(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0048823
(43) 공개일자 2023년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4709 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4709 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0131698
(22) 출원일자 2021년10월05일
심사청구일자 2021년10월05일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
신동명
서울특별시 강동구 고덕로 131, 105동 2904호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
김용환
서울특별시 강동구 올림픽로81길 5(천호동, 현임빌라)
(74) 대리인
특허법인태백

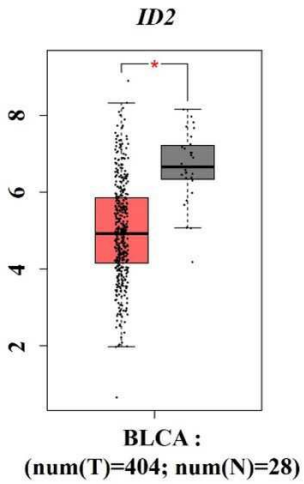
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **CDK 억제제 및 ID2 활성화제를 포함하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CDK 억제제 및 ID2 활성화제를 포함하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 방광암 세포에서 요로상피 분화와 관련된 CDK1-TFCP2L1 경로 표적 중에서 ID2가 방광암의 종양 등급과 유의미한 관계가 있는 인자임을 확인하고, ID2 활성화제가 방광암의 치료 효과를 나타내는 것을 확인하고, CDK1 억제제와 ID2 활성화제를 병용 투여하는 경우 각각 단독 투여하는 경우에 비해 방광암의 세포자살을 유도하고 암세포의 침윤능이 현저히 억제되는 것을 확인하여 방광암의 크기 및 진행이 현저하게 억제되는 치료 효과가 나타나는 것을 확인함으로써, CDK 억제제 및 ID2 활성화제를 포함하는 조성물 및 병용투여 방법은 방광암의 예방 또는 치료를 위한 새로운 치료 수단으로 제공으로 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133170
과제번호	2021R1A2C2005790
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	TFCP2L1 전사 인자 아세틸화 기반 전분화능 줄기세포와 방광암 세포의 줄기세포성 조절 기전 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및

ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CDK 억제제는 RO-3306, BEY-11707, ON-01500, R547, 옥사메이트 나트륨 (Sodium oxamate), 디나시클립(Dinaciclib, SCH727965), BMS-265246, AZD5438, SU9516, 리비시클립 염산염(Riviciclib hydrochloride, P276-00), AT7519, 및 NU6027로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ID2 활성화제는 아피제닌(apigenin), 이소리퀴리티제닌 (isoliquiritigenin), 4-하이드록시칼콘(4-hydroxychalcone), 디오스메틴(diosmetin), 비오카닌 A(biochanin A), 및 루테올린(luteolin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및

ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 혼합된 형태로 제제화되어 투여되거나, 각각 제제화되어 동시적 또는 순차적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 CDK 억제제의 투여 용량은 1 mg/kg 내지 10 mg/kg이고, ID2 활성화제의 투여 용량은 5 mg/kg 내지 150 mg/kg인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 CDK 억제제는 RO-3306, BEY-11707, ON-01500, R547, 옥사메이트 나트륨 (Sodium oxamate), 디나시클립(Dinaciclib, SCH727965), BMS-265246, AZD5438, SU9516, 리비시클립 염산염(Riviciclib hydrochloride, P276-00), AT7519, 및 NU6027로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 ID2 활성화제는 아피제닌(apigenin), 이소리퀴리티제닌 (isoliquiritigenin), 4-하이드록시칼콘(4-hydroxychalcone), 디오스메틴(diosmetin), 비오카닌 A(biochanin A), 및 루테올린(luteolin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CDK 억제제 및 ID2 활성화제를 포함하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방광암(bladder cancer, BC)은 전 세계적으로 10번째로 흔한 암이며, 2020년에는 약 573,278명의 새로운 방광암 환자가 발생하고, 212,536명 이상의 환자가 사망할 정도로 발병률 및 사망률이 높은 질환이다. 방광암은 높은 비율로 체세포 돌연변이를 특징으로 하며, 임상 및 병리학적 이질성을 나타낸다.

[0003] 방광암은 침윤정도에 따라 크게 비침윤성(non-muscle invasive) 방광암과 침윤성(invasive) 방광암으로 구분된다. 비침윤성 방광암은 암이 근육층의 침범 없이 점막에 국한된 병변으로써 경요도 방광절제술(transurethral resection of bladder tumor) 시행 후 위험 인자 유무에 따라 방광내 항암제 또는 BCG를 주입함으로써 비교적 간단하게 치료가 가능하나, 암의 재발과 침윤성 암으로의 진행이 문제가 된다. 한편, 침윤성 방광암은 암이 근육층까지 침투한 상태를 말하는 것으로서, 이의 치료를 위하여는 근치적 방광적출술과 함께 복잡한 요로전환(urinary diversion)을 수행하여야 할 뿐 아니라, 환자에게 치명적인 결과를 초래할 수도 있다. 따라서, 일차치료 후 재발과 진행에 대한 예측과 조기발견 및 예방이 매우 중요하다.

[0004] 방광암의 진단 및 치료를 위한 다양한 방법들이 개발되고 있음에도 불구하고, 현재까지 임상에서 사용되는 치료방법으로는 수술, 화학요법 약물(메토트렉세이트, 빈크리스틴, 독소루비신, 시스플라틴 및 시토신) 및 생물학적 치료법(Bacillus Calmette-Guerin, 면역 및 비활성화 박테리아 용액)이 사용되고 있으나, 방광암의 재발 및 사망률이 높을 뿐만 아니라, 고비용에 심각한 부작용 및 다양한 합병증에 의해 치료 방법으로 제한되고 있는 상태이다. 따라서, 이러한 잦은 재발과 병기의 진행은 방광암에서 자주 제기되는 문제점이며 방광암의 재발 및 침윤성으로 진행되는 것을 효과적으로 예측할 수 있는 지표의 발견이나 치료법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2014-0022293호 (2014. 02. 24. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 방광암에서 유효한 새로운 치료 표적을 발굴하기 위해 방광암에 주요 인자를 선별하고, 선별된 인자가 방광암의 치료 효과를 나타내는지 평가하여 치료 효과를 극대화할 수 있는 방광암의 예방 또는 치료방법을 새롭게 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 방광암 세포에서 요로상피 분화와 관련된 CDK1-TFCP2L1 경로 표적 중에서 ID2가 방광암의 종양 등급과 유의미한 관계가 있는 인자임을 확인하고, ID2 활성화제가 방광암의 치료 효과를 나타내는 것을 확인하고, CDK1 억제제와 ID2 활성화제를 병용 투여하는 경우 각각 단독 투여하는 경우에 비해 방광암의 세포자살을 유도하고 암세포의 침윤능이 현저히 억제되는 것을 확인하여 방광암의 크기 및 진행이 현저하게 억제되는 치료효과가 나타나는 것을 확인함으로써, CDK 억제제 및 ID2 활성화제를 포함하는 조성물 및 병용투여 방법은 방광암의 예방 또는 치료를 위한 새로운 치료 수단으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 방광암의 치료 표적으로 ID2의 발현 수준과 방광암에서의 관련성을 TCGA 데이터 세트로 분석한 결과이다. 빨간 박스는 Tumor(T)이고, 회색 박스는 정상(N)이다.

도 2는 방광암의 등급에 따라 ID2의 발현 수준의 관련성을 TCGA 데이터 세트로 분석한 결과이다.

도 3은 방광암의 pT 범주에 따라 ID2의 발현 수준의 관련성을 TCGA 데이터 세트로 분석한 결과이다.

도 4는 방광암 세포주인 5637, HT1197, HT1376, 및 RT4 세포주에서 ID2, TFCP2L1 및 CDK1의 발현 수준을 평가한 결과이다.

도 5는 방광암 세포주인 HT1197 및 HT1376 세포주에서 TFCP2L1이 ID2의 전사에 영향을 주는 지 염색질 면역 침전(ChIP) 분석으로 평가한 결과이다.

도 6은 방광암 세포주인 HT1197 및 HT1376 세포주에서 TFCP2L1의 결실이 ID2의 발현에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 7은 TFCP2L1 및 ID2의 발현이 방광암 세포주에서 세포 증식에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 8은 TFCP2L1 및 ID2의 발현이 방광암 세포주에서 종양구 형성에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 9는 TFCP2L1 및 ID2의 발현이 방광암 세포주에서 클론 생성에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 10은 TFCP2L1 및 ID2의 발현이 방광암 세포주에서 침윤능에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 11은 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin)이 방광암 세포주에서 세포 성장에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 12는 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin)이 방광암 세포주에서 카스파제-3 및 폴리-(ADP-리보스) 폴리머라제(PARP)에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 13은 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin)이 방광암 세포주에서 세포자살 활성화에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 14는 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin)이 방광암 세포주에서 종양구 형성 능력 및 침윤능에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 15는 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin) 및 CDK1 억제제인 RO-3306의 투여가 방광암에 미치는 영향을 평가하기 위해 방광암이 유도된 동소 이종이식 동물모델에 아피제닌(apigenin) 및 RO-3306의 투여 방법을 나타내는 그림이다.

