



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0040359
(43) 공개일자 2014년04월03일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4709 (2006.01) A61K 36/62 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0106857</p> <p>(22) 출원일자 2012년09월26일
심사청구일자 2012년09월26일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도</p> | <p>(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)</p> <p>(72) 발명자
윤진수
부산광역시 부산진구 진사로61번길 29, 12동 45호(개금동, 시영아파트)</p> <p>김군도
부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, LG메트로시티)</p> <p>최재수
부산광역시 해운대구 대천로 187, 105동 1502호(좌동, 화목아파트)</p> <p>(74) 대리인
위병갑</p> |
|--|--|

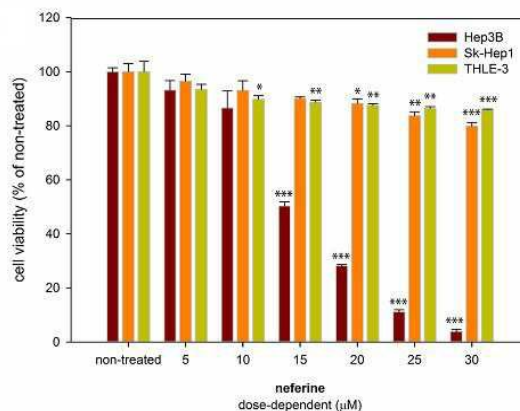
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 네퍼린을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 네퍼린(neferine)의 간암 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 네퍼린을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 네퍼린(Neferine)은 간암세포의 세포주기중지, 세포사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가질 수 있다. 특히, 네퍼린은 간암세포 중에서도 바이러스감염에 의해 유발된 간암세포에 특이적으로 세포독성을 가짐에 따라, 바이러스감염에 의해 유발된 간암세포에 최적화된 치료효과를 가진다. 따라서 본 발명의 네퍼린은 간암을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 또한 본 발명의 네퍼린(Neferine)은 특정 간암세포 외에는 세포독성을 보이지 않기 때문에, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대표도 - 도1

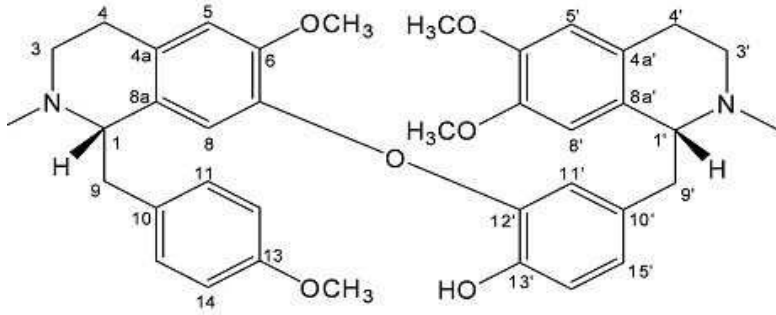


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 네페린(Neferine)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물;

<화학식 1>



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 네페린(Neferine)은 연꽃 배아로부터 유래된 것을 특징으로 하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간암은 바이러스감염에 의해 유발되는 간세포암(hepatocellular carcinoma)인 것을 특징으로 하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

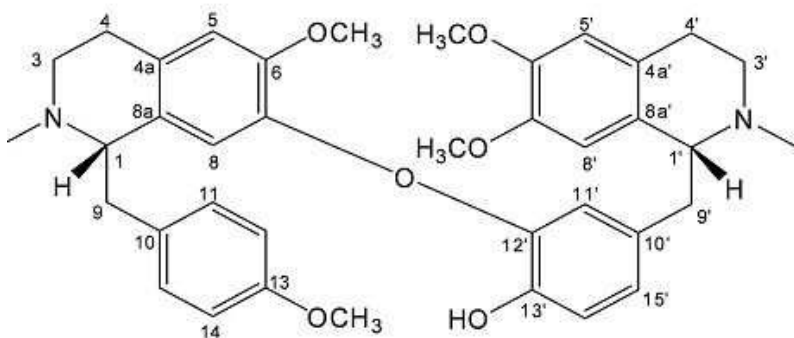
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 네페린(Neferine)을 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품;

<화학식 1>



청구항 6

제5항에 있어서,

상기 네페린(Neferine)은 연꽃 배아로부터 유래된 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 간암은 바이러스감염에 의해 유발되는 간세포암(hepatocellular carcinoma)인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 네페린(neferine)의 간암 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 네페린을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 간장은 성인의 경우 800~1,200g로 체내 최대의 장기이며 이곳에서는 여러 종류의 악성종양이 발생하는데, 간세포암과 담관세포암이 95%를 차지한다. 나머지 5%에는 소아의 간암인 간모세포종(간세포아종), 성인에서의 간세포, 담관세포혼합암, 미분화암, 담관낭포선암, 카르시노이드종양 등 극히 드문 것들이 있다.

[0003] 현재 성인 간암의 대부분(90% 이상)은 간세포암(hepatocellular carcinoma: HCC)으로 집계되고 있다. 간세포암은 해마다 50 만명이 사망하는 세계에서 5번째로 일반적인 종양이다(Okuda 2000). 간세포암 환자의 생존율은 지난 20년에 걸쳐 개선되지 않고 있으며 사망률과 거의 동일한 발병률을 지니고 있다 (Marrero, Fontana et al. 2005). 간세포암(HCC)의 평균 발증연령은 대략 55세이며, 대부분은 40~60세 사이에 상기 질환에 걸리는 것으로 조사되었다.

[0004] 간세포암의 원인은 전세계적 규모로 보았을 때 몇 가지가 있지만, 국내의 경우 대부분이 간염바이러스에 의한 감염이 원인으로 추측되고 있다. 간염바이러스는 A, B, C, D, E, F 등의 종류가 있으며, 아주 최근에 G형이 발견되었다. 우리나라에서 문제가 되고 있는 바이러스는 A, B, C의 세 종류인데, 이중 간암과 관련되는 것은 B, C의 두 종류이다. B형, C형 간염바이러스의 검사가 가능하게 된 1990년 이후의 통계에 의하면, 간암의 수술을 받은 사람들 중 85%는 B형 또는 C형 간염바이러스에 감염되어 있는 것으로 조사되었다. 이는 B형, C형 간염바이러스가 정상 간세포에 작용하여 돌연변이를 일으켜 간암으로 발전 가능성을 높이는 것으로 추정되고 있다. 따라서 우리나라의 경우에는 간염바이러스에 감염된 사람이 간염에 걸리기 쉬운 간암의 고위험군으로 분류되고 있다.

[0005] 지난 수십년 동안 간암을 치료하는 방법으로 수술, 방사선요법, 화학요법 등이 이루어져 왔고, 동시에 간암 치료제, 간염 치료제, 간염 백신 등의 연구 개발과 상품화가 진행되어 왔으나, 간암의 발생률 및 사망률은 크게 줄어들지 않고 있다. 간세포암의 치료와 관련하여, 현재까지 알려진 치료제로는 epirubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, etoposide 등이 있으나 낮은 치료 효율을 보이며, 또한 이러한 화학치료제들의 장기사용은 화학치료적 내성을 야기하는 문제점이 있다. 따라서 부작용 없이 높은 민감도를 가진 간암 치료제의 개발이 절실한 실정이다.

[0006] 한편, 네페린(neferine)은 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaerth.) 배아 유래의 주요 bisbenzylisoquinoline 알칼로이드 중 하나이다. 이러한 녹색 식물 배아 내에 풍부한 알칼로이드는 항-부정맥, 항-고혈압, 이완제, 항-당뇨, 콜린에스테라아제 억제, 진정제 및 항-다중약물내성을 포함하는 다양한 생물적 활성을 갖는 것이 보고되고 있다. 특히, 연꽃 배아는 신경질환, 불면증, 지속적인 발열 및 고혈압과 부정맥과 같은 심혈관질환을 위한 전통적 한

약제로 널리 사용되어져 왔다.

[0007] 그러나 이러한 연꽃 배아 유래의 네퍼린(neferine)이라는 화합물의 간암 예방 또는 치료 효과에 관한 연구된 바 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 연꽃 배아에서 추출·정제한 네퍼린의 약리효과를 연구하던 중, 네퍼린이 바이러스감염에 의해 유발되는 간세포암의 세포주기 진행을 중지시킬 수 있으며, 세포사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가짐에 따라 간암의 예방, 개선 또는 치료에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2009-0131720호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2011-0061108호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 바이러스감염에 의해 유발되는 간암세포에 대해 특이적으로 민감성(세포독성)이 우수하여 간암 예방 또는 치료에 효과적인 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 바이러스감염에 의해 유발되는 간암세포에 대해 특이적으로 민감성(세포독성)이 우수하여 간암 예방 또는 개선에 효과적인 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 네퍼린(Neferine)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 네퍼린(Neferine)은 연꽃 배아로부터 유래될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간암은 바이러스감염에 의해 유발되는 간세포암(hepatocellular carcinoma)일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest), 세포사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가질 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 네퍼린(Neferine)을 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 네퍼린(Neferine)은 연꽃 배아로부터 유래될 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간암은 바이러스감염에 의해 유발되는 간세포암(hepatocellular carcinoma)일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 검류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 네퍼린(Neferine)은 간암세포의 세포주기 진행을 중지시킬 수 있으며, 세포사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가질 수 있다. 특히, 네퍼린은 간암세포 중에서도 바이러스감염에 의해 유발된 간암세포에 특이적으로 세포독성을 가짐에 따라, 바이

러스감염에 의해 유발된 간암세포에 최적화된 치료효과를 가진다. 따라서 본 발명의 네퍼린은 간암을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용될 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 또한 본 발명의 네퍼린(Neferine)은 특정 간암세포 외에는 세포독성을 보이지 않기 때문에, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

도 1은 Hep3B, Sk-Hep1 및 THLE-3 암세포주 각각에 네퍼린을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 세포 생존율을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 Hep3B 세포에 네퍼린(20, 25 μ M)을 6시간 간격으로 처리한 후 DAPI 염색을 통해 세포의 핵 응축 변화를 확인한 것이다.

