

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0058107
(43) 공개일자 2020년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/17 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)*A61P 35/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/17 (2013.01)*A61K 31/506* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0142694

(22) 출원일자 2018년11월19일

심사청구일자 2018년11월19일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김병수

서울특별시 강남구 압구정로 151, 201동 603호 (압구정동, 현대아파트)

김지혜

서울특별시 성동구 천호대로 400, 707호 (용답동, 신창비바패밀리)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

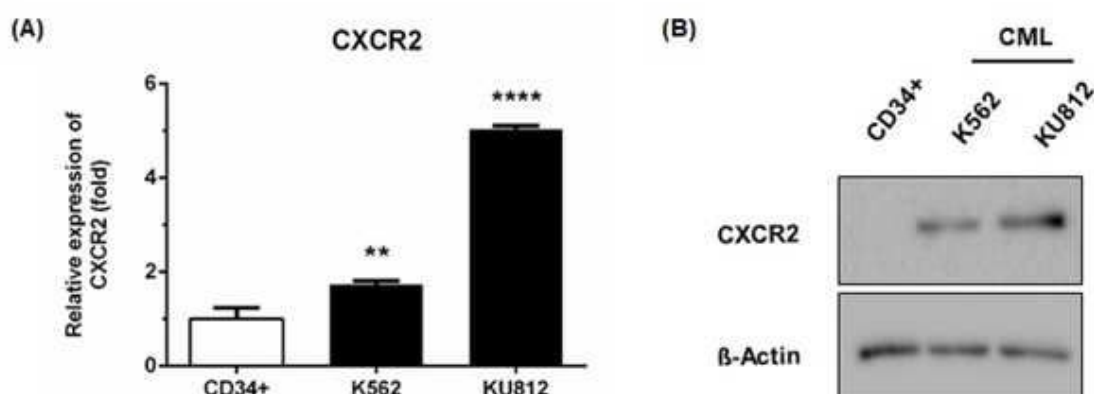
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 CXCR2 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/02 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

강가원

서울특별시 종로구 난계로 241, 1808호 (승인동,
IBC 오피스텔)

이승진

서울특별시 은평구 연서로11길 32-9 (구산동, 공작
타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C2072000018

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 KUMC Prudential Acceleration 전략을 통한 중개임상연구자 역량 강화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CXCR2 억제제는 CXCR2 발현 억제제 또는 CXCR2 길항제인, 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 CXCR2 길항제는 SB225002인, 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 티로신 인산화 효소 억제제에 감수성을 가지는 세포의 사멸을 촉진시키는 것인, 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 티로신 인산화 효소 억제제에 내성을 가지는 세포의 사멸을 촉진시키는 것인, 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 티로신 인산화 효소 억제제는 이마티닙인, 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

