



등록특허 10-2192827



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월18일

(11) 등록번호 10-2192827

(24) 등록일자 2020년12월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/11 (2006.01) **A61K 31/36** (2006.01)
A61K 31/37 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/11 (2013.01)
A61K 31/36 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0044918(분할)
- (22) 출원일자 2018년04월18일
 심사청구일자 2020년01월20일
- (65) 공개번호 10-2018-0045884
- (43) 공개일자 2018년05월04일
- (62) 원출원 특허 10-2017-0021460
 원출원일자 2017년02월17일
 심사청구일자 2017년02월17일
- (30) 우선권주장
 1020160019255 2016년02월18일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR101904893 B1*
 KR1020150102152 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
국립암센터
 경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
- (72) 발명자
정재호
 서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 808호
김수열
 경기도 고양시 일산서구 주화로 211, 103-1304 (대화동, 장성마을1단지아파트)
- (74) 대리인
이재영

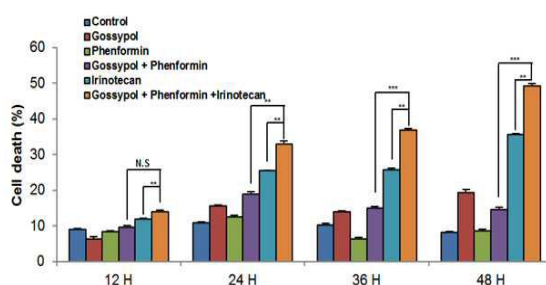
전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 본 연구에 따른 약학조성물은 암 줄기세포, 또는 저분화성 암 등의 암 줄기세포를 다량으로 포함하는 암 조직의 치료 및 예후 증진에 매우 효과적이다. 또한 폴리페놀 화합물과 비구아니드계 화합물, 및 항암제를 병용으로 암세포에 투여하면 각각 단독으로 투여한 경우보다 암세포 성장 억제 효과가 현저하게 증가되는 것을 확인하였으므로, 암 치료 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도12

(52) CPC특허분류

A61K 31/37 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H14C1324

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 국보건산업진흥원

연구사업명 구중심병원 R&D

연구과제명 글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

고시폴, 펜포르민, 및 이리노테칸을 유효성분으로 포함하는 위암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 고시폴은 0.5 내지 500 mM의 양으로 포함되는, 약학조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 치료는 위암 줄기세포를 포함하는 위암 세포의 수적 증가를 억제시키거나, 양적 증식을 억제시키거나, 세포를 사멸시키거나, 위암 줄기세포를 포함하는 위암 조직의 크기를 감소 또는 유지시키거나, 또는 위암 줄기세포를 포함하는 위암 조직 내의 신생혈관 발달을 억제하는 것을 포함하는, 약학조성물.

청구항 8

고시폴, 펜포르민, 및 이리노테칸을 유효성분으로 포함하는 위암 전이 억제용 약학조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 고시폴은 0.5 내지 500 mM의 양으로 포함되는, 약학조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제 8항에 있어서,

상기 전이는 혈행성, 임파행성, 또는 인접성인 것인, 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 전세계적으로 가장 보편적인 사망원인 중의 하나이다. 약 천만 건의 새로운 케이스가 매년 발생하며, 전체 사망원인의 약 12%를 차지하여 세 번째로 많은 사망의 원인이 되고 있다. 따라서 효과적인 항암제를 개발하고자 하는 노력이 지속되어 왔으나, 최근까지 개발된 항암제들은 대부분 일반적인 암세포를 표적으로 하는 것으로, 암 환자의 치료내성 및 재발에 중요한 역할을 하는 암 줄기세포의 사멸에는 효과적이지 못하다. 상기의 암 줄기 세포란 일반적인 줄기세포와 유사하게 무제한의 재생능력을 가진 암세포로서 일반적인 암세포와 상이하게 천천히 증식하고, 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지며, 기존에 알려져 있는 암세포들과 다른 기전(mechanism)을 가지는 것으로 알려져 있으나, 아직 암 줄기세포를 표적으로 하는 암 줄기세포 치료용 약물에 대한 개발은 매우 미비한 실정이다(국내출원특허 10-2011-0066035). 암 치료 후에도 체내에 암 줄기세포가 남게 되면 암의 재발 및 /또는 전이가 활발히 일어나므로, 암 줄기세포 치료제 개발은 시급한 과제라고 할 것이다.

[0004] 한편, 폴리페놀 화합물로서의 고시폴(Gossypol)은 면실(cotton plant)에 다량으로 포함된 페놀 유도체에 해당하는 것이다. 중국에서는 이러한 고시폴이 남성의 정자 기능을 억제하는 것을 발견하여, 남성 경구 피임약으로 개발되어 왔으나, 최근 고시폴의 암세포 성장 억제에 유의한 효과가 있다는 것이 공지되었다(미국 등록특허 US6114397). 그러나, 아직 고시폴만 단독으로 투여해서는 효과적으로 암세포 성장을 억제하는 것이 어려운 실정이다.

[0005] 본 연구는 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 및 암 줄기세포 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 본 연구에 따른 약학조성물은 암 줄기세포, 또는 저분화성 암 등의 암 줄기세포를 다량으로 포함하는 암 조직의 치료 및 예후 증진에 매우 효과적이다. 또한 폴리페놀 화합물과 비구아니드계 화합물, 및 항암제를 병용으로 암세포에 투여하면 각각 단독으로 투여한 경우보다 암세포 성장 억제 효과가 현저하게 증가되는 것을 확인하였으므로, 암 치료 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다

른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0013] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서 “암”이란, 제어되지 않은 세포성장으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 하는 것을 말한다. 학문적으로는 신생물이라고 명명되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환으로, 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과 외적 요인으로 구분한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는지에 대해서는 정확하게 규명되지 않았으나, 상당수의 암이 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로는 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성유전자 (oncogenes)와 종양억제유전자 (tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 요인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다. 암은 그 발생 부위에 따라 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암중, 항문부근암, 자궁내막암중, 질암중, 음문암중, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암중, 신장골반암중, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구분할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서 “저분화성 암(poorly differentiated cancer) 또는 저분화성 종양(poorly differentiated tumor)”이란, 암 조직 내부의 구조가 불명료하게 정돈된 배열이 상실된 상태를 의미한다. 미국 국립보건원(National Institutes of Health)의 국립 암 연구소(National Cancer Institute)에 의하면, 암 분류체계는 암의 성질에 의거하고, 일반적으로 암의 기형성(비정상성)에 따라 1, 2, 3 또는 4단계로 구분된다. 1단계는 암세포의 배열이 정상 조직과 거의 유사한 수준의 암으로, 1단계의 암은 자라는 속도와 주변 조직으로 침습하는 속도가 느리다. 대조적으로, 3 또는 4단계의 암은 정상 세포 또는 정상 조직과 완전히 다르게 보이고, 1단계 또는 2단계의 암보다 빨리 자라고 주변 조직으로 빠르게 침습한다. 이를 정리하면 하기와 같다.
- [0018] 암 전단계(GX): 전암-암의 단계를 결정할 수 없는 단계
- [0019] 1단계(G1): 고분화성 암-분화성이 좋은 단계(well differentiated)
- [0020] 2단계(G2): 중분화성 암-분화성이 중간인 단계(Moderately differentiated)
- [0021] 3단계(G3): 저분화성 암-분화성이 나쁜 단계(Poorly differentiated)
- [0022] 4단계(G4): 미분화성 암-미분화단계(Undifferentiated)
- [0023] 저분화성 암은 고분화성 또는 중분화성 암에 비하여 암 줄기세포를 다량으로 포함하고, 종양의 경계가 불분명하며, 전이가 빠르고, 치료 효과가 미비하며, 치료 후에도 예후가 좋지 않게 나타나는 것으로 알려져 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에서 “암 줄기세포(cancer stem cell)”란, 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암세포를 의미하며, 예를 들어 구(sphere) 형태의 암세포 집단이나, 저분화

성 암과 같이 형태가 불분명하고 예후가 좋지 않은 암 조직을 포함할 수 있다. 상기 암 줄기세포의 정상적인 종양 성장 조건(상기 "정상적인 종양의 성장 조건"이란 세포 성장에 필요한 영양분(포도당)이 충분하고 종양미세 환경의 성장 여건이 풍족하여 세포 스트레스가 없는 상태를 칭한다.)에서 일반적인 암세포와 상이하게 느린 속도로 증식하거나 휴지기(dormant state) 상태를 유지하여 항암제에 대한 저항성을 가지고 있을 수 있으며, 예를 들어, PGC-1a 등의 전사조절인자의 발현이 정상적인 종양세포와 달리 통제되어 주요 대사조절물질의 기능이 일반 암세포와 비교하여 상이할 수 있다. 이러한 상이한 대사조절 능력과 이에 기전(mechanism)적으로 연계된 세포 신호전달계의 조절을 통해 영양 결핍 상태에서 세포 사멸(apoptosis)에 대한 저항성을 획득하고 침윤 및/또는 전이능이 있는 세포를 포괄적으로 지칭한다. 그러나 일반적인 암세포로 분화할 수 있는 세포라면 이에 제한되지 않는다.

