



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월14일
(11) 등록번호 10-2565622
(24) 등록일자 2023년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/225 (2006.01) A61K 31/495 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/225 (2013.01)
A61K 31/495 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0037525
(22) 출원일자 2021년03월23일
심사청구일자 2021년03월23일
(65) 공개번호 10-2022-0132340
(43) 공개일자 2022년09월30일
(56) 선행기술조사문헌
Scientific Reports, 7:45951/1-10, 2017.*
Biochemical and Biophysical Research
Communications, 526, 300-305, 2020.*
Journal of Cancer Research and Clinical
Oncology, 146, 2817-2828, 2020.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
숙명여자대학교산학협력단
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)
(72) 발명자
강석구
경기도 수원시 영통구 광고호수공원로 277, 101동202호(중흥에스클래스)
심진경
서울특별시 마포구 성암로 91 현대아파트 103동 1102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 5 항

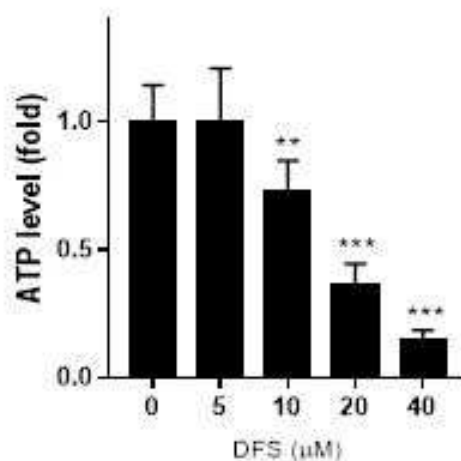
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 뇌암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이용하여 암 중에서도 특히 뇌암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/04 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

최란주

서울특별시 서대문구 증가로 150, DMC 센트럴 아이
파크 104동 1203호

류재하

서울특별시 용산구 청파로47길 100(청파동2가, 숙
명여자대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112182
과제번호	NRF-2019R1A2C3004155
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업-중견연구자지원사업
연구과제명	교모세포종 발암 기원세포의 특이적 신호전달체계 규명 및 치료 표적 발굴
기 여 율	1/6
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121356
과제번호	2020M2D9A2092372
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원자력연구개발사업-첨단방사선융합치료기술개발
연구과제명	난치성 뇌암의 방사선치료 병합 약물 발굴을 위한 다중 모니터링 시스템 개발
기 여 율	1/6
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.31 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119610
과제번호	NRF-2020M3E5E2037960
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신약분야원천기술개발(R&D)
연구과제명	신경교종 발암기원세포를 표적으로 하는 혁신 신약 타겟 검증 및 유효성 평가 시스

템 구축

기 여 율	1/6
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711042316
과제번호	2011-0030074
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초의과학분야(MRC)
연구과제명	세포운명조절 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	숙명여자대학교
연구기간	2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

(-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS]
또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하고,

테모졸로마이드(temozolomide; TMZ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는, 교모세포종의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀 및 테모졸로마이드는 1:0.001의 몰 농도비로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

(-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS]
또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 항암제의 감수성 증진용 약학적 조성물로서,

상기 항암제는 테모졸로마이드(temozolomide; TMZ)인 것이고,

상기 조성물은 교모세포종에서의 항암제의 감수성 증진용인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

(-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS]
또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하고,

테모졸로마이드(temozolomide; TMZ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는, 교모세포종의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀 및 테모졸로마이드는 1:0.001의 몰 농도비로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 중에서도 특히 뇌암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암이란 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제할 수 있는 정상 세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포 덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래하는 난치병이다.

[0003] 미국 암 협회(American Cancer Society) 자료에 따르면 2007년 한해 세계적으로 새로이 암 진단을 받은 환자는 1200만 명 이상이며 사망자는 760만 명으로 매일 약 2만 명씩 암으로 사망하는 것으로 보고되었다. 우리나라의 경우 2006년 통계청 보고에 따르면 암으로 인한 사망이 사망원인 1위를 차지하였다. 따라서, 암 발생 및 투병으로 인한 정신적, 육체적 고통의 감소와 삶의 질 향상을 위해 치료 효과가 우수한 종양 치료제의 개발이 절실히 요구된다.

[0004] 그러나 많은 노력에도 아직까지 정상 세포가 어떠한 기전을 거쳐 암 세포로 형질전환이 되는 지에 대해서는 정확하게 규명되지는 않았으나, 환경 요인, 화학 물질, 방사선, 바이러스 등 외적 요인 및 유전 인자, 면역학적 요인 등의 내적 요인 등이 복잡하게 얽혀 결과적으로 암이 발생한다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성 유전자(oncogenes)와 종양억제 유전자(tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 요인들에 의해 무너지면 암이 발생하게 된다.

[0005] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생하며, 이들의 치료방법으로 최근 글리벡 또는 허셉틴과 같은 소수의 표적 치료제가 특정암의 치료에 이용되고 있으나 현재까지는 수술이나 방사선 요법 및 세포증식을 억제하는 화학요법제를 이용한 항암제 치료가 주된 방법이다. 그러나 표적 치료제가 아니기 때문에 기존 화학요법제의 가장 큰 문제는 세포독성으로 인한 부작용과 약제 내성으로써, 항암제에 의한 초기의 성공적인 반응에도 불구하고 결국에는 치료가 실패하게 되는 주요 요인이다. 따라서, 이러한 화학요법제의 한계를 극복하기 위해서는 항암작용 기전이 명확한 표적 치료제 개발이 지속적으로 필요하다.

[0006] 한편, 신경교종(glioma)은 원발성 뇌 종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양에 해당한다. 그 중 가장 악성으로 분류되고 있는 교모세포종(glioblastoma, GBM)의 경우, 다른 암과 비교하였을 때 방사선 및 항암제 치료에 대한 저항성이 매우 높아 일단 진단되면 생존 기간이 1년에 불과하므로, 각 환자의 발생 기원과 과정에 대한 적절한 진단 및 이해가 중요하다.

