(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0097548
(43) 공개일자 2019년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/22 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/343 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/22 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0017109
(22) 출원일자 2018년02월12일
심사청구일자 2018년02월12일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
류재춘
서울특별시 광진구 자양로21길 16-14, 자양힐아파트 101동 108호
류봉하
경기도 성남시 분당구 내정로165번길 35, 529동 301호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

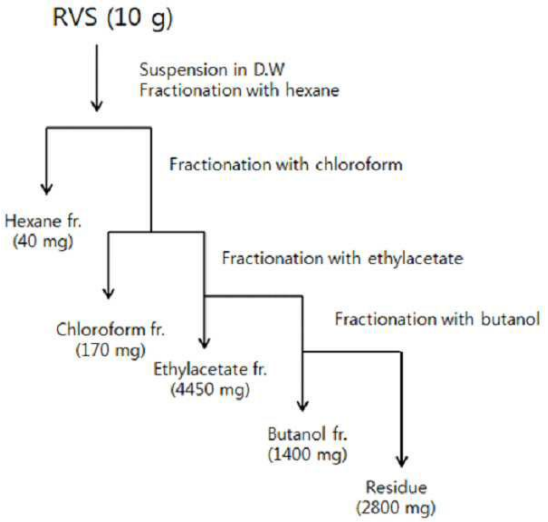
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **칠피 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 그 소분획물을 포함하는 항암용 조성물, 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예는 칠피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 및 그 소분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/343 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A61K 2236/39 (2013.01)
(72) 발명자
윤성우
서울특별시 강남구 삼성로 51길 37, 109동 2801호
최혁재
서울특별시 강남구 선릉로 221, 207동 1204호
김은진
서울특별시 동대문구 제기로 131, 한신아파트 102동 104호
박소연
서울특별시 동대문구 사가정로 65, 래미안크레시티아파트 302동 1002호
오현아
서울특별시 동대문구 경희대로1길 30
정원용
서울특별시 송파구 가락로5길 3- 81, 1동 402호

명 세 서

청구범위

청구항 1

칠피(*Rhus verniciflua Stokes*) 추출물의 에틸아세테이트 분획물 및 그 소분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 칠피 추출물은 열수 추출물인 항암용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 에틸아세테이트 분획물은 상기 칠피 추출물을 순차적으로 분획하였을 때 에틸아세테이트로 분획하여 수득한 항암용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 소분획물(subfraction)은 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 및 헥산(90:6:12:9:12)으로 구성된 혼합 용매에 용해시켜 분배 추출한 설프레틴(sulfuretin) 함량이 30%(w/w) 이상인 제1소분획물, 피세틴(fisetin) 함량이 60%(w/w) 이상인 제2소분획물, 또는 푸스틴(fustin) 함량이 15%(w/w) 이상인 제3소분획물인 항암용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 항암용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물.

청구항 9

(a) 칠피 추출물을 제조하는 단계;

(b) 상기 칠피 추출물을 증류수로 현탁한 후 에틸아세테이트(ethylacetate)로 분획하여 분획물을 수득하는 단계,

(c) 상기 에틸아세테이트 분획물을 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 및 헥산(90:6:12:9:12)의 혼합용매에 용해시켜 컬럼크로마토그래피에서 분배 추출하는 단계; 및

(d) 소분획물을 분리하는 단계;를 포함하는 항암용 조성물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 소분획물은 설프레틴(sulfuretin) 함량이 30%(w/w) 이상인 제1소분획물, 피세틴(fisetin) 함량이 60%(w/w) 이상인 제2소분획물, 또는 푸스틴(fustin) 함량이 15%(w/w) 이상인 제3소분획물인 항암용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에틸아세테이트 분획물과 그 소분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10 만 명 이상이 진단되고, 약 6 만 명 이상이 사망하고 있다.

[0003] 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 상이하다.

[0004] 최근 의학의 빠른 발전과 더불어 수술, 방사선 요법 및 화학 요법을 통해 여러 형태의 암 치료법이 다양하게 이루어지고 있음에도 불구하고, 여전히 많은 암 환자들이 암세포의 완전한 제거와 전이 방지에 대한 어려움을 겪고 있다.

[0005] 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암 세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 본 발명자들은 신규한 항암제를 개발하기 위한 노력을 계속한 결과 생약재 추출물에서 분리된 분획물이 정상 세포의 생장에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 생약 추출물의 분획물을 포함하는 생체 안전성 및 암 억제 활성이 우수한 항암용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 측면에 따르면, 칠피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 및 그 소분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물이 제공된다.

[0009] 일 실시예에 있어서, 상기 칠피 추출물은 열수 추출물일 수 있다.

[0010] 일 실시예에 있어서, 상기 에틸아세테이트 분획물은 상기 칠피 추출물을 순차적으로 분획하였을 때 에틸아세테이트로 분획하여 수득할 수 있다.

[0011] 일 실시예에 있어서, 상기 소분획물(subfraction)은 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 및 헥산(90:6:12:9:12)으로 구성된 혼합 용매에 용해시켜 분배 추출한 설프레틴(sulfuretin) 함량이 30%(w/w) 이상인 제1소분획물, 피세틴(fisetin) 함량이 60%(w/w) 이상인 제2소분획물, 또는 푸스틴(fustin) 함량이 15%(w/w) 이상인 제3소분획물일 수 있다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 하

나 이상 선택될 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품이 제공된다.

[0015] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물이 제공된다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 (a) 칠피 추출물을 제조하는 단계;(b) 상기 칠피 추출물을 증류수로 현탁한 후 에틸아세테이트(ethylacetate)로 분획하여 분획물을 수득하는 단계, (c) 상기 에틸아세테이트 분획물을 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 및 헥산(90:6:12:9:12)의 혼합용매에 용해시켜 컬럼 크로마토그래피에서 분배 추출하는 단계; 및 (d) 소분획물을 분리하는 단계;를 포함하는 항암용 조성물의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 상기 항암용 조성물은 암의 성장을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라, 천연 생약재에서 유래하므로 인체에 대한 부작용을 야기하지 않는다.

[0018] 특히, 종래 추출물과 달리 항암 활성이 우수한 최적의 분획물을 분리해낸 것으로 사용량이 현저히 저감될 수 있으므로 복용 편의성이 우수한 의약품으로 개발 가능하다.

[0019] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 칠피 추출물의 분획 순서를 도시한 것이다.

도 2는 칠피 에틸아세테이트 분획물에 대한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 순서를 도시한 것이다.

도 3은 옻나무(A) 및 칠피 추출물(B)에서 분리된 우루시올(urushiol) 혼합물에 대한 HPLC 크로마토그램 결과이다.

도 4는 설프레틴, 피세틴, 푸스틴 standards(A) 및 칠피 추출물(B)에 대한 HPLC 크로마토그램 결과이다.

도 5는 sarcoma-180 암세포를 주입하여 고형암을 유발시킨 마우스에서 칠피 추출물의 종양 억제 효과(종양 무게)를 측정한 것이다(*p< 0.05, ***p< 0.001 versus the control group).

도 6은 Melanoma 세포로 폐전이암을 유발한 마우스에서 칠피 추출물의 종양 억제 효과(종양 개수)를 측정한 것이다(*p< 0.05, ***p< 0.001 versus the control group).

도 7은 LL/2 암세포를 주입하여 고형암을 유발시킨 마우스에서 칠피 추출물의 종양 억제 효과(종양 부피 및 무게)를 측정한 것이다(*p< 0.05, ***p< 0.001 versus the control group).

도 8은 설프레틴, 피세틴, 푸스틴 standards(A), 제1소분획물(B), 제2소분획물(C), 제3소분획물(D)에 대한 HPLC 크로마토그램 결과이다.

도 9는 sarcoma-180 암세포를 주입하여 고형암을 유발시킨 마우스에서 칠피 추출물 또는 에틸아세테이트 소분획물의 종양 억제 효과(종양 무게)를 측정한 것이다(*p< 0.05, **p< 0.01 versus the control group).

도 10은 Melanoma 세포로 폐전이암을 유발시킨 마우스에서 칠피 추출물 또는 에틸아세테이트 소분획물의 종양 억제 효과(종양 개수)를 측정한 것이다(*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001 versus the control group).

도 11은 LL/2 암세포를 주입하여 고형암을 유발시킨 마우스에서 칠피 추출물 또는 에틸아세테이트 소분획물의 종양 억제 효과(종양 부피 및 무게)를 측정한 것이다(*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001 versus the control group).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수

있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0022] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0023] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0024] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0025] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 일 측면에 따르면, 칠피(*Rhus verniciflua Stokes*) 추출물의 에틸아세테이트 분획물 및 그 소분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물이 제공되며, 일 실시예에서, 상기 조성물은 (a) 칠피 추출물을 제조하는 단계; (b) 상기 칠피 추출물을 증류수로 현탁한 후 에틸아세테이트(ethylacetate)로 분획하여 분획물을 수득하는 단계, (c) 상기 에틸아세테이트 분획물을 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 및 헥산(90:6:12:9:12)의 혼합용매에 용해시켜 컬럼크로마토그래피에서 분배 추출하는 단계; 및 (d) 소분획물을 분리하는 단계;에 의해 제조될 수 있다.

