

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 4일 (04.07.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/100585 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/35 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 36/71 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/011497
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 26일 (26.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0142072 2011년 12월 26일 (26.12.2011) KR
- (71) 출원인: (재)제주테크노파크 (JEJU TECHNOPARK)
[KR/KR]; 690-787 제주도 제주시 중앙로 217, 제주벤처마루 9층, Jeju-do (KR).
- (72) 발명자: 함영민 (HAM, Young Min); 697-826 제주도 서귀포시 강정동 178 현대 2차 205-105, Jeju-do (KR). 김길남 (KIM, Kil Nam); 690-814 제주도 제주시 연동 290-2 학산맨션 403 호, Jeju-do (KR). 정용환 (JUNG, Yong Hwan); 697-851 제주도 서귀포시 서홍동 446-13 화신빌라 A/201, Jeju-do (KR). 윤원중 (YOON, Weon Jong); 690-803 제주도 제주시 노형동 1047-10, Jeju-do (KR). 박수영 (PARK, Soo Yeong); 690-121 제주도 제주시 아라 1동 2802-1 방선문빌리지 105-401, Jeju-do (KR). 오대주 (OH, Dae Ju); 690-801 제주도 제주시 건입동 1226-6, Jeju-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인태웅 (TW INTERNATIONAL PATENT AND LAW FIRM); 135-936 서울시 강남구 역삼동 832-41 현죽빌딩 13층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: ADONIS AMURENSIS EXTRACT OR ANTI-CANCER COMPOSITION USING SAME AS AN ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 세복수초 추출물 또는 그 유효물질을 이용한 항암제 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to an *Adonis amurensis* extract showing anti-cancer activity in cell and animal experiments, and an anti-cancer composition using the same as an active material.

(57) 요약서: 본 발명은 세포실험 및 동물실험에서 항암 활성을 나타내는 세복수초 추출물 또는 그 유효물질을 이용한 항암제 조성물을 개시한다.



WO 2013/100585 A2

명세서

발명의 명칭: 세복수초 추출물 또는 그 유효물질을 이용한 항암제 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 세복수초(*Adonis amurensis*) 추출물 또는 그 유효물질을 이용한 항암제 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 암이란 일반적으로 인체 조직을 이루고 있는 세포의 주기에 이상이 생겨 세포가 정상적으로 분화하지 않고 성장을 조절할 수 없이 커진 것 중 악성인 것을 말한다.
- [4] 암은 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생하는데, 환경이나 음식물 속에 포함된 발암 물질에 의해 세포 돌연변이가 일어나고 이러한 세포들이 발암 물질의 계속적인 자극을 받으면서 비정상적인 증식을 계속하여 암 조직을 형성하는 것으로 알려져 있다.
- [5] 암을 치료하기 위한 항암제의 연구 방법에는 암세포에 대한 직접적인 세포 독성 물질을 탐색하는 방법, 생체의 면역 능력을 조절하는 물질을 탐색하는 방법, 암세포의 전이를 억제하는 물질을 탐색하는 방법, 최근에 주목되고 있는 혈관신생을 억제하는 물질을 탐색하는 방법 등이 있다.
- [6] 현재 사용되고 있는 항암제들은 효소 제제나 백신 등의 생물학적 제제, 화학 합성 의약품, 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는데, 이 중 효소, 백신 등의 생물학적 제제는 실용 단계에 있는 상태는 아니며, 화학 합성 의약품은 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고(Gillman., et al., Maxwell Macmillan. 18, pp1202, 1986), 독성에 의한 부작용이 다양하게 나타나기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있다(Chung., et al., J. Wonkwang Medical Sci. , 3 , pp 13-34, 1987).
- [7] 이러한 화학 합성 항암제의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 높이기 위하여 식물 추출물을 이용한 항암제의 개발이 지속적으로 시도되고 있다.
- [8] 항암 활성을 갖는 식물 추출물들이 많이 보고되고 있다(Pujol M, Gavilondo J, Ayala M, Rodriguez M, Gonzalez EM, Perez L. 2007 Trends Biotechnol 25(10):455-459). 예컨대 당귀(*Angelica gigas*) 추출물은 결장암(KanWL, Cho CH, Rudd JA, Lin G. 2008. 120(1): 36-43), 대장암(Lu J. Kim SH Jiang C, Lee H Guo J. 2007. Acta Pharmacol Sin. 28(9):1365-1372), 뇌암(Tasi NM, Chen YL, Lee CC, Lin

