



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0085619
(43) 공개일자 2017년07월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4418 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4418 (2013.01)
A61K 31/366 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0004510
 (22) 출원일자 2016년01월14일
 심사청구일자 2016년01월14일
- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(주)제욱
 경상북도 구미시 옥계2공단로5길 8 (구포동622-15번지마동)
- (72) 발명자
조경제
 경상북도 구미시 박정희로 599, 119동 402호 (송정동, 푸르지오캐슬A단지아파트)
조병철
 서울특별시 용산구 이촌로 310, 102동 404호 (이촌동, 래미안 첼리투스)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인다나

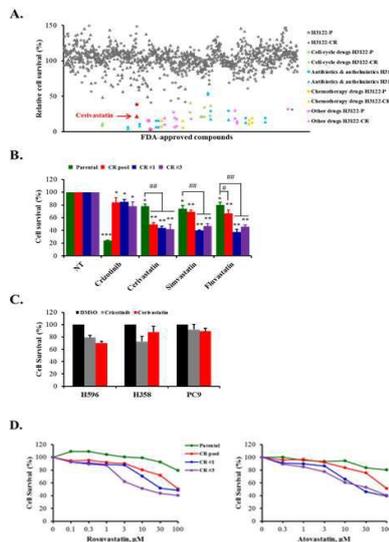
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **ALK 저해제에 대한 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료를 위한 스타틴계 약물의 용도**

(57) 요약

본 발명의 약제학적 조성물은 ALK 저해제에 대한 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암에 치료 효능을 나타내는 약제학적 조성물을 제공할 수 있다. 또한, EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자군에 있어서, 스타틴계 약물의 투여 여부를 결정하기 위한 약물 선택을 위한 정보를 제공할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/40 (2013.01)

A61K 31/404 (2013.01)

A61K 31/505 (2013.01)

G01N 33/54353 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

(72) 발명자

윤미란

경기도 고양시 일산동구 호수로 336 103-320 (백석동, 브라운 스톤)

표경호

서울특별시 강서구 강서로18바 2길, 402호

강한나

서울특별시 용산구 용산2가, 401호 (세명빌라)

최현미

서울특별시 동대문구 전농로 16, 16동 316호 (답십리동, 센시티16)

명세서

청구범위

청구항 1

스타틴계 약물 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하고, ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암은 YAP이 활성화되어 있는 상태인 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

스타틴계 약물은 세리바스타틴(cerivastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simvastatin), 아토바스타틴(atrovastatin) 및 플루바스타틴(fluvastatin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

스타틴계 약물은 세리바스타틴(cerivastatin)인 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자는 크리조티닙(crizotinib), 세리티닙(ceritinib), 알렉티닙(alectinib), 브리가티닙(brigatinib) 및 엔트렉티닙(entrectinib) 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 ALK 저해제에 내성이 있는 환자인 약제학적 조성물.

청구항 6

EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에서 ALK 저해제에 대한 내성 획득 여부를 확인하고,

ALK 저해제에 내성을 획득한 경우 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료를 위해 스타틴계 약물을 투여하도록 정보를 제공하는 것을 포함하는,

ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에서 ALK 저해제에 내성을 획득한 환자에 대해 YAP의 활성화 여부를 확인하는

단계를 추가로 포함하는,

ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

ALK 저해제에 대한 내성은 크리조티닙(crizotinib), 세리티닙(ceritinib), 알렉티닙(alectinib), 브리가티닙(brigatinib) 및 엔트렉티닙(entrectinib) 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 ALK 저해제에 대한 내성인, 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스타틴계 약물을 포함하는 ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약제학적 조성물 및 ALK 저해제에 내성을 획득한 경우 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 스타틴(Statin)계 약물은 고지혈증 치료제로서, HMG-CoA 환원 효소를 저해하여 콜레스테롤의 생합성을 억제하는 지질 저해제로 사용되어 왔다. 이러한 스타틴계 약물은 간세포 내에서 콜레스테롤 생합성의 속도 결정 단계(율속 단계)인 HMG-CoA가 메발론산(Mevalonic acid)으로 전환되는 과정에 관여하는 효소인 HMG-CoA 환원 효소의 활성을 저해함으로써 그 약효를 발현하게 된다. 또한, 콜레스테롤 합성 과정에서 생기는 중간산물(geranyl PP, farnesyl PP)은 Rho 단백질이나 Ros 단백질을 활성화시켜 세포 신호 전달 체계에서 역할을 담당하는데, 스타틴계 약물은 콜레스테롤 합성을 차단함으로써 이러한 세포의 신호 전달을 차단하는 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.

[0004] 이렇게 고지혈증 치료제로서 사용되어 온 스타틴계 약물의 종류로는 심바스타틴(Simvastatin), 로바스타틴(Rovastatin), 아토바스타틴(Atorvastatin), 프라바스타틴(Pravastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로수바스타틴(Rosuvastatin), 피타바스타틴(Pitavastatin) 등이 있다. 그러나, 최근 스타틴계 약물이 콜레스테롤 저하 적용 이외에도 약효를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 스타틴계 약물은 혈관을 확장시켜주고, 뇌 기능을 조절하며, 콜라겐 합성을 촉진시키고, 심장 동맥에도 직접 작용하여 혈관 벽을 증식시키는 작용을 하며, 치매나 알츠하이머 질환 등의 예방에도 효과가 있음이 발표되고 있다.

[0005] 한편, ALK(Anaplastic Lymphoma kinase)는 티로신 키나아제 수용체(tyrosine kinase receptor)로서 Ras/Raf/MEK/ERK1/2 경로(pathway), JAK(Janus kinase)/STAT(signal transducers and activators of transcription) 경로, PI3K(Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt 경로를 통해 세포의 증식, 성장 및 생존에 중요한 역할을 한다. 그러나 ALK 의 과다 발현은 암세포의 비정상적인 증식과 성장을 초래한다.

[0006] 한편, 비소세포폐암(Non-small cell lung cancer)에서 ALK의 EML4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4)-ALK 돌연변이(mutation)는 암세포의 비정상적인 증식에 중요한 역할을 한다고 알려져 있어 ALK 를 표적으로 하는 항암 치료에 대한 연구와 관심이 커지고 있다.

[0007] 이러한 ALK의 표적 치료제로는 크리조티닙(crizotinib)과 세리티닙(ceritinib) 등의 ALK 저해제(inhibitor)가 사용되어 왔으나, ALK 저해제를 통한 비소세포폐암 치료시 1년 내외로 ALK 저해제에 대한 내성을 보이는 폐암 세포주가 발생하게 되는 문제가 있다.

[0008] 따라서, ALK 저해제에 대해 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 환자군에서 치료 효능을 나타내는 새로운 표적 치료제의 연구, 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 출원의 목적은 상기 문제점을 해결하기 위한 것으로, ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암에 치료 효과를 나타내는 약제학적 조성물 및 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스타틴계 약물 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하고, ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에서 ALK 저해제에 대한 내성 획득 여부를 확인하고,

[0014] ALK 저해제에 내성을 획득한 경우 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료를 위해 스타틴계 약물을 투여하도록 정보를 제공하는 것을 포함하는,

[0015] ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 종래에 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료시 발생하는 ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료를 위한 스타틴계 약물의 신규 의약 용도에 관한 것으로, ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암에 치료 효능을 나타내는 약제학적 조성물을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명은 ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약물 선택을 위한 정보를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 크리조티닙에 대한 내성 획득 세포주의 구축 과정을 나타낸 것으로, A는 크리조티닙의 농도에 따른 내성 획득 비소세포폐암 세포주의 세포 생존율을 나타내었고, B는 pool, CR#1, CR#3의 세포 생존율을 나타낸 것이며, C는 colony formation assay 결과를 나타낸 것이다.

도 2에서 A는 크리조티닙에 대한 내성 획득 세포주에 대해 ALK 하부 신호전달경로 및 우회 신호전달경로 활성을 immunoblot을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이고, B는 ALK kinase domain 내의 secondary mutation을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3에서 A는 크리조티닙 내성 획득 세포주에 세리티닙을 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸 것이고, B는 제피티닙과 아파티닙을 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸 것이다.

도 4에서 A는 H3122CR pool 세포에 FDA approved drug library 640 여종의 약물을 처리하여 세포 성장을 억제하는 약물을 암맹 선별하기 위해 약물에 따른 세포 생존율을 나타낸 것이고, B는 세리바스타틴, 심바스타틴, 플루바스타틴의 항종양 효능을 확인한 것이다. C는 폐암 세포주에 대한 크리조티닙과 세리바스타틴의 항종양 효능을 확인한 것이고, D는 로수바스타틴 및 아토바스타틴의 항종양 효능을 확인한 것이다.

도 5에서 A는 크리조티닙 내성 획득 세포주에 세리바스타틴을 처리한 경우의 colony formation 분석 결과를 나타낸 것이고, B는 그에 따른 cell cycle 분석을, C는 western blot 분석 방법을 통해 세리바스타틴 및 심바스타틴의 항종양 효능을 확인한 것이다.

