(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0031203
(43) 공개일자 2012년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0018831(분할)
(22) 출원일자 2012년02월24일
심사청구일자 2012년02월24일
(62) 원출원 특허 10-2010-0072817
원출원일자 2010년07월28일
심사청구일자 2010년07월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김동현
서울특별시 성북구 성북동 15-53
한명주
서울특별시 성북구 성북동 15-53
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

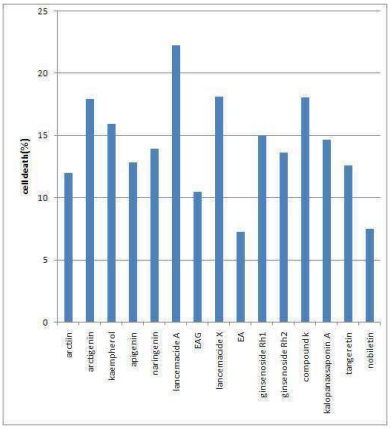
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **암 또는 사람면역결핍바이러스(ＨＩＶ)의 치료 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 란세마사이드 A, 란세마사이드 X, 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드, 이카이노시스트산, 컴파운드 K, 악티게닌, 악티인, 나린게닌, 진세노사이드 Rh1, 진세노사이드 Rh2, 칼로파낙스사포닌 A, 텡거레틴, 노빌레틴, 아피게닌, 캄페롤, 더덕 추출물, 해동피 추출물, 인삼 추출물, 인삼 발효물, 우방자 추출물, 및/또는 우방자 발효물을 유효성분으로 함유하는 HIV 감염증, AIDS, HIV성 치매, 및/또는 HIV성 신경세포 손상의 치료(개선) 또는 예방용 조성물, 란세마사이드 A, 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드, 이카이노시스트산, 악티인, 칼로파낙스사포닌 A, 더덕 추출물, 해동피 추출물, 및/또는 우방자 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 치료(개선) 또는 예방용 조성물, 란세마사이드 A, 컴파운드 K, 더덕 추출물, 및/또는 인삼 발효물을 유효성분으로 함유하는 AKT 활성화 억제제, 악티게닌 및/또는 우방자 발효물을 유효성분으로 함유하는 PI3K 억제제, 란세마사이드 A, 컴파운드 K, 악티게닌, 더덕 추출물, 인삼 발효물 및/또는 우방자 발효물을 유효성분으로 함유하는 GSK3베타 활성화제를 제공한다. 본 발명의 조성물, 억제제 및/또는 활성화제 중 유효성분은 암, HIV 감염증, AIDS, HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 등의 치료 및/또는 예방, AKT 활성화 억제, PI3K 억제 및/또는 GSK3베타 활성화에 효과적이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

조은하

인천광역시 남구 도화동 545-2 버드나무아파트 1402호

김유리

서울특별시 성동구 행당동 4-21번지 302호

특허청구의 범위

청구항 1

텡거레틴(tangeretin), 노빌레틴(nobiletin), 아피게닌(apigenin) 또는 캄페롤(kaempherol) 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사람면역결핍바이러스 감염증은 체내에 잠복 감염된 사람면역결핍바이러스 잠복 감염증인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 사람면역결핍바이러스 감염증은 대식세포 또는 마이크로글리아세포 중에서 선택된 하나 이상의 세포 감염증인 조성물.

청구항 4

텡거레틴(tangeretin), 노빌레틴(nobiletin), 아피게닌(apigenin) 또는 캄페롤(kaempherol) 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 사람면역결핍바이러스(HIV)감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 사람면역결핍바이러스 감염증은 체내에 잠복 감염된 잠복 감염증인 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 사람면역결핍바이러스 감염증은 대식세포 또는 마이크로글리아세포 중에서 선택된 하나 이상의 세포 감염증인 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암 또는 사람면역결핍바이러스의 치료(개선) 또는 예방용 조성물, PI3K 억제제, AKT 활성화 억제제 및 GS3K베터 활성화제에 관한 것으로, 상세하게는 암 또는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료(개선) 또는 예방에 효과적인 약학조성물, 식품조성물, PI3K 억제제, AKT 활성화 억제제 및 GS3K베타 활성화제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암의 성장에 필수적인 신호전달 경로인 PI3K는 유방암 등 다양한 암에 필수적이다. PI3K는 phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate(PIP2)를 활성 신호전달 중간체인 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate(PIP3)로 변환시키는 효소이다.

[0003] PIP3는 pyruvate dehydrogenase kinase 1(PDK1)을 활성화시키고 이어서 AKT를 활성화시킨다. PI3K는 p110과 p85로 구성되어있으며, PTEN은 PIP3를 탈인산화시켜 PI3K 신호전달 경로를 저해하는 PI3K의 음성 조절자이다.

[0004] PI3K에 의해 활성화된 AKT는 모든 암과 백혈병의 발병에 관여하는 마스터 스위치(master switch)로 일단 AKT 신호 스위치가 켜지면 이를 막지 못해 암 성장을 자극하는 결과를 빚게 되며. 만일 우리가 AKT 효소를 억제할 수 있다면 모든 암과 백혈병은 멈추게 된다.

[0005] 따라서, 암 치료 또는 예방을 위해 AKT 억제제의 개발이 필요하다.

[0006] 한편, 사람면역결핍바이러스(HIV-1 바이러스)는 에이즈를 일으키는 원인으로 1980년대에 처음으로 분리된 후 지

속적으로 퍼져나가고 있다.

[0007] HIV-1은 $CD4^+$ 림파구에 감염하면 세포의 자기사멸을 유도하고, 면역기전 저하을 일으키나, HIV-1의 좋은 은신처는 되지 못한다. HIV-1의 대표적인 은신처는 마크로파지와 마이크로글리아 세포 등이며, HIV-1 바이러스의 TAT 단백질은 감염된 세포(마크로파지, 마이크로글리아 세포 등)를 죽지 않고 계속 증식할 수 있도록 AKT를 활성화 시킨다. AKT의 활성화는 대식세포(macrophage)/마이크로글리아(microglia)와 같은 세포의 GSK3β의 활성화를 억제함으로써, 당분해(aeobic glycolysis)로 전환시키는 작용을 촉진하며, 이것은 HIV-1 감염세포의 사멸을 막아 독성물질의 생산을 증가시키게 되어, 신경세포 손상 등을 일으켜 HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상 등을 일으킬 뿐만 아니라 HIV-1 latent cell로 활동하게 된다.

[0008] 따라서, HIV-1성 치매, HIV-1성 신경세포 손상을 예방하고, HIV-1/AIDS환자로부터 HIV-1를 완전히 제거하기 위해서는 체내에 잠복감염된 상태로 존재하는 HIV reservoir cell을 효과적으로 제거하는 치료법 개발이 시급하다.

