(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0092695
(43) 공개일자 2015년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 36/185* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0128288
(22) 출원일자 2014년09월25일
심사청구일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
1020140013044 2014년02월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**최인근**
서울특별시 서초구 바우뫼로33길 34, 1동 302호(양재동, 일건빌라)
**서재홍**
경기도 과천시 관문로 128, 1018동 303호(중앙동, 주공아파트)
**홍순오**
경기도 용인시 수지구 수지로 166, 107동 1003호(풍덕천동, 태영데시앙아파트)
(74) 대리인
**특허법인다나**

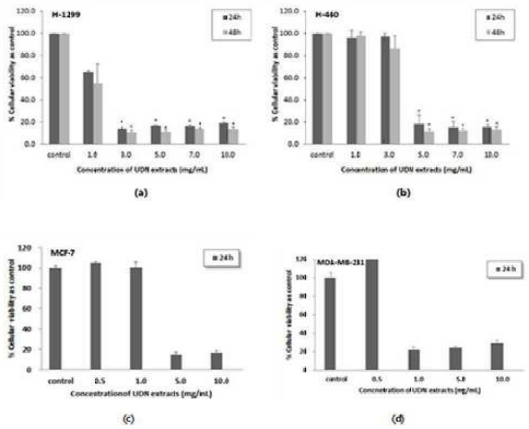
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 느릅나무 추출물은 암세포 자멸사 뿐만 아니라 암세포 자가소화 경로로도 암세포 사멸을 유도하는 이중 세포 사멸(Effect of dual cell death pathways)현상을 나타내며, 이를 통한 방사선 민감성 증진 효과가 우수하므로, 방사선 민감성 증진제 및 항암 치료 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 느릅나무 추출물은 뿌리 또는 줄기의 껍질로부터 추출한 것을 특징으로 하는, 방사선 민감성 증진용 약학적 조성물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 느릅나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 아세톤(acetone), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran) 또는 이들의 혼합 용매로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는, 방사선 민감성 증진용 약학적 조성물.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 느릅나무 추출물은 느릅나무를 80 내지 120℃에서 2 내지 48시간 동안 용매에 침지하여 추출한 것을 특징으로 하는, 방사선 민감성 증진용 약학적 조성물.

### 청구항 5

느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 치료 보조용 약학적 조성물.

### 청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 암은 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 구강암, 구강인두암, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 유방암, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 소장암, 갑상선암, 부갑상선암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구림프종, 방광암, 신장암, 간암, 대장암 또는 뇌암인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 7

느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 치료 보조용 식품 조성물.

## 발명의 설명

## 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 암의 치료법은 수술, 방사선치료법, 항암화학요법으로 크게 나눌 수 있는데, 현재 국내에서 방사선치료를 받는 암 환자의 수가 매년 증가하고 있는 추세에 있어 암 치료에 있어 방사선 치료의 중요성 또한 증가하고 있다.

[0003] 방사선 치료는 현재 다양한 종류의 암에 필수적인 치료 방법으로 알려져 있으나, 암세포의 방사선 내성 획득, 고선량의 방사선 치료시 정상조직의 손상 등이 방사선치료의 효율을 저하시키는 문제점으로 지적되어 왔다. 따라서, 방사선 치료의 효율을 증진시키기 위한 방사선 치료 민감제에 대한 연구가 시도되고 있으나, 현재까지 보고된 방사선 치료 민감제는 주로 항암제들로서, 예를 들어 탁솔(Taxol)과 시스플라틴(cisplatin) 등이 보고되어 있다.

[0004] 또한, 항암제로서의 성질은 지니지 않고 방사선 치료에만 사용되는 방사선 치료 효과 증진제로는 티라파자민(tirapazamine)이 있으나 저산소증의 종양세포에만 효과가 있으며, 저산소상태 특유의 종양 내부 압력 때문에 종양 조직 내부로의 약물전달이 미흡하여 임상적 방사선 치료에서 효과가 미약하다고 알려져 있다[비특허문헌 1~3].

[0005] 그러나, 상기와 같이 방사선 치료 효과를 증진시키기 위해 사용되는 항암제들을 방사선 치료와 병용할 때, 항암제의 독성이 방사선 치료시 나타나는 부작용, 즉, 방사선 치료부위의 염증, 위장장애, 오심, 구토, 설사 등과 복합적으로 나타날 수 있기 때문에 사용에 제한이 있다는 단점이 있다. 특히, 중추신경계의 암은 성상세포(astrocyte)와 희돌기세포(oligodendrocyte) 같은 신경교(glia)를 포함한 다른 세포 계열로부터 발생한다. 성상세포종(astrocytic tumor, astrocytomas)은 인접한 미세환경과 어떻게 상호작용을 하는가에 따라 미만성 성상세포종(diffuse astrocytoma)와 국소성 성상세포종(localized astrocytoma)으로 나눌 수 있다. 국소성 성상세포종은 주위의 미세환경과 경계가 뚜렷한 증식과 제한적인 침윤 잠재성을 가지는 반면에 종양 등급(tumor grade)과는 상관없이 미만성 성상세포종은 peritumoral margin과 주된 종양 형성부위로부터 먼 곳에서 세포침윤의 특성을 가지고 있다. 미만성 성상세포종(diffuse astrocytoma)은 astrocytoma(World Health Organization[WHO] grade), anaplastic astrocytoma(WHO grade), glioblastoma multiform(GBM, WHO grade)의 세 가지로 분류된다. 세 가지 등급의 미만성 성상세포종은 침윤 특성을 가지고 있으며 특히 GBM(신경교종)은 더 높은 증식률, 괴사와 저산소증, 혈관형성, 뇌의 지지구조에 높은 침윤 및 암 재발율이 높은 특성을 가지고 있고, 다른 조직으로의 전이가 용이하기 때문에 이들의 암 치료능을 높이기 위한 다양한 시도가 이루어져 왔지만, 화학치료만으로는 한계가 있으며, 방사선 치료시에도 암세포가 방사선 저항성을 획득하게 되어 제대로 치료되지 않은 문제점이 있었다.

[0006] 또한, 뇌종양 치료에 있어 수술적 치료 및 항암제 치료와 더불어 방사선 치료는 뇌종양 치료에 있어 중요한 치료법이다. 뇌종양 중 WHO grade인 GBM 뇌종양 환자는 수술적 치료, 항암제 치료, 방사선 치료 또는 복합적인 치료(e.g. 방사선 치료와 항암제 치료 또는 수술적 치료와 방사선 치료)에도 불구하고 예후(암 재발)가 좋지 않으며 평균 생존율이 1년이며 5년 생존율은 5% 미만이다. 뇌종양 치료법 중 방사선 요법은 방사선에 의한 DNA 손상에 대하여 세포는 세포 주기를 지연(DNA damage checkpoint)시키거나 세포사멸(apoptosis)을 유도하여 비정상 세포를 제거하는 방법이다. 그러나 방사선 요법의 문제점은 암세포의 내재적인 방사선 저항성과 방사선 치료에 따른 내성증가로 인해서 방사선 저항성 암세포들이 암의 재발을 유발시키며 방사선 저항성 세포는 항암제에도 내성을 가진다.

