



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월30일
(11) 등록번호 10-1322664
(24) 등록일자 2013년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0036604

(22) 출원일자 2013년04월04일

심사청구일자 2013년04월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120021358 A

KR1020090047718 A

KR101103426 B1

Food Chem. Toxicol. 51: 33-37 (2012. 09. 18.)

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정혜광

대전광역시 유성구 반석동 반석마을6단지아파트
609동 1102호

김형균

대전광역시 유성구 봉명동 미성샤르망 102동 508
호

나민균

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 406동
1605호

(74) 대리인

백경영

전체 청구항 수 : 총 7 항

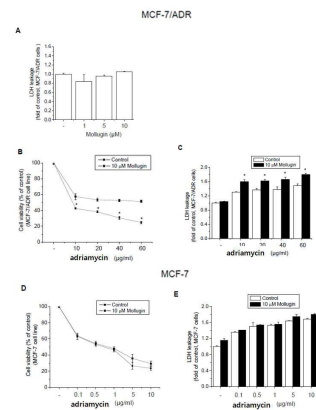
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 다약제 내성 암세포들을 사멸하는 효과가 우수하여, 기존의 항암제에 내성이 생긴 암환자들에 대한 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2

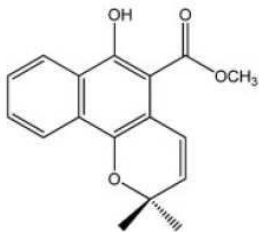


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 몰루긴(mollugin)을 함유하는 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다약제 내성 암세포는 MDR1(multidrug resistance 1)을 발현하고 있는 암세포인 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 MDR1(multidrug resistance 1)을 발현하고 있는 암세포는 아드리아마이신(adriamycin), 독시사이클린(doxycycline), 디곡신(digoxin), 빈블라스틴(vinblastine) 및 빈크리스틴(vincristine)으로 이루어진 군에서 선택되는 약물에 대한 다약제 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물에 항암제가 추가되는 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항암제는 아드리아마이신(adriamycin), 빈블라스틴(vinblastine) 및 빈크리스틴(vincristine)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물에 몰루긴은 0.001~99.9 중량%가 포함되는 것을 특징으로 하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물에 관한 것으로서, 자세하게는 본 발명은 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 암으로 인한 암환자의 치료 실패는 주로 항암제의 약물 저항성(내성)과 관련이 있으며(Longley and Johnston, 2005), 이는 다약제 저항성 관련 유전자인 MDR(multidrug resistance)과 밀접한 관련이 있다. 상기 MDR 유전자는 당단백질인 P-gp(P-glycoprotein)에 속하는데 인간의 유전자에는 2가지 타입의 MDR이 있고, 이 중에서 MDR1이 약물 저항성과 관련이 있다(van der Bliek et al., 1988). MDR은 암세포에서 여러 기작을 갖는 것으로 알려져 있으나 ATP 의존적이고 ABC 계열 트랜스포터(ATP-binding cassette family transporters : herein termed multidrug transporters)와 관련된 약물의 유입과 관련이 있다(Gottesman et al., 2002). MDR1은 암세포에서 항상 발현하는 유전자는 아니지만, 많은 종류의 암과 빈번하게 관련이 있다(Sikic, 1993).
- [0003] AMPK(AMP-activated protein kinase)는 지방과 글루코스 대사의 주된 세포 조절인자이며(Zhou et al., 2001), ACC와 HMGCoA 환원효소를 인산화하여 조절하는 역할을 한다(Carling et al., 1989). 최근에 AMPK는 암세포의 성장을 억제하며, 암세포의 약물저항성을 극복하게 하며, NF- κ B와 CREB의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Huang et al., 2009). 이 때, AMPK는 NF- κ B의 상위에 있는 AKT를 억제하여 NF- κ B의 활성을 억제한다.
- [0004] 꼭두서니(*Rubia cordifolia* L.)는 다년생 덩굴식물로서, 아프리카, 아시아, 아메리카 등지에서 널리 분포되어 있다(Singh and Chauhan, 2004). 꼭두서니의 추출물은 항균, 항산화, 항염 활성이 있는 전통적인 생약재로서 사용되어 왔다(Lu et al., 2007). 꼭두서니의 추출물에는 안쓰라퀴논, 푸로몰루긴, 몰루긴 같은 다양한 활성 물질들이 포함되어 있다(Kim et al., 2009a). 한국에서는 관절염, 생리통 또는 생리불순, 류머티즘, 비뇨기 질환 등의 전통적인 치료 약재로서 사용되어 왔다. 약리학적으로는 항균, 항산화, 산화질소의 생성 저해 효과 등이 있다고 알려져 있으며(Basu et al., 2005; Tezuka et al., 2001; Cai et al., 2004), 다양한 기능성 성분을 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다. 꼭두서니의 뿌리로부터 분리된 나프토헥드로퀴닌(naphthohydroquinone) 화합물인 몰루긴(mollugin)은 항염, 신경보호 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 몰루긴은 주로 PI3k/AKT/NF- κ B의 저해제, 염증성 장질환의 치료제로 사용될 수 있는 주된 후보 물질로서 알려져 있다(Kim et al., 2009b).
- [0005] 본 발명자들은 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴이 AMPK의 활성을 증가시켜 MDR1의 발현을 최종적으로 저해하고, 이로 인해 상기 몰루긴이 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 상기 MCF-7/ADR 암세포는 아드리아마이신(adriamycin)에 대한 약물 내성 유전자를 과발현한 다약제 내성 효과를 갖는 암세포로서, MDR1 유전자가 발현되기 때문에 아드리아마이신에 대한 약물 내성을 가질 뿐만 아니라 일반적인 항암제에 대해서도 세포 사멸 효과가 낮다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Basu S, Ghosh A, Hazra B. 2005. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytother Res* 19(10):888-894.
- (비특허문헌 0002) Cai Y, Sun M, Xing J, Corke H. 2004. Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships. *J Agric Food Chem* 52(26):7884-7890.
- (비특허문헌 0003) Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A., and Hardie, D. G., 1989. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities.
- (비특허문헌 0004) Gottesman, M. M., Fojo, T., and Bates, S. E., 2002. Multidrug resistance in cancer:

role of ATP-dependent transporters. Nature Reviews Cancer 2, 48-58.

(비특허문헌 0005) Huang, N. L., Chiang, S. H., Hsueh, C. H., Liang, Y. J., Chen, Y. J., and Lai, L. P., 2009. Metformin inhibits TNF-alpha-induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaBalpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. International journal of cardiology 134, 169-175.

(비특허문헌 0006) Kim, K. J., Lee, J. S., Kwak, M. K., Choi, H. G., Yong, C. S., Kim, J. A., Lee, Y. R., Lyoo, W. S., and Park, Y. J., 2009a. Anti-inflammatory action of mollugin and its synthetic derivatives in HT-29 human colonic epithelial cells is mediated through inhibition of NF-kappaB activation. European Journal of Pharmacology 622, 52-57.

(비특허문헌 0007) Kim, S. M., Park, H. S., Jun, D. Y., Woo, H. J., Woo, M. H., Yang, C. H., and Kim, Y. H., 2009b. Mollugin induces apoptosis in human Jurkat T cells through endoplasmic reticulum stress-mediated activation of JNK and caspase-12 and subsequent activation of mitochondria-dependent caspase cascade regulated by Bcl-xL. Toxicology and Applied Pharmacology 241, 210-220.

(비특허문헌 0008) Longley, D. B., and Johnston, P. G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. The Journal of Pathology 205, 275-292.

(비특허문헌 0009) Sikic, B. I., 1993. Modulation of multidrug resistance: at the threshold. Journal of Clinical Oncology 11, 1629-1635.

(비특허문헌 0010) Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. 2001. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bungeanum. J Ethnopharmacol 77(2-3):209-217.

(비특허문헌 0011) van der Bliek, A. M., Kooiman, P. M., Schneider, C., and Borst, P., 1988. Sequence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein. Gene 71, 401-411.

(비특허문헌 0012) Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., and Moller, D. E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. Journal of Clinical Investigation 108, 1167-1174.

발명의 내용

해결하려는 과제

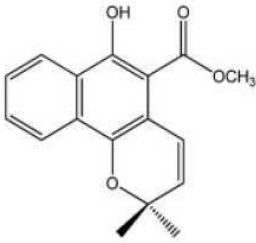
[0007] 본 발명의 목적은 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 자세하게는 본 발명의 목적은 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하기 화학식 1의 몰루긴(mollugin)을 함유하는 다약제 내성 암세포의 사멸 효과가 있는 항암용 조성물에 관한 것이다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 다약제 내성 암세포는 MDR1(multidrug resistance 1)을 발현하고 있는 암세포로서, 상기 암세포는 아드리아마이신(adriamycin), 독시사이클린(doxycycline), 디곡신(digoxin), 빈블라스틴(vinblastine) 및 빈크리스틴(vincristine)으로 이루어진 군에서 선택되는 약물에 대한 다약제 내성을 갖는 암세포일 수 있다.

