



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0077665
(43) 공개일자 2024년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/19 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/19 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0159697

(22) 출원일자 2022년11월24일

심사청구일자 2022년11월24일

(71) 출원인

국립암센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

(72) 발명자

김수열

경기도 고양시 일산서구 주화로 211, 103동 1304호

장현철

서울특별시 양천구 목동서로 100, 310동 107호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 10 항

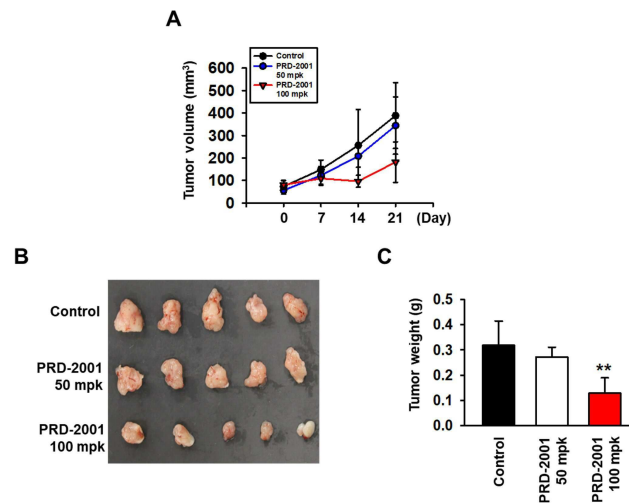
(54) 발명의 명칭 PRD-2001을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 우르손산 (ursonic acid; PRD-2001)을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우루손산을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 항암보조제에 관한 것이다.

본 발명에서는 우르손산에 의해 췌장암, 유방암, 전립선암, 간암 세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였으며, 우르손산과 이리노테칸 (Irinotecan), 파클리탁셀 (Paclitaxel), 독소루비신 (Doxorubicin) 또는 겐시타빈 (Gemcitabine)의 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 확인하였다. 나아가, 본 발명에서는 우르손산에 의해 미분화 암세포의 분화가 촉진되고, 암세포 성장 및 DNA 손상 복구가 억제되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 조성물은 효과적인 항암제로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/4745 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 31/7068 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

김중현

경기도 고양시 일산구 식사동 1510번지 313동 903호

우상명

서울특별시 강남구 삼성로 150, 209동 1408호

이호

경기도 고양시 일산동구 강송로 195, 812동 401호

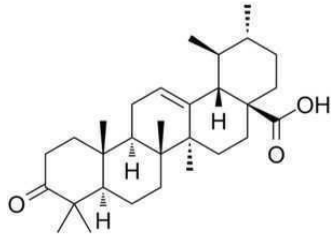
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

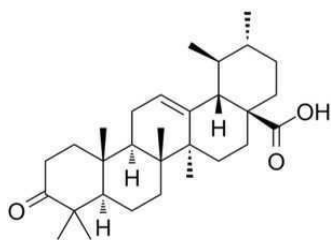
제1항에 있어서,

상기 우르손산은 미분화 암세포 분화 유도, 암세포 성장 억제 또는 암세포 DNA 손상 복구를 억제하는 것을 특징으로 하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암에 대한 항암 보조제:

[화학식 1]



청구항 4

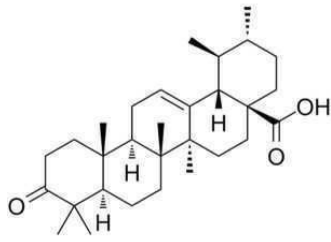
제3항에 있어서,

상기 우르손산은 미분화 암세포 분화 유도, 암세포 성장 억제 또는 암세포 DNA 손상 복구를 억제하는 것을 특징으로 하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암에 대한 항암 보조제.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

[화학식 1]



이리노테칸 (Irinotecan), 겐시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 및 독소루비신 (Doxorubicin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 우르손산은 미분화 암세포 분화 유도, 암세포 성장 억제 또는 암세포 DNA 손상 복구를 억제하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

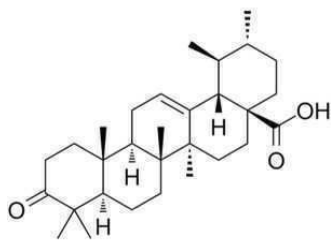
제5항에 있어서,

상기 암은 췌장암, 유방암, 간암, 전립선암, 대장암, 폐암, 위암, 흑색종, 전립선암, 난소암, 및 교모세포종으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursolic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

[화학식 1]



이리노테칸 (Irinotecan), 겐시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 및 독소루비신 (Doxorubicin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 유효성분으로 포함하는, 항암 보조제.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 우르손산은 미분화 암세포 분화 유도, 암세포 성장 억제 또는 암세포 DNA 손상 복구를 억제하는 것을 특징으로 하는, 항암 보조제.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 암은 췌장암, 유방암, 간암, 전립선암, 대장암, 폐암, 위암, 흑색종, 전립선암, 난소암, 및 교모세포종 으
로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는, 항암 보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 우르손산 (ursonic acid; PRD-2001)을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상
세하게는 우르손산을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 항암보조제에 관한
것이다.

배경 기술

[0003] 정상세포는 필요에 따라 규칙적이고 탄력적인 증식과 억제를 할 수 있는 반면에 암세포는 무제한의 증식을
하며, 이런 암세포로 구성된 세포덩어리를 종양이라고도 한다. 이러한 암세포는 주위의 조직으로 침투하고 신체
의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래한다. 의학의 발전에도 불구하고, 국내
암환자 발생자수는 지속적으로 증가하여 최근 10년간 약 44%가 증가하였으며, 국제적으로도 항암제 시장 역시
증가하여 연간 약 1000억 달러의 규모를 가지는 것으로 보고된 바 있다.

