

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0010436

(43) 공개일자 2023년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)*G01N 33/50* (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)*A61P 35/00* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2021-0090997

(22) 출원일자 2021년07월12일

심사청구일자 2021년07월12일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

최원재

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 604동 2201호(정자동, 파크뷰)

(74) 대리인

김순웅

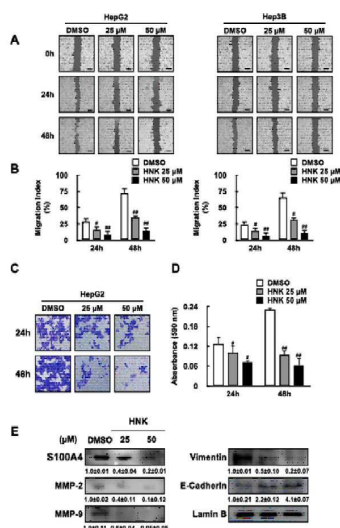
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 호노키올을 포함하는 사이클로필린 B 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 호노키올의 사이클로필린 B 억제 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 호노키올은 사이클로필린 B의 발현을 효과적으로 억제하며, 이를 통해 암세포의 세포 사멸 유도 및 세포 이동 감소 효과가 있다. 따라서 본 발명의 호노키올은 사이클로필린 B의 억제제로 관련 연구 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5011 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B(cyclophilin B) 억제용 시약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 호노키올은 농도가 0.1 내지 150 μM 인, 사이클로필린 B 억제용 시약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 시약 조성물은 시험관 내(in vitro)에서 사이클로필린 B 억제용인, 사이클로필린 B 억제용 시약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시약 조성물은 암세포 처리용인, 사이클로필린 B 억제용 시약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 시약 조성물은 사이클로필린 B 억제를 통해 암세포의 이동을 억제하거나 세포사멸을 유도하는 것인, 사이클로필린 B 억제용 시약 조성물.

청구항 6

(a) 호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 시험관 내 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 억제 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 호노키올은 농도가 0.1 내지 150 μM 인, 사이클로필린 B 억제방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 세포는 암세포인, 사이클로필린 B 억제방법.

청구항 9

(a) 세포가 포함된 시료에 호노키올(honokiol)을 처리하는 단계;

(b) 시료 내 사이클로필린 B를 측정하는 단계; 및

(c) 사이클로필린 B 유도제 후보 물질을 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 유도제 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 세포는 암세포인, 사이클로필린 B 유도제 스크리닝 방법.

청구항 11

호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B(cyclophilin B) 억제에 의한 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암 예방 또는 치료는 사이클로필린 B 억제에 의한 암세포의 사멸 유도; 또는 이동 억제;를 통해 이루어지는 것인, 사이클로필린 B 억제에 의한 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 사이클로필린 B 억제에 의한 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

(a) 호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 시험관 내(in vitro) 암세포에 처리하는 단계;를 포함하는 암세포 억제 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 암세포 억제는 암세포 사멸 유도 또는 이동 억제인, 암세포 억제 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 암세포 사멸 유도 또는 이동 억제는 사이클로필린 B 억제에 의한 것인, 암세포 억제 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 호노키올의 사이클로필린 B 억제 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사이클로필린 B(cyclophilin B)는 peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase 활성을 통해 단백질이 적절하게 접히는 것을 돕는다. 사이클로필린 B는 주로 소포체에 존재하며, PPase 활성을 통해 소포체 스트레스를 약화시킨다. 최근 사이클로필린 B는 세포 증식, Cgud 간염 바이러스 복제 및 세포 내 신호 전달과 같은 여러 기능에 관여한다는 것이 보고되었다. 또한 사이클로필린 B 억제가 STAT3 경로 조절을 통해 암세포 이동을 효과적으로 억제한다는 연구 결과가 발표되었다. 즉, 이는 사이클로필린 B가 암세포 이동을 효과적으로 방해하는바, 새로운 항암 표적이 될 수 있음을 의미한다.