도 16은 방광암 동물 모델에서 아피제닌(apigenin) 투여에 따른 종양의 크기 변화를 평가한 결과이다.

도 17은 방광암 동물 모델에서 아피제닌(apigenin) 투여에 따른 종양의 등급 변화를 평가한 조직학 검사 결과이다.

도 18은 방광암의 치료 표적으로 CDK1의 발현 수준과 방광암에서의 관련성을 TCGA 데이터 세트로 분석한 결과이다. 빨간 박스는 Tumor(T)이고, 회색 박스는 정상(N)이다.

도 19는 방광암의 등급에 따라 CDK1의 발현 수준의 관련성을 TCGA 데이터 세트로 분석한 결과이다.

도 20은 CDK1 및 ID2 발현의 관련성을 TCGA 데이터 세트로 분석한 결과이다.

도 21은 방광암의 pT 범주에 따라 CDK1 및 ID2 발현의 관련성을 평가한 결과이다.

도 22는 방광암 세포주에서 아피제닌(apigenin) 및 RO-3306의 처리에 따른 ID2 발현에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 23은 방광암 세포주에서 아피제닌(apigenin) 및 RO-3306의 처리에 따른 방광암 세포의 성장과 세포 사멸에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 24는 방광암이 유도된 동소 이종이식 동물모델에서 아피제닌(apigenin) 및 RO-3306의 투여에 따른 종양의 크기 변화를 평가한 결과이다.

도 25는 방광암이 유도된 동소 이종이식 동물모델에서 아피제닌(apigenin) 및 RO-3306의 투여에 따른 종양의 등

급 변화를 평가한 조직학 검사 결과이다.

도 26은 방광암이 유도된 동소 이종이식 동물모델에서 아피제닌(apigenin) 및 RO-3306의 투여에 따른 ID2, CDK1 및 TFCP2L1 단백질 발현에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0012] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0013] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 CDK 억제제는 RO-3306, BEY-11707, ON-01500, R547, 옥사메이트 나트륨 (Sodium oxamate), 디나시클립 (Dinaciclib), BMS-265246, AZD5438, SU9516, 리비시클립 염산염(Riviciclib hydrochloride, P276-00), AT7519, NU6027 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 상기 ID2 활성화제는 아피제닌(apigenin), 이소리퀴리티제닌 (isoliquiritigenin), 4-하이드록시칼콘(4-hydroxychalcone), 디오스메틴(diosmetin), 비오카닌 A(biochanin A), 루테올린(luteolin) 등이 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 의미하고, 약학적으로 허용 가능한 염은 의약업계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 포타슘, 소듐 또는 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산 또는 황산 등으로 제조된 무기산염; 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만델산, 프로피온산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산 또는, 바닐릭산 등으로 제조된 유기산염; 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 또는 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염; 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염; 또는 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0020] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있

다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0022] 상기 약학적 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제 (troches), 로젠지 (lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000 mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0026] 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 방광암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 혼합된 형태로 제제화되어 투여되거나, 각각 제제화되어 동시적 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0029] 상기 CDK 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 ID2 활성화제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 중량비는 1 : 10 내지 1 : 15로 투여될 수 있으며, 구체적으로 CDK 억제제는 1 mg/kg 내지 10 mg/kg으로 복강 내 주사 투여될 수 있고, 보다 구체적으로 CDK 억제제인 RO-3306은 4 mg/kg으로 투여될 수 있으며, ID2 활성화제는 5 mg/kg 내지 150 mg/kg으로 복강 내 주사 투여될 수 있고 보다 구체적으로 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin)은 50 mg/kg으로 투여될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] **<실험예> 실험 재료 및 방법**

[0032] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0033] 1. 방광암(BC) 환자에 대한 임상 코호트 분석

[0034] The Cancer Genome Atlas(TCGA; https://cancergenome.nih.gov)에서 방광암(bladder cancer, BC) 환자에 대한

2개의 독립적인 임상 코호트를 사용하였다. 첫 번째 코호트는 131명의 고위험 근육 침윤성 방광암(muscle-invasive bladder carcinomas, MIBC) 환자에 관한 것이고, 두 번째는 412명의 MIBC 환자에 대한 다중 플랫폼 분석에 관한 것이다. 생존율, 종양 단계 및 등급을 포함한 임상 병리학적 특징, 유전자 발현 데이터 세트는 UCSC Xenia 프로젝트 (http://xena.ucsc.edu/)에서 얻었다. Gene Expression Profiling Interactive Analysis(GEPIA; http://gepia.cancerpku.cn/index.html)를 사용하여 종양/비종양 차등 발현 및 쌍별 상관 유전자 발현 결과를 분석하였고, 이는 TCGA 및 Genotype Tissue Expression(GTEx; https://www.gtexportal.org/) 데이터 세트를 기반으로 빠르고 사용자 정의 가능한 기능을 제공하는 대화형 웹 기반 도구이다. BC 환자에 대한 두 번째 TCGA 연구에서 Prism 7.0을 사용하여 ID 계열 유전자의 높은(빨간색) 및 낮은(검은색) 발현 수준을 기반으로 한 Kaplan-Meier 생존 분석을 수행하였다. 이 TCGA 코호트의 유전자 발현 데이터세트를 종양 단계 및 등급에 기반한 차등 또는 짝 유전자 발현 분석에 사용하였다.

[0035] 2. 세포 배양

[0036] 인간 BC 세포주 T24, 5637, HT1197, HT1376 및 RT4는 10% 열-비활성화 FBS(Hyclone, Pittsburgh, PA, USA) 및 페니실린/스트렙토마이신(Cellgro, Pittsburgh, PA, USA)을 함유하는 Eagle's Minimum Essential(HT1197 및 HT1376용), McCoy's 5a Medium Modified(T24 및 RT4용) 및 RPMI-1640(ATCC37용) 배지(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 배양되었다. 40 μM의 Apigenin(Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)과 20 μM RO-3306(Sigma-Aldrich)을 24시간 동안 처리하여 ID2 발현을 활성화하고 CDK1의 활성을 억제시켰다.

[0037] 3. 이소성 발현 및 유전자 침묵

[0038] 타겟 유전자의 이소성 발현 또는 침묵을 유도하기 위해, 상응하는 ORF(open reading frame) 또는 특정 shRNA construct를 각각 pLEX307 (Addgene, plasmid #41392) 및 pLenti6/Block-iT lentivrial vector (Invitrogen, Waltham, MA, USA)에 클로닝 하였다. 인간 ID2 ORF의 경우, pDONR223_ID2_WT_V5는 Jesse Boehm & Matthew Meyerson & David Root (Addgene plasmid # 82960)로 사용하였다. 렌티바이러스(Lentivirus)는 4개의 플라스미드 형질감염 시스템(Invitrogen)을 사용하여 생산하고, Lenti-X Concentrator kit (Clontech, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 농축하였다. 렌티 바이러스 감염 후 4일 째에 유전자 발현 및 기능적 분석을 수행하였다. 각 shRNA의 각 ORF 및 표적 서열의 정보는 하기 표 1 및 2와 같다.

표 1

[0039]

ORF constructs	Source	Identifier
pBluescriptR_human *TFCP2L1*	Dharmacon	MHS6278-202806269
pDONR223 human *ID2*	Addgene	82960

표 2

[0040]

Oligonucleotides (shRNA)	염기서열
human TFCP2L1	GCTCTTCAACGCCATCAAAGG

[0041] 4. 염색질 면역 침전(ChIP) 분석 및 유전자 발현 분석

[0042] pCMV_3Tag-1 vector (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA)에 클로닝된 인간 TFCP2L1 ORF을 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 HT1197 및 HT1376 BC 세포를 형질감염하였다. 형질감염 24 시간 후, 표준 설정(얼음에서 30초 휴식 간격이 있는 4번의 20초 펄스 조건)으로 Bioruptor Plus sonication device (Diagenode Inc., Denville, NJ, USA)을 사용하여 세포 추출물(1 X 10^7 세포)에서 분리된 가교 염색질을 절단하였다. ChIP 분석은 Magna ChIP G 키트(Millipore, Billerica, MA, USAA)를 사용하여 수행되었다.