PC, Cheng YL, Chang WL, LIn SZ, Ham HJ. 2006. J Neurochem 99(4):1251-1262) 등 여러 종류의 암에 대해 항암 효과가 있음이 보고되어 있으며, 또한 예컨대 감초(*Glycyrrhiza glabra*)의 뿌리 추출물이 전립선암(Kanazawa M, Satomi Y, Mizutani Y, Ukimura O, Kawauchi A, Sakai T, Baba M, Okuyama T, Nishino H, Miki T. 2003. Eur Urol 43(5) :580-586)이나 유방암(Jo EH, Lim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, Yang SR, Park JS, Hwang JW, Aruoma OI, Kim TY, Lee YS, Kang Ks. 2005. Cancer Lett. 230(2): 239-247)에 항암 효과가 있음이 알려져 있다.

- [9] 본 발명은 세포실험 및/또는 동물실험을 통하여 세복수초 추출물과 그 유효물질의 항암 활성을 확인함으로써 완성된 것이다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

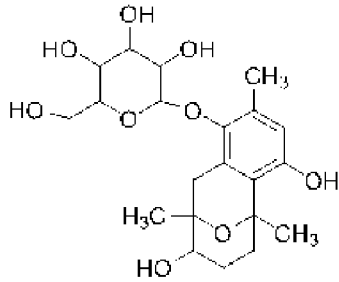
- [11] 본 발명의 목적은 항암제 조성물을 제공하는 데 있다.
[12] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.
[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명자들은 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되는 바와 같이, 세복수초 80% 에탄올 추출물을 제조함과 함께 그 80% 에탄올 추출물을 증류수에 현탁시켜 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)로 순차적으로 분획하여 세복수초 분획 추출물을 제조한 후에, 그 80% 에탄올 추출물과 각 분획 추출물의 항암 활성을 일차적으로 세포실험을 통하여 살펴본 결과 실험에 사용한 암세포주인 폐암 세포주 A549, 위암 세포주 AGS, 대장암 세포주 HCT-15, 유방암 세포주 MDA-MB-231 그리고 간암 세포주 SK-Hep1 모두에 대해서 세포 증식 억제 활성을 보임을 확인하였고, 이 중에서 가장 활성이 뛰어난 에틸아세테이트 분획 추출물을 가지고 동물실험을 수행한 결과, 폐암 세포주 A549, 위암 세포주 AGS 또는 간암 세포주 SK-Hep1을 이용한 HF(Hollow fiber) assay 모델 실험에서 에틸아세테이트 분획물은 실험에 사용한 모든 암세포주에서 농도 의존적으로 항암 활성을 나타냄을 확인하였으며, 특히 간암 세포주인 SK-Hep-1 또는 HepG-2를 이식한 누드마우스 동물실험 모델에서도 대체로 농도 의존적으로 항암 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [15] 본 발명자들은 나아가 상기 에틸아세테이트 분획물로부터 유효물질을 분리하고 그 물질을 동정한 결과, 아래의 <화학식 1>의 화합물로서 신규 화합물임을 확인하였다.

- [16] <화학식 1>

[17]



