



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0001199
(43) 공개일자 2017년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4188 (2006.01) A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/59 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4188 (2013.01)
A61K 31/53 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0090859
(22) 출원일자 2015년06월26일
심사청구일자 2015년06월26일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
김좌진
대전광역시 서구 관저북로51번길 24-20 엘리트
401호
한승연
대전광역시 유성구 상대남로 26 트리플시티아파트
913동 1501호
(74) 대리인
김대영

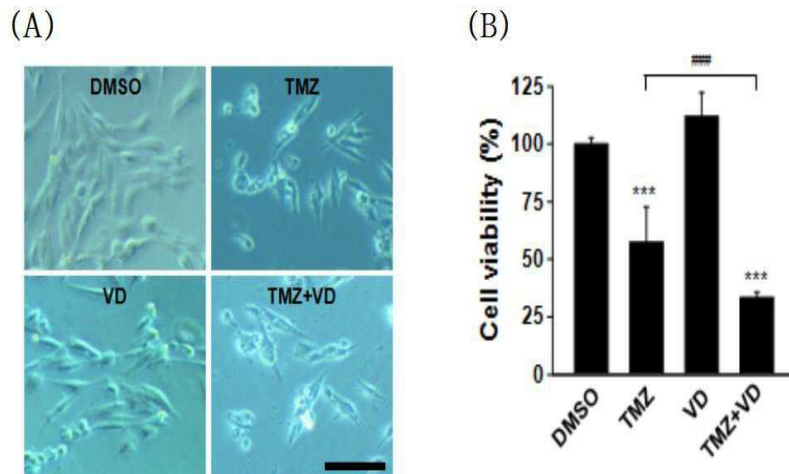
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 뇌교종 세포 치료를 위한 테모졸로마이드와 비타민 D가 포함된 조성물

(57) 요약

본 발명은 뇌교종 치료용 조성물에 관한 것으로 보다 상세하게는 테모졸로마이드의 알킬화제 및 비타민 D를 유효 성분으로 하는 뇌교종 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/59 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

알킬화제 및 비타민 D를 유효성분으로 하는 뇌교종 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 알킬화제는 테모졸로마이드인 것을 특징으로 하는 교모세포종 치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 알킬화제와 비타민 D는 몰비로 1:0.0001 내지 1:0.001인 것을 특징으로 하는 교모세포종 치료용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 뇌교종은 교모세포종인 것을 특징으로 하는 뇌교종 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌교종 세포 치료용 조성물에 관한 것으로 보다 상세하게는 테모졸로마이드와 비타민 D를 포함하는 교모세포종 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경교종(glioma)은 원발성 뇌종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양이다. 그중에서도 가장 악성으로 분류되고 있는 교모세포종(glioblastoma, GBM)의 경우, 다른 암과 비교하였을때 방사선 및 항암제 치료에 대한 저항성이 매우 높아 일단 진단되면 기대 생존기간이 단 1년에 불과하다. 또한 이와 같은 뇌종양의 경우, 뇌혈관 장벽이 있어 치료를 위한 약물의 전달이 쉽지 않다. 특히 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 그에 대한 치료제 개발이 더디게 진행되고 있다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 따라서 교모세포종의 치료에는 외과적 처치 이외에 방사선 치료 및 화학약물 치료가 함께 수행되고 있다. 그러나, 이러한 화학약물 치료는 내성 변이주의 발생, 종양줄기세포에 의한 재발 등의 원인으로 인하여 한계에 다다른 상황이므로, 새로운 치료법을 개발하여야 할 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

[0003] 최근 시스템 생물학(systems biology) 및 생물정보학 기법(bioinformatics tools)의 비약적 발전에 따라 교모세포종의 발생과 병증의 진행과 관련된 것으로 여겨지는 의미있는 유전적 결함 및 유전자 발현 패턴들이 연구되고 있다. 그러나, 임상 성과를 대표할 수 있는 고분자 마커(molecular marker)들의 발굴 성과는 전무한 실정이다. 특히, 유전자 발현 분석이 전사체(transcriptome) 수준에 머물러 있어 실제 암 조직에서의 단백질 발현 정도를 대변하지 못하는 한계가 있다.

