



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0132259
(43) 공개일자 2016년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/506 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/506 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0064586

(22) 출원일자 2015년05월08일

심사청구일자 2015년05월08일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

권택규

대구광역시 달서구 송현로7길 41 103동 1002호
(상인동, 월촌보성화성타운)

민경진

경상북도 칠곡군 왜관읍 평장3길 47 202동 1201호
(왜관리, 대동다숲아파트)

서보람

경상북도 경산시 경안로56길 14 303동 505호 (중방동, 중방e편한세상3단지)

(74) 대리인

특허법인태백

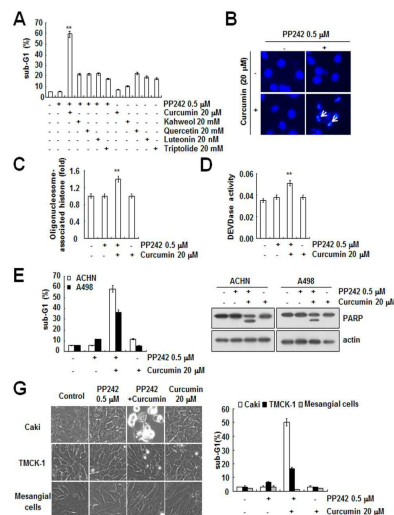
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 m-TOR 복합체 1,2 억제제 및 커큐민을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제에서 선택된 하나 이상과 커큐민을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것으로, m-TOR 복합체 1, 2 억제제인 PP242와 커큐민을 다양한 신장암 세포에 병용처리할 시 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편이 손상되고, 카스파제-3(caspase-3)의 활성이 증가되며 세포사멸이 증가되므로, 신장암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/12 (2013.01)

A61K 31/519 (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

명세서

청구범위

청구항 1

m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 및 커큐민(curcumin)을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)는 PP242, INK128, OSI-027, AZD8055, AZD2014 및 WYE-132으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 50 내지 99 중량% 및 커큐민(curcumin) 1 내지 50 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 및 커큐민(curcumin)을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)는 PP242, INK128, OSI-027, AZD8055, AZD2014 및 WYE-132으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 신장암 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신장암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신장은 혈액을 여과하여 소변을 생성함으로써 생체 내의 노폐물을 체외로 배설하는 역할을 하는 중요한 비뇨기계 기관이다. 또한, 동시에 혈압을 조절하는 안지오텐신, 적혈구 조혈 인자인 에리스로포이에틴 등의 호르몬을 생산하는 중요한 내분비 기관이기도 하다. 신장에 발생하는 종양에는, 성인에게서 발생하는 신세포암(kindney cell cancer)과 소아에게서 발생하는 윌름스(Wilms) 종양, 및 보기 드문 종양으로서 육종(sarcoma)이 있지만, 이하에서는 가장 발생률이 높은 악성 종양인 신세포암을 신장암이라고 부른다. 신장암의 발생 빈도는 인구 10만명당 2.5명 정도이고, 남녀비는 2 내지 3:1로 남성에게 많은 경향이 있다. 비뇨기계 악성 종양 중에서는, 전립선암, 방광암에 이어서 많은 종양이다.

[0003] 신장암의 위험 인자로서는 유전학적 요인도 알려져 있지만, 일반적으로는 흡연, 과도한 지방 섭취 등을 들 수 있다. 또한, 장기간 투석을 받고 있는 환자에게서 상기 종양의 발생률이 높은 것으로 알려져 있다. 신장암에서는 종양의 최대 직경이 5cm 이하인 경우에는 어떠한 자각 증상이 있는 경우가 드물고, 검진시의 CT 스캔 등에 의해 발견되는 경우가 많다. 크기가 큰 종양에서는 혈뇨, 복부 종양, 동통 등이 나타날 수 있다. 또한, 전신적

증상으로서 발열, 체중 감소, 빈혈 등을 초래하는 경우가 있으며, 드물게는 내분비 인자에 의해 적혈구 증가증이나 고혈압, 고칼슘혈증 등이 발생하는 경우가 있다. 한편, 신장암의 하대정맥 내로의 진전에 의해 복부 체표의 정맥의 노장(怒張)이나 정소 정맥류가 발생하는 경우가 있다. 신장암의 약 2할은, 폐나 골 전이로부터 발견된다. 신장암에서는 정맥 중에 종양이 확산되는 경향이 강하고, 다른 장기로의 전이가 발생하기 쉽다.

