(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0124142
(43) 공개일자 2012년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/75 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0041850
(22) 출원일자 2011년05월03일
심사청구일자 2011년05월03일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
고성규
서울특별시 강남구 압구정동 구현대아파트 13동 104호
설현철
서울특별시 금천구 금하로 724, 2층 벽산한의원 (시흥동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

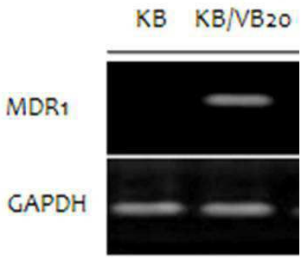
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 다중약물내성 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 다중약물내성(multidrug resistance, MDR) 억제능이 매우 뛰어난 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 다중약물내성 억제용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 항암제에 내성을 나타내는 다중약물 내성 세포에서 보이는 항암제 내성을 극복할 수 있어, 약학적으로 유용한 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암보조제로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자
임희선
서울특별시 강남구 압구정로 347, 한양아파트 26동 501호 (압구정동)

최형심
서울특별시 영등포구 신풍로10길 5-5 (신길동)

특허청구의 범위

청구항 1

백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제에 대한 다중약물 내성 (multidrug resistance) 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 백선피 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 백선피 추출물은 전체 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 다중약물 내성은 P-당단백질 (P-glycoprotein)에 의한 다중약물 내성인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 다중약물내성 억제는 암 세포에서의 다약제 내성 억제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 백선피 추출물은 전체 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 식품학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 백선피 추출물은 전체 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다중약물내성 (multidrug resistance, MDR) 억제능이 매우 뛰어난 백선피 (Dictamnus dasycarpus Turcz)추출물을 유효성분으로 포함하는 다중약물내성 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재까지 암을 치료하기 위한 외과적 요법, 방사선 요법, 화학적 요법 등과 같은 다양한 치료방법이 연구되고 있으나, 아직까지 암의 완전 치료에는 이르지 못하고 있는 실정이다.

[0003] 이중, 외과적 요법과 방사선 요법은 암 발생의 초기 단계에서 유용한 방법이기 때문에 초기에 감지하기가 힘든 암의 경우에는 화학적 요법에 대한 의존도가 점차 증가하고 있으며, 상기 화학적 요법은 50년 이상의 역사를 가지고 있고, 현재까지 수백여 종의 항암제가 개발되어 임상에서 사용되어 왔으나, 임상적으로 만족할만한

효과를 얻는 경우는 아직 많지 않다.

[0004] 항암화학요법 (Chemotherapy)은 가장 효과적인 암환자 치료 방법 중의 하나로 잘 알려져 있으나, 항암제의 지속적 투여는 항암화학요법의 실패를 초래하는 원인으로 지적되어 오고 있다. 이는 세포가 항암제에 내성을 획득하게 되기 때문이며, 한 항암제에 내성을 획득하면 구조가 서로 다른 항암제에 대해서도 내성을 획득하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 암세포가 항암제 구조에 상관없이 비특이적인 내성을 획득하는 것을 "다중약물내성 (다약제 내성, Multidrug Resistance: MDR)"이라 한다 (Gottesman et al., Nat Rev Cancer 2:48-58, 2002; Ambudkar et al.,Oncogene 22:7468-85, 2003). 이러한 암세포의 MDR 획득은 항암화학요법 실패의 가장 큰 원인 중 하나로 잘 알려져 있다. 항암제 내성은 크게 2가지로 분류될 수 있는데 하나는 약물에 세포내로 유입이 되지 못해 생기는 것이고, 또 다른 하나는 암세포 자체가 유전적 (genetic) 또는 후생유전적 (epigenetic) 변화에 의해 항암제에 대한 감수성이 떨어져 나타날 수 있는 것이다.

[0005] 암세포가 MDR을 획득하는 기전을 자세하게 살펴보면 크게 5가지 정도로 나눌 수 있다. 첫째, ATP-의존적 수송체와 같은 유출 펌프 (efflux pump)를 이용하여 세포 내 약물을 세포 외로 쉽게 유출시켜 세포 내 유효약물 농도보다 낮은 농도로 유지하여 내성을 유발하거나, 둘째, 약물 수송체 또는 엔도사이토시스를 통한 약물 유입 감소로 인하여 세포 내 유효약물농도가 유지되지 못해 내성이 발생하거나, 셋째, 세포 내로 유입된 약물의 대사를 촉진/불활성화 시켜 약물내성을 유도 하거나, 넷째, 약물에 의한 DNA 손상을 복구할 수 있는 시스템의 활성화로 약물의 작용을 무력화하여 내성을 발현 시키거나, 다섯째, 약물에 의해 유도되는 세포사멸 (Apoptosis)을 억제할 수 있는 방어 체계 (NF-kB 신호전달과정 활성화, 세라마이드 농도 감소 등)의 활성화로 인하여 내성을 유발할 수 있다.

