



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월20일

(11) 등록번호 10-2422090

(24) 등록일자 2022년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/196 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01) A61K 31/409 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/196 (2013.01)

A61K 31/155 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0124719

(22) 출원일자 2020년09월25일

심사청구일자 2020년09월25일

(65) 공개번호 10-2021-0036299

(43) 공개일자 2021년04월02일

(30) 우선권주장

1020190118160 2019년09월25일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

Am. J. Cancer Res., 6(5), 996-1010, 2016.

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 5 항

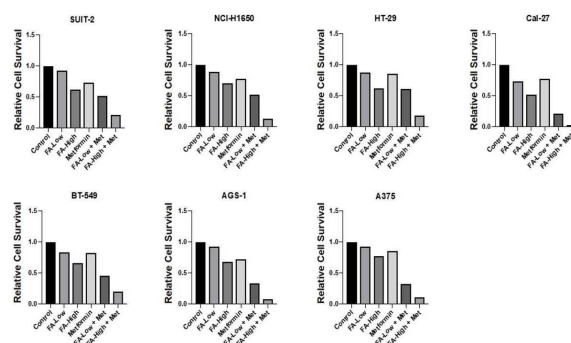
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 YAP-TEAD 상호작용 저해제 및 혈당 강하제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

## (57) 요약

본 발명은 히포(Hippo) 신호전달 경로의 활성화제; 및 혈당 강하제의 복합 처방을 통한 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 31/167* (2013.01)

*A61K 31/409* (2013.01)

*A61K 31/4406* (2013.01)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2300/00* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Cancer, 70, 329/1-19, 2018.

W02019126524 A1

W02018213748 A1

KR1020130015669 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465028659

과제번호 HI17C1560000019

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발(R&D)

연구과제명 암 대사체 재프로그래밍을 통한 혁신적 항암약물요법 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.04.01 ~ 2020.12.31

## 명세서

### 청구범위

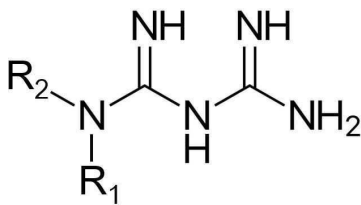
#### 청구항 1

히포(Hippo) 신호전달경로 활성화제; 및 혈당 강하제를 포함하고,

상기 히포(Hippo) 신호전달경로 활성화제는 플루페남산(flufenamic acid), 베르테포르핀(Verteporfin), TED-347(2-Chloro-1-(2-((3-(trifluoromethyl)phenyl)amino) phenyl)ethanone), VGLL4(Vestigial like family member 4), 펩타이드 17(Peptide 17) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하며,

상기 혈당강하제는 하기 화학식 1로 표시되는 비구아나이드(Biguanide) 계열 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

#### 화학식 1



상기 화학식 1에서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 또는 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이다.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 화학식 1의 R<sub>1</sub>은 수소 또는 메틸이고, R<sub>2</sub>는 메틸, 부틸 또는 페닐 에틸인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 폐암, 위암, 유방암, 대장암, 췌장암 및 두경부암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

제 1 항에 있어서, 상기 암의 치료는 암의 재발 또는 암의 전이를 억제하는 것을 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

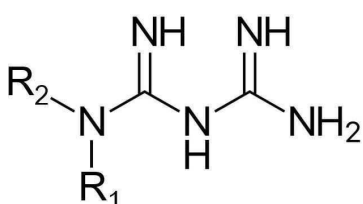
#### 청구항 18

히포(Hippo) 신호전달경로 활성화제; 및 혈당 강하제를 포함하고,

상기 히포(Hippo) 신호전달경로 활성화제는 플루페남산(flufenamic acid), 베르테포르핀(Verteporfin), TED-347(2-Chloro-1-(2-((3-(trifluoromethyl)phenyl)amino) phenyl)ethanone), VGLL4(Vestigial like family member 4), 펩타이드 17(Peptide 17) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하며,

상기 혈당강하제는 하기 화학식 1로 표시되는 비구아나이드(Biguanide) 계열 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

#### 화학식 1



상기 화학식 1에서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 또는 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이다.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 YAP-TEAD 상호작용 저해제 및 혈당 강하제의 복합 처방을 통한 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 인간 게놈프로젝트의 결과 사람의 염기서열이 분석되었으며, 이후 유전체 분석을 통해 암의 발생 원인이 유전자 돌연변이에 있음을 발견하였다. 이를 바탕으로 암환자가 가지는 유전적 돌연변이를 타겟으로 하는 표적치료가 등장하였으며, 이는 큰 효과를 보여 암 치료의 새로운 길을 열었다고 평가받고 있다.

[0004] 한편, 표적치료의 경우 암 특이적 돌연변이를 타겟으로 하기 때문에 치료의 대상이 될 수 있는 환자의 수가 적고, 일시적으로 큰 효과를 보이더라도 항암약물에 대한 저항성을 갖는 경우가 많아 지속적인 후속 치료제의 개발이 또 다른 해결 과제로 남아있다.

[0005] 이에 기존의 돌연변이 표적치료에서 나아가 암세포가 가지는 고유한 대사적 특징을 타겟으로 하기 위한 다양한 시도들이 이루어지고 있다. 특히 암세포의 경우 포도당을 비롯한 당에 중독되어 있는 것으로 알려져 있으므로, 기존에 제2형 당뇨병 치료제로 사용되는 혈당강하제인 메트포르민(Metformin) 또는 펜포르민(Phenformin) 등의 비구아나이드(Biguanide) 계열 약물들을 암 치료제로 사용하고자 다양한 임상시험이 진행중이다.

[0006] 비구아나이드 계열 약물은 지난 수십년간 제2형 당뇨병 치료제로 사용된 약물로서 그 안전성과 경제성이 입증된 약물이며, 현재 다양한 연구 결과들이 비구아나이드 계열 약물의 항암 효능을 제시하고 있어 이를 항암 약물로 재활용하기 위한 다양한 임상시험이 진행 중이다.

[0007] 하지만, 비구아나이드 계열 약물을 기존 항암제의 보조제로 활용하는 방안 등이 제시되었을 뿐, 히포(Hippo) 경로 조절제 등과 병용하여 사용되는 방안은 전혀 알려진 바 없다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0103732호

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 히포(Hippo) 신호전달 경로 활성제; 및 혈당 강하제를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 히포(Hippo) 신호전달 경로 활성제; 및 혈당 강하제를 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 측면은, 히포(Hippo) 신호전달 경로 활성제; 및 혈당 강하제를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

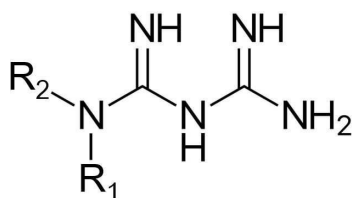
[0015] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 혈당 강하제는 포도당 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor), 포도당 수송체(glucose transporter, GLUT) 저해제, 해당작용(glycolysis) 저해제, 인슐린 분비 증진제 및 인슐린 감수성 개선제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이다.

[0017] 보다 구체적으로는, 상기 포도당 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor)는 SGLT2(Sodium-glucose

cotransporter 2) 억제제 또는  $\alpha$ -글루코시다제( $\alpha$ -glucosidase) 억제제이다.

- [0019] 보다 더 구체적으로는, 상기 SGLT2 억제제는 다파글리플로진(Dapagliflozin), 이프라글리플로진(Ipragliflozin), 엠파글리플로진(Empagliflozin), 에르투글리플로진(Ertugliflozin) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 보다 더 구체적으로는, 상기  $\alpha$ -글루코시다제 억제제는 아카보즈(Acarbose), 보글리보스(Voglibose) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 GLUT 저해제는 BAY-786, STF-31, WZB-117, 파센틴(Fasentin) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 해당작용 저해제는 2-디옥시글루코스(2-DG) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 인슐린 분비 증진제는 GLP-1 수용체 작용제, DPP-4(Dipeptidyl peptidase-4) 억제제, 레파글리니드(Repaglinide), 미티글리니드(Mitiglinide), 나테글리니드(Nateglinide), 글리클라지드(Gliclazide), 글리메피리드(Glimepiride), 글리피지드(Glipizide) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 보다 구체적으로는, 상기 GLP-1 수용체 작용제는 렉시세나티드(Lixisenatide), 리라글루티드(Liraglutide), 둘라글루티드(Dulaglutide) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 보다 구체적으로는, 상기 DPP-4 억제제는 시타글립틴(Sitagliptin), 빌다글립틴(Vildagliptin), 삭사글립틴(Saxagliptin), 리나글립틴(Linagliptin), 제미글립틴(Gemigliptin), 테넬리글립틴(Teneligliptin), 알로글립틴(Alogliptin), 에보글립틴(Evogliptin), 아나글립틴(Anagliptin) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 인슐린 감수성 개선제는 피오글리타존(Pioglitazone), 로베글리타존(Lobeglitazone), 하기 화학식 1로 표시되는 비구아나이드(Biguanide) 계열 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다:

[0032] **화학식 1**



- [0033]
- [0034] 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$  및  $\text{R}_2$ 는 각각 독립적으로 수소,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  알킬 또는 페닐  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  알킬이다.
- [0036] 구체적으로, 상기 화학식 1의  $\text{R}_1$ 은 수소 또는 메틸이고,  $\text{R}_2$ 는 메틸, 부틸 또는 페닐 에틸일 수 있다
- [0037] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$  및  $\text{R}_2$ 는 모두 메틸일 수 있으며, 이 경우 화학식 1 화합물은 메트포르민(Metformin)이 된다.
- [0038] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$  및  $\text{R}_2$ 는 각각 수소 및 페닐 에틸일 수 있으며, 이 경우 화학식 1 화합물은 펜포르민(Phenformin)이 된다.
- [0039] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$  및  $\text{R}_2$ 는 각각 수소 및 부틸일 수 있으며, 이 경우 화학식 1 화합물은 부포르민(Buformin)이 된다.
- [0040] 구체적으로는, 상기 화학식 1 화합물은 메트포르민일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 “비구아나이드(Biguanide)”는 비구아나이드 계열 유도체인 메트포르민, 펜포르민 및 부포르민을 포함하여 이미도디카보니미딕 디아마이드(Imidodicarbonimidic diamide) 백본(backbone)을 가지는 모든

유기 화합물을 의미할 수 있으며, 대표적인 비구아나이드 계열 약물인 메트포르민, 펜포르민 및 부포르민은 일차적으로 간에서 생성되는 포도당의 양을 감소시키고, 근육 조직이 인슐린에 민감하게 만들어 근육으로 포도당이 흡수되는 것을 도와 혈당을 낮추어주는 효과를 갖는다.

