

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0144778
(43) 공개일자 2022년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/54 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/54 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0048269

(22) 출원일자 2022년04월19일

심사청구일자 2022년04월19일

(30) 우선권주장

1020210051244 2021년04월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 더퓨처

제주특별자치도 제주시 중앙로14길 21, 206호(삼도이동)

(72) 발명자

엄성운

제주특별자치도 제주시 구좌읍 해맞이해안로 486, 비 101-2호(월정에비뉴)

오영지

서울특별시 서초구 서초대로33길 22, 201동 205호(방배동, 방배2차이편한세상)

(74) 대리인

특허법인이씨엠

전체 청구항 수 : 총 10 항

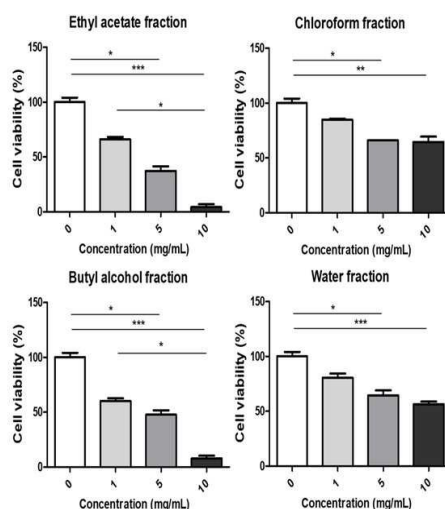
(54) 발명의 명칭 후박나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 후박나무(*Elaeocarpus sylvestris*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 암 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

상기 후박나무 추출물 또는 이의 분획물은 암세포의 사멸 효과를 가지므로, 항암용 약학 조성물과 식품 조성물의 유효성분으로 이용이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

후박나무(*Elaeocarpus sylvestris*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 후박나무 추출물은 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 후박나무 추출물은 후박나무 잎 또는 가지를 물, 메탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분획물은 후박나무의 추출물을 헥산(Hexane), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 부탄올(butanol), 물 또는 이들의 혼합용매로 분획하여 제조한 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분획물은 후박나무의 추출물의 에틸아세테이트 분획물인 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암은 위암, 유방암, 간암, 및 신장암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 암은 신장암 또는 유방암인 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 정상 세포에 독성이 없는 것인, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 9

후박나무(*Elaeocarpus sylvestris*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품인 것인, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 암은 현재 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로서, 암 발생 연령은 점차 낮아지고 있는 반면 평균 수명은 점차 연장되어가고 있어 암 발생률은 더욱 증가할 것으로 전망되고 있다.
- [0004] 대표적인 암 치료 방법으로는 항암화학요법이 있으나, 이는 암세포 뿐만 아니라 빠르게 분열 증식하는 정상 세포에도 손상을 가할 수 있어 암세포에 대한 표적성이 낮고, 항암화학요법 후 빈혈, 백혈구 및 혈소판 수의 감소, 구토, 오심, 및 설사 등의 부작용이 발생할 수 있다.
- [0005] 신장암(renal cell carcinoma)은 대부분 신장에서 소변을 만드는 세포들이 모여 있는 부분인 실질(수질과 피질로 구성)에서 발생하는 신장세포 암을 의미한다 신장암의 위험 인자로는 유전학적 요인이 있으나, 일반적으로는 흡연, 과도한 지방 섭취 등을 들 수 있다. 신장암은 종양의 크기가 작을 때는 증상이 거의 없으며, 종양이 어느 정도 커져서 장기를 밀어낼 정도가 되어야 비로소 증상이 나타난다.
- [0006] 신장암의 치료를 위해, 신장과 그 주위 정상 조직을 광범위하게 절제하는 수술을 하는 외과적 수술이 일반적이다. 종양이 크지 않은 경우에는 복강경을 이용하여 절제 수술을 한다. 그 외의 치료 방법으로는 면역요법, 호르몬요법, 항암 화학요법, 방사선요법 등이 있지만, 치료 효과는 크지 않은 것으로 알려져 있어, 아직까지는 외과적 수술 이외에는 확실한 효과가 있는 치료법이 없다.
- [0007] 유방암의 원인에 대해 명확하게 밝혀진 것은 없으나, 여성 호르몬, 가족력, 과거력, 출산력, 식생활 습관 등의 다양한 인자들이 거론되고 있다. 한국 여성의 유방암 발생은 급격히 증가하여 1998년 자궁경부암을 추월하였으며, 여성암으로 1위이다. 짧은 수유기간, 식생활의 서구화, 생활환경의 오염 등의 이유로 유방암 발생이 급격하게 증가하고 있다.
- [0008] 유방암과 신장암 등 여러 암종에 항암 효과를 가지는 치료제를 개발하기 위한 다수의 연구가 있었으나, 정상 세포에 독성을 가지는 등 부작용이 많았다. 이에 정상 세포에는 독성이 없으면서 암 세포에만 특이적으로 독성을 나타내는 보다 안전하면서 효과가 뛰어난 천연 항암제의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허공보 제10-2010-0001756호(2010년01월06일)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로 본 발명은 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 용어 "후박나무(*Machilus thunbergii*)"는 녹나무과에 속하며, 바닷가, 산기슭 등 낮은 지대에서 자라는 상록활엽교목이다.
- [0016] 본 발명에서 상기 암 치료 또는 예방용 약학 조성물은 후박나무를 건조하거나 또는 건조 및 파쇄하여 분말화한

