



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0112562
(43) 공개일자 2018년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/353 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/353 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0043806

(22) 출원일자 2017년04월04일

심사청구일자 2017년04월04일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

최정혜

서울특별시 성동구 독서당로 175, 104동 1902호 (옥수동, 극동그린아파트)

장대식

서울특별시 강남구 광평로10길 50, 106동 103호 (일원동, 청솔빌리지)

우정화

서울특별시 동대문구 이문로34길 16, 4/4 (이문동)

(74) 대리인

안소영

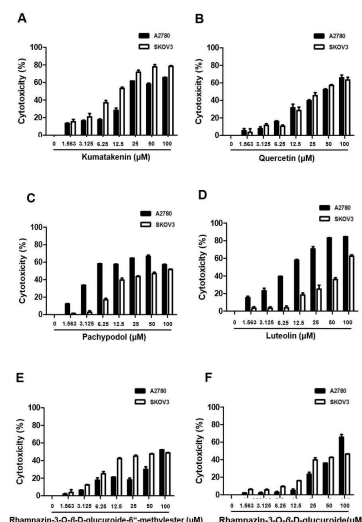
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 쿠마타케닌을 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 쿠마타케닌(kumatakenin) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물과 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 쿠마타케닌은 암세포의 생존 능력을 억제하고 암의 악성화를 억제하는 효능이 탁월하여, 이를 이용한 약학적 조성물 및 건강기능식품은 암을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 쿠마타케닌은 암세포에 아포토시스(apoptosis)를 유도하여 암세포에 강력한 세포 독성을 나타내며, MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제하여 대식세포가 종양 부위로 이동하는 것을 억제하는 효과가 우수하다. 또한 M2 표현형 마커인 CD206 및 Trem-2의 발현을 억제하고, 암 촉진 인자인 IL-10, VEGF, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제함으로써 암의 악성화를 억제하는 효과가 탁월하다. 또한, 본 발명의 쿠마타케닌은 천연 유래의 화합물로서 부작용이 없어 약학적 조성물, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A2A2A01067888

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(핵심연구)

연구과제명 염증성 미세환경 조절을 통한 난소암 항암제저항성 제어 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

쿠마타케닌 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포에 대하여 세포 독성을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포에 대하여 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 효능을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 MCP-1, RANTES, CD206, Trem-2, IL-10, VEGF, MMP-2 및 MMP-9로 이루어진 군에서 선택되는 유전자의 발현을 억제하는 효능을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 암은 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 뇌종양, 전립선암, 담낭암, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 자궁암, 직장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암 및 요도암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암은 난소암인 것인 약학적 조성물.

청구항 7

쿠마타케닌 또는 그의 식품학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 건강기능식품은 암세포에 대하여 세포 독성을 갖는 것인 건강기능식품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 건강기능식품은 암세포에 대하여 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 효능을 갖는 것인 건강기능식품.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 건강기능식품은 MCP-1, RANTES, CD206, Trem-2, IL-10, VEGF, MMP-2 및 MMP-9로 이루어진 군에서 선택되는 유전자의 발현을 억제하는 효능을 갖는 것인 건강기능식품.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 암은 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 뇌종양, 전립선암, 담낭암, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 자궁암, 직장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암 및 요도암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 건강기능식품.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 암은 난소암인 것인 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쿠마타케닌(kumatakenin)을 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 구체적으로 본 발명은 쿠마타케닌 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물과 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 암은 주로 세포 성장과 아포토시스(apoptosis) 사이의 불균형으로 인해 악성 세포의 통제되지 않는 성장으로 발생하는 것으로 알려져 있다. 아포토시스는 프로그램된 세포 사멸 중 가장 잘 알려진 방식의 하나로, 암세포에서 아포토시스를 유도하는 것은 암세포의 성장을 제어하는 치료 전략으로 널리 사용되고 있다. 실제로, 다수의 종래 항암제가 아포토시스 경로를 통해 종양 세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 아포토시스는 염색질 응축, 뉴클레오솜 DNA 단편화, 세포 사멸체(apoptotic body) 형성 및 카스파제(caspase)의 활성화를 특징으로 한다. 면역 세포, 섬유아세포 및 내피 세포를 포함한 다양한 비-암세포로 구성된 종양 미세환경(tumor microenvironment)은 암 발달 및 진행에 영향을 미치는 주요 요인으로 인식되고 있다. 예를 들어, 대부분의 종양은 숙주 백혈구 침윤의 주요 성분으로서 다수의 대식세포를 포함하는 것으로 알려져 있다. 또한, 대식세포가 종양의 성장과 전이를 촉진할 수 있는 M2 표현형의 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage, TAM)로 변화한다는 것이 보고되었으며, 이와 관련하여 TAM은 암 치료를 위한 잠재적인 치료 타겟으로 제안되어왔다(Tsuboki J, et al. Onionin A inhibits ovarian cancer progression by suppressing cancer cell proliferation and the protumour function of macrophages. Sci Rep. 2016;6:29588).

[0005] 부인과(gynecology) 암 질환에서의 주요 사망 원인은 난소암인 것으로 알려져 있으며, 대부분의 난소암 환자들은 진행성 질환(III기 또는 IV기)으로 진단되며 생존율은 10-30%에 불과한 것으로 알려져 있다. 종래 난소암 치료에는 일반적으로 플라티늄, 타산(taxane) 등과 같은 화학 치료제가 사용되어 왔으나, 이들은 메스꺼움, 구토 등과 같은 광범위한 부작용을 나타내었으며(Ferrandina G, et al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. Ann Oncol. 2002;13:1205-1211), 또한 대부분의 환자에서 화학 요법에 대한 저항성이 반복적으로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Kigawa J. New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. Yonago Acta Med. 2013;56:43-50). 따라서, 난소암, 특히 후기 단계 및 재발 난소암을 위한 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 한편, 일반적으로 정향으로 알려진 시기지움 아로마티쿰(*Syzygium aromaticum*)의 꽃봉오리는 수세기 동안 식품 보존제 및 여러 의약 목적으로 사용되어 온 가장 유용한 향신료 중 하나이다. 정향은 항박테리아, 항곰팡이, 항산화, 항염증 활성 등의 생물학적 활성을 갖는 것으로 보고된바 있다(Kislev ME, et al. Early domesticated fig in the Jordan Valley. Science. 2006;312:1372-1374). 그러나 정향으로부터 분리된 성분인 쿠마타케닌(kumatakenin)의 생물학적 활성에 관하여는 보고된 바가 거의 없으며, 특히 쿠마타케닌의 항암 효능에 관하여는 전혀 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 쿠마타케닌(kumatakenin)을 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

