



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0069534
(43) 공개일자 2018년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/282 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0171803

(22) 출원일자 2016년12월15일

심사청구일자 2016년12월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송권화

충청남도 천안시 동남구 문암1길 68, 105동 1402호

임화선

서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호

정우영

충청남도 천안시 서북구 두정로 216, 610호

(74) 대리인

정은열

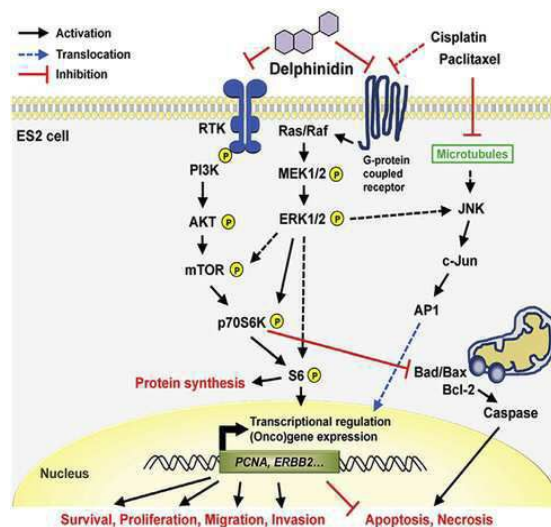
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 델피니딘을 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연물질로부터 추출된 것으로서 화학적 화합물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 상피성 난소암 세포의 생존을 및 이동성을 억제하고 용량 의존적으로 상피성 난소암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K, ERK1/2 또는 P38 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 시스플라틴 및 파클리탁셀과 같은 항암화학치료제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/282 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0810

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 염증성 조산 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 효과 검증

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.07 ~ 2017.09.06

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1D1A1A01059331

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원-기본연구

연구과제명 염증성 태반 형성 억제를 위한 아연 이온 수송체의 역할 규명 및 후생유전학적 변화 연구

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 텔피니딘이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 하는, 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, PI3K, ERK1/2 또는 P38 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 텔피니딘이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 하는, 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, PI3K, ERK1/2 또는 P38 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 상피성 난소암 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식

및 이주 능력을 억제시키는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 상피성 난소암 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 델피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 난소암은 초기 증상 및 조기 진단을 위한 효과적인 바이오마커의 부재로 대다수의 난소암 환자들이 병기(stage) III 또는 IV에 진단되며 낮은 5년 생존율을 나타내며, 2016년 통계학적 분석을 통해 미국 내 사망률 5위에 이르는 치명적인 암으로 분류되었다(Siegel RL *et al.*, CA Cancer J Clin, 65:5-29 2016; and Jayson GC *et al.*, Lancet, 384:1376-88, 2014).
- [0004] 대다수의 난소암은 난소 상피세포로부터 유전적 변이 발생에 따라 악성 종양으로 발생되어 상피성 난소암으로 명명된다. 상피성 난소암은 조직병리학적 분석을 통해 장액성 난소암(serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 투명세포암(clear cell carcinoma)으로 분류된다 (Kaku T *et al.*, Med Electron Microsc, 36:9-17, 2003).
- [0005] 일반적인 상피성 난소암의 치료 방법은 종양감축술(cytoreductive surgery) 이후 항암화학요법 또는 방사선치료를 실시하는 것이다. 하지만, 고등급 장액성 난소암과 투명세포암은 백금계, 탁산계 항암제를 동시에 사용하는 표준 항암화학요법에 저항성을 나타내며 나쁜 예후를 나타낸다 (Tan DS and Kaye S, J Clin Pathol, 60:355-60, 2007; Vaughan S *et al.*, Nat Rev Cancer, 11(10):719-25, 2011). 그러므로 상피성 난소암 신호전달과정 내 세포사멸기전을 방해함에 따라 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 상피성 난소암 예방법 및 새로운 치료제 개발이 요구된다.
- [0006] 안토시아닌은 폴리페놀 구조를 나타내며 플라보노이드계 속하는 천연색소로서 보라색을 나타내는 포도, 베리류, 고구마, 적양배추 등에 다량 포함되어 있다(Wang LS and Stoner GD, Cancer Lett, 169:281-90, 2008). 안토시아닌은 그 구조에 따라 시아닌(cyanidin), 델피니딘(delphinidin), 말비딘(malvidin), 펠라곤리딘(pelargonidin), 페오니딘(peonidin), 페튜니딘(petunidin)과 같이 6가지로 분류된다(Kong JM *et al.*, Phytochemistry, 64:923-33, 2003). 그 중 델피니딘은 항산화, 항염증, 항혈관신생, 항암 기작 등 다양한 생물학적 기능을 지니는 것으로 알려져 있다(Hou DX *et al.*, Biochem Pharmacol, 25:29-36, 2005; and Lamy S *et al.*, Carcinogenesis, 100:100-11, 2006).
- [0007] 특히, 델피니딘은 종양형성 과정동안 정상세포의 암화과정 및 암세포의 증식을 억제시키는 것으로 알려져 있으며 유방암, 대장암, 간암, 폐암, 전립선암, 피부암 등의 암세포 내에서 세포사멸을 유도한다 (Yun JM *et al.*, Mol Carcinog, 48:260-270, 2009; Feng R *et al.*, J Agric Food Chem, 58:3957-64, 2010; Pal HC *et al.*, PLoS One, 8e77270, 2013; and Kwon JY *et al.*, Carcinogenesis, 30:923-33, 2009). 하지만, 현재까지 난소암 내에서 델피니딘을 이용한 치료기전에 관한 연구는 전무한 실정이다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 상피성 난소암 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 상피성 난소암 세포주 ES2 세포를 사용하여 델피니딘에 의한 세포 생존율 및 이동성 감소 및 세포 사멸 유도 효과를 확인하고, 아울러 상피성 난소암에서 두드러진 발현을 보이는 PCNA, ERBB2 단백질의 발현이 ES2 세포 내에서는 과발현하지만 델피니딘에 의해 감소하는 양상을 확인하였을 뿐만 아니라, 델피니딘이 상피성 난소암 세포주 ES2 내 세포 증식 관련 PI3K/AKT와 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 비활성화시킨다는 것을 확인하고, 본

