



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월11일
(11) 등록번호 10-2674191
(24) 등록일자 2024년06월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 38/08 (2019.01)
A61K 39/395 (2006.01)
 - (52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2023.05)
A61K 38/08 (2021.08)
 - (21) 출원번호 10-2017-7018938
 - (22) 출원일자(국제) 2015년12월09일
심사청구일자 2020년12월08일
 - (85) 번역문제출일자 2017년07월07일
 - (65) 공개번호 10-2017-0098861
 - (43) 공개일자 2017년08월30일
 - (86) 국제출원번호 PCT/IB2015/002577
 - (87) 국제공개번호 WO 2016/092378
국제공개일자 2016년06월16일
 - (30) 우선권주장
62/090,029 2014년12월10일 미국(US)
 - (56) 선행기술조사문헌
W02010019103 A1*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
하이퍼스템 에스에이
스위스, 체하-6900 루가노, 비아 바구티 5
- (72) 발명자
베스코비, 안젤로, 루이지
스위스 6817 마로지아 (멘드리지오) 비아 알 파코 13
빈다, 엘레나
이탈리아 24123 베르가모 비아 에프.리 이엔알 아가시 2
- (74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 51 항

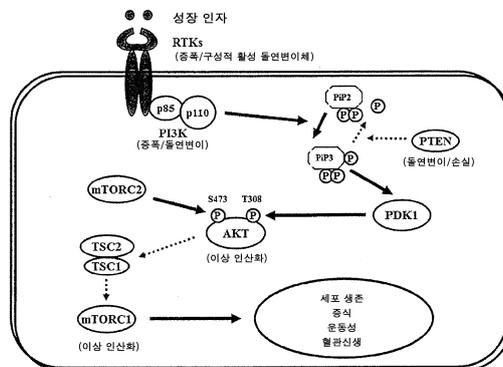
심사관 : 문영혜

(54) 발명의 명칭 **뇌암 줄기 세포의 성장, 이동 및 침습성 감소 그리고 뇌종양을 가진 환자의 생존 개선 방법 및 조성물**

(57) 요약

상기 기재된 발명은 치료제의 치료적으로 효과 양을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 여기에서 상기 치료제는 (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 조합을 감소시키기 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 개선하기에 효과적이다. 상기 기재된 발명은 또한 종양을 가진 대상체의 치료 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (1) 약제학적 조성물의 제공 단계; 및 (2) 상기 약제학적 조성물의 투여 단계 (여기에서 상기 조성물은 종양 성장, 이동, 침습 또는 조합을 감소시키는데 효과적인 치료제의 치료적으로 유효량을 포함한다). 상기 방법은 추가로 치료제의 제조 및 상기 약제학적 조성물의 제조를 포함할 수 있다. 상기 치료제는 비제한적으로 Wnt5a 유도체 펩타이드 또는 Wnt5a 길항제 또는 Wnt5a 블로킹 항체를 포함한다. 상기 종양은 암 줄기 세포의 집단을 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 대상체에서 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 고형 종양을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 치료제가 Wnt5a의 펩타이드 유도체이며, Wnt5a의 펩타이드 유도체가 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 A이고,

상기 치료량의 상기 치료제가

- (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 억제시키고;
- (2) 상기 대상체의 생존을 증가시키기에 효과적인, 약제학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 고형 종양이 뇌 종양, 결장 종양, 전립선 종양, 유방 종양, 폐 종양, 피부 종양, 간 종양, 골 종양, 난소 종양, 췌장 종양, 두부 종양, 경부 종양, 신경 종양 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 고형 종양이 뇌 종양인, 약제학적 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 뇌 종양이 신경교종인, 약제학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 신경교종이 성상세포종, 희소돌기아교세포종 및 뇌실막세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 성상세포종, 상기 희소돌기아교세포종 및 상기 뇌실막세포종이 역형성인, 약제학적 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 성상세포종이 다형성 교모세포종인, 약제학적 조성물.

청구항 8

청구항 3에 있어서, 상기 뇌 종양이 수모세포종, 뇌수막종, 신경초종, 두개인두종, 생식 세포 종양 및 송과체부 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드가 Wnt5a 길항제인, 약제학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드가 합성인, 약제학적 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

청구항 4에 있어서, 상기 신경교종이 중간엽 조직, 전신경 조직, 정통 조직 또는 이들의 조합을 포함하는, 억제학적 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 중간엽 조직 및 상기 전신경 조직이 정통 조직에 비해 Wnt5a 리간드의 발현의 증가된 수준을 특징으로 하는, 억제학적 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, Wnt5a 리간드의 발현의 상기 증가된 수준이 세포 이동을 나타내는, 억제학적 조성물.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 상기 집단이 침습성 표현형인, 억제학적 조성물.

청구항 18

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드 유도체에 의한 Wnt5a 발현 및/또는 활성의 조절은 용량-의존성 방식으로 줄기-유사 특징을 가진 GFI 종양-증식 세포의 침습성을 감소시키기에 효과적인, 억제학적 조성물.

청구항 19

청구항 4에 있어서, 상기 신경교종이 Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 세포를 포함하는, 억제학적 조성물.

청구항 20

청구항 19에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포가 PSA-NCAM에 대하여 면역반응성인 Wnt5a 및 Dlx2 양성 세포의 최대 60%로 상기 추정 신경모세포 마커 PSA-NCAM을 공-발현시키는, 억제학적 조성물.

청구항 21

청구항 19에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포가 CD44의 발현의 증가된 수준을 특징으로 하는, 억제학적 조성물.

청구항 22

청구항 19에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포가 상기 추정 줄기-유사 종양 증식 세포 마커 EphA2를 공-발현시키지 않는, 억제학적 조성물.

청구항 23

청구항 1에 있어서, 침습 마커 FRAS1-관련 세포의 매트릭스 단백질 2 (Frem2)의 발현을 포함하는 침습성 표현형을 추가로 포함하는, 억제학적 조성물.

청구항 24

청구항 4에 있어서, 상기 억제학적 조성물이 뇌 실질을 통해 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 상기 집단을 포함한 상기 종양의 침습을 감소시키기에 효과적인, 억제학적 조성물.

청구항 25

치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 비-인간 포유동물에서 고형 종양의 치료를 위한 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 고형 종양의 치료 방법으로서, 상기 치료제가 Wnt5a의 펩타이드 유도체이며, Wnt5a의 펩타이드 유도체가 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 A이고,

상기 치료량의 상기 치료제가

- (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 억제시키고;
- (2) 상기 대상체의 생존을 증가시키기에 효과적인, 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 고형 종양이 뇌 종양, 결장 종양, 전립선 종양, 유방 종양, 폐 종양, 피부 종양, 간 종양, 골 종양, 난소 종양, 췌장 종양, 두부 종양, 경부 종양, 신경 종양 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 고형 종양이 뇌 종양인, 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 뇌 종양이 신경교종인, 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 신경교종이 성상세포종, 희소돌기아교세포종 및 뇌실막세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 성상세포종이 다형성 교모세포종인, 방법.

청구항 31

청구항 27에 있어서, 상기 뇌 종양이 수모세포종, 뇌수막종, 신경초종, 두개인두종, 생식 세포 종양 및 송과체 부 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

청구항 25에 있어서, 상기 펩타이드가 Wnt5a 길항제인, 방법.

청구항 33

청구항 25에 있어서, 상기 펩타이드가 합성인, 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

청구항 28에 있어서, 상기 신경교종이 중간엽 조직, 전신경 조직, 정통 조직 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 중간엽 조직 및 상기 전신경 조직이 정통 조직에 비해 Wnt5a 리간드의 발현의 증가된 수준을 특징으로 하는, 방법.

청구항 39

청구항 38에 있어서, Wnt5a 리간드의 발현의 상기 증가된 수준이 세포 이동을 나타내는, 방법.

청구항 40

청구항 25에 있어서, 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 상기 집단이 침습성 표현형인, 방법.

청구항 41

청구항 25에 있어서, 상기 펩타이드 유도체에 의한 Wnt5a 발현 및/또는 활성의 조절이 용량-의존성 방식으로 줄기-유사 특징을 가진 GFI 종양-증식 세포의 침습성을 감소시키기에 효과적인, 방법.

청구항 42

청구항 28에 있어서, 상기 신경교종이 Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 세포를 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 42에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포가 PSA-NCAM에 대하여 면역반응성인 Wnt5a 및 Dlx2 양성 세포의 최대 60%로 상기 추정 신경모세포 마커 PSA-NCAM을 공-발현시키는, 방법.

청구항 44

청구항 42에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포가 CD44의 발현의 증가된 수준을 특징으로 하는, 방법.

청구항 45

청구항 42에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포가 상기 추정 줄기-유사 종양 증식 세포 마커 EphA2를 공-발현시키지 않는, 방법.

청구항 46

청구항 25에 있어서, 침습 마커 FRAS1-관련 세포의 매트릭스 단백질 2 (Frem2)의 발현을 포함하는 침습성 표현형을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 47

청구항 28에 있어서, 상기 펩타이드 유도체가 뇌 실질을 통해 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 상기 집단을 포함하는 상기 종양의 침습을 감소시키기에 효과적인, 방법.

청구항 48

청구항 25에 있어서, 종양 성장, 이동 및 침습으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 측정 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 49

청구항 25에 있어서, 상기 조성물이 경구로, 구강으로, 비경구로, 비강내로, 직장으로, 또는 국소로 투여되는, 방법.

청구항 50

청구항 25에 있어서, 제2 치료제의 투여 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 제2 치료제가 화학치료제인, 방법.

청구항 52

청구항 50에 있어서, 상기 제2 치료제가 Wnt5a 길항제인, 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제가 항체인, 방법.

청구항 54

청구항 52에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제가 Wnt3a인, 방법.

청구항 55

청구항 52에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제가 프리즐레드-관련 단백질인, 방법.

청구항 56

치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 대상체에서 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 고형 종양의 치료에서 사용하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 치료제가 Wnt5a의 펩타이드 유도체이며, Wnt5a의 펩타이드 유도체가 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 A이고,

상기 치료량의 상기 치료제가

- (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 억제시키고;
- (2) 상기 대상체의 생존을 증가시키기에 효과적인, 약제학적 조성물.

청구항 57

치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 줄기-유사 특징을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함하는 고형 종양의 치료용 약제의 제조에서 사용하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 치료제가 Wnt5a의 펩타이드 유도체이고, Wnt5a의 펩타이드 유도체가 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 A이고,

상기 치료량의 상기 치료제가

- (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 억제시키고;
- (2) 상기 대상체의 생존을 증가시키기에 효과적인, 약제학적 조성물.

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 교차 참조
- [0002] 본 출원은, 발명의 명칭이 "뇌암 줄기 세포의 성장, 이동 및 침습성 감소 및 뇌 종양을 가진 환자의 생존 개선 방법 및 조성물"인, 2014년 12월 10일 출원된 미국 가출원 번호 62/090,029의 우선권을 주장하고, 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로서 편입된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 기재된 발명은 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합의 감소 및 대조군에 비해 대상체 생존의 개선 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 발명의 배경
- [0006] 악성 종양/암
- [0007] 암은 세포 수 (증식) 또는 신체의 다른 부분에 침습 또는 확대하는 포텐셜을 가진 세포 크기 (전이)의 면에서 비정상 세포 성장에 연루한 질환이다. 암 세포 증식은 널리 공지되지만 전이를 구동하는 기전(들)은 널리 공지되지 않는다. 암은 게놈 변경의 질환이다: DNA 서열 변화, 카피 수 이상, 염색체 재배열 및 DNA 메틸화의 변형은 인간 악성종양의 발달 및 진행을 함께 구동한다. (The Cancer Genome Atlas Network (TCGA), Nature 2008, 455(23): 1061-68.)
- [0008] 신경교종
- [0009] 신경교종은, 뇌 또는 척수에서 아교 세포로부터 발생하는, 종양의 유형이다. 신경교종의 가장 흔한 부위는 뇌이다. 신경교종은 모든 뇌 및 중추 신경계 종양의 약 30% 및 모든 악성 뇌 종양의 80%를 이룬다.
- [0010] 중추 신경계에서 가장 풍부한 세포 유형인, 아교 세포는, 뉴런을 둘러싸는 및 이들 사이의 지원 및 절연을 제공하는 지원성 세포이다. 뉴런과 달리, 아교 세포는 전기 임펄스를 전도하지 않는다. 중추 신경계에서 아교 세포의 2개 주요 클래스가 있다: 성상세포 및 희돌기교세포 (Kandel ER, 등, Principles of Neural Science, 4th Ed. McGraw-Hill New York (2000), Ch. 2, pp. 20-21).
- [0011] 신경교종은 조직학적 특성을 공유하지만, 이들이 반드시 유래하지 않는 세포의 특이적 유형에 따라 명명된다. 신경교종의 주된 유형은 하기이다: 성상세포종 - 성상세포와 조직학적 특성을 공유하는 것 (예를 들면, 다형성 교모세포종은 악성 성상세포종이고 성인 중에서 가장 흔한 1차 뇌 종양이다); 팽돌기신경교종 - 희소돌기아교세포와 조직학적 특성을 공유하는 것; 뇌줄기 신경교종 - 뇌 줄기에서 발달하는 신경교종; 시 신경 교종 - 시 신경에서 또는 주위에서 발달하는 신경교종; 및 혼합 신경교종, 예컨대, 희소돌기아교세포 및 성상세포와 조직학적 특성을 공유하는 세포를 함유하는, 팽돌기성상세포종.
- [0012] 신경교종은, 종양의 병적 평가에 의해 결정되는, 그들의 등급에 따라 추가로 카테고리화된다. 사용중인 다수의 등급화 시스템 중, 종양이 I 내지 IV로 등급화된, 신경교종에 대하여 세계 보건 기구 (WHO) 등급화 시스템은 가장 흔하다 (Louis DN, 등, Acta Neuropathol, 2007, 114(2):97-109).
- [0013] I 등급 종양은 저성장이고, 비악성이고, 장기 생존과 관련된다 (예를 들면, 모양세포성 성상세포종).
- [0014] II 등급 종양은 상대적으로 느린-성장이지만 때때로 고 등급 종양으로서 재발한다. 이들은 비악성 또는 악성 (예를 들면, 확산 성상세포종)일 수 있다.

- [0015] III 등급 종양은 악성이고 종종 더 높은 등급 종양 (예를 들면, 역형성 정상세포종)으로서 재발한다.
- [0016] IV 등급 종양은 빠르게 재생하고 매우 공격성 악성 종양 (예를 들면, 교모세포종, 거대 세포 교모세포종, 및 신경교육종)이다.
- [0017] 수모세포종은 소아에서 발생하는 1차 뇌 종양의 가장 흔한 유형이다. 용어 "수모세포종"은 소아의 소뇌에서 발견된 일련의 종양을 지칭한다. 신경교종으로서 본래 분류되면, 수모세포종 (WHO IV 등급 종양)은 현재 배아 종양으로서 지칭된다. 소뇌의 외부 과립 층의 조상세포의 악성 전환으로부터 발생한다고 생각되면, 상기 종양은 모든 두개내 종양의 대략 7-8% 및 소아 뇌 종양의 30%를 차지하고, 아교 종양에 반대로, 뉴런의 분화에 의해 주로 특성규명된다.
- [0018] 교모세포종
- [0019] 다형성 교모세포종 (GBM), WHO IV 등급 악성 신경교종, 분류 명칭 "교모세포종"은, 가장 흔하고 성인에서 가장 공격성 1차 뇌 종양이다. GBM은 아교 세포에서 발생하고 모든 확산 정상세포 종양의 40%-60% 및 모든 두개내 신 생물성 병변의 10%-15%를 차지한다. 상기 종양의 생물학적 특징은 두드러진 증식, 활성 침습성, 및 풍부한 혈관 신생에 의해 예시된다. (Nakada, M. 등, Cancers, 2011, 3: 3242-3278). GBM은 저조하게 분화된 신생물성 정상 세포로 구성된다. 미세혈관 증식 및/또는 괴사의 존재는 GBM의 조직-병리적 진단에 필수적이다.
- [0020] GBM은 가장 공격성 인간 암 중 하나이고 몇 개의 하기 복잡한 인자 때문에 치료하기가 매우 어렵다: 종양 세포가 종래의 요법에 매우 저항성인 점; 뇌가 종래의 요법에 의한 손상에 민감한 점; 뇌가 치유 자체에 매우 제한된 수용력을 갖는 점; 및 많은 약물이 종양상에서 작용하기 위해 혈액-뇌 장벽을 넘을 수 없다는 점.
- [0021] 치료가 방사선, 수술 및, 메틸화 제제 (P.J. Noughton 등 Clin. Cancer Res. (2000) 6:4110-4118)인, 테모졸로 마이드를 이용한 화학요법을 포함할 수 있어도, 수십 년의 외과용 요법, 방사선요법, 및 화학요법은 GBM에 대하여 생존을 급격하게 변화시키는데 실패하였다. 다중양식 치료 접근법으로 치료된 임상시험 집단에서 GBM을 가진 환자의 중간 생존은 대략 12-15 개월이고, 환자의 단 3%-5%가 36 개월보다 더 오래 생존한다 (McNamara. M.G. 등, Cancers, 2013, 5: 1103-1119).
- [0022] 임상 경험에 기반하여, 이들 2개 그룹이 조직학적으로 구별될 수 없어도, 1차 교모세포종 및 2차 교모세포종인, GBMs의 2개 하위그룹은 확립되었다. 생체검사된 또는 절제된 사례의 90% 초과를 포함하는, 1차 교모세포종은 저-등급 질환의 선행된 이력 없이 신규로 발생하고, 반면에 2차 교모세포종은 이전에 진단된 저-등급 신경교종으로부터 진행된다.
- [0023] 암 게놈 지도 (TCGA) 네트워크에 의해 기재된 유전자-발현-기반 분자 분류에 따라서, 다형성 교모세포종은 4개의 상이한 분자 하위유형을 갖는다: 정통, 전신경, 중간엽 및 신경 (TCGA Research Network, Nature, 2008, 455: 1061-1068).
- [0024] 정통 GBM 종양은, 상피 성장 인자에 의해 결합된 경우, 수에서 계속 성장 (증식)시키기 위해 세포에 대하여 신호를 보내는, 일부 세포의 표면상에서 발견된 단백질인 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 고 수준 및 비정상 증폭에 의해 특성규명된다. EGFR 비정상은 3개의 다른 GBM 하위유형에서 훨씬 낮은 속도에서 발생한다. TP53 유전자는 종양 성장을 정상적으로 억제시키는 종양 단백질 p53에 대하여 코딩한다. TP53은 정통 GBM 종양 하위유형에서 드물게 돌연변이되지만, GBM의 다른 하위유형에서 가장 빈번하게 돌연변이된 유전자이다.
- [0025] 전신경 GBM 종양은 혈소관 유도된 성장 인자 수용체 A (PDGFRA)의 변경 및 IDH1에서 점 돌연변이에 의해 특성규명된다. 돌연변이된 경우, 이소시트레이트 탈수소효소-1을 인코딩하는 유전자 IDH1은 비정상 세포 성장에 기여할 수 있는 단백질에 대하여 코딩한다. 세포 증식, 세포 이동, 및 혈관신생에 중요한 역할을 하는, PDGFRA는 또한 비정상적으로 다량으로 돌연변이 및 발현되는 것이 발견되었다. PDGFRA 변경은 전신경 종양에서 발생할 뿐이고 임의의 다른 하위유형에서는 아니다. PDGFRA가 변경된 경우, 너무 많은 그의 단백질은 생산될 수 있어, 조절되지 않는 종양 성장으로 이어진다. 상기 하위유형의 환자는 더 어렵고 다른 하위유형에서 보다 더 오래 생존하는 경향이 있다.
- [0026] 중간엽 하위그룹은 신경섬유종종 유형 1 (NF1) 종양 억제 유전자에서 가장 빈번한 수의 돌연변이를 함유한다. PTEN (포스파타제 및 텐신 동족체) 및 TP53 종양 억제 유전자에서 빈번한 돌연변이는 또한 중간엽 하위그룹에서 발생한다. PTEN 단백질은 종양 억제제로서 작용하여, 세포 분할의 사이클을 도와 조절한다.
- [0027] 신경 하위그룹이 다른 그룹과 많은 동일한 유전자에서 돌연변이를 갖는 반면, 상기 그룹은 돌연변이의 유의미하게 더 높은 또는 더 낮은 속도를 갖는 것으로서 다른 것중에 두드러지지 않는다. 신경 그룹은 뇌의 정상, 암이

없는 신경 세포, 또는 뉴런, 예컨대 NEFL, GABRA1, SYT1 및 SLC12A5의 또한 전형적인 몇 개의 마커의 발현에 의해 특성규명된다.

[0028] 다형성 교모세포종의 이들 분자 하위유형은 그의 임상 과정 및 치료적 반응에서 상이하게 보인다. 예를 들어, 상이한 하위유형은, 하위유형 사이 약 50%의 차이로, 공격성 화학요법 및 방사선요법에 다양한 반응을 보여준다. 각 하위유형의 병리학이 상이한 유형의 세포로부터 시작할 수 있다는 것이 시사되었고, 이는 요법에 대한 반응에서 변동을 설명할 수 있다. 최대 이점은 정통 및 중간엽 하위유형에서 보여질 수 있고, 여기에서 집중 요법이 사망률을 유의미하게 감소시켰고; 신경 하위유형에서 효능의 암시가 있었지만; 그러나 전신경 하위유형은 종래의 화학요법 또는 화학-방사선 요법을 포함한 집중 요법에 덜 반응성이었다. (Verhaak, RG, 등, Cancer Cell, 2010, 17(1):98-110.)

표 1 TCGA 분류에 따른 교모세포종의 4 하위유형의 요약

(Bartek, J. Jr., 등, J. Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012, 83:753-760)

Phillips 등	전-신경	증식성		중간엽
Verhaak 등	전-신경	신경	정통	중간엽
서명	Olig2/DLL3/SOX 2	MBP/MAL	EGFR/AKT2	YKL40/CD44
돌연변이	TP53 돌연변이 PI3K PDGFRA		크롬 7 이득 크롬 10 손실 PDGRRA	NFkB NF1
임상 특성	화학요법에 대해 비-반응군		테모졸로미드/방사선 으로 개선된 임상결과	테모졸로미드/방사선 으로 개선된 임상결과

[0029]

[0030] 반대로, 중간엽 표현형은 인간 악성 신경교종에서 종양 공격성의 특징이다. 중간엽 및 정통 서브클래스는 전신경 종양에 비교된 더 악화된 예측을 나타내고, 이는, 모두 호의적인 예후 인자인, 전신경 종양의 서브셋이 *IDH1* 유전자 뿐만 아니라 신경교종-CpG 아일랜드 메틸화인자 표현형 (G-CIMP)에서 돌연변이를 나타내는 사실에 관련될 수 있다 (Verhaak, RG, 등, Cancer Cell, 2010, 17(1):98-110).

[0031] GBM의 공격성 증식, 활성 침습성, 및 혈관신생

[0032] GBM의 공격성 증식, 활성 침습성, 및 혈관신생은 주로 종양에서 크게 탈조절된 신호전달 경로에 기인한다.

[0033] 조직병리적으로 검출가능한 유사분열을 갖는 증식성 활성은 거의 모든 GBM 사례에서 두드러진다. 신경교종에서 빈번하게 탈조절된 가장 중요한 증식 신호전달 캐스케이드 중 2개는 이후에 논의될 PI3K/Akt/mTOR 및 Ras/MEK/MAPK 경로이다.

[0034] 도처에 존재하는 혈관신생은 GBMs의 뛰어난 특성이다. 혈관형성의 정도는 신경교종 악성종양, 종양 공격성, 및 임상 예측과 유의미하게 상관된다. 프로-혈관신생 경로는 내피 세포상에서 그의 동족 수용체에 대한 후속의 결합을 이용한 혈관신생 인자 예컨대 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 발현에 의해 개시되는 배위된 사건의 연속을 포함한다.

[0035] GBM은 고 침습성이다. 신경교종 침습은 하기를 포함한 복합 공정이다: (1) 최초 부위로부터 탈착; (2) 세포의 매트릭스 (ECM)에 접착; (3) ECM의 리모델링; 및 (4) 세포 이동. 신경교종 세포 이동은 혈관, 수지상조직, 및 백질내 섬유를 따라 움직이는 경향이 있다. 이들 특징은 GBM이 그의 침습성 성질을 매개하는 특이적 생물학적 기전을 보유한다는 것을 시사한다. 인간 신경교종의 고 침투성 성질은 CNS의 발달 동안 아교 조상세포의 이동성 거동을 요약하고, 신경 계간 세포 이동에 기여하는 활성제, 수용체, 및 신호전달 단백질이 신경교종 침습에서 핵심 플레이어일 수 있다는 것을 시사한다. 축적 연구는 침습 신호전달이 몇 개의 종류의 막 유형 단백질, 예컨대 티로신 키나제 수용체 (RTK), 인테그린, CD44, 및 G 단백질-커플링된 수용체 (GPCR), 뿐만 아니라, PI3K/Akt

를 포함한, 세포내 신호전달 분자, 및 작은 GTPases, 예컨대 Rac1, cdc42, 및 RhoA에 의해 유도되는 것을 보여 주었다. CD44 항원은 세포-세포 상호작용, 세포 접착 및 이동에 관여된 세포-표면 당단백질이다.

- [0036] EGFR 및 EphA2 (에프린 유형-A 수용체 2) RTK는 GBM에서 발현되고 세포 표면에 공-국재화된다. EphA2 인산화는 EGFR 활성화에 의존적이고, EphA2 하향-조절은 EGFR 인산화, 다운스트림 신호전달, 및 EGF-유도된 세포 생존력을 억제시킨다 (Rammrain, D.B.; Cancer Res. 2006, 66, 867-874).
- [0037] 주요 신경교종 신호전달 경로
- [0038] 몇 개의 주요 신호전달 경로는 신경교종과 관련되었다 (Nakada, M. 등, Cancers, 2011, 3: 3242-3278).
- [0039] 1. 수용체 티로신 키나제 경로 (RTK/PI3K/Akt/mTOR 경로).
- [0040] RTK/P13K/Akt 경로는 다양한 근본적인 세포성 공정 예컨대 증식, 성장, 세포자멸사, 및 세포골격 재배열을 조절한다. 경로는 수용체 티로신 키나제 (RTKs), 예를 들어, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR), 혈소판 유도된 성장 인자 수용체 (PDGFR), 및 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 등, 뿐만 아니라 종양 억제 단백질 포스파타제, 예를 들어, 포스파타제 및 긴장 동족체 (PTEN), 및 단백질 키나제 PI3K, Akt, 및 mTOR을 포함한다. 수용체 티로신 키나제 경로 (RTK/PI3K/Akt/mTOR 경로)는 도 1에서 보여진다.
- [0041] EGFR 유전자 증폭은 GBM에서 가장 빈번한 변경 (대략 40%)이다. EGFR은 ErbB 수용체 계열의 막통과 당단백질 구성원이다. GBM에서, EGFR은 과발현을 통해 이상조절되고, 이는 리간드-독립성 신호전달로 이어지는 EGFR 유전자 증폭 또는 활성화 돌연변이 예컨대 EGFRvIII 때문에 발생한다. EGFR 이상은 GBM의 정통 하위유형과 상관되었다 (TCGA Research Network, Nature 455: 1061-68; Verhaak, Roel G.W. 등, Cancer Cell, 2010, 17: 98-110). EGFR의 변경이 GBM의 증가된 공격성과 상관될 수 있다는 것이 시사되었어도 (Nakada, M. 등, Cancers, 2011, 3: 3242-3278), EGFR 저해제 (예를 들면, 게피니닙, 에를로티닙)는 임상시험에서 GBMs를 가진 환자에서 임상 반응을 유발하지 않았다 (Rich, J.N., 등, N. Engl. J. Med. 2004, 351, 1260-1261; Haas-Kogan, D.A. 등, J. Natl. Cancer Inst. 2005, 97, 880-887; van den Bent, M.J. 등, J. Clin. Oncol. 2009, 27, 1268-1274).
- [0042] 혈소판-유도된 성장 인자 수용체 (PDGFR), 특히 PDGFR- α , 및 혈소판-유도된 성장 인자 (PDGF)의 과발현은 모든 등급의 성상세포 종양에서 관측되었고, 악성 진행과 그들의 연관은 시사되었다 (Nakada, M. 등, Cancers, 2011, 3: 3242-3278). PDGFRA 증폭 (14%), 뿐만 아니라 IDH1 돌연변이는 TCGA 분류에 따른 GBM의 전신경 하위유형의 주요 특징이다 (TCGA Research Network, Nature 455: 1061-68; Verhaak, R.G. 등, Cancer Cell, 2010, 17: 98-110). GBM과 상기 분자의 깊은 연관에도 불구하고, 이마티닙을 이용한 항-PDGFR 요법은 단지 제한된 임상 반응을 수득하였다 (Reardon, D.A., 등, J. Clin. Oncol. 2005, 23, 9359-9368; Reardon, D.A., 등, Br. J. Cancer 2009, 101, 1995-2004).
- [0043] PI3Ks는 다양한 생물학적 기능을 촉진시키는 널리 발현된 지질 키나제이다. PI3Ks 및 RTKs의 결합은 포스파티딜 이노시톨 3,4,5-삼인산 (PiP3) 및 3-포스포이노시티드 의존적 단백질 키나제-1 (PDK1)을 통해 Akt의 활성화를 초래하고, 이는 세포 생존, 증식, 및 운동성을 포함한 다중 근본적인 세포성 공정에 영향을 미친다. GBM의 통합된 게놈 분류에 있어서, PI3K 돌연변이 (15%)는 전신경 하위유형과 관련된다 (TCGA Research Network, Nature, 2008, 455: 1061-68; Verhaak, R.G. 등, Cancer Cell, 2010, 17: 98-110).
- [0044] 감소된 PTEN 활성화는 RTKs/PI3K/Akt 경로를 활성화시킬 수 있는 것은 PTEN이 PI3K 기능의 길항화에 의해 경로를 부정적으로 조절하기 때문이다. PTEN의 동종접합성 결실 또는 돌연변이는 GBM (40%)에서 흔한 유전적 특성이어서, RTKs/PI3K/Akt 경로의 구성적 활성화를 초래한다. PTEN 손실은, TCGA 연구에 있어서, GBM의 양쪽 정통 및 중간엽 하위유형과 관련된다 (TCGA Research Network, Nature 455(23): 1061-68).
- [0045] Akt는 세포 성장, 증식, 및 세포자멸사를 조절하는 STK (세린/트레오닌 특이적 단백질 키나제)이다. Akt 활성화는 인간 GBMs의 대략 80%에서 보고되었고 RTKs/PI3K/Akt 신호전달이 GBM의 88%에서 변경된다는 사실과 상관한다 (TCGA Research Network, Nature 455(23): 1061-68). 종양발생 Akt 돌연변이는 GBM에서 검출되지 않았다. Akt 저해제 페리포신은 악성 신경교종에서 임상 평가를 경험하고 있다 (Nakada, M. 등, Cancers, 2011, 3: 3242-3278).
- [0046] 2. p14^{ARF}/MDM2/p53 경로.
- [0047] p53 유전자는 세포 사이클 휴지, 세포 사망, 세포 분화, 노화, DNA 치유, 및 신생혈관형성을 유도하는 표적 유전자를 조절하기 위해 다양한 세포성 스트레스에 반응하는 단백질을 인코딩한다. DNA 손상 이후, p53은 활성화

되고 G1 기에서 세포 사이클 진행의 조절물질로서 기능하는 유전자 (예컨대 p21Waf1/Cip1)의 전사를 유도한다. 마우스 이중 미세 2 동족체 (MDM2) 종양유전자는 p53 유전자와 단단한 복합체를 형성함으로써 p53 전사 활성을 억제시키고, p53의 분해에 참가시킨다. p14^{ARF} 유전자는 MDM2에 직접적으로 결합하는 및 MDM2-매개 p53 분해를 억제시키는 단백질이다. 이어서 p14^{ARF} 발현은 p53에 의해 부정적으로 조절된다. 따라서, p14^{ARF}/MDM2/p53의 불활성화는 임의의 p53, MDM2, 또는 p14^{ARF} 유전자의 변경된 발현에 의해 야기된다. p53 경로는 2차 GBMs의 발달에서 결정적인 역할을 한다. p53 유전자는 신경교종에서 가장 흔하게 돌연변이된 p53 경로 유전자이지만; 그러나, 경로에서 다른 유전자를 포함한 분자 비정상성은 또한 기재되었다 (Nakada, M. 등, *Cancers*, 2011, 3: 3242-3278). p14^{ARF}/MDM2/p53 경로는 도 2에서 보여진다.

