



등록특허 10-2287236



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월09일
(11) 등록번호 10-2287236
(24) 등록일자 2021년08월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 33/243 (2019.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0055164
- (22) 출원일자 2019년05월10일
심사청구일자 2019년05월10일
- (65) 공개번호 10-2020-0129963
- (43) 공개일자 2020년11월18일
- (56) 선행기술조사문헌
PHYTOTHERAPY RESEARCH Phytother. Res. 26: 148-152 (2012)*
Pharmaceutical Biology, 49(11): 1150-1157, (2011)*
Toxicology Letters 178, 71-76, (2008)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자
박지영
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
오세량
대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
리엔목특허법인

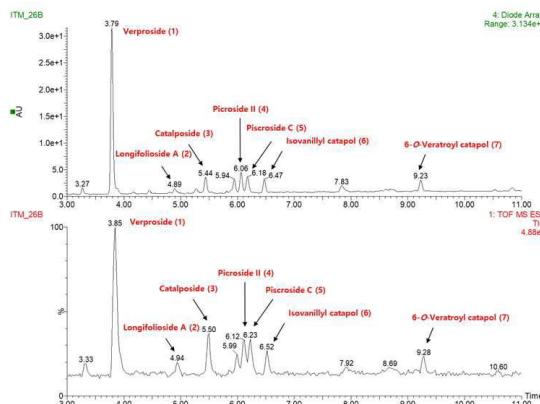
전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 홍성재

(54) 발명의 명칭 카탈풀 유도체 화합물을 포함하는 항암 보조제

(57) 요약

카탈풀 유도체 화합물을 포함하는 항암 보조제에 관한 것으로, 일 양상에 따른 화합물은 우수한 엔도트로핀 저해 효과를 나타내므로, 시스플라틴을 비롯한 백금계 항암제에 내성이 생긴 환자에게 있어서 부작용 없이 백금계 항암제에 대한 내성을 극복할 수 있어 유방암, 자궁경부암 등의 암을 효과적으로 치료하는데 적용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 33/243 (2019.01)*A61K 45/06* (2013.01)*A61P 35/00* (2018.01)*A23V 2002/00* (2013.01)*A23V 2200/308* (2013.01)*A23V 2250/30* (2013.01)

(72) 발명자

안경섭

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

류형원

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9C4065956

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단 NRF

연구사업명 (재)유전자동의보감사업단

연구과제명 비만연관 당뇨 및 암질환 개선을 위한 천연물 신약후보 발굴 및 작용기전 규명

기여율 2/3

과제수행기관명 울산과학기술원

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.12.31

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2018R1A2B6003878

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업 (증결연구)

연구과제명 비만 연관 대사성 질환에서 세포외기질 단백질 Col6A3 유래 endotrophin의 생성 및 활성 기전규명

기여율 1/3

과제수행기관명 울산과학기술원

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

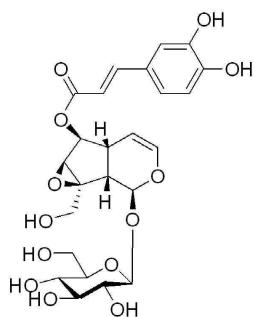
청구항 1

항암제와 병용투여되는 항암제 민감성 증진용 조성물로서,

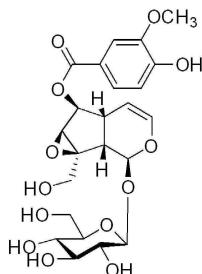
하기 화학식 2 내지 5로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하고,

상기 항암제는 시스플라틴(Cisplatin)이고, 상기 조성물은 유방암, 자궁경부암, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 암에서 상기 항암제 민감성을 증진시키는 것인, 항암제 민감성 증진용 조성물:

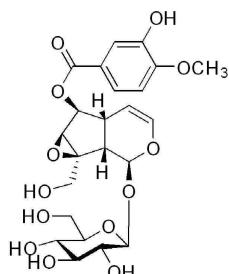
[화학식 2]



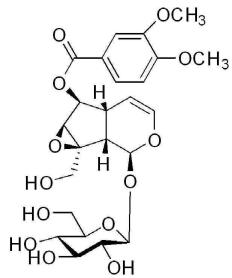
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]

**청구항 2**

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 항암제 내성을 억제하는 것인 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 항암제의 암세포 성장 저해 효과 또는 암의 전이 억제 효과를 증진시키는 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 항암제 내성 암 또는 전이성 암에 대한 항암제의 항암 효과를 증진시키기 위한 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 상피-간엽줄기세포 전환 (epithelial-mesenchymal transition) 경로를 억제하는 것인 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물인 것인 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 건강기능식품 조성물인 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 카탈올 유도체 화합물을 포함하는 항암 보조제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 암의 치료를 위해서는 수술 요법, 방사선 치료 요법 및 화학요법 등이 사용되고 있다. 화학요법은 항암제를 이용하여 암을 치료하는 방법으로, 오늘날에는 약 60여종의 다양한 항암제가 사용되고 있다. 가장 효과적인 암 치료제로 알려진 시스플라틴[cisplatin(cis-diamminedichloroplatinum; CDDP)]은 백금(platinum)을 함유한 중금속 화합물로서 백금 원자를 중심으로 2개의 염소 원자와 2개의 암모니아 분자가 시스(cis)-형으로 결합되어 있으며, DNA 가닥상의 인접한 2개의 구아닌과 결합하여 사슬 내 가교(interstrand crosslink)를 형성하여 DNA 합성을 억제한다. 즉, 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중나선 구조에 부착되어 DNA 복제를 저해하여 암세포 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하여 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다. 시스플라틴은 유방암, 자궁경부암, 두경부암, 폐암, 식도암, 고환암, 난소암, 방광암, 전립선암, 위암 등과 같은 다양한 종류의 암에 대하여 매우 효과적인 항암제이나, 최근의 연구에 의하면 그 내성으로 인하여 임상적인 문제가 증가하고 있다.

[0003] 산꼬리풀 (*Veronica rotunda* var. *subintegra*)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본으로, 한국, 일본, 만주, 사할린섬, 우수리강 등지에 분포하고 있다. 산꼬리풀은 알러지, 염증, 천식 등의 치료에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으나 (한국공개특허 10-2016-0148936), 항암제의 내성을 억제하기 위한 항암 보조제로서의 역할에 대한 연구는 미미한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 입체이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 다른 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 입체이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 산꼬리풀(*Veronica rotunda* var. *subintegra*) 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.

[0007] 상기 산꼬리풀(*Veronica rotunda* var. *subintegra*) 추출물은 산꼬리풀 전초, 그 일부분, 또는 이들로부터 유래된 재료로부터 용매에 의하여 추출된 추출물일 수 있다. 상기 일부분은 산꼬리풀의 뿌리, 줄기, 잎, 열매, 꽃, 또는 꽃잎일 수 있다.

[0008] 상기 산꼬리풀은 학명이 *Veronica rotunda* var. *subintegra*로서 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본이다. 산꼬리풀의 높이는 40~80 cm 정도이고, 줄기는 곧게 서 있으며, 굽은 털이 있는 것일 수 있다. 산꼬리풀의 잎은 마주나기를 하고 좁은 달걀형이거나 긴 타원형일 수 있으며, 산꼬리풀 잎의 끝은 뾰족하며 기부는 좁아지고, 가장자리에는 불규칙한 톱니가 있고, 잎의 길이는 5~10 cm일 수 있다. 잎의 뒷면의 맥위로는 털이 약간 있을 수 있다. 산꼬리풀의 꽃은 가지와 줄기 끝에 파란빛을 띤 자주빛의 꽃이 총상꽃차례로 달릴 수 있으며, 꽃받침과 꽃잎은 각 4개이고 끝은 뾰족한 것일 수 있으며, 수술은 2개이고 꽃밥은 짙은 자주색일 수 있다. 산꼬리풀의 열매는 삭과로 넓은 달걀 뒤집은 모양일 수 있다. 산꼬리풀은 한국, 일본, 만주, 사할린섬, 우수리강 등지에 분포하는 것일 수 있다.

[0009] 상기 용매는 물, 알콜, 예를 들면, C1-C6 알콜, 예를 들면, C1-C4 알콜 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 C1-C6 알콜은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 1,3-프로판디올, 부탄올, 펜탄올, 헥산올 등일 수 있다. 상기 용매는 예를 들면, 물과 알콜의 혼합물 즉 알콜 수용액일 수 있다. 알콜 수용액의 알콜 농도는 1 내지 99.5 (v/v)%, 예를 들면, 10 내지 99.5 (v/v)%, 1 내지 90 (v/v)%, 5 내지 80 (v/v)%, 10 내지 70 (v/v)%, 15 내지 60 (v/v)%, 20 내지 55 (v/v)%, 또는 25 내지 50 (v/v)%일 수 있으며, 보다 구체적으로 30 내지 50

(v/v)% 일 수 있다. 상기 알콜 수용액은 에탄올 수용액일 수 있다.

[0010] 상기 추출은 상기 산꼬리풀 전초, 그 일부분, 또는 이들로부터 유래된 재료에 대하여 상기 추출 용매를 3 내지 20 (부피/중량)배, 예를 들면, 3 내지 17 (부피/중량)배, 3 내지 15 (부피/중량)배, 5 내지 15 (부피/중량)배, 또는 4 내지 20배 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 산꼬리풀 전초, 그 일부분, 또는 이들로부터 유래된 재료 1kg에 대하여 상기 추출 용매를 3 내지 20 L 첨가하는 것을 포함할 수 있다.

