



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월26일

(11) 등록번호 10-1598122

(24) 등록일자 2016년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/44 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/44 (2013.01)

A23L 1/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0050942

(22) 출원일자 2015년04월10일

심사청구일자 2015년04월10일

(56) 선행기술조사문헌

KR101473965 B1

(73) 특허권자

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

홍순선

서울특별시 은평구 은평터널로 167, 402호 (신사동, 굿모닝기쁨아파트)

정경희

경기도 부천시 소사구 경인로484번길 68-7, 102동 1105호 (괴안동, 신일해피트리아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

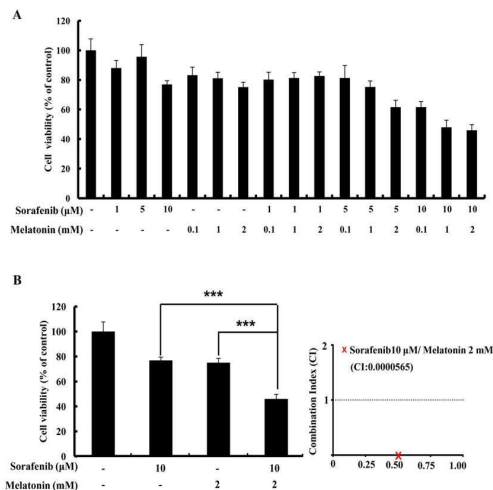
심사관 : 이수형

(54) 발명의 명칭 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 소라페닙 및 멜라토닌은 미토콘드리아 연관 아포토시스를 유의적으로 유발시킴으로써, 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 단독 투여에 비해 현저하게 우수하므로, 췌장암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4045 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

방정환

인천광역시 남구 아암대로29번길 53-22, 203 (용현동)

박정희

경기도 수원시 권선구 경수대로225번길 68-36 (세류동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014009392

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초의약학(MRC)

연구과제명 (국고)저산소 관련 질환 치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 소라페닙 및 멜라토닌은 0.1~1:10~200의 물비로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 소라페닙 및 멜라토닌은 아폽토시스를 유발시키는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 소라페닙 및 멜라토닌은 Bcl-2, survivin, Mcl-1 및 XIAP 단백질 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 소라페닙 및 멜라토닌은 caspase 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 췌장암은 췌관선암, 낭종선암 또는 내분비종양인 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

췌장암(pancreatic cancer)은 다른 암에 비해 발생 빈도는 낮으나, 기간별 암환자 사망률이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 췌장암은 조기 진단이 어려운 암으로, 주변 장기나 림프절로 쉽게 전이되는 특징이 있어, 예후가 다른 암들에 비해 좋지 않아 췌장암 치료를 위한 여러 노력에도 불구하고, 췌장암 발병 후 5년간의 생존율은 지난 30년 동안 개선되지 않았으며, 췌장암으로 인한 사망률은 계속 높아져 암 질환으로 인한 사망 중에서 5위를 차지하고 있다. 또한, 보건복지부 암등록 본부에서 공개한 자료에 따르면, 췌장암 발병 후 1년 이내의 사망률은 췌장암 발병 환자의 약 80%를 차지하는 것으로 조사되어, 췌장암 환자의 생존율 또한 매우 낮은 것으로 확인되었다. 췌장암을 치료하기 위한 요법으로는 화학요법과 방사선요법이 실시되고 있으나, 치료 효과는 매우 낮으며 췌장암에서 가장 많이 사용하는 항암제인 젬시타빈(gemcitabine)의 경우 피리미딘 항대사물질로서 췌장암 환자에 사용되고 있으나 그 효율은 6-11%인 것으로 낮아 옥살레이트(Oxalate)나 5-FU(5-fluorouracil) 등의 다른 약물과 함께 병용하여 사용되고 있으나 췌장암 환자의 유의적인 생존률 증가에는 영향을 미치지 못하고 있다. 실제로 췌장암에 사용되도록 승인받은 약물임에도 불구하고 젬시타빈은 췌장암 생존률에는 큰 영향을 미치지 못

하는 것으로 확인되고 있어, 췌장암을 치료할 수 있는 새로운 약물의 개발 및 다른 약물과 함께 병용할 수 있는 새로운 투여요법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0003] 한편, 소라페닙(일반명 Sorafenib; 상품명 Nexavar, 넥사바)은 바이엘(Bayer)과 오닉스(Onyx Pharmaceuticals)가 개발한 항암제로, 신장암과 간암 치료제로 미국 FDA의 승인을 받은 항암제로, VEGFR, PDGFR 및 Raf와 같은 키나아제 단백질의 활성을 막는 다중 키나아제 저해제(multiple kinase inhibitor)이다. 소라페닙의 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 문제점도 지적되었다.

