

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0005777

(43) 공개일자 2020년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/36 (2006.01) A61K 31/11 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01) A61K 31/37 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/36 (2013.01)
A61K 31/11 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0079157

(22) 출원일자 2018년07월09일

심사청구일자 2019년04월26일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

국립암센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

(72) 발명자

강석구

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동
601호(광교 e편한세상)

김수열

경기도 고양시 일산서구 중앙로 1376, 1001동
1805호(주엽동, 강선마을10단지아파트)

(74) 대리인

이재영

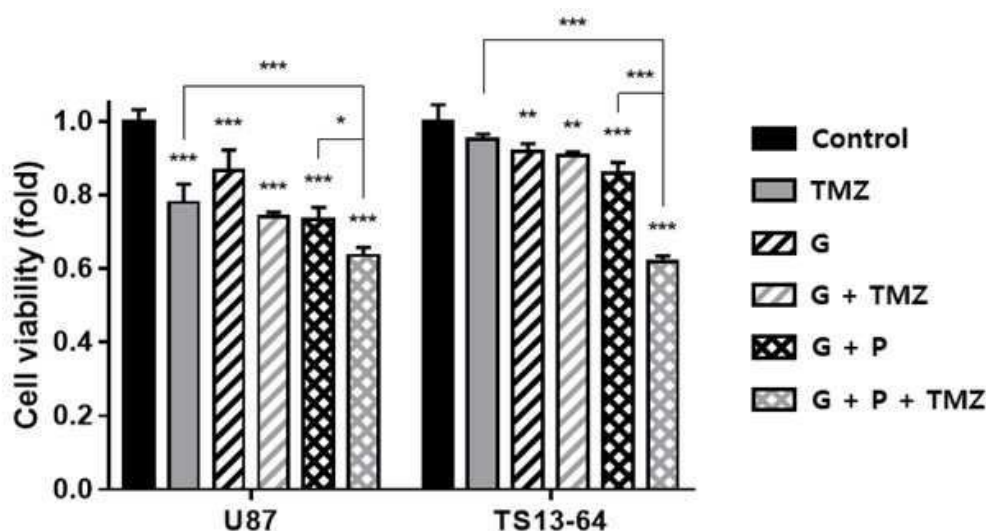
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물에 관한 것이다. 뇌암은 종류가 매우 다양하고, 뇌세포와 종양세포 간의 경계가 분명하지 않아 특히 치료가 용이하지 않다. 본 발명의 약학조성물은 필요에 의해 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 것이 가능하고, 상기 화합물은 바람직하게는 펜포르민이다. 본 발명의 약학조성물은 뇌암의 치료 및 예후 증진에 매우 효과적이고, 유효성분 각각을 단독으로 투여한 경우보다 암세포 사멸, 및 암 줄기세포 특성 억제 효과의 효과가 현저하므로, 뇌암 치료 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/155 (2013.01)

A61K 31/37 (2013.01)

A61K 31/4188 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1324

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 환자유래 암이식 in vivo 제브라피쉬 및 in vitro 복제종양 플랫폼وم 개발

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M2A2A7A01071036

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원자력연구개발사업-방사선기술개발사업

연구과제명 방사선치료 저항성 극복을 위한 암 생체에너지 대사 조절 병용 교모세포종 치료 기술 개발

기 여 율 2/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.09.21 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C2586

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한국보건산업진흥원-질병중심중개연구(중점연구)

연구과제명 에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 개발

기 여 율 3/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.12.21 ~ 2020.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 알데히드 억제제는 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol), 및 쿠마린(coumarins)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 항암제는 테모졸로마이드(Temozolomide)인 것인, 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약학조성물은 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는, 약학조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 비구아니드계 화합물은 메트포민(metformin), 부포르민(buformin), 및 펜포르민(phenformin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 뇌암은 원발성 뇌암, 또는 이차성 뇌암인 것인, 약학조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 뇌암은 성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 상의세포종(ependymoma), 뿔지교종(oligodendroglioma), 혼합교종(mixed glioma), 뇌간 교종(brain stem glioma), 시신경 교종(optic nerve glioma), 뇌하수체 종양(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 수모세포종(medulloblastoma), 원시신경외배엽종양(primitive neuroectodermal tumors), 송과체 종양(pineal tumors), 수막종(meningioma), 신경초종(schwannoma), 전이성 뇌종양(metastatic brain tumors), 중추신경 임파종(CNS lymphoma), 신경섬유종증(neurofibromatosis), 가성뇌종양(pseudotumor cerebri), 및 결절성 경화증(tuberous sclerosis)로 구성되는

그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 뇌암은 뇌암 줄기세포를 포함하는 것인, 약학조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 치료는 암세포의 수적 증가를 억제시키거나, 암세포의 양적 증식을 억제시키거나, 암 세포를 사멸시키거나, 암 조직의 크기를 유지시키거나, 암 조직의 크기를 감소시키거나, 또는 암 조직 내의 신생혈관 발달을 억제하는 것을 포함하는 것인, 약학조성물.

청구항 10

알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 전이 억제용 약학조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 알데히드 억제제는 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol), 및 쿠마린(coumarins)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학조성물.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 항암제는 테모졸로마이드(Temozolomide)인 것인, 약학조성물.

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 약학조성물은 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는, 약학조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 비구아니드계 화합물은 메트포민(metformin), 부포르민(buformin), 및 펜포르민(phenformin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학조성물.

청구항 15

제 10항에 있어서,

상기 뇌암은 원발성 뇌암, 또는 이차성 뇌암인 것인, 약학조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 뇌암은 성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 상의세포종(ependymoma), 뿔지교종(oligodendroglioma), 혼합교종(mixed glioma), 뇌간 교종(brain stem glioma), 시신경 교종(optic nerve glioma), 뇌하수체 종양(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 수모세포종(medulloblastoma), 원시신경외배엽종양(primitive neuroectodermal tumors), 송과체 종양(pineal tumors), 수막종(meningioma), 신경초종(schwannoma), 전이성 뇌종양(metastatic brain tumors), 중추신경 임파종(CNS lymphoma), 신경섬유종증(neurofibromatosis), 가성뇌종양(pseudotumor cerebri), 및 결절성 경화증(tuberous sclerosis)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학조성물.

