(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0049967
(43) 공개일자 2011년05월13일

(51) Int. Cl.
A61K 36/258 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61K 31/203 (2006.01) *A61K 31/59* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0106758
(22) 출원일자 2009년11월06일
심사청구일자 2009년11월06일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
유진철
광주 남구 진월동 새한아파트 101-1202
김태성
서울 중랑구 묵1동 신내5단지대림아파트 512-1203
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최성용

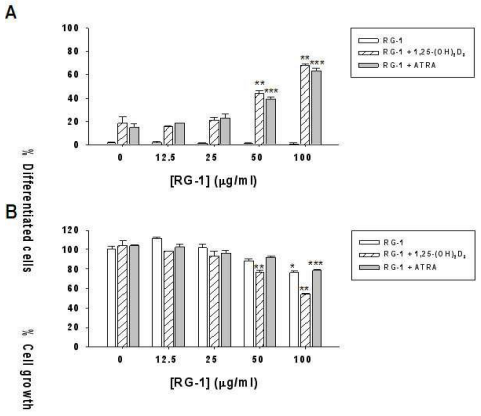
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 인삼 추출물을 포함하는 항암제 조성물

(57) 요 약

본 발명은 인삼의 메탄올 추출물을 유효 성분으로 하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 특히, 전골수구성 백혈병 치료용 항암제의 성분으로 효과적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김승현

서울특별시 성북구 월곡1동 삼성래미안아파트 122-802

이효정

광주 서구 풍암동 1093 금호아파트 204-1103

조승식

광주광역시 동구 장동 17-2 307

특허청구의 범위

청구항 1

유효 성분으로서 인삼의 메탄올 추출물, 1,25-디하이드록시 비타민 D_3(1,25-$(OH)_2D_3$) 또는 레티노인산(all-trans retinoic acid, ATRA)과의 혼합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 전골수구성 백혈병(promyelocytic leukemia) 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 1,25-$(OH)_2D_3$, 레티노인산 및 나르제니신의 투여시 최종 농도가 각각 5 nM, 50 nM, 및 200 mM인 것인 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인삼의 메탄올 추출물을 유효 성분으로 하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 특히, 전골수구성 백혈병 치료용 항암제의 성분으로 효과적으로 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 인삼[*Panax ginseng* C.A. Meyer (*Araliaceae*)]은 한국 및 중국인에 친숙한 잘 알려진 약용 식물이다. 이 식물의 뿌리는 흔히 인삼이라고 알려져 있으며 아시아, 특히 중국 및 한국에서 장수를 돕는 강장제 및 만병통치약이라는 인식하에 2000년 이상 널리 사용되고 있다[참조문헌; Chang, YS, Seo, E-K., Gyllenhall, C., and Block, K. I. **2**, 13-33 (2003); Yun, T.-K., *Mutat. Res.*, **523-524**, 63-74 (2003), Xiang, Y-Z., Shang, H-C., Gao, X-M., and Zhang, B-L., *Phytother. Res.*, **22**, 851-858 (2008)]. 인삼의 용도는 계속 늘어나서 전세계에 걸쳐서 가장 선호하는 의약 중 하나가 되었다. 한국에서 인삼은 수삼, 백삼 홍삼으로 분류되고 있다. 인삼은 백삼으로 기건시키거나 100 ℃에서 2-3시간 쪄서 홍삼으로 만드는데 후자가 약리학적으로 활성이 더 있다고 보고되고 있다[참조문헌; Takaku, T., Kameda, K., Matsuura, Y., Sekiya, K., and Okuda, H., Studies on insulin-like substances in Korean red ginseng. *Planta Med.*, **56**, 27-30 (1990)]. 인삼에 존재하는 식물성 화학물질들은 항산화제, 발암억제, 돌연변이억제, 항종양 등의 다양한 약리학적 효과를 발휘한다. 그러나, 인삼의 항암제 및 기타 활성 등의 기저 작용 기전은 대부분 명확치 않다[참조문헌; Wang, W., Rayburn, E. R., Hao, M., Zhao, Y., Hill, D., Zhang, R., and Wang, H., Experimental therapy of prostrate cancer with novel natural product anti-cancer ginsenosides. *Prostrate*, **68**, 809-819 (2008)]. 인삼에서 발견되는 성분들은 진세노사이드류, 폴리사카라이드류, 펩타이드류, 폴리아세틸렌 알코올, 비타민, 미량 원소 및 효소들이다. 인삼의 약리학적 효과는 진세노사이드류 또는 인삼 사포닌에 기인하며, 이러한 점들은 다수의 문헌에 정립되어 있다. 40 종 이상의 진세노사이드류가 구조적 차이에 기초하여 동정되었으며, 이들은 3개의 범주로 분류될 수 있다; 파낙사디올 그룹(Panaxadiol group, 예, Rb1), 파낙사트리올 그룹 (panaxatriol group, 예. Rg1) 및 올레아놀릭산 그룹(oleanolic acid group, 예, Ro). 인삼의 다양한 치료 용도 뿐만 아니라, 진세노사이드류 Rk1, Rh2, Rg3 및 Rg5은 강력한 항암 화합물로서 보고되었다[참조문헌; Kim, YJ., Kwon, HC, Ko, H., Park, J H., Kim, HY., Yoo, J-H., and Yang, HO., Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk1 in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 826-830 (2008)]. 최근에 한국의 홍삼 추출물은 아포톱시스를 유도하고, 인간 백혈병 세포 U937.8에서 텔로머라제 활성의 감소시키는 것으로 보고되었다[참조문헌; Park, S., Park, C., Kim, S., Hossain, M., Kim, M., Chung, H., Son, W., Kim, GY., Choi, Y., and Kim, N., Korean red ginseng extract induces apoptosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells. *J. Ethnopharmacol.*, **121**, 304-312 (2009)].

[0003] 대부분의 암세포는 비-복제성 성인 세포로 성숙하는 능력에 있어서 결핍됨으로써 고도로 증식되는 상태로 존재

하고 따라서 그들의 정상 세포의 동반자들을 과대성장시킨다.

[0004] 한편, 급성 전골수구성 백혈병(APL)의 주된 치료 목적은 말단 분화(terminal differentiation)를 일으키고, 약제 내성 및 부작용을 해결하는데 있다. 독성을 일으키지 않는 낮은 농도의 ATRA 또는 1,25-$(OH)_2D_3$와 다른 약물의 병용 치료는 APL 치료에 대한 유용한 전략의 하나이다.

