



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0111077
(43) 공개일자 2018년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/616 (2006.01) A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/616 (2013.01)
A61K 31/282 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0041490

(22) 출원일자 2017년03월31일

심사청구일자 2018년03월09일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

노중렬

서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 1204호 (대치동, 미도맨션)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

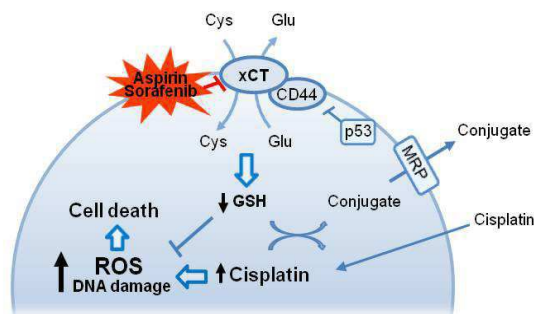
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 포함하는 항암제 내성 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 포함하는 항암제 내성 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 유효성분으로 포함하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 아스피린 및 다중 키나아제 억제제의 저용량 병용투여 방법은 플라티늄 계열 항암제 내성이 생긴 환자에게 있어서 부작용 없이 플라티늄 계열 항암제 내성을 극복하고, 플라티늄 계열 항암제의 세포 독성을 현저히 증진시킴으로써 플라티늄 계열 항암제 내성암을 효과적으로 치료하는데 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/44 (2013.01)

A61K 31/506 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A15054540

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 Cisplatin 저항성과 정상조직 독성 극복을 위한 병용 치료제 발굴과 전임상

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

아스피린(aspirin) 및 다중 키나아제 억제제(multikinase inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다중 키나아제 억제제는 소라페닙(sorafenib), 트라메티닙(trametinib), 다브라페닙(dabrafenib), 크리조티닙(crizotinib), 수니티닙(sunitinib), 베무라페닙(vemurafenib), 팔보시클립(palbociclib), 액시티닙(axitinib), 이부르티닙(ibrutinib), 룩소리티닙(ruxolitinib), 포나티닙(ponatinib), 레고라페닙(regorafenib), 알렉티닙(alectinib), 카보잔티닙(cabozantinib), 반데타닙(vandetanib), 코비메티닙(cobimetinib), 아파티닙(afatinib), 렌바티닙(lenvatinib), 닌테다닙(nintedanib), 이델라리십(idelalisib), 세리티닙(ceritinib), 다사티닙(dasatinib) 및 파조파닙(pazopanib)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 다중 키나아제 억제제는 소라페닙(sorafenib)인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아스피린은 1 μM ~ 10 mM 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다중 키나아제 억제제는 0.001 ~ 10 μM 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin)인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시스플라틴 내성암은 두경부암, 폐암, 난소암, 유방암, 방광암, 자궁경부암, 식도암, 종피종 및 신경아세포종으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유효성분은 플라티늄 계열 항암제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

아스피린(aspirin) 및 다중 키나아제 억제제(multikinase inhibitor)를 유효성분으로 포함하며, 플라티늄 계열 항암제 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 다중 키나아제 억제제는 소라페닙(sorafenib), 트라메티닙(trametinib), 다브라페닙(dabrafenib), 크리조티닙(crizotinib), 수니티닙(sunitinib), 베무라페닙(vemurafenib), 팔보시클립(palbociclib), 액시티닙(axitinib), 이부르티닙(ibrutinib), 룩소리티닙(ruxolitinib), 포나티닙(ponatinib), 레고라페닙(regorafenib), 알렉티닙(alectinib), 카보잔티닙(cabozantinib), 반데타닙(vandetanib), 코비메티닙(cobimetinib), 아파티닙(afatinib), 렌바티닙(lenvatinib), 닌테다닙(nintedanib), 이델라리스ib(idelalisib), 세리티닙(ceritinib), 다사티닙(dasatinib) 및 파조파닙(pazopanib)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 다중 키나아제 억제제는 소라페닙(sorafenib)인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 아스피린은 1 μ M ~ 10 mM 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 다중 키나아제 억제제는 0.01 ~ 10 μ M 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin)인 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 포함하는 항암제 내성 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 유효성분으로 포함하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아스피린(aspirin; acetylsalicylic acid)은 비스테로이드성 항염증 약물로서 염증 및 고통을 완화하기 위해 사용된다. 아스피린이 암 발생률, 사망률 및 암 전이 위험도를 감소시킨다는 보고가 점점 증가하고 있으며, 아스피린은 NF- κ B 및 Mcl-1(myeloid cell leukemia 1) 단백질을 억제함으로써 암 세포의 성장 및 전이를 저해한다.

[0004] 한편, 소라페닙(Sorafenib)은 신장암과 간암 치료제로 미국 FDA의 승인을 받은 항암제로서, VEGFR, PDGFR 및 Raf와 같은 키나아제 단백질의 활성을 막는 다중 키나아제 억제제(multiple kinase inhibitor)이다. 소라페닙

의 주요 표적은 Raf-1이며, Ras/Raf/MEK/ERK 신호 과정(signaling cascade)도 함께 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, 소라페닙은 EFG1,2,3, PDGFR, FGFR 등의 수용체 티로신 키나아제(receptor tyrosine kinase)도 표적으로 하여 암세포의 증식을 억제한다고 보고되어 있으나, 그 반응률이 2 ~ 3%로 매우 낮고 환자에게 장기 투여할 경우, 약물 저항성 및 내성 등이 발생할 수 있다는 문제점이 있다.

[0005] 아스피린과 소라페닙을 조합하여 사용한 경우, FLIP(FLICE (caspase-8) inhibitory protein) 및 Mcl-1를 타겟팅함으로써 TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 내성 결장암 세포에서 TRAIL-유도 세포사멸에 대한 민감도를 향상시킬 수 있다는 보고가 있다(B. Pennarun, J.H. Kleibeuker, W. Boersma-van Ek, F.A. Kruij, H. Hollema, E.G. de Vries, S. de Jong, J. Pathol. 229 (2013) 410-421). TRAIL 내성은 주로 세포 사멸 수용체(death receptor, DR)의 변형에 의해 발생하며, 유전자 독성 약물(genotoxic drugs)에 의해 내성을 극복할 수 있다고 알려져 있다. 그러나 시스플라틴 내성은 TRAIL 내성과 전혀 다른 경로로 발생하고, DR5의 상승 조절(upregulation) 등에 의해 시스플라틴 내성을 극복할 수 있다고 알려져 있어, TRAIL 내성과 그 발생 기전 및 극복 방법이 전혀 상이하다.

[0006] 또 다른 선행문헌에 따르면, 아스피린의 니트로 유도체를 이용하여 시스플라틴 저항성 난소암 세포(HOCCs)의 글루타티온 수준을 감소시킴으로써 치료하는 방법이 개시되어 있다(Proc Natl Acad Sci USA. 103:3914-3919. 2006). 이 문헌에서는 아스피린만을 사용하였을 때 내성 극복 효과가 나타나지 않는 문제점이 있다고 개시되어 있으며, 이를 해결하기 위해 아스피린의 니트로 유도체를 사용하였다.

[0007] 아스피린 또는 소라페닙을 고농도로 투여하는 경우 심각한 부작용이 발생할 수 있으며, 지금까지 저농도의 아스피린과 소라페닙을 병용 투여함으로써 시스플라틴 내성암을 치료하는 방법에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 시스플라틴 저항성 암 세포주에서 부작용 없이 시스플라틴 내성을 극복하고 그 치료 효과를 증진시키는 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 저용량의 아스피린과 소라페닙을 병용 투여했을 때 시스플라틴 내성 세포에서 시스플라틴 세포독성을 향상시킨다는 것을 세포주(in vitro) 및 동물모델(in vivo) 실험에서 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 아스피린(aspirin) 및 다중 키나아제 억제제(multikinase inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 유효성분으로 포함하며, 플라티늄 계열 항암제의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 아스피린(aspirin) 및 다중 키나아제 억제제(multikinase inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 플라티늄 계열 항암제 내성암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어, "다중 키나아제 억제제"는 암 발생에 관여하는 둘 이상의 신호전달 경로를 동시에 억제함으로써 예방 및 치료하는 저분자 물질을 의미하는 것으로서, 보다 구체적으로 소라페닙(sorafenib), 트라메티닙(trametinib), 다브라페닙(dabrafenib), 크리조티닙(crizotinib), 수니티닙(sunitinib), 베무라페닙(vemurafenib), 팔보시클립(palbociclib), 엑시티닙(axitinib), 이부르티닙(ibrutinib), 룩소리티닙(ruxolitinib), 포나티닙(ponatinib), 레고라페닙(regorafenib), 알렉티닙(alectinib), 카보잔티닙(cabozantinib), 반데타닙(vandetanib), 코비메티닙(cobimetinib), 아파티닙(afatinib), 렌바티닙(lenvatinib), 닌테다닙(nintedanib), 이델라리십(idelalisib), 세리티닙(ceritinib), 다사티닙(dasatinib) 및 파조파닙(pazopanib)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게 본 발명의 다중 키나아제 억제제는 소라페닙일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 대개 암은 하나 이상의 신호 전달 경로에 의해 발생하므로 다중 표

적 키나아제 억제제를 통해 다양한 표적을 동시에 억제하는 것이 임상적으로 효과적일 수 있고, 단일 표적 항암제에 비해 약제 내성이 적을 수 있으나, 다양한 경로를 차단하므로 선택성이 떨어질 수 있다는 단점이 있다.

- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어, "플라티늄 계열 항암제 내성암"은 플라티늄 계열 항암제 투여에 의한 항암 치료에서 암의 예방, 개선 또는 치료가 효과적으로 이루어지지 않는 암을 의미하는 것으로서, 보다 구체적으로, 암 세포의 항암제에 대한 민감성이 낮아져서 항암제로 인해 유도되는 세포 사멸, 세포 독성 기작이 효과적으로 이루어지지 않는 모든 종류의 암뿐만 아니라, 초기에는 항암제 투여에 따른 항암 효과가 나타났으나, 반복적인 항암제 투여에 의해 점차 항암제에 대한 항암 효과가 감소되거나 효과가 사라진 암을 모두 포함한다.
- [0016] 본 발명에서 상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 바람직하게 본 발명의 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴일 수 있으며, 시스플라틴 내성암은 두경부암, 폐암, 난소암, 유방암, 방광암, 자궁경부암, 식도암, 종피종, 신경아세포종 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0019] 본 발명의 상기 약학적 조성물을 시스플라틴 내성암 세포에 처리한 경우 암 세포의 xCT 억제를 통하여 세포 사멸을 촉진한다. xCT 단백질을 억제함으로써 시스틴(cystine)의 세포 내 유입을 감소시키며, 세포 GSH 합성을 감소시키고, 이는 암 세포에 투여되는 시스플라틴의 민감성을 향상시키는데 중요한 역할을 한다. 시스플라틴의 민감성이 향상된 암 세포에 시스플라틴을 처리하는 경우 종래 시스플라틴에 저항성을 나타내었던 암을 효과적으로 예방, 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물이 시스플라틴 내성암의 치료 효과를 일으키는 메커니즘을 도 1에 간략히 나타내었다.
- [0020] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 아스피린 및 소라페닙을 조합하여 시스플라틴 내성암 세포주에 함께 투여하였을 때 세포 사멸이 증진되고, 암 세포 성장을 억제하며, 세포 GSH가 감소하고, ROS를 증가시킴으로써 암 치료 및 예방 효과를 나타내며, 특히 시스플라틴의 치료 효과를 극대화시킬 수 있다는 점을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 종래 치료 방법에서 아스피린 또는 다중 키나아제 억제제의 고용량 투여로 인한 심각한 부작용을 해결하고자 하는 것으로서, 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 저용량으로 조합하여 병용하는 데 특징이 있다. 아스피린은 10 mM 이하, 다중 키나아제 억제제는 10 μ M 이하로 포함되는 것이 좋고, 바람직하게 아스피린은 5 mM 이하, 다중 키나아제 억제제는 5 μ M 이하로 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 제한적인 농도 범위는 아스피린은 0.1 μ M ~ 10 mM, 다중 키나아제 억제제는 0.001 μ M ~ 10 μ M로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 농도 범위보다 적게 포함되는 경우 본 발명에서 원하는 적절한 치료 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 상기 농도 범위를 초과하는 경우 고농도 투여로 인한 부작용이 발생할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은, 플라티늄 계열 항암제를 더 포함할 수 있으며, 플라티늄 계열 항암제의 약학적 효과를 증진시킬 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한 아스피린 및 다중 키나아제 억제제를 유효성분으로 포함하며, 플라티늄 계열 항암제의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 플라티늄 계열 항암제의 항암 효과 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 "약학적으로 허용 가능"하다는 것은, 이를 투여 시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트

린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 향산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제 들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다. 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0030] 본 발명의 상기 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다.

[0031] 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0032] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.

[0033] 본 발명의 상기 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수용용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0034] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0036] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 보다 바람직한 효과를 위한 투여량은, 바람직하게는 1일 0.1 mg/kg 내지 1,000 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수 회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[0039] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 아니한다.

[0040] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 바람직하게는 피하 주사 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 아스피린 및 다중 키나아제 억제제의 저용량 병용투여 방법은 플라티늄 계열 항암제 내성이 생긴 환자에게 있어서 부작용 없이 플라티늄 계열 항암제 내성을 극복하고, 플라티늄 계열 항암제의 세포 독성을 현저히 증진시킴으로써 플라티늄 계열 항암제 내성암을 효과적으로 치료하는데 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 아스피린 및 소라페닙의 병용투여로 인한 시스플라틴 유도 세포 독성 항상 메커니즘을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에서 HNC 세포주에 아스피린(A)과 소라페닙(B)을 단독 처리한 후 세포 생존도를 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 HNC 세포주를 아스피린 (A), 소라페닙 (1 μ M-S1, 2 μ M-S2), 또는 이들의 조합(A+S1, A+S2)에 노출시켰을 때 세포 생존도를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 시스플라틴 저항성 HNC 세포주에 아스피린(0, 5, 10 μ M)을 24시간 동안 처리한 후 cPARP, p65, Mcl-1, 및 xCT의 단백질 발현, xCT의 mRNA 농도 및 글루타메이트 방출량을 웨스턴 블롯으로 측정된 결과이다(* $P < 0.05$ relative to control or treated groups; ** $P < 0.001$ relative to the control).

도 5는 본 발명의 일실시예에서 시스플라틴 저항성 HNC 세포주에 아스피린(A5), 소라페닙(S5) 또는 이들의 조합을 6, 24, 48시간 동안 노출시킨 후 cPARP, p65, Mcl-1, 및 xCT의 단백질 발현, xCT의 mRNA 농도 및 글루타메이트 방출량을 웨스턴 블롯으로 측정된 결과이다(* $P < 0.05$ relative to control or treated groups; ** $P < 0.001$ relative to the control).

도 6은 본 발명의 일실시예에서 아스피린과 소라페닙의 병용 투여가 세포 성장 저해, GSH 감소 및 ROS 축적을 유도한다는 것을 확인한 결과이다(* $P < 0.05$ relative to control; ** $P < 0.01$ relative to control; *** $P < 0.05$ in the comparison between samples treated with and without trolox).

도 7은 본 발명의 일실시예에서 xCT의 억제제가 아스피린과 소라페닙의 조합에 의한 효과를 증진시킨다는 것을 확인한 결과이다(* $P < 0.05$ relative to control; ** $P < 0.01$ relative to control; *** $P < 0.05$ compared between sicontrol and siSLC7A11 or samples treated with and without trolox (D); * $P < 0.05$ compared between A2+S2 with vector(vtr) and xCT transfection).

도 8은 본 발명의 일실시예에서 아스피린 및 소라페닙의 조합이 내성 HNC 세포주의 시스플라틴-유도 세포독성을 향상시킨다는 것을 확인한 결과이다(* CIs < 1 (A); * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ relative to no cisplatin-treated control (C-E)).

도 9는 본 발명의 일실시예에서 각각의 약물을 투여한 마우스의 이식된 종양의 부피(A) 및 무게(B) 변화를 확인한 결과이다(* $P < 0.05$ compared between two groups; ** $P < 0.01$ relative to control or compared with two groups).

도 10은 본 발명의 일실시예에서 각각의 약물을 투여한 마우스의 세포 GSH 농도(A)와 γ H2AX 형성(B, 빨간색) 및 세포사멸체(C, 초록색)의 면역형광염색 결과를 나타낸 것이다(* $P < 0.05$ compared between two groups; ** $P < 0.01$ relative to control or compared with two groups).

