



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0129262
(43) 공개일자 2019년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/537 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 36/736 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/537 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0053631

(22) 출원일자 2018년05월10일

심사청구일자 2018년05월10일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김봉이

서울특별시 강동구 진황도로47길 43, 701호(길동, 상스빌)

송효숙

서울특별시 종로구 평창10길 5

(74) 대리인

위병갑

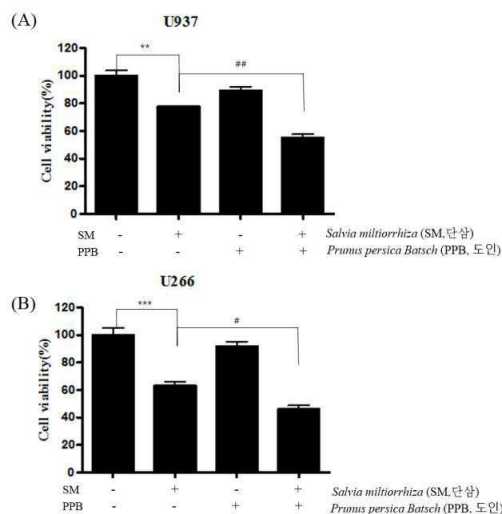
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 단삼 및 도인 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 단삼 및 도인 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단삼 추출물 및 도인 추출물은 이들 추출물을 단독 처리하였을 때 보다 병용 처리하였을 때 다발성 골수종 세포주의 생존율을 더욱 효과적으로 감소시키고, 세포고사 마커인 cleaved-PARP, Cleaved caspase 3 및 소포체 스트레스 마커인 CHOP, P-eIF2 α 발현량을 월등히 증가시키는 활성을 가지고 있어, 다발성 골수종을 비롯한 암의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/736 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1D1A1B03933656

부처명 교육부, 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 기본과제

연구과제명 Scaffold를 이용한 접골산 및 접골공진단의 골 재생 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국연구재단(학술진흥)

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, C₁-C₄의 저급 알코올, 헥산, 에틸 아세테이트, 염화 메틸렌, 아세토니트릴, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매 추출물인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 CTH 생성 종양, 급성 림프구성 또는 림프아구성 백혈병, 급성 또는 만성 림프구성 백혈병, 급성 비 림프구성 백혈병, 방광암, 뇌종양, 유방암, 경관암, 만성 골수성 백혈병, 장암, T-존 림프종, 자궁내막증, 식도암, 담즙 방광암, 에빙스 육종(Ewing's sarcoma), 두 및 목암, 설암, 홉킨스 림프종, 카포시스 육종, 신장암, 간암, 폐암, 중피종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 비홉킨 림프종, 골육종, 난소암, 신경아세포종, 유선암, 경관암, 전립선암, 췌장암, 대장암, 페니스암, 레티노블라스토마, 피부암, 위암, 갑상선암, 자궁암, 고환암, 윌름스 종양, 및 트로포블라스토마로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 다발성 골수종 세포주의 생존율을 억제 또는 감소시키는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포고사 마커인 cleaved-PARP, Cleaved caspase 3 및 소포체 스트레스 마커인 CHOP, P-eIF2 α 의 발현량을 촉진 또는 증가시키는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 개선용 건강 기능 식품.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 건강 기능 식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 개선용 건강 기능 식품.

청구항 8

약학적으로 유효한 양의 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 인간을 제외한

개체에 투여하여 다발성 골수종 세포주의 생존율을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단삼 및 도인 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다발성 골수종은 백혈병, 림프종과 함께 대표적인 혈액종양으로 B림프구의 성숙형태인 형질세포가 증식하는 혈액암이다. 평균 65세 이상의 고령에서 발병하고, 비교적 동양인에서는 낮은 발병율을 보이며, 1980년대 우리나라 발병율은 연간 100명이내로 매우 낮았다. 그러나 급속한 산업화에 따른 공해, 환경호르몬에 노출증가, 고령화로 인해 다발성 골수종 환자는 지속적으로 증가하고 있다. 지난 20년간 다른 암종의 발생률은 5배의 증가에 머물렀으나, 다발성 골수종의 경우, 약 30배 이상의 발생 증가를 보이고 있다. 2016년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 2014년에 우리나라에서는 217,057건의 암이 발생했는데, 그 중 다발성골수종(C90)은 1,396건으로 전체 암 발생의 0.6%를 차지 하는 질병으로써 발병시 완치가 어려운 질병 중 하나이다.

