(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0144969
(43) 공개일자 2015년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) *A61K 31/70* (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0074088
(22) 출원일자 2014년06월18일
심사청구일자 2014년06월18일

(71) 출원인
한국원자력연구원
대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)
(72) 발명자
정일래
대전광역시 유성구 지족로 343 (지족동, 반석마을아파트) 205-1703
(74) 대리인
특허법인 플러스

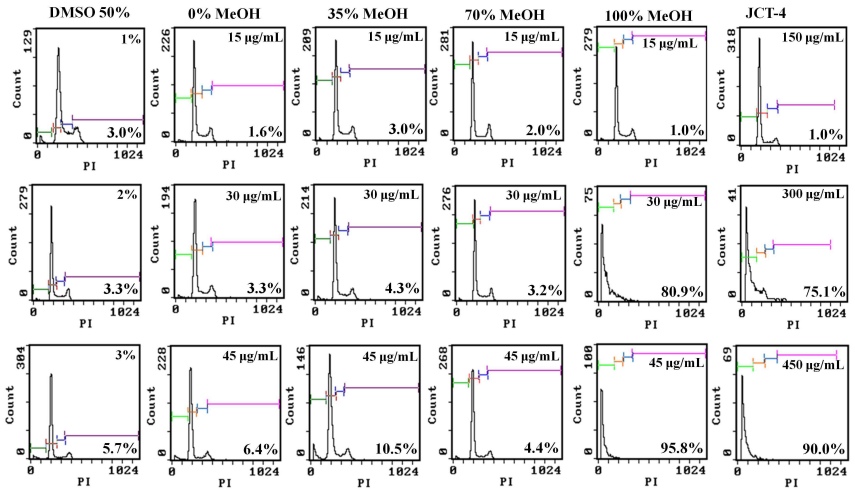
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **암 개선 또는 예방용 모링가잎 추출물**

(57) 요 약

본 발명은 모링가(*Moringa oleifera*)잎 추출물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 모링가 잎의 침출수를 순차적으로 농도가 다른 메탄올에 침지하여 얻은 암 개선 또는 예방효과가 향상된 추출물 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 모링가 잎의 추출물은 암세포의 성장, 이동 및, 침윤에 있어서. 뛰어난 억제 효과를 보였으며, 구체적으로는 암세포의 성장, 전이 및 침윤 능력이 정상세포보다 암세포에서 더 높은 독성을 보이며, 동물모델에 상기 추출물을 일회 경구 투여한 경우에도 높은 항암효능을 나타내었다. 본 발명에 따른 추출물은 천연물 항암 신약개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 527240-14
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 주요사업
연구과제명 방사선에 의한 암세포 사멸효과 증진을 위한 항암물질 병합기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국원자력연구원
연구기간 2014.04.01 ~ 2014.12.31

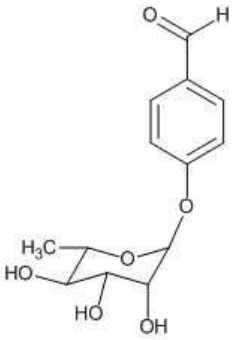
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 구조를 갖는 4-(a-L-rhamnopyranosyloxy)-benzaldehyde 화합물을 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물을 포함하는 조성물.

[화학식 I]

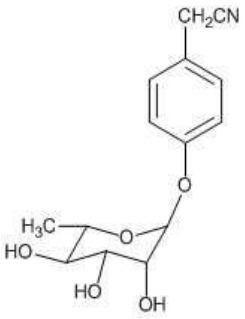


청구항 2

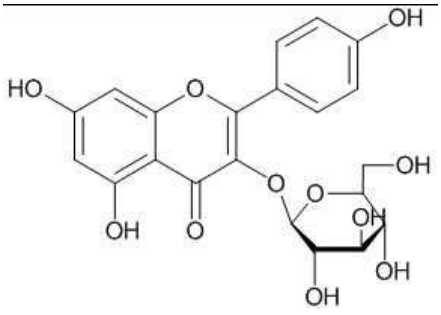
제 1항에 있어서,

상기 추출물은 하기 화학식 II, III의 구조를 갖는 니아지린(niazirin) 및 아스트라갈린(astragalin) 화합물을 추가로 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물을 포함하는 조성물.

[화학식 II]



[화학식 III]



청구항 3

(a) 모링가 잎을 질량 기준 5 내지 10배의 0 내지 20 ℃의 물에 침지하는 단계;

(b) 모링가 잎의 침출수를 수득하여, 불용성 물질을 제거하는 단계;

(c) 상기 불용성 물질을 제거한 침출수를 여과하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 얻은 여과물을 순차적으로 물 , 25 내지 45% 메탄올, 60 내지 80% 메탄올 및 90 내지 100% 메탄올에 침지하는 단계;

를 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물 제조방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 모링가 잎 추출물은 추출용매로서 물; 메탄올 또는 에탄올; 또는 상기 추출용매의 혼합물;을 사용하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 물의 온도는 0 내지 40 ℃인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 모링가 잎 추출물은 모링가 잎을 물에 1 내지 60분 동안 침지시켜 얻어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 모링가 잎 추출물은 모링가 잎을 0 내지 5 ℃의 물에 1 내지 30분 동안 침지시켜 얻는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항의 조성물을 포함하는 암 개선 또는 예방용 기능성 식품.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 암은 대장암, 간암, 유방암, 폐암, 편평상피암, 및 섬유종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 기능성 식품.

청구항 10

제 1항 또는 제 2항의 조성물을 포함하는 피부암 예방 또는 개선용 화장품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 모링가(*Moringa oleifera*)잎 추출물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 모링가 잎의 침출수를 순차적으로 농도가 다른 메탄올에 침지하여 얻은 암 개선 또는 예방효과가 향상된 추출물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 모링가는 원산지가 인도인 소목이지만, 전세계 어디에서나 재배되고 모링가 나무가 널리 이용되는 많은 지역들에서 귀화되어 야생된다. 모링가과에 속하는 13 종의 모링가 나무가 있으며, 모링가 올레이페라(*Moringa*

oleifera)가 가장 널리 알려져 있다. 모링가 올레이페라는 우산과 같이 펼쳐진 4 내지 8 미터 높이의 관목이다. 30 내지 70 cm 길이의 잎들은 낙엽성이며, 꽃들은 흰색이고 향기가 진하며, 열매는 녹색이고 혁질성 및 현수성의 긴 삼각형상의 긴 깍지로 길이는 30 내지 40 cm에 이르는 특징을 가지며, 인도 북서부 히말라야 산기슭에 자생하고, 열대 전 지역에서 재배하는 다목적 수종의 일종이다.

