



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036901
(43) 공개일자 2009년04월15일

(51) Int. Cl.

A61K 36/61 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0102198

(22) 출원일자 2007년10월10일

심사청구일자 2007년10월10일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

윤호근

경기 고양시 덕양구 행신동 소만마을 풍림아파트
801동 205호

이유현

서울 강남구 도곡1동 161 삼성아파트 5동 1105호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항

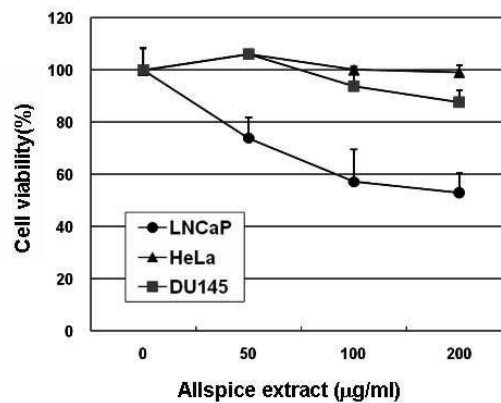
(54) 올스파이스 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 올스파이스 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 히스톤 아세틸 전이효소 (HAT) 저해능을 가지는 올스파이스 추출물의 안드로젠 수용체 매개 암, 특히 전립선암에 대한 항암용 의약품 및 건강 보조 식품의 천연소재로서의 신규 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 올스파이스 추출물은 히스톤 아세틸 전이효소의 활성을 억제하는 효과가 우수하여 암, 특히 호르몬 수용체 매개 암, 예를 들어 전립선암의 예방, 개선 또는 치료에 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

전우진

광주 북구 일곡동 롯데아파트 106동 1703호

김건홍

서울 용산구 원효로4가 강변삼성아파트 102동 1403호

허용민

서울 광진구 광장동 현대아파트 501동 507호

함승주

서울 마포구 상암동 월드컵파크 7단지 아파트 706동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 7-2007-0066 / 7-2007-0274

부처명 농림부 / 농림부

연구사업명 바이오그린21 / 한국 과학재단 기초의과학 연구센터(MRC)

연구과제명 향 히스톤 아세틸화 및 항암 활성 함유 천연물신약 소재의개발 / 만성대사성 질환 기초의
과학 센터(MRC)

주관기관 연세대학교(의과대학) / 연세대학교(의과대학)

연구기간 2007년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일 / 2007년 09월 01일 ~ 2008년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

울스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

울스파이스 추출물은 물, 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 그것의 혼합용매로 추출한 것, 또는 상기 저급알코올 추출물의 부탄올 분획인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

유효량의 울스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 포함하는 호르몬 수용체 매개 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

호르몬 수용체 매개 암은 전립선암 인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

울스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

청구항 7

제6항에 있어서,

울스파이스 추출물은 물, 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 그것의 혼합용매로 추출한 것, 또는 상기 저급알코올 추출물의 부탄올 분획인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

청구항 8

제6항에 있어서,

유효량의 울스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 포함하는 식품 또는 식품첨가제인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

청구항 9

제6항에 있어서,

유효량의 울스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 포함하는 음료 또는 음료첨가제인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 암은 호르몬 수용체 매개 암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

청구항 11

제10항에 있어서,

호르몬 수용체 매개 암은 전립선암 인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품.

청구항 12

올스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 히스톤 아세틸 전이효소 (HAT) 저해제.

청구항 13

제12항에 있어서,

올스파이스 추출물은 물, 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 그것의 혼합용매로 추출한 것, 또는 상기 저급알코올 추출물의 부탄올 분획인 것을 특징으로 하는 히스톤 아세틸 전이효소 (HAT) 저해제.

청구항 14

제12항에 있어서,

유효량의 올스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 포함하는 항염증제인 것을 특징으로 하는 히스톤 아세틸 전이효소 (HAT) 저해제.

청구항 15

제12항에 있어서,

유효량의 올스파이스 (*Pimenta diocia*) 추출물을 포함하는 후천성면역결핍증 치료제인 것을 특징으로 하는 히스톤 아세틸 전이효소 (HAT) 저해제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 올스파이스 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 히스톤 아세틸 전이효소 (HAT) 저해능을 가지는 올스파이스 추출물의 안드로젠 수용체 매개 암, 특히 전립선암에 대한 항암용 의약품 및 건강 보조 식품의 천연소재로서의 신규 용도에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 전립선암은 미국 성인 남성 사망원인 중 1위를 차지하며, 식생활 및 생활습관의 변화로 우리나라에서도 최근 발생이 급격히 증가하여 현재 성인남성 암 중 발생 증가율 1위이다. 전립선암의 발달과 진행에 필수적인 안드로젠 수용체들은 스테로이드 호르몬 수용체 상과 (steroid hormone receptor superfamily)에 속하며, 남성호르몬인 안드로젠 (androgen)은 생식계의 발달과 유지 및 전립선의 성장에 필수적이며, 이러한 리간드 의존 호르몬 수용체의 활성을 조절한다 (Park, S.K. *et al. Prostate* 66(12):1285-91 (2006); Taplin M.E. *et al. J Cell Biochem.* 15; 91(3):483-90, 2004; Chen, L. *et al. Mol Cancer Ther.* 4(9):1311-9, 2005; Yoon, H.G. *et al. Mol Endocrinol.* 20(5):1048-60, 2006).