도 6에서 A는 세리바스타틴을 처리한 크리조티닙 내성 획득 세포주에 mevalonate pathway에 의해 매개되는 부산물을 첨가하여 세포 증식을 확인한 결과이고, B는 GGPP를 처리했을 때의 p21, cleaved PARP, cleaved caspase 3의 발현을 western blot 분석을 통해 확인한 결과이며, C는 GGTI-298을 처리했을 때의 p21, cleaved PARP, cleaved caspase 3의 발현을 확인한 결과이다.

도 7에서 A와 B는 각각 GGPP와 GGRI-298을 처리하였을 때의 YAP의 발현 양상을 western blot을 통해 확인한 것이고, C는 YAP의 핵 내 이동 유무를 immunocytochemistry 분석을 통해 나타낸 것이다.

도 8에서 A는 크리조티닙 내성 세포주와 모세포에서 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후의 YAP의 발현 양상을 확인한 것이고, B는 YAP/TAZ의 발현 결손이 세포증식에 미치는 영향을 colony formation 분석을 통해 확인한 것이다.

도 9에서 A는 크리조티닙 내성 세포주와 모세포에서 YAP/TAZ의 발현 결손이 cell cycle에 미치는 영향을 분석한 결과이고, B는 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후의 cyclin D1, p21의 발현 양상을 western blot 분석을 통해 확인한 것이다.

도 10에서 A는 세리티닙 내성 획득 세포주에서 세리티닙의 농도에 따른 세포 생존율을 나타낸 것이고, B는 내성 세포주에 대한 ALK 하부 신호전달경로 및 우회 신호전달경로 활성을 immunoblot 분석법을 통해 평가한 결과를 나타낸 것이다.

도 11에서 A는 세리티닙 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴 및 심바스타틴의 농도에 따른 cleaved caspase 3, p21, YAP의 발현 양상을 나타낸 것이고, B는 GGRI를 처리한 후의 cleaved PARP, p21의 발현 양상을 확인한 것이다. C 및 D는 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후의 cell cycle을 분석한 결과와 그에 따른 YAP, cyclin D1, p21의 발현 양상을 western blot 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 크리조티닙 내성 획득 세포주와 세리티닙 내성 획득 세포주에서 베르테포르핀(verteporfin)을 처리한 후 EGFR의 활성 정도를 Western blot 분석법을 통해 확인한 결과이다.

도 13은 H3122 모세포주와 크리조티닙 내성 획득 세포주의 세포 모양 변화 양상을 면역형광염색법을 통해 확인한 결과와 YAP/TAZ의 결손 및 베르테포르핀(verteporfin) 처리에 따른 vimentin의 발현 양상을 western blot을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 14에서 A는 ALK-PDIX 조직에 크리조티닙의 용량을 점점 증강시켜 투여하는 동안의 tumor size 변화를 확인하여 크리조티닙 내성 획득 종양 조직 구축 과정을 나타낸 것이고, B는 구축된 크리조티닙 내성 획득 종양 조직에서의 YAP의 발현을 면역염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0022] 본 발명은 스타틴(statin)계 약물 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하고, ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 일반적으로 스타틴계 약물은 고지혈증 질환 치료를 위한 용도로 사용되어 왔으나, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 스타틴계 약물을 포함함으로써 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 환자 중 ALK 저해제에 내성을 획득한 환자에 대해서 비소세포폐암의 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 스타틴계 약물의 ALK 양성 비소세포폐암의 치료라는 제 2 의약 용도를 제공하는 것이다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 스타틴계 약물은 스타틴계 약물은 세리바스타틴(cerivastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simvastatin), 아토바스타틴(atovastatin) 및 플루바스타틴(fluvastatin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 스타틴계 약물은 세리바스타틴(cerivastatin)일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 스타틴계 약물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서, 이 염에 기인한 부작용이 스타틴계 약물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 예를 들어, 약제학적으로 허용 가능한 염은 유기산 또는 무기산을 이용하여 형성된 산 부가염일 수 있으며, 상기 유기산은, 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산, 벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 디클로로아세트산, 아미노옥시 아세트산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 및 메탄술폰산계 염을 포함하며 무기산은 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 및 붕산계 염을 포함한다. 바람직하게는 염산염 또는 아세트산염 형태

일 수 있다. 또한, 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염) 등일 수 있다.

- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 "EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자"는 비소세포폐암 환자 중 ALK 유전자의 변이가 발생한 환자를 말한다. 상기 ALK 유전자의 변이는 EML4와 ALK 유전자가 융합되는 것으로부터 형성될 수 있다. 융합이 일어난 유전자는 EML4-ALK을 발현함으로써 암을 유발시킨다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 "ALK 저해제"는 상기 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에 치료 효과를 나타내는 약물로, EML4-ALK 의 카이네이즈 활성을 억제시키는 약물을 의미한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 "ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암"은 비소세포폐암 중 EML4와 ALK의 융합으로부터 변이가 일어난 EML4-ALK 양성 비소세포폐암에 대해서 ALK 저해제에 대한 내성을 획득한 경우를 의미한다.
- [0030] 한 구체예에서, 상기 ALK 저해제에 대한 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암은 YAP(Yes-associated protein)이 활성화되어 있는 상태일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따르면, 상기 YAP의 활성화는 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 세포주 중 ALK 저해제에 내성을 갖는 세포주로부터 확인한 새로운 내성 획득 기전으로서, 상기 YAP은 게라닐게라닐화(geranylgeranylation)에 의해 활성화되어 EGFR 신호 전달 경로를 활성화함으로써 암세포의 증식을 일으키는 것으로 밝혀졌다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따르면, 스타틴계 약물은 비소세포폐암 세포의 YAP의 활성화를 억제하는 효과가 우수하므로, 비소세포폐암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0033] 상기 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자는 크리조티닙(crizotinib), 세리티닙(ceritinib), 알렉티닙(alectinib), 브리가티닙(brigatinib) 및 엔트렉티닙(entrectinib) 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 ALK 저해제(ALK inhibitor)에 내성을 갖는 환자를 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에서 ALK 저해제에 대한 내성 획득 여부를 확인하고,
- [0036] ALK 저해제에 내성을 획득한 경우 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료를 위해 스타틴계 약물을 투여하도록 정보를 제공하는 것을 포함하는,
- [0037] ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료용 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0038] 한 구체예에서, 상기 스타틴계 약물, ALK 저해제 및 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에 대하여 위에서 기술한 모든 내용이 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, ALK 저해제에 대한 내성 획득 여부는 비소세포폐암 환자에 비소세포폐암의 치료를 위해 투여한 ALK 저해제에 대해 극히 낮은 감수성을 나타내어 암의 증세가 호전, 완화, 경감 또는 치료 증상을 나타내지 않거나, ALK 저해제를 투여한 후에도 암이 진행성을 나타낼 때 ALK 저해제에 내성을 획득했다고 말할 수 있다. 상기 비소세포폐암의 진행은 암의 발생을 이미징하여 확인할 수 있는 모든 수단, 예를 들어 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기공명영상(MRI), 초음파, X-선 영상, 유방조영술, PET 스캔, 방사성 핵종 스캔, 뼈 스캔 등의 영상화 기법을 통해 확인할 수 있는 것이라면 그 수단이 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 또한 본 발명에 있어서, 상기 ALK 저해제에 대한 내성 획득 여부는 세포 수준에서 확인할 수 있다. 한 구체예에서, ALK 저해제에 민감성을 보이는 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 세포주에 ALK 저해제를 지속적으로 처리하여 내성을 획득한 세포주에 대해 MTT assay, colony formation assay 등의 분석법을 이용하여 ALK 저해제에 대한 내성 획득 여부를 확인할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에 따른 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자 중 ALK 저해제에 내성을 획득한 환자에 대해 추가로 YAP의 활성화 여부를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0042] 한 구체예에서, YAP 활성화 여부를 확인하는 단계는 YAP 단백질을 검출하여 YAP의 발현 유무를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 YAP 단백질을 검출하는 단계는 ALK 저해제에 대해 내성을 획득한 비소세포폐암 환자의 생체 조직에서 조직면역염색(Immunohistochemistry), 웨스턴 블랏(western blot) 등의 분석법을 통해 세포 핵 내의 YAP 단백질을 검출하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0043] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 YAP이 활성화된 ALK 저해제에 내성을 획득한 EML4-ALK 양성 비소세포폐암의 치료를 위해 스타틴계 약물을 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 본 발명에서의 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 또는 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여, 조직 또는 장기에 주입하기에 적합한 주사제의 형태로 제형화할 수 있다. 또한, 등장성 멸균 용액, 또는 경우에 따라 멸균수나 생리식염수를 첨가하여 주사 가능한 용액이 될 수 있는 건조 제제(특히 동결 건조제제)로 제형화할 수도 있다. 또한, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다.
- [0045] 또한 바람직하게 본 발명의 조성물은 충진제, 부형제, 붕해제, 결합제 및 활택제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0047] 본 명세서에서, "유효량"은 목적하는 치료되어야 할 특정 질환의 발병 또는 진행을 지연하거나 전적으로 중지시키는 데 필요한 양을 의미한다. 본 발명에서 조성물은 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다.
- [0048] 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시에 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0051] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실험예 및 제조예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실험예 및 제조예에 한정되는 것이 아니라, 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.
- [0053] **제조예 1. 크리조티닙(crizotinib)에 대한 내성을 획득한 비소세포폐암 세포주의 구축**
- [0054] EML4-ALK 양성 비소세포폐암 세포주인 H3122 (Parental이라 명명함) 세포주에 1세대 ALK 저해제인 크리조티닙(crizotinib, 화이자, US)을 0.01 μ M에서 시작하여 1 μ M까지 농도를 지속적으로 증량시키면서 살아남은 H3122 세포주를 1 μ M 크리조티닙(crizotinib)이 첨가된 배지에서 계속 배양하여 내성 획득 비소세포폐암 세포주를 구축하였다 (H3122 CRpool이라 명명함). H3122 CRpool로부터 single cell isolation을 통해 10개의 H3122CR clonal cell line (H3122CR#1~#10이라 명명함)을 구축하여 10개의 H3122CR clone들에 대해 MTT assay 및 colony formation assay를 수행하여 크리조티닙(crizotinib)에 대한 내성 획득 여부를 확인하였다. 이후 실험예의 ALK 저해제 획득 내성 기전 연구에는 대표적으로 pool, CR#1, CR#3을 이용하여 진행하였다. 이러한 내성 획득 세포주의 구축 과정을 도 1에 나타내었다. 도 1의 A는 크리조티닙의 농도에 따른 내성 획득 비소세포폐암 세포주의 세포 생존율을 나타낸 것이고, B는 pool, CR#1, CR#3의 세포 생존율을 나타낸 것이며, C는 colony formation assay의 결과를 나타낸 것이다.
- [0056] **실험예 1. 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주에서의 ALK 하위 신호 전달 활성 평가**

