(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0114467
(43) 공개일자 2023년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/076* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/076 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0010650
(22) 출원일자 2022년01월25일
심사청구일자 2022년01월25일
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김봉이
서울특별시 강동구
최진원
경기도 의정부시 시민로254번안길 36, 다동 201호(신곡동, 금오빌라)
(74) 대리인
위병갑

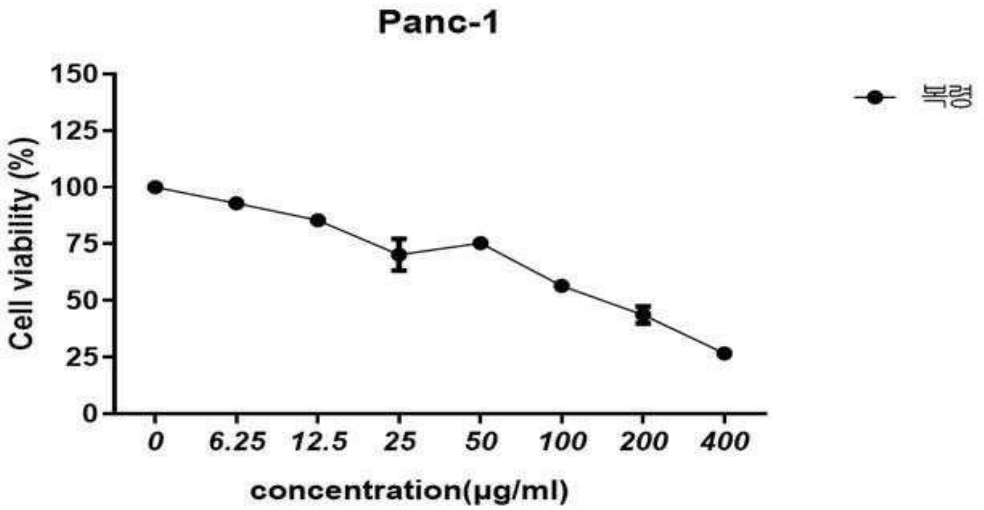
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 목적은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것으로서, 복령 추출물은 췌장암 세포주에서 세포독성을 확인하고, 세포사멸(apoptosis)를 유발하여 미토콘드리아의 효소활성을 감소 및 억제시키며 MMP에 영향을 끼쳐서 암세포의 전이 및 성장을 차단하는 효과를 보인다. 또한, 카스파제-3(Caspase-3)를 활성화시켜서 세포사멸을 유도시키면서 서바이빈(Survivin)의 발현을 감소시키는 것으로 세포사멸을 방어 또는 억제하는 기전을 차단시켜서 세포사멸을 유도시키는 것을 확인하여, 췌장암과 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465031726
과제번호 HF20C0116000020
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 혁신형 한의중개연구분야
연구과제명 BK002 (우슬, 왕불류행)와 ezalutamide 및 abiateoe acetate 복합투여의 거세 저항성 전립선암에서 상승적 항암 효과 및 기전연구
기 여 율 45/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2020.08.03 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711119405
과제번호 2020R1A5A2019413
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기초의과학분야(MRC)
연구과제명 한약물 재해석 암 연구 센터
기 여 율 5/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345332202
과제번호 2020R1I1A2066868
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 보호연구지원사업
연구과제명 한약물의 장내 미생물 조절을 통한 췌장암 억제 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

복령(*Wolfiporia extensa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 복령 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출된 것인, 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 췌장암은 악성 췌장 종양인 췌관선암, 신경 내분비 종양, 낭종성 췌장 종양인 점액성 낭성 종양, 췌관내 유두상 점액종양 및 고형 가유두상 종양으로 이러워진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 식품 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 췌장암은 췌관선암인 것인, 식품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 세포사멸을 유발하여 미토콘드리아의 효소활성을 감소시키는 것인, 식품 조성물

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 MMP 활성을 억제시켜, 암 전이 및 암세포 성장을 억제시키는 것인, 식품 조성물

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 카스파제-3(Caspase-3)를 활성화 시켜 사포사멸을 유도시키는 것인, 식품 조성물

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 서바이빈(Survivin)의 발현을 감소시켜고, 세포사멸의 방어 및 억제 기전을 차단시켜 세포사멸을 유도시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 9

복령 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 효소 활성이 증가된 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 10

복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 항암 보조제.

