

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0085544

(43) 공개일자 2020년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) *A61N 5/10* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)*A61N 5/10* (2018.08)

(21) 출원번호 10-2019-0001792

(22) 출원일자 2019년01월07일

심사청구일자 2019년01월07일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정찬현

서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 101동 301호(하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)

(74) 대리인

특허법인 하나

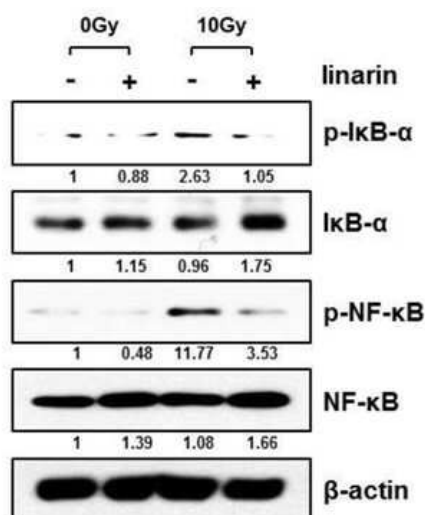
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 리나린을 포함하는 방사선 치료 증진용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 리나린을 포함하는 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물 및 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711053756

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업/일반연구자지원사업/신진연구자지원사업

연구과제명 천연물 유래 저분자 화합물을 이용한 방사선 유도 암 침윤 유발인자 (SULF2) 저해제 개발
연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

리나린(linarin)을 포함하는, 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 폐암인 것인, 방사선 치료 증진용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폐암은 비소세포폐암인 것인, 방사선 치료 증진용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 방사선 조사에 의해 유발되는 암세포의 침윤(invasion) 또는 전이(metastasis)를 억제하는 것을 특징으로 하는, 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐암 치료방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 방사선 요법과 병행하여 투여되는 것인, 폐암 치료방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 방사선 요법은 γ -선 조사인 것인, 폐암 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리나린을 포함하는 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항암 치료법으로는 대표적으로 외과적 수술, 화학 항암제 투여 및 방사선 치료법의 3가지 방법이 주로 사용되고 있다.

[0003] 화학 항암제는 부작용이 크고, 외과적 수술에 의한 치치는 통증 또는 신체 기능 상실에 대한 환자의 부담감이 크다. 때문에 상대적으로 고통이 덜하며 시간이 적게 소요되는 방사선 치료에 대한 선호도가 증가하고 있다. 방사선 치료는 항암치료에 있어 중요성이 계속해서 높아지고 있으며, 치료효율을 높일 수 있는 방법의 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0004] 현재 국내 고형암 환자의 50% 가량이 방사선 치료를 받고 있으며, 새로운 방사선 치료기기의 개발 및 설치를 통해 방사선 치료를 받는 암환자의 수가 매년 증가하고 있는 추세다.

[0005] 한편, 방사선 치료는 암세포가 방사선 내성을 획득하여 재발 및 전이가 발생하거나, 방사선 치료 부위의 정상

조직이 함께 손상되어 화상을 입거나 섬유화 되는 등의 부작용이 발생하는 문제점이 존재한다. 나아가, 방사선 치료 자체만으로 암세포의 이동성 및 침윤성을 증가시켜 전이 암의 발생을 야기할 수 있다고 알려져 있다. 폐암을 포함한 다양한 암세포에 방사선을 조사하면 암세포의 침윤성이 증가되거나, 방사선 저항성이 나타난다는 연구가 세포 및 동물 수준에서 이미 확인된 바 있다.

[0006] 방사선 치료 증진제를 사용하면 방사선 치료에 사용되는 방사선의 선량을 낮추면서도 고선량을 처리한 경우와 동일한 효과를 얻을 수 있고, 고선량의 방사선 치료시 나타나는 부작용을 현저히 줄일 수 있을 것으로 예상됨에 따라 방사선 치료 증진제 및 방사선 증감성 화합물에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 현재까지 보고된 방사선 치료 증진제는 주로 항암제로 알려진 탁솔(Taxol), 시스플라틴(cisplatin), 플루오로우라실(Fluorouracil: 5-Fu), 류프롤리드(Leuprolide) 등이 유방암, 자궁암, 위암, 난소암, 전립선암, 대장암 등의 고형암에서의 방사선 치료 증진제로서 연구되었으며, 이러한 화합물 투여와 방사선 치료를 병행하였을 때 방사선 치료의 효율이 증진된다는 것이 입증된 바 있다.