청구항 17

제 10항에 있어서,

상기 뇌암은 뇌암 줄기세포를 포함하는 것인, 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 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. 따라서 효과적인 항암제를 개발하고자 하는 노력이 지속되어 왔고, 보다 효과적으로 암세포를 사멸시키는 항암제가 다수 개발되었으나, 뇌암의 경우 효과적인 치료제 개발이 미흡한 실정이다. 뇌암은 연령에 관계없이 발생되며, 소아에 발생 빈도가 다른 암에 비하여 높은 특징이 있다. 뇌암은 뇌조직과 뇌를 싸고 있는 뇌막에서 발생하는 원발성 뇌암과 두개골이나 신체의 다른 부위에서 발생한 암으로부터 전이된 이차성 뇌암을 통칭하는데, 다른 장기에서 발생하는 암과 구분되는 점이 많다. 우선 폐, 위, 유방 등에 생기는 암은 장기별로 한 두 종류에 국한되고, 그 성질이 동일, 유사한 편이나, 뇌에는 매우 다양한 종류의 암이 발생한다. 예를 들면 다형성아교모세포종, 악성신경교종, 임파선종, 배아세포종, 전이성 종양 등이다. 특히 신경교종(glioma)의 일종인 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)은 가장 악성이고 공격적이어서 예후가 매우 좋지 않으며, 진단 후 평균 생존 기간이 약 1년을 넘지 못하는 매우 치명적인 질환이다. 뇌세포와 종양세포 간의 경계가 분명하지 않기 때문에, GBM을 외과적을 완전히 제거하는 것은 거의 불가능하다. 따라서 항암제에 의한 치료에 매우 의존적이나, 뇌 이외의 장기에서는 효과를 보이는 대부분의 항암제가 뇌암에서는 뇌까지 약효의 전달이 원활히 이루어지지 못하여 효용성이 낮으므로, 뇌암에 특이적으로 치료 효과가 현저한 항암제의 개발이 시급한 실정이다(N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):987-96).

[0004] 한편, 알데히드 억제제로서의 고시폴(Gossypol)은 면실(cotton plant)에 다량으로 포함된 페놀 유도체에 해당하는 것이다. 중국에서는 이러한 고시폴이 남성의 정자 기능을 억제하는 것을 발견하여, 남성 경구 피임약으로 개발되어 왔으나, 최근 고시폴의 암세포 성장 억제에 유의한 효과가 있다는 것이 공지되었다(미국 등록특허 US6114397). 그러나, 아직 고시폴만 단독으로 투여해서는 효과적으로 암세포 성장을 억제하는 것이 어려운 실정이다.

[0005] 따라서 본 발명은 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 본 발명의 약학조성물은 필요에 의해 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 것이 가능하고, 상기 화합물은 바람직하게는

펜포르민이다. 본 발명에 따른 약학조성물은 특히 뇌암의 치료 및 예후 증진에 매우 효과적이고, 유효성분 각각을 단독으로 투여한 경우보다 암세포 사멸, 및 암 줄기세포 특성 억제 효과의 효과가 현저하므로, 뇌암 치료 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0013] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에서 “암”이란, 제어되지 않은 세포성장으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 하는 것을 말한다. 학문적으로는 신생물이라고 명명되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환으로, 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과 외적 요인으로 구분한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는지에 대해서는 정확하게 규명되지 않았으나, 상당수의 암이 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로는 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성유전자 (oncogenes)와 종양억제유전자 (tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 용인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에서 “암 줄기세포(cancer stem cell)”란, 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암세포를 의미하며, 예를 들어 구(sphere) 형태의 암세포 집단이나, 형태가 불분명하고 예후가 좋지 않은 암 조직을 포함할 수 있다. 상기 암 줄기세포의 정상적인 종양 성장 조건(상기 "정상적인 종양의 성장 조건"이란 세포 성장에 필요한 영양분(포도당)이 충분하고 종양미세환경의 성장 여건이 충족하여 세포 스트레스가 없는 상태를 칭한다.)에서 일반적인 암세포와 상이하게 느린 속도로 증식하거나 휴지기(dormant state) 상태를 유지하여 항암제에 대한 저항성을 가지고 있을 수 있으며, 예를 들어, PGC-1a 등의

전사조절인자의 발현이 정상적인 종양세포와 달리 통제되어 주요 대사조절물질의 기능이 일반 암세포와 비교하여 상이할 수 있다. 이러한 상이한 대사조절 능력과 이에 기전(mechanism)적으로 연계된 세포신호전달계의 조절을 통해 영양 결핍 상태에서 세포 사멸(apoptosis)에 대한 저항성을 획득하고 침윤 및/또는 전이능이 있는 세포를 포괄적으로 지칭한다. 그러나 일반적인 암세포로 분화할 수 있는 세포라면 이에 제한되지 않는다.

[0018] 최근까지 개발된 항암제들은 대부분 일반적인 암세포를 표적으로 하는 것으로, 암환자의 치료내성 및 재발에 중요한 역할을 하는 암 줄기세포의 사멸에는 효과적이지 못하다. 암 치료 후에도 체내에 암 줄기세포가 남게 되면 암의 재발 및 /또는 전이가 활발히 일어나므로, 암 줄기세포 치료제 개발은 시급한 과제라고 할 것이다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에서 "암 줄기세포 치료"란, 암 줄기세포의 사멸, 암 줄기세포 유지(maintenance) 억제, 암 줄기세포 악성화(malignance) 억제, 및 암 줄기세포 침윤활성(invasive) 억제를 포함하는 의미이다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에서 "항암제"란, 악성종양의 치료를 위하여 사용되는 화학요법제의 총칭이다. 대부분의 항암제는 암세포의 각종 대사경로(代謝經路)에 개입하여 주로 핵산의 합성을 억제하거나 항암활성(抗癌活性)을 나타내는 약제이다. 현재 암치료에 사용되고 있는 항암제는 생화학적인 작용 기전에 따라 6개의 범주로 분류하고 있다.

