(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0046569
(43) 공개일자 2025년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/539 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61P 13/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/539 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0130151
(22) 출원일자 2023년09월27일
심사청구일자 2023년09월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김봉이
서울특별시 강동구 상암로 355, 4동 101호 (상일동, 대림빌라)
최민
서울특별시 동대문구 경희대로6길 19, 205호 (회기동)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

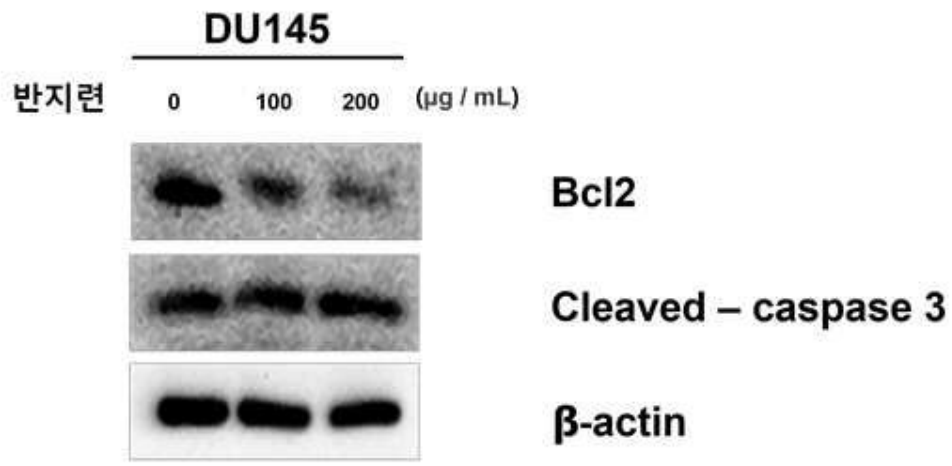
(54) 발명의 명칭 **반지련 추출물을 포함하는 전립선암의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 반지련 추출물은 전립선암 세포주에서 세포독성을 가짐을 확인하여 발명을 완성하였다. 구체적으로, 본 발명의 반지련 추출물은 거세 저항성 전립선암 세포주인 DU145에서 Bcl2를 감소시키고 Cleaved-Caspase3을 증가시킴으로써 농도 의존적으로 상기 DU145 세포의 사멸을 유도함을 확인하였다.

이에 따라 상기 반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 전립선 암에 대한 치료효과가 우수하며, 더 나은 치료 효과를 연구하는 분야에 활용할 수 있는 바, 전립선암과 관련된 유용한 사업에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61P 13/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465038589
과제번호 HF20C0038000023HF20C0038000023
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 한의약혁신기술개발
연구과제명 의한협진을 통한 암관련증상 한의완화치료 및 항암증진효과에 대한 연구개발
기 여 율 5/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345351506
과제번호 2020R1I1A2066868
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 [혁신법] 학문균형발전지원(보호연구)
연구과제명 [보호,4/7]한약물의 장내 미생물 조절을 통한 췌장암 억제 연구
기 여 율 90/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711158248
과제번호 2020R1A5A2019413
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (혁신법)이공분야기초연구사업/선도연구센터지원사업/기초의과학분야(MRC)
연구과제명 [한의대MRC 1단계3/4] 한약물 재해석 암 연구 센터
기 여 율 5/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는, 전립선 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 반지련 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출된 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 반지련 추출물은 메탄올로 추출된 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 반지련 추출물의 농도가 50mg/ml인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 전립선 관련 질환은 전립선암, 전립선 비대증, 전립선염, 전립선 농양 및 전립선석회화로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 반지련 추출물은 전립선암세포의 Bcl-2의 발현을 억제시키고 Cleaved-Caspase3을 증가시켜 전립선 관련 질환을 예방 및 치료하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 전립선암세포는 DU145인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제 6항 내지 7항에 있어서, 상기 암세포는 거세 저항성 전립선암세포인 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는, 전립선 관련 질환 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 10

반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는, 전립선 관련 질환 예방 및 개선용 사료 조성물.