<3> 히스톤은 유전정보를 가진 DNA와 단단히 결합되어 핵 안에서 뉴클레오솜을 구성하고 있으며, 이러한 DNA 결합 단백질의 해독 후 변형과정은 유전자 발현 및 신호 전달체계를 조절할 수 있다. 이러한 변형과정 중 히스톤의 아세틸화는 크게 두 가지 효소인 히스톤 아세틸 전이효소 (histone acetyltransferase: HAT)와 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase: HDAC)가 조절하며, 이들은 전사 인자와 신호 전달 매개 인자와 같은 비히스톤 단백질의 활성도 조절할 수 있다. HAT 단백질들이 호르몬 수용체들의 아세틸화를 증가시키며 아세틸화된 호르몬 수용체들은 각각의 표적 단백질을 과도하게 발현시켜 암 성장과 발달을 증가시키는 원인이 된다. 결국 호르몬 수용체 관련 암들에서 과아세틸화 (hyperacetylation)의 저해는 새로운 암 억제제를 탐색할 수 있는 분자목표로 인식이 되며, 특히 안드로젠 수용체와 히스톤의 과아세틸화는 안드로젠 수용체 비의존성 전립선암의 발달과 깊은 연관성이 있고 암 세포주를 대상으로 한 *in vitro* 실험에서 세포사멸 억제 기전이 보고되었다 (Kang, J. *et al. Biochem Pharmacol.* 69(8):1205-13, 2005; Stimson, L. *et al. Mol Cancer Ther.* 4(10):1521-32, 2005;

Balasubramanya, K. *et al.* *J Biol Chem.* 279(49):51163-71, 2004; Druesne, N. *et al.* *Carcinogenesis* 25(7):1227-36, 2004; Fu, M. *et al.* *Biochem Pharmacol.* 68(6):1199-208, 2004).

<4> 이러한 아세틸화를 조절하려는 목적으로 지금까지 주로 HDAC 단백질을 암 치료를 위한 목표 단백질로 하여 HDAC 활성 저해제들이 발표되었다. 이러한 다양한 HDAC 저해제에 비하여 상대적으로 제한된 HAT 저해제들이 발표되었다. 현재까지 연구된 저해제로는 합성 펩타이드-CoA 컨쥬게이트, 이소티아졸론 (isothiazolone), 폴리프레닐레이티드 벤조페논 (polyprenylated benzophenone), 커큐민 (curcumin), 아나카르딘산 (anacardic acid) 등이 있다 (Kang, J. *et al.* *Biochem Pharmacol.* 69(8):1205-13, 2005; Inche, A.G. *Drug Discov Today.* 11(3-4):97-109, 2006; Lau, O. D. *et al.* *Mol Cell.* 5(3):589-95, 2000; Debes, J. D. *et al.* *Cancer Res.* 63(22):7638-40, 2003; Sun, Y. *et al.* *FEBS Lett.* 580(18):4353-6, 2006). 최근 펩타이드-CoA 컨쥬게이트, 이소티아졸론 (isothiazolone) 등의 합성 화합물보다는 보다 안전성 확보가 용이한 식물 유래 저해제들에 관한 연구가 활발해지고 있다. 상기 언급한 울금에서의 커큐민 (curcumin), 캐슈넛으로부터 아나카르딘산 (anacardic acid), 그리고 가르시니아 인디카 (*Garcinia indica*)에서의 벤조페논 (benzophenone) 등이 식물 유래 HAT 저해제의 예이다. 이러한 HAT 저해 활성 함유 식물 추출물의 확보는 새로운 항암제의 개발을 위해 지속적으로 필요하다.

<5> 올스파이스는 피멘타 디오이카 (*Pimenta dioica*)의 말린 열매로서 향은 시나몬, 클로브, 너트메그, 페퍼의 혼합향을 갖기 때문에 올스파이스라는 이름이 붙여지게 되었으며, 용도는 각종 야채, 커피, 주스, 파이, 케이크, 생선, 가금, 육류의 조리에 풍미를 부여하기 위하여 널리 사용되는 향신료로서 다른 향신료와 마찬가지로 우수한 방부효과 및 항산화효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Kluth *et al.* *Free radical biology and medicine*, 2007, 42, 315-325; 박찬성 저, 1997, 한국조리과학회지, vol. 13(2), 106-111, 1998). 올스파이스는 유제놀 (eugenol)을 주성분으로 하는 2~5%의 정유성분 및 다양한 페놀류 화합물을 함유하고 있다. 현재까지 항균 및 항산화효과가 입증되었으나 (Ramos *et al.* *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 87, 241-246; Kikuzaki *et al.* *phytochemistry*, 1999, 52, 1307-1312), 전립선암을 비롯한 호르몬 수용체 관련 암의 예방 또는 치료를 위한 HAT 활성 저해제로서 보고된 바는 없다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

- <6> 본 발명의 목적은 올스파이스 추출물의 HAT 활성 억제능을 조사함으로써 암, 특히 호르몬 수용체 매개 암, 예를 들어 전립선암의 예방 또는 치료적 용도를 제공하고자 한다.
- <7> 본 발명의 다른 목적은 올스파이스 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 약학적 제제 및 건강 보조 식품을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- <8> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 올스파이스 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- <9> 본 발명에 따른 조성물은 유효량의 올스파이스 추출물을 포함하는 호르몬 수용체 매개 암 특히, 전립선암의 예방 또는 치료용 약제학적 제제로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 약제학적 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- <10> 또한, 본 발명에 따른 조성물은 유효량의 올스파이스 추출물을 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강 보조 식품으로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 건강 보조 식품은 식품 또는 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제로 사용하는 것이 좋다.