도 3은 Hep3B 세포에 네퍼린(15, 20, 25 μ M)을 24시간 동안 처리한 후 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 것이다.

도 4는 Hep3B 세포에 네퍼린을 농도별(15, 20, 25 μ M)로 24시간 동안 처리한 후 세포주기와 관련된 단백질들의 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 5는 Hep3B 세포에 15 μ M 농도의 네퍼린을 12시간 동안 처리한 후 면역형광분석법을 통해 검출한 p21^{Waf1/Cip1} 단백질 발현 수준을 형광현미경($\times 1000$)을 이용하여 측정하는 것이다 (p21^{Waf1/Cip1}: green, nucleic: blue, cytoskeletal actin: red).

도 6A는 Hep3B 세포에 네퍼린을 농도별(15, 20, 25 μ M)로 24시간 동안 처리한 후 미토콘드리아 막 관련 단백질 (Bim, BID, Bax, Bak, Puma) 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 6B는 Hep3B 세포에 네퍼린을 농도별(15, 20, 25 μ M)로 24시간 동안 처리한 후 세포사멸에 수반되는 apoptotic 단백질(cleaved caspase-8, -3, -6, -7 및 PARP) 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 7A는 Hep3B 세포에 15 μ M 농도의 네퍼린을 12시간 동안 처리한 후 면역형광분석법을 통해 검출한 cleaved caspase-3 단백질 발현 수준을 형광현미경($\times 1000$)을 이용하여 측정하는 것이다 (cleaved caspase-3: green, nucleic: blue, cytoskeletal actin: red).

도 7B는 Hep3B 세포에 15 μ M 농도의 네퍼린을 12시간 동안 처리한 후 면역형광분석법을 통해 검출한 cleaved caspase-8 단백질 발현 수준을 형광현미경($\times 1000$)을 이용하여 측정하는 것이다 (cleaved caspase-8: green, nucleic: blue, cytoskeletal actin: red).

도 8은 Hep3B 세포에 20 μ M 농도의 네퍼린을 처리한 후 시간 경과에 따라 소포체 스트레스 관련 샤페론 단백질 (Bip, calnexin, PDI, calpain2 및 caspase-12)의 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 9는 Hep3B 세포에 15 μ M 농도의 네퍼린을 12시간 동안 처리한 후 면역형광분석법을 통해 검출한 caspase-12 단백질 발현 수준을 형광현미경($\times 1000$)을 이용하여 측정하는 것이다 (caspase-12: green, nucleic: blue, cytoskeletal actin: red).

도 10은 GFP-LC3B 플라스미드로 형질전환된 Hep3B 세포에 20 μ M 농도의 네퍼린을 처리한 후, 시간 경과에 따라 세포질 내 자가포식소체(autophagosomes) 형성 정도를 형광현미경($\times 1000$)을 이용하여 측정하는 것이다.

도 11은 Hep3B 세포에 네퍼린을 농도별(15, 20, 25 μ M)로 12시간 처리한 후 LC3B 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

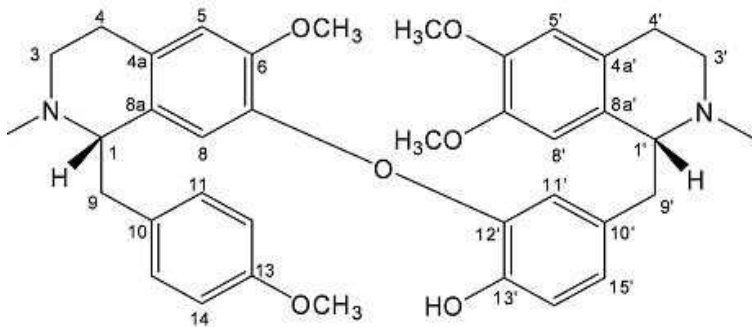
도 12A는 HUVECs 세포에 네퍼린을 농도별(10, 20, 30 μ M)로 18시간 처리한 후 튜브 형성 정도를 도립현미경($\times 40$)을 이용하여 측정하는 것이며, 도 12B는 상기 결과를 토대로 총 튜브 길이를 Wimasis Image Aalysis 소프트웨어를 이용하여 퍼센트로 변환한 그래프이다.

도 13A는 Hep3B 세포에 네퍼린을 15 μ M로 처리한 후 시간 경과에 따른 세포 이동 정도를 도립현미경($\times 40$)을 이용하여 측정하는 것이며, 도 13B는 상기 결과를 토대로 세포 이동을 Wimasis Image Aalysis 소프트웨어를 이용하여 cell-covered area퍼센트로 변환한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 네퍼린(Neferine)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0023] <화학식 1>



[0024]

[0025] 본 발명의 ‘네퍼린(neferine)’은 연꽃(Nelumbo nucifera Gaerth.) 배아 유래의 주요 bisbenzylisoquinoline 알칼로이드 중 하나이다. 네퍼린은 4-[[[(1R)-6,7-Dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-1-yl]methyl]-2-[[[(1R)-6-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-7-yl]oxy]phenol]]methyl]phenol로도 불리며, 이 물질의 분자식은 $C_{38}H_{44}N_2O_6$ 이고 분자량은 624.77이다.

[0026] 녹색 식물 배아 내에 함유된 알칼로이드는 항-부정맥, 항-고혈압, 이완제, 항-당뇨, 콜린에스테라아제 억제, 진정제 및 항-다중약물내성을 포함하는 다양한 생물적 활성을 갖는 것이 보고되고 있다. 특히, 연꽃 배아는 신경 질환, 불면증, 계속적인 발열 및 고혈압과 부정맥과 같은 심혈관질환을 위한 전통적 한약제로 널리 사용되어져 왔다.

[0027] 그러나 현재까지 네퍼린(neferine)이라는 화합물의 간암 예방 또는 치료 효과에 관해서는 연구된 바 없다.

[0028] 본 발명자들은 네퍼린이 바이러스감염에 의해 유발되는 간세포암의 세포주기 진행을 중지시킬 수 있으며, 세포 사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가짐에 따라 간암의 예방, 개선 또는 치료에 유용한 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0029] 본 발명의 하기 실험에 1에서는, 네퍼린의 암세포주에 대한 세포 독성을 확인하기 위해 Hep3B, Sk-Hep1 및 THLE-3 세포주를 이용하여 세포 생존율을 측정한 결과, Hep3B 세포주에서만 네퍼린 처리 농도에 의존적으로 세포 생존율이 두드러지게 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 네퍼린은 Hep3B 세포에 특이적인 세포 독성 민감도를 가지는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0030] 또한 본 발명의 하기 실험에 2에서는, 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 세포사멸(apoptosis)을 유도하는지를 살펴보기 위하여, DAPI 에세이를 실시한 결과, 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군과 비교하여 네퍼린을 처리한 후 6시간이 경과한 실험군에서 세포들의 응축(shrinkage) 및 파열(blebbing)과 같은 핵 막 변화가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 네퍼린 처리 후 24시간이 경과한 실험군에서 사멸세포(apoptotic cells)의 전형적인 특징인 핵 응축(apoptosome formation)이 관찰되었다(도 2 참조).

[0031] 또한 본 발명의 하기 실험에 3에서는, 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 세포주기 중지(cell cycle arrest)를 유도하는지를 살펴본 결과, 네퍼린 처리 농도(15, 20, 25 μ M)에 비례하여 sub-G1 세포 집단수가 증가되었으며(도 3 참조); 세포주기 진행의 중지를 나타내는 증거로써 세포주기와 관련된 단백질들의 발현이 조절되어지는 것이 관찰되었으며(도 4 참조); 네퍼린을 처리한 Hep3B 세포들의 세포질에서 핵 주변의 p21^{Waf1/Cip1} 단백질(세포 주기를 억제시킬 수 있는 조절자) 발현 수준이 두드러지게 증대되는 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

[0032] 일반적으로 세포주기는 세포내에서 정해진 메카니즘에 의해 일정순서 대로 이루어지고 있다. 그러나 이렇게 정해진 순서에 이상이 초래되면 세포주기의 유지는 어려워지게 되며, 세포주기의 이상이 초래되었을 때 이를 복구하는 역할을 하는 조절인자가 작용을 하게 되는데, 이러한 인자로서 사이클린(cyclin), 사이클린-의존성 키나제(cyclin-dependent kinase: 이하 간략하게 ‘CDK’라 표기함) 및 사이클린-의존성 키나제 억제제(cyclin-

dependent kinase inhibitor: 이하 간략하게 'CDKI'라 표기함)가 있다.

