



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0096141
(43) 공개일자 2020년08월11일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/555 (2006.01) A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/555 (2013.01)
A61K 31/4709 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0009712
(22) 출원일자 2020년01월28일
심사청구일자 2020년01월28일</p> <p>(30) 우선권주장
1020190013360 2019년02월01일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
(주)엠디바이오랩
서울특별시 동대문구 회기로 117-3, 3층 302호(회기동, 서울바이오허브)</p> <p>(72) 발명자
김수열
경기도 고양시 일산서구 주화로 211, 103동 1304호 (대화동, 장성마을1단지아파트)</p> <p>김태원
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 603동 2605호(정자동, 파크뷰)</p> <p>(74) 대리인
특허법인이룸리온</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 14 항

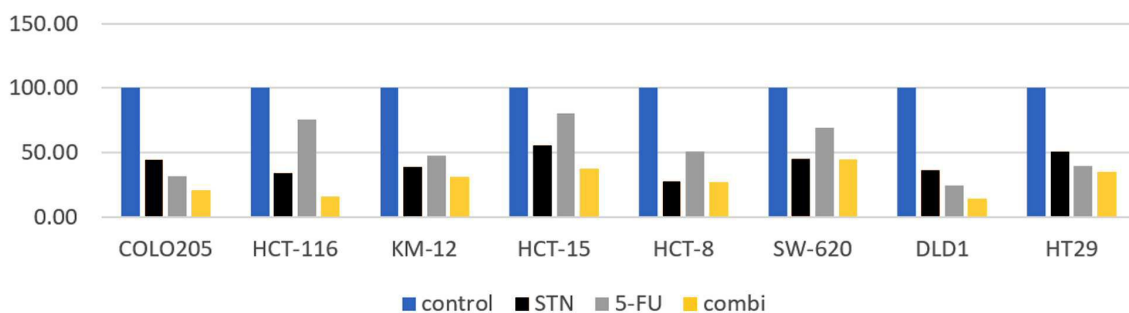
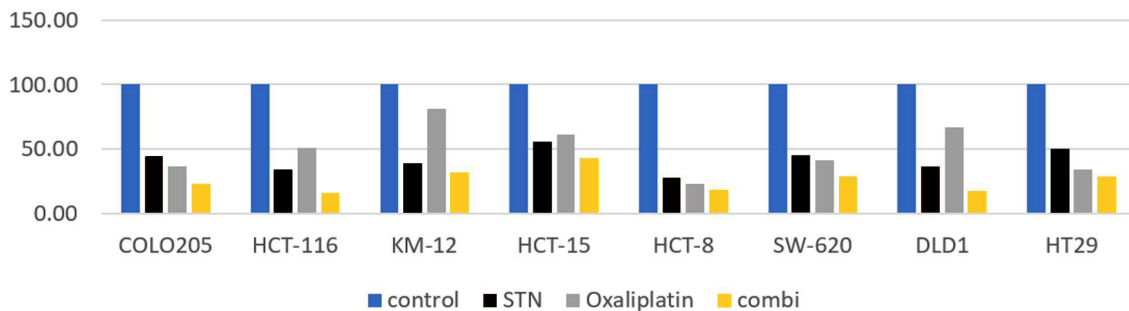
(54) 발명의 명칭 **스트렙토니그린 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 스트렙토니그린 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제에 대한 것이다.

또한, 본 발명은 스트렙토니그린을 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



에 대한 것이다.

따라서, 본 발명의 조성물은 스트렙토니그린과 옥살리플라틴 또는 스트렙토니그린과 5-FU를 포함함으로써 대장암 세포주에 대하여 생장을 억제하는 효과가 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 상승하므로 대장암 예방 또는 치료용 조성물로서 제공될 수 있다. 또한, 5-FU 내성 대장암 세포주의 경우 스트렙토니그린을 단독으로 처리하여도 항암 활성이 나타나지만 스트렙토니그린과 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 시너지가 발생하여 유의적으로 증가한 항암 활성을 나타낼 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/513 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

스트렙토니그린(streptonigrin) 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항암제는 옥살리플라틴(oxaliplatin) 또는 5-FU인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 스트렙토니그린 및 항암제는 1 : 1 내지 $1 : 10^5$ 의 몰농도비로 포함되는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

스트렙토니그린(streptonigrin)를 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 5-FU를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 스트렙토니그린 및 5-FU는 1 : 1 내지 $1 : 10^6$ 의 몰농도비로 포함되는 것을 특징으로 하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 5-FU 내성 대장암은 트랜스글루타미네이스 2(Transglutaminase 2)를 과발현하는 것을 특징으로 하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

스트렙토니그린 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 항암보조제.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항암제는 옥살리플라틴 또는 5-FU인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 항암보

조제.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 스트렙토니그린 및 항암제는 1 : 1 내지 1 : 10⁵의 몰농도비로 포함되는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 항암보조제.

