

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0131776

(43) 공개일자 2019년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 31/215* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61K 31/4188* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 31/215* (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0056599

(22) 출원일자 2018년05월17일

심사청구일자 2018년05월17일

(71) 출원인

숙명여자대학교산학협력단

서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

류재하

서울특별시 양천구 목동동로 430, 601동 402호

이화

서울특별시 은평구 서오릉로 17길 21-15 리치빌 201호

강석구

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동 601호

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 13 항

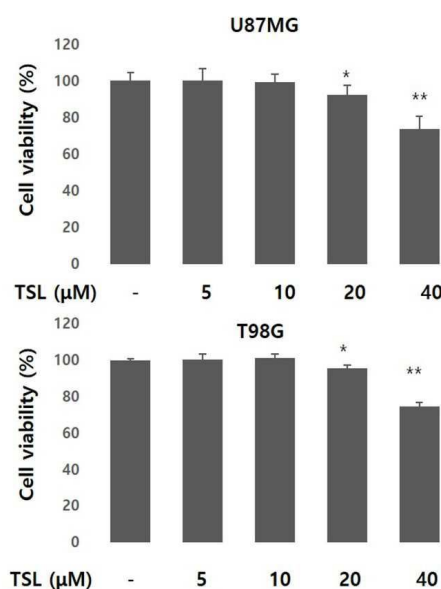
(54) 발명의 명칭 관동화 추출물로부터 분리된 투실라곤 화합물을 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 관동화 추출물로부터 분리된 투실라곤 화합물을 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 화합물을 대상으로 투실라곤의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 생존력에 미치는 영향(실험예 1); 인간 교모세포종 세포주인 U87MG 와 T98G 증식에 미치는 영향(실험예 2); 세포 에너지원인

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



ATP 생성 저해 효능 평가(실험예 3); 세포내 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향(실험예 4); 종양구 형성능에 미치는 영향(실험예 5); 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향(실험예 6); 투실라곤의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향(실험예 7) 실험에서 본 발명의 시료는 특히, 현재 유일하게 뇌암 치료제로 사용중인 테모달 ((Temozolomide, TMZ,) 의 문제점을 해결하고 보다 강한 항암활성 및 내성 극복의 중심 기전으로 FoxM1 저해 기전을 발견하여 내성 문제를 극복할 수 있음을 확인하여 기존 테모달과 같은 항암제를 대체하는 항암제인 동시에 기존 항암제와 병용투여함으로써 내성을 극복할 수 있음을 확인함으로써, 상기 조성물을 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 건강보조식품 등으로 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

**A61K 31/4188** (2013.01)

**A61K 45/06** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/308** (2013.01)

**A61K 2300/00** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0030074

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터 (MRC)

연구과제명 세포운명조절

기 여 율 1/2

주관기관 숙명여자대학교

연구기간 2011.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C2586

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한국보건산업진흥원 - 질병중심중개연구 (중점연구)

연구과제명 에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 개발

기 여 율 1/4

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.12.21 ~ 2020.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M2A2A7A01071036

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원자력연구개발사업 - 방사선기술개발사업

연구과제명 방사선치료 저항성 극복을 위한 암 생체에너지 대사 조절 병용 교모세포종 치료 기술 개발

기 여 율 1/4

주관기관 연세대학교 산학협력단

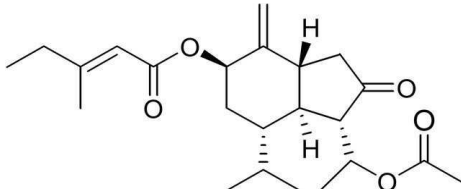
연구기간 2017.09.21 ~ 2020.02.29

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

투스실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3'-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone, I), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물:



(I)

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 암질환은 뇌암, 백혈병, 림프종, 골수종, 골수이형성증후군, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종, 위장관 기질성 종양(GIST, 기스트), 원발부위불명암, 중피종, 흑색종, 신경내분비 종양, 피부암 또는 혈액암임을 특징으로 하는 약학조성물.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 암질환은 뇌암, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종 또는 혈액암임을 특징으로 하는 약학조성물.

#### 청구항 4

투스실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3'-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염과 기존 항암제와의 조합을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 기존 항암제는 테모달((Temozolomide, TMZ,) 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 메토트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 독소루비신(Doxorubicin), 무스틴(Mustine), 비크리스틴(vincristine), 프로카바진(procarbazine), 프레드니솔론(prednisolone), 블레오마이신(bleomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 다카르바진(dacarbazine), 에토포시드 (etoposide), 시스플라틴(cisplatin), 에피루비신(Epirubicin), 시스플라틴(cisplatin), 카페시타빈(capecitabine), 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin) 임을 특징으로 하는 약학조성물.

#### 청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 암질환은 뇌암, 백혈병, 림프종, 골수종, 골수이형성증후군, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종, 위장관 기질성 종양(GIST, 기스트), 원발부위불명암, 중피종, 흑색종, 신경내분비 종양, 피부암 또는 혈액암임을 특징으로 하는 약학조성물.

## 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 암질환은 뇌암, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종 또는 혈액암임을 특징으로 하는 약학조성물.

## 청구항 8

투스실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

## 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 암질환은 뇌암, 백혈병, 림프종, 골수종, 골수이형성증후군, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종, 위장관 기질성 종양(GIST, 기스트), 원발부위불명암, 증피종, 흑색종, 신경내분비 종양, 피부암 또는 혈액암임을 특징으로 하는 약학조성물.

## 청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 암질환은 뇌암, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종 또는 혈액암임을 특징으로 하는 약학조성물. 제 10항에 있어서, 상기 건강기능식품은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 티백제, 침출차, 또는 건강 음료 형태인 건강기능식품.

## 청구항 11

투스실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 개선용 건강보조식품.

## 청구항 12

투스실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 개선용 식품첨가제.

## 청구항 13

투스실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 항암 보조 치료제.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 관동화 추출물로부터 분리된 투스실라곤 화합물을 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] [문헌 1] *J Neurooncol.* **2012**, 108, 11-27

[0003] [문헌 2] *J Neuro oncol* **2013**, 112, 277-283

[0004] [문헌 3] *J Clin Neurosci* **2012**, 19, 1530-1534

- [0005] [문헌 4] *Carcinogenesis* **1995**, 13, 70-80
- [0006] [문헌 5] *Nat Cell Biol* **2005**, 7, 126-136
- [0007] [문헌 6] *Mol Cell Biol* **2013**, 33, 227-236
- [0008] [문헌 7] *J Transl Med* **2013**, 11, 204
- [0009] [문헌 8] *PLoS One* **2013**, 8
- [0010] [문헌 9] *Cancer Lett* **2011**, 306, 214-222
- [0011] [문헌 10] *Cancer Res* **2006**, 66, 3593-3602
- [0012] [문헌 11] *Cancer Res* **2006**, 66, 3593-3602;
- [0013] [문헌 12] *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2014**, 18, 205-211
- [0014] [문헌 13] *Clin Cancer Res.* 18, **2012**, 5961-5971
- [0015] [문헌 14] *J Neurooncol* **2015**, 121, 469-477
- [0016] [문헌 15] *Eur J Pharmacol* **2015**, **765**, 346-354
- [0017] [문헌 16] *Hinyokika Kiyo* **1996**, 42, 639-643
- [0018] [문헌 17] *ur J Pharmacol* **1987**, 141, 269-281
- [0019] [문헌 18] *Gen Pharmacol* **1988**, 19, 261-263
- [0020] [문헌 19] *J Ethnopharmacol* **2002**, 82, 51-53
- [0021] [문헌 20] *Biol Pharm Bull* **2005**, 28, 455-460
- [0022] [문헌 21] *Arch Pharm Res* **2008**, 31, 645-652
- [0023] [문헌 22] *Biochem and Biophys Res Commun* **2014**, 443, 132-137
- [0024] [문헌 23] 한국특허 제 10-0697235호
- [0025] [문헌 24] 한국특허 공개 제 10-2015-0033978호
- [0026] [문헌 25] 한국특허 공개 제 10-2012-0094174호
- [0027] [문헌 26] 한국특허 공개 제 10-2012-0111764호
- [0028] [문헌 27] *J Biomed Biotechnol.* **2012**, 2012, 987495
- [0029] [문헌 28] *Disease Models &Mechanisms.* **2012**, 5, 342-350
- [0030] [문헌 29] *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 12424-12435
- [0031] [문헌 30] *Oncotarget.* **2016**, 7, 65643-65659

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0033] 본 발명은 관동화 추출물로부터 분리된 투실라곤 화합물을 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 다형성아교모세포종 (glioblastoma multiforme, GBM)은 가장 일반적이고 심한 뇌종양 중 하나이다 (*J Neurooncol.* **2012**, 108, 11-27). 현재의 표준치료법은 일차수술에서 최대한 종양을 제거한 후 방사선치료와 테모달을 이용한 약물치료를 병행진행 하는 것이다 (*J Neuro oncol* **2013**, 112, 277-283). 하지만 진단 후 5년 생존율은 3% 미만이다 (*J Clin Neurosci* **2012**, 19, 1530-1534). 테모달 (Temozolomide, TMZ)의 치료기전은 DNA를 알킬화하여 암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것이고, 뇌종양 표준요법에 사용되고 있는 약물이지만 특

정 뇌종양세포는 테모달에 의한 DNA손상을 회복할 수 있어 치료효과가 제한적이다.