청구항 11

실험관내에서(in vitro), 반지련 추출물을 거세 저항성 전립선암 전립선 관련 질환 세포에 투여하는 단계;를 포

함하는,

전립선 관련 질환세포에서 항 세포 자멸 반응 인자인 Bcl-2(B cell lymphoma-2)의 발현을 억제시키고, Cleaved-Caspase3을 증가시켜 전립선 관련 질환 세포의 세포사멸을 유도하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 반지련 추출물을 포함하는 전립선암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전립선암은 남성에서 가장 흔한 암 중 하나로, 초기 증상이 미약해 조기 발견이 어렵다. 암이 진행되면서 배뇨곤란, 야간 배뇨, 혈뇨, 요실금, 및 요통 등의 증상이 발발한다. 조기 치료를 위해, 전립선 특이 항원(Prostate-specific antigen, PSA) 검사를 실시하기도 하나, PSA 수치는 전립선암 이외의 질환에서도 높게 나타날 수 있으므로, 그 정확도가 높지 않아 전립선암 검진에 통상적으로 사용되지는 않는다. 이에 환자가 전립선암을 자각할 시점에는 악성으로 진행된 경우가 다수인 바, 조기 치료가 어렵다.

[0004] 전립선암의 원인은 정확히 밝혀지진 않았으나, 나이, 가족력, 환경적 요인 등이 관련이 있다고 보고되고 있으며, 고령일수록 발병률이 증가함에 따라, 2025년에는 한국 고령인구가 전체 인구의 20%를 넘어설 것으로 예상되는 고령화 사회 진입에 따라 그 발병정도 증대가 예상되는 질병 중 하나로 손꼽히고 있다.

[0005] 전립선암의 종양의 크기가 작은 경우 지속적 모니터링을 통해 종양을 감시하며, 종양의 위험 가능성이 높은 경우 방사선 요법 또는 근치적 절제술을 이용하여 외과적으로 제거하는 치료방법을 이용한다. 재발 또는 전이가 발생한 경우 호르몬 요법을 이용하지만, 상기 호르몬 요법을 이용하는 경우 종양의 성장은 중단되나, 호르몬 치료에 대한 내성이 생긴다. 이외에도 Docetaxel(DTX 또는 DXL) 등의 화학요법으로 치료를 하기도 하지만, 전립선암에 특화된 약물은 아니라 높은 치료효과를 기대하기는 어려운 실정이다.

[0006] 상기에서와 같이, 전립선암은 조기 진단 및 그 치료에 어려움이 있으며, 치료 이후에도 재발 가능성이 높아 완치가 힘들다. 또한 주요 5대 암에 비해 5년 생존률이 10%정도에 그치며 이에 따라 그 예후도 좋지 않은 바, 전립선암에 특화되고 부작용이 적은 전립선 치료제에 대한 수요가 증가하고 있다.

[0007] 한편, 반지련(半枝蓮, *Scutellaria barbata*)은 꿀풀과 (순형과) 골무꽃속 (genus Scutellaria)에 속하는 식물 Scutellaria barbata D. Don의 전초를 말린 것으로, 한의학에서 '청열해독' 즉, 열사와 열독을 말끔히 풀어주는 성질을 가지는 것으로 알려져 있다. 중국약전(국가약전위원회, 중화인민공화국약전 2015 edition, 중국의과학기술출판부)에 따르면, 상기 반지련은 간염, 충수염, 인두염 등 염증 질환, 외상성 손상, 부종, 및 황달 등의 치료에 사용되며, 중약대사전(이경순, 신민교 외, 2001.03., 도서출판 정담)에 따르면, 최근 암치료에의 사용에 대한 연구가 진행되고 있다(한의학융합연구정보센터).

[0008] 상기 반지련의 유효성분으로는 Neo-clerodane diterpenoids, Flavonoids, Triterpene, Phenylpropanoid and lignan, 및 Polysaccharides 등이 알려져 있으며, 최근까지 반지련에서만 203개 성분이 분리되어 있다(AWang L, Chen W, Li M, Zhang F, Chen K, Chen W. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and quality control of Scutellaria barbata D. Don. J Ethnopharmacol. 2019 Sep 29:112260. doi: 10.1016/j.jep.2019.112260.).

