



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월30일
(11) 등록번호 10-1322661
(24) 등록일자 2013년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0026035

(22) 출원일자 2013년03월12일

심사청구일자 2013년03월12일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120021358 A

KR1020090047718 A

KR101103426 B1

Food Chem. Toxicol. 51: 33-37(2012.09.18.)

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정혜광

대전광역시 유성구 반석동 반석마을6단지아파트
609동 1102호

김형균

대전광역시 유성구 봉명동 미성샤르망 102동 508
호

나민균

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 406동
1605호

(74) 대리인

백경업

전체 청구항 수 : 총 5 항

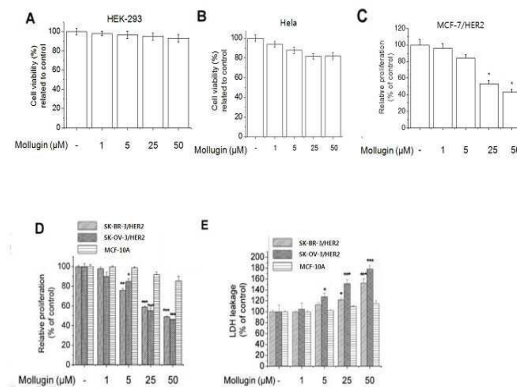
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 몰루긴을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 몰루긴(mollugin)을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 HER2가 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에서 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)/Akt/SREBPs(sterol regulatory element binding proteins)를 통해 FAS(fatty acid synthase)의 발현을 저해하고 유방암 세포와 난소암 세포의 세포 증식 억제 및 아포토시스를 유도함으로써, 상기 암세포들을 사멸하는 효과가 우수하여, 유방암 또는 난소암의 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2

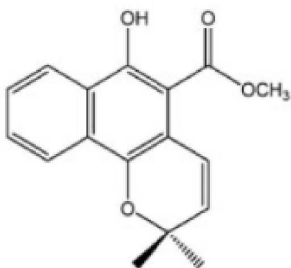


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 몰루긴(mollugin)을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유방암 또는 난소암은 HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 유전자가 과발현된 유방암 또는 난소암인 것을 특징으로 하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

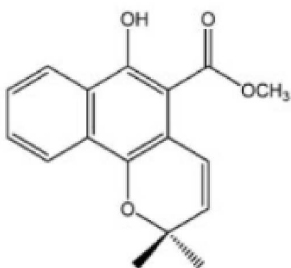
제1항에 있어서,

상기 조성물은 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)/Akt/SREBPs(sterol regulatory element binding proteins)를 억제하는 것을 특징으로 하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1의 몰루긴(mollugin) 및 억제학적 부형제를 포함하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제4항에 있어서,

상기 약학 조성물에 몰루긴이 0.001~99.9 중량%가 포함되는 것을 특징으로 하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 몰루긴을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유방암과 난소암은 사망률이 높은 여성 질환 중의 하나이다(Jemal et al., 2010). 암은 일반적으로 특정 종양 형성 유전자(oncogenes)의 과발현과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 이 중에서도 지방산 생성 효소인 FAS(Fatty acid synthase)가 암에서 과발현되는 유전자로서 많이 연구되어 왔다(Kuhajda, 2006). 특히 FAS는 유방암 세포들의 공격적인 침투 성향, 생성, 발달, 유지, 세포주기 변환 등에서 밀접한 관련이 있다(Milgraum et al., 1997). FAS의 저해제가 유방암 세포들의 성장을 저해하고 아포토시스(apoptosis)를 일으키며, 종양 형성과 관련된 여러 가지 효소들과 FAS가 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Knowles et al., 2004; Pizer et al., 1996; Alli et al., 2005).

[0003] 한편, SREBPs(sterol regulatory element-binding proteins)인 SREBP-1a, SREBP-1c, 및 SREBP-2는 FAS 발현을 조절하는 주요 전사인자(transcription factors)(Horton et al., 2002)로서, 특히, 유방암 세포에서의 FAS의 작용 기작은 SREBPs의 활성화와 밀접한 관련이 있다(Menendez et al., 2005a). 또한, 유방암 세포에서 SREBP-1은 PI3K/Akt(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 신호전달로 인해 활성화된다(Yang et al., 2003; Yang et al., 2002).

[0004] HER2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2/neu, ErbB2, or HER2)는 185-kDa의 상피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor family)의 막관통 티로신 인산화효소 수용체(transmembrane tyrosine kinase receptor)로서, 약 30%의 유방암 환자들에서 과발현되는 유전자로 알려져 있는데(Slamon et al., 1989), 유방암 세포에서 HER2는 PI3K/Akt 신호전달을 통해 FAS의 발현을 조절하고(Kumar-Sinha et al., 2003), HER2가 과발현된 암세포는 세포 증식, 종양 생성, 혈관신생, 암세포의 전이 등이 나타난다고 알려져 있다(Hynes and Lane, 2005; Klos et al., 2006). 또한, *neu-N*-유전자변형쥐(*neu-N*-transgenic mice)에서 FAS의 저해는 HER2 과발현된 암세포에서 아포토시스(apoptosis)를 일으키고(Menendez et al., 2004c) 종양 생성을 지연시킨다는 것이 알려져 있다(Alli et al., 2005). 따라서, FAS가 HER2 과발현된 유방암을 치료 또는 예방할 수 있는 타겟 유전자로 부상되고 있다.

