



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0169178
(43) 공개일자 2024년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/122 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/122 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0066338
(22) 출원일자 2023년05월23일
심사청구일자 2023년05월23일

(71) 출원인
국립순천대학교산학협력단
전라남도 순천시 중앙로 255(매곡동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김항건
광주광역시 서구 시청로96번길 15 로잔티움파크 1103호
남상집
서울특별시 서대문구
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정성중

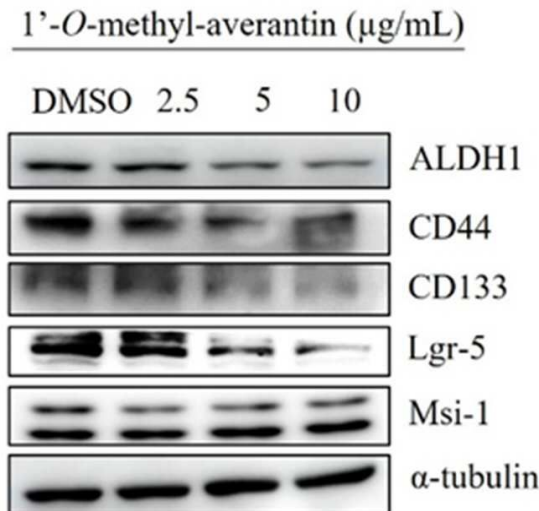
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 1'-O-메틸-아베란틴을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 1'-O-메틸-아베란틴을 암 줄기세포 성장억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 암 줄기세포의 표지자의 발현을 억제하고, 암 줄기세포의 발달을 조절하는 SHH 신호전달 경로 및 노치 신호전달 경로를 억제하는 효과를 나타내는 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물, 암의 예방 또는 치료용 조성물, 및 항암 보조제, 그리고 상기 조성물을 개체 투여하여 개체의 암 줄기세포의 성장을 억제하고/거나 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

허재선

전라남도 순천시 해룡면 백연길 105-7 대광로제비
 양 103-1301

바를르 무자히트

전라남도 순천시 중앙로 255 순천대학교 약학대학
 병태생리학실험실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711010634
과제번호	NRF-2014M3A9B8002115
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	지의류 생물자원 소재은행
기 여 율	1/2
과제수행기관명	순천대학교
연구기간	2011.11.01 ~ 2014.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345358442
과제번호	2020R1A6C101B194
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국기초과학지원연구원
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	핵심연구지원센터조성지원과제(나노바이오·에너지 소재 센터)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신장암, 유방암, 혈액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 식도암, 위암, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물.

청구항 3

1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신장암, 유방암, 혈액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 식도암, 위암, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물 유효성분으로 포함하는 항암 보조제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신장암, 유방암, 혈액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 식도암, 위암, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 항암 보조제.

청구항 7

1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제 또는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신장암, 유방암, 혈액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 식도암, 위암, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 1'-O-메틸-아베란틴의 암 줄기세포 성장억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 암 줄기세포의 표지자의 발현을 억제하고, 암 줄기세포의 발달을 조절하는 SHH 신호전달 경로 및 노치 신호전달 경로를 억제하는 효과를 나타내는 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물, 암의 예방 또는 치료용 조성물, 및 항암 보조제, 그리고 상기 조성물을 개체 투여하여 개체의 암 줄기세포의 성장을 억제하고/거나 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 암 줄기세포는 자가 재생의 잠재력과 이종의(heterogeneous) 암 세포의 성장을 개시하는 능력으로 알려져 있다. 암 줄기세포(cancer stem cells; CSC)가 항암제의 효능을 제한하는 화학 저항성에 기여한다는 증거가 증가하고 있다(비특허문헌 1-3). CSC는 뇌암, 신장암, 유방암, 혈액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 대장암을 포함한 다양한 유형의 암에서 발견된다(비특허문헌 4 및 5). 대장암(colon cancer)은 암 관련 사망의 두 번째로 큰 원인이며 모든 성별에서 세계에서 세 번째로 흔한 암이다. 대장암 치료를 위해 많은 치료제가 개발되었지만 많은 치료법이 실패하였다(비특허문헌 4). 따라서 대장암은 대장 종양 형성을 예방하고 CSC를 표적으로 하는 새로운 치료법을 찾는 데 중요하다.
- [0003] 암 줄기세포(CSC)를 표적으로 하는 것은 주로 줄기세포 마커와 배아 신호 경로(즉, 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH) 및 노치 신호경로(Notch signaling)의 발현을 차단하는 것을 목표로 한다. CSC는 CD133(cluster of differentiation 133), CD44, Lgr-5(leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-5) 및 EPHB1(ephlin type-B receptor)을 발현한다(비특허문헌 6). 또한, ALDH1은 이의 과발현이 CSCs의 발달과 관련이 있는 줄기세포 마커이며(비특허문헌 7) Musashi-1은 대장암에서 화학 저항성과 암 줄기세포를 촉진한다(비특허문헌 8).
- [0004] SHH는 배아 발달 동안 기관 형성의 중요한 조절자이다(비특허문헌 9). SHH 리간드는 PTCH1의 분해를 일으켜 SMO(G-protein-coupled receptors Smoothed) 및 Gli2(Gli Family Zinc Finger 2)를 활성화한다(비특허문헌 10 및 11). 또한 SMO의 억제제는 세포 이동(cell migration)과 세포 가소성(cell plasticity)을 조절한다(비특허문헌 12). 전사 인자로 작용할 때 Gli1은 Hh 신호(signaling)를 증폭하므로 Hh 신호 활성화에서 중요한 역할을 한다(비특허문헌 13-15). 줄기세포 신호 전달 경로(stem cell signaling pathway)라고 하는 또 다른 경로에서 Notch는 유방 발달, 정상적인 조혈 및 결장직장 상피의 성숙과 같은 중요한 과정에서 역할을 한다(비특허문헌 16 및 17). Notch 리간드는 두 개의 구조적으로 분리된 그룹인 델타-유사 리간드(Delta-like ligands)(Dlls 1, 3 및 4)와 자그드 리간드(Jagged ligand) (1 및 2)로 나뉘며, 이들은 4개의 막 관통 노치 수용체(transmembrane notch receptor)에 결합한다(비특허문헌 18). 따라서 결장직장암(및 기타 악성종양)에서 줄기세포 형성의 표적 억제, 화학내성 및 재발의 형성에는 관련 경로를 목표로 하는 특정 개입이 필요하다.
- [0005] 한편, 지의류는 항균, 항바이러스, 항산화, 항알레르기 및 항종양 효과가 있는 2차 대사산물을 생성한다. 지의류 지의체(Lichen thallus)는 그 구조 내에 공생하는 지의류 내생 곰팡이(endolichenic fungi)를 포함한다. 지의류 내생 곰팡이의 종은 지의류 형성 및 발달을 자극하고 생리 활성 물질을 생산함으로써 중요한 생태학적 역할을 하는 것으로 생각된다.
- [0006] 이에 본 발명자는 암 줄기세포를 표적으로 하여 지의류 내생 곰팡이의 효능을 연구하던 중 세트라리아 속(*Cetraria* sp.) 지의류에 공생하는 야크로게르셀라 속(*Jackrogersella* sp.)에 속하는 지의류 내생 곰팡이 추출물로부터 분리된 1'-O-메틸-아베란틴(1'-O-methyl-averantin) 화합물이 암 줄기세포의 억제 등에 매우 효과적임을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) [1] Mertins, S. D. Cancer Stem Cells: A systems biology view of their role in prognosis and therapy. *Anticancer Drugs* 25, 353 (2014).
- (비특허문헌 0002) [2] Yang, Y. et al. Tumidulin, a lichen secondary metabolite, decreases the stemness potential of colorectal cancer cells. *Molecules* 23, (2018).
- (비특허문헌 0003) [3] Longley, D. B. & Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 205, 275-292 (2005).
- (비특허문헌 0004) [4] Karsten, U. & Goletz, S. What makes cancer stem cell markers different? *Springerplus* 2, 1-8 (2013).
- (비특허문헌 0005) [5] Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* 2005 5:4 5, 275-284 (2005).
- (비특허문헌 0006) [6] Cho, Y. C. et al. Bromopropane Compounds Increase the Stemness of Colorectal Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1888 18, 1888 (2017).

- (비특허문헌 0007) [7] Holah, N. S., Aiad, H. A. E. S., Asaad, N. Y., Elkhoully, E. A. & Lasheen, A. G. Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study. J Clin Diagn Res 11, EC17 (2017).
- (비특허문헌 0008) [8] Chiou, G. Y. et al. Musashi-1 promotes a cancer stem cell lineage and chemoresistance in colorectal cancer cells. Scientific Reports 2017 7:1 7, 1-13 (2017).
- (비특허문헌 0009) [9] Kusano, K. F. et al. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. Nature Medicine 2005 11:11 11, 1197-1204 (2005).
- (비특허문헌 0010) [10] Chen, J. et al. Garcinone C suppresses colon tumorigenesis through the Gli1-dependent hedgehog signaling pathway. Phytomedicine 79, 153334 (2020).
- (비특허문헌 0011) [11] Sun, Q. et al. Berberine suppresses colorectal cancer by regulation of Hedgehog signaling pathway activity and gut microbiota. Phytomedicine 103, 154227 (2022).
- (비특허문헌 0012) [12] Magistri, P. et al. SMO inhibition modulates cellular plasticity and invasiveness in colorectal cancer. Front Pharmacol 8, 956 (2018).
- (비특허문헌 0013) [13] Wu, F., Zhang, Y., Sun, B., McMahon, A. P. & Wang, Y. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. Cell Chem Biol 24, 252-280 (2017).
- (비특허문헌 0014) [14] Guan, Y. et al. Kaempferol Inhibits Renal Fibrosis by Suppression of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway. Phytomedicine 154246 (2022) doi:10.1016/J.PHYMED.2022.154246.
- (비특허문헌 0015) [15] Zhou, X. et al. Rosmarinic Acid Decreases the Malignancy of Pancreatic Cancer Through Inhibiting Gli1 Signaling. Phytomedicine 95, 153861 (2022).
- (비특허문헌 0016) [16] Dontu, G. et al. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. Breast Cancer Research 6, 1-11 (2004).
- (비특허문헌 0017) [17] Androutsellis-Theotokis, A. et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. Nature 2006 442:7104 442, 823-826 (2006).
- (비특허문헌 0018) [18] Takebe, N. et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. Nature Reviews Clinical Oncology 2015 12:8 12, 445-464 (2015).
- (비특허문헌 0019) [19] Petitprez, A. et al. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. Int J Oncol 42, 1644-1653 (2013).
- (비특허문헌 0020) [20] Trainer, D. L. et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. Int J Cancer 41, 287-296 (1988).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제 또는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 암 줄기세포 억제용 조성물을 개체에 투여하여 개체 내 기관에 존재하는 암 줄기세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 개체 내 암을 치료할 뿐만 아니라 암의 재발을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

