



등록특허 10-2182946



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월25일  
(11) 등록번호 10-2182946  
(24) 등록일자 2020년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/155* (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)  
*A61K 31/353* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/20* (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)

(52) CPC특허분류  
*A61K 31/155* (2013.01)  
*A61K 31/352* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-7036511  
(22) 출원일자(국제) 2014년05월23일  
심사청구일자 2019년03월06일  
(85) 번역문제출일자 2015년12월23일  
(65) 공개번호 10-2016-0013164  
(43) 공개일자 2016년02월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/JP2014/064354  
(87) 국제공개번호 WO 2014/189152  
국제공개일자 2014년11월27일  
(30) 우선권주장  
JP-P-2013-110278 2013년05월24일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현  
WO2012166008 A1\*  
JP06247851 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴을 포함하는 약학적 조합물 및 이의 암치료를 위한 용도**

**(57) 요 약**

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용을 감소시킬 수 있고 항-악성 종양제로서 유용한, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 조합되어 있는 신규한 의약을 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 31/353* (2013.01)

*A61K 9/0019* (2013.01)

*A61K 9/20* (2013.01)

*A61K 9/48* (2013.01)

(72) 발명자

**나가하마 야스하루**

일본 오사카후 오사카시 츠오쿠 오테도리 3-2-27

오쓰까 세이야꾸 가부시키가이샤 나이

**와타나베 다카시**

일본 오사카후 오사카시 츠오쿠 오테도리 3-2-27

오쓰까 세이야꾸 가부시키가이샤 나이

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 조합된 약성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 의약으로서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 단일 제제에 함유되어 있거나, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 약학적 조성물에 별개로 제형화되어 병용되는 의약.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 단일 제제에 함유된 의약.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 약학적 조성물에 별개로 제형화되어 병용되는 의약.

#### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 약성 종양이 성상교종, 약성 속질모세포종, 생식 세포 종양, 두개인두종 및 뇌실막세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된 소아 뇌 종양; 신경아교종, 교종양, 수막종, 뇌하수체 샘종 및 신경초종으로 이루어진 군으로부터 선택된 성인 뇌 종양; 상악동 암, 인두암, 후두암, 구강암, 입술암, 설암 및 귀밑샘 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 두경부 암; 소세포폐암, 비(非)소세포폐암, 폐 샘종증 및 중피종으로 이루어진 군으로부터 선택된 흉부암 및 종양; 식도암, 간암, 일차성 간암, 쓸개암, 쓸개관암, 위암, 직장결장암, 결장암, 직장암, 항문암, 췌장암 및 이자내분비 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 위장관 암 및 종양; 음경암, 신장 골반-요관암, 신장 세포암, 고환 종양, 전립샘암, 방광암, 월류 종양 및 요로상피 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 비뇨기관암 및 종양; 외음부암, 자궁경부암, 자궁체암, 자궁내막암, 자궁 육종, 융모막암, 질암, 유방암, 난소암 및 난소 생식 세포 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 부인과 암 및 종양; 성인 및 소아 연조직 육종; 골육종 및 유임 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 뼈 종양; 부신피질암 및 갑상샘암으로 이루어진 군으로부터 선택된 내분비샘 조직의 암 및 종양; 약성 럼프종, 비(非)호지킨스 럼프종, 호지킨스 질병, 다발골수종, 형질세포종양, 급성 골수성 백혈병, 급성 럼프성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병 럼프 종, 만성 골수성 백혈병 및 만성 럼프성 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 약성 럼프종 및 백혈병; 및 만성 골수증식성 질환, 약성 흑색종, 편평세포암, 기저세포암 및 균상식육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 피부암 및 종양인 의약.

#### 청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-약성 종양 약물이 단지 불충분한 효과만 제공할 뿐인 환자에서 약성 종양을 치료하기 위한 의약.

#### 청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 1 종 이상의 항-약성 종양 약물이 조합된 의약.

#### 청구항 7

제 5 항에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-약성 종양 약물이 분자 표적 약물, 알킬화제, 대사 길항제, 식물 알칼로이드, 항암 항생제, 호르몬제 또는 면역요법제인 의약.

**청구항 8**

제 6 항에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-악성 종양 약물이 분자 표적 약물, 알킬화제, 대사 길항제, 식물 알칼로이드, 항암 항생제, 호르몬제 또는 면역요법제인 의약.

**청구항 9**

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 의약 및 이와 함께 결부된 서면지를 포함하는 상업적 패키지로서, 서면지는 의약이 악성 종양의 예방 또는 치료에 사용될 수 있거나 또는 사용되어야 한다는 점을 명시하는 상업적 패키지.

**청구항 10**

디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용을 저감시키는 악성 종양 치료제.

**청구항 11**

디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 항-악성 종양 작용 증강제.

**청구항 12**

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되는, 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용을 저감시키는 악성 종양 치료제.

**청구항 13**

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되는, 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 항-악성 종양 작용 증강제.

**청구항 14**

젬시타빈과 병용하기 위한, 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 체장암 줄기 세포의 증가의 저해제.

**청구항 15**

디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되기 위한, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 악성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 의약.

**청구항 16**

메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되기 위한, 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 악성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 의약.

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 메트포르민 (metformin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 (dihydroquercetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 조합되어 있는 의약 (medicament)에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 특히 문헌 1은 피론 유사체 또는 이의 유도체를, 하나 이상의 추가적인 제제, 예컨대 지질 저하제 또는 글루코오스 저하제와 조합하여 투여하는 것에 의한 대사 장애, 및 기타 질환의 치료 및 예방 방법을 기재하고 있다.

피론 유사체의 예 중 하나로서, 택시폴린 (taxifolin)이 기재되어 있으며, 글루코오스 저하제의 예 중 하나로서, 메트포르민이 기재되어 있다. 그러나, 상기 문헌은 메트포르민과 택시폴린의 조합의 임의 특정한 예는 개시하지 않았으며, 이들을 조합해서 함유하는 의약의 약성 종양에 대한 시너지 효과 또는 락트산 산증 저하 효과도 기재하지 않고 있다.

[0003] [문헌 목록]

[0004] [특허 문헌]

[0005] 특허 문헌 1: WO 2010/042886

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 메트포르민 히드로클로라이드는 바이구아니드 경구 혈당 강하제로서 시판중이며, AMP-활성화 단백질 키나아제 (AMPK)를 활성화하는 작용을 갖는 것으로 공지되어 있다.

[0007] 최근, 메트포르민, 펜포르민 (phenformin), 올리고마이신 (oligomycin), 디니트로페놀, 2-데옥시글루코오스, 5-아미노이미다졸-4-카르복시아미드 리보뉴클레오티드, 과산화수소, 소르비톨, 칼시마이신, 4-히드록시-3-(2'-히드록시바이페닐-4-일)-6-옥소-6,7-디히드로티에노[2,3-b]페리딘-5-카르보니트릴 (A-769662), 갈레진

(galegine), 트로글리타존 (troglitazone), 페노바르비탈 (phenobarbital), 쿠에르세틴 (quercetin), 레스베라트롤 (resveratrol), 베르베린 등과 같은 AMPK 를 활성화시키는 작용을 갖는 화합물 (AMPK 활성화제) 이 그의 단일 사용 또는 기존의 항암제와의 병용에 의해 항-악성 종양 효과를 보인다는 점이 보고된 바 있고, 이의 항-악성 종양제로서의 개발이 고려되고 있다.

[0008] 그러나, 상기 중, AMPK 활성화제, 예컨대 메트포르민, 펜포르민, 5-아미노이미다졸-4-카르복시아미드 리보뉴클레오티드, 소르비톨, 칼시마이신, A-769662, 갈레진, 트로글리타존 등은 투여를 받았던 환자에게서 심각한 락트산 산증의 문제와 연관된다.

[0009] 본 발명은 항-악성 종양제로서 유용한 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용을 줄일 수 있는 신규한 의약을 제공하는 것을 목표로 하고 있다.

[0010] 메트포르민은 암 줄기 세포를 억제하는 작용을 갖는 것으로 공지되어 있다. 이러한 암 줄기 세포를 억제하는 의약은 항-악성 종양 효과뿐 아니라 암 전이 예방 및 재발 방지를 가능하게 할 수 있다고 기대된다.

[0011] 본 발명은 또한 암 줄기 세포 억제 작용을 갖고 항-악성 종양제로서 유용한 신규한 의약을 제공하는 것을 목표로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상술된 문제점을 해결하기 위해 예의 연구하였고, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 조합이 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 유도된 혈액 락트산 값 증가를 억제한다는 점을 알아냈다. 게다가, 본 발명자들은 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 조합이 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 항-악성 종양 작용 효과를 현저하게 증가시킨다는 것을 알아냈다.

[0013] 본 발명자들은 또한 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 체장암의 예방 또는 치료에 유효하다는 사실도 알아냈다.

[0014] 본 발명자들은 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 체장암 줄기 세포를 억제하는데 효과적인 사실을 알아냈다.

[0015] 이러한 발견을 기초로, 본 발명자들은 추가 연구하여 본 발명을 완성했다.

[0016] 따라서, 본 발명은 하기를 제공한다.

[0017] [1] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 조합된 의약으로서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 단일 제제로 함유되거나 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 약학적 조성물에 별개로 제형화되어 병용되는 의약.

[0018] [2] 상기 [1] 의 의약으로서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 단일 제제로 함유되어 있는 의약.

[0019] [3] 상기 [1] 의 의약으로서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 약학적 조성물에 별개로 제형화되어 병용되는 의약.

[0020] [4] 악성 종양의 예방 또는 치료를 위한 상기 [1] 내지 [3] 중 임의의 의약.

