



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0051193
(43) 공개일자 2019년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/22 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/22 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0146567

(22) 출원일자 2017년11월06일

심사청구일자 2017년11월06일

(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

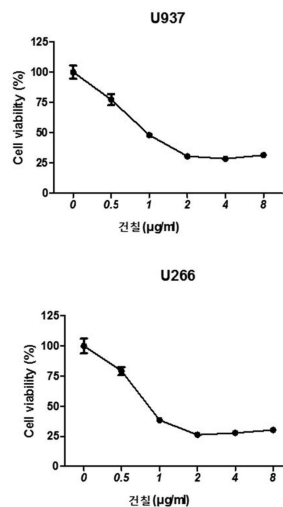
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 건칠 추출물을 포함하는 암의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 건칠 추출물의 항암 활성에 관한 것으로, 구체적으로, 건칠 추출물은 cleaved-PARP 및 CHOP(C/EBP homologous protein)의 발현량을 증가시켜 세포 내의 활성 산소의 생성량을 증가시키고, 이에 따라 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스에 의한 세포사멸을 유도하여 암세포를 제거하는 효과를 나타냄으로써, 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1D1A1B03933656

부처명 교육부, 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 이공학개인지초연구지원

연구과제명 Scaffold를 이용한 접골산 및 접골공진단의 골 재생 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국연구재단(학술진흥)

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

진칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 추출물은 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 추출물은 에탄올로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 추출물은 암세포의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스로 인한 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 추출물은 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 암은 다발성 골수종(multiple myeloma), 혈액암, 대장암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 전립선암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 골수종, 백혈병, 림프종, 위암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부흑색종, 안구내흑색종, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 중추신경계(central nervous system; CNS) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 암은 다발성 골수종(multiple myeloma)인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

진철(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암보조제 조성물.

청구항 10

진철(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

진철(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진철 추출물의 항암 활성에 관한 것으로, 구체적으로는 진철 추출물의 활성산소 생성 및 ER-stress 유발로 인한 암세포 사멸 효과에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재, 암의 치료를 위해서는 자가조혈모세포이식, 동종조혈모세포이식 등의 수술 요법, 방사선 치료 요법 및 화학요법 등이 사용되고 있다. 이 중에서, 화학요법은 항암제를 이용하여 암을 치료하는 방법을 말한다. 그러나 항암 화학치료 과정에 있어 많은 환자들이 항암제의 부작용에 의하여 고통을 받고 있으며, 특히 항암제의 독성으로 인하여 제한적인 투여가 이루어지고 있다. 임상에서 사용되고 있는 항암물질은 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치며 투여회수가 반복되면서 치료에 실패하는 등 부작용 및 항암제 내성과 같은 문제점을 가지고 있다. 암 자체의 다양성 및 발병기전의 다양화로 인해 야기되는 기존항암제의 부작용을 극복할 수 있는 새로운 형태의 항암제 치료물질 연구가 진행되고 있다.

[0003] 다발성 골수종은 골수에서 항체를 생산하는 백혈구의 한 종류인 형질세포(Plasma Cell)가 비정상적으로 증식하는 혈액질환으로 특히 뼈를 침윤하는 것이 특징이고 면역장애, 조혈장애 및 신장장애를 일으키는 치명적인 암질환이다. 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 다발성 골수종 환자의 20%는 증상 없이 우연히 발견되기도 한다. 2016년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 다발성골수종(C90)은 전체 암 발생의 0.6%를 차지하는 질병으로써 발병시 완치가 어려운 질병 중 하나이다.

