(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0025501
(43) 공개일자 2011년03월10일

(51) Int. Cl.
A61K 38/13 (2006.01) *A61K 31/5025* (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0083601
(22) 출원일자 2009년09월04일
심사청구일자 2009년09월04일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
김성수
서울시 송파구 잠실동 44 레이크 팰리스 102동 301호
(74) 대리인
손민

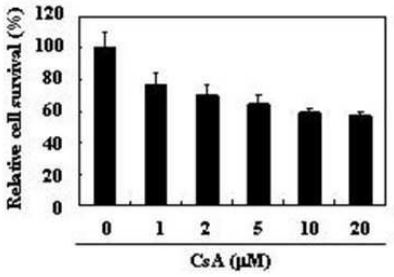
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 포함하는 고형암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 사이클로스포린 A(cylcosporin A) 또는 상글리페린 A(sanglifehrin A), 및 시스플라틴(cisplatin)을 포함하는 고형암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 조성물을 사용하여 신경교종을 포함하는 뇌종양을 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R13-2002-020-02001-0
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관
연구사업명 기초의과학연구센터(MRC)
연구과제명 Cyclophilin A의 기능조절을 통한 항산화 치료제 개발
기여율
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2007년09월01일~2011년08월31일

특허청구의 범위

청구항 1

사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA) 또는 상글리페린 A(sanglifehrin A, SFA), 및 시스플라틴(cisplatin)을 포함하는 고형암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 사이클로필린 A(Cyclophilin A, CypA)의 PPIase(peptidyl-prolyl cis-transisomerase) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 신경교종의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암세포의 ROS(reactive oxygen species) 생성 증가 및 글루타치온(Glutathione)의 농도 감소를 유도함으로써 신경교종 세포의 아폽토시스(apoptopsis)를 일으키는 것을 특징으로 하는 신경교종의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 고형암은 신경교종, 방광, 신장 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 신경교종은 성상세포종, 핍지교세포종 및 상의세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 경구, 정맥내, 피하, 피내, 비강내, 근육내 또는 경피로 투여되는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 시스플라틴 및 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 사이클로스포린 A(cylcosporin A) 또는 상글리페린 A(sanglifehrin A), 및 시스플라틴(cisplatin)을 포함하는 고형암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 조성물을 사용하여 신경교종을 포함하는 뇌종양을 예방 또는 치료할 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 신경교종은 성인 뇌종양의 가장 일반적인 유형으로 모든 뇌종양의 25%의 비율을 차지한다. 암 치료의 상당한 진보에도 불구하고 신경교종에 대한 치료기술은 아직까지 고식적이다. 지금까지 다형성아교모세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM)을 포함하는 신경교종을 가진 환자의 평균 생존기간은 1년 미만이다. 그러므로 보다 효율적이고 개선된 조직적인 치료 전략이 필요하다.

[0003] 사이클로필린(Cyclophilin)은 네 가지 아형(사이클로필린 A, B, C 및 D)으로 구성되어 있으며, 그 중 사이클로필린 A(Cyclophilin A, CypA)는 일반적으로 정상세포에서 발현되는 단백질이다. 이는 생체 안에서 단백질 접힘을 위한 효소적 펩티딜-프로일 시스-트랜스이소머라제(peptidyl-prolyl cis-transisomerase, PPIase) 활성을 갖는다. 비록 암세포 안에서 사이클로필린 A의 기능에 관해서 명확히 규명되지 않았으나, 일부 암세포에서 사이클로필린 A가 과발현된다는 사실이 최근 보고된 바 있다. 또한, 암세포 안에서 과발현된 사이클로필린 A의 항산화 효과로 인하여 최소한의 저산소상태(hypoxia)와 시스플라틴(cisplatin)의 처리로 인한 세포의 스트레스에 대항하여 세포를 보호한다고 알려져 있다. 이와 같은 사실은 사이클로필린 A가 고형암의 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다. 또한, 사이클로필린 A는 이뮤노필린(immunophilin)과 면역억제제인 사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA) 및 상글리페린 A(sanglifehrin A, SFA)의 세포질 수용체로 알려져 있다. 그러나, 뇌종양 특히, 치료가 어려운 악성 신경교종을 포함한 신경교종에서 과발현된다는 사실에 관하여는 보고된 바 없다.

[0004] 한편, 시스플라틴은 DNA를 손상시키는 약물로 사용되는 세포독성 항암제로서, 유방암, 방광암, 위암 및 자궁경부암 등과 같은 다양한 종류의 암을 치료하는데 사용되고 있다. 이러한 시스플라틴은 백금(platinum)을 함유한 중금속 화합물로서 백금 원자를 중심으로 2개의 염소 원자와 2개의 암모니아 분자가 시스(cis)-형으로 결합되어 있다. 시스플라틴은 DNA 가닥상의 인접한 2개의 구아닌과 결합하여 사슬 내 가교(interstrand crosslink)를 형성하여 DNA 합성을 억제함으로써, 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다.

[0005] 다만, 이처럼 항암세포에 독성을 제공하는 시스플라틴을 개체에 투여하는 경우, 내성이 유발되어 사용량에 제한이 따르는 등 치료제로서의 한계가 존재하여 왔다.

[0006] 이에 본 발명자는 시스플라틴과 병용투여함으로써, 내성을 최소화하거나 또는 내성을 완전히 억제하는 한편 항암효과를 높일 수 있는 물질에 대해 연구하던 중 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A가 사이클로필린 A의 PPIase의 활성을 억제시키는 것을 확인하고, 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A를 시스플라틴과 병용하여 뇌종양 세포에 투여한 결과, 암세포의 아폽토시스를 유도하여 시스플라틴의 항암활성 상승시킨다는 사실을 확인하여 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 포함하는 고형암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 하나의 양태로서, 본 발명은 고형암의 예방 또는 치료를 위한 조성물에 관한 것으로서, 바람직하게는 사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA) 또는 상글리페린 A(sanglifehrin A, SFA), 및 시스플라틴(cisplatin)을 포함하는 고형암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0009] 본 발명에서의 용어 "사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA)"란, 진균으로부터 분리한 지용성 고리형 펩타이드로서, 70년대 면역 억제제로 개발되었으며, 주로 장기이식 후에 따르는 조직이식 거부반응을 억제하여 장기이식의 성공과 환자의 생존율을 유의하게 향상시키는 약물이다. 현재 기존에 발견된 약 30종의 고리형 포자균 중 오직 사이클로스포린 A만이 강한 면역 억제 활성을 가진다고 보고되었으며, 일부 동족체는 면역 억제 활성이 매우

약하거나 전혀 억제 활성이 없다고 알려져 있다.

[0010] 본 발명에서의 용어 "상글리페린 A(sanglifehrin A, SFA)"란, 처음에 방선균류의 발효 육즙으로부터 단리된 폴리사이클릭 마크로라이드 화합물의 부류로서, 사이클로필린(Cyclophilin)과 결합하는 활성을 가지며, 상글리페린 A 내지 D의 경우에는 면역억제활성 및 B-세포와 T-세포 증식의 억제활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0011] 본 발명은 상기 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A를 시스플라틴과 병용투여함으로써 고형암, 바람직하게는 신경교종을 포함하는 뇌종양 세포에 아폽토시스를 유발 유도할 수 있는 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명에서 상기 조성물은 사이클로스포린 A 및 시스플라틴, 상글리페린 A 및 시스플라틴, 또는 사이클로스포린 A, 상글리페린 A 및 시스플라틴의 형태로 시스플라틴과 하나 또는 두 가지의 조성물을 암세포에 병용투여하여, 바람직하게는 뇌종양, 더욱 바람직하게는 신경교종의 아폽토시스를 유발하여 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0012] 본 발명에서의 용어 "시스플라틴(cisplatin)"이란, 백금을 함유하는 세포독성 항암제로서, 빈블라스틴과 함께 사용하기도 한다. 독소루비신과 함께 사용하면 난소암에 효과가 있으며, 방광, 머리, 목의 종양에도 효과가 있다고 알려져 있다. 이러한 시스플라틴은 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중나선 구조에 부착되어 DNA 복제를 저해하여 암세포 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하여 항암효과를 나타낸다고 보고되어 있다. 그러나 시스플라틴은 간 또는 신장 독성, 항암제 내성 등과 같은 부작용 등이 문제점이 존재하여 사용량 및 사용시기 등에 제한이 따른다.