[0004] 신장암의 주 치료법은 외과 요법이다. 병의 시기에 관계없이, 적출할 수 있는 경우에는 신장의 적출, 또는 신장의 부분적 적출이 가장 일반적이며, 만일 전이가 있다 하더라도 신장의 외과적 적출이 고려되는 경우가 있다. 외과 요법 이외의 방법으로서 신동맥의 동맥색전술이 있으며, 이 방법은 적출이 불가능한 경우나, 큰 종양을 적출하는 경우에, 수술에 앞서서 시행되는 경우가 있다.

[0005] 그러나 외과요법에 의해 신장을 적출하는 경우, 남은 신장에 부담이 가해질 수 있다.

[0006] 따라서 신장암을 보다 효과적으로 치료하기 위한 새로운 약물의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2012-0122405호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 종래의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

[0009] 또한 본 발명은 신장암 예방 또는 개선용 건강식품을 제공하는 데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 및 커큐민(curcumin)을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 및 커큐민(curcumin)을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제에서 선택된 하나 이상과 커큐민을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것으로, m-Tor 복합체 1, 2 억제제인 PP242와 커큐민을 다양한 신장암 세포에 병용처리할 시 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편이 손상되고, 카스파제-3(caspase-3)의 활성이 증가되며 세포사멸이 증가되므로, 신장암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 사람 신장암세포인 Caki 세포에서 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸 증진 효과를 확인한 결과이고,

도 2는 이종이식(xenograft) 동물 모델에서 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 종양 형성 억제 효과를 확인한 결과이고,

도 3은 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸과 Akt의 관련성을 확인한 결과이고,

도 4는 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸과 릭터(Rictor)의 관련성을 확인한 결과이고,

도 5는 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸과 자가포식(autophagy)의 관련성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 하기에서 보다 상세하게 설명한다.
- [0015] 본 발명의 발명자들은 신장암에 효과적인 치료법에 대하여 연구하던 중, m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)인 PP242와 커큐민(curcumin)을 신장암 세포에 병용처리한 경우 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편이 손상되고, 카스파제-3(caspase-3)의 활성이 증가되며 세포사멸이 증가되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 상기 포유류라파마이신표적(mammalian target of rapamycin, m-TOR)는 영양상태, 세포 에너지 수준, 산소 수준과 분열촉진 신호전달을 점검함으로써 세포 성장과 증식의 조절에서 핵심적인 역할을 한다. m-TOR는 m-TOR 복합체 1(m-TOR Complex 1, m-TORC1)와 m-TOR 복합체 2(mTOR Complex 2, m-TORC2)로서 2개의 복합체로 구성되어 있다. m-TORC1은 포스포이노시타이드3-효소(phosphoinositide 3 - kinase, PI3K), 포스포이노시타이드-의존 효소-1(phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1)와 Akt에 의한 신호전달을 통해 활성화되고, 단백질 합성 조절자인 S6K1와 4E-BP1의 인산화를 촉진시켜 신진대사를 조절함으로써 세포의 성장과 증식을 조절하는 핵심적인 기능을 하는 것으로 보고되고 있다. m-TORC2는 액틴 세포 골격과 Akt 활성화의 중요한 조절자로 작용하여 암세포의 생존과 증식에 핵심적인 역할을 하며 많은 암세포의 생존과 증식에 핵심적인 역할을 하며 많은 암세포에서 과활성화되어 있다.
- [0017] 상기 커큐민(curcumin)은 동인도산의 생강과에 속하는 식물인 울금(*Curcuma longa* Linn, Zingiberaceae)의 뿌리에서 추출된 폴리페놀 성분의 노란색 향신료로 심황(turmeric)의 커큐미노이드(curcuminoid)이다. 항종양, 항산화, 항아밀로이드와 항염증작용을 가지고 있으며 산화에 의한 DNA 손상과 지질과산화를 억제하고 자유라디칼을 소거할 수 있다고 알려져 있다.
- [0018] 따라서 본 발명은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 및 커큐민(curcumin)을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)는 PP242, INK128, OSI-027, AZD8055, AZD2014 및 WYE-132으로 이루어진 군에서 선택되며, 보다 바람직하게는 PP242이지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에 따른 약학 조성물은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 50 내지 99 중량% 및 커큐민(curcumin) 1 내지 50 중량%를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0024] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 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.
- [0025] 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.
- [0026] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, PP242 0.4 mg/m² /day 내지 10.0 mg/m² /day 및 커큐민 0.4 mg/m² /day 내지 10.0 mg/m² /day의 양을 주 2회 1 내지 4주기로 투여할 수 있다.
- [0027] 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.