[0003] 모링가는 동남아시아 등에서 자생하는 식물로서 다량의 영양분을 함유하고 있어 기적의 식물로 불리고 있으며, 항당뇨, 항암, 항알러지 등 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 종래 모링가 추출물과 관련된 일본공개특허공보 제2006-508902호는 조성물에 유효성분으로서 모링가 추출물을 포함하고 있으나, 혈관성 두통 또는 신경질환의 치료 효능에 대해서만 언급하고 있으며, 미국공개특허공보 제2007-0264366호의 모링가 잎 추출물은 에탄올을 이용해서 추출한 것으로, 항진균 효과에 대해서만 기술하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 일본공개특허공보 2006-508902(2006. 03. 16.).

(특허문헌 0002) 미국공개특허공보 2007-0264366(1995. 11. 21.).

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Tiloke et al., BMC Complementary and Alternative Medicine 2013, 13:226.

발명의 내용

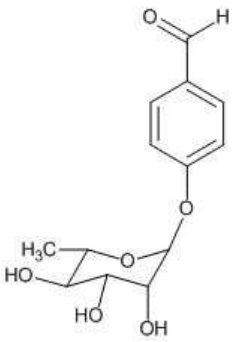
해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 모링가 잎의 수용성 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 기능성 식품 및 화장품과 상기 추출물의 제조방법을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

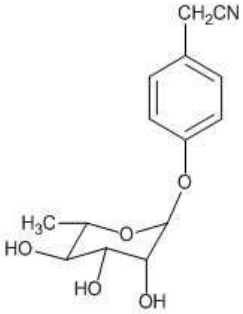
[0007] 본 발명은 하기 화학식 I의 구조를 갖는 4-(a-L-rhamnopyranosyloxy)-benzaldehyde 화합물을 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0008] [화학식 I]

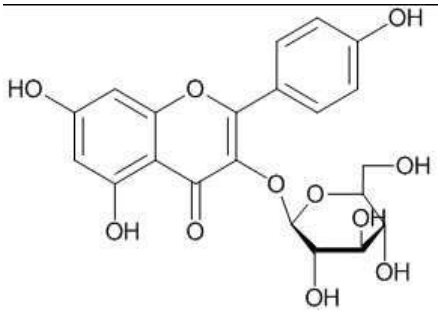
[0009] 

[0010] 본 발명에서, 상기 추출물은 제한되지는 않으나 하기 화학식 II, III의 구조를 갖는 니아지린(niazirin) 및 아스트라갈린(astragalin) 화합물을 추가로 포함할 수 있다.

[0011] [화학식 II]

[0012] 

[0013] [화학식 III]

[0014] 

[0015] 또한 본 발명은 (a) 모링가 잎을 질량 기준 5 내지 10 배의 0 내지 20 ℃의 물에 침지하는 단계; (b) 모링가 잎의 침출수를 수득하여, 불용성 물질을 제거하는 단계; (c) 상기 불용성 물질을 제거한 침출수를 여과하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 얻은 여과물을 순차적으로 물 , 25 내지 45% 메탄올, 60 내지 80% 메탄올 및 90 내지 100% 메탄올에 침지하는 단계;를 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물 제조방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에서 상기 모링가 잎의 수용성 추출물은 제한되지는 않으나 추출용매로서 물; 메탄올 또는 에탄올; 또는 상기 추출용매의 혼합물;을 사용할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 상기 물의 온도는 제한되지는 않으나 0 내지 40 ℃일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 상기 모링가 잎의 추출물은 제한되지는 않으나 모링가 잎을 물에 1 내지 60분 동안 침지시켜 얻을 수 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 모링가 잎의 추출물은 제한되지는 않으나, 바람직하게는 모링가 잎을 0 내지 5 ℃의 물에 1 내지 30분 동안 침지시켜 얻을 수 있다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암 개선 또는 예방용 기능성 식품에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 상기 암은 대장암, 간암, 유방암, 폐암, 편평상피암, 및 섬유종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 피부암 예방 또는 개선용 화장품에 관한 것이다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 모링가 잎의 추출물은 암세포의 성장, 이동 및, 침윤에 있어서. 뛰어난 억제 효과를 보였으며, 구체적으로는 암세포의 성장, 전이 및 침윤 능력이 정상세포보다 암세포에서 더 높은 독성을 보이며, 동물모델에 상기 추출물을 일회 경구 투여한 경우에도 높은 항암효능을 나타내었다. 본 발명에 따른 추출물은 천연물 항암 신약개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 모링가 잎 냉수추출물의 메탄올 추가분획의 MTT assay 결과를 보여주는 도면이다.

도 2는 모링가 잎 냉수추출물의 농도에 따른 메탄올 추가분획의 FACScan 결과를 보여주는 도면이다.

도 3은 100% MeOH 분획에 대한 성분 분리 개요도이다.

도 4는 100% MeOH 추가분획에 대한 HPLC 성분 분석 결과로, 첫번째 도면은 225 nm로 분석한 제1분획의 프로파일이며, 두번째 도면은 254 nm로 분석한 제4분획의 프로파일이다.

화학식 I 화합물(compound 1): 0.6 mg, 0.014% 수율, 화학식 II 화합물(compound 2): 0.7 mg, 0.017% 수율, 화학식 III 화합물(compound 3): 1.0 mg, 0.024%.

도 5는 화학식 I로 표시되는 화합물의 ^{1}H NMR 스펙트럼이다.

도 6은 화학식 I로 표시되는 화합물의 ^{13}C NMR 스펙트럼이다.

도 7은 화학식 II로 표시되는 화합물의 ^{1}H NMR 스펙트럼이다.

도 8은 화학식 II로 표시되는 화합물의 ^{13}C NMR 스펙트럼이다.

도 9는 화학식 III으로 표시되는 화합물의 ^{1}H NMR 스펙트럼이다.

도 10은 화학식 III으로 표시되는 화합물의 ^{13}C NMR 스펙트럼이다.

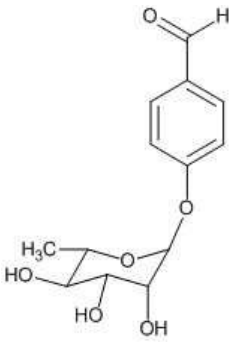
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 하기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0026] [화학식 I]

[0027] 4-(a-L-rhamnopyranosyloxy)-benzaldehyde,

[0028] 4-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy]benzaldehyde:

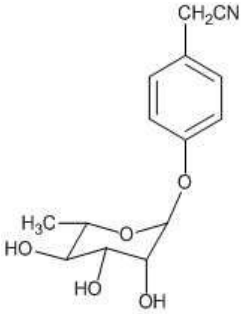
[0029] 

[0030] 본 발명에서, 상기 추출물은 제한되지는 않으나 하기 화학식 II, III의 구조를 갖는 화합물을 추가로 포함할 수 있다.