- [18] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로서, 본 발명은 일 측면에 있어서, 상기 <화학식 1>의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염으로서 파악할 수 있고, 다른 측면에 있어서는 세복수초 추출물, 상기 <화학식 1>의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물로서 파악할 수 있다.
- [19] 본 명세서에서, "항암"이란 암세포의 사멸, 암세포의 증식 억제, 암세포의 전이 억제, 암이 가지는 병리적 증상의 개선, 치료 또는 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 포함하는 의미이다.
- [20] 또 본 명세서에서, "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [21] 또 본 명세서에서, "세복수초 추출물"은 추출 방법을 불문하고 추출 대상인 세복수초 전초, 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 또는 이들의 혼합물을 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄, 물 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 얻어진 추출물과 그 추출물을 상기 열거된 용매 중 하나 이상으로 분획하여 얻은 추출물을 포함하는 의미로서 이해된다. 추출 방법을 불문하므로, 추출 대상인 세복수초 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 또는 이들의 혼합물을 추출 용매에 침지시키는 단계를 통하여 추출되는 한, 추출 방법은 냉침, 환류, 가온, 초음파 방사 등 임의의 방식이 모두 적용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 그럼에도 상기 "세복수초 추출물"은 바람직하게는 추출 대상인 세복수초 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 또는 이들의 혼합물을 물, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하고 얻어진 것으로서, 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물, 그 고형상의 추출물을 물과 헥산, 물과 디클로로메탄, 물과 에틸아세테이트 또는 물과 부탄올로 분획하여 얻어진 어느 한 분획 용매층의 추출물, 또는 그 고형상의 추출물을 물에 현탁한 후, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올을 이용하여 순차적으로 분획하여 얻어진 추출물을 의미한다. 여기서 "순차적으로 분획한다"는 것의 의미는 물층의 분획물을 분획 후에도 계속 사용하여 상기 열거된 순서의 용매로 분획한다는 의미이다.
- [22] 본 발명의 <화학식 1>의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 사용될 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산,

요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설포산, 4-톨루엔설포산, 주석산, 푸마르산과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, <화학식 1>의 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[23] 또한, 본 발명의 <화학식 1>의 화합물은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[24] 또한, 본 발명의 상기 <화학식 1>의 화합물은 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 입체이성질체 등의 형태로도 사용될 수 있다.

[25] 본 발명의 항암제 조성물에 있어서, 아래 실험예의 암세포 증식 억제 실험 결과를 참조할 때, 항암 활성은 폐암 또는 간암에 대한 항암 활성인 것이 바람직하고, 그 유효성분은 메틸렌클로라이드 분획 추출물, 에틸아세테이트

분획 추출물 또는 부탄올 추출물인 것이 바람직하다. 특히 유효성분은 메틸렌클로라이드 분획 추출물 또는 에틸아세테이트 분획 추출물인 것이 바람직하다. 아래 실험예의 동물실험 결과까지 고려하면 가장 바람직하게는 항암 활성은 간암에 대한 항암 활성이고 유효성분은 에틸아세테이트 분획 추출물인 경우이다.

- [26] 본 발명의 항암제 조성물은 그 유효성분을 제형, 배합 목적 등에 따라 의도하는 항암 활성을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게서, 암세포의 사멸, 암세포의 증식 억제, 암세포의 전이 억제, 암이 가지는 병리적 증상의 개선, 치료 또는 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.
- [27] 본 발명의 항암제 조성물은 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [28] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효물질 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀전, 캡슐, 시럽 등), 비경구용 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액), 국소용 제형(용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.
- [29] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응가능한 이상의 독성(충분히 낮은 독성)을 지니지 않는다는 의미이다.
- [30] 약제학적으로 허용되는 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 전분(예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 등), 셀룰로오스, 그것의 유도체(예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 등) 맥아, 젤라틴, 탈크, 고체 윤활제(예컨대 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 등), 황산 칼슘, 식물성 기름(예컨대 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유 등), 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린 등), 알긴산, 유화제(예컨대 TWEENS), 습윤제(예컨대 라우릴 황산 나트륨), 착색제, 풍미제, 정제화제, 안정화제, 항산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.
- [31] 부형제도 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 본 발명의 약제학적 조성물이 수성 현탁제로 제조될 경우에 적합한 부형제로서는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드로프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한

- 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.
- [32] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 경우에 따라서는 국소적으로 투여될 수 있다.
- [33] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.
- [34] 다른 구체적인 양태에 있어서, 본 발명은 식품 조성물로서 파악될 수 있다.
- [35] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 감미제, 풍미제, 생리활성 성분, 미네랄 등이 포함될 수 있다.
- [36] 감미제는 식품이 적당한 단맛을 나게 하는 양으로 사용될 수 있으며, 천연의 것이거나 합성된 것일 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.
- [37] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.
- [38] 생리 활성 물질로서는 카테킨, 에피카테킨, 갈로가테킨, 에피갈로카테킨 등의 카테킨류나, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤, 칼시페롤, 티아민, 리보플라빈 등의 비타민류 등이 사용될 수 있다.
- [39] 미네랄로서는 칼슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물, 게르마늄, 요오드, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 인, 칼륨, 셀레늄, 규소, 나트륨, 황, 바나듐, 아연 등이 사용될 수 있다.
- [40] 또한 본 발명의 식품 조성물은 상기 감미제 등 이외에도 필요에 따라 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등을 포함할 수 있다.
- [41] 이러한 보존제, 유화제 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005중량% 내지 약 0.5중량% 범위를 의미한다.
- [42] 사용될 수 있는 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨,

EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등을 들 수 있다.