청구항 11

스트렙토니그린(streptonigrin)을 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 항암보조제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 5-FU를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 항암보조제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 스트렙토니그린 및 5-FU는 1 : 1 내지 1 : 10⁶의 몰농도비로 포함되는 것을 특징으로 하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 항암보조제.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 5-FU 내성 대장암은 트랜스글루타미네이즈 2(Transglutaminase 2)를 과발현하는 것을 특징으로 하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 항암보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트렙토니그린 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제에 대한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 스트렙토니그린을 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제에 대한 것이다.

배경 기술

[0004] 정상세포는 필요에 따라 규칙적이고 탄력적인 증식과 역제를 할 수 있는 반면에 암세포는 무제한의 증식을 하며, 이는 미분화 세포로 구성된 세포덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 암세포는 주위의 조직으로 침투하고 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래한다. 의학의 발전에도 불구하고, 국내 암환자 발생자수는 지속적으로 증가하여 최근 10년간 약 44%가 증가하였으며, 국제적으로도 항암제 시장 역시 증가하여 연간 약 1000억 달러의 규모를 가지는 것으로 보고된 바 있다.

[0005] 항암제는 1세대 항암제인 화학항암제, 2세대 항암제인 표적항암제가 있으며, 이들의 부작용을 극복하고자 3세대 항암제로서 면역항암제가 개발되어 계속적으로 연구가 진행되고 있다. 그러나 현재 암 치료에서 가장 큰 문제가 되는 점은 암의 재발에 있는데 그 이유는 암의 돌연변이가 다양하여 특정 암을 표적으로 하는 것이 어려울 뿐더러, 재발된 암의 치료 과정에서 사용한 항암제에 내성이 발생하는 경우가 비일비재하기 때문이다. 결국, 원발암을 치료한 이후에도 전이 및 재발한 암에 의해 환자가 사망하는 경우가 대부분이다. 이에 따라, 항암제의 효과

를 증진시키기 위해, 항암제를 혼합하여 병용치료하고자 하는 전략이 제시되고 있다.

- [0006] 트랜스글루타미나제(Transglutaminase 2, TGase2)는 특히 펩티드에 결합된 글루타민 잔기의 γ -카르복사미드기와 다양한 아민들 사이의 결합을 촉진하는 효소이다. 이는 일차적으로는 손상의 예방과 방어 및 복구를 촉진하는데 있어서 주요한 역할을 하는 것으로 알려졌으나, 최근 연구에 의하면 비정상적으로 과도한 발현이 나타나면 신경퇴행성 질환, 죽상동맥경화증, 염증성 질환, 및 자가면역 질환과 같은 질병의 발생에 원인을 제공할 수 있는 것으로 보고된 바 있다. 특히, TGase2의 발현이 p53을 중합화하고 불안정하게 하여 소멸시킨다는 것이 보고되었으며, 이에 따라 TGase2의 억제를 통해 TGase2가 과발현된 신장암에 대한 항암 효과를 나타낼 수 있음이 보고된 바 있다.
- [0007] 대한민국 공개특허 제 10-2016-0009146호 에서는 스트렙토니그린을 포함하는 트랜스글루타미나제2 활성 증가에 의해 초래되는 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약제학적 조성물을 제공하면서, 상기 질병에 췌장암, 자궁암 내지 유방암이 포함된다고 개시하고 있다.
- [0008] 그러나, 스트렙토니그린과 다른 항암제를 병용하여 암세포의 성장 억제 등 그 항암효과에 시너지 효과를 발생시키하고자 하는 연구 내지 기재는 개시된바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이에, 본 발명자들은 병용하는 경우 유의적으로 상승한 항암 활성을 나타낼 수 있는 물질들을 연구 및 제공하고 자 예의 노력한 결과 스트렙토니그린과 옥살리플라틴 또는 5-FU를 각각 병용하여 암세포주, 특히 대장암 세포주에 처리하는 경우 단독으로 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 증가한 항암 활성을 나타낼 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 스트렙토니그린(streptonigrin)을 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 항암제는 옥살리플라틴(oxaliplatin) 또는 5-FU인 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 스트렙토니그린 및 항암제는 1 : 1 내지 1 : 10⁵의 몰농도비로 포함되는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명은 또한, 스트렙토니그린(streptonigrin)을 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 5-FU를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 스트렙토니그린 및 5-FU는 1 : 1 내지 1 : 10⁶의 몰농도비로 포함되는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 5-FU 내성 대장암은 트랜스글루타미네이즈 2(Transglutaminase 2)를 과발현하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 따라서, 본 발명의 조성물은 스트렙토니그린과 옥살리플라틴 또는 스트렙토니그린과 5-FU를 포함함으로써 대장암 세포주에 대하여 성장을 억제하는 효과가 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 상승하므로 대장암 예방 또는 치료용 조성물로서 제공될 수 있다. 또한, 5-FU 내성 대장암 세포주의 경우 스트렙토니그린을 단독으로 처리하여도 항암 활성이 나타나지만 스트렙토니그린과 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 시너지가 발생하여 유의적으로 증가한 항암 활성을 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 대장암 세포주들에 스트렙토니그린(STN), 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 스트렙토니그린과 옥살리플라틴 또는 스트렙토니그린과 5-FU를 각각 병용하여 처리하는 경우 (combi) 대장암 세포주들에 대한 항암 활성이 효과적으로 증가하는 것을 나타낸다. 특히, 스트렙토니그린을 옥살리플라틴과 병용하는 경우 HCT-116 및 DLD1 세포주에 효과적이며, 스트렙토니그린과 5-FU를 병용하는 경우에는 HCT-116 세포주에 효과적으로 항암활성을 나타나는 것을 확인하였다.

