(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0071852
(43) 공개일자 2019년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/36 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/36 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0172336
(22) 출원일자 2017년12월14일
심사청구일자 2017년12월14일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
권형주
충청북도 청주시 상당구 월평로 189 103동 506호 (용암동,용암현대1차아파트)
이근욱
서울특별시 동작구 동작대로 39 길 22, 113동 805호
(74) 대리인
구현서

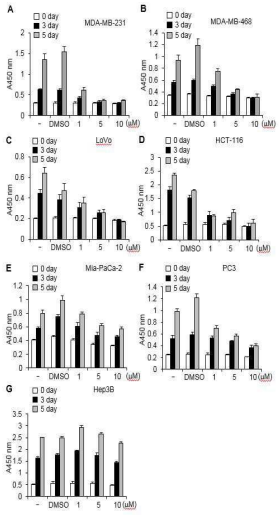
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **고미신 G 화합물을 유효성분으로 포함하는 유방암, 췌장암, 대장암 및 전립선암 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 고미신 G 화합물을 유효성분으로 포함하는 유방암, 췌장암, 대장암 및 전립선암 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.본 발명의 천연 화합물인 Gomisin G는, 유방암, 특히 TBNC 타입과, 대장암, 췌장암, 및 전립선암에 특이적인 항암 효과를 나타내어 이들 암에 대한 유용한 항암제 후보물질로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 316028-3
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발사업
연구과제명 약용작물 유효성분의 생체내 분포도 작성을 통한 신규 유용성 발굴 및 상용화
기 여 율 1/1
주관기관 건국대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

고미신 G를 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유방암은 삼중-음성 유방암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유효량은 1 내지 10 μM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

고미신 G를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유효량은 1 내지 10 μM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

고미신 G를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 유효량은 1 내지 10 μM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

고미신 G를 유효성분으로 포함하는 전립선암 예방 및 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유효량은 1 내지 10 μM인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고미신 G 화합물을 유효성분으로 포함하는 유방암, 췌장암, 대장암 및 전립선암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유방암은 선진국형 질병으로 미국에서는 가장 흔한 암으로 보고되며, 일생동안 8명의 여성 중 1명이 유방암이 발병될 수 있다. 우리나라의 경우, 전체 암에서 위암, 폐암, 간암, 대장암에 이어 다섯 번째로 2000년에는 전체 암 발생의 6.5(5,444명)를 차지했으며, 보건복지부 중앙 암등록 보고서에 의하면 2002년에는 유방암이 여성 악성종양의 16.8%를 차지하여 1위에 올랐다. 유방암의 경우 암세포가 주변 조직에 침범하거나 림프절로 전이가 시작되면 완치가 어렵기 때문에 조기발견이 다른 암보다 더욱 중요하다.

[0003] 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체 및 인간 표피 성장인자 수용체와 같은 세 분자 마커가 결핍된 유방암의 한 타입을 삼중-음성 유방암(triple-negative breast cancer;TNBC)이라 한다. TNBC를 가지는 많은 환자들은 낮은 예후 때문에 다른 암들에 비하여 생존률이 더 낮다.

[0004] 췌장암은 세계에서 가장 공격적이고 치명적인 암의 하나이다. 2012년에, 췌장암은 세계적으로 남자에서는 178,000건이 발생하여 12번째로 가장 흔한 암이었으며, 여자에서는 160,000건으로 11번째로 가장 흔한 암이었다. 같은 해에 330,000건의 사망이 보고되었으며, 이에 따라 췌장암은 암 사망 원인 중 7위이다(World Cancer Report, 2014).

[0005] 췌장암은 단일의 암 객체가 아니라 몇몇 뚜렷한 아형을 구별해야 한다. 외분비 종양이 모든 췌장암의 약 95%를 차지하며, 이에는 췌관 및 선방형 선암종, 췌관내 유두상 점액 종양(IPMN), 고형 가유두상 종양, 점액성 낭성선암 및 장액성 남선종이 포함된다. 모든 췌장암의 나머지 5%는 췌장 신경내분비 종양의 하위군에 속한다(World Cancer Report, 2014).

[0006] 췌장암은 구체적인 증상의 결여로 인해 전형적으로 진행 단계 및 흔히 이미 전이된 단계에서 진단된다. 진단 시점에서 예후는 매우 불량하여 5년 생존율은 5%이고 사망률 대 발생률 비는 0.98이다(World Cancer Report,2014).

[0007] 대장암은 세계에서도 두 번째로 발병률이 높고, 우리나라에서도 상당히 발병률이 높다. 대장암의 유발 요인은 현대화로 인한 서구형 식생활 변화에 따른 과다한 동물성 지방 섭취 및 섬유질, 칼슘 부족 등의 환경 요인과 염증질환 및 대장 용종 등의 유전적 요인이다.

[0008] 전립선암은 세계적으로 선진국에서 두번째로 흔하게 진단되는 암이며, 인간의 암 관련된 사망의 네번째 주요 원인이다. 효과적인 치료(curative treatment) 방법(modalities)은 약화시키는 것(debilitating)이며, 현재 국소화된 질병에 유일하게 활용 가능하다. 호르몬 무반응(거세-내성(resistant); 거세-내화(refractory)) 전립선암에서, 대략 1년을 넘는 연장된 생존기간을 보이는 제제는 없었다 (예를 들어 Pavlenko, M., A. K. Roos,et al. (2004). "A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer." Br J Cancer 91(4): 688-94. 참조).

