



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0070629
(43) 공개일자 2023년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2018.01) A61K 36/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/145 (2021.05)
A61K 36/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0156407
(22) 출원일자 2021년11월15일
심사청구일자 2021년11월15일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)
(72) 발명자
박준태
인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호
이윤행
서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 111동 80
1호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
차준용

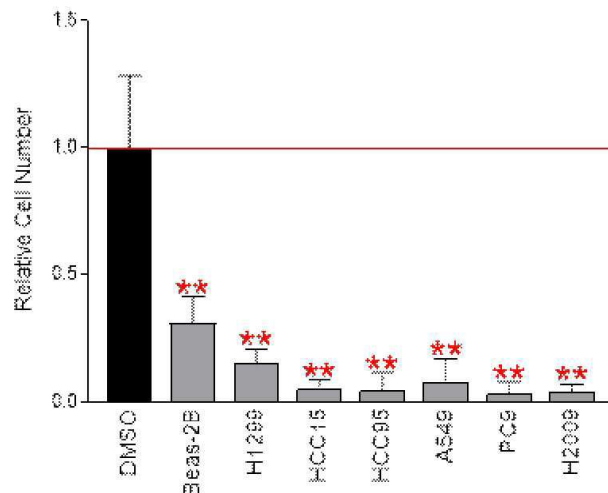
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 항암 활성을 가지는 폴리포르스 파보바리우스(Polyporus parvovarius) 균주

(57) 요약

본 발명의 일실시예는 항암 활성을 가지는 폴리포르스 파보바리우스(Polyporus parvovarius) 균주를 제공한다. 또한, 본 발명에 따른 폴리포르스 파보바리우스(Polyporus parvovarius) 균주 또는 이의 배양액 추출물을 유효성
분으로 포함하는 항암 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따른 항암 조성물은 암세포의 세포자가사
멸(Apoptosis)를 유도할 수 있고, 세포주기(cell cycle)에서 G1/G0기의 비율 증가 및 S기 비율을 감소시킬 수
있다. 또한, 본 발명의 일실시예에 따른 항암 조성물은 p-ERK단백질을 억제할 수 있으며 p27, p21, p16INK4A 및
Rb 단백질을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12R 2001/645 (2021.05)

(72) 발명자

최재혁

인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 96, 604동 302호

김창무

경기도 고양시 일산서구 후곡로 9, 807동 101호

김민경

인천광역시 계양구 장제로928번길 6, 201호

안초롱

서울특별시 마포구 포은로2길 26, 301호

유영현

인천광역시 서구 검암로10번길 39, 403동 602호

지원재

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로22번길 36, 6002동 2404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711130730

과제번호 2021R1A2C100429811

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어

기 여 율 0.4/1

과제수행기관명 인천대학교 산학협력단

연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345316455

과제번호 2017R1D1A1B04035879

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 비교유전체학 기반 치마버섯균의 산화효소 분비 유전자 기능 분석

기 여 율 0.4/1

과제수행기관명 인천대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485018081

과제번호 202102107

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 국립생물자원관

연구사업명 생물자원 발굴 및 분류 연구(R&D)

연구과제명 자생 균류 발굴 및 특성 분석연구(5차년도)

기 여 율 0.2/1

과제수행기관명 국립생물자원관

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

항암 활성을 가지는 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius* 수탁번호 KACC 83044BP) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 배양액은 배양여액 또는 이의 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 배양여액 또는 이의 추출물은 프로토크테추익 알데하이드(Protochatechuic Aldehyde, PCA)를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸(Apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 항암 조성물은 암세포의 세포주기(cell cycle)에서 G1/G0기의 비율 증가 및 S기 비율을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 항암 조성물은 p-ERK 단백질을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서,

상기 항암 조성물은 p27, p21, p16INK4A 및 Rb 단백질을 증가시키는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암 활성을 가지는 균주에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항암 활성을 가진 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 다른 일반적인 세포들과 달리 세포 증식능력이 무한하며, 그 증식 속도 또한 빠르게 이루어지고, 암세포를 둘러싼 혈관, 림프관 및 섬유아세포 등을 이용하여 종양 미세환경을 형성하여 다른 조직으로의 전이 및 일반세포의 기능상실 등을 유발함으로써 사망에 이르게 하는 무서운 질병 중 하나이다. 이러한 암을 치료하기 위해 전세계의 많은 연구자들이 암세포의 세포 내 신호전달 및 전이, 약물의 부작용 등에 관한 다양한 주제에 대하여 수많은 연구들을 진행하고 있으며, 매년 새로운 신약들이 개발되어 많은 암환자들에게 치료효과를 기대하게 하는 임상시험들이 실시되고 있다. 현재 항암치료에 사용되고 있는 항암제들은 각 암 종에 따라 다르게 적용이 되고 있다. 일반적으로 암환자들에게 처방되고 있는 화학항암제들은 암세포를 표적으로 하는 표적약물이 아닌 것들이 많다 보니, 암세포를 죽이는 효과를 가지고 있으나 동시에 정상세포들도 공격을 하여 탈모, 설사, 발열, 면역력 저하 등의 많은 부작용이 발생되고 있다. 이후, 암에 대한 유전적인 연구 등을 바탕으로 각 암종에서 발생하는 유전변이를 타겟으로 하는 표적 항암제가 개발되어 기존의 화학항암제에 의해 발생하는 부작용은 많이 개선되었으나, 환경에 따른 적응이 매우 빠른 암세포가 표적 항암제의 공격으로부터 벗어나고자 항암제 내성을 유발하게 되어, 표적항암제에 의한 지속적인 암 치료효과를 100% 기대할 수 없다는 문제점이 발생하고 있다.

[0004] 전세계 많은 연구자들이 항암 효과를 가지는 미생물이나 균주들에 대해서 연구를 진행하고 있는 상황이며, 국내 연구자들 역시 해외가 아닌 국내에 서식하고 있는 미생물이나 균주들의 항암 효과를 연구하고 있는 상황이며 여러 미생물들이나 균주들의 항암 효과가 밝혀지고 있다.