[0004] 한편, 소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 세포에서 단백질과 콜레스테롤 생산에 관여하는 소기관으로, 세포에서 단백질을 전달하는 역할을 수행한다. 소포체(ER)에서 단백질들은 번역 후 수정(post-translational modification)과정을 거치게 되며, 수정(modification), 폴딩(folding) 등의 과정을 통해 활성형 단백질 구조가 된다. 따라서, 소포체는 분비 또는 막 단백질의 품질을 조절하는데에 매우 중요한 기관이다. 소포체 스트레스(ER stress)란 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말하며, 주로 단백질 폴딩 용량을 넘어서서 ER 단백질 폴딩 부하를 초과한 상태를 의미한다. ER stress가 심해지면 손상된 세포를 제거하기 위해 세포사멸(apoptosis)을 유도하게 되는데 이 과정에서 CHOP/GADD153이 중요한 매개체로 작용한다. 세포사멸을 회피하는 것은 악성 세포의 전형적인 특징이며, 세포사멸에 대한 세포의 저항성은 중요한 임상적 문제가 된다. 이러한 ER stress의해 유도된 세포사멸 경로 활성화는 허혈성 혈관질환에서 활성산소(ROS)와도 연관이 있다고 보고되어 진다.

[0005] 이런 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 정상적인 세포내 활성작용 과정에서 생성되며 세포분화, 유전자의 발현, 사이토카인에 분비 등을 포함한 여러 생물학적 과정에 연관되어 있다. 산화적스트레스는 활성산소의 생성과 이를 제거하는 항산화 반응간의 불균형으로 인해 세포내 활성산소가 증가하여 DNA나 단백질, 지질(lipid)과 반응하여 손상시키는 현상으로 이러한 ROS의 항상성을 유지하는 것은 정상세포뿐만 아니라 암세포성장과 생존에 매우 중요하다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 소포체 스트레스를 조절하여 암을 예방하고 치료할 수 있는 부작용이 적은 천연물을 이용한 항암제를 개발하기 위한 연구를 수행한 결과, 진철(*Rhus verniciflua* Strokes)의 추출물이 cleaved-PARP 및 CHOP(C/EBP homologous protein)의 발현량을 증가시켜 세포 내의 활성 산소의 생성량을 증가시키고, 이에 따라 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스에 의한 세포사멸을 유도함으로써 다발성 골수암에 대한 항암 효과

가 우수함을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2001-0018662호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 건칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물이 암세포에 세포 독성을 가지고, 특히, 세포내 ROS를 증가시키며 ER-stress를 유발하여 암세포의 사멸을 유도하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 건칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 항암보조제, 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0013] 본 발명은 건칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 건칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암보조제 조성물을 제공한다.

[0015] 나아가, 본 발명은 건칠 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 더 나아가, 본 발명은 건칠 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, 건칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물은 cleaved-PARP 및 CHOP(C/EBP homologous protein)의 발현량을 증가시켜 세포 내의 활성 산소의 생성량을 증가시키고, 이에 따라 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스에 의한 세포사멸을 유도하여 암세포를 제거하는 효과를 나타냄으로써, 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 건칠 추출물 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937 및 U266의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 2는 건칠 추출물 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937 및 U266에서의 세포사멸 및 ER 스트레스 유발 관련 단백질들의 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