- [0057] 상기 제조예 1에서 구축한 세포주에 대해 ALK 하부 신호전달경로 및 우회 신호전달경로 활성을 Immunoblot 분석법을 통해 평가하였다. 그 결과를 도 2의 A에 나타내었다. B는 ALK kinase domain 내의 secondary mutation을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [0059] 도 2에서 보는 바와 같이, Parental 세포주의 경우 1 μ M 크리조티닙 (crizotinib)에 의해 ALK, AKT, 그리고 ERK 모두 활성화가 억제되었으나 CR pool, CR#1, CR#3는 1 μ M crizotinib를 처리하더라도 ERK의 활성이 유지되었고, AKT의 활성은 감소되었으나 CR#1과 CR#3에서 parental과 비교 시 인산화 basal level이 훨씬 높았다.
- [0060] 최근 ALK저해제 획득 내성 기전으로 EGFR 활성화가 보고되어 본 연구팀이 구축한 내성 세포주에서 EGFR 활성화 여부를 확인한 결과, parental 세포주에 비해 EGFR의 발현과 활성화 모두 증가되었고, 이는 고농도의 크리조티닙에 의해 저해되지 않았다.
- [0061] 더욱 흥미로운 것은 CR pool, CR#1, CR#3에서 ALK 발현이 parental 세포에 비해 훨씬 감소되어 있고, ALK 저해제 내성 유발과 관련된 것으로 보고된 ALK kinase domain 내의 secondary mutation (L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, L1198F, G1202R, S1206Y, G1269A) 여부를 Sanger 시퀀싱으로 확인하였으나 이들 내성 세포주들에서는 mutation들이 일어나지 않았음을 확인하였다.
- [0063] **실험예 2. 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주의 내성 극복 실험**
- [0064] 상기 제조예 1에서 구축한 세포주에 2세대 ALK 저해제인 세리티닙(ceritinib)과 EGFR 저해제인 제피티닙(gefitinib)과 아파티닙(afatinib)을 처리한 후 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 A는 세리티닙을 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸 것이고, B는 제피티닙과 아파티닙을 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸 것이다.
- [0066] 도 3에서 보는 바와 같이, 2세대 ALK 저해제인 세리티닙을 처리하거나 ALK를 킥다운(Knock down) 시켜도 내성 획득 세포주의 증식을 억제하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 도 2에서 확인한 것과 같이 크리조티닙 (crizotinib) 내성 세포주에서 ALK의 dependency가 떨어져 있고, 2차적 mutation이 일어나지 않은 결과의 의미와 일치한다. 또한, 상기 내성 획득 세포주에서 EGFR의 발현 및 활성이 증가되어 있음에도, EGFR 저해제인 제피티닙과 아파티닙으로부터 내성 획득 세포주의 증식을 억제할 수 없는 것을 확인하였다.
- [0067] 따라서, 위 결과들을 통해 본 연구팀에서 구축한 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주들은 ALK 비의존적이며, second gatekeeper mutation 획득이 아닌 새로운 다른 기전을 통해서 ALK 저해제 내성을 획득함을 의미한다. 그리고 EGFR 활성이 내성 극복을 위한 주요 표적은 아닐 수 있음을 시사한다.
- [0069] **실험예 3. 약물 선별 및 약물의 항종양 효능**
- [0070] **1) 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주에서 항종양 효능을 나타내는 약물의 선별 실험 및 스타틴 (statin) 계열 약물의 항종양 효능 평가**
- [0071] 하나의 약제에 대한 내성 기전의 다양성을 고려하여 이미 보고된 ALK 억제제의 내성 기전이 아닌 새로운 기전을 규명하기 위해 이미 판매 중이거나 임상단계에서 안전성 이외의 이유로 산업화에 실패한 약물들의 새로운 의학적 용도를 개발하는 신약개발의 한 방법인 Drug repositioning (신약재창출) 전략을 응용하여 H3122CR pool 세포에 Enzo life 사의 FDA approved drug library 640여종의 약물을 1 μ M 농도로 72시간 처리 후 세포 성장을 억제하는 약물을 암행 선별하였다. 그 결과를 도 4의 A에 나타내었다. B는 크리조티닙과 세리바스타틴 (cerivastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin)의 항종양 효능을 나타낸 것이고, C는 폐암 세포주에 대한 크리조티닙과 세리바스타틴의 항종양 효능을 나타낸 것이며, D는 로수바스타틴 (rosuvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin)의 항종양 효능을 나타낸 것이다.
- [0073] 도 4에서 보는 바와 같이, 선별된 약물들을 확인해 본 결과 H3122 parental 세포와 H3122 CRpool 세포의 성장을 모두 억제시키는 약물들은 대부분 doxorubicin 등을 포함한 anthracycline 항생제, 빈카 알칼로이드(Vinca

alkaloids), doxorubicin과 같은 화학요법에 쓰이는 세포살상 항암제들이며, 이들은 표적 치료제로서의 가능성이 없고 또한 ALK 양성 비소세포폐암 및 ALK 저해제 내성 획득 시에 실질적으로 임상에서 치료 효과가 매우 미미하기 때문에 후보 약물에서 제외시켰다. 표적 치료제로서의 가능성이 높은 약물을 선별했을 때 본 연구팀은 흥미롭게도 parental 세포보다는 내성 세포주에 특이적으로 세포 증식 억제 효과를 보이는 HMG-CoA reductase 억제제인 스타틴 (statin) 계열의 세리바스타틴(cerivastatin)에 focus하였다. 또한, 세리바스타틴(cerivastatin) 외의 스타틴계 약물(심바스타틴, 플루바스타틴, 로수바스타틴, 아토바스타틴)의 항종양 효능을 평가하였고, 모두 ALK 저해제 내성 세포주에 특이적으로 항종양 효능을 보이는 것을 확인하였다. 최근 스타틴 (statin) 계열의 약제들이 암세포 증식 및 암 전이 억제 효과가 있다고 보고 되고 있어 이러한 결과를 바탕으로 ALK 저해제 내성 기전에 대한 스타틴 (statin)계 약물의 기능 규명이 필요하다고 판단하였다.

[0075] 2) 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴(cerivastatin)의 항종양 효능 평가

[0076] 나아가 MTT 이 외에 Colony formation, Cell cycle 분석, Western blot 분석 방법을 통해 ALK 저해제 내성 세포주에서 세리바스타틴(cerivastatin)의 항종양 효능을 다시 한번 확인하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5의 A는 세리바스타틴의 colony formation 분석 결과를 나타내었고, B는 cell cycle 분석을 나타내었으며, C는 western blot 분석 방법을 통해 세리바스타틴 및 심바스타틴의 항종양 효능을 확인한 결과이다.

[0078] 도 5에서 보는 바와 같이, 세리바스타틴(cerivastatin)은 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 획득 세포주에만 특이적으로 Colony formation를 차단하였고, 세포 주기 (Cell cycle)에서 G1 arrest를 강하게 유도하였으며, 농도의존적으로 G1 arrest 유도 단백질로 알려진 CDK inhibitor protein(CIP/KIP family)인 p21의 발현과, 세포사멸 (Apoptosis) 관련 단백질인 cleaved PARP와 cleaved caspase 3의 발현을 증가시킨 것을 확인하였다.

