



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0055698
(43) 공개일자 2023년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/232 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 36/25 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/232 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0139401
(22) 출원일자 2021년10월19일
심사청구일자 2021년10월19일

(71) 출원인
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
(72) 발명자
조정용
광주광역시 광산구 왕버들로132번길 22 수완2차우
미린아파트 209동 301호
김성학
광주광역시 북구 설죽로 560 금호타운 101동 170
1호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지원

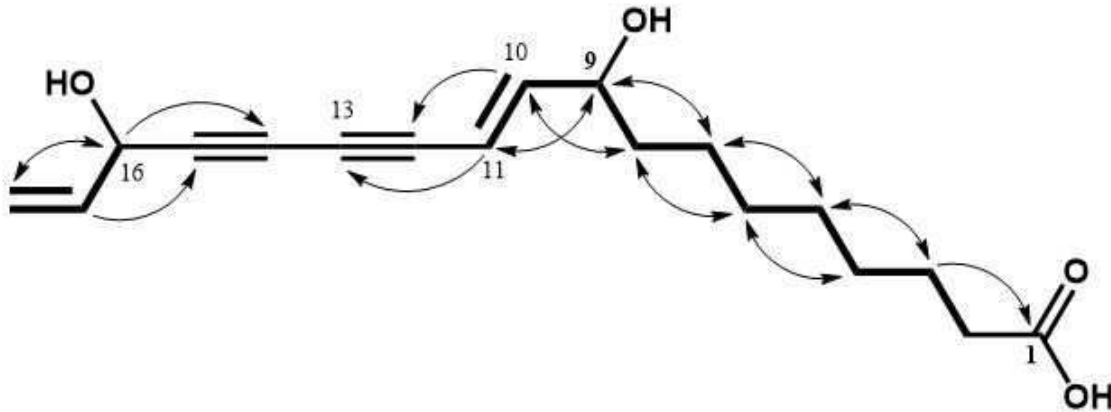
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 황칠나무 잎에서 분리된 아세틸렌산 유도체를 유효성분으로 포함하는 뇌종양 예방 또는 치료
용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 황칠나무 잎에서 분리된 아세틸렌산 유도체를 유효성분으로 포함하는 뇌종양 예방 또는 치료용 조성물
에 관한 것으로, 본 발명에 의한 황칠나무 잎에서 분리된 아세틸렌산 유도체는 뇌종양 줄기세포 억제 활성을 나
타내고, 천연물 추출물 성분으로서 상대적으로 부작용 및 독성 발현율이 낮아 생체 친화적으로 뇌종양을 효과적
으로 예방 및 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/25 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

문제학

광주광역시 서구 풍암중앙로 25 풍암모아아파트
103동 1305호

이계한

광주광역시 북구 매곡로 95 매곡동 대주피오레 아
파트 103동 1407호

박영신

광주광역시 광산구 월계로 117-32 첨단산업기지사
인1차아파트 119동 307호

김현진

광주광역시 서구 화운로 122

김지희

광주광역시 광산구 소촌로86번길 20-5 모아드림2차
아파트 203동 508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2020183002
과제번호	2020183A00-2022-AA02
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림융복합 전문인력 양성사업
연구과제명	난대 산림생물소재 고부가가치 전문인력양성사업
기 여 율	1/1
과제수행기관명	전남대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

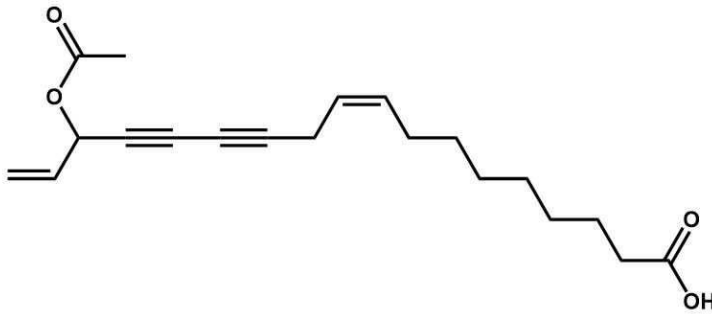
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 아세틸렌산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 유효 성분으로 포함하는 뇌종양 예방 및 치료용 약학적 조성물;

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아세틸렌산 유도체는 황칠나무 잎으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 아세틸렌산 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 뇌종양은 역형성 성상세포종(anaplastic astrocytomas), 교모세포종(glioblastomas), 수막종(meningiomas), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 신경초종(schwannomas), 중추신경계 임파종(CNS lymphoma), 희소돌기아교세포종(oligodendrogliomas), 상의세포종(ependymomas), 저등급 성상세포종(low-grade astrocytomas), 수모세포종(medulloblastomas), 성상세포종 종양(astrocytic tumors), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic astrocytoma), 미만성 성상세포종(diffuse astrocytomas), 다형성 황색성상세포종(pleomorphic xanthoastrocytomas), 상의하 거대세포 성상세포종(subependymal giant cell astrocytomas), 역형성 희소돌기아교세포종(anaplastic oligodendrogliomas), 희소돌기성상세포종(oligoastrocytomas), 역형성 희소돌기성상세포종(anaplastic oligoastrocytomas), 점액성 유두상 상의세포종(myxopapillary ependymomas), 상의하세포종(subependymomas), 뇌실상의세포종(ependymomas), 역형성 뇌실상의세포종(anaplastic ependymomas), 아스트로블라스토마(astroblastomas), 제3뇌실의 척삭모양 신경아교종(chordoid gliomas of the third ventricle), 대뇌 신경교종증(gliomatosis cerebris), 글랜글리오사이토마스(glangliocytomas), 결합조직생성 유아 성상세포종(desmoplastic infantile astrocytomas), 결합조직생성 유아신경절교종(desmoplastic infantile gangliogliomas), 태생기발육부전 신경상피종(dysembryoplastic neuroepithelial tumors), 중심성 신경세포종(central neurocytomas), 소뇌지방신경세포종(cerebellar liponeurocytomas), 부신경절종(parangliomas), 상의모세포종(ependymoblastomas), 천막위 원시신경외배엽성 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 맥락막층 유두종(choroids plexus papilloma), 송과체세포종(pineocytomas), 피네오블라스토마(pineoblastomas), 중등도 분화형의 솔방울샘 실질 종양(pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation), 혈관주위세포종(hemangiopericytomas), 안장영역의 종양(tumors of the sellar region), 두개인두종(craniopharyngioma), 혈관모세포종(capillary hemangioblastoma), 및 일차성 중추신경계 임파종(primary CNS lymphoma)으로 이루어진 것으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌종양 예방 및 치료용 약학적

조성물.