것을 추출에 적용할 수 있고, 후박나무의 잎, 줄기, 가지, 뿌리, 꽃 또는 이들 모두를 포함할 수 있으며, 후박나무의 잎 또는 가지를 사용할 수 있다.

- [0017] 본 발명에서 용어, "가지"는 식물의 원줄기에서 파생하여 자라는 부분으로 식물의 줄기에서 갈라져 뻗은 줄기를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "추출물"은 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0019] 본 발명에서 추출물의 건조는 채취한 식물로부터 유용한 성분들이 파괴되지 않는 범위에서 공지의 방법으로 진행될 수 있고, 예를 들어 음지에서 자연건조의 방법으로 진행될 수 있다. 또한, 파쇄 또는 분쇄는 이후 추출과정에서 식물의 유용한 성분들이 충분히 추출될 수 있을 정도로 파쇄 또는 분쇄하여 분말화할 수 있다. 상기 건조와 파쇄 또는 분쇄 공정은 필요에 따라서 순서를 뒤바꿔서 진행하거나 반복하여 실시할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 추출에 있어서, 상기 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 수득될 수 있으며, 구체적으로 후박나무 잎 또는 가지를 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것일 수 있다. 또한, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올 일 수 있으며, 상기 후박나무 추출물은 후박나무 잎 또는 가지를 물, 메탄올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것일 수 있다. 상기 메탄올은 50~70% 메탄올일 수 있다. 상기 후박나무의 물 추출물은 90~110℃에서 2~10시간 동안 열수 추출할 수 있으며, 상기 후박나무의 메탄올 추출물은 50~70℃에서 15~25 시간 동안 추출하여 얻을 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산(Hexane), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 또는 이들의 혼합용매를 들 수 있다.
- [0025] 구체적으로 상기 분획물은 후박나무의 추출물을 헥산(Hexane), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 부탄올(butanol), 물 또는 이들의 혼합용매로 분획하여 제조한 것일 수 있다.
- [0026] 또한 본 발명에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서, 용어 "암"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. "암"이란 세포의 정상적인 분열, 분화 및 사멸의 조절 기능에 문제가 발생하여 비정상적으로 과다 증식하여 주위 조직 및 장기에 침윤하여 덩어리를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는 상태를 의미한다.
- [0028] 상기 암은 본 발명에서 제공하는 후박나무 추출물 또는 이의 분획물에 의해 증상이 완화, 경감, 개선 또는 치료될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적인 예로, 위암, 유방암, 간암, 및 신장암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있으며, 더욱 구체적으로 신장암 또는 유방암일 수 있다.
- [0029] 상기 조성물은 상기 암세포에 세포독성을 나타내어, 항암 효과를 가지나, 정상세포에는 독성이 없거나 약하다. 특히 정상 장관계 세포, 구체적으로 인간 장(intestine) 상피 세포나 정상 소장 세포에는 독성이 없다. 또한, 피부정상세포, 구체적으로 인체피부섬유모세포에도 독성이 없다.
- [0030] 또한, 본 발명의 후박나무 추출물 또는 이의 분획물은 항산화 활성을 가진다.
- [0031] 본 발명의 용어, "예방"이란, 상기 후박나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 암을 억제