청구항 12

실험관 내에서(*in vitro*) 복령 추출물을 췌장암 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 MMP활성을 억제하여 미토콘드리아 효소 활성이 감소 되고, Caspase-3 활성화하고, Survivin의 발현량 감소시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 목적은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 전 세계적으로 많은 사망자를 발생시키는 질병이다. 세계보건기구 산하 국제 암 연구 기관에 조사 결과 2018년 한 해 동안 전 세계 인구 중 1,700만 명이 암으로 진단 받았고 950만 명이 암으로 사망했다. 암으로 인한 사망은 전체 사망률 1위에 해당하는 수치이다. 우리나라에서도 암으로 인한 사망이 전체 사망 원인 중 1위에 해당하며 이 중에서도 특히 췌장암은 세계적으로 남,여 모두 사망률 7위에 해당하고 5년 생존율이 12.6%인 예후가 매우 안좋은 암으로 진단받은 환자 10명 중 9명이 사망하는 암이다.

[0003] 암은 세포성장체계를 계속 진행시켜서 끊임없이 성장하고 주변의 혈관을 신생시켜서 영양분을 끌여당기는 악성 세포로서 정상적인 세포가 돌연변이가 된 것으로 끊임없이 성장하며 다른 장기로 전이가 발생한다는 것이 특징이다. 현재 암을 치료하는 방법으로는 수술, 방사선 치료, 유전자 치료등이 사용되고 있으며 가장 많이 사용되는 방법이 항암제를 투여하는 화학요법(chemotherapy)이다. 항암제를 이용한 치료는 전신 치료로 주사나 경구로 투여하는 혈류 치료로 전신으로 퍼져서 미세전이에 작용하지만 그만큼 부작용도 심하게 나타나 전신적인 부작용이 나타나고 대부분의 항암제는 정상세포와 암세포를 구별하는 특이적 선택을 못하여 용량 제한적 독성을 나타내는 문제점이 있다.

[0004] 여러 암중 췌장암(pancreatic cancer)은 초기 진단이 어렵고 주변 장기나 림프절로 쉽게 전이되는 특징이 있어 예후가 매우 좋지 않으며 수술로 절제하는 것이 가장 효과적인 치료법이지만, 10-20% 정도의 환자들만이 수술이 가능한 것으로 알려져 있어 암 사망률이 매우 높은 공격적인 암 종으로 분류되어 있다. 또한, 수술을 받은 환자들 중에서도 공격적인 전이가 발생하면 일반적인 화학 요법이나 방사선 요법 등의 치료가 어려웠다.

[0005] 이러한 췌장암 치료에 사용되는 많은 약물 치료법 중에서도 젬시타빈 (gemcitabine) 치료법은 지난 20년 간 췌장암 환자 치료에서 가장 일반적으로 사용되는 치료법으로 알려져 있다. 젬시타빈과 함께 다양한 약물과의 병용 치료가 췌장암에서 사용되고 있지만, 그 효과는 미미하여 췌장암 환자들의 유의적인 생존율 증가에는 영향을 미치고 있지 않다. 이후로 개발된 폴피리녹스(FOLFIRINOX)는 5-FU(5-fluorouracil), 류코보린(leucovorin), 이리노테칸(irinotecan) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)의 4가지 약물의 조합으로 구성되어 있으며, 젬시타빈 단독과 비교하여 췌장암의 중앙 생존율을 증가시켰으며, 마찬가지로 알부민이 결합된 파클리탁셀(paclitaxel)과 젬시타빈의 병용 치료도 젬시타빈 단독과 비교하여 췌장암에서 중앙 생존율을 증가시키는 효과를 보였다. 하지만, 최종적으로 장기 생존율을 확인하였을 때 이러한 약물의 병용 치료의 효과는 미미했고, 약물 독성으로 인한 부작용이 발생하기도 하였다. 따라서 췌장암 환자들에게는 이를 대체할 치료 방법 또는 보다 표적화된 약물 전달 방법이 필요한 상황이다.

