(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0131713
(43) 공개일자 2024년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/8945 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/8945 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0025111
(22) 출원일자 2023년02월24일
심사청구일자 2023년02월24일
기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 10 항

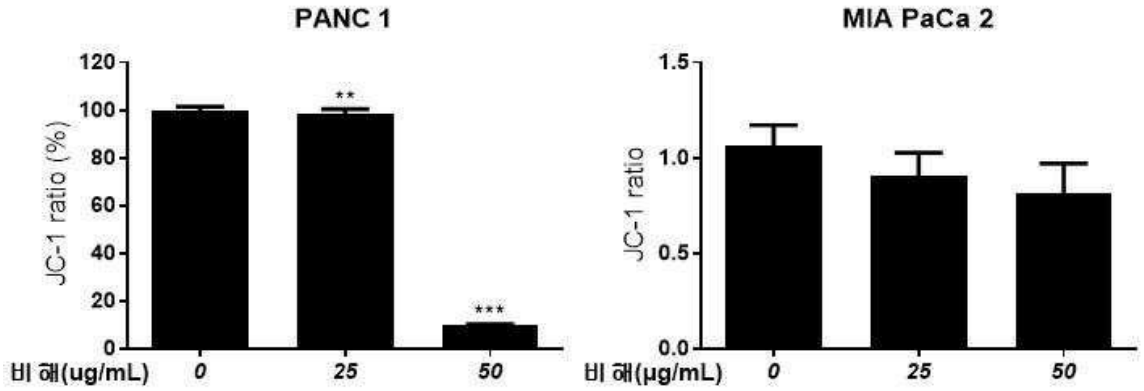
(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김봉이
서울특별시 강동구 상암로 355, 4동 101호
최진원
경기도 의정부시 시민로254번안길 36, 다동 201호
(74) 대리인
위병갑

(54) 발명의 명칭 **비해 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 비해 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 비해 추출물은 췌장암 세포주를 효과적으로 사멸시키는 것을 확인하였다. 또한, 세포사멸과 관련된 인자의 발현을 조절하고, 미토콘드리아 매개 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 비해 추출물이 췌장암 세포주를 특이적으로 사멸시키는 것을 확인하였다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345351506
과제번호 2020R1I1A2066868
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 학문균형발전지원(보호연구)
연구과제명 한약물의 장내 미생물 조절을 통한 췌장암 억제 연구
기 여 율 95/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711158248
과제번호 2020R1A5A2019413
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/선도연구센터지원사업/기초의과학분야(MRC)
연구과제명 한약물 재해석 암 연구 센터
기 여 율 5/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 비해 추출물은, 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 저급 알코올 수용액, 에틸아세테이트, 헥산 및 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출되는 것인, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 비해 추출물은, 췌장암의 세포사멸을 유도하는 것인, 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 세포사멸을 유도하는 것은, C-Caspase-3 또는 C-PARP의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 세포사멸을 유도하는 것은, pro PARP의 발현을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 비해 추출물은, 미토콘드리아 막 투과성을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 미토콘드리아 막 투과성을 증가시키는 것은, 미토콘드리아 매개 세포 사멸을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 췌장암은, 악성 췌장 종양(췌관선암 (Pancreatic ductal adenocarcinoma), 신경 내분비 종양(Neuroendocrine tumor), 낭종성 췌장 종양(점액성 낭성 종양(mucinous cystic neoplasm), 췌관내 유두상 점액 종양(intraductal papillary mucinous neoplasm) 및 고형 가유두상 종양(solid pesudopapillary neoplasm))으로 이루어진 군에서 선택된 암종인 것인, 조성물.

청구항 9

비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 항암보조제.

청구항 10

비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 예방 또는 개선용 식품조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 비해 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다. 암을 정복하기 위해 DNA 손상/복구의 기본적인 메커니즘, 아폽토시스, 종양형성, 및 분자 측면에서의 치료의 더 깊은 이해에 초점을 맞춘 혁신적인 암 연구가 강력하게 요구되며, 이는 결국 암 요법에서의 돌파구가 될 수 있을 것이다.