[0003] 호노키올(honokiol)은 후박나무의 줄기껍질로부터 추출된 것으로, 일본, 중국, 한국에서 예로부터 기침, 설사,

알레르기예 사용된 천연약제였다. 여기서 언급된 후박나무의 약리효과를 넓게 알아보자면, 강력한 항산화 효능이 있는 후박은신경계에 주로 영향을 끼친다. GABA 생성량을 증가시켜, 항우울, 상경련 작용을 하며 뇌의 세로토닌 농도를 증가시킨다. 또한 항산화효능을 바탕으로 신경계 염증을 완화시킨다. 최근 후박은 방향성이 있는 약제로서, 강력한 천연 항균제로 연구가 활발히 진행되고 있다. 한의학적으로 아직까지는 방향화 습약으로 분류되는데 이는 소화제 같은 약제로 사용되어지며 앞으로 활발한 연구와 많은 논문들이 나오며 신경계에 작용하는 약제로 분류될 전망이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 이에 본 발명자들은 호노키올이 사이클로필린 B의 발현을 효과적으로 억제한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0005] 따라서 본 발명의 목적은, 호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B(cyclophilin B) 억제용 시약 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 (a) 호노키올 또는 이의 유도체를 시험관 내 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 억제방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 세포가 포함된 시료에 호노키올을 처리하는 단계; (b) 시료 내 사이클로필린 B를 측정하는 단계; 및 (c) 사이클로필린 B 유도체 후보 물질을 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 유도체 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 호노키올 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B 억제에 의한 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 시험관 내(in vitro) 암세포에 처리하는 단계;를 포함하는 암세포 억제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B(cyclophilin B) 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 (a) 호노키올 또는 이의 유도체를 시험관 내 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 억제방법을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 (a) 세포가 포함된 시료에 호노키올을 처리하는 단계; (b) 시료 내 사이클로필린 B를 측정하는 단계; 및 (c) 사이클로필린 B 유도체 후보 물질을 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 유도체 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 호노키올 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B 억제에 의한 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 (a) 호노키올 또는 이의 유도체를 시험관 내(in vitro) 암세포에 처리하는 단계;를 포함하는 암세포 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 호노키올은 사이클로필린 B의 발현을 효과적으로 억제하며, 이를 통해 암세포의 세포 사멸 유도 및 세포 이동 감소 효과가 있다. 따라서 본 발명의 호노키올은 사이클로필린 B의 억제제로 관련 연구 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1A는 상처 치유 분석을 통해 호노키올 처리에 따른 HepG2 및 Hep3B 세포의 세포 이동을 확인한 결과를 나타낸 도이다(Scale bar, 2mm).
- 도 1B는 상처 치유 분석을 통해 호노키올 처리에 따른 Hep3B 세포의 세포 이동을 확인한 결과를 나타낸 도이다

([#]P<0.01, ^{##}P<0.05 versus DMSO-treated controls).

도 1C는 트랜스웰 침습 분석을 통해 HepG2 세포의 침습 능력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1D는 상기 도 1C에서 확인한 HepG2 세포의 침습능을 정량화한 결과를 나타낸 도이다([#]P<0.01, ^{##}P<0.05 versus DMSO-treated controls).

도 1E는 웨스턴 블롯팅을 통해 호노키올 처리에 따른 세포 이동 관련 단백질의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2A는 real-time PCR을 통해 호노키올 처리에 따른 CypB의 mRNA 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다(^{##}P<0.05, ^{\$\$}P<0.05 versus DMSO-treated controls).

도 2B는 웨스턴 블롯팅을 통해 호노키올 처리에 따른 CypB의 단백질 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2C는 real-time PCR을 통해 Thapsigargin 및 호노키올 처리에 따른 CypB의 mRNA 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다(^{##}P<0.05, ^{\$\$}P<0.05 versus DMSO-treated controls).

도 2D는 웨스턴 블롯팅을 통해 Thapsigargin 및 호노키올 처리에 따른 CypB의 단백질 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3A는 상처 치유 분석을 통해 CypB를 과발현하는 HepG2 세포에서 호노키올 처리에 따른 세포 이동능을 분석한 결과를 나타낸 도이다(Scale bar, 2mm).

도 3B는 상기 도 3A에서 확인한 세포 이동능을 정량화한 결과를 나타낸 도이다([#]P<0.01, ^{##}P<0.05 versus pcDNA-transfected cells treated with DMSO; ^{\$}P<0.05 versus pcDNA-transfected cells treated with HNK).

도 3C는 트랜스웰 침습 분석을 통해 CypB를 과발현하는 HepG2 세포의 침습 능력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3D는 상기 도 3C에서 확인한 CypB를 과발현하는 HepG2 세포의 침습능을 정량화한 결과를 나타낸 도이다([#]P<0.01, ^{##}P<0.05 versus pcDNA-transfected cells treated with DMSO; ^{\$}P<0.05 versus pcDNA-transfected cells treated with HNK).

도 3E는 웨스턴 블롯팅을 통해 CypB를 과발현하는 HepG2 세포에서 세포 이동 관련 단백질의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4A는 MTS 분석을 통해 HepG2 세포에서 호노키올이 세포 사멸에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다(^{**}P<0.05 versus cells treated with DMSO for 24 hr; ^{***}P <0.05 versus cells treated with DMSO for 48 hr).

도 4B는 MTS 분석을 통해 CypB 과발현이 호노키올 매개 세포 사멸에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타낸 도이다([#]P <0.01 versus pcDNA-transfected cells treated with DMSO; ^{##}P <0.05 versus HA-CypB-transfected cells treated with DMSO; ^{\$}P <0.05 versus pcDNA-transfected cells treated with 50 μ M HNK).

