(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월11일
(11) 등록번호 10-1756283
(24) 등록일자 2017년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 36/605 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0018576
(22) 출원일자 2016년02월17일
심사청구일자 2016년02월17일
(56) 선행기술조사문헌
US07326734 B2
US06737439 B2
KR100784628 B1
KR1020150136001 A

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김광동
경상남도 진주시 석갑로53번길 28, 104동 901호(평거동)
박수종
충청남도 당진시 합덕읍 은매미길 111-55
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

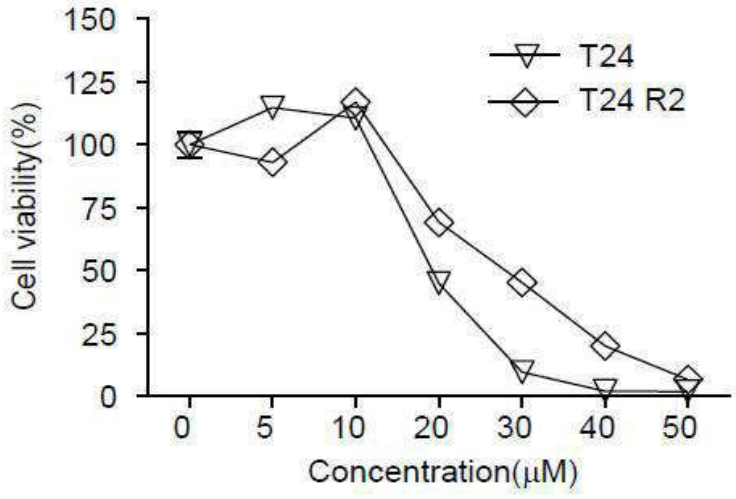
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **카지놀 A 또는 이를 포함하는 꾸지나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 유효성분인 카지놀 A 또는 이를 포함하는 꾸지나무 추출물은 방광암 세포(T24)뿐만 아니라 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)의 생존율을 감소시키고, 상기 T24 및 T24R2 세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포자살(apoptosis) 및 자가포식성 세포사멸(autophagic cell death)을 유도하여 항암 효과를 나타내므로, 방광암의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 36/605 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자
오상석
경상남도 진주시 말티고개로 113, 101동 1304호(초전동, 초전대림아파트)
이기원
경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 103동 2513호(상남동, 성원아파트)
유지윤
경상남도 진주시 석갑로53번길 28, 104동 1102호(평거동)
류형원
대전광역시 서구 대덕대로175번길 60, 1207호(둔산동, 메르하우젠)
박기훈
경상남도 진주시 초장로14번길 29, 206동 1303호(초전동, 진주초전푸르지오2단지)
김동희
경상남도 진주시 천수로 30, 102동 304호 (주약동, 한보은빛마을아파트)
아흐맛 부다이리
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01107002
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단
연구사업명 차세대바이오그린21 사업
연구과제명 주요작물 대사체 Flux별 면역활성비교 분석 및 생물활성기전 규명
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2016.02.16
공지예외적용 : 있음

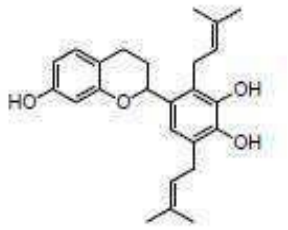
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 꾸지나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 방광암은 항암제 내성이 있는 방광암을 포함하는 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항암제는 플라티늄(platinum) 계열인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 플라티늄 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 또는 카보플라틴(carboplatin)인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 카지놀 A의 농도는 20 내지 50 μM인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포사멸(apoptosis) 유도 또는 자가포식(autophagy) 유도를 통해 항암 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

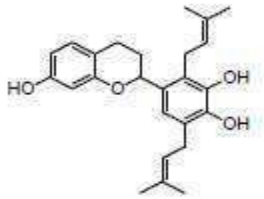
제1항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출

물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 10

제9항에 있어서, 상기 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

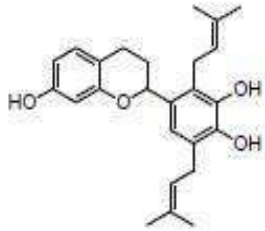
청구항 11

제9항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 치료용 항암보조제.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카지놀 A 또는 이를 포함하는 꾸지나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방광암은 전 세계적으로 11번째 발생빈도를 가진 암으로서, 모든 악성종양 환자의 3~4%를 차지한다. 전 세계적으로 매년 약 20만 명 이상의 새로운 환자가 발생하며, 이 중에서 15만 명 이상이 남성이다. 방광암은 암의 진행경과에 따라 표재성 방광암, 침윤성 방광암 및 전이성 방광암으로 구분되는데, 가장 많은 표재성 방광암의 경우 조기 발견이 되면 경요도 방광암 절제술이 시행되는데, 절제술을 통해 육안적으로 발견된 방광암 조직을 모두 절제한다 하더라도 약 50~70%의 매우 높은 암재발률을 가지고 있다. 또한 반복적인 재수술로 인한 요도협착, 방광천공, 중증감염 등의 합병증이 다수 발생하고 있다. 이러한 재발률을 낮추기 위해, 최근에는 일차적인 경요도 방광암 절제술 후, 항암제 또는 면역요법제를 이용한 방광내 항암요법을 추가로 시행하기도 하지만 매우 심한 혈뇨 및 방광요도 염증성 질환을 일으키게 되며, 방광암의 계속적인 진행을 방지하지는 못한다. 또한 침윤성 방광암은 근치적 방광암 적출술의 매우 큰 수술로서 치료받아야만 하는데 수술 후 인조방광대체 및 지속적인 소변주머니를 차야만 하여 일상 생활에 큰 지장을 초래할 뿐 아니라, 수술 후의 합병증도 매우 심각한 경우가 많다. 또한 환자가 일단 전이성 방광암으로 진단되면 전신적인 항암요법만이 유일한 치료법이나 이 치료 역시 전