[0027] 상기 "암", "종양" 또는 "악성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 상기 암의 예는 암종, 림프종, 백혈병, 모세포종 및 육종을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니며, 예컨대 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0028] 상기 “유효성분으로 포함하는”은 항암 효과를 나타낼 수 있는, 예컨대, 암 세포의 사멸을 유도하거나 암 세포의 증식을 저해하는 정도의 유효량을 함유하는 것을 의미할 수 있다.

[0029] 상기 “추출물”은 용매와 추출 원료를 특정 조건하에서 접촉시킴으로써 추출 원료에 함유된 유효성분을 분리해낸 것으로, 상기 추출물은 추출 원료에 함유된 다양한 유효성분을 포함할 수 있다.

[0030] 상기 “분획물”은 상기 칠피 추출물 제조시 사용한 용매와 상이한 용매를 이용하여 분리해낸 활성 추출 분획물(fraction)을 의미한다.

[0031] 상기 분획물을 얻기 위하여 사용되는 용매는 당업계에서 통상적으로 이용되는 추출 용매를 이용할 수 있으나, 본 발명자들은 에틸아세테이트 분획물의 현저한 항암 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0032] 상기 “칠피(*Rhus verniciflua Stokes*)”는 옻나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 옻나무의 수피이다. 상기 옻나무는 중국, 일본 등 동북아시아에서 많이 자라는 낙엽활엽수교목으로 이의 수피(bark)인 칠피로부터는 현재까지, 칼콘(chalcone), 플라보노이드 등의 페놀성화합물이 분리 및 보고되어 있고, 생리 활성으로는 근래에 칠피 추출물 또는 이로부터 분리된 페놀성화합물들의 항암, 항염증, 항산화, 간세포보호활성, 항-아폽토시스, 면역조절활성 등이 보고된 바 있다.

[0033] 상기 추출물은 상기 원료를 물로 수세한 후 건조시키고 잘게 분쇄하여, 각 원료 중량의 5 내지 20배에 달하는 부피의 용매로 약 2시간 내지 5시간 동안 환류 순환 추출, 가압 추출, 초음파 추출 등의 통상적인 방법으로 추출하고 여과함으로써 제조될 수 있다.

[0034] 또한, 상기 추출물은 감압 증류 또는 동결 건조 등과 같은 추가적인 공정에 의해 분말 상태로 수득될 수 있다.

[0035] 상기 추출물은 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 추출물은 일정한 분자량 컷-

오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획물을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 추출 공정에 있어서 용매의 종류는 특별히 한정되지 않으며 필요에 따라 다양한 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출은 상기 용매를 사용하여 냉침, 온침, 가열 등 당해 기술 분야의 통상적인 방법이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 상기 칠피 추출물은 열수 추출물일 수 있다.

[0037] 상기 원료에 포함된 유효성분은 용매의 극성에 따라 추출 비율이 상이해질 수 있으므로, 상기 원료에 함유된 항암 활성을 나타내는 유효성분의 함량을 극대화 하기 위해 추출 용매의 특성을 달리할 수 있다.

[0038] 본 발명자들은 수천례에 이르는 임상 치료를 바탕으로 탁월한 항암 효과가 구현될 수 있는 최적화된 용매를 적용하였다. 특히, 물과 에탄올은 상기 칠피에 함유된 생리 활성 물질의 추출에 있어서 선택성이 우수하므로 상기 용매에 의해 최적의 항암 효과가 구현될 수 있으며, 바람직하게는 상기 칠피를 열수 추출할 수 있다.

[0039] 상기 에틸아세테이트 분획물은 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 및 헥산(90:6:12:9:12)으로 구성된 혼합 용매에 용해시켜 분배 추출한 소분획물(subfraction)일 수 있다.

[0040] 본 발명자들은 칠피 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 그 소분획물이 우수한 항암 효과가 있음을 확인하였으며, 상기 혼합 용매를 이용하여 분배 추출함으로써 항암 효과가 극대화된 최적의 소분획물을 분리할 수 있다.

[0041] 상기 소분획물은 설프레틴(sulfuretin) 함량이 30%(w/w) 이상인 제1소분획물, 피세틴(fisetin) 함량이 60%(w/w) 이상인 제2소분획물, 또는 푸스틴(fustin) 함량이 15%(w/w) 이상인 제3소분획물일 수 있다.

[0042] 상기 설프레틴(sulfuretin), 피세틴(fisetin), 및 푸스틴(fustin)은 폴리페놀의 플라보노이드 그룹에 속하는 독특한 구조를 가지는 플라보놀(flavonol)이며, 상기 화합물을 다량 함유하는 소분획물의 우수한 항암 활성이 확인되었다.

[0043] 본 발명자들은 RVS가 우수한 항산화 효과 및 암세포 증식 억제능을 가지며, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 및 항암 활성의 밀접한 관련성을 확인하였다.

[0044] 상기 폴리페놀 및 플라보노이드 성분들은 에틸아세테이트 분획으로 다량 이동하였으며, 컬럼 크로마토그래피를 통해 대표적 항암성분인 sulfuretin, fisetin 및 fustin을 함유한 소분획물을 선별하였다.

[0045] 상기 소분획물은 우수한 항산화 효과와 함께 항암 효능을 보유하였으며, sarcoma-180, melanoma, LL/2 암세포를 이용한 *in vivo* 실험에서도 칠피 추출물 보다 현저히 우수한 항암 효과를 나타내었다.

[0046] 즉, 상기 에틸아세테이트 분획물 및 소분획물은 종래 칠피 추출물보다 항암 효과가 우수하며, 저용량으로 더 높은 효과를 기대할 수 있으므로 환자의 복용 편의성을 고려한 의약품으로 개발될 수 있다.

[0047] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.

[0048] 상기 "예방"은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 상기 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 개체 내 암세포의 성장이 억제되거나 암세포가 사멸하는 현상을 의미할 수 있다.

[0049] 상기 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.

[0050] 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 전신 또는 국소 투여될 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.

[0051] 상기 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0052] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0054] 경구 투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있고, 상기 고형제제는 상기 화합물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0055] 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있고, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0056] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0057] 상기 조성물은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 약학적으로 유효한 양이 투여될 수 있으며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0058] 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제, 예컨대 항암제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있고, 단일 또는 다중 투여될 수 있다.

[0059] 상기 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티눔(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin), 메토트렉세이트(methotrexate)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0061] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 상이해질 수 있으며, 적합한 총 1 일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1 회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0062] 상기 조성물은 암의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용 가능하다. 예컨대, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 및 인간 등 어느 개체에나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법 이라면 제한 없이 포함한다.

[0063] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품이 제공된다.

[0064] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.

[0065] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의 약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다.

[0066] 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.

[0067] 상기 건강기능식품은 탈모증의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.

[0068] 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 목적으로 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.

[0069] 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0070] 상기 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질캅셀제는 통상의 경질캅셀에 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질캅셀제는 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0071] 상기 환 형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0072] 상기 과립형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0073] 또한, 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 본 발명의 기재내용에 기초하여 각 구성의 종류, 도입 비율 등을 변화시켜 적용할 수 있을 것이며, 상기 변형에도 불구하고 동등한 기술적 효과가 구현되는 경우라면, 본 발명의 기술적 사상에 포괄된다고 할 것이다.

[0075] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물이 제공된다.

[0076] 상기 "항암 보조제"는 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제를 의미한다. 예컨대, 상기 항암 보조제는 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있다.

[0077] 다른 예로서, 농도의존적인 항암활성을 나타내는 제제를 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 항암 보조제로서 사용할 수 있다.

[0078] 상기 항암 보조제는 처리농도에 따라 항암제 또는 항암 보조제로서 사용할 수 있으며, 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않는 처리농도 범위에서 항암 보조제로 사용할 수 있다.

[0079] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0080] **제조예**

[0081] 본 실험에 사용된 칠피 추출물(RVS)은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 칠피 700 g을 증류수(DW)로 2 시간 추출 및 농축하여 동결 건조물로 24 g을 수득하였다(수율 3.4 %).

[0082] 도 1을 참조하면, RVS를 이용하여 용매별 순차적인 분획을 실시하였다. RVS 10 g을 1 L의 증류수에 용해한 후 2 L의 헥산으로 5회 분획하고 농축, 동결건조하여 40 mg을 수득하였다(수율 0.4 %).

[0083] 물층을 2 L의 클로로포름으로 5회 분획하고 농축, 동결건조하여 170 mg을 얻었으며(수율 1.7 %), 물층을 2 L의 에틸아세테이트로 5회 분획하고 농축, 동결건조하여 4450 mg을 수득하였다(수율 44.5 %).

