



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0150652
(43) 공개일자 2024년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 49/743 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 31/122 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 1/14 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C07C 49/743 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0045594

(22) 출원일자 2023년04월06일

심사청구일자 2023년04월06일

(71) 출원인

국립순천대학교산학협력단

전라남도 순천시 중앙로 255(매곡동)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김향건

광주광역시 서구 시청로96번길 15 로잔티움파크 1103호

남상집

서울특별시 서대문구

허재선

전라남도 순천시 해룡면 백연길 105-7 대광로제비양 103-1301

(74) 대리인

정성중

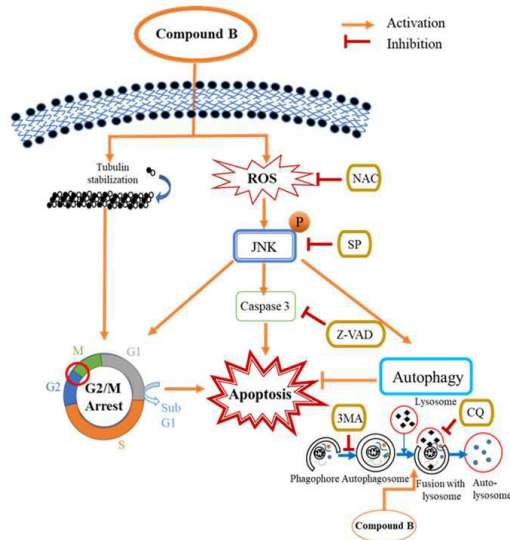
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 항암 활성을 갖는 리베르텔레논 티 화합물 및 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)하는 신규한 리베르텔레논 티(liberetellenone T) 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 이들을 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도41



(52) CPC특허분류

A61K 31/122 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 1/145 (2021.05)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/208 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111077
과제번호	2020R1C1C1007832
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구지원사업
연구과제명	유전체분석 기반 교모세포종 치료저항 예후예측인자 발굴 및 조절기전 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	순천대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

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	20/100
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188039
과제번호	2022R1A2C1011848
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	상처치유 효능미생물 천연물 연구
기 여 율	30/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

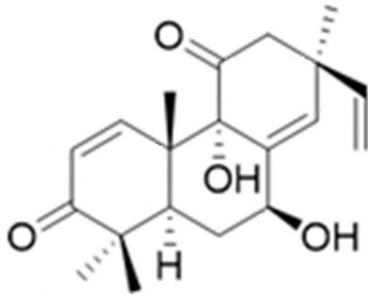
명세서

청구범위

청구항 1

제1항에 나타내는 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)하는 것을 특징으로 하는 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)하는 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암용 조성물.

청구항 6

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암 보조제.

청구항 7

제1항의 화합물 또는 이의 식품적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항암 활성을 갖는 리베르텔레논 티 화합물 및 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)하는 신규한 리베르텔레논 티

(liberetellenone T) 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 이들을 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 결장이나 직장에서 발생하는 비정상적인 세포 성장은 단순히 대장암(Colorectal cancer; CRC)으로 인식된다. 용종(polyp)으로 알려진 비암성 세포 성장은 결장 또는 직장의 점막층에서 발생할 수 있으며 CRC로 발전할 수 있다. 용종(polyp)의 10% 미만은 10-20년에 걸쳐 침습성 암(invasive cancer)으로 진행될 가능성이 높다. CRC는 주로 50세 이상의 성인에서 발생한다. 2020년에 CRC는 전 세계적으로 세 번째로 가장 흔한 암 유형이자 두 번째로 가장 흔한 암 사망 원인으로 인식되었다. 지리적으로 CRC의 발생은 아시아 지역에서 가장 높다. IARC(International Agency for Research on Cancer)는 2020년에서 2040년 사이에 전 세계적으로 CRC 부담이 56% 증가하고 CRC 관련 사망률이 69% 증가할 것으로 추정하였다. 따라서, 새로운 항암 치료제의 발견에 대한 강력한 연구가 시급히 요구된다.
- [0003] 최근 많은 과학자들은 식물, 지의류, 미생물과 같은 천연 자원에서 유래한 혁신적인 약물 개발에 관심을 집중하고 있다. 지의류는 곰팡이(mycobiont) 및 시아노박테리움 또는 녹조류(photobiont) 또는 이들 둘과 관련된 공생 생물이다. 일부 지의류 내생 곰팡이(endolichenic fungi, ELF)는 지의류 지의체(thalli) 내부에 상주하며 약용 및 경제적 잠재력을 가진 생리 활성 이차 대사 산물을 생성한다. 이러한 2차 대사산물은 세포독성, 항산화, 항진균 및 항균, 생물활성을 나타내며, 이는 제약 산업의 약물 개발에 중요하다(비특허문헌 1 및 2 참조). 따라서 항암 특성을 지닌 독특한 2차 대사산물을 생산하는 지의류 내생 곰팡이의 능력은 효과적인 암 치료제를 식별할 수 있는 새로운 기회를 제공한다(비특허문헌 3 참조).
- [0004] 많은 화학 요법(chemotherapeutics)은 세포 독성을 발휘하고 세포에서 세포 사멸(apoptosis)을 유도하여 암세포 사멸을 유발한다. 세포 사멸(apoptosis) 또는 프로그램된 세포 사멸(programmed cell death)은 지속적인 생존이 차단될 때 활성화되는 세포 자살 과정이다. 염색질 응축(chromatin condensation), 핵 단편화(nuclear fragmentation), 세포 수축(cell shrinkage), 막 기포(membrane blebbing), DNA, 단백질 분해(protein breakdown) 및 카스파제 활성화(caspase activation)와 같은 형태학적 및 생화학적 변화가 세포사멸 세포에서 관찰될 수 있다. 암세포는 정상세포(normal cells)에서 악성세포(malignant cells)로 변이하는 과정에서 유전적 돌연변이를 일으켜 자연적인 세포사멸을 피한다. 세포사멸 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)과 항-세포사멸 단백질(anti-apoptotic protein) 사이의 균형 파괴, 카스파제(caspase) 기능 감소 및 사멸 수용체 신호전달(death receptor signaling) 장애는 모두 암세포에서 세포 사멸 저항성을 유발한다(비특허문헌 4 참조). 따라서 치료제에 의한 이러한 기능의 회복은 암 진행을 성공적으로 예방할 수 있다. 또한, 체크 포인트(check point)에서 세포 주기 조절자(cell cycle regulators)에 발생하는 변경은 암에서 비정상적인 세포 증식을 유발한다(비특허문헌 5 참조). 따라서 G2/M기 정지의 유도는 많은 항암제의 또 다른 목표이다. 관련 단백질을 조절하거나 튜불린 구성을 방해하여 세포 주기를 통해 세포 진행을 제어하면 결국 세포가 G2/M기 정지 및 후속 세포 사멸로 이어진다(비특허문헌 6 및 7 참조).
- [0005] 자가포식(autophagy, 거대자가포식(macroautophagy))은 주로 손상된 소기관을 완전히 에워싸(engulfing) 자가포식소체(autophagosome)의 형성, 리소좀과의 융합, 리소좀 가수분해효소에 의한 세포 파편의 분해를 포함한다(비특허문헌 8 및 9 참조). 자가포식은 암 진행에서 역설적인 역할을 한다. 많은 암의 초기 단계에서 자가포식은 세포 항상성을 보호함으로써 종양 억제자 역할을 한다. 반대로 자가포식은 스트레스 내성을 증가시켜 더 진행된 암 단계에서 종양 성장을 촉진한다(비특허문헌 10 참조). 많은 항암 치료제가 세포 사멸과 동시에 자가포식을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 자가포식의 활성화는 암세포의 생존을 촉진하거나 억제할 수 있다. 따라서 자가포식의 역할은 항암제 개발에 중요하다(비특허문헌 11 참조). 또한 자가포식과 세포사멸 사이의 관계는 불분명하고 아직 명확히 연구되지 않았다.
- [0006] 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 자유 라디칼 형태의 반응성이 높고 수명이 짧은 소분자이다(비특허문헌 12 참조). ROS는 최적의 조건에서 세포의 많은 생리적 기능을 지원한다. 그러나 ROS의 과잉 생산은 세포에 해로운 영향을 미치고 산화 스트레스를 유발할 수 있다. ROS의 생성은 미토콘드리아 수송 사슬 누출, 높은 대사율, 환경 오염 물질, 방사선 및 약물과 같은 내인성 및 외인성 원인에 의해 유발될 수 있다. ROS는 자가포식, 세포사멸 및 괴사(necrosis)를 포함하는 세포 생존 또는 세포 사멸로 이어지는 많은 세포 신호 전달 경로를 활성화하는 역할을 한다. c-Jun N 말단 키나아제(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 신호는 ER 스트레스 또는 ROS에 의한 세포 사멸의 미토콘드리아 경로 활성화에 반응하여 활성화된다(비특허문헌 13 참조).
- [0007] 이에 본 발명자들은 지의류 내생 곰팡이로부터 신규한 물질을 발견하고자 실험하던 중, 지의류 내생 곰팡이의

추출물로부터 신규한 화합물을 발견하였고, 그 신규한 화합물이 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)하는데 매우 탁월한 효능이 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008]

- (비특허문헌 0001) [1] Kellogg, J.J.; Raja, H.A. Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon. *Phytochem. Rev.* 2017, 16, 271-293.
- (비특허문헌 0002) [2] Suryanarayanan, T.S.; Thirunavukkarasu, N. Endolichenic fungi: the lesser known fungal associates of lichens. *Mycology* 2017, 8, 189-196, doi:10.1080/21501203.2017.1352048.
- (비특허문헌 0003) [3] Yang, Y.; Bae, W.K.; Nam, S.-J.; Jeong, M.-H.; Zhou, R.; Park, S.-Y.; Tas, i.; Hwang, Y.-H.; Park, M.-S.; Chung, I.J.; et al. Acetonic extracts of the endolichenic fungus EL002332 isolated from *Endocarpon pusillum* exhibits anticancer activity in human gastric cancer cells. *Phytomedicine* 2018, 40, 106-115, doi:10.1016/j.phymed.2018.01.006.
- (비특허문헌 0004) [4] Wong, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2011, 30, 87, doi:10.1186/1756-9966-30-87.
- (비특허문헌 0005) [5] Kasibhatla, S.; Tseng, B. Why target apoptosis in cancer treatment. *Mol. Cancer Ther.* 2003, 2, 573-580.
- (비특허문헌 0006) [6] Choi Hyun, Y.; Yoo Hyun, Y. Taxol-induced growth arrest and apoptosis is associated with the upregulation of the Cdk inhibitor, p21WAF1/CIP1, in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2012, 28, 2163-2169, doi:10.3892/or.2012.2060.
- (비특허문헌 0007) [7] Arora, S.; Wang, X.I.; Keenan, S.M.; Andaya, C.; Zhang, Q.; Peng, Y.; Welsh, W.J. Novel microtubule polymerization inhibitor with potent antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res.* 2009, 69, 1910-1915, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0877/654413/P/NOVEL-MICROTUBULE-POLYMERIZATION-INHIBITOR-WITH.
- (비특허문헌 0008) [8] Yang, Z.J.; Chee, C.E.; Huang, S.; Sinicrope, F.A. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 2011, 10, 1533-1541, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0047.
- (비특허문헌 0009) [9] Sun, K.; Deng, W.; Zhang, S.; Cai, N.; Jiao, S.; Song, J.; Wei, L. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci.* 2013, 3, 35, doi:10.1186/2045-3701-3-35.
- (비특허문헌 0010) [10] Gracio, D.; Magro, F.; T. Lima, R.; Maximo, V. An overview on the role of autophagy in cancer therapy. *Hematol. Med. Oncol.* 2017, 2, doi:10.15761/HMO.1000117.
- (비특허문헌 0011) [11] Sui, X.; Chen, R.; Wang, Z.; Huang, Z.; Kong, N.; Zhang, M.; Han, W.; Lou, F.; Yang, J.; Zhang, Q.; et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 2013 410 2013, 4, e838-e838, doi:10.1038/cddis.2013.350.
- (비특허문헌 0012) [12] Sies, H.; Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020 217 2020, 21, 363-383, doi:10.1038/s41580-020-0230-3.
- (비특허문헌 0013) [13] Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2016, 1863, 2977-2992, doi:10.1016/J.BBAMCR.2016.09.012.
- (비특허문헌 0014) [14] Guo, L.D.; Huang, G.R.; Wang, Y.; He, W.H.; Zheng, W.H.; Hyde, K.D. Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycol. Res.*

2003, 107, 680-688, doi:10.1017/S0953756203007834.

(비특허문헌 0015) [15] Vilgalys, R.; Hester, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 1990, 172, 4238-4246, doi:10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990.

발명의 내용

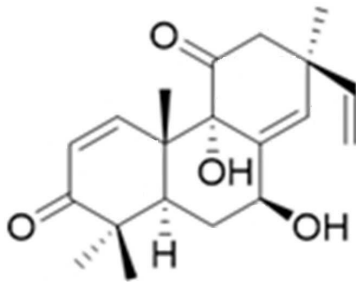
해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 화학식 1의 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항암용 조성물을 개체에 투여하여 개체의 암 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암보조제를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 하나의 목적은 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 하나의 양태로서, 본 발명은 항암 활성을 갖는 하기 화학식 1의 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

화학식 1



- [0015]
- [0016] 본 발명의 상기 화학식 1의 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물은 한국 제주도 한라산에서 채집된 지의류에 서식하는 슈도플렉타니아 속(*Pseudoplectania* sp.)의 지의류 내생 곰팡이(endolichenic fungus) EL000327에서 추출한 2차 대사산물로부터 분리된 새로운 세포독성 화합물이다. 본 명세서에서 화합물 B로 표현될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 상기 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물은 지의류, 바람직하게는 슈도플렉타니아 속(*Pseudoplectania* sp.)의 지의류 내생 곰팡이로부터 추출 및 분리하거나, 화학적으로 합성하는 등의 방법에 의하여 제조할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 상기 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물 도 41에서 볼 수 있는 바와 같이 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)시키는 효과를 가진다.
- [0019] 본 발명의 상기 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 존재할 수

있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 리베르텔레논 티 화합물의 이로온 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 염의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0020] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0021] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만테르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0022] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0023] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 리베르텔레논 티 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브륨 화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르 트레이트, 락테이트, 만텔레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0024] 본 발명의 리베르텔레논 티 화합물의 염으로는 약학적으로 허용가능한 염으로서, 리베르텔레논 티 화합물과 동등한 약리활성을 나타내는, 예컨대, 암 세포의 세포 주기 중 G2/M기로의 진행을 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)시켜 암을 치료하는 리베르텔레논 티 화합물의 염이면 제한없이 모두 사용 가능하다.

[0025] 또한, 본 발명에 따른 상기 리베르텔레논 티 화합물은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 수화물 등의 용매화물 및 가능한 모든 입체 이성질체를 제한없이 포함한다. 상기 리베르텔레논 티 화합물의 용매화물 및 입체이성질체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 리베르텔레논 티 화합물로부터 제조할 수 있다.

[0026] 나아가, 본 발명에 따른 상기 리베르텔레논 티 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 본 발명에서는 상기 리베르텔레논 티 화합물의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 리베르텔레논 티 화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

[0028] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1의 리베르텔레논 티(libertellenone T) 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 리베르텔레논 티 화합물, 이의 염, 및 이의 항암 효과는 상술한 바와 같다.

[0030] 상기 리베르텔레논 티 화합물은 미세소관 역학(dynamics)을 안정화시켜 암 세포의 G2/M기로의 진행을 정지시키며, ROS 생성을 유발하여 JNK/c-jun 신호를 활성화하여 암 세포에서 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)을 유도하는 물질이다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 암은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 아폽토시스 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 말한다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은, 경우에 따라 주위

조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고, 체내의 정상적인 구조를 파괴하거나 변형시키게 되는데, 이러한 상태를 암이라고 한다.

