



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0106331
(43) 공개일자 2020년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) A61K 31/201 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/28 (2013.01)

A61K 31/201 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0024716

(22) 출원일자 2019년03월04일

심사청구일자 2019년03월04일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

재단법인 전통천연물기반 유전자동의보감 사업단

대전광역시 유성구 대학로 291, 5층 513호 (구성동, 한국과학기술원 정문술 빌딩)

(72) 발명자

홍순선

서울특별시 서대문구 문화촌길 6-24, 102동 1601호(홍제동, 문화촌현대아파트)

김주영

인천광역시 미추홀구 매소홀로 143, 2동 308호(용현동, 윤성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

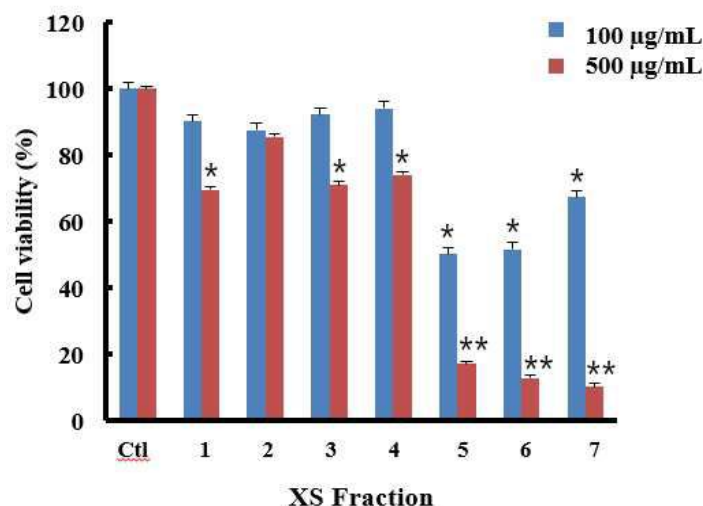
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **창이자 추출물의 분획물을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 분획물은 메탄올-물 혼합 용액을 전개 용매로 하고, 역상 실리카 겔 컬럼이 포함된 중압 액체 크로마토그래피(MPLC)로 상기 창이자 에탄올 추출물을 분획한 활성 분획물로, 간암 세포의 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제할 수 있고, 간암 세포의 성장, 증식, 이동 및 침윤을 억제할 수 있으며, 간암 세포의 세포 사멸을 유도할 수 있다. 상기 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용함으로써 효과적으로 간암을 예방하거나 치료할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

정경희

경기도 부천시 경인로484번길 68-7, 102동 1105호
(괴안동, 신일해피트리아파트)

이재선

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호(서
초동, 삼풍아파트)

이도현

대전광역시 서구 둔산로 155, 113동 805호(둔산동,
크로바아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2014009392
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초의과학연구센터(MRC)사업
연구과제명	저산소 표적 질환 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2020.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A2A1A05077263
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	후속연구지원(도전)
연구과제명	시스템 생물학을 이용한 체장암의 타겟 인자 발굴 및 치료제 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2018.09.01 ~ 2021.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2014M3C1A3051476
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래유망 융합기술 파이오니아사업
연구과제명	세포내 단백질 타겟 항체의 임상적용 기술
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2020.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012M3A9C4048758
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	가상인체 및 세포 모델링 기술개발
기 여 율	10/100
과제수행기관명	재단법인 전통천연물기반 유전자동의보감 사업단
연구기간	2018.07.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 창이자 에탄올 추출물은,

상기 창이자를 포제한 후에 에탄올 추출된 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 창이자 에탄올 추출물은,

60 내지 80 중량%의 에탄올 수용액으로 추출된 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 분획물은,

메탄올-물 혼합 용액을 전개 용매로 하고, 역상 실리카 겔 컬럼이 포함된 중압 액체 크로마토그래피(MPLC)로 상기 창이자 에탄올 추출물을 분획한 활성 분획물인 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 전개 용매는,

메탄올-물의 혼합 비율이 0:100 내지 100:0인 농도 구배로 전개되는 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 활성 분획물은,

상기 전개 용매가 20 내지 40mL/min 속도로 전개시, 상기 전개 용매의 메탄올-물 혼합 비율이 80:20 내지 100:0 일 때 획득되는 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

상기 활성 분획물은,

4'-디설페이트아트락틸로시드(4'-desulphate-atractyloside, $C_{30}H_{46}O_{13}S_1$), 9S,12S,13S-트리하이드록시-10E-옥타데센산(9S,12S,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid, $C_{18}H_{34}O_5$), (9Z)-12,13-디하이드록시-9-옥타데센산(9Z)-12,13-dihydroxy-9-octadecenoic acid, $C_{18}H_{34}O_4$), 12,13-디하이드록시옥타데센산(12,13-dihydroxyoctadecanoic acid, $C_{18}H_{36}O_4$), 및 (9Z)-12,13-에폭시옥타데센산((9Z)-12,13-epoxyoctadecenoic acid, $C_{18}H_{32}O_3$)으로 이루어진

군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 4 항에 있어서,

상기 활성 분획물은,

간암 세포의 성장, 증식, 이동 및 침윤을 억제하는 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 4 항에 있어서,

상기 활성 분획물은,

간암 세포의 세포 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 4 항에 있어서,

상기 활성 분획물은,

간암 세포의 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는, 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 창이자 추출물의 분획물을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간세포암종(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 난치암 중 사망률이 5번째로 높고 매년 발병률이 지속적으로 증가하고 있으며, 주변 장기나 림프절로 급속 전이되는 특징을 가지고 있어 심각한 이환율과 사망률을 보이는 악성 종양으로 알려져 있다. 간암 환자의 예후가 좋지 않은 이유는 중기 혹은 말기에 발견되어 치료 및 완치가 어려우며, 소수의 환자만이 간이식 혹은 수술을 받을 수 있다. 또한, 간암은 재발 위험이 높아 환자의 5년 생존율이 50%에 정도에 미치는 수준이다.

[0003] 현재 간암을 치료하기 위한 요법으로 화학 요법 및 방사선 요법 등이 실시되고 있으나, 이득(benefit)의 한계가 있고 여러 부작용이 따르기 때문에 치료를 받은 간암 환자의 평균 생존율은 11 내지 20개월 밖에 되지 않는다. 따라서 간암을 치료할 수 있는 새로운 치료 방법 및 전략이 필요한 실정이다.

[0004] 현재 천연 추출물(natural extracts)은 다양한 질병 치료에 사용되고 있다. 특히, 암 치료에서 천연 추출물은 부작용을 감소시키고 암 재발 및 진행을 지연시키는 효과를 가져와 항암제와 병용하여 사용되고 있다.

[0005] 창이자는 국화과의 도꼬마리(Xanthium strumarium L.) 또는 대꼬리의 열매로서, 시이실, 호시, 지규, 시일, 상사 등으로도 불리며, 들판에 널리 자라는 한해살이풀이다. 창이자는 풍한을 없애는 약재로서, 축농증, 비염, 두통, 발열, 기침, 사지 동통 마비, 굴신이 자유스럽지 못할 때, 피부 가려움증, 중이염에 사용한다고 알려져 있으며, 이와 같은 창이자의 약리작용으로 정유와 알칼로이드에 독성 반응, 혈당 강하, 백혈구 감소 방지, 진해, 심장 억제 작용 등이 보고되었다. 그러나 아직까지 창이자 추출물로부터 간암의 억제 효과에 대한 보고는 접할 수 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1469325호 (2014.11.28. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 창이자 추출물의 분획물을 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 창이자 추출물의 분획물을 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 창이자 에탄올 추출물의 분획물은 독성을 제거하고 최적화된 추출 및 분획 과정으로 제조되어, 간암 세포의 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제할 수 있고, 간암 세포의 성장, 증식, 이동 및 침윤을 억제할 수 있으며, 간암 세포의 세포 사멸을 유도할 수 있다. 이러한 항암 활성을 가지는 상기 분획물은 간암 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 활용될 수 있다.

[0012] 상기 분획물은 천연물을 이용하여 제조된 것으로 부작용이 적어 안전하고, 상기 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용함으로써 효과적으로 간암을 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 창이자 추출물의 독성 성분을 분석한 크로마토그램이다.

도 2 및 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 분획물의 크로마토그램이다.

도 4 및 도 5는 본 발명의 일 실험예에 따른 창이자 추출물 및 분획물의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 증식률 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실험예에 따른 TUNEL 분석 결과이다.

도 8 및 도 9는 본 발명의 일 실험예에 따른 웨스턴 블랏 분석 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실험예에 따른 미토콘드리아를 관찰한 현미경 이미지이다.