[0043] 구체적으로, 상기 암은 흑색종, 폐암, 위암, 유방암, 대장암, 췌장암 및 두경부암으로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에서, 상기 “히포(Hippo) 신호전달 경로”는 세포 증식 및 세포 사멸을 조절하고 기관 크기를 결정하는 신호전달 경로를 의미한다. 상기 경로는 포유동물에서 종양 억제자로서의 역할을 하는 것으로 여겨지며, 인간 암에서 이러한 경로의 장애가 종종 검출된다. 상기 히포(Hippo) 신호전달 경로는 줄기 세포 및 전구 세포의 자기-재생 및 분화에 관여하거나 이를 조절할 수 있다. 또한, 상기 히포(Hippo) 신호전달 경로는 상처 치유 및 조직 재생에 관여할 수 있으며, 다른 신호전달 경로, 예컨대 Wnt, Notch 및 헛지호그와 교차-소통하기 때문에 광범위하게 다양한 생물학적 사건에 영향을 미칠 수 있고, 이의 기능장애는 암 이외에도 다수의 인간 질환에 관여할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0046] 상기 히포(Hippo) 신호전달 경로는 MST1/2-LATS1/2의 Kinase Cascade로 이루어져 있으며 종양유전자(Oncogene)인 YAP(Yes-연관 단백질) 및 TAZ(PDZ-결합 모티프를 갖는 전사 보조활성화제; WWTR1)의 전사 보조 활성제(Transcriptional Coactivator)를 인산화시켜 발현을 억제하는 역할을 한다. 히포(Hippo) 신호전달 경로가 억제되면 YAP/TAZ는 활성화되어 TEAD(TEA-도메인-함유 패밀리의 4종의 단백질) 전사조절인자와 결합함으로써 세포주기 및 성장, 줄기세포 및 다양한 암종의 발생, 전이, 약물 저항성 및 재발에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 즉, 일부 조건 하에서 YAP 또는 TAZ는 종양유전자로서 작용하고, 히포(Hippo) 신호전달 경로는 종양 억제자로서 작용한다.

[0048] 구체적으로, 본 발명은 상기 조성물이 히포(Hippo) 신호전달 경로를 활성화하고, YAP를 인산화 또는 불활성화시키거나, YAP-TEAD의 단백질-단백질 상호작용을 억제하는 기작을 통해 암세포 사멸효과를 나타내는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명에서 상기 “히포(Hippo) 신호전달 경로의 활성화”는 히포(Hippo) 신호전달 경로가 활성화되어 YAP가 불활성(인산화)되는 경우를 의미하는 것으로서, 히포(Hippo) 신호전달 경로를 활성화하는 것 그 자체를 의미할 뿐만 아니라, YAP와 TEAD 단백질의 결합이 억제되는 모든 경우를 의미하는 것으로 사용하였다.

[0051] 구체적으로, 본 발명은 상기 히포(Hippo) 신호전달 경로 활성제는 YAP-TEAD의 단백질-단백질 상호작용의 저해제일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 YAP 저해제는 YAP 활성을 억제하거나, YAP의 인산화를 촉진시키거나, YAP의 분해를 촉진시킬 뿐만 아니라 YAP와 TEAD의 상호작용을 저해하는 모든 경우를 유발하는 물질을 의미하는 것일 수 있다.

[0053] 보다 구체적으로, 상기 YAP-TEAD 단백질-단백질 상호작용의 저해제는 플루페남산(flufenamic acid), 베르테포르핀(Verteporfin), CA3, TED-347, VGLL4 및 이의 유도체, 벤조설폰일 할로젠(Benzosulfonyl halogen), 비스-아릴 하이드라진 스캐폴드(Bis-aryl hydrazine scaffold), MGH-CP1, 펩타이드 17(Peptide 17) 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 상기 나열된 저분자 화합물 외에도, 특정 단백질(예를 들어 GLUT, SGLT2, DPP-4,  $\alpha$ -글루코시다제 등)에 대한 억제제로서 당업계에 이미 그 서열이 공지된 상기 단백질의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 타겟 유전자-인식 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 시스템 등의 발현 억제용 핵산 분자; 및 단백질 수준에서의 억제를 위해 이들 단백질을 특이적으로 인식하는 항체 또는 앵타머도 사용될 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[0056] 본 발명의 일 실시예에서는, 암세포에 YAP-TEAD 상호작용 저해제를 처리한 경우 히포(Hippo) 신호전달 경로가 활성화되며, 상기 암세포에 예시적인 혈당 강하제로서 비구아나이드 계열 화합물인 메트포르민 또는 펜포르민을 처리한 경우 시너지 효과에 의해 각각의 인자를 따로 처리한 것에 비교할 때 암세포 사멸효과가 현저히 상승하는 것을 확인하였다.

[0057] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 포도당 수송체(GLUT) 저해제를 처리하는 경우, 암세포 사멸효과가 나타나는 것을 확인하였으며(도 1 및 2), 나아가 이러한 효과가 히포(Hippo) 신호전달 경로를 활성화시켜 YAP가 불활성화(인산화)되는 것에서 기인한다는 사실을 확인하였다(도 3 내지 8).

[0058] 또한, 상기한 사실을 기초로 하여 YAP-TEAD 상호작용 저해제와 메트포르민을 처리한 경우 흑색종, 폐암, 위암,



유방암, 대장암, 췌장암 및 두경부암의 세포가 사멸하는 효과를 확인하였다(도 9 내지 11).

- [0059] 구체적으로, 본 발명은 상기 비구아나이드 계열 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이를 필요로 하는 개체를 대상으로 체중kg 당100 내지300mg의 양으로 투여되는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 더욱 구체적으로는 체중kg 당250mg의 양으로 투여되는 것일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에서 용어 “예방”은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 발암 증상이 상기 조성물을 사용하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 용어 “치료”는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다.
- [0062] 구체적으로, 상기 암의 치료는 암의 재발 또는 암의 전이를 억제하는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0064] 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 전신 또는 국소 투여될 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.
- [0066] 상기 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.
- [0068] 경구 투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있고, 상기 고형제제는 상기 화합물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [0069] 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있고, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.
- [0070] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.
- [0071] 상기 조성물은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 약학적으로 유효한 양이 투여될 수 있으며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 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.
- [0072] 본 발명에서 약학적으로 허용 가능한 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 히드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트



레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 다이하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로벤조에이트, 히드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트,  $\beta$ -히드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만텔레이트 등을 포함한다.

- [0073] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 디클로로메탄, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산염)과 반응시켜 얻는다.
- [0074] 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0075] 상기 암의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용 가능하다. 예컨대, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 및 인간 등 어느 개체에나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한 없이 포함한다.
- [0076] 본 발명의 다른 측면은, 상기 조성물을 다른 항암제와 동시 또는 순차적으로 병용투여 하는 것인약학적 조성물을 제공한다.
- [0077] 상기 약학적 조성물은 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있다.
- [0078] 다른 예로서, 농도 의존적인 항암활성을 나타내는 조성물을 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 다른 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있다.
- [0079] 상기 조성물과 함께 병용투여 될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 티오테파(thiotepa), 멜파란(melphalan), 부설판(busulfan), 니무스틴(nimustine), 라니무스틴(ranimustine), 다카르바진(dacarbazine), 프로카르바진(procarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 메토트렉사이트(methotrexate), 페메트렉시드(pemetrexed), 테가풀/우라실(tegaful · uracil), 독시플루리딘(doxifluridine), 테가풀/기메라실/오테라실(tegaful · gimeracil · oteracil), 카페시타빈(capecitabine), 시타라빈(cytarabine), 에노시타빈(enocitabine), 겐시타빈(gemcitabine), 6-메르캅토프린(6-mercaptopurine), 플루다라빈(fludarabine), 펜토스타틴(pentostatin), 클라드리빈(cladribine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 피라루비신(pirarubicin), 마이토잔트론(mitoxantrone), 암루비신(amurubicin), 악티노마이신D(actinomycin D), 블레오마이신(bleomycin), 페플레오마이신(pepleomycin), 마이토마이신C(mytomycin C), 아클라루비신(aclarubicin), 지노스타틴(zinostatin), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이리노테칸(irinotecan), 이리노테칸 활성 대사물(SN-38), 노기테칸(nogitecan, topotecan), 에토포시드(etoposide), 프레드니솔론(prednisolone), 텍사메타손(dexamethasone), 타목시펜(tamoxifen), 토레미펜(toremifene), 메드록시프로게스테론(medroxyprogesterone), 아나스트로졸(anastrozole), 엑세메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole), 리투시맵(rituximab), 이마티닙(imatinib), 게피티닙(gefitinib), 겐투주맵 · 오조가마이신(gemtuzumab ozogamicin), 보르테조미브(bortezomib), 엘로티닙(erlotinib), 세톡시맵(cetuximab), 베바지주맵(bevacizumab), 수니티닙(sunitinib), 소라페닙(sorafenib), 다사티닙(dasatinib), 파니투무맵(panitumumab),

아스파라기나아제(asparaginase), 트레티노인(tretinoin), 삼산화비소(arsenic trioxide) 또는 이들의 염이나 활성 대사물을 포함할 수 있다.

- [0080] 본 발명의 다른 측면은, 히포(Hippo) 신호전달 경로 활성화제; 및 혈당 강하제를 포함하는 암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0081] 본 발명에서 사용되는 히포(Hippo) 신호전달 경로 활성화제 및 혈당 강하제에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0082] 상기 식품학적으로 허용 가능한 염은 식품학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염을 의미하는 것일 수 있다. 예를 들어, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속 염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명에서 상기 식품 조성물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있다.
- [0084] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.
- [0085] 상기 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안정처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다.
- [0086] 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.
- [0087] 상기 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 목적으로 정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.
- [0088] 구체적으로 상기 정제 형태의 식품 조성물은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0089] 상기 캡셀 형태의 식품 조성물 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0090] 상기 환 형태의 식품 조성물은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0091] 상기 과립형태의 식품 조성물은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0092] 또한, 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0094] 본 발명은 YAP-TEAD 상호작용 저해제와 혈당 강하제를 병용 처리하는 경우 선택적암세포 사멸 효과를 갖는 것을 확인하고, 이를 통해 전혀 새로운 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0095]

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

[0097]

도 1은 GLUT의 저해제를 투여한 경우의 메트포르민과의 병용 요법의 효과가 유지되는 것을 확인한 결과를 나타내었다.

도 2는 GLUT의 저해제를 투여한 경우 A375(흑색종)을 대상으로 MTT-assay를 실시한 결과를 나타내었다.

도 3은 GLUT를 저해하면 히포(Hippo) 신호전달경로를 활성화되고, 이에 따라YAP 단백질이 인산화(불활성화) 되는 것을 확인한 결과를 나타내었다.