[0021] [5] 상기 [4] 의 의약으로서, 악성 종양이, 성상교종, 악성 속질모세포종, 생식 세포 종양, 두개인두종 및 뇌실막세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된 소아 뇌 종양; 신경아교종, 교종양, 수막종, 뇌하수체샘종 및 신경초종으로 이루어진 군으로부터 선택된 성인 뇌 종양; 상악동 암, 인두암, 후두암, 구강암, 입술 암, 설암 및 귀밀샘 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 두경부암; 소세포폐암, 비(非)소세포폐암, 폐 샘종증 및 중피종으로 이루어진 군으로부터 선택된 흉부 암 및 종양; 식도암, 간암, 일차성 간암, 쓸개암, 쓸개관암, 위암, 직장결장암, 결장암, 직장암, 항문암, 체장암 및 이자내분비 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 위장관 암 및 종양; 음경암, 신장 골반-요관암, 신장 세포암, 고환 종양, 전립샘암, 방광암, 월경 종양 및 요로상피 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 비뇨기관 암 및 종양; 외음부암, 자궁경부암, 자궁체암, 자궁내막암, 자궁 육종, 융모막암, 질암, 유방암, 난소암 및 난소 생식 세포 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 부인과 암 및 종양; 성인 및 소아

연조직 육종; 골육종 및 유잉 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 뼈 종양; 부신피질암 및 갑상샘암으로 이루어진 군으로부터 선택된 내분비샘 조직의 암 및 종양; 악성 램프종, 비(非)호지킨스 램프종, 호지킨스 질병, 다발골수종, 형질세포종양, 급성 골수성 백혈병, 급성 립프성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병 램프종, 만성 골수성 백혈병 및 만성 립프성 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 악성 램프종 및 백혈병; 및 만성 골수증식성 질환, 악성 흑색종, 편평세포암, 기저세포암 및 균상식육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 피부암 및 종양인 의약.

- [0022] [6] 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-악성 종양 약물이 단지 불충분한 효과만 제공할 뿐인 환자의 치료를 위한 상기 [1] 내지 [5] 중 임의의 의약.
- [0023] [7] 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-악성 종양 약물 중 하나 이상의 종이 조합된 상기 [1] 내지 [5] 중 임의의 의약.
- [0024] [8] 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-악성 종양 약물이 분자 표적 약물, 알킬화제, 대사 길항제, 식물 일칼로이드, 항암 항생제, 호르몬제 또는 면역요법제인 상기 [6] 또는 [7] 의 의약.
- [0025] [9] 상기 [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 따른 의약 및 이와 함께 결부된 서면지 (*written matter*) 를 포함하는 상업적 패키지로서, 상기 서면지는 상기 의약이 악성 종양의 예방 또는 치료에 사용될 수 있거나 또는 사용되어야 한다는 점을 명시하는 상업적 패키지.
- [0026] [10] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용 저감제.
- [0027] [11] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 항-악성 종양 작용 증강제.
- [0028] [12] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용 저감제.
- [0029] [13] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 항-악성 종양 작용 증강제.
- [0030] [14] 악성 종양의 예방 또는 치료용 의약 제조에 있어서 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.
- [0031] [15] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는 악성 종양의 예방 또는 치료 방법으로서, 상기 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 단일 제제로서, 또는 동시 또는 상이한 시점에 투여되는 별개의 제제로서 투여되는 방법.
- [0032] [16] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 체장암의 예방 또는 치료용 의약.
- [0033] [17] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는 체장암의 예방 또는 치료 방법.
- [0034] [18] 체장암의 예방 또는 치료용 의약으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.
- [0035] [19] 체장암의 예방 또는 치료에 사용되기 위한 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.
- [0036] [20] 체장암의 예방 또는 치료용 의약 제조에 있어서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.
- [0037] [21] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 체장암 줄기 세포 저해제.
- [0038] [22] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함

하는 췌장암 줄기 세포의 억제 방법.

[0039] [23] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 췌장암 줄기 세포 저해제로서의 용도.

[0040] [24] 췌장암 줄기 세포 억제에 사용하기 위한 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[0041] [25] 췌장암 줄기 세포 저해제의 제조에 있어서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

[0042] [26] 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되기 위한 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 의약.

[0043] [27] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합되어 사용되기 위한 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 의약.

### 발명의 효과

[0044] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 조합하여 함유하는 본 발명의 의약은 항-악성 종양의 시너지 효과를 갖고 항-악성 종양 약물로서 유용하다.

[0045] 본 발명의 의약은 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 유도된 혈액 락트산 값 증가를 억제하므로, 락트산 산증을 감소시키는 안전한 의약이다.

[0046] 본 발명의 의약은 항-악성 종양의 시너지 효과를 지니므로, 이의 투여량을 적게 하는 것이 가능하고, 추가로 부작용을 감소시키는 것으로 기대된다.

[0047] 활성 성분으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 본 발명의 의약은 췌장암의 예방 또는 치료 약물로서 유용하다.

[0048] 췌장암 치료의 제 1 의 대안 약물인 켐시타빈 (gemcitabine) 은 췌장암 줄기 세포의 성장을 후술하는 실시예 12의 결과에서 나타내듯이 허용한다.

[0049] 췌장암 줄기 세포의 시너지 억제 효과를 갖는 본 발명의 의약은 특히 췌장암의 예방 또는 치료 약물로서 유용하다. 게다가, 본 발명의 의약 및 켐시타빈의 조합은 암 줄기 세포의 증가 및 켐시타빈 치료에서의 재발 증가의 위험이라는 임상적 문제를 개선하는 것으로 기대되고, 이는 췌장암의 예방 또는 치료 약물로서 특히 유용하다.

[0050] 활성 성분으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 본 발명의 의약은 췌장암 줄기 세포 억제 효과를 보인다. 그러므로, 이는 췌장암 예방 또는 치료 약물로서 유용하고, 나아가 췌장암의 전이 또는 재발을 방지하는 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0051] 도 1 은 실시예 1 의 결과를 나타낸다.

도 2 는 실시예 2 의 결과를 나타낸다.

도 3 은 실시예 3 의 결과를 나타낸다.

도 4 는 실시예 10 에서 디히드로쿠에르세틴의 라세메이트 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴) 의 결과를 나타낸다.

도 5 는 실시예 10 에서 광학 활성 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴) 의 결과를 나타낸다.

도 6 은 실시예 11 의 결과를 나타낸다.

도 7 은 실시예 12 의 결과를 나타낸다. 도면에서, Met 은 메트포르민을 의미하고, DHQ 는 디히드로쿠에르세틴을 의미하며, Gem 은 켐시타빈을 의미한다.

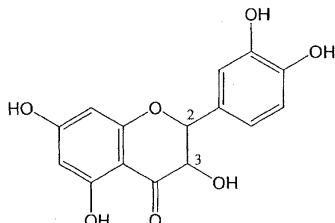
### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] (I) 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 병용

[0053] 메트포르민의 약학적으로 허용가능한 염의 예는 무기산과의 염, 유기산과의 염, 산성 아미노산과의 염 등을 포함한다.

[0054] 무기산과의 염의 예는 염산, 히드로브롬산, 질산, 황산, 인산과의 염 등을 포함한다. 유기산과의 염의 예는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레산, 시트르산, 숙신산, 말산, 메탄솔폰산, 벤젠솔폰산, p-톨루엔솔폰산과의 염 등을 포함한다. 산성 아미노산과의 염의 예는 아스파르트산, 글루탐산과의 염 등을 포함한다. 이들 중, 히드로클로라이드가 바람직하다.

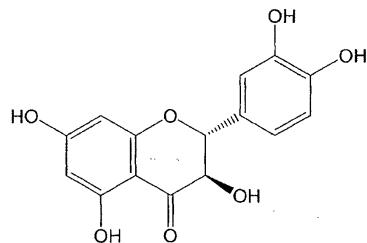
[0055] 디히드로쿠에르세틴은 쿠에르세틴의 피란 고리의 2-위치 및 3-위치 사이의 이중 결합이 감소되고, 하기 식으로 나타낸 화합물이다:



[0056]

[0057] 디히드로쿠에르세틴은 2 개의 비대칭 탄소 원자 (크로만 고리의 2-위 및 3-위) 기재의 4 개의 입체이성질체를 포함한다 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴, (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴, (2R,3S)-디히드로쿠에르세틴, (2S,3R)-디히드로쿠에르세틴). 본 발명에서 디히드로쿠에르세틴은 이들 이성질체 또는 이들의 라세메이트 중 2 종 이상의 조합 (예, (2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 혼합물) 일 수 있으나, (2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트 및 (2R,3R)-디히드로쿠에르세틴이 바람직하고, (2R,3R)-디히드로쿠에르세틴이 특히 바람직하다.

[0058] 이성질체 중에서, 하기 식으로 나타낸 (2R,3R)-디히드로쿠에르세틴이 라릭스 시비리카 (*Larix sibirica*) 에 포함되고, 또한 탁시풀린으로 명명되는 점이 공지되어 있다:



[0059]

[0060] 본 발명에서, 천연 발생 물질, 예컨대 공지된 방법 등에 의해 추출된 탁시풀린이 또한 이용될 수 있고, 시판 제품도 또한 이용될 수 있다.

[0061] 디히드로쿠에르세틴의 약학적으로 허용가능한 염의 예는 무기 염기와의 염, 유기 염기와의 염, 염기성 아미노산과의 염 등을 포함한다.

[0062] 무기 염기와의 염의 예는 알칼리 금속, 예컨대 나트륨, 칼륨 등, 알칼리 토금속, 예컨대 칼슘, 마그네슘 등, 및 알루미늄, 암모늄 등과의 염을 포함한다. 유기 염기와의 염의 예는 트리메틸아민, 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염을 포함한다. 염기성 아미노산과의 염의 예는 아르기닌, 리신, 오르니틴 등과의 염을 포함한다. 바람직한 염의 예는 알칼리 금속 염, 및 알칼리토금속 염을 포함한다.

