(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0086852
(43) 공개일자 2021년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 31/4985* (2006.01) *A61K 31/337* (2006.01)
*A61K 31/4745* (2006.01) *A61K 31/513* (2006.01)
*A61K 31/538* (2006.01) *A61K 31/555* (2006.01)
*A61K 31/704* (2006.01) *A61K 31/7068* (2006.01)
*A61K 33/243* (2019.01) *A61K 45/06* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 31/4985* (2013.01)
*A61K 31/337* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0178981
(22) 출원일자 2019년12월31일
심사청구일자 2019년12월31일

(71) 출원인
**이화여자대학교 산학협력단**
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
**가천대학교 산학협력단**
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
(72) 발명자
**문창모**
서울특별시 서초구 신반포로 270, 137동 902호(반포동, 반포자이아파트)
**서승용**
인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 901동 1303호(송도동, 더샵 엑스포)
**조민경**
서울특별시 노원구 마들로 59, 7동 406호(월계동, 월계미성아파트)
(74) 대리인
**특허법인 무한**

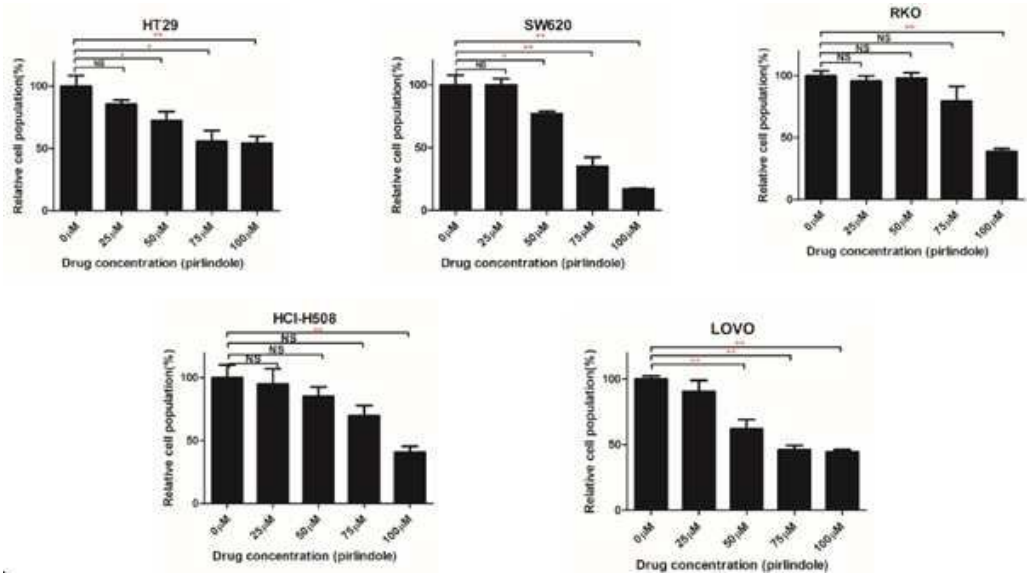
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **펄린돌을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 약학적 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 포함하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물 및 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 함유하는 항암제 보조용 약학적 조성물로서, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항암제 또는 표적치료제와 병용 투여되는, 항암제 보조용 약학적 조성물에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*A61K 31/4745* (2013.01)
*A61K 31/513* (2013.01)
*A61K 31/538* (2013.01)
*A61K 31/555* (2013.01)
*A61K 31/704* (2013.01)
*A61K 31/7068* (2013.01)
*A61K 33/243* (2019.01)
*A61K 45/06* (2013.01)
*A61P 35/00* (2018.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 포함하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 대장암의 항암제 내성을 억제하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 암 줄기세포의 침윤(invasion)을 억제하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 암 줄기세포의 증식을 억제하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항암제는 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물.

### 청구항 6

펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 함유하는 항암제 보조용 약학적 조성물로서,

옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항암제 또는 표적치료제와 병용 투여되는, 항암제 보조용 약학적 조성물.

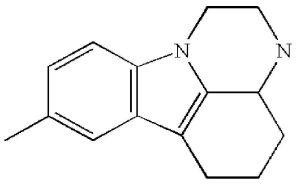
## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0003] 펄린돌((2,3,3a,4,5,6-hexahydro-8-methyl-1H-pyrazino[3,2,1-jk]carbazole)은 모노아민 산화효소 A (Monoamine Oxidase A, MAO-A)에 대해 선택적이고 가역적인 억제 효과로 항우울제로 사용되어온 약물이며, 하기의 화학식의 구조를 갖는다.

[0004] 

[0005] 펄린돌은 광범위한 1차 통과효과(first pass effect)로 인해 20~30 %의 절대 생체 이용률(bioavailability)을 갖는다. 또한, 급성 및 만성 독성 연구에 따르면 일반적인 복용량에서 잠재적인 약물 위험성을 나타내지 않았고, 측정 가능한 변이원성, 염색체이상유발성 또는 발암성을 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0006] 현재, 암을 치료하는 방법은 크게 수술, 방사선 치료, 항암화학요법, 그리고 생물학적 치료법 등으로 나눌 수 있다. 이 중 수술이나 방사선치료가 용이하지 않는 환자(전체 암 사례의 약 50%)와, 이미 암이 전이된 환자들은 주로 화학요법으로 치료한다. 항암화학요법에 사용되는 약제의 경우 다양한 종류의 암세포주 및 동물 종양 모델을 이용한 효능평가를 통해 항암효과를 갖는 성분을 분리해내기 위한 노력이 계속되고 있다. 암의 전이 예방에 대한 항암화학요법의 연구도 활발히 진행되어 암의 확산 및 전이 방지에 관여하는 angiostatin 등이 개발되었다. 이렇듯 항암화학요법제는 점점 더 많이 개발되고 아울러 처치하는 요법도 복잡해지고 있지만 아직까지 만족할 만한 효과적인 치료법은 나타나고 있지 않다.