[0009] 본 발명자들은 암, HIV 등의 치료 또는 예방, AKT 활성화 억제제, GSK3베타 활성화제, 및 PI3K 억제제의 개발을 위한 연구 결과 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 하나의 과제는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료(개선) 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 하나의 과제는 암 치료(개선) 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 AKT 활성화 억제제를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 PI3K 억제제를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 GSK3베타 활성화제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 란세마사이드 에이(lancemacide A)[3-O-β-D-glucuronopyranosyl-3β, 16α-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid 28-O-β-D-xylopyranosyl(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-Larabinopyranosyl ester], 란세마사이드 엑스(lancemacide X)[echinocystic acid 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl ester], 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드(echinocystic acid 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside; EAG), 이카이노시스트산(echinocystic acid; EA), 컴파운드 케이(compound K)[20-S-β-D-glucopuranosyl-protopanaxadiol], 악티게닌(arctigenin)[(3R,4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one], 악티인(arctiin)[(3R,4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[[3-methoxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]methyl]oxolan-2-one], 나린게닌(naringenin)[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one], 진세노사이드 Rh1(ginsenoside Rh1)[(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[[(3S,5R,6S,8R,9R,10R,12R,13R,14R,17S)-3,12-dihydroxy-17-[(2S)-2-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl]-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-6-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol], 진세노사이드 Rh2(ginsenoside Rh2)[2-[[(3S,8R,9R,10R,12R,14R,17S)-12-hydroxy-17-[(2S)-2-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl]-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol], 칼로파낙스사포닌 A(kalopanaxsaponin A)[3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl(1→2)-alpha-L-arabinopyranosyl-Hederagenin], 텡거레틴(tangeretin)[5,6,7,8-tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one], 노빌레틴(nobiletin)[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxychromen-4-one], 아피게닌(apigenin)[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one], 캄페롤(kaempherol)[3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one], 더덕 추출물, 해동피(海桐皮) 추출물, 인삼 추출물, 인삼 발효물, 우방자(牛蒡子) 추출물 또는 우방자 발효물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상

중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 면역결핍바이러스는 HIV-1일 수 있다.

[0017] 상기 사람면역결핍바이러스 감염증은 체내에 잠복 감염된 사람면역결핍바이러스 잠복 감염증일 수 있다.

[0018] 상기 사람면역결핍바이러스 감염증은 대식세포(macrophage) 또는 마이크로글리아(microglia) 세포 중에서 선택된 하나 이상의 세포 감염증일 수 있다.

[0019] 상기 후천성면역결핍증(AIDS)은 HIV 감염에 의한 것일 수 있다.

[0020] 상기 HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상은 체내에 잠복 감염된 사람면역결핍바이러스에 의한 신경세포 손상 및/또는 그로 인한 치매 등을 포함하는 의미이다.

[0021] 또한, 본 발명은 란세마사이드 에이(lancemacide A)[3-O-β-D-glucuronopyranosyl-3β, 16α-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid 28-O-β-D-xylopyranosyl(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-Larabinopyranosyl ester], 란세마사이드 엑스(lancemacide X)[echinocystic acid 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl ester], 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드(echinocystic acid 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside; EAG), 이카이노시스트산(echinocystic acid), 컴파운드 케이(compound K)[20-S-β-D-glucopuranosyl-protopanaxadiol], 악티게닌(arctigenin)[(3R,4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one], 악티인(arctiin)[(3R,4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[[3-methoxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]methyl]oxolan-2-one], 나린게닌(naringenin)[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one], 진세노사이드 Rh1(ginsenoside Rh1)[(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[[(3S,5R,6S,8R,9R,10R,12R,13R,14R,17S)-3,12-dihydroxy-17-[(2S)-2-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl]-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-6-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol], 진세노사이드 Rh2(ginsenoside Rh2)[2-[[(3S,8R,9R,10R,12R,14R,17S)-12-hydroxy-17-[(2S)-2-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl]-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol], 칼로파낙스사포닌 A(kalopanaxsaponin A)[3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl(1→2)-alpha-L-arabinopyranosyl-Hederagenin], 텡거레틴(tangeretin)[5,6,7,8-tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one], 노빌레틴(nobiletin)[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxychromen-4-one], 아피게닌(apigenin)[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one], 캄페롤(kaempherol)[3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one], 더덕 추출물, 해동피(海桐皮) 추출물, 인삼 추출물, 인삼 발효물, 우방자 추출물, 또는 우방자 발효물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 식품 조성물에 있어서, 본 발명의 약학 조성물에서 언급한 사항이 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0023] 또한, 본 발명은 란세마사이드 에이(lancemacide A), 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드(echinocystic acid 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside; EAG), 이카이노시스트산(echinocystic acid), 악티인(arctiin), 칼로파낙스사포닌 A(kalopanaxsaponin A), 더덕 추출물, 해동피 추출물, 또는 우방자 추출물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 암은 바람직하게는 폐암, 유방암, 위암 또는 대장암 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 란세마사이드 에이(lancemacide A), 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드(echinocystic acid 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside; EAG), 이카이노시스트산(echinocystic acid), 악티인(arctiin), 칼로파낙스사포닌 A(kalopanaxsaponin A), 더덕 추출물, 해동피 추출물, 또는 우방자 추출물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 식품 조성물에 있어서, 본 발명의 약학 조성물에서 언급한 사항이 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0027] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 치료(개선) 또는 예방은 PI3K(Phosphoinositide 3-Kinase) 억제, AKT 활성화 억제 또는 GSK3베타(Glycogen synthase kinase 3 beta) 활성화 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것일 수 있다.

상기 PI3K는 phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate(PIP2)를 활성 신호전달 중간체인 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate(PIP3)로 변환시키는 효소로, PI3K 억제는 PI3K의 효소활성 억제를 포함하는 의미이다. PI3K의 작용 억제에 의해 PIP2의 활성화(PIP3로의 변환)를 억제하고, 그 결과 pyruvate dehydrogenase kinase 1(PDK1)의 활성화를 억제할 수 있다. 또한, 상기 PI3K 억제는 그로 인한 PIP2 활성화 억제 및/또는 PDK1 활성화를 억제할 수 있음을 포함하는 의미이다. 상기 AKT 활성화 억제는 AKT의 인산화를 억제하는 것에 의할 수 있다. 상기 GSK3베타 활성화는 인산화를 억제하여 활성화 상태인 기저상태로 되돌리는 거나 유지하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 추출물은 용매추출물일 수 있으며, 상기 용매는 물, 및/또는 탄소수 1~4의 알코올 등일 수 있다. 또한, 발효물은 인삼 등의 천연물을 발효 후 추출한 것 또는 추출물을 발효한 것일 수 있으며, 상기 발효는 유산균 발효일 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 란세마사이드 에이(lancemacide A), 컴파운드 케이(compound K), 더덕 추출물, 또는 인삼 발효물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 AKT 활성화 억제제를 제공한다.