[0005] 백혈병은 궁극적으로 말단 분화를 유도하는 약물로 치료가능한 것으로 밝혀졌으며, 아마도 세포 파괴 약물로 치료하는 것과 관련된 것보다는 이병율(morbidity)이 낮을 것이다. 1,25-$(OH)_2D_3$ 및 ATRA는 모두 단기간 배양한 인간의 APL 세포주 뿐만 아니라 HL-60 및 U937 세포 등의 백혈구 세포주에서 말단 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 더욱이, ATRA는 APL 블라스트의 생체내 분화를 거쳐서 APL을 가진 거의 모든 환자에 있어서 완전한 완화(complete remission, CR)을 유도하는 것으로 입증되었다. ATRA는 APL의 사례에 있어서 CR을 유발할 수 있기는 하나, ATRA 단독의 치료는 ATRA 증후군 및 2차 ATRA 내성의 도입을 포함하는 특정한 심각한 부작용과 관계되어 있다. 따라서 이 문제를 해결하는 현재의 접근법은 낮거나 비독성의 농도에서 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA의 분화 유도 효과를 증대시키는 두 번째 약품의 도입을 수반하는 것이다. 인간 백혈병 HL-60 세포 배양물은 세포 분화의 시험관내 연구를 위한 뛰어난 모델로 자주 이용되고 있다. HL-60 세포는 1,25-$(OH)_2D_3$로 처리할 때는 단핵구 계열로 분화되고, ATRA로 처리하였을 때에는 과립구 계열로 분화된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명자들은 인삼의 메탄올 추출물(RG-1)의 약리학적 기능 및 치료제로서의 가능성을 탐색하고자 예의연구한 결과, 이것이 미분화된 전골수구세포를 분화시킴으로써 항생제, 전골수구성(promyelocytic leukemia) 백혈병의 치료제 등으로 다양하게 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결수단

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 인삼의 메탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 전골수구성 백혈병 치료제를 제공하는 데 있다.

효 과

[0008] 본 발명에 따른 인삼의 메탄올 추출물을 조성물은 전골수구성 백혈구 세포의 분화를 효과적으로 유도할 수 있으므로 항암제, 특히 급성전골수구성 백혈병 치료제 등으로서 널리 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 인삼의 메탄올 추출물의 용도, 특히 전골수구성 백혈병 등의 종양의 치료 용도를 제공한다.

[0010] 구체적인 실시형태에 있어서, 본 발명은 유효 성분으로서 인삼의 메탄올 추출물, 1,25-디하이드록시 비타민 D_3(1,25-$(OH)_2D_3$) 또는 레티노인산(all-trans retinoic acid, ATRA)과의 혼합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 전골수구성 백혈병(promyelocytic leukemia) 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따른 전골수구성 백혈병의 치료제는 낮거나 비독성 농도의 백혈구 세포 분화 유도제와 함께 인삼의 메탄올 추출물을 유효 성분으로 포함하고, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0012] 본 발명에서 사용된 용어, 인삼은 홍삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 건조된 뿌리를 의미한다.

[0013] 본 발명은 단독으로 또는 공지의 분화제와 조합하여 APL 치료에 있어서 유용할 수 있는 천연원을 탐색하는 것에 초점을 맞추었다.

[0014] 인삼(*Panax ginseng*C.A. Meyer)은 활력저하, 식용부진, 호흡곤란, 동계, 불면증, 임포텐스, 출혈 및 당뇨 등의 다양한 병리학적 조건 및 질환에 사용되는 고가의 약용 식물이다. 또한, 인삼은 유효 성분 중 하나인 진세노사이드류가 항암, 항산화, 항-세포사멸, 면역촉진, 신경보호, 면역조절 등의 몇가지 약리학적 특성을 가졌기 때문에 전세계에 걸쳐서 수요가 많은 의약 중의 하나이다. 본 발명자들은 홍삼의 메탄올 추출물(RG-1) 중 정확한 유효 성분을 지목할 수는 없으나, Rg1, Rg3, Rg5 및 Rk1 등의 진세노사이드류가 ATRA 및 1,25-$(OH)_2D_3$-유도 HL-60

세포 분화에 관여하는 것으로 여겨진다.

[0015] 본 발명자들은 인삼의 메탄올 추출물(RG-1)이 HL-60 백혈병 세포에서 ATRA 및 1,25-$(OH)_2D_3$ -유도 분화를 증대시킬 수 있으나, RG-1 단독은 분화를 유도하지 않음을 발견하였다(도 1A 및 2 참조). HL-60 백혈병 세포들은 RG-1을 각각 낮은 투여량의 ATRA 및 1,25-$(OH)_2D_3$과 혼합 처리하였을 경우 과립구 및 단핵구 계통으로 상승적으로 분화되었다(도 3 참조). 1,25-$(OH)_2D_3$ 및 ATRA 등의 유도제의 분화 강도는 다른 추가 약물과 상승적으로 증대시키는 것으로 이전에 보고되었다; 히스톤 데아세틸라아제 억제제[참조문헌; Savickiene, J., Treigyte, G., Borutinskaite, V., Navakauskiene, R., and Magnusson, K.-E., The histone deacetylase inhibitor FK228 distinctly sensitizes the human leukemia cells to retinoic acid-induced differentiation. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **1091**, 368-384 (2006)], 겔피티닙[참조문헌; Miranda, M.B., Duan, R., Thomas, S.M., Grandis, J.R., Redner, R.L., Jones, J.E., and Johnson, D.E., Gefitinib potentiates myeloid cell differentiation by ATRA. *Leukemia*, **22**, 1624-1627 (2008)] 및 카르노익산[참조문헌; Steiner, M., Priel, I., Giat, J., Levy, J., Sharoni, Y., and Danilenko, M., Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Nutr. Cancer*, **41**, 135-144 (2001)]과의 ATRA 조합은 HL-60 백혈병 세포 분화에 상승 효과를 발휘하였다. 마찬가지 방식으로, 캡사이신[참조문헌; Kang, S. N., Chung, S. W., and Kim, T. S., Capsaicin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-and all-*trans* retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **420**, 83-90 (2001)], 아스코르브산[참조문헌; Lpez-Lluch, G., Fernndez-Ayala, D.J., Alcan, F.J., Burn, M.I., Quesada, J.M., and Navas, P., Inhibition of COX activity by NSAIDs or ascorbate increases cAMP levels and enhances differentiation in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **436**, 32-39 (2005)] 및 사이클로옥시게나아제 억제제 [참조문헌; Jamshidi, F., Zhang, J., Harrison, J., Wang, X., and Studzinski, G., Induction of differentiation of human leukemia cells by combinations of COX inhibitors and 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves Raf1 but not Erk 1/2 signaling. *Cell Cycle*, **7**, 917-924 (2008)]는 낮은 레벨의 1,25-$(OH)_2D_3$에 의해 생성된 HL-60 세포 분화를 증대시켰다. 1,25-$(OH)_2D_3$ 등의 비타민 D3의 유사체들은 건선의 치료에 임상적으로 사용된다[참조문헌; Kragballe, K., Vitamin D3and skin diseases. *Arch. Dermatol. Res.*, **284**, 30-36 (1992)].