[0007] 항암화학요법을 이용한 암치료에 있어서 장애가 되는 요소 중의 하나는 항암제 내성이다. 암환자에 대한 항암화학요법이 성공하기 위해서는 정상조직이 살아남을 수 있는 혈중농도에서 환자는 부작용을 감수할 수 있어야 하고 암세포는 사멸해야 한다. 그러나 항암제를 지속적으로 투여하는 경우 항암제에 대한 약제 내성은 암세포를 죽일 수 있는 혈중농도에 도달할 수 있는 양의 항암제를 투여했음에도 불구하고 암세포가 죽지 않는 경우가 발생하는데, 이를 항암제 내성이라고 한다.

[0008] 항암화학요법에서 항암제에 대한 내성의 발현은 암 치료의 중대한 장애요소로 남아있으며, 한가지 약제에 대해 내성이 생긴 세포는 작용부위나 작용기작이 상이한 다른 종류의 약제에 대해서도 교차 내성이 발생하는 경우가 많아 항암치료 실패의 주요한 원인이 되고 있다. 이러한 항암제에 대한 내성의 발현은 치료의 중대한 장애요소로 남아있으며, 암세포에 대한 내성 기작의 연구는 전 세계적으로 그 중요성이 점차로 증가하는 추세에 있으며, 암세포에 대한 다양한 분자생물학적, 생화학적 정보들이 밝혀지고 있으나, 아직까지 암세포의 약제내성 기작에 대한 이해는 초기단계를 벗어나지 못하고 있는 실정이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Bruhwyler J, Liegeois J F, Geczy J, Pharmacol Res. 1997 July; 36(1):23-33

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 펄린돌이 농도 의존적으로 암세포의 증식을 억제하고, 항암제 내성에 중요한 역할을 하는 암줄기세포의 침윤(invasion)을 억제하는 사실을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 펄린돌을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은, 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 함유하는 항암제 보조용 약학적 조성물로서, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항암제 또는 표적치료제와 병용 투여되는, 항암제 보조용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

## 과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 포함하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물이 제공된다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 대장암의 항암제 내성을 억제할 수 있다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 암 줄기세포의 침윤(invasion)을 억제할 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 암 줄기세포의 증식을 억제할 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 항암제는 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 함유하는 항암제 보조용 약학적 조성물로서, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항암제 또는 표적치료제와 병용 투여되는, 항암제 보조용 약학적 조성물이 제공된다.

## 발명의 효과

[0022] 본 발명의 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 포함하는 항암제 내성 억제용 약학적 조성물은 암 줄기세포의 증식 및 침윤을 억제함으로써, 항암제 내성, 암 재발 및 전이를 억제하는 효과를 가진다.

[0023] 또한, 본 발명의 조성물은 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈(capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel) 등의 항암제 또는 표적치료제와 병용 투여되어 암 세포 또는 항암제 내성을 갖는 암세포의 약물 내성을 억제하고, 치료제의 항암 효과를 증진시킬 수 있다.

[0024] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

## 도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 대장암 세포주(HT29, SW629, RKO, NCI-H508 및 LOVO)에 펄린돌을 0, 25, 50, 75, 100㎛M로 72h 동안 처리한 경우 세포 생존율을 CCK-8 분석법으로 측정한 것이다.

도 2는 HT29 세포주에 각각 0, 5, 10, 20㎛M 농도의 펄린돌을 72시간 처리한 후 암 줄기세포의 비율을 CD44, CD133로 확인한 것이다.

도 3은 RKO 세포주에 각각 0, 5, 10, 20㎛M 농도의 펄린돌을 72시간 처리한 후 암 줄기세포의 비율을 CD44,

CD133로 확인한 것이다.

도 4는 LOVO 세포주에 각각 0, 5, 10, 20μM 농도의 펄린돌을 72시간 처리한 후 암 줄기세포의 비율을 CD44, CD133로 확인한 것이다.

도 5는 NCI-H508 세포주에 각각 0, 5, 10, 20μM 농도의 펄린돌을 72시간 처리한 후 암 줄기세포의 비율을 CD44, CD133로 확인한 것이다.

도 6는 HT29 세포의 스페로이드에 0, 5, 10μM 농도의 펄린돌을 48시간 처리한 후 0μM를 기준으로 하여 침윤 감소 정도를 비교한 것이다.

도 7은 RKO 세포의 스페로이드에 0, 5, 10μM 농도의 펄린돌을 48시간 처리한 후 0μM를 기준으로 하여 침윤 감소 정도를 비교한 것이다.

도 8은 HT29 세포주에 5FU(2μM), 5FU(2μM) 및 펄린돌(5μM)을 72시간 동안 처리한 후 암 줄기세포 마커인 CD44, CD133의 발현을 통해 암 줄기세포의 비율을 비교한 것이다.

도 9은 RKO 세포주에 5FU(2μM), 5FU(2μM) 및 펄린돌(5μM)을 72시간 동안 처리한 후 암 줄기세포 마커인 CD44, CD133의 발현을 통해 암 줄기세포의 비율을 비교한 것이다.

도 10은 5FU에 내성을 갖는 HT29세포주 구축한 뒤, 5FU 내성이 없는 parent cell과 암 줄기세포 마커인 CD44, CD133의 발현을 통해 암 줄기세포의 비율을 비교한 것이다.

도 11은 구축된 5FU에 내성을 갖는 HT29세포주에 펄린돌을 72시간 동안 처리한 후 암 줄기세포 마커인 CD44, CD133의 발현을 통해 암 줄기세포의 비율을 비교한 것이다.

도 12는 HT29 세포주에 펄린돌(5μM)을 72시간 동안 처리한 후, HT29세포, 세포의 핵 및 세포질로부터 분리된 단백질에 대해 웨스턴 블롯팅을 수행하여 시그널을 확인한 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0027] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0028] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0029] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0030] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0031] 본 발명자들은 종래에 항우울제로 사용되어 온 펄린돌(Pirlindole)이 암 세포, 특히 대장암 세포주에서 암 줄기세포의 증식 및 침윤(invasion) 억제 효과를 나타낸다는 것을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

[0032] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펄린돌(pirlindole)을 유효성분으로 포함하는, 항암제 내성 억제용 약학적 조성물이 제공된다.