[0013] 따라서, 시스플라틴의 한계점을 해결하기 위한 다양한 제제들과의 병용 투여에 관한 연구가 지속되어 왔으며, 빈블라스틴과의 병용투여와 같이 일부 병용제제에 관해 알려진 바 있으나, 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴과의 병용투여에 대해서는 알려진 바 없으며, 본 발명의 병용제제를 포함하는 조성물의 뇌종양, 특히 악성 신경교종에의 효과에 대해서는 알려진 바 없다. 본 발명의 조성물을 사용하는 경우, 사이클로필린 A의 PPIase(peptidyl-prolyl cis-transisomerase) 활성을 저해함으로써, 뇌종양, 바람직하게는 신경교종 세포의 성장 억제 및 아폽토시스(apoptosis) 효과를 나타냄을 최초로 규명하였다.

[0014] 본 발명자들은 본 발명의 조성물인 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 포함하는 조성물에 대한 고형암, 바람직하게는 신경교종의 예방 또는 치료 효과를 확인하기 위해 실험한 결과, 시스플라틴과 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A를 병용 처리하는 경우, 사이클로스포린 A, 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 C6 신경교종세포에 각각 단독으로 처리하였을 때보다 C6 신경교종세포의 세포사멸 효과가 유의적으로 높아짐을 확인하였다(도 2a).

[0015] 바람직한 일 양태로서, 본 발명은 사이클로필린 A(Cyclophilin A, CypA)의 PPIase(peptidyl-prolyl cis-transisomerase) 활성을 억제함으로써, 고형암 특히 신경교종의 예방 또는 치료 효과가 있는 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에서의 용어, "사이클로필린 A(Cyclophilin A, CypA)"란, 포유류 세포 내에서 매우 잘 보존된 단백질로서, 원래 면역억제제인 사이클로스포린 A라는 약물과 결합하여 면역억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 전통적으로, 사이클로필린류는 네 가지의 이형으로 구성되어 있다(사이클로필린 A, B, C 및 D). 인간 서열 상동성 분석은 인간 사이클로필린 A가 인간 사이클로필린 B(Cyp B), C(Cyp C) 및 D(Cyp D)와 매우 상동적임을 나타낸다. 사이클로필린 C 및 D가 소포체에게로 표적화하는 N-말단의 서열을 가지고 있는데 반해, 18kDa의 분자량을 가지는 사이클로필린 A는 세포질에 현저하게 집중되어 있다(Harding MW, Handschumacher RE, Speicher DW., J Biol Chem 1986;261:8547-55.). 그것은 면역억제제인 사이클로스포린 A에 대한 이뮤노필린 및 세포질의 수용체(cytosolic receptor)로서 알려져 있다(Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW., Science 1984;226:544-7). 또한, 사이클로필린 A는 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase) 효소 활성을 가지고 있어, in vivo에서 단백질의 폴딩(folding)에 필수

적이다. 게다가 사이클로필린의 PPIase 활성은 최근 세포내 단백질 트래피킹(trafficking)(Andreeva L, Heads R, Green CJ., Int J Exp Pathol 1999;80:305-15. 및 Caroni P, Rothenfluh A, McGlynn E, Schneider C., J Biol Chem 1991;266:10739-42), 미토콘드리아의 기능(Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM., Mol Cell Biochem 1997;174:167-72. 및 Connern CP, Halestrap AP., Biochem J 1994;302:321-4), 전구-mRNA(pre-mRNA) 프로세싱(Bourquin JP, Stagljar I, Meier P, et al., Nucleic Acids Res 1997;25:2055-61), 및 다중 단백질 집합체(multiprotein complex)의 안정성 유지(Andreeva L, Heads R, Green CJ. Cyclophilins and their possible role in the stress response. Int J Exp Pathol 1999;80:305-15)를 포함하는 다양한 세포 프로세스(cellular process)들에 관여하는 것으로 나타났다. 사이클로필린 A가 밝혀진 이후로 많은 다른 사이클로필린이 동정되었고 이들 모두는 PPIase 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 27종 이상의 사이클로필린의 서열이 알려져 있다.

[0017] 한편, 사이클로필린 A에 관하여 최근 이 단백질이 일부 암 조직에서 정상 조직에서 보다 과발현된다는 사실이 보고되었으나, 뇌종양, 바람직하게는 신경교종에서의 과발현에 대해서는 본 발명자들이 최초로 밝혔다. 뿐만 아니라, 이러한 사이클로필린 A와 관련하여 아폽토시스에서의 사이클로필린 A의 역할에 관하여 확실히 밝혀지지 않았으며, 산화적 스트레스에 의해 유도된 아폽토시스로부터 심근세포를 보호할 수 있다는 것을 나타내는 몇몇 보고가 존재하나, 뇌종양, 바람직하게는 신경교종의 예방 또는 치료에 있어서 사이클로필린 A가 시스플라틴의 내성 억제에 중요한 역할을 한다는 것에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[0018] 본 발명에서 사이클로필린 A의 PPIase 활성을 억제함을 확인하기 위해 사용된 siRNA는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법으로서 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있으며, 사이클로필린 A의 PPIase 활성 억제를 위한 siRNA에 대해서는 본 발명자들의 이전 대한민국 등록특허(제10-0880850호)에 자세히 기술되어 있다.

[0019] 구체적인 일 실시예로서, 본 발명자는 다음과 같은 사이클로필린 A의 siRNA를 제조하였다 :

[0020] CypA-siRNA(서열번호 1 : 센스, 5'-UGACUUCACACGCCAUAAUdTdT-3';

[0021] 서열번호 2 : 안티센스, 5'-AUUAUGGCGUGUGAAGUCAdTdT-3')

[0022] 본 발명자들은 본 발명의 조성물에 대한 고형암, 바람직하게는 뇌종양의 일종인 신경교종의 예방 또는 치료에 있어서 시스플라틴의 내성을 감소시키는 효과가 사이클로필린 A의 PPIase 활성 억제로 인한 것임을 확인하기 위하여 PPIase 분석법을 수행한 결과, 사이클로스포린 A, 상글리페린 A, 및 칼시뉴린 경로와 무관하게 작용함으로써 사이클로필린 A의 PPIase 활성을 억제하는 사이클로스포린 A의 유사물, NIM811 모두가 매우 낮은 농도에서 사이클로필린 A의 PPIase 활성을 억제하였음을 확인하였다(도 5). 또한, 사이클로필린 A siRNA(CypA siRNA)를 사용하여 사이클로필린 A 발현을 억제한 결과, 특이적인 siRNA 간섭에 의해 사이클로필린 A의 발현이 약 90% 억제되는 경우(도 5a), 암세포의 사멸이 증가됨을 확인하였다. 이는 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A를 시스플라틴과 병용처리하는 경우와 거의 유사한 효과였다(도 5b). 상기 결과로부터 본 발명의 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 포함하는 조성물이 시스플라틴의 내성을 감소시킴으로서, 항암활성을 증대시켜 뇌종양, 바람직하게는 신경교종의 아폽토시스를 유발함을 알 수 있다.

