



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0048363
(43) 공개일자 2013년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0113179

(22) 출원일자 2011년11월02일

심사청구일자 2011년11월02일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

안광석

서울특별시 성북구 장위로2길 67, 106동 1307호 (하월곡동, 꿈의숲푸르지오)

(74) 대리인

김승진, 양부현

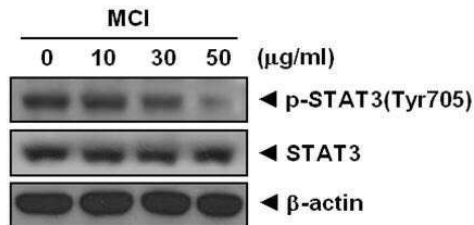
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 야국(*Chrysanthemum indicum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 STAT3 신호전달 과정을 억제함으로써 암 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 나타낸다.

대표도 - 도2b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0006220

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초의과학연구센터 (MRC)

연구과제명 암세포 사멸 유도 및 항암제 독성완화/내성 억제 효능 한방소재 개발

주관기관 경희대학교

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

야국(*Chrysanthemum indicum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선암 또는 다발성골수종의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 헥산, 부탄올, 메틸렌 클로라이드, 물 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 STAT3 활성(activity)을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 JAK1 및 JAK2의 인산화(phosphorylation)을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 STAT3 타겟 유전자의 발현을 하향조절(down-regulation) 하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 타겟 유전자는 Bcl-2, Bcl-xl, IAP-1, 사이클린D1(Cyclin D1) 또는 서바이빈(survivin)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 카스파아제-3(caspase-3)의 활성(activity)을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

(a) 상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 조성물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

(a) 상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 조성물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선암 또는 다발성골수종의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 야국(*Chrysanthemum indicum*)은 몇 세기 걸쳐 다양한 염증 관련 질환을 치료하기 위해 한국, 중국 및 일본에서 이용되고 있다. 최근 야국의 약리작용을 평가하기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 야국 추출물은 항염증(M. S. Cheon et al., *J Ethnopharmacol*, 122:473-477(2009), Y. Lee do et al., *J Ethnopharmacol*, 123:149-154(2009), I. S. Kim et al., *Food Chem Toxicol*, 49:963-973(2011)), 항암(Z. F. Li et al., *World J Gastroenterol*, 15:4538-4546(2009), Z. D. Wang et al., *Oncol Rep*, 23:413-421(2010)), 진통(G. B. Shi et al., *Phytomedicine*, 18:609-616(2011)), 항균(B. C. Aridogan et al., *Arch Pharm Res*, 25:860-864(2002)), 항산화 및 낮은 독성을 가지면서 높은 효능의 면역조절 효과 (A. N. Ren et al., *Pharm. Biotechnol.*, 6:492-493(1999))를 갖는다는 것이 밝혀졌다. 특히, 야국의 에탄올 추출물은 마우스에서 만성적 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA) 노출에 의해 유도된 피부 염증을 약화시켰으며(Y. Lee do et al., *J Ethnopharmacol*, 123:149-154(2009)), 마우스 RAW 264.7 대식세포에서 MAPKs 신호전달 및 NF- κ B(nuclear factor- κ B)를 저해함으로써 지질다당체(lipopolysaccharide, LPS)에 의해 유도된 염증 마커들의 생성을 억제시키고(M. S. Cheon et al., *J Ethnopharmacol*, 122:473-477(2009)), 인간 간세포암종의 증식을 억제(Z. D. Wang et al., *Oncol Rep*, 23:413-421(2010), A. Yuan et al., *Oncol Rep*, 22:1357-1363(2009))하고 세포사멸(Z. F. Li et al., *World J Gastroenterol*, 15:4538-4546(2009))을 유도하는 능력을 가짐으로써 항암제로서의 가능성을 나타내고 있다. 그러나 야국이 매개하는 항암 효과에 대한 메커니즘에 대해서 많은 연구가 필요하다. STAT(signal transducer and activator of transcription) 신호전달 경로는 염증, 세포 생존 및 세포 사멸과 밀접한 관련이 있으며, 야국은 STAT 신호전달 경로 조절을 통해 염증, 세포 생존 및 세포 사멸을 매개할 수 있다. STAT 단백질은 전사 요소(transcription factors)로써 알려졌으며, 모든 사이토카인 신호전달 조절에 중요한 역할을 한다(J. E. Darnell, *Science*, 277:1630-1635(1997)). 7개의 포유류 STAT 단백질(STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b 및 6)이 알려져 있는데, 이들은 세포 증식, 분화 및 사멸에 연관되어 있다(Z. Zhong et al., *Science*, 264:95-98(1994)). STAT3(Signal transducer and activator of transcription-3)는 골수종, 백혈병, 림프종 및 전립선 종양을 포함하는 다양한 인간 암세포에서 활성을 나타낸다(A. C. Bharti et al., *J Immunol*, 171:3863-3871(2003), R. Buettner et al., *Clin Cancer Res*, 8:945-954(2002), L. B. Mora et al., *Cancer Res*, 62:6659-6666(2002)). 특히, 인간 원발성 종양들은 높은 수치의 구성적(constitutive) STAT3 활성(activity)(45개 종양 중 37개로 82%)을 나타내며 인간 전립선암 세포주(DU145, PC3 및 LNCaP)에서도 구성적 STAT3 활성을 나타낸다(L. B. Mora et al., *Cancer Res*, 62:6659-6666(2002)).