청구항 4

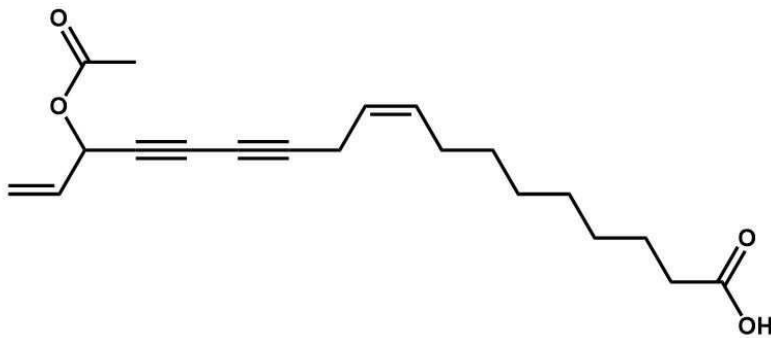
제1항에 있어서,

상기 뇌종양은 교모세포종(glioblastoma)인 것을 특징으로 하는 뇌종양 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

하기 [화합식 1]로 표시되는 아세틸렌산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 유효 성분으로 포함하는 뇌종양 예방 및 개선용 건강기능식품;

[화합식 1]



청구항 6

제5항에 있어서,

상기 뇌종양은 역형성 성상세포종(anaplastic astrocytomas), 교모세포종(glioblastomas), 수막종(meningiomas), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 신경초종(schwannomas), 중추신경계 임파종(CNS lymphoma), 희소돌기아교세포종(oligodendrogliomas), 상의세포종(ependymomas), 저등급 성상세포종(low-grade astrocytomas), 수모세포종(medulloblastomas), 성상세포종 종양(astrocytic tumors), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic astrocytoma), 미만성 성상세포종(diffuse astrocytomas), 다형성 황색성상세포종(pleomorphic xanthoastrocytomas), 상의하 거대세포 성상세포종(subependymal giant cell astrocytomas), 역형성 희소돌기아교세포종(anaplastic oligodendrogliomas), 희소돌기성상세포종(oligoastrocytomas), 역형성 희소돌기성상세포종(anaplastic oligoastrocytomas), 점액성 유두상 상의세포종(myxopapillary ependymomas), 상의하세포종(subependymomas), 뇌실상의세포종(ependymomas), 역형성 뇌실상의세포종(anaplastic ependymomas), 아스트로블라스토마(astroblastomas), 제3뇌실의 척삭모양 신경아교종(chordoid gliomas of the third ventricle), 대뇌 신경교종증(gliomatosis cerebris), 글랑글리오사이토마스(gliangliocytomas), 결합조직생성 유아 성상세포종(desmoplastic infantile astrocytomas), 결합조직생성 유아신경절교종(desmoplastic infantile gangliogliomas), 태생기발육부전 신경상피종(dysembryoplastic neuroepithelial tumors), 중심성 신경세포종(central neurocytomas), 소뇌지방신경세포종(cerebellar liponeurocytomas), 부신경절종(parangliomas), 상의모세포종(ependymoblastomas), 천막위 원시신경외배엽성 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 맥락막종 유두종(choroids plexus papilloma), 송과체세포종(pineocytomas), 피네오블라스토마(pineoblastomas), 중등도 분화형의 솔방울샘 실질 종양(pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation), 혈관주위세포종(hemangiopericytomas), 안장영역의 종양(tumors of the sellar region), 두개인두종(craniopharyngioma), 혈관모세포종(capillary hemangioblastoma), 및 일차성 중추신경계 임파종(primary CNS lymphoma)으로 이루어진 것으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌종양 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 뇌종양은 교모세포종(glioblastoma)인 것을 특징으로 하는 뇌종양 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 8

황칠나무 잎 추출액을 얻는 단계;

상기 황칠나무 잎 추출액을 감압농축하는 단계;

상기 농축물의 용매분획을 거쳐 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계; 및

상기 에틸아세테이트 분획물을 ODS 컬럼 크로마토그래피를 이용한 MPLC에 의해 정제하는 단계를 포함하는 제1항의 아세틸렌산 유도체를 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 황칠나무 잎 추출액을 얻는 단계는 황칠나무 잎을 분쇄한 후 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 추출하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 저급 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황칠나무 잎에서 분리된 아세틸렌산 유도체를 유효성분으로 포함하는 뇌종양 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌종양이란 두개골 내에 생기는 모든 종양을 말하며 뇌조직이나 이를 둘러싸고 있는 막조직에서 발생한다. 대표적으로 신경교종, 뇌수막종, 뇌하수체종양이 알려져 있으며 이 중 신경교세포에서 기원하는 신경교종이 가장 높은 발생율을 보인다. 신경교종은 세포괴사, 혈관내피세포 증식정도, 핵의 비정형성, 유사분열성 등의 조직학적 특성을 고려하여 악성등급을 구분할 수 있는데 가장 높은 등급 4인 악성신경교종을 교모세포종(GBM, glioblastoma multiforme)이라고 한다. 이는 전체 뇌종양의 12~15%를 차지하며, 다른 종양에 비해 예후가 상당히 나빠서 진단 후 평균 생존기간이 14개월 정도에 불과하다.

[0003] 이러한 악성교모세포종은 대표적인 난치성 고형암으로 치료방법으로는 외과적 수술, 방사선 치료, 항암약물요법이 시도되고 있지만 환자 생존율은 크게 향상시키지 못하는 것으로 알려져 있다. 방사선 치료의 경우 신경독성과 치매 등 방사선 치료와 동반되는 부작용이 문제점으로 지적되고 있고 이에 항암약물요법(화학요법)이 주목받고 있으나, 약물요법의 경우 ‘혈뇌장벽 (Blood-brain barrier)’이라는 특수보호체계에 막혀 뇌까지 전달될 수 없는 약물이 다수이고, 항암제에 대한 암의 저항성으로 인해 매우 제한적이다. 최근, 이러한 항암제 저항성에 관여하는 세포로서 종양 조직 내 적은 수로 존재하는 종양줄기세포가 알려지면서 이를 표적으로 하는 항암제 개발에 관심이 주목되고 있다.

[0004] 따라서, 뇌종양을 치료하기 위해서는 천연 소재로부터 기존 화학치료제의 단점을 보완하고 부작용이 적은 뇌종양 줄기세포를 표적으로 하는 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0005] 황칠나무(*Dendropanax morbiferus*)는 두릅나무과에 속하는 다년생의 상록교목으로, 우리나라의 남해안지역에서 주로 분포되어 있다. 우리나라에서는 잎과 줄기 부위가 식용으로 이용할 수 있다. 황칠나무 잎은 항산화, 항염증, 항비만 및 항암 활성 등의 생리활성을 발휘한다고 보고되고 있다. 황칠나무는 유방암과 폐암치료에 효과가 있다고 보고(Park Soyi et al., Korean J. Food Preserv., 25, 471~481, 2018) 되고 있으며, 유효성분으로 diacetylene류의 존재를 밝혔지만, 황칠나무 잎에 포함된 성분 연구는 충분치 못한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제10-1454359호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허등록번호 제10-2031569호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 다수의 연구를 통해 황칠나무 잎에 포함된 화합물을 정제 및 분리함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 황칠나무 잎에 다양한 생리활성물질이 함유되어 있음을 확인하였을 뿐만 아니라, 뇌종양 줄기세포 사멸하는 새로운 기능을 갖는 화합물을 제공하는 것이다.