[0006] 이 중에서 약물 유출 펌프 과발현에 의한 암세포의 MDR 획득은 효과적인 치료를 위해 항암제를 고용량 투여해야 하는 문제를 발생하게 하고, 기존 항암제의 가장 큰 문제점인 골수 독성 (bone marrow toxicity)을 야기할 수 있다. 즉 항암화학요법제를 투여할 경우 암세포가 유출 펌프 과발현에 의해 내성을 획득하였을 경우 암세포는 항암제를 효과적으로 세포 외로 유출시켜 생존할 수 있으나, 골수에서는 유출 펌프 발현이 적어 항암제에 감수성이 높아져 세포사멸이 일어나고 골수 독성이 증가할 수 있다. 따라서 내성 발현에서 유출 펌프 과발현에 의한 내성이 가장 심각하고, 항암화학요법을 이용하여 암을 성공적으로 극복하기 위해서는 이를 극복할 수 있는 유출 펌프를 효과적으로 제어할 수 있거나, 유출 펌프에 상관없이 항암효과를 나타낼 수 있는 기술의 개발이 반드시 필요하다고 할 수 있다 (Gottesman et al., Nat Rev Cancer 2:48-58, 2002; Friedenberg et al., Cancer 106:830-8, 2006; Seiden et al., Gynecol Oncol 86:302-10, 2002).

[0007] 약물 유출 펌프는 아미노산 염기서열 및 구조적 특징 등을 비교해 보면 ATP-결합 카세트 (ATP-binding cassette; ABC) 수송체 패밀리에 속하는 막단백질 (membrane protein)이다. 지금까지 사람에서 48개의 ABC 유전자가 확인되었고, 7개의 아형 (subfamily; ABCA-ABCG)으로 구분되고 있다. 이중에서 약물수송과 관련된 ABC 수송체는 MDR1, MRP (multidrug-resistant protein)1~7, BSEP/SPGP, MXR/BCRP/ABC-P 등이 있다. 상기 약물수송 ABC 수송체는 약물의 구조와 상관없이 비특이적으로 세포내의 약물을 세포 외로 유출시키는 역할을 하며, 이는 MDR 발현에 가장 중요하게 작용하는 것으로 잘 알려져 있다 (Endicott et al., Annu Rev Biochem 58:137-71, 1989; Ambudkar et al., Annu Rev Pharmacol Toxicol 39:361-98, 1999; Gottesman et al., Nat Rev Cancer 2:48-58, 2002).

[0008] 약물수송 ABC 수송체 중에서 가장 잘 알려져 있는 것은 ABCB1 (또는 MDR1) 유전자의 산물인 P-당단백질 (P-gp)이다. P-gp는 170 KDa의 12개의 막통과 도메인 (transmembrane domain)과 2개의 ATP 결합 부위를 가지고 있는 막 단백질로서 대부분의 항암제 (빈카 알카로이드 (vinca alkaloids), 택솔 (taxol), 에토포시드 (etoposide) 등)를 기질로 하여 세포 외로 유출하는 기능을 수행한다. P-gp의 막투과 도메인에 소수성의 약물 (중성 또는 양이온성 약물)이 결합하면 두 분자의 ATP가 가수분해하면서 P-gp의 형태적 변화가 유도되어 세포 외로 약물이 배출되게 된다 (Ambudkar et al., Annu Rev Pharmacol Toxicol 39:361-98, 1999). 따라서 P-gp의 넓은 범위의 기질 특이성 (broad substrate specificity)은 약물결합부위인 막투과 도메인의 다양한 약물과 결합할 수 있는 다형성 때문인 것으로 생각된다. 이와 더불어, MRP1 (multidrug-resistance-associated protein 1; ABCC1)도 MDR 발현에 중요하게 작용한다. MRP1은 주로 중성 또는 음이온성의 소수성 약물 및 글루타치온과 결합된 약물과 주로 결합하고 이를 배출하는 기능을 하고 있다 (Gottesman et al., Nat Rev Cancer 2:48-58, 2002).

[0009] 화학요법제 치료 후에 암세포에서의 P-gp 발현 증가는 크게 두 가지 모델로 설명이 된다. 첫 번째로 모델은 "선택 및 과잉증식 모델(selection and expansion model)"로서 약 20년 전에 제안되었다. 즉, 암이 발생하면서 P-gp를 많이 발현하는 세포와 적게 발현하는 세포가 공존하게 되는데 화학요법제 치료과정에서 P-gp를 적

게 발현하는 세포는 죽고, 대신 많이 발현하는 세포가 살아남는 "선택 (selection)" 과정을 거치게 되고 이후 P-gp 과발현 세포들이 "과잉증식 (expansion)"하여 항암제에 내성을 나타내는 과정으로 설명이 된다 (Goldie & Coldman, Cancer Res 44:3643-53, 1984). 두 번째 모델은 화학요법제가 직접 MDR1 유전자를 활성화 시켜 P-gp를 과발현 시키고 이를 통해 약물내성이 발현된다는 "활성화 모델 (activation model)"이다 (Abolhoda et al., Clin Cancer Res 19995:3352-6, 1999).