[0023] 바람직한 일 양태로서, 본 발명은 암세포의 ROS(reactive oxygen species) 생성 증가 및 글루타치온(Glutathione)의 농도 감소를 유도함으로써 신경교종 세포의 아폽토시스(apoptosis)를 일으키는 조성물에 관한 것이다.

[0024] 일반적으로 세포의 사멸은 크게 세포괴사(necrosis)와 아폽토시스(apoptosis)로 구분된다. 아폽토시스(apoptosis)는 주위의 환경이 악화되었을 때 세포가 적응을 하지 못하고 파괴되는 병적인 상태를 말하는 세포괴사와 구분되는 용어로써, 세포가 능동적으로 죽는 것을 의미한다. 이러한 아폽토시스는 병태 생리학적으로 불필요하거나 손상받은 세포를 제거하기 위한 생체의 정상적이고 능동적 세포 사멸 과정으로, 유전적으로 프로그램된 세포 수축, 염색질 응축, 핵 단편화(fragmentation) 및 막의 수포성 구조형성(blebbing)과 같은 현상이 일어난다. 이러한 세포사멸은 특히 항상성을 유지하거나 이상을 초래하여 생체에 해롭게 된 세포, 즉 암세포, 바이러스 감염된 세포 등의 제거에 중요하다. 따라서, 세포사멸 조절의 실패와 각종 질환의 발생은 높은 상관 관계를 가지며, 특히 세포의 비정상적인 증식을 보이는 암과 같은 증식성 질환의 치료에 있어서, 아폽토시스의 유도

는 매우 중요하다. 또한, 그에 따라 거의 모든 항암제는 내인적 세포사멸 경로(intrinsic apoptosis pathway)를 개시함으로써 세포사멸을 유도하는 것이므로, 암세포에서의 아폽토시스를 조절하고 그 분자기작을 이용한다면 향후 효과적으로 암세포를 치유할 가능성도 매우 높아지게 된다. 따라서, 본 발명은 고형암세포, 바람직하게는 신경교종을 대상으로 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A를 시스플라틴과의 병용처리로 인한 아폽토시스를 유도함으로써, 암의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명에서의 용어, "글루타치온(Glutachione)"이란, 시스테인, 글루탐산(glutamic acid), 글라이신 세 개의 아미노산으로 구성된 단백질로서, 자연계에 널리 분포하여 동물, 효소 등 거의 모든 생체 내의 산화환원반응 및 신체의 필수건강 AID 항산화제, 면역증강, 및 해독제 역할을 한다. 본 발명의 조성물을 사용하는 경우, 체내 글루타치온 농도를 감소시킬 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 사이클로스포린 A, 또는 상글리페린 A 또는 시스플라틴을 단독 투여하는 경우보다 병용 투여하는 경우 글루타치온의 농도를 효과적으로 감소시킴을 확ㅇ니하였다(도 3b).

[0026] 한편, 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 산화력이 강한 산소종으로서, 과잉 생산되면 생체에서 독성 즉, 산화적 손상(oxidative stress)을 가져온다 하여, 이를 유해산소라고 부르기도 한다. 이들은 세포 내의 거대한 분자(단백질, 지질 등)를 산화시킴으로써 세포의 항상성을 파괴하고, 세포를 사멸시키는 등의 작용으로 세포조직 내에 치명적인 손상을 유발하기도 한다.

[0027] 본 발명의 조성물을 사용하는 경우, 사이클로스포린 A 또는 상글리페린, 및 시스플라틴을 단독처리하는 경우에 비하여 세포 내 활성 산소종(ROS)의 증가시켰음을 확인하였다.

[0028] 본 발명의 조성물은 고형암, 바람직하게는 뇌종양의 예방 또는 치료를 위한 조성물에 관한 것이며, 더욱 바람직하게는 신경교종의 예방 또는 치료에 효과적이다.

[0029] 고형암(Solid cancer)이란, 유방 또는 전립선 등의 고형 장기(solid organ)에서 비정상적으로 세포가 성장하는 것으로, 액체인 혈액에 영향을 끼치는 백혈병(leukemia)과 구분된다. 본 발명의 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 다음과 같은 여러 고형암 치료시에 시스플라틴의 내성을 억제하는데 유용하다: 방광, 뇌, 식도, 쓸개, 갑상선 및 피부(편평상피세포 암종 포함)와 같은 암종; 성상세포종, 신경모세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함한 중추 및 말초 신경계의 종양; 및 흑색종, 정상피종, 기형종, 골육종, 색소건피증, 각화극세포증, 갑상선 여포상암 및 카포시 육종을 포함한 기타 종양, 바람직하게는 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 경추암, 신경아세포종, 골육종, 자궁경부암, 전립선암 또는 직장암, 보다 바람직하게는 자궁경부, 전립선암 또는 직장암 치료시의 시스플라틴의 내성을 억제하는데 효과적이다.

[0030] 또한, 뇌종양(brain tumor)이란, 두개골 내에 생기는 모든 종양을 의미하고, 뇌 및 뇌 주변 구조물에서 발생하는 모든 종양을 포함하며, 크게 뇌에 발생하는 원발성 뇌종양과 다른 장기에 생긴 암이 옮겨와서 생긴 전이성 뇌종양으로 구분된다.본 발명에 의해 예방 또는 치료 가능한 뇌종양으로는, 뇌종양의 악성도에 따른 분류로 신경교종 또는 뇌전이암과 같은 악성 뇌종양 및 뇌수막종, 청신경초종, 뇌하수체 종양 또는 양성 신경교종과 같은 양성 뇌종양을 들 수 있다.

[0031] 한편, 본 발명에서 용어, "신경교종(glioma)"이란, 원발성 뇌종양의 일종으로, 약 35%를 차지하고 있으며, 신경원 신경교세포(성상세포, 핍지교세포 및 상의세포)에서 기원한다. 신경교종의 대부분이 악성종양이고, 양성인 분화형 신경교종도 시간이 경과하면 악성화되는 경향을 보인다.

[0032] 신경교종의 특징으로는 주위 정상 뇌조직으로 침습하여 파괴하는 침윤성 발육, 건강한 조직과의 경계가 불분명하여 외과적 수술로 제거하기가 힘들고, 정상 세포에 대한 독성때문에 제한적 방사선 요법이 필요하며, 임파계 부재 및 암세포의 짧은 생존기간으로 타 조직으로 전이가 힘들다는 점을 들 수 있다.

[0033] 상기 신경교종은 종양을 구성하는 주된 세포에 따라, 크게 성상세포종(Astrocytic Tumor), 핍지세포종(Oligodendroglial Tumor) 및 상의세포종(Ependymoma) 등으로 분류될 수 있으며, 성상세포종은 다시 악성도에 따라 양성인 1 등급에서 가장 악성인 4 등급으로 분류할 수 있다. 구체적으로, 세계보건기구는 성상세포종을 그 기원, 병리적 현상에 따라 뇌종양을 분류하여 천천히 자라는 저등급 신경교종(Low grade glioma)은 등급(grade) 1, 2로 분류하고 매우 빨리 자라는 고등급 신경교종(High grade(malignant) glioma)은 등급(grade) 3, 4로 분류한다. 40세에서 49세 사이의 뇌종양 환자 중 약 40%가 등급(grade) 3, 4 신경교종(glioma) 이며 60세 이상의 환자에서는 60% 정도가 등급(grade) 3, 4이다. 등급 3, 4 신경교종은 다형성아교모세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM)이라고 부른다. 특히, GBM은 다양한 유전적, 염색체 이상을 복합적으로 가지고 있어서 암조직

의 성장이 매우 빠르며 주변 뇌 조직을 침윤해서 파괴할 뿐만 아니라, 암 조직이 성장하고 진행되는데 필수적인 혈관신생이 매우 많이 일어나는 특징을 가지고 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 상기와 같은 고형암의 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있고, 바람직하게는 뇌종양에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타낸다. 더욱 바람직하게 본 발명의 조성물은 신경교종에 아폽토시스를 유도함으로써 신경교종을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0035] 한편, 본 발명에 따른 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 포함하는 고형암, 바람직하게는 뇌종양, 더욱 바람직하게는 신경교종의 예방 또는 치료용 조성물은 상기 조성물에 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 나아가 본 발명의 조성물에 고형암의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0036] 구체적으로 상기 약학적으로 허용 가능한 담체로는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 또한, 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있으며, 이들 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적 조성물의 제제, 이들 제제를 제조하는 방법의 실례는 공지된 방법에 의한다.

