

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0074017 (43) 공개일자 2014년06월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/4965 (2006.01) A61K 31/343 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0142148 (22) 출원일자 2012년12월07일 심사청구일자 2012년12월07일	(71) 출원인 계명대학교 산학협력단 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동) (72) 발명자 권택규 대구 달서구 송현로7길 41, 103동 1002호 (상인동, 월촌보성화성타운) 민경진 경북 칠곡군 왜관읍 평장3길 47, 202동 1201호 (대동다숲아파트) 우선민 경북 경산시 남매로 235, 다동 201호 (중방동, 전원주택) (74) 대리인 특허법인태백	

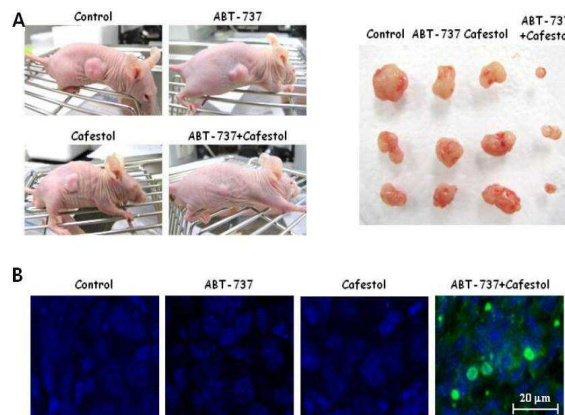
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 A B T-737 및 카페스톨을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 병용사용시 암세포 특이적으로 세포사멸을 유도하여, Mcl-1이 과발현된 암세포에서 뛰어난 항암활성을 나타내는 바, 암, 특히 신장암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

ABT-737 및 카페스톨(cafestol)은 Mcl-1이 과발현된 암 세포의 세포사멸 유도를 통하여 항암활성을 나타내는 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 담체, 부형제, 분해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤회제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤회제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함하는 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암은 고형암인 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 고형암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 핍지교종, 두개 내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 또는 피부암인 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 고형암은 신장암인 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 인류 건강을 위협하는 악성종양, 즉 암은 세계적으로 사망원인의 1, 2위를 차지하고 있으며 심혈관 질환 다음으로 서구사회에서 가장 일반적인 사망원인이다. 현대사회에서 인구의 노령화, 흡연인구의 증가 및 대기오염으로 인한 폐암이 증가하고 있으며 식생활의 서구화에 따른 고지방식의 섭취, 환경오염물질의 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가 추세에 있다. 따라서 암의 조기예방 및 치료를 가능하게 하여 인간건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.
- [0003] 종양은 세포내 세포사멸을 억제하기 위해 다양한 기전을 보유하고 있다. 그중 항 세포사멸 단백질로 알려진 Bcl-2 부류가 가장 잘 알려져 있고, 실제로 여러 가지 종양세포에서 Bcl-2 부류 단백질인 Bcl-2, Bcl-x_L 및 Mcl-1의 발현이 높은 것으로 알려져 있다.
- [0004] 따라서, 이러한 Bcl-2 부류 단백질의 발현을 억제하는 약물들이 많이 개발되고 있고, 실제로 이러한 약물을 사용하여 종양세포의 사멸을 유도하고자 하는 치료법이 밝혀지고 있다. 그중 Bcl-2 부류 단백질의 활성화 억제제로 알려진 ABT-737(CAS 등록번호: 852808-04-9, C₄₂H₄₅ClN₆O₅S₂)이 효과적으로 종양세포의 사멸을 유도함으로써 주목을 받게 되었지만(*Nature* 435, 677-681 (2 June 2005)), Mcl-1에 대한 친화력이 상대적으로 낮아 Mcl-1이 과발현 되어 있는 경우 ABT-737 만으로는 세포사멸을 유도할 수 없음이 밝혀졌다. 따라서 ABT-737은 단독으로 일부 소세포 폐암 세포주와 백혈병 세포에 효과가 있지만, 신장암 세포주를 포함한 다른 암세포에 대해서는 효과가 없다.
- [0005] 따라서, Mcl-1을 표적으로 삼는 다른 항암제인 ARC과 같은 물질을 ABT-737과 병용하여 사용하여 세포경로를 표적으로 치료하는 새로운 효과적인 암 치료제를 개발하는 연구가 수행되고 있다 (U. G. Bhat, et al., ARC Synergizes with ABT-737 to Induce Apoptosis in Human Cancer Cells, *Mol Cancer Ther* June 2010 9:1688-1696).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 따라서 본 발명은 Mcl-1을 과발현하는 암세포에 적용할 수 있는 신규 항암제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0008] ABT-737 및 카페스톨(cafestol)은 Mcl-1이 과발현된 암 세포의 세포사멸 유도를 통하여 항암활성을 나타내며, 상기 Mcl-1이 과발현된 암은 신장암일 수 있다.