[43] 사용될 수 있는 유화제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있다.

[44] 사용될 수 있는 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등을 들 수 있다. 이러한 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.

[45] 사용될 수 있는 점증제로서는 현탁화 구형제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등을 들 수 있다.

[46] 또한 향미나 기호성을 향상시키고 다른 기능성(예컨대 골다공증 예방 등)을 추가하기 위하여 여러 한약재가 본 발명의 식품 조성물에 추가될 수 있는데, 추가될 수 있는 한약재로서는 두충 추출물, 숙단 추출물, 녹용 추출물, 홍화인 추출물, 토사자 추출물, 숙지황 추출물, 별갑 추출물, 산수유 추출물, 구기자 추출물, 감초 추출물, 당귀 추출물, 갈근 추출물, 강진향 추출물, 합환피 추출물, 산두근 추출물, 괴화 추출물, 고삼 추출물 등이 예시될 수 있다.

[47]

발명의 효과

[48] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 세복수초 추출물 또는 그 유효물질을 유효성분으로 하는 항암제 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물은 특히 폐암, 위암, 대장암, 유방암, 간암 등에 대하여 적응증을 가지며, 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로 제품화되어 사용될 수 있다.

[49]

도면의 간단한 설명

[50] 도 1은 세복수초에 분리한 유효물질의 ^1H NMR 스펙트럼이다.

[51] 도 2는 세복수초에 분리한 유효물질의 ^{13}C NMR 스펙트럼이다.

[52] 도 3은 세복수초에 분리한 유효물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터를 정리한 것이다.

[53] 도 4는 세복수초에 분리한 유효물질의 DEPT NMR 스펙트럼이다.

[54] 도 5는 세복수초에 분리한 유효물질의 H-H COSY 스펙트럼이다.

[55] 도 6은 세복수초에 분리한 유효물질의 HSQC 스펙트럼이다.

[56] 도 7은 세복수초에 분리한 유효물질의 HMBC 스펙트럼이다.

[57] 도 8은 누드마우스에 이식된 SK-Hep-1에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 실험동물의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

[58] 도 9는 누드마우스에 이식된 SK-Hep-1에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 종양 부피 변화를 나타낸 그래프이다.

[59] 도 10은 누드마우스에 이식된 SK-Hep-1에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 종양 부피 변화를 나타낸 그래프이다.

- [60] 도 11은 누드마우스에 이식된 SK-Hep-1에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 종양 중량 변화를 나타낸 그래프이다.
- [61] 도 12는 누드마우스에 이식된 HepG-2에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 실험동물의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.
- [62] 도 13은 누드마우스에 이식된 HepG-2에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 종양 부피 변화를 나타낸 그래프이다.
- [63] 도 14는 누드마우스에 이식된 HepG-2에 대한 항암 활성 실험 기간 동안 종양 중량 변화를 나타낸 그래프이다.
- [64] 도 15는 세복수초에 분리한 유효물질의 SK-Hep-1에 대한 증식 억제 활성을 MTT 방법에 의하여 측정한 결과이다.

[65]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[66] <실시예 1> 세복수초 추출물과 분획물의 제조

- [67] 세절한 세복수초(전초) 1kg을 80% 에탄올에 넣고 48시간 동안 침지시켜 3회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 동결건조하여 분말상의 추출물을 얻었다.
- [68] 그리고 상기 얻어진 에탄올 추출물을 10 중량의 증류수에 현탁 및 용해시킨 후에 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)로 순차적으로 분획하여, 헥산층, 디클로로메탄층, 에틸아세테이트층 및 부탄올층 및 잔여 물층의 순차적 분획물을 얻었다.