[0003] 인산화된 STAT3는 핵 안으로 전위되며, 핵에서 STAT3는 타깃 유전자의 전사를 조절한다. STATs의 인산화는 JAK(janus-like kinase)라고 불리는 비수용체 단백질 티로신 키나아제(non-receptor protein tyrosine kinases)의 활성화를 통해 매개되며, JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2는 STAT3의 활성과 연관되어 있다(J. N. Ihle, *Cell*, 84:331-334(1996)). 또한, c-Src 키나아제의 역할은 STAT3 인산화에서 증명되어졌다(S. J. Schreiner et al., *J Biol Chem*, 277:45680-45687(2002)). STAT3는 세포사멸 억제제(Bcl-2, Bcl-x1, IAP-1 및 survivin) 및 세포주기 조절자(cyclin D₁) 같은 종양형성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다(B. B. Aggarwal et al., *Ann N Y Acad Sci*, 1091:151-169(2006)). 구성적 STAT3 활성을 억제하는 피토케미칼(phytochemicals)들은 암 예방 및 치료를 위한 가능성을 갖는다(B. B. Aggarwal et al., *Ann N Y Acad Sci*, 1171:59-76(2009), B. B. Aggarwal et al., *Biochem Pharmacol*, 72:1605-1621(2006)). 생존 및 증식을 포함하는 종양형성에 있어 STAT3의 활성화는 중요한 역할을 하기 때문에, 본 발명자들은 야국 추출물이 STAT3 신호전달을 억제함으로써 종양형성을 매개할 것이라고 가설을 세웠다. 본 발명에서 실제로 야국의 메틸렌 클로라이드 분획물이 구성적 STAT3 활성을 억제하며, 세포 생존 및 증식에 관련된 유전자 생성물의 발현을 감소시켜 세포주기를 sub-G1기에 머물게 하고, 또한 인간 전립선 암세포(DU145)에서 카스파아제-3의 활성화를 통해 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명자들은 여러 가지 천연물 중에서 보다 개선된 항암 작용을 갖는 유효성분을 추출하고자 연구 노력한 결과, 야국(*Chrysanthemum indicum*) 추출물이 암 세포 사멸 활성을 가짐을 실험적으로 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 야국 추출물의 약제학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 완화용 기능성 식품 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 야국(*Chrysanthemum indicum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명자들은 여러 가지 천연물 중에서 보다 개선된 항암 작용을 갖는 유효성분을 추출하고자 연구 노력한 결과, 야국 추출물이 항암 활성을 가짐을 실험적으로 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 명세서에서 용어 “야국(*Chrysanthemum indicum*)”은 국화과(Asteraceae)에 속하는 다년생초본으로 주로 산 기슭의 양지에서 자라며 땅속줄기가 길게 옆으로 뻗는다. 줄기는 높이 30-60 cm이며 여러 개가 뭉쳐나며, 잎은 달걀 모양의 진녹색이고 다섯 갈래로 깊게 갈라지고 끝이 뾰족하며, 갈라진 조각은 장 타원형이며 가장자리에 거친 톱니가 있다. 9-10월에 황색의 꽃이 줄기와 가지 끝에서 피는데 지름이 2.5 cm 정도이다. 식용, 관상용 및 약용으로 쓰이며, 한방 및 민간에서 열감기, 몸살, 폐렴, 두통, 기관지염, 위염, 장염, 종기, 고혈압 등의 약재로 쓰인다.
- [0013] 본 발명의 명세서에서 용어 “야국 추출물”은 상기 야국으로부터 적합한 용매를 사용하여 추출하여 얻는 혼합물을 의미한다.
- [0014] 본 발명의 조성물에서의 유효성분인 야국 추출물을 분리하는 방법은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 조성물에서 이용되는 야국 추출물을 야국에 추출용매를 처리하여 얻는 경우에는, 다양한 추출용매가 이용될 수 있다. 바람직하게는, 극성 용매 또는 비극성 용매를 이용할 수 있다. 극성 용매로서 적합한 것은, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethyl-formamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함한다. 비극성 용매로서 적합한 것은, 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 메틸렌 클로라이드, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, *o*-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디

클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함한다.

[0016] 보다 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 추출용매는 (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 부틸아세테이트, (h) 1,3-부틸렌글리콜, (i) 핵산 및 (j) 메틸렌 클로라이드를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 추출물은 메틸렌 클로라이드를 야국에 처리하여 수득한 것이다.

[0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 “추출물”은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 추출물을 추가적으로 분획(fractionation)한 분획물도 포함한다. 즉, 야국 추출물은 상술한 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 야국 추출물에 포함되는 것이다.

[0018] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 야국 추출물은 암세포의 사멸을 유도한다. 야국 추출물은 STAT3 경로를 억제함으로써 암세포 사멸을 유도하는데, STAT(signal transducers and activators of transcription) 단백질은, 시그널 전달 및 전사 활성화에서 이중적 역할을 하는 DNA-결합 단백질로 STAT 계통의 6개 뚜렷한 요소(STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 및 STAT6) 및 여러 이소형태 (STAT1-알파, STAT1-베타, STAT3-알파 및 STAT3-베타)가 존재한다. STAT의 활성화는 다양한 사이토카인 및 마이토젠 자극에 의해 조절되며, 그의 수용체에 사이토카인이 결합되면, 이러한 수용체와 결합된 제너스(Janus) 단백질 티로신 키나아제(JAKs)가 활성화된다. 이것은 다시 STAT을 인산화하고, 그 결과 핵으로의 전좌 및 STAT 반응성 유전자의 전사 활성화가 일어난다. STAT 위에서 특정한 티로신 잔기에 대한 인산화는 그들을 활성화시키고, 그 결과 특정한 유전자 프로모터 서열에 결합하는 STAT의 호모이량체 및/또는 헤테로이량체가 형성된다. STAT 활성화를 통해 사이토카인에 의해 매개되는 사건은, 세포 증식 및 분화와 세포고사의 방지를 포함한다.

[0019] 하기 본 발명의 구체적인 일 실시예에 의하면, 야국의 메틸렌 클로라이드 분획물(methylene chloride fraction of *Chrysanthemum indicum*, MCI)은 인간 전립선암 세포(DU145) 및 인간 다발성 골수종 세포(U266)에서 강한 세포독성 효과를 나타내며(도 1), 농도 의존적으로 STAT3의 활성화를 억제한다(도 2b). MCI가 JAK1/2의 인산화를 억제함으로써 STAT3의 구성적 활성이 억제되는데, MCI에 의한 STAT3 활성 억제에 Src 인산화 경로가 작용하지는 않는다(도 2c). 또한, MCI는 세포주기를 sub-G1기에 머무르게 하고(도 3), 항-세포사멸 단백질(Bcl-2, Bcl-x1, IAP-1 및 서바이빈) 및 증식 단백질(사이클린 D1) 발현을 감소시키며, 카스파아제-3를 활성화시켜 암세포를 사멸시킨다(도 4).