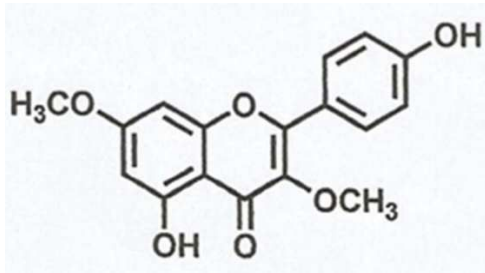
[0008] 구체적으로 본 발명은 쿠마타케닌 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물과 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 쿠마타케닌(kumatakenin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 쿠마타케닌은 천연 유래의 화합물로서, 구체적인 구조는 하기 화학식 1과 같다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 본 발명의 쿠마타케닌은 화학적으로 합성하거나 천연물로부터 분리할 수 있으며, 국내외에서 시판되는 것을 구입하여 사용할 수도 있다.

[0014] 본 발명의 실시예에서는 시지기움 아로마티쿰(*Syzygium aromaticum* L.; 정향)의 분획물로부터 쿠마타케닌을 분리 정제하여 사용하였다.

[0015] 구체적으로, 경동 생약 시장에서 구입한 건조 및 분말화된 시지기움 아로마티쿰의 꽃봉오리(2.1 kg)를 수조에서 2 시간 동안 60℃ 조건에서 70% EtOH 20L로 2회 추출하고, 용매를 40℃에서 진공상태에서 증발시켰다. 상기 70% EtOH 추출물(625.0 g)을 n-헥산 (2L×3), EtOAc (2L×3) 및 BuOH (2L×3)으로 연속적으로 분별하여 각각의 n-헥산 추출물(303.1 g), EtOAc-가용성 추출물(132.0 g), BuOH 추출물(93.0 g) 및 수용성 추출물 (95.7 g)을 수득하였다.

[0016] 상기 EtOAc-가용성 추출물(132.0 g)을 CH₂Cl₂-가용성 및 비- 용성 분획물로 분획하였다. 상기 CH₂Cl₂-가용성 분획물(12.2 g)을 이동상으로 CH₂Cl₂-MeOH 혼합물(1:0 내지 9:1 v/v의 구배), 고정상으로 실리카겔(70-230 메쉬, ϕ6.0×44 cm)을 이용한 크로마토그래피를 수행하여, 7개의 분획물(EM1-EM7)을 수득하였다. 그 중 EM3 분획물 [CH₂Cl₂-MeOH (19:1 v/v)로 용리됨; 7.2 g]을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(CC)(230-400 메쉬, ϕ5.0×33 cm, n-헥산-EtOAc = 4:1 내지 1:1 v/v)를 수행하여, 8개의 하위 분획물(EM3-1 -EM3-8)을 수득하였다. 상기 하위 분획물 중, EM3-4에 대하여 MeOH-H₂O 혼합물(7:3 v/v)을 이용한 역상 CC (YMC gel 150 μm, ϕ3.5×24 cm)를 수행하여 쿠마타케닌(9.0 mg)을 수득하였다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어, "추출물"은 물질의 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0018] 본 발명의 추출물을 제조하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법, 침지 추출법, 고온 및 고압 증기 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0020] 본 발명에서 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.

[0021] 본 발명에서 분획물을 얻는 데에 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 등의 극성 용매; 헥산, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합하여 사용될 수 있다.

- [0022] 본 발명자들은 본 발명의 쿠마타케닌이 암세포의 생존 능력을 억제하고 암의 악성화를 억제하는 효능이 탁월함을 최초로 규명하였으며, 이로써 쿠마타케닌의 암의 예방, 개선 또는 치료 용도를 최초로 규명하였다.
- [0023] 구체적으로, 본 발명의 실시예들에서 인간 난소암 세포(A2780 및 SKOV3)의 암세포 생존 능력에 대한 쿠마타케닌의 억제 효능을 확인한 결과, 쿠마타케닌은 A2780 및 SKOV3 모두에 강력한 세포 독성을 나타내는 것으로 확인되었으며(도 2A), 이는 쿠마타케닌이 암세포에 대하여 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 것과 관련이 있는 것으로 확인되었다(도 4).
- [0024] 또한, 본 발명의 다른 실시예들에서 종양의 악성화와 관련된 유전자들의 발현에 대한 쿠마타케닌의 억제 효능을 확인한 결과, 쿠마타케닌이 MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제하여 대식세포가 종양 부위로 이동하는 것을 억제하는 것으로 확인되었으며(도 6), M2 표현형 마커인 CD206 및 Trem-2의 발현을 억제하고(도 7), 암 촉진 인자인 IL-10, VEGF, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제하여(도 8), 암의 악성화를 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)" 및 "RANTES (Regulated upon Activation, normal T cell Expressed and Secreted)"은 CC 케모카인(chemokine)의 일종으로서, 여러 암세포에서 높은 발현을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 종양 부위로 대식세포가 이동하도록 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "CD206" 및 "Trem-2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)"는 M2 표현형 마커를 말한다. 종양 부위로 이동한 대식세포는 암세포에 의해 M2 표현형 및 종양 촉진 활성을 갖는 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage; TAM)로 전환될 수 있는 것으로 알려져 있으며, TAM의 M2 분극화를 통해 암이 악성화되는 것으로 알려져 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "IL-10 (Interleukin-10)", "VEGF (Vascular endothelial growth factor)", "MMP-2 (Matrix metalloproteinase-2)" 및 "MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9)"는 종양 촉진 인자로 알려져 있으며, 종양 관련 대식세포에서 상기 종양 촉진 인자들의 발현을 통해 암이 악성화되는 것으로 알려져 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "암(cancer)"은 의학적으로 세포의 정상적인 분열, 분화 또는 사멸의 조절 기능에 문제가 발생하여 비정상적으로 과다 증식하여 주위 조직 또는 장기에 침윤하여 덩어리를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는 모든 상태를 의미한다. 암은 크게, 발생한 부위에 존재하는 원발암과 발생 부위로부터 신체의 다른 부위로 퍼져나간 전이암으로 구분된다.
- [0029] 본 발명의 예방, 개선 또는 치료 대상 질환은 의학적으로 암의 범주에 해당하는 한, 모두 포함되는 것으로 해석하며 구체적인 질환명이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 뇌종양, 전립선암, 담낭암, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 자궁암, 직장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암 및 요도암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 난소암일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용되는 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 통상적으로 금속염, 유기 염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등; 유기 염기와 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 쿠마타케닌 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는 것 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용될 수 있는 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, 알부민 주사 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.