도 4는 NCI-H1975(폐암) 및 MRC-5(정상 폐 세포) 세포를 대상으로, 병용 요법을 실시한 경우 히포(Hippo) 신호 전달 경로가 활성화되는지 여부를 확인한 결과를 나타내었다.

도 5는 AGS(위암) 및GES(정상 위 상피세포) 세포를 대상으로, 병용 요법을 실시한 경우 히포(Hippo) 신호전달 경로가 활성화되는지 여부를 확인한 결과를 나타내었다.

도 6은 Mel624(흑색종) 및 HEMn(정상 멜라닌 세포) 세포를 대상으로, 병용 요법을 실시한 경우 히포(Hippo) 신호 전달 경로가 활성화되는지 여부를 확인한 결과를 나타내었다.

도 7은 암세포인 AGS(위암) 및 정상 상피세포인 RGE를 대상으로, 병용 요법에 따른 결과를 면역형광법(Immunofluorescence)을 이용해 확인한 결과를 나타내었다.

도 8은 본 발명의 병용 요법을 적용한 경우, YAP 관련 인자의 발현을 확인한 결과를 나타내었다(A: YAP/TAZ의 전사 보조 활성제(transcription co-activator)와 전사 인자인TEAD의 결합이 억제됨, B: TEAD의 상대적인 루시퍼라아제(Luciferase) 활성도가 감소함).

도 9는 YAP-TEAD 상호작용 저해제를 메트포르민과 병용 처리한 경우, AGS(위암) 및 BT-549(유방암)의 사멸효과를 확인한 결과를 나타내었다.

도 10은 YAP-TEAD 상호작용 저해제인 플루페남산(Flufenamic Acid)을메트포르민과 병용 처리한 경우,A375(흑색종), NCI-H1650(비 소세포암 세포), Cal-27(두경부암), HT-29(대장암), SUIT-2(췌장암), AGS(위암) 및 BT-549(유방암)의 MTT-assay 결과를 나타내었다.

도 11은 YAP-TEAD 상호작용 저해제인 베르테포르핀(Verteporfin)을메트포르민과 병용 처리한 경우,A375(흑색종), NCI-H1650(비 소세포암 세포), Cal-27(두경부암), HT-29(대장암), SUIT-2(췌장암), AGS(위암) 및 BT-549(유방암)의 MTT-assay 결과를 나타내었다.

도 12는 글루코스 차단(Glucose Starvation)과 펜포르민의 병용 처리에 의해 암세포에서 Hippo 신호전달경로가 활성화됨을 보여주는 웨스턴 블롯 결과(도 12a) 및 암세포 사멸 효과를 보여주는 MTT 어세이 결과(도 12b)를 각각 나타낸다.

도 13은 2-디옥시글루코스(2-DG)와 펜포르민의 병용 처리에 의해 암세포에서 Hippo 신호전달경로가 활성화됨을 보여주는 웨스턴 블롯 결과(도 13a) 및 암세포 사멸 효과를 보여주는 MTT 어세이 결과(도 13b)를 각각 나타낸다.

도 14는 인 비보 수준에서 저혈당 처리와 메트포르민 처리의 조합에 의한 효과를 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 도 14a는 동물실험의 개요도로서, Balb/C 누드 마우스를 두 그룹으로 나누어 한 그룹에는 정상 사료를, 다른 그룹에는 탄수화물이 없는 사료를 주고, 메트포르민을 주사하였다. 도 14b는 대조군과 조합 처리군에서의 종양 크기 변화를 보여준다. 도 14c는 식이조절에 따라 마우스의 혈당 수치가 현저히 감소함을 보여주는 그래프이다. 식이조절에 따라 마우스의 체중이 일정 정도 감소하나, 안정적으로 유지됨을 확인하였으며(도 14d), 병용처리 결과 마우스의 종양 크기와 무게가 모두 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 14e).

도 15는 인 비보 수준에서 YAP-TEAD 단백질 상호작용 억제제와 메트포르민의 병용 투여에 의한 효과를 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 도 15a는 대조군과 병용투여군에서의 종양 크기 변화를 보여준다. 병용투여 결과 마우스의 종양 크기와 무게가 모두 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 15b).

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0100] **실시예 1. 세포 배양 및 실험 재료의 준비**
- [0101] 실험에 사용한 모든 세포주는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 구체적으로, A375(흑색종), Mel624(흑색종), BT-549(유방암), Cal-27(Head and Neck Cancer; 두경부암), 3T3-L1(지방 전구세포), MEF(Mouse embryonic fibroblast), SVEC(Seminal vesicle epithelial cells) 및 HT-29(대장암) 세포주는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다. HEL-299(정상 폐 세포), NCI-H1650(비소세포폐암 세포), AGS(위암), Suit-2(췌장암), NCI-H23(폐암), NCI-H1975(폐암) 및 MRC-5(정상 폐 세포) 세포주는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. Sk-Mel-2(흑색종) 및 Sk-Mel-28(흑색종) 세포주는 MEM(Minimum Essential Medium) 배지에서 배양하였고, HEMn(정상 멜라닌 세포) 세포주는 피부세포 기반 배지(Dermal Cell Basal Media)에 멜라닌세포 성장 키트(Melanocyte Growth Kit)를 넣어준 배지에서 배양하였다. IMCD3(마우스 유래의 정상 세포), GES(정상 위 상피 세포) 및 RGE(정상 상피세포) 세포주는 DME/F12 배지에서 배양하였다.
- [0102] 상기 모든 배양액에는 10% FBS를 첨가하였고, 50ug/ml의 페니실린/스트렙토마이신 용액(Penicillin/Streptomycin solution)을 첨가하였다.
- [0103] MCF10A(정상 상피세포) 세포주는 DMEM-F12배지에 5% 말 혈청(horse serum), EGF(Epidermal Growth Factor) 20ng/ml, 히드로코르티손(hydrocortisone) 0.5 µg/ml, 콜레라 독소(cholera toxin) 100ng/ml 및 인슐린(insuline) 10 µg/ml을 넣어 배양하였다.
- [0104] YAP(Yes-연관 단백질)-TEAD 상호작용 저해제와 대사질환 치료제의 병용 효과를 규명하기 위해 사용한 YAP-TEAD 상호작용 저해제는 플루페남산(Flufenamic Acid)(Cayman, 21447) 및 베르테포르핀(Verteporfin)(Cayman, 17334)을 사용하였다.
- [0105] 본 발명에서 사용한 항체인 YAP(14074S), YAP(12395S), TAZ(4883S), phospho-AMPK<sup>T172</sup>(2535S), phospho-AMPK<sup>S485</sup>(2537S), AMPK(5831S), phospho-ACC<sup>S79</sup>(3661S), LATS(9153S), phospho-LATS1<sup>T1079</sup>(8654S), Pan-TEAD(13295S), phospho-p38<sup>T180</sup>(4511S), phospho-ERK<sup>T202/T204</sup>(9101S), phospho-S6K<sup>T421/T424</sup>(9204S), p62(88588S) 항체는 Cell Signaling을 통해 구매하여 사용하였다.
- [0106] 또한, Cyr61(sc-374129), GAPDH(sc-25778), Vinculin(sc-73264) 항체는 Santa Cruz biotechnology를 통해 구매하여 사용하였다.
- [0108] **실시예 2. 포도당 수송체(GLUT) 저해제를 이용한 병용 요법의 효과 확인**
- [0109] 본 발명의 병용 요법(Combination therapy)에 의하여, 포도당 수송체(GLUT)의 저해제와 비구아나이드 계열 약물을 함께 처방하는 경우 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서 암세포만을 사멸하는 효과가 있는지 확인하기 위한 실험을 실시하였다.
- [0110] 구체적으로, 두 종류의 암세포인 A375(흑색종) 및 Mel624(흑색종)를 대상으로 GLUT의 저해제로 알려진 BAY-876을 처리하고, 메트포르민을 3 내지 10mM의 농도로 처리하여 세포 사멸정도를 현미경으로 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0111] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 포도당 수송체인 GLUT의 저해제(BAY-876)와 메트포르민을 병용 투여하는 경우 우수한 세포 사멸효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0112] 이러한 결과를 뒷받침하기 위하여, A375(흑색종)을 대상으로 MTT-assay를 실시하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 그 결과, GLUT 저해제인 Bay-876 또는 메트포르민을 단독으로 처리한 경우와 비교하여 상기 두 약물을 병용처리한 경우 암세포의 사멸 효과가 현저히 증가한 것을 확인하였다.
- [0114] **실시예 3. 병용 요법에 의한 암세포 특이적 히포(Hippo) 경로 활성화 여부 확인**
- [0115] 상기 실시예 2의 실험과정에서 GLUT의 억제제가 히포(Hippo) 신호전달경로를 활성화시키고, 이에 따라 YAP 단백질이 인산화(불활성화) 되는 것을 확인하였다. 이런 결과에 대해서는 도 3에 나타내었다.