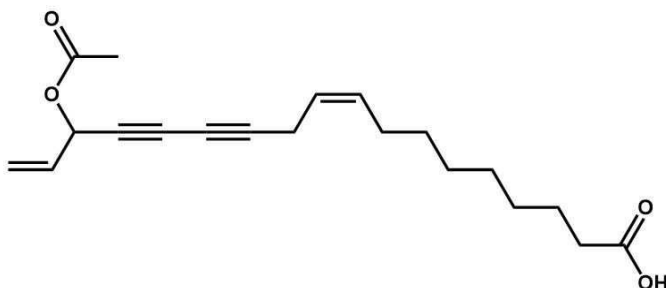
[0009] 본 발명의 다른 목적은 황칠나무 잎으로부터 분리, 구조 결정된 아세틸렌산 화합물의 뇌종양 줄기세포 사멸을 통한 뇌종양 치료용 약학적 조성물, 식품조성물 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 명시적으로 언급되지 않았더라도 후술되는 발명의 상세한 설명의 기재로부터 통상의 지식을 가진 자가 인식할 수 있는 발명의 목적 역시 당연히 포함될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일실시예에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 아세틸렌산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 유효 성분으로 포함하는 뇌종양 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다;

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 아세틸렌산 유도체는 황칠나무 잎으로부터 분리된 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 유효성분인 황칠나무 잎에서 분리되고, [화학식 1]로 표시되는 아세틸렌산 유도체는 [화학식 1]과 같은 구조식을 갖는데, 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산[16-acetyl-(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-dienoic acid]로 명명하였다.

[0016] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]의 화합물은 바람직하게는 황칠나무 잎으로부터 추출 및 정제하여 얻을 수

있고, 유기합성을 통하여 얻을 수 있다.

- [0017] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 뇌종양의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함하며, "치료"는 본 발명의 조성물에 의해 뇌종양에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 포함한다.
- [0018] 상기 [화학식 1]의 아세틸렌산 유도체는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 동일한 효능을 나타내고, 통상의 방법에 의해 제조되는 염, 수화물 및 용해화물을 포함한다.
- [0019] 본 발명에서, "약학적으로 허용가능한 염"은 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성 및 물성을 손상시키지 않는 임의의 무기산 또는 유기산 또는 염기와 형성된 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염과 같이, 당업계에서 통상적으로 사용되는 염을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0020] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [0021] 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소황산염, 인산염, 수소 인산염, 이 수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 벤질술포네이트(베실레이트), 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 또는 에스테르를 포함하는 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, "약학적으로 허용 가능한 담체"는 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 포함한다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 동결 건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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.
- [0025] 또한 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 아세틸렌산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 유효 성분으로 포함하는 뇌종양 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 조성물을 건강기능식품에 포함하여 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식

품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 15 중량부 이하, 보다 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물을 포함할 수 있는 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 구체적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있으며, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품을 포함할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0030] 본 발명에서, "뇌종양(brain tumor)"은 뇌 및 중추신경계에서 발생하는 종양으로서 "뇌암(brain cancer)"과 혼용하여 사용될 수 있다. 상기 뇌종양은 암은 일차성 뇌종양(primary brain tumor) 또는 전이성 뇌종양(metastatic brain tumor)일 수 있다.

[0031] 상기 뇌종양은 역형성 성상세포종(anaplastic astrocytomas), 교모세포종(glioblastomas), 수막종(meningiomas), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 신경초종(schwannomas), 중추신경계 임파종(CNS lymphoma), 회소돌기아교세포종(oligodendrogliomas), 상의세포종(ependymomas), 저등급 성상세포종(low-grade astrocytomas), 수모세포종(medulloblastomas), 성상세포종 종양(astrocytic tumors), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic astrocytoma), 미만성 성상세포종(diffuse astrocytomas), 다형성 황색성상세포종(pleomorphic xanthoastrocytomas), 상의하 거대세포 성상세포종(subependymal giant cell astrocytomas), 역형성 회소돌기아교세포종(anaplastic oligodendrogliomas), 회소돌기성상세포종(oligoastrocytomas), 역형성 회소돌기성상세포종(anaplastic oligoastrocytomas), 점액성 유두상 상의세포종(myxopapillary ependymomas), 상의하세포종(subependymomas), 뇌실상의세포종(ependymomas), 역형성 뇌실상의세포종(anaplastic ependymomas), 아스트로블라스토마(astroblastomas), 제3뇌실의 척삭모양 신경아교종(chordoid gliomas of the third ventricle), 대뇌 신경교종증(gliomatosis cerebris), 글랑글리오사이토마스(gliangliocytomas), 결합조직생성 유아 성상세포종(desmoplastic infantile astrocytomas), 결합조직생성 유아신경절교종(desmoplastic infantile gangliogliomas), 태생기발육부전 신경상피종(dysembryoplastic neuroepithelial tumors), 중심성 신경세포종(central neurocytomas), 소뇌지방신경세포종(cerebellar liponeurocytomas), 부신경절종(parangliomas), 상의모세포종(ependymoblastomas), 천막위 원시신경외배엽성 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 맥락막층 유두종(choroids plexus papilloma), 송과체세포종(pineocytomas), 피네오블라스토마(pineoblastomas), 중등도 분화형의 솔방울샘 실질 종양(pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation), 혈관주위세포종(hemangiopericytomas), 안장영역의 종양(tumors of the sellar region), 두개인두종(craniopharyngioma), 혈관모세포종(capillary hemangioblastoma), 및 일차성 중추신경계 임파종(primary CNS lymphoma)으로 이루어진 것으로부터 선택될 수 있다.

[0032] 바람직하게, 상기 뇌종양은 교모세포종(glioblastoma)일 수 있다.