[0016] 비타민 A의 활성 유도체인 ATRA는 고도의 완화율로 APL 환자의 치료에 널리 이용되고 있다[참조문헌; Wang, W., Zu, W. Y., Yao, X. Z., and Ling, B. J., A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, **78**, 1413-1419 (1991); Lengfelder, E., Saussele, S., Weisser, A., Buchner, T., and Hehlmann, R., Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **56**, 261-274 (2005)]. 백혈병 치료에 있어서 이점에도 불구하고, ATRA은 레티노산 증후군 및 고칼슘혈증 등의 부작용이 있다[참조문헌; Patatanian, E., and Thompson, D. F., Retinoic acid syndrome: a review. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **33**, 331-338 (2008); Bennett,M. T., Sirrs, S., Yeung, J. K., and Smith, C. A., Hypercalcemia due to all *trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia potentiated by voriconazole. *Leuk. Lymphoma*, **46**, 1829-1831 (2005).

[0017] 본 발명자들은 인삼의 메탄올 추출물이 생리활성에 미치는 영향을 연구하던 중, 상기 이것이 백혈병 및 면역계 질환에 영향을 미칠 수 있다는 점에 주목하게 되었는데, 전골수구세포(promyelocyte)의 미분화에 의하여 유발되는 전골수구성 백혈병에 촛점을 맞추어 연구를 진행하던 중, 인삼의 메탄올 추출물이 미분화된 전골수구세포를 분화시킬 수 있음을 알게 되었다. 즉, 전골수구는 정상적으로 분화되어, 단식구세포, 대식구세포, 과립구세포 등으로 분화되는데, 상기 전골수구가 분화되지 못하면, 전골수구성 백혈병을 유발시킬 수 있다. 이에, 본 발명자들은 인삼의 메탄올 추출물을 사람의 전골수구성백혈병 세포주 HL-60에 처리하였다. 그 결과, 상기 추출물은 단독적으로 상기 세포주의 분화를 유도하지 못하였다. 그러나, 상기 세포주의 분화를 유도하는 물질로 알려진 1,25-디하이드록시 비타민 D_3(1,25-$(OH)_2D_3$) 또는 레티노인산(all-trans retinoic acid, ATRA)과 인삼의 메탄올 추출물을 혼합하여 사용할 경우, 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA의 분화유도 효과를 증폭시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 인삼 추출물을 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA와 함께 HL-60에 처리하면, 분화된 세포의 비율이 급격히 증가되고, 분화된 세포에서 발현되는 세포표면 항원의 발현량이 급격히 증가됨을 알 수 있었다.

[0018] 인간의 전골수구성 백혈병 HL60 세포들은 각각 1,25-디히드록시비타민 D3[1,25-$(OH)_2D_3$] 또는 all-*trans* RA로

처리했을 때 단구성 계통 및 과립구형 계통으로 분화된다. 이것은 시험관내(*in vitro*) 세포 분화를 연구하는데 뛰어난 모델 시스템으로 이용되고 있는데, 1,25-$(OH)_2D_3$ 및 all-*trans*RA를 선택한 이유는 HL-60 세포에서 분화의 내인성 촉진제로서 널리 이용되기 때문이다. 또한, all-*trans* RA는 급성 전골수구성 백혈병의 치료에 널리 사용되고, 1,25-$(OH)_2D_3$을 포함하는 비타민 D3의 유사체는 건선의 치료에 임상적으로 이용되고 있다. 비타민 A의 활성 유도체인 ATRA는 고도의 완전 완화율로 APL 환자의 치료에 널리 사용된다. 백혈병 치료의 이점에도 불구하고, ATRA는 레티노산 증후군 및 과칼슘혈증의 부작용이 있다.

[0019] HL-60 세포에서 분화의 유도는 PI3-K, PKC 및 MAPK 경로[참조문헌; Pan, Q., Granger, J., O'Connell, T.D., Somerman, M.J., and Simpson, R.U., Promotion of HL-60 cell differentiation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of protein kinase C levels and activity. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 909-915 (1997); 및 Marcinkowska, E., Garay, E., Gocek, E., Chrobak, A., Wang, X., and Studzinski, G., Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp. Cell. Res.*, **312**, 2054-2065 (2006)]를 포함하는 다양한 신호 전도 경로의 활성화를 요구한다.

[0020] 본 발명의 실시예를 통하여 PKC 또는 ERK 키나아제에 대한 억제제들은 ATRA 또는 1,25-$(OH)_2D_3$와 조합된 RG-1에 의해 유도된 HL-60 세포 분화를 상당히 억제함을 확인하였으며, 이는 RG-1에 의한 세포 분화의 강도는 적어도 ATRA 또는 1,25-$(OH)_2D_3$와 조합하여 PKC 및 ERK-중재 신호화 경로를 경유하는 것을 의미한다. 대조적으로, PI3-K 억제제는 낮은 레벨의 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA에서 RG-1에 의한 증대된 세포 분화를 감소시키지 못하였다. 이러한 결과는 RG-1이 PKC/ERK 신호화 경로를 경유하여 ATRA 및 1,25-$(OH)_2D_3$-유도 HL-60 세포 분화를 강화시킴을 의미한다.