[0004] 특히, 췌장암은 5년 생존율이 1-4%, 중앙생존기간 5개월에 이르는 치명적인 암으로 인체의 암 중에서 가장 불량
한 예후를 보이고 있다. 80-90% 환자에서 진단시 완치를 기대하는 근치적 절제가 불가능한 상태에서 발견되기
때문에 예후가 불량하고 치료는 주로 항암요법에 의존하고 있다. 췌장암의 항암치료에 가장 많이 사용되는 항암
제 조합은 4가지 항암제 (5-Fu, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin)을 조합한 FOLFIRINOX 요법과 젬시타빈
(gemcitabine) 및 아브락산 (abraxane, nab-paclitaxel) 조합이 있다.

[0005] 하지만, 상기 요법들을 이용한 항암치료에 대한 반응율은 15% 내외에 불과한 실정으로, 효과적으로 췌장암을 치
료할 수 있는 약물의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명에서는 췌장암에 효과적인 항암제를 선별하기 위해, 예의 노력한 결과 우르손산 (ursonic acid;
PRD-2001)에 의해 췌장암, 유방암, 간암 및 전립선암의 성장이 억제되는 것을 확인하였으며, 우르손산과 이리노
테칸 (Irinotecan), 파클리탁셀 (Paclitaxel), 독소루비신 (Doxorubicin) 또는 젬시타빈 (Gemcitabine)의 병용
투여에 따른 항암 시너지 효과를 확인하였다. 나아가, 우르손산에 의해 미분화 암세포의 분화가 촉진되고, 암세
포 성장 및 DNA-손상 복구가 억제되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 우르손산(ursonic acid; PRD-2001)을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물,
또는 항암 보조제를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 우르손산(ursonic acid; PRD-2001) 및 항암제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적
조성물, 또는 항암보조제를 제공하는 데 있다.

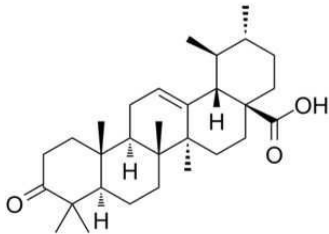
과제의 해결 수단

[0012] 상술한 목적을 달성하기 위해,

[0013] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암에 대한 항암 보조제를 제공한다.

[0015] [화학식 1]



[0016]

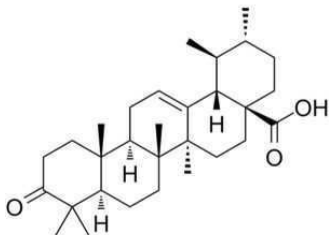
[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 우르손산은 미분화 암세포의 분화를 유도하고, 암세포 성장을 억제하며, 암세포의 DNA 손상 복구를 억제할 수 있다.

[0019] 다른 목적을 달성하기 위해,

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및 이리노테칸 (Irinotecan), 젬시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 및 독소루비신 (Doxorubicin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 이리노테칸 (Irinotecan), 젬시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 및 독소루비신 (Doxorubicin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 우르손산은 미분화 암세포의 분화를 유도하고, 암세포 성장을 억제하며, 암세포의 DNA 손상 복구를 억제할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 우르손산 및 항암제는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 암은 췌장암, 유방암, 간암, 전립선암, 대장암, 폐암, 위암, 흑색종, 전립선암, 난소암, 및 교모세포종 으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에서는 우르손산에 의해 췌장암, 유방암, 전립선암, 간암 세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였으며, 우르손산과 이리노테칸 (Irinotecan), 젬시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 또는 독소루비신

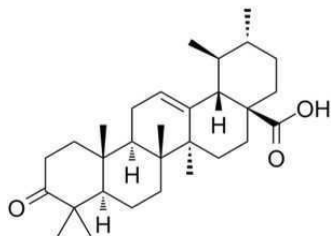
(Doxorubicin)의 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 확인하였다. 나아가, 본 발명에서는 우르손산에 의해 미분화 암세포의 분화가 촉진되고, 암세포 성장 및 DNA-손상 복구가 억제되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 조성물은 효과적인 항암제로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 다양한 암세포에 우르손산을 처리하였을 때, 암세포 성장 정도를 확인한 데이터로, (A) 췌장상피 세포주, (B) 신장암 세포주, (C) 췌장암 세포주, (D) 유방암 세포주, (E) 간암 세포주, 및 (F) 전립선암 세포주에서 암세포 성장 정도를 확인하였다.
- 도 2는 우르손산 처리에 따른 암세포 내 (A) 미분화 유전자군 발현 감소, (B) 세포주기진행 유전자군 발현 감소, 및 (C) DNA 손상 복구 관련 유전자군 발현 감소를 확인한 데이터이다.
- 도 3은 췌장암 세포주인 (A) PANC1 및 (B) BXPC3에 우르손산 및 이리노테칸을 단독 또는 병용 처리하였을 때, 암세포 성장 정도를 확인한 데이터이다.
- 도 4는 암세포 이중이식 종양 모델에 이리노테칸을 농도를 다르게 하여 단독처리 하였을 때, (A) 종양 조직 부피 변화, (B) 종양 조직 관찰 및 (C) 종양의 무게 변화를 관찰한 데이터이다.
- 도 5는 암세포 이중이식 종양 모델에 우르손산 및 이리노테칸을 단독 또는 병용처리 하였을 때, (A) 종양 조직 크기 변화, (B) 종양의 무게 변화, (C) 마우스 체중 변화를 관찰한 데이터이다.
- 도 6은 우르손산과 (A) 젬시타빈 (Gemcitabine), (B) 독소루비신 (Doxorubicin), (C) 파클리탁셀 (Paclitaxel), 및 (D) 플루오로우라실 (fluorouracil, 5-FU)을 췌장암 세포주에 병용투여하였을 때, 항암 시너지 효과를 확인한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 발명을 상세하게 설명한다.
- [0033] 본 발명은 일관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid; PRD-2001) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명은 다른 일관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid; PRD-2001) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 췌장암, 유방암, 간암 또는 전립선암에 대한 항암 보조제에 관한 것이다.
- [0035] [화학식 1]



- [0036]
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 우르손산은 미분화 암세포의 분화를 유도하고, 암세포 성장을 억제하며, 암세포의 DNA 손상 복구를 억제시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 일실시예에 있어서, 정상 췌장상피 세포주 (HPNE), 신장암 세포주 (A498), 췌장암 세포주 (MIAPACA2), 유방암 세포주 (MDAMB231), 간암 세포주 (HEP3B) 및 전립선암 세포주 (PC3)에 우르손산을 처리한 결과, 췌장암 세포주, 유방암 세포주, 간암 세포주 및 전립선암 세포주만 성장이 억제되었으며, 정상 췌장상피

세포주 및 신장암 세포주에 대해서는 성장 억제 효과가 없는 것을 확인하였다 [도 1].