도 3은 건칠 추출물과 활성산소 억제제(NAC) 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937 및 U266의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 4는 건칠 추출물 또는 뷰테인 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937 및 U266의 세포 생존율을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] **암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**
- [0024] 본 발명은 건칠(*Rhus verniciflua* Stokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 상기 건칠은 옻나무 *Rhus verniciflua* Stokes(옻나무과 Anacardiaceae)의 줄기에 상처를 입혀 흘러 나온 수액이 자연 건조된 덩어리를 의미한다. 동의보감에 따르면 혈액 순환을 촉진하고 어혈을 없애며 적(積)을 삭이고 기생충을 구제한다고 알려있다. 또한, 항박테리아, 항진균, 항염증, 항바이러스, 항천식, 항암, 항전립선염, 항산화, 항당뇨 등의 활성이 있는 것으로 보고되어 있으며, 대장, 위, 간, 신장, 췌장 및 폐암 치료 효과에 대한 임상보고가 존재한다. 그러나 다발성 골수종에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물(extract)"은 생약을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물일 수 있다. 상기 건칠 추출물은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, 상기 추출용매는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 또한, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 더 바람직하게는 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 상기 용매로서 100% 에탄올을 이용하여 추출한 뒤 감압 농축한 건칠 추출물을 제조하였다.
- [0028] 본 발명에서, 상기 암은 다발성 골수종(multiple myeloma), 혈액암, 대장암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 전립선암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 골수종, 백혈병, 림프종, 위암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부흑색종, 안구내흑색종, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 중추신경계(central nervous system; CNS) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 다발성 골수종(multiple myeloma)인 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명에 따른 상기 건칠 추출물은 암세포의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스로 인한 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있고, 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성량을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암의 예방 또는 치료는 암세포의 활성산소 생성 증가 및 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스로 인한 세포사멸을 통해 달성될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서는 건칠 추출물 처리에 의해 다발성 골수종 세포의 사멸이 증가하는 것을 확인하였으며(실험예 1 및 도 1 참조), 이와 같은 항암 활성 기작을 확인하기 위하여 세포사멸 관련 단백질들과 ER-스트레스 관련 세포사멸 유발 단백질들의 발현 변화를 확인한 결과, CHOP 발현이 증가하고 PARP의 절단이 증가하였으며(실험예 2 및 도 2 참조), 다발성 골수종 내의 활성산소(ROS)가 증가하는 것을 확인함으로써(실험예 3 및 도 3 참조), 본 발명의 건칠 추출물이 ER-스트레스 및 ROS 생성을 유발하고 이를 통해 세포사멸을 유도해 항암 활성을 나타내는 것임을 확인하였다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어 "세포사멸"은 아포토시스(apoptosis) 또는 세포자멸사라고도 하며, 일종의 계획된 세포 죽음(programmed cell death; PCD)으로서, 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램에 의해 비정상 세포, 손상된 세포, 노화된 세포가 스스로 자살해 사멸함으로써 전체적인 신체 건강을 유지하도록 하는 메커니

증이다.

- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란 본 발명의 건칠을 포함하는 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0037] 본 발명의 건칠 추출물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0038] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 왕불류형 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0039] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 건칠 추출물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07-7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7-2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 건칠 추출물 이외에 공지된 항암제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다. 다른 치료에는 화학요법, 방사선치료, 호르몬 치료, 자가조혈모세포이식, 동종조혈모세포이식, 골수 이식, 줄기-세포 대체치료, 다른 생물학적 치료, 면역치료 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 항암제의 예시에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agents)로 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부칠(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부숴판(busulphan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토크산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C) 및 블레오마이신(bleomycin); 및 식물 알칼로이드(plant alkaloids)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] **항암보조제 조성물**
- [0045] 본 발명은 건칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암보조제 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 용어 "항암보조제"는 항암제의 항암효과를 증대시키고, 항암제의 부작용을 억제하거나 개선시키기 위하여 사용될 수 있으며, 항암제와 병용하여 환자에게 투여될 수 있다.

[0048] **건강기능성식품 및 건강식품 조성물**

[0049] 본 발명은 건칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 건강식품 조성물에 관한 것이다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 항암제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0051] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 건칠 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품 또는 건강식품을 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 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0053] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강기능식품 또는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 건칠 추출물을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0054] 본 발명의 건칠 추출물은 천연 식물을 원료로 하므로 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 사용할 경우에도 일반적인 합성 화합물에 비하여 부작용이 덜할 수 있으므로, 안전하게 약학적 조성물, 건강기능식품 및 건강식품에 포함되어 유용하게 사용될 수 있다.

[0056] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0058] **<실시예 1> 건칠(*Rhus verniciflua* Strokes) 추출물 제조**

[0059] 100% 에탄올 1L에 건칠 1kg을 삼각 플라스크에 넣고 상온에서 96시간 추출한 뒤 거름종이로 약제를 걸러주어 추출액을 여과하였다. 알코올 추출액을 100ml씩 50℃에서 3시간 동안 감압 농축한 후 -80℃에서 4~10Pa 압력으로 6시간동안 동결 건조 시킨 후 다시 -80℃에서 얼려 주고 다시 동결 건조를 시키는 작업을 3회 반복 하였다. 이후 약 수저를 이용하여 동결 건조시킨 건칠 추출물을 끊어 낸 후 무게를 측정하여 수득률을 계산 하였다. DMSO(dimethyl sulfoxide)1ml에 건칠 추출물을 200mg으로 녹여 200mg/ml의 농도로 Stock 을 만든 후 1.5ml 튜브에 넣어 -20℃에 보관 하였다.