[0033] 상기 교모세포종의 아형태는 전신경 아류형(proneural subtype), 간엽성 아류형(mesenchymal subtype), 고전적 아류형(classical subtype) 또는 신경형 아류형(neural subtype)일 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 [화학식 1]의 아세틸렌산 유도체를 제조하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 황칠나무 잎 추출액을 얻는 단계; 상기 황칠나무 잎 추출액을 감압 농축하는 단계; 상기 농축물의 용매분획을 거쳐 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계 및 상기 에틸아세테이트 분획물을 ODS 컬럼 크로마토그래피를 이용한 MPLC에 의해 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 [화학식 1]의 아세틸렌산 유도체의 제조방법의 일 실시예는 다음과 같다. 황칠나무 잎을 실내 온도에서 메탄올을 가하여 추출한다. 상기 메탄올 추출물을 진공농축기를 이용하여 45℃에서 감압 농축한다. 상기 얻어진 농축액을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 수포화 부탄올을 이용하여 분획한다. 상기 에틸아세테이트 분획물을 ODS-MPLC에 주입한 다음, 물(H₂O)과 아세톤니트릴(MeCN)의 혼합용매를 이용하여 용출하여 29개의 분획을 얻는다. 상기 분획 중 분획 21을 ODS-MPLC를 이용하여 정제한다.

[0036] 상기 황칠나무 잎 추출액을 얻는 단계는 황칠나무 잎을 분쇄한 후 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 추출하여

수행될 수 있으며, 상기 저급 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0037] 상술한 바와 같이 구성된 본 발명에 따르면, 본 발명에 의한 황칠나무 잎에서 분리된 [화학식 1]의 아세틸렌산 유도체는 뇌종양 세포 억제 활성을 나타내고, 천연물 추출물 성분으로서 상대적으로 부작용 및 독성 발현율이 낮아 생체 친화적으로 뇌종양을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 1인 (E)-9,16-다하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[(E)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]의 ^1H - ^1H -COSY 상관관계(굵은선), gHMBC 상관관계(화살표) 및 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 2인 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]의 ^1H - ^1H -COSY 상관관계(굵은선), gHMBC 상관관계(화살표) 및 구조식을 나타낸 것이다.

도 3은 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 3인 메틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노에이트[methyl-(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoate]의 구조식을 나타낸 것이다.

도 4는 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 4인 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[16-acetyl-(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]의 ^1H - ^1H -COSY 상관관계(굵은선), gHMBC 상관관계(화살표) 및 구조식을 나타낸 것이다.

도 5는 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 1 내지 4의 뇌종양 줄기세포 생존율 감소 효과를 나타낸 결과이다.

도 6은 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 4인 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[16-acetyl-(9Z,16S)-16-hydroxy octadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]의 아포토시스에 의한 뇌종양 줄기세포 사멸 효과를 나타낸 결과이다.

도 7은 황칠나무잎으로부터 분리된 화합물 4인 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[16-acetyl-(9Z,16S)-16-hydroxy octadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]의 아포토시스에 의한 뇌종양 줄기세포 사멸 효과를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1. 황칠나무 잎으로부터 아세틸렌산 유도체 분리

[0042] 1. 추출 및 용매분획

[0043] 황칠나무 잎은 전남 보성군에서 건조하여 판매되고 있는 것을 사용하였고, 건조 황칠나무 1.5 kg를 분쇄한 다음 메탄올 15 L를 가하여 24시간 동안 상온 추출하였다. Whatman 여과지 No. 2로 여과한 후 얻어진 잔사에 메탄올 6 L를 가하여 동일 방법으로 다시 추출 및 여과하였다. 얻어진 추출 여액은 아스피레이터(CCA-1110, Eyela, Tokyo, Japan)가 장착된 진공농축기(A-3S, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 45℃에서 감압 농축하였다. 얻어진 농축액을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 수포화 부탄올로 각각 1 L씩 3회 반복하여 순차적으로 용매 분획하였다.

[0045] 2. 성분분리

[0046] 황칠나무 메탄올추출물을 용매분획하여 얻어진 에틸아세이트 획분 13.7796 g을 대상으로 octadecylsilane column (SNAP Ultra C18 120 g, Biotage, Uppsala, Sweden)이 연결된 medium pressure liquid

chromatography(MPLC; Isolera One, Biotage)를 이용하여 성분을 분리 및 정제하였다.

[0047] 에틸아세이트 획분을 ODS-MPLC에 주입한 다음, 물(H₂O)과 아세토니트릴(MeCN)의 혼합용매를 이용하여 용출·분획하였다. 즉 초기 30분 동안 H₂O/MeCN = 9:1 (v/v)로 유지한 다음 이후 130분까지 H₂O/MeCN = 0:10 (v/v)가 되도록 한 gradient 방법으로 용출하였다. 이때 유속은 50 mL/min으로, 그리고 성분은 210 nm와 254 nm에서 검출하였다. 에틸아세이트 획분의 ODS-MPLC를 통해 29 획분(D1~D29)로 분획하였다.

[0048] 에틸아세이트 획분의 ODS-MPLC에 의해 얻어진 D13, D19, 그리고 D21를 대상으로 ODS column(SNAP Ultra C18 30 g, Biotage)이 장착된 MPLC를 이용하여 성분을 재차 정제하였다. 이때 유속은 25 mL/min으로, 그리고 성분은 210 nm와 254 nm에서 검출하였다. 에틸아세이트 획분의 ODS-MPLC에 의해 얻어진 D13으로부터 D13a (화합물 1)를, D19로부터 D19a (화합물 2)와 D19a (화합물 3)를, 그리고 D21로부터 D21c (화합물 4)를 분리하였다.

[0050] 실시예 2. 화합물의 구조 분석

[0051] 1. 화합물 1

[0052] 실시예 1에서 얻은 화합물 1의 구조를 다음과 같이 해석하고, 그 해석 결과를 표 1 및 도 1에 나타내었다.

[0053] 화합물 1의 HR-ESI-MS (positive) spectrum에서 sodiated molecular ion 피크인 m/z 327.1569 [M+Na]⁺가 관찰되었고, 이 화합물의 분자식이 C₁₈H₂₄O₄ (분자량 304)임을 알 수 있었다. 그리고 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) 스펙트럼에서 5종의 olefinic double bond proton signal들[δ 6.33 (1H, dd, J = 16.0, 5.5 Hz, H-10), 5.77 (1H, ddd, J = 16.0, 1.5, 1.0 Hz, H-11), 5.93 (1H, ddd, J = 17.0, 10.0, 5.5 Hz, H-17), 5.41 (1H, dt, J = 17.0, 1.5 Hz, H-18a) 및 5.19 (1H, dt, J = 10.0, 1.5 Hz, H-18b)]와 2종의 oxygenated proton signal들[δ 4.92 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-16) 및 4.12 (1H, dt, J = 6.0, 5.5 Hz, H-9)]이 관찰되었다. 게다가 16H의 methylene proton singal들[δ 1.35-2.28 (H-2~H-8)]이 관찰되었다. 특히 ¹H-¹H COSY 스펙트라에서 프로톤-프로톤 상관관계를 나타낸 δ 6.33 (H-10)과 5.77 (H-11)의 coupling constant 값들(J)이 16.0 Hz로, 1종의 olefine double bond는 *trans*임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 1종의 카르보닐 carbon signal [δ 177.9 (C-1)]과 4종의 quaternary carbon signal들[δ 78.1 (C-12), 74.2 (C-13), 79.7 (C-14) 및 82.4 (C-15)]를 포함한 총 18종의 carbon signal들이 관찰되었다.

