

3cm

11-1543000-002754-01

4cm

발간등록번호
11-1543000-002754-01

표적항암제 효능개선 맞춤형 고부가가치 특수의료용도식품 개발 최종보고서

2019.06.10.

주관연구기관 / 중앙미생물연구소
협동연구기관 / 건국대학교 글로벌 산학협력단

농림축산식품부

표적항암제 효능개선 맞춤형 고부가가치 특수의료용도식품개발 최종보고서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품개발사업 R&D Report

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “표적항암제 효능개선 맞춤형 고부가가치 특수의료용도식품 개발” (개발기간 : 2016.07.07 ~ 2018.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

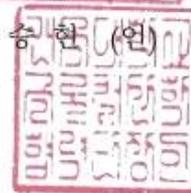
주관연구기관명 : 중앙미생물연구소

(대표자) 임 우 종 (인)



협동연구기관명 : 건국대학교 글로컬 산학협력단

(대표자) 이 승 현 (인)



주관연구책임자 : 임 우 종

협동연구책임자 : 임 지 흥

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116025-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016. 7. 7. - 2018. 12. 31.	단 계 구 분	(해당단계)/ <u>(총 단계)</u>
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	표적항암제 효능개선 맞춤형 고부가가치 특수의료용도식품 개발			
연구책임자	임 우 종	해당단계 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 500,000천원 민간: 170,000천원 계: 670,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 500,000천원 민간: 170,000천원 계: 670,000천원
연구기관명 및 소속부서명	중앙미생물연구소			참여기업명: 건국대학교 글로컬 산학협력단	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반등급				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	molecules23010042, ijms19103127	10-1895418									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

○ 연구개발 목표 및 성과

- 연구개발 목표: 표적항암제 효능개선 기능성강화 신소재를 활용한 암환자 전용 제2세대 특수의료용도식품의 개발 및 사업화
- 기술성과: 국내특허출원2건, 국내특허등록 1건, 기술이전 1건
- 학술성과: 국제 SCI논문 2건 게재, 국내 학술발표 3건
- 인력양성성과: 학사급 전문연구원 4명 양성
- 고용창출성과: 학사급 연구원 2명, 석사급 연구원 2명

○ 연구내용 및 결과

- 표적항암제 기능성강화 신소재로써 에모딘 발굴 성공
- 세포와 동물모델에서 에모딘의 간암표적항암제 시너지 효과 검증 성공
- 에모딘에 의한 간암표적항암제 시너지 효과의 분자작용기전 규명 성공
- 알로에와 호장근에서 에모딘 함량 분석 기술 표준화 성공
- 에모딘을 함유하는 알로에 및 호장근 추출물의 간암표적항암제 효능강화 효능 검증 성공
- 간암표적항암제 저항성 간암세포주 개발 및 저항성 극복효능 검증 성공
- 알로에 및 호장근 추출물로부터 에모딘 추출 및 생물전환 기술 표준화 성공
- 개발된 소재의 동물학적 안정성 평가 진행 중

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 연구성과 활용실적: 기술이전 1건 (중앙미생물연구소로 특허양도 1건, 기술이전료: 6백만원)
- 연구성과 활용계획
 - ☞ 간암표적항암제 효능개선 환자맞춤형 특수의료용도식품 생산 및 판매
 - ☞ 암환자 맞춤형 특수의료용도식품의 기능성 강화 및 다양화 추진
 - ☞ 후속제품 기획 및 R&D방향 확대
 - ☞ 농가와 협력을 통한 양질의 소재 확보 시스템 및 농가소득 증대 기반 구축

보고서 면수

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> • 목적 : 표적항암제 효능개선 기능성강화 신소재를 활용한 암 환자 전용 특수 의료용도식품의 개발 및 사업화 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 특수 의료용도식품의 기능성 향상을 위한 신소재 발굴 및 개발 ☞ 특수 의료용도식품의 기능성 향상을 위한 생물전환 적용 기술 개발 ☞ 표적항암제 효능개선 및 영양기능이 향상된 특수 의료용도식품의 개발 및 사업화 				
	<ul style="list-style-type: none"> • 표적항암제 효능개선을 위한 기능성강화 천연물 신소재 발굴 • 발굴된 천연물 신소재의 표적항암제 효능개선 규명 (세포/동물모델) • 암 환자 전용 특수 의료용도 식품 개발을 위한 신소재 가공기술 최적화 • 생물전환 기능성 강화 신소재의 발굴, 대량생산 및 자동화 공정 확립 • 생물전환 기능성 강화 신소재의 표적항암제 효능개선 규명 (세포/동물모델) • 천연물 신소재 및 생물전환 기반 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 작용기전 규명 • 최종 개발 시제품의 안정성 및 영양평가 • 기능성 강화 신소재의 생산 및 제품개발 표준화 구축을 통한 제품의 안정적 생산 • 표적항암제 사용농도를 1/3로 감소시키며 효능은 강화시킬 수 있는 제2세대 암 환자 전용 특수 의료용도식품 개발 및 사업화 • 일반 및 특수 시장의 활성화 전략 수립 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> • 특허출원 및 등록: 특허출원 2건(2차년도 1건, 3차년도 1건), 특허등록 1건(3차년도 1건 등록완료, 추가 1건 등록 예정) • 국외 전문 SCI논문 게재: 상위45% 1편, 상위 30% 이내 1편 • 국내학술발표: 3건 • 인력양성: 학사급 전문연구원 4명(2차년도 1명, 3차년도 3명, 이학사 졸업) • 고용창출: 학사급 연구원 2명, 석사급 연구원 2명을 고용창출 • 기술이전: “알로에 추출물을 함유하는 소라페니브 암 치료 효과 증강용 조성물” 특허권 양도 실시완료 • 제품화: 시제품 프로글루 플러스 제작 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> • 농업발전측면: 국내 천연물, 농산물 및 특용작물 농가의 소득증대 • 기술적 측면: 고부가가치 및 고기능성 신소재 이용한 특수 의료용도식품 개발 • 경제적 측면: 기존 치료 대비 환자의 기능 개선 면에서의 비용 효과 • 산업적 측면: 식품과 의료가 결합된 새로운 융·복합 식품 산업 및 시장 형성 • 사회적 측면: 해마다 증가하고 있는 암 환자들의 삶의 질 향상 				
국문핵심어 (5개 이내)	표적항암제	알로에	생물전환	기능성소재	특수 의료용도 식품
영문핵심어 (5개 이내)	Targeted agent	aloe	bioconversion	Functional materials	Specialized Medicinal Food

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	25
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	109
4. 연구결과의 활용 계획 등	118
붙임. 참고 문헌	121

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 개요

(1) 연구개발 목표

표적항암제 효능개선 기능성장화 신소재를 활용한 암환자 전용 제2세대 특수의료용도식품의 개발 및 사업화

(2) 핵심용어 설명

- **특수의료용도식품**은 정상적으로 섭취, 소화, 흡수 또는 대사할 수 있는 능력이 제한되거나 손상된 **환자** 또는 **질병**이나 임상적 상태로 인하여 일반인과 생리적으로 특별히 다른 영양요구량을 가진 사람의 식사의 일부 또는 전부를 대신할 목적으로 이들에게 경구 또는 경관급식을 통하여 공급할 수 있도록 제조, 가공된 제품을 지칭하는 것으로서 **특정 질환**자들에게 적용할 수 있다.
- **제2세대 표적항암제**는 기존의 **1세대 항암제**의 부작용을 극복하고자 개발된 **암 특이적 유전자 돌연변이를 표적하고 제어하는 특수한 항암제**로써 현재 국내 개발된 표적항암제는 약 2종에 불과하며 실제로 국내시장의 95%이상이 외국에서 전량 수입되고 있는 표적항암제가 차지하고 있음.

(3) 연구의 필요성

- 고령사회와 주요질병률이 증가하면서 환자들의 **질병에 대한 개선과 삶의 질**에 대한 중요성이 더욱 강조되고 있다. 이에 따라 특수의료용도식품의 시장은 **국내외 지속적인 증가 추세**를 보이고 있으며, 특히 국내의 경우 매년 20% 이상 증가하고 있는 추세이다. 반면 그에 부합하는 **고기능성 특수의료용도식품의 개발은 미미한 실정**이다. 따라서 영양 및 기능이 강화된 고부가가치의 제2세대 특수의료용도식품의 개발이 필요함

(4) 연구개발 주요 내용

(가) 특수의료용도식품의 기능성 향상을 위한 신소재 발굴 및 개발

- 천연물 스크리닝을 통한 표적항암제 효능강화 기능성 천연물 신소재 발굴
- 발굴된 기능성 소재의 대량생산 및 최적 가공 기술 개발
- 특수의료용도식품으로써 개발을 위한 기능성 신소재의 영양 가치, 기능성 및 안전성 평가

(나) 특수의료용도식품의 기능성 향상을 위한 생물전환 적용 기술 개발

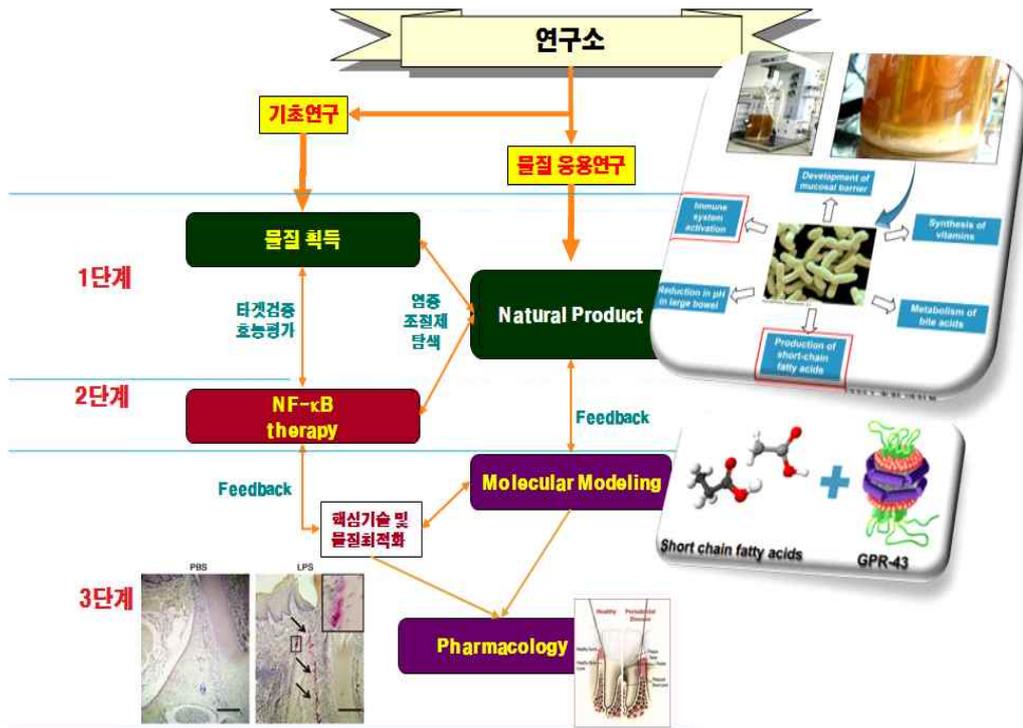
- 개발하고자하는 특수의료용도식품의 발굴된 신소재의 함유량 증대 및 효능강화를 위한 생물전환 기술 개발
- 생물전환을 통한 기능성장화 신소재의 표적항암제 효능증대 전임상평가
- 생물전환 기술을 통한 기능성장화 신소재의 대량생산을 위한 생산효율 증대 기술 개발
- 생물전환유래 기능성장화 신소재의 영양 가치, 기능성 및 안전성 평가

(다) 표적항암제 맞춤형 항암 및 영양기능이 향상된 제2세대 특수의료용도식품의 개발 및 사업화

- 소비자 신뢰도제고를 위한 표적항암제 맞춤형 효능개선 신소재의 작용기전 및 표적분자

규명

- 최종 개발 시제품의 안전성 및 영양 평가
- 기능성 향상 특수의료용도식품의 생산 표준화 구축 및 제품화 기술 개발
- 일반 및 특수 시장의 활성화 전략 수립



(5) 연구의 독창성

- 환자들에게 필수적으로 공급되어야 할 영양과 표적항암제 치료중인 환자의 항암효능 개선 효과가 뚜렷한 **표적항암제 맞춤형 암환자 전용 특수의료용도식품의 개발**
- 단계적 공서배양 생물전환을 통한 기능성향상 및 효율 증대로 인한 고기능의 고부가가치 제2세대 특수의료용도 식품 개발
- 천연물 및 생물전환을 통한 부작용의 최소화 및 전량수입에 의존하고 있는 표적항암제 사용량 축소를 통한 가정 및 국가경제제고 효과를 지닌 제2세대 특수의료용도식품 개발

(6) 기술의 시장성

- 환자들에 기존 특수의료용도식품 시장은 약 800억 이상이며, (2014년 기준) 이중 80% 환자용 식품으로 매년 증가 추세
- 제2세대 표적항암제는 기존의 1세대항암제에 비해 현재 약 3배이상 높은 성장률을 보이고 있으며, 특수의료용도식품 시장 또한 매우 크다. 하지만, 표적항암제의 효능개선을 최우선으로 하는 기능성강화 특수의료용도식품개발은 국내는 물론 국외에서도 전혀 진행되고 있지 않는 것으로 보아 향후 시장 발전가능성이 매우 높다고 판단됨

(7) 용도 및 적용분야

- 고령인구가 늘어나면서 생기는 여러 주요 질환, 특히 암 환자들에게 있어 기본적인 영양 공급 및 해당 질병에 특화된 영양분 공급
- 항암 치료중인 암환자의 영양상태를 회복 또는 유지시켜 의학적 치료를 할 수 있는 상태로 만들고자 하는 용도와 환자의 회복을 도와주는 식품으로서 적용
- 치료를 목적으로 하는 의약품이 아닌 치료에 도움을 주어 치료 효과를 개선시킬 수 있는 식품으로서 적용
- 병원 체계적 관리 이후 암 환자들의 퇴원 후 또는 요양원에서 지속적인 개선용도
- 항암효능 개선 시너지 효과를 보일 수 있는 표적항암제 맞춤형 특수의료용도식품으로서 적용
- 식품과 의료가 결합된 새로운 융·복합 식품으로 암환자 전용 요양원 및 요양병원 전용 제품 용도로서 적용



(8) 사업화 계획

본 주관 기관의 1세대 특수의료용도식품 프로글루는 이미 특수의료용도식품 내 환자용 특수 영양식으로서 허가를 취득해 있는 상태이며, 차세대 표적항암제 맞춤형 제품으로서 기술 개발이 완료 되는 시점에서 다음과 같은 추진 전략 및 계획을 통해 사업을 진행할 예정이다.

- 신제품의 마케팅 기획 및 디자인을 위한 제품명 컨설팅
- 제품의 성격에 맞는 마케팅 기술 자문

- 포장 유형별 포장 패키징 컨설팅 및 디자인 개발
- 신제품의 시작품 제작
- 시장 활성화 전략 수립

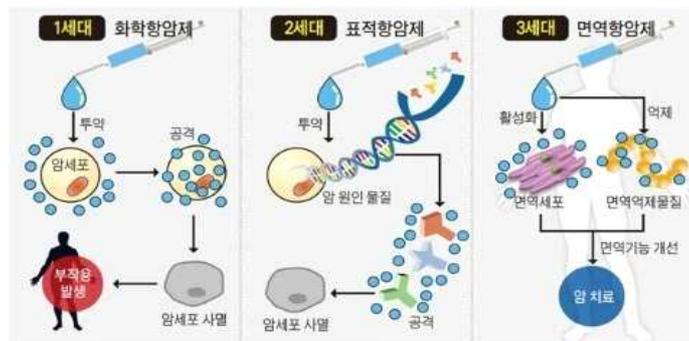
주판매처	- 직영 판매망을 이용한 일반 소비자 (환자), 요양원, 요양병원 - OEM 방식의 판매사 혹은 대형 종합병원
판매경로	- 제조사 -> 총판 -> 대리점 -> 일반 환자 - 제조사 -> 총판 -> 요양원 및 요양병원 -> 일반 환자 - 제조사 -> 판매사 -> 판매사 대리점 -> 일반 환자 - 제조사 -> 대형 종합병원 -> 일반 환자
기타	- 국외 판매사로의 수출 - 국내 요양원 및 병원과 링크되어 있는 국외 요양원 및 병원

나. 연구개발 대상의 국내·외 현황

(1) 국내·외 기술 수준 및 시장 현황

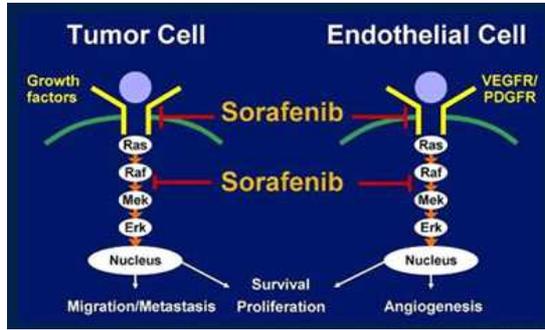
(가) 표적항암제의 배경 및 국내·외 표적항암제 시장현황

① 항암치료제 시장의 변화 및 대응방안



세대별 항암제의 작용원리 비교

- 1세대 항암제는 화학항암제로써 빠르게 성장하는 세포에 침투하여 유전자복제, 세포 분열, 세포증식을 제어함으로써 암세포를 사멸시키며, 면역, 생식, 위장관세포 등 정상세포에 독성을 나타내 심각한 부작용을 초래한다는 단점을 가지고 있음
- 2세대 항암제는 표적항암제로써 암의 발생 및 성장 원인을 표적함으로써 인체를 구성하는 정상세포 및 조직에 독성이 없이 암세포만을 선택적으로 제어할 수 있으나, 의료비가 매우 높다는 단점이 있음
- 3세대 항암제는 인체 면역세포 활성을 조절하여 암세포를 선택적으로 제거할 수 있는 항암제로, 현재 개발 및 임상시험 단계에 있으며 국내 경우 막대한 의료비가 지출될 것으로 예상됨



Sorafenib (넥사바)의 항암 작용 원리

- 구체적으로 넥사바에 의한 암세포 사멸 기전은 약 50% 이상의 간암, 신장암, 갑상선암 환자에게서 공통적으로 활성화된 세포성장 신호체계인 RAS-Raf-MEK-Erk 및 신생혈관작용을 제어함으로써 암세포의 성장을 억제함

② 국내·외 표적항암제 시장동향 분석

제품	2012년1분기	2013년1분기	증감률
글리벡(노바티스)	221	234	6.0%
허셉틴(로슈)	186	210	13.3%
알림타(힐리)	94	103	10.2%
이레사(아스트라제네카)	60	71	19.6%
맙테라(로슈)	61	70	15.8%
넥사바(바이엘)	36	58	58.2%
벨케이드(안센)	49	52	7.1%
타세바(로슈)	48	49	1.1%
아바스틴(로슈)	31	37	19.3%
수텐(화이자)	18	19	4.8%

주요 표적항암제 개발사 및 성장 추이

약	개발사	적응증	표적	생존연장기간
글리벡	노바티스	만성골수성백혈병	필라델피아 염색체	15년
허셉틴	로슈	유방암	HER-2 수용체	30개월
이레사	아스트라제네카	비소세포폐암	EGFR 단백질	논란 중
젤코리	화이자	비소세포폐암	ALK 유전자	20개월
맙테라	로슈	림프종	B세포	19개월
넥사바	바이엘 헬스케어	간암	VEGF 단백질	3개월
타세바	로슈	췌장암, 폐암	EGFR 단백질	2주

국내 도입 표적항암제 현황

- 주요 표적항암제 개발사 및 성장세를 살펴보면 모든 표적항암제 개발사들이 외국기업이며, 특이한 사항은 넥사바의 경우 2012년 대비 2013년 약 60% 성장하였음
- 현재 국내에서는 대부분의 표적항암제를 수입하고 있으며, 이는 곧 초고령화 사회 진입에 따른 암환자의 급증에 따른 국가경제악화와 외화유출을 근본적인 원인이 될 것으로 보임

③ 간암치료 표적항암제(넥사바)의 경제적·기술적 문제점

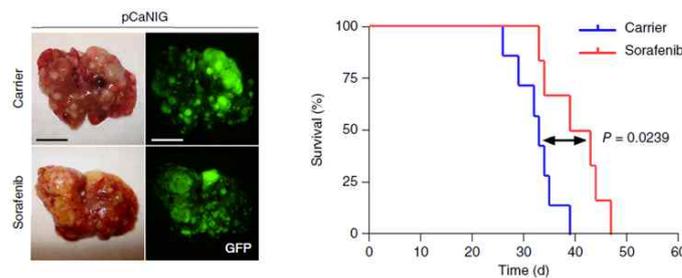


넥사바 치료에 소요되는 의료비

암 종류	표적치료제(불안 글리벡은 보험 미적용)
비소세포성폐암*	타소셀, 일림타, 이레사, 타세바, 아바스틴(비급여)
위암*	타소셀, 쥘루다
유방암*	타소셀, 쥘루다, 허셉틴, 타이커보, 아바스틴(비급여)
대장암(직장암)*	엘루사틴, 쥘루다, 엘버릭스(비급여), 아바스틴(비급여)
간암*	넥사바(비급여)
위장관기저종양	글리벡, 수텐
만성골수성백혈병	글리벡, 스프라이셀
다발성골수종	벨케이드
림프종	맙테라, 벨케이드(비급여)
골성골수성백혈병	스프라이셀

표적항암제의 보험적용 현황

- 보건복지부 통계자료 (2009년)에 따르면 간암 환자의 1년간 넥사바 치료비용은 약 3,700 백만원인 것으로 분석되었으며, 이는 신장암에 비해 무려 20배나 높은 것으로 분석됨
- 현재는 일부 진행성 간암에 대한 넥사바치료를 건강보험적용을 하여 연간 약 1,000 만원 정도로 환자의 의료비 부담이 다소 완화되기는 하였지만 그럼에도 불구하고 여전히 암 환자들에게 있어 표적항암제는 부담스러운 치료방법중 하나임
- 아바스틴, 엘비투스, 벨케이드, 넥사바, 이마티닙 등 대부분의 표적항암제들이 보험적용 비급여 대상에 포함되어 경제적으로 어려운 국민은 부작용이 심한 1세대 항암제 투여를 받고 있는 실정임
- 따라서 표적항암제의 효능을 극대화시킬 수 있는 표적항암보조치료제 및 특수의료용 도식품개발은 표적항암제 치료비용 및 평균생존율을 높임으로써 국민의 건강과 가정경제 활성화에 도움을 줄 것으로 판단됨



장기적인 투여에 따른 넥사바 (Sorafenib) 치료효과의 제한성(Nature Medicine, 2014)

- 환자를 대상으로 지속적으로 넥사바(Sorafenib)을 투여할 경우 약 30~40% 환자에게서 넥사바에 대한 내성이 나타난다는 것이 보고됨 (Rudalska et al, Nature Medicine, 2014, Sun et al, World Journal of Hepatology, 2013)
- 동물모델을 이용한 다수의 연구에서 공통적으로 넥사바 내성의 발생과 치료효과 제한이 밝혀짐
- 넥사바 내성의 원인으로 종양성장을 촉진하는 유전자 및 세포진호전달 체계가 재활성되는 것이 확인됨
- 또한, 넥사바의 경우 평균생존을 연장이 3개월에 불과함

④ 넥사바 치료효과 개선을 위한 Combination Therapy기술 개발, 임상시험 동향 및 문제점 분석

Table 1 Completed clinical trials for overcoming sorafenib resistance

Therapeutic strategies	Phases	Cases	Efficacy
Combinational therapy			
5-fluorouracil plus sorafenib ^[46]	Phase II	39	SD: 46.2%; median TTP: 8 mo; OS: 13.7 mo
Tegafur/uracil plus sorafenib ^[47]	Phase II	53	Median PFS: 3.7 mo; median OS: 7.4 mo
Octreotide plus sorafenib ^[48]	Phase II (So.LAR.)	50	SD: 66%; median TTP: 7.0 mo; median OS: 12 mo
Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin plus placebo ^[50]	Phase III	47 vs 49	Median TTP: 6.4 mo vs 2.8 mo; OS: 13.7 mo vs 6.5 mo; PFS: 6.0 mo vs 2.7 mo
Erlotinib plus sorafenib vs erlotinib plus placebo ^[53, 54]	Phase III (SEARCH)	362	Median TTP: 3.2 mo vs 4.0 mo; OS: 9.5 mo vs 8.5 mo
Second-line treatments			
Sunitinib ^[55]	Retrospective analysis	11	SD: 40%; median TTP: 3.2 mo
Brivanib ^[56]	Phase II	46	SD: 41.3%; RR: 4.3%; DCR: 45.7%; median OS: 9.79 mo
Tivantinib vs placebo ^[6]	Phase II	71 vs 36	Progressive disease: 65% vs 72%; TTP: 1.6 mo vs 1.4 mo
Gemcitabine plus oxaliplatin ^[59]	Retrospective analysis	18	Overall RR: 18.8%; SD: 18.8%; median PFS: 3.2 mo; OS: 4.7 mo
Erlotinib plus bevacizumab ^[61]	Phase II	10	No response or SD; median TTP: 1.81 mo; OS: 4.37 mo

넥사바(Sorafenib) 저항성 극복을 위한 복합치료 기술 및 임상시험 완료

- 넥사바 저항성 극복을 통한 치료효과 개선을 위해 외국의 많은 연구그룹에서 기존의 1세대 항암제와 2세대 항암제들을 이용해 Combination Therapy기술을 개발하고 있음
- 현재 대부분의 기술들이 임상 2~3상 시험 중에 있으며, 세포독성을 유발하는 항암제의 과다사용으로 치료효과 개선은 보이지만 부작용이 심하다는 보고가 있음
- 따라서, 현재 넥사바 치료효과 개선을 위한 Combination Therapy기술 개발 파이프라인은 부작용을 최소화할 수 있는 소재로 변화가 필요하다고 판단됨
- 이러한 표적항암제의 배경 및 문제점들을 분석해볼 때 표적항암제의 사용을 줄이고, 효과를 증대시키며, 항암제에 대한 내성을 극복할 수 있는 기술개발은 반드시 필요하다고 판단됨.
- 본 연구팀은 표적항암제의 사용량 축소, 효과극대화, 내성극복의 3대 문제점을 개선할 수 있는 천연물 신소재를 발굴하고 이를 통해 표적항암제 맞춤형 특수의료용도식품을 개발하여 암 환자의 의료비부담, 낮은 항암효과, 항암제 내성에 따른 효과감소를 효과적으로 개선함으로써 보건·의료적 측면과 국가의 경제·산업적 발전에 이바지하고자 함

다. 연구개발의 중요성

(1) 연구개발의 차별성 및 혁신성

(가) 항암제 부작용 개선을 위한 특수의료용도식품이 아닌 항암제 효능을 증가시키는 특수의료용도식품 개발

- 현재 개발 및 환자에게 적용되는 암환자 전용식품은 1세대 항암제 치료(Chemotherapy) 독성으로 인한 영양공급부족(정맥영양제, 경장영양제)을 보완
- 항암보조 의약품으로서 LG생명과학에서 개발한 에피트롤(암환자 식욕촉진제)은 1세대 항암제 치료에 의한 위장관손상과 식욕부진을 개선

- 녹십자HS에서 개발하고 현재 독일에서 임상시험 중인 항암보조 천연물신약으로서 BST204는 1세대 항암치료에 의한 면역저하 (호중구감소증) 개선
- 본 연구의 차별성은 국내외 산업체에서 개발하고 있는 항암치료에 의한 부작용 개선을 위한 특수의료용도식품이 아닌 항암치료의 효과를 극대화 시킬 수 있는 특수의료용도식품을 개발함에 있음

(나) 제2세대 표적항암제에 의한 암세포 저항성을 제어할 수 있는 특수의료용도식품 개발

- 기존의 1세대 항암제 (화학항암요법)의 면역세포, 생식세포 등에 대한 독성을 개선하고자 암 특이적인 유전자 돌연변이를 표적하는 2세대 표적항암제가 개발되어 현재 전 세계적으로 널리 사용되고 있음
- 하지만 제2세대 표적항암제 역시 환자적용 과정에서의 제한성(저항성, 생존율 개선 미흡, 고가의 의료비)이 발견되고, 고가의 2세대 표적항암제 사용에 대한 찬반의견이 중요한 이슈로 떠오르고 있음
- 본 연구에서는 암 특이적 표적항암제 저항성을 지닌 암세포의 성장을 제어할 수 있는 특수의료용도식품을 개발, 보급함으로써 표적항암제 치료에 따른 암 환자의 평균 생존율을 개선시키고자 함

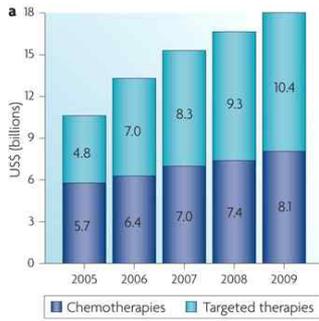
(다) ‘1+1=2’ 가 아닌 ‘1+1=100’ 항암효과를 지닌 특수의료용도식품 개발

- 현재까지의 항암보조제 (대부분 합성화합물)는 ‘1+1=2’ 였음. 다시 말해, 고용량의 서로 다른 두 가지약물을 투여할 경우 나타나는 항암효능이 2배 강해진다는 의미
- 본 연구의 가장 큰 혁신성은 표적항암제 치료를 받고 있는 환자에게 본 연구팀이 개발하고자 하는 표적항암제 맞춤형 특수의료용도식품의 핵심 천연물 소재를 투여 할 경우 항암효능이 최대 3배 이상 높게 나타난다는 것임.
- 즉, 고비용의 표적항암제의 사용은 줄이고, 효능은 높임으로서 최종적으로 환자의 의료비 부담을 줄이고, 평균생존율은 높이는 것임

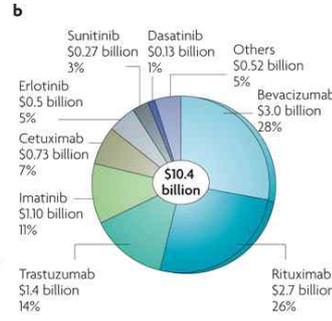
(2) 연구의 경제·산업적 중요성

(가) 제2세대 표적항암제 시장과 더불어 표적항암치료 맞춤형 특수의료용도식품 시장의 발전

- 2012년 Nature Review Drug Discovery에서 발표한 논문에 따르면 제1세대 항암제 (Chemotherapy)대비 제2세대 항암제(Targeted therapy)의 성장이 빠르게 증가하고 있다는 것을 보고하였음. 다시 말해 환자들의 항암제 선택이 부작용이 적은 표적항암제인 2세대 항암제를 선택하고 있다는 것임
- 현재 국내 출시된 표적항암제는 약 10종정도이며 모든 표적항암제들의 시장성장률



국외 표적항암제 시장 성장률



제품	2012년1분기	2013년1분기	증감률
글리벡(노바티스)	221	234	6.0%
허셉틴(로슈)	186	210	13.3%
알림타(힐리)	94	103	10.2%
이레사(아스트라제네카)	60	71	19.6%
말테라(로슈)	61	70	15.8%
넥사바(바이엘)	36	58	58.2%
벨케이드(안센)	49	52	7.1%
타케바(로슈)	48	49	1.1%
아바스틴(로슈)	31	37	19.3%
수텐(화이자)	18	19	4.8%

국내 표적항암제 시장의 성장률

이 2012년도 대비 2013년도에 크게 성장하였음. 가장 두드러진 성장은 국내에서 간암, 신장암, 갑상선암에 적용하고 있는 넥사바(Nexavar)로서 2012년도 대비 2013년도에 약 60%에 가까운 성장을 보였음.

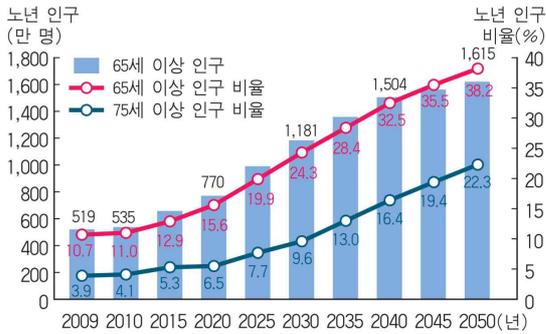
- 하지만 거대자본을 투입해 개발한 표적항암제들은 1세대 화학항암제에 비해 정상조직에 대한 부작용이 적은 반면에 수개월간의 치료에도 쉽게 저항성이 생김으로 평균생존율 개선이 높지 않다는 치명적인 제한성(limitation)을 가지고 있음
- 따라서 표적항암제 저항성에 따른 평균생존율 개선 미흡과 외국제약회사로부터 수입에 의존해야 함으로 생기는 환자의료비 부담 개선이 중요한 과제가 될 것임. 이러한 두 가지 이슈를 극복할 수 있는 천연물 소재를 발굴하고 이를 이용하여 **표적항암제 치료 환자를 위한 특수의료용도식품을 개발할 경우 표적항암제 시장과 함께 표적항암제 맞춤형 특수의료용도식품 시장 또한 동반성장할 수 있을 것으로** 판단됨

(나) 특수의료용도식품의 경제·산업적 중요성

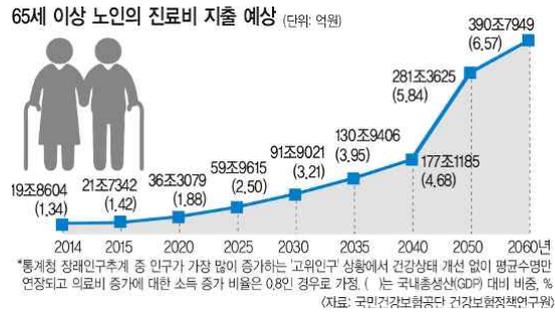
- 기존의 1세대 항암제 (화학항암요법)의 면역세포, 생식세포 등에 대한 독성을 개선하고자 암 특이적인 유전자 돌연변이를 표적하는 2세대 표적항암제가 개발되어 현재 전 세계적으로 널리 사용되고 있음
- 하지만 제2세대 표적항암제 역시 환자적용 과정에서의 제한성(저항성, 생존율 개선 미흡, 고가의 의료비)이 발견되고, 고가의 2세대 표적항암제 사용에 대한 찬반의견이 중요한 이슈로 떠오르고 있음
- 본 연구에서는 암 특이적 표적항암제 저항성을 지닌 암세포의 성장을 제어할 수 있는 특수의료용도식품을 개발, 보급함으로써 **표적항암제 치료에 따른 암 환자의 평균 생존율을 개선**시키고자 함

(3) 연구의 필요성 및 정부지원의 필요

(가) 초고령화 사회진입에 따른 의료비지출 증가 극복을 위한 보건의료산업 미충족 수요 해소 필요



한국은 초고령화 사회



초고령화 사회에 따른 진료비 지출 예상

- 통계청 분석에 따르면 한국은 이미 고령화 사회에 진입하였으며, 2020년 이후에는 초고령화 사회에 진입할 것이라고 발표하였음. 이와 더불어 국가는 U-헬스 등 다양한 노인인구 삶의 질 향상을 위한 연구에 정부투자를 지속적으로 확대하고 있음
- 국민건강보험공단에서 발표한 자료에 따르면 초고령화 사회 진입에 따른 만65세 노인의 진료비 지출을 예상한 결과 현재(약21조) 대비 2025년(약 59조)에는 두 배 이상 증가할 것으로 예상하였음. 앞으로 10년 후에는 대표적 노인성 질환인 암, 뇌신경계, 뇌혈관, 심혈관계 질환 노인환자가 크게 증가할 것으로 보이며 그에 따른 의료비 지출 감소를 위한 대책이 필요하다고 판단됨
- 암은 대표적인 노인성 질환으로서 남녀모두 일생동안 암에 걸릴 확률이 30%이상으로 발병확률이 매우 높은 질환중 하나임. 많은 제약회사들은 부작용이 적은 차세대 항암제(표적항암제 및 면역항암제 등)를 개발하고 있으며, 차세대항암제 개발에 대한 모든 기술은 외국제약회사에 의존하고 있음에 따라 중장기적으로 기술이 부족한 한국의 경우 국가외화 손실에 영향을 미칠 것으로 판단됨
- 본 연구에서는 외국제약회사에 독점하고 있는 표적항암제의 효과를 저용량에서도 극대화시킬 수 있는 천연물 신약 소재를 발굴하고 이를 통해 암환자 전용 특수의료용도식품을 개발함으로써 **고가의 표적항암제 사용에 따른 국가외화손실을 막고자 하며 더 나아가 우리의 기술을 외국제약회사에 기술이전 함으로써 외화창출에 기여하고자 함**

(나) 표적항암제 효능 개선을 위한 천연물 소재기반의 특수의료용도식품 개발 및 특허권 선점 시급

- 천연물신약 세계시장 규모는 2002년 약 2000억 달러로 추산되며, 매년 평균 10%이상의 성장률을 나타나내고 있으며, 용도별 비율을 보면 항암 및 암 예방(12%), 심혈관계 질환(11%), 내분비대사(15%), 면역질환(10%), 피부질환(13%), 간질환(8%)로 집계되었음
- 천연물 신약 관련 해외특허출원 동향을 살펴보면 미국의 경우 1992년부터 국립보건

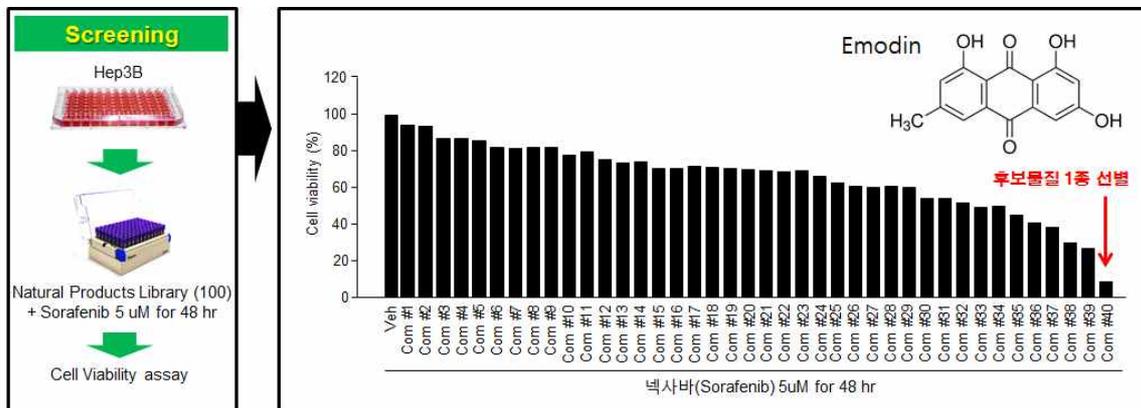
원 산하에 보완대체의학부(NCCAM, National Center for Complementary and Alternative Medicine)를 설립하여 막대한 예산을 투입하고 천연물 의약 분야를 집중적으로 연구하고 있어 향후 천연물 의약 시장의 큰 영향력을 갖게 될 것으로 분석됨

- 질환 맞춤형 표적항암제의 효과개선, 부작용제어, 사용량감소 등의 기능성을 확보한 천연물 기반의 **표적항암제 맞춤형 특수의료용도식품을 개발하고 특허권을 선점함으로써 외국의 합성의약품 시장과 동반성장할 수 있을 것으로** 판단됨

라. 선행연구 내용 및 결과

(1) 선행연구 내용 및 결과

(가) 미공개 선행 연구결과 (천연화합물 Emodin에 의한 간암 표적항암제, 넥사바저항성 개선 규명)



넥사바 저항성을 가진 간암세포 (Hep3B)에서 넥사바 보조효과 후보물질 발굴

- 본 연구팀은 넥사바 (Sorafenib)에 대한 저항성을 가진 간암세포 (Hep3B)와 천연물에서 분리된 화합물 100 종을 이용하여 넥사바에 대한 저항성을 극복하여 간암세포의 사멸을 촉진시키는 천연물 후보물질을 발굴
- 천연물 단독 (20uM)에 대한 세포독성이 없는 물질을 1차 스크리닝하여 40종의 물질을 분리하였음
- 2차 스크리닝을 통해 IC50에 해당하는 넥사바 (5uM, IC50=약6uM)의 간암세포 사멸효과를 극대화시키는 천연물 후보물질 1종을 선별하였음

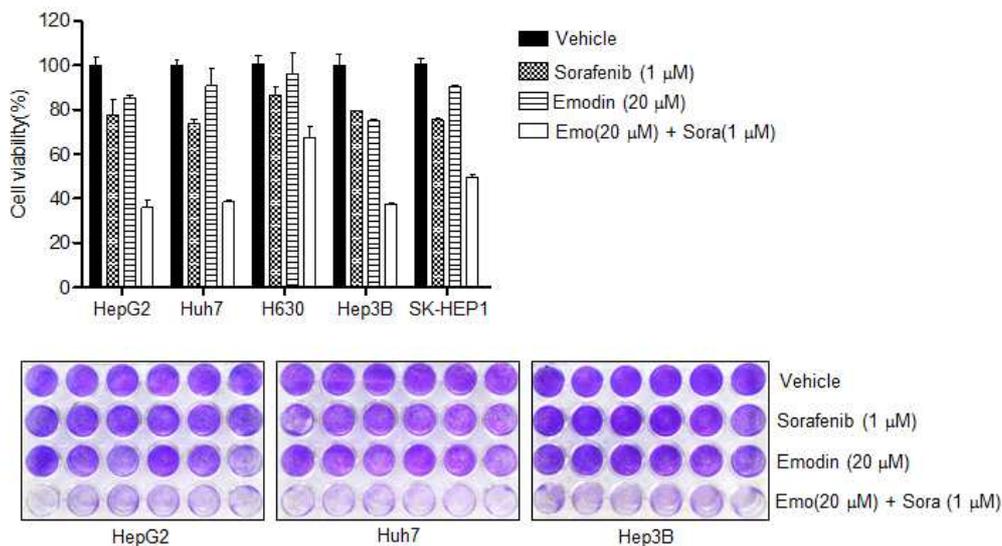


히말라야 대황 (*Himalayan rhubarb*)



알로에 이모딘 (*Aloe emodin*)

- 후보물질, 이모딘(Emodin)은 히말라야 대황(Himalayan rhubarb)의 진액에서 최초로 확인되었음
- 이모딘은 다양한 진액을 가진 식물에 함유되어 있으며, 다양한 생리활성 (항면역, 항종양, 항균 등)을 지니고 있다는 것이 과학적으로 증명되면서 천연물 신약으로써의 가치가 높이 평가되고 있음
- 또한 이모딘은 건강기능성식품 소재로 시장우위를 차지하고 있는 알로에(Aloe vera)서도 추출되었으며, 화학 구조적으로 메틸기가 없다는 것이 히말라야 대황에서 추출된 이모딘과의 가장 큰 차이라고 볼 수 있으며, 현재까지 생리활성 기능은 이모딘과 유사한 것으로 보고됨

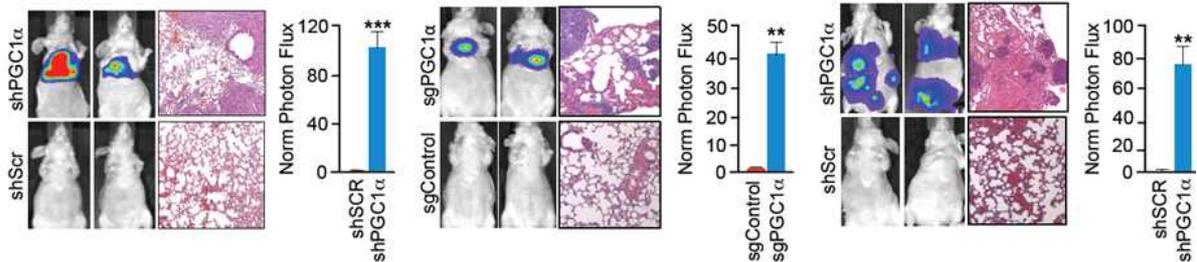


간암세포 성장 억제에서 이모딘(Emodin)의 넥사바 효능 개선 효과

- 넥사바 (1uM)과 이모딘(20uM)을 복합 투여한 결과 5종의 간암세포의 성장이 현저히 감소되는 것을 확인
- 이 연구결과에서의 중요한 의의는 넥사바의 사용량을 기존의 IC50농도의 1/5줄였음에도 불구하고 이모딘의 병행투여에 의해 간암세포 성장을 효과적으로 억제하였다는 것
- 즉, 임상적 측면에서 넥사바 치료 효과를 증가시킴으로써 간암환자의 생존율을 높일 수 있을 것임
- 경제적 측면에서 넥사바와 같은 의료비가 높은 항암제 사용에 의한 의료비지출을 줄일 수 있음

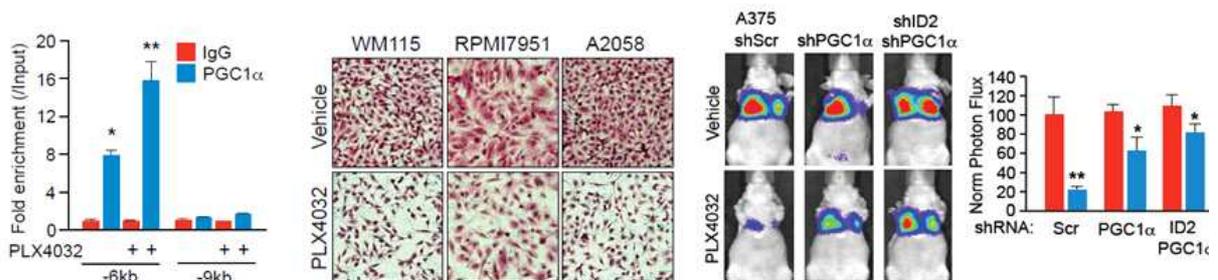
(나) 악성흑색종 표적항암제 (Vemurafenib)의 암 줄기세포 형성 및 암전이 억제 기전 규명

- 2세대 표적항암제 Vemurafenib의 암전이 억제 기전 규명 (주저자, Nature, 2016, Accepted, IF: 41.45)



악성흑색종(Malignant Melanoma) 전이 억제유전자의 발굴 및 효능 규명

- 본 연구팀은 악성흑색종의 전이에 관여하는 신규 유전자 (PPARgamma coactivator-1a, PGC1a)를 발굴하였으며, 동물모델을 통해 PGC1a유전자의 변화가 악성흑색종의 전이에 직접적인 영향을 미친다는 사실을 규명하였음
- 상기 선행연구 결과를 통해 악성흑색종 세포에서 유전자편집기술을 이용하여 PGC1a의 유전자를 제거한 악성흑색종 세포들이 실험용 쥐의 폐로 전이되는 것을 촉진시킨다는 사실을 규명하였으며, 본 연구결과는 2016년 2월 Nature에서 게재승인을 받고 현재 논문게재를 기다리고 있음

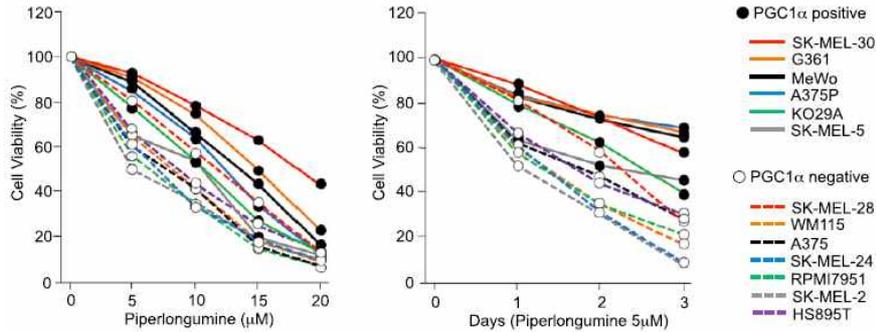


Vemurafenib에 의한 악성흑색종 전이에서 PGC1a의 관련성

- 세포성장 조절인자, B-Raf의 돌연변이를 정확하게 표적할 수 있는 표적항암제 Vemurafenib에 의한 악성흑색종의 전이과정에서 PGC1a 유전자의 중요성을 규명함으로써, PGC1a의 조절을 통한 악성흑색종 맞춤형 항암 및 항암보조식품 개발에 크게 활용될 것으로 기대됨

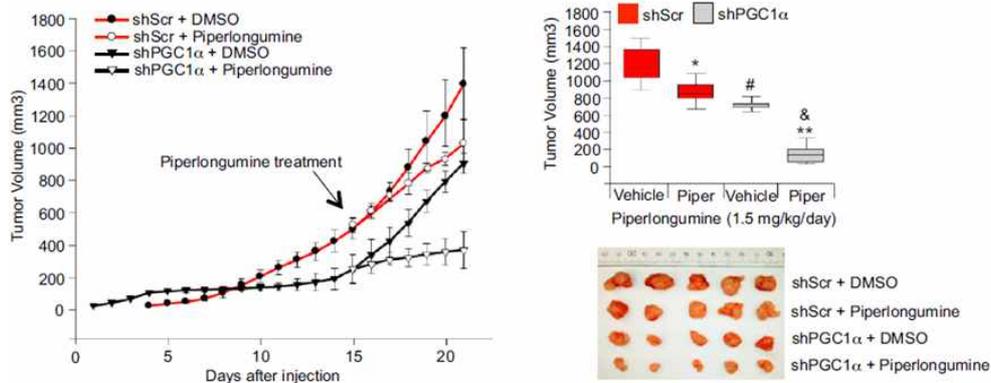
(다) 천연물 소재를 이용한 항암효능 분석 및 규명

■ Piperlongumine의 항암효능 및 작용기전 규명 (주저자 발표, Cancer Cell, 2013, IF:23.523)



PGC1 α 유전자에 따른 Piperlongumine의 항암효과 특이성

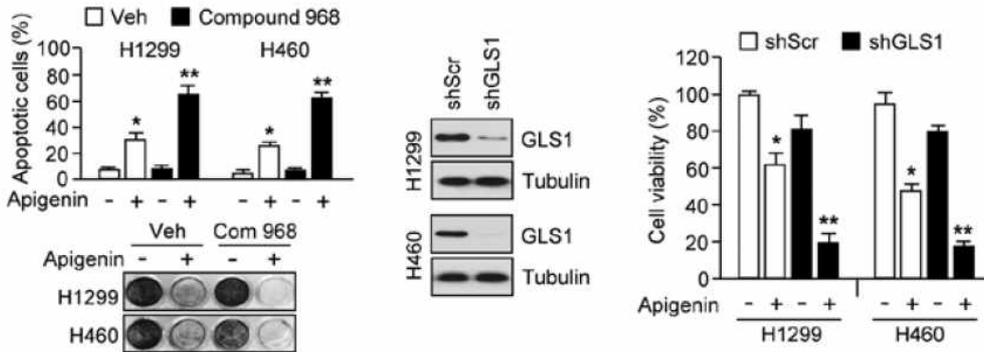
- PGC1 α 의 유전자의 양에 따른 Piperlongumine의 암세포 사멸 효과를 분석하였으며, 이 결과를 통해 Piperlongumine은 암세포의 PGC1 α 유전자의 존재여부에 따라 맞춤형 항암제로 개발될 수 있다는 것을 규명



PGC1 α 유전자에 따른 Piperlongumine의 항암효과

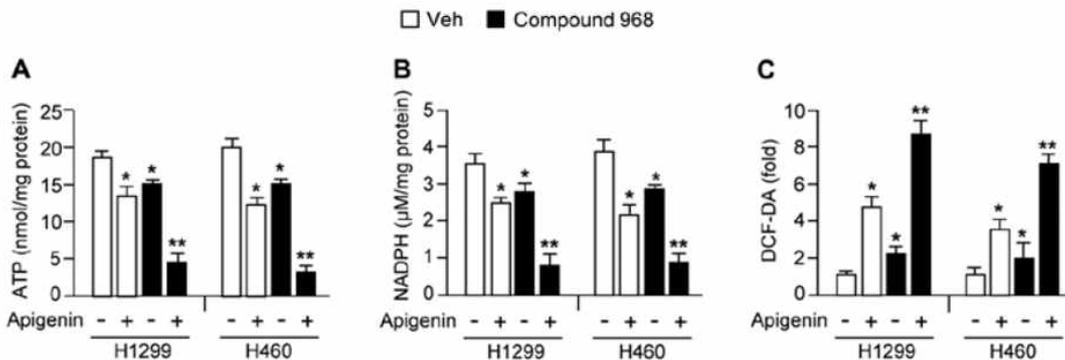
- PGC1 α 유전자를 제거한 암세포와 PGC1 α 유전자가 정상적으로 많이 존재하는 암세포를 동물모델에 주입하여 Piperlongumine의 항암효능을 동물모델에서 규명하여 천연물 항암신약으로써 Piperlongumine의 가능성을 제시하였음.