[0007] 그러나, 위에서 언급한 화학 물질들은 다양한 암세포 조직에서의 방사선 치료 증진 효과를 나타내지 못할 뿐 아니라 부작용 또한 큰 것으로 나타나고 있어 새로운 방사선 치료 증진제의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2016-0005162호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2017-0134237호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 리나린(linarin)을 포함하는, 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

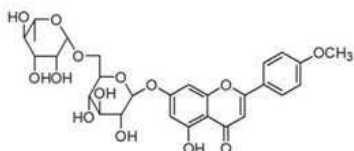
[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 리나린(linarin)을 포함하는, 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명에서, '리나린(linarin)'은 플라보노이드(flavonoid)의 일종으로 주로 감귤, 구절초, 영경귀 등 국화과 식물에 다량 포함되어 있다. 아카세틴(acacetin) 7번 탄소의 위치에 루티노스(rutinoside)가 결합한 플라보노이드 글리코시드(flavonoid glycoside)로서, 하기 화학식 1의 구조를 가진다. 리나린은 항산화, 항알러지, 항아세틸콜린에스테라아제 효과가 있음이 보고된 바 있다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 본 발명에서, '암에 대한 방사선 치료'는 수술, 항암약물치료와 함께 3대 암 치료 중 하나로서, 방사선이 발생되는 장치 혹은 방사성 동위원소를 이용하여 고에너지 방사선을 조사하여 암세포를 죽이는 치료법이다. 암세포에 대한 파괴효과로 인하여 방사선 치료는 다수 사용되고 있으나, 설사, 피로, 탈모, 구강변형, 메스꺼움, 두통, 연하통증, 림프부종 등의 부작용이 보고되고 있으며, 이는 화학 요법과 병행할 경우 부작용은 더욱 심해지는 경향이 있다. 또한, 방사선 치료시 조사되는 방사선에 의해 암세포가 이동하거나 다른 장기로 침윤하는 경

우가 나타남에 따라 이로 인하여 암세포가 다른 장기로 이동하는 전이암이나 암세포가 다시 자라나는 재발암이 나타나는 문제가 있다.