[0004] 테모졸로마이드(Temozolomide, TMZ)는 항암 약물의 일종으로서, 마우스 종양 연구에 있어서 넓은 범위의 생물활성의 항암 작용을 구비하고 있다. 테모졸로마이드는 임상 항암 작용 연구를 통해 악성 흑색종, 균상 식육종(mycosis fungoides) 및 진행 신경 아교종(advanced glioma)에 대하여 효과를 나타내는 것이 증명되었다. 또한, 테모졸로마이드는 마우스에 이종 이식된 뇌종양 및 폐종양의 피하 치료에 효과가 있다. 시험관 내 항종양 시험을 통해, 테모졸로마이드는, 뇌종양, 난소암, 흑색종과, 다카바진(dacarbazine), 카르머스틴(carmustine),

시스플라틴(cisplatin), 독소루비신(doxorubicin), 5-플루오로라실(5-fluorouracil), 에토포시드(etoposide) 및 빈블라스틴(vinblastine)과 같은 종래 약물을 사용한 화학요법에 내성이 있는 종양 등 광범위한 종양에 대하여 항-종양 활성을 구비하고 있음이 증명되었다.

[0005] 종래의 교모세포종 치료에 관한 기술로, 대한민국 공개특허 제 10-2013-0118981호(2013.10.30.)은 악성 뇌교종, 특히 다형 교모세포종의 치료에서 테모졸로마이드 또는 파클리탁셀 등의 세포독성 치료제, 방사선요법 또는 세포독성 치료제 및 방사선요법 모두와 조합된 마시텐탄의 용도에 관한 것이다. 하지만, 세포독성 및 자가포식작용 등에 대한 실험적 내용이 기재되어 있지 않다.

[0006] 본 발명에서는 교모세포종의 세포독성 등의 실험적 내용 및 세포독성 치료제로 사용되는 테모졸로마이드와 비타민 D를 혼합하여 시너지 효과를 얻을 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 공개특허 제 10-2013-0118981(2013.10.30.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 알킬화제인 테모졸로마이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌교종 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 테모졸로마이드 및 비타민 D를 함유하는 교모세포종 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 알킬화제 및 비타민 D를 유효성분으로 하는 뇌교종 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 일 실시예로, 알킬화제는 테모졸로마이드일 수 있다.

[0012] 일 실시예로, 알킬화제와 비타민 D는 몰비로 1:0.0001 내지 1:0.001일 수 있다.

[0013] 일 실시예로 뇌교종은 교모세포종일 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 테모졸로마이드 및 비타민 D는 뇌종양의 일종인 교모세포종의 증식을 효과적으로 억제함으로써, 교모세포종의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포내 뇌교종 치료 유효성분이 배양 후 현미경 사진 및 세포 생존율을 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포집락형성능 측정에 결과를 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 상처 치유분석 결과를 도시한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포사멸 분석 결과를 도시한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역형광염색과 전자현미경에 의해 분석된 결과를 도시한 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 유세포 분석결과를 도시한 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴블롯 결과를 도시한 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 종양의 자기공명영상(MRI) 결과를 도시한 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 쥐의 생존율을 분석한 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있는 바람직한 실시 예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다. 본 발명의 각 도면에 있어서, 구조물들의 사이즈나 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하거나 축소하여 도시한 것이고, 특징적 구성이 드러나도록 공지의 구성들은 생략하여 도시하였으므로 도면으로 한정하지는 아니한다. 본 발명의 바람직한 실시 예에 대한 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0017] 본 발명은 알킬화제 및 비타민 D를 유효성분으로 하는 뇌교종 치료용 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 알킬화제는 테모졸로마이드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있으며, 보다 바람직하게는 테모졸로마이드일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명에서 상기 알킬화제와 비타민 D는 몰비로 1:0.0001 내지 1:0.001로 혼합되어 세포에 배양될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 뇌교종은 바람직하게는 교모세포종일 수 있다.
- [0021] 이하, 본 발명을 실시 예를 통해 자세히 설명한다.
- [0022] (실시예)
- [0023] 실시예 1. 세포주 배양
- [0024] 신경교세포인 C6 세포주는 미국(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용했다. 사용하는 배지는 DMEM medium에 10% fetal bovine serum(FBS), 4 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin를 첨가하여 사용하고, 95%의 습도가 유지되는 37℃, 5% CO₂, incubator에서 배양한다. 세포가 85% 범위로 배양되며 트립신 처리한다.
- [0025] 실시예 2. TMZ+VD 결합된 C6 rat glioblastoma cell 라인의 체내효과 관측
- [0026] 2-1. 세포독성 실험(MTT assay)
- [0027] 96-well plate에 well 당 세포(C6: 5×10^3)를 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 24시간 배양하여 세포단층을 도포한 후, 1 mM TMZ, 100 nM Vitamin D(VD), 1 mM TMZ와 100 nM의 VD 혼합물(TMZ+VD)을 각각 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.
- [0028] 배양 후, MTT 용액을 각각의 well에 추가한 후 37℃에서 4시간 동안 배양 후, 배양액을 제거하며, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 추가하여 30분간 상온에서 혼합한다. 이후, 세포 생존율을 확인하기 위해, 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0029] 본 발명의 도 1 (a)는 DMSO, TMZ(1 mM), VD(100 nM), TMZ(1 mM)+VD(100 nM) 혼합물 접종 후 24시간 동안 배양 후 현미경 사진이며, 도 1 (b)는 DMSO, TMZ(1 mM), VD(100 nM), TMZ(1 mM)+VD(100 nM) 처리 후, 생존하는 세포율을 나타낸 것이다. 결과적으로 TMZ+VD 혼합물이 처리된 경우 교모세포종에 독성을 가하게 됨으로써, 교모세포종이 사멸되는 것으로 사료된다.
- [0030] 2-2. 세포집락형성능의 측정(clonogenic assay)
- [0031] plating 전, 세포 배양액을 제거하고, PBS(phosphate buffered saline) 로 2회 세포를 세척한다. 또한, 부착성 세포(adherent cell)는 PBS로 세척한 후 트립신 처리 및 세포의 수를 측정한다.
- [0032] 오천개의 세포가 담긴 60mm 조직배양접시에 각각 배양액을 함유하는 DMSO, TMZ(1 mM), VD(100 nM), TMZ(1 mM)+VD(100 nM) 혼합물을 각각 접종하고, 72 시간 후 콜로니(colonies, 군락수)가 형성되는 것을 확인할 수 있다. 세포 배양액을 제거한 후, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 이후 콜로니는 30 분 동안 100 % 메탄올로 고정하고, 15 분 동안 쿠마시블루로 염색하여, 콜로니 수를 측정하였다.
- [0033] 본 발명에서 도 2 (A)는 C6 세포에 DMSO, TMZ(1 mM), VD(100 nM), TMZ(1 mM)+VD(100 nM) 혼합물 배양 72시간 후 측정된 사진으로, TMZ+VD 혼합물로 처리된 세포에서 콜로니가 현저하게 적은 것을 확인할 수 있고, 도 2

