



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월12일
(11) 등록번호 10-2312414
(24) 등록일자 2021년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 38/191 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0001358
(22) 출원일자 2020년01월06일
심사청구일자 2020년01월06일
(65) 공개번호 10-2021-0088180
(43) 공개일자 2021년07월14일
(56) 선행기술조사문헌
EXPERIMENTALCELL RESEARCH 316, 2194 - 2203 (2010)*
J. Cell. Mol. Med. Vol 12, No 6B, 2628-2643 (2008)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내 (반포동)
(72) 발명자
전신수
서울특별시 서초구 남부순환로 2183, 102동 2101호(방배동, 방배래미안타워)
안스데반
서울특별시 강남구 자곡로 204-5, B-929(자곡동) (뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 양웅철

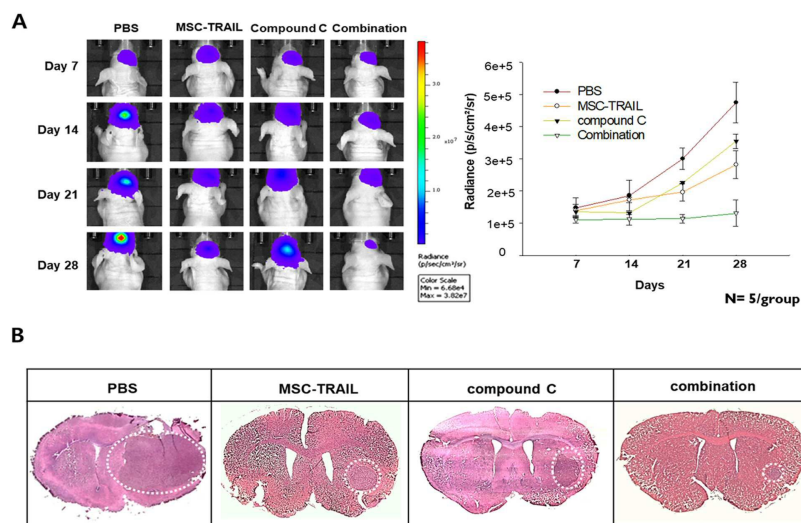
(54) 발명의 명칭 TRAIL을 발현하는 중간엽 줄기세포와 화합물 C를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 키트 또는 항암보조제에 대한 것이다.

본 발명의 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C를 병합 처리하는 경우, TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 또는 화합물 C를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 암세포의 세포자멸과 관련된 단백질들의 발현을 증가시키고 항-세포자멸과 관련된 단백질들의 발현을 감소시켜 암세포의 세포자멸을 유의적으로 증가시킬 수 있어 높은 항암 효과를 얻을 수 있다.

대표도 - 도5



- (52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

한혜림

서울특별시 관악구 남부순환로240길 32(봉천동, 성문캠퍼스텔)

- (72) 발명자
박순아
서울특별시 종로구 홍지문길 56, 6-202(홍지동, 완성빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|---------------------------|
| 과제고유번호 | 1711104625 |
| 과제번호 | 2020M3A9E8024875 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 임상의과학자연구역량강화사업 |
| 연구과제명 | 교모세포종 치료를 위한 면역항암세포치료제 개발 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 가톨릭대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2020.01.01 ~ 2021.12.31 |
| 공지예외적용 | : 있음 |

명세서

청구범위

청구항 1

TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 뇌암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 인간, 소, 돼지 및 말로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방, 자궁, 골수, 근육, 태반, 제대혈, 모낭 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 비경구 투여용 제제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 뇌암 예방 또는 치료용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 인간, 소, 돼지 및 말로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방, 자궁, 골수, 근육, 태반, 제대혈, 모낭 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C는 비경구 투여되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

삭제

청구항 11

TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 뇌암의 항암보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 키트 또는 항암보조제에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 다형성 교모세포종(Glioblastoma multiforme, GBM)은 신경교종(glioma) 중 가장 공격적이고 파괴적인 유형의 암 중 하나이다. GBM은 기능성 뇌 조직으로의 침투 특성과 화학 요법 및 방사선 요법에 대한 내성을 가지고 있다. 수술, 방사선 요법 및 화학 요법과 같은 기존의 치료는 평균 생존율이 낮으며, 특히 뇌세포와 종양세포 간의 경계가 분명하지 않기 때문에, GBM을 외과적으로 완전히 제거하는 것은 거의 불가능하다. 따라서, 치료 효능을 증가시키기 위한 새로운 전략이 필요하다.

[0004] 종양 괴사 인자 관련 세포자멸 유도 리간드(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)는 정상 세포가 아닌 암 세포에서 세포자멸(apoptosis)을 선택적으로 활성화시킨다. 그러나, TRAIL만을 단독으로 사용하여 신경교종(glioma)을 포함하여 암을 치료하는데에는 이의 독성 및 짧은 단백질 반감기가 문제된다. 특히, 대부분의 악성 신경교종 세포들은 표면의 사멸 유도 TRAIL 수용체들의 발현에도 불구하고 TRAIL-유도 세포독성에 저항성을 가진다.

