



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0098649
(43) 공개일자 2019년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)

A61K 36/185 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0018829

(22) 출원일자 2018년02월14일

심사청구일자 2018년02월14일

(71) 출원인

(주)카이언바이오텍

서울특별시 구로구 가마산로 226 ,
고려구로빌딩2층,204호(구로동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

이대희

경기도 용인시 처인구 고진로27번길 28-5

오상철

서울특별시 강남구 남부순환로 2914번지 7동 602
호(개포 우성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조희원

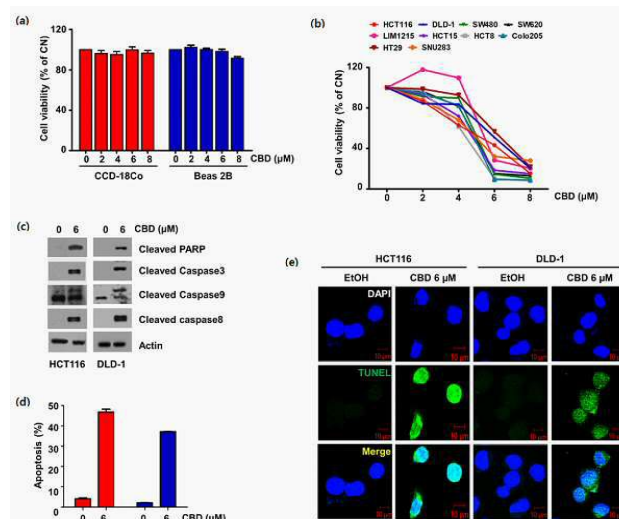
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 상기 칸나비디올 추출물에 의한 대장암 세포주의 세포사멸 유도 현상을 이용한 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

이선일

서울특별시 서초구 전원말8길 5-4(방배동)

정소연

인천광역시 부평구 길주남로 175(부개동, 상우신명
보람아파트) 101동 793호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0566291

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 연구마을

연구과제명 천연물 (CBD)를 이용한 항암보조제 및 병용의약품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)카이언바이오텍

연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1665

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구역량 강화지원

연구과제명 바이오메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

칸나비디올(cannabidiol) 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 대마의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 추출된 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 물, 탄소수 1내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 알코올은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물의 농도는 0.1 내지 0.4 mg/ml인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 전체 조성물 중 0.00001 내지 30 중량% 로 함유되는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라의 대장암 발병률은 세계 1위를 차지하고 있으며 노령화 사회가 되고 서구화된 식습관에 의해 대장암의 증가는 더욱 가속화 되고 있다. 그에 따라 많은 사회 비용이 초래되며 대장암 치료에 사용할 수 있는 약제의 수

가 많지 않아 대장암에 대한 적극적인 연구가 반드시 필요하다. 대장암에는 현재 옥살리플라틴, 이리노테칸 같은 항암제와 세툽시맙이나 베바시주맙 같은 항체 치료제를 병용하여 사용하고 있으나 암세포 뿐만 아니라 정상 세포에도 치명적일 뿐만 아니라 항암제 내성이 생겨 치료에 어려움이 있으며 완치 후에도 재발률이 높아 그 위험률이 더욱 심각하다고 할 수 있다. 이러한 관점에서 지금보다 더욱 나은 대장암 치료법 개발을 위해서는 새로운 약제를 발굴하고 개발해야 한다.

- [0004] 칸나비디올(CBD: cannabidiol)은 대마(Cannabis)의 주된 성분 중 하나로 테트라하이드로칸나비디올(THC: Tetrahydrocannabinol)와 함께 많이 비교되는 물질이다. 우리나라의 경우 마약류로 지정되어 많은 연구가 이루어지고 있지 않으나 외국의 경우 통증이나 기억 장애, 불안 등의 증상 완화를 위한 의료용으로 실제 사용하고 있을 뿐만 아니라 활발한 연구가 이루어지고 있는 물질이다.
- [0005] CBD는 THC와 유사한 구조를 가지나, THC는 흥분을 유도하고 일부 암에서 세포 사멸 효과가 있다고 알려져 있는 반면 CBD는 THC에 비해 연구가 많이 되어있지 않고 흥분을 유도하지 않는다고 알려져 있다.
- [0006] 또한, THC와 CBD 모두 cannabinoids receptor (CB1, CB2)와 결합하여 작용하며 THC는 직접적으로 receptor와 결합하지만 CBD는 간접적으로 receptor에 결합하여 작용한다고 보고 되어 지고 있다.
- [0007] CBD가 receptor에 결합하면 Ceramide를 만들어 ER stress를 통한 Autophagy, 세포 사멸을 유도하고 ERK를 통한 cell cycle arrest 유도를 할 수도 있다.
- [0008] 전 세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나인 암은 서구화된 식습관과 함께 평균 수명의 연장으로 발병률이 더욱 증가할 것으로 전망되고 있다. 특히 우리나라 대장암의 경우 세계에서 가장 많이 발병하는 것으로 조사되었고 치료제의 경우에도 더 이상의 진전 없이 현재에 머물러 있기 때문에 새로운 치료제의 개발이 시급하다고 할 수 있다.
- [0009] 이에 대장암의 사멸을 유도하고 현재 사용되고 있는 치료제와 병용하였을 때 치료제의 효과를 더욱 높일 수 있는 새로운 치료제 및 치료방법으로서 CBD를 이용하는 기술 개발에 대한 관심이 커지고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2013-0067248호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 천연물 중에서도 한방이나 민간 요법으로 많이 사용하는 약재들 중에서도 대마 유래의 칸나비디올(cannabidiol) 추출물이 대장암 세포주의 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 칸나비디올(cannabidiol) 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 칸나비디올 추출물은 대마의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 추출된 것일 수 있다.
- [0015] 상기 칸나비디올 추출물은 물, 탄소수 1내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득된 것일 수 있다.