[0020] 본 명세서에서 사용되는 상기 용어 “구성적 활성(constitutive activity)”은 아고니스트의 존재와 무관한 수용체의 상승된 기저 활성을 의미한다. 예컨대, 수용체의 구성적 활성은 세포(예를 들어, 막) 프리퍼레이션(preparation)(참조: Barr & Manning, *J. Biol. Chem.* 272:32979-87 (1997)), 인지질 소포 중의 관련 G-단백질의 존재 또는 부존재하에 정제되고 재구성된 수용체(Cerione et al., *Biochemistry* 23:4519-25(1984)), 및 기능성 세포 검정(U.S. Patent Application Ser. No. 60/103,317)을 포함하는 다수의 상이한 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골수종, 다발성골수종, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 고환암, 구강암, 담낭암, 담도암, 소장암, 식도암, 신장암, 요도암, 직장암, 척수암, 편도암 또는 요관암이고, 바람직하게는 위암, 폐암, 간암, 대장암, 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이며, 보다 바람직하게는 위암, 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이고, 가장 바람직하게는 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 야국 추출물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0025] 본 발명의 조성물은 그 유효성분인 상기 식물 추출물을 제형, 배합 목적 등에 따라 치료를 의도하는 암에 대한

개선 활성을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 99.999 중량 % 범위 내에서 결정될 수 있다. 여기서 “유효량”이란 임의 개선, 치료, 또는 이러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

[0028] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.

[0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골수종, 다발성골수종, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 고환암, 구강암, 담낭암, 담도암, 소장암, 식도암, 신장암, 요도암, 직장암, 척수암, 편도암 또는 요관암이고, 바람직하게는 위암, 폐암, 간암, 대장암, 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이며, 보다 바람직하게는 위암, 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이고, 가장 바람직하게는 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 조성물은 식품 조성물로 제공될 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 야국 추출물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 야국 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골수종, 다발성골수종, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 고환암, 구강암, 담낭암, 담도암, 소장암, 식도암, 신장암, 요도암, 직장암, 척수암, 편도암 또는 요관암이고, 바람직하게는 위암, 폐암, 간암, 대장암, 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이며, 보다 바람직하게는 위암, 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이고, 가장 바람직하게는 골수종, 다발성골수종 또는 전립선암이다.

[0035] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [0036] (i) 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0037] (ii) 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0038] (iii) 본 발명은 야국 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0039] (iv) 본 발명의 조성물은 STAT3 신호전달 과정을 억제함으로써 암 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 나타낸다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 야국(*Chrysanthemum indicum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 활성성분인 야국 추출물은 암 세포에서 STAT3 신호전달 과정을 억제함으로써 암 세포의 사멸을 효과적으로 유도한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 암의 예방 및 치료에 뛰어난 효능을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1a 내지 도 1c는 DU145, MDA-MB-231 및 U266 암세포에서 야국의 세포독성 효과를 확인한 결과를 보여준다.

도 1a는 다양한 암세포에 야국 분획물(50 μ g/ml)을 24시간 처리하고 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존능력을 측정한 결과이다.

도 1b는 세포에 다양한 농도의 MCI를 24시간 동안 처리하고 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존능력을 측정한 결과이다. 모든 데이터는 3차례의 독립된 실험으로부터 얻었으며, 평균치와 표준편차로 표시하였다.

도 1c는 MCI를 처리한 DU145, MDA-MB-231 및 U266 세포의 형태학적 변화를 도립현미경(inverted microscopy)을 이용하여 확인한 결과이다.

도 2a 내지 도 2c는 STAT3 경로에 있어 상류 신호전달 물질의 억제에 대한 MCI의 효과를 확인한 결과이다.

도 2a는 DU145, MDA-MB-231 및 U266 세포에 MCI(50 μ g/ml)를 8 시간 처리하고, 세포 용해물을 수득한 후 인산-STAT3 및 STAT3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다.

도 2b는 DU145 세포에 MCI(0, 10, 30 또는 50 μ g/ml)를 8시간 처리하고, 세포 용해물을 수득한 후 인산-STAT3 및 STAT3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다.

도 2c는 DU145 세포에 MCI(0, 10, 30 또는 50 μ g/ml)를 8시간 처리하고, 세포 용해물을 수득한 후 인산-JAK1, JAK1, 인산-JAK2, JAK2, 인산-Src, Src 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. β -액틴을 대조군으로 이용하였으며, 데이터는 3차례의 독립된 실험으로부터 대표되는 그림을 나타내었다.

도 3a 내지 도 3b는 DU145 세포에서 MCI에 의한 세포주기(sub-G1) 정지 및 세포사멸을 확인한 그림이다.

도 3a는 DU145 세포에 MCI(0, 10, 30 또는 50 μ g/ml)를 24시간 처리하고, 세포 DNA를 염색한 후 유세포 분석법을 이용하여 세포주기를 확인한 결과이다.

도 3b는 DU145 세포에 MCI(0 또는 50 μ g/ml)를 24시간 처리하고, FITC가 접합된 항-아넥신 V 항체를 배양한 후, 유세포 분석기를 이용하여 초기 세포사멸 효과를 확인한 결과이다.

도 3c는 DU145 세포에 MCI(0 또는 50 μ g/ml)를 24시간 처리한 후, 세포를 고정하고 TUNEL 분석법을 통해 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 DNA 단편화(fragmentation)를 확인한 결과이다. 데이터는 3차례의 독립된 실험으로부터 대표되는 그림이며, 다른 데이터 모두 비슷한 결과를 나타내었다.

도 4a 및 도 4b는 MCI에 의한 STAT3-조절 유전자 생성물의 하향조절 및 카스파아제-3 활성화를 확인한 그림이다.

도 4a는 DU145 세포에 MCI(0, 10, 30 또는 50 μ g/ml)를 24시간 처리하고, 세포 용해물을 수득한 후 Bcl-2, Bcl-x1, IAP-1, 사이클린 D1 및 서바이빈 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. 데이터는 3차례의 독립된 실험으로부터 대표되는 그림을 나타내었다.