발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연물질로부터 추출된 것으로서 화학적 화합물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 상피성 난소암 세포의 생존율 및 이동성을 억제하고 용량 의존적으로 상피성 난소암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K, ERK1/2 또는 P38 신호전달 경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 시스플라틴 및 파클리탁셀과 같은 항암화학치료제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의학학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 상피성 난소암 세포 내 텔피니딘에 의한 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.
- 도 2는 상피성 난소암 ES2 세포 내 텔피니딘에 의한 영향을 분석한 결과를 나타낸 것으로, (A)는 텔피니딘 용량에 의존적인 ES2 세포의 증식력을 나타낸 것이고, (B)는 TUNEL 분석 결과를 나타낸 것이고, (C)는 PCNA 세포를 염색하여 관찰한 결과를 나타낸 것이고, (D)는 ERBB2 세포를 염색하여 관찰한 결과를 나타낸 것이며, (E)는 트랜스웰 막을 이용한 세포 이동성을 분석한 결과를 나타낸 것이고, (F)는 상처 치유 분석을 통한 세포 이동성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 텔피니딘에 의해 사멸된 상피성 난소암 세포의 수를 분석한 결과를 나타낸 것으로, (A)는 대조군, (B)는 텔피니딘 0.1 μ M, (C)는 텔피니딘 1 μ M, (D)는 텔피니딘 10 μ M, (E)는 텔피니딘 20 μ M에서 유세포 분석기를 이용하여 측정한 요오드화 프로피디움 및 아넥신 V 형광을 표시한 것이고, (F)는 사멸 세포의 비율(%)을 나타낸 것이다.

도 4는 ES2 세포 내 텔피니딘에 의해 조절되는 신호전달분자 분석 결과를 나타낸 것으로, (A) AKT, (B) p70S6K, (C) GSK3 β , (D) ERK1/2, (E) p38 MAPK, 및 (F) JNK의 용량 의존적 인산화 억제 효과를 나타낸 것이고, (G) AKT, (H) p70S6K, (I) ERK1/2, 및 (J) p38 MAPK의 시간 의존적 인산화를 나타낸 것이다.

