(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0048415
(43) 공개일자 2024년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0128173
(22) 출원일자 2022년10월06일
심사청구일자 2022년10월06일

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
홍태연
강원도 강릉시 강릉대로469번길 14, 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
공병욱

전체 청구항 수 : 총 11 항

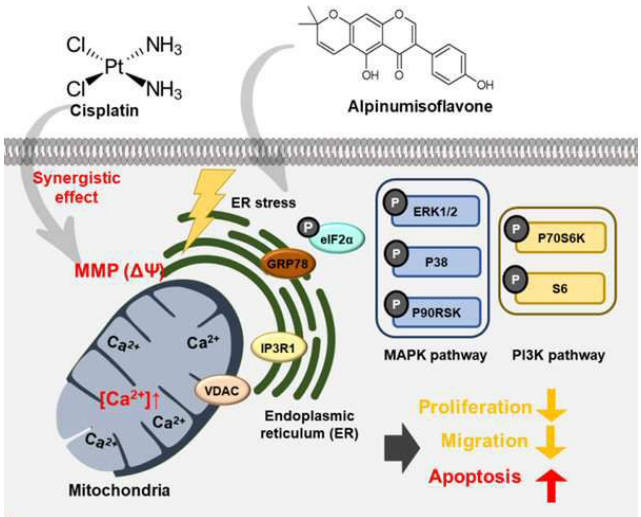
(54) 발명의 명칭 **알피눔이소플라본을 포함하는 난소암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 상기 약제학적 조성물은 항암제 또는 신호전달기전 억제제와 병용 투여용인 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 약제학적 조성물은 상피성 난소암 세포 내 증식 및 이동성을 억제하고, 용량 의존적으로 상피성 난소암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐 아니라, 암세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유도할 수 있다. 더욱이, PI3K/AKT, ERK1/2 또는 P38 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 시스플라틴과 같은 백금계 항암제와 병용 처리함으로써 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는 바, 상피성 난소암을 예방 및 치료할 수 있는 의약학 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호

함지연
경기도 수원시 장안구 정자천로13번길 130-14 나노팰리스 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155899
과제번호 2021R1C1C1009807
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율 50/100
과제수행기관명 성균관대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711157986
과제번호 2021R1A2C2005841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기지표 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 항암제 또는 신호전달기전 억제제와 병용 투여용인 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항암제는 백금계 항암제인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 피코플라틴(picoplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 및 사트라플라틴(satraplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전 억제제인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전의 하위 신호전달 단백질의 발현 또는 활성 억제제인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 LY294002, U0126, 및 SB203580로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 난소암은 상피성 난소암인 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 상피성 난소암은 장액성 난소암(serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 및 투명세포암(clear cell carcinoma)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 상피성 난소암은 장액성 난소암인 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 미토콘드리아의 기능 장애는 미토콘드리아의 막 전위의 탈분극 또는 세포 호흡의 감소로 이루어지는 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 상기 약제학적 조성물은 항암제 또는 신호전달기전 억제제와 병용 투여용인 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 난소암은 모든 부인과 암 중에서 가장 높은 사망률을 나타내는 치명적인 암에 해당하며, 최근 한국에서는 생활 양식이 서구화되고 노령 인구가 증가함에 따라 그 빈도가 점차 증가하고 있는 추세이다.

[0004] 다른 부인암과는 달리, 난소암은 초기에 뚜렷한 증상이 나타나지 않아 조기 진단에 어려움이 있으며, 암이 상당히 진행된 상태에서도 증상이 경미하여 약 70% 이상의 환자가 병기(stage) III기 이상의 광범위한 전이가 진행된 상태로 발견된다. 이로 인해, 난소암의 5년 생존율은 약 50%에 불과하고, 재발률 또한 85% 이상의 매우 높은 편에 속한다.

[0005] 대다수의 난소암은 난소 상피세포로부터 유전적 변이 발생에 따라 악성 종양으로 발생되어 상피성 난소암으로 명명된다. 상피성 난소암은 조직병리학적 분석을 통해 장액성 난소암(serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 투명세포암(clear cell carcinoma)으로 분류된다 (Kaku T *et al.*, Med Electron Microsc, 36:9-17, 2003).

[0006] 일반적인 상피성 난소암의 치료 방법은 종양감축(cytoreductive surgery)이후 항암화학요법 또는 방사선 치료를 실시하는 것이다. 하지만, 고등급 장액성 난소암과 투명세포암은 백금계, 탁산계 항암제를 동시에 사용하는 표준항암화학요법에 저항성을 나타내며 나쁜 예후를 나타낸다 (Tan DS and Kaye S, J Clin Pathol, 60:355-60, 2007; Vaughan S *et al.*, Nat Rev Cancer, 11(10):719-25, 2011). 그러므로 상피성 난소암 신호전달과정 내 세포사멸기전을 방해함에 따라 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 상피성 난소암 예방법 및 새로운 치료제 개발이 요구된다.

[0007] 이소플라본(isoflavone)은 여성 호르몬인 에스트로겐과 비슷한 구조 및 활성을 나타내어 식물성 에스트로겐이라 불리는 것으로, 다양한 암과 만성질환 치료에 효과적이며 기존 치료제보다 부작용이 적은 것이 특징이다.

[0008] 구체적으로, 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)은 꾸찌뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)의 미성숙과 및 *Genista pichisermolliana*에서 추출한 프레닐화 이소플라보노이드(prenylated isoflavonoid)로, 주요 생리활성 물질 중 하나에 해당하며, 결장직장암, 식도암, 신장암 등을 포함한 다양한 암세포에서 항암 특성을 가지고 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 천연물 유래 물질을 이용하여 기존의 항암제 또는 암세포 내 신호전달기전 억제제의

효과를 증진시키고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2018-0130090호(공개일자: 2018.12.06)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 난소암을 치료하기 위한 천연물 유래의 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 천연물 유래 물질인 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 기존의 항암제 또는 신호전달기전 억제제와 병용 투여하는 경우, 이들의 항암 효과가 증진됨을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

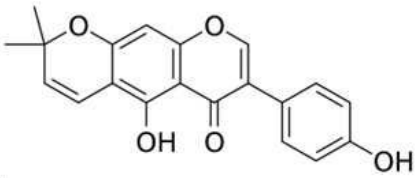
[0014] 구체적으로 본 발명의 목적은 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는, 난소암 예방 또는 치료를 위하여 항암제 또는 신호전달기전 억제제와의 병용 투여용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서, 항암제 또는 신호전달기전 억제제와 병용 투여용인 약제학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 난소암을 치료하기 위한 천연물 유래의 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 천연물 유래 물질인 알피눔이소플라본을 기존의 항암제 또는 신호전달기전 억제제와 병용 투여하는 경우, 이들의 항암 효과가 증진됨을 규명하였다.

[0018] [화학식 I]

[0019] 

[0020] 상기 화학식 I로 표시되는 "알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)"은 상술한 바와 같이, 프레닐화 이소플라보노이드(prenylated isoflavonoid)이며, 꾸찌뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)의 미성숙과 및 *Genista pichisermolliana*에서 추출한 주요 생물 활성물질 중 하나이다.

[0021] 또한, 상술한 바와 같이, 인체 내에서 에스트로겐과 유사한 기능을 하는 것이 이소플라본의 특징으로, 에스트로겐을 수용하는 단백질군인 에스트로겐 수용체(estrogen receptor)와 결합해 약한 에스트로겐 활성을 발휘하며 이를 통해 유방암 세포의 발생을 억제하는 효과가 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여에 의해 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여에 의해 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를

의미한다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "약제학적 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다.

[0026] 본 발명에서 용어 "항암제"는 암을 치료하기 위한 화학요법(chemotherapy)에 사용되는 물질로써, 암세포의 각종 대사경로에 작용하여 암세포에 대하여 세포독성(cytotoxicity)이나 성장억제 효과(cytostatic effect)를 나타내는 약제를 의미한다. 지금까지 개발된 항암제는 그 작용기전과 화학구조에 따라 대사 길항제, 식물성 알칼로이드, Topoisomerase inhibitor, 알킬화제, 항암성 항생물질, 호르몬제, 기타 약제로 분류할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항암제는 백금계 항암제이다.

