



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월17일  
(11) 등록번호 10-1768370  
(24) 등록일자 2017년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/614 (2014.01) A23L 1/30 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 35/614 (2013.01)  
A23L 33/10 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2016-0045914  
(22) 출원일자 2016년04월15일  
심사청구일자 2016년04월15일  
(56) 선행기술조사문헌  
Fisheries Science, 79(3), 2013.5., pp.487-494  
Applied Microbiology and Biotechnology,  
89(1), 2011.1., pp.45-55  
Bioscience Biotechnology and Biochemistry,  
2006.10., pp.293-299

(73) 특허권자  
성균관대학교산학협력단  
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)  
부경대학교 산학협력단  
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)  
(72) 발명자  
김철호  
서울특별시 강남구 압구정로39길 58 1269번지 보성맨션 201동 407호  
하선형  
서울특별시 서초구 효령로77길 14 708호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이명진

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김강필

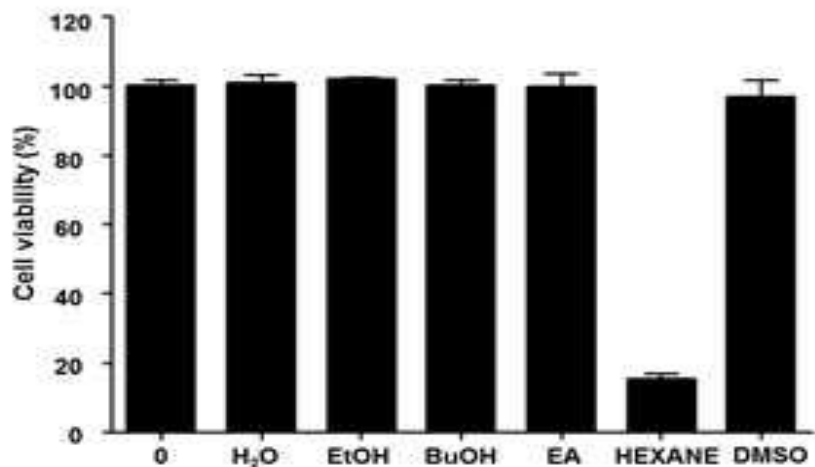
(54) 발명의 명칭 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 포함하는 백혈병 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 노무라 입깃 해파리 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 개선용 식품 조성물, 및 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 백혈병 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

본 발명의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 포함하는 조성물은 만성 골수성 백혈병 세포의 세포예정사 및 세포주기정지 효과를 나타내므로, 부작용은 적고 우수한 치료 활성을 나타내는 백혈병 치료제로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/2042 (2013.01)

(72) 발명자

**곽충환**

부산광역시 동래구 명장로 115-8

**박남규**

부산광역시 수영구 남천동로 46

**박준영**

울산광역시 중구 난곡6길 20

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

노무라 입깃 해파리(*Nemopilema nomurai*) 핵산 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 백혈병은 만성 골수성 백혈병인 것인, 약학 조성물

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백혈병의 예방 또는 치료는 세포 내 세포예정사 유도에 의해 달성되는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 세포예정사는 외인성 또는 내인성 세포예정사 경로를 통해 유도되는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 세포예정사는 MAPK 신호전달경로를 통해 유도되는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 MAPK 신호전달경로는 p38 경로인 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 백혈병의 예방 또는 치료는 세포주기정지에 의해 유도되는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포주기정지는 G0/G1기 억제에 의해 유도되는 것인, 약학 조성물.

#### 청구항 9

노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 개선용 식품 조성물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 백혈병은 만성 골수성 백혈병인 것인, 식품 조성물.

## 청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 백혈병이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 백혈병의 예방 또는 치료방법.

## 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 백혈병은 만성 골수성 백혈병인 것인, 백혈병의 예방 또는 치료방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 포함하는 백혈병 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 노무라 입깃 해파리 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 개선용 식품 조성물, 및 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 백혈병 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 해파리는 몸이 한천질로 되어 있어 헤엄치는 힘이 약하기 때문에 수면을 떠돌며 생활하고 해류와 같이 이동하므로 플랑크톤 무리에 넣고 있다. 대부분은 바다에서 살지만 예외적으로 바닷물과 민물이 섞이는 강어귀에 사는 종이 있고 담수호에 사는 종이 있다. 최근에는 해파리의 무분별한 증식으로 환경적 문제가 이슈화되고 있다. 특히, 우리나라 연근해에서 문제가 되고 있는 노무라 입깃 해파리는 성체의 길이가 2 m, 무게는 200 kg에 육박하며, 떼를 지어 다니는 특성 때문에 해파리가 발생한 어장에서는 조업시 어망을 파손시키거나 연근해 멸치, 전어 어장 등을 황폐화시켜 수산업의 피해가 기하급수적으로 늘어나고 있고, 여름철 해수욕객의 피해도 커지고 있어 국가적인 난문제로 대두되고 있다. 지금까지는 계절적, 산발적인 출현으로 그 심각성이 부각되지 않았지만, 최근 생태연구에 따르면 이 노무라 입깃 해파리가 2000년 이래로 발해만, 동중국해, 남해, 동해에 이르는 넓은 구역에서 대량으로 발생한 뒤 쿠로시오 난류를 타고 국내 연근해로 유입되고 있으며, 토착 생물로 서식한다는 점에서 많은 우려를 낳고 있다.

[0004] 지금까지 해파리에 관한 연구로, 세포독성(Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 150(1):85-90, 2009), 항균성(Biochem Biophys Res Commun., 348(2):514-23) 또는 산화 방지(Bioorg Med Chem Lett., 15(10):2659-64) 등의 효과가 있음이 알려져 있지만, 해파리를 이용한 백혈병 치료 연구에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다.

[0006] 만성골수성백혈병은 악성 골수 증식 질환으로 100,000명당 1 내지 2명 발병하고, 9번 염색체와 22번 염색체의 각각에서 일부분이 절단된 후 두 조각이 서로 위치를 바꾸어 이동하는 현상인 전위에 의해서 생기는 필라델피아 염색체(Philadelphia chromosome)의 bcr-abl 융합 유전자에 의해 발병된다. 이러한 BCR-ABL 융합 유전자는 비정상적인 타이로신 카이네이즈(Tyrosine kinase) 활성을 갖는 융합단백질을 발현시킴으로써 p210 단백질 생합성에 관여하며, 생합성된 p210 단백질은 골수구 전구세포의 세포예정사를 억제하여 결국 이들 세포의 비정상적인 증식으로 인한 골수증식성 질환을 초래한다.

[0007] 만성골수성백혈병 치료제로는 타이로신 카이네이즈 억제제인 이매티닙 메실레이트(imatinib mesylate, STI-571)가 잘 알려져 있지만 STI-571에 대한 내성문제로 STI-571에 대한 내성을 가진 만성골수성백혈병 환자들에게는 다른 치료법이 필요하다.

[0009] 세포예정사(apoptosis)는 세포괴사(necrosis)와 더불어 세포의 사멸을 일으키는 메커니즘을 말하는 것으로, 물리적 외상 또는 독성 화학물질 등에 의해 우발적으로 일어나는 괴사와 달리 유전자에 의해 결정된 세포의 자기 파괴(gene-directed cellular self-destruction) 또는 예정된 세포 사멸로 불리운다. 다세포 생물의 경우 끊임

없는 세포의 증식과 사멸간의 균형을 통해 세포 수의 항상성을 유지하는데, 정상적인 생리 상태에서 세포 사멸이 일어나는 기전이 바로 세포예정사이다.