- [0028] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물을 구성하는 PP242 및 커큐민은 이미 다른 의학적 용도에 처방되고 있어 안전성이 확보되어 있는 물질이다.
- [0029] 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.
- [0030] 또한 본 발명은 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)에서 선택된 하나 이상 및 커큐민(curcumin)을 유효성분으로 포함하는 신장암 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0031] 상기 m-TOR 복합체 1, 2 억제제(m-TOR complex 1,2 inhibitor)는 PP242, INK128, OSI-027, AZD8055, AZD2014 및 WYE-132으로 이루어진 군에서 선택되며, 보다 바람직하게는 PP242이지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 PP242 및 커큐민 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0033] 상기 건강식품에 함유된 PP242 및 커큐민의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0034] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 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 등을 들 수 있다.
- [0036] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0038] <참고예 1> 항체, 커큐민 및 PP242 준비
- [0039] 항-포스포-S6K(anti-phospho-S6K), 항-S6K(anti-S6K), 항-포스포-Akt(anti-phospho-Akt), 항-Akt(anti-Akt), 항-랩터(anti-Raptor), 항-릭터(anti-Rictor), 항-P62(anti-P62), 항-경쇄 3(anti-light chain 3, anti-LC3) 및 항-폴리(ADP-리보오스)중합효소(anti-Poly(ADP-Ribose)Polymerase, anti-PARP) 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.
- [0040] 항-액틴(anti-actin) 항체와 다른 화학물질은 시그마(Sigma, Louis, MO)에서 구입하였고, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine, NAC)과 트록스(Trolox)는 칼바이오오켄(calbiochem, San diego, CA)에서 구입하였으며, 는 시그마(Sigma, St. Louis, MO)로부터 각각 구입하였다.
- [0041] PP242는 셀렉캠 (Selleckchem, Houston, TX)으로부터 구입하여 사용하였고, 커큐민은 바이오몰 (Biomol, Plymouth Meeting, PA)으로부터 구입하여 사용하였다.
- [0043] <실험예 1> 실험 방법
- [0044] 1. 세포 준비
- [0045] 1) 세포배양
- [0046] 신장암 세포인 Caki와 ACHN, 신장상피세포주인 A498 세포를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(Americaan Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며, 마우스 신장 세포인 TMCK-1은 영남대학교(Yeungnam University, Korea)의 Dr. T.J. Lee로부터 받아 사용하였다.

