



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월09일

(11) 등록번호 10-2214057

(24) 등록일자 2021년02월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/409 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/409 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0052415
(22) 출원일자 2019년05월03일
심사청구일자 2019년05월03일
(65) 공개번호 10-2020-0127721
(43) 공개일자 2020년11월11일
(56) 선행기술조사문헌
Scientific Reports, Vol. 7, No. 7602, pp. 1-8 (2017)*
Am J Cancer Res, Vol. 6, No. 12, pp. 2816-2830 (2016)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
강석구
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동 601호 (이의동, 이편한세상광교)
김의현
서울특별시 강남구 압구정로39길 58, 64동 404호 (압구정동, 구현대아파트)
오유정
서울특별시 종로구 세검정로 252-8 월드캐슬빌라 5동 202호
- (74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 6 항

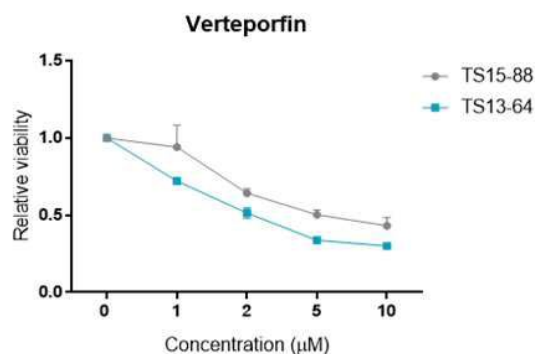
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 조성물은 히포(Hippo) 세포신호전달 경로가 활성화되어 있는 암에 특이적으로 암 세포, 특히는 암 종양구의 성장 억제, 사멸 등을 유도할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	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	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI17C2586
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질병중심 중개 중점연구
연구과제명	에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 임상 적용성 검증
기 여 율	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.12.20 ~ 2020.09.30

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	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.09.21 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1D1A1B07043625
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명	교모세포종에서 자가-유비퀴틴화 시스템을 이용한 차세대 종양억제 조절기전 규명

및 종양억제효과 확인

기 여 율	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

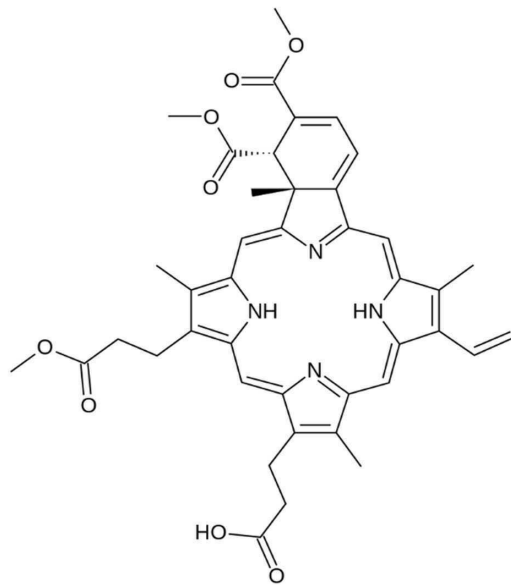
청구항 1

뇌암에서 세포 핵에 비하여 YAP(Yes-associated protein) 단백질이 세포질에 높은 수준으로 존재하는 대상체에 대하여,

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 뇌암의 예방 또는 치료용 약학 조성물로,

상기 뇌암은 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 YAP/TEAD 복합체가 형성되지 않은 뇌암인, 약학 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종인 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 암은 암 종양구인 것인, 약학 조성물.