[0035] 다형성아교모세포종의 테모달에 대한 내성은 DNA복구유전자인 O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)와 관련되어 있다고 알려져 있다 (*Mol (Carcinogenesis)* **1995**, 13, 70-80). 또한, forkhead box M1 (FoxM1)는 전사인자로서 세포주기 및 세포사멸 관련한 유전자들의 발현을 유도한다 (*Nat Cell Biol* **2005**, 7, 126-136; *Mol Cell Biol* **2013**, 33, 227-236). 이런 FoxM1은 다형성아교모세포종을 포함한 다양한 종양세포에서 과발현되며 빠른 세포증식을 유도한다 (*J Transl Med* **2013**, 11, 204; *PLoS One* **2013**, 8; *Cancer Lett* **2011**, 306, 214-222; *Cancer Res* **2006**, 66, 3593-3602). 따라서 FoxM1은 암예방 또는 치료에 새로운 타겟으로 주목 받고 있다. 선행 연구결과에 의하면 FoxM1에 감소에 따라 신경교종세포의 성장도 억제되며 (*Cancer Res* **2006**, 66, 3593-3602; *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2014**, 18, 205-211), 재발한 다형성아교모세포종의 FoxM1을 억제함으로써 암세포의 테모달내성을 감소시켰다는 보고가 있다. 또한 FoxM1은 DNA 복구 유전자인 Rad51 발현을 조절함으로써 테모달 내성을 유발하기도 한다 (*Clin Cancer Res* **2012**, 18, 5961-5971). 이러한 알려진 기전에 근거하여 수종의 FoxM1 억제 물질들의 교모세포종에 대한 치료효과를 확인한 바 있다 (*J Neurooncol* **2015**, 121, 469-477; *Eur J Pharmacol* **2015**, **765**, 346-354).

[0036] 관동화 (*Tussilago farfara* L.)는 국화과에 속하는 다년생 초본이다. 한방에서는 관동화의 꽃봉오리를 약제로 사용해왔으며, 폐의 기능을 튼튼하게 하고 기침과 가래를 멎게 하는 효능이 있어 기관지염이나 천식의 치료를 위해 사용되었다. 관동화추출물은 아라키돈산의 대사를 억제하고(*Hinyokika Kyo* **1996**, 42, 639-643), 혈소판 활성인자 수용체 (platelet activating factor receptor)를 억제(*Eur J Pharmacol* **1987**, 141, 269-281)한다고 보고되었다. 심혈관계 및 호흡기계의 기능을 증진시킨다고도 알려졌다(*Gen Pharmacol* **1988**, 19, 261-263). 또한, 항미생물효과(*J Ethnopharmacol* **2002**, 82, 51-53), 항산화 활성에 의한 신경보호효과(*Biol Pharm Bull* **2005**, 28, 455-460) 등의 연구 결과도 있다. 투실라곤 (tussilagone)은 관동화에서 분리된 sesquiterpene의 일종이다. 본 발명자들은 투실라곤이 리포다당류 (lipopolysaccharide) 자극한 소교세포 (BV2세포)에서 일산화질소 (nitric oxide) 합성억제를 통한 항염증효과와(*Arch Pharm Res* **2008**, 31, 645-652) Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달 경로를 억제하여 대장암세포의 증식을 막을 수 있음을 보고한 바 있다(*Biochem and Biophys Res Commun* **2014**, 443, 132-137).

[0038] 선행발명으로는 관동화 추출물 또는 투실라곤 함유 비만 또는 당뇨치료제 용도 발명 (한국특허 제 10-0697235호); (2) 투실라곤 함유 수지상세포 성숙화 또는 활성화 억제용 조성물 또는 면역질환 치료제 용도 발명 (한국특허 공개 제 10-2015-0033978호); (3) 관동화 추출물 함유 뇌암 치료제 용도 발명 (한국특허 공개 제 10-2012-0094174호); (4) 관동화 추출물 함유 폐암 치료제 용도 발명 (한국특허 공개 제 10-2012-0111764호) 등이 알려진 바 있다.

[0041] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 관동화 추출물로부터 분리된 투실라곤 (tussilagone) 화합물을 함유하는 암 질환의 치료 효과에 대하여 개시되거나 교시된 바가 없다.

[0042] 특히, 현재 유일하게 뇌암 치료제로 사용중인 테모달(Temozolomide, TMZ,)의 경우, 함암활성이 약하고 내성을 유발한다는 문제점을 안고 있어 내성세포에 대해서도 우수한 항암 활성을 나타내고, 그 내성과 관여하는 지표들을 억제하는 기전을 가진 항암 화합물을 개발하여야 하는 시급한 과제를 안고 있다.

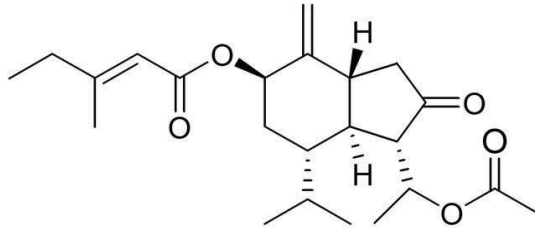
[0044] 그러나, 본원 발명자들은 보다 항암 치료 효과면에서 보다 치료 활성이 강력한 천연물 신약 또는 건강기능식품 소재로서의 개발 가능성을 높이하고자 기존에 알려진 관동화 추출물보다 강력한 치료효과를 나타내는 화합물을 분리하고자, 지속적으로 관동화 추출물을 대상으로 분획 및 정제과정을 통하여 투실라곤 (tussilagone) 화합물을 분리하였으며, 이를 대상으로 투실라곤의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 생존력에 미치는 영향(실험예 1); 인간 교모세포종 세포주인 U87MG 와 T98G 증식에 미치는 영향(실험예 2); 세포 에너지원인 ATP 생성 저해 효능 평가(실험예 3);세포내 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향(실험예 4); 종양구 형성능에 미치는 영향(실험예 5); 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향(실험예 6); 투실라곤의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향(실험예 7) 실험에서 본 발명의 시료는 특히, 현재 유일하게 뇌암 치료제로 사용중인 테모달(Temozolomide, TMZ,)의 문제점을 해결하고 보다 강한 항암활성 및 내성 극복의 중심 기전으로 FoxM1 저해 기

전을 발견하여 내성 문제를 극복할 수 있음을 확인하여 기존 테모달과 같은 항암제를 대체하는 항암제인 동시에 기존 항암제와 병용투여함으로써 내성을 극복할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

## 과제의 해결 수단

본 발명의 과제는 하기 구조식 (I)의 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

## 화학식 1



(I)

또한 본 발명은 하기 구조식 (I)의 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

본 발명의 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

본 발명의 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수산화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동일한 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산 및 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비 용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 하이드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르테레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포 네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조 방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.