[0010] 세포예정사에는 크게 두 가지 주요한 경로인 외인성 경로와 내인성 경로가 있다. 외인성 경로는 사멸 수용체와 연관되어 있고 내인성 경로는 미토콘드리아를 통해 일어난다. 대부분의 화학치료제는 암세포를 제거하는 세포예정사를 유도시키는 방법이며 이러한 화학요법은 만성골수성백혈병 환자들에게도 여전히 이용되고 있다. 하지만, 독성과 내성 때문에 만성골수성백혈병 환자들을 치료하는데 어려움을 겪고 있다. 이러한 이유로 화학치료제보다 부작용이 적은 천연물을 이용한 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 부작용을 최소화하면서, 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있는 백혈병 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 노무라 입깃 해파리 추출물이 만성골수성백혈병 세포 특이적으로 세포 생존율을 감소시키고, 만성골수성백혈병 세포에서 세포예정사의 외인성 및 내인성 경로, MAPK 신호전달경로 중 p38 경로를 통해 세포예정사 및 세포주기정지(cell cycle arrest)를 유도하여 세포사멸을 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 하나의 목적은 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 하나의 목적은 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 백혈병 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0018] 본 발명자들은 해양 천연물을 이용하여 부작용이 적고 우수한 치료효과를 가지는 백혈병 치료제를 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 다양한 용매를 이용한 노무라 입깃 해파리 추출물 중 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 백혈병에 특이적으로 치료활성을 나타냄을 확인하였다. 구체적으로, 상기 추출물은 만성골수성백혈병 세포인 K562 세포 특이적으로 세포생존율을 감소시키고, 세포예정사의 외인성 및 내인성 경로, p38 경로를 통한 세포예정사, 세포주기정지를 유도하여 세포의 사멸을 유도함을 확인하여 상기 추출물이 우수한 백혈병 치료제로 사용될 수 있음을 규명하였다. 종래의 해파리 독소를 이용한 연구는 다양한 의학 분야에 활용되고 있고 주로 열수를 이용하여 해파리 독소를 추출할 수 있음이 알려져 있지만, 본 발명의 노무라 입깃 해파리 추출물은 핵산으로 추출하여 해파리의 독소가 포함되지 않는 추출물이고, 이를 이용하여 백혈병 치료활성을 확인하였다는 점에서 본 발명이 가지는 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다. 또한, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 이용한 백혈병 치료제에 대해서는 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0020] 본 발명은 하나의 양태로서, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명에서 용어, "노무라 입깃 해파리(*Nemopilema nomurai*)"는 해파리강 근구해파리목의 강장동물로써, 현재까지는 중국의 동쪽 해안에서 발생하여 해류를 타고 우리나라와 일본의 해역으로 유입되는 것으로 생각되고 있다. 또한, 지구온난화로 인해 바닷물의 온도가 올라가면서 이 해파리들의 수가 급격히 늘어날 뿐만 아니라, 1년 중 발견시기가 점차 빨라지고 있는 것으로 보고 있다. 지금까지 노무라 입깃 해파리를 이용한 연구로는 상기에서 설명한 바와 같이, 세포독성, 항균성 또는 산화 방지 등이 알려져 있지만, 해파리를 이용한 백혈병 치료 연구에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다.

[0024] 본 발명의 용어 "추출물"은 노무라 입깃 해파리를 추출하여 수득한 추출물을 의미하여, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물, 정제물 또는 이의 분획물을 모두 포함한다.

[0025] 상기 노무라 입깃 해파리를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 용매 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다. 구체적으

로 용매 추출법일 수 있다.

- [0026] 본 발명에서 상기 노무라 입깃 해파리의 추출에 사용되는 추출용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출용매의 비제한적인 예로는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성 용매 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트 또는 헥산일 수 있고, 보다 구체적으로, 헥산일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 추출물은 헥산을 용매로 이용하여 제조하였다는 점에서 열수를 이용하여 해파리 독소를 추출한 종래의 해파리 독소를 이용한 연구와 구별된다.
- [0029] 기존 알려진 해파리 독소를 이용한 연구에서는 해파리 독소 추출시 모두 열수를 용매로 이용하여 추출하였음이 알려져 있다(J Venom Res., 2014, 5:22-32). 그러나, 해파리 독소의 헥산 추출에 대해서는 전혀 알려지지 않았고, 또한, 해파리 독소는 펩타이드성 물질이라는 점에서 열수로 추출할 경우에 독소가 포함되어 추출되지만, 헥산으로 추출할 경우에 독소가 포함되어 추출되지 않는 점에서 본 발명은 기존에 알려진 해파리 독소를 이용한 연구와 구별된다. 따라서, 본 발명자들은 노무라 입깃 해파리를 헥산으로 추출하여, 해파리의 독소가 포함되지 않은 추출물이 백혈병에 특이적으로 치료활성을 가짐을 처음으로 규명한 것이다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서는 노무라 입깃 해파리의 다양한 용매 추출물을 K562 세포에 처리하여 다양한 용매 중 헥산 특이적으로 세포생존율이 감소되고, 헥산 추출물의 농도에 따라 세포생존율이 감소됨을 확인하였다(도 1 및 도 2).
- [0032] 또한, 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물은 다른 고형압보다 백혈병에 특이적으로 치료활성을 나타낸다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 처리된 K562 세포에서 세포 생존율이 상기 추출물이 처리된 대장암 세포인 HCT116 및 간암 세포인 Huh-7 세포에서 세포 생존율과 비교하여 현저히 감소됨을 확인하였다(도 2의 A) 내지 C)).
- [0035] 본 발명에서, 용어 "백혈병"은 백혈병은 혈액 세포와 림프구를 생산하는 조혈모세포를 포함한 인체의 조혈계에서 발생하는 악성 혈액질환으로서, 백혈구가 성숙하는 조혈 과정에 장애가 생겨 발생한 미성숙 악성 백혈구가 골수에서 증식함으로써, 정상 적혈구, 백혈구, 혈소판의 생성이 방해되어 전체 골수 조혈모세포의 30% 이상을 악성 백혈구가 차지하는 질환의 일종이다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 백혈병은 만성 골수성 백혈병일 수 있다.
- [0037] 상기 만성 골수성 백혈병은 조혈모세포의 이상으로 모든 단계의 골수구계 세포가 증식하는 만성 골수증식성 질환으로, 백혈구의 증가, 비장 증대, 염색체 9번 장완과 22번 장완의 전좌를 특징으로 한다.
- [0039] 본 발명에서, 용어 "예방"은 상기 조성물의 투여로 백혈병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 상기 조성물의 투여로 백혈병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 백혈병의 예방 또는 치료는 세포 내 세포예정사 유도에 의해 달성되는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 용어 "세포예정사(apoptosis)"는 물리적 외상 또는 독성 화학물질 등에 의해 우발적으로 일어나는 괴사와 달리 유전자에 의해 결정된 세포의 자기 파괴(gene-directed cellular self-destruction) 또는 예정된 세포 사멸로 불리운다. 세포예정사의 특징으로 세포 수축, DNA 분절화, 염색질 응축, 세포사멸체(apoptotic bodies)등이 있다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에서는 K562 세포에서 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물에 의해서 나타나는 세포사멸체, 염색질 응축, 세포예정사로 나타나는 발현 증가를 확인하였다(도 3의 A) 및 B), 및 도 4의 A) 및 B)).
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 세포예정사는 외인성 또는 내인성 세포예정사 경로를 통해 유도되는 것일 수 있다.
- [0045] 상기 외인성 경로는 FasR(FAS(TNF receptor superfamily member 6) receptor), TNFR1(tumor necrosis factor receptor 1) 및 TNFRSF25(tumor necrosis factor receptor superfamily member 25), TNFRSF10A, TNFRSF10B와 같은 세포사멸 수용체에 의해 개시된 후 FADD(Fas-associated protein with death domain) 또는 TRADD(TNFRSF1A-associated via death domain adaptor)와 결합하여 세포예정사 신호를 세포 내로 전달한다. 전달된 신호는 DISC(death-inducing signaling complex)와 세포예정사 관련 시스템인 캐스파제인 caspase-

8/caspase-3 경로를 통해 세포예정사를 유도한다.

