



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월02일

(11) 등록번호 10-2210800

(24) 등록일자 2021년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/5375 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61K 31/565* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/5375 (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0112473

(22) 출원일자 2019년09월10일

심사청구일자 2019년09월10일

(56) 선행기술조사문헌

Molecular Cancer Therapeutics, Vol. 1,
205~213, January 2002*JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, VOL. 24(7)
2006.03.01., pp. 1052~1056*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

가천대학교 산학협력단

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

박우재

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)

박주원

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)

김신

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 3 항

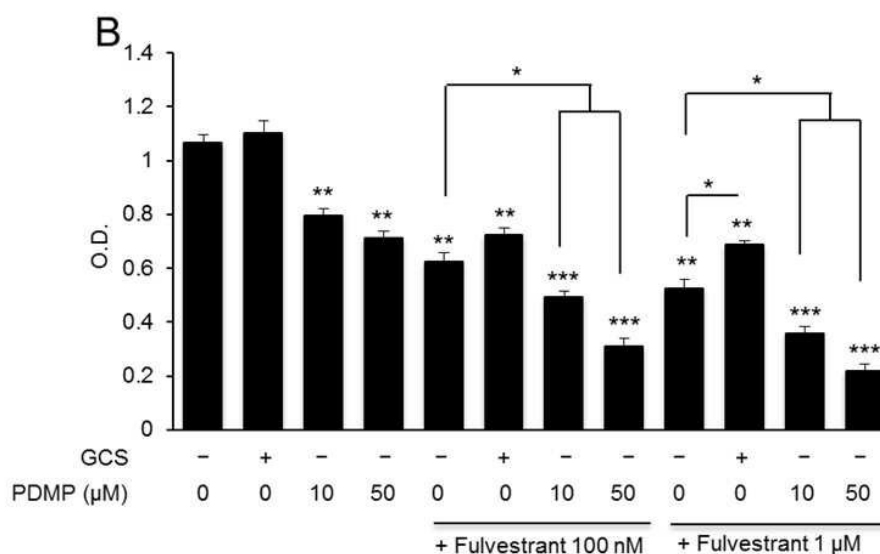
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 글루코실세라마이드 합성효소 억제제를 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 글루코실세라마이드 합성효소 억제제를 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 글루코실세라마이드 합성효소 억제제인 PDMP는 에스트로겐 수용체 분해를 증가시키고, 폴베스트란트(fulvestrant)와 함께 처리한 경우 폴베스트란트에 의한 에스트로겐 수용체 분해 효과 및 세포 사멸 효과를 증대시키므로, 유방암 예방 및 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

A61K 31/565 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345302731
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	스핑고지질 기반 담석 후보 치료제 개발 연구
기 여 율	35/100
과제수행기관명	가천대학교
연구기간	2019.07.01 ~ 2020.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345301743
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	지방조직 리모델링에 미치는 스핑고지질의 역할 규명
기 여 율	35/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2019.07.01 ~ 2019.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345301087
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(1년~5년)
연구과제명	유방암 약물 저항성에 있어서 다양한 세라마이드와 글루코실세라마이드 합성효소, 글루코실세라미다아제의 연계성 규명
기 여 율	30/100
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

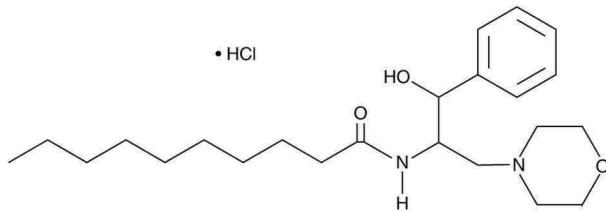
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



이때, 상기 약학적 조성물은 항암제인 풀베스트란트(fulvestrant)와 병용되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 에스트로겐 수용체 분해를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

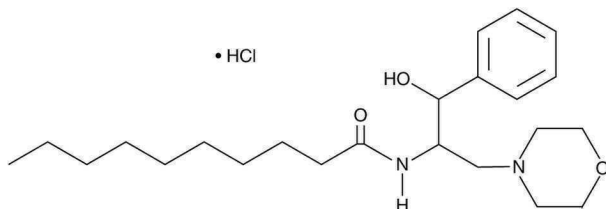
청구항 4

삭제

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 개선 또는 치료용 건강기능식품:

[화학식 1]



이때, 상기 건강기능식품은 항암제인 풀베스트란트(fulvestrant)와 병용되는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 글루코실세라마이드 합성효소 억제제를 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유방암은 2012년 발표된 중앙 암 등록 본부 통계에 따르면, 2010년 대한민국에서 총 14,277 건이 발생되었으며, 전체 암 발생의 7.1%(6위)를 차지하는 수위의 암 중 하나이다. 또한, 여성에서 유방암의 발생 건수는 연 14,208 건으로 여성암 중에서는 2위를 차지하고 있으며, 유방암의 발생 연령대는 40대가 36.2%로 가장 많고, 50대가 28.4%, 60대가 13.7%의 순으로 나타났다. 유방암의 5년 생존률은 0기 암의 경우 100%에 가까우나 4기의 경우 20% 미만에 불과하여, 유방암의 진단 시점 및 그 성격에 따라 다양한 경과를 보인다. 유방암 환자의 40%는 초기에 뼈 전이가 일어나며, 뼈 전이가 일어난 환자의 15%는 병적인 골절이 생긴다. 뼈 전이 또는 척추 전이로 신경학적 이상이 일어나는 경우 심한 통증을 수반하기 때문에 환자들의 삶의 질이 크게 떨어지게 된다.

