



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0016525  
(43) 공개일자 2019년02월18일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 31/167 (2006.01) A61K 31/4188 (2006.01)<br/>A61K 31/66 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 31/167 (2013.01)<br/>A61K 31/4188 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0014533(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2019년02월07일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2017-0076675<br/>원출원일자 2017년06월16일<br/>심사청구일자 2017년06월16일</p> | <p>(71) 출원인<br/>연세대학교 산학협력단<br/>서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자<br/>강석규<br/>경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동 601호 (이의동, 이편한세상광교)</p> <p>육종인<br/>서울특별시 강남구 압구정로 201, 85동 103호 (압구정동, 현대아파트)</p> <p>이지현<br/>경기도 고양시 일산동구 산두로 72, 205동 105호 (마두동, 정발마을2단지건영빌라)</p> <p>(74) 대리인<br/>이재영</p> |
|---|--|

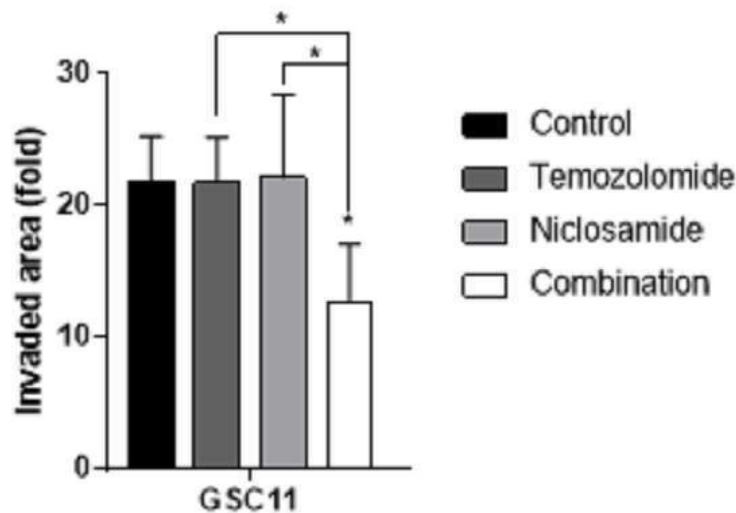
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 암 종양구의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 암 세포 중에서도 특히 암 종양구의 성장, 증식, 침윤성 및 전이성을 억제할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것으로, 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드 및 알킬화제를 유효 성분으로 포함할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

**A61K 31/66** (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1A09916521

부처명 교육부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 기본연구지원사업(후속연구지원)

연구과제명 다른 공간적 적소에서 분리된 기질간엽세포에 의한 고등급교종 암세포 침윤 증가와 세포외  
기질 재형성 조절 기전발굴 및 치료 저항성 획득 기전 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1324

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 환자유래 암이식 in vivo 제브라피쉬 및 in vitro 복제종양플랫폼 개발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드 및 테모졸로마이드(Temozolomide)를 유효 성분으로 포함하는 암 종양구의 전이성 억제용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드 및 테모졸로마이드는 1:10~3000의 중량비로 포함되는, 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암 종양구는 뇌암 종양구인, 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 뇌암 종양구의 직경은 10 내지 500  $\mu\text{m}$ 인, 약학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 암 세포 중에서도 특히 암 종양구의 성장, 증식, 침윤성 및 전이성을 억제할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 암은 전세계적으로 가장 보편적인 사망원인 중의 하나이다. 약 천만 건의 새로운 케이스가 매년 발생하며, 전체 사망원인의 약 12%를 차지하여 세 번째로 많은 사망의 원인이 되고 있다. 여러 가지 종류의 암 중에서 특히 뇌암은 연령에 관계없이 발생되며, 소아에 발생 빈도가 다른 암에 비하여 높은 특징이 있다. 뇌암은 뇌조직과 뇌를 싸고 있는 뇌막에서 발생하는 일차성 뇌종양과 두개골이나 신체의 다른 부위에서 발생한 암으로부터 전이된 이차성 뇌종양으로 구별되는데, 증세로는 운동 마비, 지각 마비, 언어 장애, 시력 장애, 평형 장애 등과 같은 국소 증상과 두개내압상승 증상을 들 수 있다. 상기 뇌암은 조직특이적으로 1 내지 2종의 암이 발병되는 다른 조직에서 발병되는 암과는 달리 다형성아교모세포종, 악성신경교종, 임파선종, 배아세포종, 전이성 종양 등의 다양한 종류의 암을 포함하는데, 이 중에서도 신경교종(glioma), 특히 교모세포종(glioblastoma)은 가장 악성이고 공격적이어서 예후가 매우 좋지 않으며, 진단 후 평균 생존 기간이 약 1년을 넘지 못하는 매우 치명적인 질환이다. 상기 교모세포종이 발병된 환자에서는 뇌세포와 종양세포 간의 경계가 분명하지 않기 때문에, 암 조직을 외과적으로 완전히 제거하는 것은 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

[0003] 이에, 상기 교모세포종을 치료하는 방법을 개발하기 위하여, 다양한 연구가 수행되고 있지만, 교모세포종은 다양한 유전적 돌연변이를 포함하기 때문에, 상기 병용 치료 방법이 사용되고 있는 현재에도 교모세포종 환자의 평균 생존율이 현저히 낮아, 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있다. 이러한 필요성에 따라 새로운 교모세포종 치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 국제특허공개 제2012-061120호에는 정제된 교모세포종 GBM6-AD 줄기세포를 이용하여 교모세포종을 치료하는 방법이 개시되어 있고, 국제특허공개 제2012-104822호에는 마시텐탄을 투여하여 교모세포종을 치료하는 방법이 개시되어 있다.