[0032] 상기 암의 종류는 뇌척수종양, 뇌암, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁경부암, 자궁 내막암, 림프종, 백혈병 예컨대 급성 백혈병 또는 만성백혈병, 골육종, 다발성 골수종, 육종, 흑색종, 악성 흑색종 및 피부암 등이 있다. 본 발명의 항암용 조성물은 암의 종류에 제한없이 사용될 수 있으나, 본 발명의 목적상 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암을 억제시키거나 발명을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어, “치료”란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0035] 본 발명에서 상기 암의 예방 또는 치료는 본 발명의 리베르텔레는 티 화합물 또는 이의 염에 의해 암 세포에 성장주기를 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로의 활성화를 통해 세포사멸 및 자가포식을 유도함에 의해 암을 경감, 개선, 또는 치료할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0037] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0039] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암 질환의 예방 또는 치료할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 항암제를 병행하여 투여할 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등과 같은 비

경구적으로 사람과 동물에게 투여될 수 있다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥 주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.

- [0044] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 본 발명에 따른 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 성인을 기준으로 1회 투여시 100 μ g 내지 3,000 mg의 유효용량으로 하루에 수차례 반복 투여될 수 있다. 그러나 상기 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정될 수 있다. 따라서 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염의 암 질환의 치료 또는 예방제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있으며, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여방법에 특별히 제한되지는 않는다.
- [0045] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염 이외에 공지된 항암제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.
- [0046] 하나의 구체적 예로서, 본 발명의 유효성분인 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 공지된 항암제와 병용 투여 시 암세포에 대한 세포 독성을 현저히 증가시키는 효과를 나타내었다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 항암제는 화학항암제, 표적항암제, 또는 면역항암제일 수 있다.
- [0048] 구체적으로, 상기 화학항암제는 이에 한정되지는 않으나, 알킬화제(alkylating agent), 미세소관 억제제(microtubule inhibitor), 대사길항제(antimetabolite), 또는 토포이소머라아제 억제제(topoisomerase inhibitor)일 수 있다.
- [0049] 상기 알킬화제는 메클로르에타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(al tretamine), 프로카바진(procarbazine), 부설판(busulfan), 스트렙토조신(streptozocin), 카르무스틴(carmustine), 이오무스틴(iomustine), 다카바진(dacarbazine), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 미세소관 억제제는 도세탁셀(docetaxel), 빈블라스틴(vinblastine), 온코빈(Oncovin), 비노렐빈(vinorelbine)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 대사길항제는 플루오로우라실(flurouracil), 카페시타빈(capecitabine), 시타라빈(cytarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 플루다라빈(fludarabine), 메토틱렉세이트(methotrexate), 페메트렉세이드(Pemetrexed), 메르캅토피린(mercaptopurine)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 토포이소머라아제 억제제는 하이캄틴(hycamtin), 캄토사(camptosar), 베페시드(vepesid), 탁솔(taxol), 블레오마이신(bleomycin), 아드리아마이신(adriamycin), 세루비딘(cerubidine)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0050] 또한, 상기 표적항암제는 이에 한정되지는 않으나, 트라스투주맙(trastuzumab), 퍼투주맙(pertuzumab), 파니투무맙(panitumumab), 세툽시맙(cetuximab), 베바시주맙(bevacizumab), 라무시루맙(ramucirumab), 애플리버셉트(aflibercept), 리톡시맙(rituximab), 오비누투주맙(obinutuzumab), 다라투무맙(daratumumab), 데노수맙(denosumab), 이브루티닙(ibrutinib), 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib), 이마티닙(imatinib), 보수티닙(bosutinib), 오시머티닙(osimertinib), 엘로티닙(erlotinib), 제피티닙(gefitinib), 닌테다닙(nintedanib), 수니티닙(sunitinib), 소라페닙(sorafenib), 카보잔티닙(cabozantinib), 렌바티닙(lenvatinib), 레고라페닙(regorafenib), 액시티닙(axitinib), 파조파닙(pazopanib), 카보잔티닙(cabozantinib), 트라메티닙(trametinib), 다브라페닙(dabrafenib), 아베마시클립(abemaciclib), 팔보시클립(palbociclib), 레날리도마이드(lenalidomide), 록소리티닙(ruxolitinib), 알렉티닙(alectinib), 크리조티닙(crizotinib), 올라파립(olaparib), 베네토클락스(venetoclax)일 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 면역항암제는 이에 한정되지는 않으나, 면역관문억제제, 면역세포 치료제(CAR-T), ADC(antibody drug conjugate), 이중항체, 항암 바이러스, 또는 항암백신일 수 있다.
- [0052] 상기 면역관문억제제는 PD-1 항체, PD-L1 항체, CTLA-4 항체, TIM3 항체 또는 LAG3 항체일 수 있다. 상기 PD-1 항체는 펌브로리주맙(pembrolizumab), 니볼루맙(nivolumab), 세미플리맙(cemiplimab)일 수 있고, 상기 PD-L1 항체는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 더발루맙(durvalumab)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 CTLA-4 항체는 이필리무맙(ipilimumab), 트레멜리무맙(tremelimumab)일 수 있고, 상기 TIM3

항체는 MBG452일 수 있으며, LAG3 항체는 BMS-986016, LAG525일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 면역 세포 치료제는 티사젠렉류셀(tisagenlecleucel), 액시카브타겐실루셀(axicabtagene ciloleucel)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 ADC는 겐투주맙 오조가미신(gemtuzumab-ozogamicin), 브렌투시맙 베도틴(brentuximab vedotin), 트라스투주맙 엠탄신(trastuzumab emtansine), 이노즈맙 오조감신(inotuzumab ozogamicin), 에리불린 메실산염(eribulin mesylate)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 이중항체는 블리나투모맙(blinatumomab)일 수 있고, 상기 항암 바이러스는 탈리모진 라헤르파렙벡(talimogene laherparepvec)일 수 있으며, 상기 항암백신은 시풀루셀-T(sipuleucel-T)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0054] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 암 질환의 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명에서 상기 암 질환의 의심 개체는 암 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염을 포함하는 약학적 조성물을 암 질환 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 암 질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0056] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 암 질환 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 치료 방법은 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염을 포함하는 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0060] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염을 포함하는 항암 보조제를 제공한다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 항암 보조제는 종래의 화학항암제 등과 함께 병용하여 사용함으로써 암 세포를 사멸시키는 항암제의 효과를 증강시키는 것을 말한다. 일례로서, 항암제의 치료학적 유효 투여량을 감소시켜 항암제로 인한 부작용을 최소화시키거나, 암의 성장을 유의적으로 저해시키는 것을 나타낸다. 상기 화학적 항암제 등은 상술한 바와 같다.
- [0062] 본 발명의 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 암 세포의 성장주기를 정지시키고 ROS/JNK 신호 경로를 활성화시켜 암 세포를 세포사멸 또는 자가포식할 수 있다. 또한, 본 발명의 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 종래의 항암제와 병용하였을 때 암세포에 대한 세포독성 증가하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 상기 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 항암 보조제로서도 유용하게 사용할 수 있다.
- [0064] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염을 포함하는 암 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0065] 본 발명의 상기 리베르텔레논 티 화합물 및 이의 염의 예방 또는 개선 효과는 상술한 바와 같다.
- [0066] 본 발명의 상기 리베르텔레논 티 화합물의 염은 식품학적으로 허용 가능한 염을 의미하는데, 이는 상술한 리베르텔레논 티 화합물의 약학적으로 허용가능한 염과 동일할 뿐만 아니라 리베르텔레논 티 화합물의 수화물 또는 입체 이성질체를 포함한다.
- [0067] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은, 상기 조성물을 이용하여 암 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0068] 본 발명의 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염을 식품 조성물로 사용하는 경우, 이들 성분 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.

[0069] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 이의 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.

[0070] 본 발명의 식품이 음료일 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0071] 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 건강식품은 천연 과일주스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에 따른 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 세포독성이 있으며, 미세소관 역학(dynamics)을 안정화 시킴으로써 암 세포에서 G2/M기의 정지를 유도하여 암 세포의 세포사멸을 유도한다. 또한, 본 발명에 따른 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 JNK 경로를 포함한 많은 세포 사멸 신호 경로의 활성화로 이어지는 활성 산소종(ROS)의 생성을 유도함으로써 ROS/JNK 신호 경로의 활성화하여 암 세포에서 세포사멸 및 자가포식을 유도한다. 또한, 본 발명에 따른 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 공지된 항암제와 병용 투여 시 세포 독성 효과가 상승적으로 증가한다. 따라서, 본 발명의 리베르텔레논 티 화합물 또는 이의 염은 암 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품 및 식품 등에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 지의류에서 분리된 슈도플렉타니아속(*Pseudoplectania sp*)에 속하는 지의류 내생 곰팡이 EL000327 추출물로부터 정제된 화합물 B의 정제 공정을 나타낸 그림이다.

도 2는 지의류 내생 곰팡이 EL000327 추출물의 HT29, HCT116, Caco2, DLD1, CSC221, TMK1, RV1, A549, HaCaT, CT26, 및 MDCK 세포에 대한 세포 독성 실험 결과를 나타낸 그림이다.

도 3은 지의류 내생 곰팡이 EL000327 추출물로부터 분리된 화합물 B를 48시간 동안 CRC 세포주인 Caco2, HCT116, DLD1, 및 HT29 세포에 처리한 후의 세포 독성 실험 결과를 나타낸 그림이다.

도 4은 지의류 내생 곰팡이 EL000327 추출물, 이의 분획물(Fraction 2), 및 화합물 B로 처리된 인간 CRC 세포 Caco2 및 비암 세포주 HaCaT 및 MDCK의 IC₅₀ 값을 나타낸 그림이다.

도 5는 24시간, 48시간 및 72시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포의 세포 주기 분포를 유세포 분석하여 나타낸 그림이다.

도 6은 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포의 세포 주기 각 단계에서 시간 및 처리 농도에 따른 세포 분포를 백분율로 나타낸 그림이다.

도 7은 24시간, 48시간 및 72시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 세포 주기 조절 단백질, Cyclin B1, Cyclin D1 및 p-Cdc2의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 그림이다.

도 8은 20, 60 및 3.3 μ g/ml의 농도에서 시험관 내 튜블린 중합에 대한 화합물 B의 효과를 나타낸 그림이다. DMSO, 미세소관 안정제인 파클리탁셀(10 μ M), 및 미세소관 불안정제인 빈블라스틴(10 μ M)는 대조군으로 사용되었다.

도 9는 48 시간 동안 화합물 B (20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리한 후 각각 미세 소관 불안정화 및 안정화와 관련된 stathmin 및 MAP4의 상대적 mRNA 수준을 나타낸 그림이다.

도 10은 화합물 B(20, 60, 100 μ g/ml), 파클리탁셀(100nM), 빈블라스틴(50nM) 또는 DPT, 미세소관 불안정화제(25nM)로 24시간 동안 처리한 후 Caco2 세포에서 미세소관 구성(microtubule organization)을 면역형광 현미경(Immunofluorescence microscopy)으로 관찰한 결과를 나타낸 그림이다. 액틴은 Alexa flour 568 phalloidin(빨간색)으로 염색되었고, 미세소관은 α -tubulin 항체(녹색)로 염색되었으며, DNS는 DAPI(파란색)로 염색되었다.

도 11은 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 24시간 동안 처리한 Caco2 세포의 핵 응축(Nuclei condensation)을 Hoechst 염색에 의해 관찰한 결과이다. 여기서, 화살촉은 세포의 핵 응축을 나타낸다.

도 12는 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327(60 μ g/ml)로 24시간 동안 처리한 Caco2 세포의 핵 응축(Nuclei condensation)을 정량화(quantification)하여 나타낸 그림이다.

도 13은 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 caspase 3/7(녹색)로 염색된 세포사멸(apoptosis) 세포를 형광스캔한 결과이다.

도 14는 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 caspase 3/7로 염색된 세포사멸(apoptosis) 세포를 정량화한 결과이다.

도 15는 caspase 억제제 Z-VAD-FMK (10 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48 시간 동안 화합물 B (20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 Annexin V로 염색된 세포사멸(apoptosis) 세포를 형광스캔한 결과이다.

도 16은 Z-VAD-FMK(10 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48 시간 동안 화합물 B (20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 Annexin V로 염색된 세포사멸(apoptosis) 세포를 정량화한 결과이다.

도 17은 Z-VAD-FMK (10 μ M) 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 Annexin v-FITC(세포사멸 세포) 및 PI(괴사 세포)에 의해 염색된 죽은 세포의 유세포 분석 결과이다.

도 18은 Z-VAD-FMK(10 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 유세포 분석에 의해 세포사멸 세포의 백분율의 정량화 결과이다.

도 19는 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 12시간 또는 24시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물 (60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 세포사멸 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)인 BAX 및 항-세포사멸 단백질(anti-apoptotic protein)인 Bcl-xL의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 20은 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물 (60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 세포사멸 단백질인 PARP와 caspase-3의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 21은 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 12시간 또는 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물 (60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 자가포식(autophagy) 관련 단백질인 Beclin 1, p62 및 LC3B I/II의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 22는 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 12시간 또는 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물 (60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 세포사멸 신호전달 경로 관련 단백질 p-JNK, JNK, pc-JUN, c-JUN, p-AKT 및 AKT의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 23은 Z-VAD-FMK(10 μ M) 및 자가포식(autophagy) 억제제인 3 MA(1mM) 및 CQ(10 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리한 Caco2 세포의 상대적인 세포 생존율을 나타낸 그림이다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS: Z-VAD-FMK, 3MA 및 CQ 처리군과 비교하여 유의한 차이 없음($p > 0.05$).

도 24는 CQ(10 μ M)의 존재 또는 부재 하에서 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)이 처리된 Caco2 세포에서 PARP, Caspase 3, 및 Bcl-xL의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 25는 CQ(10 μ M)의 존재 또는 부재 하에서 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)이 처리된 Caco2 세포에서 p-JNK, NF- κ p62, 및 LC3B I/II의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 26은 ROS 억제제인 NAC(5mM)의 존재 또는 부재 하에 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 12시간 동안 처리한 Caco2 세포에서 DCFH-DA(10 μ M)를 사용하여 형광 현미경으로 검출한 세포 내 ROS 생성 정도를 나타낸 그림이다.

도 27은 DCFH-DA(10 μ M)로 전배양된 Caco2 세포, 및 NAC(5 mM)의 존재 또는 부재 하에 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 12시간 동안 처리한 Caco2 세포의 형광 강도에 대한 유세포 분석 결과를 나타낸 그림이다.

도 28은 DCFH-DA(10 μ M)로 전배양된 Caco2 세포, 및 NAC(5 mM)의 존재 또는 부재 하에서 12시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포의 평균 형광 강도를 정량화한 그림이다.

도 29는 NAC(5 mM)의 존재 또는 부재 하에서 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 PARP, Caspase 3, Bcl-xL, p62 및 LC3B I/II의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 30은 NAC(5 mM)의 존재 또는 부재 하에서 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 p-JNK, JNK, pc-JUN 및 c-JUN의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 31은 NAC(5mM) 또는 JNK 억제제인 SP600125(15 μ M)의 존재 또는 부재하에 48시간 동안 화합물 B(20 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리한 Caco2 세포의 세포 생존율에 대한 상대적 백분율을 나타낸 그림이다.

도 32는 NAC(5mM) 또는 SP600125(15 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 화합물 B(20 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리한 Caco2 세포에서 Annexin V-FITC 및 PI로 염색된 죽은 세포의 유세포 분석 결과이다.

