



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0098650
(43) 공개일자 2019년08월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A61K 38/191 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0018830
(22) 출원일자 2018년02월14일
심사청구일자 2018년02월14일
- (71) 출원인
(주)카이언바이오텍
서울특별시 구로구 가마산로 226 ,
고려구로빌딩2층,204호(구로동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
- (72) 발명자
이대희
경기도 용인시 처인구 고진로27번길 28-5
오상철
서울특별시 강남구 남부순환로 2914번지 7동 602
호(개포 우성아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
조희원

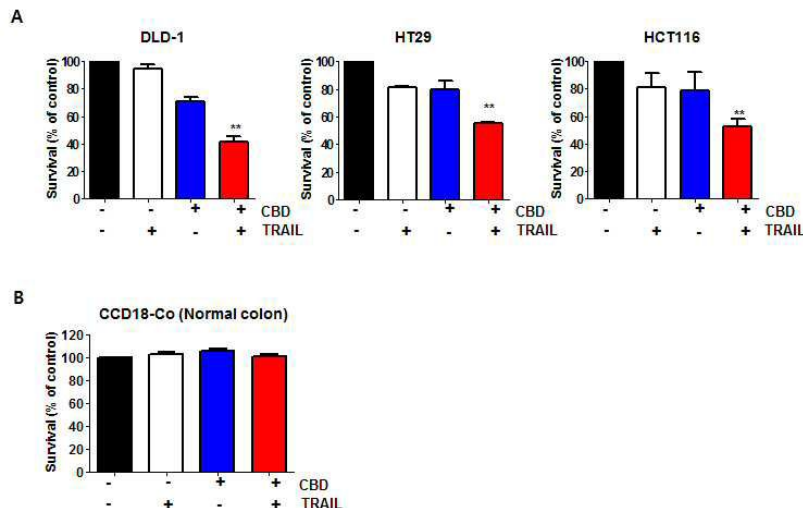
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 대마로부터 추출된 칸나비디올 추출물 및 트레일을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 칸나비디올 추출물 및 트레일(TRAIL: tumornecrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 상기 칸나비디올 추출물에 트레일을 병용 사용함으로써 정상 세포에 대한 안정성을 확보하는 동시에 세포 사멸 민감도를 현저히 높여 항암효과를 높일 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

이선일

서울특별시 서초구 전원말8길 5-4(방배동)

김보람

서울특별시 구로구 구로중앙로 137(구로동) 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0566291

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 연구마을

연구과제명 천연물 (CBD)를 이용한 항암보조제 및 병용의약품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)카이언바이오텍