[0061] **<실험예 1> 건칠 추출물의 다발성 골수종에 대한 세포 독성 확인**

[0062] 상기 실시예 1에서 제조한 건칠 추출물의 다발성 골수종에 대한 항암 활성을 확인하기 위하여, 다발성 골수종

세포주인 U937 세포주(한국세포주은행) 및 U266 세포주(한국세포주은행) 50 μ l를 각각 96웰-플레이트에 2×10^4 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 배지에서, 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다.

[0063] 배양한 세포주 U937 및 U266에 상기 실시예 1에서 제조한 건칠 추출물을 0, 0.5, 1, 2, 4 및 8 μ g/ml의 농도로 각각 50 μ l씩 처리한 뒤, 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션한 세포에 EZ-Cytox 시약(DoGen)을 10 μ l 처리하고 30분 내지 4시간 동안 인큐베이션한 뒤, 마이크로플레이트 리더기(Bio-rad Model 680) 흡광도 450nm에서 세포 생존율을 확인하였다. 도 1에 건칠 추출물 처리에 의한 다발성 골수종 세포주 U937(상단) 및 U266(하단)의 세포 생존율을 측정된 결과를 나타내었다.

[0064] 그 결과, 건칠 추출물의 농도 의존적으로 다발성 골수종에 독성을 나타내어 세포 생존율이 감소하였고, 건칠 추출물이 다발성 골수종을 사멸시키는 것을 확인하였다(도 1).

[0066] <실험예 2> 건칠 추출물에 의한 다발성 골수종의 세포사멸 및 소포체스트레스 유도 효과 확인

[0067] 상기 실시예 1에서 제조한 건칠 추출물이 다발성 골수종에서의 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포 사멸 진행시 절단되는 것으로 알려진 PARP(Poly ADP ribose polymerase)의 발현 정도와 DNA 손상 및 소포체스트레스(ER stress)를 유발하는 것으로 알려져 세포사멸의 마커로 이용되는 CHOP(C/EBP homologous protein)의 발현 정도를 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다.

[0068] 구체적으로, 다발성 골수종 세포주인 U937 및 U266 세포주에 상기 실시예 1에서 제조한 건칠 추출물을 0, 0.25 및 0.5 μ g/ml로 각각 처리하고 24시간 동안 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터로 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 Na₃VO₄ 및 1 μ g/ml leupeptin(Cell signaling))를 첨가하여 30분간 4℃에서 세포파쇄하였다. 세포파쇄물을 15,520 $\times$ g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거한 후 RC DC™ Protein Assay Kit II(protein assay kit) (Bio-rad, USA)를 사용하여 단백질을 정량하여 시료별(건칠 추출물 0, 0.25 및 0.5 μ g/ml 처리군)로 동일한 단백질의 양이 포함되도록 조절하였다. 준비된 단백질 시료에 5 $\times$ 로딩 다이(loading dye)를 넣고 5분 동안 95℃로 가열하여 단백질을 변성시켰다. 그 후, 8 내지 10% SDS-PAGE 겔에 시료를 로딩하여 90 내지 100V로 1시간 30분 내지 3시간 동안 전기영동을 수행하였으며, 겔 위에서 분리된 단백질들을 200mA~300mA로 1시간 내지 2시간 동안 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼된 멤브레인을 5% 스킵 밀크가 포함된 TBST(tris buffered saline, pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 블로킹한 뒤 1차 항체 항-PARP(cell signaling) 및 항-CHOP(cell signaling)를 각각 1:500으로 희석하고 블로킹한 멤브레인과 4℃에서 오버나잇으로 반응시켰다. 멤브레인을 TBST로 3회 워싱한 뒤 2차 항체인 horseradish peroxidase가 결합된 항-rabbit IgG를 1:1,000으로 희석하여 상온에서 멤브레인과 1시간 동안 반응시킨 다음 TBST로 3회 워싱하였다. 워싱한 멤브레인을 chemiluminescent reagent와 1 내지 3분 동안 반응시키고 필름에 감광하여 단백질 밴드를 가시화하였다.

