

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0122675

(43) 공개일자 2020년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/522 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 33/243 (2019.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/522 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0045661

(22) 출원일자 2019년04월18일

심사청구일자 2019년04월18일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이성진

경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22 한림대학

교정심병원 내분비내과

김시형

경기도 안양시 동안구 관평로170번길 22 한림대학

교정심병원 내분비내과

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 10 항

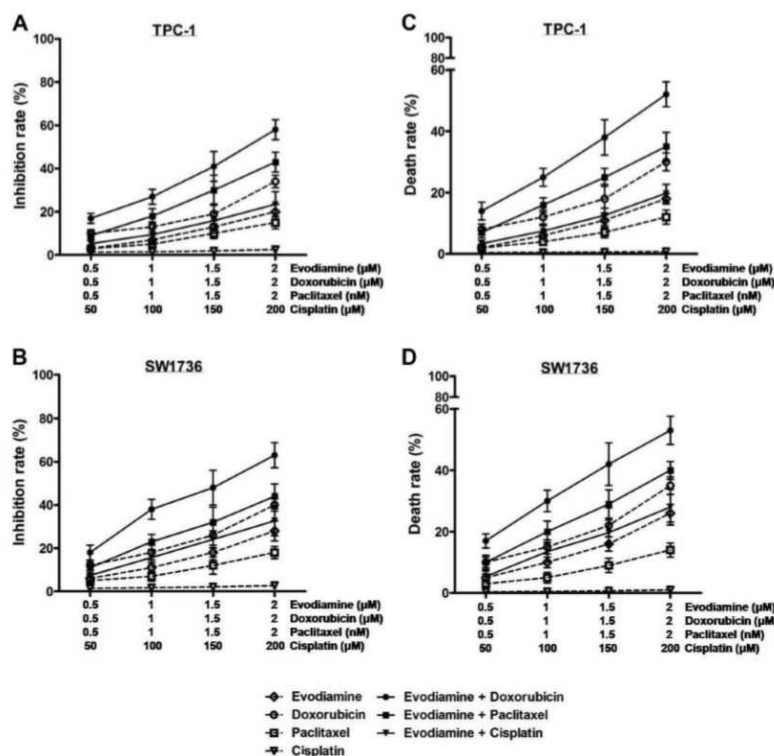
(54) 발명의 명칭 에보디아민과 화학치료제를 포함하는 갑상선암 치료용 조성물

(57) 요약

배경/목적: 이 연구의 목적은 에보디아민을 화학치료제와 병용하여 갑상선암 세포에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 대상 및 방법: TPC-1 및 SW1736 갑상선암 세포를 사용하였다. 세포 생존율, 세포 독성 활성, 세포 사멸 및 이동을 적절한 방법을 적용하여 조사하였다. 약물 조합 분석이 수행되었다. 결과: 에보디아민을 처리하였을 때

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



세포 생존율 및 Bcl2와 인산화-AKT 단백질 수준이 감소하였고, 세포 독성 및 세포 사멸 세포의 비율이 증가하였다. 워트만닌을 함께 처리하였을 때 세포 생존율 및 인산화-AKT와 Bcl2 단백질 수준이 감소하였고, 세포 독성 활성이 증가하였다. TGF- β -처리 세포에서, 에보디아민은 형태, 성장 및 이동의 변화를 약화시켰고, p21 및 p53 단백질 수준을 증가시켰고, β -카테닌, N-카데린, 비멘틴, 인산화-AKT, MMP-2 및 MMP-9 단백질 수준을 감소시켰다. 에보디아민과 화학치료를 함께 처리하였을 때 조합 지수는 모두 1.0 미만이었다. 결론: 에보디아민은 갑상선암 세포에서 세포 독성을 보였으며 AKT의 억제는 에보디아민 유도 세포 독성을 강화하였다. 또한, 에보디아민은 갑상선암 세포의 증식, 이동 및 상피-간엽 전이를 억제하였고 화학치료제와 상승 작용하였다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/366 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 33/243 (2019.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1D1A1B07044901
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	난치성 갑상선암의 새로운 치료모델 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

에보디아민을 포함하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 2

에보디아민과 PI3K 억제제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 갑상선암은 고분화 갑상선암 및 미분화 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서,

PI3K 억제제는 워트만닌임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 5

에보디아민 및 갑상선암에 효과를 나타내는 화학치료제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 갑상선암은 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 갑상선암은 방사성 요오드 (radioactive iodine) 치료에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물.

청구항 8

에보디아민 및 파클리탁셀을 포함하는, 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암에 대한 치료제 조성물.

청구항 9

에보디아민 및 시스플라틴을 포함하는, 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암에 대한 치료제 조성물.

청구항 10

에보디아민 및 독소루비신을 포함하는, 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암에 대한 치료제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 에보디아민과 화학치료제를 포함하는 갑상선암 치료용 조성물에 관한 것으로서, 에보디아민 단독으로 생존 관련 단백질의 동반 변이와 함께 세포 사멸을 초래하였고, AKT의 불활성화가 에보디아민이 갑상선암 세포의 생존에 미치는 부정적 효과를 강화시켰다. 또한 에보디아민은 상피-간엽 전이 관련 단백질을 조절하여 증식, 이동 및 상피-간엽 전이를 억제시켰고, 갑상선암 세포의 성장과 생존을 억제함에 있어서 화학치료제와 상승 작용을 나타냈다.

배경 기술

[0003]

갑상선 유두암 (papillary thyroid cancer; PTC)과 갑상선 여포암 (follicular thyroid cancer; FTC)을 포함한 고분화 갑상선암 (well differentiated thyroid cancer; WDTC)은 가장 빈번한 하위 유형이지만 약 2/3의 환자에서 방사성 요오드 (radioactive iodine; RAI) 치료가 잘 듣지 않는다. 역형성 갑상선암(anaplastic thyroid cancer; ATC)을 포함한 미분화 갑상선암 (undifferentiated thyroid cancer; UDC)은 갑상선 외부 침윤 및 원격전이로 특징지어지는 매우 공격적인 특징을 나타내며 예후가 매우 불량하다 (1-3). RAI 치료제 저항성 WDTC 및 UDC 환자는 기존 치료법에 반응하지 않기 때문에 암세포에 대한 치료 효능을 향상시키는 새로운 치료법이 연구 중이다 (1-3).

[0004]

에보디아민 (Evodiamine)은 오수유 (Wu-Zhu-Yu)라고도 불리는 에보디아 루태카르파 (Evodia rutaecarpa)에서 분리된 천연 인돌 알칼로이드이며, 다양한 생물학적 활성 스펙트럼을 지닌 다중 표적 화합물이다 (4). 에보디아민은 전통적으로 복통, 구토, 설사, 두통 및 출산 후 출혈 치료에 사용되어 왔다 (4). 에보디아민은 체온 조절, 통각, 염증, 비만, 심혈관 질환, 전염성 질환 및 알츠하이머 병에 유익한 활성을 나타내며 다양한 암세포에서 항암 효과를 발휘한다 (4, 5). 에보디아민의 항암 작용 기전은 Cdc2/cyclin B 복합체의 활성화를 통한 G2/M 기의 세포주기 정지, Bcl2 계열 단백질인 p21과 p53과 같은 생존 관련 단백질뿐만 아니라 PI3K/AKT 및 NF- κ B를 포함하는 다중 신호전달경로를 조절하여 세포 사멸을 유도한다고 제안되어 왔다 (6-15). 그러나 에보디아민이 갑상선암 세포의 생존에 미치는 영향은 밝혀지지 않았다.

[0005]

에보디아민은 암세포의 이동, 침윤 및 전이를 억제시켜 암의 진행을 막는다 (5, 6). 에보디아민은 전립선암과 비인두암 세포에서 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)와 MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)의 세포 이동과 침윤을 억제하고 대장암 동물 모델에서 전이성 병소 형성을 억제한다 (17-19). 상피-간엽 전이 (epithelial mesenchymal transition; EMT)와 관련하여 에보디아민은 간세포 성장 인자 (HGF)로 활성화된 암세포의 침습성을 억제하고, 위암 줄기세포에서 EMT의 완화를 통해 자가 재생 (self-renewal)을 없애고, 시험관 내 및 생체 모델에서 TGF- β 에 의해 활성화된 EMT를 개선하였다 (15, 20-22). 한편, 에보디아민은 기존 화학치료제에 잘 듣지 않는 유방암에서 세포 독성을 나타낸다 (23, 24). 또한, 에보디아민은 파클리탁셀 (paclitaxel) 저항성 난소암 세포에서 세포활동 억제 특성 및 세포 독성을 나타낸다 (25). 그러나, 갑상선암 세포에 대한 에보디아민과 화학치료제의 조합 효과는 아직 밝혀지지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) Nervo A et al., Anticancer Res 38: 1643-1649, 2018
- (비특허문헌 0002) Haugen BR et al., Thyroid 26: 1-133, 2016
- (비특허문헌 0003) Smallridge RC et al., Thyroid 22: 1104-1139, 2012
- (비특허문헌 0004) Yu H et al., Molecules 18: 1826-1843, 2013
- (비특허문헌 0005) Jiang J and Hu C, Molecules 14: 1852-1859, 2009
- (비특허문헌 0006) Zhang C et al., Anticancer Drugs 21: 766-776, 2010
- (비특허문헌 0007) Chen MC et al., J Cell Biochem 110: 1495-1503, 2010
- (비특허문헌 0008) Takada Y et al., J Biol Chem 280: 17203-17212, 2005
- (비특허문헌 0009) Wang C et al., Toxicol In Vitro 24: 898-904, 2010
- (비특허문헌 0010) Wang C et al., J Pharmacol Sci 97: 494-500, 2005
- (비특허문헌 0011) Yang F et al., Biochem Biophys Res Commun 485: 54-61, 2017
- (비특허문헌 0012) Wei WT et al., Int J Biol Sci 8: 1-14, 2012
- (비특허문헌 0013) Meng ZJ et al., Oncol Rep 34: 1388-1396, 2015
- (비특허문헌 0014) Chien CC et al., PLoS One 9: e99729, 2014
- (비특허문헌 0015) Wen Z et al., Int J Mol Med 36: 1657-1663, 2015
- (비특허문헌 0016) Fei XF et al., Cancer Sci 94: 92-98, 2003
- (비특허문헌 0017) Chang WL et al., Biochem Pharmacol 94: 12-21, 2015
- (비특허문헌 0018) Peng X et al., Cancer Chemother Pharmacol 76: 1173-1184, 2015
- (비특허문헌 0019) Ogasawara M et al., Biol Pharm Bull 24: 917-920, 2001
- (비특허문헌 0020) Ogasawara M et al., Biol Pharm Bull 27: 578-582, 2004
- (비특허문헌 0021) Wei J et al., Cell Biol Int 38: 875-880, 2014
- (비특허문헌 0022) Yang D et al., J Nat Med 72: 145-154, 2018
- (비특허문헌 0023) Wang S et al., PLoS One 9: e97512, 2014
- (비특허문헌 0024) Liao CH et al., Carcinogenesis 26: 968-975, 2005
- (비특허문헌 0025) Zhong ZF et al., Sci Rep 5: 16415, 2015
- (비특허문헌 0026) Cory S and Adams JM, Nat Rev Cancer 2: 647-656, 2002
- (비특허문헌 0027) Cory S and Adams JM, Cancer Cell 8: 5-6, 2005
- (비특허문헌 0028) Schweppe RE et al., J Clin Endocrinol Metab 93: 4331-4341, 2008
- (비특허문헌 0029) Testa JR and Tsichlis PN, Oncogene 24: 7391-7393, 2005
- (비특허문헌 0030) Xing M, Thyroid 20: 697-706, 2010
- (비특허문헌 0031) Kim SH et al., Anticancer Res 34: 4829-4837, 2014
- (비특허문헌 0032) Kim SH et al., Endocrine 48: 886-893, 2015
- (비특허문헌 0033) Kim SH et al., J Clin Endocrinol Metab 100: E253-E261, 2015

