



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월20일

(11) 등록번호 10-1538264

(24) 등록일자 2015년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/5415 (2006.01) A61K 31/54 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0009045

(22) 출원일자 2014년01월24일

심사청구일자 2014년01월24일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020030048460 A

Apoptosis, 2012, Vol. 17, pp. 989-997

Oncogene, Vol. 24, pp. 355-365, 2005

(73) 특허권자

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)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

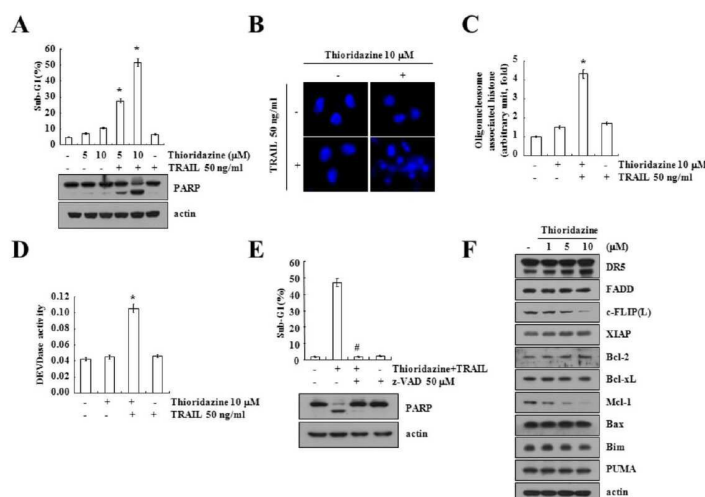
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 낮은 농도의 티오리다진이 세포내 활성산소종의 생성을 증가시켜 단백질분해효소를 활성화시킴으로써, Akt 인산화를 억제시키고 c-FLIP(L) 및 McI-1의 발현을 감소시켜 암세포의 트레일 내성을 극복하고 트레일에 의한 세포사멸을 효과적으로 증가시킬 수 있기 때문에 본 발명에 따른 티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유하는 약학조성물 또는 병용투여는 암세포에 대한 항암활성을 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서보람

경북 경산시 경안로56길 14, 303동 505호 (중방동,
중방e편한세상3단지)

우선민

경북 경산시 남매로 235, 다동 201호 (중방동, 전
원주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0016239

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자 지원사업(핵심)

연구과제명 NQ01 표적을 통한 apoptosis, necroptosis, autophagic cell death의 통합적 조절 연구

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 티오리다진은 세포내 활성산소종(ROS)를 증가시켜 단백질분해효소를 활성화시킴으로써, Akt 인산화를 억제시키고 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현을 감소시켜 트레일에 의한 세포사멸을 증가시키는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 티오리다진 1~50 중량 % 및 트레일 50~99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 암은 신장암, 유방암 및 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택될 수 있는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 티오리다진과 트레일을 함께 투여함으로써 트레일에 의해 유도되는 암세포사멸을 증가시켜 암치료에 효과적인 암 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 티오리다진(Thioridazine)은 10-[2-(1-메틸-2-피페리딘)에틸]-2-(메틸티오)페노티아진 화합물이며, 1세대 항정신병 치료제로 개발되어 정신병 및 정신 분열증과 같은 정신이상 질환의 치료제로 사용되어 왔다. 최근 티오리다진의 새로운 용도로 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)과 같이 약물저항성을 나타내는 미생물에 대한 항 미생물 활성이 확인되었다. 또한 암세포에 대한 항-세포증식 및 항-생존능을 이용한 항암효과가 연구되어졌는데 항암효과를 나타내는 매커니즘으로 PI3K/Akt 신호 경로 억제 및 포유류 대상의 라파마이신(mTOR) 신호 억제와 같은 매커니즘이 연구되어졌다. 또한 미토콘드리아 DNA 중합효소 및 ATP 생성의 억제는 티오리다진에 의해 유도되는 백혈병 세포의 세포사멸과 관련있는 것이 확인되었다.

[0003] 그러나 아직 티오리다진에 의한 세포사멸에 대한 명확한 매커니즘이 확립되지 않았으며 높은 농도의 티오리다진을 사용할 경우 부정맥과 돌연사와 같은 부작용을 유발시키는 문제점이 있다.

[0004] 트레일(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)은 종양괴사인자(TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로서 트레일이 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 데스 수용체(death receptor)에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려짐에 따라 매우 효과적인 항암치료제이다.

[0005] 그러나 많은 암세포는 데스 수용체의 감소와 c-FLIP(L), Bcl-2, Bcl-xL 또는 Mcl-1와 같은 항-세포사멸 단백질

을 증가시키는 다양한 매커니즘을 통하여 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.

[0006] 따라서 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 10-2005-7012117 호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 종래의 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 티오리다진과 트레일을 함유하는 조성물 또는 병용투여를 통하여 낮은 농도의 티오리다진으로 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 정상세포에는 영향을 주지 않고 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암효과를 증진시킬 수 있는 티오리다진과 트레일을 함유한 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 상기 티오리다진은 세포내 활성산소종(ROS)을 증가시켜 단백질분해효소를 활성화시킴으로써, Akt 인산화를 억제시키고 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현을 감소시켜 트레일에 의한 세포사멸을 증가시킬 수 있다.

[0011] 상기 약학조성물은 티오리다진 1~50 중량 % 및 트레일 50~99 중량%를 포함할 수 있다.

[0012] 상기 암은 신장암, 유방암 및 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0013] 또한 티오리다진과 트레일을 암세포에 병용투여 하여 암세포 사멸을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0014] 상기 암세포는 신장암, 유방암 및 뇌종양 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 트레일과 낮은 농도의 티오리다진을 각각 단독으로 암세포에 처리한 경우보다 트레일과 티오리다진을 함께 포함하는 조성물 또는 이들의 병용 투여시 효과적인 암세포의 세포사멸이 일어난 반면, 정상세포에서는 세포사멸이 나타나지 않았다. 보다 상세하게는 티오리다진은 세포내 활성산소종을 증가시켜 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 단백질분해를 증가시키고 Akt 인산화를 억제시킴으로써, 암세포의 트레일 내성을 극복할 수 있기 때문에, 티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유한 조성물 또는 이들의 병용 투여는 트레일의 내성을 극복하고 티오리다진의 부작용을 억제하여 정상세포에는 안전하면서 암세포에 대한 항암 치료 효과를 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 티오리다진에 의해 민감성이 증가된 트레일 유도 세포사멸을 확인한 결과로, 1A는 Caki 세포에 트레일 50ng/ml을 처리한 후 5 또는 10 μ M의 티오리다진을 24시간 동안 처리한 세포군 또는 비 처리 세포군의 세포사멸 수준을 유세포 분석기(FACS)의 sub-G1 분획 측정을 통하여 확인한 결과이며, 1B는 Caki 세포에 10 μ M의 티오리다진 처리 또는 비 처리 조건에 50ng/ml 트레일을 24시간 처리 후 4',6'-디아미디노-2-페닐인돌 염색을 통하여 핵의 응축과 분열을 확인한 결과이며, 1C는 상기 1B와 같은 방법으로 처리된 세포의 세포질 히스톤-연결 DNA 단편을 DNA 분열 확인 키트를 통하여 확인한 결과이며, 1D는 상기 1B와 같은 방법으로 처리된 세포의 카스파제 활성을 카스파제-3(DEVDase) 분석 키트를 이용하여 비색 분석한 결과이며, 1E는 Caki 세포에 50 μ M z-VAD-fmk(z-VAD) 처리 또는 비 처리 조건에서 10 μ M 티오리다진과 50ng/ml 트레일을 24시간 병합처리한 후 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 측정된 sub-G1 분획을 나타낸 결과와 PARP 및 액틴의 단백질 발현 수준을 나타낸 웨스턴 블롯 결과이며, 1F는 Caki 세포에 1, 5 또는 10 μ M 농도의 티오리다진을 24시간 동안 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 DR5, FADD, c-FLIP(L), XIAP, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bax, Bim, Puma 및 액틴 단백질의 발현 정도