[0010] 최근 암 치료 효과를 증진시키기 위해 P-gp와 같은 배출펌프의 작용을 저해할 수 있는 물질을 개발하여 기존 항암제와 병용 투여함으로써 항암제에 대한 내성을 감소시키고, 항암제의 용량도 줄여 약에 대한 부작용을 감소시키는 방향으로의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 내성 저해물질은 다약제 내성역전제 (MDR reversing agent), 화학감작제 (chemosensitizer) 또는 다약제 내성조절제 (MDR modulator)라 한다. 가장 먼저 개발된 다약제 내성역전제는 P-gp 억제제로 베라파밀 (verapamil)이며, 그 후 다양한 물질들이 많이 개발되어 사용되어 왔으나 세포독성으로 인한 다른 부작용이 발생하여 문제되고 있다. 또한 다중약물내성에 관한 특허를 살펴보면, 이미다졸 화합물 (대한민국 등록특허 제 0330698호, 0349500호), 크로몬 화합물 (대한민국 등록특허 제0580743호, 대한민국 공개특허 제2005-0034024호), 퀴놀린 화합물 (대한민국 등록특허 제0639163호, 대한민국 공개특허 제2006-0093554호), 피페라진-2,5-디온 화합물 (대한민국 공개특허 제1998-7000978, 제1998-700972호), 한국산 자생식물 중 번행초, 조릿대풀, 석송, 큰개불알풀 및 약모밀에 의한 항암제 감수성 증가 (대한민국 공개특허 제2006-0124453호), MDR 억제용 P-당단백질 170에 대한 백신 (대한민국 공개특허 제2006-0125676호) 및 MDR생성물에 대한 항체 (대한민국 공개특허 제1995-7000938호) 등이 있다.

[0011] 한편 백선 (Dictamnus dasycarpus Turcz.)은 운향과 (Rutaceae)에 속하는 다년생초본으로 높이는 90cm 안팎이고 굵은 뿌리가 있으며 원줄기는 곧게 자란다. 제주를 제외한 전국의 산기슭에서 자라며, 만주, 몽고, 아무르, 우수리에 분포한다. 생약으로는 백선의 근피를 백선피 (白鮮皮)라 하며, 북방에서는 봄과 가을, 남방에서는 여름에 채취하여 흙을 털어내고 깨끗이 씻은 후 수염뿌리를 제거하고 굵은 뿌리를 싱싱할 때 세로로 잘라 코르크층인 목심부를 제거하고 햇볕에 말려 사용한다. 백선피는 원통 모양이고 길이 510 cm, 지름 12 cm, 두께 13 mm 이며 잔뿌리가 있다. 바깥 면은 황백색 또는 엷은 갈색이고 매끄러우며, 안쪽 면은 엷은 황색이고, 질은 부드러워 쉽게 부러지며 꺾은 면은 유백색 또는 엷은 황색이고 층 모양을 나타낸다. 육이 두텁고 색이 회백색이며 단면은 층층이 나뉜 것이 좋으며 특이한 냄새가 있고 맛은 조금 쓰다. 민간에서 거풍(風), 조습(燥濕), 해열(解熱), 해독(解毒), 옴, 피부습진, 류머티즘으로 인한 통증, 황달 등의 치료에 사용하였다. 백선피로부터 주성분으로는 리모노이드 화합물, 퓨로퀴놀린 알칼로이드 화합물, 플라보노이드 화합물, 코마린 화합물, 세스퀴테르페노이드 화합물, 페놀성 화합물 등 다양한 성분에 대한 보고가 있다. 그러나 백선피의 생리활성으로서 다중약물내성 억제제로서의 연구 결과는 보고되어 있지 않다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 항암화학요법의 가장 큰 실패요인인 MDR 현상을 극복하고, 세포독성으로 인한 다른 부작용을 방지하기 위하여 천연물 (식물 및 생약)로부터 새로운 다중약물내성 억제용 조성물을 연구하던 중, 백선피 추출물이 P-당단백질 (P-glycoprotein)발현을 억제하고, MDR1 유전자의 발현을 억제하여 다중약물내성 암세포주에서 항암제에 대한 민감도를 높여주는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 항암화학요법의 문제점인 다중약물내성을 극복하기 위하여, 다중약물내성 암세포주에서 항암제에 대한 민감도를 높여주는 다중약물내성 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 항암화학요법의 문제점인 다중약물내성을 극복하기 위하여 다중약물내성 암세포주에서 항암제에 대한 민감도를 높여주는 항암제 보조용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 항암화학요법의 문제점인 다중약물내성을 극복하기 위하여 다중약물내성 암세포주에서 항암제에 대한 민감도를 높여주는 항암제 보조용 식품학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 다중약물 내성 억제용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 식품학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 조성물은 항암제에 내성을 나타내는 다중약물내성 (Multidrug resistance, MDR) 세포에서 P-당단백질 (P-glycoprotein)에 의한 다중약물내성 억제 활성이 매우 우수하여 항암 약물 내성을 가진 암환자의 치료에 사용될 수 있는 조성물로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 정상 암세포인 KB 세포주와 다중약물내성 암세포인 KB/VB20 세포주에서 MDR1의 발현 여부를 확인한 그림이다.

도 2는 백선피 추출물의 Rhodamine 123 assay 결과이다.

도 3은 백선피 추출물이 P-당단백질 (P-glycoprotein)의 발현에 미치는 영향을 분석한 그림이다.

도 4는 백선피 추출물이 MDR1의 유전자 발현에 미치는 영향을 분석한 그림이다.

도 5는 백선피 추출물이 YB-1 유전자 발현에 미치는 영향을 분석한 그림이다.