[0005] 본 발명자들은 이러한 노력의 일환으로 작은노란대구멍장이버섯(*Polyporus parvovarius*; 국립생물자원관 기탁번호: NIBRFGC000500557)을 연구했다. 이 버섯은 우리나라 인제군, 울릉도 등에 분포하는 균주로서, 자실체는 단년생이고, 갓은 원형으로 오목편평형이 되며 직경 3.5cm, 두께는 1.5mm에 이른다. 갓의 윗면은 담갈색이 되며 평활하며 방사상 선이 있다. 자실층은 구멍형으로 크림색이나 점차 갈색으로 변하고 구멍은 mm당 6~7개를 형성한다. 균사는 이균사로 생식균사는 클램프커넥션을 가지고 직경은 2.5~3 μ m에 이르고 결합균사는 직경 3~6 μ m이다. 담자기는 곤봉형으로 크기는 24~27 $\times$ 7.5~8.5 μ m이고, 담자포자는 원통형이며 크기는 7.4~8.6 $\times$ 3.5~4.5 μ m이다. 이 균주는 활엽수의 우수한 목재부후능을 지닌 목재분해효소에 대한 생물자원으로 산업적 가치가 있다고 알려져 있다. 하지만, 본 발명자들은 이 균주를 연구하면, 이 균주가 항암 효과를 지닐 수 있다는 것을 개발해내었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 항암 활성을 가지는 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주를 제공하는 것이다. 또한, 상기 항암 활성을 가지는 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주 또는 이의 배양액 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 항암 활성을 가지는 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius* 수탁번호 KACC 83044BP) 균주를 제공할 수 있다.
- [0011] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 암은 폐암일 수 있다.
- [0012] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 본 발명에 따른 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 배양액은 배양여액 또는 이의 추출물을 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 배양여액 또는 이의 추출물은 프로토허카테추익 알데하이드(Protochatechuic Aldehyde, PCA)를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸(Apoptosis)을 유도할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포주기(cell cycle)에서 G1/G0기의 비율 증가 및 S기 비율을 감소시킬 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 p-ERK단백질을 억제할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 p27, p21, p16INK4A 및 Rb 단백질 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주는 항암 활성을 가질 수 있다.
- [0021] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 *Polyporus parvovarius*의 ITS(Internal Transcribed Spacer) 염기서열이다.
- 도 2는 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY) 및 다른 비교대상 균주들의 배양여액 추출물들에 대한 HTS Screening결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY)의 항암 활성 농도최적화를 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY)의 암세포 억제력 결과를 보여주는 Cell toxicity 그래프이다.
- 도 5는 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY)의 암세포 세포자가사멸 분석(Apoptosis analysis)결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY)의 암세포 세포주기 분석(Cell cycle assay) 결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY) 처리시 HeLa 세포에서의 단백질 변화 분석을 위한 western blot 결과를 보여주는 그림이다.
- 도 8은 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY)의 7가지 폐암세포들에 대한 범용성 분석결과를 보여주

는 그래프이다.

도 9는 *Polyporus parvovarius*의 배양여액 추출물(5-DY)의 분획물이 가지는 암세포 활성분석(cell proliferation assay)에 대한 결과값을 보여주는 그래프이다.

도 10은 도9에서 P-3-2-1과 p-3-3-1의 구조 동정 분석 결과로 나온 3,4-dihydroxybenzaldehyde (Protochatechuic Aldehyde, PCA)의 구조식이다.

도 11은 Protochatechuic Aldehyde(PCA)의 농도별 암세포 viability test 결과값을 보여주는 그래프이다.

도 12는 Protochatechuic Aldehyde(PCA)의 암세포 세포자사멸분석(Apoptosis analysis)결과값을 보여주는 그래프이다.

도 13은 Protochatechuic Aldehyde(PCA)의 암세포 세포주기 분석(Cell cycle assay) 결과를 보여주는 그래프이다.

도 14는 Protochatechuic Aldehyde(PCA)의 6가지 폐암세포들에 대한 범용성 분석결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0025] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 본 발명의 일측면에 따른 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius* 수탁번호 KACC 83044BP) 균주는 항암 활성을 가질 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또다른 일실시예에 따르면, 상기 암은 폐암일 수 있다. 구체적으로, 도8을 참고해 보면, 본 발명에 따른 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 또는 이의 배양액이 폐암에 항암 효과가 있다는 것을 보여주고 있으며, 폐암 중에서도 Beas-2B(Bronchus; 기관지암), H1299(lymph node; 림프절암), HCC15 및 HCC95(squamous carcinoma; 편평세포암), A549, Lung; alveolar basal epithelial cells; 폐포기저 상피세포암), PC9 및 H2009(Adenocarcinoma; 선암종)에 항암효과를 보여주고 있다.
- [0029] 본 발명에서의 용어, 항암이란 암세포의 증식을 억제하거나 암세포를 죽이는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명의 다른 일측면에 따른 항암 조성물은 본 발명에 따른 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 균주는 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양액(배양물), 상기 균주의 배양여액, 상기 배양물의 추출물 등의 상태로 이용될 수 있다. 여기서, 상기 균주의 균체는 균 자체를 모두 포함하는 의미이며, 상기 배양액은 균체가 포함된 배양액을 의미하며, 상기 배양여액은 균체 비포함 배양액을 의미하고, 상기 배양물의 추출물은 유기용매를 사용하여 농축 또는 건조된 것을 의미한다.
- [0032] 상기 배양액은 구체적으로 본 발명의 상기 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻어지는 배양된 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미하며, 균주 배양 후 균주를 제거한 배양여액도 포함한다. 또한, 상기 균주의 배양에 의해 수득된 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 용해효소(lysozyme)를 처리하여 수득된 세포 파쇄액, 상기 배양액을 틄달화(tyndalization)한 틄달화물도 및 상기 정의

한 배양물들의 건조분말 또한 본 발명의 배양물에 포함될 수 있다.