[0013] 상기 항암용 조성물은 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 활성을 증가시키는 효과가 있을 수 있다.

[0014] 또한 상기 조성물은 몰루긴에 항암제가 추가된 항암용 조성물일 수 있다. 상기 항암제는 아드리아마이신, 빈블라스틴 및 빈크리스틴으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0015] 한편, 본 발명의 항암용 조성물에 몰루긴은 0.001~99.9 중량%가 포함될 수 있다.

[0016] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0017] 상기 몰루긴은 통상적인 방법으로 합성될 수 있으며, 꼭두서니(*Rubia cordifolia* L.)의 뿌리 또는 각종 약용식물로부터 추출될 수 있다. 상기 꼭두서니의 뿌리 또는 약용식물의 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 물과의 혼합용매를 이용하여 제조될 수 있으며, 상법에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 헥산과 물의 분배, 크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합한 방법을 이용하여 분획 또는 정제한 후, 상기 몰루긴을 분리해낼 수 있다.

[0018] 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘레이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한 몰루긴 및 약제학적 부형제를 포함하는 항암용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약제학적 부형제는 담체, 부형제 또는 희석제가 사용될 수 있다. 상기 몰루긴을 함유하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 본 발명의 생약 혼합물의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 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 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 몰루긴을 함유하는 항암용 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이

러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 몰루긴을 함유하는 항암용 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 몰루긴을 함유하는 항암용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 항암제에 내성이 있는 암세포들을 사멸하는 효과가 우수하여, 기존의 항암제에 내성이 생긴 암환자들에 대한 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1A는 MCF-7/ADR 암세포에서 아드리아마이신 다약제 저항성 유전자인 MDR1이 발현되고 있음을 확인한 웨스턴 블롯 결과를 나타내는 그림이다.

도 1B는 MCF-7/ADR 암세포가 MCF-7 암세포와 비교하여 아드리아마이신(adriamycin)에 대한 강한 내성이 있음을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2A는 MCF-7/ADR 암세포에서 10 μ M 이하의 몰루긴(molugin)이 세포 사멸에 거의 영향을 주지 않는 것을 나타내는 LDH 어세이 결과이다.

도 2B는 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin)의 전처리로 인해 아드리아마이신(adriamycin)의 세포 사멸 효과가 증가되는 것을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2C는 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin)의 전처리로 인해 아드리아마이신(adriamycin)의 세포 사멸 효과가 증가되는 것을 나타내는 LDH 어세이 결과이다.

도 2D는 MCF-7 암세포에서 몰루긴(molugin)의 전처리가 아드리아마이신(adriamycin)의 세포 사멸 효과에 영향을 주지 않음을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2E는 MCF-7 암세포에서 몰루긴(molugin)의 전처리가 아드리아마이신(adriamycin)의 세포 사멸 효과에 영향을 주지 않음을 나타내는 LDH 어세이 결과이다.

도 3A는 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin) 처리 농도(왼쪽) 또는 시간별(오른쪽)로 MDR1 mRNA 발현이 감소하는 것을 나타내는 리얼타임 PCR 결과이다.

도 3B는 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin)이 MDR1의 단백질 발현을 농도(왼쪽) 또는 시간(오른쪽) 의존적으로 억제하고 있는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 3C는, MCF-7/ADR 암세포에서의 MDR1의 프로모터 활성이 몰루긴(molugin)에 농도의존적으로 감소하고 있는 것을 나타내는 루시퍼레이즈 어세이 결과이다.

도 4A는 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin)에 시간(왼쪽) 또는 농도(오른쪽) 의존적으로 AKT의 인산화는 억제되고 AMPK의 인산화는 증가하는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 4B는 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin) 처리로 인해 감소되어 있는 MDR1의 프로모터 활성이 AMPK 저해제인 컴파운드 C(Compound C)의 처리로 인해 다시 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