[0033] 이하 실시예에 기재된 In vitro 실험 결과에 따르면, 펄린돌(pirlindole)은 그 농도를 증가시키는 경우 농도 의존적으로 암 줄기세포를 선택적으로 감소시키고, 암 줄기세포의 침윤 또한 억제시키는 것을 확인할 수 있다. 또한, 항암제와 병용투여 시, 일반 암 세포뿐만 아니라 항암제에 내성을 갖는 암 세포에 대한 약물 내성을 억제

할 수 있다.

[0034] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 암세포의 항암제 내성을 억제하는 데 유용하게 이용될 수 있으며, 특히 대장암의 항암제 내성을 억제할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물은 펄린돌을 단독으로 함유하거나, 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제, 방부제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

[0036] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유 도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또 한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안 정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제 가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸 -또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습 윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현택제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있으며, 예를 들어 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여 방법으로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하또는 직장내 투여일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 요법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 이는 제제화 방법, 투여경로 치료횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 증상, 투여시간 및 방법 등 다양한 요인들을 고려하여 결정될 수 있다. 이러한 점을 고려할 때, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 있어 특별히 제한되지 아니한다.

[0043] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 25μM 이하에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 세포 독성이 적고, 암 줄기세포의 증식과 침윤을 억제하므로, 항암제 내성, 암세포의 전이 및 암 재발을 방지하고, 암 치료 효과를 증대시키기 위해 항암제 또는 표적치료제와 병용 투여될 수 있으며, 항암제 또는 표적치료제와 동시에 투여되거나 순차적으로 투여될 수 있다.

[0044] 병용 투여되는 항암제로는 옥살리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸 (irinotecan), 독소루비신(Doxorubicib), 시스플라틴 (Cisplatin), 5-플루오로유라실 (5-FU, 5-fluorouracil), UFT (tegafur-uracil), 카페시타빈 (capecitabine), 닥티노마이신 (Dactinomycin) 및 도세탁셀 (docetaxel) 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 대장암 치료에 쓰이는 항암제는 어느 것이든 이용 가능하다.

[0045] 또한, 상기 표적치료제로는 베바시주맙(Bevacizumab), 세툭시맙(Cetuximab), 레고라페닙(Regorafenib)을 예로

들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **실시예 1. 대장암 세포의 생존율 감소 효과**

[0051] 대장암 세포주인 HT29, SW620, RKO, NCI-H508 및 LOVO 세포주(HT29, SW620, RKO, NCI-H508, LOVO: 한국세포주은행)각각을 96well plate에 5000 cell/well로 세포를 깔아준 뒤, 하루 동안 세포를 안정화시켰다. 안정화시킨 각 well에 펄린돌을 0, 25, 50, 75, 100μM의 농도로 72h 동안 처리하였다. 그 다음, CCK-8 용액을 더하여 2시간 동안 배양하였다. 이어서, 각 배양 well의 광학 밀도를 450 nm에서 측정하고, 그 결과를 도 1에 나타냈다.

[0052] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, HT29 세포주의 경우, 100μM의 펄린돌을 처리한 경우 세포 생존율이 54.13%로 나타나 IC50에 도달하지 않았고, RKO세포주는 세포 생존율이 75μM의 펄린돌 처리 시 79.60%, 100μM의 펄린돌 처리 시 38.70%로 75μM에서 세포 생존율 감소가 크지 않았으며, IC50은 75~100μM 사이로 추정할 수 있었다. SW620 세포주의 경우에도 세포 생존율이 50μM의 펄린돌 처리 시 77.10%, 75μM의 펄린돌 처리 시 34.87%로 나타나 50μM에서 세포 생존율이 크게 감소하지 않았고, IC50은 50μM에서 75μM 사이로 추정되었다. NCI-H508 세포주의 경우 세포 생존율이 75μM의 펄린돌 처리 시 69.75%, 100μM의 펄린돌 처리 시 40.70%이었고, LOVO 세포주는 50μM의 펄린돌 처리 시 61.95%, 75μM의 펄린돌 처리 시 46.04%이었다.

[0053] 상기 결과를 종합해 볼 때, 세포 생존율은 펄린돌의 농도가 증가할수록 감소하나, 고농도의 펄린돌을 처리한 경우에도 크게 감소하지 않았으므로, 펄린돌의 세포 독성이 적음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로, 이하의 실시예에서는 각 세포주의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 25μM 이하의 농도로 실험을 진행하였다.

[0055] **실시예 2. 펄린돌의 암 줄기세포 억제 효과**

[0056] HT29, RKO 및 LOVO 세포주 각각을 $2.5X10^5$ cell/60πdish로 씨딩하고, 하루 동안 안정화시킨 후, 펄린돌을 0, 5, 10, 20μM의 농도로 72h 동안 처리하였다. 다음으로, 암 줄기세포의 마커인 CD44, CD133 항체 (CD44 antibody: BD biosciences, CD133 antibody: Miltenyi biotec)를 이용하여 각 세포주의 암 줄기세포 비율을 확인하고, 그 결과를 도 2 내지 5에 나타냈다.

[0057] HT29 세포주에서 CD44, CD133를 모두 발현하는(double positive) 암 줄기세포의 비율은 0μM에서 24.5%, 5μM에서 9.192%, 10μM에서 7.258%, 20μM 7.160%로 나타나, 처리한 펄린돌의 농도가 증가할수록 감소하는 양상을 나타냈다. 한편, 펄린돌의 농도가 5μM 이상인 경우에는 암 줄기세포의 비율이 크게 감소하지 않았다(도 2)

[0058] RKO 세포주에서는 CD44, CD133를 모두 발현하는(double positive) 암 줄기세포의 비율이 0μM에서 21.50%, 5μM에서 3.86%, 10μM에서 3.58%, 20μM 3.57%로 나타나, 처리한 펄린돌의 농도가 증가하였고, 펄린돌의 농도가 5μM 이상인 경우에는 암 줄기세포의 비율이 크게 감소하지 않았다(도 3).

