



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 36/36 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A61K 36/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0124453
(43) 공개일자 2006년12월05일

(21) 출원번호 10-2005-0046389
(22) 출원일자 2005년05월31일
심사청구일자 없음

(71) 출원인 조선대학교산학협력단
광주직할시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀

(72) 발명자 최철희
광주광역시 남구 봉선동 502번지 라인아파트 101동1410호
김준호
광주광역시 남구 양림동 24-26

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 한국산 자생식물 중 P-당단백질에 의해 매개되는 다약물내성을 역전시킬 수 있는 화학감작효능 물질의 탐색 및분리정제

(57) 요약

본 발명은 항암제에 내성을 보이는 암세포에 대한 효과적인 항암화학요법을 실시하고자 항암제 내성에 관여하는 P-당단백질의 기능을 억제하기위해 한국산 자생식물 100종을 스크리닝하여 분리한 물질을 이용하여 화학감작제 (chemosensitizer)로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

P당단백질을 과발현하여 다약물내성을 보이는 암세포에서 화학감작효과를 나타내는 식물 변형초, 조릿대풀, 석송, 큰개불알풀 및 약모밀.

청구항 2.

1차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였을 때 용출용매 hexan: 디클로로 메탄: 메탄올=1:9:1 로 전개시켰을 때 용매 조건, 2차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였을 때 용출용매 hexan: 디클로로 메탄: 메탄올=1:45:1 로 전개시켰을 때 용매조건, 박층크로마토그래피를 실시하여 알에프(Rf)값이 0.4 이며 발색시 갈색의 색깔을 나타내는 물질.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

일반적으로 성공적인 암치료에 대한 장애 요인 중 하나로 종양세포의 다약물내성(multi-drug resistance, MDR)기전의 획득을 들 수 있다. 이러한 다약물내성은 P-당단백질(P-glycoprotein)과 다약물내성 관련 단백질(MRP)의 유전자인 인간 *MDR1*이나 *MRP* 유전자의 과발현(overexpression)에 의해 매개된다. 상기 P-당단백질이나 MRP 단백질이 과발현되면 세포내의 약물축적을 감소시켜 암세포로 하여금 다약물내성의 표현형을 갖게한다. 다약물내성 세포에서 화학감작제로 알려진 P-당단백질 저해제를 항암제와 동시에 처리하면 항암제의 효과가 증대된다. 칼슘통로 차단제(verapamil)와 면역억제제(cyclosporin A)와 같은 많은 약물들이 자신의 고유한 약리작용과는 무관하게 P당단백질(P-glycoprotein)의 경쟁적 기질로 작용하여 내성을 억제한다. 임상시험에서도 이들 약물에 의해 항암제 내성의 역전이 가능하다는 것을 보여 주고 있다. 베라파밀(Verapamil)은 다약물내성을 억제한다고 최초로 알려진 화학감작제(Tsuruo 등, 1981)로서 최근 임상시험에서도 효과가 증명되었다(Belpomme 등, 2000). 그러나 베라파밀은 내성을 억제하는 농도에서 심장독성을 초래하므로 문제가 되고 있고, 싸이클로스포린 A 임상에서 사용할 경우 고유한 면역억제, 간 및 신장 독성 때문에 화학감작제의 임상에서 사용이 제한을 받아 왔다(Raderer 등, 1993). 그러므로 부작용이 적으면서 화학감작효능이 뛰어난 2세대 화학감작제 개발이 필요한 실정이다. 이러한 목적으로 개발된 2세대 화학감작제에는 PSC833(Boesch 등, 1991), VX710(Germann 등, 1997) 등이 있다.

베라파밀, 싸이클로스포린 A를 포함하는 대다수의 화학감작제는 P-당단백질에 의해 운반되어지는 것으로 알려져있다. 즉 이들은 실질적인 P-당단백질 저해제가 아니고 경쟁적인 방법에 의해 항암제의 배출속도를 감소시키는 의사기질(pseudosubstrates)로 작용하는 것으로 보고되었다(Sikic 등, 1997).

P-당단백질에 의해 운반되어지지 않는 화학감작제를 찾기 위하여 소수성 스테로이드 및 플라보노이드에 대한 연구가 집중되고 있는데 그중에서도 플라보노이드는 새로운 종류의 화학감작제로 여겨지고 있으며, P-당단백질의 세포질 도메인 및 그의 ATP결합부위와 상호작용한다고 알려져있다(Conseil 등, 1998). 이러한 플라보노이드 화학감작제로는 갈라닌(galania), 캐프페롤(kaepferol), 퀘세틴(quercetin)이 있지만 P-당단백질-매개 다약물내성 세포에서 약한 효능을 나타내는 것으로 보고되었다. 또한 현재까지 화학감작제를 개발하기 위한 목적으로 식물로부터 화학감작제 활성을 갖는 신규 플라보노이드 화학감작제를 스크리닝하는 연구는 극히 미비한 현실이다.