[0005] 꼭두서니(*Rubia cordifolia* L.)는 다년생 덩굴식물로서, 아프리카, 아시아, 아메리카 등지에서 널리 분포되어 있다(Singh and Chauhan, 2004). 한국에서는 관절염, 생리통 또는 생리불순, 류머티즘, 비뇨기 질환 등의 전통적인 치료 약재로서 사용되어 왔다. 약리학적으로는 항균, 항산화, 산화질소의 생성 저해 효과 등이 있다고 알려져 있으며(Basu et al., 2005; Tezuka et al., 2001; Cai et al., 2004), 다양한 기능성 성분을 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다. 꼭두서니의 뿌리로부터 분리된 나프토히드로퀴닌(naphthohydroquinone) 화합물인 몰루긴(mollugin)은 항염, 신경보호 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 한편, 본 발명자들은 HER2가 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에서 몰루긴 화합물이 HER2/Akt/SREBPs를 억제함으로써 FAS의 발현을 저해하고 유방암 세포와 난소암 세포의 세포 증식 억제 및 아포토시스를 유도하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP. 2005. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 24(1):39-46.

(비특허문헌 0002) Basu S, Ghosh A, Hazra B. 2005. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytother Res* 19(10):888-894.

(비특허문헌 0003) Cai Y, Sun M, Xing J, Corke H. 2004. Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships. *J Agric Food Chem* 52(26):7884-7890.

(비특허문헌 0004) Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program

of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest 109(9):1125-1131.

(비특허문헌 0005) Hynes NE, Lane HA. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. Nat Rev Cancer 5(5):341-354.

(비특허문헌 0006) Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 60(5):277-300.

(비특허문헌 0007) Ju JH, Jeon MJ, Yang W, Lee KM, Seo HS, Shin I. 2011. Induction of apoptotic cell death by Pharbitis nil extract in HER2-overexpressing MCF-7 cells. J Ethnopharmacol 133(1):126-131.

(비특허문헌 0008) Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, Tan M, Zhou X, Li P, Yang W, Yin G, Hittelman WN, Yu D. 2006. ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. Cancer Res 66(4):2028-2037.

(비특허문헌 0009) Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. 2004. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. J Biol Chem 279(29):30540-30545.

(비특허문헌 0010) Kuhajda FP. 2006. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. Cancer Res 66(12):5977-5980.

(비특허문헌 0011) Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. 2003. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. Cancer Res 63(1):132-139.

(비특허문헌 0012) Menendez JA, Colomer R, Lupu R. 2005a. Why does tumor-associated fatty acid synthase 26 (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? Med Hypotheses 64(2):342-349.

(비특허문헌 0013) Menendez JA, Mehmi I, Verma VA, Teng PK, Lupu R. 2004c. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase (FAS): a novel therapeutic approach for breast cancer chemoprevention through its ability to suppress Her-2/neu (erbB-2) oncogene-induced malignant transformation. Mol Carcinog 41(3):164-178.

(비특허문헌 0014) Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. 1997. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. Clin Cancer Res 3(11):2115-2120.

(비특허문헌 0015) Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. 1996. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. Cancer Res 56(12):2745-2747.

(비특허문헌 0016) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244(4905):707-712.

(비특허문헌 0017) Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. 2001. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bungeanum. J Ethnopharmacol 77(2-3):209-217.

(비특허문헌 0018) Yang YA, Han WF, Morin PJ, Chrest FJ, Pizer ES. 2002. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Exp Cell Res 279(1):80-90.

(비특허문헌 0019) Yang YA, Morin PJ, Han WF, Chen T, Bornman DM, Gabrielson EW, Pizer ES. 2003. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. Exp Cell Res 282(2):132-137.

발명의 내용

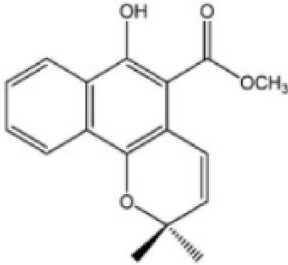
해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 몰루긴을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하기 화학식 1의 몰루긴(mollugin)을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 유방암 또는 난소암은 HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 유전자가 과발현된 유방암 또는 난소암일 수 있다.

[0013] 상기 조성물은 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)/Akt/SREBPs(sterol regulatory element binding proteins)를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 조성물은 FAS(fatty acid synthase)의 활성을 억제시키는 효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명은 또한 몰루긴 및 약제학적 부형제를 포함하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물에 몰루긴은 0.001~99.9 중량%가 포함될 수 있다.

[0016] 상기 몰루긴은 통상적인 방법으로 합성될 수 있으며, 꼭두서니(*Rubia cordifolia* L.)의 뿌리 또는 각종 약용식물로부터 추출될 수 있다. 상기 꼭두서니의 뿌리 또는 약용식물의 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 물과의 혼합용매를 이용하여 제조될 수 있으며, 상법에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 헥산과 물의 분배, 크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합한 방법을 이용하여 분획 또는 정제한 후, 상기 몰루긴을 분리해낼 수 있다.

[0017] 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[0018] 본 발명은 몰루긴 및 약제학적 부형제를 포함하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약제학적 부형제는 담체, 부형제 또는 희석제가 사용될 수 있다. 상기 몰루긴을 함유하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 생약 혼합물의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를

들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 몰루긴을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 몰루긴을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 몰루긴을 함유하는 유방암 또는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 HER2가 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에서 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)/Akt/SREBPs(sterol regulatory element binding proteins)를 통해 FAS(fatty acid synthase)의 발현을 저해하고 유방암 세포와 난소암 세포의 세포 증식 억제 및 아포토시스를 유도함으로써, 상기 암세포들을 사멸하는 효과가 우수하여, 유방암 또는 난소암의 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 MCF-7 세포에서 HER2 과발현이 성공적으로 유도되었음을 확인한 웨스턴 블롯 결과를 나타내는 그림이다.

