

특허증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허

Patent Number

제 10-2907970 호

출원번호

Application Number

제 10-2022-0024281 호

출원일

Filing Date

2022년 02월 24일

등록일

Registration Date

2025년 12월 30일



발명의 명칭 Title of the Invention

항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터 균주 배양방법

특허권자 Pattee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Ministry of Intellectual Property.



지식재산처

Ministry of
Intellectual Property

2025년 12월 30일



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요

지식재산처장

MINISTER,
MINISTRY OF INTELLECTUAL PROPERTY



김용선

등록사항

특허 등록 제 10-2907970 호

Patent Number

특허권자 Patentees

인천대학교 산학협력단(120171-*****)

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

서울대학교산학협력단(114371-*****)

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

발명자 Inventors

박준태(750404-*****)

인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호

송은선(980425-*****)

인천광역시 연수구 아카데미로 119 인천대학교 제3기숙사 A동 101호

최재혁(770620-*****)

인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 96, 604동 302호

임영운(690518-*****)

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 생명과학부 502동 424호



등록특허 10-2907970



(19) 대한민국 지식재산처(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년01월05일

(11) 등록번호 10-2907970

(24) 등록일자 2025년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/14 (2018.01) A61K 36/07 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/14 (2021.05)

A61K 36/07 (2024.05)

(21) 출원번호 10-2022-0024281

(22) 출원일자 2022년02월24일

심사청구일자 2022년02월24일

(65) 공개번호 10-2023-0126887

(43) 공개일자 2023년08월31일

(56) 선행기술조사문헌

US20170035829 A1

Biomedicine & Pharmacotherapy, 제83권, 526-535
면(2016) 1부.*환경부 국립생물자원관 연구보고서(2020.12.31.)
1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

서울대학교 산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

박준태

인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호

송은선

인천광역시 연수구 아카데미로 119 인천대학교
제3기숙사 A동 101호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

차준용

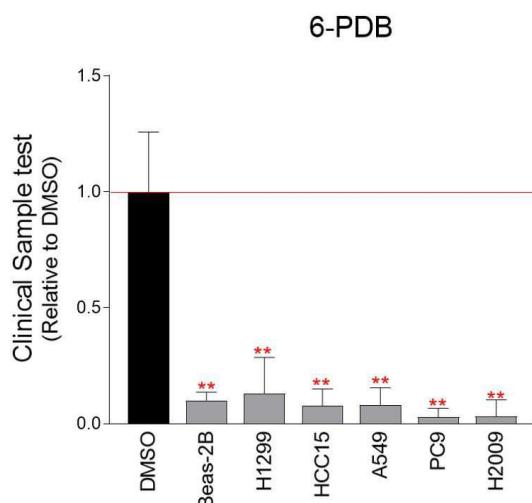
전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터 균주 배양방법

(57) 요약

본 발명의 일실시에는 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 및 그 배양방법을 제공한다. 또한, 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 또는 이의 배양액 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 일실시에 따른 항암 조성물은 암세포의 세포 자가사멸(Apoptosis)를 유도할 수 있고, 세포주기(cell cycle)에서 S기 비율을 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 일실시에 따른 항암 조성물은 p-ERK 및 p-MEK-1단백질을 억제할 수 있으며 p21 및 p-Rb 단백질을 증가시킬 수 있다.

대 표 도 - 도8

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2500/34 (2013.01)

(72) 발명자

최재혁

인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 96, 604동
302호

임영운

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 생명과학
부 502동 424호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130730
과제번호	2021R1A2C1004298
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어
기여율	0.35/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1345345508
과제번호	2017R1D1A1B04035879
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구지원사업
연구과제명	비교유전체학 기반 치마벼섯균의 산화효소 분비 유전자 기능 분석
기여율	0.35/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711104851
과제번호	2015M3A9B8029237
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	연구소재지원사업
연구과제명	한국 담자벼섯 소재 은행
기여율	0.30/1
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2015.05.01 ~ 2020.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

덱스트로스 및 감자 전분을 포함하는 배지에서 배양되는 단계를 포함하는 배양방법 따라 배양된 폴리포루스 투버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물로서,

상기 암은 폐암이고,

상기 균주의 배양액은 p-ERK 및 p-MEK-1을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 배양액은 배양여액 또는 이의 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸(Apoptosis)를 유도하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 항암 조성물은 암세포의 세포주기(cell cycle)에서 S기 비율을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 항암 조성물은 p21 및 p-Rb를 증가시키는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항암 활성을 가지는 균주의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항암 활성을 가지는 폴리포루스 투버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003]