- [0016] 본 발명에서, '방사선 치료 증진'이란, 상기와 같은 방사선 치료의 암세포에 대한 파괴효과는 유지되도록 하면서도 전이암이나 재발암이 발생하는 것을 억제하고 부작용을 최소화시키는 것을 말한다.
- [0017] 본 발명 일 실시예에서는 리나린이 세포독성이 없어 고농도로 처리 가능함을 확인하였으며(도 1), 리나린을 처리하고 방사선을 조사한 경우에는 방사선 조사에 의해 유도되는 암세포의 이동 및 침윤이 억제되는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3).
- [0018] 구체적으로, 상기 암은 폐암일 수 있으며, 더욱 구체적으로 비소세포폐암일 수 있으나, 본 발명의 조성물을 이용할 수 있는 암은 상기에 제한되지 않는다. 예를 들면, 유방암, 난소암, 대장암, 췌장암, 뇌암, 전립선암 등 방사선 치료에 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명 일 실시예에서는 폐암 세포주인 A549 세포에서 방사선 조사시 암세포의 이동이 활발하였으나, 리나린을 처리한 후 방사선 조사시 암세포의 이동이 억제됨을 확인하였다. 또한, 리나린을 처리하고 방사선을 조사한 A549 세포에서의 침윤이 억제됨을 확인하였는 바, 구체적으로 본 발명의 방사선 치료 증진용 약학적 조성물은 폐암에 적용될 수 있다. 또한, 상기 A549 세포주는 세부적으로 비소세포폐암으로 구분될 수 있는 바, 비소세포 폐암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물로 활용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물은 방사선 치료와 동시에 투여할 수도 있으며, 방사선 치료 이전 또는 이후에 투여될 수 있다. 방사선 치료 및 본 발명의 방사선 치료 증진용 약학적 조성물의 효과로서 상호작용을 나타낼 수 있는 범위 내이기만 하면, 방사선 치료와 본 발명의 방사선 치료 증진용 약학적 조성물의 투여 간 시간적 격차를 두고 수행할 수 있다.
- [0021] 또한 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 방사선 치료에 의해 유발되는 암세포의 침윤(invasion) 또는 전이(metastasis)를 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서, '침윤(invasion)'이란 암세포가 처음 생긴 곳에서 가까운 주위 조직으로 침투해 파괴하면서 증식하는 증상을 말하고, '전이(metastasis)'는 암세포가 혈관과 림프관으로 침윤하고 혈액과 림프를 따라 순환하다가 다른 조직에 정착, 증식하게 되는 현상을 말한다.
- [0023] 방사선이 조사된 암세포에서는 SULF2의 발현이 증가하고, 순차적으로 β -카테닌, IL-6, STAT3 및 Bcl-XL이 관여하는 신호전달경로를 자극하여 MMP-2(matrix metalloprotease-2)의 과발현을 유도함으로써 암세포의 침윤성이 증가된다.
- [0024] 또한, 방사선은 PI3K-Akt-NF- κ B 신호전달경로를 자극하여 MMP-9의 과발현을 촉진하고, NF- κ B를 활성화시킴으로써 암세포의 전이 및 침윤을 증가시킨다.
- [0025] 본 발명 일 실시예에서는 리나린이 방사선 조사된 암세포의 MMP-9 발현을 특이적으로 억제하는 것을 확인하였으며(도 5), 리나린을 처리하고 방사선을 조사하면 NF- κ B의 인산화가 감소된 것을 확인하였는 바(도 6), 리나린이 NF- κ B 활성화를 억제하여 암세포의 침윤을 감소시킴을 확인하였다.
- [0026] 이는 방사선에 의해 MMP-9 발현량이 증가한 암세포에 리나린을 처리하면 NF- κ B 및 I κ B- α 의 인산화 반응을 억제함으로써 방사선에 의해 유도된 암세포의 침윤성 및 전이성을 억제하여 암에 대한 방사선 치료 효과를 향상시킬 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0027] 상기 암에 대한 방사선 치료 증진용 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 약학적으로 유효한

양으로 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료방법을 제공한다. 구체적으로 상기 암은 폐암일 수 있다.

[0030] 또한 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 방사선 요법과 병행하여 투여될 수 있다. 상기 방사선 요법은 γ -선 조사일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 방사선 요법이면 X-선 조사, γ -선 조사 등 구분없이 적용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 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 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0032] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 암을 가진 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써, 암을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 본 발명에 따른 상기 치료방법은 인간을 제외한 동물을 치료하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 인간의 경우 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 암을 가지는 것을 고려할 때, 인간의 치료에 있어서도 충분히 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 1 일 1 내지 10 mg/kg으로, 더욱 구체적으로 1 내지 5 mg/kg으로 투여될 수 있으며, 투여는 1 일 1 회 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0035] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 방사선 요법 외에도 공지의 항암제를 병용 투여하거나 외과적 수술요법 등의 보조 치료 방법들과 병행하여 사용하여 항암 효과를 증대시킬 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제(chemotherapeutic agent)는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴 carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 마이토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 타목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토포트렉세이트(methotrexate) 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 리나린을 포함하는 조성물은 암에 대한 방사선 치료에 있어 방사선 치료 효과를 증진시키면서도 세포 독성이 없는 바, 기존의 합성 화학제제의 독성에 기인한 2차 부작용 없이 암에 대한 치료효과를 높일 수 있어, 암에 대한 치료제, 치료 보조제 또는 방사선 치료 증진제로서의 활용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 A549 세포에 대한 리나린의 세포독성 시험 (MTT assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 방사선을 조사한 A549 세포의 리나린 처리 여부에 따른 세포 이동 정도를 확인하는 상처 치유 시험방법(wound healing assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 방사선을 조사한 A549 세포의 리나린 처리 여부에 따른 세포 침윤 정도를 확인하는 침윤 분석법