[0007] 또한, 상기 뇌 종양의 경우, 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)이 존재하기 때문에 치료를 위한 약물 전달이 목적인 뇌 부위로 전달되기 어려울 뿐만 아니라, 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 치료제 개발이 활발하지 못한 것이 현실이다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌 종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다.

[0008] 따라서, 교모세포종의 치료에는 외과적 처치 이외에 방사선 치료 및 화학 약물 치료가 함께 수행되고 있으나, 상기 치료는 내성 변이의 발생, 종양줄기세포에 의한 재발 등의 원인으로 인하여 완벽한 치료법이 없다. 따라서, 보다 효과적으로 교모세포종을 치료할 수 있는 약물이 요구되고 있는 실정이다.

(선행문헌 1) Scientific Reports, 7:45951/1-10, 2017.

(선행문헌 2) Biochemical and Biophysical Research Communications, 526, 300-305, 2020.

(선행문헌 3) Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 146, 2817-2828, 2020.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 일 목적은 암 중에서도 특히 뇌암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 암 중에서도 특히 뇌암을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 항암제의 감수성을 증진시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명에서 상기 “(-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS]”은 오리나무(*Alnus japonica*)로부터 분리된 리그난(lignan) 성분에 해당하는 것이다.
- [0014] 본 발명에서 상기 약학적으로 허용되는 염은, 의학적 적용에 적합한 것으로 당업자에 의해 일반적으로 간주되는 염(예를 들어 이러한 염이 상기 염으로 치료될 수 있는 대상체에게 유해하지 않기 때문임), 또는 각각의 치료 내에서 허용 가능한 부작용을 야기하는 염이다. 일반적으로, 상기 약학적으로 허용되는 염은 미국 식품 의약국(FDA), 유럽 의약청(EMA), 또는 일본 후생성의 의약품 의료가기 종합기구(PMDA)와 같은 규제 당국에 의해 허용되는 것으로 간주되는 염이다. 그러나, 본 발명은 원칙적으로, 예를 들어 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체, 또는 본 발명에 따른 화합물의 약학적으로 허용되는 염 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체로서, 그 자체로는 약학적으로 허용되지 않는 본 발명에 따른 화합물의 염을 또한 포함한다. 상기 염은 수불용성 염을 포함하고, 특히, 수용성 염을 포함한다.
- [0015] 각각의 경우에, 당업자는 본 발명에 따른 특정 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가 염을 형성할 수 있는지 여부, 즉, 상기 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가, 예를 들어 아미노기, 카르복실산기 등과 같은 전하를 띌 수 있는 기를 가지는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 화합물의 예시적인 염은 산 부가 염 또는 염기와의 염, 특히 약학적으로 허용되는 무기산 및 유기산 부가 염 및 약학에서 통상적으로 사용되는 염기와의 염이며, 이는 수불용성 또는 특히 수용성 산 부가 염이다. 본 발명의 화합물의 치환기에 따라 염기와의 염이 또한 적합할 수 있다. 산 부가 염은, 예를 들어, 본 발명의 화합물의 용액을 염산, 황산, 푸마르산, 말레산, 석신산, 아세트산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 탄산 또는 인산과 같은 약학적으로 허용되는 산의 용액과 혼합함으로써 형성될 수 있다. 마찬가지로, 약학적으로 허용되는 염기 부가 염은 알칼리 금속염(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염); 알칼리 토금속 염(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염); 및 적합한 유기 리간드로 형성된 염(예를 들어, 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 알킬 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 반대 음이온을 사용하여 형성된 암모늄, 4차 암모늄 및 아민 양이온)을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 염의 예시적인 예로는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아르기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카르보네이트, 바이설페이트, 바이타르타레이트, 보레이트, 브로마이드, 부티레이트, 칼슘 에데테이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 캄실레이트, 카르보네이트, 클로라이드, 시트레이트, 디글루코네이트, 디하이드로클로라이드, 도데실설페이트, 에데테이트, 에디실레이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 갈락테이트, 갈락투로네이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 헥실레소르시네이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 하이드록시나프토에이트, 요오다이드, 이소부티레이트, 이소티오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트), 메틸설페이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레이트, 옥살레이트, 팔미테이트,

판토테네이트, 펙티네이트, 퍼실페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트/디포스페이트, 프탈레이트, 피크레이트, 피발레이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 셀페이트, 수베레이트, 석시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 운테카노에이트, 발레레이트 등이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0017] 본 발명에서 약학적으로 허용되지 않으며, 예를 들어, 산업적 규모로 본 발명에 따른 화합물을 제조하는 동안 공정 생성물로서 수득될 수 있는 염이 또한 본 발명에 포함되고, 요망되는 경우, 이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 약학적으로 허용되는 염으로 전환될 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학적 조성물은 테모졸로마이드(temozolomide; TMZ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화합물 및 테모졸로마이드는 1:0.001 내지 1:1000, 바람직하게는 1:0.01 내지 1:100, 더욱 바람직하게는 1:0.1 내지 1:10의 몰 농도비로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에서 상기 "암"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리키는 것으로, 그 발생 부위에 따라 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양일 수 있고, 바람직하게는 뇌암, 보다 바람직하게는 신경 교종 또는 교모세포종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 또한, 본 발명에서 상기 암은 FOXM1의 발현 수준이 증가하지 않은 암일 수 있다. 여기서, 상기 발현 수준의 증가는 대조군과 비교한 것으로, 대조군은 정상 기관, 조직 또는 세포에서의 발현 수준, 또는 그 평균 값 또는 중앙 값일 수 있고, 혹은 해당 암에서의 발현 수준, 또는 그 평균 값 또는 중앙 값일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 암 세포 및 암 줄기세포에 대한 성장 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다. 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훌름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 5-플루오로우라실, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스트라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 항암제의 감수성 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에서 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훌름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트