■ Apigenin의 암세포 특이적 대사제어 약물(Compound 968)의 항암효능 개선 효과 규명
(교신저자, International Journal of Oncology, 2016, IF: 3.025)



Apigenin에 의한 글루타민(Glutamine) 대사 억제제의 항암효과 개선

- 암세포는 포도당과 글루타민 의존적으로 성장하며 (Glutamine addiction), 기존의 연구들을 통해 글루타민 대사를 억제할 수 있는 억제제가 개발되었고 항암제 개발을 위한 연구 중에 있음
- 암 특이적 에너지대사는 정상조직에서의 대사과정과는 다르기 때문에 2세대 표적항암제 개발을 위한 원천기술로 활용되고 있으며, 다양한 종류의 암 선택적 에너지 대사 억제제들이 현재 임상시험 중에 있음
- 상기 연구를 통해서 암세포의 글루타민 의존적 성장기전을 억제하는 Compound968과 Apigenin을 병행투여 할 경우 폐암세포의 성장 억제효과가 현저히 증가되는 것을 확인하였음



Apigenin과 글루타민 대사 억제제에 의한 암세포 사멸기전 규명

- Apigenin에 의한 Compound968의 항암효과 개선의 분자적 기전을 규명하기 위해 세포내 글루타민 대사에 의해 생성되는 생화학적 물질들을 분석한 결과
- 세포 내 항산화 기능의 핵심물질인 NADPH가 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 결과적으로 세포 내 활성산소에 의한 산화스트레스로 암세포가 사멸된다는 것을 규명하였음

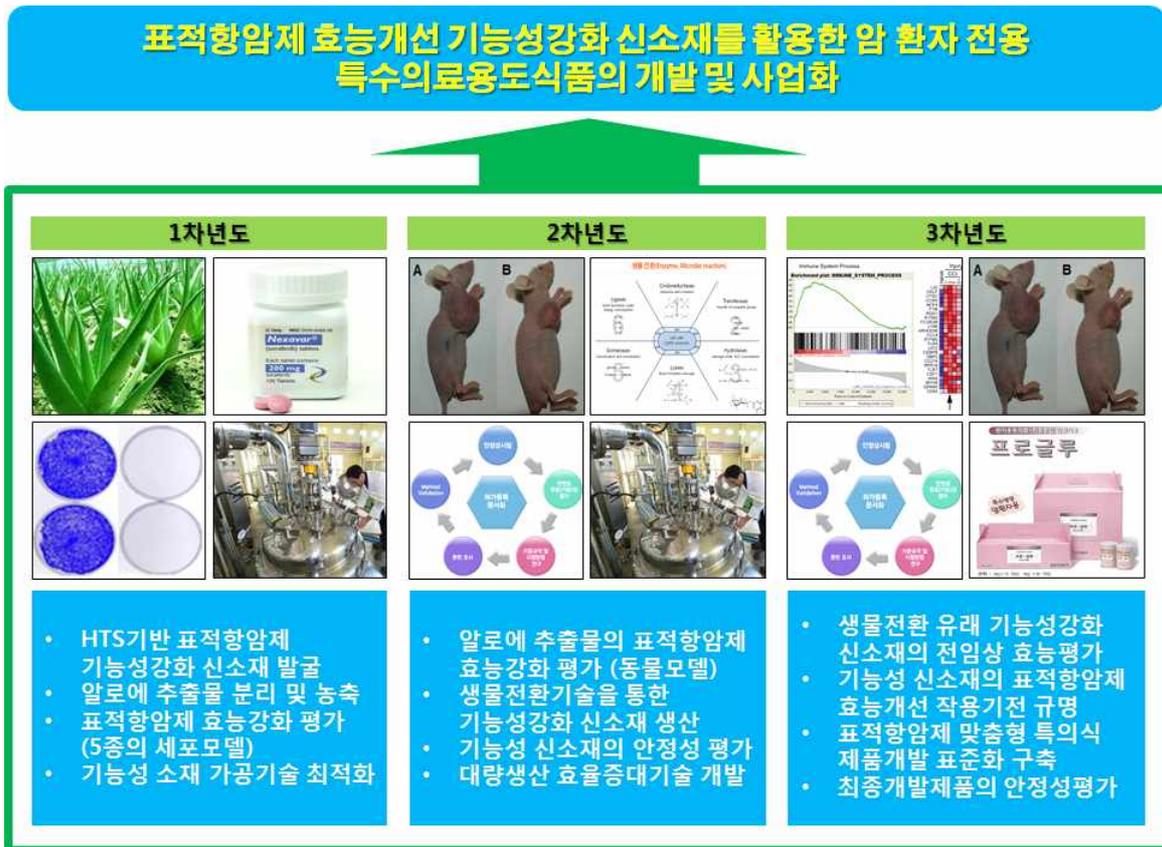
1-2. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종목표	표적항암제 효능개선 기능성 강화 신소재를 활용한 암환자 전용 특수의료용도식품의 개발 및 사업화
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> 표적항암제 효능개선을 위한 천연물 신소재 발굴 발굴된 천연물 신소재의 표적항암제 효능개선 규명 (세포/동물모델) 암환자 전용 특수의료용도 식품 개발을 위한 신소재 가공기술 최적화 생물전환 기능성 강화 신소재의 발굴, 대량생산 및 자동화 공정 확립 생물전환 기능성 강화 신소재의 표적항암제 효능개선 규명 (세포/동물모델) 천연물 신소재 및 생물전환 기반 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 작용기전 규명 최종 개발 시제품의 안정성 및 영양평가 기능성 강화 신소재의 생산 및 제품개발 표준화 구축을 통한 제품의 안정적 생산 표적항암제 사용농도를 1/3로 감소시키며 효능은 강화시킬 수 있는 제2세대 암 환자 전용 특수의료용도식품 개발 및 사업화 일반 및 특수 시장의 활성화 전략 수립

나. 연차별 개발목표 및 내용

(1) 연차별 연구개발 목표 및 내용의 개요



(가) 1차 년도 개발목표 및 내용

개발목표	주관연구기관 (중앙미생물연구소)	암 환자 전용 특수의료용도식품 기능성 향상을 위한 신소재 발굴 및 가공기술 최적화
	협동연구기관 (건국대학교글로벌)	표적항암제 효능개선을 위한 신소재 발굴
개발내용 및 범위	주관연구기관 (중앙미생물연구소)	기능성소재의 가공기술 최적화 및 기능성소재의 영양가치 평가
	협동연구기관 (건국대학교글로벌)	표적항암제 효능개선 기능성 신소재 발굴, 항암효과 개선 효능평가

(나) 2차 년도 개발목표 및 내용

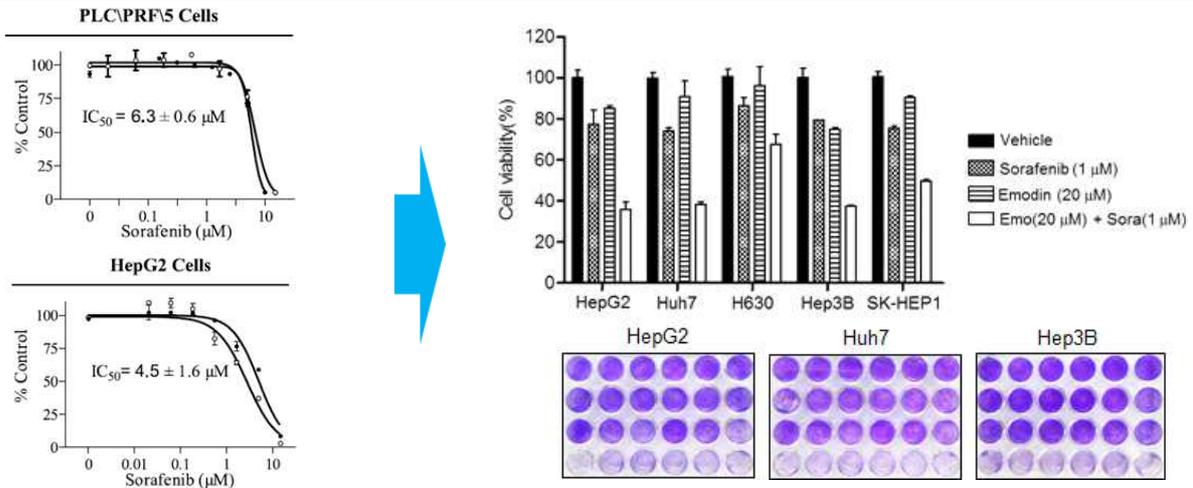
개발목표	주관연구기관 (중앙미생물연구소)	암 환자 전용 특수의료용도식품 기능성 강화를 위한 생물전환 적용 기술개발
	협동연구기관 (건국대학교글로벌)	표적항암제 효능개선 신소재의 효능평가
개발내용 및 범위	주관연구기관 (중앙미생물연구소)	생물전환을 통한 신소재의 기능성 향상 및 효율 증대 기술 개발, 기능성소재의 안정성 평가
	협동연구기관 (건국대학교글로벌)	생물전환 기능성강화 소재의 항암효과 개선 효능평가

(다) 3차 년도 개발목표 및 내용

개발목표	주관연구기관 (중앙미생물연구소)	암 환자 전용 특수의료용도식품의 완제품 개발 및 사업화
	협동연구기관 (건국대학교글로벌)	기능성소재의 적용범위 확대 근거 및 작용기전 확립
개발내용 및 범위	주관연구기관 (중앙미생물연구소)	최종 개발 시제품의 안정성 및 영양평가, 신소재의 대량생산 및 자동화 공정 가능성 평가, 기능성 소재 생산 및 제품개발 표준화 구축
	협동연구기관 (건국대학교글로벌)	다른 암 종류로 기능성소재 활용범위 확대 근거확립, 기능성소재의 작용기전 규명

(2) 연구개발의 창의성·혁신성 등

(가) 기존 기술 대비 저용량의 넥사바로 최대효과 도출



이모딘 병행치료에 의한 기존 연구대비 저농도 (약 1/5)의 넥사바에 의한 항암효과

- 현재까지 보고된 넥사바 (Sorafenib)에 의한 간암세포 성장저해 농도 (IC_{50})는 약 5~7 μM 정도이며, 동물모델에서는 20~40mg/kg/day, 환자적용 농도는 800mg/day (**참고문헌: Llovet et al, NEJM, 2008., Liu et al, Cancer Research, 2006**)
- 기존보고와는 달리 본 연구를 위한 선행연구에서 이모딘(Emodin)은 1 μM (기존농도의 1/5) Sorafenib과 병행투여할 경우 간암세포의 성장을 효과적으로 저해하는 것을 확인하였음
- 본 연구의 가장 큰 창의성 및 혁신성은 넥사바 치료에 소요되는 의료비 (연간 약 4,000만원)를 효과적으로 줄임으로써 환자의 의료비 부담 해소 및 치료효과를 개선시킬 수 있을 것이라는 점

(나) 이모딘과 넥사바 병행투여에 의한 간암치료 연구 최초

연구의 창의성, 혁신성 및 사업화를 위한 희소성 분석

연구내용	이모딘과 항암연구	이모딘과 간암 연구	이모딘, 간암, 넥사바
연구결과 발표 건수	368편의 논문	48편의 논문	보고된 바 없음

- 알로에를 비롯한 다양한 식물에서 분리된 이모딘 및 알로에 이모딘의 항암효과는 1990년대 후반부터 본격적으로 연구되기 시작했으며, 폐암, 대장암, 유방암 등 다양한 형태의 암세포 및 동물모델에서 항암효과가 증명되었음
- 현재까지 약 368편의 연구논문에서 이모딘의 항암효능이 보고되었으며, 특히 이모딘에 의한 간암세포 성장억제 효능과 관련된 논문은 약 48편 보고되었음
- 본 과제에서 제안한 알로에의 성분인 이모딘의 넥사바에 의한 간암세포 성장억제와 치료 보조제로써의 가능성에 대한 연구는 전혀 보고되지 않았으며, 제1세대 항암제 (Cisplatin 과 Gemcitabine)와의 복합치료에 의해 암세포 사멸이 촉진된다는 결과는 3편정도 보고되었음 (Biomed Res Int, 2014, Ma et al., Int J Onco, 2013, Zhang et al)
- 이모딘과 제1세대 항암제와의 병행투여에 의한 항암효능 개선에 관한 연구결과에서 고농도의 1세대 항암제와 이모딘을 병행투여한 후의 세포생존을 분석하기에 사업화 가능성이 없다고 판단됨

다. 연구개발 성과 및 평가방법

성과지표명	세부항목	성과지표명	세부항목
지식재산권	특허 출원 및 등록 건수	사업화	제품화(완제품) 건수
논문발표	국외 논문(SCI/SCIE) 발표건수	인력양성	석사이상급 전문인력양성 (명)
학술발표	국내외 학술발표 건수	홍보/전시	신문, 방송, 저널, 전시회 등 건수
고용창출	신규인력채용 건수	기타	타산업체와 공동연구개발사업 발굴 건수

(단위 : 백만원, 건수)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기 타 (타 연구 활용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문							
												SCI	비 SCI			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
최종 목표	2	2		1		1			5			2		2		4		1	
1차 년도									3										
2차 년도	1											1		1		2			
3차 년도	1	1		1		1			1			1		1		2			
소 계	2	1		1		1			5			2		2		4			
종료 1차 년도		1							1										1
소 계																			
합 계	2	2		1		1			5			2		2		4		1	

* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성

(2) 1차 년도 세부 연구개발 추진 전략 및 방법

1차 년도 (2016년) 연구개발 추진전략 및 방법	
연구내용	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알로에 선정 및 알로에 추출물 분리 및 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (암세포) ▪ 표적항암제 저항성 암세포주 제작 및 기능성 신소재의 효능평가 ▪ 특수의료용도식품 개발을 위한 알로에 기능성 신소재의 가공기술 최적화

● 알로에 함유 단일물질(Emodin, Aloe-Emodin)의 표적항암제 효능강화 기능성 평가

- ☞ HTS로부터 도출된 후보물질 (Emodin)과 유사물질인 Aloe-emodin에 의한 간암 표적항암제 넥사바의 효능을 개선하는지 평가하기 위해 5종의 간암 세포주를 이용할 것임
- ☞ 5종의 간암 세포주에 Emodin 또는 Aloe-emodin을 각각 10~50uM농도와 간암 표적항암제 넥사바를 1~10uM까지 농도별로 처리하고 3일 동안 간암 세포의 성장률을 관찰하고 분석(Crystal violet staining and assay)할 것임

● 알로에 추출물(AE) 분리 및 농축

- ☞ 추출재료로서 알로에는 알로에 재배농장에서 3년생의 발육상태가 좋고 신선한 Aloe arborescence Mill.을 구입하여 엽체 부위를 껍질과 육질을 따로 분리하여 동결건조기로 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 70 mesh 이하의 것을 시료로 사용할 것임
- ☞ 증류수 추출물(Water extract): 10g의 알로에 분말에 1L의 증류수를 첨가하고 항온수조에서 60℃로 24시간 동안 추출한 다음 여과지 (Whatman No.2 filter paper)로 여과한 다음 냉장보관하면서 시료로 사용할 것임
- ☞ 에탄올 및 메탄올 추출물(Ethanol or Methanol extract): 10g의 알로에 분말에 1L의 에탄올(60%) 및 메탄올(60%)을 첨가하고 항온수조에서 60℃로 24시간 동안 추출한 다음 여과지로 여과한 다음, 여과액은 rotary vacuum evaporator로 감압 농축시켜 에탄올 및 메탄올 성분을 제거한 후 1% Tween-20 10ml를 첨가한 후 냉장보관하면서 시료로 사용할 것임

● 알로에 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가

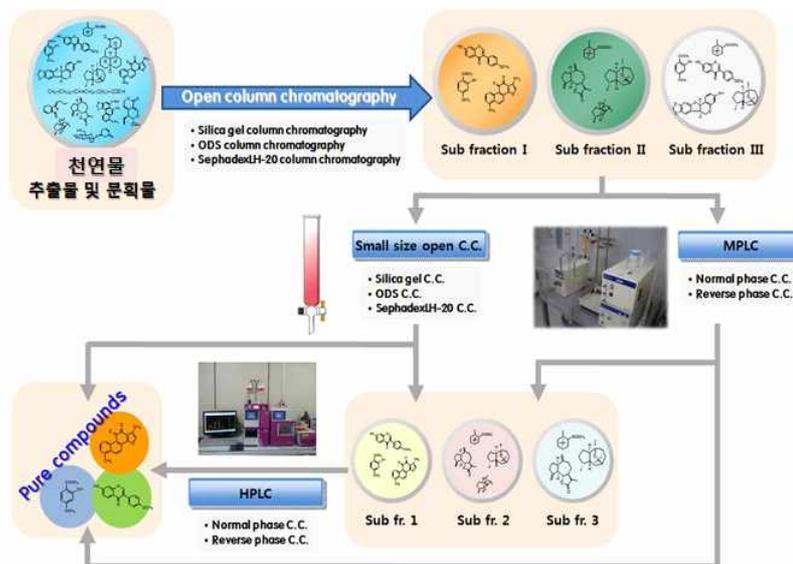
- ☞ 5종의 간암 세포주에 알로에 추출물의 3가지 서로 다른 농도와 간암 표적항암제 넥사바를 1~10uM까지 농도별로 처리하고 3일 동안 간암 세포의 성장률을 관찰하고 분석(Crystal violet staining and assay)할 것임
- ☞ 알로에 추출물에 의한 넥사바의 간암세포 성장저해 효과가 개선되었다는 것을 Combination Index analysis를 통해 알로에 추출물(AE)와 넥사바의 Combination에 의한 넥사바 IC50값의 감소를 분석함

● 표적항암제 저항성 암세포주 제작 및 기능성 신소재의 표적항암제에 대한 저항성 극복 평가

- ☞ 유전자주입기술(Lentiviral vector) 기반 넥사바 저항성 간암 세포주 구축. MAPK14, NRas V12 등은 넥사바의 저항성을 유도하는 종양촉진유전자로 알려져 있기에, 연구팀은 상기 종양촉진유전자를 과발현시킨 간암세포주를 이용하여 넥사바에 저항성을 가진 세포주를 구축함
- ☞ 저농도의 넥사바 장기적인 처리(약 2개월)는 간암세포의 넥사바 저항성 발생의 원인이 됨으로써, 2종의 간암세포를 이용하여 약 2개월 간 0.2~1uM농도의 넥사바를 장기적으로 처리하여 넥사바에 대한 저항성을 지닌 간암 세포주를 구축함
- ☞ 구축된 2종류의 넥사바 저항성 간암 세포주에 알로에 추출물 및 알로에 유래 emodin을 넥사바와 함께

● 암 환자 전용 특수의료용도식품 적용 가능 기능성 소재 발굴

- ☞ 차세대 암환자 전용 특수의료용도식품에 적용할 수 있는 소재를 발굴 하고자 염증 인자 조절 및 고효율 영양 공급원 천연물 소재들을 각각 구입하거나, 채집하여 동정을 하고 표본을 보관.
- ☞ 기연구된 천연물 유래 개발 방향에 맞추어 유기용매를 선정하여 각 천연물의 유기용매 추출물을 제조. 추출은 수욕상에서 수시간 동안 가온 추출을 한 뒤, 여과하여 감압 농축장치를 이용하여서 농축함.
- ☞ 70% 에탄올 사용: 의약품 및 기능성 식품으로도 이용가능성을 넓히기 위해서 선택함.
- ☞ 1차 예상 천연물 추출물로부터 스크리닝을 통한 염증 인자 조절 관련 천연물 추출물 선정.
- ☞ 항염 효과 천연물 추출물 스크리닝: RAW 264.7 세포로부터 NO, iNOS, COX-2 등의 염증매개인자의 발현을 억제 확인.
- ☞ Folin-Denis법을 응용한 폴리페놀 화합물 함량 분석: 각 추출물 시료를 증류수를 이용해 10 µg/ml 농도로 희석하여 2 N Folin 시약 200 µl를 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치. 여기에 10% Na₂CO₃ 2 ml를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 방치한 후 ELISA (Bio-Tek Instruments Inc, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정. 폴리페놀 화합물의 표준곡선은 tannic acid를 이용.
- ☞ 플라보노이드류 함량 분석: 시료에 함유되어 있는 Flavonol류를 분석하기 위하여 시료 0.5 ml에 증류수 2 ml을 취한 후 15% NaNO₂ 150 ul를 첨가하고 6분간 반응. 반응액에 10% AlCl₃ 150 ul를 첨가한 후 6분간 반응하였으며, 이 반응액에 4% NaOH solution 2 ml을 첨가한 후 혼합하고 최종 볼륨 5 ml이 되도록 증류수를 첨가하고 혼합. 15분간 반응 후 510nm에서 흡광도를 측정.
- ☞ Active-guided fractionation에 근거한 활성 물질 및 활성 분획의 분리 및 정제: 스크리닝 및 활성 검색 방법에서 활성을 나타낸 추출물을 각종 크로마토그래피를 이용하여 활성물질을 분리함.
- ☞ 활성 물질의 구조 분석 및 활성 분획의 함유성분 분석: TLC, HPLC를 이용한 활성 분획의 함유성분 분석



천연물 유래 소재로부터 활성 분획 제조 및 유효 성분 분리, 분석 방법

● **알로에 기능성 신소재의 가공기술 최적화**

- ☞ 알로에 기능성 신소재의 대량 가공 기술을 최적화하기 위해 용매, 온도, 압력, 물리화학적 방법을 활용하여 지표 물질인 emodin을 최대한 추출할 수 있는 기술 탐색.
- ☞ 용매에 따른 최적 추출 및 농축 조건 확립: 기본적인 증류수, 에탄올, 메탄올 및 기타 용매들을 사용하여 추출 및 농축 과정을 거쳐 emodin을 지표 물질로 하여 최적의 Aloe-emodin 수율 확보. 용매 사용량 배수 정립.
- ☞ 온도 및 압력에 따른 최적 추출 조건 확립: 저온추출 (25℃ ~ 45℃), 중온추출 (50℃ ~ 60℃), 고온추출 (80℃ ~ 100℃) 조건으로 각각 shaking water bath를 이용하여 24시간 추출. 실험에 사용된 추출물을 감압 농축하여 emodin을 지표 물질로 수율 평가.
- ☞ 화학적 및 물리적 처리에 의한 최적 유용 성분 추출법 확립: 화학적 처리는 pH환경을 pH4, pH7, pH10으로 조절하였고, 물리적 처리는 초고압추출기를 이용하여 시료를 초고압 처리 (2,500psi, 15min), 각각의 추출물의 emodin 함유량을 측정하여 유용성분 추출법을 확립.

● **기능성 소재의 영양 가치 평가**

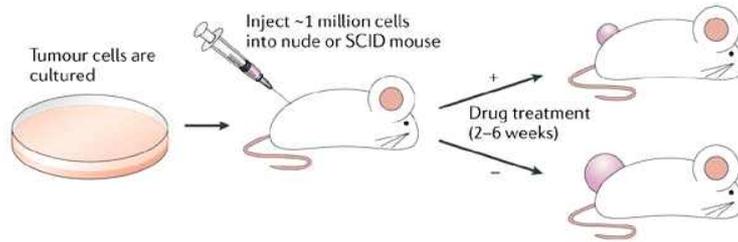
- ☞ 환자용 특수의료용도식품으로서의 영양 가치를 평가하기 위해 영양성분 규격 분석: 단백질, 지방, 당류, 식이섬유, 비타민 (A, B군, C, D, E, 나이아신 등), 무기질 (칼슘, 아연, 철)에 대한 영양 성분 규격 분석.

(3) 2차 년도 세부 연구개발 추진 전략 및 방법

2차 년도 (2017년) 연구개발 추진전략 및 방법	
연구내용	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알로에 기능성 소재 및 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (동물모델) ▪ 미생물기반 생물전환 기술을 통한 기능성 강화 신소재 발굴 및 안정성 평가 ▪ 생물전환 유래 기능성강화 신소재의 대량생산을 위한 효율증대기술 개발

● **알로에 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (동물모델, Xenograft)**

- ☞ 본 연구팀이 개발하고자 하는 암 환자 전용 특수의료용도식품의 주요 성분으로써 알로에 유래 표적항암제 효능개선 단일물질(emodin, aloe-emodin) 및 알로에 추출물(AE)의 기능성 평가를 위해 연구팀은 중증복합면역결핍증(SCID) 마우스를 이용하여 인간종양 동물모델을 구축할 것임
- ☞ 인간종양을 가진 동물모델은 3종의 간암세포를 피하주사를 통해 구축할 것이며, 간암세포로부터 유래된 종양의 지름이 약 0.5cm 정도 크기로 자라게 되면, emodin/aloe-emodin/aloe extract 각각과 넥사바 (10 또는 30mg/kg)농도로 약 1개월간 복강 내 주사를 통해 병행치료 할 것임
- ☞ Emodin (에모딘)의 경우 **최저농도 10mg/kg/day, 최대 40mg/kg/day** (참고문헌: Clinical Cancer Research, 1999, Zhang et al)
- ☞ Sorafenib (넥사바)의 경우 **최저농도는 5mg/kg/day, 최대농도 4mg/kg/day** (참고문헌: Heaptology, 2015, Won et al)
- ☞ Aloe-emodin (알로에 에모딘)의 경우 **최저농도 10mg/kg/day, 최대농도 40mg/kg/day** (참고문헌: Cancer Research, 2000, Pecere et al)



그룹별 약물투여 계획 (단위, mg/kg/day), n=10, 총 4주간 투여								
Combination	Veh	Emo	Sor	A-Emo	A-Ext	Emo	A-Emo	A-Ext
						Sor	Sor	Sor
저농도	-	10	5	10	10	10+5	10+5	10+5
고농도	-	40	40	40	50	40+40	40+40	50+40

Xenograft 모델 구축과 그룹별 약물투여 계획

*Emo=Emodin, Sor=Sorafenib(Nexavar), A-Emo=Aloe-emodin, A-Ext=Aloe-extract

● **기존 표적항암제 효능개선 물질 대비 알로에 유래 신소재의 우수성 규명**

☞ 간암 표적항암제 넥사바의 효능을 강화시키는 후보물질 3종을 선택하여 알로에 유래 신소재인 에모딘의 우수성을 세포실험을 통해 규명

● **미생물기반 생물전환 기술을 통한 기능성 강화 신소재 발굴 및 효율 증대 기술 개발**

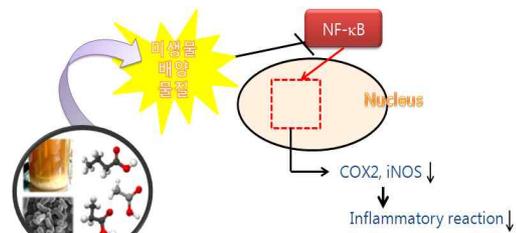
☞ 기존 1세대 특수의료용도식품 소재의 미생물 기반 생물 전환: 1세대 특수의료용도식품 소재로 사용된 허브류, 대두, 균사체, 해조류 및 이 후 활용 가능 소재의 생물 전환을 통해 기능성 향상 및 효율을 증대 시키고자 함.

☞ 활용 균주는 기존 보유 균종인 *Saccharomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Rhodospseudomonas* spp. 등을 활용하여 단계적 공생배양을 통한 생물전환 추진.

☞ 생물전환 소재의 효능 평가: RAW 264.7 세포로부터 NO, iNOS, COX-2 등의 염증매개인자의 발현 억제 확인.



생물전환을 통한 소재의 고기능성 및 고부가가치화

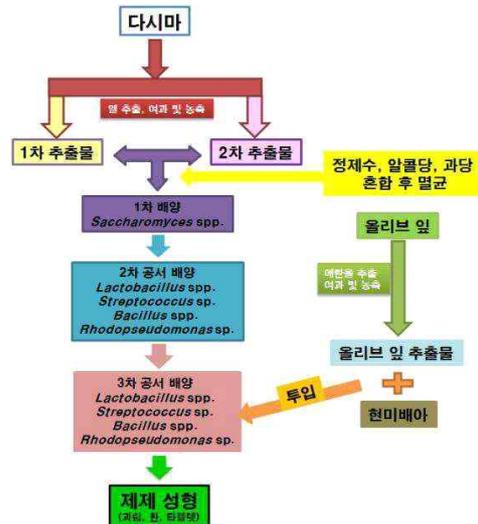


생물전환 소재의 효능 평가

☞ 알로에 기능성 신소재 생물전환을 위한 균주의 분리 및 동정: 알로에 신소재의 최적 생물전환 균주를 선별하기 위해 소재로부터 균주의 분리. 균주의 특성 분석 및 16s rDNA sequencing을 이용하여 분리균 동정.

☞ 알로에 신소재를 활용하여 균주의 최적 생육 조건 확인: 최적 온도 조건 탐색 (25°C, 35°C, 40°C), 최적 배양 시간 탐색 (12h ~ 72h), 최적 pH 조건 탐색 (pH4 ~ pH10).

- ☞ 분리 균주와 기 보유 균주를 활용한 단계적 공서배양 조건 탐색: 알로에와 알로에에서 추출한 aloe-emodin을 분리한 균주와 기 보유 균주를 활용하여 최적의 배양 조건 (대량 배양 조건에서 Aeration, 교반 속도 등) 을 확립하고 단계적 공서 배양을 위한 조건을 탐색.
- ☞ 복합 균주의 단계적 공서배양 조건 확립 후 생물전환에 따른 지표 물질 분석 (emodin)과 물질 변환 구조 분석을 통해 효율 증대 기술 개발.



단계적 공서배양의 과정 예시

● 기능성 신소재의 안정성 평가

- ☞ 알로에 추출물 및 생물전환 신소재의 가속시험: 추출물 및 생물전환 신소재를 대상으로 습도 75%, 온도 40°C의 조건에서 6개월 동안 2개월 단위로 지표성분의 함량 변이 측정.
- ☞ 알로에 추출물 및 생물전환 신소재의 장기보존시험: 추출물 및 생물전환 신소재를 온도 25°C, 습도 60%의 조건에서 6개월 동안 2개월 단위로 지표성분의 함량 변이 측정.
- ☞ 미생물 발효 유발독소(mycotoxin) 분석: 미생물 배양 과정에 의한 안전성 연구를 위하여 총아플라톡신 (B1, B2, G1 및 G2의 합), 제랄레논, 데옥시니발레놀, 오크라톡신A, 푸모니신 (F1, F2의 합) 등 분석.
- ☞ 영양성분 분석 데이터와 안정성 평가 데이터를 활용한 신소재의 기준 규격 설정.

(4) 3차 년도 세부 연구개발 추진 전략 및 방법

3차 년도 (2018년) 연구개발 추진전략 및 방법	
연구내용	<ul style="list-style-type: none"> ■ 생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가 (세포 및 동물모델) ■ 기능성강화 신소재의 표적항암제 기능성 강화 작용기전 규명 ■ 발굴된 기능성소재와 표적항암제의 상호작용 규명 ■ 신소재의 대량생산 및 특수의료용도식품 제품개발 표준화 구축 ■ 최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가

● 생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가 (세포모델)

- ☞ 5종의 간암 세포주 (일반 간암세포주 3종 + 넥사바 저항성 간암세포주 2종)에 알로에 추출물로부터

터 유래된 생물전환 기반의 기능성강화 신소재 후보물질을 3가지 서로 다른 농도와 간암 표적항암제 넥사바를 1~10uM까지 농도별로 처리하고 3일 동안 간암 세포의 성장률을 관찰하고 분석 (Crystal violet staining and assay)할 것임

☞ 생물전환 기반 기능성강화 신소재에 의한 넥사바의 간암세포 성장저해 효과가 개선되었다는 것을 Combination Index analysis를 통해 생물전환 기능성강화 신소재와 넥사바의 Combination에 의한 넥사바 IC50값의 감소를 분석함

● **생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가 (동물모델)**

☞ 생물전환 기반 표적항암제 맞춤형 기능성 강화 신소재의 전임상 효능평가를 위해 연구팀은 중증복합면역결핍증(SCID) 마우스를 이용하여 3종의 인간종양 동물모델을 구축 (일반간암세포주 1종 + 넥사바 저항성 간암세포주 2종)할 것임

☞ 간암세포로부터 유래된 종양의 지름이 약 0.5cm 정도 크기로 자라게 되면, 생물전환으로 생산된 기능성강화 신소재의 2개 농도 (세포모델에서의 결과에 따라 동물모델에서의 사용할 농도가 결정될 것임)와 넥사바 (10 또는 30mg/kg)농도로 약 1개월간 복강 내 주사를 통해 병행치료 할 것

● **생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능개선 작용기전 규명**

☞ RNA-sequencing을 기반으로 생물전환 유래 기능성 강화 신소재와 표적항암제의 Combination에 따른 간암 세포사멸 및 세포성장 조절 유전자군의 변화 및 시너지를 발굴하고, 발굴된 유전자의 제거 및 과발현을 통해 생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적유전자군을 제시할 것임

☞ Secretomics를 기반으로 생물전환 유래 기능성 강화 신소재와 표적항암제의 Combination에 따른 간암 세포사멸 및 세포성장 조절 작용기전을 규명하고자 함. 현재까지 많은 종류의 표적항암제에 의한 저항성발생 기전은 분비성 성장인자 및 단백질들의 재활성에 의존적이라는 연구결과들이 많이 보고됨. 따라서 본 연구팀은 넥사바 저항성 간암세포주에서 특이적으로 증가되는 분비성 성장인자 및 신호전달 단백질을 분석하고 본 연구팀이 개발한 알로에 기반의 기능성강화 소재에 의해 넥사바 저항성에 따른 분비성 성장인자 및 단백질의 감소를 분석하여 기능성강화 신소재의 직접적인 표적 신호전달체계 또는 표적분자를 제시함으로써 개발상품에 대한 신뢰성을 소비자들에게 제시하고자 함

● **발굴된 기능성소재와 표적항암제의 약물간상호작용 규명**

☞ 발굴된 기능성 강화소재와 표적항암제 간의 배합비율 분석 및 세포내 흡수율 분석을 통해 약물 간의 상호작용을 규명하고자 함

● **기능성 신소재를 활용한 2세대 특수의료용도식품 제품의 생산**

☞ 특수의료용도식품 군중 환자용 균형영양식 규격에 맞추어 시제품 생산:

- ① 단백질 공급원 선택: 아미노산 스코어가 100으로 맞추어진 단백질 공급원 선택 (완두, 대두, L-메티오닌, L-라이신 염산염, L-트레오닌, L-트립토판), 대두분말, 분리대두단백
- ② 비타민 및 미네랄: 제품 1,000 kcal 당 1일 기준치의 50% 이상 함유, 비타민군, 칼슘, 철, 아연 1포당 30% 이상 함유.
- ③ 항암 맞춤형 기능성 개선: 표적항암제 효능 개선을 위한 맞춤형 신소재 함유, 항염증 관련 천연물 및 생물전환 소재 함유.
- ④ 환자들이 거부감 없이 즐길 수 있는 이미, 이취가 없는 성상과 맛.

☞ 개발 시제품의 환자용 특수용도식품으로서의 식품위생법 상에서 요구되는 규격에 따라 규격 적합성에 대한 분석 시행.

식품의약품안전청 특수의료용도식품 규격

성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.
수분 (%)	10.0 이하 (건조분말 제품에 한한다)
영양소	표시량 이상 (단, 제한 필요 영양소는 표시량 이하 또는 범위이내)
대장균군	음성이어야 한다.
세균수	1 mL 당 100 이하 (액상제품에 한한다.)
타르색소	검출되어서는 아니된다.
탄화물	100g 당 7.5 mg (미국 ADPI에서 정하고 있는 표준판 Disk A와 비교) 이하여야 한다. (단 분말제품에 한한다)
엔테로박터사카자기	음성 (단, 생후 6개월 미만의 영·유아용 특수조제식품 중 분말제품에 한한다.)
바실러스 세레우스	1g 당 100이하

☞ 암 환자 전용 특수의료용도식품의 제품화 공정 개발: 개략적인 다음의 과정에 따라 공정 개발

- ① 원료 구입, 수급 및 선별 세척: 각각의 원료를 선별, 세척하여 건조.
- ② 원료의 칭량 및 전처리.
- ③ 원료의 추출 및 농축 과정.
- ④ 추출물의 미생물의 단계적 공서배양에 의한 생물전환.
- ⑤ 배양 종료 된 이후 열수추출과 여과 공정을 통해 수용성 다당체 성분 추출, 불용성 성분들을 여과를 통해서 제거하거나 건조, 분쇄하여 활용.
- ⑥ 여과액에 대해서 동결 건조와 분쇄 공정.
- ⑦ 제품의 혼합과 기초 배합비 개발.
- ⑧ 제품의 멸균, 최종 제제화 (과립, 분말, 환류, 타블렛, 액상 등), 충전, 포장

☞ 기타 제품화: 제품의 성상, 포장의 형태 및 디자인

● **최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가**

- ☞ 최종 제품의 안전성 데이터 확보를 위한 일반 독성 시험: 랫을 사용한 단회투여독성시험, 4주 DRF, 13주 반복 독성 (4주 회복군 포함) 등
- ☞ 환자용 특수의료용도식품 완제품으로서의 영양 가치를 평가하기 위해 영양성분 규격 분석: 단백질, 지방, 당류, 식이섬유, 비타민 (A, B군, C, D, E, 나이아신 등), 무기질 (칼슘, 아연, 철)에 대한 영양성분 규격 분석.

● **기능성 소재 및 제품의 표준화 구축**

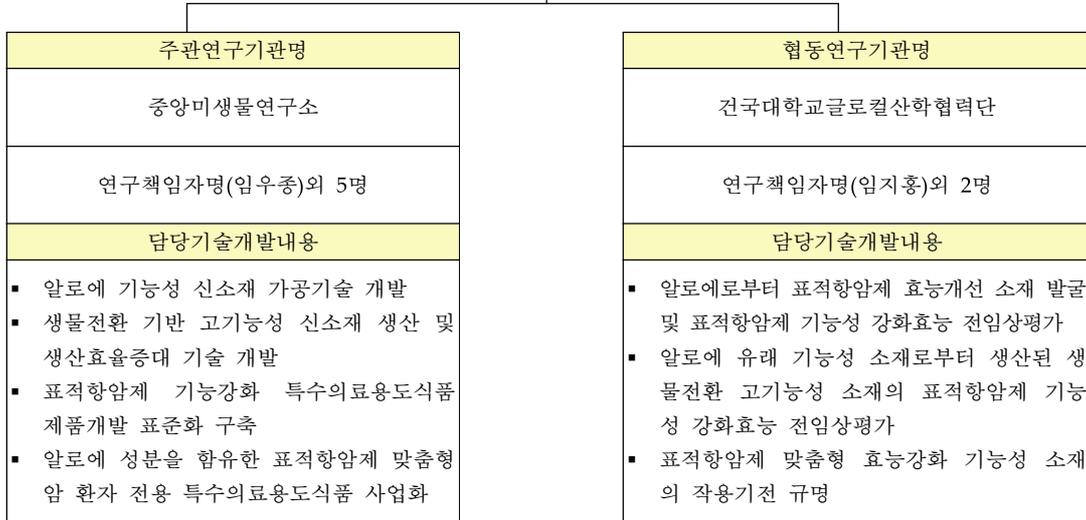
- ☞ 적용 환자의 상황에 따른, 일일섭취량에 따른 기능성 소재의 표준화 구축.
- ☞ 영양성분 분석 데이터와 안전성 평가 데이터를 활용한 완제품의 기준 규격 설정.
- ☞ 관능 평가를 통한 제품 성상의 표준화 구축.

나. 연구개발 추진체계

○ 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	표적항암제 효능개선 맞춤형 고부가가치 특수의료용도식품 개발	주관연구책임자 (임우중)외 총 8명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	1	6
대학	1	3
국공립(연)		
출연(연)		
기타		



다. 연구개발 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (부담금)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	알로에 추출물 분리 및 농축	■	■	■	■	■								20,000	임지홍 (건국대학교 글로벌캠퍼스)
2	표적항암제 효능개선 기능성 평가 (세포)			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	70,000	임지홍 (건국대학교 글로벌캠퍼스)
3	알로에 기능성 신소재의 가공기술 최적화				■	■	■	■	■	■	■	■	■	50,000 (30,000)	임우종 (중앙미생물 연구소)
4	생물전환 기술을 통한 기능성 강화 신소재 발굴						■	■	■	■	■	■	■	60,000 (40,000)	임우종 (중앙미생물 연구소)
2차년도															
1	알로에 기능성소재의 표적항암제 효능개선 평가 (동물모델)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	임지홍 (건국대학교 글로벌캠퍼스)
2	알로에 추출물의 표적항암제 효능개선 평가 (동물모델)						■	■	■	■	■	■	■	30,000	임지홍 (건국대학교 글로벌캠퍼스)
3	생물전환 유래 기능성강화 신소재의 생산효율증대 기술개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	80,000 (50,000)	임우종 (중앙미생물 연구소)
4	표적항암제 저항성 암세포주 제작 및 기능성소재 효능평가			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	임지홍 (건국대학교 글로벌캠퍼스)
5	특수의료용도식품으로써 기능성 신소재의 안정성 평가							■	■	■	■	■	■	30,000 (20,000)	임우종 (중앙미생물 연구소)
3차년도															
1	생물전환 유래 기능성 신소재의 표적항암제 효능개선 효과 (세포)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	임지홍 (건국대학교 글로벌산학협 력단)
2	생물전환 유래 기능성 신소재의 표적항암제 효능개선 효과 (동물)						■	■	■	■	■	■	■	30,000	임지홍 (건국대학교 글로벌산학협 력단)
3	기능성 강화 신소재의 표적항암제 효능개선 작용기전 규명	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	50,000	임지홍 (건국대학교 글로벌산학협 력단)
4	표적항암제 기능강화 특수의료용도식품 제품개발 표준화 구축							■	■	■	■	■	■	20,000 (20,000)	임우종 (중앙미생물 연구소)
5	최종 제품의 개발과 안전성 및 영양평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	90,000 (50,000)	임우종 (중앙미생물 연구소)

라. 위탁연구/외부용역/국제공동연구 현황 : 해당사항 없음

2-2. 연구개발성과

가. 연구개발 성과

(1) 논문게재 성과

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Fascaplysin Sensitizes Anti-Cancer Effects of Drugs Targeting AKT and AMPK	<i>Molecules</i>	임지홍	22	스위스	MDPI	SCIE (IF3.098, 상위45%)	2017년 12월	molecules23010042
2	Emodin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to the Anti-Cancer Effect of Sorafenib through Suppression of Cholesterol Metabolism	International Journal of <i>Molecular Sciences</i>	임지홍	19	스위스	MDPI	SCIE (IF3.687, 상위30%)	2018년 10월	ijms19103127

(2) 특허성과

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	에모딘을 포함하는 소라페니브의 암 치료효과 증강용 조성물	국내	건국대학교 글로벌산학협력단	2017년 3월 13일	10-2017-0031336	건국대학교 글로벌산학협력단	2018년 8월 30일	10-1895418	100
2	알로에 추출물을 포함하는 소라페니브의 암 치료효과 증강용 조성물	국내	건국대학교 글로벌산학협력단	2018년 10월 12일	10-2018-0121559				100

(3) 국내 및 국제학술대회 발표성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2017 한국분자세포생물학회 대전충청 연합 학술대회	김영선	2017년 8월 17일-18일	충북 수안보면 THE조선포텔	국내
2	2018 한국생물과학협회 정기학술대회	김영선	2018년 8월 22일	평창 알펜시아 리조트	국내
3	2018 한국분자세포생물학회 대전충청 연합 학술대회	김영선	2018년 8월 23일-24일	충북 수안보면 THE조선포텔	국내

(4) 기술거래(이전) 성과

No.	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	특허양도	“알로에추출물을 포함하는 소라페니브의 암 치료 효과 증강용 조성물” 특허권 양도	중앙미생물 연구소	2018년 11월 09일	6백만원	

(5) 전문연구 인력양성 성과

No.	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	학사졸업	2017			○		○			○				
2	학사졸업	2019			○			○		○				
3	학사졸업	2019			○		○			○				
4	학사졸업	2019			○		○			○				

나. 연구결과

(1) 기술적 성과

① 전체연도 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	표적항암제 기능성장화 신소재 발굴	HTS를 통한 표적항암제 효능강화 천연물 유래 단일물질 발굴	알로에 함유 단일물질의 표적항암제 효능강화 기능성 평가	넥사바와 이모딘을 복합 처리결과 5종의 간암세포 성장이 현저히 감소됨을 확인
			암환자 전용 특수의료용도식품 적용 가능 기능성 소재 발굴	염증인자 조절 및 고효율 영양 공급원 천연물 소재 후보군을 선정하여 추출물 수득 후 효능 및 생리활성 물질 탐색
	알로에 추출물 분리 및 농축	알로에 선정 및 알로에 추출물 분리	알로에 베라(엽체, 줄기), 알로에 페록스 2종의 메탄올과 에탄올 추출	알로에 베라 엽체 메탄올 추출물, 알로에 베라 줄기 메탄올 추출물, 알로에 페록스 에탄올 추출물의 3종을 획득
			알로에 기능성 신소재의 가공 기술 최적화	aloe로부터 aloe-emodin을 추출하는 가공기술을 최적화하기 위해, 성상, aloe의 종류, 용매 등을 조절하여 가장 좋은 수율의 방법을 수립하여 추출, 농축물을 획득
	표적항암제 효능강화 평가	표적항암제 효능강화 기능성 평가 (간암세포)	알로에 추출물과 넥사바의 복합효과 분석	추출물 단독처리 후 세포독성을 확인
				알로에 추출물 2종에 의한 넥사바의 간암세포 성장저해 효과가 개선되었음을 확인
2차 년도 (2017)	알로에 기능성 신소재의 가공기술 최적화 및 생물전환을 이용한 효율 증대	특수의료용도식품 에 활용 가능한 알로에의 가공기술 최적화	다양한 조건의 추출법을 통해 추출물 확보 후 HPLC와 UPLC를 사용하여 Aloe-emodin과 emodin 분석	확보한 추출물에서 비교적 높은 수준의 Aloe-emodin과 emodin을 확인하여 최적에 가까운 추출법을 확립
		알로에 소재의 생물전환을 이용한 효율 증대	알로에를 이용한 액상 생물전환과 고상 생물전환을 이용하여 효율 증대	최적 추출 방법에 따른 추출물 확보 후 액상 생물전환 과정 진행 중이며, 그와는 별도로 고체상태로 배양 가능한 방법을 고안하여 생물전환
	기능성 소재 발굴 및 생물전환을 이용한 발굴 신소재의	특수의료용도식품 에 사용가능한 기능성 신소재 확보	기능성 소재로서 가치가 있는 소재를 스크리닝하여 소재로서 가치가 있다고 판단되는 소재의 추출물 확보	잎새버섯, 두충, 개똥썩, 모링가, 영지버섯, 결명자, 호장근, 천년초, 미술토, 버드나무 등의 천연물을 선별하여 추출물 확보하였으며, 이중 몇 가지 추출물을 선별하여 생물전환