CXCR2 억제제 및 티로신 인산화 효소 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 만성 골수성 백혈병(Chronic myeloid leukemia; CML)은 조혈모 세포가 골수 내에서 대량 증식하여 비정상적으로 증가한 각종 혈구세포가 말초 혈액이나 기타 장기를 침습하는 악성 혈액 질환으로 성인에서 주로 발병하는 악성 혈액암이다. 만성 골수성 백혈병의 병인은 BCR 유전자와 ABL유전자의 염색체 전위로 나타나는 BCR-ABL 유전자 이상에 의한 티로신 인산화 효소 (tyrosine kinase)의 과발현으로 알려져 있으며, 이를 억제하는 이마티닙 (Imatinib) 등의 약제가 개발됨으로써 만성 골수성 백혈병의 치료효과가 매우 상승하였음은 주지의 사실이다.
- [0004] 그러나 BCR-ABL 티로신 인산화 효소 억제제(이하, BCR-ABL 억제제)의 사용으로 인해 ABL키나아제 도메인 내에서 다양한 점 돌연변이를 일으키며 돌연변이가 일어난 만성골수성 백혈병의 경우 치료가 어렵다. 또한 돌연변이를 갖지 않는 만성 골수성 백혈병에 있어 약물 치료에 실패한 환자의 경우 BCR-ABL에 독립적인 기전을 가지고 있을 것으로 예상된다. 이에, BCR-ABL 억제제 이외의 다른 세포 내 신호전달 경로를 억제할 수 있는 새로운 치료 표적을 발굴하고 이에 대한 치료제 개발이 절실히 요구되는 실정이다.
- [0005] 최근, 염증(inflammation) 및 세포사멸(apoptosis)과 관련된 세포 수용체인 CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2)에 대한 관심이 높아지고 있으며, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식 및 낭포성 섬유증 등의 치료를 위해 여러 CXCR2 억제제가 개발되고 있다. 또한, 고형암 세포에서 CXCR2를 억제하였을 때 암 세포의 생존, 침입 및 증식을 억제하고 AKT, MAPK 등의 신호전달을 억제하는 효과가 확인되었으며, 이는 CXCR2가 새로운 치료 표적으로 기능할 수 있다는 점을 시사한다.
- [0006] 한편, 혈액암의 경우 급성 골수성 백혈병 세포에서의 CXCR2 과발현과 나쁜 예후에 관계가 있는 것으로 밝혀진 바 있으나, 만성 골수성 백혈병에 대한 치료표적으로서 CXCR2의 유효성은 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 만성 골수성 백혈병 세포에서 CXCR2가 유효한 치료 표적이 될 수 있으며, 티로신 인산화 효소 억제제에 감수성이 있는 만성 골수성 백혈병 세포 뿐만 아니라 내성을 가지는 세포에도 치료 효과를 가지는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0013] 일 측에 따르면, 상기 CXCR2 억제제는 CXCR2의 발현 억제제 또는 CXCR2 길항제일 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 CXCR2 길항제는 SB225002일 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 티로신 인산화 효소 억제제에 감수성을 가지는 세포의 사멸을 촉진시키는 것일 수 있다.

- [0016] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 티로신 인산화 효소 억제제에 내성을 가지는 세포의 사멸을 촉진시키는 것일 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 티로신 인산화 효소 억제제는 이마티닙일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, CXCR2 억제제 및 티로신 인산화 효소 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물은 새로운 치료 표적으로서 CXCR2 수용체를 제시하며, 티로신 인산화 효소 억제제에 민감성을 가지는 만성 골수성 백혈병 세포 뿐만 아니라 내성을 가지는 세포의 사멸을 효과적으로 유도할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물은 티로신 인산화 효소 억제제와 병용으로 투여하는 경우 만성 골수성 백혈병 세포의 사멸을 현저하게 증가시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a는 조혈모세포(CD34+)와 만성 골수성 백혈병 세포주의 CXCR2 유전자 발현양을 실시간 중합효소 연쇄반응으로 측정한 것이고, 도 1b는 CXCR2 단백질 발현양을 웨스턴 블롯 분석법으로 측정한 것이다.
- 도 2a는 만성 골수성 백혈병 세포주에 CXCR2 억제제를 처리한 경우 핵 절편이 형성되는지 여부를 DAPI 형광염색으로 확인한 것이다. 도 2b는 조혈모세포(CD34+)와 만성 골수성 백혈병 세포주에 CXCR2 억제제를 처리한 경우 세포사멸 단백질의 증가여부를 확인한 것이다.
- 도 3a는 이마티닙 내성을 가지는 만성 골수성 백혈병 세포주에 CXCR2 억제제를 처리한 경우 세포사멸이 유도되는지 확인하기 위해 DAPI 형광염색으로 핵 절편 생성여부를 관찰한 것이고, 도 3b는 세포사멸 단백질인 cleavage-PARP의 발현이 증가하는지 여부를 관찰한 것이다.
- 도 4는 티로신 인산화 효소 억제제에 감수성을 가지는 만성 골수성 백혈병 세포주에 CXCR2 억제제와 이마티닙을 단독으로 처리한 경우 및 병용 처리한 경우의 세포 사멸효과를 확인한 것으로, 도 4a는 세포생존율을 나타내고, 도 4b는 도 4a의 결과를 바탕으로 한 약물 조합지수(combination index)를 나타낸다.
- 도 5는 티로신 인산화 효소 억제제에 내성을 가지는 만성 골수성 백혈병 세포주에 CXCR2 억제제와 이마티닙을 단독으로 처리한 경우 및 병용 처리한 경우의 세포 사멸효과를 확인한 것으로, 도 5a는 세포생존율을 나타내고, 도 5b는 도 4a의 결과를 바탕으로 한 약물 조합지수(combination index)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0026] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의