(B)는 이를 수치화한 것으로 TMZ+VD 혼합물의 수치가 현저히 낮은 것을 확인 할 수 있다. 결과적으로 TMZ+VD 혼합물을 처리한 경우 교모세포종의 사멸률이 높기 때문에 콜로니의 수가 적은 것으로 사료된다.

[0034] 2-3. 상처 치유 분석(Wound healing assay)

[0035] 세포를 60mm 조직배양접시에 도포한 후, 포화상태로 성장시킨 후, DMSO, TMZ(1 mM), VD(100 nM), TMZ(1 mM)+VD(100 nM) 혼합물을 처리하였다. 그런 다음, 피펫 팁을 사용하여 세포를 긁어 상처를 주었다. 0 내지 24시간 동안 관찰하였으며, 세포의 증식을 확인하였다.

[0036] 본 발명의 도 3 (A)에서 각각의 샘플에서 상처난 부분을 관찰한 결과, TMZ+VD 혼합물의 증식한 세포수가 가장 적은 것을 육안으로 확인할 수 있으며, 도 3 (B)는 시간 경과에 따른 세포의 증식에 따른 간격을 타나낸 것이다. 결과적으로, TMZ+VD 혼합물의 경우 세포의 증식성이 가장 낮은 것을 확인할 수 있으며, 이는 교모세포종의 운동성을 저하시켜 세포의 전이를 억제하는 것으로 사료된다.

[0037] **실시예 3. 교아세포종의 자가포식(autophagy) 작용**

[0038] 3-1. 세포 사멸 분석(Hoechst 33258 염색)

[0039] C6 세포를 12-well plate용 커버슬립위에 1×10^6 cells/well의 밀도로 분주하였다. 세포에 DMSO, TMZ(1 mM), VD(100 nM), TMZ(1 mM)+VD(100 nM) 혼합물 처리 후, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 incubator에서 반응시켰다. 이후, 4% 파라포름알데히드 500 μ L을 넣고 세포를 고정시킨 후 5 μ L Hoechst 33258 용액을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 세포를 공초점 현미경(LSM-700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

[0040] 본 발명에서 도 4 (A)는 세포사멸에 의한 핵의 수축, 밝기 및 응축을 확인할 수 있으며, 결과적으로 TMZ+VD 혼합물의 경우 핵이 강한 형광을 갖으며, 수축되거나 응축된 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 4 (B)는 핵 사멸율 그래프로 DMSO에 비해 TMZ, TMZ와 VD를 혼합한 경우의 사멸률이 높은 것을 확인할 수 있으며, 이를 통해 세포사멸이 일어남을 확인 할 수 있다.

[0041] 3-2. 면역 형광 염색법(Immunofluorescence, IF)

[0042] Microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)은 세포의 자가포식현상 검사에 있어서 바림작한 마커이다.