효 과

- <11> 본 발명의 올스파이스 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물은 히스톤 아세틸 전이효소의 활성을 억제하는 효과가 우수하여 암, 특히 호르몬 수용체 매개 암, 예를 들어 전립선암의 예방, 개선 또는 치료에 뛰어난 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <12> 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

- <13> 본 발명은 500여 종의 식·약용 식물을 대상으로 추출한 추출물 중에서 호르몬 매개 암의 성장과 발달에 관여하는 HAT의 저해활성을 갖는 식물 유래 추출물을 인간 암 세포주인 HeLa 세포주에서 추출한 핵단백질 (nuclear extract)을 이용하여 선정하고, 선정된 추출물을 대상으로 인간 전립선암 세포주인 LNCaP 세포주를 이용하여 *in vitro* 상에서 암세포주의 성장 억제 및 전사활성 억제와 안드로젠 수용체 조절 유전자의 mRNA 발현 억제 분자기전을 확인하여 항암활성을 보이는 올스파이스의 추출물을 획득함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <14> 따라서, 본 발명은 HAT 활성 억제제인 올스파이스 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공함을 특징으로 한다.
- <15> HAT 활성 억제제에 있어서, 전립선암과 밀접한 관련을 맺고 있는 HAT의 작용기작 및 이들에 의한 항암 또는 항염증 또는 후천성면역결핍증 치료에 관한 내용들이 당업계에 널리 알려져 있으므로 (Stimson, L. *et al. Mol Cancer Ther.* 4(10):1521-32, 2005; Balasubramanyam, K. *et al. J Biol Chem.* 279(49):51163-71, 2004; Balasubramanyam, K. *et al. J Biol Chem.* 279(32):33716-26, 2004; Adcock, I. *et al. Curr Opin Immunol.* 19:1-7), HAT 활성을 억제하는 올스파이스 추출물이 호르몬 수용체 매개 암, 특히 전립선암, 또는 염증 또는 후천성면역결핍증의 예방 및/또는 치료제로서 유용성이 있음은 자명하다.
- <16> 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 조성물은 암, 특히 호르몬 수용체 매개 암, 예를 들어 전립선암의 예방 또는 치료용 약제학적 제제로 제조될 수 있다.
- <17> 상기 약제학적 제제는 향신료인 올스파이스로부터 분리한 천연 소재를 사용함으로써 기존의 유기합성 약제에 비해 부작용이 없고, 안전성이 매우 높은 특징을 가지고 있다.
- <18> 본 발명의 올스파이스 추출물의 분리방법은 특별히 한정되지는 않으나, 물 또는 탄소수 1~6의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 90~100℃에서 추출한 후 감압 농축하거나 상기 탄소수 1~6의 저급알코올, 특히 메탄올 추출물에 대해 각종 유기용매, 예컨대, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올로 추가 분획할 수도 있으며, 유기용매 분획 후 각종 크로마토그래피로 추가 정제될 수도 있다.
- <19> 본 발명의 올스파이스 추출물에는, 추출, 분획 및 정제 처리의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그 회석액 또는 농축액 또는 그 건조물 중 어느 하나를 포함하는 것으로 한다. 바람직하게는, 올스파이스의 열수 또는 메탄올 추출물, 보다 바람직하게는 메탄올 추출물의 부탄올 분획을 사용하는 것이 좋다.
- <20> 본 발명의 암 예방 또는 치료용 조성물은 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 과립, 정제, 캡슐 또는 드링크제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 또한, 보존이나 취급을 용이하게 하기 위하여 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 통상 제제화에 사용되는 담체, 그 밖의 임의의 조제를 부가하여도 좋다. 또한, 식품 또는 약물에 통상적으로 첨가되는 보조적인 원료 또는 첨가물로는 특히 제한되지 않으나, 예컨대, 포도당, 과당, 자당, 말토오스, 솔비톨, 스테비오사이드, 룩소사이드, 콘시럽, 유당, 구연산, 주석산, 사과산, 호박산, 유산, L-아스코르빈산, d1- α -토코페롤, 엘리솔빈산 나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 글리세린지방산 에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 자당지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, 아라비아검, 칼라기난, 카제인, 젤라틴, 펙틴, 한천, 비타민 B류, 니코틴산 아미드, 팬트텐산 칼슘, 아미노산류, 칼슘염류, 색소, 향료, 보존제 등을 들 수 있다.
- <21> 또한, 본 발명은 올스파이스 추출물을 유효성분으로 포함하는 암, 특히 호르몬 수용체 매개 암, 예를 들어 전립선암의 예방 또는 개선용 건강 보조 식품을 제공한다.
- <22> 건강 보조 식품이란, 올스파이스 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강 보조 식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 항암 및 암 예방 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.
- <23> 본 발명의 건강 보조 식품에 있어서, 올스파이스 추출물의 첨가량은 대상인 건강 보조 식품의 종류에 따라 달리 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되고, 대상 식품에 대하여 통상 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1~100 중량%, 바람직하게는 5~100 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.
- <24> 또한, 본 발명의 유효량의 올스파이스 추출물을 포함하는 약제학적 제제인 경우, 성인 하루당 섭취량이 1~3,000mg이 되도록 투여하는 것이 적당하다. 또한, 투여량은 연령, 증상 등에 따라 적당히 증감하는 것이 가능하다.