[0023] (1) 알킬화제(alkylating agents): 어떤 화합물에 알킬기 R-CH₂를 도입할 능력을 갖춘, 반응성이 대단히 높은 물질로 세포에 작용시키면 대부분은 DNA의 구아닌의 N7과 반응하여 DNA구조를 변형시키고, 사슬절단[鎖切斷]을 일으켜 항암효과 및 세포독효과를 나타낸다. 여기에 속하는 약물로는, ① 나이트로젠머스터드계(系): 나이트로젠 머스터드·클로람부실·멜팔란·사이클로포스파마이드 등 ② 에틸렌이민계: 싸이오테과 ③ 알킬설포네이트계: 부셀판 ④ 트라이아진계·하이드라진계: DTIC(다카바진)·프로카바진 ⑤ 나이트로소요소계: BCNU, CCNU, 메틸-CCNU 등이 있다.

[0024] (2) 대사길항제(代謝拮抗劑: antimetabolites): 이 군(群)에 속하는 약물은 암세포의 증식에 필요한 대사과정을 저해하는 작용을 가진 것으로 ① 엽산유도체: 메소트렉세이트(MTX) ② 퓨린 유도제: 6-메르캅토피리딘(6-MP), 6-싸이오구아닌 ③ 피리미딘 유도제: 5-플루오로우라실, 시타라빈 등이 있다.

[0025] (3) 항생물질(抗生物質: antibiotics): 세균에서 생산되는 항생물질 가운데 항암작용을 나타내는 것으로는 아리라마이신, 다우노루비신, 블레오마이신, 미토마이신-C, 악티노마이신-D 등이 있다.

[0026] (4) 유사분열억제제(有絲分裂抑制劑: vinca alkaloid): 이들 약물은 분열시기 특이성 약물로서 유사분열 시기 중 중기(metaphase)에서 세포분열을 중지시킨다. 빈크리스틴, 빈블라스틴, VP-16-213 및 VM-26이 있다.

[0027] (5) 호르몬제: 어떤 종류의 암은 호르몬을 투여함으로써 치료효과를 볼 수 있는데, 남성호르몬을 사용하는 경우는 유방암, 여성호르몬은 전립선암, 프로게스테론은 자궁내막암에 효과가 있으며, 부신피질호르몬은 급성림프성 백혈병이나 림프종(腫)의 치료에 사용하고 있고, 유방암에 대해서는 항여성 호르몬제인 타목시펜이 쓰이고 있다.

[0028] (6) 기타: 시스플라틴, L-아스파라지네이스, o,p-DDD 등이 있다.

[0029] 효과적인 항암제 개발에 대한 지속적인 노력에도 불구하고, 현재 선두적인 치료는 수술, 방사선 및 화학요법 등이 주종을 이룬다. 화학요법적인 접근은 전이성이거나 특별히 공격적인 암을 치료하는데 주로 사용된다.

[0030] 현재 임상적으로 사용되는 대부분의 암화학요법 약제는 세포독소(cytotoxins)이다. 세포독성제는 빠른 성장을 보이는 세포들에 해를 입히거나, 살해함으로써 작용하게 된다. 이상적인 세포독성제는 암 및 종양 세포들에 특이성을 가지고 있는 반면, 정상 세포에는 영향을 미치지 않아야 한다. 그러나 이러한 이상적인 세포독성제는 현재까지 발견되지 않았으며, 대신 특별히 빠르게 분화하는 세포들(종양 세포 및 정상 세포 모두)을 타겟으로 하는 약제가 사용되고 있을 뿐이다. 따라서, 정상 세포들에게는 단지 가벼운 효과를 미치면서, 암세포에게는 세포독성이 있는 물질들이 매우 바람직하다. 따라서, 종양세포들(tumor cells)의 증식을 특히 억제할 수 있는 대안적인 항암물질의 개발이 필요하며, 암이 발생하는 원발 장기의 특성이 상이하므로, 각 조직의 특징을 반영하는 장기 맞춤형 항암제의 개발이 요구된다.

- [0032] 본 발명의 일 구체예에서 “전이”란, 암세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 가는 것이며, 상기의 “암”이란 “암 줄기세포”를 포함하는 의미이다. 암이 신체의 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암조직이 성장하여 직접적으로 주위장기를 침윤하는 것과 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격전이를 하는 것으로 나눈다. 전이는 암 발생과 관련된 유전자의 발현 억제 또는 상기 유전자의 단백질 활성 억제를 통해 조절될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서 “고시폴(Gossypol)”이란, 고시피움(Gossypium)속 식물과 아욱과(Malvaceae) 식물의 일부의 씨앗, 잎, 줄기, 뿌리의 분리성 색소선에 포함되어 있는 알데히드 억제제의 일종으로, 폴리페놀릭 고시폴(polyphenolic gossypol) 또는 면실색소라고도 한다. 식물에게 해충에 대한 내성을 제공한다. 가끔사료에 고시폴을 첨가할 때, 사료 이용성, 계란생산성 저하와 저장된 계란의 난황탈색 등이 보고된 바 있다. 반면 반추가축은 발효에 의해 고시폴을 비활성화시킨다. 유리 고시폴은 생리적으로 유독성인 반면 결합 고시폴은 비활성이다. 면실 중 비단백질 성분도 고시폴과 결합하여 비용해성 및/또는 비소화성 복합체를 형성한다. 이 결합은 면실박내 고시폴을 해독시키긴 하지만 단백질 및 생물학적 가치를 감소시킨다. 유리 고시폴에 대해 철을 2:1 혹은 3:1의 비율로 첨가하면 간에서의 고시폴이 독성을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 중국에서는 이러한 고시폴이 남성의 정자 기능을 억제하는 것을 발견하여, 남성 경구 피임약으로 연구되고 있다. 최근, 고시폴의 암세포 성장 억제에 유의한 효과가 있다는 것이 공지되었다(미국 등록특허 US6114397). 그러나, 아직 고시폴만 단독으로 투여해서는 효과적으로 암세포 성장을 억제하는 것이 어려운 실정이다.
- [0036] 본 발명의 일 구체예에서 “비구아니드(biguanide)계 화합물”이란, 바람직하게는 비구아나이드 계열 당뇨병 치료제이며, 더욱 바람직하게는 메트포민(metformin), 펜포르민(phenformin), 또는 부포르민(buformine)이고, 더욱 바람직하게는 펜포르민이나, 세포 내 에너지 생성을 방해하여 영양 결핍 유사 상태를 유도하는 비구아나이드 계열 화합물이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 일 구체예에서 “약학조성물”이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학조성물은 알데히드 억제제, 및 항암제를 유효성분으로 포함하고, 바람직하게는 신경구의 증식, 유지, 악성화 및 침윤능을 억제하여 뇌암, 특히 교모세포종을 효과적으로 예방 및/또는 치료할 수 있는 것이며, 이에 관여하는 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은, 상기 조성물에 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하여 제공될 수 있고, 상기 비구아니드계 화합물은 펜포르민인 것이 바람직하고, 상기 항암제는 테모졸로마이드인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 유효성분을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 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 및 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에서 “치료”란, 목적하는 질병의 완화 또는/및 개선을 위해 수행되는 일련의 활동을 의미한다. 본 발명의 목적상 치료는 암 줄기세포를 포함하는 암세포의 수적 또는 양적 증식을 억제시키거나, 암세포를 사멸시키거나, 암 조직의 성장을 억제시키거나, 암 조직의 크기를 감소시키거나, 암 조직 내의 신생혈관의 발달을 억제시키는 활동을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에서 “진단”이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 진단은 암의 발병 유무, 증식 여부 및 전이 여부를 확인하는 것이며, 상기의 “암”이란 “암 줄기세포”를 포함하는 의미이다. 암 발병 또는 전이 의심 환자로부터의 조직의 육안적 또는 세포학적 확인으로 암을 진단할 수 있으며, 암 발병 또는 전이 의심 조직의 검체(임상적으로는 세포, 혈액, 수액, 흉수, 복수, 관절액, 농(膿), 분비액, 담, 인두점액, 요(尿), 담즙, 대변등) 내에 포함되어 있는 암 대응 항체를 이용하는 방법, 상기 검체 내 암 관련 단백질을 직접 검출하는 방법 또는 암 관련 단백질을 코딩하는 핵산을 직접 검출하는 방법으로