[0011] 상기 추출은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출, 또는 이들의 조합에 의하여 수행될 수 있고, 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 자명한 추출법이라면 제한이 없으며, 구체적으로 냉침 추출 또는 환류 추출일 수 있다. 예를 들어, 냉침추출 이후에 환류 추출을 수행하는 과정을 1회 내지 5회 반복 추출하고 그 여과추출물을 감압농축기로 20 내지 100°C, 예를 들어, 상온에서 감압 농축하여 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 산꼬리풀 추출물을 수득할 수 있다. 상기 추출물은 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함한다.

[0012] 상기 추출은 4°C 내지 100°C, 예를 들면, 4°C 내지 90°C, 4°C 내지 85°C, 4°C 내지 80°C, 10°C 내지 90°C, 10°C 내지 85°C, 10°C 내지 80°C, 15°C 내지 90°C, 15°C 내지 85°C, 15°C 내지 80°C, 20°C 내지 90°C, 20°C 내지 85°C, 20°C 내지 80°C, 10°C 내지 40°C, 10°C 내지 35°C, 10°C 내지 30°C, 50°C 내지 90°C, 50°C 내지 80°C, 60°C 내지 85°C에서 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상온일 수 있고, 65°C 내지 85°C일 수 있다. 상기 추출 시간은 추출 용매 또는 추출 온도 등의 조건에 따라 달라질 수 있는데 1 시간 내지 10일, 예를 들면, 1 시간 내지 10일, 1 시간 내지 5일, 1 시간 내지 3일, 1 시간 내지 2일, 1 시간 내지 1일, 1 시간 내지 12시간, 5 시간 내지 10일, 5 시간 내지 5일, 5 시간 내지 3일, 5 시간 내지 2일, 5 시간 내지 1일, 5 시간 내지 12시간, 10 시간 내지 10일, 10 시간 내지 5일, 10 시간 내지 3일, 10 시간 내지 2일, 10 시간 내지 1일, 또는 10 시간 내지 12시간일 수 있다. 상기 추출은 상기 용매 중에 산꼬리풀 전초, 그 일부분, 또는 이들로부터 유래된 재료를 혼합하고 일정 시간 동안 방치하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방치는 적당한 교반을 포함할 수 있다. 상기 추출은 활성성분을 보다 다량 수득하기 위해 1 회 이상 여러 번 추출할 수 있으며, 구체적으로 1 내지 5회, 보다 구체적으로 2회 연속추출하여 합한 추출액을 이용할 수 있다.

[0013] 상기 추출은 식물체 잔사 및 추출액을 여과 등의 알려진 방법에 의하여 분리할 수 있다. 상기 추출은 또한 얻어진 추출액으로부터 감압 농축과 같은 알려진 방법에 의하여 용매를 제거하는 것을 포함할 수 있다. 상기 추출은 또한 얻어진 추출물을 동결건조와 같은 건조에 의하여 건조 추출물을 제조하는 것을 포함할 수 있다.

[0014] 상기 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 80 중량%, 예를 들면, 0.01 중량% 내지 60 중량%, 0.01 중량% 내지 40 중량%, 0.01 중량% 내지 30 중량%, 0.01 중량% 내지 20 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량%, 0.01 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 60 중량%, 0.05 중량% 내지 40 중량%, 0.05 중량% 내지 30 중량%, 0.05 중량% 내지 20 중량%, 0.05 중량% 내지 10 중량%, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 60 중량%, 0.1 중량% 내지 40 중량%, 0.1 중량% 내지 30 중량%, 0.1 중량% 내지 20 중량%, 0.1 중량% 내지 10 중량%, 또는 0.1 중량% 내지 5 중량%로 포함될 수 있다.

[0015] 상기 조성물에 있어서, 용어 "분획물(fraction)"은 상기 산꼬리풀 추출물이 그 일부의 성분으로 나누어진 물질 즉 분획된 물질을 나타낸다. 일 양상에 따른 산꼬리풀 분획물은 산꼬리풀 추출물을 물에 혼탁한 후, 물, 메탄올, 에탄올 등의 극성 용매 또는 혼산, 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매를 사용하여 분획함으로써 극성 용매 분획물과 비극성 용매 분획물을 각각 수득할 수 있다. 구체적으로, 산꼬리풀 추출물을 물에 혼탁시킨 후, 혼탁액의 1 내지 100배, 예를 들어 1 내지 5배 부피의 물, C1-C4 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 혼산, 부탄올, 또는 이들의 혼합용매와 같은 극성 또는 비극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 예를 들어, 2 회 내지 5 회에 걸쳐 극성 또는 비극성 용매 가용층을 추출, 분리하여 수득할 수 있다. 또한, 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다 (Harborne J.B. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis, 3rd Ed. p6-7, 1998). 보다 구체적으로, 상기 산꼬리풀 추출물을 물에 혼탁시킨 후, 물, 메탄올, 또는 이의 혼합용매 [MeOH-H₂O (73:27, 65:35, 0:100, 0:100, 73:27, 73:27)]를 용매로 이용하여 연속 추출 후 산꼬리풀 각 용매 가용 분획물을 수득할 수 있다.

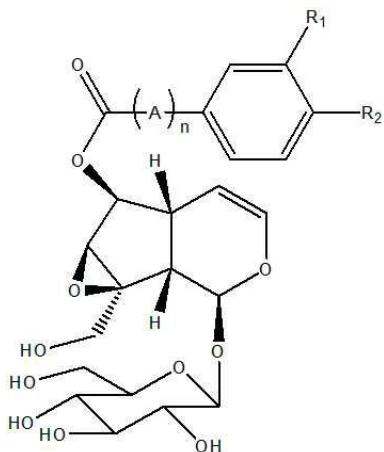
[0016] 상기 분획물을 분리하는 것은 여과 등의 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 상기 분획화는 또한 얻어진 분획물으로부터 감압 농축과 같은 알려진 방법에 의하여 용매를 제거하는 것을 포함할 수 있다. 상기 분획화는 또한 얻어진 분획물을 농축 및/또는 건조하는 것을 포함할 수 있다. 상기 농축은 감압 농축일 수 있다. 상기 건조는 감압 건조, 비등 건조, 분무 건조, 상온 건조 또는 동결건조를 포함할 수 있다.

- [0017] 일 양상에 따른 추출물 또는 분획물은 하기 화학식 1 내지 4를 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 용어 "항암 치료 보조용 조성물", "항암 치료 보조제(anti-cancer therapy adjuvant)", 또는 "항암 보조제(anti-cancer adjuvant)"는 항암제 내성이나 항암제의 부작용을 억제 또는 개선시키기 위해 사용되는 보조제를 의미할 수 있다. 용어 "억제"는 항암 보조제의 투여에 의해 항암제의 부작용이나 내성을 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있고, 용어, "개선"이란 항암보조제의 투여에 의한 항암제 부작용이나 내성의 감소 또는 항암제 부작용이나 내성의 감소로 인한 암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다. 용어 "치료하다(treat)"는 질병을 앓거나 또는 질병을 발병할 위험이 있는 개체에게, 상기 개체의 상태(예를 들면, 하나 이상의 증상)의 개선, 질병 진행의 지연, 증상 발생의 지연 또는 증상 진행의 둔화 등을 포함한 효과를 제공하는 임의의 형태의 치료 또는 예방을 의미한다. 따라서, 용어 "치료(treatment)"는 또한 증상의 발생을 예방하는 개체의 예방적 치료를 포함한다. 용어 "치료(treatment)" 및 "예방(prevention)"은 증상의 치유 또는 완전한 제거를 의미하도록 의도되지 않는다. 이들은 환자의 상태(예를 들면, 하나 이상의 증상)의 개선, 질병의 진행의 지연 등을 포함한, 질병을 앓고 있는 환자에게 효과를 제공하는 임의의 형태의 치료를 의미한다.
- [0019] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되어 항암제의 항암효과 예를 들어, 암세포 성장 저해 효과 또는 암의 전이 억제 효과를 증진시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 항암제와 병용 투여될 때 발생되는 효과가, 상기 조성물이 단독으로 투여될 때 발생되는 효과보다 더 큰 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물의 단독 투여시에는 유의한 항암효과를 나타내지 않으나, 항암제와 병용 투여시 항암제의 항암 효과를 증진시키는 것일 수 있다. 용어 "항암제의 항암효과 증진"은 항암제 민감성을 증진시켜 항암제의 반복 투여 시에 항암효과 지속성을 증가시키는 것을 의미할 수 있다.
- [0020] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 항암제 내성 암에 대한 항암제의 항암 효과를 증진시키기 위한 것일 수 있다. 용어 "항암제 내성 암"은 항암제 투여에 의한 항암 치료에서 암의 예방, 개선 또는 치료가 효과적으로 이루어지지 않는 상태를 의미하는 것으로서, 구체적으로, 암 세포의 항암제에 대한 민감성이 낮아져서 항암제로 인해 유도되는 세포 사멸, 세포 독성 기작이 효과적으로 이루어지지 않는 모든 종류의 암뿐만 아니라, 초기에는 항암제 투여에 따른 항암 효과가 나타났으나, 반복적인 항암제 투여에 의해 점차 항암제에 대한 항암 효과가 감소되거나 효과가 사라진 암을 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0021] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 암세포의 항암제 내성 또는 암의 전이 구체적으로, 유방암의 전이와 관련된 EMT(Epithelial Mesenchymal Transition) 경로에 관여하는 엔도트로핀(Endotrophin; ETP) 활성을 억제하는 것일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 항암제는 백금계 항암제일 수 있다. 용어 "항암제"는 암세포의 각종 대사경로에 작용하여 암세포에 대하여 세포독성(cytotoxicity)이나 성장억제효과(cytostatic effects)를 나타내는 기준의 암 치료에 사용되는 공지의 약제를 총칭하는 것이며, 지금까지 개발된 대사길항제, 식물성 알칼로이드, 토포이소머라제 저해제(topoisomerase inhibitor), 알킬화제, 항암성 항생물질, 호르몬제 및 기타 약제를 모두 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 백금계 항암제는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 오르마플라틴, 제니플라틴, 엔로플라틴, 로바플라틴, 스피로플라틴, 테트라플라틴, 오르미플라틴 및 이프로플라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 있어서, 상기 항암제는 유방암, 두부 또는 경부암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 방광암, 식도암, 종피종, 신경아세포종, 고환암, 백혈병, 위암, 간암, 대장암, 피부암, 뇌암, 후두암, 전립선암, 갑상선암, 신장암, 혈액암, 및 직장암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 암에 대한 것일 수 있다.
- [0024] 일 양상에 따른 항암 치료 보조용 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 이 경우, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 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, 일부민주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충진제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0025] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