[0004] 에스트로겐 수용체(Estrogen Receptor, ER)는 표적 조직에서 진행 유전자 발현, 세포 증식 및 분화의 조절에 연관된 스테로이드/핵 수용체 슈퍼패밀리에 속한다. ER은 ESR1 및 ESR2 유전자에 의해 각각 암호화되는 에스트로겐 수용체 알파(ER α) 및 에스트로겐 수용체 베타(ER β)의 두 가지 형태로 존재한다. ER α 및 ER β 는 에스트로겐 호르몬에 의해 활성화되는 리간드-활성화 전사 인자이다. 호르몬의 부재시, ER은 주로 세포의 세포핵에 위치한다. 에스트로겐 호르몬이 ER에 결합할 때, ER은 세포핵으로부터 세포의 핵으로 이동하여 이량체를 형성한 다음 에스트로겐 반응 요소(Estrogen Response Element, ERE)로 불리는 특이적 게놈 서열에 결합한다. DNA/ER 복합체는 공동-조절자와 상호작용하여 표적 유전자의 전사를 조절한다.

[0005] ER α 는 주로 생식 조직, 예를 들어 자궁, 난소, 유방, 골 및 백색 지방 조직에서 발현된다. 비정상 ER α 신호전달은 다양한 질환, 예를 들어 암, 대사 및 심장혈관 질환, 신경변성 질환, 염증 질환 및 골다공증의 발생을 초래한다. ER α 는 정상 유방 상피의 10% 이하에서 발현되지만, 유선 종양의 대략 50 내지 80%에서 발현된다. 높은 수준의 ER α 를 갖는 이러한 유선 종양은 ER α -양성 유선 종양으로 분류된다. 유방암에서 에스트로겐의 병인학적 역할은 잘 확립되어 있고 ER α 신호전달의 조절은 주요 ER α -양성 유선 종양에 대한 유방암 치료의 주축으로 남아있다. ER α 신호 전달은 인슐린 성장인자 수용체(IGFR) 또는 상피 성장인자 수용체(EGFR)와 관련되어 있으며, 이는 mTOR 및 MAP 키나제 신호전달경로를 활성화시킨다. 유방암의 75 %가 ER α 양성이므로, ER α 는 유방암에서 중요한 치료 표적이 될 수 있다.

[0006] 따라서, ER α 길항제는 유방암 치료제로서 개발되어 왔다. 예를 들어, 타목시펜은 ER α 의 기능을 억제하고 폴베스트란트는 ER 이량체화를 방지하여 ER 분해를 증가시킨다. 또한, HER2, EGFR, VEGFR, IGFR, Akt, mTORC1, Raf, MEK1/2 등과 같은 ER α 의 다양한 다운 스트림 표적이 밝혀졌으며, 이러한 표적에 대한 작용제가 유방암을 치료하기 위해 개발되었다. ER 및 프로게스테론 수용체와 같은 유방암의 특정 수용체를 직접 표적으로하는 호르몬 요법의 개발은 치료 결과를 개선하였다. ER 양성 종양은 특히 전통적인 화학 요법보다 부작용이 적으면서도 타목시펜과 같은 에스트로겐 길항제로 치료하고 있는 실정이다.

[0007] 스핑고지질(Sphingolipids, SLs)은 포유동물에서 C18-스핑가닌(18:0) 및 C18-스핑고신(C18:1)을 포함하는 긴 사슬 염기를 함유하는 지질로 정의된다. 스핑고지질은 세라마이드, 스핑고미엘린, 스핑고신, 스핑고신-1-포스페이트(S1P) 및 수백 가지의 다양한 글라이코스핑고리피드를 포함한다. 스핑고리피드의 기본 구조 요소인 세라마이드는 다양한 아실 사슬 길이를 가진 지방산과 스핑고신을 포함한다. 최근에 6개의 세라마이드 합성효소(ceramide synthase, CerS) 유전자가 포유동물에서 발견되었으며, CerS 패밀리의 각 구성원은 서로 다른 길이의 세라마이드 아실 사슬(chain)을 합성한다. 예를 들어, CerS1은 C18-세라마이드를, CerS2는 C22-24-세라마이드를, CerS3은 C26-34-세라마이드를, CerS4는 C20-세라마이드를, CerS5 및 CerS6는 C16-세라마이드를 합성한다. 다양한 아실 사슬 길이를 갖는 이들 세라마이드는 스핑고신으로 분해된 뒤 UDP-글루코스 세라마이드 글루코실 전이효소(UGCG)에 의해 글라이코실 세라마이드로 전환되고, 스핑고신 키나제(SPHK)에 의해 S1P로 전환될 수 있다. 스핑고리피드는 세포막의 구조적 분자일 뿐만 아니라 종양 억제 또는 생존을 제어하기 위해 세포 신호의 조절에 중요한 역할을 하는 생물활성 분자이다. 세라마이드는 세포 내에서 일어나는 여러 가지 작용 기전을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 세포 증식, 세포 분화, 성장 억제, 세포 사멸에 관여하고 있다.

