

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0121081

(43) 공개일자 2020년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/11 (2006.01) *A61K 31/495* (2006.01)*A61K 31/675* (2006.01) *A61K 36/54* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/11 (2013.01)*A61K 31/495* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0043651

(22) 출원일자 2019년04월15일

심사청구일자 2019년04월15일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

강석구

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동 601호 (이의동, 이편한세상광교)

육종인

서울특별시 강남구 압구정로 201, 85동 103호 (압구정동, 현대아파트)

박준성

서울특별시 강동구 천중로5길 47, 강변갤럭시 아파트 203동 403호

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 13 항

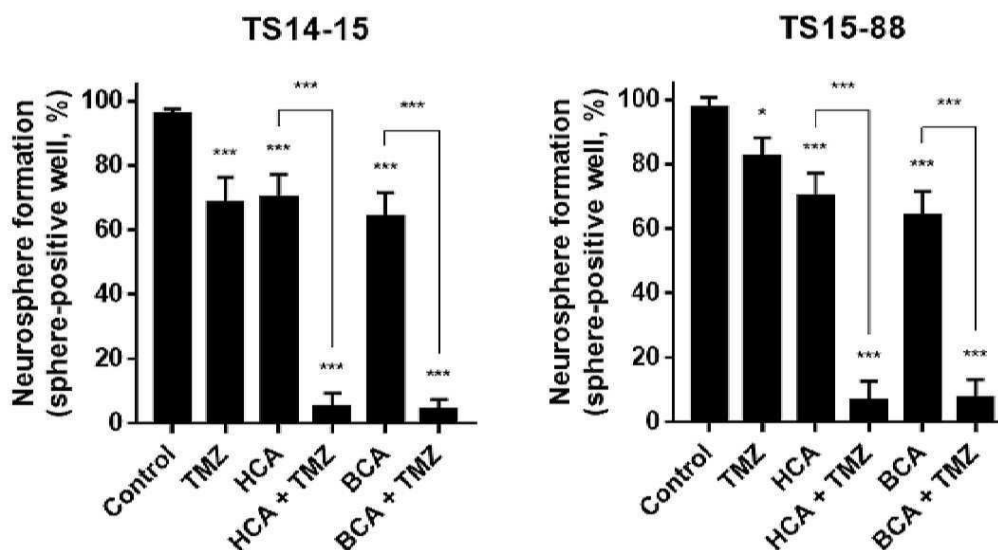
(54) 발명의 명칭 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 신남알데히드 유도체(cinnamaldehyde derivative) 또는 이의 염; 및 알킬화제(alkylating agent) 또는 이의 염;을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물을 이용하는 경우 암 세포, 특히는 암 종양구의 증식, 줄기세포능 또는 침윤성을 현저히 억제하여 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 암이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 퍼지는 전이를 억제할 수 있고, 이러한 전이로 인해 다른 조직에서 파생된 암 관련 질환 또한 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/675 (2013.01)

A61K 36/54 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/04 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI17C2586
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	한국보건산업진흥원-질병중심중개연구(중점연구)
연구과제명	에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.10.01 ~ 2019.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017M2A2A7A01071036
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원자력연구개발사업-방사선기술개발사업
연구과제명	방사선치료 저항성 극복을 위한 암 생체에너지 대사 조절 병용 교모세포종 치료 기

술 개발

기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016R1D1A1A09916521
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구지원사업(후속연구지원)
연구과제명	다른 공간적 적소에서 분리된 기질간엽세포에 의한 고등급 교종 암세포 침윤 증가와 세포외 기질 재형성 조절 기전발굴 및 치료 저항성 획득 기전 발굴

기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.09.01 ~ 2019.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

신남알데히드 유도체(cinnamaldehyde derivative) 또는 이의 염; 및
알킬화제(alkylating agent) 또는 이의 염;을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 신남알데히드 유도체는 육계나무(*Cinnamomum cassia*) 유래 신남알데히드 유도체인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 신남알데히드 유도체는 2'-하이드록시신남알데히드(2'-Hydroxycinnamaldehyde; HCA) 및 2'-벤조일옥시신남알데히드(2'-benzoyloxycinnamaldehyde; BCA) 중 적어도 하나인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 알킬화제는 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan) 및 테모졸로마이드(temozolomide)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 신남알데히드 유도체 또는 이의 염과, 상기 알킬화제 또는 이의 염은 1:0.001 내지 1:1000의 몰 농도비로 포함되는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 암 세포, 암 종양구 또는 암 줄기세포의 증식, 줄기세포능 또는 침윤성을 억제하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 암은 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양인, 약학적 조성물.

청구항 8

신남알데히드 유도체(cinnamaldehyde derivative) 또는 이의 염; 및
알킬화제(alkylating agent) 또는 이의 염;을 유효 성분으로 포함하는 암의 전이성 억제용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 신남알데히드 유도체는 육계나무(*Cinnamomum cassia*) 유래 신남알데히드 유도체인, 약학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 신남알데히드 유도체는 2'-하이드록시신남알데히드(2'-Hydroxycinnamaldehyde; HCA) 및 2'-벤조일옥시신남알데히드(2'-benzoyloxycinnamaldehyde; BCA) 중 적어도 하나인, 약학적 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 알킬화제는 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan) 및 테모졸로마이드(temozolomide)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 신남알데히드 유도체 또는 이의 염과, 상기 알킬화제 또는 이의 염은 1:0.001 내지 1:1000의 몰 농도비로 포함되는, 약학적 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 암은 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 암 종양구(tumor sphere)의 성장, 줄기세포능 및 침윤성 등을 현저히 억제하여 암, 특히는 전이성 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경 오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암, 뇌암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0003] 악성 종양은 대부분의 경우 하나의 장기(뇌, 폐, 간, 신장, 위, 대장, 직장 등)에서 발생한 후 처음 발생한 원발 부위인 장기로부터 다른 조직으로 퍼져 나가는데, 이렇게 원발 부위로부터 다른 조직으로 퍼져 나가는 것을 전이(metastasis)라 한다. 전이는 악성 종양의 진행에 수반되는 현상으로, 악성 종양 세포가 증식하고 암이 진행함에 따라 전이에 필요한 새로운 유전 형질을 획득한 후 혈관과 림프선으로 침윤하고 혈액과 림프를 따라 순환하다가 다른 조직에 정착한 후 증식하게 된다.