[0043] 실시간 정량 PCR(Real-time quantification PCR)를 사용하여 유전자 발현의 정량 분석을 수행하였다. QIAGEN RNeasy RNA 분리 키트(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 총 RNA를 추출하고, Taqman Reverse Transcription Reagents(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 50 ng 총 RNA를 역전사하였다. 역치 주기(Ct)는 2-DDCt 방법을 사용하여 표적 유전자의 상대 발현 수준을 결정하는 데 사용되었다. GAPDH의 발현을 내인성 대조군 유전자로 사용되었다. ChIP 및 유전자 발현 분석에 사용된 프라이머는 하기 표 3 및 4와 같다.

표 3

[0044]

Oligonucleodes (qPCR)	Forward primer	Reverse primer
human *TFCP2L1*	GCTCTTCAACGCCATCAAA	CAGGGGCACTCGATTCTG
human *ID2*	CAGCATCCCCCAGAACAAGAA	CGATCTGCAGGTCCAAGATGT

표 4

[0045]

Oligonucleodes (qChIP)	Forward primer	Reverse primer
human *ID2_#1*	CTCCGATGGGTTGCAGTGAA	CGGCAGCTCTAAAATCACAGCTA
human *ID2_#2*	TGCAGCACGTCATCGACTACAT	CTGGTGATGCAGGCTGACAA

[0046] 5. 웨스턴 블롯 분석

[0047] 세포 추출물(30 ug)을 프로테아제 및 포스파타제 억제제 칵테일(Roche, Indianapolis, IN, USA)이 보충된 RIPA 용해 완충액(Santa Cruz Biotechnology)으로 제조하고, 12% SDS-PAGE 겔에서 분리하였다. 표시된 단백질의 발현 수준은 다음 항체로 프로빙하여 평가하였다: ID2(NBP-88630; Novusbio, Centennial, CO, USA), TFCP2L1(OAAB09732; Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA), CDK1(sc-54; Santa Cruz), PARP(9542; Cell Signaling), Cleaved Caspase-3(9661; Cell Signaling), b-ACTIN(A5441; Sigma-Aldrich) 및 Flag-epitope (F3165; Sigma-Aldrich).

[0048] 6. 면역 세포 화학(Immunocytochemistry) 분석

[0049] 면역세포화학을 위해, 4% 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich)로 고정된 인간 BC 세포를 ID2(NBP-88630; Novusbio) 또는 TFCP2L1(OAAB09732; Aviva Systems Biology)에 특이적인 항체로 염색하고, Alexa 488-접합된 항-토끼 항체(A11008, Molecular Probes, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 시각화 하였다. 염색된 샘플은 도립 형광 현미경(EVOS® FL Color Imaging System, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 사진 찍었다.

[0050] 7. 세포 증식 및 세포자살(apoptosis) 분석

[0051] 세포 증식 능력은 MTT 분석(Sigma-Aldrich)에 의해 결정되었다. 세포자살(Apoptotic)은 annexin-V fluorescein isothiocyanate (FITC) /propidium iodide (PI) 분석에 의해 분석되었다. 세포를 트립신화하여 수확하고, PBS로 세척한 후, 아넥신-V 결합 완충액(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl2)에 재현탁하여 아넥신-V FITC 및 PI로 표지하였다. FITC- 및/또는 PI-표지된 세포 집단을 유세포 분석기(BeckmanCoulter, Brea, CA, USA)에서 정량화 하였다.

[0052] 8. 종양구(Tumor sphere) 형성 및 제한 희석(limiting dilution) 분석

[0053] 종양구(tumor sphere)를 형성하기 위해, BC 세포를 무혈청 각질형성세포 성장 배지(Gibco, Waltham, MA, USA)와 성장 인자 감소 Matrigel(BD Biosciences, Mountain View, CA, USA)을 1:1 비율로 혼합한 단일 세포 현탁액에 재현탁하고, Ultra Low Attachment plates (Costar, Corning, NY, USA)에 배양하였다. 종양구의 크기는 첫 배양 후 7일 동안 측정되었다. 정량 분석을 위해, Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 각 그룹에서 무작위로 선택된 8개의 대표 영역에서 종양구의 둘레를 측정하였다.

[0054] 제한 희석 분석을 위해 BC 세포를 웰당 1개 세포 밀도로 희석하고, 50 uL의 배양 배지에서 배양하였다. 2일 마다 새로운 배지를 첨가하여 도말한 세포를 10일까지 배양하고, 정량 분석을 위해 콜로니 수를 계산하였다.

[0055] 9. in vitro 세포 침윤능 분석

[0056] 8.0 um 기공 폴리카보네이트 막 필터가 있는 Transwell 투과성 지지체(Corning Inc, Corning, NY, USA)의 상부 챔버를 1:5 비율로 희석된 Matrigel(BD Biosciences)로 코팅하였다. 100 uL 무혈청 DMEM에서 BC 세포를 2 x 10^4 세포/웰 농도로 상부 챔버에 로딩하고, 3% FBS를 함유하는 배양 배지를 하부 챔버에 채웠다. 세포 침윤능은 세포를 5% CO_2 배양기에서 37℃에서 24 시간 동안 배양한 후, 만의 아래쪽으로 이동한 세포의 수를 계수하여 평가

하였다. 각 Transwell 챔버에서 무작위로 3개의 시야(배율, X 200)를 선택하여 정량 분석하였다.

[0057] 10. BC 세포의 동소 이식(Orthotopic implantation)(이종이식 xenograft)

[0058] 본 실험에 수행된 모든 동물 실험은 울산대학교 의과대학 기관동물 관리위원회(IACUC-2020-12-209)의 승인을 받고 수행되었다. 8 주령 수컷 NOD/ShiLtJ-*Prkdc*^{em1AMC} *Il2rg*^{em1AMC} (NSGA) 마우스는 GEM Biosciences Inc.(한국 청주)에서 구입하였다. 서울 아산병원 동물실험실에서 1주일 동안 적응된 마우스에 500 um 주사기와 26 게이지 바늘을 사용하여 방광의 전벽과 돔의 외층에 1.0×10^6 HT1376 BC 세포를 100 ul 만큼 주사하였다. BC 세포의 동소 이식 3주 후부터 마우스에 RO-3306(4 mg/kg) 및 아피제닌(apigenin)(50 mg/kg)의 단독 또는 조합을 4일 간격으로 6회 동안 복강내 주사하였다. BC 세포의 초기 투여 후 45일 동안 2일 마다 마우스 및 주사 부위를 모니터링 하였다. 종점에서 종양 크기를 측정하고, 조직학적 검사 또는 면역형광 염색 분석을 수행하기 위해 종양 부위를 절개하여 회수하였다. 마우스를 무작위로 처리군에 배정하고(N=5 또는 10), 세포 이식, 처리, 평가 및 일일 검사의 순서를 무작위로 지정하였다. 종양 크기 측정 및 조직학적 평가와 관련된 조사는 치료 그룹에 대한 블라인드 테스트로 진행되었다.

[0059] 11. 조직학적 검사

[0060] 조직학적 분석을 위해, 이종이식 마우스의 방광을 1일 동안 4% 파라포름알데하이드로 고정하였다. 30% 자당에서 24 시간 동안 동결 보호한 후, 각 방광을 cryostat(Leica, Lussloch, Germany)를 사용하여 20 um 절편으로 절단하고, hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다. 면역형광(IF) 염색을 위해, 방광을 ID2(NBP-88630; Novusbio), TFCP2L1(OAAB09732; Aviva Systems Biology), CDK1(ab131450; Abcam, Cambridge, MA, USA), CD44(ab78960; Abcam) 및 Cytokeratin 14(KRT14; Ab7800)에 특이적인 항체로 염색하였다. Alexa Fluor 488-conjugated(A11001 및 A11008) 항-마우스 및 항-토끼 항체 또는 Alexa Fluor 546-conjugated 항-토끼 항체(A11010)를 이차 항체(Molecular Probes)로 사용하였다. 핵은 4',6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI; D9542; Sigma-Aldrich)로 대조염색 하였다. 슬라이드당 3개의 대표적인 영역을 무작위로 선택하였다. 염색된 샘플은 도립 형광 현미경(EVOS® FL Color Imaging System, Life Technologies)을 사용하여 사진 촬영하였다.

[0061] 12. 통계

[0062] 정량적 결과는 비모수 Mann-Whitney 테스트 또는 Bonferroni 사후 테스트와 함께 일원 또는 양방향 ANOVA를 사용하여 통계적으로 분석되었다. 모든 분석은 GraphPad Prism 7.0 소프트웨어(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 수행되었으며 $p<0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0063] **실시예 1. 방광암(BC) 세포에서 치료 표적 선별**

[0064] TFCP2L1의 침묵 또는 Thr177 인산화 null 돌연변이를 포함하는 TFCP2L1의 이소성 발현이 요로상피 분화(urothelial differentiation)를 자극하는 BMP, GATA 및 ID 패밀리를 포함하는 분화 유전자의 발현을 유도하는 것이 보고된 바 있다. 또한, 저용량 FK506에 의한 BMP 경로의 약리학적 활성화는 초기 진단시 비침윤성 요로상피암을 나타내는 환자의 70-80%에서 진행을 억제하는 데에 효과적인 것으로 보고되었다. 상기의 보고를 통해 방광암(BC)에서 ID 유전자가 임상적으로 중요한 인자일 가능성이 제시되고 있다.