- [0047] 또한 초대 배양한 사람 사구체간질 세포(mesangial cells) Cryo NHMC은 클로네틱스(Clonetics, San Diego, CA)에서 구입하였다.
- [0048] 상기 세포들을 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 20mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰 산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES) 버퍼 및 100 μ g/ml 겐타마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다.
- [0049] **2) PP242 및 커큐민 처리**
- [0050] PP242는 DMSO에 0.5 mM로 녹이고, 커큐민은 DMSO에 25 mM로 녹여서 세포 배양액에 각 실험별 사용 농도로 직접 처리하였다.
- [0052] **2. 웨스턴 블롯 분석**
- [0053] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 각각의 세포를 차가운 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척하였다. 그런 후 100 μ M 페닐메틸설폰닐 플로라이드(phenylmethanesulfonylfluoride, PMSF), 10 μ g/ml 류펩틴(leupeptin), 10 μ g/ml 펩스타틴(pepstatin) 및 2 mM 에틸렌디아민사세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)로 구성된 프로테아제(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 Na₃VO₄ 및 1mM NaF로 완충된 방사선 면역 침전(Radioimmunoprecipitation, RIPA) 버퍼를 사용하여 아이스 위에서 용해하였다.
- [0054] 용해물을 4℃에서 10.000xg의 속도로 10분간 원심분리한 후 상등액을 수집하였다.
- [0055] 웨스턴 블롯 분석은 웨스턴 블롯팅 키트 제조사의 설명서에 따라 수행하였으며, 단백질을 소듐도데실설파이트-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.
- [0057] **3. 유동세포계수분석(Flow cytometry analysis)**
- [0058] 유동세포계수 분석을 위해, 100 μ l PBS를 세포에 첨가하여 재부유시키고 95% 에탄올 200 μ l를 첨가하여 세포를 와류시킨 후 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 12.5 μ g 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase)가 포함된 pH 8.4의 1.12% 시트르산나트륨(sodium citrate) 용액 250 μ l를 첨가하여 재부유시키고 37℃에서 30분간 추가로 인큐베이션하였다.
- [0059] 그 후 세포에 50 μ g/ml 농도의 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI) 용액 250 μ l를 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.
- [0061] **4. 4', 6'-다이아미디노-2-페닐인돌 염색(4', 6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, DAPI)을 이용한 핵 응축과 분열 확인**
- [0062] 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.
- [0064] **5. DNA 단편화 분석**
- [0065] 세포사멸 확인 효소면역분석법 플러스 키트(ELISA plus kit, Boehringer Mannheim; Indianapolis, IN)를 이용하여 PP242와 커큐민을 각각 단독처리한 세포 및 PP242와 커큐민을 병용처리한 세포의 핵 내 단편화된 DNA를 확

인하여 세포사멸 정도를 확인하였다.

[0066] 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.

[0067] 상기 반응물에 퍼옥시다제 기질을 첨가하여 5분간 인큐베이션한 후 분광광도계를 이용하여 405 및 490 nm로 측정하였다.

[0069] <실시예 1> PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸 증진 효과 확인

[0070] 먼저, PP242와 다양한 추출물을 Caki 세포에 병용처리한 후, ACS분석을 통하여 세포의 DNA 함량을 측정하고 그 중 Sub-G1 분획을 측정함으로써 병용처리에 의한 세포사멸 증진 효과를 확인하였다.

[0071] 그 결과, 도 1A와 같이 PP242와 커큐민의 병합처리 시 Sub-G1 분획이 유의적으로 증가한 것을 확인하였고 이를 통하여 세포사멸이 증가하였다는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 또한 Caki 세포에 PP242와 커큐민을 24시간 동안 병용처리한 후 DAPI 염색을 통하여 핵의 응축과 분열을 확인하였다.

[0073] 그 결과 도 1B 및 1C를 참고하면, PP242와 커큐민의 병용처리에 따른 핵 내 염색질과 세포질의 히스톤 관련 DNA 단편의 손상을 확인할 수 있었다.

[0074] 더불어 상기 실험에 1 중 6의 방법으로 DEVDase를 이용하여 카스파제-3의 활성을 분석한 결과, 도 1D와 같이 PP242와 커큐민의 병용처리는 카스파제-3 활성을 증가시켰다.

[0075] Caki 세포 이외의 다른 신장암 세포에서 PP242와 커큐민의 병용처리의 항암효과를 확인하기 위해, 신장암 세포인 ACHN과 A489에서 PP242와 커큐민의 병용처리 효과를 확인하였다.

[0076] 각각의 세포주에 0.5 μ M PP242와 20 μ M 커큐민을 처리한 후, FACS분석을 통한 DNA의 함량을 측정하고 그 중 Sub-G1 분획을 측정하여 항암효과를 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 1E와 같이 두 가지 세포에서 Sub-G1 분획이 유의적으로 증가하였으며 PARP 분열도 확인할 수 있었다.