[0043] 세포(1×10^6 cells/well)는 멸균 커버 글라스에 부착하여 준비한 후, 1 mM TMZ와 100 nM의 VD 혼합물, DMSO, 1 mM TMZ, 100 nM VD를 24시간 동안 처리한다. 이후, 세포는 4% 파라포름알데히드를 이용하여 고정한 후, 3% normal goat serum으로 blocking 하였다. 그리고 세포의 막을 뚫기 위해 0.25 % Triton-X100을 넣고 15분간 상온에서 반응시킨다. 그 후, 1차 antibody인 rabbit polyclonal anti-LC3 antibody를 상온에서 2시간 처리한 후, PBS 버퍼로 2회 세척한다. 그리고 fluorescein isothiocyanate(FITC)와 접합된 2차 antibody인 anti-rabbit IgG antibody를 차광 상태에서 1시간 동안 추가적으로 반응시킨 후 PBS 버퍼로 세척한다. 그 후 DAPI 염색을 하고, mounting solution을 이용하여 커버슬립을 고정한다.

[0044] 이후, 공초점 현미경으로 이미지를 분석한 후, 세포내 LC3 puncta를 수량화하였다.

[0045] 본 발명에서 도 5 (A)에서는 1 mM TMZ와 100 nM의 VD 혼합물, DMSO, 1 mM TMZ, 100 nM VD 처리된 세포의 형광 이미지를 확인할 수 있으며, 도 5 (B)를 통해 LC3 puncta를 수량화하여 나타냈다. 결과적으로, DMSO 처리된 세포의 경우 LC3가 핵 주변에 puncta 형태로 분포되어 있는 반면, TMZ+VD 혼합물 처리된 경우, 전체적으로 분산되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0046] 또한, 도 5 (C)는 1 mM TMZ와 100 nM의 VD 혼합물, DMSO, 1 mM TMZ, 100 nM VD처리된 세포의 TEM 사진으로 세포내 물질들이 자가포식소체(autophagosome)로 둘러싸인 것을 확인(사진 내 빨간색 화살표 표시)할 수 있으며, 결과적으로 TMZ 처리한 군 보다 TMZ+VD 혼합물 처리한 군에서 자가포식소체가 크게 증가하여 자가포식현상이 증가한 것을 확인할 수 있다.

[0047] 3-3. 유세포 분석(Flow cytometry, FACS)

[0048] 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 4% 파라포름알데히드로 10분간 고정한 후 10분간 0.25% Triton X-100으로 처리한다. 세포에 1차 항체를 (1:100) 넣은 뒤, 얼음에서 1시간 반응시켰다. 이후 PBS로 2회 세척하고 2차 antibody를 넣은 뒤 1시간 반응시킨다. 그 후 FACS solution을 400ul 넣고, 형광강도를 측정하였다.

[0049] 본 발명에서 도 6 (A)는 유세포 분석한 결과로 DMSO 처리한 것과 비교하였을 때, TMZ+VD 혼합물 처리된 경우 LC3의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있으며, 도 6 (B)는 형광 강도를 수치화하여 나타냈다.

[0050] 3-4. 웨스턴블롯(Western blot)

[0051] 30-50 μ g 단백질은 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 겔에 전기영동한 후, polyvinylidene difluoride membranes으로 트랜스퍼하여 분석된다.

[0052] 밴드 확인을 위해 1:1000으로 희석된 1차 항체(anti-cleaved caspase3, β -actin, LC3, beclin-1, and p62)와 4°C에서 overnight 반응하고, 이후, 형광물질(horseradish peroxidase)이 부착된 secondary antibody로 2차 항체와 반응시켰다. 단백질은 X-ray 필름에 감광함으로써 감별할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 도 7 (A)는 웨스턴블롯을 실시하여 그 결과를 나타낸 것으로, TMZ+VD 처리 시, LC3 및 Beclin-1의 경우 단백질의 발현이 증가하는 반면, p62는 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있으며, LC3의 경우 TMZ+VD를 처리하지 않은 경우에 비해 발현이 증가되는 것을 알 수 있다.

[0054] 실시예 4. 동물실험

[0055] 동물실험은 7 내지 9주(250 내지 300g)된 수컷 쥐를 사용하였으며, 낮 12시간, 밤 12시간 및 23°C, 상대 습도 60% 분위기 하에서 사육하였다.

