



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0129148
(43) 공개일자 2016년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) A61K 36/23 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/37 (2013.01)
A61K 36/23 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0060456
(22) 출원일자 2015년04월29일
심사청구일자 2015년04월29일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
권택규
대구광역시 달서구 송현로7길 41 103동 1002호
(상인동, 월촌보성화성타운)
민경진
경상북도 칠곡군 왜관읍 평장3길 47 202동 1201호
(왜관리, 대동다숲아파트)
한민애
대구광역시 동구 율하동로15길 52 (율하동)
(74) 대리인
특허법인태백

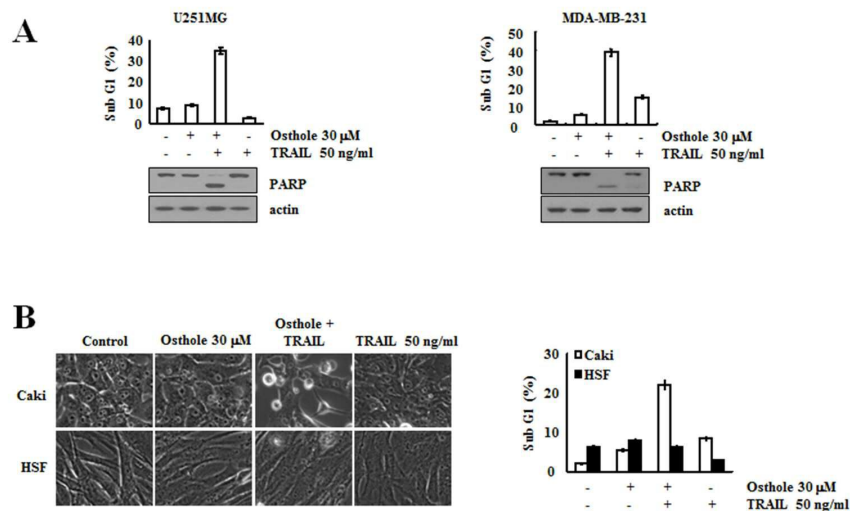
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 오스톨과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물과 오스톨(Osthole)을 유효성분으로 포함하는 트레일의 항암효과 증진용 약학 조성물 및 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 암세포 사멸 증진 방법에 관한 것으로, 오스톨과 트레일을 신장암, 유방암 및 신경교종 중 어느 하나의 암세포에 병용투여한 경우 세포사멸 단백질의 억제자(inhibitor of apoptosis protein, IAP)인 c-FLIP(L)가 감소되며 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되므로 신장암, 유방암 및 신경교종의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 38/191 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A5A2010008

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구지원센터(의과학연구센터) 사업

연구과제명 비만매개질환연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 오스톨 1 내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 암은 신장암, 유방암 및 신경교종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

오스톨(Osthole)을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 5

오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 암세포는 신장암, 유방암 및 신경교종 세포로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암 효과를 증진시킬 수 있는 트레일 보조용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대한민국 통계청의 분석에 따르면 암은 대한민국의 제 1의 사망원인으로 남성이 31.7%, 여성이 22.5%를 차지하며 전체 인구의 31.7%가 암으로 사망한다.

[0003] 암을 치료하기 위한 방법으로는 수술을 통한 치료, 방사선 치료 그리고 항암제 투여를 통한 치료 등이 있으나 이러한 치료방법들은 부작용이 수반되거나, 암의 진행 정도에 따라 시술이 제한적으로 적용된다. 특히, 대부분의 항암제는 분열이 왕성한 세포의 세포주기를 멈추게 하고 사멸케 하는 메커니즘으로 작동하기 때문에 세포 이외에도 정상적으로 분열하는 세포를 공격해서 탈모, 식욕부진 그리고 백혈구 감소로 인한 면역력 저하 등의 부작용을 동반한다. 이로 인해 거듭된 연구결과 양적인 측면에서는 그 종류가 늘었지만, 질적인 측면에서는 큰 변화가 없었다.