를 확인한 결과이다. * $p < 0.001$ 티오리다진 단독 처리군과 비교한 결과이며, # $p < 0.001$ 티오리다진과 트레일 병용처리군과 비교한 결과이다.

도 2는 다른 신장암 세포주 및 정상세포에서 티오리다진과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸 효과를 확인한 결과로, 2A는 신장암 세포주인 ACHN 및 A498 세포에 $10\mu\text{M}$ 티오리다진과 50ng/ml 트레일을 24시간 동안 단독 또는 병용처리한 후 세포사멸 수준을 유세포 분석기(FACS)의 sub-G1 분획 측정을 통하여 확인한 결과와 PARP의 발현 수준을 나타낸 웨스턴 블롯 결과이며, 2B는 유방암 세포주인 MDA-MB231 세포 및 신경교종 세포인 U251MG 세포에 2A와 같은 방법으로 세포사멸 수준을 확인한 sub-G1 분획과 PARP의 발현 수준을 나타낸 웨스턴 블롯 결과이며, 2C는 Caki, 정상세포인 TMCK-1 또는 혈관사이세포(mesangial cell)에 $10\mu\text{M}$ 티오리다진과 50ng/ml 트레일을 24시간 동안 단독 또는 병용처리한 후 세포형태를 간섭 광학 현미경(interference light microscopy)을 통하여 확인한 결과와 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 세포사멸 수준을 측정한 결과이다. * $p < 0.001$ 티오리다진 단독 처리군과 비교한 결과이다.

도 3은 티오리다진에 의한 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 감소와 트레일에 의해 유도된 세포사멸의 관련성을 확인한 결과로, 3A는 Caki 세포에 $10\mu\text{M}$ 티오리다진 처리 후 각 시간대별로 웨스턴 블롯하여 측정한 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 단백질 발현 수준과 mRNA 발현 수준을 확인한 결과이며, 3B는 Caki 세포에 $20\mu\text{g/ml}$ 의 싸이클로헥사민을 처리하고 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 처리한 군과 비 처리군을 분리하여 각 시간대별로 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 분석결과이며, 3C는 대조군인 Caki/vector 세포와 c-FLIP(L)가 과발현되도록 재조합된 Caki/cFLIP(L)세포에 50ng/ml 의 트레일을 처리한 후 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 처리한 군과 비 처리군의 24시간 후에 세포사멸 수준을 확인한 FACS와 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 분석결과이며, 3D는 대조군인 Caki/vector 세포와 Mcl-1가 과발현되도록 재조합된 Caki/Mcl-1 세포에 50ng/ml 의 트레일을 처리한 후 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 처리한 군과 비 처리군의 24시간 후에 세포사멸 수준을 확인한 FACS와 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 4는 티오리다진에 의해 유도된 단백질분해효소 활성을 확인한 결과로, 4A는 Caki 세포에 $1\mu\text{M}$ MG132 또는 $5\mu\text{M}$ 락타시스틴을 30분 동안 처리한 후 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 처리 또는 비 처리하고 24시간 처리한 후 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 분석결과이며, 4B는 $10\mu\text{M}$ 티오리다진 또는 양성 대조군인 MG132를 Caki 세포에 처리한 후 각 시간대별 세포를 용해하여 단백질분해효소 활성을 측정하는 결과이며, 4C는 단백질분해효소 센서 벡터인 ZsProSensor-1를 Caki 세포에 형질주입 후 $10\mu\text{M}$ 티오리다진 또는 MG132를 처리하여 각 시간대별로 단백질분해효소 활성을 분석한 FACS 분석 결과이며, 4D는 Caki 세포에 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 처리한 후 각 시간대별로 세포를 수집하고 용해시켜 PSMA5 및 PSMD4/S5a 단백질 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 5는 티오리다진에 의한 Akt 신호 억제와 트레일에 의한 세포사멸 유도의 관련성을 확인한 결과로 5A는 $10\mu\text{M}$ 티오리다진, $15\mu\text{M}$ LY294002 및 $1\mu\text{M}$ 웰트만닌(wortmannin)을 Caki 세포에 처리하고 각 시간대 별로 c-FLIP(L), Mcl-1, phospho (p)-Akt, Akt 및 액틴의 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 5B는 Caki 세포에 $10\mu\text{M}$ 티오리다진, $15\mu\text{M}$ LY294002 및 $1\mu\text{M}$ 웰트만닌(wortmannin)을 각각 처리 또는 비 처리한 세포에 50ng/ml 트레일을 24시간 처리한 후 PARP와 액틴의 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과와 세포사멸 수준을 유세포 분석기(FACS)의 sub-G1 분획 측정을 통하여 확인한 결과이다.

