



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0109926
(43) 공개일자 2016년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/70 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(52) CPC특허분류
A61K 31/70 (2013.01)
A61K 31/155 (2013.01)

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

(21) 출원번호 10-2015-0035203
(22) 출원일자 2015년03월13일
심사청구일자 2015년03월13일

정재호
서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 808(대치동, 한보미도맨션)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인 정안

전체 청구항 수 : 총 8 항

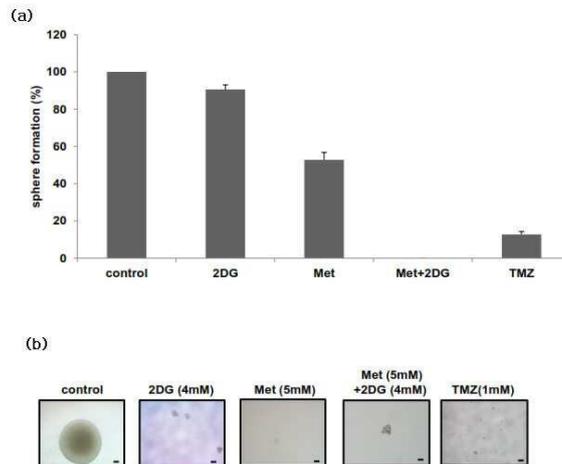
(54) 발명의 명칭 암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor)와 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 억제학적 조성물은 암 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 암을 예방 및/또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

- A61K 9/0053 (2013.01)
- A61K 9/16 (2013.01)
- A61K 9/20 (2013.01)
- A61K 9/48 (2013.01)

(72) 발명자

장중희

서울특별시 마포구 백범로25길 63, 105동 1601호(염리동, 삼성아파트)

김의현

서울특별시 강남구 압구정로39길 58, 64동 404호(압구정동, 구현대아파트)

이지현

경기도 고양시 일산서구 대산로 183, 607동 506호(주엽동, 문촌마을6단지아파트)

김필남

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 26-30, 101동 705호(도룡동, 스마트시티 리버뷰)

최혜지

경기도 안양시 동안구 귀인로 258, 107동 1201호(평촌동, 꿈마을라이프아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2013-R1A1A2006427
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	한국연구재단-일반연구자지원사업(기본연구)
연구과제명	고등급 교종 암세포의 침윤과정에서 교종기질 간엽세포의 역할 규명 및 관련 신호전달 네트워크 구축
기여율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	HI13C1509
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발사업-질병중심중개연구(기반연구)
연구과제명	악성 교종에서 “Seed and Soil” 3차원 상호관계 규명을 통한 관련 표적 발굴 및 악성화 스크리닝 플랫폼 개발
기여율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor) 및 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 글루코즈 흡수 억제제는 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2-DG)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비구아나이드 계열 화합물은 메트포민(metformin)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 글루코즈 흡수 억제제와 비구아나이드 계열 화합물은 1:0.5~100의 중량비로 포함되는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암은 자궁암, 위암, 뇌암, 직장암, 대장암, 폐암, 피부암, 혈액암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 암은 뇌암인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(glioblastoma)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 교모세포종은 종양구(tumorsphere)를 포함하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor)와 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 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.