	효율 증대	생물전환 기술을 이용하여 신소재의 효율 증대	생물전환 시킨 신소재의 효율 증대 확인과 생리활성 물질 분석	생물전환 신소재의 염증성 테스트 수행중이며, LC-MS/MS 분석을 통하여 생리활성물질 naringin 확인
	표적항암제 효능강화 평가	기능성소재 및 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가(동물모델)	Xenograft 모델 구축과 약물그룹별 투여 후 평가	인간종양 동물모델 구축완료 후 에모딘 투여를 통해 종양이 감소됨을 확인
	신소재의 우수성 규명	기존 표적항암제 효능개선 물질 대비 신소재의 우수성 규명	에모딘과 넥사바의 복합효과 및 재현성 분석	기존 효능개선 물질 5종 대비하여 에모딘의 복합효과 우수성을 확인
알로에 추출물과 넥사바의 복합효과 및 재현성 분석			알로에 추출물에 의한 넥사바의 효능개선 효과 확인	
	표적항암제 저항성 세포주 평가	넥사바 저항성 암세포주 구축 및 저항성 극복 평가	저항성 암세포주에 대한 에모딘과 알로에추출물의 효능개선 효과 분석	넥사바 저항성 세포주 2종 구축완료 및 에모딘과 알로에추출물의 극복 가능성 확인
3차 년도 (2018)	표적항암제 효능강화 평가	생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가(세포모델)	간암세포주에 알로에추출물 유래 생물전환 기반 기능성 신소재 처리 후 넥사바 효능강화 평가	알로에추출물 5종으로부터 생물전환 유래 기능성 소재의 세포독성을 확인 후, 넥사바와 병행처리를 통해 시간-농도 의존적 효능 개선 우수성을 확인
		생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가(동물모델)	Xenograft모델에 알로에추출물 유래 생물전환 기반 기능성 신소재 처리 후 넥사바 효능강화 평가	인간종양 동물모델 in vivo 결과, 에모딘과 넥사바 병행투여를 통해 종양이 현저히 감소됨을 확인
	신소재의 기능성 강화 작용기전 규명	생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능개선 작용기전 규명	RNA sequencing 기반 기능성 신소재와 넥사바의 병행처리시 유전자 발현 변화 규명	간암세포주에서 에모딘과 넥사바의 병행처리시의 콜레스테롤 생합성 유전자 발현 조절 기전을 통해 효능개선 효과를 나타냄을 증명
			Secretomics 기반 기능성 신소재와 넥사바의 병행처리시 조절 작용기전 규명	간암세포주에서 에모딘과 넥사바를 병행처리시 AKT 신호전달체계를 억제하는 단백질 변화량을 확인하여 기전을 증명
	상호작용 규명	발굴된 기능성 신소재와 표적항암제의 약물간 상호작용 규명	발굴된 기능성 강화소재와 표적항암제 간의 배합비율 분석 및 세포내 흡수율 분석을 통해 약물간의 상호작용을 규명	간암세포주에서 에모딘과 넥사바의 배합비율과 처리농도 조절을 통해 세포내의 단백질 변화량을 측정하여 콜레스테롤 저하 효과와 그 기전을 규명
기능성	발굴된 신소재를	특수의료용도식품	환자용 특수용도식품으로서의	

신소재를 활용한 2세대 특수의료용 도식품 제품의 생산	활용한 특수의료용도식품의 시제품 생산과 제품화 공정 개발	시제품 생산	식품위생법 상에서 요구되는 규격에 따라 시제품 제작
		특수의료용도식품의 제품화 공정 개발	제품의 혼합과 기초 배합비를 개발하여 최종 제제화함
최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가	시제품의 일반 독성시험 및 영양성분 분석	일반 독성 시험	최종 제품의 안전성 데이터 확보를 위한 일반 독성 시험 실시 : 랫드를 사용한 단회투여독성시험을 통한 안전성 확인
		영양성분 분석	환자용 특수의료용도식품 완제품으로서의 영양 가치를 평가하기 위해 영양성분 규격 (탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨)분석을 통한 영양가치 확인
기능성 소재 및 제품의 표준화 구축	최종 개발 제품의 표준화 구축	완제품의 기준 규격 설정	영양성분 분석 데이터와 안전성 평가 데이터를 활용한 완제품의 기준 규격 설정
		제품 성상의 표준화 구축	관능 평가를 통한 제품 성상의 표준화 구축

② 연구범위 및 연구수행 방법

1) 1차년도

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차 년도 (2016)	알로에 함유 단일물질(Emodin, Aloe-Emodin)의 표적항암제 효능강화 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 암세포의 성장-세포주기-세포사멸 분석 Crystal violet assay for cell viability analysis FACS for cell cycle analysis FACS for apoptosis analysis 	<ul style="list-style-type: none"> 알로에 함유 단일물질 2종을 세포에 처리하여 Crystal violet assay를 기반으로 세포성장률, FACS를 이용한 세포주기 및 세포사멸 분석 표적항암제와 알로에 함유 단일물질을 병행처리 후 세포성장률, FACS를 이용한 세포주기 및 세포사멸 분석
	알로에 추출물 분리 및 농축	<ul style="list-style-type: none"> 추출재료 알로에의 선정 알로에 추출, 분리 및 농축 	<ul style="list-style-type: none"> 알로에 베라, 알로에 페록스 2종 선정하여 유기용매로 추출 추출물 3종 획득 후 냉장보관하여 세포 실험에 사용
	알로에 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성평가	<ul style="list-style-type: none"> 암세포의 성장 분석 Crystal violet assay for cell viability analysis 	<ul style="list-style-type: none"> 알로에 추출물과 표적항암제를 병행투여한 후 Crystal violet assay를 기반으로 세포성장률분석
	표적항암제 저항성 암세포주 제작 및 기능성 신소재의 표적항암제에 대한 저항성 극복 평가	<ul style="list-style-type: none"> 넥사바저항성 간암세포주 구축 Lentiviral-mediated gene transduction Sorafenib-mediated cell line 	<ul style="list-style-type: none"> 유전자기반의 넥사바저항성 세포주는 MAPK14 or NRas-V12 over expressing lentiviral vector를 간암세포에 감염시킨 후 Puromycin을 이용하여 약 4주 간 안정화시킴 Sorafenib을 0.5uM에서 점차적으로 증가시켜 약 4개월 간 최대 10uM의 농도의 sorafenib과 함께 간암세포주 배양하여 최종적으로 Sorafenib에 대한 저항성을 지닌 간암세포주를 구축함
	암환자 전용 특수의료용도식품 적용 가능 기능성 소재 발굴	<ul style="list-style-type: none"> 천연물의 선정과 추출 및 농축 기능성 소재의 효능 및 생리 활성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 염증인자 조절 및 고효율 공급원 천연물 소재 후보군 선정 (해조류, 버섯류, 홍삼, 개똥쑥, 모링가, 한약재류 등) 천연물소재 후보군 추출 및 농축 HPLC를 이용한 기능성 소재의 생리 활성 물질 분석
	알로에 기능성 신소재의 가공 기술 최적화	<ul style="list-style-type: none"> aloe-emodin 추출을 위한 최적 조건 탐색 aloe-emodin 수율 확인을 위한 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 알로에의 종, 성장, 용매 등을 다양하게 비교하여 최적의 수율 방법 선정을 위한 실험 HPLC를 통한 aloe-emodin의 검출과 수율을 분석

2) 2차년도

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2차 년도 (2017)	알로에의 가공기술 최적화 및 생물전환을 이용한 효율 증대	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알로에 종, 성상, 부위 등 최적 시료 탐색 ▪ 알로에 추출 방법에 따른 최적 추출 조건 확립 ▪ 알로에 및 기타 영양원과 미생물 소재를 이용한 생물전환 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알로에로부터 Aloe-emodin 추출의 효율을 높이기 위해 성상, 종류, 용매, 시간 등 조건을 비교 ▪ 다양한 조건에서 수득한 추출물을 Aloe-emodin과 emodin을 HPLC, UPLC로 분석하여 효율을 확인 ▪ 알로에 생물전환의 경우 가장 최적화된 추출법을 사용하여 액상발효를 진행 ▪ 그와는 달리 고상 발효 방법 또한 새롭게 고안하여 수행
	기능성 소재 발굴 및 생물전환을 이용한 발굴 신소재의 효율 증대	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 기존의 데이터 베이스를 통해 기능성 소재로서 가치가 있는 소재를 스크리닝 ▪ 기능성 소재로서 가치있다고 판단되는 소재의 추출물 확보 ▪ 생물전환 기술을 이용하여 신소재의 효율 증대 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 잎새버섯, 두충, 개똥쑥, 모링가, 영지버섯, 결명자, 호장근, 천년초, 미슬토, 버드나무 등의 천연물을 선별하여 추출물 확보 ▪ 확보한 추출물의 염증성 테스트 수행 ▪ 신소재의 효율을 증대하기 위하여 각각의 추출물 생물전환 ▪ 생물전환한 해조류를 LC-MS/MS 분석을 이용하여 생리활성물질 분석
	알로에 기능성 소재 및 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (동물모델, Xenograft)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 중증복합면역결핍증(SCID) 마우스에서 인간종양동물모델(xenograft) 구축 ▪ 기능성 소재 및 추출물의 복강내 반복투여 ▪ 효능강화 효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 간암세포를 마우스에 피하주사하여 종양지름을 0.5cm정도까지 유도 ▪ Emodin, aloe extract 각각과 넥사바를 24일 동안 복강주사로 병행처리 ▪ 각 군별로 종양의 크기변화를 측정하여 효과분석
	기존 표적항암제 효능개선 물질 대비 알로에 유래 신소재의 우수성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포의 세포주기, 세포사멸, 단백질 발현량 분석 ▪ FACS for cell cycle analysis ▪ FACS for apoptosis analysis 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알로에 함유 기능성 소재를 간암세포에 처리하여 유세포분석기(FACS)를 이용한 세포주기 및 세포사멸 분석 ▪ 표적항암제와 알로에 함유 기능성 소재를 병행처리 후 FACS를 이용한 세포주기 및 세포사멸에 대한 기존의 효능개선 대표물질 5종과의 비교 분석 ▪ 약물처리된 간암세포에서 분리한 단백질의 western blot 분석
	표적항암제 저항성 암세포주에서 기능성 신소재의 저항성 극복 평가	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 넥사바저항성 간암세포주 구축 완료 ▪ Crystal violet assay for cell viability analysis ▪ Sorafenib-mediated cell line ▪ Lentiviral-mediated gene transduction 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 구축된 넥사바저항성 간암세포주 2종에 대한 알로에 유래 기능성 신소재의 병행처리한 후 crystal violet assay를 기반으로 세포성장률 분석

3) 3차년도

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
3차 년도 (2018)	생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가(세포모델)	<ul style="list-style-type: none"> Crystal violet assay for cell viability analysis Combination Index analysis 	<ul style="list-style-type: none"> 간암세포주에 알로에추출물 유래의 생물전환 기반 기능성강화 신소재 후보물질을 농도별로 병행처리 간암세포 성장률 분석 생물전환 기반 기능성강화 신소재에 의한 넥사바의 간암세포 성장저해 효과 개선 측정 Combination에 의한 IC₅₀ 감소 분석
	생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가(동물모델)	<ul style="list-style-type: none"> 중증복합면역결핍증(SCID) 마우스에서 인간종양동물모델(xenograft) 구축 생물전환 유래 기능성 신소재 및 추출물의 복강주사 반복투여 넥사바 병행투여로 효능강화 평가 분석 Immunohistochemistry 	<ul style="list-style-type: none"> 간암세포를 마우스에 피하주사하여 종양지름을 0.5cm정도까지 유도 생물전환 유래 기능성 신소재, 생물전환 후보용 추출물을 각각 넥사바를 24일 동안 복강주사로 병행 치료 각 군별로 종양의 크기변화를 측정하여 개선효과 및 면역조직화학염색 분석
	생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능개선 작용기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> Quantitative RT-PCR 성장인자 및 신호전달 단백질 분석 FACS for cell cycle, Ki67, apoptosis assay 	<ul style="list-style-type: none"> RNA sequencing 기반 생물전환 유래 기능성강화 신소재와 넥사바의 병행에 따른 세포사멸 및 조절 유전자군 변화 및 시너지 발굴 Secretomics 기반 생물전환 유래 기능성강화 신소재와 넥사바의 병행에 따른 간암세포사멸 및 조절 작용기전을 규명 알로에 기반의 기능성강화 소재에 의해 넥사바 저항성에 따른 분비성 성장인자 및 단백질 감소를 분석
	발굴된 기능성소재와 표적항암제의 약물간 상호작용 규명	<ul style="list-style-type: none"> Combination index analysis Measurement of intracellular cholesterol Luciferase assay 	<ul style="list-style-type: none"> 발굴된 기능성강화 신소재와 표적항암제 간의 배합비율 분석 세포 내 흡수율 분석을 통해 약물간의 상호작용을 규명
	기능성 신소재를 활용한 2세대 특수의료용도식품 제품의 생산	<ul style="list-style-type: none"> 특수의료용도식품 시제품 생산 특수의료용도식품의 제품화 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 특수의료용도식품 군중 환자용 균형영양식 규격에 맞추어 시제품 생산 암 환자 전용 특수의료용도식품의 제품화 공정 개발
	최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가	<ul style="list-style-type: none"> 일반 독성 시험 영양성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 최종 제품의 안전성 데이터 확보를 위한 일반독성시험 (단회경구투여) 환자용 특수의료용도식품 완제품으로서의 영양 가치를 평가하기 위해 영양성분 분석
	기능성 소재 및 제품의 표준화 구축	<ul style="list-style-type: none"> 완제품의 기준 규격 설정 제품 성상의 표준화 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 영양성분 분석 데이터와 안전성 평가 데이터를 활용한 완제품의 기준 규격 설정 관능 평가를 통한 제품 성상의 표준화 구축

③ 세부목표별 연구결과

1차 년도 (2016년) 연구개발 추진전략 및 방법

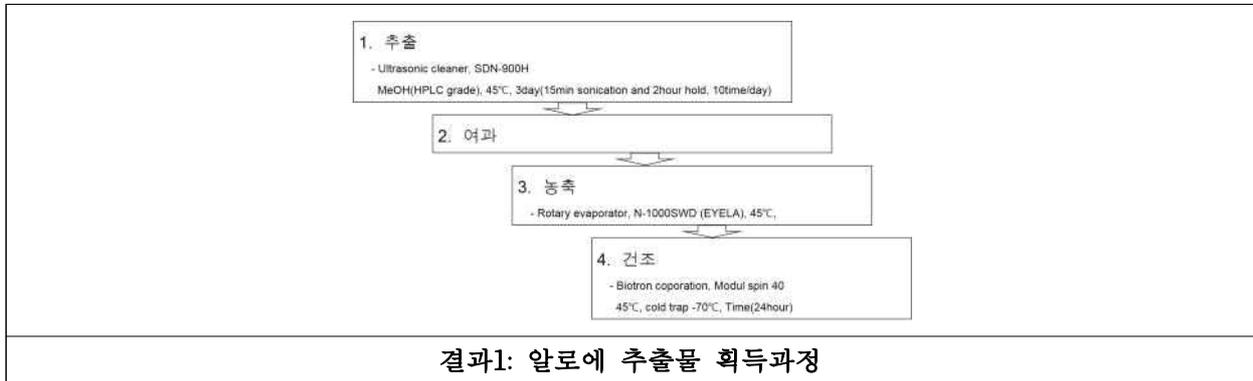
연구내용	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 알로에 선정 및 알로에 추출물 분리 및 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (암세포) ▪ 표적항암제 저항성 암세포주 제작 및 기능성 신소재의 효능평가 ▪ 특수의료용도식품 개발을 위한 알로에 기능성 신소재의 가공기술 최적화
------	---

■ **협동 (건국대학교글로벌산학협력단)**

● **알로에 추출물(AE) 분리 및 농축**

알로에 베라(Aloe vera) 엽체, 알로에 베라 줄기와 알로에 페록스(Aloe ferox) 생약을 구입하여 사용함. 알로에 분말 10g에 1L의 메탄올(99%) 및 에탄올(95%)을 첨가하고 항온수조에서 45°C로 72시간 동안 추출한 후, 여과하여 rotary vacuum evaporator로 농축함. 농축물은 동결건조하여 최종적으로 추출물을 획득하였음.

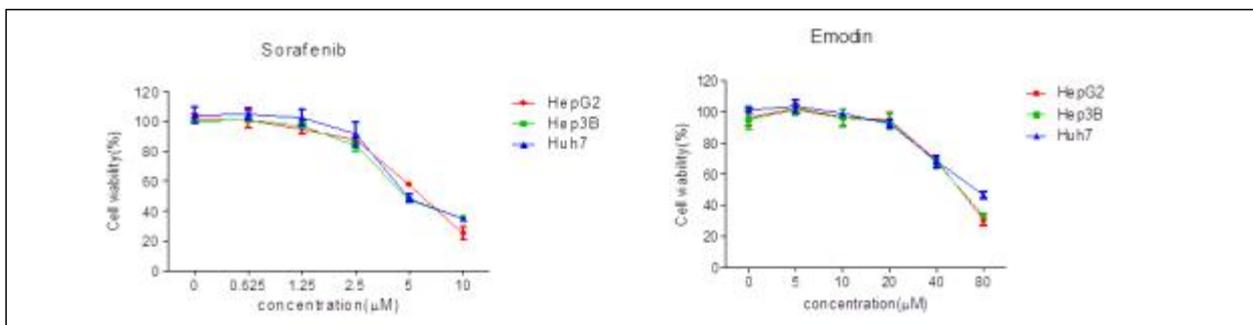
☞ **결과1:** 그림에서 제시한 방법을 통해 알로에 베라 엽체 메탄올 추출물(Aloe #1) 21.06±0.15mg, 알로에 베라 줄기 메탄올 추출물(Aloe #2) 15.8±0.1mg, 알로에 페록스 에탄올 추출물(Aloe #3) 30.96±0.19mg의 추출물 3종을 획득하였음. 추출물에 대한 HPLC분석을 통해 에모딘과 알로에 에모딘의 함량을 측정할 예정임.



● **알로에 함유 단일물질(Emodin, Aloe-Emodin)의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (스크리닝)**

Emodin 및 sorafenib에 의한 3종의 간암 세포주 성장곡선을 분석하였음. 그림에 제시된 농도의 에모딘 및 sorafenib을 48시간 동안 처리하여 Crystal violet assay를 통해 에모딘에 의한 간암 세포 성장저해를 확인하였음.

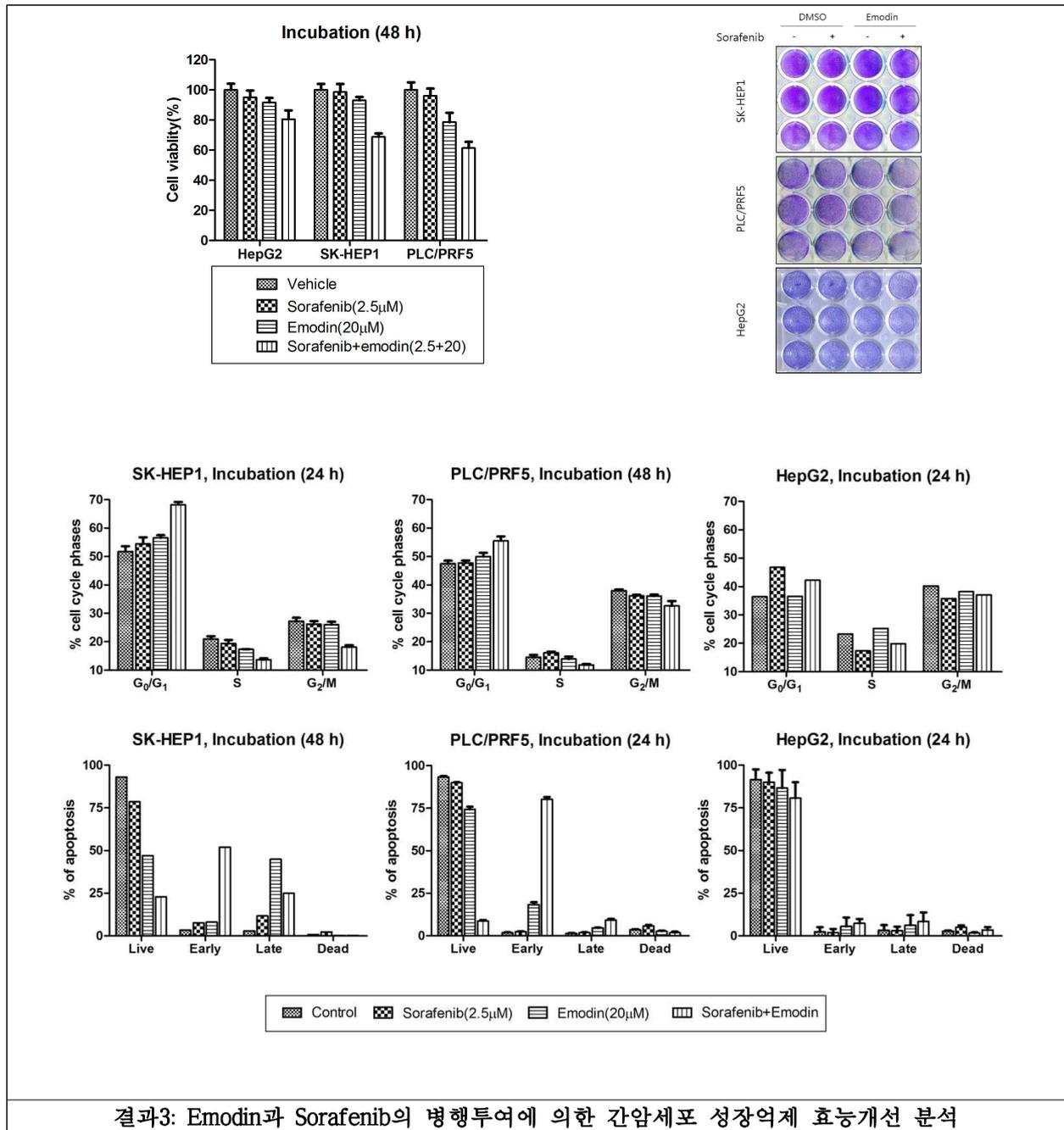
☞ **결과2:** Sorafenib의 경우 약 5uM 농도에서 급격한 세포성장 저해를 확인하였으며, 에모딘의 경우 40uM 농도에서 간암 세포의 성장저해를 확인하였음.



결과2: Emodin 및 Sorafenib에 의한 간암 세포주 3종의 항암효능 분석

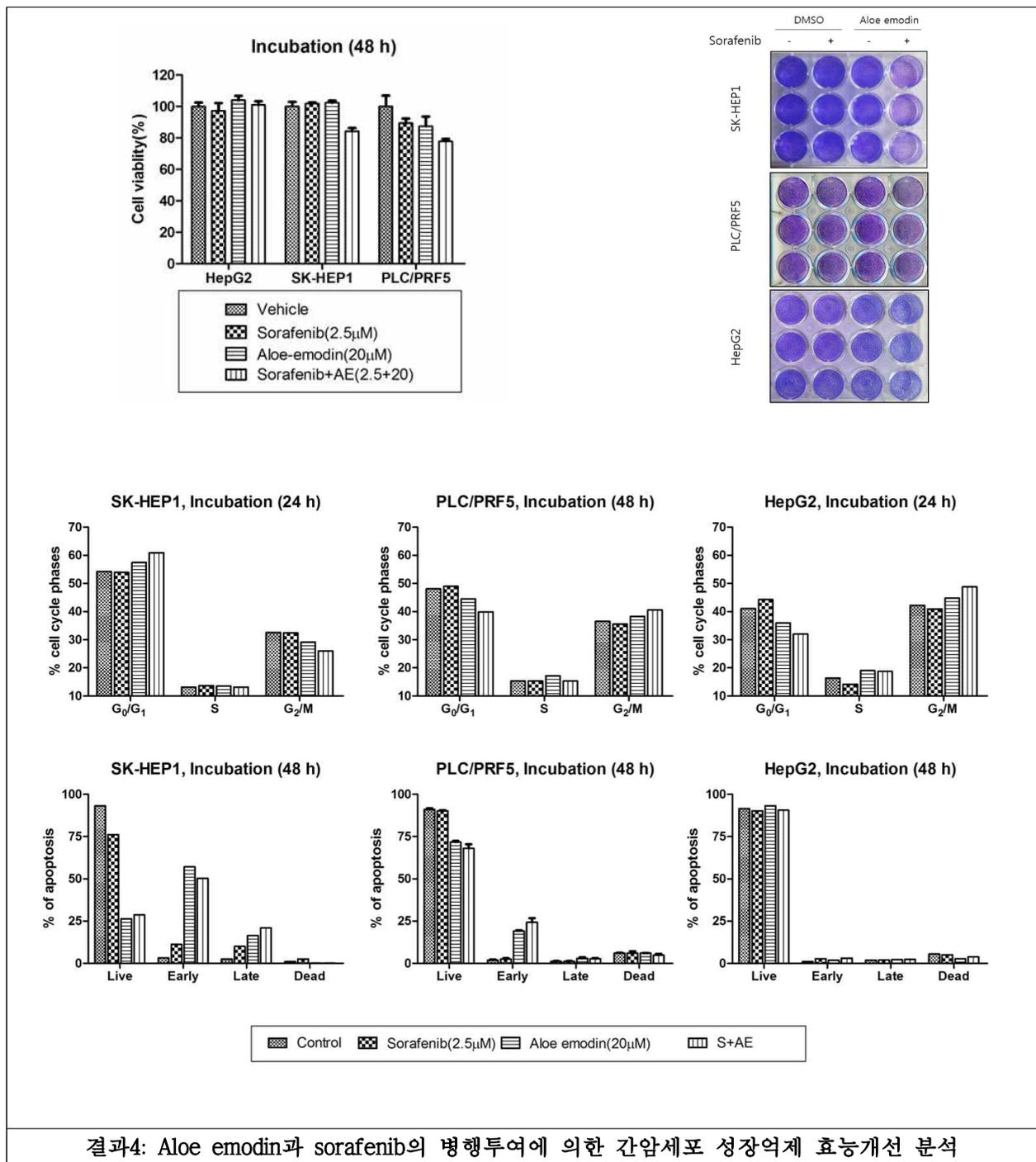
간암 표적항암제 sorafenib(상품명: Nexava)의 효능을 강화시키는 알로에 유래 신소재인 emodin의 우수성을 규명하고자 세포사멸 유도 분석을 실시하였음. 그림에 제시된 농도의 emodin(20 μ M)과 sorafenib(2.5 μ M)을 48시간 동안 처리하여 crystal violet assay로 성장저해를 확인하였고, FACS 분석을 통해 간암세포의 주기(cell cycle), 사멸(apoptosis) 변화를 측정하였음.

☞ **결과3:** Emodin과 sorafenib을 병행투여 할 경우 제시된 그림과 같이 간암세포 3종의 성장이 약 20-40% 정도까지 억제됨을 확인하였음. 효능개선 작용을 규명하고자 세포의 주기와 사멸 변화량을 분석한 결과, 3종의 간암세포주에서 세포주기 중에 간기 G₀/G₁ phase arrest와 세포사멸에 대한 total apoptosis(early + late)를 극대화시키는 것으로 확인되었음. 세포주기와 세포사멸의 변화량으로 인해 간암세포주의 성장이 억제된다는 것을 알 수 있었으며 작용기전 연구에 대한 가능성을 보여주었음.



Aloe-emodin과 sorafenib의 병행투여에 의한 간암세포주의 세포사멸 유도 분석을 실시하였음. 그림에 제시된 농도의 aloe-emodin(20 μ M)과 sorafenib (2.5 μ M)을 48시간 동안 처리하여 crystal violet assay로 성장저해를 확인하였고, FACS 분석을 통해 간암세포의 주기(cell cycle), 사멸(apoptosis) 변화를 측정하였음.

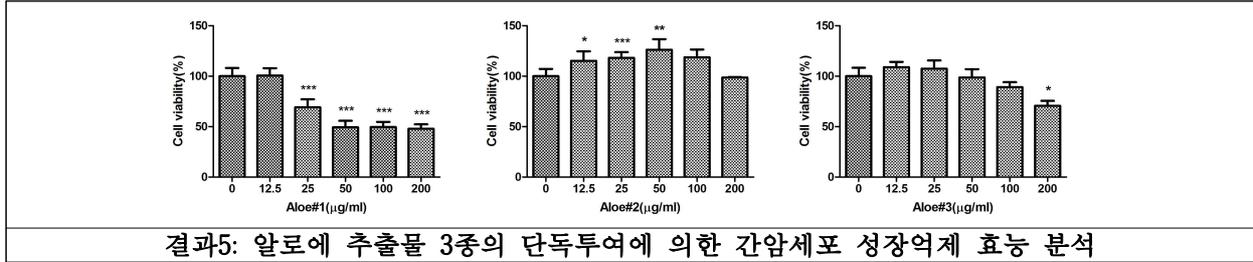
결과4: Aloe emodin과 sorafenib을 병행투여 할 경우 제시된 그림과 같이 간암세포의 성장이 억제됨을 확인하였음. 효능개선 작용을 규명하고자 세포의 주기와 사멸 변화량을 분석한 결과, 세포 주기 중에 간기 G₀/G₁ 및 G₂/M phase arrest와 세포사멸에 대한 total apoptosis(early + late)가 유도되는 것으로 확인되었음. 그러나 물질의 고유 발색에 의한 간섭으로 측정 오류 등의 변수가 있어 추가적인 반복실험을 필요로 함.



● 알로에 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (암세포 스크리닝)

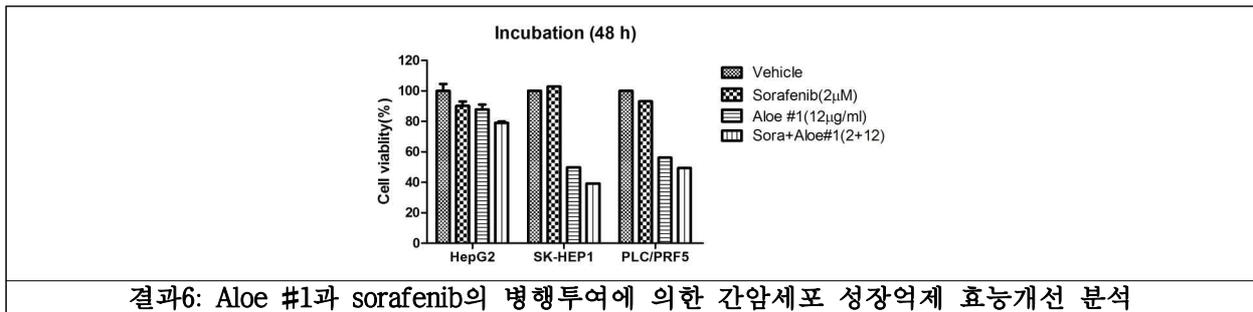
추출물 단독투여에 의한 간암세포(HepG2)의 성장저해 효과를 분석하였음. 그림에 제시된 농도의 추출물(12-200µg/ml)을 48시간 동안 처리하여 Crystal violet assay를 통해 추출물 단독투여에 의한 간암세포(HepG2) 성장저해를 확인하였음.

☞ **결과5:** Aloe #1의 경우 25µg/ml 농도에서 급격한 세포성장 저해를 확인하였으며 Aloe #2의 경우 세포독성이 없었으며, Aloe #3의 경우 200µg/ml 농도에서 급격한 성장저해를 확인



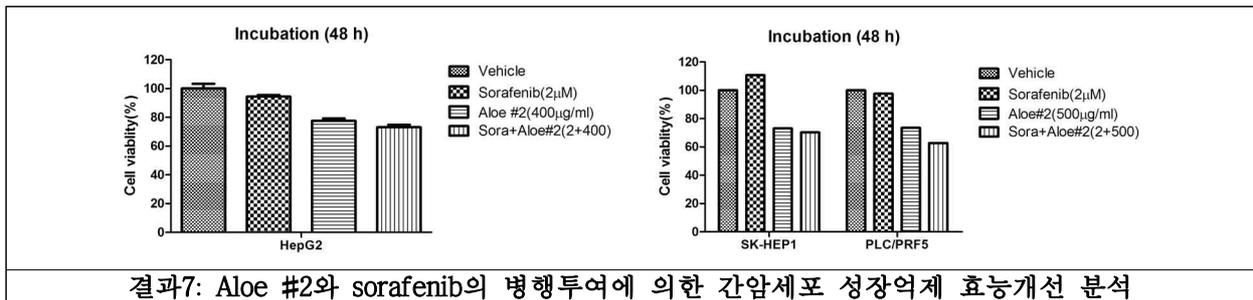
알로에 베라 염색 메탄을 추출물(Aloe #1)과 sorafenib의 병행투여에 의한 3종의 간암세포 성장저해 효능 개선을 분석하였음. 그림에 제시된 농도의 추출물(12µg/ml) 및 sorafenib(2µM)을 48시간 동안 처리하여 Crystal violet assay를 통해 추출물+sorafenib 병행투여에 의한 간암세포 성장저해를 확인하였음.

☞ **결과6:** Aloe#1과 sorafenib을 병행투여할 경우 3종의 간암세포의 세포성장이 약 20~60% 정도까지 억제됨을 확인하였음. 추가적으로 세포주기 및 세포사멸 분석을 통해 넥사바 효능개선 작용기전을 규명할 예정임.



알로에 베라 줄기 메탄을 추출물(Aloe #2)과 sorafenib의 병행투여에 의한 3종의 간암세포 성장저해 효능 개선을 분석하였음. 그림에 제시된 농도의 추출물(400~500µg/ml) 및 sorafenib(2µM)을 48시간 동안 처리하여 Crystal violet assay를 통해 추출물+sorafenib 병행투여에 의한 간암세포 성장저해를 확인하였음.

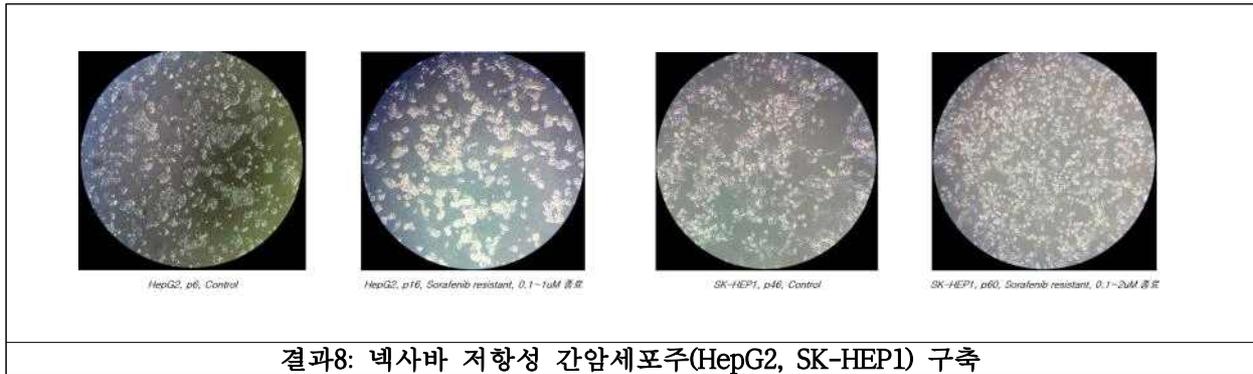
☞ **결과7:** Aloe#2과 sorafenib을 병행투여할 경우 3종의 간암세포의 세포성장이 약 25~40% 정도까지 억제됨을 확인하였음.



● 표적항암제 저항성 암세포주 제작 및 기능성 신소재의 표적항암제에 대한 저항성 극복 평가

2종의 간암세포를 이용하여 약 2개월 동안 0.1 ~ 2uM 농도의 넥사바를 장기적으로 처리하여 넥사바에 대한 저항성을 지닌 간암세포주를 구축함.

☞ **결과8:** 간암세포주 HepG2, SK-HEP1에 넥사바를 0.1 ~ 2uM 농도로 장기처리하여 넥사바 저항성 간암세포주를 구축하는 중이며, 완료 후에 알로에 추출물 및 알로에 유래 Emodin을 넥사바와 병행 투여하여 간암세포 저해가 개선되는지 세포성장률, 세포주기 및 세포사멸을 분석할 예정임.



■ 주관 (중앙미생물연구소)

● 암환자 전용 특수의료용도식품 적용 가능 기능성 소재 발굴

- 차세대 암환자 전용 특수의료용도식품에 적용할 수 있는 소재를 발굴하고자 염증인자 조절 및 고효율 영양 공급원 천연물 소재들을 각각 구입 및 채집하여 동정하고 표본을 보관.
- 기 연구된 천연물 유래 개발 방향에 맞추어 유기용매를 선정하여 각 천연물의 유기용매 추출물을 제조.
- 염증인자 조절 및 고효율 영양 공급원 천연물 소재 후보군: 해조류, 버섯류, 홍삼, 개똥쑥, 모링가, 한약재류 등.
- 1kg의 두충을 5L의 D.W.로 110°C 에서 2시간 동안 추출. 추출한 시료를 1L까지 농축하여 30분간 휴지시킨 후, D.W. 5L를 가하여 2차 추출. 110°C 에서 2시간 다시 추출한 후, 1L까지 농축시킨 후, 30분간 휴지시킨 후, 수득.
- 500g의 모링가를 2.5L의 D.W.로 110°C 에서 1시간 30분 동안 추출. 추출한 시료를 600mL까지 농축시킨 후, 물 2.5L를 가하여 2차 추출. 110°C 에서 1시간 30분 가량 추출하여 1L 까지 농축시킨 후, 30분간 휴지시켜 수득.
- 500g의 영지 버섯 (건조)을 D.W. 2.5L의 용매로 110°C 에서 1시간 30분 동안 추출. 추출한 시료를 600mL까지 농축시킨 후, 물 2.5L를 가하여 2차 추출. 110°C 에서 1시간 30분 동안 추출한 후, 1L까지 농축시킨 후, 30분간 휴지시킨 후, 수득.
- 잎새 버섯 (생물) 1kg을 5L의 D.W.로 110°C 에서 2시간 동안 추출. 추출한 시료를 800mL까지 농축하여 1시간 동안 휴지시킨 후, 물 5L를 가하여 2차 추출. 110°C 에서 1시간 동안 추출한 후, 500mL까지 농축한 시료를 30분간 휴지시킨 후, 수득.
- 500g의 개똥쑥을 2.5L의 D.W.로 110°C 에서 1시간 추출. 추출한 시료를 1L까지 농축시킨 후, 1시간 동안 휴지. 후에 물 2.5L를 가하여 110°C 에서 1시간 30분 가량 추출. 다시 500mL까지 농축시킨 후, 30분간 휴지시킨 후, 수득.

- 천연 혼합물 추출을 위해 작약 54g, 당귀 54g, 숙지황 54g, 홍삼 30g, 하수오 30g를 10L의 D.W.에 1차 100℃ 3시간, 2차 110℃ 4시간 추출함.

☞ **결과9:** 각각의 천연물들의 추출물 성상 (Brix, pH, 염도)은 다음과 같다.

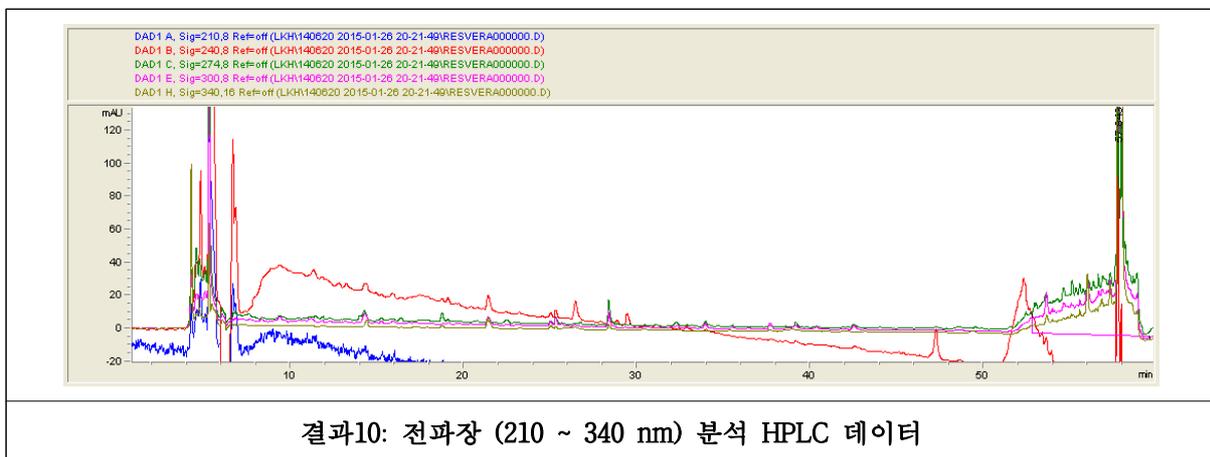
추출물질명	농도 (brix)	염도 (%)	pH
두충	3.3	0.1	5.5
홍삼, 한약재 혼합물	2.8	0.1	5.5
모링가	5.2	0.3	5.5
영지 버섯	0.9	0.1	5.5
앞새 버섯	4.8	0.6	7.5
개똥썩	2.6	0.3	5.5

결과9: 천연물 추출물의 성상

● **암환자 전용 특수의료용도식품 적용 가능 기능성 소재 발굴 - 소재의 생리 활성 물질 분석**

- 기존 연구되어 염증 인자 억제 효능이 있다고 판명된 톳 추출 발효물의 생리 활성 물질을 분석.
- 톳 추출물의 성분분석을 연구하기 위해 HPLC를 이용하여 C18 컬럼과 Diode array detector 283 nm 파장에서 분석하였으며, 2% acetic acid 수용액과 acetonitrile 용매를 사용한 기울기 용리법으로 분리.
- HPLC는 1200 solvent delivery system (Agilent, U.S.A.)을, column은 ZORBAX Eclipse XDB- C18 5um column (250 × 4.6 mm ID, 5 μm particle size)를 사용함. 컬럼의 온도는 25 ℃를 유지하도록 함. 이동상으로는 2% acetic acid in D.W. : 100% acetonitrile solution 용액을, 검출기는 210-340nm의 UV Detector를 사용함. MS/MS는 API-4000 triple quadrupole mass spectrometer(Applied Biosystems, Canada)를, column은 Phenomenex Luna C18 3um column (50 × 2.0 mm ID, 3 μm particle size)을 데이터 처리장치는 Analyst 1.6.2 program(Applied Biosystems, Canada)를 사용함. 컬럼의 온도는 30 ℃를 유지하도록 함. 이동상으로는 D.W. : (methanol : acetonitrile = 1 : 1, (v/v) with 0.1 % formic acid) = 30 : 70 (v/v)용액을 사용하였다. 시료주입량은 5 μL, 유속은 200 μL/min로 함.

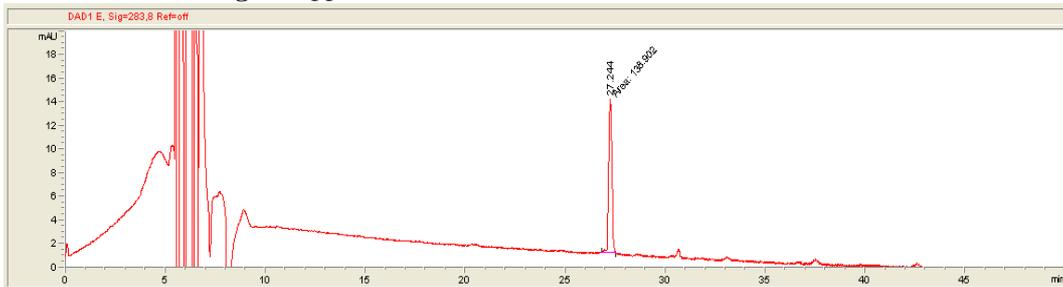
☞ **결과10:** 시험물질을 전 파장 (210 ~ 340 nm) 에 걸쳐 HPLC로 분석한 결과 27 min 대 에서 naringin으로 의심되는 피크를 발견.



- naringin의 λ max 파장인 283 nm 부근에서 표준물질과 함께 정밀 분석함.

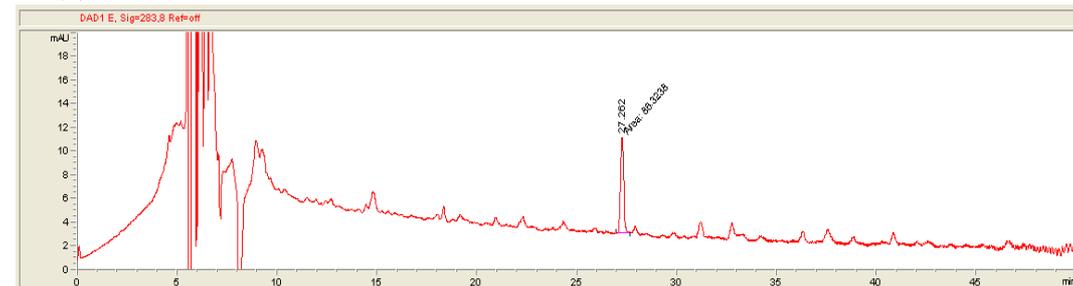
☞ **결과 11:** 같은 물질일 경우 spiking sample의 area 이론적 데이터 값은 아래와 같으며 peak는 sharp하게 하나로 측정됨. 다른 물질일 경우에는 peak가 fat한 형태가 되며 peak 끝이 두 개로 나뉜. (Naringin area(138.9) ÷ 2) + (시험물질 area(88.3) ÷ 2) = 113.6 (실제값과 유사함->128.4). HPLC 분석결과 항균작용, 항산화작용, 아스코르빈산 상승작용, 항암작용이 있는 것으로 알려진 naringin 과 유사한 물질을 분석.

1) 표준시료 (Naringin 2 ppm)



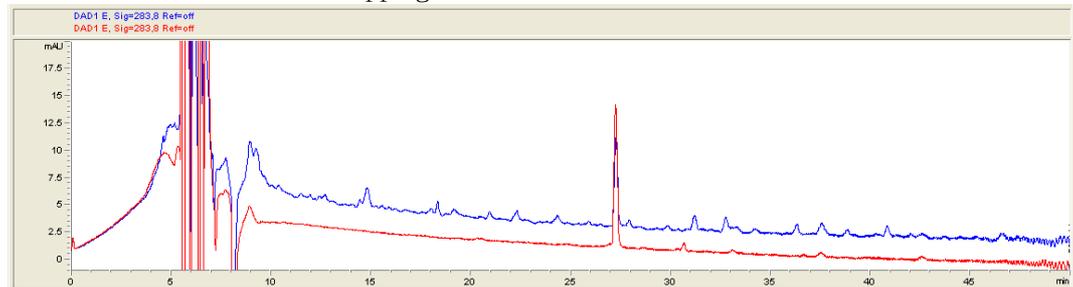
Retention time = 27.244min

2) 시험물질 (×100 in DMSO)



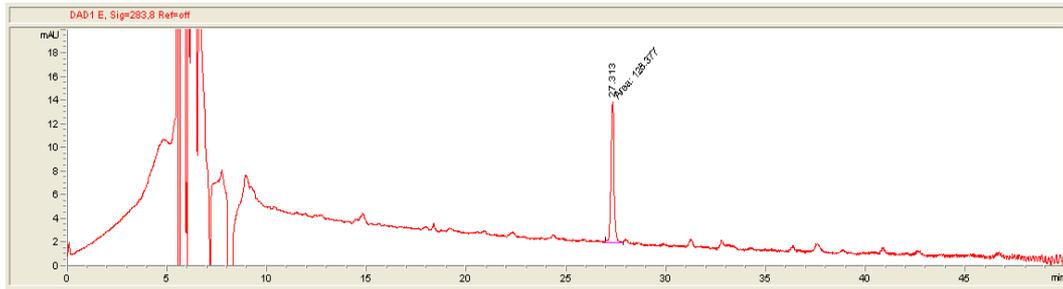
Retention time = 27.262 min

3) 표준시료/시험물질 (Overlapping screen)



표준시료와 시험물질의 Retention time 이 일치함 = 27 min

4) Spiking analysis (내부표준동시분석)



5) HPLC 분석결과

Sample	Retention Time	Area
Naringin	27.244	138.9
시험물질	27.262	88.3
Spiking sample (Naringin+시험물질)	27.313	128.4

결과11: HPCL Naringin 분석 데이터

● 알로에 기능성 신소제의 가공 기술 최적화

- 알로로부터 aloe-emodin을 추출하는 가공기술을 최적화하기 위해, 성상, aloe의 종류, 용매 등을 조절하여 가장 좋은 수율의 방법을 수립한다.
- 표준 시료 확보: 알로에 베라(생과육) 500g을 2.5L의 EtOH(60%)에 45°C에서 24시간 동안 추출. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100mL까지 농축. D.W를 1L 넣은 뒤, 다시 농축하여 최종 시료를 수득.
- 알로에 종에 따른 비교: 사포나리아 알로에(생과육) 500g을 2.5L의 EtOH(60%)에 45°C에서 24시간 동안 추출. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득한다. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100mL까지 농축. D.W를 1L 넣은 뒤, 다시 농축하여 최종 시료를 수득.
- 알로에 성상 비교: 알로에 베라(냉동 건조 분말) 500g을 2.5L의 EtOH(60%)에 45°C에서 24시간 동안 추출. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100mL까지 농축. D.W를 1L 넣은 뒤, 다시 농축하여 최종 시료를 수득.
- 추출 용매 비교: 알로에 베라(생과육) 500g을 2.5L의 D.W에 45°C에서 24시간 동안 추출. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 최종 시료를 수득.
- 알로에 기능성 신소재 최적 가공 기술을 확립하기 위해 각각의 조건에서 추출, 농축한 시료를 HPLC를 통해 aloe-emodin의 검출과 수율을 분석.

2차 년도 (2017년) 연구개발 추진전략 및 방법

연구내용

- 알로에의 가공기술 최적화 및 생물전환을 이용한 효율 증대
- 기능성 소재 발굴 및 생물전환을 이용한 발굴 신소재의 효율 증대
- 알로에 기능성 소재 및 추출물의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (동물모델)
- 기존 표적항암제 효능개선물질 대비 알로에 유래 신소재의 우수성 규명

■ 주관 (중앙미생물연구소)

● 알로에의 가공기술 최적화 및 생물전환을 이용한 효율 증대

1. aloe-emodin 추출법 확립

1) 실험방법

가) 비교 대조군 추출 방법

알로에 베라(생과육) 500 g을 2.5 L의 EtOH(60%)에 담가 45℃에서 12시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100mL까지 농축. D.W를 1L 넣은 뒤, 다시 농축하여 최종 시료를 수득함.

나) 추출 시간에 따른 aloe-emodin 함량 비교

추출 시간에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라 (생과육) 500 g을 2.5 L의 EtOH(60%)에 담가 45℃에서 2시간 동안 추출함. 70mesh이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 최종 시료를 수득함.

다) 알로에의 종에 따른 aloe-emodin 함량 비교

알로에의 종에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 사포나리아 알로에(생과육) 500 g을 2.5 L의 EtOH(60%)에 담가 45℃에서 12시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100 mL까지 농축함. D.W.를 1 L 넣은 뒤, 다시 농축하여 최종 시료를 수득함.