[0008] 유방암에서 스핑고리피드 대사 조절의 장애는 이미 알려져 있고, CerS2, CerS4 및 CerS6의 mRNA의 증가와 함께 C16 및 C24-세라마이드의 증가가 보고되었다. 또한, 상승된 C16-세라마이드의 수준은 양성 림프절 상태와 관련이 있고, C18 및 C20-세라마이드의 수준은 ER 음성 종양 조직과 비교하여 ER 양성 종양 조직에서 유의하게 더

높았다. UGCG에 의한 세라마이드의 글라이코실화는 유방암 줄기 세포의 특성을 선택적으로 유지하고 화학요법에 대한 반응이 좋지 않은 약물내성 암 세포 및 유방암에서 상승하였다는 연구 결과가 보고되었다(Carcinogenesis. 2009 May;30(5):745-52. doi: 10.1093/carcin/bgp061. Epub 2009 Mar 11.). 또 다른 연구는 세라마이드 글라이코실화의 억제가 cSrc/ β -카테닌 경로를 통한 MDR1 유전자 발현을 감소시키고 RNA스플라이싱을 통해 p53의 발현을 회복시킬 수 있음을 밝혔다. 또한, 여러 동물 연구에서 유방암 진행에 있어 SPHK1/S1P의 중요한 역할을 제안하였다. 마우스에서 안정적으로 SPHK1 과발현된 유방암 세포는 말초에서 더 높은 미세혈관 밀도를 갖는 백터 트랜스퍼보다 더 많은 종양을 형성하였다. 무린 유방암 세포를 면역 적합 암컷 마우스의 유선 지방 패드에 이소성 이식하여 유사한 결과를 얻었다. 유방암에서 스펅고리피드의 변경에 의한 몇 가지 보고에도 불구하고, 유방암에 대한 예방 및 치료에 중요한 ER α 수준에 대한 스펅고리피드의 효과는 지금까지 뚜렷한 연구성과가 없는 실정이다.

[0009] 한편, 트레오-1-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-프로판올(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-pro-panol, PDMP)은 글루코실세라마이드 합성효소 억제제로 알려져 있으며, 높은 수준의 세라마이드의 결과로 골지복합체를 통해 골지로부터 원형질막으로의 단백질 수송을 억제하는 것으로 나타났다.

[0010] 본 발명자들은 이러한 글루코실세라마이드 합성효소 억제제(Glucosylceramide synthase inhibitor, GCS inhibitor)인 D-트레오-1-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-프로판올(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-pro-panol, PDMP)을 단독 또는 풀베스트란트(Fulvestrant)와 병용처리한 경우 에스트로겐 수용체의 발현 감소 효과 및 세포사멸을 증가시켜 유방암 예방 또는 치료에 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 개선 또는 치료용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 개선 또는 치료용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 글루코실세라마이드 합성효소 억제제인 D-트레오-1-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-프로판올(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-pro-panol, PDMP)는 에스트로겐 수용체 분해를 증가시키고, 풀베스트란트(fulvestrant)와 함께 처리한 경우 풀베스트란트에 의한 에스트로겐 수용체 분해 효과 및 세포 사멸 효과를 증대시키므로, 유방암 예방 및 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1의 a는 MCF-7 및 MCF-7 / ADR 세포의 유전자 발현 마이크로 어레이 데이터를 나타낸 도이고, b는 독소루비신 저항성을 갖는 MCF-7 유방암 세포주에서 스펅고지질 관련 효소의 발현 변화를 웨스턴 블롯 결과로 나타낸 도이다.

도 2의 a는 PDMP를 처리한 후 에스트로겐 수용체(Estrogen receptor, ER)의 수준을 웨스턴 블롯 결과로 나타낸 도이다.

도 2의 b는 글루코실세라마이드 합성효소를 과발현 시킨 후 에스트로겐 수용체(Estrogen receptor, ER)의 수준을 웨스턴 블롯 결과로 나타낸 도이다.

도 2의 c는 대조군, PDMP를 처리한 MCF-7 세포 및 글루코실세라마이드 합성효소(Glucosylceramide synthase, GCS)를 과발현한 MCF-7 세포에서 에스트로겐 수용체(ER) 분해 정도를 나타낸 결과(왼쪽)와 시간에 따른 에스트로겐 수용체(ER) 신호 강도를 나타낸 그래프(오른쪽)이다.

도 3의 a는 풀베스트란트(fulvestrant)와 PDMP 및 GCS의 에스트로겐 수용체 발현 감소 효과 및 세포사멸 효과를 나타낸 도이다.