[0003] 보건복지부 통계자료에 따르면 췌장암은 2017년 전체 암 발생 중에서 8위를 차지하는 암으로 조기 진단이 어렵고 다른 장기로 전이가 잘 되어 예후가 좋지 않은 암으로 알려져 있다. 또한 5년 생존율이 약 12%정도로 위암, 대장암, 유방암이 각각 76.5%, 75%, 93%인 것에 비해 현저히 낮은 수준이다. 현재, 암의 치료를 위해서는 수술요법, 방사선 치료 요법 및 화학요법 등이 사용되고 있다. 이 중에서, 화학요법은 항암제를 이용하여 암을 치료하는 방법을 말한다. 오늘날에는 약 60여 종의 다양한 항암제가 사용되고 있으며, 현재 사용되고 있는 젬시타빈(gemcitabine)과 같은 항암제와 방사선치료는 혈관계, 신경계, 혈액계, 피부 등에서 다양한 부작용을 초래할 수 있기 때문에 이를 최소화하고 보다 나은 치료효과를 갖는 새로운 치료제가 필요한 상황이다.

[0004] 한편, 생체 내의 세포들은 세포사멸(apoptosis)의 과정을 거쳐 제거된다. 그러나 암세포는 계속된 분열로 인해 무한으로 증식한다. 이러한 암세포를 제거하기 위해서는 사멸을 유도해야 한다. PARP(Poly ADP-Ribose Polymerase)는 DNA가 손상되었을 때 복구를 하는 역할을 한다. 이는 세포사멸이 일어나면 기능을 하지 못한다. 때문에 사멸이 일어나는 세포에서 PARP의 양은 줄어드는 것으로 나타난다. ROS(Reactive oxygen species)는 암세포에서 세포사멸을 일으키는 요소 중 하나이다. DCF-DA를 이용한 염색은 ROS의 발생 정도를 확인할 수 있게 하며, ROS의 증가는 암세포의 사멸이 증가함을 확인할 수 있게 한다.

[0005] 한편, 비해는 도코로마(*Dioscorea tokoro* Makino)의 뿌리 줄기이며, 산비해 또는 백지라고도 한다. 비해는 습열로 소변이 탁하고 시원하지 않으며, 열감과 통증이 생길때 사용하여, 관절통, 퇴행성관절염, 류머티즘성 관절염, 요통, 무릎통에 쓰이며, 습진, 창진, 단독 등에도 쓰인다. 비해의 약리작용으로는 살충작용, 항진균작용 및 죽상동맥 경화증 치료효과가 보고되었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 비해 추출물이, 췌장암의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 항암보조제를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 항암보조제를 제공

한다.

[0012] 또한, 본 발명은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 비해 추출물은 췌장암 세포주를 효과적으로 사멸시키는 것을 확인하였다. 또한, 세포사멸과 관련된 인자의 발현을 조절하고, 미토콘드리아 매개 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 비해 추출물이 췌장암 세포주를 특이적으로 사멸시키는 것을 확인하여, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 비해 추출물의 처리 농도에 따른, 췌장암 세포주 PANC-1 및 MIA PaCa 2의 세포 생존율을 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 비해 추출물의 처리에 따른, 췌장암 세포주 PANC-1 및 MIA PaCa 2에서의 세포 사멸 관련 단백질의 발현을 웨스턴블랏으로 분석한 도이다.

도 3은 본 발명의 비해 추출물의 처리에 따른, 췌장암 세포주 PANC-1 및 MIA PaCa 2에서의 미토콘드리아 막 투과성을 JC-1 ratio로 정량한 도이다.

도 4는 본 발명의 비해 추출물의 처리 농도에 따른, 전립선암 및 폐암 세포주의 세포 생존율을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 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.

[0016] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0020] 췌장암은 악성 췌장 종양(췌관선암 (Pancreatic ductal adenocarcinoma), 신경 내분비 종양 (Neuroendocrine tumor), 낭종성 췌장 종양(점액성 낭성 종양(mucinous cystic neoplasm), 췌관내 유두상 점액종양(intraductal papillary mucinous neoplasm), 고형 가유두상 종양(solid pesudopapillary neoplasm))으로 분류될 수 있다.