청구항 5

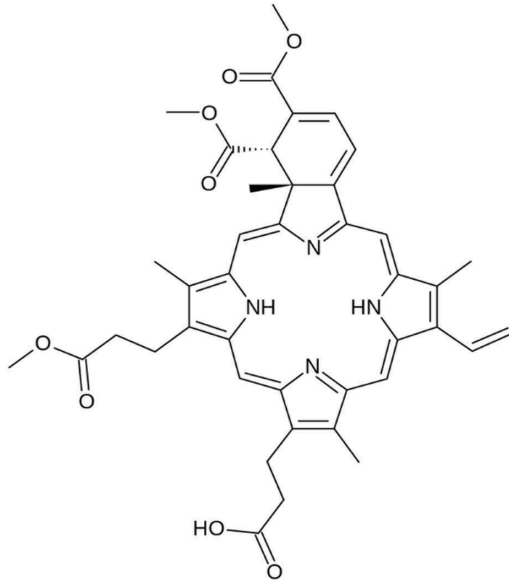
삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

뇌암에서 세포 핵에 비하여 YAP 단백질이 세포질에 높은 수준으로 존재하는 대상체에 대하여,
 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 뇌암의 예방 또는 개선용 식품 조성물로,
 상기 뇌암은 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 YAP/TEAD 복합체가 형성되지 않은 뇌암인, 식품 조성물:
 [화학식 1]



청구항 8

삭제

청구항 9

제 7항에 있어서,
 상기 뇌암은 교모세포종인 것인, 식품 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서,
 상기 암은 암 종양구인 것인, 식품 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 예방, 개선 또는 치료용 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 뇌 암은 연령에 관계없이 발생되며, 소아에 발생 빈도가 다른 암에 비하여 높은 특징이 있다.

- [0003] 신경교종(glioma)은 원발성 뇌 종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양에 해당한다. 신경교종 중에서 특히 교모세포종(GBM; Glioblastoma multiforme)은 인간에서 나타나는 120 가지의 다양한 유형의 원발성 뇌종양 중에서 가장 보편적으로 나타나는 형태이며, 공격적인 악성 원발성 뇌종양으로서, 신경교세포와 관련된 모든 두개내 종양 중에서 가장 많은 부분을 차지한다. 교모세포종의 경우 유럽 및 북아메리카에서 100,000명 당 2 ~ 3건 정도 발병된다.
- [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 치료제의 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] 현재까지 상기 교모세포종의 치료 방법으로는 동시 또는 순차적인 화학요법, 방사선요법, 항혈관형성 요법, 면역요법, 감마 나이프 방사선 수술 및 코르티코 스테로이드를 이용한 대증 치료뿐만 아니라, 절제술과 같은 치료 방법이 존재한다. 그럼에도 불구하고 교모세포종의 경우 중추 신경계 악성 종양 중에서 예후가 매우 나쁘며, 교모세포종 환자의 경우 평균 생존율이 1년 밖에 되지 않을 뿐만 아니라, 환자의 약 3%만이 3년 이상의 생존율을 보이기 때문에 교모세포종의 치료제에 대한 개발이 시급한 실정이다.
- [0006] 그러나, 교모세포종의 경우 고유한 복잡성 및 약물 내성의 매우 복잡한 분자생물학적 기전으로 인하여 현재까지 교모세포종을 완치할 수 있는 치료제는 전무한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- (비특허문헌 0001) Scientific Reports, Vol. 7, No. 7602, pp. 1-8 (2017)
- (비특허문헌 0002) Am J Cancer Res, Vol. 6, No. 12, pp. 2816-2830 (2016)

발명의 내용

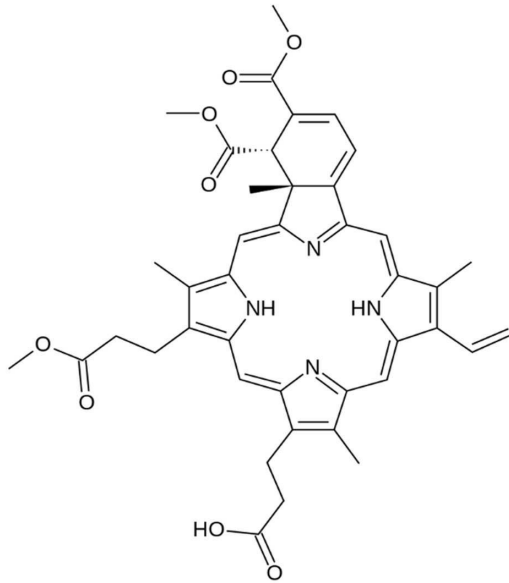
해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 일 목적은 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 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