- [0026] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 혼탁액, 유성 혼탁액, 조제 분말, 과립제, 환제, 산제, 에멀젼, 경질캡슐제, 연질캡슐제, 시럽제 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다. 상기 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 슬비톨, 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 봉피제; 스테아르산 마그네슘(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.
- [0027] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하주사 등의 주사제, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다. 상기 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁제, 유제, 동결건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 혼탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 구체적으로 상기 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 혼탁액으로 제조하고 이를 앰풀(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 상기 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다. 또한, 상기 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0028] 상기 약학적 조성물의 치료적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 중세나 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. 용어 "치료적 유효량(treatment-effective amount)"은 암에 걸린 환자에서, 암 환자의 항암 치료에 의한 부작용이나 항암제 내성, 상태(예를 들면, 하나 이상의 증상)의 개선, 질병의 진행의 지연 등을 포함한 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양을 의미한다.
- [0029] 또 다른 양상은 산꼬리풀(Veronica rotunda var. subintegra) 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 산꼬리풀, 산꼬리풀 추출물, 추출, 분획물, 항암 치료 보조용 조성물에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0031] 일 양상에 따른 항암보조제를 항암제 투여로 인한 부작용의 억제 또는 개선하기 위한 목적으로 또는 항암제 내성을 억제 또는 완화하기 위한 목적으로 건강기능식품 조성물에 첨가할 수 있다.
- [0032] 상기 건강기능식품 조성물은 건강 기능성 식품, 영양 보조제, 영양제, 파마푸드(pharmafood), 건강 식품, 뉴트라슈티컬(nutraceutical), 디자이너 푸드, 식품 첨가제 등의 모든 형태에 해당한다.
- [0033] 일 양상에 따른 항암보조제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 건강식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합 양은 암의 진행 단계, 암의 종류 및 병용 투여되는 항암제의 종류 등에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0034] 상기 식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 페트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0036] 또 다른 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 입체이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.

[0037] [화학식 1]



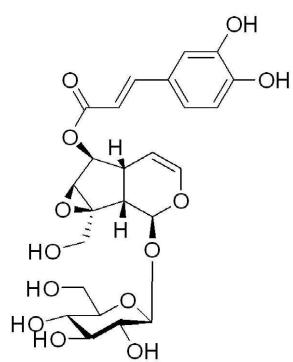
[0038]

[0039] 식 중, R1 및 R2는 서로 독립적으로 히드록시기, 티올기, 또는 C1-C6 알콕시기이고; 및 A는 CH₂ 또는 HC=CH이고, 여기서, n은 0 또는 1의 정수이다.

[0040] 상기 항암 치료 보조용 조성물에 있어서, 항암 치료 보조용 조성물에 대해서는 상술한 바와 같다.

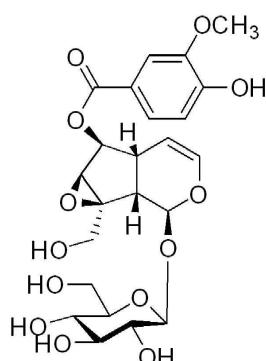
[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 R1 및 R2는 서로 독립적으로 히드록시기 또는 메톡시기일 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0042] [화학식 2]



[0043]

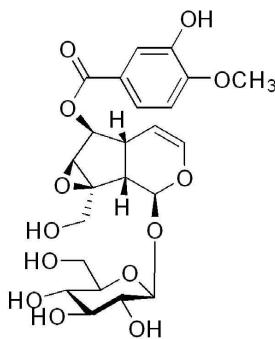
[0044] [화학식 3]



[0045]

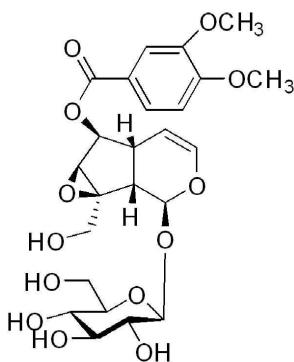
[0046]

[화학식 4]



[0047]

[화학식 5]



[0049]

[0050] 상기 화학식 2로 표시되는 베르미노사이드(verminoside, 화합물 1)는 분자식이 C₂₄H₂₈O₁₃이고 분자량이 524.5 g/mol인 화합물로 카탈폴(catalpol) 유도체이며, 산꼬리풀(Veronica rotunda var. subintegra)로부터 분리된 천연 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 꼬리풀 속의 산꼬리풀 근연종이나 다른 속 식물부터 분리된 것일 수 있다.

[0051]

[0051] 상기 화학식 3으로 표시되는 피크로사이드 II (picroside II, 화합물 2)는 분자식이 C₂₃H₂₈O₁₃이고 분자량이 512.5 g/mol인 화합물로 카탈폴(catalpol) 유도체이며, 산꼬리풀(Veronica rotunda var. subintegra)로부터 분리된 천연 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 꼬리풀 속의 산꼬리풀 근연종이나 다른 속 식물부터 분리된 것일 수 있다.

[0052]

[0052] 상기 화학식 4로 표시되는 이소바닐릴 카탈폴 (isovanillyl catalpol, 화합물 3)은 분자식이 C₂₃H₂₈O₁₃이고 분자량이 512.5 g/mol인 화합물로 카탈폴(catalpol) 유도체이며, 산꼬리풀(Veronica rotunda var. subintegra)로부터 분리된 천연 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 꼬리풀 속의 산꼬리풀 근연종이나 다른 속 식물부터 분리된 것일 수 있다.

[0053]

[0053] 상기 화학식 5로 표시되는 6-0-베라트로일 카탈폴(6-0-veratroyl catalpol, 화합물 4)은 분자식이 C₂₄H₃₀O₁₃이고 분자량이 526.5 g/mol인 화합물로 카탈폴(catalpol) 유도체이며, 산꼬리풀(Veronica rotunda var. subintegra)로부터 분리된 천연 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 꼬리풀 속의 산꼬리풀 근연종이나 다른 속 식물부터 분리된 것일 수 있다.

[0054]

[0054] 상기 "용매화물(solvate)"은 비공유적 분자간력에 의해 결합된 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미할 수 있다. 그에 관한 바람직한 용매들로는 휘발성, 비독성, 및/또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들일 수 있다.

[0055]

[0055] 상기 "입체이성질체(stereoisomer)"는 분자식 및 구성원자의 연결 방법도 같으나 원자 사이의 공간적 배치가 상이한 것을 지칭한다. 상기 입체이성질체는 상기 화합물의 거울상 이성질체, 또는 부분입체 이성질체일 수 있다.

[0056]

[0056] 상기 "거울상 이성질체(enantiomers)"는 특정 화합물과 분자식이 동일하고, 원자의 결합 순서가 동일하나, 그 공간에서 원자의 3차원적 입체 배열이 상이한 화합물로, 특정 화합물과 그 거울상이 겹치지 않는 관계에 있는 화합물을 의미할 수 있다.

[0057]

[0057] 상기 조성물은 2개의 거울상 이성질체가 1:1, 즉 동일한 비율로 혼합되어 있는 라세미 혼합물(racemic Mixtum).

e)일 수 있다.

[0058] 상기 "부분입체 이성질체(diastereomers)"는 거울상 이성질체가 아닌 모든 입체 이성질체를 의미할 수 있다. 입체 중심이 없는 시스, 트랜스 배열을 가지는 고리형 화합물 또는 알켄이 부분입체 이성질체의 관계에 있는 경우 및 입체 중심이 2 이상인 경우로 입체 배열이 부분적으로만 상반된 배열을 가지고 있는 화합물의 관계를 지칭하는 것일 수 있다.