[0004] 최근 연구 결과에서 전이와 관련된 유전 형질들이 밝혀지고 있으며, 원발 조직의 유전자 검사를 통해 차후 타 장기로의 전이를 통한 재발 고위험군을 유추할 수 있다. 이러한 전이 초기 단계에서 단백질 분해 효소인 매트릭

스 메탈로프로티나아제(matrix metalloproteinase; MMP)는 암세포가 세포 외 기질과 기저막을 분해하여 암세포의 침윤을 유도하고 전이하는데 중요한 역할을 하며 지금까지 20종 이상이 분리, 확인되었다.

[0005] 악성 종양의 전이에 대한 치료는 국소 치료와 전신 치료로 나누어 볼 수 있는데, 악성 종양의 전이에 대한 치료의 원칙은 종양의 종류와 종양의 전이 부위에 따라 다르다. 전이에 의한 국소 증상이 심하거나, 전이에 대한 수술적 치료가 악성 종양의 자연 경과를 호전시킬 수 있다고 알려진 일부 악성 종양의 경우 전이에 대해 치료 수술 혹은 방사선 치료와 같은 국소 치료 방침을 고려할 수 있다. 일반적으로는 악성 종양에서 전이가 일어난 경우 국소적인 치료보다는 항암 화학 요법과 같은 전신적인 치료를 통하여 전이 부위뿐만 아니라 원발 부위의 종양을 함께 치료하는 것이 도움이 된다. 하지만 림프종과 같은 극소수의 종양을 제외하고는 전이가 발생한 악성 종양의 경우 완치의 가능성은 대단히 낮다.

[0006] 전이가 발생한 악성 종양에 대한 경과는 다양하며, 원발성 악성 종양의 종류와 전반적인 종양의 진행 속도에 따라 경과가 결정된다. 어떤 장기에 전이가 되었느냐에 따라 합병증은 다양하게 발생할 수 있다. 예를 들어, 뇌 전이의 경우 두통, 시야 감소, 구역, 구토 등의 증상이 발생할 수 있다. 골 전이의 경우 골의 통증이 발생할 수 있으며, 병적 골절이 발생할 수도 있다. 골 전이에 동반하여 고칼슘 혈증으로 의식 혼탁이 발생할 수도 있다. 따라서 검진을 통한 종양의 조기 발견 및 원발 종양의 유전자 검사는 전이로 인한 사망률 증가를 예방할 수 있는 방법이다.

[0007] 한편, 일부 종양에서 수술적인 치료 후 보조 항암 화학 요법 및 방사선 치료를 이용하여 재발 및 전이를 예방할 수 있다고 알려져 있으나 이러한 치료법은 정상 세포들에게도 영향을 주어 심각한 부작용을 초래하는 문제가 있다. 따라서 보다 안전하고 치료 효과가 높은 대체적인 암치료 방법이 요구되고 있으며, 이에 최근에는 안전성이 보장된 식물, 미생물 유래 등 천연 자원을 이용한 기능성 식품 및 의약품 연구에 관심이 집중되고 있다.

[0008] 현재까지 암 치료를 위해 개발된 약제들은 전신 치료용 주사제나 경구 투여제로서 혈류를 따라 전신에 비특이적으로 작용하여 암세포에 대한 특이성이 낮으며, 약제 투여에 따른 전신적인 부작용이 많아 수술이나 방사선 치료에 비해 부작용이 많이 나타나는 단점이 있다. 암 세포를 직접 공격하여 효과를 보는 기존의 화학적 치료법 역시 부작용이 많고, 폐와 같은 장기로의 전이 등을 막을 수 있는 획기적인 신약은 아직 개발되지 않은 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 일 목적은 암 세포 중에서도 특히 암 종양구(tumor sphere)의 성장, 줄기세포능 또는 침윤성 등을 억제하여 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 암 세포 중에서도 특히 암 종양구의 성장, 줄기세포능 또는 침윤성 등을 억제하여 암의 전이성 억제용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0011] 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

[0012] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 신남알데히드 유도체(cinnamaldehyde derivative) 또는 이의 염; 및 알킬화제(alkylating agent) 또는 이의 염;을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에서 상기 신남알데히드 유도체로는 육계나무(*Cinnamomum cassia*) 유래 신남알데히드 유도체로, 바람직하게는 2'-하이드록시신남알데히드(2'-Hydroxycinnamaldehyde; HCA) 및 2'-벤조일옥시신남알데히드(2'-benzoyloxycinnamaldehyde; BCA) 중 적어도 하나일 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 알킬화제(alkylating agent)로는 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan) 및 테모졸로마이드(temozolomide)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에서 상기 신남알데히드 유도체 및 상기 알킬화제의 약학적으로 허용 가능한 염 형태를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주