[0084] 물층을 2 L의 부탄올로 5회 분획하고 농축, 동결건조하여 1400 mg을 얻었으며(수율 14.0 %) 나머지 잔사를 농축, 동결건조하여 2800 mg을 수득하였다(수율 28.0 %)

[0085] RVS 에틸아세테이트 분획을 실리카겔로 충진된 컬럼으로 크로마토그래피하였다.

[0086] 톨루엔, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 헥산(90:6:12:9:12)으로 구성된 용매로 소분획물(sub fraction)을 1번부터 9번까지(A1-A9) 순차로 분리하였고 실리카겔 TLC판에 분리한 시료를 점적하여 분리한 물질을 확인하였다(도 2).

[0087] **실험 방법(*in vitro*)**

[0088] ***HPLC 기기 및 분석 방법***

[0089] 본 실험에 사용된 HPLC system은 Alliance 2690 Separation Module, a Waters 996 Photodiode Array Detector, a Millenium32 Chromatography Manager Version 3.2 로 구성되었으며, 컬럼은 Nucleosil C18(5 μm, 4.0 mm × 250 mm I.D.; Macherey-Nagel, Germany)을 사용하였다.

[0090] 표준품으로 사용된 fisetin은 Sigma(MO, U.S.A.)에서 구입하였고, fustin 및 sulfuretin은 Indofine(NJ, U.S.A)에서 구입하였다.

[0091] HPLC 용매인 acetonitrile, methanol, water는 J.T. Baker(U.S.A.)의 제품을 사용하였으며 그 외 용매는 특급 시약을 사용하였다.

[0092] Urushiol의 분석을 위해 이동상은 85 % methanol을 사용하여 유속 1 ml/min로 흘려주었고 UV 280 nm에서 분석하였다.

[0093] 검액의 urushiol peak는 참고 문헌1)에서 분석한 urushiol mixture chromatogram을 바탕으로 생옻 추출물의 13.008, 16.736, 23.122 min의 peak를 각각 urushiol A, B, C로 임의적으로 명명하였다.

[0094] 분석용 검액은 샘플 5 g을 물에 녹여 헥산으로 분획한 뒤 헥산 층을 농축하였다. 농축물에 메탄올 5 ml를 넣어 용해한 후, 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

[0095] Fustin, fisetin 및 sulfuretin의 동시분석을 위해 이동상은 A(2 % acetic acid)와 B(methanol)를 사용하여 유속 1.0 ml/min의 gradient 조건(0 min; 5 % B, 10 min; 20 % B, 40 min; 60 % B, 50 min; 80 % B)으로 흘려주었고, UV 254 nm에서 분석하였다.

[0096] 분석용 검액은 샘플 100 mg에 메탄올 10 ml를 넣어 초음파로 30분간 추출한 후, 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

[0097] ***DPPH 라디칼 소거능 측정***

[0098] DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법에 준하여 실시하였다. 시료를 메탄올에 녹여 검액으로 준비한 후 1 ml씩 취하고 DPPH 용액을 0.25 ml 넣은 후 상온에서 30분간 방치하였다.

[0099] 반응이 진행된 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하여 free radical 소거율이 50 %에 해당하는 시료의 농도(IC_{50})를 산출하였으며, 양성 대조군으로 아스코르브산(ascorbic acid)을 사용하였다.

[0100] ***Xanthine oxidase 저해 활성 측정***

[0101] Xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide radicals 소거 활성은 NBT(nitro-blue tetrazolium) 환원법을 사용하여 분석하였다.

[0102] 즉, 시험관에 0.05 M의 sodium carbonate buffer(pH 10.5)를 1.05 ml 넣고, 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15 % bovine serum, 0.75 mM NBT를 50 μl씩 넣고 검액을 150 μl 넣은 후 10분간 실온에서 방치하였다.

[0103] 6 mM의 xanthine oxidase를 50 μl 넣고 20분간 상온에서 반응시킨 후 6 mM의 $CuCl_2$로 반응을 종결시켰다.

[0104] 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NBT 환원에 대한 저해율이 50 %에 해당하는 시료의 농도(IC_{50})를 계산하였다. 양성 대조군으로는 아스코르브산(ascorbic acid)을 사용하였다.

[0105] ***총 폴리페놀 함량 측정***

[0106] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법을 약간 변형하여 측정하였다. 검액 0.05 ml 및 증류수 4.2 ml를 가하여 혼합한 후, Folin-Ciocalteus phenol reagent를 0.25 ml 가하고 8분간 교반하였다.

[0107] 20 % Na_2CO_3 용액을 0.5 ml 첨가한 후 vortexing 하고 상온에서 1시간 방치한 다음 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 샘플의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 구하였다.

[0108] ***총 플라보노이드 함량***

[0109] 총 플라보노이드 함량은 질산알루미늄법을 사용하여 측정하였다. 시료를 에탄올에 녹여 검액으로 준비한 후 각 시험관에 검액 0.5 ml, 에탄올 1.5 ml, 10 % 질산알루미늄용액 0.1 ml, 1 M 초산칼륨용액 0.1 ml 및 증류수 2.8 ml을 가하여 충분히 교반하였다.

[0110] 실온에서 40분간 방치시킨 후, 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도별로 표준물질 및 시험용액의 공시험은 10 % 질산알루미늄용액 대신 증류수 0.1 ml을 가하였으며, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 구하였다.

[0111] ***암세포주 배양***

[0112] 위암세포주 AGS, 비소세포성 폐암세포주 A549 및 유방암세포주 MCF-7은 한국 세포주 은행에서 분양을 받았다.

[0113] AGS와 A549 세포는 10 % FBS 와 1 % penicillin- streptomycin을 함유한 RPMI 배지(Gibco, U.S.A.)로 37 ℃, 5 % CO_2 농도의 incubator에서 배양하였다.

[0114] MCF-7은 10 % FBS 와 1 % penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM 배지(Gibco, U.S.A.)로 37 ℃, 5 % CO_2 농도의 incubator에서 배양하였다.

[0115] ***암세포주에 대한 독성 측정***

[0116] 세포 독성 측정 실험은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)의 환원정도를 측정하는 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다.

[0117] 각 세포주를 96 well plate에 2 x 10^4 cells/well로 seeding 하였으며, 24시간 배양한 후 시료를 0.1 내지 1 mg/ml 농도로 처리하였다.

[0118] 48시간 동안 배양한 후, 각 well에 1 mg/ml의 MTT 용액(Sigma, U.S.A.)을 25 μl/ml씩 첨가하여, 37 ℃, 5 % CO_2 농도의 incubator에서 4시간 배양하였다.

[0119] 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 50 μl/ml씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0120] **실험 방법(*in vivo*)**

[0121] ***실험동물***

[0122] 실험동물은 6주령 된 C57BL/6(중앙실험동물, 서울) 또는 ICR male mouse(영바이오, 성남)을 사용하였으며, 온도 22±2 ℃, 습도 60±10 %, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 반입 후 7일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

[0123] 실험동물의 관리와 유지 및 모든 실험은 경희의료원 실험동물윤리위원회의 승인 하에 실시되었다.

[0124] ***암세포주 배양***

[0125] 본 실험에 사용한 복강암세포주 sarcoma-180과 흑색종세포주 B16F10은 한국 세포주 은행에서 분양을 받았다.

[0126] Sarcoma-180 세포는 10 % FBS 및 1 % penicillin- streptomycin을 함유한 RPMI 배지(Gibco, U.S.A.)에서 배양하고, B16F10은 10 % FBS 와 1 % penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM 배지(Gibco, U.S.A.)에서 37 ℃, 5 % CO_2 농도의 incubator에서 배양하였다.

[0127] 소세포성 폐암세포주 LL/2는 American Type Culture Collection(ATCC, U.S.A.)에서 구입하였으며, 10 % FBS와 1 % penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM 배지(ATCC, U.S.A.)에서 37 ℃, 5 % CO_2 농도의 incubator에서 배양하였다.

[0128] ***Sarcoma-180으로 유도한 고형암 모델***

[0129] ICR mouse에 고형암을 유발시키기 위하여 0.3 ml(2.0×10^7 cells/mouse)의 sarcoma-180 세포 부유액을 서혜부에 주사하였다.

[0130] 복강 내 암세포를 이식하고, 24시간이 경과한 후부터 4주간 연속적으로 생리식염수 또는 RVS(100 mg/kg)를 경구로 투여하였다.

[0131] A6(제1소분획물), A7(제2소분획물), A9(제3소분획물)은 50 mg/kg으로 4주간 연속적으로 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다.

[0132] 서혜부 내에 암세포를 이식한 이후부터 4주 후 생성된 고형암을 적출하여 무게를 측정하였다. 종양 성장저지능은 다음과 같이 산출하였다.