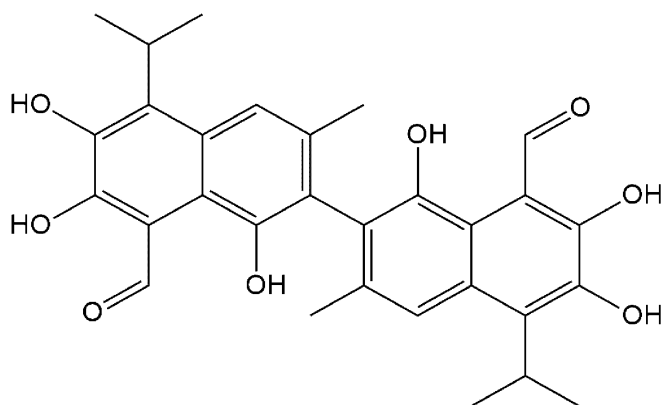
[0027] 본 발명의 일 구체예에서 "암 줄기세포의 성장 억제"란, 암 줄기세포 유지(maintenance) 억제, 암 줄기세포 악성화(malignance) 억제 및 암 줄기세포 침윤활성(invasive) 억제를 포함하는 의미이다.

[0029] 본 발명의 일 구체예에서 "폴리페놀(polyphenol)"이란, 식물에서 발견되는 화합물질의 일종으로서 분자 하나에 페놀 그룹이 한 개 이상 있는 것이 특징이다. 폴리페놀은 일반적으로 타닌, 페닐프로파노이드(플라보노이드, 리그닌 등)로 분류된다. 페놀은 벤젠의 수소원자 하나가 히드록시기로 치환된 것이며, 폴리페놀은 두 개 이상의 히드록시기로 치환된 것이다. 폴리페놀의 종류는 수천 가지가 넘는데 녹차에 든 카테킨, 포도주의 레스베라트롤, 사과, 양파의 퀘세틴 등이 있다. 과일에 많은 플라보노이드와 콩에 많은 이소플라본도 폴리페놀의 일종이다.

[0030] 폴리페놀은 우리 몸에 있는 활성 산소(유해 산소)를 해가 없는 물질로 바꾸어 주는 항산화 효과가 있어 노화를 방지한다. 또한 활성 산소에 노출되어 손상되는 DNA 보호, 세포구성 단백질 및 효소를 보호하는 기능이 뛰어나 다양한 질병에 대한 위험도를 낮춘다고 보고된다. 그러나 특정한 폴리페놀의 경우, 페놀 치환기의 작용으로 세포에 독성을 발휘할 수 있다. 대표적인 폴리페놀성 독소의 종류로는 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol) 및 쿠마린(coumarins) 등이 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 일 구체예에서 "고시폴(Gossypol)"이란, 고시피움(Gossypium)속 식물과 아욱과(Malvaceae) 식물의 일부의 씨앗, 잎, 줄기, 뿌리의 분리성 색소선에 포함되어 있는 폴리페놀 화합물의 일종으로, 폴리페놀릭 고시폴(polyphenolic gossypol) 또는 면실색소라고도 한다. 식물에게 해충에 대한 내성을 제공한다. 가금사료에 고시폴을 첨가할 때, 사료 이용성, 계란생산성 저하와 저장된 계란의 난황탈색 등이 보고된 바 있다. 반면 반추가 축은 발효에 의해 고시폴을 비활성화시킨다. 유리 고시폴은 생리적으로 유독성인 반면 결합 고시폴은 비활성이다. 면실 중 비단백질 성분도 고시폴과 결합하여 비용해성 및/또는 비소화성 복합체를 형성한다. 이 결합은 면실박내 고시폴을 해독시킨 하지만 단백질 및 생물학적 가치를 감소시킨다. 유리 고시폴에 대해 철을 2:1 혹은 3:1의 비율로 첨가하면 간에서 고시폴의 독성을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 중국에서는 이러한 고시폴이 남성의 정자 기능을 억제하는 것을 발견하여, 남성 경구 피임약으로 연구되고 있다. 본 발명에 있어서의 고시폴은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 유도체인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] [화학식 1]



[0034]

[0036] 본 발명의 일 구체예에서 "비구아니드(biguanide)계 화합물"이란, 바람직하게는 비구아나이드 계열 당뇨병 치료제이며, 더욱 바람직하게는 메트포르민(metformin), 펜포르민(phenformin), 부포르민(buformine) 등 일 수 있으나, 세포 내 에너지 생성을 방해하여 영양 결핍 유사 상태를 유도하는 비구아나이드 계열 화합물이라면 이에

제한되지 않는다.

- [0038] 본 발명의 일 구체예에서 “항암제”란, 악성종양의 치료를 위하여 사용되는 화학요법제의 총칭이다. 대부분의 항암제는 암세포의 각종 대사경로(代謝經路)에 개입하여 주로 핵산의 합성을 억제하거나 항암활성(抗癌活性)을 나타내는 약제이다. 현재 암치료를 사용되고 있는 항암제는 생화학적인 작용 기전에 따라 6개의 범주로 분류하고 있다.
- [0039] (1) 알킬화제(alkylating agents): 어떤 화합물에 알킬기 R-CH₂를 도입할 능력을 갖춘, 반응성이 대단히 높은 물질로 세포에 작용시키면 대부분은 DNA의 구아닌의 N7과 반응하여 DNA구조를 변형시키고, 사슬절단[鎖切斷]을 일으켜 항암효과 및 세포독효과를 나타낸다. 여기에 속하는 약물로는, ① 나이트로젠머스터드계(系): 나이트로젠 머스터드·클로람부실·멜팔란·사이클로포스파마이드 등 ② 에틸렌이민계: 싸이오테파 ③ 알킬설포네이트계: 부설판 ④ 트라이아진계·하이드라진계: DTIC(다카바진)·프로카바진 ⑤ 나이트로소요소계: BCNU, CCNU, 메틸-CCNU 등이 있다.
- [0040] (2) 대사길항제(代謝拮抗劑: antimetabolites): 이 군(群)에 속하는 약물은 암세포의 증식에 필요한 대사과정을 저해하는 작용을 가진 것으로 ① 엽산유도체: 메소트렉세이트(MTX) ② 퓨린 유도체: 6-메르캅토피린(6-MP), 6-싸이오구아닌 ③ 피리미딘 유도체: 5-플루오로우라실, 시타라빈 등이 있다.
- [0041] (3) 항생물질(抗生物質: antibiotics): 세균에서 생산되는 항생물질 가운데 항암작용을 나타내는 것으로는 아드리아마이신, 다우노루비신, 블레오마이신, 미토마이신-C, 악티노마이신-D 등이 있다.
- [0042] (4) 유사분열억제제(有絲分裂抑制劑: vinca alkaloid): 이들 약물은 분열시기 특이성 약물로서 유사분열 시기 중 중기(metaphase)에서 세포분열을 중지시킨다. 빈크리스틴, 빈블라스틴, VP-16-213 및 VM-26이 있다.
- [0043] (5) 호르몬제: 어떤 종류의 암은 호르몬을 투여함으로써 치료효과를 볼 수 있는데, 남성호르몬을 사용하는 경우는 유방암, 여성호르몬은 전립선암, 프로게스테론은 자궁내막암에 효과가 있으며, 부신피질호르몬은 급성림프성 백혈병이나 림프종(腫)의 치료에 사용하고 있고, 유방암에 대해서는 항여성 호르몬제인 타목시펜이 쓰이고 있다.
- [0044] (6) 기타: 시스플라틴, L-아스파라지네이스, o,p-DDD 등이 있다. 이상과 같이 현재 암치료를 사용되고 있는 항암제는 40여 종으로서 각각의 약제마다 그 항암범위에는 큰 차이가 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구체예에서 “이리노테칸(Irinotecan)”이란, 재발성, 전이성인 위암, 직장암 또는 결장암 등에 사용되는 항암제의 일종으로, 바람직하게는 이리노테칸염산염이나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 일 구체예에서 “진단”이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 진단은 암의 발병 유무, 증식 여부 및 전이 여부를 확인하는 것이며, 상기의 “암”이란 “암 줄기세포”를 포함하는 의미이다. 암 발병 또는 전이 의심 환자로부터의 조직의 육안적 또는 세포학적 확인으로 암을 진단할 수 있으며, 암 발병 또는 전이 의심 조직의 검체(임상적으로는 세포, 혈액, 수액, 흉수, 복수, 관절액, 농(膿), 분비액, 담, 인두점액, 요(尿), 담즙, 대변등) 내에 포함되어 있는 암 대응 항체를 이용하는 방법, 상기 검체 내 암 관련 단백질을 직접 검출하는 방법 또는 암 관련 단백질을 코딩하는 핵산을 직접 검출하는 방법으로 암을 진단할 수 있다. 항원-항체 결합 또는 암 관련 단백질을 직접 검출하는 방법을 이용한 진단적 수단으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 암 관련 단백질을 코딩하는 핵산을 직접 검출하는 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 구체예에서 “치료”란, 목적하는 질병의 완화 또는/및 개선을 위해 수행되는 일련의 활동을 의미한다. 본 발명의 목적상 치료는 암 줄기세포를 포함하는 암세포의 수적 또는 양적 증식을 억제시키거나, 암세포를 사멸시키거나, 암 조직의 성장을 억제시키거나, 암 조직의 크기를 감소시키거나, 암 조직 내의 신생혈관의 발달을 억제시키는 활동을 포함한다.
- [0052] 본 발명의 일 구체예에서 “전이”란, 암세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 가는 것이며, 상기의 “암”이란