<실시예 1. 몰루긴의 분리>

- [0026] 건조된 꼭두서니(*Rubia cordifolia* L.)의 뿌리(10kg)를 실온에서 메탄올(20ℓ)로 추출하고 감압건조하여 1000g의 메탄올 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 물 4ℓ에 현탁한 후, 디클로로메탄 4ℓ와 혼합하여 현탁한 후, 디클로로메탄 가용 분획만을 취해 감압건조하였다. 건조된 상기 디클로로메탄 분획물(2g)은 디클로로메탄/메탄올(100:0→0:100)의 용매 농도구배조건의 MPLC[Si gel column(7.5×3cm)]을 이용하여 10개로 분획하였으며(Fr. 1-10), 이 중 Fr.2 분획물(380mg)을 메탄올/물(40:60→90:10)의 용매 농도구배 조건의 C18 HPLC(250×21.2mm, 10μm)를 이용하여 몰루긴(21.5mg)을 분리하였다.
- [0027] 분리된 몰루긴의 순도는 HPLC[Luna C18 column (250×21.2mm, 10μm), mobile phase: linear gradient of MeOH/H₂O (40:60→90:10) over 60min, flow rate: 6ml/min, UV detection at 254nm]를 통해 순도 98%인 것으로 확인되었으며, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR의 분석결과는 하기와 같다.
- [0028] ¹H-NMR (250 MHz, methanol-d₄) : δ 8.19 (1H, dd, J = 8.3, 0.8 Hz, H-5), 8.00 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-8), 7.37-7.55 (2H, m, H-6, 7), 7.01 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-19), 5.62 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-29), 3.90 (3H, s, -OCH₃), 1.37 (6H, s, -CH₃).
- [0029] ¹³C-NMR (63 MHz, methanol-d₄) : δ 174.5 (??C=O), 156.7 (C-1), 142.7 (C-4), 130.3 (C-6), 130.1 (C-4a), 127.3 (C-2'), 126.2 (C-7), 125.8 (C-8a), 124.8 (C-5), 123.2 (C-1'), 122.8 (C-8), 114.0 (C-3), 103.8 (C-2), 75.9 (C-3'), 52.7 (-OCH₃), 27.0 (C-4' and 5').
- [0030] <실시예 2. 세포의 준비 및 몰루긴의 항암제 내성 세포 사멸 효과 확인>
- [0031] 실시예 2-1. 세포의 준비 및 배양
- [0032] MCF-7 암세포 및 아드리아마이신 내성 유전자를 과발현시킨 다약제 저항성 MCF-7/ADR 암세포(ultidrug-resistant sub-line MCF-7/adr)는 Buffalo University(Dr. Marulyn E. Morris, Buffalo University, Buffalo, NY, USA)에서 제공받았다. 각 세포들은 10% FBS가 포함된 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium containing 10% fetal bovine serum)을 이용하여 37℃의 CO₂ 습윤 배양기에서 배양되었다.
- [0033] 실시예 2-2. MDR1 발현 상태 확인
- [0034] MCF-7/ADR 암세포에서의 다약제 저항성 유전자인 MDR1 발현 상태를 확인하기 위해 일반 암세포인 MCF-7 암세포와 함께 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이를 위해, 상기 세포들을 100μℓ의 세포용해버퍼(120mM NaCl, 40mM Tris, pH 8, 0.1% NP40)에 녹인 후(4℃, 30분), 용해된 액상을 13,000×g에서 15분간 원심분리하고, 상등액만을 모아서 BCA 단백질 어세이를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 정량된 결과를 참고하여 80μg씩의 단백질을 10% SDS-PAGE(10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후, PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 이 후, MDR1의 단백질량을 확인하였다. 각 단백질량은 β-actin에 대한 양을 기준으로 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 1A에 나타내었다.
- [0035] 도 1A를 참고하면, MCF-7 암세포에서는 MDR1 단백질 발현이 되지 않는 것으로 확인되지만, MCF-7/ADR 암세포에서는 MDR1 단백질이 다량으로 발현하고 있는 것을 알 수 있다.
- [0036] 실시예 2-3. 항암제 내성에 따른 세포 사멸률 확인
- [0037] MCF-7/ADR 암세포의 항암제 내성상태를 확인하기 위해 아드리아마이신(adriamycin)의 처리에 따른 세포 사멸률을 일반 MCF-7 암세포와 비교하여 확인하였다.
- [0038] 48-웰플레이트(48-well plate)에 각 웰당 4×10⁴ cells/500μℓ로 MCF-7/ADR 및 MCF-7 암세포를 분주하고 24시간 후에 세포배양배지를 무혈청 배지로 교체하였다. 이 후 아드리아마이신을 0.1~60μM의 농도로 하여 24시간 동안 37℃에서 처리하였다. 이 후 상기 세포들을 이용하여 MTT 어세이(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay)를 수행하였다. MTT 어세이를 위해서는 MTT 용액(USB Corp. Cleveland, OH, USA; final concentration, 0.5mg/ml)을 1시간 동안 각 세포들에 처리한 후, 포마잔 크리스탈(formazan crystals)이 생성되면, 이를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해한 후, 마이크로플레이트 분석기(microplate reader; Varioskan; Thermo Electron, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570nm에서 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 1B에 나타내었다.