[0133] 종양 성장저지능 (%)= 대조군의 고형암 무게 (g) - 실험군의 고형암 무게 (g) / 대조군의 고형암 무게 (g) × 100

[0134] ***폐암 전이 모델***

[0135] C57BL/6 mouse에 폐암 전이를 유발하기 위하여 실험동물의 꼬리 정맥에 0.1 ml(6.0 × 105 cells/mouse)의 B16-F10 cell을 투여하였다.

[0136] 암세포를 투여하고, 24시간이 경과한 후부터 18일간 연속적으로 생리식염수 또는 RVS(100 mg/kg)를 경구로 투여하였다.

[0137] A6(제1소분획물), A7(제2소분획물), A9(제3소분획물)은 50 mg/kg으로 18일간 연속적으로 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 18일 후 부검하여 폐를 적출하고, 종양 개수를 육안으로 관찰하여 비교하였다.

[0138] ***LL/2 유도 고형암 모델***

[0139] C57BL/6 mouse에 고형암을 유발하기 위하여 실험동물의 등에 0.1 ml(1.0×10^6 cells/mouse)의 LL/2 cell 을 피하 주사하였다.

[0140] 암세포를 이식하고, 24시간이 경과한 후부터 3주간 연속적으로 생리식염수 또는 RVS를 100 mg/kg으로 경구 투여하였다.

[0141] A6(제1소분획물), A7(제2소분획물), A9(제3소분획물)은 50 mg/kg으로 3주간 경구 투여하였다. 양성대조군은 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 3주 후 생성된 고형암을 적출하여 무게를 측정하였고 종양 성장저지능은 하기와 같이 산출하였다.

[0142] 종양 성장저지능 (%)= 대조군의 고형암 무게 (g) - 실험군의 고형암 무게 (g) / 대조군의 고형암 무게 (g) × 100

[0143] **실험 결과(RVS 및 분획물)**

[0144] ***RVS의 urushiol에 대한 HPLC 분석***

[0145] 칠피의 urushiol은 항암, 항산화, 면역증강 작용이 우수하나, 항원성 물질로 단백질과 비특이적 결합 및 피부에 대한 극심한 알레르기를 일으키며 생명까지 위협할 정도로 알러지 작용이 강한 물질이다.

[0146] HPLC을 통해 알레르기 유발 물질인 urushiol이 함유되어 있는지 확인하였다. 생옻 추출물(A)에 함유된 urushiol A, B, C 성분들이 RVS(B)에서 검출되지 않았으며 알레르기로부터 안전한 것으로 확인되었다(도 3).

[0147] ***RVS의 fustin, fisetin, sulfuretin에 대한 HPLC 분석***

[0148] 칠피(옻)이 함유한 여러 성분들 가운데 플라보노이드는 혈관이나 모세혈관을 보호하는 작용이 있으며 과산화 지질을 억제하고 알레르기나 피부질환을 억제하는 작용을 한다.

[0149] 대표적 플라보노이드 성분인 fustin, fisetin 그리고 sulfuretin은 암세포의 성장을 저해하고 apoptosis를 유도하여 암세포의 proliferation을 억제할 수 있다.

[0150] Fustin, fisetin, sulfuretin의 함량을 HPLC로 분석한 결과, RVS에 각 6.86, 8.50, 1.17%(w/w)가 함유되어 있었다(도 4).

[0151] ***RVS 분획물의 fisetin에 대한 HPLC 분석***

[0152] RVS의 유효성분을 세분화하여 저용량에서도 더 뛰어난 항암효과를 가진 소재를 발굴하고자 용매별 순차적인 분획을 실시하였다.

[0153] 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 잔사로 분획하고 RVS의 플라보노이드 중 가장 함량이 높았던 fisetin에 대해 HPLC로 정량분석을 실시하였다.

[0154] RVS의 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올 분획 및 잔사에서 각각 0.06, 0.04, 18.94, 0.12, 0 %의 fisetin의 함량이 확인되었으며 다른 분획에 비하여 에틸아세테이트 분획에서 가장 fisetin 함량이 높았다.

[0155] fisetin과 같은 플라보노이드 성분의 대부분이 에틸아세테이트 분획으로 이동하는 것을 확인하였다(표 1).

표 1

[0156]

구분		Fisetin 함량(%)
RVS 분획물	hexane	0.06
	chloroform	0.04
	ethylacetate	18.94
	butanol	0.12
	residue	0

[0157] ***RVS 및 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라노이드 함량***

[0158] 폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있으며 분자 내 두 개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지고 있는 방향족 화합물로 단백질 및 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화, 항암, 항염증 등의 효과가 우수한 것으로 알려져 있다.

[0159] 또한, 플라보노이드는 항균, 항암, 항바이러스, 항알레르기 및 항염증 활성을 지니며, 독성은 거의 없이 생체 내 산화작용을 억제하는 것으로 알려져 있다.

[0160] RVS 및 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하여 비교해 보았다(표 2).

[0161] RVS 1 mg 당 함유된 총 폴리페놀 함량은 0.863 mg으로 확인되었다. 또한 RVS 1 mg 당 함유된 총 플라보노이드 함량은 0.139 mg으로 확인되었다.

[0162] 에틸아세테이트 분획에서 가장 높은 폴리페놀 함량(0.838 mg)과 플라보노이드 함량(0.186 mg)이 측정되어 폴리페놀 및 플라보노이드 대부분 에틸아세테에트 분획으로 이동하는 것으로 확인되었다.

표 2

[0163]

구분		Total polyphenols (mg/sample mg)	Total flavonoids (mg/sample mg)
RVS		0.863	0.139
분획물	hexane	0.015	0
	chloroform	0.091	0
	ethylacetate	0.838	0.186
	butanol	0.406	0.012
	residue	0.079	0

[0164] ***RVS 및 분획물의 항산화 활성***

[0165] 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 지질 과산화를 유도하고 조직의 세포를 손상시켜 심장질환, 뇌졸중, 암 등 각종 성인병과 노화를 유발할 수 있다.

[0166] 활성산소종에는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, nitric oxide등이 있으며, DPPH는 짙은 보라색의 비교적 안정한 free radical로서 항산화 활성을 갖는 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 환원되어 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다.

[0167] superoxide anion radical은 xanthine-xanthine oxidase 반응에 의하여 생성되며 독성이 강한 radical로 노화

와 관련된 산화반응의 개시단계에 관여하며, 각종 활성산소종의 전구체로 작용하므로 radical에 대한 소거활성 측정하는데 효과적인 방법으로 알려져 있다.

[0168] 따라서, RVS의 항산화능을 평가하기 위해 DPPH와 xanthine oxidase(XOD) 저해 활성 실험을 실시하였다(표 3).

[0169] RVS에서 DPPH 소거능에 대한 IC_{50} 값이 0.002 mg/ml로 확인되었고 XOD 저해능에 대한 IC_{50} 값은 0.009 mg/ml로 확인되어 항산화 효과가 매우 우수한 것으로 평가되었다.

[0170] RVS 분획물의 DPPH 및 XOD 저해능 결과를 살펴보았을 때, 에틸아세테이트 분획에서 가장 낮은 IC_{50} 값을 나타냈으며 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 많았던 에틸아세테이트 분획에서 가장 우수한 항산화 효능을 가지는 것으로 확인되었다.

표 3

[0171] [단위 : IC_{50} (mg/ml)]

구분		DPPH	XOD
RVS		0.002	0.009
분획물	hexane	0.027	0.175
	chloroform	0.028	0.173
	ethylacetate	0.001	0.007
	butanol	0.004	0.016
	residue	0.044	0.052
Ascorbic acid		0.004	0.021

[0172] ***RVS 및 분획물의 암세포 성장 억제에 대한 효과***

[0173] RVS 및 분획물의 암세포 증식 억제 효과를 알아보기 위해, 위암세포주 AGS, 비소세포성 폐암세포주 A549 및 유방암세포주 MCF-7을 사용하여 MTT assay를 실시하였다(표 4).

[0174] RVS는 AGS 세포에 대해 0.172 mg/ml에서 50% 이상의 세포 증식 억제 효과가 있었고 A549 세포에서 IC_{50}는 0.734 mg/ml, MCF-7 세포에서 IC_{50}는 0.565 mg/ml으로 확인되었다.

[0175] 상기 결과를 바탕으로 RVS가 효과적으로 위암, 폐암 및 유방암세포의 증식을 억제하는 것으로 판단되었으며, 에틸아세테이트 분획에서 가장 우수한 암세포 성장 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0176] RVS 에틸아세테이트 분획의 AGS 세포에 대한 IC_{50}는 0.044 mg/ml, A549 세포에 대한 IC_{50}는 0.208 mg/ml, MCF-7 세포에 대한 IC_{50}는 0.238 mg/ml으로 가장 효율적으로 암세포의 성장을 억제하였다.