또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

- [0032] 본 발명의 용어, "치료"란, 상기 후박나무 추출물 또는 이의 분획물을 조성물의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 추출물 또는 분획물은 유효성분으로 1일 0.001 내지 500 mg/kg으로, 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물 또는 분획물을 0.001 내지 50% 중량 백분율로 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 워텍솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0038] 상기 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물은 신장암 또는 유방암 세포를 사멸함으로써 항암 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 후박나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 치료 또는 예방용 약학 조성물에 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0040] 다른 하나의 양태로 본 발명은 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명에서, 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물, 암, 예방에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0042] 본 발명의 용어 "개선"이란 본 발명의 후박나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 본 발명의 상기 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는

식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

- [0044] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있으며, 본 발명의 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.
- [0045] 상기 식품 조성물에는 후박나무(*Machilus thunbergii*) 추출물 또는 이의 분획물 이외에도 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용되는 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 본 발명에서 용어, "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 텍스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이 있으며, 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴 등), 스테비아 추출물(레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.
- [0049] 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 유효성분은 원료 조성물 중 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0051] 본 발명의 후박나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 세포의 사멸 효과를 가지므로, 항암용 조성물로 이용하다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 실시예 2의 후박나무 분획물 시료를 대상으로 신장암 세포주(A489)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 4의 후박나무 분획물 시료를 대상으로 신장암 세포주(A489)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 대장암 세포주(HT-29)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 정상 장관계 세포주(인간 장 상피 세포, INT-407)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물 시료를 대상으로 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.

도 6은 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 항산화 효과를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 첨부한 도면을 참고로 하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[실시예 제조]

실시예 1. 후박나무 가지 추출물 제조

건조된 후박나무 가지 1kg에 후박나무 가지 중량의 10배(v/w)에 해당하는 60% 메탄올 10L를 투입하고 60℃에서 17시간 동안 추출하여 후박나무 가지 추출액을 얻었다. 다음으로 상기 후박나무 가지 추출액을 10 μm 여과포를 이용하여 여과하였다. 이 후, 60℃, 0.1~0.3 MPa에서 진공감압으로 농축하여 후박나무 가지의 메탄올 추출물 원액(농축액)을 얻었다.

실시예 2. 후박나무 가지 추출물의 분획물 제조

실시예 1에서 얻은 후박나무 가지의 메탄올 추출물 원액(농축액)을 3L 분액 깔대기를 이용하여 계통분획을 실시하였다.

상기 실시예 1에서 얻은 후박나무 가지의 메탄올 추출물 원액(농축액)에 hexan, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올, 물 순서로 계통분획하여 후박나무 가지의 메탄올 추출물의 hexan, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올 그리고 물 분획물을 얻었다.

실시예 3. 후박나무 잎 추출물 제조

건조된 후박나무 잎 1kg에 후박나무 잎 중량의 10배(v/w)에 해당하는 60% 메탄올 10L를 투입하고 60℃에서 17시간 동안 추출하여 후박나무 잎 추출액을 얻었다. 다음으로 상기 후박나무 잎 추출액을 10 μm 여과포를 이용하여 여과하였다. 이 후, 60℃, 0.1~0.3 MPa에서 진공감압으로 농축하여 후박나무 잎의 메탄올 추출물 원액을 얻었다.

실시예 4. 후박나무 잎 추출물의 분획물 제조

실시예 3에서 얻은 후박나무 잎의 메탄올 추출물 원액(농축액)을 3L 분액 깔대기를 이용하여 계통분획을 하였다.

상기 실시예 3에서 얻은 후박나무 잎의 메탄올 추출물 원액(농축액)에 hexan, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올, 물 순서로 계통분획하여 후박나무 잎의 메탄올 추출물의 hexan, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올 그리고 물 분획물을 얻었다.