도 11은 본 발명의 일실시예에서 아스피린과 소라페닙의 농도별 투여에 따른 폐암 세포(A, LK2; B, Calu-1) 및 난소암 세포(C, OVCAR3; D, SKOV3)의 세포의 생존도를 측정된 결과이다.

도 12는 본 발명의 일실시예에서 아스피린과 소라페닙을 병용투여 했을 때 폐암 세포(A, LK2; B, Calu-1) 및 난소암 세포(C, OVCAR3; D, SKOV3)에서 시스플라틴-유도 세포독성의 변화를 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의

지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] <실험 방법>

[0049] 1. 세포주

[0051] 본 발명의 일실시예에 사용한 HNC 세포주(HN2-10) 및 SNU 세포주는 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였으며, EMEM(Eagle's medium essential medium) 또는 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640)(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) 배지를 사용하여, 37℃, 10% FBS, 5% CO₂를 포함하는 습한 조건에서 배양하였다. 3 종류의 시스플라틴 내성 두경부암 세포주(HN3R, HN4R 및 HN9R 세포)는 각각 HN3, HN4 및 HN9 모세포로부터 개발된 것으로, 종래 알려진 방법에 따라 모세포를 시스플라틴에 농도를 높여 가며 지속적으로 노출시킴으로써 만들었다. 두경부암 모세포주와 시스플라틴 내성 세포주 각각의 시스플라틴(Sigma-Aldrich, St.Louise, MO) 억제 중간값(IC₅₀)은 세포 생존도 분석(cell viability assays)을 사용하여 측정하였으며, 모세포주는 2.2 ~ 3.5 μM, 저항성 세포주는 25.5 ~ 38.9 μM로 나타났다.

[0053] 2. 세포 생존도 분석(cell viability assays)

[0055] 본 명세서의 실시예에서 세포 생존도 분석은 각각의 세포를 아스피린, 소라페닙, 시스플라틴(Sigma-Aldrich) 또는 이들의 조합 약물에 노출시킨 후 MTT 분석법, 트리판 블루 배제법(trypsin blue exclusion) 및 클론원성 분석법(clonogenic assay)을 이용하여 측정하였다.

[0056] MTT 분석은 용해 버퍼로 2시간 동안 처리하고, 테트라졸리움 화합물(tetrazolium compound; MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich)을 4시간 동안 처리한 후 SpectraMax M2 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 트리판 블루 배제법은 0.4% 트리판 블루로 염색한 후 혈구측정계(hemocytometer)로 세포 생존도를 측정하였다. 클론원성 분석법은 0.5% 크리스탈 바이올렛 용액(crystal violet solution)을 사용하였으며, 14일 동안 배양한 후에 콜로니(> 50 cells) 개수를 측정하였다. 세포 사멸 분석(Cell death assays)은 아넥신 V(annexin V) 및 요오드화프로피디움(propidium iodide, PI; Sigma-Aldrich)으로 염색한 후 유동세포계수법(flow cytometry) 및 Cell Quest Pro software(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 아넥신 V 또는 PI-양성 세포를 계수하였다. 상기 모든 분석은 3가지 샘플군에 대하여 3번씩 수행하였다.

[0057] 저농도/고농도의 아스피린 및 소라페닙(각각의 컷오프 농도 5 mM, 5 μM)은 종래 문헌을 참조하였다(B. Pennarun, J.H. Kleibeuker, W. Boersma-van Ek, F.A. Kruij, H. Hollema, E.G. de Vries, S. de Jong, Targeting FLIP and Mcl-1 using a combination of aspirin and sorafenib sensitizes colon cancer cells to TRAIL, J. Pathol. 229 (2013) 410-421.). 약물 상호작용의 조합 지수(combination index, CI)는 Chou-Talalay 방법을 사용하여 계산하였으며, 이에 따르면 CI < 1일 때 시너지 관계가 있다고 정의한다(ComboSyn, Inc., Paramus, NJ).

[0059] 3. 글루타티온 합성, ROS 생산 및 글루타메이트 방출 측정

[0061] 비색측정 키트(colorimetric detection kit, BioVision Inc., Milpitas, CA)를 이용하여 서로 다른 약물에 24 시간 동안 노출시킨 두경부암 세포의 용출물(lysate)에서 세포 글루타티온(glutathione, GSH) 농도를 측정하였다. 상기 용출물에서 세포 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 측정하기 위하여 DCFDA(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) (cytosolic ROS; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)를 사용하였다. ROS 농도는 CellQuest Pro (BD Biosciences)에 FACS Calibur 유동 세포계수법을 이용하여 분석하였고, 글루타메이트 방출량은 글루타메이트 비색측정 키트(glutamate colorimetric assay kit, BioVision Inc)를 이용하여 측정

하였다.

4. 면역블롯팅(Immunoblotting)

세포 밀집도(confluence)가 70%가 될 때까지 배양한 세포를 약물 또는 조정 배지로 처리하였다. 이 세포를 방사선 면역 촉진 분석(radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 용출 버퍼(Thermo Fisher Scientific)로 4℃에서 용출시켰다. SDS-PAGE로 분해된 총 단백질은 50 µg이었고, 1차 또는 2차 항체로 처리하기 전에 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 또는 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(polyvinylidene difluoride membranes)으로 이동시켰다. 1차 항체는 다음의 항원에 대한 항체를 사용하였다: cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(cPARP), phospho-p53-Ser15 및 Mcl-1(이상 Cell Signaling Technology, Danvers, MA), p65 및 xCT(이상 Abcam, Cambridge, UK). 대조군으로 β-액틴(Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 모든 항체는 1 : 500 내지 1 : 5000으로 희석하여 사용하였다.

실시예 1. 아스피린 및 소라페닙 병용 투여 시 HNC 세포 사멸 효과 향상

아스피린과 소라페닙 단독 투여 시 세포 사멸을 측정하기 위하여, 다양한 HNC 세포주를 서로 다른 농도의 아스피린(1 ~ 40 mM) 또는 소라페닙(1 ~ 15 µM)에 72시간 동안 노출시킨 후 세포 생존도(cell viability)를 확인하였다. 그 결과, 아스피린과 소라페닙을 각각 단독으로 처리하였을 때 시스플라틴 민감성 HNC 세포 및 시스플라틴 내성 HNC 세포 모두 농도 의존적으로 생존도가 감소하였으며, 아스피린은 10 mM 이하에서 소라페닙은 10 µM 이하에서 대부분의 세포가 사멸되는 것을 확인할 수 있었다(도 2A 및 2B).

아스피린과 소라페닙을 동시에 투여했을 때 세포 사멸 효과의 변화를 확인하기 위하여, 아스피린, 소라페닙 (1 µM-S1, 2 µM-S2), 또는 이들의 조합(A+S1, A+S2)에 시스플라틴 민감성 세포(HN3, HN4, HN9) 또는 시스플라틴 저항성 세포 (HN3R, HN4R, HN9R)를 노출시켰을 때 세포 생존도를 측정하였다. 그 결과, 아스피린과 소라페닙의 저용량 병용투여 시(아스피린 1 ~ 3 mM 및 소라페닙 1 ~ 3 µM) 시스플라틴 민감성 세포인 HN3, HN4 및 HN9 뿐만 아니라 시스플라틴 내성 세포인 HN3R, HN4R 및 HN9R에서도 세포 사멸을 유도하는 데 시너지 효과가 있다는 점을 확인할 수 있었다(도 3A ~ 3B에서 CIs <1.0). 아스피린과 소라페닙 병용투여의 시너지 효과는 10개 이상의 다른 HNC 세포주에서도 확인할 수 있었다.

실시예 2. 고농도의 아스피린 및 소라페닙 병용 투여 시 xCT 저해, GSH 감소 및 ROS 축적 효과 증가

고농도의 아스피린이 시스플라틴 저항성 HNC 세포주에 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 시스플라틴 저항성 HNC 세포주(HN3R, HN4R, HN9R)에 아스피린을 농도별(0, 5, 10 mM)로 24시간 동안 처리한 후 cPARP, p65, Mcl-1, 및 xCT의 단백질 발현, xCT의 mRNA 농도 및 글루타메이트 방출량을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 그 결과 고농도의 아스피린(5 ~ 10 mM)을 처리하였을 때 농도 의존적으로 cPARP의 활성을 유도하고, p65, Mcl-1 및 xCT 단백질의 발현 억제를 유도하는 것을 확인할 수 있었다(도 4A). 또한 고농도의 아스피린은 시스플라틴 저항성 세포주 HN3R 및 HN9R에서 xCT 유전자의 발현과 글루타메이트 방출을 억제한다는 점을 확인할 수 있었다(도 4B 및 4C).