[0021] 유행병학적 연구에 의하면, 다량의 과일 및 야채를 섭취하는 사람들이 암 발생 위험이 낮은 것으로 보고되고 있다[참조문헌; Powolny, A. A., and Singh, S. V., Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related *Allium*vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Lett.*, **269**, 305-314 (2008)]. 그 이유는 잘 밝혀지지 않았으나, 카로테노이드류, 서커미노이드류 및 토코페롤류 및 기타 식물의 구성 성분등의 다양한 식이 화합물들이 부분적으로는 레티노산 및 1,25-$(OH)_2D_3$ 등의 내재적으로 생성된 분화 촉진자를 상승작용시킴으로써 인간 암을 예방하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

[0022] 본 발명의 결과는 인삼의 추출물이 낮은 투여량의 ATRA 또는 1,25-$(OH)_2D_3$ 과 조합하여 ATRA 또는 1,25-$(OH)_2D_3$ 단독의 것보다 더 큰 치료효과를 제공하고, 레티노산 증후군 등의 부작용이 덜 한 APL 치료 용도를 제시한다.

[0023] 상기 1,25-$(OH)_2D_3$, 레티노인산 및 나르제니신의 투여시 최종 농도는 각각 5 nM, 50 nM, 및 200 mM인 것이 바람직하나 본 발명은 이에 한정되지 않음은 자명하다.

[0024] 본 발명에 따른 전골수구성 백혈병 치료제의 유효성분으로 함유되는 인삼의 메탄올 추출물은 약학적으로 허용가능한 결합제(예, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스), 붕해제(예, 카복시메틸셀룰로오스칼슘, 전분글리콜산나트륨), 희석제(예, 옥수수전분, 유당, 콩기름, 결정셀룰로오스, 만니톨), 활택제(예, 스테아린산 마그네슘, 탈크), 감미제(예, 백당, 과당, 솔비톨, 아스파탐), 안정제(카복시메틸셀룰로오스나트륨, 알파 또는 베타 싸이클로덱스트린, 비타민 C, 구연산, 백납), 보존료(예, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 안식향산나트륨) 및 향료(예, 에틸바닐린, 마스킹후레바, 멘톨후라보노, 허브향)와 혼합하여 정제, 캅셀제, 연질캅셀제, 액제, 연고제 또는 주사제와 같은 약학적 제제로 제조될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 비경구제의 형태로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0025] <유효량>

[0026] 본 발명에 있어서의 약제조성물 중 유효성분인 인삼의 메탄올 추출물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 증상, 투여방법 또는 예방목적에 따라, 체중 kg 당 6 내지 300㎎을 일일 1회 내지 3회 분복할 수 있다. 특이 증상을 나타내는 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 당업자가 투여량을 변화시킬 수도 있다.

[0027] <실시예>

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적

으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0029] 후술하는 실시예에서 사용되는 약어는 다음과 같다. 1,25-$(OH)_2D_3$, 1,25-디히드록시비타민 D3, APL; 급성 전골수성 백혈병; ATRA, all-trans 레티노산; ERK, 세포외 신호-조절 키나아제; FITC, 플루오레세인 이소티오시아네이트; MAPK, 미토겐-활성 단백질 키나아제; NBT, 니트로블루 테트라졸륨; PD 98059, 2-(2'-아미노-3'-메톡시페닐)-옥사나프탈렌-4-온; PI3-K, 포스포이노시티드 3-키나아제; PE, 피코에리쓰린; PI, PKC 펩티드 억제제; PKC, 단백질 키나아제 C; PMA, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트.

[0030] 실시예에서 모든 조작은 조절된 광 조건에서 수행하였다. HL-60 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 입수하였고, 10% 태아 송아지 혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 보충한 RPMI-1640 배지에 보관하였다. 1,25-$(OH)_2D_3$, all-*trans* 레티노익산 (ATRA), 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA), 2-[4-모르폴리닐]-8페닐-1[4H]-벤조피란-4-온 (LY 294002), 월트만인(wortmannin), 안드라피라졸론 (SP 600125), Giemsa 염색용액, 무메탄올 파라포름알데이드 및 기타 시약들은 기타 모든 시약은 시그마사(Sigma, St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 캘러리쓰린(Chelerythrine), 및 2-(2'-아미노-3'-메톡시페닐)-옥사나프탈렌-4-온(PD 98059)은 토크리스 쿡산(Tocris Cookson Ltd. (UK)으로부터 입수하였다. 1 mM ATRA 원액을 디메틸술폭시드에 용해시켰다.

[0031] 후술하는 실시예에서 사용된 방법 및 절차를 간단히 설명한다.

[0032] <세포 생존능 및 증식의 결정>

[0033] 세포 생존능은 트립판 블루 배제 에세이에 의해 결정하였다(참조문헌: Coligan, J.E., Kruisbeck, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M, and Strober, W. 1995. *Current Protocols in Immunology* (2nd ed.) Wiley, New York.). 생존능은 전체 세포 집단 중의 살아있는 세포의 백분율로 계산하였다. 세포 증식은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl-tetrazolium) 에세이를 사용하여 결정하였다. 이를 간단히 요약하자면, 각각의 처리 후, MTT (5 mg/ml) 10 ㎕을 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 37℃에서 4 시간 동안 인큐베이션시킨 후 생존 세포의 결정을 이소프로판올 중의 0.04N HCl 100 ㎕에 녹였다. 각 웰의 흡광도는 카이네틱 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 540 nm에서 판독하였다.

[0034] <세포 분화의 결정>

[0035] HL-60 세포 분화는 공지된 바의 니트로블루 테트라졸륨(NBT) 환원 에세이에 의해 산정하였다(참조문헌: Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. and Gallo, R.C. 1979. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. J. Exp. Med. *149,* 969974.). 이 에세이는 조직 플라스미노겐 활성화제로 자극시 식세포가 수퍼옥사이드를 생산하는 능력에 기초한다. 이 에세이를 위하여, 2 x 10^5 세포를 원심분리에 의해 수확하여 1 ng/ml의 바로 준비한 희석된 플라스미노겐 활성화제를 함유한 PBS에 용해된 0.2% 니트로불루 테트라졸륨 동일 부피로 37℃에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션시켰다. 사이토스핀 슬라이드를 준비하여 PMA-자극시킨 호흡폭발반응(respiratory burst)의 지표인 암청색 니트로불루 디포르마잔 침적물에 대해서 검사하였다. 최소 200개의 세포가 각 시험에서 확인되었다.