암은 다른 일반적인 세포들과 달리 세포 증식능력이 무한하며, 그 증식 속도 또한 빠르게 이루어지고, 암세포를 둘러싼 혈관, 림프관 및 섬유아세포 등을 이용하여 종양미세환경을 형성하여 다른 조직으로의 전이 및 일반세포의 기능상실 등을 유발함으로써 사망에 이르게 하는 무서운 질병 중 하나이다. 이러한 암을 치료하기 위해 전세계의 많은 연구자들이 암세포의 세포 내 신호기전 및 전이, 약물의 부작용 등에 관한 다양한 주제에 대하여 수많은 연구들을 진행하고 있으며, 매년 새로운 신약들이 개발되어 많은 암환자들에게 치료효과를 기대하게 하는 임상시험들이 실시되고 있다. 현재 항암치료에 사용되고 있는 항암제들은 각 암 종에 따라 다르게 적용이 되고 있다. 일반적으로 암환자들에게 처방되고 있는 화학항암제들은 암세포를 표적으로 하는 표적약물이 아닌 것들이 많다 보니, 암세포를 죽이는 효과를 가지고 있으나 동시에 정상세포들도 공격을 하여 탈모, 설사, 발열, 면역력 저하 등의 많은 부작용이 발생되고 있다. 이후, 암에 대한 유전적인 연구 등을 바탕으로 각 암종에서 발생되는 유전변이를 타겟으로 하는 표적 항암제가 개발되어 기존의 화학항암제에 의해 발생하는 부작용은 많이 개선되었으나, 환경에 따른 적응이 매우 빠른 암세포가 표적 항암제의 공격으로부터 벗어나고자 항암제 내성을 유발하게 되어, 표적항암제에 의한 지속적인 암 치료효과를 100% 기대할 수 없다는 문제점이 발생하고 있다.

[0004]

전세계 많은 연구자들이 항암 효과를 가지는 미생물이나 균주들에 대해서 연구를 진행하고 있는 상황이며, 국내 연구자들 역시 해외가 아닌 국내에 서식하고 있는 미생물이나 균주들의 항암 효과를 연구하고 있는 상황이며 여러 미생물들이나 균주들의 항암 효과가 밝혀지고 있다.

[0005]

본 발명자들은 이러한 노력의 일환으로 결절구멍장이버섯(*Polyporus tuberaster*)을 연구했다. 결절구멍장이버섯은 여름에서 가을까지 활엽수(특히 너도밤나무) 죽은 나무 가지 위에 홀로 또는 무리지어 돋는다. 그런데 경우에 따라 죽은 나무에서 돋지 않고 땅속에 반쯤 묻혀 돋을 때에는 기부에 균핵이 붙어 있다. 이 균핵은 균사속이 단단하게 굳어서 덩어리(sclerotium-like tuber)를 이룬 것으로 가혹한 환경 조건에서 자실체가 살아남기 위하여 양분을 비축해 놓은 것이다. 덩이는 둥글거나 계란 꿀, 또는 불규칙한 모양을 가지고 있고 색깔은 황토색이다. 것은 5-10cm 크기의 처음에 둥그런 모양이다가 편평해지면서 얇은 또는 짚은 깔때기 모양 또는 부채모양이 된다. 담갈색에서 암갈색을 가진 납작한 작은 인편으로 덮여 있다. 얇은 것 가장자리는 아래로 말려 있다. 대는 잘 발달하지 않아 식별이 어려울 정도이며 연한 노란색이고 중심생 또는 편심생이다. 자실총은 관공으로 되어 있는데 원형 또는 불규칙한 타원형이며 흰색에서 차 차 노란색으로 변해 간다. 결절구멍장이버섯은 콜레스테롤 혈증 치료를 위해 유용하게 이용할 수 있는 버섯이라고 알려져 있으며, 이러한 의학적 용도 외에도 결절구멍장이버섯에는 여러 향기 성분이 들어 있어서 에센셜 오일이나 화장품 생산에 이용할 가치가 있는데 특히 모발 손질을 위한 화장품에 유용한 버섯이기도 하다.

[0006]

하지만, 본 발명자들은 이 균주를 연구하면서, 이 균주가 항암 효과를 지니게 하도록 하는 기술을 개발했다.

[0007]

삭제

선행기술문헌

비특허문헌

(비특허문헌 0001) Guo-Hui CHENG, Xiao-Ya AN, Xu WANG, Bo ZHANG, Yu LI. Cultural characteristics and domestic cultivation of *Polyporus tuberaster*. *MYCOSYSTEMA*. 2018, (6): 712 -721.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 배양방법을 제공하는 것이다. 또한, 상기 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 또는 이의 배양액 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 텍스트로스 및 감자 전분을 포함하는 배지에서 배양되는 단계를 포함하는, 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 배양방법 제공할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 텍스트로스는 10 내지 30 g/L의 농도로 함유될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 감자 전분은 1 내지 7 g/L의 농도로 함유될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 암은 폐암일 수 있다.
- [0015] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 일실시예는 본 발명에 따른 배양방법으로 배양된, 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주를 제공할 수 있다.
- [0016] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 또 다른 실시예는 본 발명에 따른 배양방법으로 배양된 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 배양액은 배양여액 또는 이의 추출물을 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸(Apoptosis)를 유도할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포주기(cell cycle)에서 S기 비율을 감소시킬 수 있다.
- [0020] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 p-ERK 및 p-MEK-1을 억제할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 항암 조성물은 p21 및 p-Rb를 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주는 항암 활성을 가질 수 있다.
- [0024] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 ITS(Internal Transcribed Spacer) 염기서열(서열번호 1)이다.
- 도 2는 서로 다른 4가지 배지에서 배양된 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물에 대한 HTS Screening 결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물(6-PDB)의 농도에 따른 항암 활성 및 농도최적화를 보여주는 그래프이다.