- [0056] 또한, 본 발명의 화합물은 비대칭 중심을 가지므로 상이한 거울상 이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 본 발명의 화합물의 모든 광학 이성질체 및 R 또는 S형 입체 이성질체 및 이들의 혼합물도 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 한다. 본 발명은 라세미체, 하나 이상의 거울상 이성질체 형태, 하나 이상의 부분 입체 이성질체 형태 또는 이들의 혼합물의 용도를 포함하며, 당업계에서 알려진 이성질체의 분리 방법이나 제조과정을 포함한다.
- [0057] 본 발명의 화합물들은 당업계에 잘 알려진 실리카겔 컬럼, 및 재결정법을 이용한 정제과정을 반복수행하는 분리 방법 및 정제방법으로부터 분리하는 방법 또는 화학적으로 합성하여 제조하거나, 상업적으로 구입가능하다.
- [0059] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0060] 본 발명의 화합물들은 하기와 같은 제조방법으로 수득될 수 있다.
- [0061] 예를 들어, 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0062] 건조된 관동화 (*Tussilago farfara* L.)을 세척 및 세절 후 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 10~100% 메탄올을 수회 섞은 다음에 10 내지 150℃, 바람직하게는 20 내지 70 의 온도에서 30분 내지 72시간, 바람직하게는 1시간 내지 48시간 초음파 추출법, 열수 추출법, 상온 추출법 또는 환류추출법, 바람직하게는 냉침추출법을 약 1 내지 20회, 바람직하게는 2 내지 10회 반복 수행하여 얻은 추출액을 여과, 감압 농축, 및 건조하여 본 발명의 조추출물을 얻을 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명의 화합물들은 상기에서 얻은 조추출물을 역상크로마토그래피법, 플래쉬 컬럼크로마토그래피, RP C18 컬럼크로마토그래피 또는 실리카겔 오픈 컬럼크로마토그래피, Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피, 세파텍스 컬럼 크로마토그래피법 등의 하나 이상의 정제방법을 선택적으로 수회 반복 수행하여 본 발명의 화합물을 분리 가능하다.
- [0064] 본 발명자들은 상기 제조방법으로 수득되는 화합물들을 대상으로 투실라곤의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 생존력에 미치는 영향(실험예 1); 인간 교모세포종 세포주인 U87MG 와 T98G 증식에 미치는 영향(실험예 2); 세포 에너지원인 ATP 생성 저해 효능 평가(실험예 3);세포내 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향(실험예 4); 종양구 형성능에 미치는 영향(실험예 5); 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향(실험예 6); 투실라곤의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향(실험예 7) 실험에서 본 발명의 시료는 특히, 현재 유일하게 뇌암 치료제로 사용중인 테모달((Temozolomide, TMZ,)의 문제점을 해결하고 보다 강한 항암활성 및 내성 극복의 중심 기전으로 FoxM1 저해 기전을 발견하여 내성 문제를 극복할 수 있음을 확인하여 기존 테모달과 같은 항암제를 대체하는 항암제인 동시에 기존 항암제와 병용투여함으로써 내성을 극복할 수 있음을 확인하였다.
- [0066] 본원에서 정의되는 암질환는 뇌암, 백혈병, 림프종, 골수종, 골수이형성증후군, 유방암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암(=결장암), 직장암, 항문암, 간세포간암, 담관암, 담낭암, 췌장암, 폐암(비소세포성 폐암, 소세포성 폐암), 흉선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁경부암, 육종, 위장관 기질성 종양(GIST, 기스트), 원발부위불명암, 중피종, 흑색종, 신경내분비 종양, 피부암, 혈액암 등을 포함한다.
- [0068] 또한 본 발명은 투실라곤(tussilagone; 14-Acetoxy-7β-[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암 보조 치료제를 제공한다.
- [0069] 또한, 본 발명은 투실라곤(tussilagone; 14-Acetoxy-7β-[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염과 기존 항암제와의 조합을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물, 항암치료 보조제 또는 건강기능식품을 제공한다.
- [0070] 본원에서 정의되는 기존 항암제는 테모달((Temozolomide, TMZ,) 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 메토틱렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 독소루비신(Doxorubicin), 무스틴(Mustine), 비크리스틴(vincristine), 프로카바진(procarbazine), 프레드니솔론(prednisolone), 블레오마이신(bleomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 다카르바진(dacarbazine), 에토포시드(etoposide), 시스플라틴(cisplatin), 에피루비



신(Epirubicin), 시스플라틴(cisplatin), 카페시타빈(capecitabine), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 등을 포함한다.

- [0073] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득된 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 또는 건강기능식품을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.01 내지 99% 중량으로 포함한다.
- [0076] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 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 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 갈슘 포스페이트, 갈슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 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 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 먼, 전분, 갈슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 화합물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 조성물은 마우스, 생마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 및 직장, 또는 정맥 등의 방법을 통하여 투여할 수 있다.
- [0082] 또한, 본 발명은 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.
- [0083] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0084] 본 발명의 암 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.01 내지

95%, 바람직하게는 1 내지 80% 중량백분율로 포함한다.

- [0086] 더욱이, 본 발명의 조성물은 암 질환의 치료 및 개선을 목적으로 한 건강식품일 수 있다.
- [0087] 또한, 암 질환의 예방 및 개선을 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 약학 투여형태 또는 티백제, 침출차, 건강 음료 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.
- [0088] 또한, 본 발명은 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 개선용 건강보조식품을 제공한다.
- [0089] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1~20 g, 바람직하게는 약 5~12 g이다.
- [0090] 또한, 본 발명은 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone), 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 개선용 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.
- [0091] 본 발명에 따른 추출물을 식품첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0092] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0093] 또한, 본 발명의 화합물은 목적 질환이 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml을 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

## 발명의 효과

- [0095] 본 발명의 화합물을 대상으로 투실라곤의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 생존력에 미치는 영향(실험예 1); 인간 교모세포종 세포주인 U87MG 와 T98G 증식에 미치는 영향(실험예 2); 세포 에너지원인 ATP 생성 저해 효능 평가(실험예 3);세포내 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향(실험예 4); 종양구 형성능에 미치는 영향(실험예 5); 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향(실험예 6); 투실라곤의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향(실험예 7) 실험에서 본 발명의 시료는 특히, 현재 유일하게 뇌암 치료제로 사용중인 테모달 ((Temozolomide, TMZ,) 의 문제점을 해결하고 보다 강한 항암활성 및 내성 극복의 중심 기전으로 FoxM1 저해 기전을 발견하여 내성 문제를 극복할 수 있음을 확인하여 기존 테모달과 같은 항암제를 대체하는 항암제인 동시에 기존 항암제와 병용투여함으로써 내성을 극복할 수 있음을 확인함으로써, 상기 조성물을 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 건강보조식품 등으로 유용함을 확인하였다.

## 도면의 간단한 설명

- [0097] 도 1은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 세포생존율(cell viability) 실험 결과이며 (U87MG 세포주 및 T98G 세포주에서의 결과를 각각 나타냄);
- 도 2은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 세포 계수 (cell count) 실험 결과이며 (U87MG 세포주 및 T98G 세포주에서의 결과를 각각 나타냄);
- 도 3은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 세포생존율(cell viability) 실험 결과이며 (U87MG 세포주 및 T98G 세포주에서의 결과를 각각 나타냄);
- 도 4은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 ATP 생성 저해 효능 실험결과를 나타낸 도이며;.
- 도 5은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 세포내 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향 실험결과를 나타낸 도이며;.
- 도 6은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 종양구 형성능에 미치는 영향 실험결과를 나타낸 도이며;.
- 도 7은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향 실험결과를 나타낸 도이며( 도 7 A 는 종양구의 3차원 침윤이 억제된 도를 나타내고, 도 7 B는  $\beta$ -catenin, N-cadherin 및 Zeb1과 같은 상피간엽 이행 (EMT) 관련 마커의 발현 수준을 측정한 결과임);.
- 도 8은 본 발명의 투실라곤 (TSL) 시료의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향 실험결과를 나타낸 도이다 (도 8 A는 U87MG 와 T98G 두 세포주에 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현양을 비교분석한 결과이고, 도 8 B, C 은 투실라곤의 FoxM1, Rad51 및 MGMT 단백질 억제활성을 분석한 결과임).

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 이하, 본 발명을 하기 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0099] 단, 하기 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

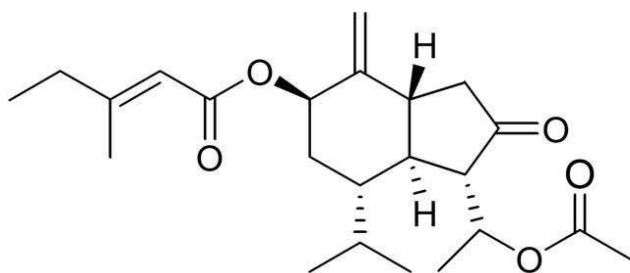
### [0102] 실시예 1. 관동화(*Tussilago farfara*) 추출물 제조 및 투실라곤 (tussilagone) 분리

