



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월14일
(11) 등록번호 10-1275106
(24) 등록일자 2013년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/34 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0114674
(22) 출원일자 2010년11월17일
심사청구일자 2010년11월17일
(65) 공개번호 10-2012-0053415
(43) 공개일자 2012년05월25일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Agricultural and Food Chemistry,
2010, 58, 860-867*
Food Sci. Biotechnol. 2010, 19(2), 305-3119*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국원자력연구원
대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)
(72) 발명자
정일윤
전라북도 정읍시 학산로 89-25, 수목토아파트
102-1402 (상동)
진창현
전라북도 정읍시 학산로 89-25, 수목토아파트
102-804 (상동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

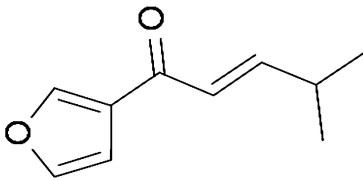
심사관 : 나영민

(54) 발명의 명칭 이소에고마케톤을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

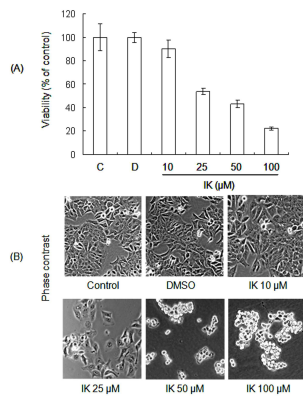
본 발명은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyupjaso)로부터 분리한 하기 [화학식 1]의 이소에고마케톤이 다양한 암 세포주에서 암세포의 아포토시스(apoptosis) 유도에 의한 암세포 사멸 효과를 나타내고, 이러한 아포토시스가 카스파제(caspase) 의존적 또는 비의존적 경로를 통해 이루어짐을 확인하였으므로, 상기 이소에고마케톤은 암 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다:

[화학식 1]



대표도 - 도1

DLD1 대장암 세포주에서 IK의 세포 독성



(72) 발명자

박용대

광주광역시 광산구 장덕로95번길 45, GS자이아파트
105동 1502호 (장덕동)

조병욱

전라북도 정읍시 학산로 89-71, 휴먼시아 204동
1304호 (상동)

강시용

대전광역시 유성구 어은로 57, 110동 605호 (어은
동, 한빛아파트)

김동섭

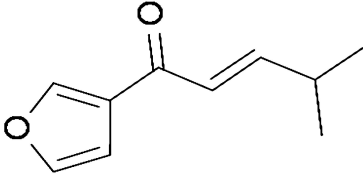
광주광역시 광산구 장덕로95번길 45, GS자이아파트
105동 1703호 (장덕동)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 나타내는 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 이소에고마케톤은 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoupjaso)으로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

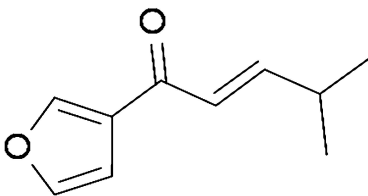
청구항 4

삭제

청구항 5

하기 [화학식 1]로 나타내는 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 예방 및 개선용 건강식품:

[화학식 1]



청구항 6

삭제

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 이소에고마케톤은 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoupjaso)으로부터

분리되는 것을 특징으로 하는 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 예방 및 개선용 건강식품.

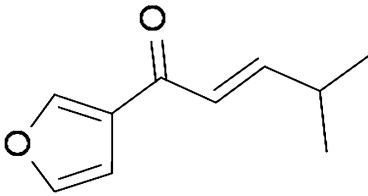
청구항 8

삭제

청구항 9

약학적으로 유효한 양의 하기 [화학식 1]로 나타내는 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 암에 걸린 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 치료 방법:

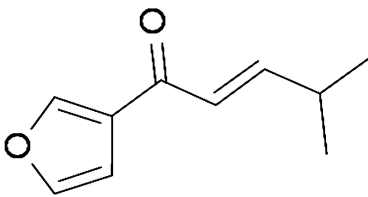
[화학식 1]



청구항 10

약학적으로 유효한 양의 하기 [화학식 1]로 나타내는 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 예방 방법:

[화학식 1]



청구항 11

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 자소엽에서 분리한 이소에고마케톤(isoegomaketone)을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대장암은 미국에서 암과 연관된 사망의 주된 요인일 뿐 아니라, 2010년 미국에서 약 102,900명이 대장암으로 진단되고, 51,370명이 사망할 것으로 추정되는 암으로(Jemal et al., 2010), 아시아에서도 서구화된 식습관으로 인해 그 발병률이 증가하고 있는 추세이다(Park et al., 2008). 현재 암의 치료는 수술적 방법, 항암 치료 및 방사선 치료를 이용하여 이루어지고 있다. 하지만, 이러한 치료들은 진행되거나 전이된 암에서는 제한적인 효

과를 나타내는 문제점이 있다(Lee et al., 2008; Tan et al., 2009). 최근에, 중국의 전통 의학과 같은 대체 의학적인 치료법이 서구의 나라에서 뿐 아니라, 아시아에서도 급속히 증가하고 있다. 지금까지, 식물에서부터 유래한 많은 천연 화합물이 아폽토시스 유도에 의한 항암 효과를 나타내는 것이 확인되고 있으며, 이러한 천연 화합물이 암의 치료 및 예방을 위한 신약 발굴에 기초한 새롭고 효과적인 천연 화합물로 사용될 수 있다(Athar et al., 2007; Nobili et al., 2009).

[0003] 아폽토시스(apoptosis)는 프로그램된 세포 사멸로 알려져 있으며, 이는 세포 항상성 유지에서 중요한 역할을 수행하는 유전적 조절 메커니즘이다. 아폽토시스는 일반적으로 외인성(사멸 수용체) 경로 또는 내인성(미토콘드리아 내) 경로를 통해 유도될 수 있다. 외인성 경로에서, 그 리간드(ligand)에 의한 TNF/Fas-수용체의 라이게이션(ligation)은 카스파제-8 개시자의 절단을 유발하고, 효과자 카스파제-3를 직접적으로 활성화시키거나, Bcl-2 패밀리의 멤버인 Bid의 절단을 유도한 후, 미토콘드리아 막으로 Bax의 전위를 유도한다(Mellier et al., 2010; Tan et al., 2009; Wu, 2009). 반면, 내인성 경로는 미토콘드리아에 의해 매개되고, 아폽토틱 자극에 대한 반응에서, 미토콘드리아로부터 시토크롬 c 및 아폽토시스-유도 인자(apoptosis-inducing factor, AIF)가 방출되며, 이러한 인자들은 카스파제-의존적 및 비의존적 아폽토시스에 관여한다. 시토크롬(cytochrome) c는 Apaf-1과 결합하여 아폽토좀(apoptosome)으로 불리는 구조를 형성하고, 카스파제-9를 활성화시키고, 이어서 카스파제-3를 활성화시킨 다음, 최종적으로 아폽토틱 세포 사멸을 일으킨다. AIF는 카스파제 비의존적 아폽토시스의 징표로, 아폽토틱 자극 후에, 핵내로 전위되어, DNA 단편화(fragmentation)를 유도한다(Huerta et al., 2006; Millan and Huerta, 2009).

[0004] 한편, 자소엽(*Perilla frutescens* (L.))은 특유의 향과 맛을 지닌 일년생 초본 식물로, 그 잎은 식용 야채로 널리 이용되고, 그 종자는 한국에서 식용 오일에 사용되고 있으며, 중국의 전통 의학에서도 사용되고 있다(Seo and Baek, 2009). 한국에서는 통일신라시대 때부터 재배하기 시작했으며, 높이는 60~90 센티미터이며 줄기는 네모지고 곧게 서며 긴 털이 있고, 잎은 마주나고 난상 원형으로 뽕족하며 밑부분은 등글다. 잎은 길이 7~12 센티미터, 나비 5~8 센티미터로 톱니가 있고 앞면은 녹색이지만 뒷면에는 자줏빛이 돈다. 꽃은 총상꽃차례를 이루고 백색이며 작은 입술 모양의 통꽃이 많이 핀다. 화관은 길이 4~5 밀리미터로 아랫입술꽃잎이 약간 길다. 4개의 수술 중 2개가 길고 분과는 꽃받침 안에 들어 있으며 등글고 곁에 그물무늬가 있다. 한국에서는 대부분 갈색종을 재배하고 있으며, 유료작물로 재배하며, 잎에 특이한 냄새가 있으며 식용하는데, 한국, 일본, 중국, 베트남 등지에서 요리 재료로 많이 쓰나 서로 풍미가 조금씩 다르다. 씨는 그대로 빵아 음식에 쓰거나, 들기름을 내어 나물 등에 쓰고, 가루를 내어 국에 넣기도 하며, 먹기도 하지만 페인트·니스·리놀륨·인쇄용 잉크, 포마드·비누 등의 원료로 이용한다. 또한, 백지에 기름을 먹여 유지 장판지로 쓰기도 한다.