도 5는 ES2 세포 내 텔피니딘과 신호전달기전 억제제를 통한 (A) AKT, (B) p70S6K, 및 (C) ERK1/2 인산화 패턴 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 신호전달경로 조절을 통한 텔피니딘에 의한 상피성 난소암 세포 증식 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 텔피니딘과 기존 항암화학치료제를 이용한 상피성 난소암 내 치료 효율을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0025] 본 발명에서는 텔피니딘의 상피성 난소암 세포 내 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 1).
- [0027] 본 발명은 일 관점에서 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명은 다른 관점에서 텔피니딘을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀전, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6722호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 검, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.
- [0036] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 인체를 비롯한 동물 신체에 투여하기 적합한 임의의 생약 형태, 더욱 구체적으로는 경구 투여에 통상적인 임의의 형태, 예를 들어 식품 또는 사료, 식품 또는 사료의 첨가제 및 보조제, 강화된 식품 또는 사료, 정제, 환제, 과립, 캡슐 및 발포 배합물 등과 같은 고체 형태 또는 용액, 현탁액,

유화액, 음료, 페이스트 등과 같은 액체형태 일 수 있고, 영양제, 비타민, 전해질, 감미제, 착색제, 유기산, 방부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [0038] 본 발명에 있어서, 텔피니딘이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, PI3K, ERK1/2 또는 P38 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 상피성 난소암 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0046] [실시예]

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0049] **실시예 1: 재료의 준비**

[0050] 1-1: 실험동물 및 세포배양

[0051] 상피성 난소암 세포주인 ES2 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 McCoy' 5A (Modified) 배지에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0052] 1-2: 실험 재료

[0053] 후보 조성물질인 텔피니딘은 Indofine Chemical Company(Hillsborough, NJ, USA)로부터 구매하여 사용하였으며, 텔피니딘에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3 β , JNK, P38 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, GSK3 β , JNK, P38 단백질을 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA, USA)로부터 구매하였다. 이 외, PCNA와 ERBB2 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology 및 Thermo사에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2, P38 억제제인 U0126, SB203580을 Enzo Life Science사(Farmingdale, NY, USA)로부터 구매하여 사용하였다. 또한 항암화학요법에 사용되는 시스플라틴과 파클리탁셀은 Sigma-Aldrich, Inc(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

[0055] **실시예 2: 세포 증식 능력 분석**

[0056] 2-1: BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0057] 상피성 난소암 세포의 증식 능력에 텔피니딘이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 1 × 10³ 개의 ES2 세포와 McCoy' 5A (Modified) 배지 100 μ l를 96 well에 분주하고 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μ M) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용

하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양한다. ES2 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어준다. 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5' substrate으로 세포를 반응하여 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0058] 2-2: TUNEL 분석(assay)

[0059] 3×10^4 개의 ES2 세포를 10% FBS가 포함 된 McCoy' 5A (Modified) 배지 300 μ l와 함께 공초점 접시(Confocal dish, catalog number: 100350, SPL Life Science, 한국)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 텔피니딘 10 μ M을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde 로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시킨다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹구내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시킨다. 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) 에 포함된 TUNEL 염색 혼합물(Staining mixture)을 사용하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양한다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0060] 2-3: 면역형광법

[0061] 3×10^4 개의 ES2 세포를 10% FBS가 포함 된 McCoy' 5A (Modified) 배지 300 μ l와 함께 공초점 접시(catalog number: 100350, SPL Life Science, 한국)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 텔피니딘 10 μ M을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml의 PCNA, 1 μ g/ml의 ERBB2 로 희석된 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4°C에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200 으로 희석하여 상온에서 1시간동안 배양하였다. ES2 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 ES2 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0062] 2-4: 트랜스웰을 이용한 세포 이주 능력 측정

[0063] ES2 세포의 이주 능력에 텔피니딘이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 1×10^5 개의 ES2 세포와 McCoy'5A (Modified) 배지 100 μ l를 8-mm 트랜스웰 인서트(inserts) (Corning, Inc., Corning, NY, USA)에 분주하고 10 μ M 텔피니딘을 처리하여 12시간 동안 배양한 다음, 메탄올로 10분간 트랜스-막(trans-membrane)을 이동한 세포를 고정하여, 건조 및 헤마톡실린 (catalog number: HHS32, Sigma Aldrich, Inc.) 염색을 30분 동안 수행하고, 씻어주었다. 슬라이드 글라스에 막을 올려주고 퍼마운트 용액(Permount solution)으로 고정하여 세포 이주 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영, 계산하였다.

