



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0073210
(43) 공개일자 2016년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/76 (2015.01) A61K 39/155 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0181724

(22) 출원일자 2014년12월16일

심사청구일자 2014년12월16일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

권형주

충청북도 청주시 상당구 중흥로 70, 306동 1204호
(용암동, 용암현대3차아파트)

최송희

강원도 춘천시 후석로326번길 31, 304동 401호 (후평동, 현대3차아파트)

박병권

서울특별시 중랑구 봉우재로59길 3 (망우동)

(74) 대리인

특허법인피너클, 한양특허법인

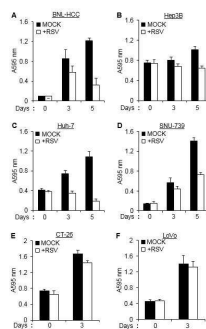
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 인간 호흡기 세포융합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 간암 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간 호흡기 세포융합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 간암 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9A9050126

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 TM4SF5를 타겟으로 하는 항체의 최적화를 통한 간암 치료용 항체 후보 개발

기 여 율 50/100

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.10.17 ~ 2018.10.16이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A2A2A03067981

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 에피통 발굴기술 개발을 통한 암 치료용항체 개발 기반구축 및 기전 규명 연구

기 여 율 50/100

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

인간 호흡기 세포융합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 간암 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포 이동 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포에 대한 에팍토시스 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 호흡기 세포융합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 간암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전 세계 사망의 주된 원인이다. 암에 대한 예방 백신과 치료제를 개발하기 위하여 다양한 시도가 있다. 방사선치료, 화학요법 및 면역요법 등이 개발되었으나 암의 예방이나 치료는 여전히 해결되지 않고 있다.

[0003] 간세포 암종(Hepatocellular carcinoma, 이하, 'HCC'라 함)은 전세계적으로 1년에 500,000 명 이상이 사망하는 가장 흔한 암 중에 하나이다. HCC의 빈도는 아시아 및 아프리카에서 가장 흔하나 미국에서도 급격하게 증가하고 있다(Hoofnagle JH (2004) Hepatocellular carcinoma: summary and recommendations. Gastroenterology **127**, S319-S323). HCC의 발생은 간염 바이러스 감염이나 간경변증에 의하여 개시된다고 알려졌다. 두 타입의 간염 바이러스인 HBV 및 HCV가 HCC의 발생에 관여한다(Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ and Bell BP (2006). J Hepatol **45**, 529-538).

[0004] HCC에 대한 통상의 화학요법 및 방사선요법이 개발되었으나 HCC 치료에 제한된 효과가 보고되었다(Douek M and Taylor I (2003). Lancet Oncol **4**, 626-630;Llovet JM, Burroughs A and Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma. Lancet **362**, 1907-1917).

[0005] 한편, 인간 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus;이하, 'RSV'라 함) 파라믹소바이러스(paramyxovirus) 계열에 속하는 외비모유 비분절화된(non-segmented) 네가티브 단일 가닥 RNA 바이러스이다(Chang J (2011) Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine. BMB Rep **44**, 232-7). RSV RNA 지놈의 전사 및 복제는 핵 관련없이 원형질에서 일어난다. RSV는 유아 및 면역이 약화된 성인의 하기도(lower respiratory tract) 감염에 관여하는 폐 병원체이다(Tregoning JS and Schwarze J (2010). Clin Microbiol Rev **23**, 74-98;Falsey AR and Walsh EE (2000). Clin Microbiol Rev **13**, 371-384).

[0006] [선행 특허 문헌]