도 4b는 카스파아제-3 및 PARP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. β -액틴을 대조군으로 이용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0043] 실시예

[0044] 재료 및 방법

[0045] 1. 실험재료

[0046] RPMI 1640, DMEM, FBS(fetal bovine serum), 0.4% 트립판 블루 생체 염색시약 및 항생제/항진균제 Life Technologies(Grand Island, NY)로부터 구입하였다. MTT, 트리스 베이스, 글라이신, NaCl, SDS(sodium dodecyl sulfate), RNase A 및 우혈청알부민은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. STAT3에 대한 토끼 폴리클로날 항체 및 인산-STAT3(Tyr⁷⁰⁵), Bcl-2, Bcl-xL, 서바이빈(Survivin), IAP-1, 사이클린 D1(cyclin D1), 프로카스파아제-3(procaspase-3) 및 PARP에 대한 마우스 모노클로날 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. Dead EndTM fluorometric TUNEL(TdT-mediated-dUTP Nick-End Labeling) 분석 키트는 Promega(Madison, WI)에서 구입하였으며, 고우트(goat) 항-토끼 HRP(horse radish peroxidase)컨쥬게이트 항체는 Bio-Rad(Hercules, CA)에서 구입하였다. 인산-JAK1(Tyr^{1022/1023}) 항체, JAK1 항체, 인산-JAK2(Tyr^{1007/1008}) 항체, JAK2 항체, 인산-Src(Tyr⁴¹⁶) 및 Src의 항체들은 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다. 고우트 항-마우스 HRP 컨쥬게이트 항체는 Bio-rad, 고우트 항-토끼 HRP 컨쥬게이트 항체는 Transduction Laboratories(Lexington, KY)에서 구입하였다.

[0047] 2. 세포 배양

[0048] 인간 전립선암 세포주 DU145, 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 인간 다발성 골수종 세포주 U266은 American Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 구입하였다. U266(ATCCTIB-196)는 B 세포 유래 형질세포종으로 단일클론성 항체 및 IL-6 생산하는 것으로 잘 알려진 세포주이다. 모든 세포는 항생제(100 units/ml 페니실린 A 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신) 및 10% FBS(Gibco-BRL)가 첨가된 DMEM 또는 RPMI 1640 배지(L-글루타민, 25 mM HEPES 버퍼 및 소듐 카보네이트, Gibco-BRL)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

[0049] 3. 식물재료

[0050] 야국은 경동시장에서 구입하였으며 증거표본(voucher specimen)(D-622)은 한국과학기술원 강릉분원 식물표본실에 기탁하였다.

[0051] 4. 야국 분획

[0052] 야국(*Chrysanthemum indicum*)(1.5 kg)는 뜨거운 에탄올에서 4 시간 동안 4 차례 추출을 행하였으며, 잔여 에탄올을 증발시켜 총 추출물(250.0 g)을 수득하였다. 이 추출물을 증류수로 현탁시킨 후 n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트 및 n-부탄올을 분획한 후, 잔여 용매를 증발시켜, n-헥산(20.1 g), 메틸렌 클로라이드(11.5 g), 에틸 아세테이트(4.6 g) 및 n-부탄올(18.5 g)의 분획물을 각각 수득하였다. 메틸렌 클로라이드 분획이 다른 분획물에 비해 가장 강력한 세포독성을 나타내어 이를 실험에 사용하였다.

[0053] 5. 세포 생존능 측정

[0054] DU145, MDA-MB-231 및 U266 세포를 96 웰(well) 플레이트에 웰당 5×10^3 세포의 농도로 첨가하고 37℃에서 배양하였다. 세포에 야국의 메틸렌 클로라이드 분획물(methylene chloride fraction of *Chrysanthemum indicum*, 이하 MCI로 기재)을 10, 30 또는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고 24시간 및 36시간 배양한 후, MTT 용액(5 mg/ml, Sigma Aldrich, USA) 30 μl 를 각 웰에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 추출 버퍼(20% SDS 및 50% 디메틸포름아마이드)를 세포에 처리한 후 37℃에서 하룻밤 동안 배양하고, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Model 680, Bio-Rad)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0055] 6. 웨스턴 블롯 분석

[0056] MCI를 처리한 세포에 용해 버퍼[(20 mM Tris(pH7.4), 250 mM NaCl, 2 mM EDTA(pH8.0), 0.1% Triton X-100, 0.01 mg/ml 아프로티닌(aprotinin), 0.005 mg/ml 루페틴(leupeptin), 0.4 mM 페닐 메탄 술폰닐 플로라이드(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF) 및 4 mM NaVO_4)]를 처리하여 세포 용해물을 수득하였다. 세포 용해물을 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 불용성물질을 제거하고, 10% SDS-PAGE를 행하여 단백질을 분리하였다. PAGE를 행한 후 단백질들은 니트로셀룰로오스 멤브레인(Bio-RAD)으로 전기적으로 이동시키고, 니트로셀룰로오스 멤브레인을 5% 탈지유(nonfat milk)로 블로킹한 후, 1/1000으로 희석한 항-STAT 항체에 담가 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 블롯을 세척한 후 희석한 HRP-결합 2차 항체에 2시간 동안 반응시킨 후, 적당히 건조된 멤브레인에 화학발광기질 용액(ECL, Amersham Biosciences, UK)을 첨가하여 발색시켰다. 세포사멸(apoptosis) 분석을 위해 세포 용해물(30 μg)을 8-12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔의 각 웰에 주입하여 전기영동한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(Bio-RAD)에 블로팅하였다. 멤브레인을 5% 탈지유를 포함하는 TBST(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20) 용액에서 2시간 동안 블로킹시켰다. 이를 세척 후 5% 탈지유를 포함하는 TBST에서 1/1000으로 희석한 항-PARP, 항-caspase-3, 항-cyclin D₁, 항-survivin, 항-IAP-1, 항-Bcl-2 및 항 Bcl-x_L 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 대조군으로는 동량의 β -액틴을 로딩하여 사용하였다. 세척 후 TBST에 1/5000으로 희석한 HRP-컨쥬게이트 항-마우스 IgG 또는 항-토끼 IgG 항체에 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면 세척 후 적당히 건조된 멤브레인에 화학발광 기질 용액(ECL, Amersham Biosciences, UK)을 첨가하여 발색시켜, 면역반응성 밴드를 시각화하여 관찰하였다.