지 않아야 한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산과 상기 신남알데히드 유도체 및 상기 알킬화제 화합물의 산부가염 등이 가능하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0016] 본 발명에 따른 화합물의 바람직한 염의 형태로는 무기산 또는 유기산과의 염을 들 수 있다. 이때, 무기산은 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 브롬산 등이 사용될 수 있다. 또한, 유기산은 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 글루탐산 등이 사용될 수 있다. 유기염기 부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기는 트리스(하이드록시메틸)메틸아민, 디사이클로헥실아민 등이다. 아미노산 부가염 제조에 사용될 수 있는 아미노산은 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산이다. 상기 예시된 무기산, 유기산, 유기염기 및 아미노산 외에 다른 산 또는 염기가 사용될 수 있음은 당해 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0017] 본 발명에서 상기 염 형태는 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어 상기 신남알데히드 유도체 및 상기 알킬화제 화합물을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 1,4-디옥산과 같은 물과 섞일 수 있는 용매에 녹인 다음에 유리산 또는 유리염기를 가한 후에 결정화시켜 제조할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 신남알데히드 유도체 또는 이의 염과 상기 알킬화제 또는 이의 염을 동시에 포함하는 경우, 이들 두 화합물은 1:0.001 내지 1:1000, 바람직하게는 1:0.01 내지 1:100, 더욱 바람직하게는 1:0.1 내지 1:10의 몰 농도비로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 상기 신남알데히드 유도체 중에서도 특히 2'-하이드록시신남알데히드(HCA) 및 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 중 적어도 하나와, 상기 알킬화제 중에서도 특히 테모졸로마이드를 병용 투여할 경우, 암 세포, 특히는 암 종양구 또는 암 줄기세포의 증식, 줄기세포능 또는 침윤성을 현저히 억제하여 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "암"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리키는 것으로, 그 발생 부위에 따라 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양일 수 있고, 바람직하게는 뇌암, 보다 바람직하게는 신경 교종 또는 교모세포종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명에서 상기 "암 종양구(tumor sphere)"란 암 세포/암 줄기 세포의 증식 과정에서 발생하는 고상의 구형 세포를 의미한다. 상기 암 종양구는 일부 암 줄기세포의 특징을 나타내고, 높은 침윤성을 가지며, 항암 약제에 대하여 내성을 가진다.
- [0022] 본 발명에서 상기 암 종양구로는 상기 열거된 암의 줄기세포를 모두 포함할 수 있고, 구체적인 예로는 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양 유래 종양구일 수 있고, 바람직하게는 뇌암의 종양구, 보다 바람직하게는 신경 교종 또는 교모세포종의 종양구일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에서 상기 "암 줄기세포"란 줄기세포 특유의 능력인 자가 재생이나 분화 능력을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암 세포를 의미한다. 본 발명에서 상기 열거한 암 세포로 분화할 수 있는 암 줄기세포는 악성 종양 조직 내에 1 ~ 2% 정도로 존재하며 정상줄기세포의 특성인 자가복제 능력 (self-renewal)과 다른 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotent)을 가지고 있으나 자가 조절 기능에 이상이 있어 세포분열 활성화로 세포 수를 증가하게 되고 스스로 악성 종양 세포로 분화하는 것으로 보고되었다.
- [0024] 1997년 백혈병에서 암 줄기세포(cancer stem cell)의 존재가 밝혀진 이래로 (Blood, 1997), 유방암 (PNAS, 2003), 뇌종양 (Nature, 2004), 전립선암 (Cancer Res, 2005), 대장암 (Nature, 2007), 흑색종 (Nature, 2008)에서도 암 줄기세포가 존재한다는 증거들이 제시되었고. 종양에 포함되어 있는 소수의 암 줄기세포가 종양의 악성화, 항암 저항성 및 재발의 주된 원인으로 부각되었다.
- [0025] 암 줄기세포들은 다른 암 세포들과 구별되는 표지 인자(marker)가 존재하며, 암 줄기세포의 표지 인자(cancer

stem cell marker)로는 하기 표 1과 같이 다양한 암 종 특이적인 암 줄기세포 표지 인자가 알려져 있다.

표 1

암종	암 줄기세포 표지인자	출처
교모세포종	CD133	
신장암	CD105, CD133	Contemp Oncol (Pozn). 2015; 19(1A): A44-A51
갑상선암	ABCG2, MRP1, LRP 및 CXCR4	J Clin Pathol. 2014 Feb;67(2):125-33
급성골수성백혈병 (AMM)	CD34+/CD38-	
다발성골수종 (multiple myeloma)	CD133-	
유방암	CD44+/CD24-/low	Breast Cancer Res. 2007; 9(3): 303
대장암	CD133+	
전립선암	CD44+/ α2β1hi/CD133+	
흑색종 (melanoma)	ABCB5+	

본 발명에서 상기 암 줄기세포로는 상기 열거된 암의 줄기세포를 모두 포함할 수 있고, 구체적인 예로는 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양 유래 암 줄기세포일 수 있고, 바람직하게는 뇌암의 암 줄기세포, 보다 바람직하게는 신경 교종 또는 교모세포종의 암 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 신남알데히드 유도체(cinnamaldehyde derivative) 또는 이의 염; 및 알킬화제(alkylating agent) 또는 이의 염;을 유효 성분으로 포함하는 암의 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에서 상기 신남알데히드 유도체로는 육계나무(*Cinnamomum cassia*) 유래 신남알데히드 유도체로, 바람직하게는 2'-하이드록시신남알데히드(HCA) 및 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 중 적어도 하나일 수 있다.

본 발명에서 상기 알킬화제(alkylating agent)로는 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan) 및 테모졸로마이드(temozolomide)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명에서 상기 신남알데히드 유도체 및 상기 알킬화제의 약학적으로 허용 가능한 염 형태를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않아야 한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산과 상기 신남알데히드 유도체 및 상기 알킬화제 화합물의 산부가염 등이 가능하나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명에 따른 화합물의 바람직한 염의 형태로는 무기산 또는 유기산과의 염을 들 수 있다. 이때, 무기산은 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 브롬산 등이 사용될 수 있다. 또한, 유기산은 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 글루탐산 등이 사용될 수 있다. 유기염기 부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기는 트리소(하이드록시메틸)메틸아민, 디사이클로헥실아민 등이다. 아미노산 부가염 제조에 사용될 수 있는 아미노산은 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산이다. 상기 예시된 무기산, 유기산, 유기염기 및 아미노산 외에 다른 산 또는 염기가 사용될 수 있음은 당해 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 자명할 것이다.