도 4는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물(6-PDB)의 암세포 억제력 결과를 보여주는 Cell toxicity 그래프이다.

도 5는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물(6-PDB)의 암세포 세포자가사멸 분석(Apoptosis analysis) 결과를 보여주는 그래프이다.

도 6은 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물(6-PDB)의 암세포 세포주기 분석(Cell cycle assay) 결과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물(6-PDB) 처리시 HeLa 세포에서의 단백질 변화 분석을 위한 western blot 결과를 보여주는 그림이다.

도 8은 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)의 배양여액 추출물(6-PDB)의 6가지 폐암세포들에 대한 범용성 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0028]

명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0029]

본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0030]

본 발명의 일측면에 따른 항암 활성을 가지는 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 배양방법은 텍스트로스 및 감자 전분을 포함하는 배지에서 배양되는 단계를 포함할 수 있다.

[0031]

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 텍스트로스는 10 내지 30 g/L의 농도로 함유될 수 있으며, 보다 구체적으로 15 내지 25 g/L의 농도로 함유될 수 있다. 바람직하게는 18 내지 22 g/L의 농도로 함유될 수 있다. 상기 텍스트로스의 농도가 10 g/L미만이거나 30 g/L초과하면, 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)가 항암 활성을 가지지 못한다.

[0032]

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 감자 전분은 1 내지 7 g/L의 농도로 함유될 수 있으며, 보다 구체적으로 2 내지 6 g/L의 농도로 함유될 수 있다. 바람직하게는 3 내지 5 g/L의 농도로 함유될 수 있다. 상기 감자 전분의 농도가 1 g/L미만이거나 7 g/L초과하면, 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*)가 항암 활성을 가지지 못한다.

[0033]

본 발명의 다른 일측면에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주는 항암 활성을 가질 수 있다. 도3 및 도4를 참고해서 보면, 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 또는 이의 배양액이 암세포 증식을 억제하였다.

[0034]

본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 암은 폐암일 수 있다. 구체적으로, 도8을 참고해 보면, 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주 또는 이의 배양액이 폐암에 항암 효과가 있다는 것을 보여주고 있으며, 폐암 중에서도 Beas-2B(Bronchus; 기관지암), H1299(lymph node; 림프절암), HCC15 (squamous carcinoma; 편평세포암), A549(Lung; alveolar basal epithelial cells; 폐포기저 상피세포암), PC9 및 H2009(Adenocarcinoma; 선암종)에 항암효과를 보여주고 있다.

[0035]

본 발명에서의 용어, 항암이란 암세포의 증식을 억제하거나 암세포를 죽이는 것을 의미한다.

[0036]

본 발명의 다른 일측면에 따른 항암 조성물은 본 발명에 따른 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균

주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 상기 균주는 상기 균주의 균체, 배양액(배양물), 배양여액, 상기 배양물의 추출물 등의 상태로 이용될 수 있다. 여기서, 상기 균주의 균체는 균 자체를 모두 포함하는 의미이며, 상기 배양액은 균체가 포함된 배양액을 의미하며, 상기 배양여액은 균체를 포함하지 않는 배양액을 의미하고, 상기 배양물의 추출물은 유기용매를 사용하여 농축 또는 건조된 것을 의미한다.

[0038] 상기 배양액은 구체적으로 본 발명의 상기 폴리포루스 투버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻어지는 배양된 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미하며, 균주 배양 후 균주를 제거한 배양여액도 포함한다. 또한, 상기 균주의 배양에 의해 수득된 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 용해효소(lysozyme)을 처리하여 수득된 세포 파쇄액, 상기 배양액을 텐달화(tyndalization)한 텐달화물도 및 상기 정의한 배양물들의 건조분말 또한 본 발명의 배양물에 포함될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸(Apoptosis)를 유도할 수 있고, 암세포의 세포주기(cell cycle)에서 S기 비율을 감소시킬 수도 있다. 즉, 상기 항암 조성물은 암세포의 세포자가사멸을 유도하여 암세포를 억제하거나 죽일 수 있고, 암세포의 세포주기에서 S기 비율을 감소시켜서 암세포의 분열 또는 증식을 억제할 수도 있다(도5 및 도6).

[0040] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 항암 조성물은 p-ERK 및 p-MEK-1단백질을 억제할 수 있고, p21 및 p-Rb 단백질을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 항암 조성물은 세포분열과 관련된 단백질인 p-ERK 및 p-MEK-1발현을 억제시킬 수 있고, 세포주기와 관련된 p21 및 p-Rb 단백질을 증가시켜서 세포주기에서 분열을 억제시킴으로써 암세포의 증식을 막을 수 있다(도7).