표 4

[0177] [단위 : IC_{50} (mg/ml)]

구분		AGS	A549	MCF-7
RVS		0.172	0.734	0.565
분획물	hexane	-	-	-
	chloroform	0.168	0.625	0.244
	ethylacetate	0.044	0.208	0.238
	butanol	0.115	>1	0.692
	residue	0.564	>1	>1

[0178] ***RVS의 sarcoma-180으로 유도한 고형암 성장 억제효과***

[0179] Sarcoma-180 암세포에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 mouse 서혜부에 sarcoma-180 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 4주 후 종양의 무게를 측정한 결과는 다음과 같다(도 5).

[0180] 생리식염수를 투여한 대조군의 평균 종양 무게는 8.1 g이었으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 5.2 g

으로 35.7 %의 종양성장 억제 효과를 보였다.

[0181] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군의 평균 종양무게는 1.5 g으로 81.2 %의 종양성장 억제능을 보였다.

[0182] ***RVS의 melanoma 세포로 유도한 전이암 억제효과***

[0183] Melanoma 세포로 유발한 폐전이암 모델에서 항암효과를 측정하기 위하여 실험동물의 미정맥에 melanoma 세포를 주입하고 18일간 RVS를 투여하고 항암 효과를 확인하였다(도 6).

[0184] 생리식염수를 투여한 대조군의 평균 종양 개수는 73.2개였으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양 개수는 52.1개로 28.8 %가 감소하였다.

[0185] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군의 평균 종양 개수는 26.7개로 63.6 %의 종양 억제능을 보였다.

[0186] ***RVS의 LL/2로 유도한 고형암 성장 억제효과***

[0187] LL/2 암세포에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 mouse의 배부에 LL/2 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 3주간 고형암의 크기 및 종양 무게를 측정한 결과는 다음과 같다(도 7).

[0188] 생리식염수를 투여한 대조군의 평균 종양 크기는 실험 종료시 8.2 cm^3이었으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양크기는 5.9 cm^3로 27.7 %가 감소하였다.

[0189] 실험종료 시 대조군의 평균 종양무게는 6.5 g이었으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 4.5 g으로 29.9 % 감소하였다.

[0190] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군의 평균 종양크기는 4.2 cm^3, 평균 종양무게는 3.4 g으로 각 48.0, 48.2 %의 종양성장 억제능을 보였다.

[0191] **실험 결과(RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획물)**

[0192] ***RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 fustin, fisetin, sulfuretin에 대한 HPLC 분석***

[0193] 칠피가 함유한 여러 성분들 가운데 플라보노이드는 혈관이나 모세혈관을 보호하는 작용이 있으며 과산화 지질을 억제하고 알레르기나 피부질환을 억제하는 작용을 한다.

[0194] 대표적 플라보노이드 성분인 fustin, fisetin 그리고 sulfuretin은 암세포의 성장을 저해하고 apoptosis를 유도하여 암세포의 proliferation을 억제할 수 있다.

[0195] 상기 실험을 통해 RVS의 폴리페놀, fisetin을 비롯한 플라보노이드 등이 대부분 에틸아세테이트 분획으로 이동하는 것을 확인하였고, 다양한 활성 실험을 통해 에틸아세테이트 분획에서 가장 우수한 항산화 효과 및 in vitro상 암세포 증식 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0196] RVS의 에틸아세테이트 분획을 좀 더 세분화시켜 항암 효과가 더 뛰어난 하위분획을 찾아, 저용량에서 뛰어난 항암효과를 가진 소재를 발굴하고자 추가 연구를 진행하였다.

[0197] 컬럼 크로마토그래피를 이용해 추가적으로 분획을 진행하면서 함유 성분을 중점으로 하여 소분획물을 분류하였으며, HPLC를 통해 소분획물 6번, 7번 및 9번(A6, A7, A9)에서 sulfuretin, fisetin, fustin의 함량을 정량하였다.

[0198] 정량 결과 A6에서 각 0.06, 14.06, 31.78%의 fustin, fisetin 및 sulfuretin 함량이 확인되었다.

[0199] A7에서는 각 1.16, 61.16, 10.38 %의 fustin, fisetin 및 sulfuretin 함량이 확인되었고 A9에서는 각 15.82, 10.36, 0.34 %의 fustin, fisetin 및 sulfuretin 함량이 확인되었다.

[0200] 즉, A6에서는 sulfuretin, A7에서는 fisetin, A9에서는 fustin이 가장 많이 함유되어 있었다(도 8).

[0201] ***RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 총 폴리페놀 및 총 플라노이드 함량***

[0202] RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하여 비교해 보았다(표 5).

[0203] 그 결과 A6 1 mg 당 0.577, 0.107 mg의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 확인되었고, A7 1 mg 당 0.825, 0.568 mg의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 확인되었다.

[0204] A9 1 mg 당 0.871, 0.154 mg의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 확인되어 A9가 가장 많은 양의 폴리페놀을 함

유하고 있었고 A7이 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있었다.

표 5

[0205]

구분	Total polyphenols (mg/sample mg)	Total flavonoids (mg/sample mg)
A6(제1소분획물)	0.577	0.107
A7(제2소분획물)	0.825	0.568
A9(제3소분획물)	0.871	0.154

[0206] ***RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 항산화 활성***

[0207] 본 실험에서는 RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 항산화능을 평가하기 위해, DPPH와 xanthine oxidase(XOD) 저해 활성 실험을 실시하였다(표 6).

[0208] DPPH 결과 A6의 IC_{50}는 0.003 mg/ml, A7의 IC_{50}는 0.002 mg/ml, A9의 IC_{50}는 0.001 mg/ml로 확인되었다.

[0209] XOD 저해능 실험 결과 A6의 IC_{50}는 0.068 mg/ml, A7의 IC_{50}는 0.023 mg/ml, A9의 IC_{50}는 0.006 mg/ml로 확인되어 A9의 항산화능이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

표 6

[0210] [단위 : IC_{50} (mg/ml)]

구분	DPPH	XOD
A6(제1소분획물)	0.003	0.068
A7(제2소분획물)	0.002	0.023
A9(제3소분획물)	0.001	0.006
ascorbic acid	0.002	0.038

[0211] ***RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 암세포 성장 억제에 대한 효과***

[0212] RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 암세포 증식 억제 효과를 알아보기 위해, 위암세포주 AGS, 비소세포성 폐암세포주 A549 및 유방암세포주 MCF-7을 대상으로 MTT assay를 실시하였다(표 7).

[0213] AGS 세포에 대해서 A6의 IC_{50}는 0.072 mg/ml, A7의 IC_{50}는 0.078 mg/ml, A9의 IC_{50}는 0.065 mg/ml로 확인되었다. A549 세포에 대해서 A6의 IC_{50}는 0.150 mg/ml, A7의 IC_{50}는 0.238 mg/ml, A9의 IC_{50}는 0.447 mg/ml로 확인되었다.

[0214] MCF 세포에 대해서 A6의 IC_{50}는 0.156 mg/ml, A7의 IC_{50}는 0.224 mg/ml, A9의 IC_{50}는 0.128 mg/ml로 확인되었다.

[0215] 하위분획물 모두 암세포의 증식을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.

표 7

[0216] [단위 : IC_{50} (mg/ml)]

구분	AGS	A549	MCF-7
A6(제1소분획물)	0.072	0.150	0.156
A7(제2소분획물)	0.078	0.238	0.224
A9(제3소분획물)	0.065	0.447	0.128

[0217] ***RVS와 RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 sarcoma-180로 유도한 고형암 성장 억제효과***

[0218] Sarcoma-180 암세포에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 mouse 서혜부에 sarcoma-180 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 4주 후 종양의 무게를 측정한 결과는 다음과 같다(도 9).

[0219] 생리식염수를 투여한 대조군의 평균 종양 무게는 7.9 g이었으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 5.4 g

으로 31.8 %의 종양성장 억제 효과를 보였다.

[0220] A6 50 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 4.5 g, A7 50 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 3.5 g, A9 50 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 4.4 g으로 각 42.7, 55.2, 44.2 %가 감소하였다.

[0221] A6, A7 및 A9의 평균 종양무게는 모두 유의적으로 감소하였으며 A7의 평균 종양무게가 가장 크게 감소하였다. 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군의 평균 종양무게는 3.3 g으로 58.5 %의 종양성장 억제능을 보였다.

[0222] ***RVS와 RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 melanoma로 유도한 전이암 억제효과***

[0223] Melanoma 세포로 유발한 폐전이암 모델에서 항암효과를 측정하기 위하여 실험동물의 미정맥에 melanoma 세포를 주입하고 18일 후 폐전이암 개수를 확인한 결과는 다음과 같다(도 6).

[0224] 생리식염수를 투여한 대조군의 평균 종양 개수는 73.8개였으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양 개수는 56.6개로 22.7 %가 감소하였다.

[0225] A6 50 mg/kg 투여군의 평균 종양개수는 49.5개, A7 50 mg/kg 투여군의 평균 종양개수는 42.8개, A9 50 mg/kg 투여군의 평균 종양개수는 50.0개로 각 32.4, 41.6, 31.7 %가 감소하였다.