- [0116] 이에 따라, 본 발명자는 면역침강법(Immunoprecipitation) 및 면역블로팅(Immunoblotting)법을 이용하여 본 발명의 병용 요법을 실시하였을 경우 정상세포와 암세포 간의 히포(Hippo) 경로 활성화 여부에 대하여 확인하였다.
- [0117] 상기 면역침강법 및 면역 블로팅을 위하여 정상세포와 암세포를 각각 6 웰 플레이트에 배양한 뒤, 24시간 경과 후 포도당이 풍부한 배지(High Glucose) 또는 무포도당 배지(Glucose Free Media)로 배지를 교체하였다.
- [0118] 배지를 교제한 후 3시간 뒤 메트포르민을 10mM로 처리하여 9시간 경과 뒤 세포를 용해시켰다. 용해물(Lysate)은 프로테아제(Protease)/포스파타아제(phosphatase) 억제제(Thermo Fisher, 78446)이 포함된 0.5%의 노닐 페녹시폴리에톡시에탄올(Nonyl phenoxypolyethoxylethanol)(NP-40) 라이시스 완충액(lysis buffer) 조건에서, 13000g로 4℃에서 10분간 원심분리 하였다. 이후, 상층액만 새로운 튜브로 옮겨, 일부는 2X SDS 샘플 완충액(100mM Tris, 4% SDS, 0.004% Bromo-phenol-blue, 20% Glycerol, 10% β-머캅토에탄올)과 섞어 7분간 끓여 시료를 제작하였으며, 나머지 용해물은 항체와 함께 밤새도록 인큐베이션 한 뒤, 마그네틱 비드(Magnetic Bead; Bio-rad, 1614023)와 2시간 배양한 후 4회 세척하여 1X SDS 샘플 완충액과 섞어 시료를 제작하였다. 제조된 시료는 7.5~9% SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 활용하여 분리되었으며, 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인에 전사(transfer) 하였다. 상기 멤브레인은 TBS-T(Tris-buffered saline with Tween 20)에 녹인 5% 탈지 우유(skim milk)로 블로킹하였으며, 1차 항체는 밤새도록 인큐베이션 하였다. 항체와 배양한 뒤, TBS-T로 10분씩 3번 세척한 뒤, HRP(horseradish peroxidase)가 붙은 2차 항체를 1:5000의 비율로 탈지우유(skim milk)에 희석하여 40분간 멤브레인을 인큐베이션 하였다. 밴드는 ECL(enhanced chemiluminescence) 용액(Millipore, WBKLS0500)을 사용하여 확인하였다.
- [0119] 본 발명에서는 폐암, 위암 및 흑색종에 대하여 본 발명의 병용 요법을 실시한 경우 히포(Hippo) 신호전달 경로가 활성화되는지 상기한 방법을 통해 확인하였다.
- [0120] 구체적으로, 폐암과 관련하여 NCI-H1975(폐암) 및 MRC-5(정상 폐 세포) 세포를, 위암과 관련하여 AGS(위암) 및 GES(정상 위 상피세포)세포를, 흑색종과 관련하여 Mel624(흑색종) 및 HEMn(정상 멜라닌 세포)를 1:1로 대응하여 병용 요법을 실시하였고, 그 결과를 도 4 내지 도 6에 각각 나타내었다.
- [0121] 그 결과, 본 발명의 병용 요법에 의하여 암세포에서는 히포(Hippo) 신호전달경로가 활성화되고, YAP 단백질이 인산화되어 불활성화 되며, 특히 메트포르민 10mM 투여군에서는 밴드가 사라지는 것을 확인할 수 있었던 반면, 정상세포에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다.
- [0122] 또한, 그 이외의 단백질들의 변화는 정상세포와 암세포에서 동일하게 나타나, 정상세포-암세포 간의 병용처리에 의한 차이는 히포(Hippo) 신호전달 경로 및 그 타겟인YAP 단백질에 의해 나타난다는 사실을 확인하였다.
- [0124] **실시예 4. 병용 요법에 의한 암세포 특이적 YAP 관련 인자의 발현 확인**
- [0125] 히포(Hippo) 신호전달 경로의 중요한 단백질인 YAP은 암세포의 국소 부착 및 종양 공격성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 활성화(비-인산화)된YAP는 세포 핵 내로 전위되어 주요 표적 전사 인자인 TEA-도메인-함유 패밀리의4종의 단백질(TEAD1-TEAD4, 통칭"TEAD")을 발현시키는 것으로 알려져 있다.
- [0126] 본 발명자는 상기 실시예 3에서 병용 요법에 의해 히포(Hippo) 신호전달 경로의 YAP/TAZ 단백질이 불활성화 되는 것을 확인하였고, 이를 뒷받침하기 위해 YAP과 관련된 인자의 발현정도를 확인하였다.
- [0127] 암세포인 AGS(위암) 및 정상 상피세포인 RGE를 대상으로, 병용 요법에 따른 YAP과 세포의 국소부착(Focal Adhesion) 단백질인 Paxillin의 발현정도를 면역형광법(Immunofluorescence)을 이용해 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0128] 구체적으로, 면역형광법(Immunofluorescence)의 실시를 위하여 세포를 커버 슬라이드위에 시딩한 뒤, 24시간 경과 후 포도당이 풍부한 배지(High Glucose) 또는 무포도당 배지(Glucose Free Media)로 배지를 교체하였다.
- [0129] 배지 교체 후 3시간 뒤 메트포르민을 10mM로 처리하여 10시간 경과 뒤 PBS로 1회 세척 후, 4% 파라포름알데히드 용액으로 15분간 고정(fixation)하였다.
- [0130] PBS로 3번 세척한 뒤, 15분간 0.1% Triton-X100 용액으로 투과화(permeabilization)를 진행하였다. PBS로 10분간 3번 세척한 후 3% BSA/PBS 용액으로 30분 간 블로킹하였다. PBS로 10분 간 3번 다시 세척하고, Alexa-Fluor 488/594nm(Invitrogen, A-11001, A-11005)가 컨쥬게이션된 2차 항체로 2시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 10분씩 4번 세척한 후 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 마운팅 용액(mounting

solution; Invitrogen, P36931)을 활용하여 슬라이드 글라스에 마운팅 한 후 LSM880 공초점 현미경을 활용해 이미지를 촬영하였다.

[0131] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 정상세포인 RGE에서는 YAP 및 paxillin의 변화가 크지 않은 반면, 암세포인 AGS에서는 paxillin의 발현이 감소한 것을 확인하였다.

[0132] 나아가, YAP의 주요 표적 전사 인자인 TEAD와 관련하여, 본 발명의 병용 요법을 실시한 경우 도 8A에 나타난 바와 같이 YAP/TAZ의 전사 보조 활성제(transcription co-activator)와 전사 인자인 TEAD의 결합이 억제되는 것을 확인하였고, 도 8B에 나타난 바와 같이 TEAD의 상대적인 루시페라아제(Luciferase) 활성도가 감소하는 것을 확인하였다.

[0134] **실시예 5. YAP-TEAD 상호작용 저해제를 이용한 병용 요법의 효과 확인**

[0135] 상기 실시예를 통하여 본 발명의 병용 요법이 히포(Hippo) 신호전달 경로의 YAP/TAZ를 조절함으로써 항암효과를 나타내는 것을 확인하였으므로, 병용 요법의 GLUT 저해 조건을 YAP-TEAD 상호작용 저해제를 처리하는 것으로 대체하는 경우 암세포 사멸효과가 유지되는지 여부에 대한 실험을 실시하였다.

[0136] 구체적으로, 암세포인 AGS(위암) 및 BT-549(유방암)를 대상으로, YAP-TEAD 상호작용 저해제로 알려진 플루페남산(Flufenamic Acid)을 메트포르민과 병용처리한 후의 세포 사멸정도를 현미경으로 관찰하고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0137] 도 9에 나타난 바와 같이, YAP-TEAD 상호작용 저해제를 메트포르민과 병용 처리한 경우 암세포 모두에서 암세포 사멸효과가 유지되는 것을 확인하였다.

[0138] 상기 암세포 사멸효과에 대해 추가적으로 확인하기 위하여 A375(흑색종), NCI-H1650(비 소세포암 세포), Cal-27(두경부암), HT-29(대장암), SUIT-2(췌장암), AGS(위암) 및 BT-549(유방암)를 대상으로 YAP-TEAD 상호작용 저해제로 알려진 플루페남산(Flufenamic Acid) 및 베르테포르핀(Verteporfin)을 메트포르민과 병용 처리하고, MTT-assay를 실시한 결과를 도 10 및 도 11에 각각 나타내었다.

[0139] 그 결과, 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이 광범위한 암종에서 각각의 약물을 처리한 경우보다 두 약물을 병용처리한 경우에 암세포의 사멸이 현저하게 증가한 것을 확인하였다.

[0141] **실시예 6. 펜포르민을 이용한 병용 요법 효과의 추가적인 확인**

[0142] 글루코스가 없는 상태에서 약물의 세포사멸 효능을 규명하기 위하여 Glucose Free DMEM(Gibco, 11966025)를 사용하였다. 글루코스 수송체(transporter)를 억제하기 위하여 포도당 수송체 억제제인 BAY-876 (Caymanchem, 19961)을 사용하였고, 세포의 글루코스 대사작용을 억제하기 위하여 2-디옥시글루코스(2-DG, Sigma, D-8375)를 사용하였다. 약물에 의한 세포 사멸 분석을 위해 MTT 어세이를 수행하였으며, 이를 위한 MTT 시약은 Invitrogen(M6494)에서 구입하였다.

[0143] 면역 블롯팅을 위한 항체로 항-YAP(14074S), 항-TAZ(4883S), 항-phospho-LATS1<sup>T1079</sup>(8654S), 항-LATS1(3477S), 항-pan-TEAD(13295S), 항-phospho-FAK<sup>Y397</sup>(8556S), 항-FAK(71433S) 항체는 Cell Signaling에서 구입하였고, 항-빈쿨린(sc-73614) 항체는 Santa-Cruz에서 구입하였다.

[0145] **웨스턴 블롯팅**

[0146] 저혈당(Hypoglycemia) 자극과 펜포르민(Phenformin)의 병행 처리에 의한 시너지 효과를 확인하고자 A375 흑색종 세포를 12-웰 플레이트에 배양하고, 고-글루코스(High glucose)와 저-글루코스(Low glucose) 배지로 교체한 뒤 3시간 후 펜포르민을 30  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M 처리한 다음 8시간 뒤 1 X sample buffer(50mM Tris pH6.8, 2% SDS, 0.002% 브로모페놀 블루, 10% 글리세롤, 5%  $\beta$ -머캅토에탄올)을 이용하여 세포를 용해시켰다. 용해된 시료에 대해 Tris-아크릴아마이드 겔을 이용하여 웨스턴 블롯을 진행하였고, YAP 단백질의 인산화 패턴을 분석하기 위한 phos-tag 겔에는 phos-tag 아크릴아마이드(Wako, AAL-107)와 10mM MnCl<sub>2</sub>를 사용하였다.