[0041] 또한, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 항암 조성물은 프로 카스파제(pro-caspase)를 감소시키고 절단된 카스파제(cleaved caspase)를 증가시킬 수 있다(도7). 상기 프로 카스파제는 카스파제-8(caspase-8)의 비활성화된 형태인 반면 상기 절단된 카스파제(cleaved caspase)는 카스파제-8(caspase-8) 및 카스파제-9(caspase-9)의 활성화된 형태이다. 상기 카스파제-8(caspase-8) 및 카스파제-9(caspase-9)는 세포자가사멸을 실행시키는데 있어서 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 따라서, 상기 항암 조성물은 세포자가사멸과 관련하여 직접적으로 관련 단백질들을 조절할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 항암 조성물은 바람직하게는 의약외품 또는 의약품의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물이 의약품의 형태일 경우에는, 본 발명의 미생물 또는 이의 배양물 뿐만 아니라, 병원성 미생물 또는 항암 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 항암 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비허클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 항암 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 혼탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화학식 1 또는 2의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 혼탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 혼탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비

수성 용제 및 혼탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 항암 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할수 있으며, 병원성 세균 및 내성균에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0046] 본 발명의 항암 조성물은 바람직하게 의약외품 조성물일 수 있다. 본 발명의 항암 조성물이 의약외품의 형태일 경우에는, 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 상기 의약외품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제 또는 필터 충진제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 이하 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

실시예1. 폴리포루스 투버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양 및 시료 전처리

[0050] 본 발명에 사용된 버섯균주는 한국연구재단 연구소재지원사업 '한국 담자버섯 소재 은행' 과제를 통해 버섯 자실체에서 분리 배양한 균주이고, 균주의 자실체와 포자의 형태 관찰과 염기서열 분석을 통해 *Polyporus tuberaster* (서울대학교 한반도진균자원은행 등록번호: KMRB 18083112)종으로 명명된 균주로서, 서울대학교 한반도진균자원은행으로부터 분양을 받아 실험을 진행했다.

[0051] 균주는 PDA 평판배지에 7일간 전배양한 후 작은 조각으로 잘라 4종류(DY, MEB, MY, PDB)의 액체배지에 접종한 후, 25°C에서 60일간 170 rpm으로 진탕배양(shaking incubation)하였다. 배양이 완료된 액체배양 시료는 균사체와 배양여액으로 분리하고 동결건조처리 후 시료로 사용하였다(PDB (DB Difco), MEB (DB Difco), DY(Dextrose, DB Difco, Yeast extract, DB Difco), MY (Malt extract DB Difco, Yeast extract, DB Difco)).

실시예2. 폴리포루스 투버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양여액 추출

[0054] 동결건조된 배양액 시료에 100% 에탄올을 첨가하여 Waving shaker에서 50rpm으로 48시간 동안 추출하였다. 추출물은 0.45 μm filter로 여과한 후 농축건조하고 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich)에 녹였다. 500 mg/ml 농도로 조정하여 항암 활성 분석의 시료로 사용하였다.

표 1

배지 이름	배지 성분
DY 배지	넥스트로스 20 g/L, 효모추출물 2g/L
MEB 배지	넥스트로스 6 g/L, 말토스 1.8 g/L, 맥아 추출물 6 g/L, 효모 추출물 2g/L
MY 배지	맥아 추출물 20 g/L, 효모 추출물 2g/L
PDB 배지	넥스트로스 20 g/L, 감자 전분 4 g/L

[0056] 본 발명의 균주와 4가지 배지와의 조합으로 배양된 배양여액 추출물을 4일간 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 세포배양 배지에 녹여 HeLa 세포에 처리하였다. 4일간의 약물 처리 후 DNA 염색을 통해 cell proliferation assay를 진행했다. Cell proliferation은 well 당 2000개의 HeLa 세포를 키웠으며 4일간 음성, 양성 대조군과 함께 4개의 실험군의 버섯 배양여액 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리했다. 처리된 HeLa 세포는 0.2% SDS solution 1시간 처리, 1:1000 gel green solution을 넣어준 후 victor X3장비로 측정이 됐다. Cell proliferation assay 결과 음성 대조군 대비 약 80% 세포 억제력을 보여줬다 (다른 실험군은 대략 20~40%의 억제력을 보여줬다). 이를 근거로 본 발명의 균주 *Polyporus tuberaster*를 넥스트로스 20 g/L, 감자 전분 4 g/L을 포함하는 배지에 배양한 배양여액 추출물(6-PDB)를 선정해 추가 실험을 진행했다.

실시예3. 폴리포루스 투버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 억제 확인

[0059] 6-PDB 추출물이 가지는 암세포 억제력을 분석하기 위해 농도 최적화를 진행했다. 또한 cell toxicity를 살펴보기 위해 농도별 세포 억제량을 비교했다(도3). 96-well plate에 HeLa 세포를 well당 2000개씩 seeding 한 후

1~4일동안 약물처리를 진행했다. 약물 처리 후 1~4일이 경과한 각 96well plate에 0.2% SDS solution 150 μ l 을 1시간 처리해 세포를 깨주었고, 1:1000으로 dilution한 gel green 시약 150 μ l를 넣어 DNA를 염색했고, VICTOR X3 장비로 측정해 cell proliferation assay를 진행했다 (도4). 도4를 참고해서 보면, Cell viability는 같은 조건으로 실험했을 때 약물처리시 농도에 따른 안정적인 세포 억제력을 보여줬다.