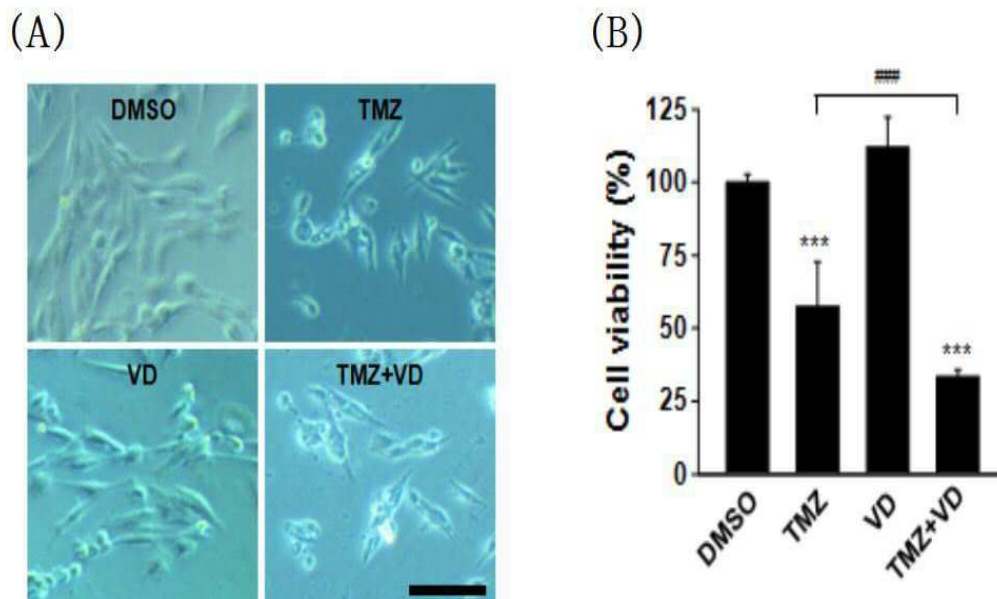
[0056] 상기 쥐의 두개골을 천공하여 C6세포를 주입 후, 7일 경과 후(PDO 7), DMSO, 200 μ L DMSO에 용해된 TMZ 10 mg/kg/day, 200 μ L 생리식염수(saline solution) 및 TMZ에 용해된 VD 0.2 μ g/kg/day를 각각 주입하여 비교하였다.

[0057] 본 발명에서 도 8 (A)를 통해 TMZ 처리 시 종양은 $580 \pm 83 \text{ mm}^3$ and $186 \pm 52 \text{ mm}^3$ 으로 Vehicle > TMZ > TMZ+VD 순으로 종양의 부피를 알 수 있으며, 8 (B)는 이를 수치화 한 것이다. 결과적으로, TMZ+VD 처리시 종양 성장을 억제하는 것으로 사료된다.

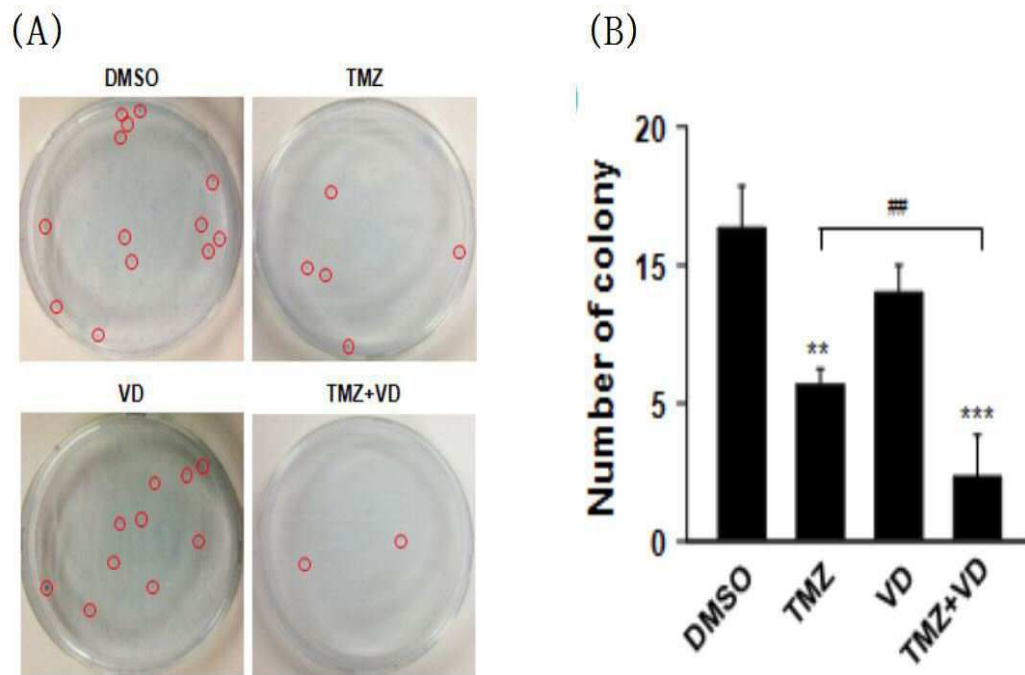
[0058] 또한, 본 발명의 도 9에 자기공명영상(MRI) 분석 결과를 나타냈으며, C6 세포만 주입된 (PDO 7)과 DMSO, TMZ, TMZ+VD 처리된 후 (PDO 14) 비교를 통해 TMZ+VD가 주입된 경우 생존률이 가장 높은 것으로 확인된다.