[0003] 형질세포는 B림프구가 항원에 자극을 받아 최종적으로 분화되는 세포로 혈액이나 조직 내에 존재하며, 체내에 침입한 바이러스나 세균 등에 대항해 싸우는 단백질(항체, 면역글로불린)을 생산, 저장, 분비하는데 혈액속의 형질세포는 B세포가 외부에서 들어온 침입자(항원)와 싸우기 위해 최종적으로 분화된 세포로써 이 형질세포와 골수에서는 각종 사이토카인이라는 단백을 분비해 우리 몸에 필요한 항체를 만들게 되는데, 증상으로는 뼈의 용해성 병변, 신부전, 빈혈, 반복되는 감염 등으로 인한 골통증, 어지럼증 등의 여러 가지 임상증상을 나타낸다. 그러나 임상증상이 나타나기 전에 보통 일정기간의 무증상 기간이 선행되며 다발성골수종 환자의 20%는 증상 없이 우연히 발견되기도 한다.

[0004] 현재 시행되고 있는 치료법으로는 항암화학요법, 자가조혈모세포이식, 동종조혈모세포이식, 방사선치료 등이 있으나 치료과정에서 정상 세포들이 손상되어 여러 가지 합병증을 초래하기도 한다. 이에 본 발명자들은 부작용을 최소화 하고, 상승효과를 기대해 볼수 있는 천연 한방 재료를 이용하여 다발성 골수종 치료제를 개발 하고자 본 연구를 수행하였다.

[0005] 또한, 소포체 (ER)에서 unfolded protein이 축적되어 나타나는 반응이 unfolded protein response (UPR)인데 이러한 반응이 일어나도록 하는 자극들을 ER stress라고 부른다. 실험적으로는 ER은 산화적환경을 유지하고 있기 때문에 세포에 DTT나 beta-mercaptoethanol과 같은 환원제를 처리하면 UPR가 일어나게 된다. ER stress는 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 단백질이 소포체 내로 유입되거나 소포체 내 칼슘이 고갈돼 소포체 기능에 장애가 발생하는 상태를 일컫는데, 이는 암의 발달과 유지에 영향을 주기 때문에 중요한 암 치료 타겟으로 생각되고 있다. ER stress가 심해지면 손상된 세포를 제거하기위해 세포사멸 (apoptosis)을 유도한게 되는데 이 과정에서 따라서, 본 발명자들은 다발성 골수암 세포주에서 단삼 추출물 및 도인 추출물을 이용하여 ER stress와 ROS로 유도된 Apoptosis 기전을 연구 수행하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1135576호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제1585523호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 다발성 골수종을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 새로운 치료제를 연구하던 중, 단삼 추출물 및 도인 추출물을 단독으로 처리하였을 때보다 병용 처리하였을 때 다발성 골수종 세포주의 생존율을 더욱 효과적으로 감소시키고, 세포고사 마커인 cleaved-PARP, Cleaved caspase 3 및 소포체 스트레스 마커인

CHOP, P-eIF2 α 발현량을 월등히 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 개선용 건강 기능 식품을 제공하는 것이다.

[0010] 나아가 본 발명의 다른 목적은 약학적으로 유효한 양의 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 다발성 골수종 세포주의 생존율을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁-C₄의 저급 알코올, 헥산, 에틸 아세테이트, 염화 메틸렌, 아세토니트릴, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매 추출물일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 CTH 생성 종양, 급성 림프구성 또는 림프아구성 백혈병, 급성 또는 만성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 방광암, 뇌종양, 유방암, 경관암, 만성 골수성 백혈병, 장암, T-존 림프종, 자궁내막증, 식도암, 담즙 방광암, 에빙스 육종(Ewing's sarcoma), 두 및 목암, 설암, 흡킨스 림프종, 카포시스 육종, 신장암, 간암, 폐암, 중피종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 비흡킨 림프종, 골육종, 난소암, 신경아세포종, 유선암, 경관암, 전립선암, 췌장암, 대장암, 페니스암, 레티노블라스토마, 피부암, 위암, 갑상선암, 자궁암, 고환암, 윌름스 종양, 및 트로포블라스토마로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 다발성 골수종 세포주의 생존율을 억제 또는 감소시킬 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 세포고사 마커인 cleaved-PARP, Cleaved caspase 3 및 소포체 스트레스 마커인 CHOP, P-eIF2 α 의 발현량을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 건강 기능 식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태일 수 있다.