[0005] 로즈마리산(rosmarinic acid), 루테오린(luteolin), 아피게닌(apigenin), 페루릭산(ferulic acid), 카테킨(catechin), 및 카페인산(caffeic acid)과 같은 많은 화합물이 자소엽(*Perilla frutescens* (L.))으로부터 분리되었으며(Peng et al., 2005), 상기 다양한 성분 중에서, 로즈마리산(rosmarinic acid), 루테오린(luteolin), 아피게닌(apigenin) 및 카페인산(caffeic acid)이 다양한 암세포주에서 아폽토시스를 유도할 수 있음이 보고된 바 있다(Hsu, 2010; Hur, 2004; Lim, 2007; Moon, 2010; Selvendiran, 2006).

[0006] 이소에고마케톤(IK)은 자소엽(*Perilla frutescens*(L.))의 필수 오일 성분으로, Park et al(2009)의 선행문헌에서 자소엽으로부터 분리되었으며, RAW 264.7 대식세포에서 항염증 효과를 나타냄이 보고된 바 있다(Jin et al., 2010). 그러나, 아직까지 이소에고마케톤이 암세포의 아폽토시스와 연관되어 있음은 보고된 바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 이소에고마케톤과 암과의 관련성을 연구하던 중, DLD1 및 HT29 대장암 세포주, PC-3 및 DU145 전립선암 세포주, Hela 자궁암 세포주 및 U2OS 골육종 세포주에 이소에고마케톤(IK) 처리시 농도 의존적으로 암세포의 생존 및 성장을 저해하여 사멸 효과를 나타내고, 이러한 암세포 사멸 효과가 암세포의 아폽토시스(apoptosis) 유도에 의한 것임을 확인하였다. 또한, DLD1 세포에 이소에고마케톤(IK) 처리시 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP)가 절단되고, 카스파제(caspase)-8, -9, 및 -3이 활성화되며, Bid 절단 및 Bax의 전위를 일으키고, 미토콘드리아에서 세포질 내로 시토크롬 C의 방출을 촉진시킬 뿐 아니라, 카스파제 비의존적 미토콘드리아 아폽토시스 인자(caspase-independent mitochondrial apoptosis factor)

인 아폽토시스 유도성 인자(apoptosis inducing factor, AIF)를 미토콘드리아에서 핵 내로 전위시킴을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명자들은 이소에고마케톤이 카스파제 의존적 또는 비의존적 경로를 통해 암세포의 아폽토시스를 유도하여 암세포의 사멸 효과를 나타냄을 확인함으로써, 이소에고마케톤을 암의 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물, 또는 건강식품을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이용한 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0013] 아울러, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)은 다양한 암 세포주에서 카스파제(caspase) 의존적 또는 비의존적 경로를 통해 암세포의 아폽토시스(apoptosis)를 유도하여 암세포를 사멸시키는데 효과적이므로, 상기 이소에고마케톤은 다양한 암종에서 그 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 DLD1 대장암 세포주에서 IK의 효과를 나타낸 결과이다:
 - (A) DLD1 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 그 세포 생존능을 EZ-Cytox 세포 생존 어썬이(assay) 키트를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그림으로, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;
 - (B) DLD1 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 세포의 성장 저해 및 형태학적 변화를 역상 현미경(×100)을 통하여 확인하였다;
 - C: 대조군; 및
 - D: DMSO 처리군.
- 도 2는 HT-29 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 그 세포 생존능을 EZ-Cytox 세포 생존 어썬이(assay) 키트를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그림으로, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;

C: 대조군; 및

D: DMSO 처리군.

도 3은 PC-3 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 그 세포 생존능을 EZ-Cytox 세포 생존 어ッセ이(assay) 키트를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그림으로, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;

C: 대조군; 및

D: DMSO 처리군.

도 4는 DU145 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 그 세포 생존능을 EZ-Cytox 세포 생존 어ッセ이(assay) 키트를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그림으로, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;

C: 대조군; 및

D: DMSO 처리군.

도 5는 HeLa 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 그 세포 생존능을 EZ-Cytox 세포 생존 어ッセ이(assay) 키트를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그림으로, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;

C: 대조군; 및

D: DMSO 처리군.

도 6은 U2OS 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1 % DMSO를 24시간 동안 처리하고, 그 세포 생존능을 EZ-Cytox 세포 생존 어ッセ이(assay) 키트를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그림으로, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;

C: 대조군; 및

D: DMSO 처리군.

도 7은 IK가 DLD1 세포에서 아포토시스를 유도함을 확인한 결과이다;

DLD1 세포에 다양한 농도의 IK 또는 0.1% DMSO를 24시간 동안 처리한 후, PI로 접합된 아넥신(annexin) V FITC 염색을 통한 아포토틱 세포를 유세포 분석기를 통해 확인하고, 오차 바(bar)는 세 번의 개별 실험을 통한 평균±표준편차로 나타내었다;

C: 대조군, 및

D: DMSO.

도 8은 DLD1 세포에서 IK가 유도하는 아포토시스가 카스파제-3의 활성화에 의해 매개됨을 확인한 결과이다;

(A) IK가 처리된 DLD1 세포를 수확하고 얻어진 샘플은 PARP-1 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 절단 여부를 확인하였으며, β -튜블린(tubulin)은 로딩 대조군으로 사용하였다;

(B) DLD1 세포에 25 μ M 및 50 μ M IK 또는 0.1% DMSO를 24시간 동안 후 카스파제-3 활성을 카스파제-3 어ッセ이 키트를 이용하여 분광광도계적으로 측정된 결과이다;

(C) DLD1 세포에 50 μ M의 IK를 3, 6, 12, 16 및 24시간 동안 처리한 후 카스파제-3 활성을 카스파제-3 어ッセ이 키트를 이용하여 분광광도계적으로 측정된 결과이다; 및

* 대조군과 대비하여 $P < 0.01$ 로 유의한 경우.

도 9는 IK가 DLD1 세포에서 카스파제(caspase)를 활성화함을 확인한 결과이다;

(A) DLD1 세포에 25 μ M 및 50 μ M IK 또는 0.1% DMSO를 24시간 동안 처리하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다; 및

(B) DLD1 세포에 50 μ M의 IK를 3, 6, 12, 16 및 24시간 동안 처리하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이고, β -튜블

린(tubulin)은 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 10은 IK가 DLD1 세포에서 미토콘드리아 경로를 통해 아포토시스를 유도함을 확인한 결과이다;

(A) DLD1 세포에 25uM 및 50 uM의 IK 또는 0.1% DMSO를 24시간 동안 처리한 후, 미토콘드리아로부터 세포질 내로 방출된 시토크롬(cytochrome) c를 시토크롬 c 방출 어셈블리 키트를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 측정된 결과이다;

COX4 및 β-튜블린(tubulin)은 각각 미토콘드리아 분획 및 세포질 분획의 로딩 대조군으로 사용하였다;

(B) DLD1 세포에 25uM 및 50 uM의 IK 또는 0.1% DMSO를 24시간 동안 처리한 후, Bid의 절단 및 세포질로부터 미토콘드리아로의 BAX의 전위를 나타낸 결과로, β-튜블린(tubulin)은 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 11은 IK가 DLD1 세포에서 카스파제 비의존적 경로를 통한 아포토시스를 유도함을 확인한 결과로, DLD1 세포에 25 uM 및 50 uM의 IK 또는 0.1% DMSO를 24시간 동안 처리한 후, 미토콘드리아로부터 핵으로 AIF의 전위를 웨스턴 블롯을 통해 측정하였으며, 라민(Lamin) B1 및 β-튜블린(tubulin)은 로딩 대조군으로 사용하였다.

