



등록특허 10-2287072



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월09일

(11) 등록번호 10-2287072

(24) 등록일자 2021년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/5685 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/198 (2006.01) A61K 31/336 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01) A61K 31/4741 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01) A61K 31/505 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/5685 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0179035

(22) 출원일자 2019년12월31일

심사청구일자 2019년12월31일

(65) 공개번호 10-2021-0086859

(43) 공개일자 2021년07월09일

(56) 선행기술조사문헌

학위논문(박사), 양지혜, YONSEI UNIVERSITY,
APPLIED LIFE SCIENCE 2018.2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

강석구

경기도 수원시 영통구 광고호수공원로 277,
101-202(중흥에스클래스)

육종인

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

(74) 대리인

파도특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 17 항

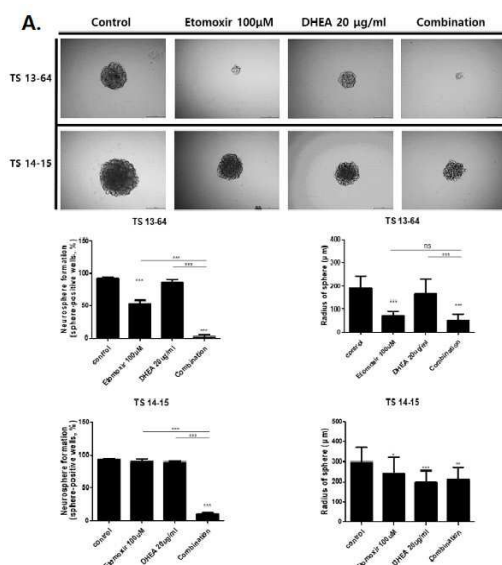
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 **뇌 중앙 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 암 세포 중에서도 특히 뇌암의 성장, 증식, 침윤성 및 전이성을 억제할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것으로, 펜토오스 인산염 억제제(pentose phosphate inhibitor) 및 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 유효 성분으로 포함할 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 31/198 (2013.01)
A61K 31/336 (2013.01)
A61K 31/455 (2013.01)
A61K 31/4741 (2013.01)
A61K 31/495 (2013.01)
A61K 31/505 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (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 HR14C0005
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원육성사업
연구과제명 환자유래 암이식 in vivo 제브라피쉬 및 in vitro 복제종양 플랫폼 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 연세대학교 세브란스병원
연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA)를 유효 성분으로 포함하는 뇌암의 신생혈관 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

에토목실(Etomoxir)을 추가로 포함하는 뇌암의 신생혈관 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 신생혈관 억제는 뇌암의 예방 또는 치료용인, 뇌암의 신생혈관 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA) 및 상기 에토목실(Etomoxir)은 1:1~100의 중량 비로 포함되는, 뇌암의 신생혈관 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(GBM)인, 뇌암의 신생혈관 억제용 약학적 조성물.

청구항 9

디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA)를 유효 성분으로 포함하는 뇌암 종양구(tumorsphere)의 성장 또는 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

에토목실(Etomoxir)을 추가로 포함하는 뇌암 종양구(tumorsphere)의 성장 또는 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA) 및 상기 에토목실(Etomoxir)은 1:1~100의 중량 비로 포함되는, 뇌암 종양구(tumorsphere)의 성장 또는 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(GBM)인, 뇌암 종양구(tumorsphere)의 성장 또는 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 종양구의 직경은 10 내지 500 μm 인, 뇌암 종양구(tumorsphere)의 성장 또는 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 17

디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA)를 유효 성분으로 포함하는 뇌암의 전이성 억제용 약학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

에토목실(Etomoxir)을 추가로 포함하는 뇌암의 전이성 억제용 약학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA) 및 상기 에토목실(Etomoxir)은 1:1~100의 중량 비로 포함되는, 뇌암의 전이성 억제용 약학적 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

제17항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(GBM)인, 뇌암의 전이성 억제용 약학적 조성물.

청구항 24

디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA)를 유효 성분으로 포함하는 뇌암의 예방 또는 개선용

식품 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

에토목실(Etomoxir)을 추가로 포함하는 뇌암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

제24항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(GBM)인, 뇌암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 세포 중에서도 특히 뇌 종양의 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 뇌 암은 연령에 관계없이 발생 되며, 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, 지각마비, 언어 장애, 시력 장애, 평형 장애 등과 같은 국소 증상과 두개내압항진 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.

[0004] 한편, 상기 뇌 종양의 경우, 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)이 존재하기 때문에 치료를 위한 약물 전달이 목격하는 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) 종양 치료법 또는 예후에 대한 예측 인자에 대한 필요성을 오랫동안 통감하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 암 세포 중에서도 교모세포종을 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] 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 구현예에는 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 구현예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0009] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당 업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0010] 본 발명에서, "교모세포종(Glioblastoma, GBM)"은 난치성 뇌 종양의 일종으로, 진단 후 평균 총 생존기간이 15개월 정도에 불과하다. 교모세포종은 정상적으로 뇌조직에 풍부하게 존재하고 있는 신경교세포에서 기원한 종양을 통틀어 일컫는다.
- [0011] 본 발명의 발명자들은 펜토오스 인산염 억제제(pentose phosphate inhibitor)와 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)를 병용 투여하는 경우 암 세포 중에서도 특히 뇌암의 성장, 증식, 침윤성 및 전이성이 현저히 억제되는 것을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [0013] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 펜토오스 인산염 억제제(pentose phosphate inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 신생혈관 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명의 약학적 조성물은 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor) 또는 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 신생혈관 억제는 암의 예방 또는 치료용일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제는 펜토오스 인산염 회로(pentose phosphate pathway; PPP)를 억제하는 것으로, 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA), 켈레리트린(chelerythrine), 아미노-5-(4-클로로 페닐)-7-(t-부틸)피라졸로[3,4-d]피리미딘(amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine; PP2) 또는 6-아미노 니코틴 아마이드(6-aminonicotinamide; 6-AN)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I (Carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) 억제제일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 CPT1 억제제는 에토목실(Etomoxir), 옥스페니신(Oxfenicine), 퍼헭린(Perhexiline) 및 라놀라진(Ranolazine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 트리메타지딘(trimetazidine) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제 및 지방산 산화 억제제는 1:1~100의 중량비, 보다 바람직하게는 1:5~20의 중량비로 사용될 수 있다.
- [0021] 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.