도 11은 본 발명의 일 실험예에 따른 공초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지이다.

도 12는 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 이동 분석 결과 이미지이다.

도 13은 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 침윤 분석 결과 이미지이다.

도 14는 본 발명의 일 실험예에 따른 생체 외(ex vivo) 종양 모델에서의 면역 조직화학 염색 분석 이미지이다.

도 15는 본 발명의 일 실험예에 따른 면역 형광 분석 이미지이다.

도 16은 본 발명의 일 실험예에 따른 고성능 액체 크로마토 그래피-질량 분광법 크로마토그램 핑거프린팅이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0015] 본 발명자는 (재)유전자동의보감사업단이 보유하고 있는 천연물 데이터베이스인 코코넛(COCONUT) 시스템을 분석하여 간암에 효능이 기대되는 유효성분 조합 후보를 도출하고, 컴퓨터 가상 인체 시스템인 코다(CODA)를 이용하

여 성분 후보와 간암 간의 상호 작용을 예측했다. 그 결과를 통해 간암 관련 효능이 높을 것으로 기대되는 유효 성분 조합을 결정하고, 해당 성분 조합을 함유한 것으로 알려진 창이자를 선정하여 본 발명을 완성하였다.

- [0017] 본 명세서에서 "창이자"란, 국화과의 도꼬마리(*Xanthium strumarium*)의 열매를 의미하는 것으로, "창이자 추출물"은 "도꼬마리 추출물"과 호환성 있게 사용될 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 "추출물"이란, 추출 방법, 추출 용매, 추출된 성분 또는 추출물의 형태를 불문하고 천연물의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 의미하는 것으로, 천연물의 성분을 뽑아내어 얻어진 물질을 추출 후 다른 방법으로 가공 또는 처리하여 얻어질 수 있는 물질을 모두 포함할 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 "예방"이란, 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 간암 또는 간암의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.
- [0020] 본 명세서에서 "치료"란, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 간암 또는 간암의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 명세서에서 "개선"이란, 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물의 섭취에 의해 간암 또는 간암의 적어도 하나 이상의 증상이 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0022] 본 명세서에서 "약학 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 간암 또는 간암의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다.
- [0023] 본 명세서에서 "건강기능식품"이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품으로, 영양 공급 외에도 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미하며 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 창이자 에탄올 추출물은 상기 창이자를 포제한 후에 에탄올로 추출된 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, "포제"는 한약재와 같은 약용 식물의 가공 방법의 하나로, 상기 포제 과정을 통해 상기 약용 식물의 독성을 제거하거나 약성을 오래 유지시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 창이자는 약 180℃ 정도로 가열된 스토브에서 창이자만을 넣어 볶는 청초법을 이용하여 포제하였고, 이를 통해 독성을 제거할 수 있었다.
- [0028] 상기 창이자 에탄올 추출물은 60 내지 80 중량%, 바람직하게는 65 내지 75 중량%, 보다 바람직하게는 70 중량%의 에탄올 수용액으로 추출될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 창이자를 포제한 후 70% 에탄올 추출물로 제조하였을 때, 독성 성분인 카르복시아트랙틸로사이드(*Carboxyatractyloside*) 및 아트랙틸로사이드(*Atractyloside*)의 양이 현저히 줄어들었음을 확인할 수 있었다.
- [0030] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 분획물은 상기 창이자 에탄올 추출물로부터 분획하여, 본 발명에서 목적하는 활성을 가지는 물질을 얻은 활성 분획물로, 보다 상세하게는 메탄올-물의 혼합 용액을 전개 용매로 하고, 역상 실리카 겔 컬럼이 포함된 중압 액체 크로마토그래피(MPLC)로 상기 창이자 에탄올 추출물을 분획한 활성 분획물일 수 있다.
- [0031] 상기 전개 용매는 메탄올-물의 혼합 비율이 0:100 내지 100:0의 농도 구배로 전개될 수 있고, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 크로마토그래피의 분석 시간이 0 내지 5분에서는 메탄올-물의 혼합비율이 20:80, 5 내지 35분에서는 20:80 내지 80:20, 35 내지 55분에서는 80:20 내지 100:0, 55 내지 80분에서는 100:0의 농도 구배로 전개되었다.
- [0032] 상기 활성 분획물은 상기 전개 용매가 20 내지 40mL/min, 바람직하게는 25 내지 35mL/min, 보다 바람직하게는

30mL/min의 속도로 전개시, 상기 전개 용매의 메탄올-물 혼합 비율이 80:20 내지 100:0일 때 획득되는 것일 수 있다.

[0033] 또한, 상기 활성 분획물은 4'-디설페이트아트락틸로시드(4'-desulphate-atractyloside, C₃₀H₄₆O₁₃S₁), 9S,12S,13S-트리하이드록시-10E-옥타데센산(9S,12S,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid, C₁₈H₃₄O₅), (9Z)-12,13-디하이드록시-9-옥타데센산(9Z)-12,13-dihydroxy-9-octadecenoic acid, C₁₈H₃₄O₄), 12,13-디하이드록시 옥타데센산(12,13-dihydroxyoctadecanoic acid, C₁₈H₃₆O₄), 및 (9Z)-12,13-에폭시옥타데센산((9Z)-12,13-epoxyoctadecenoic acid, C₁₈H₃₂O₃)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있고, 이들은 본 발명에서 목적하는 활성을 가질 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 활성 분획물은 간암 세포의 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제할 수 있고, 간암 세포의 성장, 증식, 이동 및 침윤을 억제할 수 있으며, 간암 세포의 세포 사멸을 유도할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 활성 분획물인 XS-5 및 XS-6 분획물이 처리된 HCC 세포에서 PI3K의 다운스트림(downstream)인 AKT 및 mTOR의 인산화를 저해함으로써 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제하고, 이에 의해 상기 세포의 성장, 증식 등이 저해되며 세포 사멸이 유도되는 것을 확인하였다. 이러한 효과를 이용하여 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용될 수 있다. 보다 상세한 것은 하기 실험예에서 후술될 것이다.

[0037] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 봉해제, 용제 등을 더 포함하여 제조할 수 있다.

[0039] 상기 "약학적으로 허용 가능한"이란, 상기 약학 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 의미하고, 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 창이자 추출물의 분획물의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0041] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.

[0042] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0043] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.

[0044] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D₃ 등을 더 첨가할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 상기 "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.

[0047] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또

는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 따른 약학 조성물은 간암이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약학 조성물은 간암 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 창이자 에탄올 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 분획물의 활성 분획물은 하기 실험예에서 확인할 수 있듯이, 간암 세포의 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제할 수 있고, 간암 세포의 성장, 증식, 이동 및 침윤을 억제할 수 있으며, 간암 세포의 세포 사멸을 유도하는 등, 간암에 대한 항암 활성을 가지므로, 간암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물로서 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과일 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 간암 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0059] <준비예 1>

[0060] 1. 식물 재료

[0061] 도꼬마리(Xanthium strumarium) 열매(이하, 창이자)는 2017년 7월에 중국 내몽골 자치구역(Inner Mongolia Autonomous Region)으로부터 수집되었고(Lot No. K1451201707), 김호철 박사(Dr. Hocheol Kim)에 의해 확인되었다. 이 원재료의 대조 표본(voucher specimen)은 대한민국 서울의 경희대학교 동의보감 소재은행(the Herb Resource Bank of Traditional Korean Medicine, <http://herb-bank.com>)에 기탁되었다. 이 열매는 중국 약전(Chinese Pharmacopeia)에 기재된 방법에 따라 180±5℃의 키친 스토브에서 1시간 동안 열매 표면이 진한 갈색이 될 때까지 볶았다.

2. 세포 재료

HCC 세포(Huh-7 및 Hep3B, 간세포암종)는 일본 암연구자원은행(Japanese Cancer Research Resources Bank, JCRB, Shinjuku, Japan)으로부터 구입하여, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; 이하, FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)이 추가된 돌베코수정이글배지(Dulbecco Modified Eagle Medium; 이하, DMEM)에서 배양되었다. 세포는 95% 공기 및 5% CO₂로 구성된 습한 대기의 CO₂ 인큐베이터에서 37℃로 유지되었다. 세포 배양 물질, FBS 및 페니실린/스트렙토마이신은 인비트로젠(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로부터 구입하였다.

<실시예 1> 창이자(Xanthium strumarium) 추출물 및 분획물 제조

앞서 볶은 열매, 즉 포제된 창이자를 동결 건조한 뒤, 실험실 칼날 커터를 이용하여 작은 조각으로 잘랐다. 40 KHz(각각 15분)에서 SD 300H 소니케이터(SD-ultra, Seoul, Korea)를 사용하여 분말 시료(2.0kg)는 70% 에탄올(3L×3)로 추출되었다. 추출물을 합하여 40℃에서 진공 농축시켜 건조 추출물(126.5g, 6.3%)을 제조하였다.