발명의 효과

- [0009] 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 병용사용시 암세포 특이적으로 세포사멸을 유도하여, Mcl-1이 과발현된 암세포에서 뛰어난 항암활성을 나타내는 바, ABT-737 및 카페스톨(cafestol)은 암, 특히 신장암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 신장암세포에서 Bcl-2 부류 단백질 중에서 Mcl-1의 발현이 카페스톨 처리로 인해 특이적으로 감소됨을 보여주는 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 2는 ABT-737과 카페스톨의 암세포 특이 사멸유도효과를 검토한 실험 결과이다. A는 세포 형태학적 변화 관찰 사진이고, B는 유세포분석 결과 그래프이며, C는 세포사멸 마커 PLC- γ 1 에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 3은 ABT-737과 카페스톨의 항암 활성을 암세포 이종이식 후 in vivo 조건에서 검토한 실험 결과이다. A는 종양 크기에 대한 마우스 및 분리된 종양 사진이며, B는 TUNEL assay 결과 사진이다.

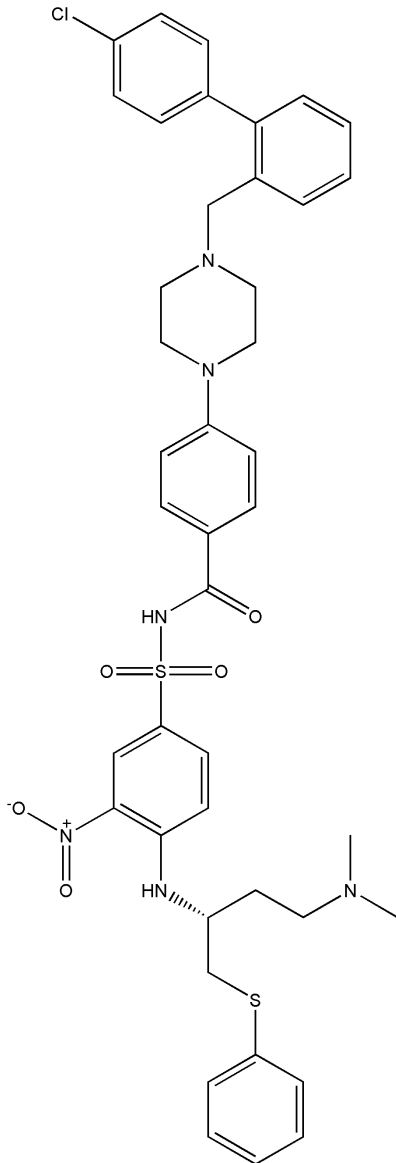
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 발명자들은 ABT-737 을 Mcl-1이 과발현된 암세포에도 적용하기 위해 연구하던 중, 카페스톨(cafestol)과 함께 사용하는 경우, Mcl-1이 과발현된 암세포의 사멸을 효과적으로 유도하며, 상기 항암 활성이 각 화합물을 단독 처리하는 경우보다 월등히 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 ABT-737은 이하의 화학식 1의 구조로 표현되는 화합물일 수 있다.

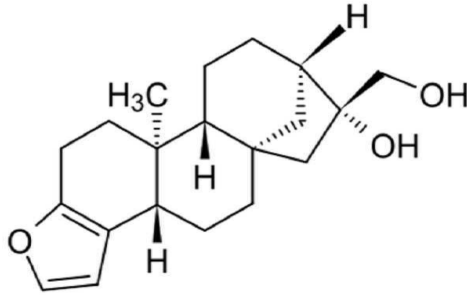
[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 본 발명의 다른 구체예에서, 카페스톨(cafestol)은 커피에 포함된 커피 기름성분으로서 이하의 화학식 2의 구조로 표현되는 화합물일 수 있다.