본 발명에서 상기 염 형태는 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어 상기 신남알데히드 유도체 및 상기 알킬화제 화합물을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 1,4-디옥산과 같은 물과 섞일 수 있는 용매에 녹인 다음에 유리산 또는 유리염기를 가한 후에 결정화시켜 제조할 수 있다.

- [0035] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 신남알데히드 유도체 또는 이의 염과 상기 알킬화제 또는 이의 염을 동시에 포함하는 경우, 이들 두 화합물은 1:0.001 내지 1:1000, 바람직하게는 1:0.01 내지 1:100, 더욱 바람직하게는 1:0.1 내지 1:10의 몰 농도비로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서 상기 "암의 전이"란 암이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 전이된 상태를 말한다. 하나의 장기에서 시작한 암이 진행함에 따라 처음 발생한 원발 부위인 장기로부터 다른 조직으로 퍼져 나가는데, 이렇게 원발 부위로부터 다른 조직으로 퍼져 나가는 것을 전이라 할 수 있다. 전이는 암의 진행에 수반되는 현상이라고 할 수 있는데, 암 세포가 증식하고 암이 진행함에 따라 새로운 유전 형질을 획득하면서 전이가 일어날 수 있다. 새로운 유전 형질을 획득한 종양 세포가 혈관과 림프선으로 침입하고 혈액과 림프를 따라 순환하다가 다른 조직에 정착, 증식하게 되면 전이가 일어날 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 전이성이 억제되는 암은 뇌암, 갑상선암, 유방암, 담도암, 담낭암, 췌장암, 대장암, 자궁암, 식도암, 위암, 직장암, 폐암, 방광암, 신장암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 두경부암, 피부암, 혈액암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 암일 수 있고, 바람직하게는 뇌암일 수 있으며, 보다 바람직하게는 교모세포종(glioblastoma)일 수 있다.
- [0038] 종래의 일반적인 암 치료제가 암 세포의 증식을 억제하는 활성은 가지고 있으나, 항 전이 활성은 가지지 못하는 경우가 많다. 그런데 본 발명에서 상기 신남알데히드 유도체 중에서도 특히 2'-하이드록시신남알데히드(HCA) 및 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 중 적어도 하나와, 상기 알킬화제 중에서도 특히 테모졸로마이드를 병용 투여할 경우, 암 세포, 특히는 암 종양구 또는 암 줄기세포의 증식, 줄기세포능 또는 침윤성을 현저히 억제함으로써 암이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 퍼지는 전이를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 전이로부터 파생되는 암 관련 질환 또한 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 일반적으로 사용되는 항암제를 추가로 더 포함하여 항암 효과를 보다 향상시킬 수 있다. 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 마시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 파조파닙, 토세라닙, 닌테다닙, 레고라페닙, 세막사닙, 티보자닙, 포나티닙, 카보잔티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 렌바티닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙, 오조가마이신, 이브리투모맙, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름, 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 케페시타빈, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 올라파립, 나벨빈, 파드라줄, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴, 보리노스텐, 엔티노스텐 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 조성물을 이용하여 암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 조성물을 이용하여 암 증상을 차단하거나, 암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0043] 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.
- [0044] 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. 약제학적으로 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, 운화제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 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.

[0045] 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, 항응집제, 운화제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0047] 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.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 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.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 조성물을 이용하는 경우 암 세포, 특히는 암 종양구의 증식, 줄기세포능 또는 침윤성을 현저히 억제하여 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 암이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 퍼지는 전이를 억제할 수 있고, 이러한 전이로 인해 다른 조직에서 파생된 암 관련 질환 또한 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1의 A는 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)에서 CD133 및 Nestin의 발현을 확인한 사진이다.

도 1의 B는 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)의 신경교세포로 분화를 유도한 후 GFAP, MBP, NeuN, 및 TUBB3의 발현을 확인한 사진이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS15-88)에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 또는 테모졸로마이드(TMZ) 단독; 혹은 이들의 조합을 처리한 뒤 상기 종양구의 세포 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 세포(TS14-15 및 TS15-88)에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 또는 테모졸로마이드(TMZ) 단독; 혹은 이들의 조합을 처리한 뒤 신경구 형성능의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 세포(TS14-15 및 TS15-88)에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 또는 테모졸로마이드(TMZ) 단독; 혹은 이들의 조합을 처리한 뒤 형성된 신경구의 반경의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 또는 테모졸로마이드(TMZ) 단독; 혹은 이들의 조합을 처리한 뒤 상기 종양구의

침윤성의 변화를 확인한 사진이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 또는 테모졸로마이드(TMZ) 단독; 혹은 이들의 조합을 처리한 뒤 침윤된 면적의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 또는 테모졸로마이드(TMZ) 단독; 혹은 이들의 조합을 처리한 뒤 Nestin, Sox2, PDPN, Zeb1, N-cadherin, 및 β -catenin의 발현 수준의 변화를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)를 정위적으로 이종 이식한 마우스 모델에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA) 단독, 테모졸로마이드(TMZ) 단독 또는 이들의 조합을 처리한 뒤 상기 마우스 내 종양의 크기 변화를 나타낸 생물 발광 사진이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 교모세포종 종양구(TS14-15 및 TS15-88)를 정위적으로 이종 이식한 마우스 모델에 2'-하이드록시신남알데히드(HCA) 단독, 테모졸로마이드(TMZ) 단독 또는 이들의 조합을 처리한 뒤 발광(luminescence) 정도의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0053] 실시예