[0036] 형태학적 연구

[0037] 단일 세포 현탁액들을 준비하여 사이토-펀넬에 부하한 후 사이토스핀 원심분리기에서 1,050 x g로 원심분리시켰다. 슬라이드들을 메탄올로 고정시키고 건조하였다. 슬라이드들을 김사(Giemsa) 염색용액으로 20 분 동안 염색하고 탈이온수에 세정한 후 건조하여 카메라가 장착된 현미경으로 관찰하였다. 염색된 세포들을 크기, 세포 가장자리의 균일성 및 핵의 형태학적 특성에 대하여 평가하였다.

[0038] 면역형광염색 및 세포형광분석법

[0039] 세포에서 세포 표면 분자의 발현은 FACSCalibur 플로우 사이토메타(BD Bioscience, San Jose, CA)를 사용하여 사이토플루오로메타에 의해 분석하였다. 이를 간단히 요약하자면, 단일 세포 현탁액을 여러 가지 배양물로부터 수집하여 빙냉 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.4)로 2회 세척하였다. 이어서, 피코에리쓰린(PE)-공액 항-인간 CD11b 또는 플루오레세인 이소치오시아네이트((FITC)-공액 항-인간 CD14 단일 클론 항체들(BD Bioscience)를 첨가한 다음 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 세포들을 PBS로 세척하고 1% 파라포름알데하이드를 함유하는 PBS에 고정하고 세포 형광 분석을 수행하였다. 배경 염색은 특정 항체로 염색된 세포에 대하여 염색된 세포를 PE- 또는 FITC-공액 아이소타입 대조군 단일 클론 항체로 대체함으로써 결정하였다. 단일 변수 형광 히스토그램은 최소 1 x 10^4 세포를 분석함으로써 발생되었다.

[0040] 통계적 분석

[0041] 통계적 분석에 관련하여 스튜던트의 *t*-test 및 일방향 분산 분석(ANOVA)에 이어 본페로니 방법(Bonferroni method)을 사용하여 다양한 실험 및 대조군에 대한 차이의 통계적 유의성을 결정하였다. *P*-values<0.05 이 유의한 것으로 고려되었다.

[0042] 실시예 1: 홍삼 추출물의 제조

[0043] 6년근 홍삼을 고려풍기인삼영농조합으로부터 구입하였다. 메탄올/물 (30:70, v/v) 용액 (150 mL)를 홍삼 분말 20g에 첨가하고 실온에서 방치시켰다. 3일 후, 잔류물을 여과에 이에 4,000 x g로 30분 동안 원심분리하여 제거하였다. 에틸아세테이트(150 mL)를 얻어진 상층액에 가하여 격렬하게 혼합하였다. 이어서, 상부 에틸아세테이트층을 분리하여 회전증발기를 사용하여 30℃에서 증발시켰다. 홍상의 메탄올 추출물(RG-1)로 부터의 최종 건조 잔류물 (150 mg)을 사용할 때까지 -20℃에서 저장하였다. RG-1을 디메틸술폭시드(DMSO)에 용해시켜 100 mg/mL 원액을 제조하였다. 용액들을 성장 배지 중에서 1,000-배 이상으로 희석하여 DMSO 농도가 HL-60 세포의 분화 및 증식 행동에 영향을 미치지 않도록 하였다.

[0044] 실시예 2: 1,25-$(OH)_2D_3$- 및 all-*trans* RA(ATRA)-유도 HL-60 세포 분화에 미치는 RG-1의 효과

[0045] 1,25-$(OH)_2D_3$- 및 all-*trans* RA(ATRA)-유도 세포 분화에 미치는 인삼의 메탄올 추출물(RG-1)의 효과에 대하여 검사하였다. HL-60 백혈병 세포들을 RG-1과 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 all-*trans* RA와 조합하여 처리하고, 세포 분화를 니트로블루 테트라졸륨 환원 에세이(NBT 에세이)에 의해 평가하였다. 대조군으로서, 세포들을 나RG-1 단독으로 처리하였다. RG-1 단독의 처리는 HL-60 세포의 분화에 있어서 비교적 매우 적은 증가(<5%)를 유도하였다. 최적 이하의 농도의 ATRA (50 nM) 또는 1,25-$(OH)_2D_3$ (5 nM)의 처리는 세포 분화도에 있어서 각각 18 및 15%의 약간 증가를 초래하였다(도 1A 참조).

[0046] 도 1은 RG-1의 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA-유도 HL-60세포 분화 및 성장에 미치는 효과를 나타내는 그라프도이다. HL-60 백혈병 세포들을 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA 단독으로 처리하거나, 또는 인삼의 메탄올 추출물(RG-1)과 혼합 처리하여 72시간 동안 처리하였다. 후속적인 HL-60 세포 분화 및 증식은 NBT 환원에세이(A) 및 MTT 에세이(B)에 의해 평가하였다. 데이터는 하나의 대표적인 실험으로부터 3회 결정하여 표준편차로 나타내었다. (*P<0.01, 미처리 군에 대하여; **P<0.01, 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 단독으로 처리한 군에 대하여; ***P<0.01, 50 nM ATRA 단독 처리한 군에 대하여).

[0047] 흥미롭게도, RG-1은 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA-유도 HL-60 세포 분화를 상승적으로 증대시켰는데, 이는 RG-1 농도의 증가에 따라 증가되는 것으로 나타났다. 100 ㎍/mL RG-1과 혼합된 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA의 효과는 개별 처리에서 관찰된 효과에 비하여 현저하게 높았다(>70%).

[0048] 각 처리 군에 대한 세포 증식 및 생존능을 결정하였다. 도 1B에 나타낸 바와 같이, 100 ㎍/mL RG-1 처리는 MTT 에세이에 의해 결정된 바와 같이, 23% 정도 세포 증식을 억제하였다. 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA와 혼합하여 RG-1을 처리한 결과 대략 26-48%로 세포 증식을 억제하였다. 모든 처리구에 대하여 세포 생존능은 트리판 블루 배제

에세이에 의해 확인되는 바와 같이 배양 기간 전체를 통하여 95% 이상이었다(데이터 나타내지 않음).