[0226] A6, A7 및 A9의 평균 종양개수는 모두 유의적으로 감소하였으며 A7의 평균 종양개수가 가장 크게 감소하였다.

[0227] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군의 평균 종양 개수는 32.5개로 55.6 %의 종양 억제능을 보였다.

[0228] ***RVS와 RVS 에틸아세테이트 분획의 하위분획별 LL/2로 유도한 고형암 성장 억제효과***

[0229] LL/2 암세포에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 mouse의 배부에 LL/2 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 3주간 고형암의 크기 및 종양 무게를 측정한 결과는 다음과 같다(도 9).

[0230] 생리식염수를 투여한 대조군의 평균 종양 크기는 실험 종료시 7.8 cm^3이었으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양크기는 5.0 cm^3로 36.1 %가 감소하였다.

[0231] A6 50 mg/kg 투여군의 평균 종양크기는 4.4 cm^3, A7 50 mg/kg 투여군의 평균 종양크기는 3.8 cm^3, A9 50 mg/kg 투여군의 평균 종양크기는 4.4 cm^3로 각 43.2, 51.5, 43.9 %가 감소하였다.

[0232] A6, A7 및 A9의 평균 종양크기는 모두 유의적으로 감소하였으며 A7의 평균 종양크기가 가장 크게 감소하였다.

[0233] 실험종료 시 대조군의 평균 종양무게는 6.6 g이었으나 RVS 100 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 5.0 g으로 24.1 % 감소하였다.

[0234] A6 50 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 4.7 g, A7 50 mg/kg 투여군의 평균 종양무게는 4.1 g, A9 50 mg/kg 투여군의 평균 종양크기는 4.6 g으로 각 29.3, 37.9, 30.3 %가 감소하였다.

[0235] A6, A7 및 A9의 평균 종양무게는 모두 유의적으로 감소하였으며 A7의 평균 종양무게가 가장 크게 감소하였다.

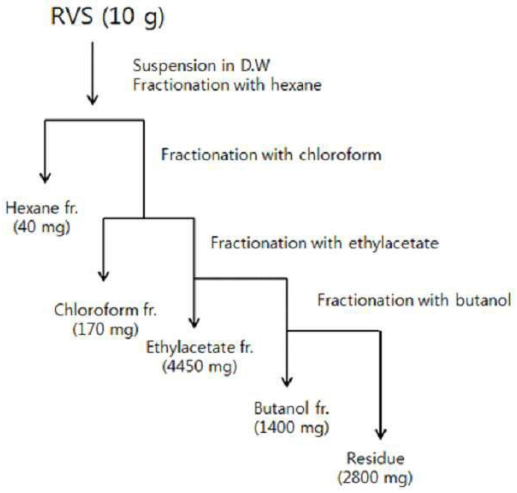
[0236] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군의 평균 종양크기는 1.7 cm^3, 평균 종양무게는 2.3 g으로 각 77.6, 65.0 %의 종양성장 억제능을 보였다.

[0237] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

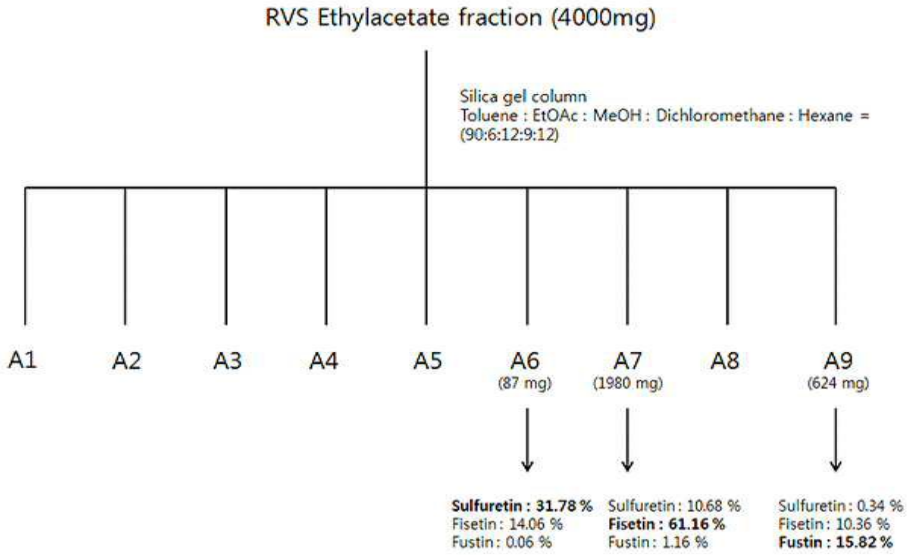
[0238] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

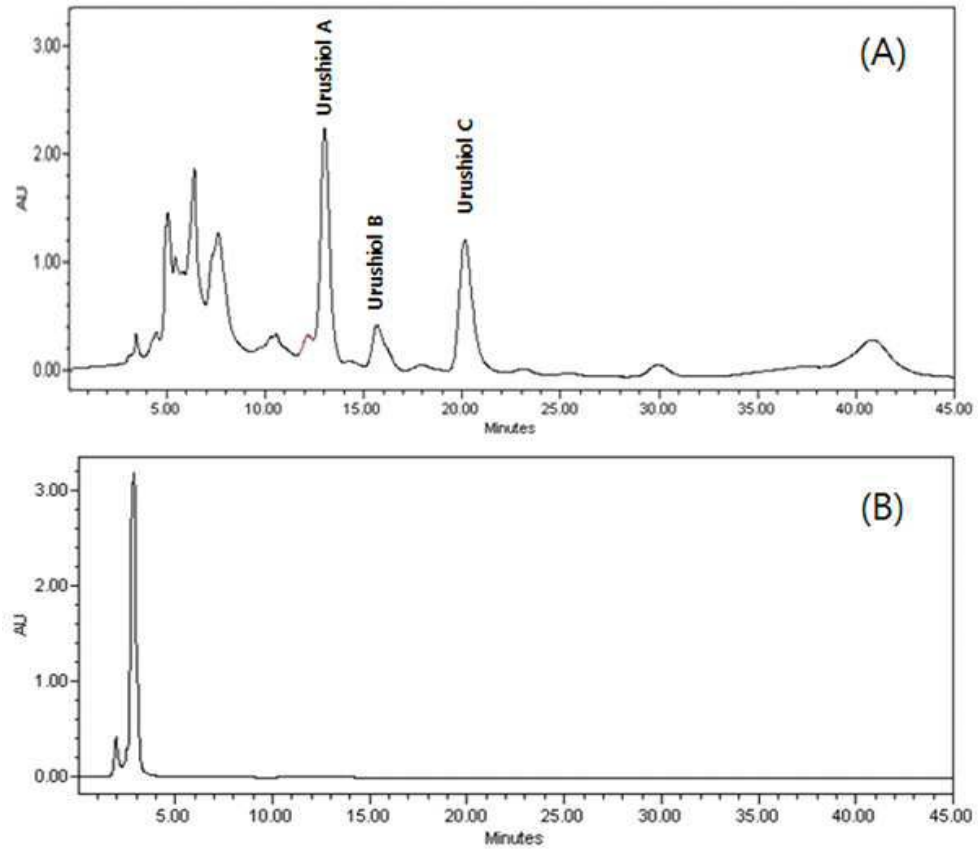
도면1


RVS (10 g)
Suspension in D.W
Fractionation with hexane
Fractionation with chloroform
Hexane fr.
(40 mg)
Fractionation with ethylacetate
Chloroform fr.
(170 mg)
Fractionation with butanol
Ethylacetate fr.
(4450 mg)
Butanol fr.
(1400 mg)
Residue
(2800 mg)