[0069] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 건칠 추출물의 농도에 의존적으로 PARP의 절단이 증가하고, CHOP의 발현이 증가함에 따라, 세포사멸과 ER-스트레스가 건칠 추출물에 의해 증가되는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 건칠 추출물이 다발성 골수종의 세포 사멸을 농도의존적으로 유발시킬 수 있음을 알 수 있었다.

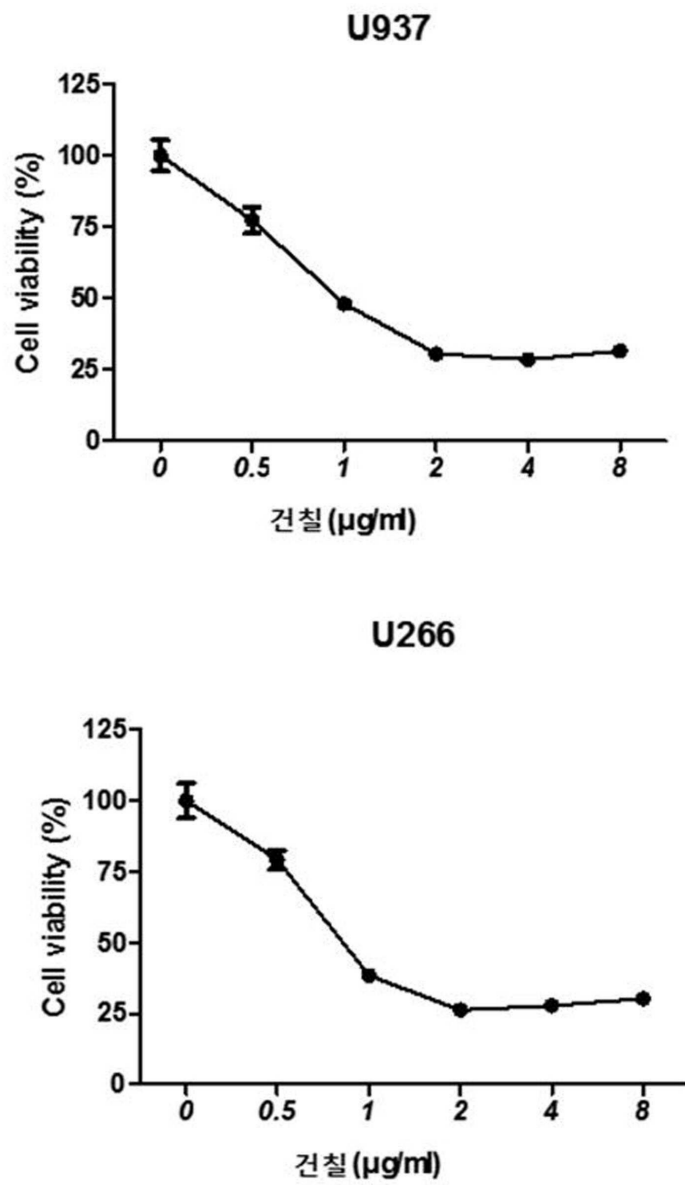
[0071] <실험예 3> 다발성 골수종에서의 건칠 추출물의 활성산소 유발에 따른 세포사멸 효과 확인

[0072] 상기 건칠 추출물의 다발성 골수종 세포사멸 유도 효과가 활성산소 생성 유발로 인한 세포사멸에 의한 것인지 확인하기 위하여, 다발성 골수종 세포주인 U937 및 U266 세포주 50 μ l를 각각 96웰-플레이트에 2×10^4 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 억제제로 알려진 NAC(N-Acetyl-L-cysteine)를 5mM 농도로 1시간 전처리 후, 상기 실시예 1에서 제조한 건칠 추출물을 0.5 μ g/ml 농도로 50 μ l 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 측정하였다. 이때, 상기 NAC(5mM) 및 건칠 추출물(0.5 μ g/ml)을 각각 단독처리한 세포의 생존율도 함께 측정하여 세포 생존율을 비교하여, 활성산소생성과 세포 독성 사이의 상관 관계를 확인하였다.