도 2A는 신장 세포인 HER-293에서 몰루긴의 세포 사멸 효과가 낮음을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2B는 자궁경부암 세포인 Hela에서 몰루긴의 세포 사멸 효과가 낮음을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2C는 HER2 과발현된 MCF-7 유방암 세포(MCF-7/HER2)에서 몰루긴의 세포 사멸 효과가 높음을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2D는 유방상피세포인 MCF-10A 세포에서는 몰루긴의 세포 사멸 효과가 낮지만 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포와 SK-OV-3 난소암 세포(SK-BR-3/HER2, SK-OV-3/HER2)에서는 몰루긴의 세포 사멸 효과가 높음을 나타내는 MTT 어세이 결과이다.

도 2E는 유방상피세포인 MCF-10A 세포에서는 몰루긴의 세포 사멸 효과가 낮지만 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포와 SK-OV-3 난소암 세포(SK-BR-3/HER2, SK-OV-3/HER2)에서는 몰루긴의 세포 사멸 효과가 높음을 나타내는 LDH 어세이 결과이다.

도 3A는 유방상피세포인 MCF-10A 세포에서는 몰루긴의 카스페이스-3의 활성이 없지만 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포와 SK-OV-3 난소암 세포(SK-BR-3/HER2, SK-OV-3/HER2)에서는 몰루긴 농도 의존적으로 카스페이스-3 활성이 증가하는 것을 나타내는 카스페이스-3 어세이 결과를 나타낸다.

도 3B 내지 도 3D는 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2, 도 3B)와 SK-OV-3 난소암 세포(SK-BR-3/HER2, 도 3C)에서는 PARP의 절단이 몰루긴 농도 의존적으로 증가하지만 유방상피세포인 MCF-10A 세포(도 3D)에서는 몰루긴 유도로 인한 PARP의 절단이 일어나지 않는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 4A는 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 FAS의 단백질 발현이 몰루긴에 농도 의존적으로 감소함을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 4B는 유방상피세포인 MCF-10A에서는 몰루긴 유도로 인한 FAS의 발현량이 변화가 없음을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 4C는 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 FAS mRNA 발현이 몰루긴에 농도의존적으로 감소함을 나타내는 리얼타임 PCR 결과이다.

도 5A는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 SREBP-1의 단백질 발현량과 Akt의 인산화가 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 5B는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 SREBP-1c의 mRNA 발현량이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것을 나타내는 리얼타임 PCR 결과이다.

도 5C는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 SREBP-1c의 프로모터 활성이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것을 나타내는 루시퍼레이즈 어세이 결과이다.

도 5D는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 몰루긴을 처리한 것과 유사하게 Akt 저해제(LY294002) 처리시 SREBP-1과 FAS의 단백질 발현 및 Akt의 인산화가 억제되는 것을 나타낸다.

도 5E는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 몰루긴을 처리한 것과 유사하게 Akt 저해제(LY294002) 처리시 세포 사멸이 유도되는 것을 나타낸다.

도 6A는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 HER2의 단백질 발현량이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 6B는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 몰루긴의 처리 농도에 따라 HER2 유전자의 mRNA 발현량이 줄어드는 것을 나타내는 리얼타임 PCR 결과이다.

도 6C는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 HER2의 프로모터 활성이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것을 나타내는 루시퍼레이즈 어세이 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

<실시예 1. 몰루긴의 분리>

[0025] 건조된 꼭두서니(*Rubia cordifolia* L.)의 뿌리(10kg)를 실온에서 메탄올(20ℓ×3)로 추출하여 감압건조하여 1000g의 메탄올 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 물 4ℓ에 현탁한 후, 디클로로메탄 4ℓ와 혼합하여 현탁한 후, 디클로로메탄 가용 분획만을 취해 감압건조하였다. 건조된 상기 디클로로메탄 분획물(2g)은 디클로로메탄/메탄올(100:0→0:100)의 용매 농도구배조건의 MPLC[Si gel column(7.5×3cm)]을 이용하여 10개로 분획하였으며(Fr. 1-10), 이 중 Fr.2 분획물(380mg)을 메탄올/물(40:60→90:10)의 용매 농도구배 조건의 C18 HPLC(250×21.2mm, 10μm)를 이용하여 몰루긴(21.5mg)을 분리하였다.

[0026] 분리된 몰루긴의 순도는 HPLC[Luna C18 column (250×21.2mm, 10μm), mobile phase: linear gradient of MeOH/H₂O (40:60→90:10) over 60min, flow rate: 6mℓ/min, UV detection at 254nm]를 통해 순도 98%인 것으로 확인되었으며, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR의 분석결과는 하기와 같다.

[0027] ¹H-NMR (250 MHz, methanol-d₄) : δ 8.19 (1H, dd, J = 8.3, 0.8 Hz, H-5), 8.00 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-8), 7.377.55 (2H, m, H-6, 7), 7.01 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-19), 5.62 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-29), 3.90 (3H, s, OCH₃), 1.37 (6H, s, CH₃).

[0028] ¹³C-NMR (63 MHz, methanol-d₄) : δ 174.5 (C=O), 156.7 (C-1), 142.7 (C-4), 130.3 (C-6), 130.1 (C-4a), 127.3 (C-2'), 126.2 (C-7), 125.8 (C-8a), 124.8 (C-5), 123.2 (C-1'), 122.8 (C-8), 114.0 (C-3), 103.8 (C-2), 75.9 (C-3'), 52.7 (OCH₃), 27.0 (C-4' and 5').

<실시예 2. 세포의 준비 및 몰루긴의 세포 사멸 효과 확인>

실시예 2-1. 세포의 준비, 배양

[0031] HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포와 SK-OV-3 난소암 세포, HEK-293 신장 세포, 293T 신장 세포, MCF-10A 유

방 상피세포, MCF-7 유방암 세포, Hela 자궁경부암 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다.

[0032] HER2 과발현 MCF-7 유방암 세포는 한양대학교(Dr. Incheol Shin, Hanyang University, South Korea, Ju et al., 2011)로부터 얻었다.

