(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월19일
(11) 등록번호 10-1667485
(24) 등록일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/35* (2006.01)
A61K 36/282 (2006.01) *A61K 38/19* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 31/35 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0060455
(22) 출원일자 2015년04월29일
심사청구일자 2015년04월29일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Cellular Biochemistry, 2007, vol. 100, pp. 998~1009*
Molecular Carcinogenesis, 2015, vol. 54, pp. 751~760*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
권택규
대구광역시 달서구 송현로7길 41 103동 1002호 (상인동,월촌보성화성타운)
우선민
경상북도 경산시 남매로 235 다동 201호 (중방동,전원주택)
한민애
대구광역시 동구 율하동로15길 52 (율하동)
(74) 대리인
특허법인태백

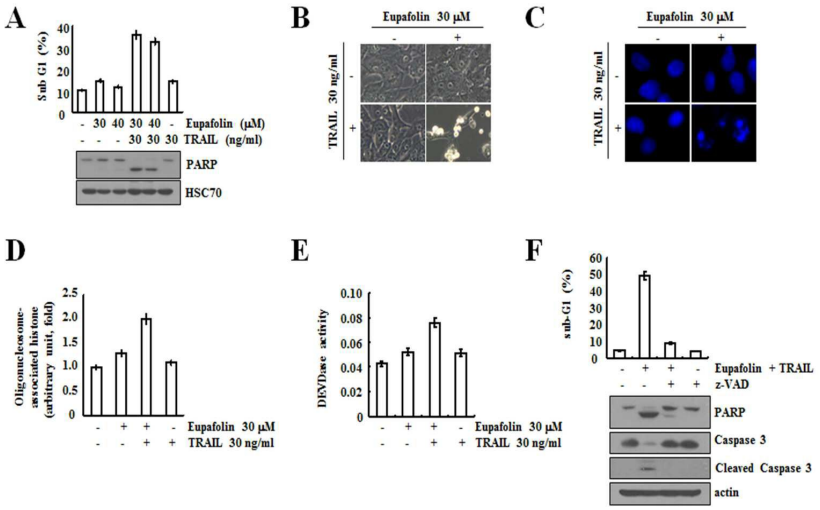
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 **유파폴린과 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 유파폴린(Eupafolin)을 유효성분으로 포함하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물 및 유파폴린과 트레일을 암세포에 병용투여하는 암세포 사멸 증진 방법에 관한 것으로, 유파폴린(Eupafolin)과 트레일을 병용투여한 경우 세포사 유도 단백질인 bim의 발현이 증대되며, Mcl-1의 발현이 감소됨으로써 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되므로 신장암, 전립선암 및 뇌종양암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/282 (2013.01)
A61K 38/191 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A5A2010008
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구지원센터(의과학연구센터) 사업
연구과제명 비만매개질환연구센터
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교
연구기간 2014.05.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하며, 상기 유파폴린은 세포내 세포사 유도 단백질인 빔(Bim)의 발현을 증가시키고 세포 생존과 관련있는 단백질인 골수성 백혈병 세포-1(Mcl-1)의 발현을 감소시켜 트레일에 의한 세포사멸을 증가시키는 것을 특징으로 하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 유파폴린 1 내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

유파폴린(Eupafolin)을 유효성분으로 포함하며, 상기 유파폴린은 세포내 세포사 유도 단백질인 빔(Bim)의 발현을 증가시키고 세포 생존과 관련있는 단백질인 골수성 백혈병 세포-1(Mcl-1)의 발현을 감소시켜 트레일에 의한 세포사멸을 증가시켜 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 신장암 치료 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 6

유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 인간을 제외한 포유류의 신장암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 신장암세포 사멸 증진 방법.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암 효과를 증진시킬 수 있는 트레일 보조용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대한민국 통계청의 분석에 따르면 암은 대한민국의 제 1의 사망원인으로 남성이 31.7%, 여성이 22.5%를 차지하며 전체 인구의 31.7%가 암으로 사망한다.