[0080] 3) 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴의 mevalonate pathway에서의 작용 기전 확인

[0081] 스타틴 (statin) 계 약물은 mevalonate pathway에서 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA)를 mevalonic acid로 전환시키는 효소인 HMG-CoA Reductase의 억제제로서, 콜레스테롤 저해제로 알려져 있지만 콜레스테롤 이외에 mevalonate pathway의 최종 부산물 중 표적 단백질의 isoprenylation의 기질로 작용하는 isoprenoids (Farnesyl pyrophosphate;FPP, Geranylgeranyl pyrophosphate;GGPP)의 생성 억제를 통해 다양한 세포내 신호 전달 과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 그래서 본 연구팀은 mevalonate pathway에 의해 매개되는 부산물들 중에서 어떤 것이 ALK 저해제에 대한 내성 획득에 관여하는지 알아내기 위해 H3122 parental, CR pool, CR#1, CR#3 세포주에 세리바스타틴(cerivastatin)을 처리한 후 각 단계의 부산물인 mevalonate, GGPP, FPP, squalene을 각각 첨가한 후 세포 증식을 확인하였다. 그 결과를 도 6의 A에 나타내었다. B는 GGPP를 처리했을 때의 p21, cleaved PARP, cleaved caspase 3의 발현을 western blot 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이고, C는 GGTI-298을 처리했을 때의 p21, cleaved PARP, cleaved caspase 3의 발현을 확인한 결과를 나타내었다.

[0083] 도 6에서 보는 바와 같이, CRpool, CR#1, CR#3 세포주에서 세리바스타틴(cerivastatin)에 의해 억제된 세포 증식이 mevalonate와 GGPP에 의해 각각 복원되었고, FPP와 squalene의 첨가는 아무 효과가 없었다. 나아가 western blot 분석을 통해 세리바스타틴(cerivastatin)에 의해 증가한 p21, cleaved PARP, 그리고 cleaved caspase 3의 발현이 GGPP에 의해 다시 감소하였다. 이를 더 확실하게 규명하기 위해 geranylgeranyl transferase inhibitor인 GGTI-298를 처리했을 때 내성 세포주들에서 GGTI-298 농도 의존적으로 PARP, caspase 3, p21의 발현을 유도하였다. 상기 결과들을 통해서 Mevalonate에 의한 복원은 세리바스타틴(cerivastatin)의 항종양 효능을 재증명해 보이는 결과임을 확인할 수 있으며, GGPP에 의한 복원은 ALK 저해제에 대한 내성 획득 기전이 mevalonate pathway에 의해 매개되는 콜레스테롤 합성 경로보다는 세포내 여러 신호전달계에 영향을 미치는 geranylgeranylation 에 의한 것일 수 있다는 가능성을 제시하는 것으로 볼 수 있다.

[0085] 실험예 4. 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주에서 YAP의 기능 규명

[0086] 1) 세리바스타틴(cerivastatin)의 항종양 효능에 대한 YAP 활성과의 상관관계

[0087] YAP은 인산화가 억제되면 핵 내로 축적되어 TEAD와 복합체를 이루어 암과 관련된 유전자의 발현을 유도하여 과도한 암세포 증식 및 암 전이를 촉진시키는 oncogene으로 알려져 있다. 게다가 YAP은 전사인자로서 EGFR 및 EGFR ligand의 발현에도 관여하는 것으로 보고되었다. 최근 암세포 대사에 중요한 기전인 mevalonate pathway가 YAP 활성을 조절한다는 것과 특히 geranylgeranylation가 YAP 활성에 직접적인 영향을 줄 수 있다는 것이 보고되었다. 따라서, 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴(cerivastatin)의 항종양 효능이 YAP 활성화와 관련이 있는지 알아보기 위해 H3122 parental 세포와 H3122 CR 세포주에서 YAP의 발현 양상과 핵 내 이동 유무를 western blot과 immunocytochemistry를 통해 비교하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7의 A와 B는 각각 GGPP와 GGRI-298을 처리하였을 때의 YAP의 발현 양상을 western blot을 통해 확인한 것이고, C는 YAP의 핵 내 이동 유무를 immunocytochemistry 분석을 통해 나타낸 것이다.

[0089] 도 7에서 보는 바와 같이, H3122 parental 세포에 비해 내성 세포주에서 YAP의 발현이 훨씬 높았고, YAP 인산화는 낮았으나 세리바스타틴(cerivastatin)을 처리하면 YAP 인산화가 증가하고 mevalonate 신호의 부산물인 GGPP를 함께 추가하면 다시 인산화가 줄어들었다. 게다가 geranylgeranylation의 억제제인 GGTI를 처리했을 때 세리바스타틴(cerivastatin)과 동일하게 YAP의 인산화를 증가시켜 활성화를 감소시키는 것을 확인하였다. 이는 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 세포주에서 특이적으로 YAP의 활성이 증가 되어 있고, cerivastatin/GGTI에 의해 조절된다는 것을 알 수 있다. 또한 세포 형광염색을 통해서도 내성 세포주에서만 YAP의 발현이 핵에서 강하게 염색되어 있는 것을 확인하였고, 이것이 cerivastatin에 의해 억제되었으며 GGPP를 다시 추가했을 때 YAP이 다시 핵내로 이동되는 것을 관찰하였다. 상기 결과를 바탕으로 ALK 억제제 내성 기전으로서 YAP의 가능성을 확인하였다.

[0091] 2) 크리조티닙(crizotinib) 내성 획득 세포주에서 YAP의 내성유발인자로서의 가능성 검증

[0092] 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 획득 세포주에서 YAP의 기능을 규명하기 위해 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 세포주와 모세포 모두 siRNA 이용하여 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후 colony formation과 cell cycle을 확인하였다. 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다. 도 8의 A는 크리조티닙 내성 세포주와 모세포에서 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후의 YAP의 발현 양상을 확인한 것이고, B는 YAP/TAZ의 발현 결손이 세포증식에 미치는 영향을 colony formation 분석을 통해 확인한 것이다. 도 9의 A는 크리조티닙 내성 세포주와 모세포에서 YAP/TAZ의 발현 결손이 cell cycle에 미치는 영향을 분석한 결과이고, B는 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후의 cyclin D1, p21의 발현 양상을 western blot 분석을 통해 확인한 것이다.

[0094] 도 8에서 보는 바와 같이, H3122 모세포에서는 YAP을 결손 시키더라도 colony formation에는 영향을 주지 않았으나, 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 세포주에서는 YAP이 결손 되었을 때 colony formation이 강하게 억제되었다. 뿐만 아니라 도 9에서 보는 바와 같이, 세리바스타틴(cerivastatin)과 동일하게, YAP의 결손은 p21의 발현을 증가시키고, cyclin D1의 발현은 감소시키면서 세포 주기에서 G1 arrest를 유도한 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통해 세리바스타틴(cerivastatin)에 의한 YAP 활성 조절이 EML4-ALK 양성 비소세포폐암에서 크리조티닙 (Crizotinib)에 대한 획득 내성 극복에 대한 가능성을 확인하였다.

[0096] 제조예 2. 세리티닙(ceritinib) 에 내성을 획득한 NSCLC 세포주 구축

[0097] 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 H3122 세포주에 2세대 ALK 저해제인 세리티닙(ceritinib (LDK378), 노바티스, Switzerland)을 지속적으로 증량시키면서 세리티닙에 대한 내성을 획득한 비소세포폐암 세포주를 구축하였다 (H3122 LRpool이라 명명함).

[0099] 실험예 5. 세리티닙 내성 획득 세포주에서의 ALK 하위 신호 전달 활성 평가

[0100] 상기 제조예 2에서 제조한 H3122 LRpool로부터 single cell isolation을 통해 9개의 H3122LR clonal cell line (H3122LR#1-#9이라 명명함)을 구축하여 9개의 H3122LR clone들에 대해 MTT assay를 수행하여 세리티닙

(ceritinib)에 대한 내성 획득 여부를 확인하였다. 이후 실험예의 ALK 저해제 획득 내성 기전 연구에서는 대표적으로 pool, LR#4, LR#3을 이용하여 진행하였다. 또한, 세리티닙(ceritinib) 내성 세포주에 대해 ALK 하부 신호전달경로 및 우회 신호전달경로 활성을 Immunoblot 분석법을 통해 평가하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다. A는 세리티닙 내성 획득 세포주에서 세리티닙의 농도에 따른 세포 생존율을 나타낸 것이고, B는 내성 세포주에 대한 ALK 하부 신호전달경로 및 우회 신호전달경로 활성을 immunoblot 분석법을 통해 평가한 결과를 나타낸 것이다.

[0101]

[0102] 도 10에서 보는 바와 같이, 크리조티닙 (crizotinib) 내성세포주와 동일하게 세리티닙(ceritinib) 내성 세포주에서도 EGFR의 활성이 증가되었고, AKT와 ERK 활성 모두 세리티닙(ceritinib)에 의해 억제되지 않았다.