[0059] LOVO 세포주에서는 CD44, CD133를 모두 발현하는(double positive) 암 줄기세포의 비율이 0μM에서59.57%, 5μM에서 38.92%, 10μM에서 38.78%, 20μM 37.15%로 나타나, 처리한 펄린돌의 농도가 증가하였고, 펄린돌의 농도가 5μM 이상인 경우에는 암 줄기세포의 비율이 크게 감소하지 않았다(도 4).

[0060] NCI-H508 세포주에서는 CD44, CD133를 모두 발현하는(double positive) 암 줄기세포의 비율이 0μM에서 27.24%, 5μM에서 17.08%, 10μM에서 15.58%, 20μM 14.32%로 나타나, 처리한 펄린돌의 농도가 증가하였고, 펄린돌의 농도가 5μM 이상인 경우에는 암 줄기세포의 비율이 크게 감소하지 않았다(도 5).

[0062] **실시예 3. 펄린돌의 암 줄기세포 침윤 억제 효과**

[0063] HT29 및 RKO 세포주에서 각각 1X10$^5$cell을 METHOCEL 20%, Matrigel 1%인 배지에서 48시간 동안 행잉 드롭(hanging drop) 방법으로 스페로이드를 형성하였다. 48시간 뒤 매트리겔과 콜라겐을 1:1로 섞은 매트릭스에 스페로이드를 심고, 각 스페로이드에 펄린돌을 0, 5, 10㎛M의 농도로 처리하여 48시간 경과 후 사진을 촬영하고 0㎛M를 100%로 하여 침윤 정도를 비교하였다.

[0064] 그 결과, 도 6 및 도 7 나타낸 바와 같이 HT29 세포의 스페로이드에서 침윤 정도가 펄린돌 농도 5㎛M에서 90.26%, 10㎛M에서 77.48%로 감소하고, RKO 세포의 스페로이드에서는 펄린돌 농도 5㎛M에서 97.01%, 10㎛M에서 86.21%로 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0066] **실시예 4. 펄린돌과 항암제 병용 투여에 의한 약물 내성 억제 효과**

[0067] 4-1. 일반 암세포주

[0068] HT29 및 RKO 세포주를 2.5X10$^5$ cell/60πdish로 씨딩하고, 하루 동안 안정화시킨 후, 5FU(2㎛M)를 단독으로 처리한 세포, 5FU(2㎛M)와 펄린돌(5㎛M)을 병용 처리한 세포로 나누어 실험하였다. 72시간 경과 후, 세포를 떼어 암 줄기세포의 마커인 CD44, CD133 항체 (CD44 antibody: BD biosciences, CD133 antibody: Miltenyi biotec)를 이용하여 각 세포주의 암 줄기세포 비율의 변화를 유세포분석기로 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, HT229 세포주에서, 5FU와 펄린돌을 처리하지 않은 대조군 세포의 암 줄기세포 비율은 평균 29.95%였고, 5FU를 단독으로 처리한 세포에서는 평균 41.99%으로 나타나 암 줄기세포의 비율이 증가한 것으로 나타났다. 그러나, 5FU와 펄린돌을 병용 처리한 세포의 경우, 암 줄기세포의 비율이 32.38%로 감소하였다.

[0070] RKO 세포의 경우에도, 대조군 세포에서는 암 줄기세포의 비율이 25.95%였으나, 5FU를 단독으로 처리한 세포에서는 59.76%로 급증하였고, 5FU와 펄린돌을 병용 처리하면 44.89%로 감소한 것이 확인되었다(도 9).

[0072] 4-2. 항암제 내성 암세포주

[0073] HT29 세포주에 5-FU를 0.01㎛M의 농도로 3계대 이상 배양한 후, 0.05㎛M, 0.1㎛M, 0.5㎛M, 1㎛M, 2㎛M까지 점차 5FU의 농도를 높이면서 각 농도마다 3계대 이상 배양하여 항암제 내성 암세포주를 제작하였다. 그 다음, 일반 HT29 세포인 parent 세포와 5-FU항암제 내성 암세포주의 CD44, CD133 발현을 확인한 결과, CD44, CD133를 모두 발현하는(double positive) 세포의 비율이 각각 20.41%과 73.92%로 나타나, 항암제 내성 암세포주의 암 줄기세포 비율이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이로 인하여 5-FU 항암제 내성 암세포주가 만들어진 것을 확인할 수 있었다(도 10).

[0074] 다음으로, 5FU 항암제 내성 암세포주(5FU 항암제 내성 암세포 주는 5FU 2㎛M인 배지에서 계속해서 배양하였다)를 2.5X10$^5$ cell/60πdish로 씨딩하고 하루 동안 안정화시켰다. 이 후, 5FU 항암제 내성 암세포주(5FU resistant cell)에 대해, 5FU와 펄린돌을 5㎛M, 10㎛M의 농도로 병용 처리하고 72시간이 경과한 후 CD44, CD133 항체(CD44 antibody: BD biosciences, CD133 antibody: Miltenyi biotec)를 이용하여 각 세포주의 암 줄기세포 비율의 변화를 유세포분석기로 확인하였다. 그 결과, 5FU 항암제 내성 암세포주의 암 줄기세포 비율은 76.01%, 펄린돌 5㎛M(pirlindole 5㎛M)로 처리한 군에서 49.15%, 펄린돌을 10㎛M(5FU+ pirlindole 10㎛M)로 처리한 군에서 49.80%인 것이 확인되었다(도 11).