암을 진단할 수 있다. 항원-항체 결합 또는 암 관련 단백질을 직접 검출하는 방법을 이용한 진단적 수단으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunoassay), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 암 관련 단백질을 코딩하는 핵산을 직접 검출하는 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044]

본 발명의 일 구체예에서 “투여”란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 치료용 약학 조성물을 1회 50ml~500ml의 양으로 체내에 투여 가능하며, 화합물일 경우 0.1mg/kg~10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1mg/kg~10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여간격은 1일 1회 내지 12회일 수 있으며, 1일 12회 투여할 경우에는 2시간마다 1회씩 투여할 수 있다. 또한 본 발명의 약학조성물은 목적하고자 하는 암 줄기세포의 치료를 위해 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법, 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학조성물은 면역 반응을 증진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 같은 어쥬번트 또는 사이토카인(또는 사이토카인을 코딩하는 핵산)과 혼합하여 투여될 수 있다. 바이오리스틱(biolistic) 전달 또는 생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다. 생체 외 처리에서 예를 들어 항원제시 세포들(APCs), 수지상세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 약학조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수 있다.

[0046]

본 발명의 일 구체예에서, 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물을 제공하고, 상기 알데히드 억제제는 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol), 및 쿠마린(coumarins)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 항암제는 테모졸로마이드(Temozolomide)인 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 약학조성물은 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 약학조성물을 제공하며, 상기 비구아니드계 화합물은 메트포르민(metformin), 부포르민(buformin), 및 페포르민(phenformin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 뇌암은 원발성 뇌암, 또는 이차성 뇌암인 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 뇌암은 성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 상의세포종(ependymoma), 뿔교종(oligodendroglioma), 혼합교종(mixed glioma), 뇌간 교종(brain stem glioma), 시신경 교종(optic nerve glioma), 뇌하수체 종양(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 수모세포종(medulloblastoma), 원시신경외배엽종양(primitive neuroectodermal tumors), 송과체 종양(pineal tumors), 수막종(meningioma), 신경초종(schwannoma), 전이성 뇌종양(metastatic brain tumors), 중추신경 임파종(CNS lymphoma), 신경섬유종증(neurofibromatosis), 가성뇌종양(pseudotumor cerebri), 및 결절성 경화증(tuberous sclerosis)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 뇌암은 뇌암 줄기세포를 포함하는 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 치료는 암세포의 수적 증가를 억제시키거나, 암세포의 양적 증식을 억제시키거나, 암 세포를 사멸시키거나, 암 조직의 크기를 유지시키거나, 암 조직의 크기를 감소시키거나, 또는 암 조직 내의 신생혈관 발달을 억제하는 것을 포함하는 것인 약학조성물을 제공한다.

[0048]

본 발명의 다른 구체예에서, 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 전이 억제용 약학조성물을 제공하고, 상기 알데히드 억제제는 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol), 및 쿠마린(coumarins)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 항암제는 테모졸로마이드(Temozolomide)인 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 약학조성물은 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 약학조성물을 제공하며, 상기

비구아니드계 화합물은 메트포민(metformin), 부포르민(buformin), 및 펜포르민(phenformin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 뇌암은 원발성 뇌암, 또는 이차성 뇌암인 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 뇌암은 성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 상의세포종(ependymoma), 뿔지교종(oligodendroglioma), 혼합교종(mixed glioma), 뇌간 교종(brain stem glioma), 시신경 교종(optic nerve glioma), 뇌하수체 종양(pituitary adenoma), 두개인두종(cranioopharyngioma), 수모세포종(medulloblastoma), 원시신경외배엽종양(primitive neuroectodermal tumors), 송과체 종양(pineal tumors), 수막종(meningioma), 신경초종(schwannoma), 전이성 뇌종양(metastatic brain tumors), 중추신경 임파종(CNS lymphoma), 신경섬유종증(neurofibromatosis), 가성뇌종양(pseudotumor cerebri), 및 결절성 경화증(tuberous sclerosis)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 뇌암은 뇌암 줄기세포를 포함하는 것인 약학조성물을 제공한다.