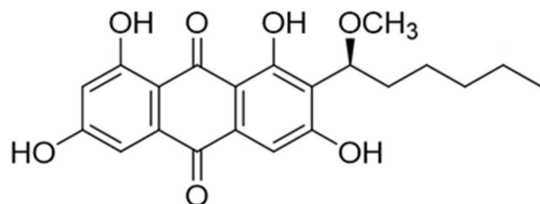
[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항암 보조제를 종래 다른 화학요법과 병용하여 암의 재발을 억제시킬 뿐만 아니라 암을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 하나의 양태로서, 본 발명은 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로부터 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 1'-*O*-메틸-아베란틴(1'-*O*-methyl-averatin)은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 안트라퀴논(anthraquinone)계 화합물로 분류되는 분자량 386.13 g/ml인 화합물이다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 상기 1'-*O*-메틸-아베란틴 화합물은 지의류 또는 지의류 내생 곰팡이(endolichenic fungi)로부터 분리되거나 화학적으로 합성할 수 있다. 상기 지의류는 예를 들어 세트라리아 속(*Cetraria* sp.) 지의류일 수 있으며, 상기 지의류 내생 곰팡이는 예를 들어 야크로게르셀라 속(*Jackrogersella* sp.)에 속하는 진균일 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0020] 하나의 구체적 예로, 상기 1'-*O*-메틸-아베란틴 화합물은 세트라리아 속(*Cetraria* sp.) 지의류에 공생하는 야크로게르셀라 속(*Jackrogersella* sp.)에 속하는 지의류 내생 곰팡이의 에탄올 추출물로부터 분리할 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 1'-*O*-메틸-아베란틴 화합물은 무기산 또는 유기산으로부터 유도된 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염은 바람직하게는 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산, 아세트산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 석신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 만델산, 타타르산, 시트르산, 아스코빈산, 팔미트산, 말레인산, 하이드록시말레인산, 벤조산, 하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 신남산, 살리실산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산 및 톨루엔설폰산으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0022] 본 발명의 상기 1'-*O*-메틸-아베란틴 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 수화물 및 용매화물을 포함할 수 있다. 상기 수화물은 1'-*O*-메틸-아베란틴 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 물분자와 결합하여 형성된 것을 의미할 수 있다.

[0023] 본 발명의 상기 1'-*O*-메틸-아베란틴 화합물은 이의 입체 이성질체를 포함할 수 있다. 상기 입체 이성질체(stereoisomer)는 분자식 및 구성원자의 연결 방법도 같으나 원자 사이의 공간적 배치가 다른 화합물을 말한다. 상기 입체 이성질체는 부분입체 이성질체(diastereomer) 또는 거울상 이성질체(enantiomer) 일 수 있다. 거울상 이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체(optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R(Rectus: 시계 방향) 및 S(sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체 이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스(cis)-트랜스(trans) 이성질체로 구분할 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 암 줄기세포는 자가재생능력(self-renewal)과 암 세포로 분화하는 능력(differenatiation)을 동시에 가진 미분화세포를 말한다. 상기 암은 반드시 이로 제한되는 것은 아니지만, 뇌암, 신장암, 유방암, 혈

액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 위암, 식도암, 또는 대장암 중의 어느 하나일 수 있다.

- [0025] 본 발명에 있어서, 암 줄기세포 성장 억제제는 암 줄기세포의 사멸, 암 줄기세포의 자가 재생, 암 세포로의 분화 억제, 암 줄기세포의 표지자인 ALDH-1, CD133, CD44, Lgr-5, Msi-1, 및 EphB1의 발현 억제, 및 암 줄기세포의 SHH 신호전달경로 및/또는 노치 신호전달경로 억제를 포함하는 의미이다.
- [0026] 상기 암 줄기세포 표지자(cancer stem cell markers)는 암 줄기세포의 전이, 암 세포로의 성장 및 증식 등에 관여하며, 암이 재발한 환자에서 많이 발현하는 단백질이다. 따라서, 상기 암 줄기세포 표지자의 발현 억제는 암 줄기세포의 전이, 암세포로의 성장 및 증식, 암세포의 재생성을 억제할 수 있으므로 암을 치료할 수 있다.
- [0027] 하나의 구체적 실시예로서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴은 암 줄기세포의 표지자(마커)인 ALDH1, CD133, CD44, Lgr5, Msi-1 및 EphB1의 mRNA 수준 및 단백질 수준을 하향 조절하였다. 따라서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 암 줄기세포의 성장을 억제하고 암을 치료할 수 있다.
- [0028] 상기 SHH 신호전달경로 및 노치(Notch) 신호전달경로는 줄기세포의 신호전달 경로이며, 암의 발달 과정에서 매우 중요한 역할을 하므로 이들 신호전달경로를 차단 또는 억제하는 것은 암 치료의 하나의 표적이 된다.
- [0029] SHH 신호전달경로에서 SHH 리간드에 대한 막관통 반응(transmembrane response)은 두 가지 막관통 단백질인 PTCH 및 SMO에 의해 조절되고 매개되며, Gli1과 Gli2는 SHH 신호 전달의 하향(downstream) 표적이다. 또한, SHH 신호는 Bmi-1 발현을 증가시켜 세포 재프로그래밍을 유도하며, SHH 경로 내의 다운스트림 전사 인자 Gli는 Bmi-1의 발현을 유도한다.
- [0030] 하나의 구체적 실시예로서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴은 SHH 신호전달경로의 막관통 단백질인 SMO, 및 SHH 신호전달경로의 하향 표적인 Gli1과 Gli2의 mRNA 및 단백질의 발현 수준을 억제하였다.
- [0031] 또 하나의 구체적 실시예로서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴은 Gli 과발현 세포에서 Gli 리포터 활성을 억제하였으며, 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 1'-O-메틸-아베란틴의 억제 활성은 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 사용된 Gli 억제제(GANT61) 및 SMO 억제제(Vismodegib)의 억제 활성과 유사하였다.
- [0032] 또 하나의 구체적 실시예로서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴은 SHH 경로 내의 다운스트림 전사 인자 Gli에 의해 발현이 유도되는 Bmi-1의 발현을 하향 조절하였다.
- [0033] 따라서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 SHH 신호전달경로를 억제하므로 암 줄기세포의 성장을 억제하고 암을 치료할 수 있다.
- [0034] 노치(Notch) 신호전달경로에서 노치 리간드가 노치 수용체에 결합할 때 γ 세크레타제는 단백질 분해 절단(S3 절단)을 통해 NICD(노치 수용체)의 세포내 도메인을 해방시킨다. NICD는 핵 전위(nuclear translocation)를 겪고 전사 인자 CSL과 결합한다. NICD/CSL 복합체는 Hes1 및 다른 Notch 신호 표적 유전자를 활성화한다.
- [0035] 하나의 구체적 실시예로서, qRT-PCR과 리포터 분석을 사용하여 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴에 의한 Notch 신호 전달의 억제를 조사한 결과, Notch-1 및 Hes-1 mRNA가 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴 처리 후에 하향 조절되는 경향이 있었으며, CSL과 Hes-1 리포터 활성도 억제되었다.
- [0036] 따라서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물은 노치 신호전달경로를 억제하므로 암 줄기세포의 성장을 억제하고 암을 치료할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 상기 암 줄기세포의 성장억제용 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 5 중량%의 함량으로 포함될 수 있다. 상기 함량인 0.001 중량% 미만인 경우에는 암 줄기세포의 성장을 억제하는 효과가 너무 미약하고, 10 중량%를 초과하는 경우에는 함량의 증가에 따른 효과의 증가가 미비하므로 비경제적이다.
- [0038] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [0039] 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물은 본 명세서에서 편의상 항암제로 표현할 수 있으며, 상기 암은 반드시 이로 제한되는 것은 아니지만, 뇌암, 신장암, 유방암, 혈액암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 또는 대장암 중의 어느 하나일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 암 줄기세포 마커의 발현을 하향 조절하며, 암 세포의 SHH 신호전달 경로 및 노치 신호전달 경로를 현저하게 억제하므로 암 줄기세포의 성장 억제에 유용할 뿐만 아니라 암 세포주에 대한 세포독성이 있고, 암 세포에 의한 스페로이드(spheroid) 형성을 억제하므로 암을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물로 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물은 유효성분인 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물 이외에 약학적 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 윤활제, 습윤제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 및 담체이다.
- [0042] 상기 약학적 조성물로 적합한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 5 중량%의 함량으로 포함될 수 있다. 상기 함량인 0.001 중량% 미만인 경우에는 암의 예방 또는 치료하는 효과가 너무 미약하고, 10 중량%를 초과하는 경우에는 함량의 증가에 따른 효과의 증가가 미비하므로 비경제적이다.
- [0044] 상기 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 경구, 비경구 등의 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 직장 또는 정맥 내 주입, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여 등으로 투여될 수 있다.
- [0045] 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 보다 구체적으로, 치료될 개체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 함량을 투여하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 환자에게 투여되는 조성물의 투여량은 환자 체중의 약 0.5-1,000 mg/kg 일 수 있다. 다만, 상기 투여량은 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0046] 상기 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 현탁액, 과립제, 정제, 분말제, 에멀전제 또는 캡슐제 등의 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0047] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를 제공한다.
- [0048] 본 발명에 따른 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물 및 이의 효과는 상술한 바와 같다.
- [0049] 본 발명의 1'-*O*-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 기존의 화학적 항암제 등과 함께 투여함으로써 암 줄기세포의 선택적 타겟팅 효과를 통해 종래의 항암제 및 방사선 저항성을 감소시켜 암의 재발을 억제할 뿐만 아니라 암을 원천적으로 치료할 수 있다.
- [0050] 상기 항암제는 기존에 사용되고 있는 임의의 약물이거나 어느 것이나 사용 가능하다. 예를 들어, 머스타드 가스 유도체류(메클로레타민, 시클로포스파미드, 클로람부실, 멜팔란, 및 이포스파미드 등), 에틸렌이민류(티오테파 및 헥사메틸멜라민), 아킬알킬술포네이트류(부술판), 히드라진류 및 트리아진류(알트레타민, 프로카르바진, 다

카르바진 및 테모졸로마이드), 니트로스유레아류(카르뮤스틴, 로뮤스틴 및 스트렙토조신 등), 금속염류(카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴), 빈카 알칼로이드류(빈크리스틴, 빈블라스틴 및 빈오렐빈), 타산류(파클리탁셀 및 도세탁셀), 포도필로톡신류(에토포시드 및 테니소피드), 캄프토테칸 유사체류(이리노테칸 및 토포테칸), 안트라시클린류(독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 미톡산트론 및 이다루비신), 크로모마이신류(닥티노마이신 및 플리카마이신), 항종양 항생제류(미토마이신 및 블레오마이신 등), 염산 길항제류(메토트렉세이트), 피리미딘 길항제류(5-플루오로우라실, 폭수리딘, 시타라빈, 카페시타빈 및 켄시타빈), 퓨린 길항제류(6-메르캅토피린 및 6-티오구아닌), 아데노신 디아미나제 억제제류(클라드리빈, 플루다라빈, 넬라라빈 및 펜토스타틴), 토포이소머라제 I 억제제류(이리노테칸 및 토포테칸), 토포이소머라제 II 억제제류(암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트 및 테니포시드), 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제류(히드록시유레아), 아드레노코르티칼 스테로이드 억제제류(미토탄), 효소류(아스파라기나제 및 페가스파르가제), 항미소관체류(에스트라뮤스틴) 및 레티노이드류(백사로텐, 이소트레티노인 및 트레티노인(ATRA))로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

