



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0113953
(43) 공개일자 2018년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0119565(분할)
(22) 출원일자 2018년10월08일
심사청구일자 2018년10월08일
(62) 원출원 특허 10-2016-0080814
원출원일자 2016년06월28일
심사청구일자 2016년06월28일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
강창원
부산광역시 금정구 수림로66번길 49(장전동)
박민석
부산광역시 동구 중앙대로 514, 1621호(한성기린
아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

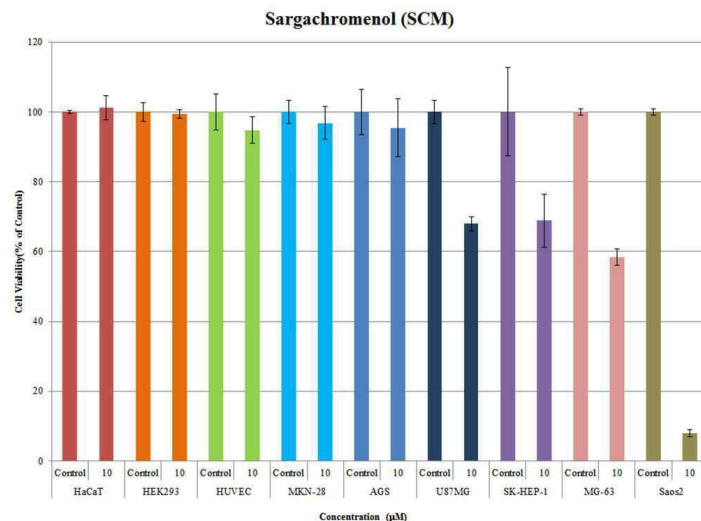
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 톱니모자반 추출물, 분획물 또는 사가크로메놀을 함유하는 특정 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 톱니모자반 추출물, 분획물 또는 사가크로메놀을 함유하는 특정 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 톱니모자반 에탄올 추출물, 헥산 분획물 또는 사가크로메놀은 정상세포에 대한 세포독성은 거의 없으면서, 특정 암세포(특히, 교모세포종 및 골육종암)에 대한 세포독성은 매우 높으므로, 특정 암의 치료제로 유용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/14 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

(72) 발명자

강민재

부산광역시 남구 못골변영로71번길 32, A동 402호
(글로리아트빌)

김난희

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 102동 1507호(
평거동, 들말대경아파트)

김군도

부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동,
엘지메트로시티)

김형락

부산광역시 남구 황령대로319번길 26, 104동 2102
호(대연동, 대연경동메르빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2015-0417

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 톱니모자반을 이용한 건강 기능성 식품소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.05 ~ 2015.12.29

명세서

청구범위

청구항 1

톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 에탄올 추출물로부터 얻은 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 분획물은 에틸아세테이트 분획물 또는 헥산 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 분획물은 헥산 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 암은 위암, 교모세포종, 자궁경부암, 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 암은 위암, 교모세포종, 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 암은 교모세포종인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 암은 위암, 교모세포종, 자궁경부암, 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 암은 위암, 교모세포종, 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 암은 교모세포종 또는 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암은 교모세포종인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 톱니모자반 추출물, 분획물 또는 사가크로메놀을 함유하는 특정 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 악성 뇌교종 중 하나인 교모세포종은 뇌를 구성하고 있는 세포 중 교세포가 악성을 보이는 종양으로 변질된 것을 통틀어 말한다. 현재 악성 뇌교종의 치료법으로는 절제술이 가장 많이 사용되고 있지만, 발병부위의 특이성과 뇌교종의 강력한 침윤성에 의해 주변 정상조직과 정확히 구분하여 절제하기란 불가능하여 절제술에 의한 치료 외에 방사선과 항암화학요법 치료 기술이 추가적으로 필요한 상황이다.

[0005] 골육종암은 뼈에서 발생하는 원발성 악성 종양으로 성장기의 10대에서 가장 많이 발생하는 질병이다. 현재 골육종암의 치료법으로는 수술과 항암약물 치료가 있으나 5년후 생존율이 20-30%로 낮아 새로운 치료약물과 기술이 필요한 상황이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 에탄올 추출물, 헥산 분획물 및 이로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)이 정상세포에는 세포독성이 거의 없으면서, 특정 암 세포에 세포독성이 높은 것을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 공개특허공보 10-2004-0092302호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 에탄올 추출물로부터 얻은 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 사가크로메놀(Sargachromenol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

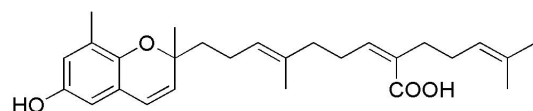
[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0017] 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 여기서, 상기 추출물은 에탄올 추출물일 수 있고, 상기 암은 위암, 교모세포종, 자궁경부암, 또는 간암이고, 바람직하게는 위암, 교모세포종, 또는 간암이고, 더욱 바람직하게는 교모세포종이다.

[0019] 또한, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 에탄올 추출물로부터 얻은 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 여기서, 상기 분획물은 에틸아세테이트 분획물 또는 헥산 분획물이고, 바람직하게는 헥산 분획물이다. 상기 암은 위암, 교모세포종, 자궁경부암, 또는 간암이고, 바람직하게는 위암, 교모세포종, 또는 간암이고, 더욱 바람직하게는 교모세포종이다.

[0021] 나아가, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 사가크로메놀(Sargachromenol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 여기서, 상기 암은 위암, 교모세포종, 간암, 또는 골육종암이고, 바람직하게는 교모세포종, 간암, 또는 골육종암이고, 더욱 바람직하게는 골육종암이다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 톱니모자반 에탄올 추출물, 헥산 분획물 또는 사가크로메놀은 정상세포에 대한 세포독성은 거의 없으면서, 특정 암세포(특히, 교모세포종 및 골육종암)에 대한 세포독성은 매우 높으므로, 특정 암의 치료제로 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 제조예 2에서 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)의 다양한 암세포 생존율을 평가한 그래프이다.

도 2는 제조예 2에서 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)의 골육종암 세포 생존율을 평가한 그래프이다.

도 3은 제조예 2에서 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)의 세포 주기 조절 관련 단백질의 발현량을 확인한 웨스턴 블롯 평가 이미지이다.

도 4는 제조예 1-2의 에틸아세테이트 분획물의 4가지 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 그래프이다.

도 5는 제조예 1-1의 에탄올 추출물의 4가지 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 그래프이다.

도 6은 제조예 1-2의 헥산 분획물의 4가지 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 그래프이다.

도 7은 제조예 1-1의 에탄올 추출물 및 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 농도별로 처리하였을 경우의 세포독성을 확인한 그래프이다.

도 8은 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG) 및 정상 신장세포(HEK293)에 농도별로 처리하였을 경우의 세포독성을 확인한 그래프이다.