“암 줄기세포”를 포함하는 의미이다. 암이 신체의 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암조직이 성장하여 직접적으로 주위장기를 침윤하는 것과 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격전이를 하는 것으로 나눈다. 전이는 암 발생과 관련된 유전자의 발현 억제 또는 상기 유전자의 단백질 활성 억제를 통해 조절될 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 구체예에서 “약학조성물”이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학조성물은 폴리페놀 화합물을 포함하고 암 줄기세포를 포함하는 암을 치료하거나 암의 전이를 억제하는 것이며, 이에 관여하는 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은, 상기 폴리페놀 화합물에 비구아니드계 화합물과 항암제를 추가로 포함하는 제공될 수 있고, 상기 비구아니드계 화합물은 펜포르민(phenformin)이고, 상기 항암제는 이리노테칸(Irinotecan)인 것이 바람직하나, 이에 한정하는 것은 아니다. 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 유효성분을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 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 및 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 일 구체예에서 “투여”란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 치료용 약학 조성물을 1회 50ml~500ml의 양으로 체내에 투여 가능하며, 화합물일 경우 0.1mg/kg-10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1mg/kg-10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여간격은 1일 1회 내지 12회일 수 있으며, 1일 12회 투여할 경우에는 2시간마다 1회씩 투여할 수 있다. 또한 본 발명의 약학조성물은 목적하고자 하는 암 줄기세포의 치료를 위해 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법, 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학조성물은 면역 반응을 증진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 같은 어쥬번트 또는 사이토카인(또는 사이토카인을 코딩하는 핵산)과 혼합하여 투여될 수 있다. 바이오리스틱(biolistic) 전달 또는 생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다. 생체 외 처리에서 예를 들어 항원제시 세포들(APCs), 수지상세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 약학조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 구체예에서, 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고, 상기 폴리페놀 화합물은 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol), 및 쿠마린(coumarins)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 폴리페놀 화합물은 0.5 내지 500 mM의 양으로 포함되는 약학조성물을 제공하며, 상기 약학조성물은 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 약학조성물을 제공하며, 상기 비구아니드계 화합물은 메트포민(metformin), 부포르민(buformin), 및 펜포르민(phenformin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 약학조성물은 항암제를 추가로 포함하는 약학조성물을 제공하며, 상기 항암제는 이리노테칸(Irinotecan)인 약학조성물을 제공하며, 상기 암은 암 줄기세포를 포함하는 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 암은 위암인 약학조성물을 제공하며, 상기 치료는 암 줄기세포를 포함하는 암세포의 수적 증가를 억제시키거나, 양적 증식을 억제시키거나, 세포를 사멸시키거나, 암 줄기세포를 포함하는 암 조직의 크기를 감소 또는 유지시키거나, 또는 암 줄기세포를 포함하는 암 조직 내의 신생혈관 발달을 억제하는 것을 포함하는 약학조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명의 다른 구체예에서, 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 약학조성물을 제공하고, 상기 폴리페놀 화합물은 사프롤(safrole), 고시폴(Gossypol), 및 쿠마린(coumarins)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 폴리페놀 화합물은 0.5 내지 500 mM의 양으로 포함되는 약학조성물을 제공하며, 상기 약학조성물은 비구아니드계 화합물을 추가로 포함하는 약학조성물을 제공하며, 상기 비구아니드계 화합물은 메트포민(metformin), 부포르민(buformin), 및 펜포르민(phenformin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학조성물을 제공하며, 상기 약학조성물은 항암제를 추가로 포함하는 약학조성물을 제공하며, 상기 항암제는 이리노테칸(Irinotecan)인 약학조성물을 제공하며, 상기 암은 암 줄기세

포를 포함하는 것인 약학조성물을 제공하며, 상기 암은 위암인 약학조성물을 제공한다.

[0062] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0064] 암 줄기세포란 일반적인 줄기세포와 유사하게 무제한의 재생능력을 가진 암세포로서 일반적인 암세포와 상이하게 천천히 증식하고, 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지며, 기존에 알려져 있는 암세포들과 다른 기전(mechanism)을 가지는 것으로 알려져 있다. 암 치료 후에도 체내에 암 줄기세포가 남게 되면 암의 재발 및 /또는 전이가 활발히 일어나므로, 암 줄기세포 치료제 개발은 시급한 과제라고 할 것이다.

[0065] 본 연구는 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 본 연구에 따른 약학조성물은 암 줄기세포, 또는 저분화성 암 등의 암 줄기세포를 다량으로 포함하는 암 조직의 치료 및 예후 증진에 매우 효과적이다. 또한 폴리페놀 화합물과 비구아니드계 화합물, 및 항암제를 병용으로 암세포에 투여하면 각각 단독으로 투여한 경우보다 암세포 성장 억제 효과가 현저하게 증가되는 것을 확인하였으므로, 암 치료 분야에서 크게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴의 증식 억제 효과를 확인한 결과이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴의 ATP 합성 억제 효과를 확인한 결과이다.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴의 세포사 촉진 효과를 확인한 도이다.
 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴의 세포사 촉진 효과를 확인한 그래프이다.
 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 고시폴 처리한 위암 세포주의 세포주기를 분석한 결과이다.
 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 일반 위암세포 및 위암 줄기세포에 고시폴을 투여하고, IC50 농도를 확인한 결과이다.
 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 일반 위암세포 및 위암 줄기세포에 고시폴을 투여하고, 48시간 후 세포 생존율을 확인한 결과이다.
 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, PAGS 및 SAGS 세포에 고시폴을 투여하고, IC50 농도를 확인한 결과이다.
 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴 및 기존 약제의 병용 투여시 세포 성장 억제 효과를 확인한 결과이다.
 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴 및 기존 약제의 병용 투여시 세포내 미토콘드리아 활성 저하를 확인한 결과이다.
 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴 및 기존 약제의 병용 투여시 세포 사멸 효과를 확인한 결과이다.
 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른, 위암 세포주에 대한 고시폴 및 기존 약제의 병용 투여시 세포 사멸 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 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.