추출물(4.5g)은 역상 실리카 겔 컬럼(reversed-phase silica gel column, YMC ODS-AQ, 10 μm, 220g)을 가진 중압 액체 크로마토그래피(Medium pressure liquid chromatography, MPLC, Spot Prep II 250 Armen, Paris, France)를 이용하여 메탄올-물(MeOH-H₂O)의 단계적 구배(0-5분 20% MeOH, 5-35분 20-80% MeOH, 35-55분 80-100% MeOH, 55-80분 100% MeOH, 30mL/min, 80min)를 이용하여 6개의 분획물(XS 2-7, FSX II-02~07)을 수득하였다. 이 분획 공정은 분리 및 생물학적 평가를 위해 16회 반복하여 각 분획물을 대량으로 제조하였다.

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 창이자 추출물의 독성 성분을 분석한 크로마토그램이다.

도 1을 참조하면, 창이자 포제 전 30% 에탄올(주정) 추출물(FSX I-01), 창이자 포제 후 30% 에탄올 추출물 및 창이자 포제 후 70% 에탄올 추출물(FSX II-01)을 초고성능 액체 크로마토 그래피 -포토 다이오드/하전 에어로졸 검출기(Ultra Performance Liquid chromatography-photodiode/Charged aerosol detector, UPLC-PDA/CAD)로 분석한 결과, 창이자 포제 후 70% 에탄올 추출물에서 독성 성분인 카르복시아트랙틸로사이드(Carboxyatractyloside) 및 아트랙틸로사이드(Attractyloside)의 양이 현저히 줄어들었음을 확인할 수 있었다. 하기 표 1은 상기 창이자 추출물 제조시 사용된 구배를 나타낸다.

표 1

Time(min)	Flow(mL/min)	% solvent A (0.1% Formic acid/D.W)	% solvent B (0.1% Formic acid/ACN)
initial	0.400	99	1
1.00	0.400	95	5
10.00	0.400	70	30
17.00	0.400	40	60
17.10	0.400	0	100
19.00	0.400	0	100
19.10	0.400	99	1
20.00	0.400	99	1

그리하여, 본 발명은 상기 실시예에 따라, 상기 창이자 포제 후 70% 에탄올 추출물을 제조한 후 이를 분획하여 분획물을 제조하였다.

도 2 및 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 분획물의 크로마토그램이고, 하기 표 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 분획물을 나타낸 것이다.

도 2, 도 3 및 표 2를 참조하면, 도 2는 중압 액체 크로마토그래피(Medium pressure liquid chromatography, MPLC)로 분석한 것이고, 도 3은 초고성능 액체크로마토그래피-포토다이오드(Ultra Performance Liquid chromatography-photodiode, UPLC-PDA) 250nm로 분석한 것으로, 상기 실시예에 따라 70% 추출물 및 6개 분획물

로 총 7개의 시료가 제조되었다.

[0076] 상기 7개의 시료는 차례로, XS-1(창이자 포제 후 70% 에탄올 추출물, FSXII-01), XS-2(컬럼분획물 1, Fr.1, FSXII-02), XS-3(컬럼분획물2, Fr.2, FSXII-03), XS-4(컬럼분획물3, Fr.3, FSXII-04), XS-5(컬럼분획물4, Fr.4, FSXII-05), XS-6(컬럼분획물5, Fr.5, FSXII-06) 및 XS-7(컬럼분획물6, Fr.6, FSXII-07)로 명명하였다.

표 2

창이자(FSXII)	MeOH(%)	분석 시간(min)	무게(g)
컬럼분획물 1(Fr.1) (FSX II-02) XS 2	0-45	0-17	20.0
컬럼분획물 2(Fr.2) (FSX II-03) XS 3	45-55	17-22	53.0
컬럼분획물 3(Fr.3) (FSX II-04) XS 4	55-82	22-37	28.6
컬럼분획물 4(Fr.4) (FSX II-05) XS 5	82-98	37-51	11.8
컬럼분획물 5(Fr.5) (FSX II-06) XS 6	98-100	51-63	10.2
컬럼분획물 6(Fr.6) (FSX II-07) XS 7	100	63-80	10.1

[0079] <실험예 1> MTT 분석을 이용한 분획물의 세포 독성 확인(Cell viability assay)

[0080] 상기 분획물 처리된 세포의 생존율은 3-(4,5-디메틸치아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; 이하, MTT]를 이용하여 분석하였다.

[0081] 간단하게, Huh-7 및 Hep3B 세포(6×10^3 cell/well)는 24시간 동안 96-웰에 시드되었고, 다양한 농도의 분획물 (1, 5, 10, 100 및 $500 \mu\text{g/mL}$)로 처리되었다. 72시간 동안 배양한 후, MTT 용액 일부를 각 웰에 첨가하여 37°C 에서 4시간 더 배양하였다. 세포에 형성된 포마잔 결정(formazan crystals)은 10분 동안 일정하게 흔들어 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)로 용해시켰다. 플레이트는 540nm에서 마이크로플레이트 리더기로 판독되었고, 각 분석을 위해 4개의 복제 웰이 사용되었다.

[0083] 도 4 및 도 5는 본 발명의 일 실험예에 따른 창이자 추출물 및 분획물의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.

[0084] 도 4를 참조하면, 상기 실험예 1에 따라 100 및 $500 \mu\text{g/mL}$ 의 창이자(XS) 추출물 및 분획물을 Huh-7 세포에 처리한 후 MTT 분석한 결과, 상기 창이자 분획물 중 XS-5 및 XS-6 분획물에서 세포 독성 효과가 큰 것으로 나타났다.

[0085] 도 5를 참조하면, 상기 도 4에서 세포 독성 효과가 큰 XS-5 및 XS-6 분획물을 Huh-7 및 Hep3B 세포에 1, 5, 10, 100 및 $500 \mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 MTT 분석한 결과, 상기 분획물의 농도가 높아질수록 세포 독성 효과도 커지는 것으로 나타났고, 특히, $100 \mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 세포 독성 효과가 현저히 향상되었다.

[0087] <실험예 2> BrdU를 이용한 분획물의 세포 증식 억제 효과 확인

[0088] Huh-7 및 Hep3B 세포(7×10^3 cell/well)는 96-웰 플레이트에서 상기 실험예 1에 따른 분획물 중 세포 독성 효과

가 큰 XS-5 및 XS-6의 여러 가지 다른 농도로 37℃, 6시간 동안 배양되었다. 배양 후에, 5'-브로모-2'-데옥시우리딘(5'-bromo-2'-deoxyuridine; 이하, BrdU) 세포 증식 분석 키트(Merck, Darmstadt, Germany)를 이용하여 제조업체의 지시에 따라 DNA 함량을 측정하였다.

[0089] 간단하게, 각 웰의 세포는 37℃에서 3시간 동안 5 μM BrdU로 표지되었다. 표지 배지를 제거한 후, 고정/변성 용액(fixing/denaturing solution)을 각 웰당 100 μL 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양하였다. 고정/변성 용액을 제거한 후, 검출 항체 용액을 각 웰당 100 μL 첨가하여 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척한 후, 홀스레디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; 이하, HRP) 접합 용액을 첨가하여 30분 동안 배양하였다. 플레이트에 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 기질을 첨가하고 30분 동안 더 배양하였다. 다음, 1 mM 황산(H₂SO₄)을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 각 웰의 흡광도는 450nm 파장에서 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 측정되었다. 각 분석을 위해 3개의 복제 웰이 사용되었다.

[0091] 도 6은 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 증식률 그래프이다.

[0092] 도 6을 참조하면, 상기 실험예 2에 따른 BrdU 분석 결과, 상기 분획물 XS-5 및 XS-6의 농도가 높아질수록 세포 증식 억제 효과가 향상되었고, 특히, 10 μg/mL 이상의 농도에서는 세포 증식이 대조군에 비해 50% 이상 억제되기 시작하여 100 μg/mL 이상의 농도에서는 세포 증식이 80% 이상 억제되었다. 상기 결과 값은 3차례의 실험의 평균 ± 표준편차(SEM)로 나타내었다. (*P < 0.05, **P < 0.005, 및 ***P < 0.001 vs 대조군)

[0094] <실험예 3> TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling) 분석을 이용한 분획물의 세포 사멸 효과 확인

[0095] Huh-7 및 Hep3B 세포는 배지의 18mm 커버 글라스에 시드되어 24시간 동안 배양되었다. 세포는 XS-5 및 XS-6 분획물의 다양한 농도로 처리되었고, 얼음처럼 차가운 아세트산과 에탄올의 1:2 비율의 혼합물에 5분 동안 고정된 후 PBS로 세척되었다.