도 6은 티오리다진과 트레일 병용처리에 의한 세포사멸이 활성산소종에 의한 것인지 확인한 결과로, 6A는 Caki 세포에 1, 5 또는 $10\mu\text{M}$ 로 30분간 처리한 후 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 형광염료로 염색하고 형광현미경을 통하여 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 형광 정도를 확인하고, 유세포 분석기(FACS)를 통하여 확인한 결과이며, 6B는 Caki 세포에 5 mM NAC, 2 mM GEE, $200\mu\text{M}$ 트롤록스를 30분 동안 처리하고 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 50ng/ml 트레일을 24시간 동안 처리하여 세포사멸 수준을 유세포 분석기(FACS)의 sub-G1 분획 측정을 통하여 확인한 결과와 PARP, c-FLIP(L), Mcl-1, phospho (p)-Akt 및 액틴의 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 6C는 5 mM NAC, 2 mM GEE, $200\mu\text{M}$ 트롤록스를 30분 동안 처리하고 $10\mu\text{M}$ 티오리다진을 24시간 동안 처리한 Caki 세포를 용해하고 단백질분해효소 활성을 측정하는 결과이며, 6D는 티오리다진에 의해 유도되는 트레일 민감성 매커니즘을 나타낸 모델로 티오리다진은 세포내 활성산소종 생성을 유발시키고 세포내 증가된 활성산소종은 Akt 신호를 억제하고 단백질분해효소 활성을 증가시킨다. 이렇게 증가된 단백질분해효소 활성은 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 번역 후 수준에서 발현을 감소시킨다. 따라서 티오리다진을 처리한 Caki 세포에서 Akt 신호 억제와 단백질분해효소 활성 증가는 트레일에 의한 세포사멸 유도에 효과는 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 티오리다진과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 티오리다진은 세포내 활성산소종(ROS)를 증가시켜 단백질분해효소를 활성화시킴으로써, Akt 인산화를 억제시키고 c-FLIP(L) 및 Mc1-1의 발현을 감소시켜 트레일에 의한 세포사멸을 증가시킬 수 있다.
- [0019] 보다 상세하게는 암세포의 트레일 내성은 암세포 표면의 데스 수용체의 감소와 항-세포사멸 단백질인 c-FLIP(L) 및 Mc1-1의 발현 증가에 의해 나타나는데, 티오리다진은 도 6A와 같이 세포내 활성산소종의 생성을 증가시킬 수 있으며, 도 6B 내지 6C와 같이 티오리다진에 의해 증가된 활성산소종은 단백질분해효소를 활성화시킴으로써, 트레일 내성을 나타내는 항-세포사멸 단백질인 c-FLIP(L) 및 Mc1-1의 발현 증가를 억제시키고, Akt 인산화를 억제하여 트레일에 의해 유도되는 세포사멸 효과를 증진시킬 수 있다.
- [0020] 상기 약학조성물은 티오리다진 1~50 중량 % 및 트레일 50~99 중량%를 포함할 수 있다.
- [0021] 이때, 본 발명에 따른 약학조성물에서 상기 트레일이 상기 함량범위를 벗어나 과량으로 함유되면 악성 빈혈, 구역, 식욕 부진, 불안, 수면 장애, 호흡 곤란, 두통, 피부 발진, 간세포에 일부 독성을 나타내는 문제가 야기될 수 있고, 소량으로 함유되면 약제 효과 부족의 문제가 야기될 수 있다.
- [0022] 또, 본 발명에 따른 약학조성물에서 상기 티오리다진이 상기 함량범위를 벗어나 과량으로 함유되면 복통, 설사, 구역, 피부 발진, 수면 장애, 아연 결핍, 발작 등의 문제와 심장혈관 질환 유도가 야기될 수 있고, 소량으로 함유되면 약제 효과 부족의 문제가 야기될 수 있다.
- [0023] 상기 암은 신장암, 유방암 및 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0024] 보다 상세하게는 신장암세포인 ACHN 및 A489, 유방암세포인 MDA-MB231, 뇌종양 세포인 U251MG에 10 μ M 티오리다진과 50 ng/ml 트레일을 각각 단독 또는 병용처리한 결과, 도 2A 내지 2B와 같이 상기 모든 세포주에서 티오리다진 또는 트레일을 단독처리보다 병용처리 시 높은 세포사멸 효과를 나타낸 반면, 도 2C와 같이 정상세포인 TMCK-1 마우스 신장 세포에서는 티오리다진과 트레일 병용처리에도 세포사멸 또는 세포수축이 나타나지 않았다.
- [0025] 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0028] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0029] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 약학조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 트레일 0.05 mg/day 내지 10.0 mg/day 및 폴리에테르 항생제 0.4 mg/day 내지 10.0 mg/day의 양을 일일 1회 내지 일일 수회 분복 투여할 수 있다.
- [0031] 또한, 이러한 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물을 구성하는 트레일과 티오리다진은 이미 다른 의학적 용도에 처방되고 있어

안전성이 확보되어 있는 물질이다.

[0033] 상기 약화조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 또한 티오리다진과 트레일을 암세포에 병용투여 하여 암세포 사멸을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0035] 상기 암세포는 신장암, 유방암 및 뇌종양 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0036] 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.

[0037] <실험예 1> 세포배양 및 물질

[0038] Caki, ACHN, A498, MDA-MB-231 및 U251MG 세포를 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며, 마우스 신장 세포인 TMCK-1은 Dr. T.J. Lee (Yeungnam University, Korea)로부터 받아 사용하였다.

[0039] 또한 초대 배양한 사람 사구체간질 세포(mesangial cells) Cryo NHMC는 Clonetics (San Diego, CA)에서 구입하였다.

[0040] 상기 세포들을 10% 태아소혈청(fetal bovine serum; FBS), 20mM HEPES 버퍼 및 100 μ g/ml 겐타마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다.

[0041] PCR 프라이머는 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 다른 화학물질은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다. N-아세틸-L-시스테인(NAC)과 트록소(Trolox)는 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하였으며, 항-DR5, 항-Bcl2, 항-Bcl-xL, 항-Mcl-1, 항-XIAP, 항-PARP 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

[0042] 항-FADD는 BD Bioscience (San Jose, CA)에서 구입하였으며, 항-c-FLIP(L)항체는 ALEXIS Corporation(San Diego, CA)으로부터 구입하였으며, 항-Bim 항체는 Millipore Corporation(Billerica, MA, USA)으로부터, 항-엑틴 항체는 Sigma (St. Louis, MO)로부터 각각 구입하였다.

[0043] 또한 재조합 사람 트레일(TRAIL)은 KOMA Biotech (Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

[0044] <실험예 2> 웨스턴 블롯 분석

[0045] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 각각의 세포를 차가운 인산완충용액(phosphate-buffered saline; PBS)으로 세척하고 100 μ M 페닐메틸설포닐 플로라이드, 10 μ g/ml 류페틴, 10 μ g/ml 펩스타틴 및 2 mM EDTA로 구성된 프로테아제 억제제를 첨가한 50mM 트리스-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-데옥시콜레이트, 150mM NaCl, 1mM Na₃VO₄ 및 1mM NaF로 완충된 리파(RIPA) 버퍼를 사용하여 아이스 위에서 세포를 용해시켰다.

[0046] 용해물을 10.000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 수집하였다.

[0047] 웨스턴 블롯 분석은 웨스턴 블롯팅 키트 제조사의 설명서에 따라 수행하였으며, 단백질을 SDS-PAGE 전기영동으로 분리하고 임보빌론-P 막으로 옮겼다. 그 후 향상된 화학발광(ECL)법을 이용하여 특이적 단백질을 검출하였다.

[0048] <실험예 3> 유세포 분석(Flow cytometry analysis)

[0049] 유세포 분석을 위해, 100 μ l PBS를 세포에 첨가하여 재부유시키고 95% 에탄올 200 μ l를 첨가하여 세포를 와류시킨 후 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 12.5 μ g RNase가 포함된 pH 8.4인 1.12% 시트르산나트륨 용액 250 μ l를 첨가하여 재부유시키고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 추가로 인큐베이션하였다.

[0050] 그 후 세포에 50 μ g/ml 농도의 프로피디움 아이오다이드 용액 250 μ l를 첨가하고 실온에서 30분간 세포 DNA를 염색시켰다. 염색된 세포는 유세포계수분석기(FACS)를 통하여 형광 활성화된 세포를 분류하여 상대적인 DNA 함량을 분석하였으며, 적색 형광 강도를 통하여 확인할 수 있었다.