도 4C는 웨스턴 블롯팅을 통해 HepG2 세포에서 호노키올이 세포 사멸 관련 마커의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4D는 웨스턴 블롯팅을 통해 CypB 과발현이 세포 사멸 관련 마커의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4E는 호노키올의 CypB 발현 억제 및 암세포 억제 메커니즘을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

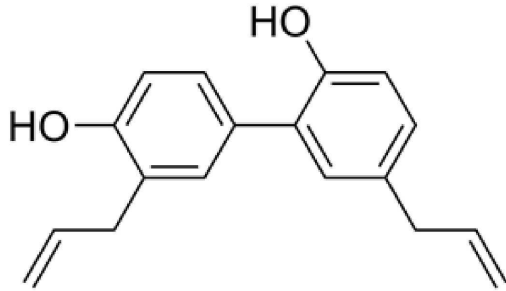
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 호노키올(honokiol) 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린

B(cyclophilin B) 억제용 시약 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 호노키올은 하기 화학식 1로 표시되는 것이 바람직하다.

[화학식 1]



본 발명의 호노키올은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다.

염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가 염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼 화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조할 수 있다.

본 발명의 구체예에서, 상기 호노키올은 농도가 0.1 내지 150 μM 인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 1 내지 100 μM 이고, 더욱 바람직하게는 25 내지 50 μM 이다. 호노키올의 농도가 0.1 μM 미만인 경우 그 효과가 미미하여 바람직하지 않고, 150 μM 초과인 경우 세포 독성을 나타내어 바람직하지 않다.

본 발명의 구체예에서, 상기 시약 조성물은 시험관 내(in vitro)에서 사이클로필린 B 억제용인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 구체예에서, 상기 시약 조성물은 암세포 처리용인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 상기 시약 조성물이 사이클로필린 B 억제를 통해 암세포의 이동을 억제하거나 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.

본 발명의 구체예에서, 상기 시약 조성물은 호노키올과 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 사이클로필린 B 억제제를 추가적으로 포함할 수 있고, 공지된 화합물 또는 관련된 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 또는 활성을 억제하는 억제제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 호노키올 또는 이의 유도체를 시험관 내 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 억제방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 구체예에서, 상기 호노키올은 농도가 0.1 내지 150 μM 인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 1 내지 100 μM 이고, 더욱 바람직하게는 25 내지 50 μM 이다. 호노키올의 농도가 0.1 μM 미만인 경우 그 효과가 미미하여 바람직하지 않고, 150 μM 초과인 경우 세포 독성을 나타내어 바람직하지 않다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 세포는 암세포인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 세포가 포함된 시료에 호노키올을 처리하는 단계; (b) 시료 내 사이클로필린 B를 측정하는 단계; 및 (c) 사이클로필린 B 유도제 후보 물질을 처리하는 단계;를 포함하는 사이클로필린 B 유도제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 구체예에서, 상기 세포는 암세포인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 호노키올은 사이클로필린 B를 mRNA 및 단백질 수준에서 효과적으로 억제한다. 스크리닝 결과, 상기 단계 (c)의 사이클로필린 B 유도제 후보 물질이 호노키올에 의한 사이클로필린 B 발현 감소(단계 (a))를 회복시키는 경우 그 후보 물질은 사이클로필린 B 유도제로 결정할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 호노키올 또는 이의 유도체를 포함하는 사이클로필린 B 억제에 의한 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 구체예에서, 상기 암 예방 또는 치료는 사이클로필린 B 억제에 의한 암세포의 사멸 유도; 또는 이동 억제;를 통해 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0041] 본 발명의 구체예에서, 상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 간암이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 상기 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강 내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0044] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 본 발명의 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 조성물은 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 파립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0047] 아울러, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 1 mg 내지 10 mg의 용량으로 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.2 mg/kg와 10 mg 중 적은 용량으로 투여될 수 있다. 상기 조성물의 투여량은 암을 예방 또는 치료하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서 암의 종류, 암의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 호노키올 또는 이의 유도체를 시험관 내(in vitro) 암세포에 처리하는 단계;를 포함하는 암세포 억제 방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 구체예에서, 상기 암세포 억제는 암세포 사멸 유도 또는 이동 억제인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 사이클로필린 B 억제에 의한 암세포 사멸 유도 또는 이동 억제인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0054] 이하, 실험예 및 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실험예 및 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실험예 및 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0056] **[실험예]**
- [0057] **실험예 1. 시약 및 플라스미드**
- [0058] 호노키올(honokiol, HNK)은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 10mM 농도로 녹여 -20℃에서 보관하였다.
- [0059] 플라스미드 및 siRNA는 제조업체의 매뉴얼에 따라 X-tremeGENE™(Invitrogen, CA, USA) 및 VIROMER®(lipocalyx, Germany)를 사용하여 형질감염시켰다.
- [0060] 실험에 사용된 항체는 Cell signalling(MA, USA)의 S100A4, CypB, HA, Vimentin, MMP-2, MMP-9, Pro-caspase-3, Pro-PARP; 및 Santa Cruz(TX, USA)의 Actin, Bax;를 사용하였다.
- [0061] 사이클로필린 B(Cyclophilin B)는 5' 끝에 HA 태그되었고, 벡터(HA 태그; 5'- TACCCATACGACGTCCAGACTACGCT-3')로 서브클로닝되었다.
- [0063] **실험예 2. 세포배양**
- [0064] 인간 HepG2 세포주는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)(HyClone, UT, USA)과 Penicillin(Corning, NY, USA)이 포함된 DMEM 배지에서 5% CO₂ 및 37℃ 조건인 배양기에서 배양되었다.
- [0066] **실험예 3. real-time PCR**
- [0067] TRIzol 시약(Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 세포에서 총 세포 RNA(total cellular RNA)를 추출하였다. cDNA는 M-MLV 역전사 효소(Fermentas, MD, USA)를 사용하여 총 RNA(total RNA) 0.2 µg로부터 합성하였다. Real-time PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다.
- [0069] - CypB : forward 5'-GCACAGGAGGAAAGAGCATC-3', reverse 5'-AGCCAGGCTGTCTTGACTGT-3'
- [0070] - GAPDH : forward 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3', reverse 5'-GTCCACCACCTGTTGCTGTAG-3'