연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1665

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구역량 강화지원

연구과제명 바이오메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

칸나비디올(cannabidiol) 추출물 및 트레일(TRAIL: tumornecrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 물, 탄소수 1내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득된 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물의 농도는 0.1 내지 0.4 mg/ml인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 전체 조성물 중 0.00001 내지 30 중량% 로 함유되는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 트레일은 전체 조성물 중 0.0005 내지 50 중량% 로 함유되는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 칸나비디올 추출물은 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 트레일은 칸나비디올로 대장암 세포주의 세포사멸 민감도를 향상시키는 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 칸나비디올 추출물 및 트레일(TRAIL: tumornecrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 우리나라의 대장암 발병률은 세계 1위를 차지하고 있으며 노령화 사회가 되고 서구화된 식습관에 의해 대장암의 증가는 더욱 가속화 되고 있다. 그에 따라 많은 사회 비용이 초래되며 대장암 치료에 사용할 수 있는 약제의 수가 많지 않아 대장암에 대한 적극적인 연구가 반드시 필요하다. 대장암에는 현재 옥살리플라틴, 이리노테칸 같은 항암제와 세특시주맵이나 베마시주맵 같은 항체 치료제를 병용하여 사용하고 있으나 암세포 뿐만 아니라 정상 세포에도 치명적일 뿐만 아니라 항암제 내성이 생겨 치료에 어려움이 있으며 완치 후에도 재발률이 높아 그 위험률이 더욱 심각하다고 할 수 있다. 이러한 관점에서 지금보다 더욱 나은 대장암 치료법 개발을 위해서는 새로운 약제를 발굴하고 개발해야 한다.
- [0003] 칸나비디올(CBD: cannabidiol)은 대마(Cannabis)의 주된 성분 중 하나로 테트라하이드로칸나비디올(THC: Tetrahydrocannabinol)와 함께 많이 비교되는 물질이다. 우리나라의 경우 마약류로 지정되어 많은 연구가 이루어지고 있지 않으나 외국의 경우 통증이나 기억 장애, 불안 등의 증상 완화를 위한 의료용으로 실제 사용하고 있을 뿐만 아니라 활발한 연구가 이루어지고 있는 물질이다.
- [0004] CBD는 THC와 유사한 구조를 가지나, THC는 흥분을 유도하고 일부 암에서 세포 사멸 효과가 있다고 알려져 있는 반면 CBD는 THC에 비해 연구가 많이 되어있지 않고 흥분을 유도하지 않는다고 알려져 있다.
- [0005] 또한, THC와 CBD 모두 cannabinoids receptor (CB1, CB2)와 결합하여 작용하며 THC는 직접적으로 receptor와 결합하지만 CBD는 간접적으로 receptor에 결합하여 작용한다고 보고 되어 지고 있다.
- [0006] CBD가 receptor에 결합하면 Ceramide를 만들어 ER stress를 통한 Autophagy, 세포 사멸을 유도하고 ERK를 통한 cell cycle arrest 유도를 할 수도 있다.
- [0007] 전 세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나인 암은 서구화된 식습관과 함께 평균 수명의 연장으로 발병률이 더욱 증가할 것으로 전망되고 있다. 특히 우리나라 대장암의 경우 세계에서 가장 많이 발병하는 것으로 조사되었고 치료제의 경우에도 더 이상의 진전 없이 현재에 머물러 있기 때문에 새로운 치료제의 개발이 시급하다고 할 수 있다.
- [0008] 이에 대장암의 사멸을 유도하고 현재 사용되고 있는 치료제와 병용하였을 때 치료제의 효과를 더욱 높일 수 있는 새로운 치료제 및 치료방법으로서 CBD를 이용하는 기술 개발에 대한 관심이 커지고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2013-0067248호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이에 본 발명자들은 천연물 중에서도 한방이나 민간 요법으로 많이 사용하는 약재들 중에서도 대마 유래의 칸나비디올(cannabidiol) 추출물이 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하며, 또한, 트레일(TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)과 병용하여 사용시, 세포사멸 민감도를 높여 대장암 예방 또는 치료에 더욱 효과적이라는 것을 확인하게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 칸나비디올 추출물 및 트레일을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 칸나비디올(cannabidiol) 추출물 및 트레일(TRAIL: tumornecrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 칸나비디올 추출물은 물, 탄소수 1내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득할 수 있다.
- [0014] 상기 칸나비디올 추출물의 농도는 0.1 내지 0.4 mg/ml일 수 있다.