신적으로 매우 치명적인 합병증을 가져오며, 항암제의 적극적인 치료에도 불구하고 환자의 예후는 매우 나쁘다.

[0003] 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera* Ventenat)는 쌍떡잎식물 쐐기풀목 뽕나무과의 낙엽활엽 소교목으로 아시아 난대와 열대에 주로 분포한다. 나무껍질은 종이의 원료로 각종 한지를 만들고, 열매는 약으로 쓰거나 맛이 좋아 그냥 먹으며, 어린 잎도 식용한다. 꾸지나무의 인피섬유는 제지의 원료로 사용되고 있으며 꾸지나무로부터 추출한 여러 성분들이 다양한 약효를 가지고 있음이 보고되었다. 구체적으로, 꾸지나무는 강장, 명복작용, 음위, 수종, 익기, 이뇨 등에 효과를 나타내는 성분, 풍을 제거할 수 있는 성분 및 피를 맑게하고 시력감퇴 등에 효능을 나타내는 성분 등을 함유하는 것으로 보고되어 있고, 한방에서는 신체 허약·시력 감퇴·수종 등에 약으로 사용되고 있으며, 중국 및 인도차이나에서는 수종 및 복수증(ascites)에 전통 의약으로 이용되고 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제0361090호에는 꾸지나무로부터 분리한 항염증 활성을 나타내는 신규한 플레닐레이티드 플라보노이드 화합물, 이를 주성분으로 함유하는 꾸지나무 추출물, 이들의 제조방법 및 이들을 함유하는 약학적 조성물에 대해 개시하고 있고, 한국등록특허 제1264737호에는 꾸지나무 추출물 및 인동 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증 의약조성물에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 카지놀 A 또는 이를 포함하는 꾸지나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 아직 개시한 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 카지놀 A를 방광암 세포(T24)뿐만 아니라 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, T24 및 T24R2 세포의 생존율이 감소되고, 상기 T24 및 T24R2 세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포자살(apoptosis) 및 자가포식성 세포사멸(autophagic cell death)을 유도하여 항암 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(Broussonetia papyrifera) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 치료용 항암보조제를 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 유효성분인 카지놀 A 또는 이를 포함하는 꾸지나무 추출물은 방광암 세포(T24)뿐만 아니라 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)의 생존율을 감소시키고, 상기 T24 및 T24R2 세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포자살(apoptosis) 및 자가포식성 세포사멸(autophagic cell death)을 유도하여 항암 효과를 나타내므로, 방광암의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 농도별로 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때의 세포 생존율(cell viability)을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 대장암 세포(SW620), 유방암 세포(MCF-7), 뇌종양 세포(T98G), 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때의 세포 생존율(cell viability)을 나타낸 것이다. ***은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리한 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)의 생존율 감소 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.001 미만인 것을 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24)(A) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)(B)에 처리하였을 때, 유도되는 세포주기 중지(cell cycle arrest)를 확인한 결과이다. ***은 $G_{0/1}$기에서 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24 및

T24R2 세포군의 감소 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.001 미만인 것을 의미한다. **은 S기에서 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24 및 T24R2 세포군의 감소 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, G_2/M기에서 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24R2 세포군의 감소 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.01 미만인 것을 의미한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24)(A) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)(B)에 처리하였을 때, 세포주기 중지에 관여하는 *cyclin D1* 및 *p21* 유전자의 발현 정도를 나타낸 것이다. **은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24 및 T24R2 세포에서 *cyclin D1*의 발현의 감소 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.01 미만인 것을 의미한다. ***은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24 및 T24R2 세포에서 *p21*의 발현의 증가 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.001 미만인 것을 의미한다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, 세포주기 중지에 관여하는 cyclin D1 및 p21 단백질의 발현 정도를 나타낸 것이다. α-튜불린(tubulin)은 로딩 컨트롤이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, T24 및 T24R2의 세포사멸 효과를 나타낸 것이다. *은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24의 세포사멸 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.05 미만인 것을 의미한다. **은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24R2의 세포사멸 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.05 미만인 것을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, 세포자살의 전형적인 표현형인 cf-카스파아제-3(cf-caspase-3) 및 cf-PARP(cf-Poly ADP-ribose Polymerase)의 발현 양상을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, 세포자살과 관련이 있는 미토콘드리아 외막 투과성을 미토트래커 레드(Mitotracker Red) CMXRos 염색 및 유세포 분석기를 통해 분석한 결과이다.