[0007] 대한 민국 특허공개번호 10-2011-0096579

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 간암 치료용 조성물을 제공하는

것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인간 호흡기 세포융합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 간암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 암 세포 이동 억제 활성을 가지는 것이 바람직하고, 암 세포에 대한 에팍토시스 활성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0011] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0012] 본 발명에서 본 발명자들은 HCC 세포주에 RSV 감염의 HCC 성장 저해를 발견하였으며, 인 비트로에서 HCC 세포에서 RSV의 세포 이동 억제(anti-migratory) 기능을 분석하였다.
- [0013] 본 발명자들은 간암 세포주에서 RSV 감염의 저해 효과를 관찰하였다. 세포 성장은 BNL-HCC, Hep3B, Huh-7 및 SNU-739 세포에서 RSV 감염에 의하여 현저하게 감소하였다. 용균반 형성 및 신시티움 형성이 RSV 감염 후 Hep3B 및 Huh-7 세포에서 관찰되었고, RSV 단백질 발현도 Hep3B 및 Huh-7 세포에서 관찰되었다. 그러나, Huh-7 세포에서만 RSV 감염 후 에팍토시스를 나타내었다. 또 RSV 감염에 의한 세포 이동의 저해가 BNL-HCC, Hep3B, Huh-7 및 SNU-739 세포에서 관찰되었다.
- [0014] 본 발명의 RSV는 인산염 버퍼 식염수와 같은 생리학적 허용 담체 또는 운반체 내에서 종양으로 투여한다. "종양으로 투여"는 RSV를 종양 세포와 접촉하는 방식으로 투여한다는 것을 뜻한다. RSV의 투여 경로는 물론 그 제형, 담체 또는 운반체는 종양의 유형은 물론 그 위치에 의존한다. 매우 다양한 투여 경로를 이용할 수 있다. 예를 들어 접근 가능한 고형 종양의 경우, RSV는 종양에의 직접 주입으로 투여할 수 있다. 예를 들어 조혈 종양의 경우, RSV는 정맥주사 또는 혈관주사로 투여할 수 있다. 체내에서 쉽게 접근할 수 없는 전이 또는 뇌종양과 같은 종양의 경우, RSV는 포유류의 신체를 통해 전신 수송되어 종양에 도달하는 방식으로 투여할 수 있다(예컨대, 경막투여, 정맥주사 또는 근육주사). 대안으로, RSV는 단일 고형 종양에 직접 투여할 수 있고, 그러면 여기에서 신체를 통해 전이로 전신 운반된다. 또한, RSV는 피하투여, 복강투여, 국소투여(예컨대 흑색종에 대해), 경구투여(예컨대 구강 또는 식도 종양에 대해), 직장투여(예컨대 직장결장 종양에 대해), 질투여(예컨대 자궁경부 또는 질 종양에 대해), 비강투여 또는 흡입분사(예컨대 폐 종양에 대해)할 수 있다.
- [0015] 일반적으로, 적합한 조성물은 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조할 수 있으며 따라서 약학적 허용 담체, 희석제 및/또는 보조제(adjuvant)를 포함할 수 있다.
- [0016] 이들 조성물은 표준 경로로 투여할 수 있다. 일반적으로, 조성물은 비경구(예컨대 정맥주사, 척수강내, 피하 또는 근육주사), 경구 또는 국소 경로로 투여할 수 있다. 보다 바람직하게는 투여는 비경구 경로에 의존한다.
- [0017] 담체, 희석제 및 보조제는 조성물의 다른 성분과의 적합성 관점에서 "허용가능"하여야 하며, 그 수령자에게 유해하지 않아야 한다.
- [0018] 약학적 허용 담체 또는 희석제는 탈이온수(demineralised water) 또는 증류수; 식염수; 식물 기반 오일, 예컨대 땅콩유, 홍화유, 올리브유, 면실유, 옥수수유, 참기름, 아라키스유(arachis oil) 또는 코코넛유; 폴리실록세인을 포함하는 실리콘 오일, 예컨대 메틸 폴리실록세인, 페닐 폴리실록세인 및 메틸페닐 폴리실록세인; 휘발성 실리콘, 미네랄 오일, 예컨대 액체 파라핀, 연질 파라핀 또는 스쿠알렌; 셀룰로스 유도체, 예컨대 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 소듐카복시메틸셀룰로스 또는 하이드록시프로필메틸셀룰로스; 저급 알칸올, 예컨대 에탄올 또는 아이소-프로판올; 저급 아랄칸올; 저급 폴리알킬렌 글리콜 또는 저급 알킬렌 글리콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜 또는 글리세린; 지방산 에스테르, 예컨대 아이소프로필 팔미테이트, 아이소프로필 미리스테이트 또는 에틸 올레에이트; 폴리비닐피롤리돈; 한천; 트라가칸트 고무 또는 아카시아 고무, 및 석유 젤리이다. 전형적으로, 담체 또는 담체들은 조성물의 10 중량% 내지 99.9 중량%를 형성할 것이다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 경구 소화에 적합한 제형(예컨대 캡슐, 정제, 당의제, 엘릭서제)의 형태, 국부투여에 적합한 연고, 크림 또는 로션의 형태, 안약으로서의 전달에 적합한 형태, 흡입투여, 예컨대 비강내 흡입 또는 경구 흡입에 적합한 에어로졸 형태, 비경구투여 즉 피하, 근육 또는 정맥주사에 적합한 형태가 될 수 있다.
- [0020] 주사 용액 또는 현탁액으로서의 투여를 위해, 비독성 비경구 허용 희석제 또는 담체는 링거 용액, 등장 식염수, 인산염 식염수, 에탄올 및 1,2-프로필렌 글리콜을 포함할 수 있다.