[0051] <실험예 4> 4',6'-다이아미디노-2-페닐인돌 염색(DAPI)을 이용한 핵 응축과 분열 확인

- [0052] 세포의 핵을 확인하기 위해, 유리 슬라이드 위에서 세포를 1% 파라포름알데하이드로 실온에서 30분간 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 300nM 4',6'-다이아미디노-2-페닐인돌 용액(Roche, Mannheim, Germany)을 첨가하여 추가로 5분간 고정하고 핵을 염색한 후 세포를 형광 현미경으로 확인하였다.
- [0053] **<실험예 5> DNA 단편화 분석**
- [0054] 세포사멸 확인 ELISA plus kit (Boehringer Mannheim; Indianapolis, IN)를 이용하여 티오리다진을 단독처리한 세포, 트레일을 단독처리 세포 및 티오리다진과 트레일을 병용처리한 세포의 핵 내 단편화된 DNA를 확인하여 세포사멸 정도를 확인하였다.
- [0055] 각각의 배양 플레이트를 10분 동안 200×g로 원심분리하고 상등액을 제거한 후 세포 펠렛을 30분 동안 용해시켰다. 세포 용해물을 200×g로 10분간 원심분리하고 세포질 히스톤 관련 DNA 단편이 포함된 상등액을 수집하였으며, 수집된 상등액에 고정화된 항-히스톤 항체를 넣고 인큐베이션하였다.
- [0056] 상기 반응물에 퍼옥시다제 기질을 첨가하여 5분간 인큐베이션 한 후 분광광도계를 이용하여 405 및 490 nm로 측정하였다.
- [0057] **<실험예 6> Asp-Glu-Val-Asp-ase (DEVDase)활성 분석**
- [0058] DEVDase 활성 분석을 위해, 티오리다진 처리 세포군과 비처리 세포군에 트레일을 투여하고 각각의 실험군의 세포를 용해시켰다. 세포용해물 20 μg을 Asp-Glu-Val-Asp-크로모포어-p-니트로아닐라이드(DVAD-pNA) 5 μM이 포함된 반응 버퍼(1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol) 100 μl에 넣고 96-well 마이크로티터 플레이트에서 37℃로 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0059] 인큐베이션 후 분광광도계를 이용하여 405nm 흡광도를 측정하였다.
- [0060] **<실험예 7> 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)**
- [0061] 트라이졸(Trizol)시약(Life Technologies; Gaithersburg, MD)을 사용하여 전체 RNA를 분리하고 M-MLV 역전사 효소(Gibco-BRL; Gaithersburg, MD)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. 사람 c-FLIP(L), Mcl-1 및 액틴(actin)을 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머가 사용되었다. c-FLIP(L) (sense) 5' - CGG ACT ATA GAG TGC TGA TGG -3' (서열목록1) 와 (antisense) 5' - GAT TAT CAG GCA GAT TCC TAG -3' (서열목록2); Mcl-1 (sense) 5' - GCG ACT GGC AAA GCT TGG CCT CAA-3' (서열목록3) 와 (antisense) 5' - GTT ACA GCT TGG ATC CCA ACT GCA-3' (서열목록4); 및 actin (sense) 5' - GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC -3' (서열목록5)와 (anti-sense) 5' - CGA TTT CCC GCT CGG CCG TGG -3' (서열목록6)를 사용하여 PCR 증폭조건으로 94℃에서 3분간 진행 후 액틴은 17 사이클, c-FLIP(L) 및 Mcl-1은 23 사이클로 94℃, 45초의 조건으로 진행하였다. 또한 58℃에서 45초, 72℃에서 10분간 진행하여 증폭하였다.
- [0062] 증폭물은 1.5% 아가로스 겔로 전기영동하여 분리하고 UV로 확인하였다.
- [0063] **<실험예 8> Mcl-1과 c-FLIP(L)구조와 안정세포**
- [0064] 사람 Mcl-1과 c-FLIP(L) 발현 벡터를 보고되어진 방법(Um HJ, Kwon TK. Protective effect of melatonin on oxaliplatin-induced apoptosis through sustained Mcl-1 expression and anti-oxidant action in renal carcinoma Caki cells. *J Pineal Res* 2010, 49(3): 283-290.)으로 합성하였다.
- [0065] pFLAG-CMV-4/Mcl-1 또는 pcDNA 3.1-c-FLIP(L) 플라스미드를 LipofectAMINE(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 Caki 세포에 안정적으로 형질주입하였다.
- [0066] 48시간 인큐베이션 후 형질전환된 세포를 선별하여 700 μg/ml G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된 세포 배양 배지에서 배양하고, 2 내지 3주 후 독립적인 단일 클론을 무작위로 분리하였다. 각각의 개별 클론을 각기 별도의 플레이트에 분주하고 클론 확장 후 각각의 독립적인 클론의 세포에서 Mcl-1과 c-FLIP(L)의 발현을 면역블롯팅을 통하여 확인하고 실험에 사용하였다.
- [0067] **<실험예 9> 단백질분해효소 활성 분석**
- [0068] 키모트립신 단백질분해효소 활성을 Suc-LLVY-AMC (chymotryptic substrate, Biomol International, Plymouth Meeting, PA)으로 측정하였다.
- [0069] 측정을 위해 세포를 수집하여 PBS로 세척한 후 용해시켰다. 세포 용해물의 1 μg 단백질을, 100mM Tris-HCl (pH

8.0), 10mM MgCl₂ 및 2mM ATP가 포함된 혼합물에 50 μM Suc-LLVY-AMC를 첨가하여 37°C에서 30분간 인큐베이션하였다.

[0070] 효소 활성은 380nm 여기 파장과 440nm 방출 파장 조건으로 형광검출기(fluorometric plate reader)를 사용하여 측정하였다.

[0071] 세포내 단백질분해효소 활성을 ZsGreen (proteasome sensor vector)-형질전환된 Caki 세포 주(BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 측정하였다. ZsGreen은 마우스 오르니틴 탈카복실화 효소 측매에 의한 단백질분해효소에 의해 불안정화된 염기서열과 융합하고 빠르게 유비퀴틴화와 분해를 진행하였다.

[0072] 그 후 형광현미경과 FACS Canto™(BD Biosciences, San Jose, CA)을 이용하여 형광분석하였다.

[0073] <실험예 10> 활성화산소(ROS) 측정

[0074] 보편적인 ROS 측정방법인 2',7'-다이클로로디하이드로플루오레세인 디아세타에트(H₂DCFDA)형광 탐촉자를 사용하여 세포 내 축적된 활성화산소(ROS)를 측정하였다. Caki 세포에 5 mM NAC, 2 mM GEE 및 200 μM 트롤록스(trolox)를 30분간 처리한 후 10 μM 티오리다진을 투여하고 30분 동안 인큐베이션하고 추가로 10분간 형광 염료 H₂DCFDA로 세포를 염색하였다.

[0075] 염색된 세포에 트립신을 처리하고 PBS로 재 부유시켜 특정시간 간격으로 유세포 분석기(flow cytometer; FACS; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 또는 형광현미경(Zeiss, Goettingen, Germany)으로 형광분석하였다.

[0076] <실시예 1> 트레일 유도 세포사멸에 관한 티오리다진 민감성 확인

[0077] 티오리다진이 트레일이 유도 세포사멸에 어떠한 효과를 나타내는지 사람 신장암세포인 Caki 세포를 이용하여 확인하였다.