- [0103] 관동화는 서울경동한약시장(서울 한국, 숙명여자대학 약초표본실 보존 표본 SPH 1702) 에서 구입하였다. 건조된 관동화 6 kg에 메탄올 5 L 로 가열 환류 방식으로 2시간씩 3회 반복하여 추출후 여과하고 감압 조건하에서 농축하였다. 투실라곤을 포함한 분획을 얻기 위하여 상기 추출물 1.25 Kg에 정제수 800 mL 를 가하여 현탁하고 이 현탁물에 에틸아세테이트(ethylacetate) 800 mL 을 가하여 분획하고 감압농축하여 에틸아세테이트가용 분획물 150g 을 얻었다. 투실라곤을 분리하기 위하여 상기 분획물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피법을 n-헥산(Hexane)/에틸아세테이트(ethylacetate) 경사법 조건 (gradient system, 70:1  $\rightarrow$  1:1)으로 수행하여 15개의 분획물을 (F1 ~ F15) 얻고, 이중 F-11을 대상으로 추가로 역상 컬럼크로마토그래피법(reverse phase column chromatography)을 메탄올 경사법 조건(gradient system, 50 $\rightarrow$ 90%)으로 수행하고, 이중 분획물 F-11-6을 대상으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피법을 n-헥산(Hexane)/에틸아세테이트(ethylacetate) (10% 이소프로판올 포함) 경사법 조건 (gradient system, 30:1 $\rightarrow$ 1:1)으로 수행하고, 이중 F-11-6-2 대상으로 세미-프레파라티브(semi-preparative) HPLC ( $\mu$ -Bondapak C18 컬럼, 20x300 cm, 90% 메탄올, 8 mL/min, 254 nm)을 수행하여 하기 물성치를 갖는 투실라곤을 약 146 mg을 수득하였고 이 물성치를 기초로 기존문헌에 기재된 물성치와 비교하여 최종 동정하였다 (Arch. Pharm. Res. 31, 645-652, 2008)

### [0105] 투실라곤(tussilagone, I) 물성치

- [0106] : 투실라곤 (tussilagone; 14-Acetoxy-7 $\beta$ -[3 '-ethyl-*cis*-crotonoyloxy]-notonipetranone)

[0107] [화합식 1]



(I)

[0108]

[0110] :성상: 무색의 오일상;

[0111]  $[\alpha]_D^{25} +55.81^\circ (c\ 0.22, 31.8\ ^\circ\text{C}, \text{CHCl}_3)$ ;

[0112]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  5.56 (1H, t,  $J=3.0$ , H-7 $\alpha$ ), 5.61 (1H, d,  $J=1.2$ , H-2'), 5.13 (1H, s, H-10), 5.09 (1H, q,  $J=3.2$ , H-14), 4.77 (1H, br s, H-10), 2.57 (1H, m, H-9 $\beta$ ), 2.47 (1H, dd,  $J=3.2$ , 11.0, H-3 $\beta$ ), 2.37 (1H, dd,  $J=4.8$ , 16.4, H-1 $\beta$ ), 2.28 (1H, m, H-11), 2.16 (2H, m, H-4'), 2.13 (3H, d,  $J=1.2$ , H-6'), 2.08 (3H, s, 14- $\text{OCOCH}_3$ ), 2.08 (1H, m, H-6 $\beta$ ), 2.04 (1H, m, H-1 $\alpha$ ), 1.96 (1H, m, H-5 $\beta$ ), 1.45 (1H, m, H-6 $\alpha$ ), 1.44 (1H, m, H-4 $\alpha$ ), 1.21 (3H, d,  $J=6.8$ , 15- $\text{CH}_3$ ), 1.06 (3H, t,  $J=7.5$ , 5'- $\text{CH}_3$ ), 0.97 (3H, d,  $J=6.8$ , 12- $\text{CH}_3$ ), 0.77 (3H, d,  $J=6.8$ , 13- $\text{CH}_3$ );

[0113]  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  214.8 (C-2), 171.0 (14- $\text{OCOCH}_3$ ), 166.0 (C-1'), 162.1 (C-3'), 146.2 (C-8), 114.8 (C-2'), 110.3 (C-10), 73.2 (C-7), 69.8 (C-14), 57.5 (C-3), 49.4 (C-4), 44.2 (C-5), 42.9 (C-1), 42.5 (C-9), 34.1 (C-4'), 31.5 (C-6), 27.9 (C-11), 21.9 (C-12), 21.7 (C-6'), 19.2 (14- $\text{OCOCH}_3$ ), 15.7 (C-13), 15.5 (C-15), 12.2 (C-5');

[0114]  $\text{EIMS } m/z\ 390\ [\text{M}]^+$

# [0117] 실험예 1. 세포배양 및 투실라곤의 세포 생존력에 미치는 영향

[0118] 상기 실시예에서 분리한 투실라곤의 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)의 생존력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기존 문헌에서 많이 사용하는 두 인간 교모세포종 세포주를 선정하였다. 그중 U87MG 세포주(ATCC, HTB-14)는 기존 뇌종양 치료제인 테모달 (Temozolomide) 민감성 세포주이고, T98G 세포주(ATCC, CRL-1690)는 테모달 내성을 가진 세포주이다 (*J Biomed Biotechnol.* **2012**, 2012, 987495). 이 두 세포주에 대한 투실라곤의 세포생존력에 미치는 영향을 살펴보았다.

## [0120] 1-1. 실험과정

[0121] U87MG 세포주는 10% 우태아 혈청이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)으로, T98G 세포주는 10% 우태아 혈청이 포함된 Minimum essential medium (MEM)으로 37 $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건의 세포배양기에서 배양하였다.

[0122] 세포의 생존력을 분석하기 위해서, 두 세포주를  $5 \times 10^3$  cells/100  $\mu\text{L}$  로 96 well에 접종하고 투실라곤(tussilagone, TSL)을 농도별(0, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{M}$ )로 24시간 동안 처리한 후 세포활성을 문헌에 기재된 MTT 법으로 평가하였다 (*Disease Models & Mechanisms.* **2012**, 5, 342-350). 또한, 투실라곤 20, 40  $\mu\text{M}$ 을 처리 24

시간 후에 세포생존율을 트립판 블루(trypan blue) 염색법으로 확인하였다.

## 1-2. 실험 결과 (도 1 내지 도 2)

본 실험 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, U87MG 과 T98G에 투실라곤을 24시간 처리한 경우, 40  $\mu$ M의 농도에서도 세포 활성이 70% 이상으로 확인하였다. 또한, 도 2에서 나타낸 바와 같이, 투실라곤 20  $\mu$ M 과 40  $\mu$ M 농도로 처리할 경우 대조군에 비해서 죽은 세포가 차지한 비율은 변하지 않았다. 따라서, 24시간 투실라곤 처리에 따른 도 1 중에서의 세포활성이 미약하게 감소한 것은 독성에 의한 것이 아닌 것으로 예상하였다.

## 실험예 2. 투실라곤의 세포증식에 미치는 영향

투실라곤의 장시간 투여가 인간 교모세포종 세포주인 U87MG 와 T98G 증식에 미치는 영향을 문헌에 기재된 평가법을 참고하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (*J Biomed Biotechnol.* **2012**, 2012, 987495).

## 2-1. 실험 과정

상기 실험예 1-1의 배양한 세포주를 각각 500 cells/100  $\mu$ L 과 1000 cells/100로 96 well plate에 접종한 후에, 테모달 (Temozolomide, TMZ, Sigma, T2577) (0, 10, 30, 50, 100, 300 500  $\mu$ M) 혹은 투실라곤 (tussilagone, TSL) (0, 10, 20, 40, 80  $\mu$ M)를 6일 동안 처리한 후 세포활성을 MTT법으로 평가하여 IC50값을 구하였다.

## 2-2. 실험 결과 (도 3, 표 1)

도 3은 테모달 와 투실라곤의 장시간 투여가 교모세포종 세포주인 U87MG 와 T98G에 증식에 미치는 영향을 평가한 결과이다. 실험예 1 에 의하면 투실라곤 24시간 처리가 세포활성에 미치는 영향이 매우 약한 것을 알 수 있었으므로 본 실험에서는 실험예 1와 다르게 약물 처리시간을 6일로 연장하여 세포활성을 MTT법으로 평가하였다.

실험결과, 테모달을 처리한 결과, 두 세포주에서 다른 경향이 관찰되었다. U87MG 세포주에서는 100  $\mu$ M 까지 농도 의존적으로 세포 증식을 감소시킨 반면에, 테모달 내성인 T98G 세포주에서는 같은 농도범위에서 세포증식억제 효과가 10% 미만으로 약했다. 이 결과는 문헌 (*J Biomed Biotechnol.* **2012**, 2012, 987495)의 결과와 유사하여, T98G 세포주의 테모달에 대한 내성을 다시 확인할 수 있었다. 상기 결과와 다르게, 투실라곤을 처리한 세포는 농도 의존적으로 세포증식이 감소하였으며, 이런 현상은 테모달 민감성세포주인 U87MG와 내성 세포주인 T98G에서 모두 비슷한 경향이었다.