[0031] [화학식 II]

[0032] Niazirin,

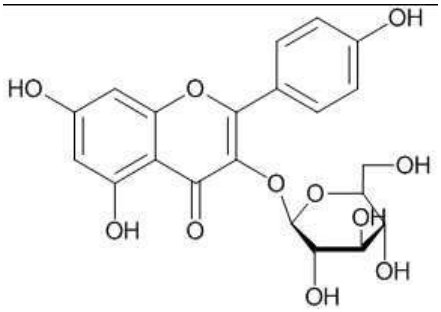
[0033] 2- {4-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy]phenyl}acetonitrile:

[0034] 

[0035] [화학식 III]

[0036] astragalin (Kaempferol 3-Glucoside),

[0037] 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3- {[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy }-4H-chromen-4-one:

[0038] 

[0039] 상기 화합물을 포함하는 모링가 잎 추출물을 투여하는 경우, 암 개선 또는 예방 효과가 크게 증가하는 것을 본 발명의 일 실시예를 통하여 확인하였다. 특히도 1과 도 2에 의하면 추가 분획 전의 JCT-4보다 항암능력을 보이기 시작하는 농도가 현저히 낮아졌음을 확인할 수 있었다.

[0040] 또한 본 발명은 (a) 모링가 잎을 질량 기준 5 내지 10 배의 0 내지 20 ℃의 물에 침지하는 단계; (b) 모링가 잎의 침출수를 수득하여, 불용성 물질을 제거하는 단계; (c) 상기 불용성 물질을 제거한 침출수를 여과하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 얻은 여과물을 순차적으로 물 , 25 내지 45% 메탄올, 60 내지 80% 메탄올 및 90 내지 100% 메탄올에 침지하는 단계;를 포함하는 암 개선 또는 예방용 모링가 잎 추출물 제조방법에 관한 것이다.

[0041] 본 발명에서 상기 모링가 잎의 수용성 추출물은 제한되지는 않으나 추출용매로서 물; 메탄올 또는 에탄올; 또는 상기 추출용매의 혼합물;을 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 물의 온도는 제한되지는 않으나 0 내지 40 ℃일 수 있다.

[0043] 상기 모링가 잎은 건조된 모링가 잎을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 건조되지 않은 모링가 잎의 사용도 가능하다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 의하면, JCT-4 또는 CanTher로 명명된 상기 모링가 잎의 수용성 추출물을 얻기 위해서 추출용매로 물을 사용할 수 있다. 또한 상기 추출용매로서 사용하는 물은 0 내지 40 ℃의 온도로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0 내지 20 ℃의 물, 더욱 바람직하게는 0 내지 10 ℃의 물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 추출용매인 물의 온도가 40 ℃ 이상일 경우 추출물의 농도를 높여서 처리하더라도 암세포의 생존에의 추출물의 영향이 미비하며, 온도가 낮을수록, 암세포에의 독성이 높아지게 된다.

[0045] 상기 불용성 물질의 제거는 원심분리를 이용하여 제거할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 12,000 rpm, 10분 동안 3회 원심분리하여 상등액만을 취하여 불용성 물질을 제거하였다.

[0046] 또한, 상기 여과는 기공 크기가 마이크로미터 단위인 여과포 또는 여과지에 의해 추출물을 추출액과 잔여 추출원료 고형물로 분리할 수 있으며, 여과된 추출액은 추가적으로 기공 크기가 나노미터 단위인 멤브레인 필터로

여과하여 불순물(이취 성분이나 색상 성분)을 제거할 수 있다. 상기 여과에 의해 수득한 여과액은 농축되어 액상 형태의 모링가 잎 추출물로 제조될 수 있고 또한, 건조에 의해 분말 형태로 제조될 수 있다. 이때 건조 방법은 그 종류가 크게 제한되지 않으나, 활성 성분의 열적 변형을 최소화시키기 위해 동결 건조인 것이 바람직하다.

[0047] 상기 여과 후 여과물을 순차적으로 물 , 25 내지 45% 메탄올, 60 내지 80% 메탄올 및 90 내지 100% 메탄올에 침지하는 단계를 거쳐서 얻은 분획의 경우 상기 분획 단계를 거치지 않은 추출물(JCT-4) 대비하여 보다 10배 이상의 항암 활성을 나타내는 것을 본 발명의 일 실시예를 통해 확인할 수 있었다.

[0048] 본 발명에서 상기 모링가 잎의 추출물은 제한되지는 않으나 모링가 잎을 물에 1 내지 60분 동안 침지시켜 얻을 수 있다. 상기 침지 시간은 1시간 이내인 것이 바람직하며, 침지 시간을 30분 이하로 추출한 추출물이 암세포의 생존에 있어서, 더욱 우수한 독성 효과를 보이게 된다.

[0049] 본 발명에서 상기 모링가 잎의 추출물은 제한되지는 않으나, 바람직하게는 모링가 잎을 0 내지 5 ℃의 물에 1 내지 30분 동안 침지시켜 얻을 수 있다.

[0050] 더욱 바람직한 일 구체예로 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 모링가 잎의 추출물은 0 내지 5 ℃의 물에서 1 내지 30분 동안 침지시켜 얻어진 것을 사용할 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 4 ℃의 물에서 1 내지 30분 동안 침지시켜 얻어진 것을 사용할 수 있다. 또한 모링가 잎의 질량 기준 5 내지 10 배의 물에 침지시켜서 얻는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암 개선 또는 예방용 기능성 식품에 관한 것이다.

[0052] 본 발명에서 상기 암은 제한되지는 않으나 대장암, 간암, 유방암, 폐암, 편평상피암, 및 섬유종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 상기 암은 대장암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 편평상피암, 섬유종, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 나팔관임종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(Central nervous system, CNS) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 또는 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 대장암, 간암, 유방암, 폐암, 편평상피암, 및 섬유종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 대장암, 폐암 또는 간암에서 선택될 수 있다.

[0053] 상기 기능성 식품은 모링가 잎 수용성 추출물을 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 기능성 식품에 첨가되는 모링가 잎 수용성 추출물은 모링가 잎을 추출용매로 물을 이용해서 얻어지는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 추출용매로서 물은 40 ℃ 미만의 물을 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0 ℃이상 내지 20 ℃이하의 온도일 수 있다. 20 ℃ 이하의 물을 추출용매로 사용할 경우 암의 예방 또는 개선에 더욱 우수한 효과를 가지는 모링가 잎의 추출물을 얻을 수 있다. 또한 모링가 잎의 추출물은 모링가 잎을 물에 침지시켜 얻는 것이 바람직한데, 이때 침지시간은 1시간 이내인 것이 암의 예방 또는 개선에 더욱 활성이 좋은 추출물을 얻을 수 있다.

[0054] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 모링가 잎 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0055] 본 발명의 기능성 식품으로서 음료조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 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 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g 이다. 상기 외에 본 발명의 모링가 잎 추출물은 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수

있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0056] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 피부암 예방 또는 개선용 화장품에 관한 것이다.