[0040] 본 발명의 구체적인 다른 일실시예에서, 우르손산에 의한 암세포 사멸 작용 기전을 확인한 결과, 우르손산에 의해, 암세포 내 미분화 유전자군 및 세포주기 진행 유전자군의 발현이 감소한 것을 확인하였다. 또한, 암세포의 DNA 손상 복구 관련 유전자군 발현 역시 감소한 것을 확인하였다 [도 2].

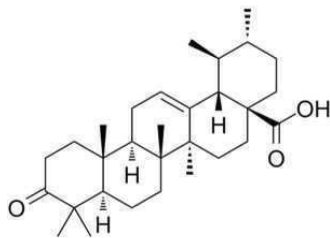
[0042] 암세포는 생긴 양상에 따라 분화암 또는 미분화암으로 성숙도를 나눌 수 있으며, 분화암은 성숙한 정상세포에 가까운 양상이고, 미분화암은 정상세포와는 상당히 다른 모습을 보인다. 미분화암일수록 분화암에 비해 분열속도가 빨라 전이가 될 가능성이 높다. 암세포의 유전적 비정상성이 분화를 차단하면, 성장과 분화 능력이 조절되지 않아 무한정 분열할 수 있게 된다. 암세포에서 정상적인 분화를 유도하여 암세포의 증식 능력을 차단하면 부분적으로 악성을 양성으로 바꿀 수 있는 치료가 가능하다.

[0043] 즉, 본 발명에서는 우르손산에 의해 암세포의 미분화 유전자군 발현이 감소되어 암세포의 분화가 촉진되고, 세포주기 진행 감소 및 DNA 손상 복구 억제를 통해 암세포의 성장을 억제시킬 수 있는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 우르손산은 효과적인 항암제 또는 항암보조제로 활용될 수 있다.

[0045] 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 이리노테칸 (Irinotecan), 겐시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 및 독소루비신 (Doxorubicin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0046] 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 우르손산 (ursonic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 이리노테칸 (Irinotecan), 겐시타빈 (gemcitabine), 파클리탁셀 (Paclitaxel) 및 독소루비신 (Doxorubicin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암 보조제에 관한 것이다.

[0047] [화학식 1]



[0048]

[0050] 본 발명의 구체적인 일실시예에서, 췌장암 세포주인 PANC1 및 BxPC3에 우르손산 및 이리노테칸을 병용투여한 결과, 암세포 성장 억제 효능이 크게 증가한 것을 확인하였으며, PANC1 및 BxPC3 각각에 대한 병용투여에 의한 시너지 점수 (Synergy score)는 30 및 50인 것으로 나타났다 [도 3].

[0051] 또한, 암세포 이중이식 종양 모델에 우르손산을 단독투여한 결과, 우르손산 농도에 따라 대조군에 비해 종양조직의 부피 및 무게가 현저히 감소되는 것을 확인하였다 [도 4].

[0052] 암세포 이중이식 종양 모델에서 우르손산 및 이리노테칸을 병용투여한 결과, 대조군 및 단독투여군에 비해 종양조직 부피 및 무게가 현저하게 감소하였고, 이 때 마우스의 체중에는 변화는 없는 것을 확인하였다 [도 5].

[0053] 본 발명의 구체적인 다른 일실시예에서, 이리노테칸 이외에 플루오로우라실 (fluorouracil, 5-FU), 파클리탁셀 (Paclitaxel), 독소루비신 (Doxorubicin), 또는 겐시타빈 (Gemcitabine)을 우르손산과 췌장암 세포주에 병용투여한 결과, 겐시타빈 (Gemcitabine), 독소루비신 (Doxorubicin), 및 파클리탁셀 (Paclitaxel)이 우르손산과 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 보이는 것을 확인하였다 [도 6].

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 암은 상기 암은 췌장암, 유방암, 간암, 전립선암, 대장암, 폐암, 위암, 흑색종, 전립선암, 난소암, 및 교모세포종으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 암일 수 있다.

- [0056] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제 (예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제 (예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아주반트 (예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0057] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose), 락토오스 (lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.
- [0058] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0059] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.
- [0061] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로오스와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0063] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 예컨대 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0066] 본 발명의 항암보조제는 항암제의 항암효과를 증대시키거나 항암제의 부작용을 억제 또는 개선시키기 위한 모든 형태를 의미한다. 본 발명의 항암보조제는 다양한 종류의 항암제 또는 항암보조제와 병용투여될 수 있으며, 병용투여시 통상적인 항암제의 투여량보다 낮은 수준으로 항암제를 투여하더라도 동등한 수준의 항암치료효과를 나타낼 수 있으므로 보다 안전한 항암치료를 수행할 수 있다.

[0067] 상기 항암보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0068] 본 발명의 항암보조제는 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 항암보조제로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 항암치료 보조제에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명의 항암보조제는 경구 또는 비경구 투여를 위한 제제일 수 있으며, 제제에 대한 설명은 상기 약학적 조성물의 제제에 대한 기재로 대신한다.