[0009] 미국과 같이 고도로 개발된 일부 서방 국가에서, 전립선암은 현재 가장 흔하게 진단되는 악성 종양이며 미국(예를 들어Jemal,A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." CA Cancer J Clin 56(2): 106-30. 참조) 및 유럽(예를 들어 Thomas-Kaskel, A. K., C. F. Waller, et al. (2007). "Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer." Int J Cancer 121(3): 467-73 참조) 각각 사람들 가운데 암 관련된 사망의 세번째 주요 원인이다. 진단된 종양의 대부분은 호르몬 의존적 방식으로 초기에 증식하는 선암(adeno-carcinomas)이다.

[0010] 전립선암은 전립선, 남성 생식계 내 샘(gland)에서 발달하는 암인 질병이다. 이는 전립선의 세포가 변이되고 통제 불능의 증식을 시작할 때 발생한다. 정상적인 상대(counterparts)에 비해 전립선암 세포에 의해 과발현되는 것으로 보이는 전형적인 항원은은 PSA, PSMA, PAP, PSCA, HER-2 및 Ep-CAM과 같은 그 중에서 항원이다. 이들 전립선암은 전립선으로부터 다른 인체 부위, 특히 뼈 및 림프절로 확산(전이)될 수 있다. 전립선암은 통증, 배뇨 곤란, 발기 부전 및 다른 증상을 유발할 수 있다. 전형적으로, 전립선암은 환자의 가장 흔한 그룹을 나타내는, 50세 이상의 사람에서 가장 흔하게 발달된다. 그러나, 전립선암은 결정이 가능하더라도, 가장 흔하게 발견되지 않은채 남아있다. 전립선암의 결정은 전형적으로 신체 검사에 의해 또는 PSA(전립선 특이적 항원) 테스트와 같은 스크리닝 혈액 테스트에 의해 일어난다. 전립선암이 의심될 때 암은 전형적으로 전립선(생검)의 조각을 제거하고 현미경 하에 이를 실험함으로써 확인된다. X-레이 및 뼈 스캔과 같은 추가적 실험은 전립선암이 확산되었는지 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0012] 일반적인 암의 치료법으로는 수술, 항암화학요법, 방사선치료가 있다. 수술의 경우는 목적에 따라서 진단적 수술, 근치적 수술, 예방적 수술, 완화적 수술로 구분된다. 종양의 분류와 유형을 알기 위해서 진단적 수술을 시행하며 근치적 수술은 초기단계의 암을 치료하는 방법으로 종양을 둘러싼 림프절과 원발병소 모두를 제거하는 방법이다. 예방적 수술은 전암성 병변으로 알려진 일부 폴립 등을 미리 제거함으로써 암 예방을 도움을 주는 방법이며 완화적 수술은 종양의 크기를 감소시킴으로써 암의 증상을 완화하는 방법이다.

[0013] 우리 몸의 정상세포의 성장과 분화는 엄격하게 조절되어 있으나, 암세포의 경우 세포성장 조절에 이상을 보이며 계속적으로 증식하는 형태를 보이는 비정상적 패턴을 보인다. 그러므로 암세포 증식 억제가 중요한데 항암화학요법이 그 중 하나이다.

[0014] 암세포를 파괴하여 재발하지 못하도록 하는 암의 치료 목적으로 사용되며 완치가 가능하지 못한 암에 있어서는

암의 성장이나 암세포가 퍼지는 것을 억제하여 생명을 연장하는 목적으로 사용한다. 적용되는 약물에는 알킬화 약물과 항대사물질 등이 사용된다.

[0015] 알킬화 약물은 DNA에 직접 결합하여 DNA 분자 자체를 파괴하고 동일 나선 혹은 이중 나선 구조에 손상을 주어 암세포의 성장 및 분열을 억제한다. 대표적인 약물은 백금 화합물의 종류인 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin) 등이 있고, 니트로겐 머스타드(Nitrogen mustard)계 약물은 메클로레타민 (Mechlorethamine, nitrogen mustard), 사이클로포스파마이드 (Cyclophosphamide) 등이 있다.

[0016] 항대사물질은 정상세포의 DNA복제에 필요한 대사물질들과 유사한 구조를 가지므로 퓨린(Purine)과 피리미딘(Pyrimidine)의 생합성 효소에 정상 대사물질들과 경쟁적으로 결합하여 그 작용을 방해함으로 항암효과를 나타낸다. 대표적인 예로는 피리미딘(Pyrimidine) 유도체로 플루오로우라실(Fluorouracil, 5-FU), 카페시타빈(Capecitabine), 시타라빈(Cytarabine)등이 있으며, 퓨린(Purine) 유도체로는 메르캅토퓨린(Mercaptopurine,6-MP)이 있다.

[0017] 방사선 치료는 암세포에 방사선을 이용하여 파괴하는 방법으로 때로는 치료가 더 이상 가능하지 않을 때 환자의 증상을 완화시키는 목적으로 사용된다.