[0063] 본 발명에서 이용가능한 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염은 또한 하나 이상의 원자가 특정한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 하나 이상의 원자에 의해 대체된 동일한 동위원소 표지된 화합물을 포함한다. 이들 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 황, 불소 및 염소 동위원소, 예컨대  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  등이다. 상술된 동위원소 및/또는 다른 원자의 다른 동위원소를 포함하는 특정 동위원소-표지된 화합물, 예를 들어  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  등과 같은 방사성 동위원소가 혼입된 화합물이 약물 조직 분포 검정 및/또는 기질 조직 분포 검

정에 유용하다. 삼중수소화 (즉,  $^{3}\text{H}$ ) 동위원소 및 탄소-14 (즉,  $^{14}\text{C}$ ) 동원원소가 제조의 용이성 및 검출능 측면에서 특히 바람직하다. 나아가, 중질의 동위원소, 예컨대 듀테륨 (즉,  $^{2}\text{H}$ ) 등으로의 치환이, 예를 들면 생체 내 반감기 증가 또는 필수 투여량 감소로 인해 치료에서 특정한 이점을 제공함으로써 대사 안정성을 개선시키는 것으로 예상된다.

[0064] 본 발명의 의약에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 병용된다. 본 발명의 의약에 있어서, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 동시에 제형화될 수 있거나 또는 동일 제제에 함유될 수 있다. 다르게는, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 개별적으로 제형화될 수 있고 동일한 경로 또는 상이한 경로로써 동시에 또는 다른 시점에 단일의 대상에 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 의약은 단일의 제제 중메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 의약, 및 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물 (개별적으로 제형화됨)을 조합하여 이용하는 의약을 포함한다.

[0065] 본 발명의 의약은 예를 들어 약학적 조성물, 예컨대 정제 (당의정, 필름코팅 정제 포함), 분말, 과립, 캡슐 (연질 캡슐 포함), 지질, 주사제, 좌제, 서방성 제제 (예, 서방성 마이크로캡슐), 또는 즉방성 제제로, 예를 들면 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및/또는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을, 약물학적으로 허용가능한 담체와 함께 공지된 방법에 따라 혼합하여 제형화될 수 있고, 안전하게 경구 또는 비경 투여될 수 있다 (예, 국소, 직장, 정맥내 투여 등). 주사는 정맥내, 근육내, 피하 또는 기관내 투여용일 수 있거나 또는 직접 병변에 투여될 수 있다.

[0066] 본 발명의 의약 제조에 사용될 수 있는 약물학적으로 허용가능한 담체의 예는 통상 이용되는 각종 유기 또는 무기 담체 물질, 예컨대 부형제, 윤활제, 결합제 및 고체 제제용 봉해제, 용매, 가용화제, 혼탁제, 등장화제, 완충제 및 액체 제제용 평활제 (smoothing agent) 등을 포함한다. 나아가, 필요한 경우, 적절량의 일반적인 첨가제, 예컨대 보존제, 항산화제, 쟉색제, 감미제, 흡착제, 습윤제 등이 이용될 수도 있다.

[0067] 부형제의 예는 락토오스, 수크로오스, D-만니톨, 전분, 옥수수전분, 결정질 셀룰로오스, 경질 무수 규산 등을 포함한다.

[0068] 윤활제의 예는 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 탈크, 클로이드성 실리카 등을 포함한다.

[0069] 결합제의 예는 결정질 셀룰로오스, 수크로오스, D-만니톨, 텍스트린, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 전분, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 등을 포함한다.

[0070] 봉해제의 예는 전분, 카르복시메틸셀룰로오스, 칼슘, 나트륨 카르복시메틸 전분, L-히드록시프로필셀룰로오스 등을 포함한다.

[0071] 용매의 예는 주사용수, 알코올, 프로필렌 글리콜, 마크로골, 참기름, 옥수수기름, 올리브기름 등을 포함한다.

[0072] 가용화제의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, D-만니톨, 벤질 벤조에이트, 에탄올, 트리스아미노메탄, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 나트륨 카르보네이트, 나트륨 시트레이트 등을 포함한다.

[0073] 혼탁화제의 예는 계면활성화제, 예컨대 스테아릴트리에탄올아민, 나트륨 라우릴 술페이트, 라우릴 아미노프로파온산, 레시틴, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 글리세롤 모노스테아레이트 등; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등을 포함한다.

[0074] 등장화제의 예는 글루코오스, D-소르비톨, 나트륨 클로라이드, 글리세롤, D-만니톨 등을 포함한다.

[0075] 완충제의 예는 완충물, 예컨대 포스페이트, 아세테이트, 카르보네이트, 시트레이트 등; 등을 포함한다.

[0076] 평활화제의 예는 벤질 알코올 등을 포함한다.

[0077] 보존제의 예는 파라옥시벤조에이트, 클로로부탄올, 벤질 알코올, 페네틸 알코올, 헤이드로아세트산, 소르브산 등을 포함한다.

- [0078] 항산화제의 예는 술파이트, 아스코르브산,  $\alpha$ -토코페롤 등을 포함한다.
- [0079] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 본 발명의 의약 중 함량은 제제 형태 등에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0080] 예를 들어, 단일 제제 내 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴을 함유하는 본 발명의 의약에서 메트포르민의 함량은 전체 제제에 대해 일반적으로 약 0.01 내지 약 99.99 wt%, 바람직하게 약 0.1 내지 약 50 wt%이고, 디히드로쿠에르세틴의 함량은 전체 제제에 대해 일반적으로 약 0.01 내지 약 99.99 wt%, 바람직하게 약 0.1 내지 약 50 wt%이다.
- [0081] 본 발명의 의약 중 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 함량비는, 디히드로쿠에르세틴 1 중량부 당, 약 0.0005 - 300 중량부, 바람직하게 약 0.5 - 300 중량부, 더욱 바람직하게 약 0.5 - 100 중량부, 보다 더욱 바람직하게 약 2.5 - 50 중량부, 특히 바람직하게 약 2.5 - 10 중량부의 메트포르민이다.
- [0082] 게다가, 본 발명의 의약 중 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 함량비는, 디히드로쿠에르세틴 1 mol 당, 약 1 - 600 mol, 바람직하게 약 1 - 200 mol, 더욱 바람직하게 약 5 - 100 mol, 보다 더욱 바람직하게 약 5 - 20 mol의 메트포르민이다.
- [0083] 본 발명의 의약 중 담체 등과 같은 첨가제의 함량은 제제 형태에 따라 가변적이지만, 이것은 전체 제제에 대해 일반적으로 약 1 내지 약 99.99 wt%, 바람직하게 약 10 내지 약 90 wt%이다.
- [0084] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴이 따로 따로 제형화되는 경우, 메트포르민 함유 제제 내 메트포르민의 함량은 전체 제제에 대해 일반적으로 약 0.01 내지 약 100 wt%, 바람직하게 약 0.1 내지 약 90 wt%이고, 디히드로쿠에르세틴 함유 제제 내 디히드로쿠에르세틴의 함량은 전체 제제에 대해 일반적으로 약 0.01 내지 약 100 wt%, 바람직하게 약 0.1 내지 약 90 wt%이다. 담체 등과 같은 첨가제의 함량은 상기 언급된 바와 같다.
- [0085] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴이 따로 따로 제형화되는 경우 이들의 이용비는 디히드로쿠에르세틴 1 중량부 당 일반적으로 약 0.0005 - 300 중량부, 바람직하게 약 0.5 - 300 중량부, 더욱 바람직하게 약 0.5 - 100 중량부, 보다 더욱 바람직하게 약 2.5 - 50 중량부, 특히 바람직하게 약 2.5 - 10 중량부의 메트포르민이다.
- [0086] 더욱이, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴이 개별적으로 제형화되는 경우 이들의 이용비는 디히드로쿠에르세틴 1 mol 당 약 0.001 - 600 mol, 바람직하게 약 1 - 600 mol, 더욱 바람직하게 약 1 - 200 mol, 보다 더욱 바람직하게 약 1 - 100 mol, 특히 바람직하게 약 5 - 20 mol의 메트포르민이다.
- [0087] 메트포르민의 약학적으로 허용가능한 염 및/또는 디히드로쿠에르세틴의 약학적으로 허용가능한 염이 이용되는 경우, 이의 제제 내 함량 및 이의 함량비는 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴에 대해 상기 지시된 것과 동일한 범위 내에 있다.
- [0088] 이들 제제는 제조 단계에 일반적으로 사용된 공지 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0089] 주사의 경우, 예를 들어 주사 (예, Captisol 제제)는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및/또는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 수성 주사액을, 분산제 (예, Tween 80 (Atlas Powder, USA 사제), HCO 60 (Nikko Chemicals 사제), 폴리에틸렌 글리콜, 카르복시메틸셀룰로오스, 나트륨 알기네이트, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 엑스트렌 등), 안정화제 (예, 아스코르브산, 나트륨 피로설파이트 등), 계면활성제 (예, 폴리소르베이트 80, 마크로골 등), 가용화제 (예, 글리세롤, 에탄올, Captisol (상표명, 술포부틸에테르- $\beta$ -시클로텍스트렌 나트륨 염) 등), 완충화제 (예, 시트르산, 인산 및 그의 알칼리금속염, 시트르산 및 그의 알칼리금속염 등), 등장화제 (예, 나트륨 클로라이드, 칼륨 클로라이드, 만니톨, 소르비톨, 글루코오스 등), pH 조절제 (예, 염산, 나트륨 히드록시드 등), 보존제 (예, 에틸 파라히드록시벤조에이트, 벤조산, 메틸 p-히드록시벤조에이트, 프로필 p-히드록시벤조에이트, 벤질 알코올 등), 용해제 (예, 농축 글리세롤, 메글루민 등), 가용화제 (예, 프로필렌 글리콜, 수크로오스 등), 평활제 (예, 글루코오스, 벤질 알코올 등) 등과 함께, 또는 상기를 식물성 오일, 예컨대 올리브기름, 참기름, 면실유, 옥수수기름 등, 또는 가용화제, 예컨대 프로필렌 글리콜 등에서 용해, 혼탁 또는 에멀젼화하는 것에 의한 유성 주사물을 제조함으로써 제조될 수 있다.
- [0090] 경구 제제 (정제)의 경우, 예를 들어 경구 제제는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및/또는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의, 부형제 (예, 락토오스, 수크로오스, 전분, 옥수수 전분 등), 봉해제 (예, 전분, 칼슘 카르보네이트 등), 결합제 (예, 전분, 검 아라빅, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필셀룰로오스, 젤라틴 등), 윤활제 (예, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜 6000 등) 등과의 혼합, 상기 혼합물의 압축 성형, 이후 필요에 따라 이의 맛의 차폐, 장용 코팅 또

는 지속성을 위한 공지 방법에 의한 코팅에 의해 제조될 수 있다.