[0064] 2-5: 상처 치유 분석(wound healing assay)을 통한 상피성 난소암 세포의 이동성 분석

[0065] 세포의 이동성을 측정하기 위해 Ibidi사의 이동 배양 접시 인서트(Migration culture dish insert)를 사용하였다. 2×10^5 세포/mL의 ES2 세포 70 μ l를 배양 접시 내 구획된 칸에 넣고 세포로 가득 메워질 때까지 키운다. 이후, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하고 배양 접시 내 구획을 위한 삽입물을 제거 하여 세포와 세포 간 이동할 수 있는 500 μ m의 공간을 확보한다. 10 μ M 텔피니딘이 포함된 배지를 사용하여 추가적으로 세포를 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내 배양시키고 세포 사이 공간을 세포 간 상호작용 및 이동성에 의해 메워지는 양상을 현미경을 통해 확인한다. 20시간 이후, 광학현미경(Leica, DM3,000)을 사용하여 세포가 이동한 공간을 촬영하고 이동거리를 정량화한다.

[0066] 2-6: 상피성 난소암 ES2 세포에 대한 텔피니딘의 영향 분석

[0067] 텔피니딘에 의해 상피성 난소암 세포주 ES2 세포의 변화양상을 분석하기 위하여 먼저 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μ M) 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과 ES2 세포의 증식력이 텔피니딘에 의해 단계적으로 감소함을 확인할 수 있었다(도 2A).

[0068] 이를 토대로 10 μ M 텔피니딘을 사용하여 TUNEL assay를 통해 DNA 분절화(DNA fragmentation)가 발생되며 세포

사멸이 유도되는 것을 확인하였으며(도 2B), 동일한 조건 아래 면역형광기법을 바탕으로 상피성 난소암 증식마커인 PCNA, ERBB2 세포를 염색하여 관찰한 결과 핵과 세포막에 뚜렷한 발현을 보이던 PCNA와 ERBB2가 텔피니딘을 처리함에 따라 감소함을 확인할 수 있었다(도 2C 및 2D). 이후, 텔피니딘에 의한 ES2 세포의 이동성을 확인하기 위하여 트랜스웰 막을 이용한 세포의 이주성, 상처 치유 분석을 통한 세포 간 상호작용 및 이동성을 분석한 결과 텔피니딘이 상피성 난소암 ES2 세포의 이동을 확연히 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(도 2E 및 2F).

[0070] 실시예 3: 세포 사멸 분석

[0071] 3-1: 아넥신 V 및 요오드화 프로피디움(PI) 염색을 이용한 세포 사멸 분석

[0072] 텔피니딘에 의한 상피성 난소암 ES2 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC 아넥신 V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 0.1, 1, 10, 20 μ M) 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1×binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻는다. 다음으로 200 μ L의 1×binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μ L 넣고 아넥신 V 5 μ L, PI 5 μ L를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1×binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0073] 3-2: 텔피니딘에 의한 상피성 난소암 세포의 사멸 효과

[0074] 텔피니딘에 의해 상피성 난소암 세포 내 사멸된 세포의 수를 측정하기 위하여 텔피니딘을 용량의존적으로 처리하여 48시간 인큐베이션 시킨 후 아넥신 V 및 요오드화 프로피디움을 사용하여 유세포 분석기를 이용하여 사멸 세포 수를 측정하였다. 그 결과, 텔피니딘은 ES2 세포 내 작용하여 용량의존적으로 사멸 세포의 수를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0076] 실시예 4: 단백질 발현 분석

[0077] 4-1: 웨스턴 블롯

[0078] ES2 세포에 텔피니딘 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 ES2 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95°C에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 화학발광 감지(chemiluminescence detection, SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0079] 4-2: 텔피니딘에 의한 상피성 난소암 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석

[0080] 텔피니딘에 의해 유도되는 상피성 난소암 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 증식과 연관된 PI3K, MAPK(ERK1/2, JNK, P38)의 조절 인자에 대한 인산화 양상을 용량 의존적(도 4A 내지 4F), 시간 의존적(도 4G 내지 4J)으로 웨스턴블롯을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 텔피니딘은 AKT, P70S6K, ERK1/2, JNK의 인산화를 불활성화시키고 이와는 반대로 P38의 인산화를 촉진시키는 것으로 나타났다.