[0018] 그러나, 암 치료 방법들이 효과적으로 암의 성장을 억제함과 동시에 부작용을 초래하기도 한다. 수술의 경우는 폐합병증, 문합부(장을 자르고 이어준 부위) 누출, 장폐색, 배뇨장애, 성기능장애 등의 부작용이 나타날 수 있다. 항암화학요법 시에는 암세포 뿐만 아니라 정상세포까지 약물의 독성이 파급되기 때문에 다소간의 합병증이 나타나게 된다. 또한, 소화기 장애 및 장염, 백혈구나 혈소판 감소증, 면역억제, 피부 소양증 및 탈모, 신경계 독성, 신장 및 간독성이 있다. 방사선 치료에서도 암조직 뿐만 아니라 정상 조직에 방사선이 일부 투여되기 때문에 창상이 잘 아물지 않거나 피부괴사, 골수기능억제, 직장염 및 출혈 등이 합병증으로 나타날 수 있다.

[0019] 따라서 상기 언급한 부작용이 적으며 항암효과를 가지고 있는 천연소재의 추출물에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이며 안전하고 효능이 우수한 천연약제 및/또는 이들로부터 유래한 화합물의 개발이 요구되고 있다.

[0020] [선행 특허 문헌]

[0021] 대한민국 특허공개번호 제1020140066844호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 항암제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 고미신 G를 유효성분으로 포함하는 유방암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유방암은 삼중-음성 유방암인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유효량은 1 내지 10 μM인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0026] 또 본 발명은 고미신 G를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0027] 또 본 발명은 고미신 G를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0028] 또한 본 발명은 고미신 G를 유효성분으로 포함하는 전립선암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 고미신(Gomisin) G는 암세포의 성장을 효과적으로 억제하는 효과를 지니고 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 암의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0031] 구체적으로, 본 발명의 화합물은 유방암, 대장암, 췌장암 및 전립선암, 특히 삼중-음성 유방암 세포의 성장을 억제하는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 화합물은 이들 암의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분인 화합물의 함량은 암의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조

절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.001 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 25 중량% 이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분으로 함유되는 화합물은 약제학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등과 함께 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

[0034] 본 발명의 구현형태로써, 본 발명에 따른 화합물을 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0035] 여기에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0037] 경구투여를 위한 고형제제로 제제화되는 경우, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 가능하며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물 이외에 적어도 한 가지 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 혼합하여 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0038] 경구투여를 위한 액상제제로 제제화되는 경우, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 가능하며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0039] 비경구 투여를 위한 제제로 제제화되는 경우, 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름,에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 연령, 상태 및 체중, 암의 진행 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위하여, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분인 화합물 함량을 기준으로 성인 남성 기준 1일 0.001 mg/kg 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg 이다.

[0041] 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구로, 또는 복강내, 직장내, 정맥내, 근육내, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(Intracerebroventricular)로 주사 등에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 천연 화합물인 Gomisin G는, 유방암, 특히 TBNC 타입과, 대장암, 췌장암, 및 전립선암에 특이적인 항암 효과를 나타내어 이들 암에 대한 유용한 항암제 후보물질로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 고미신(Gomisin) G의 유방암 세포주의 증식에 대한 효과를 나타낸 그림, (A) MDA-MB-231, (B) MDA-MD-468, (C) LoVo, (D) HCT-116, (E) Mia-PaCa-2, (F) PC3, 및 (G) Hep3B 세포를 DMSO (D) 및 1μM, 5μM, 10μM

의 Gomisin G로 3일 및 5일 처리 또는 비처리하고 MTT 어세이를 수행함.

도 2는 Gomisin G가 MDA-MB-231에서 여러 신호 전달체의 변화를 매개한다는 것을 나타낸 그림, MDA-MB-231 세포를 10μM Gomisin G로 24, 48, 및 72 h 처리하고 파쇄함. 동일 농도의 단백질을 전개하고, 전기적으로 블럿팅하고 pERK, ERK, pAKT, AKT, pP38, P38, pRB, RB 항체를 사용하여 확인하였다. 로딩 대조군으로 β-actin을 사용하였다.

도 3은 Gomisin G가 induced cyclin D1 분해를 MDA-MB-231 세포에서 유도하는 것을 나타낸 그림,

(A) MDA-MB-231 세포를 10μM의 Gomisin G로 72 h을 처리하고, cyclin D1의 발현을 면역블럿팅으로 결정하였다. β-actin을 로딩 대조군으로 사용하였다.