- [0052] 다른 하나의 양태로서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명에 따른 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물 및 이의 효과는 상술한 바와 같다.
- [0054] 본 발명의 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 유효성분으로 포함되는 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물 이외에 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 포도당 및 과당 당의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 올리고당 등의 디사카라이드, 텍스트린 및 사이클로텍스트린 등의 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0055] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 유효성분을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0056] 본 발명의 식품이 음료일 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0057] 상기 식품은 상술한 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품은 천연 과일주스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0059] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 포함하는 암 줄기세포 성장 억제용 조성물을 개체에 투여하여 개체 내에 존재하는 암 줄기세포의 성장을 억제하고/거나 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0060] 하나의 구체적 양태로서, 본 발명은 상기 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 포함하는 암 줄기세포 성장억제용 조성물을 개체에 투여하여 개체 내에 존재하는 암 줄기세포의 사멸유도, 암 줄기세포의 자가재생 억제, 암 세포로의 분화, 성장 및 증식 억제, 암 세포를 사멸하는 방법을 제공한다.
- [0061] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물

및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 포함하는 항암 보조제를 종래 다른 화학 요법(항암제 및 방사선 치료)과 병용하여 암의 재발을 억제시킬 뿐만 아니라 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0062] 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물을 포함하는 항암 보조제를 기존의 항암제와 함께 개체에 투여하거나 방사선 치료에 함께 병용하여 종래 항암제 및 방사선 저항성을 감소시켜 암의 재발을 억제할 뿐만 아니라 개체 내에 존재하는 암 줄기세포의 선택적 타겟팅(targeting)을 통해 암을 원천적으로 치료하는 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명에 있어서, 용어 "개체"는 본 발명의 상기 암 줄기세포 성장 억제용 조성물, 항암제, 또는 항암 보조제를 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이, 랫트, 마우스, 침팬지 등의 포유동물을 의미한다.

[0064] 본 발명에 있어서, 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 암 줄기세포 성장 억제용 조성물, 항암제, 또는 항암 보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.

[0065] 본 발명에 있어서, 용어 "억제" 또는 "치료"는 개체에서 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제, (b) 질환 또는 질병의 경감 및 (c) 질환 또는 질병의 제거를 의미한다.

[0066] 본 발명의 상기 방법에 의하여 상술한 개체의 질환 또는 질병은 본 발명의 암 줄기세포 성장 억제용 조성물, 항암제, 또는 항암 보조제의 개체 내 투여에 의하여 억제 또는 치료 등의 목적을 달성할 수 있음은 상술한 내용 및 하기에 기술된 실시예 등을 통하여 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 이해될 것임은 물론이다.

[0067] 본 명세서에서, 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 개체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 본 명세서에서, 용어 "치료"는 개체에서 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제 (b) 질환 또는 질병의 경감 및 (c) 질환 또는 질환의 제거를 의미한다. 상기 개체는 본 발명의 상기 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이, 랫트, 마우스, 침팬지 등의 포유동물을 의미한다.

[0068] 본 발명의 상기 방법에 의하여 상술한 개체의 질환 또는 질병은 본 발명의 암 줄기세포 성장 억제용 조성물, 항암제, 또는 항암 보조제의 개체 내 투여에 의하여 억제 또는 치료 등의 목적을 달성할 수 있음은 상술한 내용 및 하기에 기술된 실시예 등을 통하여 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 이해될 것임은 물론이다.

발명의 효과

[0069] 본 발명에 따른 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 ALDH1, CD44, CD133, Lgr-5, Msi-1 및 EphB1과 같은 암 줄기세포 마커를 억제하며, 암 줄기세포를 조절하는 SHH 신호전달 경로의 조절자인 Gli1, Gli2 및 SMO에 대한 억제 활성을 나타내었다. 또한, 본 발명에 따른 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 SMO와 독립적으로 Gli1 다운스트림 이펙터(Gli1 downstream effector)를 표적으로 하여 SHH 신호전달 경로를 조절하는 효과를 가진다. 이외에도 본 발명에 따른 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물은 업스트림 수용체 NOTCH와 다운스트림 이펙터 Hes-1 및 CSL 복합체에서 억제 효과를 가진다. 따라서, 본 발명은 1'-O-메틸-아베란틴, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 수화물 및 이의 입체 이성질체로 이루어진 군으로부터 1이상 선택된 화합물이 암 줄기세포의 성장 억제용 조성물, 암의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물, 항암 보조제의 유효 성분으로 매우 효과적이며 유용하게 적용 가능할 뿐만 아니라 상기 조성물들에 의하여 암을 예방, 치료, 또는 개선할 수 있을 것이다. 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분은 천연물인 지의류로부터 유래하여 인체에 대한 부작용이 극히 적어 약학적 및 식품 조성물에 매우 안전하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 결장암 세포주인 CSC221, Caco2, DLD1 및 HCT116 세포주에 대한 지의류 내생 곰팡이 EL001672의 추출물 및 1'-O-메틸-아베란틴의 농도별 세포 생존력을 나타낸 그림이다. 대조군은 DMSO를 사용하였으며, 50, 25, 12.5

및 6.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 129.49, 64.74, 32.37 및 16.19 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균의 평균 $\pm$ 표준오차이며, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (DMSO 처리된 세포와 비교)임.

도 2는 비형질전환 세포(non-transformed cells)인 HEK293T 세포주에 대한 1'-O-메틸-아베란틴의 농도별 세포 생존력을 나타낸 그림이다. 여기서, 50, 25, 12.5 및 6.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 129.49, 64.74, 32.37 및 16.19 μM 의 농도를 나타낸다.

도 3은 14일 동안 1'-O-메틸-아베란틴 또는 EL001672 추출물로 처리된 CSC221 세포에서 스페로이드(spheroid) 형성이 농도 의존적으로 억제함을 보여주는 이미지 및 각 처리 후 형성된 스페로이드 개수의 정량 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차이며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 이다.

도 4는 14일 동안 1'-O-메틸-아베란틴 또는 EL001672 추출물로 처리된 DLD1 세포에서 스페로이드(spheroid) 형성이 농도 의존적으로 억제함을 보여주는 이미지 및 각 처리 후 형성된 스페로이드 개수의 정량 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차이며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 이다.

도 5는 14일 동안 1'-O-메틸-아베란틴 또는 EL001672 추출물로 처리된 HCT116 세포에서 스페로이드(spheroid) 형성이 농도 의존적으로 억제함을 보여주는 이미지 및 각 처리 후 형성된 스페로이드 개수의 정량 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차이며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 이다.

도 6은 CSC221 세포를 EL001672 추출물로 48시간 동안 처리한 후 암 줄기세포 마커 ALDH1(aldehyde dehydrogenase-1), CD133(cluster of differentiation 133), CD44, Lgr5, Musashi-1 및 EphB1을 암호화하는 mRNA의 정량 분석 결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 7은 CSC221 세포를 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 후 암 줄기세포 마커 ALDH1(aldehyde dehydrogenase-1), CD133(cluster of differentiation 133), CD44, Lgr5, Musashi-1 및 EphB1을 암호화하는 mRNA의 정량 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 8은 CSC221 세포를 EL001672 추출물로 48시간 동안 처리한 후 각 표적 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 9는 CSC221 세포를 EL001672 추출물로 48시간 동안 처리한 후 각 표적 단백질의 상대적인 발현 수준을 나타낸 그림이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 10은 CSC221 세포를 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 후 각 표적 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 11은 CSC221 세포를 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 후 각 표적 단백질의 상대적인 발현 수준을 나타낸 그림이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 12는 CSC221 세포를 지시된 농도의 EL001672 추출물로 48시간 동안 처리한 후 CSC221 세포에 의한 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1을 코딩하는 mRNA의 발현 결과를 나타낸 그림이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 13은 CSC221 세포를 지시된 농도의 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 후 CSC221 세포에 의한 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1을 코딩하는 mRNA의 발현 결과를 나타낸 그림이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 14는 CSC221 세포를 지시된 농도의 EL001672 추출물로 48시간 동안 처리한 후 CSC221 세포에 의한 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1 단백질 수준의 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 15는 CSC221 세포를 지시된 농도의 EL001672 추출물로 48시간 동안 처리한 후 CSC221 세포에 의한 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1 단백질 상대적인 발현 수준을 나타낸 그림이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. * $p < 0.05$;

**p<0.01(DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 16은 CSC221 세포를 지시된 농도의 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 후 CSC221 세포에 의한 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1 단백질 수준의 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 17은 CSC221 세포를 지시된 농도의 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 후 CSC221 세포에 의한 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1 단백질 상대적인 발현 수준을 나타낸 그림이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05; **p<0.01(DMSO 처리된 CSC221 세포와 비교).

도 18은 Gli-dependent firefly luciferase 및 constitutive Renilla luciferase reporter를 안정적으로 포함하는 NIH 3T3 세포를 2.5, 5 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 추출물, 1'-O-메틸-아베란틴, 5 $\mu\text{g/ml}$ GANT61(Gli 억제제) 및 Vismodegib-GDC-0449(SMO 억제제)로 처리하고 48시간 배양한 후의 Gli 활성을 측정하는 Gli-luc 리포터 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05. **p<0.01; ***p<0.001; DMSO 처리와 비교한 차이임.

도 19는 HEK293T 세포를 si-음성 대조군 및/또는 si-SMO로 12시간 동안 형질감염시킨 후, 세포를 Gli1 플라스미드 및/또는 모의(mock) 형질감염에 12시간 동안 노출시킨 후 세포를 DMSO 또는 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 경우의 Gli1의 mRNA 발현 수준의 정량 분석 결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05. **p<0.01; ***p<0.001; DMSO 처리와 비교한 차이임.

도 20은 HEK293T 세포를 si-음성 대조군 및/또는 si-SMO로 12시간 동안 형질감염시킨 후, 세포를 Gli-luc 플라스미드 및 Gli1 또는 Gli2 플라스미드 형질감염에 12시간 동안 노출시킨 후 세포를 DMSO 또는 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 경우의 Gli 활성을 측정하는 Gli-luc 리포터 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05. **p<0.01; ***p<0.001; DMSO 처리와 비교한 차이임.

도 21은 HEK293T 세포를 si-음성 대조군 및/또는 si-SMO로 12시간 동안 형질감염시킨 후, 세포를 Gli1 플라스미드 및/또는 모의(mock) 형질감염에 12시간 동안 노출시킨 후 세포를 DMSO 또는 1'-O-메틸-아베란틴으로 48시간 동안 처리한 경우의 SMO의 mRNA 발현 수준의 정량 분석 결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05. **p<0.01; ***p<0.001; DMSO 처리와 비교한 차이임.

도 22는 지시된 농도의 추출물로 처리되고 48시간 배양된 CSC221 세포에 의한 Notch-1 및 Hes-1(split-1의 모상(hairy) 및 인핸서) mRNA 발현의 정량 분석 결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; 각 그룹과 비교한 차이임.

도 23은 지시된 농도의 1'-O-메틸-아베란틴으로 처리되고 48시간 배양된 CSC221 세포에 의한 Notch-1 및 Hes-1(split-1의 모상(hairy) 및 인핸서) mRNA 발현의 정량 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; 각 그룹과 비교한 차이임.