- [0033] 세포주기 과정에서, G1기(G1 phase) 초기에는 세포의 종류에 따라서 CDK4, 6, 8등이 활성화되어 작용하고, G1기 후기와 S기 초기에서는 CDK2가 작용하며, G2에서 M으로의 진행에는 CDK1이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CDK의 활성화에는 사이클린과의 결합이 필수적인데 CDK4, 6, 8은 사이클린 D와의 결합에 의하여 활성화되며, CDK2는 사이클린 A 및 E와 결합한다. CDK1은 사이클린 B 및 A와 결합하며, 이외에 사이클린 G, F 등이 알려져 있다. 이러한 세포주기의 각 시기에서 특이적인 cyclin-CDK 복합체가 각각 활성화되고 CDK에 특이적으로 인산화되는 단백질들이 세포주기의 진행을 담당하게 되므로 세포주기를 CDK 주기로 명명할 수도 있다.
- [0034] 또한, CDK는 사이클린의 활성화에 필수적인 인자로 작용하는데, 활성화된 CDK-사이클린은 사이클린의 조절단위와 CDK의 활성단위로 구분되어 있으며, 사이클린의 CDK 조절방법은 두 가지로 볼 수 있는데, 첫 번째가 사이클린과 CDK가 결합하여 단백질의 구조변화를 유도하여 ATP phosphate group의 배치가 기질 단백질에 전달하기 쉽게 변한다. 또한, 단백질의 기질이 CDK에 접근할 수 없도록 막고 있는 T loop의 위치가 변하여 기질의 접근이 용이해진다. CDK의 활성이 세포주기의 특정 시기에만 활성화되는 것은 세포주기 특이적으로 일어나는 사이클린 합성 때문이다. 또한, 사이클린 D는 주로 G1 중기에 합성이 최고조에 달하며 주로 세포성장인자 등의 마이토젠(mitogen)에 의하여 유도된다. 사이클린 D는 세 종류의 서브타입(D1, 2, 3)이 있는데, 세포의 종류에 따라서 발현되는 정도가 다르다. 예컨대, 사이클린 D의 합성을 저해하면 세포주기 G1이 정지되고, 사이클린 D를 과발현하면 G1기가 짧아지고 마이토젠 없이도 세포주기가 시작된다.
- [0035] 한편 p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, p27^{Kip1} 및 p21^{WAF1/Cip1}과 같은 세포주기 조절자들은 사이클린 D1/CDK4,6 또는 사이클린 E/CDK2 복합체를 억제하는 핵심 조절자로 알려져 있다. 따라서 상기와 같은 세포주기 조절자들은 negative cell cycle regulator라고 하며, 이들이 발현되는 경우 세포주기 진행이 억제될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 하기 실험에 4에서는, 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 세포사멸(apoptosis)을 유도를 살펴본 결과, 미토콘드리아-매개된 세포사멸 경로를 조절하는 것으로 알려진 Bcl-2 패밀리에 속한 단백질(Bim, Bid, Bax, Bak 및 Puma) 발현이 증대되는 것을 확인할 수 있었으며, 소포체 스트레스에 따른 세포사멸에 수반되는 apoptotic 단백질(cleaved caspase-8, -3, -6, -7 및 PARP)들의 변화가 관찰되었다(도 6 참조). 뿐만 아니라, 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군과 비교하여 네퍼린을 처리한 Hep3B 세포에서 cleaved caspase-8, 및 -3이 두드러지게 발현되는 것으로 나타나, 네퍼린에 의해 유도된 apoptosomes이 세포질에서 caspase-3 및 caspase-8을 활성화시켜 세포사멸을 야기하는 것이라 유추할 수 있었다(도 7 참조).
- [0037] 또한 본 발명의 하기 실험에 5에서는, 네퍼린의 간암세포에 대한 항암 효과로서 자가포식을 유도할 수 있는지를 확인한 결과, 네퍼린을 처리한 실험군에서 시간 경과에 따라 자가포식의 형태학적 특징 중 하나인 세포질에서의 소체(vacuole) 형성이 발생되었다. 또한 자가포식은 자가포식소체(autophagosomes)라 불리는 이중막으로 둘러싸인 소포를 형성하는데, 네퍼린을 처리한 실험군에서 시간 경과에 따라 강력한 형광 스팟(GFP-LC3B "dots")이 나타남으로써 자가포식소체 수가 세포질 내에서 증가함을 확인할 수 있었다(도 10 참조).
- [0038] 또한 본 발명의 하기 실험에 6에서는, 네퍼린의 HUVECs 세포에서 신생혈관형성 억제 효과를 실험한 결과, 네퍼린 처리 농도에 의존하여 HUVECs의 튜브 길이(px)가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0039] 또한 본 발명의 하기 실험에 7에서는, 네퍼린의 간암세포에 대한 항암 효과로서 세포이동 억제를 유도할 수 있는지를 확인한 결과, 네퍼린 처리 농도에 의존하여 세포이동이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 13 참조).
- [0040] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 네퍼린이 간암세포 중에서도 바이러스감염에 의해 유발된 간암세포에 특이적으로 세포독성을 가지며, 간암세포의 세포주기중지, 세포사멸(apoptosis) 유도, 자가포식(autophagy) 유도, 신생혈관형성 억제 및 세포이동 억제 활성을 통해 항암 효과를 가진다는 사실을 실험적으로 입증하였다.
- [0041] 그러므로 네퍼린을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 간암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있으며, 특히 바이러스감염에 의해 유발된 간암세포에 특이적으로 세포독성을 가짐에 따라, 바이러스감염에 의해 유발된 간암세포에 최적화된 치료효과를 가진다.
- [0042] 본 발명에 따른 상기 네퍼린은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유기산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유기산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한

되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

- [0043] 본 발명에 따른 네페린은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 네페린을 천연물로부터 분리하고 하는 경우, 분리방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 하기 실시예에서는 *N. nucifera*의 배아를 메탄올 환류 추출한 후 진공 건조를 통해 농축하여 연꽃 배아 메탄올 추출물을 수득하였으며, 이렇게 수득한 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 n-부탄올로 순차적으로 분획한 다음, 상기 디클로로메탄 분획물을 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 최종적인 네페린을 정제하였다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 상기 네페린을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0047] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 봉해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 봉해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 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. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 네페린은 조성물에 1 내지 300 μ M의 농도로 포함될 수 있으며, 또한 본 발명의 네페린 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95중량%로 포함될 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명은 간암 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 네페린(neferine)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 네페린을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 간암의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 포유동물에게 네페린(neferine)을 투여하는 것을 포함하는 간암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0051] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0052] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 네페린(neferine)을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

- [0053] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 네페린(neferine)을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명은 네페린(neferine)을 유효성분으로 포함하는 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 건강기능식품은 간암의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0057] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0058] 상기 “식품 첨가물 공전” 에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0059] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 네페린(neferine)을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0060] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 네페린(neferine)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 네페린(neferine)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0061] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 네페린(neferine)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0062] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 네페린(neferine)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0063] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0065] <실시예>

[0066] 시약

[0067] DMSO, BSA 및 propidium iodide은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며; EZ-Cytox Cell Viability Assay Solution WST-1은 Daeil Lab Service (Jong-No, Seoul, Korea)로부터 구입하였고; DAPI은 Roche (Pleasanton, CA, USA)로부터 구입하였으며; Lysis buffer[50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS] 및 proteinase inhibitors (PMSF, EDTA, Aprotinin, Leupeptin, and Prostatin A)는 Intron biotechnology (Gyeonggi, Korea)에서 구입하였고; The Protein Quantification Kit (CBB solution)는 Dojindo Molecular Technologies (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며; Nitrocellulose membranes는 PALL Life Sciences (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였고; Enhanced

chemiluminescent (ECL) detection solutions은 Pierce (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였으며; caspase-12 및 사이클린 D1에 대한 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)으로부터 구입하였고; 및 c-Myc, Cyclin D3, CDK4, E2F-1, p21Waf1/Cip1, phospho-cdc2(Tyr15), GAPDH, Bim, Bid, Bax, Bak, Puma, β -actin, cleaved caspase-8, caspase-3, cleaved caspase-3, cleaved caspase-6, cleaved caspase-7, cleaved PARP, Bip, calnexin, PDI, Calpain 2, LC3B, SirT6, DFF45/DFF35, Lamin A/C, HRP conjugated anti-rabbit with anti-mouse, anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ fragment (Alexa Fluor 555 Conjugate) and anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate)에 대한 항체들은 Cell Signaling Biotechnology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

[0068] **통계**

[0069] 모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 그 결과들의 통계 분석하기 위하여 통계 소프트웨어 시그마 플랏 v.12.3 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA)을 이용 Tukey's test에 따른 one-way ANOVA를 수행하였다. P = <0.001 가 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

[0070] **<실시예 1>**

[0071] **네페린(neferine)의 정제**

[0072] 연꽃 (*N. nucifera*) 배아 2.0kg을 3.0L 메탄올에서 3시간 동안 환류 추출한 다음 40℃에서 진공 건조를 통해 농축시켜 연꽃 배아 메탄올 추출물을 543.5g를 수득하였다. 상기 과정을 통해 수득한 추출물은 증류수에 현탁시킨 후 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 n-부탄올로 순차적으로 분획하여 디클로로메탄 분획물 13.8g, 에틸아세테이트 분획물 2.2g 및 부탄올 분획물 58.3g을 각각 수득하였으며, 물 잔여물은 469.0g을 얻었다. 상기 분획물 중 디클로로메탄 분획물(13.8g)은 다시 실리카겔 컬럼(120mm i.d.)에 걸어 크로마토그래피를 수행하였으며, 그 결과 최종적으로 네페린(neferine) 920mg을 수득하였다. 이때 용출용매로는 벤젠-에틸아세테이트-디에틸아민(7:2:1, isocratic)의 혼합용매를 이용하였다.