도 9는 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 MAPK(Mitogen Activated Protein Kinase) 발현량을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 이미지이다.

도 10은 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 형광항체법(Immunofluorescence staining)을 이용하여 촬영한 이미지이다.

도 11은 제조예 1-2의 헥산 분획물을 처리할 경우 인간 뇌교모종세포(U87MG)의 세포골격 형성을 도립현미경으로 확인한 이미지이다.

도 12는 제조예 1-2의 헥산 분획물을 처리할 경우 인간 뇌교모종세포(U87MG)의 세포골격 형성에 필요한 인자의 발현량을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 이미지이다.

도 13은 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 Trans well invasion assay를 통해 침윤성을 확인한 이미지이다.

도 14는 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 MMP-2 및 MMP-9의 발현량을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 이미지이다.

도 15는 제조예 1-2의 헥산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 Wound healing assay를 통해 이동성을 확인한 이미지이다.

도 16은 톱니모자반 주정(에탄올) 추출물로부터 얻은 n-헥산 분획물을 메탄올에 녹여 HPLC를 이용하여 4개의 분획물을 얻은 크로마토그램이다.

도 17은 도 16의 2번 분획물을 재크로마토그래피하여 2차 분획물 3개를 얻은 크로마토그램이다.

도 18은 도 17의 2번 분획물을 다시 동일한 조건으로 재크로마토그래피하여 얻은 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

약학적으로 허용가능한 염

[0030]

본 발명에 일실시예에 따른 사가크로메놀(Sargachromenol)은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 사가크로메놀의 염기 화합물의 이로온 효능을 떨어뜨리지 않는 사가크로메놀의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0031]

이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산,

글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다.

[0032] 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 메실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0033] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 사가크로메놀을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0034] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0035] 나아가, 본 발명은 상기 사가크로메놀 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0037] 약학적 조성물

[0038] 본 발명의 화합물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0039] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07-7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7-2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것

일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<제조예 1> 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물 및 분획물의 제조

<1-1> 주정(에탄올) 추출물의 제조

본 발명에 사용한 톱니모자반은 부산시 기장군에 자생하는 천연산을 스쿠버를 동원하여 채취하였고, 기장산의 종확인은 부경대학교 생태공학과 최창근 교수가 수행하였다. 톱니모자반을 양지에서 자연건조 후, 마쇄하여 얻은 분말 2kg을 주정(95% 에탄올) 8L에 넣고 70℃에서 3시간 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후, 한외여과기(니또텐코, 일본)로 이물질을 제거하였다. 여과 추출물은 진공회전농축기로 40℃에서 주정을 제거한 후, 추출된 잔사로서 조추출물 200±25g을 수득하였다. 이렇게 수득한 톱니모자반 주정추출물은 4℃온도에서 냉장보관하면서 하기 실험의 시료로 사용하였다.

<1-2> 톱니모자반의 주정추출물로부터 n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 가용분획물의 제조

상기 제조예 1-1에서 제조한 톱니모자반 주정(에탄올) 추출물 50g을 물:에탄올 (9:1, v/v)의 혼합용매 1L로 녹인 후, 분액깔때기에 부어, 동량의 n-헥산 1 L을 넣어 분액깔때기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 n-헥산 가용부를 모아 무수황산나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하였다. 이와 같은 방법으로 5회 더 반복하여 42g의 n-헥산 분획물을 얻었다.

n-헥산으로 분획 후 남은 획분(H₂O층)에 동량의 에틸아세테이트를 넣어 분액깔때기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 에틸아세테이트 가용부를 모아 농축하여 에틸아세테이트 획분을 얻었다.

에틸아세테이트 분획 후 남은 획분(H₂O층)에 동량의 부탄올을 넣어 분액깔때기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 부탄올 가용부를 모아 농축하여 부탄올 획분을 얻었으며, 남은 수용성 획분을 물획분으로 사용하였다.

상기와 같이 분리 수득한 에틸아세테이트 획분(1L), 부탄올 획분(1L) 및 물획분(0.9L)은 각 40℃에서 진공회전농축기로 감압농축하여 용매를 제거한 후 남은 잔사 각각 1.2g, 2.1g, 4.6g씩을 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물로서 최종 수득하였다. 이렇게 수득한 각각의 분획물은 4℃에서 냉장보관하면서 하기 실험의 시료로 사용하였다.

<제조예 2> 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)으로부터 사가크로메놀(Sargachromenol, SCM)의 분리

상기 제조예 1-2를 통해 얻은 n-헥산 분획물 12.2g을 120 mL 메탄올에 녹여 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과 후 200 μL를 주입하여 Phenomenex C18(2) (15 μm, 21.2 mm × 250 mm) 칼럼이 장착된 HPLC로 4개의 획분으로 분리하였다(도 16 참조).

도 16의 2번 분획물을 실시예 HPLC 장치와 칼럼을 사용하여 채크로마토그래피하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 메탄올(A)/물(B)(91.5/8.5)~A/B(92.2/7.8) 농도로 26분간, A/B(92.2/7.8)~A/B(100/0) 농도로 2분간, A/B(100/0)로 6분간 씻어준 후에 A/B(91.5/8.5) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 피크는 270 nm에서 탐지하였으며, 유속은 7 mL/분으로 고정하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50-100회 실시하여 대량의 2번 분획물의 2차 획분을 얻었다(도 17 참조).

도 17에 나타난 바와 같이 2번 분획물은 3개의 피크를 나타내었으며, 이중 2번 피크 (Frc2-2)를 다시 동일한 조건으로 채크로마토그래피하여 정제하였으며(126 mg), 분석용칼럼 (Phenomenex C18(2), 3 μm, 3 mm × 150 mm)으로 분석한 결과 단일물질로 판명되었다(도 18 참조). 최종 분리물을 NMR로 분석한 결과 사가크로메놀(sargachromenol, 이하 SCM)로 판명되었다.

<실험예 1> 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol, SCM)의 암세포 생존율 평가

제조예 2에서 준비한 사가크로메놀이 인간 암세포에 독성을 나타내는지 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다.