다.

- <25> 다음은 상기와 같이 구성된 본 발명에 대해 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서는 자명할 것이다.
- <26> <실시예 1> 올스파이스 열수 및 메탄올 추출물의 제조
- <27> 올스파이스 분말 (유양 스파이스 Co.) 5g을 100℃에서 5분간 블랜칭(blanching)하여 열수 추출의 경우 시료의 5배 량의 증류수를 가하여 환류 추출하였고, 메탄올 추출의 경우 시료의 5배 량의 메탄올을 가하여 실온에서 24시간 정치하고, 이 과정을 3회 반복한 다음, 그 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 올스파이스 열수 및 메탄올 추출물을 얻었다.
- <28> <실시예 2> 올스파이스 추출물의 HAT 억제 활성 조사
- <29> 사람의 전립선암 세포주인 LNCaP 세포(American Cell Type Collection; ATCC, VA, USA)를 150mm 플레이트에 완전한 컨플루언스 (confluence)에 이르도록 키운 뒤 수거한 후, 1,000rpm에서 3분 동안 원심분리하여 펠렛을 수집하였다. 수집한 펠렛에 냉 완충용액 A (cold buffer A, 10mM pH 7.9 Hepes, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF) 20mL를 넣고 얼음에 10분간 방치한 후 4℃, 3,000rpm에서 5분간 원심분리를 실시한 다음, 펠렛을 다시 수집하여 상기와 같은 완충용액 A 6mL를 넣고 균질화하였다. 만들어진 세포 균질액을 4℃, 12,500rpm에서 30분간 원심분리하고 펠렛을 수집하여 완충용액 C (20mM pH 7.9 Hepes, 25% 글리세롤, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF) 4mL를 넣고 재현탁하여 얼음에서 30분간 방치하고, 4℃, 12,500rpm에서 30분간 다시 원심분리 하였다. 최종적으로 상등액을 4℃, 30,000rpm에서 1시간 원심분리하여 얻은 상등액을 수집하여 실험에 사용하였다.
- <30> HAT 억제 활성 측정을 위해, 상기에서 제조한 핵단백질 (nuclear extract) 5μg과 올스파이스 열수 또는 메탄올 추출물을 첨가하여 HAT 활성 측정용 비색정량키트를 사용하여 흡광도 440nm에서 활성을 측정하였다 (Biovision, CA, USA). 여기서 HAT 활성 억제능(%)은 다음 식에 따라 환산하였다.
- <31> HAT 활성 억제능(%)= $[1 - (As - Ab / Ac - Ab)] \times 100$
- <32> Ac: 증류수 처리구의 흡광도
- <33> Ab: blank의 흡광도
- <34> As: 샘플 처리구의 흡광도
- <35> 결과적으로, 올스파이스 열수 및 메탄올 추출물에서 각 35~40%의 동등한 억제 활성을 얻었으므로(미도시됨), 수율이 높은 메탄올 추출물을 실험에 사용하였다.
- <36> 도 1에 나타난 바와 같이, 올스파이스의 메탄올 추출물을 0, 50, 100, 200μg/mL의 농도로 처리했을 때 25~35% 억제활성을 확인할 수 있었다.
- <37> 상기 메탄올 추출물을 대상으로 유기용매 분획을 실시하였다. 올스파이스 분말을 100℃에서 5분간 블랜칭하여 생체세포내 효소를 불활성화시키고 분쇄한 후, 실온에서 시료의 다섯 배의 95% 메탄올로 24시간 정치하여 추출하는 방법을 3회 반복한 다음, 그 추출물을 감압 농축하였다. 상기의 농축물에 1L의 헥산, 클로로포름, 부탄올 순으로, 각 용매당 36시간 동안 3회 용매를 교환하여 분획대기로 분획하고 남은 것을 물에 녹였으며 각각의 용매 분획물을 여과포로 여과하고 여액을 감압 농축한 후 건조하여 추출물을 얻었다 (도 2).
- <38> 도 3에 나타난 바와 같이, #4의 부탄올 분획에서 60% 이상의 높은 억제 활성을 보였다. 따라서, 이하 실시예에서는 올스파이스 메탄올 추출물의 부탄올 분획을 실험에 사용하였다.
- <39> <실시예 3> 올스파이스 부탄올 분획의 면역침강법(IP, Immunoprecipitation)을 이용한 효소 특이적 HAT 억제 활성 조사
- <40> P300 및 CBP 등의 효소 특이적 HAT 단백질에 대한 활성을 측정하고 저해 특이성을 검토하기 위하여, 상기 실시예 2와 같은 방법으로 제조한 LNCaP 핵단백질(nuclear extract) 50μg를 4℃에서 2시간 동안 미리 세정(pre-clearing)한 후 Protein A/G agarose bead (10μL, Santa Cruz, CA, USA)와 p300 및 CBP 단백질의 항체 2μL를 첨가하여 밤새도록 IP하여 세척한 후, 용출된 생성물 (eluted product)로 상기 실시예 2의 방법에 따라 올스파

이스 부탄올 분획을 농도별 (50~200 μ g/mL)을 첨가하고 HAT 분석을 실시하여 특이적 억제활성을 비교하였다.