(invasion assay)의 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 방사선을 조사한 A549 세포에 리나린 처리 여부와 β -catenin, STAT3 및 Bcl-XL의 활성화 여부를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 방사선을 조사한 A549 세포에 리나린 처리 여부와 MMP-2 및 MMP-9 발현 수준 차이를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 방사선을 조사한 A549 세포에 리나린 처리 여부와 NF- κ B, p-NF- κ B, I κ B- α , p-I κ B- α 의 발현 수준 차이를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0040] 실시예 1. 리나린의 세포독성 시험

[0041] 폐암 세포주인 A549 세포에 대한 리나린의 세포독성을 MTT assay를 통해 확인하였다.

[0042] 상기 A549 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 획득하였다. 상기 A549 세포를 열처리 불활성화 된 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS) 10% 가 보충된 RPMI-1640 배지에 37° C, 5% CO₂ 조건 하 접종하고, 리나린의 농도를 다양하게(5, 10, 50, 100, 200 및 500 μ M) 처리하여 24 시간 동안 배양하였다.

[0043] 배양 후 50 μ l의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)시약을 각 배지에 첨가하고 3시간 동안 항온에서 배양하여 세포독성시험(MTT assay)을 실시하였다.

[0044] 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 세포독성 시험 결과, 리나린의 IC₅₀ 값은 282 μ M로 나타났으며, 리나린을 5 μ M의 농도로 처리한 경우 94.1 $\pm$ 5.7 %의 세포 생존율을 나타내었다. 특히, 200 μ M 이상의 고농도를 처리한 경우에도 50 % 이상의 생존율을 나타냄으로써, 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0045] 실시예 2. 리나린의 방사선 조사에 의한 암세포의 전이 및 침윤 억제효과 확인

[0046] 2-1. 상처 치유 분석(wound healing assay)

[0047] 리나린의 전이 및 침습성 억제능력 확인을 위해 감마선(γ -irradiation)을 조사한 A549 세포주에 5 μ M의 리나린을 처리하고, 상처 치유 분석(wound healing assay)을 실시하였다.

[0048] 상처 치유 분석은 세포를 단층(monolayer) 배양하고 상처를 내어 세포의 이동(migration)에 의해 상처가 치유되는 정도를 확인하는 시험방법으로, CytoSelect™ 24-Wound Healing Assay Kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 실시하였다.

[0049] 구체적으로, A549 세포를 상처 생성용 플라스틱 인서트(가) 들어있는 24-웰 플레이트에 접종하고 24시간 동안 배양했다. 웰에서 인서트를 제거한 후 세포를 세슘-137(Cs-137) 감마선 (Atomic Energy of Canada, Mississauga, Canada)을 사용하여 1분당 3Gy의 선량률로 총 10Gy 감마선에 노출시켰다. 방사선 조사된 세포를 배지로 세척하고 5 μ M의 리나린과 함께 배양하였다. 배양 후 0h, 24 시간 및 48 시간이 경과한 시점에서 촬영하여 세포 이동 정도를 분석 하였다.

[0050] 도 2에 나타난 바와 같이, 방사선을 조사한 A549 세포는 48 시간 동안 약 80%의 상처 치유효과를 보여, 약 50%의 치유효과를 보인 방사선 비조사 군에 비해 암세포의 이동이 더욱 활발한 것을 확인하였다. 반면, 리나린을 처리하고 감마선을 조사한 경우에는 감마선 비조사 군과 비슷한 수준으로 암세포의 이동이 억제된 것을 확인하였다.

[0051] 2-2. 침윤 분석(invasion assay)

[0052] 또한, 본 발명자들은 리나린의 침윤 및 전이 억제능력을 확인하기 위해 침윤 분석법(invasion assay)을 실시하였다. 암세포가 전이(metastasis)를 하기 위해서는 혈관벽을 침범해 혈액으로 넘어가야 하므로, 침윤 분석법을 통해 침윤뿐 아니라 전이의 위험도를 측정할 수 있다. 침윤 분석법을 실시하기 위해서는 세포의 기질(extracellular matrix)과 비슷한 환경을 조성하는 것으로 알려진 매트릭젤(Matrigel)을 이용하였다.

