



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0027081  
(43) 공개일자 2015년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/09 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7034337  
(22) 출원일자(국제) 2012년11월14일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2014년12월05일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/064993  
(87) 국제공개번호 WO 2013/169291  
국제공개일자 2013년11월14일  
(30) 우선권주장  
13/466,827 2012년05월08일 미국(US)

(71) 출원인  
크로마텍스 아이엔씨.  
미국, 캘리포니아 92618, 어바인, 슈트 쥐, 10005  
뮤어랜즈  
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아  
미합중국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 프랭클  
린 스트리트 1111, 5층  
(72) 발명자  
바르토시, 제레미  
미국, 캘리포니아 92868, 오렌지, 494 노스 시트  
루스  
텔링거, 리안  
미국, 캘리포니아 92603, 일바인, 5 썸머셋  
(74) 대리인  
허용록

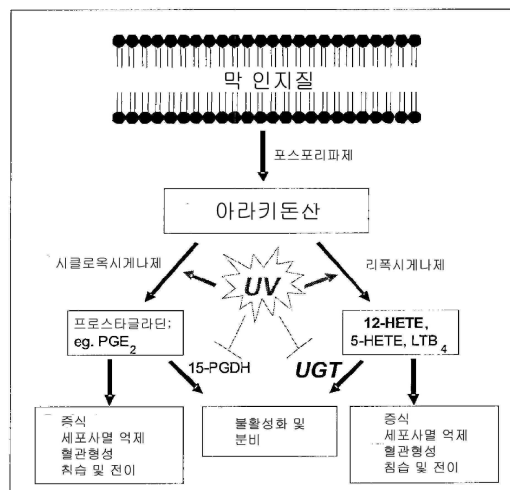
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 프테로스티렌을 사용한 UDP-글루쿠로노실 전이 효소 활성 유도 방법

### (57) 요약

세포 증식성 질환에 대해 개인을 치료하기 위한 방법으로서, 치료 유효량의 화합물 프테로스티렌을 그러한 치료를 필요로 하는 개인에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가되는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서 12-HETE 수준이 프테로스티렌의 투여에 의해 감소될 수 있다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

세포 증식성 질환에 대해 개인을 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 화합물 프테로스틸벤을 그러한 치료를 필요로 하는 개인에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가되는, 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, UGT 활성이 UGT 발현의 유도에 의해 증가되는, 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 개인이 인간인, 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프테로스틸벤 화합물이 약제학적으로 또는 기능성 식품으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물로 제공되는, 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 총 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량% 범위에 있는, 방법.

### 청구항 6

제 4 항에 있어서, 총 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 0.5 중량% 범위에 있는, 방법.

### 청구항 7

제4항에 있어서, 총 1일 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 약 5 mg 내지 약 1000 mg의 범위에 있는, 방법.

### 청구항 8

제4항에 있어서, 총 1일 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 약 50 mg 내지 약 250 mg의 범위에 있는, 방법.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 화합물의 투여 경로가 경구, 국소, 피내, 경피 및 피하로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 10

제7항에 있어서, 상기 세포 증식성 질환이 피부 암인 방법.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 피부 암이 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 카포시 육종, 머켈 세포 암종, 및 피하 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 악성 흑색종이 전이성인, 방법.

### 청구항 13

제7항에 있어서, 상기 세포 증식성 질환이 광선 각화증 및 이형성 네비로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 추가로 12-HETE 수준이 감소되는, 방법.

#### 청구항 15

개인에서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성의 UV-유도된 손실을 방지하거나 억제하는 방법으로서, 화합물 프테로스틸벤의 치료 유효량을 그러한 치료를 필요로 개인에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가되는, 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 UGT 활성이 UGT 발현의 유도에 의해 증가되는, 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 개인이 세포 증식성 질환을 앓는, 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 개인이 인간인, 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 프테로스틸벤 화합물이 약제학적으로 또는 기능성 식품으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물로 제공되는, 방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 총 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 조성물의 총 중량 기준으로 약 0.1% 중량% 내지 약 10 중량%의 범위에 있는, 방법.

#### 청구항 21

제19항에 있어서, 총 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 0.5 중량%의 범위에 있는, 방법.

#### 청구항 22

제19항에 있어서, 총 1일 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 약 5 mg 내지 약 1000 mg의 범위에 있는, 방법.

#### 청구항 23

제19항에 있어서, 총 1일 투여량에 대한 프테로스틸벤의 치료 유효량이 약 50 mg 내지 약 250 mg의 범위에 있는, 방법.

#### 청구항 24

제22항에 있어서, 상기 화합물의 투여 경로가 경구, 국소, 피내, 경피, 및 피하로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 25

제22항에 있어서, 상기 세포 증식성 질환이 피부 암인, 방법.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 피부 암이 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 카포시 육종, 머켈 세포

암종, 및 피하 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 악성 흑색종이 전이성인, 방법.

#### 청구항 28

제22항에 있어서, 상기 세포 증식성 질환이 광선 각화증 및 이형성 네비로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 29

제22항에 있어서, 상기 세포 증식성 질환이 유방암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암, 고환암, 대장암, 폐암, 신장암, 간암, 뇌암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 및 뼈암으로 이루어진 그룹에서 선택되는 암인, 방법.

#### 청구항 30

제15항에 있어서, 추가로 12-HETE 수준이 감소되는, 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

유효량의 프테로스틸벤을 사용하여 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 활성을 증가시키거나 유도하기 위한 방법이 세포 증식성 질환을 치료하는 방법과 관련하여 기술된다. UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성을 유도하기 위하여 개인에게 투여하기에 적절한 프테로스틸벤을 함유하는 약제학적 제제 및 기능성 식품 제제가 기술된다.

### 배경기술

[0002]

II기(Phase II) 대사 동안, 내생적 또는 외생적 기질이 내생적 분자의 공유결합성 부착을 통해 보다 친수성으로 된다. 접합 모이어티(conjugating moieties), 예를 들어, 설포네이트, 글루쿠로네이트, 글루타치온, 글리시네이트, 아세테이트, 및 메틸레이트가 형성될 수 있기 때문에, II기는 접합(conjugative) 대사라고도 부른다. 보통 II기 대사는 기질 분자의 친수성을 증가시키기 위하여 신체에 의해 사용되며, 이는 접합 생성물의 수송 및 제거를 용이하게 한다.

[0003]

II기 글루쿠론산화 반응은 효소 중 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT)계(family)에 의해 촉매된다. 글루쿠론산화 반응은 글루쿠로노실 그룹을 우린딘 5'-디포스포-글루쿠론산(UDP-GA)으로부터 산소, 질소, 황 또는 카복실 작용기를 함유하는 기질 분자로의 전이로 이루어진다. UGT 효소는 발암물질의 돌연변이원성, 및 비생체 성분 및 내생 대사 중간체의 독성에 대해 고반응성 방어 시스템을 나타낸다. 또한, 대사 활성 조직에서, 특정 전사(transcription) 인자, 예를 들어, 페록시좀 증식제-활성화 수용체(PPARs)는 UGT 유전자 발현 및 활성의 조절에서 능동적인 역할을 한다(참조, Runge-Morris, *et al.*, *PPAR Res.*(2009), Article ID 728941, 14 pages, "Regulation of Sulfotransferase and UDP-Glucuronosyltransferase Gene Expression by the PPARs"(Hindawi Publ. Co., New York).

[0004]

글루쿠론산화는 생물학적으로 활성인 내생적 호르몬 및 대사 중간체의 조절에 생리학적 역할을 한다. 하나의 중요한 내생적 UGT 기질은 빌리루빈이고, 이의 대사는 UGT1A1에 의해 엄격히 조절되고, 따라서, 제거 생성물 빌리루빈 디글루쿠로니드를 형성한다. 또 다른 유사 형태(isoform)인, UGT2B4는 인간의 간에서 UGT 효소를 접합하고, 히오테옥시콜산의 글루쿠론산화를 촉진하는 주요 담즙산으로 알려져 있다. 또한, UGT의 다양한 유사 형태가 유도 가능하다는 것이 관찰되어 왔고, 그들의 활성 조절이 약물 탈독소화 및 제거에 중요한 결정 요소일 수 있다. 예를 들어, PPAR은 UGT 조절에서 중요한 역할을 한다(Barbier, *et al.*, *J. Biol. Chem.*(2003) 278:32852-32860).