도 6은 백선피 추출물이 다중약물내성 암세포에서 항암제인 빈블라스틴 (vinblastine)의 민감도에 미치는 영향을 분석한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은, 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 다중약물 내성 억제용 조성물을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 보조용 식품학적 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 백선피 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

[0026] 백선피를 물로 세척하여 이물질을 제거한 후 그늘에서 건조하고 분쇄한다. 백선피는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 분쇄된 백선피에 적당한 양의 용매를 첨가하여 완전히 침지되도록 한다. 추출용매로는 물, 탄소수 1내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매가 바람직하며, 보다 바람직하게는80% 에탄올이다. 다음 상기에서 얻은 백선피 추출물을 여과한 후 감압 농축하여 최종 추출물을 수득한다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 다중약물내성 (multidrug resistance)"는 세포 특히 특정 질병 유발 세포가 매우 다른 화학 구조를 갖는 다양한 약물들 또는 화합물들에 대해 내성을 갖는 특성을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 다중약물내성은 P-당단백질 (P-glycoprotein)에 의한 다중약물내성이다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "P-당단백질 (P-glycoprotein)"은 ATP-결합 카세트 (ATP-binding cassette, ABC)를 갖는 세포막에 존재하는 수송단백질 (transporter protein)의 일종을 의미하고, 상기 P-당단백질은 약물과 결합하여 ATP를 에너지원으로 사용하는 능동적 수송 기작에 약물을 세포 밖으로 방출시켜 세포에 약물내성을 부여한다. 특히, 암세포에서 발현되는 P-당단백질은 항암 약물에 대한 내성을 증가시켜 항암치료 효능을 현저히 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다.

[0029] 본 발명의 다중약물내성을 나타내는 약물은 예를 들어, 빈카 알카로이드 (vinca alkaloids) 계열의 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine) 및 나벨빈 (navelbine); 탁산스 (taxanes) 계열의 파클리탁셀 (paclitaxel;TAX), 탁소테르 (taxotere); 안트라사이클린 (anthracyclines) 계열의 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신 (daunorubicin), 에피루비신 (epirubicin) 및 이다루비신 (idarubicin); 에피포도필로톡신 (epipodophyllotoxins) 계열 약물인 에토포시드 (etoposide) 및 테니포시드 (teniposide); 콜히친 (colchicine), 미톡산트론 (mitoxantrone), 닥티노마이신 (dactinomycin), 토포테칸 (topotecan), 트리메트렉스산 (trimetrexate), 미트라마이신 (mithramycin), 미토마이신 C (mitomycin C)의 기타 약물을 포함하지만,

이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명의 조성물의 상기 다중약물내성 억제 효능은 암 세포에서의 다중약물내성 억제 효능인 것을 특징으로 한다.

[0031] 상기 암세포에서의 암은 예를 들어, 구강암 (oral cancer), 위암 (stomach cancer), 폐암 (lung cancer), 유방암 (breast cancer), 난소암 (ovarian cancer), 간암 (liver cancer), 기관지암 (bronchogenic cancer), 비인두암 (nasopharyngeal cancer), 후두암 (laryngeal cancer), 췌장암 (pancreatic cancer), 방광암 (bladder cancer), 대장암 (colon cancer), 자궁경부암 (uterine cervical cancer), 뇌암 (brain cancer), 전립선암 (prostate cancer), 골암 (bone cancer), 피부암 (skin cancer), 갑상선암 (thymus cancer), 부갑상선암 (parathyroid cancer), 신장암 (renal cancer) 또는 요관암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물의 유효량은 본 발명의 조성물 총 중량에 대하여 상기 백선피 추출물인 유효성분을 0.001 내지 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물은 상기 유효성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 또한 단독으로 또는 타약학적 활성 화합물, 예를 들어, 당업계에 잘 알려진 항암제들, 즉, 빈블라스틴 (vinblastine), 아드리아마이신 (adriamycin), 사이클로포스파마이드 (cyclophosphamide), 5-FU, 암사크린 (amsacrine), 도노마이신 (daunomycin), 탁솔 (taxol) 등의 기존 항암제들과의 결합뿐만 아니라 적당한 조합으로 기존 항암제에 대한 다중약물내성을 갖는 암세포의 성장을 억제하기 위한 항암 보조제로 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물에 포함되는 유효성분 화합물의 농도는 치료목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0034] 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0035] 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100 mg/kg(체중)이다.

[0036] 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0038] 또한 본 발명의 다중약물내성 억제용 조성물 및 항암제 보조용 조성물은 식품학적으로 허용되는 담체와 함께 식품 조성물로 제공될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초콜릿, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0040] 식품 또는 음료 중의 백선피 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 기

능성 음료 조성물은 100㎖를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 백선피 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 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, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0042] 또한 상기 식품 조성물은 백선피 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, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0043] 본 발명의 유효성분인 백선피 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0044] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위 한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실험예 1. 한약재 추출물의 제조**

[0046] 백선피를 100g 정량 후 80 % 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 획득하였다. 다시 추출액은 지름 185mm 종이여과지 (Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과 하였다. 그 후 감압 농축기 (Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기 (Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 얻은 분말을 DMSO에 녹여 vortexing한 후 원심분리하여 녹지 않은 물질은 제거한 후 실험에 사용하였다.