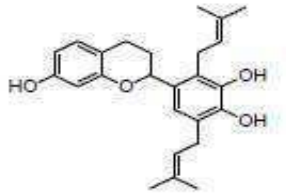
도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A를 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, 자가포식 형성시 점 형태를 이루는 LC3B-GFP를 찍은 공초점 현미경 사진(A) 및 총 GFP 세포 대비 점 형태를 이루는 GFP 세포 비율 그래프(B)를 나타낸 것이다. **은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24 세포에서 자가포식으로 형성되는 점 형태의 GFP 세포수 증가가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.01 미만인 것을 의미한다. ***은 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에 대비하여 카지놀 A를 처리하였을 때, T24R2 세포에서 자가포식으로 형성되는 점 형태의 GFP 세포수 증가가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.001 미만인 것을 의미한다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 꾸지나무 뿌리 추출물로부터 분리한 카지놀 A 및 자가포식 억제제인 3MA를 함께 방광암 세포(T24) 및 항암제 내성이 있는 방광암 세포(T24R2)에 처리하였을 때, 카지놀 A만 처리한 군에 대비하여 LC3B-Ⅱ의 발현 정도 차이를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

화학식 1



[0012]

[0013] 본 발명의 방광암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매, 바람직하게는 에탄올을 용매로 이용하여 추출한 것이다.

[0014] 상기 꾸지나무 추출물은 꾸지나무 뿌리로부터 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 상기 방광암은 항암제 내성이 있는 방광암을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 상기 항암제는 플라티늄(platinum) 계열인 것이며, 바람직하게는 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 또는 카보플라틴(carboplatin)인 것이며, 더욱 바람직하게는 시스플라틴(Cisplatin)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 상기 카지놀 A의 농도는 20 내지 50㎛M인 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 상기 조성물은 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포사멸(apoptosis) 유도 또는 자가포식(autophagy) 유도를 통해 방광암의 예방 또는 개선 효과를 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

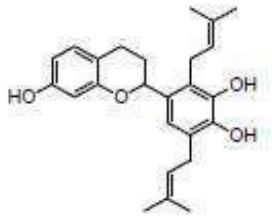
[0021] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0022] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0023] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0024] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 조성물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

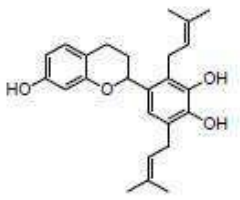
[0029] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 카지놀 A를 포함하는 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 카지놀 A에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0031] 본 발명의 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물은 쥐, 생쥐, 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.

[0032] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 카지놀 A(kazinol A) 또는 이를 포함하는 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 방광암의 예방 또는 치료용 항암보조제를 제공한다.

[0033] [화학식 1]



[0034]

[0035] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상

의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0036] **재료 및 방법**

[0037] **1. 시료 준비**

[0038] 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*)는 한국의 남동쪽에 있는 경남 지방의 언덕(200m 고도)에서 2008년 7월에 수집하였으며, 대조표본(voucher specimen)은 경북대학교 식물표본실에 보관하였다.

[0039] **2. 꾸지나무 추출물 제조 및 이로부터 카지놀 A(kazinol A)의 분리 및 정제**

[0040] 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*) 추출물 및 이로부터 카지놀 A(kazinol A)를 분리 및 정제하기 위하여, 건조된 1.0kg의 꾸지나무 뿌리를 분말화한 후, 상온에서 에탄올로 추출하였다. 추출물은 감압농축기를 이용하여 농축시키고, 암적색 잔류물(143g, 14.3%)을 수득하고 사용한 용매를 완전히 제거하기 위해 건조기에 보관하였다. 상기 잔류물의 일부(5g)는 9개의 분획물(BP1-9)을 얻기 위해, 30㎖/분의 유속 및 0~100% CH_3OH/H_2O의 선형 구배로 중압(medium-pressure) 액체 크로마토그래피(MPLC)(Puriflash 450, France, Interchim)를 이용하여 역상 실리카겔 칼럼(5×30cm, YMC ODS AQ-HG 10㎛, 220g)으로 분획하였다. 카지놀 A가 풍부한 소분획물 BP7에서 헥산/에틸아세테이트 구배(30:1→1:1)를 이용한 플래쉬 칼럼 크로마토그래피법을 이용하여 카지놀 A(115mg)를 획득하였고, 이로부터 정제된 화합물은 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 데이터를 비교함으로써 확인하였다.