- <41> 도 4에 나타난 바와 같이, 올스파이스 부탄올 분획 100 μ g/mL의 농도에서 CBP (50%)와 P300 (70%)에 억제 효과가 있음을 확인하였다.
- <42> CBP 및 p300의 경우, 히스톤 뿐만 아니라 안드로젠 수용체의 아세틸화에 직접적으로 관련되어 있다고 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 보고되어 있다. 상기 실험결과로 볼 때, 올스파이스 부탄올 분획의 경우, CBP 및 p300의 HAT 활성을 억제시킴으로써 전립선암세포의 성장과 밀접한 관련이 있는 안드로젠 수용체의 아세틸화를 억제시키는데 탁월한 효과가 있는 것으로 사료된다.
- <43> <실시예 4> 전립선암 세포주에서 올스파이스 부탄올 분획의 전사활성 억제능 조사
- <44> 전립선암 세포주인 LNCaP 세포주를 10%(w/v) 소태아혈청 (fetal bovine serum) 함유 RPMI 1640 배지에 3일 배양하고 LNCaP 세포주를 10% CS-FCS (charcoal-stripped FCS, 라이프 테크놀로지스) 함유 phenol red-free RPMI 1640 배지로 교환하여 다시 2일간 배양한 후 PSA (prostate-specific antigen) 조절 프로모터 부위를 포함한 발광효소 발현 분석 (Luciferase reporter assay)용 벡터 (pGL3-PSA: 연세대 의대)로 통상의 방법에 따라 트랜스펙션 (transfection)을 시행하였다. 합성 안드로젠 R1881 (17 β -hydroxy-17 α -methyl-19-norandrost-4,9,11-tri β n-3-one, 퍼킨 엘머)을 50nM로 처리하고, 60시간 후 50, 100 μ g/mL의 올스파이스 부탄올 분획을 처리하여 16시간 경과 뒤 세포의 용해물 (lysate)을 이용하여 리포터 분석을 시행하였다.
- <45> 도 5에 나타난 바와 같이, 올스파이스 부탄올 분획이 100 μ g/mL의 농도에서 대조군과 비슷한 수준으로 전사를 억제함을 확인할 수 있었다.
- <46> <실시예 5> 전립선암 세포주에서 올스파이스 부탄올 분획의 안드로젠 수용체 조절 유전자의 mRNA에 대한 발현 억제 조사
- <47> LNCaP 세포주를 10%(w/v) 소태아혈청 함유 RPMI 1640 배지에 3일 배양하고 LNCaP 세포주를 10% CS-FCS (charcoal-stripped FCS, 라이프 테크놀로지스) 함유 phenol red-free RPMI 1640 배지로 교환하여 다시 3일간 배양한 후 50nM 농도의 합성 안드로젠 R1881를 처리하였다. 다시 6시간 후 최종농도 100 μ g/mL로 올스파이스 부탄올 분획을 처리하여 16시간 경과 뒤 총 RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행하였다. 관련 표적 유전자의 프라이머 (target gene primer)는 다음과 같다:
- <48> ① TSC22:
- <49> Forward primer(서열번호 1): 5'-ATTTTCTCTATTAGTTCTTTGATTG-3'
- <50> Reverse primer(서열번호 2): 5'-GACTTGATAATAGCTCCTCTGGT-3'
- <51> ② PSA:
- <52> Forward primer(서열번호 3): 5'-GCCACCCAGGAGCCAGCACT-3'
- <53> Reverse primer(서열번호 4): 5'-GGCCCCCAGAATCACCCGAGCAG-3'
- <54> ③ GAPDH:
- <55> Forward primer(서열번호 5): 5'-CGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC-3'
- <56> Reverse primer(서열번호 6): 5'-CTCCGACGCTGCTTACCACCTTCTT-3'
- <57> 상기의 프라이머로 94 $^{\circ}$ C, 2분; 94 $^{\circ}$ C, 30초, 55 $^{\circ}$ C, 30초, 72 $^{\circ}$ C, 30초의 27 사이클; 익스텐션은 94 $^{\circ}$ C, 5분의 조건으로 RT-PCR을 수행한 결과, R1881 (합성 안드로젠)의 처리로 증가되었던 안드로젠 수용체 표적 유전자의 mRNA 발현이 올스파이스 부탄올 분획을 처리함에 따라 R1881 (합성 안드로젠) 무처리군과 동일한 수준으로 감소하였다 (도 6).
- <58> <실시예 6> 전립선암 세포주에서 올스파이스 부탄올 분획의 안드로젠 수용체 및 히스톤 아세틸화 억제 활성 조사
- <59> 올스파이스 추출물의 안드로젠 수용체 아세틸화 억제활성을 검토하기 위하여, 100mm 세포배양접시에 전립선암 세포주 (LNCaP)를 10%(w/v) 소태아혈청 (fetal bovine serum) 함유 RPMI 1640 배지에 배양하고 컨플루언스 (confluence)에 도달하면 10% CS-FCS (charcoal-stripped FCS, 라이프 테크놀로지스) 함유 phenol red-free RPMI 1640 배지로 교환하여 다시 2일간 배양하여 합성 안드로젠인 R1881 (50nM)과 올스파이스 부탄올 분획 (100