[0004] 한편, 상기 교모세포종은 전이의 유발 빈도가 높은 암으로 알려져 있다. 암의 전이는 다발성, 전신성이며, 그

존재 여부의 판정도 어렵기 때문에 현재의 암 치료방법으로는 치료 효능이 만족스럽지 못하다. 하지만, 암 전이는 1차 종양을 구성하는 암세포의 극히 일부분만이 전이 과정의 여러 단계를 성공적으로 마치고 전이암으로 되는 비효율적인 과정이다. 따라서, 전이 과정을 잘 이해하고, 임상적, 생물학적으로 유용한 치료 표적을 발굴하고 이를 효과적으로 억제할 수 있는 방법을 개발하면 암 전이에 의한 사망을 효과적으로 제어할 수 있는 유용한 치료법의 개발이 가능하게 된다. 예를 들어, 한국등록특허 제1213033호에는 EI24 단백질 수준을 측정하여 암의 전이를 진단하는 방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0084149호에는 카페인 및/또는 그 유사체를 포함하는 약학 조성물을 사용하여 뇌암의 침윤, 전이 및 증식을 억제하는 방법이 개시되어 있다. 그러나 교모세포종의 전이를 억제하는 방법에 대하여는 아직 보고되지 않고 있다.

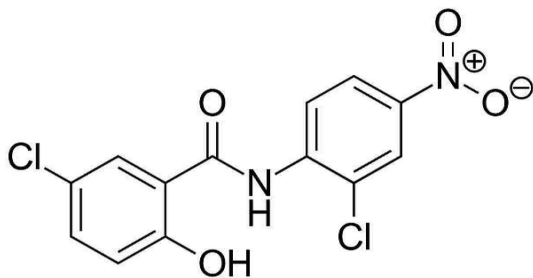
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 일 목적은 암 세포 중에서도 암 종양구의 침윤성 또는 전이성을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 암 종양구의 성장 또는 증식을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 발명자들은 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드(5-Chloro-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide)와 알킬화제(alkylating agent)를 병용 투여하는 경우 암 세포 중에서도 특히 이미 형성된 암 종양구(tumorsphere)의 성장, 증식, 침윤성 및 전이성이 현저히 억제되는 것을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [0009] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드 및 알킬화제를 유효 성분으로 포함하는 암 종양구의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다:
- [0010] [화학식 1]



- [0011]
- [0012] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드 및 알킬화제를 유효 성분으로 포함하는 암 종양구의 성장 또는 증식 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다:
- [0013] 본 발명에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 살리실아마이드(Salicylamide)의 유도체로서 분자량은 327이며, 비수용성이다. 상기 화합물은 위장관에서 거의 흡수되지 않아 일반적으로 장내 조충과 흡충 감염증에 주로 사용되고 있다. 작용기전은 충체의 ATPase 활성을 억제하거나 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 영향을 줌으로써 포도당 대사를 방해하는 것으로 추정되고 있다.
- [0014] 본 발명에서 상기 알킬화제는 DNA를 알킬화 또는 메틸화하여 세포독성 작용 및 DNA 복제와 RNA 전사를 방해할 수 있다. 본 발명에서 상기 알킬화제로는 테모졸로마이드(Temozolomide), 사이클로포스파마이드(Cyclophosphamide), 메클로레타민(Mechlorethamine), 클로람부실(Chlorambucil), 멜팔란(Melphalan), 카무스틴(Carmustine, BCNU), 로무스틴(Lomustine, CCNU), 이포스파마이드(Ifosfamide), 프로카바진(Procarbazine),

다카바진(Dacarbazine, DTIC), 알트레타민(Altretamine), 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin) 및 옥살리플라틴(Oxaliplatin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 가장 바람직하게는 테모졸로마이드일 수 있다.