[0104] **실험예 6. 세리티닙(ceritinib) 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴(cerivastatin) 및 YAP 의 기능 확인**

[0105] 크리조티닙 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴 및 YAP의 기능을 western blot과 cell cycle 분석을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11의 A는 세리티닙 내성 획득 세포주에서 세리바스타틴 및 심바스타틴의 농도에 따른 cleaved caspase 3, p21, YAP의 발현 양상을 나타낸 것이고, B는 GGRI를 처리한 후의 cleaved PARP, p21의 발현양상을 확인한 것이다. C 및 D는 YAP/TAZ의 발현을 결손 시킨 후의 cell cycle을 분석한 결과와 그에 따른 YAP, cyclin D1, p21의 발현 양상을 western blot 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[0107] 상기 도 11에서 보는 바와 같이, 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 세포주에서와 동일하게 스타틴 (statin)계 약물인 세리바스타틴(cerivastatin) 및 심바스타틴 (simvastatin)을 세리티닙(ceritinib) 내성 세포주에 처리했을 때, 농도 의존적으로 G1 arrest 유도 단백질로 알려진 CDK inhibitor protein(CIP/KIP family)인 p21의 발현과, 세포사멸 (Apoptosis) 관련 단백질인 cleaved caspase 3의 발현을 증가시켰고, YAP의 인산화를 유도함으로써 YAP 활성을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 geranylgeranyl transferase inhibitor인 GGTI-298를 처리했을 때도 내성 세포주들에서 GGTI-298 농도 의존적으로 PARP와 p21의 발현을 유도하였다. 나아가 YAP이 결손 되었을 때, p21의 발현은 증가시키고, cyclin D1의 발현은 감소시키면서 세포 주기에서 G1 arrest를 유도한 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통해 1세대 ALK 저해제인 크리조티닙 (Crizotinib) 뿐만 아니라 2세대 ALK 저해제인 세리티닙(ceritinib)의 내성 기전에도 세리바스타틴(cerivastatin)에 의한 YAP 활성 조절이 중요하다는 것을 확인하였다.

[0109] **실험예 7. 베르테포르핀 (Verteporfin)의 EGFR 활성능 관찰**

[0110] 크리조티닙 내성 획득 세포주에 베르테포르핀(verteporfin)을 처리한 후 EGFR의 활성 정도를 Western blot 분석법을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0112] 도 12에서 보는 바와 같이, 베르테포르핀(verteporfin)은 YAP와 TAZ의 결합을 막아 YAP/TAZ의 표적 인자의 전사 활성을 억제시키는 기능을 하는데, 이를 전처리 했을 때 ALK 저해제 내성 획득 세포주에서 EGFR의 활성이 농도 의존적으로 억제된 것을 확인할 수 있었다.

[0114] **실험예 8. 암 전이능에 대한 YAP의 기능 확인**

[0115] H3122 모세포주와 크리조티닙 내성 획득 세포주의 세포 모양 변화 양상을 면역형광염색법을 통해 확인하였고, YAP/TAZ의 결손 및 베르테포르핀(verteporfin) 처리에 따른 vimentin의 발현 양상을 western blot을 통해 분석하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0117] 도 13에서 보는 바와 같이, H3122 모세포주가 원래는 대부분 동그란 모양을 가지며 colony를 형성하면서 증식하는데, 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 획득 세포주는 구형을 가지는 본래의 세포 형태에서 위축과 같은 돌출부를

가진 길쭉한 형태로 세포 모양의 변화가 일어났음을 관찰하였다. 이는 모세포주에 비해 내성 세포주가 이동성이 강한 세포 형태 (migratory phenotype)로 변형되어 epithelial mesenchymal transition (EMT)로 세포 특성의 변화가 일어났을 가능성을 제시해준다. 게다가 EMT 관련 단백질인 Vimentin의 발현이 모세포와 비교하여 ALK 저해제 내성 세포주들에서 강하게 발현이 증가하였다. 또한 이 증가된 Vimentin의 발현이 베르테포르핀 (verteporfin)처리에 의해 그리고 YAP 결손 시 확연하게 감소되었다. 상기 결과들을 통해 YAP 이 ALK 저해제 내성 세포주에서 암세포 증식 및 암전이에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0119] **제조예 3. EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자 조직을 이용한 환자 유래 이종이식 마우스 모델 (Patient-derived tumor xenograft, PDX)에서 크리조티닙 (Crizotinib) 획득 내성 모델 구축**

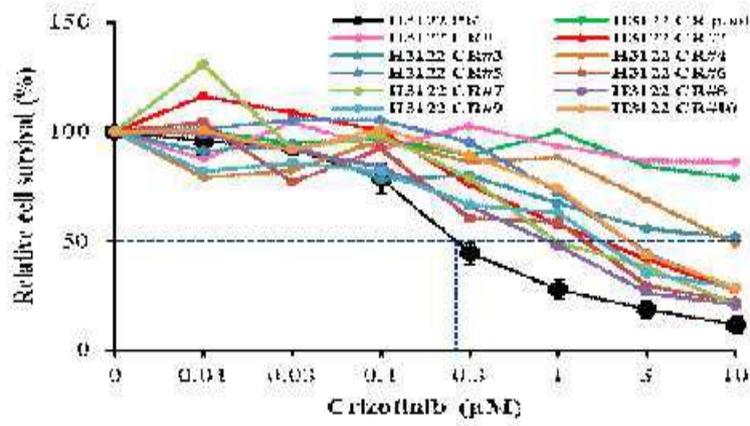
[0120] 제조예 1과 유사한 방법으로 ALK-PDX에 지속적으로 ALK 저해제를 투여해줌으로써 *in vivo* 내성 획득 모델을 구축하였다. 구축된 ALK-PDX 에서 크리조티닙 (Crizotinib) 에 대한 내성 획득 모델을 구축하기 위해 ALK-PDX 조직을 다시 mouse에 engraft한 후, tumor size가 약 200 mm³ 정도가 되었을 때 군을 분리하였다. 분리된 군에 크리조티닙 (Crizotinib) 을 25mg/Kg (oral, daily)으로 투여를 시작하여 최대 종양 감소로부터 25% re-growth가 일어날 때마다 크리조티닙 (Crizotinib) 용량을 50mg/Kg, 75mg/Kg, 100mg/Kg, 150mg/Kg으로 점점 증강시켜 최종적으로 고농도인 150mg/Kg에서도 tumor가 줄지 않을 때 마우스 희생 후 크리조티닙 (Crizotinib) 내성 획득 종양 조직을 확보해 두었다. 그리고 그 조직으로 파라핀 절편을 만들어 YAP 의 발현을 면역염색법으로 확인하여 도 14에 나타내었다. 도 14의 A는 ALK-PDX 조직에 크리조티닙의 용량을 점점 증강시켜 투여하는 동안의 tumor size 변화를 확인하여 크리조티닙 내성 획득 종양 조직 구축 과정을 나타낸 것이고, B는 구축된 크리조티닙 내성 획득 종양 조직에서의 YAP의 발현을 면역염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[0122] 도 14에서 보는 바와 같이, 크리조티닙 (Crizotinib)을 처리하지 않은 군에 비해 내성 조직군에서 YAP 의 발현이 강하게 증가되어 있고, 주로 핵 내에 염색이 된 것을 확인하였다. 게다가 EML4-ALK 양성 비소세포폐암 환자에서 크리조티닙 (Crizotinib)을 치료하기 전과 후에 바이옵시 (biopsy; 생체조직)에서 YAP 의 발현을 확인하였더니 치료 전에 비교하여 치료 후 다시 암이 진행된 조직에서 YAP 의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다. 상기 결과들로 통해 *in vitro* 결과들과 동일하게 핵 내 YAP의 활성이 ALK 저해제 내성 획득에 중요한 인자임을 알 수 있다.

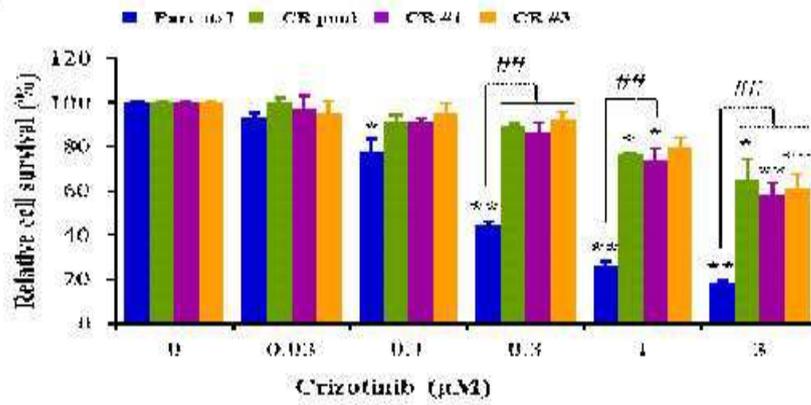
도면

도면1

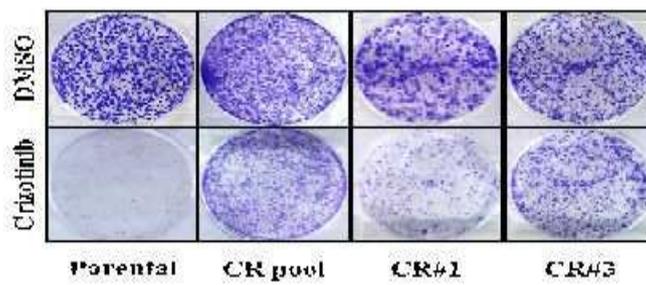
A.