도 33은 NAC(5mM) 및 SP600125(15 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 화합물 B(20 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리한 Caco2 세포에서 Annexin V-FITC 및 PI로 염색된 죽은 세포의 유세포 분석에 따른 세포사멸 세포의 백분율 정량화 결과이다.

도 34는 SP600125(15 μ M)와 함께 또는 없이 48시간 동안 화합물 B(20 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 PARP, Caspase 3, Bcl-xL, p62 및 LC3B I/II의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 35는 SP600125(15 μ M)와 함께 또는 없이 48시간 동안 화합물 B(20 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리된 Caco2 세포에서 p-JNK, JNK, pc-JUN 및 c-JUN의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 36은 Caco2 세포에서 5-FU(4 또는 6 μ g/ml) 및 화합물 B(2 또는 4 μ g/ml)의 조합 처리에 대한 Fa-CI 곡선(plot)이다.

도 37은 48시간 동안 5-FU(4 또는 6 μ g/ml) 및 화합물 B(2 또는 4 μ g/ml)로 조합 처리한 Caco2 세포에서 PARP, Caspase 3, 및 Bcl-xL의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 38은 48시간 동안 5-FU(4 또는 6 μ g/ml) 및 화합물 B(2 또는 4 μ g/ml)로 조합 처리한 Caco2 세포에서 p62 및 LC3B I/II의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 39는 Caco2 세포에서 화합물 D(0.5 또는 1 μ g/ml) 및 화합물 B(5 또는 10 μ g/ml)의 조합 처리에 대한 Fa-CI 곡선이다.

도 40은 48시간 동안 화합물 D(0.5 또는 1 μ g/ml) 및 화합물 B(10 μ g/ml)로 조합 처리한 Caco2 세포에서 PARP, LC3B I/II의 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 41은 Caco2 세포에서 화합물 B로 유도된 세포사멸 및 자가포식에 대한 메커니즘의 도식적 표현이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074]

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.

[0076]

이하의 모든 실험은 적어도 3회 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표현되었다. 모든 통계 분석은 Sigma Plot version 12.5를 사용하여 수행하였다. Student's t-test는 두 그룹 간의 통계적 유의성을 비교하는

데 사용되었다. 달리 명시되지 않는 한, p -값 < 0.05 는 유의한 것으로 간주되었다.

[0078] 실시예 1: 지의류 내생 곰팡이의 분리 및 동정

[0079] 지의류 표본은 2009년 대한민국 제주도 한라산에서 채집되었다. 바우처 표본은 한국 순천대학교 한국지의류연구소(KoLRI)에 기탁되어 있다. 지의류 내생 곰팡이(endolichenic fungus; ELF) EL000327은 표면 멸균 방법으로 분리되었다(비특허문헌 14 참조).

[0080] 상기 분리된 지의류 내생 곰팡이 EL000327에 대한 ITS(internal transcribed spacer) 시퀀싱(sequencing)을 수행하였다. 구체적으로, 25℃의 PDA(potato dextrose agar) 배지에서 2-3주 동안 배양하였다. 총 DNA는 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 EL000327에서 제조업체의 지침에 따라 추출되었다. 범용 프라이머 ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (서열번호 1) (비특허문헌 15 참조) 및 LR5(5'-ATCCTGAGGGAACTTC-3') (서열번호 2) (비특허문헌 15 참조)는 EL000327의 rDNA 유전자의 내부 전사된 스페이서(ITS) 영역으로 증폭되었고 ITS 시퀀싱은 문헌 비특허문헌 3에 설명된 대로 수행되었다. 그 결과, 지의류 내생 곰팡이 EL000327의 ITS 시퀀싱을 하기 표 1에 나타내었으며, 지의류 내생 곰팡이 EL000327은 GeneBank 데이터베이스의 BLAST 검색에 따라 슈도플렉타니아 속(*Pseudoplectania* sp.)으로 식별되었다.

표 1

EL000327의 ITS 서열	서열번호
CACAGCTAGAGGGCAAGGACCATCAGAAGCGAATAAATATCACGCCGAGGTCTCTTGCGCTTCTGCTGAAGGATTTAAGAGGGGATCGACCAAGGTTGATCCTCTCCAGGTCCAGGTGCAATGCACCTGAGGATGTGTTTGATGACGCTCGAACAGGCATACCTCCCGGAATACCAGGAGGTGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATACGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTTGTTGCGGTGTTGTTAACACTCGGACTGCCACGATGGAATAACGAGGGTTTAAACGCTATTACCGTGCAGGCTTGGGACGTAACCCCAAGGCTTTTCAGGGAGCAACCTCCGTTACCCGGGTAGGGTCAGAGGAAGCTGCAGGCAACACGGAAGCAACAGGAGAATGTTTCACAGGAGGGAGGAAATCAAATGATCACTTGAAGAGGATTCCTGATCCGTCCATAAGATGAAGGTATAGATGAGGTCTTCGCCTAGCTGCAAGCTTGCGACGTCATGCAACCCACCCACAGTCTAGGGTTTGACCCCTCCGGACTCAGCGGTACCCACCCCTAGTTCCAGCAGATGCAGAGCAGAGCTACTGGGACACAGAGGATTATGGGGTAGGGTGACGCCACCCGATCGGTTTACGCAAAGTGCCACGTACAAGCATCTATGCCACGACCCCGTTAATCCTAGGCTTCCACGTTTGCCAGACTCGATTCCCGAGTGGGAATCGGTGGGACAGACAGCCAGTGACTCAGCAGCGTTAACTGCCCATCCCTTGACGCCCTACTATGGACAGGTGACACCCACAGCCATAGTAGCCCAAGGCAATCCCTTACCACACTATCTGTCCACGGCATCATGTTCAAGTATAGTGATGGTCAAGAGATCTCAGATTGCCTCGATCGACTGATCTCCATGCCGATCCCATGGGCAGGACCCCTCTCAAGCATTGCACTTTATTTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTAC	3

[0083] 실시예 2: 지의류 내생 곰팡이의 추출물의 제조

[0084] 지의류 내생 곰팡이 EL000327은 25℃의 PDA(potato dextrose agar) 배지에서 시각적 콜로니가 나타날 때까지 약 2-3주 동안 배양되었다. 한천에서 성장한 ELF 균사체를 잘라 500ml 삼각 플라스크(3L)에 담긴 200ml PDB(potato dextrose broth)에 접종하고 약 3-4주 동안 150rpm의 진탕 배양기에서 25℃에서 배양하였다. 그런 다음 각 플라스크에 EA 200ml를 넣고 플라스크를 약 2시간 동안 진탕하였다. 그런 다음 각 배양액을 여과하여 여액과 균사체를 분리하였다. 여액을 분리 깔대기에 세워 두어 여액을 수용성 및 EA-가용성 층으로 분리하였다. EL000327의 추출물 5.8g은 회전 증발기를 사용하여 진공 하에서 EA를 증발 건조시켜 얻었다. EL000327의 추출물은 하기 실험에서 100% DMSO에 용해시키고 사용하였다.

[0086] 실시예 3: 지의류 내생 곰팡이 추출물로부터 화합물의 분리 및 구조 동정

[0087] 상기 실시예 2의 추출물(5.8g)을 메탄올/H₂O의 단계적 구배(20%에서 100%의 메탄올) 용출에 의해 RP C₁₈ flash column이 있는 개방형 컬럼 크로마토그래피(open column chromatography) 정제하여 8개의 분획(327-F1~327-F8로 표시됨)을 얻었다. 분획 327-F2(360mg)(H₂O:MeOH = 60:40)를 수중 47% 아세토니트릴(47% acetonitrile in water)과 등용매 용매 시스템(isocratic solvent system)을 사용하여 역상 HPLC(Phenomenex Luna C-18(2), 250 × 100mm, 2.0mL/분, 5 μm, 100Å, UV = 254 nm)으로 정제하여 핑크 오일(pink oil) 95mg을 분리하였다. 이의 분자식은 HR-FAB-MS 데이터를 기반으로 C₂₀H₂₆O₄로 추론되었다. 화학구조는 MS, UV 및 NMR 분광 데이터의 해석에

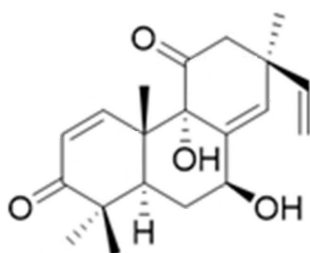
기초하여 7β-9α-디하이드록시-1,8(14),15-피마라트리엔-3,11-디온(7β α-dihydroxy-1,8(14),15-pimaratrien-3,11-dione) (**화합물 B**)로 결정되었고, 이를 리베르텔레논 티(Libertellenone T) 화합물로 명명하였다(화학식 1). 상기한 화합물 B의 분획 방법을 도 1에 나타내었고, ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼 데이터는 다음과 같다.

[0088] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.25 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 6.02 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 17.2, 10.4 Hz, 1H), 4.99 (dd, *J* = 17.3, 0.9 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 10.4, 0.9 Hz, 1H), 4.40 (m, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.18 (s, 3H)

[0089] ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 212.1, 206.3, 159.5, 145.4, 141.5, 130.9, 128.8, 69.6, 54.0, 45.7, 45.3, 43.2, 42.9, 33.2, 28.5, 28.1, 22.8, 20.8.

[0090] HR-FAB-MS *m/z* [M+H]⁺ 331.1904 (calcd. for C₂₀H₂₆O₄, 331.1909)

[0091] [화학식 1]



[0092]

[0094] 실시예 4: 세포 배양

[0095] 인간 CRC 세포주 HT29, SW620, DLD1, Caco2, 결장 줄기세포암 세포주(colon stemness cancer cell line); CSC221, 인간 위암 세포주; AGS, TMK1, 인간 전립선암 세포주; RV1, 인간 폐암 세포주; A549, 마우스 결장암 세포주; CT26 및 비암성 세포주; MDCK는 한국세포주은행(서울, 대한민국)에서 구입하였다. 세포를 10% FBS(fetal bovin serum)(GenDEPOT) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액이 보충된 DMEM 또는 RPMI 배양 배지(GenDEPOT, Katy, TX, USA)에서 배양하고, 37℃, 5% CO₂의 가습 분위기에서 배양하였다. 이들 배양된 세포들은 이후 실험에 사용하였다.

[0097] 실시예 5: 추출물 및 화합물 B의 세포 독성 실험

[0098] 세포 독성 실험은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 비색 분석법(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 측정하였다. $2 \times 10^4 - 4 \times 10^4$ cells/ml를 96웰 플레이트에 시딩(seeding)하였다. 부착 후 세포를 다양한 억제제(Z-VAD-FMK(10 μM)(R&D System, Inc), 3-MA (1mM), CQ(10 μM), NAC(5mM)(Sigma, St. Louis, MO, USA), SP600125(15 μM)(Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)의 존재 또는 부재하에 48시간 동안 다양한 농도의 화합물 B, EL000327의 추출물, 화합물 D(미동정), 및 5-FU로 처리하였다. 15 μl의 MTT 시약을 각 웰에 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 배지를 완전히 흡인하고 150 μl의 DMSO(Sigma-Aldrich)를 세포에 첨가한 후 Gen 5(2.03.1) 소프트웨어를 사용하는 마이크로플레이트 판독기(Bio Tek Instruments, Winooskim, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 계산에는 SPSS 통계 소프트웨어 23을 사용하였다. 화합물 B와 화합물 D 또는 5-FU의 시너지 효과(synergic effects)는 compuSyn 소프트웨어로 평가하였다.

[0099] 지의류 내생 곰팡이 EL000327의 추출물의 HT29; HCT116; Caco2; DLD1; CSC221; AGS; TMK1; RV1; A549; 마우스 결장암 세포주, CT26; 및 비암성 세포주인 MDCK에 대한 세포 독성 실험 결과, EL000327은 인간 CRC 세포주인 Caco2(IC₅₀ = 52.2 μg/ml)와 마우스 결장암 세포주인 CT26(IC₅₀ = 33.12 μg/ml)에 대해 가장 높은 세포독성을 보였다(도 2 참조).

[0100] 화합물 B는 암이 아닌 MDCK 세포주보다 훨씬 낮은 용량에서 Caco2 세포주에 독성이 있었으며 IC₅₀ 값은 17.5 μ

g/ml 및 171.8 μ g/ml였다(도 3 참조). 또한, MDCK 세포의 경우, 화합물 B의 IC₅₀이 EL000327 추출물(IC₅₀ = 102.5 μ g/ml) 또는 EL000327의 추출물의 분획물(Fr.2)(IC₅₀ = 81.35 μ g/ml) 보다 유의하게 높았다(도 4 참조).

[0101] 따라서 화합물 B는 인간 CRC 세포주인 Caco2에 대해 선택적인 세포 독성을 발휘하는 새로운 화합물로 확인되었다.

[0103] 실시예 6: 화합물 B의 세포 성장 억제에 관한 세포 주기의 검정

[0104] 6-1. 유세포 분석(flow cytometry)에 의한 세포 주기 분석

[0105] 화합물 B 및 EL000327 추출물이 세포 주기를 조절하여 Caco2 세포 성장을 억제하는지 여부를 확인하기 위해 화합물 B 또는 EL000327 추출물 처리 후 Caco2 세포의 세포 주기 분포를 유세포 분석기로 분석하였다.

[0106] Caco2 세포를 6개의 웰 플레이트에 2×10^5 cells/well의 밀도로 시딩하고 밤새 인큐베이션한 후 다양한 농도의 화합물 B 및 60 μ g/ml의 EL000327 추출물로 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 처리하였다. 세포를 수확하고 FACS 세척 완충액으로 세척하고, 실온에서 10분 동안 트립신 용액에 인큐베이션하고 이어서 RNase 억제제와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리하고 펠릿을 수집한 후 100 mL의 4 mg/mL PI(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 4℃, 2시간 동안 암실에서 염색하였다. 세포 주기 분석은 CytoFLEX 기기(Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA)에서 수행되었다.

[0107] 화합물 B는 처리 24시간 후 용량 의존적 방식으로 G2/M기의 세포 비율을 현저하게 증가시켰다. 처리 후 48시간 및 72시간에, G2/M기 세포의 비율은 시간 의존적으로 감소하였고, G1 이하 개체군이 증가하여 G2/M기 정지 후 세포 사멸을 나타냈다. EL000327 추출물로 처리하면 G2/M기에 약간의 세포 축적이 발생하지만 화합물 B로 처리하는 것보다 적었다(도 5 및 6 참조).

[0109] 6-2. 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 분석

[0110] Caco2 세포를 2×10^5 cells/well의 밀도로 6개의 웰 플레이트에서 밤새 배양하고 다양한 억제제(Z-VAD-FMK(10 μ M), 3-MA(1mM), CQ(10 μ M), NAC(5mM), SP600125(15 μ M))의 존재 또는 부재하에 24시간 또는 48시간 동안 다양한 농도의 화합물 B 및 60 μ g/ml의 EL000327 추출물로 처리하였다. 세포를 수확 및 용해하고, 제조업체의 지시에 따라 BSA 단백질 분석으로 단백질 농도를 결정하였다. 25 μ g 또는 50 μ g의 단백질을 SDS-PAGE(12%)로 분리하고 1.2 A에서 6시간 동안 블로팅 멤브레인(blotting membrane)으로 옮겼다. 멤브레인을 5% 탈지유로 1시간 동안 차단한 후 다양한 일차 항체(Cyclin B1, D1, p-Cdc2, BAX, Bcl-XL, PARP, Caspase 3, Beclin 1, P-62, LC3B I/II, p-JNK, JNK, p-Akt, Akt, NF- κ B, Actin을 Cell Signaling Technology(Massachusetts, USA)에서 구매)와 함께 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 블롯(blots)을 세척하고 RT에서 30~60분 동안 서양고추냉이 과산화효소-접합된 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies; Thermo Fisher Sciences)와 함께 배양하였다. 특정 항체 결합은 화학발광 이미징(Chemiluminescence imaging; iBright FL1000 Imaging System, Thermo Fisher Sciences, biomolecular imager, Amersham ImageQuant™ 800 western blot imaging System)에서 검출되었고 Multi Gauge 3.0으로 측정되었다. 상대 밀도(Relative density)는 액틴 밴드(actin bands)의 밀도에 대해 계산되었다.