[0096] 마지막으로, 터미널 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라아제-매개 Nick End 라벨링(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling, TUNEL)이 터널(TUNEL) 키트(Chemicon, Temecula, CA)를 이용하여 제조업체의 지시에 따라 순차적으로 수행되었다.

[0098] 도 7은 본 발명의 일 실험예에 따른 TUNEL 분석 결과이다. XS-5 및 XS-6 분획물의 세포 사멸 효과를 확인하기 위해 상기 실험예 3에 따라 Huh-7 및 Hep3B 세포에서 TUNEL 염색을 시행한 결과이다.

[0099] 도 7을 참조하면, 100 μg/mL 농도의 XS-5 및 XS-6 분획물을 각 세포에 24시간 처리하고 400×배율로 관찰한 결과, 상기 세포는 DNA가닥 절단에 의한 DNA 분열과 같은 세포 사멸 세포의 형태학적 특징을 나타냈고, 상기 XS-5 및 XS-6 처리 군에서 TUNEL 양성 세포의 비율이 현저히 높은 것으로 나타났다. 상기 결과 값은 3차례의 실험의 평균 ± 표준편차(SEM)로 나타내었다. (** P < 0.001 vs 대조군).

[0101] <실험예 4> 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)을 통한 분획물의 세포 사멸 효과 확인

[0102] 세포는 프로테아제 및 포스파티제 저해제뿐만 아니라 1% 트리톤 X-100(Triton X-100) 및 1% NP-40을 포함하는 완충용액으로 용해되었다. 단백질은 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)로 분리되었고, 그 후 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 1차 항체로 면역 염색하고, 이어 2차 항체는 홀스레디쉬 퍼옥시다아제(HRP)에 접합되었다. 검출은 향상된 화학발광(chemiluminescence) 시약(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 수행되었다. cleaved PARP, cleaved caspase-3, XIAP, Mcl-1, p-mTOR, p-AKT(Tyr³⁰⁸), p-4EBP1, p-GSK3β 및 β-actin에 대한 항체는 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology, Danvers, MA), 에이비캠(Abcam, Cambridge, MA) 및 산타크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로부터 구매하였다.

- [0104] 도 8 및 도 9는 본 발명의 일 실험예에 따른 웨스턴 블랏 분석 결과이다.
- [0105] 도 8을 참조하면, 상기 실험예 4에 따라 24시간 동안 XS-5 및 XS-6 분획물을 세포에 처리한 후 웨스턴 블랏 분석을 실시한 결과, cleaved caspase-3 및 PARP의 발현이 증가하고 XIAP 및 Mcl-1의 발현이 감소되었다. 이러한 결과는 상기 XS-5 및 XS-6이 HCC 세포에서 세포 사멸 유도를 통해 세포 증식을 억제한다는 것을 나타낸다.
- [0106] 도 9를 참조하면, Huh-7 및 Hep3B 세포에 100 μ g/mL의 XS-5 및 XS-6 분획물을 6시간 처리한 후 웨스턴 블랏 분석을 실시한 결과, p-AKT, p-mTOR, p-GSK3 β 및 p-4EBP1의 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 세포 생존 경로인 PI3K/AKT/mTOR 경로의 수차(aberration)는 HCC 발암과 관련이 있는데, PI3K/AKT 경로의 신호 분자인 p-AKT, p-mTOR, p-GSK3 β 및 p-4EBP1의 발현이 감소됨을 통해 상기 XS-5 및 XS-6은 HCC 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 억제할 수 있는 것으로 이해할 수 있다.
- [0108] <실험예 5> 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP) 변화에 미치는 분획물의 영향 확인
- [0109] 미토콘드리아 막 전위를 측정하기 위해 JC-1 미토콘드리아 염색 키트(JC-1, Grand Island, NY)가 이용되었다. 전위-의존적 축적은 미토콘드리아에서 나타날 수 있다.
- [0110] Huh-7 및 Hep3B 세포는 18mm 커버 글라스에서 24시간 동안 플레이트 되었다. 부착 후에, 세포는 6시간 동안 100 μ g/mL의 XS-5 및 XS-6 분획물이 처리되었고, 100 μ L의 JC-1 용액(최종 농도 12.5 μ g/mL)을 37 $^{\circ}$ C에서 30분 더 첨가하였다. 핵을 시각화하기 위해 6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole; 이하, DAPI)로 염색되기 전, 세포는 PBS로 세척되었다. 세포는 PBS로 여러 번 세척된 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하기 전에 형광 마운팅 용액으로 덮였다.
- [0112] 도 10은 본 발명의 일 실험예에 따른 미토콘드리아를 관찰한 현미경 이미지이다. 상기 실험예 5에 따라 내재적 아포토시스(intrinsic apoptosis)와 관련이 있는 미토콘드리아 막 전위의 변화에 대한 XS-5 및 XS-6 분획물의 효과를 평가하기 위해 JC-1 염색법을 수행하였다.
- [0113] 도 10을 참조하면, 상기 실험예 5에 따라 Huh-7 및 Hep3B 세포에 100 μ g/mL 농도의 XS-5 및 XS-6 분획물을 6시간 처리하였을 때, 대조군에서는 적색 및 녹색 형광이 함께 나타나는 세포질의 이중 염색이 관찰되었다. 이는 미토콘드리아의 국소화와 일치하고, 적색 형광은 대체로 세포질 전반에 분포하는 입상 구조에서 발견되었다.
- [0114] 반면, XS-5 및 XS-6 분획물을 처리한 경우에는 대부분의 세포에서 적색 형광이 사라지거나, 녹색 형광이 다량으로 증가하는 것으로 나타나 미토콘드리아의 막 전위의 현저한 변화가 유발된 것으로 볼 수 있었다.
- [0115] 또한, 도 10의 그래프는 녹색 형광 대 적색 형광의 강도를 백분율로 나타낸 것으로, XS-5 및 XS-6 분획물의 경우, 대조군에 비해 녹색 형광 강도의 비율이 현저히 높은 것으로 나타났다. 상기 결과 값은 3차례의 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었다.(** P < 0.005 및 *** P < 0.001 vs 대조군)
- [0117] <실험예 6> 시토크롬(cytochrome) c 방출 분석을 통한 분획물의 세포 사멸 유도 효과 확인
- [0118] Huh-7 및 Hep3B 세포는 18mm 커버 글라스에서 24시간 동안 플레이트 되었고, 100 μ g/mL의 XS-5 및 XS-6 분획물을 6시간 동안 처리하였다. 미토콘드리아-특이적 염료인 미토타래커(MitoTracker Green FM, Molecular Probes Inc, Eugene, OR)가 첨가되어 세포는 1시간 더 배양되었다. 배지가 제거되었고, 세포는 PBS로 세척되었으며, 1:1 비율의 아세톤-메탄올 용액으로 20 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 고정되었다.
- [0119] 고정된 세포는 PBS로 여러 번 세척되었고 시토크롬 c 항체(Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA)로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양되었다. PBS로 여러 번 세척된 후, 세포는 마우스 형광-표지된 2차 항체(1:100, Dianova, Hamburg, Germany)로 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 세포는 핵을 시각화하기 위해 DAPI로 염색되었다. 마지막으로, 세포는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus)으로 관찰하기 전에 형광 마운팅 용액(Dako, Carpinteria, CA)으로 덮였다.
- [0121] 도 11은 본 발명의 일 실험예에 따른 공초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지이다. 상기 세포에서 XS-5 및 XS-6 분

획물에 의한 세포 사멸 유도 효과를 시토크롬 c 방출 분석으로 확인하였다.

[0122] 도 11을 참조하면, 상기 실험에 6에 따라 Huh-7 및 Hep3B 세포에 100 μ g/mL 농도의 XS-5 및 XS-6 분획물을 6시간 처리하고 미토트래커(Mitotracker, 녹색) 및 시토크롬 c(적색)로 염색한 결과, 시토크롬 c 방출을 증가시키고 대조군에 비해 시토크롬 c 및 미토콘드리아의 공존을 감소시키는 것으로 나타났다. 미토콘드리아 막 전위는 미토콘드리아 시토크롬 c의 세포질 내로의 방출을 유도하는데, 이는 내재적 경로-매개된 아포토시스의 특징이다. 세포질에서 시토크롬 c의 국소화는 400 $\times$ 배율로 관찰되었고, 상기 결과 값은 3차례의 실험의 평균 $\pm$ 표준평균오차(SEM)로 나타내었다.(** P <0.005 및 *** P <0.001 vs 대조군)

[0124] <실험예 7> 분획물에 의한 세포 이동(cell migration) 억제 효과 확인

[0125] Huh-7 세포는 90% 밀집도(confluence)에서 60mm 접시에 시드되고 마이크로펫 팁으로 스크래치되었다. 박리된 세포는 PBS를 이용하여 제거되었고, 손상된 Huh-7 세포는 100 μ g/mL의 XS-5 및 XS-6 분획물로 48시간 처리되었다. 세포는 PBS로 헹구진 뒤, 메탄올로 고정되었다.