- [0039] 도 1B를 참고하면, MCF-7 암세포는 5 μ M의 아드리아마이신(adriamycin)이 처리될 때 세포 사멸이 50% 이상 진행되었으나, MCF-7/ADR 암세포는 아드리아마이신이 60 μ M의 농도로 처리되어도 45% 정도의 세포사멸만이 일어나는 것으로 확인되어, MCF-7/ADR 암세포는 MCF-7에 비해 아드리아마이신에 대한 강한 내성이 있는 암세포인 것으로 확인되었다.
- [0040] **실시예 2-4. MCF-7/ADR 암세포에 대한 몰루긴의 세포 사멸 효과 확인**
- [0041] 다음으로는 LDH 어세이(lactate dehydrogenase assay)를 통해 몰루긴에 대한 MCF-7/ADR 암세포의 사멸률을 확인하였다.
- [0042] LDH 어세이를 통한 LDH 방출 확인은 lactate dehydrogenase release detection kit(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)(catalog # 11 644 793 001)를 이용하여 확인하였으며, 마이크로플레이트 분석기를 이용하여 490nm에서 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 2A에 나타내었다.
- [0043] 도 2A를 참고하면, 몰루긴(molugin)을 처리한 MCF-7/ADR 암세포에서 10 μ M 이하의 몰루긴이 세포 사멸에 거의 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0044] **실시예 2-5. MCF-7/ADR 암세포에 대한 몰루긴의 아드리아마이신 내성 억제 효과 확인**
- [0045] MCF-7 암세포 및 아드리아마이신에 대한 내성을 나타내었던 MCF-7/ADR 암세포에 몰루긴(10 μ M: 세포사멸 효과가 거의 없었던 농도)을 24시간 동안 전처리(pretreated)하고, 아드리아마이신(10~60 μ M)을 첨가하여 24시간 더 반응시킨 후의 세포 사멸률을 MTT 어세이와 LDH 방출 실험을 이용하여 확인하였다. 각 실험조건은 실시예 2-3의 MTT 어세이 방법 및 실시예 2-4의 LDH 어세이 방법을 이용하여 확인하였으며, 마이크로플레이트 분석기를 이용하여 490nm에서 확인하였다. 이에 대한 결과는 도 2B 및 2D(MTT 어세이 결과)와 도 2C 및 2E(LDH 방출 확인 결과)에 나타내었다.
- [0046] 도 2B를 참고하면, MTT 어세이를 통해 MCF-7/ADR 암세포에서 아드리아마이신만 처리한 대조군(Control)에서는 고농도의 아드리아마이신(adriamycin)을 처리해도 세포사멸 효과가 높지 않았으나, 아드리아마이신을 처리하기 전에 10 μ M 몰루긴을 전처리한 세포군(10 μ M molugin)에서는, 세포 사멸 효과가 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 효과는 도 2C의 LDH 방출 확인 결과에서도 동일하게 나타났다.
- [0047] 그러나, MCF-7에서는 아드리아마이신만 단일 처리한 대조군(Control)과, 아드리아마이신을 처리하기 전에 10 μ M 몰루긴을 전처리한 세포군(10 μ M molugin)에서의 세포 사멸 효과가 MTT 어세이(도 2D)나 LDH 어세이(도 2E)에서 거의 변화가 없는 것으로 확인되었다.
- [0048] 따라서, 상기 결과들을 통해 10 μ M 몰루긴 자체로는 세포독성이 거의 없었으나, 약물 내성이 있는 암세포들에서의 항암제에 대한 민감성을 높여주어, 몰루긴이 상기 암세포들의 사멸 효과를 증강시켰음을 알 수 있다.
- [0049] **실시예 3. 몰루긴의 MDR1 발현 억제 효과**
- [0050] **실시예 3-1. MDR1 mRNA 발현 확인**
- [0051] MDR1 mRNA의 발현량을 리얼타임 PCR(Quantitative Real-Time RT-PCR)을 이용하여 확인하였다. 이를 위해 MCF-7/ADR 암세포에 몰루긴을 2~10 μ M의 농도로 48시간 동안 처리하거나 10 μ M의 농도로 12~48시간 동안 처리하고, RNAiso plus Reagent(Takara, Tokyo, Japan)를 이용하여 총 RNA를 추출하였으며, Reverse transcription kit(Promega)(catalog # M5101)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 후 reporter dye(SYBR)를 이용하여 FAS에 대한 mRNA의 발현량을 비교 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 3A에 나타내었다. 각 유전자의 정량은 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)인 β -actin에 대한 양으로 평준화하여 확인하였으며, 이 때, 사용된 프라이머(primer)의 조건은 하기와 같다.
- [0052] MDR1 forward, 5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAAAATT-3';
- [0053] MDR1 reverse, 5'-CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGAC-3';
- [0054] β -actin forward, 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3';
- [0055] β -actin reverse, 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3';
- [0056] 도 3A를 참고하면 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin) 처리 농도(왼쪽) 또는 시간별(오른쪽)로 MDR1 mRNA 발현이 감소하는 것으로 확인된다.