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

[0073] 우르손산 항암 효과 확인

[0074] 본 발명에서는 우르손산 (ursonic acid; PRD-2001)의 항암 효과를 확인하기 위해, 정상 췌장상피 세포주 (HPNE), 신장암 세포주 (A498), 췌장암 세포주 (MIAPACA2), 유방암 세포주 (MDAMB231), 간암 세포주 (HEP3B) 및 전립선암 세포주 (PC3)에 우르손산을 농도별로 (0, 1, 5 μ M) 처리한 다음, 각각의 암세포 성장 정도를 확인하였다.

[0075] 구체적으로, 인간 췌장 내피세포인 HPNE는 ATCC에서 구매하였으며, HPNE 세포주는 글루코스 (glucose)가 없는 DMEM 배양 배지에 5% FBS (Fetal bovine serum), 10 ng/ml 인간 재조합 EGF, 5.5 mM D-글루코스, 750 ng/ml 푸로마이신 (puromycin)을 추가한 배지를 이용하여 37°C 인큐베이터에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다. 인간 췌관선암종 세포주 MIAPACA2, 인간 유방암 세포주 MDAMB231, 인간 간세포암 세포주 HEP3B는 KCLB에서 구매하였으며, 10% FBS를 포함하는 DMEM/high glucose 배양 배지를 이용하여 37°C 인큐베이터에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다. 인간 전립선암 세포주 PC3는 KCLB에서 구매하였으며, 10% FBS를 포함하는 RPMI 배양 배지를 이용하여 37°C 인큐베이터에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다.

[0076] 인간 췌장 내피세포인 HPNE, 인간 신장암 세포주 (A498), 인간 췌장암 세포주 MIAPACA2, 인간 유방암 세포주 MDAMB231, 인간 간세포암 세포주 HEP3B, 인간 전립선암 세포주 PC3에 대한 우르손산의 효과를 확인하기 위해 Cell viability assay인 SRB assay를 진행하였다. 96-웰 플레이트에 세포를 배양하고, PRD-2001을 0, 1, 5 μ M 농도로 처리하여 3일간 배양하였다. 50% TCA 용액을 50 μ l 추가하여 4°C에서 세포를 고정하였고 DW를 이용하여 5번 세척한 다음 플레이트를 건조하였다. 건조된 플레이트에 SRB 용액을 100 μ l씩 상온에서 5분간 처리하고, 1% 아세트산을 이용하여 3번 세척한 다음, 상온에서 건조하였다. 건조된 플레이트에 100 μ l 10mM Tris 용액을 추가하여 30 분간 진탕 (shaking)하여 SRB를 녹이고 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표 1

[0078] 우르손산 처리에 따른 암세포 성장 억제율(대조군 대비 %)

PRD-2001	HPNE	A498	MIAPACA2	MDAMB231	HEP3B	PC3
0 μ M	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000
1 μ M	98.9052	95.6061	97.8936	103.7414	93.6059	91.4123
5 μ M	98.8190	95.4786	56.1213	67.3997	61.2830	48.8013

[0079] 그 결과, 췌장암 세포주, 유방암 세포주, 간암 세포주 및 전립선암 세포주만 성장이 억제되었으며, 정상 췌장상피 세포주 및 신장암 세포주에 대해서는 성장 억제 효과가 없는 것을 확인하였다 [도 1]. 상기 [표 1]은 [도 1]의 암 세포주에 대한 성장 억제정도 (대조군 대비 %)를 나타낸다.

실시예 2

[0081] 우르손산에 의한 항암 효과 작용 기전 확인

[0082] 본 발명에서는 우르손산에 의한 암세포 사멸 작용 기전을 확인하기 위해, 췌장암 세포주에 우르손산을 처리하였을 때, 췌장암 세포의 전체 전사체 분석을 수행하였다.

[0083] 먼저, 인간 췌관선암종 세포주 BXPC3에서 우르손산 (10 μ M)을 처리하여, 10일 배양한 다음 살아남은 세포에 대해, TRIzol을 이용해 전체 RNA를 추출한 후 마크로젠에 의뢰하여 RNA 염서열분석 (RNA sequencing)을 수행하였다. Bioanalyzer 2100과 RNA 6000 Nano Labchips를 사용하여 RNA의 품질과 양을 평가하였으며 Truseq RNA-Seq Library Prep Kit-v2를 이용해 RNA 라이브러리(RNA library)를 준비하였다.

[0084] 이어 NovaSeq6000 sequencing system을 사용하여 paired-end sequencing을 수행하였다. 차등 발현 유전자 (Differentially expressed genes; DEGs)는 TPM (transcript per million mapped reads) 값이 10 미만인 값을 제외하고 선별하였다. 우르손산에 의해 변형된 생물학적 기능을 연구하기 위해 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis) 소프트웨어 v4.2.3을 사용하여 GSEA를 수행하였으며, GSEA 분석에 사용된 유전자 세트는 Reactome gene set 및 문헌 자료 (Ting Xi et al., PLoS One. 13(3): e0193427, 2018)로부터 획득하였다. 또한, 선별된 DEGs으로 IPA (Ingenuity pathway analysis)를 수행하여 Ingenuity Knowledge Base에 기반하는 주요 생물학적 기능을 식별하였다.

[0085] 인간 췌관선암종 세포주 BXPC3는 KCLB에서 구매하였으며, 10% FBS를 포함하는 RPMI 배양 배지를 이용하여 37℃ 인큐베이터에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다.

[0087] GSEA 분석 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 우르손산 처리시 대조군에 비해, 췌장암 세포에서는 미분화 유전자군 [도 2A], 암세포의 성장 및 분열 과정인 세포주기 진행에 관여하는 유전자군 [도 2B]이 하향조절 되어 있음을 확인하였다. 또한, 우르손산 처리 췌장암 세포에서 하향 조절된 유전자군은 암세포의 성장 및 DNA 손상 복구 기전에 작용하는 유전자임을 IPA 분석 [도 2C]을 통해 확인하였다.