[0127] 도 12는 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 이동 분석 결과 이미지이다.

[0128] 도 12를 참조하면, 상기 실험에 7에 따라 HCC 세포의 이동에 대한 XS-5 및 XS-6 분획물의 영향을 평가하기 위해 6-웰 플레이트에 Huh-7 세포를 접종하고 밀집도가 90%에 도달할 때까지 성장시킨 결과, 손상이 치유된 세포의 이동 분석에서, 대조군은 48시간 내에 손상 부위의 90%가 치유되었으나, XS-5 및 XS-6 처리된 세포의 경우, Huh-7 세포의 이동이 억제되는 것으로 나타났다. 모든 이미지는 200 $\times$ 배율로 관찰되었다.

[0130] <실험예 8> 분획물에 의한 세포 침윤(cell invasion) 억제 효과 확인

[0131] 침윤 분석을 위해, 24-웰 수정된 보이든 챔버(modified Boyden chambers, pore size, 8 μ m)는 10% 매트릭젤(Matrigel)로 코팅되었다. 그 다음, 2 $\times$ 10⁵ cell의 Huh-7 세포는 100 μ g/mL의 XS-5 및 XS-6 분획물과 함께, 또는 이들 없이 750 μ L의 완전 배지로 찬 챔버 위 및 아래에 배치되었다. 배양 48시간 후에, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에서 20분 동안 낮은 표면에 도달한 세포는 0.5% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색되었다. 필터의 위 표면의 세포는 세척되고 400 $\times$ 의 배율로 카운터되었다. 우리는 5개의 무작위 필드를 선택하고 침윤된 세포의 수를 세었다.

[0133] 도 13은 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 침윤 분석 결과 이미지이다. 암세포의 침윤성 특성이 전이의 초기 단계에 필요하므로 트랜스웰-24 유닛(Transwell-24 unit) 침윤 분석을 이용하여 HCC 세포의 침윤에 대한 XS-5와 XS-6 분획물의 영향을 확인하였다.

[0134] 도 13을 참조하면, 상기 실험에 8에 따른 침윤 분석은 상기 실험에 7에 따른 세포 이동 분석의 결과와 유사하게, 세포 침윤은 상기 분획물에 의해 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 모든 이미지는 200 $\times$ 배율로 관찰되었고, 상기 결과 값은 3차례의 실험의 평균 $\pm$ 표준평균오차(SEM)로 나타내었다.(** P <0.005 및 *** P <0.001 vs 대조군)

[0136] <실험예 9> 생체 외(Ex vivo) 원발성 장기 종양(primary organotypic tumor) 회전체 분석을 통한 분획물의 치료 효과 분석

[0137] 수컷 BALB/c 누드마우스(4주령, 무게 18-20g)를 오리엔트 바이오(Orient Bio. Animal Inc. Seoul, Republic of Korea)로부터 획득하였다. 모든 동물 실험은 인하대학교 동물실험윤리위원회(INHA IACUC)의 지침에 따라 수행되었다(approval ID: INHA 180523-569).

[0138] 6주령 수컷 누드마우스(Orient-Bio, Korea)의 복부에 8 $\times$ 10⁶ cells을 피하에 주사함으로써 Huh-7 이종이식 종양 모델이 확립되었다. 종양이 약 500mm³(4-6주)에 도달한 후에, 종양 조직은 외과적으로 절제되고 혈액 및 피사 조직은 제거되었으며, 종양 단편(직경 1-2mm)은 무균의 21-게이지 바늘로 해부되었다. 이 외식편(explant)은

1.45% 아가로스 코팅된 24-웰에 개별적으로 플레이트되어 10% FBS로 보충된 DMEM 배지에서 배양되었다. 배양은 2주 동안 2 또는 3일마다 신선한 배지에서 이루어졌다. 약 2mm의 직경을 갖는 구형(즉, 회전 타원체)이 된 외식 편만이 다음 실험에 사용되었다.

[0140] 1. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

[0141] 조직을 고정시키고 파라핀을 묻힌 다음, 8 μ m 두께의 절편을 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. PBS에서 10분 동안 3% 과산화수소(H_2O_2)로 퍼옥시다아제 담금질(peroxidase quenching) 전에, 열 유발 항원요소 복구(heat-induced epitope retrieval, HIER)는 구연산 완충용액(citrate buffer, pH 6.0)에서 5분 동안 수행되었다. 상기 조직 절편은 PBS로 세척되었고 정상 염소 또는 말 혈청으로 실온에서 30분간 차단되었다.

[0142] 다음, 상기 조직 절편은 항-증식 세포 핵 항원(anti-proliferating cell nuclear antigen, PCNA, Abcam) 및 cleaved caspase-3(Cell Signaling Technologies)로 4°C에서 밤새 배양되었다. PBS로 여러 번 세척 후에 절편은 1시간동안 바이오티닐화된 2차 항체로 또 배양되었고, 스트렙타비딘-HRP(streptavidin-HRP)가 적용되었다.

[0143] 마지막으로, 상기 조직 절편은 디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드(diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)로 전개되었고, 헤마톡실린(hematoxylin)으로 대조 염색되었다. 각 절편의 3개 이상의 무작위 필드가 400 $\times$ 배율로 검사되었다.

[0145] 2. 면역형광 현미경법(Immunofluorescence microscopy)

[0146] 세포는 2×10^5 cells/well의 세포 밀도 DMEM 배지에서 18mm 커버 글라스에 플레이트되어 24시간 동안 배양되었다. 그 후 6시간 동안 세포에 100 μ g/mL의 XS-5 및 XS-6 분획물을 처리하고 PBS로 세척하였으며, 2:1의 아세트산-에탄올 용액으로 5분 동안 고정시켰다.

[0147] 비특이적 결합은 실온에서 1시간 동안 5% 염소 및 말 혈청(PBS로 차단되었고, 세포는 가슴 챔버에서 1차 항체(1:50)와 함께 밤새 배양되었다. PBS로 두 번 세척한 후, 세포는 실온의 암실에서 1시간 동안 형광 표지된 2차 항체(1:100)와 함께 배양되었다. 핵은 실온 암실에서 30분동안 DAPI로 염색되었다.

[0148] 슬라이드는 PBS로 두 번 세척되고, 1,4-디아자바이사이클로[2.2.2]옥테인(1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, DABCO, Sigma-Aldrich)으로 덮였으며, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 488 및 568 nm에서 검사되었다.

[0150] 도 14는 본 발명의 일 실험예에 따른 생체 외(ex vivo) 종양 모델에서의 면역 조직화학 염색 분석 이미지이다. XS-5 및 XS-6 분획물의 치료 효과를 확인하기 위해, 다세포 구조 및 약물 전달에 대한 물리적 장벽과 같은 생체 내 생리적 매개 변수를 밀접하게 모방하는 마우스 이종 이식 종양 조직을 사용하여 장기 종양 회전 타원체 분석을 수행하였다.

[0151] 도 14를 참조하면, 헤마톡실린(hematoxylin, H) 및 에오신(eosin, E) 염색(H&E)으로부터, XS-5 및 XS-6 분획물 처리된 종양 회전 타원체가 대조군 Huh-7 종양 회전 타원체보다 유의하게 큰 종양 세포 사멸(apoptosis) 및 괴사(necrosis)를 유발하는 것으로 나타났다.

[0152] 또한, 상기 세포 사멸, 즉 아포토시스 효과는 cleaved caspase-3의 발현 증가 및 HCC 종양 회전 타원체에서의 세포 증식 마커 PCNA의 발현 감소를 통해 확인되었다. 모든 이미지는 400 $\times$ 배율로 관찰되었고, 상기 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SEM)로 나타내었다. (** P < 0.001 vs 대조군)

[0154] 도 15는 본 발명의 일 실험예에 따른 면역 형광 분석 이미지이다.