- [0022] 본 발명에서 상기 암은 뇌암 유방암, 폐암, 난소암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암 및 혀암으로 이루어진 군에서 선택되는 것, 약학적 조성물일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma, GBM)일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 성장, 증식, 침윤성 또는 전이성을 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 성장, 증식, 침윤성 또는 전이성을 억제하여 암 질환을 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] 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.
- [0030] 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.
- [0031] 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.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 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, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙류세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀륨, 키토산,

젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토틱렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 부실판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라클, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라클, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0035] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 펜토오스 인산염 억제제(pentose phosphate inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암 종양구(tumorsphere)의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor) 또는 항암제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 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 μm 일 수 있다.
- [0038] 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 있으며, 보다 바람직하게는 교모세포종(GBM) 종양구일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제는 펜토오스 인산염 회로(pentose phosphate pathway; PPP)를 억제하는 것으로, 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA), 켈레리트린(chelerythrine), 아미노-5-(4-클로로 페닐)-7-(t-부틸)피라졸로[3,4-d]피리미딘(amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine; PP2) 또는 6-아미노 니코틴 아마이드(6-aminonicotinamide; 6-AN)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I (Carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) 억제제일 수 있다.
- [0041] 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.
- [0042] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 트리메타지딘(trimetazidine) 일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0043] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제 및 지방산 산화 억제제는 1:1~100의 중량비, 보다 바람직하게는 1:5~20의 중량비로 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 상기 암, 상기 항암제 및 상기 약학적 조성물에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 펜토오스 인산염 억제제(pentose phosphate inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암 줄기세포의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor) 또는 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 상기 암, 상기 항암제 및 상기 약학적 조성물에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0049] 본 발명에서 상기 암 줄기세포란 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암 세포를 의미한다. 상기 암 줄기세포는 악성 종양 조직 내에 1 ~ 2% 정도로 존재하며 정상줄기세포의 특성인 자가복제 능력 (self-renewal)과 다른 세포로 분화 할 수 있는 전분화능 (pluripotent)을 가지고 있으나 자

가 조절 기능에 이상이 있어 세포분열 활성화로 세포 수를 증가하게 되고 스스로 악성 종양 세포로 분화하는 것으로 보고되었다.

- [0050] 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 포함되어있는 소수의 암 줄기세포가 종양의 악성화, 항암저항성 및 재발의 주된 원인으로 부각되었다.
- [0051] 본 발명에서 상기 암 줄기세포는 뇌암, 유방암, 폐암, 난소암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암 및 혀암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 뇌암 줄기세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 교모세포종(GBM) 줄기세포일 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제는 펜토오스 인산염 회로(pentose phosphate pathway; PPP)를 억제하는 것으로, 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA), 켈레리트린(chelerythrine), 아미노-5-(4-클로로 페닐)-7-(t-부틸)피라졸로[3,4-d]피리미딘(amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine; PP2) 또는 6-아미노 니코틴 아마이드(6-aminonicotinamide; 6-AN)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I (Carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) 억제제일 수 있다.
- [0054] 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.
- [0055] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 트리메타지딘(trimetazidine) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제 및 지방산 산화 억제제는 1:1~100의 중량비, 보다 바람직하게는 1:5~20의 중량비로 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 상기 암 전이(cancer metastasis)라 함은 암 세포가 그의 원래 자리로부터 체내의 다른 부분으로 확산되는 것을 의미한다. 전이의 형성은 매우 복잡한 과정으로서 종양으로부터 악성 세포의 탈착, 세포외 매트릭스의 침윤 또는 침습, 상피거막의 침입에 의한 체강 및 혈관으로의 유입 및 이어서 혈액에 의한 운반 후 표적 장기내로의 침윤에 의존한다. 마지막으로, 표적 부위에서의 새로운 종양의 성장은 혈관신생에 의존한다. 종양 전이는 원발성 종양의 제거 후에도 종양 세포 또는 성분들이 남아있을 수 있거나 전이 잠재능을 발달시키기 때문에 종종 발생한다. 일 구체예에서, 본 발명에 따라 "전이"라는 용어는 원발성 종양 및 지역 림프절 시스템으로부터 멀리 떨어진 전이에 관한 것인 원격전이(distant metastasis)에 관한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 상기 침윤성 및 전이성 억제제는 상기 전이, 침윤 및 침습의 각 단계를 억제하는 것일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 펜토오스 인산염 억제제(pentose phosphate inhibitor)를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명의 상기 식품 조성물은 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor) 또는 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제는 펜토오스 인산염 회로(pentose phosphate pathway; PPP)를 억제하는 것으로, 디히드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone; DHEA), 켈레리트린(chelerythrine), 아미노-5-(4-클로로 페닐)-7-(t-부틸)피라졸로[3,4-d]피리미딘(amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine; PP2) 또는 6-아미노 니코틴 아마이드(6-aminonicotinamide; 6-AN)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I (Carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) 억제제일 수 있다.
- [0063] 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.
- [0064] 본 발명에서 상기 지방산 산화 억제제(Fatty acid oxidation inhibitor)는 트리메타지딘(trimetazidine) 일 수