[0006] 복령(*Wolfiporia extensa*)은 소나무를 벌채하고 났을 때, 3년 째부터 10년에 걸쳐서 소나무의 뿌리에서 기생해서 자라는 버섯으로 음지에서 말려서 한약재로 사용한다. 사용 부위에 따라서 적복령, 백복령, 복신등으로 나뉘며 껍질 아래 담홍색 부분이 적복령, 적복령을 잘라 낸 다음의 백색 부분을 백복령, 소나무 뿌리 근처에 얽혀 있는 것을 복신이라고 하며 각 부위 별로 효능에서 차이가 나타난다. 점액성이고, 맛은 달고 밋밋하며 평한 성질을 지니고 있으며 이뇨작용으로인해 신장염,방광염,요도염에 사용하고 거담작용으로 만성기관지염과 기관지확장증에 효능을 보인다. 특히나 최근 국내 연구진의 연구로 폐암 세포의 증식을 억제하는 항암물질이 발견되었고 이 효능의 기전은 암 세포를 세포사멸에 이르게 하는 효능이였다.

[0007] 이에 따라, 본 발명자들은 복령에 대한 생약 연구를 하던중, 복령이 Panc-1 세포주에서 암세포를 농도 의존적으로 세포사멸(apoptosis)를 유발하여 미토콘드리아의 효소활성을 감소 및 억제시키며 MMP(matrix metalloproteinase)에 영향을 끼쳐서 암세포의 전이 및 성장을 차단하는 효과를 확인하였다. 또한, 카스파제-

3(Caspase-3)를 활성화시켜서 세포사멸을 유도시키면서 서바이빈(Survivin)의 발현을 감소시키는 것으로 세포사멸을 방어 또는 억제하는 기전을 차단시켜서 세포사멸을 유도시키는 것으로써 췌장암 세포에서의 항암효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 복령(*Wolfiporia extensa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 효소 활성이 증가된 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 실험관 내에서(*in vitro*) 복령 추출물을 췌장암 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 MMP 활성을 억제하여 미토콘드리아 효소 활성이 감소 되고, Caspase-3 활성화하고, Survivin의 발현량 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 복령(*Wolfiporia extensa*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 효소 활성이 증가된 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 항암 보조제를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 실험관 내에서(*in vitro*) 복령 추출물을 췌장암 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 MMP활성을 억제하여 미토콘드리아 효소 활성이 감소 되고, Caspase-3 활성화하고, Survivin의 발현량 감소시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 복령 추출물은 췌장암 세포주에서 세포독성을 확인하고, 세포사멸(apoptosis)를 유발하여 미토콘드리아의 효소활성을 감소 및 억제시키며 MMP에 영향을 끼쳐서 암세포의 전이 및 성장을 차단하는 효과를 보인다. 또한, 카스파제-3(Caspase-3)를 활성화시켜서 세포사멸을 유도시키면서 서바이빈(Survivin)의 발현을 감소시키는 것으로 세포사멸을 방어 또는 억제하는 기전을 차단시켜서 세포사멸을 유도시키는 것을 확인하여, 췌장암과 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 복령 추출물을 췌장암 세포인 Panc-1 세포에 처리시 농도별로 세포 독성을 나타낸 도이다.

도 2는 복령 추출물을 췌장암 세포인 Panc-1 세포에 처리시 MMP의 활동을 억제하여 췌장암 세포에 성장 및 전이 차단을 JC-1(세포 비율)값으로 나타낸 도이다.

도 3은 복령 추출물을 췌장암 세포인 Panc-1 세포에 처리시 Caspase-3를 활성화 및 서바이빈(Survivin)의 발현량을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명

의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다, 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0021] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 사료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하여 전립선 관련 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 전립선 관련 질환 발병 의심 개체에 투여하여 전립선 관련 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 창출으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 창출으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 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 있다.