- [0046] 상기 내인성 경로는 DNA 손상, 사이토카인, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등의 자극에 의해 유발되며 이런 자극은 미토콘드리아 투과도 전이 미세공(mitochondrial permeability transition pore)를 열리게 함으로써 미토콘드리아막의 전위조절 능력을 파괴하면서 시토크롬 c(cytochrome c), Smac(second mitochondria-derived activator of caspases), HtrA2(high temperature requirement protein A2)와 같은 세포예정사 개시 단백질들을 세포질로 유출시킨다. 시토크롬 c는 APAF1(apoptotic protease activating factor 1) 및 caspase-9과 결합하여 아포토좀(apoptosome)을 형성한 후 caspase-3를 활성화시켜 세포예정사를 유도한다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에서는 다양한 농도의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 처리한 K562 세포에서 세포예정사 마커인 PARP 및 caspase-3, 외인성 세포예정사 마커인 caspase-8, 및 내인성 세포예정사 마커인 caspase-9의 절단형태 단백질의 발현, 대조군 대비 caspase-3의 절단형태 단백질 및 대조군 대비 PARP의 절단형태 단백질의 비율을 확인하여 상기 추출물이 세포예정사의 외인성 및 내인성 경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다(도 5의 A) 및 B)).
- [0048] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 다양한 농도의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 처리한 K562 세포에서 세포예정사 촉진 마커인 BAX 단백질의 발현, 항 세포예정사 마커인 BCL-2의 단백질 발현 및 BAX/BCL-2 단백질의 비율을 확인하여 상기 추출물이 세포예정사의 내인성 경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다(도 6의 A) 및 B)).
- [0049] 본 발명의 다른 일 실시예에서는 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 및 Z-VAD가 함께 처리된 K562 세포와 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물만 단독으로 처리된 K562 세포에서의 세포생존율 및 caspase-3의 절단형태 단백질의 발현을 비교하여 상기 추출물이 세포예정사의 외인성 및 내인성 경로에서 caspase 의존적으로 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다(도 7의 A) 및 B)).
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 세포예정사는 MAPK 신호전달경로를 통해 유도되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 MAPK 신호전달 경로는 p38 경로를 통해 유도되는 것일 수 있다.
- [0052] 상기 MAPK 신호전달경로는 ERK, p38, JNK 단백질 신호전달 경로로 나눌 수 있으며 각각의 신호전달 경로는 긴밀하게 연관되어 있다. 세포에 활성 산소종이나 UV 등의 물리·화학적 스트레스가 오면 가장 상부에 있는 Raf나 ASK1과 같은 단백질인산화효소가 활성화되어 다음 단계의 인산화효소를 활성화 시킨다. 일련의 연속적인 세포질 내 단백질인산화효소의 활성화가 일어나면 활성화된 단백질이 핵 내부로 이동하여 타겟 단백질의 유전자 발현을 증가시킨다. 그 결과로 세포의 증식, 생존, 분화, 사멸 등의 세포생리가 조절된다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에서는 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 처리시간 또는 농도에 따라 다르게 처리된 K562 세포에서 MAPK 신호전달 경로 중 ERK1/2 단백질, JNK 단백질, p38 단백질의 인산화된 단백질의 발현, 및 상기 단백질 대비 상기 단백질의 인산화된 단백질의 비율을 확인하여, 상기 추출물이 MAPK 신호전달경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다(도 8의 A) 내지 D)).
- [0054] 본 발명의 다른 일 실시예에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 및 p38 저해제 SB203580이 함께 처리된 세포와 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물만 단독으로 처리된 K562 세포에서 세포생존율, p38의 인산화된 단백질, caspase-3의 절단형태 단백질 발현을 비교하여 상기 추출물이 MAPK 신호전달 경로 중 p38 경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다(도 9의 A) 및 B)).
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 백혈병의 예방 또는 치료는 세포 내 세포주기정지에 의해 유도되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 세포주기정지는 G0/G1기 억제에 의해 유도되는 것일 수 있다.
- [0057] 상기 세포주기는 세포가 세포 내 물질들을 기존의 것보다 두 배 증가시킨 후, 두 개로 나뉘는 일련의 과정을 통해서 기존의 세포와 같은 세포를 계속해서 생산하는 과정을 의미하는 것으로, M기, G1기, S기 및 G2기로 구성되어 있다. 이러한 세포 주기 조절을 위해서는 많은 인자들이 필요하며, 그 중에 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 것이 사이클린 의존성 단백질(Cyclin-dependent protein kinase, CDK)이다. CDK는 세포 주기의 각 단계마다 특이적으로 발현되는 사이클린(Cyclin) 이라는 조절 단백질과 결합함으로써 기능적 단위체를 형성하게 되며, 이것에 의해 세포 주기의 각 단계마다 활성화되는 특이적 cyclin-Cdk 복합체가 만들어지게 된다. 예를 들어, 세포 주기 G1기 초기에서는 세포의 종류에 따라서 Cdk4, 6, 8가 Cyclin D와의 결합에 의하여 활성화되고, G1기 후기와 S기 초기에서는 Cdk2가 Cyclin A 및 E와 결합에 의하여 활성화되며, G2에서 M으로의 진행에는 Cdk1(Cdc2)이 Cyclin B 및 A와 결합하여 활성화된다. 본 발명에서는 CDK4와 cyclin D1, CDK2와 cyclin A 단백질 발현을 확인

하였다.

- [0058] 본 발명의 일 실시예에서는 다양한 농도의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 처리한 K562 세포에서 세포주기 조절 단백질인 CDK2, CDK4, cyclin A 및 cyclin D1 단백질 발현 및 대조군 대비 상기 단백질의 비율을 확인하여 상기 추출물이 세포주기 정지에 의한 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다(도 10의 A) 및 B)).
- [0060] 따라서, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물은 K562 세포에서 세포예정사의 외인성 경로 및 내인성 경로 활성화 및 MAPK 신호전달 경로 중 p38 경로의 활성화를 통해 세포예정사, 및 G0/G1기의 세포주기정지로 인한 세포사멸을 유발하므로, 노무라 입깃 핵산 추출물이 백혈병의 치료활성을 가짐을 알 수 있었다(도 11).
- [0062] 상기 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 운할제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명의 약학조성물은 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. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 젤제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 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.
- [0064] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 운할제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61(tween 61), 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0065] 한편, 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 구체적으로 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 달라질 수 있으므로, 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명은 다른 하나의 양태로서, 노무라 입깃 해파리 추출물을 유효성분으로 포함하는 백혈병 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0070] 상기 백혈병 예방 또는 치료용 약학조성물의 유효성분인 해파리 추출물은 해파리로부터 유래된 것으로, 해파리

및 해파리 추출물을 이용한 기능성 식품(대한민국 특허출원번호 제10-2009-0130434호, 대한민국 특허출원번호 제10-2011-0007220호)이 알려져 있으므로, 상기 해파리 추출물은 백혈병의 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.