트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부실판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스트라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 테모졸로마이드일 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 테모졸로마이드(temozolomide; TMZ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화합물 및 테모졸로마이드는 1:0.001 내지 1:1000, 바람직하게는 1:0.01 내지 1:100, 더욱 바람직하게는 1:0.1 내지 1:10의 몰 농도비로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 항암제는 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포 암종, 신장 골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양의 암, 바람직하게는 뇌암, 보다 바람직하게는 신경 교종 또는 교모세포종의 예방, 개선 또는 치료를 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 또한, 본 발명에서 상기 항암제는 FOXM1의 발현 수준이 증가하지 않은 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 것일 수 있다. 여기서, 상기 발현 수준의 증가는 대조군과 비교한 것으로, 대조군은 정상 기관에서의 발현 수준, 또는 그 평균 값 또는 중앙 값일 수 있고, 혹은 해당 암에서의 발현 수준, 또는 그 평균 값 또는 중앙 값일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 암 세포 및 암 줄기세포에 대한 성장 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다. 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 5-플루오로우라실, 부실판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스트라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 항암제의 감수성 증진용 약학적 조성물에서 약학적으로 허용 가능한 염의 정의는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 이하 그 기재를 생략한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀[(-)-(2R,3R)-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol; DFS] 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 테모졸로마이드(temozolomide; TMZ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 더 포함할 수 있다.

- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화합물 및 테모졸로마이드는 1:0.001 내지 1:1000, 바람직하게는 1:0.01 내지 1:100, 더욱 바람직하게는 1:0.1 내지 1:10의 물 농도비로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서 상기 암은 뇌암, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종 또는 척수 종양의 암, 바람직하게는 뇌암, 보다 바람직하게는 신경 교종 또는 교모세포종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 본 발명에서 상기 암은 FOXM1의 발현 수준이 증가하지 않은 암일 수 있다. 여기서, 상기 발현 수준의 증가는 대조군과 비교한 것으로, 대조군은 정상 기관, 조직 또는 세포에서의 발현 수준, 또는 그 평균 값 또는 중앙 값일 수 있고, 혹은 해당 암에서의 발현 수준, 또는 그 평균 값 또는 중앙 값일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 암 세포 및 암 줄기세포에 대한 성장 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다. 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시타딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 5-플루오로우라실, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톨, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에서 약학적으로 허용 가능한 염의 정의는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 이하 그 기재를 생략한다.
- [0041] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 암 증상을 차단하거나, 암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 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, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0045] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자

일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0047] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에 따른 조성물을 이용하는 경우 뇌암 세포의 사멸을 효과적으로 유도하여, 뇌암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있으며, 더 나아가 상기 뇌암에 대한 항암제의 감수성을 보다 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 암의 침윤성 또는 전이성 또한 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 본 발명의 준비예 1에서 다양한 교모세포종 종양구에서 FoxM1 mRNA 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 ATP 활성도의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 2에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 세포 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 3에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 각 세포 주기에 따른 세포의 비율 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 4에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 세포 자멸율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 4에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 절단된 카스파제-3(cleaved caspase-3), Bcl-2 및 BAX의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 5에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 현미경으로 종양구를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실시예 5에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 종양구의 반경 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 실시예 6에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 위상차 현미경으로 종양구를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실시예 6에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-0-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 종양구를 포함하는 웰의 수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 실시예 6에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 종양구의 반경 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 실시예 7에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 CD133, 네스틴(nestin), Sox2, CD44, Msi-1 및 PDPN의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 실시예 7에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 CD133, 네스틴(nestin), Sox2, CD44, Msi-1 및 PDPN의 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 실시예 8에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 위상차 현미경으로 종양구를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 실시예 8에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 종양구 세포의 침윤 면적 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 실시예 8에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 Twist, N-카데린(N-cadherin), Snail 및 Zeb1의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 실시예 8에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리한 뒤 Twist, N-카데린(N-cadherin), Snail 및 Zeb1의 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 실시예 9에서 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물의 처리 후 생존한 교모세포종 종양구를 이중 이식한 마우스 모델의 뇌의 MRI를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명의 실시예 9에서 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물의 처리 후 생존한 교모세포종 종양구를 이중 이식한 마우스 모델에서 화합물의 처리 농도에 따른 교모세포종 종양의 부피 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 실시예 9에서 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물의 처리 후 생존한 교모세포종 종양구를 이중 이식한 마우스 모델에서 화합물의 처리 농도에 따른 마우스 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 실시예 10에서 교모세포종 종양구에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물과 테모졸로마이드를 병용 처리한 뒤 세포 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0053] 실시예

[0055] [준비예 1]

[0056] 다양한 교모세포종 종양구의 세포 용해물을 획득하여 마이크로어레이(microarray)를 이용해 FoxM1에 대한 mRNA 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0057] 도 1에 나타난 바와 같이, 교모세포종 종양구 중 TS13-64는 FoxM1 mRNA가 낮은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 더 나아가서는 정상 뇌 성상교세포(NHA)에서의 FoxM1 mRNA 발현 수준이 0.214인데, 상기 교모세포종 종양구 TS13-64에서의 FoxM1 mRNA 발현 수준은 0.0997으로, 정상 뇌 성상교세포에 비하여서도 낮은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0059] [실시예 1] 교모세포종 종양구에서의 ATP 활성 변화 실험

[0060] 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 72 시간 배양 후 CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit (Promega)를 넣어주고 형광

을 측정해 대조군 대비 ATP 활성도(%)를 측정하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0061] 도 2에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리하자 농도 의존적으로 ATP 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0063] [실시예 2] 교모세포종 종양구의 사멸율 변화 실험

[0064] 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 72 시간 배양 후 WST 시약 (D-Plus™ CCK cell viability assay kit, 동인LS)를 넣고 2시간 더 배양하고 450nm에서 흡광도를 측정하여 대조군(control) 대비 %를 계산해 각 군의 처리에 따른 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0065] 도 3에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리하자 농도 의존적으로 세포 사멸율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0067] [실시예 3] 교모세포종 종양구의 세포 주기율 변화 실험

[0068] 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 24 시간 배양 후 유세포 분석기를 이용하여 세포 주기를 분석하고 각 주기에 따른 세포의 비율을 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0069] 도 4에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리하자 농도 의존적으로 sub-G1기에 있는 세포 비율이 증가하였고, 이를 통해 세포 사멸이 유도되는 것을 알 수 있었다.