도 2는 대장암 세포주들에 스트렙토니그린(STN)과 시스플라틴(cisplatin) 또는 스트렙토니그린과 파클리탁셀 (paclitaxel)을 각각 병용하여 처리하더라도 항암 활성에 대한 시너지효과가 발생하지 않았으며 오히려 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 항암 활성이 떨어지는 경우도 발생하는 것을 나타낸다.

도 3은 5-FU 내성 대장암 세포주(FR) 및 야생형 대장암 세포주(HCT-15, WT)의 트랜스글루타미나아제 2(TGase 2)의 발현 수준을 나타낸다. WT에 비하여 FR에서 TGase 2의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

도 4는 5-FU 내성 대장암 세포주(Resistance) 및 야생형 대장암 세포주(WT)들에 5-FU를 농도별로 처리하는 경우 그 생존률을 나타낸다. 1 μ M의 5-FU를 처리하는 경우 생존률이 감소하기 시작하는 WT에 비하여, 5-FU 내성 대장암 세포주의 경우 100 μ M의 5-FU를 처리하여도 이의 세포 생존률에 영향이 없음을 확인할 수 있었다.

도 5는 5-FU 내성 대장암 세포주(HCT-15FR)에 스트렙토니그린 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우보다 병용하여 처리하는 경우(combination) 항암 활성이 유의적으로 증가하는 것을 나타낸다.

도 6은 대장암 세포주(HCT116)에 스트렙토니그린 및/또는 5-FU를 처리하는 경우 그 부피 변화를 나타낸다. 스트렙토니그린 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 스트렙토니그린 및 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 종양의 부피가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

도 7은 대장암 세포주(HCT116)에 스트렙토니그린 및/또는 5-FU를 처리하는 경우 그 무게 변화를 나타낸다. 스트렙토니그린 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 스트렙토니그린 및 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 종양의 무게가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0026] 상술한 바와 같이, 종래 기술에서는 암 환자에 대하여 항암제를 사용하는 항암제에 대한 내성이 발생할 우려가 있다는 문제점이 존재하였으며, 스트렙토니그린의 트랜스글루타미나아제(TGase2) 억제 효과를 이용하여 항암효과를 나타낼 수 있음을 확인하고 있었을 뿐 이와 병용하는 경우 유의적으로 항암효과가 증가하는 항암제와의 시너지 효과에 대한 연구 내지 기재는 개시된 바 없었다.

[0028] 본 발명에 따른 스트렙토니그린과 다른 항암제를 포함하는 조성물은 암 세포주, 특히 대장암 관련 세포주들의 성장 내지 성장을 유의적으로 억제하여 항암 활성에 시너지 효과를 나타내므로, 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제로서 효과적이다.

[0030] 본 발명의 스트렙토니그린(streptonigrin)은 스트렙토마이세스 플로쿨루스(*Streptomyces flocculus*)에 의해 생산되는 Tgase2 억제제로서, 염색체 절단을 일으키는 항생물질을 말한다.

[0031] 본 발명의 옥살리플라틴(oxaliplatin)은 백신에 기초하는 항종양제제 계열의 약물로서, 암 세포의 DNA 복제를

억제하는 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.