[0027] 췌장암은 악성 췌장 종양(췌관선암 (Pancreatic ductal adenocarcinoma), 신경 내분비 종양 (Neuroendocrine tumor), 낭종성 췌장 종양(점액성 낭성 종양(mucinous cystic neoplasm), 췌관내 유두상 점액종양(intraductal papillary mucinous neoplasm), 고형 가유두상 종양(solid pesudopapillary neoplasm))으로 분류될 수 있다.

[0028] 췌장암을 연구하기 위한 세포주는 다양하며, 현재 일반적으로 PANC-1, AsPC-1 등을 포함하는 11개이상의 세포주를 이용하고 있다. 상기 각 세포주는 서로 다른 표현형과 유전형이 나타나고 이에 따라 종양 성장, 침습 및 전이 뿐만 아니라 화학요법과 약물 내성에 따른 특징이 상이한 것으로 알려져 있다(Pancreas. 2010 May; 39(4): 425-435.)

[0029] 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 복령 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출된 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 췌장암은 악성 췌장 종양인 췌관선암, 신경 내분비 종야 및 낭종성 췌장 종양인 점액성 낭성 종양, 췌관내 유두상 점액종양, 고형 가유두상 종양으로 이러워진 군에서 선택된 1종 이상인 것이나, 바람직하게는 Panc-1 세포에서 발생되는 췌관선암일 수도 있다.

[0032] 상기 조성물은 세포사멸을 유발하여 미토콘드리아의 효소활성을 감소시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 상기 조성물은 세포의 MMP 활성을 억제시켜, 암 전이 및 암세포 성장을 억제시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 상기 조성물은 카스파제-3(Caspase-3)를 활성화 시켜 사포사멸을 유도시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 상기 조성물은 서바이빈(Survivin)의 발현을 감소시키고, 세포사멸의 방어 및 억제 기전을 차단시켜 세포사멸을 유도시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0037] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 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. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 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.

[0038] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (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 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0039] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'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 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 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-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 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. 과립형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0040] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0041] 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 효소 활성이 증가된 췌장암 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학

조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0046] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0048] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0049] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0050] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0051] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명은 복령 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암 항암 보조제를 제공한다.

[0053] 본 발명은 실험관 내에서(*in vitro*) 복령 추출물을 췌장암 세포에 처리하는 단계;를 포함하는 MMP활성을 억제하여 미토콘드리아 효소 활성이 감소 되고, Caspase-3 활성화하고, Survivin의 발현량 감소시키는 방법을 제공한다

[0055] 이하 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0057] **[실시예]**

[0058] **실시예 1. 복령 추출물 제조방법.**

[0059] 본 실험에 복령은 광명당 한약도매상에서 구입하여 실험을 진행하였다. 복령 500g을 부직포에 넣고 10배(5 L)의

프레타놀A 25%를 채우고 환류추출기(MS-609, Korea)를 이용하여 80℃에서 3시간 2회 추출 후 대형 회전감압농축기(Eyela, CA-2600-chiller가 장착된 Eyela, NVC-2200, Japan)를 이용하였고 55℃에서 30 hPa 농축하여 10 brix 내외의 표준 추출물을 제작하였다. 추출물을 Deep freezer(Themo Scientific, TSE600D, U.S.A)를 이용하여 -70℃에서 동결하였고 동결건조기(일신, 본디로 LYOPH-PRIDE 20R)로 옮긴 후 동결 건조를 실시하였다. 124시간 후 종료된 동결건조기로부터 32g (수득률 6.4%)추출물을 수득하였다.

[0061] **실시예 2. 복령 추출물의 췌장암 세포 독성 효과 확인.**

[0062] 본 발명의 복령 추출물이 췌장암 세포인 Panc-1 세포의 독성 효과를 확인하기 위해, 췌장암 세포에 복령 추출물을 처리하여 WST assay를 이용한 세포독성 평가함으로써, 본 발명의 복령 추출물이 췌장암 세포 Panc-1에 독성 효과를 확인하였다.