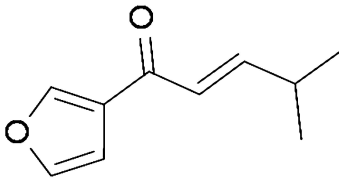
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 이소에고마케톤은 하기 [화학식 1]로 나타내는 화합물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

화학식 1



[0019]

[0020] 상기 이소에고마케톤은 식물에서 분리되는 천연물 또는 통상의 치환기들의 합성 및 분획 방법을 통한 합성에 의해 제작된 화합물이 모두 사용가능하며, 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoujaso)으로부터 분리되는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0021] 상기 [화학식 1]로 표시되는 본 발명의 이소에고마케톤은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부텐-1,4-디오에이트, 핵산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

- [0022] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, [화학식 1]의 이소에고마케톤을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.
- [0023] 동량의 [화학식 1]의 이소에고마케톤 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0024] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0025] 또한, 본 발명의 상기 [화학식 1]로 표시되는 이소에고마케톤은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.
- [0026] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 [화학식 1]의 이소에고마케톤을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0027] 상기 암은 간암, 위암, 유방암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 대장암, 폐암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골육종 및 중추신경계 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하며, 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, DLD1 및 HT29 대장암 세포주, PC-3 및 DU145 전립선암 세포주, Hela 자궁암 세포주 및 U2OS 골육종 세포주에 이소에고마케톤(IK) 처리시 농도의존적으로 암세포의 생존 및 성장을 저해하여 사멸 효과를 나타내고, 이러한 암세포 사멸 효과가 암세포의 아포토시스(apoptosis) 유도에 의한 것임을 확인하였다. 또한, DLD1 세포에 이소에고마케톤(IK) 처리시 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP)가 절단되고, 카스파제(caspase)-8, -9, 및 -3이 활성화되며, Bid 절단 및 Bax의 전위를 일으키고, 미토콘드리아에서 세포질 내로 시토크롬 C의 방출을 촉진시킬 뿐 아니라, 카스파제 비의존적 미토콘드리아 아포토시스 인자(caspase-independent mitochondrial apoptosis factor)인 아포토시스 유도성 인자(apoptosis inducing factor, AIF)를 미토콘드리아에서 핵 내로 전위시킴을 확인하였다.
- [0029] 따라서, 본 발명의 이소에고마케톤이 카스파제(caspase) 의존적 또는 비의존적 경로를 통해 다양한 암 세포주에서 암세포의 아포토시스(apoptosis) 유도하여 암세포의 사멸을 일으킴을 확인함으로써, 상기 이소에고마케톤은 암 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 [화학식 1]로 표시되는 이소에고마케톤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리 에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/ 또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/ 또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0032] 상기 [화학식 1]로 표시되는 이소에고마케톤을 유효 성분으로 하는 약학 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비

경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다.

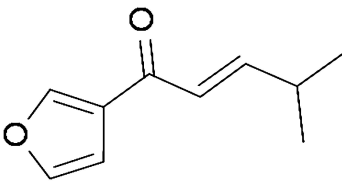
[0033] 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 [화학식 1]의 이소에고마케톤 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유효 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0036] 상기 이소에고마케톤은 하기 [화학식 1]로 나타내는 화합물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 이소에고마케톤은 식물에서 분리되는 천연화합물 또는 통상의 치환기들의 합성 및 분획 방법을 통한 합성에 의해 제작된 화합물이 모두 사용가능하며, 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoupjaso)으로부터 분리되는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 암은 간암, 위암, 유방암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 대장암, 폐암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골육종 및 중추신경계 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하며, 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 본 발명의 이소에고마케톤이 카스파제(caspase) 의존적 또는 비의존적 경로를 통해 다양한 암 세포주에서 암세포의 아포토시스(apoptosis) 유도하여 암세포의 사멸을 일으킴을 확인함으로써, 상기 이소에고마케톤을 암 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명의 건강식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01 ~ 0.04 중량부, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 중량부 범위에서 선택하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0043] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0044] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0045] 아울러, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하는 방법을 제공한다.
- [0046] 상기 이소에고마케톤은 식물에서 분리되는 천연화합물 또는 통상의 치환기들의 합성 및 분획 방법을 통한 합성에 의해 제작된 화합물이 모두 사용가능하며, 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoupjaso)으로부터 분리되는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 상기 개체는 마우스, 랫트, 가축 또는 인간 등의 모든 포유동물에 적용가능하다.
- [0048] 상기 암은 간암, 위암, 유방암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 대장암, 폐암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골육종 및 중추신경계 종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하며, 대장암, 전립선암, 자궁암 및 골육종 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 이소에고마케톤은 카스파제(caspase) 의존적 또는 비의존적 경로를 통해 다양한 암 세포주에서 암세포의 아포토시스(apoptosis) 유도하여 암세포의 사멸을 일으킴을 확인함으로써, 상기 이소에고마케톤은 암의 예방 및 치료를 위한 방법에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0050] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기 위해 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 설명하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0051] <실시예 1> 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)의 분리
- [0052] 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)은 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoupjaso)으로부터 분리하였다.
- [0053] 구체적으로, 건조된 자소엽(*Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Chookyoupjaso)의 지상부(3 kg)를 95% 메탄올 10 L에 3일간 방치하고 여과지로 여과하였다. 이 용액을 감압하에서 농축하여 농축액(45.6 g)을 얻었다. 이후, 얻은 추출물을 물 400 ml에 현탁시키고, 에틸아세테이트 400 ml로 분획하여 에틸아세테이트 분획물 17 g을 얻었다. 얻은 파우더 17 g을 클로로포름을 이동상으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 : Merk, Art 9385, 컬럼크기 : $\phi 7 \times 40$ cm)를 실시하여 분획물 1-6을 획득하였다. 상기 얻어진 1번 분획물(3 g)을 에틸아세테이트 Hexan의 혼합 용매를 이동상으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 : Merk, Art 9385, 컬럼크기 : $\phi 7 \times 40$ cm)를 실시하였다. 이때, 이동상 용매는 에틸아세테이트 : Hexan = 98 : 2(v/v)에서 가장 효과적인 활성물질인 IK 화합물들을 10 mg 얻었으며, 분리된 이소에고마케톤을 분광분석으로 확인하였고, 멸균된 DMSO에 용해시켜 준비하였다.
- [0054] <실시예 2> 암세포주 배양
- [0055] 인간 대장암 DLD1 및 HT-29 세포주, PC-3 및 DU145 전립선암 세포주, Hela 자궁암 세포주, 및 U2OS 골육종 세포주(조선대학교)는 열불활성화된 10% 소태아혈청(FBS)(Hyclone, Utah, USA), 100 units/ml 페니실린(penicillin), 및 100 ug/ml 스트렙토마이신(streptomycin)(Invitrogen, CA, USA)이 포함된 RPMI1640 배지에서 배양하였으며, 5% CO₂-95% 산소, 37°C 조건의 배양기에서 유지하였다.
- [0056] <실험예 1> 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)의 암세포 생존력 및 성장 저해 효과 확인
- [0057] 다양한 암세포주에서 본 발명의 이소에고마케톤(IK)이 암세포 생존 및 성장에 어떤 영향을 미치는지 여부를 확

인하기 위하여, 각 세포주에 IK를 처리한 다음, 상기 암세포주의 생존력 및 성장 저해 정도를 확인하였다.

[0058] 구체적으로, 상기 <실시예 2>의 방법으로 배양된 각 암세포(인간 대장암 DLD1 및 HT-29 세포주, PC-3 및 DU145 전립선암 세포주, HeLa 자궁암 세포주, 및 U2OS 골육종 세포주)를 5×10^4 세포/ml의 농도로 96 웰 플레이트에서 배양하고 24시간 후에, DLD1 세포주(10, 25, 50 및 100 μM 이소에고마케톤 처리)를 제외한 각 세포에 10, 20, 40 및 80 μM 의 이소에고마케톤(IK)을 처리한 다음, 24시간 또는 48시간 동안 추가 배양하였다. 이후, EZ-Cytox 세포 생존능 어세이(assay) 키트(DAEILLAB, Korea) 용액 10 μl 를 각 웰에 첨가하고, 추가로 37°C에서 4시간 동안 배양한 다음, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Benchmark plus, Bio-Rad)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 참조 흡광도는 650 nm였으며, 결과는 무처리 대조군 세포의 값과 상대적인 값의 퍼센트로 나타내었으며, 모든 결과는 적어도 3번의 개별 실험에서 얻어진 결과를 통합하여 나타내었다.

[0059] 그 결과, 모든 암세포주에서 이소에고마케톤의 처리에 의해 세포 생존이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 1A, 및 도 2 내지 6).

[0060] 또한, DLD1 세포주에 10, 25, 50 및 100 μM 의 이소에고마케톤을 처리하고, 그 세포의 형태 변화를 위상차 현미경을 이용하여 확인한 결과, IK를 처리하는 동안 세포 표면의 거품상(blebbing) 및 위축(shrinkage)과 같은 형태적 변화뿐 아니라, 세포 성장 또한 농도 의존적으로 저해함을 확인하였다(도 1B).

[0061] 이를 통해, 본 발명의 이소에고마케톤(IK)이 다양한 암세포주에서 그 세포 생존 및 성장을 저해함을 확인하였다.