- [0062] 구체적으로, 정상 피부 세포(HaCaT), 정상 신장 세포(HEK293), 정상 혈관내피 세포(HUVEC), 인간 위암 세포(MKN-28, AGS), 인간 교모세포종(U87MG), 인간 간암 세포(SK-Hep 1), 인간 골육종암 세포(MG-63, Saos-2) 각각을 96 well plate에 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cell/well이 되게끔 분주한 후 제조예 4에서 준비한 사가크로메놀을 10 μ M의 농도로 각각 처리하고 24시간 후 WST-1 solution을 포함한 배지로 교체(배지 100 μ L, WST-1 solution: 10 μ L) 후 4시간 뒤에 microplate reader를 사용하여 460nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 3회 반복 측정하여 평균값을 이용하여 결과를 만들었고 이를 도 1에 나타내었다.
- [0064] 도 1은 제조예 2에서 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)의 다양한 암세포 생존율을 평가한 그래프이다.
- [0066] 도 1에 나타난 바와 같이, 톱니모자반에서 분리된 사가크로메놀은 정상 세포(HaCaT, HEK293, HUVEC)에서는 독성을 거의 나타내지 않았으나, 암세포에서는 독성을 나타내는 것으로 나타났다. 특히, 인간 골육종암 세포(MG-63 및 Saos-2)에서 높은 세포독성을 나타내었고, 그 중에서도 Saos-2 세포에 가장 높은 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 한편, 위암 세포(MKN-28, AGS)에서는 세포독성이 낮게 나타나, 특정 암에서만 항암 효능이 나타남을 알 수 있었다.
- [0068] 한편, 도 1의 결과에서 우수한 항암 활성이 나타나는 인간 골육종암 세포(Saos-2)에서 사가크로메놀의 항암 활성을 더욱 자세히 알아보기 위하여, 상기 실험방법과 동일하게 실시하되 투여 농도를 달리하여 세포독성을 측정하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0070] 도 2는 제조예 2에서 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)의 골육종암 세포 생존율을 평가한 그래프이다.
- [0072] 도 2에 나타난 바와 같이, 사가크로메놀은 골육종암 세포에 대한 50% 세포독성 농도는 약 6 μ M로 나타나, 골육종암 세포에 대해 높은 항암활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0074] <실험예 2> 사가크로메놀(Sargachromenol, SCM)의 인간 골육종암 세포에 대한 항암 효능 평가
- [0075] 상기 실험예 1에서 사가크로메놀이 인간 골육종암 세포 Saos-2에서 가장 높은 세포 독성을 나타냄을 확인하였다. 이에, 본 실험예 2에서는 사가크로메놀의 세포 독성이 Saos-2 세포내 어떠한 기작의 변화를 통해 일어나는지 알아보기 위하여 Western blot analysis를 통하여 세포 주기 조절 관련 단백질의 발현량을 확인하였다.
- [0077] 도 3은 제조예 2에서 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀(Sargachromenol)의 세포 주기 조절 관련 단백질의 발현량을 확인한 웨스턴 블롯 평가 이미지이다.
- [0079] 도 3에 나타난 바와 같이, Western blot analysis를 통하여 사가크로메놀은 Saos-2 세포의 세포 주기 조절 관련 단백질인 CDK 2, 4, 6, Cyclin B 1, P70S6Kinase의 발현량을 감소시킴을 확인하였다. 또한, Cell cycle arrest 단백질인 P21, P27, p-Cdc 2(Tyr 15)의 발현량이 증가됨을 확인하였다. 이를 통해 톱니모자반에서 분리된 Sargachromenol은 인간 골육종암 세포 Saos-2에서 세포 주기 조절 단백질들의 발현을 조절하여 세포주기를 억제하는 효능을 가지고 있음을 알 수 있었다.
- [0081] <실험예 3> 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물 및 분획물의 암 세포독성 평가

- [0082] 상기 실험에 1과 2에서는 톱니모자반으로부터 분리한 사가크로메놀의 암세포에 대한 세포 독성을 확인하였다. 이에, 본 실험에 3에서는 톱니모자반 에탄올 추출물(제조예 1-1), 에틸아세테이트 분획물(제조예 1-2) 및 핵산 분획물(제조예 1-2, HES)이 다양한 암세포들에도 독성을 나타내는지 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다.
- [0083] 구체적으로, 인간 위암 세포(MKN-28), 인간 자궁경부암 세포(HeLa), 인간 교모세포종(U87MG), 인간 간암 세포(SK-Hep 1)에 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 WST-1 solution을 이용하여 세포들의 생존율을 확인하였다. 각 세포들을 96 well plate에 1×10^4 cell/well이 되게끔 분주한 후 제조예 1-3에서 준비한 추출물 및 분획물을 표기된 농도별로 24시간 처리하였다. 이후 WST-1 solution을 포함한 배지로 교체(배지 100 μl , WST-1 solution : 10 μl)후 4시간 뒤에 microplate reader를 사용하여 460nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 3회 반복 측정하여 평균값을 이용하여 결과를 얻었다.
- [0085] 도 4는 제조예 1-2의 에틸아세테이트 분획물의 4가지 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 그래프이다.
- [0086] 도 5는 제조예 1-1의 에탄올 추출물의 4가지 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 그래프이다.
- [0087] 도 6은 제조예 1-2의 핵산 분획물의 4가지 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 그래프이다.
- [0088] 도 7은 제조예 1-1의 에탄올 추출물 및 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 농도별로 처리하였을 경우의 세포독성을 확인한 그래프이다.
- [0089] 도 8은 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG) 및 정상 신장세포(HEK293)에 농도별로 처리하였을 경우의 세포독성을 확인한 그래프이다.
- [0091] 도 4-8에 나타난 바와 같이, 제조예 3의 핵산 분획물이 제조예 1의 에탄올 추출물 및 제조예 2의 에틸아세테이트 분획물에 비해 상대적으로 높은 암 세포독성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 제조예 3의 핵산 분획물은 4종류의 인간 암세포 중에서 특히 인간 교모세포종(U87MG)에서 가장 높은 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 도 8에서 정상 신장세포(HEK293)에는 독성을 거의 나타내지 않고, 인간 뇌교모종세포(U87MG)에만 독성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 톱니모자반 핵산 분획물이 인간 뇌교모종세포(U87MG)의 치료제로서 유용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0093] <실험예 4> 톱니모자반 핵산 분획물의 암세포 증식억제(anti-proliferation) 효능 평가
- [0094] 실험예 4는 실험예 3에서 확인한 톱니모자반 핵산 분획물이 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 나타내는 세포독성 효과가 세포 내 어떠한 기작의 변화를 통해 일어나는지 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다.
- [0095] 구체적으로, U87MG의 경우 세포 외막에 존재하는 Receptor Tyrosine Kinase중 하나인 Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)가 돌연변이에 의해 과발현 되어있는 상태이다. 이러한 과발현은 세포내 Mitogen Activated Protein Kinase(MAPK) 중 하나인 Ras/Raf/Mek/Erk(Erk MAPK)를 활성화시켜 암세포가 가지는 무분별한 증식과 전이 등의 특징을 나타낸다고 알려져 있다. 톱니모자반 핵산 분획물이 Erk MAPK 기작에 미치는 영향을 알아보기 위해 웨스턴 블롯 평가(Western blot analysis, 도 9) 및 형광향체법(Immunofluorescence staining, 도 10)을 실시하였다.
- [0097] 도 9는 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 MAPK(Mitogen Activated Protein Kinase) 발현량을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 이미지이다.
- [0098] 도 10은 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 형광향체법(Immunofluorescence staining)을 이용하여 촬영한 이미지이다.
- [0100] 도 9-10에 나타난 바와 같이, Erk MAPK의 상위 인자인 Ras의 발현량 감소와 c-Raf/Mek/Erk 각각의 인산화 잔기의 인산화반응(phosphorylation)이 감소됨을 알 수 있었다. 이를 통해 Erk MAPK 기작의 활성이 감소됨을 확인하였다. 또한, Erk MAPK의 주요 단백질인 Erk의 활성이 감소됨을 형광향체법(Immunofluorescence staining) 통해

서 확인할 수 있었다.