표 1은 도 3의 결과로부터 계산한 테모달과 투실라곤의 교모세포종 세포주 증식에 대한 IC50값이다. 두 세포주에 대한 테모달의 활성은 차이가 크게 나지만, 투실라곤의 두 IC50 값은 비슷하였다. 따라서 투실라곤은 테모달이 치료하기 어려운 내성세포주인 T98G에서도 세포증식을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

## 표 1

테모달과 투실라곤의 교모세포종 세포주 증식억제 효과

세포주	IC50 ( $\mu$ M)	
	TMZ	TSL
U87MG	49.9	13.8
T98G	> 100	15.3



[0142] **실험예 3. 투실라곤의 세포 에너지원인 ATP 생성 저해 효능 평가**

[0143] 암세포는 지속적으로 변화하는 미세 환경 속에서 빠르게 증식하기 위해 많은 에너지가 필요하다. 상기 실험예 2 중에서는 투실라곤이 세포 증식 억제 효과를 보였다. 따라서 본 실험에서는 세포 에너지원인 ATP 생성에 미치는 영향을 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (*Disease Models & Mechanisms*. **2012**, 5, 342-350).

[0145] **3-1. 실험 과정**

[0146] 세포 에너지원인 ATP 생성을 평가하기 위해서 측정 키트(CellTiter-Glo®Luminescent Cell Viability Assay kit, Cat# G7572, Promega)를 사용하였다. 구체적으로, 상기 실험예 1-1의 배양한 세포주들을 60 mm Dish에 각각  $5 \times 10^4$  과  $3 \times 10^4$  세포를 접종하고 24시간 배양 후, 투실라곤 20  $\mu$ M을 3일간 처리하였다. 회수한 세포를 인산완충염수 (PBS)로 세척 후 일정한 세포수를 취하여 리포터 용해 버퍼(reporter lysis buffer, Cat# E1941, Promega) 용해하여 얻은 세포용해물 5  $\mu$ L를 취하여 루시페라제 분석용 96-웰 플레이트 (Luciferase analysis, Cat# 31196, SPL)에 분주하고 어세이 시약(CellTiter-Glo®Luminescent Cell Viability Assay, Cat# G7572, Promega) 시약을 50  $\mu$ L를 더해 흡광도를 측정하였다.

[0148] **3-2. 실험 결과 (도 4)**

[0149] 본 실험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 투실라곤을 처리할 경우, ATP 생성이 현저히 감소하였다. 투실라곤의 ATP 생성저해 활성이 U87MG 세포주 (44.9% 감소)보다 테모달 내성 세포주인 T98G (61.8% 감소)에서 더 강하게 관찰되었다.

[0152] **실험예 4. 투실라곤의 세포내 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향**

[0153] 인간 교모세포종 세포주인 U87MG 과 T98G에 투실라곤을 처리한 후 세포내 미토콘드리아 막전위 (mitochondrial membrane potential, MMP) 변화의 분석을 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (*Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 12424-12435).

[0155] **4-1. 실험 과정**

[0156] 상기 실험예 1-1의 배양한 세포주들을 100 mm Dish에  $2 \times 10^5$  를 넣고 24 시간 배양 후, 투실라곤 20  $\mu$ M 처리하고 24 시간 배양하였다. 회수한 세포를 1 mL 배양액에 분산하고 용액(JC-1 working solution, Cat# 551302, BD)를 첨가하여 37° C, 5% CO<sub>2</sub>에 15 분간 처리한 후 FACS 분석법을 이용하여 MMP를 측정하였다.

[0157] 실험원리에 따르면 정상 세포내에서 JC-1색소는 미토콘드리아 막을 투과하여 빨간색 형광 (FL-2)을 나타내고, 미토콘드리아 막전위가 감소할 경우 JC-1색소는 세포질에 남아 녹색 형광(FL-1)을 나타낸다. 따라서 본 실험에서는 FL-1 영역에 세포비율의 증가량으로 MMP 감소 정도를 평가한다.

[0159] **4-2. 실험 결과 (도 5)**

[0160] 본 실험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 투실라곤을 처리할 경우, MMP의 저하가 유도되었다. 또한, U87MG 세포주 비해 (12.15%→17.89%) 테모달 내성 세포주인 T98G (9.87%→ 22.96%)에서 투실라곤의 MMP 변화효과가 더 큰 것으로 확인되었다.

[0163] **실험예 5. 투실라곤의 종양구 형성능에 미치는 영향**



[0164] 본 발명의 투실라곤 화합물이 종양구 형성능에 미치는 영향을 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (*Oncotarget*. 2016, 7, 65643-65659).

#### [0166] 5-1. 실험 과정

[0167] 상기 실험에 1-1 중에 세포주들을 B27(1X; Invitrogen, San Diego, CA, USA), 20 ng/mL의 염기성 섬유 모세포 성장인자 (bFGF; Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 ng/mL의 표피성장인자(EGF; Sigma) 및 50 U/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신(100x, Gibco, Invitrogen Korea, Seoul, Korea)이 혼합된 완전 배지(DMEM/F-12)에서 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 이하의 실험에서는 이렇게 얻어진 GBM 종양구 세포를 사용하였다.

[0168] 투실라곤의 종양구 형성능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 상기 종양구들을 획득한 뒤, 투실라곤을 농도별로 (0, 1, 5, 20 μM) 처리하여 1주간 배양하였다. 역위상차 현미경 (IX71 Inverted Microscope; Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 배양된 GBM 종양구의 형상과 사이즈를 관찰하고, 세포의 사진은 디지털 카메라(DP70 Digital Microscope Camera; Olympus)를 이용하여 DP 컨트롤러 소프트웨어(Olympus)로 촬영하였다.

[0169] 웨스턴 블롯 분석은 Nestin, Sox-2 및 Oct3/4 와 같은 줄기세포성 마커에 대해 수행하였고, 로딩대조군으로 하우스 키핑 유전자인 GAPDH를 사용하였다. 구체적으로, GBM 종양구세포를 용해버퍼 (lysis buffer) (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, phosphate inhibitor cocktail solution, protease inhibitor cocktail solution)를 이용하여 용해시킨 뒤, 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하고, 얻어진 상층액을 웨스턴블롯 분석을 위한 세포 추출물로 사용하였다. 단백질의 웨스턴블롯 분석을 위하여, 샘플을 SDS-polyacrylamide gel에 120 V로 전기영동시켜 분리한 뒤, 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막은 3% 탈지유가 포함된 PBS/트윈 용액으로 1시간 동안 비특이적 반응을 막기 위해서 블로킹한 후, 1차 항체(1:1000 희석)를 3시간 동안 반응시킨 뒤, 2차 항체(1:2000 희석)를 1시간 동안 반응시켰다. Amersham Bioscience에 기재된 화학 발광법을 이용하여 자료를 획득하였다.

#### [0171] 5-2. 실험 결과 (도 6)

[0172] 도 6 A에서 보는 바와 같이, 5 μM 투실라곤 처리한 경우 U87MG 와 T98G 종양구 형성능이 유의적으로 감소하기 시작하고 20 μM 처리시 종양구 형성능이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0173] 도 6 B에서는, Nestin, Sox-2 및 Oct3/4 와 같은 줄기세포성 마커발현 수준을 측정하였다. U87MG 종양구의 Nestin, Sox-2 및 Oct3/4에 발현양은 투실라곤에 의해 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. T98G 종양구의 Sox-2 및 Oct3/4 발현양도 투실라곤에 의해 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이결과는 상기 도 6 A 결과와 일치 하게 나왔다.

#### [0176] 실험예 6. 투실라곤의 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향

[0177] 본 발명의 투실라곤 화합물이 종양구 3차원 침윤에 미치는 영향을 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (*Oncotarget*. 2016, 7, 65643-65659).

#### [0179] 6-1. 실험 과정

[0180] 본 실험에서는 상기 실험에 5-1에서 배양한 종양구를 사용하였다. U87MG세포와 T98G세포의 종양구를 배양 플레이트로부터 콜라겐 I 매트릭스(collagen I matrices, BD bioscience, 354236)에 이동시켰다. 매트릭셀과 콜라겐 I의 혼합 매트릭스는 Dulbecco's 인산완충식염수 (DPBS), NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, 0.05N NaOH와 B27(1X), 20 ng/mL의 염기성 섬유 모세포성장인자 (bFGF), 20 ng/mL의 표피성장인자(EGF) 및 50 U/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신이 혼합된 완전 배지(DMEM/F-12, Mediatech)로 제조하였다. 혼합 매트릭스는 사용 전까지 4℃에서 혼합 및 유지시켰다. 종양구가 이식된 혼합 매트릭스가 겔화된 후, 투실라곤이 혼합된 배양 배지를 혼합 매트릭스 위에 첨가하였다. 72시간이 경과한 시점에서 종양구의 침윤을 역위상차 현미경 (Nikon Ti-E, Tokyo, Japan)으로

관찰하였다. 또한, 종양구의 침윤능 (invasiveness)은 하기 계산식 I 을 이용하여 측정하였다. 이미지 데이터 분석은 ToupView 이미지 분석 소프트웨어 (x64 v3.7.1460; Irvine, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0181] 웨스턴 블롯 분석은  $\beta$ -catenin, N-cadherin 및 Zeb1과 같은 상피간엽이행 (EMT) 관련 마커를 이용하여 수행하였고, 방법은 상기 실험에 5-1 과 동일하였다.