[0018] 나아가 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 다발성 골수종 세포주의 생존율을 감소시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 단삼 추출물 및 도인 추출물은 이들 추출물을 단독 처리하였을 때 보다 병용 처리하였을 때 다발성 골수종 세포주의 생존율을 더욱 효과적으로 감소시키고, 세포고사 마커인 cleaved-PARP, Cleaved caspase 3 및 소포체 스트레스 마커인 CHOP, P-eIF2 α 발현량을 월등히 증가시키는 활성을 가지고 있어, 다발성 골수종을 비롯한 암의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a는 단삼, 도인 추출물을 단독 혹은 병합 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 1b는 단삼, 도인 추출물을 단독 혹은 병합 처리에 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U266의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 2a는 단삼, 도인 추출물을 단독 혹은 병합 처리에 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937의 세포사멸 관련 단백질과 ER스트레스 유발 관련 단백질의 발현 정도를 확인한 결과이다.

도 2b는 단삼, 도인 추출물을 단독 혹은 병합 처리에 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U266의 세포사멸 관련

단백질과 ER스트레스 유발 관련 단백질의 발현 정도를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 앞서 종래기술에서도 기술한 바와 같이, 현재 시행되고 있는 치료법으로는 항암화학요법, 자가조혈모세포이식, 동종조혈모세포이식, 방사선치료 등이 있으나 치료과정에서 정상 세포들이 손상되어 여러 가지 합병증을 초래하기도 한다.
- [0023] 이에 본 발명자들은 상기 치료법의 부작용을 최소화 하고, 상승효과를 기대해 볼수 있는 천연 한방 재료를 이용하여 다발성 골수종 치료제를 개발 하고자 본 연구를 수행하였으며, 단삼 및 도인 추출물을 병용 사용하였을 때 이를 단독으로 사용하였을 때보다 다발성 골수종의 치료 효과가 월등히 높음을 실험을 통해 확인하였다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에서 상기 “암”은 CTH 생성 종양, 급성 림프구성 또는 림프아구성 백혈병, 급성 또는 만성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 방광암, 뇌종양, 유방암, 경관암, 만성 골수성 백혈병, 장암, T-존 림프종, 자궁내막증, 식도암, 담즙 방광암, 에빙스 육종(Ewing's sarcoma), 두 및 목암, 설암, 홉킨스 림프종, 카포시스 육종, 신장암, 간암, 폐암, 중피종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 비홉킨 림프종, 골육종, 난소암, 신경아세포종, 유선암, 경관암, 전립선암, 췌장암, 대장암, 페니스암, 레티노블라스토마, 피부암, 위암, 갑상선암, 자궁암, 고환암, 윌름스 종양, 및 트로포블라스토마로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 가장 바람직하게는 다발성 골수종일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 상기 단삼 및 도인의 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 단삼 및 도인을 대상으로 추출물을 분리 및 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 ‘추출물’은 적절한 용매를 이용하여 단삼 및 도인으로부터 추출할 수 있다. 이때 추출물을 수득하기 위해 사용할 수 있는 적절한 용매로는 당업계에서 허용되는 용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0027] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 단삼 및 도인추출물의 제조 방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0029] 또한 상기 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0030] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0031] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한

되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 단삼 및 도인 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 50 중량%로 포함될 수 있다.

[0033] 나아가 본 발명의 조성물은 암 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물 이외에도 식품 조성물로 사용될 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 단삼 및 도인추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0034] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0036] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 단삼 및 도인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0037] 본 발명의 유효성분인 단삼 및 도인 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 건강기능식품은 암을 개선 및 예방하기 위한 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0040] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정 이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0041] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0042] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 단삼 및 도인추출물을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0043] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 단삼 및 도인 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 단삼 및 도인 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필

요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0044] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 단삼 및 도인 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0045] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 단삼 및 도인 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0046] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태로 제조될 수 있으며, 예로 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0047] 나아가 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 다발성 골수종 세포주의 생존율을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0049] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0051] <실시예 1>

[0052] 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물 제조 방법

[0053] 100% 에탄올 1L에 단삼 1kg을 삼각 플라스크에 넣고 상온에서 96시간 추출한 뒤 거름종이로 약재를 걸러주었다. 알코올 추출액을 100ml씩 50℃에서 3시간 동안 감압 농축한 후 -80℃에서 4~10Pa 압력으로 6시간동안 동결 건조시킨 후 다시 -80℃에서 열려 주고 다시 동결 건조를 시키는 작업을 3회 반복 하였다. 이후 약 수저를 이용하여 동결 건조시킨 단삼 추출물을 긁어 낸 후 무게를 측정하여 수득물을 계산하였다. DMSO(dimethyl sulfoxide) 1ml에 단삼 추출물을 200mg으로 녹여 200mg/ml의 농도로 Stock 을 만든 후 1.5ml 튜브에 넣어 -20℃에 보관 하였다.