[0057] 7. 세포 주기 분석

[0058] DU145 세포를 6웰 플레이트에 웰당 5×10^5 세포의 농도로 플레이팅하였다. 세포를 10, 30 또는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 MCI로 24시간 동안 처리하였다. 이어서, 세포를 회수하고 차갑게 냉각시킨 PBS로 2회 세척하였다. 세포 펠릿을 250 μl 의 차가운 PBS로 재현탁하고, 매우 낮은 속도의 볼텍스(vortex)상에서 유지하면서, 냉각시킨 100% 에탄올 750 μl 를 점적방식으로 첨가하였다. 재현탁 상태로 4℃에서 하룻밤동안 유지시킨 후에, 13,000 rpm의 30초 동안 냉각시킨 PBS를 사용하여 2회 세척하고, 100 μl 의 PBS내에서 다시 재현탁한 후, 2 μl RNase(1 mg/ml)와 함께 1 시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 400 μl 의 PI(propidium iodide, 50 $\mu\text{g/ml}$)으로 상온에서 30분간 염색하고, 이어서, 유세포 분석기(FACScan Calibur, BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 데이터 분석은 Cell Quest 3.0f software를 이용하여 수행하였다.

[0059] 8. 아넥신 V 분석

[0060] DU145 세포를 6 웰 플레이트에 웰당 5×10^5 개 세포의 농도로 플레이팅하였다. 세포에 MCI(50 $\mu\text{g/ml}$)를 24시간 동안 처리한 후, 세포를 회수하고 차갑게 냉각시킨 PBS로 2회 세척하였다. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I(Becton Dickinson Biosciences)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 포스파티딜세린 노출에 대한 분석 실험을 수행하였다. 염색된 샘플은 유세포 분석기(FACScan Calibur, BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 데이터 분석은 Cell Quest 3.0f software를 이용하여 수행하였다.

[0061]

[0062] 9. TUNEL 분석

[0063] Roche Diagnosis TUNEL(terminal transferase mediated dUTP-fluorescein nick end labeling) 분석 키트를 이

용하여 제조사의 지시에 따라 각각의 아포토시스 세포 사멸에 대한 분석 실험을 수행하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 MCI를 처리한 DU145 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 4% 파라포름알데하이드로 30분간 세포를 고정시킨 후, PBS로 2분간 2회 세척하였다. 재현탁시킨 세포에 투과성촉진 용액(0.1% Triton X-100 및 0.1% 소듐 시트레이트)을 처리하고 4°C에서 하룻밤동안 정지시켰다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 25 μl 의 TUNEL 효소와 함께 37°C에서 1시간 동안 암(dark)조건 및 가습 조건하에서 인큐베이션하였다. PBS로 2분씩 3회 세척한 후, 컨쥬게이트된 항-아넥신 V 항체를 이용하여 형광-활성 세포 분류 유세포 분석 시스템으로 필터링한 다음, 유세포 분석기(FACScan Calibur, BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

10. 통계 분석

모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 데이터의 다중 비교의 통계학적 분석을 위해 ANOVA 분석 및 Bonferroni's test를 사용하였다. p -값이 0.01 이하일 때, 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

실험 결과

본 발명자들은 인간 전립선암 세포주(DU145)에서 STAT3 신호전달 경로에 대한 약국의 항암 효과를 확인하였다. 약국의 4개 분획물 및 에탄올 추출물의 세포독성을 먼저 확인하였고, MTT 분석법을 이용하여 세포 생존능력을 측정하였다. 그 결과, 메틸렌 클로라이드 분획물이 DU145 및 U266 세포주에서 다른 분획물에 비해 가장 강력한 세포독성을 나타냈다(도 1a). 본 발명자들은 발암과 강력하게 연관되어 있으며, 세포 주기 진행, 세포 증식 및 암세포 형질전환을 촉진시키는 구성적 STAT3 활성화에 대한 데이터를 바탕으로 STAT3 신호전달 경로에 연구의 중점을 두었다.

1. 인간 전립선암 세포 및 다발성 골수종 세포에 대해 MCI는 세포독성을 나타내었다.

인간 전립선암 세포(DU145), 유방암 세포(MDA-MB-231) 및 다발성 골수종 세포(U266)에 다양한 농도(0-50 $\mu\text{g/ml}$)의 MCI를 24 시간 동안 처리한 후, MTT 분석법을 이용하여 MCI의 세포독성을 측정하였다. 도 1b에서 보는 바와 같이, MCI는 DU145 및 U266 세포에서 현저한 성장 억제 효과를 나타낸 반면, MDA-MB-231 세포주에서는 세포독성을 나타내지 않았다. MCI 농도가 약 40 $\mu\text{g/ml}$ 일 때, DU145 및 U266 세포의 치사율이 50% 까지 올라갔다. 또한, MCI(30 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$)를 24시간 처리한 DU145, MDA-MB-231 및 U266 세포에서 형태학적 변화가 나타났다(도 1c).

2. MCI는 STAT3의 구성적 인산화를 억제하였다.

DU145, MDA-MB-231 및 U266 세포는 구성적 STAT3 활성을 나타낸다는 것(K. S. Ahn et al., *Cancer Res*, 68:4406-4415(2008))이 이미 알려져 있기 때문에, MCI가 이들 세포에서 구성적 STAT3 활성을 억제하는지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 실제로 MCI는 DU145 및 U266 세포에서 STAT3 활성화를 억제하였으나, MDA-MB-231세포에서는 억제하지 못했고(도 2a), STAT3 단백질의 발현에도 영향을 미치지 못했다(도 2b).

3. MCI는 구성적 STAT3 인산화를 농도의존적으로 억제하였다.

인간 전립선암 세포주는 구성적으로(constitutively) 활성인 STAT3을 발현하는 것으로 잘 알려져 있다(L. B. Mora et al., *Cancer Res*, 62:6659-6666(2002)). MCI가 인간 전립선암 세포주에서 구성적 STAT3 활성을 조절할 수 있는지를 확인하기 위해 실험을 수행하였다. 도 2b에서 보는 바와 같이, MCI는 구성적 STAT3 활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시에는 완전히 억제되었다. MCI는 STAT3 단백질 발현에는 영향을 끼치지 않았다(도 2b).