- [0033] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 증진제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 쿠마타케닌 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001 중량% 내지 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 90 중량%, 보다 바람직하게는 0.1 중량% 내지 70 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 중량% 내지 50중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 봉해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 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.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁액, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수용용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물을 연고, 크림, 도포용 파우더, 오일, 피부 외용제 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.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 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.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 쿠마타케닌은 천연물로부터 유래된 화합물로서, 독성 및 부작용이 없어 질환의 예방, 개선, 치료 목적으로 장기간 투여 시에도 안전하게 사용할 수 있다.

- [0046] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용할 수 있으나, 치료 효율을 증가시키기 위하여 추가적으로 방사선 요법, 화학 요법 등의 다양한 암 치료 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명은 쿠마타케닌 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 사용되는 용어, “식품학적으로 허용되는 염”은, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 식품학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 그 종류에 대한 구체적인 예는 상술한 “약학적으로 허용되는 염”의 예를 포함한다.
- [0051] 본 발명에서 사용되는 용어, “건강식품(health food)”은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강 보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 호용된다. 상기 식품은 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 사용되는 용어, “기능식품(functional food)”은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다.
- [0053] 본 발명의 건강기능식품은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 건강기능식품을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 건강기능식품에 있어서, 쿠마타케닌 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명의 쿠마타케닌(kumatakenin)은 암세포의 생존 능력을 억제하고 암의 악성화를 억제하는 효능이 탁월하여, 이를 이용한 약학적 조성물 및 건강기능식품은 암을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있다.
- [0057] 구체적으로 본 발명의 쿠마타케닌은 암세포에 아포토시스(apoptosis)를 유도하여 암세포에 강력한 세포 독성을 나타내며, MCP-1 및 RANTES의 발현을 억제하여 대식세포가 중앙 부위로 이동하는 것을 억제하는 효과가 우수하다. 또한 M2 표현형 마커인 CD206 및 Trem-2의 발현을 억제하고, 암 촉진 인자인 IL-10, VEGF, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제함으로써 암의 악성화를 억제하는 효과가 탁월하다.
- [0058] 또한, 본 발명의 쿠마타케닌은 천연 유래의 화합물로서 부작용이 없어 약학적 조성물, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1은 쿠마타케닌의 화학 구조식이다.
- 도 2는 쿠마타케닌(a), 케르세틴(b), 파치포돌(c), 루테올린(d), 람나진-3-O- β -D-글루쿠로니드-6"-메틸에스테르(e) 및 람나진-3-O- β -D-글루코시드(f)의 인간 난소암 세포 A270 및 SKOV3에 대한 세포 독성 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 쿠마타케닌을 처리한 SKOV3에 PI 염색을 수행하여 세포 주기를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 쿠마타케닌을 처리한 SKOV3에 아넥신 V 및 PI 이중 염색을 수행하여 아포토시스를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 쿠마타케닌에 의해 유도된 SKOV3의 아포토시스가 카스파제 의존적 경로를 포함하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면 및 그래프이다(#: 대조군 대비 $p < 0.05$; *: 쿠마타케닌 대비 $p < 0.05$).
- 도 6은 쿠마타케닌을 처리한 SKOV3에서 케모카인 MCP-1 (a) 및 RANTES (b)의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(*: $p < 0.05$).
- 도 7은 쿠마타케닌을 처리한 SKOV3에서 M2 표현형 마커 CD206 (a) 및 Trem-2 (b)의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(*: $p < 0.05$).
- 도 8은 쿠마타케닌을 처리한 SKOV3에서 종양 촉진 인자 IL-10 (a), VEGF (b), MMP-2 (c), 및 MMP-9 (d)의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(*: $p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 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.
- [0061] 통계 분석
- [0062] 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 나타내었다. 통계적으로 유의한 차이를 확인하기 위하여 스튜던트 t-테스트(Student's t-test) 및 일원 분산 분석(one-way analysis of variance)을 사용했다. P 값 < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.
- [0063] 실시예 1: 쿠마타케닌(kumatakenin)의 분리 정제
- [0064] 실시예 1-1: 정향 추출물 및 분획물의 제조
- [0065] 본 발명의 실시예들에서 사용된 추출물과 화합물의 제조 과정은 종래 알려진 방법을 따랐다(Ryu B, et al. New Flavonol Glucuronides from the Flower Buds of Syzygium aromaticum (Clove). J Agric Food Chem. 2016;64:3048-3053).
- [0066] 간략하게, 시지기움 아로마티쿰(*Syzygium aromaticum* L.; 정향)의 꽃봉오리는 2013년 6월에 경동 생약 시장에서 구입하였다. 한약재의 원산지는 장대식 교수로부터 확인받았으며, 증거 표본(SYAR1-2013)을 경희대학교 약학대학에 기탁하였다. 건조 및 분말화된 식물 원재료(2.1 kg)를 수조에서 2 시간 동안 60℃ 조건에서 70% EtOH 20L로 2회 추출하고, 용매를 40℃에서 진공상태에서 증발시켰다. 상기 70% EtOH 추출물(625.0 g)을 n-헥산(2L×3), EtOAc (2L×3) 및 BuOH (2L×3)으로 연속적으로 분별하여 각각의 n-헥산 추출물(303.1 g), EtOAc-가용성 추출물(132.0 g), BuOH 추출물(93.0 g) 및 수용성 추출물 (95.7 g)을 수득하였다.
- [0067] 상기 EtOAc-가용성 추출물(132.0 g)을 CH_2Cl_2 -가용성 및 비-용성 분획물로 분획하였다. 상기 CH_2Cl_2 -가용성 분획물(12.2 g)을 이동상으로 CH_2Cl_2 -MeOH 혼합물(1:0 내지 9:1 v/v의 구배), 고정상으로 실리카겔(70-230 메쉬, $\phi 6.0 \times 44$ cm)을 이용한 크로마토그래피를 수행하여, 7개의 분획물(EM1-EM7)을 수득하였다. 그 중 EM3 분획물 [CH_2Cl_2 -MeOH (19:1 v/v)로 용리됨; 7.2 g]을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(CC)(230-400 메쉬, $\phi 5.0 \times 33$ cm, n-헥산-EtOAc = 4:1 내지 1:1 v/v)를 수행하여, 8개의 하위 분획물(EM3-1 -EM3-8)을 수득하였다.
- [0068] 실시예 1-2: 쿠마타케닌 및 그 밖의 화합물 분리 정제
- [0069] MeOH-H₂O 혼합물(7:3 v/v)을 이용한 역상 CC (YMC gel 150 μm , $\phi 3.5 \times 24$ cm)를 수행하여, 하위 분획물 EM3-4