- [0015] 상기 칸나비디올 추출물은 전체 조성물 중 0.00001 내지 30 중량% 로 함유되는 것일 수 있다.
- [0016] 상기 트레일은 전체 조성물 중 0.0005 내지 50 중량% 로 함유되는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 칸나비디올 추출물은 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 트레일은 칸나비디올로 대장암 세포주의 세포사멸 민감도를 향상시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 칸나비디올 추출물 및 트레일을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 대장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 상기 칸나비디올 추출물에 트레일을 병용 사용함으로써 정상 세포에 대한 안정성을 확보하는 동시에 세포 사멸 민감도를 현저히 높여 항암효과를 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 대장암 세포주 및 대장 정상 세포에 대하여, TRAIL과 CBD가 세포성장에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- 도 2는 대장암 세포주 및 대장 정상 세포에 대하여, TRAIL과 CBD 의 병용 사용이 세포성장에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 대장암 세포주에 대하여 TRAIL과 CBD 병용 사용시 CBD에 의해 TRAIL의 민감도의 향상 정도에 대한 실험 결과이다.
- 도 4는 TRAIL과 CBD의 병용 사용시 세포 사멸 민감도 향상 인자를 확인하기 위한 실험 결과이다.
- 도 5는 대장암 세포주에서 CBD에 의한 ER stress로부터 유도되는 Chop의 증가를 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명은 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 대마로부터 추출물 칸나비디올 추출물 및 트레일을 함유하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에서 "대장암(colon cancer)"이란 대장에 생긴 암세포로 이루어진 악성 종양을 의미하며, 크게 유전적인 요인과 식이로 나눌 수 있다. 음식 그 자체가 직접적인 발암물질을 포함하고 있지 않더라도, 우리가 음식물을 섭취하고 몸에 흡수되는 과정에서 발암물질이 생겨날 수도 있는데, 이는 식이성분을 대사시키는 과정에서 장내 세균이 생산하는 효소에 의해 섭취 음식물이 발암물질로 전환될 수 있기 때문이다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 칸나비디올 추출물은 대마의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 추출된 것일 수 있으며, 특히, 대마의 잎으로부터 추출된 칸나비디올 추출이 대장암 세포에 대한 세포사멸 유도 효과 측면에 있어서 유리할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 칸나비디올 추출물은 물, 탄소수 1내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출된 것일 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 상기 칸나비디올 추출물의 추출 용매로서 에탄올, 특히 70% 에탄올을 추출 용매로 하여 추출된 칸나비디올 추출물의 경우 인체에 대한 독성과 부작용을 최소화할 수 있다는 측면에서 유리할 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 칸나비디올 추출물의 농도는 0.1 내지 0.4 mg/ml, 바람직하게는 0.1 내지 0.3 mg/ml, 보다 바람직하게는 0.1 내지 0.2 mg/ml일 수 있으며, 상기 칸나비디올 추출물의 농도가 상기 범위 미만이면 대장암 세포에 대한 세포사멸 효과가 미미할 수 있으며, 상기 범위 초과이면 인체에 대한 독성과 부작용이 증가할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 칸나비디올 추출물의 함량은 전체 약학 조성물 중 0.00001 내지 30 중량%, 바람직하게는 0.00001 내지 20 중량%, 보다 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량% 만큼 포함될 수 있다. 상기 칸나비디올 추출물의 함량이 상기 범위 미만이면 대장암 세포에 대한 세포사멸 효과가 미미할 수 있으며, 상기 범위 초과이면 인체에 대

한 독성과 부작용이 증가할 수 있다.

- [0031] 일반적으로, TRAIL은 임상 적용 시 비교적 안전하고 유망한 death ligand이나, 최근 들어 TRAIL에 의한 세포 사멸 민감도가 암세포에 따라 다르며, TRAIL receptor가 발현되는 암세포들 중에서도 TRAIL에 저항성이 있는 암세포가 많다고 보고 되었다. 또한 TRAIL을 암세포에 지속적으로 처리하면 처음에는 TRAIL에 감수성을 보이던 암세포주도 TRAIL에 저항성을 가지게 된다는 보고도 있다.
- [0032] 이러한 문제점을 극복하기 위해 세포에 거의 독성을 유발하지 않는 농도의 TRAIL을 다른 기존의 doxorubicin, cisplatin 등과 같은 항암제를 같이 혼합하여 처리하면 TRAIL에 대한 감수성을 증가시켜 apoptosis를 효과적으로 유도할 수 있다고 보고되었다. 그러나 이들 항암제 또한 세포 독성을 나타내므로 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 극심한 손상을 유발한다는 문제점이 있다. 이러한 이유로 인해 세포 독성이 약하며 TRAIL sensitizing 효능이 있지만 정상세포에 대한 독성을 최소화할 수 있는 새로운 암 화학예방법 제제를 발굴하여 TRAIL과의 병합 처리에 이용하고자 하는 연구가 진행 되어야 한다.
- [0034] 특히, 전술한 바와 같은 칸나비디올과 트레일을 병용 사용하는 약학 조성물에 의해 정상세포에 대한 독성을 최소화하면서 항암효과를 극대화할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 트레일의 함량은 0.0005 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 45 중량%, 보다 바람직하게는 0.005 내지 40중량%일 수 있으며, 상기 트레일의 함량이 상기 범위 미만이면, 칸나비디올의 세포 사멸 민감도 향상 효과가 미미하고, 상기 범위 초과이면 안정성에 문제가 있을 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 보다 효과적인 예방 또는 치료를 위하여, 본 발명의 약학 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여함이 바람직하고, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게 상기 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 경피흡수제, 젤제, 로션제, 연고제, 크림제, 첩부제, 카타플라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 현탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 붕대 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61(tween 61), 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명은 또한 상기 약학 조성물을 대장암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장암의 치료 방법을 제공한다.