- [0015] 본 발명에서는 상기와 같이 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드와 알킬화제를 병용 투여함으로써 암 세포 중에서도 특히 암 종양구의 크기 성장을 억제하거나, 암 종양구의 증식, 즉 암 종양구로부터 다른 종양구의 형성능을 감소시킬 수 있고, 가장 바람직하게는 암 종양구의 침윤성 및 전이성을 현저히 억제할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드와 알킬화제는 1:10~3000의 중량비, 보다 바람직하게는 1:500~1000의 중량비로 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 종양구(tumorsphere)는 암 조직을 구성하는 세포 중 줄기세포(stem cells)와 유사한 특성을 가지는 일부의 세포가 3차원 배양 조건에서 형성하는 세포응집체를 의미하며, 그 직경 사이즈는 특별히 제한하지 않으나 예를 들면 10 내지 500  $\mu$ m일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 종양구는, Wnt 신호 전달 경로에서 베타 카테닌(beta-catenin)의 안정성을 조절하는 데에 중요한 역할을 하는 AXIN2 단백질 또는 mRNA의 발현 수준이 정상 조직보다 낮거나 발현되지 않는 것이 바람직하며, 예를 들면 대장암을 제외한 모든 종류의 암의 종양구일 수 있고, 바람직하게는 뇌암, 유방암, 폐암, 난소암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암 및 혀암으로 이루어진 군에서 선택되는 암의 종양구일 수 있으며, 보다 바람직하게는 뇌암 종양구일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암 종양구의 성장, 증식, 침윤성 또는 전이성을 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 암 종양구의 성장, 증식, 침윤성 또는 전이성을 억제하여 암 질환을 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0023] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.
- [0025] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변

할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물은 단독으로, 혹은 종전의 항암제를 혼합하여 사용할 수 있고, 혹은 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 기타 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0028] 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 만데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쑼알bum, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 캄투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산효몰 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 알티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

### 발명의 효과

[0029] 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 암 세포 중에서도 특히 암 종양구의 크기가 성장하는 것을 억제하고 상기 암 종양구로부터 다른 종양구의 형성능 또한 억제하며, 종양구가 이웃하여 존재하는 부위로 침윤하는 성질을 가장 효과적으로 억제함으로써 전이암의 발생 가능성을 현저히 낮출 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 세포 생존율의 변화를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 크기 변화를 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 세포를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 세포 반경의 변화를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 상기 종양구 세포로부터의 종양구 형성능을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로 네스틴(Nestin), Sox2, PDPN 및 Oct3/4의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 형상 변화를 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 세포를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 7은 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드 (250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 침윤 면적 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 교모세포종 종양구 세포인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드

(250  $\mu$ M) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로  $\beta$ -카테닌( $\beta$ -catenin), N-카데린(N-cadherin), 스네일(Snail) 및 Zeb1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 각 암종별 종양구 세포에 있어서 웨스턴 블롯으로 AXIN2의 mRNA의 발현 수준을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 교모세포종 종양구인 GSC11, TS15-88 세포와, 대장암 종양구인 SW480 세포에 있어서 웨스턴 블롯으로 AXIN2의 mRNA의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

### [0033] 실시예

#### [0035] 교모세포종 환자로부터 종양구의 분리

[0036] 이하의 실험은 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88 및 GSC11를 사용하여 수행하였다. 연세 의료원 세브란스 병원 임상시험심사위원회(4-2012-0212)에서 승인된 프로토콜에 따라 교모세포종 조직으로부터 유래된 환자 유래 TS15-88 종양구를 획득하였다. 교모세포종 시료로부터 종양구 분리를 위하여, 종래에 알려진 인간 뇌로부터 종양구를 분리하는 방법을 수행하였다(Sulman E, Aldape K, Colman H (2008) Brain tumor stem cells. Curr Probl Cancer 32: 124-142; Kong BH, Park NR, Shim JK, Kim BK, Shin HJ, Lee JH, Huh YM, Lee SJ, Kim SH, Kim EH, Park EK, Chang JH, Kim DS, Kim SH, Hong YK, Kang SG, Lang FF (2013) Isolation of glioma cancer stem cells in relation to histological grades in glioma specimens. Childs Nerv Syst 29: 217-229; Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63: 5821-5828). 헬싱키 선언(Declaration of Helsinki)에 따라 사전 동의를 받았고, 신경 병리학자는 WHO 분류에 따라 외래적 시료를 진단하였다. 기계적 해리 방법을 사용하여 종양 제거하는 2시간 안에 세포 분리 절차를 수행하였다. 구체적으로는, 외과적 시료를 분쇄한 후 더블코 변형 이글 배지/햄 F-12 50/50 혼합 배지(DMEM/F-12; Corning Incorporated, NY, USA)에서 메스(scalpel)로 해리한 뒤 100 $\mu$ m 나일론 메쉬 세포 스트레이너(cell strainers)(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)를 통과시켰다. 세포 부유물을 DMEM/F-12에서 2차례 세척하고 1 $\times$ B27 보충제(Invitrogen, San Diego, CA, USA), 염기성 섬유 아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor, bFGF; Sigma, St. Louis, MO, USA) 20 ng/ml, 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF; Sigma) 20 ng/ml, 및 50 U/ml 페니실린/50 mg/ml 스트렙토마이신(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함하는 완전 배지(DMEM/F-12)에서 배양하였다. 환자 유래 GSC11 종양구는 랭 의사(Department of Neurosurgery, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, TX, USA)로부터 제공받았다.