[0003] 암을 치료하기 위한 방법으로는 수술을 통한 치료, 방사선 치료 그리고 항암제 투여를 통한 치료 등이 있으나 이러한 치료방법들은 부작용이 수반되거나, 암의 진행 정도에 따라 시술이 제한적으로 적용된다. 특히, 대부분의 항암제는 분열이 왕성한 세포의 세포주기를 멈추게 하고 사멸케 하는 메커니즘으로 작동하기 때문에 세포 이

외에도 정상적으로 분열하는 세포를 공격해서 탈모, 식욕부진 그리고 백혈구 감소로 인한 면역력 저하 등의 부작용을 동반한다. 이로 인해 거듭된 연구결과 양적인 측면에서는 그 종류가 늘었지만, 질적인 측면에서는 큰 변화가 없었다.

[0004] 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 표적항암제의 개발이 활발히 일어나고 있으며, 현재까지 18종 이상의 표적항암제가 개발되어 임상에 적용 중이고, 200여종 이상이 임상실험 중이다. 하지만, 이러한 표적항암제는 같은 종류의 암이라도 특정 표적인자가 나타난 환자에게만 효과가 있다는 한계가 있으며, 장기간에 걸쳐서 투여해야 하기 때문에 내성을 유발하는 문제가 있다. 이를 보완하기 위해서 표적치료제를 기존의 강력한 항암제와 병합하는 칵테일 요법과 여러 표적인자를 동시에 공격함으로써, 단시간에 암을 제거하는 단일약물을 사용하는 방법 등이 있는데, 이것 또한 심각한 부작용을 유발할 위험성을 내포하고 있다.

[0005] 트레일(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)은 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor, TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로서 트레일이 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 데쓰 수용체(death receptor)에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려짐에 따라 매우 효과적인 항암 치료제이다.

[0006] 그러나 많은 암세포는 데쓰 수용체의 감소와 세포의 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L)), B-세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL) 또는 골수성 백혈병 세포-1(myeloid cell leukemia- 1, Mcl-1)와 같은 항-세포사멸 단백질을 증가시키는 다양한 매커니즘을 통하여 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.

[0007] 따라서 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 10-2014-0009045호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기 종래의 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암 효과를 증진시킬 수 있는 트레일 보조용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 유파폴린(Eupafolin)을 유효성분으로 포함하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물 및 유파폴린과 트레일을 암세포에 병용투여하는 암세포 사멸 증진 방법에 관한 것으로, 상기 유파폴린(Eupafolin)과 트레일을 암세포에 병용투여한 경우 세포사 유도 단백질인 빔(bim)의 발현이 증가하고, 세포 생존과 관련있는 골수성 백혈병 세포-

1(Myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)의 발현이 감소됨으로써 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되므로 신장암, 전립선암 및 뇌종양암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 트레일에 의해 유도된 사람 신장암 세포의 세포사멸에 관한 유파폴린의 민감성을 확인한 결과이고,

도 2는 유파폴린에 의한 Bim의 발현의 증가를 확인한 결과이고,

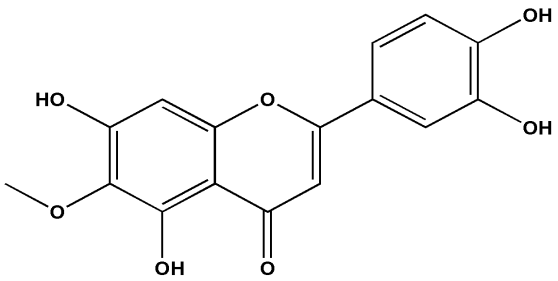
도 3은 유파폴린에 의한 Mcl-1의 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 발명자들은 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 유파폴린(Eupafolin)과 트레일을 신장암 세포에 병용 투여한 경우 세포사 유도 단백질인 빔(Bim)의 발현이 증대되며, 세포 생존과 관련있는 골수성 백혈병 세포-1(Myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)의 발현이 감소함으로써 트레일에 의한 신장암 세포의 세포사멸이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 상기 유파폴린(Eupafolin)은 하기 화학식 1로 표시되며 사자발쑥(Sajabalssuk)으로 알려진 쑥에서 발견된다. 유파폴린은 항산화 효과, 항균 작용 등의 효과를 가지고 있어 염증을 비롯한 질환의 치료에 대해 한의학적으로 사용되었다.