[0091] 본원에서 사용된 코팅제의 예는 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌글리콜, Tween 80, 플루로닉 (pluronic) F68, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트, 히드록시메틸셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트, Eudragit (Rohm, Germany 사 제조, 메타크릴산-아크릴산 공중합체) 및 염료 (예, 산화 제2철 레드, 티타늄 디옥시드 등) 등을 포함한다. 당의의 예는 수크로오스, 탈크, 검 아라비, 염료 (예, 산화 제2철 레드, 티타늄 디옥시드 등), 폴리싱제 (예, 밀랍 등) 등을 포함한다.

[0092] 좌제의 경우, 예를 들어 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및/또는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 공지의 방법에 따라, 오일 기재 (예, 고급 지방산의 글리세리드 [예, 카카오버터, 위텝솔 (witepsol; Dynamitnovel Ltd., Germany 사제) 등], 중쇄 지방산 [예, 미글리올 (Dynamitnovel Ltd., Germany 사제) 등], 식물성 오일 (예, 참기름, 대두 오일, 면실유 등) 등), 수성 기재 (예, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌 글리콜 등), 수성 겔 기재 (예, 천연 검, 셀룰로오스 유도체, 비닐 중합체, 아크릴산 중합체 등) 등과 같은 기질을 이용함으로써 유성 또는 수성 고체, 반고체 또는 액체 좌제로 제형화될 수 있다.

[0093] 본 발명의 의약은 감소된 부작용을 보이고, 인간 및 동물 (예, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 원숭이 등)에 안전하게 투여될 수 있다.

[0094] 본 발명의 의약의 투여량은 용법, 환자의 연령 및 성별, 질병 중증도 등에 따라 적절히 선택될 수 있다. 일일 성인 (체중 60 kg)을 위한 본 발명의 의약 투여량은 일반적으로 약 250 - 3000 mg, 바람직하게 500 - 2250 mg의 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 일반적으로 약 40 - 1200 mg, 바람직하게 50 - 900 mg의 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다. 투여량은 일일 1회 내지 수회 분할되어 투여된다.

[0095] 본 발명의 의약은 악성 종양의 예방 또는 치료제로서 유용하다.

[0096] 악성 종양의 예는 하기를 포함한다: 성상교종, 악성 속질모세포종, 생식 세포 종양, 두개인두종 및 뇌실막세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된 소아 뇌 종양; 신경아교종, 교종양, 수막종, 뇌하수체샘종 및 신경초종으로 이루어진 군으로부터 선택된 성인 뇌 종양; 상악동 암, 인두암 (예, 코인두암, 입인두암, 하인두암), 후두암, 구강암, 입술 암, 설암 및 귀밀샘 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 두경부 암; 소세포폐암, 비(非)소세포폐암, 폐 샘종증 및 중피종으로 이루어진 군으로부터 선택된 흉부암 및 종양; 식도암, 간암, 일차성 간암, 쓸개암, 쓸개관암, 위암, 직장결장암, 결장암, 직장암, 항문암, 췌장암 및 이자내분비 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 위장관 암 및 종양; 음경암, 신장 골반-요관암, 신장 세포암, 고환 종양 (또한 음낭 종양으로도 명명), 전립샘암, 방광암, 월류 종양 및 요로상피 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 비뇨기관암 및 종양; 외음부암, 자궁경부암, 자궁체암, 자궁내막암, 자궁 육종, 융모막암, 질암, 유방암, 난소암 및 난소 생식 세포 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 부인과 암 및 종양; 성인 및 소아 연조직 육종; 골육종 및 유잉 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 뼈 종양; 부신피질암 및 갑상샘암으로 이루어진 군으로부터 선택된 내분비샘 조직의 암 및 종양; 악성 림프종, 비(非)호지킨스 림프종, 호지킨스 질병, 다발골수종, 형질세포종양, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병 림프종, 만성 골수성 백혈병 및 만성 림프성 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 악성 림프종 및 백혈병; 및 만성 골수증식성 질환, 악성 흑색종, 편평세포암, 기저세포암 및 균상식육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 피부암 및 종양.

[0097] 본 발명의 의약은 특히 항-악성 종양 효과가 현저하므로, 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 외의 항-악성 종양 약물이 단지 불충분한 효과만을 제공하는 환자에게 항-악성 종양 효과를 나타내는 것으로 기대된다.

[0098] 본 발명의 의약은 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-악성 종양 약물 1종 이상과 추가로 조합될 수 있다.

[0099] 메트포르민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항-악성 종양 약물의 예는 분자 표적 약물, 알킬화제, 대사 길항제, 식물 알칼로이드, 항암 항생제, 호르몬제, 면역요법제 등을 포함한다.

[0100] 상술된 "분자 표적 약물"의 예는 이마티닙 (imatinib), 게피티닙 (gefitinib), 에르로티닙 (erlotinib), 수니티닙 (sunitinib), 소라페닙 (sorafenib), 브리바닙 (brivanib), 티반티닙 (tivantinib), 리니파닙 (linifanib), 보르테조닙 (bortezomib), 닐로티닙 (nilotinib), 다사티닙 (dasatinib), 레스타우르티닙

(lestaurtinib), 라파티닙 (lapatinib), 탈리도미드 (thalidomide), 레날리도미드 (lenalidomide), 시롤리무스 (sirolimus), 에베롤리무스 (everolimus), 템시로리무스 (temsirolimus), 보리노스타트 (vorinostat), 트레티노인 (tretinooin), 타미바로텐 (tamibarotene), 리툭시마브 (rituximab), 베바시주마브 (bevacizumab), 라무시루마브 (ramucirumab), 파니투무마브 (panitumumab), 세툭시마브 (cetuximab), 트라스투주마브 (trastuzumab), 알렘투주마브 (alemtuzumab), 겜투주마브 (gemtuzumab), 오조감미신 (ozogamicin), 이브리투모마브 티우액세탄 (ibrutumomab tiuxetan), 아자시티딘 (azacitidine), 데시타빈 (decitabine), 콜레드론산 (zoledronic acid), 아르세닉 트리옥시드 (arsenic trioxide), 오블리메르센 (oblimersen) 등을 포함한다.

[0101] 상술된 "알킬화제"의 예는 메클로레타민; 시클로포스파미드; 이포스파미드; 카르무스틴; 부술판; 테모졸로미드; 프로카르바진; 로무스틴; 다카르바진; 벤다무스틴; 멜팔란; 니무스틴; 라니무스틴; 클로람부실; 포테무스틴; 플라티늄 제제, 예컨대 옥살리플라틴, 시스플라틴, 카르보플라틴 등; 등을 포함한다.

[0102] 상술된 "대사 길항제"의 예는 겜시타빈, 메토트렉세이트, 카페시타빈, 시타라빈, 플루다라빈, 클라드리빈, 에노시타빈, 카르모푸르, 테가푸르, 테가푸르 · 우라실, 테가푸르 · 기메라실 · 오테라실 칼륨, 5-플루오로우라실, 독시플루리딘, 벨아라빈, 히드록시카르바미드, 펜토스타틴, 메르캅토푸린, 류코보린, 폐메트렉세드 등을 포함한다.

[0103] 상술된 "식물 알칼로이드"의 예는 토포이소미라아제 저해제, 예컨대 이리노테칸, 토포테칸, 노기테칸, 에토포시드, 소부족산 등; 유사분열 저해제, 예컨대 과클리탁셀, Abraxane (상표명), 도세탁셀, 이삭사베필론, 빈블라스틴, 빈데신, 빈크리스틴, 비노렐빈, 에리불린 등; 등을 포함한다.

[0104] 상술된 "항암 항생제"의 예는 독소루비신, 미토마이신 C, 미톡산트론, 에피루비신, 이다루비신, 다우노루비신, 아클라루비신, 암루비신, 피라루비신, 악티노마이신 D, 블레오마이신, 웨플로마이신, 시클로스포린 등을 포함한다.

[0105] 상술된 "호르몬제"의 예는 타목시펜, 아나스트로졸, 레트로졸, 엑세메스탄, 폴베스트란트, 폴루타미드, 바이칼루타미드, 에스트라무스틴, 클로르마디논, 토레미펜, 고세렐린, 프레드니손, 류프로렐린, 아비라테론, 텍사메타손 등을 포함한다.

[0106] 상술된 "면역요법제"의 예는 GM-CSF, 인터페론 알파 2b, 인터류킨 2, 필그라스팀, 에포에틴 알파 등을 포함한다.

[0107] 본 발명은 또한 상술된 본 발명의 "메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 조합되어 있는 의약", 및 의약이 악성 종양의 예방 또는 치료를 위해 이용될 수 있거나 이용되어야 한다고 기재되어 있는, 상기와 함께 결부된 서면지를 포함하는 상업적 패키지에 관한 것이다.

[0108] 본 발명은 추가로 활성 성분으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용 (특히 락트산 산증)의 저감제, 및 활성 성분으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 항-악성 종양 작용의 증강제에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 병용되는 활성 성분으로서의 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 부작용 (특히 락트산 산증) 저감제, 및 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 병용되는 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 포함하는 항-악성 종양 작용의 증강제에 관한 것이다.

[0109] 부작용 저감제 및 항-악성 종양 작용 증강제에 있어서, "메트포르민", "메트포르민 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염", "디히드로쿠에르세틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염", 투여 형태, 투여량, 투여 대상, 표적질환 등의 예는 본 발명의 상술한 의약에 기재된 것과 유사하다.