[0009] 반지련을 이용한 항암 연구 분야에서는, 반지련의 항암 기전으로서, PI3K/AKT/mTOR pathway의 경로 조절(Lin J, Feng J, Yang H, Yan Z, Li Q, Wei L, Lai Z, Jin Y, Peng J. Scutellaria barbata D. Don inhibits 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by regulating PI3K/AKT pathway. Oncol Rep. 2017 Oct;38(4):2293-300. doi: 10.3892/or.2017.5892), Wnt/β-catenin signaling pathway의 활성 억제(Wei LH, Lin JM, Chu JF, Chen HW, Li QY, Peng J. Scutellaria barbata D. Don inhibits colorectal cancer growth via suppression of Wnt/β-catenin signaling pathway. Chin J Integr Med. 2017 Nov;23(11):858-63. doi: 10.1007/s11655-017-2775-3.), 및 AKT 억제(Zhao Z, Holle L, Song W, Wei Y, Wagner TE, Yu X. Antitumor and anti-angiogenic activities of Scutellaria barbata extracts in vitro are partially mediated by inhibition of Akt/protein kinase B. Mol Med Rep. 2012 Mar;5(3):788-92. doi: 10.3892/mmr.2011.694.), 항

혈관신생(Dai ZJ, Lu WF, Gao J, Kang HF, Ma YG, Zhang SQ, Diao Y, Lin S, Wang XJ, Wu WY. Anti-angiogenic effect of the total flavonoids in Scutellaria barbata D. Don. BMC Complement Altern Med. 2013 Jul 1;13:150. doi: 10.1186/1472-6882-13-150.), 및 항전이 활성(Zheng X, Kang W, Liu H, Guo S. Inhibition effects of total flavonoids from Sculellaria barbata D. Don on human breast carcinoma bone metastasis via downregulating PTHrP pathway. Int J Mol Med. 2018 Jun;41(6):3137-46. doi: 10.3892/ijmm.2018.3515.) 등을 확인하였으나, 상기에서와 같이 반지련에는 매우 다양한 성분이 존재함에 따라 밝혀지지 않은 항암 기전도 다수 존재하는 것으로 알려져있다(한의학융합연구정보센터).

[0010] 이에 따라 반지련의 항암 효능에 대한 연구가 진행되고 있으나, 항암효과를 나타내는 전립선암의 종류 및 상기 전립선암의 세포주를 대상으로 한 치료 효과에 대하여는 알려진 바 없다. 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 반지련 추출물이 전립선암의 DU145 세포주에 대해 세포사멸(apoptosis)을 유도함을 확인함에 따라, 전립선암, 구체적으로는 거세 저항성 전립선암에 대한 예방 및 치료효과를 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 실험관 내에서(in vitro), 반지련 추출물을 DU145 세포주에 투여하는 단계를 포함하는, 전립선 관련 질환 세포의 세포 자멸 반응 인자인 Bcl-2(B cell lymphoma-2)의 발현을 억제하고, 세포사멸을 활성화시키는 Cleaved-Caspase3을 증가시킴으로써 거세저항성전립선암 세포주인 DU145의 세포사멸을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명자들은 전립선암을 예방 및 치료하기 위한 천연물을 발굴하기 위한 연구를 통해, 반지련 추출물이 전립선암 세포주에서 Bcl-2를 감소시키고 Cleaved-Caspase3을 증가시킴을 확인한 바, 상기 과제에 대한 해결 수단으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0017] 이에, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 반지련 추출물을 포함하는 반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 반지련 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 실험관 내에서(in vitro), 반지련 추출물을 DU145 세포주에 투여하는 단계를 포함하는, 전립선 관련 질환 세포의 세포 자멸 반응 인자인 Bcl-2(B cell lymphoma-2)의 발현을 억제하고, 세포사멸을 활성화시키는 Cleaved-Caspase3을 증가시킴으로써 거세저항성전립선암 세포주인 DU145의 세포사멸을 유도하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 반지련 추출물을 포함하는 조성물은 DU145 세포실험을 통하여, Bcl-2(B cell lymphoma-2)의 발현을 억제하고, 세포사멸을 활성화시키는 Cleaved-Caspase3을 증가시킴으로써 DU145 세포의 세포사멸을 유도하는 것이 확인되었으며, 이를 통해 전립선암 세포를 사멸시킴으로써 전립선암 치료 효과를 가짐을 확인한 바, 상기 조성물은 전립선암 예방, 치료, 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 반지련 추출물의 농도가 증가함에 따라 DU145 세포 생존률이 낮아짐을 확인한 도이다.