화학식 1

[0017] 

[0018] 따라서, 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 따르면, 도 1과 같이 신장암 세포인 Caki 세포에 유파폴린과 트레일을 병용처리한 경우 세포사멸이 증가하며, 항암제로 인한 DNA 손상의 회복을 도와 항암제 효과를 감소시키는 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 분열이 증가되는 것을 확인할 수 있다.

[0020] 더불어 Caki 세포의 모양 변화 및 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편의 손상을 확인할 수 있으며, 세포사멸을 유도하는 카스파제-3(caspase-3)의 활성이 증가된 것을 확인할 수 있다. 따라서 상기 결과로부터 유파폴린은 Caki 세포에서 트레일에 의해 유도되는 세포사멸의 민감성을 증가시키는 것이 확인되었다.

[0021] 더불어 유파폴린은 세포내 세포사멸을 촉진시키는 Bim의 발현을 증가시키고, 세포의 생존과 관련된 Mcl-1의 발현을 감소시켜 트레일에 의한 세포사멸을 증가시킬 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물은 유파폴린 1 내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있다.

[0023] 상기 암은 신장암, 전립선암 및 뇌종양암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0024] 더불어 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀

룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0028] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[0029] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 유파폴린 0.4 mg/m^2 /day 내지 10.0 mg/m^2 /day 및 트레일 0.05 mg/day 내지 10.0 mg/day의 양을 주 2회 1 내지 4주기로 투여할 수 있다.

[0031] 또한, 이러한 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0032] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물을 구성하는 유파폴린 및 트레일은 이미 다른 의학적 용도에 처방되고 있어 안전성이 확보되어 있는 물질이다.

[0033] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0034] 또한 본 발명은 유파폴린(Eupafolin)과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[0035] 상기 암은 신장암, 전립선암 및 뇌종양암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0039] **<참고예 1> 시약 및 유파폴린 준비**

[0040] PCR 프라이머는 마크로젠(Macrogen Inc, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 다른 화학물질은 시그마(Sigma, St. Louis, MO)에서 구입하였다. 항-카스파제-3(anti-caspase-3), 항-절단된 카스파제-3(anti-cleaved caspase-3), 항-Mcl-1, 항-B-세포 림포마 엑스트라 라지(anti-B-cell lymphoma-extra large, anti-Bcl-xL), 항-퓨마(anti-PUMA), 항-폴리(ADP-리보오스)중합효소(anti-Poly(ADP-ribose) polymerase, anti-PARP) 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

[0041] 항-Bim 항체는 밀리포어 코퍼레이션(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)으로부터, 항-액틴 항체는 Sigma (St. Louis, MO)로부터 각각 구입하였다.

[0042] 또한 재조합 사람 트레일(TRAIL)은 코마 바이오테크(KOMA Biotech, Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

[0043] 유파폴린은 인도파인(Indofine Chemical Co., Belle Mead, NJ)에서 구입하여 사용하였다.

[0045] **<실험예 1> 실험 방법**

[0046] **1. 세포 준비**

[0047] **1) 세포배양**

[0048] 신장암 세포인 Caki 세포를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

[0049] 상기 세포는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 20mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES) 버퍼 및 100㎍/ml 겐타마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다.

[0050] **2) 유파폴린(Eupafolin) 처리**

[0051] 유파폴린은 DMSO에 녹여 25 mM로 녹여서 세포 배양액에 각 실험별 사용 농도로 직접 처리하였다.

[0053] **2. 웨스턴 블롯 분석**

[0054] 웨스턴 블롯 실험을 위해, Caki 세포를 차가운 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척하였다. 그런 후 100μM 페닐메틸설포닐 플로라이드(phenylmethanesulfonylfluoride, PMSF), 10μg/ml 류펩틴(leupeptin), 10μg/ml 펩스타틴(pepstatin) 및 2 mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)로 구성된 단백질분해효소(protease) 억제제를 첨가한 50mM 트리스-HCl(tris-HCL, pH 7.4), 1% 노닐 페녹시폴리에톡시에탄올-40(nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40, NP-40), 0.25% Na-데옥시콜레이트(deoxycholate), 150mM NaCl, 1mM Na_3VO_4 및 1mM NaF로 완충된 방사선 면역 침전(Radioimmunoprecipitation, RIPA) 버퍼를 사용하여 아이스 위에서 용해하였다.