실시예 3

[0089] 우르손산 및 이리노테칸 병용투여에 따른 항암 시너지 효과 확인

[0090] 본 발명에서는 우르손산과 항암제와의 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 확인하기 위해, 췌장암 세포주인 PANC1 및 BXPC3에 우르손산 및 이리노테칸을 단독 또는 병용 처리하여 후, 암세포 성장 정도를 콜로니 어세이 (Clonogenic assay)로 확인하였다.

[0091] 먼저, 6-웰 플레이트에 각각의 췌관선암종 세포주를 배양하고, 우르손산은 0, 10 μ M 농도가 되도록, 이리노테칸은 0, 0.5 μ M 농도가 되도록 단독 또는 병용 처리하여 10일간 배양하였으며, 배양 동안 2 ~ 3일 마다 상기와 같은 조건의 배지로 교환해주었다. 그 다음, 0.02% 크리스탈 바이올렛 (Cristal Violet) 용액을 이용하여 세포

를 고정 및 염색한 후, PBS를 이용하여 3번 세척한 다음, 플레이트를 건조시켰다. 건조된 플레이트는 이미징 후 'Image J' 프로그램의 Colony area 플러그인을 이용하여 정량하여 결과값을 확인하였다. 해당 결과값은 'Combenefit' 프로그램을 이용하여 분석을 진행하였으며, HSA 모델을 이용하여 시너지 이펙트 스코어 (synergy effect score)를 확인하였다. 시너지 이펙트 스코어 20 이상을 시너지 효과가 있는 것으로 판단하였다.

표 2

[0093] 우르손산 및 이리노테칸 병용투여에 따른 암세포 성장 억제율(대조군 대비 %)

	PANC1	BXPC3
Control	100.0000	100.0000
PRD-2001 10 μ M	39.0981	61.0751
Irinotecan 0.5 μ M	36.2929	73.5274
PRD-2001 10 μ M + Irinotecan 0.5 μ M	6.1191	11.4837

[0094] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, PANC1 및 BxPC3 모두에서 단독투여군에 비해 우르손산 및 이리노테칸 병용 투여군에서 암세포 성장이 현저하게 억제되는 것으로 나타났다. 상기 [표 2]는 [도 3]의 암 세포주에 대한 성장 억제정도 (대조군 대비 %)를 나타낸다.

[0095] 또한, PANC1 및 BxPC3 각각에 대한 병용투여에 의한 시너지 점수(Synergy score)는 30 및 50으로, 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 확인하였다.

실시예 4

[0097] 동물모델에서 우르손산 투여에 따른 항암 효과 확인

[0098] 본 발명에서는 생체 내에서 우르손산 투여에 따른 항암 효과를 확인하기 위해, 췌장암 이종이식 종양 모델을 제작하여 약물을 투여하였다.

[0099] 먼저, 6-8주령 Balb/c 누드 마우스에 100 μ l PBS 중 MIAPACA2 세포(1×10^7)를 1 ml 시린지를 사용하여 피하로 접종하였으며, 종양의 크기가 100 mm³에 도달했을 때, 마우스를 하기와 같이 그룹당 5 마리가 되도록 3개의 그룹으로 무작위로 나눈 다음, 우르손산을 투여하였다. 우르손산은 5% DMSO와 3% Cremophor EL 와 92% 생리식염수에 녹였다.

[0100] 1) 대조군(용매처리)

[0101] 2) 우르손산 단독 처리군 (50 mg/kg I.P injection, 주 5회)

[0102] 3) 우르손산 단독 처리군 (100 mg/kg I.P injection, 주 5회)

[0104] 종양 크기는 캘리퍼(Caliper)를 이용하여 주 1회 측정하였고, 마우스의 체중 또한 주 1회 측정하였다. 종양의 크기는 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산하였다.

[0105] [수학적 식 1]

[0106] 종양 크기 = (단축 x 단축 x 장축)/2

[0108] 본 실험은 국립 암센터 연구소의 기관 동물 관리 및 사용위원회 (IACUC)에 의해 검토 및 승인되었다 (IACUC 승인번호; NCC-22-796).

표 3

[0110]

우르손산 투여에 따른 종양 부피

Tumor volume (mm ³)	0 day	7 day	14 day	21 day
Control	72.8016	148.4274	255.9562	388.6936
PRD-2001 50 mg/kg	55.5426	122.5912	208.0494	344.134
PRD-2001 100 mg/kg	80.1236	108.784	96.0228	181.6902

표 4

[0112]

우르손산 투여에 따른 최종 종양 무게

	Tumor weight (g)
Control	0.3180
PRD-2001 50 mg/kg	0.2720
PRD-2001 100 mg/kg	0.1280

[0114]

그 결과, [도 4A] ~ [도 4C]에 나타난 바와 같이, 암세포 이종이식 종양 모델에 우르손산을 투여한 결과, 대조군 비해 우르손산의 농도에 따라 종양조직 크기가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 상기 [표 3]와 [표 4]는 [도 4]의 종양동물모델에서 시간에 따른 종양의 부피와 최종 종양의 무게를 나타낸다.

실시예 5

[0116]

동물모델에서 우르손산 및 이리노테칸 병용투여에 따른 항암 시너지 효과 확인

[0117]

본 발명에서는 생체 내에서 우르손산 및 이리노테칸 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 확인하기 위해, 체장암 이종이식 종양 모델을 제작하여 약물을 투여하였다.

[0118]

먼저, 6-8주령 Balb/c 누드 마우스에 100 μ l PBS 중 MIA PaCa-2 세포(1×10^7)를 1 ml 시린지를 사용하여 피하로 접종하였으며, 종양의 크기가 100 mm³에 도달했을 때, 마우스를 하기와 같이 그룹당 3 마리가 되도록 4개의 그룹으로 무작위로 나눈 다음, 우르손산 및 이리노테칸을 투여하였다. 우르손산은 10% DMSO와 90% 생리식염수에 녹여 준비하였으며 이리노테칸은 4% DMSO와 96% 생리식염수에 녹여 준비하였다.