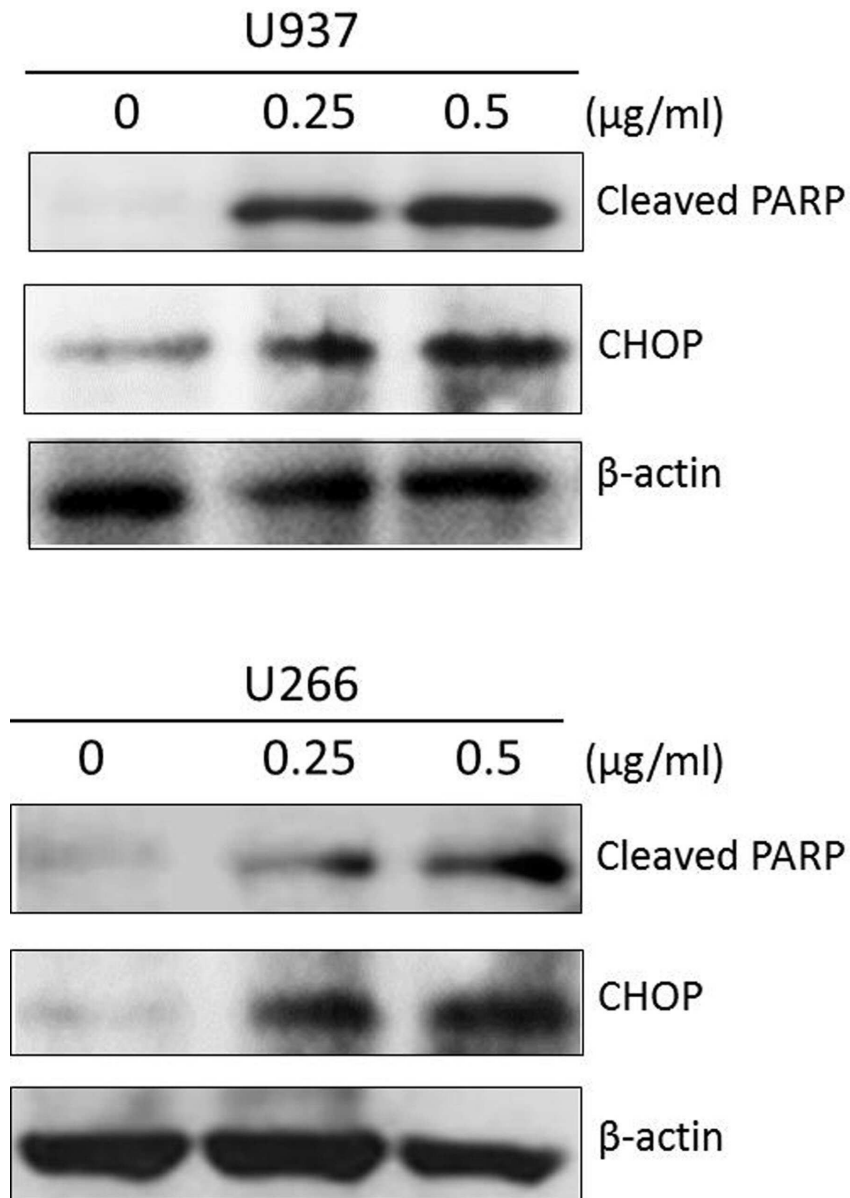
- [0073] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 건칠 추출물($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)만을 처리한 경우 세포 생존율이 유의적으로 감소된 반면, ROS 억제제인 NAC 처리시 세포 생존율이 증가 되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 건칠 추출물은 활성 산소를 증가시킴으로써 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다.
- [0075] <실험예 4> 건칠 추출물 및 뷰테인의 다발성 골수종에 대한 세포 사멸 효과 비교
- [0076] 다발성 골수종 치료 효과가 있는 것으로 알려진 뷰테인(butein)과 상기 실시예 1에서 제조한 건칠 추출물의 다발성 골수종에 대한 항암 활성을 비교하기 위하여, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 다발성 골수종 세포주인 U937 및 U266 세포주에 건칠 추출물 및 뷰테인을 각각 0, 0.5, 1, 2, 4 및 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 $50\mu\text{l}$ 씩 처리한 뒤 각 세포의 생존율을 확인하였다.
- [0077] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 다발성 골수종 세포 U937 및 U266 모두에서 건칠 추출물이 뷰테인보다 더 강한 독성을 나타내었다. 특히, $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 뷰테인 처리군의 세포 생존율은 약 90%인 것으로 나타난 반면, 건칠 추출물 처리군은 50% 이하로 세포 생존율이 감소하여, 뷰테인보다 건칠 추출물의 다발성 골수종 세포 사멸 효과가 저농도에서도 훨씬 우수한 것을 확인하였다(도 4).
- [0079] 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 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