[0082] 실시예 5: 텔피니딘과 신호전달기전 억제제를 통한 타겟 신호전달분자 인산화 패턴 양상 분석

[0083] 용량/시간의존적 분석을 통해 선별된 텔피니딘 조절 신호전달분자의 정확한 기전을 분석하기 위하여 ES2 세포 내 LY294002 (PI3K 억제제), SB203580 (P38 억제제), U0126 (ERK1/2 억제제)를 먼저 2시간 동안 37°C/CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하고 이후 10 μ M의 텔피니딘을 처리하여 단백질 추출 이후 웨스턴 블롯을 통해 타겟 분자의 인산화를 분석하였다. 그 결과, 텔피니딘에 의해 감소된 AKT의 인산화는 텔피니딘과 LY294002, SB203580을 병용 처리함에 따라 더욱이 억제되는 양상을 나타내었고(도 5A), P70S6K 역시 단독으로 처리한 텔피니딘보다

LY294002, SB203580, U0126과 병용 처리하였을 때 인산화가 더욱 약화되는 양상을 확인할 수 있었다(도 5B). 하지만 ERK1/2의 인산화는 U0126을 함께 처리하였을 때만 억제되는 양상을 나타내며 기타 신호전달물질에 의한 추가적인 조절은 받지 않는 것으로 나타났다(도 5C).

[0085] **실시예 6: 텔피니딘과 AKT, P38, ERK1/2 신호전달기전 억제제 혼합물을 통한 ES2 세포 내 신호전달물질 인산화 패턴 분석**

[0086] 신호전달기전 억제제와 텔피니딘과의 연관성 및 이에 따른 상피성 난소암 ES2세포의 증식 양상을 확인하기 위하여 텔피니딘과 각각의 억제제를 단독 또는 병행 처리하여 세포의 증식을 분석하였다(도 6). 텔피니딘에 의해 감소한 ES2 세포의 증식은 LY294002, SB203580, U0126을 병용하여 처리함으로 인해 추가적으로 세포 증식이 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 각각의 신호전달기전 억제제를 단독으로 ES2 세포 내 처리하였을 때와는 달리 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선됨을 확인할 수 있었다.

[0088] **실시예 7: 텔피니딘과 항암화학요법에 의한 상피성 난소암 세포의 증식 양상 비교 분석**

[0089] 텔피니딘을 상피성 난소암 치료를 위한 항암제로서 개발하기 위해 현재 일반적으로 사용되고 있는 항암화학치료제 시스플라틴과 파클리탁셀을 단독 또는 텔피니딘과 병용 처리하여 ES2 세포의 증식 능력을 비교 분석 하였다(도 7). 텔피니딘은 파클리탁셀(20 μ M), 시스플라틴 (50 μ M)을 단독으로 처리한 것과 같이 상피성 난소암 진행에 있어 강한 억제 효과를 나타내었으며 텔피니딘과 병용 처리 시 각각 항암화학치료제에 대한 민감도를 높여 세포의 증식을 더욱이 억제 시키는 것으로 확인되었다. 따라서 텔피니딘이 상피성 난소암 치료제로서 또는 기존 항암제 치료에 있어 보조치료제로서 개발 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