[69]

발명의 실시를 위한 형태

- [70] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[71]

[72] <실시예> 세복수초 추출물과 분획물의 제조 및 그 유효물질의 분리

[73] <실시예 1> 세복수초 추출물과 분획물의 제조

- [74] 세절한 세복수초(전초) 1kg을 80% 에탄올에 넣고 48시간 동안 침지시켜 3회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 동결건조하여 분말상의 추출물을 얻었다.
- [75] 그리고 상기 얻어진 에탄올 추출물을 10 중량의 증류수에 현탁 및 용해시킨 후에 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)로 순차적으로 분획하여, 헥산층, 디클로로메탄층, 에틸아세테이트층 및 부탄올층 및 잔여 물층의 순차적 분획물을 얻었다.
- [76] <실시예 2> 유효물질의 분리 및 동정
- [77] 상기 에틸아세테이트 분획물 8g을 취해 셀라이트545와 혼합한 후 감압농축하여 혼합물을 만든 후 오픈컬럼크로마토그래피를 실시하였다. n-Hex.,

MC(methylene chloride), DE(Diethyl ether), EA(Ethyl acetate), Methanol(MeOH)을 이동상으로 사용하여 총 5개의 소분획을 얻었다. 그 중 DE(800mg) 분획물에 대해 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하였다. Chloroform/MeOH(9/2)을 이동상으로 사용하였으며 분 당 2.5ml 유속으로 흘려주어 총 18개의 소분획을 얻었다. 그 중 14번(DE-14)분획에 대해 간단히 정제를 실시하여 단일화합물(compound 1)을 확보하였다.

- [78] 분리된 물질의 구조를 분석하기 위해 단일화합물 10mg을 메탄올-d에 녹여 NMR spectrum을 측정하였다. ^1H NMR 스펙트럼(도 1 및 도 3)에서 3개의 메틸기를 확인했으며 모두 싱글렛으로 3개의 메틸기 모두 4차 탄소와 결합하고 있음을 예상하였고, 4ppm 시그널들로 미루어 1개 이상의 벤젠고리가 있음을 예상하였다. 또한 3.7-3.3ppm 부근의 복잡한 시그널들로 미루어 1개 이상의 당이 결합하고 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR(도 2 및 도 3) 및 DEPT NMR(도 4) 스펙트럼에서 총 21개 이상의 탄소가 존재함을 예측하였고 105.8ppm에서 아노머 탄소를 확인하였다.
- [79] 그리고 H-H COSY 스펙트럼(도 5)에서 벤젠고리의 프로톤(H-11, δ 6.40)과 메틸기의 프로톤(H-15, δ 2.2)이 커플링하고 있음을 확인하였다. 따라서 H-15 메틸기는 벤젠고리에 결합하고 있으며, HSQC 스펙트럼과 HMBC 스펙트럼(도 7) 분석 결과(도 6) 아노머 수소(H-1', δ 105)와 벤젠고리 탄소(C-9, δ 146)의 커플링을 확인하였다. 그리고 벤젠고리에 연결된 메틸기는 C-9(δ 146), C-10(δ 129), C-11(δ 116)과 커플링하고 있어 C-10과 결합하고 있음을 예상하였다. 또한 벤젠링의 수소(H-11, δ 6.4)가 각각 C-9, C-12, C-7과 커플링하고 있어 C-9, C-7과는 오르토, C-12와 메타, C-8과는 파라 위치에 있음을 확인하였다. 메틸기 수소(H-14, δ 1.7)가 벤젠고리 탄소(C-7, δ 125), 4차 탄소(C-6, δ 74.4), C-5(δ 37)과 커플링되어 있어 4차 탄소와 결합하고 있음을 예측하였으며 다른 메틸기 수소(H-13, δ 1.2)는 4차 탄소(C-2, δ 74.5), C-1(δ 29.6)와 커플링하고 있어 C-2와 결합하고 있음을 확인하였다. 또한 H-1(δ 2.3)는 C-3(δ 75.5), C-7(δ 125)와, H-4(δ 1.16)는 C-6(δ 74.4), H-5(δ 2.02)는 C-3(δ 75.5)와 커플링하고 있어 C-1부터 C-8은 거대고리를 형성하고 있음을 예상하였다. 또한 C-2와 C-6은 단일결합 형태의 4차 탄소임에도 불구하고 케미컬 쉬프트가 저자장으로 이동한 것으로 보아 전기음성도가 큰 원소가 결합했음을 예상하였다. 따라서 NMR 스펙트럼을 분석한 결과 분리된 화합물은 1개의 β -glucose와 벤젠고리, 8각 다환고리로 구성되어 있음을 확인하였고 예상구조를 문헌 검색한 결과 기존에 보고되지 않은 신규물질임을 밝혀 <화학식 1>의 신규물질인 Multioside로 명명하였다.
- [80] 분리된 물질의 분자량을 측정하기 위해 HR-FABMS 분석을 실시했다. 신규물질의 분자량은 426.46이며 HR-FABMS 분석 결과 소듐이 결합된 형태인 449.1791(Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{Na}$: 449.1788)로 분석되어 예상한 분자구조가 정확함을 확인하였다.