[0070] 실시예 1. 위암 세포에 대한 고시폴의 효과 확인

[0072] 실시예 1-1. 위암 세포에 대한 고시폴의 증식 억제 효과 확인

[0073] 위암 세포주에 대한 고시폴의 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 6종류의 서로 다른 위암 세포주(MKN28, MKN45, AGS, SNU668, Kato3 및 HS746T)를 준비하였다. 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank) 또는 국제 세포주은행(ATCC)에 공지된 세포주들의 정의는 표 1에 기재하였다.

표 1

[0074]

세포주명	정의	분화도
MKN28	인간 위선암 (Human stomach adenocarcinoma, tubular)	중분화성 (moderately differentiated)
MKN45	인간 위선암 (Human stomach adenocarcinoma)	저분화성 (poorly differentiated)
AGS	인간 위선암 (Human stomach adenocarcinoma)	저분화성 (poorly differentiated)
SNU668	인간 위암 (Human stomach carcinoma, signet ring cell)	저분화성 (poorly differentiated)
Kato3	인간 위암 (Human stomach carcinoma)	저분화성 (poorly differentiated)
HS746T	인간 위암 (Human stomach carcinoma)	저분화성 (poorly differentiated)

[0075]

상기 6종류의 세포(세포수; $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ /well)를 각각 96-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하고, 고시폴을 각각 0, 10, 20, 40 또는 $60 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 후, 추가로 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 4°C 조건에서 1시간 동안 50 부피% TCA(trichloroacetic acid)로 고정하고, 증류수 세척 후, 실온에서 수분 건조하였다. 고정된 세포가 들어있는 각각의 웰을 1 부피% 아세트산 용액에 용해한 0.4 중량% 술포로다민 B(Sulforhodamine B) $100 \mu\text{l}$ 로 10분간 염색 처리하고, 1 부피% 아세트산 용액으로 4회 세척하였다. 염색된 플레이트는 실온 건조한 후에 각 웰마다 $100 \mu\text{l}$ 의 10mM 트리스 완충액(Tris buffer, pH 7.5)을 첨가하였고, 용출된 색소를 515 nm 파장에서 흡광도 측정하였다. 상기의 결과로 도출된 고시폴 농도에 따른 암세포주의 성장 억제 효과를 도 1에 기재하였다.

[0076]

실험 결과, 대부분의 저분화성 암세포(MKN45, AGS, SNU668 및 Kato3)가 모든 농도 조건에서 중분화성 암세포(HS746T)에 비해 세포 증식이 억제되는 것으로 나타났다. 또한 고시폴 $60 \mu\text{M}$ 을 처리한 경우에는 실험에 사용된 모든 종류의 저분화성 암세포(MKN45, AGS, SNU668, Kato3 및 HS746T)가 중분화성 암세포(HS746T)보다 세포 증식이 억제되었다. 상기의 실험 결과로부터 도출된 각 세포주의 GI50 수치는 표 2에 기재하였다.

표 2

[0077]

세포주명	GI50(μM)
MKN28	5.32
MKN45	4.65
AGS	6.43
SNU668	4.11
Kato3	3.15
HS746T	9.89

[0079]

실시예 1-2. 위암 세포에 대한 고시폴의 ATP 합성 억제 효과 확인

[0080]

ATP(아데노신3인산, adenosine triphosphate)은 생물의 에너지원으로, 세포 내 ATP 합성이 억제되면 에너지대사 활성도가 감소한다. 실시예 1-1의 위암 세포주 MKN28, MKN45 및 SNU668에 대하여 고시폴의 ATP 합성 억제 효과를 확인하였다.

[0081]

MKN28, MKN45 및 SNU668의 각 세포(세포수; $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ /plate)를 60mm 배양접시에서 24시간 동안 배양하고, 고시폴을 각각 0, 10, 또는 $20 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 후, 추가로 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 수확하고 계수하여 $100 \mu\text{l}$ 의 10 부피% FBS가 포함된 RPMI 배양액에 희석하였고, 이를 96-웰 플레이트의 각 웰에 이전하였다. 상기 세포가 들어있는 웰에 프로메가 ATP 분석 키트(G7572, Promega, Durham, NC, USA)의 분석 버퍼(rL/L reagent + reconstitution buffer) $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 형광의 발광 정도를 560nm에서 흡광도 측정하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0082]

실험 결과, 실험에 사용된 모든 위암 세포주에서 고시폴 농도에 비례하여 ATP 합성이 저해되는 것으로

나타났다. 이로써 고시폴이 암세포에서 효과적으로 에너지 준위를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0084] **실시예 1-3. 위암 세포에 대한 고시폴의 세포사 촉진 효과 확인**

[0085] 실시예 1-1 내지 1-2로부터 고시폴이 암세포에 대하여 세포사를 촉진하는 효과가 있을 것으로 기대되어 하기 실험을 진행하였다.

[0086] 실시예 1-1의 MKN28(중분화성 세포)과 MKN45(저분화성 세포)의 각 세포(세포수; $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ /plate)를 100mm 배양접시에서 24시간 동안 배양하고, 고시폴을 각각 0, 5, 10, 또는 $20 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 후, $400 \mu\text{l}$ 의 바인딩 버퍼(0.1M HEPES, pH 7.4, 1.4M NaCl, and 25 mM CaCl_2)에 희석하였다. 상기의 고시폴 $0 \mu\text{M}$ 처리한 대조군 세포를 4 그룹으로 나누어 각각 비염색(non-stained), Annexin V 염색, PI(propidium iodide) 염색 및 Annexin V + PI 염색하였고, 고시폴 5, 10, 또는 $20 \mu\text{M}$ 처리한 세포들은 Annexin V + PI 염색하였다. 세포의 염색은 암실에서 10분간 수행하였다. 상기 염색된 세포들을 유세포분석(FACS)하여 전체 세포에 대한 세포사 비율을 도출하였다. 그 결과를 도 3 내지 4에 나타내었다 (BD Biosciences, #556547).

[0087] 실험 결과, MKN28(중분화성 세포)의 경우 고시폴 농도 0, 5, 10 및 $20 \mu\text{M}$ 에 따른 세포사 비율이 각각 9.59%, 17.72%, 28.85% 및 55.62%로 나타났고, MKN45(저분화성 세포)의 경우에는 11.77%, 45.75%, 65.8% 및 82.22%인 것으로 나타났다. 상기의 고시폴이 처리된 모든 농도에서 MKN45(저분화성 세포)의 세포사 비율이 MKN28(중분화성 세포)보다 높다는 결과로부터 고시폴이 MKN45(저분화성 세포)에서 유의미한 암세포 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 저분화성 암이 암 줄기세포를 많이 포함한다는 점을 고려할 때, 고시폴이 암 줄기세포의 성장 억제에도 유의미한 효과가 있을 것으로 기대된다.

[0089] **실시예 1-4. 고시폴 처리한 위암 세포의 세포주기 분석**

[0090] 실시예 1-1의 서로 다른 6종류의 위암 세포주(MKN28, MKN45, AGS, SNU668, Kato3 및 HS746T)를 각각 1×10^3 내지 1×10^4 /well씩 100mm 배양접시에서 24시간 동안 배양하고, 고시폴을 0 또는 $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 후, 추가로 24시간 동안 배양하였다. 고시폴 처리된 세포를 수득하여 70% 에탄올로 고정하고, 차가운 1X PBS로 세척 후 암실에서 PI+RNase 용액(DPBS, pH7.4)으로 30분간 염색하였다. 상기 세포를 유세포분석(FACS)하여 DNA 함량으로 세포주기별 비율을 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0091] 실험 결과, 세포사(apoptosis)로 해석 가능한 sub G1 및 G0/G1을 합한 비율이 중분화성세포(MKN28)에서는 고시폴 처리 후 오히려 감소한 반면에, 저분화성 세포에서는 고시폴 처리 전보다 증가(MKN45, AGS 및 HS746T)하거나 또는 유지(SNU668 및 Kato3)되는 것을 알 수 있었다.