[0071] [실시예 4] 교모세포종 종양구의 세포 자멸율 변화 실험

[0072] 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 24 시간 배양하였다. 이후, 아넥신 V(annexin V)와 PI 염색하고, FACS 측정을 통해 세포 자멸율(%)을 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었고, 웨스턴 블롯을 통해 세포 자멸과 관련 단백질인 절단된 카스파제-3(cleaved caspase-3), Bcl-2 및 BAX의 발현 수준을 측정해 그 결과를 도 6에 나타내었다. 단, 도 5에서 'Early AP'는 세포 자멸의 초기 단계로 세포 자멸 신호로 진입된 세포를 의미하고, 'Late AP'는 세포막까지 파괴되어 핵이 노출된 상태로 완전히 사멸된 세포를 의미한다.

[0073] 도 5에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리하자 농도 의존적으로 세포 자멸율이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 도 6에서 보는 바와 같이 세포 자멸 관련 단백질인 절단된 카스파제-3와 BAX의 발현 수준은 증가하고, Bcl-2 발현 수준은 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0074] 이를 통해 상기 화합물을 처리함으로써 세포 괴사(necrosis)가 아닌 세포 자멸(apoptosis)을 통해 세포사가 발생하는 것을 알 수 있었다.

[0076] [실시예 5] 교모세포종 종양구 형성능 억제 실험(1)

[0077] 24 웰 플레이트에 교모세포종 종양구(TS13-64) 1×10^4 개의 세포를 접종한 뒤 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리하였다. 일주일 배양 후 종양구를 현미경으로 관찰한 사진을 도 7에 나타내었고, 종양구의 반경을 측정하여 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0078] 도 7 및 8에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리하자 농도 의존적으로 종양구의 반경이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0080] [실시예 6] 교모세포종 종양구 형성능 억제 실험(2)

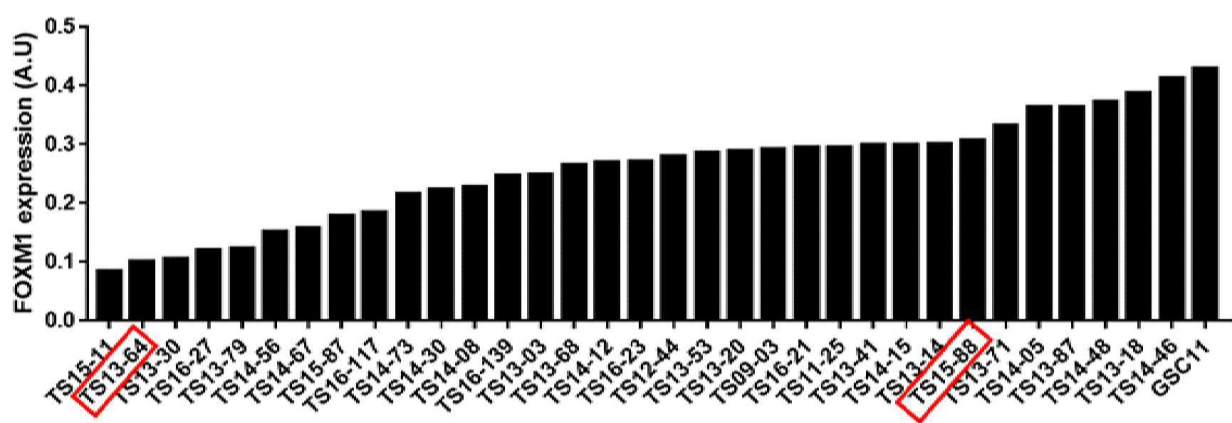
[0081] 24 웰 플레이트에 교모세포종 종양구(TS13-64) 1×10^4 개의 세포를 접종한 뒤 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리하였다. 10~11일 후 종양구를 위상차 현미경으로 촬영한 사진을 도 9에 나타내었고, 종양구를 포함하는 웰의 수를 측정하여 그 결과를 도 10에 나타내었으며, 종양구의 반경을 측정하여 그 결과는 도 11에 나타내었다.

[0082] 도 9 내지 11에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레시놀(DFS)의 화합물을 처리하자 종양구 형성 빈도나 그 크기가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