[0057] 상기 화장품 조성물은 피부암의 개선 또는 예방에 효과가 있으며, 더욱 바람직하게는 편평상피암의 개선 또는 예방에 효과가 있다. 본 발명에 따른 화장품 조성물은 물을 추출용매로서 사용하여 얻어지는 추출물을 유효성분으로 함유하는 것이 바람직하다. 또한 이때 추출시 물의 온도는 0 내지 40 ℃의 물을 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0 ℃ 내지 20 ℃의 온도일 수 있다. 또한 상기 화장품 조성물에 포함되는 모링가 잎의 추출물은 모링가 잎을 물에 침지시켜 얻는 것이 바람직한데, 이때 침지 시간은 1시간 이내인 것이 피부암의 예방 또는 개선에 더욱 활성이 좋은 추출물을 얻을 수 있다. 본 발명에 따른 화장품 조성물은 유효 성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다. 또한, 상기 화장품은 그 효과를 증진시키기 위하여 피부 흡수 촉진 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 화장품은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다.

[0058] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0060] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0061] <제조예> 모링가 잎 추출물의 제조

[0062] 건조된 모링가 잎(*M. oleifera* leaves)은 GL Network Co. Ltd.로부터 구입하였다(치앙마이, 태국). 건조된 모링가 잎 150 mg을 4 ℃의 물 1 ml에 5분간 침지시켜, 30초 동안 볼텍싱(voltexing)한 다음 냉장실에서 stirring하면서 보관하였다. 각 실시예마다 냉장실의 보관시간을 다르게 하여, 즉 하기 표 1과 같이 각 실시예마다 침지시간의 차이를 두었다. 침지시간이 다른 각각의 침지물을 1분 동안 실온에서 다시 볼텍싱하였다. 이후 부유물의 불용성 부분은 3차례의 원심분리(12000rpm, 10분)에 의해 제거한 다음, 상등액(supernatant)을 여과(0.2μM membrane filtration)하여 각각 최종 수득하였다. 상기 모링가 잎의 냉수추출물을 메탄올의 농도를 순차적으로 0%, 35%, 70% 및 100%의 네 종류로 달리하여 추가분획(Diaion HP-20)하여 4개의 분획을 얻었다. 이 4개의 분획은 동결건조한 후, -20 ℃에 저장하였다.

[0063] <실험 방법>

[0064] 1. 모링가 잎 추출물의 농도에 따른 시료 준비

[0065] 모링가 잎의 건조분말 100 g 으로부터 DW를 이용하여 추출하는 경우 추출물을 동결건조하였을때, 총 17.5 g의 활성이 있는 수용성 건조분말이 얻어졌다. 초기 원재료로부터 수용성 건조분말을 얻는 수득률은 약 17.5%였다.

[0066] 한편 상기의 방법으로 얻어진 동결 건조분말 1 g 취해 DW 10mL에 녹인 후 단백질을 정량한 경우, 상기 시료에 함유되어 있는 단백질량은 322mg로서 건조시료 중 단백질 함량은 대략 32%였다. 이를 계산해보면 초기에 원재료인 모링가 잎 100 g을 가지고 추출하였으므로 최종 단백질 수득율은 322 mg*17.5=5.6%가 된다.

[0067] 즉, 1 g의 원재료로부터 DW로 추출하면 0.175 g의 수용성 건조분말이 얻어지며, 0.056 g의 단백질이 얻어지며, 활성이 있는 수용성 건조분말에 함유되어 있는 단백질은 32%에 이른다.

[0068] 2. 세포 배양(cell culture)

[0069] 본 발명의 효과를 확인하기 위해 실험에 사용한 인간 폐암 세포주(Lung cancer cell line) A549는 ATCC(American Type Culture Collection, USA) 및 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)로부터 분양받았다. 세포들은 10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone Lab, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 RPMI-1640 (A549) 배지에서 배양하였다. 배양된 세포를 6 웰-플레이트에 1 x 10^5 cells 로 각각 분주한 다음, 37 ℃, 95% 공기/ 5% CO_2 조건에서 유지시켰다.

[0070] 3. MTT assay

[0071] 세포의 생존 능력을 테트라졸륨(tetrazolium)을 사용한 세포 증식 분석 방법인 MTT assay로 분석하였다. 세포들을 96 웰(well) 플레이트에 배지 100 μl 당 3 x 10^3 세포의 농도로 분주하였다. 1일 동안 배양한 후, 실시예에 의해 만들어진 모링가 잎 추출물을 각 플레이트에 0 내지 400 ㎍/ml의 다양한 농도로 처리하였다. 다시 1일 또는 2일 배양한 후, cell-counting Kit-8 (Cat. No. CK04, Dojindo lab. 일본) 또는 WST assay 시약 (대일 lab, 한국) 10 μl를 각 웰에 첨가한 다음, 4시간 동안 배양하였다. 이후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Model 680, Bio-Rad)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] 4. 유세포 분석(Flow cytometric detection)

[0073] 6-웰 플레이트에 세포를 1 x 10^5 cell/ml로 시딩(seeding)한 다음, 1일 동안 배양한 후, 농도에 따른 모링가 잎의 추출물을 처리하였다. 2일 더 배양시켜 세포를 회수하여, PBS로 워싱한 다음, 어두운 곳에서 70% 에탄올로 4 ℃에서 2시간 반응시켜 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 두 번 워싱한 후, 실온에서 50 ㎍/ml의 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI)로 30분 동안 염색하였다. DNA 양은 FACScan(EPICS XL Flow Cytometry, Beckman Coulter Counter)로 측정하였다. 각각의 세포주기에서 나타나는 효과는 세포주기의 각 시기에서 나타나는 세포배열의 %(백분율) 변화로부터 측정하였고, Pheonix Multicycler Software 프로그램(Phoenix Flow System)에 의해 결정하였다.

[0074] 5. 100% MeOH 분획에 대한 성분 분리

[0075] 도 3의 개략도에 도시한 바와 같이 100% MeOH 분획에 대하여 HPLC(Young Lin Acme 9000)를 분석을 실시하였다. 컬럼은 Kromasil 100-10-C18 (250 x 10 mm I.D.)을 사용하였고, UV 254 nm로 검출하였다. 유속은 3 mL/min으로 40 ℃ 조건에서 운전하였으며, 이동상(mobile phase)은 하기 표 1의 조건으로 실시하였다.

[0076] [표 1] HPLC 분리 조건

Mobile phase	A(H2O)	B(MeOH)
0 min	90	10
20 min	60	40
40 min	30	70
60 min	10	90
80 min	90	10

[0077]

[0078] 6. NMR 분석

[0079] 구조결정은 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (700MHz Nuclear Magnetic Resonance, Model : Bruker Advance, Bruker, Germany) 와 GC-MS(Model : GCMS-2010 Ultra, Shimadzu, JAPAN)를 사용하여 구조를 확인하였다.