[0055] <실시예 2>

[0056] 도인(*Prunus persica Batsch*) 추출물 제조 방법

[0057] 1차 증류수 3L에 도인 150mg을 넣고, 약 91.5℃~96.5℃ 온도에서 약 3시간 가량 열수 추출 뒤 거름종이로 약재를 걸러주었다. 열수 추출액을 100ml씩 50℃에서 3시간 동안 감압 농축한 후 -80℃에서 4~10Pa 압력으로 6시간 동안 동결 건조시킨 후 다시 -80℃에서 열려 주고 다시 동결 건조를 시키는 작업을 3회 반복 하였다. 이후 약 수저를 이용하여 동결 건조시킨 도인 추출물을 긁어 낸 후 무게를 측정하여 수득물을 계산하였다. 멸균시킨 증류수 1ml에 도인 추출물을 200mg으로 녹여 200mg/ml의 농도로 Stock 을 만든 후 1.5ml 튜브에 넣어 -20℃에 보관 하였다.

[0059] <실험예 1>

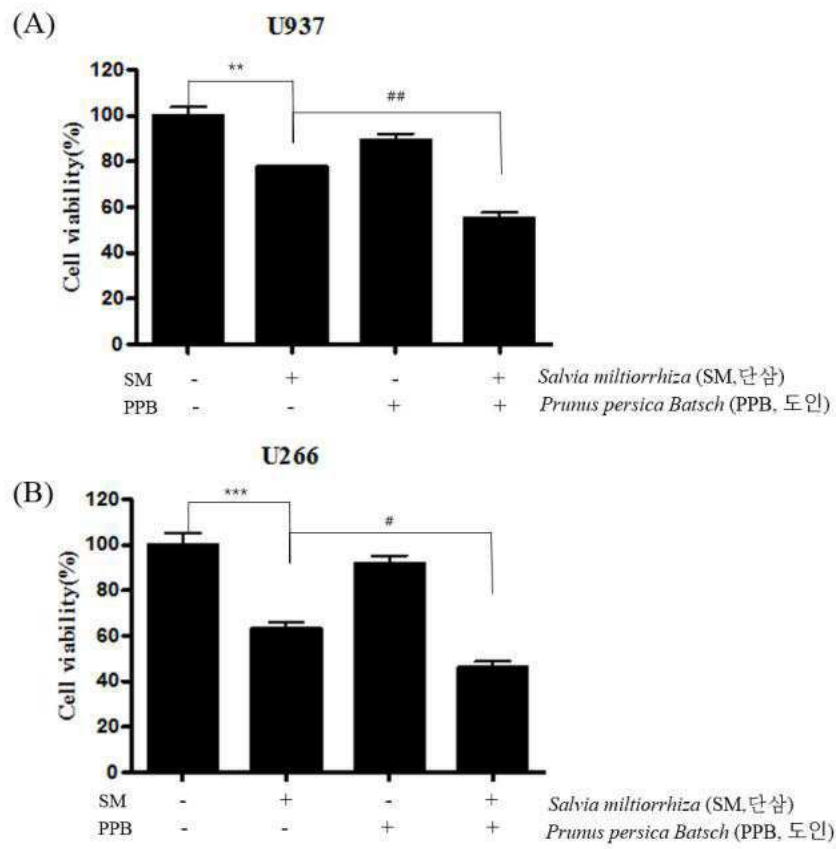
[0060] 단삼, 도인 추출물의 병합 처리 시 다발성 골수종에 대한 세포 독성 확인

[0061] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 단삼 추출물과 도인 추출물의 병합 처리 시 다발성 골수종에 대한 항암 활성을 확인하기 위하여, 다발성 골수종 세포주인 U937 세포주 (한국세포주은행)와 U266 세포주 (ATCC) 50 μ l를 96웰-플레이트에 2 $\times$ 10⁴ 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)을 첨가한 RPMI 배지에서, 37℃의 5% CO₂인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다.