[0063] WST assay를 이용하여 세포독성 평가로 Tetrazolium salt를 이용한 분석으로 미토콘드리아에 있는 탈수소효소에 의해서 Tetrazolium salt가 오렌지색의 formazan결정으로 환원되는 원리로써, 이러한 formazan을 흡광도를 이용하여 결정이 생성되는 양을 측정하는 것으로 세포가 살아있는 정도를 측정할 수 있다. 세포가 살아있게 되면 미토콘드리아에서 탈수소효소가 작용이 활발해지는데 세포가 살아서 성장을 하면서 미토콘드리아를 통해 에너지원인 ATP를 만들어서 이용하기 때문이다. 따라서 건강한 정상적인 세포라면 미토콘드리아에서의 작용이 활발하기 때문에 효소반응이 정상적으로 이루어지게 되며 이러한 세포들이 많게 되면 전체적인 formazan생성량이 많아지게 된다. 따라서 이것을 흡광도분석법을 이용하여 흡광도를 측정하게 된다면 살아있는 세포의 비율을 알 수 있게 된다.

[0064] 반면 세포가 죽게 된다면 미토콘드리아에서의 모든 활동이 정지가 되게 되므로 효소반응 또한 진행이 되지 않는다. 따라서 formazan을 형성할 수 없게 된다. 이러한 세포의 활동을 이용하여 세포에게 미치는 독성을 평가 할 수 있다.

[0065] 그 결과, 도 1과 같이 복령 추출물의 농도 의존적으로 췌장암 세포인 Panc-1세포의 생존률이 감소하는 것을 확인하여, 본 발명의 복령 추출물이 췌장암 세포에서 독성물질로서 작용하여 췌장암 세포를 죽게 만들어 세포의 성장이나 활동을 중지시키거나 정지 시키므로, 본 발명의 복령 추출물은 췌장암 항암 효능을 확인 하였다.

[0067] **실시예 3. 복령 추출물의 췌장암 세포 미토콘드리아의 MMP(matrix metalloproteinase)의 활동을 억제 효능 확인.**

[0068] 본 발명의 복령 추출물이 췌장암세포인 Panc-1 세포에 미토콘드리아 MMP의 활동을 억제하여 암세포의 성장 및 전이 차단, 억제효과를 JC-1 dye를 통해 확인하였다.

[0069] 미토콘드리아에 막을 투과하는 JC-1 dye를 이용하여 막을 잘 투과하여 dye들이 뭉쳐있으면 빨강계열의 형광을 보이며 세포가 죽거나 상태가 안좋게 되면 투과율이 떨어지게 되어서 dye가 적어지게 되는데 이때 초록색 계열의 형광을 나타내며 이러한 세포의 비율을 측정하여 나타낸다. 아무것도 처리를 안한 세포그룹에서 약품을 처리한 세포그룹을 나눈값으로 표시하며 녹색빛을 띄는 세포는 monomer라고 하며 빨강빛을 띄는 세포는 oligomer라고 한다. monomer/oligomer를 한 값이 JC-1값이다. 이러한 JC-1은 세포의 MMP(세포외기질 금속함유 단백분해효소)를 측정하는 분석법으로 암세포의 상태를 알 수 있다. MMP는 암세포의 침습과 전이에 주된 역할을 하며, 암치료에 있어서 가장 큰 장벽으로 작용한다. 만약 MMP를 억제하게 된다면 암세포가 성장 및 전이를 못하게 되는데 이러한 방식의 항생제가 많이 임상시험단계에 있는 상황이다. MMP를 억제하면 미토콘드리아 막의 탈분극을 유도하게 되고 이렇게 되면 제대로된 효소반응등을 할 수 없게되어 세포의 성장이 억제가 된다.

[0070] 그 결과, 도 2와 같이 복령 추출물을 처리하였을 때 췌장암 세포에서 농도 의존적으로 녹색의 세포는 늘고 빨강색의 세포는 줄어든 결과를 확인 하였다.

[0071] 이는 미토콘드리아의 막 단백질인 MMP(matrix metalloproteinase)가 문제가 생겨 JC-1 dye가 통과하지 못하게 된다는 것으로서, 본 발명의 복령 추출물이 MMP의 활동을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 즉, 본 발명의 복령 추출물은 췌장암세포에 성장 및 전이를 차단하거나 억제하는 효능이 있다는 것을 확인하였다(도 2).