- [0033] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 배양여액 또는 이의 추출물은 프로토허카테추익 알데하이드(Protochatechuic Aldehyde, PCA)를 포함할 수 있다. 상기 PCA는 자연에서 만들어지는 phenolic aldehyde의 일종으로서 지방산과 대장암에 대한 항암효과가 알려져 있다. 즉, 본 발명에 따른 배양방법으로 배양된 폴리포르스 파보바리우스 (*Polyporus parvovarius*) 균주 또는 이의 배양여액 추출물이 상기 PCA를 생산할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸(Apoptosis)을 유도할 수 있고, 암세포의 세포주기(cell cycle)에서 G1/G0기의 비율 증가 및 S기 비율을 감소시킬 수도 있다. 즉, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸을 유도하여 암세포를 억제하거나 죽일 수 있고, 암세포의 세포주기에서 G1/G0기의 비율을 증가시키거나 S기 비율을 감소시켜서 암세포의 분열 또는 증식을 억제할 수도 있다.
- [0035] 본 발명의 또다른 일실시예에 따르면, 상기 항암 조성물은 p-ERK단백질을 억제할 수 있고, p27, p21, p16INK4A 및 Rb 단백질을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 항암 조성물은 세포분열과 관련된 단백질인 p-ERK발현을 억제시킬 수 있고, 세포주기와 관련된 p27, p21, p16INK4A 및 Rb 단백질을 증가시켜서 세포주기에서 분열을 억제시킴으로써 암세포의 증식을 막을 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 항암 조성물은 바람직하게는 의약품 또는 의약품의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물이 의약품의 형태일 경우에는, 본 발명의 미생물 또는 이의 배양물 뿐만 아니라, 병원성 미생물 또는 항암 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 항암 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 항암 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화합식 1 또는 2의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 항암 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 병원성 세균 및 내성균에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 항암 조성물은 바람직하게 의약품 조성물일 수 있다. 본 발명의 항암 조성물이 의약품의 형태일 경우에는, 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제

또는 필터 충전제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

이하 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

실시예1. 폴리포르투스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양 및 시료 전처리

국립생물자원관으로부터 폴리포르투스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주를 분양받아서 실험을 진행했다. 또한, 비교대상 균주 *Polyporus arcularius* (NIBRFGC000143418) 및 *Polyporus brumalis* (NIBRFGC000500533)도 국립생물자원관으로부터 분양받아서 비교실험을 위해 사용하였다.

표 1

균주번호	균주 학명	비고
1	<i>Polyporus arcularius</i> (NIBRFGC000143418)	비교대상 균주
4	<i>Polyporus brumalis</i> (NIBRFGC000500533)	비교대상 균주
5	<i>Polyporus parvovarius</i> (NIBRFGC000500557; 수탁번호 KACC 83044BP)	본 발명대상 균주

각 균주는 PDA 평판배지에 7일간 전배양한 후 작은 조각으로 잘라 4종류(DY, MEB, MY, PDB)의 액체배지에 접종한 후, 25℃에서 60일간 170 rpm으로 진탕배양(shaking incubation)하였다. 배양이 완료된 액체배양 시료는 균 사체와 배양여액으로 분리하고 동결건조처리 후 시료로 사용하였다.

실시예2. 폴리포르투스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출

동결건조된 배양액 시료에 100% 에탄올을 첨가하여 Waving shaker에서 50rpm으로 48시간 동안 추출하였다. 추출물은 0.45 μ m filter로 여과한 후 농축건조하고 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich)에 녹였다. 500 mg/ml 농도로 조정하여 항암 활성 분석의 시료로 사용하였다.

1,4,5번 균주와 4가지 배지와 조합으로 배양된 배양여액 추출물을 4일간 500 μ g/ml의 농도로 세포배양 배지에 녹여 HeLa 세포에 처리하였다. 4일간의 약물 처리 후 DNA 염색을 통해 cell proliferation assay를 진행했다. Cell proliferation은 well 당 2000개의 HeLa 세포를 키웠으며 4일간 음성, 양성 대조군과 함께 12개의 실험군의 버섯 배양여액 추출물을 500 μ g/ml의 농도로 처리했다. 처리된 HeLa 세포는 0.2% SDS solution 1시간 처리, 1:1000 gel green solution을 넣어준 후 victor X3장비로 측정이 됐다. Cell proliferation assay 결과 음성 대조군 대비 약 70% 세포 억제력을 보여줬다 (다른 실험군은 대략 20~30%의 억제력을 보여줬다). 이를 근거로 5번 균주 *Polyporus parvovarius* (NIBRFGC000500557; 수탁번호 KACC 83044BP)를 dextrose 20 g/L, yeast extract 2g/L 배지에 배양한 배양여액 추출물(5-DY)를 선정해 추가 실험을 진행했다.

실시예3. 폴리포르투스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 억제 확인

5-DY 추출물을 분석하기 위해 추가적인 농도 최적화를 진행했다. 또한 cell toxicity를 살펴보기 위해 농도별 세포 억제량을 비교했다(도3). 96-well plate에 HeLa 세포를 well당 2000개씩 seeding 한 후 1~4일동안 약물처리를 진행했다. 약물 처리 후 1~4일이 경과한 각 96well plate에 0.2% SDS solution 150 μ l을 1시간 처리해 세포를 깨주었고, 1:1000으로 dilution한 gel green 시약 150 μ l를 넣어 DNA를 염색했고, VICTOR X3 장비로 측정해 cell proliferation assay를 진행했다. (도4). 도4를 참고해서 보면, Cell viability는 같은 조건으로 실험했을 때 약물처리시 농도에 따른 안정적인 세포 억제력을 보여줬다.

실시예4. 폴리포르투스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 세포자사멸 확인(Apoptosis analysis)

5-DY의 항암활성을 확인한 후 음성대조군 대비 apoptosis analysis를 통해 유도 비율을 살펴봤다. Apoptosis analysis는 3일간 5-DY로 처리된 HeLa세포 전체에 대해서 annexin V 및 Propidium iodidde를 처리한 후 유세포 분석기 장비를 이용해 측정했다(도5). 도5를 참고해서 보면, 사분면의 오른쪽 영역(C2, C4)인 전체apoptosis 비

율이 음성대조군(DMSO) 대비 약 4배 증가하였고, 이는 5-DY 배양여액 추출물이 apoptosis를 유도해 세포 억제를 한다는 것을 알 수 있었다.

[0058] **실시예5. 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 증식 억제 확인(세포주기 분석; Cell cycle assay)**

[0059] 3일간 5-DY처리 후 viable cell에 대해 70% 에탄올을 처리해 세포고정을 진행했다. 고정된 HeLa 세포에 Propidium iodide를 2.5 µg/ml의 농도로 처리된 샘플을 유세포 분석기로 측정했다(도6). 도6을 참고해서 보면, 5-DY 배양여액 추출물의 cell cycle 변화량도 확인해본 결과, 음성대조군(DMSO) 대비 G1/G0 기의 유의미한 비율 증가 및 S 기의 비율이 유의미한 수치의 감소를 확인했다. 이는 5-DY 추출물이 S기의 비율을 감소시키는 것으로 확인되었다.

