



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0136707  
(43) 공개일자 2021년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/495 (2006.01) A61K 31/198 (2006.01)  
A61K 31/336 (2006.01) A61K 31/675 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/495 (2013.01)  
A61K 31/198 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0055342

(22) 출원일자 2020년05월08일

심사청구일자 2020년05월08일

(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)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

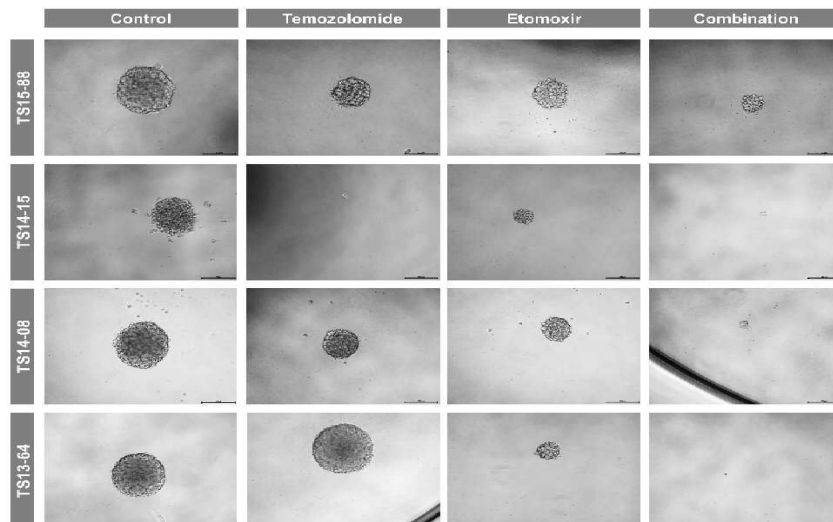
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 뇌암 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 암 중에서도 특히 뇌암의 전이성, 침윤성 및 줄기세포능을 억제할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것으로, 알킬화제 및 지방산 산화 억제제를 유효 성분으로 포함할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

**A61K 31/336** (2013.01)

**A61K 31/675** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

**A61K 2300/00** (2013.01)

(72) 발명자

**김현실**

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 102동 1504호(내수동, 경희궁파크펠리스)

**심진경**

서울특별시 마포구 월드컵북로 235, 성산시영아파트 20동 208호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112182
과제번호	NRF-2019R1A2C3004155
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업-중견연구자지원사업
연구과제명	교모세포종 발암 기원세포의 특이적 신호전달체계 규명 및 치료 표적 발굴
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465029706
과제번호	HI17C2586010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질병중심 중개 중점연구
연구과제명	에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 임상 적용성 검증
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.12.20 ~ 2020.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465031000
과제번호	HR14C0005050020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성사업
연구과제명	환자유래 암이식 in vivo 제브라피쉬 및 in vitro 복제종양 플랫폼 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 세브란스병원
연구기간	2014.10.01 ~ 2023.03.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

알킬화제(Alkylating agent) 및 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알킬화제는 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 이상인, 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 테모졸로마이드는 50 내지 1000  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 에토목실(Etomoxir), 옥스페니신(Oxfenicine), 퍼헥린(Perhexiline) 및 라놀라진(Ranolazine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 에토목실은 10 내지 500  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제는 1~10:1의 중량비인 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 뇌암, 두부 또는 경부암, 혀암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장암, 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 뇌암은, 교모세포종인, 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 교모세포종은 교모세포종 종양구인, 약학적 조성물.

#### 청구항 10

알킬화제(Alkylating agent) 및 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암의 줄기세포능 억제용 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 알킬화제는 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 이상인, 약학적 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 테모졸로마이드는 50 내지 1000  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 13

제10항에 있어서,

상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 에토목실(Etomoxir), 옥스페니신(Oxfenicine), 퍼헵린(Perhexiline) 및 라놀라진(Ranolazine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 에토목실은 10 내지 500  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 15

제10항에 있어서,

상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제는 1~10:1의 중량비인 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 16

제10항에 있어서,

상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 뇌암, 두부 또는 경부암, 혀암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장암, 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서,

상기 뇌암은, 교모세포종인, 약학적 조성물.

#### 청구항 18

제17항에 있어서,

상기 교모세포종은 교모세포종 종양구인, 약학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

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

### 배경 기술

[0002] 암은 전 세계적으로 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, 중세로는 운동 마비, 지각마비, 언어 장애, 시력 장애, 평형 장애 등과 같은 국소 증상과 두개내압향진 증상을 들 수 있다. 상기 뇌암은 조직특이적으로 1 내지 2종의 암이 발병되는 다른 조직에서 발병되는 암과는 달리 다형성교모세포종, 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.

[0004] 한편, 상기 뇌 종양의 경우, 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)이 존재하기 때문에 치료를 위한 약물 전달이 목적하는 뇌 부위로 전달되기 어려울 뿐만 아니라, 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 치료제 개발이 활발하지 못한 것이 현실이다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌 종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다.

[0005] 특히, 개선되거나 최적화된 교모세포종(GBM)의 줄기세포능 및 전이를 억제하는 치료법에 대한 필요성을 오랫동안 통감하고 있는 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 교모세포종 종양구의 침윤성 또는 전이성을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 교모세포종 종양구의 줄기세포능 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0008] 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

[0009] 이하, 본원에 기재된 다양한 구현예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구현예는 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 구현예" 또는 "구현예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구현예에서" 또는 "구현예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에

서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다. 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당 업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