[0048] 3. RB 경로.

[0049] RB (망막모세포종 종양 억제 단백질) 경로는 세포 사이클 진입 및 진행, 뿐만 아니라 p53 경로를 억제시킨다. (13q14에서) RB1에 의해 인코딩된 107-kDa RB1 단백질은 세포 사이클의 S-기에 G1을 통해 진행을 제어한다 (Serrano, M., 등, *Nature*, 1993, 366: 704-707). CDKN2A 단백질 (즉 사이클린-의존성 키나제 저해제인 2A p16^{INK4a})은 사이클린-의존성 키나제 4 (CDK4)에 결합하고 CDK4/사이클린 D1 복합체를 억제시키고, 따라서 G1부터 S 기까지 세포 사이클 전이를 억제시킨다. 따라서, RB1, CDK4, 또는 CDKN2A의 변경은 G1-S 기 전이의 조절장애를 유발시킬 수 있다. 그러나, 단지 RB 경로의 변경은 종양 형성을 유도하기에 불충분하다. EGFR 증폭은 PI3K 프로-성장 경로를 향상시키고 전형적으로 CDKN2A 결실과 관련된다. CDKN2A 손실은, TCGA 연구에 있어서, GBM의 정통 하위유형과 관련된다. (Nakada, M. 등, *Cancers*, 2011, 3: 3242-3278). RB 경로는 도 2에서 보여진다.

[0050] 4. Ras/MEK/MAPK 경로.

[0051] RAS (랫트 육종) 단백질은 RTKs 및 신경섬유종종 유형 1 종양 억제 유전자 (NF-1)에 의해 제어된 온/오프 (RAS-GDP/RAS-GTP) 스위치로서 작동한다. 활성화된 RAS (RAS-GTP)는 그 다음 세린/트레오닌 키나제 RAF를 활성화시킨다. RAF는, 또한 MEK로 불리는, 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 (MAPKK)를 활성화시키고, 이는 이어서 MAPK를 활성화시킨다. MAPK 활성화는 다양한 전사 인자, 예컨대 Elk1, c-myc, Ets, STAT1/3, 및 PPAR의 활성화를 초래한다.

[0052] NF-1 종양 억제 유전자는, 주로 RAS 음성 조절물질로서 기능하는 및 아테닐레이트 사이클라제- 및 Akt-mTOR-매개 경로에서 역할을 하는, 뉴로피브로민을 인코딩한다. NF-1 유전자가 NF-1-관련, 뿐만 아니라 산발적으로 발생하는 신경교종의 종양형성에서 관여되는 증거가 증가하고 있다. TCGA 파일럿 연구에서, NF-1 돌연변이/동종접합성 결실은 GBM의 18%에서 확인되었다. NF-1 (37%), p53 (32%), 및 PTEN 유전자의 빈번한 불활성화를 갖는, 중간엽 GBMs는 공격성 화학-방사선 아췌반트 요법에 반응한다. (Nakada, M. 등, *Cancers*, 2011, 3: 3242-3278). Ras/MAPK 경로는 도 3에서 보여진다. 상기 언급된 신호전달 경로의 전면적인 전망도는 도 4에서 보여진다.

[0053] 상기 언급된 신호전달 경로에 더하여, 다른 신호전달 경로는 GBM 개시, 이동, 및 침습에서 역할을 할 수 있다.

[0054] Wnt (윙리스-관련/마우스 유전 종양 바이러스 통합 계열) 신호전달 경로

[0055] WNT 유전자에 의해 인코딩된 단백질은 정상 배아 발생에서 역할을 한다. 이들이 제어하는 배아 공정은 신체 축 패턴화, 세포 운명 특정, 세포 증식, 및 세포 이동을 포함한다. 이들 공정은 골, 심장, 및 근육을 포함한 중요한 조직의 적절한 형성에 필요하다. 복합성인, Wnt 신호전달 경로는 거대 범위의 악성종양을 통해 비정상적으로 활성화된다. Wnt 단백질은 또한 종양형성에 연루되었고, Wnt 경로의 부적절한 활성화는, 유방암, 전립선 암, 교모세포종, 및 다른 것을 포함하는, 몇 개의 유형의 암의 개시를 초래한다 (Camilli, T. C., *Biochem. 2010, Pharmacol.* 80(5): 702-711; Polakis P., *Curr Opin Genet Dev* 2007: 17(1):45-51).

[0056] Wnt 신호전달 경로는 세포의 내부에 세포 표면 수용체를 통해 세포의 외부로부터 신호를 통과시키는 단백질의 신호 전달 경로의 그룹이다. Wnt 신호전달에 관여된 다양한 수용체 및 리간드는 다수의 다양한 신호 전달 캐스케이드로 이어진다.

[0057] 단백질의 Wnt 계열은 19개의 공지된 인간 구성원 (Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16)으로 이루어진다. 이들 분비된 지질-변형된 신호전달 당단백질은 350-400 아미노산 길이이고 20-85% 아미노산 동일성을 공유하고, 23-24 시스테인 잔기의 보존된 패턴을 갖는다. 이들 단백질 상에서 발생하는 지질 변형의 유형은 23-24 시스테인 잔기의 보존된 패턴에서 시스테인의 팔미토일화이다. 팔미토일화는 분비를 위하여 원형질막에 Wnt 단백질의 표적화를

개시하고 Wnt 단백질을 지방산의 공유 결합 때문에 그의 수용체를 결합시킨다. 그의 합성 이후, 분비된 Wnt 단백질은 당화에 의해 변형된다. Wnt 신호전달에서, 이들 분비된 단백질은 주변분비 및 자가분비 루트를 통해 상이한 Wnt 경로를 활성화시키기 위해 리간드로서 작용한다.

[0058] Wnt 신호전달 경로는, 세포 내부에서 단백질 디셰벨레드 (Dishevelled)에 생물학적 신호를 통과시키는, 프리즐레드 ("Fz") 계열 수용체에 Wnt-단백질 리간드의 결합에 의해 활성화된다. 현재까지, 프리즐레드 계열 수용체의 적어도 10 구성원은 확인되었고, 이들 모두는 Wnts와 상호작용하는 세포의 N-말단 보존된 시스테인-풍부 도메인 (CRD)에 의해 특성규명된 7-통과 막통과 단백질이다. 그러나, Wnt 신호전달을 용이하게 하기 위해, 보조-수용체는 또한 Wnt 단백질과 Fz 수용체 사이 상호작용과 함께 요구될 수 있다. 예는 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 (Lrp5/6), 수용체 티로신 키나제 (Ryk), 및 Ror2를 포함한다.

[0059] 그의 수용체 및 보조-수용체와 Wnts의 상호작용은 적어도 3 신호전달 경로, 즉 표준적 Wnt/ β -카테닌 경로, 비-표준적 (또는 이단) 평면 세포 극성 (PCP) 경로, 및 비-표준적 (또는 이단) Wnt/ Ca^{2+} 경로와 관련된다. 도 5는 이들 3개의 대표적인 Wnt 신호전달 경로를 보여준다. Fz 수용체는 상이한 Wnt 리간드 사이에서 식별하는 능력을 갖고, 이와 같이, 이들 3 경로 중 하나의 활성화는 리간드/수용체 상호작용의 성질에 의해 표시된다. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711). 표준적 Wnt 경로는 유전자 전사의 조절로 이어지고, 비표준적 평면 세포 극성 경로는 세포의 형상을 책임지는 세포골격을 조절하고, 비표준적 Wnt/갈슘 경로는 세포 내부에서 갈슘을 조절한다. Wnt 신호전달 경로는 이웃 세포-세포 연락 (주변분비) 또는 동일-세포 연락 (자가분비)를 이용한다.

[0060] 표준적 Wnt 신호전달 경로

[0061] 표준적 Wnt 신호전달 경로는 중요 매개체, β -카테닌을 포함하는 잘-확립된, β -카테닌-의존성 신호전달 경로이다. Wnt 신호전달의 부재하에, β -카테닌은, 스캐폴딩 단백질 Axin 및 종양 억제 유전자 생성물 APC (선종성 결장 폴립증)를 포함하는, 몇 개의 단백질에 의해 형성된 "파괴 복합체" 내에서 카세인 키나제 1 (CK1) 및 글리코젠 합성효소 키나제 3 베타 (GSK3 β)에 의해 인산화된다. 인산화된 β -카테닌은 그 다음 유비퀴틴화 기계에 의해 기술적으로 인식되고 프로테아솜에서 분해를 위하여 보내진다. Wnts가 그의 수용체 Fz 및 Lrp5/6에 결합하는 경우, Lrp5/6은 인산화되고 디셰벨레드는 활성화되고, 이는 β -카테닌 "파괴 복합체"의 불활성화 또는 디스어셈블리로 이어지고 이로써 β -카테닌 인산화는 감소되고 β -카테닌은 안정화된다. 그 다음 안정화된 β -카테닌은 Lef (림프양 향상된 전사 인자) 및 Tcf (T-세포 인자)에 결합에 의해 다운스트림 유전자 발현을 조절하는 핵에 전위시켜, 증식 및 종양 진행에 관련된 Wnt 표적 유전자의 전사로 이어진다. 경로의 몇 개의 구성원은 Wnt 신호전달과는 독립적으로 조절될 수 있다. 예를 들어, GSK-3 β 는 ILK (인테그린 연결된 키나제)에 의해 저해될 수 있고, 그의 발현을 조절할 수 있는 수많은 경로의 교차점에서이다. 표준적 Wnt 단백질은 Wnt1, Wnt2, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt10b를 포함한다 (Jiar CH, J Oral Pathol. Med., 2012, 41(4):332-339).

[0062] 암에서의 표준적 Wnt 경로

[0063] 분해 및 궁극적으로 핵 축적이 부족한, β -카테닌의 안정화는 저조하게 분화된 형태학 (Endo K, 등, Hum Pathol 2003, 31(5):558-565), 고 증식성 활성 (Inagawa S., 등, Clin Cancer Res 2002, 8(2):450-456), 및 좋지 못한 예측 (Wang CM, 등, Cancer 2001, 92(1):136-145)에 연결되었다. β -카테닌의 운명, 즉, 그의 축적 또는 분해는, 적절하게 조절 또는 발현되지 않으면, 암에서 증가된 β -카테닌 발현을 설명할, 수많은 단백질에 의해 조절된다. 상기 조절장애는 신호전달 경로의 다양한 구성원에서 돌연변이, 또는 후성유전적 사건 때문에 발생할 수 있다. Wnts 자체에서 돌연변이는 드물다. 그러나, 다운스트림 표적에 영향을 미치는 돌연변이는 암에서 상당히 빈번하다.

[0064] Wnt/ β -카테닌 신호전달에 대하여 최초 기재된, 및 아마 가장 잘 알려진 역할은 결장암에서이고, 여기에서 이들 종양의 거의 90%는 β -카테닌 돌연변이를 초래하는 돌연변이를 제공한다.

[0065] β -카테닌 경로를 표적하는 몇 개의 Wnt 치료제는 인간에서 임상시험의 주제가 되어 왔다.

[0066] 비-표준적 신호전달 경로

[0067] 비-표준적 신호전달 경로는 β -카테닌-매개 전사를 촉진시키지 않는 모든 Wnt-활성화된 세포성 신호전달 경로에 대하여 포괄적 용어이고, 수많은 상기 경로는 확인되었다. 표준적 Wnts와 달리, 비-표준적 경로는 유선 상피성 세포를 형질변환시킬 수 없고 주로 세포 운동 및 극성에 관여된다고 여겨진다 (Veeman MT, 등, Curr Biol 2003, 13(8):680-685; Kikuchi A, 등, Cancer Sci 2008, 99(2):202-208). 적어도 2개의 주요한 비-표준적 Wnt 경로,

평면 세포 극성 (PCP) 경로, 및 Wnt/Ca²⁺ 경로가 있다. 그러나, 양쪽 모두는 중요 분자 예컨대 Wnt5A 및 ROR2를 포함하기 때문에, 인간 암에서 Wnt/PCP 및 Wnt/Ca²⁺ 경로를 식별하는 것은 상당히 어렵다.

[0068] Wnt/PCP 경로가 개발 중에 최상으로 기재되었고, 여기에서 배아 축에 따라 세포의 극소 분극화를 배워시킨다. 이는 STAT3의 활성화, 및 JAK/STAT 신호전달을 포함한다 (Miyagi C, 등, J Cell Biol 2004, 166(7):975-981). Wnt/PCP 신호전달에서 역할을 하는 Wnts는 Wnt5A, Wnt11, 및 Wnt 7a를 포함한다 (Wang Y., Mol Cancer Ther, 2009; 8(8):2103-2109). Wnt/PCP 신호전달 동안, Wnt/Fz/Ror2 상호작용은 막에 디셰벨레드 (Dsh/Dvl)를 보급하고, 인접한 세포의 막에 사형밧줄 및 가시의 동원을 유발시키고, 그리고 이들 사이 균형은 극성을 조절한다. 그 다음 디셰벨레드-의존성 Wnt/PCP 신호전달은 JNK, Jun, Daam, RhoA, Rac, Cdc42 및 프로필린을 통해 신호를 변환시키고, 이들은 양쪽 극성 및 운동성을 궁극적으로 제어하는 세포골격 효과를 갖는다 (Carreira-Barbosa F, 등, Developmetn 2003, 130(17):4037-4046; Takeuchi M, 등, Curr Biol 2003: 13(8):674-679; Qian D, 등, Dev Biol 2007, 306(1):121-133). 이들 특징 (극성 및 운동성 의미)이 종양 진행에 임계적이기 때문에, Wnt/PCP 신호전달은 암에 연루되었다. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711).

[0069] Wnt/Ca²⁺ 경로는 Wnt 신호전달의 세포내 칼슘 다운스트림의 방출을 포함한다. Wnt/Ca²⁺ 신호전달 경로에 관여된 Wnt 계열의 구성원은 Wnt5a, Wnt11, 및 Wnt4를 포함하고, 이들 Wnts에 의한 Fz 수용체의 활성화는 칼슘-의존성 신호전달 분자, 예컨대 칼모듈린-의존성 단백질 키나제 II (CAMKII) 및 단백질 키나제 C (PKC)의 활성화를 초래한다고 보여졌다. 이들 분자는 종종 세포성 문맥에 의존적인 다운스트림 신호전달에 관한 효과의 보고를 가질 수 있다. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711).

[0070] 더 많은 비표준적 Wnt 캐스케이드 (경로)가 Wnt-RAP1 신호전달; Wnt-수용체 티로신 키나제-유사 희귀 수용체 2 (Ror2) 신호전달; Wnt-단백질 키나제 A 신호전달; Wnt-GSK-3-미소관 신호전달; Wnt-비정형 단백질 키나제 C (PKC) 신호전달; Wnt-수용체-유사 티로신 키나제 신호전달; 및 램파마이신 신호전달의 Wnt-포유동물 표적을 포함하여 시사되었다. 이들 분류가 엄격하지 않은 것은 경로가 서로 중첩 또는 교차하기 및 진화하기 때문이다. (Semenov, M. V.; Cell 2007, 131: 1378).

[0071] 내인성 Wnt 길항제

[0072] Wnt 경로의 활성화는 분비된 Wnt 저해제에 의해 조절된다 (Miller JR, 등, Oncogene 1999, 18(55):7860-72). 이들 저해제는 그의 수용체 또는 보조-수용체에 Wnt 리간드의 결합에 영향을 미친다. 이들 Wnt 길항제는 직접적으로 Wnt 단백질에 결합하는 분비 프리즐레드 관련된 단백질 (sFRPs)의 구성원, 및 Wnt 보조-수용체 LRP에 결합하는 Dkkopf (Dkk) 계열의 구성원을 포함한다. sFRPs의 전사 무위는 대장암을 포함한 수많은 암에서 검출되었다 (Suzuki H, 등, 2002, 31(2):141-9). Dkk 계열의 구성원은 또한 Wnt 신호전달에 관한 저해된 효과를 갖는 것으로 보여졌다 (Wu, W, 등, Curr Biol 2000, 10(24):611-1614).

[0073] Wnt5a의 역할 및 기능

[0074] 상이한 수용체의 존재하에 그의 상이한 효과에 있어서, Wnt5a는, 암의 유형에 의존하여, 종양 억제성 또는 종양 발생 기능을 갖는 것으로 나타났다. 예를 들어, 그의 발현은 대장암, 도관 유방암, 백혈병, 및 신경교세포종에서 하향-조절된다. (Blanc, E, 등, Oncol Rep., 2005 14(6):1583-1588). 반대로, Wnt5a는 위암, 췌장암, 비-소 세포 폐암, 및 전립선암에서 과발현된 것으로 보여졌다. Wnt5a 유전자 발현은 증가된 운동성으로 이어진 더 많은 전이성 흑색종 세포 및 증가된 발현에서 증가된 것으로 발견되었다. (Weeraratna AT 등, Cancer Cell, 2002, 1(3): 279-288).

[0075] Wnt5a 단백질 발현의 손실은 유방암종 환자의 더 짧은 무재발 생존 및 유선 세포주 증가된 운동성과 관련된다. Wnt5a의 서열 분석에 기반하여, 14 펩타이드 단편 및 다양한 펩타이드 유도체는 확인되었고, 유방암 세포주에서 유선 세포 접착 및 손상된 이동에 관한 Wnt5a의 효과를 모방하기 위한 그의 능력은 보고되었다. Wnt5a의 작용제로서 작용하는, Wnt5a의 12-아미노산 길이 펩타이드 단편 175 (Asn-Lys-Thr-Ser-Glu-Gly-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu)로부터 유도된, 폭시-5, 헥사펩타이드 (포르밀-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu)는 유방암에서 사용을 위하여 개발되었다. 폭시-5 펩타이드가 접착을 회복하였고 프리즐레드-5 수용체-의존성 기전을 통해 종양 세포 운동성을 감소시켰음이 보고되었다. 상기 포르밀화된 헥사펩타이드 리간드가 급속 세포질 칼슘 신호를 유도하였지만, 그러나 미포포릴화된 β-카테닌 또는 활성 JNK의 세포성 수준에 영향을 미치지 않았다. 폭시-5는 구체적으로 G-단백질-커플링된 프로테아제-활성화된 수용체 1 및 4를 활성화시킨다. 포유동물 세포에서, 헥사펩타이드 서열 Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu는 Wnt-5 단백질에서 단독으로 존재한다. 헥사펩타이드의 N-포르밀화는 포유동물 세포에서 발견될 수 없다. 시험관내 분석은 양쪽 재조합 Wnt5a 및 Wnt5a-유도된 폭시-5 펩타이드가 4T1

유방암 세포의 세포자멸사 또는 증식에 영향 없이 이동 및 침습을 손상시켰음이 드러났다. 생체내 실험은 폭시-5의 i.p. 주사가 유선 지방 패드로부터 폐 및 간으로의 접종된 4T1 유방암 세포의 전이를 70% 내지 90% 만큼 저해시켰음을 보여주었다 (Safholm, A, 등, Clin Cancer Res, 2008, 14(20):6556-6563).

- [0076] 흑색종에서, 상승된 Wnt5a 발현은 세포 운동성을 촉진시키고 전이를 유도한다. 두가지 접근법이 이들 효과를 대응하기 위해 탐구되었다: Wnt5a 발현의 저해 또는 Wnt5a 신호전달의 직접적인 봉쇄. 흑색종에서 사용을 위하여 개발된, 폭시-5로부터 변형된, Box5, 핵사펩타이드 (t-부복시카보닐-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu)는 흑색종 세포의 Wnt5a-매개 이동 및 침습의 강력한, 선택적 길항제이고, 이 둘 모두는 흑색종에서 전이성 과정의 필수적인 구성 요소이다 (Jenei, V, 등, PNAS, 2009, 106 (46): 19473-19478).
- [0077] 유전자 발현 프로파일링은 Wnt5a가 흑색종에서 공격성의 마커일 수 있음을 나타내었고 (Bittner M, 등, Nature, 2000, 406:536-540), 여기에서 Wnt5a 과발현은 생존 및 전이의 발달과 유의미하게 상관한다.
- [0078] 비-뇌암에 대하여 전이성 과정에서 연루되었어도, Wnt5a는 신경교종에서 광범위하게 연구되지 않았다.
- [0079] 뇌암 (신경교종 및 수모세포종) 및 Wnt5a 경로
- [0080] 면역조직화학 분석은 Wnt5a 발현이 정상 뇌 조직에서 및 저-등급 정상세포종에서 보다 인간 GBM에서 더 높았음을 드러냈다. Wnt5a의 과발현은 시험관내 GBM-05 및 U87MG 세포의 증식을 증가시켰다. 그에 반해서, RNA 간섭의 결과로서 Wnt5a 발현의 하향조절은 시험관내 GBM-05 및 U87MG 세포의 증식을 감소시켰고, 생체내 이들 세포의 종양형성능을 감소시켰다. 데이터는 Wnt5a 신호전달이 인간 신경교종 세포의 증식에서 중요한 조절물질이라는 것을 시사하였다 (Yu, J. M., 등, Cancer Lett., 2007, 257(2):172-181).
- [0081] 신경교종은 둘러싸는 뉴런의 조직에 널리 퍼진 침습과 관련된 진행을 나타낸다. 인간 신경교종에서 Wnt5a 신호전달의 역할의 독립적인 연구는 상기 침습성을 자극시키는 기전을 해결하기 위해 수행되었다. 이 결과는 Wnt5a가 신경교종-유도된 세포주에서 모든 19 Wnt 계열 중에 우세하게 및 통상적으로 과발현되었다는 것; Fz-2, -6, 및 -7이 신경교종-유도된 세포주에서 10 Fz 구성원중에 우세하게 발현되었다는 것; 그리고 Ror2, Wnt5a 수용체의 발현이 아주 낮았다는 것을 보여주었다. 이들 발견은 신호전달 경로가 Wnts 또는 Fz의 과발현을 통해 신경교종 세포에서 활성화될 수 있음을 시사한다. 면역조직화학 연구는 또한 33 인간 신경교종 사례 중 26 (79%)에서 Wnt-5a의 고 발현을 드러냈다. Wnt-5a 발현의 양성률은 임상 등급과 상관되었다. Wnt-5a 발현의 녹다운은 신경교종 세포의 매트릭스 메탈로프로테이나제-2의 이동, 침습 및 발현을 억제시켰다. 서로, 정제된 Wnt5a 리간드를 이용한 치료는 세포 이동 및 침습의 자극을 초래하였다. MMP-2 저해제는 U251 세포의 Wnt5a-의존성 침습을 억제시켰다 (Kamino, M., 등, Cancer Sci, 2011, 102(3): 540-548).
- [0082] 신경교종의 세포성 반응을 매개하는 Wnt5a의 수용체는 확인되지 않았다. Ror2가 아닌, 수용체-유사 티로신 키나제 (Ryk)의 녹다운이 신경교종 세포에서 MMP-2의 활성 및 Wnt5a-의존성 침습성 활성을 억제시켰다는 것이 보고되었다. 이들 결과는 Ryk가 신경교종-유도된 세포에서 MMP-2의 Wnt5a-의존성 유도 및 침습성 활성화에 중요하다는 것, 및 Ryk가 성인 암 침습에서 신규 병태-생리적 기능을 가질 수 있다는 것을 시사한다 (Habu, M., 등, J. Biochem, 2014, 156(1): 29-38).
- [0083] 소아에서 발생하는 1차 뇌 종양의 가장 흔한 유형인, 수모세포종 (MB)은 뇌에서 비롯되는 가장 흔한 천막하 원시 신경외배엽성 종양 (PNET)이고 고 악성 1차 뇌 종양이다. 표준적 신호전달 경로는 MB에서 잘 알려진다. 그에 반해서, MB에서 비-표준적 Wnt 신호전달 경로에 대한 매우 적은 연구는 실시되었다. MB에서 최근 연구는 Wnt5a 및 Ror2가 비-표준적 Wnt 신호전달 경로의 조절장애에 기여하는 추가의 기전이라는 것, 및 Ror2가 종양억제제로서 역할을 할 수 있다는 것을 입증한다 (Lee, S. E., 등, Brain Pathology, 2013, 23: 445-453).
- [0084] 각 경우에, 상기 언급된 연구는 벌크 뇌 신경교종 종양 세포에서 Wnt5a 신호전달 경로를 표적하였다.
- [0085] 뇌암 줄기 세포 (또는 CNS 암 줄기 세포)
- [0086] 전통적으로, 줄기 세포는 분화된 세포가 크게 대체에 대한 손실 및 필요성에 가장 민감한 조직, 예컨대 피부 (Huelsken 등, Cell 105: 533-45, 2001), 장 상피 (Potten 등, Development 110: 1001-20, 1990) 및 혈액 (Morrison 등, Annu Rev Cell Dev Biol 11: 3-71, 1995)에서만 위치될 수 있다고 생각되었다. 사실상, 성인 줄기 세포의 가장 잘-공지된 예는, 뼈 골수에서 발견되고 궁극적으로 동물의 생애 전반에 걸쳐 모든 혈액 세포 유형의 생성을 책임지는, 조혈 줄기 세포 (HSC)이다 (Morrison 등, supra.; Weissman, Cell 100: 157-68, 2000; Weissman, Science 287: 1442-6, 2000). 성인 중추 신경계 (CNS)가 유의미한 양의 뉴런의 사망을 나타내지 않는 것으로, 그리고 재생 수용력이 없다고 생각되었기 때문에, 신경 줄기 세포의 존재는 가망이 없고, 불필요한

것처럼 보여졌다. 그러나, 1992년에 2개의 독립적인 그룹이 신규 뉴런을 생기게 하는 능력을 가진 성인 포유동물 CNS 내에서 전구체 세포의 존재를 성공적으로 입증하였다 (Reynolds and Weiss, Science 255: 1707-10, 1992; Richards 등, Proc Natl Acad Sci USA 89: 8591-5, 1992). 신규 뉴런의 공급원은 성인 포유동물 CNS의 전체 심실 신경축의 줄을 세우는 줄기 세포로서 확인되었다 (Reynolds and Weiss, 1992).

[0087] 다른 조직에서 발견된 줄기 세포처럼, CNS 줄기 세포 (또는 신경 줄기 세포 (NSCs))는 증식, 광범위한 자기-재생, 다수의 자손의 생성, 다중-계통 분화 포텐셜 및 상해 이후 조직 재생의 생체내 특징의 한정적 시험관내 줄기 세포 특징 (Hall 등, Development 106: 619-33, 1989; Potten et al, supra.)을 입증하기 위해 보여졌다.

[0088] 줄기 세포의 한가지 역할은 다수의 미분화 세포를 증식 및 생성하기 위한 능력을 가진 더욱 수입된 전구체 세포를 분할 및 생기게 하는 것이다. 궁극적으로, 분화된 자손을 생기게 하는 이들 더욱 수입된 전구체 세포 유형의 자손이다. 따라서, 줄기 세포는 동물의 수명 전반에 걸쳐 그리고 광범위한 증식 포텐셜로 분할하는 능력을 가진 미수입된 세포의 상대적으로 정지 저장기로서 생각될 수 있고, 반면에 조상 세포는 더욱 수입되고 더 자주 분할하지만 그러나 경시적으로 더욱 제한된 증식 포텐셜을 갖는다. 발달 동안, 및 성인에서 모두, 줄기 및 조상 세포의 증식은 세포 기원을 입증한다.

[0089] 종양의 성장 및 번식에 기여하는 줄기 세포 특징을 가진 세포의 소집단으로부터 발생하는 종양의 개념은 암 생물학 분야에서 신규하지 않다. 아이디어는 1970년대 초기에 제안되었고 급성 골수성 백혈병 (AML)에 관한 연구에서 실험적으로 확인되었고, 여기에서 낮은 빈도 종양 개시 세포는 정상 조혈 줄기 세포 (HSCs)를 닮기 위해 입증되었다. 이들 연구는 백혈병 줄기 세포가 HSC의 직접적인 후손이었거나 또는 HSC 특징을 획득한 더욱 분화된 세포의 성과이었음을 시사하였다. 혈액 시스템 외부에서 줄기 세포의 발견은 고행 조직의 암이 또한 줄기 유사 세포를 함유할 수 있다는 가능성을 제기하였다. 고행 종양에서 종양 개시 줄기-유사 세포의 존재 및 단리는 CNS의 종양에 또한 적용된 접근법을 인간 유방암 조직에서 최초로 입증되었다.

[0090] 몇 개의 그룹은 배양액에서 신경구-유사 세포를 생성하기 위한 인간 신경교종 조직으로부터 유도된 세포의 능력에 대해 보고되었고, CNS 종양 내에서 NSCs의 존재를 시사한다. 잘-확립된 신경교종 세포주 U87MG가 생체내 악성종양을 유지하는 신경구-형성 세포의 소수 집단을 함유하는 것이 "부차-집단" 세포의 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 단리에 기반하여 입증되었다 (C. Hirschmann-Jax, Proc Natl Acad Sci 2004, 101(39):14228-233). 갈리 (Galli) 및 동료 (Galli 등, Cancer Research (2004) 64: 7011-7021)는 배아 및 성인 CNS로부터 유도된 NSCs로서 거의 동일한 기능성 특성을 나타내는 인간 다형성 교모세포종 (GBM)으로부터 종양 신경 줄기 세포 (tNSCs)의 단리, 번식 및 시리즈 이식에 대해 보고하였다. 이들 GBM tNSCs는, 시험관내 임계적 신경 줄기 세포 특징을 표시하는, 안정적인 방식으로 팽창될 수 있는 그리고 시리즈 이식-배양 사이클 내내, 최초 종양-개시 특징을 재생하는 프로미닌 양성 전구체이다. 함께, 이들 연구는 CNS 종양이 종양 개시 및 악성종양을 책임질 수 있는 줄기 세포의 집단을 함유한다는 가설을 강력하게 뒷받침한다. tNSCs는 tNSCs상에서 CD133의 발현 덕에 FACS를 이용하는 다른 GBM 세포로부터 분류될 수 있다 (Singh 등, Nature (2004) 532:396-401).

[0091] 암 줄기 세포 (CSC) 가설은 암이 증식하기 위한 제한된 수용력을 갖는 "분화된" 딸 세포가 규정되지 않게 복제하는 모 CSCs의 서브셋에 의해 생산되는 비정상적인 세포 체계로 조직화되는 것을 시사한다, 즉, 단지 CSCs가 종양 성장을 지속하기 위한 수용력을 갖고 요법 실패 이후 재발을 책임진다 (Gilbertson, Nature, 2012, 488(7412): 462-463). 2012년까지, 암 줄기 세포의 존재에 대한 증거는 논란이 되어 왔다. 드리센스 (Drissens) (Driessens, G., Nature, 2012, 742: 527-530) 및 첸 (Chen) (Chen, J, Nature, 2012, 7412: 522-526)은, 우리가 암을 생각하고 치료하는 방식으로 두드러진 변화를 제공하는, CSCs의 존재를 뒷받침하기 위한 품격있는 증거를 제공하였다.