도 2는 DU145세포에 반지련 추출물을 투여하여 Bcl2의 band가 줄어들고, Cleaved-Caspase3이 늘어난 것을 Western blot으로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 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.

[0026] 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 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0027] 본 발명에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은, 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 반지련(半枝蓮, *Scutellaria barbata*)은 꿀풀과 (순형과) 골무꽃속 (genus Scutellaria)에 속하는 식물 Scutellaria barbata D. Don의 전초를 말린 것으로, 칫솔골무꽃이라고도 한다. 초본으로 키는 15 내지 50㎝ 정도이며, 줄기에는 4개의 능선이 있다. 하부(下部)는 포복성(匍匐性)의 근경(根莖)이며 상부(上部)는 곧바로 서 있그며, 흰빛이 섞인 보랏빛의 꽃은 이름에서 알 수 있듯이 반쪽으로만 핀다. 상기 반지련은 중국 100대 한약재에 꼽힌 약초로 항알레르기, 항산화, 항염증, 및 항바이러스 활성이 있음이 알려져있다.

[0029] 본 발명에서의 용어, "전립선 관련 질환"은 남성의 생식 및 비뇨기관인 전립선에 발생하는 질환을 의미하며, 그 예로 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암, 전립선 농양, 및 전립선 석회화로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 전립선의 문제로 인하여 발생하는 다양한 질환을 모두 포함할 수 있다. 전립선 농양은 세균이 요도를 통해 전립선까지 파고들어가 급성 염증에 이어 고름 주머니를 만들면서 주변의 전립선조직을 급속히 괴사시키는 병으로, 발병 시 갑자기 심한 고열과 함께 오한이 나타나고, 소변을 보고싶어도 소변을 배출하지 못하는 요폐 증상으로 극심한 배뇨통을 느끼게 된다. 전립선 석회화는 전립선에 석회결석이 가라앉아 생기는 질환을 말한다. 상기 결석은 소변을 포함한 체액 내에 구성성분이 너무 많아지면 모두 액체화되지 못하고 남는 칼슘, 수산염, 인산염 등이 결정화된 것을 말한다.

[0030] 본 발명에서의 “DU145 세포주”는 인간 전립선암 세포주로서, 표준 전립선암 세포주중 하나이다. 상기 DU145 세포주는 안드로겐 수용체(AR)의 발현이 높고, AR 신호전달 경로의 활성화를 그 특징으로 하여, 구체적으로는 거세 저항성 전립선암 세포주로 널리 이용된다. 또한, 세포내 단백질은 LNCaP에 비해 적은 특성을 가지며, 호르몬에 대한 민감성이 낮고, 전립선 특이 항원(Prostate Specific Antigen, PSA)을 발현하지 않는다. 또한, EMEM Media 뿐만 아니라 RPMI-1640 Media에서도 배양 가능하며, 주로 뇌에 전이 되지만 이에 한정되지 않는다.

[0031] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0032] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0033] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 반지련 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 추출물을 분리 및 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 추출물은 적절한 용매를 이용하여 상기의 방법으로 준비된 유효성분 원료를 그대로 또는 분말 상태로 분쇄하여 추출할 수 있다. 이때 추출물을 수

득하기 위해 사용할 수 있는 적절한 용매로는 당업계에서 허용되는 용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 추출물을 제조할 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. 바람직하게는 바람직하게는 물 또는 에탄올로부터 선택되는 1종 이상의 추출용매를 사용하여 추출할 수 있고, 보다 바람직하게는 30 내지 70% 에탄올 수용액을 이용하여 추출할 수 있고, 30% 또는 50% 에탄올 수용액을 이용하는 것이 가장 바람직하다.