- [0021] 경구 용도에 적합한 담체, 희석제, 부형제 및 보조제의 몇몇 예는 땅콩유, 액체 파라핀, 카복시메틸셀룰로스 소듐, 메틸셀룰로스, 알진산 소듐, 아카시아 고무, 트라가칸트 고무, 텍스트로스, 설탕, 소르비톨, 마니톨, 젤라틴 및 레시틴을 포함할 수 있다. 이에 덧붙여 이들 경구 제형은 적합한 착향 및 착색제를 함유할 수 있다. 캡슐 형태로 사용시 캡슐은 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 다이스테아레이트와 같은 봉해를 지연시키는 화합물로 코팅될 수 있다.
- [0022] 보조제는 연화제, 유화제, 증점제, 보존제, 및 살균제를 전형적으로 포함한다. 경구 투여용 고체 형태는 인간 및 수의과 약학 진료에 허용가능한 바인더, 감미제, 봉해제, 희석제, 착향제, 코팅제, 보존제, 윤활제 및/또는 시간 지연제를 함유할 수 있다. 적합한 바인더는 아카시아 검, 젤라틴, 옥수수 전분, 트라가칸트 검, 알진산소듐, 카복시메틸셀룰로스 또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 적합한 감미제는 설탕, 유당, 포도당, 아스파탐 또는 사카린을 포함한다. 적합한 봉해제는 옥수수 전분, 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 구아 검, 잔탄 검, 벤토나이트, 알진산 또는 한천을 포함한다. 적합한 희석제는 유당, 소르비톨, 마니톨, 텍스트로스, 백토, 셀룰로스, 탄산 칼슘, 칼슘 실리케이트 또는 인산 이칼슘을 포함한다. 적합한 착향제는 박하유, 윈터그린, 체리, 오렌지 또는 래즈베리 향 오일을 포함한다. 적합한 코팅제는 아크릴산 및/또는 메타크릴산 및/또는 이들의 에스터의 중합체 또는 공중합체, 왁스, 지방 알콜, 제인(zein), 셀락, 또는 글루텐을 포함한다. 적합한 보존제는 벤조산 소듐, 비타민 E, 알파-토코페롤, 아스코르브산, 메틸 파라벤, 프로필파라벤 또는 중아황산 소듐을 포함한다. 적합한 윤활제는 스테아르산 마그네슘, 스테아르산, 올레산 소듐, 염화 소듐 또는 활석을 포함한다. 적합한 시간 지연제는 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 다이스테아레이트를 포함한다.
- [0023] 경구 투여용 액체 형태는 상기 물질들에 더해 액체 담체를 함유할 수 있다. 적합한 액체 담체는 물, 오일 예컨대 올리브유, 땅콩유, 참기름, 해바라기유, 홍화유, 아라키스유, 코코넛유, 액체 파라핀, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올, 프로판올, 아이소프로판올, 글리세롤, 지방 알콜, 트리글리세라이드 또는 이들의 혼합물을 포함한다.