실시예 5. 후박나무 가지의 열수 추출물 제조

건조된 후박나무 가지 2kg에 10배(w/v)의 증류수를 첨가하여, 100℃에서 4시간 동안 초고속진공저온 농축 추출

기(COSMOS-660, KYUNGSEO E&P, Incheon, Korea)로 열수 추출한 후 여과하였다. 다음으로 대형회전진공농축기(Buchi rotavapor R-220, Gschwader strasse, Flawil, Switzerland)를 이용하여 55℃, 36~39 mmTorr 조건에서 12 시간 감압농축하여 시료로 사용하였다. 시료는 2 g/mL의 농도의 stock으로 제조하여 -80℃의 Deep freezer에 보관하여 실험 전 사용하였다.

실시예 6. 후박나무 잎의 열수 추출물 제조

건조된 후박나무 잎 2kg에 10배(w/v)의 증류수를 첨가하여, 100℃에서 4시간 동안 초고속진공저온 농축 추출기(COSMOS-660, KYUNGSEO E&P, Incheon, Korea)로 열수 추출한 후 여과하였다. 다음으로 대형회전진공농축기(Buchi rotavapor R-220, Gschwader strasse, Flawil, Switzerland)를 이용하여 55℃, 36~39 mmTorr 조건에서 12 시간 감압농축하여 시료로 사용하였다. 시료는 2 g/mL의 농도의 stock으로 제조하여 -80℃의 Deep freezer에 보관하여 실험 전 사용하였다.

실험예 1. 신장암 세포주에 대한 세포독성 평가(항암 효과)

1-1. 세포주 및 세포독성 평가 방법

인간 신장암 세포주 A489는 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 세포배양과 독성 평가를 위하여 A489 세포는 MEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였다. 배지에는 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제(100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)를 첨가하였다.

세포독성 평가를 위하여 96-well plate에 well당 세포수를 1.5×10^4 이 되도록 분주하여 24~48시간 동안 배양한 후, 시료가 포함된 serum-free 배지로 교환하여 24시간 더 처리하였다. 이후 처리 배지를 제거하고, 0.5 mg/mL MTT 용액을 각 well당 100 μ L 씩 첨가하여, 37℃에서 약 1~2시간 반응시켰다. 생성된 MTT formazan을 100 μ L DMSO에 용해하여 microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 평가하였다.

일원배치 분산 분석(ANOVA, Kruskal-Wallis test)와 사후검정(Dunn's Multiple Comparison post-test)를 이용하여 통계적 유의성을 평가하였으며, $p < 0.05$ 의 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

1-2. 신장암 세포주에 대한 세포독성 평가

상기 실시예 2에서 얻은 후박나무 가지 추출물의 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물, 실시예 4에서 얻은 후박나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물을 신장암 세포주 A489에 처리하고 세포 독성을 평가하였다.

도 1은 실시예 2의 후박나무 분획물 시료를 대상으로 신장암 세포주에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.

그 결과, 실시예 2에서 얻은 후박나무 가지 추출물의 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물 모두 신장암 세포주의 생존율을 저해했다. 특히 후박나무 가지 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물은 신장암에 대한 세포독성이 우수하였으며 농도가 증가할수록 세포독성도 현저히 증가하였다.

도 2는 실시예 4의 후박나무 분획물 시료를 대상으로 신장암 세포주에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.

그 결과, 실시예 4에서 얻은 후박나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, 부탄올 분획물은 신장암 세포주의 생존율을 저해했으나, 물 분획물은 신장암 세포주의 생존에 영향이 없었다. 특히 후박나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 신장암에 대한 세포독성이 현저히 우수하였다.

결론적으로, 후박나무의 가지와 잎 모두 에틸아세테이트 분획물이 신장암 세포에 대한 항암 활성이 가장 우수했다.

실험예 2. 대장암 세포주에 대한 세포독성 평가(항암 효과)

[0093] 2-1. 세포주 및 세포독성 평가 방법

[0094] 인간 대장암 세포주 HT-29, 정상 장관계 세포주 INT-407는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양 받았다. 세포배양과 독성 평가를 위하여 HT-29과 INT-407 세포 각각 DMEM 및 MEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였다. 각 배지에는 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제(100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)를 첨가하였으며, INT-407 세포를 위한 MEM 배지에는 1% 비필수 아미노산(non-essential amino acid)을 주입하였다.