$\mu\text{g/mL}$)을 처리하여 18시간 후 세포를 수거하였다. 수거한 세포를 라이시스 버퍼 (Lysis buffer)로 파쇄한 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 대상으로 아세틸 라이신 (acetyl lysine) 단백질 항체에 대해서 면역침강법 (immunoprecipitation)을 수행하였다. 4°C에서 18시간 동안 IP를 실시한 후 비드 (A/G PLUS agarose bead, Santa Cruz)를 수거하여 안드로젠 수용체 항체에 대하여 면역 블랏팅 (immunoblotting)을 수행하였다.

<60> 도 7A에 나타난 바와 같이, R1881 (합성 안드로젠)의 처리로 증가되었던 안드로젠 수용체의 아세틸화가 올스파이스 부탄을 분획을 처리함에 따라 R1881 (합성 안드로젠) 무처리군과 동일한 수준으로 감소하였다.

<61> 다음으로, 올스파이스 추출물의 히스톤 아세틸화 억제 조절을 검토하기 위하여 150mm 세포배양접시에 전립선암 세포주 (LNCaP)를 상기와 같은 조건에서 처리하여 수거하였다. 수거한 세포를 1% 포르말데히드를 포함한 PBS로 고정하고, 10mM 디티오쓰레이톨 (dithiothreitol)을 포함한 100mM Tris (pH9.4)에 30°C에서 15분간 처리하고 Sol A 완충용액 (10mM Hepes pH7.9, 0.5% NP-40, 1.5mM MgCl_2 , 10mM KCl, 0.5mM DTT) 600 μL 에 재현탁 하였다. 800 \times g에서 5분 정도 원심분리한 후, 펠렛을 Sol B 완충용액 (20mM Hepes pH7.9, 25% 글리세롤, 0.5% NP-40, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl_2 , 0.2mM EDTA)으로 격렬하게 피펫팅하여 핵단백질을 추출하였다. 13,000 \times g에서 30분간 원심분리한 후 펠렛을 IP 버퍼 (1% 트리톤 X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 프로테아제 억제제)에 넣어 길이 0.5~1kb 정도로 소니케이션하여 절단하였다. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay는 Shang, Y. 등의 방법에 따라 실시하며 (*Cell* 103, 843-852, 2000) PSA 및 B2M (β -2-microglobulin) 프라이머 (PSA: Forward primer (서열번호 7): 5'-CATGTTACATTAGTACACCTTGCC-3', Reverse primer (서열번호 8): 5'-TCTCAGATCCAGGCTTACTGTC-3', B2M; Forward primer (서열번호 9): 5'-AGACTTCCCAATTTTGCCATCCTA-3', Reverse primer (서열번호 10): 5'-AAAGGCCTGAAATGTAAGTGTGAGT-3')로 도 7B의 항체(IgG, α AR, α Ach3, α Ach4)에 대하여 시행한 결과, 히스톤 3, 4의 아세틸화가 올스파이스 추출물을 처리한 경우 급격히 억제됨을 확인할 수 있었다 (도 7B).

<62> <실시예 7> 다양한 암세포주에서 올스파이스 부탄을 분획의 세포의 성장과 증식에 대한 억제 활성 조사

<63> 다양한 암세포주에서 세포의 성장과 증식에 대한 올스파이스 부탄을 분획의 활성을 검토하기 위하여, 자궁경부암 세포주 (HeLa; ATCC, USA), 안드로젠 수용체 결여 전립선암 세포주 (DU145; ATCC, USA) 및 안드로젠 수용체 함유 전립선암 세포주 (LNCaP; ATCC, USA)를 각각 1.0×10^3 , 1.0×10^4 , 1.0×10^5 및 1.5×10^4 cells/well로 96 웰-플레이트에 seeding한 후 37°C에서 18시간 배양하고, 올스파이스 부탄을 분획을 최종 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 48시간 경과 후 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide: 1mg/mL)를 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 형성된 포마잔 (formazane)을 흡광도 570nm, 레퍼런스 (reference) 630nm에서 측정하여 확인하였다.

<64> 도 8에 나타난 바와 같이, 올스파이스 부탄을 분획이 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 44%의 세포생존능을 보임으로써 자궁경부암 (99.1%) 및 안드로젠 수용체 결손 전립선암 (91.7%) 세포주에 비교하여 탁월한 항암 효과를 확인할 수 있었다.

<65> <제조예 1> 정제의 제조

<66> 다음의 배합의 정제(전체 조성 200 중량부 기준)를 통상의 타정기에 의해 제조하였다.

<67> 올스파이스 추출물의 분말 20 중량부

<68> 텍스트린 72 중량부

<69> 분당(粉糖) 80 중량부

<70> 글리세린지방산에스테르 8 중량부

<71> 원료의 혼합과 타정은 용이하고, 정미가 양호한 정제가 얻어졌다.