- [0010] 본 발명의 발명자들은 알킬화제(Alkylating agent)와 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 병용 투여하는 경우 암 세포 중에서도 특히 뇌암의 성장, 증식, 침윤성, 전이성 및 줄기세포능이 현저히 억제되는 것을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [0012] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 알킬화제(Alkylating agent) 및 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명에서, 상기 알킬화제는 DNA를 알킬화 또는 메틸화하여 세포독성 작용 및 DNA 복제와 RNA 전사를 방해하는 것으로, 특히 세포주기에 비특이적으로 작용하여 증식성이 높은 세포분열을 저지하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서, 상기 알킬화제는 테모졸로마이드(Temozolomide; TMZ), 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 발명에서, 상기 테모졸로마이드는 50 내지 1000  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것 일 수 있다. 상기 테모졸로마이드의 농도가 50 내지 1000  $\mu$ M 인 경우, 암 침윤성 또는 전이성을 억제하는데 특이적으로 뛰어난 효과를 보인다. 상기 테모졸로마이드의 농도가 50  $\mu$ M 미만인 경우, 조성물의 효과가 충분하게 나타나지 않을 수 있고, 상기 테모졸로마이드의 농도가 1000  $\mu$ M을 초과하는 경우, 정상 세포에 대한 조성물의 독성이 커질 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 안정 가슴조임증(stable angina pectoris; SAP) 만성 신부전 치료에 사용되는 새로운 약물로, 상기 지방산 산화 억제제는 미토콘드리아의 피루브산 산화와 포도당의 흡수와 산화를 억제한다. 상기 지방산 산화 억제제는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I(Carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) 억제제일 수 있다. 상기 CPI1은 fatty acyl-CoA를 fatty acyl-carnitine로 전환하는 역할을 한다.
- [0017] 본 발명에서, 상기 CPT1 억제제는 에토목실(Etomoxir), 옥스페니신(Oxfenicine), 퍼헥린(Perhexiline) 및 라놀라진(Ranolazine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서, 상기 에토목실은 10 내지 500  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 에토목실의 농도가 10 내지 500  $\mu$ M 인 경우, 암 침윤성 또는 전이성을 억제하는데 특이적으로 뛰어난 효과를 보인다. 상기 에토목실의 농도가 10  $\mu$ M 미만인 경우, 조성물의 효과가 충분하게 나타나지 않을 수 있고, 상기 에토목실의 농도가 500  $\mu$ M을 초과하는 경우, 정상 세포에 대한 조성물의 독성이 커질 수 있다.
- [0019] 본 발명에서, 상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제는 1~10:1의 중량비로 포함될 수 있다. 상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제는 1~10:1의 중량비인 경우, 암 침윤성 또는 전이성을 억제하는데 특이적으로 뛰어난 효과를 보인다. 상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제의 중량비가 상기한 범위를 벗어나는 경우, 조성물의 효과가 충분하게 나타나지 않을 수 있다.
- [0020] 본 발명에서, "종양" 또는 "암"은 세포 주기가 조절되지 않아 세포 분열을 계속하는 질병으로서, 발생 부위에 따라 암종(Carcinoma)과 육종(Sarcoma)으로 나뉜다. 암종(Carcinoma)은 점막, 피부 같은 상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻하고, 육종(Sarcoma)은 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 등의 비상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻한다.
- [0021] 본 발명에서, 상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 뇌암, 두부 또는 경부암, 혀암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장암, 피부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 뇌암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0022] 본 발명에서, 상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma; GBM)일 수 있다. 상기 "교모세포종(Glioblastoma; GBM)"은 정상적으로 뇌조직에 풍부하게 존재하고 있는 신경교세포에서 기원한 종양을 통틀어 일컫는다. 또한 교모세포종은 난치성 뇌 종양의 일종으로, 진단 후 평균 총 생존기간이 15개월 정도에 불과하다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 침윤성 또는 전이성 억제제의 대상이 되는 것은, 교모세포종 세포 중에서도 특히 교모세포종 종양구일 수 있다. 상기 교모세포종 종양구(GBM tumorsphere)는 암 조직을 구성하는 세포 중 줄기세포(stem cells)와 유사한 특성을 가지는 일부의 세포가 3차원 배양 조건에서 형성하는 세포응집체를 의미하며, 상기 교모세포종 종양구의 직경 사이즈는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 10 내지 500  $\mu$ m일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서, 상기 교모세포종 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 바람직하다.
- [0025] 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.
- [0026] 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. 약학적으로 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 약학적으로 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.
- [0027] 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.
- [0028] 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 포함되나, 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0029] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육 내, 관절 내, 활액낭 내, 흉골 내, 경막 내, 병소 내 및 두개골 내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0030] 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 변할 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, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 알킬화제(Alkylating agent) 및 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암의 줄기세포능 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에서, 상기 알킬화제는 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.

- [0034] 본 발명에서, 상기 테모졸로마이드는 50 내지 1000  $\mu\text{M}$ 의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 테모졸로마이드의 농도가 50 내지 1000  $\mu\text{M}$  인 경우, 암 침윤성 또는 전이성을 억제하는데 특이적으로 뛰어난 효과를 보인다. 상기 테모졸로마이드의 농도가 50  $\mu\text{M}$  미만인 경우, 조성물의 효과가 충분하게 나타나지 않을 수 있고, 상기 테모졸로마이드의 농도가 1000  $\mu\text{M}$ 을 초과하는 경우, 정상 세포에 대한 조성물의 독성이 커질 수 있다.
- [0035] 본 발명에서, 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 안정 가슴조임증(stable angina pectoris; SAP) 만성 신부전 치료에 사용되는 새로운 약물로, 상기 지방산 산화 억제제는 미토콘드리아의 피루브산 산화와 포도당의 흡수와 산화를 억제한다. 상기 지방산 산화 억제제는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I(Carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) 억제제일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 CPT1 억제제는 에토목실(Etomoxir), 옥스페니신(Oxfenicine), 퍼헥린(Perhexiline) 및 라놀라진(Ranolazine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 에토목실은 10 내지 500  $\mu\text{M}$ 의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 에토목실의 농도가 10 내지 500  $\mu\text{M}$  인 경우, 암 침윤성 또는 전이성을 억제하는데 특이적으로 뛰어난 효과를 보인다. 상기 에토목실의 농도가 10  $\mu\text{M}$  미만인 경우, 조성물의 효과가 충분하게 나타나지 않을 수 있고, 상기 에토목실의 농도가 500  $\mu\text{M}$ 을 초과하는 경우, 정상 세포에 대한 조성물의 독성이 커질 수 있다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제는 1~10:1의 중량비로 포함될 수 있다. 상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제는 1~10:1의 중량비인 경우, 암 침윤성 또는 전이성을 억제하는데 특이적으로 뛰어난 효과를 보인다. 상기 알킬화제 및 지방산 산화 억제제의 중량비가 상기한 범위를 벗어나는 경우, 조성물의 효과가 충분하게 나타나지 않을 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, "종양" 또는 "암"은 세포 주기가 조절되지 않아 세포 분열을 계속하는 질병으로서, 발생 부위에 따라 암종(Carcinoma)과 육종(Sarcoma)으로 나뉜다. 암종(Carcinoma)은 점막, 피부 같은 상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻하고, 육종(Sarcoma)은 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 등의 비상피성 세포에서 발생한 악성 종양을 뜻한다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 암은 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 뇌암, 두부 또는 경부암, 혀암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장암, 피부암으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 뇌암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma; GBM)일 수 있다. 상기 "교모세포종(Glioblastoma; GBM)"은 정상적으로 뇌조직에 풍부하게 존재하고 있는 신경교세포에서 기원한 종양을 통틀어 일컫는다. 또한 교모세포종은 난치성 뇌 종양의 일종으로, 진단 후 평균 총 생존기간이 15개월 정도에 불과하다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 줄기세포능 억제제의 대상이 되는 암은, 교모세포종 세포 중에서도 특히 교모세포종 종양구일 수 있다. 상기 교모세포종 종양구(GBM tumorsphere)는 암 조직을 구성하는 세포 중 줄기세포(stem cells)와 유사한 특성을 가지는 일부의 세포가 3차원 배양 조건에서 형성하는 세포응집체를 의미하며, 상기 교모세포종 종양구의 직경 사이즈는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 10 내지 500  $\mu\text{m}$ 일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서, 상기 교모세포종 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 바람직하다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 "암의 줄기세포능"은 암 세포들로 종양을 생성할 수 있는 능력(tumorigenic)을 의미한다. 현재 존재하는 암 치료 방법은 대부분 흔히 종양 덩어리 일부에 관해 진행하고, 꼭 줄기세포 능력에 대한 활성을 갖는 약을 꼭 선택하지는 않는다. 따라서 암의 줄기세포능을 남겨두는 일반적인 화학요법(Chemotherapy)은 새로운 세포를 생성하지는 않지만 종양의 대부분을 차지하는 분화된되거나 분화중인 세포를 죽이며, 발생한 암 줄기세포 부분은 그대로 남아 재발의 원인이 될 수 있다. 따라서 암의 줄기세포능을 억제할 경우, 암 치료 후 재발의 위험성을 낮출 수 있을 것이라 기대된다. 상기 암의 줄기세포능은 일반적으로 암 줄기세포가 가진다. 상기