[0065] ID 패밀리들 중에서 방광암의 주요 인자를 발굴하기 위해, GEPIA 및 UCSC Xena 프로젝트(http://xena.ucsc.edu/) 웹 서버를 사용하여 BC 환자의 TCGA 데이터 세트를 분석한 결과, ID 패밀리들 중에서 ID2의 발현이 정상 요로상피보다 방광암에서 높은 것으로 나타났다(도 1). 또한, TCGA 데이터 세트의 BC 환자에 대해서 ID2의 발현 수준에 따른 종양 등급을 비교한 결과, 종양 등급이 높을 수록 ID2의 발현이 억제되는 경향을 나타냈다(도 2). 특히, ID2 전사체는 방광의 근육 침범을 나타내는 pT 범주 종양 병기에서 근육 침범이 관찰되는 pT2 이상의 방광암 환자에서 유의하게 감소하는 경향을 나타냈다(도 3). 상기 결과는 방광암에서 요로상피 분화와 관련된 CDK1-TFCP2L1 경로 표적 중 ID2이 주요 인자라는 것을 입증한다.

[0066] **실시예 2. 방광암(BC) 세포에서 치료 타겟으로서 ID2 평가**

[0067] 다른 분자 분류 기능을 가진 BC 세포에서 ID2 및 TFCP2L1의 내인성 발현 수준을 근육 침윤성 BC(MIBC)의 기저 유사 하위 유형(5637 및 HT1197), 관강 유사 하위 유형(HT1376), 혼합 하위 유형(T24 및 UMUC3) 및 비근육 침윤성 BC의 모델인 RT4 세포주를 포함한 다양한 분자 분류 특징과 비교하였다. 대부분의 BC 세포주에서 ID2 및 TFCP2L1 전사체의 수준은 상반되는 경향을 나타내고, 이들의 상호 발현 수준을 웨스턴 블롯 및 면역형광 염색 분석으로 분석한 결과, 단백질 수준에서 눈에 띄게 상반되는 경향을 나타내는 것을 확인하였다(도 4). 특히,

ID2 단백질은 TFCP2L1 단백질 함량이 가장 높은 HT1197 및 HT1367 BC 세포주에서 거의 검출되지 않았다.

[0068] TFCP2L1이 ID2의 전사를 직접 억제하는지 확인하기 위해, Flag-tagged TFCP2L1(Flag-TFCP2L1) 단백질을 포함하는 HT1197 및 HT1367 BC 세포에서 염색질 면역 침전(ChIP) 분석을 수행하였다. ChIP-qPCR 분석 결과, BC 세포주에서 TFCP2L1이 ID2 유전자좌의 프로모터에 결합하는 것이 확인되었다(도 5). 또한, ID2의 발현이 TFCP2L1의 침묵에 의해 억제(도 6)는 것을 확인함에 따라, 상기 결과들은 ID2가 BC 세포에서 TFCP2L1의 직접적인 억제 표적임을 입증한다.

[0069] ID2가 CDK1-TFCP2L1 경로에 의한 BC 세포의 세포 증식 및 줄기세포 특성에 영향을 미치는지 여부를 평가하였다. HT1376 및 HT1197 BC 세포에서 ID2의 발현 강화는 TFCP2L1 과발현에 의한 세포 증식의 자극을 억제하는 것으로 나타났다(도 7). BC 세포의 줄기세포적 특성을 종양구 및 클론 생성능으로 조사한 결과, TFCP2L1 과발현에 의해 증가된 종양구 형성은 ID2의 발현 강화로 억제되는 것으로 나타났다(도 8). TFCP2L1 유도 셀프-재생 활성에 대한 ID2의 부정적 결과는 클론 생성 제한 휘석 분석에서 관찰되었다(도 9). 또한, 트랜스-웰 챔버 분석은 TFCP2L1 과발현이 있는 HT1376 및 HT1197 BC 세포가 대조군 세포에 비해 침윤능이 높게 나타났으나, ID2가 자극된 경우 침윤능이 손상되는 것으로 나타났다(도 10). 상기 결과는 ID2가 BC 세포의 줄기세포 특성 및 침윤능을 조절하기 위한 TFCP2L1을 억제시키는 표적 인자임을 입증한다.

[0070] **실시예 3. ID2 활성화에 따른 방광암(BC)의 치료능 평가**

[0071] ID2 활성화가 방광암의 치료 표적이 될 수 있는지를 검증하기 위해, BMP 신호전달 및 ID2 유도를 활성화하는 무독성 식이 플라보노이드인 아피제닌(apigenin)을 BC 세포에 처리하여 세포 성장, 세포 사멸 정도, 세포의 침윤능의 변화가 나타나는지 평가하였다. 아피제닌의 처리 용량이 증가함에 따라 BC 세포의 성장이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(도 11). 또한, BC 세포에 아피제닌 활성화제를 처리하자 카스파제-3 및 폴리-(ADP-리보스) 폴리머라제(PARP)가 절단되는 것으로 나타났다(도 12). 시간 의존적 방식으로 아피제닌을 처리한 결과 BC 세포의 세포자살이 활성화되는 것으로 나타났다(도 13). 또한, 아피제닌은 BC 세포의 종양구 형성 능력 및 침윤능을 현저하게 억제시키는 것으로 나타났다(도 14). 상기 결과는 ID2 활성화제인 아피제닌이 방광암의 새로운 치료제가 될 수 있음을 입증한다.

[0072] 방광암에 대한 아피제닌(apigenin)의 치료 효과가 in vivo에서도 나타나는지 평가하기 위해, HT1376 세포가 NSG 면역 결핍 마우스의 방광 외층에 이식된 동소 이종이식 BC 동물 모델에 아피제닌(apigenin)을 투여하여 치료 효과가 나타나는지 평가하였다. 아피제닌(apigenin)은 동물 모델에 4일 간격으로 6회 복강 주사하였다(도 15). 아피제닌(apigenin)을 투여한 그룹에서 종양의 성장이 74±6.13% 억제되는 것으로 나타났다(도 16). 또한, 조직학 검사에서 종양의 등급에 관계없이 아피제닌(apigenin)의 방광암 치료 효과가 나타나는 것을 확인하였다(도 17). 상기 결과는 ID2 활성화제인 아피제닌(apigenin)이 방광암에서 단독으로도 항종양 효과를 나타내는 것을 입증한다.

[0073] **실시예 4. 방광암(BC)에서 CDK1 및 ID2의 상호 발현의 중요성 평가**

[0074] TFCP2L1의 상위 활성화제인 CDK1의 발현 여부가 아피제닌의 항종양 효과에 미치는 영향을 평가하였다. TCGA 코호트에서 CDK1의 발현과 ID2와의 상관관계를 평가하였다. CDK1의 발현은 정상 요로 상피 조직보다 방광암에서 더 높게 나타났다(도 18). ID2 발현과 일관되게, CDK1 전사체의 수준은 방광암의 종양 등급에 높을수록 CDK1의 발현이 높은 경향을 나타냈다(도 19). 또한, 두 개의 독립적인 TCGA 코호트에서 CDK1의 높은 수준은 ID2 발현 감소와 관련성이 있는 것으로 나타났다(도 20). CDK1 및 ID2 상의 역 발현은 pT 범주 종양 단계와 관련성이 있는 것으로 나타났다(도 21). 상기 결과는 CDK1 및 ID2의 잠재적 연관성이 방광암 환자에서 임상적으로 중요한 것을 입증한다.

[0075] **실시예 5. 방광암에서 아피제닌 및 RO-3306의 치료 효과 평가**

[0076] CDK1 및 ID2 연관에 대한 임상 결과를 토대로 방광암 세포 및 동물 모델에서 CDK1 억제제의 단독 또는 아피제닌과의 병용 투여가 방광암 치료 효과를 나타내는지 평가하였다. 아피제닌과 CDK1 억제제인 RO-3306의 조합이 방광암 치료에서 시너지 효과를 나타내는지 여부를 평가하였다.