미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0028] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0029] 본 발명자들은 만성 골수성 백혈병 세포에서 CXCR(C-X-C motif chemokine receptor 2)를 억제하는 경우 세포사멸이 촉진되는 것을 확인함으로써 CXCR2가 새로운 치료 표적으로 유효하다는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명자들은 CXCR2 억제제가 1세대 티로신 인산화 효소 억제제인 이마티닙에 내성을 나타내는 만성 골수성 백혈병 세포의 사멸을 유도할 수 있음을 증명함으로써 신규한 CXCR2 표적 치료제에 관한 본 발명을 완성하였다.
- [0030] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML)"은 골수에서 골수 세포가 증가되어 조절되지 않는 성장 및 과도한 백혈구의 축적에 의해 야기된 혈액학적 줄기세포 질환을 의미하는 것으로, 필라델피아 염색체를 가진 조혈모 세포의 골수 내 비정상적인 증식에 의해 생기는 질환을 포함한다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2)"는 백혈구의 표면에 존재하고, 그에 대한 천연 생성 리간드가 Gro- α , β γ IL-8, ENA-78 또는 GCP-2인 사이토카인 수용체를 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명의 약학적 조성물의 투여로 만성 골수성 백혈병에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 CXCR2 억제제로는 CXCR2의 발현 억제제 또는 CXCR2의 길항제(antagonist)를 사용할 수 있다.
- [0035] CXCR2의 발현 억제제로는 CXCR2 mRNA에 특이적인 siRNA혹은 shRNA를 이용할 수 있으며, RNAi는 CXCR2 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, CXCR2 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다.
- [0036] RNA 간섭(RNA interference, RNAi)은 표적 유전자의 발현이 이중가닥 RNA(dsRNA)에 의해 상응하는 mRNA의 선택적 불활성화로 억제되는 과정이다. RNA 간섭효과는 세포내 세포질에 전달되는 이중가닥 RNA에 의해 활성화되고 이러한 메커니즘은 small interfering RNA(siRNA), short hairpin RNA(shRNA), bi-functional shRNA를 통해 표적 mRNA의 분해나 번역 억제를 유도할 수 있다.
- [0037] RNAi에 의해 CXCR2의 발현을 억제하는 물질로, shRNA 또는 상기 DNA를 포함하는 발현벡터 또는 상기 발현벡터를 함유하는 세포를 이용할 수 있으며, 예를 들어, 바이러스 벡터, 리포솜을 이용한 유전자 도입 방법을 이용하는 것이 가능하다. 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 (또는 바이러스 벡터)로는 렌티바이러스, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노부속바이러스 등을 예로 들 수 있다.
- [0038] 또한, CXCR2 길항제(antagonist)로는 공지된 물질은 제한없이 사용 가능하며, 예를 들어 SB225002를 이용할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 티로신 인산화 효소 억제제에 감수성을 가지는 세포의 사멸을 촉진시키거나, 티로신 인산화 효소 억제제에 내성을 가지는 세포의 사멸을 촉진시키는 것일 수 있다.
- [0040] 여기서, 상기 티로신 인산화 효소 억제제는 이마티닙일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 CXCR2 억제제를 단독으로 함유하거나, 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제, 방부제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.
- [0042] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또 한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸 -또는 프로필-파라벤 및 클로