- [0003] 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 원발성 뇌암과 두개골이나 신체의 다른 부위에서 발생한 암으로부터 전이된 이차성 뇌암을 통칭하는 것이다. 이와 같은 뇌암은 다른 장기에서 발생하는 암과 구분되는 점이 많다. 우선 폐, 위, 유방 등에 생기는 암은 장기별로 한 두 종류에 국한되고, 그 성질이 동일, 유사한 편이다. 그러나 뇌에는 매우 다양한 종류의 암이 발생한다. 예를 들면 교모세포종, 악성신경교종, 임파선종, 배아세포종, 전이성 종양 등 다양하다.
- [0004] 이 중에서도 신경교종 (glioma), 특히 교모세포종 (glioblastoma, GBM)은 가장 악성이고 공격적이어서 예후가 매우 좋지 않으며, 진단 후 평균 생존 기간이 약 2년을 넘지 못하는 매우 치명적인 질환이다. 뇌세포와 종양세포 간의 경계가 분명하지 않기 때문에, GBM을 외과적으로 완전히 제거하는 것은 거의 불가능하다.
- [0005] 암 치료 분야에서의 발전에도 불구하고, 현재 선두적인 치료는 수술, 방사선 및 화학요법 등이 주종을 이룬다. 화학요법적인 접근은 전이성이거나 특별히 공격적인 암을 치료하는데 주로 사용된다. 현재 임상적으로 사용되는 대부분의 암 화학요법 약제는 세포 독성제(cytotoxic agent)이다. 세포 독성제는 빠른 성장을 보이는 세포들에 해를 입히거나, 살해함으로써 작용하게 된다.
- [0006] 이상적인 세포 독성제는 암 및 종양 세포들에 특이성을 가지고 있는 반면, 정상 세포에는 영향을 미치지 않아야 한다. 그러나, 이러한 이상적인 세포 독성제는 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, 암 세포에게는 세포 독성이 있는 물질들이 매우 바람직하다. 사실, 최근의 많은 연구들이 종양 세포들(tumor cells)의 증식을 특히 억제할 수 있는 대안적인 항암 물질을 개발하는데 초점이 맞춰져 왔다.
- [0007] 따라서, 외과적 치료 이외의 화학적 치료제의 개발이 시급한 실정이지만, 아직 효과적인 치료법이 개발되지 않아서, 이에 대한 연구와 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 일 목적은 암 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 암을 예방 및/또는 치료할 수 있는 약제학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 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

- [0010] 본 발명자들은 연구 결과, 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor)인 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2-DG)과 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물인 메트포민(metformin)을 병용 투여할 경우, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 암을 예방 및/또는 치료할 수 있음을 확인해 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 구체적으로, 본 발명은 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor) 및 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 글루코즈 흡수 억제제는 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2-DG)일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 비구아나이드 계열 화합물은 메트포민(metformin)일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 글루코즈 흡수 억제제와 비구아나이드 계열 화합물은 1:0.5~100의 중량비로 포함될 수 있고, 바람직하게는 1:0.5~20, 또는 1:0.5~10, 또는 1:1~5의 중량비로 포함될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 암은 자궁암, 위암, 뇌암, 직장암, 대장암, 폐암, 피부암, 혈액암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 뇌암일 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 뇌암은 교모세포종(glioblastoma, GBM)일 수 있다. 여기서, 상기 교모세포종은 종양구(tumorsphere)를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 추가적으로 다른 항암제와 병용투여할 수 있으며, 이를 통

하여 효과적으로 암 세포를 치료할 수 있고, 나아가서는 암의 재발 또는 전이를 억제하는 약제학적 조성물로도 사용될 수 있다.

[0017] 한편, 본 발명의 약제학적 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 약제학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 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, 유회제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0018] 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, 충진제, 향응집제, 유회제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0020] 본 발명의 약제학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 암 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 암을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1의 (a) 내지 (c)는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 2의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 교모세포종 종양구 형성능 분석(GBM sphere formation assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 침윤 분석(Three-dimensional invasion assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 ¹⁸F-플루오로디옥시글루코스 양전자 방출 단층 촬영(¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography) 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 유전자 발현 마이크로어레이 및 분류 비교(Gene expression microarray and class comparison) 결과를 나타낸 것이다.

도 6의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 동소 이종이식 동물 모델(Orthotopic xenograft animal

model)에서 신경교종발생(gliomagenesis)과 종양 세포의 침윤을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 GBM 종양구 세포-이식 마우스의 생존 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8의 (a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 세포와 교모세포종 세포의 형상 사진을 나타낸 것이고, (b)는 MCF7 세포주에 대하여 각 처리 조건별 종양구의 크기 변화를 나타낸 것이다.