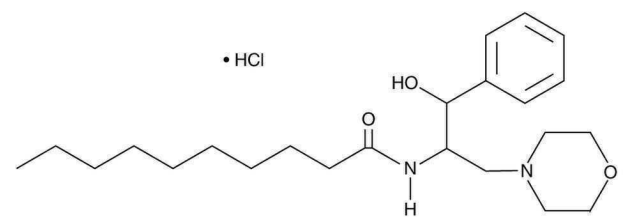
도 3의 b는 풀베스트란트(fulvestrant)와 PDMP의 병용치리에 의한 세포 생존력 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] [화학식 1]



[0025] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 D-트레오-1-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-프로판올(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, PDMP)로, 글루코실세라마이드 합성효소 억제제로 작용될 수 있다.

[0026] 삭제

[0027] 삭제

[0029] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 에스트로겐 수용체 분해를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 항암제와 병용하여 투여할 수 있다.

[0031] 상기 항암제는 풀베스트란트(fulvestrant)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0032] 상기 항암제는 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid) 계열, 택산(taxan) 계열, 안트라사이클린(anthracycline) 계열, 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin) 계열, 콜히친(colchicine), 미톡산트론(mitoxantrone), 닥티노마이신(dactinomycin), 토폠테칸(topotecan), 트리메트렉스산(trimetrexate), 미트라마이신(mithramycin) 및 미토마이신 C(mitomycin C)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 일례로, 빈카 알칼로이드 계열은 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 및 나벨빈(navelbine)일 수 있고, 택산 계열은 파클리탁셀(paclitaxel, TAX), 탁소테르(taxotere)일 수 있다. 또한, 안트라사이클린 계열은 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin) 및 이다루비신(idarubicin)일 수 있고, 에피포도필로톡신 계열은 에토포시드(etoposide) 및 테니포시드(teniposide)일 수 있다. 또한, 상기 항암제는 항암제로 공지된 약물이라면 모두 포함될 수 있다.

[0033] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트,

디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만텔레이트 등이 있다.

[0034] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸클로라이드, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0035] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0036] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물 전체 중량에 대하여 유효성분인 보르테조미드 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 10 내지 95 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내에 전달하는데 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예로서, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합한 것일 수 있다. 이때, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

[0038] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0039] 본 발명의 조성물은 경구제제 또는 비경구제제로 제형화 될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 첨가될 수 있다. 한편, 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 여기에는 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 부형제가 포함될 수 있다.

[0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제 등의 주사제가 포함될 수 있다.

[0041] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식중 선택될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여된다. 이는 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물 등에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 병용 투여시, 투여는 순차적 또는 동시일 수 있다.

[0044] 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함되는 유효성분의 양은 0.001 내지 10,000 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 5 g/kg일 수 있다. 상기 투여는 하루에 1회일 수 있고, 수회로 나눌 수도 있다.

[0045] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 MCF-7 또는 MCF-7/ADR 세포주에서의 스펙고지질 관련 효소 발현

량을 분석하기 위해 웨스턴 블롯 실험을 수행한 결과, 독소루비신 저항성을 갖는 MCF-7 유방암 세포주에서 ER 및 CerS2의 발현이 감소하고, CerS6, GCS, SphK1의 발현이 증가한 것을 확인하였다(도 1의 b 참조).

[0046] 또한, 본 발명자들은 D-트레오-1-페닐-2-데카노일아미노-3-모르폴리노-프로판올(D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-pro-panol, PDMP)처리와 글루코실세라마이드 합성효소(Glucosylceramide synthase, GCS) 과발현에 따른 에스트로겐 수용체(ER)의 발현량을 비교하기 위해 실험을 수행한 결과, PDMP를 처리한 경우 에스트로겐 수용체(ER)의 발현이 감소한 반면, GCS를 처리한 경우 에스트로겐 수용체의 발현이 증가한 것을 확인하였다(도 2의 a와 b 참조).

[0047] 또한, 본 발명자들은 PDMP 처리와 GCS 과발현에 따른 에스트로겐 수용체(ER) 분해 속도를 측정하기 위해서 펄스 추적실험을 수행한 결과, 인큐베이션한 시간에 따라 PDMP를 처리한 경우 에스트로겐 수용체 분해 정도가 증가한 반면, GCS 과발현된 세포에서는 에스트로겐 수용체 분해 정도가 PDMP를 처리한 경우에 비해 큰 차이가 없음을 확인하였다(도 2의 c 참조).