[0077] 도 22에 나타난 바와 같이, 아피제닌 또는 RO-3306를 처리할 경우, ID2 발현이 HT1197과 HT1376 방광암 세포에서 모두 증가하였다. 또한, 도 23에 나타난 바와 같이, 아피제닌 또는 RO-3306를 저농도로 단독 처리는 세포 성장, 증식과 카스파제-3 및 PARP의 절단에 유의한 영향을 미치지 않았으나, 아피제닌 및 RO-3306의 병용 투여는 카스파제-3 및 PARP 절단을 유도하였다. 상기 결과는 아피제닌 또는 RO-3306의 단독 처리는 방광암 세포의 증식과 세포 자살을 유도하지 못하지만, 아피제닌 및 RO-3306의 병용 투여는 방광암 세포의 증식 억제와 세포자살을

유도하는 것을 입증한다.

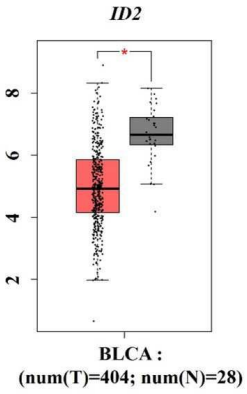
[0078] RO-3306의 단독 또는 아피제닌과의 병용 투여로 인한 방광암 치료 효과가 in vivo에서도 나타나는지 평가하기 위해, HT1376 세포가 NSG 면역 결핍 마우스의 방광 외층에 이식된 동소 이종이식 BC 동물 모델에 RO-3306의 단독 또는 아피제닌과의 병용투여 하였다(도 15). 도 24에 나타난 바와 같이, 종양 성장은 RO-3306의 단독 투여 및 아피제닌과의 병용투여에서 각각 66.8±2.48% 및 36.9±2.31% 억제되는 것으로 나타났다. 방광암에 대한 이종이식 모델에서 RO-3306 및 아피제닌의 병용 투여가 항종양 효과를 나타내는지 검증하기 위해 조직학적 분석을 수행하였다. 그 결과 방광암의 크기 및 진행이 RO-3306 및 아피제닌의 병용 투여에서 현저하게 억제되는 것으로 나타났다(도 25). 또한, 대조군 및 RO-3306 단일 투여군에서는 ID2 단백질의 발현 수준이 낮고, CDK1 및 TFCP2L1 단백질이 높은 수준으로 나타났으나, RO-3306 및 아피제닌의 병용 투여에서는 ID2 단백질의 발현이 높고 CDK1 및 TFCP2L1 단백질의 발현이 억제되는 것으로 나타났다(도 26).

[0079] 상기 결과는 CDK1-표적 억제제는 ID2 활성화제인 이피제닌의 항암 효과를 향상시키는 것을 확인하였으며, CDK1-표적 억제제 및 ID2 활성화제의 병용투여가 각각의 단독 투여에 비해 시너지 효과를 나타냄을 입증하였다.

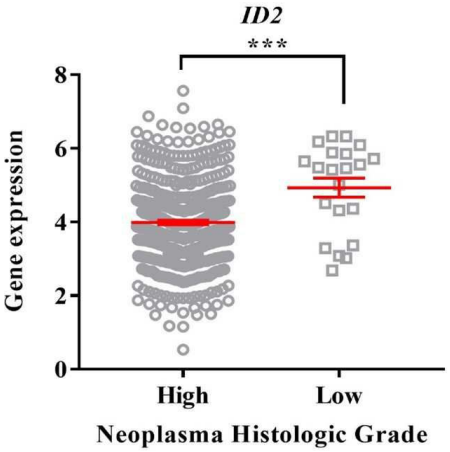
[0080] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

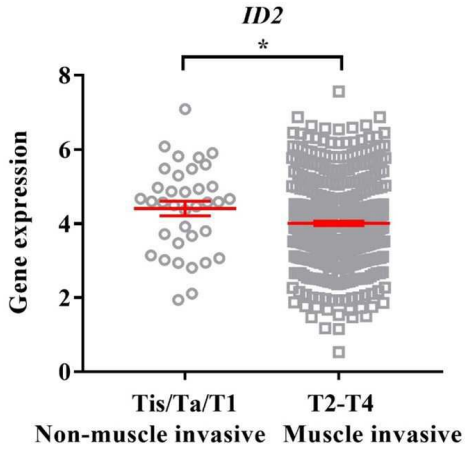
도면1



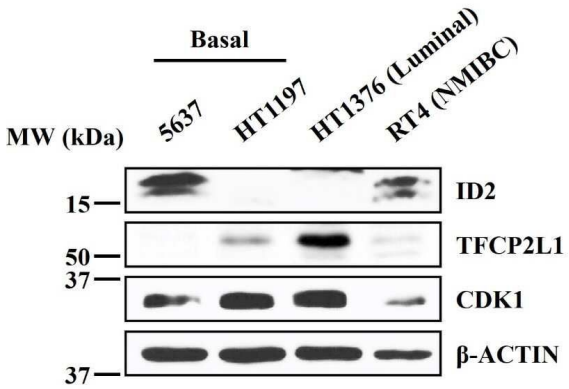
도면2



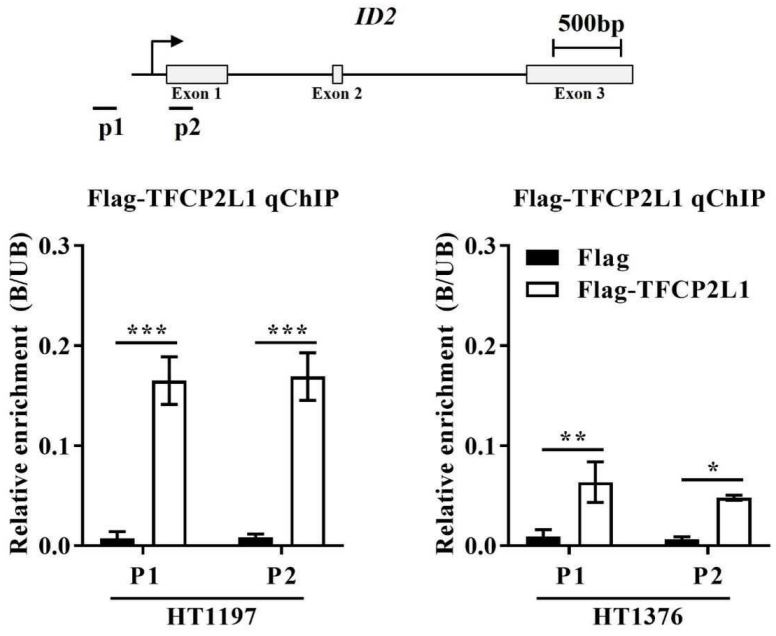
도면3


ID2
*
Gene expression
8
6
4
2
0
Tis/Ta/T1
Non-muscle invasive
T2-T4
Muscle invasive

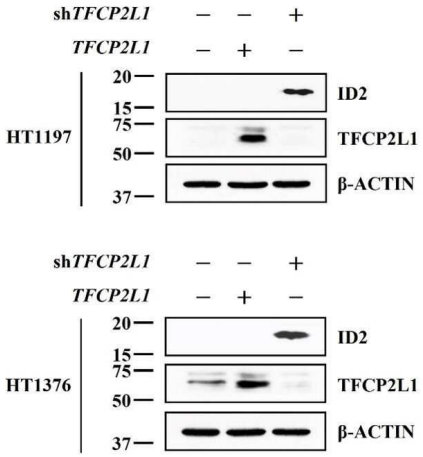
도면4


Basal
MW (kDa)
5637
HT1197
HT1376 (Luminal)
RT4 (NMIBC)
15
50
37
37
ID2
TFCP2L1
CDK1
β-ACTIN

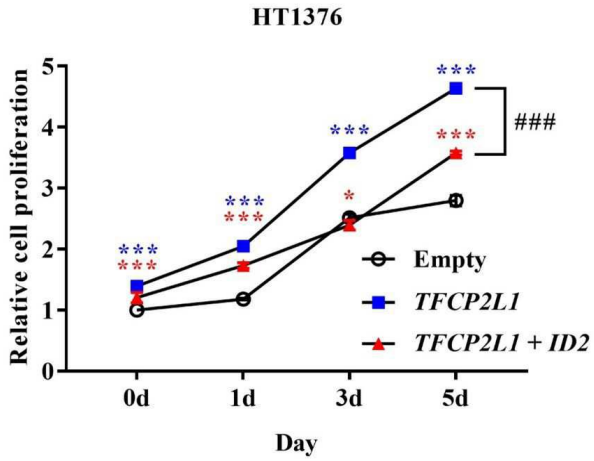
도면5


ID2
500bp
Exon 1
Exon 2
Exon 3
p1
p2
Flag-TFCP2L1 qChIP
Relative enrichment (B/UB)
0.3
0.2
0.1
0.0
***
***
P1
P2
HT1197
Flag-TFCP2L1 qChIP
Flag
Flag-TFCP2L1
**
*
P1
P2
HT1376