[0007] 따라서, 방사선에 대해서 내재적인 방사선 저항성을 가진 암세포의 방사선 민감성을 증진시키면서 부작용은 최소화되어 방사선 요법을 최적화할 수 있는 방사선 민감성 증진제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0008] 한편, 느릅나무(Ulmus davidiana var. japonica)는 쌍떡잎식물 쐐기풀목 느릅나무과의 낙엽활엽 교목이다. 봄에 어린잎은 식용으로 사용하며 껍질을 유피라고 하고 특히 뿌리껍질을 유근피라고 한다. 느릅나무에는 종류가 여러 가지가 있다. 그 중 참느릅나무와 둥근 참느릅나무, 좀참느릅나무는 열매가 9~10월에 익고, 당느릅나무, 혹느릅나무, 떡느릅나무 등은 4~5월에 익는다. 이들 나무는 열매 익는 시기와 껍질의 생김새만 다를 뿐 잎 모양이나 약으로의 쓰임새는 같다.

[0009] 느릅나무는 예로부터 종기나 종창에 효과가 있는 나무로 알려져 왔으며 최근에는 항산화 효과, 아질산염 제거능과 치과 카리에스에 대한 항세균 효과에 대한 보고가 있다[비특허문헌 4].

[0010] 동의보감에서 느릅나무는 성질이 평하고 맛이 달고 독이 없으며 부드러워 대소변을 잘 통하게 하고 장, 위의 사열을 없애 장염에 효과적이며 부은 것을 가라앉히고 불면증을 낫게 한다고 하였다. 그러나, 현재까지 느릅나무 추출물의 방사선 민감성 증진 효과에 대해서는 알려진 바 없으며, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Hicks KO, Pruijn FB, Secomb TW, Hay MP, Hsu R, Brown JM, et al., Use of three-dimensional tissue cultures to model extravascular transport and predict in vivo activity of hypoxia-targeted anticancer drugs. J Natl Cancer Inst 2006 ; 98 : 1118-28.

(비특허문헌 0002) Kyle AH, Minchinton AI. Measurement of delivery and metabolism of tirapazamine to tumour tissue using the multilayered cell culture model. Cancer Chemother Pharmacol 1999 ; 43 : 213-20.

(비특허문헌 0003) Hicks KO, Pruijn FB, Sturman JR, Denny WA, Wilson WR. Multicellular resistance to tirapazamine is due to restricted extravascular transport: a pharmacokinetic/pharmacodynamic study in HT29 multicellular layer cultures. Cancer Res 2003 ; 63 : 5970-7.

(비특허문헌 0004) Lee, S. J. and K. T. Lim (2007). UDN glycoprotein regulates activities of manganese-superoxide dismutase, activator protein-1, and nuclear factor-kappaB stimulated by reactive oxygen radicals in lipopolysaccharide-stimulated HCT-116 cells, Cancer Lett 254(2): 274-287.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 이에, 본 발명자들은 새로운 방사선 민감성 증진용 조성물을 개발하기 위해 연구를 수행한 결과, 느릅나무 추출물이 암세포 자가소화 경로 및 세포자멸사 경로를 통한 우수한 방사선 민감성 증진 효과를 가지고 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 본 발명의 목적은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 치료 보조용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 해결 수단으로, 본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 상기 목적을 달성하기 위한 다른 해결 수단으로, 본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 치료 보조용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 해결 수단으로, 본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 치료 보조용 식품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 느릅나무 추출물은 암세포 자멸사 뿐만 아니라 암세포 자가소화 경로로도 암세포 사멸을 유도하는 이중 세포 사멸(Effect of dual cell death pathways)현상을 나타내며, 이를 통한 방사선 민감성 증진 효과가 우수하며, 방사선 민감도가 높을수록 효과는 배가 되고, 방사선 조사량도 줄일 수 있어 방사선 치료에 의한 부작용을 최소화할 수 있으므로, 방사선 민감성 증진제 및/또는 항암 치료 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 폐암 세포주(H-1299, H-460) 및 유방암 세포주(MDA-MB-231, MCF-7) 에 대한 느릅나무 열수 추출물의 세포독성 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 2은 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 세포 외관을 트리판블루 염색으로 관찰한 이미지 및 이의 세포생존율을 나타낸 도면이다.

도 3은 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 외형의 변화를 Hoechst 33342 염료로 염색하여 관찰한 도면이다.

도 5는 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 Annexin V 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 MDC 염색 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 방사선 조사에 따른 세포독성 효과를 나타낸 도면이다[(a) 콜로니형성 분석법을 실시하였다. 세포는 x-ray에 표시된 용량에 노출시킨 후 콜로니 형성능의 결정을 위해 14일간 무약물 배지에서 배양시켰다. 오차 막대는 3회 실험에서의 표준편차(SEM)을 나타내었다. 현미경 관찰을 통하여 50개 이상의 세포를 가진 콜로니의 수를 측정하되, 방사선 조사한 샘플의 콜로니 형성수를 방사선 미조사 샘플의 콜로니 형성수로 나누어 생존율을 산출하였다. (b) 트리판 블루 배제법으로 폐암 세포주 H-1299과 H-460에서의 방사선 조사 후, 0일째, 무약물 배지에서 배양한 5~6일째 세포 생존율을 평가하였다. 데이터는 방사선 조사하지 않은 무처리 대조군과 대비한 상대적 세포 생존율(%)을 나타낸 것으로, 3회 반복 실험한 평균표준편차로 표시하였다].

도 8은 느릅나무 추출물과 방사선 병행 치료를 효과 평가를 위한 분석 프로토콜이다.

도 9는 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 방사선 민감도를 나타낸 도면이다.[(a) 세포에 약물 처리 후 14일간 무약물 배지에서 배양시켜 형성된 콜로니를 관찰 및 비교함으로 약물의 세포 독성을 측정하는 콜로니형성 분석법을 실시하였다. 세포는 느릅나무 추출물을 24시간 동안 처리한 후, x-ray에 표시된 용량에 노출시키고, 콜로니 형성능의 결정을 위해 14일간 무약물 배지에서 배양시켰다. 오차 막대는 3회 실험에서의 표준편차(SEM)을 나타내었다. (b) 콜로니 형성은 크리스탈 바이올렛 염색으로 확인하였다. 데이타는 느릅나물 추출물을 처리하지 않고, 방사선 조사하지 않은 무처리 대조군과 대비한 상대적 세포 생존율(%)로 나타낸 것으로, 3회 반복 실험한 평균표준편차로 표시하였다.

도 10은 방사선 증감을 평가하기 위한 기준을 설정한 것이다.