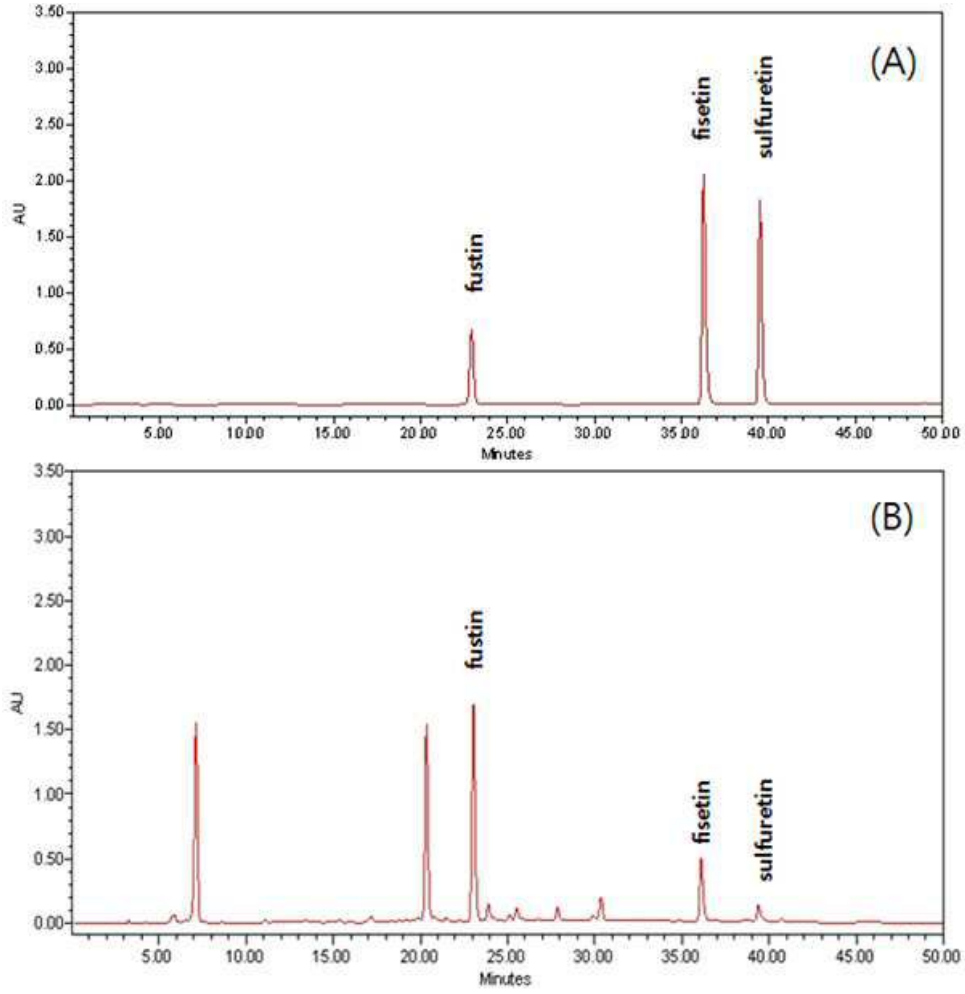
도면2


RVS Ethylacetate fraction (4000mg)
Silica gel column
Toluene : EtOAc : MeOH : Dichloromethane : Hexane =
(90:6:12:9:12)
A1
A2
A3
A4
A5
A6
(87 mg)
A7
(1980 mg)
A8
A9
(624 mg)
Sulfuretin : 31.78 %
Fisetin : 14.06 %
Fustin : 0.06 %
Sulfuretin : 10.68 %
Fisetin : 61.16 %
Fustin : 1.16 %
Sulfuretin : 0.34 %
Fisetin : 10.36 %
Fustin : 15.82 %

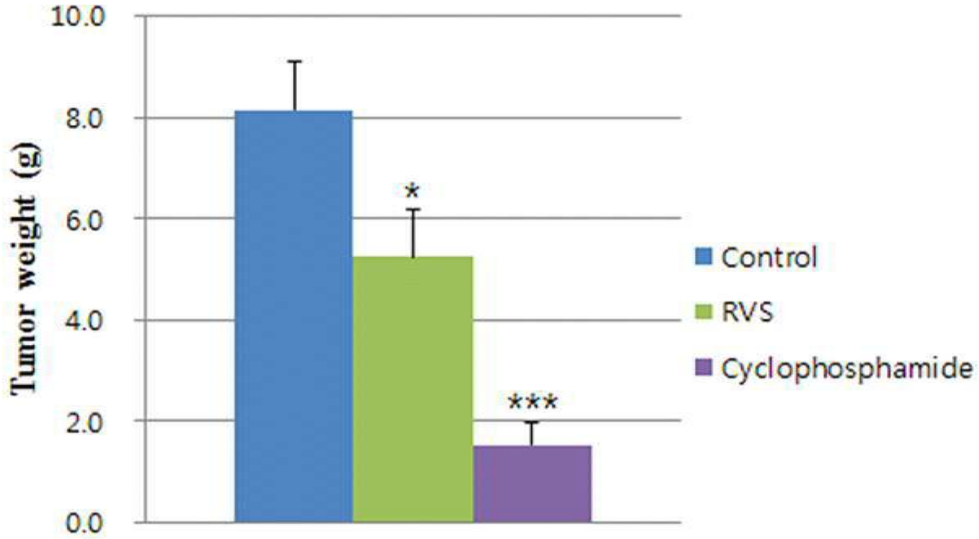
도면3


(A)
Urushiol A
Urushiol B
Urushiol C
AU
3.00
2.00
1.00
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
Minutes
(B)
AU
3.00
2.00
1.00
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
Minutes

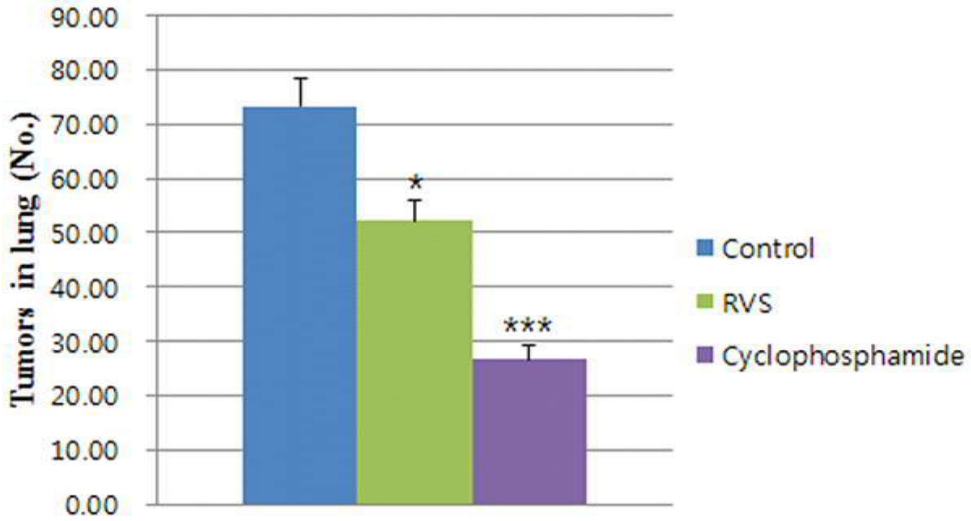
도면4


(A)
fustin
fisetin
sulfuretin
AU
Minutes
(B)
fustin
fisetin
sulfuretin
AU
Minutes

도면5

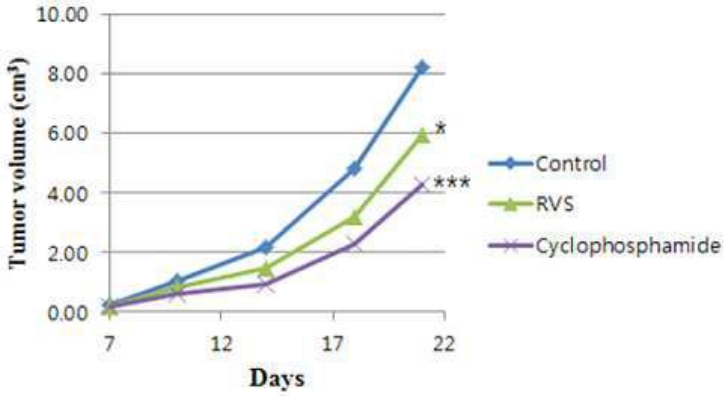

Tumor weight (g)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
*
***
Control
RVS
Cyclophosphamide

도면6

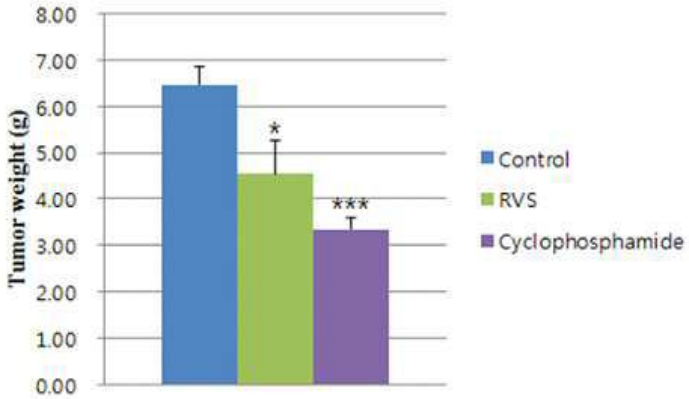

90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
Tumors in lung (No.)
*
***
Control
RVS
Cyclophosphamide