[0072] Real-time PCR은 SYBR-Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, CA, USA)와 함께 ABI prism 7500 Sequence Detection System(Applied biosystems, CA, USA)을 사용하여 수행되었다. PCR 반응은 40 사이클을 수행하였다. 표적 유전자의 발현은 absolute quantification method로 분석하고 GAPDH level을 사용하여 정규화하였다. 결과는 다음 방정식을 사용하여 계산하였다.

[0073]
$$R \text{ (ration)} = 2^{-[\Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{control}}]}$$
.

[0075] 실험예 4. 웨스턴 블롯

[0076] 세포를 Laemmli lysis buffer(2% SDS, 10% Glycerol, 0.002% bromphenole blue, 0.0625M Tris-Cl, pH 6.8, 5% 2-mercaptoethanol and 1% protease inhibitor, 1% phosphatase inhibitor)에 용해시켰다. 용해물의 단백질 농도는 BCA(Bicinchoninic Acid) 단백질 정량으로 결정하였다. 용해물에서 얻은 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE에 로딩하고 BioTrace™ NT 니트로셀룰로스 멤브레인(Pall Corporation, FL, USA)으로 옮겼다. 멤브레인을 블로킹 용액(5% BSA) 및 1차 항체와 함께 배양하였고, 2차 항체와 추가 배양하였다. 단백질은 ECL-plus 검출 시스템(Santa Cruz, TX, USA)을 사용하여 시각화하였다. 면역 반응성 단백질 밴드를 검출하였고, 밴드 밀도는 Amersham Imager 600(GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)을 사용하여 정량화하였다.

[0078] 실험예 5. 상처 치유 분석

[0079] 세포는 6웰 플레이트에 5×10^5 cells/well의 농도로 시딩하였다. 시딩된 세포에 DMSO(대조군) 또는 호노키올(25, 50 μ M)을 처리하였다. 24시간 후, 200 μ l 파이프렛 팁을 이용하여 세포에 상처를 만든 후, 24시간 또는 48시간 후에 이미지를 캡처하여 이동성 세포가 차지하는 면적을 추정하였다. 세포 이동능은 “[Δ 면적/면적(0h)]x100%”로 계산하였다.

[0081] 실험예 6. 트랜스웰 침습 분석

[0082] 세포에 서로 다른 농도의 호노키올을 처리한 후, 1×10^5 HepG2 세포를 500 μ l 무혈청 DMEM 배지에 희석하였다. 희석된 세포를 growth factor-reduced Matrigel(Corning, AZ, USA)로 코팅된 상부 Transwell 챔버에 접종하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지를 화학 유인제(chemoattractant)로써 하부 챔버에 첨가하였다. 24시간 또는 48시간 후, 면봉을 이용하여 막 윗면의 세포를 제거하고 침습된 세포를 4% 포르말데히드로 10분 동안 실온에서 고정하였다. 고정된 세포를 실온에서 10분 동안 0.25% 크리스탈 바이올렛 염색(Sigma-Aldrich; Merck KGaA, MO, USA)하였다. 크리스탈 바이올렛 염색은 33% 아세트산에 용해시켰고, OD 값은 590 nm에서 확인하였다.