[0182] [계산식 I]

[0183] 침윤능(%)= (특정 시간에서의 침윤된 면적/초기 종양구의 면적) X 100]

## [0185] 6-2. 실험 결과 (도 7)

[0186] 도 7 A에서 보는 바와 같이, 투실라곤 처리에 의해 종양구의 3차원 침윤이 현저하게 억제된 것을 확인하였다. T98G 종양구에 대한 억제효과가 U87MG 보다 더 현저하였다(U87MG 종양구: 44.2% 감소; T98G 종양구: 66.5% 감소).

[0187] 도 7 B에서는,  $\beta$ -catenin, N-cadherin 및 Zeb1과 같은 상피간엽이행 (EMT) 관련 마커의 발현 수준을 측정된 결과이다. U87MG 과 T98G 종양구에  $\beta$ -catenin, N-cadherin 및 Zeb1의 발현양이 투실라곤에 의해 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 상기 도 7 A 결과와 일치하였다.

## [0190] 실험예 7. 투실라곤의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향

[0191] 상기 실험결과들을 의하면 투실라곤은 일반 악성 교모세포종 세포주 U87MG 뿐만 아니라, 테모달 내성 세포주인 T98G에서도 비슷한 뇌종양 억제효과를 보였다. 그 기전을 규명하기 위하여 테모달 내성을 일으키는 중요한 인자인 MGMT (*Neuro-Oncology*. **2009**, 11, 281-291; *J Biomed Biotechnol*. **2012**, 2012, 987495) 와 FoxM1의 단백질 발현양을 측정하였다. 또한, 문헌에 따르면 DNA 복구 유전자인 Rad51은 FoxM1 타겟유전자로써 발현 증가로 테모달 내성을 유발하는 것으로 알려져 있다 (*Clin Cancer Res*. 18, **2012**, 5961-5971).

## [0193] 7-1. 실험 과정

[0194] 세포용해물을 획득하여 웨스턴 블롯법(Western blot analysis)을 통해 FoxM1 및 MGMT 단백질 발현 수준을 평가하였고, 또 투실라곤의 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

[0195] 구체적으로, 상기 실험예 1-1의 배양한 세포주를 60 mm Dish에  $4 \times 10^5$  세포를 접종하고 24 시간 배양 후 투실라곤 20  $\mu$ M을 16 시간 (도 8A, B) 또는 24 시간 (도 8C) 처리한 후에 세포용해버퍼로 [lysis buffer, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), protease inhibitor cocktail (Calbiochem, Darmstadt, Germany)] 단백질 추출물(Protein extracts)을 얻었다. 20-40  $\mu$ g의 단백질 추출물로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 실시하고, 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) 멤브레인으로 이동시켰다. 이 후 5% 탈지유가 포함된 PBS/Twin 으로 1 시간 동안 비특이적 반응을 막기 위해서 블로킹하였다. 이 후 블롯에 일차 마우스 항-FoxM1, MGMT, Rad51를 4 ° C에서 12 시간 동안 결합시키고, 이어서 Horseradish peroxidase가 연결된 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG-HRP, Cat# ADI-SAB-300-J, Enzo)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이를 PBS/Twin 으로 10분씩 세번 세척하고 화학발광 시약을 이용해 발현을 확인하였다. 로딩 대조군으로 하우스 키팅 유전자인  $\beta$ -actin (Sigma)를 사용하였다.

## [0197] 7-2. 실험 결과 (도 8, 표 2, 3)

표 2

[0198]

투실라곤의 FoxM1 단백질 발현 억제활성 실험결과 (도 8B)

처리군		(배)
U87MG	대조군	1.0
	TSL-20 $\mu$ M	0.5
	TSL-40 $\mu$ M	0.2
T98G	대조군	1.0
	TSL-20 $\mu$ M	0.4
	TSL-40 $\mu$ M	0.1

**표 3**

[0200]

투실라곤의 T98G 세포주에서 Rad51 및 MGMT 단백질 발현 억제활성 실험결과 (도 8C)

처리군		(배)
Rad51	대조군	1.0
	TSL-20 $\mu$ M	0.3
	TSL-40 $\mu$ M	0.4
MGMT	대조군	1.0
	TSL-20 $\mu$ M	0.8
	TSL-40 $\mu$ M	0.4

[0202]

도 8 A는 U87MG 와 T98G 두 세포주에 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현양을 비교분석한 결과이다. 테모달 내성의 중요한 원인이 되는 FoxM1 과 MGMT 단백질 발현양은 U87MG 세포주보다 테모달 내성 세포주인 T98G에서 현저히 높게 측정되었다.

[0203]

도 8B는 투실라곤의 FoxM1 단백질 발현 억제활성을 분석한 결과이다. 두 세포주 모두에서 투실라곤 처리에 의해 FoxM1 단백질 발현양은 농도 의존적으로 감소하였다. 도 8C는 테모달 저항성 발현을 유도하는 유전자인 Rad51과 MGMT 단백질 발현양상을 T98G 세포주에서 분석한 결과이다. 투실라곤 처리에 의해 테모달내성의 주요인자인 Rad51과 MGMT의 단백질 발현양이 현저하게 감소하였다.

[0206]

하기에 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0208]

**제제예 1. 산제의 제조**

[0209]

투실라곤 ----- 20 mg

[0210]

유당 ----- 100 mg

[0211]

탈크 ----- 10 mg

[0212]

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0214]

**제제예 2. 정제의 제조**

[0215]

투실라곤----- 10 mg

[0216]

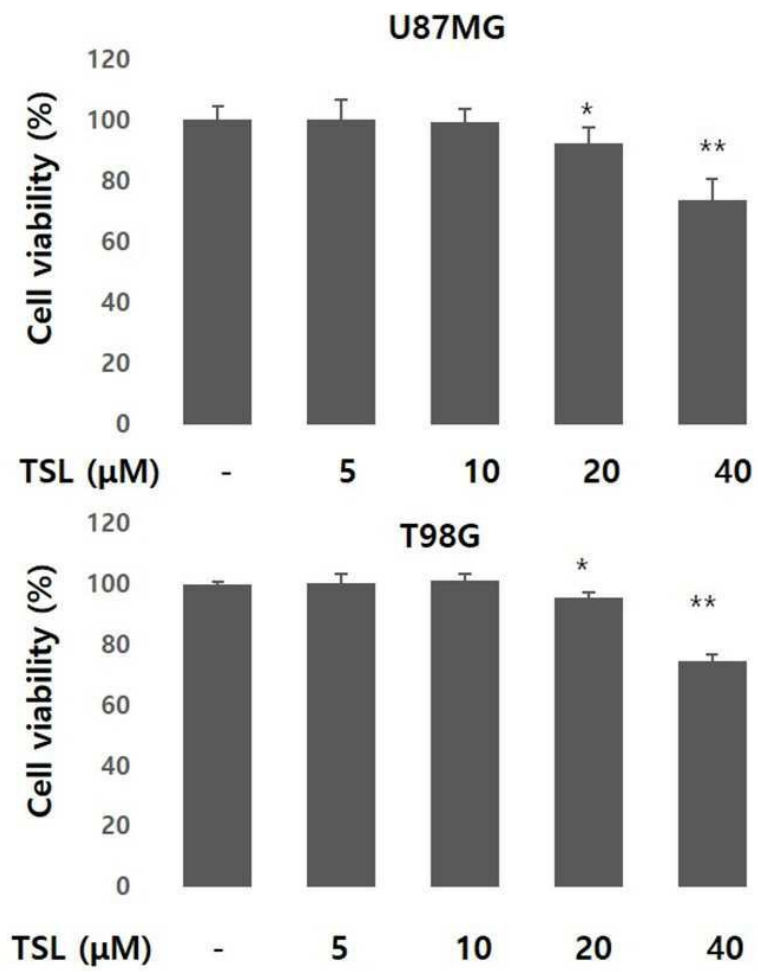
옥수수전분 ----- 100 mg

- [0217] 유당 ----- 100 mg
- [0218] 스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg
- [0219] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0221] **제제예 3. 캡슐제의 제조**
- [0222] 투실라곤 ----- 10 mg
- [0223] 결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg
- [0224] 락토오스 ----- 14.8 mg
- [0225] 마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg
- [0226] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0228] **제제예 4. 주사제의 제조**
- [0229] 투실라곤 ----- 10 mg
- [0230] 만니톨 ----- 180 mg
- [0231] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0232]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ----- 26 mg
- [0233] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0235] **제제예 5. 액제의 제조**
- [0236] 투실라곤 ----- 20 mg
- [0237] 이성화당 ----- 10 g
- [0238] 만니톨 ----- 5 g
- [0239] 정제수 ----- 적량
- [0240] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0242] **제제예 6. 건강 식품의 제조**
- [0243] 투실라곤 ----- 1000 mg
- [0244] 비타민 혼합물 ----- 적량
- [0245] 비타민 A 아세테이트 ----- 70  $\mu\text{g}$
- [0246] 비타민 E ----- 1.0 mg
- [0247] 비타민 B1 ----- 0.13 mg
- [0248] 비타민 B2 ----- 0.15 mg
- [0249] 비타민 B6 ----- 0.5 mg
- [0250] 비타민 B12 ----- 0.2  $\mu\text{g}$