- [0053] 구체적으로, 무혈청 배지의 A549 세포를 1×10^4 개/웰의 밀도로 매트리지 코팅 된 트랜스웰 챔버(transwell chamber, BD Biosciences, Bedford, MA, USA)의 상부 표면에 분주하고, 챔버의 하부 구획은 10% 열처리 불활성화 된 FBS 및 $5 \mu\text{M}$ 리나린으로 처리한 배지로 채웠다. 배양 16시간 후, 매트리지 코팅을 넘어 챔버의 하부 표면을 침윤한 세포를 Diff-Quick Kit(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 염색하고 현미경으로 계수하였다.
- [0054] 도 3에 나타난 바와 같이, 리나린을 처리하고 감마선을 조사한 A549 세포에서는 암세포의 침윤이 현저히 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 리나린이 방사선 조사에 의해 유도되는 A549 세포의 전이와 침윤을 억제함을 확인하였다.
- [0055] **실시예 3. 방사선 조사에 의한 암세포 침윤의 신호전달경로 억제 효과 확인**
- [0056] 3-1. β -카테닌, STAT3 및 Bcl-XL을 포함하는 신호전달경로 확인
- [0057] 고선량의 방사선은 β -카테닌 활성화, STAT3의 인산화 및 Bcl-XL 발현을 유도하여 세포 침윤을 증가시킨다. 본 발명자들은 리나린의 세포 침윤 억제 능력이 상기 β -카테닌, STAT3 및 Bcl-XL을 포함하는 신호전달경로를 억제하는지 확인하였다.
- [0058] 구체적으로, A549 세포 5×10^5 개를 60 mm 접시에 접종하고, 세포 밀집도(confluence)가 70~80%될 때까지 배양하였다. 이후 세슘-137(Cs-137)의 감마선 (Atomic Energy of Canada, Mississauga, Canada)으로부터 1분당 3Gy의 선량률로 총 10Gy 감마선에 노출시켰다. 이어서, $5 \mu\text{M}$ 의 리나린을 세포에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 이후, 웨스턴 블랏팅(western blotting)으로 β -카테닌, STAT3 및 Bcl-XL의 발현 정도를 확인하였다.
- [0059] 도 4에 나타난 바와 같이, 리나린의 처리여부와 상기 신호전달경로의 발현 정도에 차이가 없어 세포 침윤 억제 능력은 β -catenin, STAT3 및 Bcl-XL의 활성화 여부와는 관계가 없는 것을 확인하였다.
- [0060] 3-2. MMP-2 및 MMP-9를 포함하는 신호전달경로 확인
- [0061] 상기 β -카테닌, STAT3 및 Bcl-XL이 관여된 신호경로 외에도 MMP-2 및 MMP-9 또한 암세포의 전이, 침윤 및 혈관 신생과 밀접하게 관련된 인자이므로, 리나린이 MMP-2 및 MMP-9 발현에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0062] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, MMP-2 및 MMP-9의 발현도가 방사선 조사된 세포에서 더 높다는 것을 확인하였다. MMP-2 발현은 리나린을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에서 차이가 없는 반면, 리나린을 처리한 세포에서 MMP-9의 발현이 감소되었는 바, 리나린이 방사선 조사된 암세포의 MMP-9 발현을 특이적으로 억제하는 것을 확인하였다.
- [0063] 나아가, MMP-9의 발현은 고선량의 방사선이 PI3K, Akt 및 NF- κ B 신호전달 경로를 자극하여 유도되므로, 리나린의 MMP-9의 발현 억제가 NF- κ B의 발현 억제에서 기인하기 때문인지 확인하기 위한 추가 실험을 실시하였다. 이를 위해 NF- κ B 및 인산화 된 NF- κ B(p-NF- κ B) 및 NF- κ B의 억제자인 I κ B- α 와 인산화 된 I κ B- α (p-I κ B- α)의 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.
- [0064] 도 6에 나타난 바와 같이 A549 세포에 방사선을 조사하면 NF- κ B의 인산화가 증가하는 반면, 리나린을 처리하고 방사선을 조사하면 NF- κ B(p-NF- κ B)가 인산화가 현저하게 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 방사선이 조사된 세포는 방사선이 조사되지 않은 세포보다 p-I κ B- α 가 많이 검출되었고, I κ B- α 의 분해가 일어났음을 확인하였다. 반면, 리나린을 처리한 세포는 p-I κ B- α 의 축적을 저해하고, I κ B- α 의 분해를 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 리나린이 NF- κ B 활성화를 억제하여 암세포의 침윤을 감소시킴을 확인하였다.
- [0065] 이와 같이, 본 발명자들은 방사선에 의해 MMP-9 발현량이 증가한 폐암 세포주 A549에 리나린을 처리하면 NF- κ B 및 I κ B- α 의 인산화 반응을 억제함으로써 방사선에 의해 유도된 암세포의 침윤성 및 전이성을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0066] 상기와 같은 결과로부터 본 발명의 리나린을 포함하는 조성물은 암에 대한 방사선 치료에 있어 방사선 치료 효과를 증진시키면서도 세포 독성이 없는 바, 기존의 합성 화학제제의 독성에 기인한 2차 부작용 없이 암에 대한 치료효과를 높일 수 있어, 암에 대한 치료제, 치료 보조제 또는 방사선 치료 증진제로서 활용 될 수 있음을 확인하였다.
- [0067] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해