4. MCI는 JAK1/2 구성적 활성화를 억제하였으나, Src의 활성화는 억제하지 않았다.

[0076] STAT3는 JAK의 수용성 티로신 키나아제에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다(J. N. Ihle, *Cell*, 84:331-334(1996)). JAK1/2가 주(main) 키나아제이기 때문에 JAK1/2 활성화에 있어서의 MCI의 효과를 측정하였다. 도 2c에서 보여지는 바와 같이, JAK1 및 JAK2는 DU145 세포에서 구성적으로(constitutively) 활성화되었고, MCI는 농도 의존적으로 JAK1 및 JAK2의 인산화를 억제하였다. 또한, STAT3는 Src 키나아제 패밀리의 수용성 티로신 키나아제에 의해서도 활성화되기 때문에(S. J. Schreiner et al., *J Biol Chem*, 277:45680-45687(2002)) DU145 세포에서 Src 키나아제의 구성적 활성화에 대한 MCI의 효과를 확인하였다. 본 발명자들은 MCI가 Src 키나아제의 구성적 인산화를 억제하지 않는 것을 확인하였다(도 2c). 총 Src 키나아제의 수준은 같은 조건 하에서 변하지 않았다(도 2c의 아래쪽 패널).

[0077]

[0078] 5. MCI는 의한 세포주기 중 sub-G1기에서 세포를 누적시켰다.

[0079] 세포 주기 분포에 있어 MCI의 효과를 확인하기 위해 실험을 수행하였다. 10, 30 또는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 MCI를 24 시간 동안 처리한 경우, 농도 의존적 방식으로 sub-G1기에서 세포 누적이 유도되었는데, 이는 세포사멸(apoptosis)을 의미한다(도 3a).

[0080] 6. DU145 세포에서 MCI는 세포사멸(apoptosis)를 유도하였다.

[0081] MCI가 세포사멸(apoptosis)을 유도하는지를 확인하기 위해 아넥신 V 분석법을 수행하였다. 아넥신 V 분석에서 MCI가 DU145 세포에서 초기 세포사멸을 증가시키고, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 비-처리 세포(non-treated cell, NT)와 비교하여 초기 사멸세포가 15%에 도달하는 것을 확인하였다(도 3b). 세포사멸의 유도는 TUNEL 염색법에 의해서도 확인되었다. 이전 결과와 일치하게, MCI를 처리한 DU145 세포는 비-처리 세포(non-treated, NT)에 비해 TUNEL 포지티브 세포가 최대 15.4%까지 현저하게 증가하였다(도 3c).

[0082] 7. MCI의 항-세포사멸 및 증식에 관여하는 유전자의 발현을 억제하였다

[0083] 항-세포사멸 단백질(Bcl-2, Bcl-x1, IAP-1 및 서바이빈(survivin)) 및 증식 단백질(cyclin D1)발현에 대한 MCI의 효과를 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 세포에 MCI(10, 30 또는 50 $\mu\text{g/ml}$)를 24시간 동안 처리한 결과, Bcl-2, Bcl-x1, IAP-1, 서바이빈(survivin) 및 사이클린 D1의 구성적 과발현이 MCI를 처리한 DU145세포에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 4a).

[0084] 8. MCI는 카스파아제-3를 활성화시켜 RARP 단편화를 유도하였다.

[0085] MCI가 DU145 세포에서 STAT3의 구성적 활성화를 억제함으로써 결국 세포사멸(apoptosis)에 이르게 되는지에 대해 조사하였다. 세포에 MCI(10, 30 또는 50 $\mu\text{g/ml}$)를 24시간 동안 처리하고, 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 카스파아제 활성화를 확인하였다. 하류(downstream) 카스파아제의 활성화에 의해 116kDa PARP 단백질이 87kDa의 단편으로 절편화되었다(도 4b 가운데 패널). 이러한 결과들은 MCI가 DU145 세포에서 카스파아제-3-의존적 세포사멸을 유도한다는 것을 강하게 암시한다.

[0086] 고찰

[0087] 야국은 다양한 암세포에서 세포 주기 정지(cell cycle arrest) 및 세포사멸을 유도하지만, 인간 전립선암 세포에서의 정확한 메커니즘에 대해서는 아직 충분히 알려져 있지 않다. 본 발명은 STAT3 신호전달 경로, 유전자 생성물 및 세포간 반응에 있어서 야국의 효과를 연구한 것이다. 본 발명자들은 야국의 메틸렌 클로라이드 분획물(methylene chloride fraction of *Chrysanthemum indicum*, MCI)이 인간 전립선암 세포(DU145)에서 구성적 JAK1 및 JAK2 활성화의 억제와 병행하여 구성적 STAT3 활성화를 억제한다는 것을 확인하였다. 더욱이, MCI는 Bcl-x1, Bcl-2, IAP-1, 사이클린 D1 및 서바이빈을 포함하는 STAT3-조절 유전자 생성물의 발현을 저하시키고, 세포독성, G1-G0기에서 세포 누적 및 카스파아제-3 활성화를 통한 세포사멸을 유도하였다. 구성적 STAT3 활성화는 전립선암, 다발성 골수종암, 유방암, 두경부 편평상피암, 림프종, 백혈병, 뇌암, 결장암, 유잉육종, 위암, 식도암, 난소암, 비인두암 및 췌장암을 포함하는 다양한 암에서 종양 발생에 관여한다(B. B. Aggarwal et al.,

Ann N Y Acad Sci, 1091:151-169(2006)). 따라서, 구성적으로 활성화된 STAT3의 억제제는 암 치료에 있어 적합한 타겟으로 주목을 받고 있다. 본 발명자들은 최초로 MCI가 인간 전립선암 세포(DU145) 및 다발성 골수종암 세포(U266)에서 구성적 STAT3 활성화를 억제하고 유방암 세포(MDA-MB-231)에서는 그렇지 않다는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 MCI에 의한 STAT3 하향조절이 세포 타입에 의존적인 것임을 암시한다.