있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0065] 본 발명에서 상기 펜토오스 인산염 억제제 및 지방산 산화 억제제는 1:1~100의 중량비, 보다 바람직하게는 1:5~20의 중량비로 사용될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 상기 암 및 상기 항암제에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0067] 본 발명의 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0068] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 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 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.
- [0069] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

발명의 효과

- [0070] 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 암 세포 중에서도 특히 뇌암세포의 치료에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1a는 교모세포종 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 대한 종양구 형성능을 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 세포를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 1b는 교모세포종 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 종양구에서 CD133, 네스틴, 무사시 및 포도플라닌을 확인하기 위하여 면역 세포 화학을 사용한 것이다.
- 도 1c는 교모세포종 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 종양구에서 신경교 섬유질 단백질(GFAP), 수초 염기성 단백질(MBP), NeuN, 튜블린(TUBB)을 확인하기 위하여 면역 세포 화학을 사용한 것이다.
- 도 2a는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 단독, 에토목실(Etomoxir) 단독 투여 농도에 따른 세포 활성의 변화를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 2b는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 단독, 에토목실(Etomoxir) 단독 투여 농도에 따른 ATP 생성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 2c는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA)을 단독 투여한 경우, 에토목실(Etomoxir)을 단독 투여한 경우 또는 이들 혼합물을 처리한 후 세포 활성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 2d는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA)을 단독 투여한 경우, 에토목실(Etomoxir)을 단독 투여한 경우 또는 이들 혼합물을 처리한 후 세포 ATP 생성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3a는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 처리하여 상기 종양구 세포의 형상과 사이즈를 관찰한 것이다.
- 도 3b는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir) 각각 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로 네스틴(Nestin), Sox2, PDPN, Oct3/4 및 BMI-1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4a는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 형상 변화를 확인하기 위하여 위상차 현미

경으로 세포를 촬영한 사진 및 종양구 세포의 침윤 면적 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4b는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로 β -카테닌(β -catenin), N-카데린(N-cadherin), 스네일(Snail) 및 Zeb1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.

도 5a는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 투여하는 in vivo 실험 설계의 대략적인 흐름을 보여주는 것이다.

도 5b는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 결과를 IVIS로 나타낸 그래프이다.

도 5c는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 결과를 생존 그래프로 나타낸 그래프이다.

도 5d는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 결과를 생존 그래프로 나타낸 그래프이다.

도 5e는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 후 그 검체를 헤마톡실린-에오신 염색법(H&E stain)으로 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 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.

[0074] 실시예

[0076] 교모세포종 환자로부터 세포의 분리

[0077] 이하의 실험은 환자유래 교모세포종 세포인 TS13-64, TS14-15를 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, 신경병리학자는 WHO 분류에 따라 외래적 시료를 진단하였다. 세포 분리 절차는, 외과적 시료를 분쇄한 후 둘베코 변형 이글 배지/햄 F-12 50/50 혼합(DMEM/F-12; Corning Incorporated, NY, USA) 배지에서 메스(scalpel)로 해리한 뒤 100 μ 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 섬유아세포 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.

[0079] 종양구 특성(Tumorsphere characterization)

[0080] 하기 표 1은 본 발명의 실시예의 교모세포종 세포인 TS13-64, TS14-15 종양구의 특성에 관한 것이다.

표 1

종양구	세포 아형	조직 아형	분자 마커		
			IDH 1 돌연변이	MGMT 프로모터	Codeletion of 1p19q
TS13-64	Classical	Classical	야생형	메틸화되지 않음	intact
TS14-15	Proneural	Classical	야생형	메틸화	intact/LOH

- [0084] 도 1a는 교모세포종 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 대한 종양구 형성능을 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 세포를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- [0085] 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(accumase)(Gibco)를 사용하여 상기 교모세포종(GBM) 종양구 세포를 해리시킨 뒤 10 개의 단일 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 단독, 에토목실(Etomoxir) 단독 투여 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 교모세포종(GBM) 종양구의 형상 및 사이즈를 결정하였다. 세포 사진은 ToupView 이미지 분석 소프트웨어 (ToupTek Photonics, Zhejiang, China)를 사용하여 디지털 카메라 (Industrial Digital Microscope Camera; Huaguang, Zhejiang, China)로 촬영하였다.
- [0086] 도 1b는 교모세포종 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 종양구에서 CD133, 네스틴, 무사시 및 포도플라닌을 확인하기 위하여 면역 세포 화학을 사용한 것이다.
- [0087] 도 1c는 교모세포종 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 종양구에서 신경교 섬유질 단백질(GFAP), 수초 염기성 단백질(MBP), NeuN, 튜블린(TUBB)을 확인하기 위하여 면역 세포 화학을 사용한 것이다.
- [0088] 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 β -튜블린(TUBB)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 1X B27 보충제를 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 신경 분화시켰다.
- [0090] 세포 활성 및 ATP 생성능 분석
- [0091] 도 2a는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 단독, 에토목실(Etomoxir) 단독 투여 농도에 따른 세포 활성의 변화를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [0092] 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir) 투여가 환자유래세포인 TS13-64 및 TS14-15의 세포 활성에 미치는 영향을 알아보는 실험을 수행하였다. 5×10^3 cells/100 μ L 로 96 well에 seeding 하고 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 농도별로 72시간 동안 처리한 후 WST 법으로 확인하였다. 에토목실(Etomoxir) 처리시에는 두 세포에서 세포 활성이 미약하게 감소함을 확인하였다. 한편, 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 처리시에는 두 세포에서 다른 경향으로 감소하였는데, TS14-15 에서 더 민감한 효과를 나타내었다.
- [0093] 도 2b는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 단독, 에토목실(Etomoxir) 단독 투여 농도에 따른 ATP 생성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