[0021] 췌장암을 연구하기 위한 세포주는 다양하며, 현재 일반적으로 PANC-1, AsPC-1 등을 포함하는 11개이상의 세포주를 이용하고 있다. 상기 각 세포주는 서로 다른 표현형과 유전형이 나타나고 이에 따라 종양 성장, 침습 및 전이 뿐만 아니라 화학 요법과 약물 내성에 따른 특징이 상이한 것으로 알려져 있다(Pancreas. 2010 May; 39(4): 425-435.)

[0022] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서,

약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0025] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에0.01 ~ 5,000 ㎍/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 ㎍/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 ㎍/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 비해 추출물은, 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 저급 알코올 수용액, 에틸아세테이트, 헥산 및 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출되는 것일 수 있고, 바람직하게는 에탄올 수용액이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 비해 추출물은, 췌장암의 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 세포사멸을 유도하는 것은, C-Caspase-3 또는 C-PARP의 발현을 증가시키는 것일 수 있고, pro PARP의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 비해 추출물은, 미토콘드리아 막 투과성을 증가시키는 것일 수 있고, 상기 미토콘드리아 막 투과성을 증가시키는 것은, 미토콘드리아 매개 세포 사멸을 증가시키는 것일 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 항암보조제를 제공한다.

[0034] 본 발명의 "항암 보조제"는 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제로서, 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않으나 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제일 수 있다. 또한, 농도의존적인 항암활성을 나타내는 제제를 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제일 수 있다.

[0035] 항암 보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암 보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암 보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 췌장암의 예방 또는 개선용

식품조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0040] 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 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0041] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 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, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0042] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 췌장암의 예방 또는 치료 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0046] **<제조예 1> 비해 추출물의 제조**

[0047] 본 발명의 비해(*Dioscorea tokoro* Makino) 추출물의 췌장암에 대한 항암 효과를 확인하기 위하여, 비해 추출물을 제조하였다. 구체적으로, 비해 600g에 25%에탄올을 3 L첨가하여 비해가 담겨 있는 플라스크가 완전히 잠기도록 넣어주고 72시간 동안 추출하였다. Evaporator를 이용하여 에탄올 성분을 증발시켜서 순수한 비해 추출물 성

분만이 남도록 에탄올을 증발시켜 주었다. 그 후 추출액을 동결건조하여, 비해 추출물을 수득하였다. 이렇게 수득한 비해 추출물의 수득률은 13.073%였다.

[0049] **<실시예 1> 비해 추출물의 췌장암 세포주에 대한 세포 독성 확인**

[0050] 본 발명의 비해 추출물의 췌장암에 대한 세포 독성을 확인하였다. 구체적으로, 췌장암 세포주인 PANC-1 및 MIA PaCa 2 세포주(한국세포주은행, 대한민국, 서울)를 사용하였으며, 배양 배지는 10% inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin를 포함한 DMEM배지를 이용하였다. PANC-1 및 MIA PaCa 2 세포주 100 μl를 96-well plate에 1.3×10^4 세포농도가 되도록 각각 분주한 뒤, 37℃의 5% CO_2 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포에, 배지를 제거하고, 상기 제조예 1의 비해 추출물을 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/ml의 농도로 각각 100 μl씩 처리한 뒤, 24시간동안 추가로 배양하였다. 그 후 배양된 세포에 EZ-Cytox 시약 (DoGen)을 10 μl 처리하고 1시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 마이크로플레이트 리더기(BKMPR-1101)를 이용하여 450nm 파장대에서 흡광도를 측정하여, 세포 생존율을 확인하였다.

[0052] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 비해 추출물은, 농도의존적으로, 췌장암 세포주인 PANC-1 및 MIA PaCa 2를 사멸시키는 것을 확인하여, 암세포주에 대한 세포 독성을 확인하였다.