[0049] RG-1에 의해 증대되는 세포 분화를 더욱 확인하기 위하여, HL-60 세포 상의 형태학적 표현형을 분석하였다. 도 2는 RG-1 처리한 HL-60 백혈병 세포의 형태학적 분석 결과를 나타내는 사진이다. HL-60 백혈병 세포를 배지 단독, 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA 단독 (상부 판넬), 100 ㎍/ml RG-1 단독, 100 ㎍/ml RG-1 + 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$, 또는 나르제니신 + 50 nM ATRA(하부 판넬)로 72 시간 동안 처리하였다. 세포들은 김사(Giemsa) 염색을 사용하여 형태학적 분석에 의하여 평가하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로 나타냈다.

[0050] 도 2에 나타낸 바와 같이, 김사(Giemsa)-염색 미분화 대조군 HL-60 세포(좌상부)는 둥글고 규칙적인 세포 가장자리 및 큰 핵을 가진 우세한 전골수구이었는데 이는 세포들이 DNA 합성에 있어서 고도로 활성이고 신속하게 증식하고 있음을 나타낸다. 100 ㎍/mL RG-1, 5nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA 세포는 불규칙한 세포 가장자리 등의 비교적 작은 변화를 나타내었다. HL-60 세포에 대한 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA + 100 ㎍/mL RG-1의 병용처리는 상당히 감소된 세포 크기, 더 짙은 크로마틴 및 세포질에 대한 핵의 비율의 증가를 초래하였는데 이는 HL-60 세포의 분화를 나타낸다. 도 2에 나타낸 바와 같이 일부 세포들은 다엽의 핵으로 보였으며 이는 세포 분화의 징후이다.

[0051] 또한, 세포형광 분석을 수행하여 HL-60 세포에 대한 특이 표면 항원의 발현을 결정하였다. HL-60 백혈병 세포는 단핵구 및 과립구로 분화될 때 세포 표면 마아커, CD11b을 발현한다(참조문헌: Kansas, G. S.; Muirhead, M. J.; Dailey, M. O. *Blood* 1990, 76, 2483). 도 3은 HL-60 세포들을 RG-1으로 처리하고 그 결과를 사이토플루오로메트릭 분석에 의해 나타낸 도면으로서, HL-60 세포들을 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA 중 하나와 100 ㎍/mL RG-1으로 72 시간 동안 처리하였다. 세포들을 PE-공액 안티-CD11b mAb (*A*), FITC-공액 안티-CD14 (*B*) (그늘진 영역), 또는 mAb (그늘진 영역)을 사용하여 사이토플루오로메트릭 분석에 의해 평가하였다. 데이터는 3회 독립적인 실험의 대표값이다.

[0052] 도 3A에 나타낸 바와 같이, RG-1의 처리는 고형광 밀도를 나타내는 세포의 수를 상당히 증대시켰고, 또한 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA 중 하나와 합하여 처리하였을 경우에도 상승하여 CD11b-양성 세포의 수를 증가시켰는데 이로부터 RG-1이 1,25-$(OH)_2D_3$- 또는 ATRA-유도 HL-60 세포 분화를 강화하였음을 확인할 수 있다.

[0053] 실시예 3: HL-60 백혈병 세포의 분화 경로에 미치는 RG-1 및 1,25-$(OH)_2D_3$- 또는 ATRA의 영향

[0054] RG-1 및 1,25-$(OH)_2D_3$- 또는 ATRA로 처리한 후 분화 경로를 결정하기 위하여, CD14 항원의 발현을 사이토플루오로메트릭 분석법에 의해 RG-1 단독 또는 1,25-$(OH)_2D_3$- 또는 ATRA와 혼합하여 처리한 HL-60 세포에서 수행하였다. CD14 항원은 세포들이 단핵구로 분화될 때 독자적으로 발현된다(참조문헌: Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Mathison, J. C. *Science* 1990, 249, 1431). 도 3B에 나타낸 바와 같이, RG-1 및 1,25-$(OH)_2D_3$의 혼합물로 처리한 HL-60 세포는 항-CD14 단일 클론 항체와 매우 강하게 반응하였다. 1,25-$(OH)_2D_3$ 단독으로 처리한 세포들도 역시 항-CD14 단일 클론 항체와 반응하였으나, RG-1 및 1,25-$(OH)_2D_3$의 혼합물로 처리한 세포들이 나타낸 정도보다는 약하였다. 이들 결과는 RG-1이 단핵구 경로를 따라 1,25-$(OH)_2D_3$-유도 HL-60 세포 분화를 촉진하였음을 나타낸다.

[0055] 대조적으로, RG-1 및 ATRA의 혼합물로 처리한 HL-60 세포는 안티-CD14 단일클론 항체와의 염색을 거의 나타내지 않았다. 대조적으로, RG-1 및 ATRA의 혼합물로 처리한 HL-60 세포는 HL-60 세포 분화 마아커 CD11b에 대한 단일클론 항체로 강하게 염색되었는데 (도 3A 참조), 이는 RG-1이 과립구형 경로를 따라 ATRA-유도 HL-60 세포 분화를 자극하였음을 의미한다.

[0056] 실시예 4: RG-1의 HL-60 세포 분화에 미치는 감작 효과

[0057] 일부 분화 유도제는 백혈구 세포들을 다른 분화 유도제에 감작화시켜서 강력한 세포분화의 증가를 초래하는 것으로 알려졌다(참조문헌: (a) Wang, S. Y.; Chen, L. Y.; Wang, S. J.; Lin, C. K.; Ho, C. K. *Exp. Hematol.* 1991, 19, 1025 (b) Makishima, M.; Kanatani, Y.; Yamamoto-Yamaguchi, Y.; Honma Y. *Blood* 1996, 87, 3384 (c) Kang, S. N.; Chung, S. W.; Kim, T. S. *Eur. J. Pharmacol.* 2001, 420, 83 (d) Kang, S. N.; Lee, M.

H.; Kim, K. M.; Cho, D.; Kim, T. S. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61, 1487).

[0058] HL-60 세포들을 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA의 처리에 앞서 나르제니신으로 전처리, 동시처리, 후처리하였다. 도 4는 1,25-$(OH)_2D_3$/ATRA-유도 HL-60 세포 분화에 대한 RG-1 처리 시간에 따른 효과를 나타내는 도면이다.