- [0016] 상기 알코올은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 칸나비디올 추출물의 농도는 0.1 내지 0.4 mg/ml인 것일 수 있다.
- [0018] 상기 칸나비디올 추출물은 전체 조성물 중 0.00001 내지 30 중량% 로 함유되는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 칸나비디올 추출물은 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 칸나비디올 추출물에 의한 대장암 세포주의 세포사멸 유도하여 대장암을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1 은 KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 CBD에 의한 세포성장 및 단백질 발현 변화를 관찰하기 위하여 실시한 실험 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 CBD에 의해 변화하는 세포 사멸 신호전달을 조사하기 위하여 단백질의 수준을 확인한 결과이다.
- 도 3은 CBD에 의해 유도된 세포 사멸에 ROS가 미치는 영향에 대해 실험 결과이다.
- 도 4는 CBD에 의해 ER stress가 유도되는지 여부를 실험한 결과이다.
- 도 5는 In vivo에서 CBD의 효과를 확인하기 위해 5주령 누드 마우스에 대장암 세포주를 주입한 후, CBD를 농도 별로 투여한 후의 실험 결과로서, (a) 내지 (c)는 제노그래프트, (d)는 TUNEL 분석결과, (e)는 면역형광법 (immunofluorescence) 분석결과이다.
- 도 6은 KRAS WT 대장암 세포주인 HT29에 CBD, Cetuximab(Erbix®), 머크社) 및 CBD와 Cetuximab(Erbix®, 머크社)의 병용 처리한 결과를 나타낸 것이다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명은 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 대마로부터 추출물 칸나비디올 추출물을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에서 "대장암(colon cancer)"이란 대장에 생긴 암세포로 이루어진 악성 종양을 의미하며, 크게 유전적인 요인과 식이로 나눌 수 있다. 음식 그 자체가 직접적인 발암물질을 포함하고 있지 않더라도, 우리가 음식물을 섭취하고 몸에 흡수되는 과정에서 발암물질이 생겨날 수도 있는데, 이는 식이성분을 대사시키는 과정에서 장내 세균이 생산하는 효소에 의해 섭취 음식물이 발암물질로 전환될 수 있기 때문이다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 칸나비디올 추출물은 대마의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 추출된 것일 수 있으며, 특히, 대마의 잎으로부터 추출된 칸나비디올 추출이 대장암 세포에 대한 세포사멸 유도 효과 측면에 있어서 유리할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 칸나비디올 추출물은 물, 탄소수 1내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출된 것일 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 상기 칸나비디올 추출물의 추출 용매로서 에탄올, 특히 70% 에탄올을 추출 용매로 하여 추출된 칸나비디올 추출물의 경우 인체에 대한 독성과 부작용을 최소화할 수 있다는 측면에서 유리할 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 칸나비디올 추출물의 농도는 0.1 내지 0.4 mg/ml, 바람직하게는 0.1 내지 0.3 mg/ml, 보다 바람직하게는 0.1 내지 0.2 mg/ml일 수 있으며, 상기 칸나비디올 추출물의 농도가 상기 범위 미만이면 대장암 세포에 대한 세포사멸 효과가 미미할 수 있으며, 상기 범위 초과이면 인체에 대한 독성과 부작용이 증가할 수 있다.

- [0031] 또한, 상기 칸나비디올 추출물의 함량은 전체 약학 조성물 중 0.00001 내지 30 중량%, 바람직하게는 0.00001 내지 20 중량%, 보다 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량% 만큼 포함될 수 있다. 상기 칸나비디올 추출물의 함량이 상기 범위 미만이면 대장암 세포에 대한 세포사멸 효과가 미미할 수 있으며, 상기 범위 초과이면 인체에 대한 독성과 부작용이 증가할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 보다 효과적인 예방 또는 치료를 위하여, 본 발명의 약학 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여함이 바람직하고, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게 상기 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 경피흡수제, 겔제, 로션제, 연고제, 크림제, 점부제, 카타플라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 현탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 봉대 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 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 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61(tween 61), 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한 상기 약학 조성물을 대장암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장암의 치료 방법을 제공한다.
- [0038] 상기 조성물, 대장암 및 치료에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0039] 상기 치료 방법은 구체적으로 상기 조성물을 약학적 유효량으로 대장암 의심 개체 내에 투여하는 것을 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 면역억제 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 비 경구 주입에는 근육 내, 정맥내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 바람직한 투여방식은 정맥 주사, 피하주사, 피내주사제, 근육주사 및 점적 주사이다.
- [0040] 본 발명의 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 자외선이 처리된 벼 잎의 추출물은 암세포에 대하여 높은 성장억제 효과를 나타내므로, 상기 칸나비디올 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 대장암 의심 개체에 투여하여, 대장암의 발생 또는 진행을 막아 대장암을 치료할 수 있다.
- [0041] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 시험예로 한정되는 것은 아니다.
- [0042]