[0147] 2-DG와 펜포르민의 병행처리에 의한 시너지 효과를 확인하고자 A375 흑색종 세포를 12-웰 플레이트에 배양하여, 2-DG를 5mM 처리한 뒤, 3시간 경과 후 펜포르민을 30  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M 처리한 다음 상술한 방법으로 샘플을 제작하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0149] **세포 독성 검증 및 MTT 어세이**

- [0150] 저혈당 자극과 펜포르민 처리의 시너지 효과를 세포 수준에서 관찰하기 위해 A375 흑색종 세포주를 24-웰 플레이트에 배양 후 고-글루코스, 저-글루코스 및 글루코스 수송체 억제제를 처리한 환경에서 펜포르민을 50  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M 처리하였다. 약물 처리 후 24시간이 경과한 시점에 100배율 현미경으로 세포 사진을 촬영하였다. 이후 12mM MTT 용액을 각 웰에 처리한 후 2시간배양한 뒤 DMSO로 용해시켜 MTT 어세이를 수행하였다.
- [0152] 실험결과
- [0153] 저혈당 자극과 펜포르민을 병행 처리한 결과 Hippo 신호전달경로가 활성화되면서 암세포의 사멸이 발생함을 관찰하였다. 두가지 처리에 의한 상승 효과를 확인하기 위해 고-글루코스 및 저-글루코스 배지에서 세포를 배양 후펜포르민을 용량 별로 처리한 결과, 저-글루코스 조건에서만 암세포에서 hippo 신호전달경로가 현저하게 활성화되고 이로 인해 YAP/TAZ 단백질의 인산화 및 분해가 유의하게 발생함을 확인하였다(도 12a). 아울러, 저-글루코스 배지와 글루코스 수송체 억제제인 BAY-876을 함께 처리한 경우에만 펜포르민에 의한 세포 사멸이 유의하게 발생함을 세포 사진 및 MTT 결과를 통해 확인하였다(도 12b)
- [0154] 아울러, 2-DG도 글루코스 대사과정을 억제하여 펜포르민과의 병용 처리시 상승효과가 확인되었다. 저혈당 조건을 유발하기 위하여 글루코스 공급 차단, 글루코스 수송체 억제제 처리 외에 글루코스 유사체인 2-디옥시글루코스 (2-DG)를 사용하였다. 2-DG는 해당과정(glycolysis)을 억제하는 것으로 보고되었으므로, 글루코스 공급 차단 (Glucose starvation)과 마찬가지로 2-DG도 비구아나이드 계열 약물과 시너지를 보일 것으로 예상되었다. 예상대로 웨스턴 블롯 결과 2-DG와 펜포르민을 병용 처리한 경우에만 hippo 신호전달경로가 현저히 활성화되어 YAP/TAZ 단백질이 유의하게 인산화되었고(도 13a), 2-DG와 펜포르민을 병용처리한 경우 글루코스 공급 차단과 마찬가지로 세포사멸이 현저히 증가하였으며, 이는 MTT 어세이 결과를 통해서도 확인되었다(도 13b).
- [0156] 실시예 7. 동물 실험
- [0157] 세포주 및 시약
- [0158] A375(흑색종) 세포주는 25mM 글루코스가 포함된 DMEM(Hyclone, SH30022.01) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였으며, 실험에 사용한 모든 배지에는 10%의FBS(Hyclone, SV30207.02)와 50  $\mu$ g/ml의 페니실린/스트렙토마이신 용액을 첨가하였다. 마우스에 주사하기 위하여 메트포르민 염산염(Cayman, 13118)과 베르테포르핀(Verteporfin)(Cayman, 17334)를 사용하였다.
- [0160] 마우스 이식
- [0161] 동물실험은 연세대학교 실험동물윤리위원회의 승인을 받아 동물윤리규정을 준수하며 실행되었다. 동물실험에는 6주령 BALB/C 누드 마우스를 사용하였고, 동물은 연세대학교 실험동물연구센터를 통하여 대한바이오링크사에서 구매하였다. 실험을 위해 100,000개의 A375 세포를 100  $\mu$ l PBS(Phosphate buffer saline, Welgene)에 풀어 마우스에 피하주사하였다. 이식된 마우스들을 1주일 뒤 2개의 그룹으로 무작위 분류하였다. 글루코스 제한과 메트포르민의 조합에 의한 효과를 확인하기 위해 대조군에는 PBS를, 조합 투여군에는 250mg/kg의 메트포르민을 주사하였다. 마우스 혈당 강하를 목적으로 탄수화물을 제거한 Ain-93 기반의 사료를 제작하여(중아바이오) 급여하였다. 베르테포르핀과 메트포르민의 병용투여 효과를 확인하기 규명하기 위해 대조군에는 PBS를, 조합 투여군에는 10mg/kg의 베르테포르핀과 250mg/kg의 메트포르민을 주사하였다. 각 약물은 5주 간 복강으로 주사하였고, 동물윤리규정을 준수하면서 안락사시켜 종양을 적출한 뒤 무게와 크기를 측정하였다. 종양의 크기는  $V = w \times w \times h \times 1/2$  의 방식으로 계산하였고, 마우스의 혈당은 혈당측정기(올메디쿠스)를 사용하여 측정하였다.
- [0163] 실험결과
- [0164] 저탄수화물 식이와 메트포르민 투여의 조합에 의해 병용투여가 인 비보에서의 종양 성장이 현저히 억제됨을 확인하였다. 인 비보 수준에서 저혈당 조건을 유도하기 위하여 탄수화물이 제거된 사료를 급여하였고, 그 결과 마우스의 혈당이 지속적으로 낮아짐을 확인하였다(도 14c). 또한, 식이조절의 결과 마우스의 무게 또한 감소하였다(도 14d). 식이 조절에 의해 혈당이 낮아진상태에서 메트포르민을 복강주사한 결과 종양의 크기가 대조군에 비해 현저히 작아지는 것을 확인하였으며(도 14b), 종양의 크기와 무게 모두 병용 처리시 현저하게 감소하였다(도 14e).
- [0165] 아울러, 인 비보에서 YAP-TEAD 단백질 상호작용 억제제와 메트포르민의 병용투여 효과를 확인하기 위하여 베르테포르핀과 메트포르민을 병용투여한 결과, 종양의 크기가 현저하게 감소하였으며(도 15a), 종양의 무게와 크기가 모두 유의하게 감소함을 관찰함으로써(도 15b), YAP 억제제와 메트포르민의 병용투여가 인 비보 수준에서도



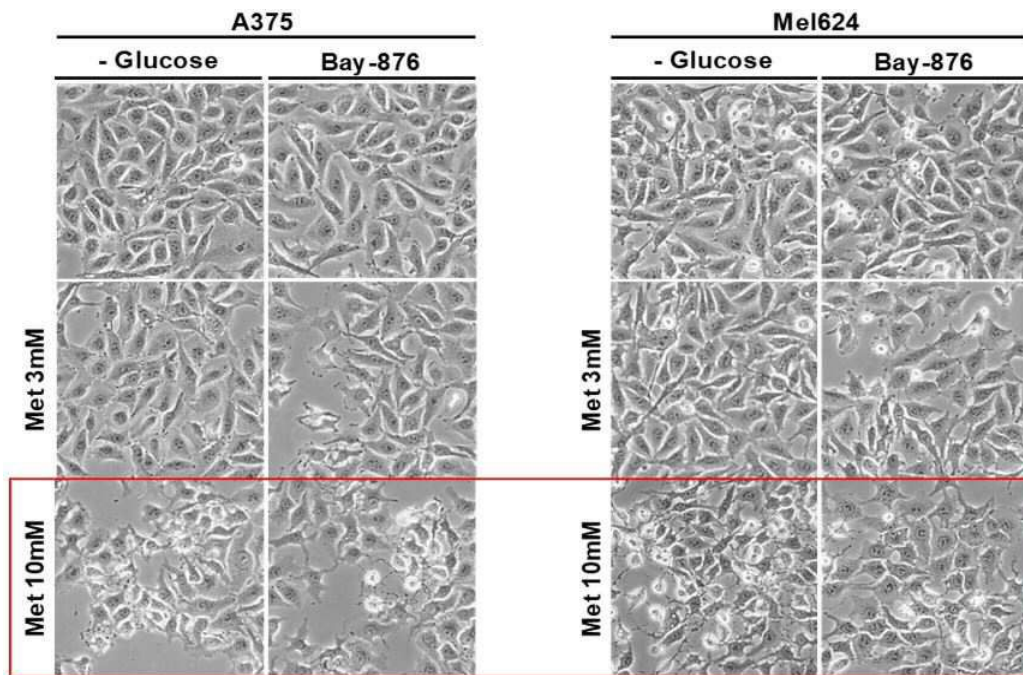
종양성장을 효율적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

[0167] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

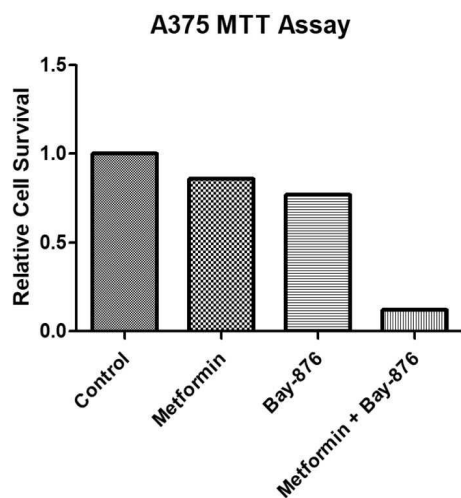
[0168] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 도면