[0059] HL-60 세포들을 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA (1-4)의 부재하에(NT) 또는 존재 하에 72시간 동안 인큐베이션시키고, 24 시간 전에 100 ㎍/mL RG-1 첨가(그룹 1), 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA 처리와 동시(그룹 2), 또는 24시간 후(그룹 3)에 RG-1을 첨가하였거나 또는 RG-1을 1 시간 동안 인큐베이션시키고 어느 하나의 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 50 nM ATRA 단독 (그룹 4)으로 인큐베이션시켰다. 세포 분화는 NBT 에세이에 의해 분석하였다. 데이터는 하나의 대표적인 실험으로부터 3회 측정치의 평균ㅁ표준 편차로 나타내었다.(*P<0.05, 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 단독으로 처리한 군에 대하여; **P<0.05, 50 nM ATRA 단독으로 처리한 군에 대하여).

[0060] 도 4에 나타낸 바와 같이, RG-1의 전처리(24시간) 및 동시처리는 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA 유도 HL-60세포 분화를 상당히 증가시킨 반면, RG-1의 후처리(24시간)는 비교적 적은 영향을 미쳤다. 더욱이, 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA로 처리하기 전에 RG-1을 제거한 경우도 마찬가지로, 전처리 및 동시처리 보다 HL-60 세포 분화에 영향을 미치지 않았다. 이들 결과는 RG-1이 백혈구 세포 분화를 강화함과 동시에 세포들을 세포 분화를 증대시키기 위해 세포들을 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA에 감작화시키는 것을 의미한다.

[0061] 실시예 5: 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA와 결합된 RG-1에 의해 유도되는 HL-60 세포 분화에 미치는 PKC, ERK, 또는 PI3-K의 억제제의 효과

[0062] RG-1의 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA-유도 세포 분화에 미치는 효과 및 PKC, ERK, 및 PI3-K 활성화 사이의 관계를 결정하기 위하여, HL-60 세포들을 특이 억제제로 전처리하고 이어서 RG-1 단독 또는 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA와 결합된 혼합물의 존재하에서 72 시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포 분화의 정도를 니트로블루 테트라졸륨 환원 에세이에 의해 평가하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 PKC, ERK, 및 PI3-K 억제제의 RG-1 단독 또는 ATRA 또는 1,25-(OH)2D3와의 혼합에 의해 유도되는 HL-60 세포 분화에 미치는 효과를 나타내는 도면이다. HL-60 세포들은 PKC 펩타이드 억제제 (PI), GF 109203X (GF), chelerythrine (CE) 등의 PKC 억제제 10 M; 10 M PI3-K 억제제, LY 294002 (LY); 또는 10 M ERK 억제제, PD 98059 (PD)로 1 시간 동안 처리하고, 이어서 5 nM 1,25-(OH)2D3 또는 50 nM ATRA 단독 또는 100 ㎍/mL RG-1와 혼합하여 인큐베이션시켰다. NT는 억제제의 부재를 의미한다. 세포의 분화는 NBT 환원 에세이에 의해 평가하였다. 데이터는 분화된 세포의 비율을 평균 s.e.m. (n = 3)으로 나타내었다. (*P<0.05, 5 nM 1,25-$(OH)_2D_3$ 단독으로 처리한 군에 대하여; **P<0.05, 50 nM ATRA 단독으로 처리한 군에 대하여).

[0063] 도 5에 나타낸 바와 같이 PKC 억제제 (GF 109203X, 첼에리쓰린(chelerythrine), 및 PKC 펩티드 억제제) 및 ERK 억제제(PD 98059)는 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA와 혼합된 나르제니신으로 처리된 HL-60 세포 분화를 상당히 억제한 반면, PI3-K 억제제(LY 294002)는 억제하지 못하였다.

산업이용 가능성

[0064] 이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 조성물은 상승작용에 의해 전골수구성 백혈병 치료제 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 RG-1의 1,25-$(OH)_2D_3$ 또는 ATRA-유도 HL-60세포 분화 및 성장에 미치는 효과를 나타내는 그라프도,

[0066] 도 2는 RG-1 처리한 HL-60 백혈병 세포의 형태학적 분석 결과를 나타내는 사진,

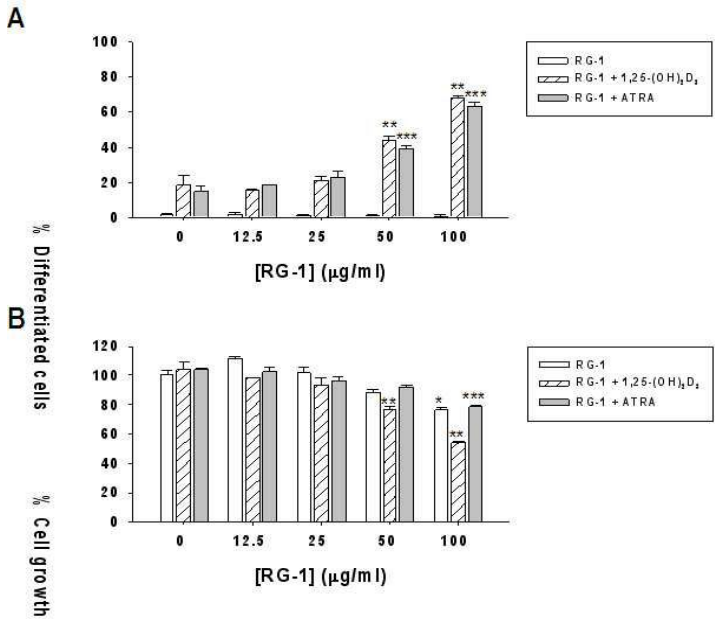
[0067] 도 3은 HL-60 세포들을 RG-1으로 처리하고 그 결과를 사이토플루오로메트릭 분석에 의해 나타낸 도면,