[0050]

이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0052]

뇌암은 종류가 매우 다양하고, 뇌세포와 종양세포 간의 경계가 분명하지 않아 특히 치료가 용이하지 않다. 본 발명의 알데히드 억제제, 및 항암제를 포함하는 뇌암 치료용 약학조성물은 필요에 의해 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 것이 가능하고, 상기 화합물은 바람직하게는 펜포르민이다. 본 발명의 약학조성물은 뇌암의 치료 및 예후 증진에 매우 효과적이고, 유효성분 각각을 단독으로 투여한 경우보다 암세포 사멸, 및 암 줄기세포 특성 억제의 효과가 현저하므로, 뇌암 치료 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0054]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 고시폴, 펜포르민, 또는 TMZ를 단독, 또는 병용으로 처리한 후, 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 고시폴, 펜포르민, 또는 TMZ를 단독, 또는 병용으로 처리한 후, 세포의 구체 형성 정도를 촬영한 이미지를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 고시폴, 펜포르민, 또는 TMZ를 단독, 또는 병용으로 처리한 후, 세포의 구체 형성 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 고시폴, 펜포르민, 또는 TMZ를 단독, 또는 병용으로 처리한 후, 세포의 침윤 정도를 촬영한 이미지를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 고시폴, 펜포르민, 또는 TMZ를 단독, 또는 병용으로 처리한 후, 세포의 침윤 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 항암제 TMZ, PTX, 또는 5-FU를 단독, 또는 고시폴+펜포르민과 병용으로 처리한 후, 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 항암제 TMZ, PTX, 또는 5-FU를 단독, 또는 고시폴+펜포르민과 병용으로 처리한 후, 세포 생존율을 측정한 결과를 각 항암제 단독투여 기준으로 환산한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, U87과 TS13-64 세포에 항암제 TMZ, PTX, 또는 5-FU를 단독, 또는 고시폴+펜포르민과 병용으로 처리한 후, 세포의 구체 형성 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055]

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.

[0057] **준비에: 세포 배양 및 시약**

[0058] 본 발명을 위해 2 종류의 종양구(tumorsphere; TS)형성 교모세포종(glioblastoma; GBM) 세포를 사용하였다. TS13-64는 GBM 환자에서 유래된 원발 종양 세포이며, 연세대학교 의과대학 생명윤리 검토위원회의 승인을 받아 신생 GBM 조직 표본으로부터 확립하였다(승인번호: 4-2012-0212, 및 4-2014-0649). U87 세포는 U87MG 세포주로부터 TS 배양 조건 하에서 배양하여 구형(sphere) 세포로 제조하여 사용하였다. TS 배양을 위해 2중량% 1xB27, 0.02중량%의 bFGF 20ng/ml, 0.02중량%의 EGF 20ng/ml 및 50U/ml 페니실린/50mg/ml 스트렙토마이신(100x, Gibco, Invitrogen Korea, Seoul, South Korea)이 첨가된 DMEM/F-12 배지를 처리 하였고, 모든 in vitro 실험은 TS 배양 조건 하에서 수행하였다.

[0059] in vitro 실험을 위한 고시폴(gossypol; G)과 펜포르민(phenformin; P, Sigma-Aldrich)은 10 μ M의 농도로 각각 DMSO와 H₂O에 용해시켜 사용하였다. 항암제 테모졸로마이드(Temozolomide; TMZ, Sigma-Aldrich)는 DMSO에 용해시켰고, 250 μ M의 농도로 사용하였다. 고시폴 및 펜포르민의 병용 투여용 항암제 TMZ의 비교군으로서 기타 항암제는 파크리탁셀(Paclitaxel; PTX)과 플루러유리실(Fluorouracil; 5-FU)을 사용하였다. 각 항암제마다 독성 및 기전이 다르므로, 실제 의료 분야에서 임상적으로 적용되는 농도를 반영하여 파크리탁셀의 경우 저농도 2 nM과 고농도 5 nM을, 플루러유리실의 경우 저농도 50 μ M과 고농도 100 μ M을 TMZ와 동일한 방법으로 준비하여 사용하였다(저농도는 L, 고농도는 H로 표기).

[0060] in vivo 실험을 위한 고시폴은 DMSO에 가용화시킨 후 동일한 부피의 크레모포르(cremophor, Sigma-Aldrich)와 혼합하였고, 펜포르민은 PBS에 용해시켰다.

[0062] **실시에 1: 뇌암 세포에 대한 고시폴, 펜포르민, 및 TMZ의 병용 효과 확인**

[0063] 배양된 종양구 형성 교모세포종 세포(GBM TS)를 96-웰 플레이트에 10⁴ cells / well 의 밀도로 파종하고, 제조사에서 준비한 약물이 포함된 배지로 72시간 처리한 후(대조군은 일반 배양 배지로 처리), EZ-Cytox 시약(DoGenBio, Seoul, Korea)을 이용한 WST 분석으로 제조사의 프로토콜에 따라 암세포에 대한 세포 독성을 측정하였다. 실험 결과, 구형화된 U87 세포, 및 TS13-64 세포 모두 고시폴을 단독 처리하거나, TMZ를 단독 처리한 경우보다 고시폴+TMZ 2제를 처리한 경우에 암세포가 더 많이 사멸된 것을 확인하였다. 또한 고시폴+TMZ 2제를 처리하거나, 고시폴+펜포르민 2제를 처리한 경우보다 고시폴+펜포르민+TMZ 3제를 처리한 경우에 암세포가 더 많이 사멸되는 것으로 나타났다. 상기 결과를 도 1에 나타내었다.

[0064] 다음으로, 약물 종류에 따른 세포의 구체 형성 능력을 평가하였다. 구체 형성 능력은 암 줄기세포의 특성을 유지하기 위한 능력으로, 구체 형성 능력 평가를 통해 약물의 암 줄기세포 치료 효과를 확인할 수 있다. 이를 위해 먼저 분리된 10개의 단일 GBM TS를 96-웰 플레이트에 파종하고, TS 배양 배지로 3주간 배양하였다. TS 배양 배지는 매주 신선하게 교체하였다. 이후, ToupView 소프트웨어 (ToupTek Photonics, Zhejiang, China)를 사용하여 이미지를 캡처하고, 구체 형성 정도와 구체의 크기를 분석하였다. 상기 결과를 도 2와 도 3에 나타내었다. 실험 결과, 세포 독성 결과와 마찬가지로 고시폴을 단독 처리하거나, TMZ를 단독 처리한 경우보다 고시폴+TMZ 2제를 처리한 경우에 구체 형성능 억제 효과가 더 우수하며, 고시폴+TMZ 2제를 처리하거나, 고시폴+펜포르민 2제를 처리한 경우보다 고시폴+펜포르민+TMZ 3제를 처리한 경우에 구체 형성능 억제 효과가 더 우수한 것을 확인하였다.