- [81] <실험예> 세복수초 추출물 및 분획물의 항암 활성 실험

[82] <실험 예 1> MTT 방법에 의한 암세포 증식 억제 활성실험

[83] <1> 실험 방법

[84] 5종의 암세포(폐암: A549, 위암: AGS, 대장암: HCT-15, 유방암: MDA-MB-231, 간암: SK-Hep1)에 대한 실시예의 세복수초 80% 에탄올 추출물과 각 분획물의 세포 증식 억제 효과는 MTT 방법을 사용하여 평가하였다. 이를 위해 암세포별로 $3 \sim 5 \times 10^4/\text{mL}$ 의 농도로 세포수를 조정하여 96-well plate의 각 well에 넣고 24시간 부착시켰다. 24시간 후 시료를 처리하여 3일간 배양한 후 MTT시약을 첨가하여 4시간 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음 DMSO를 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[85] <2> 실험 결과

[86] 실험 결과를 도 8, 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[87] A549, AGS, HCT-15, MDA-MB-231 및 SK-Hep1를 이용한 암세포 증식 억제 효과를 본 결과, 도 1에서 확인되는 바와 같이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세복수초 80% 에탄올 추출물에서 A549와 SK-Hep1에서 80% 이상의 억제 효과를 보였다. 상기 A549와 SK-Hep1에 대해서 세복수초 추출물의 각 분획물을 농도별로 처리하였을 때 표 1 및 표 2에서 확인되는 바와 같이 A549 및 SK-Hep1에 대해 농도 의존적으로 세포 증식 억제 효과를 보였다.

[88] 이와 같은 실험 결과에 기초하여 가장 효과가 우수한 나타난 EtOAc 분획물(AAM-EA)을 사용하여 동물실험을 수행하였다.

[89] 표 1

[Table 1]

Treatment ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibitory effect of A549 cell growth (%)			
	1	6.25	12.5	25
80% EtOH	10.1 $\pm$ 6.7	32.5 $\pm$ 2.7	52.4 $\pm$ 3.8	73.6 $\pm$ 1.6
n-Hexane	4.7 $\pm$ 3.9	3.4 $\pm$ 6.7	8.5 $\pm$ 5.5	22.1 $\pm$ 0.2
CH ₂ Cl ₂	33.0 $\pm$ 5.5	43.3 $\pm$ 5.3	65.5 $\pm$ 1.1	88.6 $\pm$ 0.9
EtOAc	39.3 $\pm$ 2.4	55.7 $\pm$ 1.5	75.0 $\pm$ 2.5	88.7 $\pm$ 1.7
BuOH	2.1 $\pm$ 3.5	14.7 $\pm$ 1.5	42.8 $\pm$ 3.5	69.1 $\pm$ 1.6
H ₂ O	3.4 $\pm$ 3.4	2.8 $\pm$ 3.7	8.5 $\pm$ 5.8	31.5 $\pm$ 1.9

[90] 표 2

[Table 2]

Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory effect of SK-Hep cell growth (%)			
	1	6.25	12.5	25
80% EtOH	5.8 $\pm$ 2.6	24.3 $\pm$ 5.1	47.1 $\pm$ 7.4	65.0 $\pm$ 5.5
n-Hexane	1.2 $\pm$ 7.3	4.8 $\pm$ 2.7	3.4 $\pm$ 3.1	6.1 $\pm$ 3.8
CH ₂ Cl ₂	26.7 $\pm$ 5.6	53.5 $\pm$ 2.2	70.8 $\pm$ 4.5	81.8 $\pm$ 2.0
EtOAc	28.3 $\pm$ 2.5	65.8 $\pm$ 4.3	79.2 $\pm$ 3.4	84.6 $\pm$ 1.9
BuOH	2.5 $\pm$ 6.8	18.7 $\pm$ 3.5	37.4 $\pm$ 4.7	60.8 $\pm$ 5.6
H ₂ O	3.7 $\pm$ 3.7	2.3 $\pm$ 4.5	5.4 $\pm$ 3.6	15.2 $\pm$ 1.9

[91] <실험예 2> AAM-EA의 Hollow fiber (HF) assay 모델에서 항암 활성 실험

[92] <1> 실험 방법

[93] <1-1> 투여 방법 및 투여 횟수

[94] 시험물질의 투여는 경구투여용 존데를 부착한 일회용주사기를 이용하여 1 HF 이식 후 일 1회씩 7일간 위내 강제투여하였다.

[95] <1-2> 군 구성 및 투여 용량

[96] <1-2-1> 군 구성

[97] 군 구성은 아래의 [표 3]과 같다.

[98] 표 3

[Table 3]

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
G1	Male	6	1~6	10	0
G2	Male	6	7~12	10	25
G3	Male	6	12~18	10	50
G4	Male	6	19~24	10	100

[99] <1-2-2> 투여 용량의 설정

[100] 시험물질의 투여용량은 25, 50 및 100 mg/kg 으로 설정하였으며 음성대조군은 부형제인 주사용수를 투여하였다. 음성대조군 및 시험물질투여군의 투여액량은 10 mL/kg으로 설정하고, 개체별 투여액량은 최근 주 1회 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

[101] <1-3> 관찰 및 체중 측정

[102] <1-3-1>. 일반 증상 관찰

[103] 투여 전 기간에 걸쳐 1일 1회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였다. 일반 증상의 관찰은 사망 여부, 증상의 종류 및 정도, 발현일을 개체별로 기록하였다.

- [104] <1-3-2> 체중 측정
- [105] 모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여개시시, 투여기간 동안 매주 1회 측정하였다.
- [106] <1-4> HF assay
- [107] <1-4-1> 세포 배양
- [108] 시험물질을 이용하여 5가지 세포주에 대한 세포 독성 시험을 실시한 후(supplementary data) 선별하여 HF assay에 사용된 사람 유래 암세포주는 다음과 같다; A549(폐암), AGS(위암), SK-Hep1(간암).
- [109] A549와 AGS는 RPMI 1640 배지에, SK-Hep1은 DMEM 배지에 sodium bicarbonate, L-glutamine, penicillin/streptomycin을 첨가한 후 최종 농도가 10%가 되도록 FBS를 첨가하여 humidified CO₂ incubator에서 배양하였다. 충분히 자란 세포주를 trypsin으로 분리한 후 HF(Cellmax implant membrane, Spectrum)에 1x10⁶ cells/ml의 농도로 loading한 후 humidified CO₂ incubator에서 24 hr 배양하였다.
- [110] <1-4-2> Implantation
- [111] 누드 마우스를 zoletil과 rompun을 사용하여 마취한 후 복벽을 약간 절개하여 24 hr 배양한 HF를 이식한 후 3일이 지난 다음 시험물질 투여를 시작하였다.
- [112] <1-4-3> HF 적출 및 암세포 증식 억제 정도의 측정
- [113] 시험 종료 후 마우스를 경추탈골로 희생시킨 후 이식했던 fiber를 적출하여 표면의 이물질을 제거한 후 미리 37°C로 맞춰둔 배지에 넣어 30분 동안 humidified CO₂ incubator에서 안정화시킨 후 MTT(final conc. 1 mg/ml)를 처리한 후 4시간 동안 배양하였다.
- [114] 배양 종료 후 2.5% protamine sulfate로 washing한 후 새 2.5% protamine sulfate에 fiber를 담근 후 4°C에서 O/N하였다. 다시 새 2.5% protamine sulfate를 넣은 후 4시간 동안 반응시킨 후 fiber를 세로로 잘라 O/N dry하였다. Fiber가 완전히 마른 것을 확인한 후 DMSO를 넣고 실온에서 4시간 동안 shaking하면서 formazan 염을 용해시킨 후 ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.
- [115] <1-5> 자료의 통계처리
- [116] 얻은 자료에 대한 부형제 대조군과 시험물질 투여군간의 비교는 일반적으로 Student-t test를 사용하여 검정하였다. 부종율과 억제율의 표기는 일반적으로 백분율로 나타내었다. 통계방법은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 12.1K 프로그램을 이용하였다.
- [117] <2> 실험 결과
- [118] 결과를 [표 4]에 나타내었다.
- [119] [표 4]에서 확인되듯이, A549, AGS 및 SK-Hep1를 이용한 HF assay 결과, 전 투여군에서 유의적인 세포 증식 억제 효과를 나타내었고, 특히 SK-Hep1의 경우에 가장 높은 수준으로 암세포 증식이 억제되었다.
- [120] 표 4