[0062] <실험예 2> 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)의 아포토시스(apoptosis) 유도 효과 확인

[0063] 본 발명의 이소에고마케톤(IK)이 유도하는 세포 생존능의 저해가 아포토시스(apoptosis)와 관련되어 있는지 확인하기 위하여, DLD1 세포에 IK를 처리한 다음, 아포토시스의 정도를 확인하였다.

[0064] 구체적으로, DLD1 세포는 2×10^5 세포/ml의 농도로 6-웰 플레이트에서 배양하고, 10, 25, 50 및 100 μM 농도의 이소에고마케톤(IK)을 24시간 동안 처리하여 배양한 후, 세포를 세척하고, 85 μl 의 결합 완충용액으로 재부유하였다. 그 다음 10 μl 의 아넥신(Annexin) V-FITC 및 5 μl 의 프로피디움(propidium) 이오다이드(Iodide)를 첨가하고 어두운 상태에서 상온에서 15분 동안 배양하였다. 배양 후에, 400 μl 의 MEBCYTO 아포토시스 키트(MBL International, Nagoya, Japan)의 결합 완충용액을 첨가하고, 아포토틱(apoptotic) 세포를 유세포 분석기(Cytomics FC500, Beckman)를 이용하여 분석하였다.

[0065] 그 결과, DLD1 세포에 이소에고마케톤(IK) 처리시 괴사 세포(necrotic cell)는 IK의 농도에 비례하여 증가하지 않는 반면, 아포토틱 세포(apoptotic cell)는 처리된 IK의 농도의존적으로 증가함을 확인하였다(도 7).

[0066] 또한, DLD1 세포에 IK를 처리하여 항-PARP 항체(Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과, 50 μM 의 IK를 처리하였을 때 아포토시스의 다른 징후인, PARP가 절단되었음을 확인하였다(도 8A).

[0067] 이를 통해, 본 발명의 이소에고마케톤이 아포토시스를 유도하여 암세포의 생존능을 저해하는 암세포 사멸 효과가 있음을 확인하였다.

[0068] <실험예 3> 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)의 카스파제(caspase) 활성 유도 효과 확인

[0069] 카스파제(caspase)는 아포토시스(apoptosis)에 필수적인 역할을 수행하므로, 이소에고마케톤(IK)에 의해 유도되는 암세포의 아포토시스가 카스파제의 활성화와 관련있는지의 여부를 확인하기 위하여, DLD1 세포에 IK를 처리하고, 카스파제의 활성을 측정하였다.

[0070] 카스파제-3 발색 어세이 키트(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO)는 펩티드 기질인 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide(Ac-DEVD-pNA)이 카스파제-3에 의해 가수분해되는 것에 기초한 것으로, 상기 펩티드 기질의 pNA 부분(moiety)이 방출되면, 카스파제-3가 활성화됨을 의미한다.

[0071] 구체적으로, DLD1 세포에 25 및 50 μM 의 이소에고마케톤(IK)을 24시간 동안 처리하거나, 또는 50 μM 의 이소에고마케톤(IK)을 0, 3, 6, 12, 18, 및 24시간 동안 처리한 후, 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 상기 얻어진

펠릿(pellets)에 세포 파쇄 완충용액을 첨가하고 아이스에서 20분 동안 유지한 후, 16,000×g로 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 세포 파쇄액을 얻고, 상기 세포 파쇄액내 포함된 단백질의 농도를 측정하였다. 이후, 세포 파쇄액은 2 mM 기질 Ac-DEVD-pNA 어ッセ이 완충 용액과 혼합하고 37℃에서 2시간 동안 배양한 후에, pNA의 값을 마이크로플레이트 리더(Benchmark plus, Bio-Rad)의 405 nM 흡광도에서 모니터링하고, 표준 pNA 용액으로 준비한 검량 곡선을 통해 각각의 pNA 값을 계산하였다.

[0072] 그 결과, IK가 처리된 DLD1 세포에서, 카스파제-3의 활성이 증가하였고, 특히 50 μM의 IK 처리하였을 때 카스파제-3의 활성이 농도 및 시간 의존적으로 유의성있게 증가하는 것을 확인하였다(도 8 B 및 C).

[0073] 또한, DLD1 세포에 IK를 처리하여 얻어진 세포 추출물에 대하여 항-카스파제-3, 항-카스파제-8, 항-카스파제-9, 및 항-절단된 카스파제-3 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 일차 항체로 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0074] 세포 추출물을 얻기 위하여, DLD1 암세포를 100 mm 디쉬(dish)에서 2×10^6 세포/ml의 농도로 배양하고, PBS로 세척한 다음, 수확하였다. 전체 세포 추출물은, 세포에 1 mM PMSF 및 단백질 분해효소 저해제 각테일(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO)이 포함된 NP40 세포 용해 완충용액을 넣고 아이스 조건에서 30분 동안 용해한 다음, 원심분리하여 얻어진 상등액을 수확하여 준비하였다.

[0075] 또한, 상기 얻어진 추출물 및 분획물의 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 위하여, 우선 레인당 50 μg의 단백질을 준비하고 Laemmli 샘플 완충용액에서 5분 동안 끓인 다음, 10-15 % SDS-PAGE 겔에서 전기영동하였다. 그 다음, 단백질을 니트로셀룰로오즈 막(nitrocellulose membrane)(Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham, USA)으로 블랏팅하였다. 이후, 상기 막을 5 % 스킴 밀크(skim milk)가 포함된 TBS-T(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)로 블락킹(blocking)하였으며, 제조사의 방법에 따라 희석된 일차 항체로 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 상기 막을 세척한 다음, HRP가 접합된 항-마우스 IgG 항체(Zymed, San Francisco, CA, USA) 또는 항-토끼 IgG 이차 항체(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 1:4,000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 막을 세척하고 블랏팅된 단백질을 강화된 화학발광 검출 시스템(iNtRON Biotech)을 이용하여 검출하였다.

[0076] 그 결과, 카스파제-8 및 -9의 개시자, 및 카스파제-3의 효과자가 이소에고마케톤을 처리한 농도 및 시간 의존적으로 절단됨을 확인하였다(도 9 A). 카스파제-8의 절단은 50 μM의 IK를 처리한 DLD1 세포에서 명확히 확인되었고, 이 절단의 시간 키네틱스(kinetics)는 50 μM의 IK를 처리한 후 6 시간에 개시되었으며, 카스파제-9 및 -3의 절단도 카스파제-8의 절단과 유사한 패턴을 나타내었다(도 9 B).

[0077] 또한, DLD1 세포에 IK를 처리한 후, 효과자 카스파제-3의 다운스트림(downstream)의 활성을 정량한 결과, IK를 처리한 DLD1 세포에서 카스파제-3의 활성이 현저히 증가함을 확인하였다.

[0078] 이를 통해, DLD1 세포에서 IK의 처리에 의해 유도되는 아포토시스는 외인성 및 내인성 아포토시스 경로와 연관된 카스파제를 활성화시킴을 확인하였다.

[0079] <실험예 4> 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)의 카스파제(caspase) 의존적 경로를 통한 암세포의 아포토시스 유도 효과 확인

[0080] <4-1> 미토콘드리아 경로(외인성 경로)와의 상관관계 확인

[0081] 미토콘드리아는 화학 약품에 의해 촉발되는 아포토시스의 필수적인 기능에 역할을 수행하며, 시토크롬(cytochrome) c는 세포에서 아포토시스가 일어나는 동안미토콘드리아로부터 방출된다. 세포질 내에서, 시토크롬(cytochrome) c는 Apaf-1 및 카스파제(caspase)-9를 갖는 미토콘드리아 구조체 아포토좀(apoptosome) 복합체로부터 방출되고, 카스파제-3를 활성화시켜 세포 사멸에 이르게 한다(Mellier et al., 2010; Tan et al., 2009; Wu, 2009).

[0082] IK에 의해 유도된 아포토시스가 카스파제-9를 활성화시키므로(도 5), IK에 의해 유도된 아포토시스에서 미토콘드리아로부터 세포질 내로 시토크롬 c의 방출이 일어나는 지의 여부를 확인하기 위하여, 미토콘드리아 및 세포질 분획물에 대하여 항-시토크롬 c 항체(clontech, Mountain View, CA, USA)를 일차 항체로 이용하여 상기 <실험예 3>과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0083] 그 결과, IK를 처리한 DLD1 세포에서 미토콘드리아에서는 IK가 농도에 비례하여 감소한 반면, 세포질 내에서는

그 농도가 반대로 증가하였으며, 이를 통해, IK 처리시 시토크롬 c가 미토콘드리아로부터 세포질 내로 방출되었음을 확인하였다(도 10A).

[0084] 따라서, 본 발명의 이소에고마케톤에 의해 유도되는 암세포의 아포토시스는 미토콘드리아 경로와 관련되어 있음을 확인하였다.