도 11은 폐암 세포주(H-1299, H-460)에 대한 느릅나무 추출물 미처리군 및 처리군의 농도 의존적으로 세포사멸 유도 효과를 나타낸 도면이다[세포는 느릅나무 추출물을 24시간 동안 처리하고, 연속적으로 방사선 조사, 트립신화, 안넥신 V와 PI로 염색하였다. 데이터는 분석된 전체 세포의 %로 초기 세포사멸 세포(안넥신 양성) 및 후기 세포사멸 세포(안넥신 양성/PI 양성)을 유동 세포 분석법을 이용하여 분석하였다. 느릅나무 추출물을 24시간 동안 처리(0-3mg/mL)하고, 방사선 조사 후 5일째 도립 위상차 현미경으로 느릅나무 추출물로 유도된 폐암 세포주(H-1299, H-460) 형태적 변화를 확인하였다. H-1299 및 H-460의 대조군 세포는 정상 형태로 표시되었다. 대조적으로, 풍부한 세포질 액포가 느릅나무 추출물 처리된 H-460 세포에서 관찰되었지만, H-1299 세포 및 방사선만 처리한 H-460 세포에서는 그렇지 않았다(배율 : 400 배). 3회 별도 실험에서 대표적인 결과만 표시하였다].

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 방사선 민감성 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 이하, 본 발명에 관하여 더욱 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명에서 방사선 민감성 증진 효과란 방사선 치료 증진 효과로, 특히 암에 대한 방사선 치료 증진 효과를 의

미한다.

[0023] 본 발명의 유효성분인 느릅나무 추출물은 일반적인 방법으로 구입하거나, 통상적인 추출 및 분획 방법에 따라 물 또는 유기용매로 추출 및/또는 분획하여 얻을 수 있다.

[0024] 상기 느릅나무 추출물은 느릅나무의 뿌리 및 줄기의 껍질로부터 추출할 수 있으며, 바람직하게는 뿌리껍질로부터 추출할 수 있다.

[0025] 상기 유기용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 아세톤(acetone), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran) 또는 이들의 혼합 용매 등을 포함하나 이에 한정하지 않는다. 바람직하게는 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매이며 더욱 바람직하게는 물이다. 필요한 경우 느릅나무 추출물의 순도를 높이기 위해 칼럼 크로마토그래피를 수행할 수 있다.

[0026] 본 발명에서는 하기와 같은 방법으로 느릅나무 추출물을 수득하였다.

[0027] 먼저, 느릅나무 100g 당 물 또는 에탄올 0.2 내지 2 L를 가한 후 80 내지 120℃, 바람직하게는 100 내지 120℃에서 2 내지 48시간 동안 침지시켜 추출액 또는 층분리된 분액을 분리하고, 추출액 및 분액은 여과 후 감압 농축하였다. 감압 농축한 추출액 및 분액을 동결건조하여 용매를 제거하여 느릅나무 추출물을 수득한다.

[0028] 암세포 사멸 경로는 암세포 자멸사(apoptosis, programmed cell death type) 및 암세포 자가소화(autophagy, programmed cell death type) 경로로 분류된다. 본 발명에 따른 느릅나무 추출물은 암세포 자멸사 뿐만 아니라 암세포 자가소화 경로로도 암세포 사멸을 유도하는 이중 세포 사멸(Effect of dual cell death pathways) 현상을 나타내며, 이를 통해 우수한 방사선 민감성 증진 효과를 가진다.

[0029] 또한, 본 발명의 구현예에서 느릅나무 추출물의 방사선 증감 효과 여부를 판단하기 위하여 세포 사멸능과 세포사 유도능을 평가하였고, 느릅나무 추출물은 방사선 치료와 병행하여 이루어졌으며, 방사선 단독 처리시와 비교 결과로 느릅나무 추출물이 방사선의 효과를 배가시키는 기능을 지니고 있음을 확인하였다.

[0030] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 느릅나무 추출물은 방사선 민감성 증진 효과가 우수하므로, 방사선 민감성 증진에 유용한 의약품 또는 의약외품으로 사용될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 느릅나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 조성물은 약학적 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.

[0033] 상기 느릅나무 추출물은 방사선 민감성을 증진시키므로 방사선을 이용하는 항암 치료에 사용될 수 있으며, 항암 치료의 효율을 높일 수 있으므로 항암 치료 보조에 유용하게 사용될 수 있다.

[0034] 상기 암은 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 구강암, 구강인두암, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 유방암, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 소장암, 갑상선암, 부갑상선암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장암, 간암, 대장암 또는 뇌암일 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제,

동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은 느릅나무 추출물과 함께 방사선 민감성 증진 또는 항암 치료 보조 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0040] 본 발명의 조성물은 방사선 민감성 증진 또는 항암 치료 보조를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물은 방사선 민감성 증진 또는 항암 치료 보조를 목적으로 의약외품 조성물에 첨가될 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물을 외약외품 조성물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0043] 본 발명에서, "건강기능식품"이란, 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.

[0044] 본 발명의 조성물은 방사선 민감성 증진 또는 항암 치료 보조를 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 느릅나무 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 느릅나무 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 느릅나무 추출물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0045] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0046] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g이다.

[0047] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0048] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1. 느릅나무 추출물 제조**

[0050] 강원도 영월 일대에서 증식한 건조된 느릅나무를 소창유통에서 구입하여 느릅나무 껍질을 100 g을 물 2 L에 넣고 8시간 열수 추출하였다. 추출 시료의 상등액을 수집하고, 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 추출액은 왓트만 여과지(Whatman filter)로 여과한 후 감압 농축하여 용매의 부피를 최소화시켰다. 감압 농축된 추출액을 -70℃로 냉동 후 동결 건조기로 분말 상태가 될 때까지 건조하여 제조하여 느릅나무 추출물 9 g을 수득하였다. 각각의 느릅나무 추출물은 10 ㎍/㎕의 농도로 녹인 후 이 후 실험에 적용하였다.

[0051] **실시예 2. 세포주 배양**

[0052] 유방암 세포주(MDA-MB-231, MCF-7) 및 폐암 세포주(H-1299, H-460)는 한국세포주은행(Korea cell line bank, KCLB)으로부터 분양받아 본 실험에 이용하였다. 각 암 세포주들을 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 항생제(anti-biotics)가 함유된 RPMI-1640 배지를 이용하여, 37℃, 5% $CO_2$ 조건이 유지되는 항온 세포 배양기에서 배양하였다.

[0053] **실험예 1. 세포독성 실험(Cell cytotoxicity test)**

[0054] **1-1. XTT 검색법(XTT assay)을 통한 세포독성 측정**

[0055] 상기 실시예 1에서 제조한 느릅나무 추출물이 세포성장의 억제 효과가 있는지 여부를 확인하기 위해 상기 실시예 2에서 배양된 암 세포들을 96-웰플레이트에 $5\times10^4$~$10^5$개/ml의 농도로 37℃, 5% $CO_2$가 공급되는 항온 세포 배양기에서 24시간 이상 전배양하였다.