도 24는 2.5, 5 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 추출물, 1'-O-메틸-아베란틴, 5 $\mu\text{g/ml}$ GANT61(Gli 억제제) 및 Vismodegib-GDC-0449(SMO 억제제)를 첨가하고 48시간 배양된 HEK293T 세포에서 CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1)-luc 리포터 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; 각 그룹과 비교한 차이임.

도 25는 2.5, 5 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 추출물, 1'-O-메틸-아베란틴, 5 $\mu\text{g/ml}$ GANT61(Gli 억제제) 및 Vismodegib-GDC-0449(SMO 억제제)를 첨가하고 48시간 배양된 HEK293T 세포에서 Hes-1 리포터 분석 결과이다. 여기서, 10, 5 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 1'-O-메틸-아베란틴은 각각 25.90, 12.95 및 6.47 μM 의 농도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차이다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; 각 그룹과 비교한 차이임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0073] 실시예 1: 일반 실험 절차 및 통계 분석

[0074] NMR 스펙트럼은 용매 DMSO-d₆(Cambridge Isotope Laboratories(CIL), Inc., Tewksbury, 메사추세츠, 미국)를 사용하여 Varian Inova spectrometers 400MHz 및 100MHz 분광계(Varian Medical Systems, Inc., Virginia, USA)에서 내부 표준으로 Me₄Si를 포함하여 획득하였다. 저해상도 LC-MS 측정은 Agilent Technology 1260 quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 및 역상 컬럼(Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 50mm × 4.6mm, 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하는 Waters Alliance Micromass ZQ LC-MS 시스템(Waters Corp, Milford, MA, USA)을 사용하여 이화여자대학교 국립연구시설 및 장비센터(NanoBioEnergy Materials Center)에서 1.0 mL/min의 유속으로 수행하였다. 광학 회전(optical rotations)은 5cm 셀이 있는 Kruss Optronic P-8000 선광계(Kruss, Habrug, Germany)를 사용하여 획득하였다.

[0075] 본 실험은 모두 세 번 수행되었다. 데이터는 평균 ± 표준 편차로 나타내었다. 모든 통계 분석은 Sigma Plot software를 사용하여 수행되었다.

[0077] 실시예 2: 세포 배양 및 시약

[0078] CSC221(인간 결장직장 선암종이 풍부한 CSC), CaCo2(MSS 및 야생형 KRAS, BRAF 및 PIK3CA), DLD1(MSI 및 돌연변이 KRAS 및 PIK3CA), HT116(KRAS 돌연변이), HEK293T(인간 배아 신장 세포) 세포가 본 실험에 사용되었다. CSC221 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 1% 페니실린 스트렙토마이신 용액이 보충된 DMEM(GenDepot, Katy, TX, USA)에서 배양하였다. 세포는 37℃의 가습 환경에서 5% CO₂에서 배양되었다. GANT61(G9048)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였고 Vismodegib-GDC-0449(A10258)는 AdooQ Bioscience(Irvine, CA, USA)에서 구입하였다.

[0080] 실시예 3: 지의류 내생 곰팡이의 추출물 제조 및 지의류 내생 곰팡이로부터 분리된 화합물의 동정

[0081] 3-1. 지의류 내생 곰팡이의 분리 및 이의 추출물 제조

[0082] 세트라리아 속(*Cetraria* sp.)의 지의류 표본은 백마설산(baima snow mountain) 원난성(Yunnan)에서 채집하였다. 바우처 표본은 순천대학교 한국지의류연구소(<https://cc.aris.re.kr/kolabic>)에 기탁되었다. 지의류 내생 곰팡이(Endolichenic fungus) EL001672는 표면 살균 방법을 사용하여 세트라리아 속(*Cetraria* sp.)의 지의류 표본에서 분리되었다.

[0083] 분리된 지의류 내생 곰팡이에 대하여 내부 전사된 스페이서 시퀀싱을 수행하였다. 제조업체의 프로토콜(Qiagen, Hilden, Germany)에 따라 DNeasy Plant Mini Kit를 사용하여 PDA에서 배양된 지의류 내생 곰팡이 EL0001672로부터 DNA를 추출하였다. rDNA의 내부 전사 스페이서(ITS) 영역은 범용 프라이머 ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (서열번호 1) 및 LR5(5'-ATCCTGAGGGAACTTC-3') (서열번호 2)으로 증폭되었다. 지의류 내생 곰팡이 EL001672는 ITS 서열의 BLAST 검색에 의해 *Jackrogersella multiformis*(GenBank Accession No. ON453667.1)와 98.99%의 유사성을 나타낸 야크로게르셀라 속(*Jackrogersella* sp.)으로 결정되었다. 야크로게르셀라 속(*Jackrogersella* sp.)에 속하는 지의류 내생 곰팡이 EL001672의 ITS 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0084]

지의류 내생 곰팡이 EL001672의 ITS 서열 (서열번호 3)
TCAAAAGGAACCAAGAATTTTTTTGATTTTTTATTTTGTCTTACTTTTTTGTGGTGGGGCCTTGTTTTCTTTTTTTTTGTTTCCTTT CCCGGTTTTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTAATCCGAGGTCAACCACTAGAAATATAGGGGGTTTTACGGCAGGCAGCTAAG GCGACTGCAGAAGCGAGAAAAGATTTACTACGCTCAGAGTACGCCATACTCCGCCACTGACTTTGAGGAGCTACGCTATAACCGTAGGCTCC CAACGCTAAGCTACAGGGCTTAATGGTCGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC GATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTACTATCGCATTTGCTGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT TTAAGTTATTTTTGTTTGGAGCATTCAGAAATACACTATTTTAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCCGGCGGGCGTGAGCCGGCTACAGGGTAGC CGCCCGTTTTACAGGGCGGGCTACAGGGTAGCCGAGCGAGCGCCGAGGCAACTGGAGGTAAGGTTACATAGGGTTTGAGGTTTAGTTTAAC TCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAGGAAACCAAAAAATTGTGGGGGTTAAAGG AAGGCGACGCCTACACC

[0085] 상기 분리된 지의류 내생 곰팡이 EL001672를 25℃에서 PDA(potato dextrose agar) 배지로 배양하였다. 균사(mycelial) 성장은 4주 동안 150rpm의 회전식 진탕기에서 25℃에서 배양된 200ml의 PDB(potato dextrose broth)가 함유된 500ml 삼각 플라스크에서 모니터링되었다. 다음으로 액체배양으로 배양한 EL001672를 4주간 추가로 배양하여 표면의 균사체 분리가 이루어졌다. 균사체를 건조시킨 후 아세톤으로 추출하였다. 조추출물(62g)을 생성하기 위해, 유기상을 진공 하에서 증발 건조시켰다. 이후 실험에 사용하기 위해 건조 추출물을 DMSO에 완전히 용해하였다.

[0087] 3-2. 지의류 내생 곰팡이 추출물로부터 활성 화합물의 분리 및 동정

[0088] 상기 실시예 3-1에서 제조한 지의류 내생 곰팡이 EL001672의 추출물(62g)을 CH₂Cl₂/CH₃OH(100/0, 100/2, 100/1, 100/5, 100/10, 100/20, 100/50, 100/100 및 0/100, v/v, 각 600mL)로 용출하는 실리카 겔 플래시 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography on silica gel)로 8개의 분획(분획 1 ~ 분획 8)을 얻었다. 분획 2(7.88g)는 H₂O/CH₃OH(80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 0/100, 각 600mL)로 용출하는 C-18 레진 플래시 컬럼 크로마토그래피로 8개의 하위 분획(분획 1~분획 8)을 얻었다. 하위 분획 7은 등용매 조건 H₂O 중 85% CH₃CN을 사용하여 역상 HPLC(Phenomenex Luna C-18 (2), 250×100mm, 2.0mL/min, 5 μm, 100 Å, UV = 280nm)에 의해 1'-O-메틸-아베란틴(1'-O-methyl-averantin) (1.4mg, t_R = 22.5분)이 분리되었다.

[0089] 상기 분리된 1'-O-메틸-아베란틴은 주황색-빨간색 무정형 분말이다. LR-ESI-MS 분광 데이터는 m/z 372.3 [M+H]⁺에서 이온 피크를 나타냈다. 1'-O-메틸-아베란틴의 ¹H NMR 스펙트럼은 2개의 메타 결합 방향족 양성자 [δ_H 7.10 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-5), 3개의 수산기 [δ_H 12.82 (1H, s, 1-OH), δ_H 12.15 (1H, s, 8-OH), and δ_H 6.58 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-7)], 및 1개의 메톡시 양성자 [δ_H 3.15 (3H, s, 1'-OCH₃)]를 나타냈다. 1'-O-메틸-아베란틴의 ¹³C NMR 스펙트럼은 12개의 탄소를 나타냈다. HSQC 스펙트럼은 2개의 카르보닐 탄소 [δ_C 188.8(C-9) 및 δ_C 181.4(C-10)], 메톡시 탄소 [δ_C 56.3(C-OCH₃)], 9개의 완전 치환 탄소 [δ_C 165.4 (C-8), δ_C 164.4(C-1), δ_C 164.0(C-6), δ_C 163.2(C-3), δ_C 133.5(C-10a), δ_C 134.9(C-4a), δ_C 119.4(C-2), δ_C 108.8(C-8a) 및 δ_C 108.1(C-9a)], 4개의 메틸렌 탄소 [δ_C 32.5(C-2'), δ_C 31.2(C-4'), δ_C 25.4(C-3') 및 δ_C 22.1(C-5')], 4개의 메틴 탄소 [δ_C 108.5(C-5), δ_C 108.7(C-4), δ_C 108.2 (C-7), 및 δ_C 74.6 (C-1')], 및 1개의 메틸 탄소 [δ_C 13.9 (C-6')]를 나타냈다. 문헌의 NMR 데이터와의 비교에 기초하여, 화합물은 1'-O-메틸-아베란틴으로 확인되었다. 1'-O-메틸-아베란틴의 광학 회전도 ($[\alpha]_D^{25} = +24.09^\circ$, c 0.11, CH₃OH)은 C-1'의 절대 구성이 (R)-구성이어야 함을 시사하였다

[0091] 실시예 4: MTT 분석

[0092] 결장암 세포주 CSC221, Caco2, DLD1 및 HCT116의 생존력에 대한 지의류 내생 곰팡이 EL001672의 추출물 및 1'-O-메틸-아베란틴의 효과를 조사하기 위해 MTT 검정을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 세포를 96-웰 플레이트에 2.5×10^3 cells/well의 밀도로 시딩하고, 세포를 EL001672의 추출물 및 1'-O-메틸-아베란틴으로 처리한 후 48시간 배양하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하고 4시간 동안 유지하였다. 배지를 제거한 후 DMSO를 첨가하였다. 570 nm 흡광도는 Gen 5(2.03.1) 소프트웨어(BioTek, Winooski, VT, USA)가 포함된 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 결정되었다.