- [0032] 본 발명의 5-FU는 플루오르아실(fluorouracil)로도 불리며 티미딜산합성효소(thymidylate synthase)를 억제하여 DNA 생산을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [0033] 대장암 세포주에 스트렙토니그린과 옥살리플라틴을 병용하거나, 스트렙토니그린과 5-FU를 병용하여 포함하는 조성물을 처리하는 경우 스트렙토니그린, 옥살리플라틴 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 상승한 대장암 세포주 생존 내지 성장을 억제하는 효과가 발생할 수 있다([도 1], [도 6] 및 [도 7]). 그러나 스트렙토니그린이 모든 항암제에 대하여 시너지 효과를 발생시킬 수 있는 것은 아니다. 스트렙토니그린과 시스플라틴 또는 스트렙토니그린과 파클리탁셀을 병용하는 경우에는 항암활성에 대하여 시너지 효과가 발생하지 않았으며 오히려 단독처리군에 비하여 항암활성이 감소할 수 있다(도 2).
- [0034] 항암제, 특히 5-FU에 대하여 내성을 갖는 대장암 세포주에 스트렙토니그린을 단독으로 처리하는 경우 효과적으로 그 생존을 억제할 수 있다. 그러나 상기 세포주에 스트렙토니그린 및 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 유의적으로 시너지 효과가 발생하여 더욱 상승한 세포주 생존 억제 효과를 얻을 수 있다(도 5). 이는 5-FU에 대하여 내성을 갖는 대장암 세포주의 경우 트랜스글루타미나아제 2를 과발현하기 때문인 것으로 추측할 수 있다(도 4).
- [0036] 따라서, 본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin) 및 항암제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 항암제는 옥살리플라틴(oxaliplatin) 또는 5-FU인 것이 바람직하다. 즉, 상기 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제에는 스트렙토니그린과 옥살리플라틴이 포함되거나, 스트렙토니그린과 5-FU가 포함될 수 있다. 상기 항암보조제는 스트렙토니그린과 항암제가 동시에 투여되거나 또는 순차적으로 투여되는 것이 효과적일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 스트렙토니그린 및 항암제는 1 : 1 내지 1 : 10⁵의 몰농도비로 포함되는 것이 바람직하나, 더욱 바람직하게는 1 : 10 내지 1 : 10⁴의 몰농도비로 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 1 : 30 내지 1 : 10³의 몰농도비로 포함되는 것이 가장 바람직하다.
- [0040] 또한, 본 발명은 스트렙토니그린(streptonigrin)을 포함하는 5-FU 내성 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내지 항암보조제를 제공할 수 있다.
- [0041] 상기 약학적 조성물 내지 항암보조제에 5-FU를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하며, 그 경우 스트렙토니그린 및 5-FU는 1 : 1 내지 1 : 10⁶의 몰농도비로 포함되는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 1 : 10 내지 1 : 10⁵의 몰농도비로 포함되는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 1 : 100 내지 1 : 10⁴의 몰농도비로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 항암보조제에 5-FU를 추가적으로 포함하는 경우, 스트렙토니그린과 5-FU는 동시에 투여되거나 또는 순차적으로 투여되는 것이 효과적일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 5-FU 내성 대장암은 트랜스글루타미네이즈 2(Transglutaminase 2)를 과발현하는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아쥘란트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0045] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

- [0046] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉쇄제로 첨가할 수 있으며, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.
- [0049] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매 질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 젤제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [0051] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 대장암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 스트렙토니그린 및 이와 병용하는 항암제를 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여 시는 본 발명의 스트렙토니그린 및 이와 병용하는 항암제를 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사

용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0055] 본 발명의 약학 조성물은 또한 스트렙토니그린 및 이와 병용하는 항암제를 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다. 본 발명의 대장암 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 대장암 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 항암보조제는 항암제의 항암효과를 증대시키거나 항암제의 부작용을 억제 또는 개선시키기 위한 모든 형태를 의미한다. 본 발명의 항암보조제는 다양한 종류의 항암제 또는 항암보조제와 병용투여될 수 있으며, 병용투여시 통상적인 항암제의 투여량보다 낮은 수준으로 항암제를 투여하더라도 동등한 수준의 항암치료효과를 나타낼 수 있으므로 보다 안전한 항암치료를 수행할 수 있다.
- [0058] 상기 항암보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 항암보조제는 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 항암보조제로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 항암치료 보조제에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 항암보조제는 경구 또는 비경구 투여를 위한 제제일 수 있으며, 제제에 대한 설명은 상기 약학적 조성물의 제제에 대한 기재로 대신한다.
- [0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

- [0064] **대장암 세포주 배양**
- [0065] COLO205, HCT-116, KM-12, HCT-15, HCT-8, SW-620 및 HT29 세포주는 국립암센터(National Cancer Institute; MTA: 2702-09)에서, DLD1 세포주는 한국 세포주 은행에서 입수하였다. 세포들은 각각 37 °C, 5 % CO₂ 및 100 % 습도의 환경에서 10 % 소태아 혈청(Hyclone, UT, USA)을 함유하는 완전 RPMI 1640 배지(Hyclone, UT, USA)에서 배양하였다.
- [0066] 5-FU 내성 대장암 세포주 HCT-15-FR는 HCT-15 세포주를 5-FU 농도 구배(gradient)에 노출시켜 제작하였다. 구체적으로, HCT-15 세포를 약물이 없는 RPMI 1640 배지에서 24 시간 동안 배양한 다음, 배지를 5 μM 5-FU를 첨가한 완전 배지로 교체한 후 72시간 동안 배양하였다. 세포가 80 %(confluence) 정도 성장하면, 상기 단계를 수회 반복하였다. 결과적으로, 100 μM의 5-FU에서 안정적으로 성장할 때까지 배양된 HCT-15 세포, 즉 5-FU 내성 세포주 HCT15-FR 를 획득하였다.

실시예 2

[0068] 항증식 활성을 위한 SRB 분석

[0069] 세포(100 μ l)를 개별 세포주의 배양 시간(doubling time)에 따라 5000 내지 40000 세포/웰의 도금 밀도로 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 접종하였다. 약물 첨가 전까지 24 시간 동안 배양한 후 항암제를 각 웰에 첨가하고 배양액을 37 °C 에서 48 시간 동안 배양하였다. 세포를 50 % 트리클로로 아세트산(50 μ l/웰)에 고정시킨 후, 4 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 액체를 플레이트에서 제거한 다음, 물로 5 회 헹구고 약 12-24 시간 동안 실온에서 건조시켰다. 고정된 세포를 100 μ l SRB로 5 분 동안 실온에서 염색한 후, 플레이트를 1 % 빙초산으로 3 회 세척하고 실온에서 약 12 내지 24 시간 동안 건조시켰다. 이어서, SRB 염색을 10 mM Trizma 염기에서 가용화시키고 515 nm에서 흡광도를 판독하였다. 약물의 효과는 GI50(50 % 성장 억제; 50 % growth inhibition), TGI(총 성장억제; total growth inhibition) 또는 LC50(치사 농도; lethal concentration)으로 나타냈다.