[0111] 그 결과, 웨스턴 블로팅에 의한 알려진 세포 주기 조절 단백질의 발현 분석은 Cyclin B1, Cyclin D1 및 p-Cdc2의 발현이 화합물 B 또는 EL000327로 48시간 동안 처리한 후 상향 조절되었다(도 7 참조).

[0113] 6-3. 튜불린 중합 검정(Tubulin polymerization assay)

[0114] 미세소관(microtubules)은 G2/M기를 통한 세포 주기의 진행에 중요한 역할을 하는데, 이는 미세소관이 유사분열 동안 염색체 분리에 대한 구조적 지원을 제공하는 유사분열 방추(mitotic spindles)를 형성하기 때문이다. 따라서, 시험관 내 튜불린(tubulin) 중합(polymerization)에 대한 화합물 B의 효과를 평가하기 위해 튜불린 중합 검정(tubulin polymerization assay)을 수행하였다.

[0115] 화합물 B가 튜불린 구성에 미치는 영향은 제조사의 지시에 따라 튜불린 중합 분석 키트(Cytoskeleton, Inc.,

Denver, CO, USA)를 사용하여 조사되었다. 구체적으로, 튜블린 단백질(>99% 순도)을 얼음처럼 차가운 TP(ice-cold TP)에 3.0 mg/mL의 최종 농도로 현탁하고, 튜블린 용액을 화합물 B(3.3, 20, 60 µg/ml)가 있거나 없는 일반 튜블린 완충액과 함께 37°C에서 배양하였다. 파클리탁셀(paclitaxel) 및 빈블라스틴(vinblastine) (10 µM)은 각각 미세소관의 안정화 또는 불안정화를 위한 양성 대조군으로 사용되었다. Gen 5(2.03.1) 소프트웨어를 사용하는 마이크로플레이트 판독기로 340nm에서 탁도 변화를 지속적으로 모니터링하여 튜블린 중합을 측정하였다.

[0116] 도 8에서 볼 수 있듯이, 잘 알려진 미세소관 안정제인 파클리탁셀(paclitaxel) (10 µM)로 처리하면 튜블린 중합이 증가되는 반면, 미세소관 불안정제인 빈블라스틴(vinblastine) (10 µM)은 튜블린 중합을 손상시켰다. 아무것도 처리되지 않은 조건에서 미세소관은 자가 조립되어 시간 의존 방식으로 튜블린 중합체를 형성하였다. 화합물 B(3.3, 20, 60 µg/ml) 처리는 미세소관(MT) 중합에 대해 파클리탁셀과 유사한 효과를 보였고 용량 및 시간 의존 방식으로 튜블린 중합을 증가시켰다(도 8 참조).

[0118] 6-4. 정량 실시간 PCT (Quantitative real-time PCR)

[0119] 화합물 B(20, 60 µg/ml) 및 EL000327 추출물(60 µg/ml) 처리된 Caco2 세포의 총 RNA를 제조업체의 지침에 따라 RNAiso Plus(TaKaRa)를 사용하여 추출하였다. cDNA는 M-MLV 역전사 효소 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 각 처리 그룹의 총 RNA 3 µg에서 역전사되었다. Stathmin의 mRNA 수준은 (정방향) 5'-GGTGGCGGCAGGACTTTCCTTATCCCAGTTGATT-3 (서열번호 4) 및 (역방향) 5'-TTCTCGTGCTCTCGTTTCTCAGCCAGCTGCTTC-3 (서열번호 5)을 사용하여 측정되었다. MAP4(정방향)의 mRNA 수준은 5'-CCCTTCTGAGGTAGCGTGCCTTGTGGAGGT-3 (서열번호 6) 및 (역방향) 5'-CTGGCTCCCTCATGTTCTTGGCAGCAGA-3 프라이머 (서열번호 7)을 사용하여 측정되었다. SYBR 그린(Enzymomics). qRT-PCR 반응 및 분석은 CFX(Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다.

[0120] 그 결과 도 9에서 볼 수 있듯이, qRT-PCR 분석은 튜블린 불안정화 유전자 Stathmin이 화합물 B 또는 EL000327 추출물 처리에 의하여 상당히 하향조절되었음을 확인할 수 있었다(도 9 참조).

[0122] 6-5. 면역형광(Immunofluorescence) 이미징 분석

[0123] 상기 실시예 6-4에 따른 결과를 좀더 확인하기 위하여 화합물 B 처리 후에 나타나는 Caco2 세포의 유사분열 스피indle 조직(mitotic spindle organization)의 변화를 면역형광염색법으로 가시화하였다.

[0124] 구체적으로, Caco2 세포를 12웰 플레이트에서 1×10^5 밀도로 커버 슬립에서 배양하였다. 유착 세포를 화합물 B, 파클리탁셀(100 nM), 빈블라스틴(50 nM) 및 테옥시포도필로톡신(DPT)(25 nM)의 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 세포를 인산완충식염수(PBS)로 3회 세척한 후 PBS 중 4% 파라포름알데하이드로 10분 동안 고정하고 실온에서 0.1% Triton™ X-100으로 10분 동안 투과화(permeabilization)한 후 실온에서 PBS 중 1% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 세포를 0.1% BSA 중 2 µg/mL로 알파 튜블린(B-5-1-2) Alexa Fluor 488 마우스 단클론 항체(Mouse Monoclonal Antibody)로 표지하고 실온에서 3시간 동안 배양하였다. 세포를 각 단계 후 PBS로 5분 동안 3회 세척하였다. 그런 다음 실온에서 30-45분 동안 1% BSA를 포함하는 차단 용액으로 세포를 다시 차단하였다. 세포를 형광성 팔로이딘(phalloidin) 염색 용액으로 다시 염색하고 실온에서 30-60분 동안 배양하였다. PBS로 세척한 후, 커버 슬립을 DAPI가 장착된 prolong gold가 있는 유리 슬라이드에 장착하고 실온에서 밤새 기다렸다. 이미지는 K1-Fluo Confocal Laser Scanning Microscope(Nanoscope Systems, Daejeon, Korea)를 사용하여 촬영하였다.

[0125] 이러한 면역형광현미경검사(Immunofluorescence microscopy)는 화합물 B가 증가된 튜블린 중합의 결과로 다극 유사분열 스피indle(multipolar mitotic spindles)을 유도함으로써 파클리탁셀(100nM)과 같은 미세소관에 유사한 효과를 나타내는 것으로 증명하였다. 구체적으로, 도 10에서 볼 수 있듯이, 고농도의 화합물 B(20, 60, 100 µg/ml) 처리는 용량 의존적으로 Caco2 세포에서 미세소관의 번들링(bundling) 및 안정화를 증가시켰다. 이와 달리, 알려진 미세소관 불안정화제인 빈블라스틴(50nM) 및 DPT(25nM)는 미세소관 구성을 방해하였다

[0127] 상기 실시예 6-1 내지 6-5의 결과로부터, 화합물 B는 세포 주기 관련 단백질을 조절하고 미세소관을 안정화하여 G2/M기 정지를 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, 화합물 B는 파클리탁셀과 유사한 기능적 효과를 갖는 미세소관 안정화제로 확인되었다.

- [0129] 실시예 7: 세포의 세포사멸(apoptosis) 유도도 화합물 B의 세포독성이 나타나는지 검증
- [0130] Caco2 세포에 대한 화합물 B의 세포독성이 세포사멸(apoptosis)의 유도 때문인지 확인하고자 아래의 실험을 수행하였다.
- [0132] 7-1. 웨이스트 염색(Hoechst staining)
- [0133] 세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위해 세포독성 농도의 화합물 B 또는 EL000327 추출물로 12시간 동안 처리한 후 Caco2 세포를 Hoechst 33258로 염색하였다.
- [0134] 구체적으로, Caco2 세포를 1×10^5 cells/well의 밀도로 커버 슬립을 포함하는 12웰 플레이트에 시딩하였다. 하룻밤 배양 후, 세포를 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 및 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 24시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 4% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 세포를 0.1% Triton X-100(Sigma-Aldrich)에서 30분 동안 투과시키고 Hoechst 33258(Sigma-Aldrich)로 1시간 동안 실온의 암실에서 염색하였다. 핵의 형태학적 변화를 확인하기 위해 Nikon Eclipse 400 형광 현미경(Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)으로 세포를 관찰하였다.
- [0135] 그 결과, 화합물 B와 EL000327 추출물로 처리된 세포는 응축된 염색질(chromatin)을 나타내어 세포사멸의 시작을 나타내었다(도 11). 볼 수 있는 응축된 핵의 수는 용량 의존적으로 증가했다(도 12).
- [0137] 7-2. IncuCyte™ caspase-3/7 및 Annexin V 세포사멸 분석
- [0138] 카스파제 억제제인 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 카스파제 3/7(녹색) 및 Annexin V(적색) 염료를 사용하는 IncuCyte™ 세포사멸 검정을 사용하여 화합물 B 또는 EL000327 추출물 처리에 의해 유도된 세포 사멸을 분석하였다.
- [0139] Caco2 세포를 96-웰 플레이트에 2.5×10^3 cells/well의 밀도로 시딩하였다. 세포는 분석 시작 시 25-30% 컨플루언스까지 밤새 성장시켰다. 배지에 1: 200으로 희석된 5 μ M의 Caspase-3/7 Green reagent(4440, ESSEN BIOSCIENCE) 또는 Annexin V red reagent(4641, ESSEN BIOSCIENCE)를 보충하고 Z-VAD-FMK(10 μ M)의 존재 또는 부재하에 화합물 B 및 EL000327 추출물을 다양한 농도로 48시간 동안 처리한 세포를 첨가하였다. 세포의 세포사멸(apoptosis)은 10X 대물렌즈가 장착된 IncuCyte Zoom® 기기에 의해 48시간 동안 2시간마다 수행되는 형광 스캐닝에 의해 결정되었고 표준 스캔 유형으로 분석되었다.
- [0140] 그 결과, Caco2 세포에서 Caspase-3/7 형광 녹색 신호의 수준은 화합물 B 또는 EL000327 추출물로 48시간 동안 처리했을 때 현저하게 증가하였다(도 13 및 14). 이 분석에서 Annexin V 염료는 세포사멸 세포의 노출된 포스파티딜세린(PS)에 결합할 때 적색 형광 신호를 방출한다. 적색 표지된 사멸 세포의 수는 화합물 B에 노출된 후 용량 의존적으로 증가하였다. 그러나, Z-VAD-FMK에 의한 카스파제의 억제는 Annexin V 염색에 의해 검출된 세포사멸 세포의 수를 상당히 감소시켰다(도 15 및 16).
- [0142] 7-3. 유세포 분석에 의한 세포사멸 분석
- [0143] Caco2 세포에서 화합물 B에 의한 카스파제(caspase) 의존성 세포사멸의 유도를 확인하기 위해 세포사멸의 유세포 분석을 수행하였다. Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 화합물 B 또는 EL000327 추출물로 처리한 후 세포를 PI 및 Annexin V로 이중 염색하였다.
- [0144] Caco2 세포는 부착될 때까지 2.5×10^3 cells/well의 밀도로 6웰 플레이트에서 배양되었다. 세포를 Z-VAD-FMK(10 μ M)의 존재 또는 부재 하에 48시간 동안 상이한 농도의 화합물 B 및 EL000327 추출물로 처리하였다. 세포를 수확하고 PBS로 세척한 후 100 μ L의 1x binding buffer에 재현탁한 다음 암실에서 30분 동안 5 μ L의 50 μ g/mL 요오드화 프로피듐(PI; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 및 3 μ L의 Annexin V-FITC(BD, Biosciences, San Jose, CA, USA)로 염색했다. 사멸 세포는 CytoFLEX 기기(Beckman Coulter Life Sciences,

Indianapolis, IN, USA)에서 유세포 분석법으로 검출되었다.

[0145] 그 결과, 용량 의존적으로 증가하는 세포사멸(apoptosis) 세포의 수는 화합물 B 또는 EL000327 추출물의 처리 48시간 후에 관찰되었다. 더욱이, 카스파제의 억제제는 Caco2 세포에서 세포사멸을 상당히 감소시켰다(도 17 및 18).

[0147] 상기 실시예 7-1 내지 7-3의 결과로부터, 화합물 B와 EL000327 추출물은 모두 Caco2 세포에서 세포사멸(apoptosis)성 세포 사멸을 유도하였음을 알 수 있었다.

[0149] 7-4. 웨스턴 블롯팅 분석

[0150] Caco2 세포에서 B에 의한 카스파제 의존성 아포토시스의 활성화를 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부재 하에 웨스턴 블롯 분석에 의해 추가로 확인하였다. 그 구체적인 실험 방법은 상기 실시예 6-2와 같다.

[0151] 그 결과, 세포사멸 촉진 단백질(Pro-apoptotic protein)인 BAX의 수준은 12시간 동안 세포 독성 농도에서 화합물 B 또는 EL000327 추출물로 처리했을 때 상당히 증가했다. 반대로, Z-VAD-FMK로 전처리된 세포에서는 감소하는 수준의 BAX가 관찰되었다. 대조적으로 항세포사멸 단백질(anti-apoptotic protein)인 Bcl-xL의 발현 수준은 화합물 B 또는 EL000327 추출물로 24시간 동안 처리한 후 Caco2 세포에서 감소했지만 Z-VAD-FMK의 존재 하에서는 증가하였다(도 19).

[0152] Z-VAD-FMK가 없는 상태에서 48시간 동안 화합물 B(20, 60 μ g/ml) 또는 EL000327 추출물(60 μ g/ml)로 처리한 후 주요 세포사멸 마커인 PARP와 caspase-3의 절단이 명확하게 검출되었다(도 20).

[0153] 자가포식(autophagy) 관련 단백질인 Beclin 1, p62 및 LC3B I/II의 조절도 Z-VAD-FMK의 존재 또는 부존재 하에서 조사되었다. Beclin 1, p62 및 LC3BI/II 단백질 수준의 상향 조절은 화합물 B 또는 EL000327 추출물의 세포 독성 농도로 처리한 Caco2 세포에서 관찰되었으며, 이는 이들 세포에서 자가포식소체(autophagosome) 분해의 억제를 의미한다. 그러나 Z-VAD-FMK의 존재 하에서 이러한 자가포식(autophagy) 마커에 대해 일관된 조절 패턴이 관찰되지 않았다(도 21).

[0154] JNK/c-jun 및 Akt 신호 전달 경로의 활성화에 대한 화합물 B 및 EL000327 추출물의 효과를 평가하였는데, 이는 이들 경로가 결국 세포에서 자가포식뿐만 아니라 세포사멸의 유도를 유도하기 때문이다. JNK, c-jun 및 AKT의 인산화는 48시간 동안 IC₅₀ 농도에서 화합물 B로 처리했을 때 현저하게 유도되었지만, EL000327 추출물로 처리된 세포에서는 단백질 수준의 유의한 변화가 검출되지 않았다(도 22).

[0156] 실시예 8: 세포 사멸 경로(cell death pathway) 확인 실험

[0157] 화합물 B와 EL000327 추출물에 의해 유도된 주요 세포 사멸 경로를 확인하기 위해, 세포사멸 및 자가포식 억제제로 전처리한 후 세포 생존력을 평가하였다. 세포 생존력 평가 실험은 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 수행하였으며, 하기 결과 중 웨스턴 블롯팅 결과는 상기 실시예 6-2에 기술된 방법과 같다.