[0054] **<실시예 2> 비해 추출물의 세포사멸 유도 효과 확인**

[0055] 본 발명의 비해 추출물이, 세포사멸과 관련된 인자의 발현을 조절하는지 확인하였다. C-Caspase-3는 Pro Caspase-9이 활성화되어, Pro Caspase-3를 활성화 시키게되며, 활성화된 Pro Caspase-3가 절단되어 활성화 상태가 된 C-Caspase-3는 세포사멸 인자로서, PARP를 활성화 시키고, PARP는 절단되어 C-PARP가 되어, 신호를 전달하여 아폽토시스(apoptosis)를 유도하여, 세포가 사멸되게 된다. 구체적으로, PANC-1 및 MIA PaCa 2 세포주에, 비해 추출물을 25 및 50 μg/ml의 농도로 각각 처리하고, 24시간 동안 37℃의 5% CO_2의 조건으로 배양하였다. 그 후 세포를 수득하여, PBS로 세척한 뒤, CETI Lysis Buffer with Inhibitor(TransLab, Korea)를 첨가하여 세포를 파쇄 후 30분 동안 -4℃에서 반응시켰다. 그 후 세포파쇄물을 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거한 후, RC DC™ Protein Assay Kit II(protein assay kit) (Bio-rad, USA)를 사용하여 단백질을 정량하여 시료별 (비해 추출물 25, 50 ㎍/ml 처리군들)로 동일한 단백질의 양이 포함되도록 정량하였다. 그 후 단백질 시료에 5×로딩 다이를 넣고 5분 동안 100℃로 가열하여 단백질을 변성시키고, 12% SDS-PAGE 젤에 시료를 로딩하여 90V로 120분간 동안 전기영동을 수행하였으며, 젤 위에서 분리된 단백질들을 280mA로 2시간 동안 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 그 후 멤브레인을 5% 탈지유가 포함된 TBST (tris buffered saline, pH 7.5) 용액으로 상온에서 1시간 동안 블로킹한 뒤 TBST로 3회 세척한 뒤, 1차 항체를 1:1000 비율로 희석하고, 블로킹한 멤브레인과 4℃에서 오버나잇으로 반응시켰다. 반응 종료 후 TBST로 3회 세척한 뒤, horseradish peroxidase가 결합된 항-rabbit IgG, 항-mouse IgG를 1:10,000 으로 희석하여 상온에서 멤브레인과 1시간 동안 반응시킨 다음 TBST로 3회 세척하였다. 세척된 멤브레인을 chemiluminescent reagent와 1분동안 반응시킨 후, chemiluminescent western blot 이미징 장비(Corebiosystem, Korea)를 통해 단백질 밴드를 가시화하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 비해 추출물은 농도 의존적으로 PANC-1 및 MIA PaCa 2 세포주에서 농도 의존적으로 C-Caspase-3, C-PARP의 발현을 증가시키고, pro PARP를 감소시키는 것을 확인하여, 비해 추출물이 췌장암 세포주의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[0059] **<실시예 3> 비해 추출물의 췌장암 세포주 미토콘드리아 막 투과성 확인**

[0060] 본 발명의 비해 추출물이, 췌장암 세포주에서, 미토콘드리아 막 투과성을 변화시키는지 확인하였다. JC-1 dye는 미토콘드리아 막을 잘 투과하는 lipophilic cation dye이며, monomer로 존재할 때는 green fluorescence을, J-aggregate일 때는 red fluorescence로 나타난다. 즉 살아있을 때는 미토콘드리아 막을 잘 투과하여 빨간색이 되

고, 세포사멸이 일어나면, MMP에 문제가 생겨 세포질에 monomer로 존재하게 되어 녹색으로 나타난다. JC-1 assay를 이용하여, 비해 추출물의 처리에 따른 미토콘드리아 막 전위를 확인하였다.