- [0057] 실시예 3-2. MDR1 단백질 발현 억제 효과
- [0058] MCF-7/ADR 세포에서의 몰루긴 처리에 따른 MDR1 단백질 발현량을 실시예 2-2에 개시된 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 3B에 나타내었다. 이 때 몰루긴은 2~10 μ M의 농도로 24시간 동안 처리하거나 10 μ M의 농도로 12~48시간 동안 처리하였다.
- [0059] 도 3B를 확인하면, 몰루긴(molugin)이 MCF-7/ADR 암세포에서 MDR1의 단백질 발현을 농도(왼쪽) 또는 시간(오른쪽) 의존적으로 억제하고 있는 것으로 확인된다.
- [0060] 실시예 3-3. MDR1 프로모터 활성 확인
- [0061] 다음으로는 MDR1의 프로모터 활성을 luciferase assay system(Promega) 키트를 이용한 루시퍼레이즈 어세이를 통해 확인하였다. 이를 위해, MCF-7/ADR 암세포에 1 μ g의 MDR1 promoter-luciferase, 0.2 μ g의 pCMV- β -galactosidase를 Lipofectamine™ 2000을 이용하여 트랜스펙션하였다. 5시간 후에 세포 배양액을 FBS가 없는 배지로 교체해주고 몰루긴(1~10 μ M)을 48시간 동안 처리하였다. 이 후 상기 세포들을 용해 후 14,240 μ g에서 10분 동안 원심분리 후, 상등액(supernatants)의 루시퍼레이즈(luciferase) 및 β -갈락토시데이즈(β -galactosidase) 활성을 측정하였다. β -갈락토시데이즈 어세이(β -galactosidase assay)는 250 μ l의 어세이 버퍼(0.12M Na₂HPO₄, 0.08M NaH₂PO₄, 0.02M KCl, 0.002M MgCl₂, 0.1M β -mercaptoethanol, 50 μ g *o*-nitrophenyl- β -galactoside)를 이용하여 확인하였다. 루시퍼레이즈 활성은 β -갈락토시데이즈의 활성으로 평준화하여 나타내었다. 상기 루시퍼레이즈 어세이 결과는 도 3C에 나타내었는데, 도 3C를 참고하면, MCF-7/ADR 암세포에서의 MDR1의 프로모터 활성이 몰루긴(molugin)에 농도의존적으로 감소하고 있는 것으로 확인되었다.
- [0062] 따라서, 실시예 3 및 도 3의 전체적인 결과를 통해, 몰루긴이 MCF-7/ADR 암세포에서 항암제 내성 관련 유전자인 MDR1의 발현을 직접적으로 억제함으로써, 항암제 내성이 있는 암세포를 사멸하는 효과가 있는 것을 알 수 있다.
- [0063] <실시예 4. AKT의 활성 억제 및 AMPK 활성 증가 효과 확인>
- [0064] 실시예 4-1. AKT와 AMPK의 인산화 확인
- [0065] 실시예 2-2에 개시된 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 1~10 μ M의 몰루긴이 48시간 동안 또는 10 μ M의 몰루긴이 15~90분 동안 처리된 MCF-7/ADR 암세포에서의 AKT와 AMPK의 인산화 활성 여부를 확인하고, 이에 관한 결과는 도 4A에 나타내었다.
- [0066] 도 4A를 참고하면 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin)에 시간(왼쪽) 또는 농도(오른쪽) 의존적으로 AKT의 인산화는 억제되고 AMPK의 인산화는 증가하는 것이 확인된다. 또한, 상기 결과를 통해 몰루긴이 활성화시킨 AMPK가 AKT의 활성을 억제하고 있는 것을 알 수 있다.
- [0067] 실시예 4-2. AMPK와 MCR1의 관계 확인
- [0068] 실시예 3-3에 개시된 방법을 이용하여 1~10 μ M의 몰루긴과 AMPK 저해제인 컴파운드 C가 48시간 동안 처리된 MCF-7/ADR 암세포에서의 MCR1의 프로모터 활성을 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 4B에 나타내었다.
- [0069] 도 4B를 참고하면 MCF-7/ADR 암세포에서 몰루긴(molugin) 처리로 인해 감소되어 있는 MDR1의 프로모터 활성이 AMPK 저해제인 컴파운드 C(Compound C)의 처리로 인해 다시 증가되는 것으로 확인되어, 몰루긴이 AMPK의 활성을 통해 MDR1의 발현을 저해함으로써, 항암제 내성이 있는 암세포를 사멸하는 효과가 있음을 알 수 있다.
- [0070] <실시예 5. 독성실험>
- [0071] 실시예 5-1. 급성독성
- [0072] 몰루긴을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v) 만을 투여하고, 실험군은 몰루긴을 2g/kg/day 농도로 상기 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 몰루긴을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.
- [0073] 실시예 5-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험
- [0074] 장기 독성 실험은 몰루긴을 각 농도(최고 농도 2g/kg/day)로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여