[0094] 그 결과, 도 1에서 볼 수 있듯이, EL001672 추출물은 세포 생존력에 유의미한 영향을 미치지 않았다. 그러나, 1'-O-메틸-아베란틴은 50 μg/mL 및 25 μg/mL에서 모든 세포주에 대해 세포독성 효과를 나타냈다. 1'-O-메틸-아베란틴의 IC₅₀은 CSC221에서 19.34 μg/mL, CaCo2에서 18.35 μg/mL, DLD1에서 21.502 μg/mL, HCT116에서 22.78 μg/mL였다(표 2 참조). CaCo2, HCT116 및 DLD1 세포주의 배가 시간(doubling time)은 각각 약 62h, 22h(비특허 문헌 19 참조), 22h(비특허문헌 20 참조)이었다. 여기서, 1'-O-메틸-아베란틴은 상이한 배가 시간으로 세포주에

서 세포독성 효과를 가지며 잠재적인 세포사멸 유도제(apoptosis-inducing agent)일 수 있다. 1'-O-메틸-아베란틴이 CRC 세포에 선택적 세포독성을 갖는지 여부를 추가로 확인하기 위해 비형질전환 세포(non-transformed cells)에서 테스트하였다. HEK293T(인간 배아 신장 세포) 세포에서 테스트한 결과 1'-O-메틸-아베란틴도 50 및 25ug/ml에서 세포독성 효과를 나타내었다(도 2 참조). 이러한 결과는 고농도에서 1'-O-메틸-아베란틴의 일반적인 세포 독성을 확인하기 위해 추가 연구가 필요함을 시사한다.

표 2

[0095]

Cell line	IC ₅₀ Compound (μg/mL)
CSC221	19.34
CaCo2	18.35
DLD1	21.502
HCT116	22.78

[0097]

실시예 5: 스페로이드(spheroid) 분석

[0098]

대장암 세포주에서 CSC 활성화에 대한 1'-O-메틸-아베란틴 및 EL001672의 조추출물의 농도 의존적 억제 효과를 확인하기 위해 CSC221, DLD1 및 HCT116 세포에 의한 스페로이드(spheroid) 형성을 조사하였다.

[0099]

구체적으로, N2-supplemented DMEM/F12(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 세척한 시점에서 세포를 트립신 처리하였다. hbFGF(human basic fibroblast growth factor; 10 ng/mL; Invitrogen) 및 hrEGF(human recombinant epidermal growth factor; 20 ng/mL; Biovision, Atlanta, GA, USA)를 N2-supplemented DMEM/F12 96에 첨가하였다. CSC221 세포가 초저부착 24-웰 플레이트(Corning Inc., Corning, NY, USA)에 5×10^3 cells/well의 밀도로 시딩되고 배양 14일 후, 구체(sphere)를 역위상하 현미경으로 정량화하였다. 상대적 구체(sphere) 형성 능력은 IMT iSolution software(IMT iSolution Inc., Northampton NJ, USA)를 통해 각 플레이트에서 무작위로 구체 영역의 픽셀 강도를 측정하여 계산하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균으로 표시되었다.

[0100]

그 결과, 도 3 내지 5에서 볼 수 있듯이, EL001672 추출물과 1'-O-메틸-아베란틴 모두 CSC221, DLD1 및 HCT116 세포에 의한 스페로이드 형성을 상당히 억제하였으며, 이는 EL001672 조추출물과 1'-O-메틸-아베란틴이 암 줄기 세포(cancer stemness)를 억제함을 의미한다.

[0102]

실시예 6: 암 줄기세포 마커의 발현 억제 활성

[0103]

6-1. 정량적 RT-PCR 분석

[0104]

EL001672 추출물과 1'-O-메틸-아베란틴이 CSC221 세포에서 암 줄기세포 마커의 발현을 억제하는지 여부를 조사하기 위해 ALDH1, CD133, CD44, Lgr5, Msi-1 및 EphB1을 인코딩하는 mRNA의 발현을 측정하였다.

[0105]

구체적으로, 정량적 RT-PCR(qRT-PCR)은 비특히문헌 3에 서술된 바와 같이 수행하였다. RNAiso Plus(TaKaRa, Otsu, Japan)를 사용하여 CSC221 세포로부터 total RNA를 분리하였다. M-MLV 역전사효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 1 mg의 RNA를 cDNA로 전환시켰다. qPCR은 SYBR Green(Enzymomics, Seoul, Korea)을 이용하여 수행하였다. 실시간 PCR을 위한 프라이머는 하기 표 3에 나타내었다. qRT-PCR 반응 및 분석은 CFX 기기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 수행되었다.

표 3

[0106]

Gene Symbol	Primers sequences	
	Forward (5'-3')	Reverse(5'-3')
GAPDH	ATCACCATCTTCCAGGAGCGA (서열번호 4)	AGTTGTCATGGATGACCTTGGC (서열번호 5)
ALDH1	TGTTAGCTCATGCCGACTTG (서열번호 6)	TTCTTAGCCCGCTCAACACT (서열번호 7)
CD44	TGCCGCTTTGCAGGTGTAT (서열번호 8)	GGCCTCCGTCGAGAGA (서열번호 9)
CD133	GGACCATTTGGCATTCTC (서열번호 10)	CAGGACACAGCATAGAATAATC (서열번호 11)
Lgr-5	CTCTCTCTCAAACCGTCTGC (서열번호 12)	GATCGGAGGCTAAGCAACTG (서열번호 13)
Msi-1	ACCAAGAGATCCAGGGGTTT (서열번호 14)	TCGTTGAGTCAACCATCTTG (서열번호 15)

Gli-1	CCATACATGTGTGAGCACGA (서열번호 16)	GGCACAGTCAGTCTGCTTT (서열번호 17)
Gli-2	CAACGCCTACTCTCCCAGAC (서열번호 18)	GAGCCTTGATGTACTGTACCAC (서열번호 19)
SMO	CATCCCTGACTGTGAGATCA (서열번호 20)	CACCATCTTGGTGACATGCT (서열번호 21)
Hes-1	CTGAAGAAAGATAGCTCGCG (서열번호 22)	ACTTCCCCAGCACACTT (서열번호 23)
Bmi-1	CCAGGGCTTTTCAAAAATGA (서열번호 24)	CCGATCCAATCTGTTCTGGT (서열번호 25)
EphB-1	TGCAAGGAGACCTTCAACCT (서열번호 26)	CGGTGTTGATTTCATGACG (서열번호 27)
Notch-1	TCAGCGGGATCCACTGTGAG (서열번호 28)	ACACAGGCAGGTGAACGAGTTG (서열번호 29)

[0107] 그 결과, 도 6 및 7에서 볼 수 있듯이, EL001672 추출물과 1'-O-메틸-아베란틴은 암 줄기세포 마커의 발현을 용량 의존적으로 하향 조절하였다.

[0109] 6-2. 웨스턴 블롯팅

[0110] EL001672 추출물과 1'-O-메틸-아베란틴이 CSC221 세포에서 암 줄기세포 마커의 발현을 억제하는지 여부를 조사하기 위해 ALDH1, CD133, CD44, Lgr5, Msi-1 및 EphB1 단백질의 발현을 조사하였다.

[0111] 구체적으로, 48시간 동안 처리된 CSC221 세포를 얼음처럼 차가운 인산완충식염수(PBS)로 두 번 세척하고 용해 완충액에서 용해시켰다. ALDH1(sc-166362; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), CD133(CA1217; Cell Applications, San Diego, CA, USA), CD44(3570; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Lgr-5(ab75850; Abcam, Cambridge, MA, USA), Msi-1(ab52865, Abcam), Gli1(sc-20687, SANTA CRUZ, Dallas, TX, USA), Gli2(sc-271786, SANTA CRUZ), Smoothed(SMO, ab72130, Abcam, Cambridge, MA, USA), Bmi-1(ab38295, Abcam)에 대한 항체가 탐지를 위해 사용되었다. α -tubulin(2125, Cell Signaling Technology) 및 β SANTA CRUZ) 항체가 내부 대조군으로 사용되었다. 항체로 반응시키기 전에 관심 있는 단백질 크기 영역에 따라 밴드를 절단한 다음 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Kit(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)로 이미지화 하였다. 밴드 상대 밀도는 Multi-Gauge 3.0을 사용하여 각 샘플에서 α -tubulin 및 액틴 밴드의 밀도를 기반으로 계산되었다. 값은 신호 강도에 해당하는 임의의 밀도 측정 단위로 입증되었다.

[0112] 그 결과, 도 8 내지 11에서 볼 수 있듯이, EL001672 추출물과 1'-O-메틸-아베란틴은 ALDH1, CD44, CD133, Lgr-5 및 Msi-1 단백질 발현을 하향조절하였다(도 3C, F).

[0114] 실시예 7: SHH 신호 전달 경로 효과

[0115] 1'-O-메틸-아베란틴 및 추출물에 의한 SHH 경로 유전자 및 단백질의 발현 억제 정도를 조사하였고, 1'-O-메틸-아베란틴 및 추출물에 의해 억제되는 경로를 조사하기 위해 리포터 분석을 수행하였다.

[0116] 구체적으로, SHH 경로 유전자 및 단백질의 발현은 상기 실시예 6에 개시된 방법과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과, 추출물 또는 1'-O-메틸-아베란틴으로 처리된 CSC221 세포에서 SHH 경로 mRNA 수준의 발현 변화가 관찰되었다. 도 12 및 13에 나타난 바와 같이, Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1 mRNA의 발현은 용량-반응 방식으로 상당히 하향조절되었다. 웨스턴 블롯 분석은 CSC221 세포에서 Gli1, Gli2, SMO 및 Bmi-1 단백질 발현의 상당한 하향 조절을 나타냈다(도 14 내지 17 참조).

[0117] 다음으로, 통합된(integrated) Gli 리포터 유전자를 품고 있는 NIH3T3 세포를 사용하여 조 추출물, 1'-O-메틸-아베란틴, GANT61(Gli 억제제) 및 Vismodegib(SMO 억제제)의 존재 하에서 Gli 루시페라제(luciferase) 활성을 조사하였다.

[0118] 구체적으로, SMO siRNA(인간 특이적) 및 si-음성 대조군은 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. si-RNA 및 si-음성 대조군을 Lipofectamine RNAiMAX 프로토콜로 형질감염시켰다. Gli1 및 Gli2 플라스미드는 X-treme GENE 9 DNA를 사용하여 HEK293T 세포에 형질감염시켰다.

[0119] NIH3T3-Gli-luc 세포(Gli-dependent firefly luciferase 및 constitutive Renilla luciferase reporters를 안정적으로 결합)를 Gli 리포터 활성 측정에 사용하였다. HEK293T 세포를 X-treme GENE 9 DNA 형질감염 시약(Roche, Werk Penzberg, Germany)을 사용하여 Renilla-luc(pRL-TK) 플라스미드와 함께 Hes-1- 및 CSL-conjugated firefly plasmid로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 세포를 EL001672의 추출물 및 1'-O-메틸-아베란틴 또는 DMSO로 처리하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. Dual-Luciferase reporter assay

system(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 형질감염 효율을 결정하기 위해 Renilla 활성에 대해 정규화된 루시퍼라제 활성을 얻었다.

[0120] 그 결과, 1'-*O*-메틸-아베란틴은 테스트한 모든 농도에서 Gli 활성을 상당히 억제했으며 Gli 억제제와 유사한 효과를 보였다(도 18).