[0005] AMPK(AMP-activated protein kinase)는 세포 에너지 항상성을 조절하는 핵심 에너지 센서이며 세포주기 및 세포자멸과 관련이 있다. 도르소모르핀(dorsomorphin)으로도 불리는 화합물 C(Compound C)는 AMPK 억제제로서 일반적으로 사용되어 AMPK의 작용을 효과적으로 차단한다.

[0006] 대한민국 공개특허 제10-2015-0012136호 "TRAIL를 분비하는 줄기세포 및 MK886의 조합에 따른 향상된 항암용도"는 TRAIL을 분비하는 줄기세포와 MK886을 조합하여 보다 증진된 항암효과를 제공하고자 한다.

[0007] 그러나 암, 특히 다형성 교모세포종 등의 뇌암에서 TRAIL에 의하여 유도된 세포자멸의 민감성을 보다 유의적으로 증가시키면서 임상적인 효과 역시 보장되는 방안에 대한 추가적인 연구가 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 암세포의 TRAIL에 의하여 유도된 세포자멸에 대한 민감성을 증가시켜 보다 효과적인 항암용 조성물을 제공하고자 예의 노력한 결과, TRAIL을 분비하는 줄기세포와 화합물 C(compound C)를 암세포에 모두 처리하는 경우 TRAIL의 세포자멸능을 유의적으로 증가시켜 높은 암세포 억제 효과를 제공할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 키트 또는 항암보조제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 키트 또는 항암보조제를 제공한다.

[0013] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포는 인간, 소, 돼지 및 말로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포는 지방, 자궁, 골수, 근육, 태반, 체대혈, 모낭 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 흑색종, 뇌암, 폐암, 유방암, 고환암 및 신장암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포, 화합물 C 또는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C를 포함하는 약학적 조성물은 비경구 투여되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 병합 처리하는 경우, TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 또는 화합물 C를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 암세포의 세포자멸과 관련된 단백질들의 발현을 증가시키고 항-세포자멸과 관련된 단백질들의 발현을 감소시켜 암세포의 세포자멸을 유의적으로 증가시킬 수 있어 높은 항암 효과를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 주된 실험방법을 나타낸다.

도 2는 신경교종(glioma) 세포(U87, U138)에 TRAIL 및/또는 화합물 C(compound C)를 처리한 후 이의 생존률을 확인한 결과를 나타낸다. A는 TRAIL 또는 화합물 C의 처리 농도별 세포 생존률을 나타내며, B는 TRAIL(10ng/ml) 및/또는 화합물 C(10 μM) 처리에 따른 세포 생존률을 나타낸다. TRAIL 단독으로는 U87 세포에 민감성을 나타내지 않으며, TRAIL 및 화합물 C를 병합 처리 하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 세포 생존률이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

도 3은 신경교종(glioma) 세포(U87, U138)에 TRAIL 및/또는 화합물 C(compound C)를 처리한 후 cFLIP, XIAP(A) 및 PARP(B)의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. TRAIL 및 화합물 C를 병합 처리 하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 항-세포자멸 관련 단백질인 cFLIP 및 XIAP의 발현은 감소하고, 세포자멸 관련 단백질인 PARP의 절단은 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

도 4는 신경교종(glioma) 세포(U87, U138)에 MSC-TRAIL 및/또는 화합물 C(compound C)를 처리한 후 이의 생존률(A) 내지 BAX, BCL2, cFLIP 또는 XIAP의 발현 수준(B)을 확인한 결과를 나타낸다. MSC-TRAIL 및 화합물 C를 병합 처리 하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 신경교종 세포의 생존률이 감소하였으며, 전구-세포자멸 단백질(BAX)을 증가시키고, 항-세포자멸 단백질(BCL2, cFLIP 및 XIAP)을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

도 5는 신경교종 마우스 모델에 MSC-TRAIL 및/또는 화합물 C(compound C)을 투여한 결과를 나타낸다. MSC-TRAIL 및 화합물 C를 병합 처리 하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 생물 발광 발현이 감소(A) 하였으며, 신경교종의 성장이 유의적으로 억제(B)되는 것을 확인할 수 있었다(배율: 1x, 점선: 중앙 가장자리).

도 6은 신경교종 마우스 모델에 MSC-TRAIL 및/또는 화합물 C(compound C)을 투여한 후 이의 조직학적 분석 결과를 나타낸다. MSC-TRAIL 및 화합물 C를 병합 처리 하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 사멸된 신경교종 세포 수가 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다(TUNEL: 상단의 붉은색, 절단된 카스파제 3: 하단의 붉은색, DAPI: 파란색).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0023] 상기 기재한 바와 같이, TRAIL 단독으로는 충분한 암세포 사멸 효과를 얻을 수 없으므로, 암세포의 TRAIL에 의하여 유도된 세포자멸에 대한 민감성을 증가시키면서 임상적 효과도 기대할 수 있는 암세포 세포자멸 활성화 방안 에 대한 추가적인 연구가 요구되는 실정이다.