[0078] 또한 도 1G를 참고하면, PP242와 커큐민의 병용처리에도 정상세포인 마우스 신장 세포 TMCK-1와 사람 사구체간질 세포(mesangial cells)에서는 세포수축과 세포사멸이 나타나지 않았으나 Caki 세포에서는 세포수축과 세포사멸이 확인되었다.

[0079] 상기 결과로부터 Caki 세포뿐만 아니라 다른 암 종의 세포에서도 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸 증가 효과가 나타난 반면, PP242와 커큐민의 병용처리는 정상세포에 안전한 것이 확인되었다.

[0081] <실시예 2> PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 이종이식 동물 모델에서의 종양 형성 억제 효과 확인

[0082] 다음으로 Caki 세포를 BALB/c-누드 마우스에 주입하여 2주간 종양 형성을 유도한 후 20 mg/kg의 PP242와 50 mg/kg의 커큐민을 각각 혹은 병용처리한 후 종양억제효과 및 사멸효과를 확인하였다. 그 결과 도 2A와 같이, 각각의 약물 및 병용처리에 의한 마우스의 체중에 변화가 없었으며, 이를 통해 약물 독성에 의한 쥐의 안전성에 문제가 없다는 것을 확인하였다.

[0083] 더불어 도 2B와 C에서 확인한 것과 같이 50 mg/kg의 커큐민도 종양 형성 억제효과가 나타나나 PP242와 커큐민을 병용처리하였을 때 유의적으로 종양의 크기가 줄어들고, 부피가 줄어든 것을 확인하였다. 또한, 도 2D와 같이, 종양의 무게를 측정하였을 때도 PP242와 커큐민의 병용처리를 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

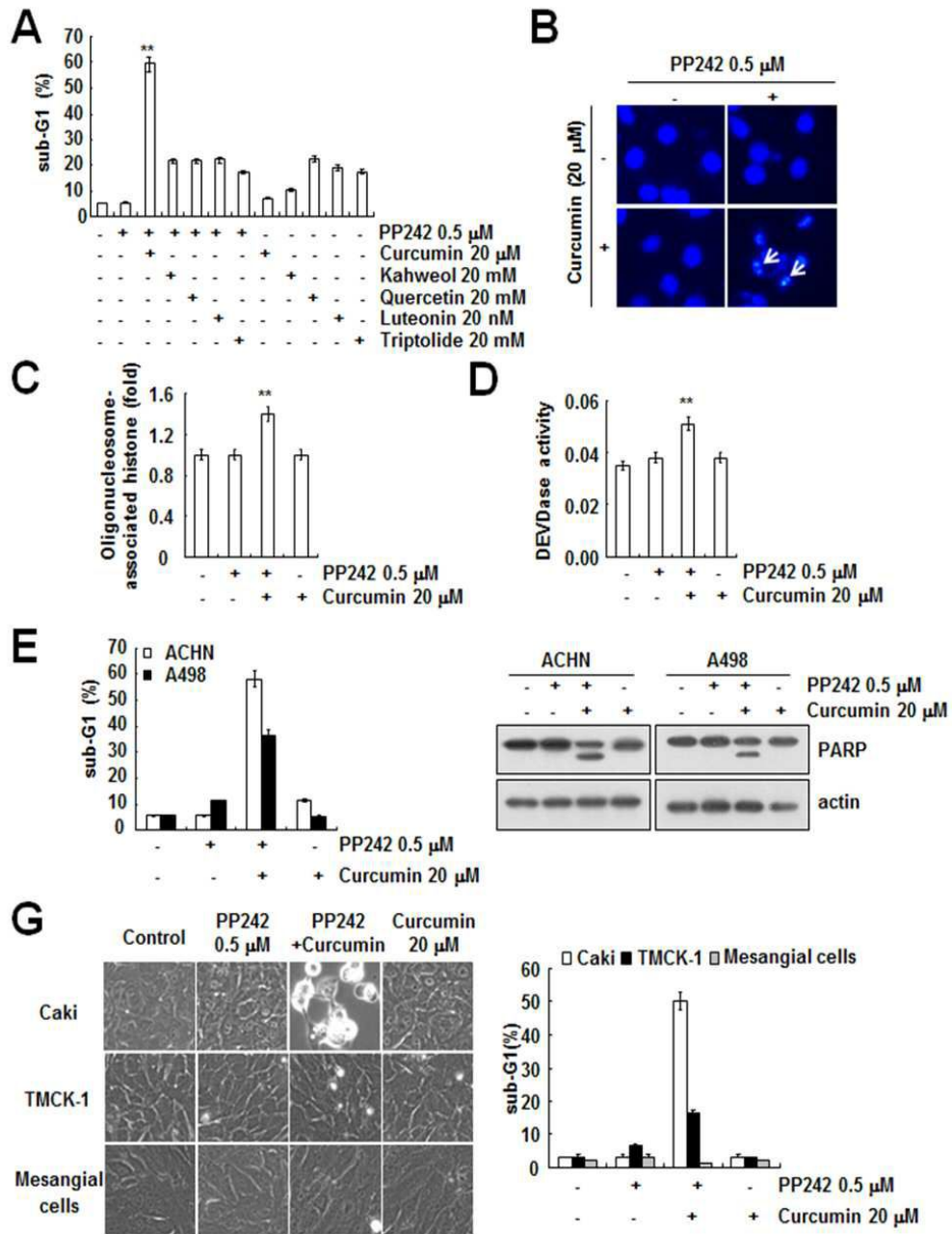
[0084] 이를 통하여, 세포뿐만 아니라 생체 내에서도 PP242와 커큐민에 의한 병용처리가 각각 약물을 처리한 것보다 더 큰 항암효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0086] <실시예 3> PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸과 Akt의 관련성 확인