[0005]

PPAR 핵 수용체 네트워크는 세포 에너지 균형의 중심 결정 요소를 나타낸다. 레티노이드 X 수용체(RXR)와의 이형이량체 협력으로, PPAR은 세포 지질 대사, 에너지 항상성 및 염증에 관련되는 넓은 범위의 표적 유전자(UGT를

포함)의 발현을 통합할 수 있는 리간드-활성화 핵 수용체 전사 인자를 형성한다. PPAR-알파 유사 형태 발현은 간, 신장, 및 심장에서 가장 현저하며, 여기서 상기 발현은 지방 산 산화의 조절에 관여한다. PPAR-알파는 또한 생체변환 효소(biotransformation enzyme)의 유도를 매개할 수 있다. 효소 수용체 활성화 결합에 대한 키-락(key-lock) 유사체를 사용하여, 지방산은 세포 에너지의 주요 공급원을 나타내고, PPAR-알파의 중요한 생리학적 활성화제이다. 앞서 언급된 PPAR-RXR 이형 이량체(heterodimer)는, 다른 공동-활성화제와 연합하여, 표적 유전자의 조절 영역에서 페록시좀 증식제 반응 요소(PPRE)라고 불리는 DNA 서열에 결합하여, UGT 등과 같은 효소의 전사 및 번역이 개시되게 된다.

[0006]

그러므로, UGT의 발현 및 활성화를 조절하기 위하여, 적절하고 선택적인 효소 유도제가 제공되어야 한다. 인간에서의 특정한 UGT 유도제, 예를 들어, PPAR-알파 작용제인 클로피브레이트(clofibrate)가 공지되어 있다 (Barbier, *loc. cit.*). 쥐에서, UGT1A1은 PPAR-알파 표적 유전자이고, PPAR-알파 작용제와 같은 특정 유도제에 노출되면 간에서 이 UGT의 mRNA 발현을 증가시킬 수 있다(Shelby, *et al.*, *Drug Metab. and Disposition* (2006) 34:1772-1778).

[0007]

더욱이, UGT는 12-하이드록시에이코사테트라에노익 산(hydroxyeicosatetraenoic acid), 또는 12(S)-HETE(“12-HETE”)을 글로쿠론산화 및 불활성화시키는 것으로 나타났다(Trugeon, *et al.* *J. Lipid Res.* (2003) 44:1182-1191, 참조). 특정한 염증 과정, 및 또한 UV-유도된 손상 및/또는 피부 발암에 대한 반응으로서, 막 인지질에 자연적으로 존재하는 지방산인 아라키돈 산(“AA”)이 리폭시게나제(LOX)에 의해 다수의 활성 에이코사노이드로 대사된다. AA에 대한 LOX 대사로 인해 류코트리엔 및 하이드록시에이코사테트라에노익 산(HETE)이 생성된다. 5-LOX는 류코트리엔 및 5-HETE의 생성을 초래하고, 한편, 12-LOX는 12-HETE를 생성한다. 특히, 리폭시게나제는 AA를 불안정한 하이드로페록시-에이코사테트라에노익 산(HPETE)으로 변환시키고, 이는 이어서 페록시다제에 의해 HETE로 가수분해된다. 늘어나는 증거에 의해 5-LOX 및 12-LOX 대사물이 증가된 증식, 신생혈관 생성 및 세포 이동뿐만 아니라 세포 자살(apoptosis)에 대한 내성을 통하여 발암을 촉진한다는 것이 밝혀졌다. 정상 상피에 대부분 결여되어 있는 5-LOX 및 12-LOX는 종종 다양한 상피 암에서 구조적으로 발현된다.

[0008]

12-LOX mRNA의 높은 수준은 또한 말기 암 및 나쁜 예후로 이어졌다. 추가적으로, 12-LOX는 마우스 모델에서 피부 발암에 직접적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌고, 12-HETE는 마우스에서 정상 피부에 비교하여 피부 종양에서 높은 수준으로 검출되었다. 특히, 12-HETE의 수준은 동일한 마우스의 정상적 피부에서 보다 유두종(papillomas) 및 편평 세포 암종(squamous cell carcinomas)에서 50배 더 높았다(Virmani, J., *et al.*, *Cancer Lett.* (2001) 162(2):161-165; Krieg, P., Krieg, P., *et al.*, *Mol. Carcinog.* (1995) 14(2): 118-129). 또 다른 모델은 특이적 12-LOX 억제제(Baicalin)의 사용이 피부의 UVB-유도 DNA 손상에 대해 보호적임을 밝혀냈다(Bing-Rong, Z., *et al.*, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* (2008) 24(4): 175-182). 이 결과는 또한 피부 암 진전에서 12-HETE의 중요성을 뒷받침한다. 따라서, 이론에 구속되려고 하지 않는다면, 인간의 피부 암은 직접적으로 12-LOX의 억제를 통해, 또는 12-LOX 신호화를 억제하여, 즉 12-HETE 수준의 감소에 의해 치료되거나 예방될 수 있다는 가설이 세워진다. 상기 논의된 바와 같이, UGT는 글루쿠론산화 될 수 있으며, 따라서, 12-HETE를 불활성화시켜, 이것이 신체에 의해 제거될 수 있다. 그러나, 피부에서 발현된 UGT는 피부 암 및 다른 증식 질환에서 주요한 의심 원인 인자(suspect causative agent)인 UV 조사(radiation)에 의해 하향조절(down-regulated) 될 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009]

상기로부터 비추어 볼 때, 개개의 동물 또는 인간에 효소 유도제를 투여하여 UGT의 발현을 활성화시키거나 유도할 수 있는 효소 유도제 또는 작용제를 제공하는 것이 바람직할 것이다. 또한, UGT의 발현을 활성화시키거나 유도할 수 있는 효소 유도제 또는 작용제는 12-HETE의 수준을 감소시킬 것이며, 이는 본 분야에 유용한 기여를 할 것이다.

[0010]

추가로, 치료 유효량의 화합물 프테로스틸벤을 치료를 필요로 하는 개인에게 투여하는 것(여기에서, UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가된다)을 포함하여, 피부 암을 포함한, 세포 증식성 질환에 대해 개인을 치료하기 위해 효소 유도제 또는 작용제를 사용하는 것은 본 분야에 유용한 기여를 할 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011]

개인의 세포 증식성 질환을 치료하기 위한 방법이 제공되는데, 이 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 개인에게

치료 유효량의 화합물 프테로스티렌을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가된다.

[0012] 대안적 실시형태에서, 개인(예를 들어, 세포 증식성 질환을 앓는 개인)에서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성의 UV-유도 손실을 방지하거나 억제하는 방법이 제공되는데, 이러한 치료를 필요로 하는 개인에게 치료 유효량의 화합물 프테로스티렌을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가된다.

[0013] 추가의 실시형태에서, 암 발생 전의 화학선 각질 섬유(AK) 손상의 12-HETE 수준이 프테로스티렌의 투여에 의해 감소될 수 있다.

[0014] 또 하나의 추가의 실시형태에서, 암 발생 전의 증식 세포, 또는 악성 세포의 12-LOX 발현 수준이 프테로스티렌의 투여에 의해 감소될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 실시형태에서 제안된 대사 경로를 기술하고, 여기에서 UGT는 12-HETE를 불활성화시킬 수 있다.

도 2는  $25 \text{ mJ/cm}^2$ 의 UV-B의 단일 용량에 노출된 정상 인간 멜라닌 세포에서 UGT의 UV-B 하향 조절을 도시한다. 검은 막대: 미처리 세포, 사선 막대: 각각 좌에서 우로, 4 시간 및 24 시간 UV-B 처리된 세포.

도 3은 일 실시형태로 정상 인간 멜라닌 세포에서의 UGT2 유사 형태(isoform)의 UV-B 유도된 손실과 프테로스티렌(Ptero)에 의한 상기 손실의 방지를 도시한다. UV-B 용량:  $25 \text{ mJ/cm}^2$ . 검은 막대: 미처리 세포; 사선 막대: UV-B 처리된 세포; 수직선 막대: UV-B 처리되고 프테로스티렌 처리(100nM).

도 4는 또 다른 실시형태로서 UGT 유사 형태 계 구성원(양성 대조군으로서 GAPDH)에 대한 총 mRNA의 RT-PCR 분석에 의한 1차 배양된 정상 인간 각질 세포에서 UGT mRNA가 발현되는 것을 도시한다.

도 5는 또 다른 실시형태로서 정상 인간 각질 세포에서의 UGT2B17 유사 형태의 UV-B 유도된 손실 및 프테로스티렌에 의한 상기 손실의 방지를 도시한다. UV-B 용량:  $25 \text{ mJ/cm}^2$ . 검은 막대: 미처리된 세포; 사선 막대: UV-B 처리된 세포; 수직선 막대: UV-B 처리되고 프테로스티렌 처리됨(100nM).

도 6은 SKmel28 인간 멜라닌 세포를  $50 \mu\text{M}$ 에서 프테로스티렌(Ptero) 또는 레스베라트롤(Res)(적재 대조군으로서 B-액틴)로 처리 후, 웨스턴 블랏에 의한 12-LOX 발현을 도시한다.