[0061] **실시예6. 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 증식 또는 분열 관련 단백질 억제 확인(Western Blot)**

[0062] 5-DY 배양여액 추출물 처리시 HeLa 세포에서의 단백질 변화를 알아보기 위한 western blot 실험을 진행했다. 3일간 5-DY로 처리된 HeLa세포에 5% β-mercaptoethanol을 넣은 2X La laemlli sample buffer에 풀어준 후 95℃에서 5분간 끓여줬다. Western blot에 사용된 primary antibody는 p16INK4A antibody (sc-1661; 1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), p21 antibody (sc-6246; 1:500 dilution; Santa Cruz), p27 antibody (sc-1646; 1:500 dilution, Santa cruz), p-Rb antibody (sc-271930; 1:500 dilution; Santa Cruz) caspase-3 antibody (9665s; 1:500 dilution; cell signaling, Danvers, MS, USA), p-ERK antibody (9101s; 1:500 dilution; cell signaling) and HRP-conjugated β-actin (sc47778; 1:1000 dilution; Santa Cruz), 사용된 secondary antibody는 HRP conjugated anti-mouse antibody (sc-516102; 1:1000 dilution; Santa Cruz), HRP conjugated anti-rabbit antibody (sc-2357; 1:1000dilution; Santa Cruz) 이다. 도7을 참고해서 보면, Western blot 결과 cell proliferation과 관련된 p-ERK 단백질을 억제하였고, cell cycle 관련 단백질인 p27, p21, p16INK4A, Rb 단백질 또한 증가하는 결과를 얻게 되었다.

[0064] **실시예7. 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 항암 병용성 확인**

[0065] 5-DY를 7가지 종류의 암세포(Beas-2B, H1299, HCC15, HCC95, A549, PC9, H2009)를 대상으로 96-well plate에 HeLa 세포를 well당 2000개씩 seeding 한 후 1~4일동안 약물처리를 진행했다. 약물 처리 후 1~4일이 경과한 각 96well plate에 0.2% SDS solution 150 µl을 1시간 처리해 세포를 깨주었고, 1:1000으로 dilution한 gel green 시약 150 µl를 넣어 DNA를 염색했고, VICTOR X3 장비로 측정해 cell proliferation assay를 진행했다.

[0067] **실시예8. 폴리포르스 파보바리우스(*Polyporus parvovarius*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 분획물 및 이의 항암 효과 확인**

[0068] 5-DY 배양여액 추출물 분획물의 암세포활성(cell proliferation assay)을 측정한 결과 p-3-2-1, p-3-3-1 분획물의 항암 활성이 효과적으로 나왔다(도9). 그리고, 통상의 물질 구조동정 방법을 통해P-3-2-1과 p-3-3-1의 구조 동정 분석 결과 3,4-dihydroxybenzaldehyde (Protocatechuic Aldehyde, PCA)라는 물질로 동정이 되었고, PCA가 5-DY 배양여액 추출물의 유효성분인지 판단하기 위해 앞선 실험의 재현성을 판단했다(도10 내지 도14). 도11을 참고하면, PCA의 농도별 viability test에서는 앞선 5-DY 배양여액 추출물의 viability test와 비슷하게 고농도에서 안정적인 세포 억제력을 보여주었고, 높은 toxicity를 띄지 않았다. 또한 도12를 참고해서 보면, apoptosis 유도를 본 실험에서도 음성 대조군(DMSO) 대비 약 3배의 증가를 보여줬다(C2, C4, E++, E+-). 도13의 Cell cycle 실험에서도 5-DY 추출물과 유사하게 G1/G0 phase의 유의미한 증가, S phase의 유의미한 감소 결과를 보여주었다. 마지막으로 도14의 병용성 테스트에서도 5-DY 배양여액 추출물 실험과 마찬가지로 높은 억제력을 보여줬다. 이 결과를 토대로 5-DY 배양여액 추출물이 항암활성을 가지고 있고, 이 5-DY 배양여액 추출물의 분획물중 하나인 PCA가 여러 실험을 통해 항암활성을 재현되는 것을 확인하였다.

[0070] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0071] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0074]