- [0024] 경구 투여용 현탁액은 분산제 및/또는 현탁제를 더 포함할 수 있다. 적합한 현탁제는 카복시메틸셀룰로스 소듐, 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로스, 폴리-비닐피롤리돈, 알진산 소듐 또는 아세틸 알콜을 포함한다. 적합한 분산제는 레시틴, 스테아르산과 같은 지방산의 폴리옥시에틸렌 에스터, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노- 또는 다이-올레이트, -스테아레이트 또는 -라우레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노- 또는 다이-올레이트, -스테아레이트 또는 -라우레이트 등을 포함한다.
- [0025] 경구 투여용 유제(emulsion)는 하나 이상의 유화제를 더 포함할 수 있다. 적합한 유화제는 상기 예시된 분산제 또는 자연검 예컨대 구아 검, 아카시아 검 또는 트라가칸트 검을 포함한다.
- [0026] 비경구 투여 조성물의 조제방법은 당업자에게 명백하며, 예컨대 Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.에 보다 상세히 기술되어 있다.
- [0027] 본 발명의 국소 제형은 활성 성분과 함께 하나 이상의 허용가능한 담체, 및 선택적으로 임의의 기타 치료 성분을 포함할 수 있다. 국소 투여에 적합한 제형은 치료가 필요한 부위로의 피부를 통한 관통에 적합한 액체 또는 반-액체 제제, 예컨대 도찰제, 로션, 크림, 연고 또는 페이스트, 그리고 눈, 귀 또는 코에의 투여에 적합한 물약을 포함한다.
- [0028] 본 발명에 따른 물약은 멸균(sterile) 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 이는 살균제 및/또는 살진균제 및/또는 임의의 기타 적합한 보존제, 그리고 선택적으로 계면활성제를 포함하는 수용액에 활성 성분을 용해시켜 조제할 수 있다. 생성된 용액은 여과로 투명하게 하고, 적합한 용기로 옮긴 뒤 멸균할 수 있다. 멸균은 1시간 반 동안 90°C-100°C에서 고압멸균(autoclave) 또는 유지, 또는 여과 뒤 무균(aseptic) 기법으로 용기로 옮김으로써 달성할 수 있다. 물약에 포함될 수 있는 적합한 살균제 및 살진균제의 예는 질산 또는 아세트산 페닐수은 (0.002%), 벤즈알코늄 클로라이드 (0.01%) 및 클로르헥시딘 아세테이트 (0.01%)이다. 유성 용액의 조제에 적합한 용매는 글리세롤, 희석 알콜 및 프로필렌 글리콜을 포함한다.
- [0029] 본 발명에 따른 로션은 피부 또는 눈의 도포에 적합한 것들을 포함한다. 점안약은 선택적으로 살균제를 함유하는 멸균수용액을 포함할 수 있고, 물약의 조제와 관련하여 앞서 기술한 방법과 유사한 방법으로 조제할 수 있다. 피부 도포용 로션 또는 연고는 알콜 또는 아세톤, 및/또는 글리세롤과 같은 보습제, 또는 피마자유 또는 아라키스유와 같은 오일과 같은, 건조 촉진 및 피부 냉각제를 포함할 수도 있다. 본 발명에 따른 크림, 연고 또는 페이스트는 외부 도포용 활성 성분의 반-고체 제형이다. 이는 미분 또는 분말 형태의 활성성분을, 단독 또는 용액으로 또는 수성 또는 비수성 유체의 현탁액으로 유지성 또는 비유지성 기제와 혼합하여 만들 수 있다. 기제는