- [0094] 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir) 투여가 세포 에너지원인 ATP 생성을 저해하는 능력을 평가 하였다. ATP 생성을 평가하기 위해서 측정 키트를 사용하였고, 도 2a의 세포 활성 평가 실험과 같게 배양한 세포들에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 농도별로 72시간 처리 후 assay 시약(CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Cat# G7572, Promega)을 더해 흡광도를 측정하였다. 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir) 각각의 투여에 관하여 두가지 세포 모두 ATP 생성 저해 활성이 확인되었다.
- [0095] 도 2c는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA)을 단독 투여한 경우, 에토목실(Etomoxir)을 단독 투여한 경우 또는 이들 혼합물을 처리한 후 세포 활성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [0096] 도 2d는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA)을 단독 투여한 경우, 에토목실(Etomoxir)을 단독 투여한 경우 또는 이들 혼합물을 처리한 후 세포 ATP 생성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [0097] 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)의 병용 투여 효과를 확인하기 위해 Etomoxir 100 μ M(약 3.3 μ g/ml), DHEA 20, 50 μ g/ml를 사용해 세포활성 및 ATP 생성 저해 능력을 확인하였다. 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 각각 투여한 그룹에 대비해 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 병용 투여한 그룹에서 세포 활성 및 ATP 생성 능력이 감소함을 확인하였다. 특히, ATP 능력이 현저하게 감소함을 확인하였다.
- [0099] 줄기세포능(stemness) 억제 분석
- [0100] 도 3a는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 처리하여 상기 종양구 세포의 형상과 사이즈를 관찰한 것이다.
- [0101] Etomoxir, DHEA와 두가지 병용 투여 그룹이 종양구 형성능에 미치는 영향을 확인하기 위해 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 (1)etomoxir 100 μ M 단독 투여, (2)DHEA 20 μ g/ml 단독 투여, (3)etomoxir 100 μ M, DHEA 20 μ g/ml 병용 투여한 6가지 교모세포종(GBM) 종양구를 3주간 배양하였다. 현미경을 이용해 배양된 교모세포종(GBM) 종양구의 형상과 사이즈를 관찰하는 신경구 형성 분석(neurosphere formation assay)을 실시하였다. 그 결과 도 3a와 같이 각 약물을 각각 투여한 그룹 대비 병용 투여 그룹에서 유의하게 종양구 형성능이 감소함을 확인하였다.
- [0102] 도 3b는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir) 각각 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로 네스틴(Nestin), Sox2, PDPN, Oct3/4 및 BMI-1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.
- [0103] 도 3b의 실험에서 로딩 대조군으로 글리 세르 알데히드 3-포스페이트 탈수소 효소(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)를 사용하였다.
- [0104] 도 3b에서 보는 바와 같이, 교모세포종(GBM) 종양구 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA), 에토목실(Etomoxir)을 단독으로 처리한 경우에 비하여 이들의 혼합물을 처리한 경우 상기 네스틴, Sox2, PDPN 및 Oct3/4의 발현 수준이 모두 감소하였다.
- [0105] 도 3b와 같은 조건 실험에서 DHEA의 농도만 50 μ g/ml로 변경한 결과, 종양구가 형성되지 않았다.
- [0107] 침윤성 분석
- [0108] 도 4a는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 종양구 세포의 형상 변화를 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 세포를 촬영한 사진 및 종양구 세포의 침윤 면적 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [0109] 3D 침윤 분석(3D invasion assay)을 사용하여 종양구 세포의 침윤성을 분석하였다. 96-웰 플레이트의 각각의 웰을 매트릭스, 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 μ l의 양으로 보충하였다. 위상차 현미경(phase-contrast microscope)을 사용하여 이미지를 촬영하였다.
- [0110] 도 4b는 교모세포종 종양구 세포인 TS14-15 및 TS13-64 세포 각각에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리한 후 웨스턴 블롯으로 β -카테닌(β -catenin), N-카데린(N-

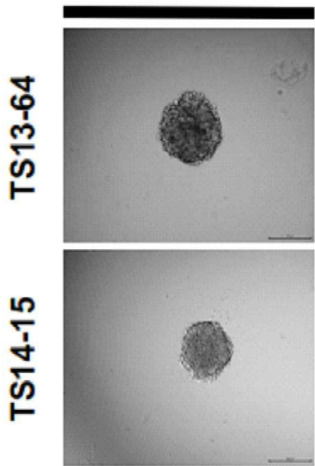
cadherin), 스네일(Snail) 및 Zeb1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 나타낸 것이다.

- [0111] 웨스턴 블롯 분석을 통해 β -catenin, N-cadherin 및 Zeb1과 같은 상피간엽이행 (EMT) 관련 마커를 확인하였다. TS13-64, TS14-15 종양구에 β -catenin, N-cadherin 및 Zeb1의 발현양이 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir) 병용 투여 그룹에서 현저히 감소한 것을 확인하였다.
- [0113] In Vivo 실험
- [0114] 도 5a는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 투여하는 in vivo 실험 설계의 대략적인 흐름을 보여주는 것이다.
- [0115] 도 5b는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 과정을 주 별로 나타낸 것이다.
- [0116] 도 5c는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 결과를 IVIS로 나타낸 그래프이다.
- [0117] 도 5d는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 결과를 생존 그래프로 나타낸 그래프이다.
- [0118] 도 5e는 교모세포종 종양구 세포인 TS13-64 세포에 디하이드로에피안드로스테론(DHEA) 및 에토목실(Etomoxir)을 단독 또는 이들 혼합물을 처리하는 in vivo 실험 후 그 검체를 헤마톡실린-에오신 염색법(H&E stain)으로 확인한 것이다.
- [0119] Day 7에 TS13-64 세포 5×10^5 를 쥐에 주입하였다. 1주차인 Day 14부터 2주일 간격으로 in vivo 이미지 시스템 (In Vivo Imaging System; IVIS) 이미지를 촬영하였다. Day 15에 대조군, 디하이드로에피안드로스테론(DHEA), 에토목실(Etomoxir), 병용투여군 4그룹으로 각 그룹당 5마리의 쥐를 이용하여 실험하였다.
- [0120] 실험 결과, 도5b 내지 5e와 같이, Etomoxir 그룹 및 DHEA 및 Etomoxir를 병용투여한 그룹에서 유의한 효과가 보였다.
- [0122] 상기와 같이, 본 발명에 따라 디하이드로에피안드로스테론(DHEA)과 에토목실(Etomoxir)을 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.
- [0123] 이에 따라, 본 발명에 따라 병용 투여 시 암의 진행을 더디게 하며, 암의 침윤 및 전이를 현저히 억제할 수 있음을 알 수 있다.