[0073] 상기 과정을 통해 최종적으로 수득한 물질이 네페린인 것을 확인하기 위하여, ¹H- 및 ¹³C-NMR을 포함하는 스펙트럼을 분석하였으며, 이러한 분석 데이터를 종래 공개된 데이터와 비교하여 상기 물질이 네페린이 것을 검증하였다.

[0074] ¹H-NMR (400 MHz, CDC13): δ 6.88 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-11/H-15), 6.81 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-14'), 6.66 (3H, d, J = 8.2 Hz, H-15'/H-12/H-14), 6.62 (1H, s, H-5), 6.51 (1H, m, H-11'), 6.49 (1H, s, H-5'), 6.35 (1H, s, H-8), 5.98 (1H, s, H-8'), 3.79 (3H, s, 6-OCH₃), 3.76 (3H, s, 7'-OCH₃), 3.70 (3H, s, 13-OCH₃), 3.60 (2H, m, H-1/H-1'), 3.52 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.15~2.95 (4H, m, H-3/H-3'/H-9/H-9'), 3.04 (1H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz, H-9), 2.98 (1H, dd, J = 12.0, 5.3 Hz, H-9'), 2.832.53 (8H, m, H-3/H-3'/H-4/H-4'/H-9/H-9'), 2.47 (3H, H-2), 2.43 (3H, s, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDC13): δ 157.7 (C-13), 148.8 (C-6), 147.1 (C-7'), 146.2 (C-6'), 145.5 (C-13'), 144.7 (C-12'), 142.7 (C-7), 131.6 (C-10'), 131.3 (C-10), 130.8 (C-8a), 130.3 (C-4a), 130.3 (C-11), 130.3 (C-15), 129.0 (C-4a'), 125.5 (C-8a'), 125.1 (C-11'), 119.8 (C-8), 119.1 (C-15'), 115.6 (C-14'), 113.3 (C-12), 113.3 (C-14), 112.2 (C-5), 111.0 (C-5'), 110.9 (C-8'), 64.6 (C-1'), 64.3 (C-1), 55.7 (7'-OCH₃), 55.6 (6'-OCH₃), 55.3 (6-OCH₃), 55.0 (13-OCH₃), 47.0 (C-3), 46.5 (C-3'), 42.5 (C-2), 42.3 (C-2'), 40.5 (C-9), 39.7 (C-9'), 26.0 (C-4), 25.0 (C-4').

[0075] **<실시예 2>**

[0076] **세포주 및 배양**

[0077] HCC Hep3B, Sk-Hep1, THLE-3(정상 간세포를 SV40 large T antigen으로 감염시켜 불멸화한 세포) 및 HUVEC(인간 체대정맥내피세포) 세포들은 the American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 얻었다.

[0078] Hep3B 및 Sk-Hep1 세포는 Earle's Balanced Salts가 포함된 최소필수배지(MEM/EBSS) (HyClone, Logan, UT,

USA)를 이용하여 배양하였으며, THLE-3세포는 상기 세포 배지에 함유된 젠타마이신/엠포테리신 및 에피네프린을 제거하고 500ml 기초 배지가 함유된 Bronchial Epithelia Cell Growth Medium (Clonetics BEGM bullet kit; CC3170, Lonza, Walkersville, MD, USA) 배지를 이용하여 배양하였으며, 여기에 5ng/ml EGF, 70ng/ml 포스포에탄올아민을 첨가하여 배양하였다. 인간제대정맥내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVECs)는 EGM-2 kit (Lonza)가 보충된 endothelial basal medium-2 (EBM-2)를 이용하여 배양하였다. 본 실험의 모든 세포주들은 10% 열 불활성화된 FBS (HyClone), 100 U/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스트렙토마이신 (PAA Laboratories GmbH, PA, Austria)을 포함하는 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양되었다. THLE-3 세포들은 0.01 mg/ml BSA, 0.01 mg/ml 피브로넥틴 및 0.03 mg/ml bovine collagen type I (BD biosciences, San Jose, CA, USA)으로 37°C에서 2시간 동안 코팅시킨 후 배양되었다.

[0079] <실험예 1>

[0080] 본 실험에서는 상기 실시예 1을 통해 수득한 네퍼린의 암세포주에 대한 세포 독성을 확인하기 위해 실시예 2를 통해 배양된 Hep3B, Sk-Hep1 및 THLE-3 세포주를 이용하여 Cell viability assay를 실시하였다.

[0081] 먼저 Hep3B, Sk-Hep1 및 THLE-3 세포 각각을 1×10^4 cells 밀도로 100 µl 배지에 재현탁시켜 96-웰 플레이트 3 개에 분주한 후 24시간 인큐베이션시켰다. 그런 다음 다양한 농도(5, 10, 15, 20, 25, 30 µM)의 네퍼린을 상기 세포에 처리하여 24시간 동안 배양한 후 새 배지로 교환 한 뒤, 10 µl의 WST-1 용액을 첨가하여 5시간 동안 반응시켰다. 반응 흡광도는 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 460nm에서 측정하였다. 결과는 3번의 독립적인 실험을 통해 평균±표준편차로 나타냈으며, 억제 그래프는 대조군 값과 관련된 각각의 농도로부터 얻어진 평균값을 이용해 도출하였다.

[0082] 그 결과 도 1에서 나타난 바와 같이, Hep3B, Sk-Hep1 및 THLE-3 세포주 중에서 단지 Hep3B 세포주에서만 네퍼린 처리 농도에 의존적으로 세포 생존율이 두드러지게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 10 µM 농도 이상의 네퍼린이 처리된 실험군에서 두드러진 세포 억제가 나타났다. 한편, Sk-Hep1 및 THLE-3 세포들은 네퍼린 처리에 따른 세포 독성이 나타나지 않았으며, Hep3B 세포주에서 10% 이하의 세포생존율을 보인 30 µM 농도의 네퍼린 처리군에서, Sk-Hep1 및 THLE-3 세포들의 생존율은 약 90%에 달하는 것으로 측정되었다.

[0083] 이러한 결과를 통해 네퍼린은 Hep3B 세포에 특이적인 세포독성 민감도를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 즉 네퍼린은 간암세포주인 Hep3B 및 Sk-Hep1에 모두 세포독성을 보이는 것이 아니며, Hep3B 세포주에 특이적인 세포독성을 보임으로써, 간암세포에서도 종류를 달리하여 항암활성을 가질 수 있음을 시사하였다.

[0084] 상기 실험을 통해 본 발명의 네퍼린이 간암세포주에서도 Hep3B 세포주에 대한 특이적인 세포독성을 확인하였는 바, 하기 실험에서는 Hep3B 세포주를 대상으로 하여 항암활성과 관련된 다양한 기작에 대한 실험을 실시하였다.

[0085] <실험예 2>

[0086] 네퍼린의 간암세포에 대한 세포사멸 유도

[0087] 본 실험에서는 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 세포사멸(apoptosis) 유도능을 살펴보기 위하여, DAPI 에세이를 실시하였다.

[0088] DAPI는 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate의 약칭으로, 세포에 투과될 수 있고 고정된 상태의 살아있는 세포핵들을 염색하는데 사용될 수 있는 프로브(probe)이다. DNA와 마이너 그루브(minor groove)와 결합을 이루며 AT rich DNA와 결합하는 것을 선호하며, 수소결합을 통해 안정된 상태가 된다. DNA와 결합한 DAPI는 DNA와 결합하지 않은 것에 비하여 20배 정도의 밝기를 가지며 형광 현미경에서 자외선에 의해 발광하는 특징을 가진다. DNA와 결합되었을 때, 358nm에서 흡광 최대치를 나타내고 461nm에서 발광최대치를 나타낸다. 본 실험에서는 네퍼린 처리에 따른 핵 응축 및 apoptosome 형성의 검출을 위해, 간암세포를 DAPI로 염색하였으며, 이를 형광 현미경 하에 분석하였다(×1000).