[0093] **실시예 2. 위암 줄기세포에 대한 고시폴의 효과 확인**

[0095] **실시예 2-1. 위암 줄기세포에 대한 고시폴의 증식 억제 효과 확인**

[0096] 상기 실시예 1로부터 고시폴이 저분화성 암의 성장 억제에 유의미한 효과가 있음을 알 수 있었고, 저분화성 암이 암 줄기세포를 많이 포함한다는 점을 고려할 때, 고시폴이 암 줄기세포의 성장 억제에도 유의미한 효과가 있을 것으로 기대되어 하기 실험을 진행하였다.

[0097] 먼저, 위암 줄기세포에 대한 고시폴의 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 2종류의 일반 위암세포(AGS, 및 MKN-74)와 2종류의 위암 줄기세포(MKN-1, 및 SNU-484)를 준비하였다. 상기 각각의 세포들을 96-웰 플레이트에서 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ /well로 24시간 동안 배양하고, 고시폴을 각각 0, 10, 20, 40 또는 $60 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 후, 추가로 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 4°C 조건에서 1시간 동안 50 중량% TCA(trichloroacetic acid)로 고정하고, 증류수 세척 후, 실온에서 수분 건조하였다. 고정된 세포가 들어있는 각각의 웰을 1 부피% 아세트산 용액에 용해한 0.4 중량% 술포로다민 B(Sulforhodamine B) $100 \mu\text{l}$ 로 10분간 염색 처리하고, 1 부피% 아세트산 용액으로 4회 세척하였다. 염색된 플레이트는 실온 건조한 후에 각 웰마다 $100 \mu\text{l}$ 의 10mM 트리스 완충액(Tris buffer, pH 7.5)을 첨가하였고, 용출된 색소를 515 nm 파장에서 흡광도 측정하였다. 상기의 결과로부터 각 세포의 생존율이 IC50이 되는 고시폴의 농도를 산출한 결과를 도 6과 도 7에 기재하였다.

[0098] 실험 결과, 위암 줄기세포인 MKN-1과 SNU-484의 IC50 고시폴 농도는 각 2.6 mM과 2.7 mM로, 평균 2.65mM인 것으로 나타났고, 일반 위암세포인 MKN-74와 AGS의 IC50 고시폴 농도는 각 5.6 mM과 4.5 mM로, 평균 5.05mM인 것으로 나타났다. 상기의 결과로부터 위암 줄기세포가 일반 위암세포보다 고시폴에 더 민감하게 반응하며, 고시폴에 의한 암세포 성장 억제 효과는 일반 암세포보다 위암 줄기세포에서 효과가 현저함을 알 수 있었다.

[0100] 실시예 2-2. 암세포로부터 선택 분리된 줄기세포에 대한 고시폴의 증식 억제 효과 확인

[0101] 일반 위암세포인 AGS(이하 PAGS, parental AGS)로부터 4주간의 지속적인 대사 스트레스하에서 생존한 암세포를 암 줄기세포 표지자 발현, 종양구(tumor spheroid) 형성능, 표준항암제 내성, 면역억제생쥐에서 종양형성능 등의 표현형 분석 방법에 의해 선택 분리된 AGS세포(이하 SAGS, selected AGS, Cell Death Dis. 2015 Jul 2;6:e1805)에 대하여 고시폴에 의한 성장 억제 효과를 확인하였다. 세포 배양 및 생존율 측정 방법은 상기 실시예 2-1과 동일하게 진행하였다. 실험 결과, PAGS의 IC50 고시폴 농도는 4.2 mM인데 비하여, 암 줄기세포의 성격을 갖는 SAGS의 IC50 고시폴 농도는 2.8mM인 것으로 나타나, 같은 기원의 세포일지라도 줄기세포의 성격을 지니는지의 여부에 따라 고시폴에 대한 약물 민감성이 현저하게 상이한 것을 알 수 있었다. 상기 결과를 도 8에 기재하였다.

[0103] 실시예 3. 위암 세포에 대한 고시폴 및 기존 약제의 병용투여 효과 확인

[0105] 실시예 3-1. 고시폴 및 기존 약제를 병용 처리한 위암 세포의 세포성장 분석

[0106] AGS, SNU484, SNU668, MKN28, Hs746T, MKN45, 및 SNU719 위암 줄기세포를 각각 5×10^3 내지 4×10^4 /well씩 96-웰 플레이트에 접종하고, 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 각 웰에 고시폴, 펜포르민(Phenformin), 및 이리노테칸(Irinotecan) 약물을 표 3과 같이 투여하였고, 추가로 24시간 동안 배양하였다. 이 후 세포를 4 °C 조건에서 1시간 동안 50 부피% TCA(trichloroacetic acid, 최종농도 10% TCA)로 고정하고, 증류수 세척 후, 실온에서 수분 건조하였다. 고정된 세포가 들어있는 각각의 웰을 1 부피% 아세트산 용액에 용해한 0.4 중량% 술포로다민 B(Sulforhodamine B) 100 μ l로 10분간 염색 처리하고, 1 부피% 아세트산 용액으로 4회 세척하였다. 염색된 플레이트는 실온 건조한 후에 각 웰마다 100 μ l의 10mM 트리스 완충액(Tris buffer, pH 7.5)을 첨가하였고, 용출된 색소를 515 nm 파장에서 흡광도 측정하였다. 상기의 결과로 도출된 위암 세포주의 성장 억제 효과를 도 9에 기재하였다.

표 3

[0107]

실험예	투여 약물
대조군	약물 투여 없음
실험예 1	고시폴 5 μ M 투여
실험예 2	펜포르민 100 μ M 투여
실험예 3	고시폴 5 μ M + 펜포르민 100 μ M 투여
실험예 4	이리노테칸 1 μ M 투여
실험예 5	이리노테칸 1 μ M + 고시폴 5 μ M 투여
실험예 6	이리노테칸 1 μ M + 펜포르민 100 μ M 투여
실험예 7	이리노테칸 1 μ M + 고시폴 5 μ M + 펜포르민 100 μ M 투여

[0108] 실험 결과, 고시폴, 펜포르민, 또는 이리노테칸이 각각 단독 투여된 경우에는 세포주에 따라 다양한 항암효능을 보이는 것으로 나타났다. 상기 3가지 약제 중 2가지를 선택적으로 병용한 경우에는 실험예 3(고시폴+펜포르민)이 비교적 안정적으로 위암 세포의 성장을 억제하는 효과가 있었으나, 다른 조합의 경우에는 세포주에 따라 효능이 다양한 것으로 나타났다. 그러나 상기 3가지 약제를 모두 병용하여 투여한 경우(실험예 7)에는 실험에 사용된 모든 세포주에서 균일하게 80% 이상의 세포 성장 억제 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

[0110] 실시예 3-2. 고시폴 및 기존 약제를 병용 처리한 위암 세포의 미토콘드리아 활성 분석

[0111] 상기 실시예 3-1의 대조군 및 실험예 1 내지 7 세포에 대하여 미토콘드리아 세포막 활성도 분석을 실시하였다. 미토콘드리아 세포막 활성은 세포내 에너지 생산의 지표로 이용된다. 먼저, 각 세포 시료의 약물 투여 처리가 끝나기 20분 전에 100 nM TMRE(tetramethylrhodamine ester, ab113852, Abcam)을 배양 배지에 첨가하고, 세포를 차가운 PBS로 3회 세척한 후, 유세포 분석기로 585 nm (FL-2) 채널을 사용하여 세포의 형광 강도를 측정하였다. 상기 결과를 도 10에 기재하였다.