[0059] 상기 "약학적으로 허용가능한"은 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점 또는 합병증 없이 이득/위험비가 합리적이어서 대상체 예를 들어, 인간의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며 건전한 의학적 판단의 범주 이내인 화합물 또는 조성물을 의미할 수 있다.

[0060] 상기 "염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다. 상기 유리산은 무기산 또는 유기산일 수 있으며, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등일 수 있고, 상기 유기산은 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설휠산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설휠산, 에테인설휠산, 4-톨루엔솔폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등일 수 있다. 또한, 상기 염은 알칼리 금속 염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 산부가염은 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설휠레이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등을 포함할 수 있다.

[0061] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되어 항암제의 항암효과 예를 들어, 암세포 성장 저해 효과 또는 암의 전이 억제 효과를 증진시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 항암제와 병용 투여될 때 발생되는 효과가, 상기 조성물이 단독으로 투여될 때 발생되는 효과보다 더 큰 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물의 단독 투여시에는 유의한 항암효과를 나타내지 않으나, 항암제와 병용 투여시 항암제의 항암 효과를 증진시키는 것일 수 있다. 용어 "항암제의 항암효과 증진"에 대해서는 상술한 바와 같다.

[0062] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 항암제 내성 암에 대한 항암제의 항암 효과를 증진시키기 위한 것일 수 있다. 용어 "항암제 내성 암"에 대해서는 상술한 바와 같다.

[0063] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 암세포의 항암제 내성 또는 암의 전이 구체적으로, 유방암의 전이와 관련된 EMT(Epithelial Mesenchymal Transition) 경로에 관여하는 엔도트로핀(Endotrophin; ETP) 활성을 억제하는 것일 수 있다.

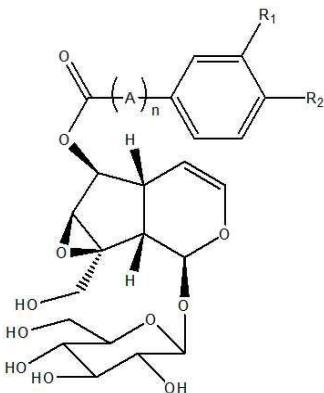
[0064] 일 구체예에 있어서, 상기 항암제는 백금계 항암제일 수 있다. 용어 "항암제"에 대해서는 상술한 바와 같다. 일 구체예에 있어서, 상기 백금계 항암제는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 오르마플라틴, 제니플라틴, 엔로플라틴, 로바플라틴, 스피로플라틴, 테트라플라틴, 오르미플라틴 및 이프로플라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0065] 일 구체예에 있어서, 상기 항암제는 유방암, 두부 또는 경부암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 폐암, 방광암, 식도암, 종괴종, 신경아세포종, 고환암, 백혈병, 위암, 간암, 대장암, 피부암, 뇌암, 후두암, 전립선암, 갑상선암, 신장암, 혈액암, 및 직장암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 암에 대한 것일 수 있다.

[0066] 또 다른 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 입체이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0067]

[화학식 1]



[0068]

[0069]

식 중, R_1 및 R_2 는 서로 독립적으로 히드록시기, 티올기, 또는 C_1-C_6 알콕시기이고; 및 A 는 CH_2 또는 $HC=CH$ 이고, 여기서, n 은 0 또는 1의 정수이다.

[0070]

상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 용매화물, 입체이성질체, 약학적으로 허용가능한 염, 항암 치료 보조용 조성물에 대해서는 상술한 바와 같다.

[0071]

일 양상에 따른 항암보조제를 항암제 투여로 인한 부작용의 억제 또는 개선하기 위한 목적으로 또는 항암제 내성을 억제 또는 완화하기 위한 목적으로 건강기능식품 조성물에 첨가할 수 있다.

[0072]

상기 건강기능식품 조성물은 건강 기능성 식품, 영양 보조제, 영양제, 파마푸드(pharmafood), 건강 식품, 뉴트라슈티칼(nutraceutical), 디자이너 푸드, 식품 첨가제 등의 모든 형태에 해당한다.

[0073]

일 양상에 따른 항암보조제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 건강식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합 양은 암의 진행 단계, 암의 종류 및 병용 투여되는 항암제의 종류 등에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0074]

상기 식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쇠코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다.

[0075]

상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0076]

또 다른 양상은 치료적 유효량의 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다. 용어 "개체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 구체적으로 인간일 수 있다. 상기 "치료적 유효량"에 대해서는 상술한 바와 같다. 상기 조성물의 투여량은 다양한 요소에 의해 달라질 수 있으며, 그 투여 경로 또한 환자의 연령, 투여기간, 체중, 질환의 중증도, 환자의 의식 여부, 항암제의 종류, 병용 약물의 종류 등과 같은 다양한 요소에 의해 경구 또는 비경구의 다양한 투여 경로를 사용할 수 있다. 또한, 각각을 별개로 동시 또는 연쇄적으로, 혹은 시간을 두고 별개로 투여하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0077]

일 양상에 따른 화합물은 우수한 엔도트로핀 저해효과를 나타내므로, 시스플라틴을 비롯한 백금계 항암제에 내성이 생긴 환자에게 있어서 부작용 없이 백금계 항암제에 대한 내성을 극복할 수 있어 유방암, 자궁경부암 등의 암을 효과적으로 치료하는데 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078]

도 1은 산꼬리풀 추출물의 UPLC-QTof-MS 분석 실험 결과이다.

도 2는 산꼬리풀 분획물 및 화합물 1 내지 4의 엔도트로핀 활성 저해 효과를 측정한 그래프이다.

도 3은 유방암 세포주에서 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4와 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과를 측정한 그래프이다.

도 4는 유방암 세포주에서 산꼬리풀 분획물의 항암제 내성 기전 억제 효과를 측정한 그래프이다.

도 5는 MMTV-PyMT 유방암 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물과 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그래프이다.

도 6은 MMTV-PyMT 유방암 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4와 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그래프이다.

도 7은 4T1 유방암 전이 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물과 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그래프이다.

도 8은 4T1 유방암 전이 동물 모델에서 화합물 1 내지 4와 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그래프이다.

도 9는 4T1 유방암 전이 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물, 화합물 1, 화합물 4의 항암제 내성 기전 억제 효과를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0080]

실시예 1. 산꼬리풀 추출물 및 분획물의 제조

[0081]

(1.1) 산꼬리풀 추출물의 제조 및 지표성분의 확인

[0082]

산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* = *Veronica rotunda* var. *subintegra*) 전초 (GAP 재배, 충북 음성군 소이면 비산리 244번지) 1.0 kg을 건조, 절단한 후, 산꼬리풀 전초 시료에 40% 에탄올 10L를 가하여 상온에서 24시간 동안 냉침 추출하였다. 그 후, 78°C에서 12시간 교반하면서 환류 추출을 수행한 후 진공 여과하여 상층액을 회수하였다. 상기 과정을 2회 반복하여 상층액을 회수하고 이 추출액을 감압농축기 (EYELA, N-2100, JAPAN)로 감압 농축하여 산꼬리풀 40% 에탄올 추출물 202 g을 수득하였다.

[0083]

수득한 산꼬리풀 추출물 중에 포함된 지표성분들을 확인하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC, Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 하기 [표 1]과 같은 조건으로 수행하였다. 도 1은 산꼬리풀 추출물의 UPLC-QToF-MS 분석 실험 결과이다.

표 1

【 UPLC-MS conditions 】

① Instrument

구분	Instrument
UPLC(UPLC-PDA)	[Waters] AQUITY™ Ultra Performance LC
Mass	[Waters] Micromass Q-Tof Premier™

② Solvents

구분	Solvent
Solvent A	0.1% Formic acid/D.W.
Solvent B	0.1% Formic acid/ACN

③ Method - Gradient

Time[min]	Flow [ml/min]	%A	%B
(Initial)	0.400	90	10
1.00	0.400	90	10
10.50	0.400	77	23
12.00	0.400	2	98
13.30	0.400	2	98
13.40	0.400	90	10
15.00	0.400	90	10

④ Mass Conditions

구분	
Desolvation gas	N ₂
Desolvation flow rate	500 L/h
Desolvation temperature	350 °C
Source temperature	110 °C
Capillary voltage	2300 V
Cone voltage	50 V
Scan mode	Negative
m/z range	100-1500 Da

⑤ Column

AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1X100mm Column

[0084]

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 3.78분에 verproside, 4.90분에 longifolioside A, 5.44분에

catalpolside, 5.93분에 verminoside, 6.05분에 picroside II, 6.17분에 picroside C, 6.47분에 isovanillylcatalpol, 7.83분에 specioside, 8.85분에 minecoside, 9.23분에 6-O-veratroyl catalpol이 분리됨을 확인하였고, 크로마토그래피에서 확인된 피크(peak)에 해당하는 성분을 하기 [표 2]에 나타내었다.