<72> <제조예 2> 캡슐제의 제조

<73> 통상의 방법에 의해, 이하의 조성을 갖는 캡슐제를 제조하였다. 또한, 캡슐에는 1호 하드젤라틴캡슐을 사용하였다.

<74> <1 캡슐(1정 200mg) 중의 조성>

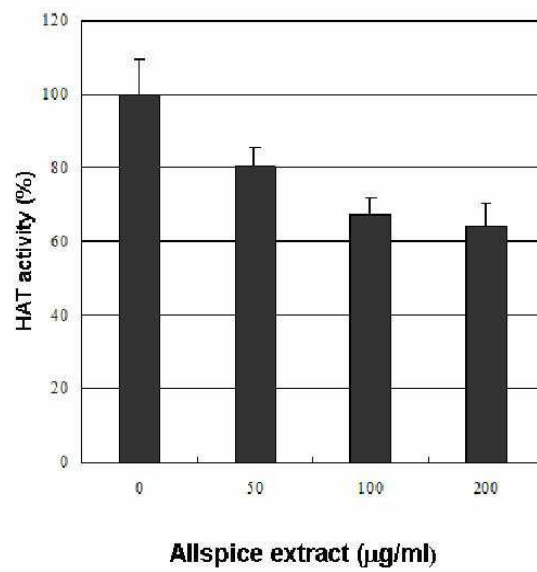
- <75> 올스파이스 추출물의 분말 5mg
- <76> 콘스타치 60.0mg
- <77> 유당 100.0mg
- <78> 유산칼슘 10.0mg
- <79> 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC-L) 10.0mg
- <80> <제조예 3> 과립제의 제조
- <81> 통상의 방법에 의해, 다음 배합의 인스턴트 티 과립을 유동층조립기에 의해 제조하였다 (전체 조성 970 중량부 기준).
- <82> 올스파이스 추출물의 분말 20 중량부
- <83> 올리고당 40 중량부
- <84> 구연산 50 중량부
- <85> 설탕 50 중량부
- <86> 텍스트린 810 중량부
- <87> 원료의 혼합과 유동층조립기에 의한 과립화는 용이하며, 정미가 양호한 인스턴트 티 과립이 얻어졌다.
- <88> <제조예 5> 음료 제조
- <89> 본 발명에 따른 올스파이스 추출물 500mg을 적당량의 물에 용해시킨 후에 보조성분으로서 비타민 C, 교미제로서 구연산, 구연산나트륨, 올리고당을 적당량 가하고, 보존제로서 적당량의 나트륨벤조에이트를 가한 후에 물을 가하여 전량을 100mL로 만들어 음료를 제조하였다. 이때, 타우린이나 마이오 이노시톨, 엽산, 판토텐산을 단독으로 혹은 함께 첨가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

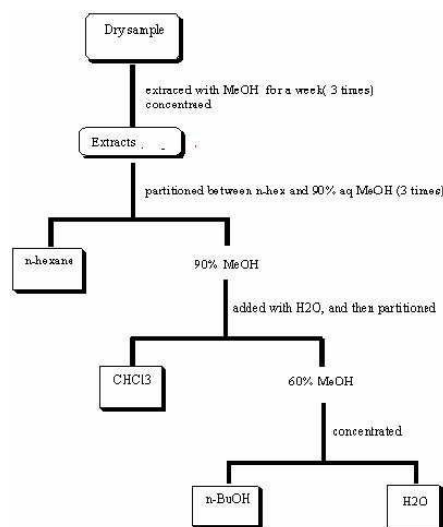
- <90> 도 1은 올스파이스 메탄올 추출물의 HAT 단백질에 대한 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- <91> 도 2는 올스파이스 메탄올 추출물의 유기용매 분획을 도식화한 것이다.
- <92> 도 3은 올스파이스 메탄올 추출물과 유기용매 분획들의 HAT 단백질에 대한 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- <93> 도 4는 올스파이스 메탄올 추출물의 부탄올 분획(A1-BuOH)의 p300 및 CBP에 대한 효소 특이적 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- <94> 도 5는 전립선암 세포주에서 올스파이스 메탄올 추출물의 부탄올 분획(A1-BuOH)의 전사활성 억제능을 나타내는 그래프이다.
- <95> 도 6은 전립선암 세포주에서 올스파이스 메탄올 추출물의 부탄올 분획(A1-BuOH)의 안드로젠 수용체 표적 유전자 mRNA 발현에 대한 억제 효과를 나타내는 사진도이다.
- <96> 도 7은 전립선암 세포주에서 올스파이스 메탄올 추출물의 부탄올 분획(A1-BuOH)의 안드로젠 수용체 및 히스톤 단백질 아세틸화에 대한 억제 효과를 나타내는 사진도이다.
- <97> 도 8은 다양한 암 세포주에서 올스파이스 메탄올 추출물의 부탄올 분획(A1-BuOH)의 세포 생존능에 대한 효과를 나타내는 그래프이다.