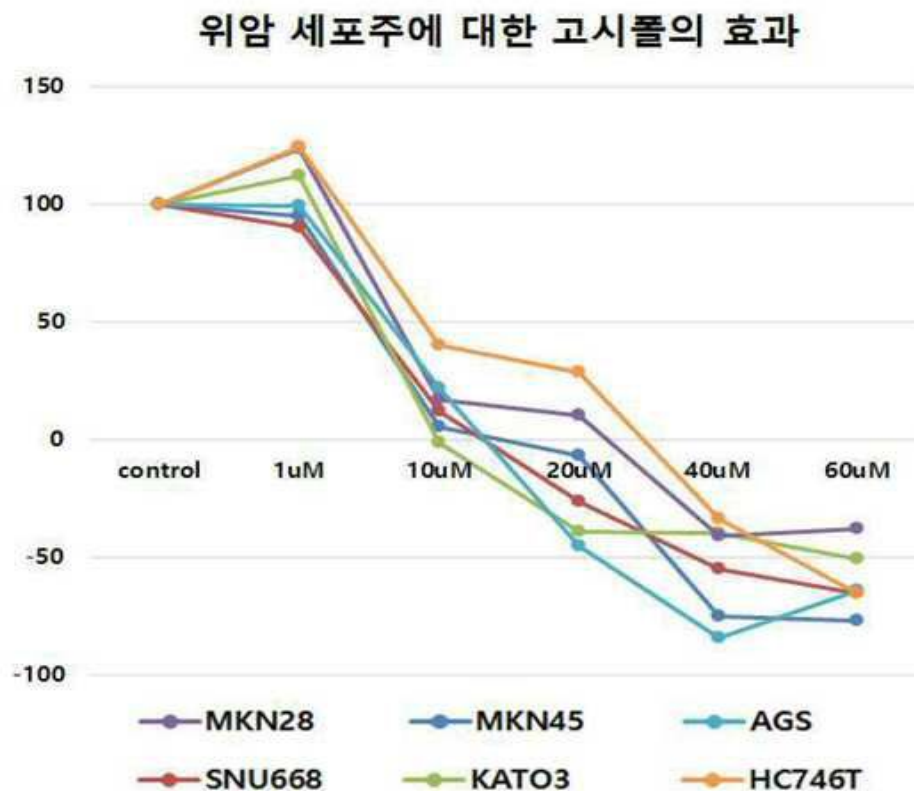
[0112] 실험 결과, 고시폴, 펜포르민, 및 이리노테칸을 병용 투여한 경우(combination)에는 고시폴과 펜포르민을 각각 단독 투여한 경우보다 유의하게 미토콘드리아 활성이 저하되는 것으로 나타났다. 이것은 암 세포의 에너지 생산이 저하되는 것으로 판단 가능하다.

[0114] 실시예 3-3. 고시폴 및 기존 약제를 병용 처리한 위암 세포의 세포사 분석

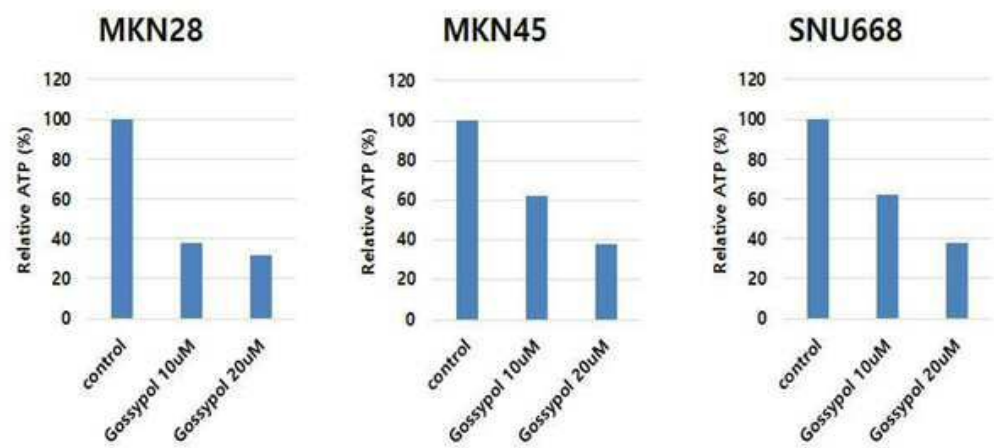
- [0115] 상기 실시예 3-1의 대조군 및 실험예 1 내지 7 세포에 대하여, 각각의 약물을 투여하고 12시간, 24시간, 48시간, 및 72시간이 지난 시점의 시료를 획득하여 세포사 분석을 실시하였다. 먼저, 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 1400 rpm에서 3 분간 원심분리 한 후 1×10^6 세포 / ml의 농도로 재현탁하였다. 상기 세포 현탁액 100 μ l를 5 ml의 배양 튜브에 옮기고 아넥신 V-FITC 및 PI 염색액을 각각 5 μ l 첨가하고 어두운 실온에서 15분간 반응시킨 후, 1X 결합완충액 400 μ l를 첨가하여 FACS 유세포 분석기(BD Falcon, Bedford, MA, USA)로 분석하였다. 상기 FACS 결과 및 수치로 환산한 그래프를 도 11과 도 12에 기재하였다. 실험 결과, 모든 시간대에서 고시폴, 펜포르민, 및 이리노테칸을 병용 투여한 경우에 고시폴, 펜포르민, 또는 이리노테칸을 각각 단독 투여한 경우와 고시폴 및 펜포르민을 병용 투여한 경우보다 유의하게 암세포 사멸이 증가하는 것으로 나타났다.
- [0117] 상기의 실시예 1 내지 3 결과로부터, 고시폴이 암 줄기세포를 포함하는 암세포의 증식을 억제하고, 세포사를 촉진시키는 효과가 현저하다는 것을 알 수 있었다. 또한 고시폴에 펜포르민과 이리노테칸을 병용하여 사용하는 경우에는 암세포 사멸 효과가 현저하게 증가되는 것을 확인하였다.
- [0119] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