도면

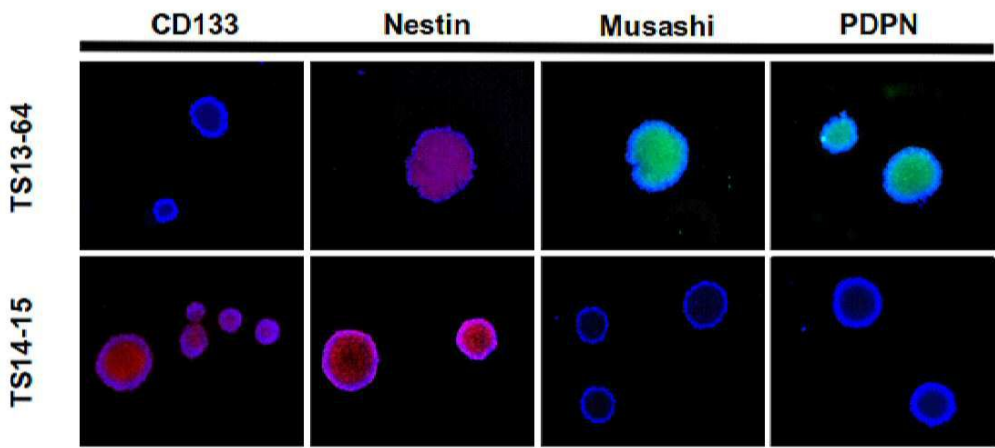
도면1a

A

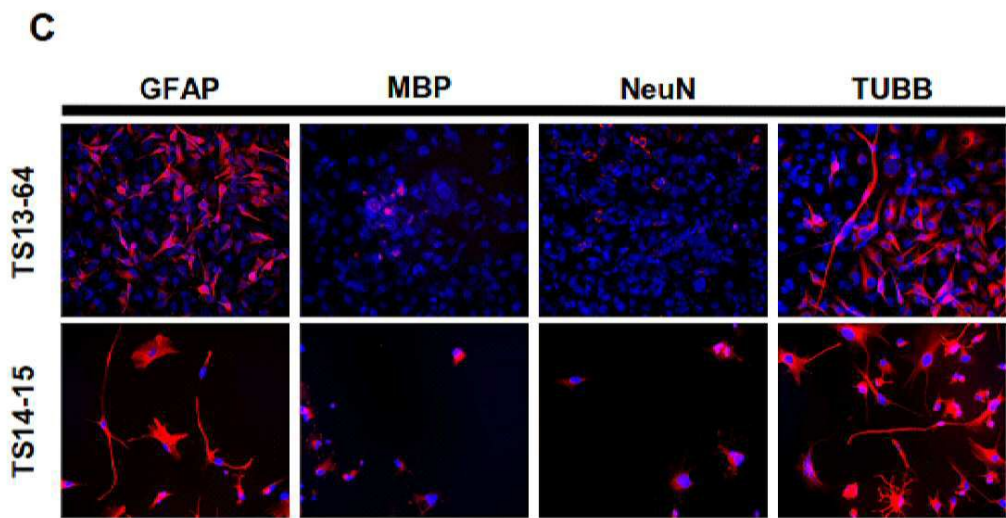


도면1b

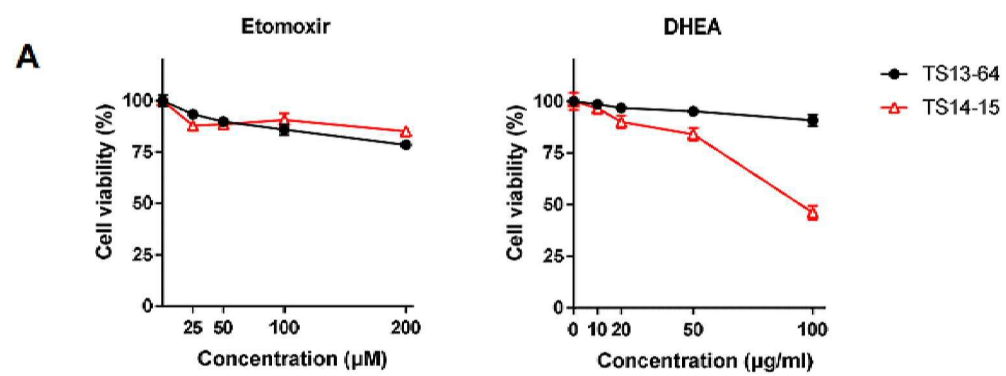
B