하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 몰루긴을 투여한 실험군과 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0075] <제제예 1 : 약학적 제제>

[0076] 1-1. 정제의 제조

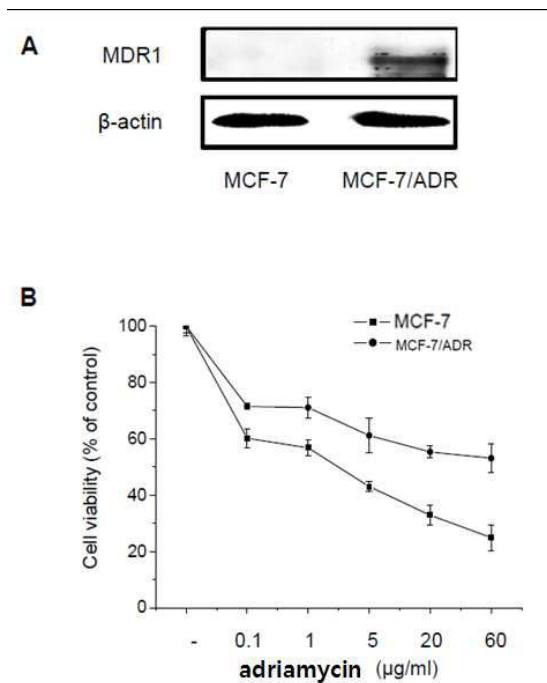
[0077] 몰루긴 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0078] 1-2. 주사액제의 제조

[0079] 몰루긴 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100mL를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