[0004] 멜라토닌은 뇌에서 생성되는 호르몬으로 뇌의 송과선에서 트립토판이라고 하는 아미노산에 의하여 만들어지며 합성과 분비는 주로 밤에는 촉진되고 낮에는 억제됨으로써 24시간 하루 주기(일주기)에 관여한다고 알려져 있다. 또한, 노화, 항산화, 및 항염증 등 다양한 신체 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 항암제투여에서 가장 중요한 것은 암세포를 사멸하는 것인데 이 과정을 아포토시스라고 한다. 이는 세포의 유전자안에 프로그램화 되어있는 죽음의 장치가 가동되어 일어나는 세포의 자기소멸 (즉 자살을 뜻함)로서 생물이 살아남에 있어서 불가피한 요소 및 생리학적 과정으로서 태아발달단계 뿐만 아니라 성인 조직에 있어서도 매우 다양한 작용을 하고 있다. 아포토시스를 일으키는 경로는 내인성과 외인성 경로로 구분 짓는데 내인성 경로는 미토콘드리아 연관경로 아포토시스라고도 하며 DNA 손상, 사이토카인, 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS) 등의 자극으로 인하여 미토콘드리아 투과도 전이 미세공 (mitochondrial permeability transition pore) 이 열리게 된다. 이때 미토콘드리아의 막전위조절 능력이 파괴되면서 시토크롬 c (cytochrome c)라는 아포토시스 개시 단백질을 세포질로 유출되어 apoptotic protease activating factor 1(APAF1) 및 caspase-9과 결합하여 apoptosome을 형성함으로써 세포사멸을 유도하게 된다. 또한 외인성 경로는 Fas (TNF receptor superfamily member 6), tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 같은 tumor necrosis factor family에 의해서 유발되고, Fas-associated protein with death domain(FADD) 또는 TNFRSF1A-associated via death domain(TRADD) adaptor와 결합하여 apoptosis 신호를 세포 내로 전달함으로써 apoptosis 관련 시스템인 캐티다제인 caspase-8/caspase-3 경로를 통해 세포사멸을 유도한다. 하지만 암세포에 있어서 이와 같은 아포토시스는 그 기능이 고장나 무한증식을 반복함으로써 거의 영구적으로 살아가는 비정상적인 생명주기를 갖고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 새로운 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 연구를 수행한 결과, 소라페닙 및 멜라토닌이 미토콘드리아 관련 아포토시스 신호경로를 유발시킴으로써, 암세포의 증식억제 및 암세포 사멸을 일으키는 효과가 우수함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

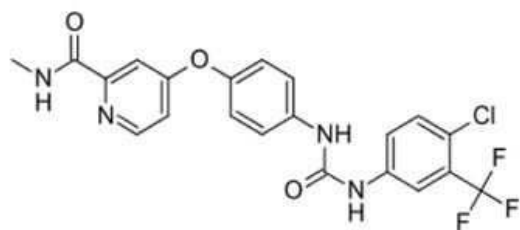
[0010] 본 발명에 따른 소라페닙 및 멜라토닌은 미토콘드리아 연관 아포토시스를 유의적으로 유발시킴으로써, 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 단독 투여에 비해 현저하게 우수하므로, 췌장암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

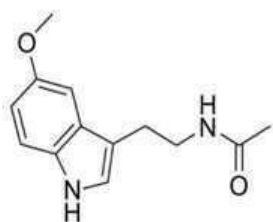
- [0011] 도 1은 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포의 세포독성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포에서 아폽토시스 유발 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포에서 미토콘드리아 연관 아폽토시스 유발 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포에서 아폽토시스 연관 단백질들의 변화를 나타낸 도이다.
- 도 5는 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포에서 활성산소종 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 소라페닙 및 멜라토닌을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 유효성분인 소라페닙(sorafenib)은 넥사바(Nexavar)로 불리는 VEGFR, PDGFR, Raf를 표적으로 하는 멀티 키나아제 저해제로서 하기 화학식 1로 표시되며, 4-(4-(3-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)-N-methylpicolinamide($C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$)이다.
- [0015] [화학식 1]



- [0016]
- [0017] 본 발명의 또 다른 유효성분인 멜라토닌(melatonin)은 뇌에서 생성되는 호르몬으로 하기 화학식 2로 표시되며, N-Acetyl-5-methoxytryptamine($C_{13}H_{16}N_2O_2$)이다.
- [0018] [화학식 2]