[0155] 도 15를 참조하면, 상기 종양 회전 타원체를 절제하고 p-AKT 및 p-mTOR에 대한 면역 형광을 처리한 결과, 상기 XS-5 및 XS-6 분획물을 처리한 경우에는 p-AKT 및 p-mTOR의 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 모든 이미지는 400 $\times$ 배율로 관찰되었고, 상기 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SEM)로 나타내었다. (** P < 0.001 vs 대조군)

[0156] 이를 통해, 상기 XS-5 및 XS-6 분획물이 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도함으로써, 생체 외 HCC 종양 장

기 회전 타원체에서 강력한 항종양 효능을 가짐을 확인할 수 있다.

[0158] <실험예 10> HPLC-MS를 이용한 분획물의 구성 분석

[0159] Agilent 1100 시리즈 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(High-performance liquid chromatography, HPLC, Agilent Corp., Santa Clara, CA)을 이용하여 크로마토그램(chromatograms)을 수집하였다. 모든 크로마토그래피 분석은 페노메넥스 키네틱스(Phenomenex Kinetex) C18 컬럼(100mm×4.6mm i.d. 2.6 μm)으로 수행되었다. 이동상(mobile phase)은 0.1% 포름산(formic acid) 함유 증류수 및 0.1% 포름산 함유 메탄올(methanol)로 구성되었다. 용매 구배 용리(gradient elution) 조건은 0-2분 30%, 2-12분 30-90%, 12-22분 90%, 22-22.1분 90-30%, 및 22.1-30분 30%, 0.5 mL/min의 유속이다. 컬럼 온도는 40℃로 유지되었고, 시료 용액의 주입 용량은 2 μL로 고정되었다. 용리액은 ESI-LTQ-XL-선형 이온 트랩(Linear Ion Trap, Thermo Scientific) 질량 분석기로 보내졌고, 데이터는 100에서 800m/z의 질량 범위에서 전체 스캔 및 양성 모드(positive modes)로 수집되었다.

[0161] 도 16은 본 발명의 일 실험예에 따른 고성능 액체 크로마토그래피-질량 분광법 크로마토그램 핑거프린팅이다. XS-5 및 XS-6 분획물의 높은 항암 효능은 아세토니트릴(acetonitrile)/물(HPLC-grade, Merck, Darmstadt, Germany)의 농도 구배(0분, 1% B; 0-1.0분, 1-5% B; 1.0-10.0분, 5-30% B; 10.0-17.0분, 30-60% B; 17.0-17.1분, 60-100% B; 17.1-19.0분, 100%B; 19.0-20.0분, back to 1% B)를 이용한 UPLC-QToF-MS(Micromass Q-ToF Premier™, Waters Corporation, Milford, MA) 분석을 수행하여 주요 화합물의 질량 데이터(experimental m/z, HRESIMS, error ppm, molecular formulae)로 특성 분석되었다.

[0162] 도 16을 참조하면, 상기 실험예 10에 따른 분석 결과, 하기 5가지 화합물에 대해 탈양자화된 분자 $[M-H]^-$ 가 가장 풍부한 것으로 나타났다: m/z 645 4'-디설페이트아트락틸로시드(4'-desulphate-atractyloside, $C_{30}H_{46}O_{13}S_1$), m/z 329 9S,12S,13S-트리하이드록시-10E-옥타데센산(9S,12S,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid, $C_{18}H_{34}O_5$), m/z 313 (9Z)-12,13-디하이드록시-9-옥타데센산(9Z)-12,13-dihydroxy-9-octadecenoic acid, $C_{18}H_{34}O_4$), m/z 315 12,13-디하이드록시옥타데센산(12,13-dihydroxyoctadecanoic acid, $C_{18}H_{36}O_4$), 및 m/z 295 (9Z)-12,13-에폭시옥타데센산((9Z)-12,13-epoxyoctadecenoic acid, $C_{18}H_{32}O_3$).

[0163] 상기 5가지 화합물은 리엑시스(Reaxys)와 퍼브캠(PubChem) 및 챔스파이더(ChemSpider)와 같은 온라인 데이터베이스를 이용하여 MS 결과 값을 내어 비교함으로써 시험적으로 확인되었다.

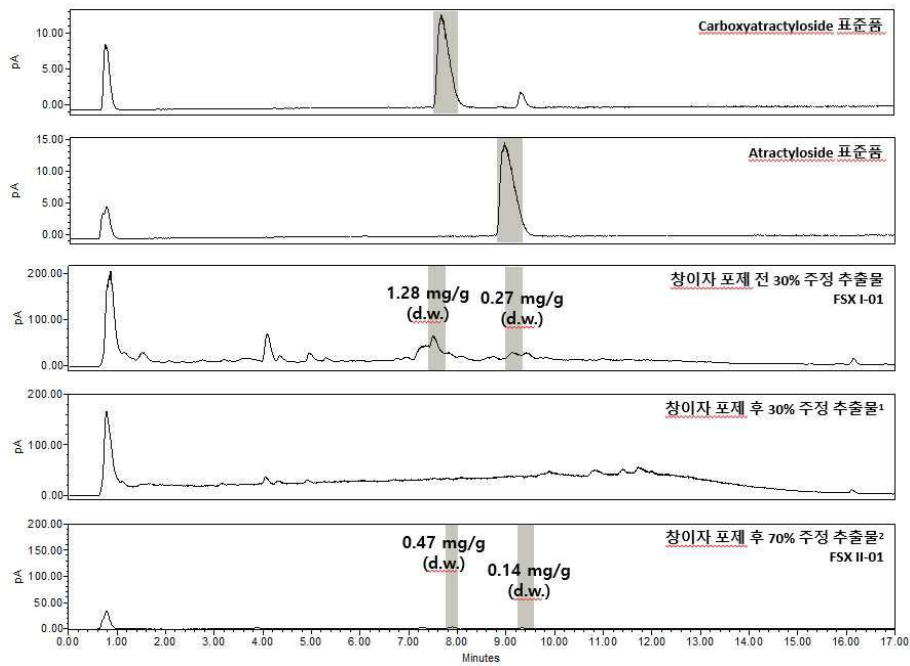
[0165] <실험예 11> 통계적 분석

[0166] 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 나타내었고 ANOVA 및 unpaired Student t-test를 사용하여 분석되었다. 0.05 또는 그 이하의 P값은 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

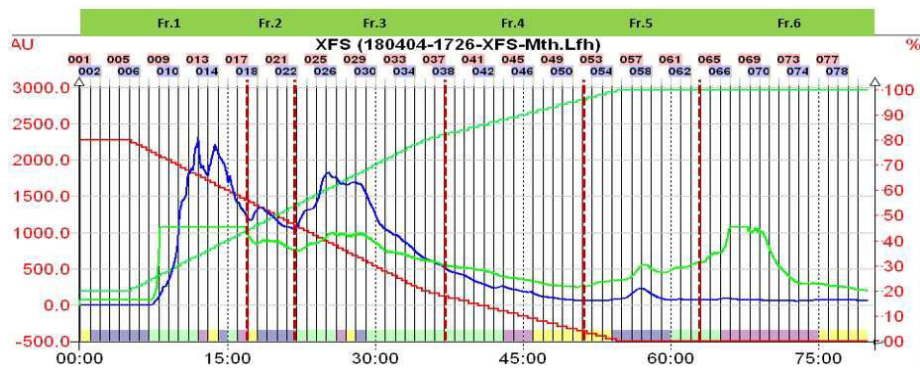
[0168] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