로부터 쿠마타케닌(kumatakenin)(9.0 mg)과 파치포돌(pachypodol)(5.5 mg)을 수득하였다. 하위 분획물 E3-5로부터 재결정화(MeOH)를 통해 퀘르세틴(queracetin)(35.1 mg)을 수득 하였다. 하위 분획물 E-6을 CH₂Cl₂-MeOH 혼합물(1:1 v/v)과 함께 Sephadex LH-20 (φ2.4×40 cm)를 이용하여 추가로 분획하여, 루테올린(luteolin)(14.0 mg)을 분리하였다. Redi Sep-C18 (26g, MeOH-H₂O, 3.5:6.5 내지 7:3 v/v) 카트리지를 이용하여 하위 분획물 E4-5로부터 람나진-3-O-β-D-글루코시드(rhamnazin-3-O-β-D-glucoside)(20.3 mg) 및 람나진-3-O-β-D-글루쿠로니드-6"-메틸에스테르(rhamnazin-3-O-β-D-glucuronide-6"-methylester)(8.0 mg)를 정제하였다.

[0070] 실시예 2: 세포 배양

[0071] 인간 난소암 세포주(A2780 및 SKOV3)와 인간 단핵구 세포주(THP-1)는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 공급받았다. 난소암 세포를 5% 소 태아 혈청(FBS), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신 설페이트(100 μg/mL)가 추가된 RPMI 1640에서 배양하였다. THP-1 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS), 1% 페니실린(100 U/mL), 스트렙토마이신 설페이트(100 μg/mL) 및 0.05 mM 2-머캅토 에탄올이 추가된 RPMI 1640에서 배양하였다. 상기 THP-1 세포를 100nM PMA로 24시간 동안 대식세포로 분화시켰다. SKOV3 난소암 세포로부터 조건화 된 배지로 24시간 동안 THP-1 대식세포를 자극하여 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage; TAM)를 제조하였다.

[0072] 실시예 3: 쿠마타케닌의 암세포 생존 능력 억제 효능 확인

[0073] 실시예 3-1: 정향 분획물의 암세포 생존 능력 억제 효능 확인

[0074] MTT 분석을 통하여 인간 난소암 세포(A2780 및 SKOV3)의 세포 생존 능력에 대한 정향 분획물의 효과를 조사하였다.

[0075] 간략하게, 각 웰 당 50 μL의 RPMI 배지를 함유하는 96-웰 플레이트의 각 웰에 세포(5×10⁴)를 분주하였다. 24 시간 후, 다양한 농도의 70% EtOH 추출물, n-헥산 분획물, EtOAc 분획물, BuOH 분획물, 물 분획물 및 n-헥산-가 용성 추출물로부터 분리한 6 가지의 화합물을 첨가하였다. 48시간 후, 25 μL의 MTT (5 mg/mL 저장용액)를 첨가한 다음, 상기 플레이트를 추가로 4시간 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 배지를 제거한 후, 세포에서 형성된 포마잔 블루(formazan blue)를 50 μL DMSO에 녹였다. 광학 밀도는 마이크로플레이트 분광 광도계(Spectra Max; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

[표 1]

그룹	세포 독성 IC ₅₀ ^{a)} (μg/mL)	
	인간 난소암 세포	
	A2780	SKOV3
n-헥산 분획물	87.1±4.5	> 100
EtOAc 분획물	63.3±1.8	65.4±7.3
BuOH 분획물	> 100	82.3±8.1
물 분획물	> 100	> 100

[0077] a) IC₅₀은 대조군과 비교하여 세포수가 50% 감소된 때의 농도를 의미한다. 데이터 값은 유사한 방식으로 실시된 3회의 독립된 실험으로부터 얻은 결과의 평균을 나타낸다.

[0079] 상기 실험 결과, 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 4개의 분획물 중, EtOAc 분획물만이 A2780 및 SKOV3 세포 모두에서 100 μM 미만의 IC₅₀ 값으로 유의한 세포 독성 활성을 나타내었다. 이에, 하기와 같이 EtOAc 분획물 내 화합물들의 난소암 세포에 대한 세포 독성 활성 실험을 수행하였다.

[0080] 실시예 3-2: 정향의 EtOAc 분획물로부터 분리된 화합물들의 암세포 생존 능력 억제 효능 확인

[0081] 본 발명자들의 선행 연구(Ryu B, et al. New Flavonol Glucuronides from the Flower Buds of Syzygium aromaticum (Clove). J Agric Food Chem. 2016;64:3048-3053)에서, EtOAc 분획물로부터 분리된 19개의 플라보노이드 중, 6개의 플라보노이드(쿠마타케닌, 파치포돌, 퀘르세틴, 루테올린, 람나진-3-O-β-D-글루쿠로니드-6"-메틸에스테르 및 람나진-3-O-β-D-글루코시드)가 약간의 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 이에, 2개의 난소암 세포(A2780 및 SKOV3)에 대한 세포 독성 활성을 추가로 확인하기 위하여 총 19개의 플라보노이드 중, 상기 6개의 플라보노이드를 선택하여 실험을 수행하였다.