[0004] 최근 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 표적항암제의 개발이 활발히 일어나고 있으며, 현재까지 18종 이상의 표적항암제가 개발되어 임상에 적용 중이고, 200여종 이상이 임상실험 중이다. 하지만 이러한 표적항암제는 같은 종류의 암이라도 특정 표적인자가 나타난 환자에게만 효과가 있다는 한계가 있으며, 표적치료제는 장기간에 걸쳐서 투여해야 하기 때문에 내성을 유발하는 문제가 있다. 이를 보완하기 위해서 표적치료제를 기존의 강력한 항암제와 병합하는 카테일 요법과 여러 표적인자를 동시에 공격함으로써, 단시간에 암을 제거하는 단일약물을 사용하는 방법 등이 있는데, 이것 또한 심각한 부작용을 유발할 위험성을 내포하고 있다.

[0005] 트레일(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)은 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor, TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로서 트레일이 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 죽음 수용체(death receptor)에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려짐에 따라 매우 효과적인 항암치료제이다.

[0006] 그러나 많은 암세포는 죽음 수용체의 감소와 세포의 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L)), B-세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL) 또는 골수성 백혈병 세포-1(myeloid cell leukemia- 1, Mcl-1)와 같은 항-세포 사멸 단백질을 증가시키는 다양한 매커니즘을 통하여 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.

[0007] 따라서 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 10-2014-0009045호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기 종래의 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암 효과를 증진시킬 수 있는 트레일 보조용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 오스톨(Osthole)을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물과 오스톨(Osthole)을 유효성분으로 포함하는 트레일의 항암효과 증진용 약학 조성물 및 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 암세포 사멸 증진 방법에 관한 것으로, 오스톨과 트레일을 신장암, 유방암 및 신경교종 중 어느 하나의 암세포에 병용투여한 경우 세포사멸 단백질의 억제자(inhibitor of apoptosis protein, IAP)인 c-FLIP(L)가 감소되며 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되므로 신장암, 유방암 및 신경교종의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

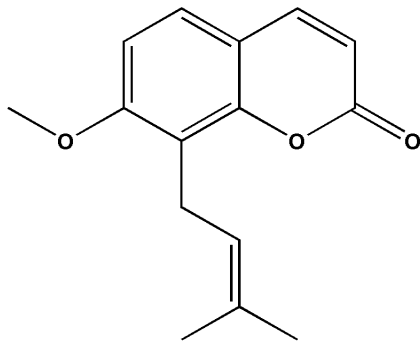
도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 트레일에 의해 유도된 사람 신장암 세포의 세포사멸에 관한 오스톨의 민감성을 확인한 결과이고,
 도 2는 트레일에 의해 유도된 사람 신장암 세포, 사람 유방암 세포 및 사람 신경교종 세포의 세포사멸에 관한 오스톨의 민감성 및 사람 피부 섬유세포에 대한 오스톨의 영향을 확인한 결과이고,
 도 3은 오스톨에 의한 c-FLIP(L)의 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 발명자들은 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 오스톨(osthole)과 트레일을 신장암 세포에 병용투여한 경우 세포사멸 단백질의 억제자 (inhibitor of apoptosis protein, IAP)인 c-FLIP(L)이 감소되며 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대될 뿐더러, 사람 유방암 세포 및 사람 신경교종 세포에서도 세포사멸이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 상기 오스톨(osthole)은 하기 화학식 1로 표시되며 미나리과 페우세디눔 오스트루툼 코치(Peucedanum ostruthium Koch, Imperatoria ostruthium L.)의 뿌리줄기에 포함된 쿠마린 중 하나로, 오스테놀(osthenol)이 디아조메탄(diazomethane)으로 메틸화되어 생성된다.