[0041] **3. 세포 배양 및 화합물**

[0042] SW620 인간 대장암 세포(human colon cell), MCF-7 인간 유방암 세포(human breast cell), T98GP2 인간 뇌종양 세포(human glioblastoma) 및 T24 인간 방광암 세포(human bladder cell)주들은 ATCC(American Type of Culture Collection, USA)로부터 제공받았다. 항암제인 시스플라틴(cisplatin)에 내성을 지닌 T24 세포 유래의 T24R2 세포는 T24 세포에 지속적으로 시스플라틴을 공급하여 탈감작(desensitization)시킴으로써 확립하였다. 상기 SW620 인간 대장암 세포, MCF-7 인간 유방암 세포, T98GP2 인간 뇌종양 세포 및 T24 및 T24R2 인간 방광암 세포는 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma-Aldrich,USA)이 첨가된 DME(Dulbecco's Modified Eagle's) 배지에 5% CO_2 가습 배양기에서 37℃의 조건하에 배양하였다. 항-카스파아제-3, 항-PARP, 항-사이클린 D1, 항-p21, 항-LC3 II, 항-p-AMPK, 항-AMPK, 항-p-AKT(T308), 항-AKT, 항-p-mTOR, 항-mTOR 및 항-pBad(S136) 항체들은 CTS(Cell Signaling Technology); Anti-active Bax 항체는 BD; Anti-α-tubulin 및 Bad 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology); PI(Propidium iodide), zVAD-fmk, DAPI(6-diamidino-2-phenylindole) 및 3-MA(3-methyladenine)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich); 티로신-EDTA는 론자(Lonza,USA) 및 MTT([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 암레스코(Amresco, USA)로부터 구매하였다.

[0043] **4. 세포 생존율(cell viability) 측정**

[0044] SW620, MCF-7, T98GP2, T24 및 T24R2 세포는 96-웰 플레이트에 24시간 배양한 후, 상기 세포에 다양한 농도의 카지놀 A를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 세포에 MTT(5㎍/mL) 용액을 첨가하여 3시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 세포에 DMSO를 처리하여 20분 동안 배양하였으며, 마이크로플레이트 리더(microplatereader, Bio-Rad)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0045] **5. RNA 추출, RT-PCR 및 Real-time PCR**

[0046] 총 RNA는 제조사의 지시에 따라 RiboEX 시약(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Seoul, Korea)을 이용하여 세포로부터 추출하였으며, RNA는 NanoDrop 분광광도계(Thermo Fisher Scientific Inc., TN, USA)를 이용하여 정량하고 cDNA는 올리고-dT 프라이머 및 역전사(Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)를 통해 합성하였다.

[0047] Real-Time PCR은 SSoFast™ EvaGreen Supermix 및 CFX96™ Real-Time 검출 시스템(바이오 레드)을 통하여 수행하였으며, 하기 표 1의 각 프라이머를 이용하였다.

표 1

[0048] 본 발명에 사용된 프라이머

목표 유전자	서열번호	정방향/역방향	염기서열
cyclin D1	1	정방향	CCTAAGTTCGGTTCCGATGA
	2	역방향	ACGTCAGCCTCCACACTCTT
p21	3	정방향	GACACCACTGGAGGGTG ACT
	4	역방향	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA

[0049] **6. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석**

[0050] 총 단백질은 RIPA 용해버퍼(50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 소듐 디옥시콜레이트 및 0.1% SDS)를 이용하여 추출하였다. 상기 단백질은 10~15% SDS-PAGE 상에서 분리한 다음, PVDF 멤브레인(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 트렌스퍼(transfer)하였다. 상기 멤브레인은 0.1% 트윈 20을 함유하는 TBS(tris-buffer saline)에 1시간 동안 5% 스킴 밀크(skim milk) 및 일차 항체(primary antibodiy)와 함께 배양하였다. 이후 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)가 붙어있는 항-마우스 IgG 및 항-토끼 IgG 항체를 추가 배양하였다. 신호는 Clarity™ Western ECL substrate(바이오 레드)를 사용하여 검출하였다.

[0051] **7. PI(Propidium Iodide) 염색**

[0052] T24 및 T24R2 세포를 6-웰 플레이트에 접종한 후, 카지놀 A를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 트립신을 통해 모았으며, PBS로 세척한 뒤, 70% 차가운-에탄올을 처리하여 -20℃에서 하루 동안 고정시켰다. 이후 PBS 세척을 거친 뒤, RNase를 처리하여 37℃에서 2시간 배양하고, PI를 처리하여 세포를 염색시켰다. 염색된 세포는 FACSVerse™(Becton dickinson, USA) 및 Modifit LT 3.3(Verity Software House, Maine, USA)을 이용하여 유세포(flow cytomery) 분석을 수행하였다.

[0053] **8. 미토콘드리아 투과성(mitochondrial permeabilization) 분석**

[0054] T24 및 T24R2 세포를 6-웰 플레이트에 접종한 후, 카지놀 A를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 250nM의 Mitotracker® Red CMXRos(Invitrogen, USA)를 이용해 30분 동안 37℃에서 염색시켰다. 이후 세포를 트립신을 통해 모았으며, PBS로 두 번 세척을 한 뒤, 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰다. 염색된 세포는 FACSVerse™(Becton dickinson, USA) 및 Modifit LT 3.3(Verity Software House, Maine, USA)을 이용하여 분석하였다.