[0080] <실험예 1> *In vitro*에서 암세포에 대한 모링가 잎 추출물의 억제효과 확인

[0081] 1. 모링가 잎 추출물의 암세포에 대한 억제 효과

[0082] 암세포에 상기 <제조예>에 따라 획득한 4개의 분획을 동결건조한 후 50% DMSO에 녹여 사용하였다. 제조된 모링가 잎 추출물을 농도에 따라 처리한 후, 하기의 방법으로 MTT assay를 실시하여 암세포의 생존율을 확인하였다 (도 1).

[0083] 세포들을 96 웰(well) 플레이트에 배지 100 ㎕ 당 3 x 10^3 세포의 농도로 분주하였다. 1일 동안 배양한 후, 모링가 잎 추출물을 각 플레이트에 0 내지 400 ㎍/ml의 다양한 농도로 처리하였다. 다시 1일 또는 2일 배양한 후, cell-counting Kit-8 (Cat. No. CK04, Dojindo lab. 일본) 또는 WST assay 시약 (대일 lab, 한국) 10 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음, 4시간 동안 배양하였다. 이후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Model 680, Bio-Rad)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0084] 도 1의 결과에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군으로 사용한 50% DMSO를 포함한 5개 군의 그래프에서 100% 메탄올 분획만이 항암활성을 나타내고 있음을 확인하였다. 특히, 100% 메탄올 분획의 경우, 15 ㎍/ml 이상에서 암세포 사멸을 80%이상 유도하여 기존의 JCT-4 대비 우수한 항암활성을 보였다. 또한 상기 결과는 인용문헌(Tiolke et al. 2013)에서 제시한 결과(표 2)와 같이, 모링가 잎의 열수추출물의 경우 암세포에 대한 억제 효과가 거의 없는 것에 비해 예측할 수 없었던 매우 향상된 결과임을 확인하였다.

[0085] [표 2] 모링가 잎의 열수추출물의 암세포에 대한 억제 효과(Tiolke et al. 2013)

Concentration (μg/ml)	Mean OD ± SD	Cell viability (%)
0 (Control)	1.469 ± 0.008	100
1	1.177 ± 0.058	80.123
10	1.120 ± 0.132	76.242
50	1.001 ± 0.118	68.108
100	1.201 ± 0.082	81.756
150	1.170 ± 0.110	79.646
200	0.966 ± 0.158	65.725
250	0.922 ± 0.177	62.730
500	0.984 ± 0.350	66.950

OD optical density, *SD* standard deviation.

[0086]

[0087] 2. FACS 분석을 이용한 모링가 잎 추출물의 암세포의 세포 주기의 변화 및 세포 사멸 효과 확인

[0088] 상기 시험예 1에서 확인한 모링가 잎 냉수추출물의 100% 메탄올 추가분획에 대하여 FACS 실험을 실시하였다(도 2). 그 결과 모링가 잎 냉수추출물의 100% 메탄올 추가분획의 농도에 따라 (15, 30, 45 ug/ml. 이 때의 농도는 단백질 농도가 아닌 총 건조중량이다), sub-G1 population을 최대 1.0%, 80.9%, 95.8% 증가시킴으로써 우수한 항암활성을 나타내고 있음을 확인하였다.

[0089] <실험예 2> 추출물 내 물질의 분석

[0090] 상기 100% 메탄올 추가분획에 어떤 성분이 포함되어 있는지 확인하기 위하여, 상기 조건의 HPLC를 이용하여 성분을 분석하였다. 그 결과 도 4와 같이 3개의 큰 피크를 갖는 화합물을 분리해 낼 수 있었다.

[0091] 상기 화합물 구조 파악을 위해 ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR을 이용하여 스펙트럼을 관찰하였다(도 5~도 10).

[0092] [화학식 I]의 NMR 결과

[0093] ^{1}H-NMR (700 MHz, MeOH-d4) : δ 9.89 (1H, s, H-7), 7.88 (2H, d, J = 8.7, H-3, 5), 7.23 (2H, d, J = 8.7, H-2 and 6), 5.55 (1H, d, J = 1.8, H-1'), 5.15 (1H, d, J = 4.4, OH-2'), 4.93 (1H, d, J = 5.7, OH-3'), 4.83 (1H, d, J = 5.9, OH-4'), 3.85 (1H, m, H-2'), 3.65 (1H, ddd, J = 9.2 & 5.9 & 3.2 H-3'), 3.32 (1H, m, H-4'), 3.41 (1H, m, H-5'), 1.10 (1H, d, J = 6.2 H-6').

[0094] ^{13}C-NMR (175 MHz, MeOH-d4) : δ 192.0 (C-7), 161.3 (C-4), 132.2 (C-2 and 6), 130.8 (C-1), 124.8 (C-8),

117.0 (C-3 and 5), 98.6 (C-1'), 72.1 (C-4'), 70.8 (C-3'), 70.4 (C-2'), 70.4 (C-5'), 18.4 (C-6').

[0095] [화학식 II]의 NMR 결과

[0096] ^{1}H-NMR (700 MHz, MeOH-d4) : δ 7.28 (2H, d, J = 8.7, H-3, 5), 7.06 (2H, d, J = 8.7, H-2 and 6), 5.37 (1H, d, J = 1.6, H-1'), 5.01 (1H, d, J = 4.3, OH-2'), 4.88 (1H, d, J = 5.6, OH-4'), 4.76 (1H, d, J = 5.9, OH-3'), 3.82 (1H, m, H-2'), 3.69 (1H, s, H-7), 3.63 (1H, ddd, J = 9.2 & 5.9 & 3.2 H-3'), 3.44 (1H, m, H-5'), 3.28 (1H, m, H-4'), 1.10 (1H, d, J = 6.2 H-6').

[0097] ^{13}C-NMR (175 MHz, MeOH-d4) : δ 156.0 (C-1), 129.2 (C-3 and 5), 124.8 (C-8), 117.3 (C-2 and 6), 98.8 (C-1'), 72.2 (C-4'), 70.9 (C-3'), 70.6 (C-2'), 70.0 (C-5'), 22.0 (C-7), 18.4 (C-6').