본 발명에서 각 도면에 기재된 'control'은 대조군을 의미하고, '2DG'는 2-탈산포도당(2-deoxyglucose), 'M' 또는 'MET'는 메트포민(metformin), 'TMZ'는 테모졸로마이드(Temozolomide)를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 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.

[0024] 실시예

[0025] 교모세포종(glioblastoma, GBM) 환자로부터 단일세포의 분리

[0026] 연세대학교 세브란스 병원으로부터 교모세포종 환자의 시료를 채취하였다. 얻어진 시료로부터 종양구 세포의 분리는 아래의 방법에 의하여 수행되었다.

[0027] 우선 채취한 시료에 대하여 기계적 분리 방법을 이용하여 종양을 제거한 뒤 2시간 이내에 세포를 분리하였다. 구체적으로는 채취한 시료를 Dulbecco 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle medium: 영양분 혼합 F-12(DMEM/F-12; Mediatech, Manassas, VA, USA))에서 메스를 이용하여 분리 및 분쇄한 뒤 70µm 구경의 나일론 메쉬 세포 여과기(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)를 통과시켰다. 이 후, 여과기를 통과한 세포 현탁액을 DMEM/F-12를 이용하여 2번 세척한 뒤, 이를 B27(1X; Invitrogen, San Diego, CA, USA), 20ng/ml의 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF; Sigma, St. Louis, MO, USA), 20ng/ml의 표피성장인자(EGF; Sigma) 및 50U/ml 페니실린/50mg/ml 스트렙토마이신이 혼합된 완전 배지(DMEM/F-12)에서 배양하였다. 이하의 실험에서는 이렇게 얻어진 GBM 종양구 세포로, GSC11 및/또는 TS13-20을 사용하였다.

[0028] 렌티바이러스 벡터 형질도입 및 발현

[0029] 세포 계수를 위하여, 앞서 분리한 GBM 종양구 세포를 완전 배지에서 배양한 뒤, GFP-발현 렌티바이러스 상층액을 첨가하여 GFP-GBM 종양구 세포를 준비하였다. 이 후, 폴리브렌(Sigma)을 최종 농도가 8µg/ml가 되도록 첨가한 뒤, 18시간 동안 배양하였다. 상기한 렌티바이러스 감염 후, 세포를 신선한 성장 배지에 첨가하고, 일반적인 방법에 따라 배양하였다. 비감염된 세포를 제거하기 위하여, 세포에 1mg/ml의 푸로마이신(Life Technologies Korea, Seoul, Korea)을 처리하여, 최종적으로 안정된 GFP-GBM 종양구 세포를 얻었다.

[0030] 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay)

[0031] GBM 종양구 세포를 용해 버퍼(lysis buffer)(50mM Tris-Cl, pH 8.0, 150mM Nonidet P-40, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, phosphate inhibitor cocktail solution, protease inhibitor cocktail solution)를 이용하여 용해시킨 뒤, 14,000rpm에서 15분간 원심 분리하고, 얻어진 상층액을 웨스턴 블롯 분석을 위한 세포 추출물로 사용하였다.

[0032] 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 위하여, 샘플을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 120V로 전기영동시켜 분리한 뒤, 니트로셀룰로오스 막에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막은 5% 탈지유가 포함된 PBS/트윈 용액으로 1시간 동안 차단(blocking)한 후, 1차 항체(1:1000 희석)를 3시간 동안 반응시킨 뒤, 2차 항체(1:3000 희석)를 1시간 동안 반응시켰다. 시각화를 위해서는 Amersham Bioscience에 기재된 화학 발광법을 이용하였다.

[0033] 웨스턴 블롯 분석은 AMPK(adenosine monophosphate-activated protein kinase)와 mTOR(mammalian target of

rapamycin)-관련 단백질(랩터(Raptor), 릭터(Rictor)), 네스틴, CD133, Oct3/4, β -액틴, 포도플라닌, Sox-2, Notch1 및 Notch2와 같은 줄기세포성 마커, 스네일(snail), Zeb1, β -카테닌 및 N-카데린과 같은 상피간엽이행(EMT) 관련 마커를 이용하여 수행하였고, 그 결과는 도 1의 (a) 내지 (c)에 나타내었다.