[0084] 실험예 7. 세포 생존 분석

[0085] 세포 생존능은 Chromo-CK™ cell viability assay kit(Chromogen, Korea)를 사용하여 분석하였다. 구체적으로, HepG2 세포를 2.5×10^4 cell/well의 밀도로 24웰 플레이트에 시딩한 후 세포 부착을 위해 24시간 동안 배양하였다. 부착된 세포에 다양한 농도의 호노키올(0-100 μ M)을 24시간 또는 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 각 웰에 50 μ l MTS 용액을 첨가한 후 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도는 SYNERGY HTX multi-mode reader(BioTek, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 세포의 흡광도 변화율을 DMSO 처리 세포의 흡광도로 나눈 값으로 계산하였다.

[0087] 실험예 8. 통계학적 분석

[0088] 실험 결과는 평균 $\pm$ SD로 표시하였다. 오차 막대는 세 번 수행된 세 개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD를 나타낸다. 두 평균값의 차이는 Student's t-test를 사용하여 분석되었다.

[0090] **[실시예]**

[0091] **실시예 1. 호노키올의 암세포 이동 억제 활성 분석**

[0092] 암세포 이동에 대한 호노키올의 효과를 평가하기 위하여, 인간 간암 세포주(HepG2 및 Hep3B)에서 상처 치유 분석을 수행하였다. HepG2 및 Hep3B 세포를 이용한 상처 치유 분석 결과는 각각 도 1A 및 B에 나타내었다.

[0093] 도 1A 및 B에 나타난 바와 같이, 호노키올이 처리된 세포의 상처폭은 대조군(DMSO 처리)에 비해 폐쇄 성향이 낮은 것을 확인하였다. 다시 말해, 호노키올 25 μ M 및 50 μ M 처리군은 대조군에 비해 HepG2 및 Hep3B 세포의 세포 이동을 최대 80%까지 감소시키는 것을 확인하였다.

[0095] 트랜스웰 침습 분석을 통해 HepG2 세포의 침습 능력을 측정하였으며, 그 결과는 도 1C 및 D에 나타내었다.

[0096] 도 1C 및 D에 나타난 바와 같이, 하부 챔버로 침습한 세포는 호노키올 처리 시 대조군에 비해 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[0098] 웨스턴 블롯팅을 통해 HepG2 세포 이동에서 호노키올의 억제 메커니즘을 조사하였다. 구체적으로, 세포 이동과 관련된 단백질인 S100A4, MMP-2, MMP-9, Vimentin 및 E-Cadherin의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 1E에 나타내었다.

[0099] 도 1E에 나타난 바와 같이, S100A4, MMP-2, MMP-9 및 Vimentin의 발현이 호노키올 처리에 의해 현저히 하향 조절되는 것을 확인하였다. 반면에 호노키올 처리에 의해 E-cadherin은 상향 조절된 것을 확인하였다.

[0101] 상기 결과는 호노키올 처리가 인간 간세포 암종에서 암세포 이동을 억제한다는 것을 의미한다.

[0103] **실시예 2. 호노키올 처리에 따른 CypB(Cyclophilin B) 발현 분석**

[0104] 호노키올이 세포 이동을 감소시키는 메커니즘을 확인하기 위하여, 호노키올이 CypB(Cyclophilin B) 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 상기 CypB는 암세포 이동을 자극한다고 알려져 있다. 구체적으로, 세포에 호노키올을 처리한 후 CypB의 mRNA 및 단백질 발현 수준을 측정하였다. CypB의 mRNA 및 단백질 발현 분석 결과는 각각 도 2A 및 B에 나타내었다.

[0105] 도 2A 및 B에 나타난 바와 같이, 호노키올은 CypB의 mRNA 및 단백질 발현을 현저히 감소시키는 것을 확인하였다.

[0107] Thapsigargin은 CypB의 유도제(inducer)로, CypB의 mRNA 및 단백질 발현을 증가시킨다고 알려져 있다. Thapsigargin 및 호노키올 처리여부에 따른 CypB의 mRNA 및 단백질 발현을 조사하였으며, 그 결과는 도 2C 및 D에 나타내었다.

[0108] 도 2C 및 D에 나타난 바와 같이, Thapsigargin 처리에 따라 CypB의 mRNA 및 단백질 발현이 증가한 것을 확인하였다. 반면, 호노키올 및 Thapsigargin을 병용 처리한 군은 thapsigargin에 의해 증가된 CypB 발현이 감소된 것을 확인하였다.

[0110] 상기 결과는 호노키올이 암세포 이동을 자극한다고 알려져 있는 CypB의 발현을 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0112] **실시예 3. 호노키올의 CypB 조절을 통한 세포 이동 억제 활성 분석**

[0113] 호노키올의 세포 이동 억제 및 CypB 과발현을 더 연구하기 위해, CypB를 과발현하는 HepG2 세포를 호노키올(50 μ M)로 24시간 또는 48시간 동안 처리한 후 상처 치유 분석을 수행하였다. 상처 치유 분석 결과는 도 3A 및 B에 나타내었다.