[0078] 1. 티오리다진과 트레일 병용처리 효과 확인

[0079] 먼저, 티오리다진과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸 유도를 확인하기 위해, FACS분석을 이용한 DNA 함량 측정과 PARP의 분열, caspase-3 기질 확인을 위한 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0080] Caki 세포에 트레일 50ng/ml을 처리한 후 5 또는 10 μM의 티오리다진을 24시간 동안 처리한 세포군 또는 비 처리 세포군의 세포사멸 수준을 유세포 분석기(FACS)의 sub-G1 분획 측정을 통하여 확인하였다.

[0081] 그 결과, 도 1A와 같이 티오리다진 또는 트레일을 단독처리한 경우 세포사멸의 효과가 나타나지 않았으나, 티오리다진과 트레일 병용처리의 경우 유의한 세포사멸 증가가 확인되었으며, 웨스턴 블롯 결과에서도 PARP 분열 증가를 확인할 수 있었다.

[0082] 또한 Caki 세포에 10 μM의 티오리다진 처리 또는 비 처리 조건에 50ng/ml 트레일을 24시간 처리 후 4',6'-디아미도노-2-페닐인돌 염색을 통하여 핵의 응축과 분열을 확인하였다.

[0083] 그 결과 도 1B 및 1C를 참고하면, 티오리다진과 트레일 병용처리에 따른 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편의 손상을 확인할 수 있었다.

[0084] 실험예 6의 방법으로 DEVDase를 이용한 카스파제-3 분석결과, 도 1D와 같이 티오리다진과 트레일 병용처리는 카스파제-3 활성을 증가시켰다. 반면, Caki 세포에 50 μM z-VAD-fmk(z-VAD) 처리 또는 비 처리 조건에서 10 μM 티오리다진과 50ng/ml 트레일을 24시간 병합처리한 후 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 측정한 sub-G1 분획 결과와 PARP 및 액틴의 단백질 발현 수준을 나타낸 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 도 1E의 그래프와 같이 z-VAD-fmk(z-VAD) 및 팬-카스파제는 유의하게 억제되었다. 또한 도 1E의 웨스턴 블롯 결과에서도 z-VAD 처리에 의한 PARP 분열의 억제가 확인되었다.

[0085] 티오리다진에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘을 확인하기 위해, Caki 세포에 1, 5 또는 10 μM 농도의 티오리다진을 24시간 동안 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 티오리다진을 처리한 Caki 세포에서 Bcl-2를 포함한 세포사멸 관련된 단백질, 세포사멸(IAP) 패밀리의 억제자, FADD 또는 c-FLIP(L)(cellular FLICE-inhibitory protein)과 같은 DISC 성분 및 데쓰 수용체의 발현 정도를 확인하였다.

[0086] 그 결과 도 1F와 같이, 티오리다진 처리 시 c-FLIP(L)과 McI-1의 발현에 유의한 감소가 확인되었으나 다른 단백질에서는 변화가 나타나지 않았다.

- [0087] 상기 결과로부터 티오리다진은 Caki 세포에서 트레일에 의해 유도되는 세포사멸의 민감성을 증가시키는 것이 확인되었다.
- [0088] 2. 다양한 암 중에서 티오리다진과 트레일 병용처리 효과 확인
- [0089] Caki 세포 이외의 다른 신장암세포 및 다른 암종에서 티오리다진의 항암효과를 확인하기 위해, 신장암세포인 ACHN과 A489, 사람 유방암세포인 MDA-MB231, 사람 신경교종 세포인 U251MG에서 티오리다진과 트레일의 병용 효과를 확인하였다.
- [0090] 각각의 세포주에 50 ng/ml 트레일과 10 μ M 티오리다진을 24시간 동안 단독 또는 병용처리한 후 유세포 분석기 (FACS)를 이용하여 sub-G1 분획을 측정하고 세포사멸 수준을 확인하였으며, PARP와 액틴 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯을 수행하여 확인하였다.
- [0091] 그 결과 도 2A 및 2B와 같이, 티오리다진과 트레일 병용 처리에 의해 ACHN, A489, MDA-MB231 및 U251MG 세포에서 세포사멸과 PARP 분열이 유도되었다.
- [0092] 또한 도 2C를 참고하면, 티오리다진과 트레일 병용 처리에도 정상세포인 마우스 신장 세포 TMCK-1에서는 세포수축과 세포사멸이 나타나지 않았으나 Caki 세포에서는 세포수축과 수포가 확인되었다.
- [0093] 상기 결과로부터 Caki 세포뿐만 아니라 다른 암 종의 세포에서도 티오리다진에 의한 트레일 민감성 증가 효과를 나타내는 반면, 티오리다진과 트레일 병용처리는 정상세포에 안전한 것이 확인되었다.
- [0094] **<실시예 2> 티오리다진에 의한 c-FLIP(L)과 Mcl-1의 감소 확인**
- [0095] 상기 도 1F 결과와 같이 티오리다진에 의한 c-FLIP(L)과 Mcl-1의 발현 감소를 확인하기 위해, Caki 세포에 티오리다진 10 μ M 을 처리한 후 시간대별로 확인하였다.
- [0096] 그 결과 도 3A와 같이, 티오리다진은 c-FLIP(L)과 Mcl-1의 발현을 3시간 이내 억제시켰으며 24 시간까지 c-FLIP(L)과 Mcl-1의 발현이 점차 감소 되는 것이 확인되었다. 그러나 PCR 분석결과, 티오리다진을 처리한 Caki 세포의 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 mRNA 발현에는 변화가 나타나지 않았다.
- [0097] 상기 결과를 확인하기 위해, 티오리다진의 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 단백질 안정성 조절 여부를 확인하였다. 먼저 Caki 세포에 단백질 신생합성 억제자인 사이클로헥사민(CHX) 20 μ g/ml을 단독처리 또는 10 μ M 티오리다진과 20 μ g/ml 사이클로헥사민(CHX)을 병용처리한 후 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 발현을 확인하였다.
- [0098] 그 결과 도 3B와 같이 사이클로헥사민(CHX)을 단독처리한 Caki 세포군에서 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소가 나타났지만, 티오리다진과 사이클로헥사민(CHX)을 병용처리한 Caki 세포군에서 사이클로헥사민(CHX) 단독처리군보다 증가된 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소를 확인하였다.
- [0099] 상기 결과로부터 티오리다진은 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 번역 후 발현 수준을 감소시키는 것이 확인되었다.
- [0100] 또한 티오리다진과 트레일 병용처리에 의한 세포사멸에 있어서 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 기능적 역할을 확인하기 위해, c-FLIP(L)이 과발현된 Caki/c-FLIP(L) 세포 및 Mcl-1이 과발현된 Caki/Mcl-1 세포에 10 μ M 티오리다진 처리 또는 비 처리 조건하에 50ng/ml 트레일을 24시간 동안 처리하였다.
- [0101] 그 결과, 도 3C 및 도 3D와 같이 대조군인 Caki/vector 세포에서는 티오리다진과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 증가하였으며, PARP 분열 유도가 확인되었으나, Caki/c-FLIP(L) 세포 및 Caki/Mcl-1 세포에서는 티오리다진과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 유도되지 않았다.
- [0102] 상기 결과로부터 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소는 티오리다진의 트레일 민감성 증가에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.
- [0103] **<실시예 3> c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소와 관련된 티오리다진에 유도된 단백질분해효소 활성**
- [0104] 보고되어진 바에 의하면, c-FLIP(L) 및 Mcl-1은 단백질분해효소 유비퀴틴 시스템에 의해 분해되어진다. 따라서 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소가 단백질분해효소 활성화에 영향을 미치는지 확인하였다.
- [0105] 먼저, 단백질분해효소 억제자인 MG132와 락타시스틴(lactacystin)이 티오리다진에 의해 유도된 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소를 역으로 증가시킬 수 있는지 확인하기 위해, Caki 세포에 1 μ M MG132 또는 5 μ M 락타시스틴을 30분 동안 처리한 후 10 μ M 티오리다진을 24시간 동안 처리하고 웨스턴 블롯을 진행하였다.