[0098] [화학식 III]의 NMR 결과

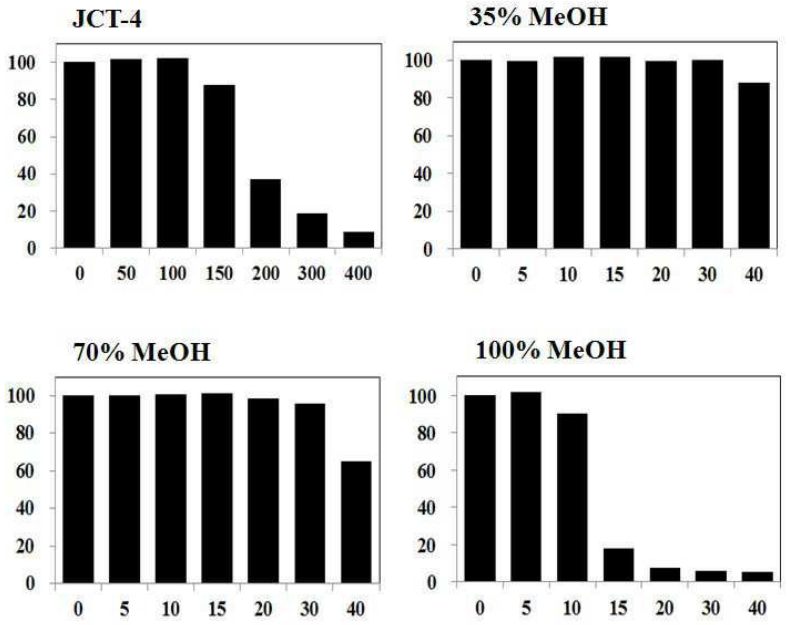
[0099] ^{1}H-NMR (700 MHz, MeOH-d4) : δ 8.08 (2H, d, J = 8.8, H-2' & 6'), 6.90 (21H, d, J = 8.8, H-3' & 5'), 6.43 (1H, d, J = 2.0, H-8), 6.23 (1H, d, J = 2.0, H-6), 5.29 (1H, d, J = 7.4, H-1').

[0100] ^{13}C-NMR (175 MHz, MeOH-d4) : δ 178.1 (C-4), 164.5 (C-7), 161.7 (C-5), 160.2 (C-4'), 157.6 (C-8a), 157.2 (C-5), 133.9 (C-3), 130.9 (C-2' & 6'), 121.3 (C-1'), 114.7 (C-3' & 5'), 104.2 (C-4a), 102.6 (C-1, glc), 98.6 (C-6), 93.4 (C-8), 77.1 (C-5, glc), 76.6 (C-3, glc), 74.3 (C-2, glc), 69.9 (C-4, glc), 61.2 (C-6, glc).

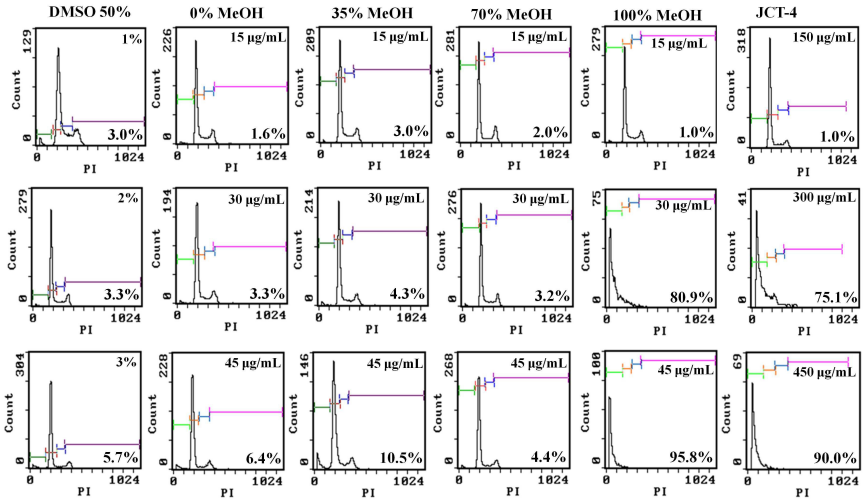
[0101] 상기 결과로부터, 본 발명의 모링가 잎 추출물과 방사선을 함께 투여하였을 때 항암효과가 높게 나타남을 확인하였으며, 적은 양의 방사선 조사를 통해서도 방사선 단일 조사 경우 대비 월등한 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 상기 모링가 잎 추출물에 포함된 대표적인 화합물을 동정하여 본 발명을 완성하였다.