[0028] 상기 '백금계 항암제"는 암 치료에 널리 사용되는 항암제로서, 약 50%의 암 환자에서 사용되고 있는 약물이다. 구체적으로, 백금과 배위결합하고 있는 착물로서, 예를 들어, 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 피코플라틴(picoplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 및 사트라플라틴(satraplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로 시스플라틴일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 시스플라틴은(Cisplatin, Cis-dichlorodiammineplatinum)은 대표적인 항암제로 난소암, 방광암, 폐암, 두경부암, 고환암 등의 치료를 위한 화학요법제로 임상에서 널리 사용되고 있다. 상기 시스플라틴 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중나선 구조에 부착되어 DNA 복제를 저해하여 암세포 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하여 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다. 그러나, 치료 과정 중 약물의 제한된 함량 이상에서는 청각의 상실, 신경 독성, 신장 독성과 같은 부작용이 나타나며, 고농도의 시스플라틴의 투여시에는 간 독성 또한 빈번하게 관찰되는 것으로 알려져 있다.

[0031] 본 발명에서 용어 "신호전달기전 억제제"는 암세포 내 세포의 성장, 활성 및 기능에 관여하는 신호전달 분자의 발현 또는 이의 활성을 억제하는 물질을 의미한다.

[0032] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전 억제제이다.

[0033] 상기 PI3K(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)은 세포 주기, 세포 운동성 및 세포사멸(apoptosis)와 같은 많은 세포성 기능에 관여하는 신호전달 분자이다. PI3K는 세린/트레오닌 키나아제, 예를 들어 PDK1 및 AKT(PKBf로도 알려짐)를 포함하는 일부 단백질을 활성화시키는 제2메신저(messenger) 분자를 생산하는 지질 키나아제이다. PI3K는 3개의 클래스로 나뉘어지고, 클래스 I은 PI3Kα, PI3Kβ, PI3Kδ 및 PI3Kɣ로 불리는 4개의 상이한 PI3K를 포함한다.

[0034] 또한, 상기 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달기전은 세포의 성장, 분화 및 스트레스 반응과 같은 세포 활동과 연관이 있다. 이는 하위 조절 단백질의 인산화를 통해 활성화되는 MAPK 신호전달 캐스케이드로서, 7개의 MAPKK 동족체 뿐 아니라, 4개의 대등한 MAPK 경로로 ERK1/ERK2, JNK, p38 및 ERK5가 잘 알려져 있다.

[0035] 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전의 하위 신호전달 단백질의 발현 또는 활성 억제제이다.

[0036] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase) 억제제, AKT(protein kinase B) 억제제와 MAPK(mitogen-activated protein kinase)와 관련된 ERK1/2(extracellular signalregulated kinase), 및 P38 억제제를 포함할 수 있고, 예를 들어, PI3K 억제제는 LY294002, Wortmmanin, LY3023414, ME401, GSK1059615 등일 수 있고, ERK1/2 억제제는 U0126, FR180204, SCH772984, PD98059 등일 수 있으며, P38 억제제는 SB203580, SB202190, BIRB796, JX-401 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 보다 더 구체적으로, 상기 신호전달기전 억제제는 LY294002, U0126, 및 SB203580로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 세포주기 정지를 유도하고 3D 세포 배양의 밀도를 감소시키며 세포 이동성의 감소 시키는 등 다양한 조절을 통해 세포 증식을 억제시킴을 확인할 수 있었다. 또한, 웨스턴 블롯을 통한 세포 증식 핵 항원(PCNA) 발현이 억제되는 것을 확인함으로써 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포의 증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0041] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 세포 사멸 능력을 유도하고 이의 능력을 향상시키는 것을 특징으로 한다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 용량 의존적 투여에 따라 이른 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

[0043] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 특징으로 한다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 기초 호흡, 최대 호흡, ATP 생산 등을 포함하는 세포 호흡을 억제시키고, 미토콘드리아의 막 전위를 감소시켜 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도함으로써, 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 확인할 수 있었다.

[0045] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 ER 스트레스 및 ER-미토콘드리아 막 접촉 관련 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본은 난소암 세포주에서 ER 스트레스 및 ER-미토콘드리아 막 접촉 관련 단백질인 GRF78(glucose-regulated protein 78), eIF2(eukaryotic translation-initiation factor 2α), VDAC(voltage-dependent anion channel) 및 IP3R1(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1)의 인산화를 조절하여, ER 스트레스를 유발하고 ER-미토콘드리아의 접촉 현상 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0047] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전을 억제함으로써 세포 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알피늄이소플라본은 PI3K/AKT 신호전달기전의 하위 조절단백질인 P70S6K 및 S6 단백질, 또는 MAPK 신호전달기전과 관련된 P38 단백질 인산화 양상을 조절함으로써 세포 증식을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0049] 상술한 바와 같이, 본 발명의 알피눔이소플라본을 포함하는 약제학적 조성물은 그 자체로 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포주에서의 항암 효과를 나타낼 수 있으나, 상기 알피눔이소플라본과 기존의 항암제 또는 신호전달기전 억제제를 병용 투여한 경우, 보다 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있다.

[0050] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알피눔이소플라본과 시스플라틴 또는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전 억제제를 병용 투여한 경우, 난소암에서 세포 증식 억제 또는 세포 사멸 효과가 더욱 향상됨을 확인할 수 있었다.

[0051] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0053] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 난소암은 상피성 난소암인 것을 특징한다.

[0054] 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 상피성 난소암은 장액성 난소암(serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 및 투명세포암(clear cell carcinoma)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 상피성 난소암은 장액성 난소암인 것을 특징으로 한다.

[0055] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 상피성 난소암 세포주인 ES2 및 OV90 세포주에 처리하여, 시스플라틴 또는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전 억제제과의 병용 투여를 통해 보다 우수한 항암 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 상기 ES2 세포주는 투명세포암에 해당하고, 상기 OV90 세포주는 고등급 장액성 난소암에 해당하는 것으로, 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 의한 항암 효과는 ES2 세

포주 보다 OV90 세포주에서 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것을 의미한다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약제학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 제형에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 알피눔이소플라본의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 구체적으로, 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0060] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들어, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로즈, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 형태로, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외의 여러 가지 부형제, 예를 들어, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리코, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol). Alz,러걸. 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용할 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.

[0064] 본 발명의 약제학적 조성물의 유효 투여량은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 증상의 경중도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법 및 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0065] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여 방법은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용 주사 등의 통상적인 방법으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0067] 본 발명에 따른 알피눔이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 약제학적 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 상피성 난소암 세포 내 증식 및 이동성을 억제하고, 용량 의존적으로 상피성 난소암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐 아니라, 암세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유도할 수 있다. 또한, PI3K/AKT, ERK1/2 또는 P38 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 시스플라틴과 같은 백금계 항암제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 상피성 난소암을 예방 및 치료할 수 있는 의약학 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 및 정상 난소 세포(CHO-K1) 내 알피눔이소플라본(AIF)의 용량의존적 투여에 따른 세포 증식(a-c), 세포 핵 항원(PCNA)의 발현양상(d-f)을 분석한 결과를 나타낸다.

도 2는 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)에 의한 세포주기 정지 효과(a 및 b), 스페로이드 형성(c) 및 세포 이동성 변화(d)를 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)에 의한 세포사멸 유도(a 및 b), 및 미토콘드리아 막 전위 변화(c 및 d)를 분석한 결과를 나타낸다.

도 4는 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)에 의한 미토콘드리아 세포 호흡의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)과 시스플라틴의 병용 처리에 따른 세포증식(a 및 b), 세포사멸 유도 및 미토콘드리아 막 전위 변화(c 및 d)를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)의 용량의존적 투여에 따른 PI3K 및 MAPK 신호전달분자의 인산화 패턴 분석 결과를 나타낸 것으로, (a) P70S6K, (b) S6, (c) P38, (d) ERK1/2, 및 (e) P90RSK의 용량 의존적 인산화 억제 효과를 나타낸다.

도 7은 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)의 용량의존적 투여에 따른 ER 스트레스 및 ER-미토콘드리아 막 접촉 관련 단백질의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)과 약리학적 억제제의 병용처리 후 세포사멸 유도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF)과 약리학적 억제제의 병용처리 후 PI3K 및 MAPK 신호전달분자의 인산화 패턴 분석 결과를 나타낸다.