[0073] **실시예 4. 복령 추출물의 췌장암 세포 세포사멸 유도효과 확인.**

[0074] 실시예 4-1. 복령 추출물의 췌장암 세포 Caspase-3를 활성화시켜 췌장암 세포사멸 유도 효과 확인.

[0075] Caspase-3는 세포사멸에 관한 핵심적인 인자로써, Caspase-3는 기본적으로 불활성화 되있는 상태이지만 신호나 자극을 받게되면 시트크롬-c가 Caspase-9을 활성화시켜서 절단이 되게 되는데 이 절단된 Caspase-9이 Caspase-3를 활성화시켜서 절단을 유도하게 되고 이 활성화된 Caspase-3가 핵안으로 들어가 세포사멸을 하는 유전정보를 전사시켜서 세포사멸을 유도하게 된다. 또한, 또 다른 경로에 의해서도 활성화가 되는데 세포사멸에 관한 인자가 단백질과 결합하게 되면 Caspase-8이 활성화가 되어 Caspase-3를 활성화시켜서 세포사멸을 유도하게 된다.

[0076] 본 발명의 복령 추출물은 췌장암 세포의 세포사멸 유도효과를 확인하기 위해 췌장암 세포인 Panc-1세포에 처리하였을 때, 복령 추출물을 처리한 췌장암 세포에서 복령 추출물 농도 의존적으로 Caspase-3의 양이 감소하는데 이는 Caspase-3를 활성화 시키게 만들어 절단되어 활성화된 Caspase-3의 양이 농도 의존적으로 증가했다는 것으로 세포사멸이 유도가 되었다는 것을 알 수 있다. 따라서 Caspase-3가 감소함으로 인해 활성화되어 절단이 많이 되었으므로 활발하게 세포사멸이 일어났다고 볼 수 있다(도 3).

[0078] 실시예 4-2. 복령 추출물의 췌장암 세포 서바이빈(Survivin)의 발현량 확인.

[0079] 서바이빈(Survivin)은 세포생존에 관여하는 인자로서 태아 발달기에서 발현이 되었다가 정상 성인 조직에서는 발현이 거의 되지 않지만 대부분의 암 세포에서는 재발현이 되는데 이는 암 환자에 있어 생존기간의 단축, 나쁜 예후와 치료 저항성, 재발 속도에 관여하는 것으로 알려져 있는데 특히 세포사멸을 억제하는 기능과 더불어서 세포의 분할을 조절하는 두 가지의 기능을 가진다. Survivin은 세포주기 중 G2/M기에서 발현이 되어 microtubule의 기능을 억제하는 것으로 세포사멸에 관여하는 Caspase-3를 직접적으로 억제하여 세포사멸을 억제시킨다. 따라서, Survivin의 발현이 증가하면 세포사멸이 억제가 된다.

[0080] 췌장암 세포에 복령 추출물을 처리하였을 때, 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 보아 세포사멸의 관여하는 Caspase-3의 활동을 억제하지 않고 이는 곧 세포사멸로 유도된다고 할 수 있다. 또한 Survivin은 Caspse-3 기전과는 무관하게 세포사멸을 억제하는데 발현을 억제하게 되었을 때, 세포사멸이 다양한 기전에 의해 유도가 된다. 즉, Survivin의 발현량 감소는 세포사멸을 유도하게 된다(도 3).