B.

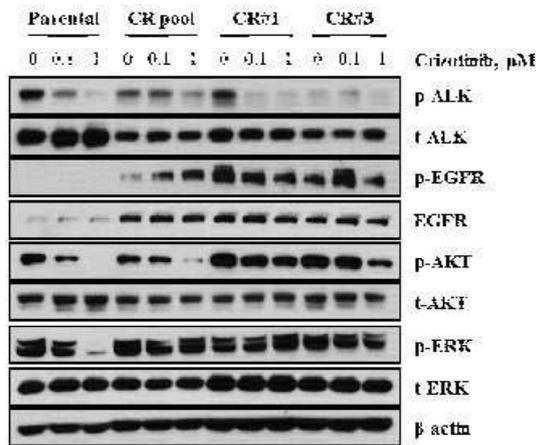


C.



도면2

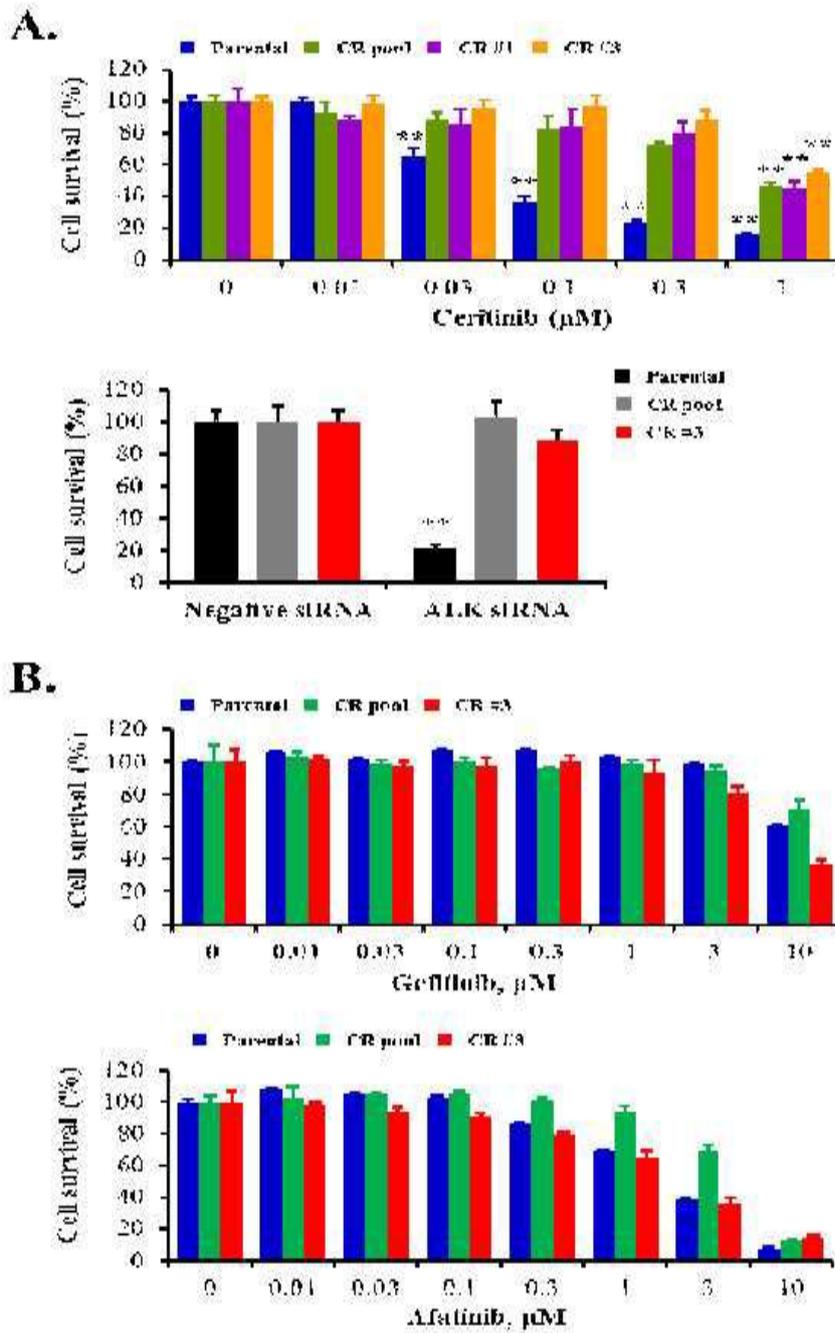
A.



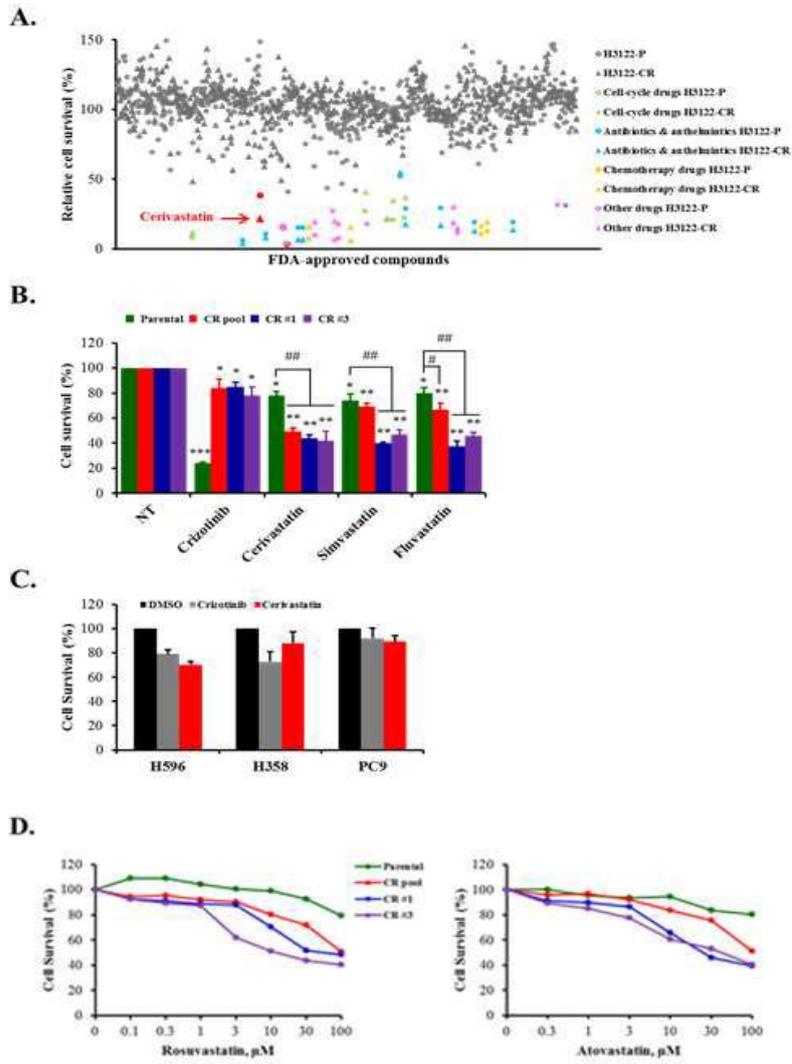
B.



도면3

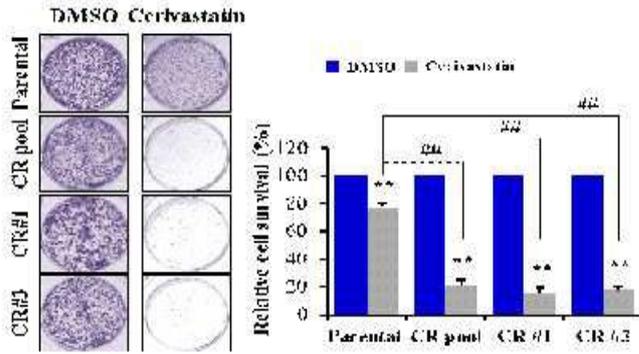


도면4

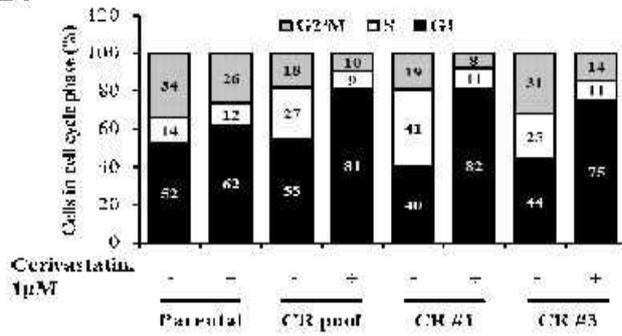


도면5

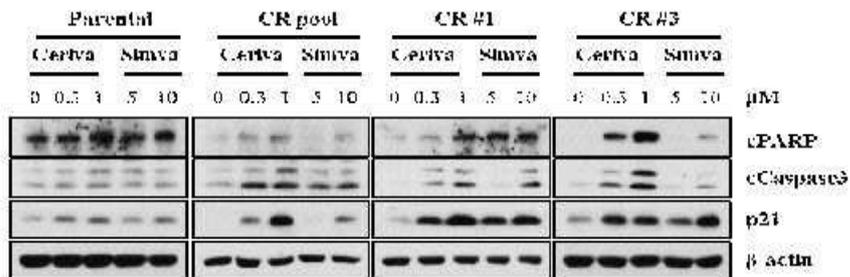
A.