[0034] 도 1의 (a)에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 병용 투여한 경우 특히 mTOR과 그 관련 단백질(랩터)의 발현이 억제된 것을 볼 수 있었고, (b) 및 (c)에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 병용 투여한 경우 줄기세포성 유전자의 경우 하향조절(down-regulation)된 것을 볼 수 있었다.

[0035] 이를 통하여 2-DG와 메트포민을 병용 투여하는 경우 이들을 각각 투여한 경우보다 세포 사멸에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0036] **GBM 종양구 형성능 분석(GBM TS formation assay)**

[0037] DMEM/F-12에 2% 1XB27, 20ng/ml의 0.02% bFGF, 20ng/ml의 0.02% EGF 및 50U/ml 페니실린/50mg/ml 스트렙토마이신(100x, Gibco, Invitrogen Korea, Seoul, South Korea)을 첨가한 배지에 GSC11 및 TS13-20 세포를 배양하여 종양구를 획득한 뒤, 종양구들을 각각 다른 조건 하에서 3주간 배양하였다. 역위상차 현미경(IX71 Inverted Microscope; Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 배양된 GBM 종양구의 형상과 사이즈를 관찰하고, 대조군 대비 각 종양구의 형성능(%)을 평가하여 그 결과를 도 2의 (a)에 그래프로 나타내었다. 또한, 배양 후 세포의 사진은 디지털 카메라(DP70 Digital Microscope Camera; Olympus)를 이용하여 DP 컨트롤러 소프트웨어(Olympus)로 촬영하여 그 결과를 도 2의 (b)에 나타내었다.

[0038] 도 2의 (a) 및 (b)에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우 종양구 형성능이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 2-DG와 메트포민을 병용 투여하는 경우 이들을 각각 투여한 경우보다 세포 사멸에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0039] **3차원 침윤 분석 모델(Three-dimensional invasion assay model)**

[0040] 스페로이드(spheroid)에서 키운 GFP 안정 GSC11 세포를 폴리디메틸실록산(PDMS)-기반 마이크로-웰(마이크로-웰의 직경 및 깊이: 6mm, 500 μ m)을 이용하여 콜라겐 I 매트릭스에서 배양하였다. 마이크로-웰을 1% 폴리(에틸렌이민)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 10분간 처리한 뒤, 0.1% 글루타르알데히드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 30분간 처리하고, PBS로 밤새 세척하였다. 4mg/ml의 콜라겐 I 매트릭스는 고농도의 쥐 꼬리 콜라겐 I (BD Bioscience, CA, USA)를 이용하여 일반적인 방법에 따라 제조하였다. 10x 인산 완충 식염수(PBS), 1N NaOH, 무균 dH₂O 및 콜라겐 I 을 목적하는 농도가 되도록 혼합하였다. 혼합 용액은 사용 전까지 4°C에서 혼합 및 유지시켰다. 이 후, 10 μ l의 콜라겐 I 용액(4mg/ml)을 마이크로-웰에 피펫팅하고, 단일 G-GSC11 스페로이드를 배양 플레이트로부터 콜라겐 I 매트릭스로 이동시킨 뒤 10 μ l의 콜라겐 I 용액(4mg/ml)을 상기 G-GSC11 스페로이드에 떨어뜨렸다. 플랫폼은 37°C 및 5% CO₂ 분위기 하에서 30분간 인큐베이션하였다. 세포 생존률의 분석은 콜라겐 매트릭스에 이식하기 전에 G-GSC11 스페로이드를 8 μ M의 에티뉼 호모다이머-1(Invitrogen Korea, Seoul, South Korea)을 이용하여 37°C에서 30분간 염색시켜 수행하였다. 완전 젤화 후에는, DMEM/F-12에 2% 1XB27, 20ng/ml의 0.02% bFGF, 20ng/ml의 0.02% EGF, 1% 항생-항진균성 용액(100x, Gibco, Invitrogen Korea, Seoul, South Korea)를 첨가한 배양 배지의 슈퍼레이어(superlayer)를 첨가하였다. 각 약물 효과를 확인하기 위하여, 각 약물의 최종 농도를 고려하여 약물을 배지에 혼합하였다. 약물 혼합 후 72시간이 경과한 시점에서 G-GSC11 스페로이드의 형상을 관찰하기 위하여 역위상차 현미경(Nikon Ti-E, Tokyo, Japan)으로 관찰하여 그 결과를 도 3의 (a)에 나타내었다. 또한, GBM 종양구의 침윤능(invasiveness)은 하기 식을 이용하여 측정해 그 결과를 도 3의 (b)에 나타내었다. 단, 데이터는 이미지 분석은 소프트웨어 이미지J(NIH, Bethesda, Maryland, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0041] 침윤능(%) = (특정 시간에서의 가려진 면적/초기 스페로이드 면적) X 100