도면

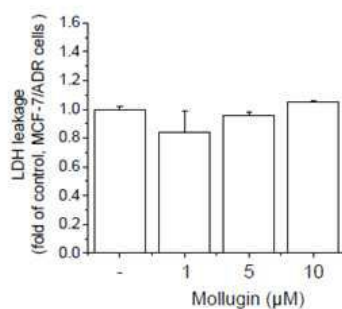
도면1



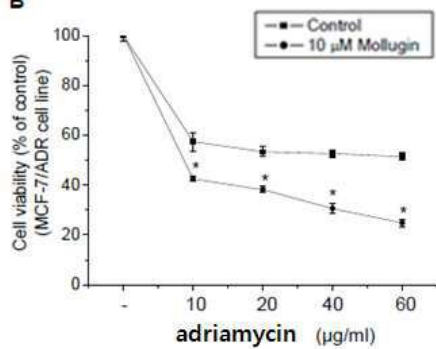
도면2

MCF-7/ADR

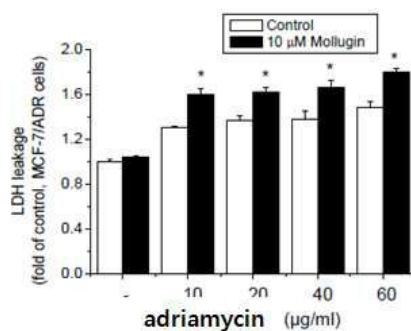
A



B

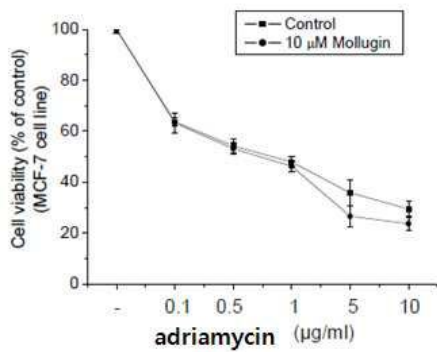


C

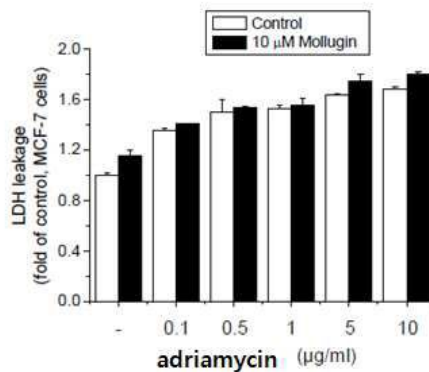


MCF-7

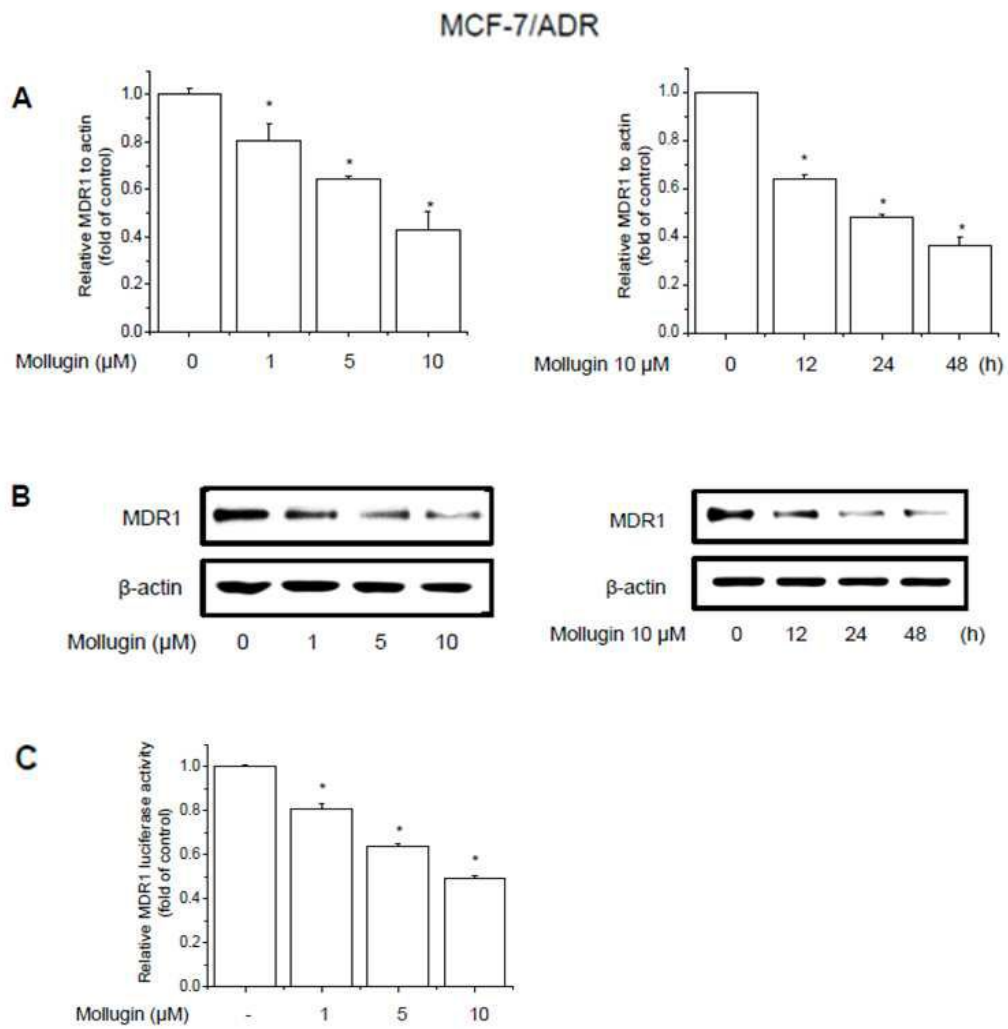
D



E



도면3



도면4