[0065] 마지막으로, 암세포의 침윤 능력을 평가하였다. 침윤은 전이에 가장 중요한 요소로서, 암의 성장과 전이가 다른 측면이라는 것을 고려할 때, 전이 억제를 위해 반드시 확인이 필요한 요소이다. 이를 위해 96웰 플레이트의 각 웰을 Matrigel, 콜라겐 타입 I(Corning), 및 약물이 혼합된 TS 배양 배지로 구성된 혼합 매트릭스로 채우고, 겔화가 완전히 일어나기 전에 GBM TS 세포를 파종하였다. 이후, 각 해당되는 TS 배양 배지를 겔화된 매트릭스 위에 첨가하여 건조를 방지하고, 콜라겐 기반 3D 침윤 분석(collagen-based 3D invasion assays)로 침윤능을 평가하였다. 상기 세포의 이미지 및 침윤 면적을 분석한 결과를 도 4와 도 5에 나타내었다. 침윤 면적은 (72 h - 0 h) / 0 h에서 점령 지역으로 계량화하였다. 실험 결과, TS 배양 배지만 첨가한 대조군에 비하여 TMZ 처리 시 침윤 면적이 크게 감소하는 것으로 나타났고, TMZ 단독 처리하거나, 고시폴+펜포르민 2제를 처리한 경우에 비해서 고시폴+펜포르민+TMZ 3제를 처리한 경우에 침윤 면적이 유의하게 감소되는 것으로 나타났다.

[0067] **실시예 2: 고시폴 및 펜포르민인 병용 투여제로서 TMZ의 효과 확인**

[0068] TMZ 이외의 다른 항암제도 고시폴 및 펜포르민과 병용 투여시 TMZ에 상응하는 암 치료 효과를 나타내는가에 대해서 확인하였다. 암세포에 대한 세포 독성, 및 세포의 구체 형성 능력 평가는 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0069] 먼저, 암세포에 대한 세포 독성 결과를 도 6에 나타내었다. 항암제 TMZ, PTX, 또는 5-FU를 단독으로, 또는 고시폴+펜포르민과 병용으로 처리한 결과를 보면, TMZ에서 병용 처리에 의한 암세포 사멸 시너지 효과가 다른 항암제들에 비해서 현저하게 우수한 것으로 나타났다. 심지어 PTX, 또는 5-FU를 고농도(H)로 처리한 경우에는, 항암제 단독 투여시에는 TMZ 단독투여보다 세포사멸 효과가 높았으나, 고시폴+펜포르민 병용 투여시에는 TMZ 병용투여보다 세포사멸 효과가 낮았다. 이를 보다 용이하게 비교하기 위해서, 각 항암제의 단독투여 세포생존율 결과치를 1로 하고, 단독투여 기준으로 병용투여 결과치를 환산한 결과를 하기 표 1, 및 도 7에 기재하였다.

표 1

[0070]

세포	약물투여	측정값	단독투여 기준 환산값	병용투여 효과 (암세포 감소율)
U87	TMZ	0.879	1.000	29.07 %
	G+P+TMZ	0.624	0.709	
	PTX(L)	0.947	1.000	9.77 %
	G+P+PTX(L)	0.855	0.902	
	PTX(H)	0.720	1.000	3.37 %
	G+P+PTX(H)	0.696	0.967	
	5FU(L)	0.980	1.000	8.09 %
	G+P+5FU(L)	0.901	0.919	
	5FU(H)	0.804	1.000	1.34 %
	G+P+5FU(H)	0.793	0.986	
TS13-64	TMZ	0.781	1.000	31.40 %
	G+P+TMZ	0.536	0.686	
	PTX(L)	0.764	1.000	3.87 %
	G+P+PTX(L)	0.735	0.962	
	PTX(H)	0.675	1.000	2.70 %
	G+P+PTX(H)	0.657	0.973	
	5FU(L)	0.826	1.000	9.08 %
	G+P+5FU(L)	0.751	0.909	
	5FU(H)	0.756	1.000	7.90 %
	G+P+5FU(H)	0.696	0.921	

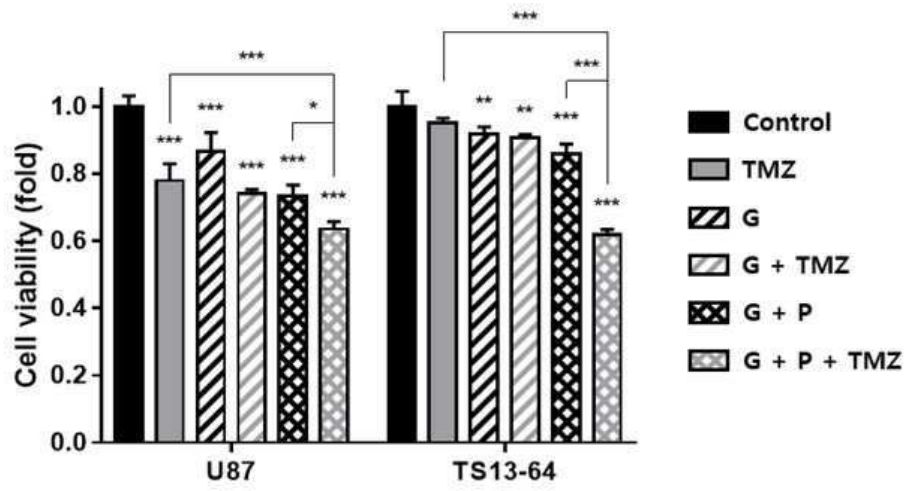
[0071] 암세포의 구체 형성 능력의 경우에도 다른 항암제에 비하여 특히 TMZ에서 고시폴+펜포르민과의 병용 투여시 구체 형성능 억제 효과가 현저히 우수하였다. 이를 도 8에 나타내었다.

[0073] 상기 실시예 1 내지 2에서, 모든 데이터는_Tukey의 post hoc test(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001)를 이용한 일원 분산 분석으로 처리하여 '평균 ± SD' 로 나타내었다.