[0055] 용해물을 4℃에서 10.000xg의 속도로 10분간 원심분리한 후 상등액을 수집하였다.

[0056] 웨스턴 블롯 분석은 웨스턴 블롯팅 키트 제조사의 설명서에 따라 수행하였으며, 단백질은 소듐 도데실설파이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)으로 분리하고 임모빌론-P(immobilon-P) 막으로 옮겼다. 그 후 향상된 화학 발광 플러스 웨스턴 블롯팅 검출 시스템(enhanced chemiluminescence plus western blotting detection system)을 이용하여 특이적 단백질을 검출하였다.

[0058] **3. 유동세포계수분석(Flow cytometry analysis)**

[0059] 유동세포계수 분석을 위해, 100μl PBS를 세포에 첨가하여 재부유시키고 95% 에탄올 200μl를 첨가하여 세포를 와류시킨 후 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 12.5μg 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase)가 포함된 pH 8.4의 1.12% 시트르산나트륨(sodium citrate) 용액 250μl을 첨가하여 재부유시키고 37℃에서 30분간 추가로 인큐베이션하였다.

[0060] 그 후 세포에 50μg/ml 농도의 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI) 용액 250μl를 첨가하고 실온에서 30분간 세포 DNA를 염색시켰다. 염색된 세포는 유동세포계수분석기(Fluorescence activated cell sorter, FACS)를 통하여 형광 활성화된 세포를 분류하여 상대적인 DNA 함량을 분석하였으며, 적색 형광 강도를 통하여 확인할 수 있었다.

[0062] **4. 4', 6'-다이아미디노-2-페닐인돌 염색(4', 6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, DAPI)을 이용한 핵 응축과 분열 확인**

[0063] 세포의 핵을 확인하기 위해, 유리 슬라이드 위에서 세포를 1% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 실온에서 30분간 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 300nM 4',6'-다이아미디노-2-페닐인돌 용액(Roche, Mannheim, Germany)을 첨가하여 추가로 5분간 고정하고 핵을 염색한 후 세포를 형광 현미경으로 확인하였다.

[0065] **5. DNA 단편화 분석**

[0066] 세포사멸 확인 효소면역분석법 플러스 키트(ELISA plus kit, Boerhringer Mannheim; Indianapolis, IN)를 이용하여 유파폴린을 단독처리한 세포, 트레일을 단독처리한 세포 및 유파폴린과 트레일을 병용 처리한 세포의 핵내 단편화된 DNA을 확인하여 세포사멸 정도를 확인하였다.

[0067] 각각의 배양 플레이트를 10분 동안 200xg의 속도로 원심분리하고 상등액을 제거한 후 세포 펠렛을 30분 동안 용해시켰다. 세포 용해물을 200xg의 속도로 10분간 원심분리하고 세포질 히스톤 관련 DNA 단편이 포함된 상등액을 수집하였으며, 수집된 상등액에 고정화된 항-히스톤 항체를 넣고 인큐베이션하였다.

[0068] 상기 반응물에 퍼옥시다제 기질을 첨가하여 5분간 인큐베이션한 후 분광광도계를 이용하여 405 및 490 nm로 측정하였다.

[0070] **6. Asp-Glu-Val-Asp-ase (DEVDase)활성 분석**

[0071] DEVDase 활성 분석을 위해, 유파폴린 처리 세포군과 비처리 세포군에 트레일을 투여하고 각각의 실험군의 세포를 용해시켰다. 세포용해물 20㎍을 Asp-Glu-Val-Asp-크로모포어-p-니트로아닐라이드(Asp-Glu-Val-Asp-chromophore-p-nitroanilid, DVAD-pNA) 5㎛M이 포함된 반응 버퍼(1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol) 100㎕에 넣고 96-well 마이크로미터 플레이트에서 37℃로 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 분광광도계를 이용하여 405nm 흡광도를 측정하였다.