도 7은 동일한 인간 환자(n=6)의 정상 피부와 AK에서의 12-HETE의 측정된 수준을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 프테로스티렌을 함유하는 안전하고 효과적인 식이 보충제(dietary supplement)가 제공되는데, 이것은 세포 증식성 질환의 치료를 위해 개인에게 치료 유효량으로 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포 증식성 질환을 앓는 개인을 치료하는 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 개인에게 치료 유효량의 화합물 프테로스티렌을 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성이 증가된다.

[0017] 일 실시형태에서, 프테로스티렌을 함유하는 상기 안전하고 효과적인 식이 보충제는 화학선 각질 섬유(actinic keratoses, AK)의 퇴화 및 UV-유도 피부 광 손상과 관련된 다른 암 발생 전의 변화를 일으킬 것이다. 더욱이, 프테로스티렌을 함유하는 상기 식이 보충제는 비-흑색종 피부 암(NMSC)의 치료, 억제 및/또는 예방에 사용될 것이다.

[0018] 추가의 실시형태에서, 세포 증식성 질환을 앓는 개인에서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성의 손실을 억제하는 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 개인에게 치료 유효량의 화합물 프테로스티렌을 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT) 활성은 증가된다.

[0019] UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT)는 고-에너지 공통 인자인, UDP-글루쿠로닉 산으로부터 비생체 성분으로, 약물로, 또는 이용 가능한 반응성 또는 친핵성 중심, 예를 들어 하이드록실, 카복실, 아미노, 또는 티올 그룹을 함유하는 내생적 기질로 글루쿠로닉 산의 전이를 촉진한다. UGT는 간 및 장에서 주로 발현되는 II기 생체 변형 효소이고, 소포체의 루미날(luminal) 표면에 위치하는 막-결합 효소이다. 모(parent) 기질에 비해서, 글루쿠론산



화의 최종 생성물은 전형적으로 보다 극성이고, 소변 또는 담즙을 통해 분비 및 제거하는 데에 보다 적합하다.

- [0020] 내생적 UGT 기질은 빌리루빈, 중성 스테로이드, 담즙산, 지방산 및 레티노이드를 포함한다. 비생체 성분 UGT 기질은 벤조[a]피렌과 같은 환경적 독성물질로부터, 아세트아미노펜 및 기타 NSAID와 같은 일반 의약품까지 포함한다. 개별 UGT 유사 형태는 기질 특이성 및 유도 가능한 조절의 뚜렷한 패턴을 나타낸다. 상이한 UGT가 종- 및 조직-특이적 방법으로 발현된다. 두 개의 주요 UGT 유전자 계는 UGT1 및 UGT2이다.
- [0021] PPAR은 UGT의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히, UGT는 PPAR-감마와 반대로 PPAR-알파의 표적이다. 공지된 PPAR-감마 활성화제인, 레스베라트롤은 UGT를 어느 정도 유도하는 것을 보여주었지만, PPAR-알파의 활성화제는 아니다. 유사한 스틸벤에 대한 한 그룹의 연구에서, 오직 프테로스틸벤만이 시프로피브레이트와 유사한 방법으로, PPAR-알파를 활성화시켰다(Rimando, *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* (2005) 53:3403-3407). 프테로스틸벤은 PPAR-감마의 활성화제라고 생각되지 않는다. 이 아류-형 선택성은 프테로스틸벤을 사용하여 UGT의 발현을 활성화시키거나 유도하는 현재의 접근법에서 유리하다고 생각된다.
- [0022] UGT는, 예를 들어, UV-유도된 피부 발암 과정 중 효소 12-LOX에 의해 생성되는 12-하이드록시에이코사테트라에노익 산(12-HETE)을 글루쿠론산화하거나 불활성화시키는 것으로 밝혀져 있다. 프테로스틸벤, 및 그의 기능성 식품 제제는 UGT 활성을 유도하여, 피부의 12-HETE 수준을 감소시키는 것이 발견되었다.
- [0023] 도 1은 아라키돈 산(AA) 대사 및 UGT 접합 대사의 한 모델을 보여준다. 사이클로옥시제네스(Cyclooxygenases)는 또한 염증 과정에서 역할을 할 수 있으나, 본 명세서에서는 논의되지 않는다. 전체적으로, 도 1은 12-HETE의 생성 및 대사를 포함하여, UV-유도된 피부 암 진행(또는 다른 유형의 UV-유도 피부 손상, 예를 들어, 일광화상(sunburn))에서 AA 대사의 제안된 역할을 보여준다.
- [0024] 비-흑색종 피부 암(NMSC)은 인간을 괴롭히는 월등히 흔한 암이다. NMSC의 발병률은 모든 다른 형태의 조합된 암과 거의 동등하게 크다. 2007년 동안, 미국 암 학회는 백만 건 이상의 비-흑색종 피부 암의 새로운 케이스가 미국에서 진단되었으며, 비-흑색종 피부 암과 관련하여 대략 2,700명이 사망했다고 추정했다. 그러나 피부의 편평 세포 암종 및 기저 세포 암종은 보고 대상이 아닌 점에서 이 추정치는 신뢰성이 낮고, 따라서, 매년 실제 케이스의 수는 아마도 삼백만 건을 넘을 것이다. 두 개의 주요 유형의 NMSC가 있다: 기저 세포 암종이 상기 케이스의 대략 80%를 차지하는 반면에, 편평 세포 암종은 대략 20%를 차지한다. NMSC에 의한 대부분의 사망은 편평 세포 암종에 의해 야기된다. 편평 세포 암종을 포함하는 대부분의 NMSC는 태양 광 노출에 의해 야기되어 결과적으로 광발암(photocarcinogenesis)을 수반한다. NMSC에 대한 치료는 외과적이고, 종종 흉터 및 다른 병적 상태를 초래한다.
- [0025] 화학선 각질 섬유(AK)는 암 발병 전의 피부 신생물(neoplasms)이고, 이는 편평 세포 암종을 발병시킬 수 있다. 이들은 장기간 태양에 노출되는 결과 발생한다. AK 및 NMSC의 다른 원인들은 태닝 부스(tanning booth) 또는 아크 용접(arc welding)으로부터의 UV 광, x-조사 또는 특정 화학물질에 노출되는 것이다. AK는 매우 흔한 병변이고, 천만 명 이상의 미국인에 존재한다. 오스트레일리아의 평균-위험 개인에서 AK의 매년 진행률은 10,000 명당 8 내지 24 명이다. 고 위험 개인(다중 AK를 갖는 개인)은 3년에 걸쳐 12 내지 30%의 높은 진행률을 갖는다. AK에서 비롯한 편평 세포 암의 2 퍼센트는 전이될 수 있고, 7 퍼센트는 국소적으로 재발할 수 있다. 화학선 각질 섬유는 액체 질소 또는 5-플루오로우라실과 같은 국소적 화학 치료 요법으로 가장 흔히 치료된다. 덜 흔하게는 이들은 다른 국소적 작용제(디클로페낙 및 이미퀴모드), 광역동 치료, 화학적 박피 또는 비-분획된 또는 분획된 박피성 레이저 재생(resurfacing)으로 치료된다.
- [0026] 본 명세서에서, “광선각화증(actinic keratosis)”은 AK를 생성하는 증식 질환이라는 것이 이해될 것이다.
- [0027] 일부 치료법이 공지되었지만, 치료 비용, 병적 상태(morbidity), 및 사망률을 감소시키기 위하여 광선 각화증 및 피부 암의 형성을 사전에 방지 또는 억제하는 것이 바람직할 것이다. 햇빛 차단 수명(lifetime of sun protection)은 광선 각화증 및 비-흑색종 피부 암의 발전 위험을 최소화하기 위한 우수한 방법이다. 그러나, 많은 비율의 환자가 이미 광범위한 광 손상을 입었고, 햇빛 차단 거동을 변화시키는 것은 어려운 것으로 판명됐다.
- [0028] 이상적인 화학적 방지제는 암 발병 이전의 변화의 퇴행을 달성할 수 있고, NMSC의 발달을 방지하며, 최소의 부작용으로 또는 부작용 없이 자외선 관련 손상을 최소화할 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 화학선 각질 섬유를 제거할 수 있는 국소 작용제가 있으나, 이들은 일반적으로 치료 부위에서 상당한 염증을 초래한다. 새로운 접근이 요구된다.
- [0029] 인간 피부는 하부 피부 층(진피) 위에 있는 상부 표피 층(표피)을 포함한다. 표피는 주로 각질세포

(keratinocyte)로 이루어지고, 이는 바닥에서 발달하여, 상부로 이동하며, 끊임없이 대체된다. 오래된 죽은 세포들이 떨어져 나감에 따라, 이들은 대체되고, 이렇게 이 층은 끊임없이 새롭게 된다. 표피는 또한 층의 바닥 근처에 주로 위치하는 멜라닌 세포를 함유하는데, 이 멜라닌 세포는 멜라닌 색소를 생성하여, 피부 색에 기여하고, 또한 UV-차단을 제공한다. 표피는 또한 면역 시스템에 관여(involve)하는 수지상(Langerhans) 세포 및 층의 바닥에서 발견되는 기저 세포를 함유한다. 표피는 또한 편평 세포를 포함한다. 표피 및 진피 층은 또한 줄기 세포 및 모공을 함유한다. 포유 동물에서, 멜라닌 세포는 또한 조직들 중에서도 뇌, 눈, 귀 및 심장에 분포되어 있다.