표 2

[0086]	Name	UV (nm)	Detected ion (m/z) [M-H] ⁻	Molecular formula	Purity
	Verproside	263, 296	497.1302	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₃	> 98.0%
	Longifolioside A	263, 296	533.1075	C ₂₂ H ₂₇ ClO ₁₃	> 98.0%
	Catalpolside	258	481.1327	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₂	> 95.0%
	Verminoside	328	523.1436	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₃	> 85.0%
	Picroside II	263, 294	511.1436	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	> 97.0%
	Picroside C	263, 296	533.1055	C ₂₂ H ₂₇ ClO ₁₃	~ 90%
	Isovaniillylcatalpol	263, 296	511.1440	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	> 97.0%
	Specioside	331	507.1504	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₂	> 98.0%
	Minecoside	326	537.1620	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	> 98.0%
	6-O-Veratroyl catalpol	263	525.1636	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	> 95%
	3-Methoxy-catalposide	260	513.1608	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₃	> 91.0%

[0087] (1.2) 산꼬리풀 분획물의 제조 및 화합물 1 내지 4의 분리

상기 (1.1)의 방법으로 제조된 산꼬리풀 40% 에탄올 추출물 33.8 g을 중류수에 2 L에 혼탁시키고, 상기 혼탁물에 동량의 부탄올을 가하여 혼합한 후에 부탄올 가용 분획부 및 수가용성 분획부를 분획하였다. 상기한 부탄올 분획부를 여과 및 감압농축하여 용매를 제거하여 정제된 부탄올 분획 정제물 13.2 g을 수득하였다. 상기 산꼬리풀 부탄올 분획 정제물 중에 포함된 지표성분들을 확인하기 위해 칼럼분획물 1-6번(분획물 1 내지 6)을 제조하고 단일성분들을 분리하기 위해 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 수행하였다.

[0089] 구체적인 실험 과정은 다음과 같다. Preparative HPLC (K-Prep LAB-300G, YMC, Kyoto, Japan)에 역상컬럼(YMC-ODS-AQ-HG, 10 μm, 520 g)을 장착한 후, 상기 (1.1)에서 수득한 추출물 4 g을 역상 컬럼 크로마토그래피 [MeOH-H₂O (73:27, 65:35, 0:100, 0:100, 73:27, 73: 27)]로 용출시켜 분획물 1 내지 6을 수득하였다. 구체적으로, 하기 [표 3]에 나타난 바와 같이, 용매로는 27% 메탄올을 등용매용리로 사용하였고 용리속도 150 mL/분으로 UV 254 nm의 파장에서 검출되는 칼럼분획물 1-6번(분획물 1 내지 6)을 반복적으로 수행하여 수득하였다.

표 3

Condition		Method - Gradient		
Instrument	YMC_LAB	Time(min)	%A	%B
Guard Column	YMC-ODS-AQ-HG-10 μm, 298 g YMC-ODS-AQ-HG-10 μm, 220 g	(Initial)	73	27
Solvents	A : MeOH / B : DW	10.00	73	27
Flow Rate	150 mL/min	60.00	65	35
UV	254 nm	61.00	0	100
Loading sample	4 g/9 mL	76.00	0	100
		77.00	73	27
		97.00	73	27

[0091] 분획물 1은 29.8 g, 분획물 2는 3.5 g, 분획물 3은 6.7 g, 분획물 4는 6.0 g, 분획물 5는 4.6 g, 분획물 6은 20.4 g을 수득하였다. 이 중 분획물 4+5 (10.6 g)를 preparative HPLC (SynergyPolar-RP4 μm, 21.2 X 2 50 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA, 22% ACN in H₂O) 조건에서 반복적인 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합

물 1 (2.0 g), **화합물 2** (4.5 g), **화합물 3** (5.0 g)을 수득하였다. 분획물 6 (20.4 g)을 preparative HPLC [40% MeOH (0-60 min); column, Merck (5 X 30 cm); resin: Zeoprep C18 (75 μm, 250 g); flow rate 30 mL/min] 조건에서 반복적인 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 **화합물 4** (670.0 mg)를 수득하였다. 이 중 산꼬리풀 부탄을 분획 정제물 (13.2 g)을 "산꼬리풀 분획물(#13)"로 명명하고 하기 실험예에 사용하였다.

[0092] (1.3) 화합물 1 내지 4의 NMR 분석

[0093] 상기 화합물 1 내지 4에 대해 NMR을 수행하여 구조를 분석하였다. 1D 및 2D NMR 스펙트럼은 DMSO-d₆를 용매로 사용하여 JEOL ECZ500R (1H NMR at 500 MHz, 13C NMR at 125 MHz, Tokyo, JP), Varian UNITY 400 NMR(1H NMR at 400 MHz, 13C NMR at 100 MHz, PaloAlto, USA), Bruker AVANCE III HD 700 (1H NMR at 700 MHz, 13C NMR at 175 MHz) 분광계에서 얻었다.

[0094] 화합물 1: 베르미노시드 (verminoside; 6-O-(3,4-디히드록시신나모일) 카탈풀)

[0095] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 5.08 (d, J = 9.2 Hz, H-1), 6.42 (d, J = 6.0 Hz, H-3), 4.93 (d, J = 5.2, 8.8 Hz, H-4), 2.47 (br s, H-5), 4.99 (d, J = 6.8 Hz, H-6), 3.64 (br s, H-7), 2.43 (br d, J = 7.6 Hz, H-9), 3.71 (br d, J = 12.8 Hz, H-10), 3.91 (br d, J = 13.2 Hz, H-10), 7.09 (d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.78 (d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.04 (dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-6'), 7.54 (d, J = 15.6 Hz, H-7'), 6.34 (d, J = 15.6 Hz, H-8'), 4.61 (d, J = 7.6 Hz, H-Glc-1'), 3.04 (m, H-Glc-2'), 3.19 (m, H-Glc-3'), 3.04 (m, H-Glc-4'), 3.15 (m, H-Glc-5'), 3.42 (dd, J = 7.6, 12.0 Hz, H-Glc-6') 3.71 (br d, J = 12.8 Hz, H-Glc-6').

[0096] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 92.9 (C-1), 141.1 (C-3), 101.7 (C-4), 35.0 (C-5), 79.1 (C-6), 58.1 (C-7), 65.7 (C-8), 41.7 (C-9), 58.4 (C-10), 125.3 (C-1'), 115.7 (C-2'), 146.0 (C-3'), 148.6 (C-4'), 113.2 (C-5'), 121.5 (C-6'), 145.5 (C-7'), 115.0 (C-8'), 166.5 (C-9'), 97.8 (C-Glc-1'), 73.4 (C-Glc-2'), 76.4 (C-Glc-3'), 70.2 (C-Glc-4'), 77.4 (C-Glc-5'), 61.3 (C-Glc-6').

[0097] 화합물 2: 피크로시드 II (Picroside II; 6-O-(4-히드록시-3-메톡시벤조일)카탈풀)

[0098] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 5.11 (d, J = 9.3 Hz, H-1), 6.42 (d, J = 5.8 Hz, H-3), 4.97 (dd, J = 5.8, 4.4 Hz, H-4), 2.58 (dd, J = 9.3, 7.6 Hz, H-5), 5.06 (d, J = 7.6 Hz, H-6), 3.67 (br s, H-7), 2.47 (d, J = 9.3 Hz, H-9), 3.72 (m, H-10), 3.93 (d, J = 13.2 Hz, H-10), 7.46 (s, H-2'), 6.85 (d, J = 7.6 Hz, H-5'), 7.52 (d, J = 7.6 Hz, H-6'), 4.63 (d, J = 7.6 Hz, H-Glc-1'), 3.07 (dd, J = 8.0, 7.6 Hz, H-Glc-2'), 3.18 (m, H-Glc-3'), 3.03 (m, H-Glc-4'), 3.14 (m, H-Glc-5'), 3.44 (dd, J = 13.2, 6.4 Hz, H-Glc-6'), 3.72 (d, J = 13.2 Hz, H-Glc-6'), 3.82 (s, 3-OCH₃).

[0099] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 93.0 (C-1), 141.1 (C-3), 101.9 (C-4), 35.2 (C-5), 79.4 (C-6), 58.2 (C-7), 65.9 (C-8), 41.8 (C-9), 58.5 (C-10), 119.9 (C-1'), 112.7 (C-2'), 147.5 (C-3'), 152.1 (C-4'), 115.3 (C-5'), 123.9 (C-6'), 165.6 (C-7'), 97.9 (C-Glc-1'), 73.5 (C-Glc-2'), 76.5 (C-Glc-3'), 70.3 (C-Glc-4'), 77.5 (C-Glc-5'), 61.4 (C-Glc-6'), 55.7 (3-OCH₃)

[0100] 화합물 3: 이소바닐릴 카탈풀 (isovanillyl catalpol; 6-O-(3-히드록시-4-메톡시벤조일)카탈풀)

[0101] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 5.10 (d, J = 9.2 Hz, H-1), 6.42 (dd, J = 6.0 Hz, 1.6, H-3), 4.95 (dd, J = 6.0, 4.0 Hz, H-4), 2.50 (m, H-5), 5.05 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, H-6), 3.72 (d, J = 8.4 Hz, H-7), 2.47 (d, J = 9.2 Hz, H-9), 3.72 (d, J = 13.2 Hz, H-10), 3.92 (d, J = 13.2 Hz, H-10), 7.41 (d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.48 (dd, J = 8.4 Hz, 2.0, H-6'), 4.63 (d, J = 7.6 Hz, H-Glc-1'), 3.05 (d, J = 7.6 Hz, H-Glc-2'), 3.17 (m, H-Glc-3'), 3.02 (d, J = 8.0 Hz, H-Glc-4'), 3.14 (m, H-Glc-5'), 3.43 (dd, J = 13.2 Hz, 6.8, H-Glc-6'), 3.72 (dd, J = 13.2 Hz, 6.0, H-Glc-6'), 3.84 (s, 4-OCH₃).