실시예 3

[0071] 웨스턴 블랏팅

[0072] 야생형 HCT-15 세포주(WT) 또는 5-FU 내성 대장암 세포주 HCT15-FR(FR)의 전체 세포 용해물은 50 mM Tris-HCl 외에 150 mM 염화나트륨, 1.0 % IGEPAL CA-630(NP-40), 0.5 % 나트륨 데옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 0.1 % 나트륨 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate), 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합제를 함유하는 RIPA 완충액(pH 8.0)을 이용하여 준비되었다. 단백질 분석은 단백질을 정상화하기 위해 BCA 단백질 분석(Thermo Fisher, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. 단백질을 SDS-PAGE로 분석하고 Polyvinylidene difluoride (PVDF) 막(Merck Millipore, MA, USA)으로 옮겼다. 막은 실온에서 1 시간 동안 5 % BSA에서 블락되었으며, 표시된 항체와 함께 밤새 4 °C에서 배양했다. 그 후 막을 실온에서 1 시간 동안 TBS-T로 세척한 후, 실온에서 1 시간 동안 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)-결합 2 차 항체와 함께 배양하였다. 배양 후, 막을 실온에서 1 시간 동안 TBS-T로 세척하여 ECL(enhanced chemiluminescence)로 확인하였다.

[0073] 그 결과, [도 3]에서 나타나는 바와 같이 트랜스글루타미나아제 2(TGase 2)의 발현 수준이 WT에 비하여 FR에서 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

실시예 4

[0075] 스트렙토니그린 및 항암제의 병용 효과 확인

[0076] 야생형 대장암 세포주, 즉 5-FU에 대하여 내성이 없는 대장암 세포주들에 스트렙토니그린 및 항암제(옥살리플라틴 또는 시스플라틴)를 병용하는 경우 항암 활성에 시너지가 발생하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0077] 구체적으로, 대장암 세포주 COLO205, HCT-116, KM-12, HCT-15, HCT-8, SW-620, DLD1 및 HT29에 스트렙토니그린(STN)은 20nM, 옥살리플라틴(Oxaliplatin)은 1 μ M, 시스플라틴(cisplatin)은 20 μ M, 파클리탁셀(paclitaxel)은 20nM 및 5-FU는 5 μ M 씩 각각 또는 병용하여 처리하고 상기 <실시예 2>의 방법으로 대장암 세포주의 생존률을 확인하였다.

[0078] 그 결과, [도 1]에서 나타나는 바와 같이 대장암 세포주들에 스트렙토니그린, 옥살리플라틴 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 스트렙토니그린과 옥살리플라틴 또는 스트렙토니그린과 5-FU를 각각 병용하여 처리하는 경우(combi) 대장암 세포주들에 대한 항암 활성이 효과적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 스트렙토니그린을 옥살리플라틴과 병용하는 경우 HCT-116 및 DLD1 세포주에 효과적이며, 스트렙토니그린과 5-FU를 병용하는 경우에는 HCT-116 세포주에 효과적으로 항암활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0079] 다만, [도 2]에서 나타나는 바와 같이 대장암 세포주들에 스트렙토니그린과 시스플라틴 또는 스트렙토니그린과 파클리탁셀을 각각 병용하여 처리하는 경우에는 항암 활성에 대한 시너지효과가 발생하지 않았으며 오히려 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 항암 활성이 떨어지는 경우도 발생하는 것을 확인하였다.

실시예 5

[0081] 스트렙토니그린 및 5-FU의 병용 효과 확인

[0082] 본 발명에서 제조한 5-FU 내성 대장암 세포주에 스트렙토니그린 및 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 항암 활성에 시너지가 발생하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0083] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 제조한 5-FU 내성 대장암 세포주(Resistance) 및 야생형 대장암 세포주(WT)에 5-FU를 농도별(1nM, 10nM, 100nM, 1 μM, 10 μM 및 100 μM)로 처리한 후 세포의 생존률을 확인하였다. 또한, 상기 <실시예 1>에서 제조한 5-FU 내성 대장암 세포주(HCT-15FR) 및 야생형 대장암 세포주(WT)에 스트렙토니그린(streptonigrin) 20nM 및 5-FU 50 μM를 각각 또는 병용하여 처리한 후 상기 <실시예 2>의 방법으로 대장암 세포주의 생존률을 확인하였다.

[0084] 그 결과, [도 4]에서 나타나는 바와 같이 1 μM의 5-FU를 처리하는 경우 생존률이 감소하기 시작하는 WT에 비하여, 5-FU 내성 대장암 세포주의 경우 100 μM의 5-FU를 처리하여도 이의 세포 생존률에 영향이 없음을 확인하였다.