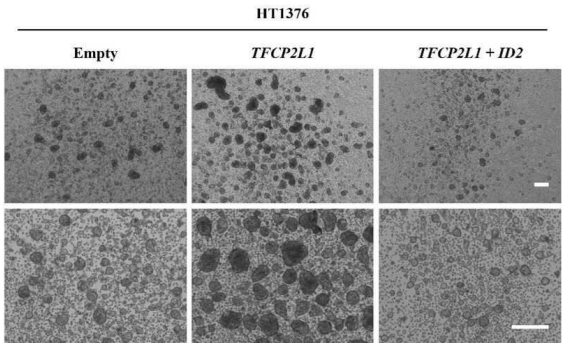
도면6

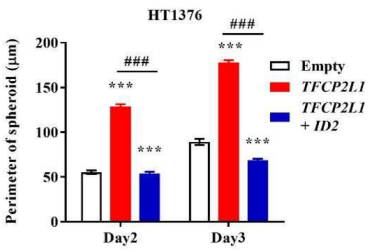

shTFCP2L1 – – +
TFCP2L1 – + –
HT1197
20
15
75
50
37
ID2
TFCP2L1
β-ACTIN
shTFCP2L1 – – +
TFCP2L1 – + –
HT1376
20
15
75
50
37
ID2
TFCP2L1
β-ACTIN

도면7

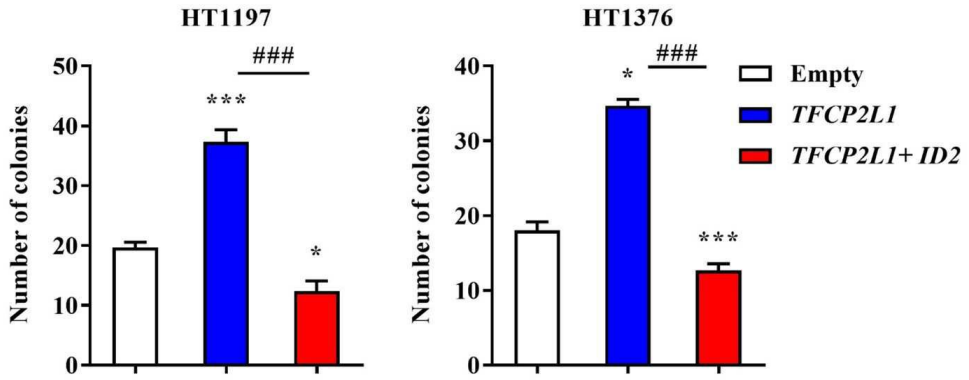

HT1376
Relative cell proliferation
0
1
2
3
4
5
0d
1d
3d
5d
Day
Empty
TFCP2L1
TFCP2L1 + ID2
###

도면8

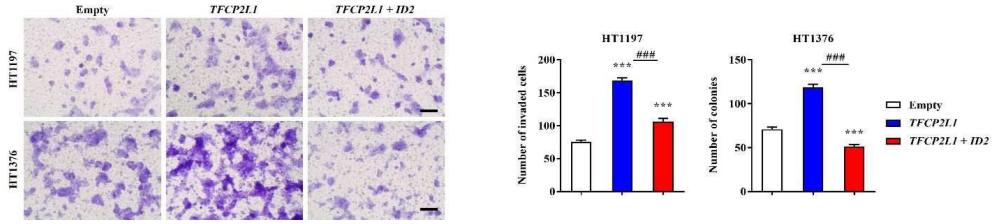

HT1376
Empty
TFCP2L1
TFCP2L1 + ID2


HT1376
Perimeter of spheroid (μm)
0
50
100
150
200
Day2
Day3
###
###
Empty
TFCP2L1
TFCP2L1 + ID2