[0017] [화학식 2]



[0018]

[0019] 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol) 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 피마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

[0020] 이하 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 ABT-737 및 카페스톨(cafestol) 화합물은 신장암 세포의 증식을 낮은 마이크로몰 농도에서 억제하며, Mcl-1을 억제하는 세포사멸 유도기작을 통하여 암 세포의 활성을 저해함으로써 뛰어난 항암활성을 나타내는 바, 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 항암제의 제조를 위한 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)의 용도, 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학 조성물 100 중량부에 대하여 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 0.01 내지 90 중량부, 0.1 내지 90 중량부, 1 내지 90 중량부, 또는 10 내지 90 중량부로 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 달라질 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 약학 조성물에 포함되는 ABT-737 및 카페스톨의 중량비는 1: (0.7-1.3) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0025] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상으로 투여할 수 있다.
- [0027] 상기 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 1,000 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 1,000 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 암은 고형암일 수 있으며, 더욱 구체적으로 본 발명에 따른 ABT-737 및 카페스톨(cafestol)은 뇌종양(Brain tumor), 양성성상세포종 (Low- grade astrocytoma), 악성성상세포종 (High-grade astrocytoma), 뇌하수체 선종 (Pituitary adenoma), 뇌수막종 (Meningioma), 뇌림프종 (CNS lymphoma), 뿔지교종 (Oligodendroglioma), 두개내인종 (Craniopharyngioma), 상의세포종 (Ependymoma), 뇌간종양 (Brain stem tumor), 두경부 종양(Head & Neck tumor), 후두암 (Laryngeal cancer), 구인두암 (Oropharyngeal cancer), 비강/부비동암 (Nasal cavity/PNS tumor), 비인두암 (Nasopharyngeal tumor), 침샘암 (Salivary gland tumor), 하인두암 (Hypopharyngeal cancer), 갑상선암 (Thyroid cancer), 구강암 (Oral cavity tumor), 흉부종양(Chest Tumor), 소세포성 폐암 (Small cell lung cancer), 비소세포성 폐암 (Non small cell lung cancer), 흉선암 (Thymoma), 종격동 종양 (Mediastinal tumor), 식도암 (Esophageal cancer), 유방암 (Breast cancer), 남성유방암 (Male breast cancer), 복부종양 (Abdomen-pelvis tumor), 위암 (Stomach cancer), 간암 (Hepatoma), 담낭암 (Gall bladder cancer), 담도암 (Biliary tract tumor), 췌장암 (pancreatic cancer), 소장암 (Small intestinal tumor), 대장(직장)암 (Large intestinal tumor), 항문암 (Anal cancer), 방광암 (Bladder cancer), 신장암 (Renal cell carcinoma), 남성생식기종양 (Male genital cancer), 음경(요도)암 (Penile cancer), 전립선암 (Prostatic cancer), 여성생식기종양 (Female genital cancer), 자궁경부암 (Cervix cancer), 자궁내막암 (Endometrial cancer), 난소암 (Ovarian cancer), 자궁육종 (Uterine sarcoma), 질암 (Vaginal cancer), 여성외부생식기암 (Vulva cancer), 여성요도암 (Urethral cancer) 또는 피부암 (Skin cancer)의 치료에 사용함이 바람직하다. 보다 더 바람직하게는 신장암, 유방암 또는 뇌종양일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 신장암의 치료에 사용될 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0031] <실시예 1> 카페스톨 처리로 인한 Mcl-1의 발현 감소 확인
- [0032] 신장암세포를 4×10^5 cells/ml의 양으로 6 well plate에 각각 2 ml씩 24시간 동안 37℃, CO₂ 배양기에서 배양한 후 카페스톨(Cafestol)을 10, 30, 50 mM 농도별로 처리하였다. Bcl-2 부류 단백질 중 Mcl-1의 발현을 확인하기 위해서 Western Blotting을 시행하였다. 카페스톨을 처리한 세포를 세포 파쇄용액 완충액(50 mM Tris-Cl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5)으로 파쇄한 후 50 mg의 단백질을 10% 젤을 이용하여 SDS-PAGE를 시행한 후, 분리된 단백질은 Immobilon-P membrane에 90volt로 1시간동안 이동시켰다. 단백질이 이동된 membrane을 5% 탈지분유로 30분간 실온에서 반응시켰다. 각각의 일체 항체를 처리하여 실

온에서 밤새 반응시킨 후, TTBS로 5분 간격으로 6회 세척한 후 Horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차 항체와 1시간 반응시키고 다시 TTBS로 5분 간격으로 6회 세척하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting kit를 이용하여 X-ray film 으로 확인하였다. 결과를 도 1에 나타내었다.