- (비특허문헌 0034) Kim SH et al., Endocrine 51: 274-282, 2016
- (비특허문헌 0035) Kim SH et al., Biomed Pharmacother 83: 22-32, 2016
- (비특허문헌 0036) Kim SH et al., J Endocrinol Invest 41: 677-689, 2018
- (비특허문헌 0037) Kim YJ et al., Anticancer Res 38: 3515-3525, 2018
- (비특허문헌 0038) Kim SH et al., J Endocrinol Invest 36: 1099-1104, 2013
- (비특허문헌 0039) Kim SH et al., Horm Metab Res 45: 408-414, 2013
- (비특허문헌 0040) Kim SH et al., Anticancer Res 35: 6529-6537, 2015
- (비특허문헌 0041) Abbas T and Dutta A, Nat Rev Cancer 9: 400-414, 2009
- (비특허문헌 0042) Pietsch EC et al., Oncogene 27: 6507-6521, 2008
- (비특허문헌 0043) Roomi MW et al., Oncol Rep 21: 1323-1333, 2009
- (비특허문헌 0044) Kim SH et al., Endocrine 59: 383-394, 2018
- (비특허문헌 0045) Haddad RI et al., Natl Compr Canc Netw 13: 1140-1150, 2015
- (비특허문헌 0046) Zheng X et al., Int J Oncol 37: 307-315, 2010
- (비특허문헌 0047) Ain KB et al., Thyroid 10: 587-594, 2000
- (비특허문헌 0048) Seto A et al., Surg Today 45: 221-226, 2015

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명의 목적은 세포 생존, 증식, 이동 및 상피-간엽 전이에 대한 에보디아민의 영향을 평가하고 화학치료제와 조합한 에보디아민이 갑상선암 세포 성장 및 생존에 미치는 영향을 분석하여 좀 더 효과적인 갑상선암 치료제를 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010]

본 발명은 에보디아민이 생존 관련 단백질의 동반 변이와 함께 세포 사멸을 초래하고 AKT의 불활성화가 에보디아민이 갑상선암 세포의 생존에 미치는 부정적 효과를 강화시켰음을 처음으로 증명했다. 또한, 에보디아민은 EMT 관련 단백질을 조절하여 증식, 이동 및 EMT를 약화시키고 갑상선암 세포의 성장과 생존을 억제함에 있어서 화학치료제와 상승 작용을 나타냈다.

[0011]

에보디아민은 세포 수준에서 호르몬에 민감한 전립선암 및 유방암에 대하여 뛰어난 항분열촉진 작용(antimitogenic action)을 나타낸다 (5). 제시된 기작 중 하나로서, 에보디아민은 Cdc2/cyclin B 복합체의 자극과 함께 G₂/M 단계에서 세포주기의 진행을 차단한다고 보고되었다 (6, 7). 한편, Bcl2 계열 단백질은 생존 및 증식과 같은 세포 항상성에 다양한 주요 기능을 수행한다 (26). 이 점에 관해서는 Bcl2/Bax 스위치라고 불리는 친 생존 단백질 Bcl2와 항 생존 단백질 Bax의 상대적 발현량이 암세포의 생존에 영향을 미친다 (27). 에보디아민이 Bcl2 계열 단백질을 포함한 생존 관련 단백질에 미치는 영향과 관련하여 에보디아민은 다양한 암에서 Bcl2, Bcl-xL, 서바이빈(survivin), 아폽토시스 단백질 억제제, MMP-9, cyclin D1 및 cyclooxygenase 2 억제를 통해 세포 사멸을 유발한다 (8). 또한, 에보디아민은 A375-S2 흑색종 세포에서 유비퀴틴-프로테아좀 시스템, Bcl2/Bax 비율, p21 및 p53에 의해 조절되는 Bcl2를 통해 세포 사멸을 유도한다는 것이 밝혀졌다 (9, 10). HepG2 간암 세포에서 에보디아민은 Bcl2/Bax 비율을 줄임으로써 세포 사멸을 초래한다 (11). 에보디아민이 ATC 세포로 여겨졌던 ARO 세포의 생존과 증식을 억제한다고 발표되었지만 이 세포는 대장암 세포로 확인되었다 (7, 28). 이 연구에서 사용된 TPC-1과 SW1736 세포는 각각 PTC 세포와 ATC 세포로 인증되었으므로 본 연구 결과는 에보디아민이 진정한 갑상선암 세포의 사멸을 유도한다는 사실을 최초로 보고한 것이다 (28). 요약하면, 에보디아

아민은 갑상선암 세포에서 세포 생존력을 감소시키고, 세포 독성 활성 및 아포토시스 세포의 백분율을 투여량의존적으로 증가시켰다. 결과적으로 에보디아민은 Bcl2 단백질 수준을 감소시키고 Bax 단백질 수준을 변화시키지 않아 Bcl2/Bax 비율을 감소시킨다. 또한, 에보디아민은 갑상선암 세포에서 γ H2AX와 절단 PARP 단백질 수준을 높이고 서바이빈 단백질 수준을 감소시켰다. 이러한 결과는 에보디아민이 갑상선암 세포에서 Bcl2, 서바이빈 및 γ H2AX의 발현을 동시에 변화시킴으로써 세포 사멸을 유도함을 의미한다. 또한, 이러한 결과는 에보디아민이 갑상선암 세포에서 생존 관련 단백질의 조절을 통해 세포 독성을 나타냄을 시사한다.

[0012] PI3K/AKT 신호 전달은 건강한 세포의 생존에 필수적인 많은 세포 내 과정을 조절한다 (29). 갑상선암 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달의 이상 현상은 신생 혈관 형성에 관여하며, PI3K/AKT 신호 전달은 본 발명자들의 선행 연구에서 세포 생존에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다 (30-37). PI3K/AKT 신호 전달이 에보디아민에 의해 유도되는 항종양 작용에 관여하는 것에 대해, 에보디아민은 시험관 내 및 생체 내 췌장암 모델에서 PI3K/AKT 신호 전달의 직접 또는 간접적인 음성 조절 (negative regulation)을 통해 겐시타빈 (gemcitabine)의 치료 효능을 향상시키는 것으로 나타났다 (12). 또한, 에보디아민이 HepG2 간암 세포에서 인산화-AKT 단백질 수준을 감소시킴으로써 세포 사멸을 초래하고, 골육종 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 및 PTEN의 불활성화를 통해 세포 증식을 억제한다는 증거가 제시되었다 (11, 13). A375-S2 흑색종 세포에서 에보디아민은 PI3K/AKT 신호의 감소 및 Fas-L/NF- κ B 신호의 증가 및 SIRT1 비활성화와 함께 PI3K/단백질 키나아제 C 및 ERK 캐스케이드의 불활성화를 통하여 세포 사멸을 유발한다 (9, 10). PI3K/AKT 신호 전달 외에도 에보디아민은 NF- κ B, 유사분열 촉진물질 활성화 단백질 카이네이즈 (mitogen activated protein kinase) 및 Wnt/ β -카테닌과 같은 다양한 신호 전달 경로를 조절하여 항암 작용을 나타낸다 (8, 14, 15).

[0013] 본 연구에서 에보디아민은 인산화-JNK의 단백질 수준을 증가시켰고, 총 AKT, 총 NF- κ B, 총 JNK와 총 및 인산화-ERK1/2의 단백질 수준에 영향을 주지 않았고 인산화-AKT와 인산화-NF- κ B의 단백질 수준을 감소시켰다. 그러나 에보디아민으로 치료한 세포에서 PI3K 억제제인 워트만닌 (wortmannin)은 NF- κ B, JNK 및 ERK1/2의 저해제와 달리 세포 생존율을 감소시키고 세포 독성을 증가시킨다. 또한, 워트만닌은 절단 PARP 단백질 수준을 증가시켰고 총 AKT 및 Bax의 단백질 수준에 영향을 미치지 않았고 인산화-AKT와 Bcl2의 단백질 수준을 감소시켰다. 이러한 결과는 갑상선암 세포에서 AKT의 억제에 에보디아민에 의해 유도된 세포 사멸을 자극한다는 것을 나타낸다. AKT의 억제가 갑상선암 세포에서 다양한 약제의 세포 독성을 증가시킨다는 본 발명자들의 종래의 연구를 고려할 때 이 연구의 결과는 갑상선암 세포에서 AKT의 억제가 에보디아민 유도 세포 독성을 강화시킨다는 것을 의미한다.