- [0042] 상기 조성물, 대장암 및 치료에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0043] 상기 치료 방법은 구체적으로 상기 조성물을 약학적 유효량으로 대장암 의심 개체 내에 투여하는 것을 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 면역억제 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 비 경구 주입에는 근육 내, 정맥내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 바람직한 투여방식은 정맥 주사, 피하주사, 피내주사제, 근육주사 및 점적 주사이다.
- [0044] 본 발명의 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 자외선이 처리된 벼 잎의 추출물은 암세포에 대하여 높은 성장억제 효과를 나타내므로, 상기 칸나비디올 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 대장암 의심 개체에 투여하여, 대장암의 발생 또는 진행을 막아 대장암을 치료할 수 있다.
- [0045] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예로 한정되는 것은 아니다.
- [0046]
- [0047] **실시예 1: 칸나비디올 추출물 제조**
- [0048] 대나무 잎과 줄기 부위를 분말화하여 100g의 대마 분말을 얻었다. 이를 1000g의 에탄올에 침적시키고, 40℃에서 48시간동안 용출시켰다. 이어서, 원심분리기로 고형분을 분리한 후 분리된 상등액을 취하여 여과하였다. 이를 통상적인 감압 농축 방법에 준하여, 농도가 0.15 mg/ml인 칸나비디올 추출물을 얻었다.
- [0050] **실시예 2: TRAIL 준비**
- [0051] 트레일(TRAIL)은 코마 바이오테크(KOMA Biotech, Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.
- [0053] 하기 비교실험예 1 및 실험예 1내지 3에서는, CBD와 TRAIL의 병용 사용이 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 하기와 같은 방법에 의해 실험을 실시하였다. 하기 실험예 1 내지 5에서 사용된 세포주들은 모두 ATCC(Manassas, 미국)에서 구입하였다.
- [0055] **[실험방법]**
- [0056] **1) 대장암 세포에서 TRAIL과 CBD 처리에 따른 Cell proliferation 측정**
- [0057] 가. TRAIL과 CBD 처리
- [0058] ① 대장암 세포주에 TRIL 6 μ M 및 CBD 4 μ M로 처리한다.
- [0059] ② MTS solution을 넣어 4시간 반응 후 550nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 확인한다.
- [0060]
- [0061] **2) 대장암 세포에서 CBD와 TRAIL에 의해 유도된 세포사멸 증가**
- [0062] 가. CBD와 TRAIL 병용 시 콜로니 형성능력 저해됨을 확인
- [0063] ① 대장암 세포주 (DLD-1)를 seeding 한다. CBD (4 μ M), TRAIL (10 μ g/ml) 처리한다.
- [0064] ② 14일 후 콜로니가 형성되면 염색하여 확인한다.
- [0066] 나. CBD 처리 시 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 확인 - 플로우 사이토메트리(Flow cytometry)
- [0067] ① 대장암 세포주 (DLD-1)를 seeding 한다. 24시간 후 CBD (4 μ M)을 처리한다.