[0158] Z-VAD-FMK 처리는 화합물 B 또는 EL000327 추출물 처리에 대한 반응으로 Caco2 세포에서 세포 생존력을 상당히 증가시켰다. 대조적으로, 자가포식소체(autophagosome) 형성의 차단제인 3MA(3-methyladenine)와 리소좀 산성화(lysosomal acidification) 및 자가포식소체(autophagosome) 분해 억제제인 CQ(chloroquine)를 적용하면 세포 생존력이 농도 의존적으로 감소하였으며, 이는 자가포식(autophagy)의 억제가 Caco2 세포에 대한 화합물 B의 세포 독성을 증가시켰음을 의미하였다(도 23). 자가포식(autophagy) 차단제 중 CQ(chloroquine)는 3MA(3-methyladenine)보다 세포 사멸 유도에 더 강력한 영향을 나타내었다. CQ의 적용은 절단된 PARP 및 caspase-3의 수준을 현저하게 증가시켰고, 48시간 동안 화합물 B로 처리된 세포에서 Bcl-xL의 수준을 감소시켰다. 또한, CQ에 의한 자가포식(autophagy)의 억제는 JNK의 인산화를 크게 증가시켰고 화합물 B로 처리된 세포에서 NF- κ B의 수준을 감소시켰다. 처리된 Caco2 세포에서 LC3II의 현저한 상승은 자가포식소체(autophagosome) 분해의 억제를 통한 CQ에 의한 자가포식의 차단을 확인시켜 주었다(도 24 및 25). 이러한 결과는 화합물 B가 주로 Caco2 세포에서 JNK/c-jun 경로의 활성화를 통해 카스파제(caspase) 의존성 세포사멸을 유도했음을 시사한다. 또한, 화합물 B에 의한 자가포식의 유도 결과는 세포에서 보호 메커니즘을 활성화할 수 있음을 의미한다.

[0160] **실시예 9: ROS 생성 측정**

[0161] 세포 내 ROS는 세포의 세포사멸(apoptotic) 및 자가포식(autophagic) 기능을 활성화하는 데 중요한 역할을 한다. 화합물 B가 ROS 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포를 항산화제 N-아세틸 시스테인(N-acetylcysteine; NAC)의 존재 또는 부재 하에 독성 농도의 화합물 B 또는 EL000327로 12시간 동안 처리하고 DCFH-DA로 세포를 염색하여 형광 현미경 또는 유세포 분석법으로 ROS를 검출하였다.

[0162] Caco2 세포를 밤새 2.5×10^3 cells/well의 밀도로 6웰 플레이트에 시딩하고 NAC(5mM)의 존재 또는 부재 하에 12시간 동안 상이한 농도의 화합물 B 및 EL000327 추출물로 처리하였다. 세포를 FBS가 없는 DMEM 배지에서 DCFH-DA(10 μ M)와 함께 37°C에서 30분 동안 배양하였고 DMEM으로 3회 세척하였다. ROS 생성은 과산화물에 민감한 형광 프로브 DCFH-DA를 사용하여 형광 현미경(K1-Fluo Confocal Laser Scanning Microscope, Nanoscope Systems, Daejeon, Korea) 및 유세포 분석법(CytoFLEX; Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA)으로 측정했다.

[0163] Caco2 세포를 화합물 B에 노출시키면 ROS 생성을 나타내는 녹색 형광 신호가 극적으로 증가하는 반면, NAC로 전처리하면 형광 신호가 크게 감소하여 ROS 생성이 차단됨을 시사하였다(도 26). 형광 표지된 세포의 수는 유동 세포 분석법에 의해 검출된 바와 같이 NAC 처리 시 감소하였다. 대조군 세포와 비교하여 12시간 후 EL000327 처리된 세포에서 형광 방출의 유의한 변화가 검출되지 않았다(도 27 및 28). 따라서, NAC로 전처리하면 세포사멸 및 자가포식 마커의 발현이 감소하고, 세포사멸 및 자가포식을 유도하는 화합물 B로부터 세포를 구출하였다. 또한, NAC는 화합물 B의 IC₅₀ 농도로 처리된 세포에서 JNK 및 c-jun의 인산화를 역전시켰다(도 29 및 30). 결론적으로, 이러한 결과는 화합물 B가 Caco2 세포에서 ROS/JNK 신호 전달 경로를 활성화한다는 것을 나타낸다.

[0165] 화합물 B 및 EL000327 추출물에 의한 세포사멸 및 자가포식 유도를 위한 ROS 및 JNK 활성화의 관련성을 추가로 조사하였다. NAC 또는 JNK 억제제인 SP600125로 Caco2를 전처리하면 억제제의 부재하에 화합물 B 또는 EL000327 추출물로 처리한 세포에 비해 화합물 B 및 EL000327 추출물에 대한 민감도가 크게 감소하였다(도 31). 유세포 분석에 의해 NAC 또는 SP600125의 존재 하에서 매우 적은 수의 사멸된 세포(apoptotic cells)를 검출하였는데, 이는 ROS 및 JNK 억제제가 Caco2 세포에서 화합물 세포사멸을 유도하는 화합물 B로부터 세포사멸을 구했다는 것을 의미한다(도 32 및 33). 또한, SP600125의 적용은 48시간 동안 화합물 B로 처리한 후 웨스턴 블롯팅으로 분석한 바와 같이 JNK 경로 관련 단백질뿐만 아니라 세포사멸 및 자가포식 마커의 발현을 유의하게 감소시켰다(도 34 및 35). 종합하면, 이러한 결과는 화합물 B에 의한 ROS의 생성 유발은 JNK/c-jun 신호를 활성화하고 Caco2 세포에서 세포사멸 및 자가포식을 유도한다는 것을 보여준다.

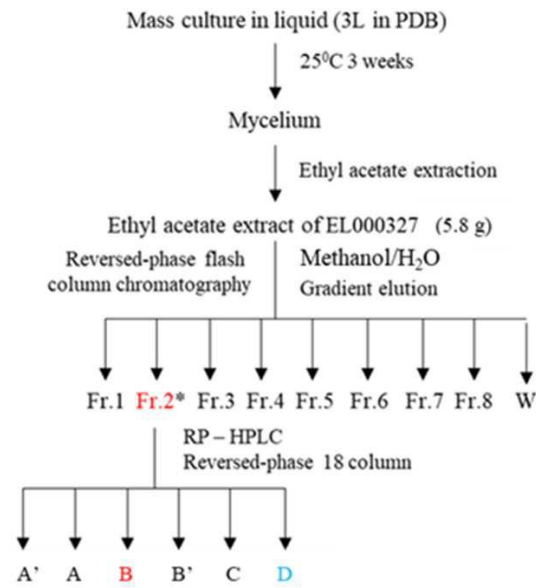
[0167] **실시예 10: 화합물 B와 다른 항암 화합물과의 시너지 효과 검증**

[0168] 임상에서 화합물 B의 항암치료제로서의 가능성을 알아보기 위해 대장암을 비롯한 여러 종류의 암 치료에 사용되는 잘 알려진 화학요법제인 5-FU와 EL000327 추출물에서 분리된 또 다른 세포독성 화합물인 화합물 D (IC₅₀ = 1 μ g/ml)를 조합하여 사용하였을 때의 효과를 분석하였다. 화합물 D의 화학 구조는 아직 결정되지 않았다. Caco2 세포를 화합물 B, 5-FU 및 화합물 D 단독으로 또는 다양한 농도에서 화합물 B 또는 D와 결합된 5-FU로 각각 48시간 및 72시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 MTT 분석을 이용하여 분석하였고, Chou-Talalay 방법은 compuSyn 소프트웨어를 이용하여 상승작용의 조합 지수(Combination Index; CI)를 계산하기 위해 사용하였다. 시너지 효과가 있는 항암제는 CI 값이 1 미만이며 CI 값이 가장 작은 것이 암 치료에 더 적합한 것으로 간주된다. 2 μ g/ml의 화합물 B와 4 μ g/ml 5-FU 조합(1; CI = 0.56), 2 μ g/ml의 화합물 B와 6 μ g/ml의 5-FU 조합(2; CI = 0.68), 및 4 μ g/ml의 화합물 B와 4 μ g/ml의 5-FU의 조합(3; CI = 0.47)은 모두 Caco2 세포에서 1 미만의 CI 값을 생성하였다(도 36). 웨스턴 블롯 분석은 CI 값이 1 미만인 농도에서 화합물 B와 5-FU의 조합이 화합물 B와 5-FU를 개별적으로 처리한 것과 비교하여 세포사멸 단백질의 발현을 상당히 증가시켰음을 증명하였다. 그러나 조합 처리 후 자가포식(autophagy) 관련 단백질 수준의 변화는 관찰되지 않았다(도 37 및 38). 또한, 5 μ g/ml의 화합물 B와 0.5 μ g/ml의 화합물 D 조합(1; CI = 0.46), 5 μ g/ml의 화합물 B와 1 μ g/ml의 화합물 D 조합(2; CI = 0.32), 10 μ g/ml의 화합물 B와 0.5 μ g/ml의 화합물 D 조합(3; CI = 0.45), 10 μ g/ml의 화합물 B와 1 μ g/ml의 화합물 D 조합(4; CI = 0.31)도 상승 효과를 나타내었다(도 39). 절단된 PARP 및 LC3B1/II의 발현은

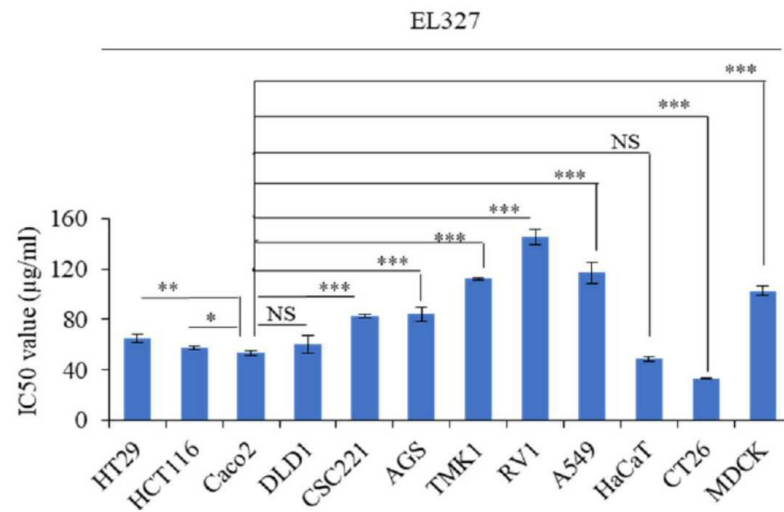
웨스턴 블롯팅에 의해 입증된 바와 같이 세포가 조합된 화합물 B 및 화합물 D 처리를 하였을 때 증가하였다(도 40). 이러한 결과는 화합물 B가 5-FU 및 화합물 D 모두와 상승적으로 작용하여 저농도에서 Caco2 세포에 대한 세포독성 효과를 상당히 증가시킨다는 것을 시사한다. 또한, 화합물 B는 다른 항암 치료제와 상승적으로 작용하여 세포 독성을 증가시켜 효과를 높일 가능성이 높음을 보여준다.