도 10은 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 내 알피눔이소플라본(AIF) 처리에 따른 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0071] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0073] **실시예**

[0075] **준비예 1. 실험 재료 준비 및 세포 배양**

[0076] 준비예 1.1. 실험 재료

[0077] 알피눔이소플라본(Alpinumisoflavone)(Cat No. CFN98440)은 ChemFaces에서 구입하였고, DMSO에 의해 용해시켰다. 항암화학요법에 사용되는 시스플라틴(cisplatine, cis-diamminedichloroplatinum)(Cat No. P4394)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 또한, 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002(Cat No. 99015)은 Cell signaling technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 각각 ERK1/2 및 P38 억제제인 U0126(Cat No. BML-EI282) 및 SB203580(Cat No. BML-EI286)은 Enzo Life Sciences(Farmingdale, NY, USA)부터 구매하여 사용하였다.

[0079] 준비예 1.2. 세포 배양

[0080] 난소암 세포인, ES2와 OV90 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 10% FBS(fetal bovine serum)(Cat No. SH30919.03, Hyclone, Carlsbad, CA, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)(Cat No. SV30010, Hyclone)을 포함하 McCoy's medium(Cat No. SH30200, Hyclone)에서 37℃/5% CO_2 인큐베이터(incubator)를 사용하여 배양하였다.

[0081] 음성대조군으로 사용하기 위하여, 정상 난소세포인 CHO-K1 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)과 함께 HEPES가 함유된 RPMI-1610 medium(Cat No. SH30255.01, Hyclone)에서 37℃/5% CO_2 인큐베이터(incubator)를 사용하여 배양하였다.

[0083] **실시예 1. 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포의 증식 조절**

[0084] 실시예 1.1 세포 증식 및 세포 생존력 분석

[0085] 알피눔이소플라본(AIF)의 용량 의존적 처리에 따른 난소암 세포(ES2 및 OV90 세포) 및 정상 난소 세포(CHO-K1) 내에서 세포의 증식 및 세포의 생존력을 평가하였다.

[0086] 먼저, BrdU(bromodeoxyuridine) Cell Proliferation ELISA Kit(Cat No. 11647229001, Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 ES2 및 OV90 세포의 증식을 평가하였다. 두 세포주를 모두 96-well cell culture plate에 $6x10^3$ cells/100 ㎕로 배양한 다음, 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 알피눔이소플라본(0, 0.5, 1, 2 μM) 또는 시스플라틴(4 μM)을 처리하였다. 48시간 후,10 μM BrdU를 각 well에 추가로 첨가하고, 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다. 그 다음, ES2 및 OV90 세포에 BrdU를 라벨링(labeling)하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 사용하여 상온에서 90분간 인큐베이션 시킨 후, 3차례 세척하였다. 마지막으로 3,3'5,5'-tetramethyl benzidine substrate으로 세포를 반응시켜 ELISA 리더기로 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 확인하였다.

[0087] 또한, 정상 난소세포 CHO-K1 세포를 음성대조군으로 사용하고, 알피눔이소플라본의 독성을 확인하고자 상기 난소암 세포와 동일한 조건에서 알피눔이소플라본을 처리하였다. 이후, MTT labeling reagent(Cat No. 11465007001, Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 CHO-K1 세포의 생존력 변화를 확인하였다.

[0088] 상기 결과를 토대로, 세포 증식 및 세포 생존력 변화는 BioTeck Epoch Plate Reader 및 BioTek Gen5 software를 사용하여 분석하였다.

[0089] 결과는 도 1의 a 내지 c에 나타내었다.

[0090] 도 1의 a 및 b에 나타낸 바와 같이, 알피눔이소플라본의 용량 의존적 처리에 대한 반응으로 ES2 및 OV90 세포 증식이 점차 감소하였다. 구체적으로, 세포 증식은 2 μM 알피눔이소플라본을 첨가한 ES2 및 OV90 세포에서 각각 39% 및 69%로 감소하였다.

[0091] 반면, 도 1의 c에 나타낸 바와 같이, 알피눔이소플라본이 정상 난소세포(CHO-K1 세포)의 세포 생존력을 변화시키지 않는 것을 확인하였다.

[0093] 실시예 1.2. 세포 증식 핵 항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)의 발현 분석

[0094] 상기 실시예 1.1.에서 확인되었던 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포의 증식이 감소된 결과를 바탕으로, ES2 및 OV90 세포에서 알피눔이소플라본의 처리 유무에 따른 PCNA의 발현 변화를 분석하고자, 면역형광 분석 및 웨스턴블롯 분석을 수행하였다.

[0095] 형광 이미지를 위해 공초점 배양플레이트(SPL, Daejeon, Korea)에 배양 후, 48시간 동안 알피눔이소플라본(2 μM)을 처리하였다. 이후, 세포를 세척하고 메탄올로 고정하고 1차 PCNA 항체(SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA))와 함께 16시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 시각화를 위해 Alexa 488이 접합된 2차 항체를 사용하여 배양한 후에 PBS로 세척하여 DAPI로 핵 염색을 수행하였다. 세포 이미지는 LSM710 공초점 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 확인하였다.

[0096] 결과는 도 1의 d 내지 f에 나타내었다.

[0097] 도 1의 d 및 e에 나타낸 바와 같이, 알피눔이소플라본을 포함하거나 포함하지 않은 ES2 및 OV90 세포 모두에서 면역반응성 PCNA의 발현이 유의하게 감소하였다. 또한, 도 1의 f에 나타낸 바와 같이, 웨스턴블롯 분석을 통해 두 세포주에서 알리눔이소플라본 처리에 따라 PCNA 발현이 억제되는 것을 추가로 확인하였다.

[0099] **실시예 2. 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포의 성장 및 이동성 변화 분석**

[0100] 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포의 성장 및 이동성의 변화를 확인하고자, 세포 주기, 스페로이드 형성 및 세포 이동성 변화를 분석하였다.

[0102] 실시예 2.1. 세포 주기 분석

[0103] 알피눔이소플라본이 난소암 세포에서 세포 주기 정지를 유도하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0104] 먼저, ES2 및 OV90 세포를 60 mm 배양 접시에서 60% confluence까지 배양한 후, 알피눔이소플라본(0, 0.5, 1, 2 μM)을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 수집하고 0.1% BSA 함유 PBS로 세척 후, 70% 에탄올을 넣고 4℃에서 24시간 동안 고정하였다. 다음으로, 세포를 원심분리기로 수집하여 0.1% 함유 PBS로 2번 세척 후, 1xbinding buffer에 RNase A(Cat No. R6513, Sigma-Aldrich)) 및 PI(propidium iodide)로 30분간 염색하였고, FACSCalibur flow cytometer(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 분석하였다. 상대 형광(relative fluorescence)는 PE 채널을 사용하여 감지하였다.

[0105] 결과는 도 2의 a 및 b에 나타내었다.

[0106] 2 μM 알피눔이소플라본으로 처리된 ES2 및 OV90 세포에서 Sub-G1 단계에 해당하는 세포의 비율은 각각 2.89% 및 3.0% 증가했지만, OV90 세포에서만 유의미한 변화를 나타내었다. 반면, S기 세포의 비율은 ES2 세포 집단에서만 유의미하게 증가하였다.

[0108] 실시예 2.2. 3D 스페로이드 형성 분석

[0109] 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포에 대한 항증식 효과를 검증하고자, 3D 배양을 통한 난소암 세포의 스페로이드 형성을 분석하였다.

[0110] 100 mm 배양 접시 덮개를 사용하여 알피눔이소플라본의 처리 또는 미처리 ES2 및 OV90 세포를 hanging drop 방법으로 5일 동안 배양하였다. 그런 다음, DM3000 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)을 통해 스페로이드의 형태를 확인하였고, 스페로이드 정량화는 imageJ software version 1.8을 사용하여 수행되었다.

[0111] 결과는 도 2의 c에 나타내었다.

[0112] 도 2의 c에 나타낸 바와 같이, ES2 및 OV90 세포의 3D 스페로이드 밀도가 대조군 대비 약 80% 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0114] 실시예 2.3. 세포 이동성 변화 분석

[0115] 알피눔이소플라본에 의한 난소암에서의 암세포 이동성 변화 분석을 수행하였다.

[0116] ES2 및 OV90 세포를 μ-dish 35 mm insert 2 well(Cat No. 80206, ibidi GmbH, Munich, Germany)에 배양한 후, 세포의 이동성을 측정하였다. 알피눔이소플라본 처리의 유무에 관계 없이 세포 사이의 거리는 DM3000 현미경으로 확인하였고 ImageJ를 사용하여 너비를 정량화하였다.

[0117] 결과는 도 2의 d에 나타내었다.