[0075] 따라서, 상기 실시예 1 내지 4의 결과는 펄린돌이 항암제와 병용 투여되는 경우, 약물 내성을 일으키는 암 줄기세포를 억제함으로써 항암제 내성을 방지하고 항암제의 항암 치료 효과를 증대시키기 위해 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

[0077] **실시예 5. 펄린돌의 항암제 내성 억제 기전**

[0078] 펄린돌이 약물 내성을 일으키는 암 줄기세포의 증식을 어떻게 억제하는지 그 기전을 규명하기 위해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0079] 구체적으로, 안정화된 HT29 세포에 펄린돌(5㎛M)을 처리하고 72시간 경과한 후 해당 세포를 핵과 세포질로 분리

하여 단백질을 분리하고, 세포 전체에서 단백질을 분리하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 핵에서는 YAP, p-smad2/3을 확인하고, 세포질에서는 smad2/3, 세포 전체에서 분리한 단백질에서는 암 줄기세포 마커인 CD44, CD166를 확인하였다(YAP, p-smad2/3, smad2/3, GAPDH antibody: cell signaling, CD44, CD166 antibody: abcam).

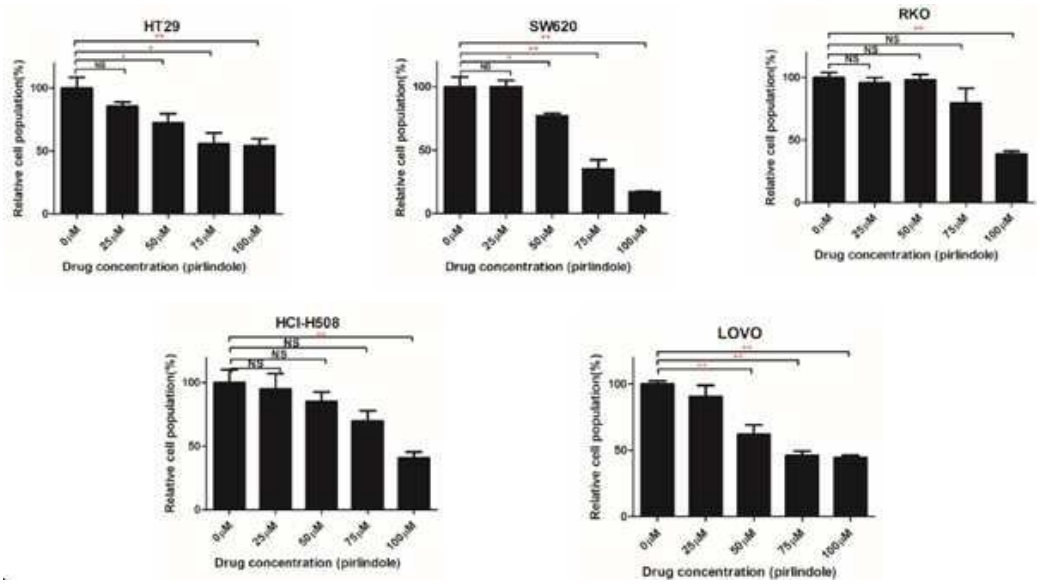
[0080] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 펄린돌이 핵에서 YAP, p-smad2/3 복합체를 억제하고, 그에 따라 암 줄기세포와 관련된 마커의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 펄린돌의 항암제 내성 억제는 YAP, p-smad2/3 복합체의 억제에 의한 것으로 유추할 수 있다.

[0082] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

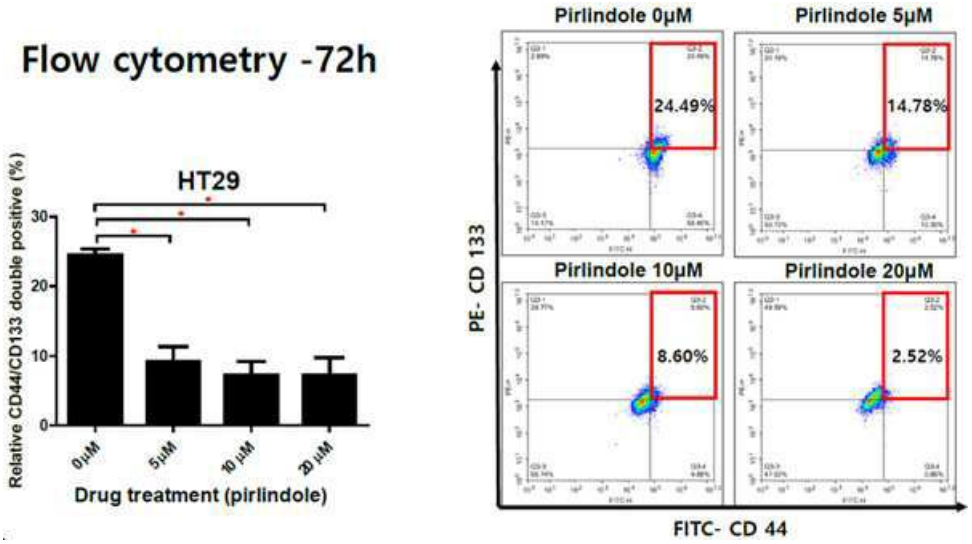
[0083] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