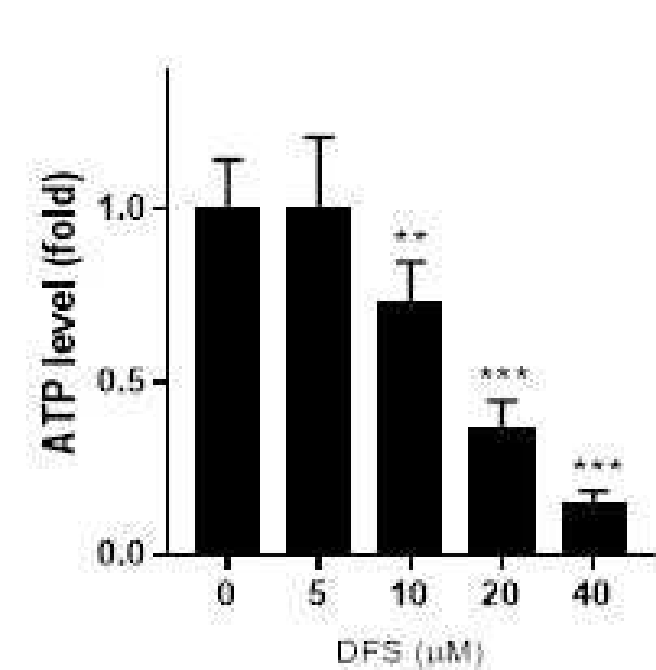
- [0084] [실시예 7] 교모세포종 종양구의 줄기세포능 억제 실험
- [0085] 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 뒤 웨스턴 블롯으로 줄기세포능과 관련된 단백질의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 12 및 13에 나타내었다.
- [0086] 도 12 및 13에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리하자 줄기세포능 관련된 단백질인 CD133, 네스틴(nestin), Sox2, CD44, Msi-1 및 PDPN의 발현 수준이 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0088] [실시예 8] 교모세포종 종양구의 침윤성 억제 실험
- [0089] 3D 침윤 어썰이를 통하여, I 형 콜라겐 매트릭스에 교모세포종 종양구(TS13-64)를 이식한 뒤 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 농도별로 처리한 후 72시간 경과한 시점에서 종양구 세포의 형상을 위상차 현미경으로 촬영해 그 결과를 도 14에 나타내었고, 종양구 세포의 침윤 면적을 측정하여 그 결과를 도 15에 나타내었다. 또한, 웨스턴 블롯을 이용하여 침윤성 관련 마커인 Twist, N-카데린(N-cadherin), Snail 및 Zeb1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 16 및 17에 나타내었다.
- [0090] 도 14 및 15에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리하자 침윤성이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었고, 도 16 및 17에서 보는 바와 같이 침윤성과 관련된 Twist, N-카데린(N-cadherin), Snail 및 Zeb1의 발현 수준이 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0092] [실시예 9] 인-비보 교모세포종 치료 효과 실험
- [0093] (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS) 화합물(5 μ M, 10 μ M)를 처리한 교모세포종 종양구(TS13-64)를 정위적 이종이식한 마우스 모델에 9주 차에 MRI를 촬영한 사진을 도 18에 나타내었고, 종양의 부피를 측정하여 그 결과를 도 19에 나타내었으며, 마우스 생존율을 측정해 그 결과를 도 20에 나타내었다.
- [0094] 도 18 내지 20에서 보는 바와 같이, (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 처리하고 생존한 교모세포종 종양구(TS13-64)를 이식한 교모세포종 마우스 모델에서 종양의 크기가 현저히 감소하고, 마우스 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0096] [실시예 10] 교모세포종 종양구에서의 테모졸로마이드 감수성 증진 효과 실험
- [0097] 교모세포종 종양구(TS13-64)에 (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물(10 μ M)과 테모졸로마이드(250 μ M)를 처리한 뒤 72 시간 배양 후 WST 시약 (D-Plus™ CCK cell viability assay kit, 동인LS)를 넣고 2시간 더 배양하고 450nm에서 흡광도를 측정하여 대조군(control) 대비 %를 계산해 각 군의 처리에 따른 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과는 도 21에 나타내었다.
- [0098] 도 21에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구(TS13-64)에 테모졸로마이드를 단독으로 처리한 경우 세포 사멸 효과가 미미하였으나, (-)-(2R,3R)-1,4-O-디페룰로일세코이솔라리시레스놀(DFS)의 화합물을 함께 처리하자 세포 사멸율이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0100] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