[0030] 기술된 피부 세포는 UV 광-유도된 손상, DNA 손상, 및 발암에 취약하다.

[0031] 프테로스틸벤 (3,5-디메톡시-4'-하이드록시-트랜스-스틸벤)은 혈액에서 약 105 분의 반감기  $t_{1/2}$ 를 갖는 경구적으로 생체 이용 가능한 화합물이다. 대조적으로, 레스베라트롤은 생체 이용성이 나쁘고, UGT에 의해 쉽게 대사되어 훨씬 짧은 반감기(혈액에서 약 14 분의  $t_{1/2}$ )에 이르고, 이로써 화학적 예방제(chemopreventive agent)로서의 그의 효능이 방해된다.

[0032] 몇몇 연구에 의해 레스베라트롤을 경구로 공급하거나 국소적으로 도포했을 때 마우스 피부의 UV-B 매개 세포 손상을 방지한다는 것이 밝혀졌다(Afaq, F., et al., "Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2003) 186(1):28-37; Reagan-Shaw, S., et al., "Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin", *Oncogene* (2004)23(30):5151-60; and Aziz, M.H., et al., "Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin", *Photochem. Photobiol.* (2005) 81(1): 25-31). 레스베라트롤은 또한 UGT 활성을 유도하는 것으로 나타났다(Chow, H.H., et al., "Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study", *Cancer Prev. Res. (Phia. Pa.)*, (2010) 3(9): 1168-75). 그러나, 화학적 예방제로서 인간에게 사용되는 것은 열등한 생체 이용성으로 인해(적어도 단일 작용제로는) 가능성이 없는 것으로 보인다. 레스베라트롤은 인간에 잘 용인되지만, (알맞게도, UGT에 의해) 쉽게 대사되어 화학적 예방제로서 그의 효능을 방해하는 짧은 반감기를 갖게 된다.

[0033] 프테로스틸벤은 포도 및 장과류(berries)에서 발견된다. 이는 자연적으로 발생하는 레스베라트롤의 디메틸화 유사체이나, UGT에 의한 대사를 극적으로 감소시킬 수 있는 메틸 그룹 때문에 아마도 보다 긴 반감기를 갖는다(Hougee, S., et al., "Selective COX-2 inhibition by a Pterocarpus marsupium extract characterized by pterostilbene, and its activity in healthy human volunteers", *Planta Med.* (2005) 71(5):387-92). 프테로스틸벤은 마우스 피부에서 NF-KB, AP-1 및 iNOS 활성화의 억제를 포함하여 마우스에서의 몇몇 생물학적 분석에서 레스베라트롤과 동등하게 또는 상당히 더 효능이 있는 것으로 밝혀졌다(Cichocki, M., et al., "Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis", *Mol. Nutr. Food Res.* (2008) 52 Suppl 1:S62-70).

[0034] 프테로스틸벤 또는 그의 유도체를 포함하는 기능성 식품 제제는 UDP-글루쿠로노실 전이 효소(UGT)의 활성을 유리하게 증가시키거나 이것의 생체내 발현을 유도하는 데에 사용될 수 있다고 여겨진다. 이 UGT의 상향 조절은 예를 들어 인간 각질 세포 또는 멜라닌 세포에서 관찰되는 UV 조사에 대해 반응하는 하향 조절을 포함하여, 특정 인자들에 의해 야기되는 UGT의 손실을 억제하거나 방지할 수 있다. 도 1 참조.

[0035] 프테로스틸벤의 유용한 치료 투여량은, 인간 개인에서 약 5 mg 내지 약 1000 mg의 범위일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 적절한 투여량 범위는 약 20 mg 내지 약 250 mg이다. 프테로스틸벤은 각각 약제학적으로 허용되는 또는 기능성 식품으로서 허용되는 담체를 포함하여, 약제학적 또는 기능성 식품 조성물로서 제형화될 수 있다. 프테로스틸벤을 함유하는 약제학적 조성물의 일 실시형태에서, 프테로스틸벤의 적절한 수준은 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량% 범위일 수 있다.

[0036] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 기능성 식품으로서 허용 가능한 담체와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 제제에서 활성 성분은 1 중량% 내지 99 중량%, 또는 달리 0.1 중량% 내지 99.9 중량%를 포함할 수 있다. "기능성 식품으로서 허용 가능한 담체"는 제제의 다른 성분과 친화성이 있고 사용자에게 해롭지 않은 임의의 담체, 희석제 또는 부형제를 의미한다. 유용한 부형제에는 미세결정성 셀룰로즈, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이



트, 임의의 허용가능한 당(예를 들어, 만니톨, 자일리톨)이 있고, 화장품 용도로는 오일-기제가 바람직하다.

- [0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 제제에서 활성 성분은 1 중량% 내지 99 중량%, 또는 대안으로서 0.1 중량% 내지 99.9 중량%를 포함할 수 있다. “약제학적으로 허용 가능한 담체”는 제제의 다른 성분과 친화성(compatible)이 있고 사용자에게 해롭지 않은 임의의 담체, 희석제 또는 부형제를 의미한다.
- [0038] 프테로스티렌은 예를 들어 인간 환자에서 약 50 mg 내지 약 250 mg의 1일 투여량으로 제공될 수 있다. 또 다른 적절한 투여량 범위는 1일 약 50 mg 내지 약 150 mg이다. 또 다른 적절한 투여량 범위는 1일 약 50 mg 내지 약 100 mg이다. 특히 적절한 투여량은 1일 투여되는 약 100 mg이다.
- [0039] 피부가 표적 기관으로서 사용될 때, AK 병변의 12-HETE 수준은 프테로스티렌 보충제(supplementation)를 투여 받기 전 및 투여 받은 후의 개인의 UGT의 발현 유도를 평가하기 위하여 결정될 수 있다. 다음은 UGT의 발현을 유도하고 그리고/또는 활성을 증가시키고, 측정 가능한 최종점 중에서 특히 12-HETE의 수준을 감소시키고 그리고/또는 12-LOX의 발현을 억제하는 프테로스티렌의 효능을 평가하기 위한 II기 임상 시도용 일반 연구 설계이다.
- [0040] 연구 집단
- [0041] 편평 세포 암종의 병력을 갖고 현재 화학선 각질 섬유를 앓는 34 명 내지 40 명이 시험을 완료할 것이다. NMSC에 대해 고위험인 개인을 시험하고, 이들은 19세 이상이다. 특히, 대상들은 마지막 5년 이내에 적어도 하나의 편평 세포 암종을 가졌을 것이고, 현재 그들의 팔뚝에 적어도 10 개의 화학선 각질 섬유(AK)를 갖고 있다.
- [0042] 연구 설계
- [0043] 본 연구는 NMSC의 억제 또는 방지를 위한 신규 방법을 평가할 기회를 제공한다. 그것은 분자 마커(marker)의 분석부터 기술 구성 이미지(art compositional imaging)의 상태에 대한 표준 임상 평가까지 다양한 종점(endpoints)을 이용한다. 이 설계는 가치있는 검증 데이터를 얻을 수 있는 관련 중요 종점 바이오 마커를 이용하여, 추정 작용제(putative agent)를 초기 임상 시험하는, 노력을 절감시킨다.
- [0044] 적격의 대상은 약 50 mg 내지 약 250 mg 범위의 투여량으로 프테로스티렌을 경구적으로 투여받을 것이다. 일일 시험형태에서, 환자는 1일 기준으로 프테로스티렌 100 mg을 경구적으로 투여 받을 것이다. 프테로스티렌은 기능성 식품으로 허용 가능한 담체와 조합하여 적절한 기능성 식품 제제로 제공되거나 또는 상기 담체와 병용 투여될 수 있다. 대안적으로 프테로스티렌은 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 적합한 약제학적 제제로 제공되거나, 또는 상기 담체와 병용 투여될 수 있다.
- [0045] 치료 기간은 최장 약 12 주일 수 있다. 대상은 본 연구 치료의 4, 8 및 12주에 평가되고, 이어서 후처리는 연구의 16 및 20 주에 평가된다.
- [0046] AK 병변의 영상화는, 예를 들어 프테로스티렌 보충 전 및 보충 후에 혈류, 지방 및 물 함량에서의 변화를 측정하기 위하여 광역 기능성 영상화(wide-field functional imaging, WiFi) 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 광역 기능성 영상화(WiFi)는 두 개의 광역 영상화 양식(modality): 공간적으로 모듈화된 반사/형광 영상화(MI)와 레이저 반점 영상화(LSI)의 통합이다. WiFi는 동시에 탁한(turbid) 조직에서 조직 혈류 및 생화학적 조성(즉, 옥시- 및 데옥시-헤모글로빈, 물 및 지질 함량)을 측정할 수 있다. 이는 두꺼운 조직에서 수 밀리미터의 깊이에서의 빠르고(즉, 밀리 초 시간의 척도) 국소화된(즉, 수십  $\mu\text{m}$  내지 mm) 이벤트를 연구하기에 충분한 시공간(spatio-temporal) 해상도를 갖는다. 대상에 대하여 안전하고(표준 디지털 포토포그래피에 유사한, 그러나 피부에 위치한 적외선 및 근적외선을 사용하여 행해진), 빠른(10분 이하) 비침습적인 측정이 각 방문 시에 행해진다. 이들 시험은 어바인(Irvine)에 있는 캘리포니아 대학 벡크만(Beckman) 레이저 센터에서 가능하다. 적어도 3 개의 AK를 갖는 햇빛 손상 피부의 8  $\text{cm}^2$  단편의 WiFi는 각 임상 방문시에 수행될 것이다. 본 발명자들은 예비 처리와 비교하여 12 주에 AK의 감소된 혈류를 관찰할 것으로 예측한다.
- [0047] 따라서, 혈류는 맵핑된(mapped) AK의 지방 및 물 함량뿐만 아니라 비침습적인 WiFi 영상화를 사용해서 검사될 것이다. 12-HETE는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 활성화를 통해 신생 혈관 생성을 자극할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 프테로스티렌 보충 후 AK 병변에서 혈류 감소를 관찰할 것으로 예측한다.
- [0048] 연구 스케줄
- [0049] 제한되는 것은 아니지만, 피부병학적 검토, 즉 AK 및/또는 햇빛 손상에 대한 팔, 사지, 및 다른 피부 영역의 완