[0089] 본 실험을 위해서 먼저 Hep3B 세포들을 cover glass bottom culture dish에서 24시간 동안 배양한 후, 6시간 간격으로 네퍼린(20, 25 µM)을 처리한 뒤 PBS 버퍼로 한번 세척한 후 DAPI 용액(1 µg/ml)을 첨가하여 염색하였

다. 37℃에서 20분간 암실에서 배양하고, 세포를 다시 메탄올로 한번 세척하였다. 핵의 변화는 ECLIPSE 50i fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

[0090] 그 결과 도 2에서 나타난 바와 같이, 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군과 비교하여 네퍼린을 처리한 후 6시간이 경과한 실험군에서 세포들의 응축(shrinkage) 및 파열(blebbing)과 같은 핵 막 변화가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 네퍼린 처리 후 24시간이 경과한 실험군에서 사멸세포(apoptotic cells)의 전형적인 특징, 핵 응축(apoptosome formation)이 관찰되었다.

[0091] <실험예 3>

[0092] 네퍼린의 간암세포에 대한 세포주기중지(cell cycle arrest) 유도

[0093] 본 실험에서는 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 세포주기중지(cell cycle arrest) 유도능을 살펴보기 위하여, 세포주기 분석; 웨스턴 블랏을 통한 세포주기와 관련된 단백질 발현 분석; 및 면역형광분석을 실시하였다.

[0094] <3-1> 세포주기 분석

[0095] Hep3B 세포에 네퍼린을 농도별(15, 20, 25 μ M)로 처리하여 24시간 반응시킨 후, 상기 세포에 트립신을 처리한 다음, 4℃에서 70% 에탄올을 이용하여 밤새 고정하였다. 그 후, 상기 세포들은 0.2mg/ml RNase A를 포함하는 PBS 버퍼로 재현탁한 다음, 37℃에서 1시간 동안 추가 배양하였다. 상기 과정을 거친 세포들은 암실에서 30분 동안 40 μ g/ml의 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)로 염색하였다. subgenomic DNA 함량의 분산은 유세포분석기(BD biosciences)를 이용하여 분석하였다.

[0096] 그 결과 도 3에서 나타난 바와 같이, 네퍼린 처리 농도(15, 20, 25 μ M)에 비례하여 sub-G1 cell population이 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군에서는 sub-G1 cell population이 1.35%를 나타낸 반면, 네퍼린을 15 μ M 농도로 처리한 실험군은 4.78%, 네퍼린을 20 μ M 농도로 처리한 실험군에서는 16.01%까지 증대되었다. 또한, 네퍼린 무처리군과 비교하여 네퍼린을 20 μ M 농도로 처리한 실험군에서 G1/S phase가 대략 9%가 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0097] 이러한 결과를 통해, Hep3B 세포에 네퍼린을 처리하는 경우 sub-G1기 및 G1기의 중지를 통해 간세포암의 세포 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0098] <3-2> 세포주기와 관련된 단백질 발현 분석

[0099] 세포주기와 관련된 단백질(c-Myc, 사이클린 D1, 사이클린 D3, CDK4, E2F-1, P21^{Waf/Cip1}, p-cdc2) 발현 분석을 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0100] 본 실험을 위해서 먼저 Hep3B 세포에 네퍼린을 농도별(15, 20, 25 μ M)로 24시간 동안 처리한 다음, 차가운 PBS로 2번 세척한 후 차가운 용해버퍼로 용해시켰다. 그런 다음, 얼음에서 30분 동안 반응시킨 후, 14,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 불용성 물질 제거하였다. 세포 용해물의 단백질 함량은 Protein Quantification Kit (CBB solution)를 이용하여 측정하였다. 웨스턴 블랏은 12% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동을 통해 분리된 단백질 30 μ g을 이용하여 수행되었으며, 니트로셀룰로오즈 멤브레인으로 이동시키고 지시 항체로 면역 반응을 수행하였다. chemiluminescent (ECL) 시약을 사용하여 화학발광을 검출하였다.

[0101] 그 결과 도 4에서 나타난 바와 같이, 농도별 네퍼린을 처리한 실험군에서 cdc2의 탈인산화; c-Myc, cyclin D1, D3, CDK4, E2F-1의 하향조절; 및 p21^{Waf1/Cip1} 단백질 발현이 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 세포주기 중지를 나타내는 증거로써 상기 실험예<3-1>과 일치하는 결과이다.

[0102] <3-3> 면역형광분석

[0103] 배양된 Hep3B 세포들을 cover-glass bottom dish 상에서 15 μ M 농도의 네퍼린을 처리하여 12시간동안 반응시켰다. 세포들은 37℃에서 20분 동안 1 μ g/ml DAPI로 전처리하였으며, 그 후 25℃에서 15분 동안 4% 포름알데하이드

트 (JUNSEI Chemical Co., Japan)로 고정된 다음, 5% 마우스 및 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 가지는 정상 토끼 혈청 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)을 함유하는 blocking 용액으로 1 시간 동안 차단시켰다. 고정되고 차단된 세포들은 1차 항체(p21^{Waf1/Cip1})로 반응시킨 다음, PBS 버퍼로 3번 세척하였다. 세척 후, 상기 세포들을 항-마우스 IgG (H+L) 0.1 µg/ml, F(ab')₂ 프래그먼트 (Alexa Fluor 555 Conjugate) 및 항-래빗 IgG (H+L), F(ab')₂ 프래그먼트 (Alexa Fluor 488 Conjugate)로 1시간 동안 처리하였다. 염색된 세포들은 Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)로 슬라이드에 옮긴 후 charged-coupled device (CCD) camera가 장착된 ECLIPSE 50i fluorescence microscope을 이용하여 측정하였다. 이미지들은 캡처된 후 High-Content Analysis Software (Cambridge Healthtech Ins., Needham, MA, USA)로 처리하였다.

[0104] 그 결과 도 5에서 나타난 바와 같이, 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군과 비교하여 네퍼린을 처리한 Hep3B 세포들은 세포질에서 핵 주변의 p21^{Waf1/Cip1} 단백질 발현 수준이 두드러지게 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

[0105] <실험예 4>

[0106] 네퍼린의 간암세포에 대한 세포사멸(apoptosis) 유도

[0107] 본 실험에서는 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 세포사멸(apoptosis)을 유도하는지를 살펴보기 위하여, 세포사멸 조절과 관련된 Bcl-2 패밀리를 단백질 발현 및 카스파아제 활성화 정도를 측정하기 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였으며, 면역형광분석법을 추가로 실시하였다.

[0108] <4-1> 웨스턴 블랏 분석

[0109] 세포사멸 조절과 관련된 Bcl-2 패밀리를 단백질(Bim, BID, Bax, Bak, Puma) 발현 및 카스파아제 활성화 정도를 분석하기 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0110] 실험 과정은 상기 실험예<3-2>과 동일하게 진행하였다.

[0111] 도 6a는 미토콘드리아-매개된 세포사멸 경로를 조절하는 것으로 알려진 Bcl-2 패밀리를 단백질(Bim, Bid, Bax, Bak 및 Puma)의 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 것으로, 이를 통해 Bak 및 Puma 단백질 발현이 네퍼린 처리 농도의 의존적으로 두드러지게 증대되는 것을 나타냈으며, Bim, Bid 및 Bax는 미미하게 발현이 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 6b에서는 소포체 스트레스에 따른 세포사멸에 수반되는 apoptotic 단백질(cleaved caspase-8, -3, -6, -7 및 PARP)의 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 것으로, 이를 통해 caspase-3 단백질 발현은 네퍼린 처리 농도에 의존적으로 감소되는 것으로 나타난 반면 cleaved caspase-6 및 cleaved PARP 단백질 발현이 두드러지게 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] <4-2> 면역형광분석

[0113] 상기 실험예<4-1>을 통해 보여준 결과를 좀 더 확인하기 위하여, 본 실험에서는 면역형광분석법을 통해 몇몇 세포사멸 관련 단백질의 발현 수준을 관찰하였다.

[0114] 실험 과정은 1차 항체로 cleaved caspase-3 및 cleaved caspase-8을 사용한 것을 제외하고는 상기 실험예<3-3>과 동일하게 진행하였다.

[0115] 그 결과 도 7에서 나타난 바와 같이, 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군과 비교하여 네퍼린을 처리한 Hep3B 세포에서 cleaved caspase-8, 및 -3이 두드러지게 발현된 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 네퍼린에 의해 유도된 apoptosomes이 세포질에서 caspase-3 및 caspase-8을 활성화시켜 세포사멸을 야기하는 것이라 유추할 수 있었다.