[0025] 본 발명의 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 병합 처리하는 경우, TRAIL, TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 또는 화합물 C를 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 PARP의 절단률을 증가시키고, 전구-세포자멸 단백질(pro-apoptotic protein)인 BAX의 발현 수준을 증가시키며, 항-세포자멸 단백질(anti-apoptotic protein)인 BCL2, cFLIP 또는 XIAP의 발현 수준을 감소시킬 수 있다. 따라서, TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C의 병합처리는 암세포 성장 억제 내지 세포자멸을 유도할 수 있어 효과적인 항암 효과를 제공할 수 있다.

[0027] 본 발명은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적

조성물을 제공할 수 있다.

- [0028] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)는 인간, 소, 돼지 및 말로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간 유래인 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포는 지방, 자궁, 골수, 근육, 태반, 제대혈, 모낭 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래된 것일 수 있으며, 바람직하게는 골수 유래인 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명의 TRAIL를 분비하는 중간엽 줄기세포는, 줄기세포를 TRAIL을 암호화하는 핵산(폴리뉴클레오티드) 또는 이를 포함한 벡터(재조합 벡터)로 형질전환하여 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 TRAIL을 분비하는 줄기세포는 (a) TRAIL을 암호화하는 핵산을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 발현 벡터를 줄기세포에 도입하는 단계를 통해 제작될 수 있다.
- [0031] 상기 ‘핵산(nucleic acid)’ 또는 ‘폴리뉴클레오티드(polynucleotide)’는 리보뉴클레오티드 뿐만 아니라 디옥시리보뉴클레오티드 등 온갖 길이의 뉴클레오티드 중합체를 의미한다. 이 용어는 분자의 1차적 구조만을 의미하고, 따라서 이중 또는 단일 사슬의 DNA 또는 RNA를 의미한다. 이것은 또한 변형의 알려진 유형, 예를 들어 당해 분야에서 알려진 표지(label), 메틸화, caps, 유사체의 하나 혹은 그 이상의 자연 발생의 뉴클레오티드 치환, 탈결합(예: methyl phosphonate, phosphotriester, phosphoamidate, carbamate, 등)과 결합(예:phosphorothioate, phosphorodithioate, 등), 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드(signal peptide), poly-Llysine, 등) 등의 부속물을 포함하는 것, 삽입물(예: 아크리딘, Psolalen, 등)을 가지는 것, 킬레이트(예: 금속원소, 방사성 금속원소, 붕소, 산화 금속원소, 등)을 가지는 것, 알킬화합물을 가지는 것, 변형된 결합(예: alpha anomeric 핵산, 등)을 가지는 것, 또한 폴리뉴클레오티드의 비변형을 포함한 뉴클레오티드 간 변형을 의미한다.
- [0032] 상기 ‘벡터(vector)’는 다른 핵산을 그것이 연관된 곳으로 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. ‘발현벡터(expression vector)’는 벡터에 의해 운반된 각각의 재조합 유전자에 의해 암호화된 목적 단백질을 합성할 수 있는 플라스미드, 코스미드(cosmid) 또는 파지(phage)를 포함한다.
- [0033] 상기 TRAIL을 암호화하는 핵산은 당업계에 공지된 TRAIL을 암호화하는 염기서열을 가지는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 상기 핵산은 TRAIL의 기능적 동등물을 암호화하는 염기서열을 가질 수 있다.
- [0034] 상기 '기능적 동등물'이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, TRAIL과 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 TRAIL과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, '실질적으로 동질의 생리활성'이란 종양 세포의 사멸을 유도하는 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, TRAIL의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 상기 TRAIL의 기능적 동등물의 범위에는 TRAIL의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다. 또한 상기 TRAIL을 암호화하는 핵산은 당업계에 공지된 유전자 재조합 방법에 의하여 제조될 수 있다. 또한 본 발명에서 '발현 벡터'라 함은 TRAIL을 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미한다. 바람직하게는 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0035] 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 아비폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 허피스 바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지된 방법 등에 의해 줄기세포 내로 도입할 수 있다.

- [0038] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 압은 흑색종, 뇌암, 폐암, 유방암, 고환암 및 신장암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 뇌암인 것이 바람직하다. 상기 뇌암은 신경교종, 신경교모종, 신경교아종, 다형성 교모세포종, 뇌수막종, 뇌하수체선종 또는 신경초종일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 비경구 투여용 제제인 것일 수 있다.
- [0040] 상기 비경구 투여용 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 종양, 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.
- [0042] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 압 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효한 양의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 증감될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 압 예방 또는 치료용 키트를 제공할 수 있다.
- [0048] 상기 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C는 상기 약학적 조성물에서 사용하는 개념과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다.
- [0049] 본 발명의 상기 키트는 TRAIL 발현벡터, 중간엽 줄기세포 및 화합물 C를 각각 따로 제공할 수도 있고, TRAIL 발현벡터로 형질감염시킨 중간엽 줄기세포와 화합물 C를 제공할 수도 있다. 상기 발현벡터는 TRAIL를 바이러스 벡터, 바람직하게는 아데노바이러스 벡터에 도입하여 제조할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C는 동시에 또는 순차적으로 비경구 투여되는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 비경구 투여는 상기 약학적 조성물에서 사용된 개념과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다. 바람직하게는 상기 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포는 암세포에 직접 투여되는 것일 수 있고, 상기 화합물 C는 복강 내 투여되는 것일 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C(compound C)를 포함하는 항암보조제를 제공할

수 있다.