도면

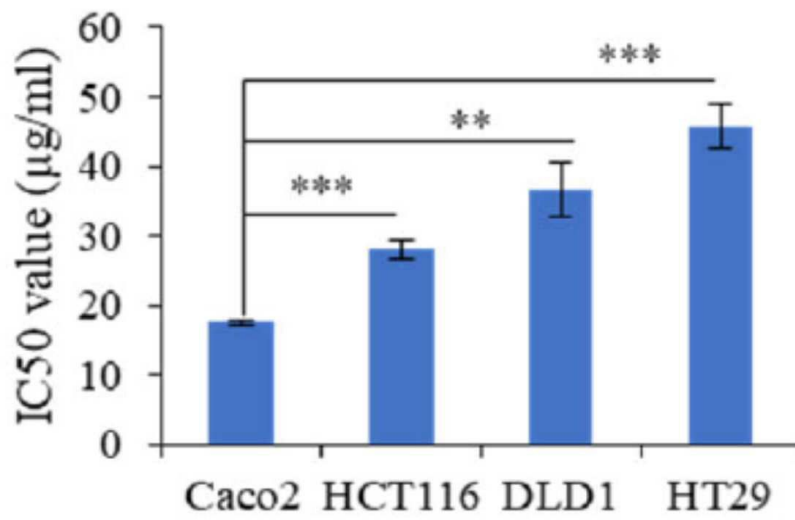
도면1



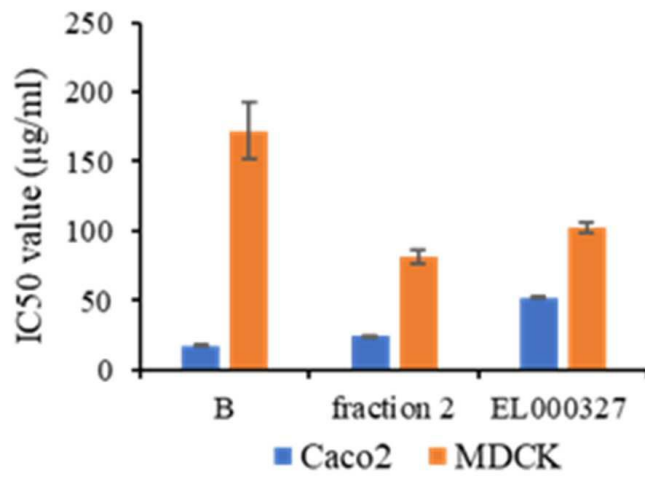
도면2



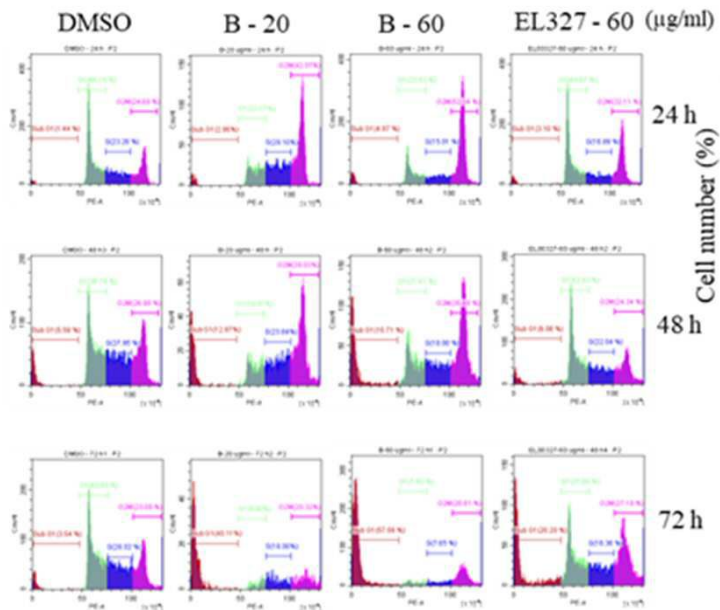
도면3



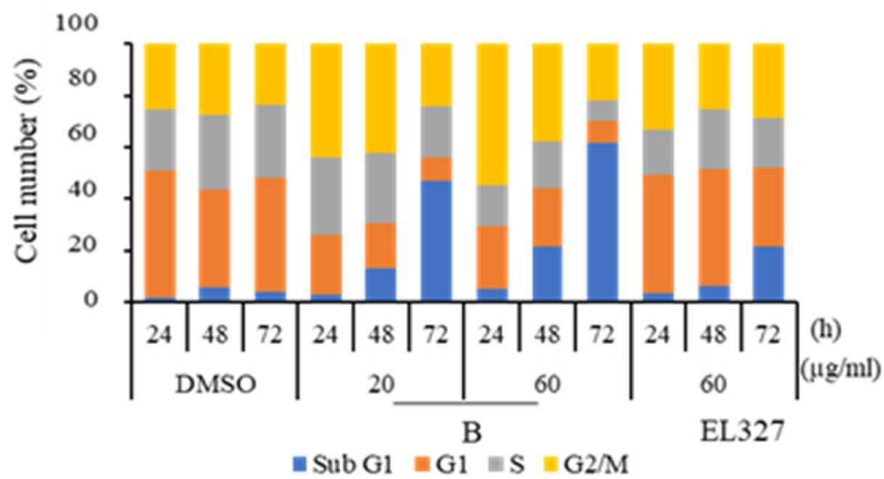
도면4



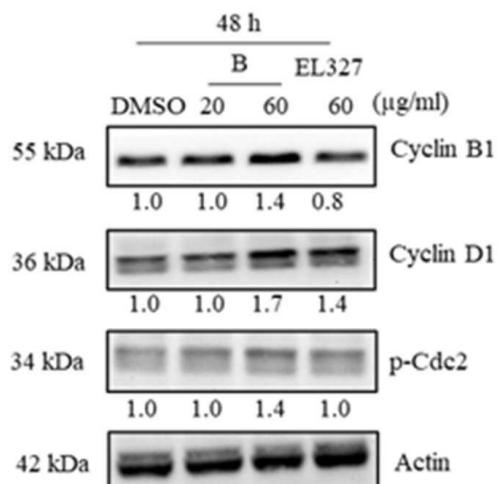
도면5



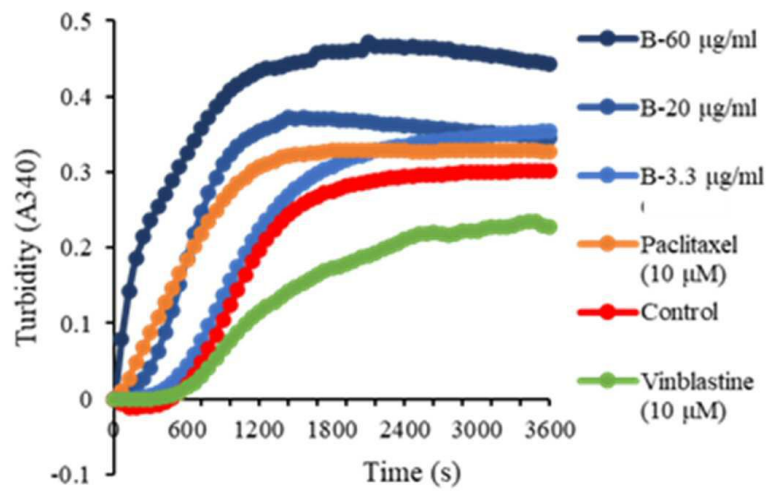
도면6



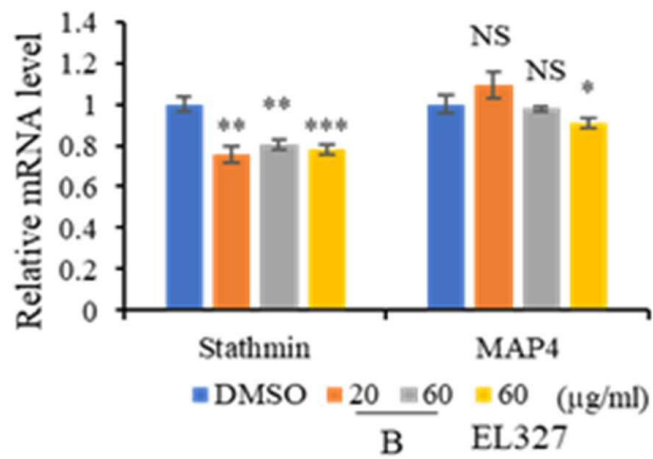
도면7



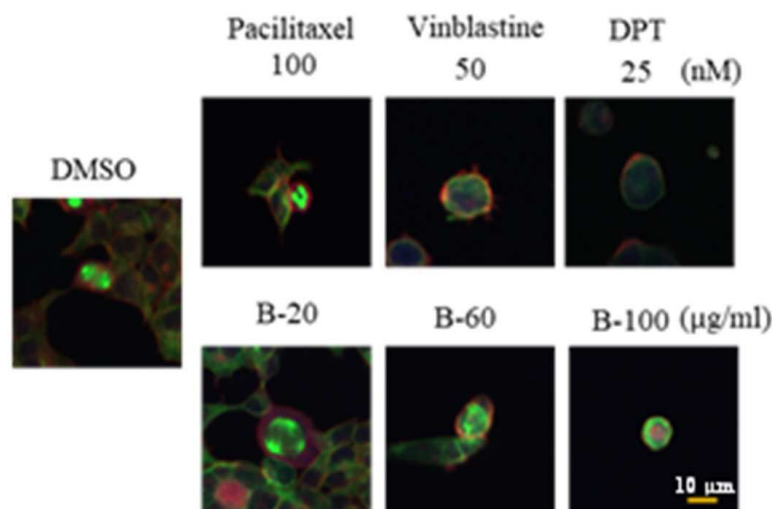
도면8



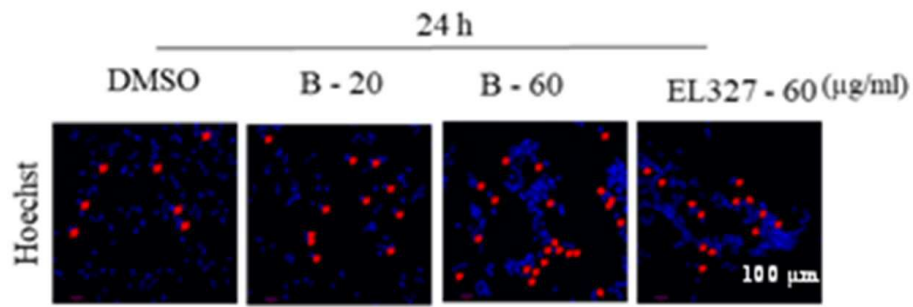
도면9



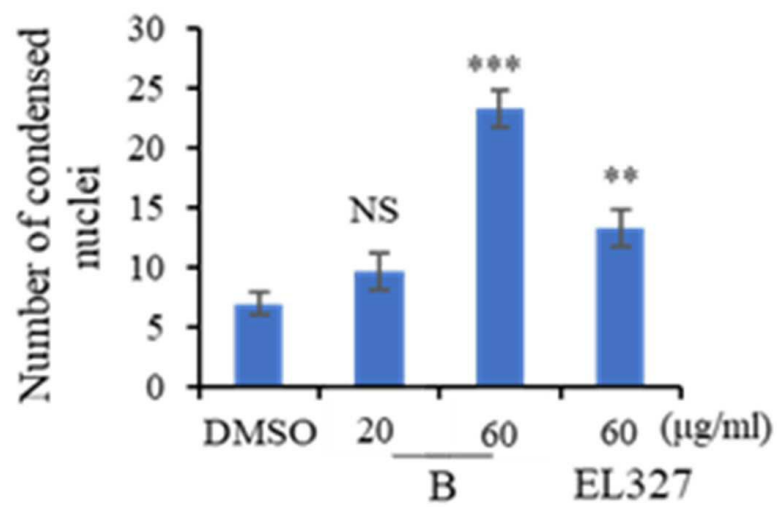
도면10



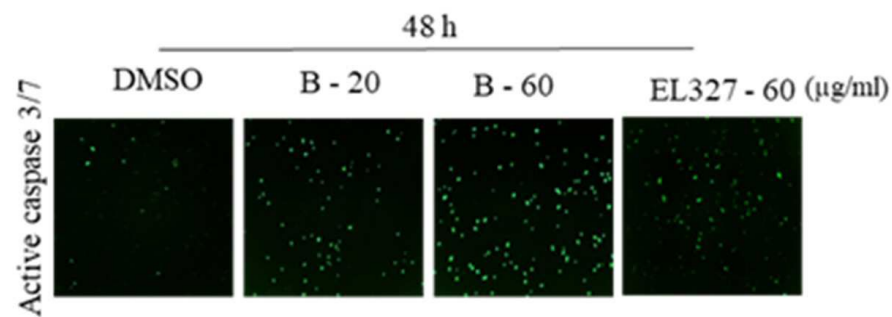
도면11



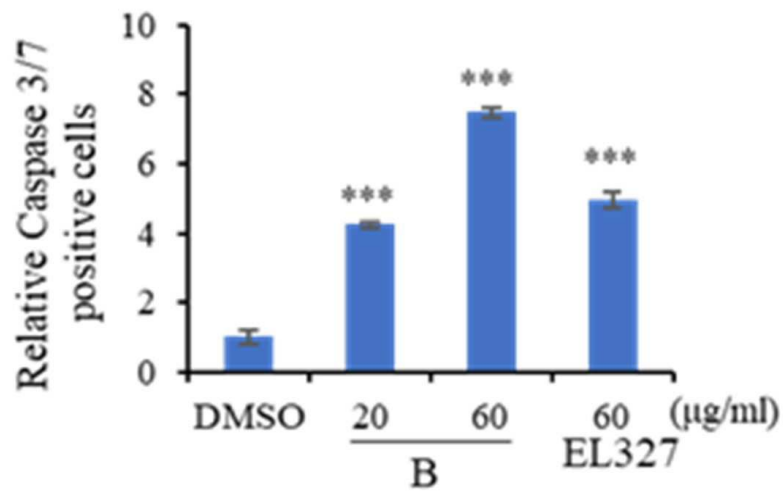
도면12



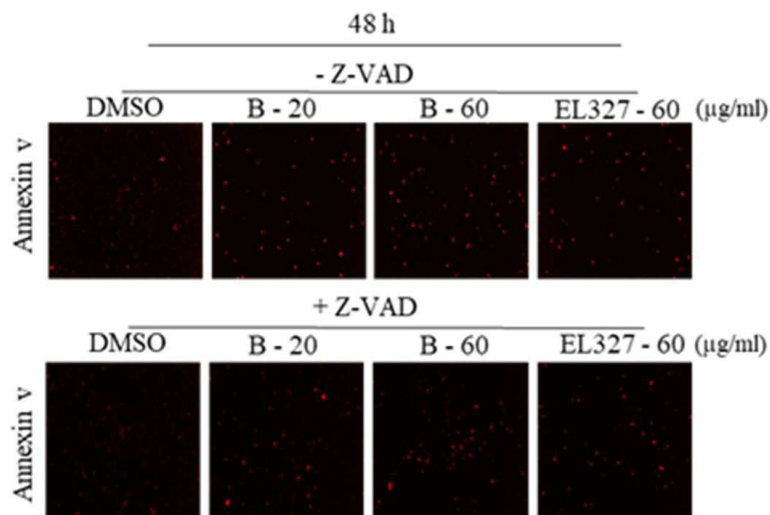
도면13



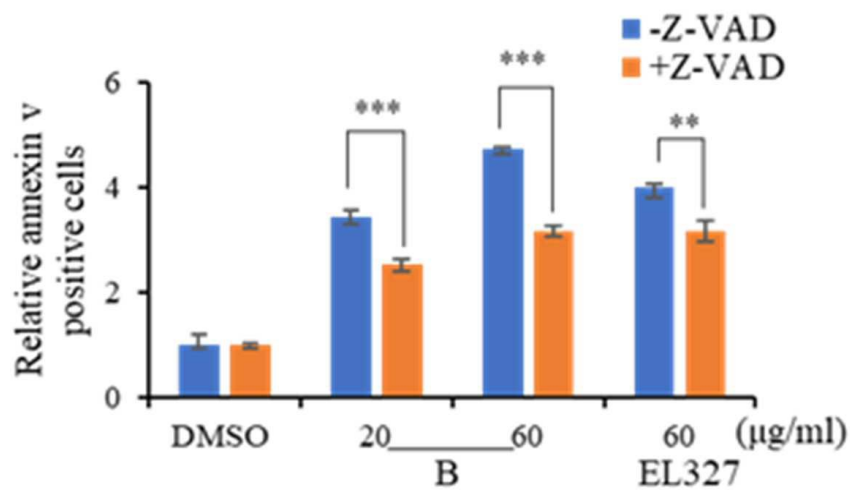