로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0043] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 텍스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있으며, 예를 들어 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여 방법으로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 요법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 이는 제제화 방법, 투여경로 치료횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 증상, 투여시간 및 방법 등 다양한 요인들을 고려하여 결정될 수 있다. 이러한 점을 고려할 때, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 있어 특별히 제한되지 아니한다.
- [0050] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, CXCR2 억제제 및 티로신 인산화 효소 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 치료용 약학적 조성물이 제공된다. 이와 같이 CXCR2 억제제와 티로신 인산화 효소 억제제를 병용 투여하는 경우 티로신 인산화 효소 억제제를 적은 양으로 사용하여 부작용을 감소시킬 수 있으며, 동시에 약물에 대한 내성 발생확률을 낮출 수 있다.
- [0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 실시예 1: 만성 골수성 백혈병에 대한 치료 표적으로서 CXCR2의 유효성
- [0054] 조혈모세포(CD34+)와 만성 골수성 백혈병 세포주(K562, KU812)에서 CXCR2 mRNA 발현양과 단백질 발현양을 각각 실시간 중합효소 연쇄반응 (real time PCR), 웨스턴 블롯으로 측정하였다.
- [0055] 먼저, total RNA를 TRIZOL (invitrogen)을 사용하여 매뉴얼에 따라 세포로부터 추출하였다. 1μg의 total RNA를 cDNA합성 키트 (Intron)를 이용하여 cDNA로 전사하고, CXCR2의 양을 정량분석하기 위해 합성된 cDNA를 SYBR Green (Bio Rad)를 이용하여 real time PCR로 분석하였으며, 사용된 프라이머는 다음과 같다:
- [0056] <Real time PCR primer>
- [0057] 정방향: 5 ‘-CAATGAATGAATGAATGGCTAAG-3’
- [0058] 역방향: 3 ‘-AAAGTTTCAAGGTCGTCCGTGTT-5’
- [0059] <GAPDH primer>

- [0060] 정방향: 5' -GAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'
- [0061] 역방향: 3' -TTCACCCCATGACGAACAT-5'
- [0062] 그 다음, CXCR2 단백질 발현양을 측정하기 위해 웨스턴 블롯 (western blot)을 실시한 후 protein lysis buffer (Intron)를 이용해 단백질을 추출하여 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 젤에 걸어 주었다.
- [0063] 그 결과, 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 만성 골수성 백혈병 세포는 대조군인 조혈모 세포에 비해 CXCR2의 mRNA, 단백질 발현양이 모두 높았으며, 이를 통해 CXCR2 억제제를 통한 만성 골수성 백혈병의 치료 가능성을 확인할 수 있었다.
- [0065] 실시예 2: CXCR2 억제제의 만성 골수성 백혈병 세포사멸 촉진 효과
- [0066] 2-1. 티로신 인산화 효소 억제제 감수성 세포
- [0067] 만성 골수성 백혈병 세포주(K562, KU812)에 CXCR2 억제제 SB225002를 1 μ g/ml로 처리한 24시간 뒤 세포를 모아 4% formaldehyde로 고정시켜 DAPI 형광염색을 수행한 다음, 형광현미경을 통해 핵의 절편이 형성되는지를 관찰하였다. 또한, 정량 분석을 위해 현광현미경 상에서 보이는 전체 세포수를 세고 그 중 핵의 절편이 보이는 세포가 얼마나 되는지를 센 다음, 페센트로 나타내어 그래프로 나타냈다.
- [0068] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, CXCR2 억제제를 처리하지 않은 대조군에 비해 CXCR2 억제제를 처리한 세포주에서 핵의 절편이 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0069] 다음으로, 만성 골수성 백혈병 세포주에 CXCR2 억제제 SB225002를 1 μ g/ml로 24시간 동안 처리한 후 단백질을 추출하여 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 젤에 걸어주었다. 세포사를 확인하기 위한 마커인 cleavage-PARP, cleavage-caspase 3, caspase 8 안티바디 (cell signaling technologies)를 사용하여 세포사멸 단백질의 발현양을 관찰하였다.
- [0070] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, CXCR2 억제제를 처리한 세포주에서 cleaved-PARP, cleaved-caspase-3 및 caspase-8 밴드가 관찰되어 CXCR2에 의해 CML 세포주의 사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다.
- [0072] 2-2. 티로신 인산화 효소 억제제 내성 세포
- [0073] 만성 골수성 백혈병 세포주(K562, KU812)에 먼저 이마티닙을 10ng/ml 농도로 처리한 다음, 일주일마다 2배씩 농도를 증가시켜 최종적으로 1 μ g/ml의 이마티닙을 처리함으로써 이마티닙 내성을 갖는 만성 골수성 백혈병 세포주(K562/IR, KU812/IR)를 제작하였다.
- [0074] 제조한 이마티닙 내성 세포주에 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 CXCR2를 처리한 다음, 세포사멸이 유도되는지 확인하기 위해 핵 절편 생성과 세포사멸 단백질 발현양을 측정하여 도 3a 및 3b에 나타냈다.
- [0075] 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, 이마티닙 내성 세포주에서 1 μ g/ml 농도의 CXCR2 억제제를 처리한 경우 핵의 절편이 증가하고, 세포사멸 단백질인 cleaved-PARP의 발현이 증가하는 것이 확인되었다.
- [0076] 상기와 같은 결과는 CXCR2 억제제가 이마티닙에 민감성이나 내성을 가지는 만성 골수성 백혈병 세포주 모두에서 세포사멸을 유도할 수 있음을 시사한다.
- [0078] 실시예 3: CXCR2 억제제와 티로신 인산화 효소 억제제를 병용투여 효과
- [0079] 3-1. 티로신 인산화 효소 억제제 감수성 세포
- [0080] 96well plate에 1×10^4 cells/well로 티로신 인산화 효소 억제제에 감수성을 가지는 만성 골수성 백혈병 세포를 깔아주고, 24시간 후 0.1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml의 이마티닙과 CXCR2억제제를 각각 처리하고, 1:1의 비율로 혼합하여 병용 처리하였다. 약물을 처리한지 48시간 후에 CCK-8 용액을 이용하여 약물의 병용투여 효과를 확인하였다.
- [0081] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 만성 골수성 백혈병 세포주에 두 가지 약물을 병용 처리하는 경우 약물을 단독으로 사용한 경우보다 세포 생존율이 낮게 나타나, 보다 효과적으로 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수