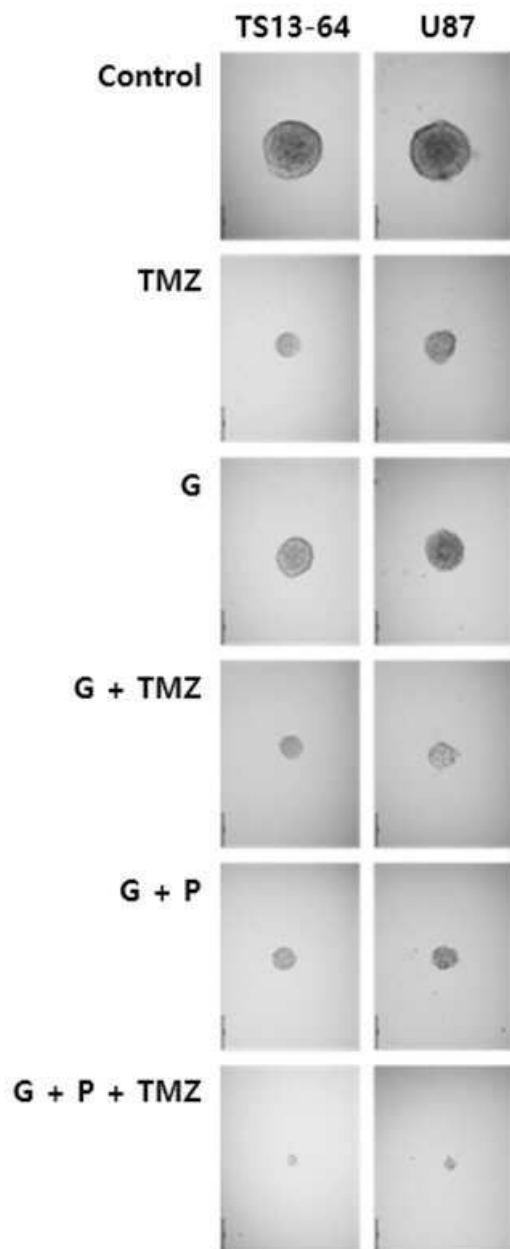
[0075] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