- [0114] 도 3A 및 B에 나타난 바와 같이, 호노키올 처리군은 대조군(DMSO 처리)과 비교하여 암세포 이동을 감소시켰다. 그러나 과발현된 CypB는 호노키올의 세포 이동 억제를 무력화시키는 것을 확인하였다.
- [0116] CypB를 과발현하는 HepG2 세포를 호노키올(50 μ M)로 24시간 또는 48시간 동안 처리한 후 트랜스웰 침습 분석을 수행하였다. 트랜스웰 침습 분석 결과 결과는 도 3C 및 D에 나타내었다.
- [0117] 도 3C 및 D에 나타난 바와 같이, 호노키올 처리는 침습을 억제시켰으며, 이는 CypB 과발현에 의해 회복된 것을 확인하였다.
- [0119] CypB를 과발현하는 HepG2 세포에서 호노키올 처리여부에 따라 세포 이동 관련 단백질(S100A4, MMP-2, MMP-9, Vimentin 및 E-Cadherin)의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 3E에 나타내었다.
- [0120] 도 3E에 나타난 바와 같이, CypB 과발현 세포에 호노키올을 처리한 군은 S100A4, MMP-2, MMP-9 및 Vimentin의 발현이 억제되지 않은 것을 확인하였다. 또한 CypB 과발현은 호노키올에 의해 유도된 E-Cadherin을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0122] 상기 결과는 호노키올이 CypB 신호 전달 경로를 표적화함으로써 암세포 이동에 영향을 미친다는 것을 의미한다.
- [0124] **실시예 4. CypB 과발현이 호노키올의 세포 사멸능에 미치는 영향 조사**
- [0125] 호노키올 처리가 암세포 사멸에 미치는 영향을 조사하였다. 구체적으로, MTS 분석은 호노키올을 24시간 또는 48시간 동안 처리된 HepG2 세포로 수행하였다. MTS 분석 결과는 도 4A에 나타내었다.
- [0126] 도 4A에 나타난 바와 같이, 호노키올은 시간 및 용량 의존적으로 암세포 사멸을 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0128] 다음으로, MTS 분석을 통해 호노키올 매개 세포 사멸에 대한 CypB의 효과를 조사하였다. MTS 분석 결과는 도 4B에 나타내었다.
- [0129] 도 4B에 나타난 바와 같이, CypB의 과발현은 호노키올 매개 세포 사멸로부터 HepG2 세포를 보호하는 것(즉, 호노키올 매개 세포 사멸을 억제하는 것)을 확인하였다.
- [0131] 또한 세포 사멸 마커인 Bax, pro-PARP 및 Pro-caspase의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 4C에 나타내었다.
- [0132] 도 4C에 나타난 바와 같이, 호노키올 처리는 Bax 발현을 상향 조절하고 pro-PARP 및 pro-Caspase3의 발현을 하향 조절한다는 것을 확인하였다.
- [0134] 추가적으로, CypB를 과발현하는 HepG2 세포에서 세포 사멸 마커의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 4D에 나타내었다.
- [0135] 도 4D에 나타난 바와 같이, 과발현된 CypB는 HepG2 세포에서 호노키올 매개 세포 사멸을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0137] 상기 결과는 호노키올이 도 4E와 같이, CypB 발현을 억제하여 세포 사멸을 유도하고, 암세포 이동을 감소시킨다는 것을 의미한다.
- [0139] 종합적으로 본 발명자들은 호노키올이 Cyclophilin B의 발현을 효과적으로 억제하며, 이를 통해 암세포의 세포