[0102] <실험예 5> 톱니모자반 핵산 분획물의 세포골격 형성 억제 효과

[0103] 암세포는 무분별한 증식과 전이를 위해 자신의 형태를 이루는 세포 골격(Cell cytoskeleton)을 안정적으로 유지하며 계속해서 형성하려 한다. 따라서 암세포의 세포 골격을 파괴 하거나 새로이 형성되는 과정을 억제 할 수 있다면 암세포의 사멸을 유도 할 수 있는 새로운 전략이 된다. 톱니모자반 추출물이 인간 교모세포종(U87MG)의 세포 골격체 형성에 미치는지 영향을 알아보기 위해 웨스턴 블롯 평가(Western blot analysis)와 도립현미경(Inverted microscope)을 이용한 세포 외형 측정을 실시하였다.

[0105] 도 11은 제조예 1-2의 핵산 분획물을 처리할 경우 인간 뇌교모종세포(U87MG)의 세포골격 형성을 도립현미경으로 확인한 이미지이다.

[0106] 도 12는 제조예 1-2의 핵산 분획물을 처리할 경우 인간 뇌교모종세포(U87MG)의 세포골격 형성에 필요한 인자의 발현량을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 이미지이다.

[0108] 도 11-12에 나타난 바와 같이, 톱니모자반 핵산 분획물의 처리 농도가 증가 할수록 세포의 외형이 대조군에 비해 원형으로 변하는 것을 확인하였다. 또한 웨스턴 블롯 평가에서는 세포 골격 형성에 필요한 Integrin β 1, PI3K p110 α , Rac1/2/3, WAVE-2, Arp-2의 발현이 억제됨이 확인되었다. 톱니모자반 추출물 처리에 따른 인간 교모세포종 U87MG 암세포의 외형 변화와 세포 골격 형성 신호기작에 관여하는 주요 단백질들의 발현 감소는 세포 골격 형성이 억제됨을 의미하며, 이를 통해 세포 주기의 억제 효능도 추가적으로 연계되어 있음을 알 수 있다.

[0110] <실험예 6> 톱니모자반 핵산 분획물의 뇌교모종 암세포 전이성 억제 효과

[0111] 인간 뇌교모종세포(U87MG)는 매우 강한 전이성을 가진 암으로 알려져 있으며, 이로 인해 외과적 수술을 통한 완전한 제거가 어렵고 생존 기간을 단축시키는 것으로 알려져 있다. 암세포가 다른 장기로의 전이성이 나타나기 위해서는 침윤성과 이동성이라는 두 개의 특징을 가지고 있어야 한다. 침윤성은 혈류라는 순환체계로 암세포가 진입하기 위해서 혈관 세포벽이나 다른 조직의 외막에 존재하는 젤라틴(gelatin) 성분을 녹이는 MMP-2(Matrix metallopeptinase-2), MMP-9(Matrix metallopeptinase-9) 효소의 발현과 활성이 필요하다. 그리고 이동성은 암세포가 종양 발생 지점에서 암세포가 떨어져 나와 침윤하기에 용이하도록 혈관벽이 있는 지점까지 이동하는 능력이다. 이러한 이동성은 상처가 생기면 주변에 있는 세포들이 그 상처를 채우기 위해 이동하는 이동성과 같은 성질이다. 톱니모자반 추출물은 전이성이 강한 U87MG의 침윤성과 관련된 MMP-2, MMP-9의 발현을 감소시킨다는 것을 웨스턴 블롯 평가를 통해 알 수 있다(도 14 참조). 또한, 이들 효소들의 발현 감소를 통해 실제로 U87MG의 침윤성이 감소됨을 Trans well invasion assay를 통해 재확인할 수 있다(도 13 참조). 나아가, Wound healing assay를 통해 톱니모자반 추출물이 U87MG의 이동성까지 억제함을 확인할 수 있다(도 15 참조).

[0113] 도 13은 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 Trans well invasion assay를 통해 침윤성을 확인한 이미지이다.

[0114] 도 14는 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 MMP-2 및 MMP-9의 발현량을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 이미지이다.

[0115] 도 15는 제조예 1-2의 핵산 분획물을 인간 뇌교모종세포(U87MG)에 처리한 후 Wound healing assay를 통해 이동성을 확인한 이미지이다.

[0117] 도 13-15에 나타난 바와 같이, 톱니모자반 핵산 분획물은 인간 뇌교모종세포(U87MG)의 침윤성 및 이동성을 모두 억제하는 것으로 나타나, 전이성을 억제하는 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[0119] **약제의 제조예**

[0120] 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0122] **<약제 제조예 1> 산제의 제조**

[0123] 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀 2 g

[0124] 유당 1 g

[0125] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0127] **<약제 제조예 2> 정제의 제조**

[0128] 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀 100 mg

[0129] 옥수수전분 100 mg

[0130] 유당 100 mg

[0131] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0132] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0134] **<약제 제조예 3> 캡슐제의 제조**

[0135] 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀 100 mg

[0136] 옥수수전분 100 mg

[0137] 유당 100 mg

[0138] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0139] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0141] **<약제 제조예 4> 주사제의 제조**

[0142] 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

[0143] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0144] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

[0145] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 °C에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0147] **<약제 제조예 5> 액제의 제조**