- [0068] ② 20시간 후 TRAIL (10 μ g/ml)을 4시간동안 처리 후 하비스트 한다..
- [0069] ③ Annexin V-FITC(Enzo Life sciences社), PI(propidium iodide)를 염색하여 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 확인한다.
- [0071] 다. RUNX3 과발현 세포주에서 TRAIL에 대해 민감성이 증가함을 단백질 수준에서 확인 - 웨스턴 블롯팅(Western blotting)
- [0072] ① 대장암 세포주 (DLD-1)를 seeding 하고, 24시간 후 CBD (4 μ M)을 처리한다.
- [0073] ② TRAIL 처리 4시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting 을 실시한다.
- [0074] ③ 세포 사멸에 관련한 marker를 사용하여 발현의 변화를 확인한다.
- [0076] **3) 대장암 세포에서 CBD 처리 시 DR5 발현 증가**
- [0077] 가. CBD 처리 시 Death receptor 단백질 발현 확인
- [0078] ① 대장암 세포주 (DLD-1)를 seeding 하고 CBD를 4 μ M로 처리한다.
- [0079] ② 24시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting 을 실시한다.
- [0081] 나. CBD 처리 시 DR5 발현 변화 확인- 면역형광법(Immunofluorescence)
- [0082] ① 대장암 세포주에 CBD 4 μ M로 처리한다.
- [0083] ② 24시간 후 3.7% formaldehyde를 넣어서 고정화시키고, triton x100으로 항체의 투과율을 높여준 후 1차 항체, 2차 항체를 붙인다.
- [0084] ③ DAPI 염색을 통하여 핵을 염색한 뒤 슬라이드에 마운팅 하여 공초점 레이저 현미경(confocal microscopy)을 통하여 DR5 발현을 확인한다.
- [0086] **비교실험예 1: 대장암 세포에서 TRAIL과 CBD각각의 단독 사용이 세포 성장에 미치는 영향**
- [0087] 도 1은 대장암 세포주 및 대장 정상 세포에 대하여, TRAIL과 CBD 각각의 단독 사용이 세포성장에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [0088] 도 1의 A 및 B를 참조하면, 대장암 세포주인 HCT116, DLD-1, HT29에 대해서, TRAIL과 CBD가 세포성장을 촉진시키는 것을 알 수 있으나, 대장 정상 세포인 CCD-18Co의 세포 성장에 대해서는 큰 영향이 없는 것을 알 수 있다.
- [0090] **실험예 1: 대장암 세포에서 TRAIL과 CBD의 병용 사용이 세포 성장에 미치는 영향**
- [0091] 도 2는 대장암 세포주 및 대장 정상 세포에 대하여, TRAIL과 CBD 의 병용 사용이 세포성장에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [0092] 도 2의 A 는 대장암 세포주인 HCT116, DLD-1, HT29에 대해서 TRAIL과 CBD을 병용하여 적용한 후 trypan blue 염색을 통해 세포 사멸 효과를 확인한 결과로서, TRAIL과 CBD 병용에 의하여 TRAIL의 민감성이 증가된 것을 알 수 있으나, 도 2의 B에 나타난 바와 같이 대장정상조직(CCD18-Co)에는 세포 사멸이 일어나지 않아 독성이 없는 것을 알 수 있다.
- [0094] **실험예 2: TRAIL과 CBD의 병용 사용에 의한 세포 사멸 효과**
- [0095] 도 3은 대장암 세포주에 대하여 TRAIL과CBD 병용 사용시 CBD에 의해 TRAIL의 민감도의 향상 정도에 대한 실험 결과이다.

- [0096] 도 3의 A를 참조하면, 대장암 세포주인DLD-1 세포주에서 TRAIL에 의한 apoptosis가 control 대비 10% 정도 증가하였는데, CBD와 병용 처리 시 TRAIL에 의한 apoptosis는 30% 이상 증가됨을 FACS analysis를 통해서 확인할 수 있다.
- [0097] 또한, 도 3의 B를 참조하면, DLD-1 세포주에서 CBD 처리 시 TRAIL 병용에 의해 Apoptosis 인자인 PARP, Caspase-3, 9, 8이 증가된 것을 알 수 있다.
- [0098] 또한, 도 3의 C를 참조하면, 이러한 apoptosis가 caspase에 의존적인 것인지 확인하기 위해 caspase 저해제를 처리한 결과, CBD에 의해 증가되었던 TRAIL의 민감도가 없어진 것을 알 수 있다.
- [0099] 이로부터, CBD에 의한 TRAIL 민감도 증가가 caspase를 통해서 일어난다는 것을 알 수 있다.