[0030] 상기 AKT 활성화 억제제는 AKT 활성화 억제에 의해 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상, 후천성면역결핍증(AIDS) 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방이 가능하다.

[0031] 또한, 본 발명은 악티게닌 또는 우방자 발효물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 PI3K(Phosphoinositide 3-Kinase) 억제제를 제공한다. 상기 억제제는 PI3K 억제에 의해 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상, 후천성면역결핍증(AIDS) 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방이 가능하다.

[0032] 또한, 본 발명은 란세마사이드 에이(lancemacide A), 컴파운드 케이(compound K), 악티게닌(arctigenin), 더덕 추출물, 인삼 발효물 또는 우방자 발효물 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 GSK3베타(Glycogen synthase kinase 3 beta) 활성화제를 제공한다. 상기 활성화제는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상, 후천성면역결핍증(AIDS) 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방이 가능하다.

[0033] 본 발명에 있어서, 식품조성물은 건강기능식품일 수 있으며, 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

[0034] 본 발명의 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분은 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 및/또는 HIV성 신경세포 손상의 치료, 개선 및/또는 예방하는 효과를 나타내고, 암 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분은 암 치료, 개선 및/또는 예방하는 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 AKT 활성화 억제제에 함유된 유효성분은 AKT 활성화 억제 효과, PI3K 억제제에 함유된 유효성분은 PI3K 억제 효과, GSK3베타 활성화제에 함유된 유효성분은 GSK3베타 활성화 효과를 나타낸다.

[0035] 따라서, 본 발명은 본 발명의 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분의 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 및/또는 HIV성 신경세포 손상의 치료, 개선 및/또는 예방 용도, 암 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분의 암 치료, 개선 및/또는 예방 용도, 본 발명의 AKT 활성화 억제제에 함유된 유효성분의 AKT 활성화 억제 용도, PI3K 억제제에 함유된 유효성분의 PI3K 억제 용도, GSK3베타 활성화제에 함유된 유효성분의 GSK3베타 활성화 용도를 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 본 발명의 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분을 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 및/또는 HIV성 신경세포 손상의 치료, 개선 및/또는 예방법, 암 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분을 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료, 개선 및/또는 예방법, 본 발명의 AKT 활성화 억제제에 함유된 유효성분을 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 AKT 활성화 억제법, PI3K 억제제에 함유된 유효성분을 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 PI3K 억제법, 및 GSK3베타 활성화제에 함유된 유효성분을 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 GSK3베타 활성화법을 제공한다.

[0037] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 조성물, 억제제, 및/또는 활성화제에 관한 내용은 본 발명의 용도, 방법에도

동일하게 적용된다.

[0038] 본 발명의 조성물, 억제제, 및/또는 활성화제 중 유효성분은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및 젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등일 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0039] 본 발명의 조성물, 활성화제, 억제제, 용도 및 방법에서는, 유효성분 기준으로 성인 기준 1일 1 mg ~ 1000 mg/kg의 용량으로 사용가능하다.

[0040] 상기 유효성분은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물, 활성화제, 억제제 중 유효성분은 총 중량에 대하여 0.1~100중량%로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 중에서 선택된 하나 이상의 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분은 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 및/또는 HIV성 신경세포 손상의 치료, 개선 및/또는 예방하는 효과를 나타내고, 암 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 함유된 유효성분은 암 치료, 개선 및/또는 예방하는 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 AKT 활성화 억제제에 함유된 유효성분은 AKT 활성화 억제 효과, PI3K 억제제에 함유된 유효성분은 PI3K 억제 효과, GSK3베타 활성화제에 함유된 유효성분은 GSK3베타 활성화 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 란세마사이드 에이, 란세마사이드 엑스, EAG, EA, 컴파운드 케이, 악티게닌, 악티인, 나린게닌, 진세노사이드 Rh1, 진세노사이드 Rh2, 칼로파낙스사포닌 A, 텡거레틴, 노빌레틴, 아피게닌, 캄페롤의 항-HIV 효과를 확인한 결과 그래프이다.

도 2는 란세마사이드 에이, 악티게닌, 컴파운드 케이의 항-HIV 효과를 형광현미경으로 관찰한 결과이다.

도 3은 란세마사이드 에이가 AKT 활성화 억제와 GSK3베타의 활성화에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블럿팅 결과이다.

도 4는 컴파운드 케이가 AKT 활성화 억제와 GSK3베타의 활성화에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블럿팅 결과이다.

도 5는 악티게닌의 PDK-1(pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1), AKT, GSK-3베타의 인산화반응에 미치는 영향을 확인한 웨스턴블럿팅 결과이다.

도 6은 악티게닌의 Phosphoinositide 3-Kinase 활성에 미치는 영향을 확인한 PIP3 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예나 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045] <제조예 1>

[0046] 유효성분을 하기의 방법으로 준비하였다.

[0047] 1-1. 란세마사이드 A, EAG, 란세마사이드 X, 이카이노시스트 산

[0048] 건조된 더덕(Codonopsis lanceolata Trautv) 뿌리(경동시장, 서울, 대한민국) 5kg을 MeOH로 3시간을 끓여서 환류추출기로 환류추출하고, 추출액을 회전감압농축기(선일아일라, Eyla KSB 201, 한국)로 감압 농축하여 439.24g의 추출물을 얻었다. 이를 물에 녹인 뒤 BuOH로 분획 추출하여 BuOH층만 분리하여 감압농축해서 211g의 추출물을 얻었다. 이를 실리카겔을 고정상으로 사용하여 dichloromethane과 MeOH의 기울기 용리 시스템의 이동상을 사용하여 14개의 분획(dichloromethane:MeOH = 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 30:70 각 1L 씩)으로 나누었고 이 중 13번째 분획을 MPLC(medium pressure liquid chromatography; Yamazen 540-SY-S2CSC, 일본)를 사용하여(이동상: 10% ACN in water to 70% ACN in water) 4ml/min의 속도로 4시간 동안 분리한 결과 80개의 분획을 얻었고 이들 중 37~42번 분획을 감압농축하여 620mg의 란세마사이드 A 를 얻어내었다. 란세마사이드 A 10mg을 물에 녹인 후 여기에 β-D-glucuronidase (sigma) 를 처리하여 섭씨 37도의 온탕에서 1시간 반응 후 부탄올로 분핵추출 한 뒤 농축하여 7mg의 echinocystic acid 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl ester(lancemaside X)를 얻어내었다.

[0049] 또한, 란세마사이드 A 50mg 을 10ml 3N NaOH 에 넣은 뒤 섭씨 70도의 뜨거운 물에 10분간 가열하여 얻은 염기분해물을 염산을 이용하여 중화시킨 뒤 부탄올로 분획 추출하고 농축하여 29mg의 echinocystic acid 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside(EAG)를 얻어내었다.