[0110] (II) 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 활성 성분으로서 함유하는 의약

[0111] 본 발명은 활성 성분으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 췌장암의 예방 또는 치료용 의약, 및 활성 성분으로서 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 췌장암 줄기 세포 저해제에 관한 것이다.

[0112] "디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염", 투여 형태, 투여 대상 등의 예는 상술된 (I)에 기

재된 것과 유사하다.

[0113] 본 발명의 의약 및 저해제는 예를 들어 약학적 조성물, 예컨대 정제 (당의정, 필름코팅 정제 포함), 분말, 과립, 캡슐 (연질 캡슐 포함), 지질, 주사제, 좌제, 서방성 제제 (예, 서방성 마이크로캡슐), 또는 즉방성 제제로, 예를 들면 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을, 약물학적으로 허용가능한 담체와 함께 공지된 방법에 따라 혼합하여 제형화될 수 있고, 안전하게 경구 또는 비경 투여될 수 있다 (예, 국소, 직장, 정맥내 투여 등). 주사는 정맥내, 근육내, 피하 또는 기관내 투여용일 수 있거나 또는 직접 병변에 투여될 수 있다. 약물학적 허용가능한 담체는 상기 (I)에 대해 기재된 것과 유사하다.

[0114] 이들 제제는 제조 단계에 통상 이용된 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0115] 의약 중 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 본 발명의 저해제의 함량은 제제 형태 등에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0116] 예를 들면, 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 함량은 전체 제제에 대해 일반적으로 약 0.01 내지 약 99.99 wt%, 바람직하게 약 0.1 내지 약 90 wt% 이다.

[0117] 본 발명의 저해제 및 의약 중 담체 등과 같은 첨가제의 함량은 제제 형태에 따라 가변적이지만, 이는 전체 제제에 대해 일반적으로 약 1 내지 약 99.99 wt%, 바람직하게 약 10 내지 약 90 wt% 이다.

[0118] 본 발명의 의약 및 저해제는, 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 항-악성 종양 시너지 효과를 발휘하므로 바람직하게 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유한다. "메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염"은 상기 (I)에 대해 기재된 것과 유사하다.

[0119] 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 함량은 디히드로쿠에르세틴 1 중량부 당 일반적으로 약 0.5 내지 약 100 wt%, 바람직하게 약 2.5 내지 약 50 wt%, 더욱 바람직하게 약 2.5 내지 약 10 wt% 이다.

[0120] 본 발명의 의약 및 저해제는 켐시타빈과 조합되어 사용될 수 있다.

[0121] 켐시타빈의 투여량은 시판중인 켐시타빈 제제의 용량에 따라 결정될 수 있다.

[0122] 본 발명의 의약 및 저해제의 투여량은 용법, 환자의 성별 및 연령, 중증도 등에 따라 적절히 선택될 수 있다. 성인 (체중 60 kg)의 일일 투여량은 일반적으로 약 40 - 1200 mg, 바람직하게 약 50 - 900 mg, 더욱 바람직하게 약 100 - 1050 mg의 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다. 투여량은 일일 1 회 내지 수 회 분할되어 투여된다.

[0123] 실시예

[0124] 제한적인 것으로서 해석해서는 안되는 실시예를 참조하여, 본 발명을 하기에 상세히 설명한다.

[0125] [실시예 1] 인간 폐암 세포주 NCI-H1299 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

[0126] 1) 시험 물질

[0127] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)을 Bionet로부터 구입했다.

[0128] 2) 시험 물질의 준비

[0129] 메트포르민을 10% 불활성화 (56°C, 30 분 처리) 소태아 혈청을 함유하는 RPMI-1640 매질 (이하, 10% FBS-RPMI1640 매질로 약칭) (NACALAI TESQUE, INC.)에서 용해해, 200 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 20 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 5 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.5 mmol/L)을 준비했다.

[0130] 3) 세포

[0131] 인간 폐암-유도 세포주 NCI-H1299 를 American Type Culture Collection (ATCC) (catalog no. CRL-5803, Cancer Res. 1992; 52 (9 Suppl): 2732s-2736s)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0132] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정

- [0133] 세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용 해물 (whole cell lysate)에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:
- [0134] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질
- [0135] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 20 mmol/L
- [0136] (3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.5 mmol/L
- [0137] (4) 조합-처리군: 메트포르민 20 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.5 mmol/L
- [0138] 계대 NCI-H1299 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를, 혈구계 (hematocytometer)를 이용하여 확인하고  $1 \times 10^6$  세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 0.5 mL로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 (IWAKI) 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 Dulbecco 인산완충식염수 (D-PBS)로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액 (Cell Signaling Technology, Inc.)을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트 (Cell Signaling Technology, Inc., catalog No. 7854)를 이용해 정량했다. 세포 추출물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정 (Pierce)을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.
- [0139] 5) 통계 분석
- [0140] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.
- [0141] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향; two-tailed) (인자: 군 및 농도)를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan)를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0142] 6) 결과
- [0143] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다 (도 1).
- [0144] 7) 결론
- [0145] NCI-H1299 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.
- [0146] [실시예 2] 인간 췌장암 세포주 AsPC-1 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과
- [0147] 1) 시험 물질
- [0148] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)을 Bionet로부터 구입했다.
- [0149] 2) 시험 물질의 준비
- [0150] 메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 200 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 20 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 2 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.2 mmol/L)을 준비했다.

[0151] 3) 세포

[0152] 인간 췌장암-유래 세포주 AsPC-1 는, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. (현 DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD., In Vitro. 1982; 18: 24-34)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0153] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0154] 세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용 해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:

[0155] (1) 대조군 (비히를 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

[0156] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 20 mmol/L

[0157] (3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

[0158] (4) 조합-처리군: 메트포르민 20 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

[0159] 계대 AsPc-1 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $1 \times 10^6$  세포/mL 로 조절했다. 세포를 웰 당 0.5 mL 로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 D-PBS 로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1 에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.

[0160] 5) 통계 분석

[0161] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD) 로 나타낸다.

[0162] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도) 를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan) 를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[0163] 6) 결과

[0164] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다 (도 2).

[0165] 7) 결론

[0166] AsPC-1 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[0167] [실시예 3] 인간 폐 섬유아세포 세포주 WI-38 (시험관 내)에서 메트포르민-유도 랙테이트 생성에 대한 디히드로쿠에르세틴의 억제 효과

[0168] 1) 시험 물질

[0169] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd 로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트) 을 Bionet 로부터 구입했다.

[0170] 2) 시험 물질의 준비

[0171] 메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 200 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 20 mmol/L) 을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 10 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 1 mmol/L) 을 준비했다.

[0172] 3) 세포

[0173] 인간 폐 섬유아세포-유래 세포주 WI-38 는, ATCC (catalog no. CCL-75, Exp. Cell. Res., 25: 585-621, 1961)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0174] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0175] 세포 파종 후 다음날, 디히드로쿠에르세틴을 첨가하고 세포를 1 시간 동안 배양했다. 이어서, 메트포르민을 첨가하고, 세포를 6 시간 동안 배양했다. 배양 후, 조건화된 배지를 표본 채취하고, 배지에 함유된 락테이트의 농도를 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:

[0176] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

[0177] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 20 mmol/L

[0178] (3) 디히드로쿠에르세틴 및 메트포르민 조합-처리군: 메트포르민 20 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 1 mmol/L

[0179] 계대 WI-38 세포를 트립신으로 분리하고, 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고 2.5 x 10<sup>5</sup> 세포/mL 로 조절했다. 세포를 웰 당 0.5 mL 로 24-웰 멀티웰 배양 플레이트 (IWAKI) 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 배양했다. 주어진 농도의 디히드로쿠에르세틴을 함유하는 매질을 각 웰에 첨가하고, 세포를 1 시간 배양했다. 이어서, 주어진 농도의 메트포르민을 함유하는 매질을 첨가하고 세포를 6 시간 동안 추가 배양했다. 배양 후, 각 웰로부터의 배양 상청액을 표본채취하고 분자량 컷 오프 10kDa 를 위한 필터를 통과시켜 여과물을 수득했다. 락테이트 검정 키트 II (BioVision) catalog no. K627-100 를 이용해, 락테이트 농도를 측정했다. 배양 상청액의 표본채취 후 세포를 D-PBS 로 2 회 세정하고, 세포 분해 완충액을 첨가해 전 세포 융해물을 제조했다. 전 세포 융해물 중 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정으로써 측정하고, 각 웰의 락테이트 농도는 단백질 농도로 정규화하였다.

[0180] 5) 통계 분석

[0181] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD) 로 나타낸다.

[0182] 메트포르민-유도 생성된 락테이트의 함량에 대한 디히드로쿠에르세틴의 영향을 평가하기 위해, Student's t-test 를, 메트포르민 단일 처리군 및 조합-처리군 간 매질 내 락테이트의 농도에 대해 수행했다. 조합-처리 군에서의 값이 메트포르민 단일 처리군과 비교시 상당히 낮은 경우, 디히드로쿠에르세틴은 함량에 대해 억제 효과를 갖는 것으로서 정의된다. 상기 분석은 SAS software Release 9.3 (SAS Institute Japan) 를 이용하여 수행했다. p 값이 0.05 미만인 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[0183] 6) 결과

[0184] 메트포르민은 WI-38 세포에서 락테이트 생성을 유도했다. 디히드로쿠에르세틴은 메트포르민에 의해 유도된 락테이트 생성을 유의하게 억제했다 (도 3).

[0185] 7) 결론

[0186] WI-38 세포에서, 메트포르민-유도 락테이트 생성에 대한 디히드로쿠에르세틴의 억제 효과를 관찰했다. 이는 메트포르민에 의해 야기된 락트산 산증의 위험을 줄이는데 있어서 디히드로쿠에르세틴의 임상적 유용성을 나타낸다.