[0014] p21, p53 및 MMP (matrix metalloproteinase)는 암세포의 증식, 이동, 침윤 및 전이와 관련이 있다 (41-43). 이와 관련하여 본 발명자들은 종래 논문에서 p21, p53, MMP-2 및 MMP-9가 갑상선암 세포의 증식 및 이동에 관여한다고 보고한 바 있다 (37, 44). 세포 증식 억제 및 세포 독성 효과 외에, 에보디아민은 암세포의 이동, 침윤 및 전이를 방해하여 암의 진행을 억제한다 (5, 16). 시험관 내 및 생체 내 연구에서 에보디아민은 전립선암과 비인두암 세포에서 MMP-2와 MMP-9를 통해 세포 이동과 침윤을 억제하고 대장암 세포 접종 누드 마우스에서 전이성 초점을 감소시키는 것으로 나타났다 (17-19). EMT와 관련하여 에보디아민은 생체 활성 HGF를 비활성화시켜서 흑색종, 폐암 및 결장암 세포에서 HGF 자극 침습성을 억제한다고 보고된 바 있다 (20). 또한, 에보디아민은 위암 줄기세포에서 표준 Wnt/ β -카테닌 신호 전달 과정에서 EMT를 개선하여 자가 재생을 줄이고 NRK52E 세포 및 쥐의 간 섬유증에서 TGF- β 자극 EMT에 대한 억제성을 발휘한다 (15, 21, 22). 본 발명에서 에보디아민은 p21과 p53 단백질 수준의 증가뿐만 아니라 MMP-2와 MMP-9를 감소시켜 세포 성장과 이동을 감소시켰다. TGF- β 는 세포 성장 및 이동을 촉진하고 섬유아세포 유사 표현형을 유도하였던 반면 에보디아민은 TGF- β 에 의해 유발된 세포 성장, 형태 및 이동의 변화를 없었다. TGF- β 처리된 세포에서 N-카데린, 인산화-AKT 및 MMP-2의 단백질 수준은 증가하였고 p21과 p53의 단백질 수준은 감소했지만 β -카테닌, 비멘틴, 슬러그, 총 AKT 및 MMP-9의 단백질 수준은 변화가 없었다. TGF- β 단독 투여군과 비교하여 에보디아민과 TGF- β 를 함께 투여한 경우에 p21 및 p53의 단백질 수준은 증가하였고 β -카테닌, N-카데린, 비멘틴, 인산화-AKT, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 수준은 감소하였던 반면 슬러그와 총 AKT는 변화가 없었다. 종합하면, 에보디아민은 TGF- β 처리한 갑상선암 세포에서 p21 및 p53의 동시 과다 발현뿐만 아니라 β -카테닌, N-카데린, 비멘틴, 인산화-AKT, MMP-2 및 MMP-9의 동시 과소 발현으로 세포 증식 및 이동을 완화시킨다. 또한, 이러한 결과는 에보디아민이 EMT 관련 단백질의 조절을 통해 갑상선암 세포의 TGF- β 유발 EMT에 부정적으로 영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0015] 치료 지침에 따르면, 티로신 키나아제 억제제 저항성 WDTC 및 ATC 환자의 경우에는 화학치료제 투여를 고려할 수 있다 (2, 3). 과거 독소루비신 (doxorubicin)이 단일 요법으로 승인되었지만 ATC 환자에서 임상 효과와 반응은 만족스럽지 않다 (45). 또한, 독소루비신은 ATC 세포 유래 암 줄기세포를 제거하지 못한다고 보고되었다 (46). 다른 화학치료제와 관련하여 파클리탁셀은 ATC 환자에게 전통적으로 사용되던 독소루비신보다 상대적으로

효과적인 화학치료제였지만 열 충격 단백질 90 억제제인 17-알릴아미노-17-디메톡시젤다나마이신 (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)은 ATC 세포 사멸 유도에 있어서 파클리탁셀에 반대로 작용함을 본 발명자들이 밝힌 바 있다 (32, 47). 또한, 시스플라틴 (cisplatin) 단독으로 또는 도세탁셀 (docetaxel)과 병용 투여 시 ATC 환자에서 효과를 보이는 것으로 나타났다 (3, 48). 에보디아민과 화학치료제의 병용의 관점에서 보면, 에보디아민은 시험관 내 및 생체 모델에서 화학치료제 저항성 유방암의 세포 사멸을 유도한다 (23, 24). 또한, 에보디아민은 파클리탁셀 저항성 A2780 난소암 세포에서 세포 증식 억제 및 세포 독성 작용을 유도한다 (25). 본 발명에서 에보디아민은 화학치료제인 독소루비신, 파클리탁셀 또는 시스플라틴과 병용되었을 때 모든 CI 값은 억제율 및 사망률 면에서 1.0보다 낮았다. 이러한 결과는 에보디아민이 독소루비신, 파클리탁셀 또는 시스플라틴과 함께 갑상선암 세포의 성장과 생존을 억제하는 시너지 효과가 있음을 보여준다. 또한, 이러한 결과는 에보디아민이 화학치료제와 상승 작용하여 갑상선암 세포 증식 억제 및 세포 독성을 유도한다는 것을 의미한다. 따라서 에보디아민과 화학치료제의 병합 요법은 갑상선암에서 매력적인 치료 요법일 수 있다.

- [0016] 결론적으로 본 연구의 결과는 갑상선암 세포에서 에보디아민이 생존 관련 단백질을 조절함으로써 항암 작용을 나타내며, AKT의 억제는 에보디아민 유도 세포 독성을 증가시킨다는 것을 시사한다. 또한, 에보디아민은 갑상선암 세포에서 EMT 관련 단백질을 조절함으로써 증식, 이동 및 EMT를 억제시키는 한편 세포 증식 억제 및 세포 독성을 유도함에 있어서 화학치료제와 상승 작용한다. 본 발명은 에보디아민과 화학치료제의 병합 사용이 통상적인 치료법에 반응하지 않는 갑상선암 환자에게 유망한 치료법임을 시사한다.
- [0018] 본 발명은 에보디아민을 포함하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 또한, 본 발명은 에보디아민과 PI3K 억제제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 고분화 갑상선암 및 미분화 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 PI3K 억제제가 워트만닌임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명은 에보디아민 및 갑상선암에 효과를 나타내는 화학치료제를 포함하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 갑상선암이 방사성 요오드 (radioactive iodine) 치료에 내성이 있는 갑상선암임을 특징으로 하는 갑상선암 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 에보디아민 및 파클리탁셀을 포함하는, 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암에 대한 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 에보디아민 및 시스플라틴을 포함하는, 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암에 대한 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 에보디아민 및 독소루비신을 포함하는, 종래 화학치료제 또는 종래 치료방법에 내성이 있는 갑상선암에 대한 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 에보디아민 단독 또는 에보디아민과 화학치료제를 유효성분으로 함유하는 갑상선 미분화암 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, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활착제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 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 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0029] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하 또는 복강 내 투여할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1회 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.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따르면, 에보디아민은 갑상선암 세포에서 생존 관련 단백질의 조절을 통해 세포 독성을 발휘하여 갑상선암 치료제로서 유용할 것으로 판단된다.

[0032] 또한, 본 발명에 따르면, 에보디아민 처리 시 워트만닌과 같은 PI3K 억제제를 추가하는 경우 AKT의 억제가 에보디아민 유도 세포 독성을 강화시켜 에보디아민과 PI3K 억제제의 병합 사용이 갑상선암 치료제로서 유용할 것으로 판단된다.

[0033] 이뿐만 아니라, 본 발명에 따르면, 에보디아민을 독소루비신, 파클리탁셀, 시스플라틴과 같은 화학치료제와 함께 처리하는 경우 갑상선암 세포의 성장과 생존을 억제하는 시너지 효과가 있는 것으로 나타나 에보디아민과 화학치료제 병용 시 갑상선암 치료제로서 유용할 것으로 판단된다.

[0034]

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 갑상선암 세포의 생존에 대한 에보디아민의 영향을 나타낸다. TPC-1 세포와 SW1736 세포를 1, 3, 5, 10 μ M의 에보디아민으로 48시간 처리한 후 세포 생존율 (A)과 세포독성 활성 (B)을 각각 CCK-8 분석법과 세포독성 분석법으로 측정하였다. C: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 5 μ M의 에보디아민으로 48시간 처리한 후, FACS 분석을 이용하여 아포토시스 세포의 백분율을 측정하였다. D: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 1, 3, 5, 10 μ M 에보디아민으로 48시간 처리한 후, 아포토시스 세포의 백분율을 측정하였다. E: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 5 μ M의 에보디아민으로 48시간 처리하고, Bcl2, Bax, 서마이빈, γ H2AX 및 절단된 PARP의 단백질 수준을 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 블롯은 세 번의 독립적인 실험을 대표한다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. * $p < 0.05$ 는 각각 대응된 대조군과 비교한 값이다.