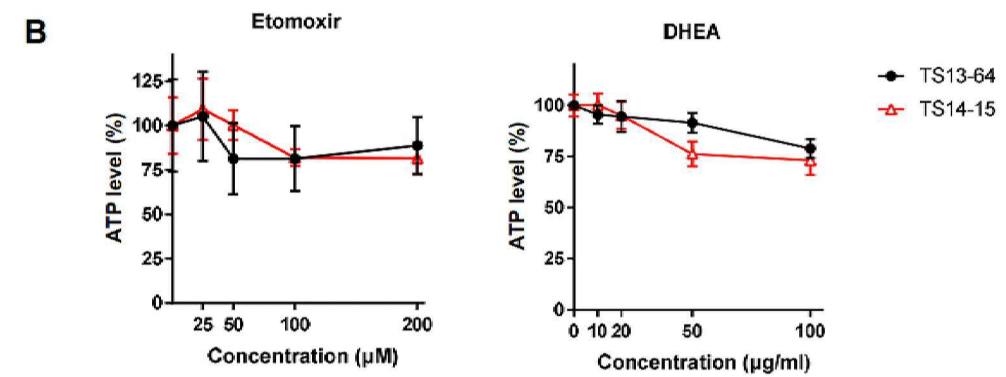
도면1c



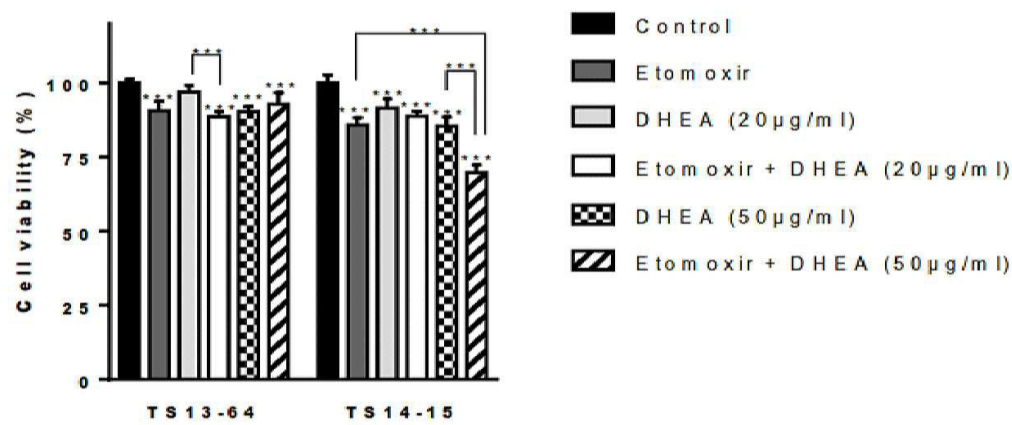
도면2a



도면2b



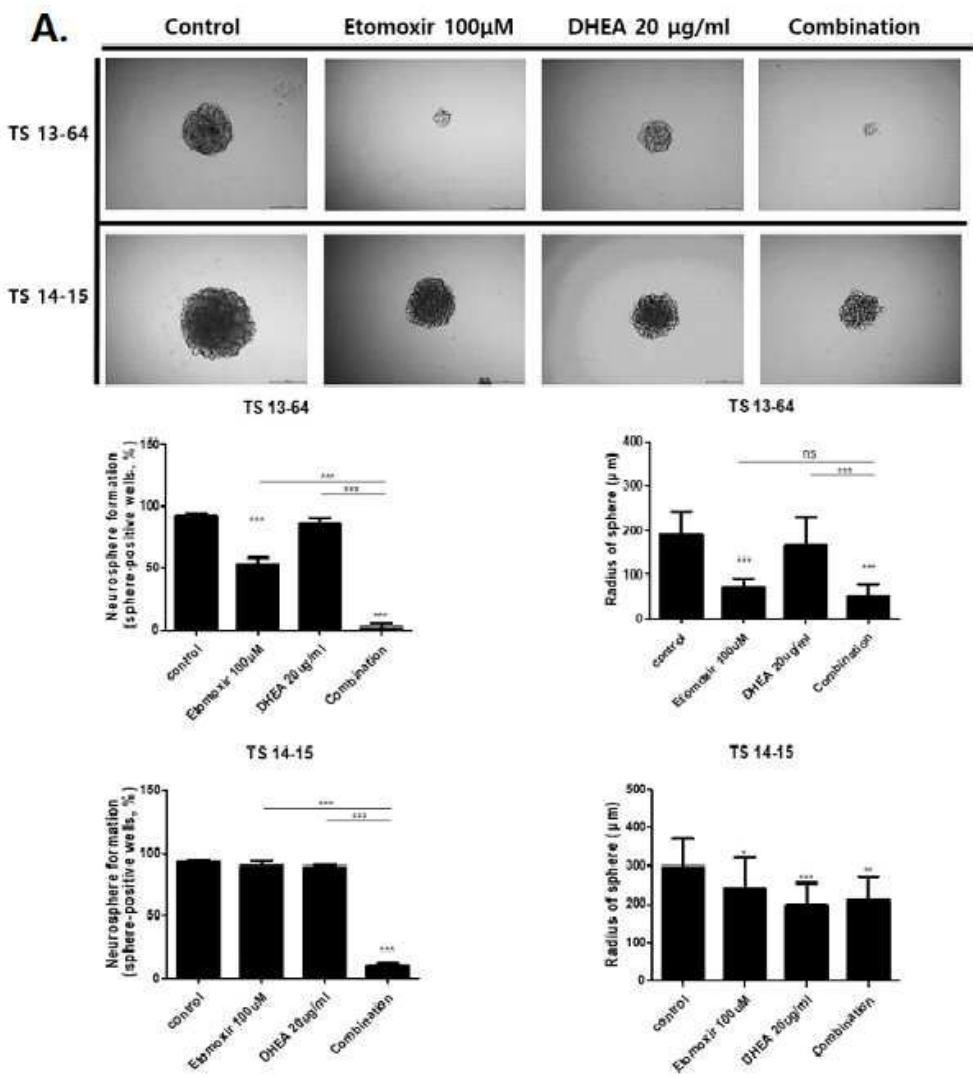
도면2c



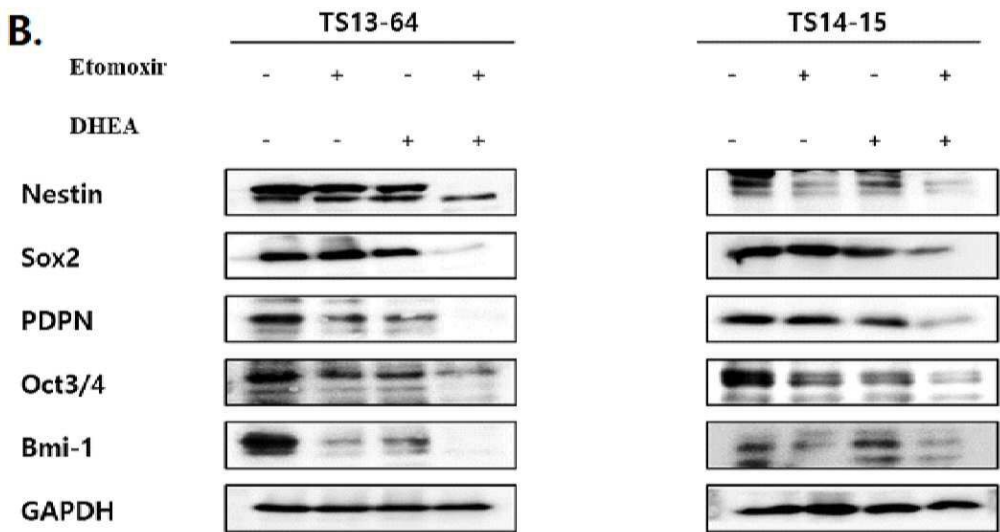