화학식 1



- [0017]
- [0018] 따라서, 본 발명은 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 따르면, 도 1과 같이 신장암 세포인 Caki 세포에 오스톨과 트레일을 병용처리한 경우 세포사멸이 증가하며, 항암제로 인한 DNA 손상의 회복을 도와 항암제 효과를 떨어뜨리는 폴리(ADP-리보오스)중합 효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 분열이 증가되는 것을 확인할 수 있다.
- [0020] 더불어 Caki 세포의 모양은 변화가 없었지만, 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편의 손상을 확인할 수 있으며, 세포사멸을 유도하는 카스파제-3(caspase-3)의 활성이 증가된 것을 확인할 수 있다. 따라서 상기 결과로부터 오스톨은 Caki 세포에서 트레일에 의해 유도되는 세포사멸의 민감성을 증가시키는 것이 확인되었다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 도 2와 같이, 신장암 세포 외에도 유방암 및 신경교종에 오스톨과 트레일을 병용 처리하면 세포사멸이 증가되는 것을 확인할 수 있다.
- [0022] 상기와 같은 오스톨의 트레일 민감성 증가는 도 3과 같이, 세포내 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L))의 발현을 억제하여 발생한다는 것을 확인할 수 있다.
- [0023] 상기 약학 조성물은 오스톨 1 내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 암은 신장암, 유방암 및 신경교종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0025] 더불어 본 발명은 오스톨(Osthole)을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

- [0027] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0029] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0030] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 오스톨 0.4 mg/m²/day 내지 10.0 mg/m²/day 및 트레일 0.05 mg/day 내지 10.0 mg/day의 양을 주 2회 1 내지 4주기로 투여할 수 있다.
- [0032] 또한, 이러한 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물을 구성하는 오스톨 및 트레일은 이미 다른 의학적 용도에 처방되고 있어 안전성이 확보되어 있는 물질이다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0035] 또한 본 발명은 오스톨(Osthole)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 암 세포는 신장암, 유방암 및 신경교종 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0040] <참고예 1> 시약 및 오스톨 준비
- [0041] 항-죽음 수용체 5(anti-death receptor 5, anti-DR5), 항-B-세포 림포마2(anti-B-cell lymphoma2, anti-Bcl2), 항-c세포사멸 단백질의 억제자2(anti-cinhibitor of apoptosis protein2, anti-cIAP2), 항-B-세포 림포마 엑스트라 라지(anti-B-cell lymphoma-extra large, anti-Bcl-xL), 항-골수성 백혈병 세포-1(anti-myeloid cell leukemia- 1, anti-Mcl-1), 항-세포사멸 단백질의 X-링크된 억제자(anti-X-linked inhibitor of apoptosis protein, anti-XIAP), 항-폴리(ADP-리보오스)중합효소(anti-Poly(ADP-ribose) polymerase, anti-PARP) 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.
- [0042] 항-c-FLIP(L) 항체는 알렉시스 코퍼레이션(ALEXIS Corporation, San Diego, CA)으로부터 구입하였으며, 항-Bim 항체는 밀리포어 코퍼레이션(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)으로부터, 항-액틴 항체는 시그마(Sigma, St. Louis, MO)로부터 각각 구입하였다.
- [0043] 또한 재조합 사람 트레일(TRAIL)은 코마 바이오테크(KOMA Biotech, Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