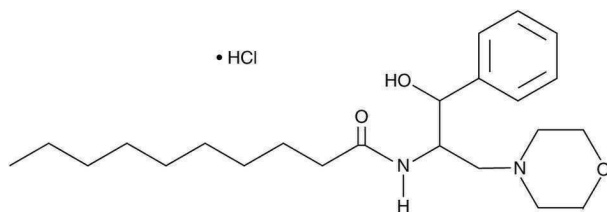
[0048] 또한, 본 발명자들은 PDMP와 풀베스트란트 병용처리 또는 GCS 과발현된 경우에 풀베스트란트 처리에 의한 에스트로겐 수용체 분해 효과를 확인하기 위해 실험을 수행한 결과, GCS 과발현된 MCF-7 세포에 풀베스트란트를 처리한 경우 에스트로겐 수용체 발현의 감소가 줄어 든 반면(도 3의 a 왼쪽 참조), 풀베스트란트 및 PDMP를 단독 처리한 경우보다 풀베스트란트와 PDMP를 병용처리한 경우 에스트로겐 수용체(ER)의 발현이 더 감소한 것을 확인하였다(도 3의 a 오른쪽 참조).

[0049] 또한, 본 발명자들은 PDMP와 풀베스트란트(fulvestrant) 병용처리 또는 GCS 과발현된 경우에 풀베스트란트 처리에 의한 세포 생존력을 분석하기 위해 MTT를 이용한 실험을 수행한 결과, 풀베스트란트 및 PDMP를 단독 처리한 경우보다 풀베스트란트와 PDMP를 병용처리한 경우 농도의존적으로 세포 생존력이 감소하였다. 반면, GCS가 과발현된 MCF-7 세포의 경우 세포 생존력이 오히려 증가함을 확인하였다(도 3의 b 참조).

[0050] 따라서, 본 발명의 글루코실세라마이드 합성효소 억제제인 PDMP는 에스트로겐 수용체 분해를 증가시키고, 풀베스트란트(fulvestrant)와 함께 처리한 경우 풀베스트란트에 의한 에스트로겐 수용체 분해 효과 및 세포 사멸 효과를 증대시키므로, 유방암 예방 및 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 유방암 개선 또는 치료용 건강기능식품을 제공한다.

[0053] [화학식 1]



[0054] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 함량은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다.

[0056] 또한, 상기 건강기능식품의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있다.

[0057] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 건강기능식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0058] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 조

성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해서 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0063] <재료의 준비>

[0064] 독소루비신, α -튜불린 항체는 Sigma-Aldrich (미국 미주리 주 세인트루이스)에서 입수하였다. 글루코실 세라 마이드 합성효소(GCS)를 검출하는 항체는 Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)로부터 구입하였다. 항-CerS6항체는 산타 크루즈 바이오 테크놀로지 (Santa Cruz Biotechnology, 미국 캘리포니아 주 산타크루즈)로부터 입수하였다. 항-ER 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 입수하였다. 항-마우스-HRP 및 항-토끼-HRP 항체는 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 입수하였으며, 항-SphK1 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다. 폴베스트란트는 Biovision (미국 캘리포니아 주 팔로 알토)으로부터 입수하였다.

[0066] <실험예 1. MCF-7 및 MCF-7 / ADR 세포의 유전자 발현 마이크로 어레이 데이터 분석>

[0067] MCF-7과 MCF-7/ADR(Adriamycin resistant cell line)에서의 스펅고지질 mRNA 발현양상을 비교하기 위해서 하기 와 같은 유전자 발현 마이크로 어레이 데이터 분석을 수행하였다. MCF-7 및 MCF-7 / ADR 세포의 유전자 발현 마이크로 어레이 데이터는 공개적으로 이용이 가능한 GEO 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에서 다운로드하였다. GEO 데이터 세트에는 2개의 모 MCF-7 세포주 샘플 및 독립적으로 성장하고 수확한 독소루비신 내성 MCF-7 세포주 샘플 2개가 포함된다. GEO 데이터베이스의 다운로드된 원시 데이터는 Robust Multichip Average 방법(Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U and Speed TP: Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics 4: 249-264, 2003.)을 사용하여 전사(transcript) 및 유전자 수준에서 정규화하였다.

[0068] 그 결과 도 1의 a에 나타난 바와 같이, 관련된 유전자 20개를 분석하였다. CerS6의 경우는 mRNA에서 차이가 없지만, 단백질은 차이가 있음을 확인하였다.

[0069]

[0070] <실시예 1. 세포 배양 및 형질감염>

[0071] MCF-7 또는 독소루비신 내성을 가진 MCF-7/ADR 세포를 RPMI-1640, 10 % 소 태아 혈청(FBS), 2 % 페니실린/스트렙토 마이신(Hyclone, Logan, UT)에서 유지하고, 3일마다 계대배양하였다. 프로토콜에 따라 메타펙텐 (Metafectene, Miotex Laboratories, 독일 뮌헨)을 사용하여 형질 감염을 수행하였다. pcDNA3-GCS의 형질감염된 벡터는 A.H. Futerman (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel)으로부터 입수하였다.

[0073] <실시예 2. 독소루비신 내성 세포의 준비 >

[0074] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Illynsky Y, Tryndyak VP, Chekhun VF and Pogribny IP: Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. Mol Cancer Ther 7: 2152-2159, 2008 에 기재된 방법과 같이 6 내지 8개월 동안 0.5 ~ 25 μ M씩 증가시키면서 독소루비신을 장기간 처리하여 독소루비신 내성 MCF-7세포(MCF-7/ADR)를 준비하였다.