- [0054] 상기 TRAIL을 분비하는 중간엽 줄기세포 및 화합물 C는 상기 약학적 조성물에서 사용하는 개념과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다.
- [0055] 본 발명의 항암보조제는 항암제의 항암효과를 증대시키거나 항암제의 부작용을 억제 또는 개선시키기 위한 모든 형태를 의미한다. 본 발명의 항암보조제는 다양한 종류의 항암제 또는 항암보조제와 병용투여될 수 있으며, 병용투여시 통상적인 항암제의 투여량보다 낮은 수준으로 항암제를 투여하더라도 동등한 수준의 항암치료효과를 나타낼 수 있으므로 보다 안전한 항암치료를 수행할 수 있다.
- [0056] 상기 항암보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있다. 또한, 상기 항암보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 항암보조제는 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 항암보조제로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 항암치료 보조제에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 항암보조제는 비경구 투여용 제제일 수 있으며, 상기 비경구 투여용 제제는 상기 약학적 조성물에서 사용된 개념과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다.
- [0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

- [0062] **실험 준비**
- [0063] <1-1> 시약 및 세포배양
- [0064] 인간 골수 유래 MSC(mesenchymal stem cells)는 가톨릭 세포 치료 연구소(CIC, 서울, 한국)에서 입수했다. MSC를 저-포도당 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 20 % 태아 소 혈청(Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Canada) 및 항생제-항생제 용액(Gibco, Carlsbad, CA, USA)과 함께 공동배양하였다. MSC는 5 내지 8 회 계대 후 실험에 사용되었다. TRAIL 유전자(Ad-TRAIL)의 분비성 삼량체(secretable trimeric) 형태를 가진 아데노바이러스를 제작하고, 강화된 그린 형광 단백질(Ad-EGFP)을 인코딩하고 있는 재조합성 복제 결핍 아데노 바이러스 벡터를 AdEasy vector system(Quantum Biotechnologies)을 이용하여 설계하였다. 세포 투과성 펩타이드-매개된 아데노바이러스형질도입을 수행하여 TRAIL을 분비하는 MSC(MSC-TRAIL)를 제조하였다. 인간 신경교종 세포주(Human glioma cell, U87, U138; American Type Culture Collection)를 고-포도당 DMEM(Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다. 반딧불이 루시페라제(Luc)-발현 U87 세포(U87-Luc)는 렌티 바이러스-발현 Luc를 사용하여 안정적으로 형질 도입되었다. 모든 세포를 5 % CO₂를 함유한 37 °C의 가습 대기에서 배양하였다.

- [0066] <1-2> 동소이종이식 마우스 모델 제조
- [0067] 누드 마우스(6 내지 8 주령, 수컷; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)의 사용은 가톨릭 대학교 기관 동물 보호 및 사용위원회의 승인(승인 번호 : 2017-0211-04)을 받았다. 인간 신경 교종의 두개 내 이종이식(intracranial xenograft) 마우스 모델은 상기 마우스에 케타민/자일라진(ketamine/xylazine)를 복강 주사하여 마취시킨 후, 마이크로 인퓨전 펌프(Harvard Apparatus)를 사용하는 Hamilton 주사기(Hamilton Company)를 통하여 우측 전두엽에 1×10⁵ U87-Luc 세포(3 μl PBS)를 정위 접종(두개저(skull base)로부터 2.5 mm 깊이에, 브레그마(bregma)의 2mm 측면 및 1 mm 전방)하여 제조하였다.

실시예 2

[0069] **TRAIL 및/또는 화합물 C의 신경교종 세포 사멸 효과**

[0070] TRAIL 및/또는 화합물 C이 신경교종 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0071] 구체적으로, 세포 생존력은 민감한 색도 검출을 허용하는 3-(4,5-디메틸-2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 측정 하였다. 살아있는 세포에서 탈수소 효소에 의해 감소된 수용성 테트라졸륨 염을 이용한 검출은 착색된 생성물(formazan, 포르마잔)을 제공한다. 신경교종 세포 U87 또는 U138 세포를 96-웰 또는 24-웰 플레이트에 시딩하여 TRAIL-유도된 세포독성 및 화합물 C-매개 세포사멸을 측정하였다. 세포에 TRAIL(0, 5, 10, 50 또는 300 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 및/또는 화합물 C(0, 5, 10 또는 20 μM; Selleckchem, Houston, TX, USA)을 처리하고 24 시간 후에 분석하였다. Spectramax Plus 384 Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 광학 밀도(OD)에 대해 각각의 웰을 측정 하였다.