#### [0038] 종양구 특성(Tumorsphere characterization)

[0039] 상기와 같이 얻어진 종양구를 종전에 알려진 방법에 따라 종양구 완전 배지에서 성장시킨 뒤(Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63: 5821-5828), 종양구 표면 마커 발현을 분석하였다. 구체적으로 종양구에서 CD133, 네스틴, 무사시 및 포도플라닌을 확인하기 위하여 면역 세포 화학을 사용하였다. 1% 소혈청 알부민(Amresco, Solon, OH, USA)을 사용하여 세포를 1시간 동안 블록시킨 후 1차 항체(토끼 항-CD133 1:250, ab19898, Abcam (Cambridge, UK), 토끼 항-네스틴 (1:250, ab5968, Abcam), 토끼 항-무사시 (1:250, ab52865, Abcam), 및 토끼 항-포도플라닌 (1:250, ab10274, Abcam))를 사용하여 상온에서 2시간 동안 배양시켰다. CD133 및 네스틴에 대한 1차 항체는 Cy3-컨쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG Alexa Fluor 555 (1:2000, Invitrogen)를 사용하여 검출하고, 무사시 및 포도플라닌은 Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen)를 사용하여 검출하였다. 세포를 고정시킨 뒤 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; Vectashield H-1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 사용하여 핵을 대비 염색시켰다. 또한, 종양구가 신경교 섬유질

산성 단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP), 수초 염기성 단백질(myelin basic protein, MBP), NeuN 및  $\beta$ -튜블린(TUBB3)으로 분화될 수 있는지 확인하였다. 마우스 항-GFAP(1:200, Dako, Carpinteria, CA, USA), 마우스 항-MBP (1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA), 마우스 항-NeuN (1:100, Chemicon), 및 마우스 항-Tuj1 (1:200, Chemicon)을 이용하여 종양구 세포를 상온에서 밤새 배양하였다. GFAP에 대한 1차 항체는 Cy3-컨쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG Alexa Fluor 555 (1:200)를 사용하여 검출하였고, MBP, NeuN 및 Tuj1에 대한 1차 항체는 염소 항-마우스 Alexa Fluor 546 (1:200, Invitrogen)를 사용하여 탐지하였다. 세포를 고정시킨 뒤 DAPI를 이용하여 핵을 대비 염색시켰다. 종양구 세포를 챔버 슬라이드(Lab-Tek II; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)에 접종한 뒤 면역 세포 화학 염색을 수행하기 전 1일 동안 10% 소 태아 혈청 (Lonza, Basel, Switzerland) 및 1×B27 보충제를 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 신경 분화시켰다.

[0041] 세포 생존율 분석

[0042] MTS 생존율 어쎬이 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드(이하, '니클로사마이드'라 한다.) 및 테모졸로마이드가 교모세포종 종양구의 생존에 미치는 영향을 분석하였다. 96-웰 플레이트에 교모세포종 종양구 세포를 웰당  $1 \times 10^4$  세포로 접종한 뒤 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 니클로사마이드 및 테모졸로마이드 단독 또는 이들의 혼합액을 3일 동안 처리하였다. MTS 시약 (20  $\mu$ l/well)을 첨가한 뒤 세포를 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 그 결과는 대조군 대비 살아있는 세포의 퍼센티지로 표현하였다.

[0044] 구 형성능 분석

[0045] 1×B27 보충제(Invitrogen, San Diego, CA, USA), 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF) 20 ng/ml, 표피 성장 인자(EGF) 20 ng/ml, 및 50 U/ml 페니실린/50 mg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 종양구 세포를 배양하였다. 아큐타제(accumutase)(Gibco)를 사용하여 상기 GBM 종양구 세포를 해리시킨 뒤 10개의 단일 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고 니클로사마이드(500 nM), 테모졸로마이드(250  $\mu$ M) 및 이들의 조합을 처리하며 3주 동안 배양하였다. 구(sphere)가 형성된 웰의 수를 측정하고, 대조군 대비 처리 그룹에서 구가 형성된 웰의 비율을 계산하여 퍼센티지로 나타내었다. 위상차 현미경(inverted phase-contrast microscope)(Optinity KI 400; Seongnam, Korea)으로 세포 배양물을 관찰하여 GBM 종양구의 형상 및 크기를 결정하였다. 세포 사진은 ToupView 이미지 분석 소프트웨어 (ToupTek Photonics, Zhejiang, China)를 사용하여 디지털 카메라 (Industrial Digital Microscope Camera; Huaguang, Zhejiang, China)로 촬영하였다.

[0047] 침윤성 분석

[0048] 3D 침윤 분석을 사용하여 종양구 세포의 침윤성을 분석하였다. 96-웰 플레이트의 각각의 웰을 매트릭셀, I형 콜라겐(Corning) 및 종양구 완전 배지로 구성된 혼합 매트릭스로 채웠다. 겔화 전에 상기 매트릭스에 단일 스페로이드를 접종하였다. 30분 경과 후 겔화된 매트릭스가 건조되는 것을 방지하기 위하여 종양구 완전 배지를 웰당 50  $\mu$ l의 양으로 보충하였다. 위상차 현미경(phase-contrast microscope)을 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0050] 웨스턴 블롯 분석

[0051] 10% 글라이신-SDS-PAGE를 이용하여 세포 용해물을 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막에 이동시킨 후 CD133, Sox2 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), 네스틴 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), PDPN,  $\beta$ -카테닌, 스네일 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), N-카데린, (R&D Systems), Zeb1,  $\beta$ -액틴 (Sigma-Aldrich), 트위스트, Oct3/4, 및 GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 항체를 이용하여 상기 단백질을 탐지하였다. 밴드 검출을 위하여, 홀스래디쉬 페록시다제-컨쥬게이트된 염소 항-토끼 및 -마우스 IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 2차 항체로 부착시킨 뒤 Western Lightning Plus-증강 화학발광 시약 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)을 사용하여 발전시켰다. ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)으로 이미지를 촬영하였다.