[0119]

1) 대조군(용매처리)

[0120]

2) 우르손산 단독 처리군 (50 mg/kg I.P injection, 주 5회),

[0121]

3) 이리노테칸 단독 처리군 (20 mg/kg, I.P injection, 주 1회),

[0122]

4) 우르손산 (50 mg/kg I.P injection, 주 5회) 및 이리노테칸 (20 mg/kg, I.P injection, 주 1회) 병용 처리군

[0124]

종양 크기는 캘리퍼(Caliper)를 이용하여 주 2회 측정하였고, 마우스의 체중 또한 주 2회 측정하였다. 종양의 크기는 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산하였다.

[0125]

[수학적 식 1]

[0126]

종양 크기 = (단축 x 단축 x 장축)/2

[0128]

본 실험은 국립 암센터 연구소의 기관 동물 관리 및 사용위원회 (IACUC)에 의해 검토 및 승인되었다 (IACUC 승인번호; NCC-20-579).

표 5

[0130]

우르손산 및 이리노테칸 병용 투여에 따른 종양 부피

Tumor volume (mm ³)	0 day	5 day	8 day	12 day	15 day
Control	155.6883	258.2663	377.2575	648.5885	842.448
PRD-2001 50 mg/kg	108.0405	121.77	159.719	301.077	501.7455
Irinotecan 20 mg/kg	120.3473	214.1228	283.558	621.017	823.444
PRD-2001 50 mg/kg + Irinotecan 20 mg/kg	78.99975	118.8765	134.514	176.176	149.2553

표 6

[0132]

우르손산 및 이리노테칸 병용 투여에 따른 최종 종양 무게

	Tumor weight (g)
Control	0.6695
PRD-2001 50 mg/kg	0.6695
Irinotecan 20 mg/kg	0.6695
PRD-2001 50 mg/kg + Irinotecan 20 mg/kg	0.6695

표 7

[0134]

우르손산 및 이리노테칸 병용 투여에 따른 마우스 체중

Mouse weight (g)	0 day	5 day	8 day	12 day	15 day
Control	18.3	18.65	19.6	20.2	20.2
PRD-2001 50 mg/kg	18.05	18.15	18.8	19.5	19.55
Irinotecan 20 mg/kg	18	17.4	18.45	17.95	18.65
PRD-2001 50 mg/kg + Irinotecan 20 mg/kg	18.2	17.9	18.35	18.7	19.35

[0135]

그 결과, [도 5A] ~ [도 5B]에 나타난 바와 같이, 암세포 이중이식 종양 모델에 우르손산 및 이리노테칸을 병용 투여한 결과, 대조군 및 단독투여군에 비해 종양조직 크기가 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 약물 투여에 따른 마우스 체중 감소는 관찰되지 않았으므로 [도 5C], 종양 성장 및 암세포 성장 억제는 약물의 부작용이 아닌 두 약물의 시너지 효과임을 확인하였다. 상기 [표 5] 내지 [표 6]은 [도 5]의 종양동물모델에서 시간에 따른 종양의 부피, 종양의 최종 무게, 마우스의 몸무게 변화를 나타낸다.

실시예 6

[0137]

우르손산 및 항암제 병용투여에 따른 항암 시너지 효과 확인

[0138]

본 발명에서는 우르손산과 다양한 항암제와의 병용투여시 항암 시너지 효과를 보이는지 확인하기 위해, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 플루오로우라실(fluorouracil, 5-FU, 1 μ M), 파클리탁셀(Paclitaxel, 1.25 nM), 독소루비신(Doxorubicin, 5 nM), 또는 겐시타빈(Gemcitabine, 2.5 nM)을 우르손산(10 μ M)과 단독 또는 병용투여하였다.

표 8

[0140] 우르손산 및 겐시타빈 병용처리에 따른 암세포 성장 억제율(대조군 대비 %)

	MIAPACA2
Control	100.0000
PRD-2001 10 μ M	91.4230
Gemcitabine 2.5 nM	60.3314
PRD-2001 10 μ M + Gemcitabine 2.5 nM	35.9009

표 9

[0142] 우르손산 및 독소루비신 병용처리에 따른 암세포 성장 억제율(대조군 대비 %)

	MIAPACA2
Control	100.0000
PRD-2001 10 μ M	70.4736
Doxorubicin 5 nM	54.7463
PRD-2001 10 μ M + Doxorubicin 5 nM	31.2762

표 10

[0144] 우르손산 및 파클리탁셀 병용처리에 따른 암세포 성장 억제율(대조군 대비 %)

	MIAPACA2
Control	100.0000
PRD-2001 10 μ M	43.1306
Paclitaxel 1.25 nM	38.8182
PRD-2001 10 μ M + Paclitaxel 1.25 nM	18.3595

표 11

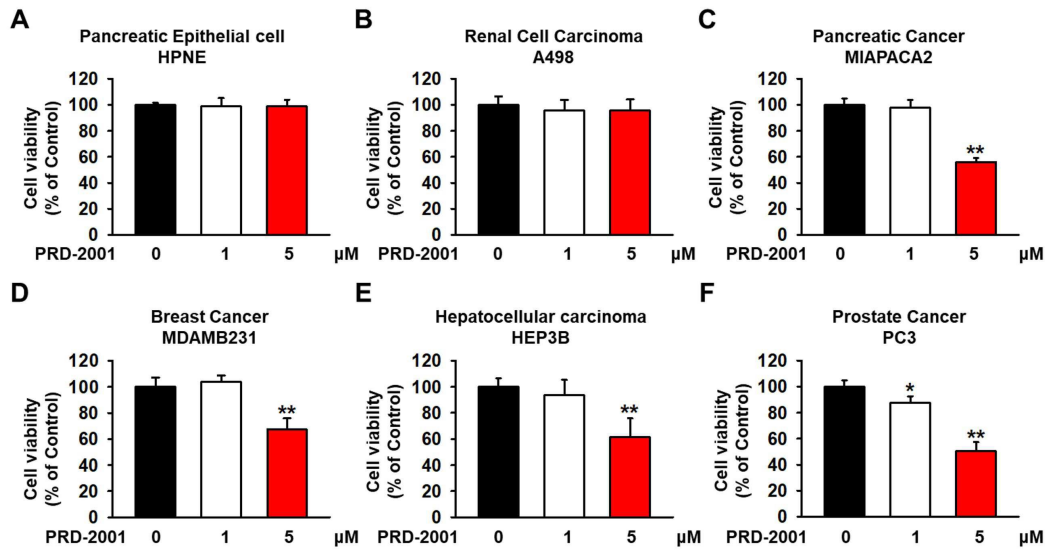
[0146] 우르손산 및 5-FU 병용처리에 따른 암세포 성장 억제율(대조군 대비 %)