[0055] 세포 배양 및 시약

[0056] 이하의 실험에서는 교모세포종(GBM) 환자 유래 TS14-15 및 TS15-88 암 세포를 사용하였다. 종양구로의 배양을 위하여 DMEM/F-12 (Mediatech, Manassas, VA, USA), 1x B27 (Invitrogen, San Diego, CA, USA), bFGF 20 ng/mL, 및 EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20 ng/mL으로 이루어지는 종양구 완전 배지를 사용하였다. 모든 생체 외(in vitro) 실험은 종양구 배양 조건 하에서 수행되었다. 또한, 생체 외 처리를 위하여 2'-하이드록시신남알데히드(HCA), 2'-벤조일옥시신남알데히드(BCA) 및 테모졸로마이드(TMZ)를 DMSO에 용해시킨 뒤 적절한 농도로 세포 배양 배지에 첨가하였다.

[0058] 교모세포종 종양구의 특성 분석

[0059] 인간 교모세포종 시료로부터 종양구를 얻기 위해, 종래의 방법(Kong BH et al., Isolation of glioma cancer stem cells in relation to histological grades in glioma specimens. Childs Nerv Syst. 2013 Feb;29(2):217-29)에 따라 수행하였고, 줄기세포능 마커인 CD133 및 Nestin (Abcam, Cambridge, UK)의 발현은 면역세포화학(immunocytochemistry)에 의해 수행하였다. 교모세포종 종양구에서 신경교세포로의 분화는 GFAP (Dako, Carpinteria, CA, USA), MBP, NeuN, 및 TUBB3 (Chemicon, Temecula, CA, USA)의 발현을 모니터링하면서 평가하였다.

[0061] 세포 생존율 분석

[0062] HCA, BCA, 또는 TMZ의 단독, 또는 이들의 조합이 세포 생존율에 미치는 영향은 EZ-Cytox 시약(DoGenBio, Seoul, Korea)을 이용하여 WST 어췌이에 의해 분석하였다. 교모세포종 종양구 세포는 96-웰 플레이트에 접종한 뒤 37℃에서 24시간 동안 배양한 뒤, HCA, BCA, TMZ, 또는 이들의 조합을 3일 동안 처리하였다. 그 후, WST 시약(100 μ L/웰)을 첨가한 뒤 37℃에서 4시간 동안 배양하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 실험은 3번 반복하여 수행하였고, 결과는 대조군 대비 생세포의 비율로 나타내었다.

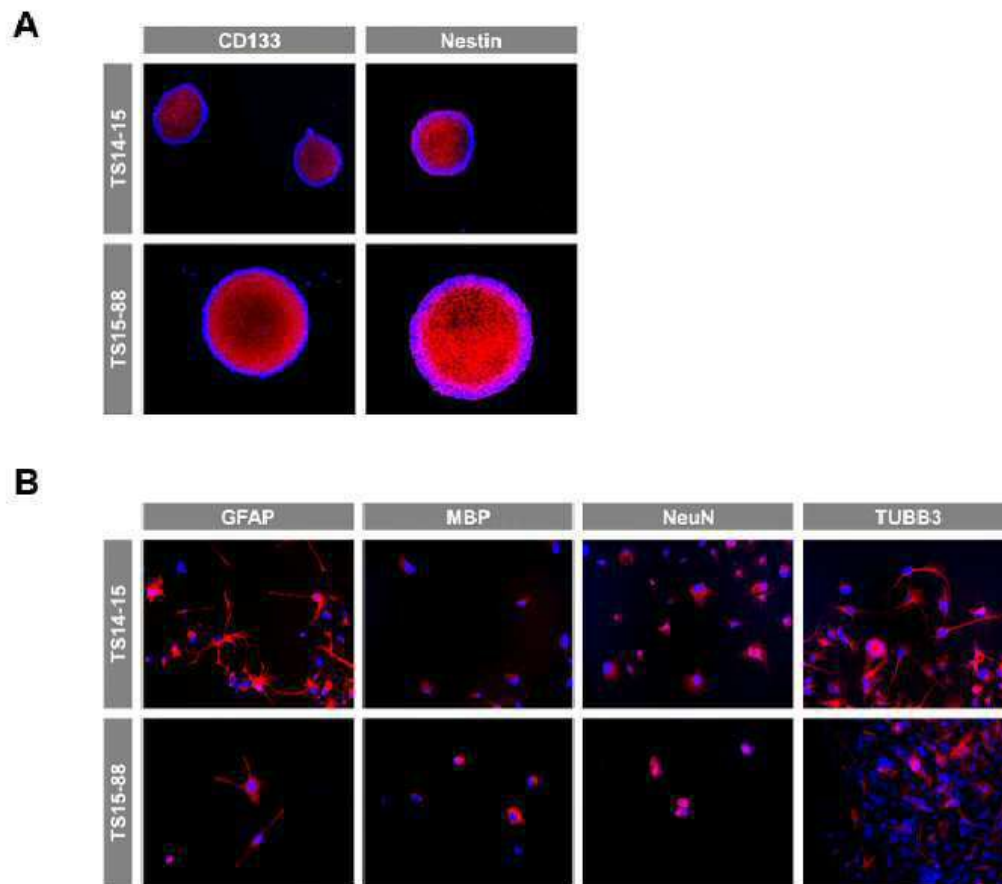
[0063]