도면

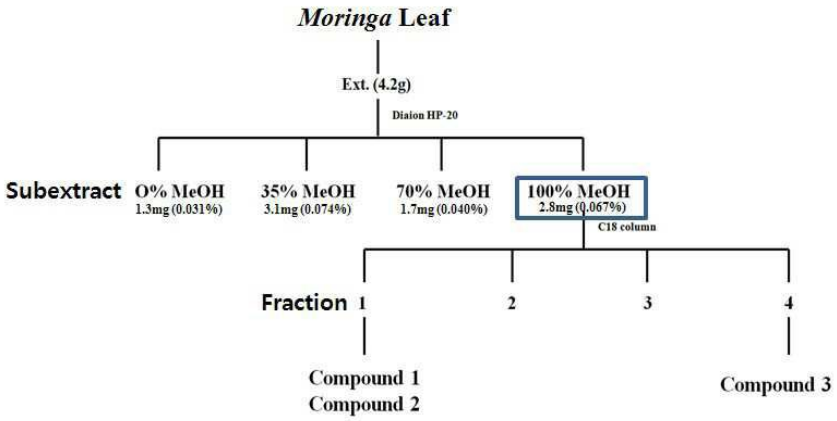
도면1



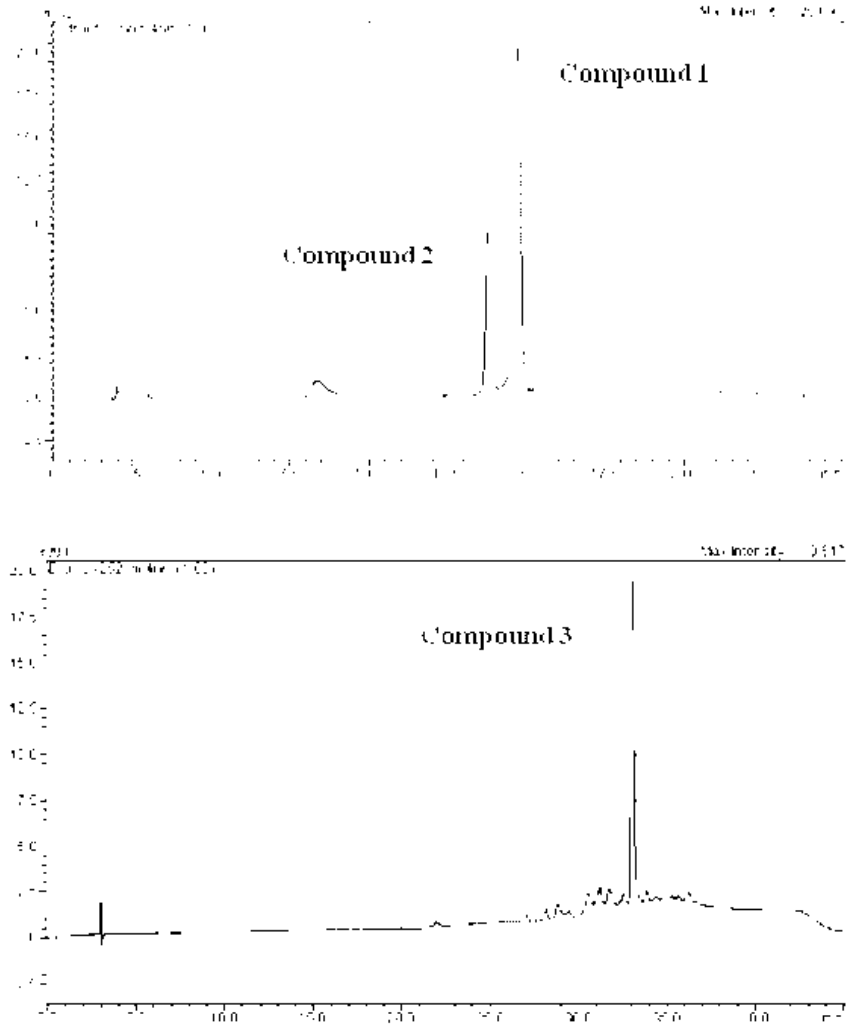
도면2


DMSO 50%
0% MeOH
35% MeOH
70% MeOH
100% MeOH
JCT-4
1%
3.0%
15 μg/mL
1.6%
3.0%
2.0%
1.0%
150 μg/mL
2%
3.3%
30 μg/mL
4.3%
3.2%
80.9%
300 μg/mL
75.1%
3%
5.7%
45 μg/mL
6.4%
10.5%
4.4%
95.8%
450 μg/mL
90.0%
Count
PI

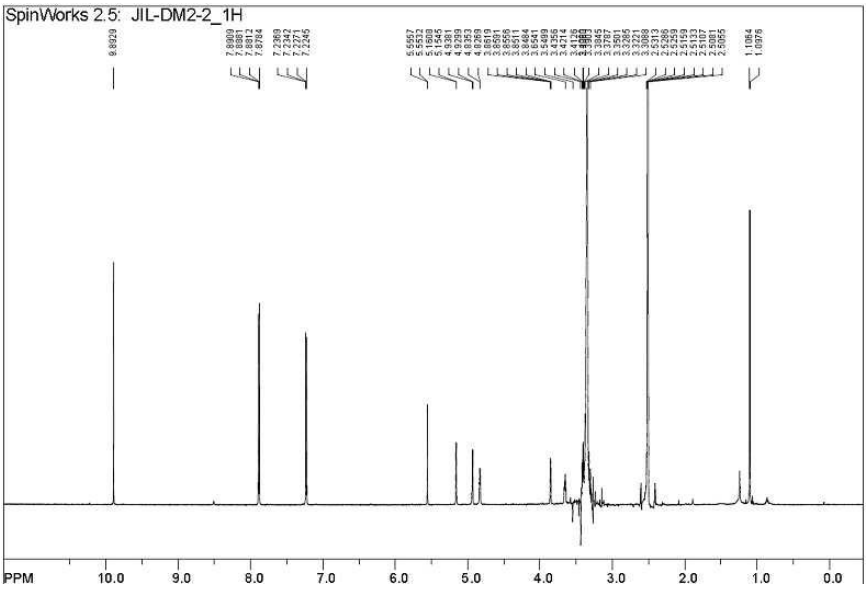
도면3


Moringa Leaf
Ext. (4.2g)
Diaion HP-20
Subextract
0% MeOH
1.3mg (0.031%)
35% MeOH
3.1mg (0.074%)
70% MeOH
1.7mg (0.040%)
100% MeOH
2.8mg (0.067%)
C18 column
Fraction 1
2
3
4
Compound 1
Compound 2
Compound 3

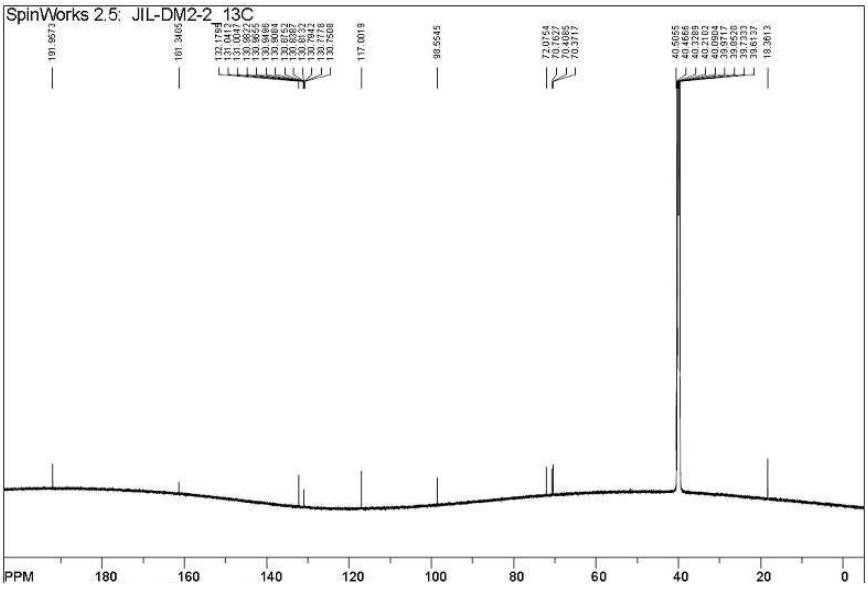
도면4


Compound 1
Compound 2
Compound 3

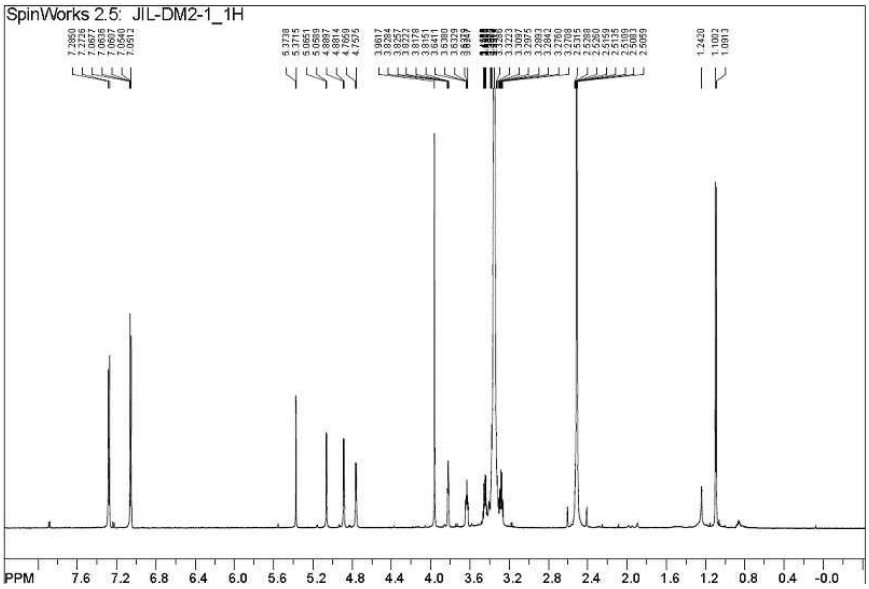
도면5


SpinWorks 2.5: JIL-DM2-2_1H
PPM
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0