[0092] 암 줄기 세포 마커

[0093] CD133은 다양한 정상 조직 및 암 유형에서 줄기 세포의 마커로 간주된다. 뇌 종양에 관하여, 싱 (Singh) 등은 면역결핍된 마우스 뇌에 이식된 경우 최초 종양의 자기-재생 및 정확한 재현을 할 수 있는, 줄기 세포 특징을 가진, CD133 양성 종양 세포 집단을 맨먼저 기재하였다 (Singh SK, 등, Nature 2004, 432: 396-401; Singh SK, 등, Cancer Res 2003, 63:5821-5828). GCSCs의 다른 추정 마커는 L1CAM, CD44, CD15, 인테그린 α6 (Brescia P., J Carcinogene Mutagene 2011, S1), 및 EphA2 (Binda E., 등, Cancer Cell 2012, 22(6): 765-780)을 포함한다. 뉴런의 세포 접착 분자 L1CAM (L1, CD171)은 줄기-유사 특성을 가진 CD 133 양성 신경교종 세포의 성장 및 생존의 유지를 위하여 요구된다. 몇 개의 보고는 교모세포종에서 줄기 세포 마커로서 CD44의 사용의 한 예를 포함하는, 상이한 유형의 종양내 암 줄기 세포의 확인에서 세포 표면 마커 CD44의 유용성을 보여주었다 (Anido J, 등, Cancer Cell 2010, 18:656-668). CD15는 종양 개시 수용력을 가진 세포에서 선택적으로 발현된 세포 표

면 단백질이다. 미세환경에서 내피 세포를 발현하는 라미닌과 상호작용에 중요한, 인테그린 $\alpha 6$ 은 접착이 신경 교종 줄기 세포 유지에 중요한 세포외 매트릭스의 구성요소이다. 인테그린 - $\alpha 6$ -라미닌 상호작용은 성인 뇌의 측면 뇌실의 뇌실하 구역 (SVZ)에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다. EphA2 수용체 티로신 키나제는 hGBM TPCs에서 과발현되고 hGBM TPCs에서 자기-재생 및 종양형성능을 구동시킨다 (Binda E., 등, Cancer Cell 2012, 22(6):765-780).

- [0094] 신경교종 암 줄기 세포 (GCSC) 표적화 치료
- [0095] GCSCs는 뉴런성, 성상세포성, 또는 희소돌기아교성 표현형을 가진 세포로 분화하기 위한 수용력인, 자기-갱신하는 능력, 뇌 종양을 개시하는 능력, 신경 줄기 세포 마커의 발현, 및 다능성에 의해 식별된다. GCSCs는 신경 줄기 및 조상세포 세포: 네스틴, CD133 (프로미닌-1), Musashi-1, 및 Bmi-1에 특이적인 항원을 발현시킨다. 소닉 헤지혹 동족체 (SHH) 및 노치는 신경 조상세포의 주요 조절물질이고 GCSCs에서 변경되거나 또는 과발현된다고 밝혀졌다 (Nakada, M. 등, Cancers, 2011, 3: 3242-3278). 도 6은 신경교종 암 줄기 세포 경로를 보여준다.
- [0096] GCSCs는, 종양 재발을 결국 초래하는, 방사선내성 및 화학내성이다. 치료용 GCSCs 표적화는 임계적이다. 5개의 일반적인 방법이 GSCs 치료를 위하여 제안되었다: (1) CSCs의 신호전달 경로를 표적하기 위해 신규한 치료제의 개발; (2) CSCs에 관한 방사선요법 효과를 향상시키기 위해 방사선-감작제의 사용; (3) CSCs를 공격하기 위한 면역 세포의 사용; (4) 정상 세포로 분화시키도록 CSCs를 촉진시키기 위한 분화 제제의 사용; 및 (5) 유전자 요법 (Cho, 등, Cell Transplant. 2013, 22(4):731-9).
- [0097] 치료제는, Wnt 경로를 포함하는, GBM, 소닉 헤지혹 (shh), 노치, 홈박스 (HOx) 계열, B-림프종 Mo-MLV 삽입 영역 1 동족체 (Bmi-1), PTEN, 텔로머라제, 유출 수송체, EGF, 마이크로-RNA, 및 VEGF 수용체를 치료하기 위한 신호 경로를 표적하는데 사용되어 왔다 (Cho, 등, Cell Transplant. 2013, 22(4):731-9).
- [0098] 표준적 Wnt-신호전달은 핵에 β -카테닌의 전좌를 활성화시켜, 여기에서 특이적 표적 유전자의 전사 인자로서 작용하고, Wnt- β -카테닌 신호전달은 양쪽 정상 줄기 세포 및 GCSCs에서 증명된 역할을 갖는다. 상기 경로가 신경 교종의 운동성/침습성을 뒷받침하고 중간엽 전이에 상피성을 닮은 변화를 구동함에 따라, Wnt- β -카테닌 신호전달은 GCSCs에서 방사선-내성에 기여할 수 있고 뇌 종양에서 GCSCs에 대하여 치료적 표적일 수 있다. (Cruceru, M.L., 등, J. of Cellular & Molecular Medicine, 2013, 17(10): 1218-1235).
- [0099] 현재까지, 뇌 신경교종의 이동, 침습, 및 전이 뒤에 경로 / 기전은 여전히 이해되지 않는다. 암 줄기 세포가 화학- 및 방사선-요법에 대한 내성 및 종양 세포의 재발을 책임지는 것이 현재 허용되지만, 그러나 현재까지, 신경교종 암 줄기 세포의 침습성을 감소시키기 위해 Wnt5a 비-표준적 신호전달 경로를 표적한 연구는 보고되지 않았고, 그리고 뇌암 줄기 세포에서 Wnt5a 비-표준적 신호전달 경로를 구체적으로 표적하는 치료제는 확인되지 않았다. 기재된 발명은 이들 문제를 다루고, Wnt5a 신호전달에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미침으로써 적어도 부분적으로, 신경교종 암 줄기 세포의 침습성을 감소시키는 Wnt5a의 펩타이드 유도체를 제공한다.
- [0100] 요약
- [0101] 기재된 발명은 치료제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 여기에서 치료제는 (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 조합을 감소시키기 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 개선시키기에 유효하다.
- [0102] 하나의 측면에 있어서, 상기 기재된 발명은, 치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 대상체에서 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 고형 종양을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공하고, 여기에서 치료제는 Wnt5a의 펩타이드 유도체이고, 여기에서 치료량의 치료제는 (1) Wnt5a의 발현의 수준에 영향을 미침으로써 대조군에 비해 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 감소시키기; 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 증가시키기에 유효하다.
- [0103] 또 다른 측면에 있어서, 상기 기재된 발명은, 치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 고형 종양의 치료 방법을 제공하고, 여기에서 치료제는 Wnt5a의 펩타이드 유도체이고, 여기에서 치료량의 치료제는 (1) Wnt5a의 발현의 수준에 영향을 미침으로써 대조군에 비해 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 감소시키기; 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 증가시키기에 유효하다.
- [0104] 또 다른 측면에 있어서, 상기 기재된 발명은, 치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는, 대상체에서 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 고형 종양의 치료에서 사용을 위한 약제학적 조성물을 제공하고, 여기에서 치료제는 Wnt5a의 펩타이드 유도체이고, 여기에서 치료량의 치료제는

(1) Wnt5a의 발현의 수준에 영향을 미침으로써 대조군에 비해 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 감소 시키기; 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 증가시키기에 유효하다.

- [0105] 또 다른 측면에 있어서, 상기 기재된 발명은, 치료량의 치료제 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약 제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 종양-증식 세포 의 집단을 포함한 고휘 종양 치료용 약제의 제조에서 약제학적 조성물의 용도를 제공하고, 여기에서 치료제는 Wnt5a의 펩타이드 유도체이고, 여기에서 치료량의 치료제는 (1) Wnt5a의 발현의 수준에 영향을 미침으로써 대조 군에 비해 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 감소시키기; 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 증가시 키기에 유효하다.
- [0106] 하나의 구현예에 있어서, 상기 고휘 종양은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 뇌 종양, 결장 종양, 전립선 종양, 유방 종양, 폐 종양, 피부 종양, 간 종양, 골 종양, 난소 종양, 췌장 종양, 두부 종양, 경부 종양, 신경 종양 및 림프종. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 고휘 종양은 뇌 종양이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 뇌 종양은 신경교종이다. 또 다른 구현예에 있어서, 신경교종은 성상세포종, 희소돌기아교세포종 및 뇌실막세포종 으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에 있어서, 성상세포종 희소돌기아교세포종 및 뇌실막세포 종은 역형성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 성상세포종은 다형성 교모세포종이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 뇌 종양은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 수모세포종, 뇌수막종, 신경초종, 두개인두종, 생식 세포 종양 및 송과체부 종양.
- [0107] 하나의 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 Wnt5a 길항제이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 합성 이다. 또 다른 구현예에 있어서, 펩타이드는 헥사펩타이드, 펜타펩타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로 부터 선택된다. 또 다른 구현예에 있어서, Wnt5a의 상기 펩타이드 유도체는 Box 5의 유도체 (서열 식별 번호: 1)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 헥사펩타이드는 아미노 서열 MDGCEL (서열 식별 번호: 1)로 이루어진다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 헥사펩타이드는 아미노 서열 LECGDM (서열 식별 번호: 2)로 이루어 진다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 펜타펩타이드는 아미노산 서열 LEGDM (서열 식별 번호: 3)으로 이루어진 다.
- [0108] 하나의 구현예에 있어서, 상기 대조군은 약제학적 조성물로 치료된 대상체이다.
- [0109] 하나의 구현예에 있어서, 상기 신경교종은 포함한다 신경교종은 중간엽 조직, 전신경 조직, 정통 조직 또는 이 들의 조합을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 중간엽 조직 및 전신경 조직은 정통 조직에 비해 Wnt5a 리간드의 발현의 증가된 수준에 의해 특성규명된다. 또 다른 구현예에 있어서, Wnt5a 리간드의 발현의 상기 증 가된 수준은 세포 이동을 나타낸다.
- [0110] 하나의 구현예에 있어서, 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 종양-증식 세포의 상기 집단은 침습성 표현형이다.
- [0111] 하나의 구현예에 있어서, 펩타이드 유도체에 의한 Wnt5a 발현 및/또는 활성의 조절은 용량-의존성 방식에서 GFI TPCs의 침습성을 감소시키기에 유효하다.
- [0112] 하나의 구현예에 있어서, 상기 신경교종은 Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 세포를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 상기 세포는 PSA-NCAM에 면역반응성인 Wnt5a 및 Dlx2 양성 세포의 최대 60%로 추정 신경모세포 마커 PSA-NCAM을 공-발현시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, Wnt5a 리간드에 대하여 양성 인 상기 세포는 대조군에 비해 CD44의 발현의 증가된 수준에 의해 특성규명된다. 또 다른 구현예에 있어서, Wnt5a 리간드에 양성인 상기 세포는 추정 줄기-유사 종양 증식 세포 (TPCs) 마커 EphA2를 공-발현시키지 않는다.
- [0113] 하나의 구현예에 있어서, 상기 침습성 표현형은 침습 마커 FRAS1-관련 세포외 매트릭스 단백질 2 (Frem2)의 발 현을 포함한다.
- [0114] 하나의 구현예에 있어서, 상기 펩타이드 유도체는 미치료된 대조군에 비교된 뇌 실질을 통해 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 종양-증식 세포의 집단을 포함한 종양의 침습을 감소시키기에 유효하다.
- [0115] 하나의 구현예에 있어서, 상기 방법은 추가로 종양 성장, 이동 및 침습으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어 도 하나의 측정의 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 추가로 제2 치료제의 투여의 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 제2 치료제는 화학치료제이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 제2 치료제는 Wnt5a 길항제이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제는 항체이다. 또 다른 구현예에 있어 서, 상기 Wnt5a 길항제는 Wnt3a이다. 또 다른 구현예에 있어서, Wnt5a 길항제는 프리즐레드-관련 단백질이다.

[0116] 하나의 구현예에 있어서, 상기 조성물은 경구로, 구강으로, 비경구로, 비강내로, 직장으로, 또는 국소로 투여된다.

도면의 간단한 설명

- [0117] 도 1은 수용체 티로신 키나제 경로 (RTK/PI3K/Akt/mTOR 경로)를 보여준다.
- 도 2는 p14ARF/MDM2/p53 경로 및 RB 경로를 보여준다.
- 도 3은 Ras/MEK/MAPK 경로를 보여준다
- 도 4는 GBM에서 연루된 전면적인 신호전달 경로를 보여준다.
- 도 5는 3개의 대표적인 Wnt 신호전달 경로를 보여준다.
- 도 6은 신경교종 암 줄기 세포 경로를 보여준다.
- 도 7은 공공연하게 이용가능한 데이터 세트에 기반된 신경교종 환자의 생존과 상관된 및 신경교종 환자의 조직학과 상관하는 Wnt5a 발현을 보여준다.
- 도 8은 역형성 성상세포종 (ANA) 및 hGBM (GBM H-TEX) 대 상의세포종 (EP), 낮은 등급 신경교종 (LOW) 및 수모세포종 (MDB) 조직에서 인-실리코 발현 프로파일링에 의해 검출된 경우 Wnt5a mRNA의 수준을 보여준다.
- 도 9는 hGBM, MDB, 낮은 등급 (LG), 및 신경절교종 조직에서 Wnt5a 및 에프린 유형-A 수용체 2 (EphA2)에 대하여 수술 시료의 면역표지화를 보여준다.
- 도 10은 줄기-유사 특징 (hGBM-유도된 TPCs) 대 정통 하위유형을 가진 중간엽 및 전신경 hGBM-유도된 종양 증식 세포에서, 및 성장 인자 의존적 (GFD) TPCs 대 성장 인자 독립적인 (GFI) TPCs에서 Wnt5a의 면역형광을 보여준다.
- 도 11은 Wnt5a, EphA2 및 CD44의 정량적 유세포측정 분석 뿐만 아니라 GFD 대 GFI TPCs에서 qPCR에 의한 Wnt5a 및 DLX2 또는 Wnt5a 및 Wnt3a mRNA 수준의 정량화를 보여준다.
- 도 12는 Wnt5a 발현 뿐만 아니라 Wnt5a 유전자 서명/활성화에 따라 염색된, 게이팅된 및 FACS 분류된 hGBM 시료에 관한 생물정보학적 분석이 더욱 침습성 및 혈관신생 표현형과 상관한다는 것을 보여준다.
- 도 13은 신경교종 환자의 생존 및 인간 GBM 조직내 Wnt5a, EphA2 및 DIX2 상관관계를 보여준다.
- 도 14는 hGBM 및 MDB 대 낮은 등급 1차 시료에서 전이-중폭 C 세포 및 신경모세포 DLX2의 추정 마커 및 Wnt5a의 공-발현을 보여준다.
- 도 15는 악성종양 스케일 전반에 걸쳐 인간 뇌 종양에서 Wnt5A, EPHA2, DLX2 및 신경 세포 접착 분자 1 (NCAM1) 유전자 발현을 보여준다.
- 도 16은 Wnt5a 과발현 GFI TPCs 대 미리 확립된 GFD 대응물의 시험관내 이동 및 침습 어세이를 보여준다.
- 도 17은 대조군 세포 (U87-wt)와 비교된 렌티바이러스-매개 Wnt5a 과발현 U87MG 세포 (U87-5A)에 의한 유의미하게 향상된 종양 발달 및 침습성을 보여준다.
- 도 18은 Wnt5a 작은 변화가 생체내 침습성 및 줄기-유사 특징 (TPCs) 종양형성 능력을 가진 hGBM 종양-증식 세포에 영향을 미치는 것을 보여준다.
- 도 19는 펩타이드 A의 HPLC 크로마토그램을 보여준다.
- 도 20은 펩타이드 A의 Maldi-Tof 스펙트럼을 보여준다.
- 도 21은 펩타이드 B의 HPLC 크로마토그램을 보여준다.
- 도 22는 펩타이드 B의 Maldi-Tof 스펙트럼을 보여준다.
- 도 23은 다형성 교모세포종 세포의 3개 서브클래스: (i) 정통 (원형); (ii) 중간엽 (삼각형); 및 (iii) 전신경 (정사각형)에 대하여 Wnt5 유전자 발현 (y-축) 대 EphA2 수용체 유전자 발현 (x-축)의 그래프를 보여준다. 형상 밀의 숫자는 세포 식별 번호를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0118] 발명의 상세한 설명
- [0119] 용어 "투여하는" 또는 "투여"는 본원에서 사용된 바와 같이 물질의 제공 또는 공급을 평균하기 위해 상호교환적으로 사용되고 생체내 투여, 뿐만 아니라 직접적으로 생체의 조직에 투여를 포함한다.
- [0120] 용어 "작용제"는 본원에서 사용된 바와 같이 전체 또는 부분 약리적 반응을 유도하기 위해 수용체를 활성화시킬 수 있는 화학 물질을 지칭한다. 수용체는, 생물학적 반응의 자극 또는 억제를 초래하는, 내인성 또는 외인성 작용제 및 길항제에 의해 활성화될 수 있거나 또는 불활성화될 수 있다. 생리적 작용제는 동일한 신체적으로 반응을 창출하지만, 그러나 동일한 수용체에 결합하지 않는 물질이다. 특정한 수용체용 내인성 작용제는 수용체에 결합하고 수용체를 활성화시키는 신체에 의해 천연적으로 생산된 화합물이다. 초작용제는 표적 수용체에 대하여 내인성 작용제보다 더 큰 최대 반응, 및 따라서 100% 초과 효율을 생산할 수 있는 화합물이다. 이는 내인성 작용제보다 더 강하지만, 오히려 수용체 결합 이후 세포 내부에서 생산될 수 있는 최대 가능한 반응의 비교인 것을 필연적으로 의미하지 않지 않는다. 전체 작용제는 수용체를 결합시키고 활성화시켜, 그 수용체에서 전체 효능을 표시한다. 부분 작용제는 또한 주어진 수용체를 결합시키고 활성화시키지만, 전체 작용제에 비해 수용체에서 부분 효능만을 갖는다. 역작용제는 그 수용체용 작용제로서 동일한 수용체 결합-부위에 결합하는 및 수용체의 구성적 활성을 역으로 하는 제제이다. 역작용제는 수용체 작용제의 반대 약리적 효과를 발휘한다. 비가역적 작용제는 수용체가 영구적으로 활성화되는 그와 같은 방식으로 수용체에 영구적으로 결합하는 작용제의 유형이다. 수용체에 작용제의 회합이 가역적이고, 반면에 수용체에 비가역적 작용제의 결합이 비가역적인 것으로 여겨진다는 점에서 단순한 작용제와 상이하다. 이는 화합물을 작용제 활성의 짧은 분출, 그 다음 수용체의 탈민감화 및 내재화를 일으키고, 이는 장기 치료와 함께 더욱 길항제처럼 효과를 생산한다. 선택적 작용제는 수용체의 한 특정 유형에 특이적이다.
- [0121] 용어 "아미노산 잔기" 또는 "아미노산" 또는 "잔기"는, 비제한적으로, 자연 발생 아미노산 및 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능할 수 있는 천연 아미노산의 공지된 유사체를 포함하는, 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드에 편입되는 아미노산을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.
- [0122] 아미노산에 대하여 본원에서 사용된 약어는 종래에 사용되는 약어이다: A=Ala=알라닌; R=Arg=아르기닌; N=Asn=아스파라긴; D=Asp=아스파르트산; C=Cys=시스테인; Q=Gln=글루타민; E=Glu=글루탐산; G=Gly=글리신; H=His=히스티딘; I=Ile=이소류신; L=Leu=류신; K=Lys=라이신; M=Met=메티오닌; F=Phe=페닐알라닌; P=Pro=프롤린; S=Ser=세린; T=Thr=트레오닌; W=Trp=트립토판; Y=Tyr=티로신; V=Val=발린. 아미노산은 L- 또는 D-아미노산일 수 있다. 아미노산은 펩타이드의 반감기를 증가시키기 위해 또는 펩타이드의 효력을 증가시키기 위해, 또는 펩타이드의 생체이용률을 증가시키기 위해 변경되는 합성 아미노산에 의해 대체될 수 있다.
- [0123] 하기는 서로에 대하여 보존적 치환인 아미노산의 그룹을 나타낸다:
- [0124] 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T);
- [0125] 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);
- [0126] 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);
- [0127] 아르기닌 (R), 라이신 (K);
- [0128] 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 및
- [0129] 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W).
- [0130] 용어 "길항제"는 본원에서 사용된 바와 같이 또 다른 물질의 효과를 대응하는 물질을 지칭한다. 용어 "Wnt5a의 길항제"는 본원에서 사용된 바와 같이 공유 결합, 이온성 결합, 수소 결합, 소수성 상호작용, 또는 이들의 조합을 통해 경쟁적으로 또는 비경쟁적으로 Wnt5a, Wnt5a 수용체 또는 Wnt5a 보조-수용체에 결합할 수 있는 및 Wnt5a 신호전달 경로를 직접적으로 또는 간접적으로 비활성화시킬 수 있는 펩타이드, 단백질, 또는 항체를 지칭한다. Wnt5a 길항제는 자체 또는 염 형태로 제형화될 수 있다.
- [0131] 용어 "암" 또는 "악성종양"은 본원에서 사용된 바와 같이 비정상 세포가 제어 없이 분할하고 이웃 조직을 침습할 수 있는 질환을 지칭한다. 암 세포는 또한 혈액 및 림프 시스템을 통해 신체의 다른 부분까지 확대할 수 있다. 중추 신경계 암은 뇌 및 척수의 조직에서 시작하는 암이다.

- [0132] 용어 "암 줄기 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 면역결핍된 마우스 뇌에 이식된 경우 최초 종양의 자기-재생 및 정확한 재현을 할 수 있는 세포의 집단을 지칭한다.
- [0133] 용어 "캐리어"는 본원에서 사용된 바와 같이 유기체에 유의미한 자극을 일으키지 않는 및 기재된 발명의 조성물의 활성 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 폐지하지 않는 물질을 기재한다. 캐리어는 이들이 치료받는 포유동물에 대한 투여에 적합하게 하기 위해 충분히 고순도 및 충분히 저독성이어야 한다. 캐리어는 불활성일 수 있거나, 또는 약학적 이점, 미용적 이점 또는 양쪽을 가질 수 있다. 용어 "부형제", "캐리어", 또는 "비히클"은 본원에서 기재된 약학적으로 허용가능한 조성물의 제형 및 투여에 적합한 캐리어 물질을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 본원에서 유용한 캐리어 및 비히클은 비독성이고 다른 구성요소와 상호작용하지 않는 당해 기술에서 공지된 임의의 상기 물질을 포함한다.
- [0134] 용어 "세포"는 살아있는 유기체의 구조적 및 기능적 단위를 지칭하기 위해 본원에서 사용되고 살아있는 것으로서 분류된 유기체의 최소 단위이다.
- [0135] 용어 "세포주"는 본원에서 사용된 바와 같이 형질변환을 경험한 및 배양액에서 무기한으로 통과될 수 있는 불멸화된 세포를 지칭한다.
- [0136] 용어 "화학치료제"는 본원에서 사용된 바와 같이 질환의 치료 또는 제어에 유용한 화학물질을 지칭한다.
- [0137] 용어 "화학요법"은 본원에서 사용된 바와 같이 하나 이상의 화학치료제를 이용한 치료의 과정을 지칭한다.
- [0138] 용어 "화학요법 레지멘" ("조합 화학요법")은 1 초과 약물의 다른 독성에서 득을 보기 위해 1 초과 약물을 이용한 화학요법을 의미한다. 조합 암 요법의 원리는 상이한 약물이 상이한 세포독성 기전을 통해 작용한다는 것이고; 이들이 상이한 용량-제한 역효과를 갖기 때문에, 이들이 전체 용량에서 함께 주어질 수 있다.
- [0139] 용어 "양립가능한"은 본원에서 사용된 바와 같이 조성물의 구성요소가 통상적인 사용 조건하에서 조성물의 효능을 실질적으로 감소시킬 상호작용이 없는 방식으로 서로와 조합될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0140] 용어 "조성물"은 본원에서 사용된 바와 같이 성분들의 혼합물, 또는 2 이상의 물질로 형성된 물질을 지칭한다.
- [0141] 용어 "유도체"는 본원에서 사용된 바와 같이 하나 이상의 단계에서 유사한 구조의 또 다른 화합물로부터 생산될 수 있는 화합물을 의미한다. 펩타이드 또는 화합물의 "유도체" 또는 "유도체들"은 적어도 펩타이드 또는 화합물의 원하는 기능의 정도를 보유한다. 따라서, "유도체"용 대체 용어는 "기능성 유도체"일 수 있다. 유도체는 펩타이드의 화학 변형, 예컨대 아킬화, 아실화, 카바미드화, 요오드화 또는 펩타이드를 유도하는 임의의 변형을 포함할 수 있다. 상기 유도된 분자는, 예를 들어, 유리 아미노기가 아민 하이드로클로라이드를 형성하기 위해 유도되는 분자, p-톨루엔 설포닐 기, 카보벤즈옥시 기, t-부틸옥시카보닐 기, 클로로아세틸 기 또는 포르말기를 포함한다. 유리 카복실기는 염, 에스테르, 아마이드, 또는 하이드라자이드를 형성하기 위해 유도될 수 있다. 유리 하이드록실기는 0-아실 또는 0-알킬 유도체를 형성하기 위해 유도될 수 있다. 히스티딘의 이미다졸 질소는 N-im-벤질히스티딘을 형성하기 위해 유도될 수 있다. 20 표준 아미노산의 하나 이상의 자연 발생 아미노산 유도체를 함유하는 펩타이드, 예를 들어, 4-하이드록시프롤린, 5-하이드록실라이신, 3-메틸히스티딘, 호모세린, 오르니틴 또는 카복시글루탐레이트가 유도체 또는 유사체로서 또한 포함되고, 펩타이드 결합에 의해 연결되지 않는 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 펩타이드 유도체는 펩타이드의 합성 동안 편입될 수 있거나, 또는 펩타이드는 공지된 화학 변형 방법에 의해 변형될 수 있다 (참고, 예를 들면, Glazer 등, Glazer 등, Chemical Modification of Proteins, Selected Methods and Analytical Procedures, Elsevier Biomedical Press, New York (1975)). 용어 "펩타이드 유도체"는 본원에서 사용된 바와 같이 직접적으로 또는 Wnt5a 펩타이드의 변형 또는 부분 치환에 의해 Wnt5a 유도된 펩타이드로부터 생산된 아미노산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 및 비제한적으로, Wnt5a의 펩타이드 유도체는 절단된 및 융합 Wnt5a 생성물을 포함한다. Wnt5a의 펩타이드 유도체는 자체 또는 염 형태로 제형화될 수 있다.
- [0142] 용어 "유효량"은 본원에서 사용된 바와 같이 원하는 생물학적 효과를 실현시키기에 필요한 또는 충분한 양을 지칭한다.
- [0143] 용어 "제형"은 본원에서 사용된 바와 같이 특정한 식, 레시피 또는 료에 따라 제조된, 특이적 절차, 식에 따라 제조된 혼합물을 지칭한다.
- [0144] 용어 "유세포측정"은 본원에서 사용된 바와 같이 세포의 표현형 및 특징 심문용 도구를 지칭한다. 유세포측정은 감지 세포 또는 입자가 감지 영역을 통과한 레이저 (방사선의 자극된 방출에 의한 광 증폭)/광 빔을 통해 액체 스트림에서 움직이는 경우 감지 세포 또는 입자용 시스템이다. 미세한 입자의 상대적 광-산란 및 색상-구별된

형광은 측정된다. 세포의 분석 및 분화는 크기, 입도, 그리고 세포가 항체 또는 염료의 형태로 형광 분자를 담지하는지에 기반된다. 세포가 레이저 빔을 통과함에 따라, 광은 모든 방향으로 산란되고, 축으로부터 저각도 (0.5-10°)에서 정방향으로 산란된 광은 구형체의 반경의 정사각형에 비례하고 세포 또는 입자의 크기에도 또한 그러하다. 광은 세포에 진입할 수 있고; 따라서, 90° 광 (직각, 측면) 산란기는 형광색소-연결된 항체로 표시될 수 있거나 또는 형광 막, 세포질, 또는 핵 염료로 염색될 수 있다. 따라서, 세포 유형의 분화, 막 수용체 및 항원의 존재, 막 전위, pH, 효소 활성, 및 DNA 함량은 용이해질 수 있다. 유세포측정기는 각 세포상에서 몇 개의 측정을 기록하는, 멀티파라미터이고; 따라서, 이중 집단 내에서 균질한 하위집단을 확인하는 것이 가능하다 (Marion G. Macey, Flow cytometry: principles and applications, Humana Press, 2007).

- [0145] 용어 "단편" 또는 "펩타이드 단편"은 본원에서 사용된 바와 같이, 더 큰 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 원하는 생물학적 활성을 보유하는, 더 큰 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질로부터 유도된, 컷오프된, 또는 파괴된 작은 부분을 지칭한다.
- [0146] 용어 "신경교종" 본원에서 사용된 바와 같이 뇌 또는 척추에서 아교 세포로부터 발생하는 종양의 유형을 지칭한다.
- [0147] 용어 "성장"은 본원에서 사용된 바와 같이 더 커지는, 더 길어지는 또는 더 많아지는 과정, 또는 크기, 수, 또는 용적의 증가를 지칭한다.
- [0148] 용어 "방해하다" 또는 "를 방해하기 위해"는 본원에서 사용된 바와 같이 작용 또는 발생의 훼방, 지체, 둔화, 지연, 침해, 차단, 감소 또는 예방을 지칭한다. 예로써, 수용체 길항제는 생물학적 반응 자체의 촉발 보다는 작용제-매개 반응을 방해 (예를 들면, 차단 또는 둔화)한다.
- [0149] 용어 "침습" 또는 "침습성"은 본원에서 사용된 바와 같이 둘러싸는 조직을 통한 운동 및 둘러싸는 조직의 침투를 포함하는 악성 세포내 과정을 지칭한다.
- [0150] 용어 "카플란 마이어 플롯" 또는 "카플란 마이어 생존 곡선" 본원에서 사용된 바와 같이 많은 작은 간격에서 시간을 고려하면서 주어진 시간의 길이에서 생존한 임상 연구 대상체의 개연성의 플롯을 지칭한다. 카플란 마이어 플롯은 하기를 추정한다: (i) 임의의 시간에서 검열받은 (즉, 손실된) 대상체가 계속해서 후속되는 대상체와 동일한 생존 전망을 가짐; (ii) 생존 개연성이 연구에서 초기 및 후기에 동원된 대상체에 대하여 동일함; 및 (iii) 사건 (예를 들면, 사망)이 지정된 시간에 발생함. 사건의 발생의 개연성은 최종 추정치를 얻기 위해 연속적인 개연성 곱하기 임의의 초기 계산된 개연성으로 특정 시점에서 계산된다. 임의의 특정한 시간에서 생존 개연성은 위험에 처한 대상체의 수로 나눈 생존한 대상체의 수로서 계산된다. 연구에서 죽은, 탈락된, 또는 검열 받은 대상체는 위험에 처한 경우 카운트되지 않는다.
- [0151] 용어 "리간드"는 본원에서 사용된 바와 같이 분자에 선택적으로 결합할 수 있는 분자를 지칭하고, 이로써 리간드와 그의 결합 파트너 사이 결합 상호작용은 정량화가능 어세이에 의해 비특이적 상호작용을 넘어 검출가능하다. 유도체, 유사체 및 모방체 화합물은 상기 용어의 정의 내에 포함되도록 의도된다.
- [0152] 용어 "마커" 및 "세포 표면 마커"는 다른 종류의 세포로부터 세포 유형을 구별할 수 있도록 하는 세포의 표면에서 발견된 수용체, 수용체의 조합, 또는 항원 결정기 또는 에피토프를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 다른 신호전달 분자에 선택적으로 결합 또는 부착의 능력을 갖는 특화된 단백질 수용체 (마커)는 신체내 모든 세포의 표면을 코팅한다. 세포는 신체에서 그의 적절한 기능을 수행하기 위한 및 다른 세포와 연락의 방식으로 이들에 결합하는 분자 및 이들 수용체를 이용한다. 세포 분류 기술은 세포 표면 마커(들)이 세포 집단으로부터 양성 선택 또는 음성 선택을 위하여, 즉, 포함 또는 배제를 위하여 사용될 수 있는 세포성 바이오마커에 기반된다.
- [0153] 용어 "이동"은 본원에서 사용된 바와 같이 한 부분부터 또 다른 부분까지 세포의 집단의 운동을 지칭한다.
- [0154] 용어 "유사분열 지수"는 본원에서 사용된 바와 같이 세포의 집단에서 유사분열을 경험하지 않은 세포의 수에 대한 유사분열 (세포 분할)을 경험하는 세포의 수의 비를 지칭한다.
- [0155] 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 2 이상의 아미노산을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0156] 용어 "약제학적 조성물"은 표적 병태 또는 질환을 예방, 강도 감소, 치유 또는 달리 치료하기 위해 이용되는 조성물을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0157] 용어 "폴리펩타이드"는 소단위 아미노산, 아미노산 유사체 또는 펩타이드모사의 서열을 지칭하기 위해 그의 가

장 넓은 의미로 본원에서 사용되고, 여기에서 소단위는 펩타이드 결합에 의해 연결된다.