[0102] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 92.9 (C-1), 141.1 (C-3), 101.7 (C-4), 35.2 (C-5), 79.7 (C-6),

58.2 (C-7), 65.8 (C-8), 41.8 (C-9), 58.4 (C-10), 121.4 (C-1'), 115.8 (C-2'), 146.3 (C-3'), 152.2 (C-4'), 111.5 (C-5'), 121.9 (C-6'), 165.5 (C-7'), 97.8 (C-Glc-1' '), 73.4 (C-Glc-2' '), 76.4 (C-Glc-3' '), 70.3 (C-Glc-4' '), 77.4 (C-Glc-5' '), 61.4 (C-Glc-6' '), 55.7 (4-OCH₃).

[0103] 화합물 4: 6-0-베라트로일 카탈폴 (6-0-veratroyl catalpol; 6-0-(3,4-디메톡시벤조일) 카탈폴)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 5.11 (d, J = 9.02 Hz, H-1), 6.43 (dd, J = 2.0, 6.0 Hz, H-3), 4.97 (d, H-4), 2.59 (m, H-5), 5.09 (d, J = 8.8 Hz, H-6) 3.71 (br s, H-7), 2.47 (m, H-9), 3.71 (d, H-10), 3.92 (d, J = 13.2 Hz, H-10) 7.47 (d, J = 2.4 Hz, H-2') 7.10 (d, J = 8.8 Hz, H-5'), 7.45 (dd, J = 2.0, 8.4 Hz, H-6'), 4.62 (d, J = 7.6 Hz, H-Glc-1''), 3.06 (d, J = 8.0, 7.6 Hz, H-Glc-2''), 3.17 (m, H-Glc-3''), 3.02 (m, H-Glc-4''), 3.14 (m, H-Glc-5''), 3.43 (dd, J = 13.2, 6.4 Hz, H-Glc-6''), 3.72 (d, J = 13.2 Hz, H-Glc-6'').

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 92.9 (C-1), 141.0 (C-3), 101.7 (C-4), 35.1 (C-5), 79.8 (C-6), 58.1 (C-7), 65.8 (C-8), 41.7 (C-9), 58.3 (C-10), 121.3 (C-1'), 111.7 (C-2'), 148.0 (C-3'), 153.2 (C-4'), 111.1 (C-5'), 123.5 (C-6'), 165.4 (C-7'), 55.7 (C-8'), 55.5 (C-9'), 97.8 (C-Glc-1' '), 73.4 (C-Glc-2' '), 76.4 (C-Glc-3' '), 70.2 (C-Glc-4' '), 77.4 (C-Glc-5' '), 61.3 (C-Glc-6' ').

[0106] 실시예 2. 엔도트로핀(Endotrophin; ETP) 억제 효과가 있는 천연 화합물 후보물질 스크리닝

[0107] 암세포의 항암제 내성 메커니즘을 억제할 수 있는 새로운 화합물을 찾기 위하여, 항염증과 관련된 천연 화합물 라이브러리에서 엔도트로핀의 억제제로 작용할 수 있는 후보물질을 스크리닝하였다.

[0108] 구체적으로, 산꼬리풀 분획물(#13) 및 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)의 엔도트로핀과의 길항작용 효과를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 저산소 조건에서 유도되는 엔도트로핀에 의해 매개된 HRE 전사 활성을 저해하는 화합물은 항암제 내성을 억제할 수 있으므로, HRE 전사활성 억제를 통한 엔도트로핀 활성 저해를 확인하였다. 산꼬리풀 분획물 및 화합물 1 내지 4의 HRE 전사활성 저해도를 측정하기 위해, 전달체 (reporter)로서 루시퍼라아제(luciferase)를 이용하는 pGL3-basic 벡터(Promega사)에 인간 VEGFA 유전자에 존재하는 HRE(Hypoxia Responsive Element, 5'-ACGTG-3')가 여섯 번 반복되도록 멀티클로닝사이트(multi-cloning site)에 복제시켜 pGL3-HRE-루시퍼라아제(pGL3-HRE-luciferase) 벡터를 제조하여 사용하였다.

[0109] 48-웰 세포 배양 용기에서 인간 자궁경부암 세포주인 HeLA 세포를 과종하고, 하루가 지난 다음, 라이포펙타민(lipofectamine, ThermoFisher)을 이용하여 100 ng의 pGL3-HRE-루시퍼라아제 벡터와 10 ng의 레닐라(Renilla) 대조군 벡터를 함께 형질전환(transfection)시켰다. 24시간 동안 배양한 후 배지를 교체하고, 4시간 동안 추가 배양한 다음, 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4를 처리하고, 저산소 조건(산소 1%, 질소 94%, 이산화탄소 5%)에서 24시간 배양하였다. NETN 완충용액(NETN buffer)을 이용하여 용해물(lysate)을 얻어 이중-루시퍼라아제 리포터 분석 시스템(Dual-luciferase assay system, Promega사)을 사용하여 저산소 조건에서 유도된 루시퍼라아제의 활성을 측정함으로써 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4의 엔도트로핀 저해 활성을 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0110] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 산꼬리풀 분획물 및 화합물 1 내지 4는 저산소 조건에서 유도되는 엔도트로핀에 의해 매개된 HRE 전사 활성화 저해 효과가 우수함을 확인하였다. 이는 산꼬리풀 분획물 및 화합물 1 내지 4는 항암제 내성과 관련 있는 엔도트로핀을 억제하는 효과가 우수하므로, 엔도트로핀 활성 억제용 또는 항암제 내성 억제용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

[0111] 실험예 1. 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4와 시스플라틴(cisplatin)의 병용 투여에 따른 생체 외 (in vitro) 항암효과의 확인

[0112] 산꼬리풀 분획물(#13) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)와 시스플라틴(cisplatin)의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 작용을 확인하기 위하여, MTT 분석을 수행하였다.

[0113] 구체적으로, 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 산꼬리풀 분획물(#13) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)와 시스플라틴(cisplatin, 0.5 mM)을 처리하였다. 각각 시스플라틴만 단독 처리한 군, 시플라틴과 양성 대조군인 로시글리타존(rosiglitazone, 10 microgram/ml)을 병용 처리한 군, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물(#13, 10 microgram/ml) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107, 10 microgram/ml)를 병용 처리한 군, 산꼬리풀 분획물 (#13) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)만 단독 처리한 군에 해당한다. 도 3은 유방암 세포주에서 산꼬리

풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4와 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과를 측정한 그레프이다.

[0114] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 항암제인 시스플라틴의 단독처리에 비해 산꼬리풀 분획물(#13) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)와 시스플라틴을 병용 처리한 경우, 항암효과가 70%이상 증진됨을 확인하였다. 또한, 산꼬리풀 분획물(#13) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)를 단독 처리한 경우 항암효과가 나타나지 않음을 확인하였다. 이는 산꼬리풀 분획물(#13) 또는 화합물 1 내지 4(#104 내지 #107)는 시스플라틴과 병용 투여되어 항암효과를 증진시키기 위한 항암 보조제로 사용될 수 있음을 의미한다.

실험 예 2. 산꼬리풀 분획물의 생체 외 (in vitro) 항암제 내성 기전 억제 효과의 확인

[0116] 산꼬리풀 분획물(#13)의 항암제 내성 기전 억제 효과를 확인하기 위하여, 웨스턴 블랏을 수행하여 EMT 마커 단백질의 상대적인 발현양을 측정하였다.

[0117] 구체적으로, 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 시스플라틴을 $0.5 \mu\text{M}$ 로 전처리한 후, 양성 대조군인 로시글리타존 (rosiglitazone) 또는 산꼬리풀 분획물(#13)을 $10 \mu\text{M}$ 로 처리하여 24시간 동안 인큐베이션한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) 마커 단백질의 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 도 4는 유방암 세포주에서 산꼬리풀 분획물의 항암제 내성 기전 억제 효과를 측정한 그레프이다.

[0118] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물을 병용 투여한 경우, 시스플라틴을 단독 투여한 경우에 비하여 EMT 마커 단백질의 발현양이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 산꼬리풀 분획물이 항암제 내성 또는 암의 전이 구체적으로, 유방암의 전이와 관련된 EMT 경로를 억제하여 항암제의 항암효과를 증진시키기 위한 항암 보조제로 사용될 수 있음을 의미한다.

실험 예 3. 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4와 시스플라틴(cisplatin)의 병용 투여에 따른 생체 내 (in vivo) 항암효과의 확인

[0120] 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4가 항암제 민감성을 증진시키는지 확인하기 위하여, MMTV-PyMT 유방암 마우스 모델 및 4T1 유방암 전이 모델 실험을 수행하여 시스플라틴과의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정하였다.

[0121] 구체적으로, 유방암 마우스 모델인 MMTV-PyMT 모델에 각각 시스플라틴을 단독 투여, 산꼬리풀 분획물을 단독 투여, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물을 병용 투여, 또는 시스플라틴과 화합물 1 내지 4를 병용투여하여 종양의 성장 및 폐 전이를 형광이미징 (in vivo Xtreme, Bruker) 장비로 모니터링하였다. 상기 유방암 마우스 모델은 정확한 정량을 위해 MMTV-PYMT X MMTV-FP635 double transgenic 마우스를 사용하였다. 도 5는 MMTV-PyMT 유방암 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물과 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그레프이다. 도 6은 MMTV-PyMT 유방암 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물 또는 화합물 1 내지 4와 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그레프이다.