[0050] 또한, 란세마사이드 A 50mg 을 10ml 5N HCl 에 넣은 뒤 섭씨 100도의 끓는 물에 3시간 환류하며 가열하여 얻은 산 분해물을 탄산수소나트륨을 이용하여 중화시킨 뒤 클로르포름으로 분획 추출하고 농축하여 22 mg의 이카이노시스트 산(EA)을 얻어내었다. 위에서 분리한 compound들은 H1-NMR(Bruker, AVANCE digital 400), 13C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 동정하였다.

[0051] 1-2. ginsenoside Rh1, ginsenoside Rh2, 컴파운드 K

[0052] 건조된 인삼(Panax Ginseng C.A. Meyer, 경동시장, 서울, 대한민국)의 분말(0.5 kg)을 물에 잠기도록 약 1L의 물을 넣고 섭씨 100도 수욕상에서 2 시간 추출하고 동량의 물을 넣어 추출하여 인삼 추출물을 제조하였다. 상기 추출물에는 ginsenoside Rh1과 ginsenoside Rh2가 포함된 것을 NMR로 확인하였다.

[0053] 건조된 인삼(Panax Ginseng C.A. Meyer, 경동시장, 서울, 대한민국)의 분말(0.5 kg)을 물에 잠기도록 약 1L의 물을 넣고 멸균하여 여기에 각각 tryptic soy broth(1 L)에서 24시간 배양하고 집균한 Lactobacillus acidophilus(KCTC, 한국생명공학원, 한국), Leuconostoc mesenterodies(KCTC, 한국생명공학원, 한국), Bifidobacterium longum(KCTC, 한국생명공학원, 한국)을 이식하여 3~5일간 배양하였다. 이 배양액을 동결건조기(ELYLA사, 일본)로 동결건조하여 분말화하거나 50%주정(에탄올)으로 추출하여 인삼 발효 배양액 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0054] 또한, 인삼 배양액 50% 주정 추출물을 부탄올로 분획 추출하여 부탄올층만 분리하여 감압농축하여 추출물을 얻었다. 이를 실리카겔을 고정상으로 사용하여 dichloromethane과 MeOH의 기울기 용리 시스템의 이동상을 사용하여 6개의 분획(dichloromethane:MeOH = 100:0, 90:10, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 각 2 L 씩)으로 나누었고, 이 중 3번째 분획을 MPLC를 사용하여 이동상(10% acetonitrile in water to 90% acetonitrile in water) 4ml/min의 속도로 4시간동안 분리한 결과 80개의 분획을 얻었고 이들 중 35번분획에서 42번 분획까지, 55분획에서부터 61분획까지를 각각 감압 농축하여 ginsenoside Rh1, ginsenoside Rh2를 얻어내었다.

[0055] 이 중 4번째 분획을 MPLC를 사용하여 이동상(10% acetonitrile in water to 90% acetonitrile in water) 4ml/min의 속도로 4시간동안 분리한 결과 80개의 분획을 얻었고 이들 중 54~62번 분획을 감압 농축하여 compound K를 얻어내었다. 위에서 분리한 compound는 H1-NMR(Bruker, AVANCE digital 400), 13C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 동정하였다.

[0056] 1-3. 악티인, 악티게닌

[0057] 우방자(Arctium Lappa, 경동시장, 서울, 대한민국) 2kg을 Hexane에 하룻동안 담궈두어 기름을 제거하고 MeOH에 하룻동안 담궈놓은 상태로 추출하고, 추출액을 회전감압농축기(선일아일라, Eyla KSB 201, 한국)로 감압 농축하여 150g의 추출물을 얻었다. 이를 물 1L에 녹인 뒤 3L MeOH를 넣어준 뒤 이를 5mm 필터종이로 필터링 한 후 상등액만을 회전식 감압 농축기로 농축하여 80g의 추출물을 얻었다. 이를 실리카겔을 고정상으로 사용하여 클로르

포름과 MeOH이 30:1 로 혼합된 용매를 이용하여 8개의 분획(각 1 L 씩)으로 나누었고 이 중 5번째 분획을 다시 실리카겔을 고정상으로 사용하여 클로르포름과 MeOH이 20:1 로 혼합된 용매를 이용하여 5개의 분획으로 나누어 (각 1L 씩) 이 중 3번째 분획만을 감압 농축하여 100mg의 악티인(arctiin)을 얻어내었다. 얻어낸 악티인 50mg을 약 1L의 물을 넣고 멸균하여 여기에 각각 tryptic soy broth(1 L)에서 24시간 배양하고 집균한 Bifidobacterium K110(KCTC, 한국생명공학원, 한국), HJ-15(KCTC, 한국생명공학원, 한국)을 이식하여 3~5일간 배양한 후 이 용액을 원심분리기에서 7000rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 침전시키고 상등액만을 감압 농축하여 실리카겔을 고정상으로 사용하여 클로르포름과 MeOH이 30:1 로 혼합된 용매를 이용하여 4개의 분획으로 나누어 (각 1L 씩) 이 중 두 번째 분획을 감압 농축하여 20mg의 악티게닌(arctigenin)을 얻어내었다. 위에서 분리한 compound들은 H1-NMR(Bruker, AVANCE digital 400), 13C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 동정하였다.

[0058] 1-4. 나린게닌, 노빌레틴, 텡거레틴

[0059] 마른 진피(Aurantii Nobilis pericarpium, 경동시장, 서울, 대한민국) 500g을 핵산에 하룻동안 담가두어 기름 성분을 제거한 후 말리고 갈아서 가루로 만든 뒤 물 2L 넣고 섭씨 40도에서 5시간 추출한 뒤 추출액을 감압 농축하여 185g의 추출물을 얻었다. 이를 실리카겔을 고정상으로 사용하여 벤젠과 아세톤이 6:1 로 혼합된 용매를 이용하여 8개의 분획(각 1L 씩)으로 나누었고 이 중 2번째 분획을 농축하여 Tangeretin을, 3번째 분획을 농축하여 Nobiletin을 5번째 분획을 농축하여 Naringenin을 얻어내었다. 위에서 분리한 compound들은 H1-NMR(Bruker, AVANCE digital 400), 13C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 동정하였다.

[0060] 1-5. kalopanaxsaponin A의 제조

[0061] 건조된 엄나무(Kalopanax pictus NAKAI)의 껍질{해동피; 경동시장, 서울, 대한민국} 3kg을 MeOH로 3시간을 끓여서 환류추출하고, 추출액을 감압 농축하여 110g의 추출물을 얻었다. 이를 물에 녹인 뒤 BuOH로 분획 추출하여 BuOH층만 분리하여 감압농축해서 18g의 추출물을 얻었다. 이를 실리카겔을 고정상으로 사용하여 dichloromethane과 MeOH의 기울기 용리 시스템의 이동상을 사용하여 7개의 분획(디클로로메탄: 메탄올 = 10:1, 7:1, 5:1, 4:1 3:1, 2:1, 1:1, 각 300 ml 씩)으로 나누었고, 이 중 5번째 분획(2.8g)을 MPLC를 사용하여(이동상: 10% ACN in water to 90% ACN in water) 4ml/min의 속도로 4시간동안 분리한 결과 80개의 분획을 얻었고 이들 중 61~69번 분획을 감압 농축하여 kalopanaxsaponin A 69mg을 얻어내었다.