라) 성상에 따른 aloe-emodin 함량 비교

성상에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(착즙) 500 g을 2.5 L의 EtOH(60%)에 담가 45℃에서 12시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100 mL까지 농축함. D.W.를 1 L 넣은 뒤, 다시 농축하여 최종 시료를 수득함.

마) 용매에 따른 aloe-emodin 함량 비교

용매에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(생과육) 500 g을 2.5 L의 D.W.에 담가 45℃에서 12시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 추출물을 걸러 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 100 mL까지 농축하여 최종 시료를 수득함.

시료명	알로에 종	시료부위	온도(℃)	용매	시간(h)
A	베라	생과육	45	EtOH(60%)	12
B	베라	생과육	45	D.W.	24
C	베라	생과육	45	EtOH(60%)	24
D	베라	착즙	45	EtOH(60%)	24
E	사포나리아	생과육	45	EtOH(60%)	24

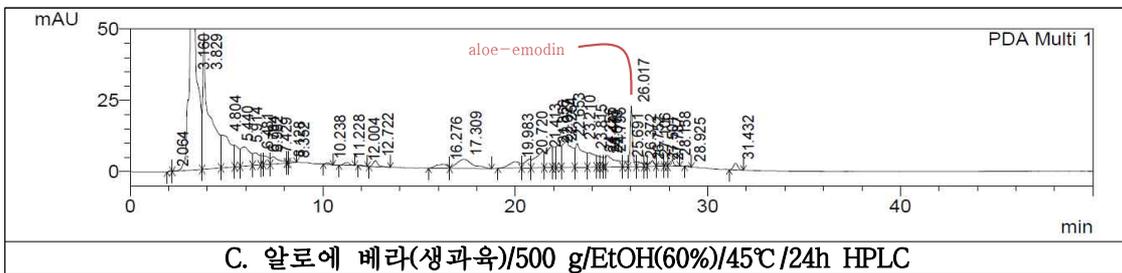
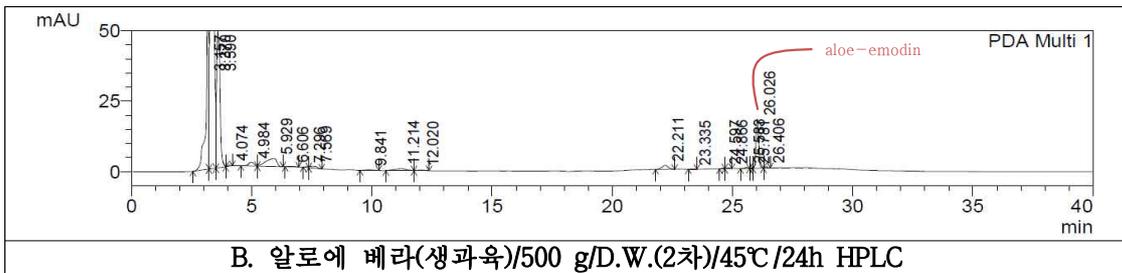
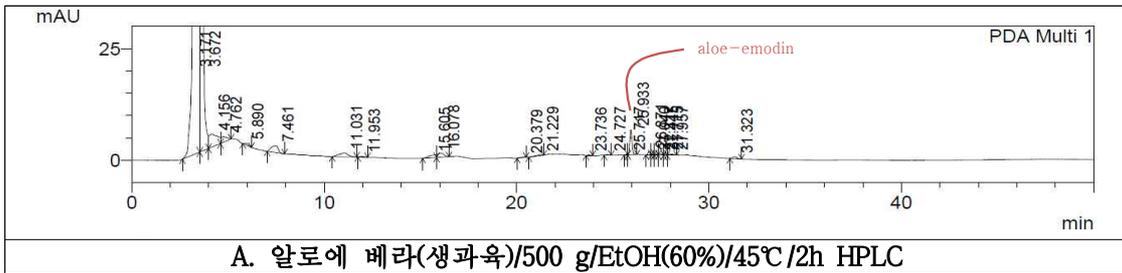
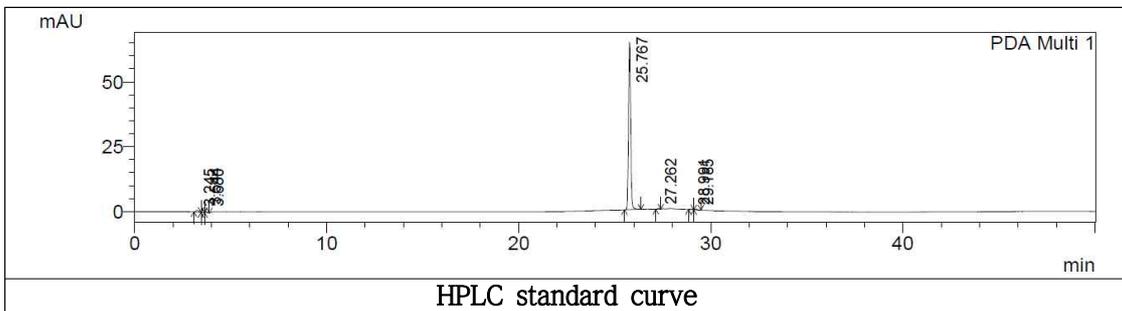
표 1. Aloe-emodin 추출법 확립을 위한 시료 추출 조건 (HPLC)

바) aloe-emodin 추출법 확립을 위한 HPLC 결과분석

Shimadzu HPLC/UV-VIS system를 사용하여 검사함. pump는 LC-10AT vp, Shimadzu, automatic injector는 SPD-10AF, Shimadzu, UV-VIS detector는 SPD-10A vp, Shimadzu를 사용함. 온도 조건은 20°C로 맞춰줌. mobile phase는 acetonitrile과 0.1% aqueous phosphoric acid로 구성함. 시료의 전처리는 100°C의 건조하여 무게를 측정한 후, DMSO 5mL로 녹인 후, 1시간 초음파 추출 후, ACN으로 10mL의 양을 맞추어 희석함. 후에 녹은 물질만을 0.4 μm필터에 여과함.

column은 waters, Xbridge C18 5um, 4.6*250mm column임. Standard는 1-20ppm까지 5point로 측정함. gradient elution은 다음과 같이 실험하였음. 0-12 min, 24%, 12-22min, 24-50%, 22-40min, 50-24%, 40-50min, 24%. flow rate는 1.0mL/min이고, separation absorbance는 254nm이며 injection volume은 20 μL임.

2) 실험결과



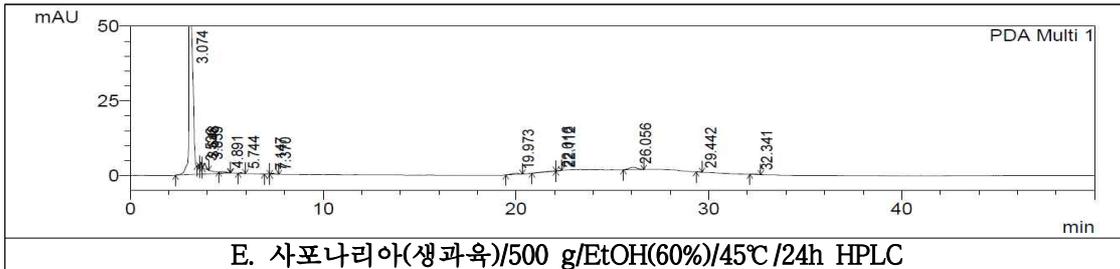
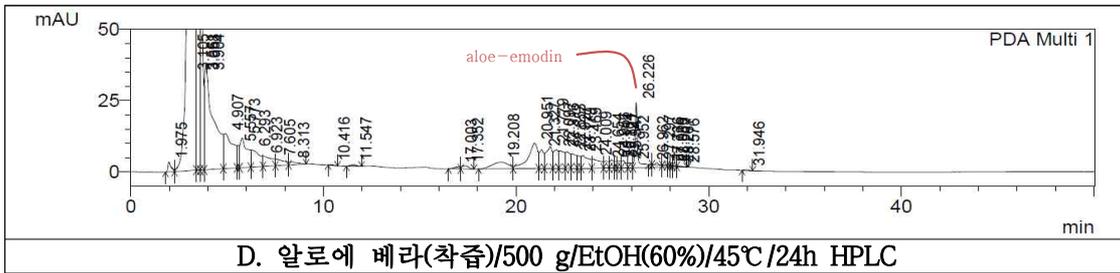
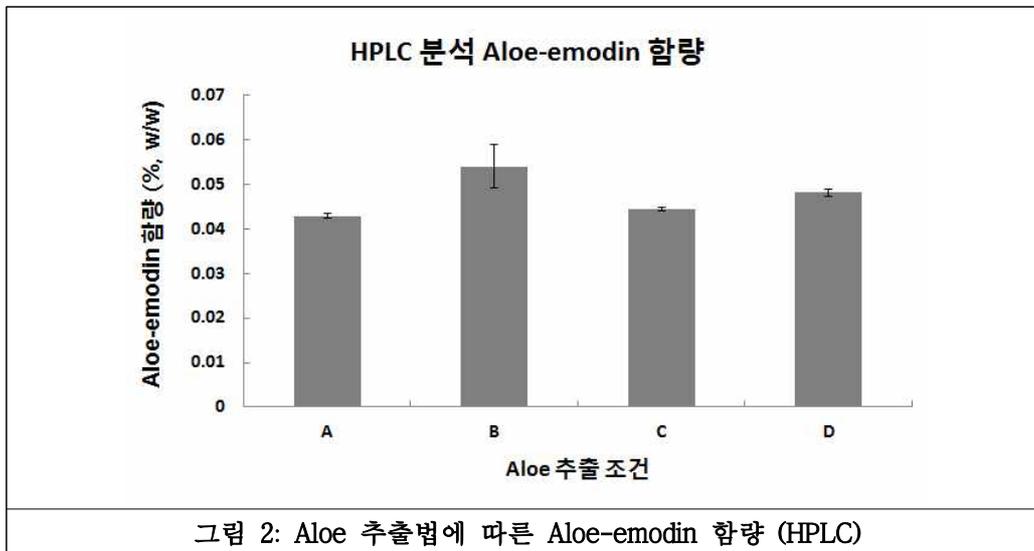


그림 1: Aloe 추출법에 따른 Aloe-emodin 피크 확인 (HPLC)



- ☞ 알로에의 추출 용매에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하였음. EtOH을 용매로 사용한 실험 C(0.0445%)와 D.W.를 용매로 사용한 실험B의 aloe-emodin 함량을 비교한 결과 실험B(0.0540%)에서 더 높은 수치의 aloe-emodin을 확인할 수 있었음.
- ☞ 알로에의 추출 시간에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하였음. 시간을 2시간 추출한 실험A(0.0429%)와 시간을 24시간 추출한 실험C(0.0445%)의 aloe-emodin 함량을 비교한 결과 실험C에서 더 높은 수치의 aloe-emodin을 확인할 수 있었으나, 시간의 배율에 따른 큰 차이를 확인할 수 없었음.
- ☞ 알로에의 성상에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하였음. 알로에 베라를 착즙하여 추출한 실험 D(0.0482%)와 알로에 베라 생과육을 추출한 실험C(0.0445%)를 비교한 결과 실험D에서 aloe-emodin의 함량이 더 높은 것을 확인할 수 있었음.
- ☞ 알로에의 종에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하였음. 사포나리아를 추출한 실험E에서는 aloe-emodin이 검출되지 않았음. 향후 사포나리아 추출 실험은 무의미할 것임.
- ☞ 용매를 비교한 실험의 경우 EtOH(60%)와 D.W. 용매 실험의 값이 차이가 있었음. 그에 더해 알코올 용매 추출의 경우, 식품 섭취를 위한 washing과정이 추가되지만 D.W 용매 기반 추출은 별도의

washing공정이 필요하지 않으므로 D.W.용매 기반의 실험이 유리함. 또한 시간 비교 시험은 축소한 비율에 비해 결과 값이 많이 낮지 않아, 한 번 더 실험해 볼 필요가 있다고 판단됨.

☞ 정상 비교 실험의 경우 착즙하여 실험한 결과값이 10%정도 높게 나온바, 한 번 더 실험하여 착즙의 공정을 거쳐 수율을 높이는 것이 유리한 것인지 재실험하여 한번더 확인할 필요가 있음. 알로에 베라의 껍질의 포함 유무가 결정적인지 판단하기 위해 속과육만을 채취한 실험 진행.

☞ HPLC검사 실험 결과 EtOH(60%)보다 D.W.에서의 공정상 수득조건이 좋을 것이라 판단하여 D.W. 용매를 기반으로 한 실험을 진행할 것임. 또한 같은 추출물:용매 비를 유지하되, 단위 부피, 용량 규모를 줄여 진행할 것임. 또한 실제 공정상 진행한 실험의 농축비(25:1)는 효율성이 떨어지기 때문에 농축비를 10:1로 줄여서 좀 더 묽은 상태의 결과물을 얻도록 설계.

2. UPLC 분석을 이용한 aloe-emodin 추출법 확립

1) 실험방법

가) 비교 대조군 추출 방법

알로에 베라(생과육) 200 g을 1 L의 D.W.에 담가 45°C에서 24시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100 mL의 최종 시료를 수득함.

나) 추출 시간에 따른 aloe-emodin 함량 비교

추출 시간에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(생과육) 200g을 1L의 D.W.에 담가 45°C에서 4시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL의 최종시료를 수득함.

추출 시간에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(생과육) 200g을 1L의 D.W.에 담가 45°C에서 48시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL의 최종시료를 수득함.

다) 알로에의 성상에 따른 aloe-emodin 비교

성상에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(착즙) 200g을 1L의 D.W.에 담가 45°C에서 24시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL의 최종시료를 수득함.

성상에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 속과육만을 취한 알로에 베라 200g을 1L의 D.W.에 담가 45°C에서 24시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL의 최종시료를 수득함.

라) 추출물 증량에 따른 aloe-emodin 함량 비교

추출물 증량에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(생과육) 400g을 1L의 D.W.에 담가 45°C에서 24시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL의 최종시료를 수득함.

마) 온도에 따른 aloe-emodin 함량 비교

온도에 따른 aloe-emodin 함량을 비교하기 위해 알로에 베라(생과육) 200g을 1L의 D.W.에 담가 70°C에서 24시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL의 최종시료를 수득함.

바) 용매에 따른 aloe-emodin 함량 비교

용매에 따른 aloe-emodin 함량 비교 알로에 베라(생과육) 200g을 1L의 *EtOH(70%)*에 담가 45℃에서 24시간 동안 추출함. 70mesh 이하의 체에 걸러 추출물을 거른 뒤, 시료를 수득함. 추출한 시료를 rotary vacuum evaporator에 넣고 농축하여 100mL까지 농축한 뒤, D.W(2차) 100mL를 첨가한 후 100mL까지 농축하여 수득함.

시료명	시료부위	온도(℃)	용매	시간(h)	비율 (알로에g:용매L)
A	생과육	45	D.W.	4	200:1
B	생과육	45	D.W.	24	200:1
C	착즙	45	D.W.	24	200:1
D	생과육	45	D.W.	48	200:1
E	생과육	45	D.W.	24	400:1
F	생과육	70	D.W.	24	200:1
G	숙과육	45	D.W.	24	200:1
H	생과육	45	EtOH(70%)	24	200:1

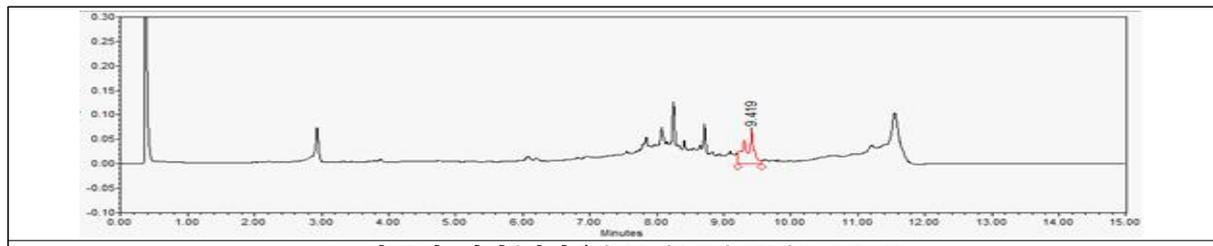
표 2. Aloe-emodin 추출법 확립을 위한 시료 추출 조건 (UPLC)

사) aloe-emodin 추출법 확립을 위한 UPLC 결과분석

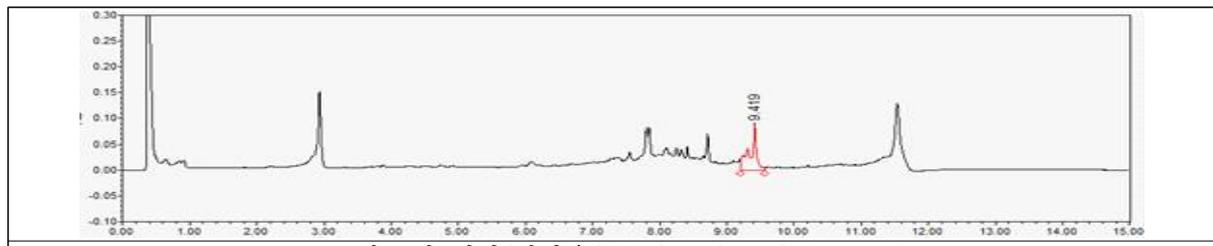
선행실험에서 HPLC를 통한 검사를 시행하였으나, 일부 시료에서 편차가 크게 발생하는 점을 보완하기 위해 UPLC를 통한 검사 방법을 시행함. C18 컬럼과 PDA 검출로 분석하였으며 0.1% formic acid 물과 methanol을 사용한 기울기 용리법으로 분리함. 알로에 추출물 10µl의 시료 분석을 위해 UPLC system (ACQUITY® CLASS 1, Waters, Milford, MA, USA)은 다음과 같은 분석조건을 준비함. Waters C18 column (2.1 x 50mm ACQUITY 1.7µm BEH C18)은 40℃를 유지하였고 전개용매 A(0.1% formic acid 수용액)와 B(Methanol)는 기울기 용리법 (linear gradient mode)으로 설정하였음(표 1). 유속은 0.35 ml/분, 컬럼과 오토샘플러는 각각 40, 25℃를 유지하였고, wash cycle로서 200µl strong solvent (80% acetonitrile in water)와 600µl weak solvent (30% acetonitrile in water)를 주입하여 세척함. 검출기로서 PDA 검출범위는 190 - 400nm를 설정하였고, emodin과 aloe emodin의 고유파장에 따른 wave length spectrum을 확인하면서 피크면적을 적분함.

Retention time	Mobile phase A	Mobile phase B
Initial	95	5
0 - 2.0	85	15
2.0 - 3.0	80	20
3.0 - 4.0	75	25
4.0 - 5.0	75	25
5.0 - 6.0	70	30
6.0 - 7.0	60	40
7.0 - 8.0	45	55
8.0 - 9.0	35	65
9.0 - 10.0	15	85
10.0 - 11.0	5	95
11.0 - 12.0	95	5
12.0 - 15.0	95	5

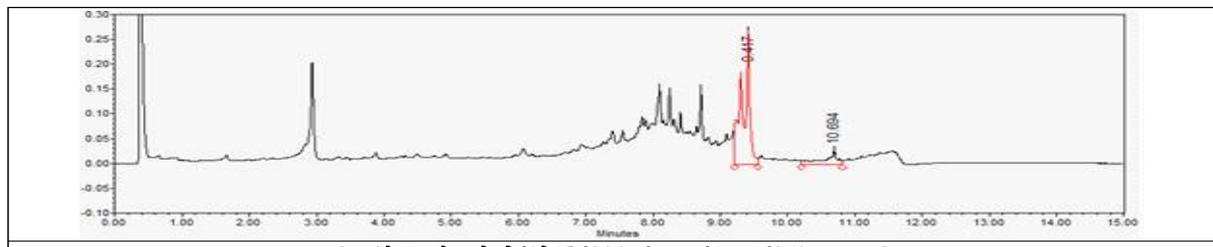
표 3. 알로에 추출물의 UPLC 분석을 위한 이동상의 기울기 용리법



A. 알로에 베라/생과육/200g/D.W/45°C/4h UPLC



B. 알로에 베라/생과육/200g/D.W/45°C/24h UPLC



C. 알로에 베라/착즙/200g/D.W/45°C/24h UPLC

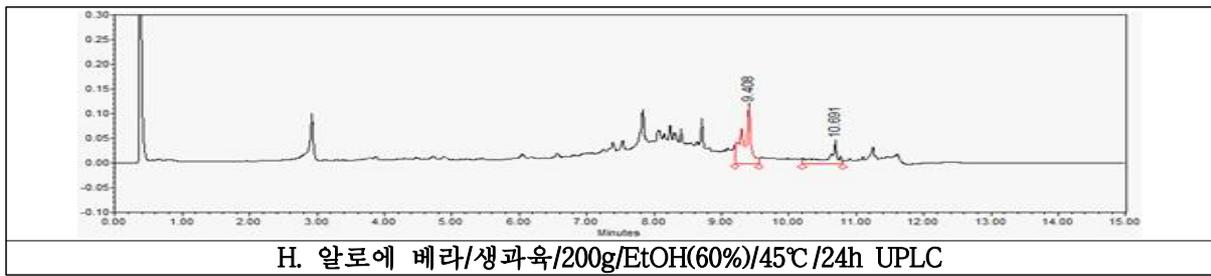
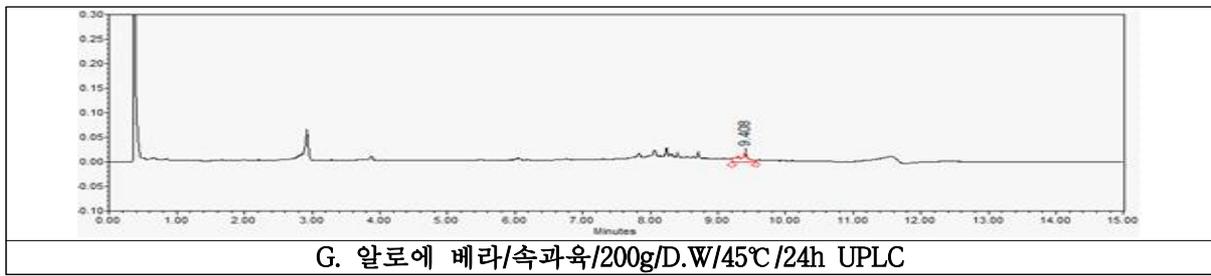
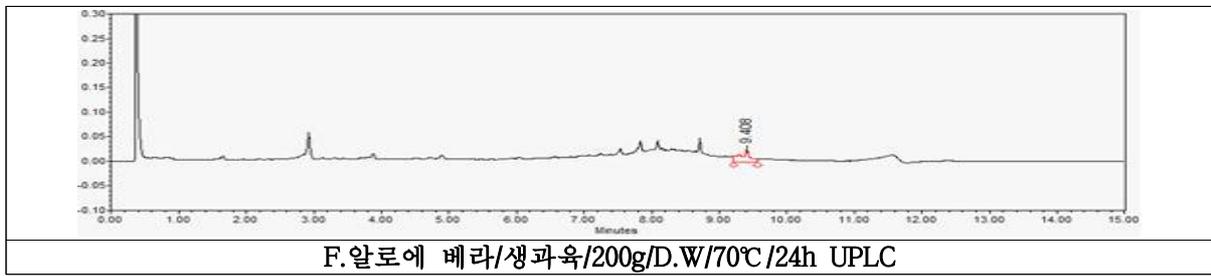
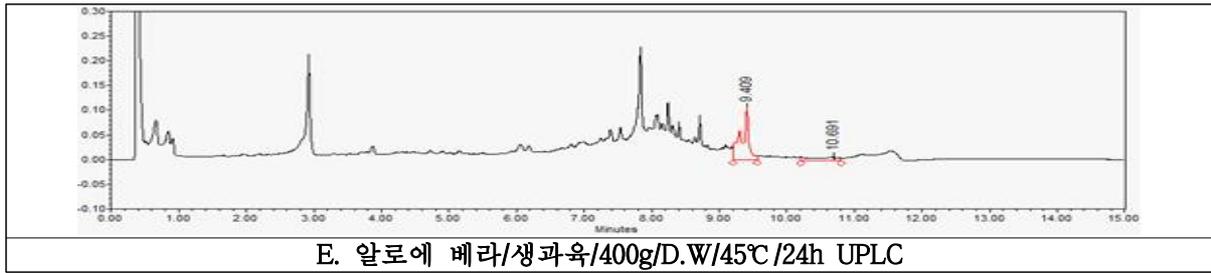
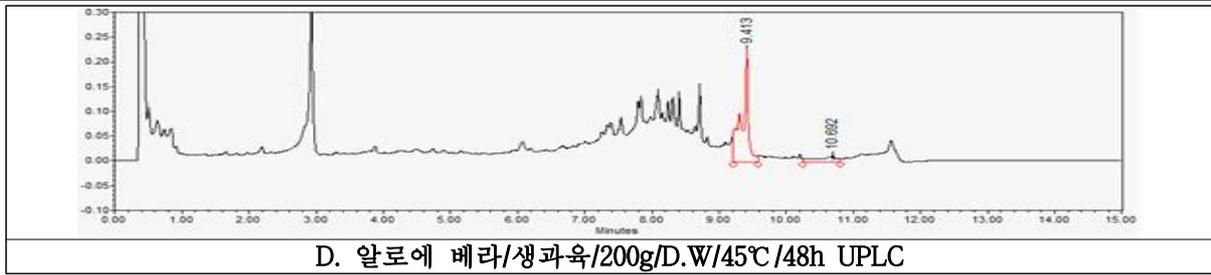


그림 3. Aloe 추출법에 따른 Aloe-emodin과 emodin 피크 확인 (UPLC)

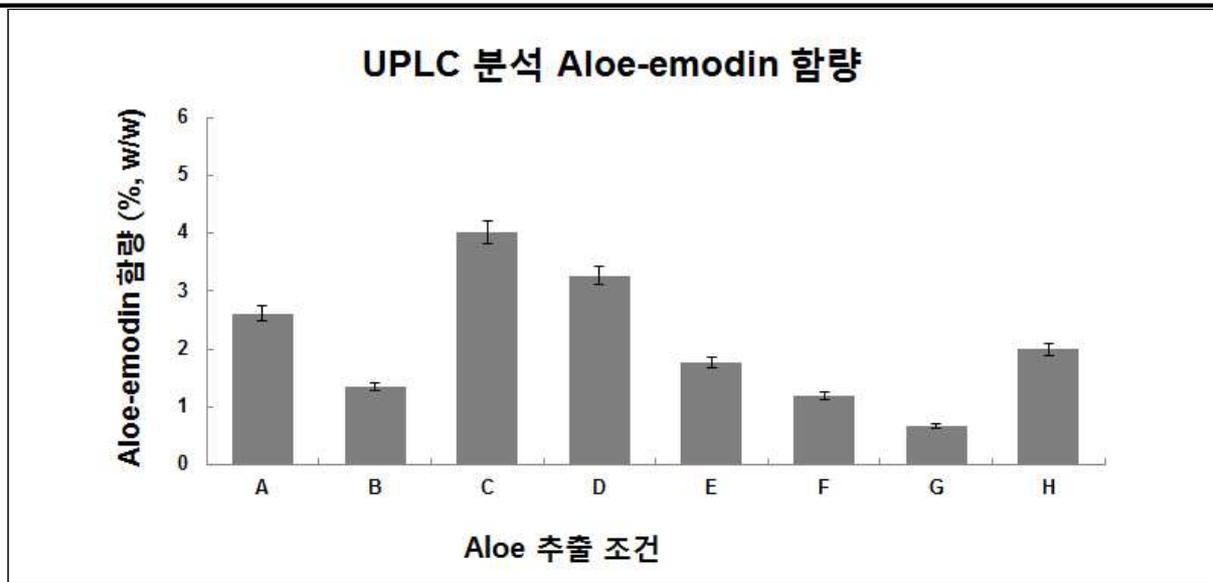


그림 4. Aloe 추출법에 따른 Aloe-emodin 함량 (UPLC)

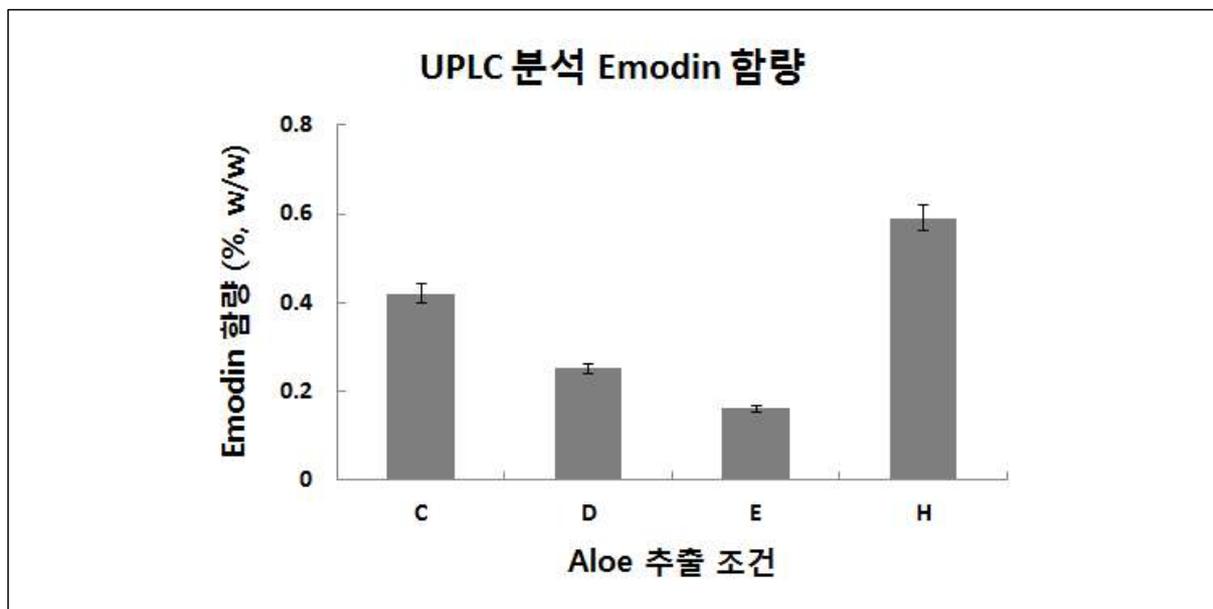


그림 5. Aloe 추출법에 따른 emodin 함량 (UPLC)

2) 실험결과

알로에 추출법에 따른 Aloe-emodin 함량을 분석하기 위하여 UPLC를 통해 분석한 결과 시간을 비교한 경우, 대조 실험(B)을 시간을 줄여 실행한 실험 A의 경우 수율(2.61%)은 올랐지만 추출물의 중량(45.6g)을 생각했을 때, 수득할 수 있는 Aloe-emodin의 양은 적었음. 반대의 경우 시간을 늘린 경우는 48시간으로 늘린 실험 D에서 볼 수 있듯이 수율이 3.27%로 2배 이상 높아진 것으로 판단됨. 이 경우 aloe-emodin에 더해 emodin도 검출된 바, 추출의 시간을 늘리는 것이 수율에 좋을 것으로 판단됨.

알로에의 양을 늘려 실험한 경우(E)는 aloe-emodin의 1.77%로 큰 수율차이를 보이지 않았음. 다만 emodin이 부가적으로 소량 검출된 바, 그에 따른 추가적인 이점을 고려할 수 있음. 또한 HPLC검사를 통한 추출실험에서의 대조 비교군 실험의 조건에서 EtOH의 농도를 늘려 실험한 용매 비교 실험(H)에서는 대조 실험(B)와 추출량은 2.00%로 큰 차이를 보이지 않았고, 1차 실험과 마찬가지로 수율

이 다소 높았으나, washing과정을 고려한다면 큰 이점을 보일만한 수치라 보긴 어려움. 다만, emodin 이 다른 실험에 비해 가장 많이 검출된 바, emodin 수율을 위해 주정을 용매로 한 추출방법을 개선 해보는 것이 바람직하다 판단됨.

☞ 성상의 실험의 경우, 껍질의 유무에 따른 수득은 실험 G의 속과육만을 추출한 실험에 따르면 매우 적은 것(0.67%)으로 나타남. 따라서 속과육만을 취하는 실험은 무의미할 것으로 판단됨. 하지만 착즙의 형태(C)를 추출한 경우 aloe-emodin의 수율이 4.02%로 가장 높게 나타남으로 착즙하여 추출 하는 방법이 가장 좋은 형태를 나타낼 것으로 판단됨.

☞ 종합적으로 착즙의 형태로 48시간정도 EtOH(70%)나 D.W.의 추출법이 가장 좋은 수율을 나타낼 것으로 보임.

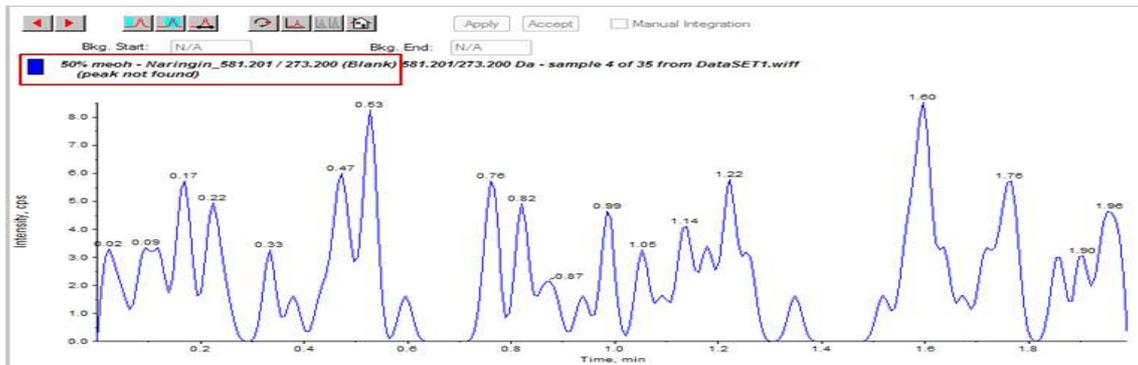
3. 생물전환 소재의 생리 활성 물질 분석

1) 실험방법

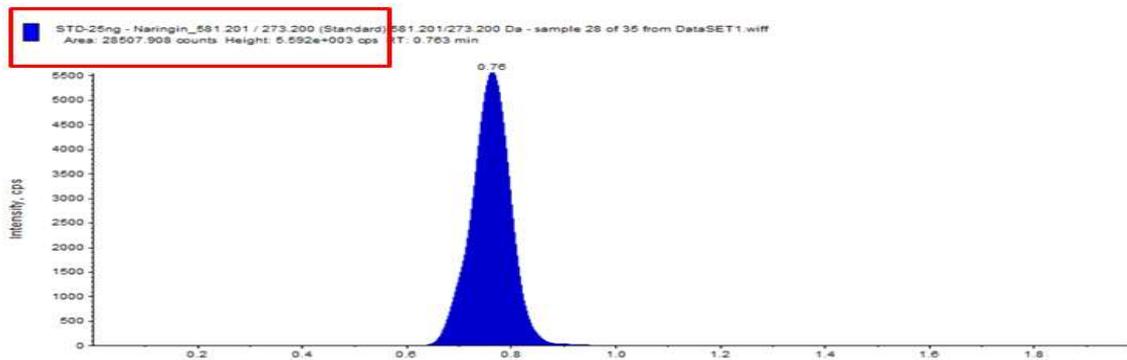
☞ 1차년도 염증 인자 억제 효능이 있다고 판명된 톳 추출 발효물의 생리 활성 물질을 HPLC를 통해 항균작용, 항산화작용, 아스코르빈산 상승작용, 항암작용이 있는 것으로 알려진 naringin과 유사한 물질을 분석하였으며, 이에 따라 동일 물질 확인 연구를 위해 LC-MS/MS 분석을 시행함.

☞ LC/MSMS MSMS system MRM

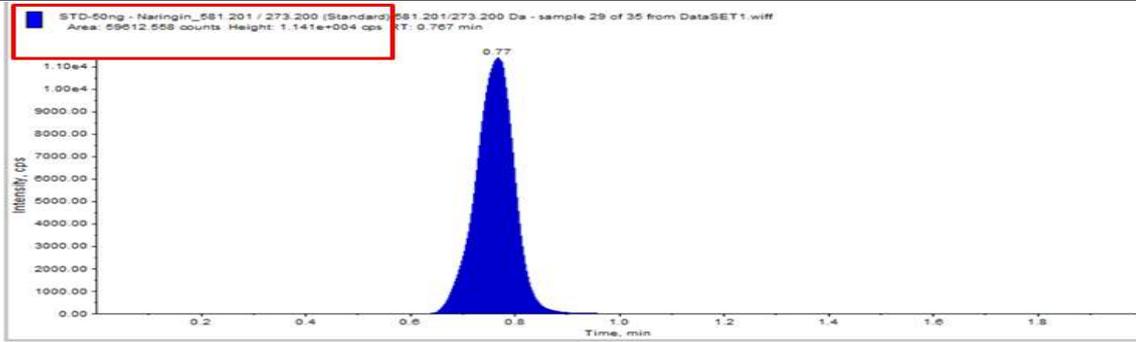
☞ positive mode를 사용하여 naringin 표준품에 대하여 분석조건을 설정하였으며, 톳 추출 발효물을 50 % methanol을 이용하여 10배 희석하여 주입함.



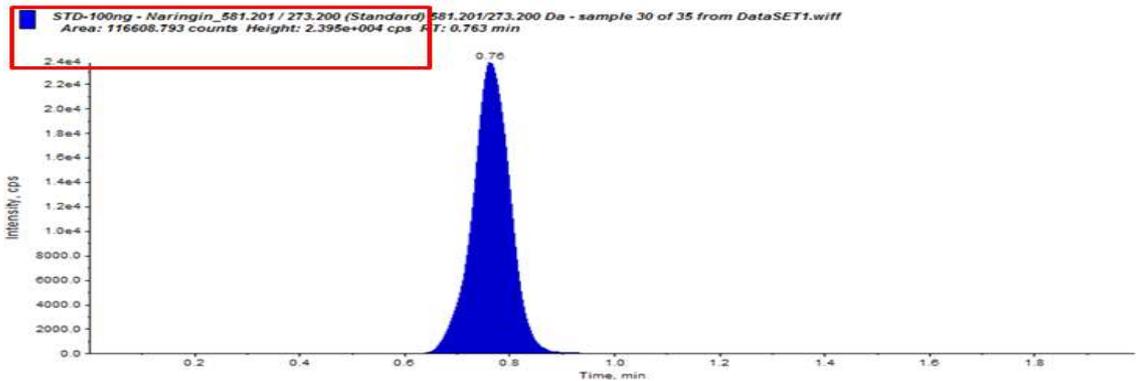
A. Naringin MRM 크로마토그램 (blank (Naringin free))



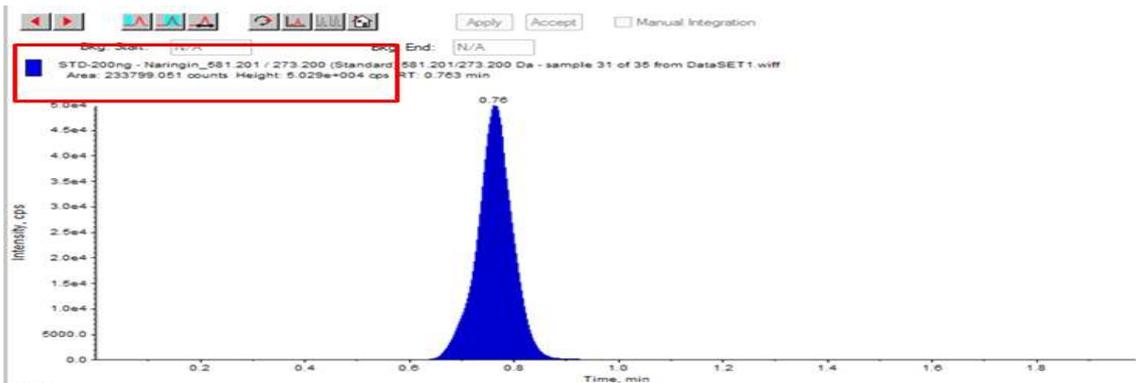
B . Naringin MRM 크로마토그램 (Naringin 25 ng/mL)



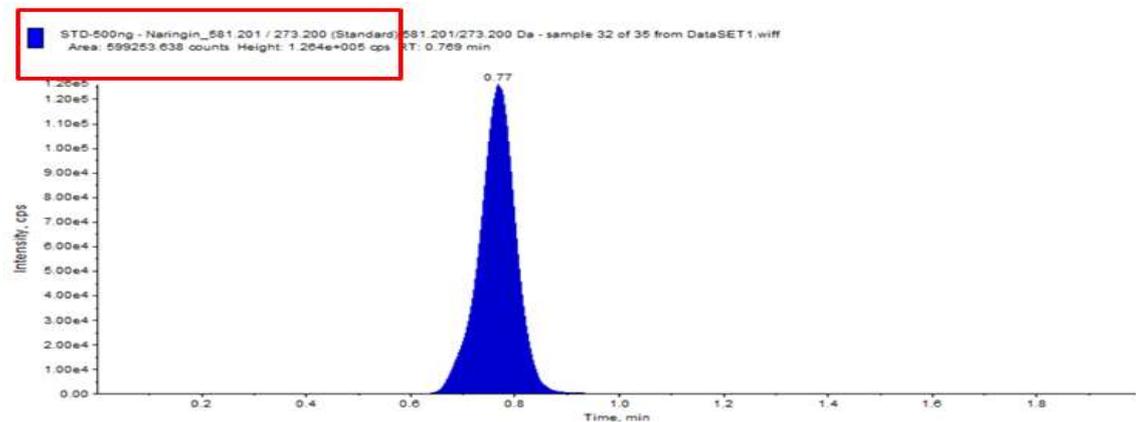
C . Naringin MRM 크로마토그램 (Naringin 50 ng/mL)



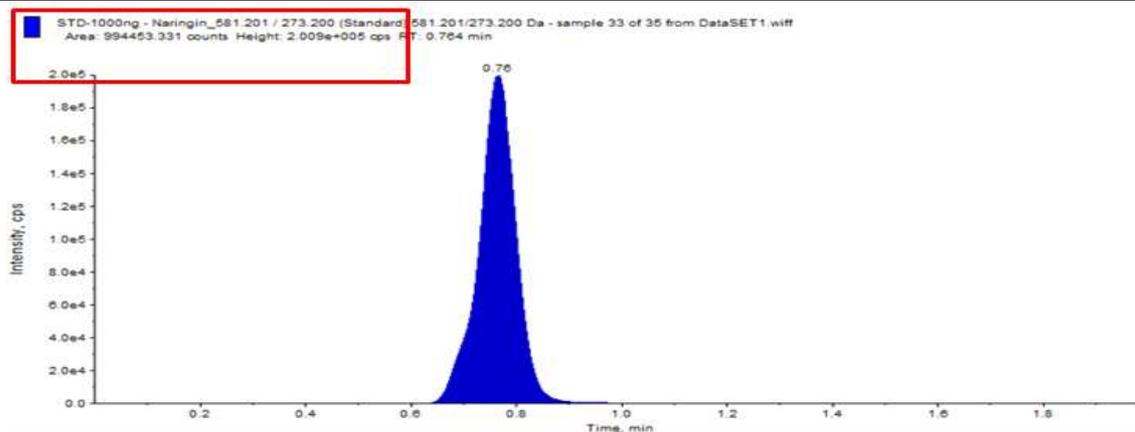
D . Naringin MRM 크로마토그램 (Naringin 100 ng/mL)



E . Naringin MRM 크로마토그램 (Naringin 200 ng/mL)



F . Naringin MRM 크로마토그램 (Naringin 500 ng/mL)



G. Naringin MRM 크로마토그램 (Naringin 1000 ng/mL)

2) 실험결과

정성분석을 위하여 LC/MSMS system MRM positive mode를 사용함. Naringin 표준품에 대하여 분석조건을 설정하였으며, 톳 추출물에 대한 naringin 성분 분석을 한 결과 서로 일치되는 결과값을 얻으며, 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 새로운 기능성 소재인 해양천연물인 발효된 톳 추출물에는 naringin이라고 하는 생리활성 물질이 존재하고 있음을 확인함.

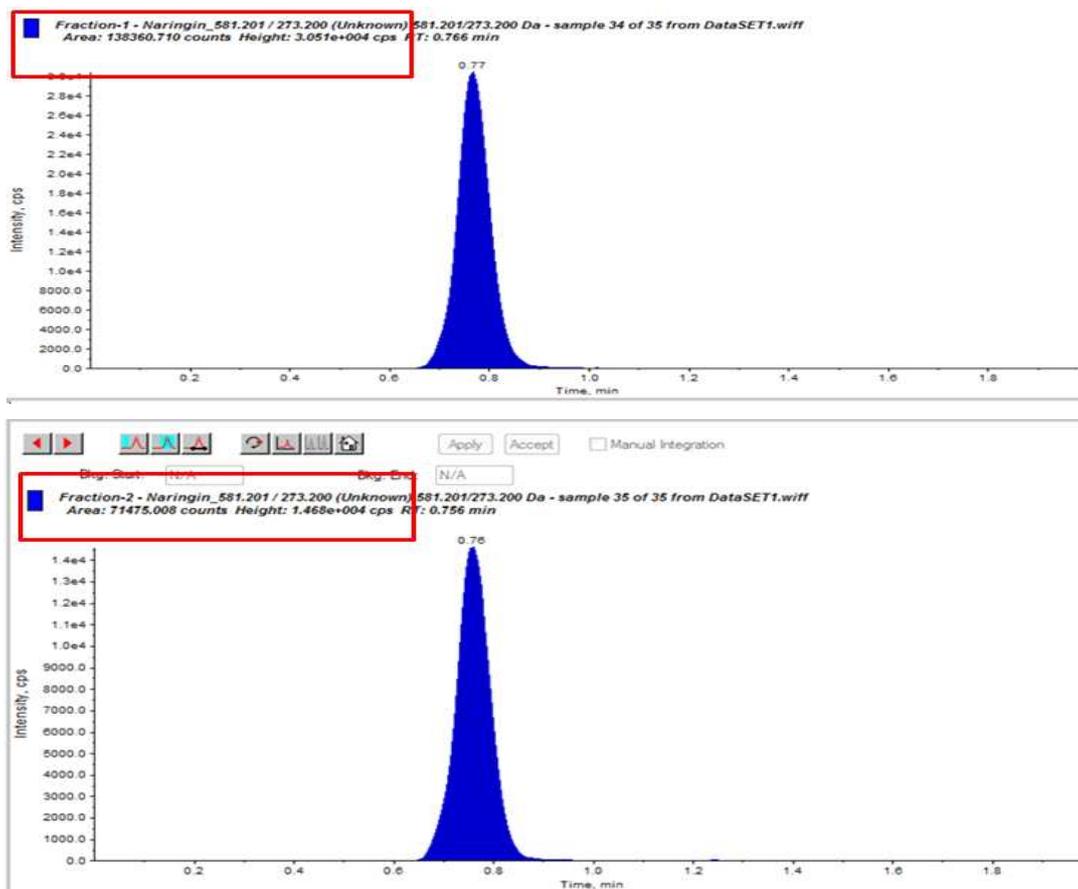


그림6 . 톳 발효물에서의 naringin 분획 크로마토그램

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Retention Time (min)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Use Record	Record Modified
1	50% meth	Blank	Naringin\DataSET1.wiff	0.000	0.000e+000	0.00	0.00	N/A	N/A		<input type="checkbox"/>
2	STD-25ng	Standard	Naringin\DataSET1.wiff	28507.908	5.582e+003	25.0	0.763	24.3	97.2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	STD-50ng	Standard	Naringin\DataSET1.wiff	53612.558	1.141e+004	50.0	0.767	51.8	104	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4	STD-100ng	Standard	Naringin\DataSET1.wiff	116608.793	2.395e+004	100	0.763	102	102	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5	STD-200ng	Standard	Naringin\DataSET1.wiff	233799.051	5.029e+004	200	0.763	206	103	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6	STD-500ng	Standard	Naringin\DataSET1.wiff	599253.638	1.264e+005	500	0.769	529	106	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7	STD-1000ng	Standard	Naringin\DataSET1.wiff	994453.331	2.009e+005	1000	0.764	879	87.9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8	Fraction-1	Unknown	Naringin\DataSET1.wiff	138360.710	3.051e+004	N/A	0.766	122	N/A		<input type="checkbox"/>
9	Fraction-2	Unknown	Naringin\DataSET1.wiff	71475.008	1.468e+004	N/A	0.756	62.3	N/A		<input type="checkbox"/>

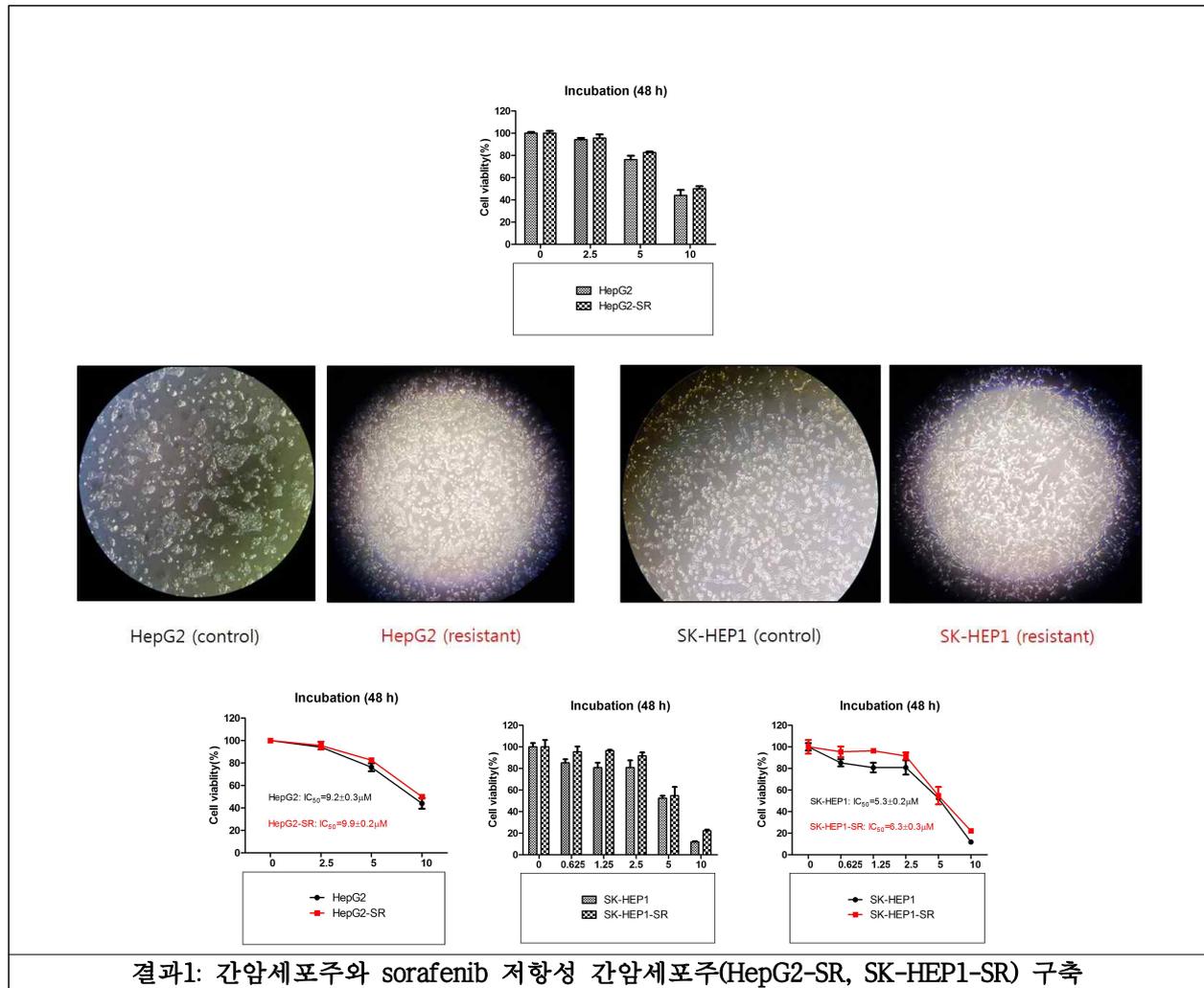
표 4. LC-MS/MS 분석을 통한 톳 발효물의 naringin 함유 확인

■ 협동 (건국대학교글로컬산학협력단)

● 표적항암제 저항성 암세포주에서 기능성 신소재의 효능평가

2종의 간암세포주에 sorafenib을 장기적으로 저농도(0.1-2 μ M) 반복처리하여 넥사바(sorafenib) 저항성 세포를 구축함.