[0085] <4-2> 미토콘드리아 업스트림 신호 경로와의 상관관계 확인

[0086] 카스파제-8은 Bid 절단을 매개한 후, 외인성 경로를 통해서 Bax를 미토콘드리아에 전위시키는 미토콘드리아 업스트림 신호와 연관된 단백질이다(Mellier et al., 2010; Tan et al., 2009; Wu, 2009).

[0087] bax의 미토콘드리아 내로의 전위 및 미토콘드리아로부터 시토크롬(cytochrome) c의 방출을 측정하기 위하여, 25 및 50 μ M의 IK를 DLD1 세포에 처리하여 배양하였다. 이후, 상기 처리한 세포로부터 미토콘드리아 분리 키트(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 미토콘드리아 및 세포질 분획물을 준비하고, 이에 대해 항-Bax(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 항-Bid 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 일차 항체로 이용하여 상기 <실험예 3>과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0088] 그 결과, DLD1 세포에 IK를 처리한 경우, Bax 단백질은 미토콘드리아 내에서 그 양이 증가하고, 세포질 내에서 감소하였으며, IK를 처리한 DLD1 세포에서 Bid 단백질의 감소하여 나타났다(도 10B). 이를 통해 본 발명의 이소에고마케톤에 의해 유도되는 암세포의 아포토시스는 Bid의 절단 및 Bax의 전위를 통한 암세포 사멸 효과가 있음을 알 수 있다.

[0089] <실험예 5> 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)의 카스파제(caspase) 비의존적 경로를 통한 암세포의 아포토시스 유도 효과 확인

[0090] AIF는 카스파제 비의존적 경로를 통한 아포토시스의 징표로, 아포토틱 자극 후에 미토콘드리아로부터 세포질 내로 사멸 자극에 대한 반응을 방출시킨 후, 핵내로 전위되어, 핵내 응축을 야기하는 것으로 알려져 있다(Huerta et al, 2006; Millan and Huerta, 2009).

[0091] 이러한 AIF가 이소에고마케톤(Ik)에 의해 유도되는 아포토시스와 연관되는지의 여부를 확인하기 위하여, 핵 내로 전위된 AIF의 양을 측정하였다.

[0092] 구체적으로, DLD1 세포에 25 및 50 μ M의 이소에고마케톤을 처리한 후, 상기 <실시예 3>의 방법을 통해 DLD1 세포 추출물을 얻은 다음, NuCLEAR 추출 키트(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO)를 이용하여 핵 및 세포질 분획물을 분리하였으며, Bio-Rad 단백질 어췌이(Bio-Rad)를 이용하여 단백질의 농도를 정량하였다. 이후, 항-AIF 항체(Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 일차 항체로 이용하여, 상기 <실험예 3>과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0093] 그 결과, 이소에고마케톤(IK)을 처리한 경우, AIF는 IK의 처리 농도에 의존적으로 미토콘드리아에서 감소되고 핵내에서 증가하였다(도 11).

[0094] 이러한 결과는 DLD1 세포 내에서 IK에 의한 아포토시스의 유도에서 AIF의 핵내 전위가 일어난다는 것을 의미하고, 따라서, 본 발명의 이소에고마케톤은 카스파제 비의존적 경로를 통해 암세포의 아포토시스를 유도하는 것을 알 수 있다.

[0095] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0096] <1-1> 산제의 제조

[0097] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 200 mg

[0098] 유당 100 mg

[0099] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

- [0100] <1-2> 정제의 제조
- [0101] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 100 mg
- [0102] 옥수수전분 100 mg
- [0103] 유 당 100 mg
- [0104] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0105] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0106] <1-3> 캡슐제의 제조
- [0107] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 100 mg
- [0108] 옥수수전분 100 mg
- [0109] 유 당 100 mg
- [0110] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0111] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0112] <1-4> 환의 제조
- [0113] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 100 mg
- [0114] 유당 150 mg
- [0115] 글리세린 100 mg
- [0116] 자일리톨 50 mg
- [0117] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0118] <1-5> 과립의 제조
- [0119] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 150 mg
- [0120] 대두 추출물 50 mg
- [0121] 포도당 200 mg
- [0122] 전분 600 mg
- [0123] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0124] <제조예 2> 식품의 제조
- [0125] <2-1> 밀가루 식품의 제조
- [0126] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0127] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0128] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의

수프 및 육즙을 제조하였다.

[0129] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0130] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0131] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0132] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0133] <2-5> 선식의 제조

[0134] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알과화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0135] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0136] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0137] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 [화학식 1]의 화합물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0138] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0139] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0140] [화학식 1]의 화합물(3 중량부),

[0141] 영지(0.5 중량부),

[0142] 지황(0.5 중량부)

[0143] <제조예 3> 음료의 제조

[0144] <3-1> 건강음료의 제조

[0145] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0146] <3-2> 야채 주스의 제조

[0147] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 1 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0148] <3-3> 과일 주스의 제조

[0149] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

산업상 이용가능성

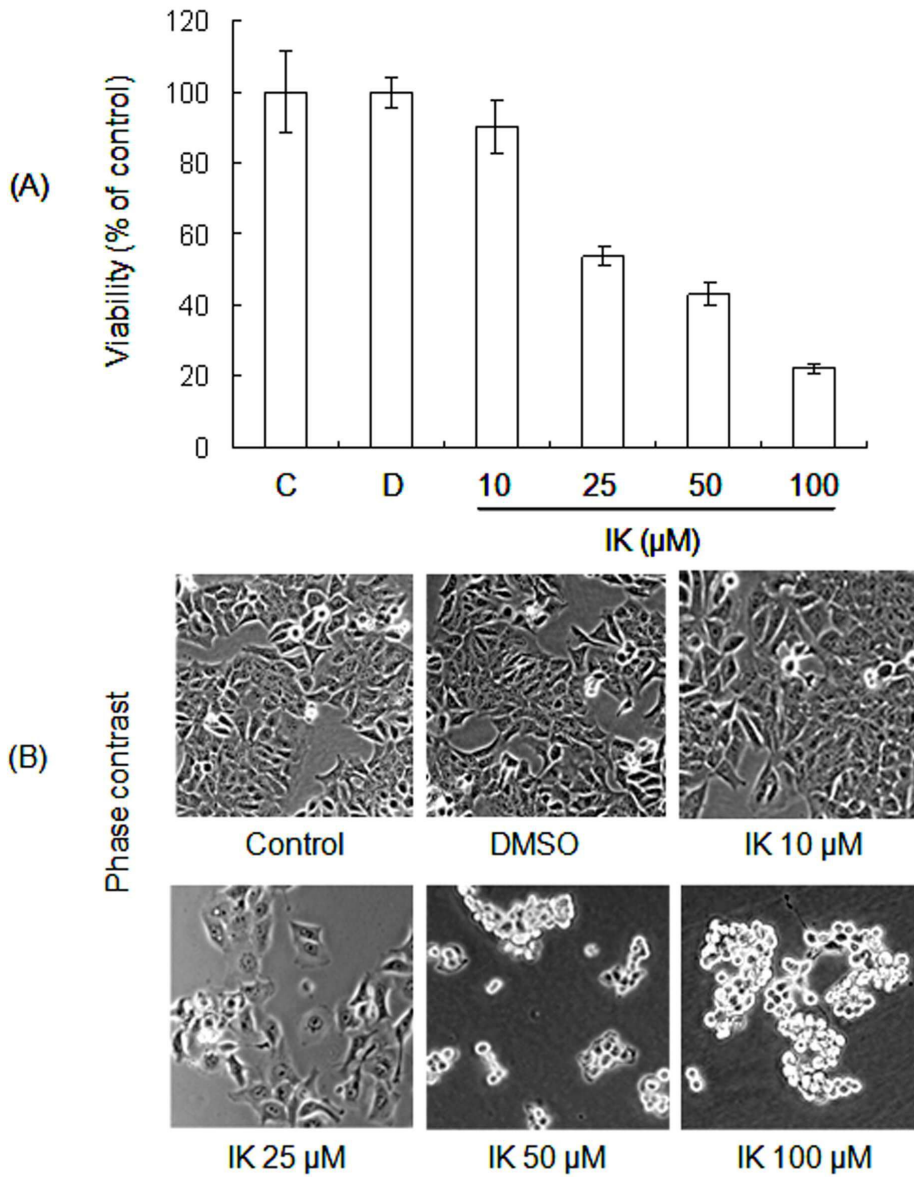
[0150] 상기에서 보는 바와 같이, 본 발명의 이소에고마케톤(isoegomaketone, IK)은 암 예방 및 치료제, 또는 암 예방