[0033] 도 1을 참조하면, 신장암세포에서 Bcl-2 부류 단백질 중에서 Mcl-1의 발현이 카페스톨 처리로 인해 특이적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0034] <실시예 2> ABT-737과 카페스톨의 암세포 특이 작용 검토

[0035] ABT-737과 카페스톨에 의한 세포사멸이 암세포 특이적인 현상인지 확인하기 위해서 신장암세포와 정상세포에 ABT-737과 카페스톨을 단독 혹은 병합 처리하여 세포의 형태학적 변화와 유세포분석기(flow cytometry), Western Blotting을 통해 세포사멸을 확인하였다.

[0036] 신장암세포와 정상세포를 4×10^5 cells/ml의 양으로 6 well plate에 각각 2 ml씩 24시간 동안 37°C, CO₂ 배양기에서 배양한 후 ABT-737과 카페스톨을 단독 혹은 병합 처리한 후 광학현미경으로 세포의 형태학적 변화를 확인하였다. 결과를 도 2의 A에 나타내었다. 도 2의 A를 통해, 신장암세포에서 ABT-737과 카페스톨을 병합처리하면 세포의 모양이 변하고 깨지면서 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였고 정상세포에서는 형태학적 변화가 없음을 확인하였다.

[0037] 세포에 100 ml PBS를 넣은 후 vortex를 사용하여 섞어주면서 200 ml 100% 에탄올을 넣고 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 원심분리기를 사용하여 상등액을 제거 후 250 ml RNase를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 동량의 PI(Propidium Iodide)를 넣고 유세포분석기 중 하나인 FACScan flow cytometer를 사용하여 세포주기를 통해 세포사멸(sub G1)을 확인하였다. 결과를 도 2의 B에 나타내었다. 도 2의 B를 참조하면, 신장암세포에서 ABT-737과 카페스톨의 단독처리에서 나타나지 않는 세포사멸이 두 가지 약물을 병합 처리하면 세포사멸이 약 25%로 증가함을 알 수 있었다. 반면에 정상세포에서는 두 가지 약물을 병합 처리하여도 세포사멸이 유도되지 않았다.

[0038] Western Blotting을 통해 세포사멸의 마커인 PLC- γ 1을 확인한 결과를 도 2의 C에 나타내었다. 도 2의 C를 참조하면, 신장암세포에서 특이적으로 ABT-737과 카페스톨을 병합 처리시 PLC- γ 1의 cleaved form 이 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0039] 상기 이 결과를 통해서 ABT-737과 카페스톨 병합처리에 의한 세포사멸은 암세포 특이적인 현상임을 확인할 수 있었다.

[0040] <실시예 3> ABT-737과 카페스톨의 *in vivo* 항암활성 검토

[0041] Mcl-1이 과발현 된 신장암세포를 1×10^6 cells/100 ml 양으로 누드마우스에 이종이식(xenograft)한 후 2주 뒤부터 일주일에 두 번씩 75mg/kg ABT-737과 75mg/kg 카페스톨을 단독 혹은 병합으로 복강에 주입하였다. 종양의 분화 및 사멸 조절의 통한 크기를 확인한 결과를 도 3의 A에 나타내었다. 도 3의 A를 참조하면 ABT-737 또는 카페스톨의 단독 처리군에서는 종양 크기 감소 효과가 매우 미미하나, ABT-737과 카페스톨의 병합 처리시 유의적으로 종양크기가 작아짐을 알 수 있었다.