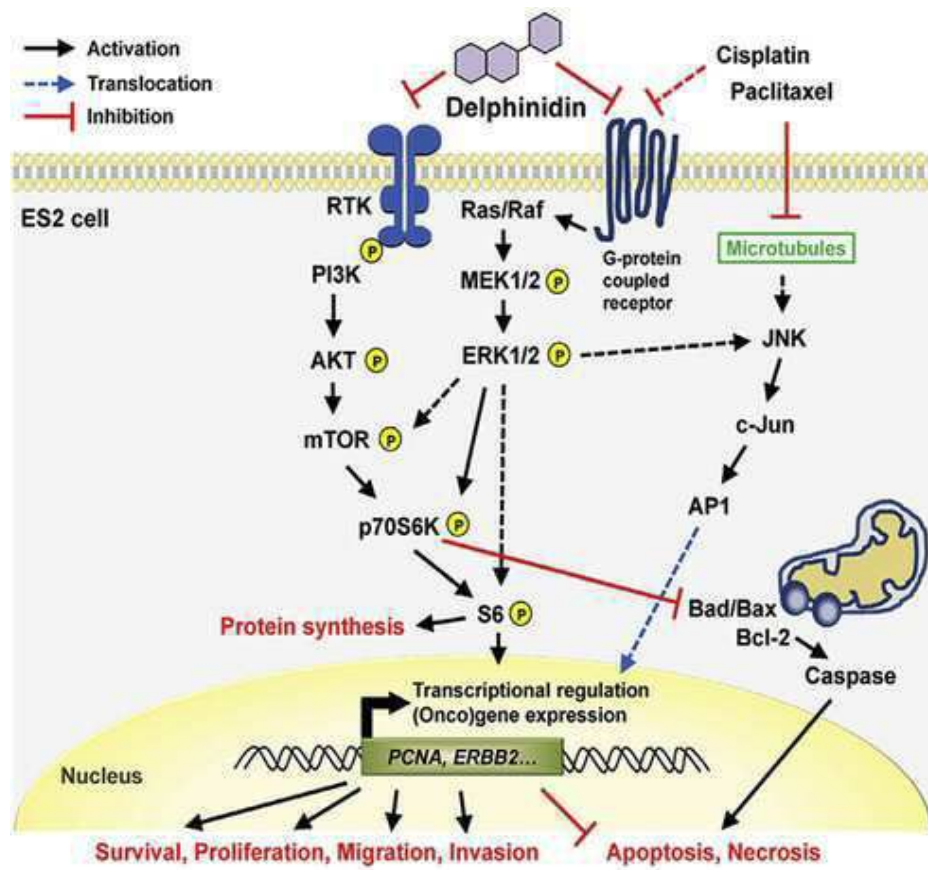
[0091] **통계분석**

[0092] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

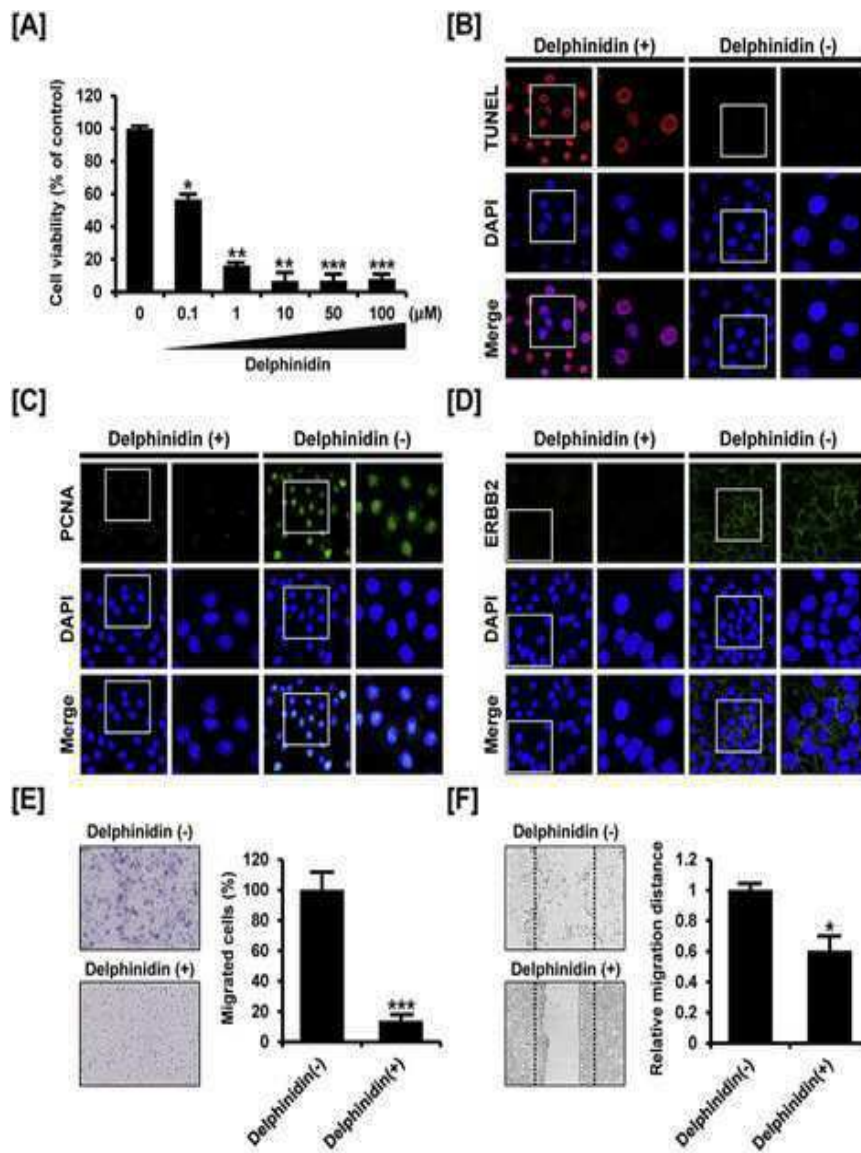
[0094] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