도면14



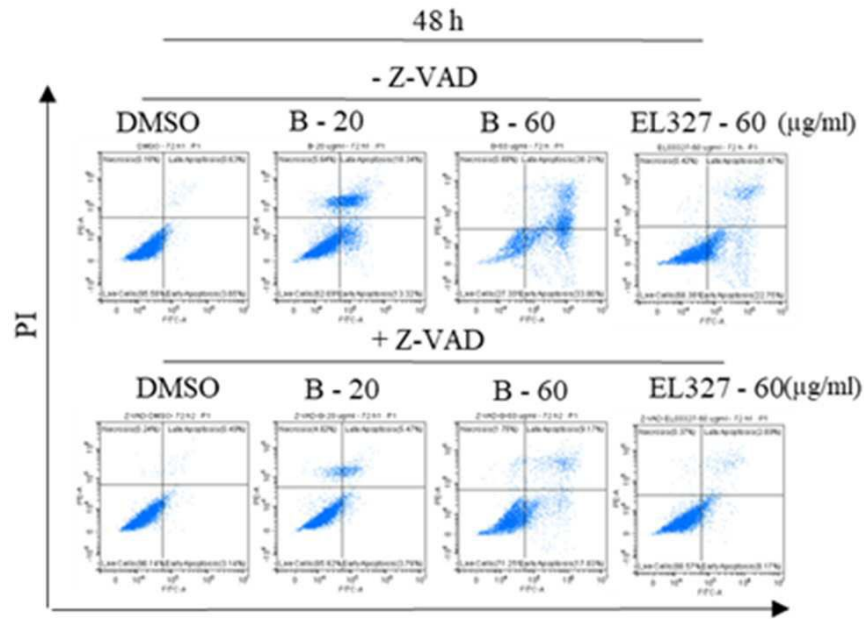
도면15



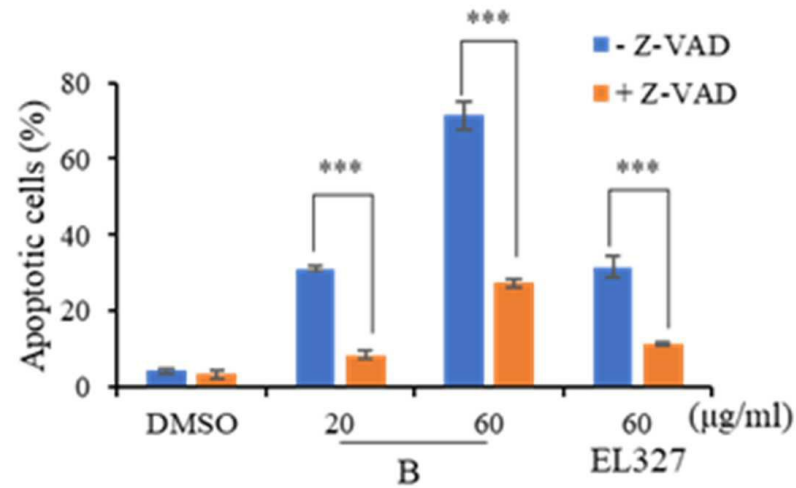
도면16



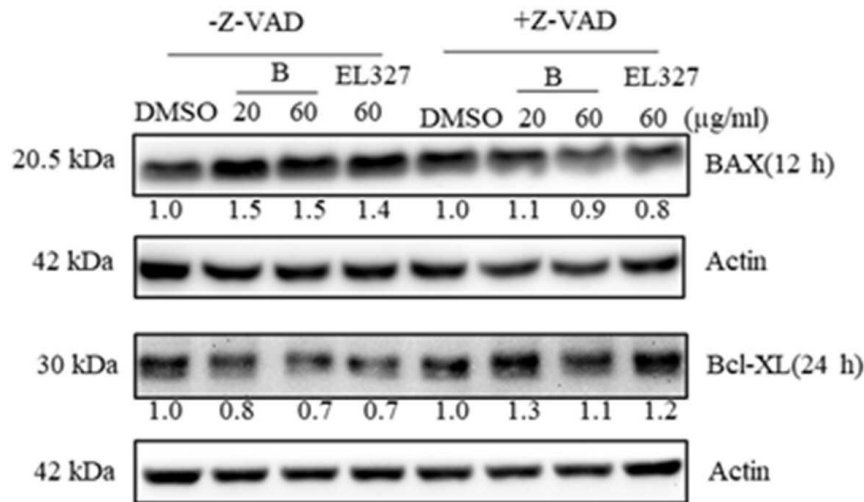
도면17



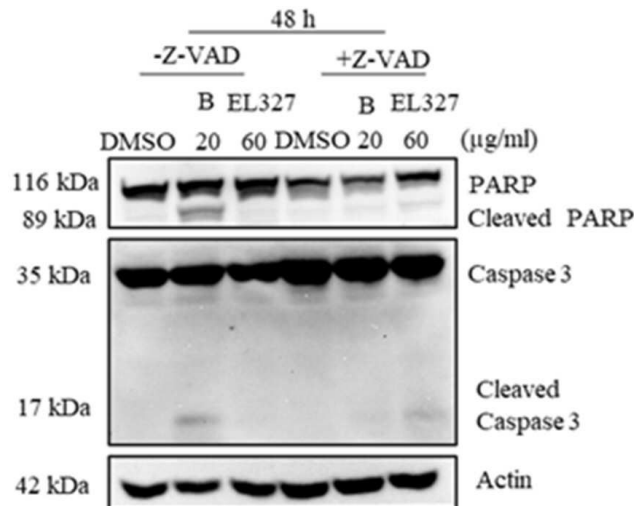
도면18



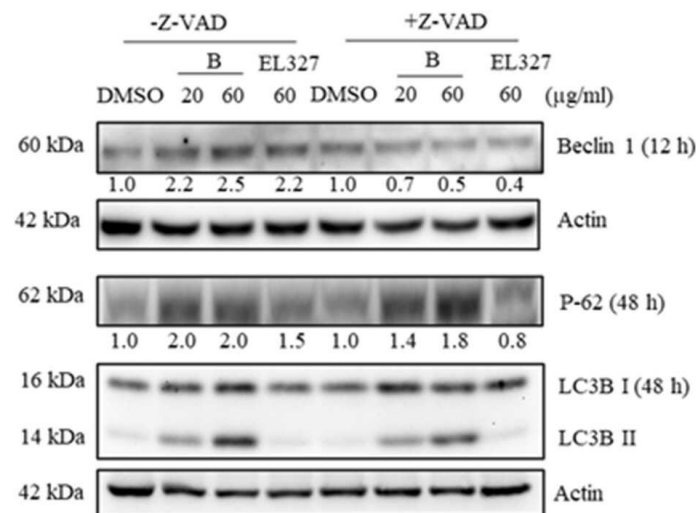
도면19



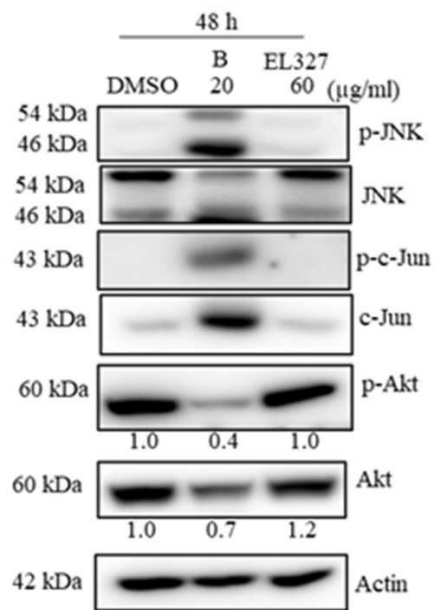
도면20



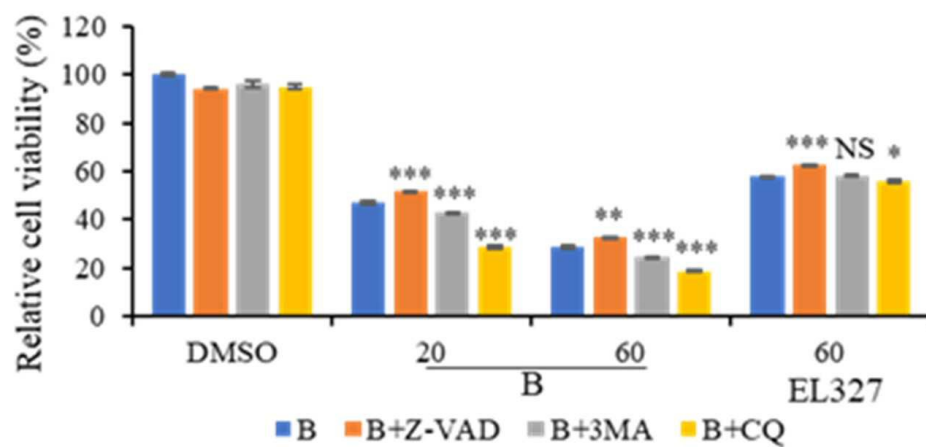
도면21



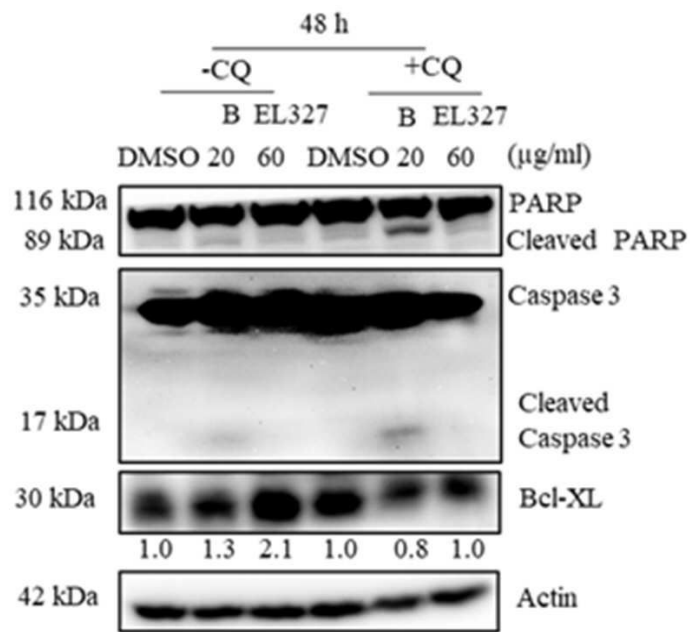
도면22



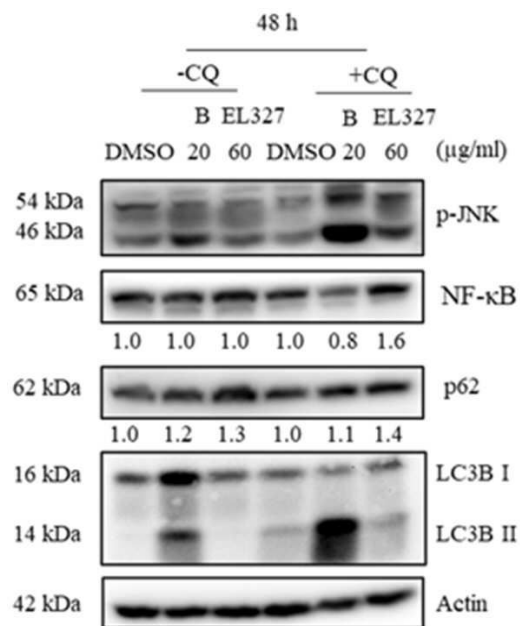
도면23



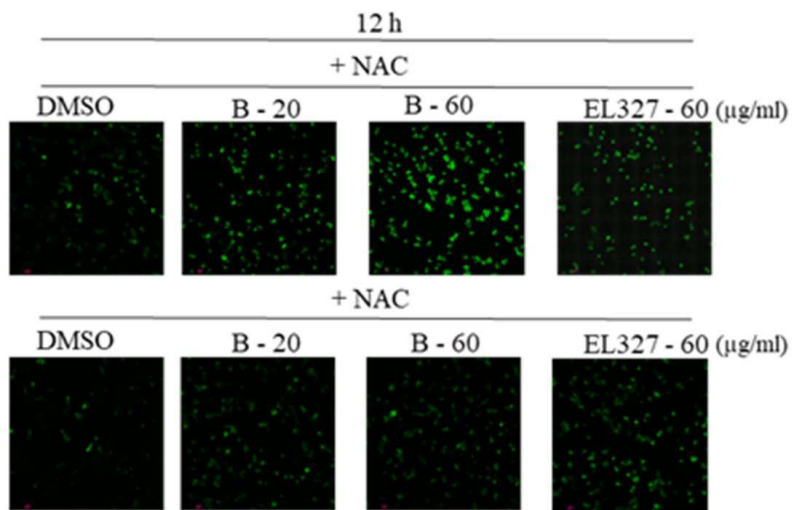
도면24



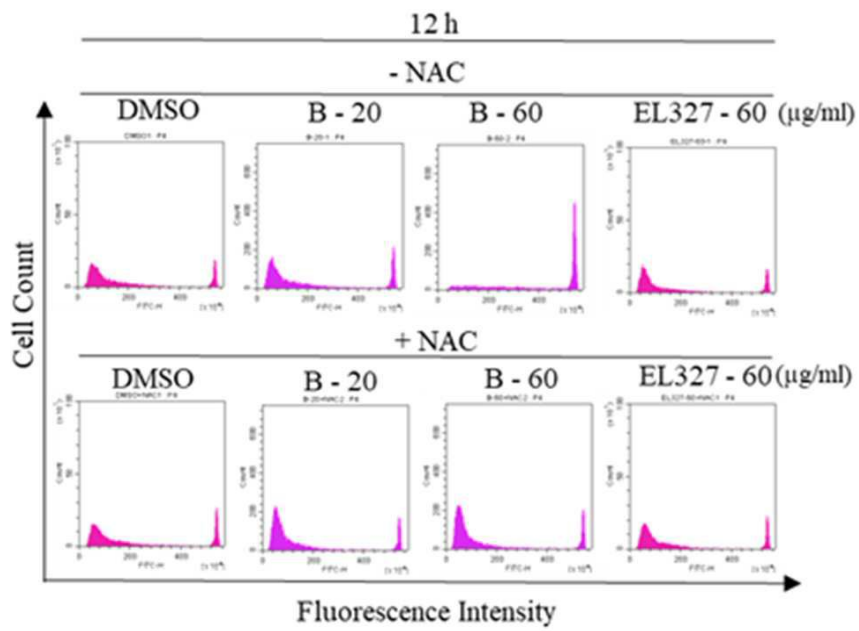
도면25



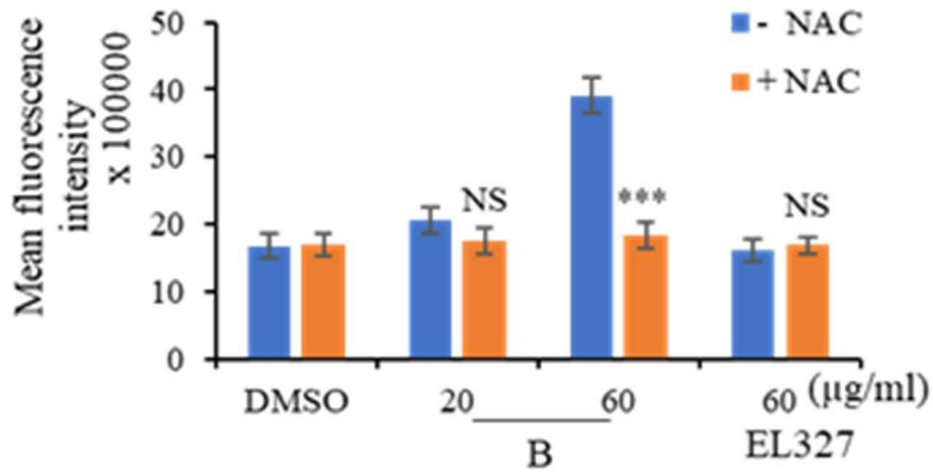
도면26



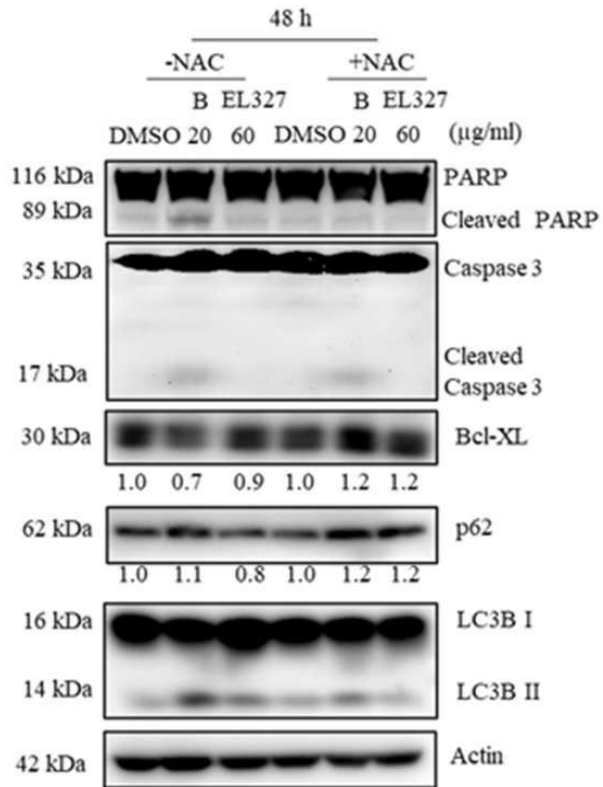
도면27