[0071] 본 발명에 있어서, 상기 백혈병은 만성 골수성 백혈병일 수 있다.

[0073] 본 발명에서 사용된 용어 "개선"은 백혈병의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0074] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태의 식품에 대한 조성물을 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 함유된 껌, 비타민 복합체, 차, 주스 및 드링크 형태로 제조할 수 있으며, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 유효성분으로 하는 식품 조성물을 과립화, 캡슐화 또는 분말화하여 섭취할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함할 수 있다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0075] 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 추출물을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0077] 본 발명은 다른 하나의 양태로서, 상기 약학 조성물을 백혈병이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 백혈병의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0078] 본 발명에 있어서, 상기 백혈병은 만성 골수성 백혈병일 수 있다.

[0079] 본 발명에서 용어 "개체"는 백혈병이 발병된 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물 또는 인간 등을 제한 없이 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명의 백혈병 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다.

[0081] 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 제형화되지 않은 형태로도 투여할 수 있고, 위산에 의하여 상기 약학 조성물이 변성 또는 분해될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화된 형태 또는 경구용 패치형태로 구강내에 투여할 수도 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0082] 본 발명의 치료 방법은 본 발명의 약학 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단 범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시에 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

### 발명의 효과

[0084] 본 발명의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 포함하는 조성물은 만성 골수성 백혈병 세포의 세포예정사 및 세포주기정지 효과를 나타내므로, 부작용은 적고 우수한 치료 활성을 나타내는 백혈병 치료제로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0086] 도 1은 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 용매에 따른 세포생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2의 A)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 농도에 따른 세포생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2의 B)는 대장암 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 농도에 따른 세포생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2의 C)는 간암 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 농도에 따른 세포생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 3의 A)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따른 세포사멸체를 확인한 사진이다.
- 도 3의 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따른 세포사멸체 및 염색질 응축을 확인한 사진이다.
- 도 4의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따른 세포예정사 및 세포예정사 비율을 확인한 그래프이다.
- 도 5의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따라 나타나는 세포예정사가 외인성 및 내인성 경로를 통해 유도됨을 확인한 사진 및 그래프이다.
- 도 6의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따라 나타나는 세포예정사가 내인성 경로를 통해 유도됨을 확인한 사진 및 그래프이다.
- 도 7의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따라 나타나는 세포예정사가 외인성 및 내인성 경로에서 caspase 의존적으로 유도됨을 확인한 그래프 및 사진이다.
- 도 8의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 처리시간 및 농도에 따라 나타나는 MAPK 신호전달경로 관련 단백질(ERK 1/2, JNK 및 p38, pERK 1/2, pJNK 및 p-p38)의 변화를 확인한 사진이다.
- 도 8의 C) 및 D)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 처리시간 및 농도에 따라 나타나는 MAPK 신호전달경로 관련 단백질의 변화를 확인한 그래프이다.
- 도 9의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따라 나타나는 세포예정사가 p38 경로에 의해 유도됨을 확인한 그래프 및 사진이다.
- 도 10의 A) 및 B)는 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물 처리에 따라 세포 주기 억제가 유도됨을 확인한 사진 및 그래프이다.
- 도 11은 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물에 유도되는 세포예정사 및 세포주기 억제를 나타내는 개략도이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0087] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0089] 실시예 1. 노무라 입깃 해파리(*Nemopilema nomurai*, Nomura's jellyfish, Cannonball jellyfish) 추출물의 활성 비교
- [0091] 실시예 1.1: 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 해파리의 다양한 추출물의 활성 비교
- [0093] 다양한 용매를 이용하여 추출한 노무라 입깃 해파리 추출물이 만성골수성백혈병 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 물(H<sub>2</sub>O), 에탄올(EtOH), 부탄올(BuOH), 에틸 아세테이트(Ethyl Acetated, EA), 핵산(Hexane)을 용매로 이용하여 추출물을 제조하여, 이를 만성골수성백혈병 세포인 K562 세포에 처리하여 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 확인하였다. 이때, 음성대조군은 DMSO를 처리한 K562 세포를 이용하였다.
- [0094] 구체적으로, K562 세포는 5 % CO<sub>2</sub>를 공급한 37 °C 인큐베이터에서 페니실린(penicillin, 100 U/mL) 및 스트렙토

마이신(streptomycin, 100 mg/mL)을 첨가한 배지에 배양시켰다. 상기 배양시킨 K562 세포는 세포배양용 96 웰 플레이트(well plate)에 웰당  $5 \times 10^4$  세포로 분주하고 다양한 용매로 추출된 추출물(50 ug/mL)을 3일 동안 처리하여 MTT 분석을 수행하였다.

[0095] MTT 분석은 노무라 입깃 해파리 추출물을 처리한 배지를 제거하고, 0.5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 각각 20  $\mu$ l씩 처리하여 4시간 동안 배양하여 수행하였다. 이 때, 생성된 포르마잔 결정을 DMSO 100  $\mu$ l에 녹여 ELISA 분석기로 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0096] MTT 분석 결과, 노무라 입깃 해파리를 물( $H_2O$ ), 에탄올(EtOH), 부탄올(BuOH), 에틸 아세테이트(EA)로 추출한 추출물을 K562 세포에 처리하는 경우에는 음성대조군(DMSO)과 비교하여 세포생존율이 변화가 없는 반면, 노무라 입깃 해파리를 헥산(HEXANE)으로 추출한 추출물을 K562 세포에 처리하는 경우에는 음성대조군 및 다른 용매의 추출물과 비교하여 세포생존율이 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 1).

[0097] 따라서, 노무라 입깃 해파리를 헥산으로 추출하는 경우에 특이적으로 만성골수성백혈병에 치료활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0098]

#### [0099] 실시예 1.2: 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물의 활성 비교

[0101] 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 만성골수성백혈병에 특이적인 치료활성을 구체적으로 확인하기 위하여, K562 세포, 대장암 세포주인 HCT116 세포 및 간암 세포주인 Huh-7 세포에 다양한 농도(0 내지 50 ug/mL)의 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물을 24시간 동안 처리하여 MTT 분석을 통해 세포생존율을 확인하였다.

[0102] MTT 분석 결과, 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 처리된 K562 세포(도 2의 A)), HCT116 세포(도 2의 B)) 및 Huh-7 세포(도 2의 C))의 세포 생존율은 모두 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 특히, 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 처리된 K562세포의 세포 생존율은 HCT116 세포 및 Huh-7 세포의 세포 생존율과 비교하여 보다 감소됨을 확인하였다.

[0103] 따라서, 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 만성 골수성 백혈병에 특이적으로 치료활성을 가짐을 알 수 있었다.