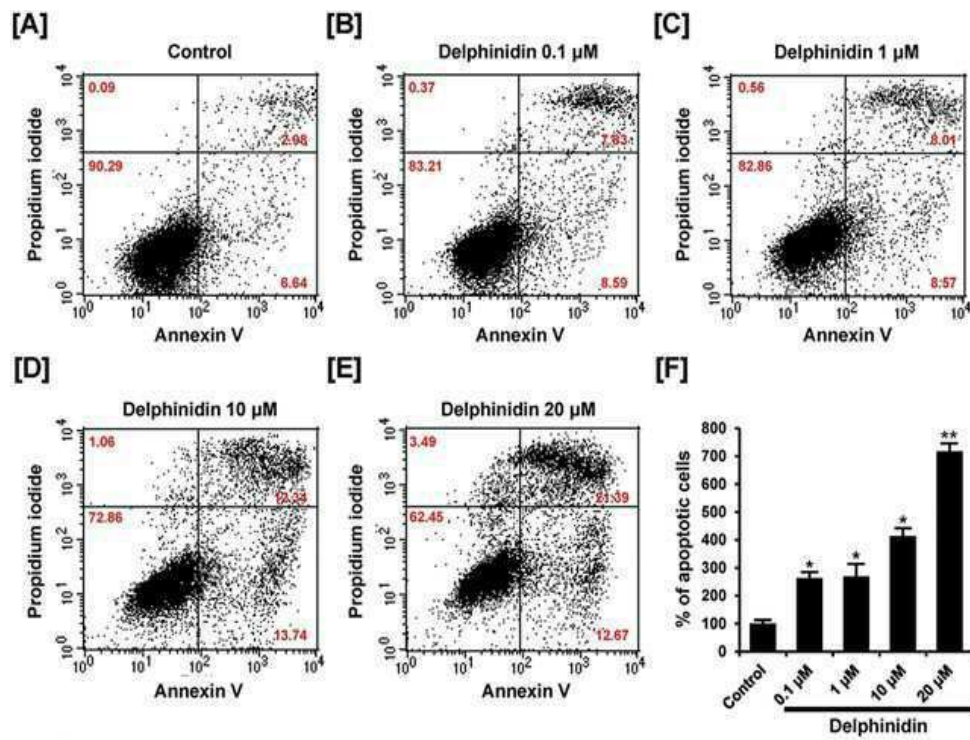
도면1



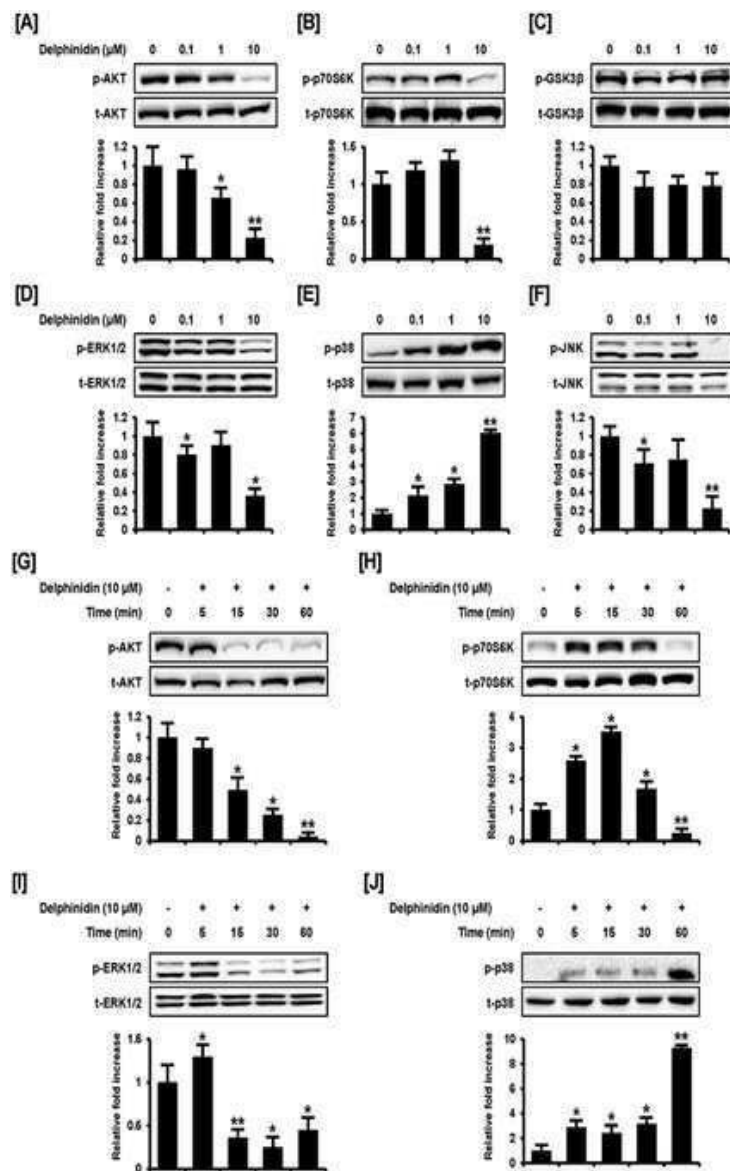
도면2