- [0082] 상기 실험 결과, 람나진-3-O-β-D-글루쿠로니드-6"-메틸에스테르 및 당 잔기를 갖는 람나진-3-O-β-D-글루코시드는 A2780 및 SKOV3 세포 모두에서 경미한 세포 독성을 나타냈다. 루테올린과 파치포들은 A2780 세포에서는 세포 생존 능력을 현저하게 억제하였으나, SKOV3 세포에서는 세포 생존 능력을 현저하게 억제하지 못했다. 이와 달리, 쿠마타케닌과 퀘르세틴은 A2780 및 SKOV3 세포 모두에 강력한 세포 독성 효과를 나타냈다(도 2).
- [0083] 여러 과일, 채소, 잎 및 곡물에서 흔히 볼 수 있는 퀘르세틴은 이의 항암 활성에 대해 연구가 진행된 바 있다. 반면, 쿠마타케닌은 그의 생물학적 활성에 대하여 알려진 바가 거의 없다. 이에 본 발명자들은 난소암 세포의 세포 생존 능력에 대한 쿠마타케닌의 억제 효능에 대하여 분자적 메커니즘을 규명하였다.
- [0084] **실시예 4: 쿠마타케닌의 암세포에 대한 아포토시스(apoptosis) 유도 효능 확인**
- [0085] SKOV3 인간 난소암 세포의 세포 생존 능력에 대한 쿠마타케닌의 억제 효과가 세포 주기의 정지 또는 아포토시스(apoptosis)와 관련이 있는지를 조사하기 위하여, 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide; PI) 염색 후 유동 세포 계측법 분석을 사용하여 세포 주기 분포를 조사하고, 아넥신 V (Annexin V)-FITC 분석 및 PI 이중 염색을 수행하여 아포토시스를 분석하였다.
- [0086] 세포 주기 분석을 위한 PI 염색은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 실시예 3-2에서 쿠마타케닌을 처리하여 세포 생존 능력이 억제된 세포를 거두어들이고 얼음으로 냉각시킨 인산 완충 식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 상기 세포를 고정시키고 얼음으로 냉각시킨 70% 에탄올을 4℃에서 1시간 동안 침투시켰다. 상기 세포를 PBS로 1회 세척하고 PI (50 μg/mL) 및 RNase (250 μg/mL)를 함유하는 염색 용액에 재현탁시켰다. 상기 세포 현탁액을 암실에서 실온에서 30분 동안 배양한 다음, 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting; FACS) 카터-플러스 유동 세포 계측기(cater-plus flow cytometry)(Bedton Dickinson Co., Germany)로 분석하였다.
- [0087] 아포토시스 분석을 위한 아넥신 V 및 PI 이중 염색은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 아넥신 V 및 PI 이중 염색을 위해, 세포를 100 μL의 바인딩 버퍼(10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4)로 현탁시키고, 1.25 μL의 FITC-결합된 아넥신 V 및 PI (50 mg/mL)로 염색하였다. 상기 혼합물을 암실에서 실온에서 15분 동안 배양하고 FACS 카터-플러스 유동 세포 계측기로 분석하였다.
- [0088] 상기 실험 결과, 쿠마타케닌은 SKOV3 세포에서 서브 G1 세포군의 증가를 유도하였으며, 쿠마타케닌 처리 후 유의한 세포 주기 정지는 관찰되지 않았다(도 3).
- [0089] 한편, 쿠마타케닌 처리는 시간 의존적으로 유동 세포 계측 그래프의 오른쪽 사분면에서 37.25%까지 아넥신 V-FITC 양성 세포(아포토시스 세포)의 개체군을 증가시켰다(도 4). 이러한 결과는 쿠마타케닌이 인간 난소암 세포의 생존 능력에 미치는 억제 효과가 세포 주기의 정지보다는 아포토시스에 의해 매개됨을 시사한다.
- [0090] **실시예 5: 쿠마타케닌에 의해 유도된 아포토시스의 카스파제(caspase) 의존성 확인**
- [0091] 다수의 경우에 아포토시스가 카스파제 활성화를 필요로 하는 것으로 알려져 있다(Villaflores OB, et al. Phytoconstituents from *Alpinia purpurata* and their in vitro inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Pharmacogn Mag. 2010;6:339-344). 이에 쿠마타케닌이 카스파제-3, 카스파제-8 및 카스파제-9의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 다음과 같이 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.
- [0092] 상기 실시예 3-2에서 쿠마타케닌을 처리하여 세포 생존 능력이 억제된 SKOV3 세포를 얼음으로 냉각시킨 PBS로 세척하고 단백질 용해 버퍼에서 추출하였다. 단백질 농도는 브래드 포드 분석(Bradford assay)을 사용하여 측정하였다. 총 단백질(30 μg)을 10% SDS-PAGE 겔을 사용하여 용해시키고, 폴리비닐리덴 플루오라이드 막 상에 전기전이(electro-transfer)를 수행한 다음, 트리스 완충 식염수(Bust Biological Technology, Ltd., Wuhan, 중국)에서 1시간 동안 5% 탈지분유로 블로킹시켰다. 상기 막은 일차 항체 및 액틴 항체와 함께 밤새 4℃에서 배양하였다. 상기 막을 5% 무지방 우유 및 0.1% Tween-20을 함유하는 PBS로 세척 한 후, 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 염소 항-토끼 면역 글로불린 G 항체와 함께 배양하였다. 마지막으로 상기 막을 증강 화학 발광 시약(EMD Millipore, Billerica, MA)과 함께 배양하고 Image Quant LAS-4000 (Fujifilm Life science, Tokyo, Japan)에 노출시켰다.
- [0093] 상기 실험 결과, 쿠마타케닌은 이들의 pro-form의 밀도가 감소함에 따라 용량 의존적으로 SKOV3 세포에서 카스파제-3, 카스파제-8 및 카스파제-9를 현저하게 활성화시켰다(도 5A).
- [0094] 쿠마타케닌에 의해 유도된 아포토시스에서 카스파제의 관여를 더 확인하기 위해, 카스파제 억제제인 z-VAD-fmk(광범위한 카스파제 억제제), z-DEVD-fmk(특정 카스파제-3 억제제), z-IEVD-fmk 카스파제-8 억제제) 및 z-

LEHD-fmk(특정 카스파제-9 억제제)를 사용하였다. 실험 결과, 카스파제 억제제는 쿠마타케닌에 의해 유도된 아포토시스를 현저하게 억제시켰으며(도 5B), 이는 인간 난소암 세포에서 쿠마타케닌에 의해 유도되는 아포토시스가 카스파제 의존적 경로를 포함함을 나타낸다.

[0095] **실시예 6: 쿠마타케닌의 MCP-1 및 RANTES 발현 억제 효능 확인**

[0096] MCP-1과 RANTES는 여러 암세포에서 높은 발현을 나타내며, 종양 부위로 대식세포가 이동하도록 하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 인간 난소암 세포에서 쿠마타케닌이 MCP-1 및 RANTES의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 본 발명의 실시예들에서 수행한 RNA 분리 및 실시간 RT-PCR 분석은 다음과 같은 방법으로 수행되었다.