[0056] 상기 추출물을 세포 배양액 대비 1:200부터 1:10 비율로 또는 0부터 1.5 ㎍/㎕ 농도로 배양된 웰 플레이트에 농도별로 각각 처리한 후 24시간 및 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 XTT assay(WelCountTM Cell Viability Assay kit, Korea)를 사용하여 세포 독성을 측정하고, XTT의 양을 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 이의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0057] 도 1에 나타낸 바와 같이, 느릅나무 추출물이 암 세포주에 대해서 강한 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 유방암 세포주와 폐암 세포주 정도의 차이는 있었으나 모두 느릅나무 추출물에 대한 민감한 독성을 나타내었다.

[0058] **1-2. 트리판블루 배제법(trypan blue exclusion assay)**

[0059] 상기 1-1에서와 동일하게 느릅나무 추출물을 세포배양액에 처리하였으며, 이를 트리판블루로 염색하였다. 트리판블루가 살아있는 세포에는 염색되지 않으므로, 세포의 외관을 관찰하여 염색여부를 확인하였으며, 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0060] 도 2에 나타낸 바와 같이, (a) H-1299 및 (b) H-460 세포에 대한 세포 생존율은 느릅나무 추출물의 처리 농도가 증가할수록 감소함을 확인하였다.

[0061] **실험예 2. 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)**

[0062] 상기 실시예 1에서 제조한 느릅나무 추출물 처리시 발생하는 암세포 내 생화학적 변화를 관찰하기 위하여 세포 사멸 및 성장에 관여하는 신호 전달 단백질의 변화를 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다.

[0063] 먼저, 상기 실시예 2에서 배양된 세포배양액에 상기 실시예 1에서 제조된 느릅나무 추출물을 적당한 농도로 첨

가하여 24시간 및 48시간 동안 처리한 후 모든 세포를 모아 라이시스 용액(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitors)을 넣고 세포를 용해하였다. 이를 4℃의 원심분리기에서 12,000 rpm의 속도로 20분간 원심분리한 후, 상층액에 있는 단백질들을 SDS-PAGE 상에서 분리하였고, 분리된 단백질을 PVDF막으로 옮긴 후, 세포사멸 과정의 표지 단백질 중 대표적인 단백질인 카스파아제-3, 카스파아제-8과 카스파아제-9에 대한 항체(Cell Signaling Technology, MA, USA)를 이용하여 웨스턴 분석을 진행하였으며, 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0064] 도 3에 나타낸 바와 같이, 느릅나무 추출물을 처리하지 않은 세포에서는 카스파아제 두 단백질이 모두 활성 분할되지 않고 활성형인 작은 크기의 단백질 조각으로 나누어지지 않아 밴드가 진하게 유지되었으나, 느릅나무 추출물을 처리한 세포에서는 처리 농도가 높아짐에 따라 카스파아제-3, 카스파아제-8과 카스파아제-9이 활성 분할을 야기하여 밴드가 점점 흐려졌으며 이를 통해 느릅나무 추출물의 암세포 세포자멸사 효과를 확인하였다.

[0065] **실험예 3. 세포자멸사(Apoptosis) 분석 실험(Annexin V analysis)**

[0066] 세포 자멸사 과정에 있는 세포(Apoptotic cell)의 외형의 변화로 세포 사멸 진행 여부를 확인할 수 있다. 상기 실험예 1에서와 같이 배양된 폐암 세포주 H-1299 및 H-460에 상기 실시예 1에서 제조한 느릅나무 추출물을 24시간 동안 처리한 군 및 미처리군을 Hoechst 33342 염료로 염색하여 외형의 변화를 관찰하였으며, 이를 도 4에 나타내었다. 이때 응축된 것은 사멸된 핵을 나타낸다.

[0067] 또한, 세포 사멸 진행시 세포의 막 인지질인 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS)이 원형질막의 안에서 밖으로 위치 이동을 하여 세포 밖의 환경에 노출되는데, 이 때 막의 불균형을 안넥신(Annexin) V 단백질을 이용하여 감지 할 수 있다. 안넥신 V 단백질을 감지하기 위하여, 배양된 폐암 세포주 H-1299 및 H-460에 대한 느릅나무 추출물 처리군 및 미처리군을 FITC Annexin V Apoptosis Detection kit(BD PharmigenTM, CA)을 사용하여 염색 후 유동 세포 분석법(flow cytometry)을 수행하였으며, 이의 결과를 도 5에 나타내었다.

[0068] 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 느릅나무 추출물에 의해 처리된 세포는 미처리된 세포에 비하여 세포자멸사의 형태를 더 많이 나타냄을 확인하였다.

[0069] **실험예 4. 세포 자가소화(Autophagy) 분석 실험(MDC staining)**

[0070] 상기 실시예 1에서 제조한 느릅나무 추출물의 세포 자가소화 유도 여부를 확인하기 위하여 상기 실험예 1에서와 같이 배양된 폐암 세포주 H-1299 및 H-460에 느릅나무 추출물을 24시간동안 처리한 군 및 미처리군을 MDC 염색하였다. 염색된 세포를 관찰하여 세포 자가 소화 여부를 확인하였으며, 이의 결과를 도 6에 나타내었다.

[0071] 도 6에 나타낸 바와 같이, 느릅나무 추출물에 의해 처리된 세포는 미처리된 세포에 비하여 세포자가소화의 형태를 더 많이 나타냄을 확인하였다.

[0072] **실험예 5. 폐암세포의 방사선 단일 치료 시 민감도 확인**

[0073] 느릅나무 추출물의 암세포 방사선 민감도 증진 효과를 검증하기에 앞서, 폐암세포에 대한 방사선 치료 효과를 평가하고, 서로 다른 폐암 세포종에 대한 방사선 치료 효과를 비교하였다. 그 실험 결과는 도 7과 같다.

[0074] 폐암의 80%를 차지하는 비소세포폐암세포 중 H-1299과 H-460을 대상으로 시행하였으며, 두 세포종을 0, 1, 3, 5, 7, 10 gray로 조사하였고, 그 결과 모두 방사선 조사량 의존적으로 암세포 성장 저해 효과를 보여주었다[도 7의 (a) 참조].

[0075] 또한, 방사선 1회 조사 후 새로운 배지 교환 조건 하에 세포의 생존 능력을 평가한 결과, 조사 후 방사선의 전형적인 세포 성장 저해 형태로 알려진 delayed effect를 보여주며, 배양 기간을 지나면서 시간 의존적으로 저해 효과가 증가되었다[도 7의 (b) 참조].

[0076] **실험예 6. 느릅나무 추출물과 방사선 병행 치료에 따른 폐암세포 성장 저해 효과 확인**

[0077] 상기 실시예 1에서 제조한 느릅나무 추출물(UDN)과 방사선 치료 병행 효과를 평가하기 위하여 다음과 같은 치료

프로토콜을 설정하였다[도 8 참조].

[0078] 도 9의 (a)에서와 같이 느릅나무 추출물은 농도 의존적으로 폐암 세포주 두 종 H-1299과 H-460에 대하여 모두 방사선 치료의 성장 저해 증가 효과와 추가적 암세포 사멸 효과를 보여주었다. 이는 또한 도 9의 (b)를 통하여 육안으로 그 효과를 확인할 수 있었다. H-1299 세포종에 대해서 방사선의 고유 특성인 delayed effects를 분명히 볼 수 있었다.