[0062] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 비해 추출물을 췌장암 세포주인 PANC-1 및 MIA PaCa 2에 처리하면, 미토콘드리아 막 투과성이 유의적으로 증가하여, JC-1 ratio가 감소하는 것을 확인하여, 비해 추출물이 미토콘드리아 매개 암세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[0064] **<실시예 4> 비해 추출물의 췌장암 특이적 세포사멸 확인**

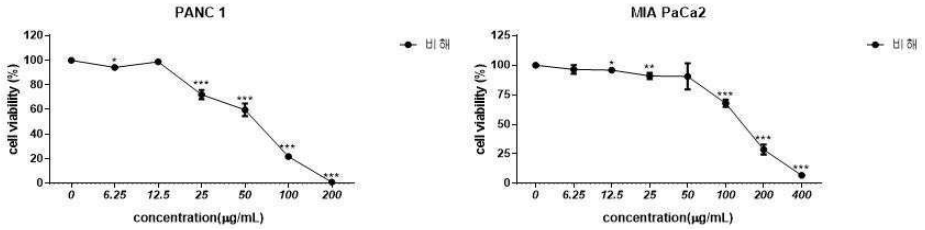
[0065] 본 발명의 비해 추출이 췌장암 세포주를 특이적으로 사멸시키는지 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1의 췌장암 세포주인 PANC-1 및 MIA PaCa 2와, 전립선암 세포주인 PC 3 세포주 및 폐암 세포주인 H1299 세포주에서, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 세포 독성을 측정하여, 세포 생존율을 확인하였다.

[0067] 그 결과, 도 1 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 비해 추출물은 농도의존적으로 췌장암 세포주 2종을 사멸시키며, PANC-1 세포주에서는 200 μg/ml의 농도에서 모든 세포가 사멸하였고, MIA PaCa 2 세포주에서는 400 μg/ml의 농도에서 모든 세포주가 사멸한 것을 확인하였으나, 전립선암 세포주인 PC3 세포주에서는, 췌장암 세포주 2종을 모두 사멸 시킨 농도에서도, 세포 사멸이 확인되지 않는 것을 확인하여, 전립선암 세포주는 비해 추출물이 유도하는 세포 사멸에 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. 또한, 폐암 세포주인 H1299 세포주에서는 췌장암 세포주 2종을 모두 사멸 시킨 농도에서도, 세포 생존율이 50% 이상인 것을 확인하여, 폐암 세포주는 비해 추출물이 유도하는 세포 사멸에 저항하는 것을 확인하여, 본원 발명의 비해 추출물이 췌장암 세포주에 특이적으로 독성을 나타내는 것을 확인하였다.

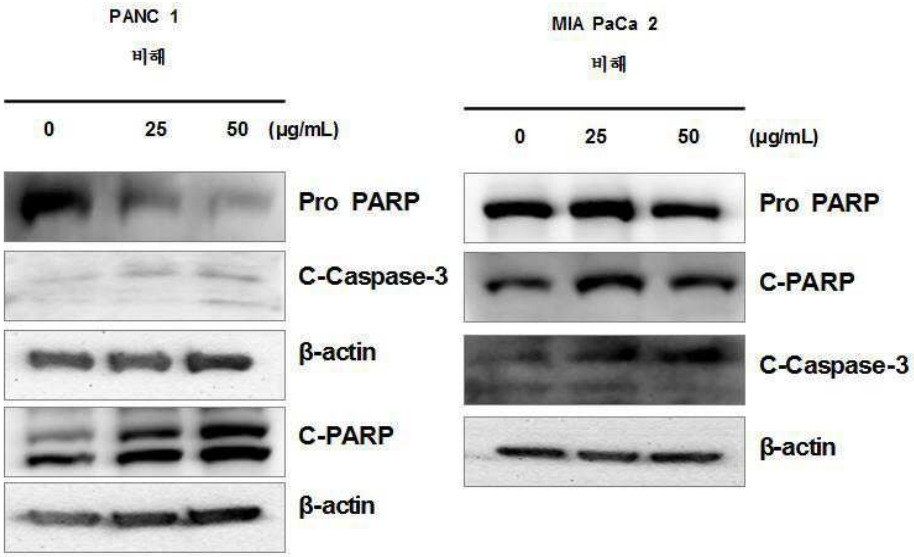
[0069] 따라서, 본 발명의 비해 추출물은 췌장암 세포주를 효과적으로 사멸시키는 것을 확인하였다. 또한, 세포사멸과 관련된 인자의 발현을 조절하고, 미토콘드리아 매개 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 비해 추출물이 췌장암 세포주를 특이적으로 사멸시키는 것을 확인하였다.