도면2d



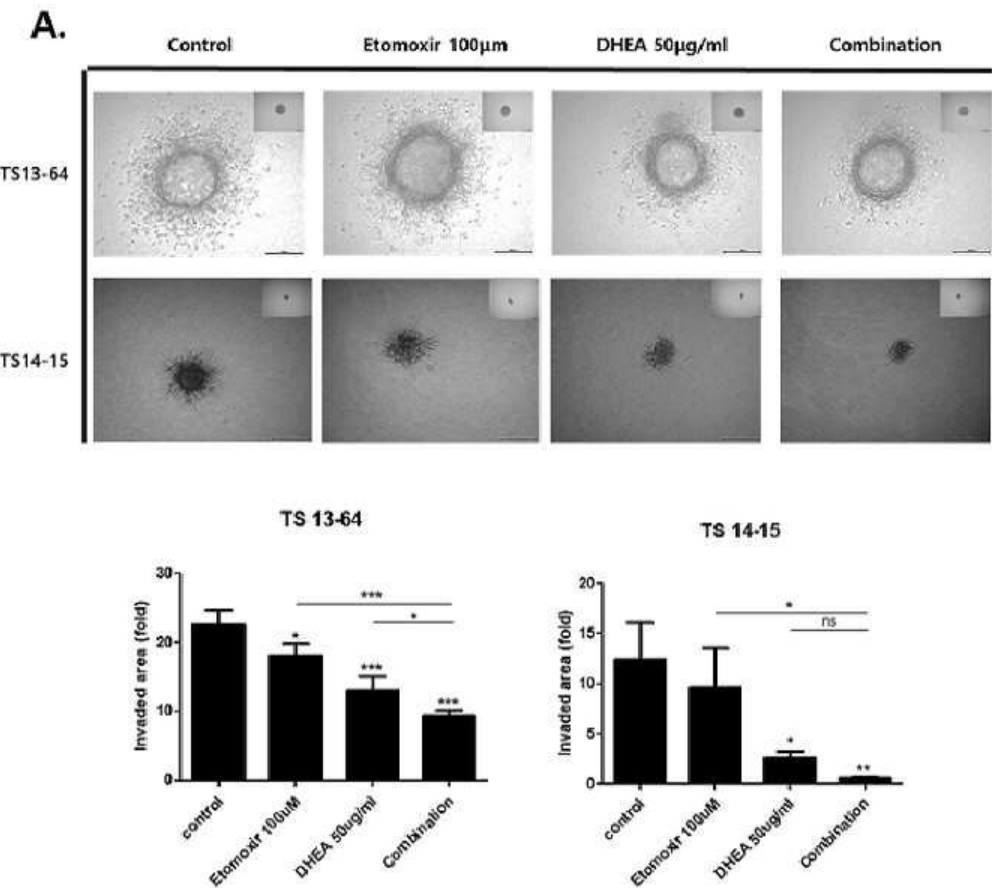
도면3a



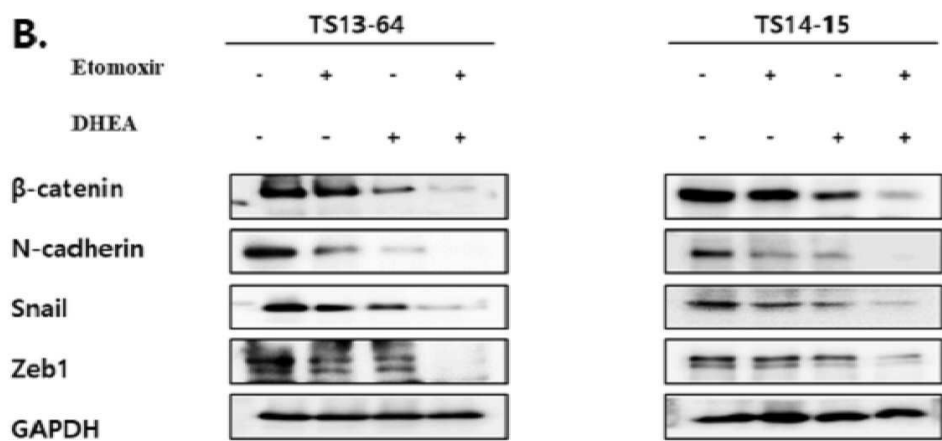
도면3b



도면4a

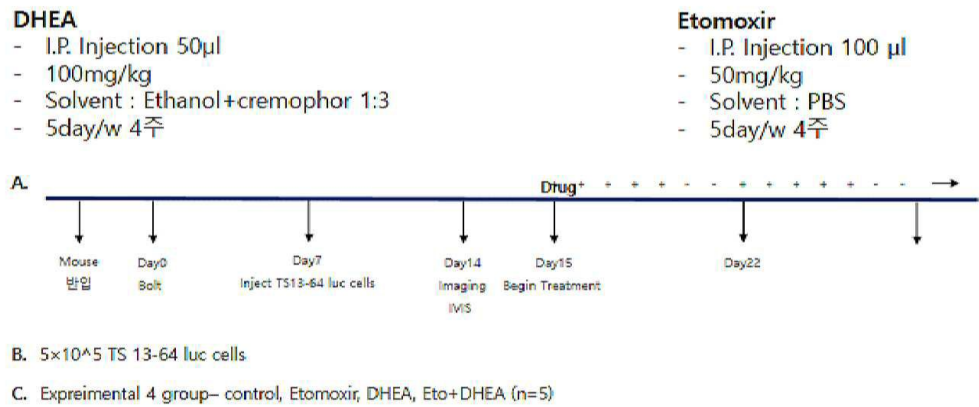


도면4b