[0062] 위에서 분리한 성분은 H1-NMR(Bruker, AVANCE digital 400), 13C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 동정하였다.

[0063] 1-6. Kaempherol, apigenin

[0064] 해당 성분을 시그마사(미국)에서 구입하여 준비하였다.

[0065] <실시예 1> 항-HIV 효과 확인: HIV tat로 유도된 사람 microglia 세포 사멸율 측정 실험

[0066] 란세마사이드 에이, 란세마사이드 엑스, EAG, EA, 컴파운드 케이, 악티게닌, 악티인, 나린게닌, 진세노사이드 Rh1, 진세노사이드 Rh2, 칼로파낙스사포닌 A, 텡거레틴, 노빌레틴, 아피게닌, 및 캄페롤 각각이 HIV tat로 유도된 사람 microglia 세포인 CHME5 cell(HIV 바이러스의 tat 단백질 유전자를 삽입한 사람의 뇌 기원 microglia 세포)의 세포 사멸율을 측정함으로써 항-HIV 효과를 확인하고자 하였다.

[0067] pTat CHME5 세포(Professor Baek Kim, Department of Microbiology and Immunology, University of Rochester Medical Center, 뉴욕, 미국)를 10^5개/ml로 24well에 풀고, 24시간 후에 제조예 1.에서 제조 또는 준비한 유효성분 각각을 10 mM이 되도록 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹이고 물로 희석하여 처리한다. 유효성분의 최종농도는 10uM이 되게 처리하며, DMSO는 최종농도 0.1%가 되도록 하였다.

[0068] 30분 후에 LPS(Lipopolysaccharide) 와 cycloheximide를 각각 최종 농도가 50 μg/ml, 10 μg/ml이 되도록 처리하고, 24시간 후에 상등액은 별도로 보관하고, 바닥에 붙은 cell은 trypsin처리하여 상등액과 합한다. 13000rpm에서 3분 정도 원심분리하고 상등액은 버린다. 세포를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media) 배지 40ul로 현탁한다. 이 때 세포가 골고루 퍼질 수 있도록 피펫팅한다. 다시 trypan blue를 60ul 넣는다. 5분 후에 현미경으로 총 세포 중 trypan blue로 염색된 세포의 비율을 측정하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0069] 그 결과, 란세마사이드 에이는 세포사멸율 22.5%를 나타내었고, 란세마사이드 엑스는 18.2%, 이카이노시스트산 3-*O*-β-D-글루쿠로노피라노사이드(EAG)는 10.8%, 이카이노시스트산(EA)은 7.6%, 컴파운드 케이는 18.1%, 악티게

닌은 18.2%를, 악티인은 12.2%, 나린게닌은 13.8%, 진세노사이드 알에치 1은 15%, 진세노사이드 알에치 2은 13.6%, 칼로파낙스사포닌 A은 14.5%, 텡거레틴은 12.7%, 노빌레틴은 8.1%, 아피게닌은 12.7%, 캄페롤은 16%를 나타내었다.

[0070] 상기 결과로부터, 란세마사이드 에이 등은 항-HIV 작용을 나타내는 것을 알 수 있다. 즉, HIV-1 바이러스의 TAT 단백질은 감염된 세포(마크로파지, 글리아 등)를 죽지 않고 계속 증식할 수 있도록 AKT를 활성화시킨다. 이 활성화된 세포에 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌 등은 작용하여, HIV-1가 감염되어 잠복하면서 감염세포(마크로파지, 글리아 등)의 사멸을 막고 있는 AKT 활성화를 억제하여 잠복한 세포를 사멸시키며, 이 방법으로 HIV-1의 숙주세포를 제거하여 HIV-1이 증식할 곳을 제거하는 방법으로 HIV-1를 효과적으로 제거할 수 있음을 알 수 있다.

[0071] 그 결과, 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌 등이 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 등의 치료(개선) 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0072] 또한, 란세마사이드 에이를 함유하는 더덕 추출물, 칼로파낙스사포닌 에이를 함유하는 해동피 추출물, 컴파운드 케이를 함유하는 인삼 발효물, 진세노사이드 알에치 1 및/또는 진세노사이드 알에치 2를 함유하는 인삼 추출물, 악티인을 함유하는 우방자 추출물, 악티게닌을 함유하는 우방자 발효물 역시 상기 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

[0073] <실시예 2> 항-HIV 효과 확인: 형광현미경을 이용한 HIV tat로 유도된 사람 microglia 세포 사멸 확인 실험

[0074] 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌이 HIV tat로 유도된 사람 microglia 세포인 CHME5 cell(HIV 바이러스의 tat 단백질 유전자를 삽입한 사람의 뇌 기원 microglia 세포로, HIV 바이러스 감염에 의해 tat 단백질을 발현하게 되어 사멸하지 않게 된 상태의 HIV 잠복 감염된 마이크로글리아를 구현한 세포 모델임)의 사멸에 미치는 영향을 형광현미경으로 관찰하여 항-HIV 효과를 확인하고자 하였다.

[0075] pTat CHME5 세포를 10^5개/ml로 24well에 풀고, 24시간 후에 제조예 1.에서 준비한 유효성분인 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌을 10 mM이 되도록 DMSO에 녹이고 물로 희석하여 각각 처리한다. 유효성분의 최종농도는 10uM이 되게 처리하며, DMSO는 최종농도 0.1%가 되도록 하였다.

[0076] 30분 후에 LPS(Lipopolysaccharide) 와 cycloheximide를 각각 최종 농도가 50 μg/ml, 10 μg/ml 되도록 처리하고, 12시간 후에 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척하고, calcein을 1:8000, ethidium을 1:4000의 비율로 PBS에 희석하여 한 well당 200ul씩 처리한 후 40분간 반응시켰다. PBS로 다시 3회 세척한 후 형광현미경(Carl Zeiss)으로 관찰하였다. 또한, LPS 처리를 제외하고 동일하게 처리한 세포를 별도로 관찰하였고, 유효성분을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하여 관찰하였다.

[0077] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2는 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌의 항-HIV 효과를 형광현미경으로 관찰한 결과로, 빨간색이 세포이다.

[0078] 그 결과, 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌 각각을 처리한 경우 죽은 세포(빨간색으로 염색되는 세포)가 증가하는 것을 볼 수 있다. 즉, 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌이 효과적으로 TAT 처리에 의해 죽지 않던 세포의 사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있다.