[0043] 실시예 1: 칸나비디올 추출물 제조

[0044] 대나무 잎과 줄기 부위를 분말화하여 100g의 대마 분말을 얻었다. 이를 1000g의 에탄올에 침적시키고, 40℃에서 48시간동안 용출시켰다. 이어서, 원심분리기로 고형분을 분리한 후 분리된 상등액을 취하여 여과하였다. 이를 통상적인 감압 농축 방법에 준하여, 농도가 0.15 mg/ml인 칸나비디올 추출물을 얻었다.

[0046] 하기 실험예 1 내지 5에서는, 대장암 세포의 세포 생존능(cell viability), 세포 사멸 관련 단백질 발현 및 세포 사멸(세포 사멸)에 미치는 상기 실시예 1의 칸나비디올 추출물(CBD)의 영향을 확인하는 실험을 하기과 같은 방법에 의해 실시하였다. 하기 실험예 1 내지 5에서 사용된 세포주들은 모두 ATCC(Manassas, 미국)에서 구입하였다.

[0048] [실험방법]

[0049] (1) 대장암 세포에서 CBD에 의한 Cell viability 측정

[0050] 가. KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 CBD에 의한 Cell Viability 측정

[0051] ① KRAS 돌연변이 대장암 세포와 대장 정상세포를 96 well plate에 seeding 한 후, 다음 날 CBD를 표시한 농도로 (0-8 μ M) 처리한다.

[0052] ② 24 시간 후에 WST-1 solution을 넣어 2-3 시간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 확인한다.

[0054] 나. KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 ROS(reactive oxygen species) scavenger인 NAC(N-acetyl cysteine)을 전처리 후 CBD에 의한 Cell viability 확인

[0055] ① KRAS 돌연변이 대장암 세포를 96 well plate에 seeding 한 후, 다음 날 NAC (1 mM)을 1시간 전처리 한다.

[0056] ② CBD 6 μ M을 처리하고 24 시간 후에 WST-1 solution을 넣어 2-3 시간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 확인한다.

[0058] 다. siChop transfection 후 CBD에 의한 Cell viability 측정

[0059] ① 대장암 세포주에서 Chop을 knockdown 시킨다.

[0060] ② 18 h 후 CBD를 처리한다.

[0061] ③ 24 시간 후에 WST-1 solution을 넣어 2-3 시간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 확인한다.

[0063] 라. KRAS 야생형 대장암 세포에서 CBD에 의한 Cell viability 확인

[0064] ① KRAS 야생형 대장암 세포를 96 well plate에 seeding 한 후, 다음 날 CBD와 Cetuximab 표시한 농도로 (Cetuximab 10 μ g/ml, CBD 4 μ M) 처리한다.

[0065] ② 24 시간 후에 WST-1 solution을 넣어 2-3 시간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 확인한다.

[0067] 2) 대장암 세포에서 CBD에 의한 세포 사멸 관련 단백질 발현 확인

[0068] 가. KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 CBD에 의한 세포 사멸 확인

[0069] ① 대장암 세포를 seeding 한 후, 다음날 CBD를 처리한다.

- [0070] ② harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 한다.
- [0072] 나. KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 ROS scavenger인 NAC을 전처리 후 CBD에 의한 세포 사멸 확인
- [0073] ① KRAS 돌연변이 대장암 세포를 96 well plate에 seeding 한 후, 다음 날 NAC (1 mM)을 1시간 전처리 한다.
- [0074] ② CBD 6 μ M을 처리하고 24 시간 후에 lysate를 얻어 western blotting으로 확인 한다.
- [0076] 다. siChop transfection 후 CBD에 의한 Cell viability 측정
- [0077] ① 대장암 세포주에서 Chop을 knockdown 시킨다.
- [0078] ② 18 h 후 CBD를 처리한다.
- [0079] ③ 24 시간 후에 cell harvest 하여 Western blotting을 수행한다.
- [0081] 라. KRAS WT(wild type) 대장암 세포에서의 Cetuximab(Erbitux®, 머크社)과 CBD의 병용처리에 의한 세포 사멸 확인
- [0082] ① 대장암 세포를 seeding 한 후, 다음날 Cetuximab(Erbitux®, 머크社)과 CBD를 처리한다.
- [0083] ② 24 시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 한다.
- [0085] **3) 대장암 세포에서 CBD에 의한 세포 사멸 확인 (Flow cytometry)**
- [0086] 가. KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 CBD에 의한 세포 사멸 확인
- [0087] ① KRAS 돌연변이 대장암 세포를 seeding 한 후, 다음날 CBD를 처리한다.
- [0088] ② 24 시간 후 harvest 후 Annexin V-FITC(Enzo Life sciences社), PI (propidium iodide)를 염색하여 Flow cytometry로 확인한다.
- [0090] 나. KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 ROS scavenger인 NAC을 전처리 후 CBD에 의한 Cell 세포 사멸 확인
- [0091] ① KRAS 돌연변이 대장암 세포를 96 well plate에 seeding 한 후, 다음 날 NAC (1 mM)을 1시간 전처리 한다.
- [0092] ② CBD 6 μ M을 처리하고 24 시간 후에 cell harvest 후 Annexin V-FITC, PI로 double staining 후 Flow cytometry로 확인한다.
- [0094] 다. siChop transfection 후 CBD에 의한 세포 사멸 측정
- [0095] ① 대장암 세포주에서 Chop을 knockdown 시킨다.
- [0096] ② 18 h 후 CBD를 처리한다.
- [0097] ③ 24 시간 후에 Trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 Annexin V-FITC, PI로 염색 후 Flow cytometry를 수행한다.
- [0099] 라. KRAS WT 대장암 세포에서의 Cetuximab(Erbitux®, 머크社)과 CBD의 병용 처리에 의한 세포 사멸 확인
- [0100] ① KRAS WT 대장암 세포를 seeding 한 후, 다음날 Cetuximab과 CBD를 처리한다.
- [0101] ② 24 시간 후 harvest 후 Annexin V-FITC, PI를 염색하여 Flow cytometry로 확인한다.