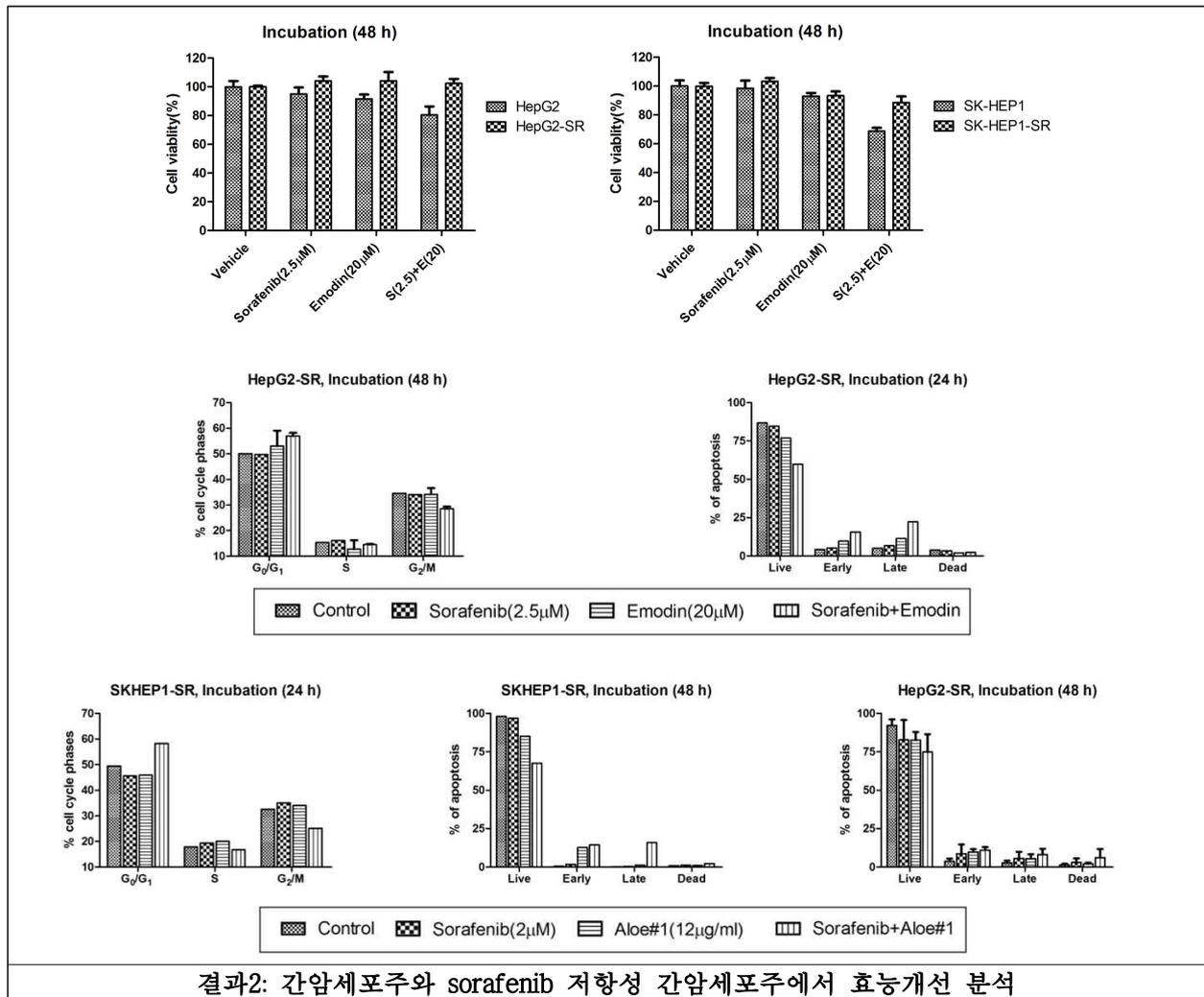
☞ **결과1:** 저항성 여부 판별을 위해 정상세포와 저항성세포에 농도의존적으로 sorafenib을 처리하여 48시간 후에 crystal violet assay를 통해 성장저해를 확인하였음. 세포주의 반수유효농도(IC₅₀)는 각각 HepG2 9.2 \pm 0.3 μ M, HepG2-SR 9.9 \pm 0.2 μ M, SK-HEP1 5.3 \pm 0.2 μ M, SK-HEP1-SR 6.3 \pm 0.3 μ M로 측정되었음. 따라서 넥사바 장기처리로 인한 저항성을 갖는 것으로 확인되었으며 기능성 신소재에 의한 효능개선 여부를 규명하게 되었음.



Sorafenib을 장기처리하여 구축된 저항성 간암세포주에서 emodin, 알로에 추출물과 sorafenib의 병행투여에 의한 효과를 확인하고자 세포사멸 유도 분석을 실시하였음. 그림에 제시된 농도의 emodin(20 μ M), aloe#1(12 μ g/ml)과 sorafenib(2.5, 2 μ M)을 48시간 동안 처리하여 crystal violet assay로 성장저해를 확인하였고, FACS 분석을 실시하였음.

☞ **결과2:** Emodin, 알로에 추출물과 sorafenib을 병행투여 할 경우 제시된 그림과 같이 sorafenib 저항성 간암세포의 성장억제는 정상 간암세포주와 비교하여 효능개선 효과가 미미한 것으로 확인되었음. 또한 세포의 주기와 사멸 변화량을 분석한 결과, 간기 G₀/G₁ phase arrest와 total

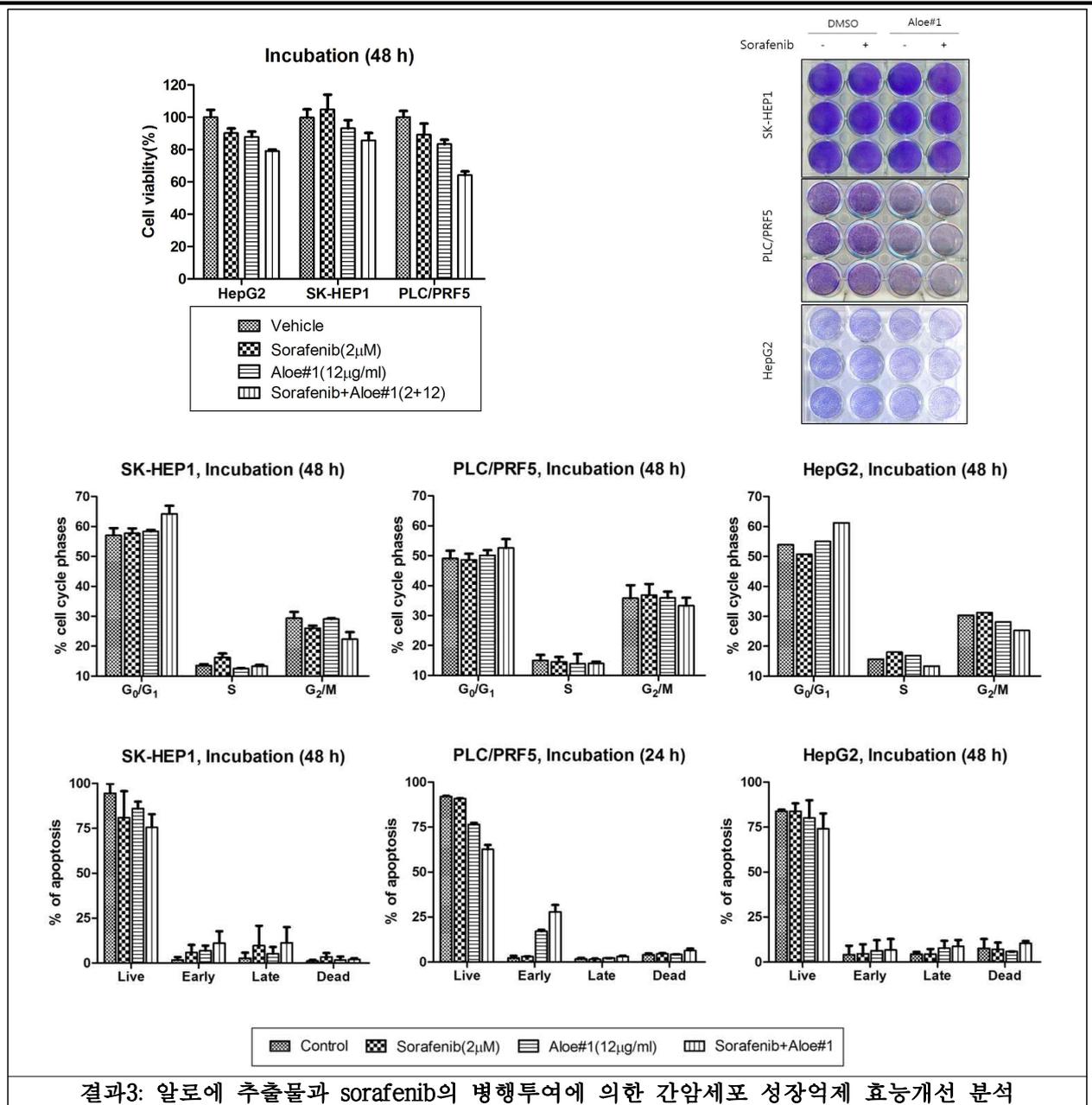
apoptosis(early + late)를 유도하는 것으로 확인되었으나 변화량이 정상간암세포주와 비교하여 크지 않았음. 따라서, sorafenib의 장기치리로 유도된 저항성 간암세포주에서는 정상 간암세포주에 비해 emodin과 알로에 추출물에 의한 효능개선 감수성이 낮은 것으로 확인되었으며 처리유효농도의 상향 조정과 작용기전 연구에 대한 추가실험 필요성을 보여주었음.



결과2: 간암세포주와 sorafenib 저항성 간암세포주에서 효능개선 분석

본 과제 1차 년도에서 sorafenib 효능개선 가능성을 보였던 알로에 추출물(Aloe#1: A. vera 엽체 MeOH 추출물)의 효과를 확인하고자 세포사멸 유도 분석을 실시하였음. 그림에 제시된 농도의 aloe#1(12μg/ml)과 sorafenib(2μM)을 48시간 동안 처리하여 crystal violet assay로 성장저해를 확인하였고, FACS 분석을 통해 간암세포의 주기(cell cycle), 사멸(apoptosis) 변화를 측정하였음.

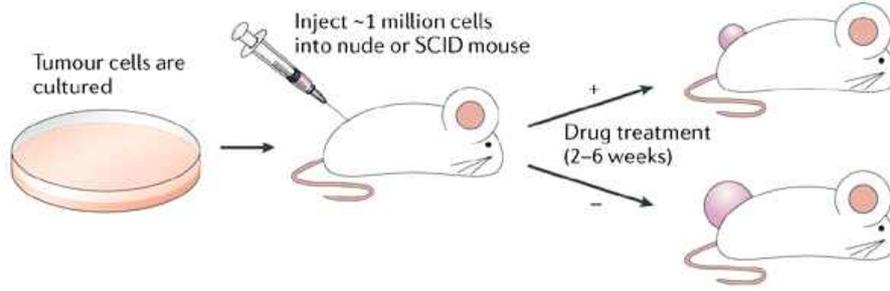
☞ **결과3:** 알로에 추출물(Aloe#1)과 sorafenib을 병행투여 할 경우 제시된 그림과 같이 간암세포의 성장이 약 20-35% 정도까지 억제됨을 확인하였음. 효능개선 작용을 규명하고자 세포의 주기와 사멸 변화량을 분석한 결과, 세포주기 중에 간기 G₀/G₁ phase arrest와 세포사멸에 대한 total apoptosis(early + late)가 유도되는 것으로 확인되었음. 세포주기와 세포사멸의 변화량에 대한 작용기전 연구 가능성을 보여주었음.



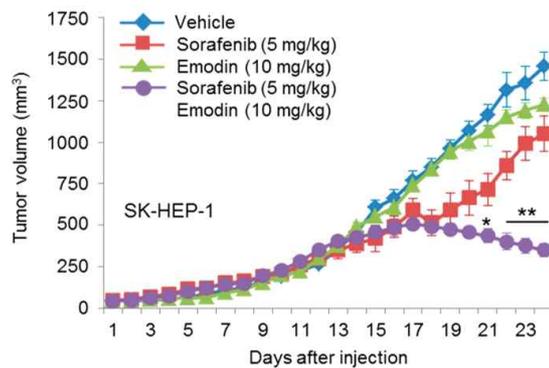
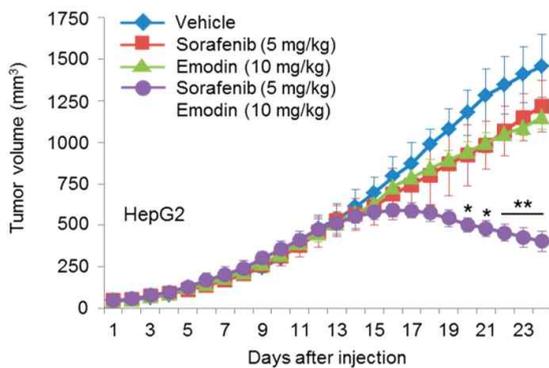
● 알로에 기능성 신소재의 표적항암제 효능강화 기능성 평가 (동물모델, Xenograft)

Emodin, sorafenib 각각과 emodin+sorafenib의 복강내 병행투여에 의한 간암 세포주에서 유래된 종양의 성장저해곡선을 분석하였음. 그림에 제시된 농도의 emodin과 sorafenib을 24일 동안 처리하여 종양의 지름 및 부피 측정을 통해 알로에 유래 emodin에 의한 성장저해효과를 확인하였음.

☞ **결과4:** Emodin과 sorafenib을 복강내 단독투여했을 때 종양의 성장억제는 각각 HepG2 유래 xenograft에서 16.5, 21.2%로 확인되었고, SK-HEP1 유래 동물모델에서 27.8, 15.8%로 확인되었음. emodin과 sorafenib을 복강내 병행투여 할 경우 종양성장억제는 각각 HepG2 모델에서 72.4%와 SK-HEP1 모델에서 76.0%의 우수한 효능개선 효과가 있음을 확인하였음.



그룹별 약물투여 (단위, mg/kg/day), n=10, 총 24일간 투여				
Combination type	Control	Sorafenib	Emodin	Sorafenib
				Emodin
저농도	-	5	10	5 + 10
<i>Xenograft 모델 구축과 그룹별 약물투여</i>				

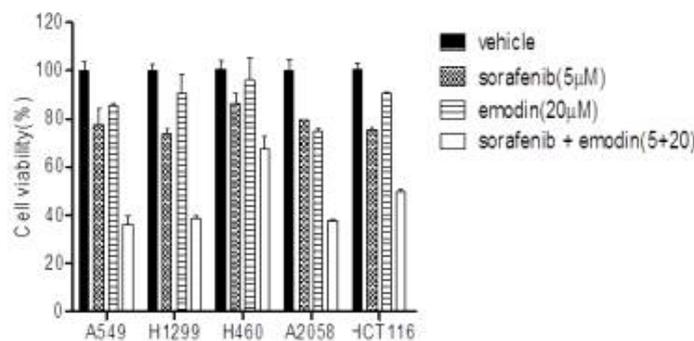


결과4: Xenograft 모델구축과 emodin과 넥사바 병행투여에 의한 종양성장억제 효능개선 분석

● 기존 표적항암제 효능개선 물질 대비 알로에 유래 신소재의 우수성 규명

Emodin과 sorafenib의 병행투여에 의한 3종의 폐암세포, 1종의 악성흑색종, 1종의 대장암세포에서 세포성장저해 개선효과를 분석하였음.

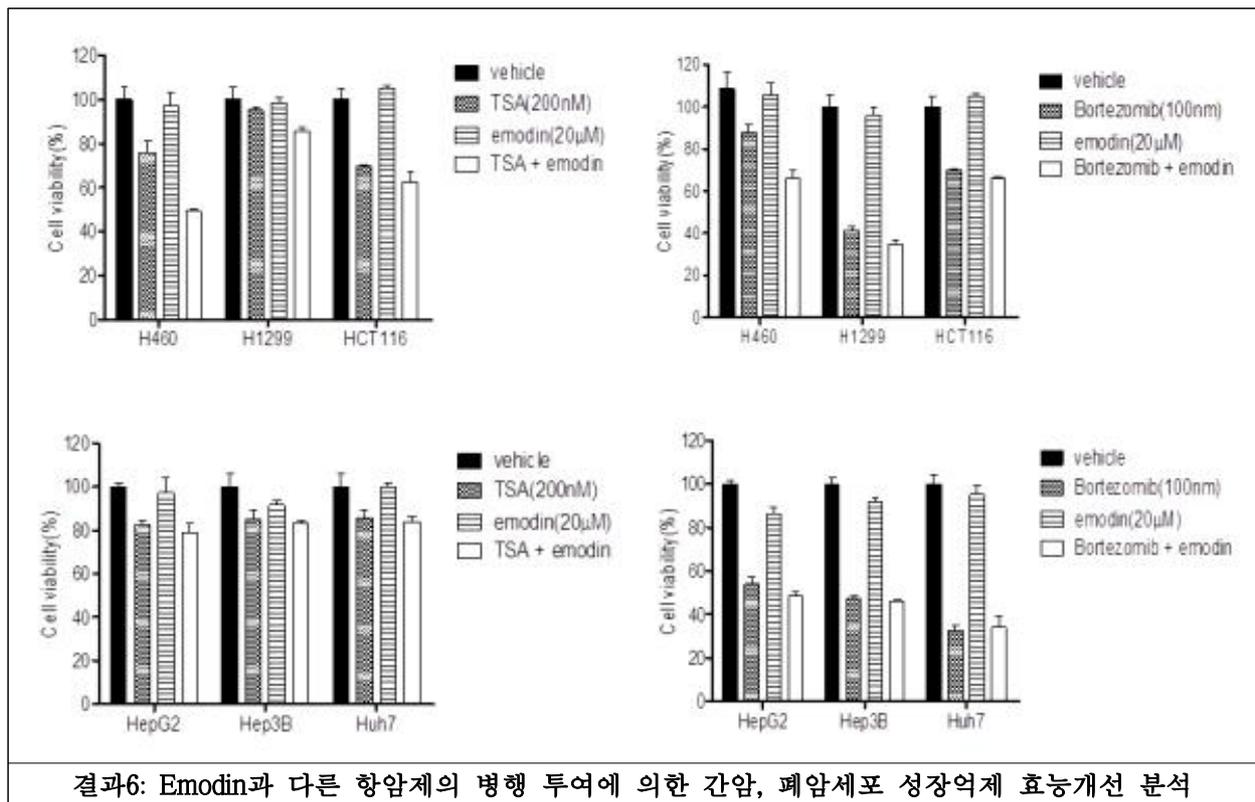
☞ 결과5: 대장암, 폐암, 악성흑색종에서도 간암세포와 동일하게 에모딘과 sorafenib의 병행투여에 의해 세포의 성장저해 효과가 개선되는 것을 확인하였음.



결과5: Emodin과 Sorafenib의 병행 투여에 의한 다른 고형암세포 성장억제 효능개선 분석

Emodin에 의한 표적항암제 효능개선은 Sorafenib에서만 적용되는가? 본 연구팀은 에모딘에 의 sorafenib의 효능개선의 특이성을 분석하기 위해 대표적인 항암제인 TSA(HDAC inhibitor)와 bortezomib(proteasome inhibitor), 2종에서 에모딘의 병행투여 효과를 분석하였음.

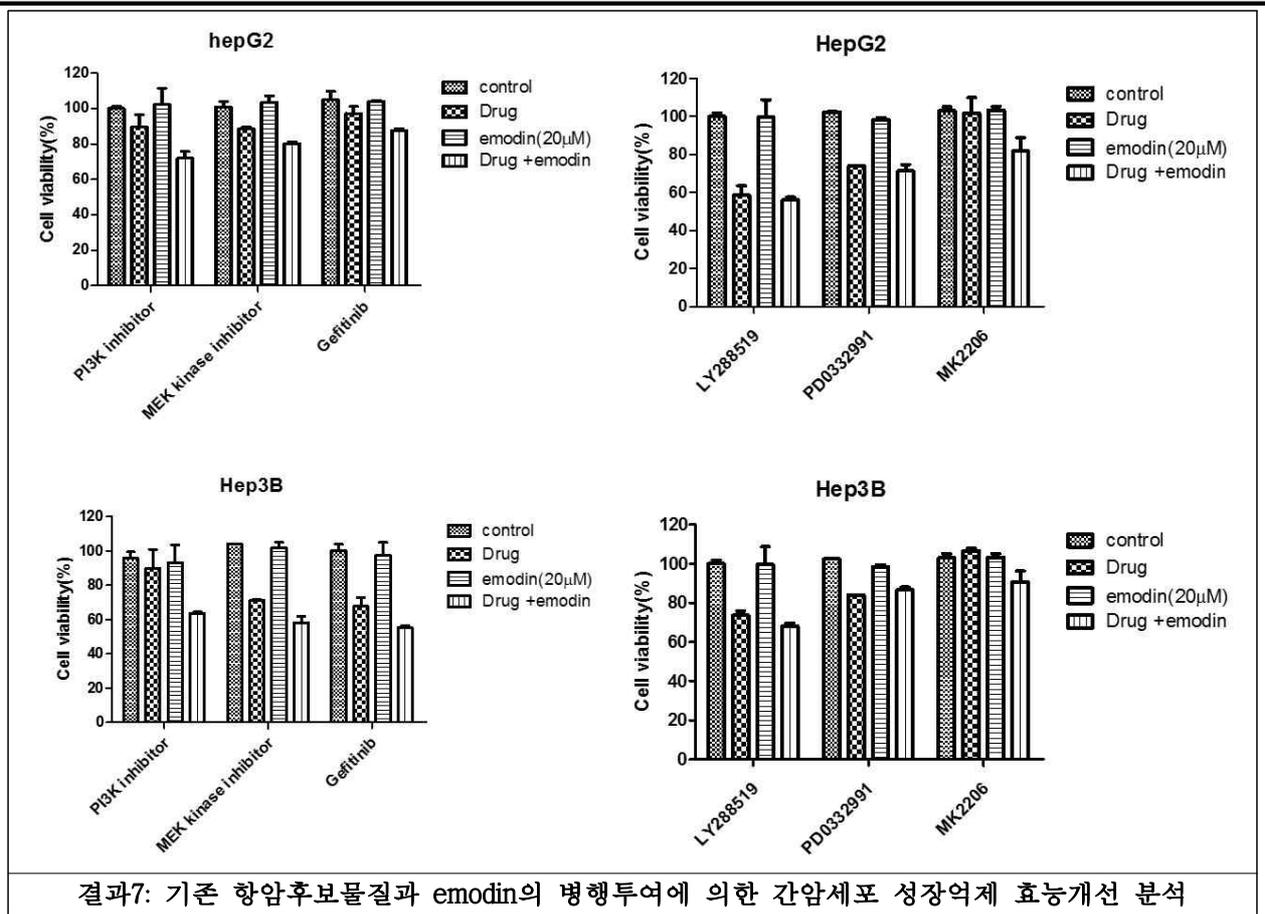
☞ **결과6:** 흥미롭게도 에모딘은 TSA와 Bortezomib에 의한 폐암세포(3종), 간암세포(3종)의 세포성장 저해를 극대화시키지는 못했음. 결과적으로 본 연구를 통해 에모딘은 Sorafenib에 특이적으로 항암 효과를 개선시킨다는 것을 확인하였음.



결과6: Emodin과 다른 항암제의 병행 투여에 의한 간암, 폐암세포 성장억제 효능개선 분석

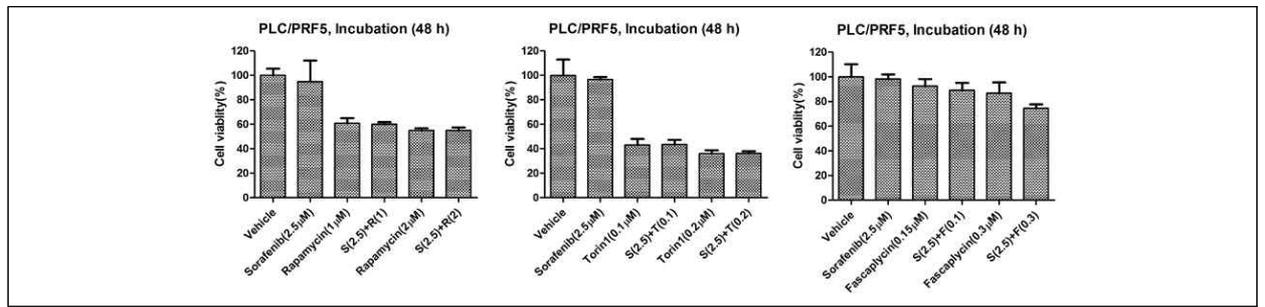
Emodin에 의한 기존 세포성장 신호전달 억제제 및 간암표적항암제 후보물질(LY288519, PD0332991, MK2206)의 병행처리로 48시간 후에 간암세포주의 성장곡선을 분석하였음.

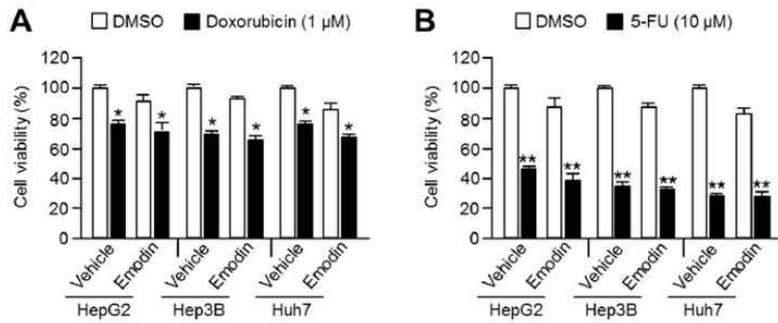
☞ **결과7:** 그림에 제시된 농도의 emodin은 PI3-kinase 신호전달체계 억제 효능을 개선시킬 수 있다는 가능성을 보여주었음. 그러나 MEK kinase inhibitor, gefitinib과 후보물질의 emodin병행처리시 효능개선 효과가 나타나지 않은 것을 확인한 바, 알로에 유래 emodin의 우수성은 면역체계 boosting 과 독립적으로 항암 효능개선이 일어났다고 볼 수 있음. 따라서, emodin에 의한 sorafenib의 효능개선이 PI3K신호전달체계의 복합적 억제에 따른 것일 수 있다는 작용기전 연구에 대한 가능성을 확인 하였음.



기존 1차 화학항암제 2종과 항암제 후보물질 3종에 대한 emodin과의 병행처리에 간암세포의 성장억제를 분석하였음.

☞ **결과8:** 기존 표적항암제 효능개선 후보물질 3종(fascaplysin, Torin1, rapamycin)은 단독투여시 성장억제 효과를 보였으나 sorafenib과 병행처리시 효능개선 효과를 나타내지 않았음. 결과8-A, B에서 제시된 농도의 emodin과 기존 1차 화학항암제 2종(Doxorubicin, 5-Fluorouracil)을 병행처리 할 경우 간암세포주에서 성장억제 효능개선 효과를 보여주지 못한 바, emodin의 sorafenib 감수성을 확인함.



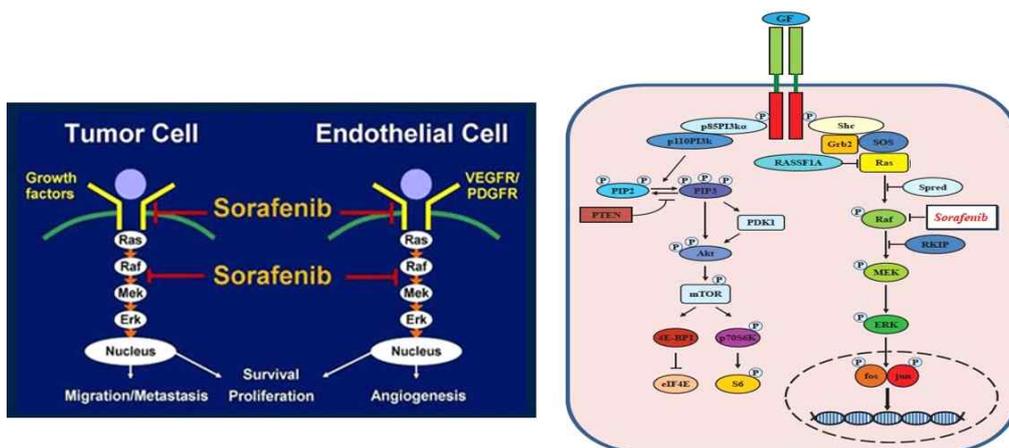


결과8: 기존 항암후보물질 및 1차 화학항암제와 emodin의 병행투여에 의한 간암세포 성장억제 효능개선 분석

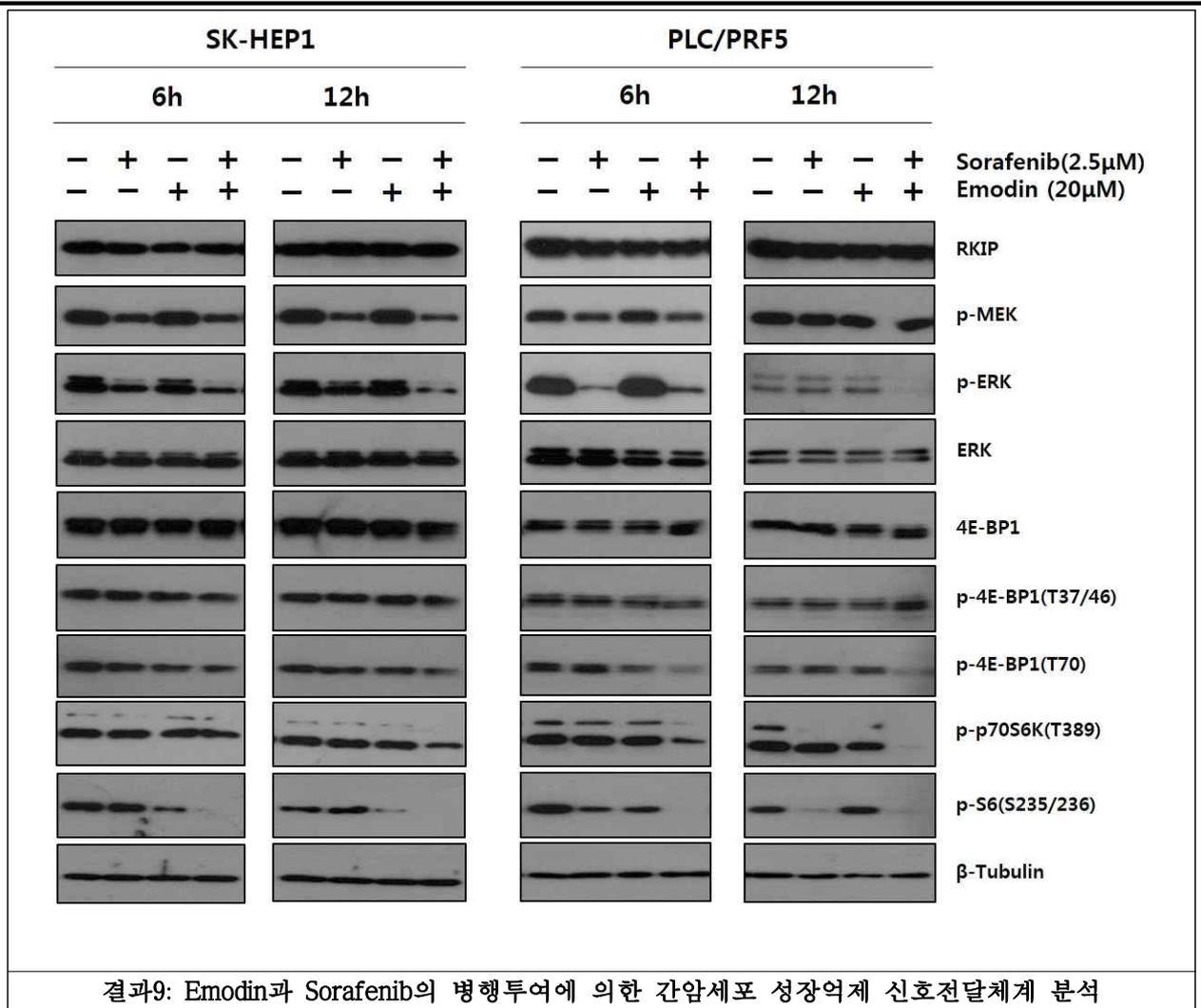
● 알로에 유래 기능성 강화 신소재의 표적항암제 효능개선 작용기전 규명 (암세포 스크리닝)

간암 표적항암제 sorafenib의 효능을 강화시키는 알로에 유래 신소재인 emodin의 작용기전을 규명하고자 western blot assay를 실시하였음. 그림에 제시된 농도의 emodin(20 μM)과 sorafenib(2.5 μM)을 각각 6, 12시간 동안 처리하여 단백질 시료를 획득하였고 암세포의 증식과 사멸의 신호전달경로에 관여하는 protein marker와 함께 비교분석 하였음.

☞ **결과9:** 제시된 그림과 같이 sorafenib은 세포성장 신호전달체계인 RAS-Raf-MEK-Erk 및 신생혈관작용을 제어함으로써 암세포의 성장을 억제함. emodin과 sorafenib을 병행투여 한 후 신호전달 단백질 변화량을 분석한 결과, RAS-Raf-MEK-Erk 경로의 하위단계인 p-Erk, p-Mek 변화를 촉진함으로써 세포성장이 억제되는 것으로 확인되었음. 또한 세포성장에 관련된 mTOR 신호전달체계의 하위단계인 p-S6, p-p70S6K, p-4EBP1 변화를 촉진하여 세포성장을 억제하는데 관여하는 것을 보여주었음. 따라서, 세포내 단백질 변화에 대한 RNA 분석과 RT-PCR에 의한 유전자발현 규명을 위한 후속 연구 가능성을 보여주었음.



Sorafenib(넥사바)의 항암작용 원리



3차 년도 (2018년) 연구개발 추진전략 및 방법

연구내용	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신소재의 대량생산 및 특수의료용도식품 제품개발 표준화 구축 ▪ 최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가 ▪ 생물전환 유래 기능성강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가 (세포 및 동물모델) ▪ 기능성강화 신소재의 표적항암제 기능성 강화 작용기전 규명 ▪ 발굴된 기능성소재와 표적항암제의 상호작용 규명
------	--

● 신기능성 소재 발굴 및 생물전환을 이용한 발굴 신소재의 효율 증대

가. 기능성 신소재 선별 추출

1) 개똥쭉

들이나 강 주변에 분포하며, 잔잎쭉, 개똥쭉이라고도 불림. 한방에서는 발열 감기, 학질, 소아경기, 소아불량, 이질 등에 사용됨. 개똥쭉에 함유되어 있는 flavonoid 물질이 항암 효능과 관련하여 차로 달여마셨을 때, 암의 예방, 지연, 치료에 효능을 보인 것으로 나타남. 특정 flavonoid는 암세포의 성장, 증식을 억제함. 또한 다른 함유 물질인 artemisinin 역시 endoperoxide기의 영향으로 혈액중 철화합물과의 상호작용을 통해 암세포의 사멸을 유도하고 높은 항암효과를 가짐. 건조된 개똥쭉 500 g을 5 L의 D.W.에 담가 100 °C에서 3시간 추출 후, 30분간 휴지시킴. 5 L의 D.W.를 추가하여 100 °C에서 3시간 추출 후, 1시간가량 휴지시킨 후, 여과하여 200 mL까지 농축하여 수득함.

2) 결명자

Carotin, Kaempferol,을 함유하며, emodin을 포함한 Anthraquinone유도체가 들어있어 간에서의 효능과 이뇨, 고혈압, 위장에 좋은 효능을 보일 것이 기대됨. 또한 항진균작용을 나타내는 Chrysophanic acid-9-anthrone이 들어있음. 건조된 결명자 500g을 5 L의 D.W.에 100 °C에서 2시간 추출함. 30분 휴지 후, 5 L의 D.W.를 추가하여 100 °C에서 3시간 추출후, 추출한 시료를 1시간가량 휴지시킨 후, 여과하여 600 mL까지 농축하여 수득함.

3) 두충

항고혈압, 항당뇨, 항비만에 관한 연구가 활발하며, 그 중 항염효과가 있는 것으로 대사증후군, 골관절의 형성 등에 관련있음. 또한 신경계질환에서 신경보호효과를 이루고 있어 파킨슨과 같은 병에서도 보호효과를 나타냄. 건조된 두충 500 g을 5 L의 D.W.에 담가 100 °C에서 3시간 추출 후, 30분간 휴지시킴. 5 L의 D.W.를 추가하여 100 °C에서 3시간 추출 후, 1시간가량 휴지시킨 후, 여과하여 200 mL까지 농축하여 수득함.

4) 모링가

잎에는 비타민 A, 칼슘, 단백질, 비타민 C가 고함량 포함되어 영양학적으로도 가치가 높은 식물. 또한 항염증 성분을 띠며 세포 손상을 보호하고, 질병과 만성 질환의 예방에 효과가 있음. 특히 고혈압환자에 대한 압 예방으로서 효능이 두드러짐. 또한 혈당의 감소에도 기작을 나타냄. 건조된 모링가 500 g을 5 L의 D.W.에 담가 100 °C에서 3시간 추출 후, 30분간 휴지시킴. 5L의 D.W.를 추가하여 100 °C에서 3시간 추출 후, 1시간가량 휴지시킨 후, 여과하여 200 mL까지 농축하여 수득.

5) 영지버섯

영지가 속하는 구멍장이버섯류의 대다수가 항암효과가 있는 것으로 알려졌으며, 최근에는 구름버섯에서도 항암제가 개발됨. 건조된 영지 버섯 500 g을 5 L의 D.W.에 담가 100 °C에서 3시간 추출함. 30분간 휴지시킴. 5 L의 D.W.를 추가하여 100 °C에서 3시간 추출 후, 1시간가량 휴지시킨 후,

여과하여 200 mL까지 농축하여 수득함.

6) 잎새버섯

베타글루칸이 포함되어 있으며, 이 물질이 항암효과가 있다. 정제과정에서 농축된 MD fraction이 가장 항암효과가 뛰어남. 생물의 잎새 버섯 500 g을 5 L의 D.W.에 담가 100 °C에서 3시간 추출 후, 30분간 휴지시킴. 5 L의 D.W.를 추가하여 3시간 추출 후, 1시간가량 휴지시킨 후, 여과하여 200 mL까지 농축하여 수득함

7) 호장근

emodin이 다량 함유된 것으로 조사되어 추출할 가치가 있음. 건조된 호장근 500 g을 5 L의 D.W.에 100 °C에서 2시간 추출함. 30분 휴지 후, 5 L의 D.W.를 추가하여 100 °C에서 3시간 추출후, 추출한 시료를 1시간가량 휴지시킨 후, 여과하여 200 mL까지 농축하여 수득함.

☞ **결과1** : 기능성 소재를 발굴하기 위해 7가지 신소재를 선별하여 추출함. 개똥쑥, 결명자, 두충, 모링가, 영지버섯, 잎새버섯에서는 Emodin이 검출되지 않았음. 호장근에서만 Emodin 함량이 10.11%로 높은 수치를 확인할 수 있었음.

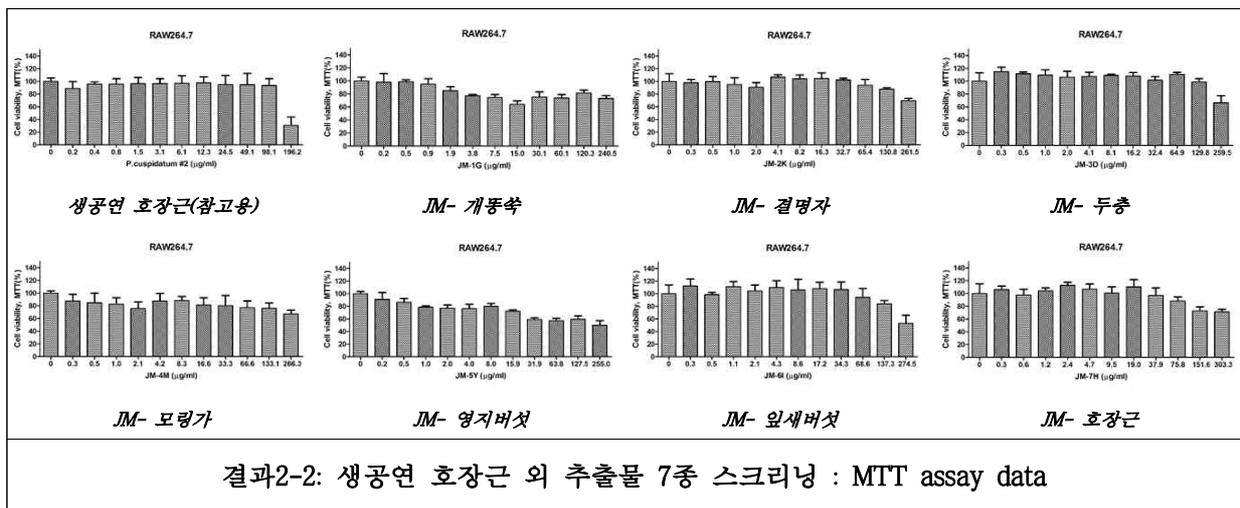
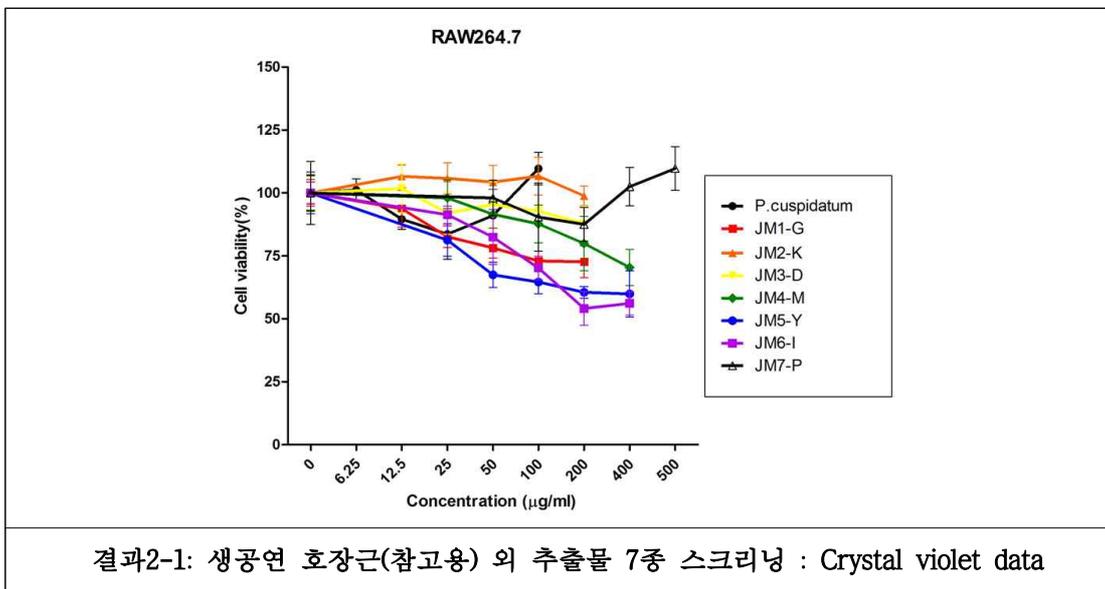
추출 물질	분석 코드	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출 온도 (°C)	추출 용매	추출 시간 (h)	추출비율 (시료 g:용매 L)	비고
개똥쑥	1G-3M	-	-	-	-	125.0	25.0	건조	100	DW	6	500:10	JM
결명자	2K-3M	-	-	-	-	106.5	21.3	건조	100	DW	6	500:10	JM
두충	3D-3M	-	-	-	-	102.3	61.4	건조	100	DW	6	500:10	JM
모링가	4M-3M	-	-	-	-	108.9	87.1	건조	100	DW	6	500:10	JM
영지버섯	5Y-3M	-	-	-	-	108.5	43.4	건조	100	DW	6	500:10	JM
잎새버섯	6I-3M	-	-	-	-	114.5	45.8	생물	100	DW	6	500:10	JM
호장근	7H-3M	10.11	10.95	-	-	108.3	65.0	건조	100	DW	6	500:10	JM
Aloe vera	Aloe#1	7.12	7.5	7.51	7.91	105.3	21.06	잎	45	Methanol	72	81:1	수율 4.38 g (5.41%)

결과1 : 기능성 신소재 선별 및 추출조건 (UPLC)

8) 기능성 신소재 선별 추출물의 세포생존에 대한 효과

기능성 신소재 선별 추출 및 미생물 소재를 활용한 기능성 신소재 생물전환용에 기여할 호장근의 6종 시료분말을 추출하였고 대조군으로서 한국생명공학연구원에서 분양받은 호장근(*Polygonum cuspidatum*, 이하 *P.cuspidatum*) MeOH 추출물과 JM호장근 및 6종의 JM추출물에 대하여 단독처리를 통해 항염증 실험용 RAW264.7 세포의 성장률을 관찰하고 분석함(Crystal violet staining assay and MTT assay).

결과2 : 생물전환용에 기여할 JM호장근추출물 외 6종은 농도의존적으로 처리한 결과 전반적으로 50 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었음. 대조군으로서 분양받은 호장근추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하까지 세포생존에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였음. 따라서 JM호장근 외 6종의 JM추출물의 항염증 효과에 대한 적정처리농도를 25~50 $\mu\text{g/ml}$ 로 설정하기로 결정하였음.



나. 후보물질 선정을 위한 추출물의 항염증 스크리닝

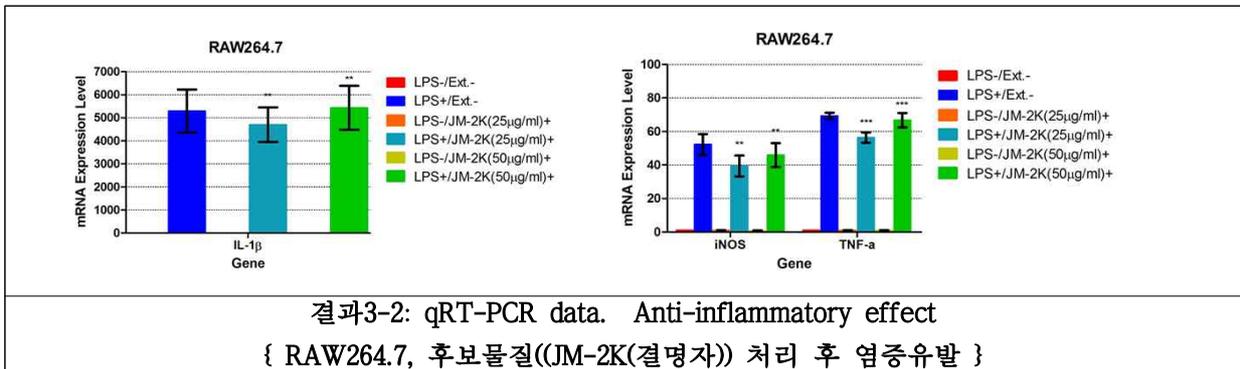
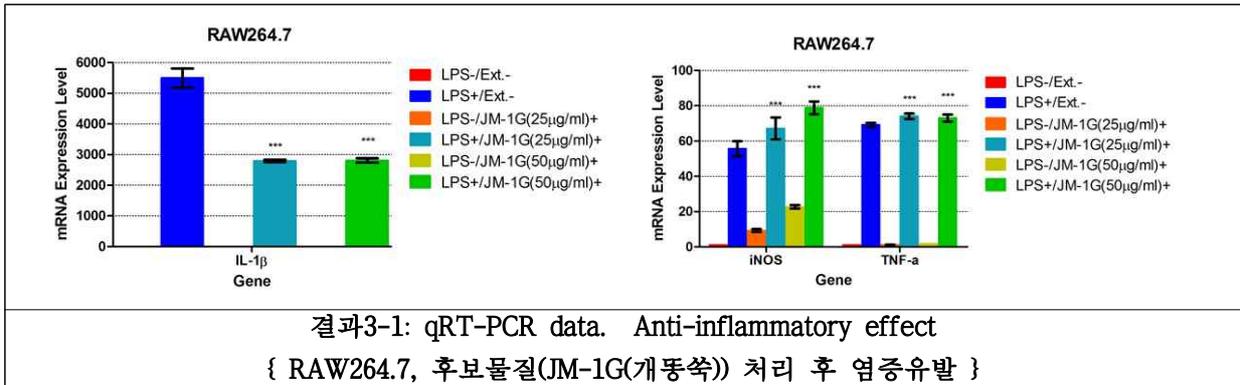
1) 세포실험

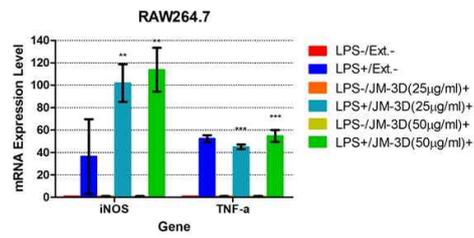
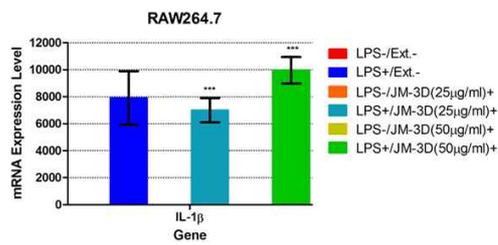
- 각각 추출물의 염증성 테스트를 위해 쥐에서 유래한 RAW 264.7 cell에 LPS로 염증을 유발하여 시료로 활성화시켜 항염 반응을 측정함.
- RAW 264.7 cell 안정화를 위해 CO2 incubator (37°C, 4h, 5% CO2 incubator)에 넣는다. DMEM과 FBS를 이용하여 cell culture를 한다.
- 1주일간 안정화 후 6well에 cell을 seeding.
- 하루 지난 후 각 추출물을 농도의존적으로 처리함.
- LPS 1 μg/mL를 처리 후 배양함.