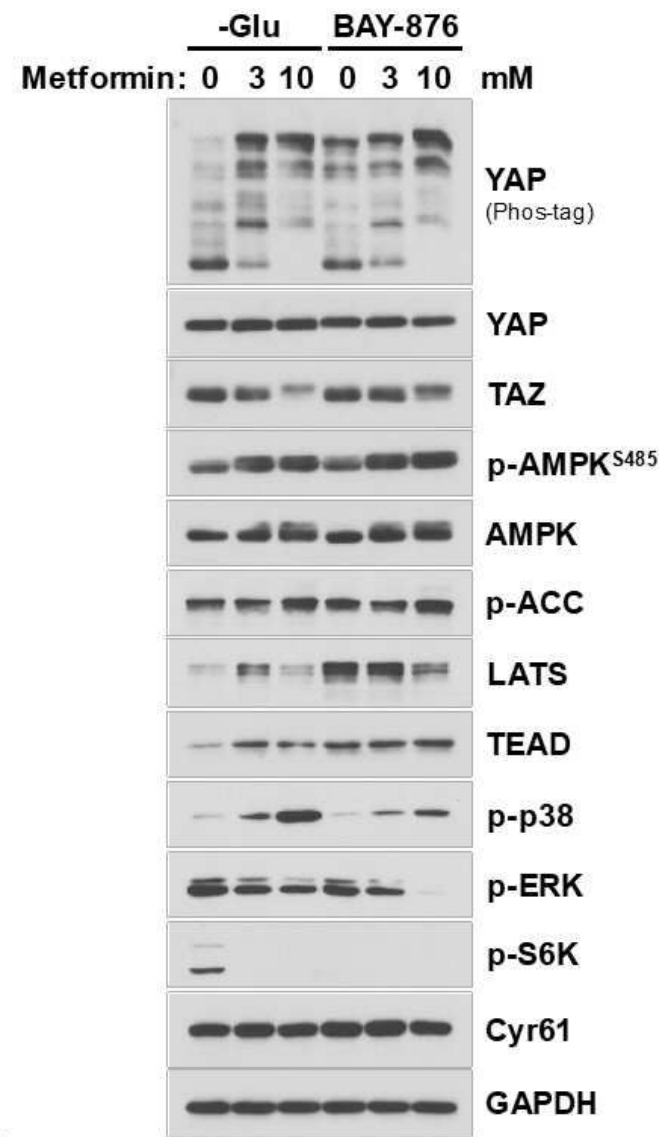
### 도면1



### 도면2

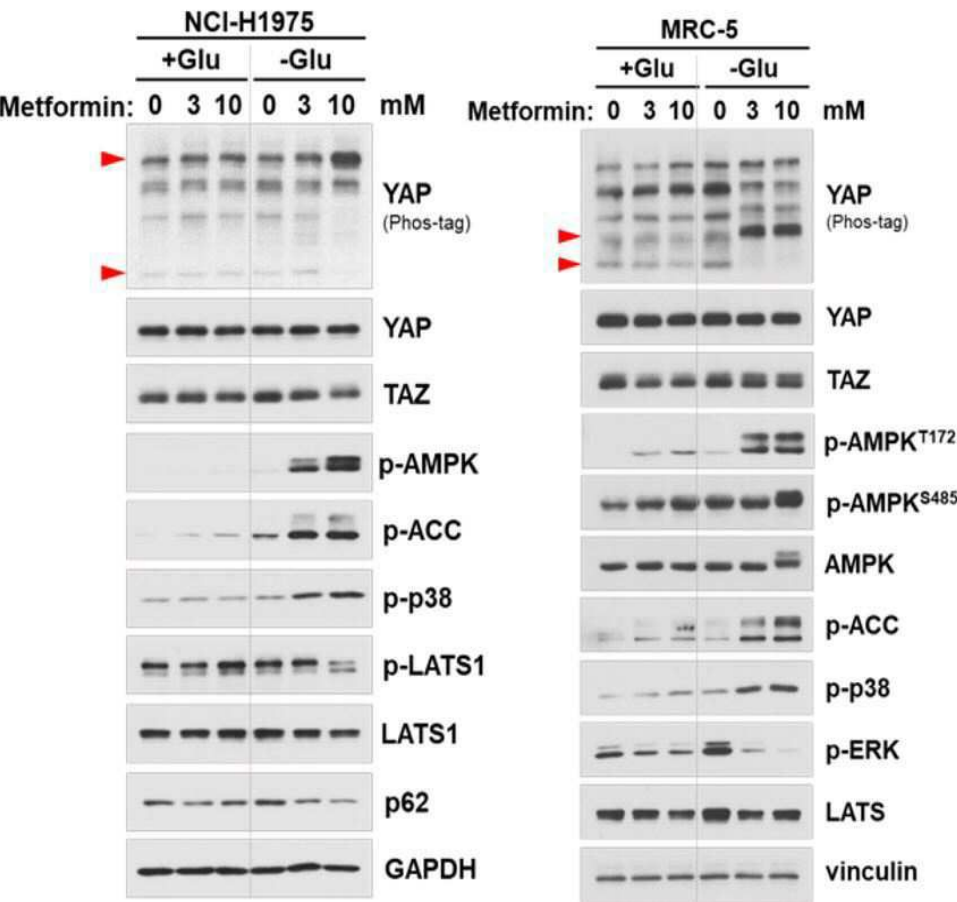


도면3



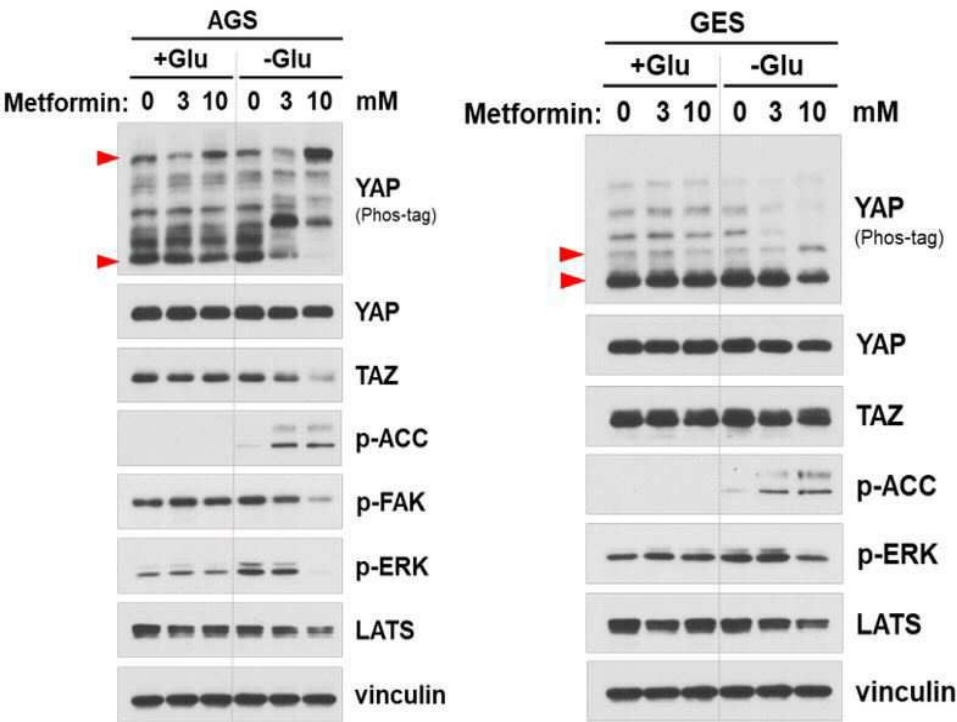
도면4

Lung Cancer



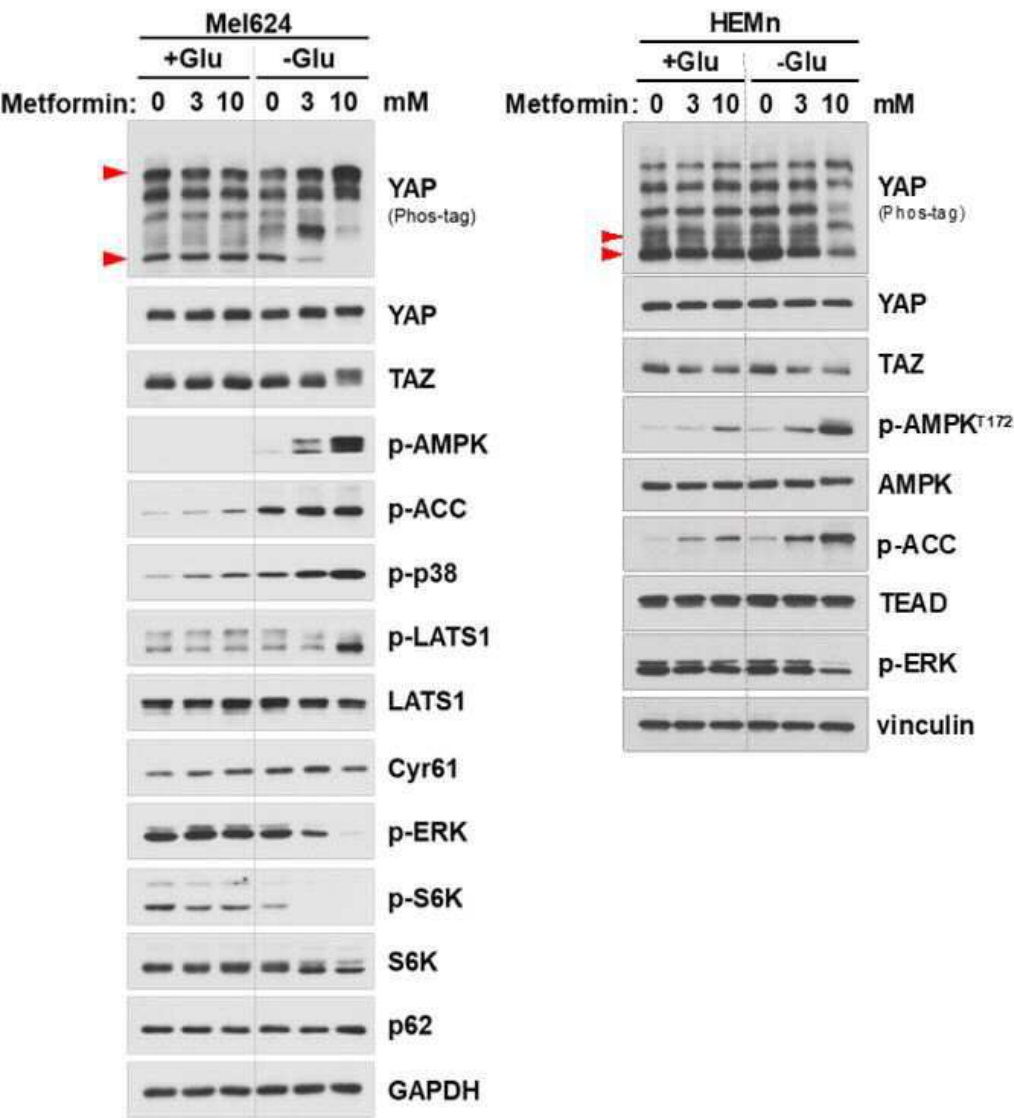
도면5

Gastric Cancer

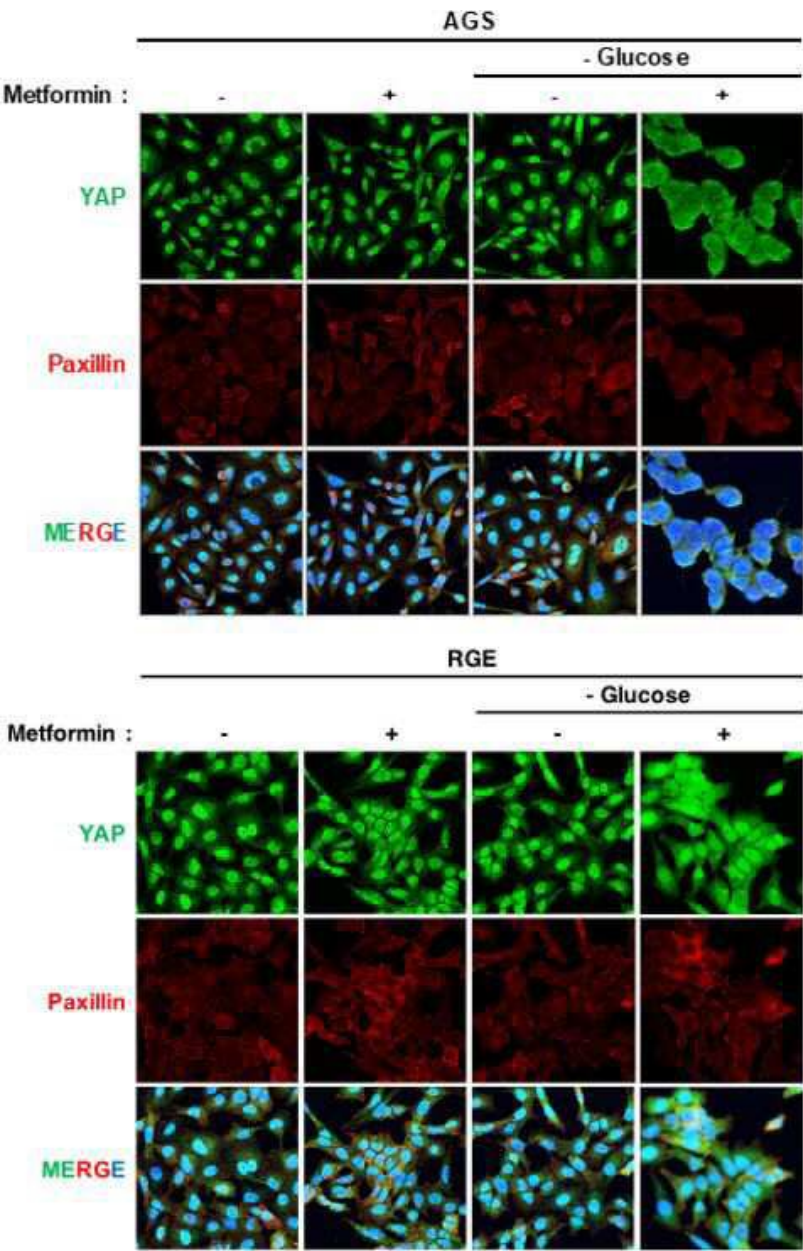


도면6

Melanoma

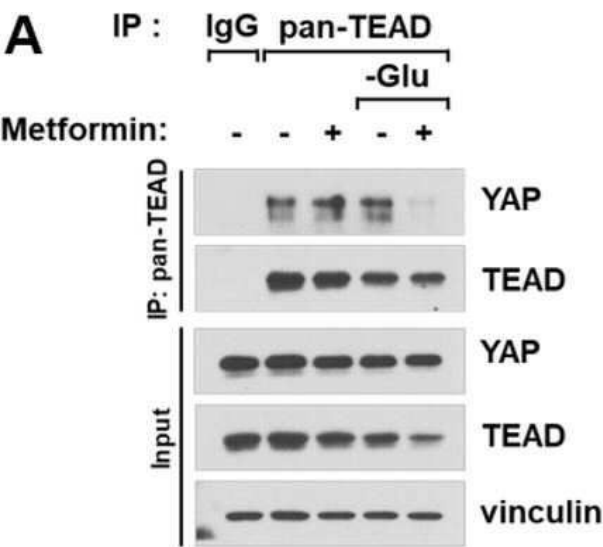


도면7