#### [0105] 실시예 2. 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물에 의한 세포예정사(apoptosis)의 특성

[0107] 실시예 1에서 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 특이적으로 만성골수성백혈병세포에서 세포생존율이 감소됨을 확인하였으므로, 상기 세포생존율 감소가 세포예정사에 의해 유도되는 것인지 알아보기 위하여, 세포예정사의 특징인 세포사멸체(apototic body), 염색질 응축 및 세포예정사으로 나타나는 발현 및 이의 비율(apoptotic ratio)을 확인하였다.

#### [0109] 실시예 2.1: 세포사멸체 및 염색질 응축 확인

[0111] 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물에 의해 나타나는 유도되는 세포예정사 특성을 확인하기 위하여, K562 세포에 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물을 다양한 농도로 처리하여 광학현미경으로 세포를 관찰하였다. 또한, K562 세포에 40 ug/mL의 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물을 처리하여 DAPI 염색 후 형광현미경으로 세포를 관찰하였다.

[0112] 구체적으로, DAPI 염색은 다음과 같이 수행하였다. 커버슬라이드에 라이신(lysine)으로 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물(40 ug/mL)을 24시간 처리한 K562 세포를 코팅시킨 후 1X PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고 4% formaldehyde로 20분 동안 4℃에서 고정시켰다. 다시 1X PBS로 세척 후 DAPI(1mg/mL)으로 10분 동안 실온에서 차광하여 반응시켰고 1X PBS로 세척하였다.

[0113] 광학현미경으로 관찰한 결과, 다양한 농도의 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 처리된 K562 세포는 모든 농도에서 세포사멸체가 나타나는 것을 확인하였다(도 3의 A). DAPI 염색 후 형광현미경으로 관찰한 결과, 40 ug/mL의 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물을 처리한 K562 세포는 세포사멸체 및 염색질 응축이 나타나는 것을 확인하였다(도 3의 B).

[0114] 따라서, 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물의 처리에 따라 만성 골수성 백혈병 세포에서 세포사멸체, 염색질 응축이 나타나므로, 노무라 입깃 해파리 헥산 추출물이 만성골수성백혈병 세포에서 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다.

#### [0116] 실시예 2.2: 세포예정사 비율(apoptotic ratio) 확인

- [0118] 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물에 의해 나타나는 유도되는 세포예정사 특성을 추가적으로 확인하기 위하여, K562 세포에 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물(40 ug/mL)을 8시간 처리한 후 Annexin V-FITC(Annexin V-FITC apoptosis kit, BD Bioscience) 및 PI 염색 후 유세포 분석기(flow cytometer)를 통해 세포예정사에 따른 발현을 확인하였고, 상기 발현에 따른 세포예정사 비율을 계산하였다.
- [0119] 실험결과, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 처리한 K562 세포는 아무것도 처리하지 않은 K562 세포인 대조군과 비교하여, Annexin 및 PI의 발현하는 세포가 증가함을 확인하였다(도 4의 A)). 또한, 상기 결과를 이용하여 세포예정사 비율을 계산한 결과, Annexin을 발현하는 세포(annexin+), PI를 발현하는 세포(PI+), Annexin 및 PI를 발현하는 세포(annexin+ PI+)가 모두 대조군과 비교하여 증가함을 확인하였다(도 4의 B)).
- [0120] 따라서, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 처리에 따라 만성 골수성 백혈병 세포에서 세포예정사로 인해 나타나는 발현 및 비율이 증가하므로, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 만성골수성백혈병 세포에서 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다.
- [0122] **실시예 3. 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물에 의한 세포예정사 유도 경로 분석**
- [0124] **실시예 3.1: 외인성 및 내인성 세포예정사 유도 경로 마커를 이용한 세포예정사 유도 경로 분석**
- [0126] 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물에 의해 유도되는 세포예정사 경로가 외인성인지 내인성 경로인지 알아보기 위하여, 다양한 농도의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 처리한 K562 세포에서 세포예정사 마커인 PARP(Santa Cruz Biotechnology) 및 caspase-3(Cell signaling Technology), 외인성 세포예정사 경로 마커인 caspase-8(Cell signaling Technology), 및 내인성 세포사멸 경로 마커인 caspase-9(Cell signaling Technology)에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 통해 상기 단백질의 발현을 확인하였다. 또한, 덴시토메트리(densitometry, Bio-Rad)를 수행하여 단백질의 발현을 정량화하였다.
- [0127] 구체적으로, 웨스턴 블롯팅은 다음과 같이 수행하여 단백질의 발현을 확인하였다. 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물을 처리한 K562 세포를 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L NaF, 100 mg/mL PMSF, 1 mg/mL aprotinin, 및 1% Triton X-100가 포함되어 있는 완충용액에 넣고 30분 동안 4℃에서 용해시킨 후 4℃에서 13,000 rpm로 원심분리한 후 상등액을 이용하였다. 단백질을 바이오라드 단백질 분석(Bio-Rad protein assay)을 통해 정량하였고 정량된 용해물은 12% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 크기별로 분리하고 호퍼 전기영동 시스템(Hoefer electrotransfer system)을 이용하여 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Polyvinylidene difluoride, PVDF) 막에 이동시켰다. 상기 막은 4℃에서 하루 동안 1차 항체와 반응시킨 후 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시키고 그 다음 ECL 화학발광 시스템(ECL chemiluminescence system)을 이용하여 결과를 확인하였다.
- [0128] 또한, 덴시토메트리는 상기 웨스턴 블롯팅에서 확인된 PARP 및 caspase-3의 절단형태(cleaved form)의 단백질 발현량을 대조군( $\beta$ -actin)으로 정량화하였다.
- [0129] 웨스턴 블롯팅 결과, 40 ug/mL의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 처리된 K562 세포에서 PARP, caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 절단형태 단백질이 모두 발현되는 것을 확인하였다(도 5의 A)). 또한, 절단형태 단백질 중 PARP 및 caspase-3의 절단형태 단백질을 덴시토메트리로 정량한 결과, 노무라 입깃 해파리 추출물이 처리된 K562 세포에서 대조군 대비 caspase-3의 절단형태 단백질 및 대조군 대비 PARP의 절단형태 단백질의 비율이 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물의 농도의존적으로 증가함을 확인하였다(도 5의 B)).
- [0130] 따라서, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 만성골수성백혈병 세포에서 세포예정사의 외인성 및 내인성 경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다.
- [0132] **실시예 3.2: BCL-2 패밀리를 이용한 세포예정사 유도 경로 분석**
- [0134] 세포예정사 유도 경로 중 내인성 경로를 통해 세포예정사가 유도되는지 다시 한번 확인하기 위하여, 다양한 농도의 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물에 처리한 K562 세포에서 세포예정사 촉진(pro-apoptosis) 마커인 BAX(Santa Cruz Biotechnology) 및 항 세포예정사(anti-apoptosis) 마커인 Bcl-2(Santa Cruz Biotechnology)의 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 통해 상기 단백질의 발현을 확인하였다. 또한, 덴시토메트리(densitometry)를 수행하여 단백질의 발현을 정량화하였다.
- [0135] 웨스턴 블롯팅 및 덴시토메트리는 실시예 3.1과 동일하게 수행하였다.
- [0136] 웨스턴 블롯팅 결과, 노무라 입깃 해파리 핵산 추출물이 처리된 K562 세포에서 BCL-2 단백질 발현은 감소하고

BAX 단백질 발현은 증가함을 확인하였다(도 6의 A)). 또한, 상기 두 단백질을 덴시토메트리로 정량한 결과, BAX 단백질 대비 Bcl-2 단백질의 비율이 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물의 농도의존적으로 증가함을 확인하였다(도 6의 B)).