있었다.

다음으로, CCK-8을 이용하여 얻은 결과를 바탕으로 Chou-Talalay 방법을 이용하여 약물 조합에 대한 시너지 효과를 확인하였다. Compusyn software를 이용하여 값과 그래프를 얻은 다음 조합지수 (combination index)는 약물 조합에서 부가 효과 (CI=1), 상승작용 (CI<1) 및 길항 작용 (CI>1)으로 정의하여 그 값을 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

Total Dose	K562 CI Value	KU812 CI Value
0.2	0.03	0.14
1	0.10	0.14
2	0.16	0.17
10	0.74	0.60
20	1.36	1.10
100	5.15	3.44

표 1과 도 4b에 나타난 바와 같이, 이마티닙과 CXCR2 억제제를 각각 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml로 병용 처리하였을 때 만성 골수성 백혈병 세포주 모두 CI 값이 1 이하로 나타나 시너지 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었으며 병용 처리 시 낮은 농도에서도 높은 효과를 나타냈다.

3-2. 티로신 인산화 효소 억제제 내성 세포

상기 실시예 2-2에 기재된 방법과 동일하게 만성 골수성 백혈병 내성 세포주를 제작하고, 실시예 3-1과 마찬가지로 이마티닙과 CXCR2 억제제를 농도별로 각각 내성 세포주에 처리하거나 병용 처리하여 약물 조합의 시너지 효과를 확인하였다.

그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 만성 골수성 백혈병 세포주에 두 가지 약물을 병용 처리하는 경우 약물을 단독으로 사용한 경우보다 세포 생존율이 낮게 나타나, 보다 효과적으로 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 상기 결과를 바탕으로 시너지 효과를 확인한 결과, 조합지수(CI)는 하기 표 2와 같이 나타났다.

표 2

Total Dose	K562 CI Value	KU812 CI Value
0.2	10.06	10.06
1	0.31	0.24
2	0.15	0.56
10	0.59	0.56
20	1.18	1.02
100	2.80	4.01

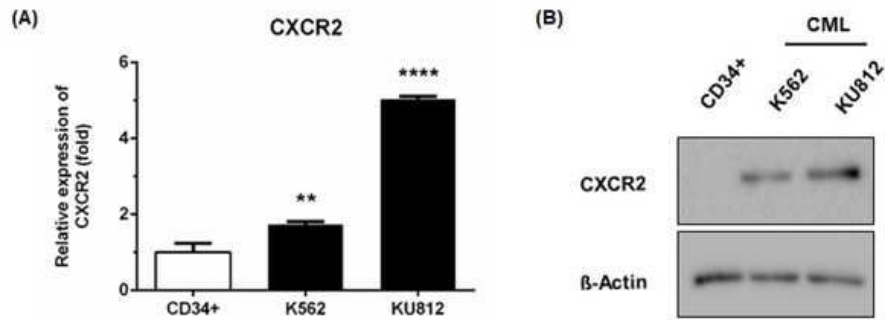
표 2와 도 5b에 나타난 바와 같이, 이마티닙과 CXCR2 억제제를 각각 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml로 병용 처리하였을 때 만성 골수성 백혈병 내성 세포주 모두 CI 값이 1 이하로 나타나 시너지 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 병용 처리 시 낮은 농도에서도 높은 효과를 나타냈다.