[0073] **7. 역전사 중합효소 연쇄 반응(Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)**

[0074] 트라이졸(TriZol)시약(Life Technologies, Gaithersburg, MD)을 사용하여 전체 RNA를 분리하고 M-MLV 역전사효소(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. 사람 Bim, Mcl-1 및 액틴(actin)을 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머가 사용되었다. Bim (sense) 5′ -ATG GCA AAG CAA CCT TCT GA-3′ (서열번호 1) 및 (antisense) 5′ -CTG TCT GTG TCA AAA GAG-3′ (서열번호2) ; Mcl-1 (sense) 5′ -GCG ACT GGC AAA GCT TGG CCT CAA-3′ (서열번호 3) 와 (antisense) 5′ - GTT ACA GCT TGG ATC CCA ACT GCA-3′ (서열번호 4); 및 actin (sense) 5′ - GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC -3′ (서열번호 5)와 (anti-sense) 5′ -CGA TTT CCC GCT CGG CCG TGG -3′ (서열번호 6).

[0075] PCR 증폭조건으로 94℃에서 3분간 진행 후, 액틴은 17 싸이클, Bim 및 Mcl-1은 23 싸이클로 94℃, 45초의 조건으로 진행하였다. 또한 58℃에서 45초, 72℃에서 10분간 진행하여 증폭하였다.

[0076] 증폭물은 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)로 전기영동하여 분리하고 UV로 확인하였다.

[0078] **8. Bim siRNA 형질 주입**

[0079] 사람 녹색 형광 단백질(green fluoresence protein, GFP) siRNA를 대조군으로 사용하였고, Bim siRNA를 산타크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. 이들 siRNA는 RNAimax 시약을 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 Caki 세포에 형질 주입하였다.

[0081] **10. pFLAG-CMV-4/Mcl-1 플라스미드의 형질주입**

[0082] 사람 Mcl-1발현 벡터를 이미 공지된 방법(Um HJ, Kwon TK. J Pineal Res 2010, 49(3): 283-290.)을 따라 합성하였다.

[0083] pFLAG-CMV-4/Mcl-1 플라스미드를 리포펙트아민(LipofectAMINE, Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 Caki 세포에 안정적으로 형질주입하였다.

[0084] 48시간 인큐베이션 후 형질전환된 세포를 선별하여 700㎍/ml G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된 세포 배양 배지에서 배양하고, 2 내지 3주 후 독립적인 단일 클론을 무작위로 분리하였다. 각각의 개별 클론을 각기 별도의 플레이트에 분주하고 클론 확장 후 각각의 독립적인 클론의 세포에서 Mcl-1의 발현을 면역블롯팅을 통하여 확인하였다.

[0086] **<실시예 1> 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 대한 유파폴린 민감성 확인**

[0087] 유파폴린이 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 어떠한 효과를 나타내는지 사람 신장암세포인 Caki 세포를 이용하여 확인하였다.

[0088] 먼저, 유파폴린과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸 유도를 확인하기 위해, FACS분석을 이용한 DNA 함량 측정과 PARP의 분열, caspase-3 기질 확인을 위한 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0089] Caki 세포에 트레일 50ng/ml을 처리한 후 30 또는 40㎛M의 유파폴린을 24시간 동안 처리한 세포군 또는 비 처리 세포군의 세포사멸 수준을 유동세포 분석기(FACS)의 Sub-G1 분획 측정을 통하여 확인하였다. 상기 Sub-G1은 세포 주기 중 G0/G1 주기 앞의 데브리스(Debris)에 해당되며, 이 주기에 속해있는 세포는 세포사멸을 겪는다고 알려져 있다.

[0090] 그 결과, 도 1A와 같이 유파폴린 또는 트레일을 단독처리한 경우 세포사멸의 효과가 나타나지 않았으나, 유파폴린과 트레일 병용 처리의 경우 유의한 세포사멸 증가가 확인되었으며, 웨스턴 블롯 결과에서도 PARP 분열 증가를 확인할 수 있었다.

[0091] 또한 Caki 세포에 30㎛M의 유파폴린 처리 또는 비 처리 조건에 50ng/ml 트레일을 24시간 처리 후 4',6'-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 염색을 통하여 핵의 응축과 분열을 확인하였다.