기탁기관명 : 국립농업과학원

수탁번호 : KACC83044BP

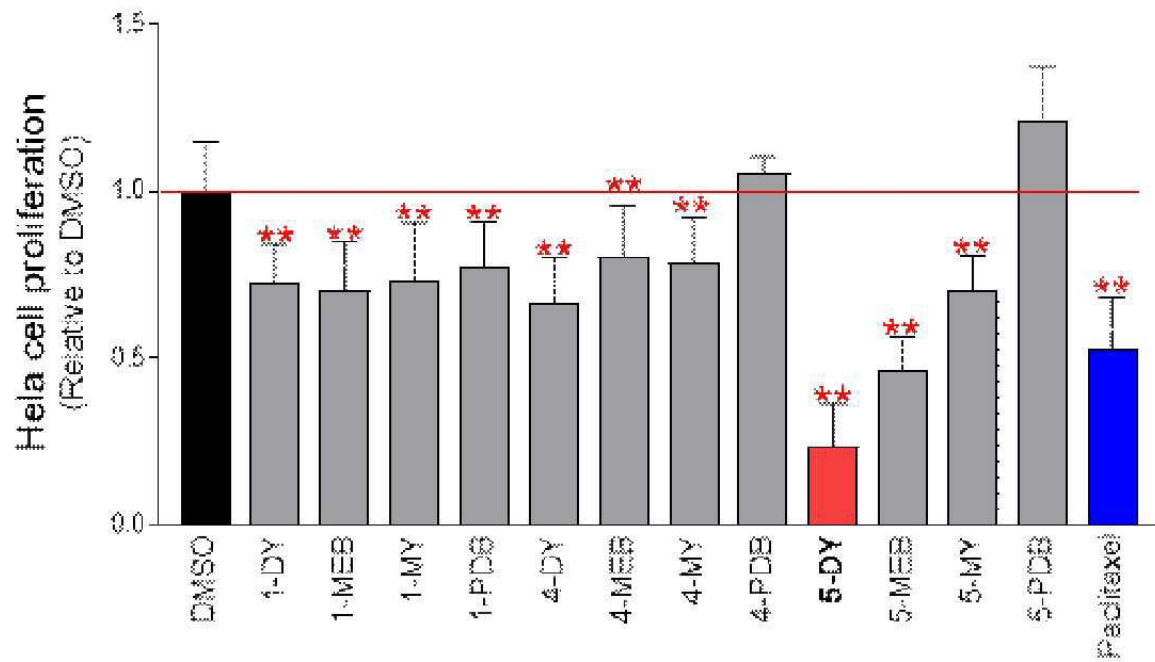
수탁일자 : 20210525

도면

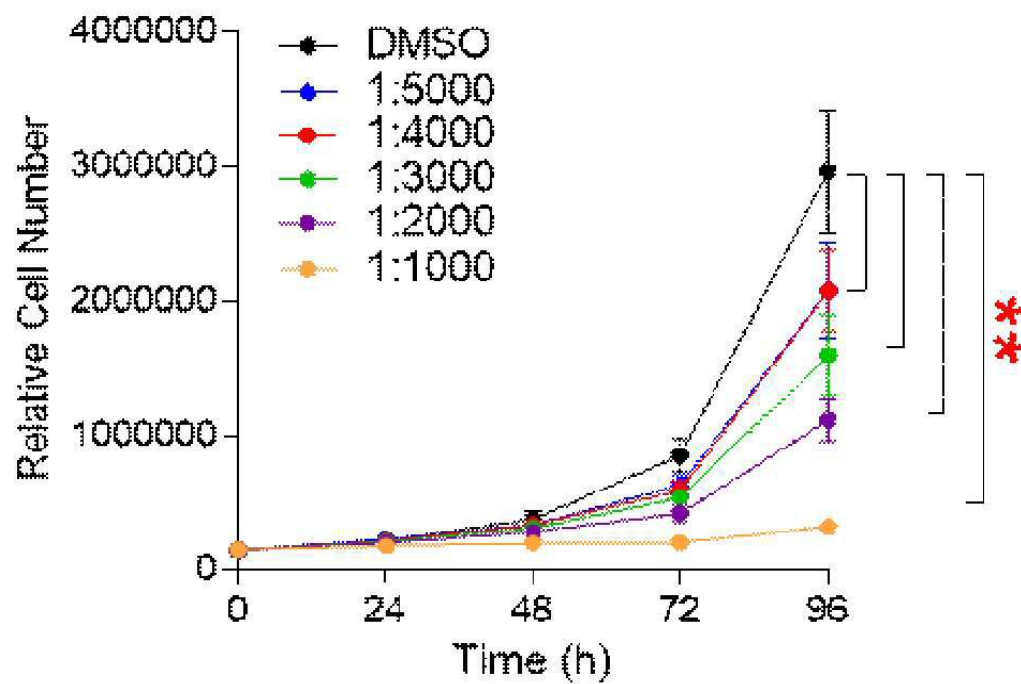
도면1

```
GCTGGCCCTTTACCGGGCATGTGCTCACCCCTTTCAAATCCACTCTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCGGTTTTTGTGGGTCTTGTTTTTTTTTTAAA
ACCTGGCCTTACGAGCCGGACTCACGTTTTTACTACAAACTCTTTAGTATCA
GAATGTGTATTGCGATGTTAATGCATCTTATACAACTTTCAGCAACGGATC
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCT
TGGTATTCCGAGGAGCACACCTGTTTGAGTGTCGTGAAACTCTCAACCTAC
AAAGCCTTTGTGTTTTGTTAGGCTTGGACTTTGGAGGCTTTGCTGGCATCG
AGTCAGCTCCTCTCAAATTTATTAGCTTGATTCTTGTGGATCAGTTCCTG
GTGTGATAATTGTCTACGCCGTGGCTGTGAAGCTTTTGGCAAGCTTCTAA
```