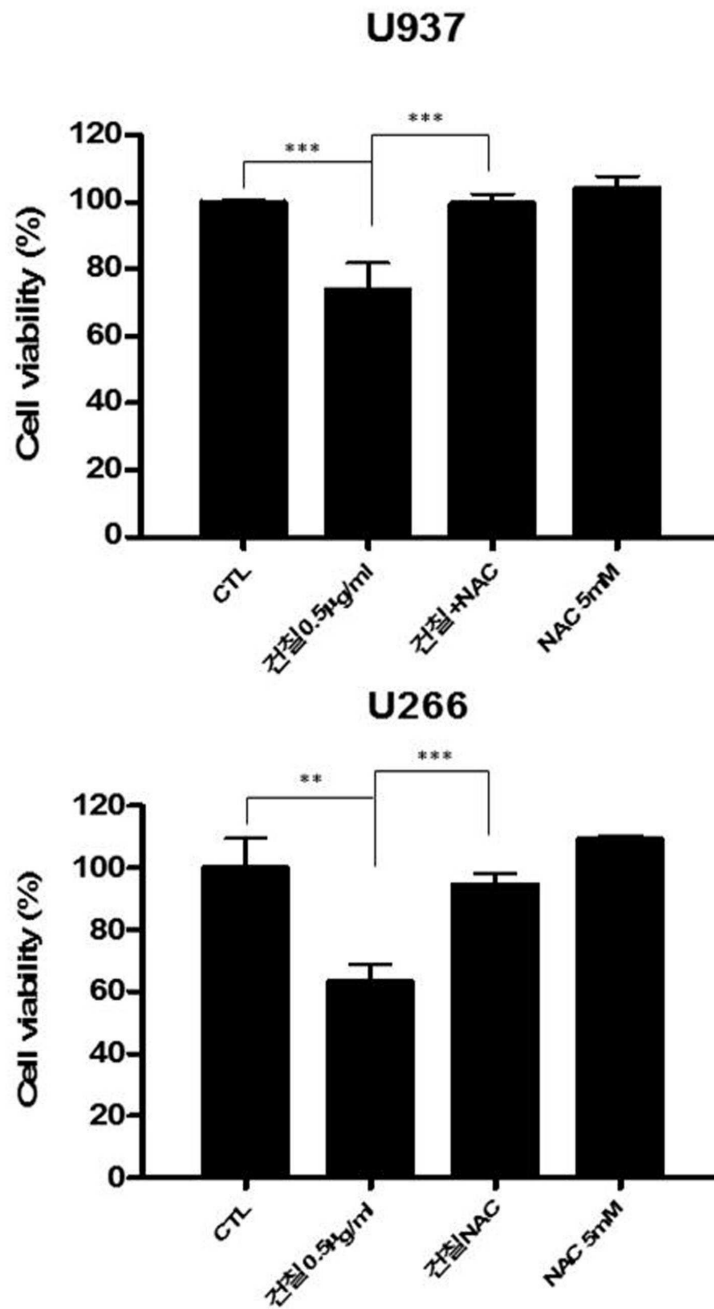
도면1



도면2



도면3



도면4