[0037] 한편, 본 발명의 조성물은 시스플라틴의 세포사멸 유도를 위해 담체, 투여 경로 및 투여량이 동일한 양상으로 적용될 수 있으며, 사이클로필린 A의 PPIase의 활성을 억제하는 물질과 시스플라틴의 조성 비율은 성별, 증상의 정도, 내성의 정도, 연령, 투여 방법 등의 다양한 인자를 고려하여 당업자가 적절하게 결정할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 사용할 수 있지만, 치료 효율을 증가시키기 위해 방사선 요법 또는 화학요법(세포 성장 정지 또는 세포 독성 물질, 항생 물질형 물질, 알킬화제, 항대사성 물질, 호르몬제, 면역제, 인터페론형 물질, 사이클로옥시게나제 억제제, 메탈로매트릭스프로테아제 억제제, 텔로머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 항성장인자 수용체 물질, 항-HER 물질, 항-EGFR 물질, 항-혈관생성 물질, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, ras-raf 시그날 전도 경로 억제제, 세포 주기 억제제, 기타 cdk 억제제, 튜불린 결합체, 토포이소머라제 Ⅰ억제제, 토포이소머라제 Ⅱ 억제제 등)과 같은 다른 항암 치료법과 병용하여 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있고, 경구 투여시에는 결합체, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 조성물은 약학적 유효량으로 당해 분야에서 공지된 투여 경로를 이용하여 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 이에 추가적으로 공지의 내성을 억제시키는 물질 등을 함께 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어, "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0042] 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는, 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화 할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제한다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 체료 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0043] 상기 조성물은 하나 이상의 항암제를 포함하는 항암조성물로 제공될 수 있다. 항암제란, 암세포를 죽이기 위해 사용되는 모든 약제를 총칭하며, 대부분의 약제는 암세포의 DNA의 복제, 전자, 번역 과정을 차단하게 된다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택시 고려하는 일반적인 원칙하에 선택될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)인 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 및 카보플라틴(carboplatin) 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 시스플라틴(cisplatin)이다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)인 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin) 및 C 블레오마이신(C Bleomycin) 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 식물 알카로이드(plant alkaloid)인 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리노테칸(irinotecan) 등을 들 수 있다. 그러나 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 실시예에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

효 과

[0045] 본 발명의 조성물을 사용하는 경우, 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 고형암, 나아가 신경교종을 포함하는 뇌종양의 예방 또는 치료에 있어서 화학약물 저항성을 경감시킴으로써, 내성을 최소화한 효과적인 치료제로 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0046] **실시예 1. 실험 재료**

[0047] DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum)및 DCF-DA(2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)는 Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY)에서 구매하였다. PI(Propidium iodide), 시스플라틴(cisplatin), MTT(3-(4,5-dimethylthiasol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), NAC(N-Acetyl-L-cycteine) 및 hoechst 33342은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였다. 상글리페린 A(sanglifehrin A, SFA)은 Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland)로부터 얻었으며, PARP(poly (ADP-ribose) polymerase-1), 사이토크롬-c(cytochrome-c) 및 액틴(actin)에 대한 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구매하였다. 또한, 카스파제-3(caspase-3)에 대한 항체는 Assay Designs (Ann Arbor, Michigan)로부터, 사이클로스포린 A(CsA)는 Millipore (Billerica, MA)로부터 구매하였으며, GenePOTER는 Genlantis (San Diego, CA)로부터 구매하였다.

[0048] **실시예 2. 세포 배양**

[0049] C6 래트 신경교종 세포는 열 비활성화된 10% (v/v) FBS, 100 units/㎖ 페니실린, 및 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지(직경 10 cm 디쉬)에서 키웠다. 현미경으로 세포사멸을 관찰하기 위해 세포를 1×10^4 세포/㎖의 밀도로 6-웰 배양 플레이트에 접종하였다.

[0050] **실시예 3. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석**

[0051] 세포 생존 능력을 12 웰 플레이트 내에서 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 전환 분석을 사용하여 평가하였다. 배양 배지를 0.5 mg/㎖ (Sigma-Aldrich)를 포함한 배지 1 ㎖로 교체하였고, 37 ℃에서 60분 동안 배양하였다.

[0052] MTT 기질 상에서의 미토콘드리아 효소 활성에 따른 푸른색의 테트라졸륨 결정을 150㎕ DMSO에 용해시켰다. 마이크로플레이트 리더(microplate reader)에서 광학밀도 값을 595nm로 측정하였다.

[0053] 세포의 생존을 미처리 세포의 흡광도와 비교하여 백분율로 나타냈다.

[0054] 이에 본 발명자들은 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A가 C6 신경교종 세포 내에서 시스플라틴에 의해 유도된 아폽토시스를 증가시킬 수 있는지 확인하기 위하여 MTT 분석(도 1)을 수행한 결과, 사이클로스포린 A, 상글리페린 A, 및 시스플라틴은 투여량 의존적으로 C6 신경교종 세포의 증식을 억제시킴을 확인하였다.

[0055] 한편, 아폽토시스 메카니즘에서 카스파제의 활성화로 인하여 카스파제-3 및 PARP를 포함하는 여러 세포 기질의 분할이 일어나는지 여부를 확인하기 위하여,사이클로스포린 A, 상글리페린 A, 및 시스플라틴 처리군에 대해 웨스턴 블롯팅 분석을 수행한 결과, 사이클로스포린 A 및 상글리페린 A를 단독으로 처리한 세포 내에서 시약처리 후 1시간 내에 사이클로스포린 A 및 상글리페린 A 농도가 상대적으로 높은 농도임에도 카스파제-3와 PARP 단백질의 분할 형태를 확인할 수 없었다(도 1d 및 1e). 그러나, 시스플라틴 처리 후 1시간 내 카스파제-3와 PARP 단백질의 분할 형태의 량이 투여량 의존적으로 증가되었음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 사실로부터 시스플라틴이 C6 신경교종 세포 안에서 직접적으로 아폽토시스를 유도한다는 것을 알 수 있다(도 1f).

[0056] **실시예 4. Hoechst Staining**

[0057] 세포들을 hoechst 33342 로딩 다이(loading dye)로 30분 동안 배양하였고, 4 % 포름알데하이드(formaldehyde)에 20분 동안 고정시켰다. 차가운 PBS로 세 번 세척한 후, 공초점 레이져 현미경(confocal laser microscope, META 510, Zeiss, Thornwood NY)을 사용하여 염색된 세포들을 관찰하였다. 핵 응축 및 분쇄에 따라 능동세포 사멸, 즉 아폽토시스된 세포를 확인하였다.

[0058] 병용처리군과 비교하기 위하여 5 μM 사이클로스포린 A (도 1a), 0.1 μM 상글리페린 A (도 1b), 및 10 μM 시스플라틴(도 1c) 단독처리 군에 의한 효과를 확인하였다.

[0059] 상기 단독처리 군에 대해 5 μM 사이클로스포린 A 또는 0.1 μM 상글리페린 A, 및 10 μM 시스플라틴을 C6 신경교종 세포에 병용처리 군의 효과는 도 2a와 같으며, 상승 효과적임을 확인하였다.