- [0019]
- [0020] 본 발명의 소라페닙 및 멜라토닌은 0.1~1:10~200의 몰비로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 1:200의 몰비로 혼합될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 췌장암(pancreatic cancer)은 췌장에 생긴 암세포로 이루어진 종양으로, 췌관선암, 낭종선암 또는 내분비종양일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 소라페닙 및 멜라토닌을 포함하는 조성물을 이용하여 췌장암 증상을 차단하거나, 췌장암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "치료"는 본 발명의 소라페닙 및 멜라토닌을 포함하는 조성물을 이용하여 췌장암 증상이 호

전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

- [0024] 본 발명의 소라페닙은 세포 사멸 효과가 우수하며, 멜라토닌은 ROS에 의한 암세포 증식을 억제하고 다양한 암세포 신호전달 경로를 차단하는데 효과가 우수하다.
- [0025] 특히, 본 발명에 따른 소라페닙 및 멜라토닌을 병용 투여할 경우, 미토콘드리아 연관 아포토시스를 유의적으로 유발시킴으로써, 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 단독 투여에 비해 현저하게 우수하므로, 체장암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0026] 따라서, 소라페닙 및 멜라토닌은 체장암의 예방 또는 치료에 유용한 의약품 또는 건강기능식품으로 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물이 체장암의 예방 또는 치료를 목적으로 약학적 조성물로 제형화 될 경우, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 그러나 경구 투여 시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 소라페닙 및 멜라토닌과 함께 체장암의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 체장암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 조성물은 체장암의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어, '건강기능식품'이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체 조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.

- [0035] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예 방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0038] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [0039] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0040] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0041] **실시예 1. 재료의 준비**
- [0042] **1-1. 소라페닙의 준비**
- [0043] 소라페닙은 *p*-톨루엔설폰산염(*p*-Toluenesulfonate Salt, >99%)을 LC Laboratories사에서 구입한 후 DMSO (실험시 최종농도 0.1%이하)에 녹여서 사용하였다.
- [0044] **1-2. 멜라토닌의 준비**
- [0045] 멜라토닌은 Sigma-Aldrich사에서 구입한 후 DMSO (실험시 최종농도 0.1%이하)에 녹여서 사용하였다.
- [0046] **실험예 1. 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포의 성장 저해 활성 측정**
- [0047] 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 췌장암 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 췌장암 세포주인 MiaPaca-2에 1 내지 10 μ M 농도의 소라페닙 및 0.1, 1 및 2 mM 농도의 멜라토닌을 상호 조합하여 24시간 동안 병용 처리한 후 MTT 분석을 수행하여 세포 독성을 평가하였다. 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였다. 이때, 소라페닙과 멜라토닌의 병용처리 및 각각의 단독처리에 대한 세포독성 평가 결과를 비교하기 위하여, MTT 분석을 통해 산출된 측정값을 이용하여 CalcuSyn software(Biosoft)로 조합률(combination index)(CI) 수치를 산출하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0048] 도 1에 나타낸 바와 같이, MiaPaca-2 세포 주에서 10 μ M 소라페닙 및 2 mM 멜라토닌을 병용 처리한 실험군이 가장 높은 수치를 확인하였다. 이는 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 경우 췌장암 세포의 성장이 가장 저해됨을 나타낸다.

[0049] **실험예 2. 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포의 세포 사멸 유도 작용 측정**

[0050] 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 췌장암 세포의 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, TUNEL 분석 및 Annexin-V 분석을 수행하였다.

[0051] 먼저, 췌장암 세포주인 Miapaca-2에 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 TUNEL 분석을 수행하고, 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였으며, 이를 도 2a에 나타내었다.

[0052] 도 2a에 나타난 바와 같이, 소라페닙과 멜라토닌의 단독 처리에서는 TUNEL 양성 세포가 조금 증가되는 반면, 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리에서는 높은 수준의 TUNEL 양성 세포가 관찰되었다.

[0053] 또한, 상기 세포주에 대하여 Annexin 분석을 수행하였으며, 이를 도 2b에 나타내었다.

[0054] 도 2b에 나타난 바와 같이, 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 경우 단독 처리에 비해 높은 수준의 세포 사멸이 유도됨을 확인하였다.

[0055] 또한, Miapaca-2에서 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 세포분열능력에 미치는 영향을 확인하기 위해 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 FACS 분석을 통해 세포 주기 기여도를 측정하였으며, 그 결과를 도 2c에 나타내었다.

[0056] 도 2c에 나타난 바와 같이, 소라페닙과 멜라토닌의 단독 처리에서는 sub-G1기의 증가가 낮은 반면 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 실험군에서는 sub-G1기의 상당한 증가가 관찰되었다.