[0042] 도 3의 (a) 및 (b)에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우 침윤 억제 효과가 현저히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

[0043] ¹⁸F-플루오로디옥시글루코스 양전자 방출 단층 촬영술(¹⁸F-fluorodeoxyglucose(FDG) positron emission tomography)

[0044] GBM 세포주를 12웰 플레이트에 3X10⁵ cells/웰의 농도가 되도록 첨가한 뒤 24시간 배양하고, 2-DG, 메트포민, 이들의 조합과 테모졸로마이드를 각각 첨가한 뒤 추가로 3일 동안 배양하였다. 이 후 배지를 ¹⁸F-FDG의 0.5uCi가 첨가된 글루코스 무첨가 DMEM 배지(Gibco)로 교체한 뒤, 15분간 배양하고, 인산 완충 식염수를 사용하여 3번 세척한 뒤, 각각의 웰에 0.1ml의 라이시스 버퍼(lysis buffer)를 첨가하였다. 용해된 세포를 채취하여, 감마-카운터(gamma-counter, Wallac 148 Wizard 3; Perkin Elmer)를 이용해 방사능의 정도를 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 측정된 방사능의 정도는 단백질 함량으로 정규화(normalization)하였다.

[0045] 도 4에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우, FDG 흡수 비율이 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 이를 통하여 2-DG와 메트포민을 병용 투여하는 경우 이들을 각각 투여한 경우보다 세포 사멸에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0046] 유전자 발현 마이크로어레이 및 분류 비교(Gene expression microarray and class comparison)

[0047] Qiagen miRNA 키트를 이용하여 일반적인 방법에 따라 RNA 전체(total RNA)를 추출하였다. 발현 프로파일은 일루미나 휴먼HT-12 v24 익스프레션 비드칩(Illumina, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 수행되었다. 로우 데이터(raw data)는 일루미나 게놈스튜디오 v2011.1(Gene Expression Module v1.9.0)에서 공급된 소프트웨어를 이용하여 추출하였다. 데이터는 로그(logarithm)에 의해 변형되었고, 분위수법(quantile method)에 의해 정규화되었다. 접합 연결(adhesion junction), 부착성 물질(CAMs), ECM-리셉터 상호작용, 초점접착역(focal adhesion), 액틴 세포골격의 조절; 소포 수송에서 SNARE 상호작용; TGF-베타 신호 전달과 관련된 유전자들(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) 패쓰웨이 유전자 세트에 의해 정의)을 필터링 및 분석하였다. 모든 분석은 리차드 시몬 박사에 의해 개발된 BRB-어레이툴스(BRB-ArrayTools)와 BRB-어레이툴스 디벨롭먼트 팀을 이용하여 수행되었다. 무선 분산 t-테스트(random-variance t-test)를 이용하여 두 분류군(대조군 및 2-DG와 메트포민 병용 투여군) 사이에서 다르게 발현되는 유전자를 확인하였고, 유전자들은 p 값이 0.001 이하이면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 또한, 두 군 사이 발현 프로파일의 차이를 비교하기 위하여, 각 군에 일치하는 어레이 레벨을 순열(permutation)로 배치함으로써 군 사이 차이가 있는 발현 프로파일에 관한 글로벌 테스트를 수행하였다. 각각의 순열을 위하여, p 값을 재산출하였고, p 값이 0.001일 때의 유전자 중요도의 수를 나타내었다. 실제 얻어진 데이터에서 적어도 중요한 유전자만큼 주어지는 순열들의 비율은 글로벌 테스트의 중요도 레벨로 평가하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0048] 도 5는 유전자 세트의 유전자 발현 히트맵을 나타낸 것으로, 2-DG와 메트포민을 병용 투여한 경우, 대조군에 비하여 상피 간엽 전이 과정과 관련된 유전자들이 하향조절(down-regulated)된 것을 볼 수 있었다.