[0187] [실시예 4] 인간 간암 세포주 HuH-7 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

[0188] 1) 시험 물질

- [0189] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트) 을 Bionet로부터 구입했다.
- [0190] 2) 시험 물질의 준비
- [0191] 메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 50 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 5 mmol/L) 을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 2 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.2 mmol/L) 을 준비했다.
- [0192] 3) 세포
- [0193] 인간 간암-유래 세포주 HuH-7 를, Health Science Research Resources Bank (Cancer Res. 1982; 42 (9): 3858-63)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.
- [0194] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정
- [0195] 세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:
- [0196] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질
  - [0197] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 5 mmol/L
  - [0198] (3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L
  - [0199] (4) 조합-처리군: 메트포르민 5 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L
- [0200] 계대 HuH-7 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고 2.5 x 10<sup>5</sup> 세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 1 mL로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 D-PBS로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시에 1에서 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 측정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.
- [0201] 5) 통계 분석
- [0202] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.
- [0203] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도)를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan)를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0204] 6) 결과
- [0205] 결과를 표 1에 나타낸다.
- [0206] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다

[0207]

표 1

상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양		
	평균	표준편차
대조군	84.1	2.1
메트포르민	61.7	3.5
디히드로쿠에르세틴	59.7	1.6
메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴	28.2	2.6

[0208]

7) 결론

[0209]

HuH-7 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[0210]

[실시예 5] 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

[0211]

1) 시험 물질

[0212]

메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)을 Bionet로부터 구입했다.

[0213]

2) 시험 물질의 준비

[0214]

메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 50 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 5 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 2 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.2 mmol/L)을 준비했다.

[0215]

3) 세포

[0216]

인간 유방암-유래 세포주 MDA-MB-231 를, ATCC (J Natl Cancer Inst. 1974; 53 (3): 661-74)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0217]

4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0218]

세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3)을 하기와 같이 처리했다:

[0219]

(1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

[0220]

(2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 5 mmol/L

[0221]

(3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

[0222]

(4) 조합-처리군: 메트포르민 5 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

[0223]

계대 MDA-MB-231 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $2.5 \times 10^5$  세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 1 mL로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 D-PBS로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화

하였다.

[0225] 5) 통계 분석

결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.

[0227] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도)를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan)를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[0228] 6) 결과

결과를 표 2에 나타낸다.

[0230] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다.

[0231] 표 2

상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양		
	평균	표준편차
대조군	33.3	3.1
메트포르민	37.1	3.1
디히드로쿠에르세틴	25.9	0.6
메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴	19.8	1.4

[0232]

[0233] 7) 결론

[0234] MDA-MB-231 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[0235] [실시예 6] 인간 전립샘 암 세포주 22Rv1 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

[0236] 1) 시험 물질

[0237] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)을 Bionet로부터 구입했다.

[0238] 2) 시험 물질의 준비

[0239] 메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 100 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 10 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 2 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.2 mmol/L)을 준비했다.

[0240] 3) 세포

[0241] 인간 전립샘암-유래 세포주 22Rv1 를, ATCC (시험관 내 Cell Dev Biol Anim. 1999; 35 (7): 403-9)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0242] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0243] 세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용

해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:

(1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

(2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 10 mmol/L

(3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

(4) 조합-처리군: 메트포르민 10 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

제대 22Rv1 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $2.5 \times 10^5$  세포/mL 로 조절했다. 세포를 웰 당 1 mL 로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상 과종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 D-PBS 로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1 에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.

#### 5) 통계 분석

결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD) 로 나타낸다.

상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도) 를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan) 를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.

#### 6) 결과

결과를 표 3 에 나타낸다.

메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다.

#### 표 3

상대적 포스포-4E-BP1		
단백질 양		
	평균	표준편차
대조군	51.0	6.7
메트포르민	57.3	2.2
디히드로쿠에르세틴	53.1	4.5
메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴	36.2	1.5

#### 7) 결론

22Rv1 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[실시예 7] 인간 쓸개관암 세포주 HuH-28 (시험관 내) 에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

- [0260] 1) 시험 물질
- [0261] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트) 을 Bionet로부터 구입했다.
- [0262] 2) 시험 물질의 준비
- [0263] 메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 200 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 20 mmol/L) 을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 2 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.2 mmol/L) 을 준비했다.
- [0264] 3) 세포
- [0265] 인간 쓸개관암-유래 세포주 HuH-28 를, Health Science Research Resources Bank (Res Exp Med (Berl). 1988; 188(5): 367-75)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.
- [0266] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정
- [0267] 세포 과종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:
- [0268] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질
- [0269] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 20 mmol/L
- [0270] (3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L
- [0271] (4) 조합-처리군: 메트포르민 20 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L
- [0272] 계대 HuH-28 세포를 트립신으로 분리하고 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $2.5 \times 10^5$  세포/mL 로 조절했다. 세포를 웰 당 1 mL 로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상 과종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 D-PBS 로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1 에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.
- [0273] 5) 통계 분석
- [0274] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD) 로 나타낸다.
- [0275] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도) 를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan) 를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0276] 6) 결과
- [0277] 결과를 표 4 에 나타낸다.
- [0278] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다

[0279]

[표 4]

상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양		
	평균	표준편차
대조군	58.8	2.8
메트포르민	55.2	1.5
디히드로쿠에르세틴	54.2	0.2
메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴	36.6	1.3

[0280]

7) 결론

[0282]

HuH-28 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[0283]

[실시예 8] 인간 난소암 세포주 Caov-3 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

[0284]

1) 시험 물질

[0285]

메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)을 Bionet로부터 구입했다.

[0286]

2) 시험 물질의 준비

[0287]

메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 200 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 20 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 2 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.2 mmol/L)을 준비했다.

[0288]

3) 세포

[0289]

인간 난소암-유래 세포주 Caov-3 를 ATCC (GYNECOL ONCOL. 1994; 53(1): 70-7)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0290]

4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0291]

세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3)을 하기와 같이 처리했다:

[0292]

(1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

[0293]

(2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 20 mmol/L

[0294]

(3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

[0295]

(4) 조합-처리군: 메트포르민 20 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.2 mmol/L

[0296]

계대 Caov-3 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $2.5 \times 10^5$  세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 1 mL로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2 회 D-PBS로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였

다.

[0297] 5) 통계 분석

[0298] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.

[0299] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 관찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도)를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan)를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[0300] 6) 결과

[0301] 결과를 표 5에 나타낸다.

[0302] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다

[0303] [표 5]

상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양		
	평균	표준편차
대조군	21.6	2.7
메트포르민	22.0	0.3
디히드로쿠에르세틴	21.0	1.0
메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴	16.8	0.3

[0304]

[0305] 7) 결론

[0306] Caov-3 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[0307] [실시예 9] 인간 췌장암 세포주 AsPC-1 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 세포 증식-관련 신호 전달에 대한 억제 효과

[0308] 1) 시험 물질

[0309] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)을 Bionet로부터 구입했다.

[0310] 2) 시험 물질의 준비

[0311] 메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜, 15, 30 및 60 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 1.5, 3 및 6 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 3 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.3 mmol/L)을 준비했다.

[0312] 3) 세포

[0313] 인간 췌장암-유래 세포주 AsPC-1를 DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD.로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0314] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0315] 각 군 (N=3)을 하기와 같이 처리했다.

[0316] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올을 함유 매질

- [0317] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 1.5, 3 및 6 mmol/L
- [0318] (3) 디히드로쿠에르세틴-단일 처리 군: 디히드로쿠에르세틴 0.3 mmol/L
- [0319] (4) 조합-처리군: 메트포르민 1.5, 3 및 6 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.3 mmol/L
- [0320] 계대 AsPC-1 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $2.5 \times 10^5$  세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 1 mL로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상과 종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로, 메트포르민 또는 디히드로쿠에르세틴, 또는 메트포르민과 디히드로쿠에르세틴 모두를 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2회 D-PBS로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.
- [0321] 5) 통계 분석
- [0322] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.
- [0323] 상기 병용의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 영향을 평가하기 위해, Dunnett 시험을 행하여 조합-처리군을 각각의 단일 제제-처리군과 비교했다. 유의한 차이가 각 단일 제제 처리군에 대해 조합-처리군에서 판찰되는 경우, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도)를 행해, 메트포르민-처리군 (1 및 2 군) 및 디히드로쿠에르세틴-처리군 (3 및 4 군) 사이의 시너지 효과를 평가했다. SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan)를 이용하여 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0324] 6) 결과
- [0325] 결과를 표 6 ~ 8에 나타낸다.
- [0326] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용은 각각의 단일 화합물 군보다 현저히 더 강하게 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 억제했다
- [0327] [표 6]
- | 메트포르민:디히드로쿠에르세틴 = 1.5 mmol/L : 0.3 mmol/L |       |      |
|---|-------|------|
| 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양                      |       |      |
|   | 평균    | 표준편차 |
| 대조군                                       | 107.3 | 9.3  |
| 메트포르민                                     | 83.1  | 5.5  |
| 디히드로쿠에르세틴                                 | 97.4  | 9.6  |
| 메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴                         | 31.2  | 4.1  |
- [0328]
- [0329] [표 7]
- | 메트포르민:디히드로쿠에르세틴 = 3 mmol/L : 0.3 mmol/L |      |      |
|---|------|------|
| 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양                    |      |      |
|   | 평균   | 표준편차 |
| 대조군                                     | 33.5 | 10.1 |
| 메트포르민                                   | 36.9 | 1.7  |
| 디히드로쿠에르세틴                               | 37.2 | 2.5  |
| 메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴                       | 18.4 | 0.9  |
- [0330]

[0331]

[표 8]

메트포르민:디히드로쿠에르세틴 = 6 mmol/L : 0.3 mmol/L		
상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양		
평균	표준편차	
대조군	107.3	9.3
메트포르민	83.1	5.5
디히드로쿠에르세틴	89.7	7.1
메트포르민 + 디히드로쿠에르세틴	29.4	1.2

[0332]

[0333]

7) 결론

[0334]

AsPC-1 세포에서, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 시너지 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합의 유용성을 나타낸다.

