



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0118286
(43) 공개일자 2019년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/105 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01) *A61K 38/19* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/105 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0041452

(22) 출원일자 2018년04월10일
심사청구일자 2018년04월10일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이대희

경기도 용인시 처인구 고진로27번길 28-5(고림동)

오상철

서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호(대치동, 개포1,2차 우성아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 7 항

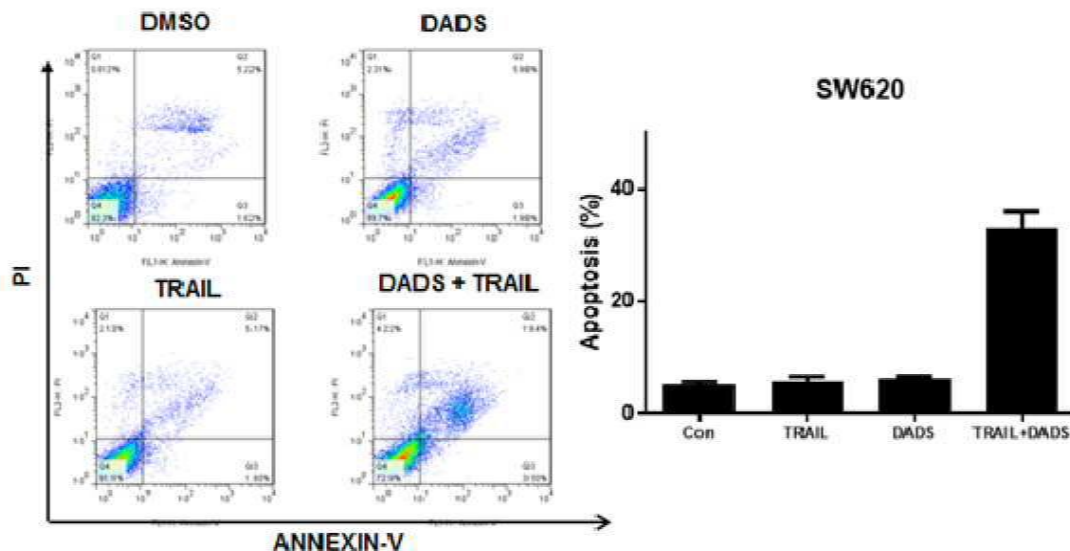
(54) 발명의 명칭 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL 단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 다이알릴 다이설파이드(DADS) 및 TRAIL 단백질을 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물, 암세포 사멸 증진 방법, 암의 예방 또는 치료 방법 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 TRAIL 내성을 극복할 수 있는 다이알릴 다이설파이드를 포함함으로써 TRAIL에 대한 내성을 보이는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)

A61K 38/191 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2011684

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자사업

연구과제명 헤지호그 억제제 신약 개발 및 내성극복 후보물질 Genipin 병용 연구

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01058303

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 TRAIL 저항성 암줄기세포를 위한 타겟 치료의 적용과 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1665

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구역량 강화지원

연구과제명 바이오메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL은 카스파제 3(caspase 3)의 활성화와 폴리(ADP-리보오스)중합효소 [(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP)]의 절단(cleavage)을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide)를 유효성분으로 포함하며, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 5

다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 인간을 제외한 포유동물의 암세포에 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

청구항 6

다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.

청구항 7

다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL 단백질을 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포주가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 불사화 되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다(Klaunig &

Kamendulis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44:239-267, 2004).