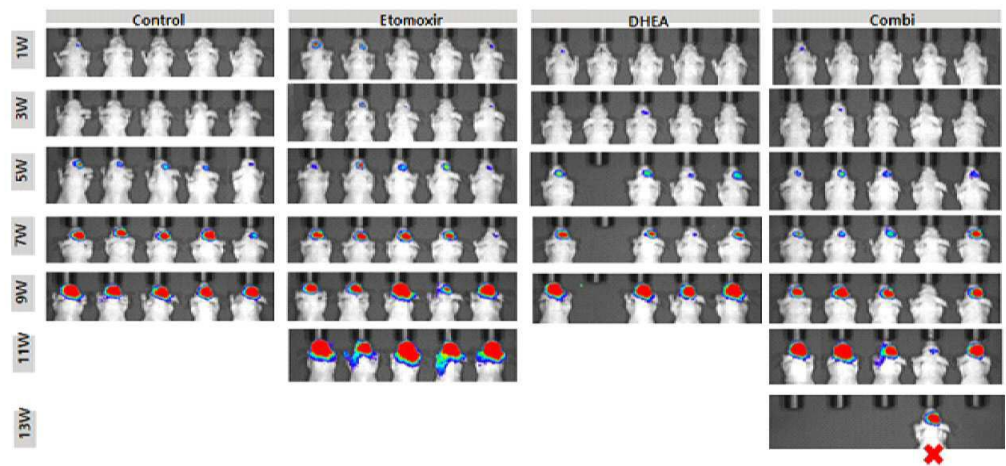


도면5a

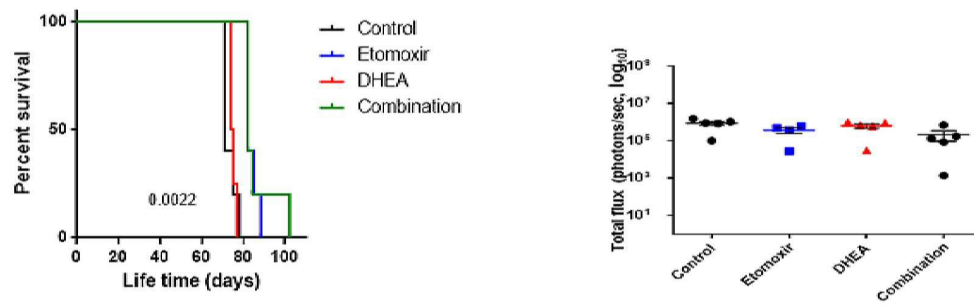
In Vivo



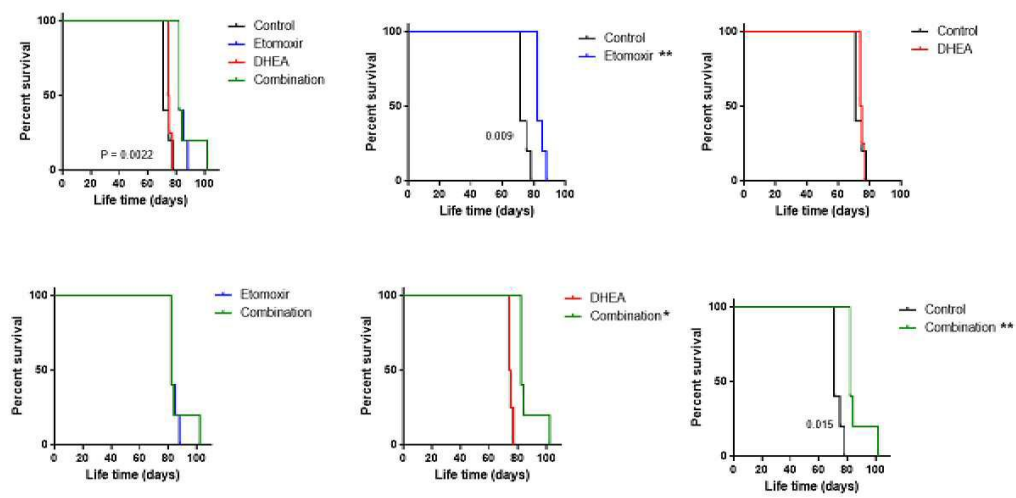
도면5b



도면5c



도면5d



도면5e