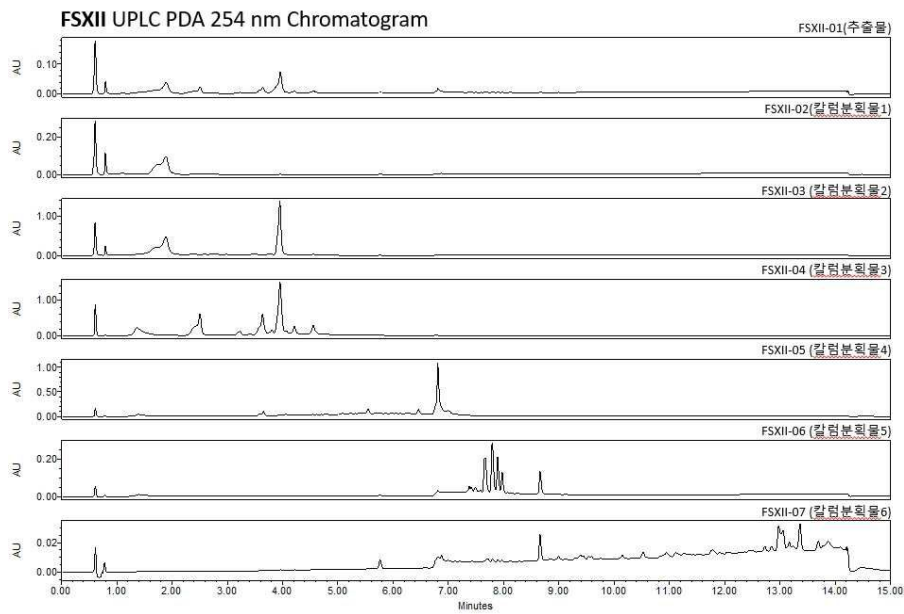
도면1



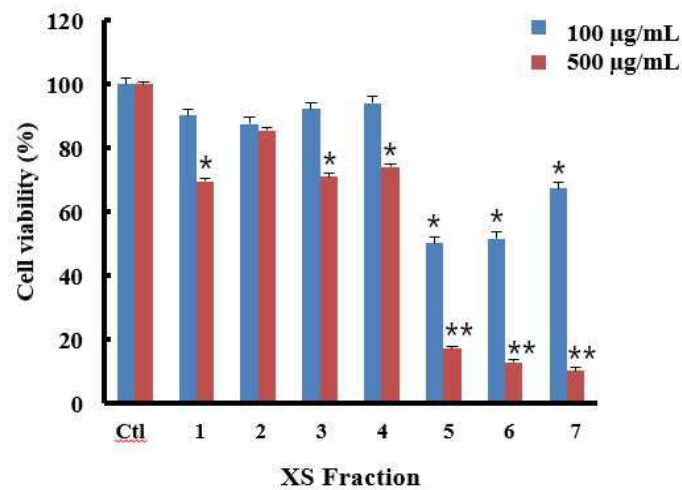
도면2



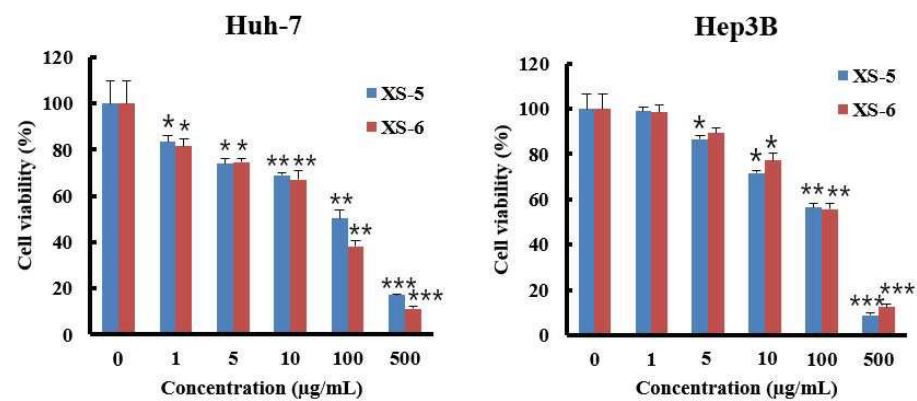
도면3



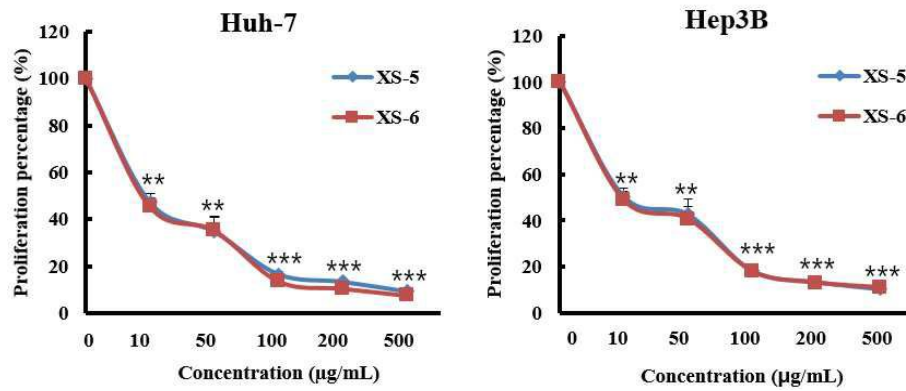
도면4



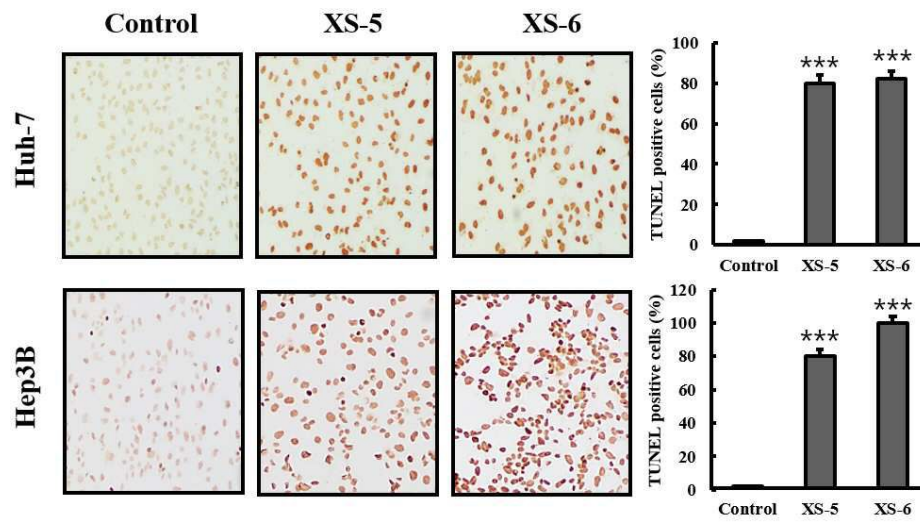
도면5



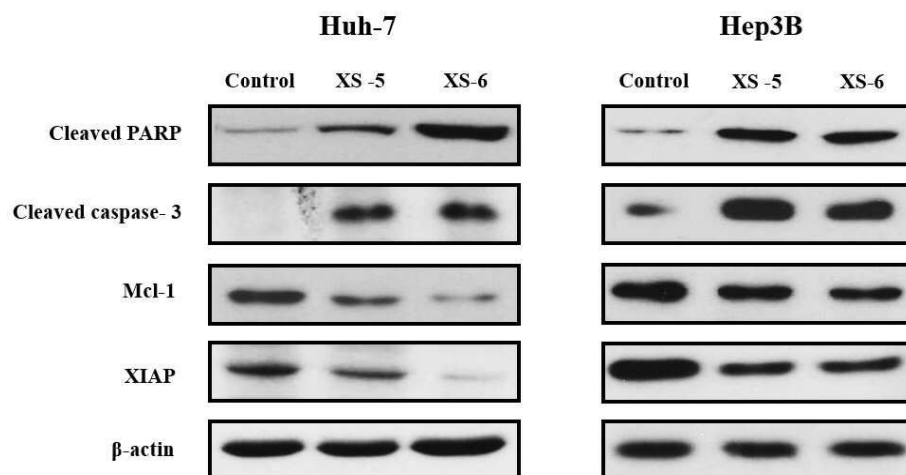
도면6



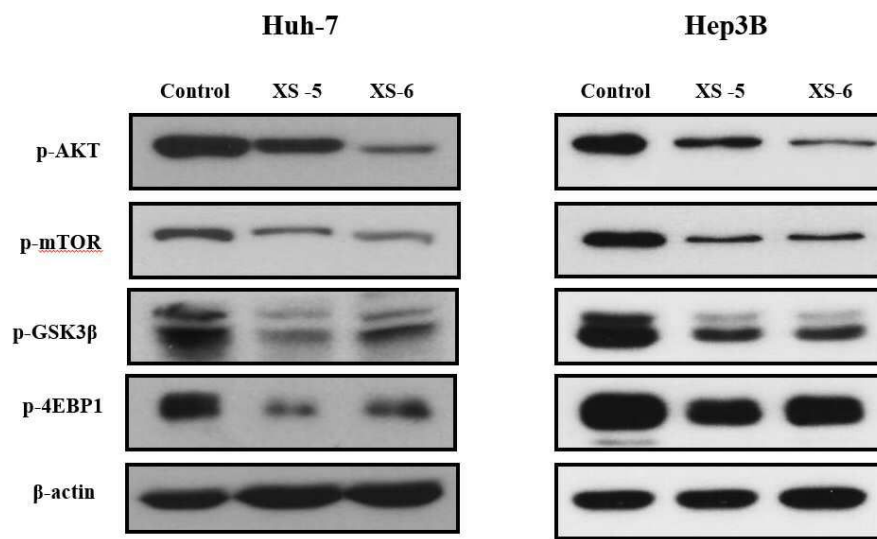
도면7



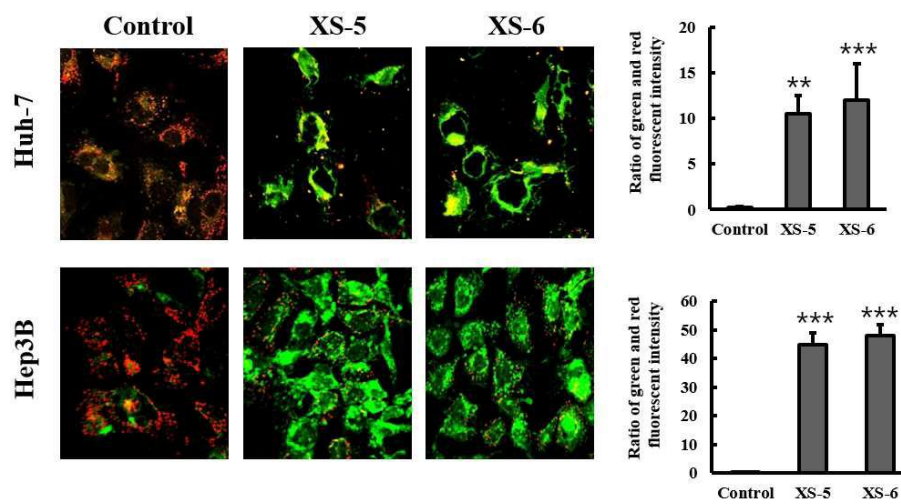
도면8



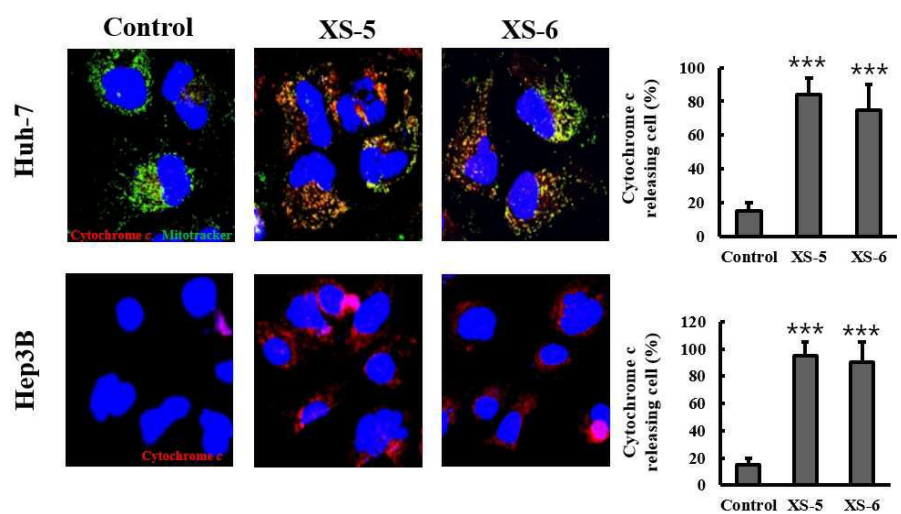
도면9



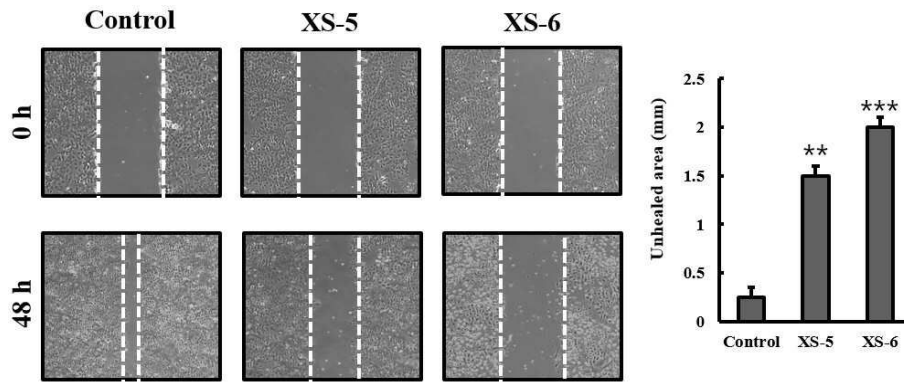