[0103] **3) 대장암 세포에서 C에 의한 Noxa mRNA 확인 (Realtime PCR)**

- [0104] ① 대장암 세포주에서 CBD를 24 시간동안 처리한다.
- [0105] ② TriZol로 cell lysis 후 Chloroform, isopropanol을 이용하여 RNA를 뽑고 PCR 기계로 cDNA를 합성한다.
- [0106] ③ 합성된 cDNA와 Noxa TaqMan probe를 이용하여 Realtime PCR을 돌린다.

[0108] **4) Xenograft**

- [0109] ① Luciferase tagging된 대장암 세포주를 nude mice 5주령의 피하에 주사하고 그 크기가 200mm가 되었을 때 CBD를 주사한다.
- [0110] ② CBD를 일주일에 2번씩 7번 주사하고 tumor의 크기와 무게 또한 함께 측정한다.
- [0111] ③ Tumor를 제거하기 전 luciferin을 한 마리당 50 mg씩 주사한 후 7분 후에 luciferase의 강도를 측정한다.
- [0112] ④ Tumor를 제거한다.

[0114] **5) 조직에서 TUNEL assay**

- [0115] ① 조직으로 만들 block을 잘라 baking 후 조직에 수분을 넣어준다.
- [0116] ② TUNEL assay kit(Invitrog社)를 이용하여 1시간 동안 37도 인큐베이터에서 반응 시킨다.
- [0117] ③ Washing 후 Dapi(4', 6-diamidino-2-phenylindo)가 포함되어 있는 mounting solution으로 mounting 해준다.

[0119] **6) 조직에서 IF(Immunoflorescence)**

- [0120] ① 조직으로 만든 ब्ल럭을 잘라 baking 후 조직에 수분을 넣어준다.
- [0121] ② 버퍼에 넣은 조직 슬라이드를 1분씩 10번 전자레인지를 돌려준다.
- [0122] ③ BSA(bovine serum albumin)로 blocking 후 1차 안티바디를 하루 동안 4도에서 붙인다.
- [0123] ④ Washing 후 2차 안티바디를 17분 동안 상온에서 붙인 후 다시 washing 해준다.
- [0124] ⑤ Dapi가 포함된 mounting solution으로 mounting 한다.

[0126] **실험예 1: KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 칸나비디올 추출물(CBD)의 세포 성장 억제 효과**

[0127] 도 1 은 KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 CBD에 의한 세포성장 및 단백질 발현 변화를 관찰하기 위하여 실시한 실험 결과를 나타낸 것으로, (a) 내지 (c)는 웨스턴 블로팅 분석결과이고, (d)는 플로우 사이토메트리(flow cytometry) 결과이며, (e)는 TUNEL 분석 결과이다.

[0129] 도 1의 (a)를 참조하면, CBD 농도에 따라 대장 섬유 아세포인 CCD-18Co의 cell viability 는 큰 변화가 없는 반면, CBD 농도가 높아짐에 따라 기관지 상피세포인 Beas 2B의 cell viability는 감소하는 것을 알 수 있다.

[0131] 도 1의 (b)를 참조하면, CBD 농도 의존적으로 다양한KRAS 대장암 세포주들의 cell viability을 감소시키는 것을 알 수 있다.

[0133] 도 1의 (c)를 참조하면, CBD에 의해 억제된 세포 성장이 세포 사멸 때문인지 살펴보기 위하여, KRAS 대장암 세포주인 HCT116 및 DLD-1의 apoptotic 분자들의 단백질 발현 정도를 관찰한 결과로서, cleaved part 뿐만 아니