암 줄기세포(Cancer Stem CELL, Tumor Initiating Cells; CSC, TICs)는 1997년에 Bonnet 과 Dick이 표면 표지자 CD38를 발현하지 않고 CD34를 발현하는 백혈구 세포 일부 집단을 분리하여 발견하였다.

[0045] 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.

[0046] 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. 약학적으로 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 약학적으로 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.

[0047] 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.

[0048] 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 직장 포함되나, 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.

[0049] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥 내, 근육 내, 관절 내, 활액낭 내, 흉골 내, 경막 내, 병소 내 및 두개골 내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0050] 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 변할 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.

## 발명의 효과

[0051] 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 교모세포종, 특히 교모세포종 종양구의 침윤성 또는 전이성을 억제하고, 줄기세포능 또한 효과적으로 억제할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 테모졸로마이드(Temozolomide; TMZ) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물로 투여한 농도에 따른 세포 ATP 생성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 테모졸로마이드(Temozolomide; TMZ) 및 에토목실(Etomoxir) 단독 또는 이들 혼합물로 투여한 농도에 따른 세포 활성의 변화를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 대한 종양구 형성능을 위상차 현미경으로 촬영하여 전체 웰 수에서 종양구가 형성된 웰 수의 비율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 대한 종양구 형성능 및

종양구 직경을 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 대한 종양구 형성능을 위상차 현미경으로 촬영하여 종양구가 형성된 웰에서 종양구의 사이즈를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로 네스틴(Nestin), Sox2, PDPN, Msi-1, CD44, Bmi-1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 형상 변화를 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 세포를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 8은 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 형상 변화를 확인하기 위하여 종양구 세포의 침윤 면적 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로  $\beta$ -카테닌( $\beta$ -catenin), N-카테린(N-cadherin), 스네일(Snail), Zeb1, Twist의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 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.

### [0055] 실시예

#### [0057] [준비예] 교모세포종 환자로부터 세포의 분리

[0058] 이하의 실험은 환자유래 교모세포종 종양구 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64를 사용하여 수행하였다. 임상시험심사위원회에서 승인된 프로토콜에 따라 종래에 알려진 방법을 통해 교모세포종 조직으로부터 유래된 환자 유래 종양구를 획득하였다. (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. 세포 분리 절차는, 외과적 시료를 분쇄한 후 돌베코 변형 이글 배지/헵 F-12 50/50 혼합(DMEM/F-12; Corning Incorporated, NY, USA) 배지에서 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 완전배지(DMEM/F-12)에서 배양하였다.