이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

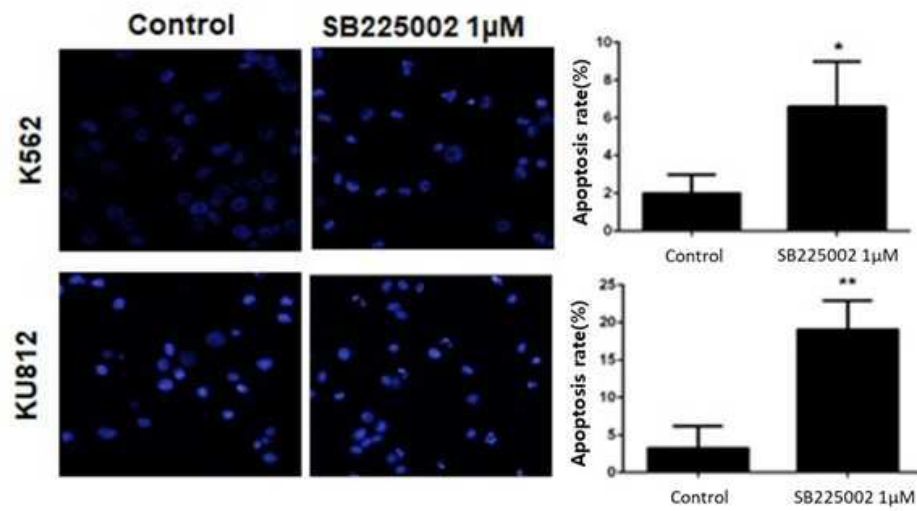
그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

