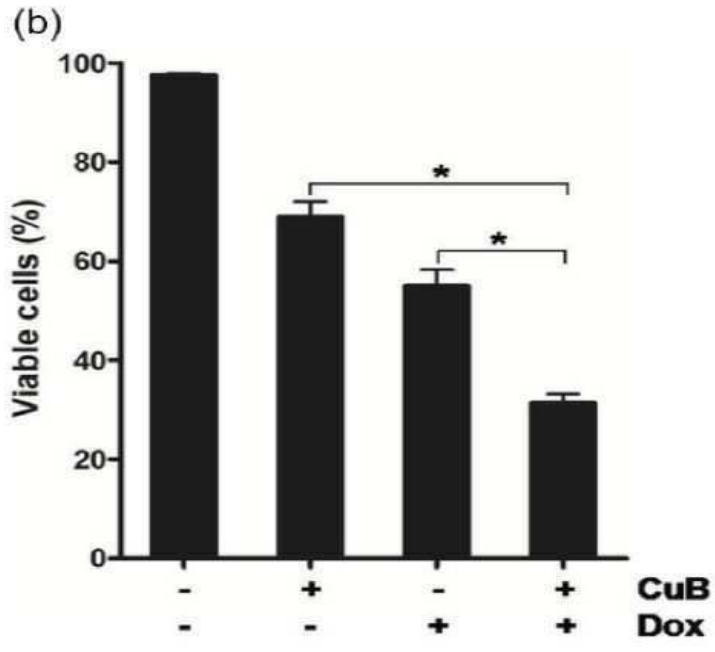
도면1


(a)
8505C
24 h
48 h
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
0
0.25
0.5
1
2
4
Dox (μM)
CAL62
24 h
48 h
Cell viability (%)
Dox (μM)
(b)
8505C
24 h
48 h
Cell viability (%)
0
37.5
75
150
300
600
CuB (nM)
CAL62
24 h
48 h
Cell viability (%)
CuB (nM)

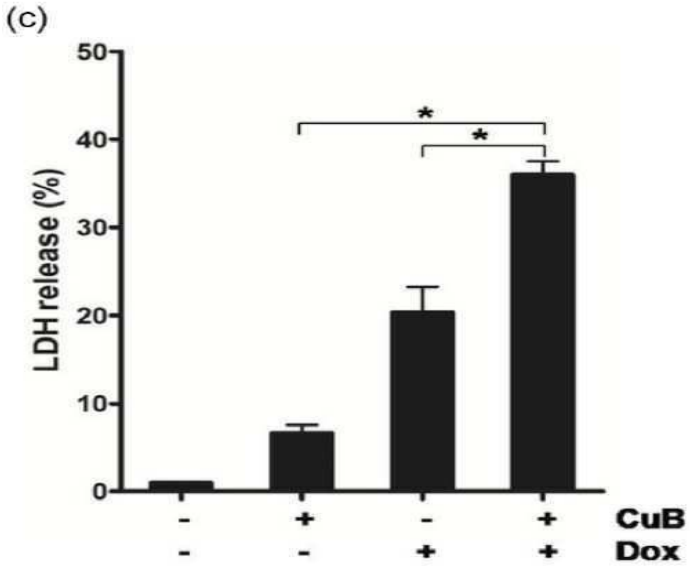
도면2a


(a)
8505C
CuB
Dox
CuB + Dox
Death rate (%)
CuB (nM)
Dox (μM)
CI
Fractional Effect
CuB
Dox
ED50
ED75
ED90
CAL62
CuB
Dox
CuB + Dox
Death rate (%)
CuB (nM
Dox (μM)
CI
Fractional Effect
CuB
Dox
ED50
ED75
ED90