[0095] 세포독성 평가를 위하여 HT-29와 INT-407 세포를 96-well plate에 well당 1.5×10^4 이 되도록 분주하여 24~48시간 동안 배양한 후, 시료가 포함된 serum-free 배지로 교환하여 24시간 더 처리하였다. 이 후 처리 배지를 제거하고, 0.5 mg/mL MTT 용액을 각 well당 100 μ L 씩 첨가하여, 37℃에서 약 1~2시간 반응시켰다. 생성된 MTT formazan을 100 μ L DMSO에 용해하여 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 평가하였다.

[0096] 일원배치 분산 분석(ANOVA, Kruskal-Wallis test)와 사후검정(Dunn's Multiple Comparison post-test)를 이용하여 통계적 유의성을 평가하였으며, $p < 0.05$ 의 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

[0098] 2-2. 대장암 세포주와 정상 장관계 세포주에 대한 세포독성 평가

[0099] 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 이용하여 대장암 세포주와 정상 장관계 세포주에 대한 세포독성을 평가하였다.

[0100] 도 3은 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 대장암 세포주(HT-29)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다. 그 결과, 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 모두 대장암 세포주(HT-29)에 세포 독성이 없었다.

[0101] 도 4는 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 정상 장관계 세포주(인간 장 상피 세포, INT-407)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다. 그 결과, 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물은 정상 장관계 세포주(정상 소장 세포)에 대해서도 세포독성이 없었다.

[0102] 결론적으로, 후박나무의 가지 또는 잎으로부터 유래한 열수 추출물은 대장암 세포와 정상 장 세포 모두에 세포 독성이 없었다.

[0104] **실험예 3. 유방암 세포주에 대한 세포독성 평가(항암 효과)**

[0105] 3-1. 세포주 및 세포독성 평가 방법

[0106] 인간 유방암 세포주 MCF-7은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. 세포배양과 독성 평가를 위하여 MCF-7 세포는 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였다. 각 배지에는 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제(100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)를 첨가하였다.

[0107] 세포독성 평가를 위하여 96-well plate에 well당 세포수를 1.5×10^4 이 되도록 분주하여 24~48시간 동안 배양한 후, 시료가 포함된 serum-free 배지로 교환하여 24시간 더 처리하였다. 이후 처리 배지를 제거하고, 0.5 mg/mL MTT 용액을 각 well당 100 μ L 씩 첨가하여, 37℃에서 약 1~2시간 반응시켰다. 생성된 MTT formazan을 100 μ L DMSO에 용해하여 microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 평가하였다.

[0108] 일원배치 분산 분석(ANOVA, Kruskal-Wallis test)와 사후검정(Dunn's Multiple Comparison post-test)를 이용하여 통계적 유의성을 평가하였으며, $p < 0.05$ 의 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

[0110] 3-2. 유방암 세포주에 대한 세포독성 평가

[0111] 상기 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물을 이용하여 유방암 세

포주에 대한 세포독성을 평가하였다.