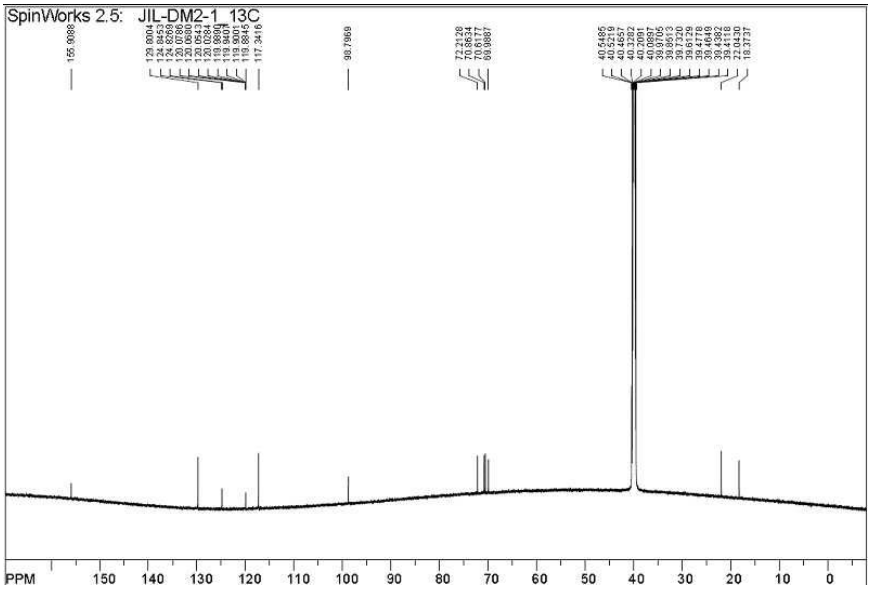
도면6


SpinWorks 2.5: JIL-DM2-2_13C
PPM
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0

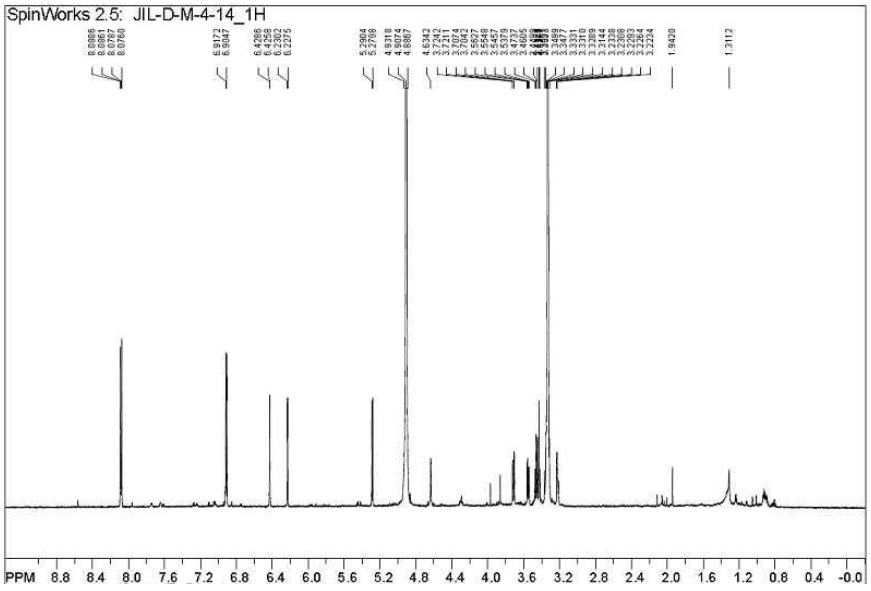
도면7


SpinWorks 2.5: JIL-DM2-1_1H
PPM
7.6
7.2
6.8
6.4
6.0
5.6
5.2
4.8
4.4
4.0
3.6
3.2
2.8
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
-0.0

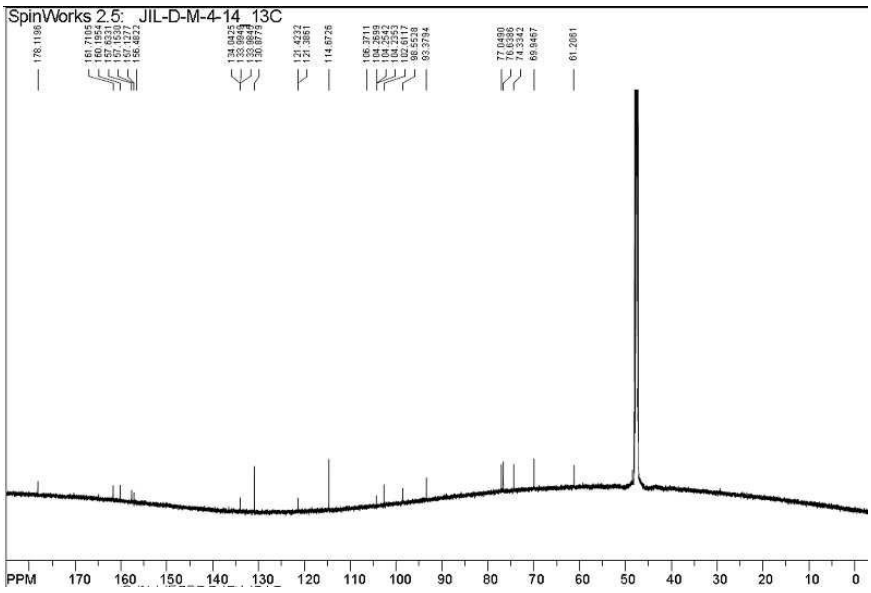
도면8


SpinWorks 2.5: JIL-DM2-1_13C
PPM
150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

도면9


SpinWorks 2.5: JIL-D-M-4-14_1H
PPM
8.8 8.4 8.0 7.6 7.2 6.8 6.4 6.0 5.6 5.2 4.8 4.4 4.0 3.6 3.2 2.8 2.4 2.0 1.6 1.2 0.8 0.4 -0.0

도면10


SpinWorks 2.5: JIL-D-M-4-14_13C
178.1198
161.7105
160.1954
157.6331
157.1530
157.1277
156.4822
134.0425
133.9949
133.9840
130.8779
121.4232
121.3861
114.6726
106.3711
104.2599
104.2542
104.2253
102.6117
96.5528
93.3794
77.0490
76.6386
74.3342
69.9467
61.2061
PPM
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0