탄화수소 예컨대 경질, 연질 또는 액체 파라핀, 글리세롤, 밀랍, 금속성 비누; 점액(mucilage); 자연 기원의 오일 예컨대 아몬드유, 옥수수유, 아라키스유, 피마자유 또는 올리브유; 양털지방 또는 그 유도체, 또는 스테아르산 또는 올레산과 같은 지방산과 프로필렌 글리콜 또는 마크로글과 같은 알콜을 포함할 수 있다.

[0030] 조성물은 소르비탄 에스터 또는 그 폴리옥시에틸렌 유도체와 같은 음이온, 양이온 또는 비이온 계면활성제와 같은 임의의 적합한 계면활성제를 혼입할 수 있다. 자연 검, 셀룰로스 유도체 또는 실리카성 실리카(siliceous silica)와 같은 무기 물질과 같은 현탁제, 및 라놀린과 같은 기타 성분 또한 포함할 수 있다.

[0031] RSV 또는 RSV로부터 얻은 또는 유도된 핵산은 종양 치료에 충분한 양으로 투여한다(예컨대, "유효량"). RSV의 종양 세포 투여가 종양 세포의 종양 용해를 일으켜, 그 결과 종양 크기의 감소 또는 종양의 완전한 제거를 가져올 때 종양은 "치료"된다. 종양 크기의 감소 또는 바람직하게는 종양의 제거는 RSV에 의한 종양 세포의 용해("종양 용해")에 의해 일반적으로 유발된다. 유효량은 개체 기준으로 결정될 것이며, 적어도 부분적으로는 RSV의 유형; 개체의 크기, 연령, 성; 및 종양의 크기 및 기타 특성의 고려에 근거할 수 있다. 예를 들어, 인간의 치료의 경우, 존재하는 종양의 유형, 크기 및 개수에 따라 대략 10^2 내지 10^{12} 의 플라크 형성 단위(PFU)의 RSV를 이용할 수 있다. 바람직하게, 접종물은 약 105 PFU 초과, 예를 들어 약 10^5 내지 10^6 PFU 또는 약 10^6 내지 10^7 PFU를 함유할 것이다. 보다 바람직하게, 접종물은 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 PFU, 예컨대 약 3×10^6 PFU를 함유할 수 있다. RSV는 단일 투약, 또는 다수 투약(즉 일회 초과 투약)으로 투여할 수 있다. 다수 투약은 동시에 또는 연속적으로(예컨대 수일 또는 수주의 기간 동안) 투여할 수 있다. 전형적으로, 치료적 적용에서 치료는 질병 상태의 지속 동안, 예컨대 적어도 종양을 통상의 방법으로 더 이상 검출할 수 없을 때까지가 될 것이다. 예컨대 치료하는 의사가 검출되지 않는 종양이 존재할 수 있다는 의심이 들 때, 검출가능한 종양의 존재를 넘어 일정 기간 동안 치료를 지속하는 것이 바람직할 수 있다는 것 또한 고려한다. RSV 또는 핵산은 동일 개체의 하나 이상의 종양에 투여할 수도 있다.

[0032] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0033] 암 세포주에서 RSV 감염에 의한 세포 성장의 저해

[0034] HCC 세포주의 성장에 대한 RSV 감염의 효과를 평가하기 위하여, 세포들을 RSV A2로 감염시키고 세포 성장을 MTT 어세이로 분석하였다. BNL-HCC, Hep3B, Huh-7 및 SNU-739 세포의 성장은 RSV 감염의 시간에 따라 현저하게 감소하였다(도 1A, B, C 및 D). 특히, 세포 생존률은 감염 5일 후 현저하게 감소하였다. 그러나, CT-26 및 LoVo와 같은 대장암 세포주의 생존률은 RSV에 의하여 큰 영향이 없었다(도 1E 및 F). 이 결과는 BNL-HCC, Hep3B, Huh-7 및 SNU-739 세포의 성장은 RSV 감염에 의하여 영향을 받는다는 것을 나타낸다.

[0035] RSV 감염에 의한 세포 형태 변화 및 용균반(Plaque) 형성

[0036] HCC 세포주가 RSV에 감염되는지가 명확하지 않으므로 본 발명자들은 HCC 세포의 RSV 감염에 대한 감수성(susceptibility)을 용균반 어세이를 사용하여 테스트하였다. 세포병원성(cytopathogenic) 효과 및 용균반 형성은 감염 5일 후 Hep3B 및 Huh-7에서 검출되었다(도 2A). 세포들은 RSV 감염 후 자이언트 세포라는 신시티움(syncytium)을 형성한다. 따라서 RSV-감염된 암 세포들을 Giemsa 용액으로 염색하여 신시티움 형성을 관찰하였다. Hep3B 및 Huh-7 세포들은 RSV 감염 후 신시티움 형성을 나타내었다(도 2B).

[0037] 세포에서 RSV 단백질들의 발현을 조사하기 위하여, HCC 세포를 감염 3일 후 anti-RSV 항체로 처리하였다. Figure 3에 나타난 것과 같이, Hep3B 및 Huh-7 세포주는 세포 표면 및 원형질에서 RSV 단백질 발현을 나타내었다. 이 결과들은 Hep3B 및 Huh-7에서 생존률 감소는 RSV 감염과 복제에 의한 것이라는 것을 시사한다.

[0038] 감염에 의한 세포 이동의 저해

[0039] 암 세포 이동에 대한 RSV 감염의 효과를 조사하기 위하여, 이동(migration) 어세이를 트랜스-웰 챔버로 수행하였다. RSV-감염된 세포들을 트랜스-웰 챔버의 상부에 로딩하였다. 도 4A에 나타난 것과 같이, HCC 세포주는 RSV 감염에 의하여 이동이 저해되었다.

[0040] RSV 감염에 의한 Huh-7 세포에서 에팍토시스

[0041] RSV 감염에 의하여 Huh-7 세포에서 에팍토시스가 유도되는지를 조사하기 위하여, TUNEL 어세이를 수행하였다. 도 4B에 나타난 것과 같이, Huh-7 세포는 RSV 감염 후 에팍토시스를 나타내었지만, RSV 감염 후 BNL-HCC, Hep3B 및 SNU-739 세포에서는 에팍토시스가 없었다.