#### [0060] [실험예 1] 세포 활성 및 ATP 생성능 분석

[0061] 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir) 투여가 환자 유래 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64의 세포 활성에 미치는 영향을 확인하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [0062] 구체적으로는, 상기 세포들을 각각  $1 \times 10^4$  cells/150  $\mu$ L 로 96 웰(well)에 접종(seeding) 하고 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 농도 별로 72시간 동안 처리한 후 ATP 어췌이(assay)로 확인하였다. ATP 어췌이에 따라, 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir) 투여가 세포 에너지원인 ATP 생성을 저해하는 능력을 평가하였다. ATP 생성을 평가하기 위해서 측정 키트를 사용하였고, 배양한 세포들에 ① 테모졸로마이드(Temozolomide) 250  $\mu$ M 단독 투여, ② 에토목실(Etomoxir) 100  $\mu$ M 단독 투여, ③ 테모졸로마이드(Temozolomide) 250  $\mu$ M, 에토목실(Etomoxir) 100  $\mu$ M 병용 투여하여 72시간 처리 후 어췌이 시약(CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Cat# G7572, Promega)을 더해 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0063] ATP 어췌이는, 루시페라제를 이용하여 ATP 및 D-루시페린으로부터의 빛의 형성을 촉진하여, 루미노미터(luminometer) 또는 베타 카운터(Beta Counter)로 측정한 결과로 세포 활성도를 측정하는 방법으로 세포 에너지원인 ATP 생성을 저해하는 능력을 평가할 수 있다.
- [0064] 그 결과, 도 1과 같이, 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir) 각각의 투여에 관하여 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포에서 ATP 생성 저해 활성이 확인되었다.
- [0065] 구체적으로 살펴보면, TS15-88과 TS14-15는 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 20%, TS14-08은 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 15%, TS13-64는 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 35% 정도 ATP 수준이 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0067] [실험예 2] 세포 활성 및 ATP 생성능 분석
- [0068] 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir) 투여가 환자 유래 세포인 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64의 세포 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 다음의 실험을 수행하였다.
- [0069] 구체적으로는, 상기 세포들을 각각  $1 \times 10^4$  cells/150  $\mu$ L 로 96 웰(well)에 접종(seeding) 하고 ① 테모졸로마이드(Temozolomide) 250  $\mu$ M 단독 투여, ② 에토목실(Etomoxir) 100  $\mu$ M 단독 투여, ③ 테모졸로마이드(Temozolomide) 250  $\mu$ M, 에토목실(Etomoxir) 100  $\mu$ M 병용 투여하여 72시간 동안 처리한 후 WST 어췌이(assay)로 확인하였고, 그 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0070] WST 어췌이는, 세포 증식 능력이나 세포 생존 능력을 정량화하기 위한 방법으로, 세포 내 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 Tetrazolium Salts에서 formazan이라는 발색물질이 생성되는 것을 ELISA로 측정한 것을 의미한다. 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 탈수소효소인 숙신산염-테트라졸륨 환원 효소 시스템(succinate-tetrazolium reductase system)에 의한 것으로, 살아있는 세포에만 유효하며, 곧 발생 강도가 세포수와 직선 상관 관계를 나타낸다.
- [0071] 도 2에서 보는 바와 같이, TS15-88, TS14-15, TS14-08은 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 30%, TS13-64는 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 25% 정도 세포활성 능력이 감소하였다. 즉, TS15-88, TS14-15 및 TS14-08에 대하여 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 각각 투여한 군에 비하여, 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir)을 병용 투여한 군에서 세포 활성 능력이 감소함을 확인하였다.
- [0073] [실험예 3] 종양구 형성능 확인
- [0074] 배양된 종양구에서, 구(sphere)가 형성된 웰의 수를 측정하고, 무처리한 대조군 대비 처리한 군에서 구가 형성된 웰의 비율을 계산하여 그 결과를 도 3에 퍼센티지로 나타내었다.
- [0075] 구체적으로는,  $1 \times B27$  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(accumase)(Gibco)를 사용하여 상기 교모세포종(GBM) 종양구 세포

를 해리시킨 뒤 10개의 단일 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고 TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 세포 각각에 ① 테모졸로마이드(Temozolomide) 250  $\mu$ M 단독 투여, ② 에토목실(Etomoxir) 100  $\mu$ M 단독 투여, ③ 테모졸로마이드(Temozolomide) 250  $\mu$ M, 에토목실(Etomoxir) 100  $\mu$ M 병용 투여하여 3주 동안 배양하였다.

[0076] 도 3에서 보는 바와 같이, TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64에서, 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)을 병용 투여한 경우, 단독 투여한 경우에 비해 종양구가 형성된 웰의 비율이 낮았다. 구체적으로, TS15-88은 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 35%, TS14-08은 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 95%, TS14-15와 TS13-64는 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 100%의 신경구 형성능(neurosphere formation)을 억제하여, 종양구 억제능이 탁월함을 확인하였다.

#### [0078] [실험예 4] 종양구 직경 확인

[0079] 다음으로, 위상차 현미경(inverted phase-contrast microscope)(Optinity KI 400; Seongnam, Korea)으로 세포 배양물을 관찰하여 교모세포종(GBM) 종양구의 사이즈를 확인하여 그 결과를 도 4 및 5와 같이 나타내었다. 세포 사진은 톱뷰(ToupView) 이미지 분석 소프트웨어(ToupTek Photonics, Zhejiang, China)를 사용하여 디지털 카메라(Industrial Digital Microscope Camera; Huaguang, Zhejiang, China)로 촬영하였다.

[0080] 도 4 및 5와 같이, TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 모두에서, 종양구의 직경이 감소하였는데, 특히 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)을 병용 투여한 경우, 단독 투여한 경우에 비해 종양구 직경이 큰 폭으로 감소하였다. 구체적으로, TS15-88은 무처리한 대조군에 비해 TMZ와 Etomoxir의 병용 처리 군에서 약 40%, TS14-08은 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 70%, TS14-15와 TS13-64는 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 100%의 종양구 직경(neurosphere의 radius)이 감소하여, 종양구 억제능이 탁월함을 확인하였다.

#### [0082] [실험예 5] 종양구 줄기세포능 유전자 발현 확인

[0083] 웨스턴 블롯 분석을 위하여 10% 글라이신-SDS-PAGE를 이용하여 세포 용해물을 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막에 이동시킨 후 네스틴(Nestin), 삭스2(Sox2), PDPN, Msi-1, CD44, Bmi-1 및 대조군으로 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 항-마우스 IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 2차 항체로 부착시킨 뒤 Western Lightning Plus-증강 화학발광 시약(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)을 사용하여 발전시켰다. 이미지퀀트(ImageQuant) LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)으로 이미지를 촬영하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0084] 도 6에서 보는 바와 같이, 교모세포종(GBM) 종양구 세포에 테모졸로마이드(Temozolomide), 에토목실(Etomoxir)을 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들을 혼합하여 처리한 경우 상기 네스틴(Nestin), 삭스2(Sox2), PDPN, Msi-1, CD44, Bmi-1의 발현 수준이 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다.

#### [0086] [실험예 6] 종양구 침윤성 분석

[0087] 3D 침윤 분석을 사용하여 종양구 세포의 침윤성을 확인하였다. 구체적으로, 96-웰 플레이트의 각각의 웰을 매트릭스, ° 형 콜라겐(Corning) 및 종양구 완전 배지로 구성된 혼합 매트릭스 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 도 7과 같이 이미지를 촬영하고, 그 결과를 도 8에 그래프로 나타내었다.