- [0003] 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용 또한 큰 문제로 대두되고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다. 또한, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다.
- [0004] 한편, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)은 종양괴사인자(Tumor necrosis factor, TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로 알려져 있다. TRAIL은 4개의 수용체를 갖고 있으며, 상기 수용체 중 사멸 수용체(death receptor, DR4, DR5)는 암 세포주에서, 디코이 수용체(Decoy receptor, DcR1, DcR2)는 정상 세포주에서 과발현된다. 상기 TRAIL은 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 사멸 수용체에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도할 수 있다. 상기 디코이 수용체의 경우는 c-터미널 말단에 사멸 도메인을 가지고 있지 않아 세포사멸 신호전달이 세포 내로 전해지지 않는다. 따라서, TRAIL을 기반으로 하는 치료는 정상세포에 대해서는 무해하면서 다양한 암 세포주에 대해서만 독성을 유도한다는 특징을 가지고 있어 매우 효과적인 차세대 항암 치료제이다.
- [0005] 그러나, TRAIL을 암세포주에 지속적으로 처리하면 TRAIL에 감수성을 보이던 암세포주도 점차 TRAIL에 대해 내성을 가지게 되는 것이 밝혀지게 되었다. 구체적으로, 많은 암세포는 사멸 수용체의 감소와 세포의 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L)), B-세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL) 또는 골수성 백혈병 세포-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)와 같은 항-세포사멸 단백질을 증가시키는 등 다양한 매커니즘을 통하여 TRAIL에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.
- [0006] 따라서, 암세포에 대해 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 TRAIL의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.
- [0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 TRAIL에 저항성을 나타내는 암에 대하여도 효과적으로 작용하는 항암 조성물을 발명하고자 연구를 수행하였으며, 이에 다이알릴 다이설파이드(DADS)가 TRAIL 저항성 암세포주에서 TRAIL 세포독성에 대한 민감성을 증가시켜, 결과적으로 아포토시스에 의한 세포사를 증가시키는 효능이 있음을 발견하고, 이를 활용한 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) KR 10-0412424 B

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 TRAIL의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암 효과를 증진시킬 수 있는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide)를 유효성분으로 포함하며, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related

apoptosis-inducing ligand; Trail)을 포유동물의 암세포에 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물, 암세포 사멸 증진 방법, 암의 예방 또는 치료 방법 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 TRAIL 내성을 극복할 수 있는 다이알릴 다이설파이드(DADS)를 포함함으로써 TRAIL에 대한 내성을 보이는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

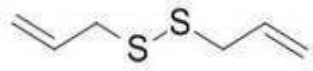
도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 DADS가 대장암의 세포성장(세포성장)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 세포성장(cell viability) 그래프이다.
- 도 2는 대장암 세포(SW620, HT-29, DLD-1, HCT116)에서 TRAIL이 세포사멸(cell death)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 3는 대장암 세포(SW620)에서 DADS와 TRAIL의 조합이 세포성장(cell viability)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 대장암 세포주(SW620)에서 DADS를 투여한 후 TRAIL을 처리한 경우 세포사멸 관련 단백질의 발현이 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 5는 DADS가 투여된 대장암 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 xenograft 실험을 통해 DADS 및/또는 TRAIL의 투여에 따른 온전한 종양의 크기를 비교한 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 7은 5주령 누드마우스에 대장암 세포주 SW620를 피하에 주사한 후 DADS 및/또는 TRAIL의 투여에 따른 종양의 크기를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 DADS가 투여된 위암 세포주 AGS에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 DADS가 투여된 유방암 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명의 발명자들은 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 TRAIL의 내성을 극복할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 다이알릴 다이설파이드(DADS) 및 TRAIL을 암 세포에 병용 투여하는 경우, TRAIL에 의한 암 세포의 세포사멸이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 본 발명의 일 측면은 다이알릴 다이설파이드(Diallyl disulfide; 이하, ‘DADS’ 라고도 함) 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에서 “다이알릴 다이설파이드(DADS)”는 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 마늘에 있는 주요 활성성분으로 마늘로부터 통상의 방법에 따라 추출하거나 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0023] [화학식 1]



[0024]

[0025] 상기 다이알릴 다이설파이드는 종양세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하는 작용을 한다고 알려져 있으나, TRAIL-저항성 암에 대한 치료 효과는 알려진 바 없다.

[0027]

본 발명의 상기 다이알릴 다이설파이드는 상기 암 세포주의 세포사멸을 유도하는 항암 효능을 나타내며, 천연물로부터 유래된 것이어서 정상 세포에 심각한 자극을 가한다거나 유해한 작용을 유발함이 없이 안정하게 사용될 수 있는 이점이 있다.