[0335]

[실시예 10] 인간 폐 섬유아세포 세포주 WI-38 (시험관 내)에서 메트포르민-유도 락테이트 생성에 대한 디히드로쿠에르세틴의 억제 효과

[0336]

1) 시험 물질

[0337]

메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴의 라세메이트 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴)을 Bionet로부터 구입하고, 광학 활성 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴)은 SIGMA로부터 구입했다.

[0338]

2) 시험 물질의 준비

[0339]

메트포르민을 10% FBS-RPMI1640 매질에 용해시켜 200 mmol/L 메트포르민 (최종 농도 20 mmol/L)을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 10 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 1 mmol/L)을 준비했다.

[0340]

3) 세포

[0341]

인간 폐 섬유아세포-유래 세포주 WI-38 를 ATCC (catalog no. CCL-75, Exp. Cell. Res., 25: 585-621, 1961)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0342]

4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0343]

세포 파종 후 다음날, 디히드로쿠에르세틴을 첨가하고, 세포를 1 시간 동안 배양했다. 이어서, 메트포르민을 첨가하고, 세포를 6 시간 동안 배양했다. 조건화된 매질을 표본 채취하고, 매질에 함유된 락테이트의 농도를 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3)을 하기와 같이 처리했다:

[0344]

(1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

[0345]

(2) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 1 mmol/L

[0346]

(3) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 20 mmol/L

[0347]

(4) 조합-처리군: 메트포르민 20 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 1 mmol/L

[0348]

계대 WI-38 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고 2.5 x 10<sup>5</sup> 세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 0.5 mL로 24-웰 멀티웰 배양 플레이트 (IWAKI) 상 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 여기에, 주어진 농도의 디히드로쿠에르세틴을 함유하는 매질을 첨가하고, 세포를 1 시간 배양하고, 주어진 농도의 메트포르민을 함유하는 매질을 첨가하고, 세포를 6 시간 동안 추가 배양했다. 배양 후, 각 웰로부터의 배양 상청액을 표본채취하고 분자량 컷 오프 10kDa를 위한 필터를 통과시켜 여과물을 수득했다. 락테이트 검정 키트 II (BioVision) catalog no. K627-100를 이용해, 락테이트 농도를 측정했다. 배양 상청액의 표본채취 후 세포를 D-PBS로 2 회 세

정하고, 세포 분해 완충액을 첨가해 전 세포 용해물을 제조했다. 전 세포 용해물 중 단백질의 농도를 BCA 단백질 측정을 이용해 측정하고, 각 웰의 락테이트 농도는 단백질 농도로 정규화하였다.

[0349] 5) 통계 분석

결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.

[0351] 메트포르민-유도 생성된 락테이트의 함량에 대한 디히드로쿠에르세틴의 영향을 평가하기 위해, Student's t-test 를, 대조군과 디히드로쿠에르세틴 단일 제제 처리군, 및 대조군과 메트포르민 단일 제제 처리군 사이의 매질 내 락테이트의 농도에 대해 수행했다. 나아가, 정규화된 생성된 락테이트 함량에 대해 디히드로쿠에르세틴 및 메트포르민의 조합의 영향을 평가하기 위해, 2-방식 ANOVA (양방향)(인자: 군 및 농도) 를, 디히드로쿠에르세틴 단일 제제 처리군 (1 및 2 군) 과 메트포르민 처리군 (3 및 4 군) 사이에서 수행했다. 디히드로쿠에르세틴 단일 제제-처리군에서 정규화된 생성된 락테이트 함량이 대조군 군에서의 것과 비교시 유의한 경우, 상기 제제는 락테이트 생성에 대해 억제 작용을 갖는 것으로 판단되었다. 메트포르민 단일 제제 처리군에서 정규화된 생성된 락테이트 함량이 대조군 군에서의 것과 비교시 유의한 경우, 상기 제제는 락테이트 생성에 대해 유도 작용을 갖는 것으로 판단되었다. 조합-처리군과 메트포르민 단일제제 처리군 사이의 정규화된 생성된 락테이트 함량의 차이가 대조군과 디히드로쿠에르세틴 단일 제제 처리군 사이의 것보다 유의하게 더 큰 경우, 디히드로쿠에르세틴은 함량에 대해 억제 효과를 갖는 것으로서 정의되었다. SAS software Release 9.3 (SAS Institute Japan)을 이용해 분석을 수행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[0352] 6) 결과

[0353] 라세메이트와 광학 활성 디히드로쿠에르세틴 양자 모두 대조군 군과 비교하면 WI-38에서 락테이트 생성을 억제하였다. 세포 내 메트포르민은 락테이트 생성을 유도했고, 이는 라세메이트와 광학 활성 디히드로쿠에르세틴 양자 모두에 의해 유의하게 억제되었다 (라세메이트; 도 4, 광학 활성; 도 5).

[0354] 7) 결론

[0355] WI-38 세포에서, 라세메이트 및 광학 활성 디히드로쿠에르세틴에 의한, 메트포르민-유도 락테이트 생성의 억제 효과를 관찰했다. 이는 메트포르민 투여에 의해 야기된 락트산 산증의 위험을 감소시키는데 있어 디히드로쿠에르세틴의 임상적 유용성을 나타낸다.

[0356] [실시예 11] 인간 체장암 세포주 AsPC-1 (시험관 내)에서 디히드로쿠에르세틴 단일 제제에 의한 암 세포 증식-관련 신호 경로에 대한 억제 효과

[0357] 1) 시험 물질

[0358] 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트) 를 Bionet에서 구입했다.

[0359] 2) 시험 물질의 준비

[0360] 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 5 및 10 mmol/L 디히드로쿠에르세틴 (최종 농도 0.5 및 1 mmol/L) 을 준비했다.

[0361] 3) 세포

[0362] 인간 체장암-유래 세포주 AsPC-1 는 Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. (현 DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD., In Vitro. 1982; 18: 24-34)로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.

[0363] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정

[0364] 세포 파종 후 다음날, 시험 물질을 첨가하고 세포를 수확하기 전 6 시간 동안 배양했다. 제조된 전 세포 용해물에 함유된 상대적 포스포-4E-BP1 단백질의 양을 측정 및 평가했다. 각 군 (N=3) 을 하기와 같이 처리했다:

[0365] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1% 에탄올 함유 매질

- [0366] (2) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.5 mmol/L
- [0367] (3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 1 mmol/L
- [0368] 계대 AsPC-1 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $1 \times 10^6$  세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 0.5 mL로 12-웰 멀티웰 배양 플레이트 상에 파종하고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 주어진 농도로 디히드로쿠에르세틴을 함유하는 매질을 각 웰에 첨가했다. 6시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 내 세포를 2회 D-PBS로 세정하고, 전 세포 용해물을 세포 분해 완충액을 이용하여 제조했다. 원심분리시, 상청액은 표본 채취하고, 샘플 내 상대적 포스포-4E-BP1 (Thr37/Thr46) 단백질의 양을 ELISA 키트를 이용해 실시예 1에서와 동일한 방식으로 정량했다. 전 세포 용해물 중 총 단백질의 농도를 BCA 단백질 검정을 이용해 측정하고, 각 웰의 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양을 총 단백질 양으로 정규화하였다.
- [0369] 5) 통계 분석
- [0370] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.
- [0371] 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 디히드로쿠에르세틴의 용량 의존성을 평가하기 위해, 선형 회귀 분석을 수행했다. 그 결과로서, 용량 의존성을 관찰했다. 이때, Williams' test (한방향; one-tailed)를 대조군과 단일 제제 처리군 사이에서 수행했다. 그 결과로서, 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대해 0.5 mmol/L 이상의 디히드로쿠에르세틴의 유의한 억제 작용이 관찰되었다. 디히드로쿠에르세틴 단일 제제-처리군에서 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양이 대조군 군에서의 것과 비교시 유의한 경우, 상기 제제는 상기 양에 대해 억제 작용을 갖는 것으로 판단하였다. SAS software Release 9.3 (SAS Institute Japan)을 이용해 분석을 행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0372] 6) 결과
- [0373] 디히드로쿠에르세틴은 상대적 포스포-4E-BP1 단백질 양에 대한 용량-의존적 억제 효과를 보였다 (도 6).
- [0374] 7) 결론
- [0375] AsPC-1 세포에서, 디히드로쿠에르세틴 단일 제제에 의한 증식-관련 신호 경로에 대한 용량-의존적 억제 효과를 관찰했다. 이는 암 화학요법에서 디히드로쿠에르세틴의 유용성을 나타낸다.
- [0376] [실시예 12] 인간 췌장암 세포주 AsPC-1 (시험관 내)에서 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의한 암 줄기 세포의 표면 마커 발현에 대한 억제 효과
- [0377] 1) 시험 물질
- [0378] 메트포르민을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd로부터 구입했다. 디히드로쿠에르세틴 ((2R,3R)-디히드로쿠에르세틴 및 (2S,3S)-디히드로쿠에르세틴의 라세메이트)를 Bionet로부터 구입했다. 켐시타빈을 Toronto Research Chemicals Inc로부터 구입했다.
- [0379] 2) 시험 물질의 준비
- [0380] 메트포르민을 증류수에서 용해하고, 10% FBS-RPMI1640 매질로 희석해 15 mmol/L 메트포르민을 준비했다. 디히드로쿠에르세틴을 에탄올 중에 용해하고, 매질로 희석해 0.3 mmol/L 디히드로쿠에르세틴을 준비했다. 켐시타빈을 디메틸су록시드 (DMSO) 중 용해하고, 매질로 희석해 100 nmol/L 켐시타빈을 준비했다.
- [0381] 3) 세포
- [0382] 인간 췌장암-유래 세포주 AsPC-1를 DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD로부터 획득했다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 10% FBS-RPMI1640 배지에서 배양했다.
- [0383] 4) 시험 물질의 첨가 및 측정
- [0384] 각 군 (N=10)을 하기와 같이 처리했다:
- [0385] (1) 대조군 (비히클 대조군) 군: 1.5% 증류수, 0.3% 에탄올 및 0.1% DMSO 함유 매질