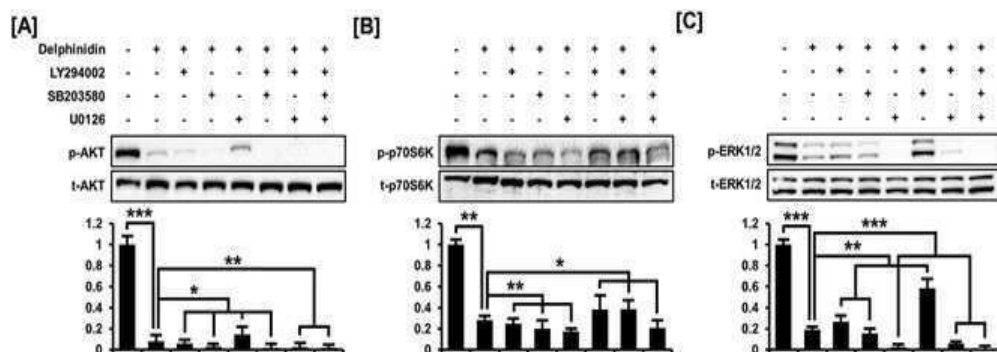
도면3



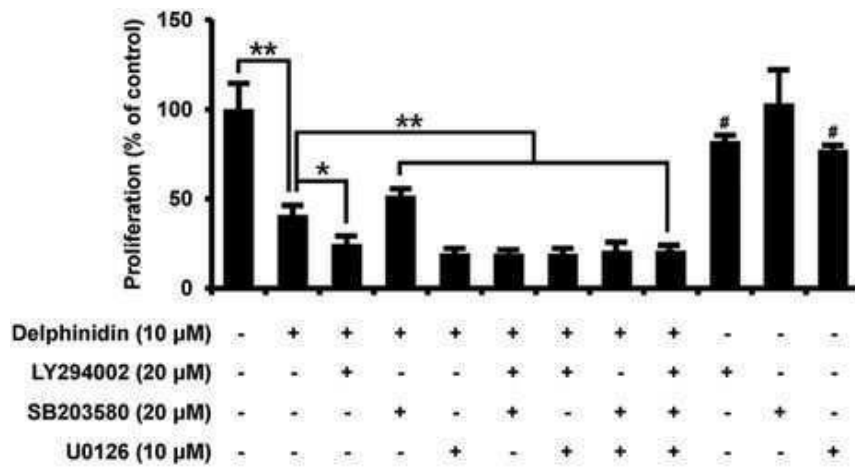
도면4



도면5



도면6



도면7