[0060] 또한, 산화적 스트레스가 시스플라틴의 아폽토시스를 유도할 수 있다는 점에 착안하여, 항산화제인 NAC의 효과 실험을 수행하였다. 그 결과, 5 mM NAC를 첨가하자 병용처리에 의해 유도된 암세포의 성장억제가 회복되었음을 확인할 수 있었다(도 2a). 아울러, 아폽토시스 변화에 대한 세포의 핵의 모양 변화 및 PARP와 카스파제-3 분할 여부 분석을 수행하였다. 그 결과, 5 μM 사이클로스포린 A 또는 0.1 μM 상글리페린 A, 및 10 μM 시스플라틴의 병용처리 군 세포들은 단독처리 군보다 많은 응축현상을 나타내었다(도 2b).

[0061] 한편, hoechst 33342으로 염색한 핵은 염색체 응축과 핵 분쇄를 포함하는 아폽토시스의 전형적인 모양을 나타내었다(도 2c). 병용처리 군은 이폽토시스가 유도되었음을 알 수 있었다. 이에 반해, 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A의 단독처리 군은 카스파제-3나 PARP의 분할을 일으키지 않았다. 그러나 병용처리 군은 NAC 전 처리에

의해 감소된 카스파제-3나 PARP의 분할을 유도하였다(도 2d). 상기와 같은 사실로부터 산화적 스트레스는 병용 처리에 의해 유도되는 아폽토시스를 위해 필요한 조건임을 알 수 있었다.

[0062] **실시예 5. 세포의 ROS 수준 분석**

[0063] 2'-7'-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(DCF-DA. Molecular Probe) 염색제를 사용하여 ROS(reactive oxygen species) 수준을 측정하였다. 세포들을 완전 배지(complete medium)에 80%의 컨플루언스가 될 때까지 배양하고, 시스플라틴을 처리하거나 처리하지 않았다. 그 후, 상기 세포들을 37 ℃에서 30분 동안 10uM DCF-DA로 로딩한 뒤, PBS 1㎖에 재분산시켰다. 유세포 분석기(flow cytometer)를 사용하여 형광을 측정하였다(FACSCalibur flow cytometer(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)). 평균 DCF 형광 강도는 488 nm에서의 여기(excitation) 및 525 nm에서의 방출(emission)로 측정하였다. 시스플라틴 미처리 세포들을 ROS 수준 분석의 기준값으로 사용하였다.

[0064] **실시예 6. 글루타치온 농도 측정(Glutathione Determination)**

[0065] 세포들을 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하였고, 세포 내 글루타치온(glutathione, GSH) 농도를 측정하기 위해 5% MPA로 처리하였다. 균질화 후 균질 현탁액을 냉각하여 30분 동안 배양하였고, 침전된 단백질들을 제거하기 위해 18,000g 에서 20분 동안 원심분리한 뒤, GSH를 HPLC로 측정하였다. GSH의 농도를 기준값과 비교하여 계산하였다.

[0066] 실시예 3 및 4를 통하여 본 발명자들은 형광 탐침 DCF-DA를 사용하여 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴의 병용처리가 ROS 생성에 어떤 연관이 있는지 실험하였다. 그 결과, 단독처리에 비하여 병용처리가 세포 내 ROS 농도를 증가시킨다는 사실이 명백히 드러났으며(도 3a), 상기 증가된 ROS가 NAC 5mM 전 처리에 의해 상반된 결과를 보였음을 확인하였다. 병용 처리군을 각각의 단독처리 군과 36 시간 동안 비교하여 본 결과, 세포 내 글루타치온 농도를 감소시켰음이 나타났다(도 3b). 이와 같은 사실로부터 산화적인 스트레스가 아폽토시스를 위해 필요 조건임을 재확인할 수 있었다.

[0067] **실시예 7. 면역화학(Immunohistochemistry)**

[0068] 형태학적으로 정상으로 보이는 뇌조직 및 GBH로 판단되는 뇌조직을 포르말린(Formalin)으로 고정시키고, 포매(paraffin-ebeded)된 상기 인간 조직을 중국의 Jilin University Institutional Review Board내 Jilin University의 First Hospital의 신경외과로부터 수득하였다. 전체 조직 절편(두께 5 μm)을 유리 슬라이드에 놓았다. 모든 절편의 파라핀은 자일렌(xylene)을 사용하여 파라핀이 제거하고, 연속적으로 에탄올을 처리하여 재수화시켰다. 열 항원 회복은 15분 동안 설정된 1,100-W를 유지시킨 전자레인지 내 pressure cooker (Nordic Ware, Minneapolis, MN)에 0.01 mol/L 구연산 나트륨(sodium citrate (pH 6.0))으로 절편을 처리하였다. 5분 동안 0.03% 과산화수소수를 사용하여 세포 내 퍼옥시다제(peroxidase)를 억제시키고, 비특이적 단백질 결합을 억제하기 위하여 30분 동안 5% 정상 염소 혈청으로 처리하였다. 토끼에서 추출한 사이클로필린 A 항체 또는 쥐에서 추출한 다클론성 신경교세포의 근섬유의 산성 단백질(GFAP) 항체(1:1000)를 상기 절편과 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 항체를 가시화하기 위해 비오틴이 결여된 면역조직화학 염색 탐지 기술을 사용하였다(EnVision+ System, HRP Rabbit kit, DAKO, Carpinteria, CA). 그 결과, 절편들은 퍼옥시다제가 표지된 중합체, 및부착된 항토끼 염소 이차항체 및 항생쥐 말 이차항체를 사용하여 상온에서 30분 동안 배양하였다. 절편들을 3,3-디아미노벤지다인(3,3-diaminobenzidine) 기질 액체로 시각화하였다. 최종적으로 같은 농도로 사용된 비면역 부적합 토끼 또는 쥐의IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)는 모든 시료들을 위한 음성 대조군으로 사용하였다. 정상 인간 간 조직의 절편은 사이클로필린 A의 발현에 대한 양성 조직 대조군으로 사용하였다. 토끼에서 추출한 비멘틴(vimentin) 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 양성 분석의 대조군으로 사용하였다.

[0069] **실시예 8. PPIase(Peptidyl Prolyl Cis-trans Isomerase) 분석**

[0070] PPIase(Peptidyl Prolyl Cis-trans Isomerase) 활성을 확인하기 위하여 공지의 방법인 키모트립신

(chymotrysin) 연결 분석법을 사용하였다. 펩타이드 기질인 N-숙시닐-Ala-Ala-Pro-Phe-p-나이트로아닐리드(N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide)를 사용하기 직전에 4 mM 로 희석하였으며, 100 mM 저장액을 제조하기 위하여 470 mM LiCl 및 TFE(trifluroethanol)에 용해시켰다. 2 uM 저장액을 수득하기 위하여 GST(glutathione-S-transferase)-CypA를 pH 8.0, 50 mM HEPES 및 86 mM NaCl, (PPIase 완충액)으로 희석하였다. 1 cm^3 cuvette 내 10 ㎕ 단백질(20 nM 최종 농도)을 860 ㎕ PPIase 완충액에 첨가하였다. 30 ㎕ (120 μM) 펩타이드 기질을 첨가하여 혼합함으로 인하여 반응을 개시하였고, Amersham Biosciences 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0071] 사이클로필린 A의 PPIase 활성 억제에 대한 사이클로스포린 A, 상글리페린 A의 효과를 확인하기 위하여 본 발명자들은 PPIase 활성 분석법을 수행하였으며, 구체적으로 사이클로필린의 PPIase 활성을 억제시키는 사이클로스포린 A 및 상글리페린 A를 칼시뉴린(calsineurin) 경로와 독립적으로 차단시키는 NIM811과 비교함으로써 분석하였다. 그 결과, 20 nM GST(glutathione-S-transferase)-CypA 결합 단백질은 100 nM 사이클로스포린 A, 100 pM 상글리페린 A 또는 100 nM NIM811의 첨가에 의해 강하게 저해됨으로서 기질의 이성질의 비율이 증가됨을 확인하였는데, 이는 사이클로스포린 A, 상글리페린 A 또는 NIM811가 매우 낮은 농도에서 사이클로필린 A의 PPIase 활성을 억제할 수 있다는 것을 암시하고 있다.