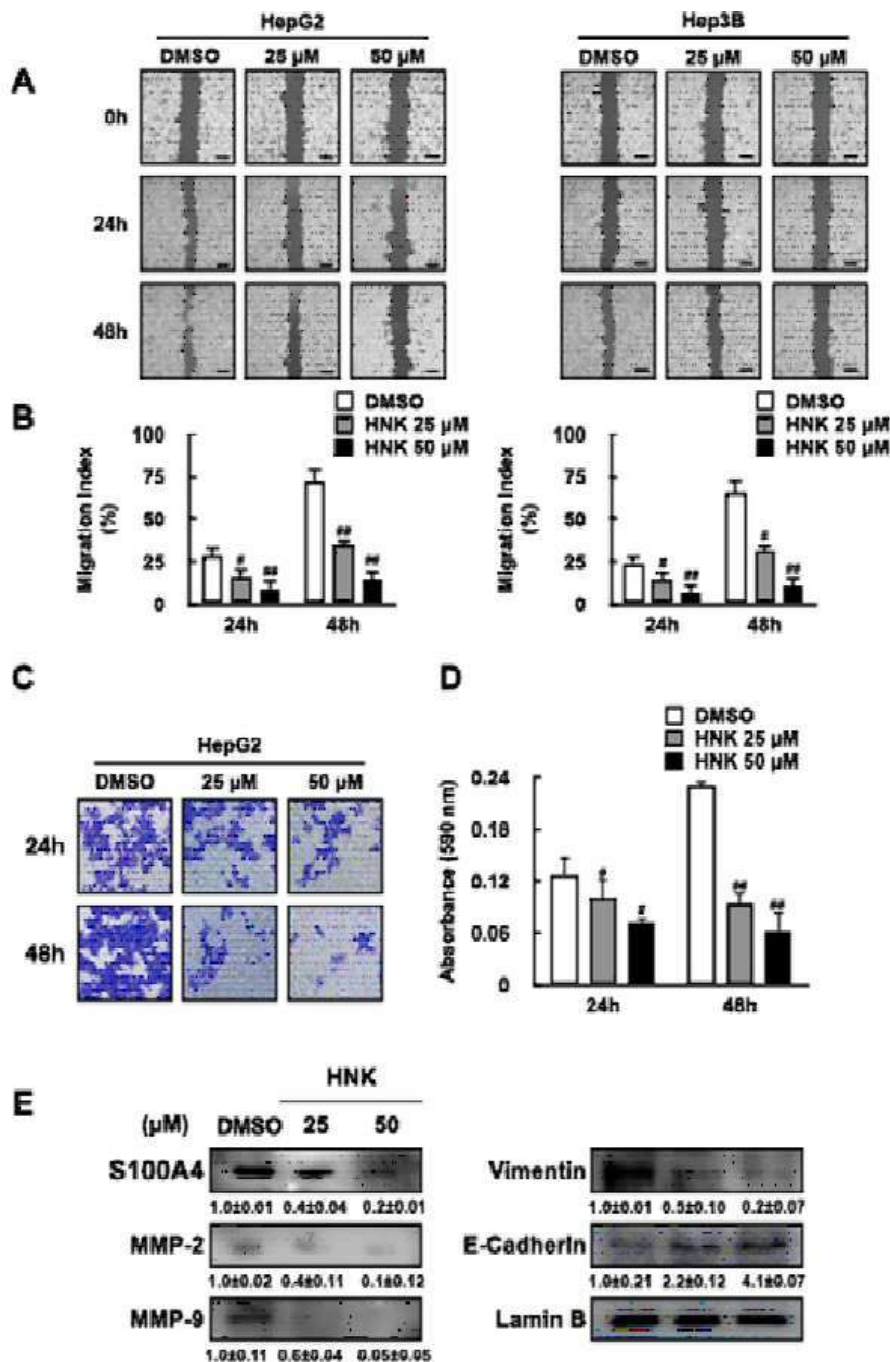
사멸을 유도하며, 세포 이동을 감소시킨다는 것을 의미한다. 따라서 본 발명의 호노키올은 Cyclophilin B의 억제제로 다양하게 활용될 수 있다.

[0141]

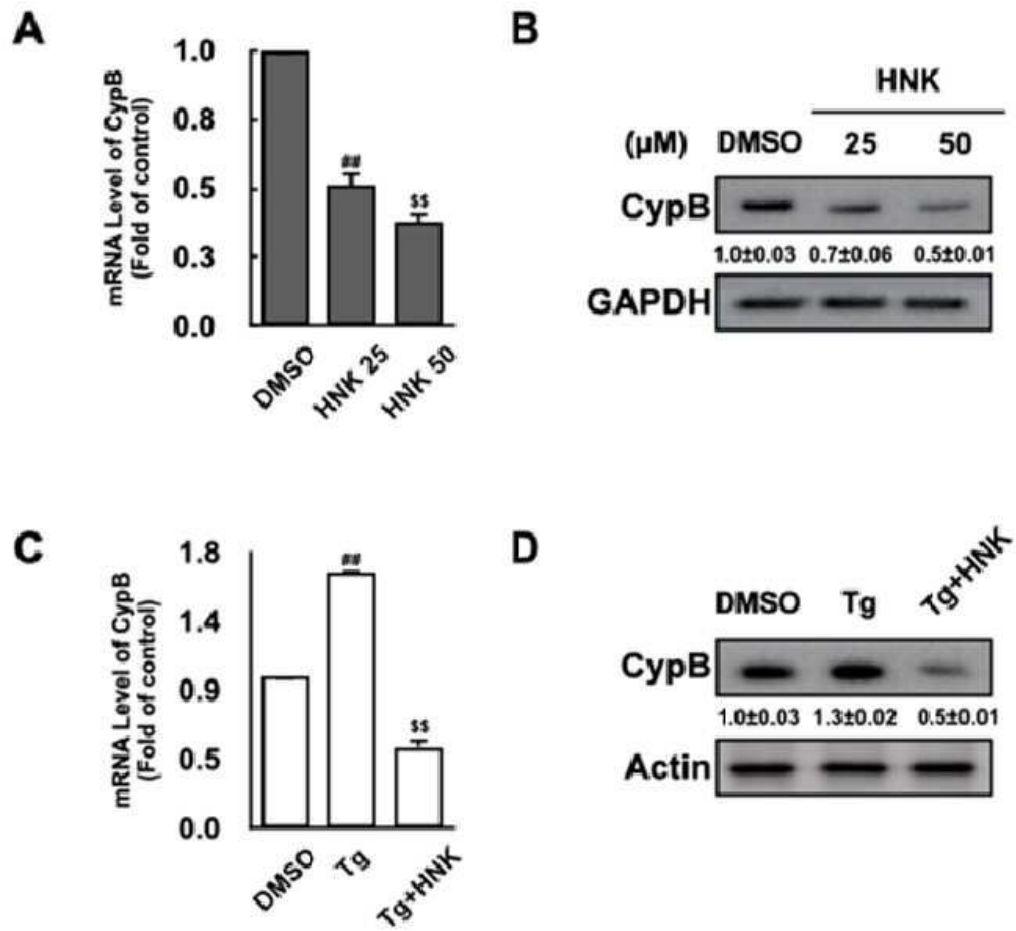
이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