도면

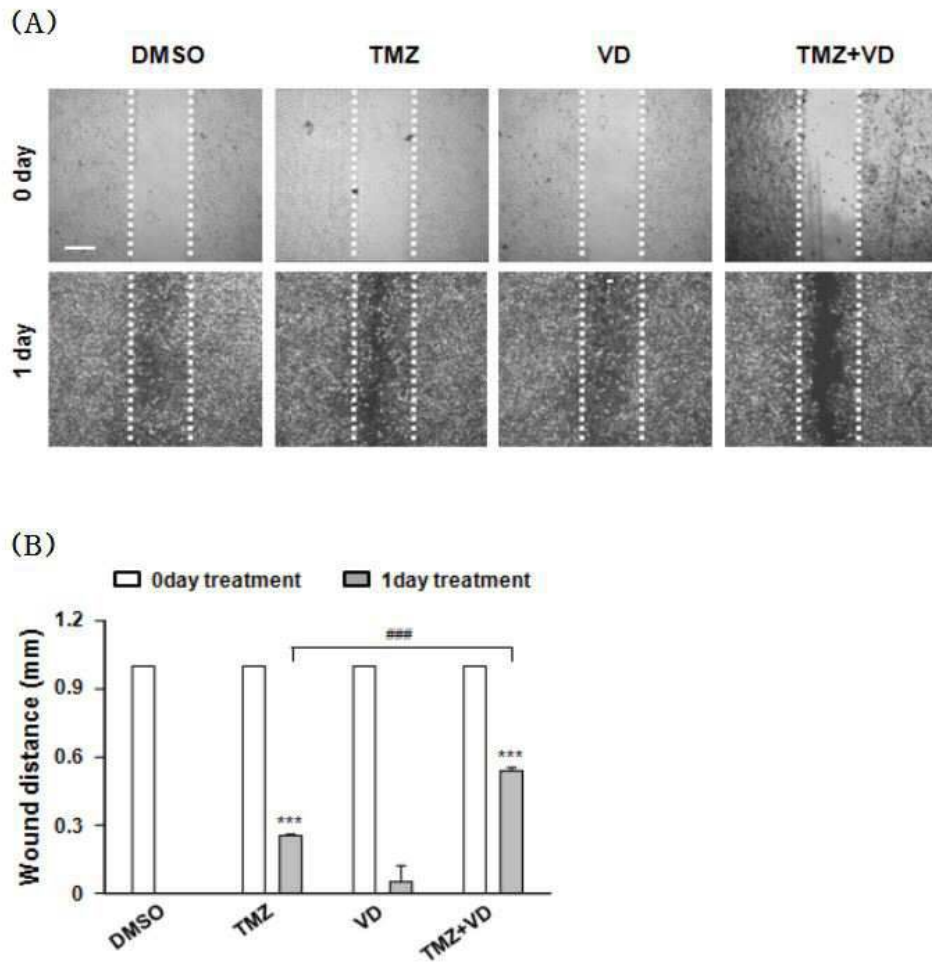
도면1



도면2

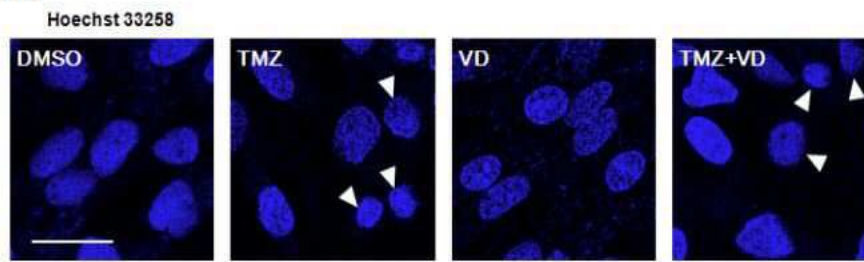


도면3