도면10



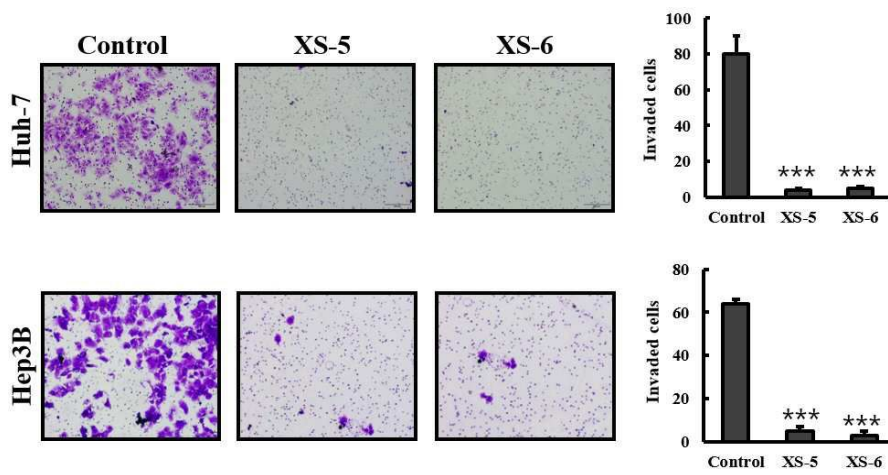
도면11



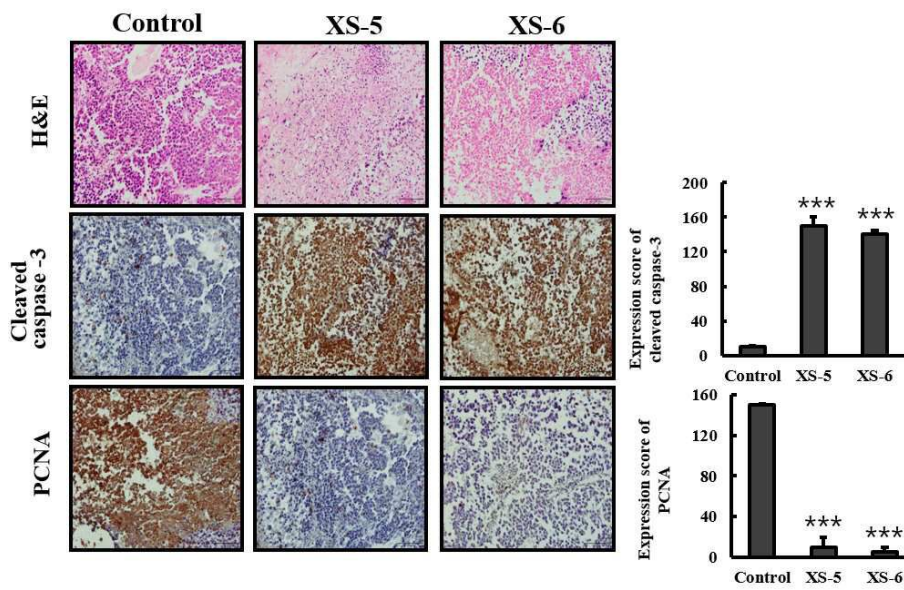
도면12



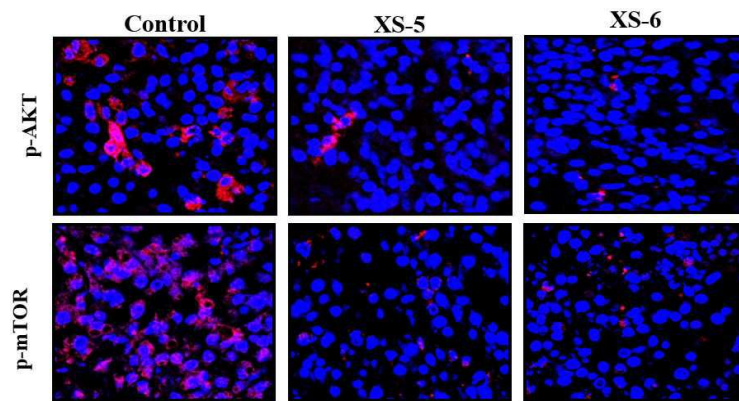
도면13



도면14



도면15



도면16

Peak	RT (min)	Name
1	11.33	4'-desulphate-atracycloside
2	12.77	9S,12S,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid
3	16.39	(9Z)-12,13-dihydroxy-9-octadecenoic acid
4	17.43	12,13-dihydroxyoctadecenoic acid
5	118.31 or 18.41	(9Z)-12,13-epoxyoctadecenoic acid