아울러, 고농도의 아스피린과 소라페닙을 병용 투여하였을 때 시스플라틴 저항성 HNC 세포주에 미치는 시너지 효과를 확인하기 위해 시스플라틴 저항성 HNC 세포주(HN3R, HN4R)를 아스피린 5 mM(A5), 소라페닙 5 µM(S5) 또는 이들의 조합(A5+S5)에 6, 24, 48시간 동안 노출시킨 후 cPARP, p65, Mcl-1 및 xCT의 단백질 발현, xCT의 mRNA 농도 및 글루타메이트 방출량을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 그 결과, 아스피린, 소라페닙 또는 이들의 조합물질 처리 후 6시간이 지난 후에 cPARP 단백질 농도가 증가되고, p65, Mcl-1 및 xCT 단백질 농도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 5A). 아스피린(5 mM) 또는 소라페닙(5 µM) 모두 시스플라틴 저항성 HNC 세포주에서 xCT mRNA 농도 및 글루타메이트 방출량을 감소시켰으며, 그 효과는 아스피린을 단독으로 처리했을 때보다 소라페닙을 단독 처리했을 때 더 컸고(P < 0.05), 두 약물을 병용 처리했을 때 현저한 상승 효과가 나타났다(P <

0.01; 도 5B 및 5C).

[0077] 실시예 3. 저농도의 아스피린 및 소라페닙 병용 투여 시 세포 성장 저해, GSH 감소 및 ROS 축적 효과 증가

[0079] 시스플라틴 저항성 HNC 세포주에 저농도의 아스피린 및 시스플라틴을 처리했을 때 세포 성장 등에 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 시스플라틴 저항성 HNC 세포주(HN3R, HN4R, HN9R)에 아스피린(2 mM), 소라페닙(2 μ M), 아스피린 및 소라페닙의 조합 또는 아스피린, 소라페닙 및 트롤록스(0.5 mM)의 조합물질을 처리했을 때 세포 수와 콜로니 형성의 변화를 측정하였다. 그 결과, 저농도의 아스피린(2 mM) 또는 소라페닙(2 μ M)을 단독으로 처리했을 때는 세포 성장 또는 콜로니 형성을 유의한 수준으로 저해시키지 못한 반면($P > 0.2$), 저농도의 아스피린과 소라페닙을 함께 처리한 경우 시스플라틴 내성 세포에서 세포 성장 및 콜로니 형성을 유의한 수준으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$) (도 6A 및 6B).

[0080] 아울러, 고농도의 아스피린 및 시스플라틴을 처리했을 때 세포 성장 등에 미치는 영향을 확인하기 위해 시스플라틴 저항성 HNC 세포주(HN3R, HN4R)에 아스피린(5 mM), 소라페닙(5 μ M), 아스피린 및 소라페닙의 조합 또는 아스피린, 소라페닙 및 트롤록스(0.5 mM)의 조합물질을 처리했을 때 세포 GSH와 ROS 농도의 변화를 측정하였다. 그 결과, 고농도의 소라페닙을 단독으로 처리한 경우 세포 GSH 감소 및 총 ROS 축적을 유의한 수준으로 유도한 반면($P < 0.05$), 고농도의 아스피린을 단독으로 처리한 경우에는 유의한 효과가 나타나지 않았다. 그러나 아스피린과 소라페닙을 병용 투여한 경우 시스플라틴 저항성 HNC 세포에서 세포 GSH 농도 감소 및 총 ROS 농도 증가 효과가 현저하게 상승하는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.01$) (도 6C 및 6D).

[0081] 한편 항산화제인 트롤록스(trolox, 0.5 mM)를 함께 처리한 경우 상기 아스피린과 소라페닙의 병용 투여에 의한 시너지 효과가 차단되는 것을 알 수 있었다.

[0083] 실시예 4. xCT 발현 억제를 통한 아스피린 및 소라페닙의 병용 투여 효과 향상

[0085] xCT 단백질 발현을 억제하기 위해 시스플라틴 내성이 있는 HN3-cisR 및 HN9-cisR 세포를 이용하였으며, xCT를 발현하는 인간 SLC7A11 유전자를 타겟팅하는 siRNA 10 nmol/L 또는 임의의 대조군 siRNA(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 10 nmol/L를 각 세포에 형질도입시켰다. 상기 siRNA-유도 유전자 억제제는 각 시료의 총 RNA 1 ~ 2 μ g를 SuperScript® III RT-PCR system(Thermo Fisher Scientific)을 이용한 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-qPCR)으로 확인하였고, 그 결과 대조군에 비해 siSLC7A11을 도입한 세포에서 SLC7A11의 발현이 현저히 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 7A).

[0086] SLC7A11 유전자의 발현을 억제시킨 세포는 그렇지 않은 세포에 비해 글루타메이트 방출이 감소하는 것을 알 수 있었고, SLC7A11 억제 세포에 아스피린(1 ~ 2 mM)과 소라페닙(1 ~ 2 μ M)을 병용 투여 했을 때 글루타메이트 방출 억제, 세포 생존도 감소 및 세포 사멸 유도 효과에 있어서 대조군에 비해 현저히 상승되는 것을 확인할 수 있었다(도 7B, 7C).

[0087] 또한, 도 7D에 나타난 바와 같이, xCT 유전자를 억제시킨 HN3R 세포에 저농도의 아스피린(2 mM) 또는 소라페닙(2 μ M) 단독 처리했을 때는 이로 인한 세포 사멸이 유도되지 않았지만, 저농도의 아스피린과 소라페닙을 병용 처리하였을 때 암 세포의 사멸을 효과적으로 증가시켰다($P < 0.05$). 나아가, xCT 유전자가 억제된 HN3R 세포에서 저용량 병용 투여 치료의 세포 사멸 효과는 siRNA 대조군에 비해 현저히 증가한다는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$).

[0088] 한편, xCT 단백질을 과발현시키기 위해 HN3R 세포를 대조군 벡터 또는 xCT 플라스미드(Transomic, Huntsville, AL)에 형질도입시켰으며, xCT의 과발현은 RT-qPCR 및 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 그 결과 도 7E에 나타난 바와 같이, xCT 플라스미드에 형질도입된 경우 안정적인 xCT 과발현을 확인할 수 있었다.

[0089] 이와 같이 유전자 형질도입에 의해 xCT를 과발현시킨 경우 같은 농도의 아스피린과 소라페닙을 병용 투여 했을 때, xCT가 과발현되지 않은 대조군에 비해서 병용 투여로 인한 세포 독성 상승 효과가 감소하는 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$, 도 7F).

[0091] 실시예 5. 시스플라틴 저항성 HNC 세포에서 아스피린 및 소라페닙 병용 투여로 인한 시스플라틴 민감성 향상

[0093] 시스플라틴 내성 HNC 세포주에서 아스피린과 소라페닙이 시스플라틴의 세포 사멸 효과를 얼마나 향상시키는지 확인하기 위하여, 3종의 시스플라틴 내성 HNC 세포주(HN3R, HN4R, HN9R)에 농도별 시스플라틴(0 ~ 20 μ M)에 각각 아스피린(2 mM), 시스플라틴(2 μ M) 또는 이들의 조합을 함께 처리한 경우 세포 생존도를 평가하였다. 그 결과, 저농도 아스피린과 소라페닙을 각각 시스플라틴과 함께 투여하는 경우에 비해 동시에 투여하였을 때 모든 내성 세포주의 시스플라틴-유도 세포 사멸을 유의한 수준으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(CIs < 1.0, P < 0.05; 도 8A).

[0094] 또한, 세포 내 cPARP, p65, Mcl-1, xCT 및 pp53-ser15 단백질 발현량을 웨스턴 블롯으로 측정된 결과, 저농도의 아스피린(2 mM), 소라페닙(2 μ M)을 단독으로 처리하거나, 각각 시스플라틴(10 μ M)과 조합하여 처리했을 때는 cPARP, p65, Mcl-1, xCT 또는 pp53 단백질 발현량에 유의미한 변화를 일으키지 못한 반면, 아스피린과 소라페닙의 조합(A+S) 또는 이들의 조합을 시스플라틴과 함께(A+S+cis) 처리했을 때 cPARP와 pp53 단백질 발현이 현저히 증가하고, p65, Mcl-1 및 xCT 단백질 발현이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 8B).