[0072] 그 결과, [도 2]의 A 에서 나타나는 바와 같이 TRAIL 단독은 U87 세포 사멸을 증가 시켰지만 U138 세포 사멸은 증가시키지 않아 TRAIL에 대한 감수성이 없는 것으로 나타났다. 반면에 화합물 C는 U87 및 U138 세포에서 세포 사멸을 증가시켰다. 또한, [도 2]의 B 에서 나타나는 바와 같이 TRAIL 및 화합물 C 를 모두 처리하는 경우 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 U87 및 U138 세포를 유의적으로 사멸시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 화합물 C가 TRAIL로 유도된 세포사멸을 증진시켰음을 나타냈다.

실시예 3

[0074] **TRAIL 및 화합물 C 병합 처리의 신경교종 세포에 대한 영향**

[0075] TRAIL과 화합물 C의 병합 처리가 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질의 발현과 관련하여 신경교종 세포에 영향을 미치는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0076] 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 TRAIL(10ng/ml) 및/또는 화합물 C(10 μM)을 처리한 신경교종 세포 U87 및 U138 세포에서 항-세포사멸 관련 단백질인 cFLIP 및 XIAP의 발현수준과, 세포사멸 관련 단백질인 PARP 의 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다. 웨스턴 블랏팅은 Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell(BIO-RAD)을 사용하여 단백질을 니트로 셀룰로스 막(Invitrogen)으로 옮긴 다음 세포성 FLICE 억제 단백질(cFLIP; Alexis), 세포사멸의 X-linked 억제제(XIAP) 및 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제(PARP)에 대한 1 차 항체와 함께 배양하였다. 로딩 대조군으로서 β-액틴(Sigma)을 사용하였다.

[0077] 그 결과, [도 3]의 A에서 나타나는 바와 같이 cFLIP 및 XIAP와 같은 항-세포사멸 단백질의 발현은 TRAIL 및 화합물 C 을 병합 처리하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 감소되었다. 신경교종 세포의 증가된 세포사멸은 신경교종 세포에서 주요 세포사멸 단백질인 PARP의 절단으로 확인할 수 있었으며, 이는 TRAIL 및 화합물 C 을 병합 처리하는 경우 더욱 증가하였다. 이는 화합물 C가 신경 교종 세포에서 TRAIL-유도된 세포 사멸을 증진시켰음을 나타낸다.

실시예 4

[0079] **MSC-TRAIL 및/또는 화합물 C의 신경교종 세포 사멸 효과(in vitro)**

[0080] MSC-TRAIL 및/또는 화합물 C 의 병합 처리가 신경교종 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0081] 구체적으로, 신경교종 세포(5×10^4)를 24-웰 플레이트의 하부 웰에 시딩하고, MSC-TRAIL(1×10^4)을 트랜스 웰 삼입물(0.4 μm 포어)에 시딩하였다. 그 후 화합물 C(10 μM)를 처리한 후 공배양하여 24시간 후 생존률을 MTT 분석으로 확인하였다. 또한, 상기 <실시예 3>과 동일한 방법으로 신경교종세포 내의 B 세포 림프종 2(BCL2) 관련 X 단백질(BAX), BCL2(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), cFLIP 및 XIAP 단백질의 발현 수준을 확인하였다.

[0082] 그 결과, [도 4]의 A에서 나타나는 바와 같이, MSC-TRAIL 및 화합물 C 의 병합 처리는 각각 단독 처리되는 경우에 비하여 유의적으로 증가한 신경교종 세포의 사멸을 증가시켜 치료 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, [도 4]의 B에서 나타나는 바와 같이, 신경교종 세포에 대한 화합물 C 및 MSC-TRAIL의 병합 처리는 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 전구-세포사멸 단백질(BAX)을 증가시키고, 항-세포사멸 단백질(BCL2, cFLIP 및 XIAP)을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 MSC-TRAIL 및 화합물 C의 병합 처리는 세포사멸 단백질의 강

화 및 항-세포자멸 단백질의 감소를 통해 세포자멸을 증가시킴으로써 신경교종에 대한 치료 효율을 증가시키는 것으로 결정되었다.

실시예 5

[0084] **MSC-TRAIL 및 화합물 C 병합 처리가 신경교종 치료 효율에 미치는 영향**

[0085] 두개 내 이종 이식 마우스 모델에서 MSC-TRAIL 및 화합물 C의 병합 처리의 치료 효과를 확인하고자 하였다.