- [0009] 본 발명의 일 구현 예에서는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0011] 본 발명의 상기 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 3-[(23S,24R)-14-에틸-5-(3-메톡시-3-옥소프로필)-22,23-비스(메톡시카르보닐)-4,10,15,24-테트라메틸-25,26,27,28-테트라아자헥사사이클로[16.6.1.13,6.18,11.113,16.019,24]octacos-1,3,5,7,9,11(27),12,14,16,18(25),19,21-도데카엔-9-yl]프로판노익 에시드(3-[(23S,24R)-14-ethenyl-5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-22,23-bis(methoxycarbonyl)-4,10,15,24-tetramethyl-25,26,27,28-tetraazahexacyclo[16.6.1.13,6.18,11.113,16.019,24]octacos-1,3,5,7,9,11(27),12,14,16,18(25),19,21-dodecaen-9-yl]propanoic acid)으로 표시될 수 있다.

[0015]

본 발명의 상기 암은 뇌암, 폐암, 유방암, 두경부암, 식도암, 난소암, 자궁암, 전립선암, 방광암, 대장암, 흑색 종, 간암, 췌장암, 위암, 설암 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있고, 바람직 하게는 뇌암일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 교모세포종인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016]

본 발명의 상기 암은 암 종양구인 것일 수 있고, 바람직하게는 교모세포종의 종양구 일 수 있으나, 이에 제한되 는 것은 아니다.

[0017]

본 발명의 상기 암 종양구란, 암 조직을 구성하는 세포 중 줄기세포(Stem cell)와 유사한 특성을 가지는 일부의 세포가 3차원 배양 조건에서 형성될 수 있는 세포응집체를 의미한다. 본 발명의 상기 조성물은 암 종양구의 증 식, 즉 암 종양구로부터 다른 종양구의 형성능 등이 억제되도록 할 수 있다.

[0018]

본 발명의 상기 암은 히포(Hippo) 세포신호전달 경로가 활성화되어 있는 것일 수 있다.

[0019]

본 발명의 상기 히포(Hippo) 세포신호전달 경로의 활성화는 세포 핵에 비하여 YAP(Yes-associated protein) 단 백질이 세포질에 높은 수준으로 존재하는 것일 수 있다.

[0020]

본 발명의 상기 히포 세포신호전달 경로란, 원래 장기의 크기를 결정하는 중요한 기능이 수행될 수 있도록 하는 세포신호전달 경로로서, 히포 세포신호전달 경로가 침묵되어 있는 경우에는 YAP(Yes-associated protein) 단백 질이 핵 내로 위치화되어 있는 반면, 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 있는 경우에는 YAP 단백질이 인산화 되게 되고, 핵 내로 위치화 되지 못한 채 세포질에서 결국 유비퀴틴화에 의해 분해(Degradation)되는 경로를 의 미한다.

[0021]

본 발명의 상기 조성물은 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 있으며, YAP 단백질이 인산화되어 세포질 내에 존재하는 암에 특이적으로 암 세포, 바람직하게는 암 종양구의 성장 억제 및 사멸 등을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0022]

본 발명의 상기 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 성장, 증식, 침윤성 또는 전이성을 진행을 지연시키 는 모든 행위를 의미한다.