[0028]

이에 따라, 다이알릴 다이설파이드는 TRAIL과 함께 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0030]

본 발명에서 사용되는 용어, “TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 단백질”은 종양괴사 인자(Tumor Necrosis Factor: TNF) 슈퍼 패밀리에 속하는 싸이토카인(cytokine) 단백질의 일원으로서, 그 서열 등은 공지의 데이터베이스인 NCBI의 GenBank 등에서 얻을 수 있다. 이와 같은 TRAIL 단백질은 차세대 항암제로 주목받고 있는, 정상세포에서는 거의 독성을 나타내지 않고 암세포만을 선택적으로 사멸시킨다. 정상세포에 무해한 특성은 일반 세포의 표면에만 존재하는 유인 수용체 1, 2(DcR1, DcR2)의 기능 때문으로, 상기 DcR1, DcR2는 TRAIL과 결합이 가능하지만, 세포내 신호 전달 부분이 결여되어 있어서 일반 세포들은 TRAIL에 의한 세포 사멸 유도가 일어나지 않는다. 이와 같이 TRAIL이 세포사멸을 유도하는 개략적인 과정을 도 1에 나타내었다. 본 발명에서, 상기 TRAIL은 일부 염기서열이 치환, 결실, 부가된 형태 등으로 변이되거나 조작(engineered)된 TRAIL을 포함한다.

[0031]

한편, 이러한 선택적 암세포 사멸 유도 특징을 가지고 있는 TRAIL 단백질은 현재 내성에 의해 치료 효과가 낮다는 문제점이 대두되고 있다.

[0032]

이로 인해 본 발명자들이 새롭게 규명한 다이알릴 다이설파이드의 병용 투여는 TRAIL-저항성 암에서도 효과적으로 TRAIL의 암세포 사멸 효과를 나타내는 특징이 있다.

[0033]

상기 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL의 병용 투여는 암 세포에 대하여 카스파제 3(caspase 3)의 활성화와 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP)의 절단(cleavage)을 유도함으로써, TRAIL-저항성 암에 대해서도 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0034]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 암 세포에 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL을 병용처리한 경우 세포사멸이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0036]

본 발명에서 “암”은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 아포토시스(apoptosis)의 균형이 깨지는 경우 세포가 과다증식하게 되어 발병하는 질병을 총칭한다. 이러한 비정상적인 과다증식 세포들은 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성할 수 있으며 체내의 정상적인 구조의 파괴나 변형을 유발할 수 있는데, 이러한 상태를 통칭하여 암이라고 한다.

[0037]

일반적으로 종양(tumor)이라 하면 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자란 덩어리를 의미하며, 종양은 양성 종양(benign tumor)과 악성 종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 악성 종양은 양성 종양에 비해 성장 속도가 매우 빠르며 주변 조직에 침윤하면서 전이(metastasis)가 일어나 생명을 위협하게 된다. 이러한 악성 종양을 통상적으로 ‘암(cancer)’이라 한다.

[0038]

본 발명에서 상기 암의 종류는 특별히 제한되지 않지만, 본 발명의 목적상 TRAIL-저항성 암을 의미한다. 상기 암의 비제한적인 예로 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암 등을 들 수 있다.

- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, “TRAIL-저항성 암”은 TRAIL 단백질 처리에 의하여 암의 예방, 개선 또는 치료가 효과적으로 이루어지지 않는 암을 의미하는 것으로, 보다 구체적으로는 암세포 표면에 TRAIL 단백질 수용체가 적은 수준으로 발현되는 등, 처음부터 TRAIL 단백질에 대한 민감성이 낮아 TRAIL 단백질로 유도되는 세포 아포토시스 기작이 효과적으로 이루어지지 않는 모든 종류의 암 뿐만 아니라, 초기에는 TRAIL 단백질 처리에 따른 항암 효과가 나타났으나, 반복적인 TRAIL 단백질 처리에 의해 점차로 TRAIL 단백질에 대한 항암 효과가 감소되거나 효과가 사라진 암을 모두 포함한다.
- [0041] 본 발명에서 상기 TRAIL-저항성 암은 TRAIL에 대하여 저항성을 나타내는 암이라면 특별한 제한없이 모든 종류의 암을 포함한다. 상기 TRAIL-저항성 암의 비제한적인 예로는, 대장암, 위암, 유방암, 폐암, 간암, 전립선암, 신장암, 피부암, 신경교종암, 갑상선암, 혈액암 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 대장암, 위암 및 유방암을 들 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서는 대표적인 TRAIL-저항성 암으로 대장암 세포주인 SW620, HT-29, DLD-1 및 HCT116에 대한 치료 효과, 위암 세포주인 AGS에 대한 치료 효과 및 유방암 세포주인 MDA-MB231에 대한 치료 효과를 확인하였다. 본 발명의 다이알릴 다이설파이드가 TRAIL과 병용 투여시 TRAIL-저항성 암에 치료효과가 있다는 상기의 구체적인 실험 결과로부터 다른 종류의 TRAIL-저항성 암세포에도 동일한 치료 효과가 있을 것임은 자명하다.
- [0044] 본 발명에서 “예방”은 본 발명의 상기 약학 조성물을 개체에 투여하여 암의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”는 본 발명의 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0046] 본 발명의 상기 약학 조성물을 TRAIL-저항성 암세포에 처리하는 경우, 본 발명의 상기 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL의 작용에 의하여 암세포에서 카스파제 3(caspase 3)의 활성화와 폴리(ADP-리보오스)중합효소 [(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP)]의 절단(cleavage)이 유도됨에 따라, TRAIL에 저항성을 나타내었던 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 다이알릴 다이설파이드(DADS)는 상기 약학 조성물에 바람직하게는 0.1 내지 500 μM 로 함유될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 100 μM 로 함유될 수 있다.
- [0049] 상기 범위 내에서 상기 다이알릴 다이설파이드를 적절한 양으로 사용하면 경제적이면서도 상기 다이알릴 다이설파이드에 따른 항암 효과가 충분히 발휘되어 본 발명의 목적을 달성하기에 보다 적합해지는 이점이 있다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 TRAIL 단백질은 상기 약학 조성물의 전체의 부피를 기준으로 바람직하게는 0.001 내지 200 ng/ml로 함유될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 100 ng/ml로 함유될 수 있다. 상기 범위 내에서, 상기 TRAIL 단백질을 적절한 양으로 사용하면 경제적이면서도 상기 TRAIL 단백질에 따른 아포토시스 유도 효과를 비롯한 항암 효과가 충분히 발휘되어 본 발명의 목적을 달성하기에 보다 적합해지는 이점이 있다.
- [0051] 또한, 상기 약학 조성물은 다이알릴 다이설파이드에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.
- [0053] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 “약학적으로 허용 가능”하다는 것은, 이를 투여시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

- [0056] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 향산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [0059] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.
- [0060] 본 발명의 상기 약학 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [0062] 상기 비경구 제제의 비제한적인 예로는 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [0063] 본 발명의 상기 약학 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0064] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [0065] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 오일, 식물성 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 상기 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 상기 약학 조성물의 보다 바람직한 효과를 위한 투여량은, 바람직하게는 1일 0.001 mg/kg 내지 1,000 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 가장 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 5 mg/kg일 수 있다. 이때, 상기 약학 조성물 내 DADS의 농도는 0.1 내지 500 μ M, 바람직하게는 1 내지 100 μ M인 것이 바람직하다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

- [0071] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 상기 약학 조성물은 바람직하게는 경구 투여되거나 주사 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 경구 투여될 수 있다.
- [0073] 또한, 상기 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 사람 또는 동물용으로 투여될 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드를 유효성분으로 포함하며, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 TRAIL의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0077] 상기 암은 대장암, 결장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 방광암 및 혈액암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 위암, 유방암 또는 대장암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않으며, TRAIL에 대한 내성을 가진 암은 모두 포함되는 것이 바람직하다.
- [0079] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 포유동물의 암세포에 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.
- [0081] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Trail)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0082] 본 발명에서 “포유동물” 또는 “개체”는 쥐, 토끼, 개, 고양이, 소, 양, 돼지 등의 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물을 비롯한 모든 동물을 의미한다.
- [0083] 본 발명의 상기 암의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL의 투여량, 투여 경로, 투여 방식 등은 본 발명의 상기 약학 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0085] 또한, 본 발명은 다이알릴 다이설파이드 및 TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0086] 본 발명에서 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0087] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.
- [0088] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 또는 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0089] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알

긴삼 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0092] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0094] 실시예

[0095] 실험예 1. 대장암 세포에서 TRAIL과 다이알릴 다이설파이드(DADS)가 세포 성장에 미치는 영향

[0096] 1-1. 대장암 세포주에서의 암세포 성장 억제효과 확인 - MTT assay

[0097] 대장암 세포주와 대장 정상세포에서 DADS 및/또는 TRAIL이 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

[0098] 1-1-1. DADS에 의한 Cell proliferation 확인

[0099] 먼저, 대장암 세포(SW620, HT-29, DLD-1, HCT116)와 대장 정상세포(FHC)를 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium(DMEM) 배지에 10% 우태아혈청과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% 이산화탄소 함온 항습 상태로 배양하였다. 1×10^4 의 대장암 세포를 200 μ l의 세포배양액에 부유시키고 96-well microplate에 일정하게 넣은 후 하룻밤 배양시켰다. 이후, 마늘 추출 성분인 DADS(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 다양한 농도(0, 5, 10, 25, 50, 100 μ M)로 각 well에 첨가하고 24 시간 동안 배양하였다.