[0095] 아울러, 각각의 경우에 시스플라틴 내성 세포에서 세포 사멸 효과(시스플라틴의 세포독성), 글루타메이트 방출 및 GSH 농도를 측정된 결과, 저농도의 아스피린 또는 소라페닙을 단독으로 처리했을 때는 큰 변화가 없었지만, 아스피린과 소라페닙을 함께 투여한 경우, 세포 사멸이 현저히 상승했고, 글루타메이트 및 세포 GSH 농도를 현저히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(P > 0.05, 도 8C ~ 8E). 이와 같은 효과는 아스피린과 소라페닙을 시스플라틴과 조합하여 사용했을 때 더 증가하는 것으로 나타났다(P < 0.05).

[0097] 실시예 6. 종양 이식(Tumor xenograft) 모델 마우스를 이용한 아스피린과 소라페닙의 병용치료 효과 확인

[0099] 실험에 사용한 동물은 모두 울산대학교 의과대학의 실험동물운영위원회가 정한 규정을 따라 수행되었다. 6주령의 흉선을 제거한 수컷 마우스(BALB/c, Central Lab Animal Inc., Seoul)의 옆구리 피하에 HN9-cisR 세포(5×10^6 cells)를 주입하였다. 이식된 종양 세포의 전체 결절이 검출되는 날부터 마우스를 10마리씩 6개의 실험군으로 나누고 각각 6종류의 서로 다른 약물을 처리하였다: PBS(vehicle; 대조군), 아스피린(10 mg/kg/day, 위관주입), 소라페닙(10 mg/kg/day, 위관주입), 시스플라틴(5 mg/kg/week, 복강내주사), 아스피린 및 소라페닙의 조합 또는 아스피린, 소라페닙 및 시스플라틴의 조합.

[0100] 먼저, 각 마우스의 몸무게 및 종양 크기를 2주에 한 번씩 측정하고, 종양의 부피를 $[(길이 \times 넓이^2)/2]$ 식으로 계산하였다. 희생시킨 마우스에서, 종양을 분리하고 세포 GSH 측정, 인산화된 히스톤 H2AX (γ H2AX)에 대한 면역형광염색을 이용하여 분석하였다. 서로 다른 약물로 처리한 종양 조직에서 임의의 형광 단위를 비교 분석하였다. 종양 조직의 세포 사멸체(apoptotic bodies)의 수 인 시추(in situ) TUNEL 분석(Promega, Fitchburg, WI) 후 임의로 선택된 10개의 고출력장(high-power fields)에서 측정하였다.

[0101] HN9R 종양 세포가 이식된 모델 마우스에서 아스피린과 소라페닙을 단독으로 투여한 경우 종양 세포의 성장에 유의미한 영향을 미치지 못했다. 그러나 아스피린과 소라페닙을 병용 투여한 경우 종양 세포 성장이 현저하게 감소하였고, 시스플라틴을 추가로 병용한 경우 종양 세포 성장이 더욱 더 감소되는 것을 확인할 수 있었다(P < 0.01, 도 9A, 9B).

[0102] 또한 시스플라틴 치료 시 아스피린과 소라페닙을 함께 사용하면, 아스피린과 소라페닙을 시스플라틴 없이 조합하는 것에 비하여 생체 내에서 세포 GSH 농도가 현저하게 감소하고(도 10A), γ H2AX 형성이 현저하게 증가하며(도 10B), 종양 세포에서 TUNEL-양성 세포사멸체가 현저하게 증가(도 10C)하는 것을 확인할 수 있었다(P < 0.05).

[0104] 실시예 7. 폐암, 난소암 세포주에서 아스피린 및 소라페닙 병용 투여의 시너지효과

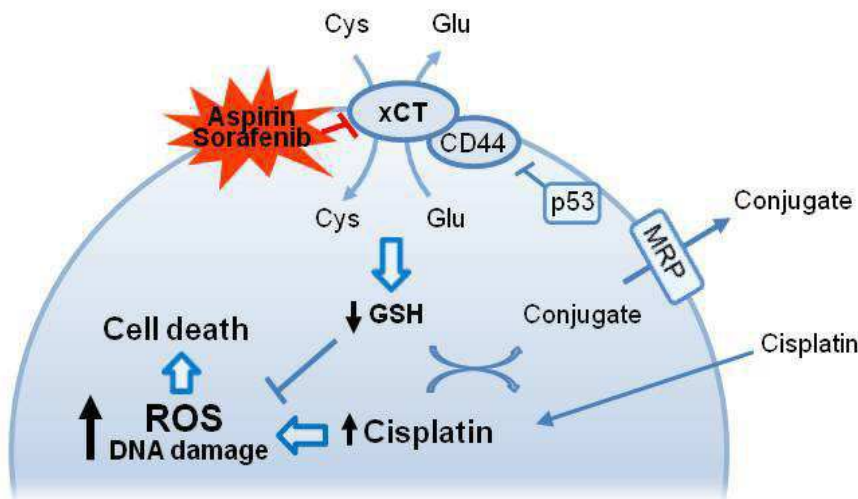
[0106] 아스피린 및 소라페닙의 병용 투여로 인해 시스플라틴 내성 두경부암 세포주(HNC cell line) 이외의 다른 암 세포에 대한 시스플라틴 민감도가 향상되는지 여부를 확인하기 위하여, 폐암 세포주(LK2, Calu-1)와 난소암 세포주(OVCAR3, SKOV3)의 세포 생존도를 측정하였다. 실험에 사용한 폐암 세포주 LK2는 소세포성폐암(small cell lung cancer, SCLC) 세포주로서 시스플라틴에 비교적 민감한 세포인 반면, Calu-1는 비소세포성폐암(NSCLC) 세포주로서 시스플라틴에 비교적 덜 민감한 세포이다. 또한 난소암 세포주 OVCAR3은 시스플라틴에 비교적 민감한 세포이고, SKOV3은 시스플라틴에 덜 민감한 세포이다.

[0107] 구체적으로 각 세포주를 아스피린(0 ~ 3 mM) 또는 아스피린과 소라페닙(1 μ M, 2 μ M) 조합에 72시간 동안 노출시킨 후 각 세포의 생존도를 측정하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 아스피린을 단독으로 처리했을 때에 비하여 소라페닙과 병용 처리했을 때 세포 생존도가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 모든 세포주에서 조합 지수 값이 CIs < 1로 나타났다. 이로부터 아스피린과 소라페닙의 조합 약물이 암 세포 사멸에 대한 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0108] 또한, 아스피린과 소라페닙의 조합이 시스플라틴에 대한 민감도를 향상시키는지 여부를 확인하기 위하여, 각 세포주에 시스플라틴을 농도별(0 ~ 5 μ M)로 처리하면서, 아스피린(2 mM), 소라페닙(2 μ M) 또는 이들의 조합을 투여한 후 각 세포의 생존도를 측정하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 아스피린이나 소라페닙을 단독으로 처리했을 때 보다 두 약물을 병용 투여했을 때 시스플라틴에 의한 세포 독성 효과가 현저히 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 시스플라틴에 대한 민감도가 떨어지는 Calu-1 및 SKOV3 세포주의 경우 시스플라틴만 단독으로 투여하거나, 시스플라틴 및 아스피린, 시스플라틴 및 소라페닙의 조합을 투여했을 때 세포 사멸 효과가 미미하였으나, 아스피린과 소라페닙을 함께 투여하였을 때 세포주의 시스플라틴 민감도를 현저히 향상시키는 것을 확인할 수 있었다(도 11B, 11D).