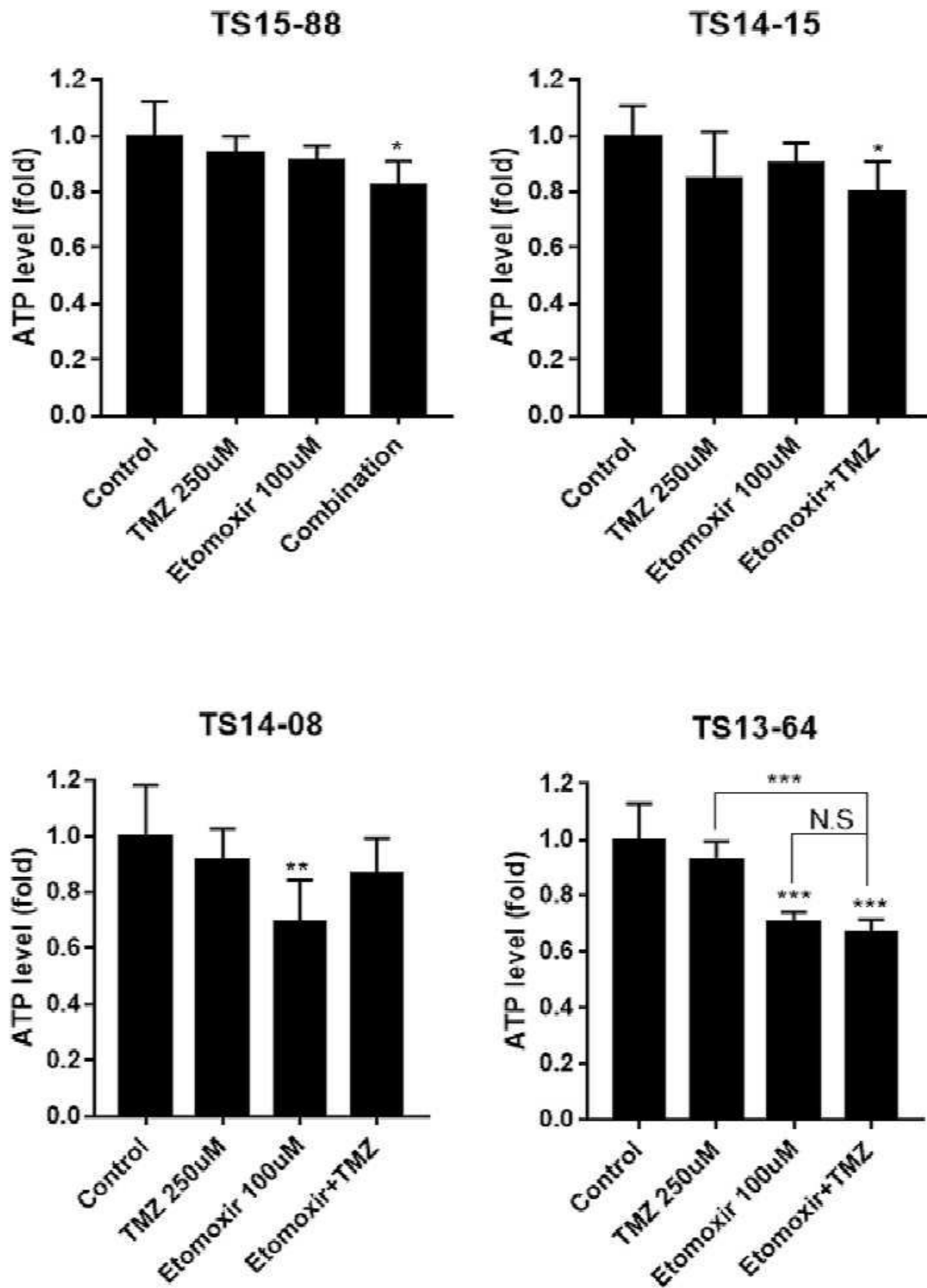
[0088] 도 7 및 8에서 보는 바와 같이, TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 GBM 종양구 세포에 테모졸로마이드(Temozolomide) 또는 에토목실(Etomoxir)을 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 종양구 세포의 침윤성이 현저하게 감소한 것을 볼 수 있다.

- [0089] 구체적으로, TS15-88은 무처리한 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 45%, TS14-15는 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 55%, TS14-08은 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 약 50%, TS13-64는 대조군에 비해 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)의 병용 처리 군에서 35%의 침윤성(invasiveness)을 억제하는 것을 알 수 있었다.
- [0091] [실험예 7] 종양구 침윤성 유전자 발현 확인
- [0092] 웨스턴 블롯 분석을 통해  $\beta$ -카테닌( $\beta$ -catenin), N-카데린(N-cadherin), 스네일(Snail), Zeb1, Twist과 같은 침윤성 관련 마커를 확인하여, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0093] 도 9에서 보는 바와 같이, TS15-88, TS14-15, TS14-08 및 TS13-64 종양구에  $\beta$ -카테닌( $\beta$ -catenin), N-카데린(N-cadherin), 스네일(Snail), Zeb1, Twist의 발현양이 테모졸로마이드(Temozolomide) 및 에토목실(Etomoxir) 병용 투여 군에서 현저히 감소한 것을 확인하였다.
- [0095] 상기와 같이, 본 발명에 따라 테모졸로마이드(Temozolomide)와 에토목실(Etomoxir)을 병용 투여하는 경우 이들을 단독으로 투여한 경우보다 이미 형성된 종양구 세포의 크기가 성장하는 것을 효과적으로 억제하였고, 종양구 세포의 형성능, 즉 증식 또한 억제하였으나, 가장 의미있게는 침윤성을 예측하기 어려운 수준 이상으로 현저히 억제하는 것을 볼 수 있었다.
- [0096] 이에 따라, 본 발명에 따라 병용 투여 시 암의 진행을 더디게 하며, 암의 침윤, 전이 및 줄기세포능을 현저히 억제할 수 있음을 알 수 있다.