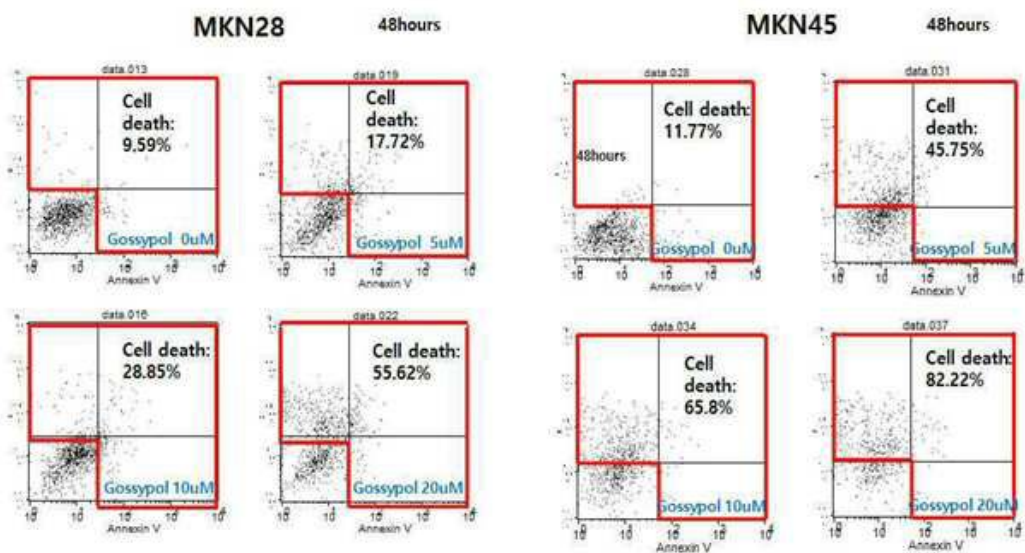
도면1



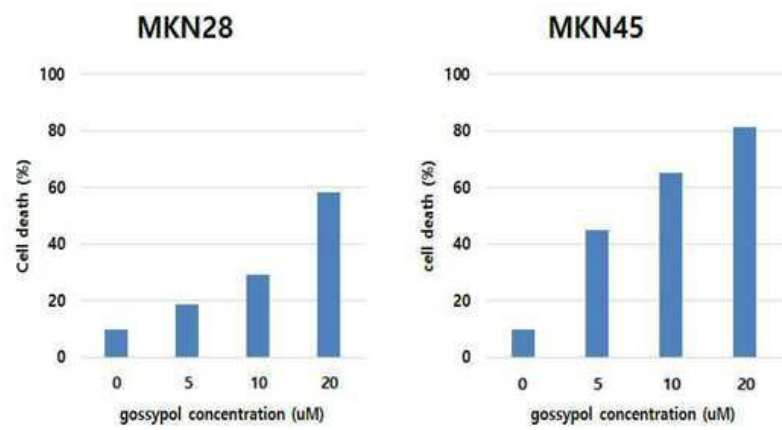
도면2



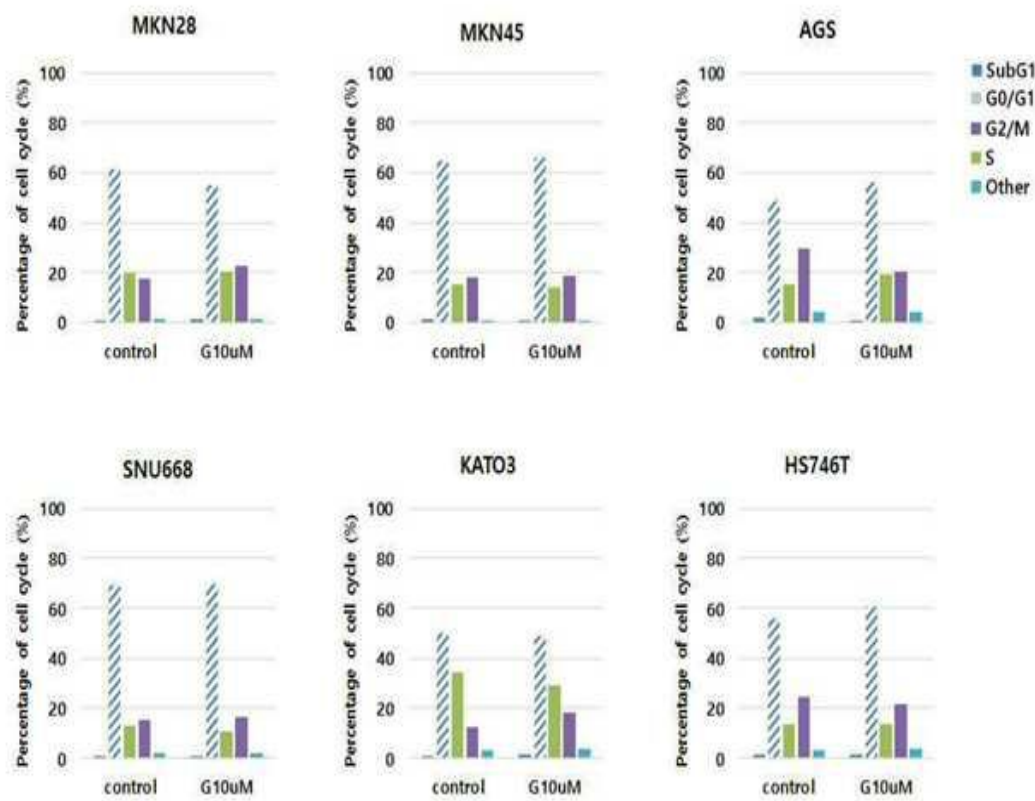
도면3



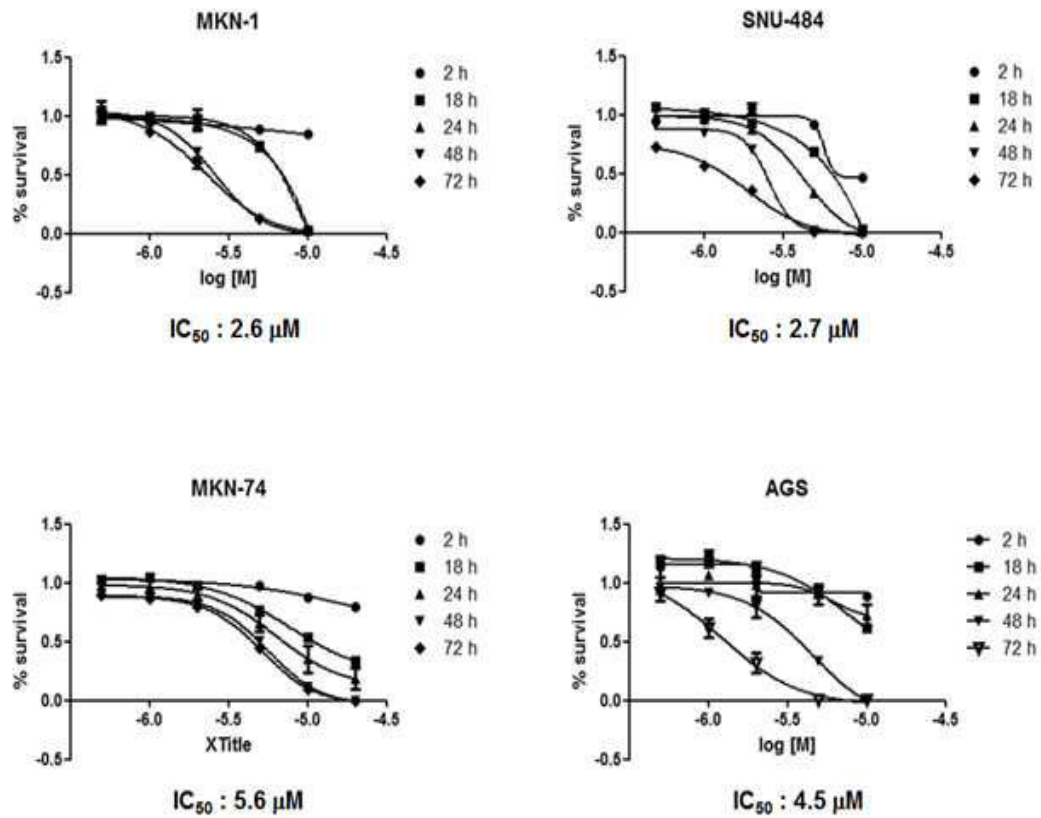
도면4



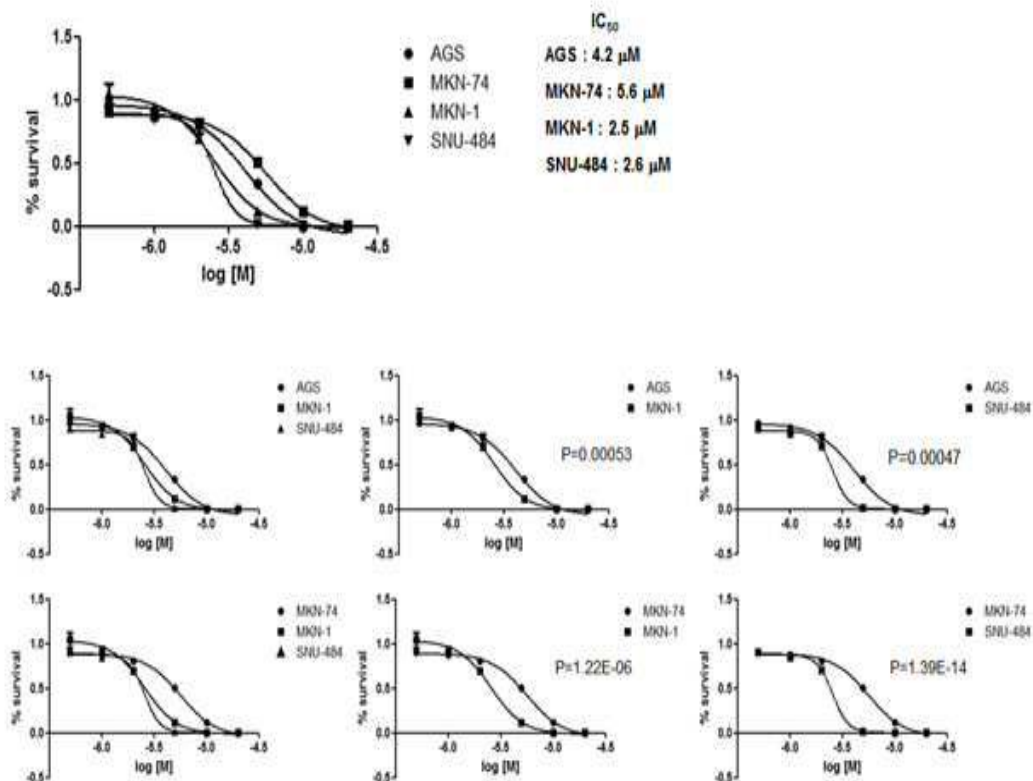