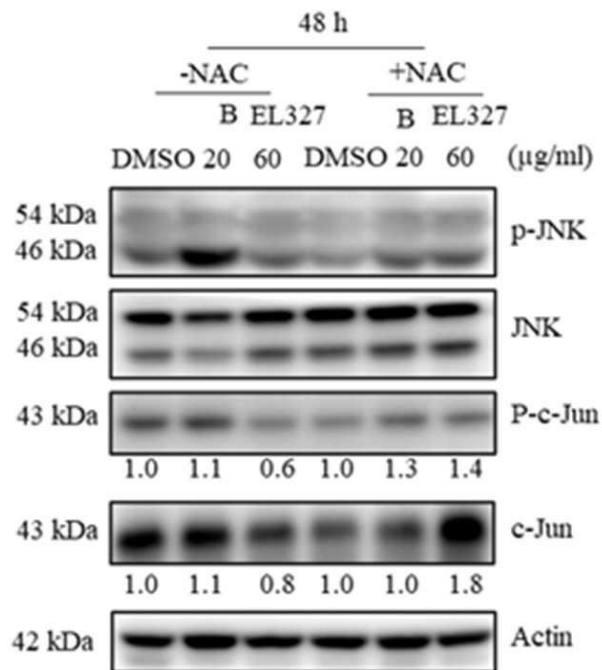
도면28



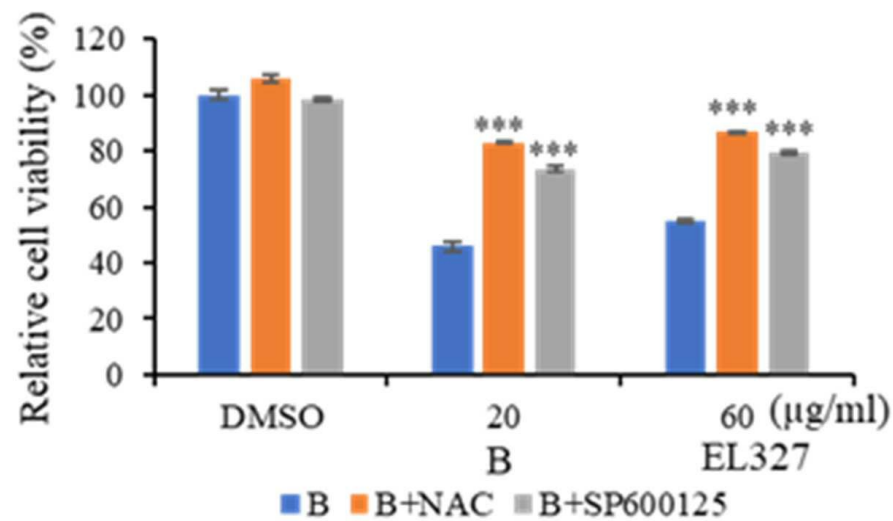
도면29



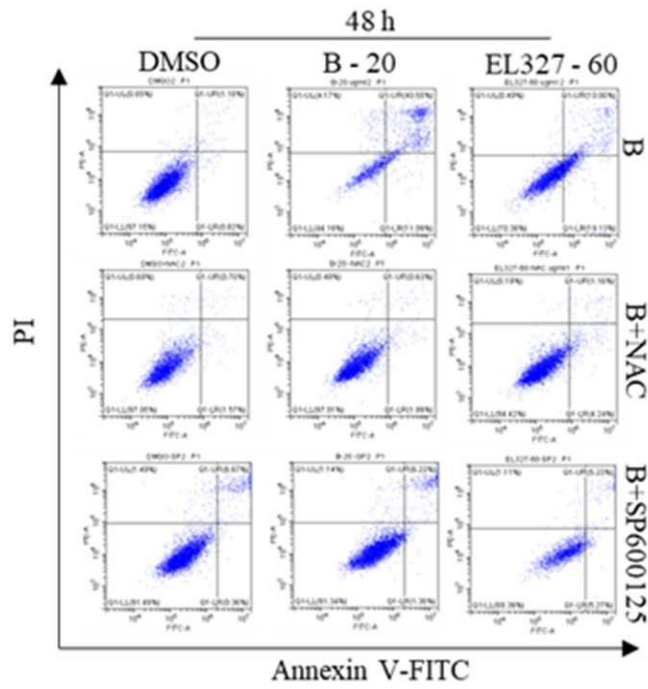
도면30



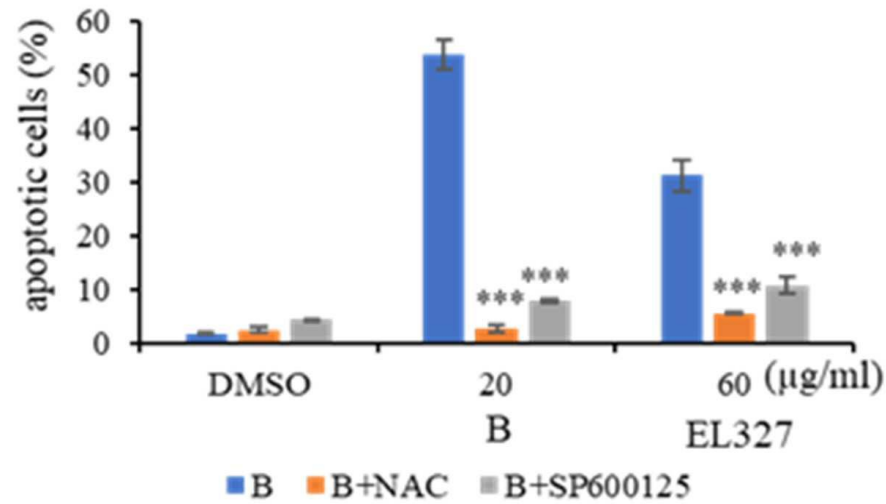
도면31



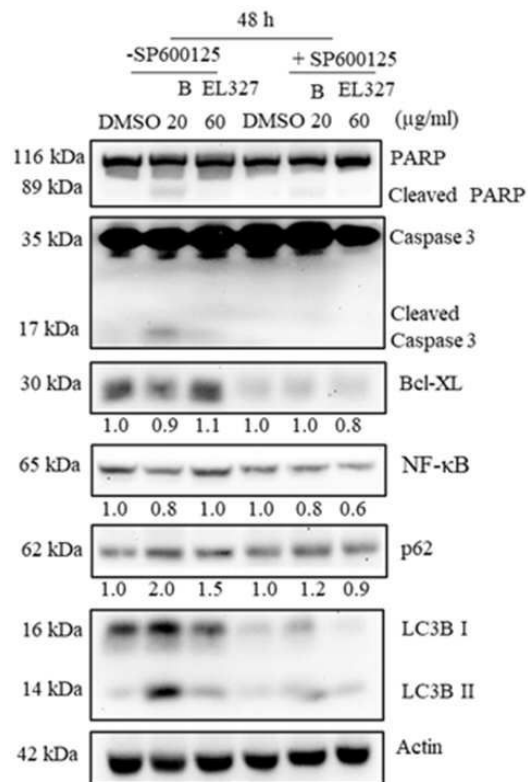
도면32



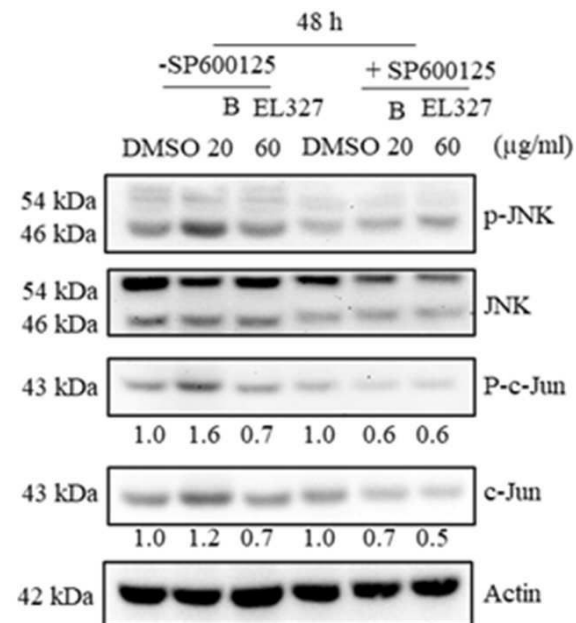
도면33



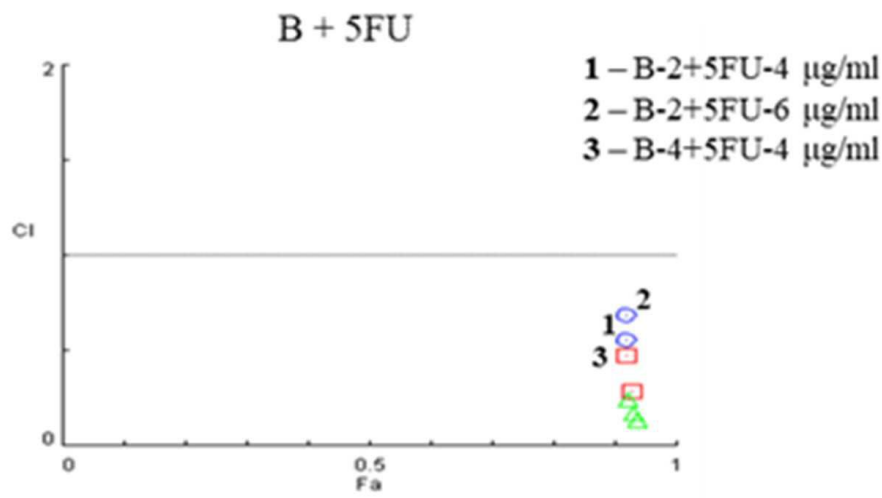
도면34



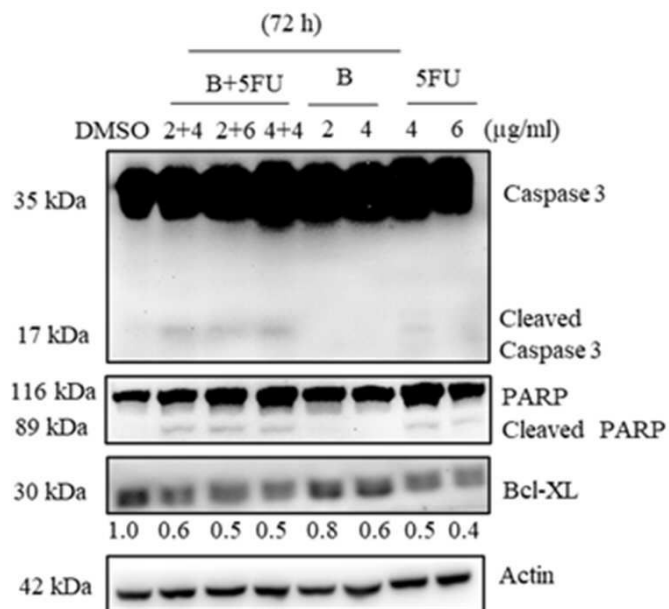
도면35



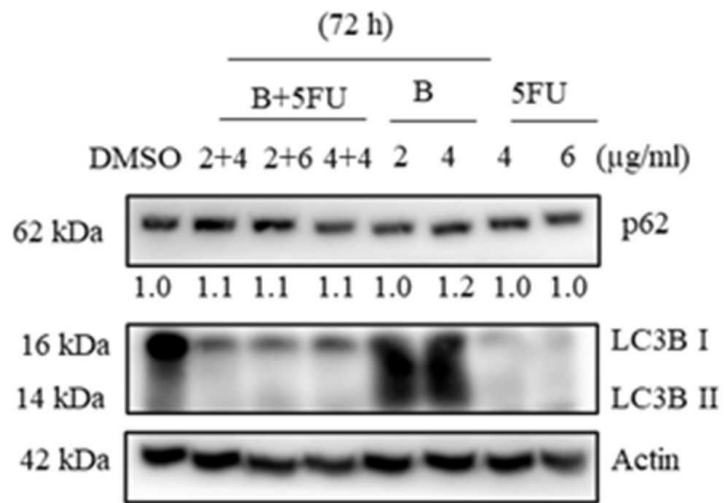
도면36



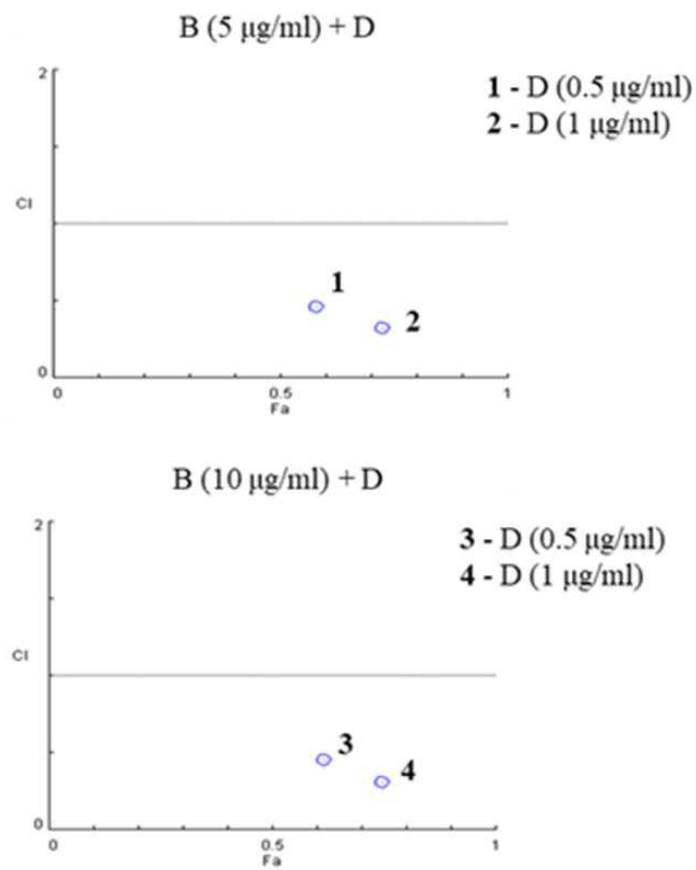
도면37



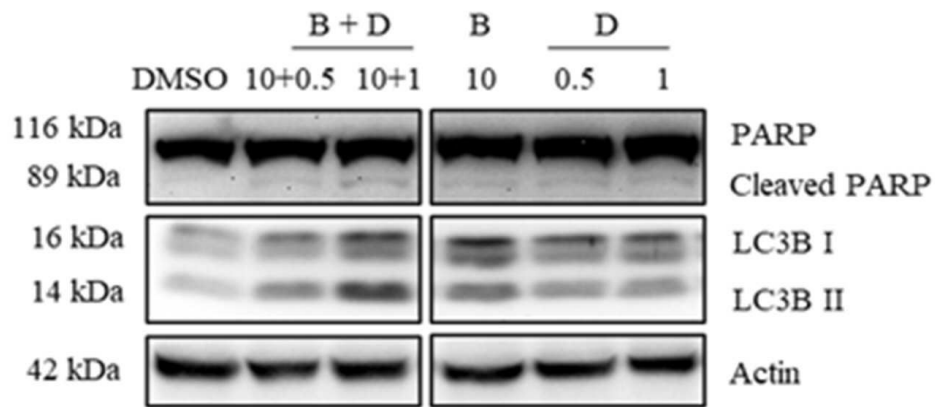
도면38



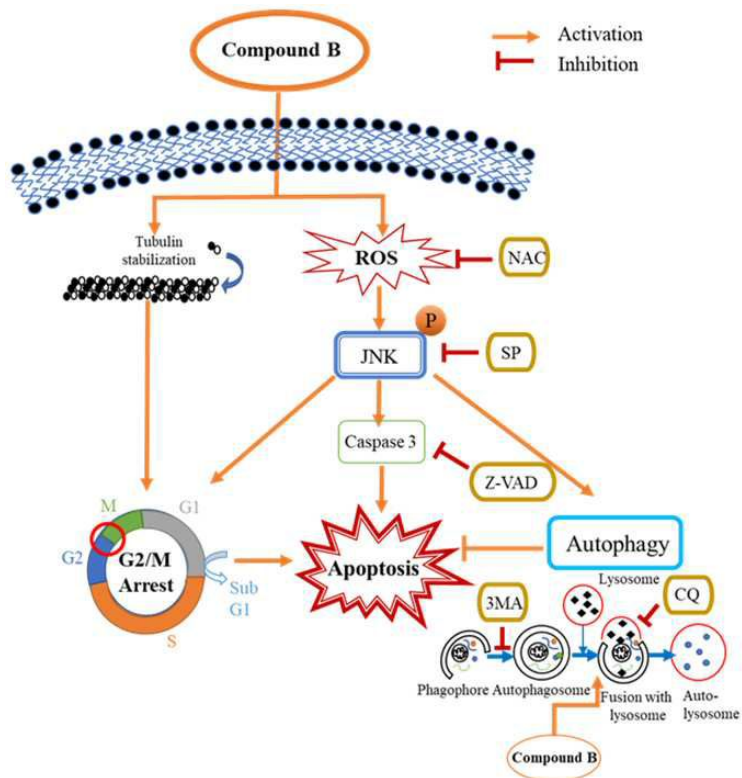
도면39



도면40



도면41



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.