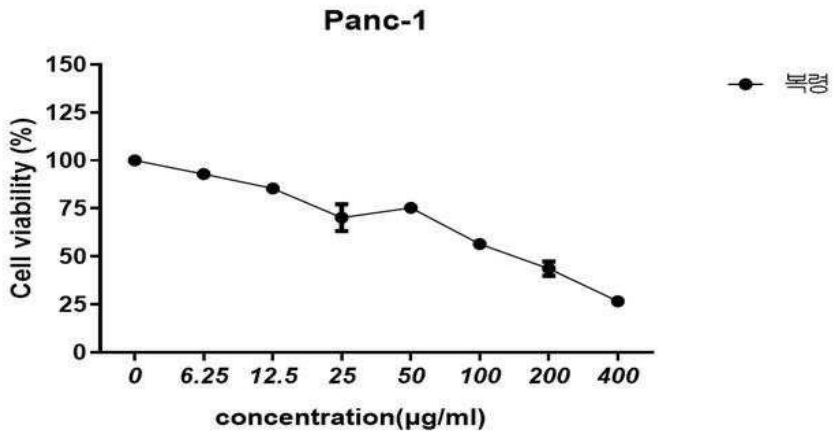
[0081] 이에 따라, 실시예 4-1, 4-2를 통하여 확인한 바와 같이, 본 발명의 복령 추출물은 Caspase-3를 활성화시키며 이를 억제하는 Survivin의 발현량은 동시에 감소시켜서 세포사멸을 유도를 확인 하여(도 3), 췌장암 항암 효과를 확인하였다.

[0083] 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.

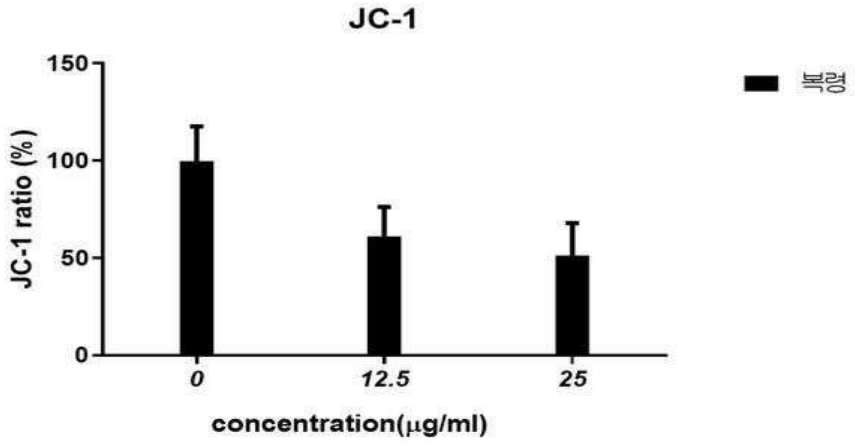
[0084]

도면

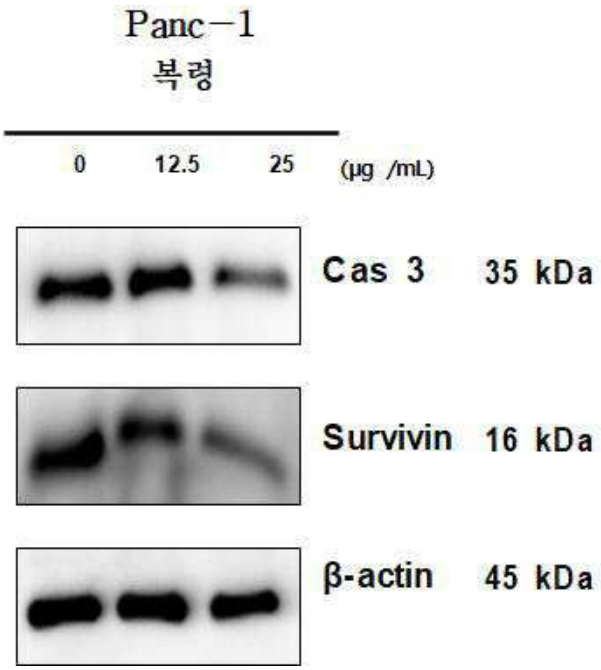
도면1


Panc-1
Cell viability (%)
150
125
100
75
50
25
0
0
6.25
12.5
25
50
100
200
400
concentration(μg/ml)
복령

도면2


JC-1
JC-1 ratio (%)
150
100
50
0
0
12.5
25
concentration(μg/ml)
복령

도면3


Panc-1
복령
0
12.5
25
(μg /mL)
Cas 3
35 kDa
Survivin
16 kDa
β-actin
45 kDa