[0079] **실험예 7. 느릅나무 추출물과 방사선 병행 치료시 유도되는 추가 암세포 사멸 효과 및 세포사 유도 특성 조사**

[0080] 상기 실시예 1에서 제조한 느릅나무 추출물은 농도 의존적으로 두 폐암세포 H-1299과 H-460에서 방사선 치료에 대한 추가적인 세포사 유도 효과를 보여주었다.

[0081] 느릅나무 추출물과 방사선 병행 치료 후 농도 의존적으로 세포에서 세포질의 액포와 세포 사멸을 관찰할 수 있었다[도 11의 (c) 와 (d) 참조].

[0082] 방사선 증감을 평가하기 위한 기준을 도 10과 같이 설정하여 적용하였으며, 그 결과, 느릅나무 추출물이 방사선의 세포사 유도능을 강화시키는 것으로 분석되었다.

[0083] 도 11에서 보는 바와 같이 H-1299에 대하여 병행 처리시 각각의 세포의 유도능의 합보다 더 커지는 상승 효과를 나타내기도 하였다. 즉, α: 7.3% (방사선 3 Gray와 느릅나무 추출물 0 mg/mL 조건) + β: 66% (방사선 0 Gray와 느릅나무 추출물 2mg/mL 조건) < γ: 81% (방사선 3 Gray와 느릅나무 추출물 2mg/mL 조건); 그리고 방사선 5 Gray와 느릅나무 추출물 2mg/L의 경우도 상승 효과를 보여주었다(α: 9.6% + β: 66% < γ: 93.4%). H-460의 경우, 모두 추가적 방사선 민감도 증진 효과를 보여주었다[도 11의 (b) 참조].

[0084] 이하 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0085] **제제예 1. 약학적 조성물의 제조**

[0086] **1-1. 산제의 제조**

| | |
|---|---|
| [0087] 느릅나무 추출물 | 20 mg |
| [0088] 유당 | 100 mg |
| [0089] 탈크 | 10 mg |

[0090] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0091] **1-2. 정제의 제조**

| | |
|---|---|
| [0092] 느릅나무 추출물 | 10 mg |
| [0093] 옥수수전분 | 100 mg |
| [0094] 유당 | 100 mg |
| [0095] 스테아린산 마그네슘 | 2 mg |

[0096] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0097] **1-3. 캡슐제의 제조**

| | |
|---|---|
| [0098] 느릅나무 추출물 | 10 mg |
| [0099] 결정성 셀룰로오스 | 3 mg |

[0100] 락토오스 14.8 mg

[0101] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0102] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0103] **1-4. 주사제의 제조**

[0104] 느릅나무 추출물 10 mg

[0105] 만니톨 180 mg

[0106] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0107] $Na_2HPO_42H_2O$ 26 mg

[0108] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0109] **1-5. 액제의 제조**

[0110] 느릅나무 추출물 20 mg

[0111] 이성화당 10 g

[0112] 만니톨 5 g

[0113] 정제수 적량

[0114] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0115] **제제예 2. 식품 조성물의 제조**

[0116] **2-1. 건강식품의 제조**

[0117] 느릅나무 추출물 100 mg

[0118] 비타민 혼합물 적량

[0119] 비타민 A 아세테이트 70 g

[0120] 비타민 E 1.0 mg

[0121] 비타민 B1 0.13 mg

[0122] 비타민 B2 0.15 mg

[0123] 비타민 B6 0.5 mg

[0124] 비타민 B12 0.2 g

[0125] 비타민 C 10 mg

[0126] 비오틴 10 g

[0127] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0128] 엽산 50 g

[0129] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0130] 무기질 혼합물 적량

| | | |
|---|---|---|
| [0131] | 황산제1철 | 1.75 mg |
| [0132] | 산화아연 | 0.82 mg |
| [0133] | 탄산마그네슘 | 25.3 mg |
| [0134] | 제1인산칼륨 | 15 mg |
| [0135] | 제2인산칼슘 | 55 mg |
| [0136] | 구연산칼륨 | 90 mg |
| [0137] | 탄산칼슘 | 100 mg |
| [0138] | 염화마그네슘 | 24.8 mg |

[0139] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0140] **2-2. 건강음료의 제조**

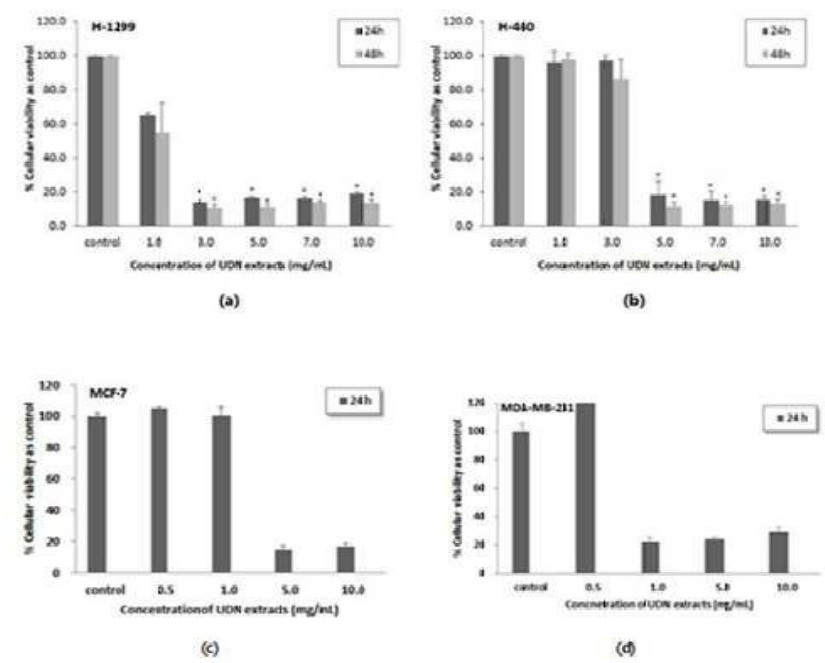
| | | |
|---|---|---|
| [0141] | 느릅나무 추출물 | 100 mg |
| [0142] | 비타민 C | 15 g |
| [0143] | 비타민 E(분말) | 100 g |
| [0144] | 젖산철 | 19.75 g |
| [0145] | 산화아연 | 3.5 g |
| [0146] | 니코틴산아미드 | 3.5 g |
| [0147] | 비타민 A | 0.2 g |
| [0148] | 비타민 B1 | 0.25 g |
| [0149] | 비타민 B2 | 0.3g |
| [0150] | 물 | 적량 |