[0101] **실험예 3: TRAIL과 CBD의 병용 사용에 의한 세포 사멸 민감도 향상 인자 확인**

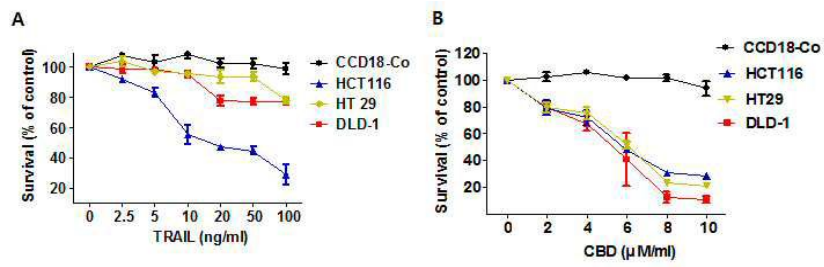
- [0102] 도 4는 TRAIL과 CBD의 병용 사용시 세포 사멸 민감도 향상 인자를 확인하기 위한 실험 결과이다.
- [0103] 도 4의 A는 대장암 세포주인 HCT116 세포주에 대해서 TRAIL과 CBD의 병용 사용시 pro-apoptotic, anti-apoptotic 단백질의 발현 수준에 대한 웨스턴 블로팅 분석결과로서, CBD 처리 시 TRAIL 민감성에 중요하다고 알려진 DR5가 증가됨을 확인하였다.
- [0104] 도 4의 B는 대장암 세포주인 HCT116 및 HT29에 대해서 TRAIL과 CBD의 병용 사용시, 웨스턴 블로팅 분석결과로서, 역시 DR5가 증가됨을 알 수 있다.
- [0105] 도 4의 C는 형광면역염색을 통해서 DR5의 발현을 확인한 결과로서, 단백질 발현과 동일하게 CBD 처리에 의해서 DR5가 증가되어져 있음을 확인하였다.
- [0106] 도 4의 D는 CBD에 의한 DR5의 증가가 TRAIL 민감도에 영향을 끼치는지 확인하고자 DR5 siRNA를 이용하여 DR5 발현을 억제한 결과, CBD에 의해 증가되었던 TRAIL 민감성이 DR5 siRNA에 의해 다시 차단됨을 FACS를 통해 확인하였다.
- [0107] 이로부터 CBD에 의한 DR5 증가가 TRAIL에 의한 세포사멸 민감도를 높여 준다는 것을 알 수 있다.

[0109] **실험예 4: 세포사멸 민감도 향상 인자의 증가에 대해 ER(endoplasmic reticulum) stress가 미치는 영향**

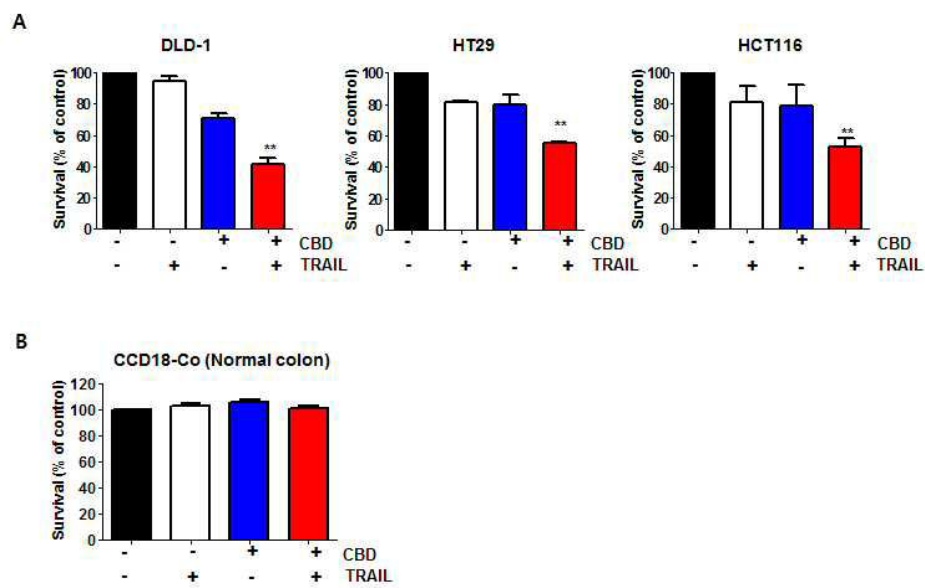
- [0110] DR5는 CHOP의 증가에 의해 증가된다고 알려져 있다. CBD에 의한 CHOP의 증가가 ER stress를 통해 증가되는지 보고자 ER Stress 관련 인자를 확인하는 실험을 실시하였다.
- [0111] 도 5는 대장암 세포주에서 CBD에 의한 ER stress로부터 유도되는 Chop의 증가를 확인한 실험 결과이다.
- [0112] 도 5의 A를 참조하면, 대장암 세포주인 HCT116에서 CBD에 의해 p-PERK이 증가하고, CHOP이 증가됨으로써 CBD가 PERK을 통해서 ER stress를 유도하고 ER stress에 의해 DR5를 증가시키는 것을 알 수 있다.
- [0113] 또한, 도 5의 B를 참조하면, 24h 동안CBD 처리에 의한 시간대 별로 PERK-EIF2 α -CHOP을 발현을 확인한 결과, 앞 시간대부터 PERK의 형광체(phosphor)가 증가되면서 CHOP이 유되는 것을 알 수 있다.
- [0114] 또한, 도 5의 C를 참조하면, CBD에 의한 CHOP의 증가가 TRAIL 민감도에 영향을 끼치는지 확인하고자 CHOP siRNA를 이용하여 CHOP 발현을 억제하였으며, 이때, CBD에 의해 증가되었던 TRAIL 민감성이 CHOP siRNA에 의해 다시 차단됨을 웨스턴블롯을 통해 확인할 수 있었다.
- [0115] 이로부터 CBD에 의한 DR5 증가가 TRAIL에 의한 세포사멸 민감성을 높여 준다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