[0072] 본 발명자들은 구체적으로 사이클로스포린 A와 상글리페린 A가 사이클로필린 A의 PPIase 활성을 억제와 어떤 관련이 있는지 사이클로필린 A siRNA(CypA siRNA)를 사용하여 사이클로필린 A의 발현 저해 실험을 수행하였다. 사이클로필린 A의 발현은 특이적인 siRNA 간섭에 의해 약 90%가 억제되었다(도 5a). 사이클로필린 A siRNA와 NIM811은 MTT 분석법에서 거의 사이클로스포린 A와 상글로페린 A와 같은 유사한 결과를 보였다(도 5b). 이는 사이클로필린 A의 PPIase 활성 억제가 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A, 및 시스플라틴의 병용처리에 대한 효과로 암 치료에 대한 화학 요법적인 효과에서 매우 중요하다는 것을 시사한다. 사이클로필린 A siRNA 감염시 hoechst 염색으로부터 얻은 결과(도 5c)와 PARP 및 카스파제-3의 웨스턴 블롯 분석으로부터 얻은 결과(도 5d)로부터 시약의 병용처리 효과가 뛰어남을 알 수 있었다.

[0073] **실시예 9. 전체 세포 내(Cellular) 분획(Fraction)의 제조**

[0074] PBS로 세 번 세척한 다음, 완충액(pH 7.4 50 mM Tris-Hcl, 1% Nonidet P-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 200 mM PMSF, 200 mM NaF, 100 mM Na_3VO_4)에서 세포를 수득하였다. 15분 동안 14,000 g에서 원심분리함으로써 세포 단편을 제거하였다. 전체 세포 추출물을 면역블롯팅(immunoblotting)을 위해 사용되기 전까지 액체 질소에서 동결시켜 -80 ℃에 보관하였다.

[0075] **실시예 10. siRNA (Small Interfering RNA)**

[0076] 사이클로필린 A-siRNA(CypA-siRNA) 또는 대조군-siRNA(control-siRNA)에 특이적인 siRNA들을 Eurogene tech(Intron Biotechnology, Kyungki, korea)로부터 수득하였다. siRNA(0.5㎍)를 GenePoter 감염 시약(Genlantis, San diego, CA)을 사용하여 세포 내로 감염시켰다. siRNA 표적 서열들은 다음과 같다:

[0077] CypA-siRNA 센스, 5'-UGACUUCACACGCCAU AAUdTdT-3' ;

[0078] 안티센스, 5'-AUUAUGGCGUGUGAAGUCAdTdT-3', 대조군-siRNA (상업적으로 판매되는 음성 대조군). siRNA의 효율은 면역블럿으로 모니터하였다.

[0079] **실시예 11. 웨스턴 블롯 분석(Western Blotting Analysis)**

[0080] 세포 추출물을 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하고, 니트로셀룰로즈 막 상으로 이동시켰다. 단백질의 이동을 Ponceaus 적색 염색으로 확인하였다. 블로킹 후에 상기 막을 지정된(indicated) 일차 항체와 함께 배양하고, 이후 2차 항체로 배양하였다. 면역블럿 분석을 위하여 기준값으로 액틴 단백질을 면역블럿팅하였다.

[0081] GBM을 포함하는 인간 시료와 정상 시료에 있어서 사이클로필린 A의 발현을 비교하기 위하여 면역 조직 화학 염색을 수행하였다. 성상세포를 확인하기 위하여 조직들을 성상세포의 특이적인 표지인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)로 염색하였다. 정상 인간 뇌 조직의 성상세포들 내에서 사이클로필린 A를 면역 염색한 결과, 사이클로필린 A가 결핍되어 있음을 알 수 있었다. 이에 반해, GBM 시료에서는 사이클로필린 A의 강한 면역 반응이 관찰되었다(도 6a).

[0082] 본 발명자들은 웨스턴 블롯팅 분석을 통하여 보통 산소상태나 저산소상태(hypoxia) 하에서 C6 신경교종 세포 내 사이클로필린 A 단백질 발현 여부를 실험하였다. 보통 산소상태에 비해 저산소상태 하에서 12시간의 세포에서 사이클로필린 A 단백질이 명백하게 증가하였음을 확인하였다(도 6b). 또한, 본 발명자들은 저산소상태 48시간 동안 하에 있는 세포내 사이클로스포린 A 및 시스플라틴을 처리하는 경우 C6 신경교종 세포의 생존에 어떤 효과를 미치는지 실험하였다. 그 결과, C6 신경교종 세포의 생존 능력이 저산소상태에 노출된 후 48 시간 내에 감소되었음을 확인하였다. 10 μM 시스플라틴은 C6 신경교종 세포의 충분한 수를 억제하지는 못하였지만, 저산소상태에 놓이기 전의 세포에서는 5 μM 사이클로스포린 A의 처리로 암세포의 생존을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 저산소상태에 놓이기 전의 세포에서는 사이클로스포린 A 및 시스플라틴을 병용처리하는 경우, 저산소상태 하에 있는 C6 신경교종 세포 생존을 매우 높게 억제시켰다. 이와 대조적으로, 모든 처리는 48시간 동안 저산소상태 이후에서는 덜 효과적이었다(결과는 나타내지 않음). 이와 같은 사실로부터 저산소상태 동안 과발현된 사이클로필린 A가 화학 약물 저항성을 유도시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0083] **실시예 12. 통계 분석(Statistical Analysis)**

[0084] 상기 실험들은 최소 세 번의 독립실험을 수행하여 평균±표준 오차(SE)값으로 결과를 나타내었다. 통계 분석은 $P < 0.05$를 유의수준으로 하여 Student's t test를 이용하여 수행하였다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 C6 신경교종 세포의 농도반응을 나타낸 것이다.

[0086] C6 세포들은 표시된 사이클로스포린 A(cyclosporin A) (1a), 상글리페린 A(sanglifehrin A) (1b) 또는 시스플라틴(cisplatin)(1c)을 농도별로 처리하였고, 세포 생존율은 60시간에 MTT 분석법을 통하여 측정되었다. 처리하지 않은 세포 초기값의 백분율로 나타내었다. 데이터는 최소한 세 번의 독립적 실험의 평균±표준오차로 나타내었다. C6 세포를 60시간 동안 사이클로스포린 A (1d), 상글리페린 A (1e)나 시스플라틴 (1f)의 지시된 농도로 처리하였고, 구 후 전체 세포 추출물의 동일양을 SDS-PAGE로 분석하였으며, 카스파제(caspase-3) 또는 PARP에 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석법으로 분석하였다.

[0087] 도 2는 시스플라틴과 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A의 병용 처리시, C6 신경교종세포에서의 시스플라틴의 상승효과를 나타낸 것이다.