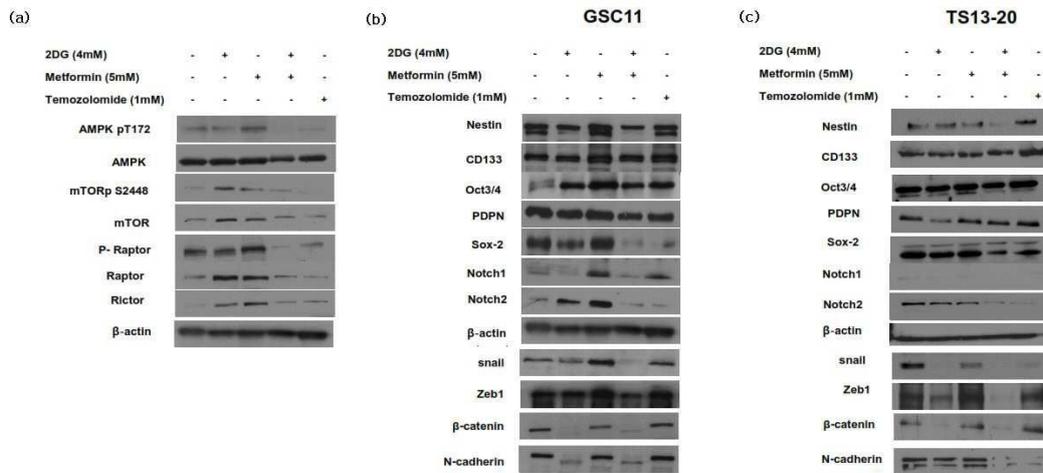
[0049] 동소 이종이식 동물 모델 (Orthotopic xenograft animal model)

[0050] 4-8 주된 수컷 무흉선 누드 쥐(Central Lab Animal Inc., Seoul, Korea)를 하기 실험에 사용하였다. 수컷 쥐를 무균의 조건 하에서 마이크로-아이솔레이터 케이지(micro-isolator cages)에서 기르며, 바람직한 건강 상태를 유지하기 위하여 실험 1주일 전까지 관찰하였다. 빛, 온도 및 습도는 중앙에서 조절하였다. 그리고 졸레틸®(Zoletil®)(30 mg/kg; Virbac Korea, Seoul, South Korea)과 자일라진(xylazine)(10 mg/kg; Bayer Korea, Seoul, South Korea)을 수컷 쥐의 복강 내에 주입하여 마취시킨 뒤, 가이드-스크류 시스템(guide-screw system)을 이용하여 누드 쥐의 오른쪽 전두엽에 GBM 종양구를 이식하였다. 해밀턴 시린지(Hamilton syringe, Dongwoo Science Co., Seoul, South Korea)를 이용하여 5 X 10⁵의 GBM 종양구 세포를 4.5mm의 깊이로 수컷 쥐에 삽입하였다. GBM 종양구 세포를 멀티플 마이크로-주입 시린지 펌프(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 이용하여 0.5μl/min의 속도로 3마리의 수컷 쥐에 동시에 주입하였다. 그 후, 500mg/kg의 2-DG, 500mg/kg의 메트포민, 이들의 조합과 66.7mg/kg의 테모졸로마이드를 상기한 수컷 쥐의 복강에 매일 주입하였다. 수컷 쥐의 몸무게를 매일 측정하고, 최초 무게보다 15% 이상이 감소하였을 경우, 안락사시켰다. 쥐가 죽으면, 그 뇌를 조심히 제거한 뒤, H/E 염색을 이용하여 신경교종발생(gliomagenesis)를 관찰하고, Zeb1 염색을 이용하여 종양 세포 침윤을 관찰하였으며, 그 결과는 도 6의 (a) 및 (b)에 나타내었다.