[0047] **실험예 2. KB/VB20 세포주에서 MDR1 발현 분석**

[0048] 실험에 사용한 사람 상피세포주 KB는 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, Korea)을 통하여 구입하였으며, 빈블라스틴 (vinblastine) 20nM에 저항성을 지닌 KB 세포주 (KB/VB20)는 성균관대학교 이동권 교수님께 분양 받았다. KB 세포주는 RPMI1640, KB/VB20세포주는 DMEM (Wellgene) 배지에 5% (v/v) 혈청 (heat-inactivated fetal bovine serum (Wellgene)과 1% 항생제 (antibiotic-antimycotic, (Gibco BRL))를 넣어 5% CO_2가 든 37 ℃ humidified incubator에서 배양하였다.

[0049] 본 실험에 사용한 KB/VB20 세포의 *MDR1* 과발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸바와 같이 KB 세포주에서는 *MDR1*이 발현되지 않았지만. KB/VB20세포주에서는 *MDR1*이 과발현 되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이하 실험에서는 상기 KB/VB20 세포주를 다중 약물 내성 세포주로 이용하였다.

[0050] **실험예 3. Rhodamine 123 assay를 통한 스크리닝**

[0051] Rhodamine 123은 P-gp에 의해 세포 안과 밖 사이를 이동할 수 있는 형광 물질로, 세포 안에 축적된 이 약물을 유세포분석기 (FACS Calibur, Becton Dickinson)를 이용하여 측정함으로써 P-gp의 발현 정도를 유추하는 지표가 된다. 즉, 세포 내에 이 물질의 축적 정도가 높으면 P-gp 발현량이 적기 때문에 세포 안으로 들어가는 양이 많아지고, 반대로 축적 정도가 낮으면 P-gp 발현량이 많아 이 물질이 세포막 바깥으로 배출된 것을 의미한다. KB와 KB/VB20 세포주 둘 다 6 well plate에 $1x10^6$ 과 $1.5x10^6$ cells/well이 되도록 준비한 후 1시간 동안 약재를 전처리 한 다음 rhodamine 123 (2.5 uM)만 넣거나 P-gp 억제제의 하나인 니카르디핀 (Nicardipine, NCD, 12.5 uM)을 동시에 넣어 한 시간 더 배양하였다. 다음으로 스크래퍼를 이용하여 세포를 모아 차가운 PBS로 두 번 세척한 후, 다시 300 ml의 PBS에 부유시켜 유세포 분석을 하였다. 약재 추출물에 의한 P-gp 기능의

억제 정도는 아래 식을 이용하여 비교함으로써 측정하였다.

[0052] % of control activity = Fluorescence sample/Fluorescence control x 100

[0053] (여기서, Fluorescence sample은 천연 추출물이나 약물 처리 후 측정한 형광 정도, Fluorescence control은 rhodamine123만을 처리 한 후 측정한 형광 정도를 나타낸다.)

[0054] KB 세포주와 KB/VB20 세포주에서 백선피 추출물을 각각 25, 50, 100 ㎍/㎖ 농도별로 처리한 후 Rhodamine 123 assay를 하였다. 그 결과 KB 세포주에서는 농도에 따른 차이가 없었지만, KB/KV20 세포주에서는 백선피 추출물에서 농도에 따라 Rhodamine 123 물질을 세포 밖으로 배출하는 능력이 증가하는 것 이 관찰되었다 (도 2). 이를 통해 백선피 추출물이 P-gp의 기능 억제 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0055] **실험예 4. P-glycoprotein과 *MDR1* 유전자의 발현 분석**

[0056] Rhodamine 123 물질을 세포 밖으로 배출하는 능력이 단백질 단계에서 조절되는지 확인하기 위해, 약재 50 ㎍/㎖을 2시간 동안 처리 한 후 샘플을 얻어 웨스턴 블랏 (western blot)을 통해 내성억제 단백질인 P-glycoprotein을 양을 확인하였다. 그 결과 도 3에 나타낸 바와 같이, P-glycoprotein 단백질은 KB 세포주에서는 발현 되지 않았으며, 오직 KB/VB20 세포주에서만 발현되었다 (도 3A). 또한 KB/VB20 세포주에서는 대조군인 P-glycoprotein 저해제로 알려진 니카르디핀 (Nicardipine, NCD) 및 백선피 추출물을 처리한 군에서 P-glycoprotein을 억제하는 것을 관찰하였다 (도 3B).

[0057] 또한, 백선피 추출물이 P-glycoprotein을 코딩하는 *MDR1* 유전자 발현 단계에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 50 ㎍/㎖ 농도의 백선피 추출물을 각 세포주에 2시간 동안 처리하여 얻은 mRNA로 RT-PCR을 수행하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, *MDR1* 유전자 발현은 KB 세포주에서는 발현이 안되었으며 KB/VB20 세포주에서만 발현되었다 (도 4A) 또한, KB/VB20 세포주에서 양성대조군인 니카르디핀 및 백선피 추출물 처리군에서 MCD 유전자 발현이 억제되는 것을 확인하였다 (도 4B).