[0085] 또한, [도 5]에서 나타나는 바와 같이 5-FU 내성 대장암 세포주(HCT-15FR)에 스트렙토니그린 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우보다 병용하여 처리하는 경우(combination) 항암 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 6

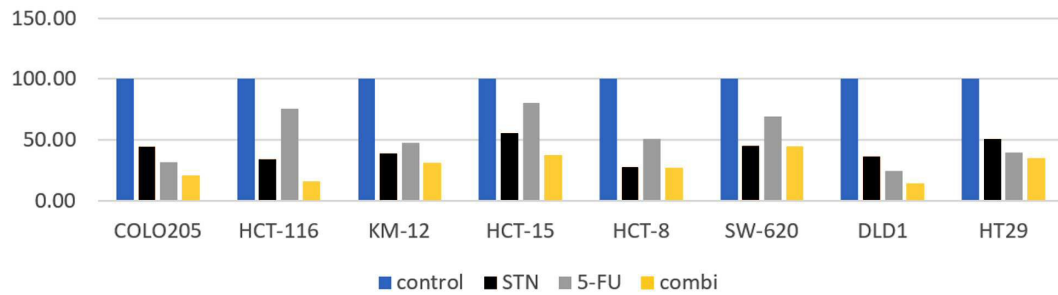
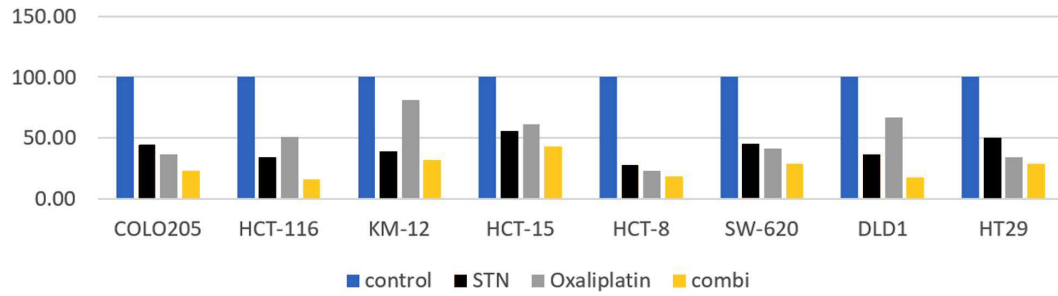
[0087] 전임상 이중이식 종양 모델

[0088] 본 발명의 실험은 실험실 동물연구소(Institute Of Laboratory Animals Research)를 따르는 미국 국립암센터 연구소(AAALAC International)의 인증을 받은 국립암센터 연구소의 기관 동물 관리 및 사용위원회(IACUC)에 의해 검토 및 승인되었다. 6주령 내지 8주령의 Balb/c-nu 마우스(Orient, Seoul, Korea)에 HCT-116 세포(100 μl PBS 중 5×10⁶)를 1-ml 주사기로 피하 접종 하였다. 일주일 후, 마우스를 용매 대조군(Control), 스트렙토니그린(Streptonigrin), 5-FU, 및 스트렙토니그린과 5-FU 병용(Streptonigrin + 5-FU, Combination)의 4 그룹으로 나누었다. 스트렙토니그린(0.1 mg/kg 체중), 5-FU(40 mg/kg 체중) 및 용매(1% DMSO + 99% PBS)를 경구로 5 일/주(스트렙토니그린), 또는 복강 내로 3 일/주(5-FU)로 투여하였다. 캘리퍼(Caliper)를 사용하여 매주 1 차 종양 크기를 측정 하였다. 종양 부피는 $V = (A \times B^2) / 2$ 로 계산하였다(V: 부피(mm³), A: 긴 직경, B: 짧은 직경).

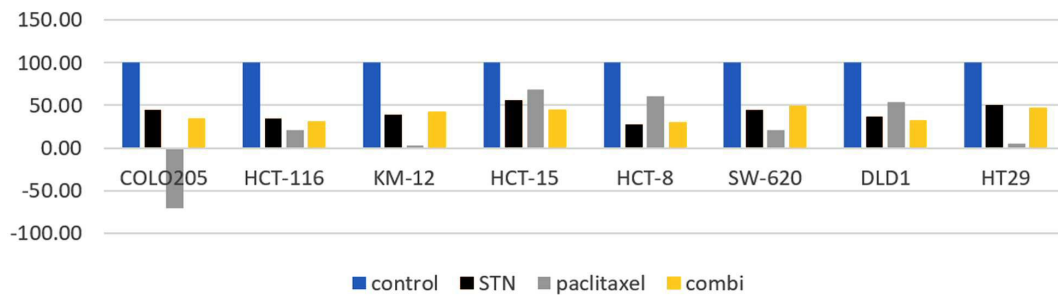
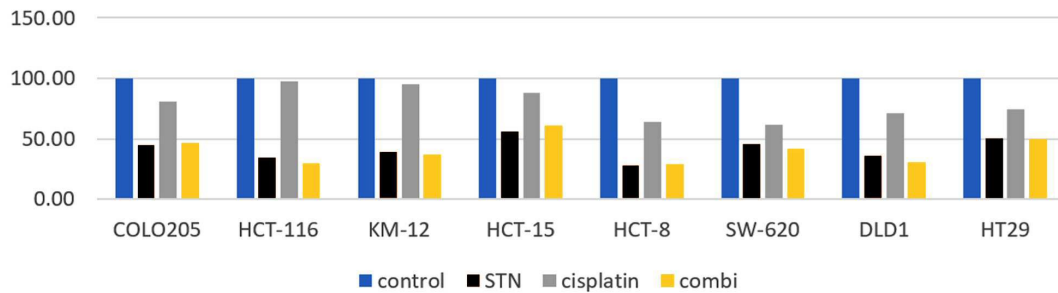
[0089] 그 결과, [도 6] 및 [도 7]에서 나타나는 바와 같이 스트렙토니그린 또는 5-FU를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 스트렙토니그린 및 5-FU를 병용하여 처리하는 경우 종양의 부피 및 무게가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