[0054] 이상의 ESI-MS 및 1D-NMR 결과로부터, 화합물 1은 2종의 hydroxyl group을 갖는 옥타데카디엔디이노익산(octadecadiendiynoic acid)로 시사되었다.

[0055] 화합물 1의 보다 정확한 구조해석을 위하여 gHSQC, ¹H-¹H-COSY, 그리고 gHMBC 등의 2D-NMR 분석을 행하였다. ¹H-¹H-COSY 결과에서 H-1-H-11 및 H-16-H-18 간의 일련의 프로톤-프로톤 상관관계들이 관찰되었다. 특히, gHMBC 스펙트럼에서 δ 1.59-1.62 (H-3)과 177.9 (C-1) 간의 상관관계가, 그리고 δ 6.33 (H-10)과 78.1 (C-12), δ 5.77 (H-11)과 74.2 (C-13), δ 4.92 (H-16)과 70.7 (C-14) 및 δ 5.93 (H-17)과 82.4 (C-15)간의 상관관계들이 관찰되었다.

[0056] 본 기기분석 결과들이 제시된 하기 표 1로부터 화합물 1은 (*E*)-9,16-디하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산[(*E*)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]로 결정되었다.

[0057] 하기 표 1은 (*E*)-9,6-디하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산(화합물 1)의 ¹H- (600 MHz) 및 ¹³C-NMR (150 MHz) 자료(CD₃OD)이다. 또한, (*E*)-9,6-디하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산의 ¹H-¹H-COSY 상관관계(굵은선), gHMBC 상관관계(화살표) 및 구조식은 도 1에 도시된 바와 같다.

표 1

Position	δ_H (Int., Multi., J in Hz)	δ_C
1	—	177.87
2	2.28 (2H, t, 7.5)	35.12
3	1.59-1.62 (2H, m)	26.21

4	1.35 (6H, m) ^a	30.30 ^a
5		30.46 ^a
6		30.60 ^a
7	1.40-1.43 (2H, m)	26.52
8	1.48-1.51 (2H, m)	37.93
9	4.12 (2H, dt, 6.0, 5.5)	72.56
10	6.33 (1H, dd, 16.0, 5.5)	152.00
11	5.77 (1H, ddd, 16.0, 1.5, 1.0)	108.49
12	–	78.14
13	–	74.18
14	–	70.72
15	–	82.35
16	4.92 (1H, d, 5.5)	64.12
17	5.93 (1H, ddd, 17.0 10.0, 5.5)	138.23
18a	5.41 (1H, dt, 17.0, 1.5)	116.73
18b	5.19 (1H, dt, 10.0, 1.5)	

^a C-4~C-6 시그널값은 서로 바뀔 수 있음.

2. 화합물 2

실시에 1에서 얻은 화합물 2의 구조를 다음과 같이 해석하고, 그 해석결과를 표 2 및 도 2에 나타내었다.

화합물 2의 HR-ESI-MS (positive) spectrum에서 분자량 피크인 m/z 311.1621 $[M+Na]^+$ 이 관찰되어, 이 화합물의 분자식은 $C_{18}H_{24}O_3$ (분자량 288)으로 해석되었다. 화합물 2의 1H - (500 MHz) 및 ^{13}C -NMR (125 MHz) 스펙트라는 화합물 1의 그것들과 유사하였으나, 1종의 oxygenated proton과 carbon 시그널 대신 1종의 methylene proton 시그널[δ 3.06 (2H, br. d, J = 7.0 Hz, H-11)]과 carbon 시그널[δ 18.23 (C-11)]이 관찰되었다. 또한, 화합물 2의 1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트라에서 관찰된 1종의 *cis*형 olefinic double bond proton 시그널[δ 5.51 (1H, dd, J = 10.5, 7.0 Hz, H-10) 및 5.37-5.40 (1H, ddd, J = 10.5, 7.0 Hz, H-11)]과 carbon 시그널[δ 133.92 (C-10) 및 123.65 (C-11)]은 화합물 1의 그것들과 차이를 나타냈다. 화합물 2의 1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트라는 선행 논문 (Kim et al., Food Bioscience, 100878, 2021)에서 보고된 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]의 그것들과 일치하였다.

본 기기분석 결과들이 제시된 하기 표 2로부터 화합물 2는 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산[(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid](화합물 2)로 결정되었다.

하기 표 2는 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-다이노익산(화합물 2)의 1H - (500 MHz) 및 ^{13}C -NMR (125 MHz) 자료 (CD_3OD)이다.

표 2

Position	δ_H (Int., Multi., J in Hz)	δ_C
1	–	177.87
2	2.28 (1H, t, 7.5)	35.12
3	1.59-1.62 (2H, m)	26.21
4	1.34 (8H, m)	30.39 ^a
5		30.34 ^a
6		30.39 ^a
7		30.41 ^a

8	1.34-1.41 (2H, m)	28.16
9	5.51 (1H, dt, 10.5, 7.0)	133.92
10	5.37-5.40 (1H, dd, 10.5, 7.0)	123.65
11	3.06 (1H, br. d, 7.0)	18.23
12	–	80.47
13	–	71.19
14	–	65.14
15	–	76.19
16	4.85 (1H, d, 5.5)	63.97
17	5.90 (1H, ddd, 17.0 10.0, 5.5)	138.35
18a	5.39 (1H, br. d, 17.0)	116.63
18b	5.18 (1H, dt, 10.5, 1.5)	
^a C-4~C-6 시그널값은 서로 바뀔 수 있음.		

[0067] 3. 화합물 3

[0068] 실시예 1에서 얻은 화합물 3의 구조를 다음과 같이 해석하고, 그 해석결과를 표 3 및 도 3에 나타내었다.

[0069] 화합물 3의 HR-ESI-MS (positive) spectrum에서 분자량 피크인 m/z 325.1778 $[M+Na]^+$ 이 관찰되어, 이 화합물의 분자식은 $C_{19}H_{26}O_3$ (분자량 302)으로 해석되었다. 화합물 3의 1H - (500 MHz) 및 ^{13}C -NMR (125 MHz) 스펙트라는 화합물 2의 그것들과 매우 유사하였으나, 1종의 methoxy proton 시그널[δ 3.65 (3H, s)]과 carbon 시그널(δ 51.12)이 추가적으로 관찰되었다. MS 및 1D-NMR 분석 결과로부터, 화합물 3은 화합물 2의 구조식인 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산에 methyl group이 결합된 화합물로 시사되었다.