## 도면

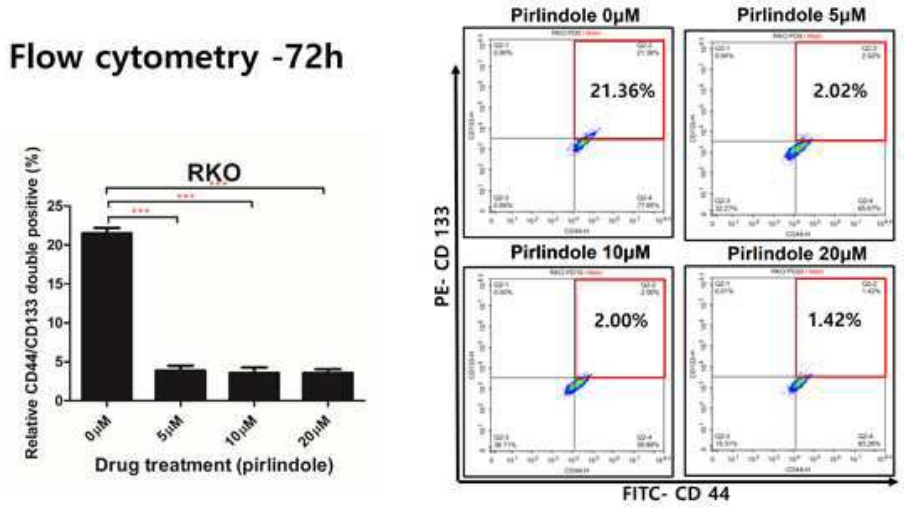
### 도면1



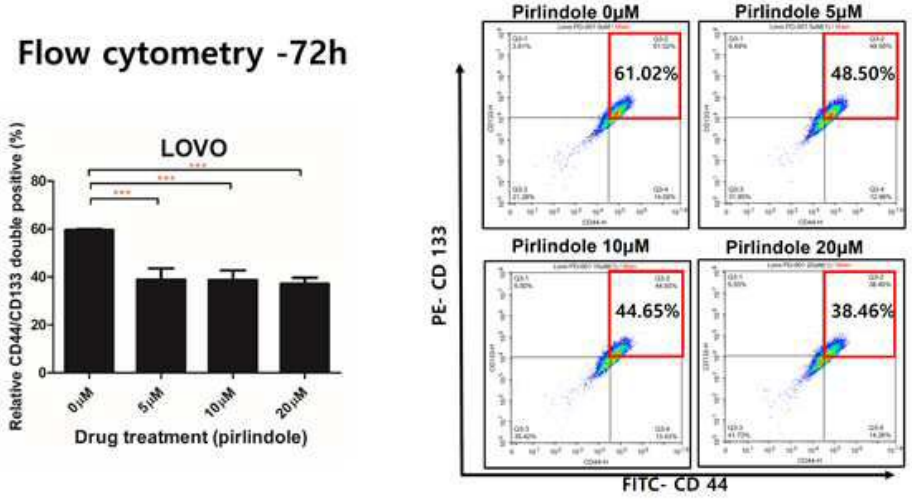
도면2


Flow cytometry -72h
HT29
Relative CD44/CD133 double positive (%)
30
20
10
0
0μM
5μM
10μM
20μM
Drug treatment (pirlindole)
Pirlindole 0μM
Pirlindole 5μM
24.49%
14.78%
Pirlindole 10μM
Pirlindole 20μM
8.60%
2.52%
PE- CD 133
FITC- CD 44

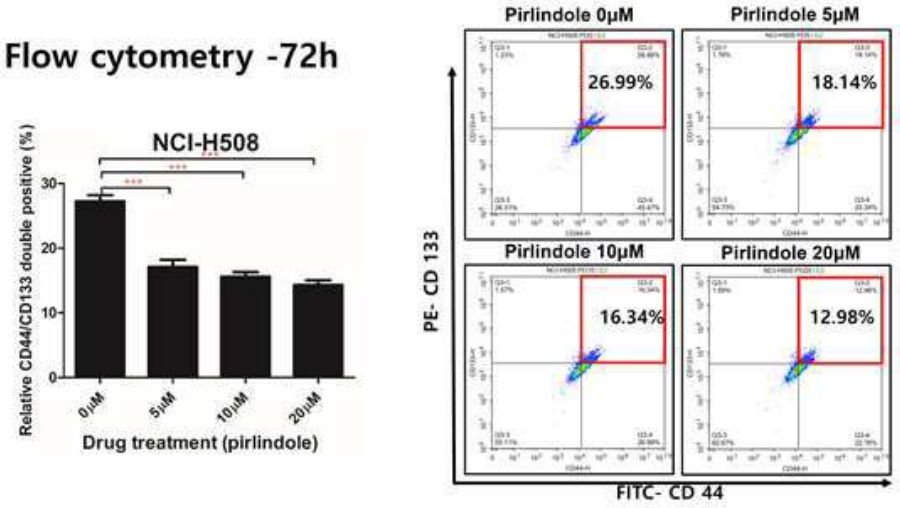
도면3


Flow cytometry -72h
RKO
Relative CD44/CD133 double positive (%)
25
20
15
10
5
0
0μM
5μM
10μM
20μM
Drug treatment (pirlindole)
Pirlindole 0μM
Pirlindole 5μM
21.36%
2.02%
Pirlindole 10μM
Pirlindole 20μM
2.00%
1.42%
PE- CD 133
FITC- CD 44

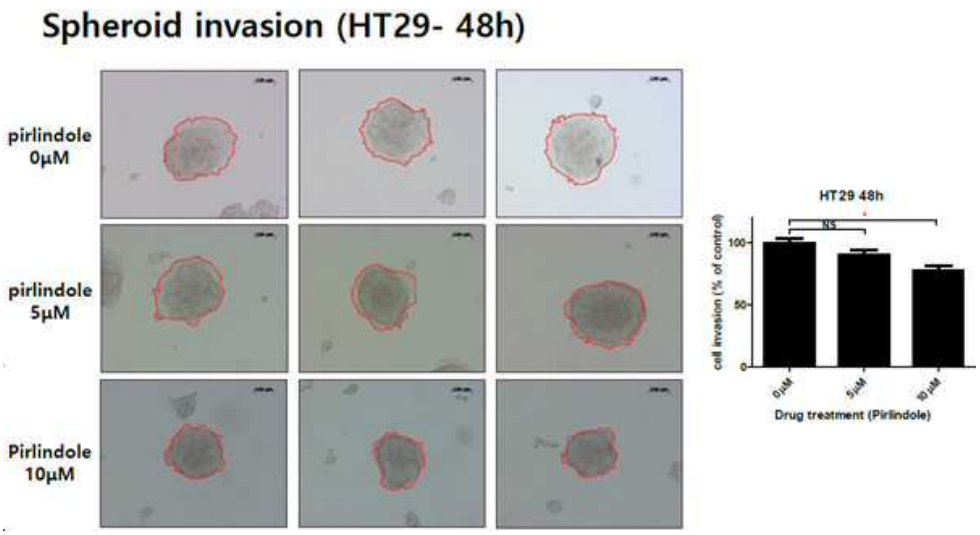
도면4


Flow cytometry -72h
LOVO
Relative CD44/CD133 double positive (%)
80
60
40
20
0
0μM
5μM
10μM
20μM
Drug treatment (pirlindole)
Pirlindole 0μM
Pirlindole 5μM
61.02%
48.50%
Pirlindole 10μM
Pirlindole 20μM
44.65%
38.46%
PE- CD 133
FITC- CD 44