[0076] <실험예 2. MCF-7 또는 MCF-7/ADR 세포주에서 스펅고지질 관련 효소 발현 분석>

[0077] MCF-7 또는 MCF-7/ADR 세포주에서의 스펅고지질 관련 효소 발현량을 분석하기 위해 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다.

[0078] 구체적으로, RIPA 완충액 (50mM의 Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM의 NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% 나트륨 데옥시콜레이트, 0.1 % SDS 및 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제)으로 세포를 용해한 후, 세포 용해물을 얼음에 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포 용해물을 4 °C에서 12000×g로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 단백질 분석 염료 시약 (Biorad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 단백질 수준을 검사하였다. 단백질 전기영동 및 블로팅 시스템(Biorad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 50 μ g의 단백질을 분리하고 니트로셀룰로오스막(Biorad Laboratories, Hercules, CA)으로 옮겼다. 니트로셀룰로오스막을 5% 소혈청 알부민 (BSA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)을 함유한 PBST (0.1%의 트윈 -20을 갖는 PBS)에서 1시간 동안 블로킹시킨 후, 4 °C에서 밤새 항-ER, 항-CerS6, 항-CerS2, 항-SphK1 또는 항-GCS 1차 항체로 인큐베이션하였다.

이어서, 항-마우스-HRP 및 항-토끼-HRP 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 부착시켰다. TBST 용액으로 10분 간격으로 3회 막을 세척한 후, 단백질 밴드는 ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약 (Amersham Biosciences, Little Chalfont Bucks, UK)을 사용하여 Chemidoc MP 이미징 시스템 (Biorad Laboratories, Hercules, CA)에 의해 검출하였다.

[0079] 그 결과, 도 1의 b에 나타난 바와 같이, 독소루비신 저항성을 갖는 MCF-7 유방암 세포주에서 ER 및 CerS2의 발현이 감소하고, CerS6, GCS, SphK1의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0081] <실험예 3. PDMP 처리와 GCS 과발현에 따른 에스트로겐 수용체(ER)의 발현량 비교>

[0082] PDMP 처리와 GCS 과발현에 따른 에스트로겐 수용체(ER)의 발현량을 비교하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다. MCF-7 세포의 배양 배지에 10 μ M의 PDMP를 처리하고, 12시간마다 10분 동안 20 μ g/ml 농도의 디지토닌(digitonin)을 처리하여 세포의 투과성을 증가시켰다. 그런 다음, 1차 항체로 항-ER항체를 사용하여 <실험예 2>와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 에스트로겐 수용체(ER)의 발현을 확인하였다. <실시예 2>에서 입수한 pcDNA3-GCS 벡터로 48시간 동안 형질감염시킨 MCF-7 세포를 상기와 같은 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0083] 그 결과, 도 2의 a와 b에 나타난 바와 같이, PDMP를 처리한 경우 에스트로겐 수용체(ER)의 발현이 감소한 반면, GCS를 처리한 경우 에스트로겐 수용체의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0085] <실험예 4. PDMP 처리와 GCS 과발현에 따른 에스트로겐 수용체(ER) 분해 속도 측정>

[0086] PDMP 처리와 GCS 과발현에 따른 에스트로겐 수용체(ER) 분해 속도를 측정하기 위해서 하기와 같은 펄스추적실험을 수행하였다.

[0087] Park W-J, Park J-W, Erez-Roman R, *et al.*: Protection of a ceramide synthase 2 null mouse from drug-induced liver injury: role of gap junction dysfunction and connexin 32 mislocalization. Journal of Biological Chemistry 288: 30904-30916, 2013.에 기재된 방법과 같이, MCF-7 세포는 메티오닌 없이 DMEM에서 1시간 동안 굶기고 10% FBS로 보충하였다. 이어서, 배지를 [35S]-메티오닌 (0.1mCi / 35-mm 접시)을 포함하는 DMEM으로 교체하였다. 30분 인큐베이션한 후, 배지를 변경하고 세포를 베타-에스트라 디올과 함께 다양한 시간(1, 2, 4 및 6시간)동안 PDMP와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 시간의 마지막에 세포를 용해 완충액(5mM Tris, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 10mM 요오도 아세트 아미드, 2mM 페닐 메틸 술폰닐 플루오라이드(pH 8.0)), 0.6 % SDS 및 프로테아제 억제제(Sigma Aldrich)에 용해시켰다. 100℃에서 3분 동안 가열한 후, 용해물을 항-ER 항체로 면역 침전시키고, 10% SDS- 폴리 아크릴 아미드 겔 전기 영동으로 분리하였다. 겔을 건조시키고 -80℃에서 Bio / Max Transcreen LE- 강화 스크린(Kodak)에 노출시켰다. GCS 과발현 실험군의 경우, 상기 펄스추적실험 수행 전에 <실시예 2>에서 입수한 pcDNA3-GCS 벡터로 48시간 동안 형질감염시킨 MCF-7 세포를 이용하였다.