(B) MDA-MB-231 세포를 1μM MG132로 처리하고, 10μM의 Gomisin G를 처리하였다. cyclin D1 및 ubiquitin의 발현을 면역블럿팅으로 결정하였다. β-actin을 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 4는 Gomisin G가 G1 phase에서 MDA-MB-231 세포 및 LoVo 세포에서 세포 주기 정지를 유도하는 것을 나타내는 그림, MDA-MB-231 및 LoVo 세포를 10μM의 Gomisin G로 72 시간 동안 처리하고, 세포를 PI로 염색하고 세포 주기를 FACSCalibur로 조사하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0047] 실시예 1:Gomisin G

[0048] Gomisin G은 Biopurify Phytochemicals Ltd (Sichuan, China)로부터 구입하였다. 그것의 순도는 상온에서 Agilent 1100 series high performance liquid chromatography (HPLC) 시스템[RP-C_{18} column (Gemini, 5μm, 4.6x250 mm; Phenomenex)를 가짐]을 사용하여 결정하였다. UV/VIS 디텍터(Agilent Technologies)는 220 nm에서 사용하였다. 이동상은 65% aqueous acetonitrile이고 유속은 3.0 mL/min이었다. 그것의 크로마토그램은 98% 순도를 나타내어 추가적인 정제없이 사용하였다.

[0050] 실시예 2:세포 배양

[0051] TNBC 세포 (MDA-MB-231 및 MDA-MB-468 cells), 대장암 세포 (Lovo, HCT-116), 췌장암 세포(Mia-PaCa-2), 전립선 암세포 (PC3) 및 간세포암(Hep3B)을 대상으로 하였다. MDA-MB-231, MDA-MD-468 및 PC3 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하고, LoVo, HCT-16, Mia-PaCa-2, Hep3B 세포들은 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. MDA-MB-231, MDA-MB-468 세포를 Leibovitz's L-15 배지(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. LoVo, HCT-116, PC3, Hep3B 세포를 RPMI-1640 배지(Thermo Fisher Scientific)에서 유지하였다. Mia-PaCa-2 세포를 DMEM 배지(ATCC)에서 유지하였다. 그 배지는 10% 우태아 혈청(Thermo Fisher Scientific), 100 U/mL penicillin, 및 100 μg/mL streptomycin으로 보충하였다. MDA-MB-468, LoVo, HCT-16, Mia-PaCa-2, Hep3B 세포를 37° C에서 5% CO_2 분위기에서 배양하였고, MDA-MB-231 세포는 37° C에서 CO_2 부존재에서 배양하였다.

[0052] 실시예 3:MTT 어세이

[0053] 세포의 생존률을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 조사하였다. 세포를 Gomisin G (0, 1, 5, 10μM) 및 대조군으로 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 3일과 5일 동안 처리하였다. 상기 기간 후, MTT 용액을 각 웰에 첨가하고 37° C에서 4시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 포함한 배지를 취해서 formazan 결정을 DMSO로 녹였다. 흡광도를 570 nm에서 분광계(Molecular Devices, Orleans, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0055] 실시예 4:면역블럿

[0056] 세포를 파쇄하여 14,000 rpm에서 15분 동안 4° C에서 원심분리하였다. 상등액을 SDS-PAGE를 사용하여 분리하고,

nitrocellulose 막으로 옮겼다. 막을 블럭킹하고, 여러 1차 항체로 배양하고, HRP-부착된 2차 항체를 처리하였다. 검출은 chemiluminenscence 시약 (Thermo Fisher Scientific)을 적용하여 수행하고 ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, California, USA)를 사용하여 확인하였다. poly-ADP ribose polymerase (PARP), caspase-3, phospho (p) ERK, ERK, pAKT, AKT, pP38, P38, pRB, RB, 및 cyclin D1에 대한 항체들을 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. ubiquitin 및 β-actin에 대한 항체들은 각각 Santa Cruz Biotechnology (Minneapolis, MN, USA) 및 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[0058] 실시예 5:세포 주기 분석

[0059] MDA-MB-231 및 LoVo 세포를 72시간 동안10μM Gomisin G를 처리하거나 무처리하였다. 세포를 모아서, FACS buffer (1% FBS in PBS)로 세척한 후 70% ethanol in PBS에서 밤새 4° C에서 고정화하였다. 다음, 고정한 세포를 FACS 버퍼로 세척하고 RNase (Sigma-Aldrich)로 30 분 동안 37° C에서 처리하였다. 세포들을 PI로 배양하고, FACSCalibur (BD Biosciences)를 사용하여 즉시 분석하였다.

[0061] 상기 실시예의 결과는 하기와 같다.

[0062] Gomisin G는 암세포의 성장을 억제

[0063] Gomisin G의 유방암 치료에 적용가능성을 확인하기 위하여, 먼저 MTT 어세이 및 apoptosis 어세이를 사용하여 여러 유방암 세포주에서 성장에 대한 저해 효과를 분석하였다. Gomisin G는 유방암 세포(MDA-MB-231, MDA-MD-468), 대장암 세포(LoVo, HCT-16), 췌장암 세포(Mia-PaCa-2) 및 전립선 암세포 (PC3)의 성장을 선택적으로 감소시켰으나 간암세포(Hep3B)에서는 그러하지 않았다 (도 1).