도면5



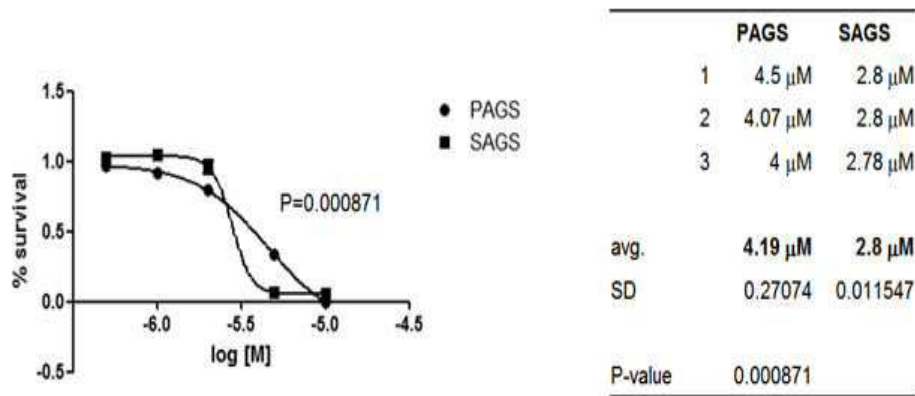
도면6



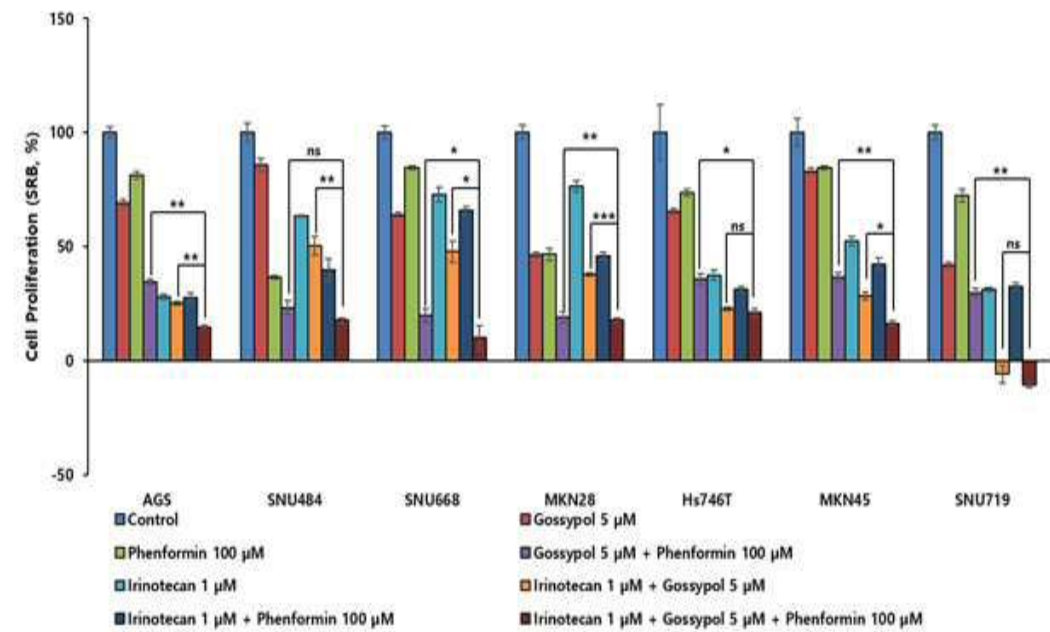
도면7



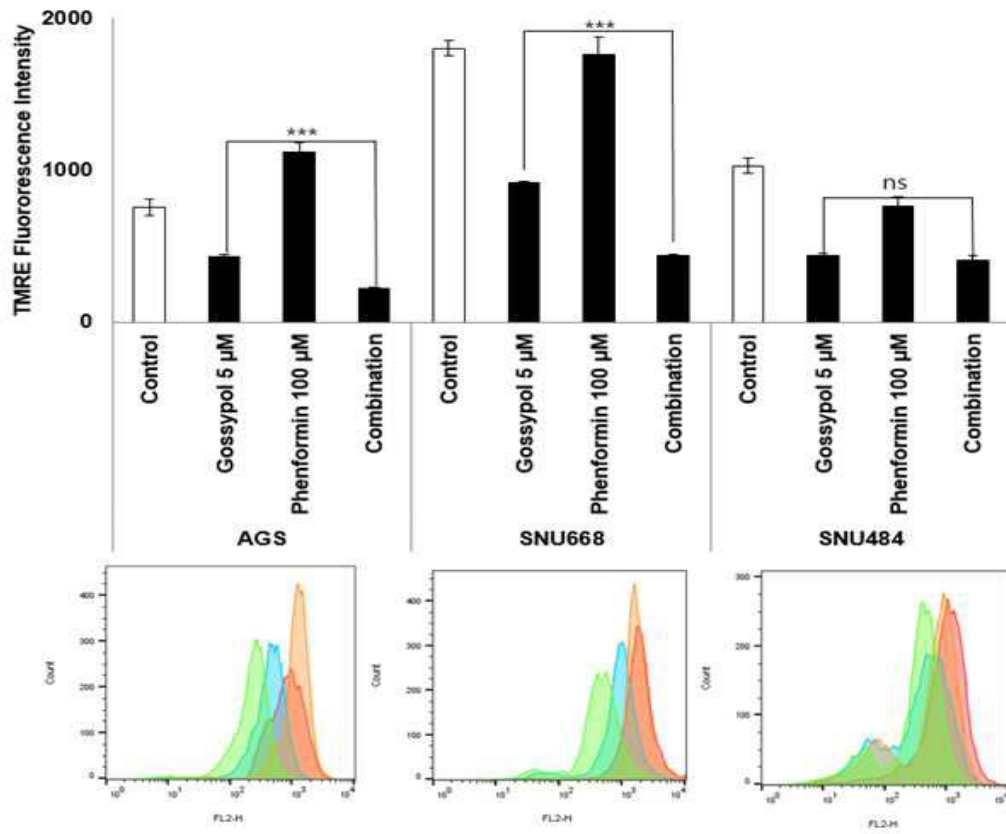
도면8



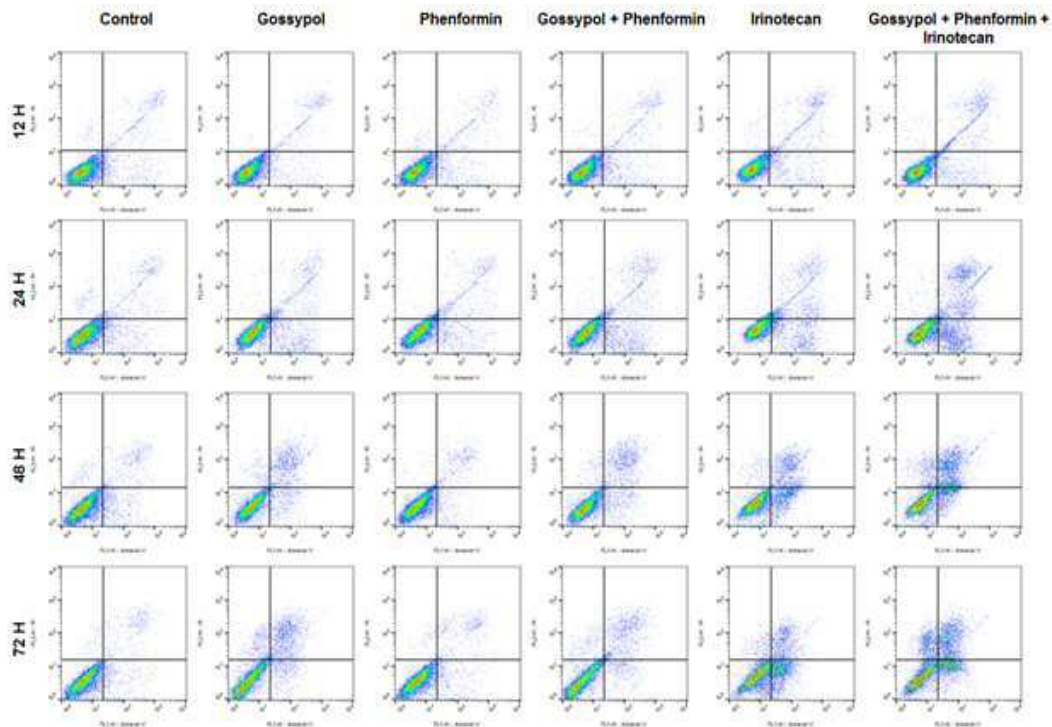
도면9



도면10



도면11



도면12