2) Quantitative Real-Time PCR

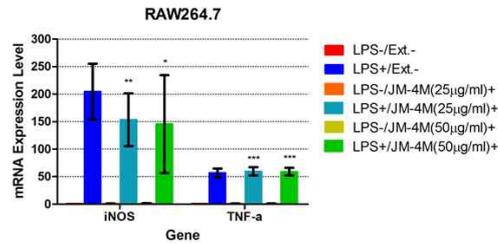
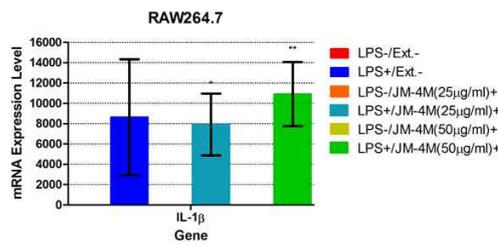
- 정량적 실시간 PCR은 다음과 같이 수행함.
- TRIzol(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 이용하여 배양된 세포에서 추출한 total RNA 2μg과 cDNA 합성은 대용량 cDNA 역전사 키트(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 수행함.
- SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량적 PCR을 수행함.

☞ **결과3** : JM호장근 등 7종 추출물의 항염증 효과확인을 위해 qRT-PCR data를 분석함. 결과3-1 ~ 3-7에 제시된 바와 같이 JM호장근 등 7종의 처리에 의한 TNF-α, IL-1β, iNOS 발현을 분석하였고 유일하게 JM호장근(JM-PC) 추출물을 LPS(염증유발물질) 세포자극물과 복합으로 작용시켰을 때 LPS 단독때보다 농도의존적으로 감소하였음 따라서 이러한 결과들을 통해 JM호장근 추출물은 LPS가 존재하는 가운데 IL-1β와 iNOS를 감소시킴에 따라 염증반응 완화작용을 예측하였음.

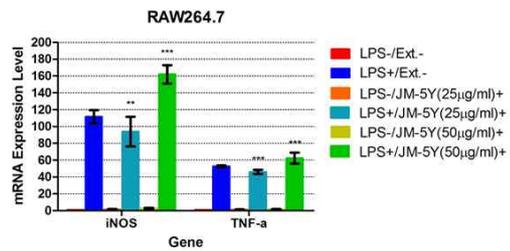
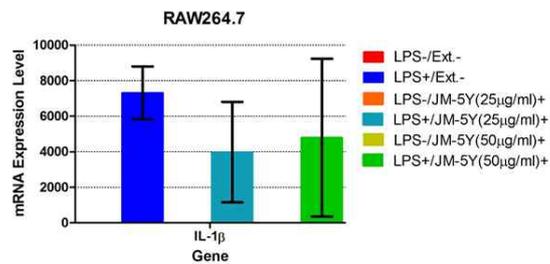




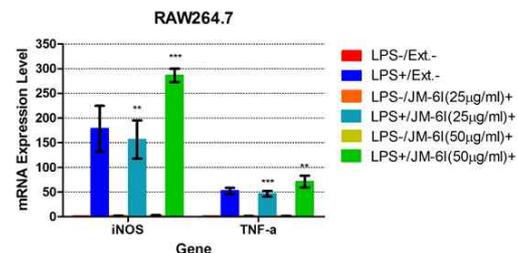
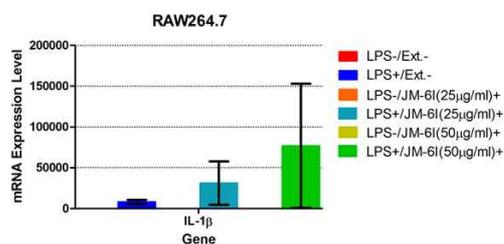
결과3-3: qRT-PCR data. Anti-inflammatory effect
 { RAW264.7, 후보물질(JM-3D(두충)) 처리 후 염증유발 }



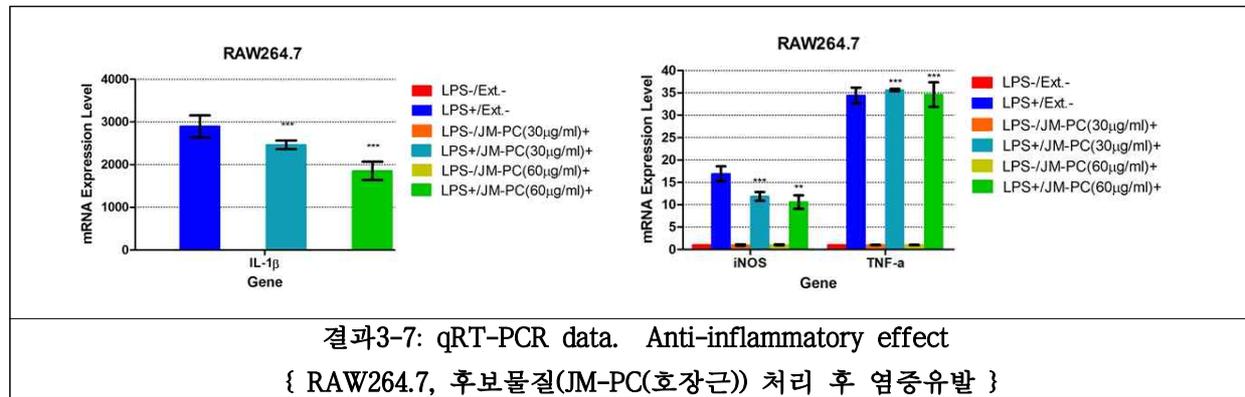
결과3-4: qRT-PCR data. Anti-inflammatory effect
 { RAW264.7, 후보물질(JM-4M(모링가)) 처리 후 염증유발 }



결과3-5: qRT-PCR data. Anti-inflammatory effect
 { RAW264.7, 후보물질(JM-5Y(영지버섯)) 처리 후 염증유발 }



결과3-6: qRT-PCR data. Anti-inflammatory effect
 { RAW264.7, 후보물질(JM-6I(앞새버섯)) 처리 후 염증유발 }



● 생물전환 후보용 알로에 베라 추출물에서 emodin, aloe-emodin 정량 확인

알로에 베라를 세척하여 절단 한 후 각각의 용매(EtOH 95.9%, 70%, DW)에 넣고 45°C 에서 추출함. 추출한 액체를 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm, 60°C 이하로 감압농축 하여 UPLC로 분석함.

☞ **결과 4:** 생물전환후보용 알로에 베라 추출물 4종에서의 emodin과 aloe-emodin 정량을 확인함.

JM-A01은 EtOH (95.9%)에서 24h 추출하였으며 emodin 함량이 0.99%, aloe-emodin 함량은 13.8% 였음. JM-A02는 EtOH (95.9%)에서 48h 추출하였으며 emodin 함량이 1.11%, aloe-emodin 함량은 5.82% 였음. JM-A03는 EtOH (70%)에서 48h 추출하였으며 emodin 함량이 0.31%, aloe-emodin 함량은 3.48% 였음. JM-A04는 DW에서 48h 추출하였으며 emodin 함량이 0.22%, aloe-emodin 함량은 1.85% 였음. 추출용매는 EtOH (95.9%)를 사용했을 때 emodin과 aloe-emodin 함량이 높게 나타나는 것을 확인함.

추출물질	분석 코드	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)	비고
알로에 베라 (생물전환용)	JM-A01	0.99	1.17	13.80	16.32	118.3	47.3	생과육	45	EtOH (95.9%)	24	200:1	JM
알로에 베라 (생물전환용)	JM-A02	1.11	1.11	5.82	5.82	100.0	40.0	착즙	45	EtOH (95.9%)	48	200:1	JM
알로에 베라 (생물전환용)	JM-A03	0.31	0.56	3.48	6.33	181.8	72.7	착즙	45	EtOH (70%)	48	200:1	JM
알로에 베라 (생물전환용)	JM-A04	0.22	0.22	1.85	1.85	99.8	39.9	착즙	45	DW	48	200:1	JM

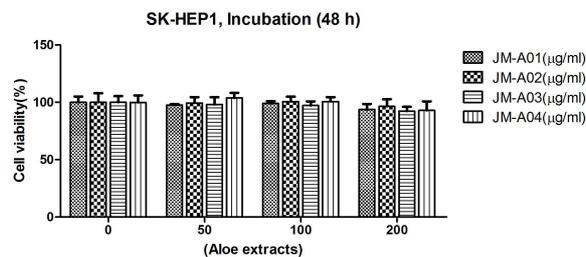
결과4: 생물전환후보용 알로에 베라 추출물 4종에서의 emodin과 aloe-emodin 정량

● 생물전환용 기능성 신소재 함유 추출물의 표적항암제 효능강화 평가 (세포모델)

기능성 강화 신소재의 생물전환 표준화에 기여할 알로에 베라(Aloe vera) 분말을 다양한 방법으로 추출하였고 4종의 알로에 추출물에 대하여 48시간 동안 단독처리한 후 간암세포의 성장률을 관찰하고 분석함(Crystal violet staining and assay).

☞ **결과5:** 생물전환 표준화에 기여할 알로에 추출물 4종은 농도의존적으로 48시간 동안 처리한 결과 200 µg/ml 농도까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었음. 따라서 넥사바의 효능개선에 주요한 상승효과를 나타낼 수 있는 알로에 추출물의 신소재 함량이 높은 것으로 확인된 EtOH 추출물 JM-A01을 선정하여 병행처리에 의한 넥사바 효능개선 효과를 측정기로 결정하였음.

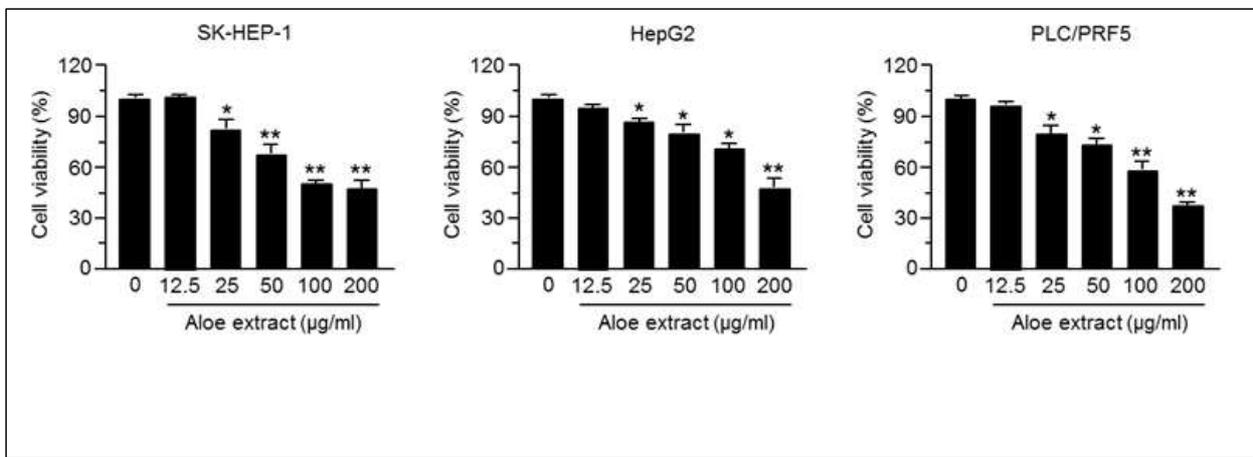
추출물질	분석코드	Emodin (중량%)	Aloe emodin (중량%)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료g:용매L)
알로에 베라	JM-A01	0.99	13.80	생과육	45	EtOH(95.9%)	24	200:1
알로에 베라	JM-A02	1.11	5.82	착즙	45	EtOH(95.9%)	48	200:1
알로에 베라	JM-A03	0.31	3.48	착즙	45	EtOH(70%)	48	200:1
알로에 베라	JM-A04	0.22	1.85	착즙	45	DW	48	200:1

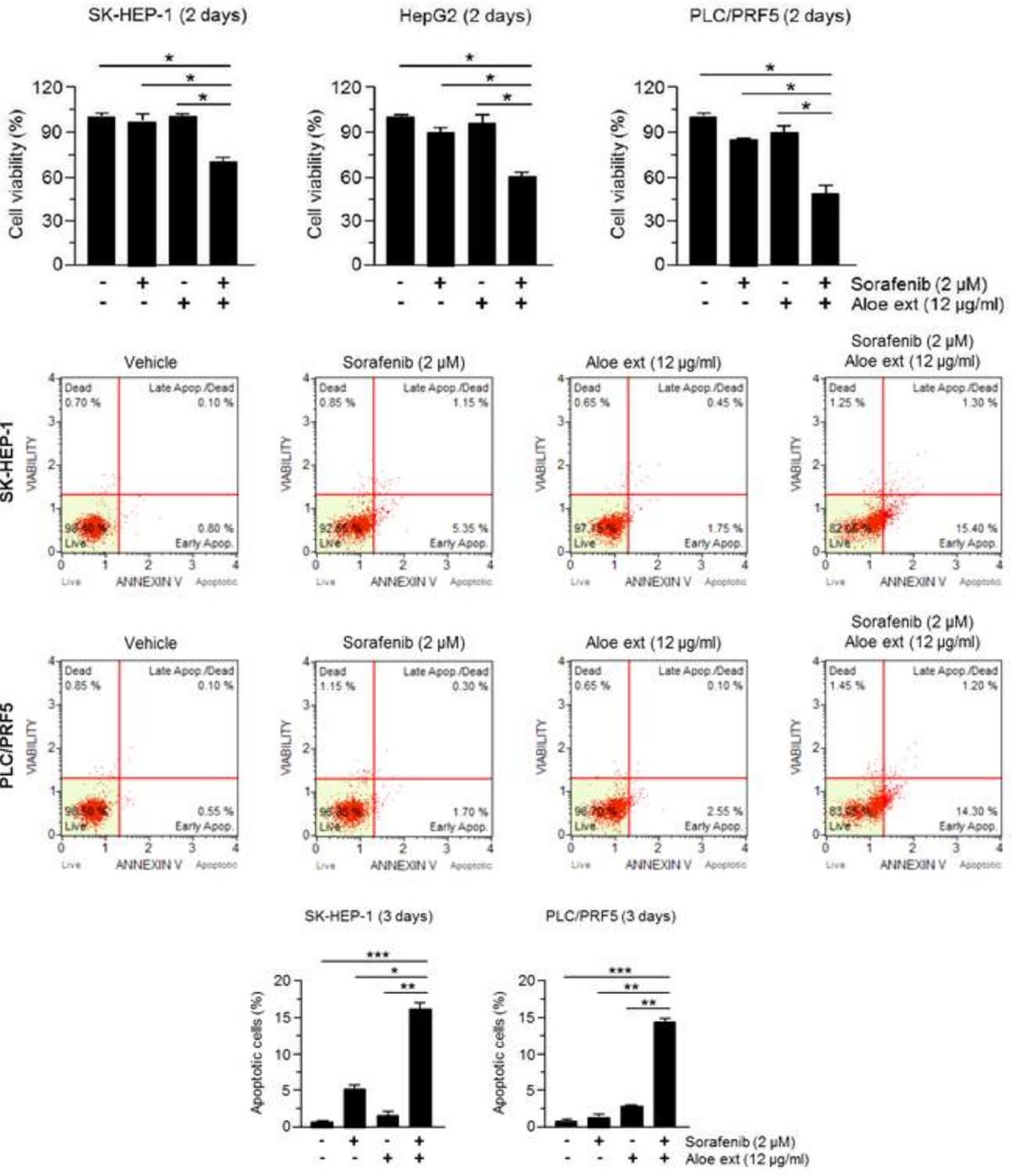


결과 5: 간암세포에서 생물전환 후보용 알로에 추출물의 세포생존 효과 분석

선별한 생물전환 후보용 알로에 추출물 JM-A01에 대하여 단독처리와 간암 표적항암제 sorafenib과의 병행처리를 통해 간암세포주 3종의 성장률을 관찰하고 분석함(Crystal violet staining and assay & Annexin V analysis).

☞ **결과6:** 생물전환 표준화에 기여할 알로에 추출물을 72시간 동안 간암세포주에 단독처리한 결과 200 µg/ml 농도까지 유의적으로 세포독성이 나타나는 것을 확인하였음. 생물전환 후보용 알로에 추출물 적정농도 12 µg/ml과 sorafenib을 48시간 동안 병행처리할 경우 간암세포의 세포성장이 10% 정도까지 최대로 억제되는 것을 세포생존과 세포사멸 분석으로 확인하였음. 이러한 결과를 바탕으로 생물전환 표준화를 시도하기 적합한 추출물로서 JM-A01을 선정하게 되었음. 연구팀은 알로에 추출물 JM-A01을 선도물질로 하여 생물전환을 통해 신소재의 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 찾고자 후속실험을 계속 실시하였음.





결과 6: 간암세포주에서 생물전환 신소재 후보물질 (JM-A01)과 넥사바의 항암 개선효과 분석

● 알로에 소재의 생물전환을 이용한 효율 증대

가. 알로에 베라 생물 추출 후 액상 발효

1) *Lactobacillus plantarum* 을 이용한 액상발효

알로에 베라를 세척하여 절단한 후 각각의 용매에 넣고 45°C 에서 24시간 동안 추출함. 에탄올 추출물의 경우 감압농축으로 에탄올을 회수 후 다시 DW 희석하여 배지원으로 사용함. 이렇게 추출한 액체를 MRS배지에 넣고 Auto clave에서 125°C로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. *Lactobacillus plantarum* (1.0x10¹⁰ cfu/g)를 MRS 액체배지에서 28°C, 24h 배양하여 준비함. 멸균된 액상배지에 배양시킨 *Lactobacillus plantarum* (1.0x10¹⁰ cfu/g)를 접종함. 셰이킹 인큐베이터에서 28°C, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킨 후 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압 농축하여 UPLC로 분석함.

☞ **결과 7:** *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 액상발효 한 후 UPLC로 분석하였음. JMA-3은 알로에 과즙을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. JMD-3은 알로에 생과육을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 0.9%였음. 본 결과는 기존 알로에 추출법을 확립한 결과보다 확연히 적은 emodin 함량을 보였으며, 이는 *Lactobacillus plantarum*를 이용하여 생물전환 적용 시 추출된 알로에의 aloe-emodin, emodin이 다른 물질로의 변환 또는 구조식이 변한 것으로 사료됨. 또한 일반 유산균 생물전환의 경우 알로에 자체의 항균성에 취약한 부분이 있을 수 있음. 따라서 이를 보완하기 위한 추가 생물전환 방법을 진행함.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)
JMA-3	-	-	-	-	105.6	73.9	과즙 추출액	45	DW	24	200:1
JMD-3	-	-	0.9	0.9	98.2	49.1	생과육 추출액	45	EtOH (70%)	24	200:1

결과7: *Lactobacillus plantarum* 을 이용한 액상발효

2) 단계적 공서배양 배양액을 이용한 액상발효

2-1) 실험 방법

항균 활성을 가진 알로에의 섬유소 분해와 유효성분 추출 그리고 자체적 항염 기능을 보강하기 위해 단일 균주가 아닌 단계적 공서 배양을 통해 알로에 생물전환을 시도함.

2-2) 해조류의 추출 및 회수

해조류 중 염증 인자 억제 효능이 있다고 판명된 톳과 다시마 50 g을 적당한 크기로 절단 및 수세한 다음, 20배액 정제수에서 10시간 이상 침지하여 알긴 등을 용출 제거함. 정제수 또는 80% Alcohol 1500 ml를 추출용매로 사용하여 80°C에서 2 ~ 10시간 추출함. 추출물을 여과하고, 진공농축 과정을 통하여 정제수 또는 Alcohol을 분리 회수함. 1차 추출 및 용매회수과정을 통하여 300 ml의 다시마 추출물을 수득함. 2차 추출과정으로 정제수 700ml를 투입하여 90° c에서 3시간 추출 한 후, 여과하고 진공 농축하여 2차 다시마 추출물을 300ml를 수득함.

2-3) 올리브 잎의 추출 및 회수

천연물 중 Polyphenol 수득이 용이한, 올리브 잎을 사용함. 건조 올리브 잎 50 g을 절단하여 50 ~ 80% Alcohol 용매 2000 ml를 투입 후 70 ~ 100°C 에서 3 ~ 12시간 추출함. 추출물을 진공 농축하여 용매 제거 후, 1차 추출액 450 ml를 수득함. 2차 추출과정으로 정제수 1000 ml 투입하고 90°C 에서 3시간 추출함. 추출물을 550 ml 볼륨으로 진공농축하고, 여과하여, 잔여 Alcohol을 회수 및 제거한 다음 1차 추출물과 혼합하여 1000 ml로 제조함.

2-4) 해조류 배양 원균과 2차 배양균 생성을 위한 단계적 공서배양 발효 과정

2-1의 1차 및 2차 추출물 각 300 ml 용액과 정제수 400 ml, 알콜당 15 g, 과당 5 g을 혼합하여 1000 ml 로 조제한 다음, 121°C 로 30분 이상 멸균함. 효모균주 사카로마이세스 (*Saccharomyces* spp.) 균종을 접종, 25°C ~ 37°C 에서 2 ~ 3일 간 1차 배양 후, 다시 락토바실러스 (*Lactobacillus* spp.), 스트렙토코커스 (*Streptococcus* sp.), 바실러스 (*Bacillus* spp.) 및 로도슈도모나스 (*Rhodospseudomonas* sp.)를 15°C ~ 30°C 로 10 ~ 30일 간 2차 공서배양 함 (해조류 배양 원균). 위의 배양물에 2-2의 추출물 1000 ml과 현미배아분말 200 g을 투입하여 15°C ~ 25°C 에서 10일 간 공서 배양 함 (2차 배양균). 배양 완료 후 Filter press에 여과하여 발효물을 제조함. 이때 공서배양을 위해 사용한 균주는 사카로마이세스로는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus* 또는 *Saccharomyces coreanus*을 사용하였고, 스트렙토코커스 속 균주로는 *Streptococcus thermophilus*을 사용하였으며, 로도슈도모나스 균주로는 *Rhodospseudomonas capsulate*을 사용함. 또한 바실러스 속 균주로는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*를 사용하였고, 락토바실러스 속 균주로는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* 을 사용함.

2-5) 해조류 배양 원균을 이용한 액상발효

알로에 베라를 세척하여 절단한 후 각각의 용매에 넣고 45°C 에서 24시간 동안 추출함. 에탄올 추출물의 경우 감압농축으로 에탄올을 회수 후 다시 DW 희석하여 배지원으로 사용함. 이렇게 추출한 액체를 LB배지에 넣고 Auto clave에서 125°C 로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. 해조류 배양 원균 배양액 (1.0×10^{10} cfu/g)을 LB 액체배지에서 28°C, 24h 배양하여 준비함. 멸균된 액상배지에 배양 시킨 해조류 배양 원균 배양액 (1.0×10^{10} cfu/g)을 접종함. 웨이킹 인큐베이터에서 28°C, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킨 후 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압농축하여 UPLC로 분석함.

☞ **결과 8:** 해조류 배양 원균을 이용하여 액상발효 한 후 UPLC로 분석하였음. JMB-3은 알로에 과즙을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량 0.9%였으며, aloe-emodin 함량은 나타나지 않았음. JME-3은 알로에 생과육을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 2.9%였음. 해조류 배양 원균을 이용한 액상발효의 경우 유산균 단일 배양 보다는 aloe-emodin, emodin 함량이 높게 나왔지만 생물전환을 하지 않은 시료에 비하여 emodin 함량이 낮아짐. 본 결과는 기존 알로에 추출법을 확립한 결과보다 확연히 적은 emodin 함량을 보였으며, 이는 생물전환 적용 시 추출된 알로에의 aloe-emodin, emodin이 다른 물질로의 변환 또는 구조식이 변한 것으로 사료됨.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (μg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (μg)	분석물 중량 (μg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 ($^{\circ}\text{C}$)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)
JMB-3	0.9	0.8	-	-	91.0	45.5	과즙 추출액	45	DW	24	20:1
JME-3	-	-	2.9	3.3	114.7	34.4	생과육 추출액	45	EtOH (70%)	24	20:1

결과8: 해조류 배양 원균을 이용한 액상발효

2-6) 2차배양균을 이용한 액상발효

알로에 베라를 세척하여 절단한 후 각각의 용매에 넣고 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 추출함. 에탄올 추출물의 경우 감압농축으로 에탄올을 회수 후 다시 DW 희석하여 배지원으로 사용함. 이렇게 추출한 액체를 LB배지에 넣고 Auto clave에서 125 $^{\circ}\text{C}$ 로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. 2차배양균 (1.0×10^{10} cfu/g)을 LB 액체배지에서 28 $^{\circ}\text{C}$, 24h 배양하여 준비함. 멸균된 액상배지에 배양시킨 2차 배양균 배양액 (1.0×10^{10} cfu/g)을 접종함. 셰이킹 인큐베이터에서 28 $^{\circ}\text{C}$, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킨 후 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60 $^{\circ}\text{C}$ 이하로 감압농축하여 UPLC로 분석함.

☞ **결과 9:** 2차배양균을 이용하여 액상발효 한 후 UPLC로 분석하였음. JMC-3은 알로에 과즙을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. JMF-3은 알로에 생과육을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 2.0%였음. 1115-D는 알로에 생과육을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 1115-E는 알로에 생과육을 EtOH(95.9%)에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 1115-F는 알로에 생과육을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (μg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (μg)	분석물 중량 (μg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 ($^{\circ}\text{C}$)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)
JMC-3	-	-	-	-	101.2	60.7	생과육 추출액	45	DW	24	200:1
JMF-3	-	-	2.0	2.3	113.3	34.0	생과육 추출액	45	EtOH (70%)	24	200:1
1115-D	-	-	-	-	98.0	78.7	생과육 추출액	45	DW	24	200:1
1115-E	-	-	-	-	99.0	78.8	생과육 추출액	45	EtOH(95.9 %)	24	200:1
1115-F	-	-	-	-	94.0	65.7	생과육 추출액	45	EtOH(70%)	24	200:1

결과9: 2차배양균을 이용한 액상발효

나. 알로에베라의 영지 *Ganderma lucidum* 균사체 고체배양

알로에 베라를 세척하여 1~2cm의 형태로 자른 뒤 30℃ 이하에서 건조시킨 후 분쇄함. 분쇄한 알로에와 glucose 20g, Agar powder 15g, KH₂PO₄ 0.5g을 오토클레이브백에 넣고 Auto Clave에서 120℃, 15분간 멸균시킴. 멸균된 오토클레이브백에 영지버섯 균사체를 넣고 상온에서 10일간 배양 시킴.

☞ **결과 10:** 배양결과 아래의 그림과 같이 *Ganderma lucidum* 균사체가 자라지 않았음.

	
<p>균사체 고체 배양에서 균사체가 자라지 않음.</p>	<p>균사체 고체 배양에서 균사체가 자라지 않고 달라붙음.</p>

다. 알로에베라의 영지 *Ganderma lucidum* 균사체배양과 *Lactobacillus plantarum* 2차배양

- 알로에 베라의 과육질이 다당체 glucomanan, acetylatemanan로 구성되어 있으므로 식용으로는 다량으로 섭취 하여야 소정의 효과를 기대할 수 있음. 따라서 알로에 베라의 기능성을 높이기 위해 1차의 강한 섬유소 cellulose 분해균인 영지균사체를 배양시킴. 그랫 항암, 항염, 자가면역 조절의 약리적 효과와 농도의 강화를 시킴. 2차로 *Lactobacilluse plantalum*을 배양시켜, 유효성분과 섬유분해 된 성분의 생물전환을 도모함.

- 알로에 300g을 가로 세로 1.5cm - 2cm 절편으로 만든 후 Glucose 7g, Agar powder 5g, KH₂pO₄ 0.15g, Malt 3g와 함께 DW 70ml에 용해시킴. 배양 flask 에 넣고 autoclave에서 125℃, 15분 간 멸균시킴. 냉각이 완전히 되기 전에 균사체가 배양될 수 있는 공극을 조성함. 영지버섯 종균 5g을 배지에 접종, 섬유소 분해가 충분히 되도록 20일 동안 28℃에서 배양함. 배양 시킨 플라스크를 90℃ 중온에서 3시간 동안 넣어둔 뒤 여과 시킴. 여액을 희석하여 Glucose 50g, Citric acid 2g을 넣어 autoclave에서 125℃, 15분 간 멸균시켜 액상배지를 만듦. *Lactobacillus plantarum* (1.0x10¹⁰ cfu/g)을 접종하여, 28℃에서 10일간 중온 배양하여 UPLC로 분석함.

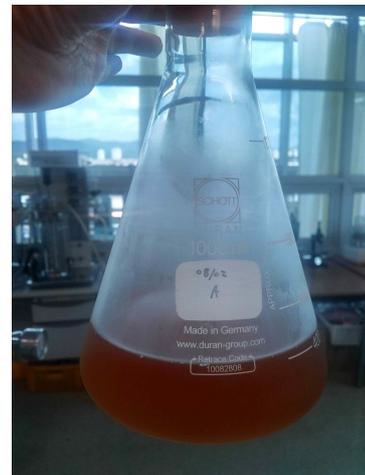
☞ **결과 11:** *Lactobacillus plantarum* 2차배양한 후 UPLC로 분석하였음. 1002-A는 영지버섯균사체 발효 뒤 여액에 10배의 DW에 희석하여 *Lactobacillus plantarum*을 접종한 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 1002-B는 영지버섯균사체 발효 뒤 여액에 5배의 DW에 희석하여 *Lactobacillus plantarum*을 접종한 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 1002-C는 영지버섯균사체 발효 뒤 여액에 2배의 DW에 희석하여 *Lactobacillus plantarum*을 접종한 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 1002-J는 영지버섯 균사체 배지를 조성할 때 agar의 양을 5배로 늘려 조성하였음. 영지버섯균사체 발효 뒤 여액에 10배의 DW에 희석하여 *Lactobacillus plantarum*을 접종한 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 이에 계속되는 생물전환 시도와 더불어 알로에에서 emodin과 aloe-emodin을 추출하기 위해 추가적인 추출방법을 시도하였음.



영지버섯 종균 접종



영지버섯 종균
접종후 20일 후



Lactobacillus plantarum
(1.0×10^{10} cfu/g)을 접종후

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (μg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (μg)	분석물 중량 (μg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	영지버섯배 지 agar 양 (g)	유산균배지 (시료 g:용매 L)
1002-A	-	-	-	-	100.0	113.4	알로에 생과육	5	1:10
1002-B	-	-	-	-	100.0	76.4	알로에 생과육	5	1:5
1002-C	-	-	-	-	100.0	131.5	알로에 생과육	5	1:2
1002-J	-	-	-	-	100.0	55.1	알로에 생과육	25	1:10

결과11: 알로에베라의 영지 *Ganderma lucidum* 균사체배양과 *Lactobacillus plantarum* 2차배양

라. 알로에 저온건조 후 추출·농축

알로에를 2~3cm로 슬라이스 하여 72h동안 30℃ 이하에서 저온건조 시킴. 건조된 알로에를 분쇄하여 각각의 용매 (EtOH 95.9%, 70%, DW)에 넣고 45℃에서 72시간 동안 추출함. 0914-E의 경우 추출 후 에탄올을 증발시킨 후 DW로 희석함. 추출액을 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60℃ 이하로 감압농축 시켜 UPLC로 분석함.

☞ 결과 12: 알로에를 저온건조 후 추출 및 농축하여 UPLC로 분석하였음. 0914-D는 알로에 분말을 DW에서 24h 추출하였으며 그 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 0914-E는 알로에 분말을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 그 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)
0914-D	-	-	-	-	100.0	102.4	알로에건조분말	45	DW	24	200:1
0914-E	-	-	-	-	100.0	82.4	알로에건조분말	45	EtOH(70%)	24	200:1

결과12: 알로에 저온건조 후 추출·농축

마. 알로에 동결건조 후 추출·농축

알로에를 2~3cm로 슬라이스 하여 동결건조기에서 -25°C 에서 6시간, -20°C 에서 6시간, -15°C 에서 6시간, -5°C 에서 18시간, 0°C 에서 2시간, 5°C 에서 4시간, 15°C 4시간, 25°C 에서 24시간, 30°C 에서 2시간 총 3일간 동결건조 시킴. 동결건조한 알로에를 분쇄기로 분쇄하여 각각의 용매에 넣고 45°C 에서 24시간 동안 추출함. 추출액을 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압농축 시켜 UPLC로 분석함.

결과 13: 알로에를 동결건조 후 추출 및 농축하여 UPLC로 분석하였음. 에탄올을 추출 용매로 사용한 경우 추출 후 에탄올을 증발 시킨 뒤 DW로 희석하여 농축함. 1115-A는 알로에 분말을 DW에서 24h 추출하였으며 그 결과 emodin 함량이 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 0.9%였음. 1115-B는 알로에 분말을 EtOH(95.9%)에서 24h 추출하였으며 그 결과 emodin 함량은 1.6%였으며 aloe-emodin 함량은 0.2%였음. 1115-C는 알로에 분말을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 그 결과 emodin 함량은 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 1.1%였음.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)
1115-A	-	-	0.9	0.9	101.0	80.6	알로에 동결건조분말	45	DW	24	20:1
1115-B	1.6	1.6	0.2	0.2	103.0	51.3	알로에 동결건조분말	45	EtOH(95.9%)	24	20:1
1115-C	-	-	1.1	1.1	99.0	49.5	알로에 동결건조분말	45	EtOH(70%)	24	20:1

결과 13: 알로에 동결건조 후 추출·농축

바. 알로에 동결건조 후 액상 발효

알로에를 2~3cm로 슬라이스 하여 동결건조기에서 -25°C 에서 6시간, -20°C 에서 6시간, -15°C 에서 6시간, -5°C 에서 18시간, 0°C 에서 2시간, 5°C 에서 4시간, 15°C 4시간, 25°C 에서 24시간, 30°C 에서 2시간 총 3일간 동결건조 시킴. 동결건조한 알로에를 분쇄기로 분쇄하여 각각의 용매에 넣고 45°C 에서 24시간 동안 추출함. 에탄올을 추출 용매로 사용한 경우 에탄올을 증발 시킨 뒤 DW로 희석함. 추출액을 Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압농축 시켜 용매를 증발시킴. 추

출한 액체를 물에 희석하여 LB배지를 넣고 Auto clave에서 125℃로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. 멸균된 액상배지에 2차 배양액 (1.0x10¹⁰ cfu/g)을 접종 한 후 셰이킹 인큐베이터에서 28℃, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킴. Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60℃ 이하로 감압 농축시켜 UPLC로 분석함.

☞ **결과 14:** 알로에를 동결건조 후 액상발효하여 UPLC로 분석하였음. 1122-C는 알로에 분말을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin과 aloe-emodin 함량이 나타나지 않았음. 1122-A는 알로에 분말을 EtOH(95.9%)에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량은 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 1.0%였음. 1122-B는 알로에 분말을 EtOH(70%)에서 24h 추출하였으며 그 결과 emodin 함량은 나타나지 않았으며 aloe-emodin 함량은 0.6%였음.



추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	Aloe emodin (중량 %)	Aloe emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (℃)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g: 용매 L)
1122-C	-	-	-	-	99.0	59.4	알로에 동결건조분말	45	DW	24	20:1
1122-A	-	-	1.0	1.0	97.0	77.4	알로에 동결건조분말	45	EtOH (95.9%)	24	20:1
1122-B	-	-	0.6	0.6	101.0	50.3	알로에 동결건조분말	45	EtOH (70%)	24	20:1

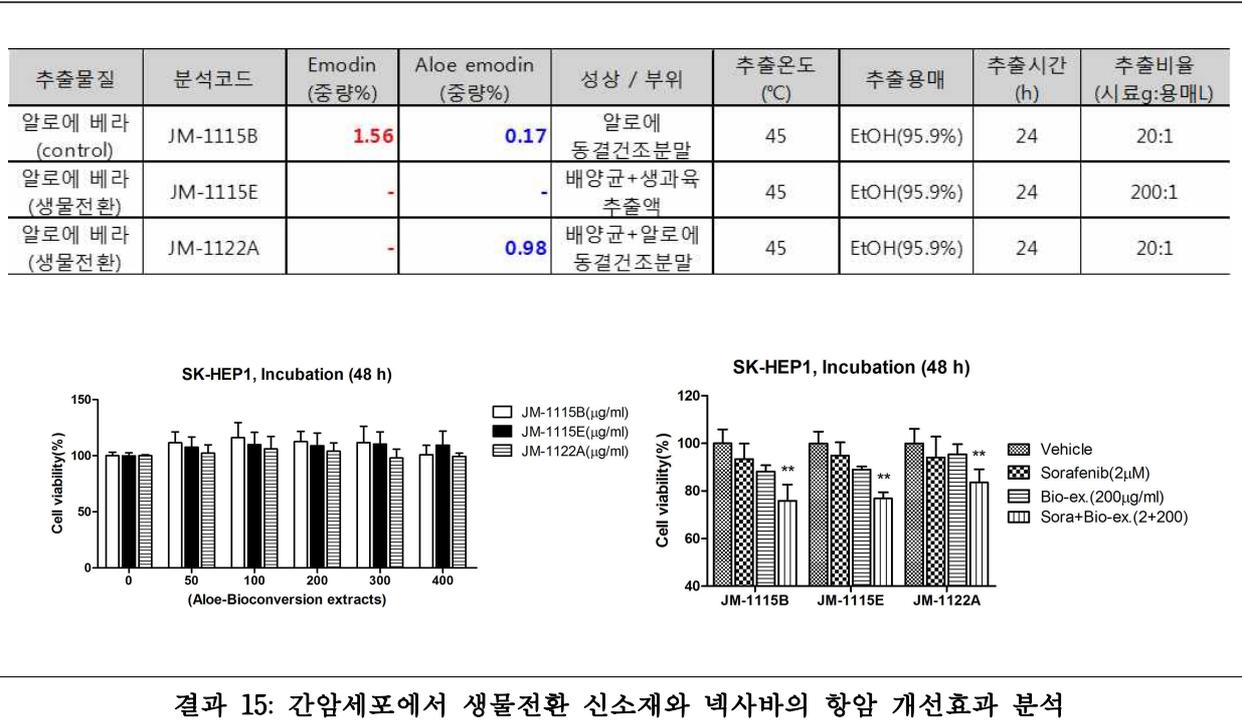
결과 14: 2차배양균을 이용한 액상발효

사. 생물전환 신소재와 넥사바의 항암 개선효과 확인

생과육 및 동결건조한 알로에 분말을 사용하여 에탄올(95.9%)로 추출한 알로에추출물 1종 (JM-1115B)과 생물전환을 통해 획득한 생물전환 알로에 추출물 2종(JM-1115E, JM1122A)에 대한 스크리닝을 위해 간암세포에서 단독처리 및 sorafenib과의 병행처리에 의한 효능강화 평가를 진행함 (Crystal violet staining and assay).

☞ **결과15:** 생물전환 표준화에 기여할 알로에 추출물 1종과 생물전환된 알로에 추출물 2종을 농도 의존적으로 단독처리한 결과 400 µg/ml 농도까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었음. 그러나

JM-A01을 선도물질로 생물전환된 알로에추출물 JM-1115E 및 동결건조분말 알로에추출물(JM-1115B)과 그의 생물전환 알로에추출물(JM-1122A)에서 신소재의 함량이 현저히 낮거나 검출되지 않는 것을 확인하였음. 그럼에도 불구하고, 알로에 추출물 및 생물전환 알로에 추출물을 sorafenib 과 병행처리할 경우 간암세포의 세포성장이 10~20% 이상 유의적으로 억제하는 효능개선효과가 모든 처리군에서 동등하게 나타남을 확인하였음. 따라서, 본 연구팀은 생물전환과정에서 변환되거나 혹은 추출, 분리되지 못하는 emodin과 aloe-emodin의 함량 개선을 위해 다른 천연물 소재를 탐색하여 보완 조치하기로 결정하였음.



결과 15: 간암세포에서 생물전환 신소재와 넥사바의 항암 개선효과 분석

● 기능성 신소재를 활용한 호장근의 생물전환

가. 건조 호장근 추출·농축 후 액상발효

1) *Lactobacillus plantarum* 을 이용한 액상발효

건조된 호장근을 2~3cm로 절단하여 용매 DW에 넣고 압력상태에서 100°C로 약 4시간 동안 추출·농축함. 호장근 농축액을 10배 희석하여 MRS배지를 넣고 Auto clave에서 125°C로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. *Lactobacillus plantarum* (1.0x10¹⁰ cfu/g)를 MRS 액체배지에서 28°C, 24시간동안 배양함. 멸균된 액상배지에 *Lactobacillus plantarum* (1.0x10¹⁰ cfu/g)를 접종하여 웨이킹 인큐베이터에서 28°C, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킴. Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압농축 시켜 UPLC로 분석함.

☞ **결과 16:** 호장근 추출물을 *Lactobacillus plantarum*를 이용하여 액상발효 후 UPLC로 분석하였음. 0914-C는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량은 17.2% 였음. 1002-F는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 4.8%였음. 1002-I는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 14.0%였음. 호장근 농축액을 DW로 10배 희석한 후 액상발효 했을 때 emodin 함량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었음.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g:용 매 L)
0914-C	17.2	17.2	100.0	80.0	호장근 추출물 10배희석	45	DW	24	50:1
1002-F	4.8	4.8	100.0	84.0	호장근 추출물	45	DW	24	50:1
1002-I	14.0	14.0	100.0	73.0	호장근 추출물 2배희석	45	DW	24	50:1

결과16: *Lactobacillus plantarum* 을 이용한 액상발효

2) 해조류 배양 원균을 이용한 액상발효

건조된 호장근을 2~3cm로 절단하여 용매 DW에 넣고 압력상태에서 100°C로 약 4시간 동안 추출·농축함. 호장근 농축액을 10배 희석하여 LB배지를 넣고 Auto clave에서 125°C로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. 해조류 배양 원균 배양액 (1.0×10^{10} cfu/g)을 LB 액체배지에서 28°C, 24시간동안 배양함. 멸균된 액상배지에 해조류 배양 원균 배양액 (1.0×10^{10} cfu/g)을 접종하여 셰이킹 인큐베이터에서 28°C, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킴. Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압농축 시켜 UPLC로 분석함.

☞ **결과 17** : 호장근 추출물을 해조류 배양원균을 이용하여 액상발효 후 UPLC로 분석하였음. 0914-A는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량은 24.5% 였음. 1002-D는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 18.8%였음. 1002-G는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 9.8%였음. 호장근 농축액을 DW로 10배 희석한 후 액상발효 했을 때 emodin 함량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었음.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g:용 매 L)
0914-A	24.5	24.5	100.0	106.7	호장근 추출물 10배희석	45	DW	24	50:1
1002-D	18.8	18.8	100.0	42.0	호장근 추출물	45	DW	24	50:1
1002-G	9.8	9.8	100.0	88.8	호장근 추출물 2배희석	45	DW	24	50:1

결과 17: 해조류 배양 원균을 이용한 액상발효

3) 2차배양균을 이용한 액상발효

건조된 호장근을 2~3cm로 절단하여 용매 DW에 넣고 압력상태에서 100°C로 약 4시간 동안 추출·농축함. 호장근 농축액을 10배 희석하여 LB배지를 넣고 Auto clave에서 125°C로 15분간 멸균시켜 액상배지를 만듦. 2차 배양균 배양액(1.0×10^{10} cfu/g)을 LB 액체배지에서 28°C, 24시간동안 배양함. 멸균된 액상배지에 2차 배양균 배양액 (1.0×10^{10} cfu/g)을 접종하여 셰이킹 인큐베이터에서 28°C, 100rpm 으로 10일간 생물전환 시킴. Rotary Evaporator를 사용하여 50 rpm에서 60°C 이하로 감압

농축 시켜 UPLC로 분석함.

☞ **결과 18** : 호장근 추출물을 2차배양균을 이용하여 액상발효 후 UPLC로 분석하였음. 0914-B는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량은 31.8% 였음. 1002-E는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 10.9%였음. 1002-H는 호장근을 DW에서 24h 추출하였으며 액상발효 결과 emodin 함량이 20.5%였음. 호장근 농축액을 DW로 10배 희석한 후 액상발효 했을 때 emodin 함량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었음.

추출물질	Emodin (중량 %)	Emodin 정량 (µg)	분석물 중량 (µg)	추출물 중량 (mg)	성상 / 부위	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료 g:용매 L)
0914-B	31.8	31.8	100.0	75.3	호장근 추출물 10배희석	45	DW	24	50:1
1002-E	10.9	10.9	100.0	123.0	호장근 추출물	45	DW	24	50:1
1002-H	20.5	20.5	100.0	48.1	호장근 추출물 2배희석	45	DW	24	50:1

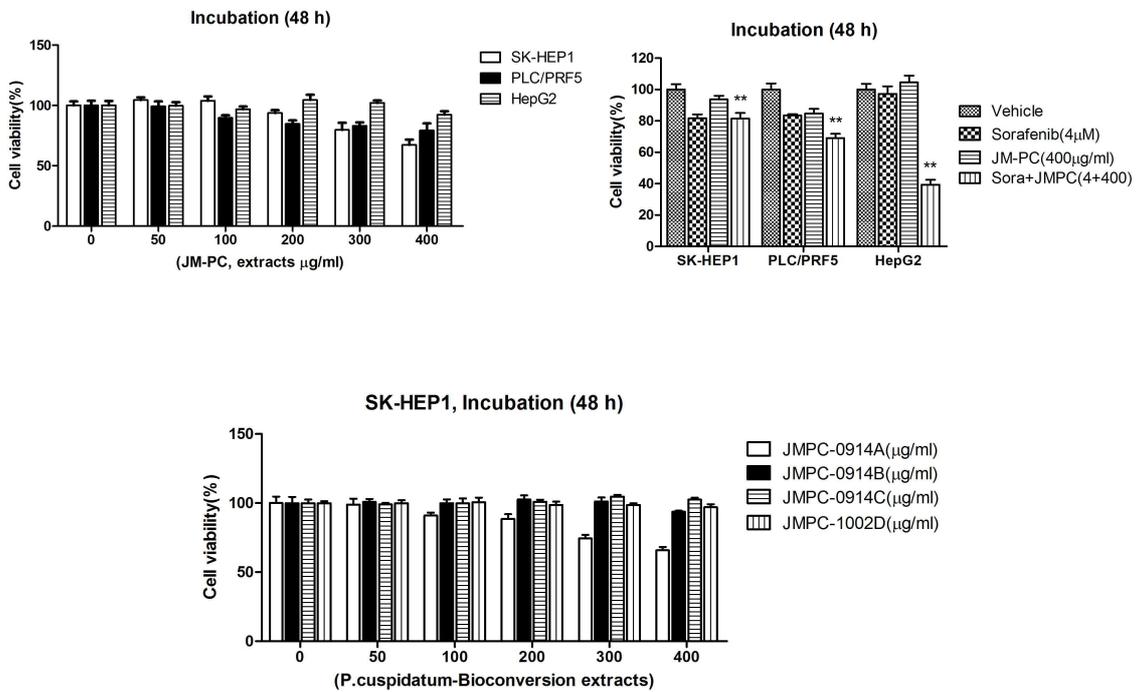
결과18: 2차배양균을 이용한 액상발효

나. 생물전환 호장근 추출물과 넥사마의 항암 개선 효과 확인

생물전환된 알로에 추출물과 그의 신소재 함량 개선을 위한 보충물로서 호장근(*Polygonum cuspidatum*, Root) 건조분말을 확보하여 물 추출을 진행하였고, 추출물에 대하여 단독처리와 sorafenib과의 병행처리를 통해 간암세포 3종의 성장률을 관찰하고 분석함(Crystal violet staining and assay).

☞ **결과19**: 생물전환 표준화에 보충물로 사용될 호장근 추출물 1종과 생물전환된 호장근 추출물 4종을 농도의존적으로 처리한 결과 200~400 µg/ml농도까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었음. 생물전환용 호장근 추출물과 sorafenib을 병행처리할 경우 간암세포의 세포성장 억제효과가 개선되는 것을 확인하였음. 또한 생물전환된 호장근 추출물은 호장근추출물 자체보다 우수한 신소재 함량 증가를 확인하였음. 생물전환된 호장근 추출물을 농도의존적으로 간암세포에 단독처리하였고 300 µg/ml농도까지 세포독성이 없는 것을 보여주었음. 따라서 생물전환 과정에서 현저히 낮은 신소재 함량을 나타내는 생물전환-알로에 추출물에 대한 보충물로서 호장근의 잠재적인 가치가 있다고 판단하였음.