[0088] 다음으로 MCI가 어떻게 구성적 STAT3 활성화를 억제하는지를 연구하였다. STAT3의 인산화는 JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 및 c-Src 키나아제를 포함하는 비-수용체 단백질 티로신 키나아제의 활성화를 통해 매개된다. 피토크미칼은 STAT3 억제제에 대한 좋은 후보로 이러한 신호전달 경로를 방해한다. 본 발명자들은 MCI가 STAT3 활성화와 밀접하게 연관되어 있는 JAK1 및 JAK2 활성을 억제할 수 있다는 것을 처음으로 밝혔다. MCI에 의한 STAT3의 억제가 NF- κ B 차단과 연관되어 있는지 알려져 있지 않지만, STAT3는 NF- κ B의 p65 소단위와 상호작용한다고 보고되어 있다

[0089] 야국은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다(M. S. Cheon et al., *J Ethnopharmacol*, 122:473-477(2009)). 그러나 MCI에 의한 STAT3의 억제가 NF- κ B를 차단하는 것과 연관되어 있는지는 알려진 바가 없고, STAT3가 NF- κ B의 p65 소단위 및 JAK2와 상호작용하며 STAT3 상류 키나아제가 에리트로포이데틴-유도 NF- κ B 활성화에 요구된다는 것이 보고되어 있다(M. Digicaylioglu et al., *Nature*, 412:641-647(2001)). 따라서, JAK2 활성화의 저해는 MCI에 의한 NF- κ B 및 STAT3 활성화의 억제와 연결되어 있을 가능성이 있다.

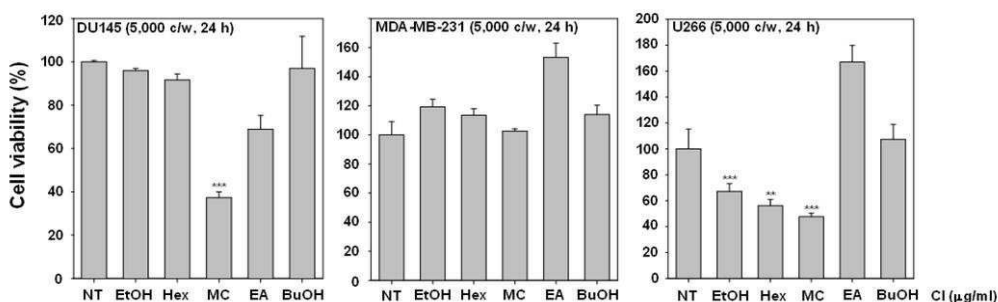
[0090] 또한, 본 발명자들은 MCI가 증식(사이클린 D1) 및 항-세포사멸(Bcl-2, Bcl-x1, IAP-1 및 서바이빈) 유전자 생성물을 포함하는 여러 STAT3-조절 유전자 생성물의 발현을 억제한다는 것을 확인하였다. 구성적으로 활성화된 STAT3는 세포사멸로부터 암세포를 보호함으로써 종양형성에 기여할 수 있다는 것은 MCI가 세포사멸을 유도할 수 있음으로 해서 STAT3 활성화를 억제하는 것을 암시한다(Z. F. Li et al., *World J Gastroenterol*, 15:4538-4546(2009), A. Yuan et al., *Oncol Rep*, 22:1357-1363(2009)). 구성적으로 활성화된 STAT3가 세포사멸(R. Catlett-Falcone et al., *Immunity*, 10:105-115(1999))에 저항성을 유도하는 것은 Bcl-2 및 Bcl-x1의 발현을 통해서 일 것이라는 가설이 있다(M. Nielsen et al., *Leukemia*, 13:735-738(1999)). 최근, Yang 등은 야국이 MCF-7/ADR 및 A549/Taxol 저항성 세포에서 현저한 다중약물내성(multidrug-resistance, MDR)-역전 효과를 나타낸다는 것을 보고 하였다(L. Yang et al., *Phytomedicine*, in press). 게다가, MCI에 의한 사이클린 D1 발현의 하향조절은 사이클린 D1가 요구되는 세포에서 세포 주기 G1기의 세포누적 및 증식 억제와 연관되어 있다. Bcl-x1의 발현은 STAT3에 의해 조절되며, 이 단백질은 인간 전립선암 세포에서 과다발현된다(S. V. Singh et al., *J Biol Chem*, 280:19911-19924(2005)). Bcl-2 및 Bcl-x1 발현의 하향조절은 인간 전립선암 세포에서 세포사멸을 유도하는 MCI의 능력에 기여할 수 있다.

[0091] 종합적으로, 본 발명은 MCI가 인간 전립선암 세포(DU145)에서 구성적 JAK1 및 JAK2의 억제를 통해 구성적 STAT3 활성화를 억제하며, 이를 통해 효과적인 암세포 생존 및 증식 억제제가 될 수 있다는 것을 보여주고 있다.

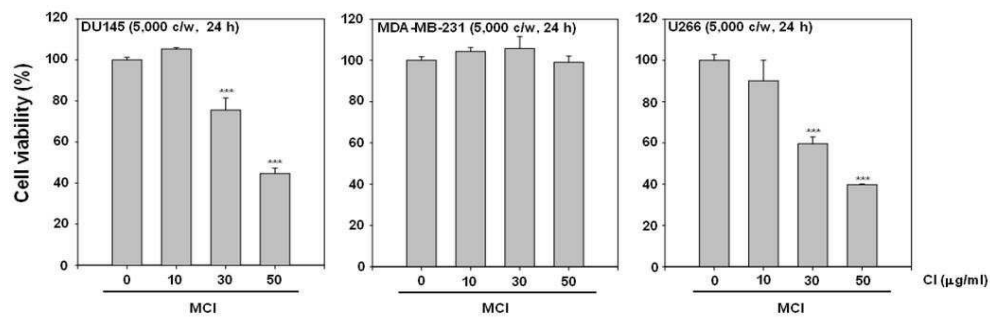
[0092] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