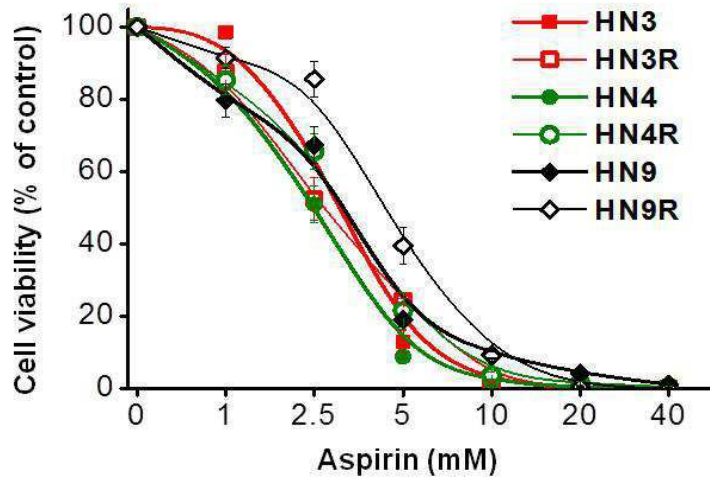
도면

도면1

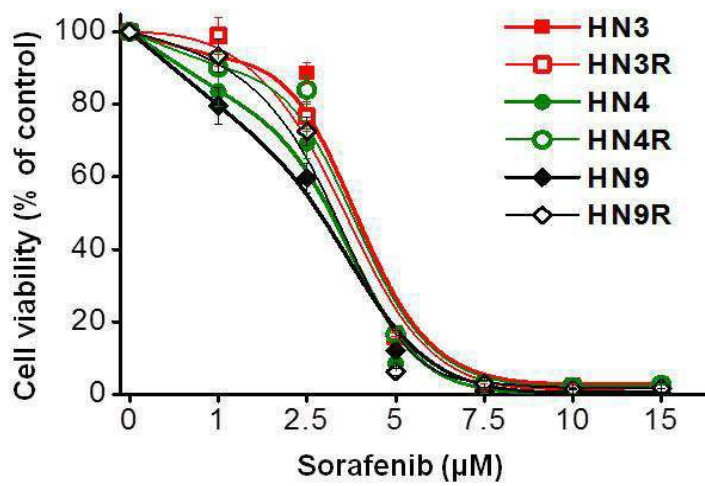


도면2

A

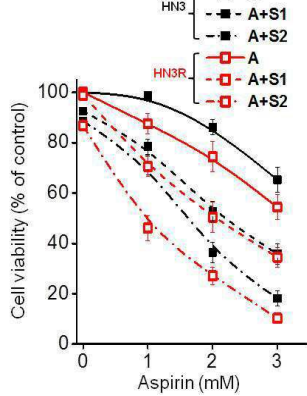


B

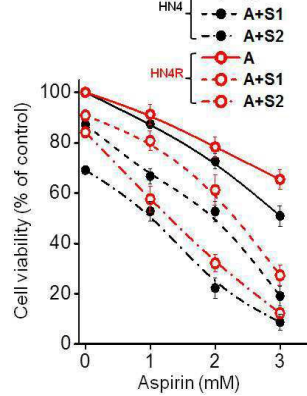


도면3