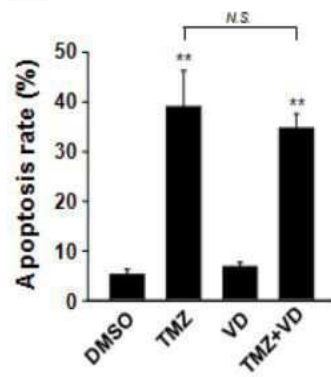


도면4

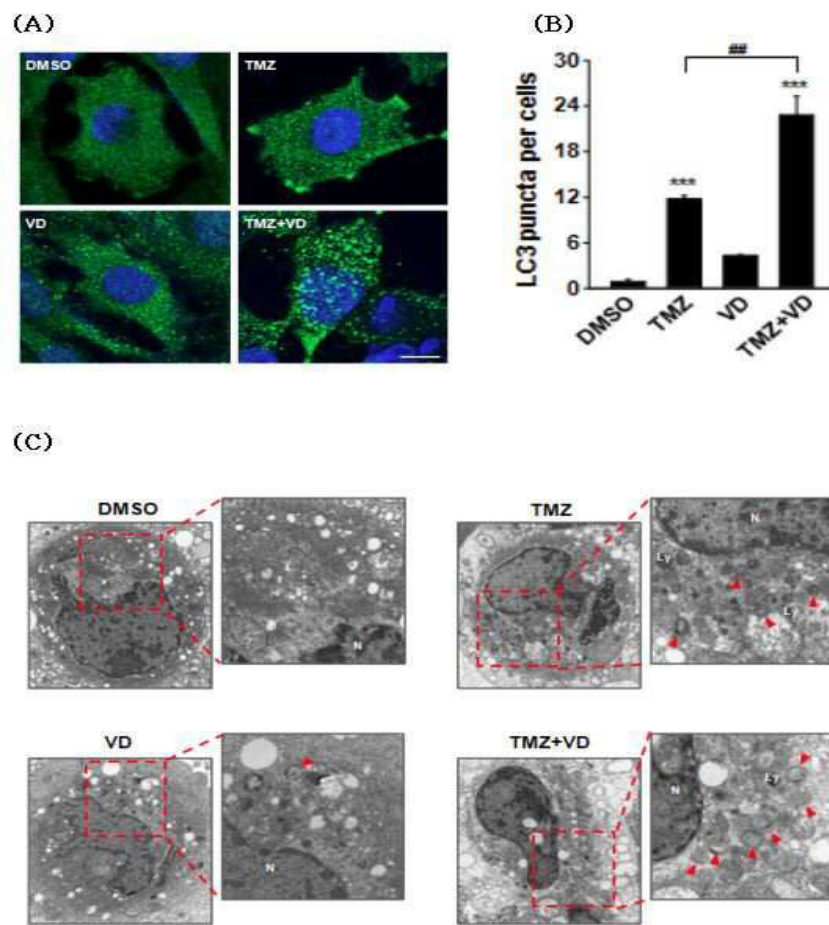
(A)



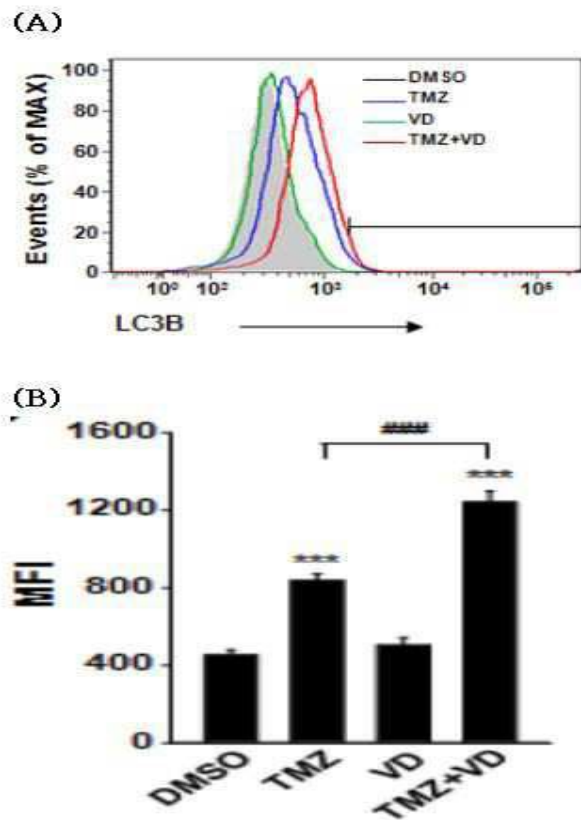
(B)