[0148] 톱니모자반 추출물 또는 사가크로메놀 100 mg

[0149] 이성화당 10 g

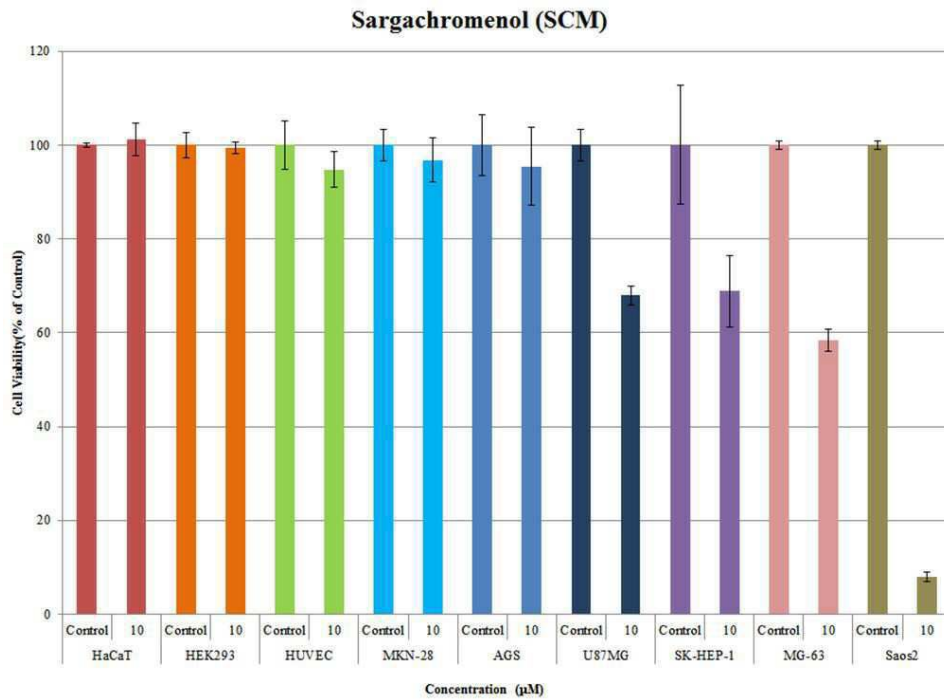
[0150] 만니톨 5 g

[0151] 정제수 적량

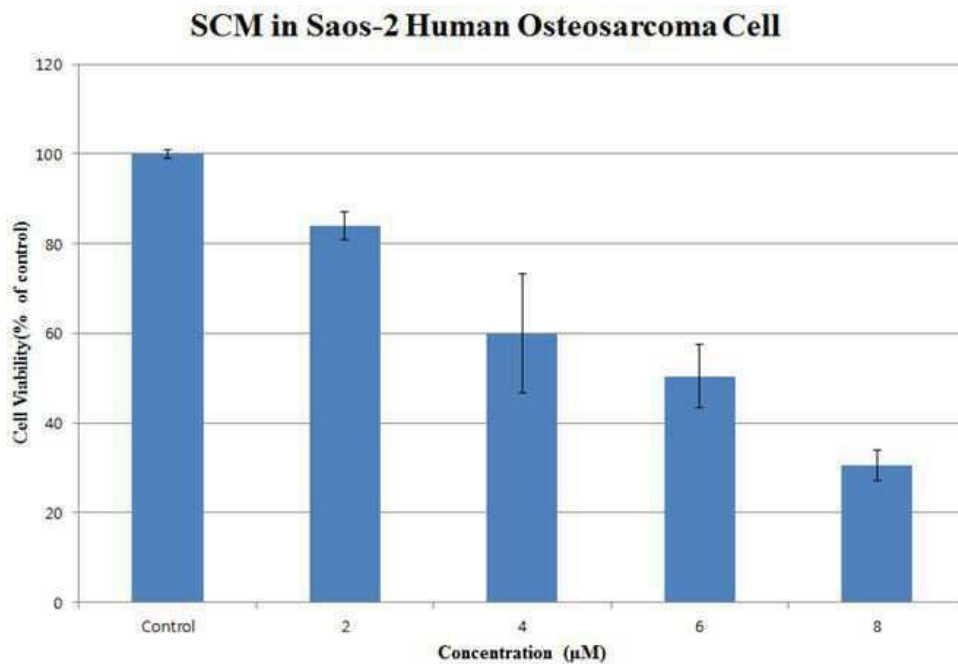
[0152] 통상의 액제의 제조방법에 따라, 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100 mL로 조절한 후 갈색 병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