[0122] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 산꼬리풀 분획물을 단독 투여한 경우 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과가 나타나지 않았으나, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물을 병용 투여한 경우, 시스플라틴을 단독 투여한 경우에 비하여 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과가 현저하게 증가함을 확인하였다. 또한, 시스플라틴을 단독으로 반복 투여한 경우 12주차 까지는 항암제에 대한 반응성이 있었으나, 13주차부터는 항암제에 대한 내성이 발달하여 항암제 반응성이 감소함을 알 수 있었다. 반면에 시스플라틴을 산꼬리풀 분획물과 병용하여 반복 투여한 경우 13 주차 이후에서도 항암효과가 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다.

[0123] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물 (#13), 화합물 1(#104), 화합물 2(#105), 또는 화합물 4 (#107)를 병용 투여한 경우, 시스플라틴을 단독 투여한 경우에 비하여 종양 성장 및 폐 전이가 감소함을 확인하였고, 화합물 1 (#104)에서 항암 병용 효과, 특히 전이 억제 효과가 현저하게 우수함을 확인하였다.

[0124] 또한, 마우스에서 기원한 유방암 세포주인 4T1 (5×10^4 cells/100ul PBS)을 Balb/c 마우스의 꼬리로 정맥 주사하여, 유방암 전이모델을 제작하고, 상기 모델에 각각 시스플라틴을 단독 투여, 산꼬리풀 분획물을 단독 투여, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물을 병용투여, 또는 시스플라틴과 화합물 1 내지 4를 병용 투여하여 종양의 성장 및 폐 전이를 형광이미징 (in vivo Xtreme, Bruker) 장비로 모니터링하였다. 시스플라틴(1.5 mg/kg)은 복강투여 (I.P)하였으며, 산꼬리풀 분획물 및 화합물 1 내지 4 (20 mg/kg)는 가루식이에 섞어서 섭취하게 하였다. 도 7은 4T1 유방암 전이 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물과 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그레프이다. 도 8은 4T1 유방암 전이 동물 모델에서 화합물 1

내지 4와 시스플라틴의 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과를 측정한 사진 및 그래프이다.

[0125] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 산꼬리풀 분획물을 단독 투여한 경우 종양 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 시스플라틴과 산꼬리풀 분획물을 병용 투여한 경우, 시스플라틴을 단독 투여한 경우에 비하여 종양 성장 억제 효과가 현저하게 증가함을 확인하였다. 또한, 시스플라틴을 산꼬리풀 분획물과 병용 투여한 경우 시스플라틴을 단독 투여한 경우에 비하여 폐암으로의 전이가 2배 이상 감소하여 유방암 전이 억제 효과가 현저하게 우수함을 확인하였다.

[0126] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 시스플라틴과 화합물 1, 2, 또는 4를 병용 투여한 경우, 시스플라틴을 단독 투여한 경우에 비하여 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제효과가 우수함을 확인하였고, 특히, 화합물 1(#104) 및 화합물 4(#107)에서 유방암의 전이 억제 효과가 3배 이상 향상됨을 확인하였다. 그러나, 화합물 3의 경우 병용 투여에 따른 종양 성장 억제 효과 및 폐암으로의 전이 억제 효과가 나타나지 않음을 확인하였다.

[0127] 이는 산꼬리풀 분획물, 화합물 1, 화합물 2, 또는 화합물 4는 항암제와 병용 투여시 항암제의 항암효과를 증진시키기 위한 항암 보조제로 사용될 수 있으며, 항암제 내성 억제 및 유방암의 전이 억제를 위한 항암 보조제로 사용될 수 있음을 의미한다.

실험 예 4. 산꼬리풀 분획물, 화합물 1, 화합물 4의 생체 내 (in vivo) 항암제 내성 기전 억제 효과 확인

[0129] 산꼬리풀 분획물(#13), 화합물 1(#104), 화합물 4(#107)의 항암제 내성 기전 억제 효과를 확인하기 위하여, quantitative-real time PCR 및 웨스턴블랏을 수행하여 EMT 마커 유전자 및 단백질의 상대적인 발현양을 측정하였다.

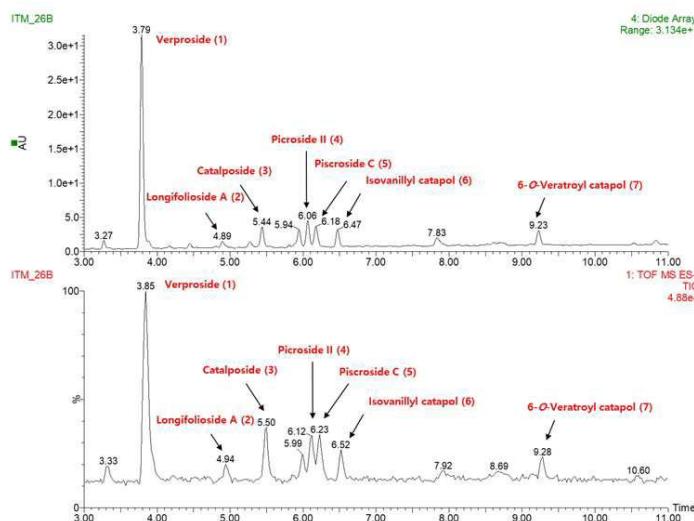
[0130] 구체적으로, 유방암 조직을 상기 유방암 전이 모델 마우스에서 분리하여 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 quantitative-real time PCR을 수행함으로써 각 유전자의 발현양을 측정하였고, 웨스턴 블랏을 수행하여 각 단백질의 발현양을 측정하였다. 도 9는 4T1 유방암 전이 동물 모델에서 산꼬리풀 분획물, 화합물 1, 화합물 4의 항암제 내성 기전 억제 효과를 측정한 그래프이다.

[0131] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, EMT를 일으킨다고 알려져 있는 유전자 (Chd2, Snail, Vim) 등의 발현은 산꼬리풀 분획물, 화합물 1, 화합물 4에 의해 감소되었으며, EMT에 의해 발현이 감소하는 Chd1의 발현은 증가됨을 확인하였다. 또한, 이는 단백질 수준에서도 동일하게 나타남을 웨스턴블랏을 통해 확인하였다.

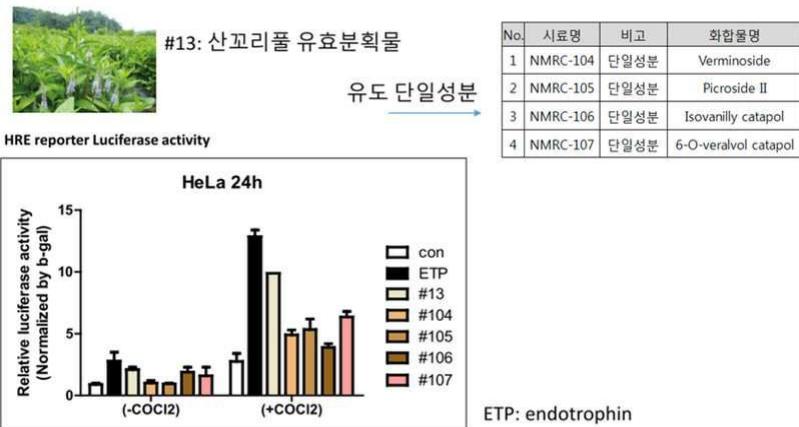
[0132] 이는 산꼬리풀 분획물, 화합물 1, 화합물 4는 항암제 내성과 관련된 EMT 경로를 억제하여 항암제의 항암효과를 증진시키기 위한 항암 보조제로 사용될 수 있음을 의미한다.