[0057] **실험예 3. 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리 한 췌장암 세포의 미토콘드리아 막전위의 변화 측정**

[0058] 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향을 확인하기 위해 췌장암 세포주인 Miapaca-2 세포주에 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 JC-1 형광염색을 수행하였다. 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였으며, 그 결과를 도 3a에 나타내었다. JC-1은 미토콘드리아 내에서 살아있는 세포에서는 빨간색 파장을 내고 세포질 안에서 죽어있는 세포에서는 초록색 파장을 내며 축적된다.

[0059] 도 3a에 나타난 바와 같이, 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 실험군에서 빨간색 파장이 줄어들고 많은 세포에서 초록색 파장이 증가된 것을 관찰하였다.

[0060] 또한, 미토콘드리아의 막전위를 확인하기 위하여, 내인성 아포토시스가 개시될 때 미토콘드리아 내막에서 세포질로 분비되는 시토크롬 c의 형광염색을 수행하였으며, 그 결과를 도 3b에 나타내었다.

[0061] 도 3b에 나타난 바와 같이, 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 실험군에서 시토크롬 c가 미토콘드리아 밖에서 염색되는 것을 통해 아포토시스가 일어남을 확인하였다.

[0062] 또한 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 미토콘드리아의 막전위 변화와 연관이 있음을 확인하기 위하여 상기과 동일한 방법으로 TMRE 형광염색을 수행하였으며, 그 결과를 도 3c에 나타내었다.

[0063] 도 3c에서 나타난 바와 같이, 소라페닙과 멜라토닌을 각각 처리한 실험군에 비해 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 실험군에서 TMRE가 현저하게 감소됨을 확인하였다.

[0064] **실험예 4. 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처리한 췌장암 세포의 미토콘드리아 막전위의 변화에 의한 세포 사멸 유도 작용 확인**

[0065] 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해 Miapaca-2 세포주에 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 미토콘드리아와 관련된 항아포토시스 단백질인 Bcl-2, survivin, Mcl-1 및 XIAP의 발현정도를 분석하였다. 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였으며, 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0066] 도 4a에 나타난 바와 같이, 소라페닙과 멜라토닌을 단독 처리한 실험군에 비해 소라페닙 및 멜라토닌을 병용처

리 한 실험군에서 Bcl-2, survivin, Mcl-1 및 XIAP의 발현이 현저하게 감소하였다.

[0067] 또한 췌장암 세포주인 Miapaca-2에 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 cleaved caspase-3의 활성을 측정하였다. 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였으며, 그 결과를 도 4b에 나타내었다.

[0068] 도 4b에 나타난 바와 같이, 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리한 실험군에서 cleaved caspase-3의 활성화로 잘 알려진 cleaved PARP의 발현이 증가되었다.

[0069] 이는 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 미토콘드리아의 신호전달 경로를 조절함으로써 미토콘드리아 연관 단백질의 발현을 억제하고 cleaved caspase-3 활성을 증가시켜 세포사멸을 유도함을 나타낸다.

[0070] 실험예 5. 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리한 췌장암 세포의 활성산소종에 의한 세포 사멸 유도 작용 확인

[0071] 활성산소종은 미토콘드리아에 투과할 수 있는 능력을 가진 단백질과 반응함에 따라 미토콘드리아의 신호전달 경로를 통해서 세포사멸을 유도할 수 있다. 따라서 활성산소종은 미토콘드리아의 막전위를 붕괴시킬 수 있고 시토크롬 c의 세포질로의 분비를 통해 프로아포토시스 단백질인 Bax와 Bad의 전좌를 촉진할 수 있다.

[0072] 이를 바탕으로 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리가 활성산소종의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 췌장암 세포주인 Miapaca-2에 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 DHE 형광염색을 수행하였다. 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였으며, 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

[0073] 도 5a에 나타난 바와 같이, 소라페닙과 멜라토닌의 단독 처리에 비해 소라페닙 및 멜라토닌을 병용 처리한 실험군에서 활성산소 생산이 상당히 증가하는 것을 확인하였다.

[0074] 또한 소라페닙 및 멜라토닌의 병용 처리가 활성산소종 유도에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포사멸을 저해한다고 알려진 활성산소종 저해제 NAC를 췌장암 세포 주인 Miapaca-2에 처리하고 소라페닙 및 멜라토닌을 24시간 동안 병용처리한 후 세포사멸 효과를 측정하였다. 소라페닙 및 멜라토닌의 단독 처리군 및 무처리한 대조군을 동일한 방법으로 실험하였으며, 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

[0075] 도 5b에 나타난 바와 같이, NAC는 소라페닙 및 멜라토닌의 병용 처리한 실험군에서 cleaved caspase-3와 survivin의 발현 감소를 통해 세포사멸을 효과를 저해함을 확인하였다. 이는 소라페닙 및 멜라토닌의 병용처리에 의한 활성산소 생산이 췌장암 세포주 내 세포사멸에 연관되어 있음을 나타낸다.