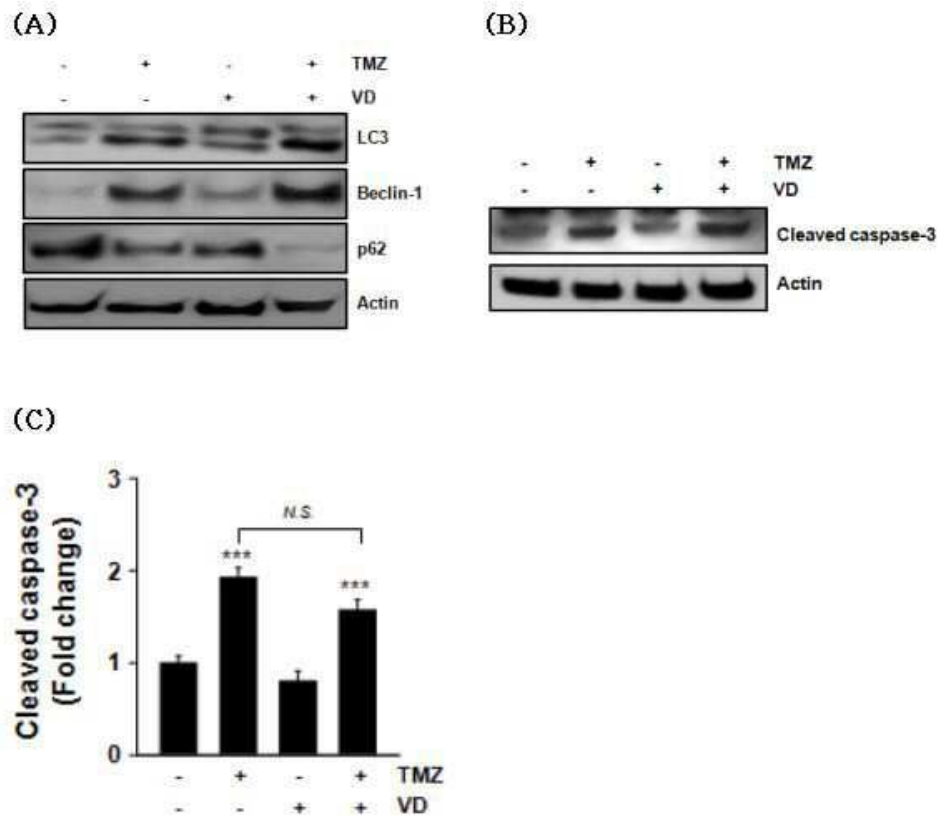
도면5



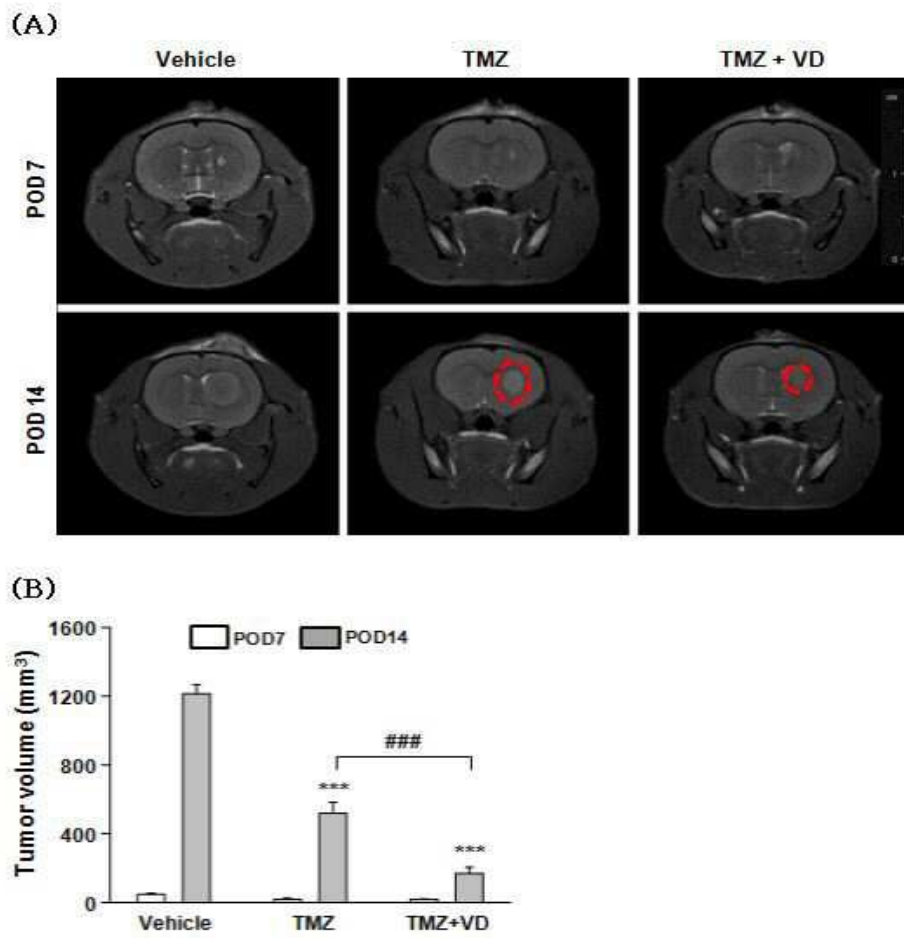
도면6



도면7



도면8



도면9