[0034] 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 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0035] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 원심분리, 여과, 농축후 동결 건조하여 냉장실에 보관하면서 그대로 사용할 수도 있고, 상기 1차 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.

[0036] 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0037] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는, 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0039] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 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.

[0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 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, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 예를 들어, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비

닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한, 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 뇌혈관내 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며, 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 전립선암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0046] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 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. 상기 건강기능식품은 통상의 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 통상의 기술 분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 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 전립선암을 개선하기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0047] 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명에 따른 반지련 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 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, 에리트라이톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0048] 상기 외에 본 발명에 따른 반지련 추출물을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 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, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0049] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이나 이에 제한되지 않는다.

[0050] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 반지련 추출물을 유효성분으로 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, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 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.

[0052] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명에 따른 상기 반지련 추출물이 포유류 마이오스타틴의 신호를 조절하는 것을 루시페라아제(Luciferase) 실험을 통해 확인하였다(실험예 2 참조).

[0053] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명에 따른 상기 반지련 추출물이 전립선 관련 질환 세포의 세포 자멸 반응 인자인 Bcl-2(B cell lymphoma-2)의 발현을 억제하고, 세포사멸을 활성화시키는 Cleaved-Caspase3을 증가시킴으로써 DU145 세포의 세포사멸을 유도하는 것을 세포실험을 통해 확인하였다(실시예 3 참조).

[0055] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0057] **<실시예 1> 반지련 추출물의 제조**

[0058] 한약진흥재단 한의약소재은행으로부터 구입한 반지련은 70% 메탄올을 추출용매로 하여, 72시간 동안 70% 메탄올에 반지련을 넣어 추출한 후, 72시간이 지난 후에 evaporator를 이용하여 메탄올을 증발시켜서 추출물만 모아주었다. 이후에 동결건조기를 이용하여 -110℃에서 동결건조한 후 -80℃에서 보관하여 반지련 추출물을 완성하였다. 이하 실시예에서는 상기 반지련 추출물 50mg을 DMSO 1mL에 녹여서 50mg/ml 농도로 하여 실험을 실시하였다.

[0060] **<실시예 2> 반지련 추출물의 전립선암 세포주인 DU145 세포독성 확인**

[0061] 본 발명의 반지련 추출물의 전립선암 세포주에 대한 세포독성 여부를 확인하기 위해, 실시예 1의 반지련 추출물 50mg을 다이메틸 설폭사이드(Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 1ml에 녹여서 50mg/ml 농도로 만들어, DU145 세포에 대해 EZ-Cytox 세포 생존도 분석 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 세포독성분석을 실시하였다. 96well plate에 DU145를 $1*10^{14}$cell을 seeding하였고 24시간 배양한 후, 다양한 농도(25, 50, 100, 200, 400㎍/ml)의 반지련 추출물을 첨가하여 24시간 배양하였다. 반지련 추출물로부터 24시간동안 배양된 cell에 EZ-Cytox 10㎕를 투여하고 1시간동안 배양한 후, 세포 생존율의 흡광도 값을 microplate reader를 사용하여 450nm에서 측정하였다.

[0062] 이를 통해 도 1과 같이, 상기 반지련 추출물의 농도가 증가함에 따라 DU145 세포 생존률이 낮아짐을 확인하였다. 따라서, 반지련 추출물은 전립선암 세포에 대해서 독성이 있으며, 이러한 독성은 전립선암 세포를 사멸시키거나 증식을 억제하는 효능이 있음을 나타낸다. 본 실험예에서 반지련 추출물의 최고 농도는 400㎍/ml로 진행했으며, 상기 농도일 때 세포 생존률은 50% 이하로 관찰되었다. 이러한 세포 독성 결과를 바탕으로 특정 억제 물질(예: 약물)이 시험관 내에서 주어진 생물학적 과정 또는 생물학적 성분을 50% 억제하는데 필요한 양을 나타내는 정량적 측정값인 IC50을 200㎍/ml로 선정하였고, 이하 실시예에서는 상기 IC50을 이용하여 실험을 진행하였다.