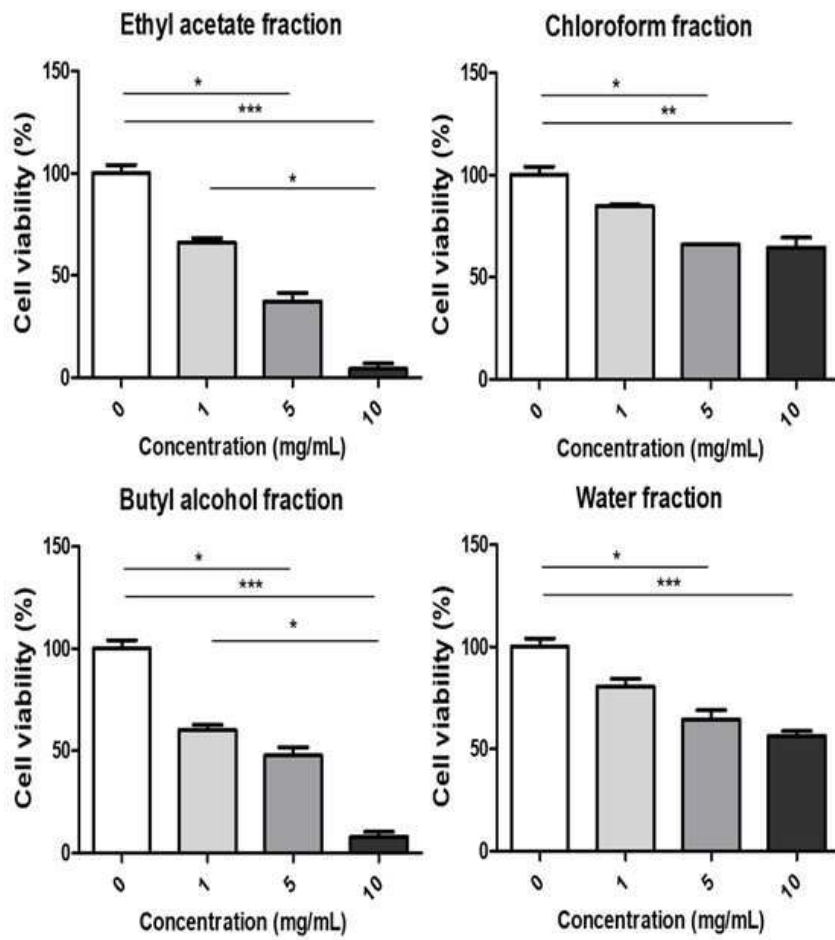
- [0112] 도 5는 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물 시료를 대상으로 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다. 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물은 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 세포 독성이 전혀 없었다.
- [0113] 도 6은 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.
- [0114] 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물은 10~25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유방암 세포주(MCF-7)의 세포 생존율을 저해하였다.
- [0115] 따라서, 후박나무 잎과 가지 중에서 후박나무 잎의 열수추출물만 유방암 세포주에 대한 세포 독성을 보여 항암 효과를 가지는 것을 알 수 있었다.
- [0116] 후박나무의 잎 또는 가지로부터 유래한 추출물 또는 이의 분획물은 신장암에 대한 항암 효과를 나타냈으며, 후박나무 잎의 추출물만 유방암에 대한 항암 효과를 나타냈다. 후박나무 가지와 잎 모두 대장암에 대한 항암 효과는 없었다. 즉, 후박나무의 추출 부위와 추출 또는 분획 용매의 종류에 따라 동일한 암세포에 대한 항암 활성이 상이하였으며, 또한 암 종류마다 상이한 항암 활성을 가지는 것을 확인했다.