[0033] HER2 과발현 MCF-7 유방암 세포의 제조를 위해서는, 먼저 293T 신장 세포에 pBMN-vec-GFP 또는 pBMNHER2-GFP와 pCMV-VSVG(encoding vesicular stomatitis virus glycoprotein) 및 pCMVgag-pol(containing the Moloney murine leukemia virus gag and pol genes)을 트랜스펙션하였으며, 48시간 후에 트랜스펙션된 293T 신장 세포의 배양액으로부터 아미콘 울트라 필터(amicon ultra; Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 레트로바이러스 파티클(retroviral particles)을 수거하였다. 이 후 MCF-7 유방암 세포에 상기 레트로바이러스 파티클과 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 폴리브란(polybrane; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 처리하고, 48시간 후에 유세포분석기(flow cytometry)를 통해 HER2를 과발현하는 세포들을 추출하였다.

[0034] MCF-10A 세포는 10% FBS(heat-inactivated fetal bovine serum) 및 2mM 글루타민이 함유된 DMEM/F12 배지에서 배양하였으며 다른 세포들은 10% FBS가 포함된 RPMI 1640이나 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 모든 세포는 37°C의 5% CO₂ 습윤 배양기에서 배양되었다.

[0035] 실시예 2-2. HER2 과발현 상태 확인

[0036] HER2 과발현을 위한 트랜스펙션이 잘 되었는지 확인하기 위해, 트랜스펙션을 수행하지 않은 일반 MCF-7 유방암 세포 및 상기 세포를 이용하여 HER2 과발현을 유도한 MCF-7 세포들을 모아 PBS로 세척하였으며 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이를 위해, 상기 세포들을 100 μL 의 세포용해버퍼(120mM NaCl, 40mM Tris, pH 8, 0.1% NP40)에 녹인 후(4°C, 30분), 용해된 액상을 13,000 $\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하고, 상등액만을 모아서 BCA 단백질 어세이를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 정량된 결과를 참고하여 80 μg 씩의 단백질을 10% SDS-PAGE(10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후, PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 이 후, HER2와 FAS의 단백질량을 확인하였다. 각 단백질량은 β -actin에 대한 양을 기준으로 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 1에 나타내었다.

[0037] 도 1을 참고하면, 트랜스펙션을 수행하지 않은 일반 MCF-7 유방암 세포에서는 HER2의 발현이 거의 되지 않는 것으로 확인되지만, HER2 트랜스펙션된 세포(MCF-7/HER2)에서는 HER2 단백질이 다량으로 발현하고 있는 것을 알 수 있다. 또한, 상기 HER2 과발현된 MCF-7 유방암 세포(MCF-7/HER2)에서 HER2의 발현에 따라 FAS의 발현량도 증가하는 것으로 확인된다.

[0038] 실시예 2-3. 세포 사멸률 확인 ①

[0039] 다음으로는 HER2 과발현된 유방암과 난소암 세포에서의 세포 사멸률을 일반 세포인 신장세포, 상피세포 및 자궁경부암 세포와 비교하여 확인하였다.

[0040] 48-웰플레이트(48-well plate)에 각 웰당 4×10^4 cells/500 μL 로 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포, BT-474 유방암세포, SK-OV-3 난소암 세포, Hela 자궁경부암 세포, HEK-293 신장 세포, MCF-10A 유방 상피세포들을 분주하고 24시간 후에 세포배양배지를 무혈청 배지로 교체하였다. 이 후 몰루긴을 1~50 μM 의 농도로 하여 48시간 동안 37°C에서 처리하였다. 이 후 상기 세포들을 이용하여 MTT 어세이(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay)를 수행하였다. MTT 어세이를 위해서는 MTT 용액(USB Corp. Cleveland, OH, USA; final concentration, 0.5mg/mL)을 1시간 동안 각 세포들에 처리한 후, 포마잔 크리스탈(formazan crystals)이 생성되면, 이를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해한 후, 마이크로플레이트 분석기(microplate reader; Varioskan; Thermo Electron, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570nm에서 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 2A 내지 2D에 나타내었다.

[0041] 도 2A를 참고하면, 일반 세포인 HEK-293 신장 세포에서는 몰루긴을 50 μM 으로 처리하여도 세포 사멸이 거의 일어나지 않는 것으로 확인된다. 도 2B의 Hela 자궁경부암 세포에서도 몰루긴으로 인한 세포 사멸은 역시 거의 일어나지 않는 것으로 나타난다. 반면, 도 2C에서 HER2 과발현된 MCF-7 유방암 세포(MCF-7/HER2)에서는 몰루긴을 25 μM 로 처리할 때 50% 이상의 세포 사멸이 일어나는 것으로 나타난다. 마찬가지로 도 2D에서도 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)와 HER2 과발현된 SK-OV-3 난소암 세포(SK-OV-3/HER2)의 사멸이 몰루긴 25 μM 처리농도 전후에서 세포 사멸이 현저하게 일어나는 것으로 확인되는데, 이에 반해 일반 세포인 MCF-10A 유방 상피세포에서는 고농도의 몰루긴을 처리해도 세포 사멸이 거의 일어나지 않는 것을 알 수 있다. 따라서 몰루

긴이 HER2 과발현된 유방암 또는 난소암 세포들의 세포 사멸에 현저한 효과가 있는 것을 알 수 있다.

[0042] 실시예 2-4. 세포 사멸률 확인 ②

[0043] LDH 어세이(lactate dehydrogenase assay)를 통해서도 몰루긴의 세포 사멸 효과를 확인하였다. LDH 어세이를 통한 LDH 방출 확인은 lactate dehydrogenase release detection kit(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)(catalog # 11 644 793 001)를 이용하여 확인하였으며, 마이크로플레이트 분석기를 이용하여 490nm에서 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 2E에 나타내었다.