[0100] 그리고, MTT solution을 넣어 4시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 1에 나타내었다.

[0101] 도 1은 DADS가 대장암의 세포 성장에 영향을 미치는 정도를 나타내는 세포성장(cell viability) 그래프이다. 상기 도 1을 살펴보면, 대장 정상세포에서는 DADS에 의한 세포 성장의 변화가 대장암 세포주보다 영향이 적은 것을 확인할 수 있다.

[0102] 1-1-2. TRAIL에 의한 Cell proliferation 확인

[0103] 또한, 대장암 세포(SW620, HT-29, DLD-1, HCT116)와 대장 정상세포(FHC)를 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium(DMEM) 배지에 10% 우태아혈청과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% 이산화탄소 함온 항습 상태로 배양하였다. 1×10^4 의 대장암 세포를 200 μ l의 세포배양액에 부유시키고 96-well microplate에 일정하게 넣은 후 하룻밤 배양시켰다. 이후, TRAIL을 다양한 농도(0, 10, 25, 50 ng/ml)로 각 well에 첨가하고 2 시간 동안 배양하였다.

[0104] 그리고, MTT solution을 넣어 4시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 사멸한 세포 수를 측정하여 도 2에 나타내었다.

[0105] 도 2는 대장암 세포(SW620, HT-29, DLD-1, HCT116)에서 TRAIL이 세포사멸(cell death)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 그래프이다. 상기 도 2를 살펴보면, TRAIL은 대장암 세포의 사멸에 미치는 영향이 대장암 세포의 종류에 따라 다른 것을 확인할 수 있다. 특히, TRAIL은 HCT116 세포의 사멸에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0106] 1-1-3. DADS와 TRAIL의 조합에 의한 Cell proliferation 확인

[0107] 대장암 세포주(SW620)에서 DADS가 TRAIL의 민감성에 영향을 끼치는지 알아보려고 하였다.

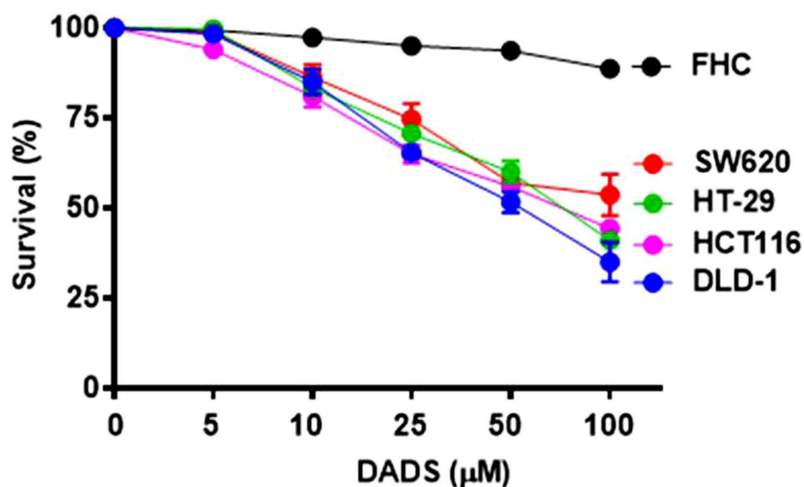
[0108] 대장암 세포(SW620)를 96well에 seeding한 후, 다음 날 DADS(0, 5, 10, 25, 50, 100 μ M)를 처리하였다. 그리고, 20 시간 후 TRAIL(50 ng/ml)을 처리하고, 2시간 후에 MTT solution을 넣어 4시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 3에 나타내었다.