도 2는 갑상선암 세포에서 신호 단백질에 대한 에보디아민의 영향을 나타낸다. TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 24, 48시간 동안 5 μ M 에보디아민으로 처리하거나, 48시간 동안 1, 2, 5 μ M로 처리하였고, AKT 및 NF- κ B (A)뿐만 아니라 JNK와 ERK1/2 (B)의 총 단백질 수준 및 인산화 단백질 수준을 측정하였다. TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 PI3K 억제제 워트만닌 2 μ M, NF- κ B 억제제 BAY11-7082 0.2 μ M, JNK 억제제 SP600125 2 μ M 또는 MEK 억제제 PD98059 2 μ M로 처리한 후 5 μ M 에보디아민을 48시간 동안 처리하였고, 세포 생존율 (C)과 세포독성 (D)을 측정하였다. E 및 F: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 2 μ M 워트만닌으로 처리한 후 5 μ M 에보디아민으로 48시간 동안 처리하였다. 총 및 인산화 AKT 단백질, Bcl2, Bax 및 절단된 PARP의 단백질 수준을 측정하였고, 농도계로 정량하였고 β -액틴 수준으로 보정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 블롯은 세 번의 독립적인 실험을 대표한다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. * $p < 0.05$ 는 각각 대응되는 대조군과 비교한 것임; † $p < 0.05$ 는 에보디아민과 DMSO를 함께 처리한 세포와 비교한 것임; ‡ $p < 0.05$ 는 에보디아민만 단독으로 처리한 세포와 비교한 것임.

도 3은 갑상선암 세포의 증식과 이동에 대한 에보디아민의 영향을 나타낸다. A: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 5 μ M 에보디아민으로 48시간 처리하였고 세포 수를 계수하여 세포 성장을 분석하였다. B와 C: TPC-1 세포와 SW1736 세포를 5 μ M의 에보디아민으로 48시간 처리한 후 세포 이동을 상처 치유 분석법으로 측정하였다. D 및 E: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 5 μ M의 에보디아민으로 48시간 동안 처리하였다. p21, p53, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 수준을 측정하였고, 농도계로 정량하였고 β -액틴 수준으로 보정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 블롯은 세 번의 독립적인 실험을 대표한다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. * $p < 0.05$ 는 각각 대응되는 대조군과 비교한 것이다.

도 4는 갑상선암 세포에서 TGF- β 자극 상피-간엽 이행에 대한 에보디아민의 영향을 나타낸다. TPC-1 세포와 SW1736 세포를 5 μ M 에보디아민과 100 ng/ml TGF- β 로 48시간 동안 처리하였고, 세포 성장 (A), 형태 (B) 및 이동 (C)을 측정하였다. D와 E: TPC-1 세포와 SW1736 세포를 5 μ M 에보디아민과 100 ng/ml TGF- β 로 48시간

처리한 후 β -카테닌, N-카데린, 비멘틴, 슬러그의 총 단백질 수준, 총 AKT 단백질 수준 및 인산화 AKT 단백질 수준을 측정하였다. F 및 G: TPC-1 세포 및 SW1736 세포를 5 μ M 에보디아민 및 100 ng/ml TGF- β 로 48시간 동안 처리한 후, p21, p53, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 수준을 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 블롯은 세 번의 독립적인 실험을 대표한다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다. *p < 0.05는 대응되는 대조군과 비교한 것; †p < 0.05는 에보디아민과 TGF- β 를 함께 처리한 세포와 비교한 것. β -Cat: β -카테닌; N-Cad: N-카데린.

도 5는 갑상선암 세포의 증식과 생존에 대하여 화학치료제와 에보디아민의 조합이 미치는 영향을 나타낸다. TPC-1 및 SW1736 세포를 0.5, 1, 1.5, 2 μ M 에보디아민 및 0.5, 1, 1.5, 2 μ M 독소루비신, 0.5, 1, 1.5, 2 nM 파클리탁셀 또는 50, 100, 150, 200 μ M 시스플라틴으로 24시간 처리하였다. A 및 B: 세포수를 계수하여 세포 성장을 측정하였고, 억제율은 100 - 세포 성장률(%)로 계산하였다. C 및 D: 세포 생존율은 CCK-8 분석법을 사용하여 측정하였고, 사멸율은 100 - 세포 생존율(%)로 계산하였다. 조합 지수 (CI)와 아이소볼로그그램을 평가하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 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.

[0038] 시약

[0039] 스트렙토마이신/페니실린은 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 에보디아민, 독소루비신 (doxorubicin), 파클리탁셀 (paclitaxel) 및 시스플라틴 (cisplatin)은 BioVision (Linda, CA, USA)에서 구입한 다음 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시켰다. Bcl2, Bax, 서바이빈, 인산화-히스톤 H2A.X (γ H2AX), 절단된 폴리 (ADPribose) 중합 효소 (PARP), 총 및 인산화 NF- κ B (Ser536), 총 및 인산화 JNK (C-Jun N-terminal kinase) (Thr183/Tyr185), 총 및 인산화 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2 (Thr402/Tyr404), p21, p53, MMP-2, MMP-9, β -카테닌 (catenin), N-카데린 (cadherin), 비멘틴 (vimentin) 및 슬러그 (slug)는 Cell Signaling Biotechnology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 총 및 인산화-AKT (Ser473)에 대한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, β -액틴에 대한 1차 항체는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 다른 모든 시약은 달리 명시하지 않는 한 Sigma에서 구입하였다.

[0040] 실험을 위해 박영주 교수 (서울대학교 의과대학 내분비대사내과)로부터 TPC-1 인간 갑상선 유두암 세포를 얻었고, 10% 열처리 불활성화 FBS와 1% 스트렙토마이신/페니실린이 첨가된 RPMI1640에서 배양하였다. SW1736 인간 역형성 갑상선암 세포를 Cell Lines Service (CLS GmbH, Eppelheim, Germany)에서 구입하여 2 mM L-글루타민, 10% 열처리 불활성화 FBS와 1% 스트렙토마이신/페니실린이 첨가된 RPMI1640에서 배양하였다. 일정한 시간 간격으로 신선한 배지를 세포에 보충하였다. 처리 및 실험은 70% 용적률 상태에서 수행하였다.

[0042] CCK-8 분석

[0043] 세포 생존율은 CCK-8 분석 키트 (Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan)로 측정하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세포 (5×10^3 /100 μ l)를 밤새 배양한 후, 37°C에서 추가로 4시간 동안 작용제로 처리하였다. 흡광도는 GlomaxTM Discover System GM3000 (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0045] 세포 독성 분석

[0046] 세포 독성은 LDH 세포독성 분석 키트 (BioVision, Linda, CA, USA)로 측정 하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세포 (5×10^3 /100 μ l)를 배양한 후, 250 g로 10분 동안 원심분리하였다. 100 μ l의 상청액을 투명한 96-웰 플레이트에 옮겼다. 반응 혼합물 (112.5 μ l 염료 용액 중 2.5 μ l 촉매 용액)을 첨가한 후, 세포를 상온에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도는 GlomaxTM Discover System GM3000 (Promega)을 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0048] **FACS 분석**

[0049] 아포토시스 세포를 Annexin V-FITC 아포토시스 검출 키트 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) 로 분석하였다. 6-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세포 (1×10^5 /ml)를 배양, 수확, 세척한 후, 제조사의 프로토 콜에 따라 고정시켰다. FITC 아넥신 (annexin) V 및/또는 프로피디움 요오드화물 (propidium iodide; PI)이 든 $1 \times$ 결합 완충액을 실온에서 15분간 첨가한 후 CytoFLEX™ Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) 및 CytExpert 소프트웨어 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 모든 실험 은 세 번 수행하였다.

[0051] **세포 계수**

[0052] 세포 성장은 트리판 블루 (trypan blue)를 사용하여 세포 수로 측정하였다. 12-웰 플레이트의 각 웰에 있는 세 포 (1×10^5 /500 μ l)를 배양한 후 37°C에서 트리판 블루 염료와 혼합하였다. 혈구계를 사용하여 염색된 세포 를 계수하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0054] **상처 치료 분석**

[0055] 세포 이동은 CytoSelect™ 24-웰 상처 치료 분석 키트 (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)로 측정하였다. 상 처 부위 (0.9 mm)를 생성한 후, 37°C에서 배양하였다. 상처 봉합을 광학 현미경으로 확인한 후, 세포 이동 속도 를 아래 식에 따라 계산하였다: 세포 이동 = [세포 이동 길이 (nm)/이동 시간 (hr)]. 모든 실험은 세 번 수행하 였다.

[0057] **웨스턴 블롯팅**

[0058] 전체 단백질은 $1 \times$ 단백질 분해효소 저해제 각테일과 $1 \times$ 포스파타제 저해제 각테일 세트 V (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 함유한 RIPA 완충액 (Sigma)으로 추출하였다. 웨스턴 블롯팅은 특이적 1차 항체와 퍼옥시다 아제-결합 항-토끼 또는 항-마우스 2차 항체를 사용하여 수행하였다. ECL Plus Western Blotting Detection System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 밴드를 검출하였다. 단백질 수준은 ImageJ 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 정량하였고 β -액틴 단백질 수준으로 보정하였다. β -액틴 단백질 수준에 대한 단 백질의 상대적 수준을 구하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0060] **약물 조합 분석**

[0061] CalcuSyn 프로그램 버전 2.11 (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK)을 이용하여 조합 지수 (Combination index; CI) 및 아이소볼로그래 (isobologram)를 계산하였고, 약물 상호 작용의 영향을 정량적으로 분석하였다. 1.0 미만, 1.0 및 1.0 초과 CI 값은 각각 시너지 효과, 가산성 및 길항 효과를 나타낸다. 아이소볼로그래는 x 축과 y 축에 50% 억제 (ED_{50})에 필요한 각 약제의 용량을 표시하고 점들을 연결하여 ED_{50} 아이소볼로그래 선분을 그린다. 선분 상, 아래 및 위의 조합 데이터 점은 각각 가산성, 시너지 효과 및 길항 효과를 나타낸다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0063] **통계 분석**

[0064] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차 (S.E)로 표현되었다. 자료는 unpaired Student's t-test 또는 ANOVA로 적절 하게 분석하였다. 0.05 미만의 p 값은 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다. 모든 분석은 SPSS 프로그 램 버전 24.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0066] 결과 1: 에보디아민은 갑상선암 세포의 사멸을 유도한다.