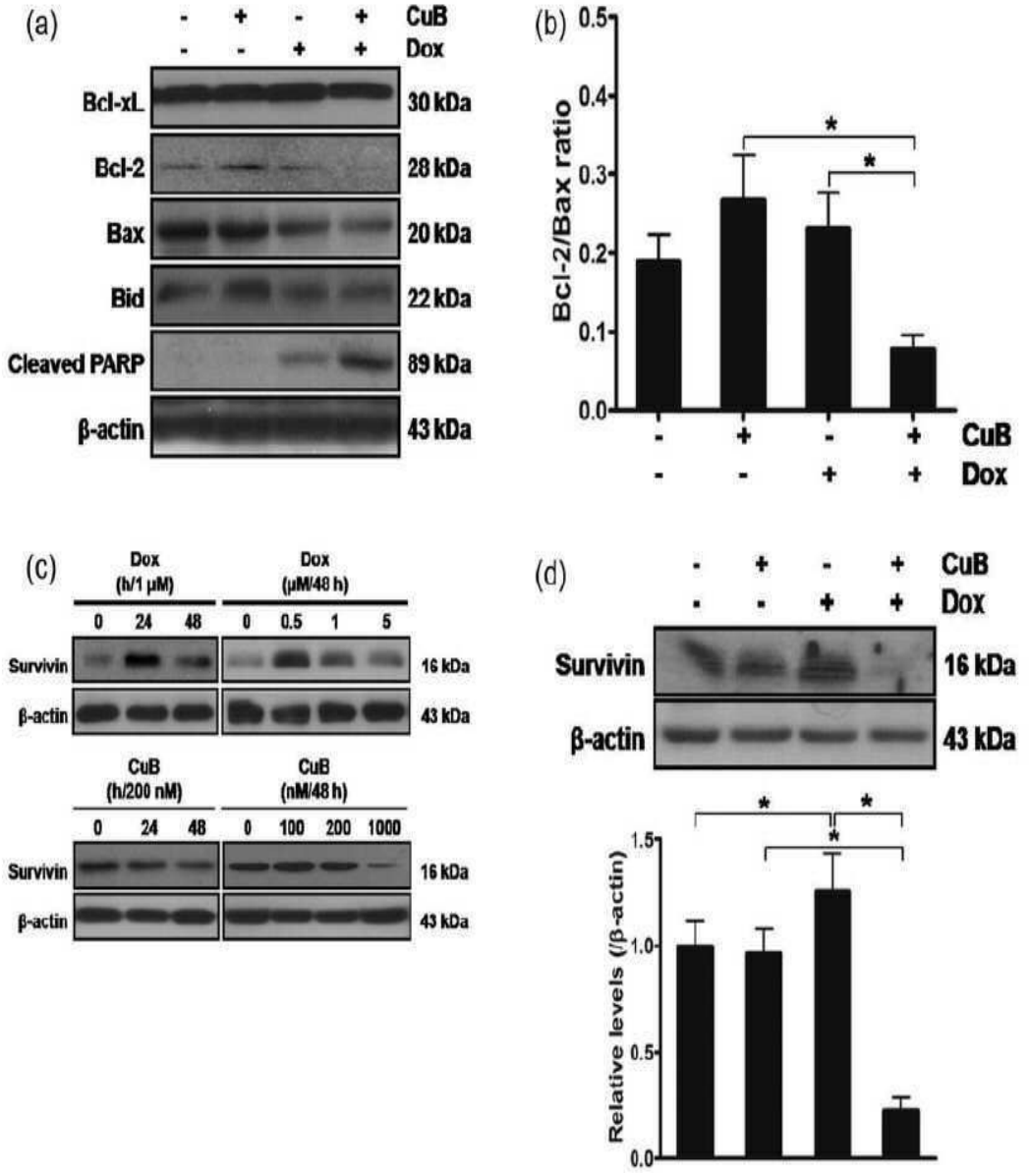
도면2b


(b)
Viable cells (%)
CuB
Dox

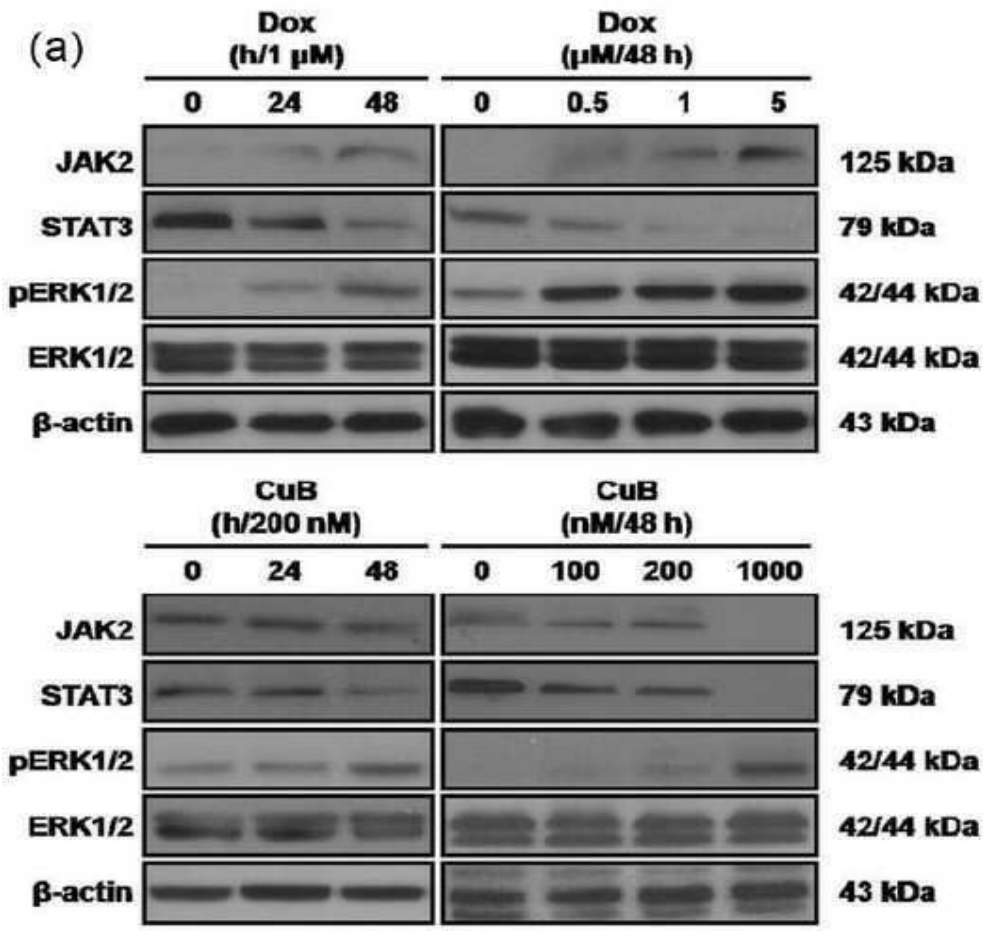
도면2c



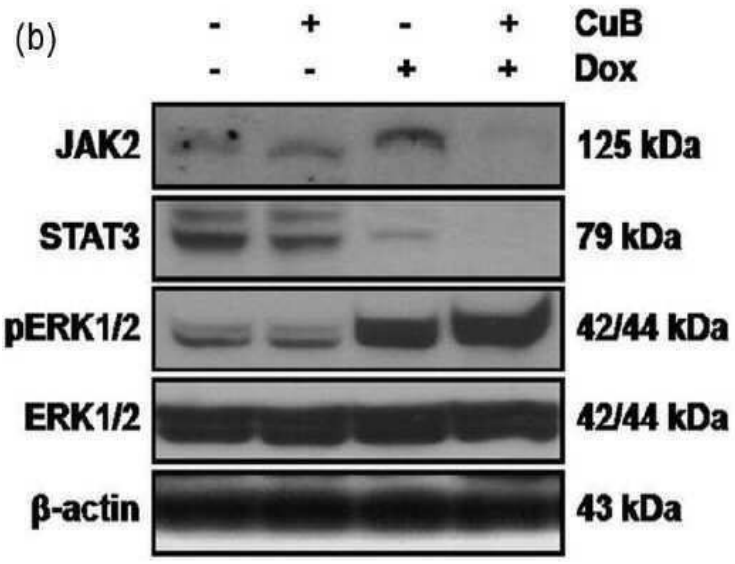
도면3


(a)
CuB
Dox
Bcl-xL
Bcl-2
Bax
Bid
Cleaved PARP
β-actin
30 kDa
28 kDa
20 kDa
22 kDa
89 kDa
43 kDa
(b)
Bcl-2/Bax ratio
CuB
Dox
(c)
Dox (h/1 μM)
Dox (μM/48 h)
CuB (h/200 nM)
CuB (nM/48 h)
Survivin
β-actin
16 kDa
43 kDa
(d)
Relative levels (/β-actin)