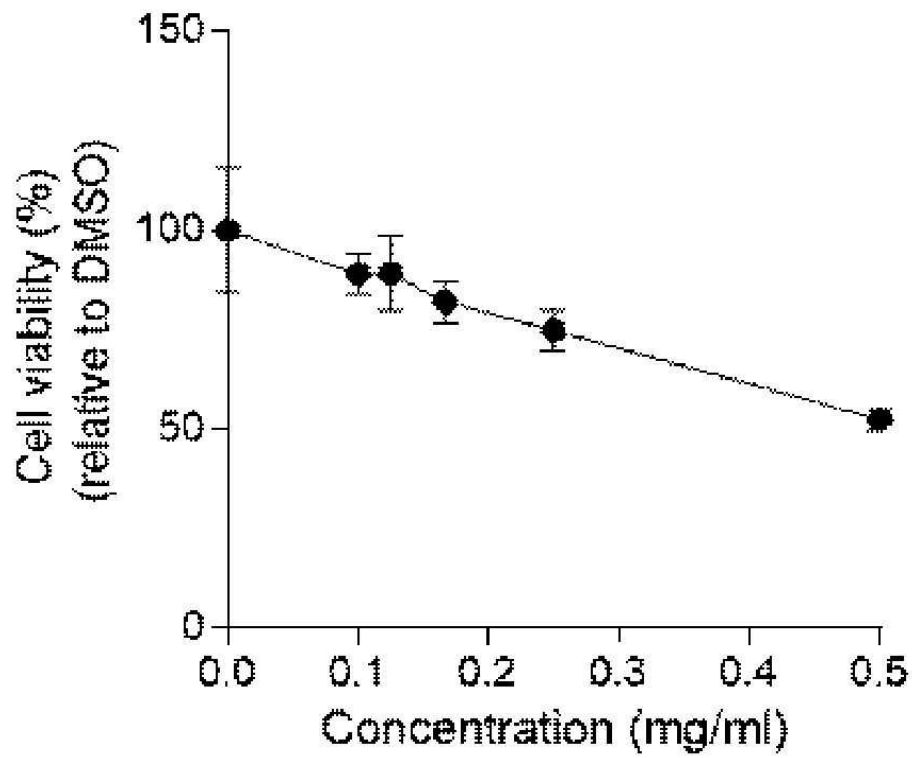
도면2



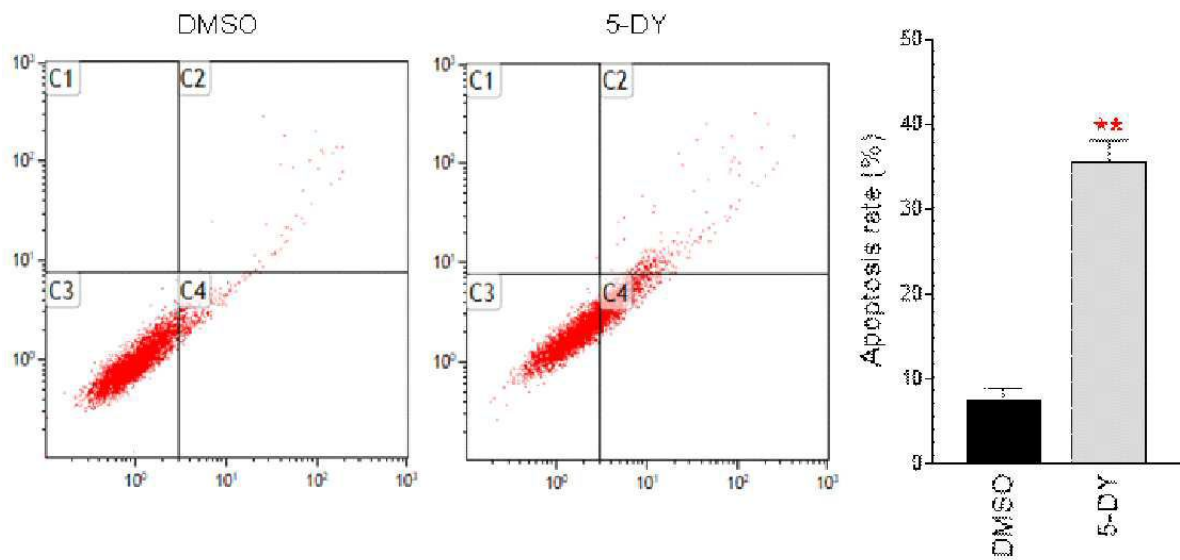
도면3



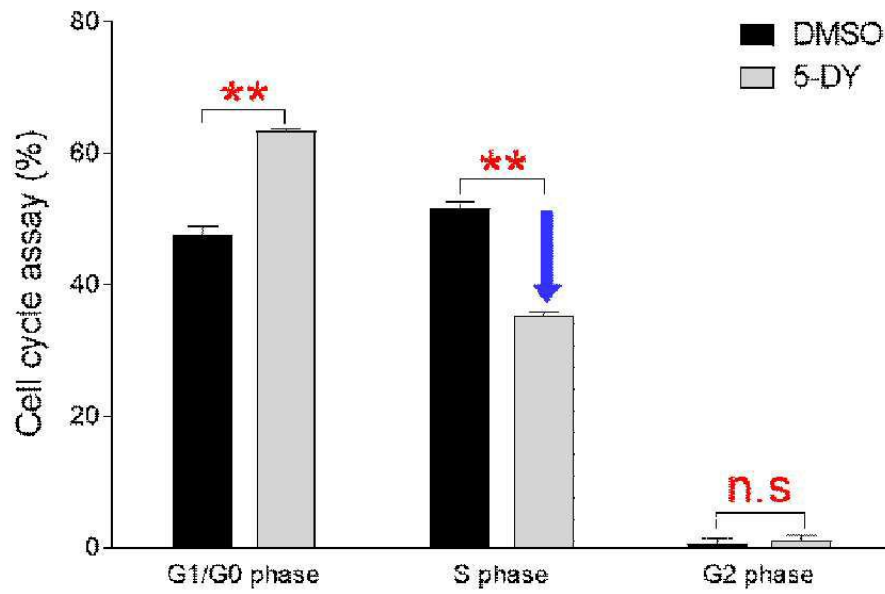
도면4



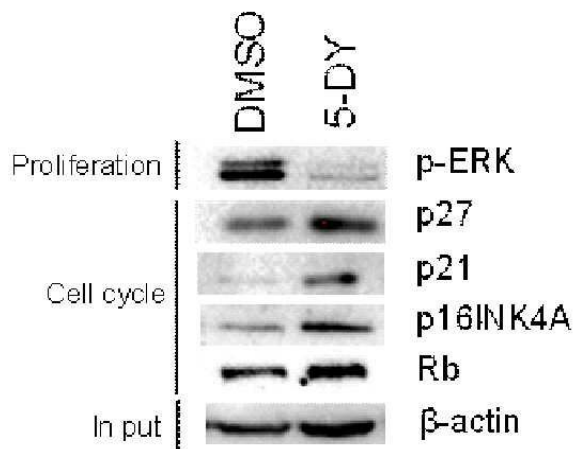
도면5



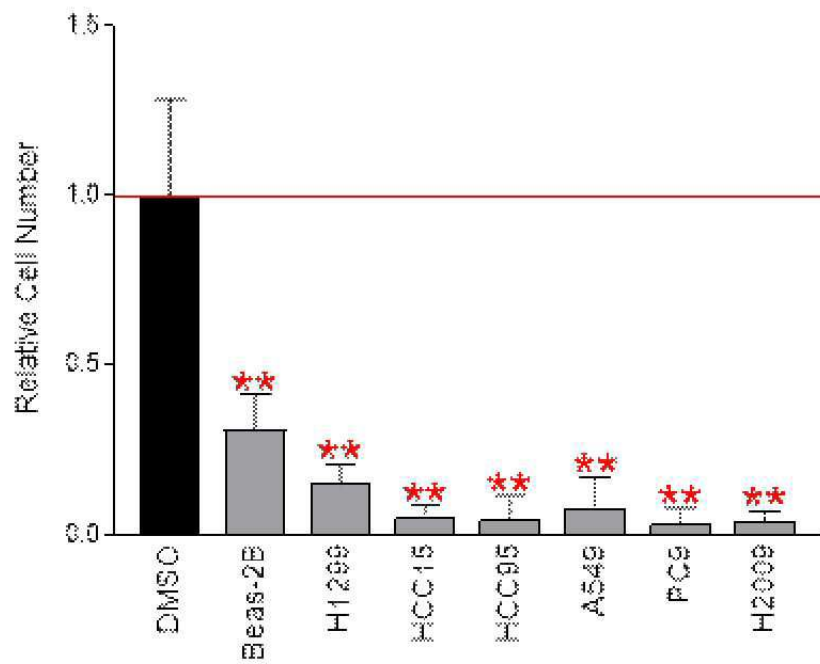
도면6



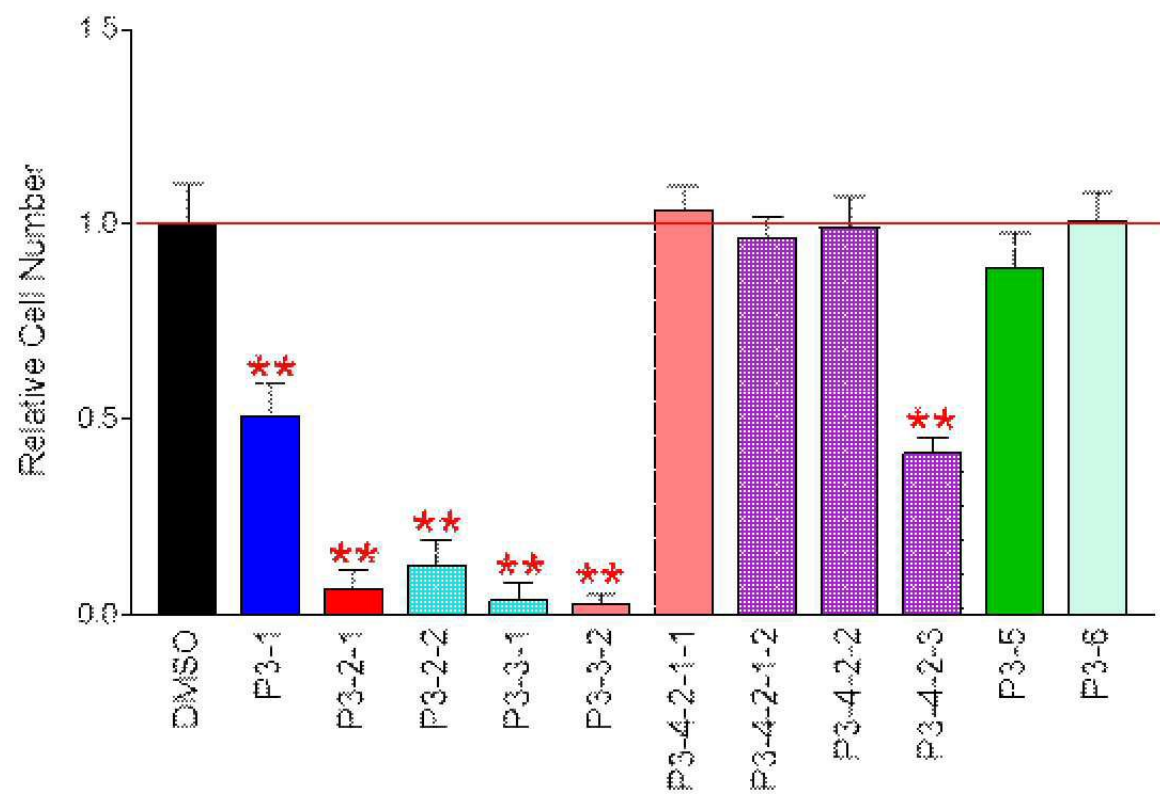
도면7



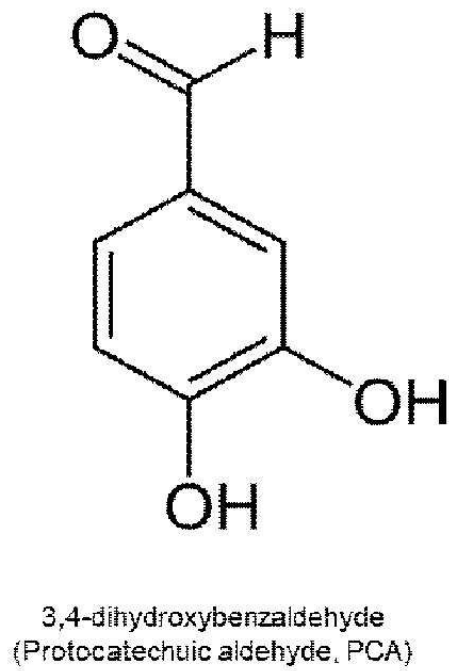
도면8



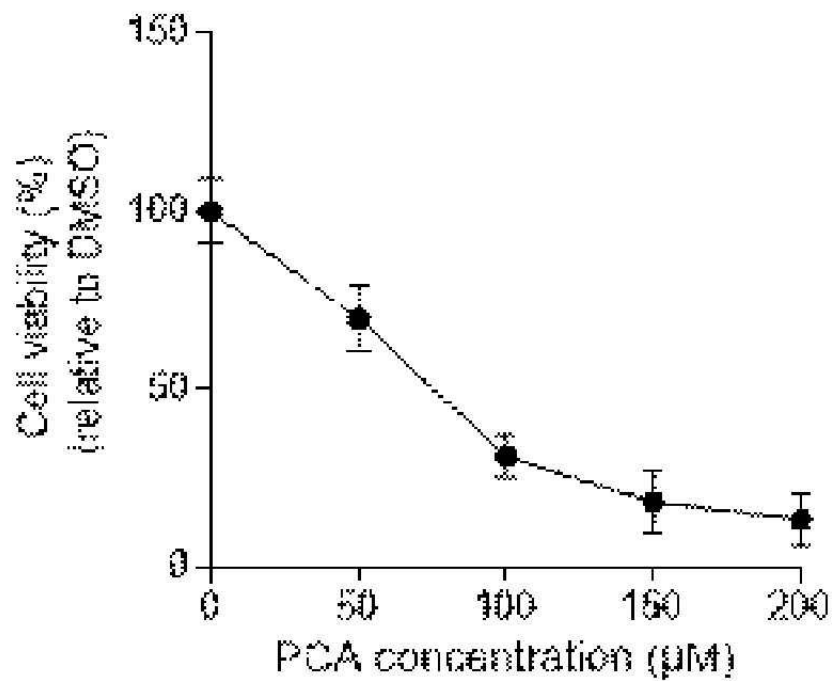
도면9



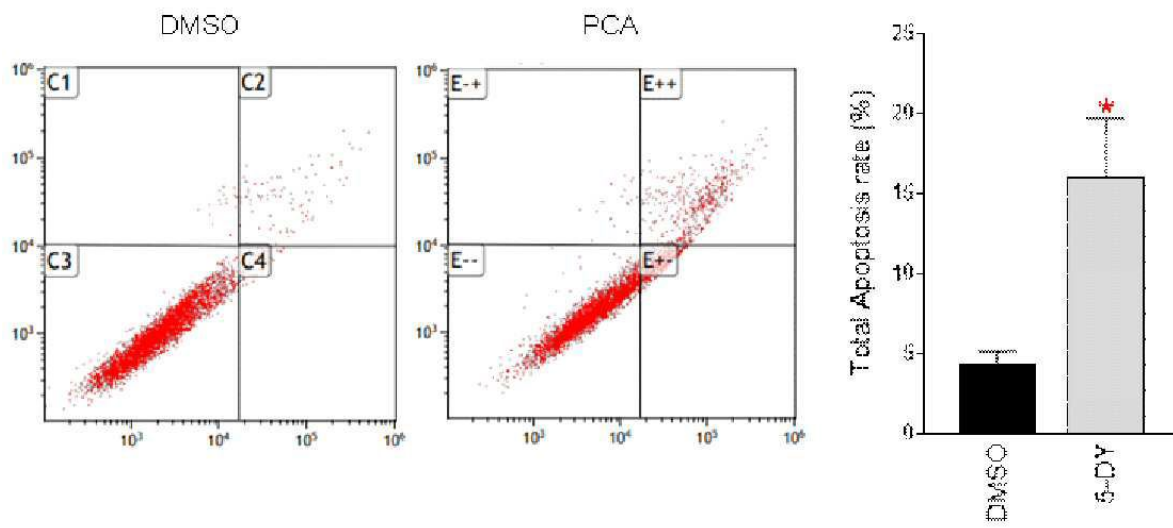
도면10



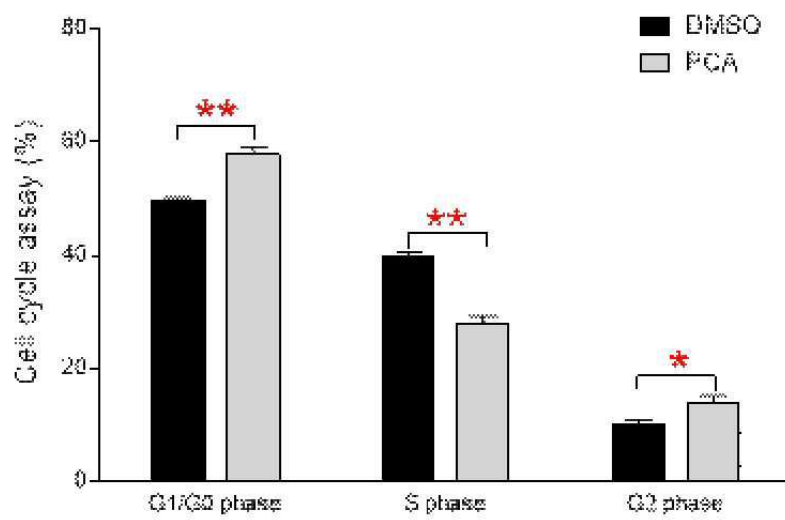
도면11



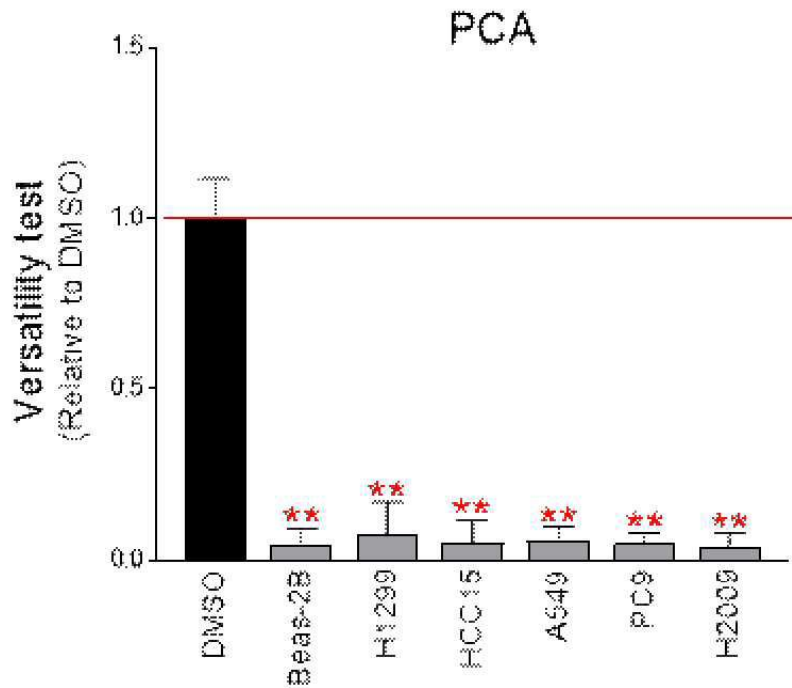
도면12



도면13



도면14



서열 목록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH and BUSINESS FOUNDATION

National Institute of Biological Resources

<120> Polyporus parvovarius HAVING ANTI-CANCER

<130> P21-0114

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 509

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Polyporus parvovarius ITS(Internal Transcribed Spacer) sequence

<400> 1

gctggccctt tacggggcat gtgtcaccc ttcaaatcc actctacacc tgtgcactta 60

ctgtgggctt cggtttttgt tgggtcttgt ttttttttta aaacctggcc ttacgagccg 120

gactcacgtt ttactacaaa ctctttagta tcagaatgtg tattgcatg ttaatgcatc 180

ttatacaact ttcagcaacg gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac gcagcgaat 240

gcgataagta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcaccttgc 300

gtccttgggt attccgagga gcacacctgt ttgagtgtcg tgaactctc aacctacaaa 360

gcctttgtgt ttgttaggc ttggactttg gaggtttgc tggcatcgag tcagctcctc	420
tcaaatttat tagcttgatt cttgtggat cagttcctgg tgtgataatt gtctacgccg	480
tggtgtgaa gcttttggca agcttctaa	509