[0092] 그 결과 도 1B 내지 1D를 참고하면, 유파폴린과 트레일 병용처리에 따른 세포의 모양 변화 및 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편의 손상을 확인할 수 있었다.

[0093] 상기 실험예 1 중 6과 같이 DEVDase를 이용한 카스파제-3의 활성을 분석한 결과, 도 1E와 같이 유파폴린과 트레일 병용처리는 카스파제-3 활성을 증가시킨 것을 확인하였다. 반면, Caki 세포에 20μM의 카스파제 억제제인 z-VAD-fmk(z-VAD) 처리 또는 비 처리 조건에서 30μM 유파폴린과 50 ng/ml 트레일을 24시간 병용 처리한 후 유동세포분석기(FACS)를 이용하여 측정한 Sub-G1 분획 결과와 PARP 및 액틴의 단백질 발현 수준을 나타낸 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 도 1F의 그래프와 같이 PARP의 분절 및 caspase 분절이 유의하게 억제되었고 Sub-G1 분획이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

[0094] 상기 결과로부터 유파폴린은 Caki 세포에서 트레일에 의해 유도되는 세포사멸의 민감성을 증가시키는 것이 확인되었다.

[0096] **<실시예 2> 유파폴린에 의한 Bim의 발현 증가 확인**

[0097] 유파폴린에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘을 확인하기 위해, Caki 세포에 10, 20, 또는 30μM 농도의 유파폴린을 24시간 동안 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2, Bim, Puma의 발현 정도를 확인하였다.

[0098] 그 결과 도 2A와 같이, 유파폴린 처리 시 Bim의 발현 증가 및 Mcl-1의 발현에 유의한 감소가 확인되었으나 다른 단백질에서는 변화가 나타나지 않았다.

[0099] 유파폴린에 의한 Bim의 발현 증가를 확인하기 위하여 농도별, 시간별대로 확인한 결과 도 2B와 같이 10μM 농도의 유파폴린부터 농도 의존적으로 Bim의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 30μM 농도의 유파폴린을 처리 시 6시간부터 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 PCR 분석결과, 유파폴린을 처리한 Caki 세포의 Bim의 mRNA 발현에는 변화가 나타나지 않았다.

[0100] 유파폴린과 트레일 병용처리에 의한 세포사멸에 있어서 Bim의 기능적 역할을 확인하기 위해, Bim의 siRNA를 형질 주입하여 발현을 억제한 후 30μM 유파폴린 처리 또는 비 처리 조건하에 50 ng/ml 트레일을 24시간 동안 처리하였다.

[0101] 그 결과, 도 2C 와 같이 대조군인 control siRNA를 형질 주입한 곳에서는 유파폴린과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 증가하고, PARP 분열 유도가 확인되었으나, Bim siRNA를 형질 주입한 경우에서는 세포사멸이 유도되지 않았다.

[0102] 상기 결과로부터 bim의 발현 감소는 유파폴린의 트레일 민감성 증가에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.

[0104] **<실시예 3> 유파폴린에 의한 Mcl-1의 감소 확인**

[0105] 상기 도 2A와 같이 유파폴린에 의한 Mcl-1의 발현 감소를 확인하기 위해, Caki 세포에 유파폴린을 농도별, 혹은 30μM을 처리한 후 시간대별로 확인하였다.

[0106] 그 결과 도 3A와 같이, 유파폴린은 10μM의 농도부터 Mcl-1의 발현을 감소시키는 것을 확인하였고, 30μM의 유파폴린을 처리한 경우 6시간 이내에 Mcl-1의 발현이 억제되었으며, 24시간까지 Mcl-1의 발현이 점차 감소되는 것을 확인하였다. 그러나 PCR 분석결과, 유파폴린을 처리한 Caki 세포의 Mcl-1의 mRNA 발현에는 변화가 나타나지 않았다.

[0107] 유파폴린과 트레일 병용처리에 의한 세포사멸에 있어서 Mcl-1의 기능적 역할을 확인하기 위해, Mcl-1이 과발현된 Caki/Mcl-1 세포에 30μM 유파폴린 처리 또는 비 처리 조건하에 50 ng/ml 트레일을 24시간 동안 처리하였다.