도면

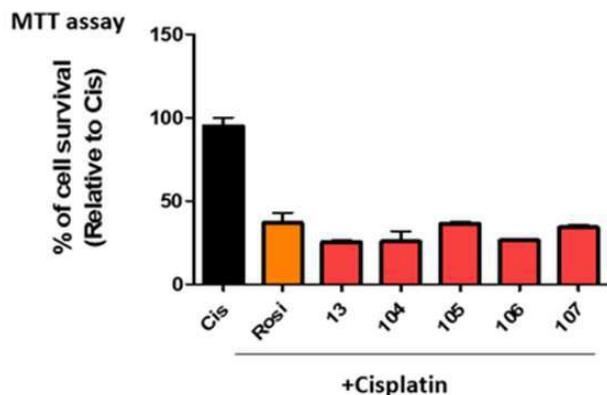
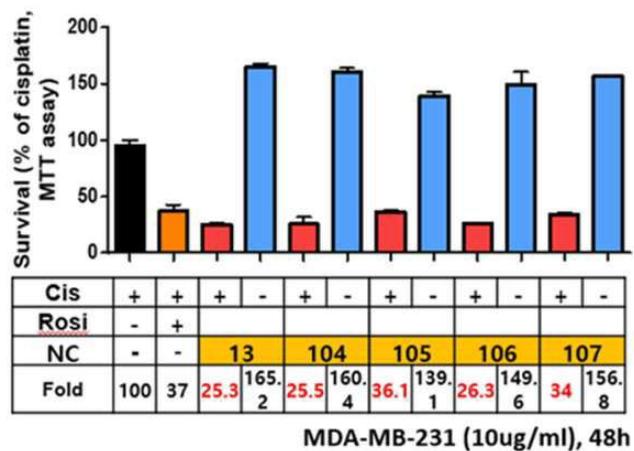
도면1



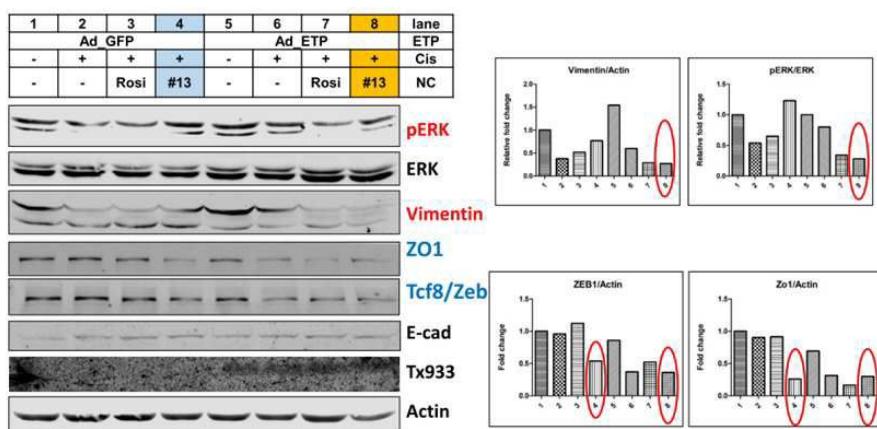
도면2



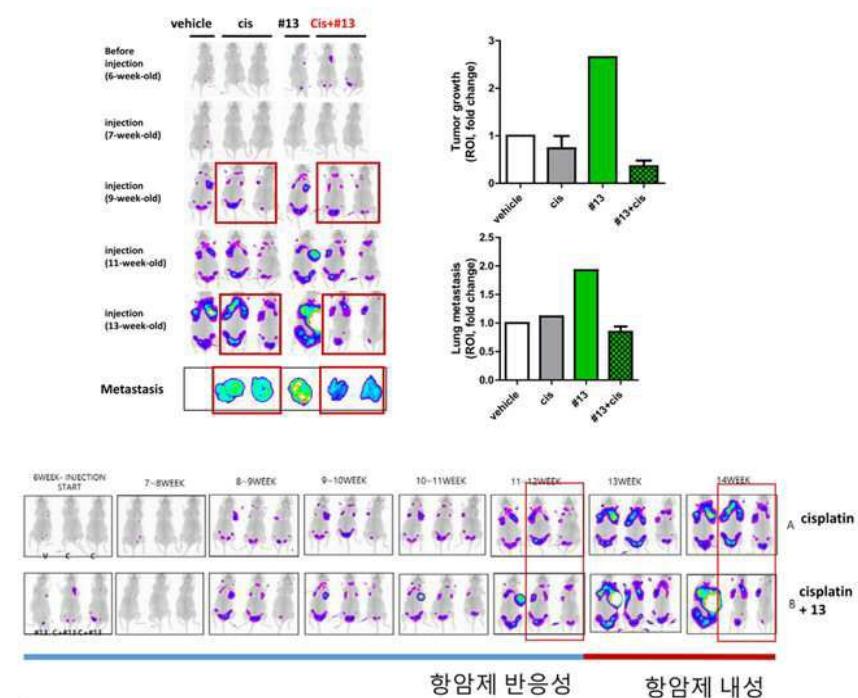
도면3



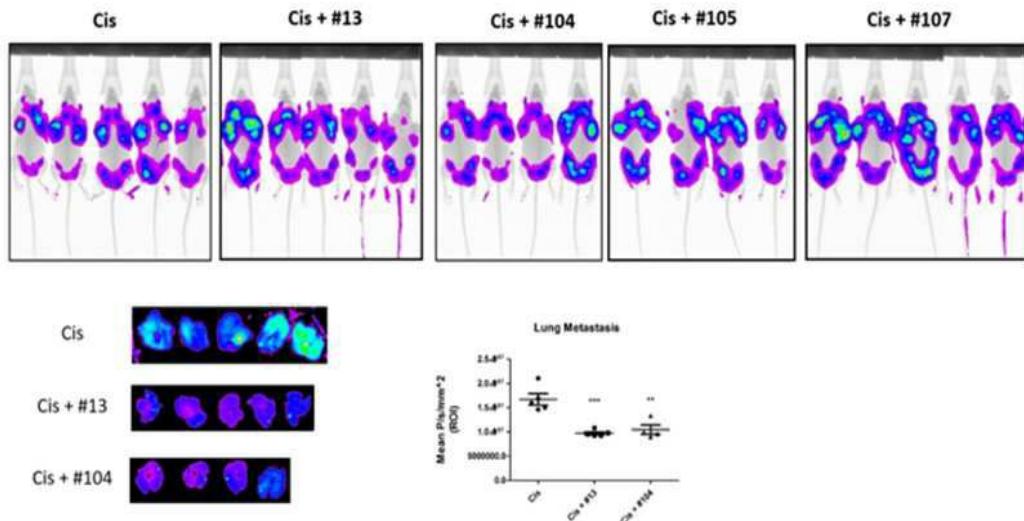
도면4



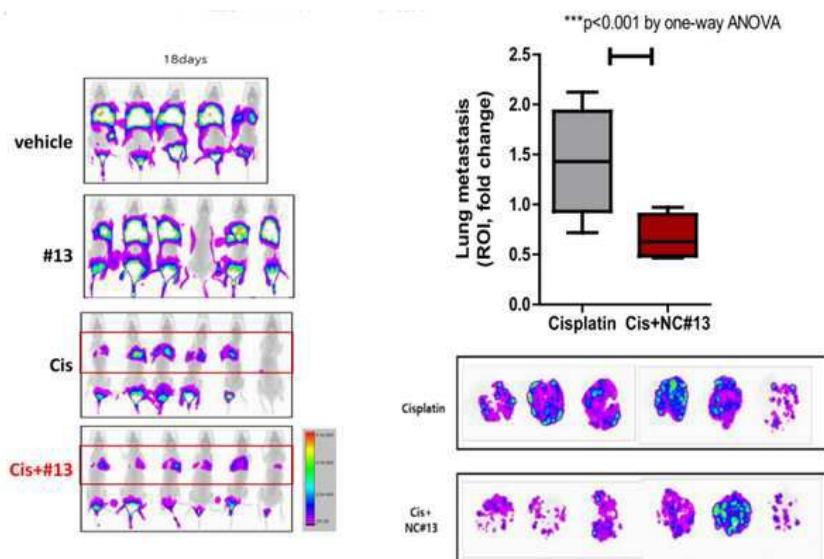
도면5



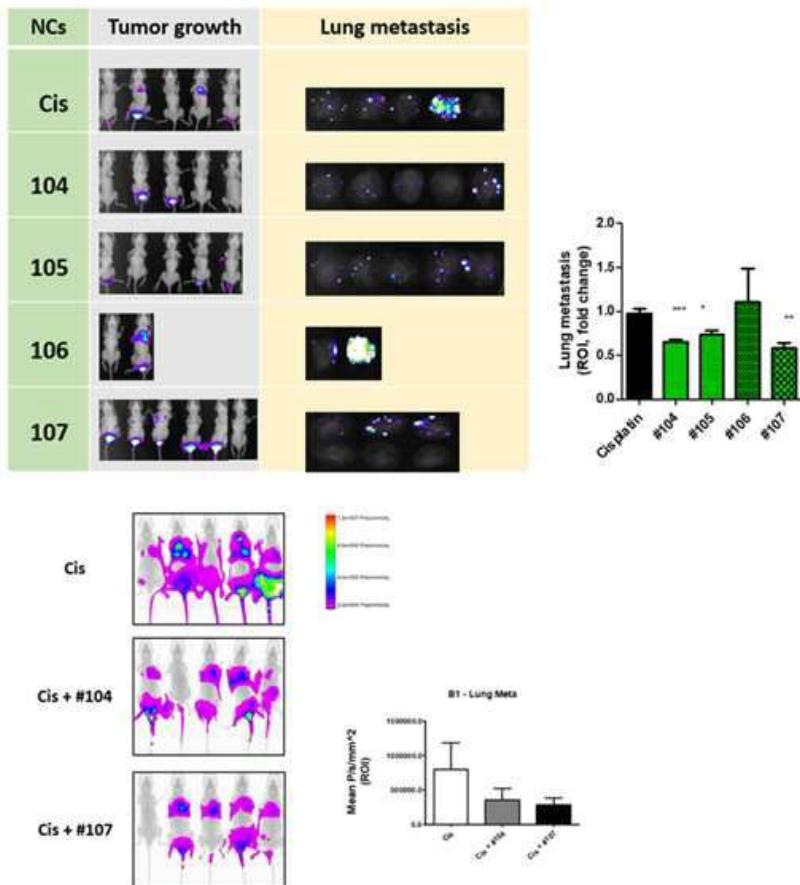
도면6



도면7



도면8



도면9