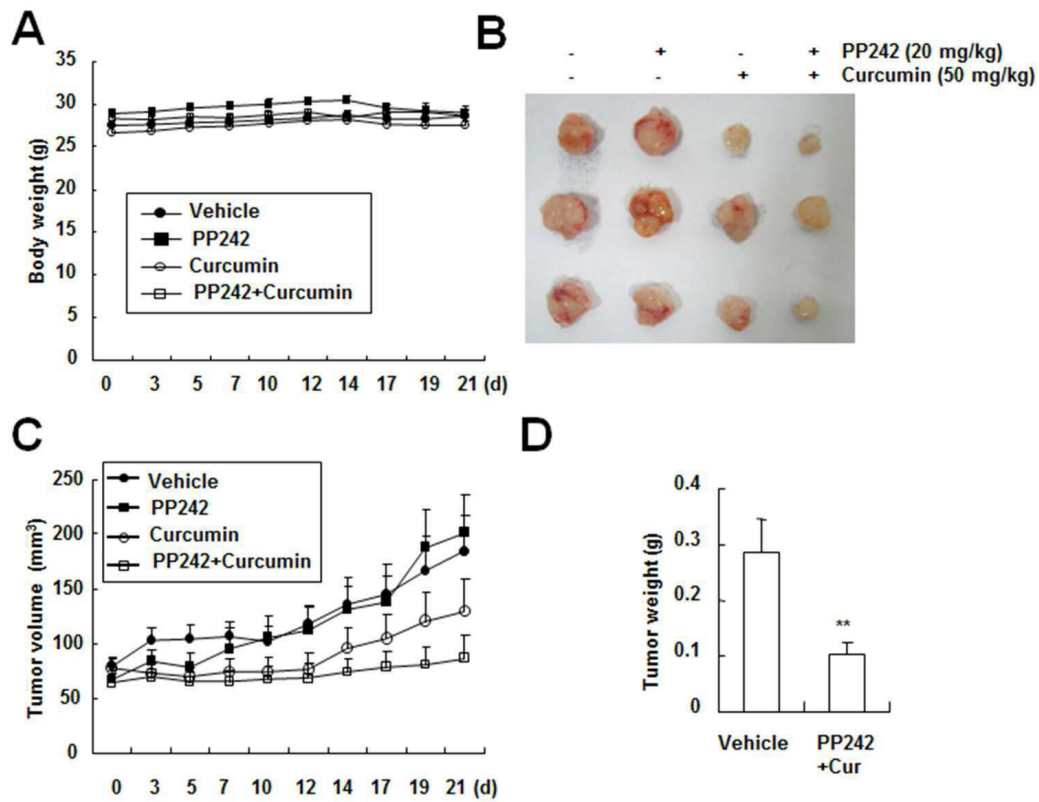
- [0087] PP242는 m-TOR 복합체 1과 2의 신호전달을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 커큐민과의 병용처리에 의한 항암효과에 관여하는 신호전달 체계를 확인하였다.
- [0088] Caki 세포와 다른 신장암세포인 ACHN과 A498세포에 PP242와 커큐민을 병용처리한 결과 도 3A와 같이, PP242와 커큐민의 병용처리에 의하여 Akt의 신호체계가 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다.
- [0089] 더불어, Akt를 일시적으로 과발현한 Caki 세포에 PP242와 커큐민을 병용처리하여 Akt의 중요성을 확인하였다. 그 결과 도 3B와 같이, 대조군인 Caki/vector 세포에서는 PP242와 커큐민의 병용처리에 따른 세포사멸이 증가하였으며, PARP 분열 유도가 확인되었으나, Caki/Akt 세포에서는 PP242와 커큐민의 병용처리에 따른 세포사멸이 유도되지 않았다.
- [0090] 이를 통하여 PP242와 커큐민의 항암효과는 Akt 신호체계를 억제함으로써 유도된다는 것을 확인하였다.
- [0092] **<실시예 4> PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸과 릭터(Rictor)의 관련성 확인**
- [0093] 다음으로 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 항암효과와 Akt의 상위 신호체계인 랩터(Raptor) 및 릭터(Rictor)의 관련성을 확인하고자 실험하였다. 그 결과 도 4A와 같이 PP242와 커큐민의 병용처리에 의하여 릭터의 발현이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다.
- [0094] 따라서, PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸에서 릭터의 관련성 여부를 확인하기 위하여 랩터 혹은 릭터를 과발현하여 세포사멸 정도를 확인한 결과 도 4B와 C와 같이 랩터는 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸에 관여를 하지 않지만, 대조군인 Caki/vector에서 릭터가 과발현되었을 때 세포사멸과 Akt의 인산화가 억제되었고, PARP의 분열과 Sub-G1이 감소하는 것을 확인하였다.