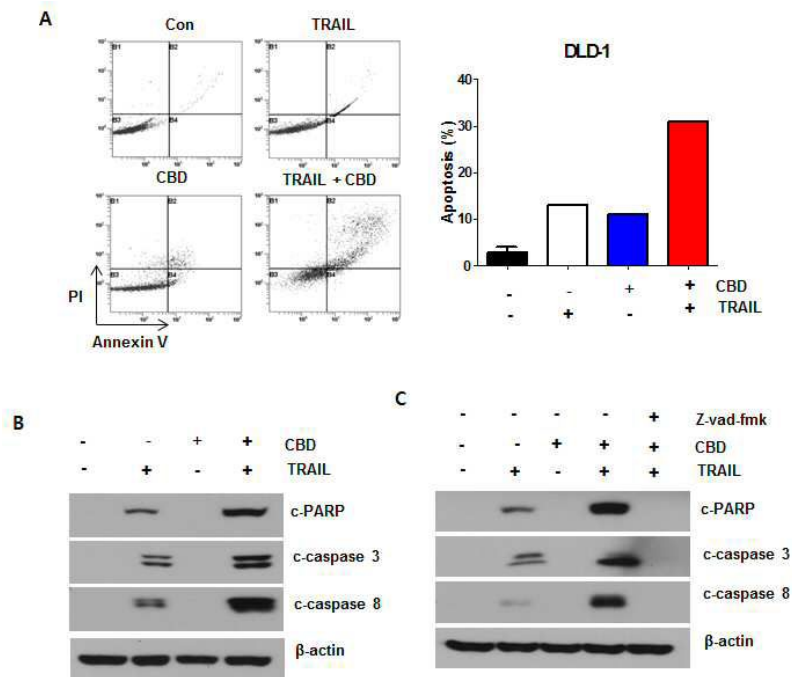
도면1



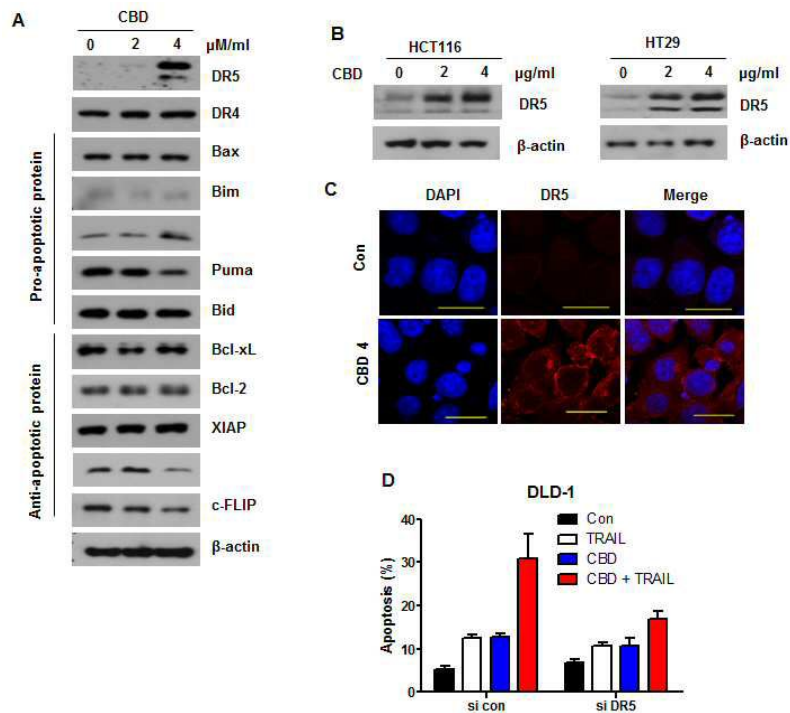
도면2



도면3



도면4



도면5