- [0064] ATP 분석
- [0065] 흡어진 교모세포종 종양구를 96-웰 플레이트에 웰당 10^4 세포의 수로 접종하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 상기 교모세포종 종양구를 HCA, BCA, TMZ 또는 이들의 조합으로 3일간 처리하고 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Fitchburg, WI, USA)를 이용하여 ATP 수준을 측정하였다. 간단히, 상기 교모세포종 종양구 세포를 상온에서 10분간 배양한 뒤, 세포 배양 배지 부피와 동일한 부피의 CellTiter-Glo 시약을 각 웰에 첨가하고 발광(luminescence) 정도를 측정하였다.
- [0067] 스피어 형성능의 분석
- [0068] 분리된 10개의 단일 교모세포종 종양구를 DMEM/F-12 (Mediatech, Manassas, VA, USA), 1x B27 (Invitrogen, San Diego, CA, USA), bFGF 20 ng/mL 및 EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20 ng/mL를 포함하는 배지가 포함된 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 상이한 조건 하에서 3주간 배양시킨 후 스피어-양성 웰을 카운팅하고, 대조군 대비 처리군에서 스피어-양성 웰의 비율을 측정하여 퍼센티지로 나타내었다. 스피어 양성 웰의 이미지를 촬영하고 ToupView 소프트웨어(ToupTek Photonics, Zhejiang, China)를 이용하여 분석하였다.
- [0069]
- [0070] 침윤성 분석
- [0071] 단일 스페로이드(spheroid)로 성장시킨 TS14-15 및 TS15-88 세포를 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 접종하고 배양하였다. 각 웰을 매트릭셀, 콜라겐 타입 I(Corning), 및 TS 완전 배지로 이루어지는 혼합 매트릭스로 채웠다. 상기 매트릭스가 겔화되기 전에 단일 스페로이드를 접종한 후, 매트릭스가 건조되는 것을 방지하기 위하여 TS 완전 배지를 첨가하였다. 침윤 면적은 하기 식 1에서 각 시간별 차지한 면적으로 나타내었다.
- [0072] [식 1]
- [0073] $(72 \text{ h} - 0 \text{ h})/0 \text{ h}$
- [0075] 웨스턴 블롯 분석
- [0076] 10% 트리스-글리신 겔(Tris-glycine)에서 SDS-PAGE를 이용하여 세포 용해물을 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막에 이동시킨 후 Sox2 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA); Nestin (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA); PDPN 및 β -catenin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); N-cadherin (R&D Systems); Zeb1 (Sigma-Aldrich); 및 GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 항체를 이용하여 상기 단백질을 분석하였다. 단백질은 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)-컨쥬게이트된 IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 Western Lightning Plus-enhanced chemiluminescence reagent (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)와 함께 이용하여 탐지하였다. ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)를 이용하여 이미지를 촬영하였다.
- [0078] 마우스의 정위적 이종이식 모델
- [0079] 이하의 실험에서는 무흉선 수컷 누드 마우스(4-8 weeks old; Central Lab. Animal Inc., Seoul, Korea)를 사용하였다. 마우스는 멸균 조건 하에서 마이크로-아이솔레이터 케이지(micro-isolator cages)에서 사육하였고, 건강 상태를 확인하기 위하여 실험 개시 전에 1주간 모니터링 하였다. 빛, 온도 및 습도는 중앙에서 관리하였다. Zoletil (30 mg/kg; Virbac Korea, Seoul, Korea) 및 자일라진 (10 mg/kg; Bayer Korea, Seoul, Korea) 용액을 복강 내 주사하여 마우스를 마취시켰다. 가이드-스크류 시스템을 이용하여 분리된 교모세포종 종양구(TS15-88)를 마우스의 우전두엽에 이식하였다. Hamilton syringe (Dongwoo Science Co., Seoul, Korea)를 이용하여 총 5×10^5 세포를 4.5mm 깊이에 주입하였다. 그 후, HCA (50 mg/kg), TMZ (30 mg/kg), 또는 이들의 조합을 마우스(n = 5 mice/group)에 투여하였다. HCA 및 TMZ는 교모세포종을 이식하기 전부터 5일 동안 복강 내 주입하였다. 마우스의 몸무게가 최초 몸무게에 비하여 15% 감소하면 승인된 프로토콜에 따라 마우스를 안락사 시켰다.