- [0106] 그 결과 도 4A와 같이 MG132와 락타시스틴은 c-FLIP(L) 및 Mcl-1의 발현 감소를 억제하였다.
- [0107] 다음 티오리다진이 단백질분해효소의 활성을 증가시키는지 확인하기 위해, 단백질분해효소 기질인 suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC를 이용하여 키모트립신과 같은 단백질분해효소 활성을 확인하였다.
- [0108] 그 결과 도 4B와 같이 티오리다진은 12시간 이내에 키모트립신과 같은 단백질분해효소의 활성을 증가시켰다.
- [0109] 또한 티오리다진에 의해 단백질분해효소 활성이 유도될 수 있는지를 확인하기 위해, 단백질분해효소 센서 벡터인 ZsProSensor-1를 이용하였다.
- [0110] ZsProSensor-1 벡터에는 단백질분해효소에 의해 빠르게 분해되는 불안정한 상태의 녹색 형광 단백질인 ZsGreen이 인코딩되어 있는데, 단백질분해효소가 억제되면 형광 단백질이 축적되고 축적된 녹색 형광 단백질을 형광현미경 관찰로 확인할 수 있으며, 이를 통하여 단백질분해효소 활성 억제를 확인하였다.
- [0111] 그 결과 도 4C를 참고하면, 티오리다진은 녹색 형광단백질을 감소시킨 반면, MG132는 녹색 형광단백질을 증가시켰다.
- [0112] 또한 티오리다진이 두 개의 중요한 프로테아좀 소단위인 20S 프로테아좀 소단위 알파 타입 5(PSMA5) 및 19S 프로테아좀 non-ATPase 조절 소단위 4(PSMD4/S5a)를 조절할 수 있는지를 확인하였으나, 티오리다진이 처리된 Caki 세포에 발현된 PSMA5 및 PSMD4/S5a은 프로테아좀 활성 증가와 관련이 없었다.
- [0113] 상기 결과로부터 티오리다진은 번역 후 수준에서 단백질분해효소 활성을 유도하여 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 발현 감소를 유도하는 것이 확인되었다.
- [0114] **<실시예 4> Akt 신호 억제와 관련된 티오리다진에 의해 유도되는 트레일 민감성 확인**
- [0115] 티오리다진은 PI3K/Akt 신호 경로 억제를 통하여 항암효과를 나타내는 것으로 보고되어짐에 따라, PI3K/Akt 신호 경로가 티오리다진에 의한 트레일 민감성에도 관여하는지를 확인하기 위하여, PI3K/Akt 신호 경로 억제자인 LY294002 및 웰트만닌(wortmannin)의 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 발현 효과를 확인하였다.
- [0116] Caki 세포에 티오리다진 10 μ M, LY294002 15 μ M 또는 웰트만닌 1 μ M을 각각 처리한 후 각 시간대별 세포를 수집하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0117] 그 결과 도 5A와 같이, LY294002 및 웰트만닌은 티오리다진과 같이 3시간 이내에 Akt 인산화를 유의하게 억제하였으나, LY294002 및 웰트만닌은 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 발현 수준을 감소시키지 못했다.
- [0118] 또한 티오리다진이 LY294002 또는 웰트만닌 보다 높은 트레일 민감성을 나타내는지 확인을 위하여, Caki 세포에 50 ng/ml 트레일을 처리한 후 10 μ M 티오리다진, LY294002 15 μ M 또는 웰트만닌 1 μ M 을 각각 처리 또는 비 처리하여 24시간 후 세포를 수집하고 도 5와 같이 웨스턴 블롯과 세포 사멸 정도를 유세포 분석(FACS)을 통하여 확인하였다.
- [0119] 그 결과 도 5B를 참고하면, 티오리다진을 처리한 Caki 세포군에서 트레일에 의해 유도된 세포사멸 민감도가 뚜렷한 증가를 나타낸 것을 확인할 수 있다.
- [0120] 상기 결과로부터 티오리다진은 LY294002 및 웰트만닌과 다르게 Akt 인산화를 억제할 뿐만 아니라 c-FLIP(L) 및 Mcl-1 발현을 감소시킬 수 있으며, 이를 통하여 더욱 효과적으로 트레일에 의한 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있다.
- [0121] **<실시예 5> 티오리다진에 의한 활성산소종(ROS) 생성 증가 확인**
- [0122] 티오리다진이 활성산소종(ROS) 생산 증가에 영향을 미치는지 확인하기 위해, Caki 세포에 도 6A와 같은 농도의 티오리다진을 30분간 처리하고 H₂DCF-DA 형광 염료로 염색한 후 형광현미경 분석과 유세포 분석(FACS)을 수행하였다.
- [0123] 또한 Caki 세포에 5mM N-아세틸-L-시스테인(NAC), 2mM 글루타티온 에틸 에스터(GEE) 또는 200 μ M 트롤록스(Trolox)를 각각 30분 동안 처리한 후 10 μ M 티오리다진을 24시간 동안 처리하여 세포사멸 정도를 유세포 분석(FACS)을 통한 sub-G1 확인과 PARP, c-FLIP(L), Mcl-1, phospho (p)-Akt 및 액틴의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통하여 확인하였다.
- [0124] 그 결과 도 6A 내지 6B를 참고하면, 티오리다진이 유의하게 세포내 활성산소종(ROS) 수준을 증가시켰으며, 티오리다진과 트레일 병용처리된 세포에 활성산소종 제거제인 N-아세틸-L-시스테인(NAC), 글루타티온 에틸 에스터

(GEE) 또는 트롤록스를 함께 처리한 경우 세포사멸 정도를 나타내는 sub-G1 및 PARP 분열의 증가가 억제되는 것을 확인할 수 있다. 뿐만 아니라, 모든 활성산소종 제거제는 티오리다진과 트레일 병용처리에도 불구하고, c-FLIP(L) 및 McI-1의 감소를 억제하고, Akt 인산화의 억제를 막은 것이 확인되었다.

[0125] 상기 결과로부터 활성산소종(ROS)이 티오리다진에 의한 단백질분해효소 활성 유도와 관련있는지를 확인하기 위해, Caki 세포에 활성산소종 제거제인 5mM N-아세틸-L-시스테인(NAC), 2mM 글루타티온 에틸 에스터(GEE) 또는 200 μ M 트롤록스(Trolox)를 각각 30분 동안 처리한 후 10 μ M 티오리다진을 24시간 동안 병용처리하고 세포를 용해시켜 단백질분해효소 활성을 확인하였다.