도면

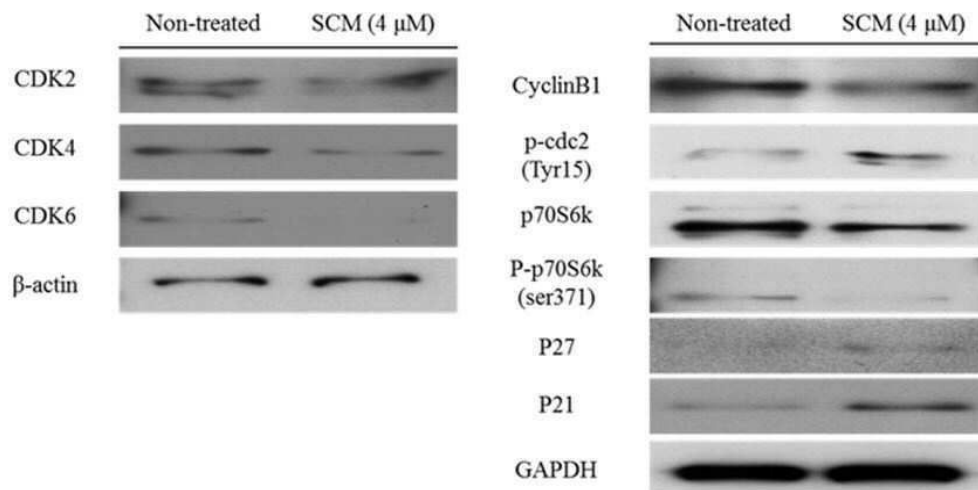
도면1



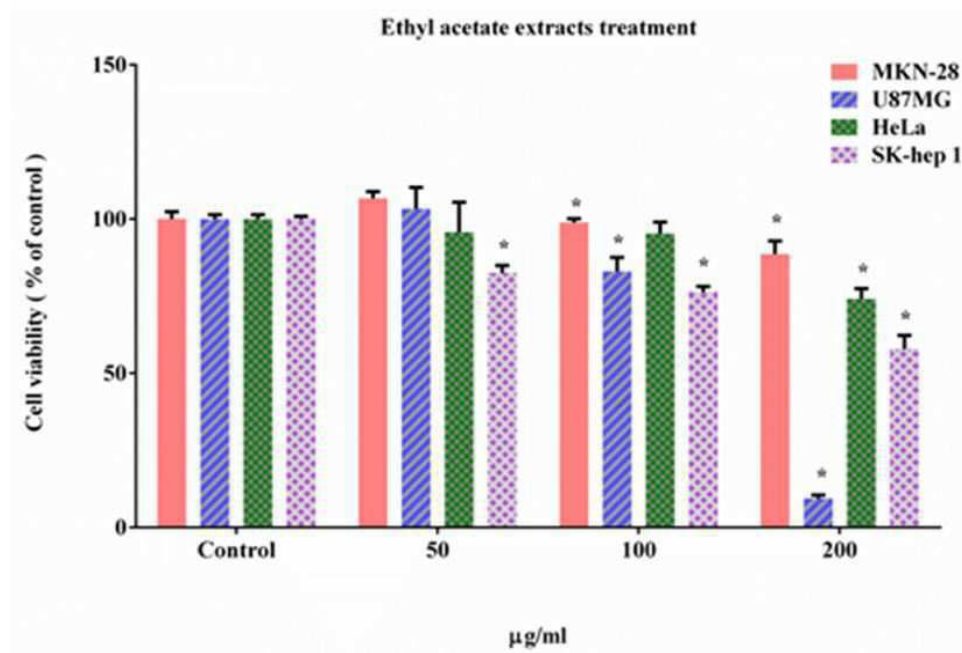
도면2



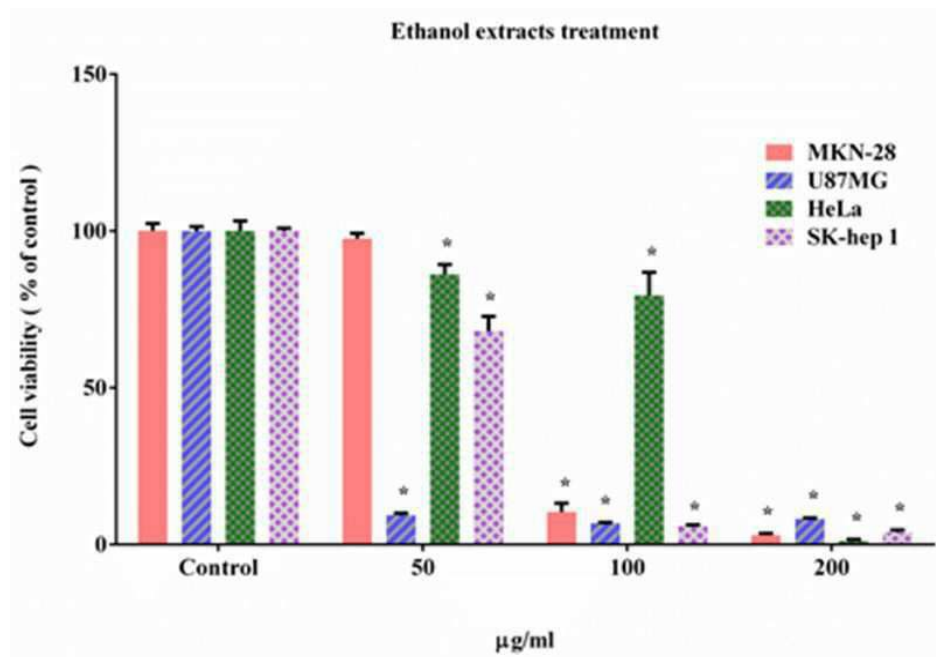
도면3



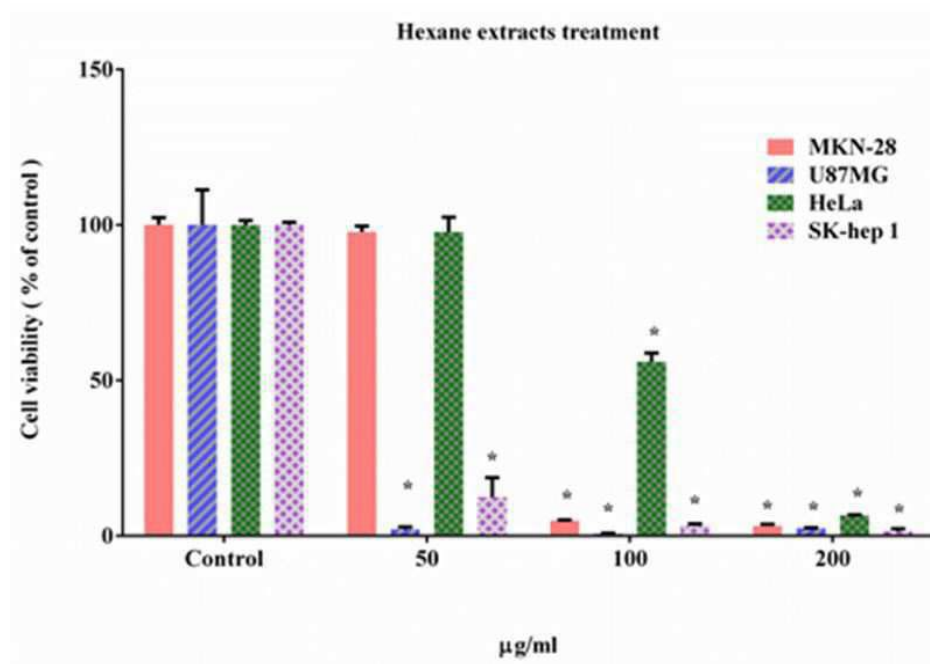
도면4



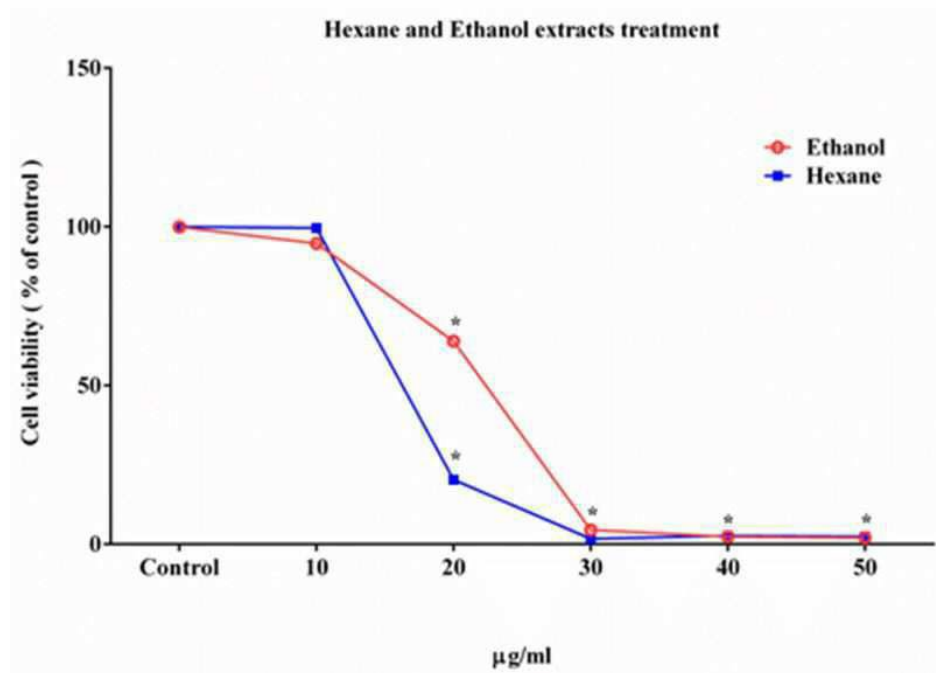
도면5