[0137] 따라서, 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물이 만성골수성백혈병세포에서 세포예정사의 내인성 경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다.

[0139] **실시예 3.3: Caspase 연쇄반응을 통한 세포예정사 유도 경로 분석**

[0141] 세포예정사가 세포예정사의 내인성 및 외인성 경로와 관련된 caspase 연쇄반응을 통해 유도되는지 확인하기 위하여, K562 세포에서 pan caspase 저해제인 Z-VAD(Calbiochem) 및 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물(40 ug/mL)을 처리한 후 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 확인하였다. 또한, PARP 및 caspase-3의 절단 형태 단백질의 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

[0142] MTT 분석은 실시예 1.1과 동일하게, 웨스턴 블롯팅은 실시예 3.1과 동일하게 수행하였다.

[0143] MTT 분석 결과, 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물 및 Z-VAD가 함께 처리된 K562 세포에서 세포생존율이 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물만 단독으로 처리된 K562 세포에서 세포생존율과 비교하여 증가함을 확인하였다(도 7의 A)).

[0144] 또한, 웨스턴 블롯팅 결과, 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물 및 Z-VAD가 함께 처리된 K562 세포에서 caspase-3의 절단형태 단백질의 발현이 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물만 단독으로 처리된 K562 세포에서 caspase-3의 절단형태 단백질 발현보다 감소되는 것을 확인하였다(도 7의 B)). 특히, 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물 및 Z-VAD를 함께 처리된 K562 세포에서 caspase-3의 절단형태 단백질의 발현은 PARP의 절단형태 단백질의 발현보다 현저하게 감소함을 확인하였다(도 7의 B)).

[0145] 따라서, 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물과 pan-caspase 저해제를 함께 처리하여 caspase 관련 단백질을 효과적으로 억제함을 확인하였으므로, 만성골수성백혈병 세포에서 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물이 caspase 의존적인 세포예정사 유도 경로를 통해 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다.

[0147] 실시예 3.1 내지 3.3을 종합하면, 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물이 만성골수성백혈병 세포에서 caspase 의존적으로 외인성 및 내인성 경로를 통해 세포예정사가 일어나는 것을 알 수 있었다.

[0149] **실시예 4. 신호전달경로를 통한 세포예정사 유도 경로 분석**

[0151] **실시예 4.1: MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달경로를 통한 세포예정사 유도 경로 분석**

[0153] 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물에 의한 MAPK 신호전달경로의 활성화를 통해 세포예정사가 일어나는지 확인하기 위하여, K562 세포에 hepatoma 핵산 추출물(40 ug/mL)을 다양한 시간 및 농도로 처리하여 ERK1/2, P38(Cell signaling Technology), JNK 단백질(Cell signaling Technology), 및 이의 인산화된 단백질의 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 상기 단백질의 발현을 확인하였다. 또한, 덴시토메트리를 통해 단백질의 발현을 정량화하였다.

[0154] 웨스턴 블롯팅 및 덴시토메트리는 실시예 3.1과 동일하게 수행하였다.

[0155] 웨스턴 블롯팅 결과, 처리시간 및 농도를 다르게 하여 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물이 처리된 K562 세포에서 ERK1/2 단백질, JNK 단백질 및 p38 단백질이 인산화됨을 확인하였다(도 8의 A) 및 B)).

[0156] 또한, ERK1/2 단백질, JNK 단백질, p38 단백질, 및 이의 인산화된 단백질을 덴시토메트리로 정량한 결과, ERK1/2 단백질 대비 인산화된 ERK 1/2 단백질, JNK 단백질 대비 인산화된 JNK 단백질 및 p38 단백질 대비 인산화된 p38 단백질의 비율이 1 이상임을 확인하여 상기 ERK1/2 단백질, JNK 단백질 및 p38 단백질이 인산화됨을 확인하였다(도 8의 C) 및 D)).

[0157] 따라서, 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물이 만성골수성백혈병 세포에서 MAPK 신호전달경로가 관여하는 세포예정사가 나타남을 알 수 있었다.

[0159] **실시예 4.2: p38 신호전달경로를 통한 세포예정사 유도 경로 분석**

[0161] 또한, MAPK 신호전달경로 중 어느 경로를 통해 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물의 만성골수성백혈병세포에 대한 세포예정사가 나타나는지 확인하기 위하여, K562 세포에 10 uM의 p38 단백질 저해제(SB203580, Calbiochem)와 노무라 입깃 hepatoma 핵산 추출물(40 ug/mL)을 8시간 동안 처리한 후 MTT 분석으로 세포 생존율을 확인하였다.

또한, 절단 형태의 caspase-3 단백질 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 상기 단백질 발현을 확인하였다.

[0162] MTT 분석 결과, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물 및 p38 저해제 SB203580이 함께 처리된 세포에서 세포생존율이 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물만 단독으로 처리된 K562 세포에서 세포생존율과 비교하여 증가함을 확인하였다(도 9의 A)).

[0163] 웨스턴 블롯팅 결과, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물 및 p38 저해제 SB203580이 함께 처리된 K562 세포를 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물만 단독으로 처리된 K562 세포와 비교하여 p38 단백질의 발현이 억제되고 이에 따라 caspase-3의 절단형태 단백질도 감소함을 확인하였다(도 9의 B)).

[0164] 따라서, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물이 만성골수성백혈병 세포에서 MAPK 신호전달 경로 중 p38 경로를 통해서 세포예정사를 유도함을 알 수 있었다.

#### [0166] 실시예 5. 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물의 세포주기 억제 활성

[0168] 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물이 세포주기 조절에 관여하는 확인하기 위하여, 다양한 농도의 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물을 24시간 동안 처리하고, 세포주기 조절 단백질인 CDK2, CDK4, cyclin A 및 cyclin D1 단백질 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 상기 단백질 발현을 확인하였다. 또한, 덴시토메트리를 통해 단백질 발현을 정량화하였다. 이때, 정량화는 대조군( $\beta$ -actin) 대비 단백질의 비율로 계산하였다.

[0169] 웨스턴 블롯팅 및 덴시토메트리는 실시예 3.1과 동일하게 수행하였다.

[0170] 웨스턴 블롯팅 결과, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물이 처리된 세포에서 세포주기 조절 단백질인 CDK2, CDK4, cyclin A 및 cyclin D1 단백질 발현이 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(도 10의 A)). 또한, 상기 세포주기 조절 단백질을 덴시토메트리로 정량한 결과, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물이 처리된 K562 세포에서 대조군 대비 각 세포주기 단백질의 비율이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(도 10의 B)).

[0171] 구체적으로, G0/G1기가 억제될 때, cyclin D1 및 CDK4 단백질의 발현이 감소되므로, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물은 G0/G1 세포주기 억제를 유도함을 알 수 있었고, 특히, cyclin D1 및 CDK4 단백질은 G1기에서 S기로 진행되는 경우, 가장 처음 발현되는 것이므로, 상기 단백질의 감소에 의해 cyclin A 및 CDK2 단백질의 발현도 감소됨을 알 수 있었다.