[0067] 에보디아민이 세포 생존에 미치는 영향을 평가하기 위해 TPC-1과 SW1736 세포를 1, 3, 5 및 10 μ M 에보디아민으로 48시간 처리한 후 세포 생존율 (도 1a)과 세포독성 (도 1b)을 CCK-8 분석법 및 세포 독성 분석법으로 각각 측정하였다. 처리 후, 세포 생존율이 감소하였고, 세포 독성 활성이 용량 의존적으로 증가하였다. 세포를 5 μ M 에보디아민으로 48시간 처리하였을 때, FACS 분석을 사용하여 측정한 아포토시스 세포의 비율은 증가하였다 (도 1c). 또한, 1, 3, 5 및 10 μ M 에보디아민을 48시간 처리하였을 때 용량 의존적으로 아포토시스 세포의 비율을 증가시켰다 (도 1d). 생존 관련 단백질 발현에 대한 에보디아민의 영향을 평가하기 위해, 5 μ M 에보디아민으로 48시간 동안 처리한 세포의 추출물을 Bcl2, Bax, 서바이빈, γ H2AX 및 절단된 PARP에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 검사하였다 (도 1e). 처리 후, γ H2AX 및 절단된 PARP 단백질 수준이 증가되었고, Bcl2 및 서바이빈 단백질 수준은 Bax 단백질 수준의 변화 없이 감소되었다.

[0069] 결과 2: AKT의 불활성화는 에보디아민으로 유도되는 갑상선암 세포의 사멸을 강화한다.

[0070] 신호 단백질에 미치는 에보디아민의 영향을 측정하기 위해 5 μ M 에보디아민으로 24, 48시간 동안 또는 1, 2 및 5 μ M 에보디아민으로 48시간 동안 처리한 세포의 추출물을 총 및 인산화 AKT, NF- κ B, JNK 및 ERK1/2에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 검사하였다 (도 2a 및 2b). 처리 후, 인산화-JNK의 단백질 수준은 증가하였고, 인산화-AKT와 인산화-NF- κ B의 단백질 수준은 감소하였다. 대조적으로, 총 AKT, 총 NF- κ B, 총 JNK 및 총 및 인산화 ERK1/2의 단백질 수준은 변하지 않았다.

[0071] 5 μ M 에보디아민에 48시간 동안 노출된 세포의 생존에 있어서 신호 단백질의 역할을 증명하기 위해 세포를 PI3K 억제제 워트만닌 (wortmannin), NF- κ B 억제제 BAY11-7082, JNK 억제제 SP600125 또는 MEK 억제제 PD98059로 전처리하였다. 처리 후, 세포 생존율 (도 2c) 및 세포 독성 활성 (도 2d)을 측정하였다. 워트만닌은 세포 생존율을 감소시켰고 세포 독성을 증가시켰으나, BAY11-7082, SP600125 및 PD98059는 그렇지 않았다. 5 μ M 에보디아민을 48시간 동안 처리하기 전에 세포를 워트만닌과 함께 배양하였을 때, 절단 PARP의 단백질 수준이 증가하였고, 인산화-AKT와 Bcl2의 단백질 수준은 감소하였다. 에보디아민 단독으로 처리한 세포와 비교하였을 때 워트만닌과 에보디아민으로 처리한 세포 내 총 AKT와 Bax 단백질 수준은 영향을 받지 않았다 (도 2e 및 2f).

[0073] 결과 3: 에보디아민은 갑상선암 세포의 증식과 이동을 억제한다.

[0074] 에보디아민이 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포를 5 μ M 에보디아민으로 48시간 처리한 후 세포를 계수하여 세포 성장을 평가하였다 (도 3a). 에보디아민 처리 후 세포 성장이 감소하였다. 에보디아민이 세포 이동에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포를 5 μ M 에보디아민으로 48시간 처리한 후 상처 치유 분석법으로 평가하였고 (도 3b 및 3c), p21, p53, MMP-2, MMP-9의 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 검사하였다 (도 3d 및 3e). 처리 후, p21 및 p53의 단백질 수준은 증가하였던 반면, 세포 이동 및 MMP-2, MMP-9의 단백질 수준은 감소하였다.

[0076] 결과 4: 에보디아민은 갑상선암 세포에서 TGF- β 활성화 EMT를 약화시킨다.

[0077] 에보디아민은 암세포의 이동, 침범 및 전이를 억제함으로써 암의 진행을 늦춘다 (5, 16). 이러한 측면에서 에보디아민은 전립선암과 비인두암 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 조절을 통하여 암세포 침윤과 전이를 방해하고, 대장암 마우스 모델에서 전이 병변의 형성을 억제한다 (17-19). EMT와 관련하여 에보디아민은 흑색종, 폐암 및 결장암 세포에서 HGF로 유도된 침습성을 약화시키고 위암 줄기세포에서 EMT 억제를 통해 자가 재생을 방지한다 (15, 20). 또한, 에보디아민은 랫트의 NRK52E 세포와 간 섬유증에서 TGF- β -유도 EMT를 억제한다 (21, 22). 본 발명자들은 에보디아민이 갑상선암 세포에서 TGF- β -유도 EMT에 영향을 주는지 여부를 조사하였다.

[0078] TGF- β 로 유도되는 EMT에 대한 에보디아민의 영향을 조사하기 위해 세포를 48시간 동안 5 μ M 에보디아민과 100 ng/ml TGF- β 로 처리한 다음 세포 성장 (도 4a), 형태 (도 4b) 및 이동 (도 4c)을 측정하였다. 처리 후, TGF- β 는 세포 성장과 이동을 증가시켰고, 섬유아세포와 같은 표현형을 유발하였다. 에보디아민은 세포 성장, 형태 및 이동에서 TGF- β 에 의해 유도된 변화를 약화시켰다.

[0079] 100 ng/ml TGF- β 로 48시간 동안 처리하였을 때 N-카데린, 인산화-AKT 및 MMP-2의 단백질 수준을 증가시켰고,

β -카테닌, 비멘틴, 슬러그, 총 AKT 및 MMP-9의 단백질 수준에는 영향을 주지 않으면서 p21 및 p53의 단백질 수준을 감소시켰다 (도 4d-g). TGF- β 만 처리한 세포와 비교하였을 때 에보디아민과 TGF- β 를 함께 처리한 세포 내 슬러그 및 총 AKT의 단백질 수준에 영향을 주지 않으면서 β -카테닌, N-카데린, 비멘틴, 인산화-AKT, MMP-2와 MMP-9의 단백질 수준을 감소시켰다.

결과 5: 에보디아민은 갑상선암 세포에 세포 증식 억제 및 세포 독성 효과를 나타낼 때 화학치료제와 상승 작용한다.

에보디아민과 화학치료제 조합의 세포 증식 억제 효과를 평가하기 위해 에보디아민과 독소루비신, 파클리탁셀 또는 시스플라틴을 사용하여 세포를 처리한 후 Chou-Talalay 방정식을 사용하여 CI를 얻음으로써 상호 작용을 해석하였다. CI < 1.0은 시너지 효과를 나타내며, CI = 1.0은 가산성을 나타내고, CI > 1.0은 길항 효과를 나타낸다 (도 5a 및 5b, 표 1). 세포를 계수하여 세포 성장을 분석하였고, 억제율은 100 - 세포 성장율 (%)로 계산하였다.

조합 처리 시, 모든 CI 값은 1.0보다 낮았으며, 조합 데이터의 점들은 모두 ED₅₀에서 아이소볼로그래프 라인 아래에 위치하였다. 이는 갑상선암 세포에서 세포 증식 억제 활성의 유도에 있어서 에보디아민과 화학치료제 사이의 상승 작용을 시사한다.

다음으로, 에보디아민과 화학치료제 조합의 세포 독성 효과를 분석하기 위해 세포를 에보디아민과 상기 화학치료제들로 처리하였다 (도 5c 및 5d, 표 2). 세포 생존율은 CCK-8 분석법으로 측정하였고, 사멸율은 100 - 세포 생존율 (%)로 계산하였다. 조합 처리 후, 모든 CI 값은 1.0 미만이었으며, 조합 데이터의 점들은 ED₅₀에서 모두 아이소볼로그래프 라인 아래로 위치하였다. 이는 에보디아민이 화학치료제와 함께 갑상선암 세포 독성에 시너지 효과가 있음을 시사한다.

표 1

Cells	Evo (μ M)	Dox (μ M)	Pac (nM)	Cis (μ M)	CI		
					Evo+Dox	Evo+Pac	Evo+Cis
TPC-1	0.5	0.5	0.5	50	0.740	0.808	0.687
	1	1	1	100	0.891	0.908	0.873
	1.5	1.5	1.5	150	0.786	0.842	0.874
	2	2	2	200	0.593	0.748	0.839
SW1736	0.5	0.5	0.5	50	0.937	0.939	0.806
	1	1	1	100	0.769	0.876	0.813
	1.5	1.5	1.5	150	0.810	0.890	0.798
	2	2	2	200	0.637	0.766	0.760

CI: Combination index; Evo: evodiamine; Dox: doxorubicin; Pac: paclitaxel; Cis: cisplatin.