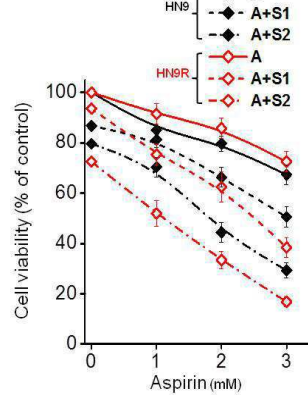
A



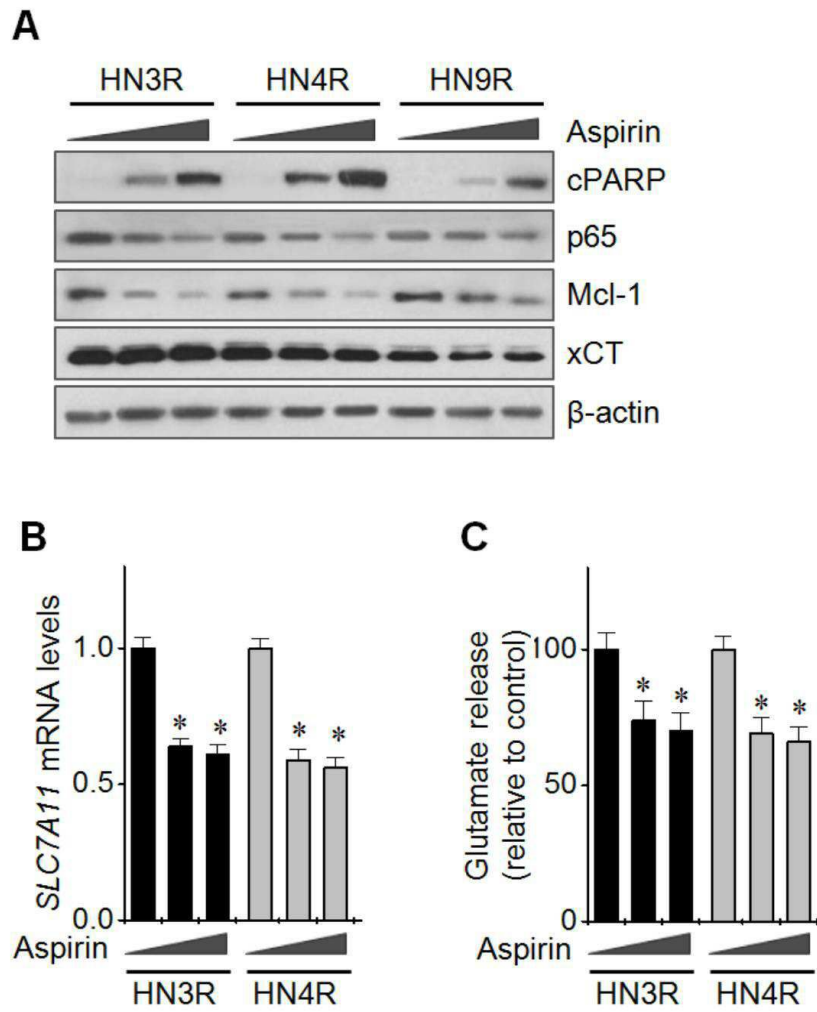
B



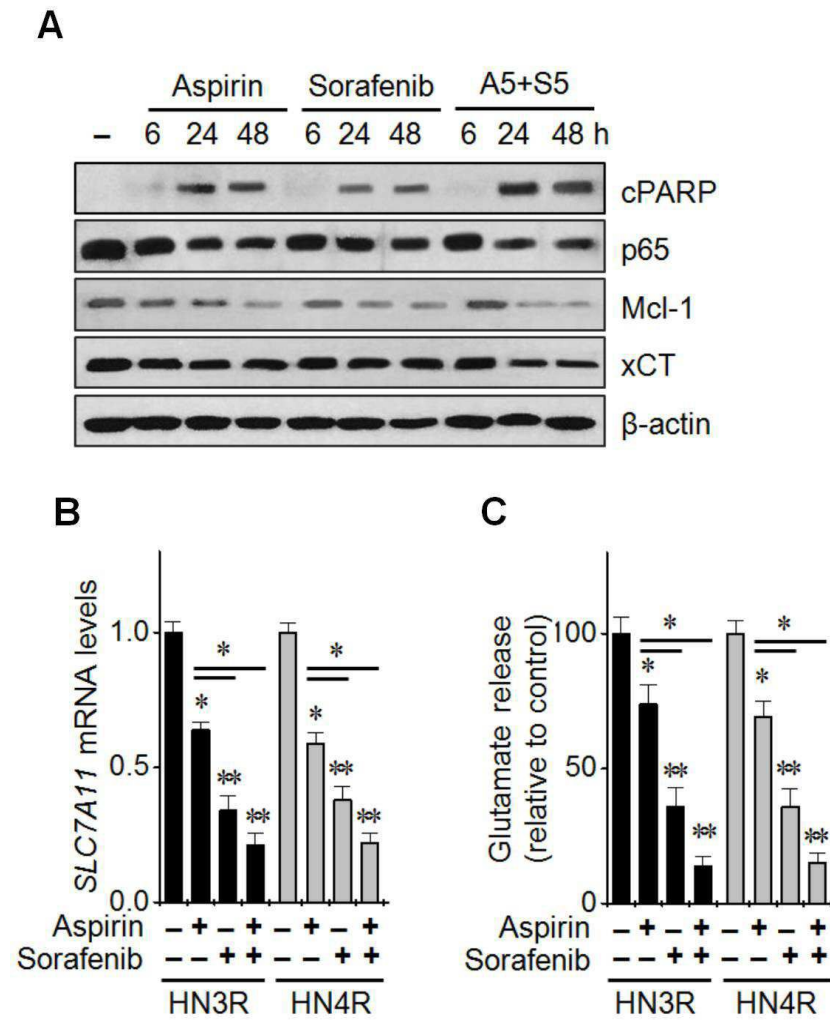
C



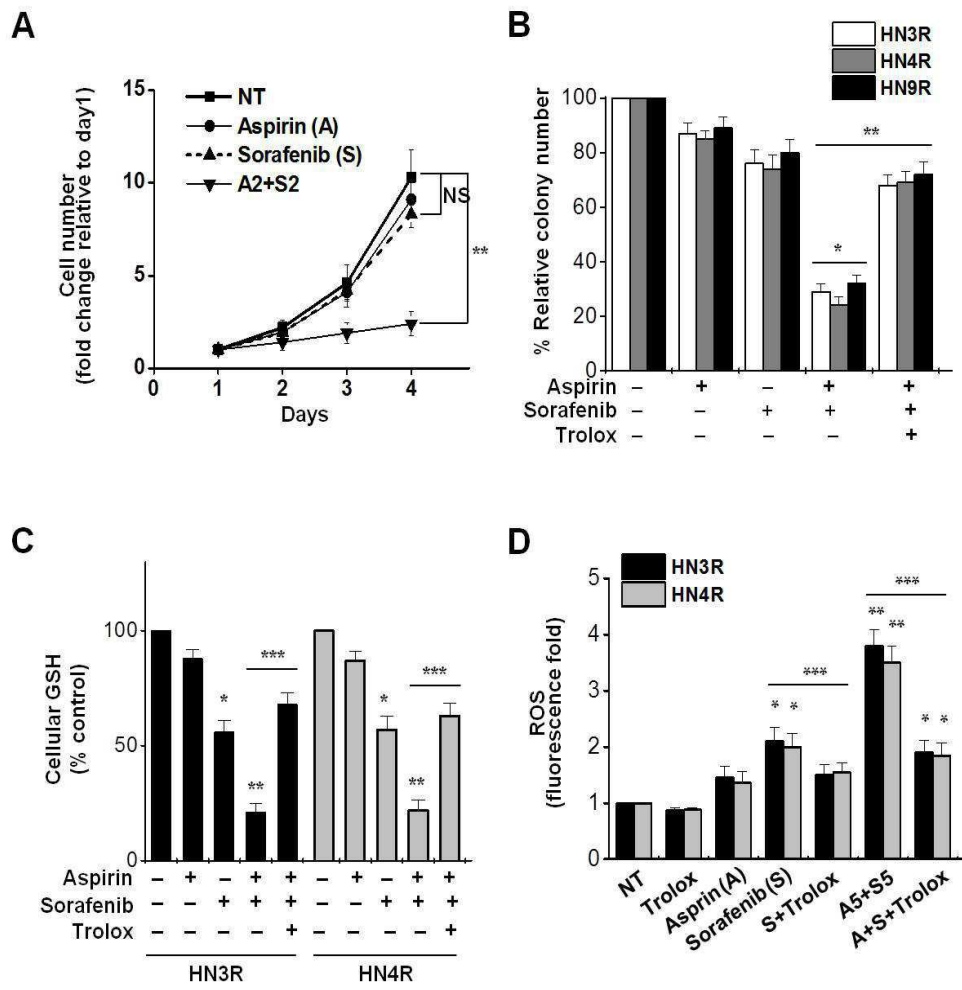
도면4



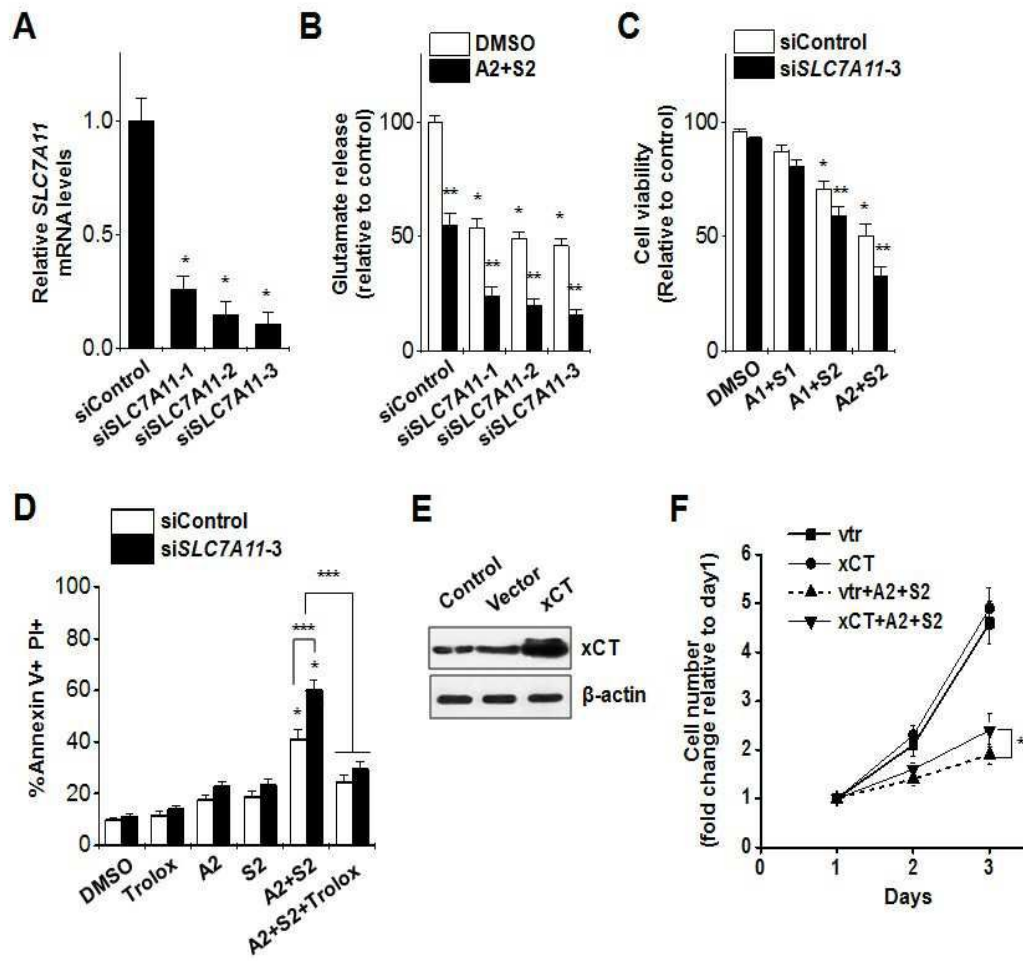
도면5