	MIAPACA2
Control	100.0000
PRD-2001 10 μ M	86.2585
5FU 1 μ M	59.3377
PRD-2001 10 μ M + 5FU 1 μ M	47.2280

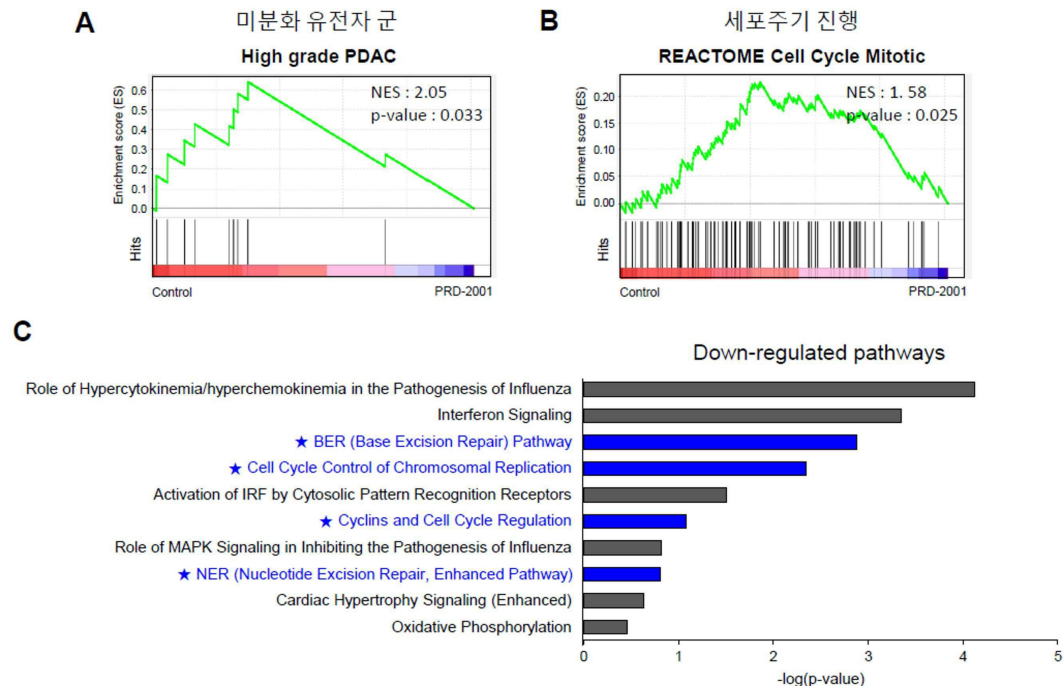
[0148] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 겐시타빈, 독소루비신 및 파클리탁셀은 우르손산과 병용투여에 따른 항암 시너지 효과를 보이는 것으로 나타났으며, 5-FU은 우르손산과의 병용투여에 대한 시너지 효과를 보이지 않는 것을 확인하였다. 상기 [표 8] 내지 [표 11]은 [도 6]의 암 세포주에 대한 성장 억제정도 (대조군 대비 %)를 나타낸다.