[0079] 상기 결과로부터, 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌은 항-HIV 작용을 나타냄을 알 수 있다. 그 결과, 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌 이 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, 또는 HIV성 신경세포 손상 등의 치료(개선) 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0080] 또한, 란세마사이드 에이를 함유하는 더덕 추출물, 컴파운드 케이를 함유하는 인삼 발효물 및 악티게닌을 함유하는 우방자 발효물 역시 상기 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

[0081] <실시예 3> 항암 효과 확인

[0082] 세포{폐암세포주인 A549(한국세포주은행, 서울대학교), 유방암 세포주인 MCF-7(한국세포주은행, 서울대학교), 위암세포주인 KATO-III(한국세포주은행, 서울대학교)}를 96well에 1well당 $1X10^5$개씩 분주하여 24시간 CO_2 인큐베이터에서 배양한 뒤 LPS(200 ng/ml)를 함께 처리하고, 표 1에 기재된 성분을 0, 10, 20, 50, 100uM의 농도로 처리한 군과, LPS를 처리하지 않고 표 1에 기재된 성분을 0, 10, 20, 50, 100uM의 농도로 처리한 군으로 나누어 실험하였다. 상기 성분은 DMSO에 녹이고 물로 희석하여 각각 처리하였다. 각 군당 3개의 웰을 실험하였고, 약물

처리 후 24시간 배양 뒤, 배지를 걷어내고 세척한 뒤 크리스탈 바이올렛법으로 잔존한 세포의 양을 측정하였다. 그 결과로 부터 50% 세포 생장 농도(50% Cell growth concentration, uM)를 계산하였고, 그 결과를 하기 표에 나타내었다.

[0083] [표 1]

[0084]

	50% Cell growth concentration (μM)					
	LPS (+)			LPS (-)		
	A-549	MCF-7	KATO-III	A-549	MCF-7	KATO-III
arctiin	30.5	28.5	25.5	40.1	49.7	31.7
lancemaside A	14.5	21.3	10.4	21.9	33.2	17.4
EAG	18.5	23.5	15.5	27.1	28.7	28.5
EA	20.1	22.7	17.5	28.5	28.5	28.2
kalopanaxsaponin A	25.5	31.7	20.3	35.2	55.5	35.9

[0085] 상기 표에서 보는 바와 같이, 란세마사이드 A, EAG, EA, 악티인, kalopanaxsaponin A는 항암 효과를 나타냄을 알 수 있다. 암세포는 외부의 LPS와 같은 자극이 있으면 더욱 사멸하지 않고 PI3K/AKT survival signal pathway가 활성화되어 사멸하지 않게 되나, PI3K/AKT 저해제인 란세마사이드 A, EAG, EA, 악티인, kalopanaxsaponin A 처리하였을 때 암세포 사멸효과가 증대됨을 확인할 수 있다.

[0086] 또한, 란세마사이드 에이를 함유하는 더덕 추출물, 칼로파낙스사포닌 에이를 함유하는 해동피 추출물, 및 악티인을 함유하는 우방자 추출물 역시 상기 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

[0087] <실시예 4> AKT 활성화 억제 및/또는 GSK3베타 활성화 효과 확인

[0088] pTat CHME5 세포를 10^5개/ml로 24well에 풀고, 24시간 후에 제조예 1.에서 준비한 유효성분인 란세마사이드 에이, 컴파운드 케이, 악티게닌을 10 mM이 되도록 DMSO에 녹이고 물로 희석하여 각각 처리한다. 유효성분의 최종농도는 5, 10, 20uM이 되게 처리하며, DMSO는 최종농도 0.1%가 되도록 하였다. 30분 후에 LPS처리하고, cells을 RIPA buffer(+PI)로 20분간 vortexing하면서 lysis 시킨다. 2000rpm에서 3분간 centrifuge한다. 상등액을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 한다 (sample, 50ug). 전기영동한 것을 니트로셀룰로스지에 100V, 400mA에서 1시간 10분간 transfer한다. 이 트렌스퍼된 니트로셀로로스지를 30분간 5% skim milk로 blocking 한 후 5분씩 3회 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100으로 overnight 반응시킨다. 10분씩 3회 세척한다. 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000으로 1시간 20분간 반응시킨다. 15분씩 3회 세척하고, 형광발색시켜 현상한다.

[0089] 유효성분과 LPS처리하지 않은 것을 제외하고, 동일하게 처리한 세포를 대조군으로 하였다.

[0090] 그 결과를 도 3~4에 나타내었다.

[0091] 도 3은 란세마사이드 에이가 AKT 활성화 억제와 GSK3베타의 활성화에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블럿팅 결과이고, 도 4는 컴파운드 케이가 AKT 활성화 억제와 GSK3베타의 활성화에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블럿팅 결과이다.

[0092] 도 3, 도 4에서 보는 바와 같이, 란세마사이드 에이 또는 컴파운드 케이는 AKT와 GSK3베타의 인산화를 농도의존적으로 억제함을 알 수 있다. AKT는 인산화되어 활성화되고, GSK3베타는 인산화에 의해 불활성화 되므로, 그 결과 란세마사이드 에이는 AKT의 활성을 억제하고, GSK3베타를 활성화시키는 작용을 나타냄을 알 수 있다. 그 결과 란세마사이드 에이 또는 컴파운드 케이는 항암작용과 항-HIV 작용을 나타내어, 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상, 암 등의 치료(개선) 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0093] 또한, 란세마사이드 에이를 함유하는 더덕 추출물, 컴파운드 케이를 함유하는 인삼 발효물 역시 상기 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

[0094] <실시예 5> Arctigenin의 PI3K 억제, AKT 활성화 억제 및/또는 GSK3베타 활성화 효과 확인

[0095] pTat CHME5 세포를 10^5개/ml로 24well에 풀고, 24시간 후에 제조예 1.에서 준비한 유효성분인 악티게닌을 10 mM이 되도록 DMSO에 녹이고 물로 희석하여 각각 처리한다. 유효성분의 최종농도는 5, 10, 20uM이 되게 처리하며,

DMSO는 최종농도 0.1%가 되도록 하였다. 30분 후에 LPS처리하고, cells을 RIPA buffer(+PI)로 20분간 vortexing하면서 lysis 시킨다. 2000rpm에서 3분간 centrifuge한다. 상등액을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 한다 (sample, 50ug). 전기영동한 것을 니트로셀룰로스지에 100V, 400mA에서 1시간 10분간 transfer한다. 이 트렌스퍼된 니트로셀로로스지를 30분간 5% skim milk로 blocking 한 후 5분씩 3회 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100으로 overnight 반응시킨다. 10분씩 3회 세척한다. 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000으로 1시간 20분간 반응시킨다. 15분씩 3회 세척하고, 형광발색시켜 현상한다.