[0086] 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 동소이종이식 마우스 모델(n=5/그룹)에 MSC-TRAIL(2×10^5 세포/5 μ l)의 PBS)을 암 접종 후 10 일에 두개 내로 이식하였다. 이어서, 식염수 혼합물로 화합물 C 10 mg/kg 을 5 일 동안 복강 내 주사 하였다. 루시페라제 기질인 D-루시페린(150mg의 루시페린/체중 kg; Xenogen, CA, USA)은 광학 생체 내 이미징 시스템-IVIS Lumina XRMS(PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 가시화 10 분 전에 복강 내 주사되었다. 생체 내 생물 발광 영상 분석을 사용하여 중앙 접종 후 7 일마다 암 성장을 모니터링하였다.

[0087] 또한, 암 성장 억제제를 조직학적 분석으로 평가하기 위해, 영상 실험 동안 암 접종 후 20 일에 마우스를 희생시켰다. 마우스 뇌는 깊은 마취하에 4 % 파라포름알데히드로 관류되었다. 고정 조직을 동결 절편(14- μ m 두께)하고 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin, eosin, H & E)으로 염색 하였다. 이미지는 Pannoramic MIDI를 사용하여 캡처하였다.

[0088] 그 결과, [도 5]의 A에서 나타나는 바와 같이 생물 발광 발현은 MSC-TRAIL 및 화합물 C 병합 처리하는 경우 각각 단독으로 처리하는 경우에 비하여 유의적으로 감소하였다. 또한, H & E 염색은 PBS 또는 단독 처리군과 비교하여 MSC-TRAIL 및 화합물 C 로 병합 처리된 마우스에서 암 성장이 유의적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 MSC-TRAIL 및 화합물 C의 병합 처리가 신경 교종-보유 마우스에서 암 성장을 감소시켰음을 나타낸다.

실시예 6

[0090] **MSC-TRAIL 및 화합물 C 병합 처리가 신경교종 세포의 사멸에 미치는 영향**

[0091] MSC-TRAIL 및 화합물 C의 병합 처리에 따른 세포자멸 효과가 항암 활성에 관여하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0092] 상기 <실시예 5>의 마우스 뇌 절편을 말단 테옥시리보뉴클레오티딜트랜스퍼라제-매개 dUTP Nick End Labeling (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 분석 키트(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 염색을 통해 검출되었고 Cy3-결합 스트렙타비딘 (Cy3-conjugated streptavidin, Invitrogen)으로 개발되었다. 핵은 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; Sigma)로 염색되었다.

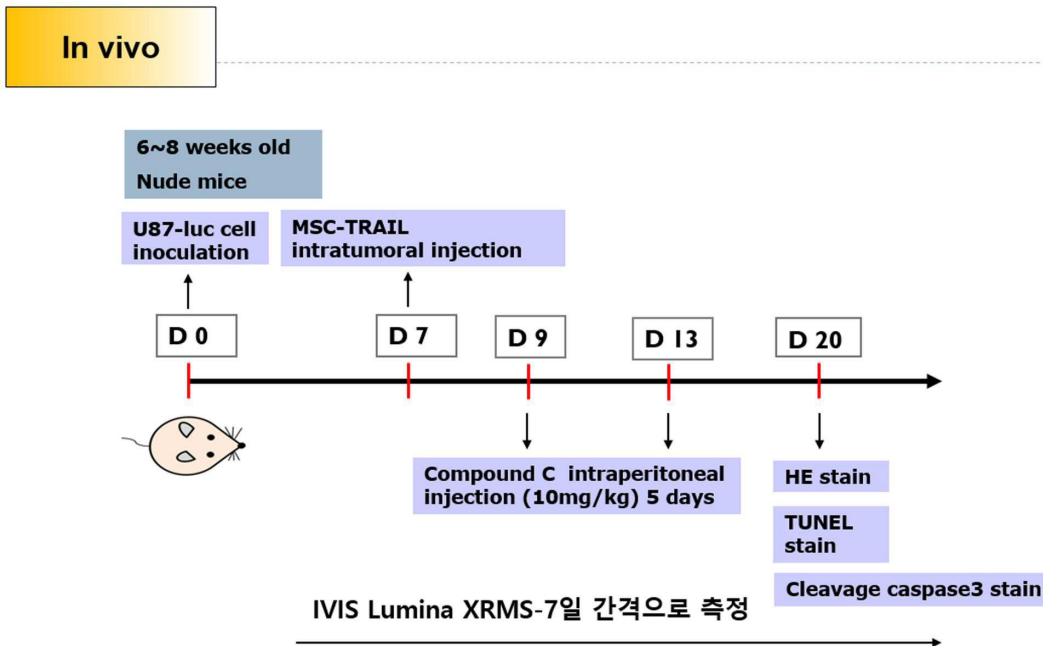
[0093] 그 결과, [도 6]의 A에서 나타나는 바와 같이 TUNEL 및 절단된 카스파제 3 의 염색은 MSC-TRAIL 및 화합물 C를 병합 처리하는 경우 각각 단독 처리하는 경우에 비하여 사멸된 세포 수가 유의적으로 증가하는 것을 나타냈다. 이들 결과는 MSC-TRAIL 및 화합물 C의 병합 처리의 항암 활성이 세포자멸에 관여하고 두개 내 신경교종의 세포자멸을 증진시킨다는 것을 의미하였다.