- [0109] 상기 도 3은 대장암 세포(SW620)에서 DADS와 TRAIL의 조합이 세포성장(cell viability)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 그래프이다. 상기 도 3을 살펴보면, 대장암 세포(SW620)에 DADS가 투여된 경우 TRAIL에 의한 민감성이 더욱 높아진 것을 확인할 수 있다.
- [0110] 1-2. DADS를 투여한 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 단백질 수준에서 확인 - Western blot
- [0111] 대장암 세포주(SW620)에서 DADS를 투여한 후 TRAIL을 처리하는 경우에 세포 사멸 관련 단백질의 발현을 비교하기 위한 실험을 실시하였다. 이를 위해 먼저, 대장암 세포주(SW620)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 DADS(10 μ M)을 처리하고, 20시간 후에 TRAIL(50 ng/ml)을 처리하였다. 4 시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하였다. 그리고, 세포 사멸에 관련한 marker(PARP, Caspase)를 사용하여 발현의 변화를 확인하여 도 4에 나타내었다.
- [0112] 상기 도 4는 대장암 세포주(SW620)에서 DADS를 투여한 후 TRAIL을 처리한 경우 세포사멸 관련 단백질의 발현이 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다. 상기 도 4를 살펴보면, 대장암 세포주(SW620)에 DADS를 투여한 후 TRAIL을 처리한 경우, c-Caspase 3(Cleaved Caspase-3) 및 c-PARP(Cleaved PARP)와 같은 세포 사멸에 관련된 단백질들의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0113] 이러한 결과들을 통해, DADS를 투여하는 경우 TRAIL에 대한 민감성이 증가하는 것을 세포 수준에서 확인할 수 있었다.
- [0114] 1-3. DADS를 투여한 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 확인함 - Flow cytometry
- [0115] 대장암 세포주(SW620)에서 DADS가 TRAIL의 민감성에 영향을 끼치는지 알아보하고자 하였다.
- [0116] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(SW620)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 DADS(10 μ M)을 처리하였다. 그리고, 20시간 후 TRAIL(50 ng/ml)을 처리하고, 4시간 후 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 5에 나타내었다.
- [0117] 도 5는 DADS가 투여된 대장암 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.
- [0118] 상기 도 5를 살펴보면, DADS가 투여된 대장암 세포주에서 TRAIL에 의한 민감성이 더욱 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0119] 1-4. DADS와 TRAIL 병용 투여에 의한 동물 종양 크기 감소 - 종양 크기 측정, xenograft
- [0120] 이전의 결과들을 바탕으로 DADS의 투여가 TRAIL에 의해 유도되는 암세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것을 동물 실험을 통해 확인하고자 하였다.
- [0121] 먼저, 5주령 Balb/c-nude mouse의 피하에 대장암 세포주(SW620) 3×10^6 cells를 주입하고 종양이 자라날 때까지 키웠다. 종양의 크기를 2-3일에 한번 측정하고, 일정한 크기(100 mm³)가 되었을 때 상기 마우스의 복강에 DADS(10 μ M)를 0.5 mg/kg의 양으로 주사하고, 그 다음날 TRAIL(200 μ g/kg)을 복강에 주사하였다. 3일 간격으로 5번 TRAIL을 복강에 주사하고, xenograft를 통해 종양 크기의 차이를 확인하였다.
- [0123] 또한, 5주령 Balb/c-nude mouse에 대장암 세포주(SW620)를 피하에 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과 DADS가 투여되었을 때 종양이 덜 형성되고, DADS와 같이 TRAIL을 병용처리한 경우 종양이 자라는 속도가 현저히 늦는 것을 확인하였다(도 6).
- [0124] 그리고, xenograft를 통해 온전한 종양의 크기를 비교한 결과 마찬가지로 DADS가 투여된 조건에서 TRAIL을 병용 처리한 것의 종양의 크기가 가장 작았다(도 7).
- [0126] **실험예 2. 위암 및 유방암 세포에서 TRAIL과 DADS가 세포 성장에 미치는 영향**
- [0127] 2-1. DADS를 투여한 위암 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 확인 - Flow cytometry
- [0128] 위암 세포주(AGS)에서 DADS가 TRAIL의 민감성에 영향을 끼치는지 알아보하고자 하였다.