[0118] 도 2의 d에 나타낸 바와 같이, 알피눔이소플라본 처리는 대조군에 비해 ES2와 OV90 세포 배양에서 세포 사이의 간격 거리를 각각 1.2배 및 1.7배 증가시켜 세포 이동을 억제하였다.

[0120] 따라서, 상기 결과를 종합하여, 알피눔이소플라본을 처리하는 경우, ES2 및 OV90 세포에서 세포 성장 및 이동성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0122] **실시예 3. 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포의 세포 사멸 및 미토콘드리아 막 전위(Mitochondrial Membrane Potential, MMP)(Ψm)의 탈분극 확인**

[0123] 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포 내 세포 사멸 수준 및 미토콘드리아 막 전위의 변화를 확인하고자, 알피눔이소플라본을 용량 의존적(0, 0.5, 1, 2 μM)으로 처리하여 수행하였다.

[0125] 실시예 3.1. 세포 사멸 분석

[0126] 먼저, 알피눔이소플라본으로 처리된 ES2와 OV90 세포 내에서 세포 사멸의 수준을 확인하고자, Annexin V Apoptosis Detection Kit(Cat No. 556547, BD Biosciences)를 사용하여 세포 사멸을 검증하였다. 48시간 동안 알피눔이소플라본과 함께 배양된 세포에 FITC-annexin V와 PI를 각각 5 ㎕씩 넣어준 후 15분간 염색시킨 후, FACSCalibur flow cytometer를 사용하여 분석하였다.

[0127] 결과는 도 3의 a 및 b에 나타내었다.

[0128] 도 3의 a 및 b에서 나타낸 바와 같이, annexin V 염색 결과는 대조군(미처리군)과 비교하여, 알피눔이소플라본을 처리한 세포에서 late apoptosis의 비율이 증가한 것을 확인하였다. 구체적으로, late apoptosis의 비율이 각각 ES2 세포에서 187%, OV90 세포에서 165%로 증가한 것을 확인하였다.

[0130] 실시예 3.2. 미토콘드리아 막 전위(MMP)(Ψm)의 탈분극 확인

[0131] 미토콘드리아는 많은 요인에 의해 유도되는 세포자멸사(apoptosis)에 결정적인 역할을 하고, 미토콘드리아 막 전위의 감소는 이른 세포자멸사의 특징이다. JC-1은 세포사멸 세포에서 미토콘드리아 막 전위 검출을 위한 선택 마커로서, 친지방성의 양이온성 염료이다. 이는 세포 내에서 단량체로 존재하고, 낮은 농도에서 미토콘드리아 막을 탈분극시켜 녹색 형광을 나타낸다. 하지만, 고농도에서 염료는 J-응집체를 형성하는데, 넓은 여기 스펙트럼을 나타내고, ~590 nm에서 방출 최대치를 나타내며, 세포 내 정상 분극된 미토콘드리아는 붉은색 형광을 나타낸다.

[0132] 따라서, 알피눔이소플라본에 의한 ES2 및 OV90 세포 내 미토콘드리아 막 전위 변화를 확인하고자, JC-1 dye(5 ㎍/mL)(Cat No. CS0390, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 37℃에서 20분간 처리하였다. 이후, 각 세포를 버퍼로 세척한 다음 FACSCalibur flow cytometer를 이용하여 세포의 미토콘드리아 막 전위차를 측정하였다.

[0133] 결과는 도 3의 c 및 d에 나타내었다.

[0134] 도 3의 c 및 d에서 나타낸 바와 같이, 알피눔이소플라본을 처리한 ES2 및 OV90 세포에서 각각 MMP가 77% 및 87%까지 파괴된 것을 확인하였다.

[0136] 결과적으로, 알피눔이소플라본 처리에 따라, 난소암 세포에서 MMP의 탈분극, 즉 미토콘트리아 막 투과성 변화와 함께 세포 사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

[0138] **실시예 4. 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포 내 미토콘드리아 기능 확인**

[0139] 알피눔이소플라본이 난소암 세포 내 미토콘드리아 기능에 미치는 영향을 확인하고자, 미토콘드리아 호흡을 확인하여 미토콘드리아 스트레스 분석을 실시하였다. 구체적으로, 미토콘드리아의 산소 소모율(Oxygen consumption rate, OCR)을 측정하기 위해 Seahorse XFe 분석기를 사용하여 Seahorse XF Cell Mito Stress 테스트를 수행하였다.

[0140] ES2 및 OV90 세포를 Seahorse XFe24 세포 배양 마이크로플레이트에 $3x10^4$ cells/100 ㎕ 농도로 배양하였다. 이후, 플레이트에 80% 세포 비율에서 알피눔이소플라본(2 μM)을 24시간 배양하였다. 그 다음, Seahorse XF Cell

Mito Stress Test Kit(Cat No. 103015-100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에 Oligomycin 1.5 μM, FCCP(carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) 0,5 μM, Rotenone/antimycin A 0.5 μM을 사용하여 처리 후, Seahore XFe244 분석기 (Agilent Technologies)를 이용하여 미토콘드리아 산소 소모율(OCR)을 측정하였다.

[0141] 결과는 도 4에 나타내었다.

[0142] 도 4에 나타낸 바와 같이, 두 세포주(ES2 및 OV90 세포)의 기초 및 최대 호흡은 2 μM 알피눔이소플라본 처리 후 약 20%까지 유의하게 감소하였다. 또한, 대조군과 비교하여 알피눔이소플라본은 ES2 및 OV90 세포에서 ATP 생성을 약 25% 감소시켰다. 이로써, 알피눔이소플라본은 미토콘드리아 호흡을 억제하여 미토콘드리아의 기능 장애를 일으키는 것을 확인할 수 있었다.

[0144] **실시예 5. 알피눔이소플라본에 의한 항암제의 효과 증진 확인**

[0145] 기존의 항암제로 주로 사용되는 시스플라틴과 알피눔이소플라본을 병용 처리함으로써, 난소암 세포 증식 억제 및 미토콘드리아 조절 세포 사멸에서 알피눔이소플라본에 의해 시스플라틴의 효과가 증진되는 것을 확인하고자 하였다.

[0146] 먼저, 세포 증식을 측정하기 위해 난소암 세포를 알피눔이소플라본 또는 알피눔이소플라본(2 μM)과 시스플라틴(4 μM)의 조합으로 48시간 동안 처리하였다. 이후, 상기 실시예 1.1에 개시된 방법을 통해 난소암 세포에서의 세포 증식 능력을 확인하였으며, 상기 실시예 3에 개시된 방법을 통해 난소암 세포의 세포 사멸 수준 및 난소암 세포에서 미토콘드리아 막 전위(MMP) 변화를 측정하였다.

[0147] 결과는 도 5에 나타내었다.

[0148] 도 5의 a 및 b에 나타낸 바와 같이, 난소암 세포 증식 억제에 있어서, 알피눔이소플라본과 시스플라틴을 병용 처리한 ES2 및 OV90 세포에서 알피눔이소플라본을 단독으로 처리한 세포에 비해 암세포 증식이 현저히 감소된 것을 확인하였다.

[0149] 또한, 도 5의 c 및 d는 미토콘드리아 조절 세포 사멸에 대한 알피눔이소플라본과 시스플라틴의 상승 효과를 나타내었다. 구체적으로, apoptotic ES2 세포의 비율은 알피눔이소플라본과 시스플라틴의 병용 처리 후 유의하게 증가하였고, OV90 세포에서도 알피눔이소플라본을 단독으로 처리한 세포에 비해 시스플라틴을 추가로 처리할 때 apoptotic 세포의 비율이 유의미하게 증가한 것을 확인하였다. 더욱이, OV90 세포에서 MMP의 투과성은 알피눔이소플라본과 시스플라틴 조합에 의해 상당히 파괴되었으나, ES2 세포에서는 유의한 영향을 나타내지 않았다.

[0150] 결과적으로, 알피눔이소플라본과 시스플라틴의 병용 처리하는 경우, 난소암에서 세포 증식 억제에 상보적인 효과를 나타낼 수 있고, 특히, OV90 세포주에서 세포 사멸 효율이 더욱 증가함을 확인하였다.

[0152] **실시예 6. 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석**

[0153] 알피눔이소플라본에 의해 유도되는 난소암 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯을 이용하여 상기 신호전달기전의 하위에서 조절되는 타겟 신호전달 단백질의 인산화 양상을 분석하였다.