[0055] **9. 공초점 현미경(confocal microscope) 분석**

[0056] 12-웰 플레이트에서 25mm 원형 유리 커버슬립에 세포를 접종한 후, 아데노 바이러스를 이용해 LC3-EGFP를 발현시켰다. 세포에 14시간 동안 카지놀 A를 처리한 후, 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고, PBS로 3회 세척을 한 후, 마운팅 배지(Vector laboratory, USA)를 이용해 커버글라스에 고정시켰다. Active-Bax (Becton Dickinson) 염색은 배양이 끝난 세포에 Mitotracker® Red CMXRos를 염색한 후, 4% 파라포름알데하이드 및 0.1% 트리톤 X-100을 이용해 고정 및 투과화를 수행하였다. 이후 Active-Bax 항체를 처리하여 하루 동안 배양한 후, 항-마우스 IgG FITC 항체를 추가적으로 처리한 후, 마운팅 배지를 이용해 커버글라스에 고정시켰다. Active-Bax 및 LC3-EGFP 발현 패턴은 FluoView™ FV1000(Olympus, Japan)을 이용하여 이미지화하였다.

[0057] **10. 통계 분석(statistical analysis)**

[0058] 모든 데이터는 unpaired Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며, 결과는 $p < 0.05$의 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0059] **실시예 1. 방광암 세포주인 T24 및 T24R2에 대한 카지놀 A의 항암효과**

[0060] 방광암 세포주인 T24 및 항암제인 시스플라틴에 내성이 있는 T24R2 세포를 대상으로 꾸지나무(B. *papyrifera*) 뿌리에서 분리된 카지놀 A에 대한 항암효과를 측정하기 위해, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 이용한 세포 생존율을 분석하였다. 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 카지놀 A를 처리하였을 경우, T24 세포 및 시스플라틴에 내성이 있는 T24R2 세포에서 모두 세포 생존율이 감소되는 효과를 확인하였다. 다른 암세포주에 대해 카지놀 A의 세포 생존율의 감소 효과를 확인하기 위해, T24 및 T24R2 방광암 세포뿐만 아니라 SW620 대장암 세포, MCF-7 유방암 세포 및 T98GP2 뇌종양 세포에도 카지놀 A를 처리하였으나, 방광암 세포를 제외한 다른 암세포주들의 생존율을 감소시키는 효과는 관찰되지 않았다(도 2).

[0061] **실시예 2. 카지놀 A 처리에 의해 유도되는 세포주기중지(Cell cycle arrest)**

[0062] T24 및 T24R2 세포주에 대해 카지놀 A의 항암효과를 세부적으로 규명하기 위해, PI(Propidium Iodide) 염색을 통해 세포주기중지를 분석하였다. 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 T24R2 세포주에서 비록 그 효과가 약하였지만, T24 및 T24R2 세포에서 모두 카지놀 A에 의한 $G_{0/1}$기에서 세포주기중지가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 카지놀 A에 의해 유도되는 세포주기중지에 관여하는 유전자를 동정하기 위해, RT-PCR을 수행하여 cDNA를 제작하였고, Real-time PCR 분석을 통해 확인한 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 카지놀 A에 의해 *cyclin D1* 유전자가 감소하고, *p21* 유전자가 증가하는 것을 확인하였으며, 단백질 수준에서도 카지놀 A를 처리하였을 때, Cyclin D1의 발현량이 감소되고 p21의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[0063] **실시예 3. 카지놀 A 처리에 의해 유도되는 세포자살(apoptosis)**

[0064] 본 발명의 카지놀 A 처리에 의해 세포자살을 유도하여 항암효과를 확인하였다. 이를 수행하기 위해, PI 염색 후, 유세포 분석기(flow cytometry)을 통해 sub-$G_{0/1}$기의 세포군을 정량화하였다. 20μM의 카지놀 A를 24시간 처리한 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 T24 및 T24R2 세포주에 대한 sub-$_{G0/1}$기 세포군의 세포사멸(%)이 카지놀 A를 처리하지 않은 대조군에서 각각 5.61% 및 1.53%인 반면, 카지놀 A를 처리한 군에서 각각 42.31% 및 26.47%로 세포사멸(%)이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0065] 또한, 도 7에 개시된 바와 같이 카지놀 A를 처리하였을 때, 전형적인 세포자살 표현형으로, 카스파아제-3(caspase-3)의 활성 형태인 cf-카스파아제-3의 발현을 증가시키고, 이로 인해 손상된 암세포의 회복을 도와주는 PARP(poly(ADP-ribose)polymerase)를 분절시켜 불활성 형태인 cf-PARP의 발현을 증가시키는 것을 확인함으로써, 본 발명의 카지놀 A가 세포자살을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] 세포사멸과 밀접한 관련이 있는 미토콘드리아 외막 투과성(MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization)이 카지놀 A 처리에 의해 유도되는지를 분석하기 위해, 카지놀 A를 처리한 세포를 Mitotracker® Red CMXRos로 염색하였다. 그 결과, 도 8에 개시된 바와 같이 미토콘드리아 막 포텐셜이 카지놀 A의 처리에 의해 감소되는 것을 확인하였으며, 이로 인해 방광암세포의 세포자살이 발생함을 확인할 수 있었다.