및 개선용 건강식품의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

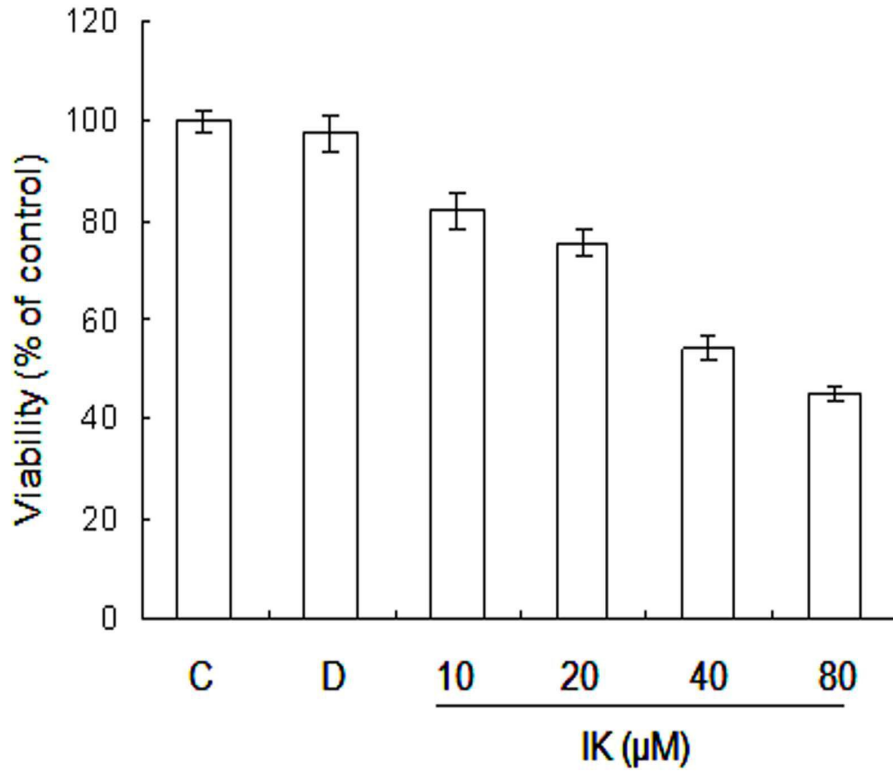
도면1

DLD1 대장암 세포주에서 IK의 세포 독성



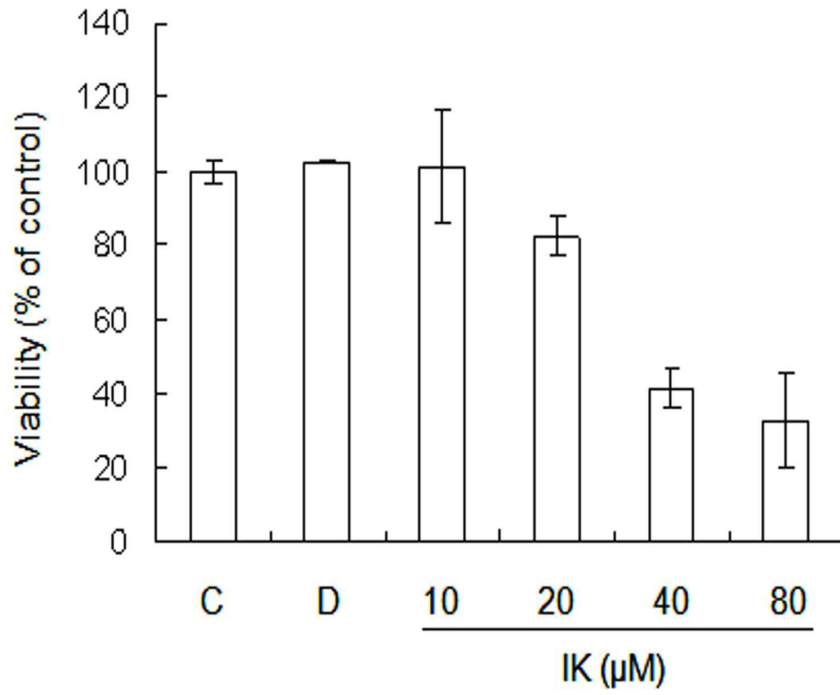
도면2

HT-29 대장암 세포주에서 IK의 세포 독성



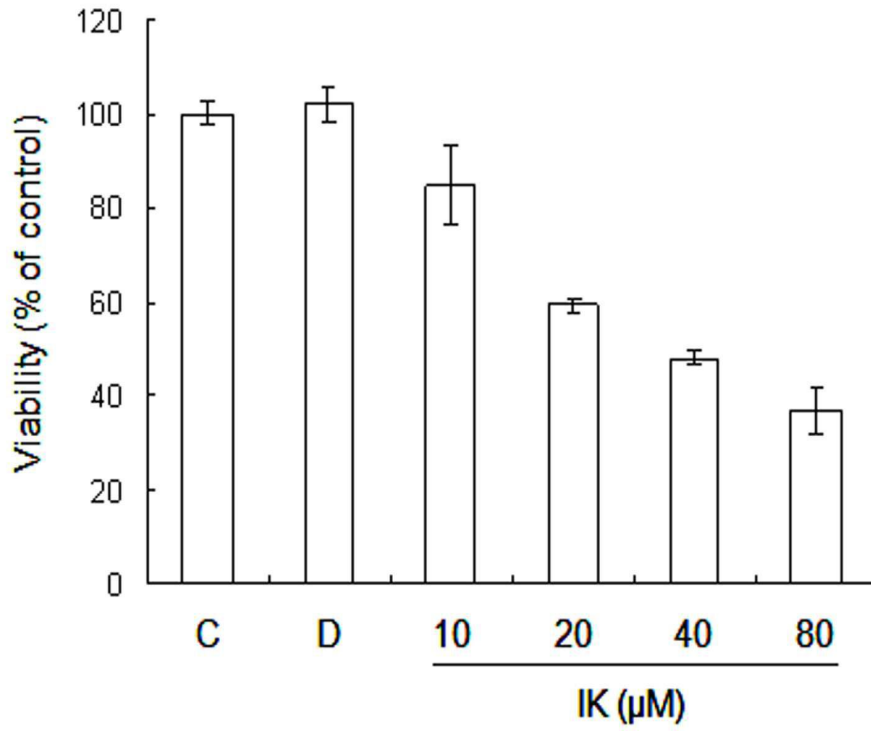
도면3