[0096] 유효성분과 LPS처리하지 않은 것을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 처리한 세포를 대조군(CON)으로 하였다. 또한, 유효성분 처리하지 않은 것을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 처리한 세포를 음성대조군(LPS/CHX)으로 하였다.

[0097] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0098] 도 5는 악티게닌의 PDK-1(pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1), AKT, GSK-3베타의 인산화반응에 미치는 영향을 확인한 웨스턴블럿팅 결과이다.

[0099] 도 5에서 보는 바와 같이, 악티게닌은 PDK-1, AKT와 GSK3베타의 인산화를 농도의존적으로 억제함을 알 수 있다. AKT는 인산화되어 활성화되고, GSK3베타는 인산화에 의해 불활성화 되므로, 그 결과 악티게닌은 AKT의 활성을 억제하고, GSK3베타를 활성화시키는 작용을 나타냄을 알 수 있다. 그 결과 악티게닌은 항암작용과 항-HIV 작용을 나타내어, 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상, 암 등의 치료(개선) 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0100] 또한, PDK-1의 활성화는 PIP3에 의하고, PIP3는 PI3K에 의해 PIP2로부터 변환되므로, 악티게닌이 PI3K 억제와 관련될 수 있음을 알 수 있다.

[0101] 또한, 악티게닌을 함유하는 우방자 발효물 역시 상기 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

[0102] <실시예 6> Arctigenin의 PI3K 억제 효과 확인

[0103] pTat CHME5 세포를 10^5개/ml로 24well에 풀고, 24시간 후에 제조예 1.에서 준비한 유효성분인 악티게닌을 10 mM이 되도록 DMSO에 녹이고 물로 희석하여 각각 처리한다. 유효성분의 최종농도는 20uM이 되게 처리하며, DMSO는 최종농도 0.1%가 되도록 하였다. 30분 후에 시료에 LPS처리하고, Echelon #K-2400 Kit(Echelon 사, 미국)를 사용하여 제조사의 사용설명서에 따라 Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate(PI(3,4,5)P3)을 추출하고 측정하였다. 구체적으로, 차가운 0.5M TCA를 넣은 후 5분간 방치, 세포를 긁어낸 후 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액은 버리고, TCA에 1mM EDTA를 첨가한 완충액을 넣은 후 vortexing 하고, 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액은 버리고(2회반복), MeOH와 $CHCl_3$를 2:1의 비율로 섞은 완충액을 넣은 후 실온에서 10분간 방치하고(방치하는 동안 3번 vortexing), 1500rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액은 버리고(2회반복), MeOH, $CHCl_3$와 HCl을 80:40:1로 섞은 완충액을 넣은 후 15분간 방치하고 (방치하는동안 4번 vortexing), 1500rpm에서 5분간 원심분리, 상등액에서 $CHCl_3$를 상등액에 첨가한 후 0.1N HCl을 첨가. 1500rpm에서 5분간 원심분리한 후 유기용매층을 eppentube에 담아서 vacuum dry하고, PIP3를 측정한다. 즉, 건조물에 CHCl3, MeOH와 H2O를 1:2:0.8로 섞은 완충액을 첨가한 후 30초간 vortexing, 차가운 water bath에서 5분간 sonication, strip에 샘플을 한 번에 소량씩 찍어 5번정도 반복하고, PBS-T에 3% BSA를 첨가한 완충액에 strip을 넣은 후 1시간 동안 실온에서 천천히 shaking하고, detector를 PBS-T에 3% BSA를 첨가한 완충액에 넣고 1시간 동안 천천히 shaking하고, PBS-T로 washing하고, PBS-T에 3% BSA를 첨가한 완충액에 항체를 넣고 45분간 천천히 shaking하고, washing하고, PBS-T에 3% BSA를 첨가한 완충액에 항체를 넣고 45분간 천천히 shaking하고 washing하고 현상한다.

[0104] 유효성분과 LPS처리하지 않은 것을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 처리한 세포를 대조군(CON)으로 하였고, 유효성분 처리하지 않은 것을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 처리한 세포를 음성대조군(LPS/CHX)으로 하였으며, 유효성분 대신 PI3K의 강력한 저해제인 wortmanin을 처리한 것을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 처리한 세포를 양성대조군(L+W)으로 하였다.

[0105] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

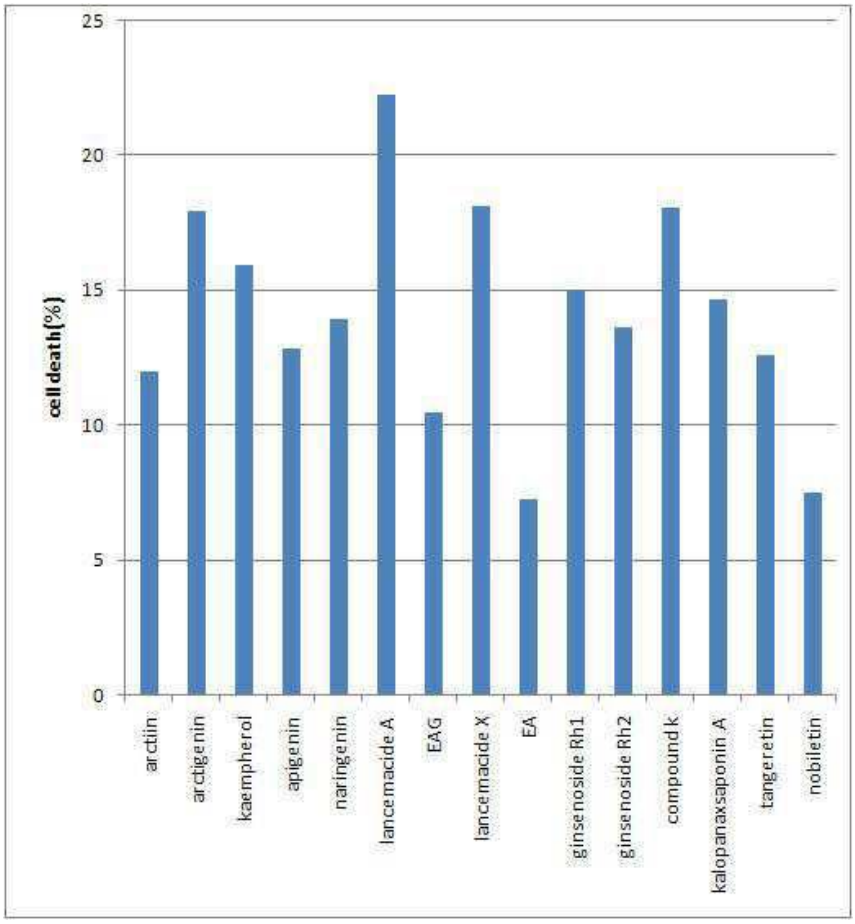
[0106] arctigenin 처리군이 현저하게 PIP3량이 처리전에 비해 낮아졌다. 이와 같은 결과는 PI3K의 강력한 억제제(inhibitor)인 wortmanin과도 비교할 수 있을 만큼 강한 저해효과를 나타내는 것이다. PIP3 양의 감소는 PIP2를