[0070] 화합물 3의 보다 정확한 구조해석을 위하여 gHSQC, 1H - 1H -COSY, 그리고 gHMBC 등의 2D-NMR 분석을 행하였다. 그 결과, 화합물 3의 기본 골격 고조는 화합물 2일 동일한 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산으로 해석되었다. 특히, gHMBC 스펙트럼에서 δ 3.65 ($-OCH_3$)과 176.15 (C-1) 간의 상관관계가 관찰되었다.

[0071] 본 기기분석 결과들이 제시된 하기 표 3으로부터 화합물 3은 메틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노에이트[methyl-(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoate]로 결정되었다.

[0072] 하기 표 3은 메틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노에이트(화합물 3)의 1H - (600 MHz) 및 ^{13}C -NMR (150 MHz) 자료 (CD_3OD)이다. 또한, 메틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노에이트의 1H - 1H -COSY 상관관계 (굵은선), gHMBC 상관관계 (화살표) 및 구조식은 도3에 도시된 바와 같다.

표 3

[0073]

Position	δ_H (Int., Multi., J in Hz)	δ_C
1	-	176.15
2	2.32 (2H, t, 7.5)	34.94
3	1.59-1.62 (2H, m)	26.15
4	1.33 (6H, m)	30.21 ^a
5		30.29 ^a
6		30.35 ^a
7	1.36-1.40 (2H, m)	30.40
8	2.07 (2H, q, 7.0)	28.14
9	5.52 (1H, br dt, 10.5, 1.5)	133.92
10	5.36-5.40 (1H, dd, 10.5, 7.0)	123.70
11	3.06 (1H, br. d, 7.0)	18.22
12	-	80.46
13	-	71.17

14	-	65.13
15	-	76.22
16	4.84 (1H, d, 5.5)	63.99
17	5.90 (1H, ddd, 17.0 10.0, 5.5)	138.42
18a	5.39 (1H, br. d, 17.0)	116.59
18b	5.18 (1H, dt, 10.5, 1.5)	
-OCH ₃	3.65 (3H, s)	52.12
^a C-4~C-6 시그널값은 서로 바뀔 수 있음.		

4. 화합물 4

실시예 1에서 얻은 화합물 4의 구조를 다음과 같이 해석하고, 그 해석 결과를 표 4 및 도 4에 나타내었다.

화합물 4의 HR-ESI-MS (positive) spectrum으로부터 분자량 피크인 m/z 353.1726 $[M+Na]^+$ 가 관찰되었고, 이 화합물의 분자식이 C₂₀H₂₆O₄ (분자량 330) 임을 알 수 있었다. 그리고 화합물 4의 ¹H- (500 MHz) 및 ¹³C-NMR (125 MHz) 스펙트라는 화합물 2의 그것들과 매우 유사하였으나, acetyl group에 해당되는 proton [δ 2.07 (3H, s, H-2')]과 carbon signal들 [δ 171.11 (C-1')과 20.91 (C-2')]이 관찰되었다.

화합물 4의 보다 정확한 구조해석을 위하여 gHSQC, ¹H-¹H-COSY, 그리고 gHMBC 등의 2D-NMR 분석을 행하였다. 그 결과, 화합물 4의 기본 골격 고조는 화합물 2일 동일한 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산으로 해석되었다. 특히, gHMBC 스펙트럼에서 δ 5.88 (H-16)과 176.15 (C-1) 간의 상관관계가 관찰되었다.

본 기기분석 결과들이 제시된 하기 표 4로부터 화합물 4는 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산[16-acetyl-(9Z,16S)-16-hydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoic acid]로 결정되었다.

하기 표 4는 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산(화합물 4)의 ¹H- (600 MHz) 및 ¹³C-NMR (150 MHz) 자료 (CD₃OD)이다. 또한, 16-아세틸 (9Z,16S)-16-하이드록시옥타-10,17-디엔-12,14-디이노익산의 ¹H-¹H-COSY 상관관계 (굵은선), gHMBC 상관관계 (화살표) 및 구조식은 도 4에 도시된 바와 같다.

표 4

Position	δ_H (Int., Multi., J in Hz)	δ_C
1	-	177.74
2	2.28 (2H, t, 7.2)	35.06
3	1.58-1.63 (2H, m)	26.16
4	1.35 (8H, m)	30.29 ^a
5		30.34 ^a
6		30.20 ^a
7	1.37-1.42 (2H, m)	30.35
8	2.09 (2H, m)	28.16
9	5.33 (1H, dd, 11.4, 1.8)	134.14
10	5.53 (1H, dt, 11.4, 1.2)	123.30
11	3.07 (2H, br. d, 7.2)	18.24
12	-	81.56
13	-	72.64
14	-	64.73
15	-	70.02
16	5.88 (1H, d, 5.5)	65.82
17	5.91 (1H, ddd, 16.4, 10.0, 5.6)	133.92
18a	5.51 (1H, dd, 16.4, 1.2)	119.74
18b	5.32 (1H, dt, 9.6, 1.2)	

1'	-	171.11
2'	2.07 (3H, s)	20.91
^a C-4~C-6 시그널값은 서로 바뀔 수 있음.		

[0083] 실험예. 뇌종양 줄기세포의 세포사멸효과 확인

[0084] 1. 시료 및 세포 배양

[0085] 하기 실시예에서 사용한 뇌종양 줄기세포는 뇌종양 환자 유래의 뇌종양 줄기세포주인 GSC11(교모세포종, Joshua M. Shulman, Texas Children's Hospital), GSC23(교모세포종, Joshua M. Shulman, Texas Children's Hospital), 악성뇌종양세포주 U87MG(교모세포종, ATCC), 정상 성상세포 NHA (ATCC)을 사용하였다. 각 세포는 뇌종양 줄기세포 배양조건인 1% 항미생물제(apenicillin/streptomycin, Lonza, Basel, Switzerland), 0.04% B27(Invitrogen, MA, USA), 표피성장인자(epidermal growth factor, 20 ng/mL; R&D Systems, MN, USA) 및 섬유모세포성장인자(basic broblast growth factor, 20 ng/mL; R&D Systems)가 포함된 DMEM/F12 배지(Hyclone, GE healthcare life sciences, IL, USA) 배양액에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하여 사용하였다. U87세포는 10% Fetal Bovine Serum(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 사용하였고 NHA는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, Astrocyte 배지에서 배양하였다.