[0158] 용어 "단백질"은 아미노산으로 구성된 큰 복합체 분자 또는 폴리펩타이드를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 단백질에서 아미노산의 서열은 인코딩하는 핵산 서열에서 염기의 서열에 의해 결정된다.

[0159] 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 대응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학 유사체인 아미노산 폴리머, 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 폴리머에 적용한다. 자연 발생 아미노산의 상기 유사체의 필수적인 성질은, 단백질에 편입된 경우 단백질이 동일한 단백질에 유발된 그러나 전적으로 자연 발생 아미노산으로 이루어진 항체에 구체적으로 반응성인 것이다. 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 또한, 비제한적으로, 당화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화를 포함한 변형을 포괄한다. 잘 알려진 및 전술한 바와 같이, 폴리펩타이드가 전적으로 선형이 아닐 수 있는 것이 인정될 것이다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 유비퀴틴화의 결과로서 분지형일 수 있고, 이들은 자연적으로 발생하지 않는 인간 조작에 의해 초래된 자연적 가공 사건 및 사건들을 포함하는, 일반적으로 후번역 사건의 결과로서, 분지화 있거나 없이, 원형일 수 있다. 원형, 분지형 및 분지형 원형 폴리펩타이드는 비-번역 자연적 과정 및 전적으로 합성 방법으로, 또한 합성될 수 있다.

[0160] 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 본원에서 사용된 바와 같이, 건전한 의료 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지성 반응 등등 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉으로 사용에 적합한, 그리고 합리적인 유익/유해 비율에 적합한 염을 지칭한다. 의약에서 사용될 때 염은 약학적으로 허용가능해야 하지만, 비-약학적으로 허용가능한 염은 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 제조하기 위해 편리하게 사용될 수 있다. 상기 염은, 비제한적으로, 하기 산으로부터 제조된 것을 포함한다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 설폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄 설폰산, 포름산, 말론산, 석신산, 나프탈렌-2-설폰산, 및 벤젠 설폰산. 또한, 상기 염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 염, 예컨대 카복실산 기의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염으로서 제조될 수 있다. "약학적으로 허용가능한 염"은, 건전한 의료 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지성 반응 등등 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉에서 사용에 적합한 및 합리적인 유익/유해 비율로 적합한 염을 의미한다. 약학적으로 허용가능한 염은 당해 기술에서 공지된다. 예를 들어, P. H. Stahl, 등은 하기에서 상세히 약학적으로 허용가능한 염을 기재한다: "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zurich, Switzerland: 2002). 염은 기재된 발명 내에서 기재된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 제자리에서 또는 개별적으로 적합한 유기 산과 유리 염기 관능기와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 산 부가 염은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 바이설피에이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 디글루코네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설피에이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 푸마레이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트(이세티오네이트), 락테이트, 말레에이트, 메탄설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설피에이트, 3-페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 포스페이트, 글루타메이트, 바이카보네이트, p-톨루엔설포네이트 및 운데카노에이트. 또한, 염기성 질소-함유 기는 저급 알킬 할라이드와 같은 제제 예컨대 하기로 사원화될 수 있다: 메틸, 에틸, 프로필, 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 아이오다이드; 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 설피에이트 같은 디알킬 설피에이트; 장쇄 할라이드 예컨대 테실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴 클로라이드, 브로마이드 및 아이오다이드; 벤질 및 페닐 브로마이드 같은 아릴알킬 할라이드 및 다른 것. 수 또는 유-가용성 또는 분산성 생성물은 이로써 수득된다. 약학적으로 허용가능한 산 부가 염을 형성하기 위해 이용될 수 있는 산의 예는 염산, 브롬화수소산, 황산 및 인산과 같은 무기 산 및 옥살산, 말레산, 석신산 및 시트르산과 같은 유기 산을 포함한다. 염기성 부가 염은 카복실산-함유 모이어티를 적합한 염기 예컨대 약학적으로 허용가능한 금속 양이온의 하이드록사이드, 카보네이트 또는 바이카보네이트 또는 암모니아 또는 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 반응시킴으로써 본 발명 내에서 기재된 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 제자리에서 제조될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은, 비제한적으로, 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속 예컨대 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등등에 기반된 양이온 및 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 디에틸아민, 에틸아민 등등을 포함한 비독성 4차 암모니아 및 아민 양이온을 포함한다. 염기 부가 염의 형성에 유용한 다른 대표적인 유기 아민은 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페리딘, 피페라진 등등을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 염은 또한 당해 기술에서 잘 알려진 표준 절차를 이용하여, 예를 들어 충분히 염기성 화합물 예컨대 아민과 생리적으로 허용가능한 음이온을 제공하는 적합한 산을 반응시킴으로써 수득될 수 있다. 카복실산의 알칼리 금속 (예를 들어, 나트륨, 칼륨 또는 리튬) 또는 알칼리

토 금속 (예를 들어 칼슘 또는 마그네슘) 염이 또한 제조될 수 있다.

- [0161] 용어 "증식-유도 성장 인자"는 상피 성장 인자 [EGF], 염기성 섬유아세포 성장 인자 [bFGF] 등을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.
- [0162] 용어 "대상체"는 본원에서 사용된 바와 같이 인간을 포함한 포유동물 기원의 동물 종을 포함한다. 추가로 이들 종으로부터 유도된 세포 및 조직을 포함한다.
- [0163] 어구 "필요로 하는 대상체"는 본원에서 사용된 바와 같이, 어구의 문맥 및 용법이 달리 지시하지 않는 한, (i) 기재된 발명의 적어도 펩타이드 유사체가 투여될, (ii) 기재된 발명의 적어도 펩타이드 유사체를 받고 있는; 또는 (iii) 기재된 발명의 적어도 하나의 펩타이드 유사체를 받은 환자를 지칭한다.
- [0164] 용어 "표적"은 본원에서 사용된 바와 같이 생물학적 독립체, 예컨대, 예를 들어, 비제한적으로, 단백질, 세포, 장기, 또는 핵산을 지칭하고, 이의 활성은 외부 자극에 의해 변형될 수 있다. 자극의 성질에 의존하여, 표적에서 직접적인 변화는 없을 수 있거나, 또는 표적에서 형태적 변화는 유도될 수 있다.
- [0165] 용어 "치료제"는 본원에서 사용된 바와 같이 치료 효과를 제공하는 약물, 분자, 핵산, 펩타이드, 단백질, 조성물 또는 다른 물질을 지칭한다. 용어 "활성"은 본원에서 사용된 바와 같이 의도된 치료 효과를 책임지는 기재된 발명의 조성물의 성분, 구성요소 또는 요소를 지칭한다. 용어 "치료제" 및 "활성제"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0166] 하나 이상의 활성제의 용어 "치료적 유효량", "양 유효한", 또는 "약학적 유효량"은 및 치료의 의도된 이점을 제공하기에 충분한 양을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 일반적으로 기재된 발명에 따라 이용될 수 있는 활성제의 유효량은 일반적으로 약 0.01 mg/kg 체중 내지 약 100 g/kg 체중 범위이다. 그러나, 복용량 수준은, 상해의 유형, 연령, 체중, 성별, 환자의 의료 병태, 병태의 중증도, 투여의 루트, 및 이용된 특정한 활성제를 포함한, 다양한 인자에 기반된다. 따라서 복용량 요법은 널리 다양할 수 있지만, 표준 방법을 이용하여 의사에 의해 일상적으로 결정될 수 있다. 추가로, 용어 "치료적 유효량" 및 "약학적 유효량"은 기재된 발명의 조성물의 예방적 또는 예방 양을 포함한다. 기재된 발명의 예방적 또는 예방 적용에서, 약제학적 조성물 또는 약제는, 질환, 장애 또는 병태의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동 증상, 그의 합병증, 및 질환, 장애 또는 병태의 발달 동안 나타내는 중간체 병리적 표현형을 포함하는, 위험을 제거 또는 감소, 중증도를 약화, 또는 질환, 장애 또는 병태의 개시를 지연시키기에 충분한 양으로 아밀로이드 펩타이드의 축적에서 비롯된 질환, 장애 또는 병태에 민감한, 또는 달리 질환, 장애 또는 병태의 위험에 처한 환자에 투여된다.
- [0167] 용어 "치료한다" 또는 "치료하는"은 질환, 병태 또는 장애의 진행의 폐지, 실질적으로 억제, 저속화 또는 반전, 병태의 임상 또는 미적 증상의 실질적으로 완화, 질환, 병태, 또는 장애의 임상 또는 미적 증상의 외관의 실질적으로 예방, 및 유해한 또는 성가신 증상으로부터 보호를 포함한다. 치료하는은 추가로 하나 이상의 하기의 달성을 지칭한다: (a) 장애의 중증도 감소; (b) 치료받는 장애(들)의 증상 특징의 발달 제한; (c) 치료받는 장애(들)의 증상 특징의 악화 제한; (d) 이전에 장애(들)을 갖는 환자에서 장애(들)의 재발 제한; 및 (e) 장애(들)에 대하여 이전에 무증상이었던 환자에서 증상의 재발 제한.
- [0168] 용어 "절단된"은 본원에서 사용된 바와 같이 잔기의 절단 제거에 의한 단축; 짧게 절단됨을 지칭한다.
- [0169] 용어 "종양"은 본원에서 사용된 바와 같이 신체의 다른 부분을 침습 또는 확대하기 위한 포텐셜로 (증식) 수에서 또는 (전이) 크기에서 비정상 세포 성장을 포함한 질환을 지칭한다.
- [0170] 하나의 측면에 있어서, 상기 기재된 발명은 치료량의 치료제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 여기에서 치료제는 펩타이드이고, 여기에서 치료제는 (1) 종양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 감소시키기 및 (2) 대조군에 비해 대상체 생존을 개선하기에 유효하다.
- [0171] 하나의 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 Box5의 펩타이드 유도체이다. 상기 펩타이드 유도체는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아미노산 서열 Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu (MDGCEL) [서열 식별 번호: 1]의 펩타이드, 서열 Leu-Glu-Cys-Gly-Asp-Met (LECGDM) [서열 식별 번호: 2]의 펩타이드, 서열 Leu-Glu-Gly-Asp-Met (LEGDM) [서열 식별 번호: 3]의 펩타이드, 및 이들의 절단된 및 융합 생성물.
- [0172] 하나의 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 Wnt5a 길항제이다. Wnt5a 길항제는, 예를 들면, Wnt5a에 결합에 의해, Wnt5a 수용체에 결합에 의해, Wnt5a 유전자의 발현 예방 또는 감소에 의해, Wnt5a 표적 유전자의 발현 예방 또는 감소에 의해 등등으로 직접적으로 또는 간접적으로 Wnt5a-활성화된 신호전달 경로를 방해하는 기능을 할 수 있다. Wnt5a-활성화된 신호전달 경로는, 비제한적으로, 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합과 관련된 신

호전달 경로, Wnt5a를 포함하는 신호전달 경로, 표준적 경로, 비표준적 경로, 등등을 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합과 관련된 신호전달 경로를 방해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 성장과 관련된 신호전달 경로를 방해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 이동과 관련된 신호전달 경로를 방해한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 침습과 관련된 신호전달 경로를 방해한다.

- [0173] 기재된 발명의 하나의 구현예에 있어서, 신호전달 경로는 β -카테닌-매개 전사를 촉진시키지 않는 Wnt-활성화된 세포성 신호전달 경로이다. 하나의 구현예에 있어서, β -카테닌-매개 전사를 촉진시키지 않는 상기 Wnt-활성화된 세포성 신호전달 경로는 비표준적 Wnt 신호전달 경로이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 비표준적 Wnt 신호전달 경로는 Wnt5a를 포함한다.
- [0174] 기재된 발명의 펩타이드는 재조합으로 발현될 수 있거나 또는 화학적으로 합성될 수 있다. 재조합으로 발현된 또는 화학적으로 합성된 펩타이드의 생산 방법은 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0175] 하나의 구현예에 있어서, 상기 기재된 발명은 합성 펩타이드를 제공한다. 합성 펩타이드의 제조 방법의 예는, 예를 들어, 하기에 기재된다: Peptide Synthesis Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 35, Pennington, MW and Dunn, BM, 1995, XII, Humana Press, Inc. Totowa, New Jersey and Peptides: Synthesis, Structures and Applications, Gutte, B, 1995, Academic Press, Inc., San Diego, California). 고상, 액상의 기술, 또는 펩타이드 축합 기술, 또는 임의의 이들의 조합을 이용하여 제조된, 합성 펩타이드는 천연 및 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 펩타이드 합성에 사용된 아미노산은 Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154)의 최초 고상 절차의 세정 프로토콜 및 표준 탈보호, 중화, 커플링을 이용한 표준 Boc (N- α -아미노 보호된 N- α -t-부틸옥시카보닐) 아미노산 수지, 또는 Carpino and Han (1972, J. Org. Chem. 37:3403-3409)에 의해 최초 기재된 염기-불안정 N- α -아미노 보호된 9-플루오레닐메톡시카보닐 (Fmoc) 아미노산일 수 있다. 양쪽 Fmoc 및 Boc N- α -아미노 보호된 아미노산은, 예를 들어, Sigma, Cambridge Research Biochemical, 또는 다른 그런 화학 회사로부터 상업적으로 취득될 수 있다. 대안적으로, 펩타이드는 임의의 다른 N- α -보호기로 합성될 수 있다.
- [0176] 고상 펩타이드 합성은, 예를 들어, 하기에 제공된 바와 같이, 또는 자동화 합성기를 이용하여 달성될 수 있다: Stewart and Young, 1984, Solid Phase Synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields and Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214. 본 발명의 펩타이드는 특별한 특성을 전달하기 위해 (생체내 L-아미노산-특이적 프로테아제에 내성인) D-아미노산, D- 및 L-아미노산의 조합, 및 다양한 "디자인" 아미노산 (예를 들면, β -메틸 아미노산, C- α -메틸 아미노산, 및 N- α -메틸 아미노산, 등)을 포함할 수 있다. 합성 아미노산은 라이신에 대하여 오르니틴, 및 류신 또는 이소류신에 대하여 노르류신을 포함한다.
- [0177] 또한, 펩타이드는, 신규 특성을 가진 펩타이드를 제조하기 위해, 펩타이드모사 결합, 예컨대 에스테르 결합을 가질 수 있다. 예를 들어, 감소된 펩타이드 결합, 즉, R1-CH₂-NH-R2 (식중 R1 및 R2는 아미노산 잔기 또는 서열이다)를 편입시키는 펩타이드는 생성될 수 있다. 감소된 펩타이드 결합은 디펩타이드 소단위로서 도입될 수 있다. 그와 같은 펩타이드는 프로테아제 활성에 내성일 수 있고, 생체내 확장된 반감기를 가질 것이다.
- [0178] 합성 펩타이드가 약 이 (2) 내지 약 삼십 (30) 아미노산 길이일 수 있다는 것이 이해된다. 하나의 구현예에 있어서, 상기 기재된 발명은 서열 식별 번호: 1에서 제시된 합성 펩타이드 및 이의 변이체를 제공한다. 하나의 구현예에 있어서, 상기 기재된 발명은 서열 식별 번호: 2에서 제시된 합성 펩타이드 및 이의 변이체를 제공한다. 하나의 구현예에 있어서, 상기 기재된 발명은 서열 식별 번호: 3에서 제시된 합성 펩타이드 및 이의 변이체를 제공한다. 합성 펩타이드 변이체는 아미노산의 치환, 결실 또는 부가를 함유할 수 있다. 치환은 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 결실 또는 부가는 단일 아미노산 또는 몇 개의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0179] 기재된 발명은 양쪽 선형 및 사이클릭 형태의 펩타이드를 고려한다. 사이클릭 펩타이드는, 예를 들어, 아미드 결합 또는 디설파이드 브릿지에 의해 형성될 수 있다. 디설파이드 브릿지는 아미노산 시스템의 2개 잔기 사이에서 형성될 수 있다.
- [0180] 기재된 발명은 기재된 펩타이드에 더하여 제2 치료제를 고려한다. 제2 치료제의 비-제한 예는 화학치료제, Wnt5a의 길항제 등등을 포함한다. Wnt5a 길항제의 비-제한 예는 항체 (예를 들면, Wnt5a 블로킹 항체), 프리즐 레드-관련 단백질 또는 단백질 유사체, 또는 Wnt3a 단백질 또는 단백질 유사체를 포함한다. Wnt5a 길항제는, 예

를 들면, Wnt5a에 결합에 의해, Wnt5a 수용체에 결합에 의해, Wnt5a 유전자의 발현 예방 또는 감소에 의해, Wnt5a 표적 유전자의 발현 예방 또는 감소에 의해 등등으로 직접적으로 또는 간접적으로 Wnt5a-활성화된 신호전달 경로를 방해하는 기능을 할 수 있다. Wnt5a-활성화된 신호전달 경로는, 비제한적으로, 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합과 관련된 신호전달 경로, Wnt5a를 포함하는 신호전달 경로, 표준적 경로, 비표준적 경로, 등등을 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합과 관련된 신호전달 경로를 방해한다. 하나의 구현예에 있어서, Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 성장과 관련된 신호전달 경로를 방해한다. 하나의 구현예에 있어서, Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 이동과 관련된 신호전달 경로를 방해한다. 하나의 구현예에 있어서, Wnt5a 길항제는 암 줄기 세포 (CSC)의 침습과 관련된 신호전달 경로를 방해한다.

- [0181] 기재된 발명의 하나의 구현예에 있어서, 신호전달 경로는 β -카테닌-매개 전사를 촉진시키지 않는 Wnt-활성화된 세포성 신호전달 경로이다. 하나의 구현예에 있어서, β -카테닌-매개 전사를 촉진시키지 않는 Wnt-활성화된 세포성 신호전달 경로는 비표준적 Wnt 신호전달 경로이다. 또 다른 구현예에 있어서, 비표준적 Wnt 신호전달 경로는 Wnt5a를 포함한다.
- [0182] 하나의 구현예에 있어서, 종양은 고형 종양이다. 고형 종양은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 뇌 종양, 결합 종양, 전립선 종양, 유방 종양, 폐 종양, 피부 종양, 간 종양, 골 종양, 난소 종양, 췌장 종양, 두부 종양, 경부 종양, 신경 종양 및 림프종. 뇌 종양의 비-제한 예는 하기를 포함한다: 수모세포종, 뇌수막종, 신경초종, 두개인두종, 생식 세포 종양, 송과체부 종양 및 신경교종. 예시적인 신경교종은 성상세포종, 희소돌기아교세포종, 뇌실막세포종 등등을 포함한다. 성상세포종의 비-제한적인 예는 다형성 교모세포종이다.
- [0183] 하나의 구현예에 있어서, 신경교종은 종양 세포를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 종양 세포는 암 줄기 세포를 포함한다.
- [0184] 하나의 구현예에 있어서, 종양은 살아있는 종양 세포의 집단을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 살아있는 종양 세포의 집단은 암 줄기 세포의 집단을 포함한다.
- [0185] 하나의 구현예에 있어서, 암 줄기 세포의 집단은 침습성 표현형에 의해 특성규명된다. 침습성 표현형은 Ki67 마커, CD147 마커, Fren2 마커 또는 이들의 조합의 발현에 의해 특성규명될 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 암 줄기 세포의 집단은 Wnt5a 및 EphA2의 드문 공발현을 보여준다.
- [0186] 하나의 구현예에 있어서, 암 줄기 세포 침습성 표현형은 Wnt5a의 발현의 높은 수준을 보여준다.
- [0187] 또 다른 구현예에 있어서, 종양 세포의 집단은 적어도 하나의 하기에 의해 특성규명된다: (1) Wnt5a 및 CD44의 발현의 높은 수준, (2) Wnt5a 또는 EphA2의 발현의 높은 수준 또는 (3) Wnt5a 및 Dlx2의 발현의 높은 수준. 또 다른 구현예에 있어서, 종양 세포의 집단은 하기 삼 (3) 과발현 Wnt5a 세포 유형의 존재에 의해 특성규명된다: (1) 뇌실하 구역 (SVZ) 성상세포, 유형 B: 아교 원섬유성 산성 단백질 (GFAP+); (2) 일시적 증폭 조상세포, 유형 C: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM- 및 (3) 신경모세포, 유형 A: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM+.
- [0188] 하나의 구현예에 있어서, 암 줄기 세포의 집단은 성장 인자에 노출 없이 배양된다. 또 다른 구현예에 있어서, 성장 인자에 노출 없이 배양된 암 줄기 세포의 집단은 성장 인자로 배양된 암 줄기 세포의 집단 (대조군)과 비교된 경우 Wnt5a의 발현의 높은 수준을 보여준다.
- [0189] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명은 암 줄기 세포의 침습을 감소시키는 치료제를 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다.
- [0190] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명은 Wnt5a 발현의 수준을 감소시키는 치료제를 제공한다.
- [0191] 또 다른 구현예에 있어서, 기재된 발명의 억제학적 조성물은 추가로 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 억제학적 조성물은 추가로 화학치료제를 포함한다.
- [0192] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명의 억제학적 조성물은 종양 성장, 이동 및 침습과 관련된 신호전달 경로에서 하나 이상의 단계를 방해하기에 유효하다. 또 다른 구현예에 있어서, 기재된 발명의 억제학적 조성물은 Wnt5a 신호전달 경로에서 단계를 방해하기에 유효하다.
- [0193] 또 다른 측면에 있어서, 기재된 발명은 필요로 하는 대상체에서 종양 성장, 이동, 침습, 또는 이들의 조합의 감소 방법으로서, (1) 치료량의 펩타이드를 포함하는 억제학적 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하고, 여기에서 치료량은 종양 성장, 이동, 침습, 또는 이들의 조합과 관련된 신호전달 경로에서 단계를 방

해하기에 유효하다.

- [0194] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명은 또한 고형 CNS 증양을 가진 대상체의 치료 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: (1) 치료량의 치료제를 포함하는 약제학적 조성물의 제공 단계 (여기에서 치료제는 펩타이드이고, 이의 치료량은 증양 성장, 이동, 침습 또는 이들의 조합을 감소시키기에 유효하다); 및 (2) 필요로 하는 대상체에 조성물의 투여 단계.
- [0195] 하나의 구현예에 있어서, 상기 방법은 대상체에 조성물의 투여를 포함하고, 여기에서 조성물은 하기를 포함한다: (1) 치료량의 Box5 펩타이드 유도체, Wnt5a 블로킹 항체, Wnt5a 길항제, Wnt5a 수용체에 결합하는 단백질, Wnt5a 보조-수용체에 결합하는 단백질, 또는 Wnt3a 및 (2) 약학적으로 허용가능한 캐리어.
- [0196] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명은 침습성 표현형의 암 줄기 세포의 집단을 포함하는 증양을 가진 대상체의 치료 방법을 제공하고, 상기 방법은 필요로 하는 대상체에 약제학적 조성물의 투여를 포함하고; 여기에서 침습성 표현형의 암 줄기 세포는 Wnt5a의 발현의 높은 수준을 갖는다.
- [0197] 하나의 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 Box5의 펩타이드 유도체의 치료적 유효량을 포함하고, 여기에서 상기 유도체는 펩타이드 A (서열 식별 번호: 2), 펩타이드 B (서열 식별 번호: 3), 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0198] 하나의 구현예에 있어서, 기재된 발명은 약제학적 조성물 투여용 루트를 제공한다. 투여의 루트는, 비제한적으로, 경구, 구강, 비경구, 비강내, 직장 및 국소를 포함한다.
- [0199] 기재된 발명의 약제학적 조성물은, 예를 들어, 정제, 트로키, 로젠지, 수성 또는 유성 현탁액, 분산성 분말 또는 과립, 에멀전, 경질 또는 연질 캡슐 또는 시럽 또는 엘릭시르로서, 경구용으로 적합한 형태일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "경구" 또는 "경구로"는 입에 의해 신체로의 도입을 지칭하고 이로써 흡수는 신체의 하기 영역의 하나 이상에서 발생한다: 입, 위, 소장, 폐 (또한 구체적으로 흡입으로서 지칭됨), 및 허 밑의 소혈관 (또한 구체적으로 설하로서 지칭됨). 경구용으로 의도된 조성물은 임의의 공지된 방법에 따라 제조될 수 있고, 그런 조성물은 약학적으로 품격있는 및 기호성 제제를 제공하기 위해 감미제, 풍미제, 착색제, 및 보존제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 정제는 정제의 제조에 적합한 무독성 약학적으로-허용가능한 부형제와 혼합물에서 활성 성분(들)을 함유할 수 있다. 이들 부형제는, 예를 들어, 하기일 수 있다: 불활성 희석제, 예컨대 탈산갈슘, 탄산나트륨, 락토오스, 인산갈슘 또는 인산나트륨; 과립화 및 봉쇄제, 예를 들어, 옥수수 전분 또는 알긴산; 결합 제제, 예를 들어, 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 및 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탈크. 정제는 미코팅될 수 있거나 또는 이들은 위장관에서 봉쇄 및 흡수를 지연시키기 위해 및 이로써 지속 작용을 장기간에 걸쳐 제공하기 위해 공지된 기술로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 시간 지연 물질 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트는 이용될 수 있다. 이들은 또한 제어된 방출로 코팅될 수 있다.
- [0200] 기재된 발명의 조성물은 또한 경질 젤라틴 캡슐 (여기에서 활성 성분(들)은 불활성 고형 희석제, 예를 들어, 탈산갈슘, 인산갈슘 또는 카올린과 혼합된다), 또는 연질 젤라틴 캡슐 (여기에서 활성 성분(들)은 수 또는 유 중간물, 예를 들어, 땅콩 오일, 유동 파라핀, 또는 올리브 오일과 혼합된다)로서 경구용으로 제형화될 수 있다.
- [0201] 기재된 발명의 조성물은 수성 현탁액으로서 제형화될 수 있고 여기에서 활성 성분(들)은 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합물이다. 그와 같은 부형제는 현탁화제, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시-프로필메틸셀룰로오스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸쓰검, 및 아카시아검이고; 분산제 또는 습윤제는 하기일 수 있다: 천연 발생 포스파타이드 예컨대 레시틴, 또는 지방산과 알킬렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 장쇄 지방족 알코올과 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어, 헵타데카에틸-엔옥시세탄올, 또는 지방산 및 헥시톨 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트로부터 유도된 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 또는 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유도된 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트. 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 풍미제, 및 하나 이상의 감미제, 예컨대 수크로오스 또는 사카린을 함유할 수 있다.
- [0202] 기재된 발명의 조성물은 식물성 오일, 예를 들어 낙화생 오일, 올리브 오일, 참깨 오일 또는 코코넛 오일에서, 또는 광유, 예컨대 유동 파라핀에서 활성 성분을 현탁시킴으로써 유성 현탁액으로서 제형화될 수 있다. 유성 현탁액은 증점제, 예를 들어, 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올을 함유할 수 있다. 감미제, 예컨대 상기에서 제시된 것들, 및 풍미제는 기호성 경구 제제를 제공하기 위해 부가될 수 있다. 이들 조성물은 항산화제 예컨대

아스코르브산의 부가에 의해 보존될 수 있다.

- [0203] 기재된 발명의 조성물은 물의 부가에 의해 수성 현탁액의 제조에 적합한 분산성 분말 및 과립의 형태로 제형화될 수 있다. 상기 분말 및 과립에서 활성 성분은 분산제 또는 습윤제, 현탁화제, 및 하나 이상의 보존제와 혼합물로 제공된다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제는 상기 이미 언급된 것들에 의해 예시된다. 추가의 부형제, 또는 예, 감미제, 풍미제 및 착색제가 또한 존재할 수 있다.
- [0204] 기재된 발명의 조성물은 또한 에멀전의 형태일 수 있다. 에멀전은 2개의 불혼화성 액체 캐리어의 조합에 의해 제조된 2-상 시스템이고, 이들 중 하나는 다른 것 전반에 걸쳐 균일하게 분배되고 최대 콜로이드성 입자의 것과 동등한 또는 보다 더 큰 직경을 갖는 구상체로 이루어진다. 구상체 크기는 임계적이고 시스템이 최대 안정성을 달성하도록 되어야 한다. 보통, 2상의 분리는 제3 물질, 유화제가 편입되지 않는 한 발생하지 않을 것이다. 따라서, 기본 에멀전은 적어도 3 구성요소, 2 불혼화성 액체 캐리어 및 유화제, 뿐만 아니라 활성 성분을 함유한다. 대부분의 에멀전은 수성상을 비-수성상 (또는 그 반대)에 편입시킨다. 그러나, 기본적으로 비-수성인 에멀전, 예를 들어, 비-수성 불혼화성 시스템 글리세린 및 올리브 오일의 음이온성 및 양이온성 계면활성제를 제조하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명의 조성물은 수중유 에멀전의 형태일 수 있다. 오일상은 식물성 오일, 예를 들어, 올리브 오일 또는 낙화생 오일, 또는 광유, 예를 들어 유동 파라핀, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 하기일 수 있다: 천연 발생 감, 예를 들어, 아카시아감 또는 트라가칸쓰감, 천연 발생 포스파타이드, 예를 들어 대두, 레시틴, 및 지방산 및 핵시톨 무수물로부터 유도된 에스테르 또는 부분 에스테르, 예를 들어 소르비탄 모노올레에이트, 및 에틸렌 옥사이드와 부분 에스테르의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트. 에멀전은 또한 감미제 및 풍미제를 함유할 수 있다.
- [0205] 기재된 발명의 조성물은 또한 시럽 및 엘릭시르로서 제형화될 수 있다. 시럽 및 엘릭시르는 감미제, 예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 소르비톨 또는 수크로오스로 제형화될 수 있다. 그와 같은 제형은 또한 진통제, 보존제, 및 풍미제 및 착색제를 함유할 수 있다. 진통제는 자극, 특히 점막 또는 마멸된 (찢어진 또는 잘라진 의미) 조직을 완화시키기 위해 주로 이용된 보호성 제제이다. 수많은 화학 물질이 진통제 특성을 갖는다. 이들 물질은 알기네이트, 점질물, 검, 텍스트린, 전분, 특정 당, 및 폴리머 다당 글리콜을 포함한다. 다른 것은 하기를 포함한다: 아카시아, 한천, 벤조인, 카보머, 젤라틴, 글리세린, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 프로필렌 글리콜, 나트륨 알기네이트, 트라가칸쓰, 하이드로겔 등등.
- [0206] 구강 투여를 위하여, 기재된 발명의 조성물은 종래의 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태를 가질 수 있다.
- [0207] 기재된 발명의 조성물은 멸균된 주사가능 수성 또는 지질생산성 현탁액의 형태일 수 있다. 용어 "비경구"는 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어, 하기를 포함하는, 주사의 방식으로 (즉, 투여 주사로) 신체에 도입을 지칭한다: 피하로 (즉, 피부밑 주사), 근육내로 (즉, 근육내 주사); 정맥내로 (즉, 정맥내 주사), 척추강내로 (즉, 척수 주위의 공간에 주사), 흉골내 주사, 또는 주입 기술. 기재된 발명의 비경구로 투여된 조성물은 바늘, 예를 들면, 외과용 바늘을 이용하여 전달된다. 용어 "외과용 바늘"은 본원에서 사용된 바와 같이, 선택된 해부상의 구조에 기재된 발명의 유체 (즉, 유효가능한) 조성물의 전달에 적용된 임의의 바늘을 지칭한다. 주사가능 제제, 예컨대 멸균된 주사가능 수성 또는 지질생산성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 이용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다.
- [0208] 멸균된 주사가능 제제는 또한, 예를 들어, 1,3-부탄디올내 용액으로서 비독성 비경구로 허용가능한 희석제 또는 용매내 멸균된 주사가능 용액 또는 현탁액일 수 있다. 용액은 일반적으로 2 이상의 물질의 균질한 혼합물로서 간주되고; 빈번하게, 필연적이지 않아도, 액체이다. 용액에서, 용질 (또는 용해된 물질)의 분자는 용매 중에서 균일하게 분포된다. 현탁액은 미세하게-분할된 종이 또 다른 종과 조합되는 분산물 (혼합물)이고, 전자는 빠르게 침강하지 않도록 미분 및 혼합된다. 일상 생활에서, 가장 흔한 현탁액은 액상수내 고형물의 것이다. 이용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매 중에는 물, 링거 용액, 및 등장의 염화나트륨 용액이 있다. 게다가, 멸균된, 고정유는 용매 또는 분산매로서 종래에 이용된다. 비경구 적용을 위하여, 특히 적합한 비히클은 용액, 바람직하게는 유성 또는 수성 용액, 뿐만 아니라 현탁액, 에멀전, 또는 이식물로 이루어진다. 수성 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있고, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 안정제를 함유할 수 있다.
- [0209] 기재된 발명의 조성물은 (입을 통해 또는 코를 통해) 흡입 또는 취입으로 전달용 분산성 건조 분말의 형태일 수 있다. 건조 분말 조성물은, 국제 특허 공개 번호 WO 91/16038 및 미국 특허 번호 6,921,527 (그들의 개시내용은

참고로 편입된다)에 개시된 바와 같이, 당해 기술에서 공지된 공정, 예컨대 동결건조 및 제트 밀링에 의해 제조될 수 있다. 분무 건조는, 예를 들어, 약물 및 캐리어의 균질한 수성 혼합물이 미세 액적을 형성하도록 용액을 분무시키는 고온 가스 스트림에 노출 (예를 들면, 2 유체 노출), 스피닝 디스크 또는 등가 디바이스를 통해 도입되는 공정이다. 수성 혼합물은 용액, 현탁액, 슬러리, 등등일 수 있지만, 혼합물 및 궁극적으로 분말화된 조성물에서 구성요소의 균일한 분포를 보장하기 위해 균질할 필요는 없다. 용매, 일반적으로 물은 약 1 μm 내지 5 μm 직경의 입자를 갖는 미세 건조 분말을 생산하는 액적으로부터 빠르게 증발시킨다. 분무 건조는 호흡가능한 입자 크기, 낮은 수분 함량 및 즉석 분무주입법을 허용하는 유동 특성을 갖는 균질한 구성의 실질적으로 비정질 분말을 초래하는 조건 하에서 실시된다. 바람직하게는 수득한 분말의 입자 크기는 질량의 약 98% 초과가 약 10 μm 이하의 직경을 갖는 입자내이고 질량의 약 90%가 5 μm 미만의 직경을 갖는 입자내인 것이다. 대안적으로, 질량의 약 95%는 10 μm 미만의 직경을 가진 입자를 가질 것이고 입자의 질량의 약 80%는 5 μm 미만의 직경을 가질 것이다. 건조 분말 조성물은 또한 국제 특허 공개 번호 WO 91/16038 (이의 개시내용은 참고로 편입된다)에서 개시된 바와 같이 동결건조 및 제트 밀링에 의해 제조될 수 있다.