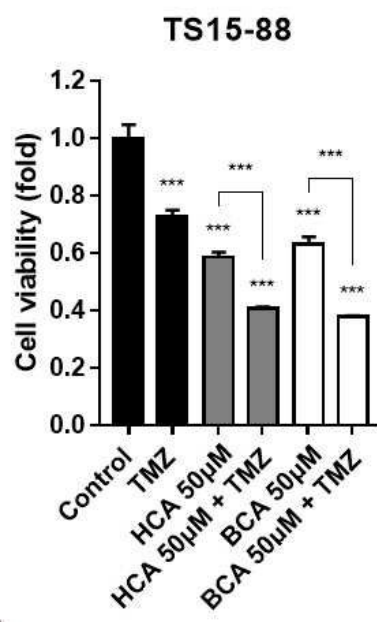
- [0081] 생물 발광 이미지(Bioluminescence imaging)
- [0082] IVIS 이미지 시스템과 Living Image v4.2 소프트웨어(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)를 사용하여 생물 발광 이미지를 얻고 분석을 수행하였다. 신호를 얻기 15분 전에 D-루시페린(D-luciferin) (30 mg/mL; Promega)을 마우스의 복강 내 주입하였다. 그레이 스케일의 사진 이미지와 생물 발광 컬러 이미지를 겹쳐 놓았다.
- [0084] HCA/BCA 및 TMZ 조합의 교모세포종 종양구의 세포 생존율의 현저한 감소
- [0085] 면역 세포 화학 분석 결과 TS14-15 및 TS15-88의 교모세포종 종양구는 모두 줄기세포능 마커로 CD133 및 Nestin을 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 1A). 이러한 두 교모세포종 종양구에 대하여 신경교세포의 분화를 유도한 결과, GFAP, MBP, NeuN, 및 TUBB3의 발현이 유도된 것을 확인할 수 있었다(도 1B). TS15-88의 교모세포종 종양구에 HCA, BCA, TMZ 단독, 또는 이들의 조합을 처리한 결과, HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합을 처리한 경우 이들을 단독으로 처리한 경우에 비하여 상기 교모세포종 종양구의 생존율이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 2).
- [0087] HCA/BCA 및 TMZ 조합의 교모세포종 종양구의 줄기세포능 억제
- [0088] 신경구 형성능을 통해 교모세포종 세포의 줄기세포능을 분석하였다. 그 결과, HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합을 처리한 경우 이들을 단독으로 처리한 경우에 비하여 스피어-양성의 웰의 비율이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 3). 스피어의 반경으로 측정된 스피어의 크기에 있어서도, HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합을 처리한 경우 이들을 단독으로 처리한 경우에 비하여 스피어의 크기가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 4). 이를 통하여 본 발명에 따른 HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합이 교모세포종 종양구의 항-줄기세포능에 현저한 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0090] HCA/BCA 및 TMZ 조합의 교모세포종 종양구의 침윤성 억제
- [0091] 3D 침윤성 분석과 웨스턴 블롯을 통해 교모세포종 종양구의 침윤성을 분석하였다. 교모세포종의 생체 내(in vivo)에서의 성향과 관련성이 높은 3D 침윤성 분석을 통해 확인한 결과, 교모세포종 종양구는 이식된 콜라겐 매트릭스의 주변으로 방사형으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 그런데 HCA, BCA 또는 TMZ를 단독으로 처리한 경우에 비하여, 이들의 조합인 HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합을 처리한 경우 상기 교모세포종 종양구의 침윤성이 현저히 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 6). 또한, 줄기세포능, 침윤성, 중간엽 전이 관련 마커인 Nestin, Sox2, PDPN, Zeb1, N-cadherin 및 β -catenin의 발현에 있어서도 HCA, BCA 또는 TMZ를 단독으로 처리한 경우에 비하여, 이들의 조합인 HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합을 처리한 경우 상기 마커의 발현 수준이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 7). 이를 통하여 본 발명에 따른 HCA 및 TMZ의 조합; 또는 BCA 및 TMZ의 조합이 교모세포종 종양구의 침윤성 억제에 현저히 뛰어난 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0093] 마우스의 정위적 이종이식 모델에서 HCA/BCA 및 TMZ 조합의 치료 효과
- [0094] 교모세포종 종양구인 TS15-88를 정위적 이종이식한 마우스 모델에 HCA 또는 TMZ를 단독으로, 혹은 이들의 조합을 처리한 결과, 생물 발광 이미지 결과로부터 HCA 또는 TMZ를 단독으로 처리한 경우에 비하여 HCA 및 TMZ의 조합을 처리한 경우 종양의 크기가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 8 및 9). 이를 통하여 본 발명에 따른 HCA 및 TMZ의 조합이 교모세포종 종양구의 항암 효과에 현저히 뛰어난 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다.