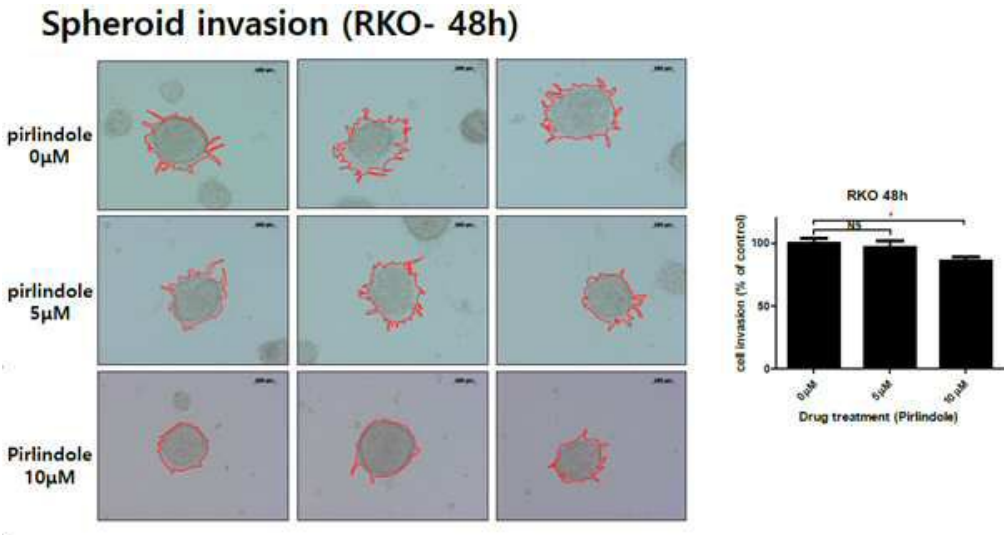
도면5


Flow cytometry -72h
NCI-H508
Relative CD44/CD133 double positive (%)
Drug treatment (pirlindole)
0μM
5μM
10μM
20μM
Pirlindole 0μM
Pirlindole 5μM
Pirlindole 10μM
Pirlindole 20μM
26.99%
18.14%
16.34%
12.98%
PE- CD 133
FITC- CD 44

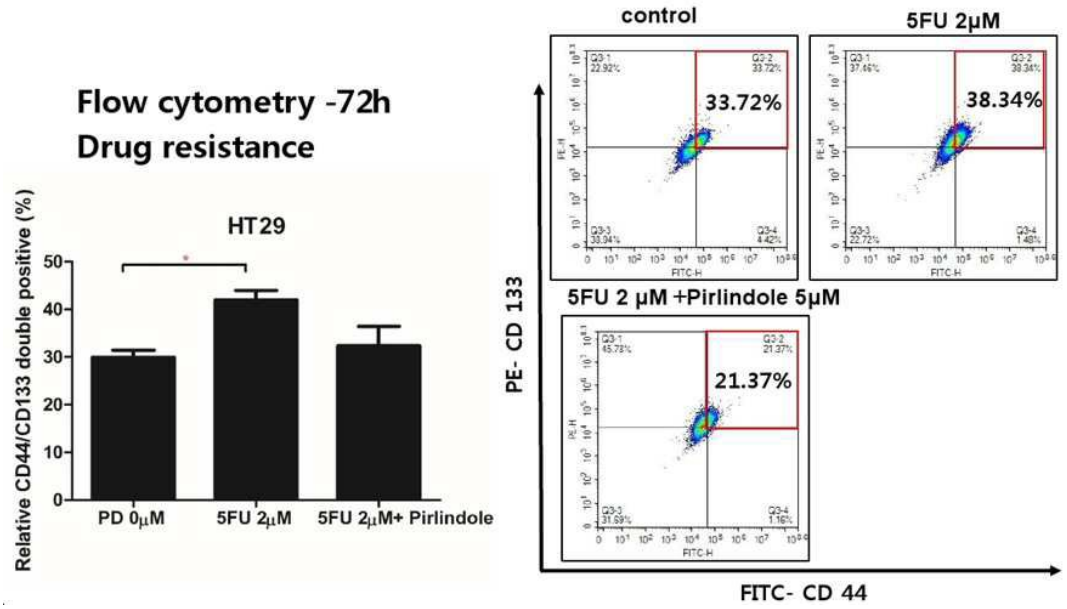
도면6


Spheroid invasion (HT29- 48h)
pirlindole 0μM
pirlindole 5μM
Pirlindole 10μM
HT29 48h
cell invasion (% of control)
Drug treatment (Pirlindole)