[0087] 2. 각 화합물의 뇌종양줄기세포의 세포사멸 평가

[0088] 본 발명자는 상기 황칠나무 잎으로 분리된 화합물 1 내지 4가 뇌종양 줄기세포에 대한 세포사멸 효과가 있는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0090] 1) Cell viability

[0091] 이를 위해, 뇌종양 줄기세포주인 GSC11, GSC23과 정상 성상세포인 NHA세포를 96 웰 플레이트(SPL, Korea)에 3,000 cells/well 이 되도록 각각 분주하고, 24시간 후, 본 발명의 화합물을 농도별(0, 6, 12, 25, 50 μM)로 처리한 다음, 2일 동안 배양하였다. 이후 Alamarblue(invitrogen, MA, USA) 분석시약을 웰 당 20 μL 씩 첨가하고 4시간 반응시킨 다음, 530(Ex) ~ 590(Em) nm 파장에서 SYNERGY HTX multi-mode reader (Bio-Tek Instruments Inc., VT, USA) 장치를 이용하여 형광도를 측정함으로써, 각 세포주별 화합물 처리 농도에 따른 세포사멸 정도를 측정하였다. 이때 측정 수치는 mean ± SEM으로 기재하였다.

[0093] 2) Annexin V/PI

[0094] Annexin V/PI 염색방법을 이용한 세포 사멸분석을 실시하여, 상기 화합물에 의한 뇌종양 줄기세포의 세포 사멸 촉진 효과를 확인하였다. 이를 위해 상기 실험에서 사용한 GSC11, GSC23, NHA 세포를 웰 당 800,000 cells/well 이 되도록 60 mm dish(SPL, Korea)에 각각 분주하였다. 그리고 24시간 배양 후, 상기 화합물을 10 μM의 농도로 처리하고, 24시간 배양하였다. 배양 후, PBS로 2회 세척과정을 거쳐준 다음, 0.25%의 트립신-EDTA를 이용해 세포를 탈착시켰다. 그리고 상기 세포를 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 침전시켰고, 이를 차가운 PBS로 1회 세척하였다. 그리고 1X annexin-binding buffer 100 μl(Thermo scientific, MA, USA)로 세포를 1.5 ml tube에서 부유시켰다. 그리고 상기세포에 염색제인 FITC annexin V 5 μl(Thermo scientific, MA, USA)와 PI working solution(100 μg/mL)(Thermo scientific, MA, USA)를 넣고 상온에서 15분간 반응시킨 후, 각 세포를 형광이용세포분류기를 이용하여 형광 분석을 실시했다. 이때 측정 수치는 mean ± SEM으로 기재하였다.

[0096] 3) Optical Diffraction Tomography(ODT)

[0097] Optical Diffraction Tomography(ODT)는 얇고 투명한 상태의 샘플을 통과하는 레이저 굴절률(refractive index)을 사용하는 정량 위상 이미징 기술이다. 이와 같은 이미징 기술을 이용해 살아 있는 세포와 사멸된 세포를 추가적인 염색과정 없이(label-free) 이미지화하기 위하여, 상기의 정량 위상 이미징 원리로 작동하는 홀로

토모그래피(holotomography, HT-2S)(Tomocube, Inc., Korea)를 사용하였다.

상기 화합물 50 μM 을 GSC11, GSC23에 처리하여 24시간 배양한 다음, 대조군과 함께 홀로토모그래피를 이용하여 이미징 하였다. 이미징은 5% CO_2 및 37 $^{\circ}\text{C}$ 조건을 유지하여 수행하였다.

도 5에 제시한 바와 같이 화합물 1 내지 화합물 3은 50 μM 의 농도까지 처리하여도 뇌종양 줄기세포주인 GSC11, GSC23, 그리고 U87MG의 생존율을 거의 감소시키지 못함을 확인할 수 있었다. 반면에, 화합물 4는 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

하기 [표 5]에 나타낸 바와 같이 25 μM 의 농도로 화합물 4를 처리하였을 때, 정상세포인 NHA의 생존율은 96 $\pm$ 1%이었으며 뇌종양 줄기세포주인 GSC11, GSC23, 그리고 U87MG의 생존율은 62 $\pm$ 1, 75 $\pm$ 2, 그리고 84 $\pm$ 1 %임을 알 수 있었다.

또한 50 μM 의 농도로 화합물 4를 처리하였을 때, 정상세포인 NHA의 생존율은 72 $\pm$ 1%이었으며 뇌종양 줄기세포주인 GSC11, GSC23, 그리고 U87MG의 생존율은 40 $\pm$ 1, 60 $\pm$ 3, 그리고 38 $\pm$ 3 %임을 알 수 있었다.

표 5

세포	화합물 4 처리 후 세포 생존율(%)			
	6 μM	12 μM	25 μM	50 μM
NHA	97 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1	72 $\pm$ 1
GSC11	87 $\pm$ 3	75 $\pm$ 1	62 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1
GSC23	89 $\pm$ 3	85 $\pm$ 1	75 $\pm$ 2	60 $\pm$ 3
U87MG	95 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2	84 $\pm$ 1	38 $\pm$ 3

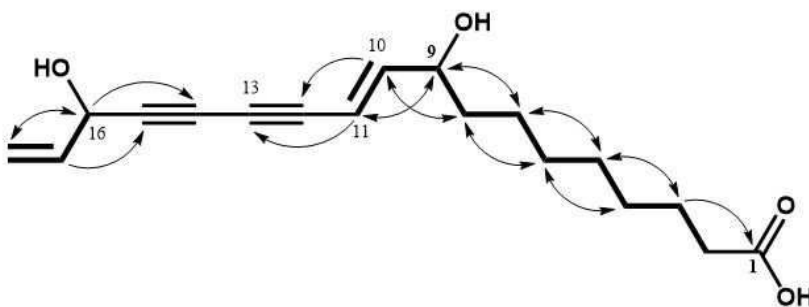
또한, 도 6 및 도 7에서 확인할 수 있듯이 뇌종양 줄기세포인 GSC11과 GSC23에 10 μM 의 농도로 화합물 4를 처리하였을 때, 이 화합물 뇌종양 줄기세포주들을 아포토시스에 의한 사멸 효과가 일어나는 것임을 Annexin V/PI 염색과 홀로토모그래피 분석을 통해 확인할 수 있었다.