[0210] 용어 "분산도" 또는 "분산성"은 약 10 중량% (% w) 미만 물, 보통 약 5% w 미만 및 바람직하게는 약 3% w 미만의 수분 함량; 약 1.0-5.0 μm 질량 중앙 직경 (MMD), 보통 1.0-4.0 μm MMD, 및 바람직하게는 1.0-3.0 μm MMD의 입자 크기; 약 >30%, 보통 >40%, 바람직하게는 >50%, 및 가장 바람직하게는 >60%의 전달된 용량; 및 약 1.0-5.0 μm 질량 중앙 공기역학적 직경 (MMAD), 보통 1.5-4.5 μm MMAD, 및 바람직하게는 1.5-4.0 μm MMAD의 에어로졸 입자 크기 분포를 갖는 건조 분말을 의미한다. 분산도 개선용 방법 및 조성물은 1995년 4월 14일 출원된 미국 출원 시리얼 번호 08/423,568에 개시되고, 그의 개시내용은 이로써 참고로 편입된다.

[0211] 용어 "분말"은 자유 유동이고 흡입 디바이스에서 쉽게 분산될 수 있고 그 뒤에 대상체에 의해 흡입되어 이로써 입자가 폐에 도달하여 폐포 속으로 침투하는 미세하게 분산된 고형 입자로 이루어지는 조성물을 의미한다. 따라서, 분말은 "호흡가능한" 것으로 언급된다. 바람직하게는 평균 입자 크기는 상대적으로 균일한 회전타원체 형상 분포를 가진 약 10 마이크로 (μm) 미만 직경이다. 더 바람직하게는 직경은 약 7.5 μm 미만이고 가장 바람직하게는 약 5.0 μm 미만이다. 보통 입자 크기 분포는 약 0.1 μm 내지 약 5 μm 직경, 특히 약 0.3 μm 내지 약 5 μm이다.

[0212] 용어 "건조"는 입자가 에어로졸을 형성하기 위해 흡입 디바이스에서 쉽게 분산성이 되는 정도로 조성물이 수분 함량을 갖는 것을 의미한다. 상기 수분 함량은 일반적으로 약 10중량% (% w) 미만 물, 보통 약 5% w 미만 및 바람직하게는 약 3% w 미만이다.

[0213] 약학적으로 허용가능한 캐리어의 양은 필요로 하는 대상체에 조성물의 균일한 폐 전달을 보장하기 위해 필요한 안정성, 분산성, 점조도 및 팽화 특징을 제공하는데 필요한 양이다. 수치로 양은, 이용되는 약물의 활성에 의존하여, 약 0.05% w 내지 약 99.95% w일 수 있다. 바람직하게는 약 5% w 내지 약 95%가 사용될 것이다. 캐리어는 하나 또는 2 이상의 약학적 부형제의 조합일 수 있지만, 일반적으로 임의의 "침투 증강제"가 실질적으로 없을 것이다. 침투 증강제는 점막 막 또는 라이닝을 통해 약물의 침투를 촉진시키는 표면 활성 화합물이고 비강내, 직장내, 및 질내 약물 제형에서 사용을 위하여 제안된다. 예시적인 침투 증강제는 하기를 포함한다: 담즙 염, 예를 들면, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 및 데옥시콜레이트; 푸시데이트, 예를 들면, 타우로데하이드로푸시데이트; 및 생체적합성 세제, 예를 들면, Tweens, Laureth-9, 등등. 폐를 위한 제형에서 침투 증강제의 사용이, 그러나, 일반적으로 바람직하지 않은 것은 폐에서 상피성 혈액 장벽이 상기 표면 활성 화합물에 부정적으로 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 기재된 발명의 건조 분말 조성물은 침투 증강제를 사용할 필요성 없이 폐에서 쉽게 흡수된다.

[0214] 폐 전달용 캐리어로서 유용한 약학적 부형제의 유형은 하기를 포함한다: 안정제 예컨대 인간 혈청 알부민 (HSA), 팽화제 예컨대 탄수화물, 아미노산 및 폴리펩타이드; pH 조정제 또는 버퍼; 염 예컨대 염화나트륨; 등등. 이들 캐리어는 결정성 또는 비정질 형태일 수 있거나 또는 2개의 혼합물일 수 있다.

[0215] 폐 전달에 특히 귀중한 팽화제는 양립가능한 탄수화물, 폴리펩타이드, 아미노산 또는 이들의 조합을 포함한다. 적합한 탄수화물은 하기를 포함한다: 모노사카라이드 예컨대 갈락토오스, D-만노스, 소르보스, 등등; 디사카라이드, 예컨대 락토오스, 트레할로오스, 등등; 사이클로덱스트린, 예컨대 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린; 및 다당류, 예컨대 라피노오스, 말토덱스트린, 텍스트란, 등등; 알디톨, 예컨대 만니톨, 자일리톨, 등등. 탄수화물의 바람직한 그룹은 락토오스, 트레할로오스, 라피노오스, 말토덱스트린, 및 만니톨을 포함한다. 적합한 폴리펩타이드는 아스파르트산을 포함한다. 아미노산은 알라닌 및 글리신을 포함하고 글리신이 바람직하다.

[0216] 폐 전달용 조성물의 소수 구성요소인 첨가제는 분무 건조 동안 형태적 안정성을 위하여 및 분말의 분산도 개선

을 위하여 포함될 수 있다. 이들 첨가제는 소수성 아미노산 예컨대 트립토판, 티로신, 류신, 페닐알라닌, 등을 포함한다.

[0217] 흡입 또는 취입으로 전달을 위하여, 기재된 발명의 조성물은 단위 복용량 치료를 대상체에 제공하기에 충분한 양으로 적합한 복용량 소켓 내에 배치된다. 복용량 소켓은 에어로졸을 형성하기 위해 가스 스트림 속에 분산 및 그 다음 치료가 필요한 대상체에 의해 후속의 흡입을 위하여 부착된 마우스피스를 갖는 챔버에서 그렇게 생산된 에어로졸의 포착에 의해 건조 분말 조성물의 분무주입법을 허용하기 위한 적합한 흡입 디바이스 내에 맞춘 것이다. 그와 같은 복용량 소켓은, 당해 기술에서 공지된 조성물 예컨대 젤라틴 또는 플라스틱 캡슐을, 건조 분말 조성물을 분산시키기 위해 컨테이너 속으로 가스 (예를 들면, 공기)의 스트림을 지향되도록 하는 제거가능 부분으로 에워싸는 임의의 컨테이너를 포함한다. 그와 같은 컨테이너는 미국 특허 번호 4,227,522; 미국 특허 번호 4,192,309; 및 미국 특허 번호 4,105,027에서 보여진 것에 의해 예시된다. 적합한 컨테이너는 또한 Glaxo's Ventolin® Rotohaler 브랜드 분말 흡입기 또는 Fison's Spinhaler® 브랜드 분말 흡입기와 함께 사용된 것을 포함한다. 우수한 수분 장벽을 제공하는 또 다른 적합한 단위-용량 컨테이너는 알루미늄 포일 플라스틱 라미네이트로부터 형성된다. 약학적-기반 분말은 형성가능한 포일에서 저압부에 중량 기준으로 또는 용적 기준으로 충전되고 덮개 포일-플라스틱 라미네이트로 용융밀봉된다. 분말 흡입 디바이스로 사용을 위한 그와 같은 컨테이너는 미국 특허 번호 4,778,054에 기재되고 Glaxo's Diskhaler® (미국 특허 번호 4,627,432; 4,811,731; 및 5,035,237)로 사용된다. 이들 참조 모두는 본 명세서에 참조로 편입된다.

[0218] 기재된 발명의 조성물은 드롭스 또는 스프레이 (예를 들면, 비강 스프레이, 에어로졸 스프레이, 또는 펌프 스프레이) 또는 비강 투여 (비강내 전달)용 다른 비히클의 형태로 사용될 수 있다. 에어로졸 스프레이 제제는 적합한 추진제 예컨대 탄화수소 추진제를 가진 가압된 컨테이너에 함유될 수 있다. 펌프 스프레이 분배기는 특이적 입자 또는 액적 크기를 갖는 정량 또는 용량을 분배할 수 있다. 임의의 분배 디바이스는 단위 용량만, 또는 다수의 용량을 분배하기 위해 정렬될 수 있다. 더욱 일반적으로, 본 발명의 조성물, 특히 비강내 투여를 위하여 제형화된 것은 또한 용액, 현탁액, 또는 점성 조성물 (예를 들면, 겔, 로션, 크림, 또는 연고)로서 제공될 수 있다.

[0219] 기재된 발명의 조성물은 조성물의 직장 투여용 좌약의 형태일 수 있다. "직장" 또는 "직장으로"는 본원에서 사용된 바와 같이 흡수가 직장의 벽을 통해 발생하는 직장을 통해 신체에의 도입을 지칭한다. 이들 조성물은 상온에서 고체이지만 직장 온도에서 액체인 적합한 무자극 부형제 예컨대 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜과 약물의 혼합에 의해 제조될 수 있고 따라서 직장에서 용융될 것이고 약물을 방출할 것이다. 좌약으로서 제형화된 경우 본 발명의 조성물은 전통적 결합제 및 캐리어, 예컨대 트리글리세라이드로 제형화될 수 있다.

[0220] 용어 "국소"는 적용의 지점에서, 또는 바로 밑에서 본 발명의 조성물의 투여를 지칭한다. 어구 "국소로 적용하는"은 상피성 표면을 포함하는 하나 이상의 표면(들)상에 적용을 기재한다. 국소 투여가, 경피 투여와 대조로, 일반적으로 전신 효과 보다 국부를 제공하여도, 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한 또는 암시된, 용어 국소 투여 및 경피 투여는 상호교환적으로 사용된다. 본원의 목적을 위하여, 국소 적용은 구강정결제 및 가글을 포함할 수 있다.

[0221] 국소 투여는 또한 당해 기술에서 잘 알려진 기술 및 절차에 따라 제조되는 경피 투여 예컨대 경피 패치 또는 이온침투요법 디바이스의 사용을 포함할 수 있다. 용어 "경피 전달 시스템", "경피 패치" 또는 "패치"는 체순환을 통해 분포에 이용가능해지도록 피부를 통해 복용 형태로부터 통로에 의해 약물(들)의 경시적 방출된 용량을 전달하기 위해 피부상에 배치된 접촉제 시스템을 지칭한다. 경피 패치는, 비제한적으로, 멀미용 스모폴라민, 협심증의 치료용 니트로글리세린, 고혈압용 클로니딘, 후-폐경 징후용 에스트라디올, 및 흡연 중단용 니코틴을 포함한, 다양한 의약품을 전달하기 위해 사용된 잘-허용된 기술이다.

[0222] 기재된 발명에서 사용에 적합한 패치는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: (1) 매트릭스 패치; (2) 저장기 패치; (3) 접촉제내 다중-라미네이트 약물 패치; 및 (4) 접촉제내 모놀리스 약물 패치; 경피 및 국소 약물 전달 시스템, pp. 249-297 (Tapash K. Ghosh 등 eds., 1997) (이로써 본 명세서에 참조로 편입된다). 이들 패치는 당해 기술에서 잘 알려지고 일반적으로 상업적으로 이용가능하다.

[0223] 일부 구현예에서, 기재된 발명의 조성물은 용매, 현탁화제, 결합 제제, 충전제, 운환제, 봉해제, 및 습윤제/계면활성제/가용화제로부터 선택된 부형제, 비히클 또는 캐리어로 제형화될 수 있다. 용어 "부형제", "비히클", 또는 "캐리어"는, 이와 혼합된 경우 활성 화합물(들)과 유해하게 반응하지 않지만, 이의 사용을 용이하게 하는 물질을 지칭한다. 용어 "활성"은 의도된 치료 효과를 책임지는 기재된 발명의 조성물의 성분, 구성요소 또는 요소를 지칭한다. 캐리어는 이들을 치료받는 대상체에 투여에 적합하도록 만들기 위해 충분히 고순도 및 충분히

저독성이어야 한다. 캐리어는 불활성일 수 있거나, 또는 약학적 이점을 가질 수 있다.

[0224] 캐리어는 액체 또는 고체일 수 있고, 주어진 조성물의 활성 및 다른 구성요소와 조합되는 경우, 원하는 벌크, 점도, 등을 제공하기 위해 투여의 계획된 방식을 염두하여 선택된다. 전형적인 약학적 캐리어는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 결합 제제 (비제한적으로 사전절라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 포함); 충전제 (비제한적으로 락토오스 및 다른 당, 미세결정성 셀룰로오스, 펙틴, 젤라틴, 황산칼슘, 에틸 셀룰로오스, 폴리아크릴레이트 또는 칼슘 수소 포스페이트 포함.); 윤활제 (비제한적으로 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 실리카, 솔리달 (solldal) 실리콘 디옥사이드, 스테아르산, 금속 스테아레이트, 수소화된 식물성 오일, 옥수수 전분, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 벤조에이트, 아세트산나트륨 포함); 붕해제 (비제한적으로 전분, 나트륨 전분 글라이콜레이트 포함) 및 습윤제 (비제한적으로 나트륨 라우릴 설페이트 포함). 기재된 발명의 조성물에 적합한 추가의 캐리어는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 물, 염 용액, 알코올, 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 락토오스, 아밀로오스, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 규산, 점성 과라핀, 방향 오일; 지방산 모노글리세라이드 및 디글리세라이드, 페트로에트랄 (petroethral) 지방산 에스테르, 하이드록시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 등등. 약학적 제제는 멸균될 수 있고 원한다면, 활성 화합물과 유해하게 반응하지 않는 보조제, 예를 들면, 윤활제, 보존제, 안정제, 습윤제, 유화제, 삼투압 영향염, 버퍼, 착색제, 풍미제 및/또는 방향족 물질 등등과 혼합될 수 있다.

[0225] 용어 "약학적으로 허용가능한 캐리어" 본원에서 사용된 바와 같이 활성 구성요소가 안정하게 남아있을 것이고 생체이용가능할 의약품의 투여에 종래 유용한 임의의 실질적으로 무독성 캐리어를 지칭한다. 일부 구현예에서, 기재된 발명의 조성물의 약학적으로 허용가능한 캐리어는 이형제 예컨대 지속 방출 또는 지연 방출 캐리어를 포함한다. 상기 구현예에서, 캐리어는, 활성 성분의 덜 빈번한 및/또는 감소된 복용량, 취급의 편리, 및 확장된 또는 지연된 효과를 초래하는, 더욱 효율적인 투여를 제공하기 위해 치료량의 치료제의 지속된 또는 지연 방출이 가능한 임의의 물질일 수 있다. 상기 캐리어의 비-제한 예는 천연 및 합성 폴리머 등등의 리포솜, 마이크로스펀지, 마이크로구형체, 또는 마이크로캡슐을 포함한다. 리포솜은 다양한 인지질 예컨대 콜레스테롤, 스테아릴아민 또는 포스파티딜콜린으로부터 형성될 수 있다.

[0226] 기재된 발명의 치료적으로 활성 펩타이드는 자체 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 기재된 발명의 펩타이드의 비독성 염을 지칭한다. 본 발명에 사용될 수 있는 펩타이드 염은 유기 산의 약학적으로 허용가능한 염 또는 무기 산의 약학적으로 허용가능한 염이다. 상기 약학적으로 허용가능한 펩타이드 염의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 유리 아미노 기로 형성된 것 예컨대 염산, 인산, 황산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 등으로부터 유도된 것, 및 유리 카복실 기로 형성된 것 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 제이철 하이드록사이드, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인, 등으로부터 유도된 것.

[0227] 기재된 발명의 추가의 조성물은 당해 기술에서 공지된 기술, 예컨대 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th or 19th editions에 기재되고, Mack Publishing Company of Easton, Pa.에 의해 공개된 것 (이는 본 명세서에 참조로 편입된다)을 이용하여 쉽게 제조될 수 있다.

[0228] 일부 구현예에 있어서, 기재된 발명의 조성물은 추가로 Wnt5a 유도제 펩타이드, Wnt5a 모방 펩타이드, Wnt5a 길항제, 또는 Wnt5a 블로킹 항체에 의해 제공된 것에 더하여 또 다른 약학적 효과를 조성물에 제공함을 목표로 한 하나 이상의 양립가능한 활성 성분을 포함할 수 있다. "양립가능한"은 본원에서 사용된 바와 같이 그와 같은 조성물의 활성 성분이 서로 그와 같은 방식으로 조합될 수 있어서 이로써 통상적인 사용 조건 하에서 각 활성 성분 또는 조성물의 효능을 실질적으로 감소시킬 상호작용이 없는 것을 의미한다.

[0229] 기재된 발명의 조성물은 또한 뇌 종양 치료를 위하여 다른 조성물과 조합으로 또는 연속으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 상기 다른 조성물은 하기를 포함할 수 있다: 골 형성 단백질 4 (BMP4); 및 항-염증성 화합물 (비제한적으로 비스테로이드 항-염증성 약물 (NSAIDs), 예컨대 이부프로펜, 인도메타신, 및 플루르바이프로펜 포함).

[0230] 단독 또는 다른 활성 성분과 조합으로, 기재된 발명의 조성물은 단위 용량 또는 다중 용량으로 일정 기간에 걸쳐 대상체에 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료적 유효량", "치료량", 및 "약학적 유효량"은 대상체에 그의 투여 이후 치료적 또는 유익한 효과를 초래하는 본 발명의 조성물의 양을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 추가로, 용어 "치료적 유효량", "치료량" 및 "약학적 유효량"은 기재된 발명의 조성물의 예방적 또는 예방 양을 포함한다. 기재된 발명의 예방적 또는 예방 적용에서, 약제학적 조성물 또는 약제는, 종양의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동 증상, 그의 합병증 및 종양의 발달 동안 나타내는 중간체 병리

적 표현형을 포함하는, 위험을 제거 또는 감소, 중증도를 약화, 또는 중양의 개시를 지연시키기에 충분한 양으로 침습성 표현형을 가진 암 줄기 세포의 집단을 포함한 중양에 민감한, 또는 달리 중양의 위험에 처한 환자에 투여된다.

[0231] 활성 물질의 농도는 그의 치료 효과를 발휘하도록 선택되지만, 숙련가의 범위 및 건전단 판단 내에서 유의미한 부작용을 피하기에 충분히 낮다. 조성물의 유효량은 치료받는 생물학적 대상체의 연령 및 신체 조건, 병태의 중증도, 치료의 지속시간, 동시 요법의 성질, 이용된 특이적 화합물, 조성물 또는 다른 활성 성분, 이용된 특정한 캐리어, 및 유사 인자를 이용하여 다양할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 상기 인자를 쉽게 평가할 수 있고, 상기 정보에 기반하여, 의도된 목적을 위하여 사용되도록 기재된 발명의 조성물의 특정한 유효 농도를 결정할 수 있다. 추가로, 기재된 발명의 치료적 적용에서, 조성물 또는 보통약은, 질환, 장애 또는 병태의 개발 중인 그의 합병증 및 중간체 병리적 표현형을 포함하여, 질환, 장애 또는 병태의 증상을 치유, 또는 적어도 부분적으로 휴지하기에 충분한 양으로 그와 같은 질환, 장애 또는 병태로 의심되는, 상기를 갖는, 또는 상기로부터 이미 고통 받고 있는 환자에 투여된다. 일부 방법에서, 기재된 발명의 조성물의 투여는 질환, 장애 또는 병태의 특징적인 병리학을 아직 개발하지 못한 환자에서 인지 손상을 감소 또는 제거한다.

[0232] 치료적 또는 예방적 처치를 달성하기에 적절한 양은 치료적으로-유효한 용량으로서 본원에서 정의된다. 양쪽 예방적 및 치료적 레지멘에서, 기재된 발명의 조성물의 양은 충분히 유의한 반응이 달성된 때까지 몇 개의 복용량으로 보통 투여된다. 전형적으로, 반응은 모니터링되고 반복된 복용량은 반응이 약해지기 시작하면 주어진다. 숙련가는, 이하에서 "단위 용량"으로서 지칭된, 효과의 주어진 강도를 이끌어내는 복용 단위 (사용의 단위 의미)로 용량을 결정함으로써 본 발명의 조성물의 약학적 유효량을 결정할 수 있다. 용어 "용량-강도 관계"는 개별적 수평체에서 효과의 강도가 용량에 관련하는 방식을 지칭한다. 일반적으로 지칭된 효과의 강도는 최대 강도의 50%이다. 대응하는 용량은 50% 유효한 용량 또는 개별적인 ED50으로 불린다. 용어 "개별적"의 사용은 본원에서 사용된 바와 같이 효과의 강도에 기반된 ED50을, 집단에서 반응 데이터의 빈도로부터 결정된, 또한 단축된 ED50인, 중양 유효 용량과 식별한다. "효능"은 본원에서 사용된 바와 같이 원하는 반응을 달성하기 위해 기재된 발명의 조성물의 특성을 지칭하고, "최대 효능"은 최대 달성가능한 효과를 지칭한다. 특정한 장애 또는 병태의 치료에서 유효할 기재된 발명의 조성물에서 화합물의 양은 장애 또는 병태의 성질에 의존할 것이고, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. (참고, 예를 들어, Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Joel G. Harman, Lee E. Limbird, Eds.; McGraw Hill, N.Y., 2001; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J., 1995; and DRUG FACTS AND COMPARISONS, FACTS AND COMPARISONS, INC., St. Louis, Mo., 1993). 제형에서 이용되는 정확한 용량은 또한 투여의 루트, 및 질환 또는 장애의 중증도에 의존할 것이고, 종사자의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 다양한 투여 패턴은 당해 분야의 숙련가에 명백할 것이다.

[0233] 기재된 발명의 조성물의 투여용 복용량 범위는 원하는 치료 효과를 생산하기에 충분히 큰 것이다. 기재된 발명의 조성물의 치료적 유효량은 규칙적 기준으로 1 일당 1회 이상 투여될 수 있다. 대상체에 투여된 전형적인 용량은 약 0.01 mg의 조성물 / kg (체중) / 일 내지 약 0.5 mg의 조성물 / kg (체중) / 일이다. 예를 들어, 비제한적으로, 조성물의 최소 용량은 하기로서 고려되고: 약 0.01 mg/kg/일, 약 0.025 mg/kg/일, 약 0.05 mg/kg/일, 약 0.075 mg/kg/일, 약 0.08 mg/kg/일, 약 0.1 mg/kg/일, 약 0.125 mg/kg/일, 약 0.15 mg/kg/일, 약 0.175 mg/kg/일, 약 0.2 mg/kg/일, 약 0.225 mg/kg/일, 약 0.25 mg/kg/일, 약 0.275 mg/kg/일, 약 0.3 mg/kg/일, 약 0.325 mg/kg/일, 약 0.35 mg/kg/일, 약 0.375 mg/kg/일, 약 0.4 mg/kg/일, 약 0.45 mg/kg/일, 약 0.475 mg/kg/일, 또는 약 0.5 mg/kg/일 그리고 최대 용량은 하기로서 고려된다: 약 0.5 mg/kg/일, 약 0.475 mg/kg/일, 약 0.45 mg/kg/일, 약 0.4 mg/kg/일, 약 0.375 mg/kg/일, 약 0.35 mg/kg/일, 약 0.325 mg/kg/일, 약 0.3 mg/kg/일, 약 0.275 mg/kg/일, 약 0.25 mg/kg/일, 약 0.225 mg/kg/일, 약 0.2 mg/kg/일, 약 0.175 mg/kg/일, 약 0.15 mg/kg/일, 약 0.125 mg/kg/일, 약 0.1 mg/kg/일, 약 0.08 mg/kg/일, 약 0.075 mg/kg/일, 약 0.05 mg/kg/일, 약 0.025 mg/kg/일, 또는 약 0.01 mg/kg/일. 인간내 본 발명의 일부 구현예에서, 용량은 약 0.01 mg 내지 약 0.3 mg의 조성물 / kg (체중) / 일, 및 인간내 다른 구현예에서 0.01 및 0.08 mg의 조성물 / kg (체중) / 일일 수 있다.

[0234] 당해 분야의 숙련가는 기재된 발명의 조성물의 적절한 치료적 복용량의 초기 징후가 시험관내 및 생체내 동물 모델 시스템에서, 및 인간 임상시험에서 결정될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 상기 연구의 목표는 독성 또는 다른 부작용의 생성 없이 안전하게 투여될 수 있는 복용량을 확인하는 것이다. 급성 치료를 위하여, 치료적 복용량은 최대 내성 용량에 근접한다. 만성적 치료를 위하여, 더 낮은 복용량이 장기간 독성 효과에 대한 관심 때문에 바람직할 수 있다.

- [0235] 인간 대상체에서 치료 효과, 즉, 종양 성장, 이동, 침습, 또는 이들의 조합의 감소 효과는 당해 기술에서 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 종양 성장은, 비제한적으로, 배가 시간 (DT) (즉, 종양이 용적으로 2배가 되는데 걸리는 시간), 특이적 성장 속도 (즉, 1 일당 종양의 백분율 성장), 고형 종양 (RECIST)에서 반응 평가 기준 등등을 포함한, 기술에 의해 결정될 수 있다. 상기 기술은 전형적으로 당해 기술에서 공지된 하나 이상의 화상형성 기술을 포함한다. 예시적인 화상형성 기술은 컴퓨터 단층촬영 (CT) 또는 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT) 스캔, 양전자 방출 단층촬영 (PET), 자기 공명 영상 (MRI), 광학 영상 등등을 포함한다. 광학 영상 기술은, 비제한적으로, 생물발광 화상형성 (BLI) 및 형광 화상형성 (FLI)을 포함한다. 종양 이동은, 비제한적으로, 트랜스웰 시스템 또는 보이덴 챔버, 상처 치유, 듀로텍시스 어세이, 마이크로피펫, 3D 세포의 매트릭스 (ECM), 미세패턴화된, 미세유체성 및 생체내 화상형성을 포함한, 기술에 의해 결정될 수 있다. 생체내 화상형성은, 비제한적으로, 다광자 현미경검사를 포함한, 당해 기술에서 일상적으로 사용된 화상형성 기술을 포함한다. 종양 침습은, 비제한적으로, Matrigel™ (Engelbreth-Holm-Swarm 마우스 육종 세포로부터 추출된 용해된 기저막 제조), 라미닌 I, 콜라겐 I, 및 콜라겐 IV 어세이를 포함한, 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0236] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명확히 달리 지시하지 않는 한 하한의 단위의 10번째까지, 각 개입 값, 그 범위의 상한과 하한 사이 및 그 언급된 범위에서 임의의 다른 언급된 또는 개입 값은 본 발명 내에서 포함되는 것으로 이해된다. 더 작은 범위에서 독립적으로 포함될 수 있는 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 또한 본 발명 내에 포함되고, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 한계를 제외 처리된다. 언급된 범위가 한계의 한쪽 또는 양쪽을 포함하는 경우, 한계가 포함된 것의 각각 양쪽을 배제한 범위가 본 발명에 또한 포함된다.
- [0237] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기재된 것에 유사한 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 기재된 발명의 실시 또는 시험에서 또한 사용될 수 있어도, 바람직한 방법 및 물질은 이제 기재된다. 본원에서 언급된 모든 공보는 개시하기 위해 본 명세서에 참조로 편입되고 공보가 인용되는 것과 함께 방법 및/또는 물질을 기재하였다.
- [0238] 본원에서 사용된 바와 같이 및 첨부된 청구항에서, 단수 형태는 문맥이 명확히 달리 지시하지 않는 한 복수의 참조를 포함하는 것이 주목되어야 한다. 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학적 용어들은 동일한 의미를 갖는다.
- [0239] 본 명세서에서 논의된 공보들은 본원의 출원일에 앞서 그의 개시내용에 대하여 단독으로 제공되고 각각은 그 전체가 참조로 편입된다. 기재된 발명이 선행 발명의 덕으로 상기 공보를 선행할 자격이 주어지지 않는 인정으로서 해석되는 것이 본원에서는 없다. 추가로, 제공된 공보의 일자는 독립적으로 확인되는 것이 필요할 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.
- [0240] 실시예
- [0241] 하기 실시예는 기재된 발명을 제조 및 사용하는 방법의 완벽한 개시내용 및 설명을 당해 분야의 숙련가에 제공하기 위해 제시되고, 발명자들이 그의 발명으로서 여기는 범위를 제한하도록 의도되지 않고 아래 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험이라는 것을 이들이 나타내도록 의도되지 않는다. 사용된 숫자 (예를 들면 양, 온도, 등)에 대하여 정확도를 보장하기 위해 노력하였지만 일부 실험적 오차 및 편차가 설명되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨온도이고, 압력은 대기압 또는 대기압에 가깝다.
- [0242] 방법
- [0243] 면역표지화 / 면역형광 표지화
- [0244] 면역표지화 / 면역형광 표지화는 세포, 조직, 또는 장기 내에서 특정한 부위에 항원의 검출 및 국제화를 가능하게 하는 생화학 공정이다. 세포 염색은 4 단계로 분할될 수 있다: 세포 제조, 고착, 항체의 적용, 및 평가.
- [0245] 첫째, 세포는 고형 지지체에 부착되어 후속의 절차에서 용이한 취급을 허용한다. 이는 몇 개의 방법에 의해 달성될 수 있고, 예를 들어, 부착 세포는 현미경 슬라이드, 커버슬립, 또는 광학적으로 적합한 플라스틱 지지체 상에서 성장될 수 있다. 현탁액 세포는 화학 링커를 이용하여 고형 지지체에 결합된, 유리 슬라이드 상에서 워셔분리될 수 있거나, 또는 일부 경우에서 현탁액에서 처리될 수 있다. 그 다음, 세포는 고정되고 투과되어 항체의 그의 항원에의 접근을 보장한다. 광범위의 정착액은 이용가능하고, 방법의 정확한 선택은 조사된 항원의 성질 및 사용된 항체의 특성에 의존할 것이다. 고착 방법은 일반적으로 2개 클래스로 나뉜다: 유기 용매 및 가교 결합 시약. 유기 용매 예컨대 알코올 및 아세톤은 지질을 제거하고 세포를 탈수시키고, 반면에 세포성 구조상에

서 단백질을 침전시킨다. 가교결합 시약 (예컨대 파라포름알데하이드)는, 정상적으로 유리 아미노기를 통해, 분자간 브릿지를 형성하여, 따라서 연결된 항원의 네트워크를 창출한다. 가교결합제는 유기 용매보다 더 나은 세포 구조를 보존하지만, 일부 세포 구성요소의 항원성을 감소시킬 수 있고, 시료에 항체의 접근을 허용하기 위해 투과화 단계의 부가를 요구할 수 있다. 모든 방법을 이용한 고착은 단백질 항원을 변성시킬 수 있고, 이러한 이유로, 변성된 단백질에 대해 제조된 항체는 세포 염색에 더욱 유용할 수 있다. 적절한 고착 방법은 관련된 적용에 따라 선택될 수 있다. 하기는 면역형광 및 표지화를 위한 예시적인 프로토콜이다.