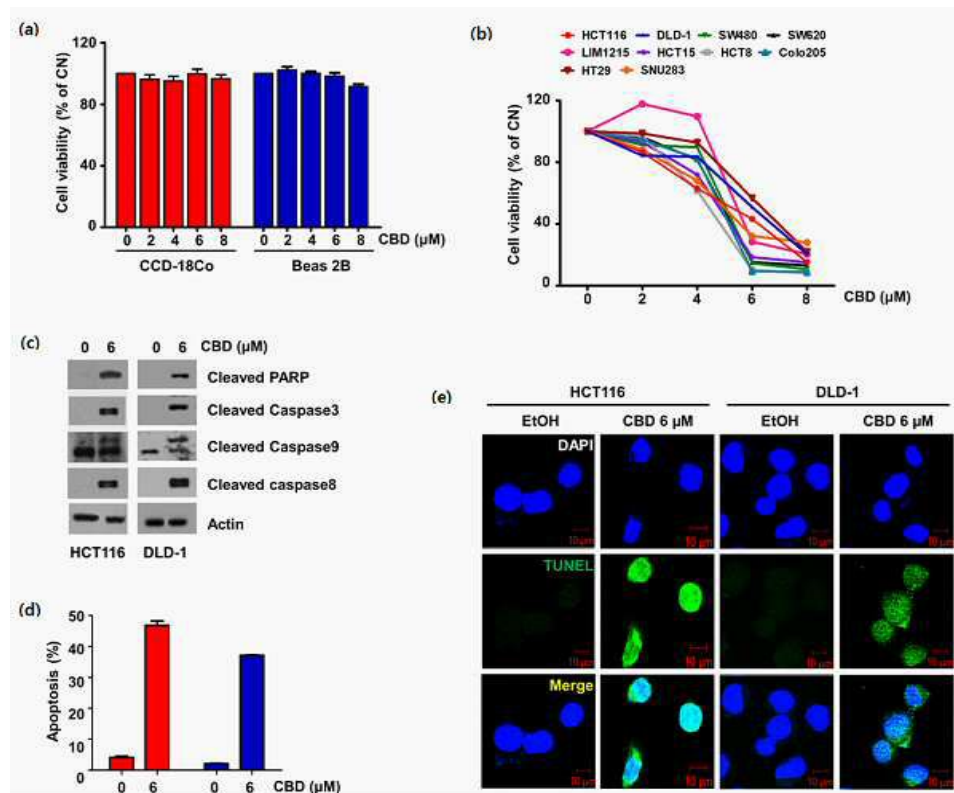
라 cleaved-caspase 들의 단백질 발현이 증가된 것을 알 수 있다.

- [0135] 도 1의 (d)를 참조하면, FACS(Fluorescence-Assisted Cell Sorter) 분석에 의해, KRAS 대장암 세포주인 HCT116 및 DLD-1에 있어서 CBD에 의해 억제된 세포 성장이 세포 사멸 때문인 것을 알 수 있다.
- [0137] 도 1의(e)를 참조하면, TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) 분석에 의해 TUNEL positive cell이 증가한 것을 알 수 있다.
- [0139] **실험예 2: KRAS 돌연변이 대장암 세포에서 칸나비디올 추출물(CBD)에 의한 세포 사멸 유발 인자 확인**
- [0140] 도 2는 CBD에 의해 변화하는 세포 사멸 신호전달을 조사하기 위하여 단백질의 수준을 확인한 결과이다.
- [0142] 도 2의 (a)는 대장암 세포주인 HCT116 및 DLD-1에서 세포 사멸과 관련된 신호 전달 단백질의 수준을 확인하기 위한 웨스턴 블로팅 분석 결과로서, Noxa가 크게 증가한 것을 알 수 있다.
- [0144] 또한, 도 2의 (b) CBD 농도에 따른 신호 전달 단백질인 Noxa의 mRNA수준을 나타낸 그래프로서, CBD 농도 의존적으로 Noxa의 mRNA가 증가한 것을 알 수 있다.
- [0146] 또한, 도 2의 (c) 및 (d)는 각각 Noxa가 CBD에 의해 유도되는 세포 사멸에 연관되어 있는지 확인하기 위하여, HCT116 및 DLD-1에 대하여 Noxa를 감소시킨 후 CBD를 처리한 웨스턴 블로팅 분석 결과 및 플로우 사이토메트리 분석 결과로서, Noxa가 감소할 경우 CBD에 의한 세포 사멸 역시 억제됨을 알 수 있다.
- [0148] **실험예 3: CBD에 의해 유도된 세포 사멸에 ROS(reactive oxygen species) 및 ER stress가 미치는 영향**
- [0149] Noxa가 미토콘드리아를 통한 세포 사멸에 영향을 줄 수 있으며 ROS를 생성시킬 수 있다고 알려져 있기 때문에 CBD에 의해 미토콘드리아 ROS 변화를 살펴보았다.
- [0150] 도 3은 CBD에 의해 유도된 세포 사멸에 ROS가 미치는 영향에 대해 실험 결과이다.
- [0152] 도 3의 (a)는 HCT116 및 DLD-1에 대하여 CBD를 6 μ M 처리하여 플로우 사이토메트리 분석을 한 결과로서, 미토콘드리아 ROS(MitoSOX)가 크게 증가된 것을 알 수 있다.
- [0154] 도 3의 (b) 및 (c)는 각각, 도 3의 (a)에서 증가된 ROS가 CBD에 의한 세포 사멸에 연관이 있는지 알아보기 위해 ROS scavenger인 NAC을 1시간 전처리 하고 CBD를 처리한 웨스턴 블로팅 분석 및 플로우 사이토메트릭 분석 결과로서, NAC가 CBD에 의해 유도되는 세포사멸을 크게 억제하는 것을 알 수 있다.
- [0155] 이로부터, CBD에 의한 세포사멸에 ROS가 연관이 있다는 것을 알 수 있다.
- [0157] 또한, ROS는 ER(endoplasmic reticulum) stress를 조절하므로 CBD에 의해 ER stress가 유도되는지를 살펴보았다.
- [0158] 도 4는 CBD에 의해 ER stress가 유도되는지 여부를 실험한 결과이다.
- [0159] 도 4의 (a)는 CBD을 6 μ M 만큼 처리한 HCT116 및 DLD-1 세포주에서 ER stress 관련 수용체 및 분자들의 단백질에 대한 웨스턴 블로팅 분석 결과로서, CBD에 의해 ATF6를 제외한 다른 ER stress 관련 수용체 및 분자들의 단백질 양이 증가된 것을 알 수 있다.