본 발명자들은 한국 자생식물로부터 플라보노이드와 같은 화학감작제를 분리 정제하고자 한국산 자생식물 100종을 선택하여 화학감작제로 개발할 수 있는 식물을 선택하여 분리정제를 실시하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 한국산 자생식물로부터 우수한 화학감작제를 개발하고자 스크리닝을 실시하여 선별한 후 가장 효과가 우수한 식물에 대한 부분정제를 실시한 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 한국산 자생식물 100종을 선별하여 화학감작효과를 실시하고, 용매계통추출, 크로마토그래피 등을 실시하여 목적물질을 분리정제한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명자들은 AML-2/D100에서 한국산 자생식물 메탄올 추출물의 세포독성 및 화학감작효과를 알아보기 위하여 MTT 분석을 수행하였다. 구체적으로, 캐나다의 온타리오 암연구소에서 구입한 약물감수성세포인 AML-2/WT세포를 항암제인 도노루비신(daunorubicine)을 처리하여 도노루비신-내성AML-2세포(AML-2/D100)를 선별하여 P-당단백질을 과발현하는 양성세포주로 사용하였다(Choi 등, 1997). 모든세포는 10% 열불활성 FBS(fetal bovine serum)가 포함된 α -MEM 배지(Gibco)를 사용하여 37℃에서 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 세포들은 현탁 배양으로 유지하고, 컨플루언스(confluence)상태로 중속 배양하였다.

약물의 시험관내(*in vitro*) 세포독성은 MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma)분석(Pieters 등, 1988)을 사용하여 결정하였다. 50% 저해 농도(IC₅₀)는 처리하지 않은 대조군에 비하여 세포수가 50% 감소하였을 때의 농도로 정의하였다. P-당단백질 과발현하는 내성세포주 AML-2/D100세포는 P-당단백질의 적합한 기질인 빈크리스틴(vincristine) 120 ng/ml농도에서도 잘 자란다. 그러므로 화학감작효과는 빈크리스틴 120 ng/ml이 존재하에서 관찰하였다(Choi 등, 1999).

<실험예 1> 식물 메탄올 추출물의 항암 활성 측정

<1-1> MTT에 의한 세포독성 측정

상기 실시예 1에서 제조된 본 발명의 메탄올추출물의 항암 활성을 측정하기 위하여, 본 발명자들은 AML-2/D100 세포주를 대상으로 MTT 분석을 수행하였다. 우선 2×10^5 세포/ml 농도의 각각 세포주 90 μ l, 시료는 10 μ l씩을 96-웰 플레이트에 분주하였다. 이때, 음성 대조군으로는 배양액만을 넣은 것을 사용하였다. 플레이트를 잘 흔든 후 3일 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였고, 살아 있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 포르마잔(formazan)을 0.04 N HCl-이소프로판올 용액 100 μ l로 잘 용해시켜 ELISA 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<1-2> 약물내성을 보이는 암세포에 대한 세포독성 측정

본 발명의 메탄올 추출물이 약물내성을 보이는 암세포에 대해서도 항암 활성 나타내는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 AML-2/D100세포를 대상으로 MTT 분석을 수행하였다. 우선 2×10^5 세포/ml 농도의 AML-2/D100세포주 90 μ l씩, 시료 10 μ l, 빈크리스틴(VCR+)을 96-웰 플레이트에 분주하였다. 이때 음성 대조군으로는 빈크리스틴이 들어가지 않은 것(VCR-)을 사용하였다. 플레이트를 잘 흔든 후 하룻밤 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)-포르마잔을 0.04 N HCl-이소프로판올 용액 100 μ l로 잘 녹여서 ELISA 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<1-3> 한국산 자생식물로부터 화학감작 효과를 나타내는 식물 선별

100여종의 식물의 메탄올 추출액 20 mg에 DMSO 100 μ l에 녹인 후 PBS 2400 μ l를 넣어 희석하여 시료로 사용한다. 실험예 1-2의 방법으로 MTT를 실시한 결과 다음과 같다. 화학감작효과가 있는 식물은 화학감작효과를 나타내는 식물은 번행초(5종-14번 시료), 조릿대풀(31번 시료), 석송(39번 시료), 큰개불알풀(82번 시료) 및 약모밀(88번 시료)로 총 5가지였다.

<1-4> 화학감작효과가 우수한 석송 선택

1) 5종의 식물중 가장 우수한 화학감작효과를 보이는 석송에서 분리정제

2) 석송은 석송과에 속하는 상록성 다년생 초본으로 잎은 밀생하고, 침형으로 비스듬히 처지는데 8-9월경에 담황색의 포자를 형성하는 식물이며 한라산, 흑산도, 울릉도 등의 깊은 산속에서 자라는 식물이다. 동의학 사전에서는 맛은 쓰고 매우며, 비중, 복장근경련, 타박상, 거풍, 이뇨, 소아마비에 민간약재로 상용된다고 알려져 있다.

<1-5> 석송의 화학감작성분 분리에 관한 연구

1) 본 발명에서는 식물을 먼저 메탄올로 추출하여 hexan, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, acetone, water로 분획하였으며 6개의 분획중에서 dichloromethane으로 유효성분이 가장 많이 이행하였다. 유효성분 이행을 백분율로 환산하면 dichloromethane(30%), hexan(25%), water(20%), ethyl acetate(15%), ethanol(5%), acetone(5%)순서였다.