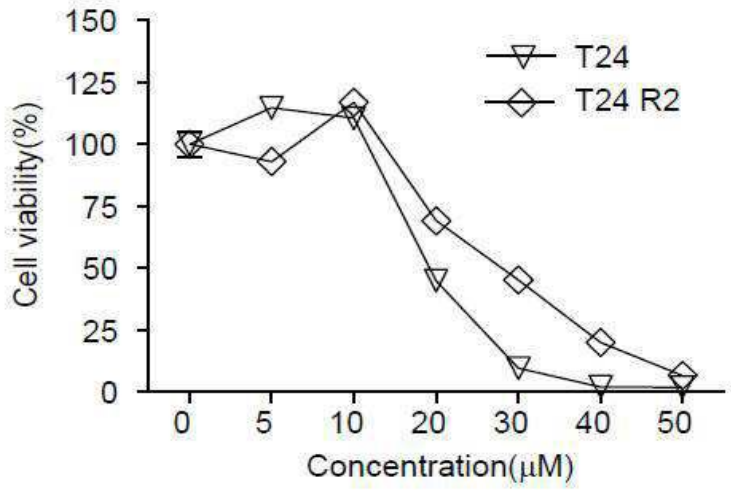
[0067] **실시예 4. 카지놀 A 처리에 의해 유도되는 자가포식성 세포사멸(autophagic cell death)**

[0068] 카지놀 A가 방광암 세포에서 자가포식(autophagy)을 일으키는지 확인하기 위해, LC3B-GFP를 세포에 발현시킨 후, 20μM의 카지놀 A를 14시간 동안 처리하였다. LC3B는 자가포식 과정에서 자가포식소체(autophagesome)의 마커로서 자가포식이 형성될 때, 자가포식소체에 모여들기 때문에, LC3B에 GFP를 표지하였을 경우, 점 형태를 보이게 되는데, 카지놀 A를 처리하였을 때 이러한 점 형태의 GFP 패턴이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 9). 또한, 자가포식이 진행되는 동안 LC3B-I에서 LC3B-II로 전환되며, 웨스턴 블롯 분석을 통해 아무것도 처리하지

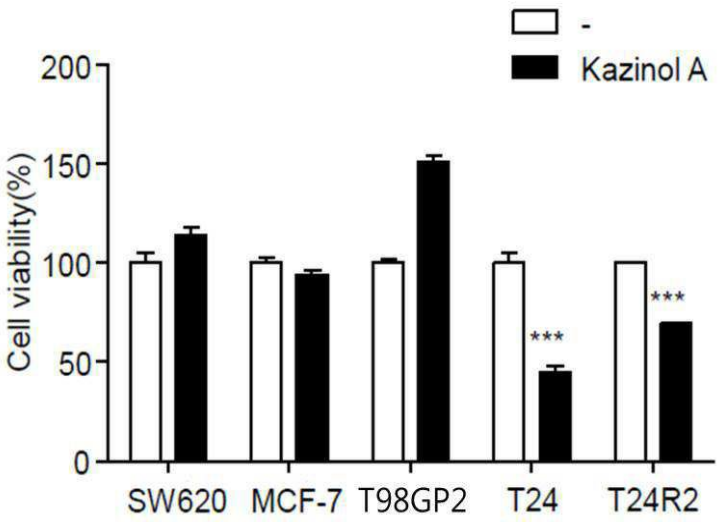
않은 대조군에 비해 카지놀 A 처리시 LC3B-II의 발현량이 증가하는 것을 확인하였고, 자가포식 억제제인 3MA 처리에 의해 LC3B-II의 발현량이 다시 감소하는 것을 확인하였다(도 10). 이를 통해, 본 발명의 카지놀 A 처리로 인해 방광암세포의 자가포식성 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