[0246] 세포는 인큐베이터로부터 제거되고 PBS에서 린스된다. 과잉의 용액은 제거되고 세포는 10-20 분 동안 3-4% 파라포름알데하이드에서 고정되고 그 다음 PBS로 간단히 린스된다. 세포는 그 다음 2-20 분 동안 0.5% 트리트론 X-100으로 투과되고 그 다음 PBS로 3회 (각각 적어도 5 분) 세정된다. 1차 항체는 적절한 희석을 위해 PBS에서 희석되고, 커버슬립으로 적용되고 실온에서 60 분 동안 인큐베이션된다. 세포는 그 다음 PBS로 3회 (각각 적어도 5 분) 세정된다. 형광 표지된 2차 항체는 PBS에서 적절한 희석액에 희석되고, 커버슬립으로 적용되고 실온에서 30 분 동안 인큐베이션된다. 세포는 그 다음 PBS로 3회 (각각 적어도 5 분) 세정된다. 과잉의 PBS는 제거되고, 커버슬립은 실장 배지로 실장되고 유리 슬라이드상에서 역전된다.

[0247] 신경구 어세이 (NA) - 시험관내 신경 줄기 세포 (NSCs)를 확인, 전파 및 열거하기 위해

[0248] 임의의 특이적 형태적, 분자 또는 항원성 서명의 부족 때문에, 줄기 세포는 기능성 기준에 기반하여 확인되었다. 신경구 어세이 (NA)로서 지칭된 배양 방법론 (Renolds and Weiss, Science, 1992, 225: 1707-1710)은 시험관내 NSCs를 확인, 전파 및 열거하기 위해 사용될 수 있다. 간단히, NA는 CNS 조직 (예를 들면, 배아부터 성인까지)의 현미해부, 세포 대 세포 접촉의 파괴, 및 단일 세포의 현탁액의 생성을 포함한다. 세포는 적어도 하나의 증식-유도 성장 인자 (즉 상피 성장 인자 [EGF], 염기성 섬유아세포 성장 인자 [bFGF] 등)의 존재하에 한정된 무혈청 배지내 조직 배양용기에 (전형적으로 저밀도로) 플레이팅된다. 이들 조건 하에서, 2-5 일 이내 다능성 NSC 집단은 분할하기 시작하여 신경구로서 지칭된 미분화 세포의 클론같이 유도된 클러스터를 일컫는다. 증식 유도 인자의 연속된 존재하에, 신경구내 세포는 계속해서 분할하여, 신경구를 포함한 세포의 수에서 그리고 결과적으로 신경구의 크기에서 증가한다. 신경구는 수집되고, 단일 세포 현탁액으로 파괴되고, 세포는 배양액에서 재플레이팅하여 신규 신경구를 생성한다. 이런 식으로 NSC의 통과는 실행가능한 CNS 전구체 세포에서 산술적 증가를 초래한다. NA 어세이는 NSCs를 한정된 조건에서 단리 및 팽창되어 이로써 추정 줄기 세포의 거동이 상이한 실험 조건 하에서 연구될 수 있다.

[0249] 침습 어세이 - 매트리지겔 (Matrigel) 침습 어세이

[0250] 침습 어세이는 악성 및 정상 세포의 침습 능력을 연구하기 위한 시험관내 시스템이다. 특이적 적용은 종양 세포의 전이성 포텐셜의 평가, 세포외 매트릭스 구성요소 또는 항신생물성 약물에 의한 전이의 저해, 세포 표면 단백질의 변경된 발현, 또는 전이성 세포에서 매트릭스 메탈로프로테이나제; 및 정상 세포, 예컨대 배아 줄기 세포, 영양막세포층, 내피 세포, 및 섬유아세포의 침습을 포함한다.

[0251] 하나의 구현예에 있어서, 하기 매트리지겔 침습 어세이 프로토콜은 침습 어세이의 하나의 실시예이다. 코팅 버퍼는 제조되고 매트리지겔 매트릭스 분취액은 4°C에서 해동된다. 그 다음, 코팅 용액은 코팅 버퍼와 매트리지겔 매트릭스의 혼합에 의해 제조된다. 수많은 투과성 지지체는 24-웰 플레이트의 웰들에 이동되고 희석된 매트리지겔의 100 μ l은 24-웰 플레이트의 각 웰에 놓여진다. 플레이트는 그 다음 37°C에서 2시간 동안 겔화를 위하여 코팅된 투과성 지지체로 인큐베이션된다. 세포는 배양되고 침습 어세이를 위하여 제조되고, 예를 들어, 줄기-유사 특징 (GFD TPCs)을 가진 성장 인자 의존적 hGBM 종양-증식 세포는 제조된 Wnt5a 단백질 (GFD+R5)의 포화 농도로 사전 치료되고; 렌티바이러스-매개 과-발현 GFD 세포 (GFD+LV5); 성장 인자 독립형 (GFI) TPCs는 Wnt5a-블록킹 항체 (AbW5) 또는 제조된 Wnt3a 단백질 (R3) 또는 제조된 분비 프리즐레드-관련 단백질 1 (SFRP1)의 포화 농도, 또는 Wnt5a-유도된 썬타이드 일명 Box5 (서열 식별 번호: 1), 썬타이드 A (서열 식별 번호: 2) 및 썬타이드 B (서열 식별 번호: 3)로 치료된다. 세포 현탁액은 24 웰 침습 챔버에 대하여 5 x 10⁴ 세포/mL를 함유하는 배양 배지에서 제조된다. 분취량의 0.5 mL의 세포 현탁액 (2.5 x 10⁴ 세포)은 그 다음 각 24 웰 침습 챔버에 추가된다. 화학유인물질은 플레이트의 웰들에 추가된다 (예컨대 접착제 기질로서 파이브로넥틴). 세포 침습 챔버는 그 다음 37°C, 5%CO₂ 대기에 가습된 조직 배양 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션된다. 매트리지겔 코팅된 투과성 지지체의 최상부에서 비침습된 세포는 면면봉으로 긁어내어 제거된다. 그 다음 24-웰 플레이트로부터 투과성 지지체는 제거되고 세포 염색 용액으로 염색되고 침습된 세포는 광학 현미경하에서 카운트된다.

[0252] 정량적 유세포측정 분석

- [0253] TPCs 또는 종양 관련된 대식세포는 해부되고 파파인 용액에서 소화되고 단일-세포 현탁액은 수득된다. 세포 분류 분석을 위하여, 세포는 원심분리되고 PBS 함유 DNase에서 재현탁된다. 세포는 그 다음 4°C에서 30분 동안 Wnt5a, CD44, EphA2를 검출하는 형광색소 접합된 단클론성 항체의 "칵테일"로 인큐베이션되고, 분류되고 FACS에 의해 분석된다. 세포는 Wnt5a, CD44, 또는 EphA2 발현에 기반된 개별적 집단에 순방향 및 직교 광 산란기 신호 (FSC 및 SSC) 및 형광 서명 (FITC 또는 PE)상에서 확인되고 전자적으로 게이팅된다. 배경 형광은 1차 항체를 특이적 아이소타입 대조군으로 치환시킴으로써 추정되었다. 자가형광의 측정은 시험된 각 조건에 대하여 또한 임상적으로 수행되었다. 기기 미가공 데이터는 파일저장 및 데이터 처리를 위하여 전자적으로 저장되었다.
- [0254] 동소 이식에 의한 생체내 종양형성 능력 및 침습성의 평가
- [0255] 종양형성능은 종양 세포를 면역공핍한 성인 중증 복합성 면역결핍 (SCID) 마우스에 주사함으로써 결정되었다. (Galli 등, Cancer Res. 2004, 65:7011-7021). 종양 세포, 예를 들어, GFI TPCs, GFD TPCs, Box5 (서열 식별 번호: 1)로 사전치료된 GFI TPCs, 펩타이드A (서열 식별 번호: 2)로 사전치료된 GFI TPCs는 동소이식으로 SCID 마우스에 주사되어 생체내 종양형성 능력 및 침습성을 평가하였다. 또한, GFD 또는 GFI TPCs 및 Wnt5a-블록킹 단백질 (AbWt)은, 단독 또는 BMP4 (B4), Box5 (서열 식별 번호: 1) 및 펩타이드A (서열 식별 번호: 2)와 조합으로 SCID 마우스에 공-주사되었다.
- [0256] 마우스는 상이한 시간에 희생되었다. 마우스 뇌 부분의 시리즈 조직학적 재건은 평가용 루시페라제로 면역표지되었다.
- [0257] 생체내 실험으로부터의 결과는 모두 통계적 분석 처리되었다. 생존 곡선은 카플란-마이어 방법을 이용하여 추정되었다.
- [0258] 고성능 액체 크로마토그래프 (HPLC)
- [0259] 하나의 구현예에 있어서, 하기 HPLC 조건은 하기를 결정하기 위해 사용된다: 펩타이드의 순도: C18 Vydac 칼럼, 이동상 A: 물에서 0.1% TFA, 이동상 B: 아세토니트릴에서 0.1% TFA, 20 분 지나 5% B 내지 65% B 구배.
- [0260] 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 (MALDI-ToF)
- [0261] 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 (MALDI)는 짧은 레이저 펄스가, 연속 레이저를 이용하는 더욱 종래의 이온화 방법에 의해 이온화된 경우 단편이 되고 취약해지는 경향이 있는, 생체분자 (생고분자 예컨대 DNA, 단백질, 펩타이드 및 당류) 및 큰 유기 분자 (예컨대 폴리머, 덴드리머 및 다른 거대분자)를 분석하기 위해 사용되는 질량 분광분석법에서 사용된 소프트 이온화 기술이다. 하나의 구현예에 있어서, MALDI-ToF용 하기 파라미터는 하기를 결정하기 위해 사용된다: 펩타이드의 분자량: 가속 전압: 20000, 그리드 전압: 93.7%, 가이드 와이어 전압: 0.070%, 낮은 질량 게이트: 오프, 지연: 100 오프, 음이온: 오프.
- [0262] 물질
- [0263] Wnt5a-블록킹 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 재조합 Wnt3a 단백질 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 재조합 분비 프리즐레드-관련 단백질 1 (R&D 시스템), Box5 (Primm srl Peptide Synthesis, 펩타이드 A (Primm srl Peptide Synthesis), 펩타이드 B (Primm srl Peptide Synthesis).
- [0264] Box5 (서열 식별 번호: 1), 펩타이드 A (서열 식별 번호: 2) 및 펩타이드 B (서열 식별 번호: 3)은 고상 펩타이드 합성을 통해 Primm srl (Milan, Italy)에 의해 합성되었다. 합성된 펩타이드는 RP-HPLC 및 질량 분광분석법에 의해 품질 관리되었다.
- [0265] 줄기-유사 특징 (TPCs), 중간엽 및 전신경 hGBM-유도된 TPCs를 가진 hGBM 종양-증식 세포는 신경구 어세이 (N A)에 의해 제조되었다 (Renolds and Weiss, Science, 1992, 225: 1707-1710).
- [0266] 향상된 Wnt5a 발현은 재조합 Wnt5a 단백질 (GFD+R5)의 포화 농도로 GFD 세포의 치료에 의해 또는 렌티바이러스-매개 과-발현 (GFD+LV5)에 의해 모두 달성된다.
- [0267] 실시예 1
- [0268] 신경교종 환자로부터 조직학-단계적인 종양 샘플과 Wnt5a 유전자 발현의 상관관계
- [0269] 본 연구에서, 암 게놈 지도 네트워크 (TCGA) (Nature 2008, 455(23): 1061-68), Phillips (Cancer cell 2006; 9: 157-173), Freije (Cancer Res. 2004; 64: 6503-6510), Murat (J. Clin. Oncol. 2008; 26: 3015-3024), Lee (BMC med. Genomics 2008; 1:52) 및 Beroukhim (PNAS 2007; 104(50): 20007-20012) 공동연구하게 이용가능한

데이터 세트는 신경교종 환자로부터 수득된 조직학-단계적인 종양 샘플에서 Wnt5a 유전자 발현의 수준을 평가하기 위해 사용되었다.

[0270] 도 7은 인간 정상 뇌, 교모세포종 (GBM), 및 다른 뇌 종양 조직학으로 Wnt5a 유전자 발현을 보여준다. 공공연하게 이용가능한 데이터 세트에 기반하여, Wnt5a의 발현은 비-악성 뇌에 비교된 인간 교모세포종 (hGBM) (도 7a)에서, 다른 뇌 종양 조직학에 비교된 교모세포종 (도 7b)에서, 및 WHO IV 등급 비 괴저성 신경교종에 비교된 높은 괴저성 교모세포종 (도 7c)에서 통계적으로 유의미하게 더 컸다. Wnt5a의 발현은 1차 교모세포종에 비교된 반복되는 교모세포종 (도 7d)에서 통계적으로 유의미하게 더 크지 않았다. Z-스코어는 양성으로 Wnt5a의 발현 수준에서 계산하였고 비-G-CIMP에 비교된 다수의 유전자좌 (신경교종 CpG 아일랜드 메틸화인자 표현형; G-CIMP) (도 7e)에서 일치된 하이퍼메틸화의 존재와 유의미하게 상관하였다. TCGA 데이터 세트의 하위그룹 내에서, Wnt5a 유전자 발현은 전신경 및 정통 하위유형에 비교된 경우 중간엽 하위유형 (도 7f-g)에서 유의미하게 더 컸다. Wnt5a 복제수는 신경교종 환자의 악성종양과 상관하였다 (Beroukhi and TCGA Brain Statistics) (도 7h-i). 교모세포종을 가진 환자 중에서, Wnt5a 유전자 발현의 높은 수준은 Wnt5a 유전자 발현의 낮은 수준에 비교된 경우 유의미하게 더 짧은 생존과 관련되었다 (Philips (도 7j), Lee (도 7k) and Murat 데이터 세트 (도 7l)).

[0271] 도 8은 조직학-단계적인 종양 샘플에서 Wnt5a mRNA 발현의 수준을 보여준다. 도 8a는 인-실리코 발현 프로파일링에 의해 검출된 경우 상의세포종 (EP), 낮은 등급 신경교종 (LOW) 및 수모세포종 (MDB) 조직에 비교된 역형성 성상세포종 (ANA) 및 hGBM (GBM H-TEX)에서 Wnt5a mRNA의 더 높은 수준을 보여준다. 성장 인자 (성장 인자 독립형; GFI) (CTR)의 특이적 조합에 동시 노출 없이 배양된 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 hGBM 종양-증식 세포는 그의 동기 성장 인자 의존형 (GFD) TPCs에 비교된 경우 더 높은 Wnt5a 수준을 표시하였다 (도 8c). TPC 분화는 Wnt5a 발현에서 임의의 검출가능한 변화를 일으키지 않았다 (DOUB 대 DIFF). 정상 신경 줄기 세포 (hNSCs; B10) 및 인간 성상세포종 U87MG는 대조군 세포로서 사용되었다. 생물정보 분석은 중간엽 및 전신경 hGBM 조직 및 그의 관련된 TPCs가 정통 조직 또는 세포주 및 총 뇌 또는 신경 줄기 세포 (B10, 건강한)에 비교된 경우 Wnt5a mRNA 발현의 최고 수준을 가졌다는 것을 보여주었다 (도 8b-e). 도 8f 및 8g에서 나타난 바와 같이, 실시간 PCR (qPCR)에 의한 Wnt5a mRNA 수준의 정량화는 Wnt5a가 전체의 인간 정상 뇌 (WHB), 낮은 등급 신경교종 및 뇌 종양의 다른 유형 (Ep; 상의세포종)에 비교된 경우 역형성 성상세포종 (AA) 및 1차 hGBMs에서 상향조절되었던 것을 확인하였다. 이론에 의한 구속됨 없이, 상기 증거는 Wnt5a가 정상 뇌 조직을 광범위하게 침투하는 종양 세포의 능력을 조절하는 것을 시사한다. 도 8h는 줄기-유사 특징 (TPCs)을 가진 hGBM 중간엽 (130419-131030) 및 전신경 (130424) 종양-증식 세포가 정통 TPCs (081104-081031-090310) 및 인간 신경 줄기 세포 (hNSCs)에 비교된 Wnt5a mRNA의 더 큰 수준을 발현시켰음을 보여준다.

[0272] 도 9는 hGBM, MDB, 낮은 등급 (LG), 및 신경절교종 외과용 샘플에서 Wnt5a 및 에프린 유형-A 수용체 2 (EphA2) 단백질용 면역표지화를 보여준다. 도 9a에서, 수술 시료의 면역표지화는 낮은 등급 (LG) 및 신경절교종 조직에서 소수의 양성 세포에 비교된 hGBM 및 MDB 조직의 많은 세포에서 강한 Wnt5a 면역반응성을 보여주었다. hGBM 조직 (130424)의 면역표지화는 또한 Wnt5a 단백질 및 TPC 마커 단백질 EphA2의 드문 공-발현을 보여주었다. Wnt5a 단백질 발현은 또한 MDB 130221에 비교된 더욱 공격성 및 침습성 수모세포종 (결합조직형성 MDB 130920)에서 더 높았다 (도 9a). 도 9b에서 나타난 바와 같이, hGBM 중간엽 (131030 및 130419) 및 전신경 (130424) 조직은 hGBM 정통 조직 (기준자, 50 μ m)에 비교된 경우 Wnt5a 단백질에 대하여 널리 퍼진 면역반응성을 표시하였다.

[0273] 실시예 2

[0274] Wnt5a 단백질 발현의 면역형광 화상형성 및 정량적 유세포측정 분석

[0275] 본 연구에서, 면역형광 화상형성 및 정량적 유세포측정은 정통 세포에 비교된 경우 중간엽 및 전신경 hGBM-유도된 TPCs에서 Wnt5a 단백질 발현을 검출하기 위해 사용되었다.

[0276] 면역형광 이미지는 정통 (0627 및 0913) 세포에서 더 약한 표지화에 비교된 중간엽 (131030 및 130419) 및 전신경 (040622) hGBM-유도된 TPCs에서 Wnt5a 단백질에 대하여 강한 양성률을 보여주었다. 렌티바이러스-매개 과-발현된 Wnt5a (040622-5A)는 양성 대조군 (기준자, 20, 30 및 50 μ m)으로서 사용되었다 (도 10a). Wnt5a 단백질 발현은 또한 복제수 변동과 상관하였다 (데이터 도시되지 않음).

[0277] 동족 미리 확립된 성장 인자 의존형 라인 (GFD TPCs) 또는 환자의 1차 종양 조직으로부터 단리된, 성장 인자 독립형 hGBM TPCs (GFI TPCs)는 명백한 및 강렬한 면역반응을 보여주었다 (도 10b 및 10c). GFI 세포는 그의 GFD

대응물 (기준자, 20, 30 및 50 μm)에 비교된 경우 더 높은 Wnt5a 단백질 발현을 표시하였다 (도 10b 및 10c). 공초점 이미지는 EphA2용 신호가 덜 명백한 및 강렬한 GFD 및 GFI TPCs (기준자, 10 및 50 μm)에서 Wnt5a 및 EphA2 단백질의 드문 공-발현을 보여주었다 (도 10b 및 10c).

[0278] 도 11a에서 나타낸 바와 같이, 정량적 유세포측정 분석은, 세포 접착 및 이동의 추정 마커인, CD44의 높은 수준을 발현시키는, GFD 및 GFI TPCs에서 Wnt5a 및 EphA2 단백질의 드문 공-발현을 확인하였다.

[0279] 도 11b 및 11c는 분화된 TPCs 및 인간 정상 신경 줄기 세포 (hNSCs)에 비교된 경우 GFD 및 GFI TPC 세포에서 qPCR에 의한 Wnt5a 및 Dlx2 또는 Wnt5a 및 Wnt3a mRNA 수준의 정량화를 보여주었다. Dlx2 유전자는 전이-중폭 세포용 마커인 및 전이 및 두개안면 발달에서 역할을 한다고 생각되는 홈박스 단백질 DLX2를 인코딩한다.

[0280] 도 11d는 qPCR에 의해 결정된 바와 같이 분화된 TPCs에 비교된 GFD (좌측) 또는 GFI TPCs (우측)에서 Wnt5a 및 EphA2 mRNA 수준의 시간경과 정량화를 보여준다.

[0281] 도 23은 보여진 세포주에 대하여 EphA2 발현에 대한 Wnt5a 발현의 상관관계를 보여준다. 도의 단위는 Y-축 상에서 Wnt5a 발현, 및 X-축 상에서 수용체 발현이다. Wnt5 발현이 더 높을수록, 더 많은 세포가 이동하고, 수용체 발현이 더 높고, 더 많은 세포가 증식한다. 수용체 발현에 대한 Wnt5a 발현의 상관에 의해, 각 세포주는 나타낸 클러스터에 할당될 수 있다. 가장 공격성 세포 유형은 정통 하위유형 (원형)으로 나뉜다.

[0282] 실시예 3

[0283] hGBM에서 Wnt5a 유전자 발현의 생물정보 분석

[0284] 본 연구에서, 생물정보 분석은 Wnt5a 발현의 수준에 따라 염색된, 게이팅된 및 분류된 hGBM 시료 상에서 수행되었다.

[0285] 도 12a 및 12b는 Wnt5a 발현에 따라 염색된, 게이팅된 및 FACS 분류된 hGBM 시료 상에서 수행된 생물정보 분석을 보여준다. TPCs 및 종양 관련된 대식세포에서 Wnt5aHigh 대 Wnt5aLow 유전자 서명/활성화는 더 많은 침습성 및 혈관신생 표현형과 상관하였다. 이론에 의한 구속됨 없이, 상기 데이터는 Wnt5a가 양쪽 종양 세포 및 종양 대식세포에서 활성을 조절하고, 따라서 증가된 종양 침습을 초래한다는 것을 시사한다 (도 12a 및 12b).

[0286] Wnt5aHigh와 관련된 유전자 온톨로지 (GO) 기간은 통계적 유의도 수준에 의해 분류되었고 도 12c에서 막대로 표시되었다. 막대가 더 높을수록, 대응하는 기간의 p-값은 더 낮았다.

[0287] 도 12d 및 12f는 세포 발달, 세포 접착 및 세포 이동에서 관련된 생물학적 과정의 Wnt5aHigh 대 Wnt5aLow 풍부한 세트를 보여준다.

[0288] 실시예 4

[0289] 인간 GBM 조직에서 Wnt5a, EphA2 및 DLX2의 발현 및 상관관계

[0290] 본 연구에서, 공공연하게 이용가능한 데이터 세트 (TCGA, Phillips and Lee)의 분석, 및 hGBM 및 MDB의 면역형광 염색은 EphA2 또는 DLX2와 Wnt5a의 공-발현이 신경교종 환자에서 악성종양, 및/또는 환자의 생존과 상관하는 지를 결정하기 위해 사용되었다.

[0291] 도 13은 신경교종 환자의 생존에 대해 인간 GBM 조직내 Wnt5a, EphA2 및 Dlx2 발현의 상관관계를 보여준다. TCGA 데이터 세트는 Wnt5a와 EphA2 또는 Wnt5a와 Dlx2 유전자 사이 상호 배제에 대하여 강한 경향을 강조하였다 (데이터 도시되지 않음). 도 13a에서 입증된 바와 같이, Wnt5a, EphA2 및 Dlx2 서명의 단백질 상호작용 네트워크 분석은 Wnt5a가, 세포 성장 및 생존, 세포자멸사, 세포-세포 접착, 세포골격 리모델링 및 분화의 조절에 관여되는 비-수용체 단백질 티로신 키나제인, YES1을 통해 EphA2와 연결되는 것을 보여주었다. 게다가, 단백질 상호작용 네트워크 분석은 Wnt5a가, 그의 급속 제거를 매개하고 낮은 세포의 수준을 유지하는 GABA 수송체인, SLC6A1을 통해 Dlx2에 연결되는 것을 보여주었다. Lee and Philips 데이터 세트로부터 환자의 카플란-마이어 플롯은 높은 Wnt5a-Dlx2 또는 Wnt5a-EphA2 발현을 가진 신경교종 환자의 유의미하게 감소된 생존을 보여주었다 (도 13b). 도 13c는 전체의 인간 정상 뇌 (WHB)에 비교된 1차 hGBM, 낮은 등급 신경교종, 역형성 성상세포종 및 수모세포종에서 qPCR에 의한 Wnt5a 및 Dlx2 mRNA 수준의 정량화를 보여준다. 도 13d는 동일한 1차 샘플 및 뇌 조직의 다른 유형 (뇌실막세포종; Ep, 및 원시 신경외배엽성 종양; PNET)에서 비-표준적 Wnt5a 대 표준적 Wnt3a (Wnt5a 발현을 억제하기 위해 공지된) mRNA 수준의 정량화를 보여준다.

[0292] 도 14a는 hGBM 및 MDB 대 낮은 등급 1차 시료 (LG) (기준자, 20 및 50 μm)에서 전이-중폭 C 세포 및 신경모세

포의 추정 마커인, Wnt5a 및 Dlx2의 공-발현을 보여준다. 다양한 배율에 공초점 이미지는 Wnt5a 및 Dlx2의 널리 퍼진 공-국재화 및 hGBM 조직내 세포의 표면 상에서 Wnt5a, Dlx2 및 EphA2의 더 약한 공-발현을 보여준다 (도 14b).

[0293] 도 15는 악성종양 스케일 전반에 걸쳐 인간 뇌 종양에서 Wnt5A, EPHA2, DLX2 및 신경 세포 접착 분자 1 (NCAM1) 유전자 발현을 보여준다. 도 15a는 악성종양 스케일 (즉 저-등급 신경교종 (성상세포종, 희소돌기아교세포종; WHO I 및 II 등급) 및 hGBM (IV 등급)) 전반에 걸쳐 인간 뇌 종양에서 및 인간 교모세포종 세포주에서 유전자 발현 지도 (TCGA)로부터 WNT5A, EPHA2, DLX2 및 NCAM1 유전자 발현을 보여준다. 도 15b는 Wnt5a, EphA2, Dlx2 및 NCAM1 서명의 단백질 상호작용 네트워크 분석을 보여준다. 도 15c의 상부 패널에서, 다양한 배율에 hGBM 조직 (130424)의 면역표지화는 Wnt5a 리간드에 대하여 양성인 세포의 높은 수가 PSA-NCAM (기준자, 20 및 50 μ m)에 대하여 면역반응성인 Wnt5a 및 Dlx2 양성 세포의 최대 60%로 추정 신경모세포 마커 PSA-NCAM을 공-발현시킨다는 것을 보여준다. 도 15c의 하부 패널에서, 도 15c의 상부 패널에서 보여진 동일한 hGBM 조직의 공초점 이미지는 1차 낮은 등급 (LG) 및 정상 뇌 조직 (기준자, 20 및 50 μ m)에서 드문 표지화에 비교된 hGBM 조직내 세포의 표면에서 신경 조상세포 튜블린 III의 마커 및 Dlx2의 공-발현을 보여준다. 양성 세포의 백분율은 도 15d에서 보여진다. 각 막대는 평균 \pm SEM을 나타낸다.

[0294] 이론에 의한 구속됨 없이, hGBM 조직에서 Wnt5a, EphA2 및 DLX2 발현의 상관관계는 상기 조직 유형에서 하기의 존재를 시사한다: 과발현 Wnt5a 세포 유형 뇌실하 구역 (SVZ) 성상세포, 유형 B: 아교 원섬유성 산성 단백질 (GFAP+); 일시적 증폭 조상세포, 유형 C: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM- 및 신경모세포, 유형 A: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM⁺.

[0295] 실시예 5

[0296] Wnt5a의 발현 및/또는 활성 조절은 hGBM TPCs 및 U87MG 세포의 이동에 영향을 미친다

[0297] 본 연구에서, 종양 개발, 이동 및 침습성에 관한 Wnt5a의 효과는 재조합 Wnt5a 단백질 및 Wnt5a 단백질의 렌티 바이러스-매개 과-발현을 이용하여 시험관내 및 생체내 결정되었다.

[0298] 도 16은 Wnt5a 과발현 GFI TPCs 대 미리 확립된 GFD 대응물의 시험관내 이동 및 침습을 보여준다. 매트릭셀 침습 어세이는 Wnt5a 과발현 GFI TPCs가 그의 미리 확립된 GFD 대응물보다 더욱 효율적으로 시험관내 이동하고 침습하는 것을 보여준다. 재조합 Wnt5a 단백질 (GFD+R5)의 포화 농도를 이용한 및 렌티바이러스-매개 과-발현 (GFD+LV5)에 의한 GFD 세포의 치료에 의해 달성된 향상된 Wnt5a 발현은 세포 이동에서 증가에 의해 필적된다 (도 16a). Wnt5a-블록킹 항체 (AbW5; R&D Systems), 재조합 Wnt3a 단백질 (R3; R&D Systems)의 포화 농도 또는 재조합 분비 프리즐레드-관련 단백질 1 (R&D Systems; SFRP1) (내인성 Wnt 길항제)의 투여는 GFI TPCs의 침습성을 감소시켰다 (도 16b). Wnt5a-유도된 펩타이드 Box5, PEPA 및 PEPB에 노출된 GFI TPCs는 또한 용량-의존성 방식으로 GFI TPCs의 침습성을 감소시켰다 (도 16c 및 16d). 도 16e는 매트릭셀-코팅된 트랜스웰 디바이스 (히스토그램, 평균 + SEM)을 통해 침습의 속도의 정량화를 보여준다. AbW5에 노출시, 1차-환자 종양 조직으로부터 단리된 GFI 세포는 GFDs보다 덜 효율적으로 이동한다 (도 16f). 도 16g는 AbW5, Box5 및 PEPA를 가진 Wnt5a 활성의 작은 변화가 곡선의 기울기로부터 간접적으로 측정된 경우 팽창하는 GFI 또는 GFD TPCs의 능력에 관해 무시해도 좋은 효과를 가졌다는 것을 보여준다. 양성 대조군 골 형성 단백질 4 (BMP4) 및 에프린A1-Fc는 성장 동력학으로부터 음성 편차를 유의미하게 유발시켰다 (도 (Galli 등, Cancer Res. 2004, 65:7011-7021). 16g). Wnt5a 저해는 또한 TPCs 클론 효율 (즉, 자기-재생 능력)에 관해 무시해도 좋은 효과를 가졌다 (도 16h).