발명의 효과

[0042] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명자들은 RSV가 HCC에서 종양세포파괴 바이로테라피(oncolytic virotherapy)에 사용될 수 있는 후보물질이라는 것을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 암세포주들의 성장에 대한 RSV 감염의 효과를 나타낸 그림. HCC 세포주 (A-D) 및 대장암 세포주(E-H)를 24시간 배양하고 RSV (0.1 MOI)를 3일 또는 5일 동안 감염하였다. 세포 성장을 MTT 어세이로 측정하였다. 각 바는 세 실험의 평균±SD로 나타내었다.

도 2는 암 세포주들에서 RSV 감염의 동정 및 신시티움 형성 그림(A 및 B) RSV 감염에 의한 용균반 형성. HCC 세포주(A) 및 대장암 세포주(E)를 12-웰 플레이트에서 12시간 동안 배양한 후 2시간 동안 RSV로 감염시켰다. 세포 배양 플레이트를 0.3% 면역화산 급 아가로 코팅한 후 용균반 형성 때까지 배양하였다. 5~7일 후, 그 플레이트를 아가를 제거한 후 crystal violet 용액으로 염색하였다. (C) RSV 감염에 의하여 신시티움 형성이 유도된다는 그림. HCC 세포주(BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7 및 SNU-739 세포)를 12-웰 플레이트의 커버슬립 상에서 12시간 동안 배양하였다. 세포를 RSV로 감염시켰다. 5~7 일 후, 그 세포를 고정하고 Giemsa 염색 용액으로 염색하였다.

도 3은 암 세포주에서 RSV 성장의 동정을 나타낸 그림. HCC 세포주(BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7 및 SNU-739)를 12-웰 플레이트 커버슬립에서 12시간 배양하고 그세포를 RSV로 감염시켜 72시간 배양하였다. 세포주에서 RSV의 성장을 공초점 현미경으로 anti-RSV 항체 및 anti-goat Alexa Flour 488로 측정하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색하였다. 스케일 바; 10 μ m.

도 4는 세포 이동 및 에팍토시스에서 RSV 감염의 효과를 나타낸 그림. (A) 세포 이동에 대한 RSV 감염의 효과. HCC 세포주(BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7 및 SNU-739)를 RSV로 감염하고 그 RSV-감염된 세포를 트랜스-웰 챔버의 위에 놓고 12시간 또는 36시간 배양 후, 막의 하단부에 그 이동된 세포를 계수하였다. 스케일 바, 50 μ m. (B) 에팍토시스에 대한 RSV 감염의 효과. BNL-HCC 및 SNU-739 세포를 12-웰 플레이트에서 감염시켜 96시간 배양한 후 그세포를 고정한 후 DeadEndTM Fluorometric TUNEL 시스템으로 염색하였다. 그 핵을 Hoechst 33258으로 염색하였다. 스케일 바; 10 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0045] 실시예 1: 세포 배양

[0046] 정상 BALB/c 배아 간세포주 BNL CL2로부터 유래한 murine HCC 세포주, BNL.1.7R.1 HCC (BNL-HCC)는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 인간 HCC 세포주, Hep3B, Huh-7, 및 SNU-739 세포, 대장암 세포주 CT-26 및 LoVo 세포는 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. HeLa 마커 염색체를 포함하는 HEp-2 세포는 ATCC로부터 구입하였다. BNL-HCC, HEp-2 및 CT-26 세포는 Dulbecco's modified Eagle 배지(DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 유지하였고, Hep3B는 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC)에서 유지하였으며, Huh-7, SNU-739 및 LoVo 세포는 RPMI1640 (Life technologies) 배지에서 유지하였다. 모든 배지들은 10% 우태아 혈청(FBS, Life Technologies), 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin 및 100 mg/ml streptomycin을 포함하였다. 모든 세포주는 All cell lines were plated in 150 mm dish에 플레이트링하고 37 $^{\circ}$ C, 95% air 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0047] 실시예 2: 바이러스

[0048] RSV A2 균주를 프로토콜에 따라 HEp-2 세포에서 증식하였다. 요약하면, HEp-2 세포를 8 개의 150 mm 디쉬 상에서 5 x 10⁶ 세포/dish로 성장시킨 후, 그 배양 디쉬를 혈청 없는 Minimum Essential Media (MEM, Life