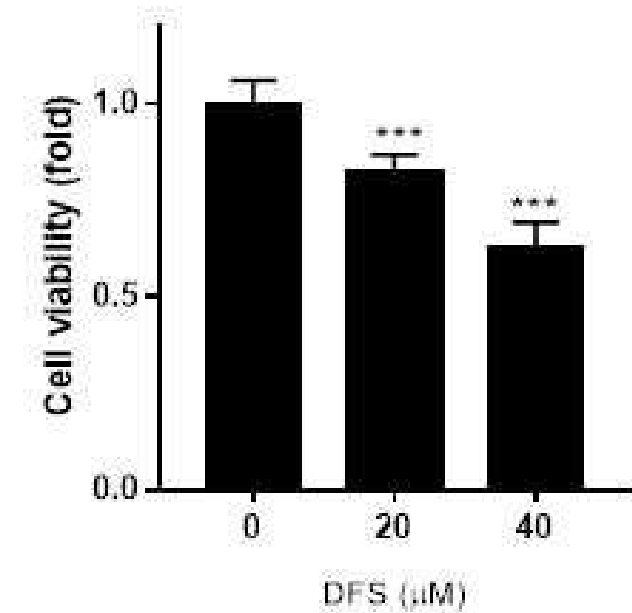
도면1



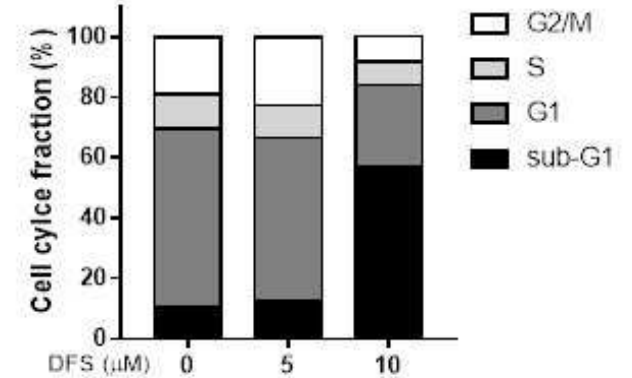
도면2



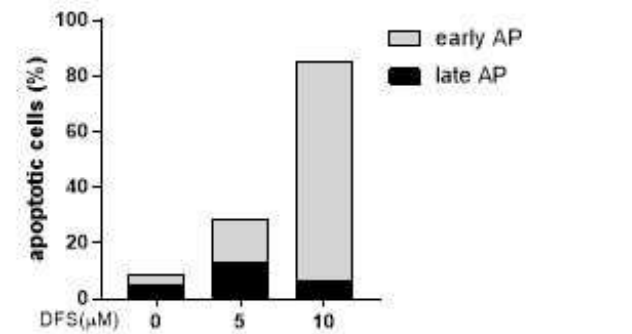
도면3



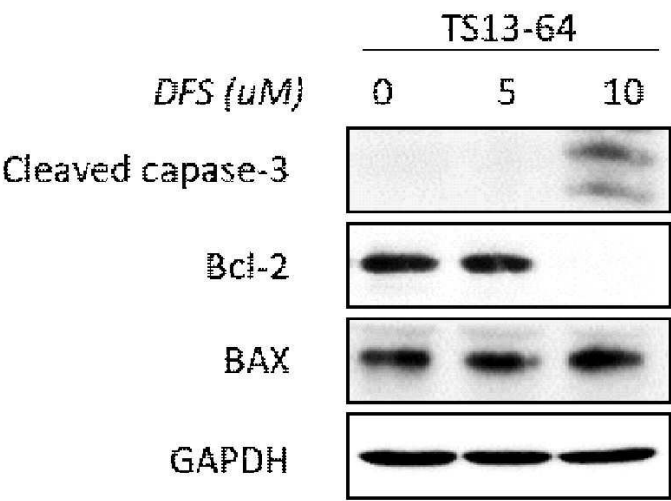
도면4



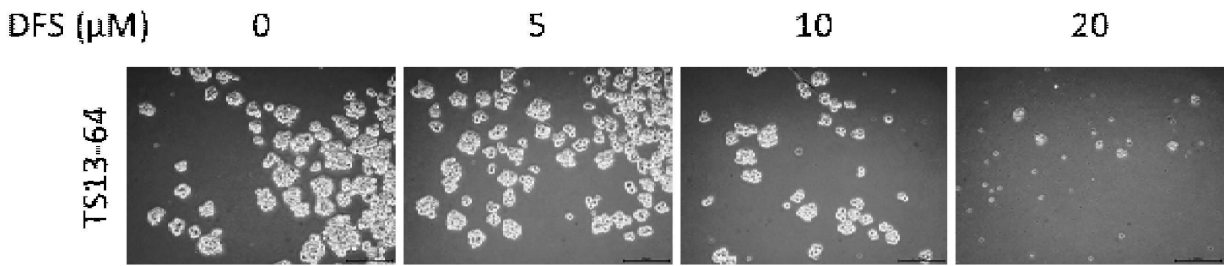
도면5



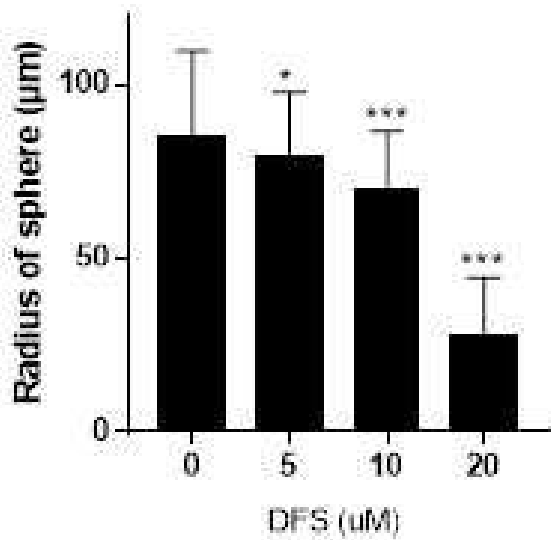
도면6