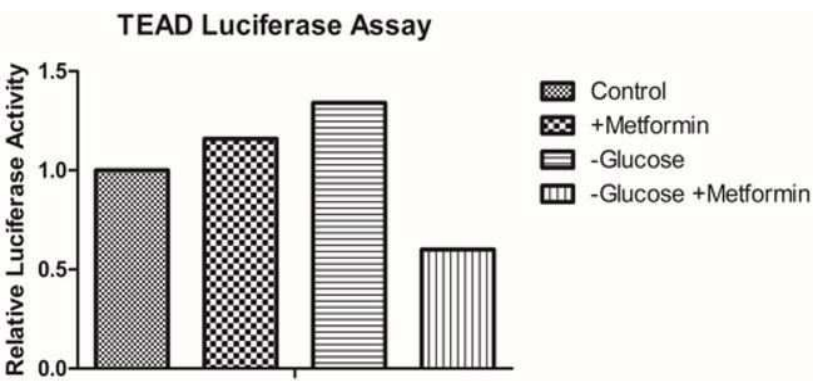




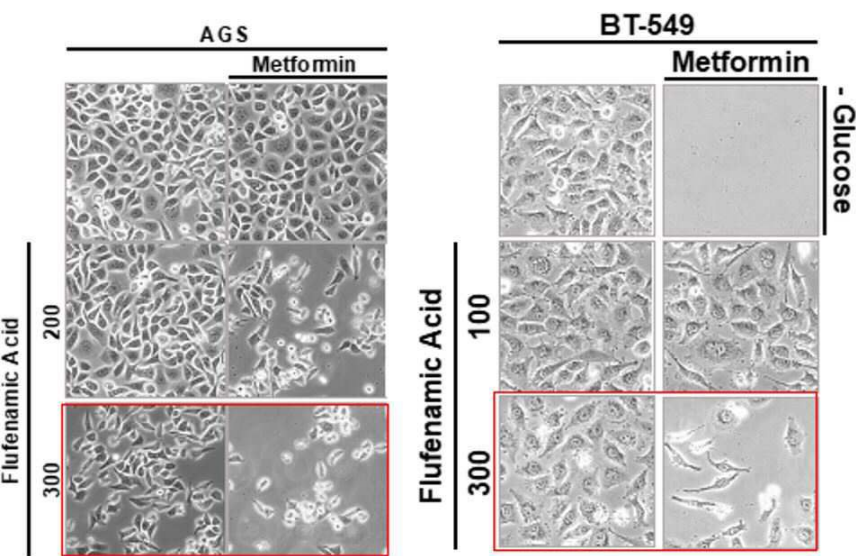
도면8a



도면8b

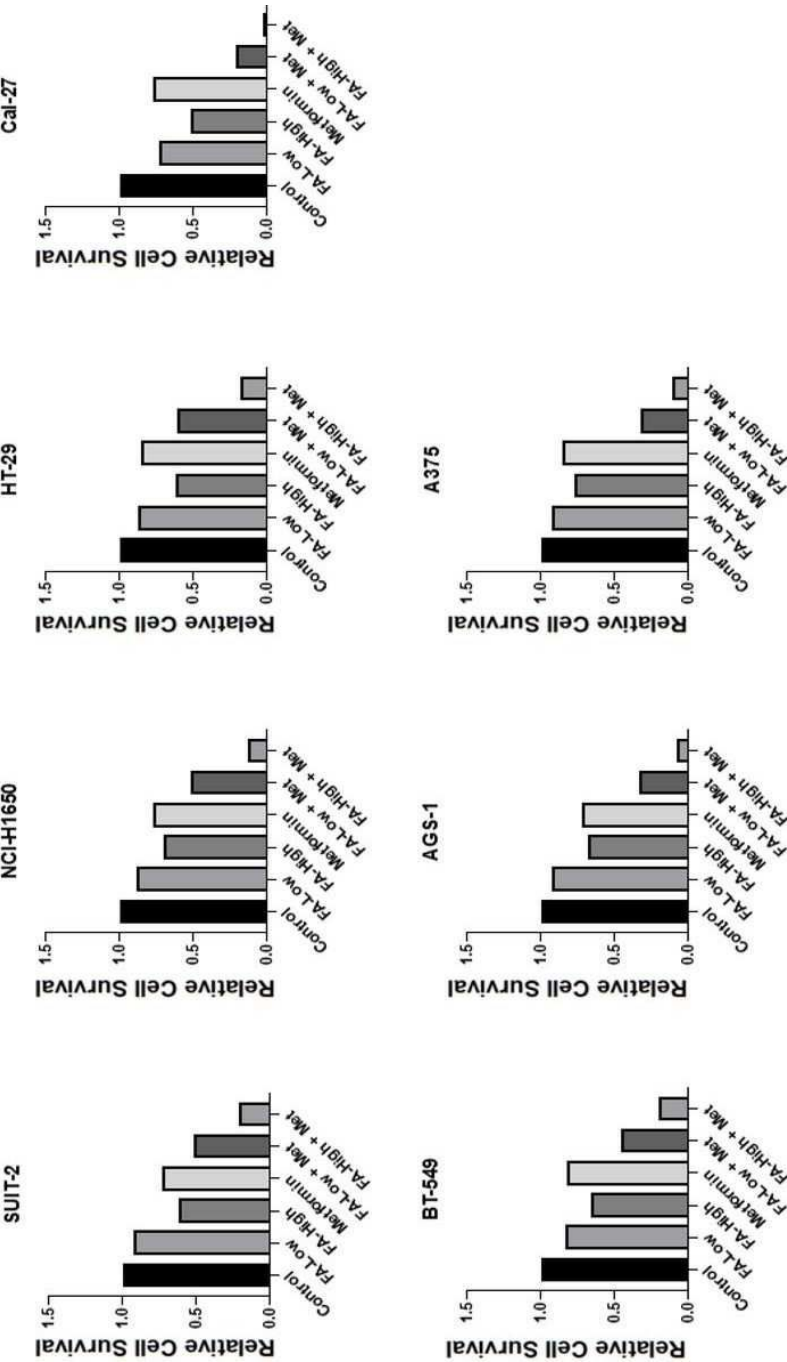


도면9

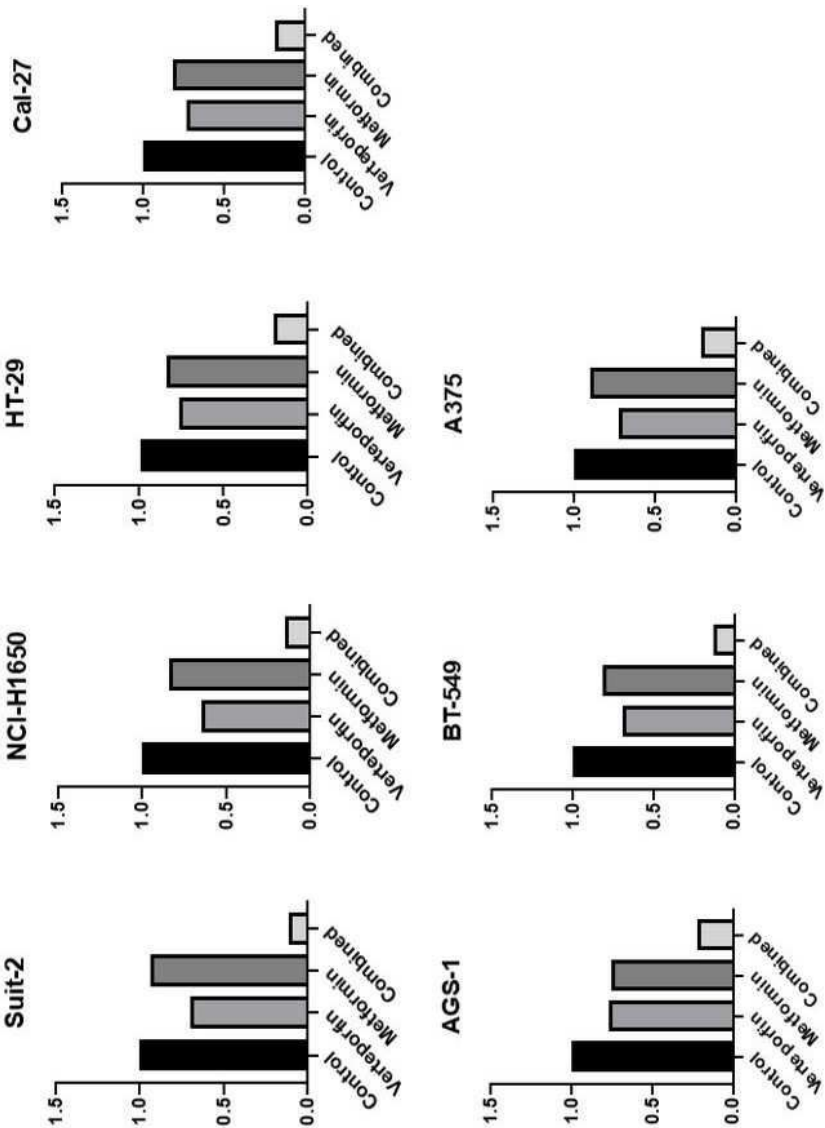




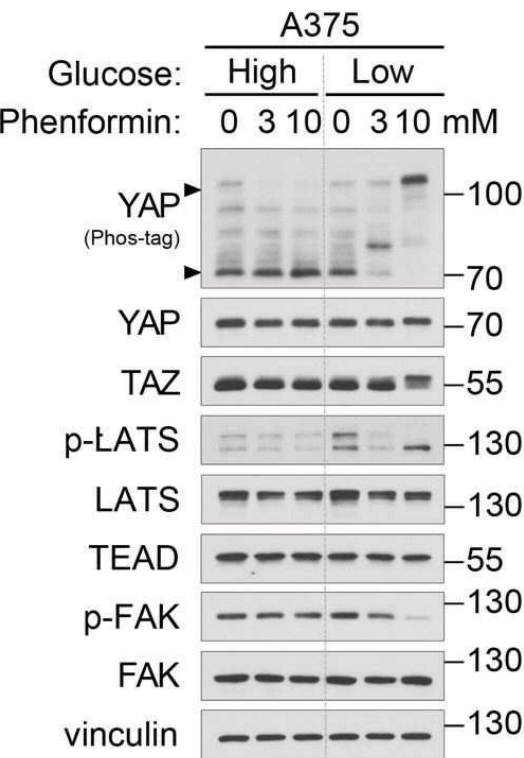
도면10



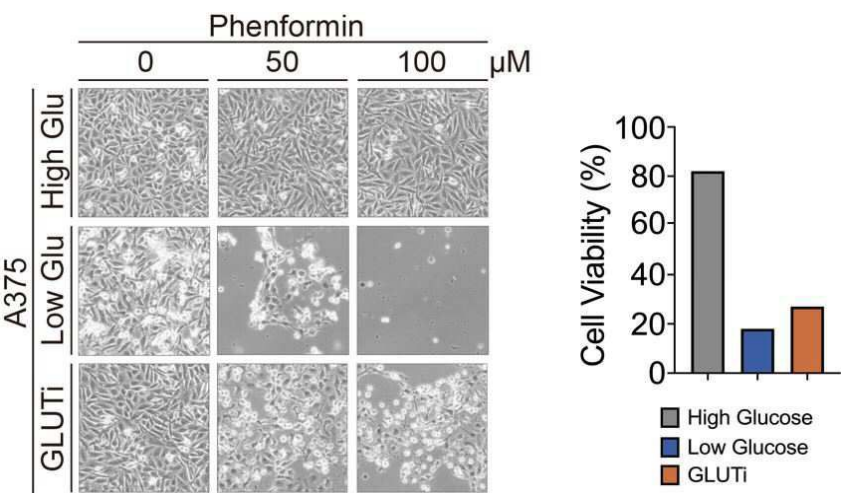
도면11



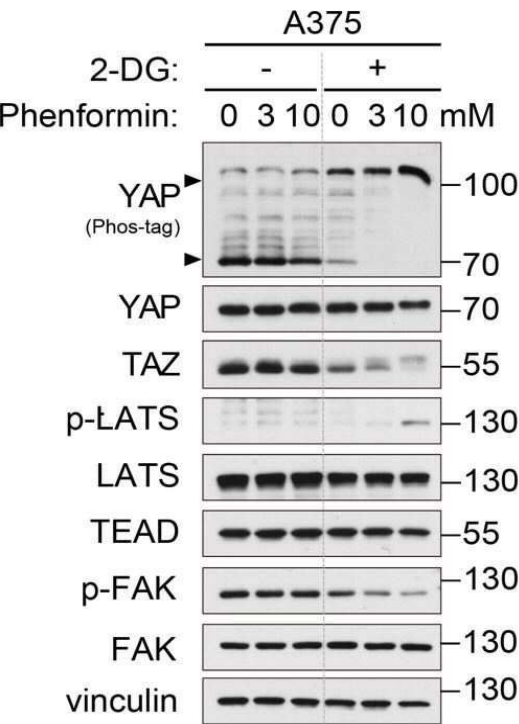
도면12a



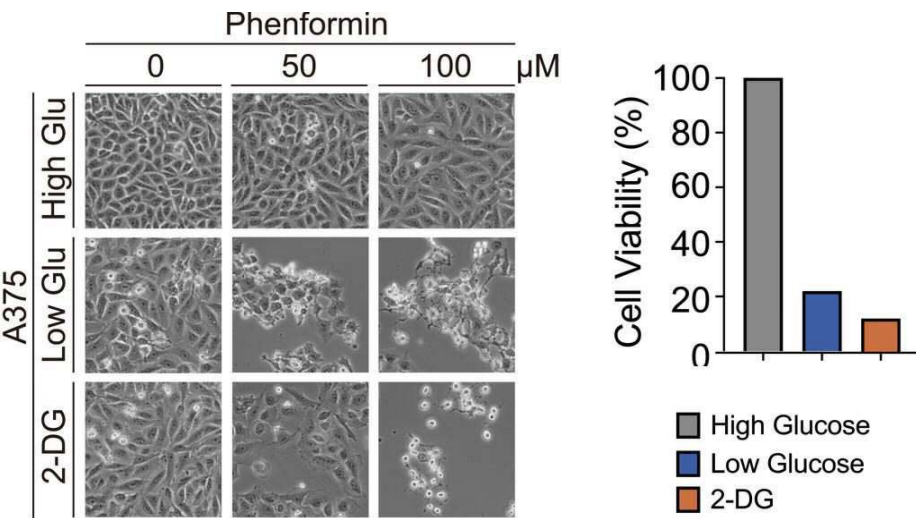