Technologies)로 씻고, 9 ml의 10mM HEPES, 100 U/ml penicillin 및 100 mg/ml streptomycin를 포함하는 혈청 없는 MEM를 각 디쉬에 첨가하였다. 그 세포를 RSV A2 균주로 MOI 0.01로 접종하고, 2시간 동안 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 매 15-20분 마다 록킹하면서 배양한 후, 21 ml의 6% FBS, 10mM HEPES, 100 U/ml penicillin 및 100 mg/ml streptomycin를 포함하는 MEM를 첨가하였다. 그 세포를 60% 세포병변(cytopathic) 효과가 관찰될 때까지 배양하였다. 그 증식된 RSV A2 바이러스를 모아서 그 상등액을 4°C에서 1시간 동안 35,000 RPM 조건에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 그 RSV A2 바이러스를 상등액을 제거하여 수집하고 펠렛을 혈청 없는 MEM으로 재가용화하였다. 그 모아진 바이러스를 용균반 어세이에 의한 감염성을 위하여 적정하였다.

[0049] 실시예 3:MTT 어세이

[0050] HCC 및 대장암 세포의 성장에 대한 RSV 효과를 측정하기 위하여, MTT 어세이를 3-(4,5 dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA) 용액으로 Kim HR, Heo YM, Jeong KI et al (2012) BMB Rep **45**,287-292에 기재된 것과 같이 수행하였다. 그 세포를 48-웰 플레이트에 1 x 10⁴ 세포/well (BNL-HCC, Hep3B) 또는 5 x 10³ 세포/well (Huh-7, SNU-739) 밀도로 시딩하여 24시간 배양 후, 그 세포를 RSV로 0.1 MOI로 감염하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 3일 및 5일 배양한 후 그 상등액을 제거하고 100 µl의 MTT 용액(오토크라이브된 증류수 내 2 mg/ml MTT)을 각 웰에 첨가하였다. 그 플레이트를 4시간 동안 37°C에서 배양한 후, 그 배양 배지를 제거한 후, 100 µl의 DMSO를 formazan 결정의 용해를 위하여 첨가하였다. 그 발색을 595 nm에서 Spectra Max 250 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였다.

[0051] 실시예 4: 암 세포주에서 용균반 어세이

[0052] 세포를 12-웰 플레이트에서 1 x 10⁶ 세포/well (BNL-HCC, Hep3B) 또는 5 x 10⁵ 세포/well (Huh-7, SNU-739) 밀도로 12 시간 동안 성장시킨 후 그 세포를 RSV (0.1 MOI)로 감염시키고, 매 15-20 분 마다 록킹하면서 2시간 동안 배양하였다. 그 배지를 제거하고 2 ml의 0.3% 면역화산 그레이트 아가 및 2 mM L-glutamine, 4% BSA, 10 mM HEPES, 2.4% sodium bicarbonate, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin를 포함하는 F12/DMEM를 첨가하였다. 그 후 그 플레이트를 용균반이 형성될 때까지 배양하였다. 5-7 일 후, 그 플레이트를 PBS내 0.5% paraformaldehyde으로 고정하고, 상온에서 12-24 시간 동안 배양하였다. 그 아가를 수돗물을 사용하여 제거하고, 각 웰을 1 ml의 crystal violet 용액으로 염색하였다. 6 시간 후, 그 염색 용액을 수돗물을 흘려서 제거하였다. 그 용균반 형성을 Nikon 카메라(Nikon, Japan)로 확인하였다.

[0053] 실시예 5:Giemsa 염색

[0054] BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7, 및 SNU-739 세포를 12-웰 플레이트 내 커버 슬립 상에서 1 x 10⁴ 세포/well (BNL-HCC 및 Hep3B) 또는 5 x 10³ 세포/well (Huh-7 및 SNU-739) 밀도로 12시간 동안 배양하였다. 그 세포를 RSV로 0.1 MOI로 접종하고 세포병변 효과가 관찰될 때까지 배양하였다. 그 플레이트들을 PBS로 씻고, 100% MeOH로 25°C에서 5분간 고정한 후, PBS로 세척한 후, 4시간 동안 건조하였다. 그 세포를 1 ml의 Giemsa 염색 용액(Sigma-Aldrich)으로 25°C에서 2시간 동안 염색하고 마운팅(mounting) 용액 fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA)으로 슬라이드 글래스 상에서 마운팅하였다. 그 세포를 현미경(E-200, Nikon, Tokyo, Japan)으로 스캐닝하였다.