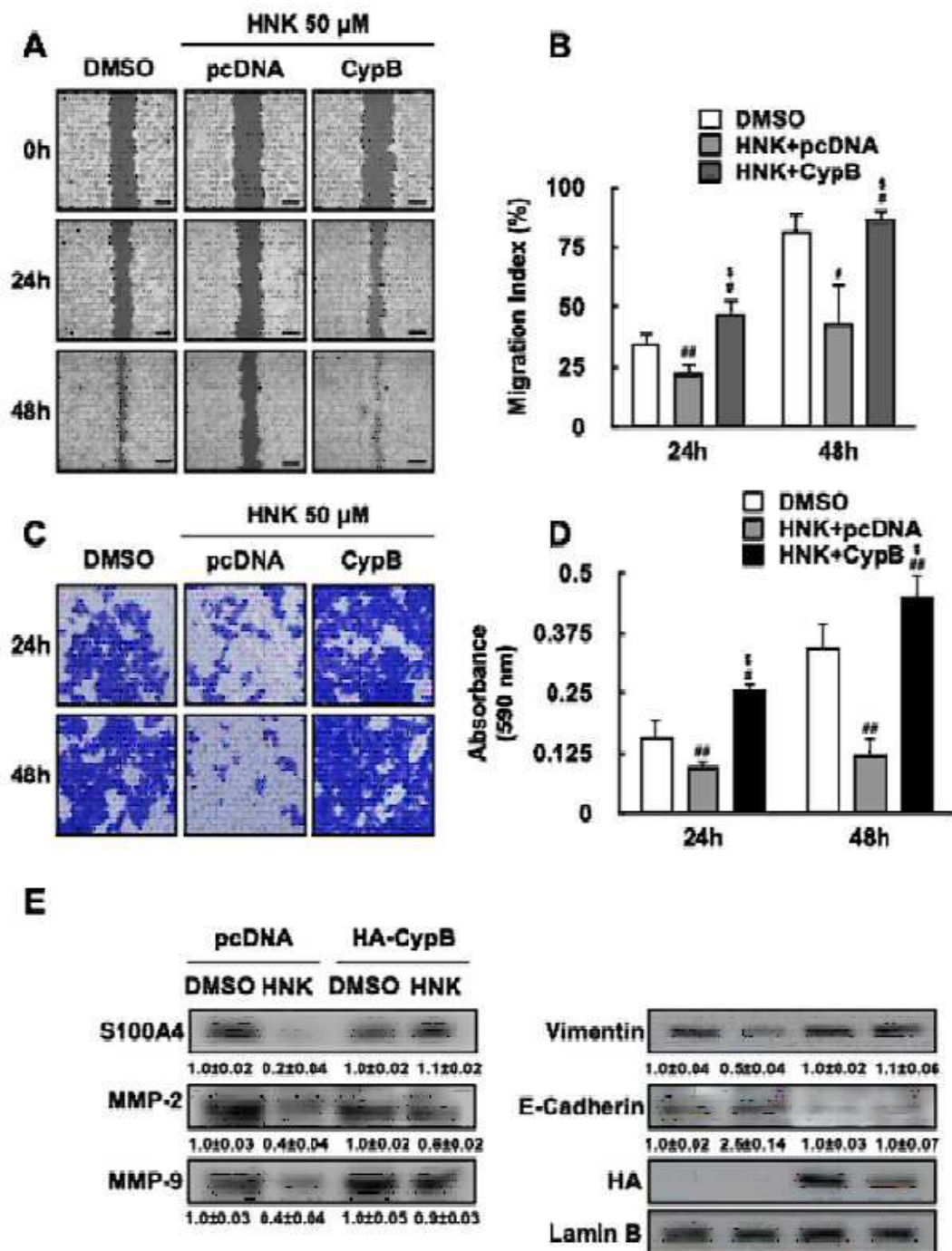
도면1



도면2



도면3



도면4