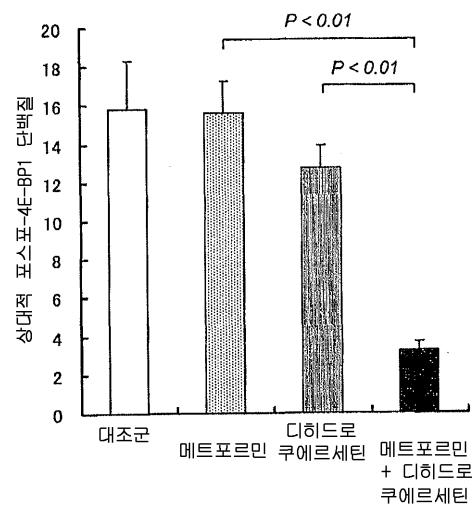
- [0386] (2) 메트포르민 단일-처리군: 메트포르민 15 mmol/L
- [0387] (3) 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군: 디히드로쿠에르세틴 0.3 mmol/L
- [0388] (4) 메트포르민 · 디히드로쿠에르세틴 조합-처리군: 메트포르민 15 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.3 mmol/L
- [0389] (5) 캡시타빈 단일-처리군: 캡시타빈 100 nmol/L
- [0390] (6) 메트포르민 · 디히드로쿠에르세틴 · 캡시타빈 조합-처리군: 메트포르민 15 mmol/L + 디히드로쿠에르세틴 0.3 mmol/L + 캡시타빈 100 nmol/L
- [0391] 계대 AsPC-1 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. 세포 혼탁액의 세포 밀도를 혈구계를 이용하여 확인하고  $2 \times 10^4$  세포/mL로 조절했다. 세포를 웰 당 3 mL로 6-웰 멀티웰 배양 플레이트 (IWAKI) 상에 펴놓고, 하룻밤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양했다. 다음날, 상기 매질을 주어진 농도로 각 시험 물질을 함유하는 매질로 변경하고, 세포를 72 시간 동안 배양했다. 배양 종료시, 세포를 트립신으로 분리하고 새 매질에서 혼탁했다. FACS (형광 활성화 세포 분류) 완충액으로 세정한 후, 세포를 FITC-표지 항-인간 CD44 항체 및 APC-표지 항-인간 CD24 항체로 염색하고, 4°C에서 30 분간 처리했다. 그후, 세포를 FACS 완충액으로 세정하고, 40 마이크론 메시 필터를 통과시키고, CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 비율을 유세포분석기 (Nippon Becton Dickinson and Company, Ltd.)를 이용해 확인했다.
- [0392] 5) 통계 분석
- [0393] 결과는 평균값 (MEAN) ± 표준편차 (SD)로 나타낸다.
- [0394] 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군 및 병용군의 CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 비율에 대한 영향을 평가하기 위해, 비쌍 (unpaired) 2-방식 ANOVA를 수행해 대조군 군과 각 물질 단일-처리군 및 조합-처리군을 비교했다. CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 비율에 대한 캡시타빈 단일-처리군의 영향을 평가하기 위해, Student's t-test를 수행해, 대조군 군과 캡시타빈 단일-처리군을 비교했다. 나아가, 캡시타빈 단일-처리군에 대항해, CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 비율에 대한 캡시타빈, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴 조합-처리군의 영향을 평가하기 위해, Student's t-test를 수행하여 캡시타빈 단일-처리군 및 캡시타빈, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴 조합-처리군을 비교했다. SAS software Release 9.3 (SAS Institute Japan)를 이용해 분석을 행했다. p 값이 0.05 미만 경우, 상기 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0395] 6) 결과
- [0396] 디히드로쿠에르세틴 단일-처리군 및 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴 조합-처리군은 대조군 군과 비교시 AsPC-1 세포에서 CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 비율을 유의하게 감소시켰다. 캡시타빈 단일-처리군은 대조군 군과 비교시 AsPC-1 세포에서 CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 비율을 유의하게 증가시켰다. 캡시타빈 단일 첨가에 의한 CD44 및 CD24 이중 양성 세포의 증가된 비율은 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 보충 첨가에 의해 유의하게 억제되었다 (도 7).
- [0397] 7) 결론
- [0398] 체장암 세포주 AsPC-1 상 체장암 내 암 줄기 세포로서 확인된, CD24 및 CD44 이중 양성 세포의 비율을 평가한 후, 유의한 감소가 디히드로쿠에르세틴 단일 첨가 및 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합 첨가에 의해 관찰되었다. 그와는 반대로, 캡시타빈에 의한 이중 양성 세포의 비율의 유의한 증가가 관찰되었다. 게다가, 캡시타빈 단일 첨가에 의한 CD24 및 CD44 이중 양성 세포의 상기 증가는 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 조합 첨가에 의해 유의하게 감소되었다. 이러한 결과는 임상적 문제, 즉 캡시타빈 치료와 관련된 암 줄기 세포의 부유에 따른 재발 위험 증가가 캡시타빈 및 디히드로쿠에르세틴의 병용, 또는 캡시타빈, 메트포르민 및 디히드로쿠에르세틴의 병용에 의해 해결될 수 있음을 시사한다.

### 산업상 이용가능성

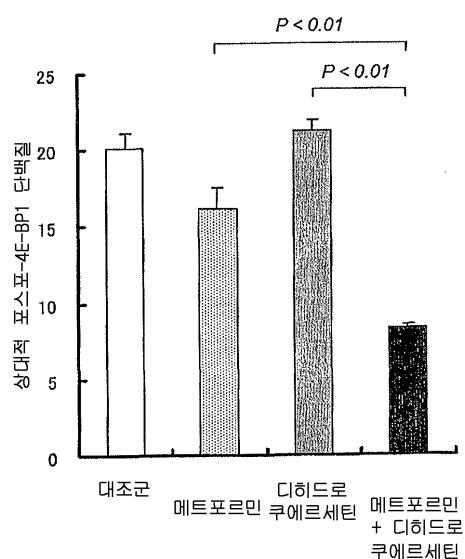
- [0399] 본 발명에 따르면, 시너지 항-악성 종양 효과를 갖고 부작용이 감소된, 항-악성 종양 약물로서 유용한 의약이 메트포르민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 디히드로쿠에르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 조합에 의해 제공될 수 있다.
- [0400] 본 출원은 본원에 그 전문이 통합되어 있는 일본에서 출원한 특허 출원 제 2013-110278 호를 기반으로 한다.

## 도면

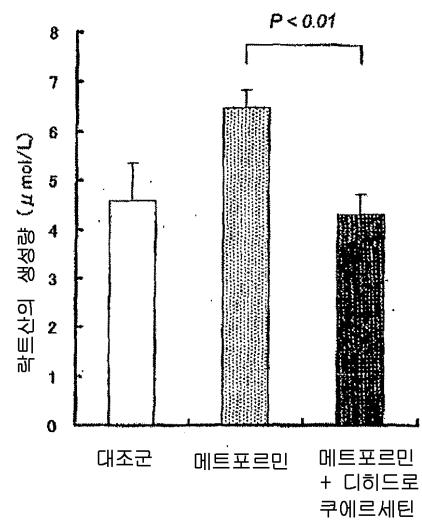
## 도면1



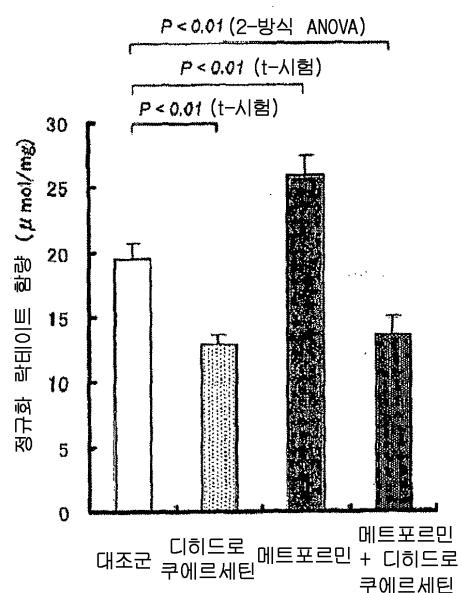
## 도면2



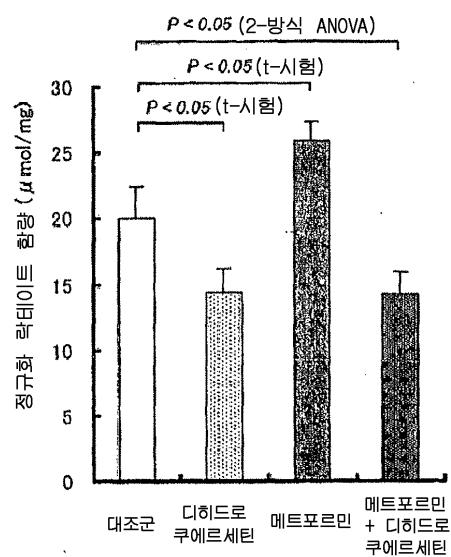
## 도면3



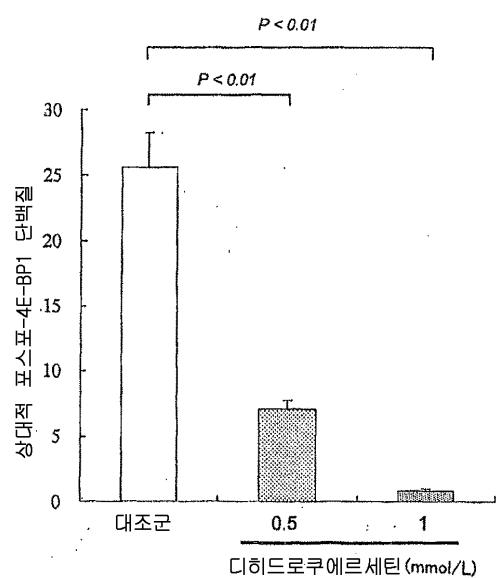
## 도면4



## 도면5



## 도면6



## 도면7