[0154] ES2와 OV90 세포에 알피눔이소플라본(0, 0.5, 1 및 2 μM)을 24시간 동안 처리한 후, 세포 용해물 완충액을 사용하여 단백질을 추출하였고, Bradford protein assay로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며, 10% SDS-PAGE Gel에 동일한 양으로 로딩하여 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 겔에서 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨 주었다. 이 후, 1차 및 2차 항체 (Cat No. 5450-00110, SeraCare, MA, USA)를 사용하여 단백질을 검출하였다. 면역블롯은 화학발광을 통해 검출되었고 ChemiDoc EQ 시스템 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 시각화하였다.

[0155] 결과는 도 6 에 나타내었다.

[0156] 도 6의 a 및 b에 나타낸 바와 같이, PI3K/AKT 신호전달기전의 하위 조절단백질인 P70S6K 및 S6 단백질의 인산화는 알피눔이소플라본에 의해 두 세포주에서 점차 감소하였다. 또한, MAPK 신호전달기전과 관련된 P38 단백질의 발현은 알피눔이소플라본이 처리된 두 세포주에서 대조군에 비해 증가하였으며(도 6의 c), ERK1/2 및 P90RSK 단

백질의 경우, 알피눔이소플라본에 의해 ES2 및 OV90 세포에서 모두 약간 감소된 양상을 나타내었다(도 6의 d 및 e).

[0157] 이를 통해, 알피눔이소플라본은 난소암 세포 내에서 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절함으로써 세포증식을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0159] **실시예 7. 알피눔이소플라본에 의한 난소암 세포 내 소포체(ER) 스트레스 변화 양상 분석**

[0160] 알피눔이소플라본의 용량 의존적 처리(0, 0.5, 1 및 2 μM)를 통해 난소암 세포 내 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스 변화 양상을 확인하기 위해 ER 스트레스 및 ER-미토콘트리아 막 접촉에 관련된 단백질인 GRF78(glucose-regulated protein 78), eIF2(eukaryotic translation-initiation factor 2α), VDAC(voltage-dependent anion channel) 및 IP3R1(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1)의 발현을 확인하였다.

[0161] 결과는 도 7에 나타내었다.

[0162] 도 7에 나타낸 바와 같이, 인산화-EIF2α 및 GRP78 단백질은 두 세포 모두에서 알피눔이소플라본에 의해 촉진되었다. 또한, 칼슘 이온 수준을 조절하여 ER-Mitochondrial axis에 관여하는 VDAC 및 IP3R1 단백질의 발현 수준이 난소암 세포에서 모두 알피눔이소플라본에 대한 반응으로 상향 조절된 것을 확인하였다.

[0163] 따라서, 알피눔이소플라본은 난소암 세포에서 증식, ER 스트레스 및 ER-미토콘드리아 막 접촉을 조절하는 신호분자의 수준을 변경함으로써, 이들을 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

[0165] **실시예 8. 알피눔이소플라본과 약리학적 억제제의 병용 투여에 의한 난소암 세포 내 세포사멸 유도 및 신호전달물질 인산화 패턴 분석**

[0166] 상기 실시예 6에서 확인된 알피눔이소플라본에 의해 조절되는 난소암 내 신호전달기전에 있어서, 이들의 신호전달 단백질을 억제하는 약리학제 억제제를 병용 투여함으로써, 세포사멸 유도 및 신호전달물질 인산화 패턴을 분석하여 알피눔이소플라본에 의한 약리학적 억제제의 상승효과를 확인하고자 하였다.

[0167] 본 실시예에서 알피눔이소플라본과의 병용처리를 위한 약리학적 억제제는 LY294002(PI3K 억제제), U0126(ERK1/2 억제제) 및 SB203580(P38 억제제)이 사용되었다. 상기 병용 투여에 의한 상승효과를 확인함에 있어서, 세포사멸 수준은 상기 실시예 3.1에 기재된 방법에 따라 확인되었고, 신호전달기전 양상 분석은 상기 실시예 6에 기재된 방법에 따라 수행되었다.

[0168] 결과는 도 8 및 9에 나타내었다.

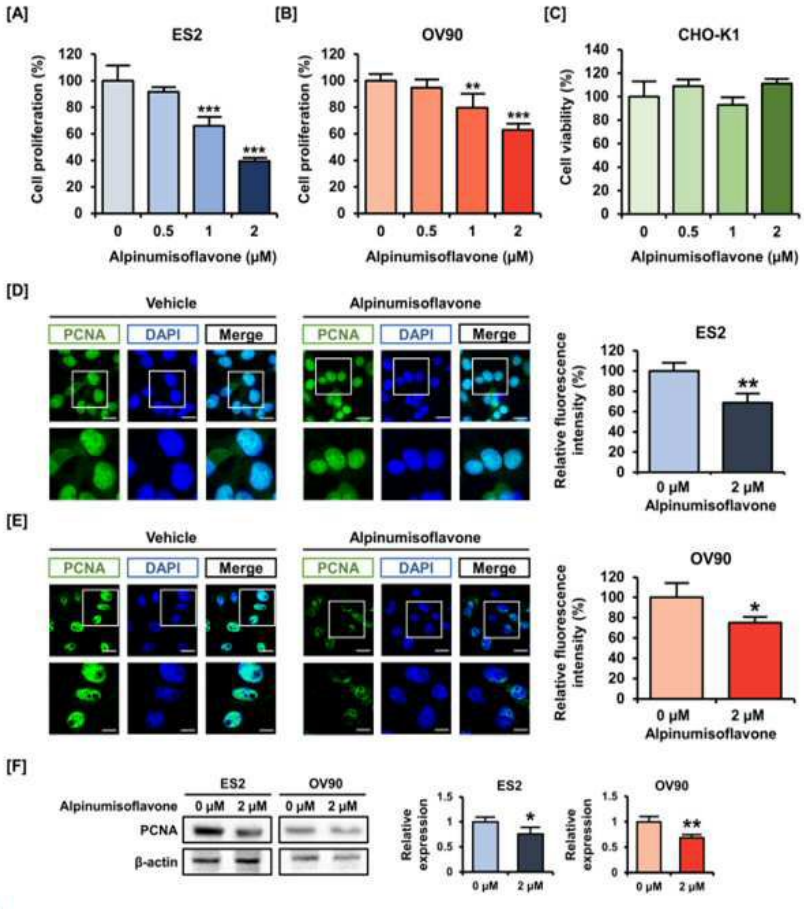
[0169] 먼저, 도 8은 세포사멸 수준을 나타내는 결과로써, OV90 세포에서 LY294002(PI3K 억제제), U0126(ERK1/2 억제제) 및 SB203580(P38 억제제)에 의한 단독 처리와 비교하여, 이를 전처리하여 알피눔이소플라본과의 병용 투여군에서 late apoptosis 세포의 양이 증가한 것을 확인하였으나, 표적물질의 단일치료와 병용치료 사이에는 유의미한 차이는 보이지 않았다.

[0170] 다음으로, 도 9는 병용처리에 따른 타겟 신호전달 단백질의 인산화 양상을 나타내는 결과로써, P70S6K 단백질의 인산화가 알피눔이소플라본 단독 사용과 비교하여, 모든 억제제를 병용 투여하였을 때 ES2 및 OV90 세포 모두에서 더 잘 억제되었음을 확인하였다. 반면, S6 단백질의 인산화는 두 세포주에서 SB203580을 제외한 억제제에 의해 차단되는 것을 확인하였다. ERK1/2의 인산화는 ES2 및 OV90 세포에서 알피눔이소플라본과 U0126의 조합에 의해 차단되었다.