[0118] **실험예 4. 후박나무 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성 실험**

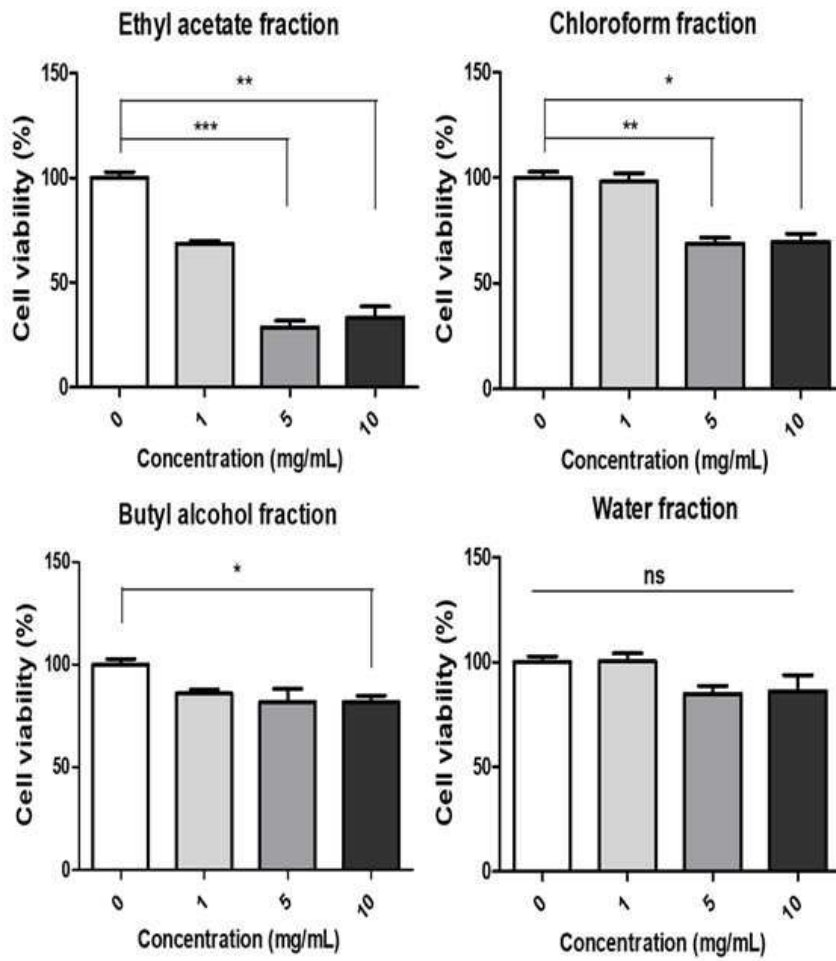
- [0119] 항산화 활성 측정을 위해 시료는 0.2 μM membrane filter로 여과시켜 시험용액으로 이용하였다. 시험용액은 멸균증류수로 연속희석하여 농도별로 분석하였다. ABTS라디칼 소거활성은 Re 등(1999)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 시료액 50 μL 를 150 μL ABTS 용액(7.4 mM ABTS and 2.6 mM potassium persulfate)와 혼합하여 상온의 암소에서 30분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(SpectraMax i3x, Molecular Devices, CA, USA). 이때 항산화 활성을 비교하기 위한 항산화제로는 Ascorbic acid를 사용하였다.
- [0120] 상기 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물을 이용하여 ABTS 자유라디칼 소거활성을 평가하여 항산화 효과를 확인하였다.
- [0121] 도 7은 실시예 5의 후박나무 가지의 열수 추출물과 실시예 6의 후박나무 잎의 열수 추출물 시료를 대상으로 항산화 효과를 비교한 것이다.
- [0122] 실시예 5의 후박나무 가지의 열수추출물은 농도가 증가할수록 ABTS 자유라디칼 소거 활성이 증가하였다. 실시예 6의 후박나무 잎의 열수추출물은 1 mg/mL 농도부터 매우 우수한 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 양성대조군으로 사용한 단일의 화합물인 ascorbic acid와 유사한 항산화 활성을 나타냈다.
- [0124] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