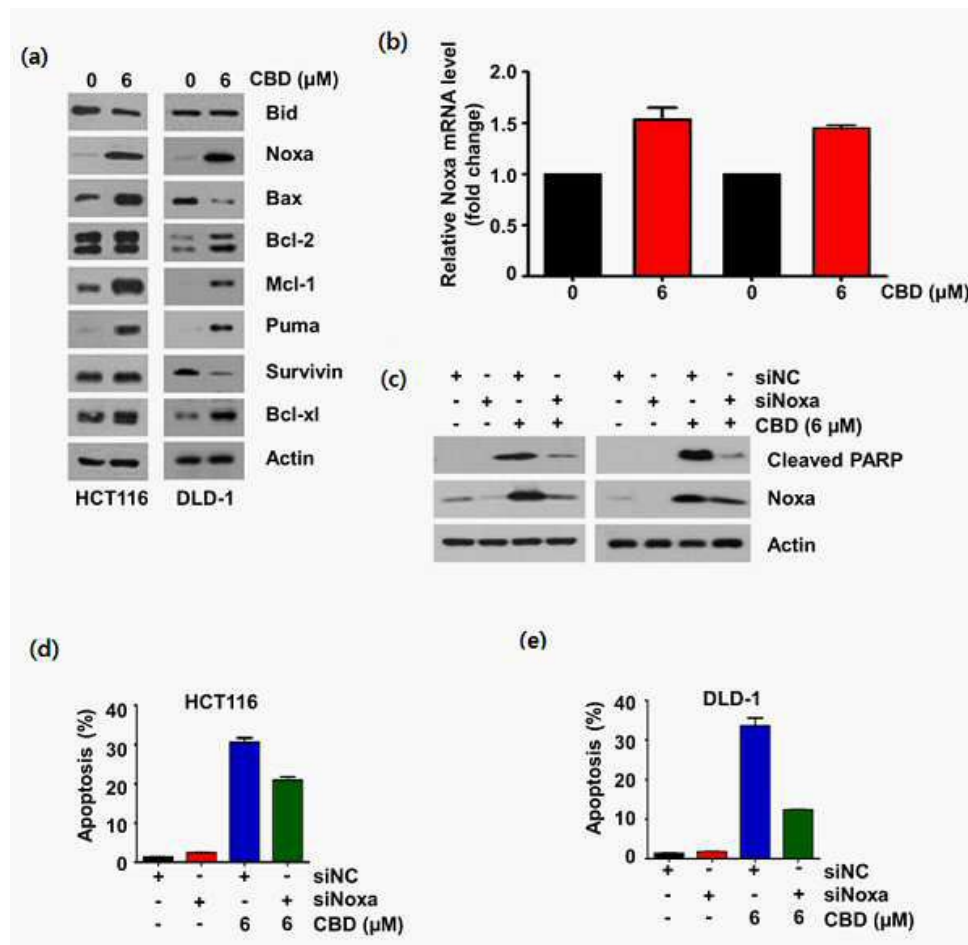
- [0160] 또한, 도 4의 (b) 및 (c)는 이렇게 증가된 ER stress에 의해 세포 사멸이 일어나는 지 확인하기 위해 ER stress의 최종 transcription factor인 Chop을 knockdown 시킨 후 CBD를 처리하여 관찰한 웨스턴 블로팅 분석 및 플로우 사이토메트리 분석 결과로서, CBD 단독 처리보다 Chop knockdown 시킨 후 CBD를 처리했을 때 세포 사멸이 감소되는 것을 확인하였다.
- [0162] **실험예 4: *In vivo*에서 CBD의 항암효과**
- [0163] 도 5는 *In vivo*에서 CBD의 효과를 확인하기 위해 5주령 누드 마우스에 대장암 세포주를 주입한 후, CBD를 농도별로 투여한 후의 실험 결과로서, (a) 내지 (c)는 제노그래프트, (d)는 TUNEL 분석결과, (e)는 면역형광법 (immunofluorescence) 분석결과이다.
- [0164] *In vivo*에서 CBD의 효과를 확인하기 위해 5주령 누드 마우스에 대장암 세포주를 주입한 후 그 크기가 200mm³이 되었을 때부터 CBD를 농도별로 투여하였다.
- [0165] 도 5의 (a) 내지 (e)를 참조하면, CBD 농도 의존적으로 tumor의 크기가 감소하였고 TUNEL positive 세포와 Noxa 발현이 크게 증가됨을 알 수 있다.
- [0167] **실험예 5: CBD가 KRAS 야생형 대장암 세포에서 Cetuximab(Erbitux®, 머크社)의 세포 사멸에 미치는 영향**
- [0168] CBD가 KRAS 야생형 대장암 환자에게 실제로 사용되는 Cetuximab(Erbitux®, 머크社)에 대한 민감도를 높이는지 확인하기 위한 실험을 실시하였다.
- [0169] 도 6은 KRAS WT 대장암 세포주인 HT29에 CBD, Cetuximab(Erbitux®, 머크社) 및 CBD와 Cetuximab(Erbitux®, 머크社)의 병용 처리한 결과를 나타낸 것이다
- [0170] 도 6의 (a) 및 (b)는 각각, HT29 세포주에 대하여 CBD 단독 처리(CBD 4 μ M), Cetuximab 단독 처리(Cet 10 μ g/ml) 및 이들의 병용처리(Cet 10 μ g/ml + CBD 4 μ M)한 후의 cell viability 및 세포사멸을 나타낸 그래프로서, CBD 및 Cetuximab 각각을 단독 처리하는 경우보다 CBD와 Cetuximab를 병용처리 시 세포 사멸이 크게 증가되는 것을 알 수 있다.