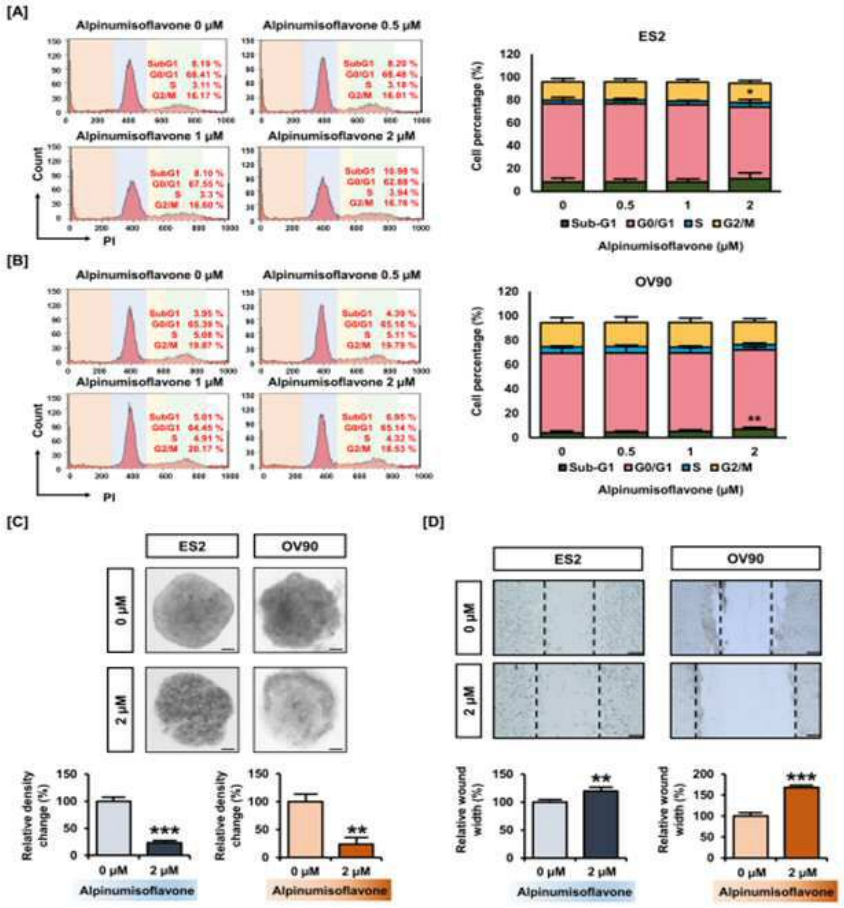
[0171] 결과적으로, 알피눔이소플라본은 PI3K 및 MAPK 신호전달경로를 통해 난소암 세포 증식을 조절할 수 있음을 확인하였으며, 구체적으로 상기 신호전달경로를 억제하는 약리학적 억제제를 알피눔이소플라본과 병용 투여함으로써, 보다 상승된 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

도면

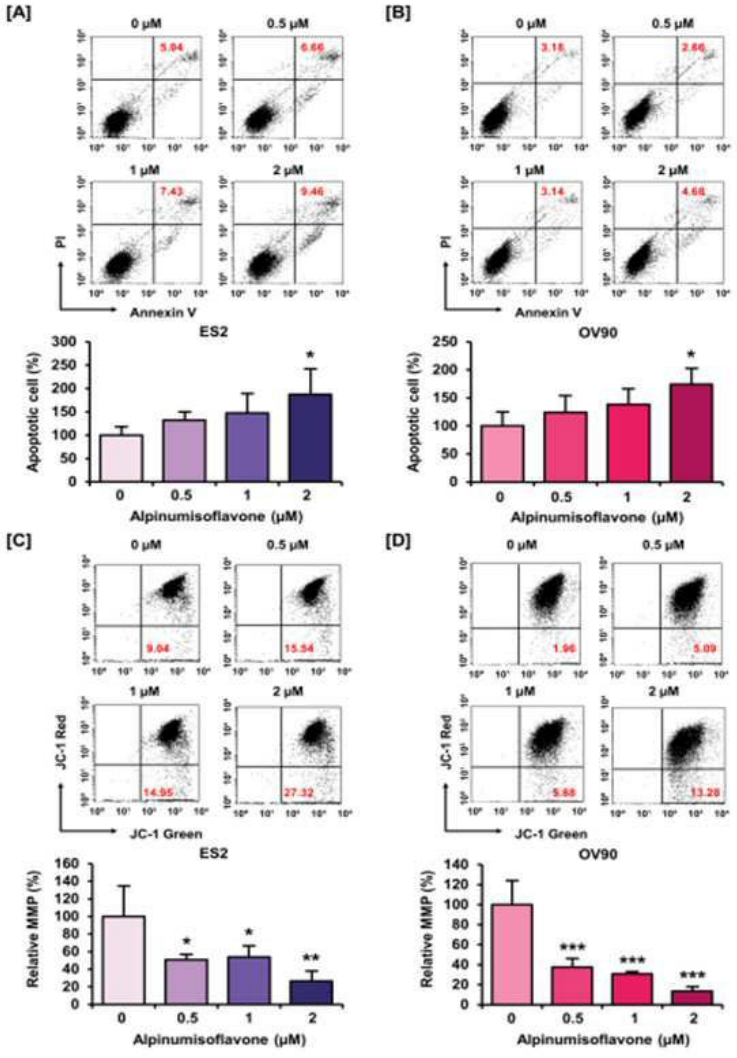
도면1


[A]
ES2
Cell proliferation (%)
Alpinumisoflavone (μM)
[B]
OV90
Cell proliferation (%)
Alpinumisoflavone (μM)
[C]
CHO-K1
Cell viability (%)
Alpinumisoflavone (μM)
[D]
Vehicle
Alpinumisoflavone
PCNA
DAPI
Merge
ES2
Relative fluorescence intensity (%)
0 μM
2 μM
Alpinumisoflavone
[E]
Vehicle
Alpinumisoflavone
PCNA
DAPI
Merge
OV90
Relative fluorescence intensity (%)
0 μM
2 μM
Alpinumisoflavone
[F]
ES2
OV90
Alpinumisoflavone
0 μM
2 μM
PCNA
β-actin
ES2
Relative expression
OV90
Relative expression

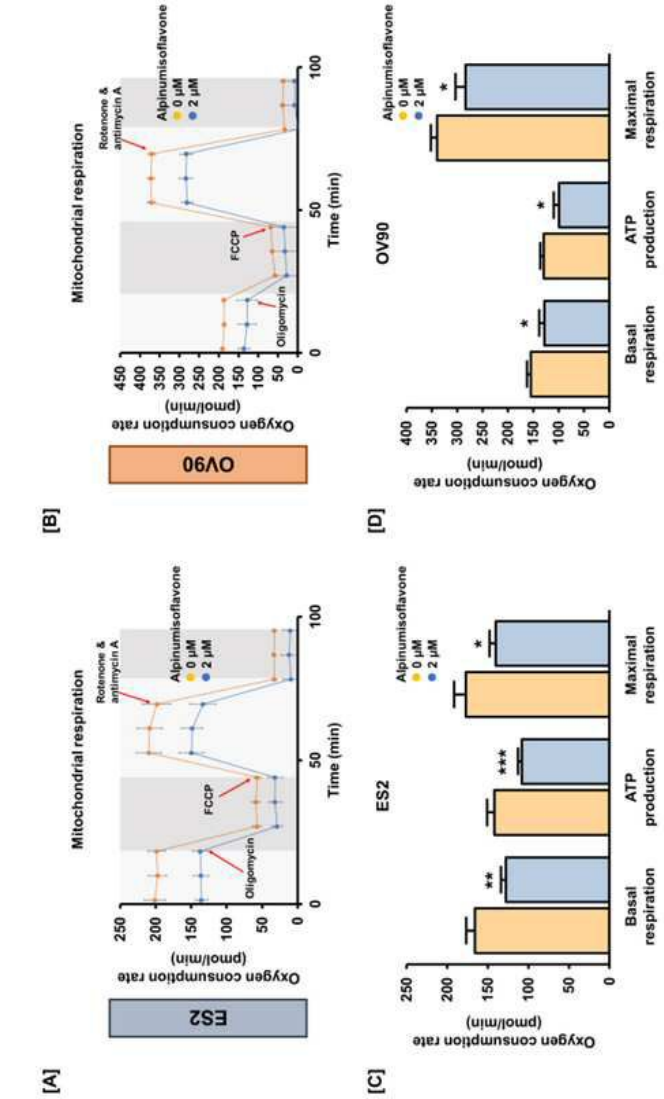
도면2


[A]
Alpinumisoflavone 0 μM
Alpinumisoflavone 0.5 μM
Alpinumisoflavone 1 μM
Alpinumisoflavone 2 μM
Count
PI
ES2
Cell percentage (%)
Sub-G1 G0/G1 S G2/M
Alpinumisoflavone (μM)
[B]
OV90
[C]
[D]
0 μM
2 μM
Relative density change (%)
Relative wound width (%)
Alpinumisoflavone