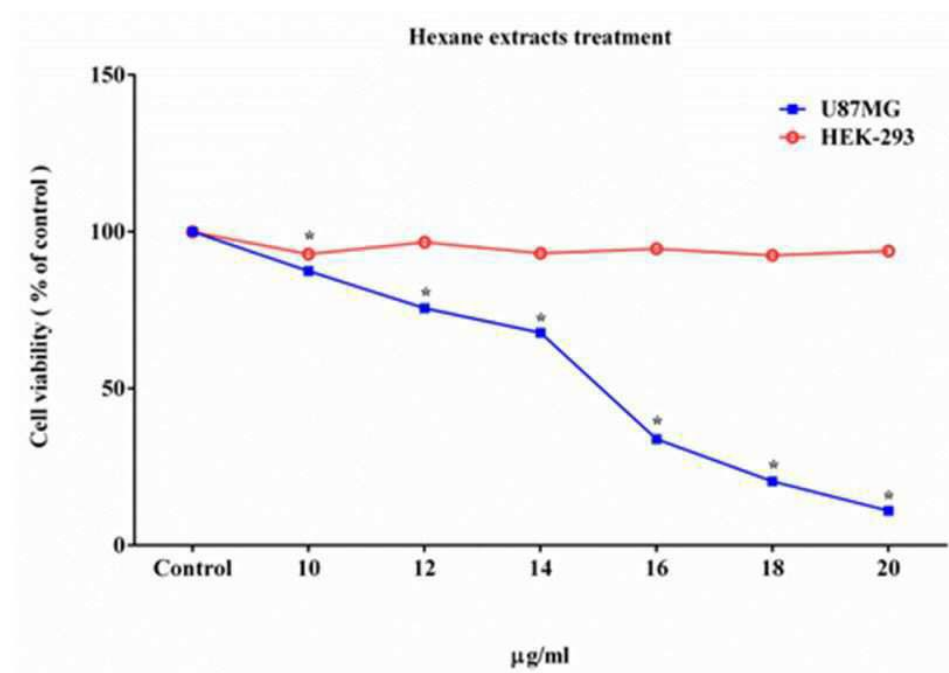
도면6



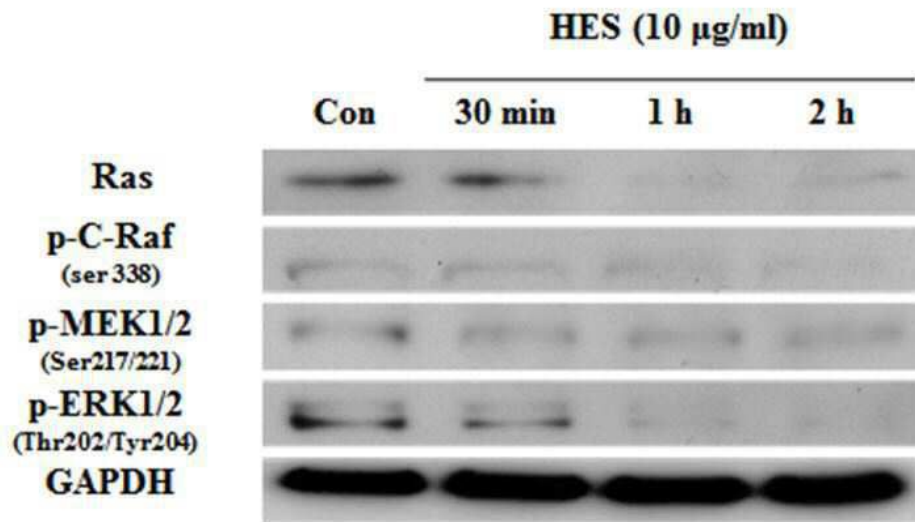
도면7



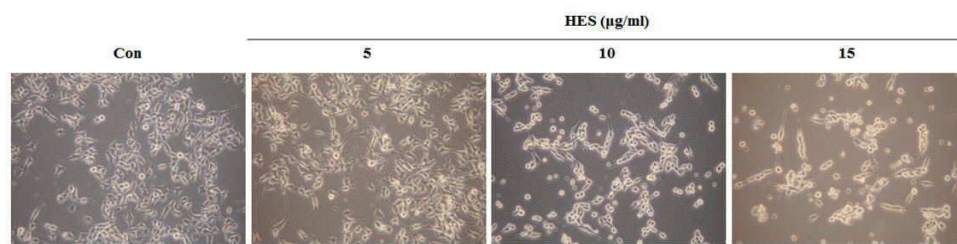
도면8



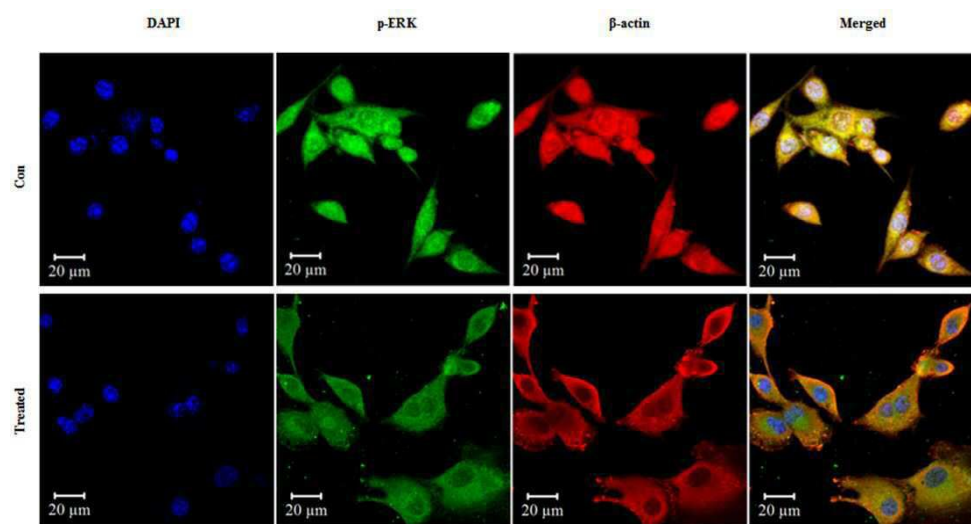
도면9



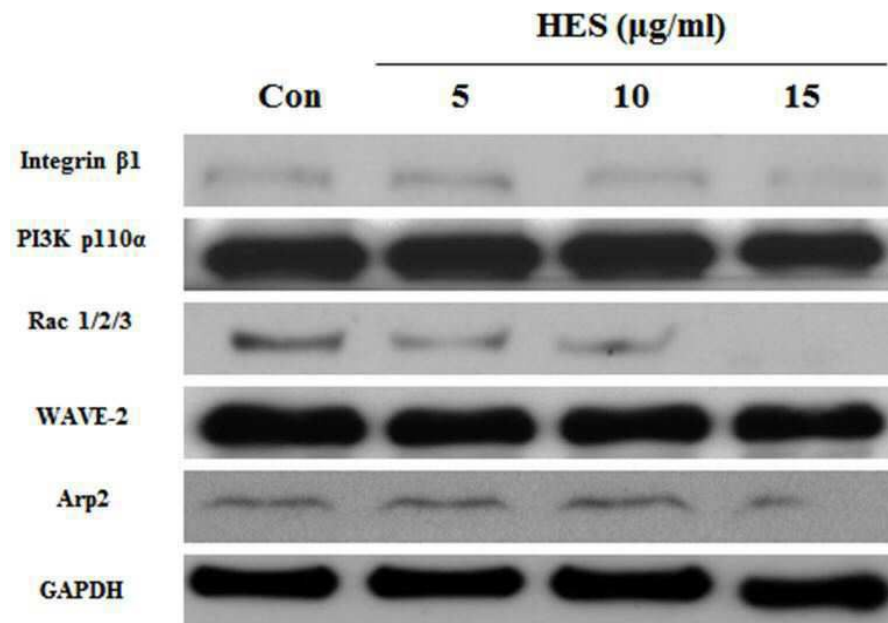
도면10