- [0044] 오스톨은 에이비캠(Abcam, Cambridge, MA)에서 구입하여 사용하였다.
- [0046] <실험예 1> 실험 방법
- [0047] 1. 세포 준비
- [0048] 1) 세포배양
- [0049] 신장암 세포인 Caki, 사람 유방암 세포인 MDA-MB-231 및 사람 신경교종 세포인 U251MG 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며, 사람 피부 섬유세포(human skin fibroblast, HSF)는 영남대학교(Yeungnam University, Korea)의 Dr. T.J. Lee로부터 받아 사용하였다.
- [0050] 상기 세포들을 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 20mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰 산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES) 버퍼 및 100 μ g/ml 겐타마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다.
- [0051] 2) 오스톨(osthole) 처리
- [0052] 오스톨은 DMSO에 30 mM로 녹여서 세포 배양액에 각 실험별 사용 농도로 직접 처리하였다.
- [0054] 2. 웨스턴 블롯 분석
- [0055] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 각각의 세포를 차가운 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척하였다. 그런 후 100 μ M 페닐메틸설폰닐 플로라이드(phenylmethanesulfonylfluoride, PMSF), 10 μ g/ml 류펩틴(leupeptin), 10 μ g/ml 펩스타틴(pepstatin) 및 2 mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)로 구성된 프로테아제(protease) 억제제를 첨가한 50mM 트리스-HCl(tris-HCL, pH 7.4), 1% 노닐 페녹시폴리에톡시에탄올-40(nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40, NP-40), 0.25% Na-데옥시콜레이트(deoxycholate), 150mM NaCl, 1mM Na₃VO₄ 및 1mM NaF로 완충된 방사선 면역 침전(Radioimmunoprecipitation, RIPA) 버퍼를 사용하여 아이스 위에서 용해하였다.
- [0056] 용해물을 4℃에서 10,000xg의 속도로 10분간 원심분리한 후 상등액을 수집하였다.
- [0057] 웨스턴 블롯 분석은 웨스턴 블롯팅 키트 제조사의 설명서에 따라 수행하였으며, 단백질을 소듐도데실설파이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)으로 분리하고 임모빌론-P(immobilon-P) 막으로 옮겼다. 그 후 향상된 화학 발광 플러스 웨스턴 블롯팅 검출 시스템(enhanced chemiluminescence plus western blotting detection system)을 이용하여 특이적 단백질을 검출하였다.
- [0059] 3. 유동세포계수분석(Flow cytometry analysis)
- [0060] 유동세포계수 분석을 위해, 100 μ l PBS를 세포에 첨가하여 재부유시키고 95% 에탄올 200 μ l를 첨가하여 세포를 와류시킨 후 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 12.5 μ g 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase)가 포함된 pH 8.4의 1.12% 시트르산나트륨(sodium citrate) 용액 250 μ l를 첨가하여 재부유시키고 37℃에서 30분간 추가로 인큐베이션하였다.
- [0061] 그 후 세포에 50 μ g/ml 농도의 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI) 용액 250 μ l를 첨가하고 실온에서 30분간 세포 DNA를 염색시켰다. 염색된 세포는 유동세포계수분석기(Fluorescence activated cell sorter, FACS)를 통하여 형광 활성화된 세포를 분류하여 상대적인 DNA 함량을 분석하였으며, 적색 형광 강도를 통하여 확인할 수 있었다.
- [0063] 4. 4', 6'-다이아미디노-2-페닐인돌 염색(4', 6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, DAPI)을 이용한 핵 응축과 분열 확인

[0064] 세포의 핵을 확인하기 위해, 유리 슬라이드 위에서 세포를 1% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 실온에서 30분간 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 300nM 4',6'-다이아미디노-2-페닐인돌 용액(Roche, Mannheim, Germany)을 첨가하여 추가로 5분간 고정하고 핵을 염색한 후 세포를 형광 현미경으로 확인하였다.

[0066] 5. DNA 단편화 분석

[0067] 세포사멸 확인 ELISA plus kit (Boehringer Mannheim; Indianapolis, IN)를 이용하여 오스톨을 단독처리한 세포, 트레일을 단독처리 세포 및 오스톨과 트레일을 병용처리한 세포의 핵 내 단편화된 DNA를 확인하여 세포사멸 정도를 확인하였다.

[0068] 각각의 배양 플레이트를 10분동안 200xg의 속도로 원심분리하고 상등액을 제거한 후 세포 펠렛을 30분동안 용해시켰다. 세포 용해물을 200xg의 속도로 10분간 원심분리하고 세포질 히스톤 관련 DNA 단편이 포함된 상등액을 수집하였으며, 수집된 상등액에 고정화된 항-히스톤 항체를 넣고 인큐베이션하였다.

[0069] 상기 반응물에 퍼옥시다제 기질을 첨가하여 5분간 인큐베이션한 후 분광광도계를 이용하여 405 및 490 nm로 측정하였다.