추출물질	분석코드	Emodin (중량%)	Aloe emodin (중량%)	성상/생물전환	추출온도 (°C)	추출용매	추출시간 (h)	추출비율 (시료g:용매L)
호장근 (control)	JM-PC	10.0	-	건조분말	45	DW	24	200:1
호장근 (생물전환)	0914-A	24.5	-	해조류배양원균50ml + 호장근추출물	45	DW	24	200:1
호장근 (생물전환)	0914-B	31.8	-	2차배양균50ml + 호장근추출물	45	DW	24	200:1
호장근 (생물전환)	0914-C	17.2	-	유산균50ml + 호장근추출물	45	DW	24	200:1
호장근 (생물전환)	1002-D	18.8	-	해조류배양원균5ml + 호장근추출물	45	DW	24	200:1



결과19: 간암세포주에서 생물전환 보충용 호장근 추출물과 넥사바의 항암 개선효과 분석

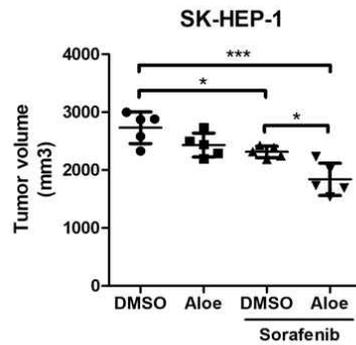
● 생물전환용 기능성 신소재 함유 추출물의 표적항암제 효능강화 평가 (동물모델)

생물전환 기반 표적항암제 맞춤형 기능성 강화 신소재의 전임상 효능평가를 위해 연구팀은 중증복합면역결핍증(SCID) 마우스를 이용하여 간암세포로부터 유래된 종양의 지름이 약 0.5cm 정도 크기로 자라게 되면, 생물전환용 추출물과 넥사바를 10일 동안 병행투여 하면서 종양의 성장저해 효과를 분석하였음.

☞ 결과20: 첫 번째 그림에서 제시된 바와 같이 SK-HEP1 종양에서 생물전환용 알로에 추출물 또는 sorafenib의 단독투여군에 비해 알로에추출물과 sorafenib을 병행투여 했을 때 종양 부피가 우수하게 감소하는 것을 확인하였음. 두 번째 그림에서는 SK-HEP1 종양에서 생물전환 보충용 호장근 추출물 또는 sorafenib의 단독투여군에 비하여 호장근추출물과 sorafenib을 병행투여 했을 경우 종양의 성장이 현저하게 감소하는 것을 확인하였음. 따라서 이런 결과는 생체 내에서 sorafenib의 항암효과 개선과 관련하여 생물전환용 알로에 추출물 또는 호장근 추출물의 병행투여로 인해 상승적으로 강화된다는 것을 증명할 수 있었음. 또한 알로에 기능성 신소재 emodin의 표적항암제 효능강화에 대한 작용기전 규명과 상호작용을 밝힐 수 있는 중요한 결과로 판단하였음.

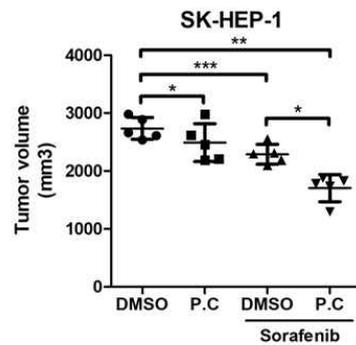
그룹별 약물투여 (단위, mg/kg/day), n=10, 총 10일간 투여				
Combination type	Control	Sorafenib	Aloe (생물전환용)	Sorafenib
				Aloe (생물전환용)
저농도	-	10	50	10 + 50

Xenograft 모델 구축과 그룹별 약물투여-1



그룹별 약물투여 (단위, mg/kg/day), n=10, 총 10일간 투여				
Combination type	Control	Sorafenib	호장근 (생물전환용)	Sorafenib
				호장근 (생물전환용)
저농도	-	10	50	10 + 50

Xenograft 모델 구축과 그룹별 약물투여-2

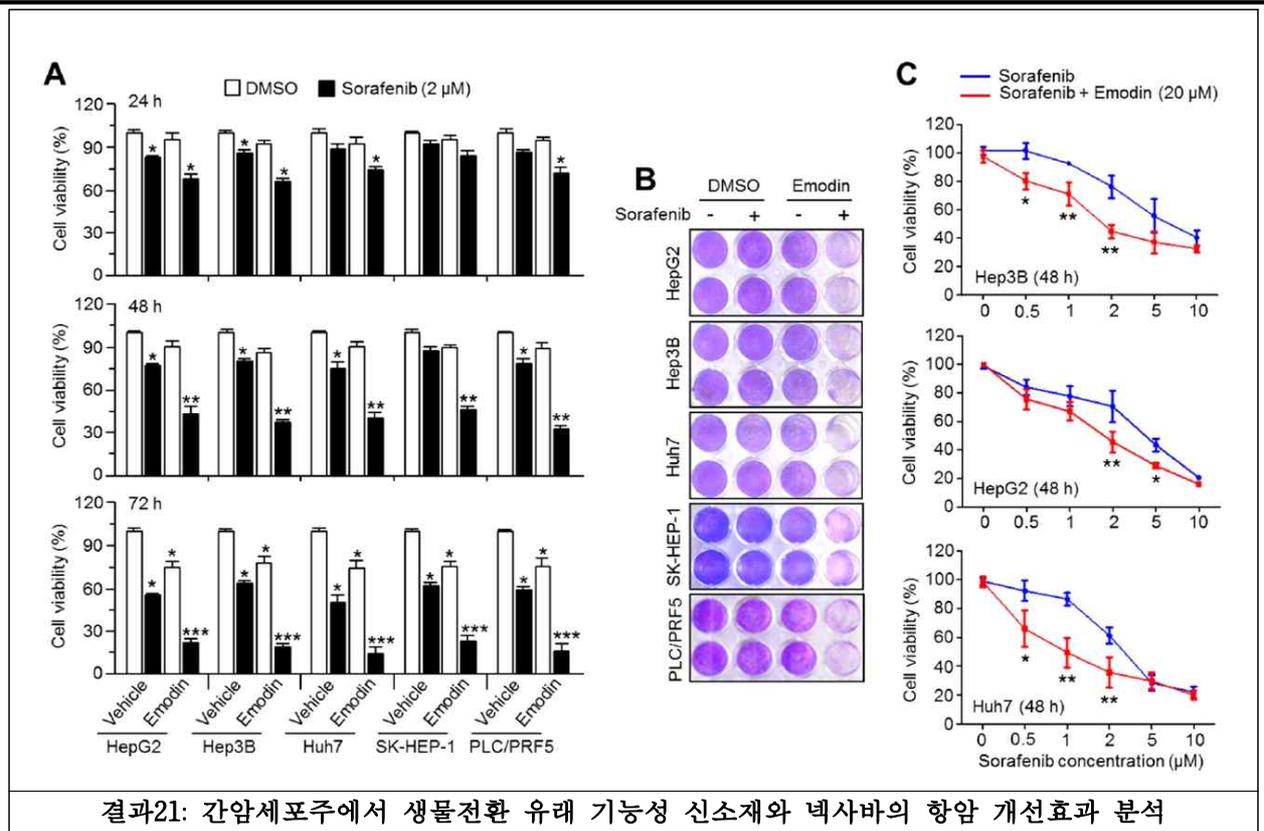


결과20: Xenograft 모델구축과 생물전환용 기능성 신소재 함유 추출물과 넥사바의 병행투여에 의한 종양성장억제 효능효과 분석

● 생물전환용 유래 기능성 강화 신소재의 표적항암제 효능강화 평가 (세포모델)

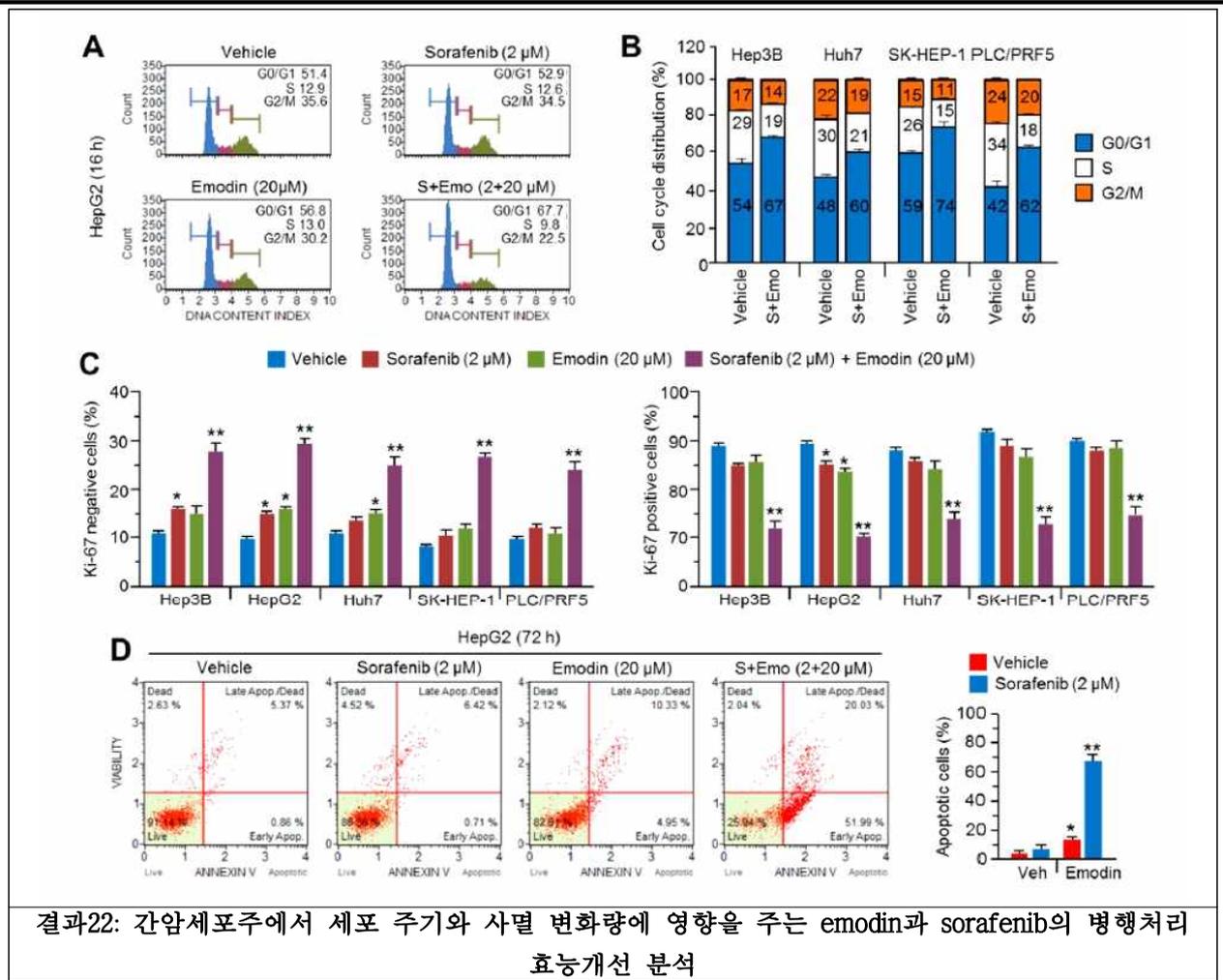
5종의 간암 세포주에 알로에 추출물로부터 유래된 생물전환 기반의 기능성강화 신소재 후보물질과 간암 표적항암제 넥사바를 병행처리하고 3일 동안 간암세포의 성장률을 관찰하고 분석함 (Crystal violet staining and assay).

☞ **결과21:** 생물전환 유래 기능성 강화 신소재 emodin(20 μM)과 sorafenib을 병행처리할 경우 시간의존적으로 간암세포주의 성장억제 효과가 크게 강화되었음(결과 5-A, B). emodin이 낮은 농도의 sorafenib의 항암활성을 증진시키는지 충분한가를 밝히기 위해 emodin 20 μM 및 다양한 농도의 sorafenib의 병행처리 후에 세포성장 억제를 측정된 결과를 확인하였음(결과 5-C). 결과 5-C를 통해 emodin 20 μM의 민감성 항암효과는 Hep3B 및 Huh7 간암세포주에서 0.5 μM 및 1 μM의 sorafenib 처리로 나타났고 간암세포주가 2 μM보다 고농도의 sorafenib에 노출될 때, 두 약물의 조합에 의해 유도된 민감성 항암효과가 관찰되지 않음을 보여주었음. 이런 결과를 통해 sorafenib의 농도를 낮추어 emodin을 병행투여 했을 때 항암 활성을 증가시킬 수 있음을 시사함.



간암 표적항암제 sorafenib의 효능을 개선시키는 생물전환 유래 신소재 emodin의 우수성을 규명하고자 세포사멸 유도 분석을 실시하였음. Emodin 20 μM과 sorafenib 2 μM을 병행처리할 경우 시간이 경과됨에 따라 FACS분석을 통해 간암 세포주기(cell cycle), 증식(proliferation), 사멸(Apoptosis) 변화량을 측정하였음.

☞ **결과22:** 생물전환 유래 기능성 신소재 emodin과 sorafenib을 병행처리할 경우 그림에 제시된 바와 같이 cell cycle arrest와 apoptosis를 통한 간암세포 성장억제를 확인하였음. HepG2 세포에서 병행투여시에 세포주기 G1 phase arrest가 15%이상 일어났으며 이는 단독처리된 emodin군이나 sorafenib군과는 대조적으로 세포주기에 영향을 미친 것으로 확인되었음. 병행처리시 다른 4종의 간암세포주에서도 G1 phase arrest가 나타나는 것으로 확인되었음. G1 phase arrest는 DNA복제와 세포증식을 중단시키는데 영향을 미치므로 그에 따라 Ki-67 proliferation측정을 한 결과, emodin과 sorafenib의 단독처리보다 병행처리시 Ki67-negative cell이 증가하며 Ki67-positive cell이 감소하는 경향이 증강하는 것으로 확인되었음. 또한 간암세포주에서 세포사멸(apoptosis) 변화량의 경우 단독 처리시에 5% 증가하는 반면에, 병행처리시에 사멸된 세포군집이 55%이상 증가하는 것으로 측정되었음. 이런 결과로 생물전환 유래 기능성 소재 emodin과 표적항암제 sorafenib을 병행처리할 경우 세포 주기 진행과 사멸에 영향을 주어 효능개선 효과가 나타난다고 확인하였음.

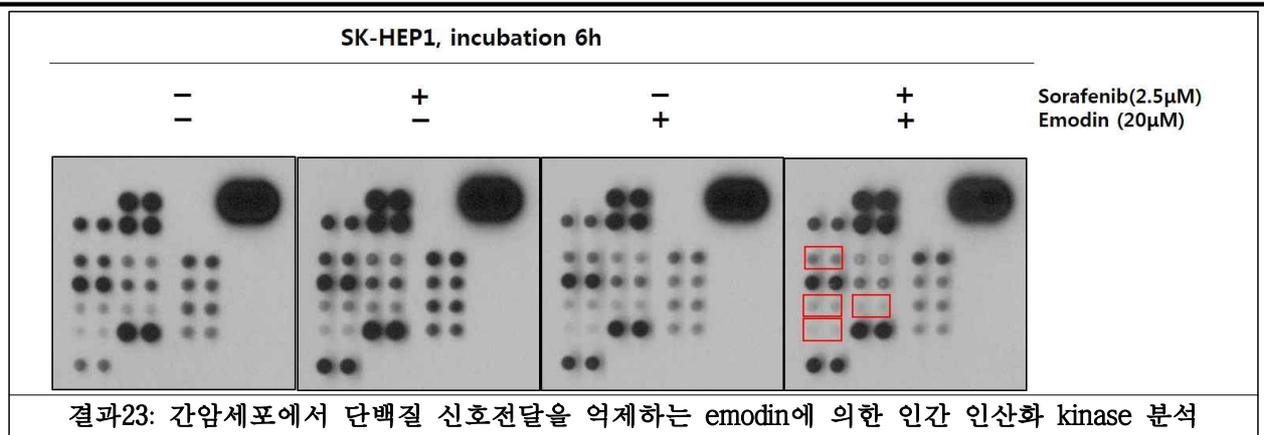


결과22: 간암세포주에서 세포 주기와 사멸 변화량에 영향을 주는 emodin과 sorafenib의 병행처리 효능개선 분석

● 생물전환 유래 기능성 강화 신소재의 표적항암제 효능개선 작용기전 규명

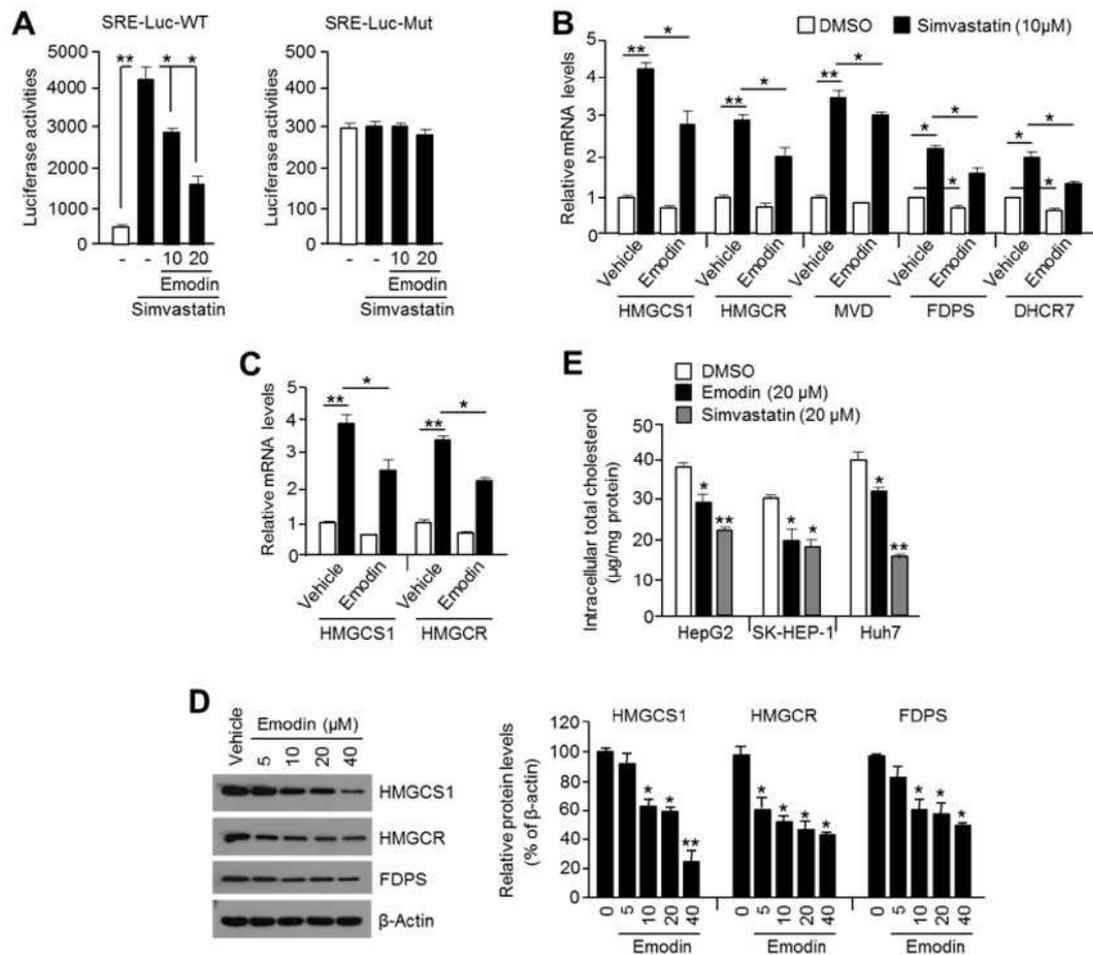
Kinase와 단백질 기질의 인산화 프로필을 분석하는 것은 세포가 환경을 어떻게 인식하고 반응하는지 이해하는데 필수적이며 본 연구팀은 Human Phospho-Kinase Array법을 통해 수많은 면역 침전 및 단백질 분석(western blot)을 수행하지 않고도 43종의 kinase 인산화 부위와 관련된 총 단백질의 인산화 수준을 동시에 탐지 할 수 있는 신속하고 민감한 분석을 실시하였음. 분석 키트 (analysis kit)의 니트로셀룰로오스 막에서 스팟 신호(spot signal)를 관찰하였고 분석 샘플 및 대조군의 목록과 좌표는 분석키트에 동봉된 부록(appendix)을 참고하여 인간 인산화 kinase의 변화를 확인하였음.

☞ 결과23: 생물전환 유래 기능성 강화 신소재 emodin과 표적항암제 sorafenib의 병행처리지 간암 세포에서 그림에 제시된 바와 같이 4종의 인산화 kinase 감소를 확인하였음. 분석키트의 부록을 통해 확인된 인산화 kinase target은 각각 p70S6K(T389), STAT3(Y705), p27(T198) 및 STAT3(S727)임을 알 수 있었음. 따라서 emodin에 의한 sorafenib의 효능개선에 관여하는 단백질 신호전달체계를 예측하여 작용기전 규명에 활용하였음.



고지방식이 마우스모델에서 emodin이 콜레스테롤 생합성 관련 유전자의 발현을 조절하여 콜레스테롤 수치를 저하시킨다는 결과가 알려져 있으며, 콜레스테롤 유전자 발현은 세포내 콜레스테롤 감소시 핵으로의 SREBP-2 전이와 전사적 활성화를 통해 조절됨. 콜레스테롤 생성은 암세포 성장에서 세포막 지질 구성분을 제공하는 필수적 단백질 동화과정이기 때문에 emodin이 간암세포주에서 콜레스테롤 유전자 발현과 생합성을 억제하는지 여부를 관찰했음.

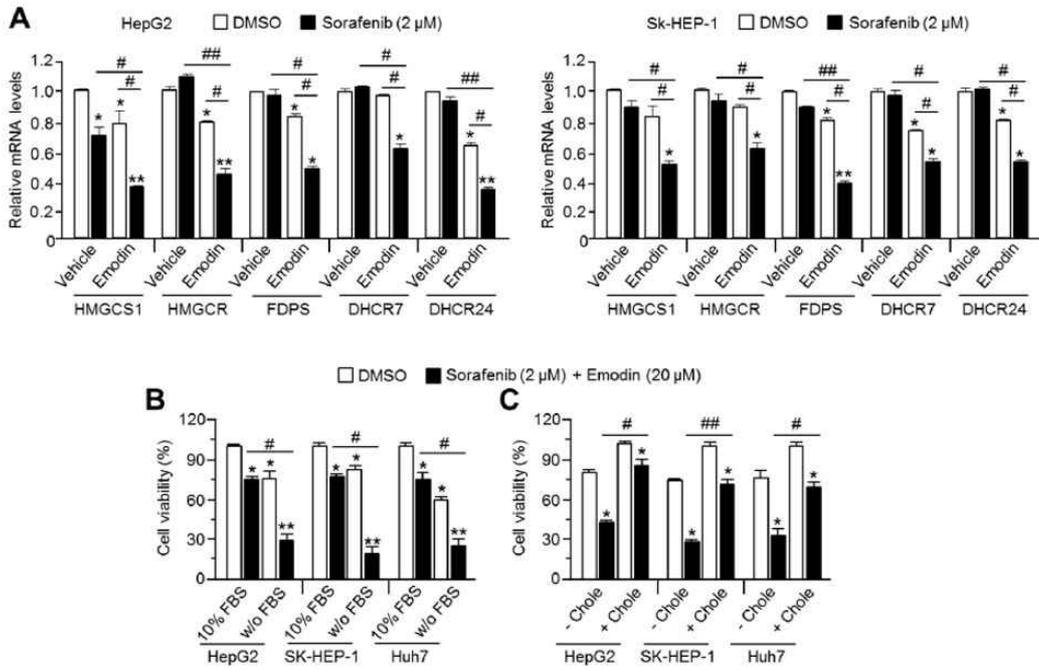
☞ **결과24:** 스테로이드 반응요소(SRE)의 심바스타틴 유도 luciferase 활성은 wild type (SRE-Luc-WT) 세포에서 emodin에 의해 저하되었지만, luciferase 백터 발현 mutant (SRE-Luc-Mut) 세포에서는 변화가 없었으며 이는 emodin이 SREBP-2 전사적 활성을 억제할 수 있음을 확인하였음. 심바스타틴에 의한 HMGCS1, HMGCR, MVD, FDPD와 DHCR7 발현같은 SREBP-2 표적 콜레스테롤 생합성 유전자의 유도는 2종의 간암세포주에서 emodin(20 μ M)에 의해 유의적으로 감소되었음. Western blot을 통해 콜레스테롤 생합성 단백질 HMGCS1, HMGCR, FDPS는 SK-HEP1 세포에서 용량 의존적으로 emodin에 의해 감소되었음. 또한 심바스타틴이 3종의 간암세포주에서 전체 세포내의 콜레스테롤 함량을 감소시키는 것을 확인했으며 이러한 결과는 emodin이 간암세포주에서 SREBP-2 전사 활성을 억제함으로써 콜레스테롤 생합성을 약화시키는 것을 보여주었음.



결과24: 간암세포주에서 emodin의 SREBP-2 감수성을 통한 콜레스테롤 생합성 유전자 발현과 세포내 콜레스테롤 수치 억제에 대한 분석

Emodin과 sorafenib이 콜레스테롤 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 간암세포주에 병행처리 한 후 HMGCS1, HMGCR, FDPS, DHCR7, DHCR24를 분석하였음. 세포 내 콜레스테롤 수치가 생합성과 혈중 콜레스테롤 보충에 의해 균형을 이루기 때문에, emodin과 sorafenib의 병행처리시 항암 효과 측정은 콜레스테롤이 많은 FBS(fetal bovine serum, 소 태아 혈청)의 부재 또는 존재 하에서 실시하였음.

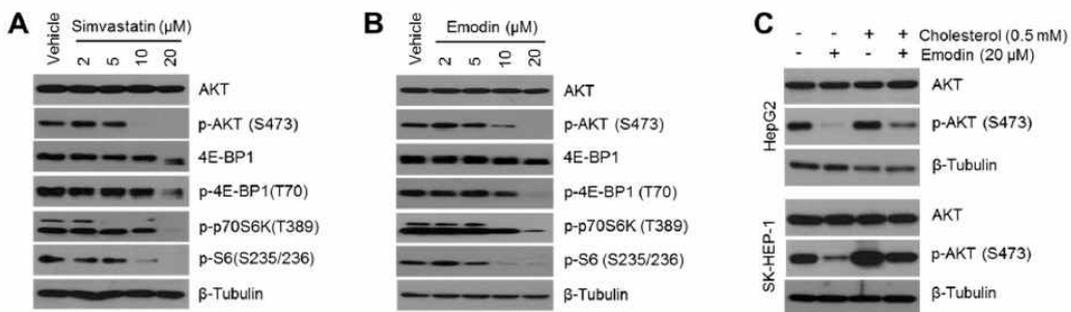
결과25: 그림에 제시된 바와 같이 HepG2와 SK-HEP1 세포에서 콜레스테롤 생합성 유전자 발현에 대한 emodin과 sorafenib의 단독처리시와 병행처리시의 상승 효과를 확인하였음. HepG2, SK-HEP-1와 Huh7 세포의 세포생존은 FBS가 결여시에 emodin과 sorafenib의 병행으로 급격히 감소되었음. 또한 수용성 콜레스테롤을 보충하면 간암세포주에서 emodin과 sorafenib의 병행처리로 인해 빠른 세포사멸을 유의적으로 예방할 수 있는 것을 발견하였음. 이러한 결과는 콜레스테롤 생합성 억제에 emodin과 sorafenib의 병행처리 요법의 항암 효능개선에 중요한 영향을 미치는 것을 보여줬음.



결과25: 간암세포주에서 콜레스테롤 유전자 발현을 억제하는데 시너지 효과를 발휘하는 emodin과 sorafenib의 병행처리의 세포사멸 유도효과 분석

암세포에서 PI3K-AKT와 MAPK 신호전달체계와 같은 증가된 발암성장 신호전달과 관련 있는 증가된 지질과 콜레스테롤이 암 공격성의 특징이라고 여겨지는 증거가 출현했다고 알려졌다. 실제로 많은 연구에 따르면 아토르바스타틴, 로바스타틴, 심바스타틴과 같은 콜레스테롤 강하제는 간암세포주, 흑색종, 신경 교종 및 난소암에서 발암 신호전달 억제를 통해 암세포 성장과 침습성을 억제한다는 사실이 밝혀졌음. 이를 바탕으로 간암세포주에서 발암성장 신호전달에 대한 emodin의 억제 효과를 평가하였음. 콜레스테롤 강하제가 발암 신호전달을 억제하기에 충분한지를 확인하기 위해 간암세포주에서 심바스타틴 처리 후 AKT 신호전달체계 인산화를 분석하였음.

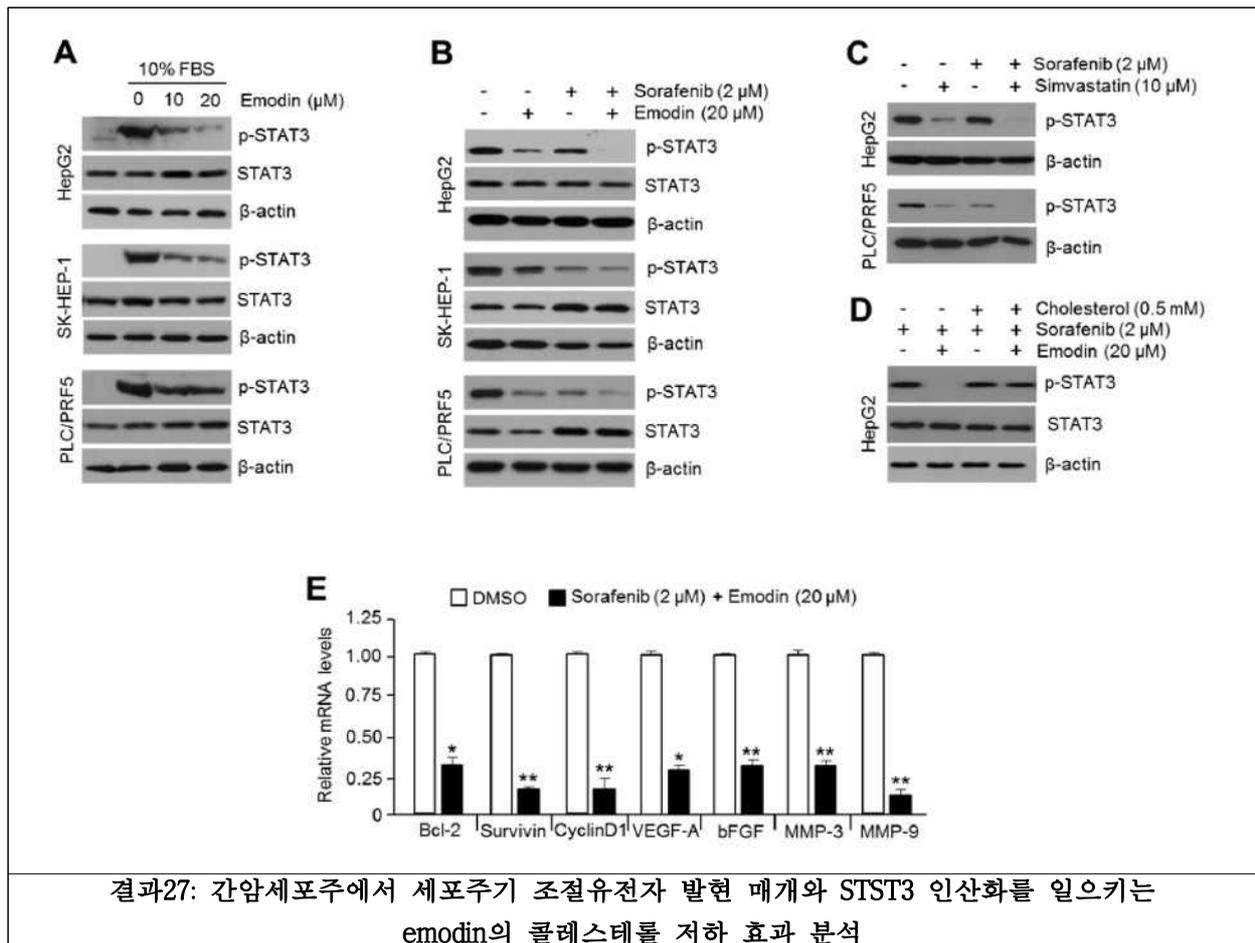
☞ **결과26:** AKT 신호전달은 심바스타틴으로 처리 된 SK-HEP-1 세포에서 용량 의존적으로 감소하였고, 결과6B에서 보여준 바와 같이, 심바스타틴과 유사하게, emodin은 AKT 및 그의 하위 신호 전달 체계인 4E-BP1, p70S6K 및 리보솜 단백질 S6의 인산화를 저해하였음. 또한, emodin 처리에 의한 AKT 인산화 감소는 콜레스테롤 보충에 의해 일부 회복되었으며, emodin으로 유도된 AKT 신호전달 체계 억제를 매개한 콜레스테롤 감소에 대해 확인하였음.



결과26: 간암세포주에서 AKT신호전달을 억제하는 emodin에 의한 세포내 콜레스테롤 감소 분석

AKT 매개 발암 성장 신호전달은 세포주기 진행과 항세포사멸 특성과 관련된 유전자 발현을 조절하는 다양한 전사 인자의 활성화를 통해 종양 성장을 지원하는 것으로 알려져 있음. 이를 바탕으로 간암세포주에서 세포주기 조절 발현과 STAT3 인산화에 대한 emodin의 단백질 신호전달체계 영향을 평가하였음. 인산화된 STAT3의 억제에 대한 emodin의 상승효과가 세포 내 콜레스테롤의 감소 수준에 의존하는지 여부를 확인하기 위해, 심바스타틴과 sorafenib의 STAT3 인산화에 대한 병용처리 효과를 분석하였음.

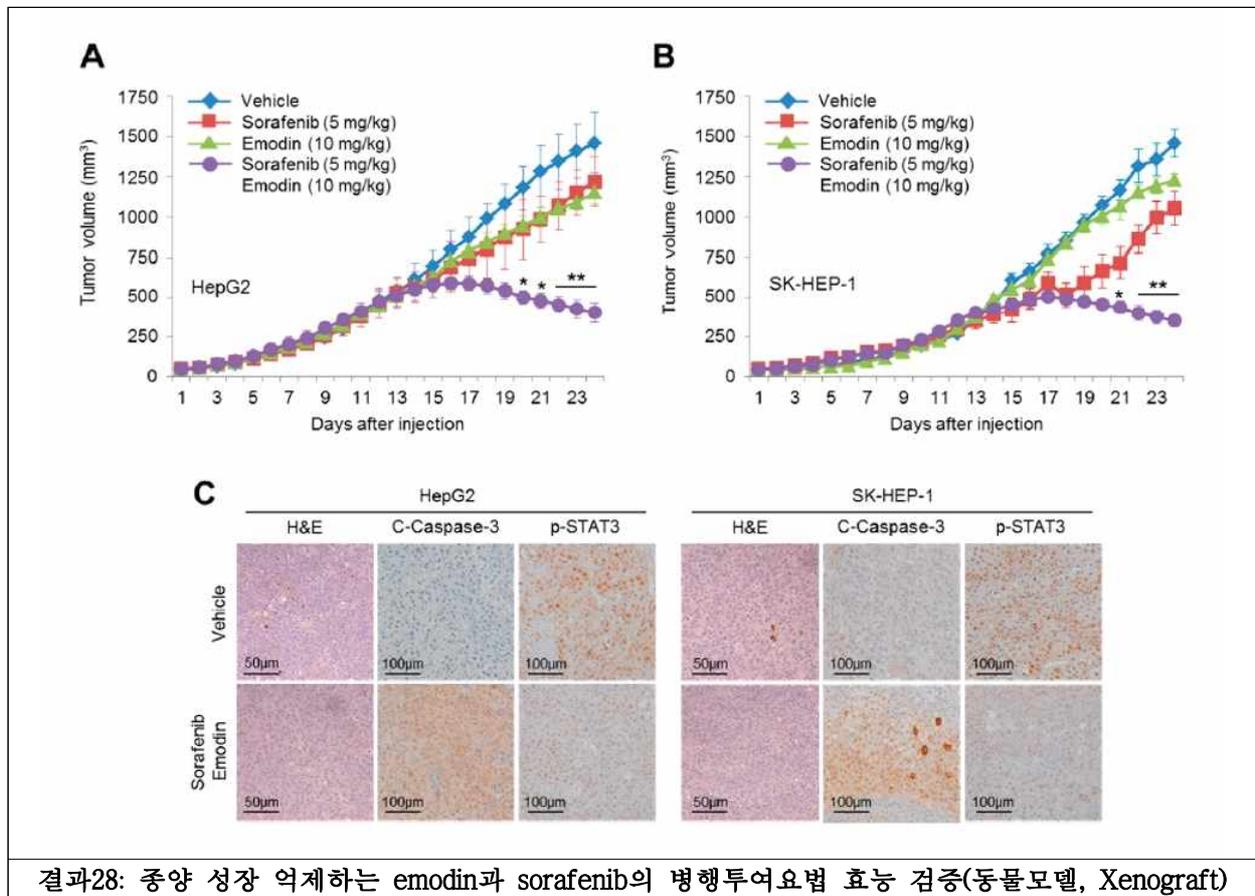
결과27: 간암세포주 3종(HepG2, SK-HEP-1, PLC/PRF5)에서 emodin은 용량 의존적으로 인산화된 STAT3을 강하게 감소시킨다는 것을 확인했고 sorafenib과의 병용처리 후 STAT3의 억제가 상승적으로 일어나는 효과를 관찰하였음. 유사하게도 STAT3의 인산화는 HepG2와 PLC/PRF5 세포에서 단독 처리시와 비교하여 심바스타틴과 sorafenib의 병행처리 할 경우 현저히 감소되었음. 결과 7D에서처럼 HepG2 세포에서 emodin과 sorafenib으로 유도된 STAT3 인산화는 콜레스테롤 보충된 군에서 부분적으로 감소되었음. STAT3의 인산화가 암의 공격성과 관련된 유전자 발현의 전사적 활성화를 유도함에 따라 emodin과 sorafenib의 병용처리 후 STAT3 표적 유전자의 변이가 측정되었음. 그 결과로, B-세포 림프종 2(BCL-2), survivin, cyclin D1, 혈관내피 성장인자-A(VEGF-A), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), matrix metalloproteinase-3(MMP-3)와 matrix metalloproteinase-9(MMP-9)가 emodin과 sorafenib이 병행처리된 HepG2 세포에서 확인되었음. 이 결과는 emodin과 sorafenib의 병행처리는 콜레스테롤 저하 작용을 통해 STAT3의 인산화를 상승적으로 억제한다고 제안할 수 있었음.



● **발굴된 기능성 소재와 표적항암제의 상호작용 규명**

Emodin과 sorafenib의 병행투여시의 상승적인 항암개선 효과에 대해 HepG2와 SK-HEP-1 세포로 유도한 xenograft 마우스 동물모델 실험에서 채취한 종양조직을 사용하여 면역조직화학염색법으로 추가적인 상호작용을 검증하였음.

☞ **결과28:** HepG2와 SK-HEP-1 종양에서 emodin 또는 sorafenib의 단독투여군에 비하여 emodin과 sorafenib을 병행투여 했을 경우 종양 부피가 현저하게 감소하는 것을 지난 2차 년도 동물모델 연구결과에서 확인하였음(결과 12-A, B). 또한, emodin과 sorafenib을 병행투여하여 치료한 종양 조직 HepG2와 SK-HEP-1군에서 절단된 caspase-3, 세포사멸(apoptosis) 마커가 증가하였고, 인산화 STAT3가 감소하는 것을 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)을 통해 관찰되었음. 이러한 결과는 생체내에서 sorafenib의 항암 효과를 emodin의 병행투여로 인해 상승적으로 강화시킨다는 것을 증명하게 되었음.



● **기능성 신소재를 활용한 2세대 특수의료용도식품 제품의 생산**

가. 환자 전용 특수의료용도식품의 제품화 제조기준 <식약처 고시 제2018-98호, 2018.11.29.>

1) 제조·가공기준

(1) 식품안전관리인증기준(HACCP) 적용원칙에 따라 위생적으로 제조·가공하여야 하며, 바이러스나 세균 등 위해미생물로 인한 위해가 발생하지 아니하도록 살균 또는 멸균 공정을 거쳐야 한다.

(2) 식품의 유형에 따라 섭취 대상의 섭취, 소화, 흡수, 대사, 배설 등의 능력을 고려하여 제조·가공하여야 한다.

(3) 성분을 배합 및 제조·가공함에 있어 업소별의 기준은 영양학적, 의학적, 생리학적인 측면에서 과학적으로 뒷받침되어야 한다.

(4) 식품의 유형에 따라 섭취대상을 고려하여 셀레늄, 크롬, 몰리브덴을 영양성분으로 첨가할 수 있다.

(5) 유단백 알레르기 영·유아용 조제식품의 원료로 가수분해되지 아니한 원유, 분유, 유청을 사용하여서는 아니 된다.

(6) 환자용식품의 질환별 제조·가공기준은 다음과 같다.

① 환자용 균형영양식은 환자의 식사 전부 또는 일부를 대신하기 위하여 제품 1000 kcal당 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양성분 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고 영양성분을 첨가하여야 한다.

② 열량 및 영양공급용 식품은 제품 1 mL(g)당 3 kcal이상의 열량이 되도록 한다.

③ 상기 규정에도 불구하고 특정환자에게 적합하도록 의사등과 상의하여 환자맞춤형으로 제조·가공할 수 있다.

④ 상기 에서 명시된 질환 이외의 환자용식품은 질환별 영양요구를 충족할 수 있도록 제조·가공하여야 한다.

⑤ 상기에 해당하는 제품 중 특정 인구 군을 대상으로 하는 경우 해당 인구군의 한국인 영양섭취기준을 기준으로 할 수 있다.

2) 식품유형

(1) 환자용 식품

환자에게 필요한 영양성분을 균형 있게 제공할 수 있도록 영양성분을 조정하여 제조·가공한 것으로 환자의 식사 일부 또는 전부를 대신할 수 있는 제품을 말한다.

개발 시제품의 환자용 특수용도식품으로서의 식품위생법 상에서 요구되는 규격에 따라 규격 적합성에 대한 분석 시행.

기존 1세대 특수의료용도식품 제품 허가사항에 추가 원료 부분을 첨가하여 신고 및 허가 취득.

국내 알로에 및 약재류, 허브류, 버섯류 원료들을 재배하는 농가를 탐색하 농가로부터 직접 구매하여 원료 가공 및 생물전환 공정을 진행하여 원료를 확보

식품의약품안전청 특수의료용도식품 규격

항목	유형	환자용 식품
(1) 수분(%)		10.0% 이하 (분말제품에 한함)
(2) 열량		-
(3) 조단백질		표시량 이상이어야 한다. (다만, 질환의 특성상 제한할 필요가 있으면 표시량 이하)
(4) 조지방		표시량 이상이어야 한다. (다만, 질환의 특성상 제한할 필요가 있으면 표시량 이하)
(5) 비타민		표시량 이상이어야 한다. (비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산에 한하여 적용한다)
(6) 무기질		표시량 이상이어야 한다. (칼슘, 철, 아연에 한하여 적용한다)
(7) 불소		0.2 mg/100kcal 이하이어야 한다. (불소 함유 식품첨가물을 사용한 경우에 한함)
(8) 대장균군		n=5, c=0, m=0
(9) 세균수		n=5, c=1, m=10, M=100 (분말제품은 n=5, c=2, m=1,000, M=10,000)
(10) 타르색소		불검출
(11) 바실러스세레우스		n=5, c=0, m=100

☞ 위와 같이 식품의약품안전청 특수의료용도식품 규격에 따라 환자 전용 제품의 제조기준을 확립.

나. 암 환자 전용 특수의료용도식품의 제품화 공정

1) 주원료 전처리 과정

		
<p>1. 알로에와 호장근 품질검사 및 원료 규격에 적합한 국내원료 구매</p>	<p>2. 알로에의 동결건조 및 알로에 생과육 처리</p>	<p>3. 동결건조 한 알로에 분쇄 및 생과육 절단</p>
		
<p>4. 알로에 및 호장근 추출</p>	<p>5. 추출한 원료 생물 전환</p>	<p>6. 추출한 원료 부원료에 혼합</p>

2) 시제품 공정

		
<p>1. 품질검사 및 원료규격에 적합한 원료 구매</p>	<p>2. 준비된 주원료 및 부 원료를 배합비율에 맞게 칭량</p>	<p>3. 칭량한 원료를 혼합기를 사용하여 혼합</p>
		
<p>4. 혼합된 원료를 로터리 포장기를 통해 PE파우치에 충전</p>	<p>5. 포장된 PE파우치를 박스에 담아 완제품 포장</p>	<p>6. 환자용 식품으로서 자가품질검사 의뢰</p>

다. 암 환자 전용 특수의료용도식품의 기초 배합비 개발

암 환자 전용 특수의료용도식품 시제품 배합비

원재료명	시제품 A	시제품 B	시제품 C	비고
영지균사체 배양 허브EX	15.00%	30.00%	20.00%	
└알로에	45.00%	45.00%	45.00%	
└호장근	26.00%	26.00%	26.00%	
└겨우살이	15.00%	15.00%	15.00%	
└그라비올라	14.00%	14.00%	14.00%	
말토덱스트린	36.40%	33.00%	31.196%	
유청단백	15.0%	15.50%	15.50%	
죽염	0.50%	0.30%	0.30%	
결정과당	8.00%	8.00%	8.00%	
분리대두단백	21.00%	9.191%	21.00%	
옥타코사놀 (12%)	0.10%	0.10%	0.1%	
비타민 및 미네랄	1.00%	0.90%	0.9%	
비타민E	-	0.009%	0.004%	
전지분유	3.00%	3.00%	3.00%	
합계	100.00%	100.00%	100.00%	

☞ 환자 전용 특수의료용도식품의 제품화 제조기준에 따라 시제품의 기초 배합비 세가지를 설정함.

● 최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가

가. 최종 개발 제품의 안전성 분석

1) 최종 제품의 안전성 데이터 확보를 위한 일반 독성 시험

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시

☞ 실험방법 및 결과

1-1) 시험 종 및 계통 : 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

1-2) 투여시 주령 및 동물수 : 암수 각 10 마리, 6 주령

1-3) 경구투여 : 시험물질의 임상적용 예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택함.

1-4) 투여방법 및 투여횟수

투여액은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출함. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위내에 단회 강제투여함. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여함.

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
대조군	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
시험물질 투여군	5,000	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)

1-5) 투여용량설정

본시험의 예비시험 (Biotoxtech Study No.: B181100P1)으로 5,000 mg/10 mL/kg 을 암수 랫드 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았음. 따라서, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 의 단일 시험물질 투여군을 설정함. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여함.

1-6) 일반증상 관찰 (SOP/SGE/160)

① 일반증상 관찰

투여당일 (0 일)에 투여 후 30 분까지는 적어도 1 회 이상, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태 (독성 징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰함. 투여 후 1 일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰함.

② 체중측정

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14 일 (부검일)에 측정함.

③ 부검

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 CO2 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검함.

④ 조직병리학적 검사

부검 시 육안소견이 관찰되지 않아, 조직병리학적 검사를 실시하지 않음.

1-7) 자료의 통계처리 (SOP/DSC/002)

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정한다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정함 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student t-test 를, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test 를 실시하여 유의성을 확인함 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

1-8) 결과 및 고찰

① 사망례 : 관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례 없음.

② 일반증상 : 관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않음.

③ 체중변화

Dose (mg/kg)	Sex	Animal ID	Days after dosing		
			0	1	3
5,000	Male	1001	199.9	226.7	249.6
	Female	2001	152.5	171.8	185.8

(g)

5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 암수 모두에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않음.

1-9) 결론

5,000 mg/kg 을 투여한 결과, 시험물질 투여에 기인한 사망례가 관찰되지 않음. 따라서, 본 시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 의 단일 시험물질 투여군을 설정함.

☞ 최종 제품의 안전성 확인을 위한 일반 독성 시험을 진행한 결과 사망례 없으며, 일반증상의 이상은 관찰되지 않아 5,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여용량에 안전성을 확인할 수 있었음.

2) 알로에의 독성 성분인 안트라퀴논 함유량 분석



일반 제 18431 호							
시 험 성 적 서							
검 체 명	알로에 A						
회 사 명	중앙미생물연구소	대 표 자	임우종				
주 소	충청북도 청주시 흥덕구공단로 134, 9층 914,915호(송정동,세종테크노밸리)						
시험항목	안트라퀴논계화합물			제조번호			
의뢰목적	참고용	제조일자		유통기한		접수일자	2018.11.22
<p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>외관.....미황색의 액상임 안트라퀴논계화합물(mg/g).....0.10(무수바바로인으로서) 끝.</p>							
2018년 12월 05일 한 국 식 품 과 학 연 구 원 16001 경기도 의왕시 봇들로 50 (포일동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072							
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.							

☞ 시제품 제조시 안트라퀴논계화합물 함유량을 식품공전에 표기된 30mg 이하로 제품을 제조하였으며 안트라퀴논계화합물 함유량 분석결과 0.1mg으로 안전성을 확인할 수 있었음.