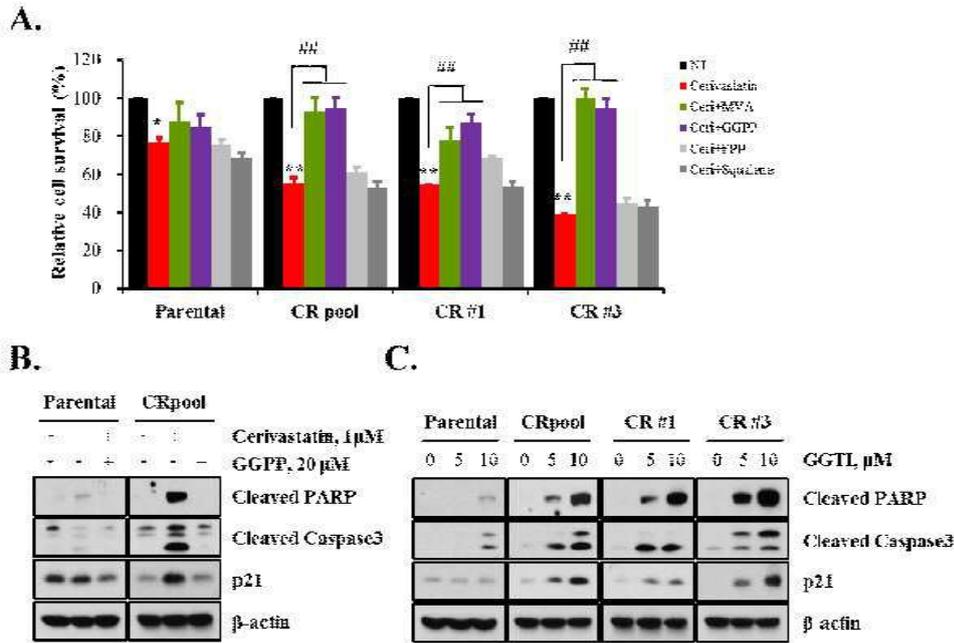
B.



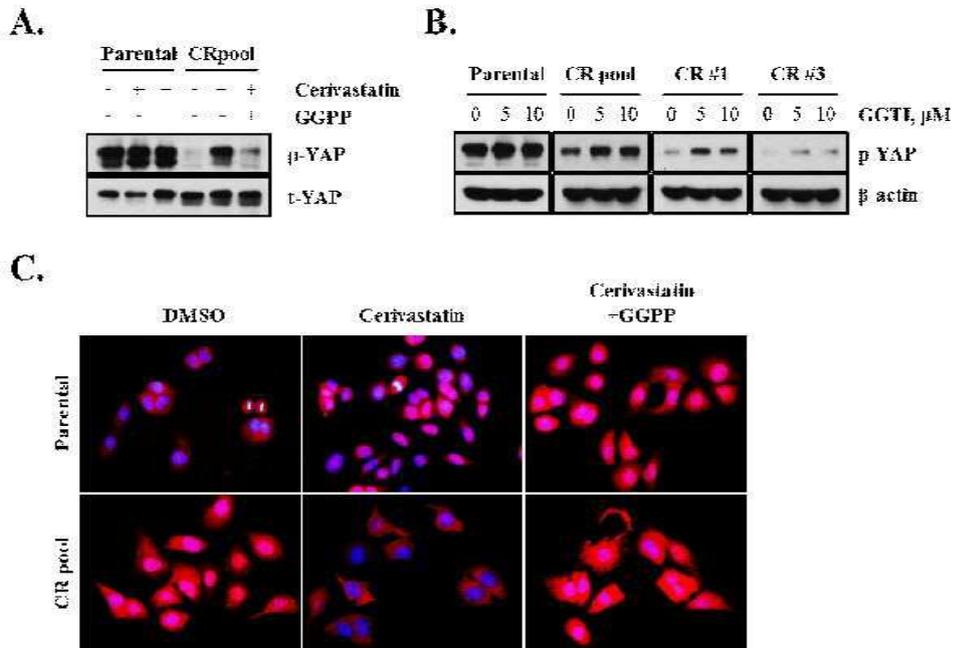
C.