- [0053] 통계적 분석
- [0054] 데이터는 통계±표준 편차로 나타내었고, 3D 침윤 모델 분석에서는 통계±표준 오차로 나타내었다. 각 군간에 비교를 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 및 Mann-Whitney U 테스트를 사용하였다. 3D 침윤 분석에서 GBM 종양구의 침윤성에 있어 각 그룹 간의 차이는 선형 혼합 모델을 사용하여 분석하였다. P 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 평가하였다. 사후 검증(post hoc tests) 시 Bonferroni 교정을 수행하였다. 모든 통계적 분석 및 그래프는 SPSS 버전 18.0KO 소프트웨어 (SPSS Korea, Seoul, Korea)를 사용하여 수행하였다.
- [0056] 니클로사마이드 및 테모졸로마이드의 병용 투여 시 GBM 종양구의 사멸 효과
- [0057] 교모세포종 종양구인 GSC11 및 TS15-88 세포 각각에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드(250 μM) 또는 이들 혼합물을 3일 동안 처리한 뒤 MTS 어췌이에 의하여 종양구 세포의 생존율의 변화를 분석하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0058] 도 1에서 보는 바와 같이, 아무 처리를 하지 않은 대조군(Control)에 비하여 상기 GBM 종양구 세포에 니클로사마이드, 테모졸로마이드 또는 이들의 혼합물을 처리한 경우 세포 생존율이 감소하였으나, 혼합물을 처리한 경우에 있어서 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우와 비교하여 효과 차이가 크지는 않았다.
- [0060] 니클로사마이드 및 테모졸로마이드의 병용 투여 시 GBM 종양구의 성장 억제 효과
- [0061] GSC11 및 TS15-88 단일 세포에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드(250 μM) 또는 이들 혼합물을 처리한 뒤, 위상차 현미경으로 촬영하여 도 2에 나타내었고, 종양구의 반경을 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0062] 도 2 및 3에 나타난 바와 같이, GBM 종양구 세포에 니클로사마이드 또는 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 종양구 세포의 크기가 현저히 감소한 것을 볼 수 있다.
- [0064] 니클로사마이드 및 테모졸로마이드의 병용 투여 시 GBM 종양구의 증식 억제 효과
- [0065] GSC11 및 TS15-88 세포에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드(250 μM) 또는 이들 혼합물을 처리하며 배양한 뒤 종양구 형성능을 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0066] 도 4에 나타난 바와 같이, GBM 종양구 세포에 니클로사마이드 또는 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 GBM 종양구로부터 증식되는 종양구의 형성능이 감소한 것을 볼 수 있다.
- [0068] 니클로사마이드 및 테모졸로마이드의 병용 투여 시 GBM 종양구의 줄기세포능(stemness) 억제 효과
- [0069] GSC11 및 TS15-88 세포에 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드(250 μM) 또는 이들 혼합물을 처리한 뒤 웨스턴 블롯에 의하여 줄기세포능 관련 마커인 네스틴(Nestin), Sox2, PDPN 및 Oct3/4의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0070] 도 5에서 보는 바와 같이, GBM 종양구 세포에 니클로사마이드 또는 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 상기 네스틴, Sox2, PDPN 및 Oct3/4의 발현 수준이 모두 감소하였으며, 특히 네스틴 및 Oct3/4의 발현 수준 감소 정도가 두드러지는 것을 확인할 수 있다.
- [0072] 니클로사마이드 및 테모졸로마이드의 병용 투여 시 GBM 종양구의 침윤성(invasiveness) 억제 효과
- [0073] 3D 침윤 어췌이를 통하여, I 형 콜라겐 매트릭스에 GFP-GBM 종양구를 이식한 뒤 니클로사마이드 단독(500 nM), 테모졸로마이드(250 μM) 또는 이들 혼합물을 처리한 후 72시간 경과 시점에서 종양구 세포의 형상을 위상차 현미경으로 촬영해 그 결과를 도 6에 나타내었고, GSC11 종양구 세포의 침윤 면적을 측정하여 그 결과를 도 7에 그래프로 나타내었다. 또한, 웨스턴 블롯을 이용하여 침윤성 관련 마커인 β-카테닌(β-catenin), N-카데린(N-

cadherin), 스네일(Snail) 및 Zeb1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0074] 도 6 및 7에서 보는 바와 같이, GBM 종양구 세포에 니클로사마이드 또는 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 종양구 세포의 침윤성이 현저하게 감소한 것을 볼 수 있다.