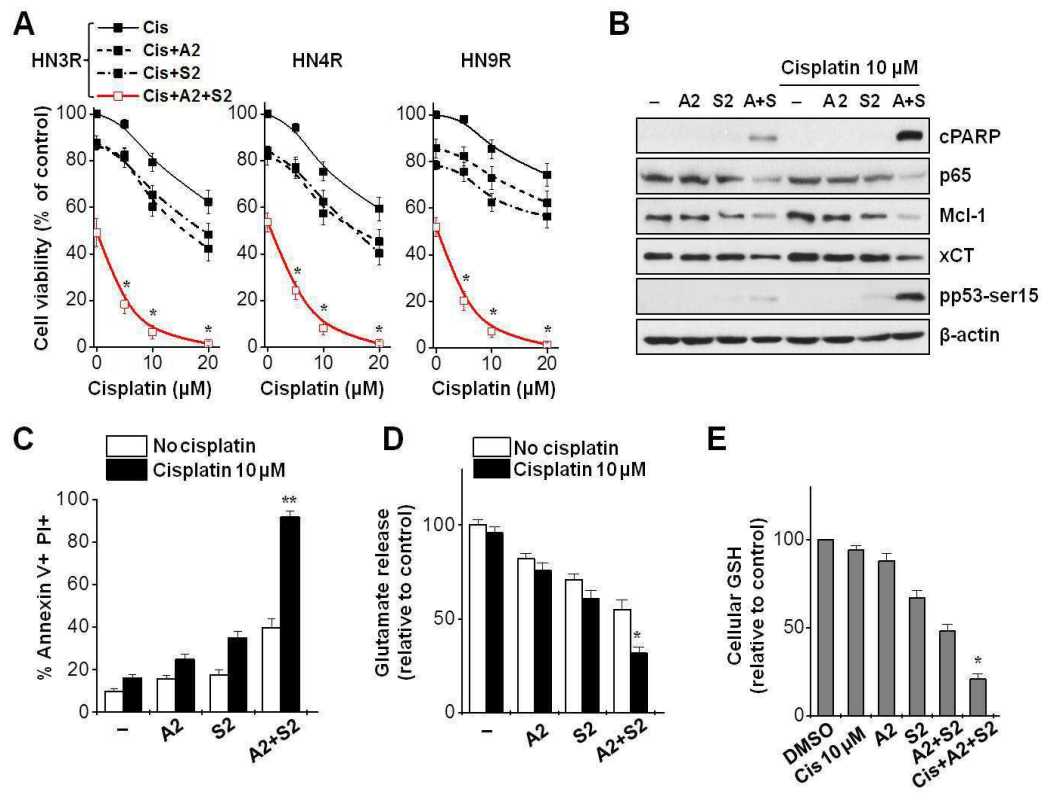
도면6



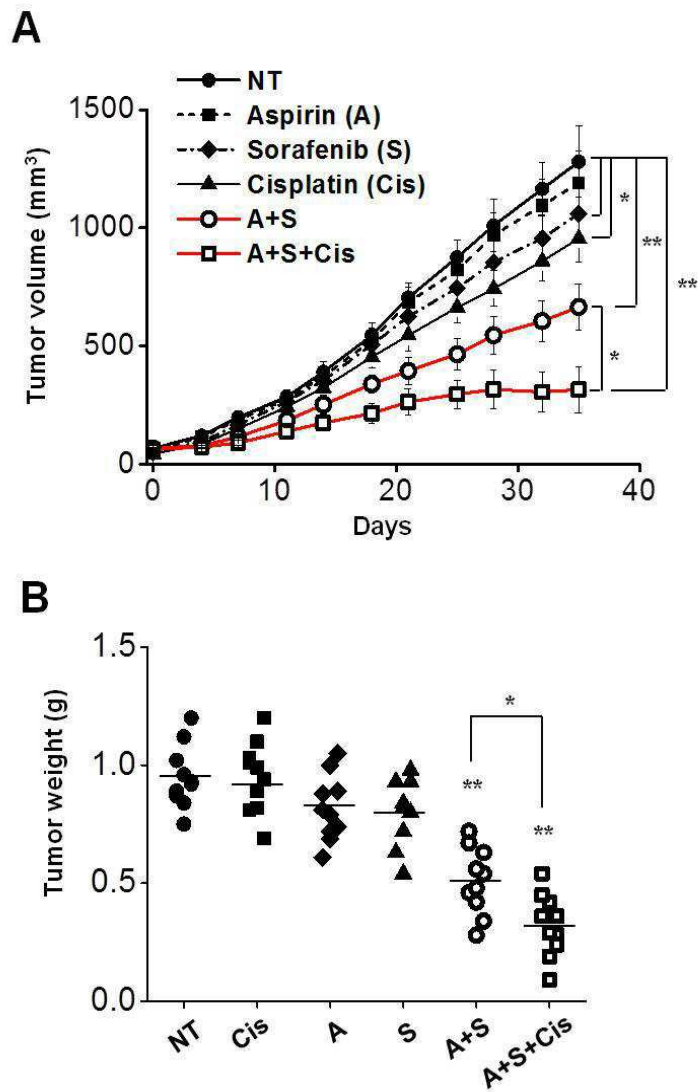
도면7



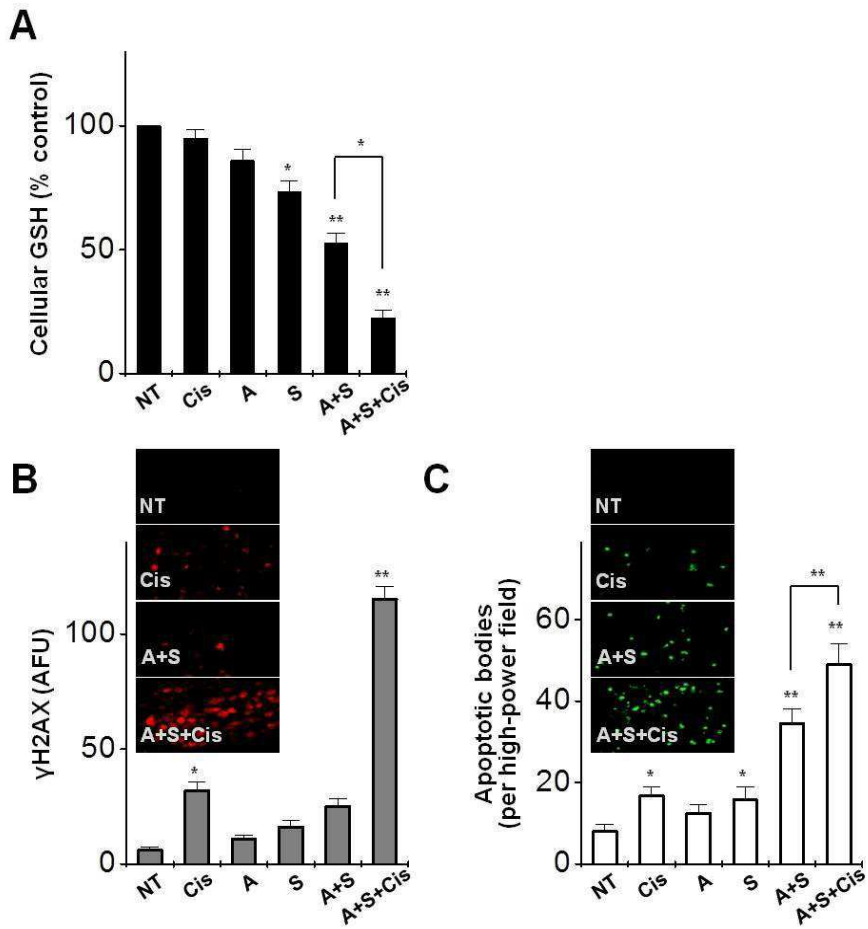
도면8



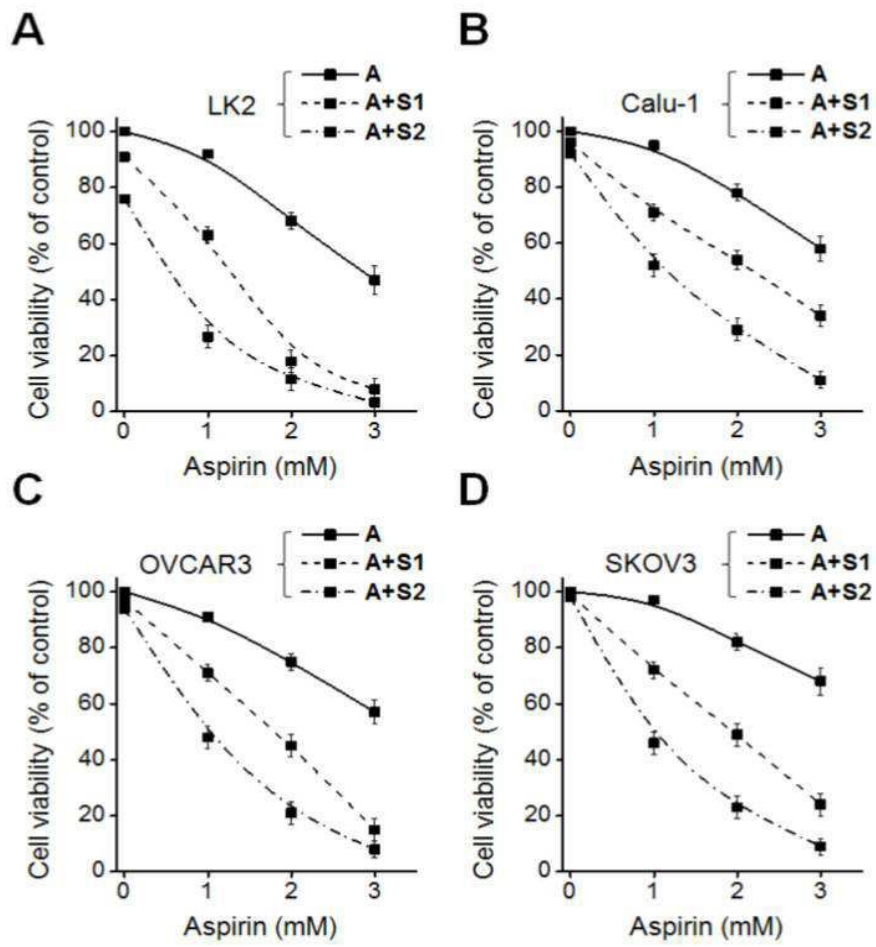
도면9



도면10



도면11



도면12