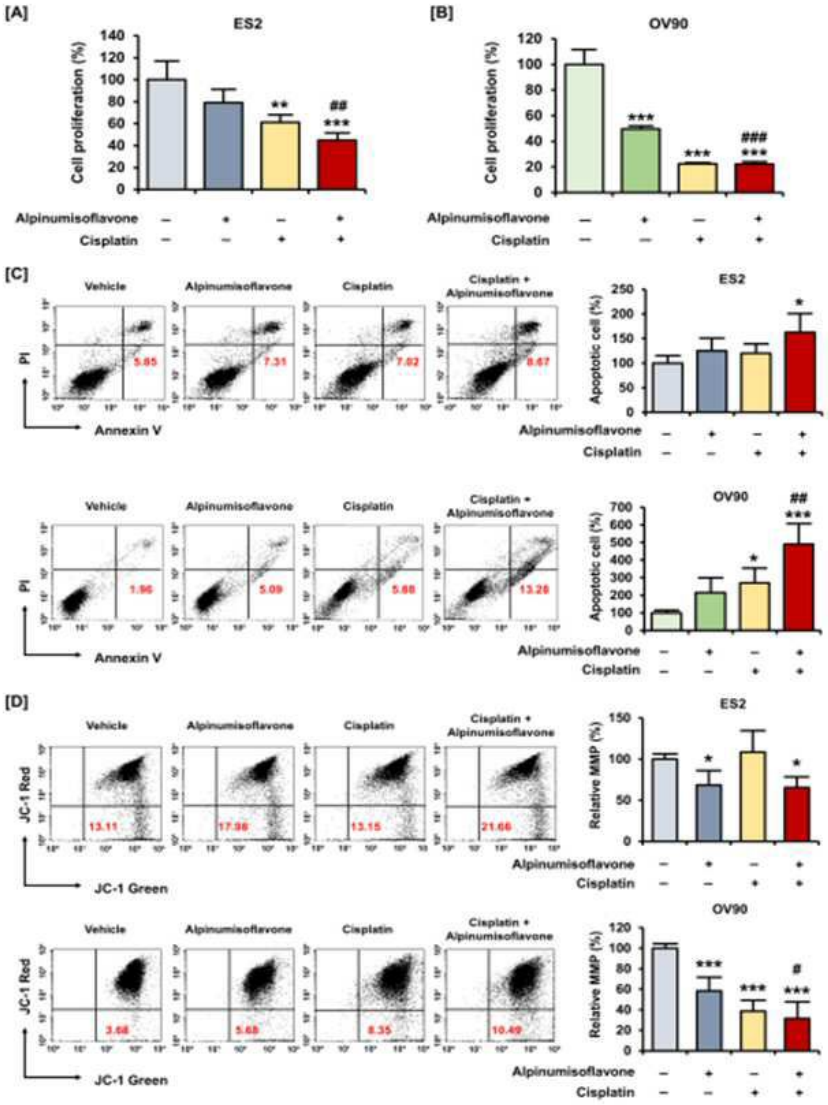
도면3


[A]
0 μM
0.5 μM
1 μM
2 μM
5.04
6.66
7.43
9.46
PI
Annexin V
ES2
Apoptotic cell (%)
Alpinumisoflavone (μM)
[B]
3.18
2.66
3.14
4.68
OV90
[C]
9.04
15.54
14.95
27.32
JC-1 Red
JC-1 Green
Relative MMP (%)
[D]
1.96
5.09
5.68
13.28

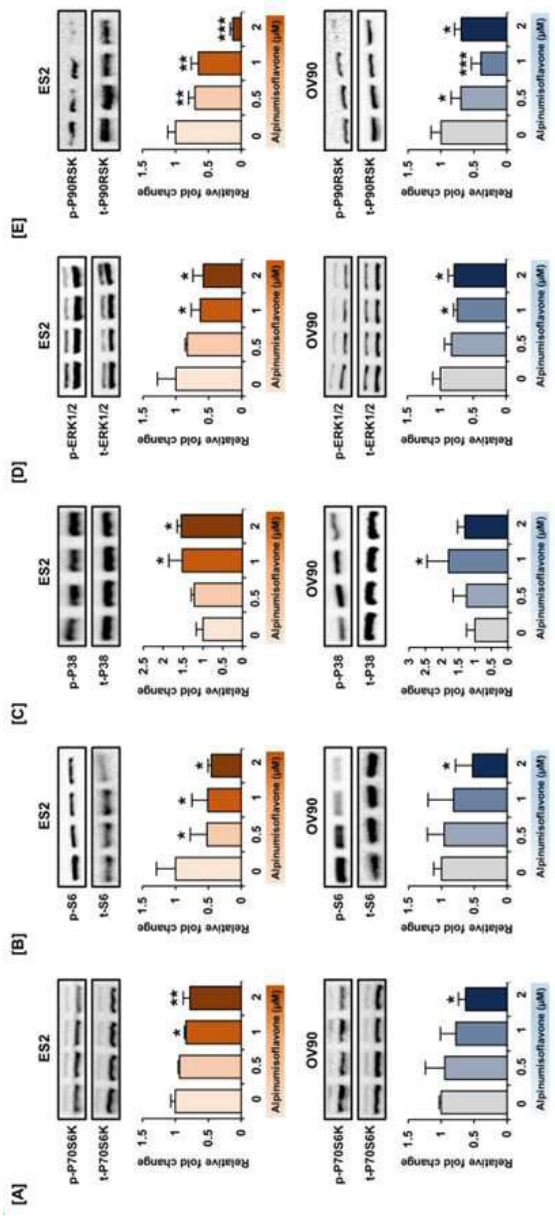
도면4


[A]
ES2
Mitochondrial respiration
Oxygen consumption rate (pmol/min)
Time (min)
Alpinumisoflavone
0 μM
2 μM
Rotenone & antimycin A
FCCP
Oligomycin
[B]
OV90
[C]
ES2
Basal respiration
ATP production
Maximal respiration
[D]
OV90

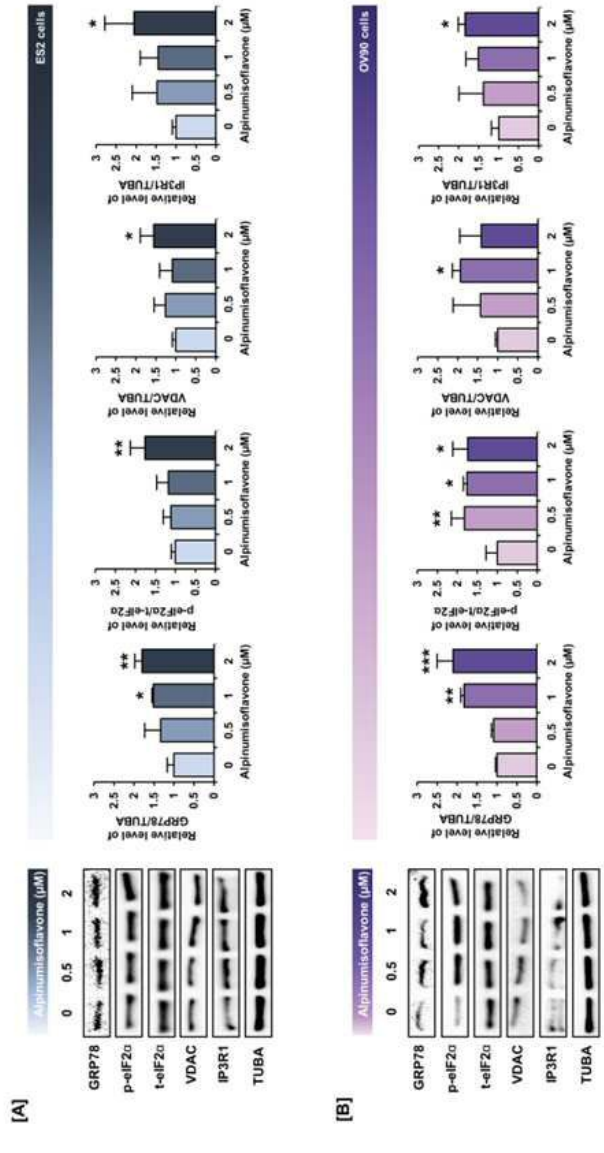
도면5


[A]
ES2
Cell proliferation (%)
Alpinumisoflavone
Cisplatin
[B]
OV90
Cell proliferation (%)
Alpinumisoflavone
Cisplatin
[C]
Vehicle
Alpinumisoflavone
Cisplatin
Cisplatin + Alpinumisoflavone
PI
Annexin V
5.85
7.31
7.02
8.67
ES2
Apoptotic cell (%)
Alpinumisoflavone
Cisplatin
1.96
5.09
5.68
13.26
OV90
Apoptotic cell (%)
Alpinumisoflavone
Cisplatin
[D]
Vehicle
Alpinumisoflavone
Cisplatin
Cisplatin + Alpinumisoflavone
JC-1 Red
JC-1 Green
13.11
17.96
13.15
21.66
ES2
Relative MMP (%)
Alpinumisoflavone
Cisplatin
3.68
5.68
8.35
10.49
OV90
Relative MMP (%)
Alpinumisoflavone
Cisplatin