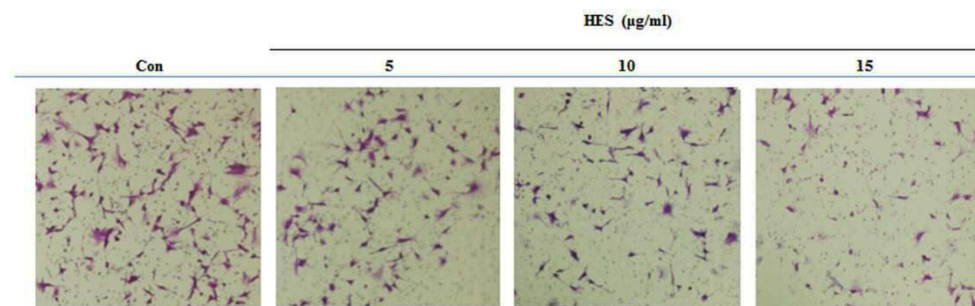
도면11



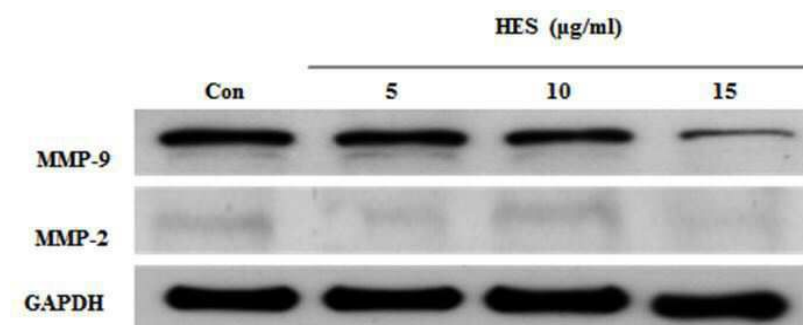
도면12



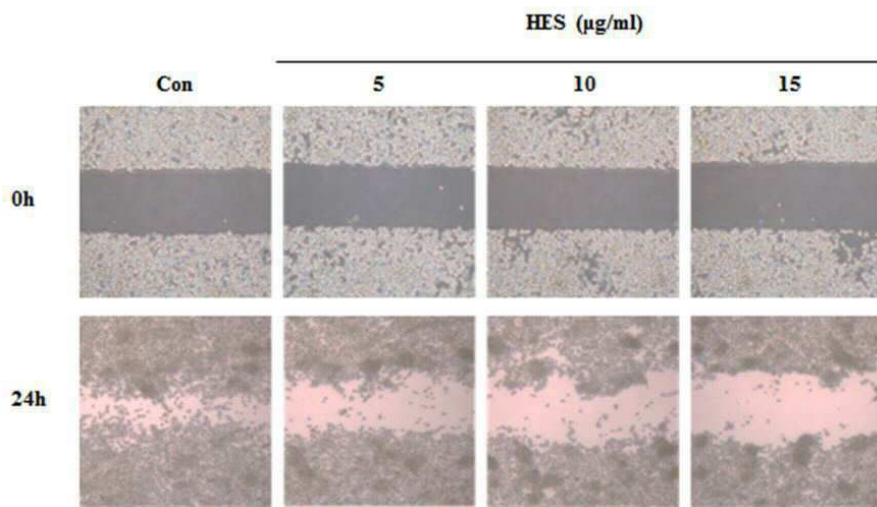
도면13



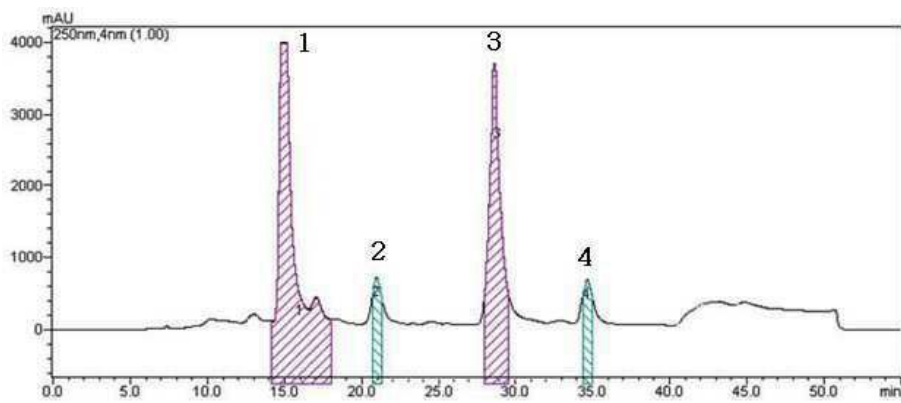
도면14



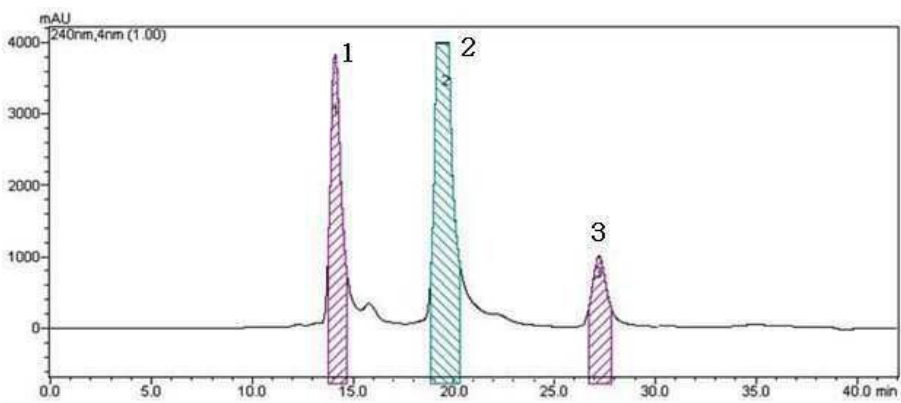
도면15



도면16



도면17



도면18