도면

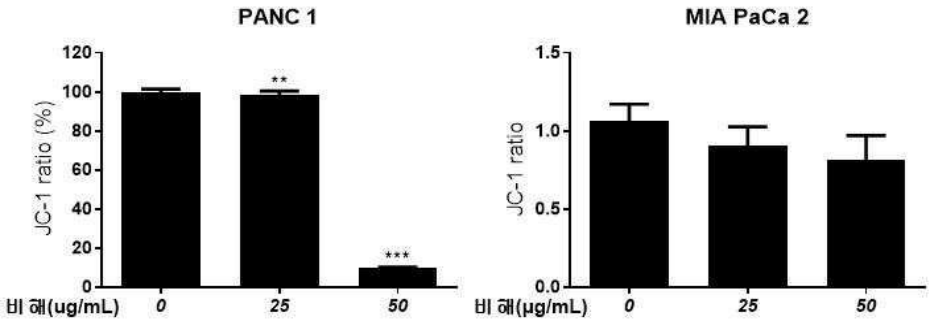
도면1



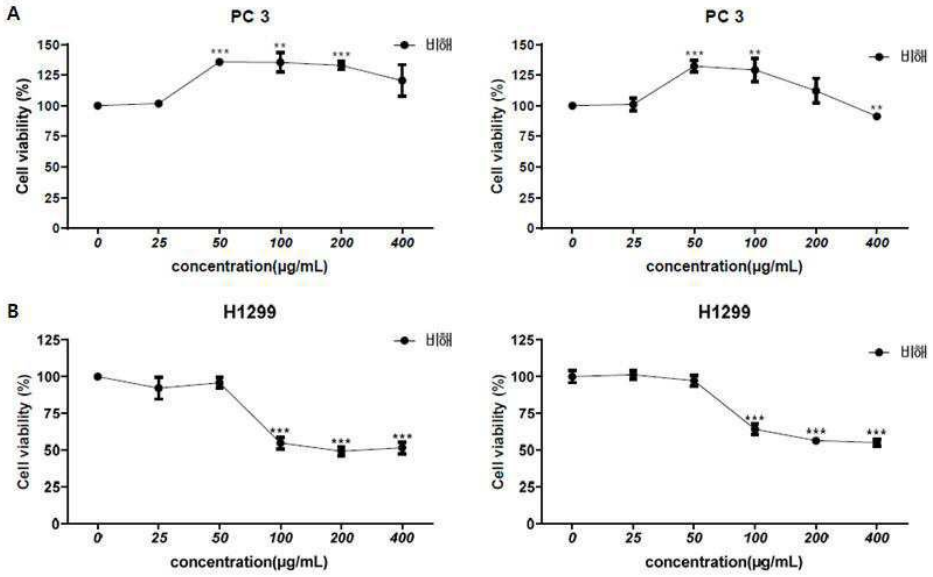
도면2


PANC 1
비해
0
25
50
(μg/mL)
Pro PARP
C-Caspase-3
β-actin
C-PARP
β-actin
MIA PaCa 2
비해
0
25
50
(μg/mL)
Pro PARP
C-PARP
C-Caspase-3
β-actin

도면3


PANC 1
JC-1 ratio (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
***
비 해(ug/mL)
0
25
50
MIA PaCa 2
JC-1 ratio
1.5
1.0
0.5
0.0
비 해(μg/mL)
0
25
50

도면4


A
PC 3
Cell viability (%)
비해
concentration(μg/mL)
PC 3
Cell viability (%)
비해
concentration(μg/mL)
B
H1299
Cell viability (%)
비해
concentration(μg/mL)
H1299
Cell viability (%)
비해
concentration(μg/mL)