[0023]

본 발명의 상기 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 성장, 증식, 침윤성 또는 전이성을 억제하 여 암 질환을 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [0025] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 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 제형화할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 약학 조성물의 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이 트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조 에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골 수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경 구 투하가 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개 골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제 의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 상기 약학 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 다양하 게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기 간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량 은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡 술, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있 으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오 시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍 미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비 율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에 따른 조성물은 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 있고, YAP 단백질이 인산화되어 세포질 내에 존재하는 암에 대하여 특이적으로 암 세포의 성장 억제 및 사멸 등을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 교모세포종 세포주들에서 히포 세포신호전달 경로와 관련된 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 환자로부터 유래된 교모세포종 세포주에서 YAP(Yes-associated protein) 단백질 및 TEAD4(TEA domain 4) 단백질의 위치화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 환자로부터 유래된 교모세포종 세포주에 베르테포핀(Verteporfin)을 처리한 뒤에 세포 생존성(Cell viability)을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 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.

[0041] 실시예

[0043] [준비예] 세포주 배양

[0044] 1XB27 보충제(인비트로젠, 미국), 염기성 섬유 아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor, bFGF; 시그마 알드리치, 미국) 20 ng/ml, 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF; 시그마 알드리치, 미국) 20 ng/ml, 및 50 U/ml 페니실린/50 mg/ml 스트렙토마이신(김코, 미국)을 포함하는 완전 배지(DMEM/F-12)에서, 신경교종 세포주인 U87 및 U251과, 환자로부터 유래된 교모세포종 종양구(tumor sphere)인 TS15-88 및 TS13-64 세포주를 배양하였다. 상기 배양 시에 5%의 CO₂, 37℃의 조건을 유지하였다.

[0046] [실시예 1] 히포(Hippo) 세포신호전달 경로와 관련된 단백질 발현 수준 확인

[0047] 상기 준비예의 각 세포주들을 수득한 뒤, 세포 용해 버퍼(Cell lysis buffer)를 이용하여 단백질을 분리하였다. 그런 다음, 상기 분리된 단백질을 정량한 뒤에 동일한 양의 단백질을 샘플 버퍼와 혼합하여 95 ℃에서 5 분 동안 가열하였다. 상기 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 넣고 전기영동하였다. 상기 겔을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 히포 세포신호전달 경로와 관련된 단백질의 발현 수준을 확인하기 위해, 1차 항체(YAP(Yes-associated protein) 단백질, 인산화 YAP(P-YAP) 단백질, CTGF(connective tissue growth factor) 단백질, CYR61(Cysteine-rich angiogenic inducer 61) 단백질, ANKRD1(Ankyrin Repeat Domain 1) 단백질, TEAD4(TEA domain 4) 단백질 및 GAPDH 단백질에 특이적인 항체)와 반응시킨 뒤 2차 항체와 반응시키고 시각화 및 정량화하여, 그 결과를 도 1의 A 및 B에 나타내었다.

[0048] 도 1의 A 및 B에서 보는 바와 같이, U87 세포주 및 TS15-88 종양구에 비하여, U251 세포주 및 TS13-64 종양구에서 인산화 YAP 단백질의 발현 수준이 증가되어 있는 것을 확인하였다. 도 2의 B에서 보는 U251 세포주 및 TS13-64 종양구와 비교하여, U87 세포주 및 TS15-88 종양구에서 바와 같이, 히포 세포신호전달 경로와 관련된 단백질인 CTGF 단백질, CYR61 단백질, ANKRD1 단백질들의 발현 수준이 감소되어 있는 것을 확인하였다.

[0049] 상기 결과를 통해, U87 세포주 및 TS15-88 종양구의 경우 히포 세포신호전달 경로가 침묵되어 있고, U251 세포주 및 TS13-64 종양구의 경우 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 있는 교모세포종을 나타내는 것임을 알 수 있다.