도면12b



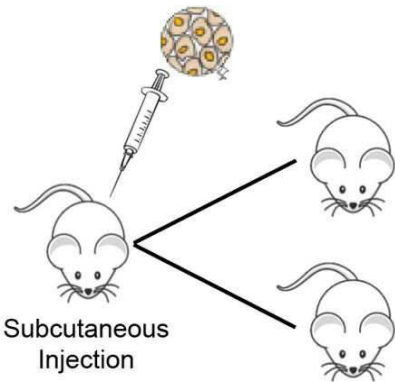
도면13a



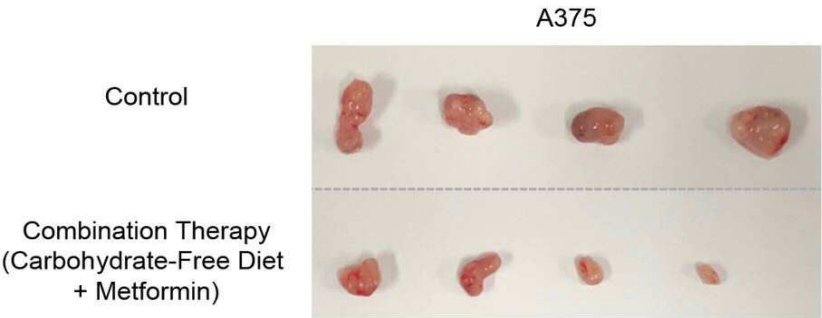
도면13b



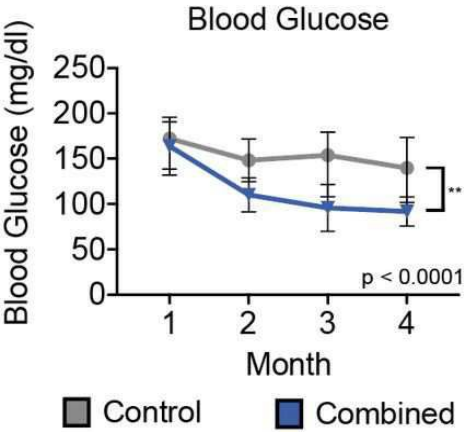
도면14a



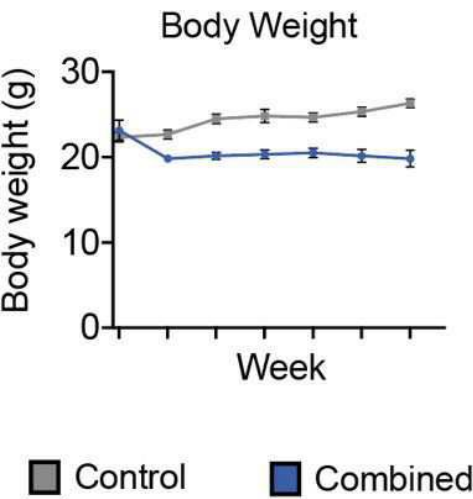
도면14b



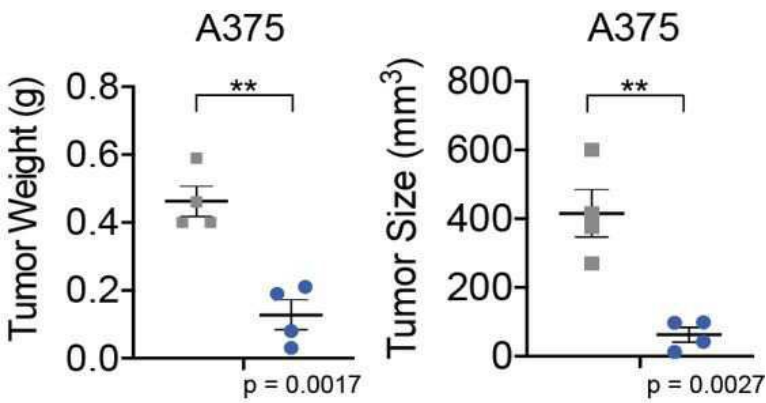
도면14c



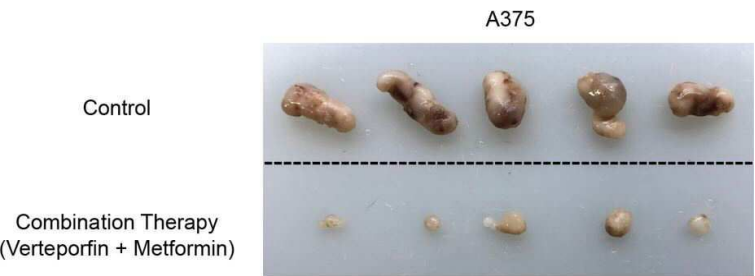
도면14d



도면14e



도면15a



도면15b