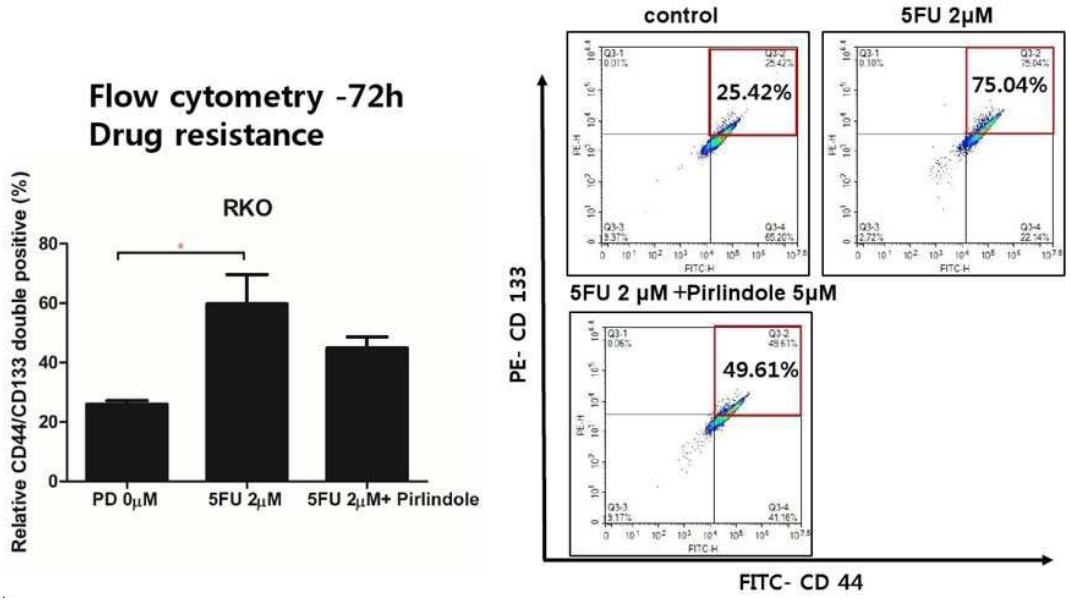
도면7


Spheroid invasion (RKO- 48h)
pirlindole 0μM
pirlindole 5μM
Pirlindole 10μM
RKO 48h
cell invasion (% of control)
Drug treatment (Pirlindole)

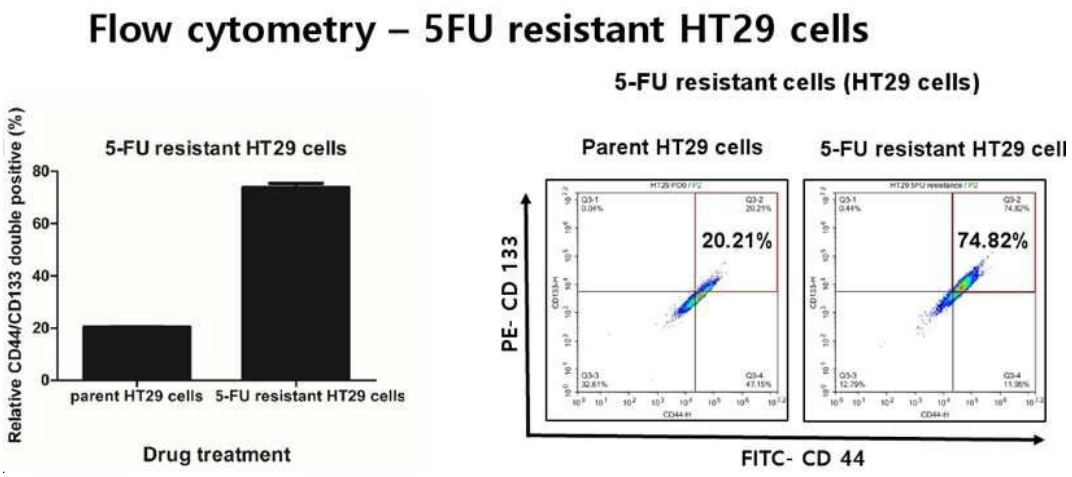
도면8


Flow cytometry -72h
Drug resistance
HT29
Relative CD44/CD133 double positive (%)
50
40
30
20
10
0
PD 0μM
5FU 2μM
5FU 2μM+ Pirlindole
control
5FU 2μM
33.72%
38.34%
5FU 2 μM +Pirlindole 5μM
21.37%
PE- CD 133
FITC- CD 44

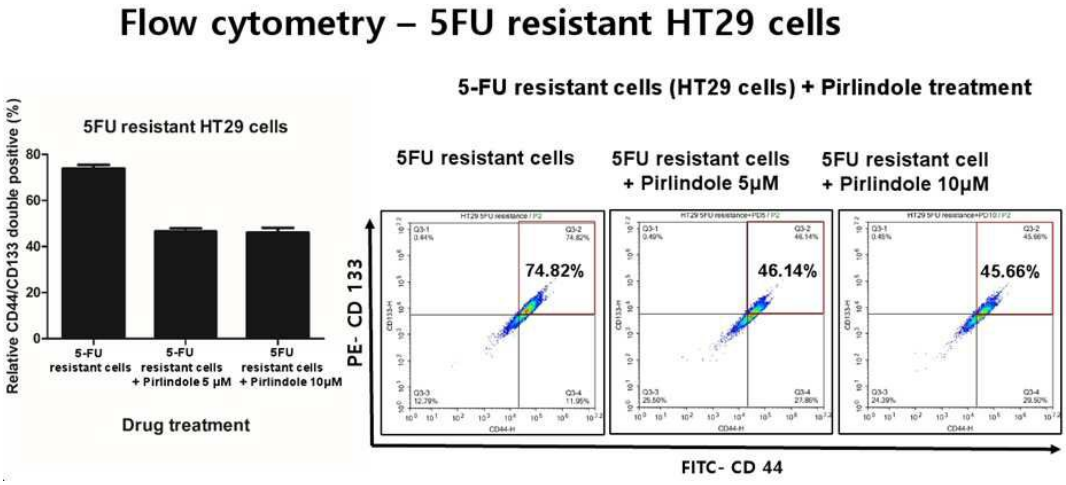
도면9


Flow cytometry -72h
Drug resistance
RKO
Relative CD44/CD133 double positive (%)
80
60
40
20
0
PD 0μM
5FU 2μM
5FU 2μM+ Pirlindole
control
5FU 2μM
25.42%
75.04%
5FU 2 μM +Pirlindole 5μM
49.61%
PE- CD 133
FITC- CD 44

도면10




도면11




도면12