도면

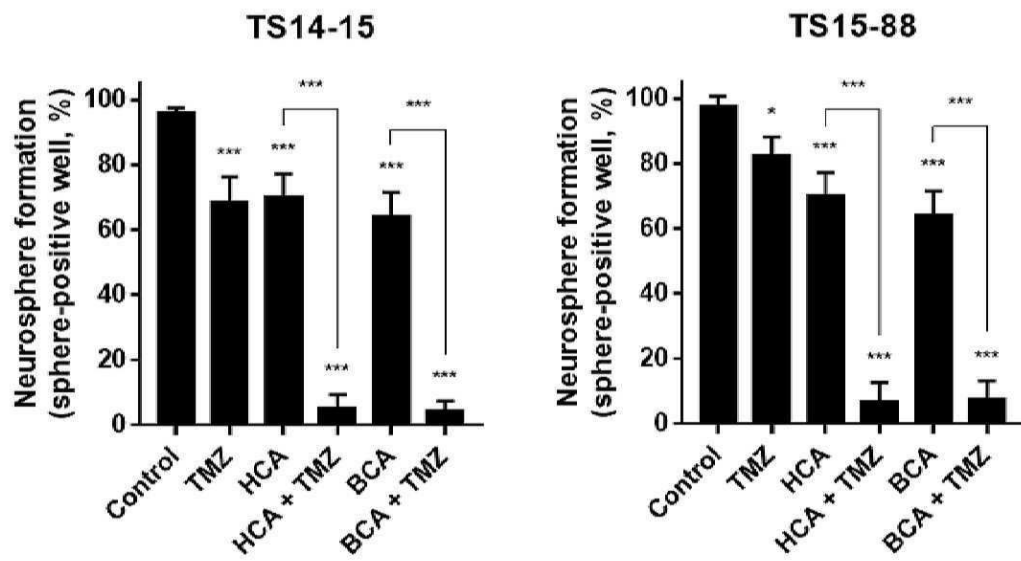
도면1



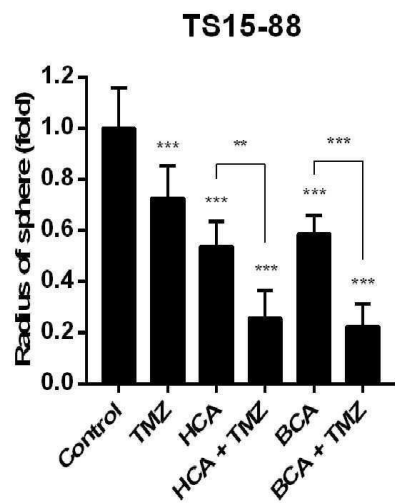
도면2



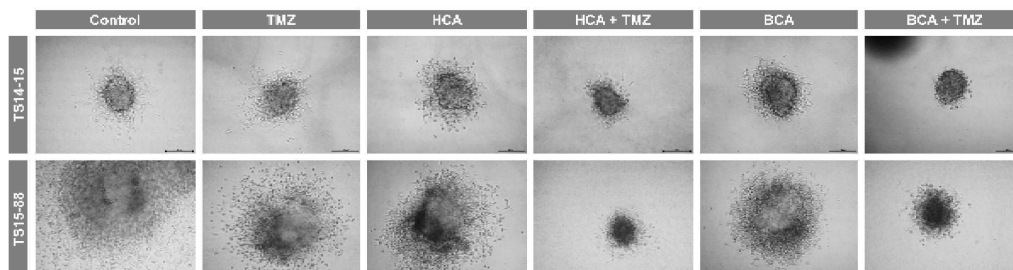
도면3



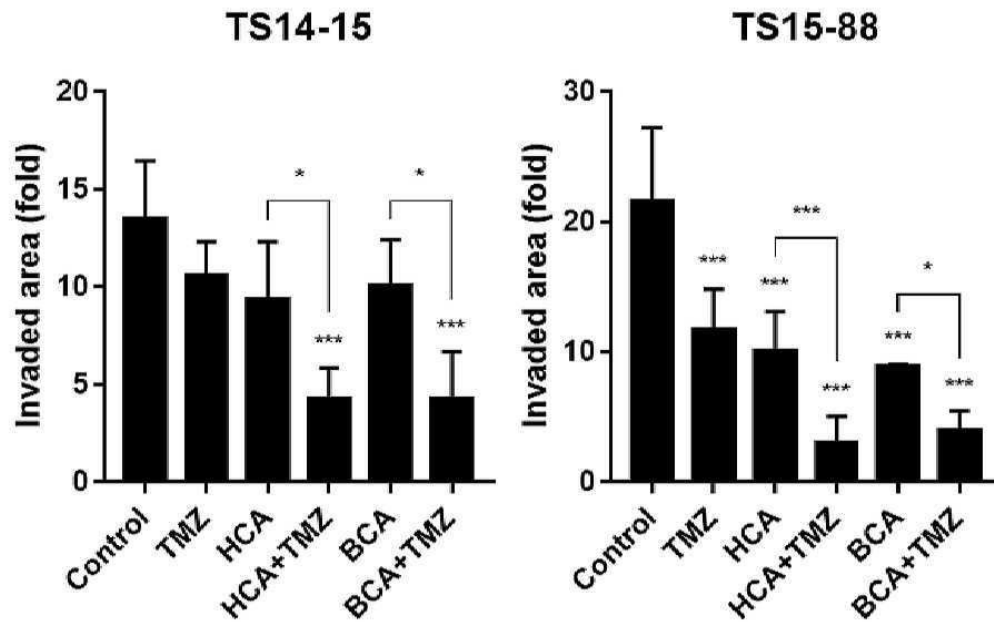
도면4



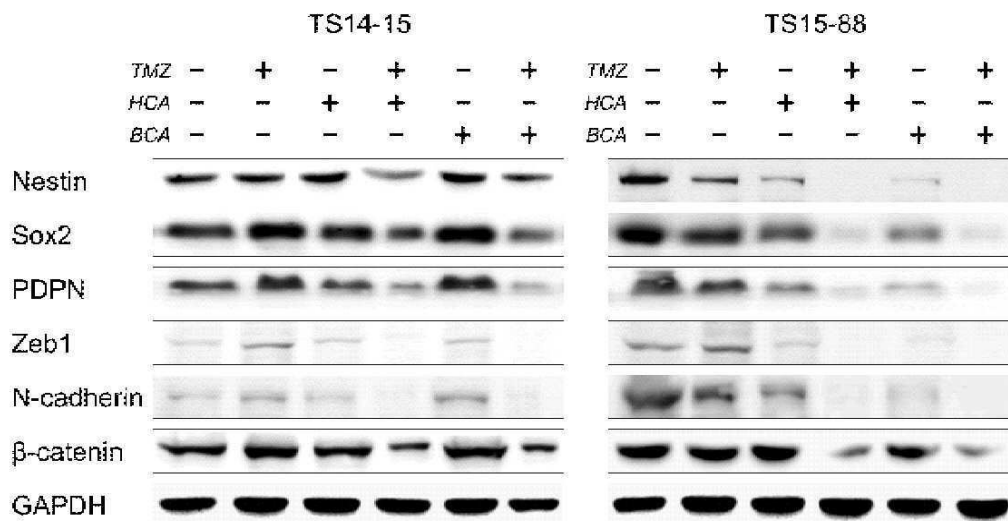
도면5



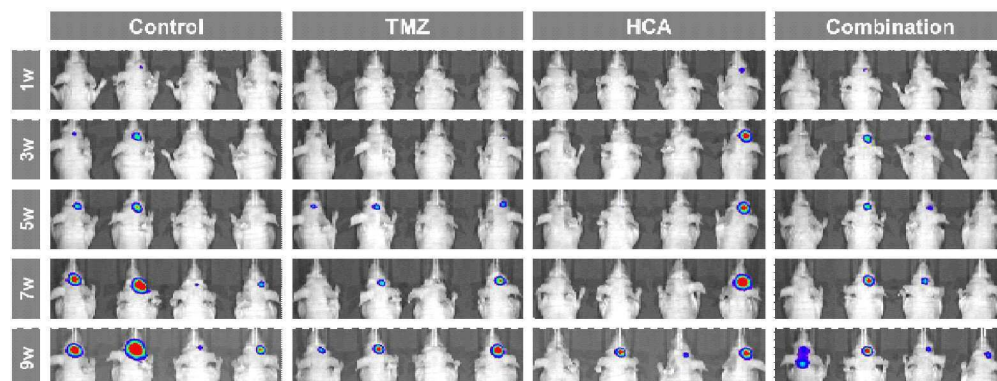
도면6



도면7



도면8



도면9