[0058] **실험예 5. YB-1 단백질의 발현 분석**

[0059] Y-box-binding protein-1 (YB-1)은 conserved nucleic acid에 결합하는 단백질 중의 하나로 전사와 번역을 조절하고, DNA에 손상을 입었을 때 복구 시스템을 증가 시키는 등의 역할을 한다. 또한 YB-1의 타겟 유전자 중의 하나로 알려진 *MDR1* 유전자를 조절함으로써, P-gp의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.

[0060] 내성억제 기작이 P-glycoprotein 발현 조절을 조절하는 것으로 알려진 Y-box binding protein-1 (YB-1) 단백질의 발현단계를 조절하는지 western blot을 통해 확인하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 양성대조군인 니카르디핀 및 백선피 추출물 처리군에서 YB-1 단백질의 발현이 감소된 것을 확인하였다.

[0061] **실험예 6. vinblastine에 대한 민감도 변화 분석**

[0062] 백선피 추출물이 KB 세포주와 KB/VB20 세포주에서 항암제 중 하나인 빈블라스틴 (vinblastine)에 대한 민감도를 높여주는지 확인하기 위해 MTT assay를 통해 세포 증식도를 측정하였다. MTT assay는 MTS 혼합액 ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5, 3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, inner salt)와 an electron coupling reagent (phenazine methosulfate; PMS))이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 숙신산 탈수소효소 (succinic dehydrogenase)라는 효소를 환원시켜 생성하는 수용성 포르마잔 (formazan)의 농도를 측정함으로써 생존한 세포수를 측정하는 실험이다.

[0063] 백선피 추출물을 KB/VB20 세포주에 2시간 동안 전 처리 한 후, 빈블라스틴 (vinblastine)을 농도별 (0?100 nM)로 72 시간 동안 처리하여 세포증식 정도를 측정하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이 니카르디핀 보다 백선피 추출물이 빈블라스틴의 낮은 농도에서 그 민감도를 높여주는데 효과가 있음을 보여주었다. 이를 통해 백선피 추출물이 다중약물내성 세포에서 항암제의 민감성을 높여주어, 다중약물내성 억제용 조성물로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0064] 이하 본 발명의 상기 조성물을 함유하는 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를

한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0065] **제제예 1. 산제의 제조**

[0066] 백선피 추출물2g

[0067] 유당 1g

[0068] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0069] **제제예 2. 정제의 제조**

[0070] 백선피 추출물100mg

[0071] 옥수수전분 100mg

[0072] 유당 100mg

[0073] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0074] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0075] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0076] 백선피 추출물100mg

[0077] 옥수수전분 100mg

[0078] 유당 100mg

[0079] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0080] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0081] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0082] 백선피 추출물 100 mg

[0083] 만니톨 180 mg,

[0084] Na2HPO412H2O 26 mg

[0085] 증류수 2974 mg

[0086] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 제조방법에 따라서 주사제를 제조하였다.

[0087] **제제예 5. 건강기능식품의 제조**

[0088] 백선피 추출물 100 mg

[0089] 비타민 혼합물 적량

[0090] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0091] 비타민 E 1.0 mg

[0092] 비타민 B1 0.13 mg

[0093] 비타민 B2 0.15 mg

[0094] 비타민 B6 0.5 mg

[0095] 비타민 B12 0.2 μg

[0096] 비타민 C 10 mg

[0097] 비오틴 10 μg

[0098] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0099] 엽산 50 μg

[0100] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0101] 무기질 혼합물 적량

[0102] 황산제1철 1.75 mg

[0103] 산화아연 0.82 mg

[0104] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0105] 제1인산칼륨 15 mg

[0106] 제2인산칼슘 55 mg

[0107] 구연산칼륨 90 mg

[0108] 탄산칼슘 100 mg

[0109] 염화마그네슘 24.8 mg

[0110] 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.