[0075] 또한, 도 8에서 보는 바와 같이, GBM 종양구 세포에 니클로사마이드 또는 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 상기  $\beta$ -카테닌, N-카데린, 스네일 및 Zeb1의 발현 수준이 모두 감소하였으며, 특히 N-카데린, 스네일 및 Zeb1의 발현 수준 감소 정도가 두드러지는 것을 확인할 수 있다.

[0077] 암종 별 종양구 세포의 AXIN2 발현 수준 비교

[0078] 본 발명에 따른 조성물이 종양구 세포에 대하여 어떠한 경로로 영향을 미치는 지 확인하기 위하여, 각 암 종별 종양구 세포에 대하여 암 신호 전달 캐스케이드 중 Wnt 신호 전달 경로에서 베타 카테닌(beta-catenin)의 안정성을 조절하는 데에 중요한 역할을 하는 AXIN2의 mRNA의 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로, GEO 마이크로레이를 통하여 교모세포종 종양구, 유방암 종양구, 대장암 종양구, 폐암 종양구, 난소암 종양구, 간암 종양구, 췌장암 종양구, 전립선암 종양구, 피부암 종양구 및 혀암 종양구와, 각 암의 정상 조직에서 AXIN2의 mRNA의 발현 수준을 비교하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 또한, 웨스턴 블롯을 이용하여 교모세포종 종양구인 GSC11, TS15-88 세포와, 대장암 종양구인 SW480 세포에서 AXIN2의 mRNA의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.

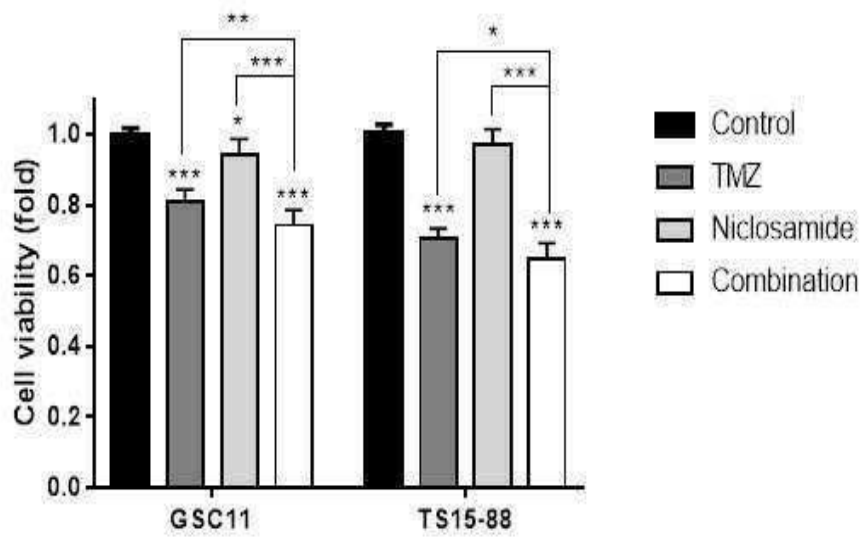
[0079] 도 9에서 보는 바와 같이, 대장암 종양구 세포를 제외하고 교모세포종 종양구, 유방암 종양구, 폐암 종양구, 난소암 종양구, 간암 종양구, 췌장암 종양구, 전립선암 종양구, 피부암 종양구 및 혀암 종양구에서는 정상 조직 대비 AXIN2의 mRNA의 발현 수준이 높지 않았으나, 대장암 종양구 세포에서는 정상 조직 대비 발현 수준이 현저히 높은 것을 확인할 수 있다.

[0080] 또한, 도 10에서 보는 바와 같이, 웨스턴 블롯 결과 상기 차이점을 명확히 알 수 있었다.

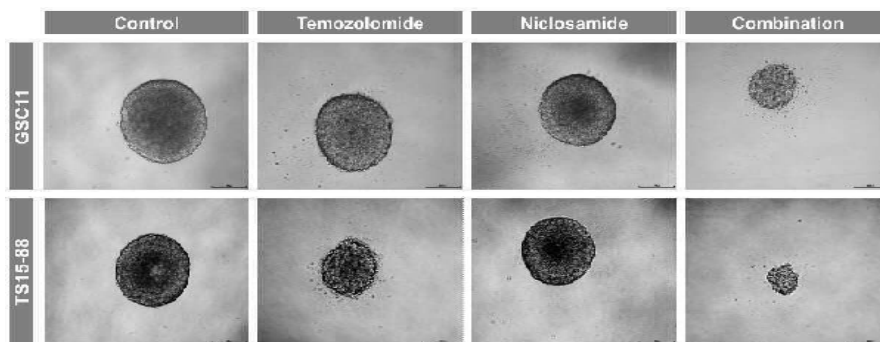
[0082] 상기와 같이, 본 발명에 따라 5-클로로-N-(2-클로로-4-니트로페닐)-2-하이드록시벤즈아마이드(니클로사마이드)와 알킬화제로 테모졸로마이드를 병용 투여하는 경우 이들을 단독으로 투여한 경우보다 이미 형성된 종양구 세포의 크기가 성장하는 것을 효과적으로 억제하였고, 다른 종양구 세포의 형성능, 즉 증식 또한 억제하였으나, 가장 의미있게는 침윤성을 예측하기 어려운 수준 이상으로 현저히 억제하는 것을 볼 수 있었다. 이에 따라, 본 발명에 따라 병용 투여 시 암의 진행을 더디게 하며, 암의 침윤 및 전이를 현저히 억제할 수 있음을 알 수 있다.