[0071] 6. Asp-Glu-Val-Asp-ase(DEVDase) 활성 분석

[0072] DEVDase 활성 분석을 위해, 오스톨 처리 세포군과 비처리 세포군에 트레일을 투여하고 각각의 실험군의 세포를 용해시켰다. 세포 용해물 20 μ g을 Asp-Glu-Val-Asp-크로모포어-p-니트로아닐라이드(Asp-Glu-Val-Asp-chromophore-p-nitroanilid, DVAD-pNA) 5 μ M이 포함된 반응 버퍼(1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol) 100 μ l에 넣고 96-well 마이크로미터 플레이트에서 37°C로 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0073] 인큐베이션 후 분광광도계를 이용하여 405nm 흡광도를 측정하였다.

[0075] 7. 형질주입

[0076] pcDNA 3.1-c-FLIP(L) 플라스미드를 리포펙트아민(LipofectAMINE, Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 Caki 세포에 안정적으로 형질주입하였다.

[0077] 48시간 인큐베이션한 후 형질전환된 세포를 선별하여 700 μ g/ml G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된 세포 배양 배지에서 배양하고, 2 내지 3주 후 독립적인 단일 클론을 무작위로 분리하였다. 각각의 개별 클론을 각기 별도의 플레이트에 분주하고 클론 확장 후 각각의 독립적인 클론의 세포에서 c-FLIP(L)의 발현을 면역블롯팅을 통하여 확인하고 실험에 사용하였다.

[0079] <실시예 1> 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 대한 오스톨 민감성 확인

[0080] 오스톨이 트레일이 유도 세포사멸에 어떠한 효과를 나타내는지 사람 신장암세포인 Caki 세포를 이용하여 확인하였다.

[0081] 먼저, 오스톨과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸 유도를 확인하기 위해, FACS분석을 이용한 DNA 함량 측정과 PARP의 분열, caspase-3 기질 확인을 위한 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0082] Caki 세포에 트레일 50ng/ml을 처리한 후 20 또는 30 μ M의 오스톨을 24시간 동안 처리한 세포군 또는 비 처리 세포군의 세포사멸 수준을 유동세포 분석기(FACS)의 Sub-G1 분획 측정을 통하여 확인하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

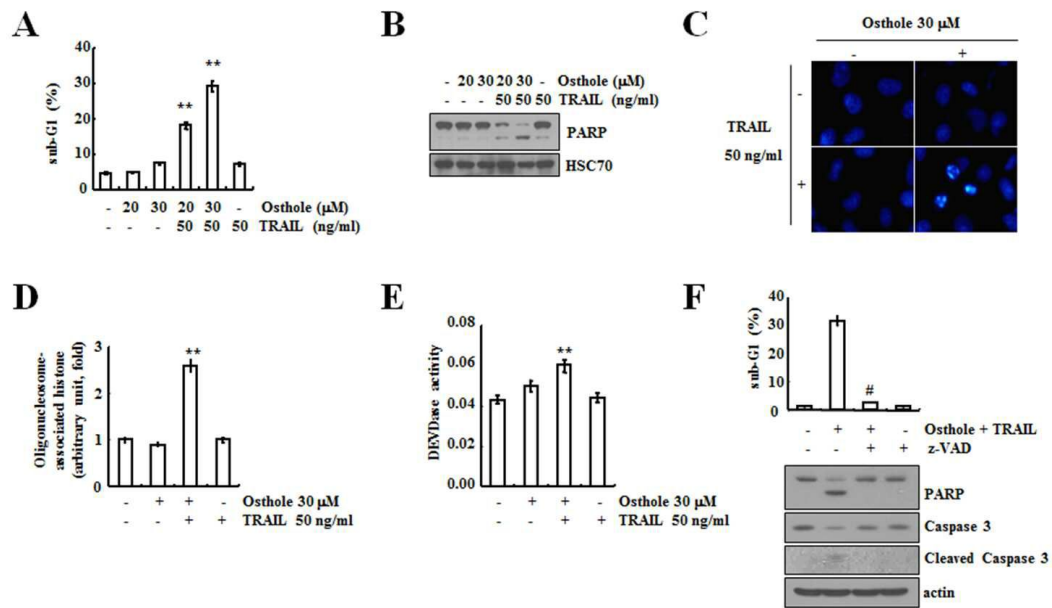
[0083] 도 1A 및 1B와 같이 오스톨 또는 트레일을 단독처리한 경우 세포사멸의 효과가 나타나지 않았으나, 오스톨과 트레일 병용처리의 경우 유의한 세포사멸 증가가 확인되었으며, 웨스턴 블롯 결과에서도 PARP 분열 증가를 확인할 수 있었다.