[0097] Easy Blue[®] 키트(Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 지침에 따라, 상기 실시예 3-2에서 쿠마타케닌을 처리한 SKOV3 세포의 RNA를 추출하였다. 총 RNA를 제1 가닥 cDNA (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON, Canada)로 제조사의 절차에 따라 역전사시켰다. 상기 합성된 cDNA를 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭의 주형으로 사용하였다. 실시간 PCR은 Thermal Cycler Dice Real Time PCR System (Takara, Tokyo, Japan)을 사용하여 수행하였다. SYBR Green 실시간 RT-PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다: MCP-1 센스 프라이머로서, 5' -GCT CAT AGC AGC CAC CTT CA 3' (서열번호 1) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -GGA CAC TTG CTG CTG GTG AT-3' (서열번호 2); RANTES 센스 프라이머로서, 5' -CCT CAT TGC TAG GCC CTC T-3' (서열번호 3) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -GGT GTG GTG TCC CGA GGA AT-3' (서열번호 4); GAPDH 센스 프라이머로서, 5' -GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3' (서열번호 5) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3 (서열번호 6).

[0098] 해리 곡선 분석은 단일 피크를 나타내었으며, PCR은 다음과 같은 조건을 이용하여 50회 수행하였다: 95°C에서 5초간 변성, 57°C에서 10초간 어닐링 및 72°C에서 20 간 신장. 대상 유전자의 평균 주기 역치(cycle threshold; Ct)는 3회 측정으로부터 계산하였고 대조군 유전자인 GAPDH의 평균 Ct로 정규화하였다.

[0099] 상기 실험 결과, 쿠마타케닌은 SKOV3 세포에서 MCP-1 및 RANTES 모두의 mRNA 수준을 유의하게 감소시켰다(도 6). 이러한 결과는 쿠마타케닌이 난소암 세포에서 케모카인 MCP-1 및 RANTES의 발현을 조절하여 암세포로부터 MCP-1 및 RANTES의 분비를 저해함으로써, 대식세포가 종양으로 이동하는 것을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0100] **실시예 7: 쿠마타케닌의 M2 표현형 마커 및 암 촉진 인자 발현 억제 효능 확인**

[0101] 종양 부위로 이동한 대식세포가 암세포에 의해 M2 표현형 및 종양 촉진 활성을 갖는 TAM으로 전환될 수 있다는 것이 보고된 바 있다(De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. Cancer Cell. 2013;23:277-286). 이에 본 발명자들은 M2 분극화 및 대식세포의 pro-종양 활성화에 대한 쿠마타케닌의 효과를 조사하였다. 실시간 RT-PCR 분석에 사용된 프라이머는 다음과 같다: CD206 센스 프라이머로서, 5' -ACC TCA CAA GTA TCC ACA CCA TC-3' (서열번호 7) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -CTT TCA TCA CCA CAC AAT CCT C-3' (서열번호 8); Trem-2 센스 프라이머로서, 5' -TTG CCC CTA TGA CTC CAT GA-3' (서열번호 9) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -CGC AGC GTA ATG GTG AGA GT-3' (서열번호 10); MMP-2 센스 프라이머로서, 5' -ACC GCG ACA AGA AGT ATG GC-3' (서열번호 11) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -CCA CTT GCG GTC ATC ATC GT-3' (서열번호 12); MMP-9 센스 프라이머로서, 5' -CGA TGA CGA GTT GTG GTC CC-3' (서열번호 13) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -TCG TAG TTG GCC GTG GTA CT-3' (서열번호 14); VEGF, 센스 프라이머로서, 5' -ATG GCA GAA GGA GGA GGG CA-3' (서열번호 15) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -ATC GCA TCA GGG GCA CAC AG-3' (서열번호 16); IL-10 센스 프라이머로서, 5' -GAC CAG CTG GAC AAC ATA CTG CTA A-3' (서열번호 17) 및 안티센스 프라이머로서, 5' -GAT AAG GCT TGG CAA CCC AAG TAA-3' (서열번호 18).

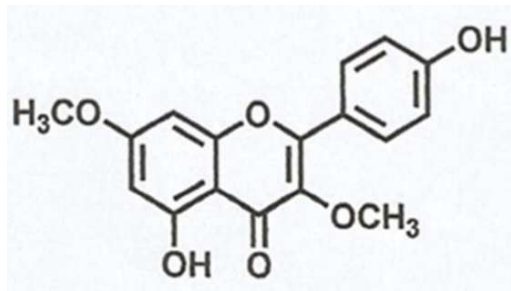
[0102] 상기 실험 결과, SKOV3 세포의 조건화된 배지에 의해 자극된 대식세포인 TAM은, 대조군 대식세포와 비교하여 M2 표현형 마커 CD206 및 Trem-2의 발현이 증가된 것으로 나타났으며, 쿠마타케닌은 TAM에서 CD206 및 Trem-2의 발현을 유의하게 억제한 것으로 나타났(도 7). 또한, 쿠마타케닌은 TAM에서 종양 촉진 인자로 알려진 IL-10, VEGF, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 유의하게 억제하였다(도 8). 이러한 결과는 쿠마타케닌이 난소암 진행에 기여하는 대식세포의 선택적 활성화를 억제함을 시사한다.