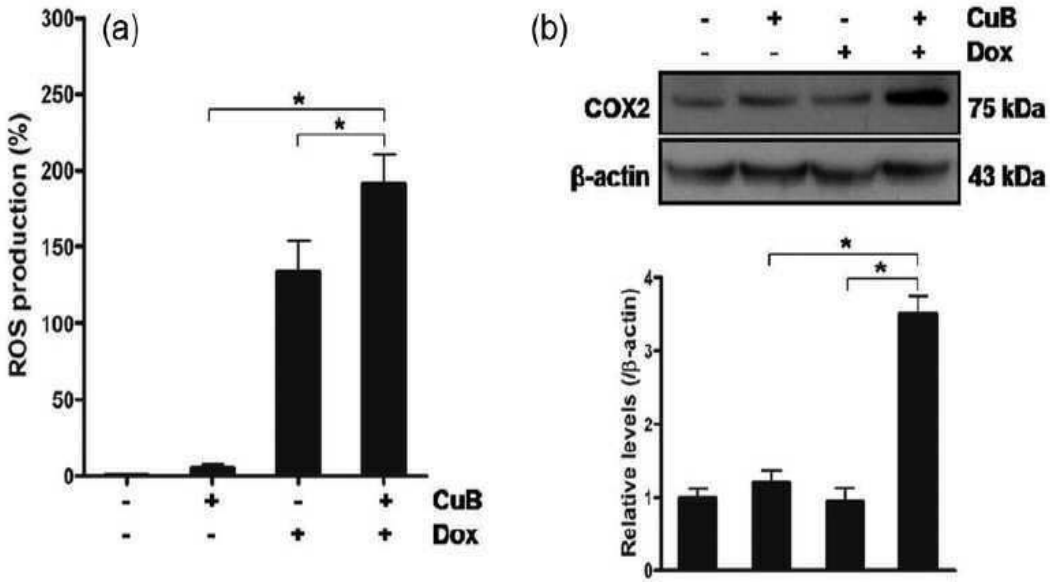
도면4a


(a)
Dox
(h/1 μM)
0
24
48
Dox
(μM/48 h)
0
0.5
1
5
JAK2
STAT3
pERK1/2
ERK1/2
β-actin
125 kDa
79 kDa
42/44 kDa
42/44 kDa
43 kDa
CuB
(h/200 nM)
0
24
48
CuB
(nM/48 h)
0
100
200
1000
JAK2
STAT3
pERK1/2
ERK1/2
β-actin
125 kDa
79 kDa
42/44 kDa
42/44 kDa
43 kDa

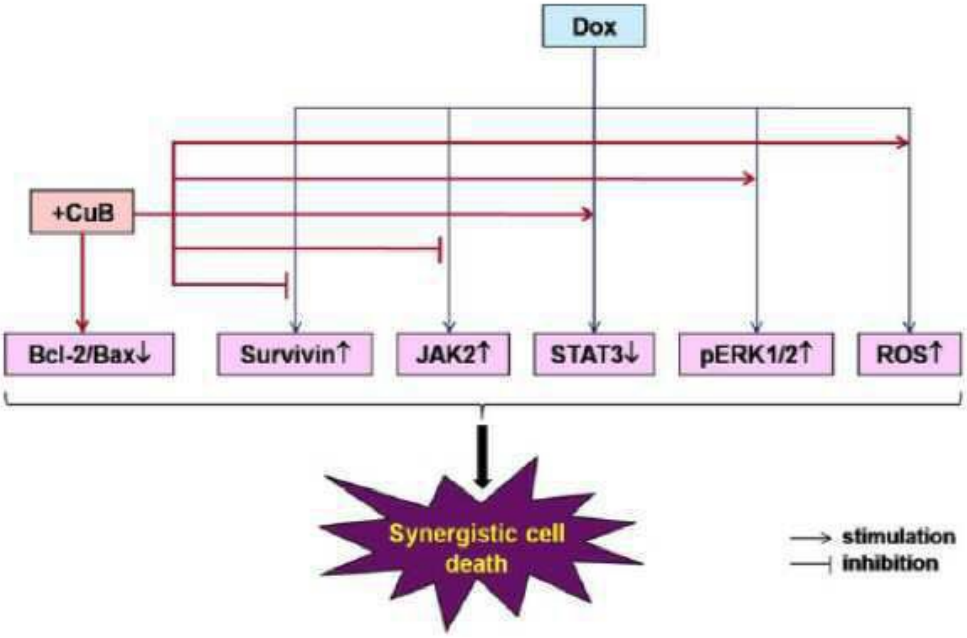
도면4b


(b)
- + - + CuB
- - + + Dox
JAK2
STAT3
pERK1/2
ERK1/2
β-actin
125 kDa
79 kDa
42/44 kDa
42/44 kDa
43 kDa

도면5


(a)
ROS production (%)
300
250
200
150
100
50
0
*
*
- + - + CuB
- - + + Dox
(b)
- + - + CuB
- - + + Dox
COX2
75 kDa
β-actin
43 kDa
Relative levels (/β-actin)
4
3
2
1
0
*
*

도면6


Dox
+CuB
Bcl-2/Bax↓
Survivin↑
JAK2↑
STAT3↓
pERK1/2↑
ROS↑
Synergistic cell death
stimulation
inhibition