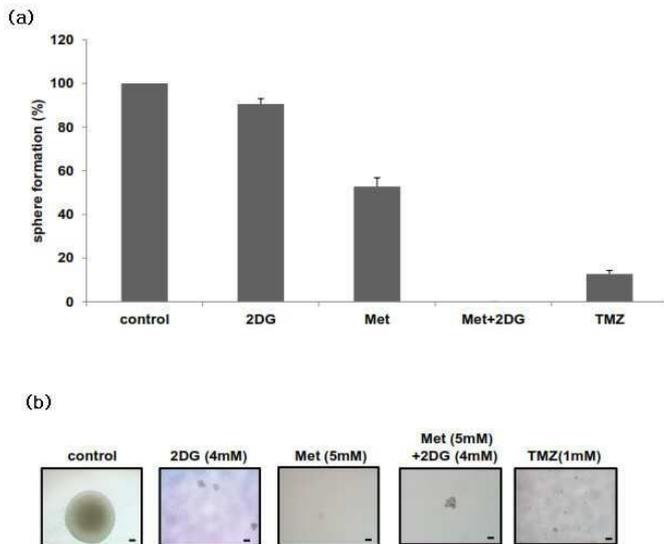
- [0051] 도 6의 (a)에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우 종양구의 크기가 현저히 감소한 것을 볼 수 있다.
- [0052] 또한, 도 6의 (b)에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우 교모세포종의 침윤능이 현저히 감소한 것을 볼 수 있었고, 테모졸로마이드를 처리한 경우보다도 침윤 억제 효과가 뛰어난 것을 볼 수 있었다.
- [0053] **통계적 분석(Statistical analysis)**
- [0054] Kaplan-Meier 평가를 이용하여 상기 얻어진 GBM 종양구 세포-이식 마우스의 생존 분석을 수행하였다. 단 데이터는 평균±표준편차로 나타내었고, 모든 통계적 분석과 그래핑은 SPSS 버전 18.0KO 소프트웨어(SPSS Korea, Seoul, Korea)를 이용하여 수행되었다. 그 결과는 도 7에 그래프(P<0.001)로 나타내었다.
- [0055] 도 7에서 보는 바와 같이, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우 쥐의 생존 기간이 증가한 것을 볼 수 있다.
- [0056] **유방암(Breast Cancer)과 교모세포종(glioblastoma)에서의 효과 비교 분석**
- [0057] DMEM/F-12에 2% 1XB27, 20ng/ml의 0.02% bFGF, 20ng/ml의 0.02% EGF 및 50U/ml 페니실린/50mg/ml 스트렙토마이신(100x, Gibco, Invitrogen Korea, Seoul, South Korea)를 첨가한 배지에 유방암 세포주 MCF7과 MDA-MB 231과, 교모세포종 GSC11 세포를 배양하였다. 상기한 세포들을 각각 다른 조건 하에서 1주간 배양시켰고, 역위상차 현미경(IX71 Inverted Microscope; Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하여 배양 후 얻어진 종양구의 형상 사진을 도 8의 (a)에 나타내었고, MCF7 세포주에 대하여 종양구 사이즈를 측정하여 그 결과를 도 8의 (b)에 나타내었다. 단, 배양 후 세포의 사진은 디지털 카메라(DP70 Digital Microscope Camera; Olympus)를 이용하여 DP 컨트롤러 소프트웨어(Olympus)로 촬영하여 나타낸 것이다.
- [0058] 도 8의 (a)에서 보는 바와 같이, MDA-MB 231의 경우 종양구를 형성하지 못하였으나, 2-DG와 메트포민을 단독으로 처리한 경우와 대비하여 이들을 병용 투여한 경우 유방암 세포의 크기 감소 효과가 미미한 것을 볼 수 있었다.
- [0059] 한편, MCF7의 경우, 2-DG와 메트포민의 병용투여로 인한 종양구 크기 감소 효과가 교모세포종인 GSC11에서와 비교할 때 매우 미미한 것을 볼 수 있었다.
- [0060] 더욱이, 도 8의 (b)에서 보는 바와 같이, MCF7의 경우 2-DG와 메트포민을 병용투여한 경우 오히려 2-DG를 단독으로 처리한 경우보다 종양구의 크기가 증가한 것을 볼 수 있다.
- [0061] 이를 통해 본 발명에 따른 2-DG와 메트포민을 포함하는 약제학적 조성물은 암 중에서도 특히 뇌암, 바람직하게는 교모세포종의 예방 또는 치료에 효과적인 것을 알 수 있다.