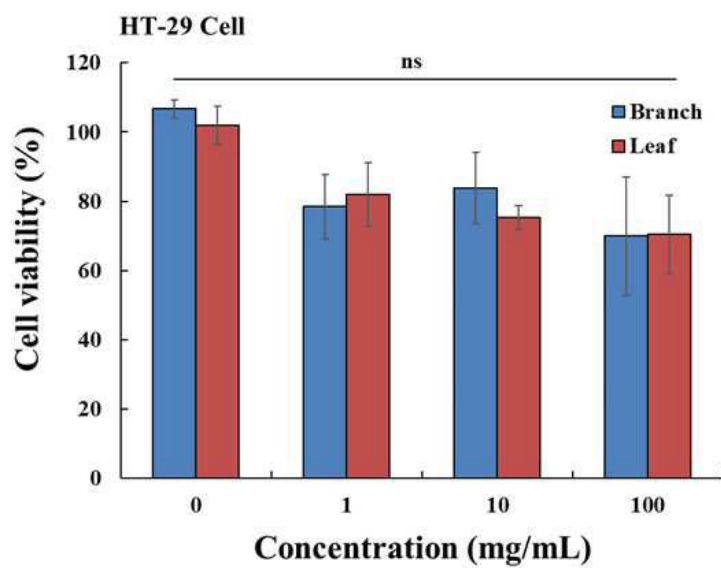
도면1



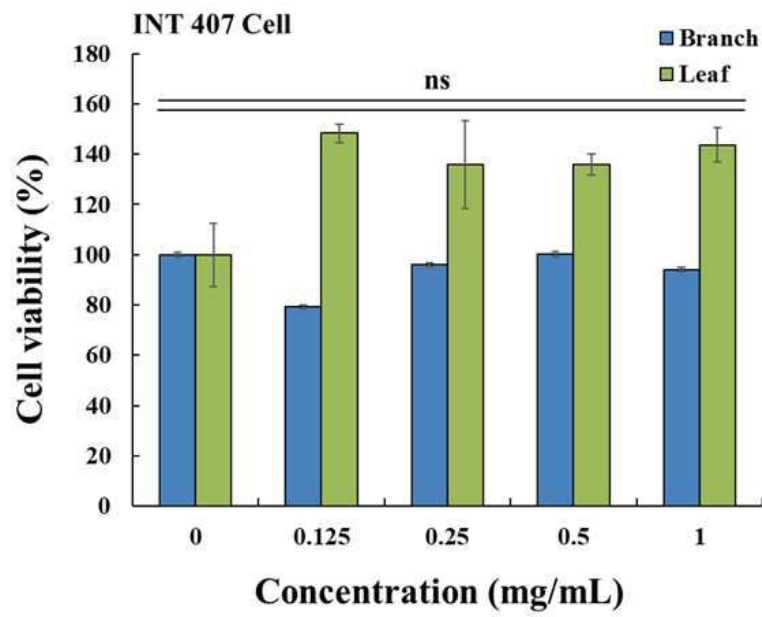
도면2



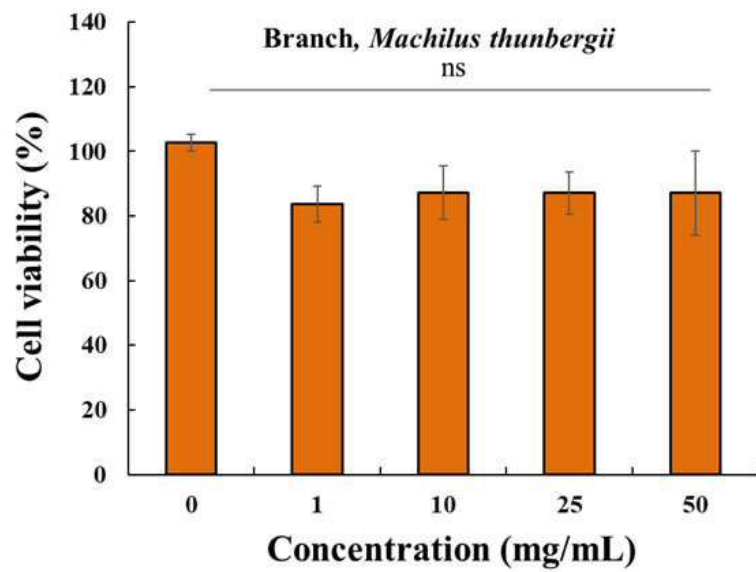
도면3



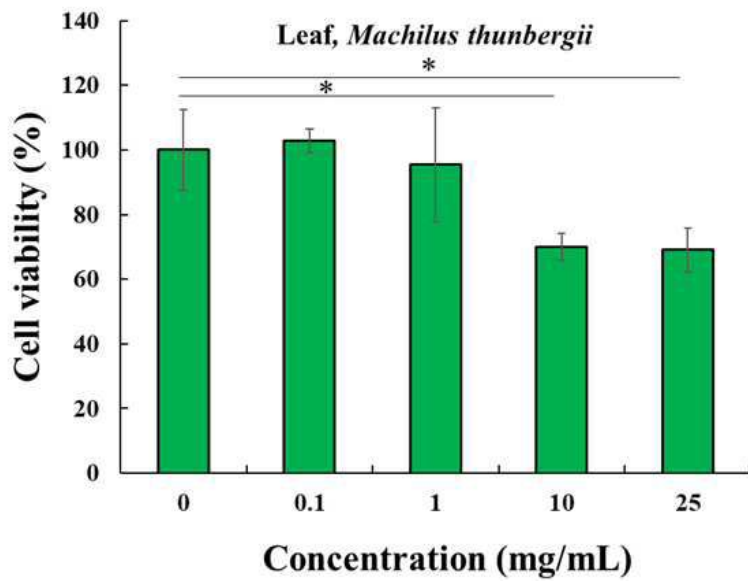
도면4



도면5



도면6



도면7