[0088] 그 결과, 도 2의 c에 나타난 바와 같이, 인큐베이션한 시간에 따라 PDMP를 처리한 경우 에스트로겐 수용체 분해 정도가 증가한 반면, GCS 과발현된 세포에서는 에스트로겐 수용체 분해 정도가 PDMP를 처리한 경우에 비해 큰 차이가 없음을 확인하였다.

[0090] <실험예 5. PDMP와 풀베스트란트(fulvestrant) 병용처리 또는 GCS 과발현된 경우에 풀베스트란트 처리에 의한 에스트로겐 수용체 분해 효과 확인>

[0091] PDMP와 풀베스트란트 병용처리 또는 GCS 과발현된 경우에 풀베스트란트 처리에 의한 에스트로겐 수용체 분해 효과를 확인하기 위해 MCF-7 세포를 RPMI-1640, 10 % 소 태아 혈청 (FBS), 2 % 페니실린 / 스트렙토 마이신 (Hyclone, Logan, UT)에서 유지시키고 3일마다 계대 배양 하였다. 48시간 동안 10 μ M의 PDMP를 처리한 후, 100pm의 풀베스트란트를 24시간 동안 추가로 처리하였다. 에스트로겐 수용체 발현은 <실험예 2>에 기재된 웨스턴 블롯 실험을 이용하여 측정하였다. GCS 과발현 실험군의 경우, <실시예 2>에서 입수한 pcDNA3-GCS 벡터로 48시간 동안 형질감염시킨 MCF-7 세포를 이용하여 PDMP를 처리한 것을 제외하고 상기와 동일한 실험을 수행하였다.

[0092] 그 결과, 도 3의 a에 나타난 바와 같이, GCS 과발현된 MCF-7 세포에 풀베스트란트를 처리한 경우 에스트로겐 수용체 발현의 감소가 줄어 든 반면(도 3의 a 왼쪽), 풀베스트란트 및 PDMP를 단독 처리한 경우보다 풀베스트란트와 PDMP를 병용처리한 경우 에스트로겐 수용체(ER)의 발현이 더 감소한 것을 확인하였다(도 3의 a 오른쪽).

[0093]

[0094] <실험예 6. PDMP와 풀베스트란트(fulvestrant) 병용처리 또는 GCS 과발현된 세포에 풀베스트란트 처리에 따른 세포 생존력 분석>

[0095] PDMP와 풀베스트란트(fulvestrant) 병용처리 또는 GCS 과발현된 세포에 풀베스트란트 처리에 따른 세포 생존력을 분석하기 위해 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium)를 사용하여 세포 생존력을 측정하였다. MCF-7 세포와 <실시예 2>에서 입수한 pcDNA3-GCS 벡터로 48시간 동안 형질감염시킨 GCS 과발현된 MCF-7 세포를 각각 준비하고, <실험예 5>에 기재된 방법으로 PDMP를 각각 0, 10 μ M, 50 μ M의 농도로 처리하였다. 이에 각각 100nM와 1 μ M 농도의 풀베스트란트를 48시간 동안 처리한 후, MTT(PBS에서 5mg/ml)를 배지에 첨가하고 세포를 4시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 석션(suction)한 후, 포르마잔(formazan)을 100 μ L DMSO로 용해시키고, 570nm 파장으로 검출하였다.

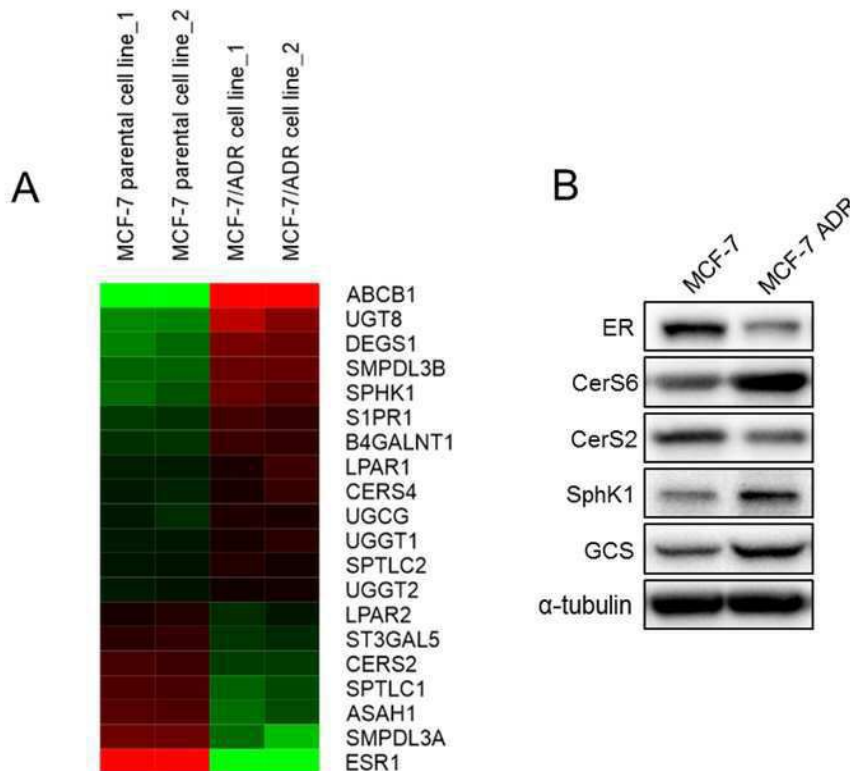
[0096] 그 결과, 도 3의 b에 나타난 바와 같이, 풀베스트란트 및 PDMP를 단독 처리한 경우보다 풀베스트란트와 PDMP를 병용처리한 경우 농도의존적으로 세포 생존력이 감소하였다. 반면, GCS가 과발현된 MCF-7 세포의 경우 세포 생존력이 오히려 증가하였다. 이를 통해, 세포 내 PDMP를 풀베스트란트와 병용처리하면 에스트로겐 수용체의 감소 효과 및 세포사멸 효과가 모두 증가함을 알 수 있다.