2) dichloromethane 분획물을 silica gel column chromatography(2.5*20cm)를 실시하였다. 평형용매는 hexan:dichloromethane=1:1, 전개 용매는 hexan:dichloromethane:ethanol=1:9:1로 전개시켰을 때 활성이 있는 물질이 용출되었다.

3) hexan: dichloromethane: ethanol=1:9:1로 용출된 부분을 농축하여 sephadex LH-20(2.0*110cm)컬럼 크로마토 그래피를 실시하였다. 분당 10ml씩 전개시켰을 때 10-20번 분획에 활성물질이 용출되었다.

4) 2차 silica gel column chromatography(2.5*20cm)를 실시하였다. 평형용매는 hexan: dichloromethane=1:1, 전개 용매는 hexan: dichloromethane: ethanol=1:45:1로 전개시켰을 때 활성이 있는 물질이 용출되었다. Prep-박층크로마토그래피(Prep-TLC)를 실시하였더니 R_f 값이 0.4이며 발색시 갈색의 색깔을 나타내었다.

5) 보통 식물에는 니코틴, 파브세틴, 리코플린, 아피게닌, 리코플라바닌, 올레인산, 시토스테린, 히드록시카페인 외 40여종이 알려져 있다.

발명의 효과

상기의 결과로부터, 본 발명은 차세대 화학감작제 개발을 위한 식물을 탐색함으로써 P-당단백질 과발현으로 인해 내성을 보이는 암세포에 유효한 화학감작제를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 100여종의 자생식물 화학감작효능 측정;

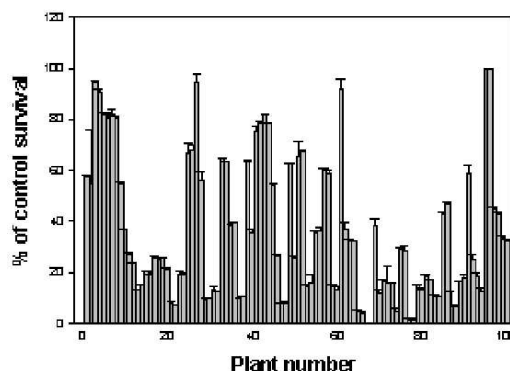
도 2는 식물에서 화학감작후보물질 계통 추출도;

도 3은 식물의 화학감작효능 측정; 및

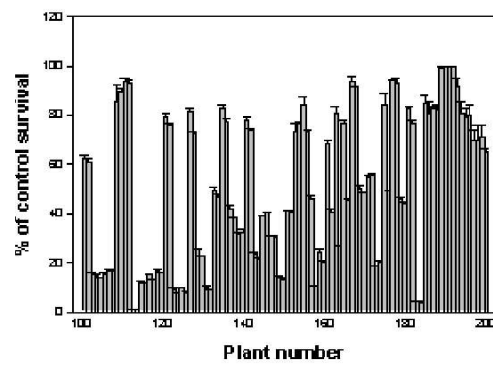
도 4는 Prep-박층크로마토그래피(Prep-TLC)후 발색된 후보물질.

도면

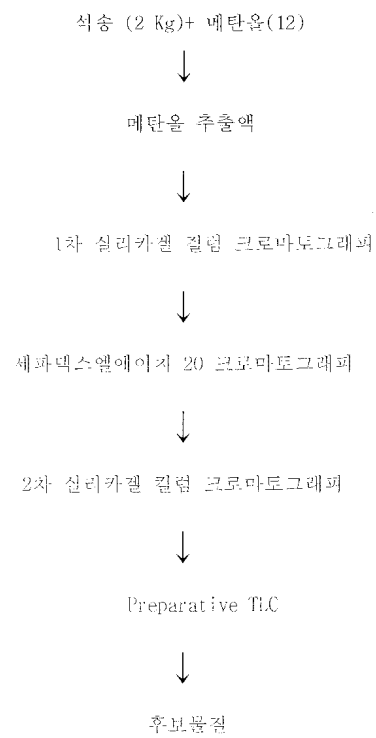
도면1a



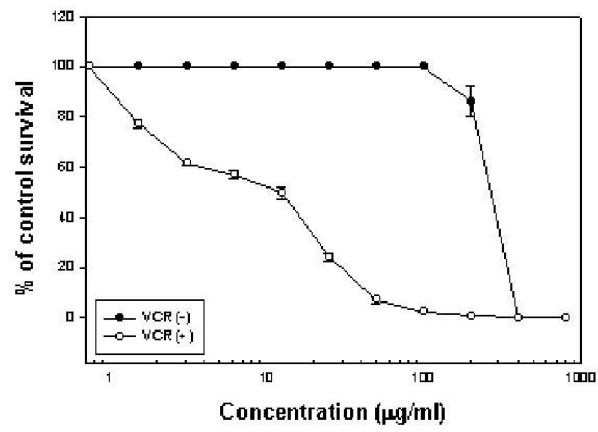
도면1b



도면2



도면3



도면4