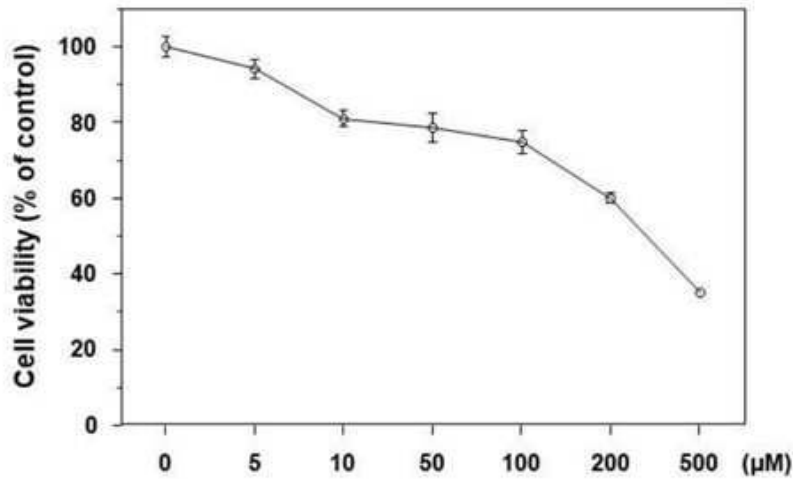
할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0068]

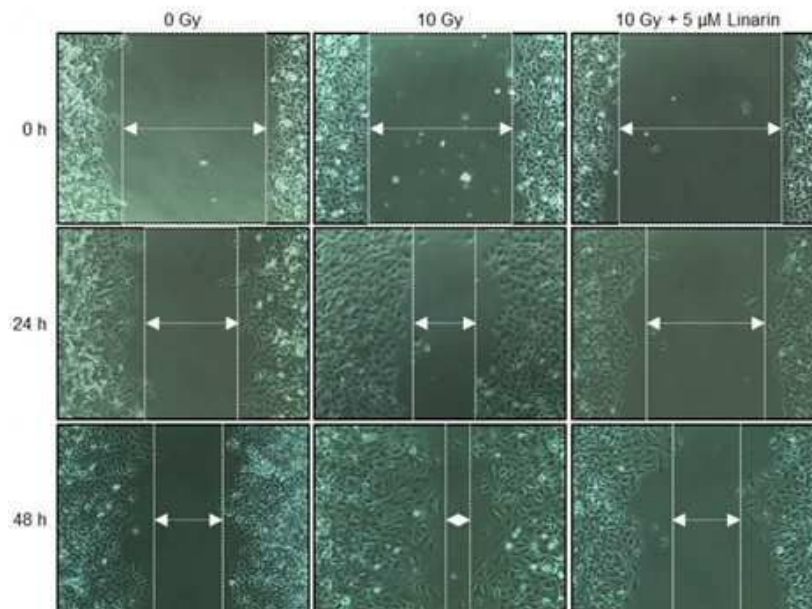
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