[0251]	비타민 C -----	10 mg
[0252]	비오틴 -----	10 $\mu$ g
[0253]	니코틴산아미드 -----	1.7 mg
[0254]	엽산 -----	50 $\mu$ g
[0255]	판토텐산 칼슘 -----	0.5 mg
[0256]	무기질 혼합물 -----	적량
[0257]	황산제1철 -----	1.75 mg
[0258]	산화아연 -----	0.82 mg
[0259]	탄산마그네슘 -----	25.3 mg
[0260]	제1인산칼륨 -----	15 mg
[0261]	제2인산칼슘 -----	55 mg
[0262]	구연산칼륨 -----	90 mg
[0263]	탄산칼슘 -----	100 mg
[0264]	염화마그네슘 -----	24.8 mg
[0265]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0267]	<b>제제예 7. 건강 음료의 제조</b>	
[0268]	투실라곤-----	1000mg
[0269]	구연산 -----	1000 mg
[0270]	올리고당 -----	100 g
[0271]	매실농축액 -----	2 g
[0272]	타우린 -----	1 g
[0273]	정제수를 가하여 -----	전체 900 ml
[0274]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0275]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

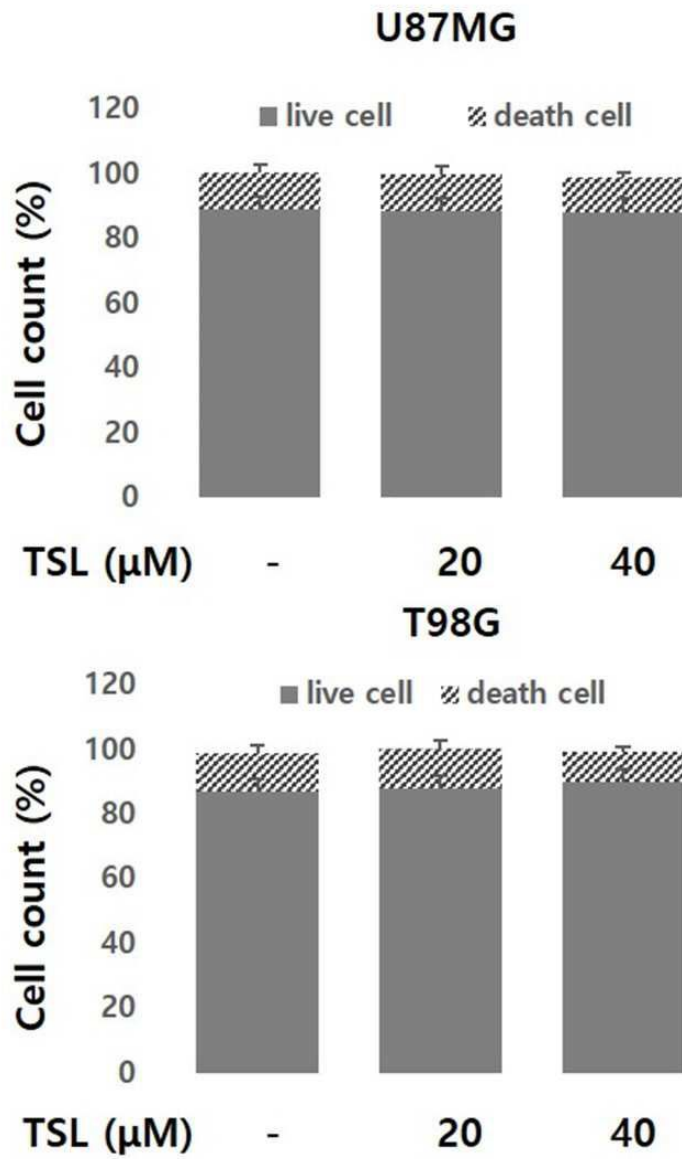
도면

도면1

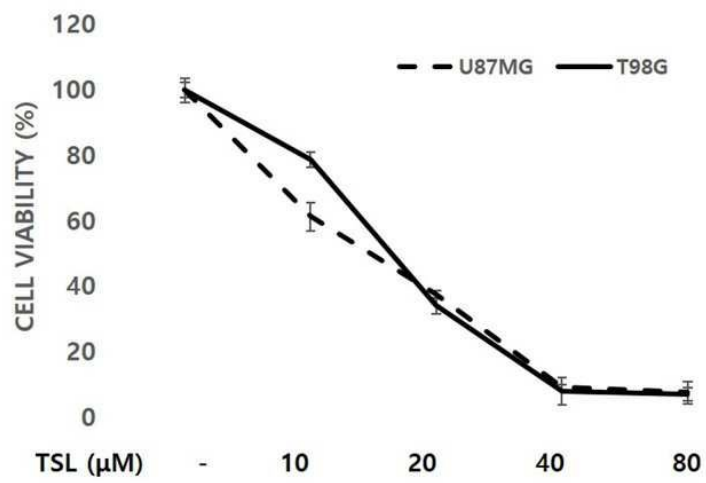
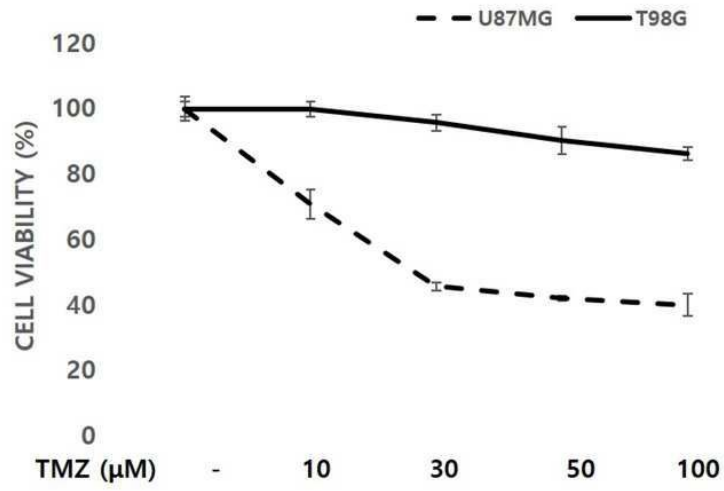