[0044] 도 2E를 참고하면, 몰루긴을 처리한 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포와 SK-OV-3 난소암 세포(SK-BR-3/HER2 및 SK-OV-3/HER2)에서의 LDH 방출량이 몰루긴에 농도의존적으로 현저하게 증가하는 것으로 확인되어 세포 사멸이 몰루긴의 처리 농도에 따라 증가하는 것을 알 수 있지만, 일반 세포인 MCF-10A 유방 상피세포에서는 LDH 방출이 거의 일어나지 않는 것으로 나타나 세포 사멸이 거의 없는 것으로 확인된다.

[0045] 따라서, 실시예 2 및 도 2의 전체적인 결과를 통해, 몰루긴이 HER2 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포의 세포 사멸 효과가 우수함을 알 수 있다.

[0046] <실시예 3. 카스페이스-3 및 PARP의 활성화 및 아포토시스 확인>

[0047] 몰루긴의 처리에 따른 HER2 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에서의 카스페이스-3(caspase-3) 및 PARP(poly(ADP-ribose) polymerase)의 활성을 일반 세포와 비교하여 상기 세포들의 아포토시스(apoptosis) 여부를 확인하였다. 세포 사멸을 유도하는 신호전달 시스템에서 프로-카스페이스-3(pro-caspase-3)의 말단이 분할되면서 상기 단백질이 카스페이스-3로 활성화되면, 상기 활성화된 카스페이스-3가 PARP의 말단을 분할시켜 PARP의 불활성화를 유도하고, 이를 통해 아포토시스가 일어난다. 따라서, 카스페이스-3의 활성이 증가하거나 분할된 PARP(cleaved PARP)가 증가하는 것이 확인되면 해당 세포에서 아포토시스가 진행되었다는 것을 의미한다.

[0048] 실시예 3-1. 카스페이스-3 활성화 확인

[0049] 카스페이스-3의 활성화는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포와 MCF-10A 세포에 5~50 μ M의 몰루긴을 처리하여 Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay kit(Promega)(catalog # G7790)을 이용하여 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 3A에 나타내었다.

[0050] 도 3A를 확인하면, 몰루긴을 처리한 HER2 과발현된 SK-BR-3 유방암 세포와 SK-OV-3 난소암 세포(SK-BR-3/HER2 및 SK-OV-3/HER2)에서의 카스페이스-3의 활성이 몰루긴에 농도의존적으로 현저하게 증가하는 것으로 확인되어 아포토시스가 몰루긴의 처리 농도에 따라 증가하는 것을 알 수 있지만, 일반 세포인 MCF-10A 유방 상피세포에서는 카스페이스-3의 활성이 몰루긴을 처리하지 않는 대조군과 비교하여 거의 변화가 없어 아포토시스가 거의 일어나지 않는 것으로 나타난다.

[0051] 실시예 3-2. PARP의 활성화 확인

[0052] 한편, PARP의 활성화는 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포, HER2 과발현 SK-OV-3 난소암 세포와 MCF-10A 세포에 5~50 μ M의 몰루긴을 처리한 뒤, 실시예 2-2에 개시된 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 확인하였고, 이에 대한 결과는 도 3B 내지 3D에 나타내었다.

[0053] 도 3B를 확인하면, HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 분할된 PARP(cleaved PARP)가 몰루긴에 농도의존적으로 증가하여 아포토시스가 증가하는 것을 알 수 있으며, 이와 같은 현상은 도 3C에서의 HER2 과발현 SK-OV-3 난소암 세포(SK-OV-3/HER2)에서도 유사하게 나타나는 것을 알 수 있다. 반면, 도 3D를 확인하면, 일반 세포인 MCF-10A 유방 상피세포에서는 고농도의 몰루긴을 처리해도 PARP의 분할이 일어나지 않는 것으로 나타난다.

[0054] 따라서, 실시예 3 및 도 3의 전체적인 결과를 통해, 몰루긴은 일반 세포에서는 아포토시스를 유도하지 않지만, 이와 달리 HER2 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에 특이적으로 아포토시스를 일으켜 세포 사멸을 유도함을 알 수 있다.

[0055] <실시예 4. FAS의 발현 억제 효과 확인>

[0056] 실시예 4-1. FAS의 단백질 발현 확인

[0057] 실시예 2-2에 개시된 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 5~50 μ M의 몰루긴이 48시간 동안 처리된 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포 및 MCF-10A 유방상피세포에서의 FAS의 발현을 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 4A 및 도 4B에

나타내었다.

[0058] 도 4A를 참고하면 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 FAS의 단백질 발현량이 몰루긴에 농도의 존적으로 감소하고 있는 것으로 나타나지만, 도 4B를 참고하면 MCF-10A 유방상피세포에서는 고농도의 몰루긴을 처리해도 FAS의 단백질 발현량이 차이가 나지 않는 것으로 확인된다.

[0059] 실시예 4-2. FAS의 mRNA 발현 확인

[0060] FAS의 mRNA의 발현량을 리얼타임 PCR(Quantitative Real-Time RT-PCR)을 이용하여 확인하였다. 이를 위해 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에 5~50 μ M의 몰루긴을 48시간 동안 처리하여 RNAiso plus Reagent(Takara, Tokyo, Japan)를 이용하여 총 RNA를 추출하였으며, Reverse transcription kit(Promega)(catalog # M5101)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 후 reporter dye(SYBR)를 이용하여 FAS에 대한 mRNA의 발현량을 비교 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 4C에 나타내었다. 각 유전자의 정량은 하우스키핑 유전자 (housekeeping gene)인 β -actin에 대한 양으로 평준화하여 확인하였으며, 이 때, 사용된 프라이머(primer)의 조건은 하기와 같다.