[0095] [통계 분석]

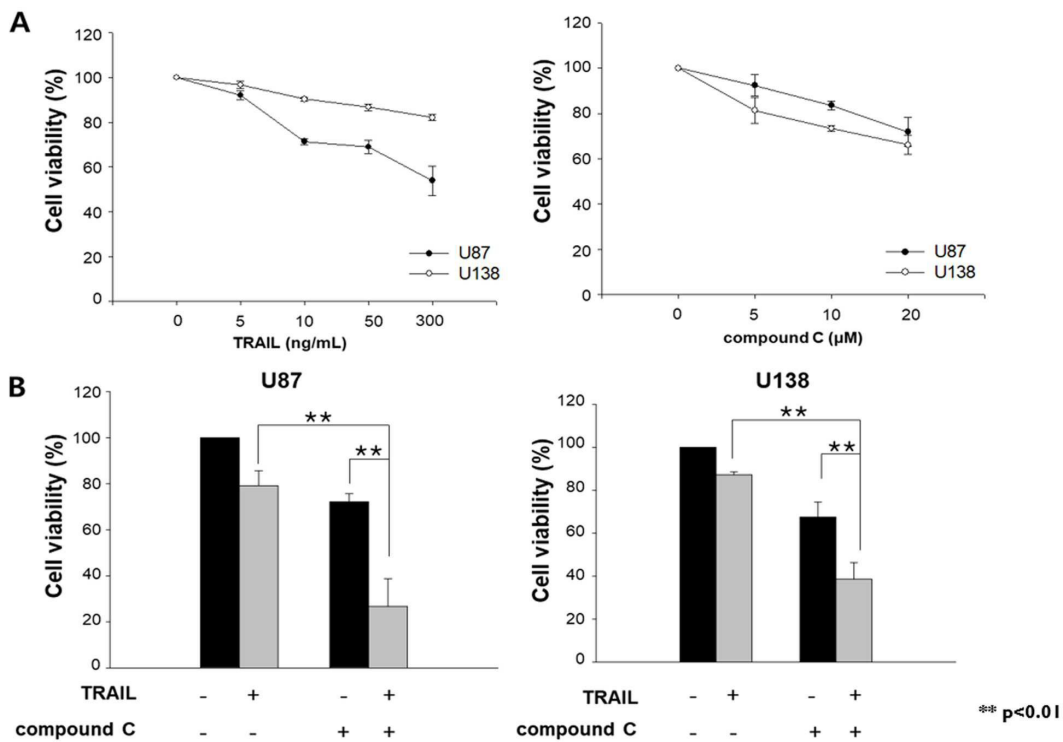
[0096] 모든 데이터는 평균 \pm SD (표준 편차)로 표시하였다. 테스트 조건들 사이의 통계적 차이는 Bonferroni 다중 보정과 함께 일원 분산 분석을 사용하여 결정되었다. $p < 0.05$ 미만의 확률 값은 유의한 것으로 간주하였다.