[0064] **<실시예 3> Western blot을 이용한 반지련 추출물의 DU145 세포사멸 인자 확인**

[0065] 상기 실시예 2에서 선정한 IC50을 이용하여, 반지련 추출물로 인한 DU145 세포의 세포 사멸과 관련된 인자들을 Western blot으로 확인하였다.

[0066] protease inhibitor cocktail을 함유한 lysis buffer(pH=7.4, 1% NP-40, 1 mM Na3VO4, 1M EDTA, 1mM NaF, 50mM Tris-Hcl, 0.25% sodium deoxycholic acid, 150mM NaCl)를 사용하여 DU145 세포로부터 protein을 분리하였다. Bio-Rad DC protein assay kit II를 사용하여 β-actin을 일정하게 맞춰 Protein quantification을 실시하였다. SDS-PAGE 12% gel을 사용하여 western blot을 진행하여, 전기영동에 의해 Protein expression의 차이를 확인하였고, 5% skim milk을 이용하여 blocking하였다. 이를 통해 확인된 protein이 함유된 membrane을 bcl2, cleaved-caspase 3, 및 β-actin에 24시간동안 배양한 후, 2차 antibodies인 mouse와 rabbit에 1시간동안 노출시켰다. Protein expression level은 chemiluminescence (ECL) system으로 확인하였다.

[0067] 이를 통해 도 2와 같이, 반지련 추출물의 투여로 인해 Bcl2의 band가 줄어들고, Cleaved-Caspase3이 늘어난 것

을 확인하였다.

[0068] 상기 Bcl2는 미토콘드리아 외막에 국한되어 세포 생존을 촉진하고 세포 사멸 촉진 단백질의 작용을 억제하는 역할을 하는 바, 이를 통해 전립선암세포인 DU145가 반지련 추출물의 농도 의존적으로 세포 사멸했다고 볼 수 있다.

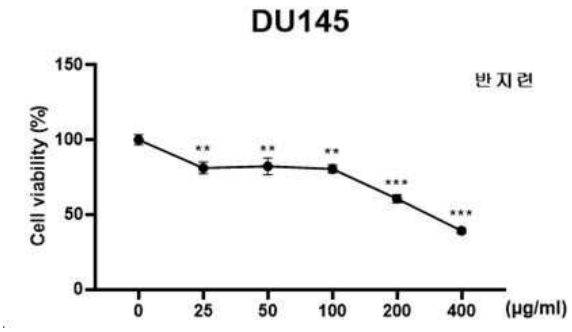
[0069] 또한, 세포사멸은 Caspase에 의해서 조절되는데 상기 Caspase는 미토콘드리아에서 방출된 Cytochrome C에 의해서 활성화되며, 상기 Cytochrome C는 미토콘드리아 내막에 결합하여 있다가 세포 사멸이 일어나게 되면 세포질로 방출되어서 칼슘을 방출하는 바, Cytochrome C가 증가하면서 Caspase 9을 활성화시키고, Caspase9은 Caspase3을 활성화시키며, DNA repair 역할을 하는 PARP의 절단에 의해서 세포 사멸이 일어나게 된다. 이에 따라, Caspase 활성화는 상기 Caspase가 절단됨으로써 발생하므로, Cleaved-Caspase3가 늘어난 것으로 보아, 세포사멸이 일어난 것을 알 수 있다.

[0071] 상기 실시예 2 및 3을 통해, 본 발명의 반지련 추출물은 전립선암 세포, 구체적으로 거세 저항성 전립선암 세포주인 DU145에서 독성을 나타내며, 이러한 독성은 Bcl2를 억제하고, 세포사멸을 활성화시키는 Cleaved-Caspase3을 증가시킴으로써 전립선암 세포를 사멸시킴을 확인한 바, 상기 반지련 추출물은 전립선암에 대해 항암 효능이 있음이 확인되었고, 이를 통해 반지련 추출물을 전립선암의 치료제로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0073] 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 특히 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