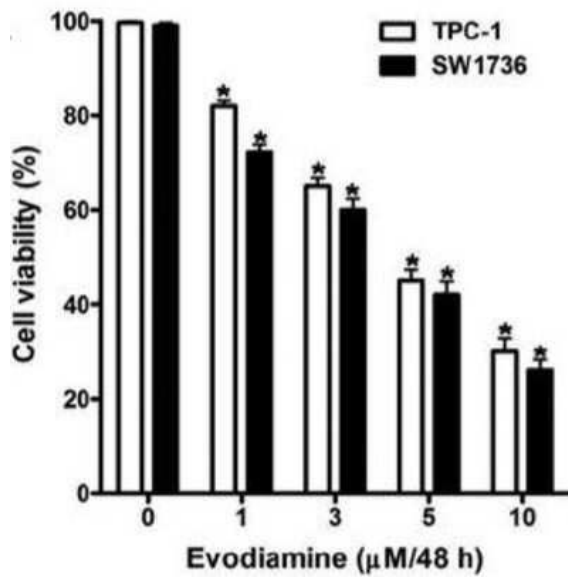
표 2

Cells	Evo (μ M)	Dox (μ M)	Pac (nM)	Cis (μ M)	CI		
					Evo+Dox	Evo+Pac	Evo+Cis
TPC-1	0.5	0.5	0.5	50	0.793	0.812	0.727
	1	1	1	100	0.901	0.883	0.880
	1.5	1.5	1.5	150	0.845	0.920	0.938
	2	2	2	200	0.732	0.899	0.910
SW1736	0.5	0.5	0.5	50	0.851	0.851	0.905
	1	1	1	100	0.905	0.900	0.841
	1.5	1.5	1.5	150	0.869	0.918	0.896
	2	2	2	200	0.797	0.833	0.843

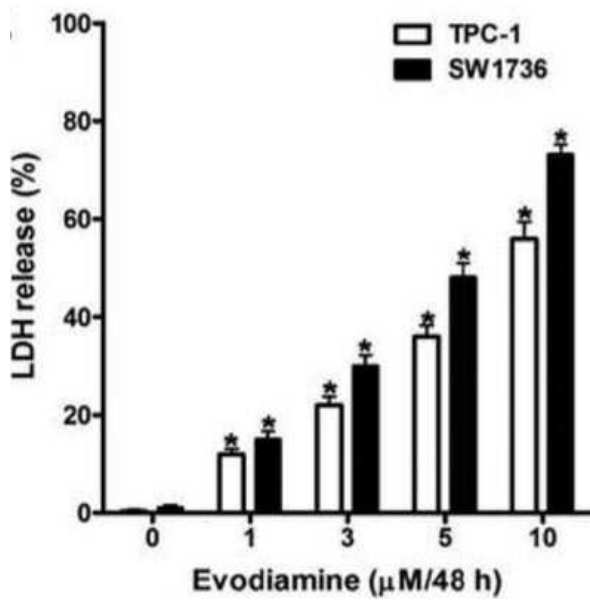
CI: Combination index; Evo: evodiamine; Dox: doxorubicin; Pac: paclitaxel; Cis: cisplatin.