[0065] Gomisin G는 AKT 인산화를 저해함

[0066] AKT는 세포 증식을 조절하고, 여러 종양에서 과발현되므로, 세포 증식의 Gomisin G-매개된 감소에 관여하는지를 조사하였다. Gomisin G의 MDA-MB-231 세포에 처리는 여러 시점에서 AKT 인산화 수준을 크게 감소시켰다 (도 3). 전체 AKT의 단백질 수준에서 변화는 없었다. 본 발명자들은 ERK 및 P38과 같은 신호물질에 대한 효과를 더 조사하였다. Gomisin G 처리는 ERK 인산화 수준을 낮추었지만, P38 인산화 수준에서 차이는 없었다(도 3). Rb(retinoblastoma tumor suppressor protein)는 세포 주기 관련된 유전자의 발현을 조절하기 때문에, Rb의 단백질 수준을 체크하였다. Gomisin G 처리는 MDA-MB-231 세포에서 전체 Rb 수준 및 Rb 인산화를 크게 감소시켰다. 따라서, 이들 결과는 Gomisin G는 MDA-MB-231 세포의 증식을 AKT 및 Rb 인산화의 다운-조절을 통하여 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0068] Gomisin G는 G_1 phase 정지를 야기하고 cyclin D1 수준을 조절함

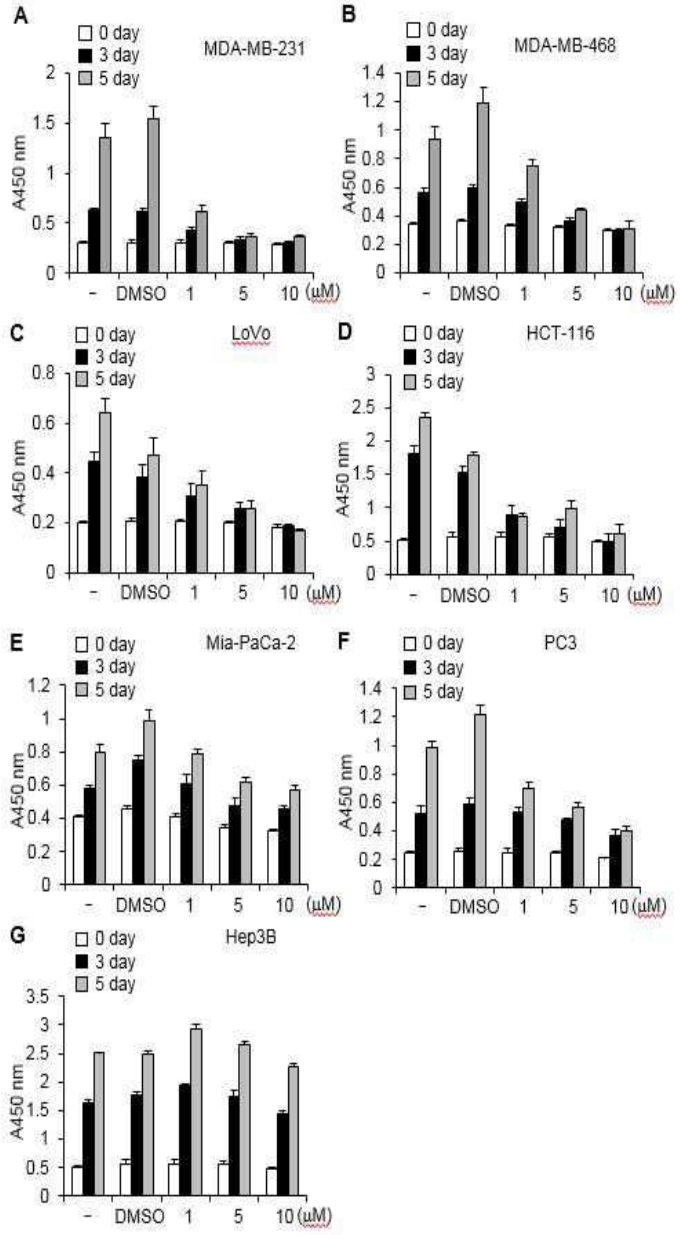
[0069] 면역블럿 분석을 사용한 Gomisin G의 cyclin D1의 수준에 대한 효과를 평가하였다. Gomisin G의 처리는 cyclin D1 수준을 level in MDA-MB-231 세포에서 현저하게 감소시켰다 (도 4A). cyclin D1 수준에서 감소 기작을 알기 위해서, MDA-MB-231 세포에 MG132, proteasome 저해제를 처리한 후, Gomisin G를 처리한 다음, 면역블럿으로 cyclin D1 발현을 조사하였다. MG132는 Gomisin-G 유도된 cyclin D1의 감소를 회복하였다(도 4B).

[0070] 또 Gomisin G의 세포주기 분포의 효과를 PI 염색을 사용하여 조사하였다. FACS 데이터는 G_1 phase에서 세포 퍼센트가 증가하고 S 및 G2/M phase가 크게 감소한 것을 MDA-MB-231 세포에서 나타내었다 (도 4A). FACS 데이터는 S-G1 (sub G_1) phase에서 세포 퍼센트가 증가하고, S 및 G2/M phase에서 크게 감소한 것을 LoVo 세포에서 나타내었다(도 4B).