[0061] 실시예4. 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 세포자가사멸 확인(Apoptosis analysis)

6-PDB 추출물의 항암활성을 확인한 후 음성대조군 대비 apoptosis analysis를 통해 유도 비율을 살펴봤다. Apoptosis analysis는 3일간 6-PDB 배양여액 추출물이 처리된 HeLa세포 전체에 대해서 annexin V 및 Propidium iodide를 처리한 후 유세포 분석기 장비를 이용해 측정했다(도5). 도5를 참고해서 보면, 사분면의 오른쪽 영역 (C2)인 Late apoptosis비율이 음성대조군(DMSO) 대비 약 3배이상 증가하였고, 이는 6-PDB 배양여액 추출물이 apoptosis를 유도해 세포 억제를 한다는 것을 알 수 있었다.

[0064] 실시예5. 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 증식 억제 확인(세포주기 분석; Cell cycle assay)

3일간 6-PDB 처리 후 viable cell에 대해 70% 에탄올을 처리해 세포고정을 진행했다. 고정된 HeLa 세포에 Propidium iodide를 2.5 μ g/ml의 농도로 처리된 샘플을 유세포 분석기로 측정했다(도6). 도6를 참고해서 보면, 6-PDB 배양여액 추출물에 대한 암세포의 cell cycle 변화량도 확인해본 결과, 음성대조군(DMSO) 대비 S 기의 비율이 유의미한 수치의 감소를 확인했다. 이는 6-PDB 추출물이 S기의 비율을 감소시키는 것으로 확인되었다.

[0067] 실시예6. 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 암세포 증식 또는 분열 관련 단백질 억제 확인(Western Blot)

6-PDB 배양여액 추출물 처리시 HeLa 세포에서의 단백질 변화를 알아보기 위한 western blot 실험을 진행했다. 3일간 6-PDB로 처리된 HeLa세포에 5% β -mercaptoethanol을 넣은 2X Laemmli sample buffer에 풀어준 후 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓여졌다. Western blot에 사용된 primary antibody는 p21 antibody (sc-6246; 1:500 dilution; Santa Cruz), p-Rb antibody (sc-271930; 1:500 dilution; Santa Cruz), p-ERK antibody (9101s; 1:500 dilution; cell signaling), p-MEK-1 antibody (9121; 1:500 dilution; cell signaling), pro-Caspase 8 (9746s; 1:500 dilution; cell signalling), Cleaved-Caspase 8 (9746s; 1:500 dilution; cell signalling), Cleaved-Caspase 9 (9502S; 1:500 dilution; cell signalling) and HRP-conjugated β (sc47778; 1:1000 dilution; Santa Cruz), 사용된 secondary antibody는 HRP conjugated anti-mouse antibody (sc-516102; 1:1000 dilution; Santa Cruz), HRP conjugated anti-rabbit antibody (sc-2357; 1:1000 dilution; Santa Cruz) 이다. 도7을 참고해서 보면, Western blot 결과 cell proliferation과 관련된 p-ERK, p-MEK-1단백질을 억제하였고, cell cycle 관련 단백질인 p21, p-Rb 단백질 또한 증가하였다.

[0070] 실시예7. 폴리포루스 튜버래스터(*Polyporus tuberaster*) 균주의 액체 배양여액 추출물의 항암 병용성 확인

[0071] 6-PDB를 6가지 종류의 암세포(Beas-2B, H1299, HCC15, A549, PC9, H2009)를 대상으로 96-well plate에 HeLa 세포를 well당 2000개씩 seeding 한 후 1~4일동안 약물처리를 진행했다. 약물 처리 후 1~4일이 경과한 각 96well plate에 0.2% SDS solution 150 μ l을 1시간 처리해 세포를 깨주었고, 1:1000으로 dilution한 gel green 시약 150 μ l를 넣어 DNA를 염색했고, VICTOR X3 장비로 측정해 cell proliferation assay를 진행했다. 도8을 참고해서 보면, 6-PDB 추출물은 다양한 폐암세포에서 효과적인 세포억제능력을 보여줬다.