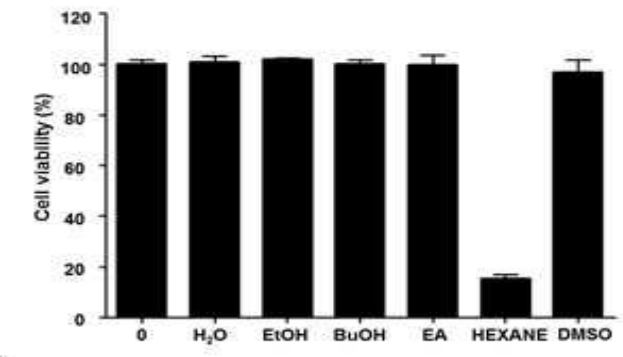
[0172] 따라서, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물이 세포주기 조절에 관여함을 알 수 있었다.

[0174] 상기 결과를 종합해보면, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물은 만성골수성백혈병세포에서 세포예정사의 외인성 경로 및 내인성 경로 활성화 및 MAPK 신호전달 경로 중 p38 경로의 활성화를 통해 세포예정사, 및 G0/G1기의 세포주기정지로 인한 세포사멸을 유발하므로, 노무라 입깃 hepatoma 세포 추출물이 백혈병의 치료활성을 가짐을 알 수 있었다(도 11).

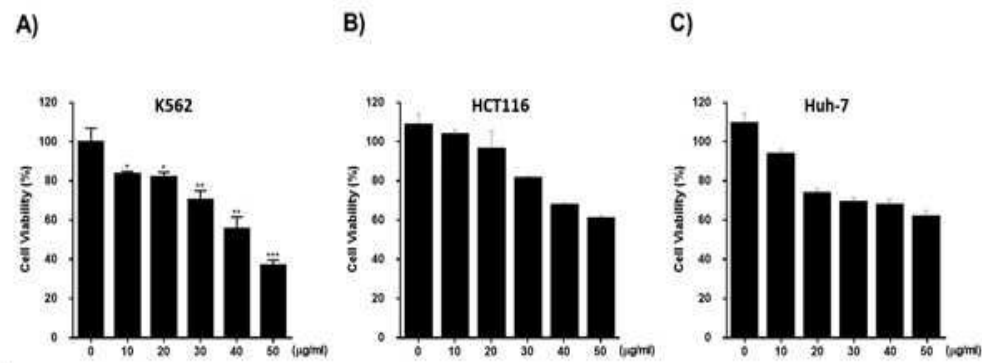
[0176] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