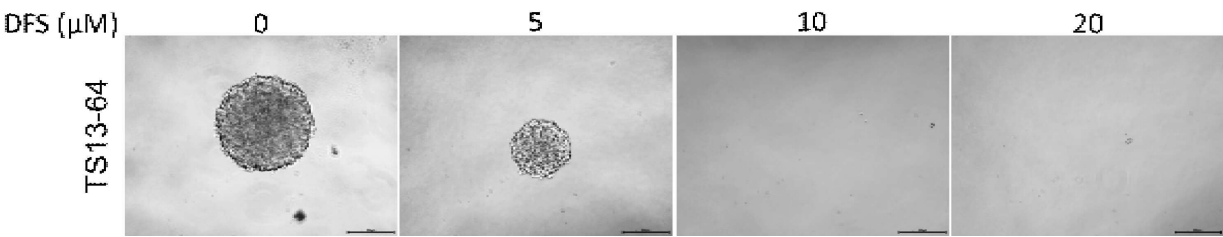
도면7



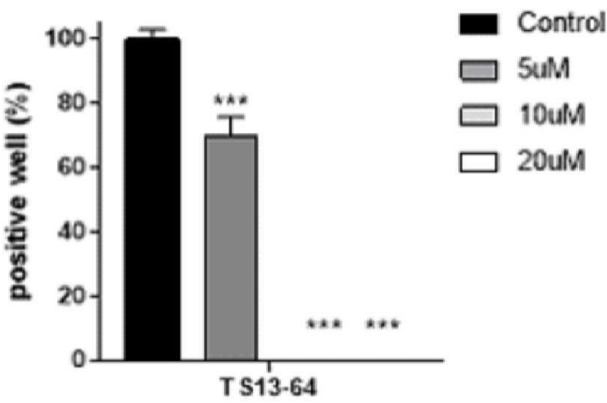
도면8



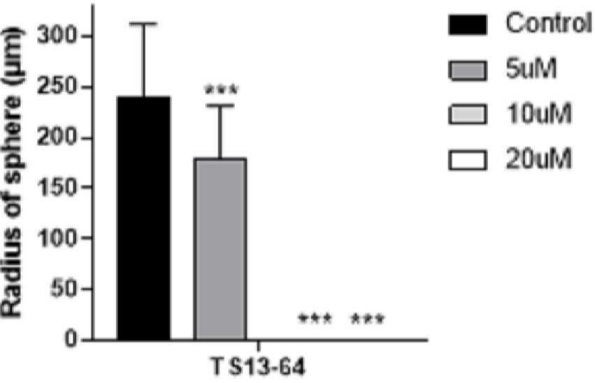
도면9



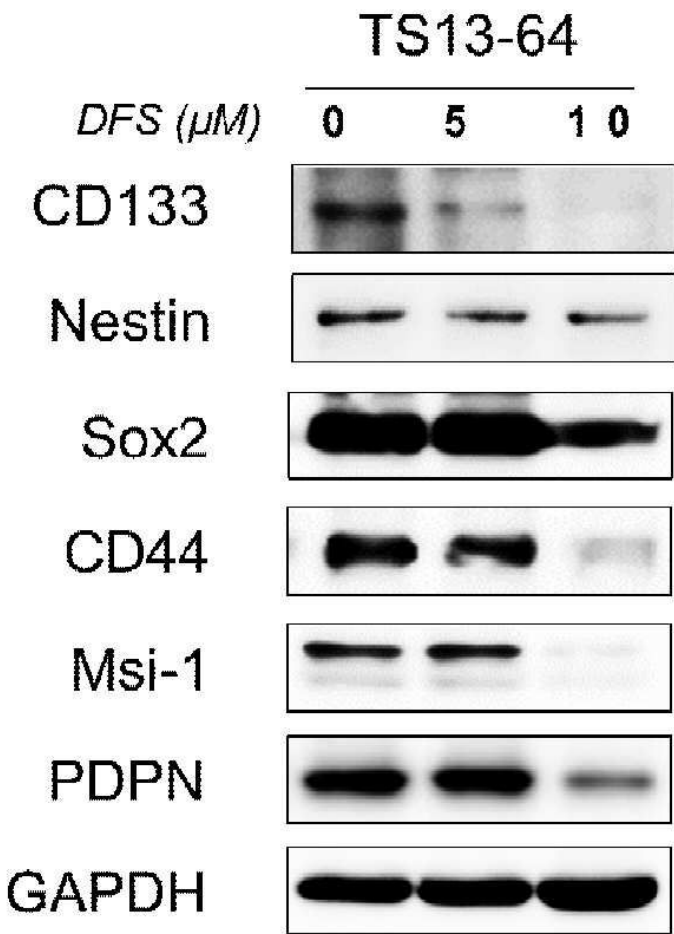
도면10



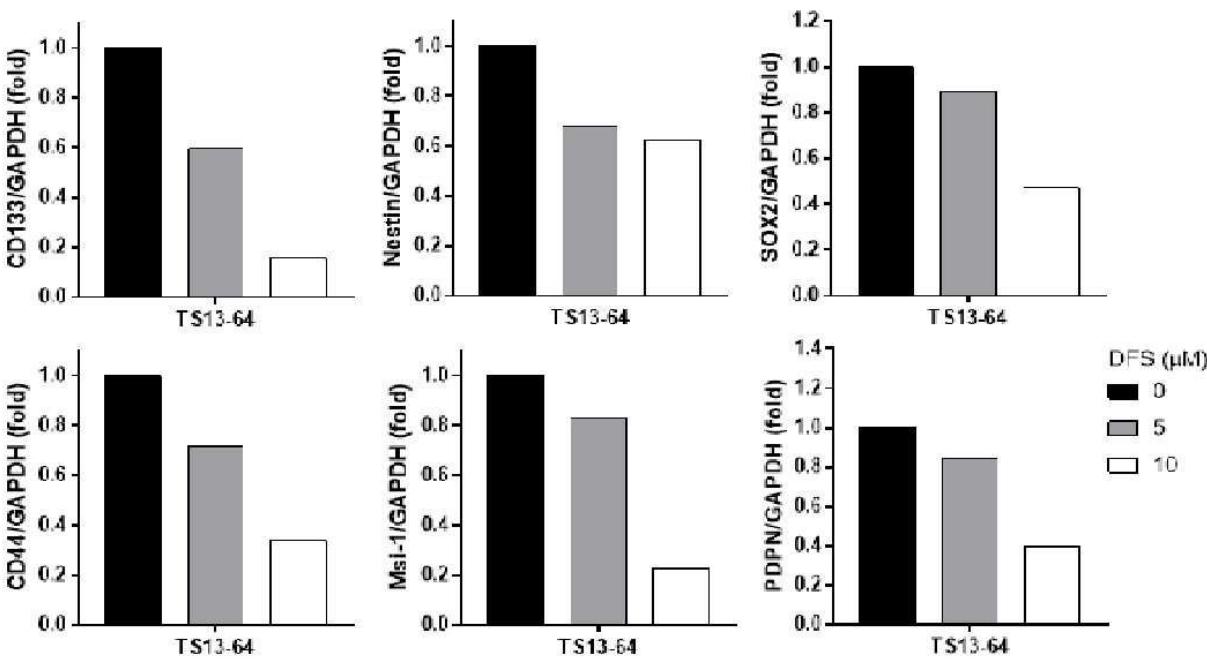
도면11



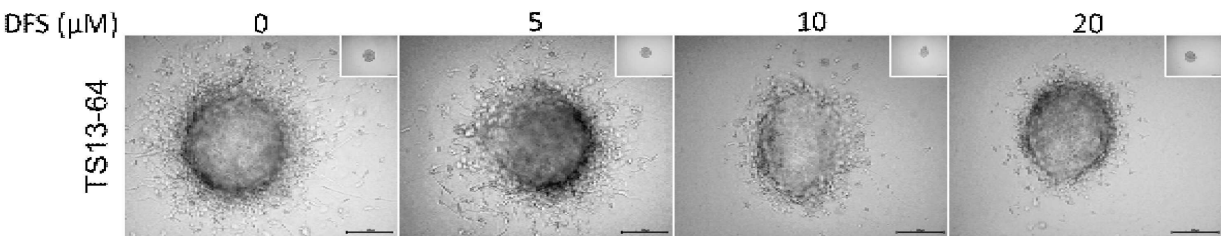
도면12