[0084] 또한 Caki 세포에 30 μ M의 오스톨 처리 또는 비 처리 조건에 50ng/ml 트레일을 24시간 처리 후 4',6'-다이아미디노-2-페닐인돌 염색을 통하여 핵의 응축과 분열을 확인하였다.

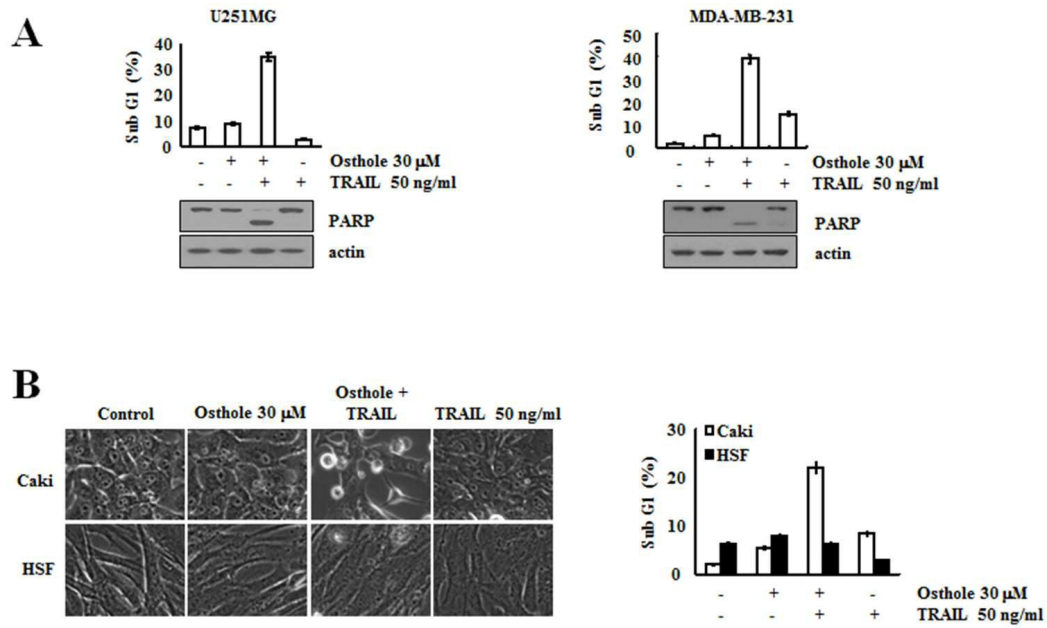
- [0085] 그 결과 도 1C와 같이, 오스톨과 트레일 병용처리에 따른 세포 모양 변화는 없었지만, 도 1D와 같이, 오스톨과 트레일 병용처리에 따른 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편의 손상을 확인할 수 있었다.
- [0086] 상기 실험에 1 중 6의 방법으로 DEVDase를 이용한 카스파제-3의 활성을 분석한 결과, 도 1E와 같이 오스톨과 트레일 병용처리는 카스파제-3 활성을 증가시켰다. 반면, Caki 세포에 20 μ M z-VAD-fmk(z-VAD) 처리 또는 비 처리 조건에서 30 μ M 오스톨과 50ng/ml 트레일을 24시간 병합처리한 후 유동세포분석기(FACS)를 이용하여 측정된 Sub-G1 분획 결과와 PARP 및 액틴의 단백질 발현 수준을 나타낸 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 도 1F의 그래프와 같이 z-VAD-fmk(z-VAD)에 의하여 세포사멸이 유의하게 억제되었다. 또한 웨스턴 블롯 결과에서도 z-VAD 처리에 의한 PARP 분열의 억제가 확인되었다.
- [0088] <실시예 2> 다른 암세포와 정상세포에서 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 대한 오스톨의 민감성 확인
- [0089] Caki 세포 이외의 다른 신장암세포 및 다른 암종에서 오스톨의 항암효과를 확인하기 위해, 사람 유방암세포인 MDA-MB231, 사람 신경교종 세포인 U251MG에서 오스톨과 트레일의 병용 효과를 확인하였다.
- [0090] 각각의 세포주에 50ng/ml 트레일과 30 μ M 오스톨을 24시간 동안 단독 또는 병용처리한 후 유동세포분석기(FACS)를 이용하여 Sub-G1 분획을 측정하고 세포사멸 수준을 확인하였으며, PARP와 액틴 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯을 수행하여 확인하였다.
- [0091] 그 결과 도 2A와 같이, 오스톨과 트레일 병용 처리에 의해 MDA-MB231 및 U251MG 세포에서 세포사멸과 PARP 분열이 유도된 것을 확인하였다.