[0151] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

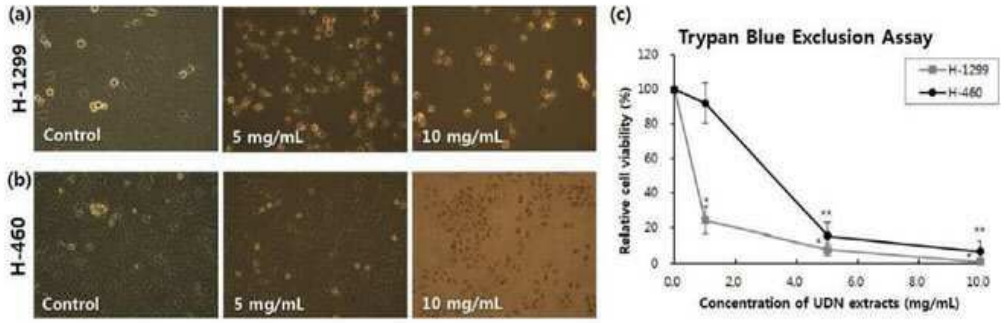
[0152] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

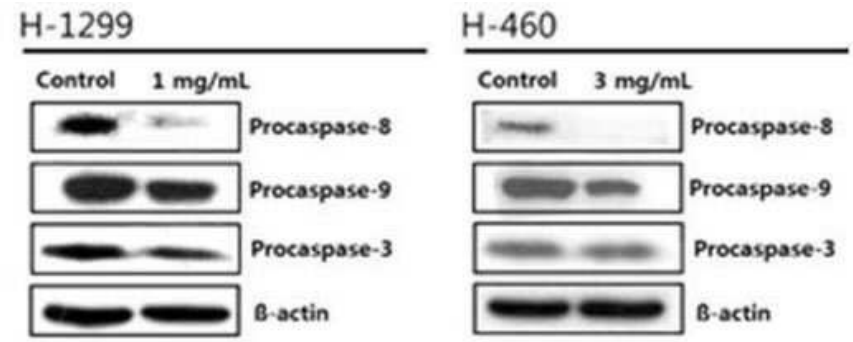
도면1


H-1299
H-460
MCF-7
MDA-MB-231
24h
48h
% Cellular viability as control
Concentration of UDN extracts (mg/mL)
(a)
(b)
(c)
(d)

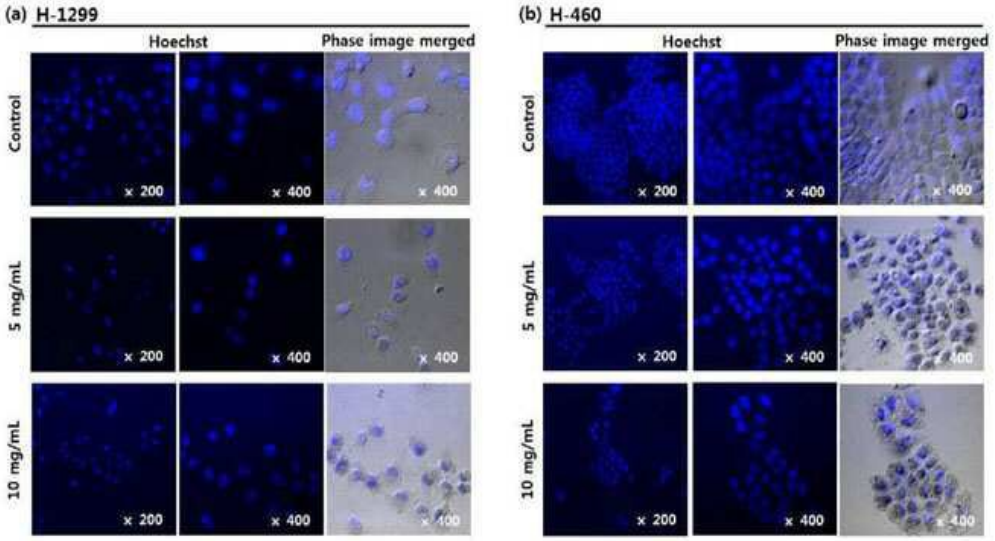
도면2


(a)
H-1299
Control
5 mg/mL
10 mg/mL
(b)
H-460
Control
5 mg/mL
10 mg/mL
(c)
Trypan Blue Exclusion Assay
H-1299
H-460
Relative cell viability (%)
Concentration of UDN extracts (mg/mL)

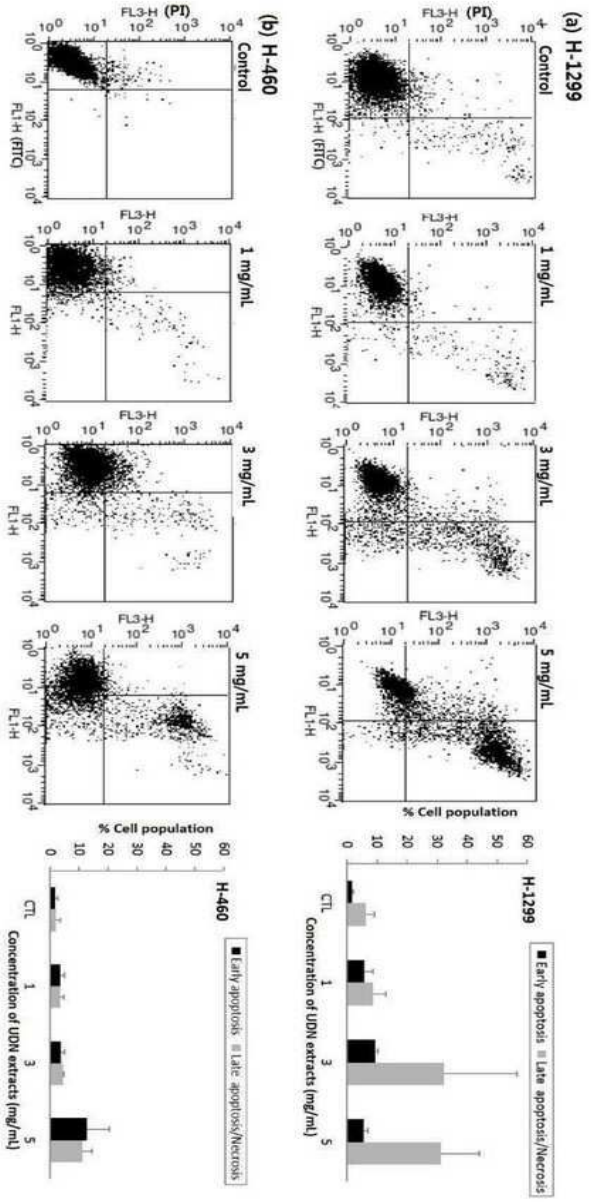
도면3


H-1299
Control
1 mg/mL
Procaspase-8
Procaspase-9
Procaspase-3
ß-actin
H-460
Control
3 mg/mL
Procaspase-8
Procaspase-9
Procaspase-3
ß-actin