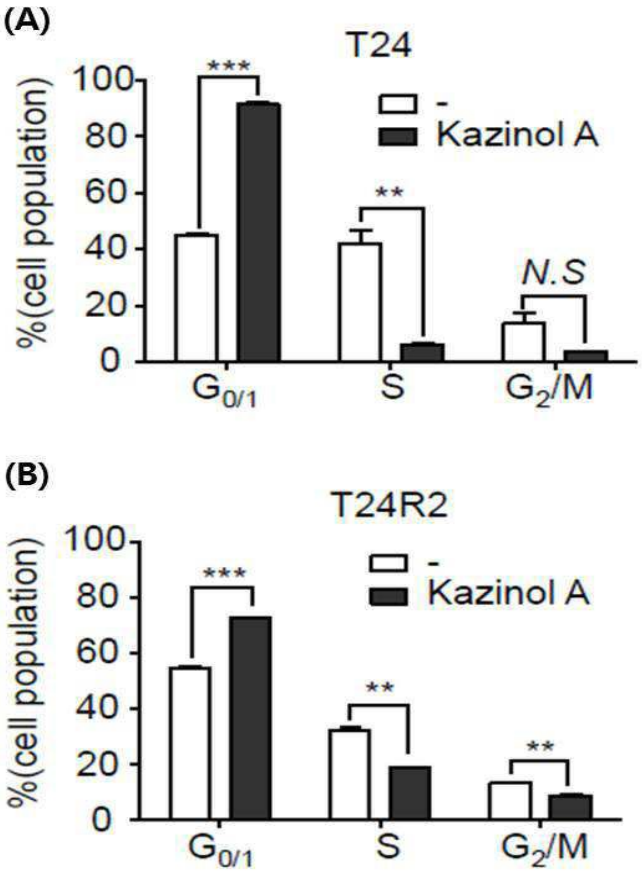
도면1



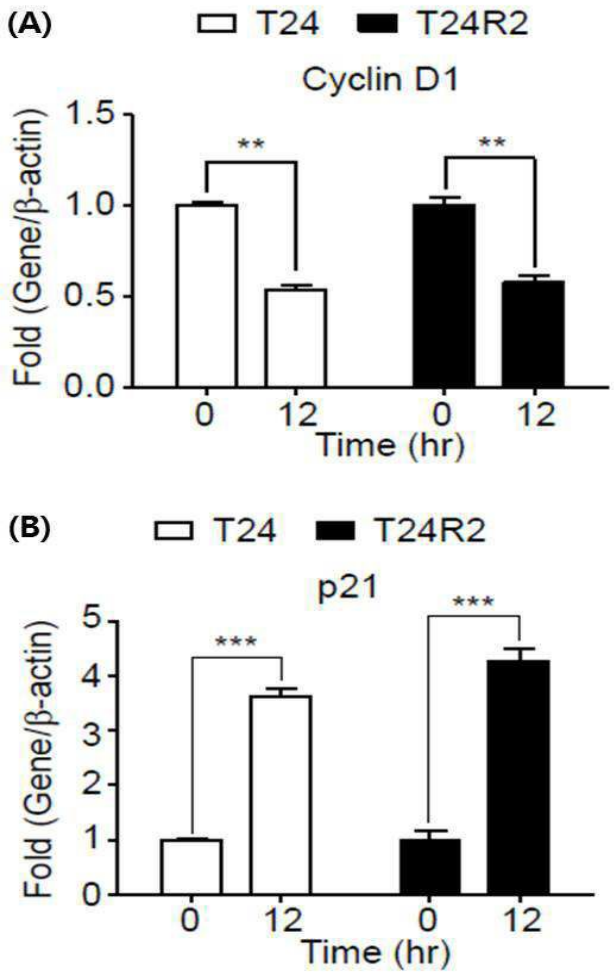
도면2



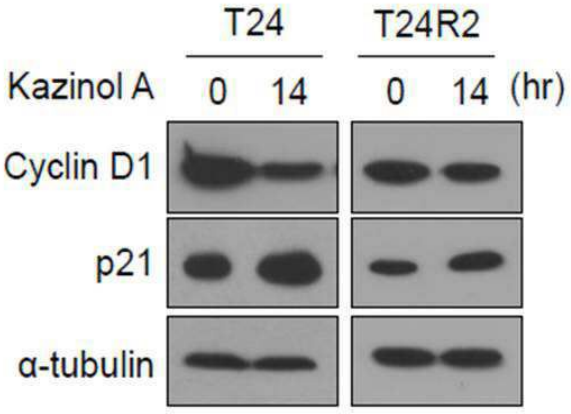
도면3


(A)
T24
%(cell population)
100
80
60
40
20
0
***
**
N.S
-
Kazinol A
G0/1
S
G2/M
(B)
T24R2
%(cell population)
100
80
60
40
20
0
***
**
**
-
Kazinol A
G0/1
S
G2/M

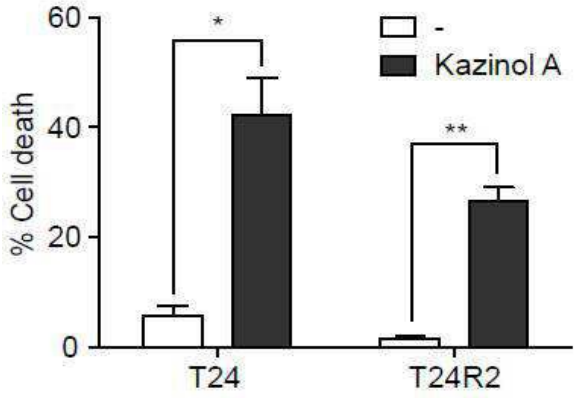
도면4


(A)
T24
T24R2
Cyclin D1
Fold (Gene/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
0
12
0
12
Time (hr)
(B)
T24
T24R2
p21
Fold (Gene/β-actin)
5
4
3
2
1
0
***
***
0
12
0
12
Time (hr)