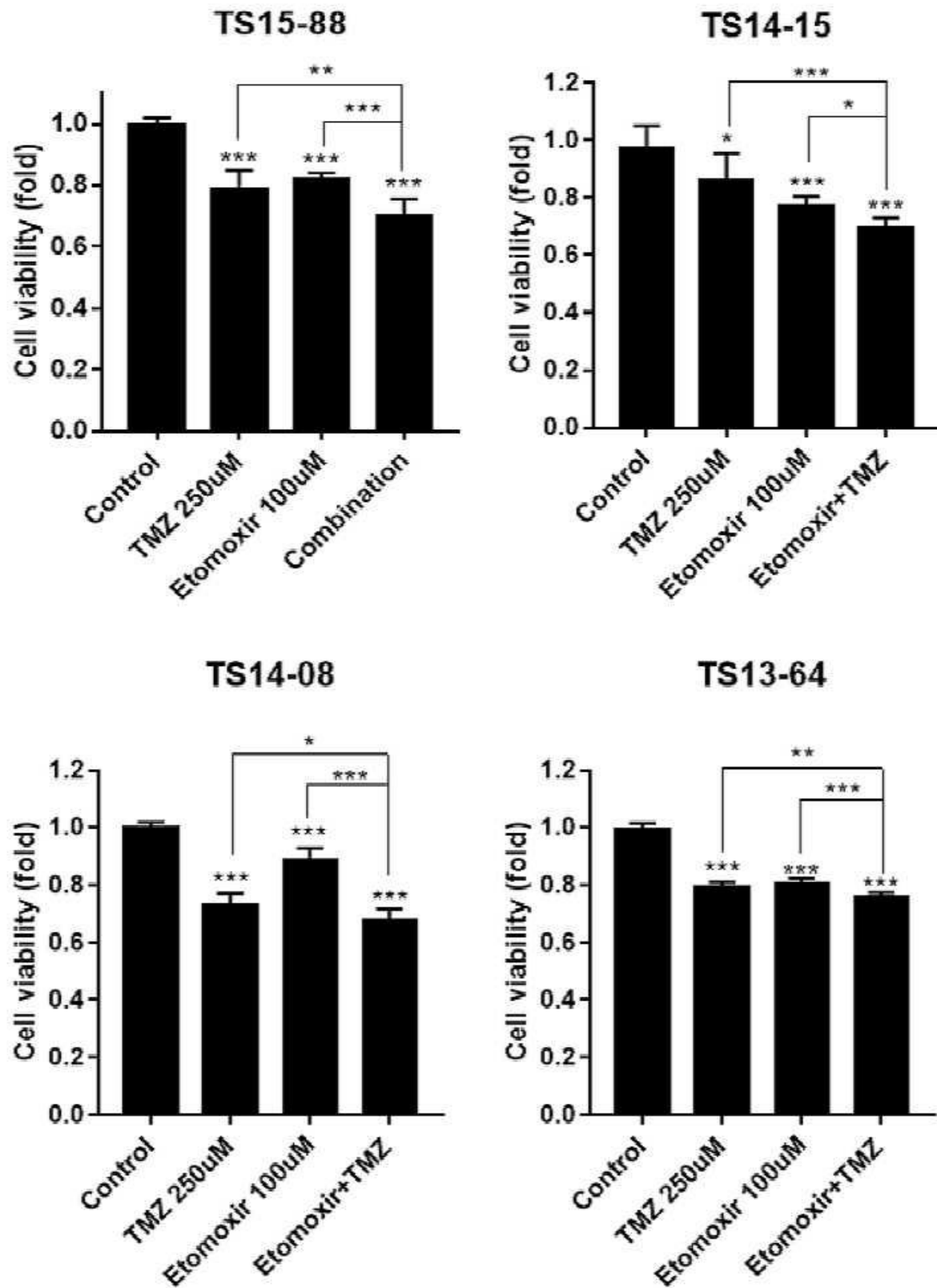
도면

도면1

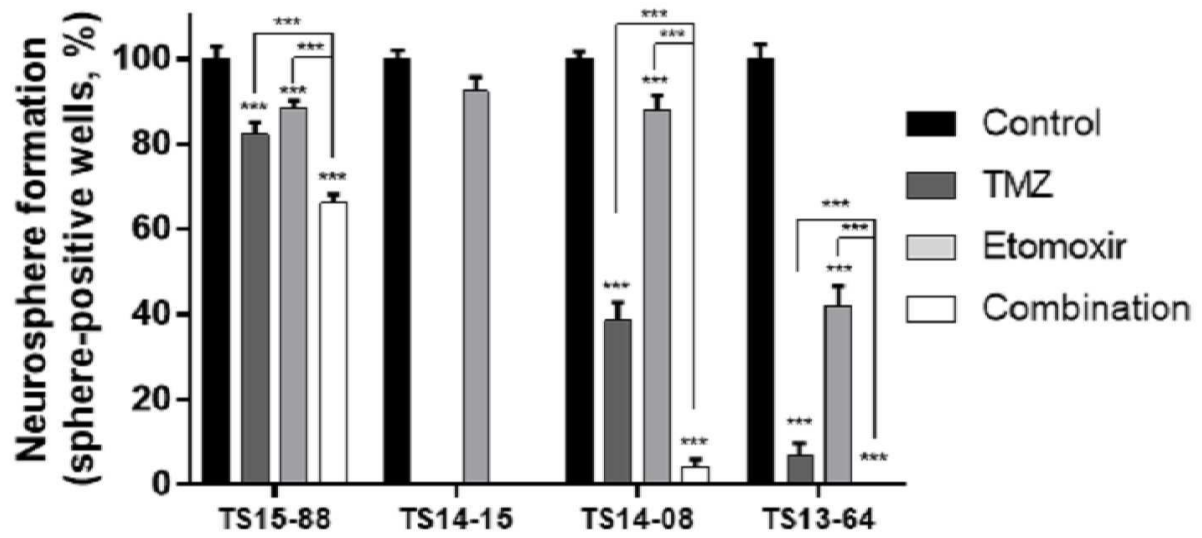




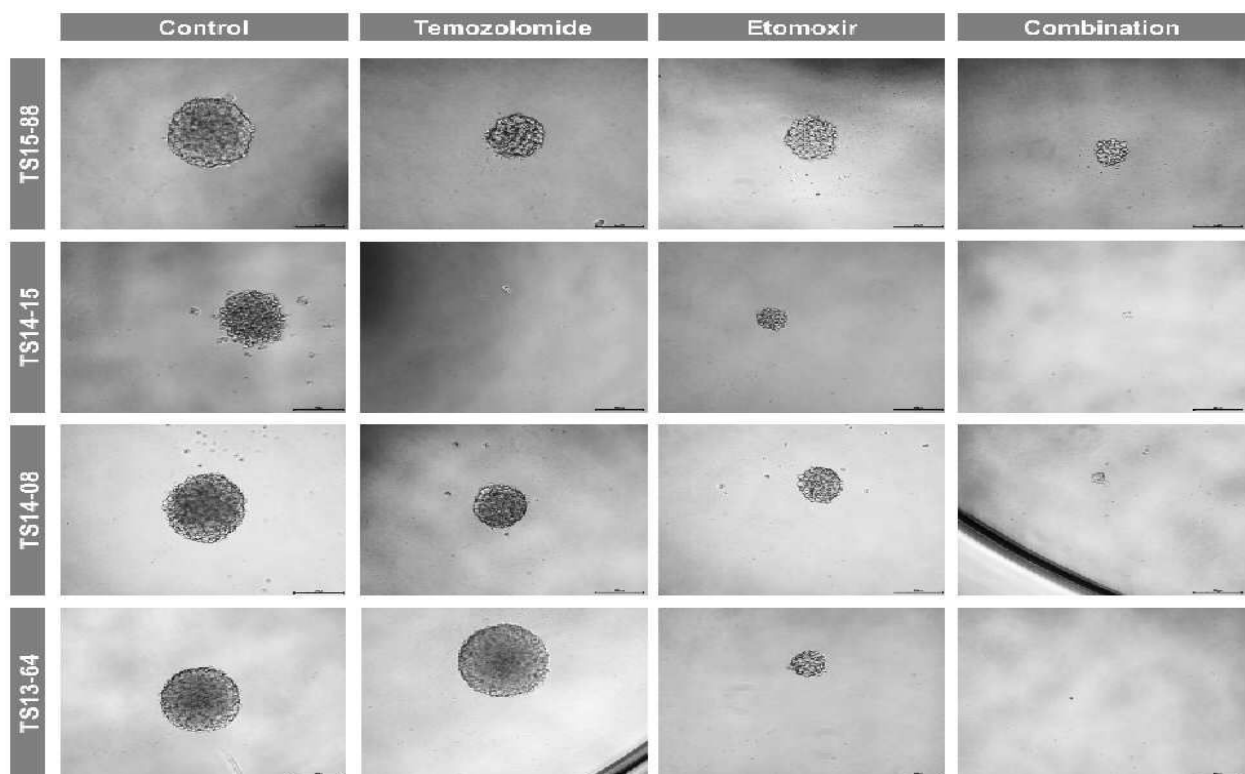