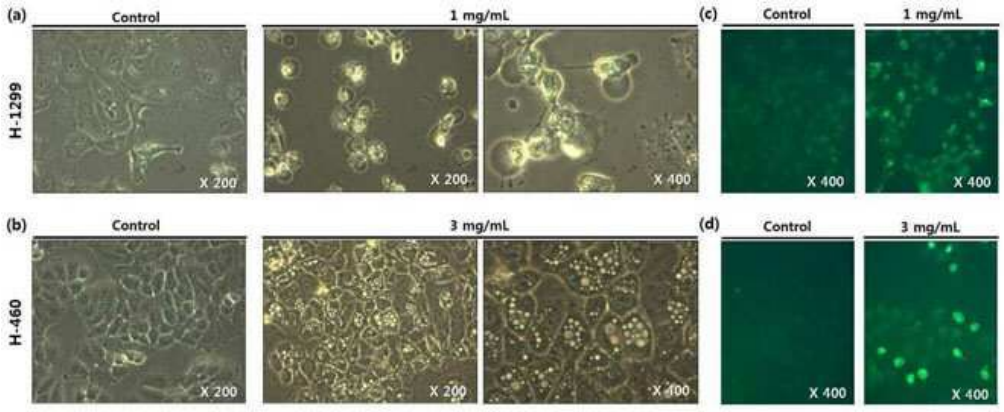
도면4


(a) H-1299
Hoechst
Phase image merged
Control
5 mg/mL
10 mg/mL
× 200
× 400
(b) H-460
Hoechst
Phase image merged
Control
5 mg/mL
10 mg/mL
× 200
× 400

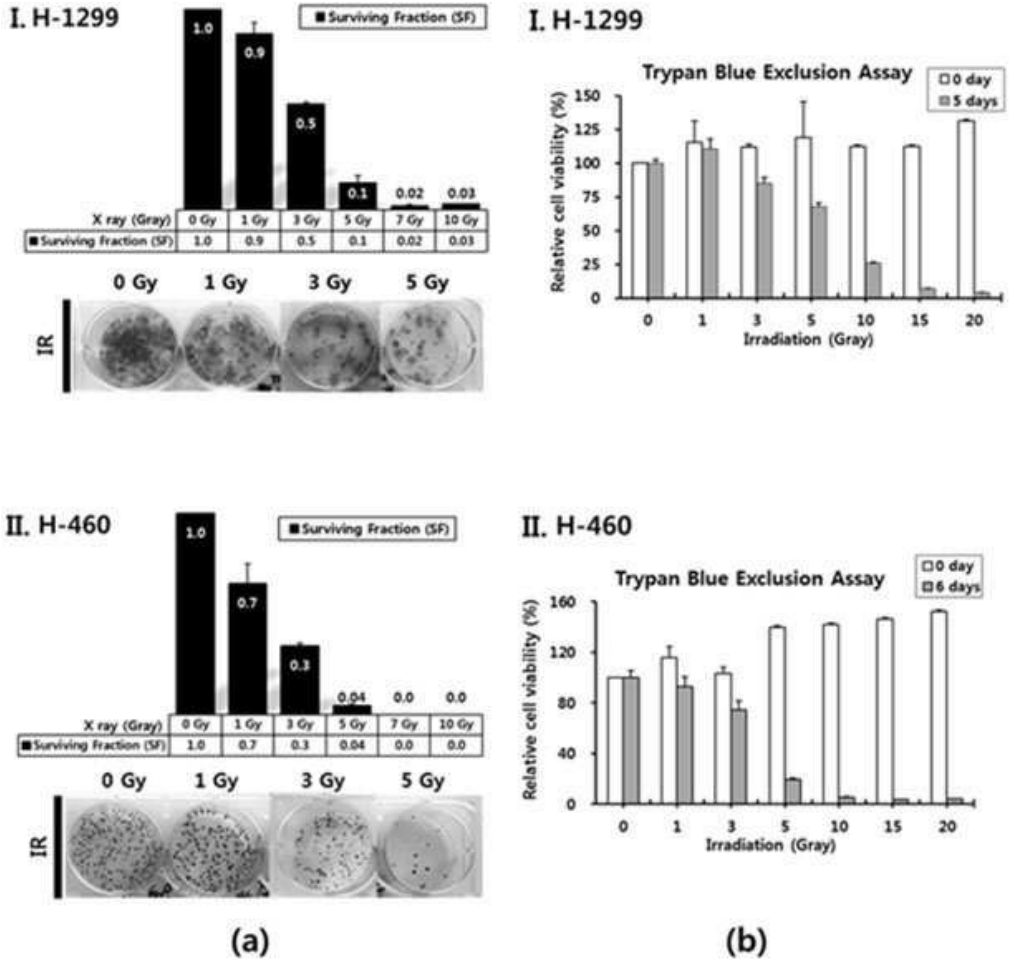
도면5


(a) H-1299
(b) H-460
Control
1 mg/mL
3 mg/mL
5 mg/mL
FL3-H (PI)
FL1-H (FITC)
% Cell population
H-1299
H-460
Early apoptosis
Late apoptosis/Necrosis
Concentration of UDN extracts (mg/mL)
CTL

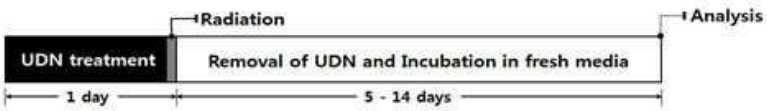
도면6


(a)
Control
1 mg/mL
H-1299
X 200
X 200
X 400
(c)
Control
1 mg/mL
X 400
X 400
(b)
Control
3 mg/mL
H-460
X 200
X 200
X 400
(d)
Control
3 mg/mL
X 400
X 400