[0055] 실시예 6: 면역형광 염색 및 공초점 현미경법

[0056] BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7 및 SNU-739 세포를 12시간 동안 12-웰 플레이트의 커버슬립 상에서 2 x 10⁴ 세포/well (BNL-HCC 및 Hep3B) 또는 1 x 10⁴ 세포/well (Huh-7 및 SNU-739) 밀도로 배양하였다. 그 세포를 RSV로 0.1의 MOI로 접종하고 72 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 그 상등액을 제거하고 그 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고, 투과하고 3% BSA 및 0.1% Triton-X 100 (PBS-BT)를 포함한 PBS로 블럭킹하였다. 그 샘플들을 goat anti-RSV 항체(Gene Way Biotech, San Diego, CA, USA)로 PBS-BT (10 ug/각 샘플)에서 2시간 동안 염색하였다. 그 후 그 샘플들을 anti-goat Alexa Flour 488 (Life Technologies)으로 1 시간 동안 1:500으로 처리하였다. 핵을 Hoechst 33258 (Life Technologies, 1:2000)으로 5분간 염색하였다. 그 샘플들을 PBS-BT로 3회 세척 후 마운팅 용액 fluoromount-G (Southern Biotech)으로 슬라이드 글래스 상에

서 마운팅하였다. 형광을 대한민국 춘천 한림대에 구비된 LSM 710 레이저 스캔(Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 스캐닝하였다.

[0057] 실시예 7: 이동 어세이

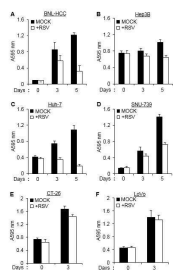
[0058] 이동 어세이를 8 μ m porosity를 가지는 트랜스-웰 챔버로 수행하였다. 트랜스 웰 챔버 막의 하단 부를 gelatin 으로 코팅하였다(10 mg/well). BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7 및 SNU-739 세포를 150 mm 디쉬에서 1×10^5 세포/ml (BNL-HCC 및 Hep3B) 또는 5×10^4 세포/ml (Huh-7 및 SNU-739) 밀도로 배양하였다. 그 세포를 RSV로 0.1의 MOI로 감염시켜 2시간, 72시간 및 120 시간 배양하였다. RSV-감염된 세포를 트랜스 웰 챔버의 상단에 위치시켰다. 10% FBS를 함유한 DMEM (BNL-HCC), EMEM (Hep3B), 및 RPMI (Huh-7 및 SNU-739) 배지를 챔버 하단에 위치시킨다. 12 시간(BNL-HCC, Huh-7 및 SNU-739) 또는 36 시간(Hep3B) 배양 후, 필터의 하단 표면으로 이동한 세포를 고정하고, crystal violet으로 염색하고, 현미경(E-200, Nikon) 하에서 계수하였다.

[0059] 실시예 8: TUNEL 어세이

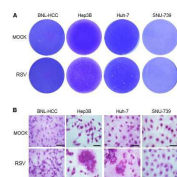
[0060] TdT(Terminal deoxynucleotidyl transferase)-매개된 dUTP Nick(end)-엔드(end) 표지(TUNEL) 어세이를 제조업자의 지시에 따라 수행하였다(Kim DS, Sohn EJ, Kim DW et al (2012) BMB Rep **45**, 532-537). BNL-HCC, Hep3B 세포, Huh-7 및 SNU-739 세포를 12-웰 플레이트 커버 슬립 상에서 1×10^4 세포/ml (BNL-HCC 및 Hep3B) 또는 5×10^3 세포/ml (Huh-7 및 SNU-739) 밀도로 12시간 동안 배양하였다. 그 세포를 RSV으로 0.1의 MOI로 감염시키고, 96 시간 동안 배양하였다. 그 세포를 4% paraformaldehyde으로 고정하고 PBS-T로 투과시켰다. DeadEndTM Fluorometric TUNEL 시스템(Promega, Madison, WI, USA)을 TdT으로 Nick-엔드 표지에 사용하였다. 핵을 Hoechst 33258 (Life technologies, 1:2000)로 10 분 동안 염색하였다. 샘플들을 PBST 및 PBS로 세척한 후, 마운팅 용액 Fluoromount-G (Southern Biotech)으로 슬라이드 글래스 상에 마운팅하였다. 형광을 LSM 710 (Carl Zeiss)으로 스캔하였다. DNase I 처리를 TUNEL-포지티브 세포의 대조군으로 사용하였다.

도면

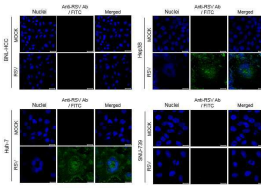
도면1



도면2



도면3



도면4