도면

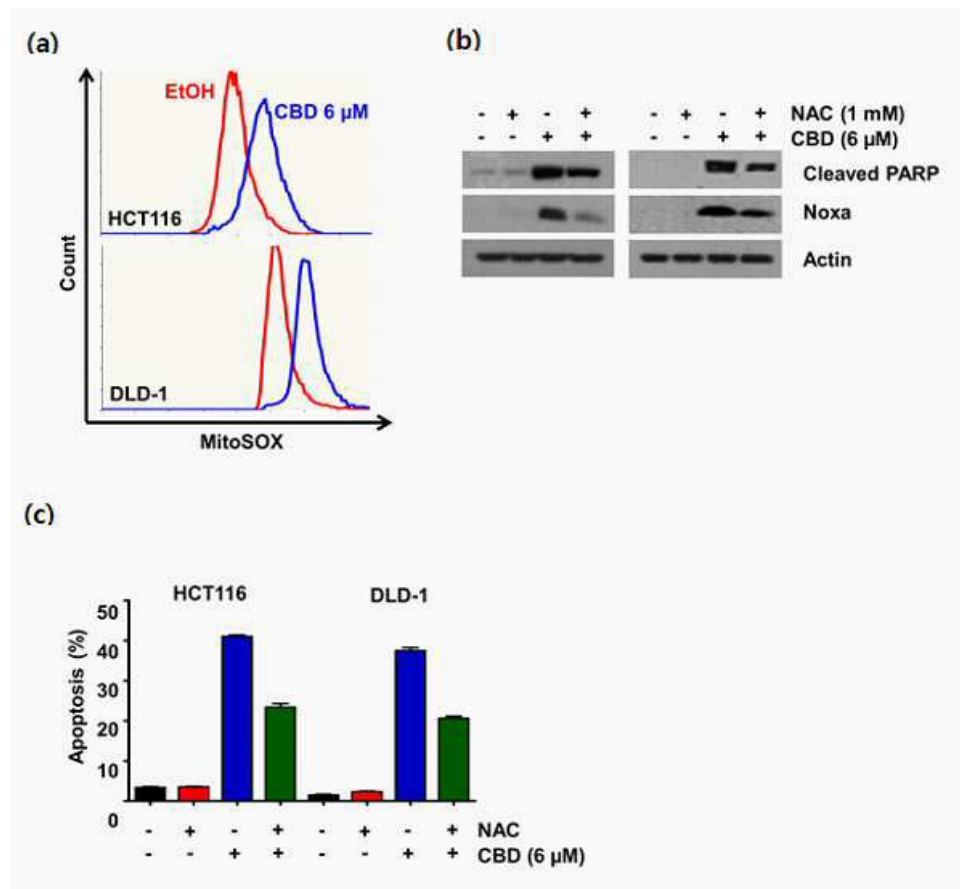
도면1



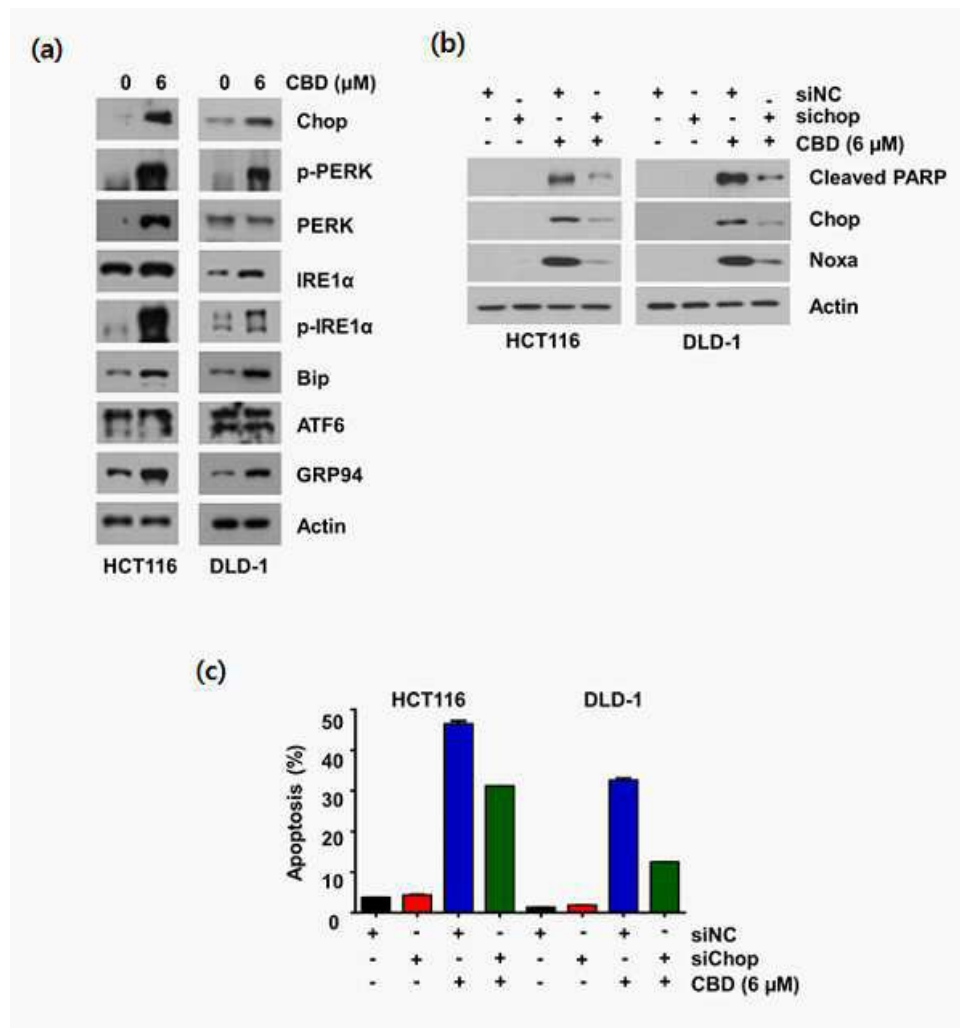