[0299] 도 17은 대조군 세포 (U87-wt)와 비교된 렌티바이러스-매개 Wnt5a 과발현 U87MG 세포 (U87-5A)에 의해 유의미하게 향상된 종양 발달 및 침습성을 보여준다. 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 대조염색된 대표적인 뇌 부문은 U87-wt 대조군 세포에 비교된 경우 렌티바이러스-매개 Wnt5a 과발현 U87MG 세포 (U87-5A)에 의해 유의미하게 향상된 종양 발달 및 침습성을 보여주었다 (도 17a). 동일한 뇌 부문은 야생형 (U87-wt) 대 Wnt5a-발현 U87MG 이종이식 (도 17a) (기준자, 25 및 50 μ m)에서 인간 백혈구 마커 (HLA)에 대하여 널리 퍼진 및 균질한 면역반응성을 보여주었다. 도 17b는 녹색 형광 단백질 (GFP)로 면역표지된 마우스 뇌 부문의 시리즈 조직학적 재건을 보여주었다. 트랜스제닉 U87MG 세포 (U87/5A)는, 크기가 상당히 크지만 입의 이동성 수용력을 나타내지 않는, wt U87-유도된 종양에 비교된 이동, 확대 및 침습에 대하여 향상된 수용력을 가진 두개내로 생성된 종양을 이종 이식하였다. 이들 wt U87-유도된 종양은 주사의 부위에 국한된 점진적으로 확장하는, 명확한 질량으로 이루어진다 (도 17b). 도 17c는 야생형 대 Wnt5a 발현-U87MG 세포의 KI67 (유사분열 지수의 마커) 및 CD147 면역반응성의 직접적인 비교를 보여준다. Wnt5a 과-발현은 양쪽 국소로 및 원격으로 (기준자, 20 및 50 μ m) 두개내 증식 또는 네오-혈관신생을 유의미하게 향상시켰다. 도 17d 및 17e는 이종이식된 종양의 면역표지화를 보여준다. 야

생형 U87 부문을, 양쪽 코어 및 종양 모서리 (기준자, 50 μ m)에서, U87-Wnt5a 유도된 종양내 강한 및 빈번한 면역반응성에 비교된 경우, 침습성의 추정 마커인, FRAS1-관련 세포외 매트릭스 단백질 2 (Frem2)에 대하여 드문 및 더 약한 표지화를 표시하였다.

[0300] 실시예 6

[0301] Wnt5a 작은 변화는 생체내 TPCs 종양형성 능력 및 침습성에 영향을 미친다

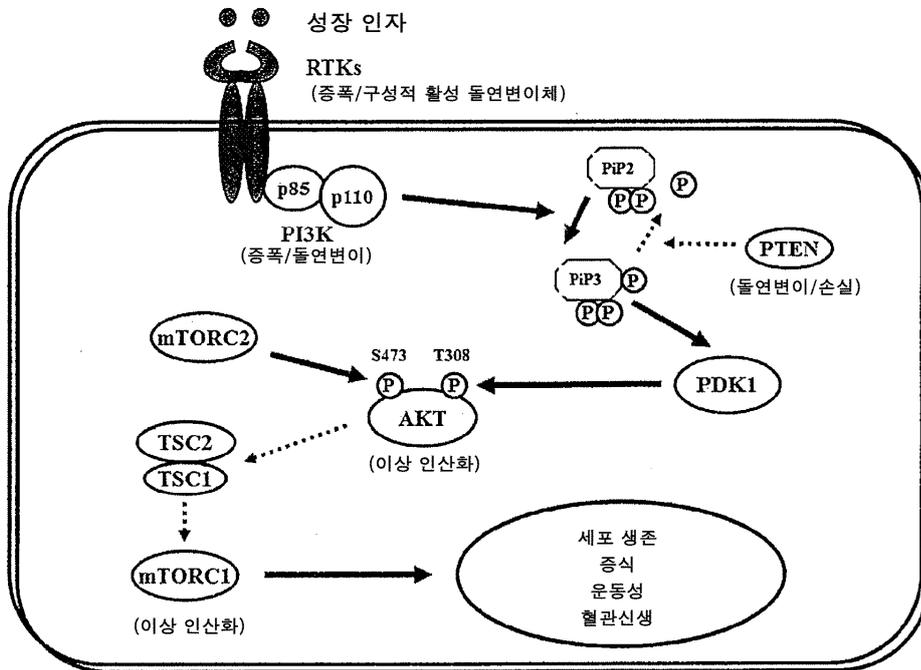
[0302] 본 연구에서, GFD 및 GFI TPCs는 종양 성장 및 침습성에 관해, 그리고 전체 생존에 관해 Wnt5a의 효과를 결정하기 위해 면역공핍한 성인 SCID 마우스에서 이식되었다.

[0303] 도 18은 Wnt5a 작은 변화가 생체내 TPCs 종양형성 능력 및 침습성에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 루시페라제에 대하여 면역표지된 마우스 뇌 부문의 시리즈 조직학적 재건은, 면역공핍한 성인 SCID 마우스에 동소 이식 시, GFI TPCs의 임플란트로부터 생성된 종양이 더욱 확장되었고 이식후 상이한 시간 (DPT; 이식후 일)에 그의 GFD 대응물 세포에 의해 생성된 것보다 더욱 효율적으로 뇌 실질을 침투할 수 있었다는 것을 보여주었다 (도 18a) (기준자, 1 mm). 이식후 40 일 만큼 빨리, GFD 및 GFI TPC-유도된 종양의 전-후축의 확대의 측정은 GFI 세포로부터 성장된 종양이 그의 GFD 대응물 보다 더욱 팽창되었음을 보여주었다 (데이터 도시되지 않음). GFI-GFD TPCs로 이식된 동물의 생존의 카플란-마이어 플롯은 GFI 세포의 향상된 종양형성 수용력이 또한 전체 생존에 관하여 반영되는 것을 보여주었다 (도 18b). 도 18c는 루시페라제-태그된 TPCs (luc-TPCs)의 정량적 시간경과 분석을 보여준다. 이식 (사전-치료)에 앞서 배양액에서 Box5 (서열 식별 번호: 1) 및 펩타이드 A (서열 식별 번호: 2)로 GFI 세포를 치료함으로써, 종양 성장은 감소된다 (도 18c) (히스토그램, 평균 \pm SEM). 루시페라제에 대하여 면역표지된 마우스 뇌 부문을 Box5 및 PEPA로 사전치료된 luc-GFI로부터 확립된 종양이 미치료된 GFI TPCs로부터 확립된 것 미만인 뇌 실질을 통해 확장한다는 것을 확인하였다 (도 18d) (기준자, 1 mm). luc-TPC 신호의 정량적 시간경과 분석은, 단독 또는 BMP4 (B4)와 조합으로, AbW5를 가진 GFI TPCs 또는 GFD의 공-주사 (즉, 공-치료)가 Box5 및 PepA 종양 성장을 저해하였다는 것을 보여주었다 (도 18e 및 18f) (히스토그램, 평균 \pm SEM). 유사한 결과는 GFI TPC 이식 (후-치료) 10 일 후 시작하는 미니-삼투 펌프를 이용하여 종양 주위에 AbW5를 주사함으로써 수득되었다. (도 18g) (각 막대는 평균 \pm SEM을 나타낸다).

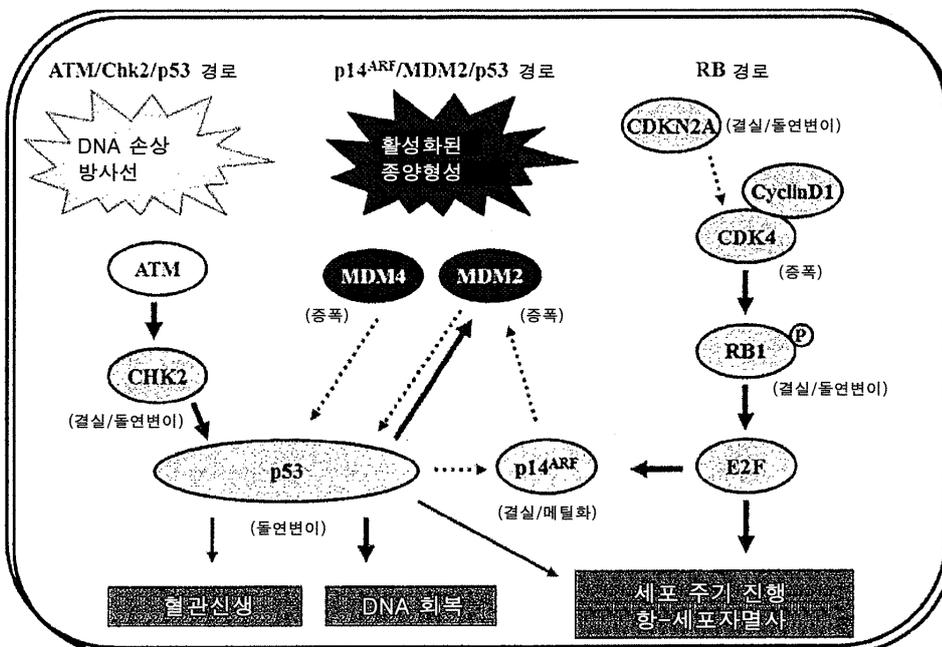
[0304] 기재된 발명이 이들의 특이적 구현예를 참조로 기재되는 반면, 다양한 변화가 실시될 수 있고 등가물이 본 발명의 실제 취지 및 범위에서 이탈 없이 치환될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되어야 한다. 게다가, 많은 변형이 기재된 발명의 목적, 취지 및 범위에 특정한 상황, 물질, 물질의 조성물, 공정, 공정 단계 또는 단계들을 적용시키기 위해 실시될 수 있다. 모든 상기 변형은 본원에 첨부된 청구항의 범위 내이도록 의도된다.

도면

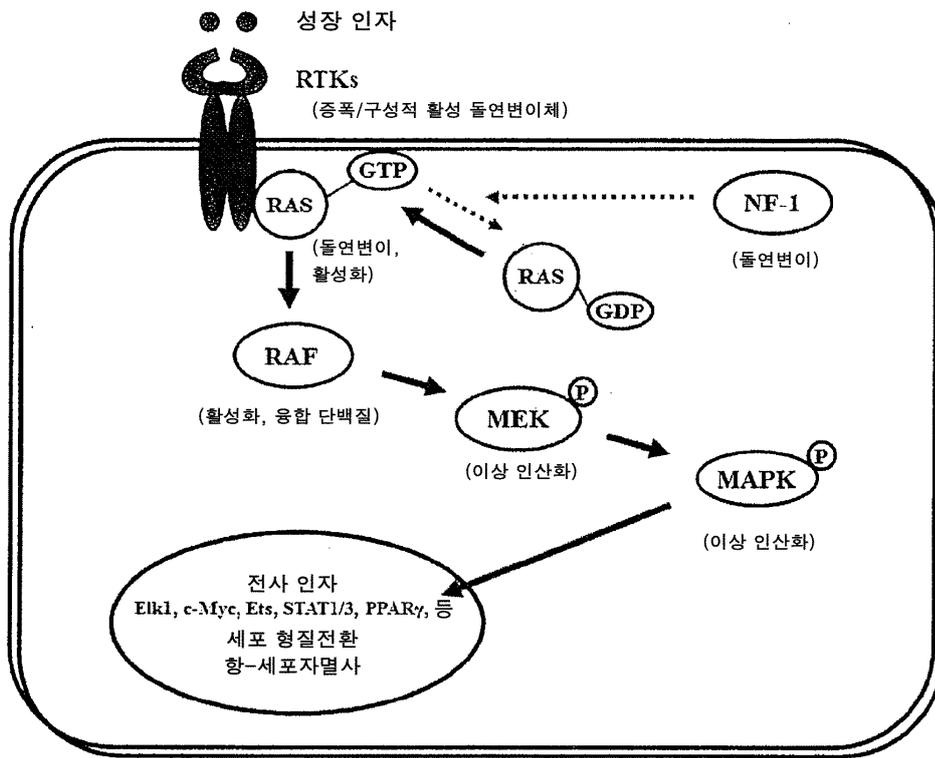
도면1



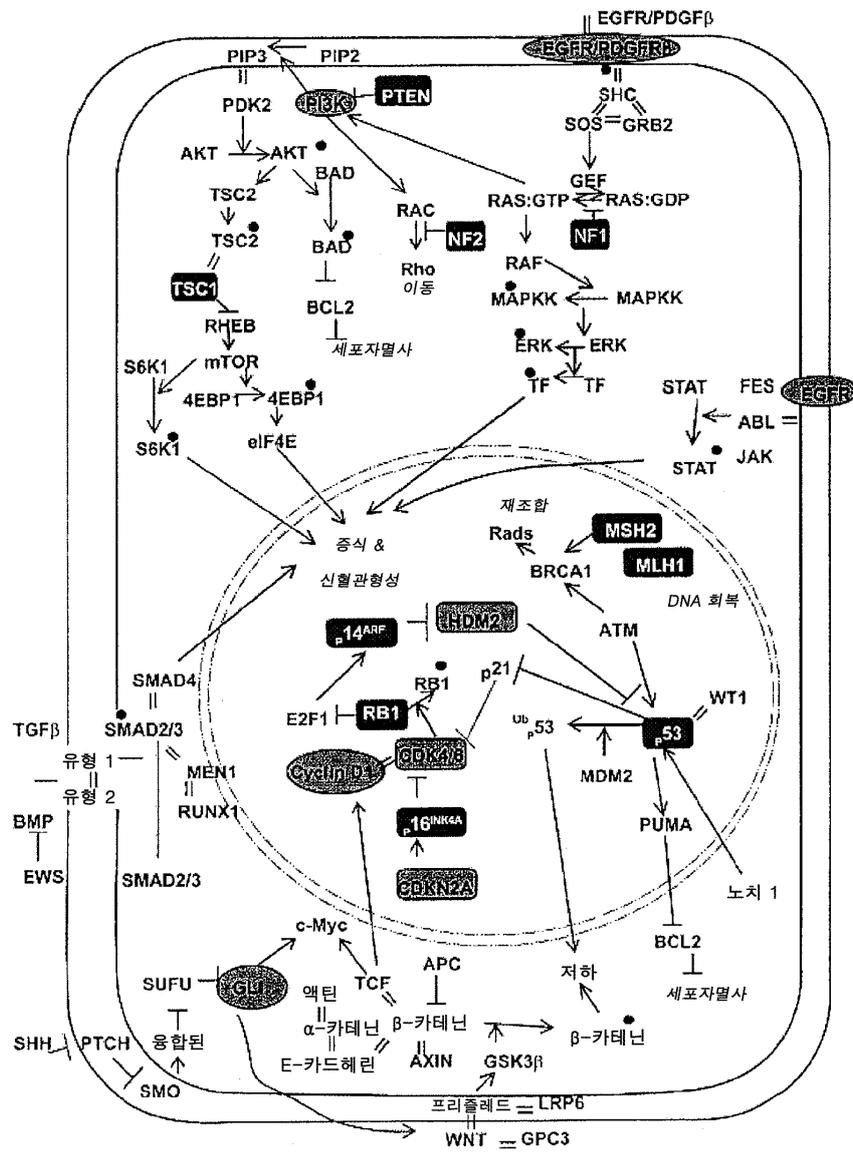
도면2



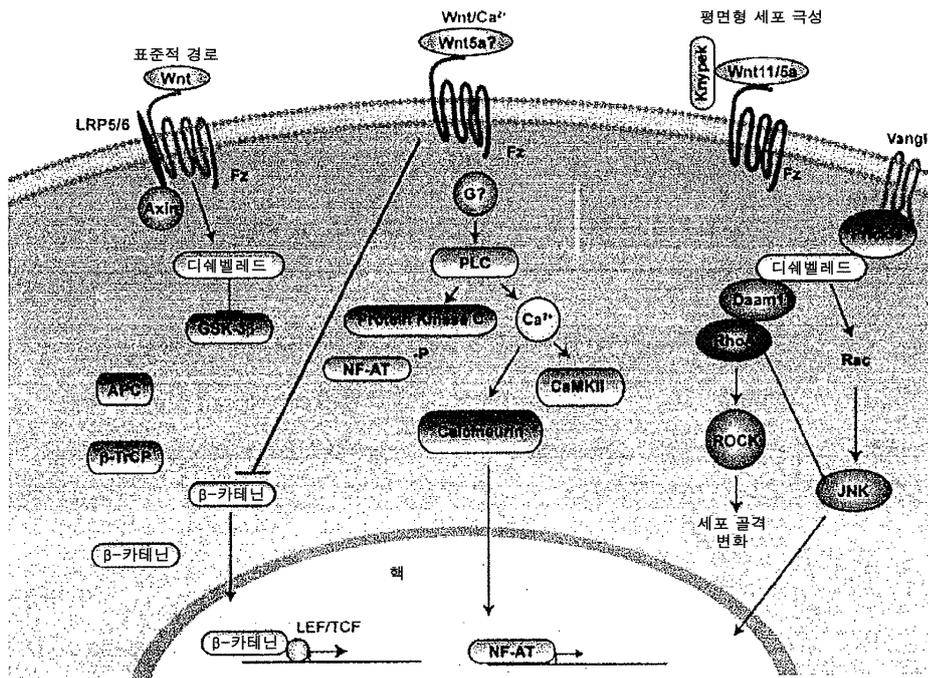
도면3



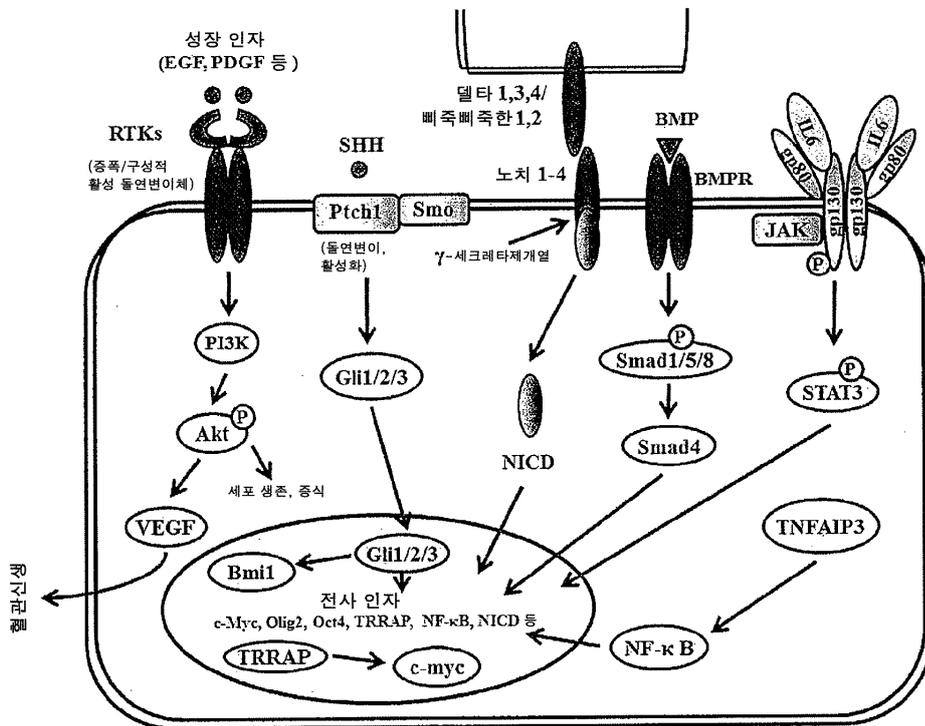
도면4



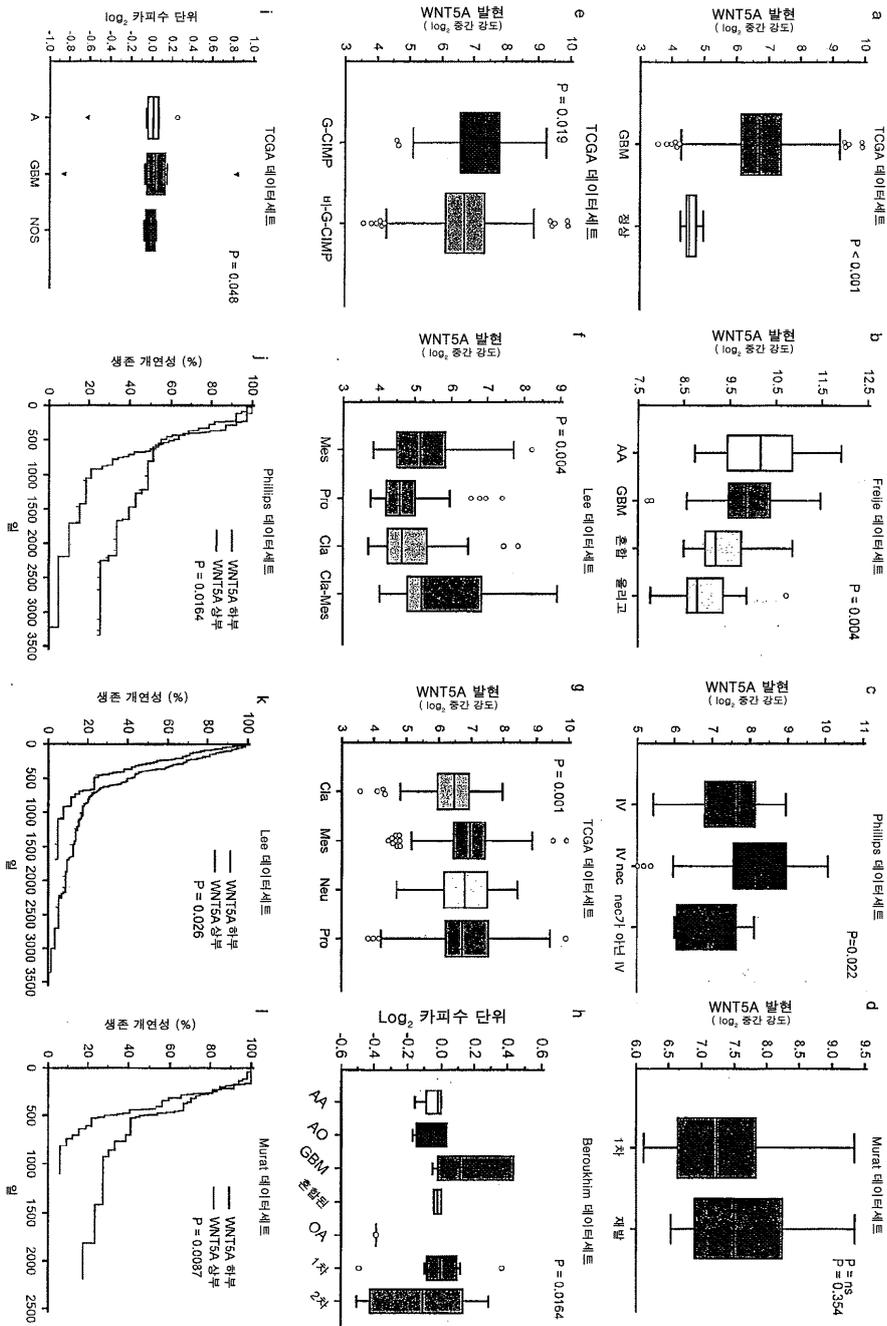
도면5



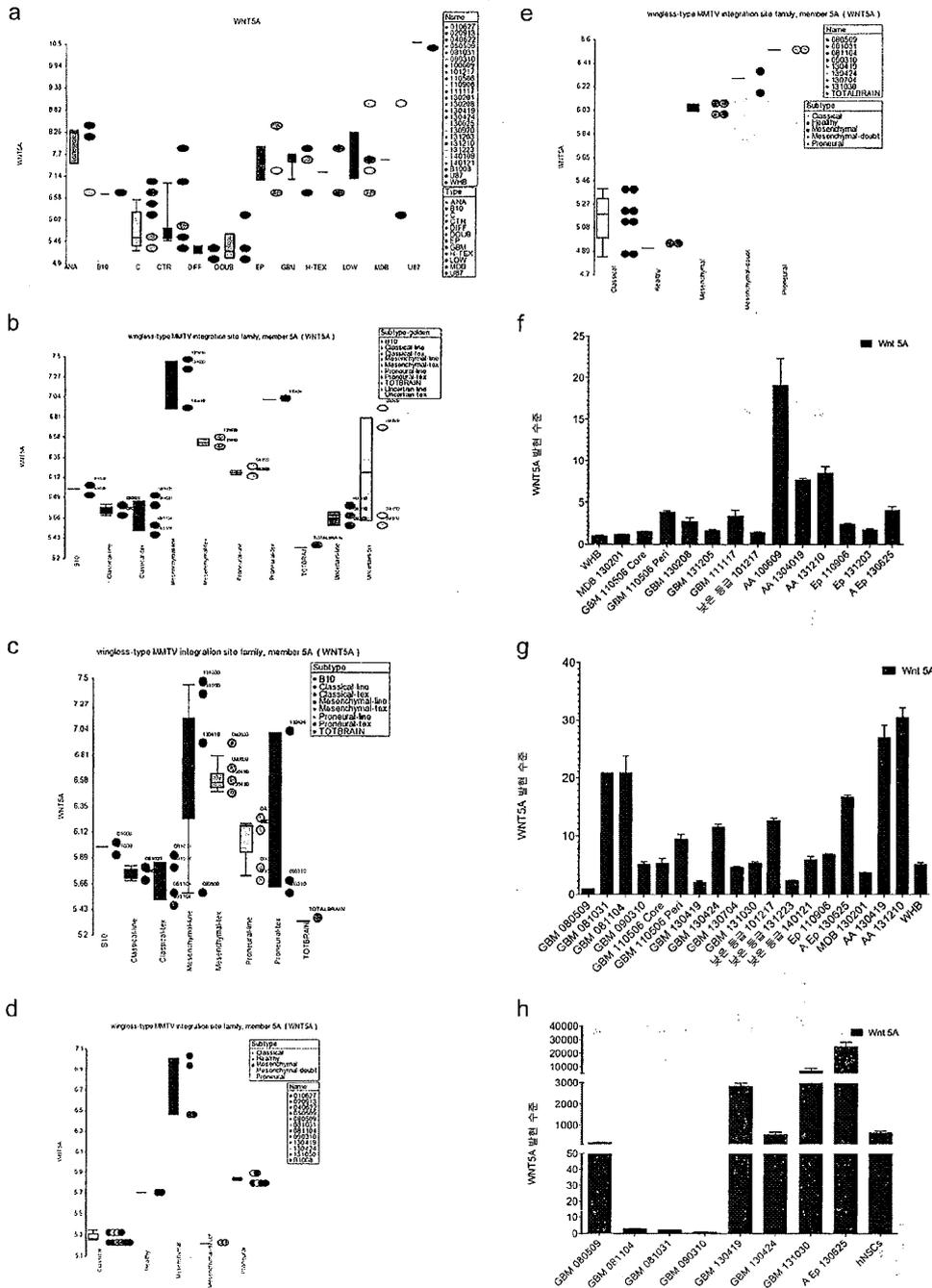
도면6



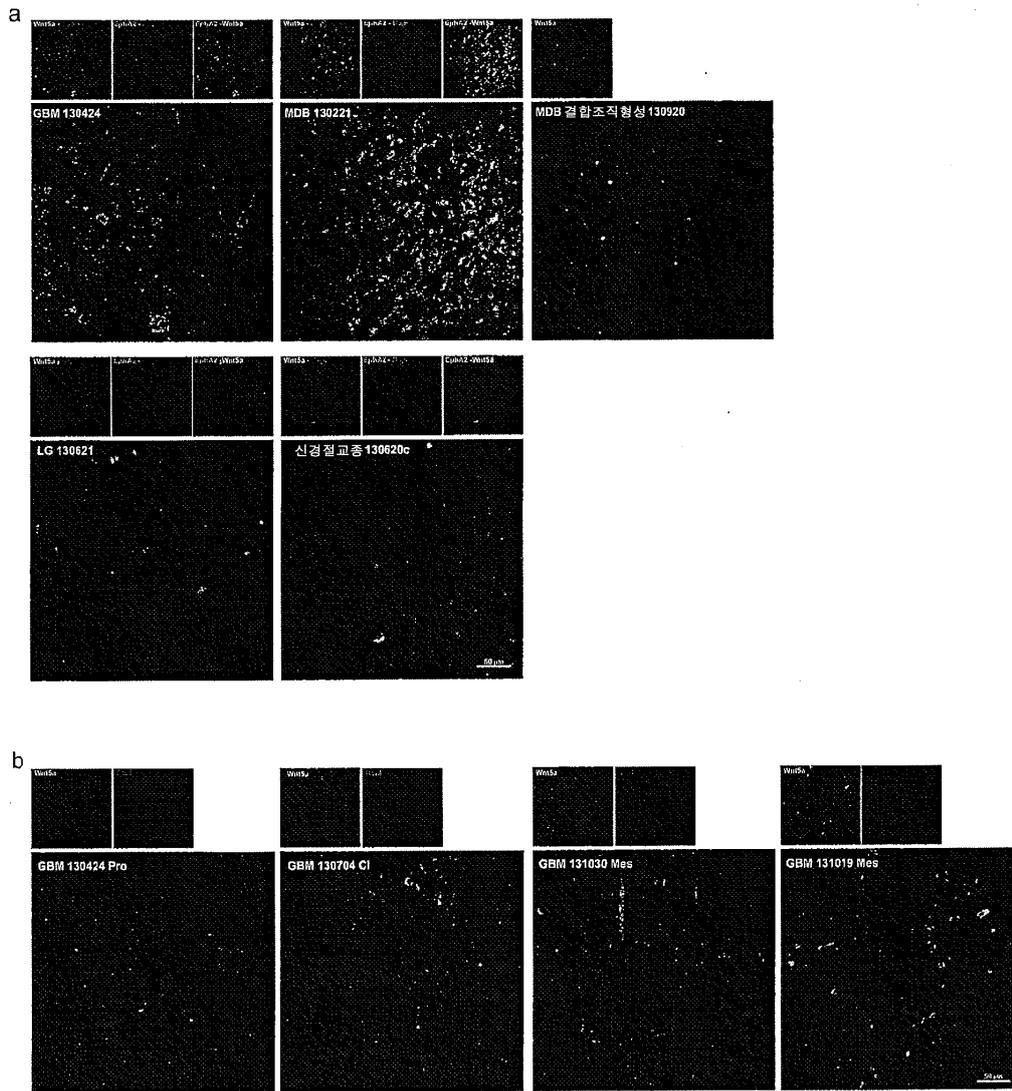
도면7



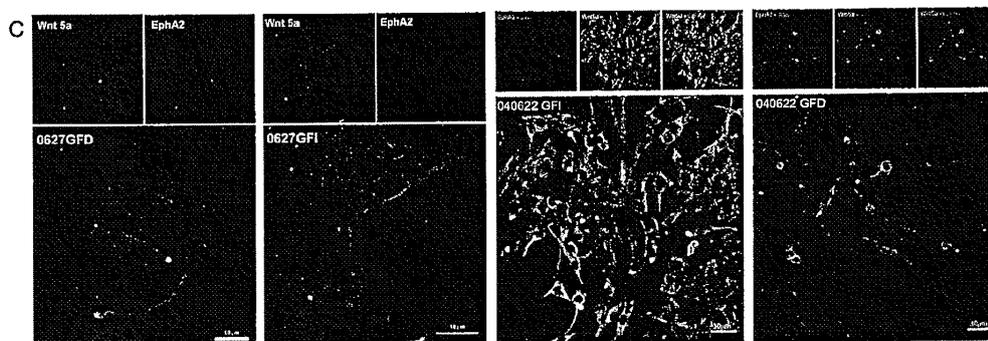
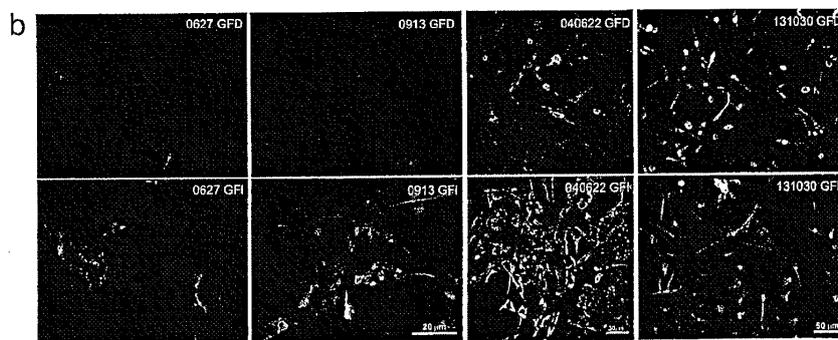
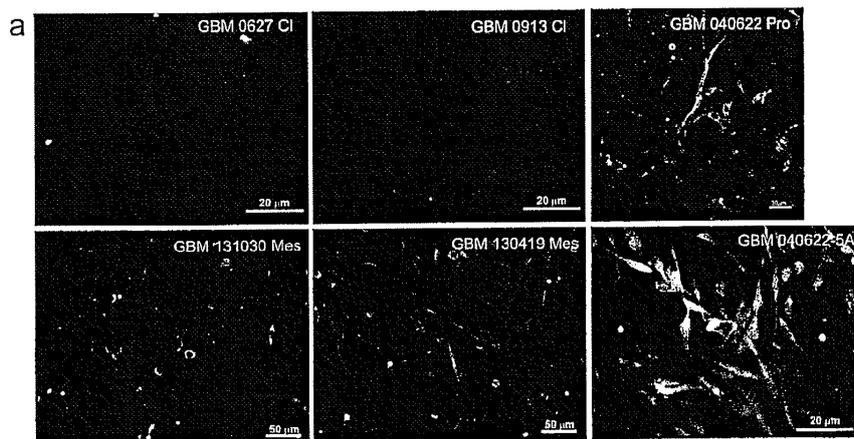
도면8