[0121] 다음으로, SHH 신호 경로에서 1'-*O*-메틸-아베란틴이 SMO를 통해 Gli 활성을 하향 조절하는지 여부를 밝히기 위해 si-SMO-silenced 및 Gli-과발현 세포 모델을 사용하였다. 그 결과, 1'-*O*-메틸-아베란틴은 NIH3T3-Gli-luc 세포뿐만 아니라 HEK293T 세포에서도 Gli 활성을 억제하였다. SMO의 결실(deletion)은 Gli 활성을 하향 조절하는 반면 1'-*O*-메틸-아베란틴은 si-SMO로 형질감염된 세포에서도 활성을 유지하였다. SMO 침묵(silenced) 세포에서 Gli1 및 Gli2 플라스미드로 형질감염된 세포는 Gli-luc 활성을 복원한다. 1'-*O*-메틸-아베란틴은 성공적으로 Gli1 및 Gli2 유도된 Gli 활성을 하향 조절하였다. 화합물 처리는 특히 Gli1로 형질감염된 세포에서 보다 현저하게 억제를 나타냈다(도 19 참조). 추가 확인을 위해 실시예 6의 qRT-PCR 방법으로 Gli1 및 SMO mRNA 수준에 대해 SMO 침묵 및 Gli1 과발현 세포를 사용하였다. 1'-*O*-메틸-아베란틴 처리는 Gli1 유도 및 SMO 침묵(silenced) 또는 비침묵(non-silenced) 세포 그룹에서 Gli1 mRNA 수준을 현저히 억제하였다. 또한, SMO 침묵(silenced) 화합물 처리군과 비침묵(non-silenced) 화합물 처리군의 Gli-1 mRNA 발현 억제 활성에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과는 SHH 신호 전달 경로 다운스트림 이펙터(effector) Gli1의 억제가 업스트림 리포터 SMO와 독립적으로 억제됨을 보여준다(도 20 및 21 참조). 종합하면, 이러한 결과는 SHH 신호 전달 경로가 1'-*O*-메틸-아베란틴에 의한 대장암 줄기세포 억제에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0123] 실시예 8: Notch 신호 전달 경로 효과

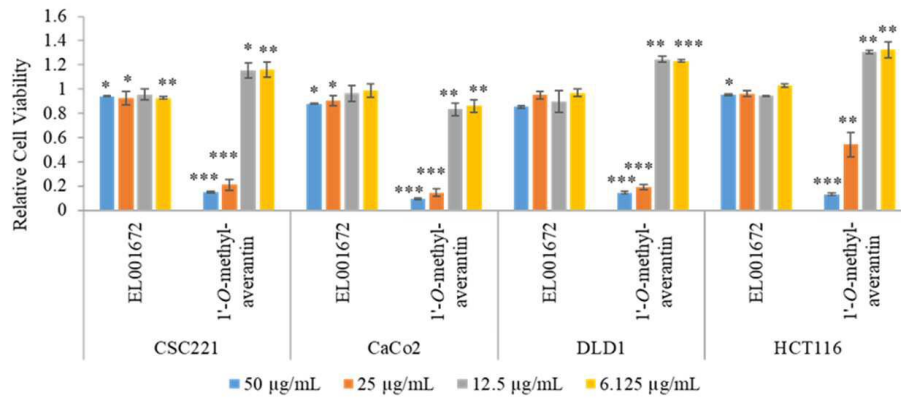
[0124] CSC221 세포에서 노치 신호 전달 경로(Notch signaling pathway)에 대한 추출물과 1'-*O*-메틸-아베란틴의 잠재적인 억제 효과를 평가하였다.

[0125] 먼저, Notch-1 및 Hes-1 mRNA의 발현을 측정하기 위해 실시예 6에 개시된 정량적 RT-PCR 방법을 사용하였다. 그 결과, Notch-1 및 Hes-1 mRNA의 발현 모두가 조 추출물에 의해 상당히 하향 조절되었음을 보여주었다. 구체적으로, 1'-*O*-메틸-아베란틴은 테스트한 모든 농도에서 Notch-1 및 Hes-1 mRNA의 발현을 하향 조절하는 경향이 있었지만, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 통계적으로 유의한 억제 수준을 보여 주었다(도 22 및 23 참조).

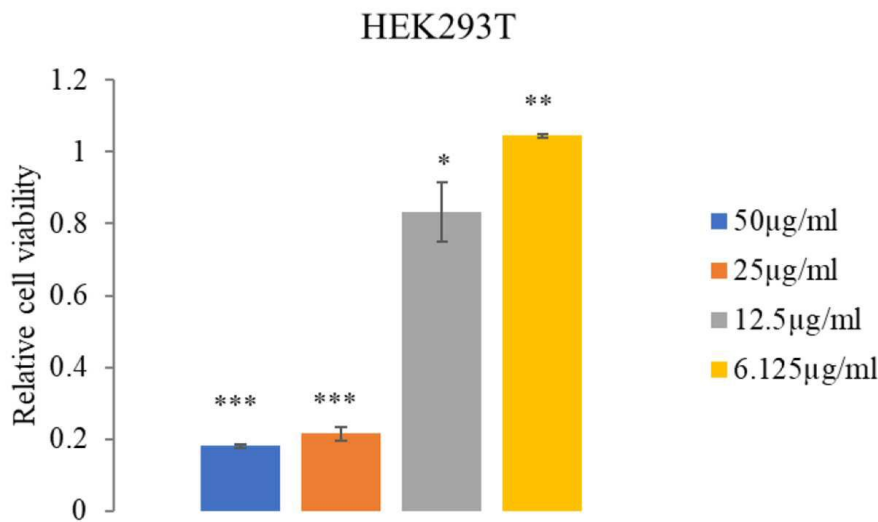
[0126] 다음으로 HEK293으로 형질감염된 세포를 사용하여 이중 루시퍼라제 프로모터 분석을 수행하여 Hes-1(스플릿-1의 모상(hairy) 및 인핸서)-luc 및 CSL(CBF1/Su(H)/Lag-1)-luc 프로모터 활성의 억제를 조사하였다. SHH와 노치 신호 경로 사이의 혼선은 이들 경로가 서로를 조절할 수 있음을 의미한다. 따라서 본 실험은 Gli 및 SMO 억제제의 억제 활성을 추출물 및 1'-*O*-메틸-아베란틴의 억제 활성과 비교하였다. 추출물과 1'-*O*-메틸-아베란틴은 Hes-1-luc 및 CSL-luc 프로모터 활성을 Gli 및 SMO 억제제에 대해 관찰된 수준으로 상당히 하향 조절하였다(도 24 및 25 참조).