[0042] 분리한 종양을 O.C.T Compound로 급속 냉각시키고 저온 유지 장치인 cryostat을 사용하여 20 mm 두께로 잘라 낸 후, 종양의 사멸을 확인할 수 있는 방법 중 하나인 TUNEL assay를 통해 세포를 염색한 뒤 형광현미경을 통해 종양의 사멸을 확인하였다. 그런 컬러는 종양이 사멸시 나타나는 현상으로 TUNEL positive한 세포를 나타나고 블루 컬러는 Hoechst33342를 사용하여 세포의 핵을 염색하였다. 결과를 도 3의 B에 나타내었다.

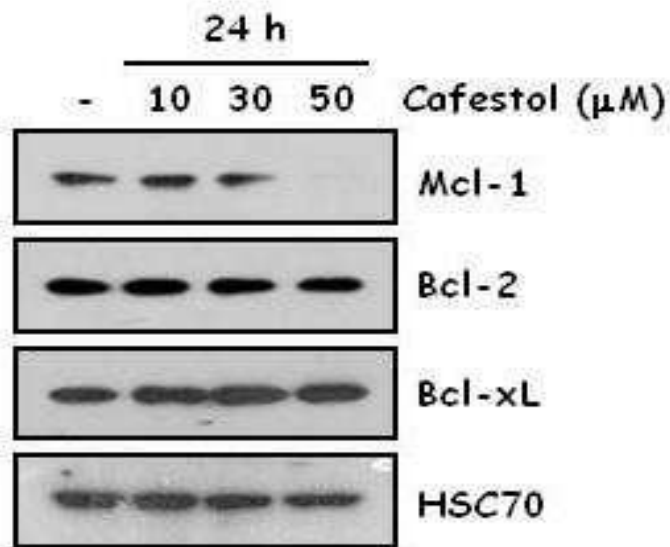
[0043] 도 3의 B를 참조하면, ABT-737 또는 카페스톨의 단독 처리군에서는 그런 컬러의 signal이 거의 관측되지 않으나, ABT-737과 카페스톨을 병합 처리시 TUNEL positive인 그런 컬러의 signal이 증가되는 것을 확인할 수 있는 바, 이를 통해 종양의 사멸이 증가함을 확인할 수 있었다.

[0044] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할

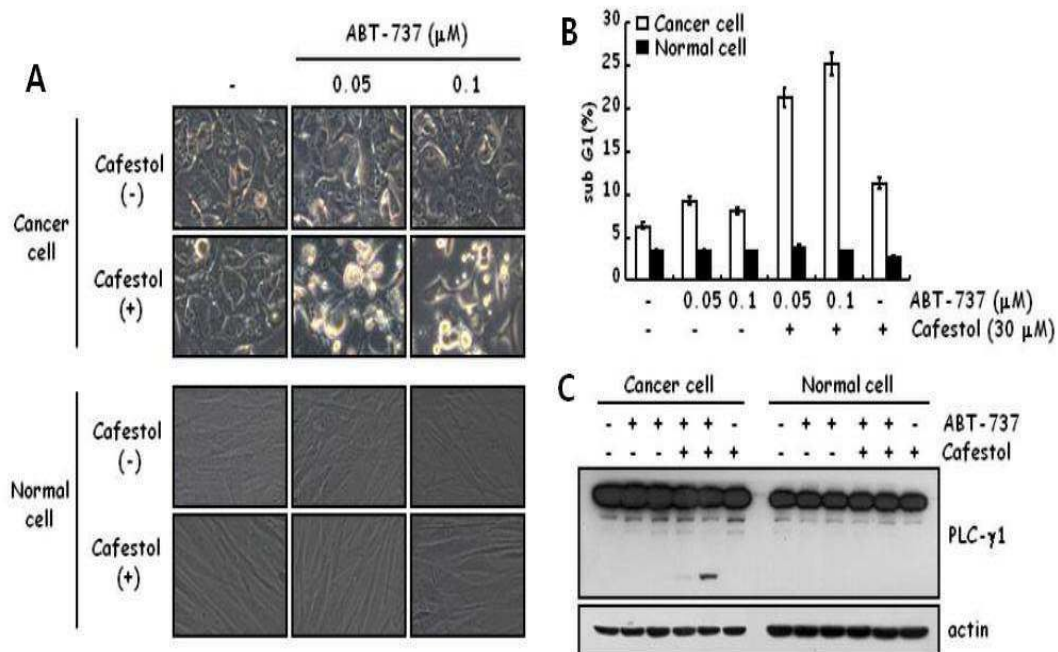
것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