도면2



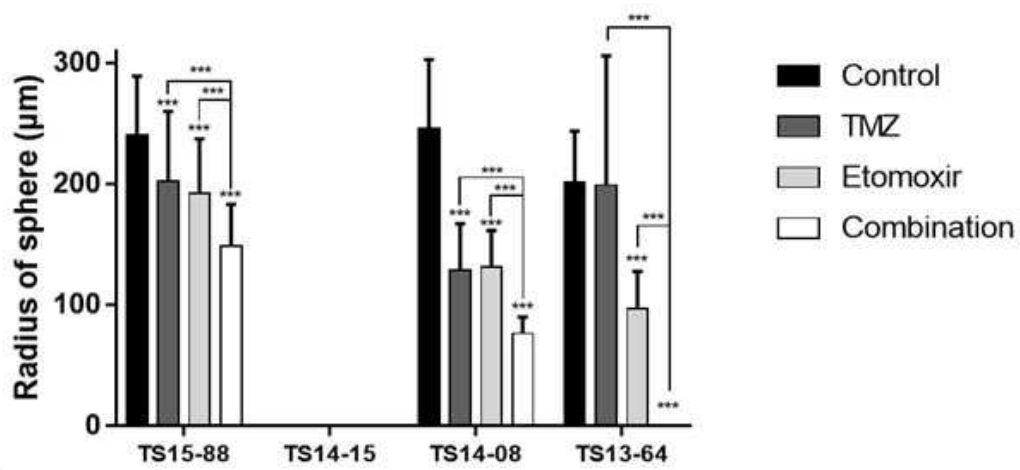
도면3



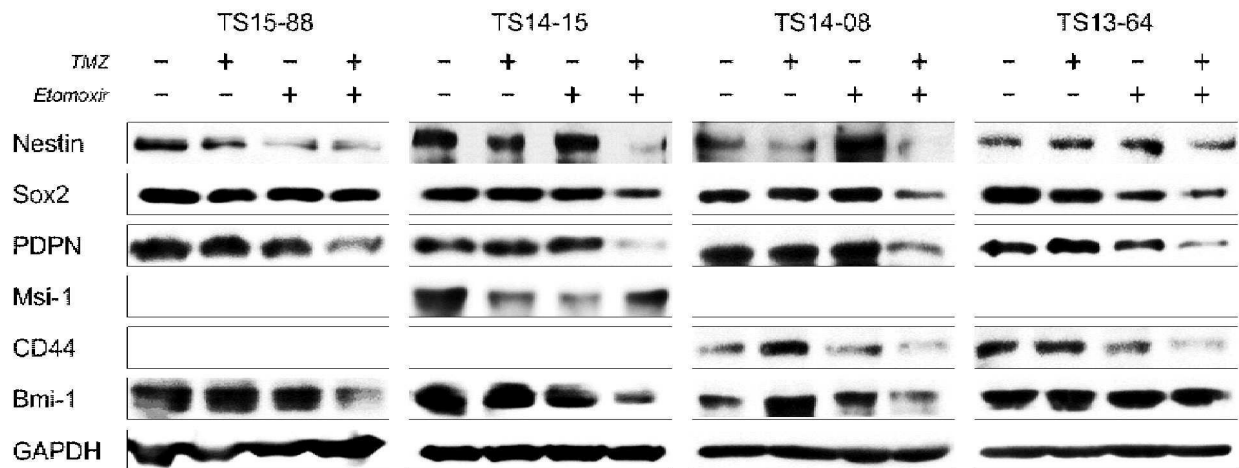
도면4