PC-3 전립선암 세포주에서 IK의 세포 독성



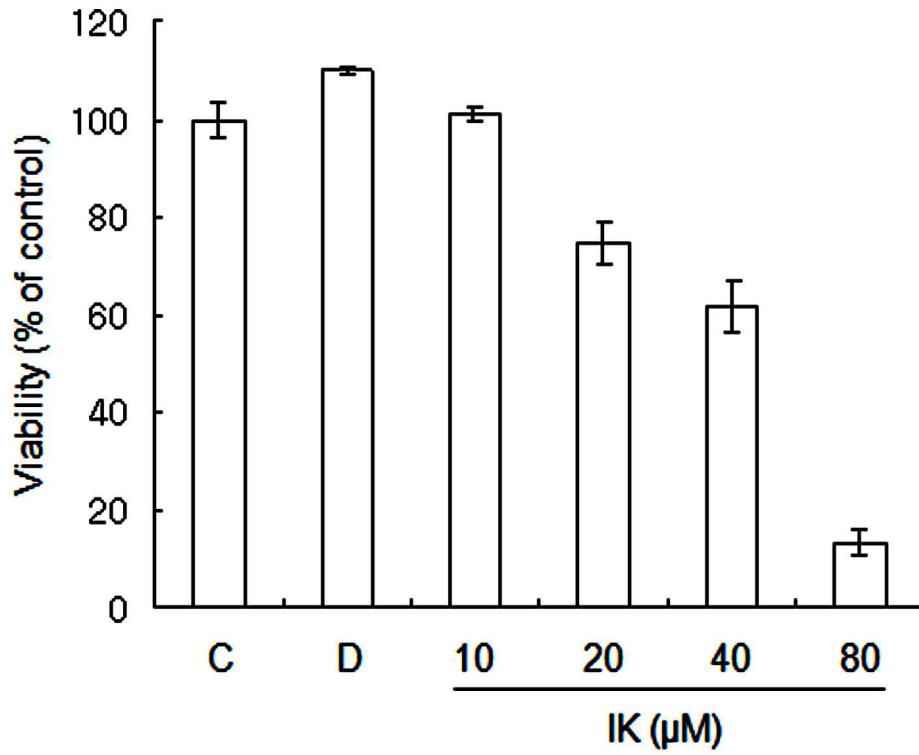
도면4

DU145 전립선암 세포주에서 IK의 세포 독성



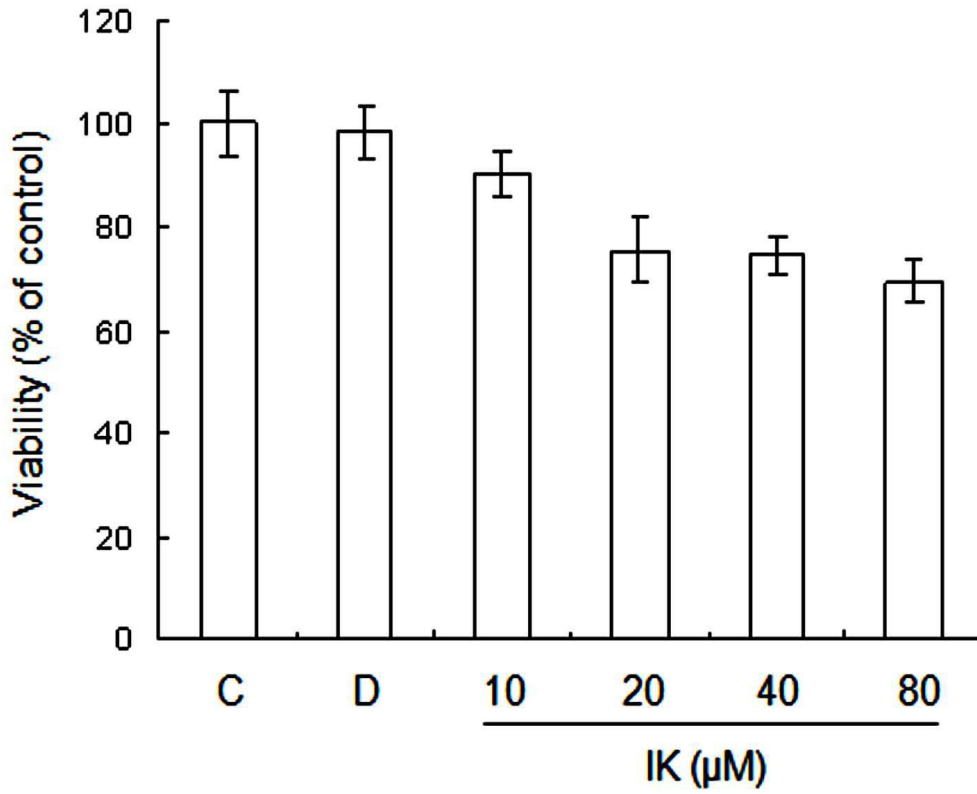
도면5

Hela 자궁암 세포주에서 IK의 세포 독성

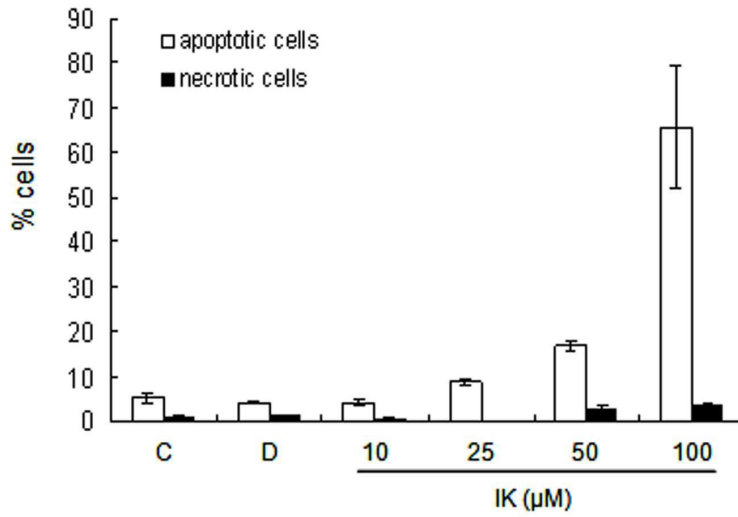
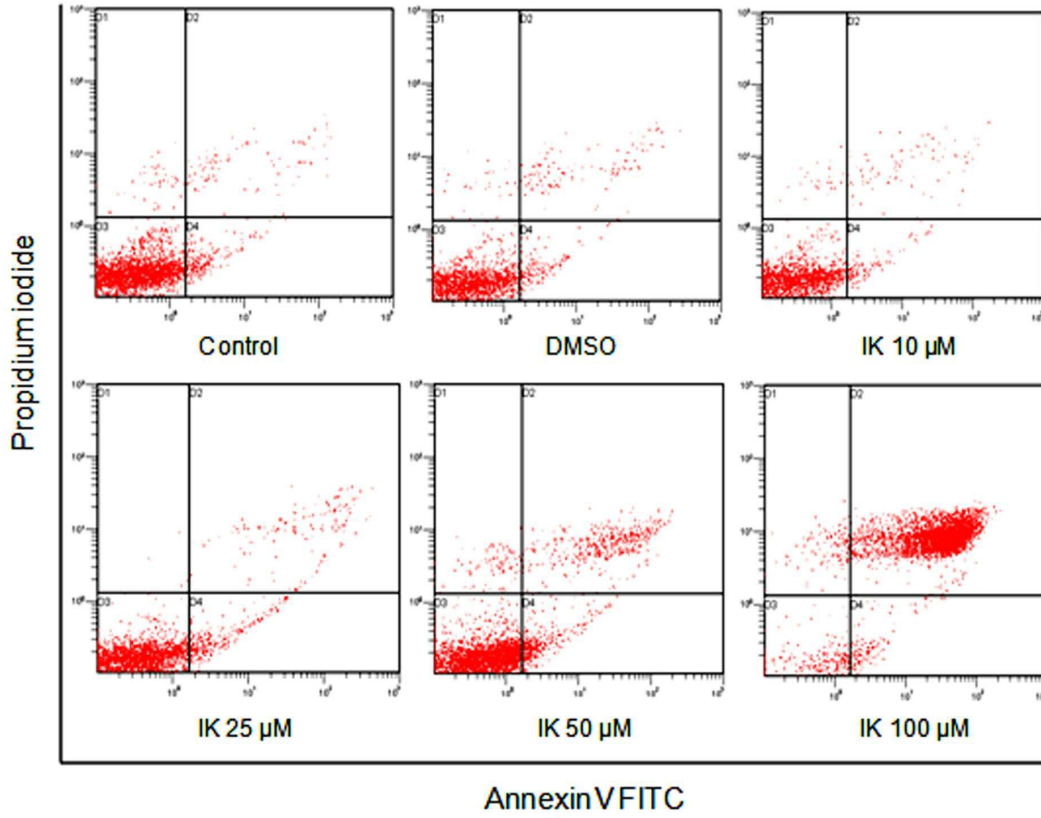