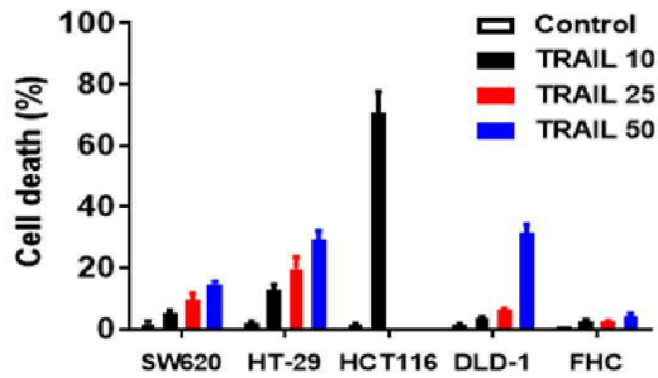
- [0129] 이를 위하여 먼저, 위암 세포주(AGS)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 DADS($10 \mu\text{M}$)을 처리하였다. 그리고, 20시간 후 TRAIL(50 ng/ml)을 처리하고, 4시간 후 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 8에 나타내었다.
- [0130] 도 8은 DADS가 투여된 위암 세포주 AGS에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.
- [0131] 상기 도 8을 살펴보면, DADS가 투여된 위암 세포주에서 TRAIL에 의한 민감성이 현저히 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0132] 2-2. DADS를 투여한 유방암 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 확인 - Flow cytometry
- [0133] 유방암 세포주(MDA-MB231)에서 DADS가 TRAIL의 민감성에 영향을 끼치는지 알아보려고 하였다.
- [0134] 이를 위하여 먼저, 유방암 세포주(MDA-MB231)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 DADS($10 \mu\text{M}$)을 처리하였다. 그리고, 20시간 후 TRAIL(50 ng/ml)을 처리하고, 4시간 후 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 9에 나타내었다.
- [0135] 도 9는 DADS가 투여된 유방암 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.
- [0136] 상기 도 9를 살펴보면, DADS가 투여된 유방암 세포주에서 TRAIL에 의한 민감성이 더욱 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0138] 상기 실험 결과들을 통해, 다양한 암 세포주에서 DADS는 TRAIL에 의해 유도되는 세포 사멸의 민감성을 증진시키는 것이 확인되었다.
- [0140] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