[0076] 이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 소라페닙 및 멜라토닌은 췌장암 세포주에서 미토콘드리아 연관 아포토시스를 유의적으로 유발시키는 등 우수한 췌장암 개선 효과를 가지고 있으며, 상기 소라페닙 및 멜라토닌을 췌장암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있음을 확인하였다.

[0077] 이하 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0078] 제제예 1. 약학적 조성물의 제조

[0079] 1-1. 캡슐제의 제조

[0080] 소라페닙 및 멜라토닌 10 mg

[0081] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0082] 락토오스 14.8 mg

[0083] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0084] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0085] **1-2. 주사제의 제조**

[0086] 소라페닙 및 멜라토닌 10 mg

[0087] 만니톨 180 mg

[0088] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0089] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0090] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0091] **1-3. 액제의 제조**

[0092] 소라페닙 및 멜라토닌 20 mg

[0093] 이성화당 10 g

[0094] 만니톨 5 g

[0095] 정제수 적량

[0096] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0097] **제제예 2. 식품 조성물의 제조**

[0098] **2-1. 건강식품의 제조**

[0099] 소라페닙 및 멜라토닌 100 mg

[0100] 비타민 혼합물 적량

[0101] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0102] 비타민 E 1.0 mg

[0103] 비타민 B1 0.13 mg

[0104] 비타민 B2 0.15 mg

[0105] 비타민 B6 0.5 mg

[0106] 비타민 B12 0.2 μg

[0107] 비타민 C 10 mg

[0108] 비오틴 10 μg

[0109] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0110] 엽산 50 μg

[0111] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0112] 무기질 혼합물 적량

[0113] 황산제1철 1.75 mg

[0114] 산화아연 0.82 mg

[0115] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0116] 제1인산칼륨 15 mg

[0117] 제2인산칼슘 55 mg

[0118] 구연산칼륨 90 mg

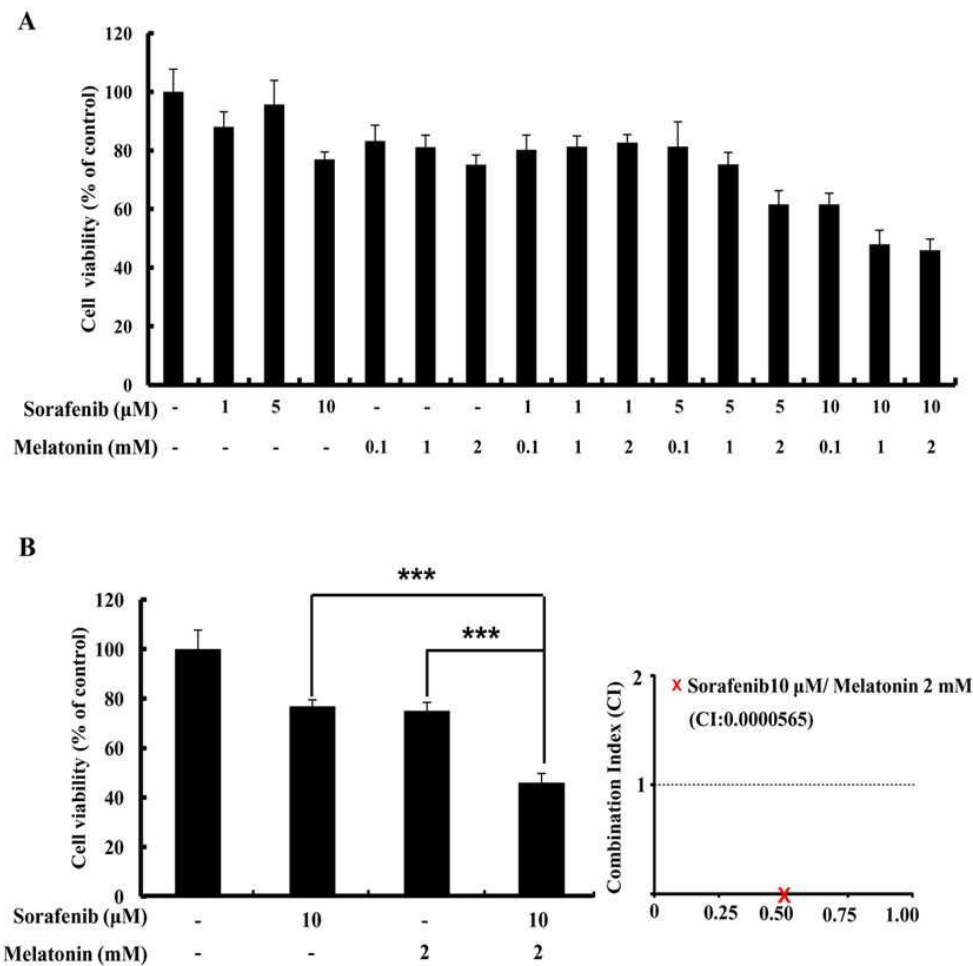
[0119] 탄산칼슘 100 mg

[0120] 염화마그네슘 24.8 mg

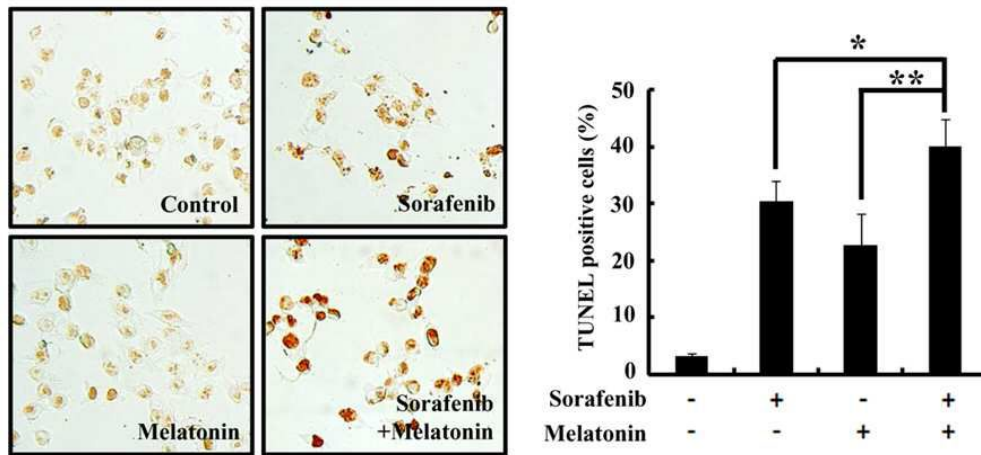
[0121] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