전한 피부 검사를 포함하여, 각 환자에 대해 초기 스크리닝 방문을 수행해야 한다. 다음 시험이 또한 실시될 수 있다: 혈액 시험(특히 형태를 갖는 CBC), 포괄적인 대사 패널(panel), 지질 패널, 및 요 분석(urinalysis).

[0050] 스크리닝 방문의 4 주 내에, 연구실 및 혈액 시험을 검토한다. 양쪽 팔뚝에 대한 사진을 찍고 AK를 계수한다. 이어서 연구 영역이 환자의 피부에서 선택되고(8 cm x 8 cm), 잔영(transparency) 상에 표시되고, 맵핑(mapping)된다. 선택된 맵핑 영역은 적어도 3 개의 AK를 가질 것이고, 오른팔 또는 왼팔일 수 있다. 영상화 부위뿐만 아니라 생검 전 및 생검 후 영역의 표시가 이루어진다. 의심되는 NMSC의 생검 시료를 수집한다. 비침습적인 영상화(즉, WiFi)가 이 단계에서 수행될 수 있다.

[0051] 일 실시형태에서, 피부 생검 부위가 처리 전 AK(pre-AK)로 표시될 수 있다. 생검 결과가 AK를 나타내지 않고, 비정형(atypical) 세포 구조를 나타내면, 대상은 계속 처리를 받고, 모니터링된다.

[0052] 임상 연구의 후반기에 걸쳐, 예를 들어 4, 8 및 12 주에, 피부 연구 영역을 모니터링하고, 검사하며, 사진을 찍고 그리고/또는 영상화 한다. 환자는 부작용에 대해서도 모니터링 될 것이다.

[0053] 12주의 종료 시에, 피부 연구 영역을 검사하고, 사진을 찍고, 영상화할 것이다. 특히, 각 환자의 양쪽 팔뚝의 AK를 사진을 찍고, 계수한다. 그리고나서 의심되는 NMSCs의 처리 후 생검 시료 및 처리 후(post treatment) AK 부위(post-AK)를 상기 혈액 및 소변 시험과 함께 수집하여 분석한다.

[0054] 일 실시형태에서, 16 및 20 주 처리 후에(또는 어떤 다른 예정된 시점 전 또는 후에), 상기와 같이 피부 연구 영역을 맵핑하고, 검사하며, 사진을 찍고, 영상화할 것이다.

[0055] 조직 샘플 및 바이오마커 평가

[0056] 출발(처리 전) 및 처리 후(12 주)에서의 4 mm AK 생검을 각 환자로부터 획득한다. 생검을 반으로 절단할 것이다. 임상적 생검 과정 직후에, 샘플을 얇게 잘라서 절반은 조직 병리학 분석을 위해 보내고, 나머지 샘플은 바이오마커 분석을 위해 실험실에 보낼 것이다. 모든 바이오마커 분석은 쌍을 이루는 샘플이 함께 분석되도록, 처리를 완료한 후 4명의 환자 집단에서 수행할 것이다.

[0057] 아라키돈산 대사물(12-HETE 및  $\text{PGE}_2$ ) 수준(pg/mg protein)을 처리 전 화학선 각질 섬유로부터 결정하고, 설정된 프로토콜에 따른 사중극자 질량 분석기(triple quad mass spectrometer)에 연결된 액체 크로마토그래피(LC/MS/MS)를 사용하여 처리 후 수준과 비교할 것이다. 분석에는 샘플 다음에 LC/MS/MS를 준비하기 위하여 조직 추출, 초음파 처리, 원심분리 및 단백질 함량 결정이 필요하다. AK의 12-HETE 및  $\text{PGE}_2$ 의 수준이 프테로스티벤 처리 또는 프테로스티벤 보충 후 상당히 감소될 것으로 예측된다.

[0058] COX-2, 12-LOX, UGT 및 15-PGDH의 단백질 수준은 설정된 프로토콜에 따른 액틴으로 표준화된 웨스턴 블랏에 의해 반 정량적으로 측정될 것이다. 프테로스티벤 처리 이후의 AK로 부터의 발현 수준의 변화는 처리 전 수준과 비교될 것이고, 농도측정(densitometry)에 의해 배로 변화된 것이 보고될 것이다. COX-2 및 12-LOX 발현은 프테로스티벤 처리 후 상당히 감소될 것으로 예측된다. 역으로, UGT 및 15-PGDH 단백질 수준은 프테로스티벤 보충 이후에 AK가 상당히 증가될 것으로 예측된다.

[0059] 임상 시험 종점

[0060] 상기 연구는 랜덤화가 없고 대조군이 없는 단일 팔(arm) 시험을 기술한다. 본 연구의 1차 목표는 프테로스티벤 보충을 받기 전 및 받은 후에 대상으로부터의 암 발병 전의 화학선 각질 섬유(AK) 병변의 생리활성 지질 12-하이드록시에이코스테트라에노익 산(12-HETE)의 수준을 평가하는 것이다. 이론에 구속되려고 하지 않는다면, 가설에 의해 본 연구 치료법이 암 발병 전의 화학선 각질 섬유의 퇴행을 일으키고 피부의 광-손상과 관련된 다른 암 발생 전의 변화를 역전시키는 안전하고 효과적인 기능성 식품임이 입증될 것이다. 할당된 연구 작용제의 모든 투여량과  $\geq 80\%$  부합성(compliance)을 나타내는 대상은 1차 종점인, 12-HETE(pg/mg protein)에 대하여 평가할 수 있는 것으로 판단될 것이다. 2차 종점은  $\text{PGE}_2$ (pg/mg protein) 및 UGT, COX-2, 15-PGDH, 및 12-LOX의 효소 단백질 수준을 포함한다. 추가적인 2차 종점은 AK 병변에서 측정된 혈류, 지방 및 물 함량, 최초의 AK 병변의 수, 새로운 AK 병변의 수, 및 비-흑색종 피부 암(NMSCs)의 수를 포함한다.

[0061] 전달 시스템

[0062] 적절한 투여 형태는 정제, 캡슐 용액, 현탁액, 분말, 검 및 과자를 포함한다. 설하(sublingual) 전달 시스템은, 혀 아래 또는 혀 위에서 용해될 수 있는 태브(tabs), 액체 방울, 및 음료를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 식용 필름, 친수성 중합체, 경구 용해성 필름 또는 경구 용해성 스트립이 사용될 수 있다. 다른 유용한

전달 시스템은 경구 또는 코 분무 또는 흡입기 등을 포함한다.

[0063] 경구 투여의 경우, 프테로스티벤은 정제, 캡슐, 환약, 분말, 과립 또는 다른 적절한 투여 형태로 조제하기 위해 하나 이상의 고체 불활성 성분과 조합될 수 있다. 예를 들어, 활성 작용제는 적어도 하나의 부형제, 예를 들어, 충전제, 결합제, 희석제, 붕해제, 용액 지연제, 흡수 가속제, 습윤제, 흡착제, 또는 윤활제와 조합될 수 있다. 다른 유용한 부형제는 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 만니톨, 자일리톨, 감미제, 전분, 카복시메틸셀룰로즈, 미세결정성 셀룰로즈, 실리카, 젤라틴, 이산화 규소 등을 포함한다.