도면

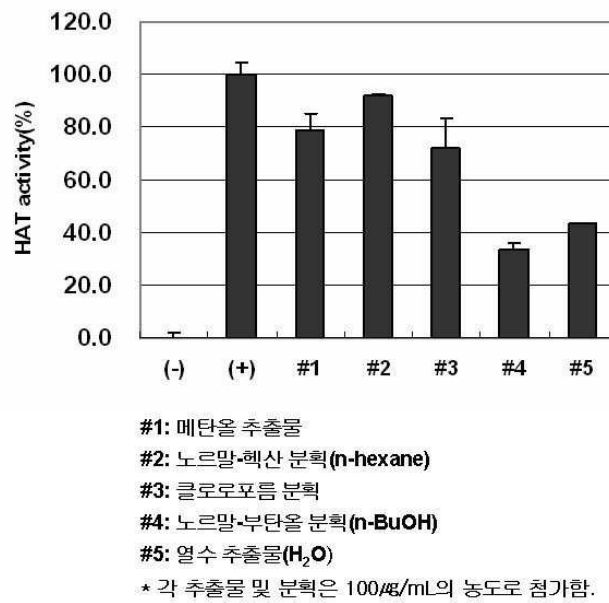
도면1



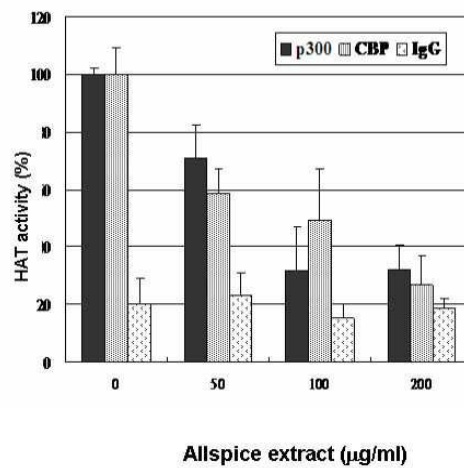
도면2



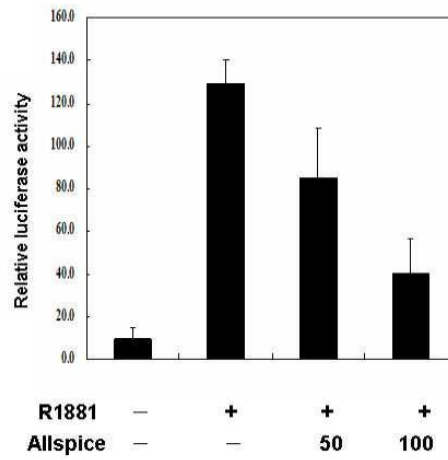
도면3



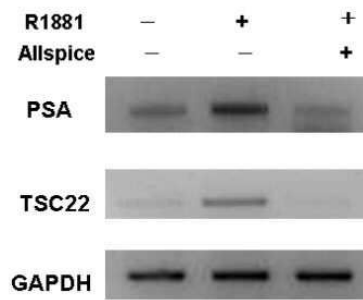
도면4



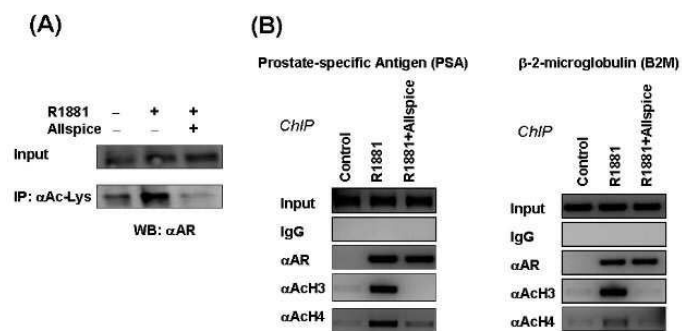
도면5



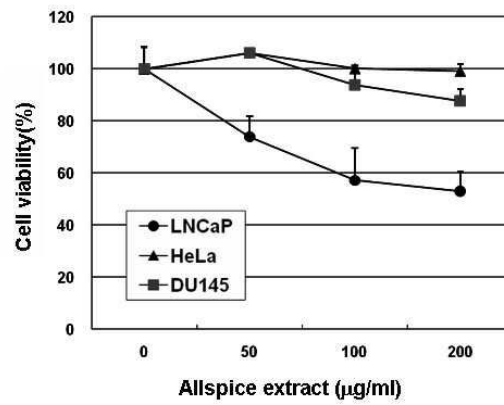
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
 <120> A composition for preventing or treating cancer comprising allspice extract

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TSC22: forward primer

<400> 1

atTTTTctct attagttctt tgatttg

27

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TSC22: reverse primer

<400> 2
gacttgataa tagctcctct ggt 23

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PSA: forward primer

<400> 3
gcccaccag gagccagcac t 21

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PSA: reverse primer

<400> 4
ggcccccaga atcaccgag cag 23

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAPDH: forward primer

<400> 5
cgcggggctc tccagaacat catcc 25

<210> 6

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GAPDH: reverse primer

<400> 6
 ctccgacgcc tgcttcacca ctttctt 27

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer: PSA

<400> 7
 catgttcaca ttagtacacc ttgcc 25

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer: PSA

<400> 8
 tctcagatcc aggcttactg tc 22

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer: B2M

<400> 9
agacttccca aattttgccca tccta

25

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer: B2M

<400> 10
aaaggcctga aatgtaagtg ttgagt

26