- [0095] 따라서, 이 결과로 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸에 Rictor/Akt 신호체계가 중요하게 관여하는 것을 확인하였다.
- [0097] **<실시예 5> PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸과 자가포식(autophagy)의 관련성 확인**
- [0098] m-TOR 복합체에 의한 신호전달 체계는 세포의 자가포식 활성화와 밀접한 관련이 있다고 보고되어있다. 따라서, PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 Rictor/Akt의 신호전달 억제효과가 자가포식에 미치는 영향과 그로 인한 세포사멸과의 관련성 여부를 확인하였다.
- [0099] 그 결과 도 5A와 같이, PP242와 커큐민의 병용처리에 의하여 p62의 단백질 발현이 감소하고 LC3의 I형태에서 II형태의 형태 변화를 확인하였다.
- [0100] 또한, 도 5B와 같이 이러한 효과는 PP242 혹은 커큐민 단독 처리에서는 자가포식 관련 단백질들의 변화가 나타나지 않고 병용처리에 의해서만 나타나는 효과임을 확인하였다.
- [0101] 더불어 자가포식 억제제를 함께 처리하여, 이러한 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 자가포식의 유도가 세포사멸에 미치는 효과를 확인하였다. 그 결과 도 5C와 D에서처럼 자가포식을 억제하였을 때 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 Sub-G1이 감소하고 PARP의 분열이 억제됨을 확인함으로써 PP242와 커큐민의 병용처리에 의한 세포사멸에 자가포식이 관여함을 확인하였다.
- [0103] 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 것이다.