도면

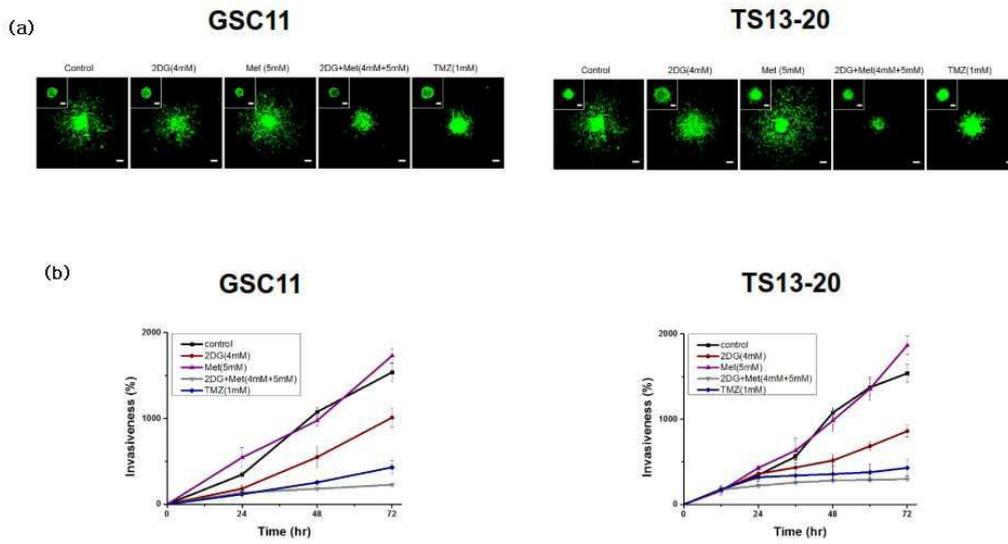
도면1



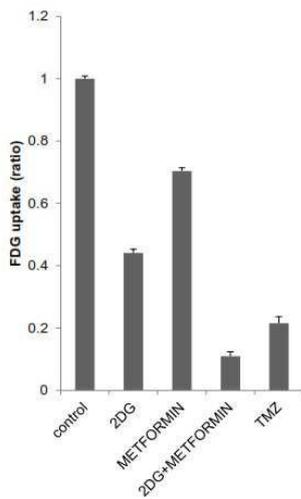
도면2



도면3



도면4



도면8