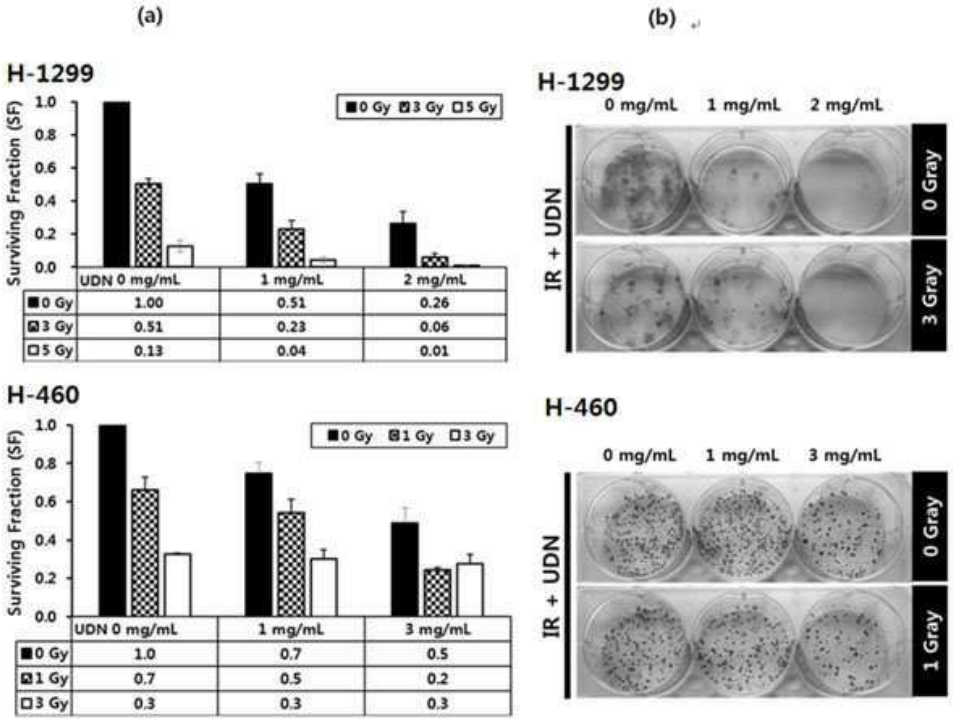
도면7


I. H-1299
Surviving Fraction (SF)
1.0
0.9
0.5
0.1
0.02
0.03
X ray (Gray)
0 Gy
1 Gy
3 Gy
5 Gy
7 Gy
10 Gy
Surviving Fraction (SF)
1.0
0.9
0.5
0.1
0.02
0.03
0 Gy
1 Gy
3 Gy
5 Gy
IR
I. H-1299
Trypan Blue Exclusion Assay
0 day
5 days
Relative cell viability (%)
150
125
100
75
50
25
0
0
1
3
5
10
15
20
Irradiation (Gray)
II. H-460
Surviving Fraction (SF)
1.0
0.7
0.3
0.04
0.0
0.0
X ray (Gray)
0 Gy
1 Gy
3 Gy
5 Gy
7 Gy
10 Gy
Surviving Fraction (SF)
1.0
0.7
0.3
0.04
0.0
0.0
0 Gy
1 Gy
3 Gy
5 Gy
IR
II. H-460
Trypan Blue Exclusion Assay
0 day
6 days
Relative cell viability (%)
160
120
80
40
0
0
1
3
5
10
15
20
Irradiation (Gray)
(a)
(b)

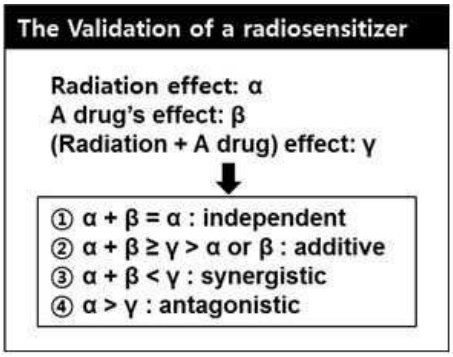
도면8


Radiation
Analysis
UDN treatment
Removal of UDN and Incubation in fresh media
1 day
5 - 14 days

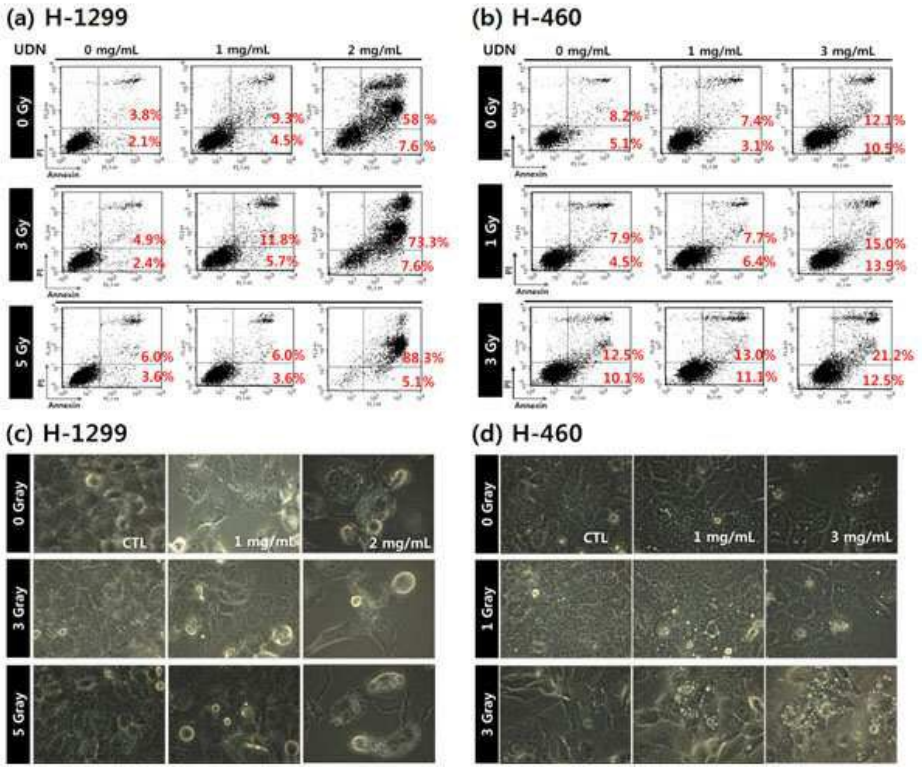
도면9


(a)
(b)
H-1299
Surviving Fraction (SF)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 Gy 3 Gy 5 Gy
UDN 0 mg/mL
1 mg/mL
2 mg/mL
0 Gy 1.00 0.51 0.26
3 Gy 0.51 0.23 0.06
5 Gy 0.13 0.04 0.01
H-460
Surviving Fraction (SF)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 Gy 1 Gy 3 Gy
UDN 0 mg/mL
1 mg/mL
3 mg/mL
0 Gy 1.0 0.7 0.5
1 Gy 0.7 0.5 0.2
3 Gy 0.3 0.3 0.3
H-1299
0 mg/mL
1 mg/mL
2 mg/mL
IR + UDN
0 Gray
3 Gray
H-460
0 mg/mL
1 mg/mL
3 mg/mL
IR + UDN
0 Gray
1 Gray

도면10


The Validation of a radiosensitizer
Radiation effect: α
A drug's effect: β
(Radiation + A drug) effect: γ
① α + β = α : independent
② α + β ≥ γ > α or β : additive
③ α + β < γ : synergistic
④ α > γ : antagonistic

도면11


(a) H-1299
UDN
0 mg/mL
1 mg/mL
2 mg/mL
0 Gy
3 Gy
5 Gy
3.8%
2.1%
9.3%
4.5%
58 %
7.6 %
4.9%
2.4%
11.8%
5.7%
73.3%
7.6%
6.0%
3.6%
6.0%
3.6%
88.3%
5.1%
(b) H-460
UDN
0 mg/mL
1 mg/mL
3 mg/mL
0 Gy
1 Gy
3 Gy
8.2%
5.1%
7.4%
3.1%
12.1%
10.5%
7.9%
4.5%
7.7%
6.4%
15.0%
13.9%
12.5%
10.1%
13.0%
11.1%
21.2%
12.5%
(c) H-1299
0 Gray
3 Gray
5 Gray
CTL
1 mg/mL
2 mg/mL
(d) H-460
0 Gray
1 Gray
3 Gray
CTL
1 mg/mL
3 mg/mL