- [0092] 또한 도 2B를 참고하면, 오스톨과 트레일 병용 처리에도 정상세포인 사람 피부 세포인 HSF에서는 세포수축과 세포사멸이 나타나지 않았으나 Caki 세포에서는 세포수축과 세포사멸이 확인되었다.
- [0093] 상기 결과로부터 Caki 세포뿐만 아니라 다른 암 종의 세포에서도 오스톨에 의한 트레일 민감성 증가 효과를 나타내는 반면, 오스톨과 트레일 병용처리는 정상세포에 안전한 것이 확인되었다.
- [0095] <실시예 3> 오스톨에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘 확인
- [0096] 오스톨에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘을 확인하기 위해, Caki 세포에 30 μ M 농도의 오스톨과 트레일을 24시간 동안 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 Caki 세포에서 Bcl-2를 포함한 세포사멸 관련 단백질, 세포사멸 단백질의 억제자(IAP), c-FLIP(L)과 같은 죽음을 유도하는 신호 복합체(death-inducing signaling complex, DISC) 성분 및 죽음 수용체의 발현 정도를 확인하였다.
- [0097] 그 결과 도 3A와 같이, 오스톨과 트레일을 함께 처리 시 c-FLIP(L)의 발현에 유의한 감소가 확인되었으나 다른 단백질에서는 변화가 나타나지 않았다.
- [0098] 따라서, 오스톨과 트레일 병용처리에 의한 세포사멸에 있어서 c-FLIP(L)의 기능적 역할을 확인하기 위해, c-FLIP(L)이 과발현된 Caki/c-FLIP(L) 세포에 30 μ M 오스톨 처리 또는 비 처리 조건하에 50ng/ml 트레일을 24시간 동안 처리하였다.
- [0099] 그 결과, 도 3B와 같이 대조군인 Caki/vector 세포에서는 오스톨과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 증가하였으며, PARP 분열 유도가 확인되었으나, Caki/c-FLIP(L) 세포에서는 오스톨과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 유도되지 않았다.
- [0100] 상기 결과로부터 c-FLIP(L)의 발현 감소는 오스톨의 트레일 민감성 증가에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.
- [0102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

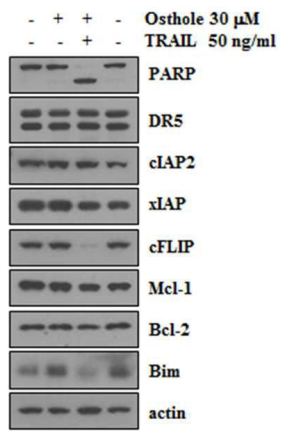


도면2



도면3

A



B