도면

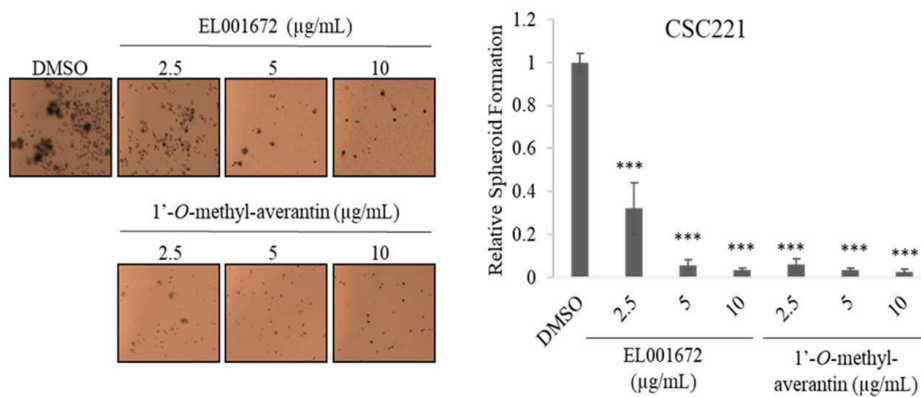
도면1



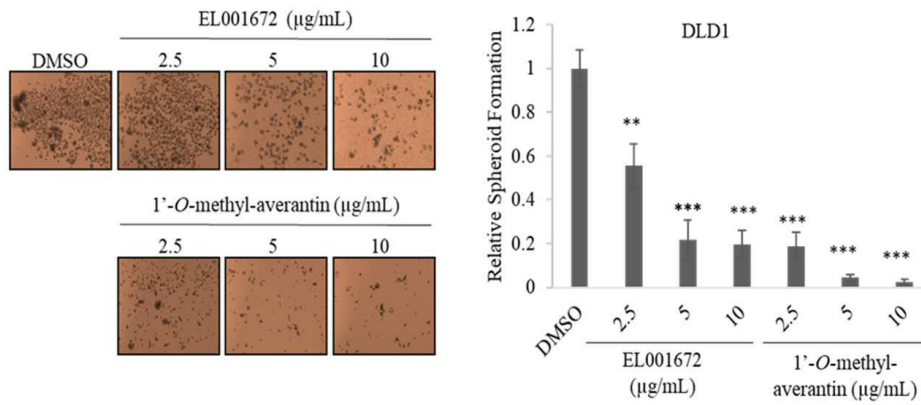
도면2



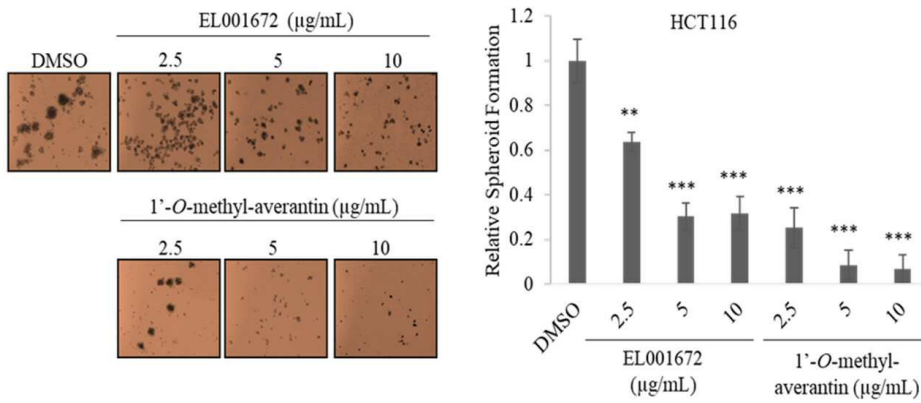
도면3



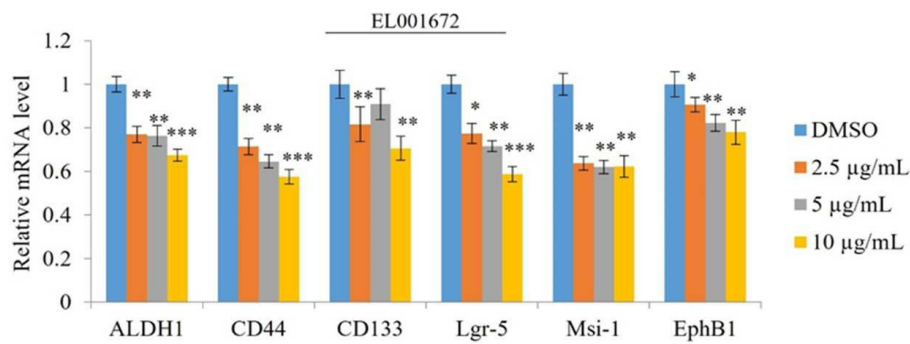
도면4



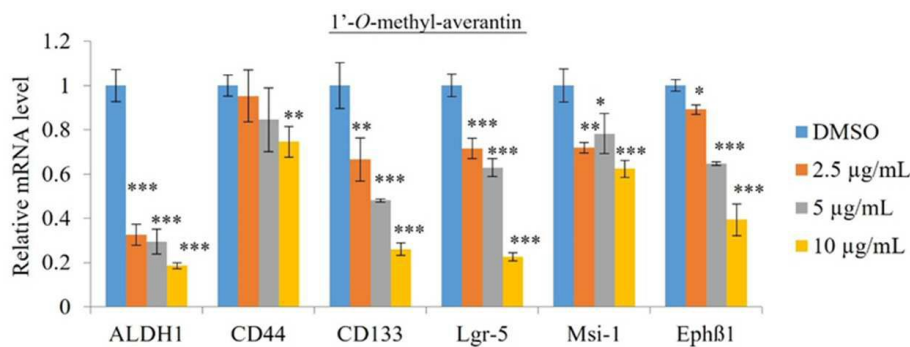
도면5



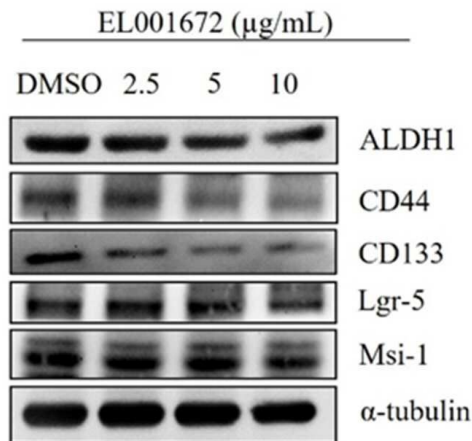
도면6



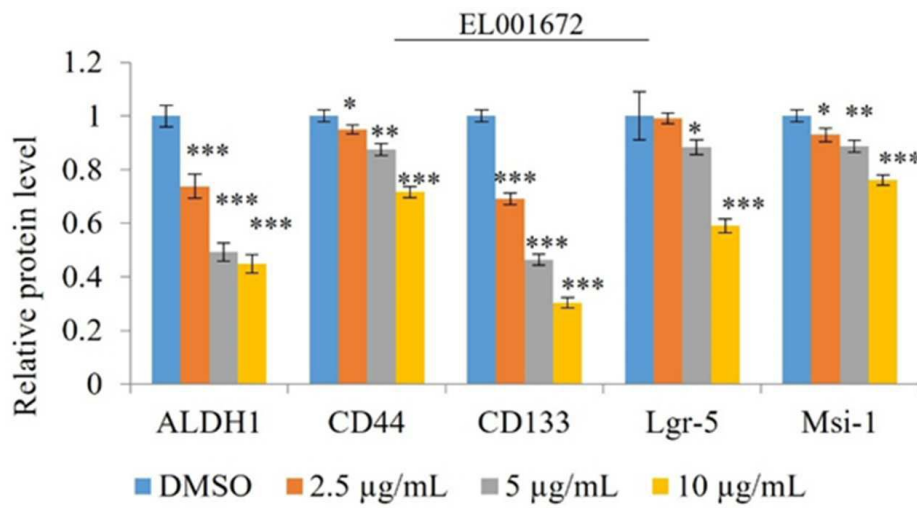
도면7



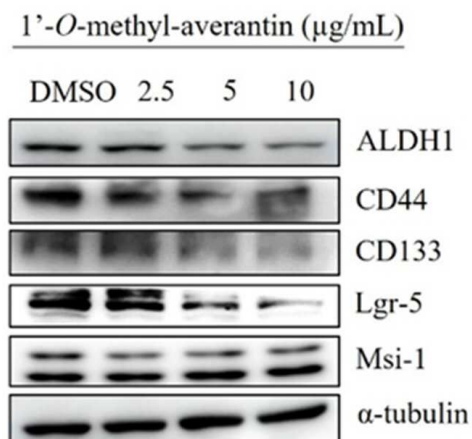
도면8



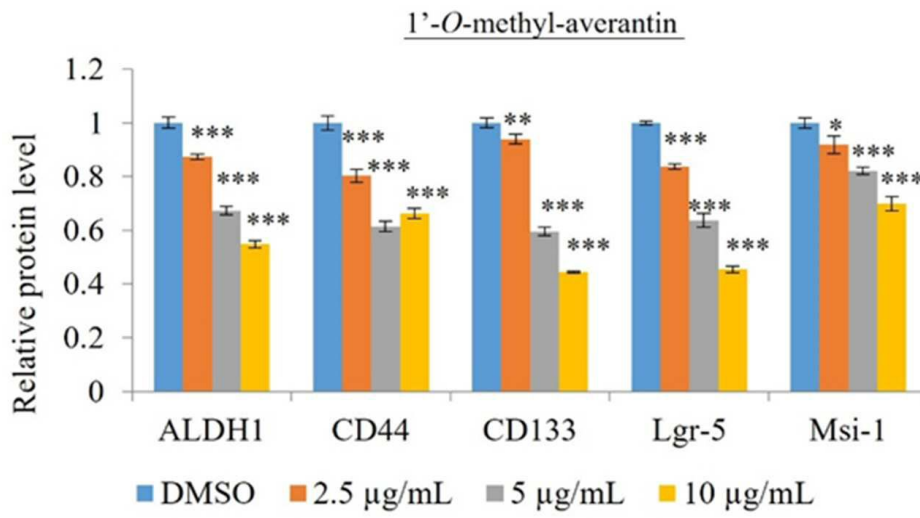
도면9



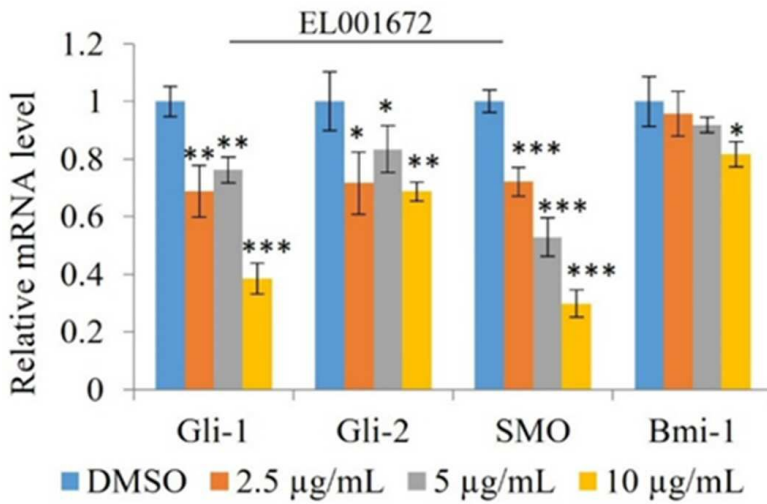
도면10



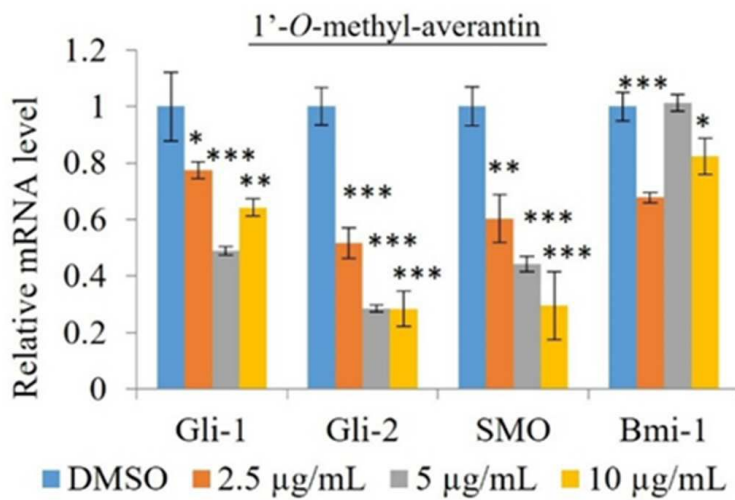
도면11



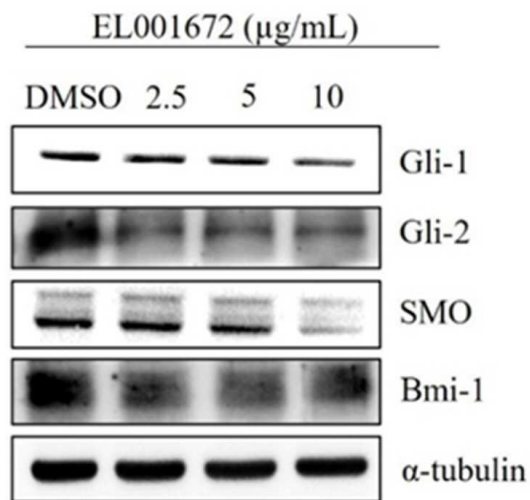
도면12