도면

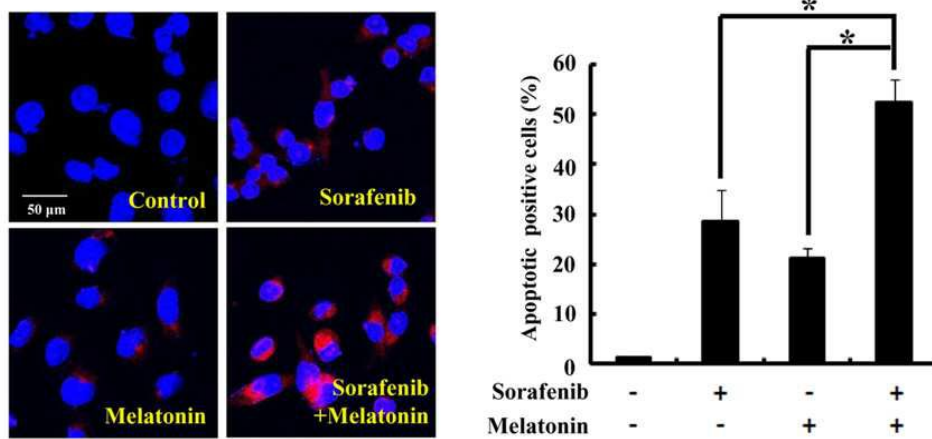
도면1



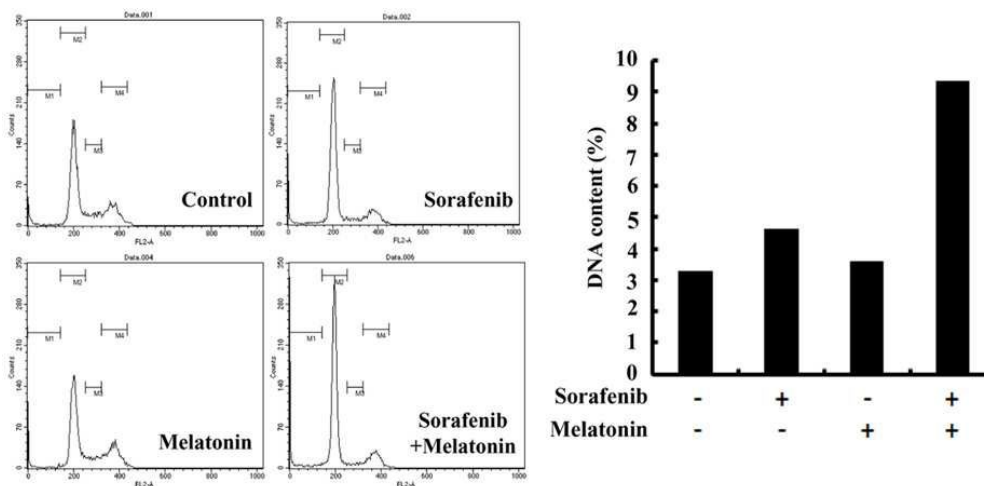
도면2a



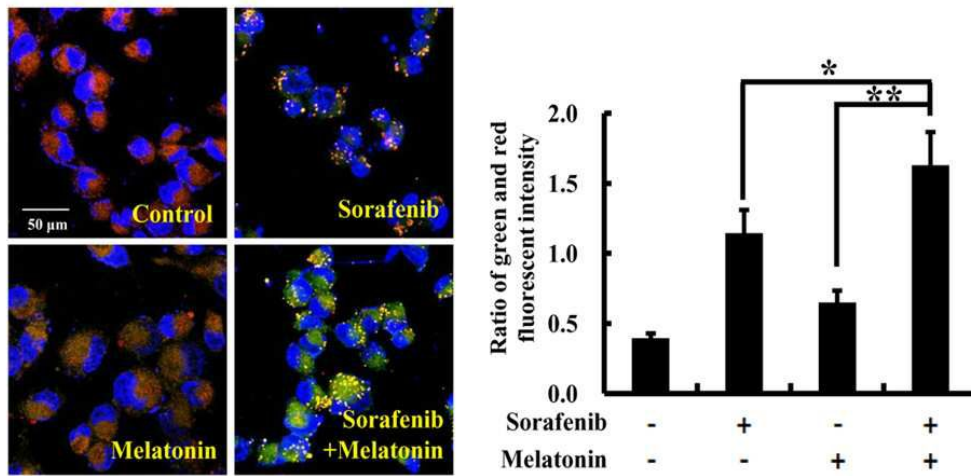
도면2b