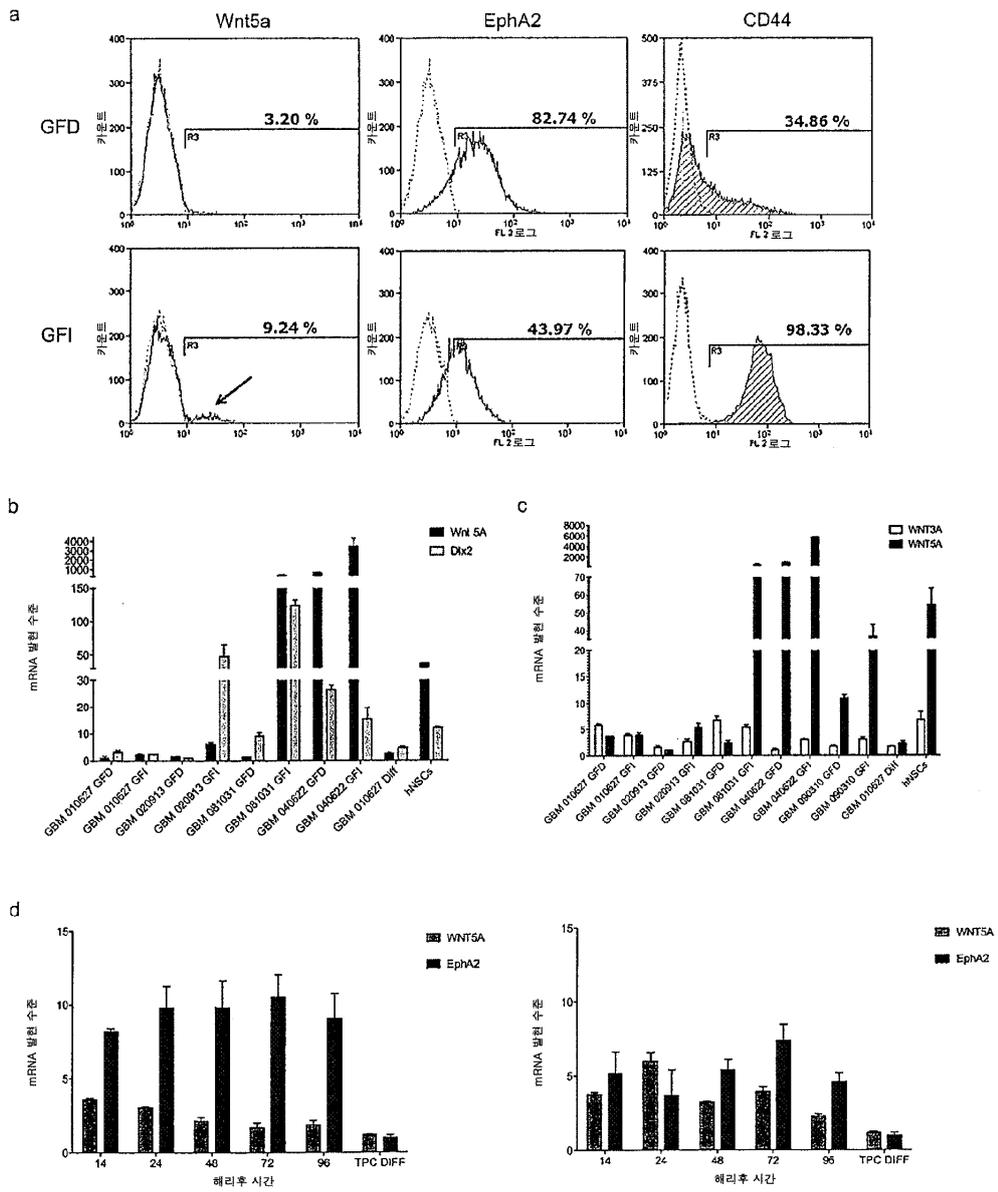
도면9



도면10

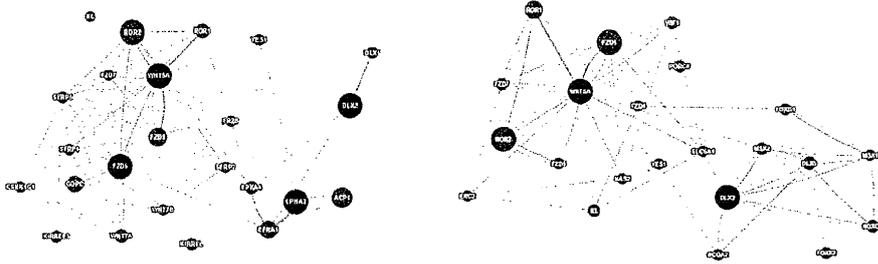


도면11

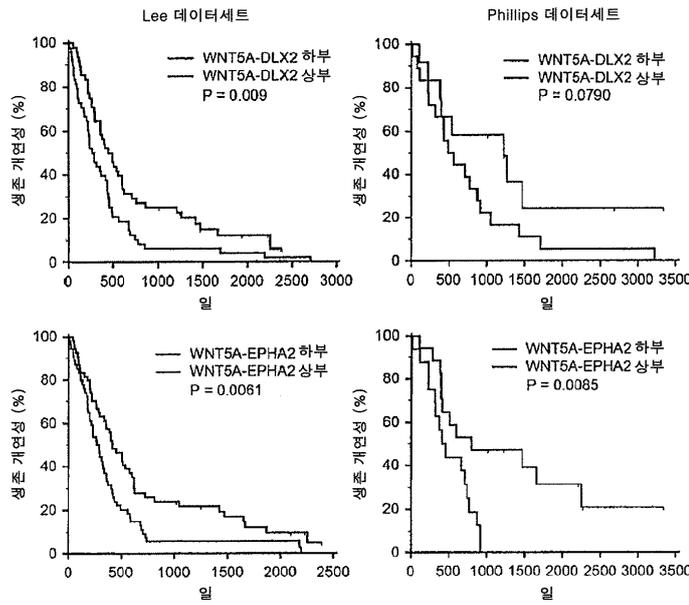


도면13

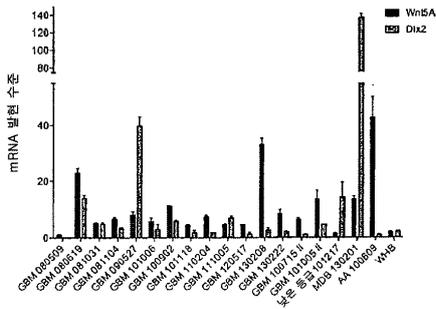
a



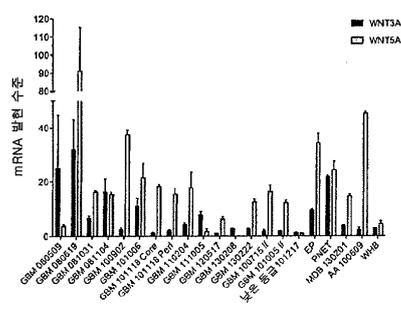
b



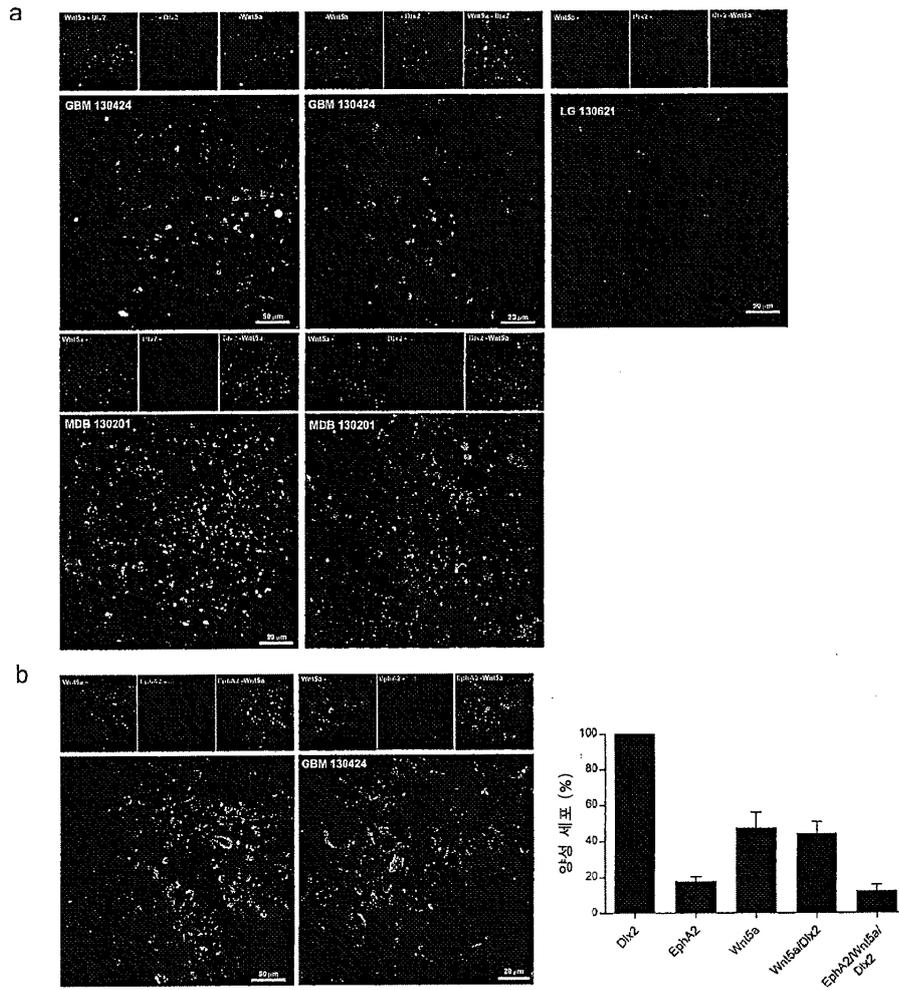
c



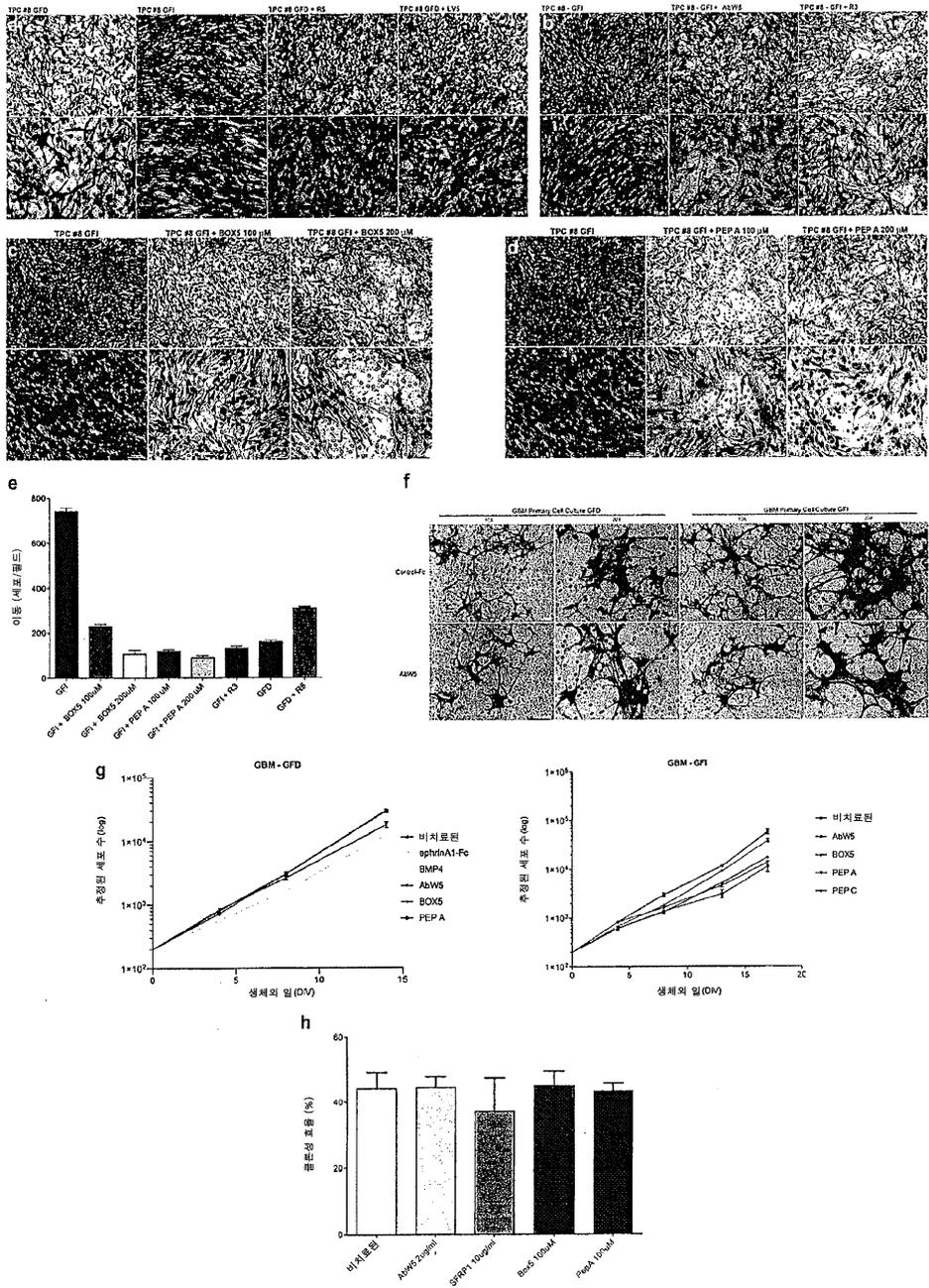
d



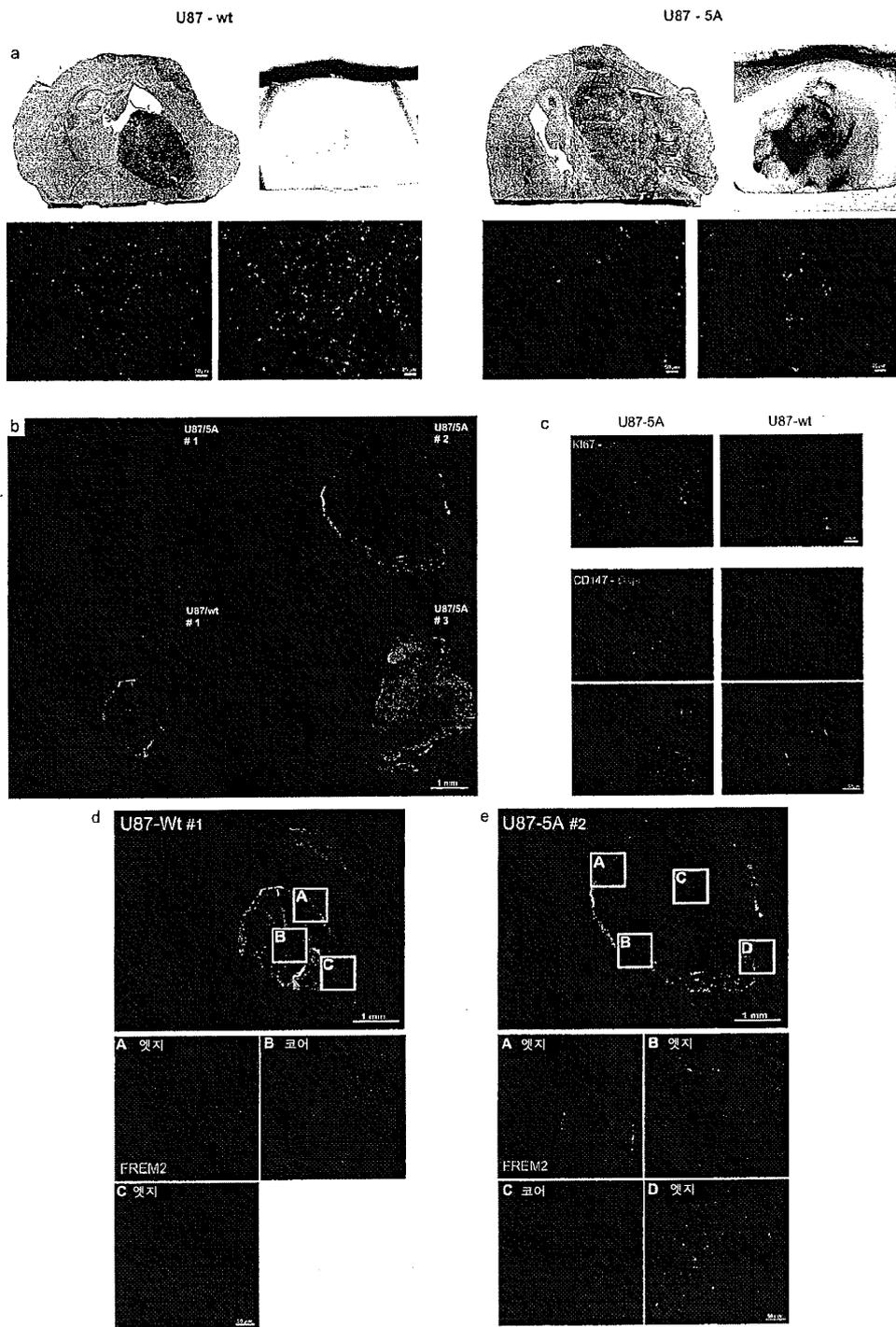
도면14



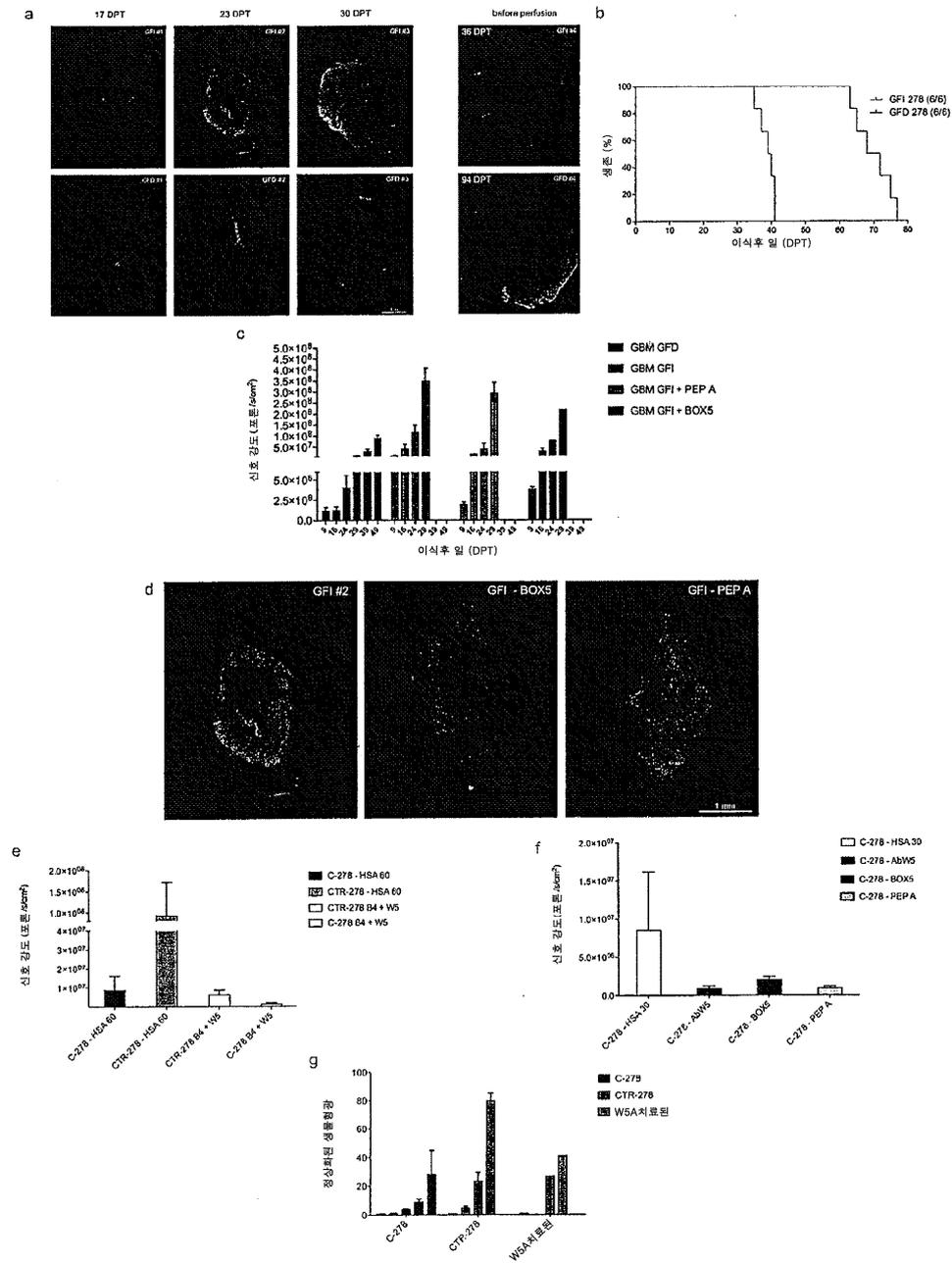
도면16



도면17

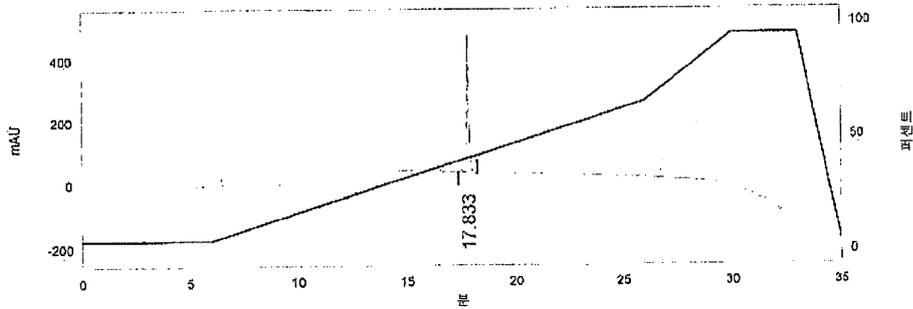


도면18



도면19

샘플 ID: 201211-00033
 방법 명칭: C:\CLASS-VP dati old\Method\5-65b.met
 주입 용적: 10
 인쇄 시간: 1/4/2013 3:00:44 PM



l: 210 nm, 2 nm

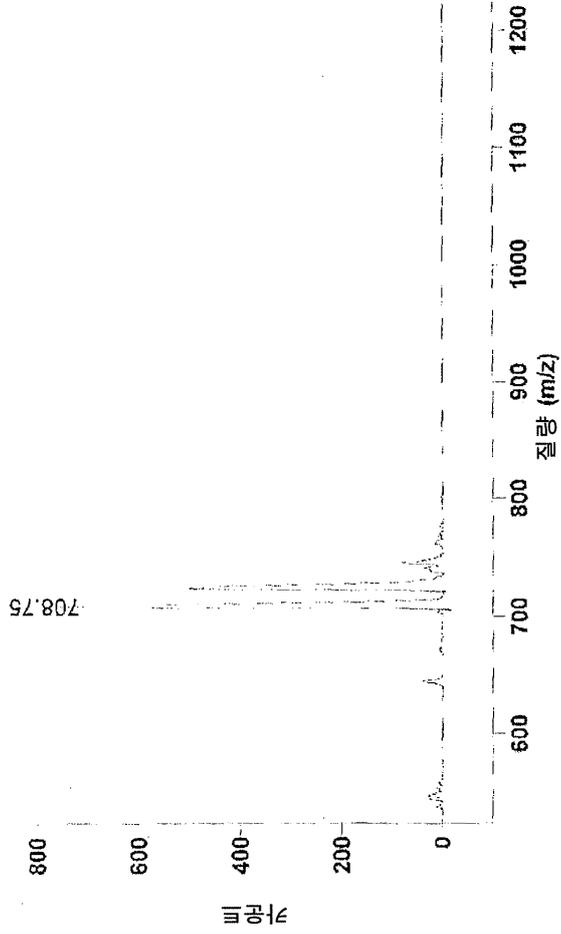
체류 시간	영역	영역 퍼센트	높이	높이 퍼센트
17.833	2961415	100.00	443732	100.00
합계	2961415	100.00	443732	100.00

컬럼 C18 Vydac
 용출액 A: 수중 0.1% TFA
 용출액 B: 아세트니트릴 중 0.1% TFA
 구배 : 20 분 지나 5%B부터 65%B까지

도면20

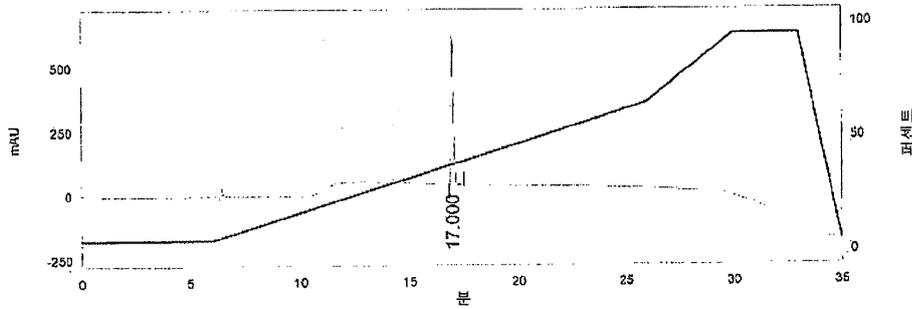
가속 전압: 20000 스캔 평균: 34
 그리드 전압: 93.700 % 압력: 3.72e-07
 가이드 와이어 전압: 0.070 % 저 질량 게이트: OFF
 지엄: 100 OFF 음성 이음: OFF
 샘플: 26

원 파일명: c:\voyager\pim_02.ms
 본 파일 # 2 : C:\VOYAGER\PRIMM\201211-33AC3.MS
 표본의 MALDI-ToF: 201211-00033



도면21

샘플 ID: 201211-00034
 방법 명: C:\CLASS-VP data\old\Method\5-65b.met
 주사 용적: 10
 인쇄 시간: 1/4/2013 3:00:11 PM



1: 210 nm, 2 nm

체류 시간	영역	영역 퍼센트	높이	높이 퍼센트
17.000	3893573	100.00	588720	100.00
합계	3893573	100.00	588720	100.00

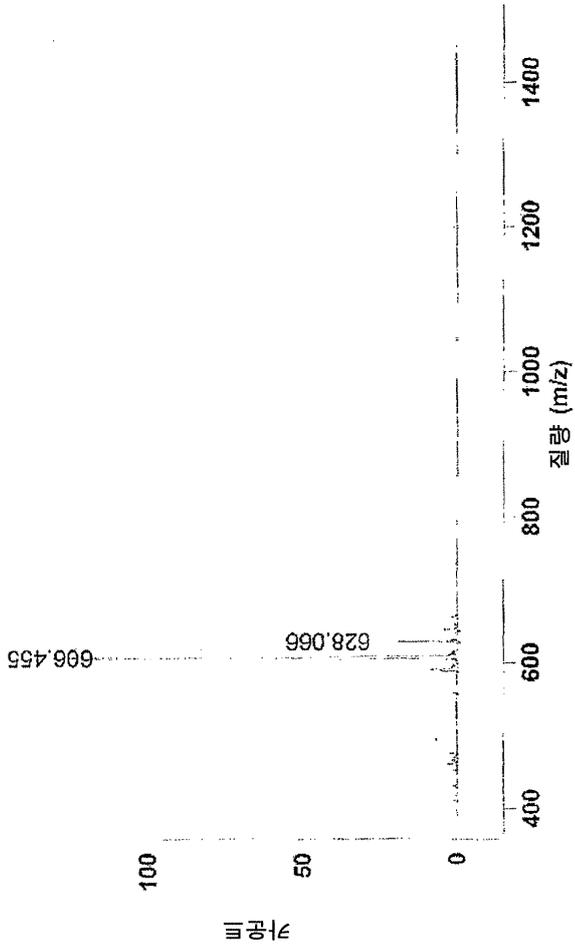
컬럼 C18 Vydac
 용출액 A: 수중 0.1% TFA
 용출액 B: 아세토니트릴 중 0.1% TFA
 구배 : 20 분 지나 5%B부터 65%B까지

도면22

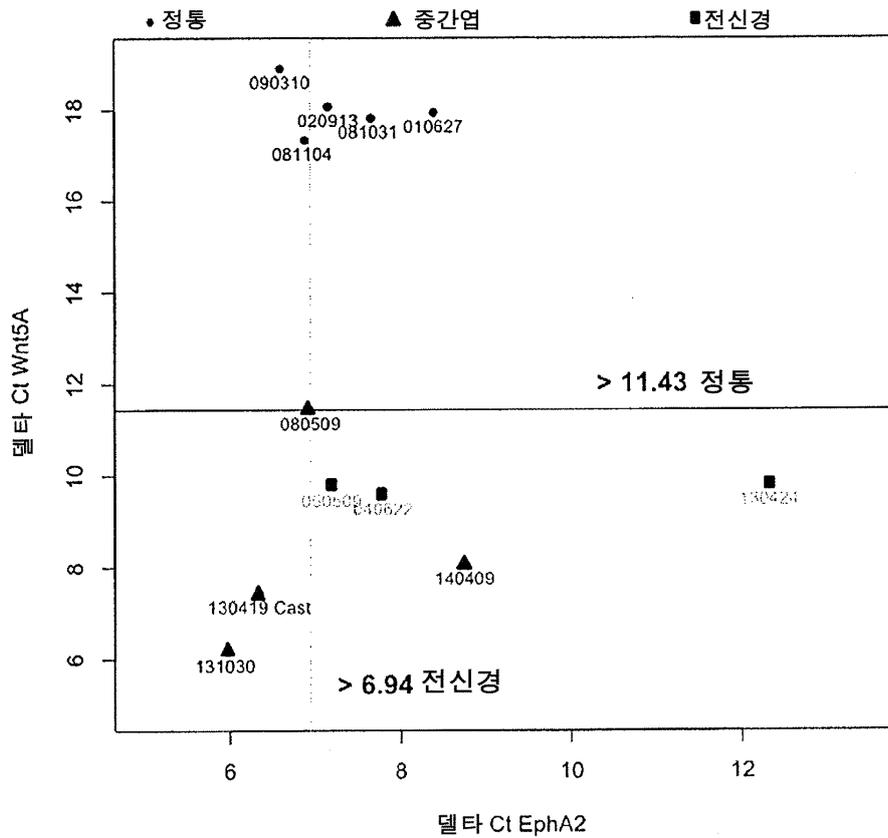
가속 전압: 20000 스캔 평균: 54
 그리드 전압: 93.700 % 안력: 2.67e-07
 가이드 와이어 전압: 0.070 % 저 질량 게이트: OFF
 지연: 100 OFF 음성 이온: OFF
 샘플: 32

원 파일명 c:\voyager\prim_07.ms
 본 파일 # 3 : C:\VOYAGER\PRIMM\201211-34AC5.MS

표본의 Maldi-Tof : 201211-00034



도면23



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> HyperStem SA Lugano

Vescovi, Angelo

<120> Methods and Compositions for Reducing Growth, Migration and Invasiveness of Brain Cancer Stem Cells and Improving Survival of Patients with Brain Tumors

<130> 18319.0004

<150> PCT/IB2015/002577

<151> 2015-12-09

<150> US 62/090,029

<151> 2014-12-10

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 1

Met Asp Gly Cys Glu Leu

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 2

Leu Glu Cys Gly Asp Met

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Mammalian

<400> 3

Leu Glu Gly Asp Met

1 5