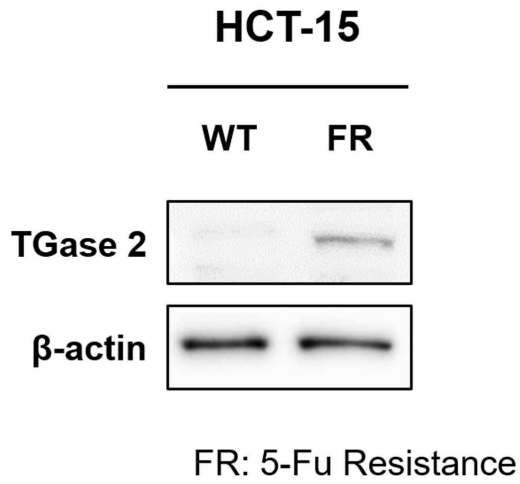
도면1



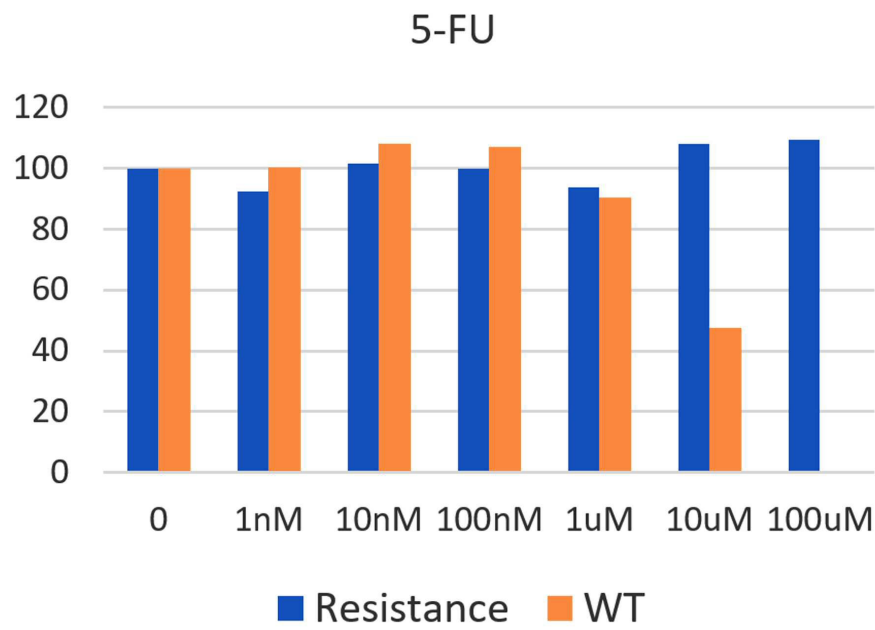
도면2



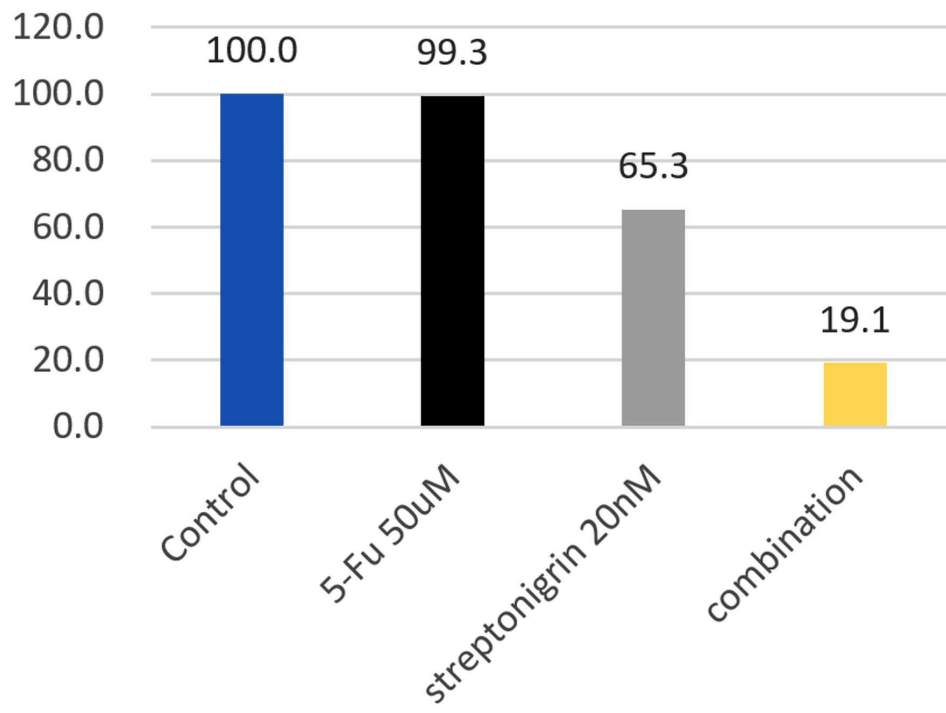