도면7

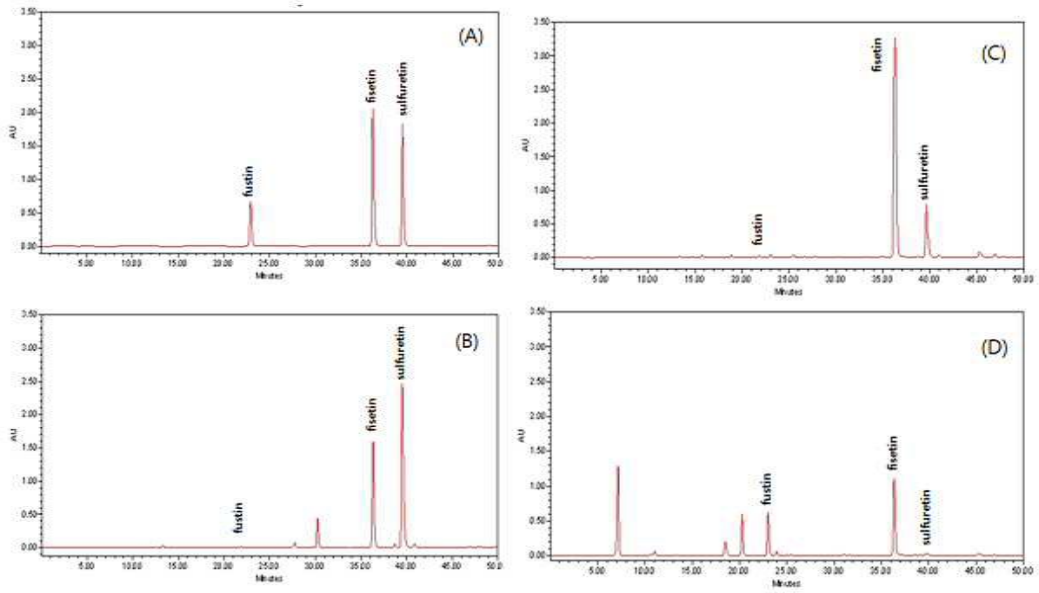
A


10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
Tumor volume (cm³)
7
12
17
22
Days
*
***
Control
RVS
Cyclophosphamide

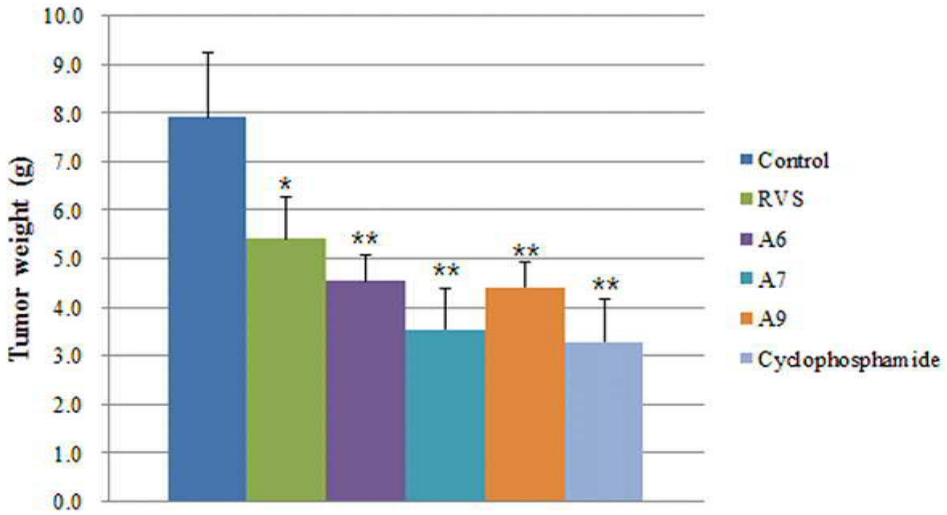
B


8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Tumor weight (g)
*
***
Control
RVS
Cyclophosphamide

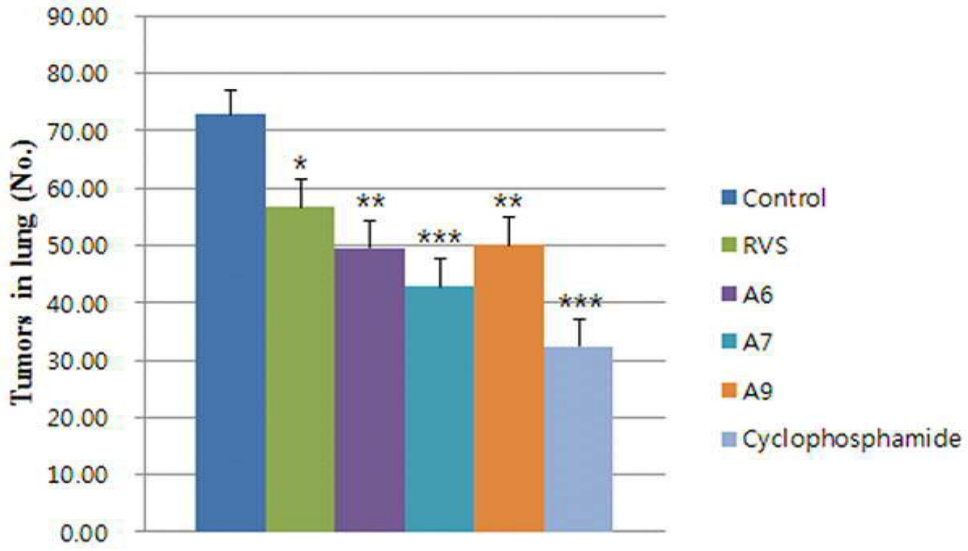
도면8


(A)
fustin
fisetin
sulfuretin
(C)
fustin
fisetin
sulfuretin
(B)
fustin
fisetin
sulfuretin
(D)
fustin
fisetin
sulfuretin

도면9

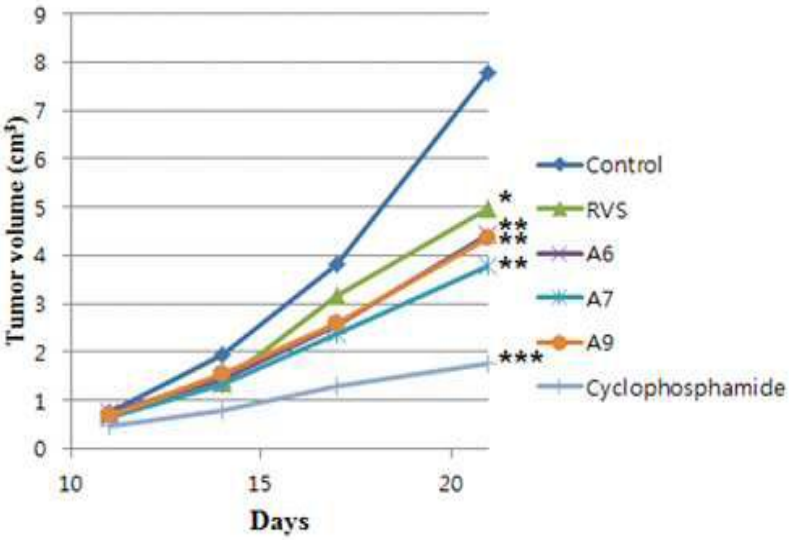

Tumor weight (g)
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
*
**
**
**
**
Control
RVS
A6
A7
A9
Cyclophosphamide

도면10

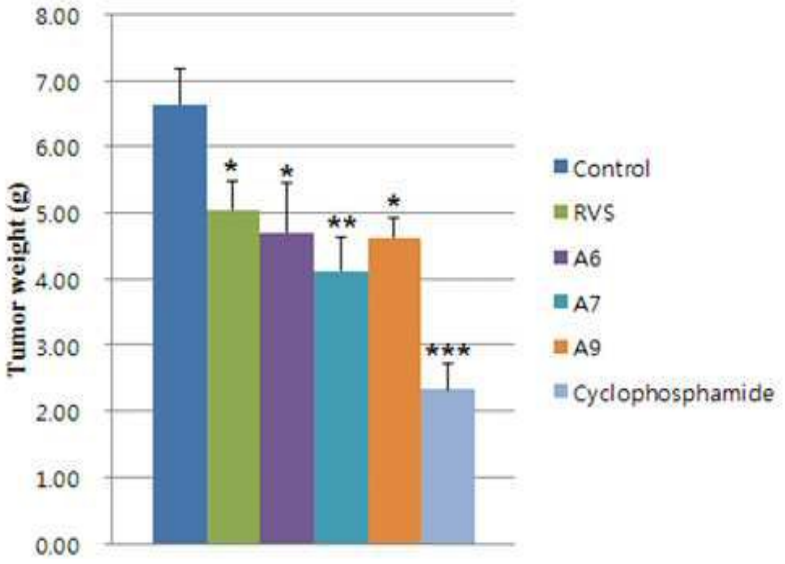

90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
Tumors in lung (No.)
*
**
***
**
***
Control
RVS
A6
A7
A9
Cyclophosphamide

도면11

A


Tumor volume (cm³)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
10
15
20
Days
Control
RVS
A6
A7
A9
Cyclophosphamide
*
**
**
**
***

B


Tumor weight (g)
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Control
RVS
A6
A7
A9
Cyclophosphamide
*
*
**
*
***