[0111] **제제예 6. 건강음료의 제조**

[0112] 백선피 추출물 100 mg

[0113] 비타민 C 15 g

[0114] 비타민 E(분말) 100 g

[0115] 젖산철 19.75 g

[0116] 산화아연 3.5 g

[0117] 니코틴산아미드 3.5 g

[0118] 비타민 A 0.2 g

[0119] 비타민 B1 0.25 g

[0120] 비타민 B2 0.3g

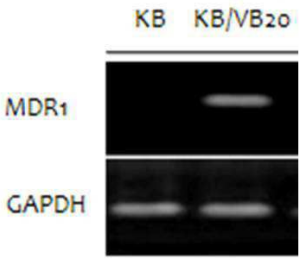
[0121] 물 정량

[0122] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

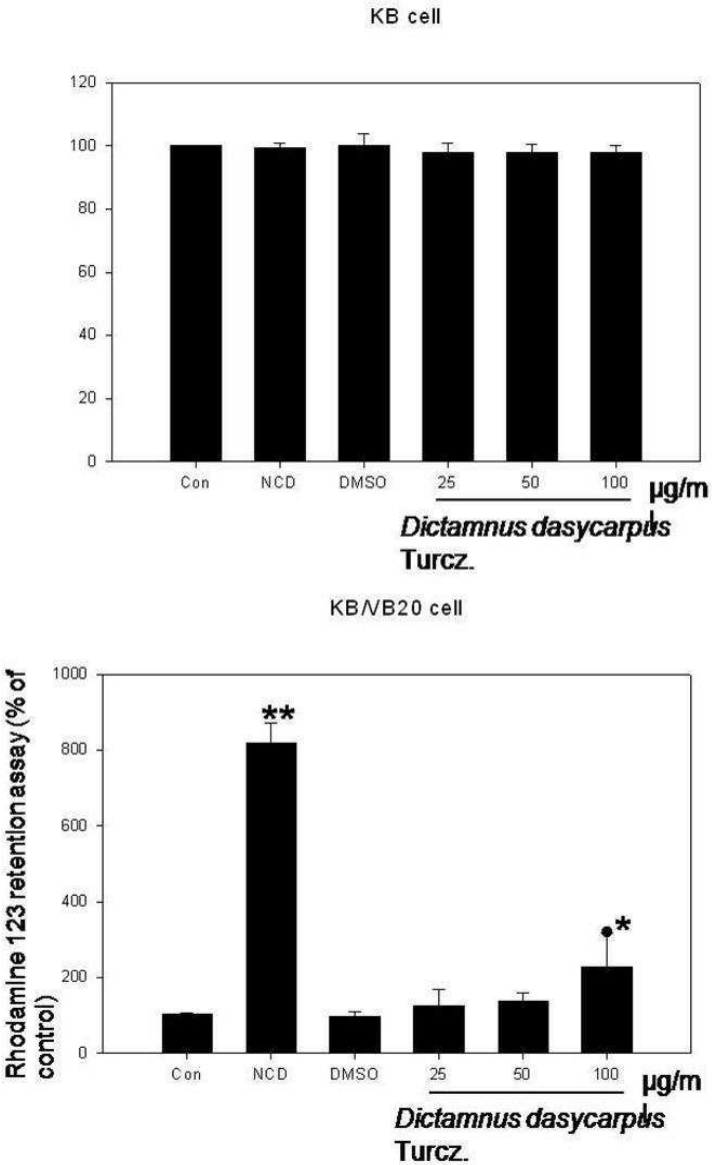
[0123] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