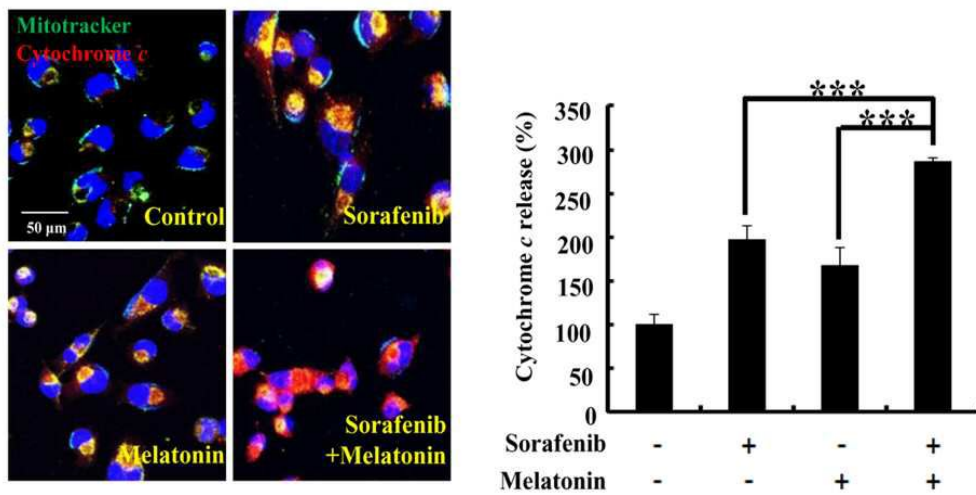
도면2c



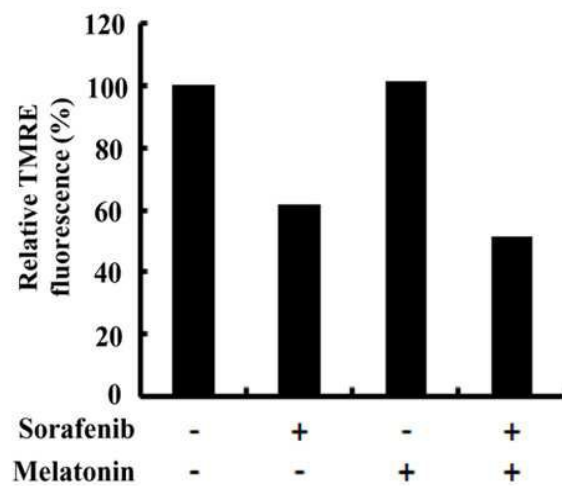
도면3a



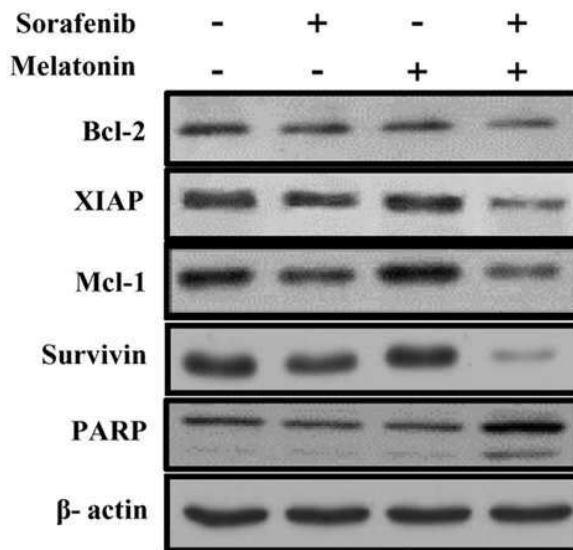
도면3b