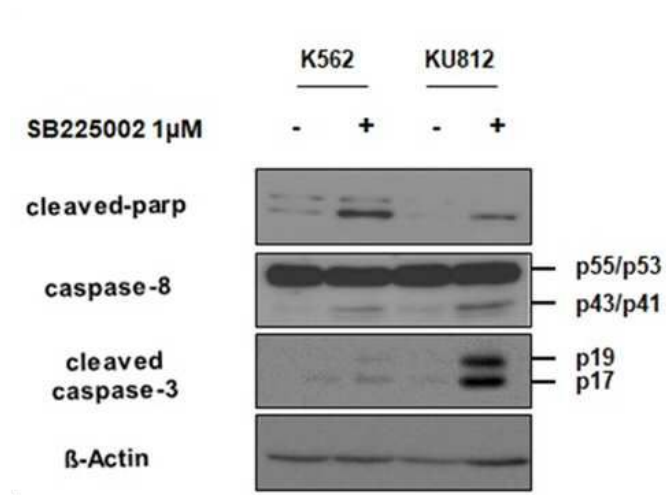
도면1



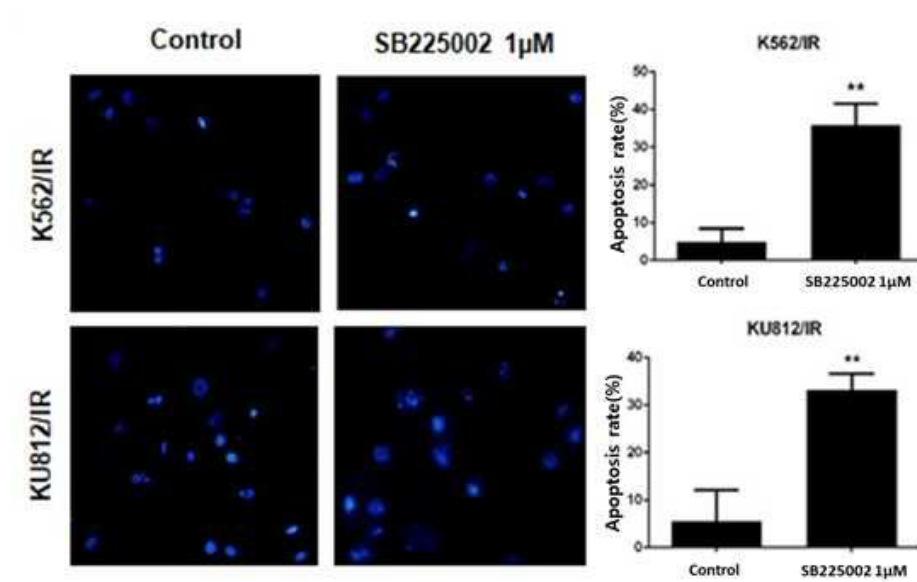
도면2a



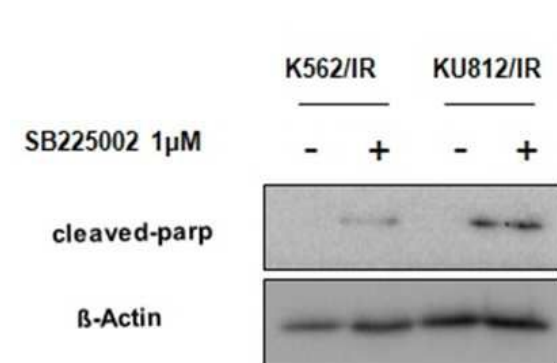
도면2b



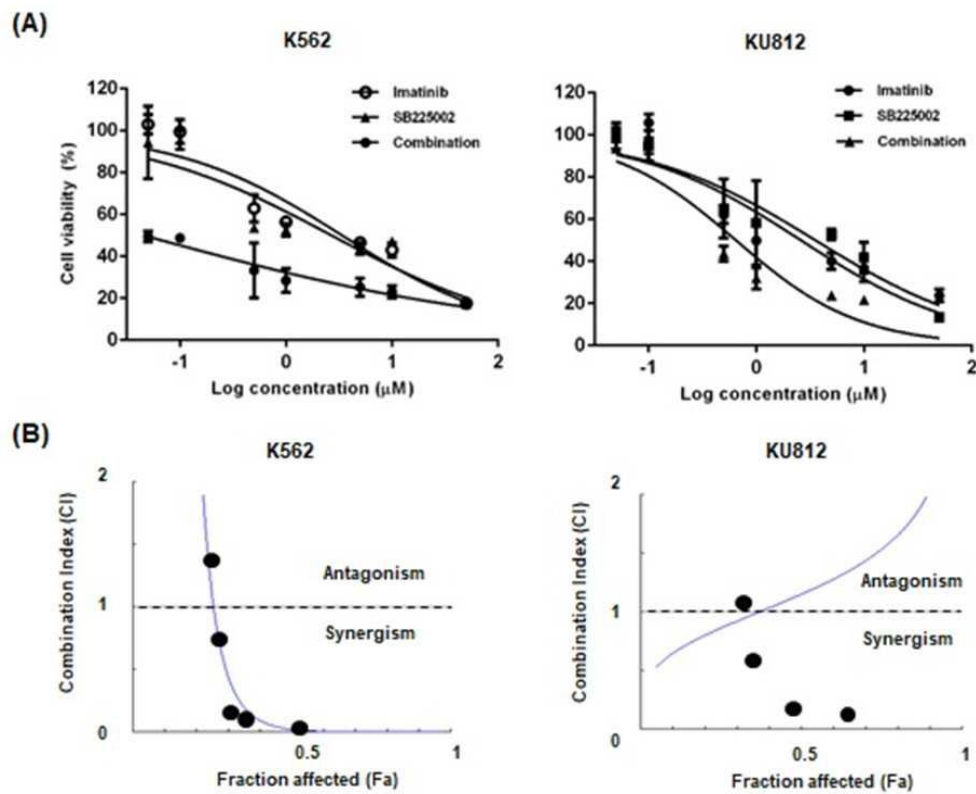
도면3a



도면3b



도면4



도면5