[0061] FAS forward, 5' -GAA ACT GCA GGA GCT GTC-3' ;

[0062] FAS reverse, 5' -CAC GGA GTT GAG GCG CAT-3' ;

[0063] β -actin forward, 5' -TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3' ;

[0064] β -actin reverse, 5' -CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3' ;

[0065] 도 4C를 참고하면 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서 몰루긴 처리 농도별로 FAS의 mRNA 발현이 감소하는 것으로 확인된다.

[0066] 따라서, 실시예 4 및 도 4의 전체적인 결과를 통해, 몰루긴이 HER2 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에서 FAS의 발현을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0067] <실시예 5. SREBPs의 발현 및 Akt 활성 억제 효과 확인>

[0068] 실시예 5-1. SREBP-1 단백질 발현 및 Akt의 인산화 확인

[0069] 실시예 2-2에 개시된 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 5~50 μ M의 몰루긴이 48시간 동안 처리된 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에서의 SREBP-1의 발현 및 Akt 인산화를 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 5A에 나타내었다. 도 5A를 참고하면 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 SREBP-1의 단백질 발현량과 Akt의 인산화가 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것으로 확인된다.

[0070] 실시예 5-2. SREBP-1c의 mRNA 발현 확인

[0071] 실시예 4-2에 개시된 방법을 이용하여 5~50 μ M의 몰루긴이 48시간 동안 처리된 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에서의 SREBP-1c의 mRNA 발현을 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 5B에 나타내었다. SREBP-1c의 확인에 사용된 프라이머는 하기와 같다.

[0072] SREBP-1c forward, 5' -GCC ATG GAT TGC ACT TT-3' ;

[0073] SREBP-1c reverse, 5' -CAA GAG AGG AGC TCA ATG-3' ;

[0074] 도 5B를 참고하면 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 SREBP-1c의 mRNA 발현량이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것으로 확인된다.

[0075] 실시예 5-3. SREBP-1c의 프로모터 활성 확인

[0076] 다음으로는 SREBP-1c의 프로모터 활성을 luciferase assay system(Promega) 키트를 이용한 루시퍼레이즈 어세이를 통해 확인하였다. 이를 위해, HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에 1 μ g의 SREBP-1c promoter-luciferase, 0.2 μ g의 pCMV- β -galactosidase를 Lipofectamine™ 2000을 이용하여 트랜스펙션하였다. 5시간 후에 세포 배양액을 FBS가 없는 배지로 교체해주고 몰루긴(5~50 μ M)을 48시간 동안 처리하였다. 이 후 상기 세포들을 용해 후 14,240 $\times$ g에서 10분 동안 원심분리 후, 상등액(supernatants)의 루시퍼레이즈(luciferase) 및 β -갈락토시데이즈(β -galactosidase) 활성을 측정하였다. β -갈락토시데이즈 어세이(β -galactosidase assay)는 250 μ l의 어세이 버퍼(0.12M Na_2HPO_4 , 0.08M NaH_2PO_4 , 0.02M KCl, 0.002M MgCl_2 , 0.1M β -mercaptoethanol, 50 μ g o-nitrophenyl- β -galactoside)를 이용하여 확인하였다. 루시퍼레이즈 활성은 β -갈락토시데이즈의 활성으로 평준화하여 나타내었다. 상기 루시퍼레이즈 어세이 결과는 도 5C에 나타내었는데, 도 5C를 참고하면, HER2 과발현

SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 SREBP-1c의 프로모터 활성이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것으로 확인되었다.

[0077] 실시예 5-4. 몰루긴과 Akt 저해제와의 효과 비교

[0078] 실시예 2-2와 동일한 방법의 단백질 발현 확인 및 실시예 2-3의 MTT 어세이를 통해 50 μ M의 몰루긴 또는 20 μ M의 LY294002(Akt 저해제)를 처리한 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에서의 FAS, SREBP-1, Akt 인산화 정도를 확인하였다.

[0079] 이에, 도 5D를 참고하면 몰루긴 또는 Akt 저해제(LY294002)를 20 μ M 처리한 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에서 몰루긴을 처리한 것과 유사하게 SREBP-1과 FAS의 단백질 발현 및 Akt의 인산화가 억제되는 것을 알 수 있다. 또한, 도 5E에서도 몰루긴을 처리한 것과 유사하게 Akt 저해제를 처리한 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서도 세포 사멸이 유도되었음을 알 수 있다.

[0080] 따라서, 실시예 2 및 도 2의 전체적인 결과를 통해, 몰루긴이 HER2 과발현된 유방암 세포와 난소암 세포에서 Akt의 활성을 억제하는 것을 알 수 있으며, 이는 Akt 저해제 사용시 유사한 형태의 세포 사멸 및 FAS와 SREBP-1의 억제 현상이 나타나는 것을 통해 입증되었다.

[0081] <실시예 6. HER2의 발현 억제 효과 확인>

[0082] 실시예 6-1. HER2의 단백질 발현 확인

[0083] 실시예 2-2에 개시된 웨스턴 블롯 방법을 이용하여 5~50 μ M의 몰루긴이 48시간 동안 처리된 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포에서의 HER2 단백질의 발현을 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 6A에 나타내었다.

[0084] 도 6A를 참고하면 HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 HER2의 발현량이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있는 것으로 확인된다.

[0085] 실시예 6-2. HER2의 mRNA 발현 확인

[0086] 실시예 6-2에 개시된 방법으로 HER2에 대한 mRNA의 발현량을 리얼타임 PCR(Quantitative Real-Time RT-PCR)을 이용하여 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 6B에 나타내었다. 사용된 HER2 프라이머의 조건은 하기와 같다.

[0087] HER2 forward, 5' -CTG AAC TGG TGT ATG CAG ATT GC-3' ;

[0088] HER2 reverse, 5' -TTC CGA GCG GCC AAG TC-3' ;

[0089] 도 6B를 확인하면, HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 몰루긴의 처리 농도에 따라 HER2 유전자의 mRNA 발현량이 줄어드는 것으로 나타난다.