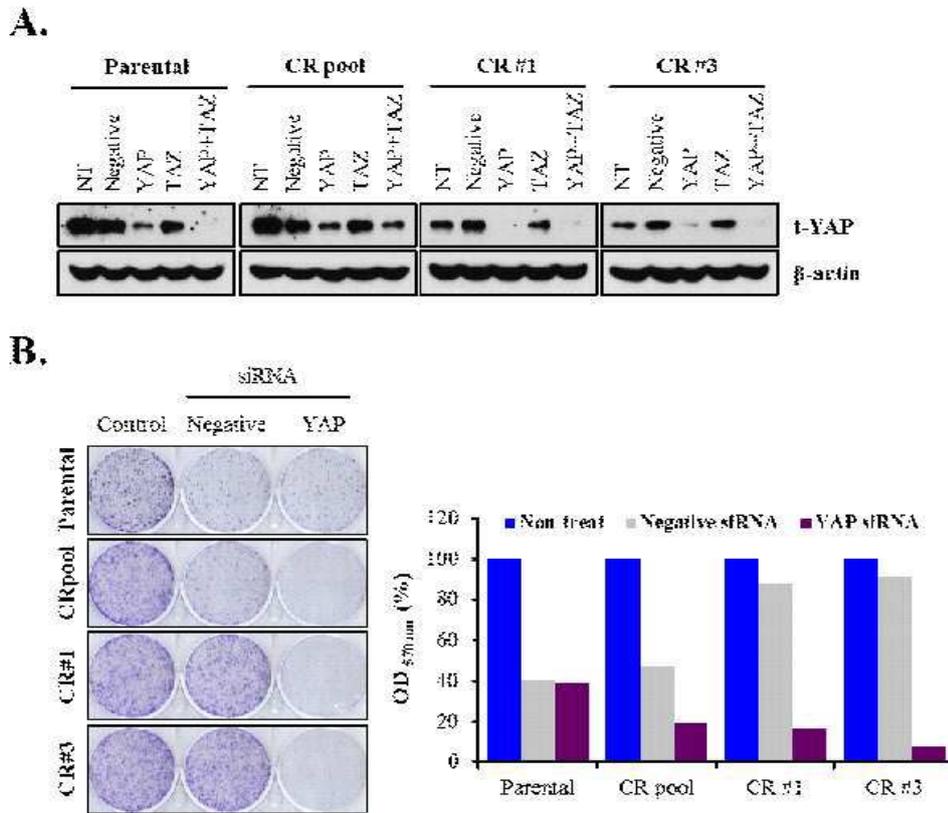
도면6



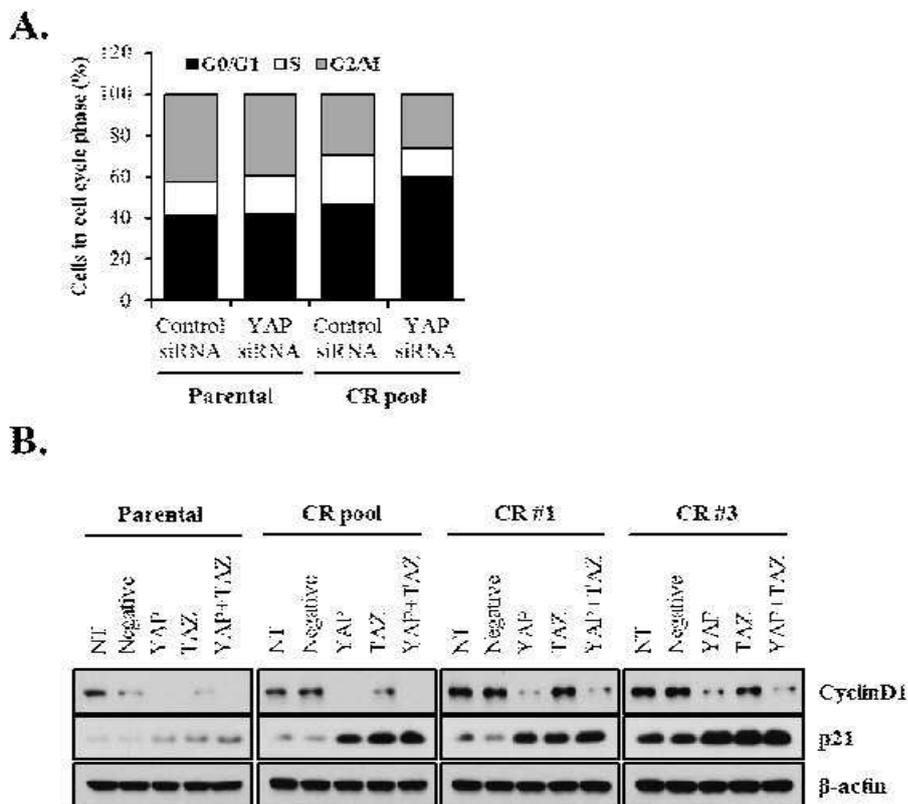
도면7



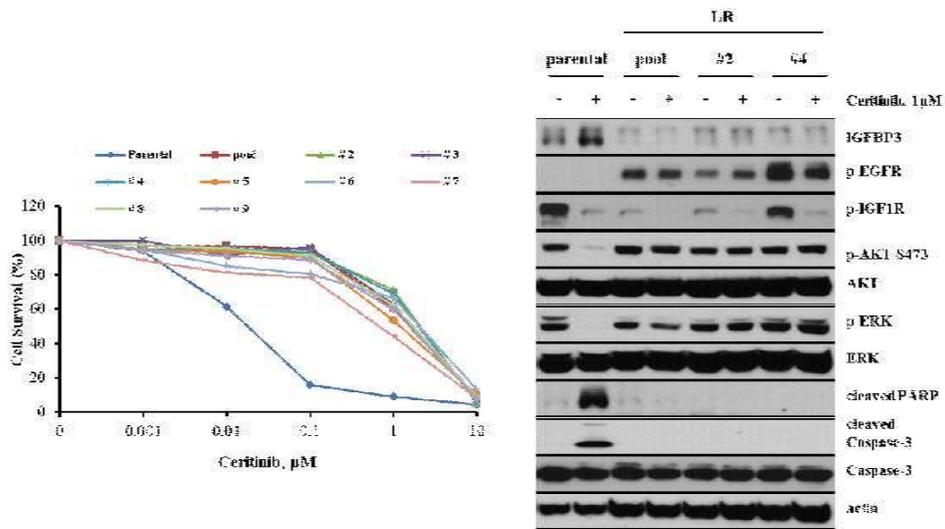
도면8



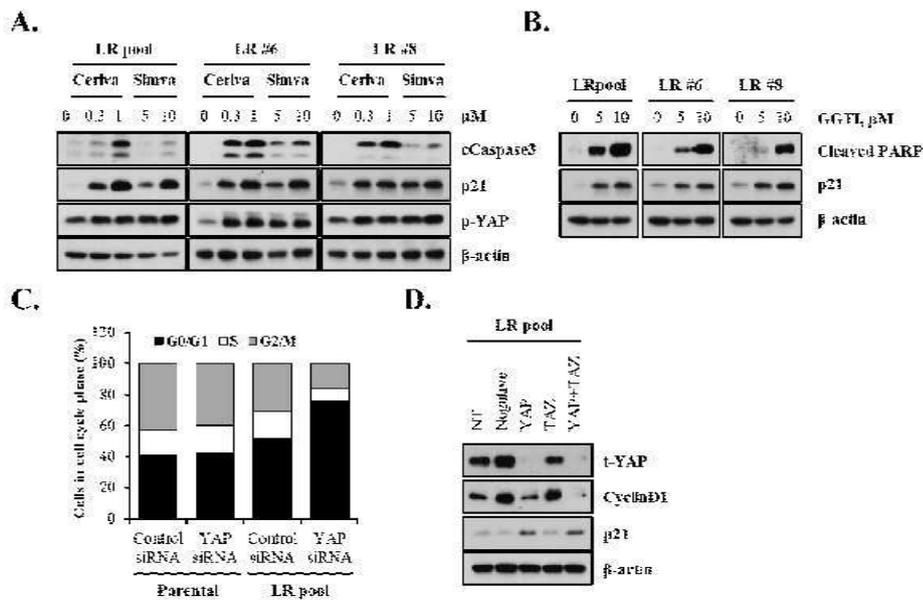
도면9



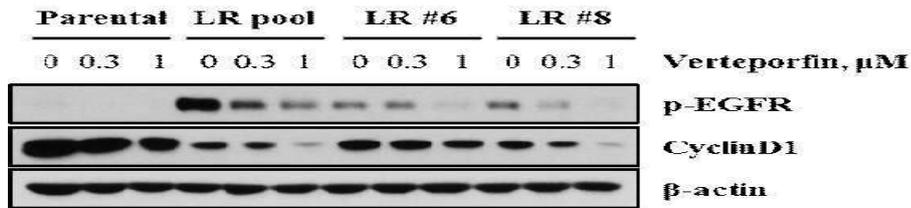
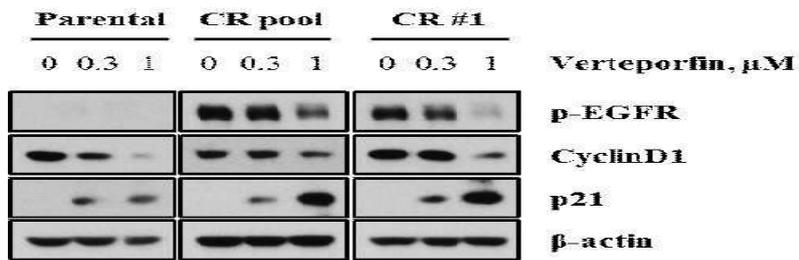
도면10



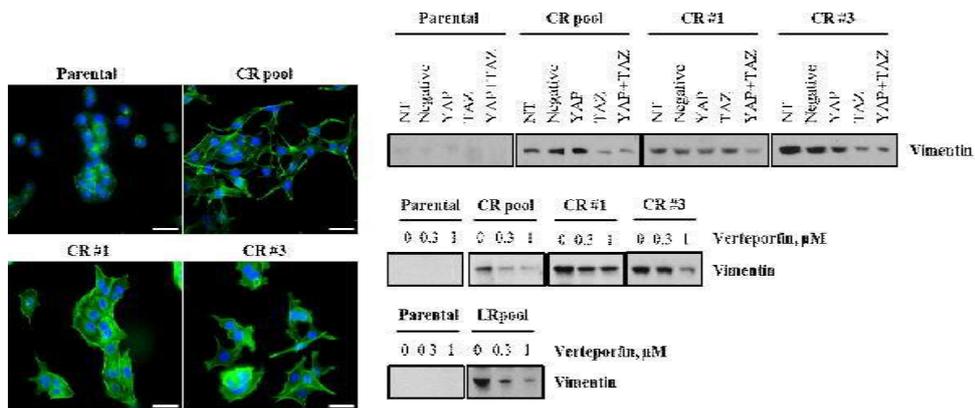
도면11



도면12

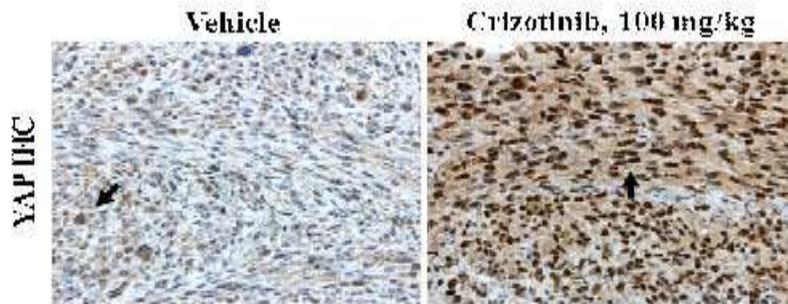
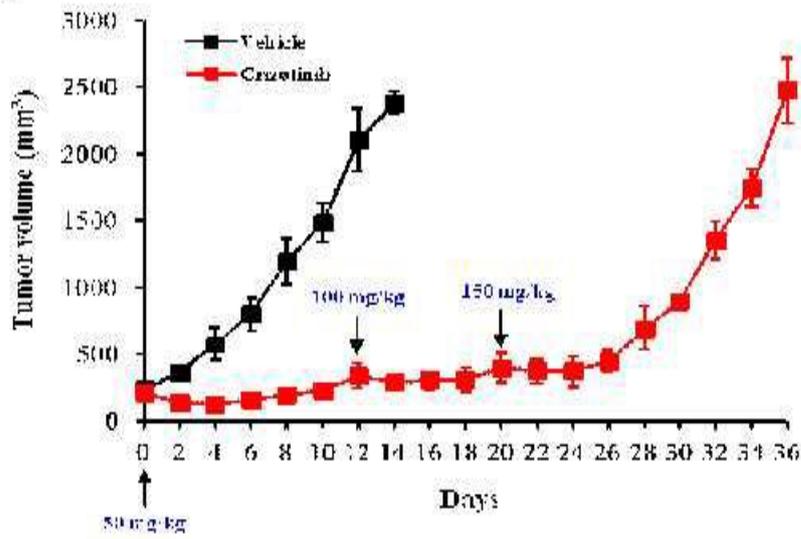


도면13



도면14

A.



B.