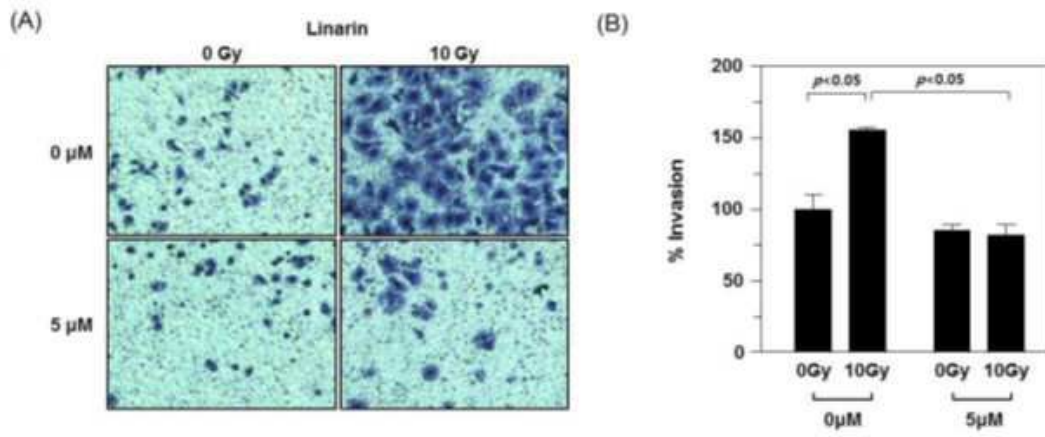
도면1



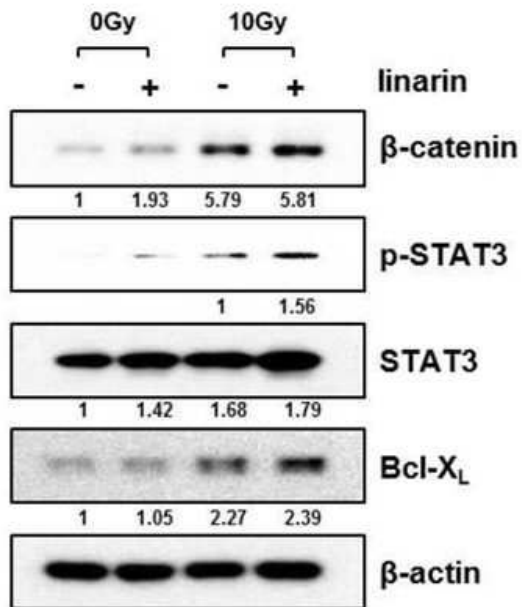
도면2



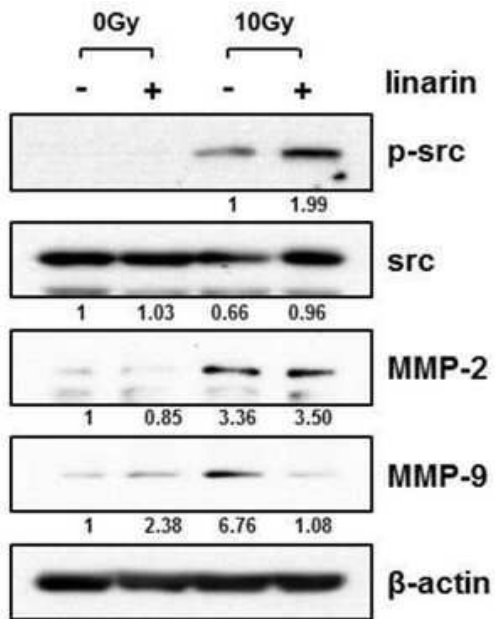
도면3



도면4



도면5



도면6