나. 최종 개발 제품의 영양분석

1) 환자용 특수의료용도식품 완제품으로서의 영양 가치를 평가하기 위해 영양성분 규격 분석

시 험 성 적 서

발급번호 : 참190000639

접수번호	1901-1849	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	프로글루		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유통 기 한	
업 소 명	중앙 미생물 연구소	의뢰인	임우중
소 재 지	충청북도 청주시 흥덕구 공단로 134,9층 914,915호(송정동,세종테크노밸리)		
접수년월일	2019.01.15	검사완료일	2019.01.23
시 험 결 과			
시험항목	기준규격	결 과	1일영양성분기준치(%)
열량(kcal/100g)		368.7	-
탄수화물(g/100g)		62.2	19
당류(g/100g)		28.0	28
조단백질(g/100g)		29.3	53
조지방(g/100g)		0.3	1
포화지방(g/100g)		0.0	0
트랜스지방(g/100g)		0	-
콜레스테롤(mg/100g)		70.1	23
나트륨(mg/100g)		367.1	18
<p>위 결과는 작성상 세밀한 검도를 필요로 하며, 분량 당 환산치가 변동되오니 포장 전 보내드린 성적서와 영양표시 관련정보 사이트 (http://www.mfds.go.kr/nutrition/index.do)을 참고하시어 재확인 후 사용하시기 바랍니다.</p>			
<p>2019년 01월 23일</p> <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">(주) 한국분석기술연구원</p> 			
<p><small>*이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용할 수 없으며 법적효력이 없음 *성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시요. *이 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다. 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 해광빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298</small></p>			

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

☞ 1000 kcal당 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양성분 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합함.

● 기능성 소재 및 제품의 표준화 구축

가. 암 환자의 일일섭취량에 따른 기능성 소재의 표준화 구축

암 환자의 일일섭취량에 따른 최종 배합비 구축

원재료명	배합비율%	비고
영지균사체 배양 허브EX	20.00%	
└알로에	45.00%	
└호장근	26.00%	
└겨우살이	15.00%	
└그라비올라	14.00%	
말토덱스트린	31.196%	
유청단백	15.50%	
죽염	0.30%	
결정과당	8.00%	
분리대두단백	21.00%	
옥타코사놀(12%)	0.1%	
비타민 및 미네랄	0.9%	
비타민E	0.004%	
전지분유	3.00%	
합계	100.00%	

나. 안전성 및 영양성분 분석 데이터를 활용한 완제품의 기준 규격 설정

영양정보	총 내용량 40g 40g당 150kcal	
40g당 1일 영양성분 기준치에 대한 비율		
탄수화물	24g	7%
당류	11g	11%
단백질	11g	20%
지방	0g	0%
포화지방	0g	0%
트랜스지방	0g	0%
콜레스테롤	25mg	8%
나트륨	146mg	7%
비타민A	123ug RE	17%
비타민B	1.2mg	100%
비타민B2	1.1mg	82%
비타민B6	1.7mg	100%
비타민C	12.5mg	12.5%
비타민D	5ug	50%
비타민E	3.2mg a-TE	29%
아연	2mg	23%
엽산	55ug	13%
철	2.3mg	19%
칼슘	273mg	39%
나이아신	2.8mg	18%

☞ 최종 개발 제품의 안전성 및 영양평가 결과를 활용하여 최종 배합비를 구축하고 완제품의 기준 규격을 설정함.

다. 포장의 형태 및 디자인 개발을 통한 시제품 제작

연구개발한 내용을 토대로 최종적으로 표적항암제의 효능을 강화시킬 수 있는 암환자 전용 특수 의료용도식품의 시제품을 제작하기 위해 전문업체에 의뢰하여 포장의 형태 및 디자인 개발을 진행함.





최종 시제품 디자인

▷ 효능

- 특수의료용도식품으로서 환자에게 필요한 9대 영양소 및 비타민과 미네랄을 식사 대응으로 쉽게 섭취 할 수 있음
- 표적항암제로서 소라페니브 병행 투여시 간암 세포 사멸 증가

▷ 내용량

- 40g x 30포

▷ 원재료

- 영지균사체 배양분말(겨우살이,그라비올라), 허브EX 배양분말(알로에, 호장근), 말토텍스트린, 유청단백, 죽염, 결정과당, 분리대두단백, 옥타코사놀, 비타민A, 미타민B, 비타민B2, 비타민B6, 비타민C, 비타민D, 비타민E, 아연, 엽산, 철, 칼슘, 나이아신

▷ 에모딘 함량

- 기존의 랫드 실험에서 1kg 의 랫드에게 6.9mg의 에모딘과 소라페니브 병행 투여시 간암 세포 사멸이 증가
- 이에 성인 기준 (60kg)에 맞춰 414mg 이상의 에모딘을 섭취시 간암 표적 항암제로서 효과를 얻는다는 결론을 내림.
- 따라서 시제품의 에모딘 일일 섭취량을 456mg로 맞춤.

(2) 경제적 성과

① 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	기술보유자의 직접사업화- 기존업체의 상품화	시제품 제작	충북주	암환자식료품 특용도식품 개발	특수식료품의 암환자용 영양식	중앙미생물연구소	-	-	2019년 이후 예상	

② 표준화 : 해당사항없음

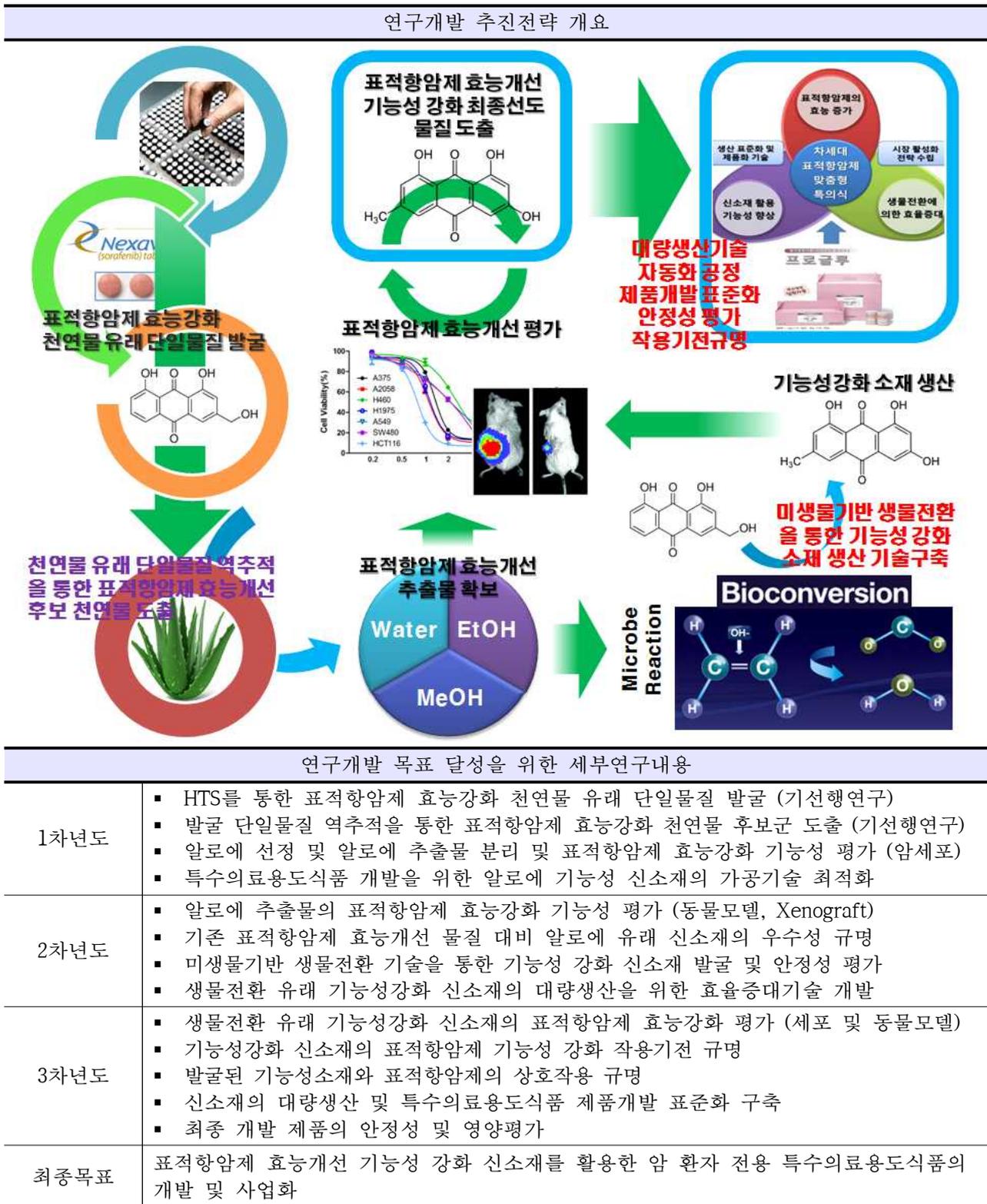
No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	제출(채택)일	국가

③ 기타

: 학사급 연구원 2명, 석사급 연구원 2명을 고용창출 하였음.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표



3-2. 목표 달성여부

가. 달성도

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 진 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	2		1		1			6			2			2		4		1	
1 차 년 도	목 표								3											
	실 적								3											
2 차 년 도	목 표	1							1			1		1		2				
	실 적	1							1			1	3.0 98	1		1				
3 차 년 도	목 표	1	1		1		1		1			1		1		2				
	실 적	1	1		1	6			-			1	3.6 87	2		3				
소 계	목 표	2	1		1				4			2		2		4				
	실 적	2	1		1	6			4			2	3.3 93	3		4				
종료 1차년도		1							1										1	
소 계		2	1		1	6			4			2	3.3 93	3		4				
합 계		2	1		1	6			4			2	3.3 93	3		4				

나. 자체평가

○ 기술적 측면

- 본 연구과제에서 우리 연구팀은 에모딘이 콜레스테롤 저하 효과를 통해 PI3K-AKT와 STAT3 신호 전달체계를 억제함을 증명했음.
- 본 연구팀은 수용성 콜레스테롤의 보충이 에모딘과 넥사바의 병행요법에서 AKT와 STAT3 신호 전달체계 뿐만 아니라 세포 생존력의 감소를 유의하게 차단한다는 것을 발견했음.
- 따라서 본 연구팀은 에모딘이 넥사바의 항암 효과에서 간암세포주를 민감하게 하는 중요한 기전은 세포 내 콜레스테롤의 감소로 인한 AKT와 STAT3 발암 성장 신호전달체계의 억제를 통한 것을 제안했음.
- 본 연구과제에서, 우리 연구팀은 선행 연구된 조합보다 낮은 에모딘 (10 mg/kg)과 간암표적항암제 넥사바 (5 mg/kg)의 병용 요법이 HepG2 또는 SK-HEP-1 간암세포 2종으로 유도된 인간종양 이식모델(xenograft) 동물실험에서 넥사바의 단독요법보다 약 50-70% 이상 더 우수한 것으로 확인되었으며 에모딘의 병행요법이 진보된 간암세포 암에서 부작용 없이 개선된 치료효능을 임상적으로 적용할 수 있음을 시사했음.
- 종합적으로 우리 연구팀의 in vitro, in vivo 실험 결과는 에모딘의 항암 효과가 세포 내 콜레스테롤 수치 억제를 통해 매개되고 이후 발암성 AKT 및 STAT3 경로의 감소를 일으킨다는 것을 증명했음. 또한, 진보된 간암세포 암 환자에서 넥사바의 항암 효과를 개선하기 위한 잠재적인 치료 전략이 될 수 있음을 확인했음.

○ 경제적·산업적 측면

- “알로에 추출물을 포함하는 소라페니브의 암 치료효과 증강용 조성물”에 관한 특허를 3차 년도에 추가로 출원했으며 2019년도에 등록이 예상되며 성과 200% 달성 예정.
- 인력양성 최종목표를 4명으로 계획했으나, 본 과제 초기에 참여한 학생연구원 1명과 석사급연구원 1명으로 총 2명을 연구인력 양성하여 각각 석사학위 진학과 박사학위 진학을 완료했음. 당초 인력양성 목표를 수행함에 있어서 인건비 비율의 제한으로 추가적인 고용과 인력 양성을 진행하기에 어려움이 있었음. 따라서 본 과제에 참여하여 의약바이오 연구인력 양성에 매진해 온 학부연구생 3명(남택진, 강혜지, 간상연)의 경우 그 기여도를 치하하기 위해 투고논문 2편에 공저자로 등재하였음. 학부연구생 3명은 본 과제에 참여하면서 연구개발 훈련을 통해 이학사 졸업예정이며 동종 분야 대학원에 진학하여 석사과정을 수행 중에 있음.

○ 보건의료 서비스 측면

- 고가의 표적항암제 사용에 따른 의료비 지출 감소
- 표적항암제 치료 효과 증대와 영양부족을 보충함으로써 암 환자의 삶의 질 향상

다. 산업화 후보물질로서 지표성분의 독성 관계

● 독성시험 정보의 다양성

1. 독성정보 요약

[하기 에모딘에 대한 독성정보는 식품의약품안전평가원에서 제공하는 독성정보제공시스템에서 발췌하였음]

☞ 용도

- ✓ 에모딘은 하제 및 염료 중간체로 사용된다 (DHHS/National Toxicology Program; Chemical Health & Safety Data File. Available from: http://ntp-db.niehs.nih.gov/cgi/iH_Indexes/Chem_H&S/iH_Chem_H&S_Frames.html on Emodin (518-82-1) as of January 17, 2003).
- ✓ 의약품(하제) (Lewis, R.J, 1997).
- ✓ 에모딘은 처방전 없이 살 수 있으며, 생약 치료제로 사용 (George J et al, 2003).
- ✓ 에모딘은 암 예방화학물질로 사용될 수 있다 (Koyama J et al, 2002).

☞ 독성자료

- ✓ 자극성 하제 효과를 나타낸다.
- ✓ 대부분의 인간에서 경증에서 중간 정도의 독성 영향이 나타난다.
- ✓ 증세로는 오심과 구토, 설사, 복부 경련 및 심계항진 등이 1차 증상으로 나타난다.
- ✓ 심하게 중독되면 신장 장애, 위장관 출혈, 근육 발작, 무호흡 및 체액 고갈 등의 증세가 나타날 수 있다.

2. 독성정보

☞ 기전

- ✓ 랫드에서 에모딘이 간 섬유화에 미치는 영향을 조사하였다. 랫드에게 40% 사염화탄소를 피하 주입하여 간 섬유화를 유도하였다. 랫드에게 에모딘을 (20, 40, 80 mg/kg(체중)의 농도로 1일 1회, 42일간) 저농도, 중간 농도, 고농도로 노출하였다. 에모딘 노출군에서는 1) 간 기능의 개선; 알라닌 트랜스아미나아제(alanine transaminase; ALT) 및 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase; AKP)가 뚜렷하게 줄어들었고, 총단백질양과 알부민 양은 확연하게 늘어났다. 2) 혈청 하이알루론산(hyaluronic acid) 및 라미닌(laminin)은 눈에 띄게 줄어들었다. 3) 간의 하이드록시프롤린(hydroxyproline)은 뚜렷하게 줄어들었다. 4) 섬유화 정도가 줄어들었다. 이런 변화는 통계적으로 유의미하게 나타났다 (유의수준 < 0.05 또는 유의수준 < 0.01). 에모딘은 간 보호 기능을 한다 (Zhan Y et al, 2000).
- ✓ 에모딘과 카시아민 B(cassiamin B)가 암 예방화학물질로서 작용할 수 있는지를 조사하였다. 이들 물질은 마우스 피부 종양에서 2단계로 진행된 발암성 연구에서 항종양 촉진 효과를 나타내었다. 마우스 피부 종양 개시 물질로는 7,12-다이메틸벤즈안트라센(7,12-dimethylbenz[a] anthracene)을 사용하였고, 촉진 물질로는 12-O-테트라데카노일포볼-13-아세테이트(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TPA)를 사용하였다. 또한 에모딘은 산화질소 공여체를 개시 물질로, TPA를 촉진 물질로 사용한 마우스 피부 종양 시험에서도 발암성을 강력하게 억제하였다

(Koyama J et al, 2002).

- ✓ 에모딘은 세포의 DNA 합성효소를 억제하고, 세포 주기 진행을 지연시킴으로서 인간 신장 섬유아세포의 증식을 억제하였다 (Ning Y et al, 2000).
- ✓ 에모딘이 활성화된 T 세포 증식을 억제하는 기전은 사이토카인(cytokine)의 생산 및 IL-2 mRNA 양, 세포내 Ca²⁺의 농도 변화와 연관이 있다 (Kuo YC et al, 2001).
- ✓ 에모딘은 인간 간암종 세포 3종에서 세포사멸 반응을 유도하였다. 이들 3종 세포의 성장은 에모딘 노출 시간과 용량에 비례하여 억제되었다. 에모딘은 활성산소종을 생성하여 세포내 미토콘드리아의 막전위를 감소시켰다. 이어서 카스파아제-9(caspase-9) 및 카스파아제-3(caspase-3)이 활성화되어서 DNA 분절화와 세포사멸효과가 나타났다 (Jing X et al, 2002).
- ✓ 안트라퀴논 진균독소인 에모딘 및 스카이린(skyrin)이 마우스 백혈구 배양 세포 L1210 및 랫드 간 미토콘드리아에서 산화적 인산화, 그리고 랫드 뇌 과립체에서 Na⁺, K⁺에 의해 활성화되는 ATPase의 활성에 저해 효과를 나타내는지 조사하였다. 스카이린은 에모딘에 비해 L1210 저해 효과가 더 컸다. 에모딘은 스카이린보다 미토콘드리아 호흡에 더 강한 영향을 나타냈다. 스카이린은 랫드 뇌의 ATPase의 활성을 저해하였으나, 에모딘은 저해효과를 나타내지 않았다 (Kawai K et al, 1984).
- ✓ 에모딘은 핵산 수송을 저해하며, 몇 종류의 항신생물제의 세포 독성 효과를 증대시킨다. 이들 물질에는 플루오로우라실(fluorouracil; 5-FU) 및 메토틱세이트(methotrexate)가 있다 (Jiang X et al, 1999).

☞ 표적장기독성

★ 신경독성

- 1) 급성 독성; 해당 자료 없음
- 2) 만성 독성; 해당 자료 없음

★ 면역독성

- 1) 급성 독성; 해당 자료 없음
- 2) 만성 독성; 해당 자료 없음

★ 유전독성

- ✓ 에모딘의 무계획 DNA 합성 유도 결과는 논란의 여지가 있는데, 각기 다른 연구에서 음성 결과와 양성 결과가 얻어졌다 (Mori et al, 1984; Westendorf et al, 1990).
- ✓ 고초균 또는 대장균에서 에모딘은 DNA 복구 결핍 균주의 성장을 저해하지 않았다 (Ueno & Kubota, 1976; Fluck et al, 1976).
- ✓ 에모딘은 S9 대사 활성이 있을 때에 살모넬라 균주 TA1537 및 TA1538에서 유전돌연변이를 유도하였다 (Brown & Brown, 1976; Wehner et al, 1979; Cheh et al., 1980; Liberman et al, 1980; Tikkanen et al, 1983; Bruggeman & van der Hoeven, 1984; Masuda & Ueno, 1984; Westendorf et al, 1990; Krivobok et al, 1992).
- ✓ 에모딘은 햄스터 V79 세포에서 자매 염색분체 교환을 유도하지 않았다 (Bruggeman & van der Hoeven, 1984).

- ✓ 에모딘은 UV 처리한 세포에서 무계획 DNA 합성을 증가시켰으며, WI38 세포에서 시스플라틴(cisplatin)으로 유도한 DNA 부가물은 감소시켰다. 이 효과는 노출 용량 의존적으로 나타났으며, 이것은 에모딘이 세포에서 핵산 절단 보수(NER; nucleotide excision repair)를 촉진할 수 있음을 보여준다 (Chang L et al, 1999).
- ✓ 대사 활성화가 없을 때 오메가-하이드록시에모딘은 살모넬라 균주에서 돌연변이를 유발하지 않았으나, 대사 활성화가 있으면 돌연변이를 유발하였다 (Murakami H et al, 1987).
- ✓ 생체외에서 에모딘은 미세소핵 시험에서 양성 결과를 보였으나, 2,000 mg/kg 농도로 1회 경구 노출한 골수에서는 음성 결과를 보였다 (Mengs et al., 1997).
- ✓ 햄스터 V79 세포에서 HGPRT 유전자 자리에 나타나는 돌연변이 결과 또한 각기 다른 연구에서 음성, 양성의 서로 상충된 결과를 얻었다 (Bruggeman & van der Hoeven, 1984; Westendorf et al, 1990).

★ 생식독성/기형유발성

1) 기형유발성

- ✓ 마우스에 5일 동안 **에모딘 50, 1000 mg/kg/day** 농도로 경구 노출시킨 후 고환에서의 다른 유전적 발현 기전을 통해 독성효과를 보고자 하였다. 에모딘은 IGF-1 수용체 전달 경로와 관련하여 생식세포의 사멸과 고환에 독성 효과를 보이며, 카제인 카이네이즈 II, 정자형성, TNFR1 전달 경로를 통해 정자의 운동성에 영향을 주었다 (Oshida K et al., 2011).
- ✓ 세포 외 증식과 세포 내 배아 착상을 통해 포배단계에서 마우스 배아에 대한 에모딘의 세포독성을 조사하였다. 24시간 동안 25-75 uM의 에모딘에 포배를 노출시킨 결과, 내부세포괴와 영양외배엽의 세포사멸을 가져와서 배아의 발달과 생육의 감소를 가져왔다 (Chang MH et al., 2012).

2) 임신 중 영향

- ✓ 에모딘을 수태한 랫드와 마우스에게 노출하였다. 두 생물종에서 출생전 사망률, 한배새끼의 숫자, 태자의 성비 및 형태 발달에 아무런 영향이 나타나지 않았다. 고농도 노출시, 랫드 태자의 체중에는 변화가 없었으나, 마우스에서는 감소하였다. 랫드에서 모체 체중 및 체중 증가분을 근거로 얻은 최소작용량[LOAEL]값은 1,700 ppm이었으며, 최대무작용량[NOAEL]값은 850 ppm이었다. 랫드의 발달 독성에 관한 최대무작용량[NOAEL]값은 1,700 ppm보다 높았다. 랫드의 발달 독성에 관한 최소작용량[LOAEL]값은 산출하지 않았다. 마우스에서 모체 체중 및 체중 증가분을 근거로 얻은 모체 독성에 관한 최소작용량[LOAEL]값은 6,000 ppm이었으며, 최대무작용량[NOAEL]값은 2,500 ppm이었다. 태자 체중 감소를 근거로 얻은 발달 독성에 관한 최대무작용량[NOAEL]값은 6,000 ppm이었으며, 최소작용량[LOAEL]값은 2,500 ppm이었다 (George J et al, 2003).

3) 수유 중 영향; 해당 자료 없음

★ 신장독성

1) 급성 독성

- ✓ 세포 외 실험으로 사람의 HK-2 근위 세뇨관 상피세포를 40 uM의 에모딘에 12, 24, 48시간 노출 후 세포 생육성과 세포 사멸/괴사 유도 및 세포사멸 효소의 활성을 조사하였다. 에모딘은 농도와 시간 의존적으로 HK-2 세포의 증식을 저해하였고, 세포 분열 분석 결과, 12시 노출 후 HK-2 세포는 G 1에서 멈추었다. HK-2 세포는 세포 독성 영향을 유도하는 에모딘에 민감하며, 이는 카스

과제 3 의존 경로에서 세포 사멸을 유도하게 된다 (Wang C et al, 2007).

2) 만성 독성: 해당 자료 없음

★ 간독성

1) 급성 독성: 해당 자료 없음

2) 만성 독성: 해당 자료 없음

★ 소화기계독성

1) 급성 독성

- ✓ 비임상 연구에서 위장관에 독성 영향을 나타내었다 [DHHS/National Toxicology Program; Chemical Health & Safety Data File. Available from: http://ntp-db.niehs.nih.gov/cgi/iH_Indexes/Chem_H&S/iH_Chem_H&S_Frames.html on Emodin (518-82-1) as of January 17, 2003].

3. 동력학 및 대사정보

☞ 흡수

- ✓ 14C 표지한 에모딘 (50 mg/kg)을 경구 노출시, 위장관을 통해 신속하게 흡수된다. 말초 혈액의 방사능은 2시간 이내에 최고 농도에 도달하며, 24시간 이내에 최고 농도의 30%로 떨어진다. 5일 뒤에도 말초 혈액에서 방사능은 검출되었다 (Bachmann & Schlatter, 1981).

☞ 대사

- ✓ 랫드 간 과립체를 에모딘과 함께 배양하여 2종의 대사체를 동정하였다. 2종은 2-하이드록시에모딘과 w-하이드록시에모딘이었다. 2-하이드록시에모딘의 생성은 3-메틸콜란트렌에 의해 자극받았으며, α -나프토플라본(α -naphthoflavone)에 의해 저해되었다. 또한 2-하이드록시에모딘의 생성은 랫드 사이토크롬P4501A1/2의 항체에 의해 저해되었으며, 랫드 사이토크롬P4501A1 항체에 의해서는 약간 저해되었다 (Mueller et al, 1998).
- ✓ 에모딘을 PCB, 3-메틸콜란트렌(3-methylcholanthrene), 또는 페노바비탈(phenobarbital)로 전처리한 랫드 간과 함께 배양하여, 최소 5종의 대사체를 동정하였다. 5종 대사체 중, 2-하이드록시에모딘(2-hydroxyemodin)만이 돌연변이원성을 나타내었다 (Masuda & Ueno, 1984). 이후 추가로 4종의 대사체가 동정되었다. 4종은 4-하이드록시에모딘(4-hydroxyemodin), 5-하이드록시에모딘(5-hydroxyemodin), 7-하이드록시에모딘(7-hydroxyemodin) 및 w-하이드록시에모딘(w-hydroxyemodin)이었다. 이들은 6번 메틸기가 수산화되어 형성되었다 (Masuda et al, 1985; Murakami et al, 1987)
- ✓ 여러 동물종에서 얻은 간 과립체에서 에모딘은 1-하이드록시, 4-하이드록시, 7-하이드록시에모딘 등과 함께 동정되지 않은 안트라퀴논으로 전환되었다. 주 대사체는 오메가-하이드록시-에모딘이었다. 이 대사체 생산능이 가장 높은 동물종은 기네피그 및 랫드였으며, 마우스와 래빗이 그 다음을 이었다. 에모딘이 오메가-하이드록시-에모딘으로 전환되는 현상은 페노바비탈(phenobarbital) 처리시 자극받았으며, SKF 525A 처리시 억제되었다. 간에서 진행되는 메틸기 및 에모딘의 안트라퀴논 골격의 수산화 반응은 여러 종류의 사이토크롬P450에 의해 구조적 특이성에 따라 진행된다고 보여진다 (Murakami H et al, 1987).
- ✓ 14C 표지한 에모딘 (50 mg/kg)을 경구 노출시, 4-6시간 뒤, 뇨 대사체로는 에모디산 [1,3,8-트리

하이드록시-6-카복시안트라퀴논]이 동정되었다 (Bachmann & Schlatter, 1981).

☞ **배설**

- ✓ 14C 표지한 에모딘 (50 mg/kg)을 경구 노출시, 4~6시간 뒤, 뇨에서 방사능이 검출되기 시작하여, 24시간 경과 시에는 노출용량의 18%가, 120시간 경과 시에는 22%가 검출되었다. 뇨 검출 방사능의 70%는 유리 안트라퀴논이며, 나머지는 글루쿠로이드 또는 황 포함물이었다. 변 방사능 배출량은 24시간 이내에 44%, 72시간 이내에 66%였다. 나머지는 방사능으로 추출되지 않았다 (Bachmann & Schlatter, 1981).

☞ **독성수치**

종말점	동물종	투여경로	용량	독성효과	참고자료
LD50	마우스	경구	>1,000 mg/kg	세부 보고 없음	Bachmann et al, 1979

● **임상시험 정보**

1. 국내 임상시험 정보 [https://cris.nih.go.kr/cris/search/basic_search.jsp]

☞ Emodin에 대한 국내임상시험 정보를 조사한 결과 0건의 선행조사가 확인

2. 해외 임상시험 정보 [<https://clinicaltrials.gov/>]

☞ Emodin에 대한 해외임상시험 정보를 조사한 결과 1건의 선행조사가 확인

☞ Randomized Clinical Trial of Triptolide Woldifii for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease

☞ ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00801268

☞ Sponsor: Zhi-Hong Liu, M.D.

☞ Information provided by (Responsible Party): Zhi-Hong Liu, M.D., Nanjing University School of Medicine

● **조사결과의 시사점**

1. 독성시험 정보의 다양성에 대한 시사점은 넥사바 효능개선 기능성강화 신소재로서 에모딘을 지표성분으로 하는 제품개발을 위한 예비 독성자료로 활용이 가능하며, 개발 가능성 평가에 중요한 자료가 될 수 있음

2. 국내외 임상시험 현황 조사 결과를 바탕으로 기능성강화 신소재로서 에모딘의 독창성과 신규성이 있다고 판단됨

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

가. 연구수행에 따른 문제점 및 개선방향

○ 주관기관 (중앙미생물연구소)

- 본 연구에서 알로에 추출방법을 확립하였을 때 알로에 에모딘과 에모딘의 함량이 적절하게 추출 되는 것을 확인 할 수 있었지만, 이를 생물전환 하였을 경우 알로에 에모딘, 에모딘의 함량이 증가한 것이 아니라 오히려 감소하는 경향을 확인함. 하지만 세포 실험에서는 유의성 있는 결과를 얻은 것으로 보아 미생물에 의한 생물전환에 의해서 에모딘의 함량의 증가 결과가 아닌 다른 구조적 변이와 이에 따른 암세포 저해 효과를 예측 할 수 있음. 따라서 추후 이에 관련된 추가 연구가 필요할 것으로 사료됨.
- 현재 검증기관을 통해 최종 시제품의 동물 시험을 통한 안전성 검사가 이루어지고 있으며, 이에 관한 결과를 바탕으로 제품의 안전성 확보가 추후 보완 될 것임.
- 현재 시제품에서 최종 제품화 되기 전 제품에 대한 관능 평가 (맛, 향, 식감, 점도 등)를 통해 제품의 품질을 향상시키기 위한 과정이 보완될 필요성이 있음.

○ 협동기관 (건국대학교 글로벌산학협력단)

- 논문발표시 당초 계획에서 2차년도에 SCI급 상위 30%이내 투고달성 및 3차년도에 SCI급 상위 10% 이내 투고달성이었으나 2차년도 발표논문 IF 3.098(상위 45% 이내), 3차년도 발표논문 IF 3.687(상위 30% 이내)이었음. 연구개발계획서에서 기재한 바와 같이 알로에의 주성분인 이모딘의 넥사바에 의한 간암세포 성장억제와 보조치료제로서의 가능성에 대한 연구가 전혀 보고되지 않은 상황에서 본 연구팀의 투고논문은 연구의 창의성과 혁신성이 우수하여 상위 랭크 저널에 게재되길 바랐으나 기대에 못 미쳤음.
- 차후에 본 연구팀에서 발표한 논문의 연구테마와 관련하여 보다 면밀히 살피고 보완하여 추가적인 연구결과를 도출할 경우, 상위 30%이내 논문발표에 재도전할 것임.
- 인력양성 계획을 석사급 전문 연구인력 2명, 박사급 전문 연구인력 2명으로 기재했으나, 본 과제에 참여한 학생연구원 3명과 학사급연구원 1명으로 총 4명을 연구인력 양성하여 각각 석사학위 진학을 완료했음. 당초 인력양성 목표를 수행함에 있어서 인건비 비율의 제한으로 추가적인 고용과 인력양성을 진행하기에 어려움이 있었음.
- 석사급, 박사급 연구인력 양성의 경우, 한정된 인건비 범위에서 등록금을 충당하기 현실적으로 어려움이 많으므로 차후에는 과제참여도를 조절하여 연구인력 양성 목표달성에 노력하겠음.

나. 중요 연구변경 사항

○ 주관기관 (중앙미생물연구소)

- 연구원 변경
기존 연구원의 퇴사로 신규 연구원을 고용하여 과제수행에 참여중임.

○ 협동기관 (건국대학교 글로벌산학협력단)

- 연구원 변경
기존 연구원의 중퇴로 학생 인건비를 변경하여 연구장비·재료비로 예산변경 함.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

1. 제품 실용화 및 현장적용 방안



프로 글루 (Pro Glu)



알로에 유래
기능성강화 신소재



표적항암제 특이적
효능증진
특수의료용도식품

- ☞ 본 주관 기관의 1세대 특수의료용도식품 프로글루는 이미 특수의료용도식품 내 환자용 특수 영양식으로서 허가를 취득해 있는 상태임
- ☞ 제품화 초기단계에서는, 현재 본 주관기관이 보유한 특수의료용도식품 개발 기술을 기반으로 천연물 유래 단일 물질에 의한 항암제 효능증진 가능성을 포함시키고자 함
- ☞ 더불어, 기능성 특수의료용도식품이라는 새로운 시장을 개척함과 동시에 신기술에 대한 핵심원천기술 및 제품개발에 대한 표준화 모델을 제시할 예정임
- ☞ 알로에 및 호장근 추출물로부터 에모딘 함량을 표준화 시켰으며 시제품에서 최종 제품화되기 전 제품에 대한 관능평가(맛, 향, 식감, 점도 등)를 통해 제품의 품질이 향상되도록 노력할 것임.
- ☞ 제품화 후 직접적인 현장 적용은, 기존의 주관 기관이 확보하고 있는 주 판매처(직영 판매망, 요양원, 요양병원, 대형 종합병원 등)를 통해 우선적으로 적용하고자 함



아이클릭 협동조합



- 2016년 협동조합 설립
- 총성도 높은 고객들의 결속을 통해 매출 신장
 - 온라인 플랫폼 TPS 80만 회원
 - 네이버 밴드 "캐치콜과다이어트" (약 3,000명 규모) 외 10개의 밴드
 - 캐치콜 80만 세트 판매의 소비자 층 결속 효과
- 국내 최초 녹엽관 런칭 (국제 녹엽 회원 유입)

TM 센터 운영



- 높은 성장세를 보이고 있는 TM시장
- 다이어트 TM 센터 운영을 기반으로 제품 포트 확장
 - 기존 약 7종의 다이어트 제품 판매 경험
 - 축적된 TM DB
 - 제조, 유통, 판매 라인의 일원화 통한 가격경쟁력 확보

☞ 탁월한 기능성으로 국외 수출이 미미한 특수의료용도식품 시장에서 해외 진출의 새로운 출구 역할 가능



녹엽

- 중국 상해 위치한 제조회사
- 약 3년만에 2018년 중국 직판사 10위 달성
- 전체 생산 센터 ISO9001 및 국제 GMP 인증 채택
- 2016년 3월, 중화 인민 공화국 상무부 직매 76호 라이선스 공식 부여
- 국내 최초 자사 제품 런칭 예정



Yezzileaf

- 2008년 설립
- 중국 의료 기기 회사
- GCP 규정에 의거 ICH 및 기타 법률 보증
- 자사 단일 제품으로, 5년간 115만\$ 수출 진행 중



중국 칭화 과기원

- 중국 제 1 과기원
- 70만 평방미터 면적, 400여개 기업, 1만5천명의 인력
- 중국 내 실리콘밸리의 중심축
- 자사가 제조한 미생물 다이어트 컨셉의 제품 계약 준비 중

2. 후속연구 방안

- ☞ 현재 충북에 소재한 바이오산업체들의 주력분야를 살펴보면 천연물 소재 기반의 건강 기능성 식품이 우위를 차지하고 있으며, 천연물 및 합성화학품 대량생산을 하는 산업체들이 많음
- ☞ 건강 기능성 식품을 생산하는 산업체의 경우 기업성장률이 다소 하락되고 있으며, 근본적인 원인 중 하나는 건강 기능성 식품 시장의 성장이 한계에 이르렀다고 분석하고 있음
- ☞ 차세대 기능성 특수의료용도식품은 새로운 분야이며, 암환자 전용 이외에 다양한 분야의 특수의료용도식품에 대한 연구 진행 또한 가능
- ☞ 따라서 충북에 소재한 바이오산업체들의 R&D 및 주력생산품에 대한 파이프라인의 변화가 필요하다고 판단되며, 현재 보유한 기술을 바탕으로 **노인성질환 (초고령화 사회 대응)**을 표적하는 천연물 신약을 개발하는 것은 지역산업 발전에 크게 기여할 것으로 판단됨

3. 인력양성 방안 및 지역 바이오관련 산업체의 R&D 확대

- ☞ 2010년 기획재정부는 ‘미래 산업 청년리더 10만 명 양성계획’ 사업을 통해 바이오분야 7,000명, 신약개발 분야를 포함한 첨단의료 분야 1만 3,000명 육성계획을 진행하고 있음
- ☞ 본 연구팀의 주관연구기관인 중앙미생물연구소는 청주에 위치하고 있으며, 협동연구기관인 건국대학교 글로벌캠퍼스는 충북 충주에 소재하고 있음. 더불어, 충북은 핵심전략산업으로 바이오산업을 육성하고 있으며, 청주와 충주는 충북의 바이오밸리에 정확하게 자리잡고 있어 바이오산업 활성화를 위한 R&D인력양성의 핵심위치에 있다고 할 수 있음



충북의 핵심전략산업 '바이오'

산업별 주요 인력양성 추진방안

(단위: 천명)

미래산업 분야	인원	소관부처
녹색산업 (신재생에너지, 환경)	신재생에너지연구개발(4.3)	지경부 환경부 국토부
	기후변화대응·환경서비스(5.9)	
	환경 유망신산업(2.8)	
첨단 산업	바이오융합·산업화(7.1)	지경부 국토부
	로봇연구개발(2.9)	
	항공기안전인증·운항(2.3)	
정보통신·융합	융복합·지식정보보안(9.8)	지경부
	산업리더(0.8)	
	연구개발(13.5)	
문화콘텐츠	문화콘텐츠 융합(4.8)	문화부
	게임,영화,방송(7.5)	
첨단의료	신약·첨단의료기기(11.6)	복지부 교과부
	국제마케팅(0.3)	
	첨단한의원(0.8)	
지식기반서비스	금융, 디자인 등(12.3)	금융위 재정부 국토부 지경부
	U-city 및 공간정보(3.4)	
	기술사업화, 플랫폼(10)	
합계	100	

산업별 인력양성 계획

- ☞ 더욱이 충청북도는 오송·오창을 중심으로 대규모 바이오산업단지가 조성되어 있으나, 위치적 한계로 인해 다수의 바이오산업체에서 인력 수급에 대한 어려움을 호소하고 있음
- ☞ 따라서 이와 같은 지역여건을 고려하여 본 연구팀은 지속적인 한의학 소재 기반의 신약개발 연구를 통해 우수한 기술을 개발하며, 전문 인력을 양성하여 지역 관련 산업체에 전문 인력 및 기술개발 Know-how를 공급함으로써 지역산업과의 공동발전을 도모하고자 함

4-2. 기술이전

No.	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	특허양도	“알로에추출물을 포함하는 소라페니브의 암 치료 효과 증강용 조성물” 특허권 양도	중앙미생물 연구소	2018년 11월 09일	6백만원	

붙임. 참고문헌

○ 보고서 작성 시

References

1. Le Grazie, M.; Biagini, M.R.; Tarocchi, M.; Polvani, S.; Galli, A. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. *World J. Hepatol.* 2017, 9, 907-920. [CrossRef] [PubMed]
2. Greten, T.F.; Korangy, F.; Manns, M.P.; Malek, N.P. Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 2009, 100, 19-23. [CrossRef] [PubMed]
3. Llovet, J.M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J.F. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Eng. J. Med.* 2008, 359, 378-390. [CrossRef] [PubMed]
4. Huang, Q.; Lu, G.; Shen, H.M.; Chung, M.C.; Ong, C.N. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med. Res. Rev.* 2007, 27, 609-630. [CrossRef] [PubMed]
5. Li-Weber, M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett.* 2013, 332, 304-312. [CrossRef] [PubMed]
6. Xing, J.Y.; Song, G.P.; Deng, J.P.; Jiang, L.Z.; Xiong, P.; Yang, B.J. Antitumor effects and mechanism of novel emodin rhamnoside derivatives against human cancer cells in vitro. *PLoS ONE* 2015, 10, e0144781. [CrossRef] [PubMed]
7. Gu, J.; Cui, C.F.; Yang, L.; Wang, L.; Jiang, X.H. Emodin inhibits colon cancer cell invasion and migration by suppressing epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncol. Res.* 2018, 32, 30-32.
8. Zhang, L.; Chang, C.J.; Bacus, S.S.; Hung, M.C. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res.* 1995, 55, 3890-3896. [PubMed]
9. Lin, W.; Zhong, M.; Yin, H.; Chen, Y.; Cao, Q.; Wang, C. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in vitro and in vivo.

- Oncol. Rep. 2016, 36, 961-967. [CrossRef] [PubMed]
10. Zhang, W.; Chen, H.; Liu, D.L.; Li, H.; Luo, J.; Zhang, J.H. Emodin sensitizes the gemcitabine-resistant cell line Bxpc-3/Gem to gemcitabine via downregulation of NF-kappaB and its regulated targets. *Int. J. Oncol.* 2013, 42, 1189-1196. [CrossRef] [PubMed]
 11. Li, J.; Liu, P.; Mao, H.; Wang, A.; Zhang, X. Emodin sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis in vitro. *Oncol. Rep.* 2009, 21, 1605-1610. [PubMed]
 12. Zhang, L.; Hung, M.C. Sensitization of HER-2/neu-overexpressing non-small cell lung cancer cells to chemotherapeutic drugs by tyrosine kinase inhibitor emodin. *Oncogene* 1996, 12, 571-576. [PubMed]
 13. Zhang, L.; Lau, Y.K.; Xia, W.; Hortobagyi, G.N.; Hung, M.C. Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 343-353. [PubMed]
 14. Beloribi-Djefafia, S.; Vasseur, S.; Guillaumond, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 2016, 5, e189. [CrossRef] [PubMed]
 15. Cruz, P.M.; Mo, H.; McConathy, W.J.; Sabnis, N.; Lacko, A.G. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: A review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers Pharmacol.* 2013, 4, 119. [CrossRef] [PubMed]
 16. DeBose-Boyd, R.A.; Ye, J. SREBPs in lipid metabolism, insulin signaling, and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 2018, 43, 358-368. [CrossRef] [PubMed]
 17. Liu, L.; Cao, Y.; Chen, C.; Zhang, X.; McNabola, A.; Wilkie, D. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006, 66, 11851-11858. [CrossRef] [PubMed]
 18. Murray, A. Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1994, 6, 872-876. [CrossRef]
 19. Li, J.; Ding, L.; Song, B.; Xiao, X.; Qi, M.; Yang, Q. Emodin improves lipid and glucose metabolism in high fat diet-induced obese mice through regulating SREBP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 2016, 770, 99-109. [CrossRef] [PubMed]
 20. Zhuang, L.; Kim, J.; Adam, R.M.; Solomon, K.R.; Freeman, M.R. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J. Clin. Investig.* 2005, 115, 959-968. [CrossRef] [PubMed]
 21. Ghalali, A.; Martin-Renedo, J.; Hogberg, J.; Stenius, U. Atorvastatin decreases HBx-induced phospho-Akt in hepatocytes via P2X receptors. *Mol. Cancer Res.* 2017, 15, 714-722. [CrossRef] [PubMed]
 22. Chen, Y.C.; Gowda, R.; Newswanger, R.K.; Leibich, P.; Fell, B.; Rosenberg, G. Targeting cholesterol transport in circulating melanoma cells to inhibit metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017, 30, 541-552. [CrossRef] [PubMed]
 23. Afshordel, S.; Kern, B.; Clasohm, J.; Konig, H.; Priester, M.; Weissenberger, J. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation-impact of Ras-/Rho-prenylation. *Pharmacol. Res.* 2015, 91, 69-77. [CrossRef] [PubMed]

24. Stine, J.E.; Guo, H.; Sheng, X.; Han, X.; Schointuch, M.N.; Gilliam, T.P. The HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, exhibits anti-metastatic and anti-tumorigenic effects in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 946-960. [CrossRef] [PubMed]
25. Li, Y.; Guo, G.; Song, J.; Cai, Z.; Yang, J.; Chen, Z. B7-H3 promotes the migration and invasion of human bladder cancer cells via the PI3K/Akt/STAT3 signaling pathway. *J. Cancer* 2017, 8, 816-824. [CrossRef] [PubMed]
26. Carpenter, R.L.; Lo, H.W. STAT3 target genes relevant to human cancers. *Cancers* 2014, 6, 897-925. [CrossRef] [PubMed]
27. Monisha, B.A.; Kumar, N.; Tiku, A.B. Emodin and its role in chronic diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 928, 47-73. [PubMed]
28. He, Y.; Huang, J.; Wang, P.; Shen, X.; Li, S.; Yang, L. Emodin potentiates the antiproliferative effect of interferon alpha/beta by activation of JAK/STAT pathway signaling through inhibition of the 26S proteasome. *Oncotarget* 2016, 7, 4664-4679. [PubMed]
29. Subramaniam, A.; Shanmugam, M.K.; Ong, T.H.; Li, F.; Perumal, E.; Chen, L. Emodin inhibits growth and induces apoptosis in an orthotopic hepatocellular carcinoma model by blocking activation of STAT3. *Br. J. Pharmacol.* 2013, 170, 807-821. [CrossRef] [PubMed]
30. Enriquez-Cortina, C.; Bello-Monroy, O.; Rosales-Cruz, P.; Souza, V.; Miranda, R.U.; Toledo-Perez, R. Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget* 2017, 8, 104136-104148. [CrossRef] [PubMed]
31. Carr, B.I.; Giannelli, G.; Guerra, V.; Giannini, E.G.; Farinati, F.; Rapaccini, G.L. Plasma cholesterol and lipoprotein levels in relation to tumor aggressiveness and survival in HCC patients. *Int. J. Biol. Marker* 2018, 18, 136-148. [CrossRef] [PubMed]
32. Fang, Z.; Tang, Y.; Fang, J.; Zhou, Z.; Xing, Z.; Guo, Z. Simvastatin inhibits renal cancer cell growth and metastasis via AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 pathway. *PLoS ONE* 2013, 8, e62823. [CrossRef] [PubMed]
33. Wang, S.T.; Ho, H.J.; Lin, J.T.; Shieh, J.J.; Wu, C.Y. Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2017, 8, e2626. [CrossRef] [PubMed]
34. Ogura, S.; Yoshida, Y.; Kurahashi, T.; Egawa, M.; Furuta, K.; Kiso, S. Targeting the mevalonate pathway is a novel therapeutic approach to inhibit oncogenic FoxM1 transcription factor in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2018, 9, 21022-21035. [CrossRef] [PubMed]
35. Cheng, Y.; Luo, R.; Zheng, H.; Wang, B.; Liu, Y.; Liu, D. Synergistic anti-tumor efficacy of sorafenib and fluvastatin in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017, 8, 23265-23276. [CrossRef] [PubMed]
36. Chen, K.F.; Yu, H.C.; Liu, T.H.; Lee, S.S.; Chen, P.J.; Cheng, A.L. Synergistic interactions between sorafenib and bortezomib in hepatocellular carcinoma involve PP2A-dependent Akt inactivation. *J. Hepatol.* 2010, 52, 88-95. [CrossRef] [PubMed]
37. Huynh, H.; Ngo, V.C.; Koong, H.N.; Poon, D.; Choo, S.P.; Thng, C.H. Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *J. Cell. Mol.*

Med. 2009, 13, 2673–2683. [CrossRef] [PubMed]

38. Huynh, H.; Ngo, V.C.; Koong, H.N.; Poon, D.; Choo, S.P.; Toh, H.C. AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Hepatol.* 2010, 52, 79–87. [CrossRef] [PubMed]

39. Li, J.; Kim, S.G.; Blenis, J. Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metab* 2014, 19, 373–379. [CrossRef] [PubMed]

40. Schwartz, G.K.; Tap, W.D.; Qin, L.X.; Livingston, M.B.; Undevia, S.D.; Chmielowski, B. Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: A multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet* 2013, 14, 371–382. [CrossRef]

41. Chen, D.; Frezza, M.; Schmitt, S.; Kanwar, J.; Dou, Q.P. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: Current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 2011, 11, 239–253. [CrossRef] [PubMed]

42. Balagula, Y.; Barth Huston, K.; Busam, K.J.; Lacouture, M.E.; Chapman, P.B.; Myskowski, P.L. Dermatologic side effects associated with the MEK 1/2 inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886). *Inv. New Drugs* 2011, 29, 1114–1121. [CrossRef] [PubMed]

43. Ma, Y.S.; Weng, S.W.; Lin, M.W.; Lu, C.C.; Chiang, J.H.; Yang, J.S. Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells in vitro and in vivo: Roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xenografts model. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 1271–1278. [CrossRef] [PubMed]

44. Cha, T.L.; Qiu, L.; Chen, C.T.; Wen, Y.; Hung, M.C. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Cancer Res.* 2005, 65, 2287–2295. [CrossRef] [PubMed]

45. Chun-Guang, W.; Jun-Qing, Y.; Bei-Zhong, L.; Dan-Ting, J.; Chong, W.; Liang, Z. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol* 2010, 627, 33–41. [CrossRef] [PubMed]

46. Oh, T.I.; Lee, Y.M.; Nam, T.J.; Ko, Y.S.; Mah, S.; Kim, J. Fascaplysin exerts anti-cancer effects through the downregulation of survivin and HIF-1 α and inhibition of VEGFR2 and TRKA. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 133–141. [CrossRef] [PubMed]

47. Smith, J.R.; Osborne, T.F.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.; Gil, G. Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A. synthase. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 18480–18487. [PubMed]

48. Sun, X.; Song, Q.; Yan, L.H.; Lu, J.; Zhang, Q.; Yu, Q. Receptor Tyrosine Kinase Phosphorylation Pattern-Based Multidrug Combination Is an Effective Approach for Personalized Cancer Treatment. *Mol. Cancer Ther.* 2016, 15, 2508–2520. [CrossRef] [PubMed]

49. Oh, T.I.; Lee, J.H.; Kim, S.M.; Nam, T.J.; Kim, Y.S.; Kim, B.M.; Yim, W.J.; Lim, J.H.; et al. Fascaplysin Sensitizes Anti-Cancer Effects of Drugs Targeting AKT and AMPK. *Molecules* 2017, 23, 42–53. [CrossRef] [PubMed]

50. Kim, Y.S.; Lee, Y.M.; Oh, T.I.; Shin, D.H.; Kim, G.H.; Kan, S.Y.; Kang, H.J.; Kim, J.H.; Kim, B.M.; Yim, W.J.; Lim, J.H.; et al. Emodin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to the Anti-Cancer Effect of Sorafenib through Suppression of Cholesterol Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3127–3143. [CrossRef] [PubMed]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.