도면

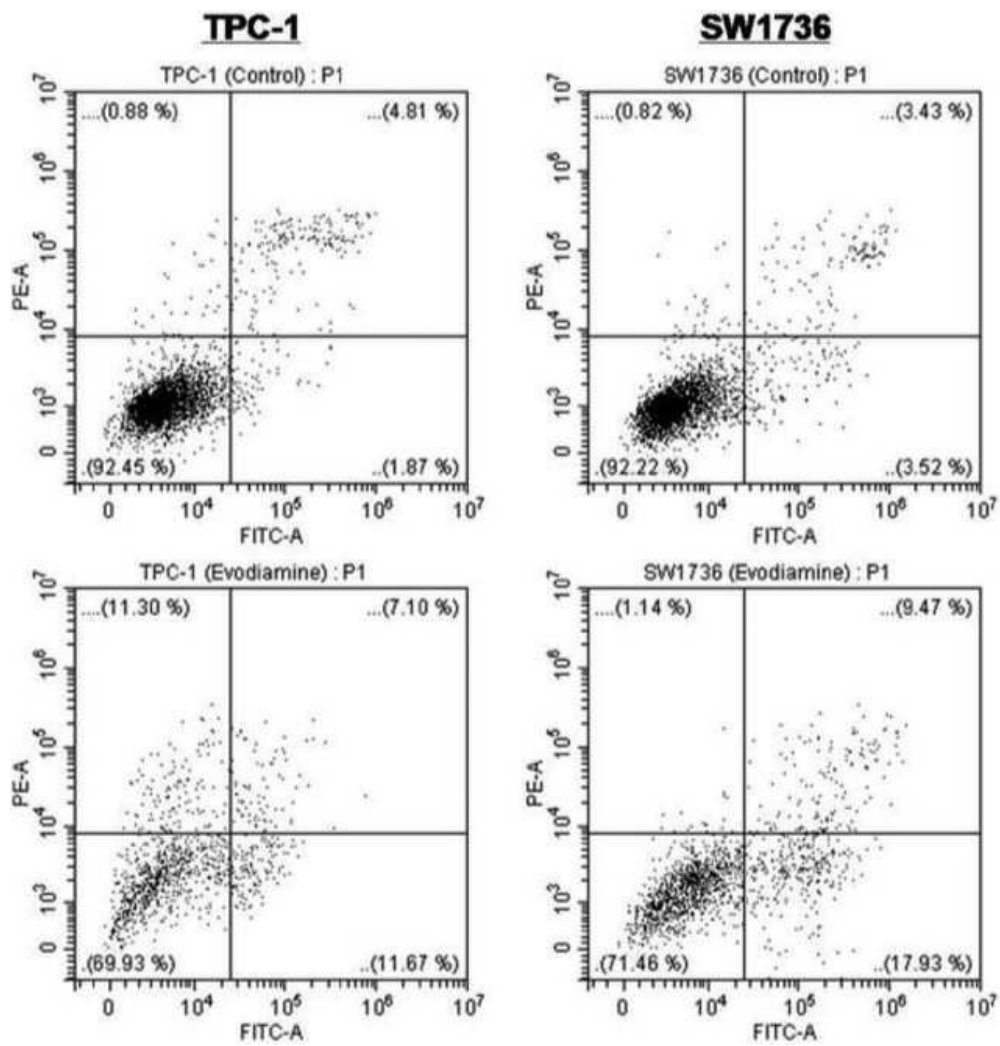
도면1a



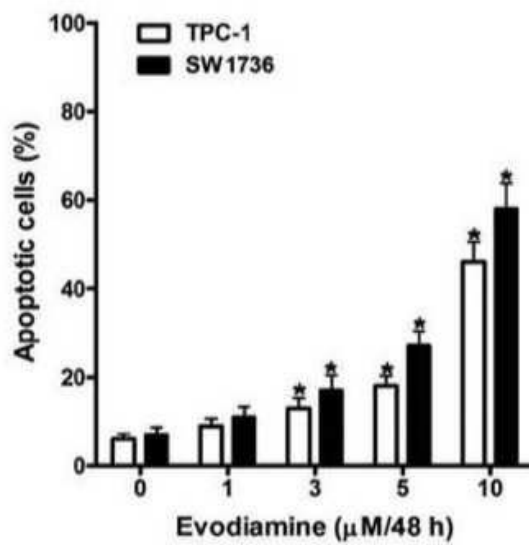
도면1b



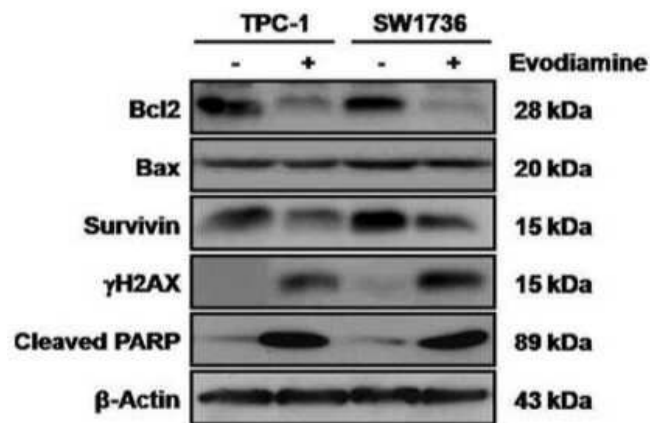
도면1c



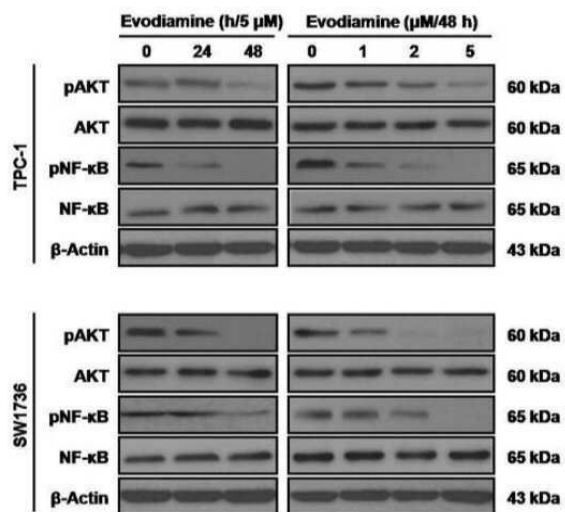
도면1d



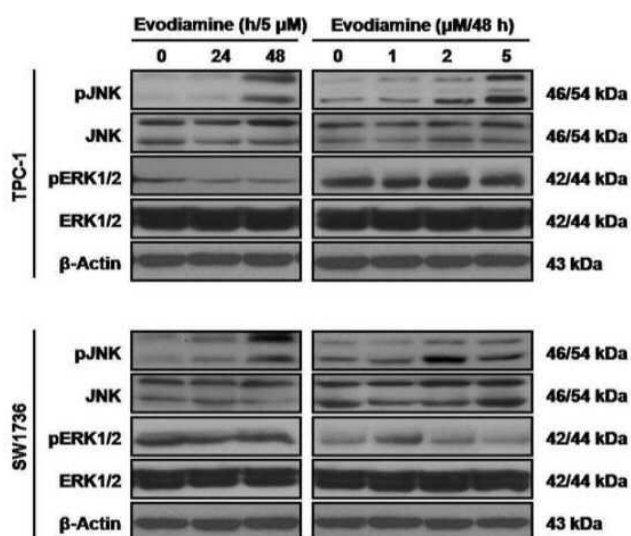
도면1e



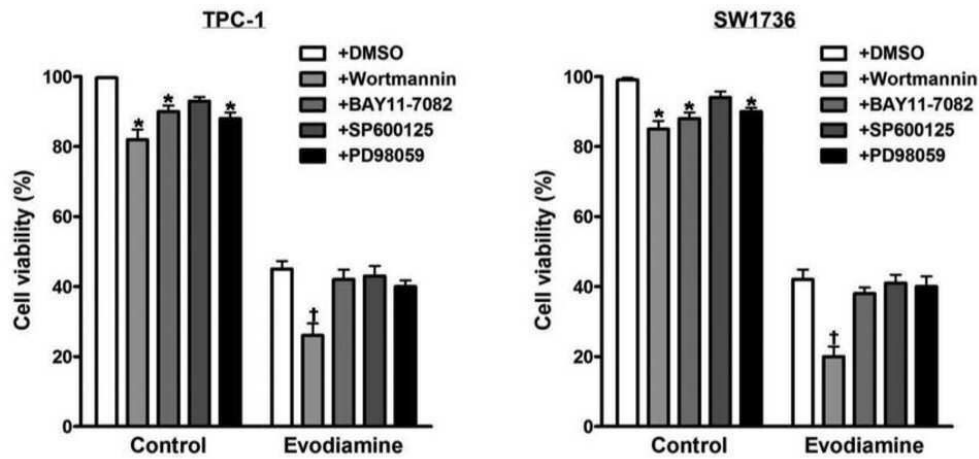
도면2a



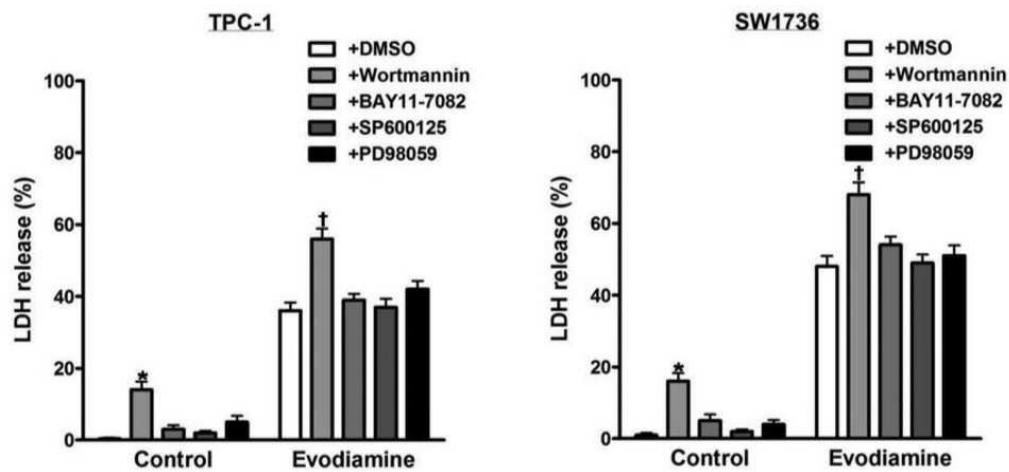
도면2b



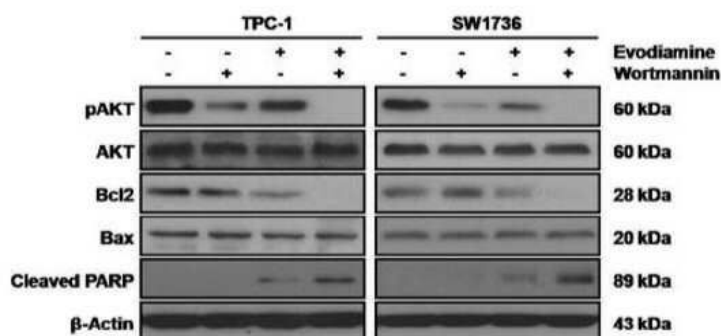
도면2c



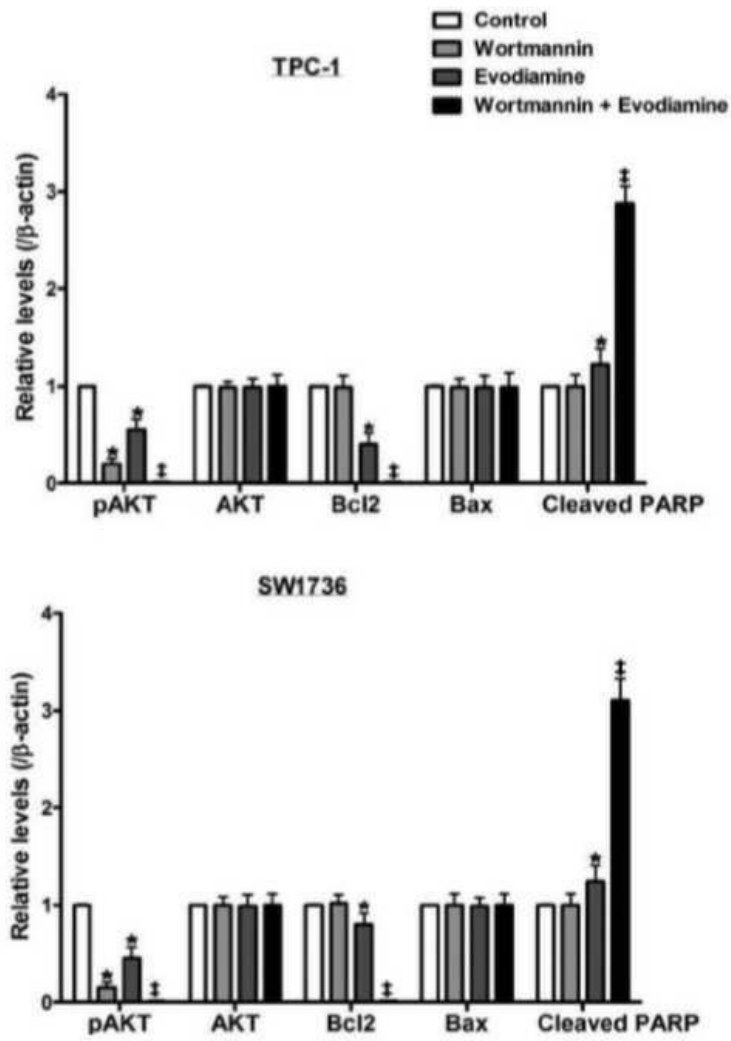
도면2d



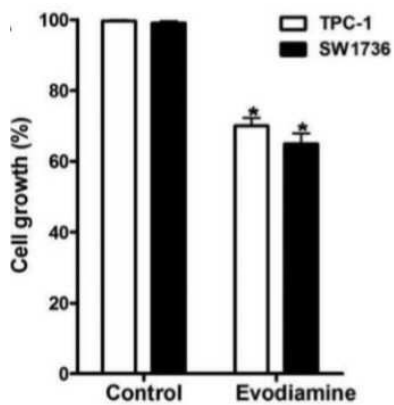
도면2e



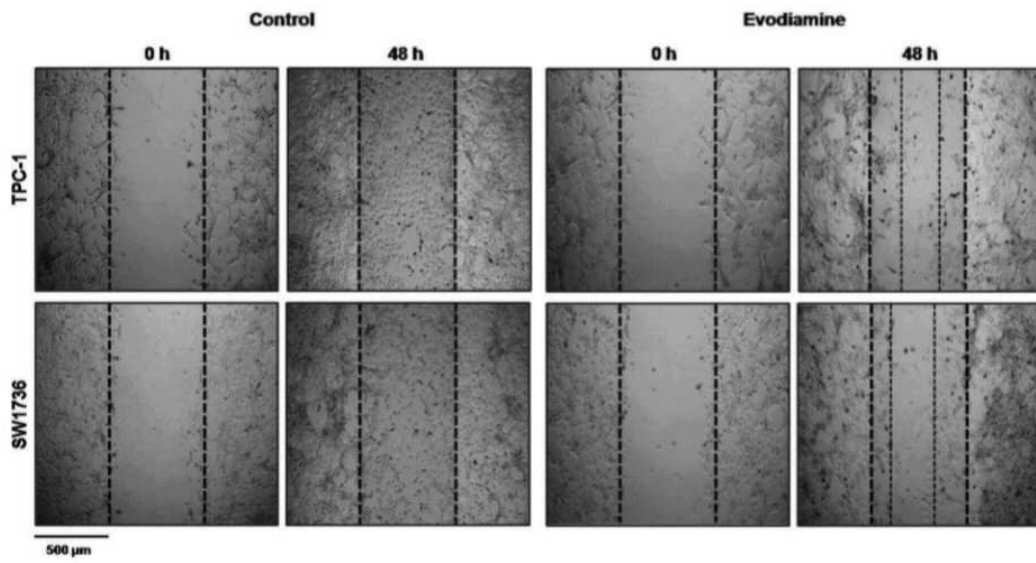