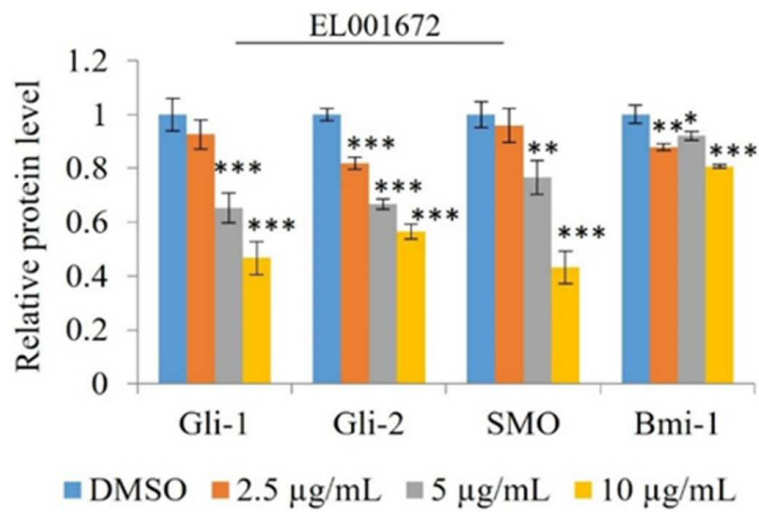
도면13



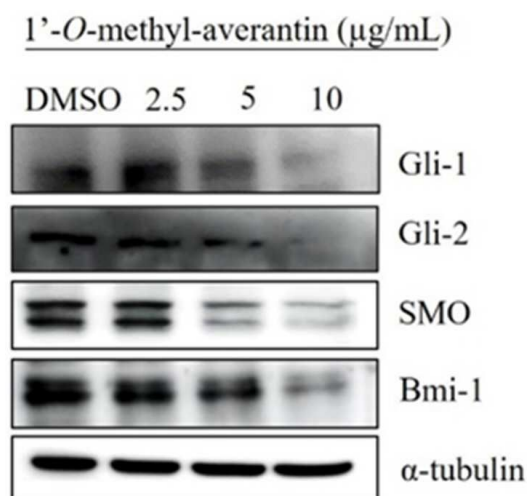
도면14



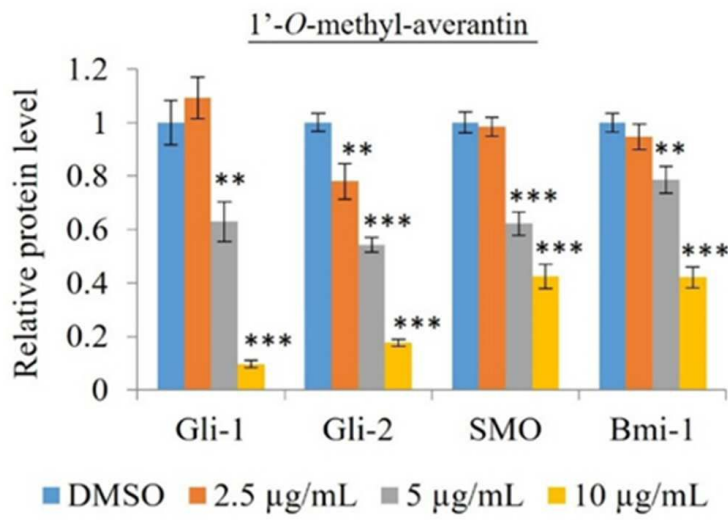
도면15



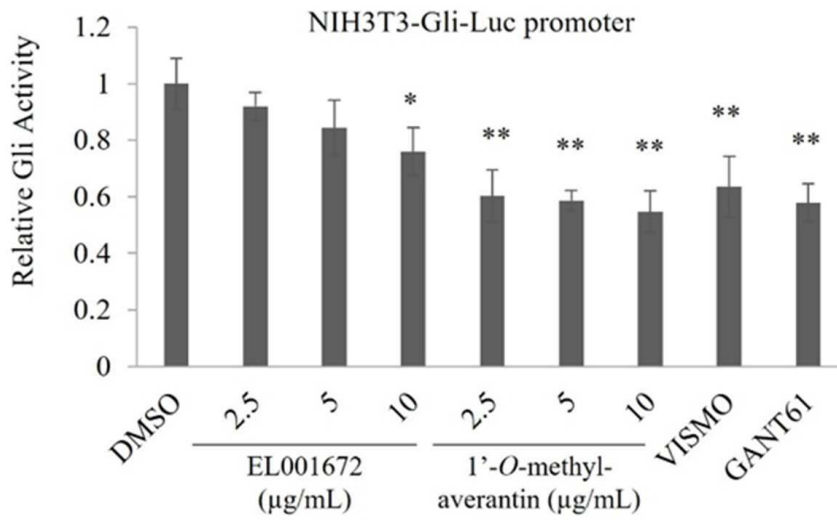
도면16



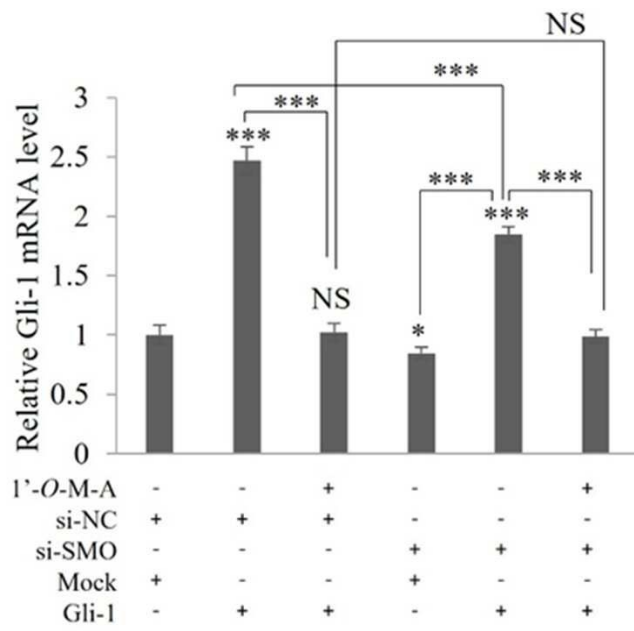
도면17



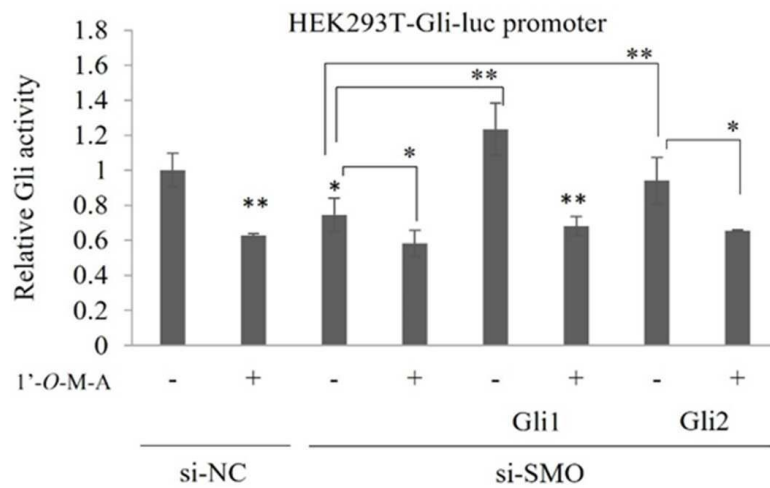
도면18



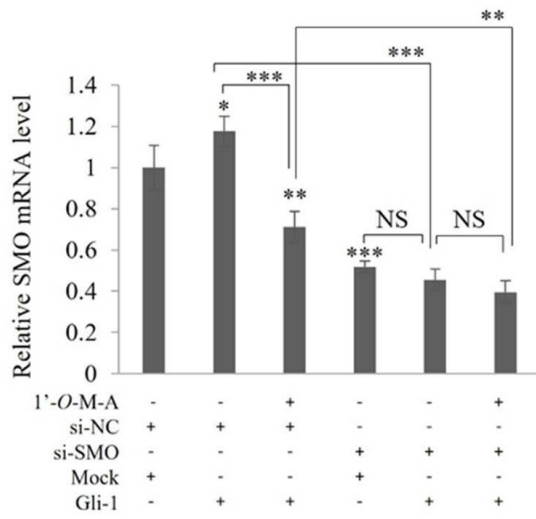
도면19



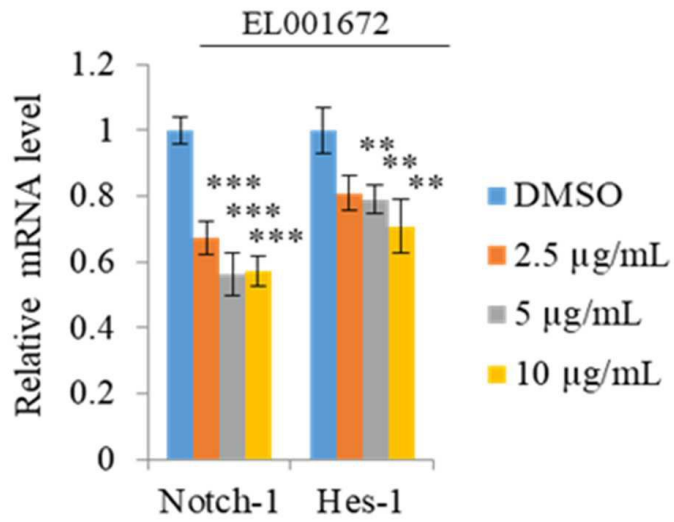
도면20



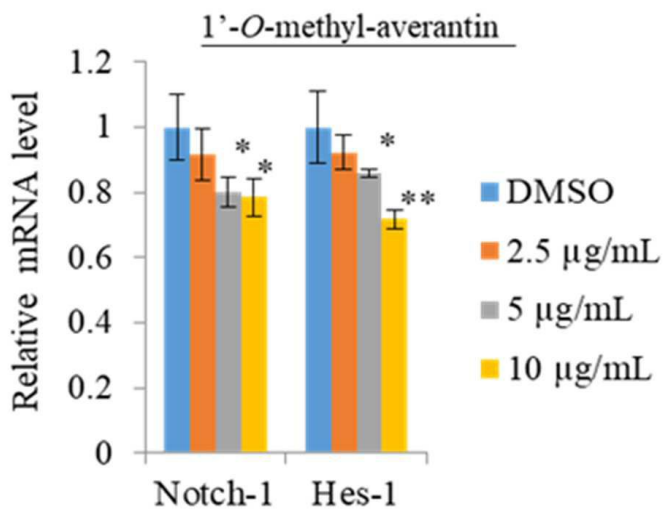
도면21



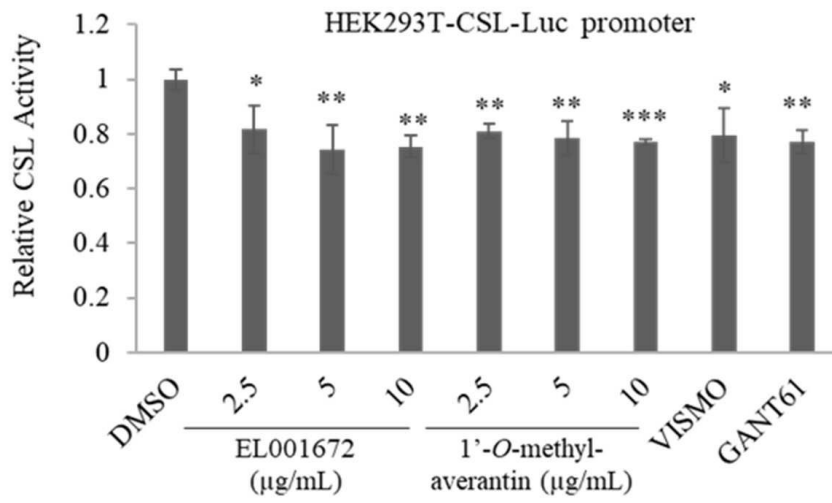
도면22



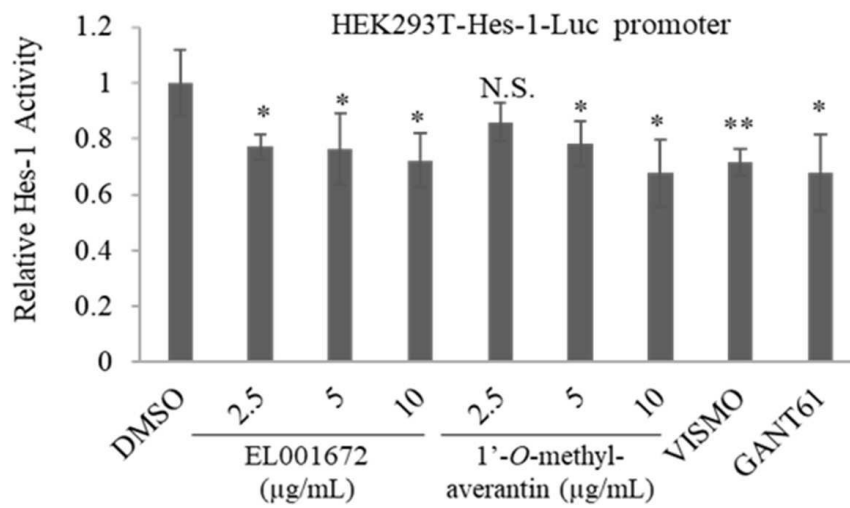
도면23



도면24



도면25



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.