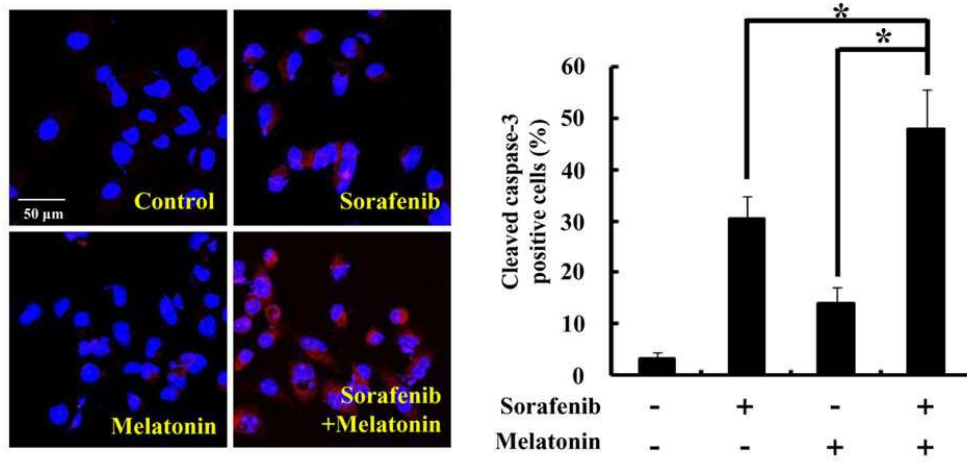
도면3c



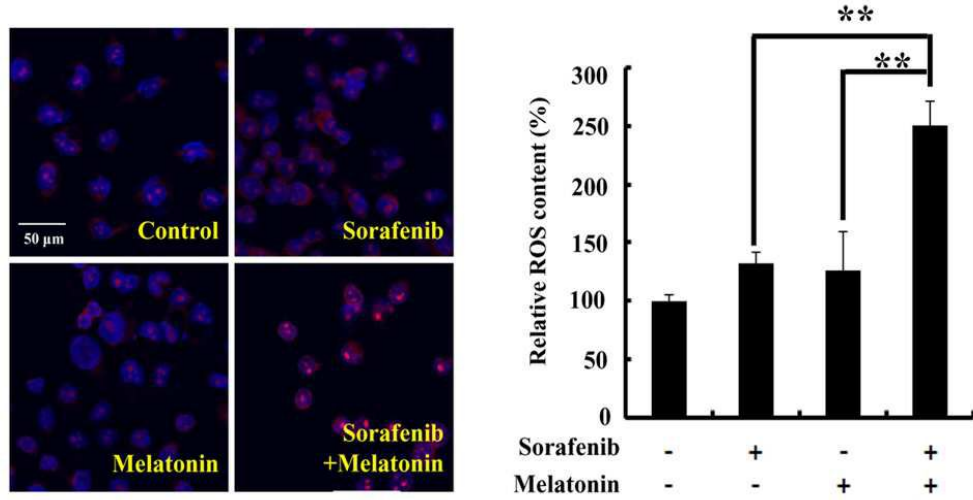
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