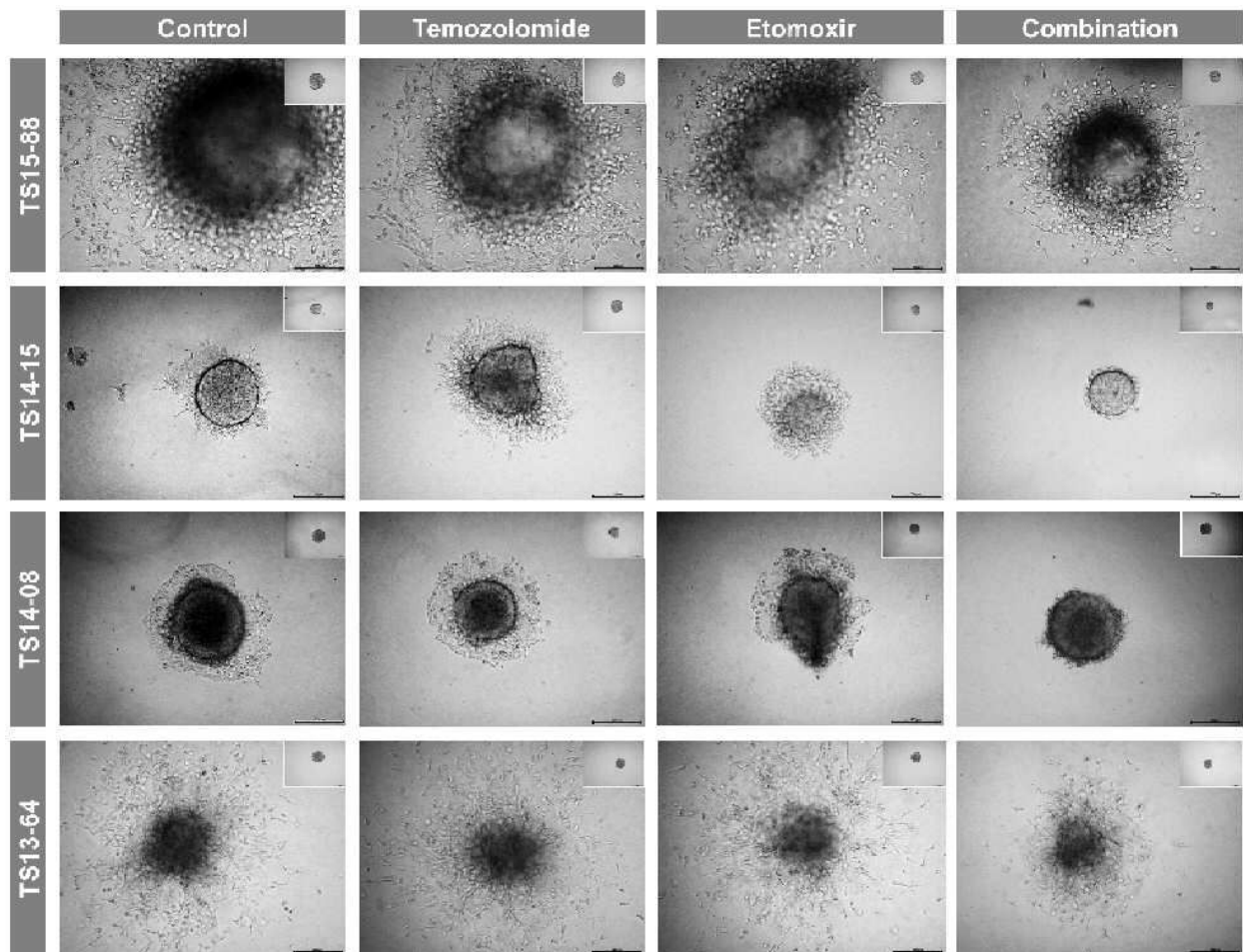
도면5



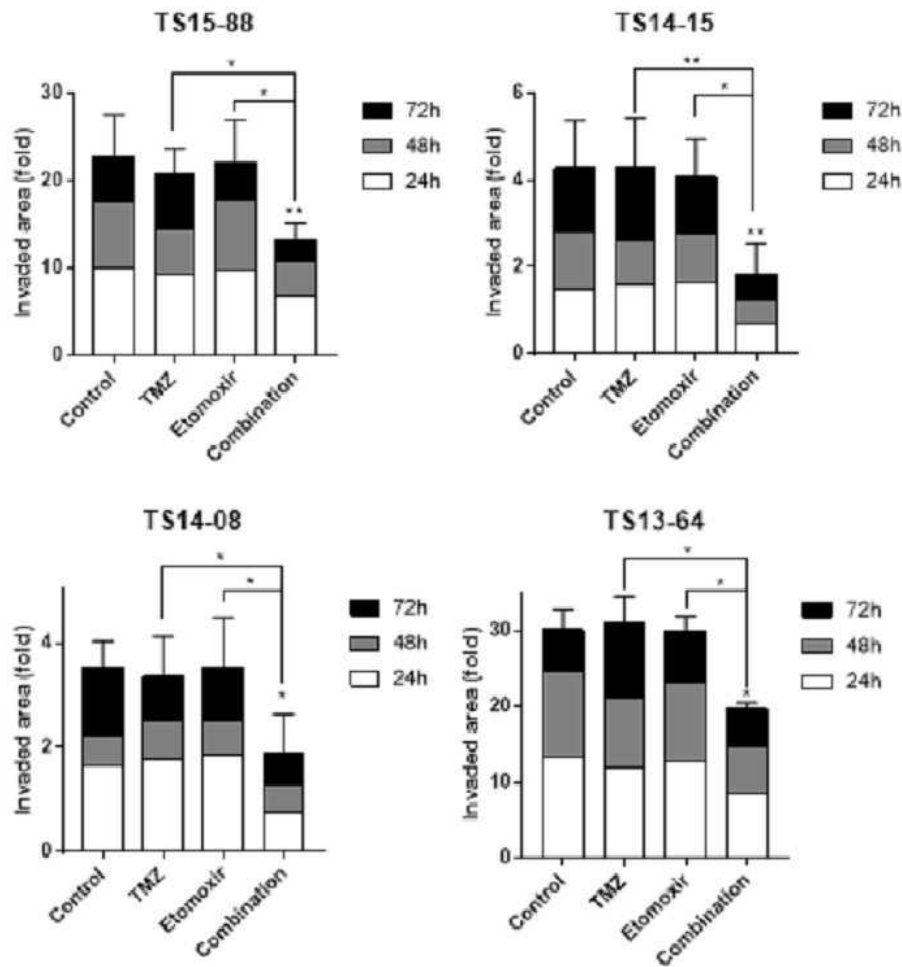
도면6



도면7



도면8



도면9