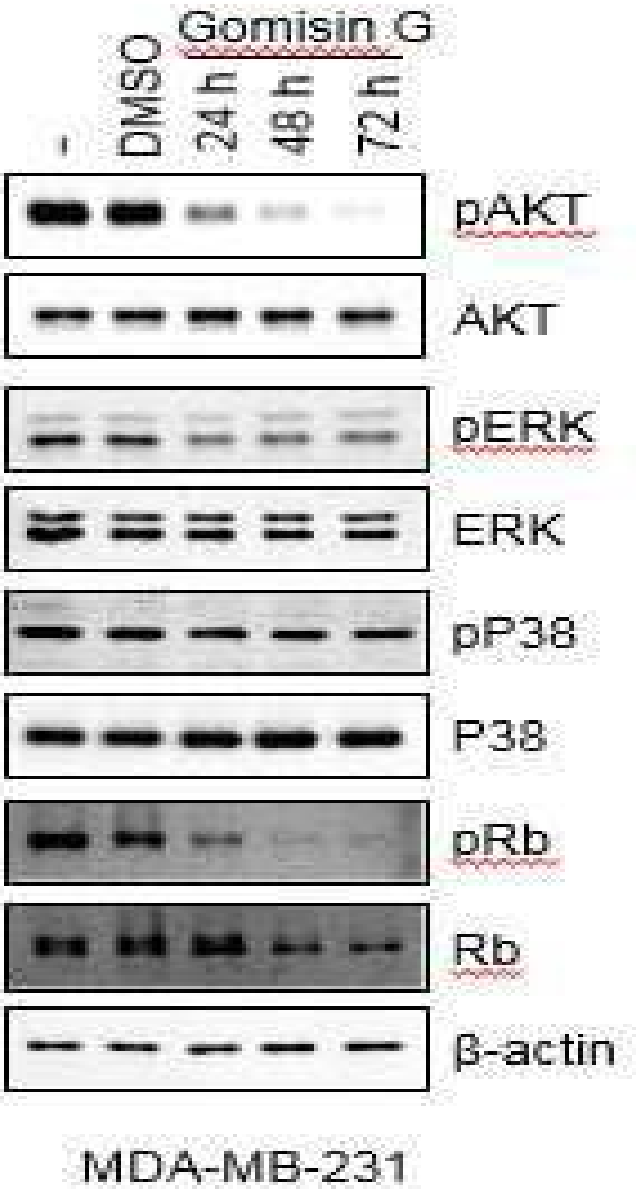
[0071] 이들 결과들은 G_1 phase에서 세포 주기 정지는 Gomisin G에 의하여 유도된 세포 증식의 감소를 설명하고, Gomisin G 매개된 cyclin D1 수준의 다운-조절은 proteasome 분해를 설명한다.

도면

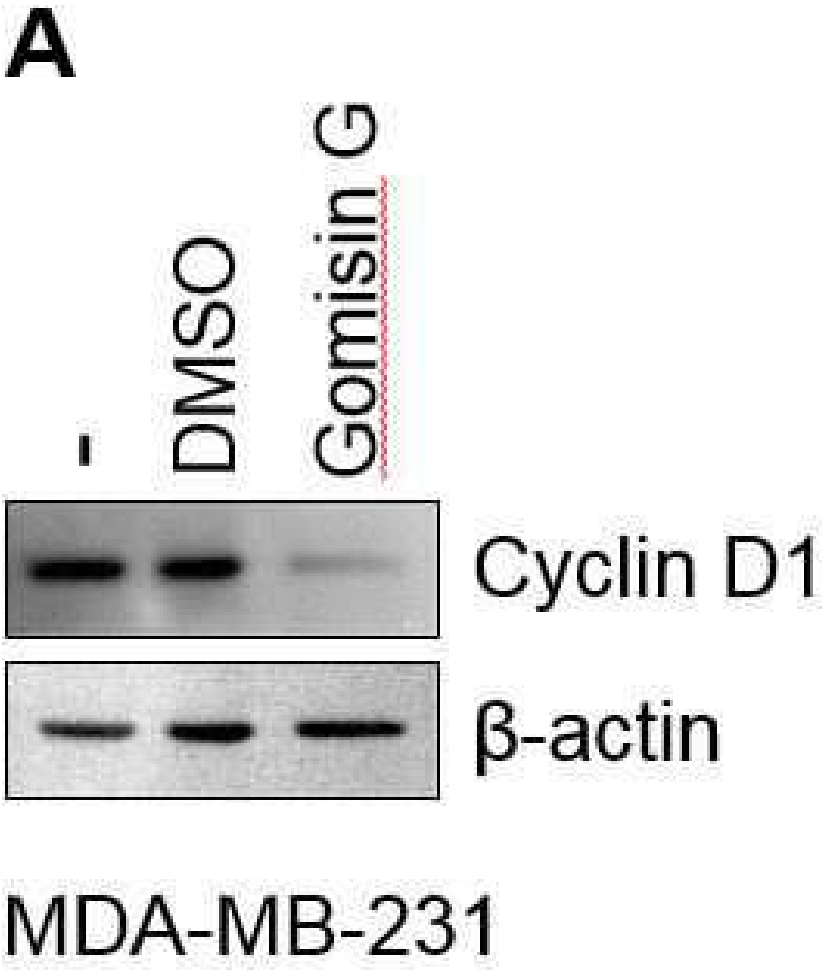
도면1


A
MDA-MB-231
B
MDA-MB-468
C
LoVo
D
HCT-116
E
Mia-PaCa-2
F
PC3
G
Hep3B
0 day
3 day
5 day
A450 nm
- DMSO 1 5 10 (μM)