[0064] 투여 경로

[0065] 화합물은 제한되는 것은 아니지만, 경구, 설하, 구강, 눈, 폐, 직장 및 비경구 투여를 포함하는 임의의 경로에 의해, 또는 경구 또는 코 분무(예를 들어, 분무된 증기, 방울, 또는 고체 입자의 흡입)로서 투여될 수 있다. 비경구 투여는, 예를 들어, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 복강 내, 비강 내, 질 내, 낭 내(예를 들어, 방광에), 피내(intradermal), 경피(transdermal), 국소적, 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 나중에 그 약물이 전신적으로 또는 국소적으로 방출되는 조절된 제형으로 환자의 몸 안에 프테로스티벤이 서서히 주입되는 것이 본 발명의 범위 내에서 예상된다. 예를 들어, 그 약물은 순환계로 조절되어 방출되도록, 또는 국소의 종양 성장 부위에 방출되도록 저장소(depot)에 저장할 수 있다.

[0066] 치료는 단일 기간, 연속된 기간, 또는 이격된 기간 중 어느 하나로, 필요한 기간 동안 수행될 수 있다. 치료의사는 환자의 반응에 근거하여 어떻게 치료를 증가시킬지, 감소시킬지, 또는 중단시킬지를 알 것이다. 일 실시형태에 따르면, 치료는 약 4 내지 약 12 주 동안 수행된다. 치료 스케줄은 필요한 대로 반복될 수 있다.

[0067] 프테로스티벤 또는 그의 기능성 식품 제제는, 제한되는 것은 아니지만 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 카포시 육종, 머켈(Merkel) 세포 암종, 피부 림프종, 기태(moles), 이형성 네비(dysplastic nevi), 지방종, 혈관종, 피부 섬유종, 켈로이드, 및 건선을 포함하는 피부 암을 포함하는 일련의 암 및 종양 유형에 대해 효과적인 것으로 여겨진다.

[0068] 피부 암은 전이성이거나 전이성이 아닐 수 있는 고형 종양일 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공된 용어, “종양 세포”는 상기 확인된 질환 중 어느 하나에 의해 고통받는 세포를 포함한다.

[0069] 제한되는 것은 아니지만 유방암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암, 고환암, 대장암, 폐암, 신장암, 간암, 뇌암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 및 뼈암으로 구성된 그룹에서 선택된 암을 포함하여, 다른 세포 증식성 질환은 본 명세서에 기술된 프테로스티벤 제제를 사용하여 치료받을 수 있다.

[0070] 또한 프테로스티벤, 및 그의 기능성 식품 제제는 양성 표시(benign indication)를 특징으로 하는 세포 증식성 질환인 비-암 세포 증식성 질환의 치료에 유용한 것으로 여겨진다. 또한 이러한 질환은 세포가 비정상적으로 높은 속도로 신체에 의해 만들어진다는 점에서 세포 증식성 또는 과증식성인 것으로 알려질 수 있다. 프테로스티벤 제제를 사용하여 치료될 수 있는 것으로 여겨지는 비-암 세포 증식성 질환은 화학선 각질 섬유(AK) 및 다른 암 발생 전의 병변을 포함한다.

[0071] UV-B 조사 치료를 위한 재료 및 방법 섹션

[0072] 시약 및 세포 배양

[0073] 정상 인간 멜라닌 세포를 UC 어바인 인터널 리뷰 보드(UC Irvine's Internal Review Board)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 포경 수술에서 분리-동정된 신생의 포피로부터 단리했다. 멜라닌 세포를 앞서 기술한 바와 같이 단리하고(Eisinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79(6): 2018-22; and Liu, et al., *J. Invest. Dermatol.*(2009) 129(2): 422-31), 2% 소 태아 혈청, 10 ng/ml의 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세테이트 및 0.15% 소 뇌하수체 추출물로 보충된 MCDB153 배지에서 배양했다. 프테로스티벤을 크로마덱스, 인크.(ChromaDex, Inc.)(Irvine, California)로부터 입수했다.

[0074] 멜라닌 세포의 UV-B 조사 처리

[0075] 앞서 기술한 바와 같이 UV-B 조사를 수행하였다(Liu, F., et al., “Mitf links Erk 1/2 kinase and p21 CIP1.WAF1 activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells”, *Mol. Cancer*(2010) 9:214). 세포를 약 70% 콘플루언스(confluence)까지 성장시키고 UV-B 조사 처리를 위해 배지를 완전히 제거하였다. UVB 조사는 312 nm에서 피크 파장을 갖는 스트라타링커 UV 크로스링커 장치(Stratalinker UV crosslinker apparatus) (Stratagene, La Jolla, California)에서 수행하였다. UV 강도는 적절한 프로브를

구비한 라디오미터를 사용하여 측정하였다. 배양 배지는 조사 처리 직후 대체하고, 세포는 회복시키기 위해서 37℃ 인큐베이터에 다시 넣었다. 장기 노출의 경우, 이 과정을 총 5회의 노출 동안 매시간 마다 반복했다. 본 명세서에서 나타난 시간은 첫 번째 노출 후의 시간을 항상 반영한다.

[0076]

총 RNA 단리, 역 전사 및 리얼-타임 PCR

[0077]

총 RNA를 표준 제조자의 프로토콜에 따라 아룸 총 RNA 미니 키트(Arum total RNA mini Kit)(BioRad, Hercules, California)를 사용하여 세포로부터 단리했다. RNA를 NanoDrop 1000(Thermo/Fisher, Wilmington, Delaware)을 사용하여 정량화했다. 그리고나서 cDNA를 표준 프로토콜에 따른 아이스크립트 역전사 키트(iScript Reverse Transcriptase Kit)(BioRad)를 사용하여 1.0  $\mu$ g RNA로부터 만들었다. 멜라닌 세포에서 UGT mRNA 발현 수준을 분석하기 위하여 앞서 기술된 바와 같이 리얼-타임 PCR을 수행하였다(Chen, G., et al., "Identification of a prevalent functional missense polymorphism in the UGT2B10 gene and its association with UGT2B10 inactivation against tobacco-specific nitrosamines", *Pharmacogenet. Genomics* (2008) 18(3): 181-91; and Dellinger, R.W., et al., "Glucuronidation of PhIP and N-OH-PhIP by UDP-glucuronosyltransferase 1A10", *Carcinogenesis*(2007) 28(11): 2412-8). 따라서, 미리 설계된 태크맨(TaqMan) 유전자 발현 분석(Applied Biosystems, Calsbad, California)(ID's Hs00426592\_m1 for UGT2B7; Hs02556282\_s1 for UGT2B10; Hs03008769\_g1 for UGT2B15; Hs0016857\_m1 for NQO1 and Hs99999905\_m1 for GAPDH)을 제조자의 프로토콜에 따라 사용하였다. 표준화하는 '하우스키핑(housekeeping)' 유전자 및 양성 대조군으로서 글리세르알데하이드 3-포스페이트 디하이드로기나제(GAPDH)를 사용하는 50 ng 의 cDNA를 함유하는 총 부피 20  $\mu$ l을 사용하여 리얼-타임 PCR을 수행하였다. 리얼-타임 PCR은 CFX96 리얼 타임 PCR 기기(BioRad) 상에서 수행하였다. 보고된 mRNA 발현값은 표준 편차를 갖는 적어도 3회의 독립적인 실험의 평균값이다.

[0078]

상기 기술된 방법들은 하기 실시예와 연결하여 더욱 이해될 수 있다.

[0079]

#### 실시예 A

[0080]

급성 UV-B 노출 이후 정상 인간 멜라닌 세포에서의 UGT 발현의 하향 조절

[0081]

UGT2B7, UGT2B10 및 UGT2B15가 분리-동정된 신생아 포피로부터 단리된 인간 멜라닌 세포에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. 또한, 어떤 UGT 발현도 검사된 5 개의 흑색종 세포주 중 4개에서는 관찰되지 않았다. 이는 UGT 발현의 손실이 흑색종 병인의 일부라는 흥미로운 가능성을 제기한다. UV-B가 멜라닌 세포에서의 UGT 발현을 조절할 수 있는가를 결정하기 위하여, 다시 한번 멜라닌 세포를 분리-동정된 신생아 포피로부터 단리하고 배양했다. 그리고나서, 이들 세포를 일광화상 용량과 거의 동등한, 25 mJ/cm<sup>2</sup>의 UV-B 단일 용량에 노출시켰다. 이어서, 조사 후 0 시간, 4 시간 및 24 시간에 세포들을 수집하고, 상기 재료 및 방법에서 기술된 바와 같이 GAPDH 발현으로 표준화된 리얼-타임 PCR을 사용하여 UGT 발현에 대해 분석했다. 도 2에 나타난 바와 같이, UGT2B7, UGT2B10 및 UGT2B15의 발현 수준은 급성 UV-B 용량에 반응하여 모두 감소하였다. 특히, UGT2B7 발현은 그 발현이 노출 후 24 시간 만에 상승된 수준으로 되돌아 오지만, 조사 후 4 시간 동안 검출할 수 없다. UGT2B10 발현은 4시간 만에 손실되고, 처리 후 24 시간 동안 검출할 수 없는 반면에, UGT2B15 발현 수준은 4 시간에 변하지 않지만, 조사 후 24 시간에 검출할 수 없다. NADPH 디하이드로게나제 퀴논 1(NQO1)은 그의 발현이 UV-B 노출 이후에 변하지 않았기 때문에 대조군으로 사용한다. 이는 UGT 발현이 UV-B 노출에 의해 조절될 수 있고, 급성 UV 노출과 관련된 흑색종의 증가된 위험과 일치한다는 것을 첫 번째로 보여주는 것이었다.