도면

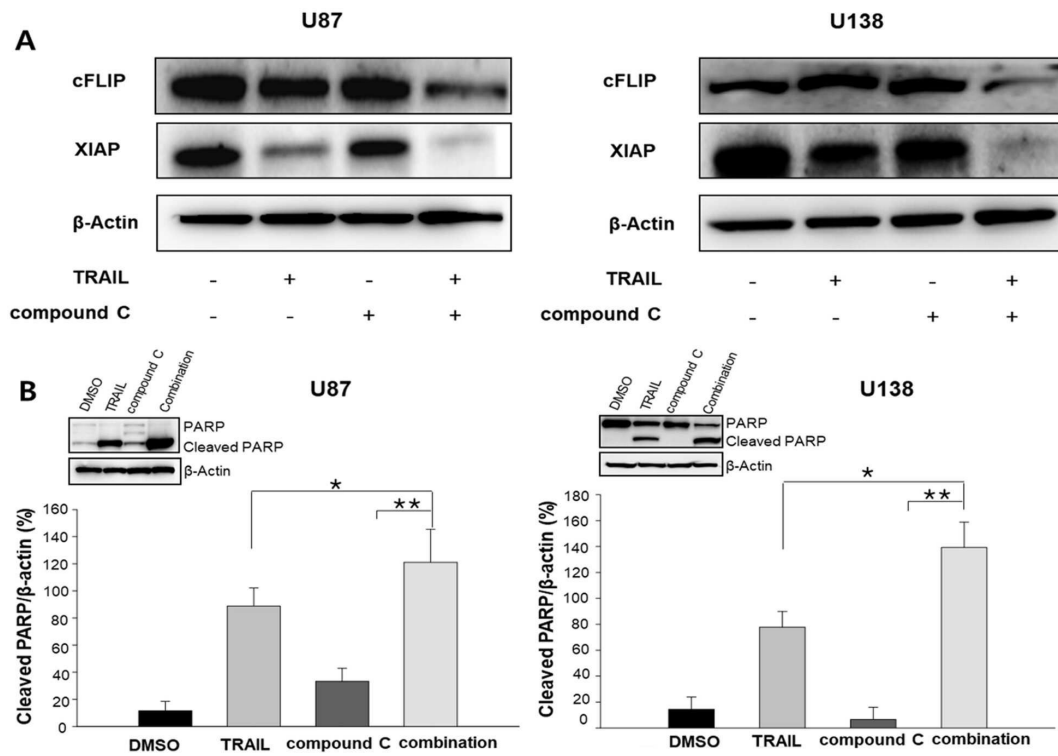
도면1



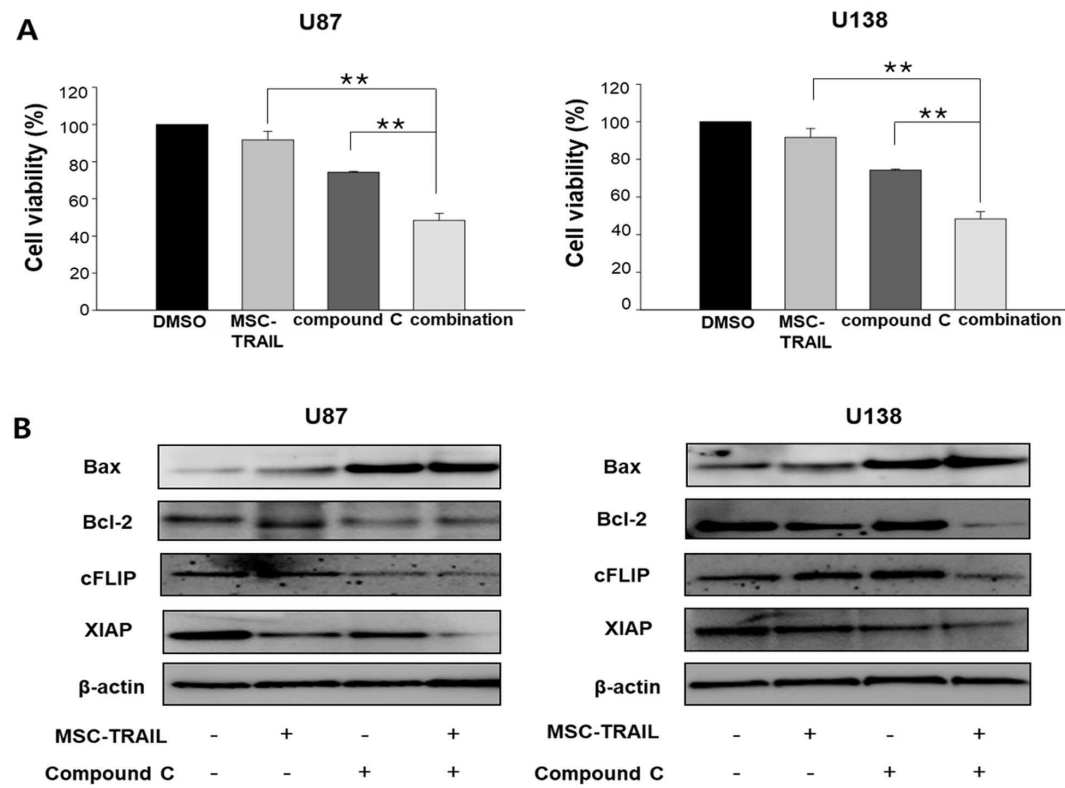
도면2



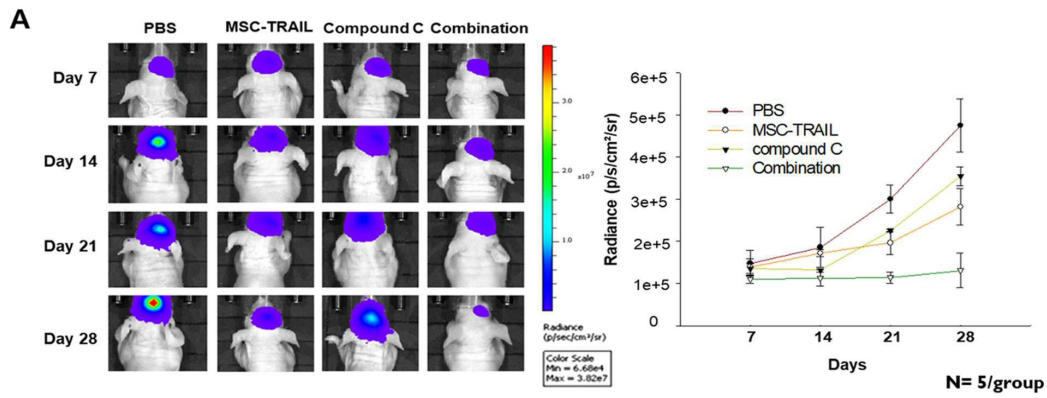
도면3



도면4



도면5



도면6