[0051] [실시예 2] 교모세포종 종양구에서 YAP 단백질 위치화 확인

[0052] 상기 준비예에서 환자로부터 유래된 교모세포종 종양구인 TS15-88 및 TS13-64 종양구에 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액을 처리하고, 24시간 동안 배양하여 세포주를 고정화시켰다. 그런 다음, PBS(Phosphate-buffered saline)를 이용하여 상기 고정화된 세포를 세척하고, 5% 또는 1% BSA가 포함된 0.3% 트리톤 X-100(Triton X-100)을 이용하여 YAP 단백질 및 TEAD 단백질을 특이적인 항체를 넣고 충분히 배양하였다. 그런 다음, 형광이 결합된 2차 항체와 함께 추가 배양하는 과정을 통해 세포 내 존재하는 상기 단

백질들 시각화 하여 광학 현미경을 통해 관찰하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이때, DAPI를 이용하여 세포 핵을 염색하였다.

[0053] 도 2에서 보는 바와 같이, TS13-64 종양구에 비하여, 히포 세포신호전달 경로가 침묵되어 있는 TS15-88 종양구의 경우, YAP 단백질과 TEAD 단백질이 대부분 핵 내에 위치화 되어 YAP/TEAD 복합체를 이루고 있는 것을 확인하였다. 반면, 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 있는 TS13-64 종양구의 경우에는 YAP 단백질이 대부분 세포질에 존재하는 것을 확인하였다.

[0054] 상기 결과를 통해 히포 세포신호전달 경로가 침묵되어 있는 경우에는 YAP 단백질이 핵 내에 위치화되어 YAP/TEAD 복합체에 의해 전사가 활성화될 수 있고, 히포 세포신호전달 경로가 활성화되어 있는 경우에는 YAP 단백질이 세포질에 위치화됨으로써 YAP/TEAD 복합체가 형성될 수 없고 이로 인해 전사가 활성화될 수 없음을 알 수 있다.

[0056] [실시예 3] 교모세포종 종양구에서 세포 생존성 저해 효과 확인

[0057] 상기 준비예에서 환자로부터 유래된 교모세포종 종양구인 TS15-88 및 TS13-64 종양구를 1×10^4 세포수/웰의 수로 96웰 플레이트에 분주하고 안정화될 수 있도록 배양하였다. 그런 다음, 상기 종양구에 베르테포핀 (Verteporfin)의 경우 0, 1, 2, 5 및 10 μM 의 농도로 처리하고, 펩타이드 17의 경우 0, 40, 80, 100 및 120 nM의 농도로 처리하고 3일 동안 배양하였다. 이후, 상기 종양구에 세포 생존성을 확인할 수 있는 WST 시약을 첨가한 뒤 충분히 반응시키고, ELISA를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 0 μM 농도를 처리한 경우를 기준으로 세포 생존도의 상대적인 값을 확인하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

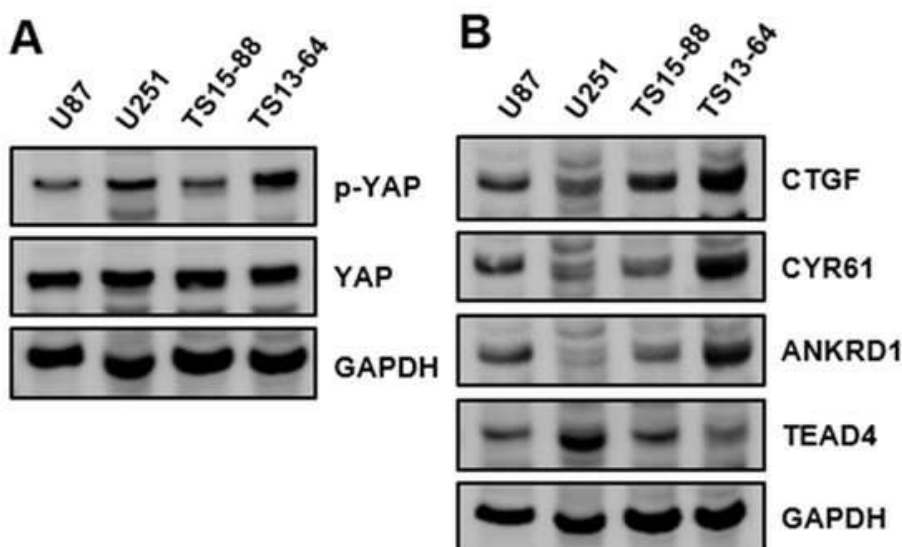
[0058] 도 3에서 보는 바와 같이, 베르테포핀이 처리되었을 때, 히포 세포신호전달 경로가 침묵된 TS15-88 종양구의 경우 5 μM 의 농도에서 세포 생존도가 절반 정도 감소되는 반면, 히포 세포신호전달 경로가 활성화된 TS13-64 종양구의 경우 2 μM 의 농도에서 세포 생존도가 절반 이상으로 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 상기 결과를 통해 본 발명의 베르테포핀은 히포 세포신호전달 경로가 활성화된 교모세포종 종양구에 대하여 특이적으로 세포 사멸 효과가 뛰어난 것을 알 수 있다.