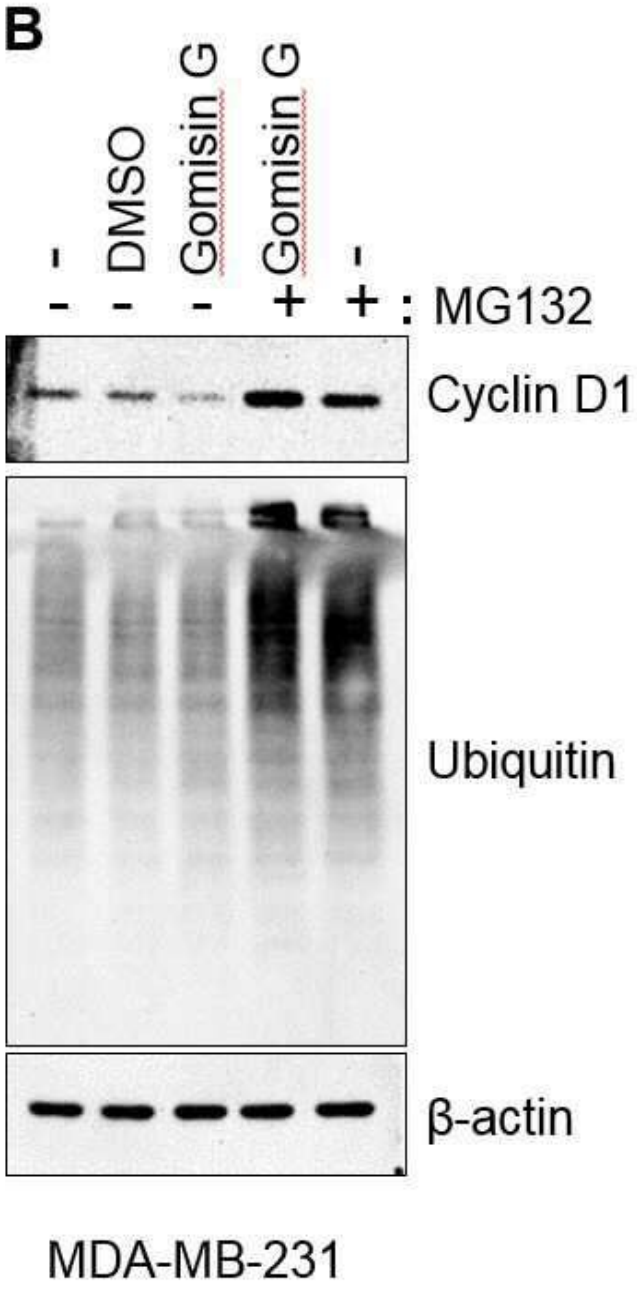
도면2


Gomisin G
-
DMSO
24 h
48 h
72 h
pAKT
AKT
pERK
ERK
pP38
P38
pRb
Rb
β-actin
MDA-MB-231