[0116] <실험예 5>

[0117] 네퍼린의 간암세포에 대한 소포체 스트레스 및 자가포식(autophagy) 유도

- [0118] 자가포식(autophagy)은 진핵세포에서 세포 내 오래된 단백질, 손상된 소기관(organelles) 그리고 세포질이 탐식 및 소화되고 재사용되는 기전을 가지며, 이는 기본적인 세포질 구성요소들의 turnover에 관여하거나 외부적인 환경의 변화, 즉 영양분 고갈, 병원균 침윤, 산소 결핍 등으로 유도되기도 한다. 최근 발표되는 연구들은 암세포에서 자가포식을 유발하여 항암 효과를 볼 수 있다고 보고하고 있다. 자가포식은 여러 종양 세포주에서 종양 치료제에 의해 활성화된다고 보고되고 있지만, 암의 형성이나 억제와의 연관성에 대해서는 확실히 규명된 바가 없다.
- [0119] 본 실험에서는 네퍼린의 간암세포에 대한 항암 효과로서 자가포식을 유도할 수 있는지를 확인하기 위하여, 네퍼린의 간암세포주인 Hep3B에 대한 소포체 스트레스를 야기 및 자가포식을 유무를 살펴보았다.
- [0120] <5-1> 네퍼린에 의한 간암세포에서 소포체 스트레스 유도
- [0121] 먼저, 네퍼린에 의한 소포체 스트레스 유도를 확인하기 위하여, Hep3B 세포에 네퍼린을 처리한 후 소포체 샤페론 단백질의 발현량 웨스턴 블랏을 분석하였다. 웨스턴 블랏 분석은 상기 실험예<3-2>과 동일하게 진행하였다.
- [0122] 그 결과 도 8에서 나타난 바와 같이, 네퍼린 처리한 실험군에서 시간에 의존적으로 Bip, calnexin, PDI, calpain2 및 caspase-12 단백질 발현 수준이 두드러지게 상향 조절되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 발명의 네퍼린이 간암세포주에서 소포체 스트레스를 야기시킴으로 인해 소포체 스트레스 완화를 위한 세포내 기작으로 샤페론 단백질의 발현이 증대되는 것을 의미한다.
- [0123] 또한 상기 네퍼린의 소포체 스트레스 유도를 다시 증명하기 위하여, Hep3B 세포에 15 μ M 농도의 네퍼린을 12시간 동안 처리한 후 소포체 막에 위치한 단백질 caspase-12의 발현 정도를 면역형광분석법을 통해 분석하였으며, 그 결과는 도 9에서 나타난 바와 같이 소포체의 확장을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 네퍼린에 의해 유도된 세포질내 소체(cytoplasmic vacuoles)가 소포체의 시스테네(cisternae)로의 확장 가능성을 의미하는 것이다. 실험 과정은 1차 항체로 caspase-12 사용한 것을 제외하고는 상기 실험예<3-3>과 동일하게 진행하였다.
- [0124] <5-2> 네퍼린에 의한 간암세포에서 자가포식(autophagy) 유도
- [0125] LC3는 자가포식의 발생에 있어서 중요한 구성요소 중 하나로 자가포식소체(autophagosome) 이중막을 형성하는데 관여하여 자가포식의 특이적 마커로 사용되고 있다. LC3는 세포 내에서 2가지 형태로 존재한다. LC3-I은 세포질 내에서 선행으로 존재하다가 세포 내부나 외부에서 스트레스를 받으면 LC3-II로 변형되며, 이는 자가포식소체 이중막 형성에 관여하게 된다. 따라서 LC3-II가 많이 발현되면 자가용해소체 역시 많이 만들어지는 상호관계에 있다.
- [0126] 본 실험에서는 LC3가 네퍼린에 의해서 유발되는 자가포식과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 Hep3B 세포에 20 μ M 농도의 네퍼린을 처리한 후 시간 경과에 따라 플라스미드 GFP-LC3의 발현 분포를 확인하였으며, 이를 통해 세포질 내 자가포식소체 형성 정도를 확인할 수 있었다.
- [0127] 먼저, GFP-LC3B(green fluorescent protein-light chain 3B) 플라스미드를 제조한 후, 본 플라스미드를 Hep3B 세포 도입하여 형질전환시켰다. 자세한 것은 PCR을 이용하여 인간 간 cDNA 도서관 (Clontech, Mountain View, CA, USA)로부터 LC3B 전장서열을 증폭하였다. PCR 증폭에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 정제된 PCR 생산물은 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) 내로 도입한 후 HindIII 및 Bam HI 로 다시 절단하여, pEGFP-N2 vector (Clontech) 내에 N-terminal GFP와 융합시켰다. 이렇게 제조된 구조물은 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였으며, GFP-LC3B 플라스미드라 명명하였다. 한편, Hep3B 세포들은 살균된 6-웰 플레이트에서 24시간 배양한 후, FBS-프리 배지에 Eugene 6 reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 혼합물을 이용하여 GFP-LC3B 플라스미드로 형질전환시켰다. 형질전환된 세포들은 레귤러 완전 배지에서 하루 동안 배양한 다음, 일정 시간 간격으로 (6, 12, 18, 24) 20 μ M 네퍼린을 처리한 후 차가운 PBS 버퍼로 세척하고 실온에서 5분간 차가운 메탄올 내에서 고정시켰다. 상기 세포들을 다시 PBS 버퍼로 2번 세척한 후, Gold Antifade Reagent로 커버슬립에 놓았다. ECLIPSE 50i fluorescence microscope을 이용하여 세포들을 관찰하였다.

[0128]

PCR에서 사용한 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열	
LC3B	sense	5' -CCGGAATTCCATGCCCTCAGACCGGCTTT-3'
	antisense	5' -CGCGGATCCTCAGAAGCCGAAGGTTTCCTG-3'

[0129]

그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 네퍼린을 처리한 실험군에서 시간 경과에 따라 자가포식의 형태학적 특징 중 하나인 세포질에서의 소체(vacuole) 형성이 발생되었다. 이러한 소체들은 시간 의존적으로 더 크고 많이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 자가포식은 자가포식소체(autophagosomes)라 불리는 이중막으로 둘러싸인 소포를 형성하는데, 네퍼린을 처리한 실험군에서 시간 경과에 따라 강력한 형광 스팟(GFP-LC3B "dots")이 나타남으로써 자가포식소체 수가 세포질 내에서 증가함을 확인할 수 있었다. 비록 FBS(-) 세포의 세포질 내 몇몇 녹색 형광들이 보이나, 이것을 자가포식소체 형태가 아니다.

[0130]

또한 상기 네퍼린의 처리에 따른 LC3B 발현 증가를 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과, 도 11에서 나타낸 바와 같이 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군과 비교하여 네퍼린 처리 실험군에서 막 주위 LC3B의 발현양이 네퍼린 처리된 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0131]

<실험예 6>

[0132]

네퍼린의 HUVECs 세포에서 신생혈관형성 억제 효과(in vitro)

[0133]

본 실험에서는 네퍼린의 신생혈관형성 억제 효과를 평가하기 위하여 튜브 형성 에세이(tube formation assay)를 실시하였다.

[0134]

Lab-Tek 챔버 슬라이드 (Thermo Fisher Scientific, NY, USA)는 웰당 200 μ l Matrigel (BD Biosciences)로 코팅하였으며 고화시키기 위하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 인간제대정맥내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVECs)들은 Matrigel 상에 웰 당 5×10^4 의 밀도로 분주하였으며, 5% CO₂, 37°C에서 18시간 동안 다양한 네퍼린 농도를 포함하는 배양 배지에서 인큐베이션되었다. 튜브 형성은 phase contrast inverted microscopy (Olympus CKX41; Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 $\times 40$ 배율에서 관찰하였다. 튜브 형성 이미지 분석은 the Wimasis Image Analysis software (Wimasis GmbH, Munich, Germany)를 이용하여 수행되었다.

[0135]

그 결과 도 12에서 나타낸 바와 같이, 튜브 길이(px)가 네퍼린 농도에 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 자세하게는, 네퍼린 처리한 실험군에서 농도에 의존하여 세포 혈관 구조의 형성의 억제가 일어나는 것을 관찰할 수 있었으며(도 12A 참조), 이러한 튜브 형성 정도를 총 관(튜브) 길이를 Wimasis Image Analysis 소프트웨어를 이용하여 퍼센트로 변환한 결과, 네퍼린을 처리하지 않은 실험군에서는 222로 나타난 반면, 네퍼린을 10 μ M 농도로 처리한 실험군에서 216, 네퍼린을 20 μ M 농도로 처리한 실험군에서 202, 네퍼린을 30 μ M 농도로 처리한 실험군에서 146으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 12B 참조).

[0136]

<실험예 7>

[0137]

네퍼린의 간암세포에 대한 세포이동 억제 효과

[0138]

본 실험에서는 네퍼린의 간암세포에 대한 항암 효과로서 세포이동 억제를 유도할 수 있는지를 확인하기 위하여, 네퍼린을 간암세포주인 Hep3B에 처리한 후 암세포의 이동 정도를 상처 치유 분석(wound-healing assay)을 실시하였다.

[0139]

Hep3B(각 웰 당 3.5×10^4 cells) 세포를 50 μ m 격막에 의해 분리된 2개의 reservoirs로 구성된 IBIDI culture insert (Ibidi GmbH, M, Germany) 챔버 내에 분주한 후 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 내용물을 제거한 후 세포들을 수거하여 배양배지에서 다시 배양하였다. 세포 이동은 도립현미경을 이용하여 네퍼린 처리 후 12시간 간격으로 측정되었다. 이미지들을 Wimasis Image Analysis software를 이용하여 cell-covered area의 퍼센트로 산출하였다.