PIP3로 변환시키는 효소인 PI3K의 작용이 억제되었음을 의미한다. 따라서, 악티게닌은 PI3K의 작용 억제에 의해 PIP2가 PIP3로 변환되는 것을 억제하고, 그 결과 PDK1의 활성화를 억제시킴으로써, 항암작용과 항-HIV 작용을 나타내어, 사람면역결핍바이러스(HIV) 감염증, 후천성면역결핍증(AIDS), HIV성 치매, HIV성 신경세포 손상, 암 등의 치료(개선) 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

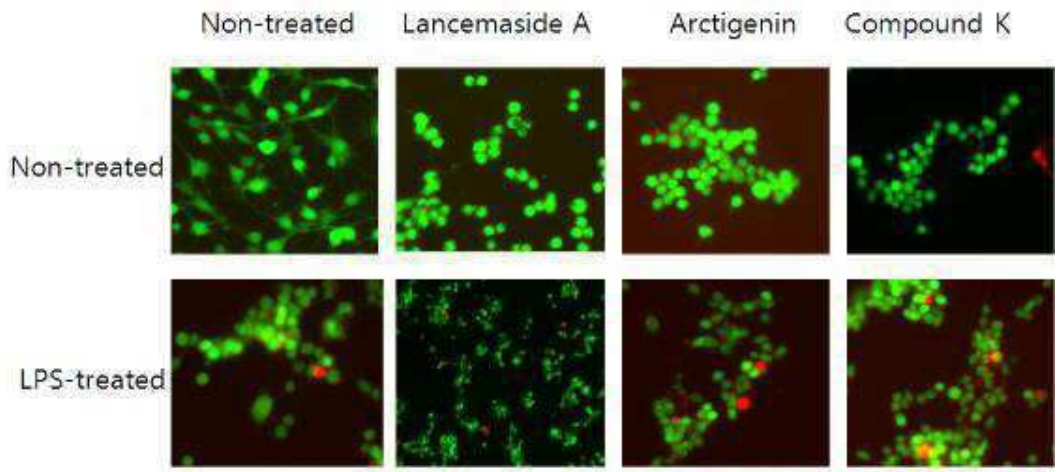
[0107] 또한, 악티게닌을 함유하는 우방자 발효물 역시 상기 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

도면

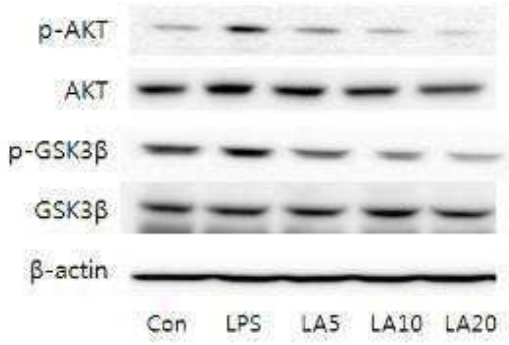
도면1



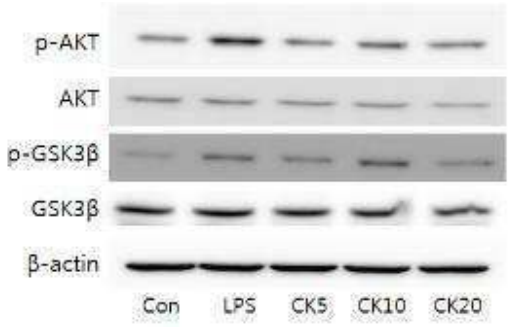
도면2


Non-treated
Lancemaside A
Arctigenin
Compound K
Non-treated
LPS-treated

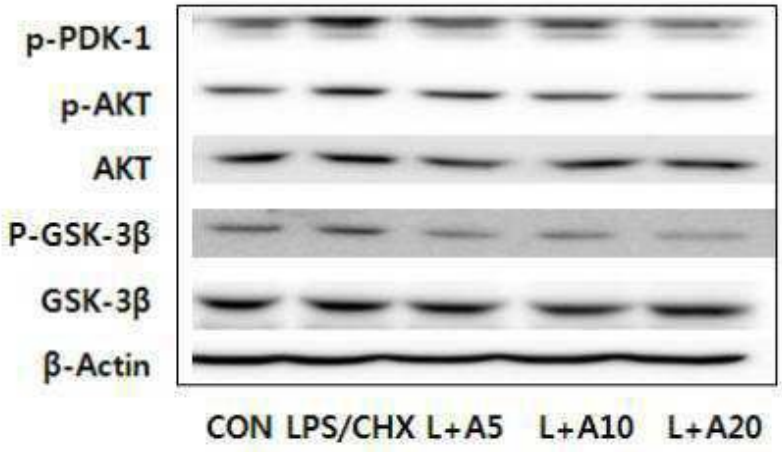
도면3


p-AKT
AKT
p-GSK3β
GSK3β
β-actin
Con
LPS
LA5
LA10
LA20

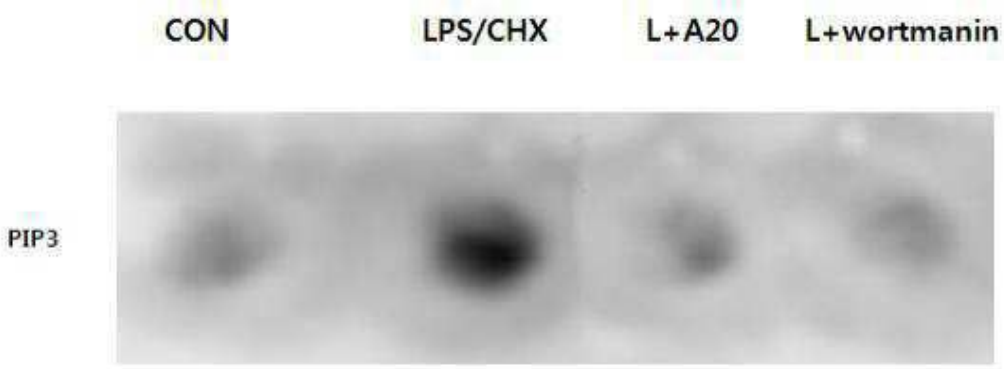
도면4


p-AKT
AKT
p-GSK3β
GSK3β
β-actin
Con
LPS
CK5
CK10
CK20

도면5


p-PDK-1
p-AKT
AKT
P-GSK-3β
GSK-3β
β-Actin
CON LPS/CHX L+A5 L+A10 L+A20

도면6


CON
LPS/CHX
L+A20
L+wortmanin
PIP3