[0088] C6 세포는 1시간 동안 5mM NAC의 전처리상태와 무처리 상태에서 전 배양시켰고, 구 후 추가로 1시간 동안 5 μM CsA, 0.1 μM SFA 또는 10 μM 시스플라틴을 처리하였다. 2a: 새포 생존율을 MTT 분석법으로 분석하였다. 데이터는 최소한 세 번의 독립적 실험의 평균±표준 오차값으로 나타내었다. 한가지 시약으로 처리한 세포와 비교하여 *, $p<0.05$로 표시했다. 2b: C6 신경교종 세포의 아폽토시스를 위상차 현미경을 사용하여 형태학적으로 관찰하였다. 2c: 세포를 10 μM hoechst 33342로 염색한 후, 핵 염색 이미지는 공초점 현미경으로 포착하였다. 눈금 크기는 20 μm이며, 40 배율로 확대했다. 2d: 전체 세포 추출물의 동일한 양은 SDA-PAGE에 의해 분리되었고, 카스파제-3(caspase-3) 또는 PARP에 특이적인 항체를 웨스턴 분석법으로 분석하였다.

[0089] 도 3은 시스플라틴과 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A의 병용 처리에 의한 ROS 생성의 증가 및 세포 내 글루타치온(glutathione, GSH) 농도의 감소를 나타낸 것이다.

[0090] C6 세포는 1시간 동안 5mM NAC의 전처리상태와 무처리 상태에서 전 배양시켰고, 구 후 추가로 1시간 동안 사이클로스포린 A, 상글리페린 A 또는 시스플라틴을 처리했다. 그 후 세포 내 ROS 농도(3a) 및 전체 글루타치온 농도(3b)는 실시예에서 개시된 바에 따라 분석하였다. 데이터는 최소한 세 번의 독립적 실험의 평균±표준 오차값으로 나타내었다. 한 가지 시약으로 처리한 세포와 비교하여 *, $p<0.05$로 표시했다. 시스플라틴과 사이클로스포린 A 또는 상글리페린 A 병용하여 처리한 세포와 비교하여 #, $p<0.05$로 표시했다.

[0091] 도 4는 사이클로스포린 A, 상글리페린 A 또는 NIM811에 의한 사이클로필린 A의 PPIase 활성의 억제를 나타낸 것

이다.

[0092] 재조합 사이클로필린 A 20 nmol 은 실시예에 개시된 바에 따라, 사이클로스포린 A, 상글리페린 A 및 NIM811의 지시된 농도로 처리하여 3.5 ㎖ PPIase 분석법 완충액에 5분 동안 10 ℃에서 전배양하였다. 상기 분석은 펩타이드 기질의 첨가로 시작되었으며, Amersham Biosciences 분광광도계로 400nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0093] 도 5는 시스플라틴에 의해 유도된 아폽토시스에서 사이클로필린 A의 발현저해 효과를 나타낸 것이다.

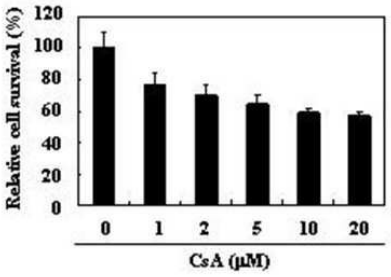
[0094] 사이클로필린 A에 특이적인 siRNA로 감염시킨 C6 세포를 1시간 동안 10 μM 시스플라틴과 5 μM 사이클로스포린 A 또는 0.1 μM 상글리페린 A의 단독 또는 병용처리하였다. 5a : 사이클로필린 A의 발현 농도는 사이클로필린 A-siRNA(CypA-siRNA)에 감염된 C6 신경교종 세포에서 이뮤노블롯팅으로 관찰하였다. 5b : 세포 생존율은 MTT로 분석하였다. 데이터는 최소한 세 번의 독립적 실험의 평균±표준 오차값으로 나타내었다. 시스플라틴을 단독으로 처리한 세포와 대조구 siRNA 감염체를 비교하여 *, $p<0.05$로 표시했다. 5c: 세포는 10 μM hoechst 33342로 15분 동안 염색한 후, 핵 염색 이미지는 공초점 현미경으로 관찰하였다. 눈금 크기는 20 μm이며, 40 배율로 확대했다. 5d: 전체 세포 추출물의 동일한 양은 SDA-PAGE에 의해 분리되었고, 카스파제-3 또는 PARP에 특이적인 항체를 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다.

[0095] 도 6은 면역조직화학법에 의한 사이클로스포린 A의 GBM(glioblastoma multiforme) 에서의 확인 및 저산소상태에 의해 증가조절을 나타낸 것이다.

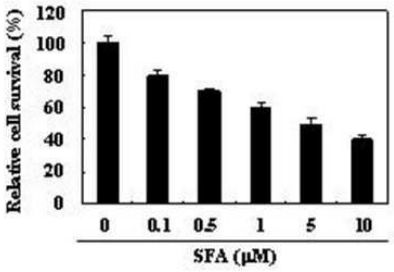
[0096] 6a : GBM과 정상 인간 뇌 조직은 인간 뇌조직 병변(H&E) 또는 사이클로필린 A 또는 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 특이적 항체로 염색하였다. 정상 신경교조직에서는 사이클로필린 A 단백질의 어떤 발현도 보이지 않았다. 반면 GBM에서는 높은 농도의 사이클로필린 A 단백질이 관찰되었다. 6b : 12시간 동안 저산소상태에 노출시킨 후, 추출한 전체 세포 용해물(10 μg)을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 6c : 사이클로스포린 A 또는 시스플라틴으로 처리된 C6 신경교종 세포는 48시간 동안 저산소상태에 노출되었다. 데이터는 최소한 세 번의 독립적 실험으로부터 나온 결과의 평균±표준 오차값을 나타낸다. 저산소상태에서 노출된 세포에 비교하여 *, $p < 0.05$로 표시했다. 저산소상태에서 사이클로스포린 A 또는 시스플라틴의 단독처리에 비교하여 #, $p<0.05$로 표시했다.