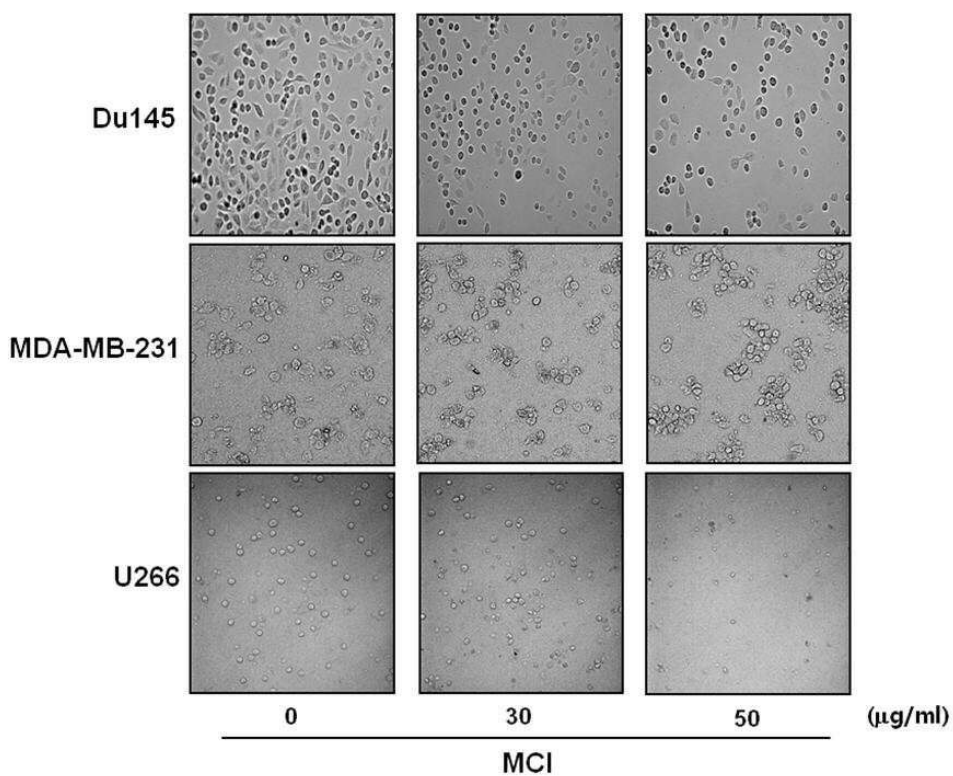
도면1a



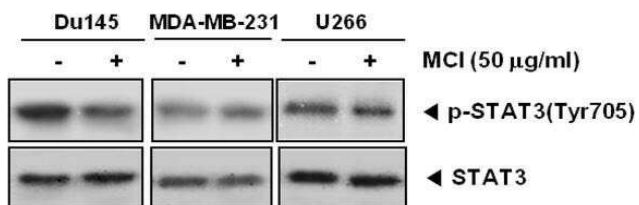
도면1b



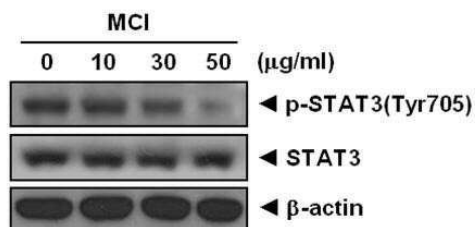
도면1c



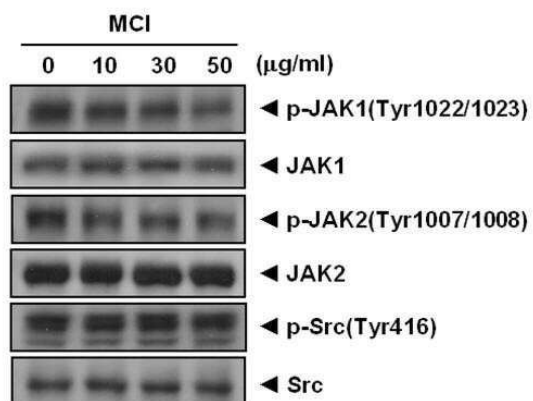
도면2a



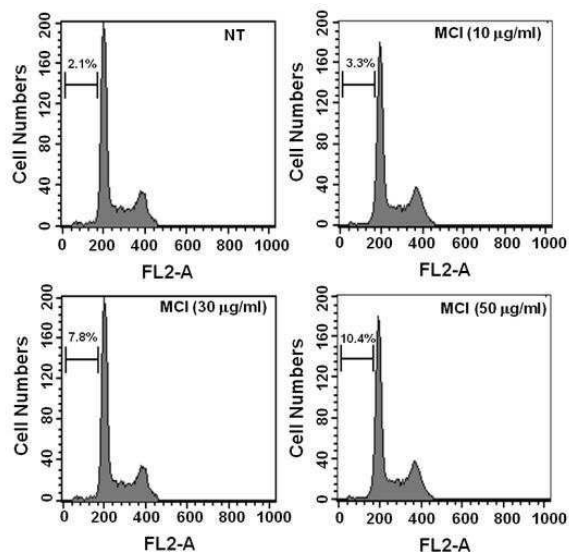
도면2b



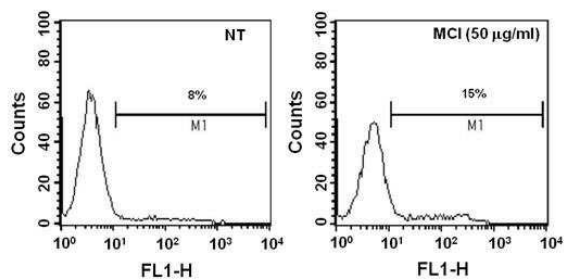
도면2c



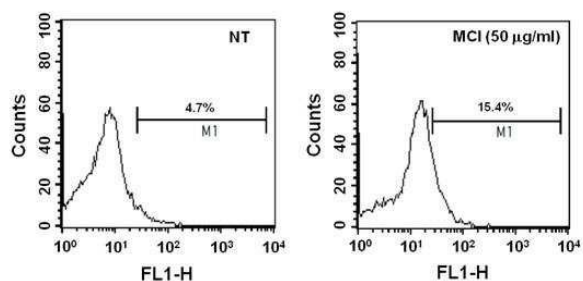
도면3a



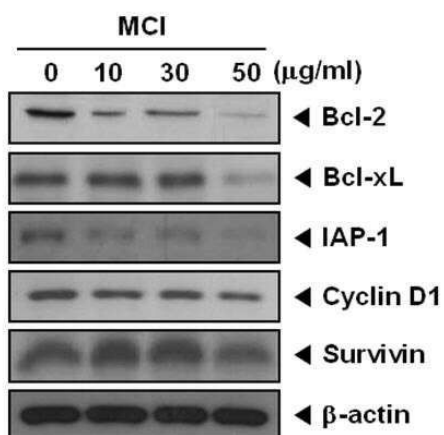
도면3b



도면3c



도면4a



도면4b