도면3



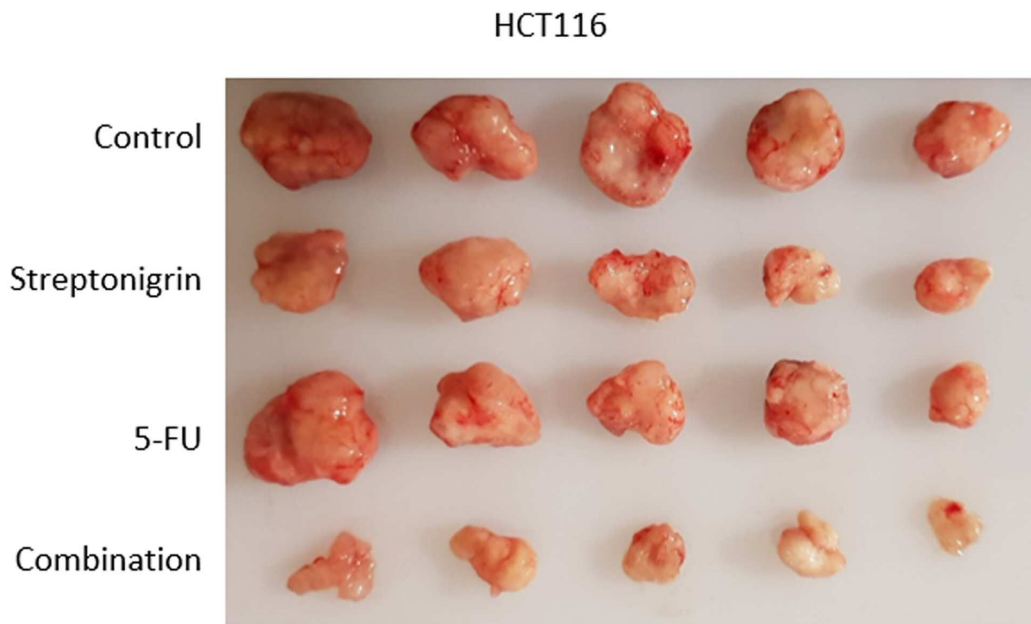
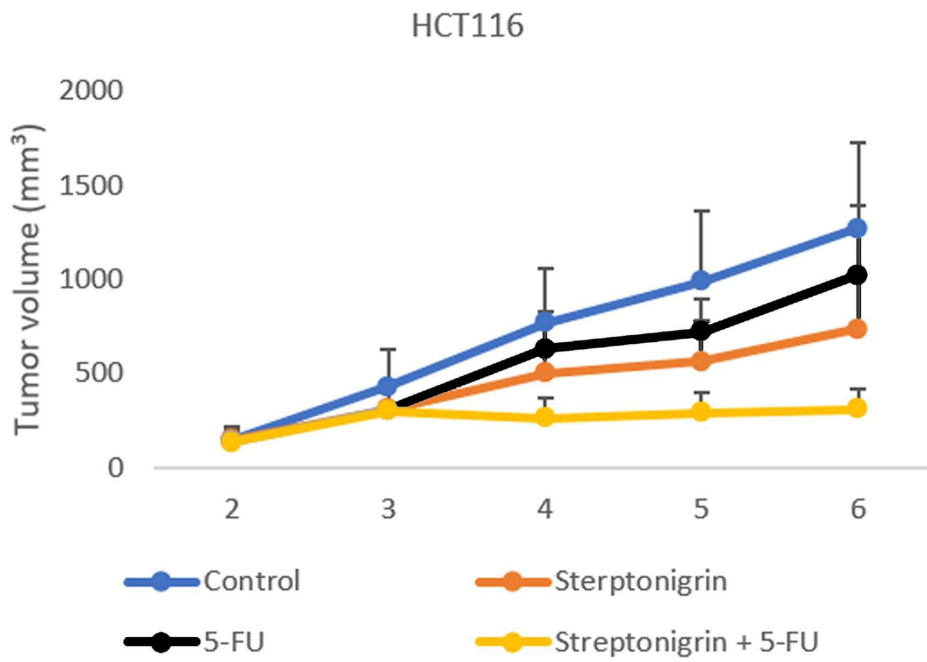
도면4



도면5



도면6



도면7