도면

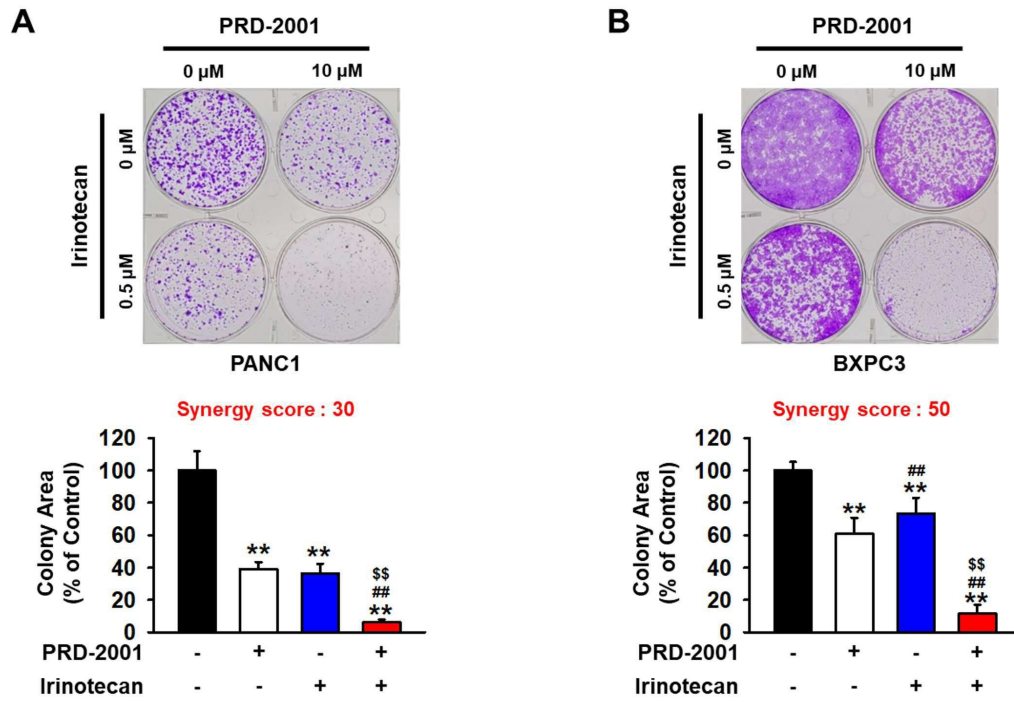
도면1



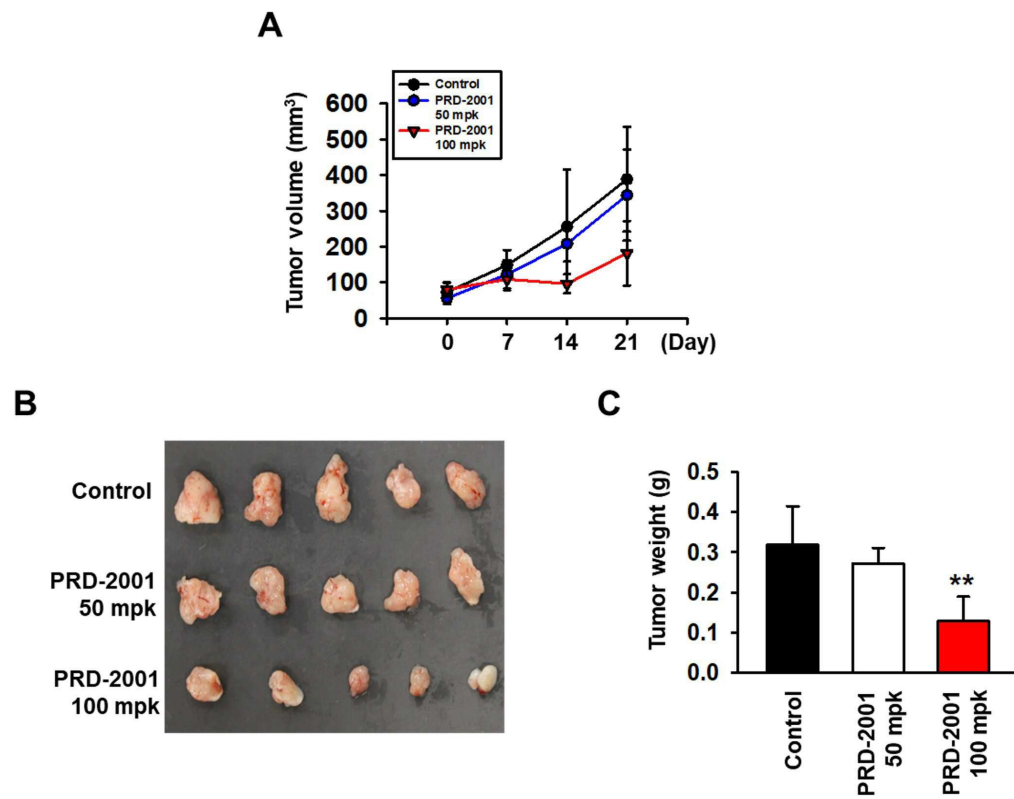
도면2



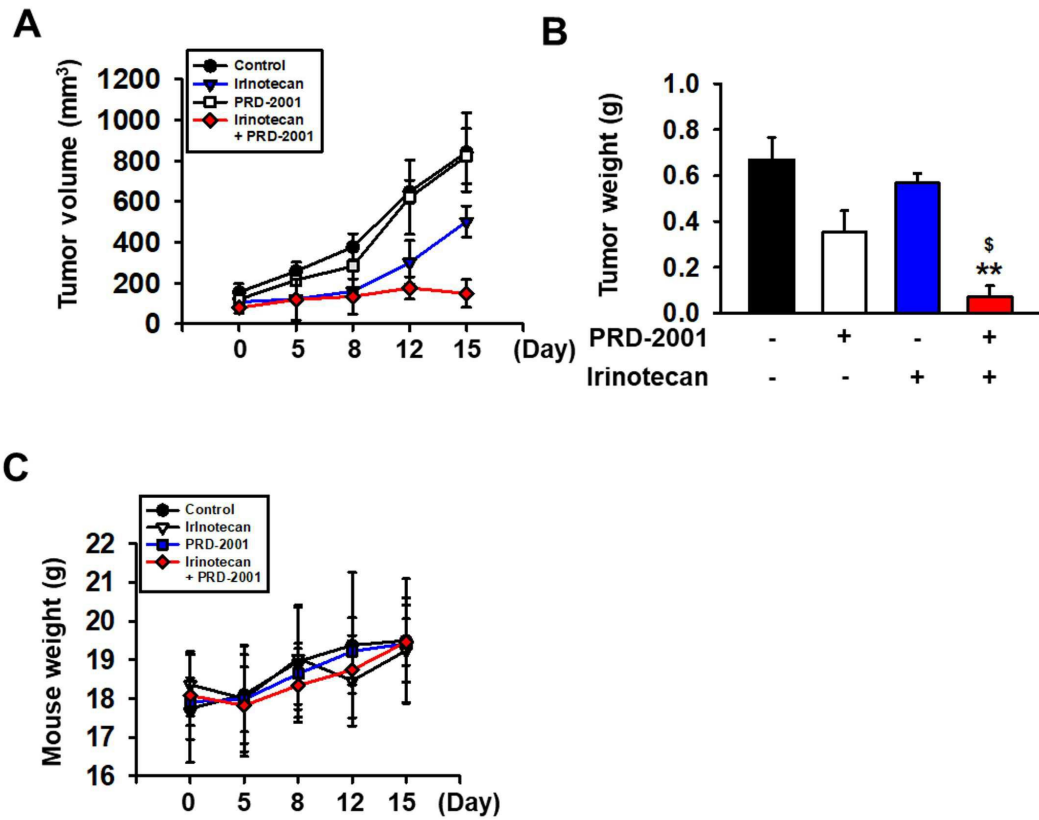
도면3



도면4



도면5



도면6