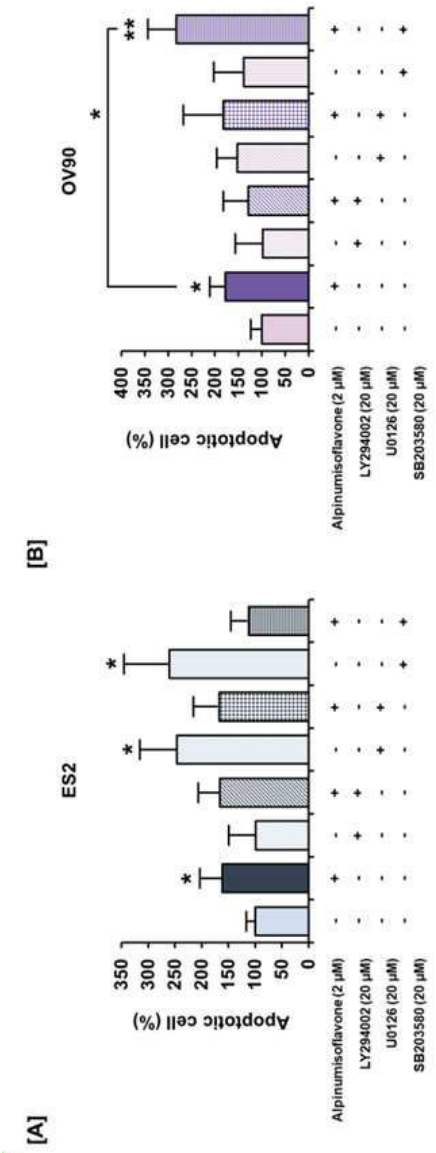
도면6


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
ES2
OV90
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-P38
t-P38
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-P90RSK
t-P90RSK
Relative fold change
Alpinumisoflavone (μM)

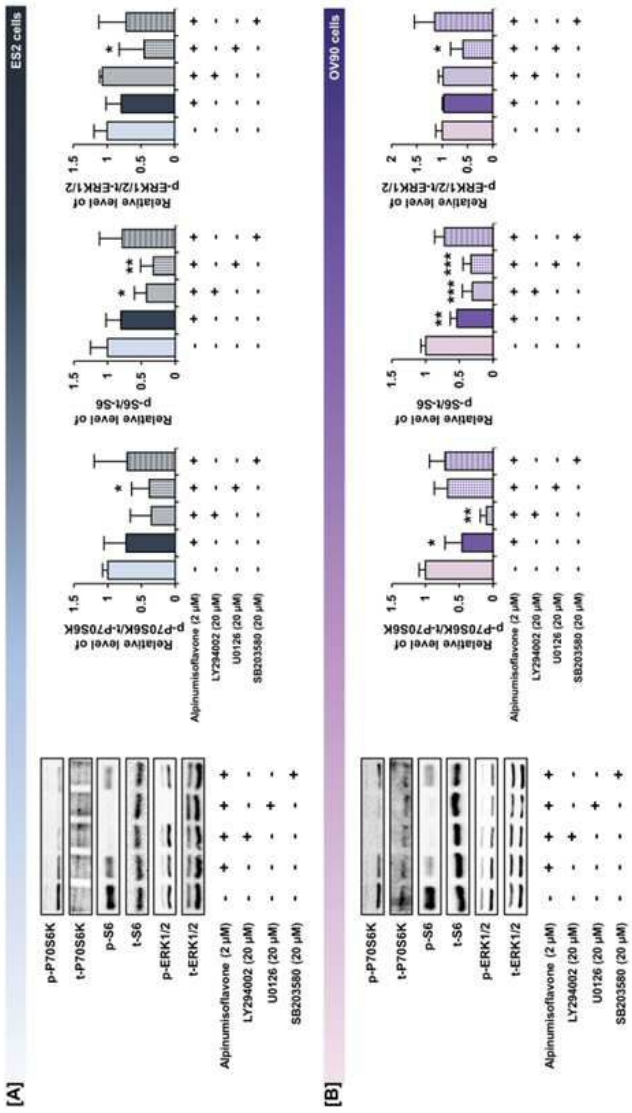
도면7


[A]
ES2 cells
Alpinumisoflavone (μM)
0 0.5 1 2
GRP78
p-eIF2α
t-eIF2α
VDAC
IP3R1
TUBA
Relative level of GRP78/TUBA
Relative level of p-eIF2α/t-eIF2α
Relative level of VDAC/TUBA
Relative level of IP3R1/TUBA
Alpinumisoflavone (μM)
[B]
OV90 cells
Alpinumisoflavone (μM)
0 0.5 1 2
GRP78
p-eIF2α
t-eIF2α
VDAC
IP3R1
TUBA
Relative level of GRP78/TUBA
Relative level of p-eIF2α/t-eIF2α
Relative level of VDAC/TUBA
Relative level of IP3R1/TUBA
Alpinumisoflavone (μM)

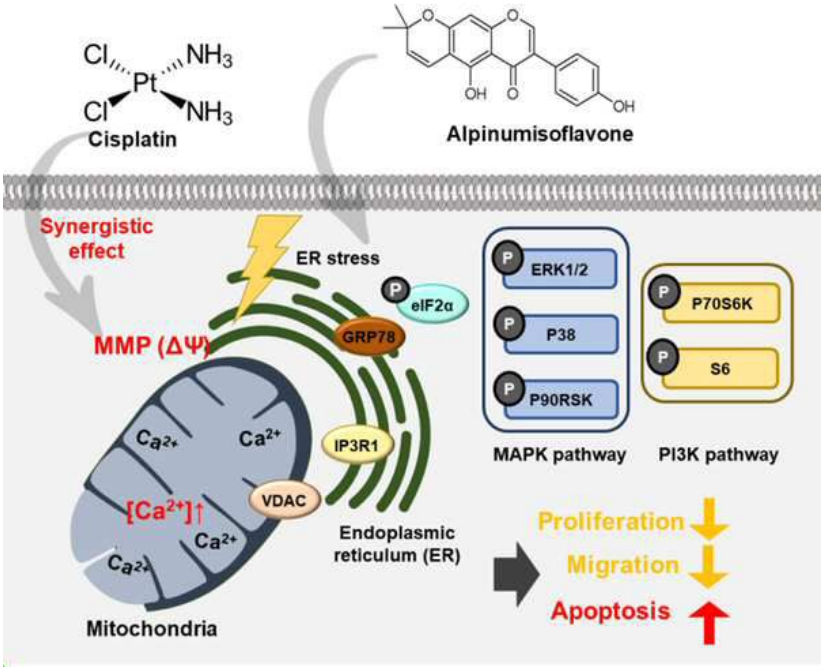
도면8


[A]
ES2
Apoptotic cell (%)
0
50
100
150
200
250
300
350
Alpinumisoflavone (2 μM)
LY294002 (20 μM)
U0126 (20 μM)
SB203580 (20 μM)
[B]
OV90
Apoptotic cell (%)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
Alpinumisoflavone (2 μM)
LY294002 (20 μM)
U0126 (20 μM)
SB203580 (20 μM)

도면9


[A]
ES2 cells
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-ERK1/2
t-ERK1/2
Alpinumisoflavone (2 μM)
LY294002 (20 μM)
U0126 (20 μM)
SB203580 (20 μM)
Relative level of p-P70S6K/t-P70S6K
Relative level of p-S6/t-S6
Relative level of p-ERK1/2/t-ERK1/2
[B]
OV90 cells

도면10


Cl
Pt
NH3
Cl
NH3
Cisplatin
OH
O
O
OH
Alpinumisoflavone
Synergistic effect
ER stress
P
eIF2α
GRP78
MMP (ΔΨ)
Ca2+
Ca2+
IP3R1
VDAC
[Ca2+]↑
Ca2+
Ca2+
Endoplasmic reticulum (ER)
Mitochondria
P
ERK1/2
P
P38
P
P90RSK
MAPK pathway
P
P70S6K
P
S6
PI3K pathway
Proliferation
Migration
Apoptosis