도면

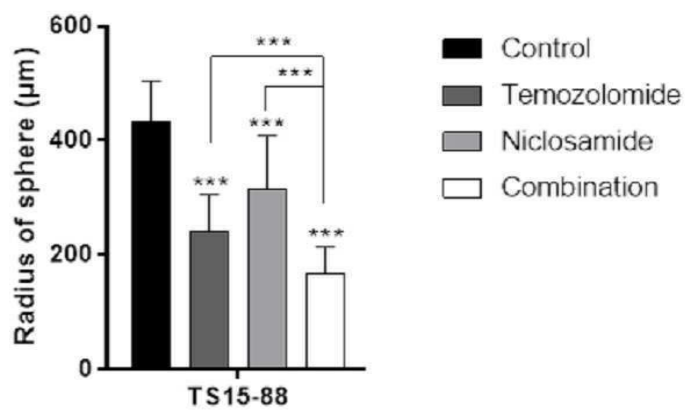
도면1



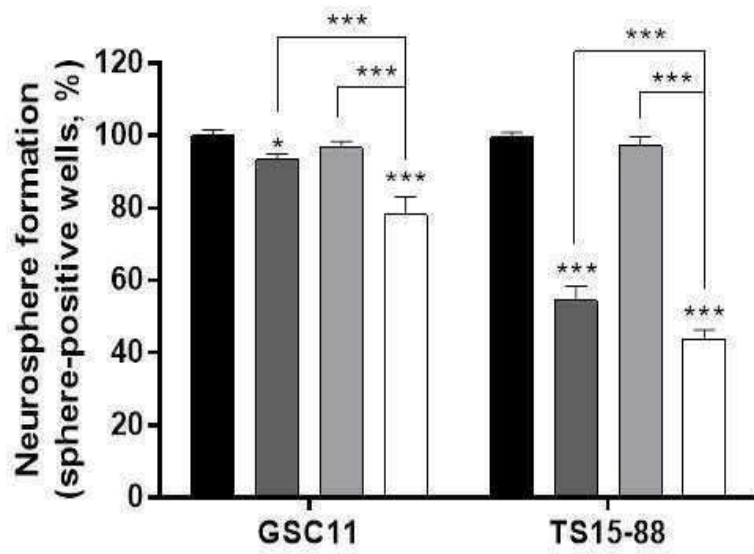
도면2



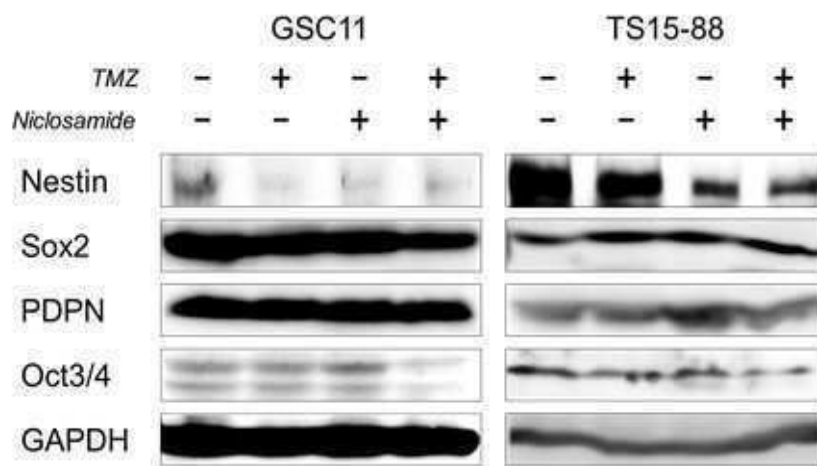
도면3



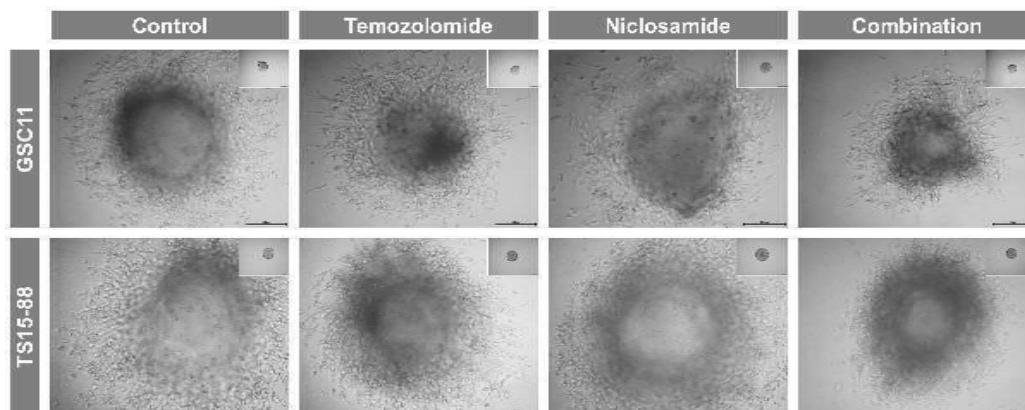