도면2f



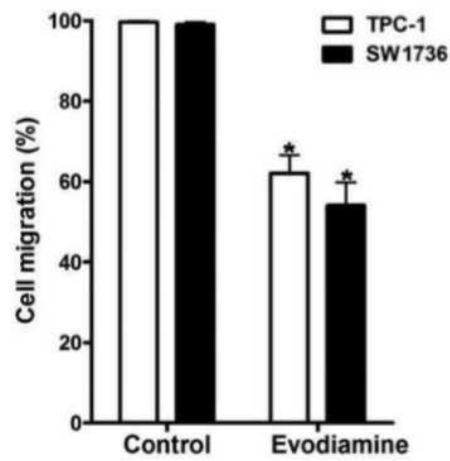
도면3a



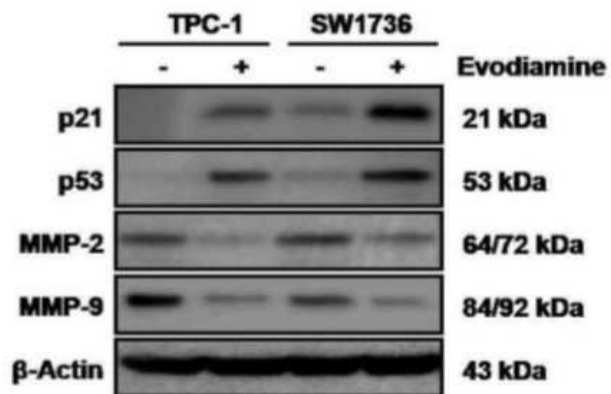
도면3b



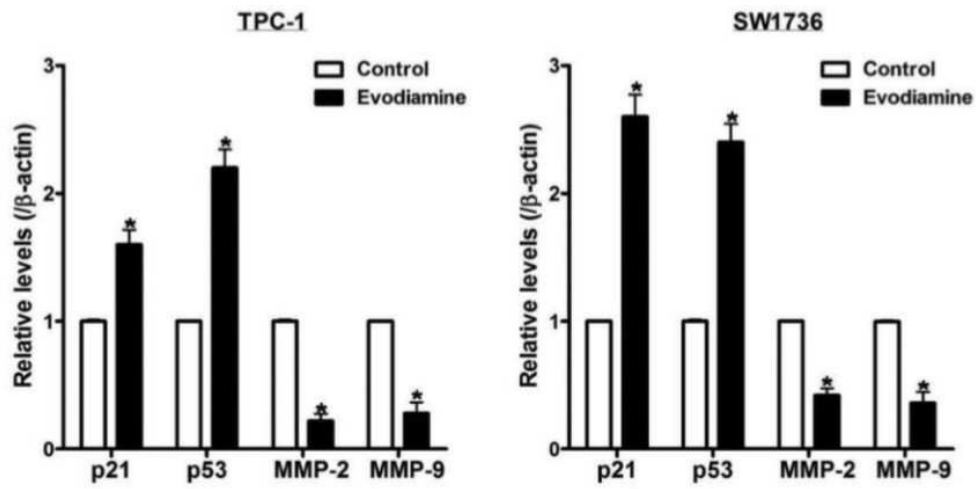
도면3c



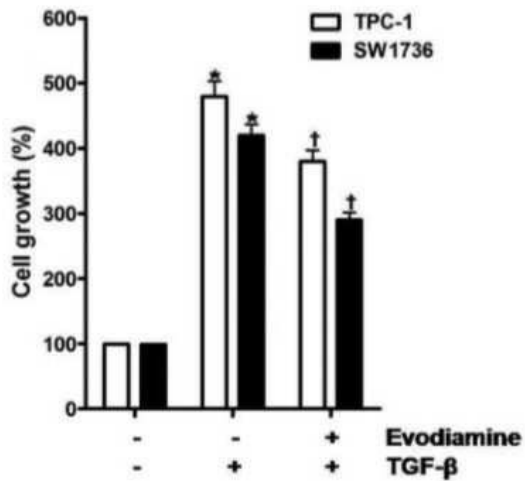
도면3d



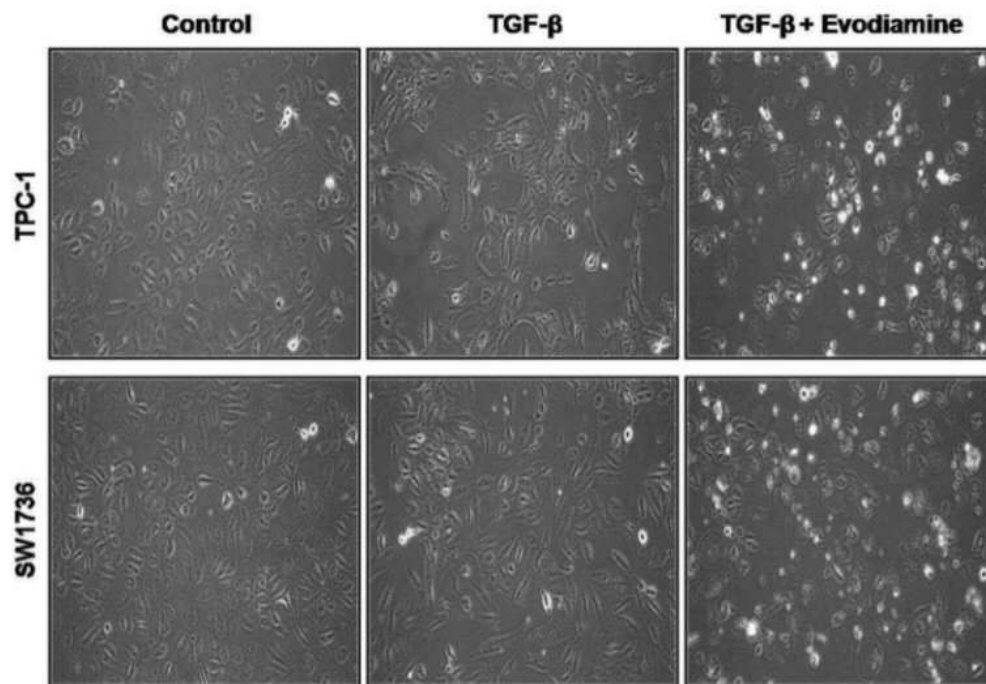
도면3e



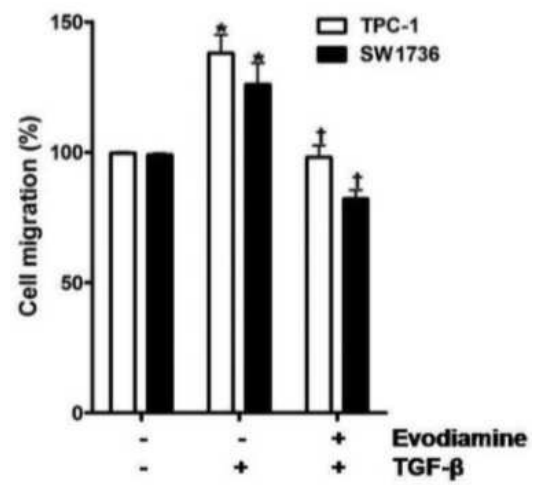
도면4a



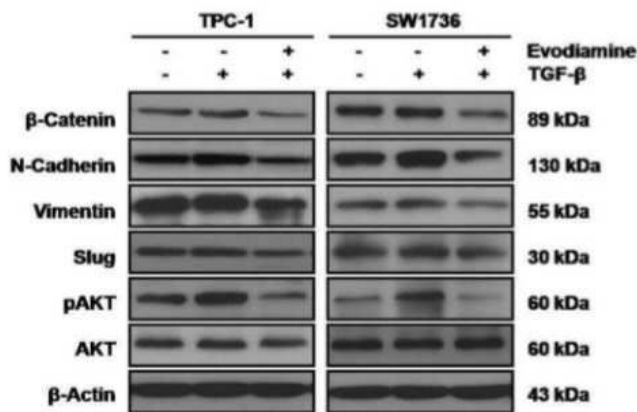
도면4b



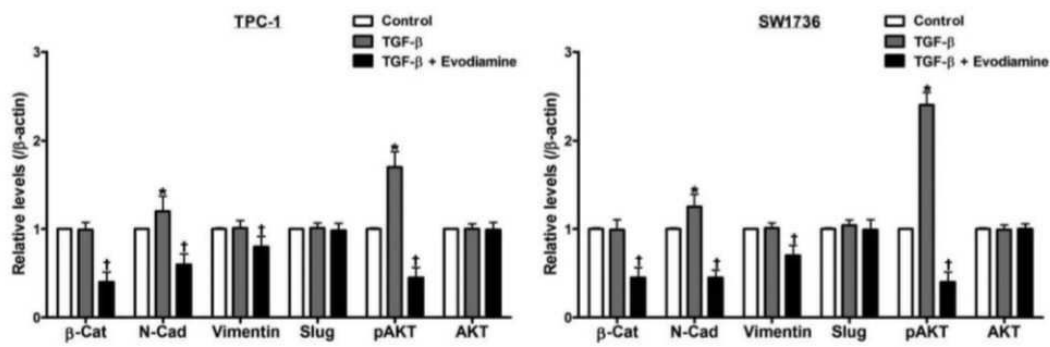
도면4c



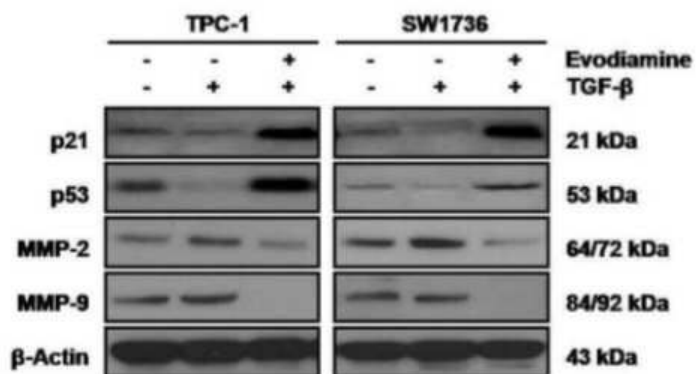
도면4d



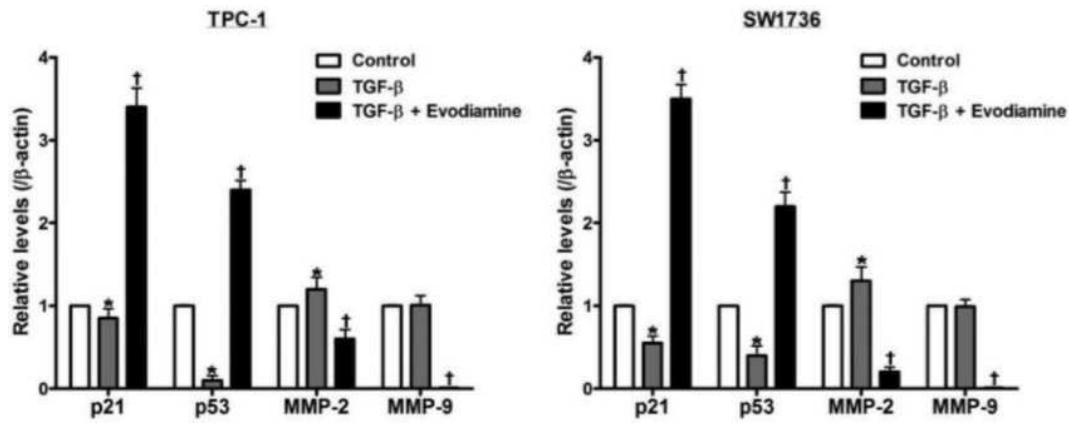
도면4e



도면4f



도면4g



도면5