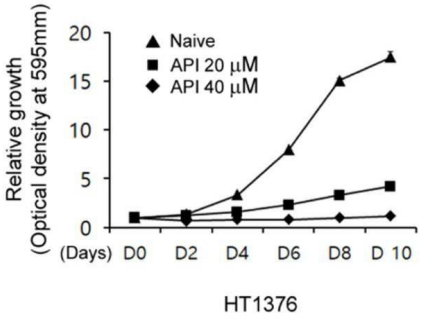
도면9

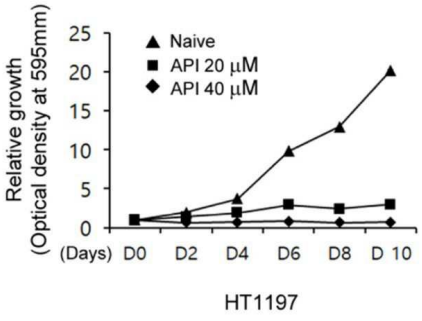


도면10

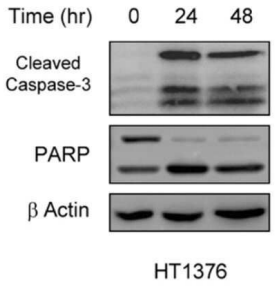


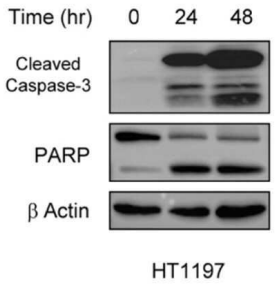
도면11



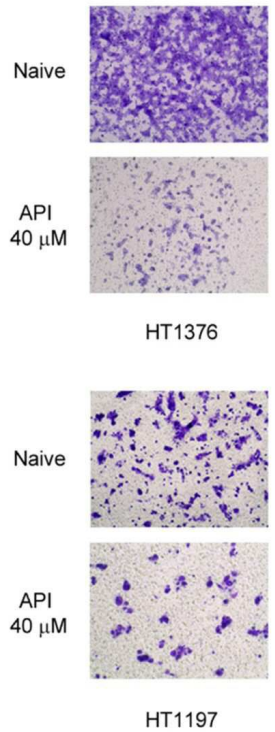


도면12

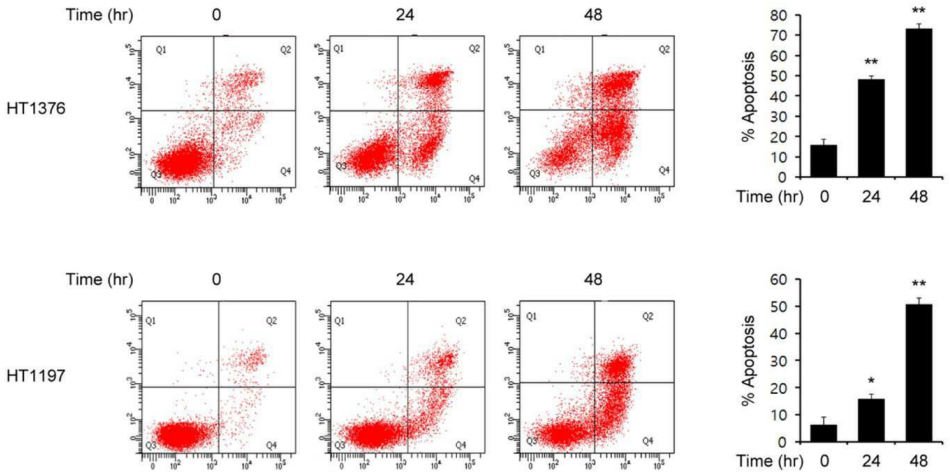

Time (hr) 0 24 48
Cleaved Caspase-3
PARP
β Actin
HT1376


Time (hr) 0 24 48
Cleaved Caspase-3
PARP
β Actin
HT1197

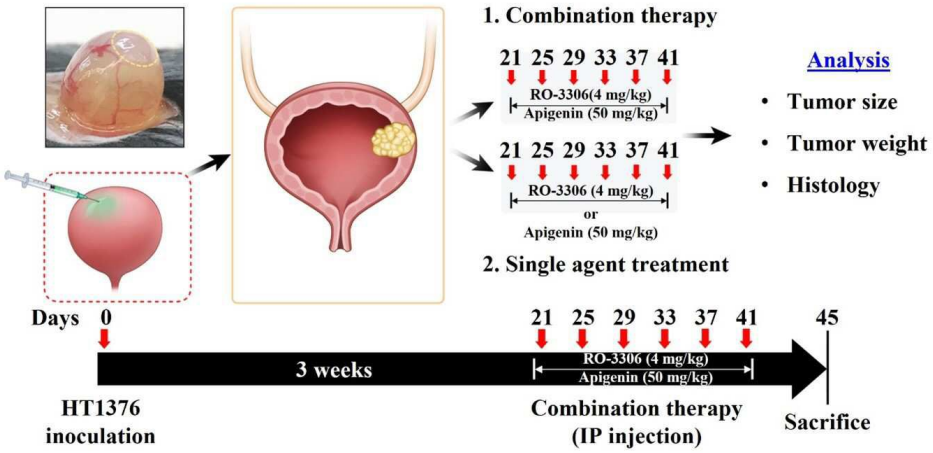
도면13


Naive
API 40 μM
HT1376
Naive
API 40 μM
HT1197

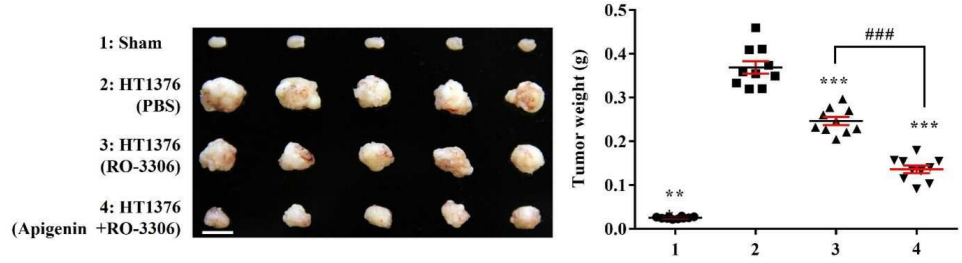
도면14



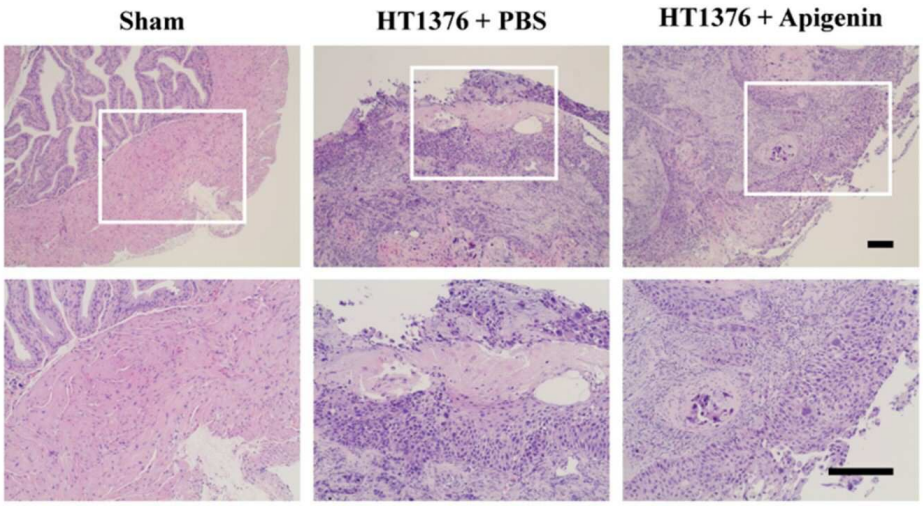
도면15



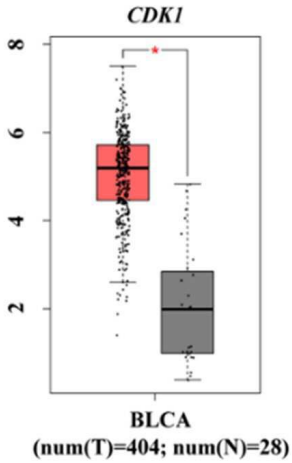
도면16



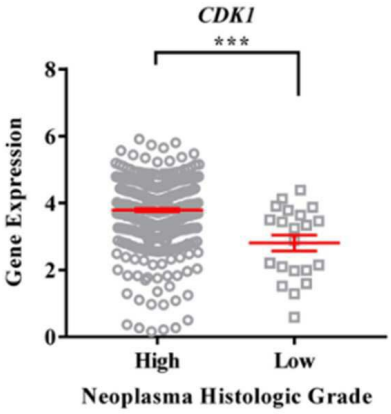
도면17



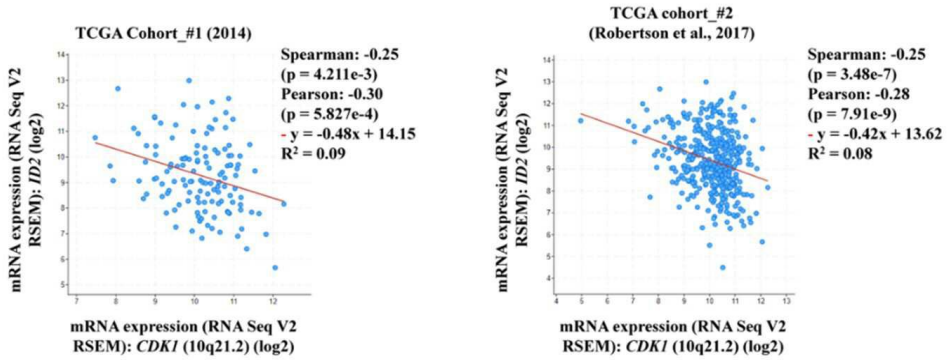
도면18



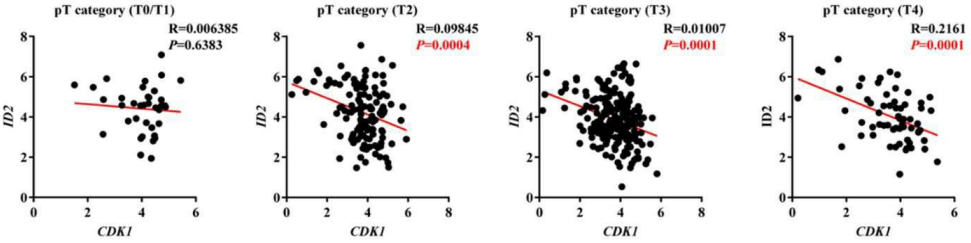
도면19



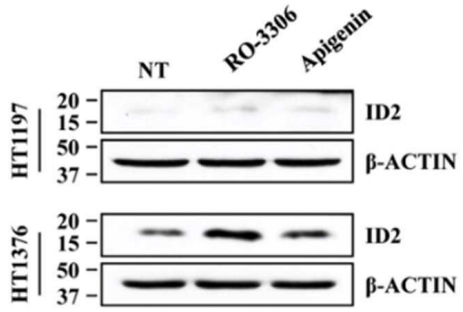
도면20



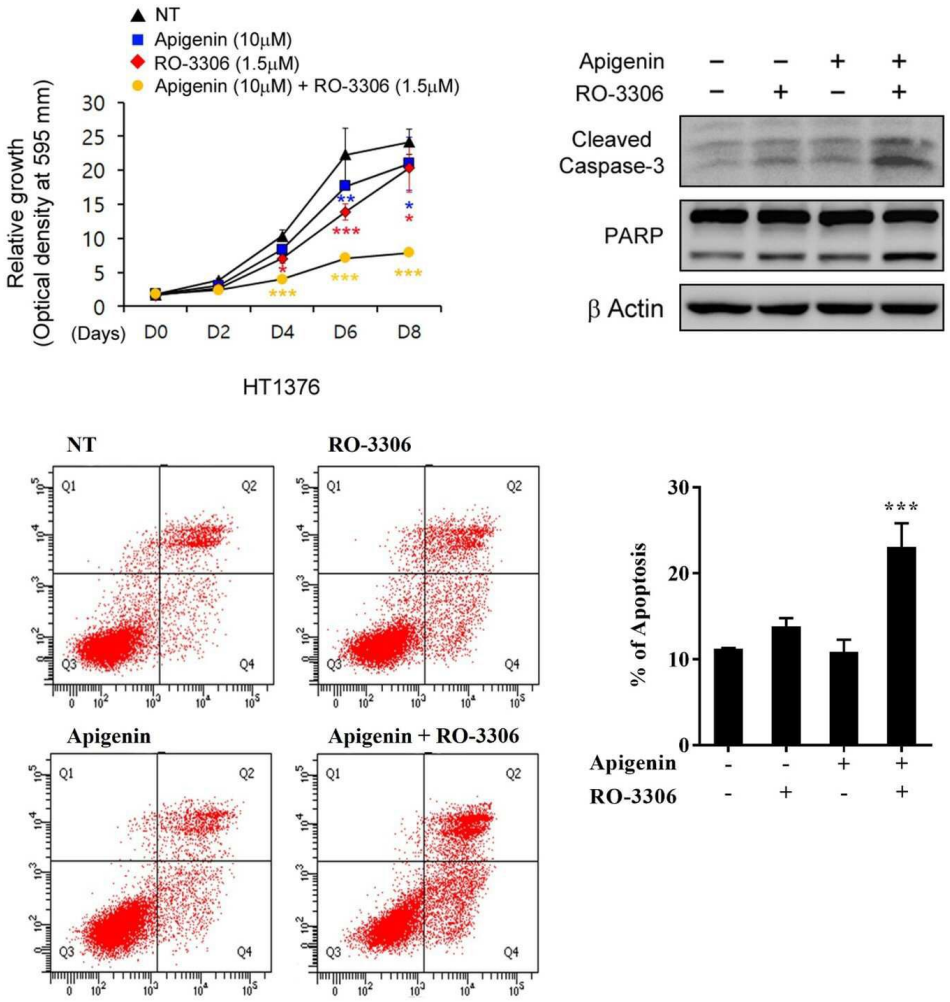
도면21



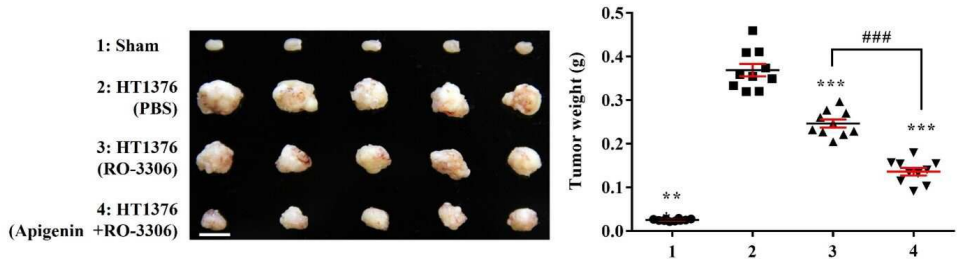
도면22



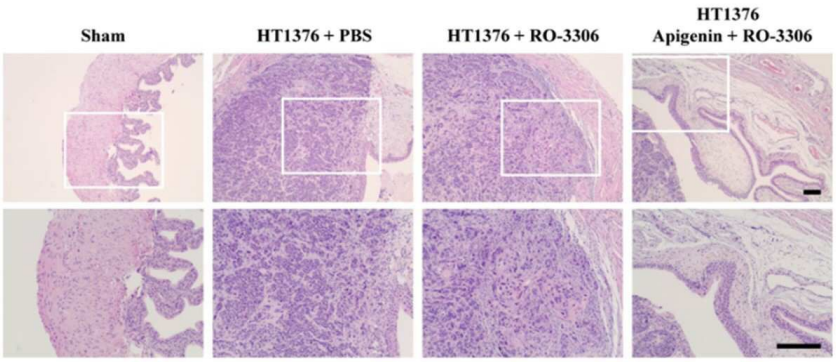
도면23


NT
Apigenin (10μM)
RO-3306 (1.5μM)
Apigenin (10μM) + RO-3306 (1.5μM)
Relative growth (Optical density at 595 mm)
(Days) D0 D2 D4 D6 D8
HT1376
Apigenin
RO-3306
Cleaved Caspase-3
PARP
β Actin
NT
RO-3306
Apigenin
Apigenin + RO-3306
Q1
Q2
Q3
Q4
% of Apoptosis
Apigenin
RO-3306

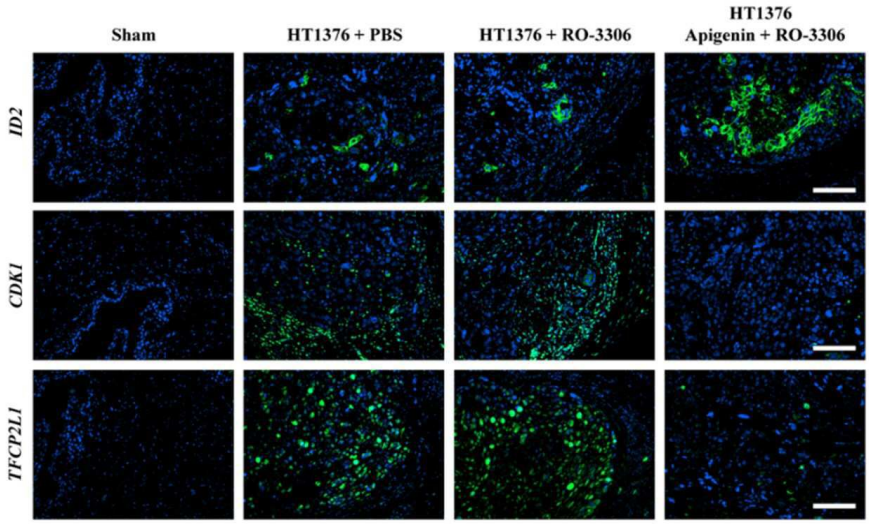
도면24


1: Sham
2: HT1376 (PBS)
3: HT1376 (RO-3306)
4: HT1376 (Apigenin +RO-3306)
Tumor weight (g)
###

도면25



도면26



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating bladder cancer comprising a CDK inhibitor and an ID2 activator

<130> ADP-2021-0493

<160> 11

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1440

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFCP2L1 ORF

<400> 1

atgctcttct ggcacacgca gcccgagcac tacaaccagc acaactccgg cagctacctg 60

cgtgatgtgc tcgctctgcc catcttcaag caggaggaac cccagctgtc ccccgagaac 120

gaggcccgcc tgccaccccct gcaatatgtg ttgtgtgctg ccacgtcccc agccgtgaag 180

ctgcatgaag agacgctgac ctacctcaac caaggtcagt cttatgaaat ccgactactg 240

gagaatcgga agctgggaga ctttcaagat ctgaacacaa aatatgtcaa gagcatcatc 300

cgtgtggtct tccatgaccg ccggctgcag tatacggagc accagcagct ggagggctgg 360

cggtggagtc ggccagggga ccggatcctg gacatcgata ttccactgtc tgttggtatc 420

ttggacccca gggccagccc gacccagctg aatgcagtcg agtttttgtg ggaccctgcg 480

aagagagctt ctgcattcat tcaggtacac tgcatcagca cagaattcac ccccaggaag 540

cacgggggcg agaagggagt gccctttcga gtccagattg acacgtttaa gcagaacgag 600