[0103] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자

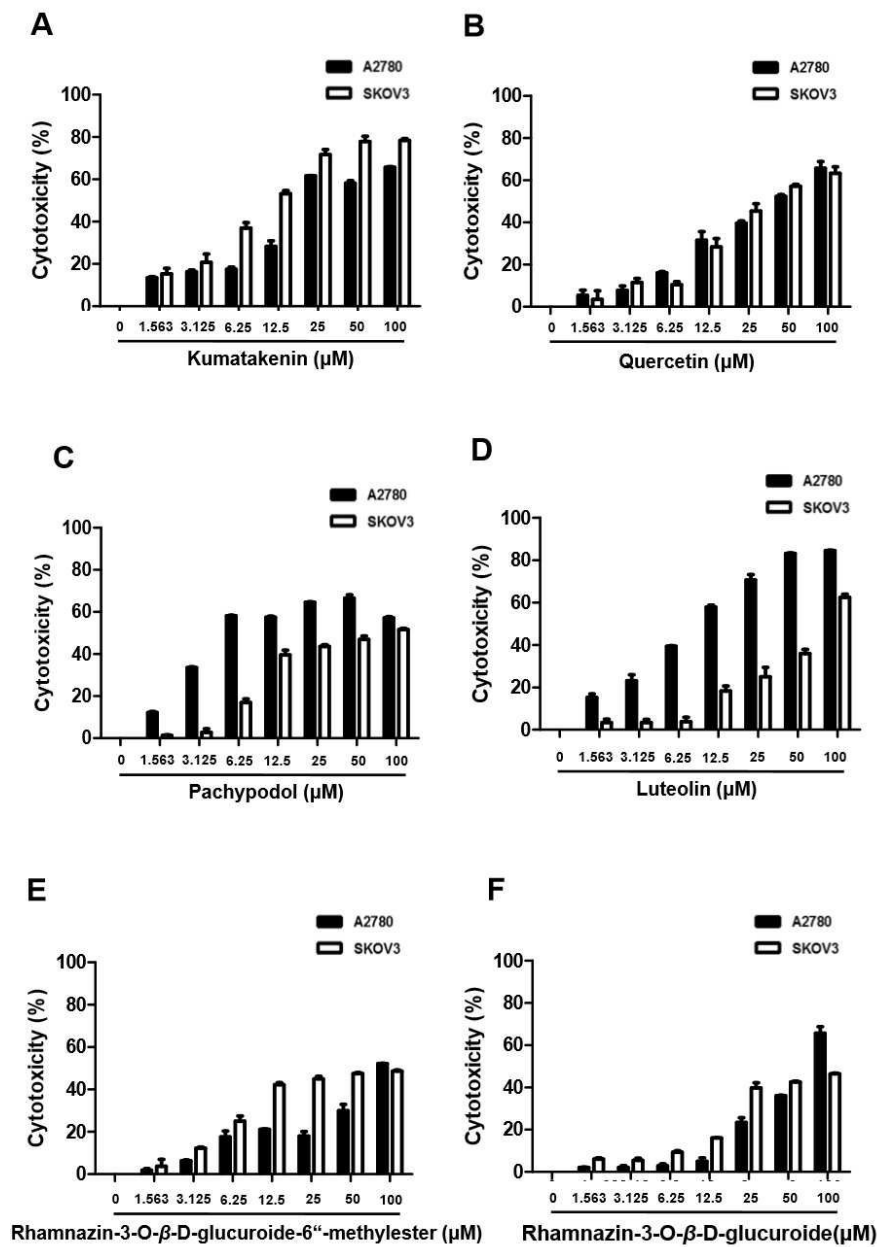
이면 이해할 수 있는 사항이다.