[0140] 그 결과 도 13에서 나타낸 바와 같이, 네퍼린 처리 농도에 의존하여 세포이동이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 네퍼린을 처리하지 않은 무처리군에서 세포 이동이 증대되는 것과 비교하여, 네퍼린을 15 μ M 농도로 처리한 후 72시간 반응시킨 실험군에서는 cell covered area가 약 20% 가까이 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (도 13B).

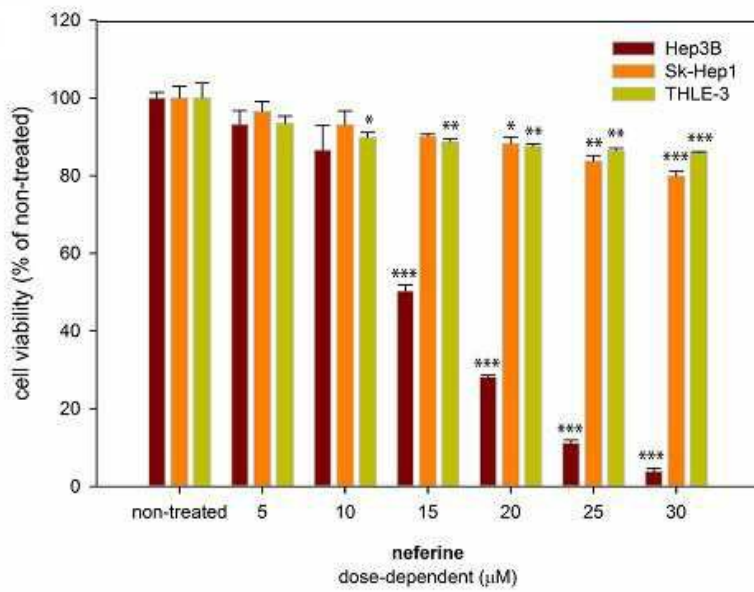
[0141] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

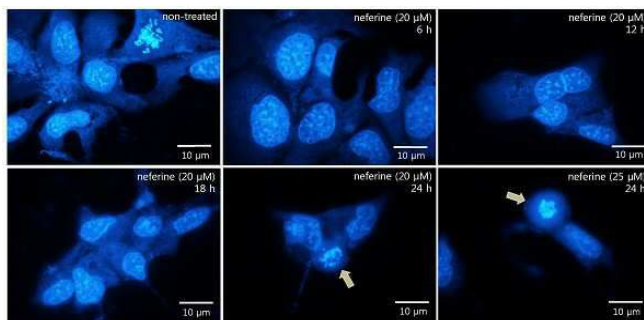
[0142] HCC: hepatocellular carcinoma
 CDKs: Cyclin-dependent kinases
 ER: endoplasmic reticulum
 HBV: hepatitis B virus
 DMSO: Dimethyl sulfoxide
 BSA: bovine serum albumin
 HUVECs: human umbilical vein endothelial cells
 WST-1: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
 DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate
 GFP: Green fluorescent protein
 PBS: phosphate-buffered saline
 DFF: DNA fragmentation factor
 GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 PARP: poly (ADP-ribose) polymerase
 PDI: protein disulfide isomerase
 LC3B: light chain 3 B
 SirT6: sirtuin-6
 PCD: programmed cell death
 MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization

도면

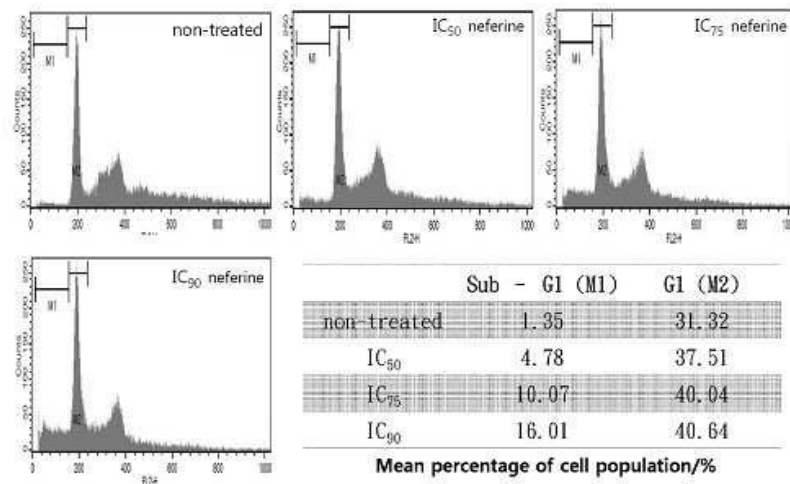
도면1



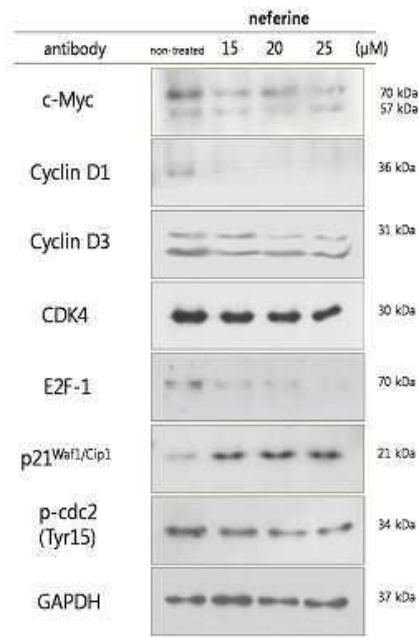
도면2



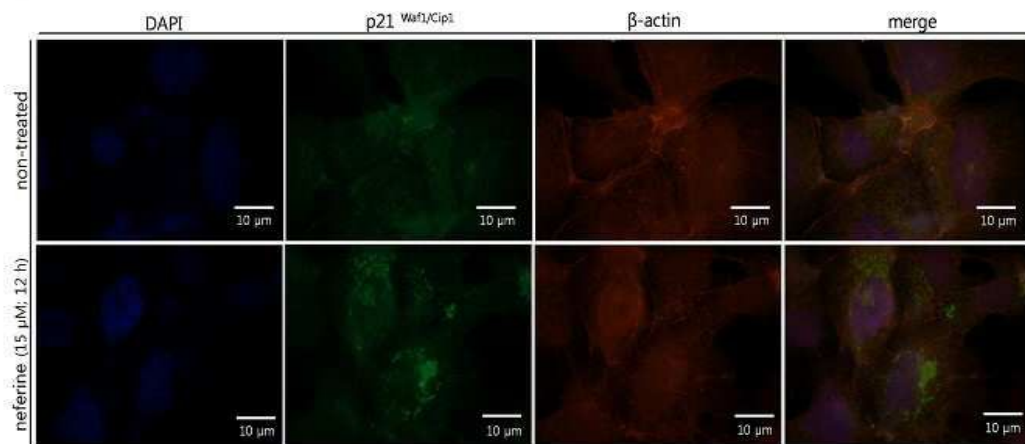
도면3



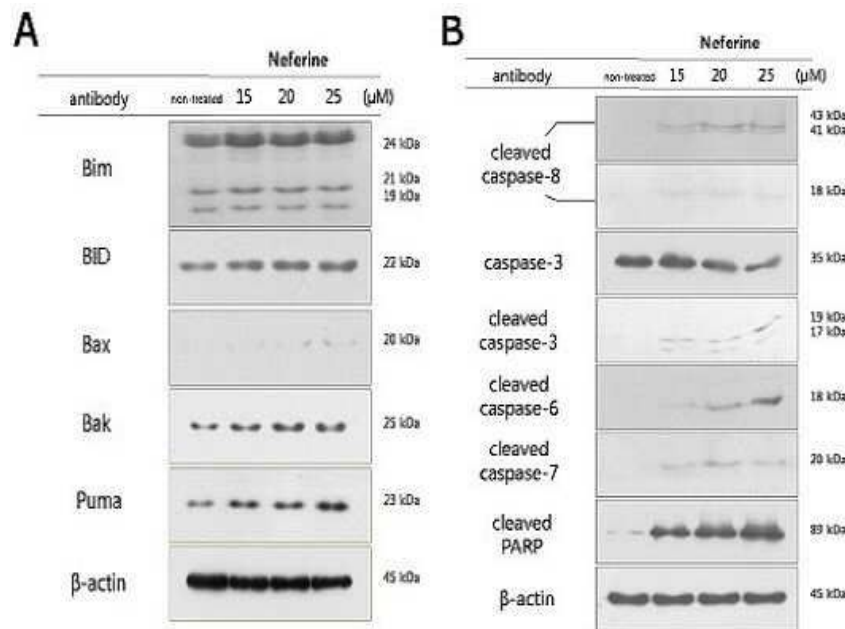
도면4



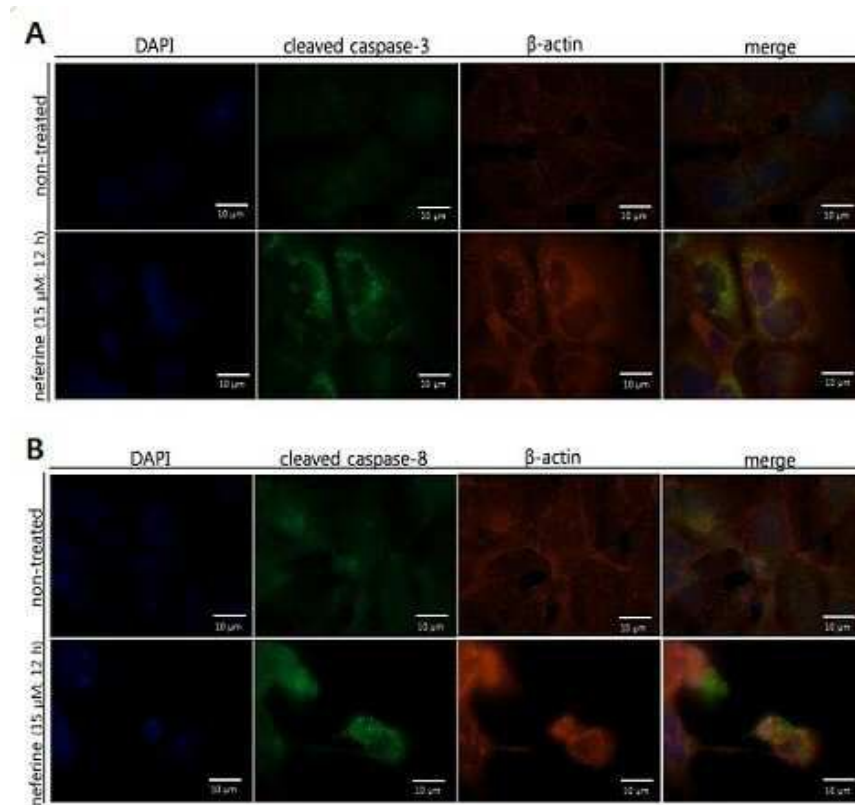
도면5



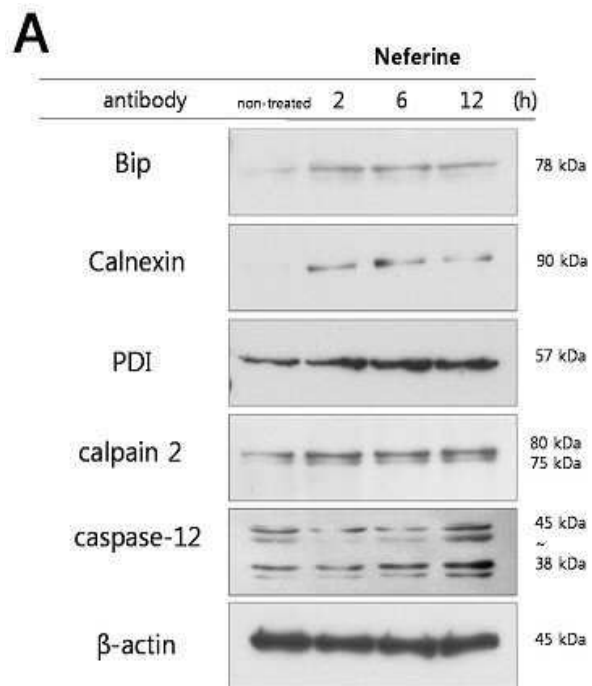
도면6



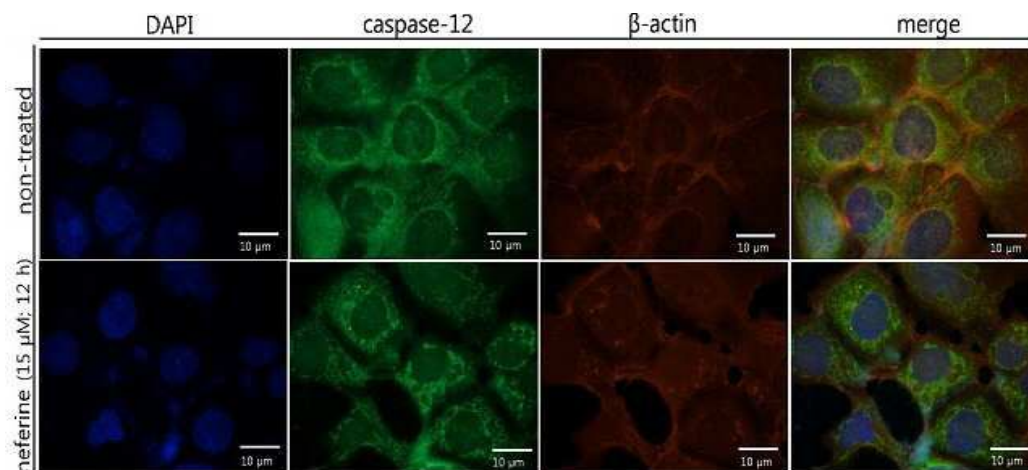
도면7



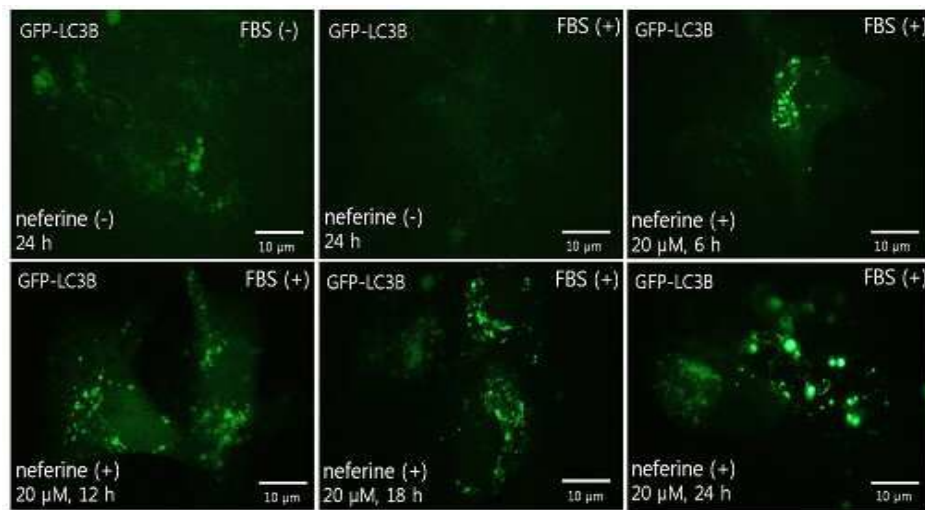
도면8



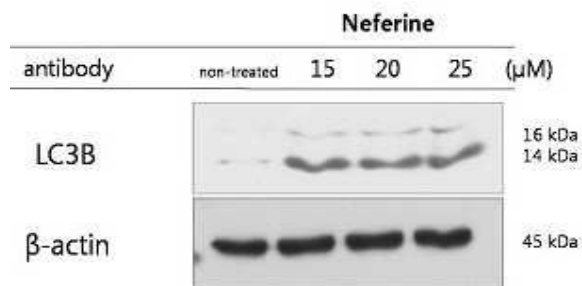
도면9



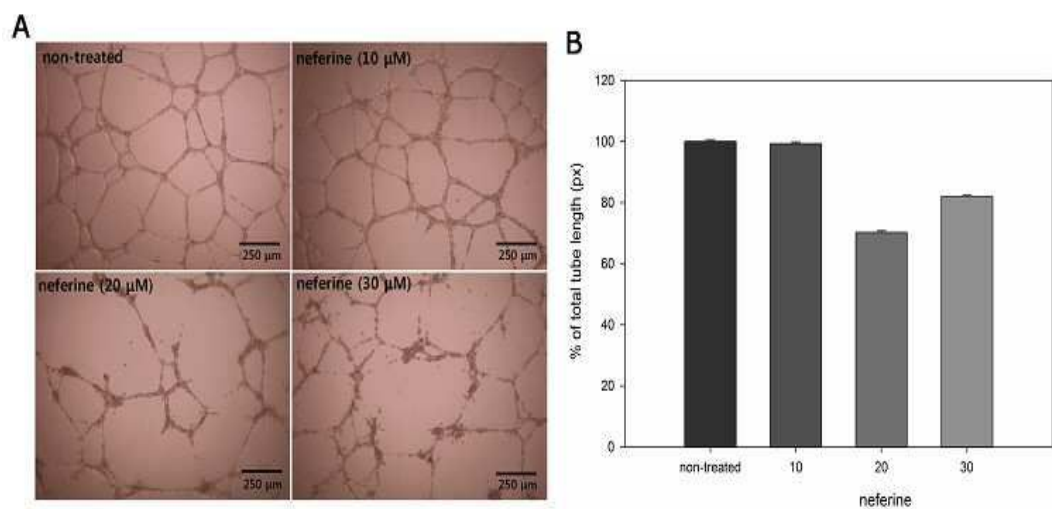
도면10



도면11



도면12



도면13