따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 화합물 4는 뇌종양 줄기세포의 세포사멸능이 있는 것을 확인할 수 있었고, 상기 화합물을 뇌종양 줄기세포를 표적하는 새로운 뇌종양 치료제로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

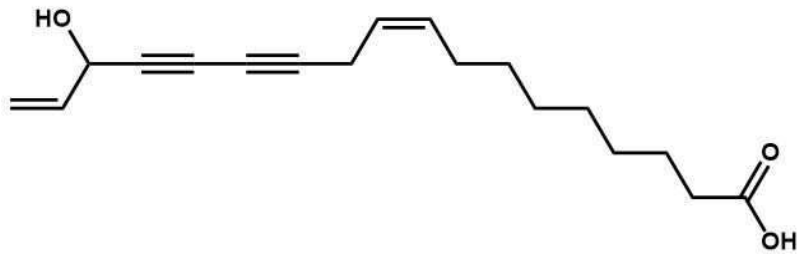
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

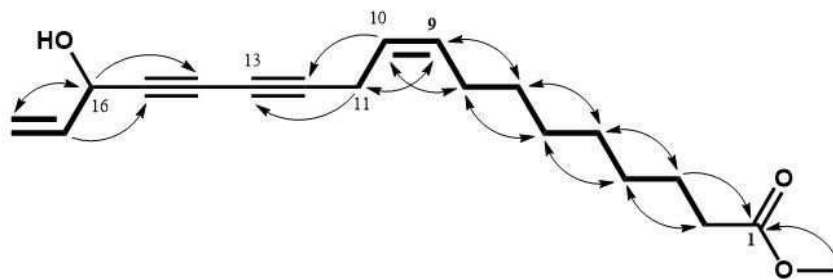
도면1



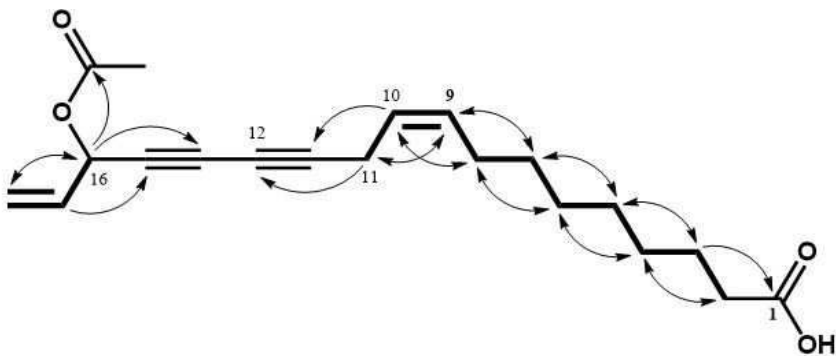
도면2



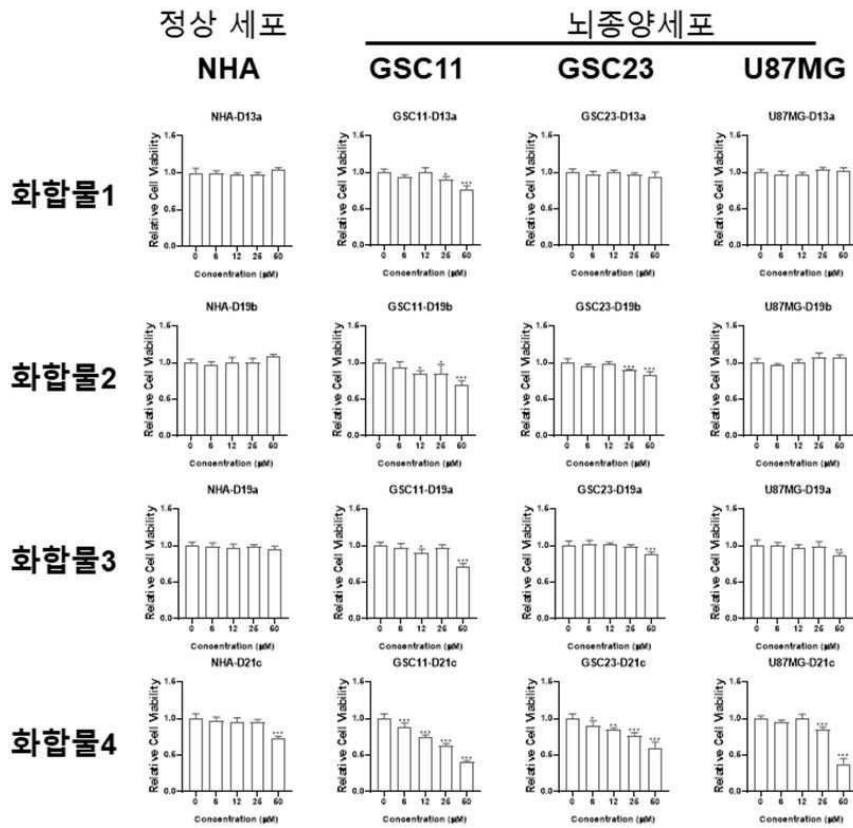
도면3



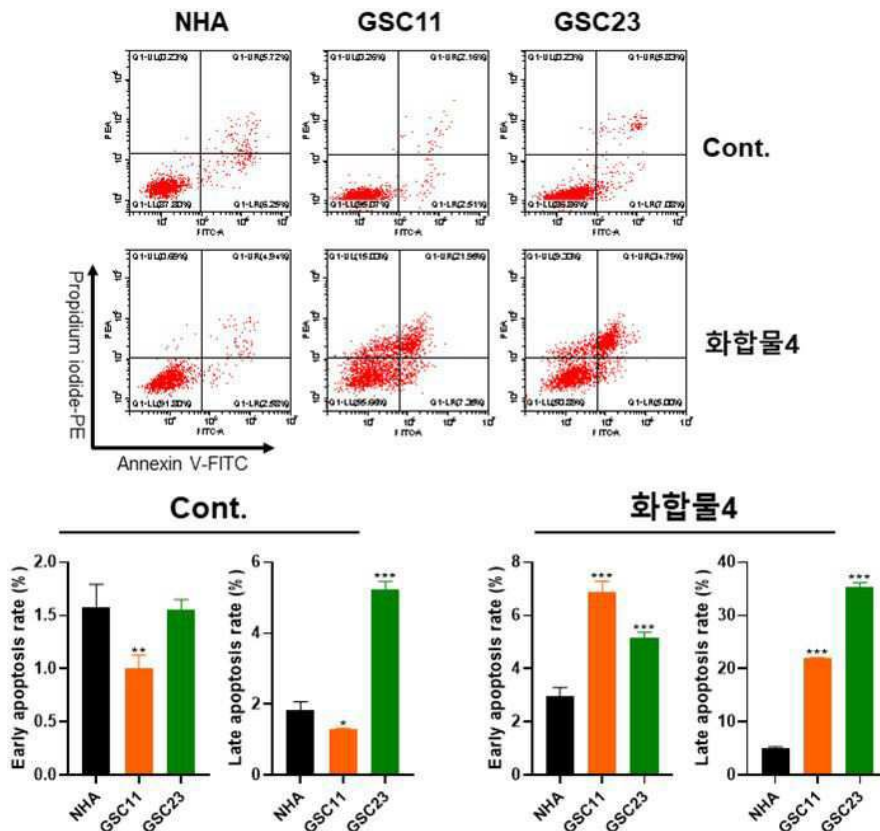
도면4



도면5



도면6



도면7