도면6

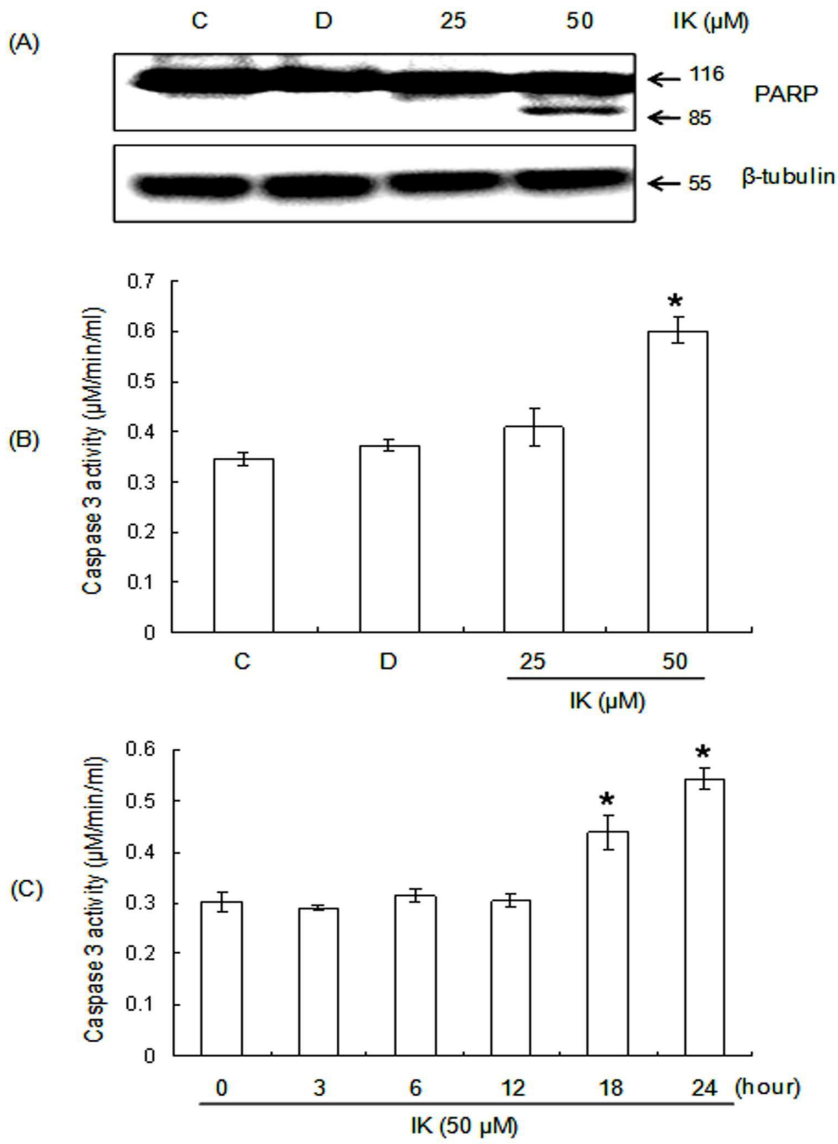
U2OS 골육종 세포주에서 IK의 세포 독성



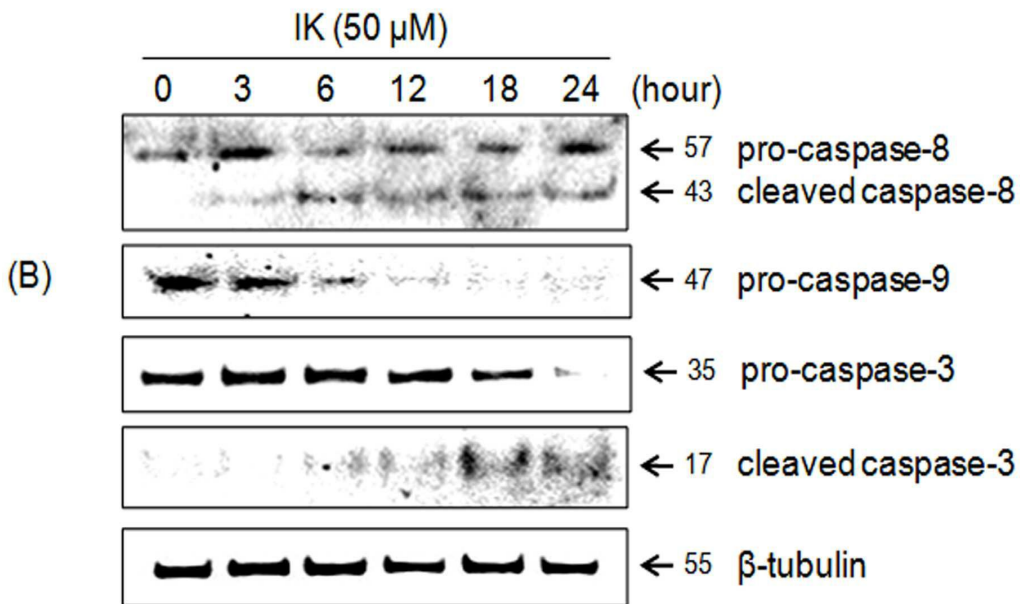
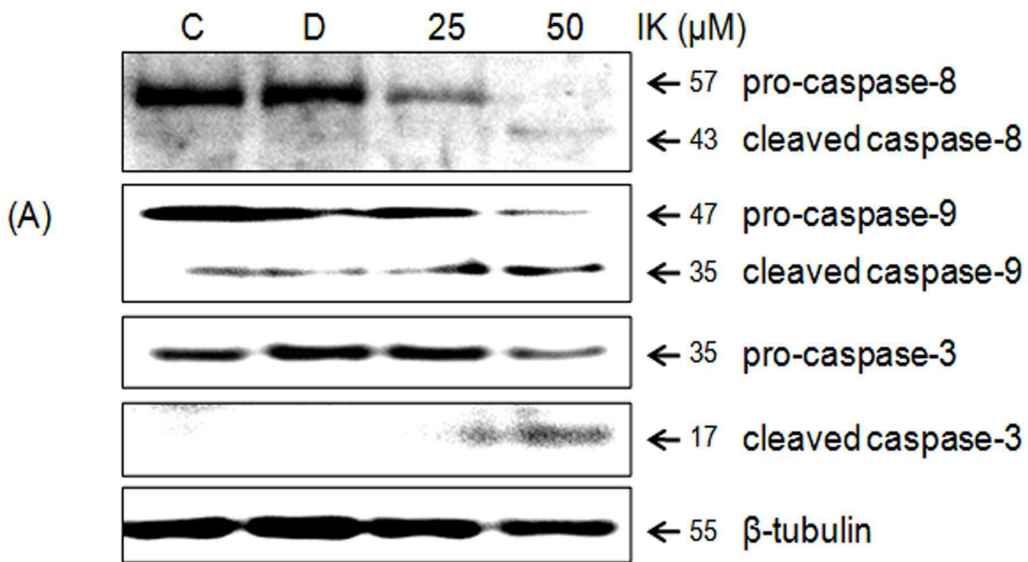
도면7



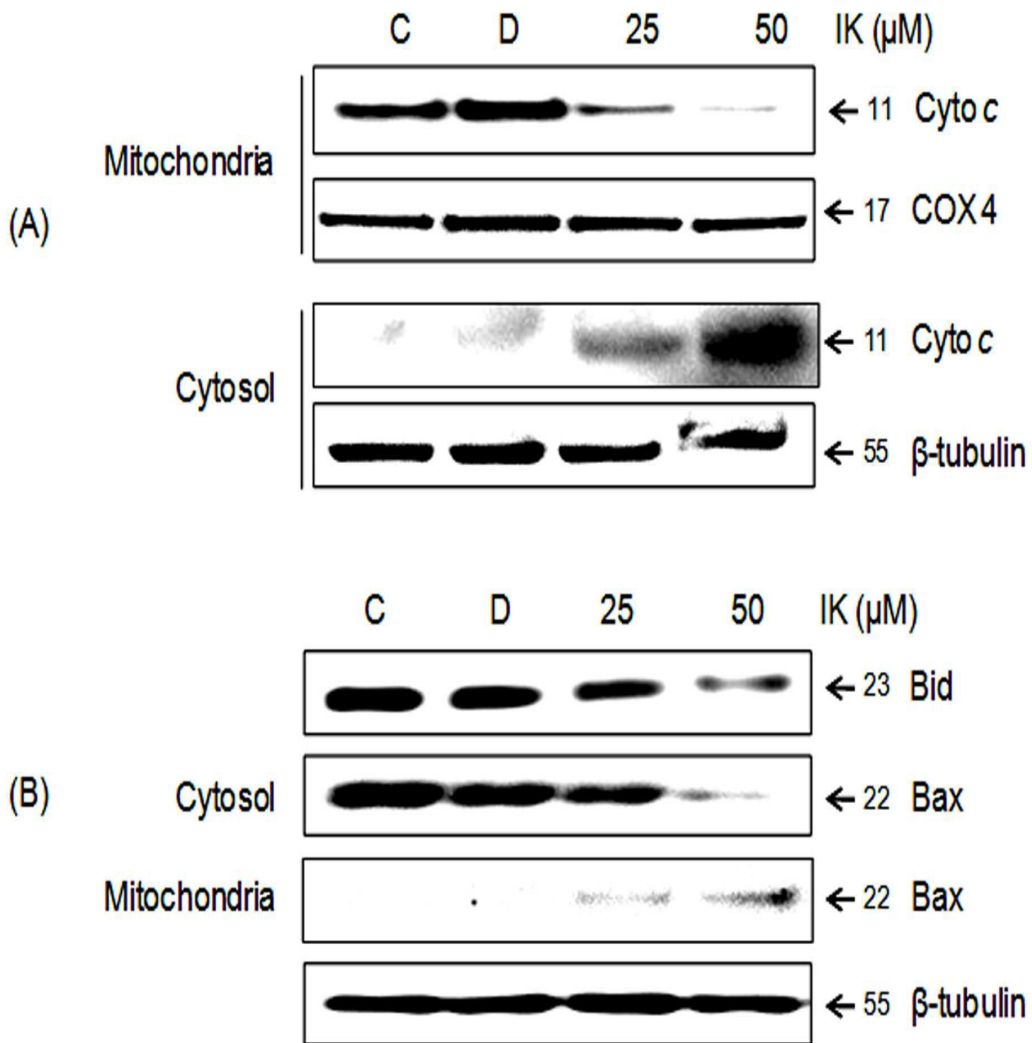
도면8



도면9



도면10



도면11