aatggggagt acacggagca cctgcactca gccagctgcc agatcaaggt gttcaagccg 660

aagggagccg atcggaaaca gaagactgac cgggagaaga tggagaaaag aactgcccaa 720

gagaaggaga aataccagcc gtcctatgaa accaccatcc tcacagagtg ctctccatgg 780

cccgacgtgg cctaccaggt gaacagcgcc ccgtccccaa gctacaatgg ttctccaaac 840

agctttggcc tcggcgaagg caacgcctct ccgacccacc cggtggaggc cctgcccgtg 900

ggcagtgacc acctgctccc atcagcttcg atccaggatg cccagcagtg gcttcaccgc 960

aacaggttct cgcagttctg ccggctcttt gccagcttct caggtgctga cttgctgaag 1020

atgtcccgag atgatttggt ccagatctgt ggtcccgcag atgggatccg gctcttcaac 1080

gccatcaaag gccggaatgt gaggccaaag atgaccattt atgtctgtca ggagctggag 1140

cagaatcgag tgcccctgca gcagaagcgg gacggcagtg gagacagcaa cctgtctgtg 1200

taccacgcca tcttcctgga agagctgacc accttggagc tgattgagaa gatcgccaac 1260

ctgtacagca tctcccccca gcacatccac cgagtctacc ggcagggccc cacgggcatc 1320

catgtggtgg tgagcaacga gatggtgcag aacttccaag atgaatcctg ttttgtcctc 1380

agcacaatta aagctgagag caatgatggc taccacatca tcctgaaatg tggactctga 1440

1440

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ID2 ORF

<400> 2

atgaaagcct tcagtcccgt gaggtccgtt aggaaaaaca gcctgtcgga ccacagcctg 60

ggcatctccc ggagcaaaac ccctgtggac gacccgatga gcctgctata caacatgaac 120

gactgctact ccaagctcaa ggagctggtg cccagcatcc cccagaacaa gaaggtgagc 180

aagatggaaa tcctgcagca cgtcatcgac tacatcttgg acctgcagat cgccctggac 240

tcgcatccca ctattgtcag cctgcatcac cagagacccg ggcagaacca ggcgtccagg 300

acgccgctga ccaccctcaa cacggatatc agcatcctgt ccttgcaggc ttctgaattc 360

ccttctgagt taatgtcaaa tgacagcaaa gcactgtgtg gctga 405

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFCP2L1

<400> 3

gctcttcaac gccatcaaag g 21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFCP2L1-F

<400> 4

gctcttcaac gccatcaaa 19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFCP2L1-R

<400> 5

caggggcact cgattctg 18

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ID2-F

<400> 6

cagcatcccc cagaacaaga a 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> ID2-R

<400> 7

cgatctgcag gtccaagatg t 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ID2_#1-F

<400> 8

ctccgatggg ttgcagtgaa 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ID2_#1-R

<400> 9

cggcagctct aaaatcacag cta 23

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ID2_#2-F

<400> 10

tgcagcacgt catcgactac at 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ID2_#2-R

<400> 11

ctggtgatgc aggctgacaa 20