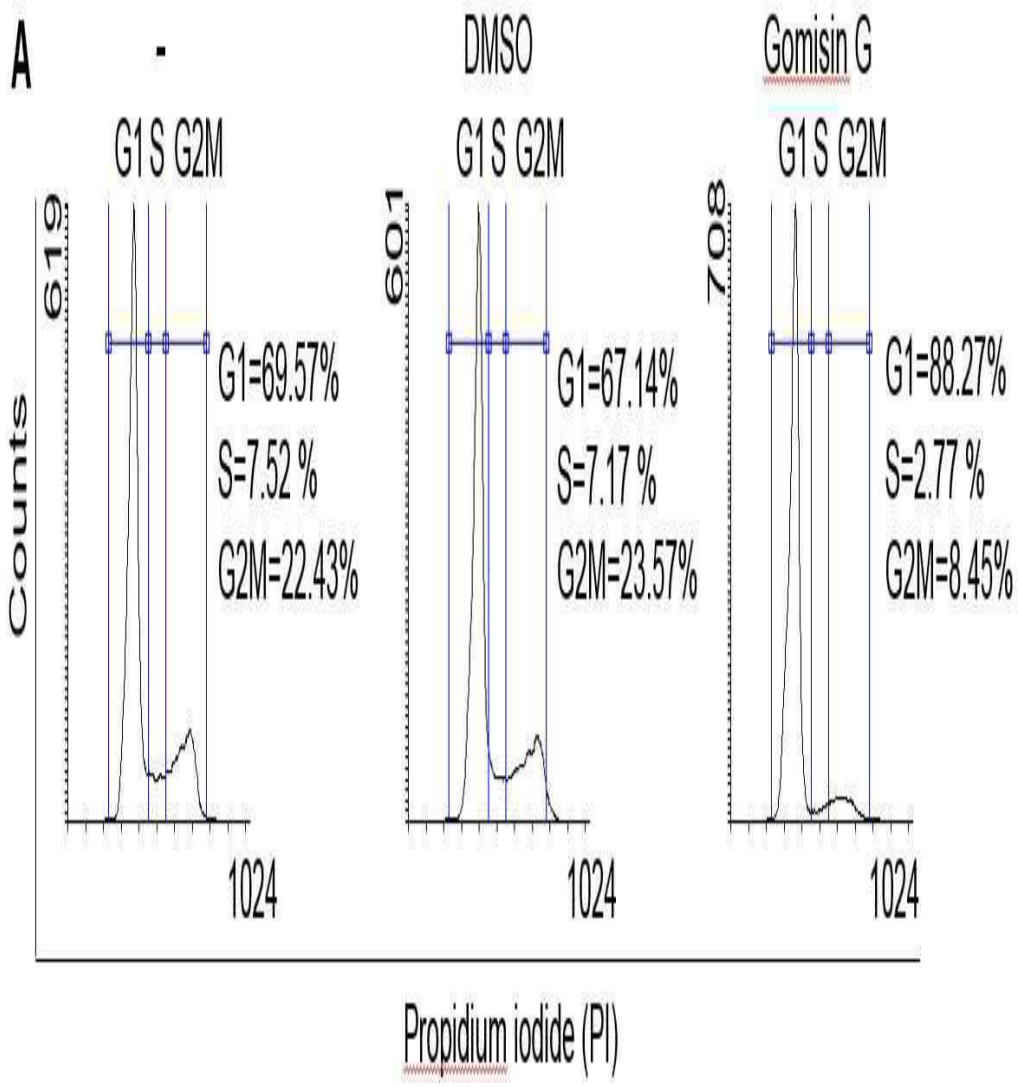
도면3a



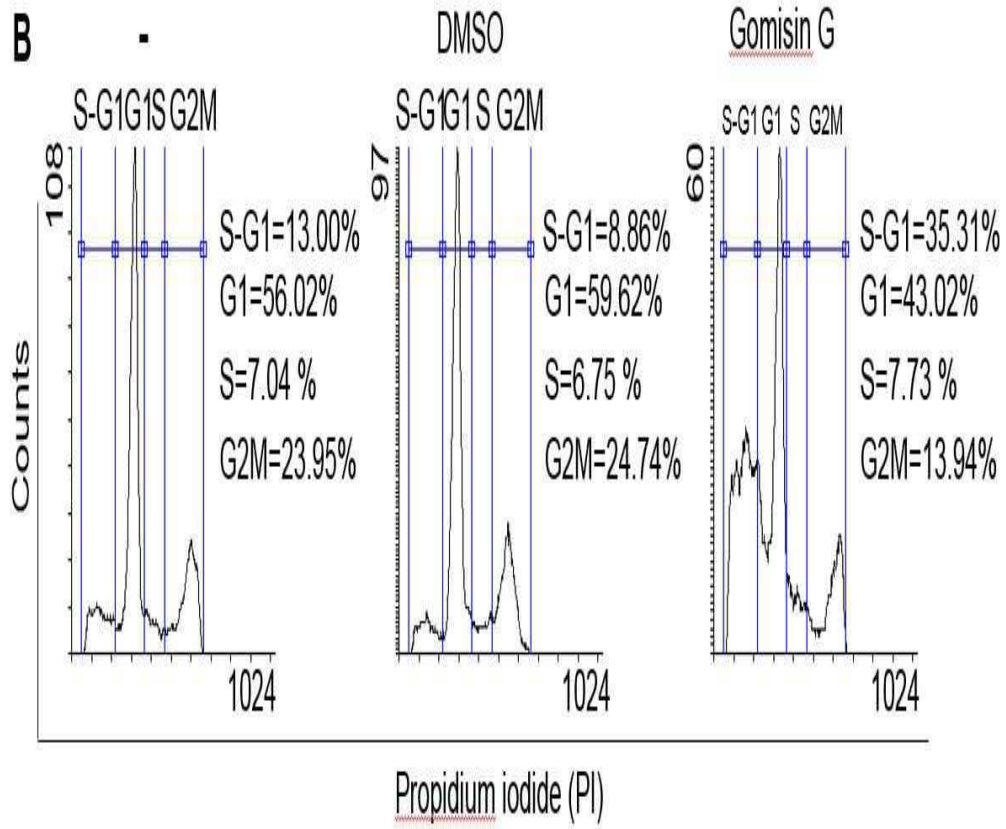
도면3b


B
-
DMSO
Gomisin G
Gomisin G
-
- - - + + : MG132
Cyclin D1
Ubiquitin
β-actin
MDA-MB-231

도면4a


A
-
DMSO
Gomisin G
G1 S G2M
G1 S G2M
G1 S G2M
619
601
708
Counts
G1=69.57%
S=7.52 %
G2M=22.43%
G1=67.14%
S=7.17 %
G2M=23.57%
G1=88.27%
S=2.77 %
G2M=8.45%
1024
1024
1024
Propidium iodide (PI)

도면4b


B
-
DMSO
Gomisin G
S-G1G1S G2M
S-G1G1 S G2M
108
97
60
S-G1=13.00%
G1=56.02%
S=7.04 %
G2M=23.95%
S-G1=8.86%
G1=59.62%
S=6.75 %
G2M=24.74%
S-G1=35.31%
G1=43.02%
S=7.73 %
G2M=13.94%
1024
1024
1024
Counts
Propidium iodide (PI)