[0068] 도 4는 1,25-$(OH)_2D_3$/ATRA-유도 HL-60 세포 분화에 대한 RG-1 처리 시간에 따른 효과를 나타내는 도면,

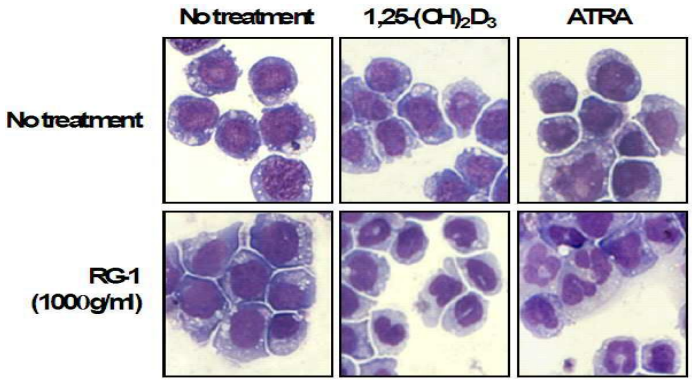
[0069] 도 5는 PKC, ERK, 및 PI3-K 억제제의 RG-1 단독 또는 ATRA 또는 1,25-$(OH)_2D_3$와의 혼합에 의해 유도되는 HL-60 세포 분화에 미치는 효과를 나타내는 도면.

도면

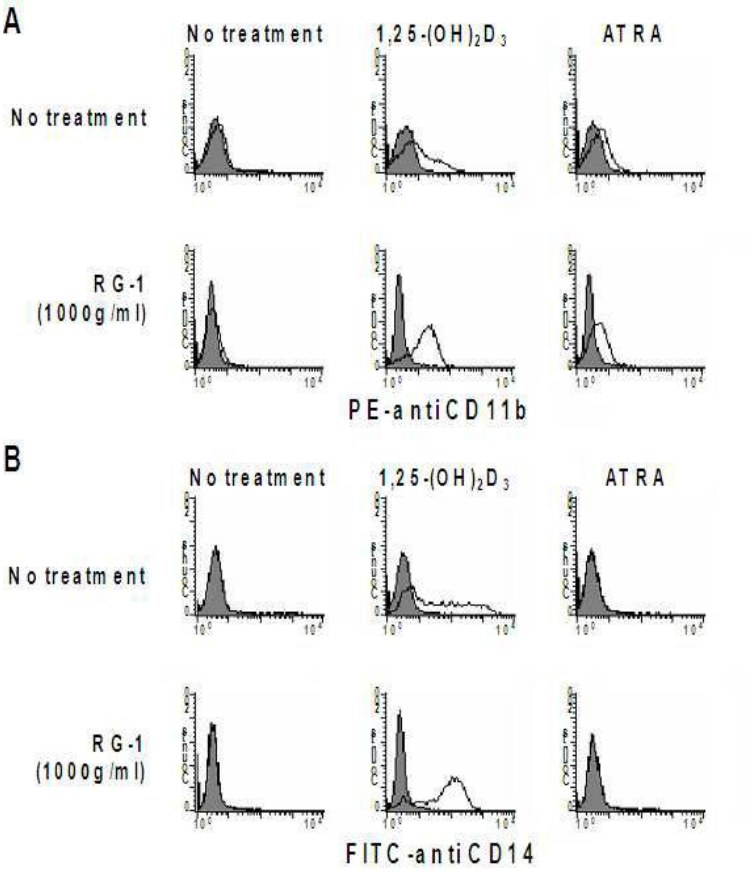
도면1



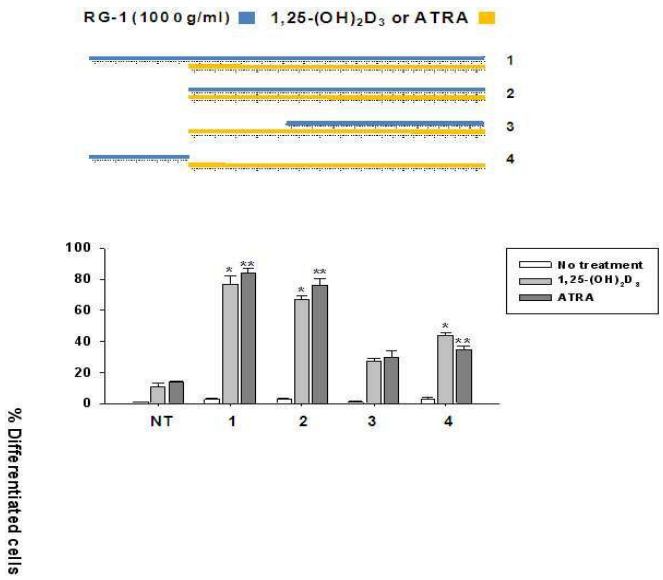
도면2



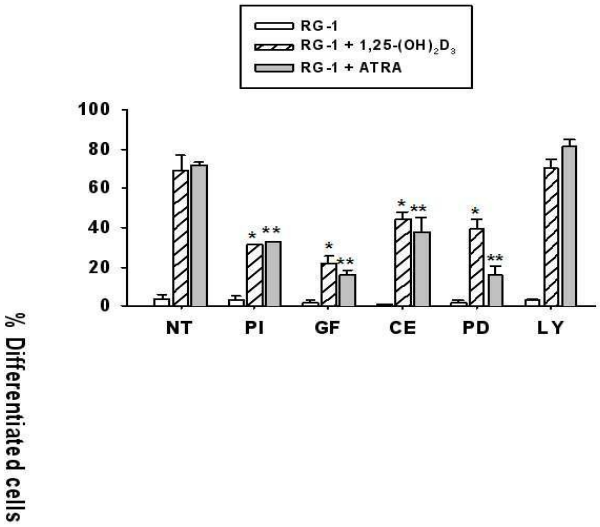
도면3


A
No treatment
1,25-(OH)2D3
ATRA
No treatment
RG-1
(1000g/ml)
PE-antiCD11b
B
No treatment
1,25-(OH)2D3
ATRA
No treatment
RG-1
(1000g/ml)
FITC-antiCD14

도면4


RG-1 (1000g/ml)
1,25-(OH)2D3 or ATRA
1
2
3
4
% Differentiated cells
100
80
60
40
20
0
NT
1
2
3
4
No treatment
1,25-(OH)2D3
ATRA

도면5


RG-1
RG-1 + 1,25-(OH)2D3
RG-1 + ATRA
100
80
60
40
20
0
% Differentiated cells
NT
PI
GF
CE
PD
LY
*
**