[0098] <통계 분석>

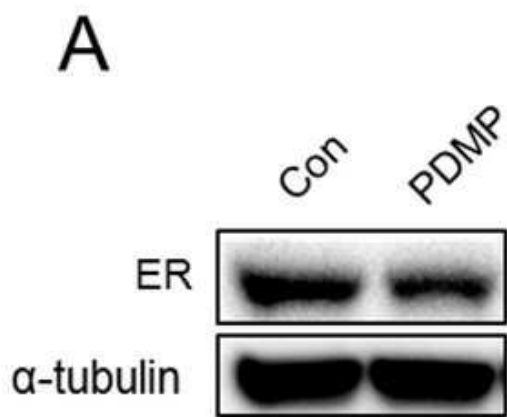
[0099] SPSS 소프트웨어 (버전 25.0; IBM SPSS, Armonk, NY, USA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였으며, 그룹 간의 차이는 Mann Whitney-U-test를 사용하여 통계적으로 분석했다. 일반적으로, P <0.05는 연구에서 수행된 모든 통계 분석에서 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다.

도면

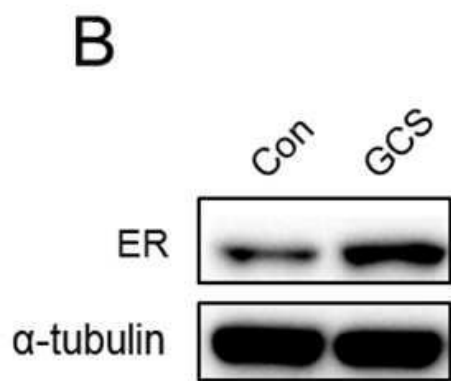
도면1



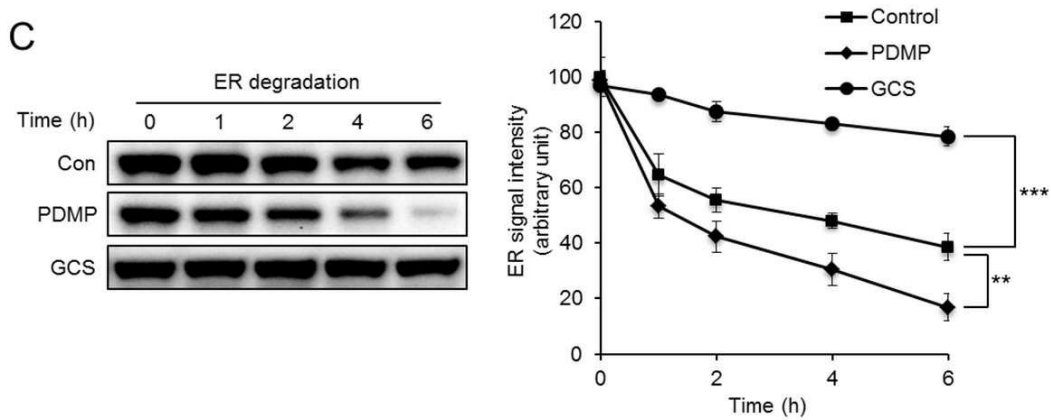
도면2a



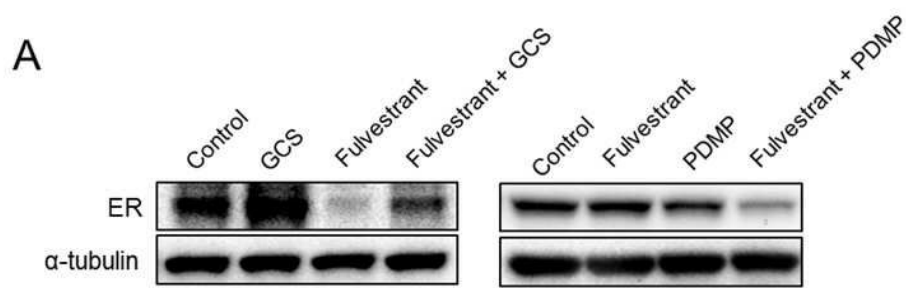
도면2b



도면2c



도면3a



도면3b