[0090] 실시예 6-3. HER2의 프로모터 활성 확인

[0091] 다음으로는 HER2의 프로모터 활성을 실시예 5-3에 개시된 루시퍼레이즈 어세이를 통해 확인하였으며(HER2 promoter-luciferase 이용), 상기 결과는 도 6C에 나타내었는데, 도 6C를 참고하면, HER2 과발현 SK-BR-3 유방암 세포(SK-BR-3/HER2)에서의 HER2의 프로모터 활성이 몰루긴에 농도의존적으로 감소하고 있어 실시예 6-1 및 6-2와 유사한 결과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0092] 따라서, 실시예 6 및 도 6의 전체적인 결과를 통해, 몰루긴이 HER2의 발현을 직접적으로 억제하여, 이를 통해, Akt 활성이 억제되고 FAS 및 SREBP-1의 발현 억제를 유도하는 것을 알 수 있다.

[0093] <실시예 7. 독성실험>

[0094] 실시예 7-1. 급성독성

[0095] 몰루긴을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v) 만을 투여하고, 실험군은 몰루긴을 2g/kg/day 농도로 상기 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 몰루긴을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0096] 실시예 8-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험

[0097] 장기 독성 실험은 몰루긴을 각 농도(최고 농도 2g/kg/day)로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 몰루긴을 투여한 실험군과 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0098] <제제예 1 : 약학적 제제>

[0099] 1-1. 정제의 제조

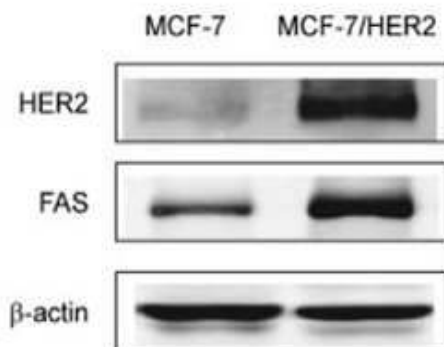
[0100] 몰루긴 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0101] 1-2. 주사액제의 제조

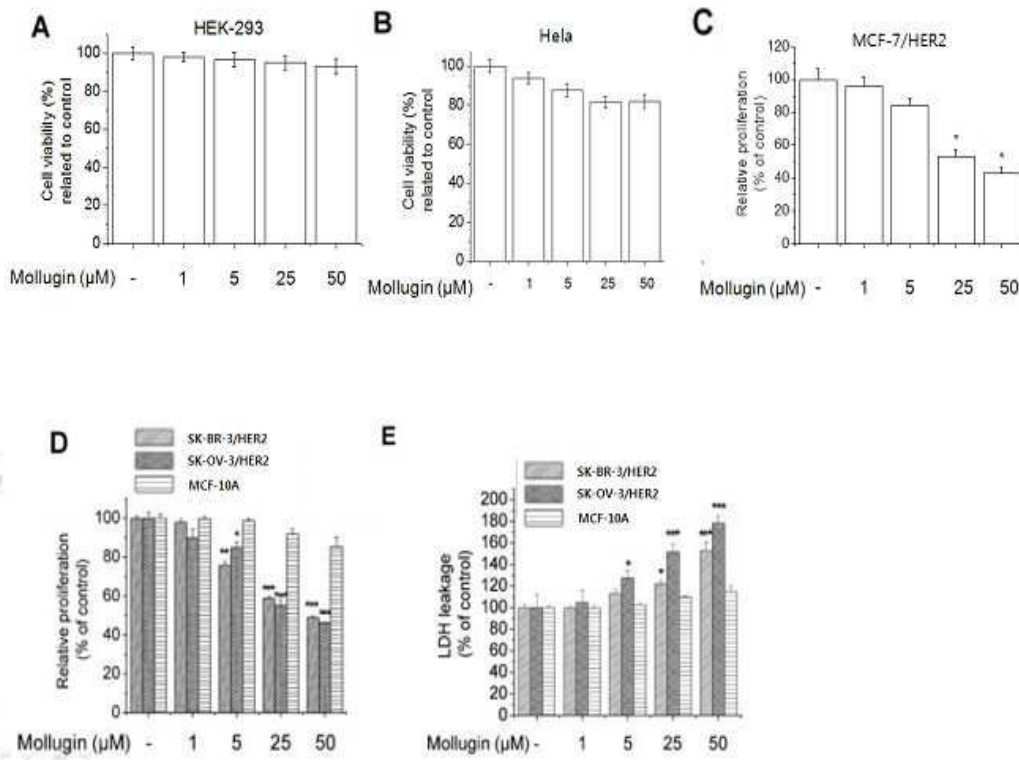
[0102] 몰루긴 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