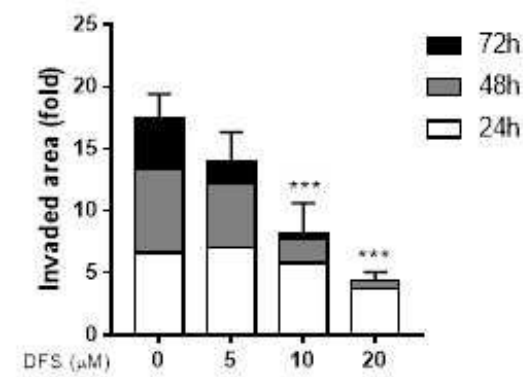
도면13



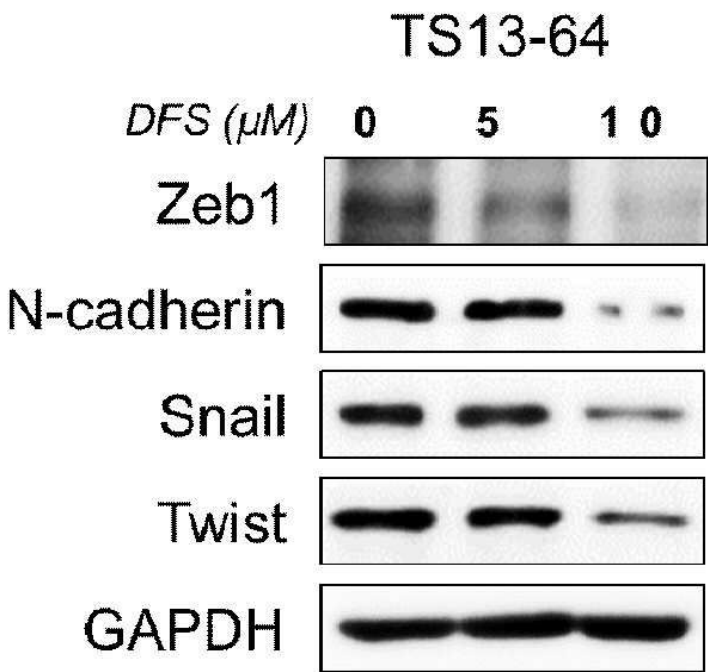
도면14



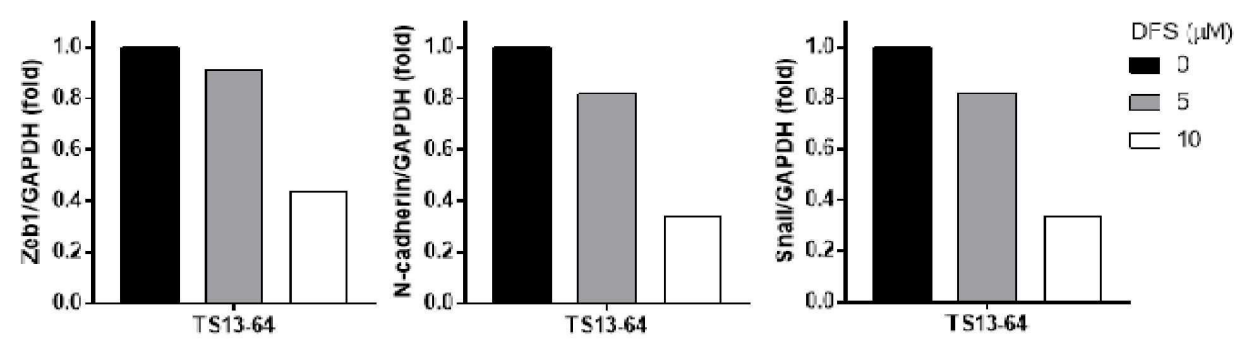
도면15



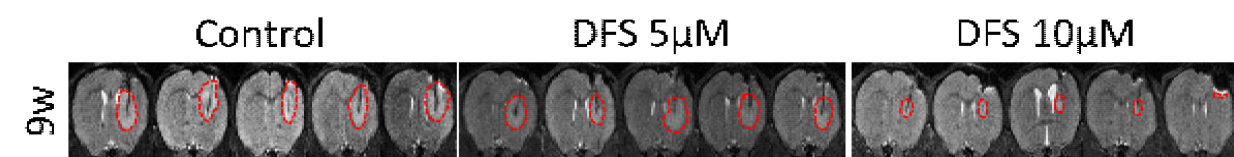
도면16



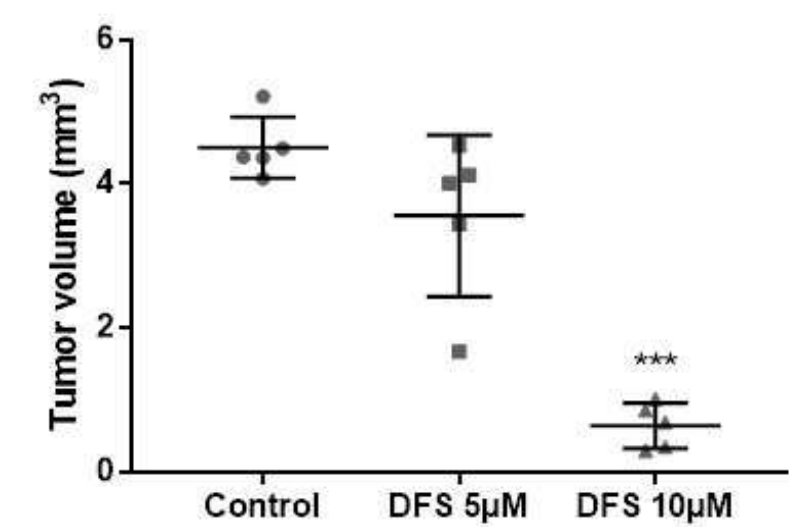
도면17



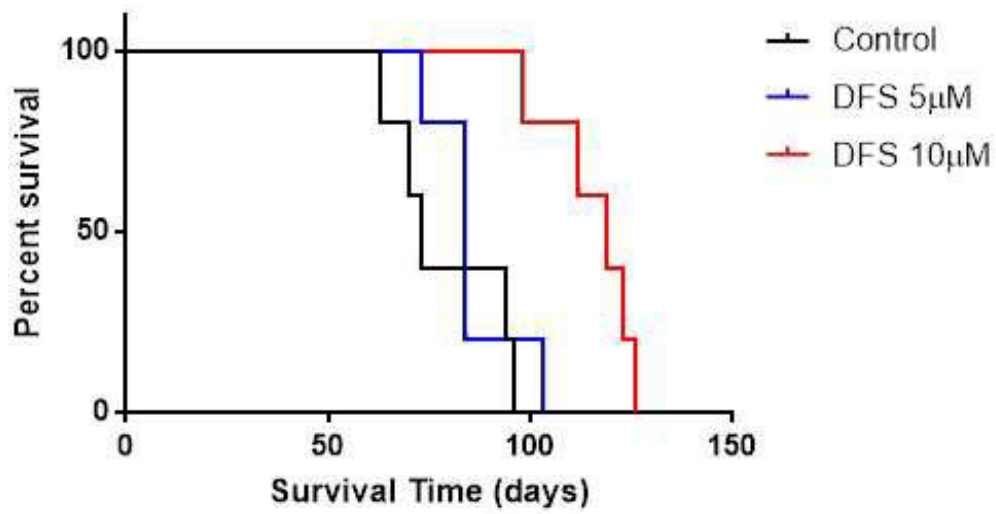
도면18



도면19



도면20



도면21