도면

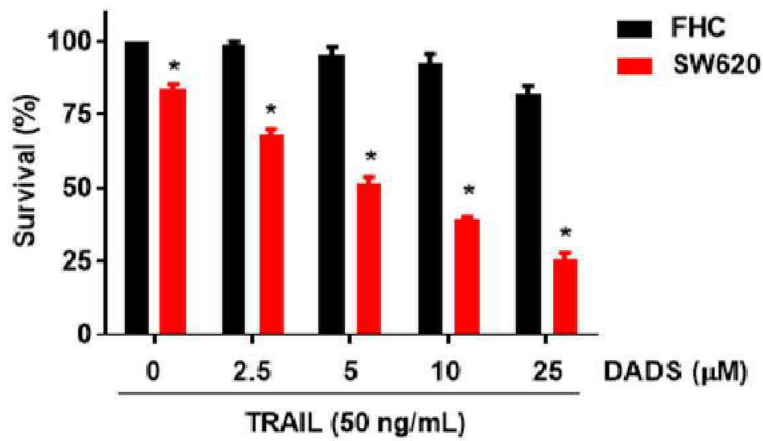
도면1



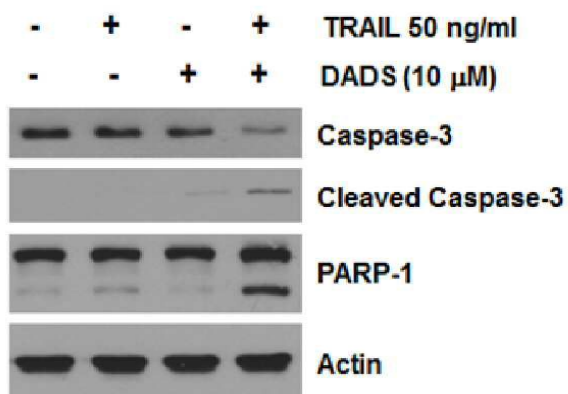
도면2



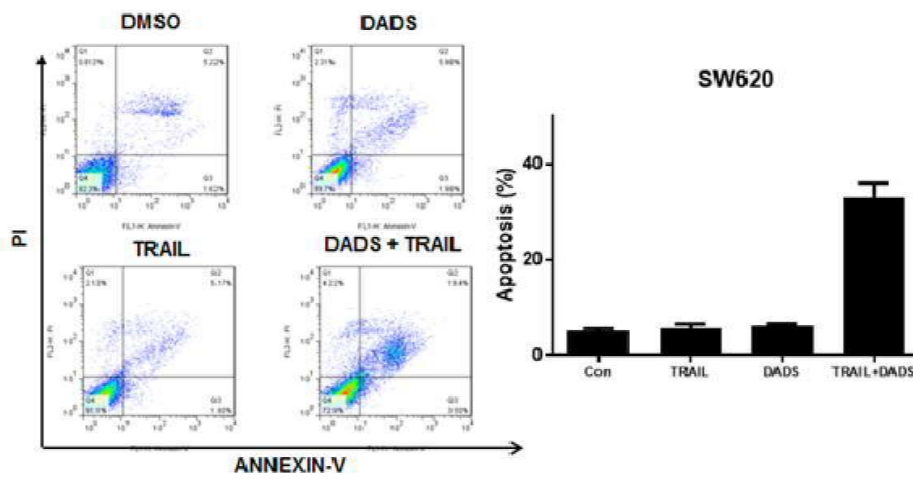
도면3



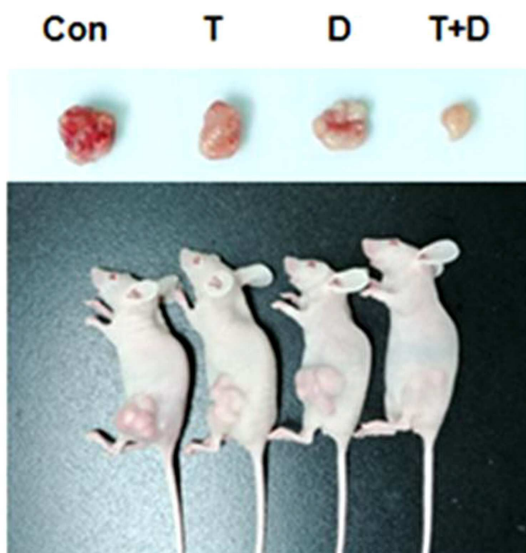
도면4



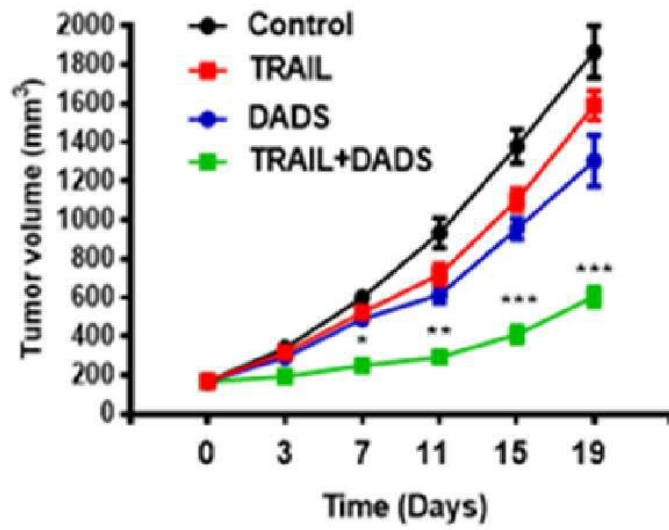
도면5



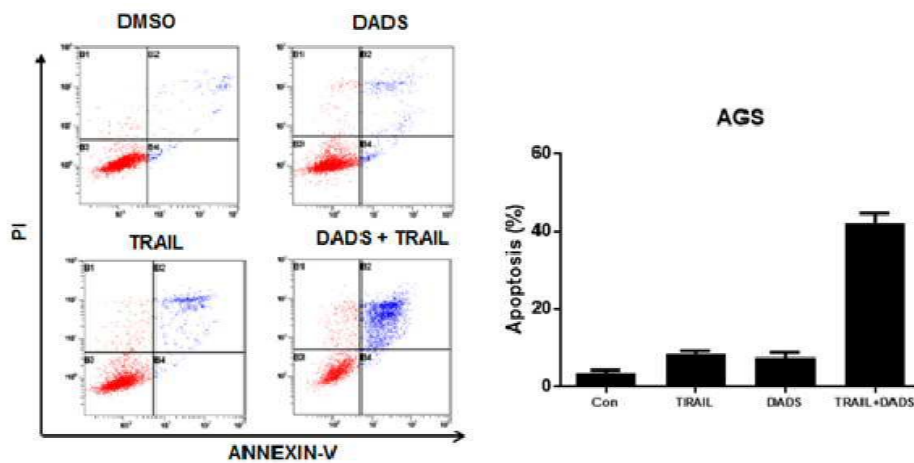
도면6



도면7



도면8



도면9