[0108] 그 결과, 도 3B와 같이 대조군인 Caki/vector 세포에서는 유파폴린과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 증가하였으며, PARP 분열 유도가 확인되었으나, Caki/Mcl-1 세포에서는 유파폴린과 트레일 병용처리에 따른 세포사멸이 유도되지 않았다.

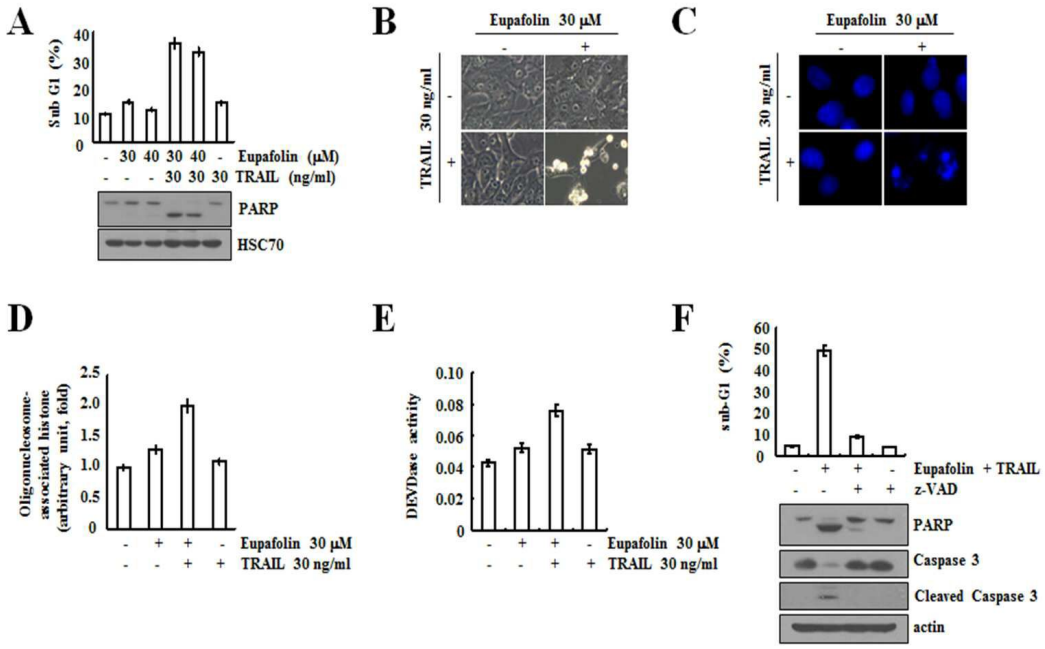
[0109] 상기 결과로부터 유파폴린에 의한 Mcl-1의 발현 감소는 트레일 민감성 증가에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.

[0111] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이

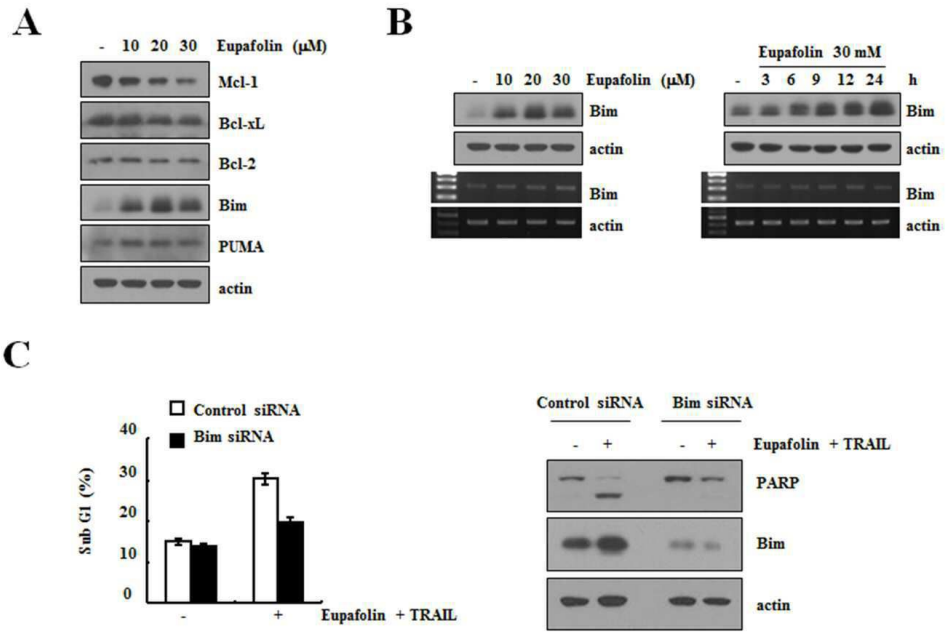
다.