[0126] 그 결과 도 6C와 같이, 단백질분해효소 활성이 활성산소종 억제제에 의해 50% 이상 유의하게 감소하였다.

[0127] 상기 결과들로부터 티오리다진은 활성산소종에 의해 유도되는 단백질분해효소 활성 증가를 통하여 c-FLIP(L) 및 McI-1의 발현 감소를 유도하는 것이 확인되었다.

[0128] 이하, 본 발명의 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0129] <제제예 1> 주사제의 제조

[0130] 트레일 3.5 mg, 티오리다진 4 mg, 소듐 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2mL이 되도록 제조한 후, 2mL용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0131] <제제예 2> 정제의 제조

[0132] 트레일 3.5 mg, 티오리다진 4 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

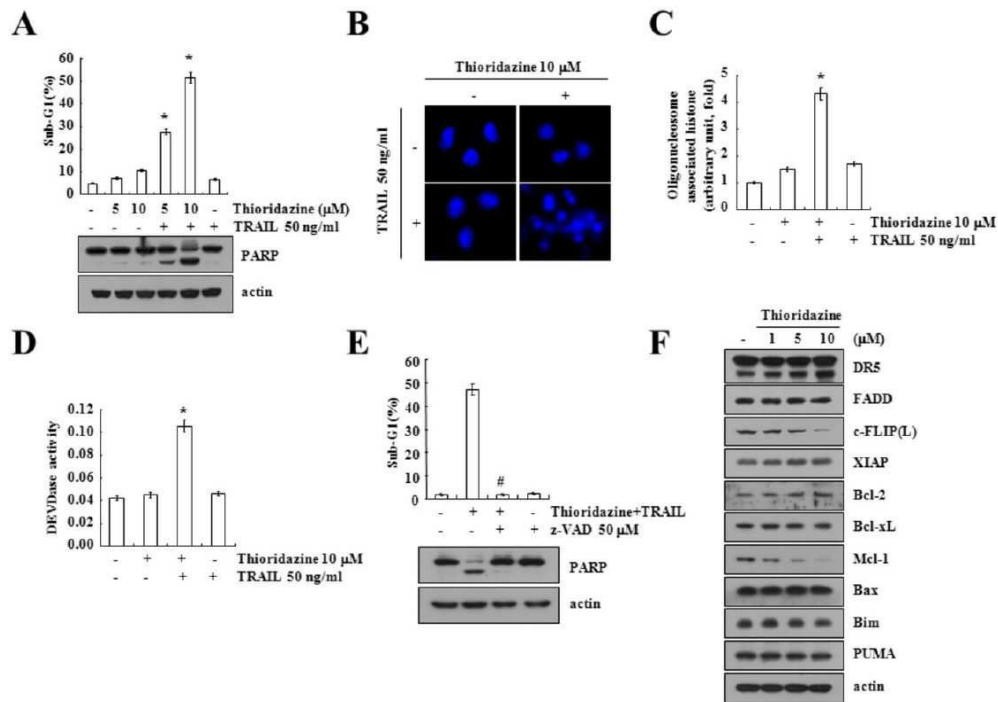
[0133] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0134] 트레일 3.5 mg, 티오리다진 4 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

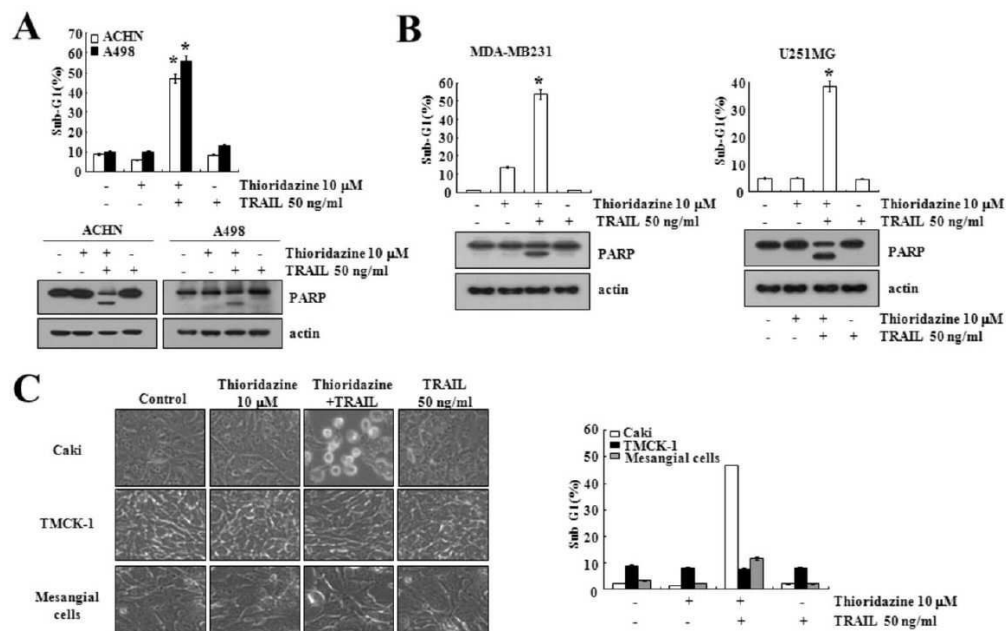
[0135] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