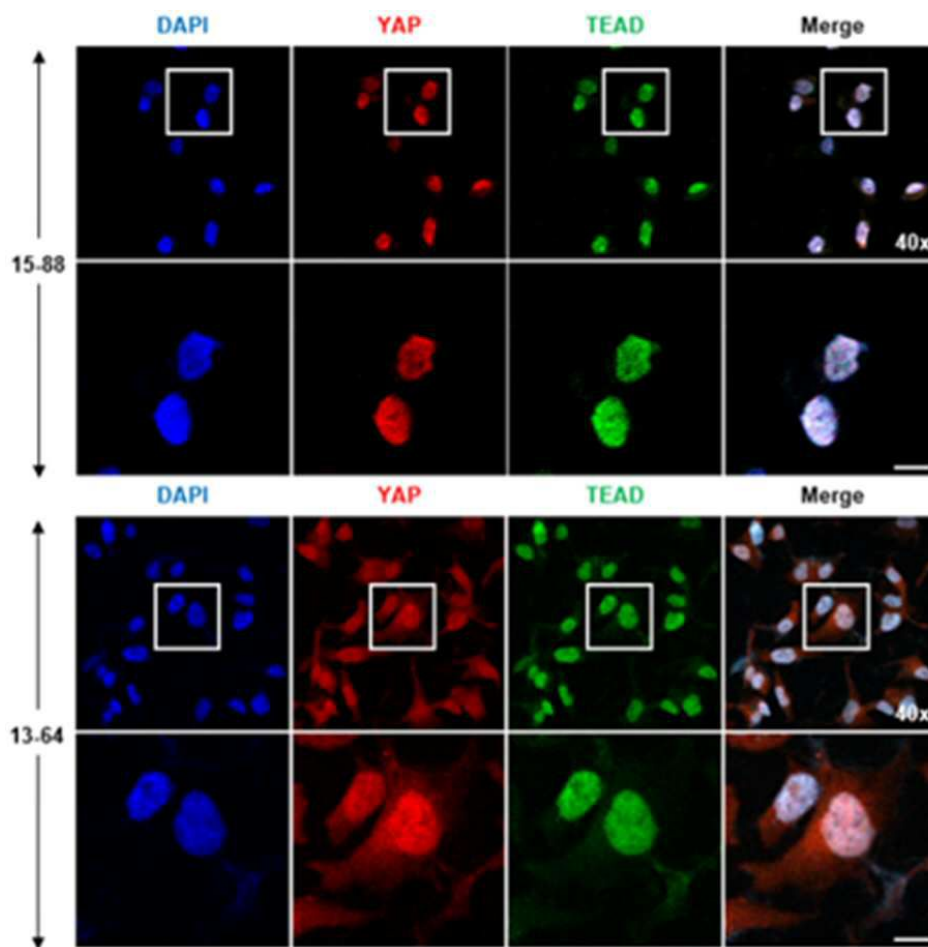
[0061] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