[0073] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

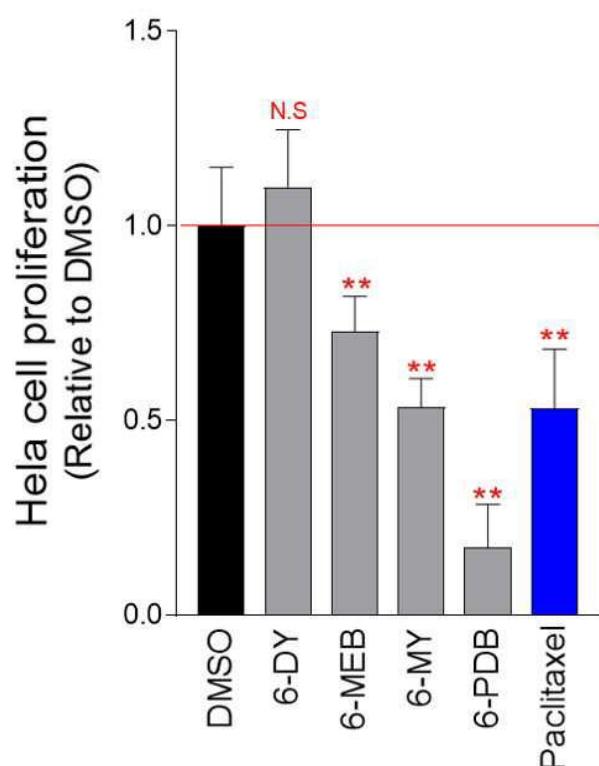
[0074] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

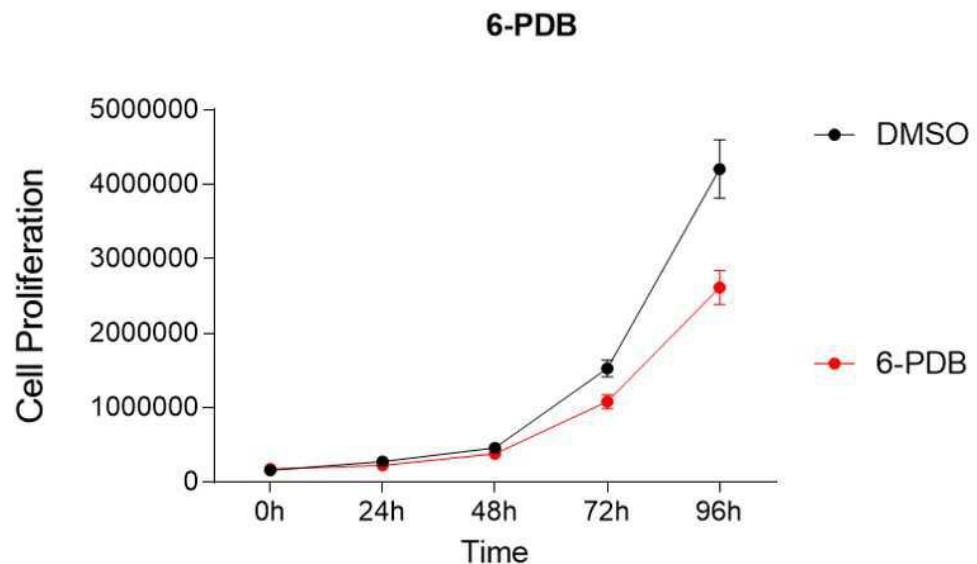
도면1

ACCTGCGGAAGGATCATTAAACGAGCTTGACACGGGTTGCAGCTTGGCCTTCTTGCAGAGGGCATGTGCT
 CGCCTTGCTCAATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTGGTGGAGGGTTGCGCTCCGGCGT
 GGCTCCTTGAAACCTGACCCACGTTCACTACAAACACGATGTATCAGAATGTCTATTGCGATGTTAACGC
 ATTTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTTGGCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
 TAATGTGAATTGAGAATTCACTGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTGCGCTTGGCATTCCGAGGAG
 CACGCCTGTTGAGTGTCACTGAAATTCTAACCTGCGAGATCCTGTGGCTTCGTAAGGCTTGGACTTTGGA
 GGCTTGTGGCGATTGCGACTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTCCCTGCGGATCGGCTTCGGTGTGA
 TAGTTGTCTACGCCGTGACCGTGAAGCGTTGGCGAGCTTCAACCGTCTCGTTGAGACTTATTCTTCATTG
 ACATCTGACCTCAAATCAGGCAGGACTACCCGCTGAACCTAACGATATC