- [0062] 배양한 세포주 U937와 U266에 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 단삼, 도인 추출물을 0, 50 μ g/ml의 농도로 각각 50 μ l씩 단독 혹은 병합 처리한 뒤, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 세포에 EZ-Cytox 시약 (DoGen)을 10 μ l 처리하고 30분 내지 4시간 동안 인큐베이션한 뒤, 마이크로플레이트 리더기 (Bio-rad Model 680)를 이용하여 흡광도 450nm 파장대에서 세포 생존율을 확인하였다.
- [0063] 본 발명의 도 1a 및 도 1b에는 단삼 추출물과 도인 추출물의 단독 혹은 병합 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937과 U266의 세포 생존율 결과를 나타내었다.
- [0064] 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이, 단삼 추출물과 도인 추출물의 단독 처리군에 비해 병합 처리군에서 다발성 골수종에 독성 효과가 더 크게 나타남을 확인 함으로써 다발성 골수종의 세포 사멸에 상승효과를 확인할 수 있었다.
- [0066] <실험예 2>
- [0067] 단삼, 도인 추출물의 병합 처리에 의한 다발성 골수종의 세포사멸 및 소포체스트레스 유발 효과 확인
- [0068] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 단삼 추출물과 도인 추출물이 다발성 골수종에서의 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포사멸 진행시 절단되는 것으로 알려진 PARP(Poly ADP ribose polymerase)와 DNA 손상을 유도하고 ER 스트레스를 유발하여 세포사멸의 마커로 이용되는 CHOP(C/EBP homologous protein)의 발현 정도를 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다.
- [0069] 다발성 골수종 세포주인 U937와 U266 세포주에 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 단삼,도인 추출물을 0, 50 μ g/ml로 단독 혹은 병합처리하고 24시간 동안 37℃의 5% CO₂인큐베이터로 인큐베이션 하였다. 그 후, 세포를 수집하여 PBS로 워싱하고, 세포 파쇄 버퍼 RIPA (20mM Tris-HCL (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM NaEDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium pyrophosphate, 1mM beta-glycerophosphate, 1mM Na₃VO₄및 1 μ g/ml leupeptin (Cell signaling)를 첨가하여 30분간 4℃에서 세포 파쇄하였다.
- [0070] 세포파쇄물을 15,520 $\times$ g에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거한 후, RC DCTTM Protein Assay Kit II(protein assay kit) (Bio-rad, USA)를 사용하여 단백질을 정량하여 시료별 (왕불류행 추출물 0, 20 및 40 μ g/ml 처리군들)로 동일한 단백질의 양이 포함되도록 조절하였다. 준비된 단백질 시료에 5 $\times$ 로딩 다이를 넣고 5분 동안 95℃로 가열하여 단백질을 변성시켰다.
- [0071] 그 후, 8~10% SDS-PAGE 젤에 시료를 로딩하여 90 내지 100V로 1시간 30분 내지 3시간 동안 전기영동을 수행하였으며, 젤 위에서 분리된 단백질을 200mA~300mA로 1시간 내지 2시간 동안 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 단백질을 트랜스퍼된 멤브레인을 5% 스킵 밀크가 포함된 TBST (tris buffered saline, pH 7.5) 용액으로 상온에서 1시간 동안 블로킹한 뒤 1차 항체 항-PARP 및 항-CHOP 를 각각 1:500으로 희석하여 블로킹한 멤브레인과 4℃에서 오버나잇으로 반응시켰다.
- [0072] 멤브레인을 TBST로 3회 워싱한 뒤 horseradish peroxidase가 결합된 항-rabbit IgG를 1:1,000으로 희석하여 상온에서 멤브레인과 2시간 동안 반응시킨 다음 TBST로 3회 워싱하였다. 워싱한 멤브레인을 chemiluminescent reagent와 1 내지 3분 동안 반응시키고 필름에 감광하여 단백질 밴드를 가시화하였다.
- [0073] 단삼, 도인 추출물의 병합 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937과 U266의 세포사멸 관련 단백질과 ER스트레스 유발 관련 단백질의 발현 정도를 확인한 결과, 본 발명의 도 2a 및 도 2b에 나타낸 바와 같이 단삼, 도인 추출물의 병합 처리 시 단독 처리군에 비해 세포고사 마커인 cleaved-PARP, Cleaved caspase 3 와 소포체 스트레스 마커인 CHOP, P-eIF2 α 발현량을 상승시키는 것을 확인 할 수 있었다.
- [0075] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