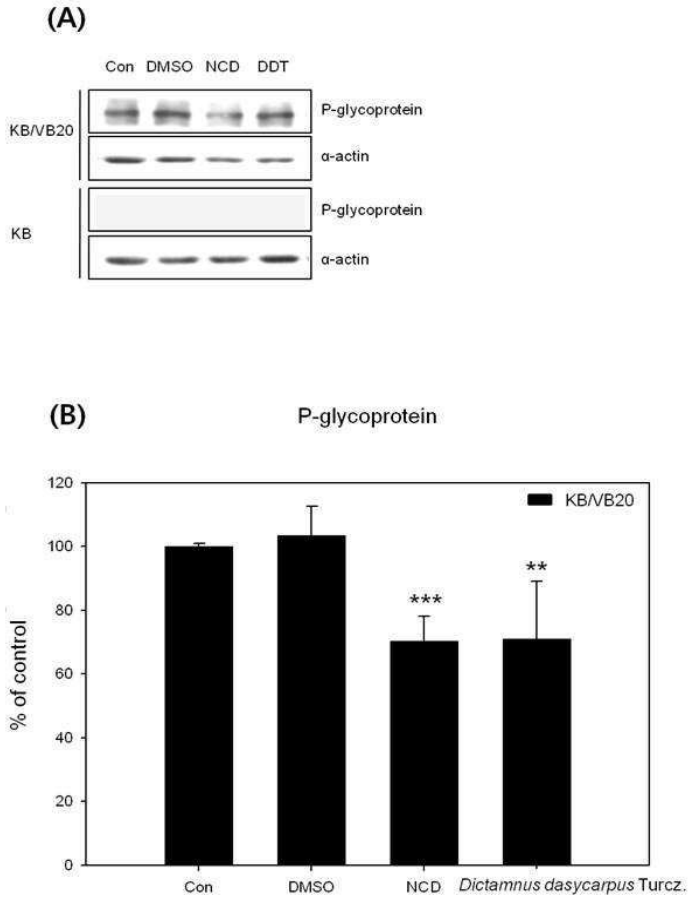
도면1


KB
KB/VB20
MDR1
GAPDH

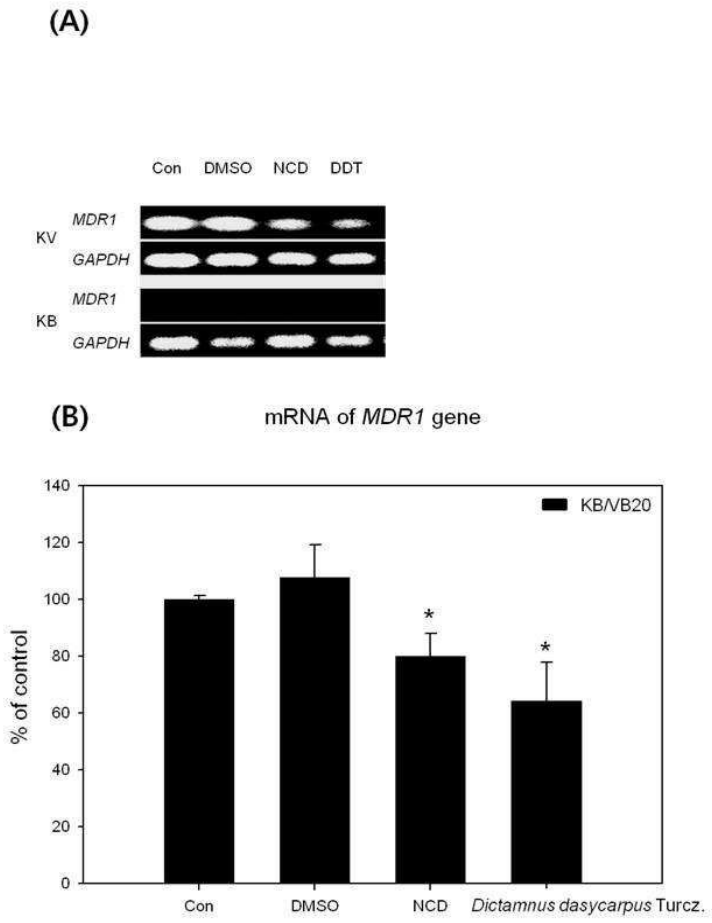
도면2


KB cell
120
100
80
60
40
20
0
Con
NCD
DMSO
25
50
100
μg/m
Dictamnus dasycarpus Turcz.
KB/VB20 cell
Rhodamine 123 retention assay (% of control)
1000
800
600
400
200
0
**
*
Con
NCD
DMSO
25
50
100
μg/m
Dictamnus dasycarpus Turcz.

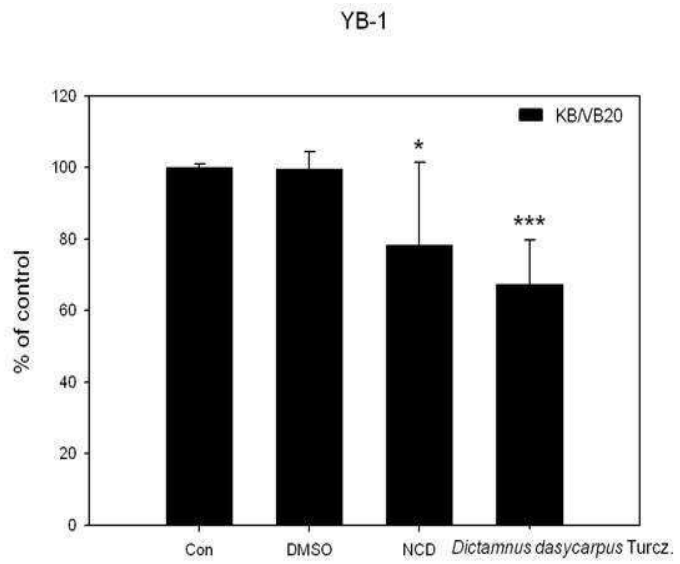
도면3


(A)
Con DMSO NCD DDT
KB/VB20
P-glycoprotein
α-actin
KB
P-glycoprotein
α-actin
(B)
P-glycoprotein
KB/VB20
% of control
120
100
80
60
40
20
0
***
**
Con
DMSO
NCD
Dictamnus dasycarpus Turcz.

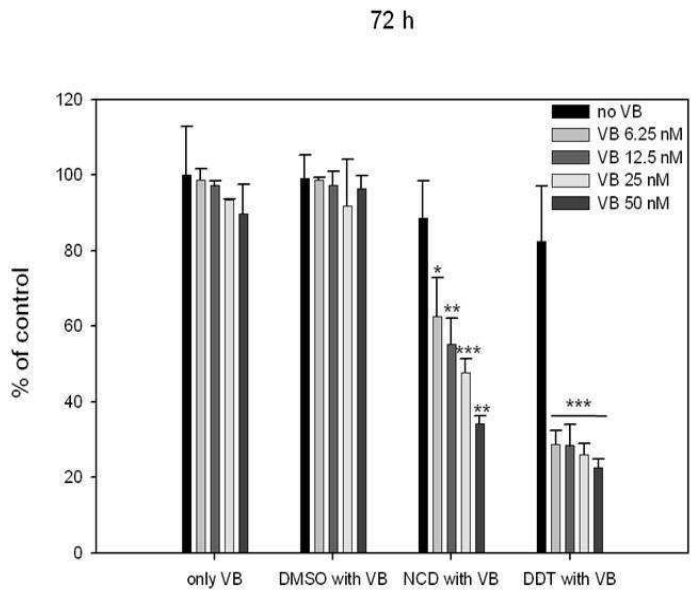
도면4


(A)
Con
DMSO
NCD
DDT
KV
MDR1
GAPDH
KB
MDR1
GAPDH
(B)
mRNA of MDR1 gene
KB/VB20
% of control
140
120
100
80
60
40
20
0
*
*
Con
DMSO
NCD
Dictamnus dasycarpus Turcz.

도면5


YB-1
KB/VB20
% of control
120
100
80
60
40
20
0
*
***
Con
DMSO
NCD
Dictamnus dasycarpus Turcz.

도면6


72 h
% of control
120
100
80
60
40
20
0
no VB
VB 6.25 nM
VB 12.5 nM
VB 25 nM
VB 50 nM
*
**
***
**
***
only VB
DMSO with VB
NCD with VB
DDT with VB