도면4



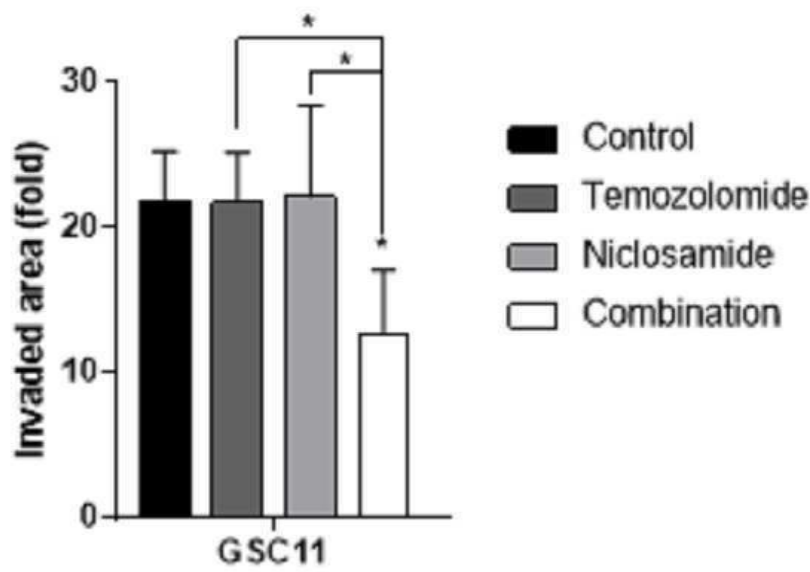
도면5



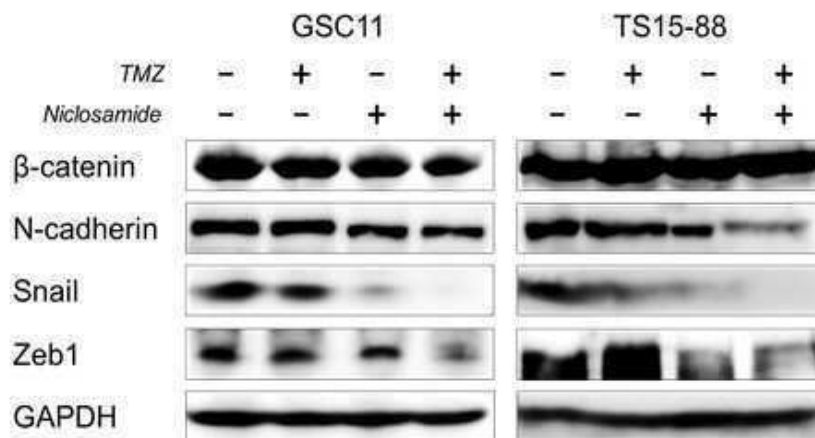
도면6



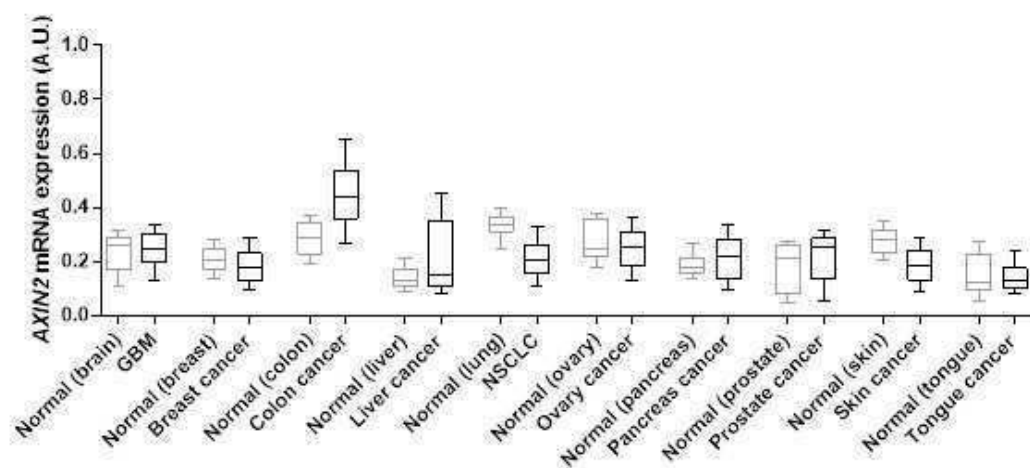
도면7



도면8



도면9



도면10