도면

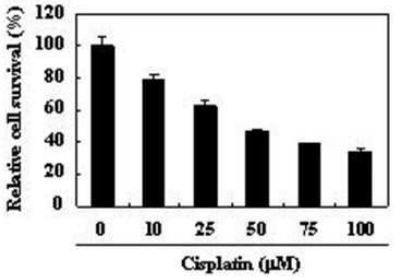
도면1a



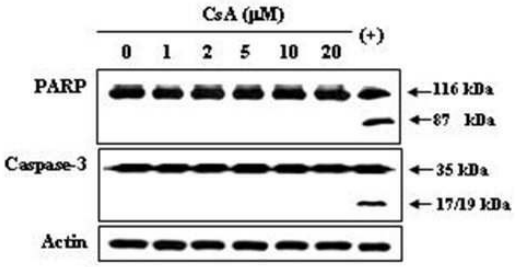
도면1b



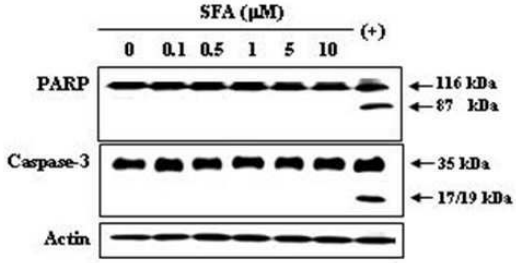
도면1c



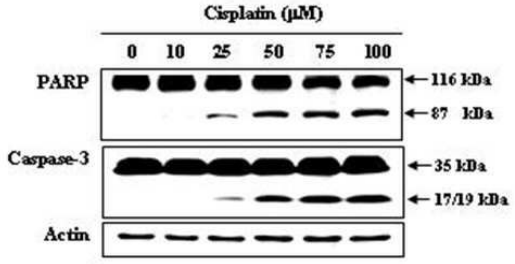
도면1d



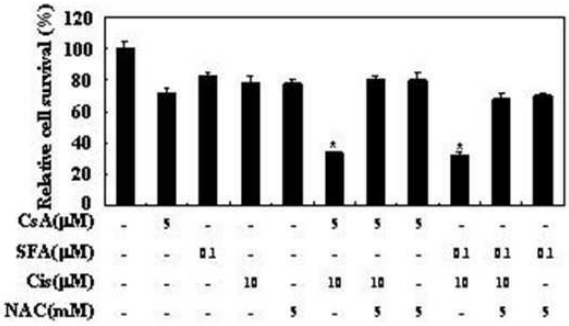
도면1e



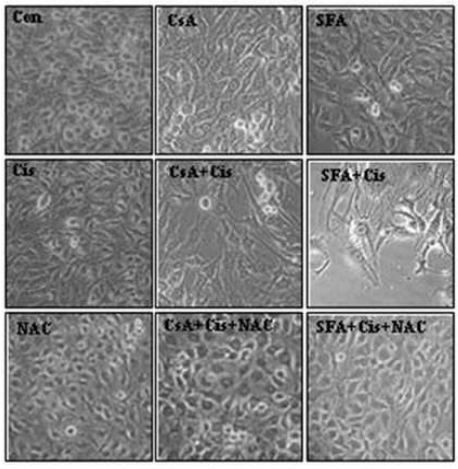
도면1f



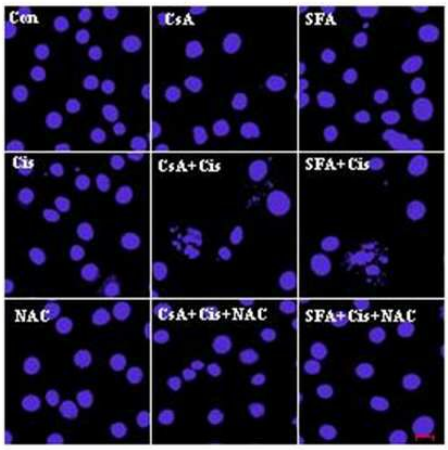
도면2a



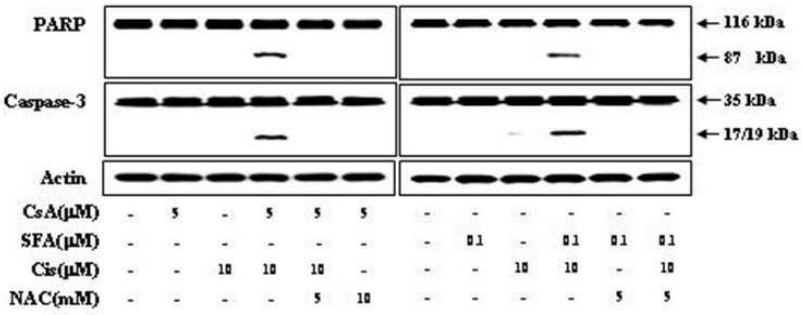
도면2b



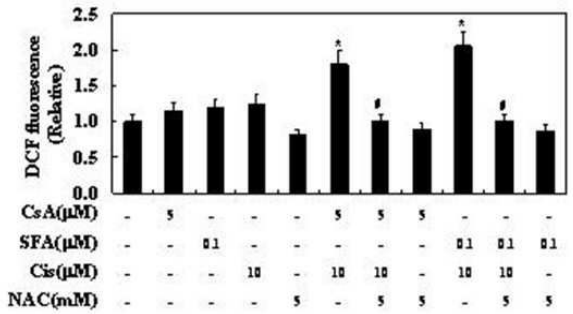
도면2c



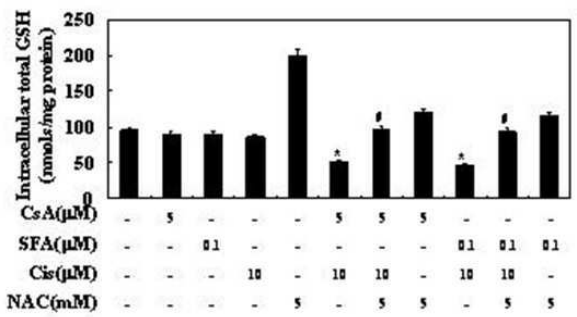
도면2d



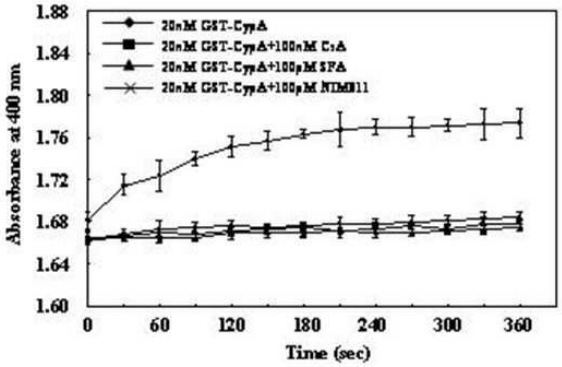
도면3a



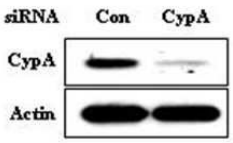
도면3b



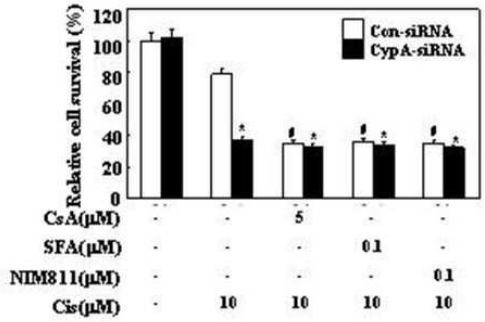
도면4



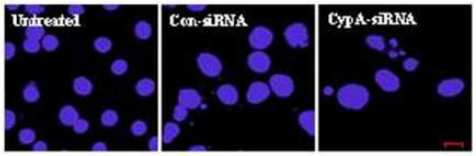
도면5a



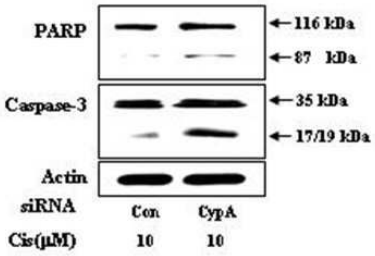
도면5b



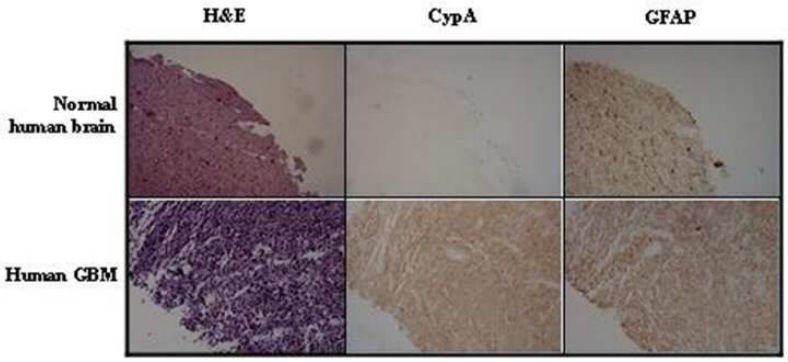
도면5c



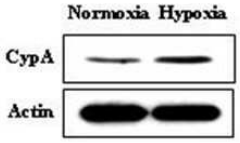
도면5d



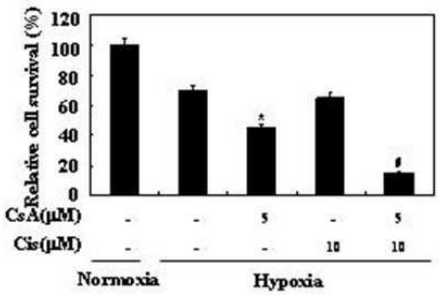
도면6a



도면6b



도면6c


Relative cell survival (%)
120
100
80
60
40
20
0
CsA(μM)
Cis(μM)
-
-
5
-
5
-
-
-
10
10
Normoxia
Hypoxia