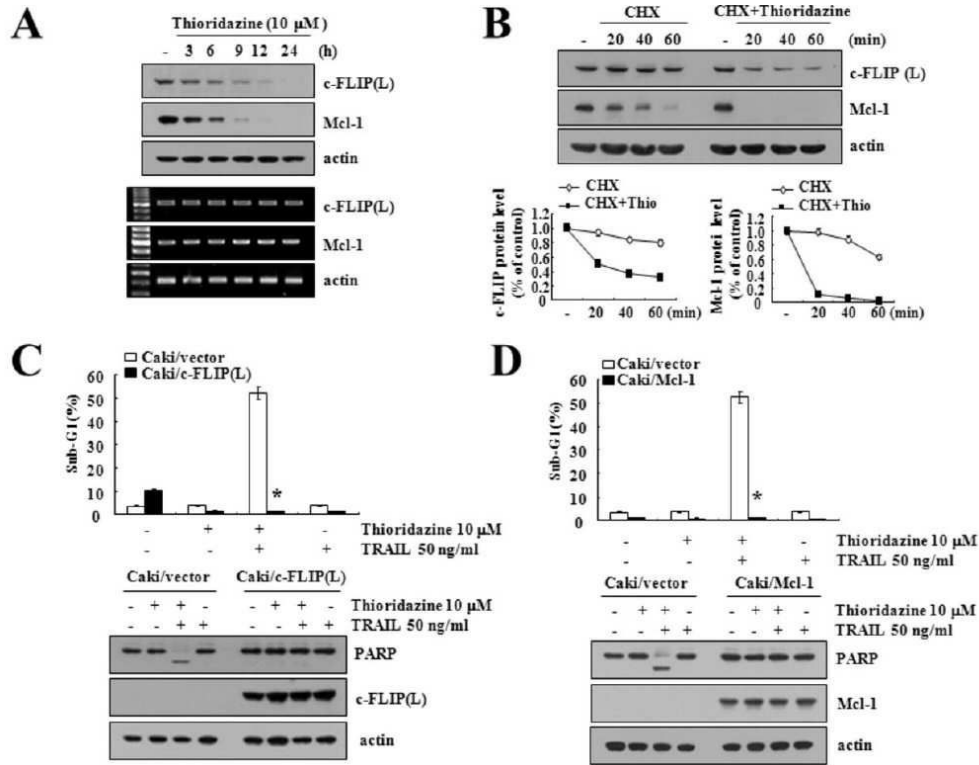
도면1



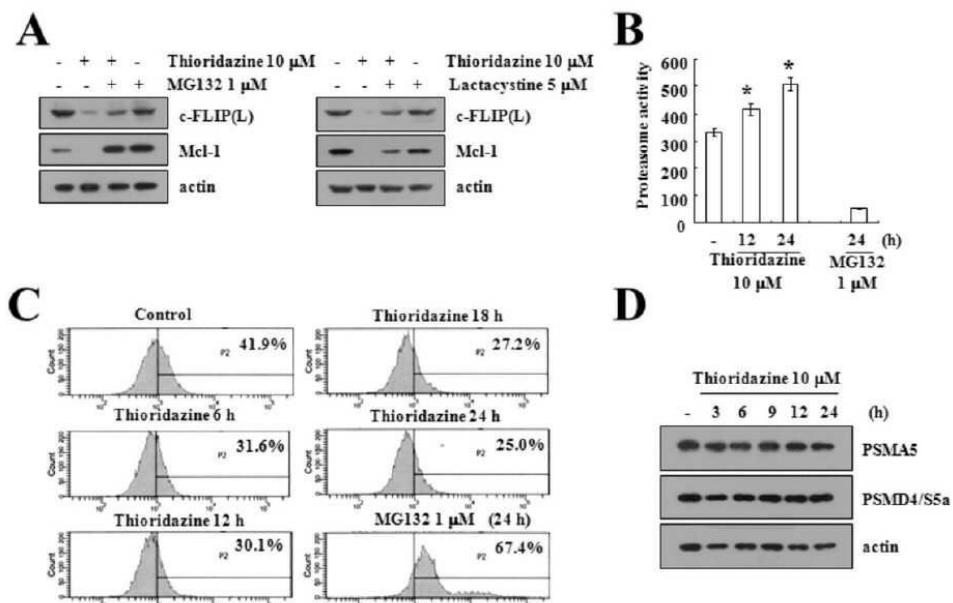
도면2



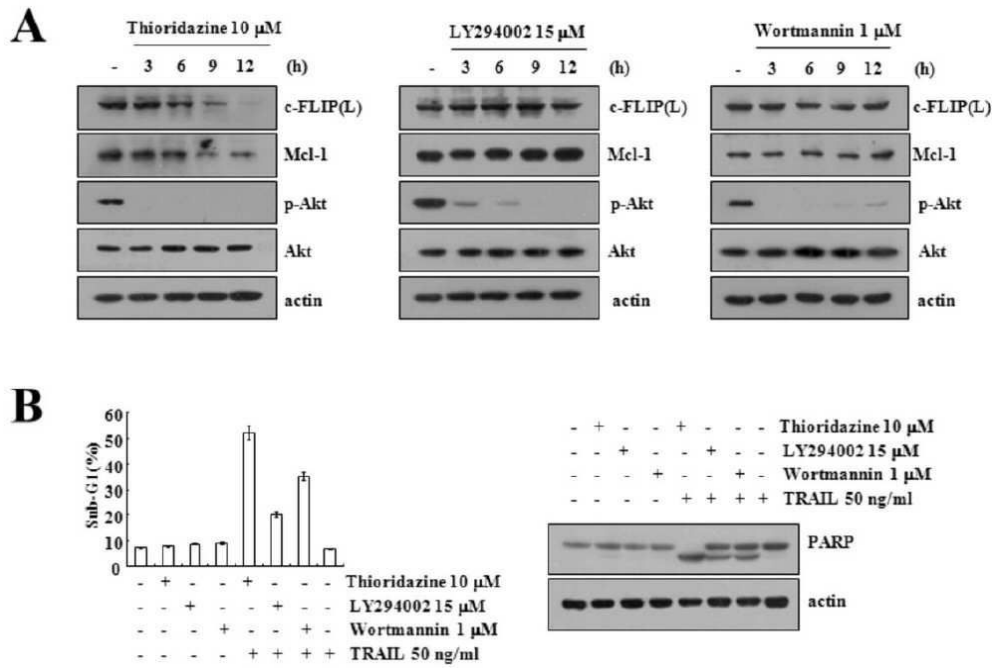
도면3



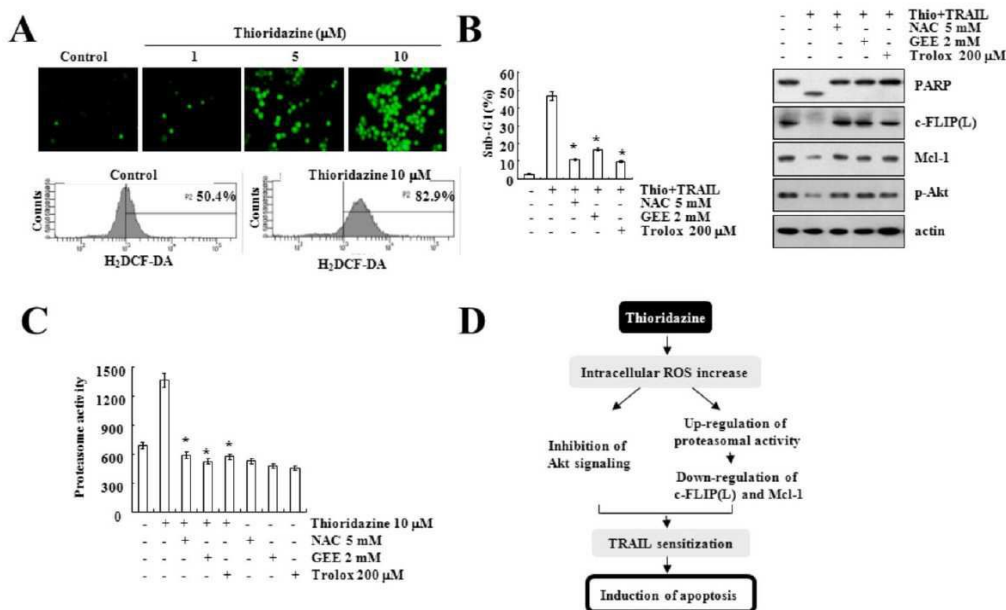
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating cancer comprising thioridazine and trail
- <130> ADP-2014-0006
- <160> 6

<170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PRIMER
 <400> 1
 cggactatag agtgctgatg g 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PRIMER
 <400> 2
 gattatcagg cagattccta g 21
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PRIMER
 <400> 3
 gcgactggca aagcttggcc tcaa 24
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PRIMER
 <400> 4
 gttacagctt ggatccaac tgca 24
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223>	PRIMER	
<400>	5	
ggcatcgta ccaactggga c		21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PRIMER	
<400>	6	
cgatttcccg ctcggccgtg g		21