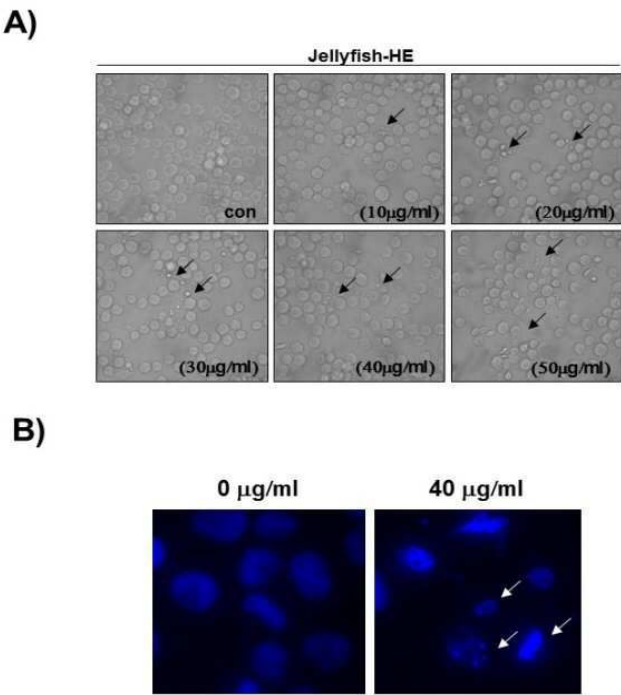
도면1



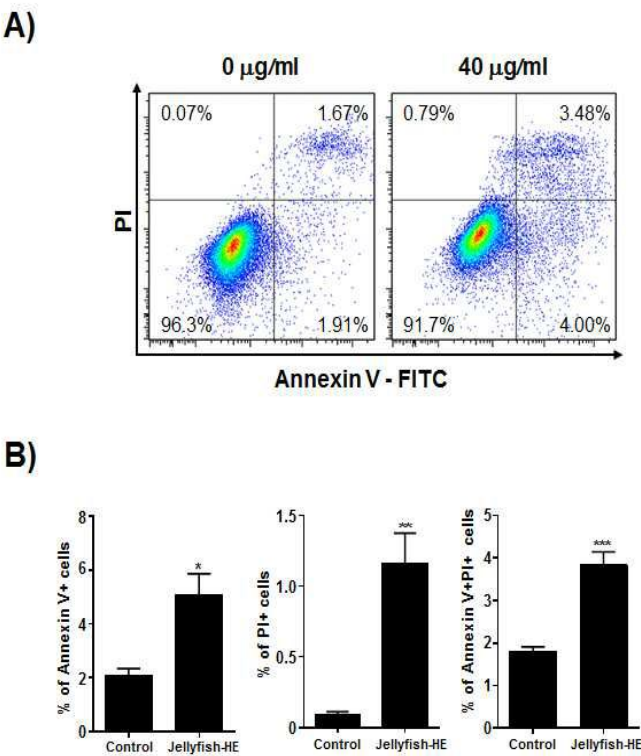
도면2



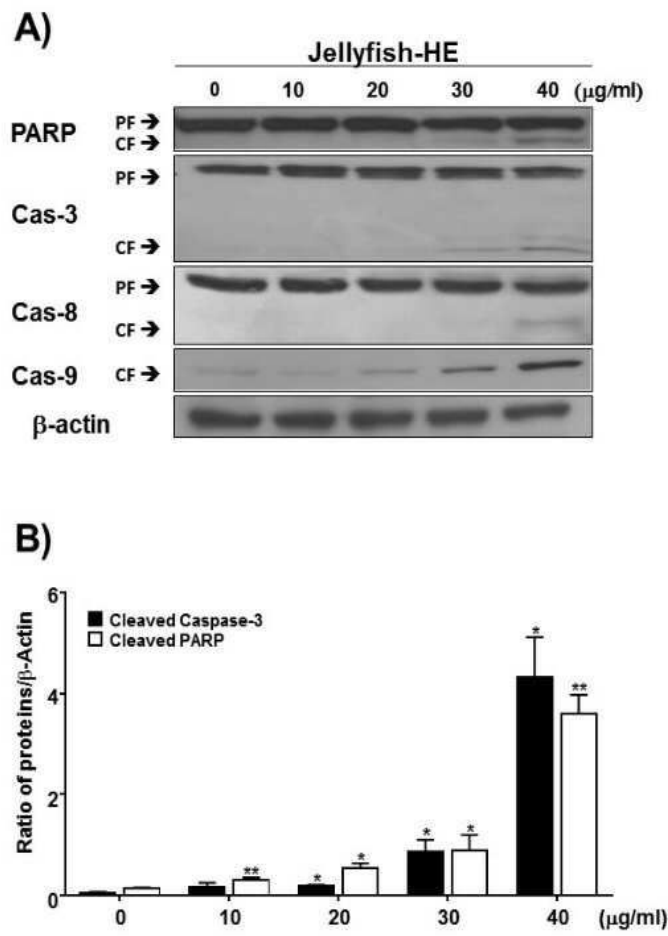
도면3



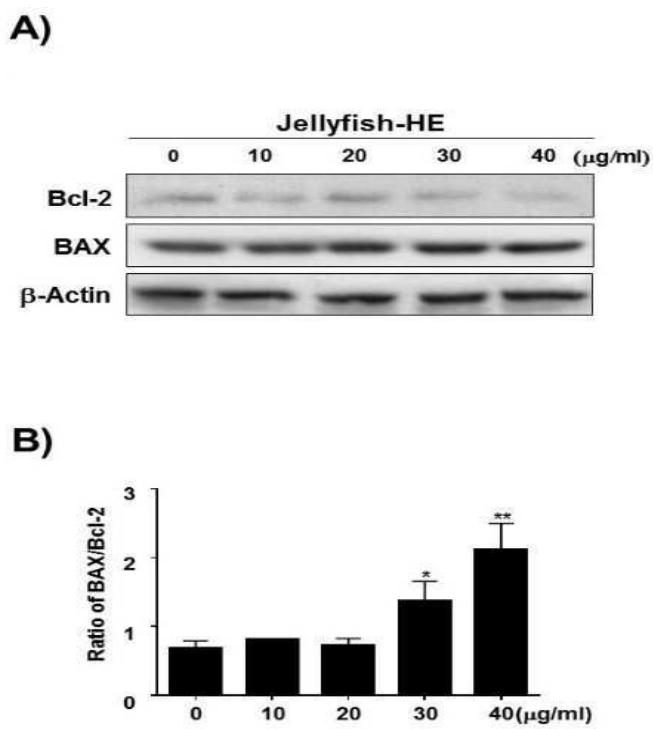
도면4



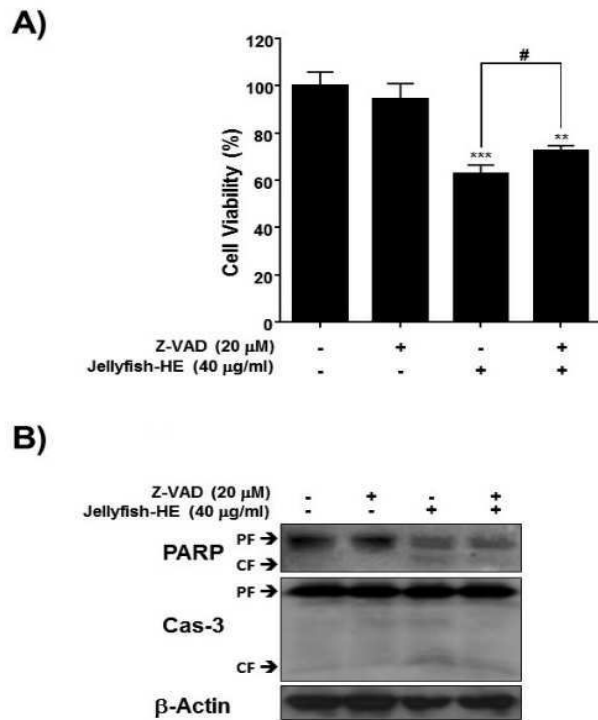
도면5



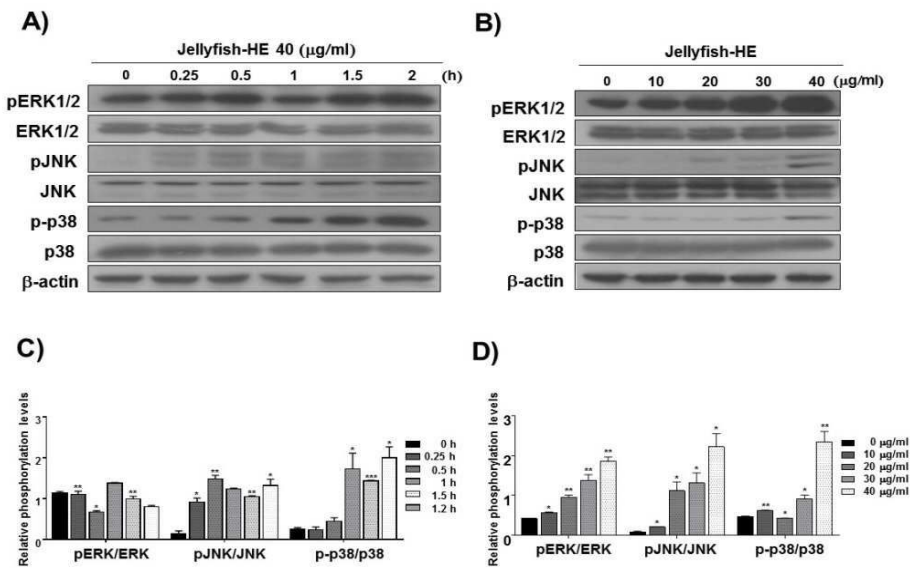
도면6



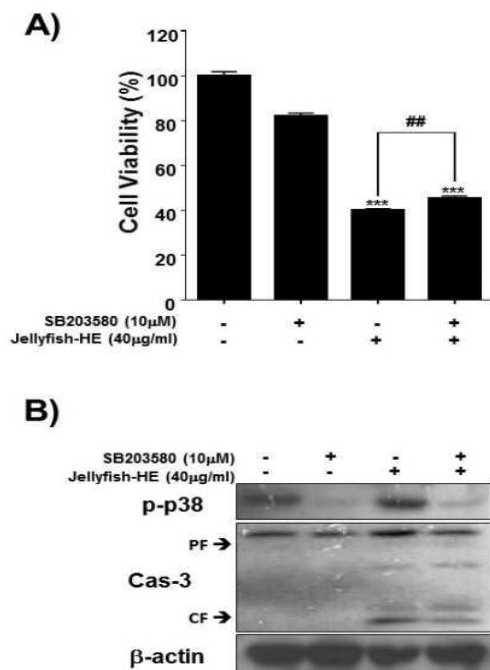
도면7



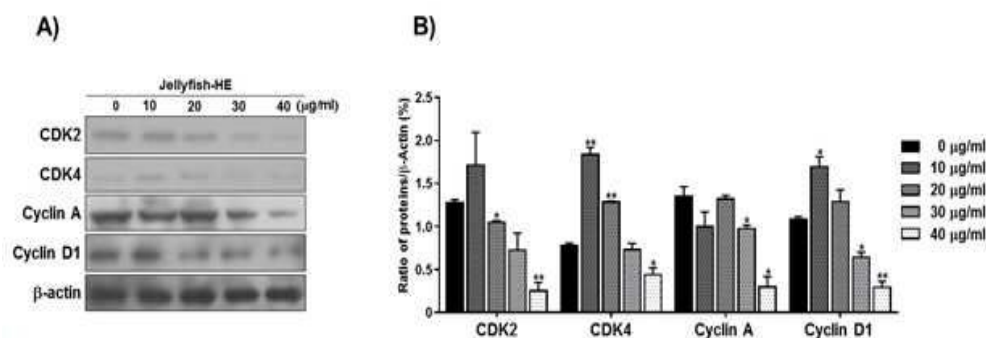
도면8



도면9



도면10



도면11