[0082]

#### 실시예 B

[0083]

인간 멜라닌 세포에서의 UGT 발현의 UV-B-유도 손실 후 프테로스틸벤 처리

[0084]

여기에서는 일광화상 용량(25 mJ/cm<sup>2</sup>)으로 급성 UV-B 노출됨에 반응하여 프테로스틸벤이 UGT의 손실을 방지할 수 있는 가를 검사하였다. 상술된 바와 같은 카프카스인/히스패닉의 멜라닌 세포 주를 비처리하거나 100 nM 프테로스틸벤으로 1시간 동안 처리했다. 그리고나서, 상기 기술된 바와 같이 세포들을 조사하고(irradiate), 조사 후 세포 배지와 함께 100 nM 프테로스틸벤을 대체하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 프테로스틸벤은 조사 후 4 시간 및 24 시간 모두에서 UGT2B7, UGT2B10 및 UGT2B15의 손실을 방지하였는데, 4 시간에서 UGT2B15 발현은 유일한 예외이다. 세 개의 UGT 모두 프테로스틸벤으로 처리 후 24 시간에서 높은 수준(8배 까지)에 있는 것으로



밝혀졌다.

[0085] 따라서, 천연 생물물 프테로스티벤이 인간 멜라닌 세포에서의 UGT 발현의 UV-B-유도 손실을 방지하거나, 손실의 위험성을 감소시킬 수 있다는 것이 입증되었다. 동일한 과정이 인간 각질 세포를 사용하여 수행할 수 있다는 것을 알 수 있다.

## [0086] 실시예 C

[0087] 정상 인간 각질 세포에서의 UGT 발현

[0088] 각질 세포는 표피에서 지배적인 유형의 세포이다(표피에서 약 95%의 세포). NMSC가 이들 세포로부터 발생할 수 있다. 이들 중요한 피부 세포가 UGT를 발현하는 지를 확인하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, UGT1A4, UGT1A6 및 UGT2B17은 신생아 포피로부터 분리된 1차 배양 인간 각질 세포(정상)에서 발현되는 것으로 나타났다. 예상된 크기의 밴드를 절제하여 표시된 UGT로서의 그들의 동일성(identity)을 확인하기 위하여 표준 방법을 사용하여 서열화했다. 이는 인간 각질 세포에서 UGT 발현의 첫 번째 특성화이었다.

[0089] 도 4는 1차 배양 인간 각질 세포에서의 UGT mRNA 발현을 보여준다. 표시된 UGT 계 구성원에 대해 인간 각질 세포로부터의 총 mRNA의 RT-PCR 분석을 수행하였다. GAPDH 프라이머를 양성 대조군(+)으로서 사용하였다. 다른 어떤 UGT 계 구성원도 검출되지 않았다.

## [0090] 실시예 D

[0091] 인간 각질 세포에서의 UGT2B17의 발현의 UV-B-유도 손실 후 프테로스티벤 처리

[0092] 여기에서, UGT2B17 발현이 UV-B 조사에 의해 조절되는지, 및 프테로스티벤이 손실을 예방할 수 있는 지를 검사하였다. 인간 각질 세포를 프테로스티벤(100 nM)의 존재 또는 부재 하에서 25 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B 조사에 노출시키고, 조사 후 0 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 및 24 시간에서 수집하였다. 그리고나서 UGT2B17에 특이 태크멘 분석을 사용하여 리얼-타임 PCR을 수행하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, UGT2B17 mRNA 발현이 UV-B 노출 후 4 시간이라는 적은 시간 동안 상당히 하향 조절되고, 적어도 24 시간에 걸쳐 낮게 유지된다. 중요하게는, 상기와 같은 프테로스티벤 처리(100 nM)는 UV-B-매개 UGT2B17 손실을 없앤다.

[0093] 도 5에 나타난 바와 같이, 프테로스티벤은 조사 후 4 시간, 8 시간 및 24 시간에서 UGT2B17의 손실을 방지하였다. UGT2B17의 상대적인 mRNA 발현은 임의로 1.0으로 설정된 0 시간으로 GAPDH에 표준화된 것으로 보인다.

[0094] 따라서, 천연 생물물 프테로스티벤은 인간 각질 세포에서 UGT의 발현의 UV-B-유도 손실을 방지시키거나, 손실의 위험성을 감소시킬 수 있다는 것이 입증되었다.

## [0095] 실시예 E

[0096] 프테로스티벤(Ptero)에 의한 인간 흑색종 세포에서의 12-LOX 발현의 억제

[0097] 도 6에 나타난 바와 같이, 프테로스티벤(50 μM)은 공지된 방법에 의해 시험하여 시험관 내에서 12-LOX 활성을 실질적으로 차단하였다. SKme128 인간 흑색종 세포로부터의 12-LOX의 웨스턴 블랏은 표시된 것처럼 미처리(UN)되었거나 50 μM의 프테로스티벤(Ptero) 또는 레스베라톨(Res)로 처리되었다. B-액틴이 적재 대조군으로서 사용되었다. 프테로스티벤이 시험관 내에서 레스베라톨보다 양호하게 12-LOX 발현을 억제함이 관찰되었다.

## [0098] 실시예 F

[0099] 정상 피부 및 인간 AK에서의 12-HETE 활성

[0100] 표준 방법을 사용하여, 지질 분획을 동일한 환자의 정상 피부 또는 AK의 3 mm 피부 천공(punch) 생검으로부터 추출하고, 12-HETE 농도를 측정하기 위하여 LC/MS/MS 표준 방법을 사용하여 분석하였다(n=6 환자들, 각 환자로부터 취해진 정상적 및 AK 샘플). 도 7에 나타난 바와 같이, 12-HETE 수준은 동일한 개인의 정상 피부와 비교하여 광선 각화증(AK)에서 3배 더 높았다.

[0101] 이는 AK에서의 12-HETE 수준이 이전에 보고되지 않았기 때문에 신규한 데이터였다. 또한, 이 데이터는 기술된 바와 같이 임상 시험에서 임상적 중점으로서 12-HETE를 사용하기 위하여 필요하다. 이 데이터는 12-HETE의 조절 완화(deregulation)를 보여주는 마우스 연구와 밀접한 상관 관계가 있다(Krieg, P. et al., “12-Lipoxygenase isoenzyme in mouse skin tumor development”, *Mol. Carcinog.* (1995) 14(2): 118-129).

[0102] 12-LOX는 12-HETE를 생성하기 때문에, 증식하는 또는 암 발병 전 세포에서 프테로스티벤에 의한 12-LOX 발현의 감소는 12-HETE 형성을 방지하거나 감소시키고 그리고/또는 프테로스티벤은 손상된 피부에서(12-LOX를 억제하거나 UGT를 상향 조절하여(upregulating)) 12-HETE를 정상 수준으로 회복시키는 데에 효과적일 것이다. 또한, 증식하는 또는 암 발병 전 세포의 처리는 AK(및 선택적으로는 NMSC)의 퇴행 또는 회복을 초래할 것으로 기대된다.

[0103] **실시예 1**

[0104] 일 실시형태에 따라, 다음과 같이 투여되는, 허용 가능한 기능성 식품 담체 안에 제형화된 100 mg 프테로스티벤의 1일 투여량으로 환자(또는 환자 집단(cohort)의 각 구성원)를 치료한다. 100 mg 프테로스티벤 및 150 mg 미세결정성 셀룰로스를 야채 캡슐 안에서 조합한다. 환자의 팔뚝 상의 피부 시험 영역( $8\text{ cm}^2$ )으로부터 AK(및 선택적으로는 NMSC)를 확인하고, 맵핑하며, 사진 찍고, 영상화하며, 병변을 생검한 후, 상술된 바와 같이, 임상적 연구를 수행한다. 연구 모니터링의 12 주 후, 개개 인간 대상자는 피부 시험 영역에서 확인된 AK의 퇴행을 나타낼 것으로 기대된다.