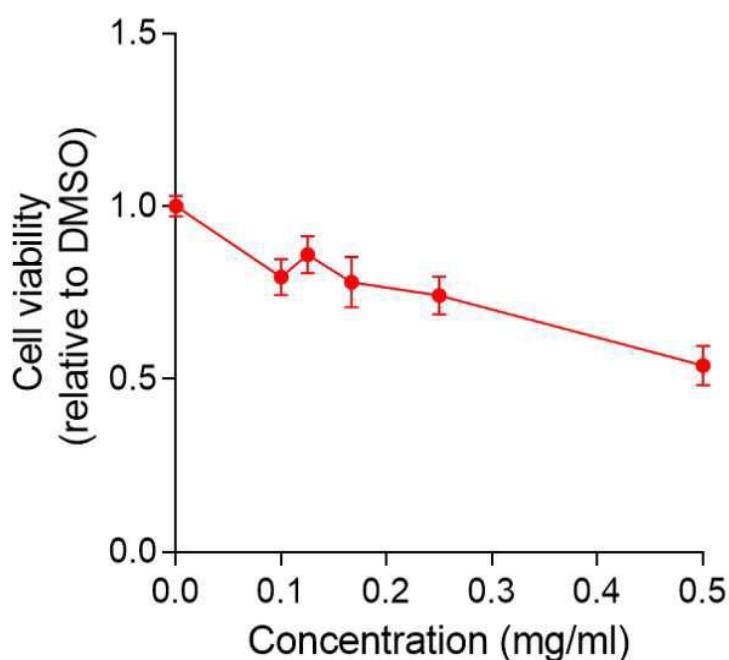
도면2



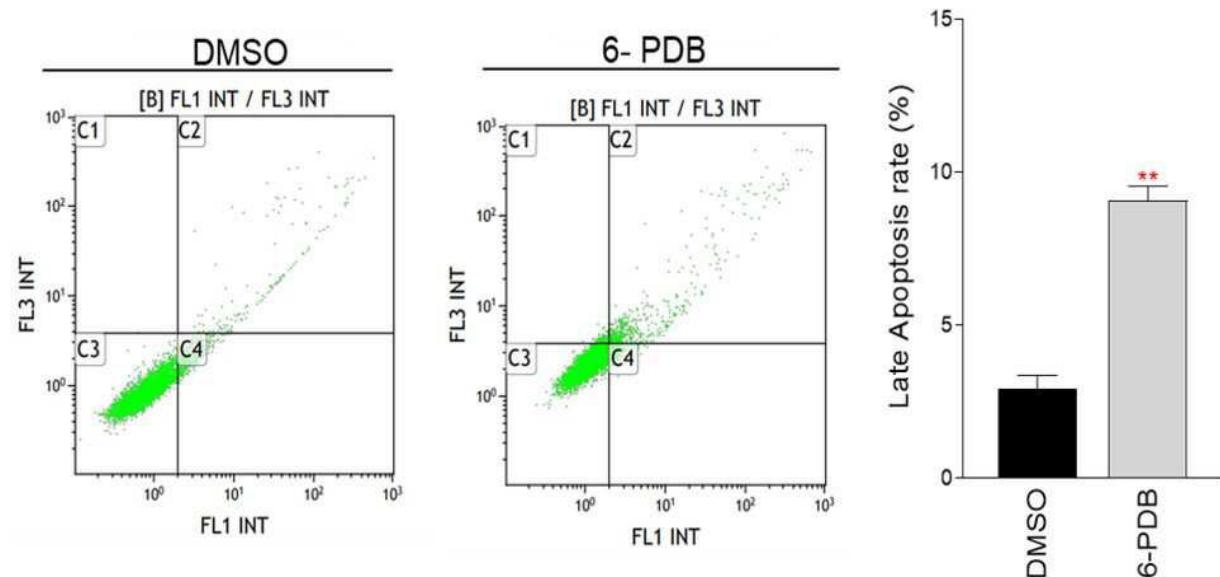
도면3



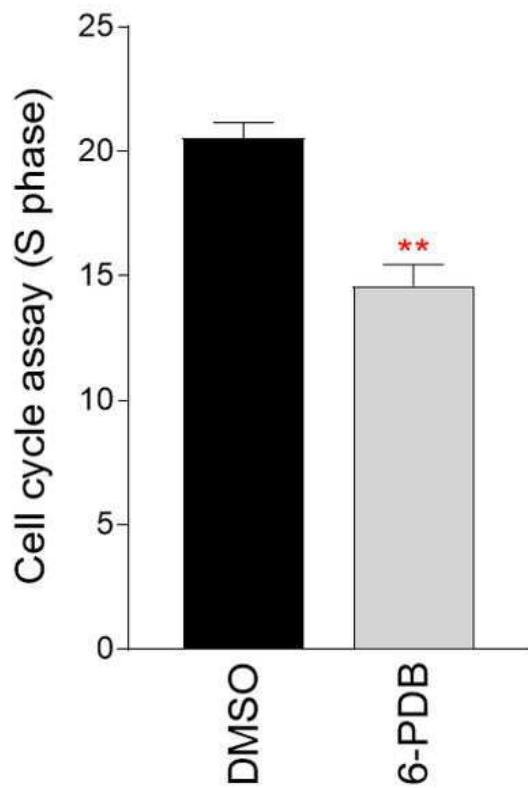
도면4



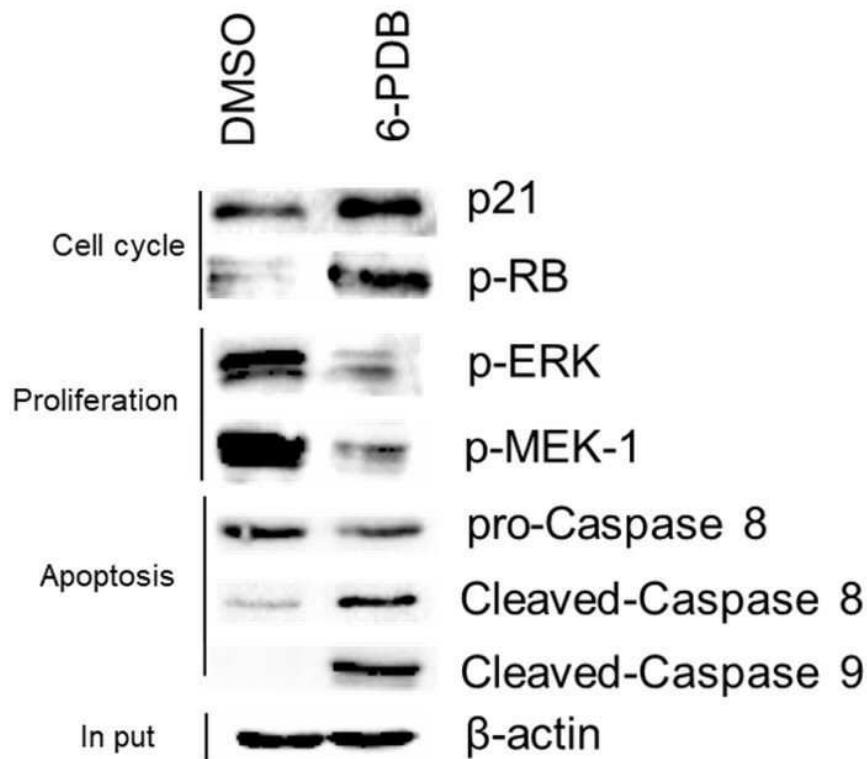
도면5



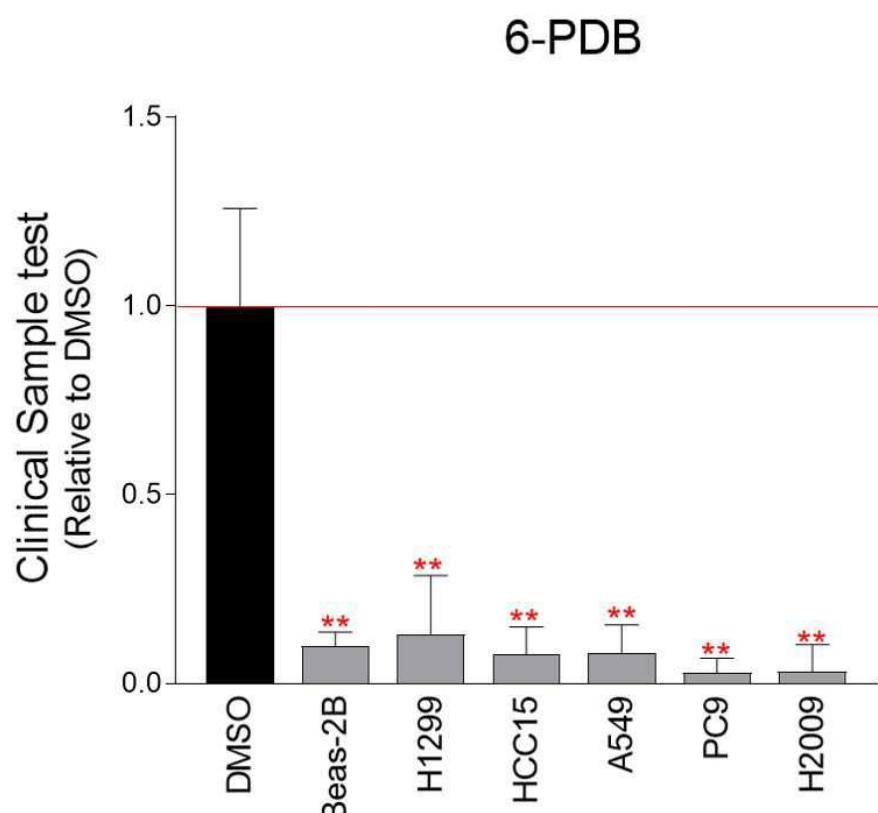
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
Seoul National University R&DB Foundation

<120> METHOD FOR CULTURING *Polyporus tuberaster* HAVING ANTI-CANCER
ACTIVITY

<130> P22-0019

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 632

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> *Polyporus tuberaster* (KMRB 18083112) ITS sequence

<400> 1

acctgcggaa ggatcattt acgagtcttg acacgggttg cagcttgcc tttcttgcga	60
gaggcatgtg ctcgccttg ctcaatccac tctacacctg tgacttact gtgggtttt	120
ggtcggaggg gttgcgtcc ggcgtggctc ctttgaacc ttgaccacg tttcactaca	180
aacacgtatgt atcagaatgt ctattgcgtat gttaacgcatttataatacaa ctttcagcaa	240
cggatctctt ggctctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag taatgtgaat	300
tgcagaattc agtgaatcat cgaatcttg aacgcaccc ttgcgtccctg gcattccgag	360
gagcacgcct gttttagtgt catgaaattc tcaacctgctt agatccttgcgtat	420
aggcttggac ttggaggct ttgtcgccg attgtcgact cctctcaaat gcatttagttt	480
ggttcccttgc ggatcggtt tcgggtgtat agttgtctac gccgtgaccg tgaagcgttt	540
tggcgagctt ctaaccgtct cgttcgagac ttattttca ttgacatctg acctcaaattc	600
aggccggact acccgctgaa cttaaagcata tc	632