도면

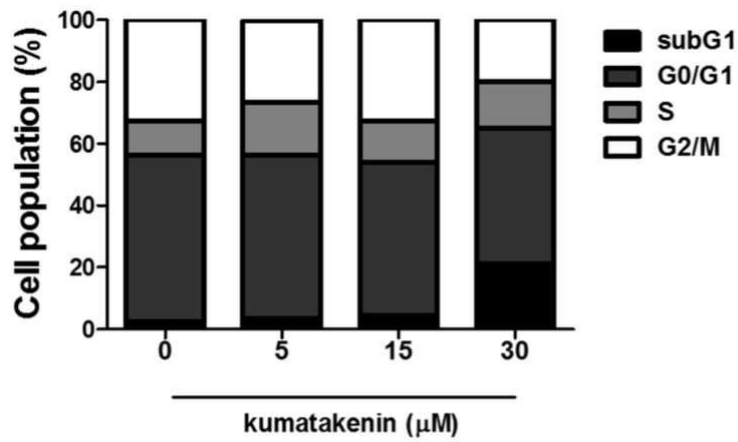
도면1



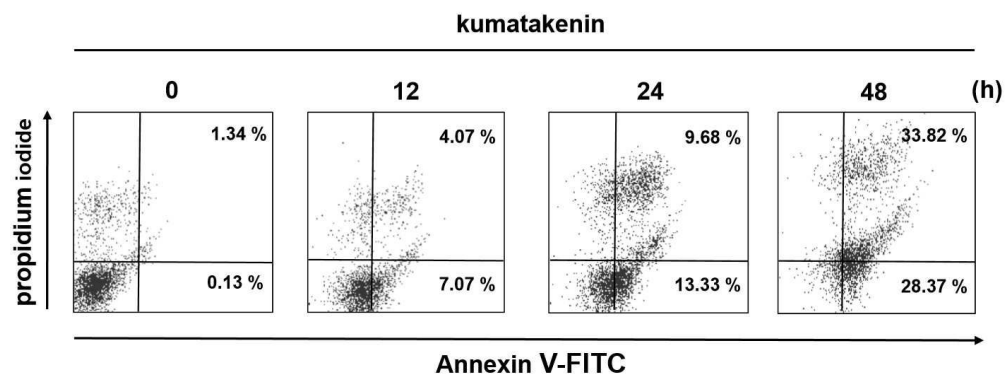
도면2



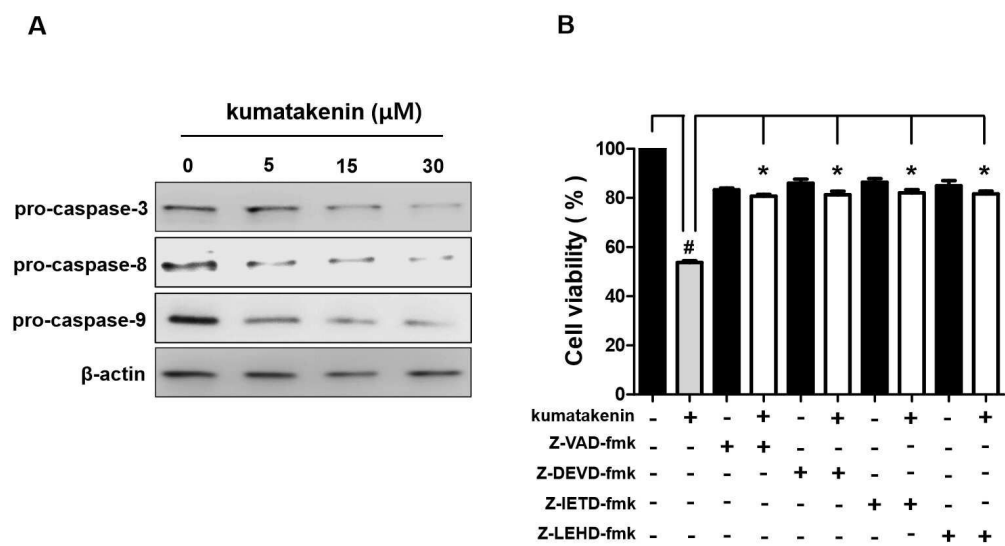
도면3



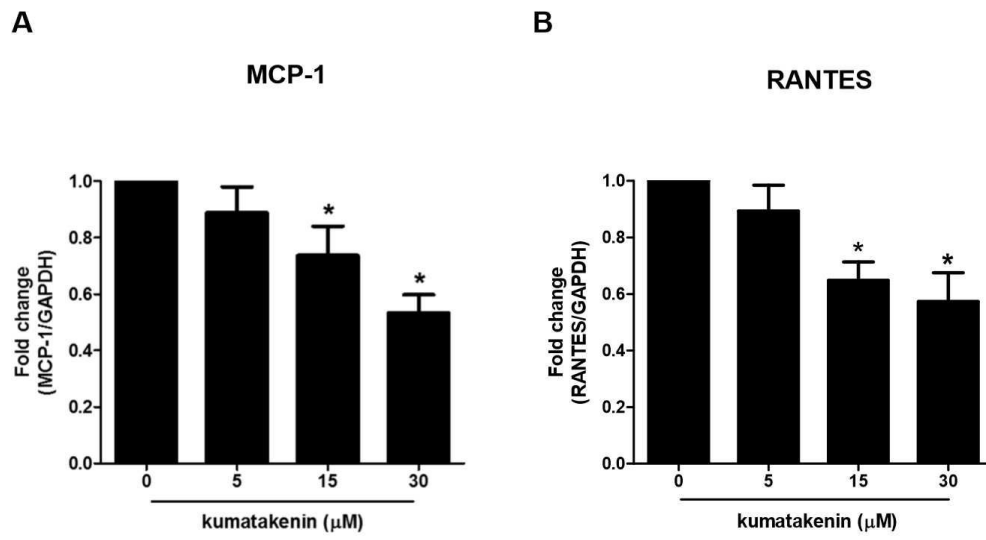
도면4



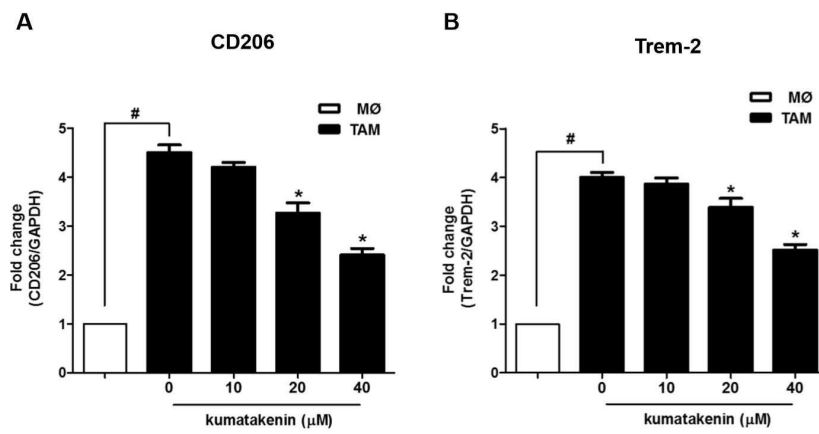
도면5



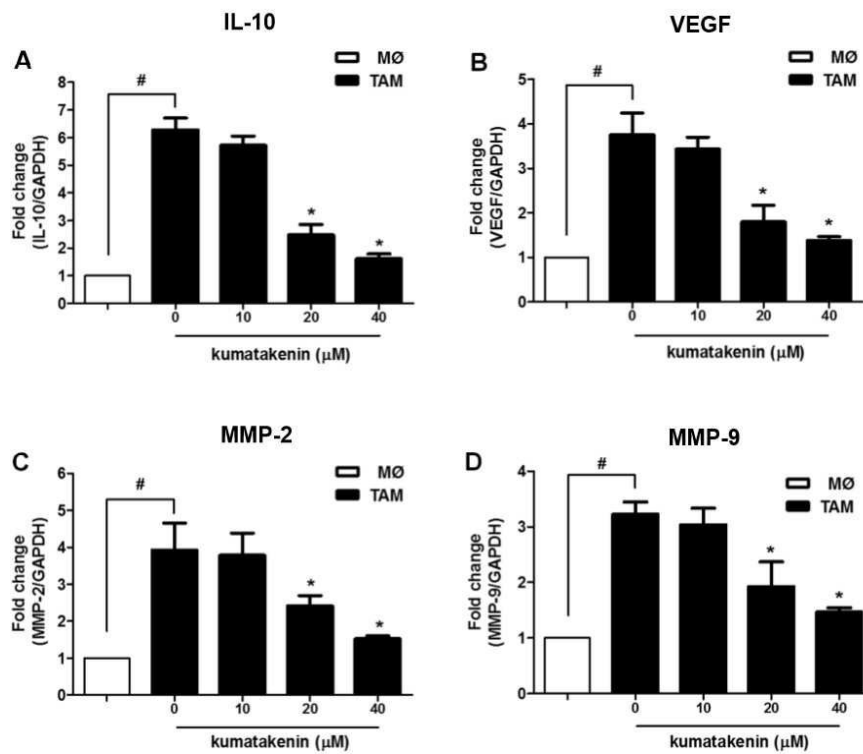
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Composition for preventing, improving or treating cancer
comprising kumatakenin

<130> P17-042-KHU

<160> 18

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP-1 sense primer

<400> 1

gctcatagca gccaccttca

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> MCP-1 antisense primer

<400> 2

ggacacttgc tgctggtgat 20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RANTES sense primer

<400> 3

cctcattgct aggccctc 18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RANTES antisense primer

<400> 4

ggtgtggtgt cccgaggaat 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH sense primer

<400> 5

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH antisense primer

<400> 6

ttgatatttg agggatctcg 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD206 sense primer

<

400> 7

cctcacaagt atccacacca tc 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD206 antisense primer

<400> 8

ctttcatcac cacacaatcc tc 22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trem-2 sense primer

<400> 9

ttgccctat gactccatga 20

<210> 10

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trem-2 antisense primer

<400> 10

cgcagcgtaa tggtagagat 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-2 sense primer

<400> 11

accgcgacaa gaagtatggc 20

<210> 12

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-2 antisense primer
 <400> 12

ccacttgagg tcacatcgt 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-9 sense primer
 <400> 13

cgatgacgag ttgtggctcc 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-9 antisense primer
 <400> 14

tcgtagtgg ccgtgtact 20

<210> 15
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF sense primer
 <400> 15

atggcagaag gaggaggca 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF antisense primer
 <400> 16

atcgcatcag gggcacacag 20

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-10 sense primer

<400> 17

gaccagctgg acaacatact gctaa 25

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-10 antisense primer

<400> 18

gataaggctt ggcaacccaa gtaa 24