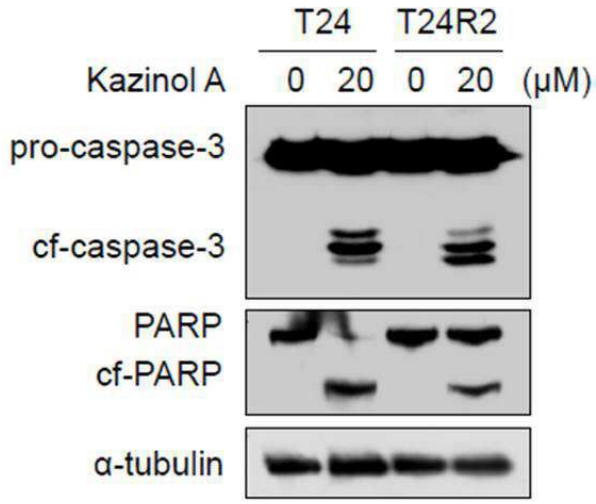
도면5


T24
T24R2
Kazinol A
0
14
0
14
(hr)
Cyclin D1
p21
α-tubulin

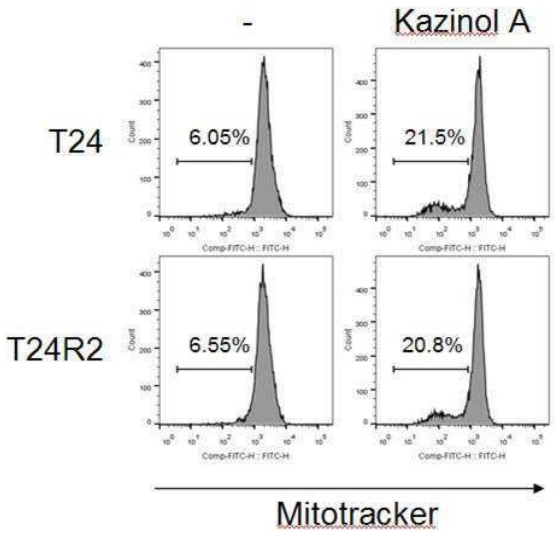
도면6


60
40
20
0
% Cell death
*
**
-
Kazinol A
T24
T24R2

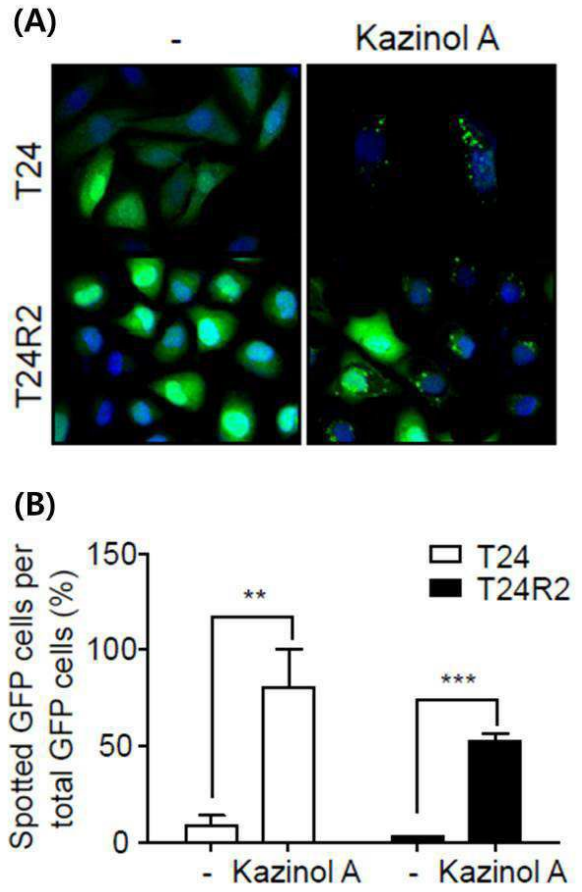
도면7


T24
T24R2
Kazinol A
0
20
0
20
(μM)
pro-caspase-3
cf-caspase-3
PARP
cf-PARP
α-tubulin

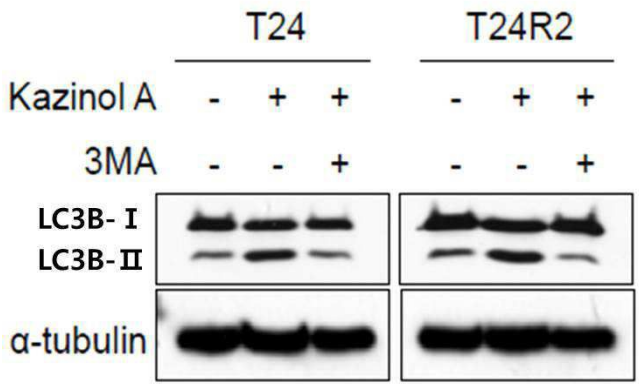
도면8


-
Kazinol A
T24
T24R2
6.05%
21.5%
6.55%
20.8%
Mitotracker

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing, improving or treating of bladder cancer comprising kazinol A or Broussonetia papyrifera extract containing kazinol A as effective component

<130> PN15445

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cctaagttcg gttccgatga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

acgtcagcct ccacactctt 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gacaccactg gagggtgact 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggcgtttgga gtggtagaaa 20