[0105] **실시예 1A**

[0106] 일 실시형태에 따라, 경구 투여되고, 허용 가능한 기능성 식품 담체 안에 제형화된 100 mg의 프테로스티벤의 1일 투여량으로 환자(또는 환자 집단(cohort)의 각 구성원)를 치료했다. 환자의 팔뚝 상의 피부 시험 영역( $8\text{ cm}^2$ )으로부터 AK(및 선택적으로 NMSC)를 확인하고, 맵핑하며, 사진을 찍고, 영상화하며, 병변을 생검한 후, 상술된 바와 같이, 임상 연구를 수행한다. 12 주에 걸친 연구의 과정 중에서 mRNA 또는 단백질의 함수로서 암 발병 전의 조직 샘플에서의 UGT 발현은 상당히 증가될 것으로 기대된다.

[0107] **실시예 1B**

[0108] 일 실시형태에 따라, 경구 투여되고, 허용 가능한 기능성 식품 담체 안에 제형화된 100 mg 프테로스티벤의 1일 투여량으로 환자(또는 환자 집단(cohort)의 각 구성원)를 치료했다. 환자의 팔뚝 상의 피부 시험 영역( $8\text{ cm}^2$ )으로부터 AK(및 선택적으로는 NMSC)를 확인하고, 맵핑하며, 사진을 찍고, 영상화하며, 병변을 생검한 후, 상술된 바와 같이, 임상적 연구를 수행한다. 12 주에 걸친 연구의 과정 중에서 암 발병 전의 조직 샘플에서 12-HETE 수준은 상당히 감소될 것으로 기대된다.

[0109] **실시예 2**

[0110] 일 실시형태에 따라, 다음과 같이 경구 투여되고, 허용 가능한 기능성 식품 담체 안에 제형화된 100 mg 프테로스티벤의 1일 투여량으로 환자(또는 환자 집단(cohort)의 각 구성원)를 치료했다. 100 mg 프테로스티벤 및 150 mg 미세결정성 셀룰로스를 야채 캡슐 안에서 조합한다. 환자의 팔뚝 상의 피부 시험 영역( $8\text{ cm}^2$ )으로부터 AK(및 선택적으로는 NMSC)를 확인하고, 맵핑하며, 사진 찍고, 영상화하며, 병변을 생검한 후, 상술된 바와 같이, 임상적 연구를 수행한다. 12 주의 연구 모니터링 후, 상기 치료는 암 발병 전의 AK가 피부 시험 영역에서 확인된 NMSC로의 진행되는 것을 방지하고 그리고/또는 개개 인간 대상에서 새로운 NMSC의 형성을 억제할 것으로 기대된다.

[0111] 앞선 명세서에서 본 발명은 그의 특정한 실시형태들에 관련해서 기술되고, 많은 상세한 사항이 예시의 목적으로 제안되어 있는 반면, 본 발명이 추가의 실시형태가 가능하며, 본 명세서에 기술된 상세한 특정 사항이 본 발명의 기본 원리로부터 벗어남이 없이 상당히 변경될 수 있다는 것이 당업자에게는 명백할 것이다.

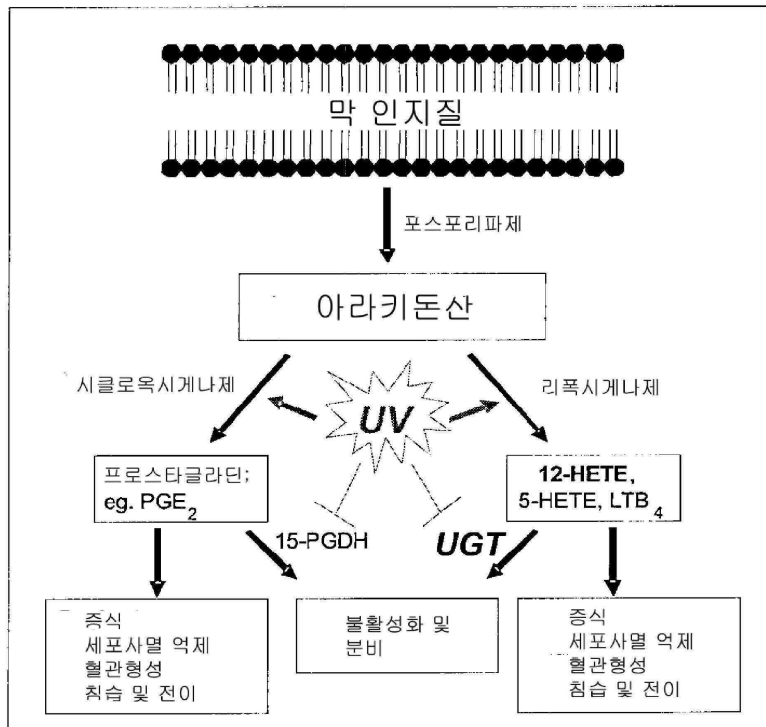
[0112] 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은 전체로서 참고로 포함된다. 본 발명은 그것의 정신 또는 필수적인 특성의



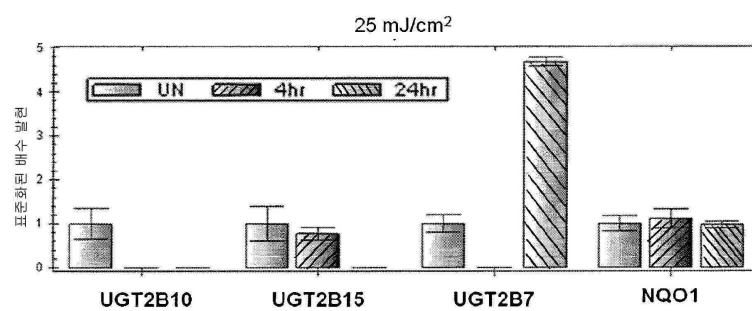
로부터 벗어남이 없이 다른 특정한 형태로 실현될 수 있으며, 따라서 본 발명의 범위를 나타내는 것으로서 앞선 명세서 보다 첨부된 청구 범위를 참고해야 한다.

## 도면

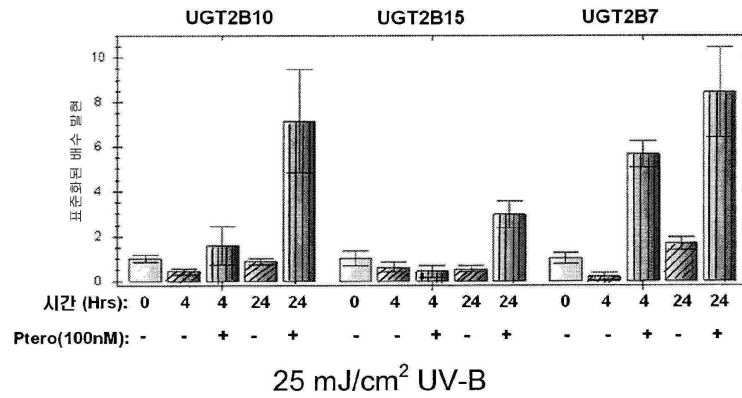
### 도면1



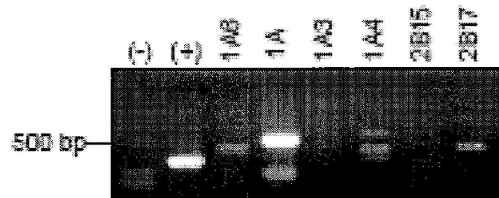
### 도면2



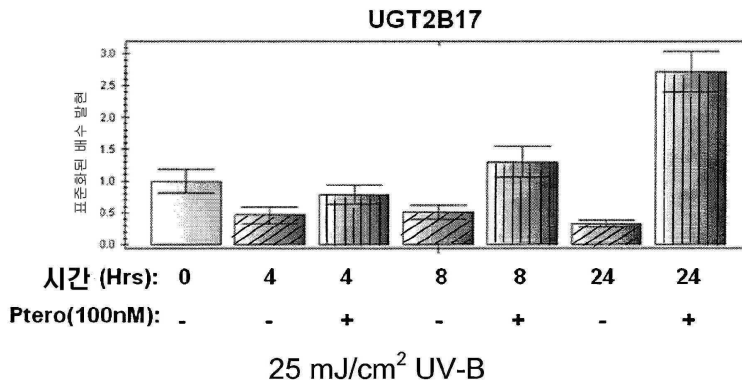
도면3



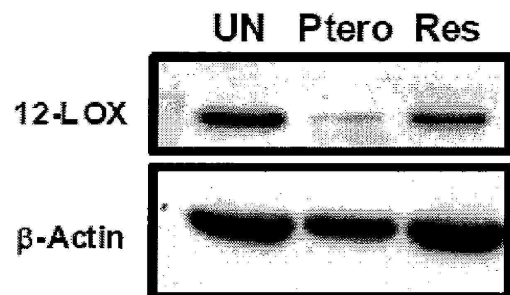
도면4



도면5



도면6



도면7