도면

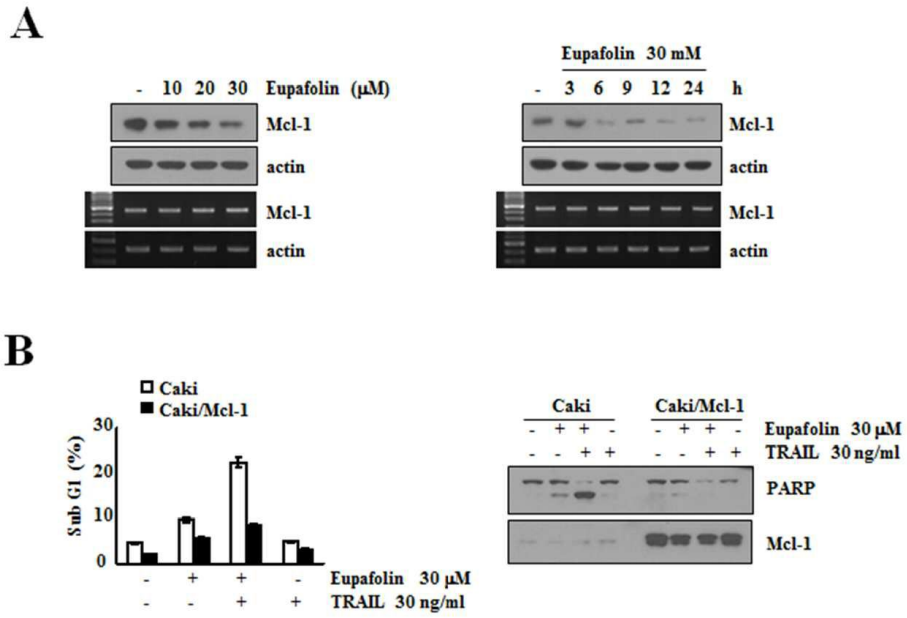
도면1


A
Sub G1 (%)
Eupafolin (μM)
TRAIL (ng/ml)
PARP
HSC70
B
Eupafolin 30 μM
TRAIL 30 ng/ml
C
Eupafolin 30 μM
TRAIL 30 ng/ml
D
Oligonucleosome-associated histone (arbitrary unit, fold)
Eupafolin 30 μM
TRAIL 30 ng/ml
E
DEVDase activity
Eupafolin 30 μM
TRAIL 30 ng/ml
F
sub-G1 (%)
Eupafolin + TRAIL
z-VAD
PARP
Caspase 3
Cleaved Caspase 3
actin

도면2


A
Eupafolin (μM)
Mcl-1
Bcl-xL
Bcl-2
Bim
PUMA
actin
B
Eupafolin (μM)
Eupafolin 30 mM
h
Bim
actin
C
Control siRNA
Bim siRNA
Sub G1 (%)
Eupafolin + TRAIL
PARP
Bim
actin

도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating cancer comprising eupafolin and TRAIL

<130> ADP-2015-0122

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bim sense primer

<400> 1

atggcaaagc aaccttctga 20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Bim antisense primer

<400> 2

ctgtctgtgt caaaagag 18

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mcl-1 sense primer

<400> 3

gcgactggca aagcttggcc tcaa 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mcl-1 antisense primer

<400> 4

gttacagctt ggatcccaac tgca 24

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> actin sense primer

<400> 5

ggcatcgtca ccaactggga c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> actin antisense primer

<400> 6

cgatttcccg ctcggccgtg g 21