도면2



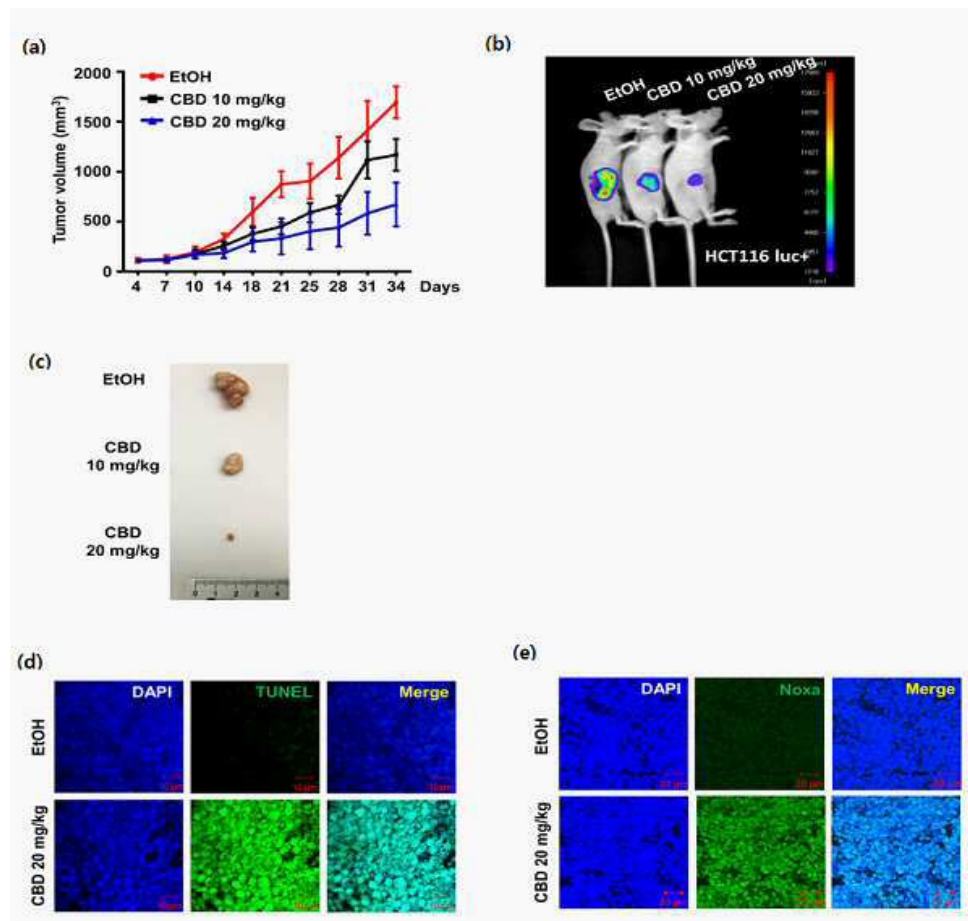
도면3



도면4



도면5



도면6