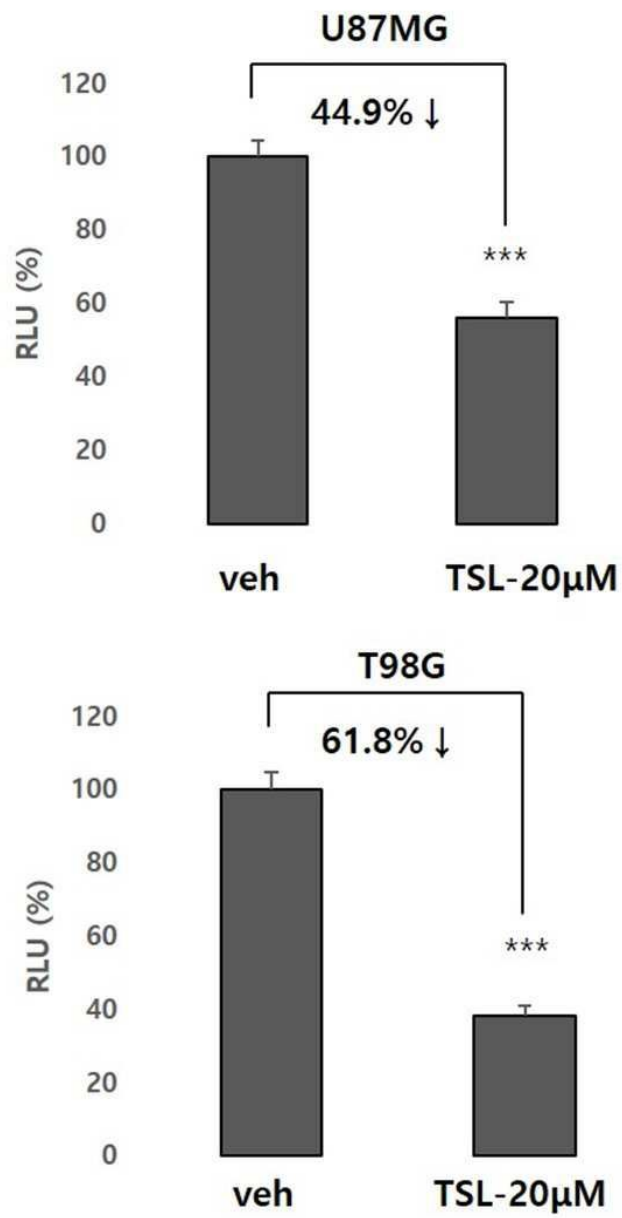
도면2



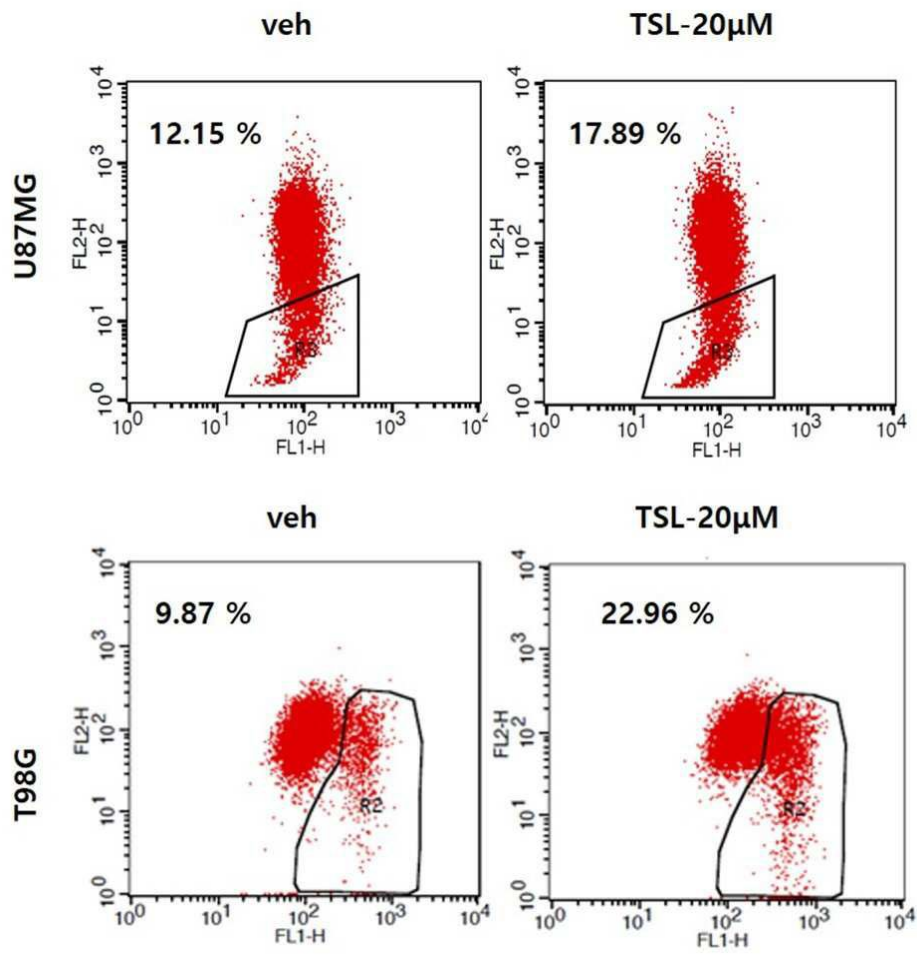
도면3



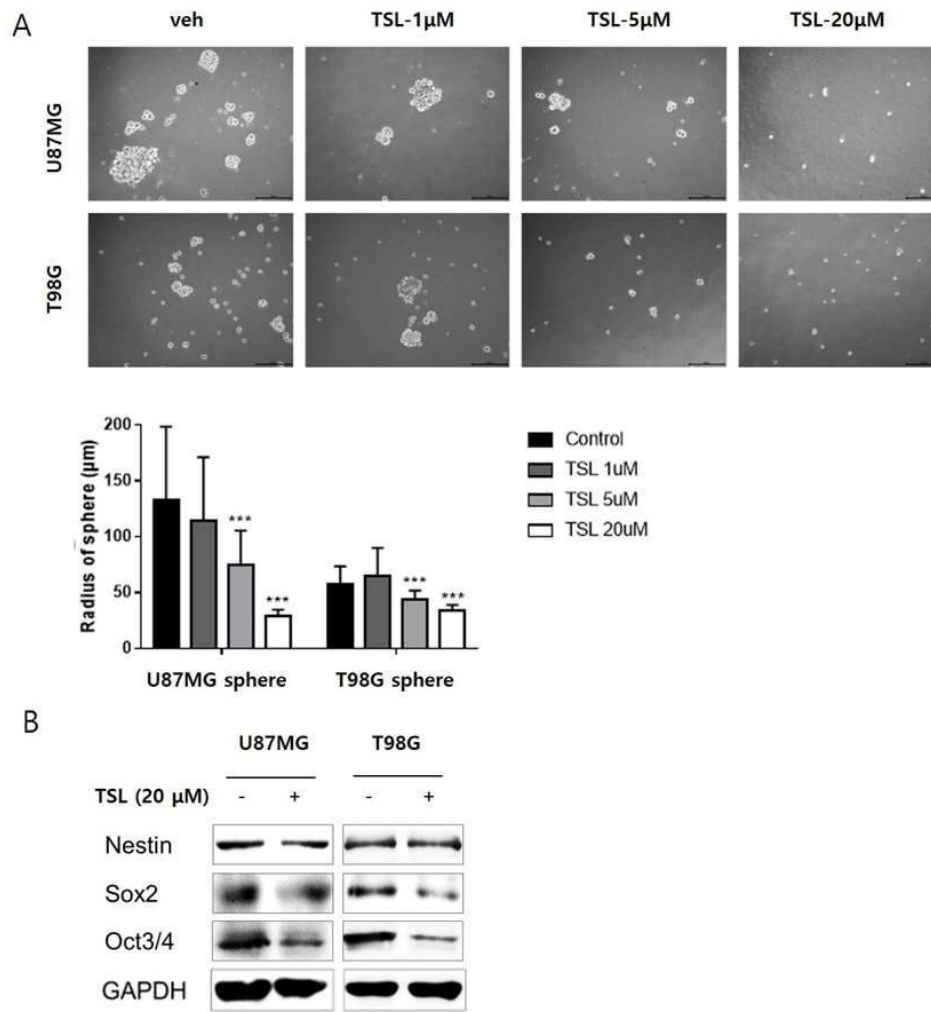
도면4



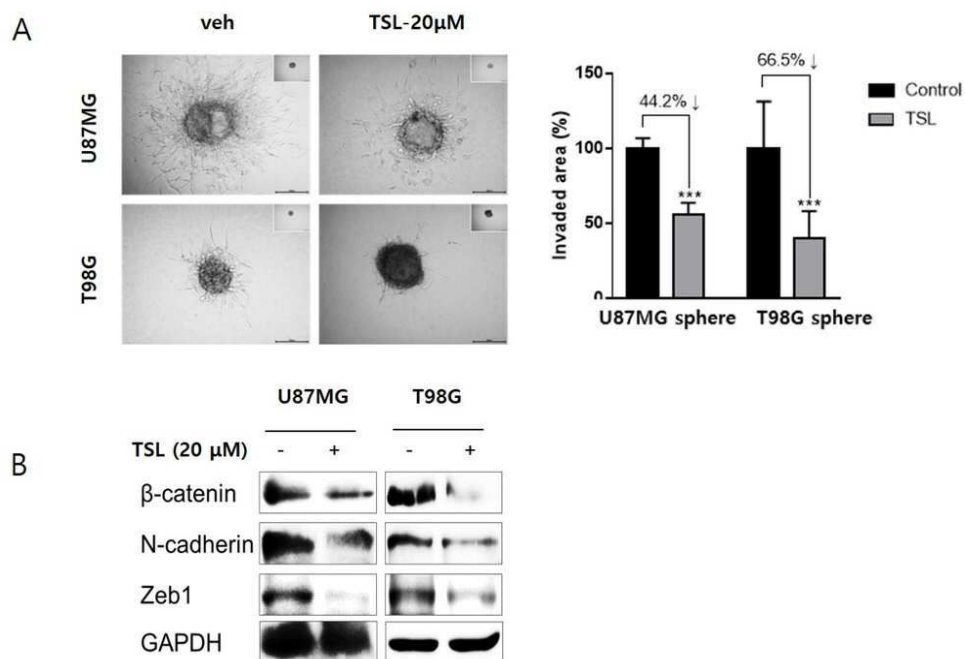
도면5



도면6



도면7



도면8