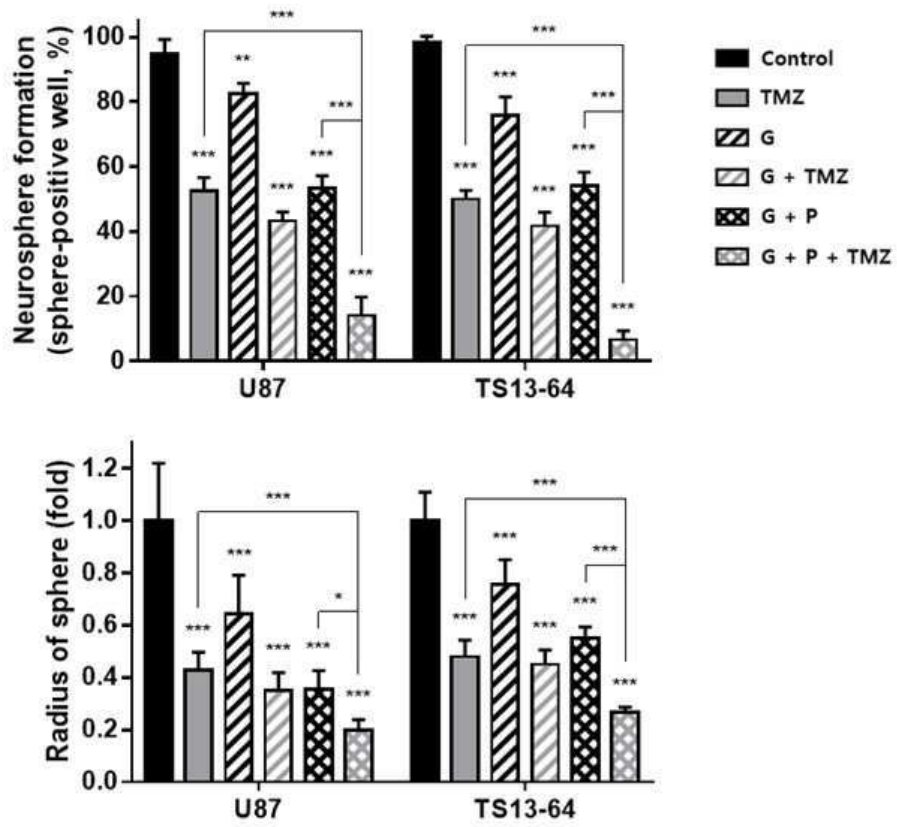
도면1



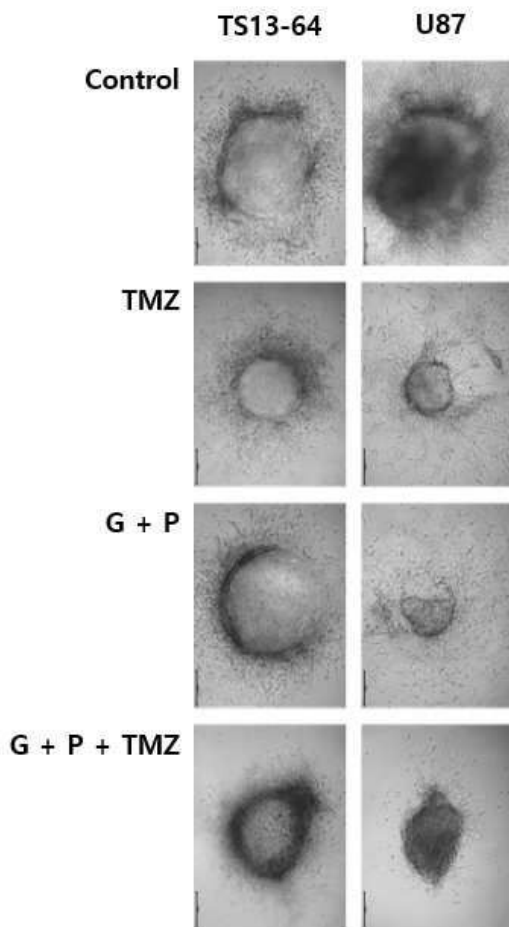
도면2



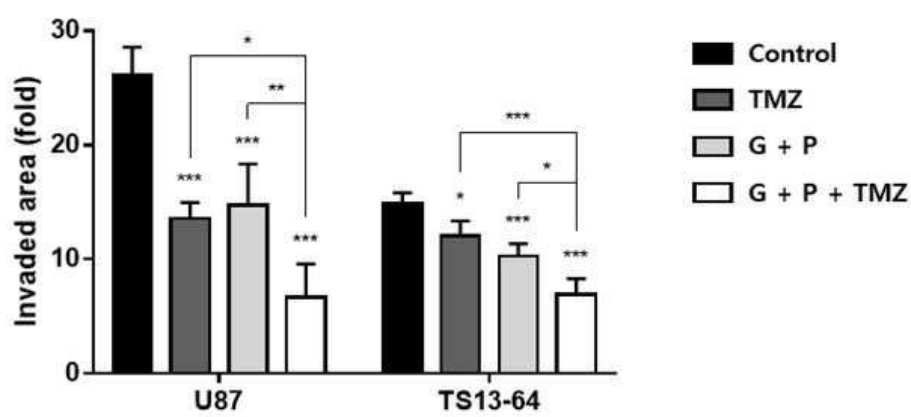
도면3



도면4

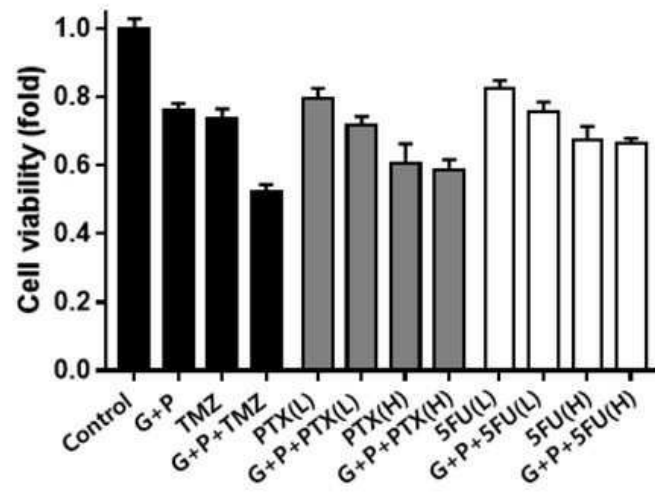


도면5

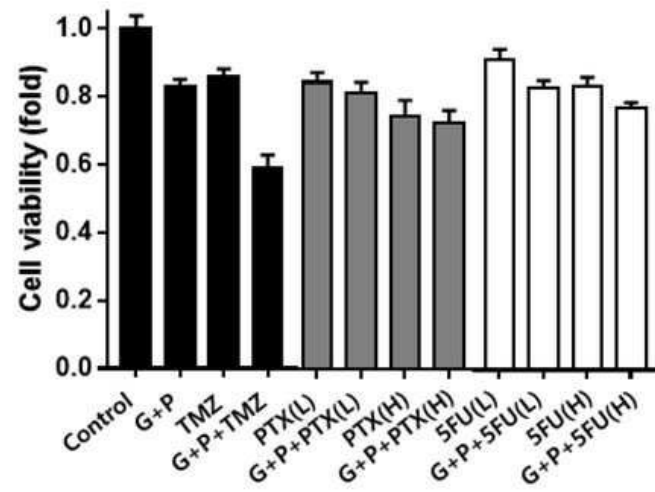


도면6

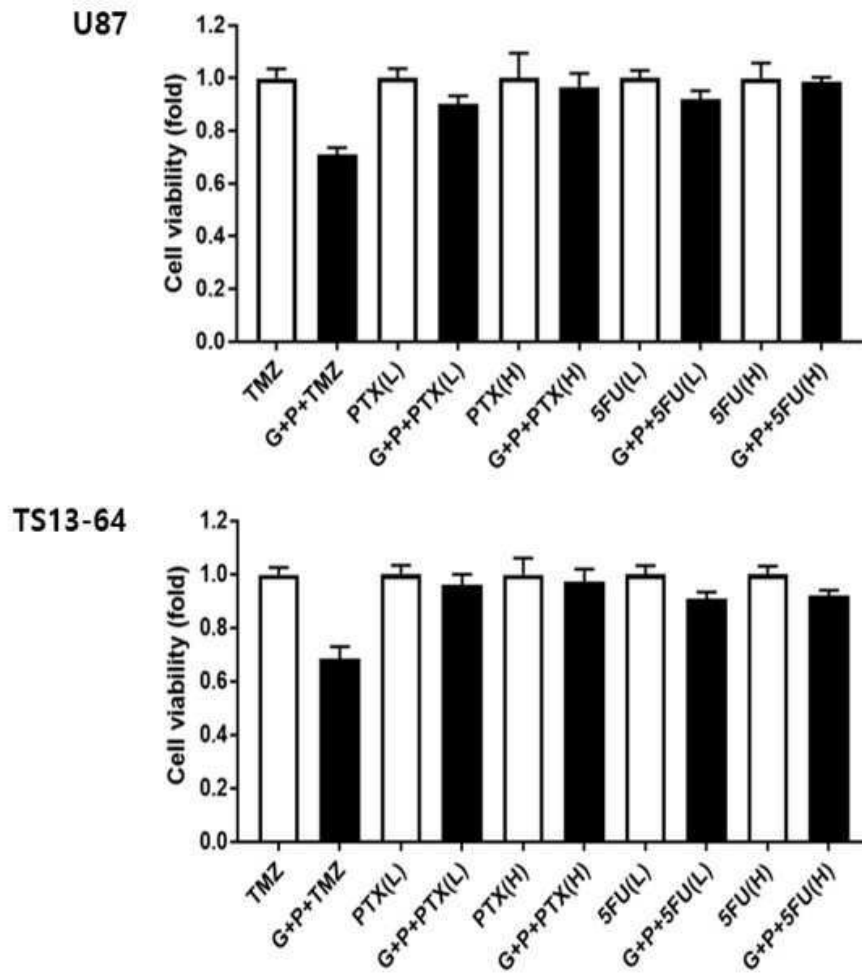
U87



TS13-64



도면7



도면8