도면

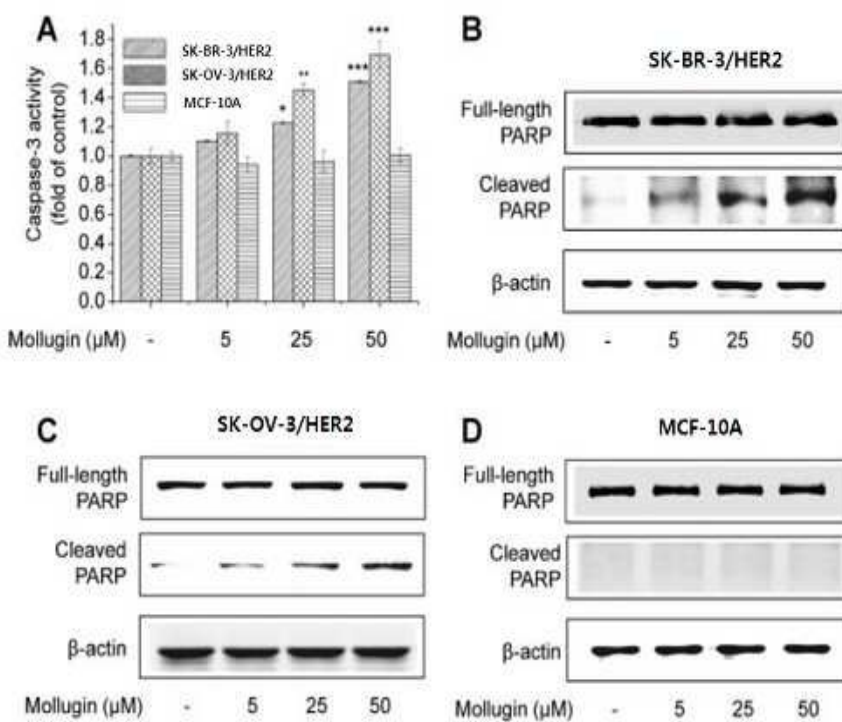
도면1



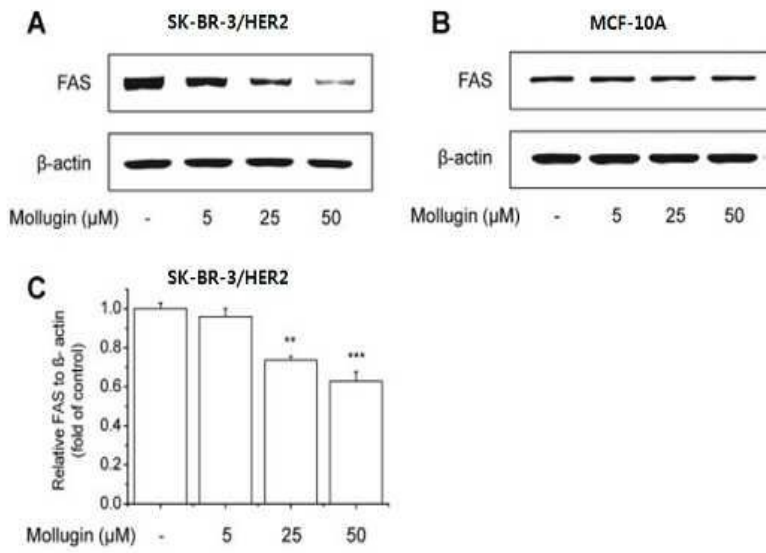
도면2



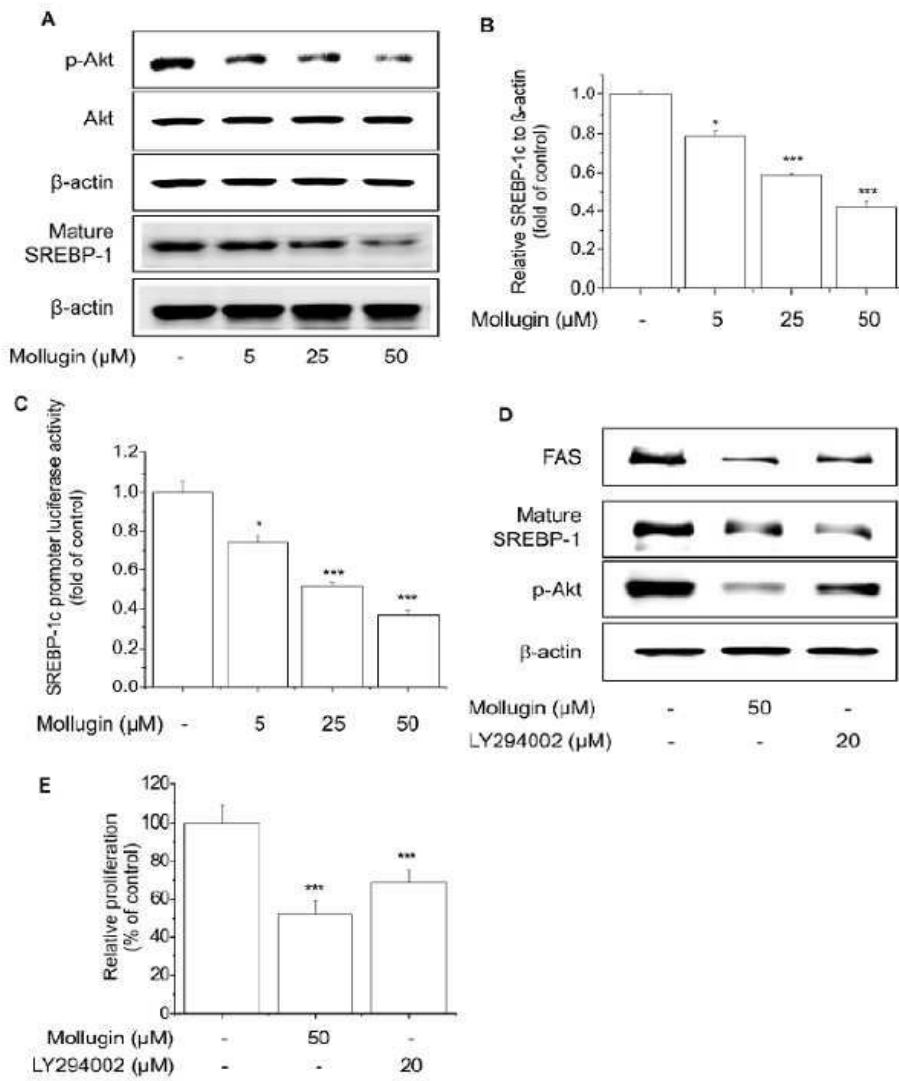
도면3



도면4



도면5



도면6