도면

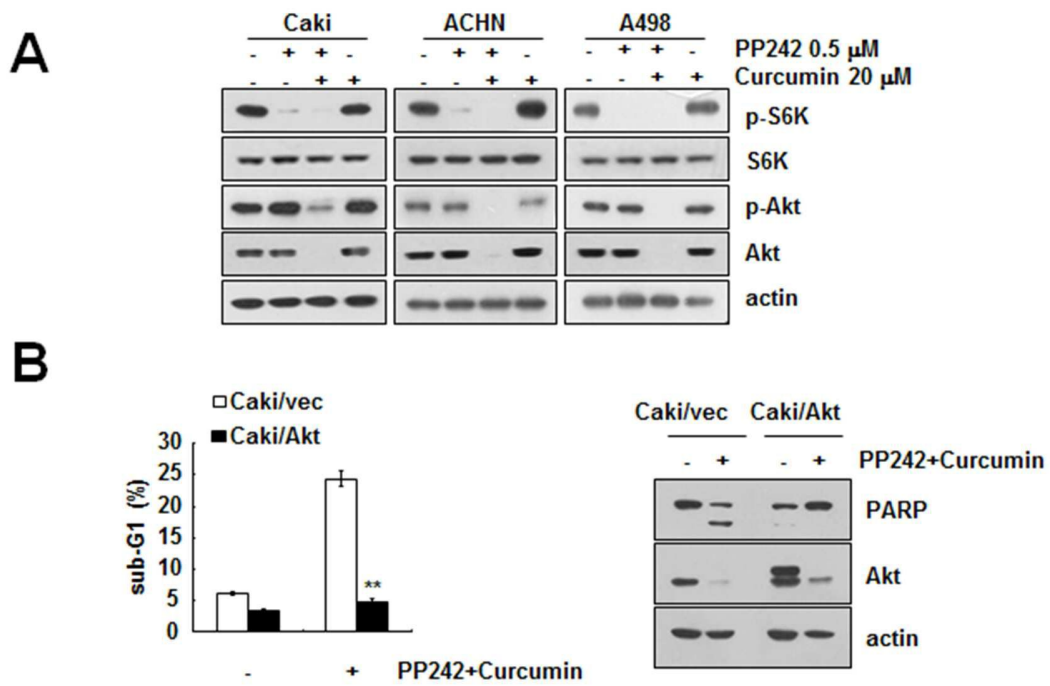
도면1



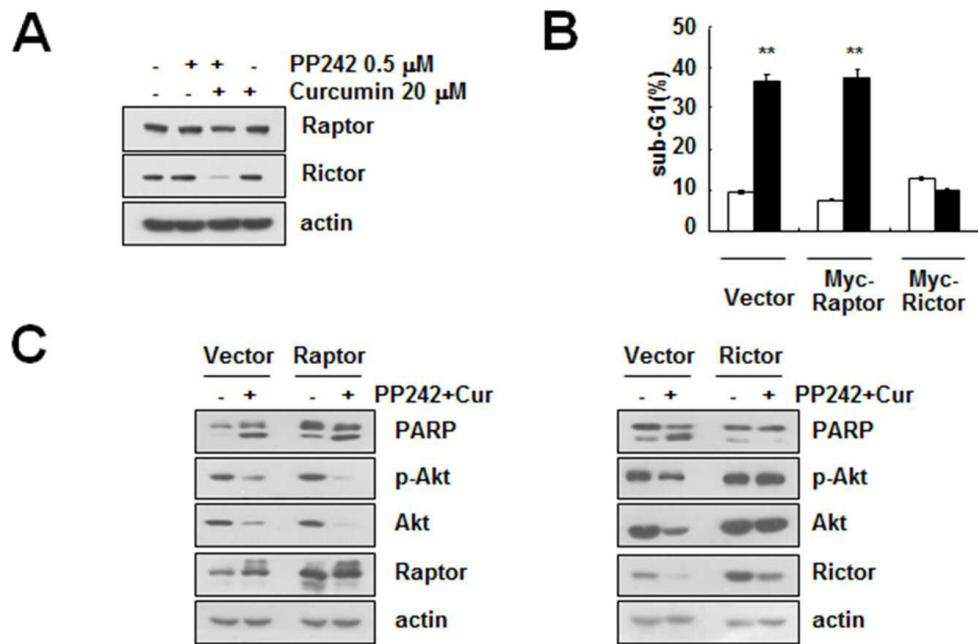
도면2



도면3



도면4



도면5