[Table 4]

	Group	Growth rate (%)
A549	Control	100.0±3.99
	25 mg/kg	81.8±7.75*
	50 mg/kg	73.8±3.25**
	100 mg/kg	71.7±6.13**
AGS	Control	100.0±7.28
	25 mg/kg	75.1±6.61*
	50 mg/kg	74.4±1.34**
	100 mg/kg	73.4±3.15**
SK-Hep1	Control	100.0±3.61
	25 mg/kg	65.9±3.48**
	50 mg/kg	65.1±6.07**
	100 mg/kg	64.6±1.28**

[121] <실험예 3> **AAM-EA의 누드마우스에 이식된 SK-Hep-1에 대한 항암 활성 실험**

[122] <1> 실험 방법

[123] <1-1> 투여 방법 및 투여 횟수

[124] 시험물질의 투여는 경구투여용 존데를 부착한 일회용주사기를 이용하여 1 일 1 회, 4 주간, 총 28 회 위내에 강제 투여하였다.

[125] 양성대조물질의 투여는 일회용 주사기 (26G, 1 mL, Doowon meditec. Corp., Korea)를 이용하여 주 2 회, 4 주간, 총 8 회 복강에 투여하였다.

[126] <1-2> 군 구성 및 투여용량

[127] <1-2-1> 군 구성

[128] 군 구성은 아래의 [표 5]와 같다.

[129] 표 5

[Table 5]

	군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)
G1	음성대조군	0	10	10 (1101 ~ 1110)
G2	시험물질투여군 1	50	10	10 (1201 ~ 1210)
G3	시험물질투여군 2	200	10	10 (1301 ~ 1310)
G4	시험물질투여군 3	500	10	10 (1401 ~ 1410)
G5	양성대조물질투여군	2	10	10 (1501 ~ 1510)

[130] <1-2-2> 투여 용량의 설정

[131] 시험물질의 투여용량은 50, 200 및 500 mg/kg 으로 설정하였으며
양성대조물질(Cis-Diamine platinum(II) dichloride)의 투여용량은 2 mg/kg으로

설정하였다. 음성대조군은 부형제인 주사용수를 투여하였다. 음성대조군, 시험물질투여군 및 양성대조군의 투여액량은 10 mL/kg으로 설정하고, 개체별 투여액량은 투여 일에 가깝게 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

[132] <1-3> 관찰 및 체중 측정

[133] <1-3-1> 일반 증상 관찰

[134] 관찰기간 동안 매일 1회 외관, 행동 및 배설물 등의 일반증상을 관찰하고, 사망동물을 확인하였다.

[135] <1-3-2> 체중 측정

[136] 체중은 투여개시일부터 주 2 회 (화, 금), 투여 전에 측정하였다.

[137] <1-4> 종양의 이식

[138] "Attachment. Succeeding generations on transplanted tumor in nude mice

(주)바이오독스텍, Study No.: B10999)"에서 형성된 종양괴를 약 3×3×3 mm³의 절편을 만들었다. 동물을 Isoflurane 으로 흡입 마취시킨 후 동물의 좌측 후지 전측방 부위를 약 4 mm 정도 절개하고 투관침 (trocar)의 끝에 종양 조각을 올린 후, 투관침을 좌측 후지 절개 부위로 관통시켜 좌측 전지 근처의 등 부위까지 밀어 넣었다. 다음 투관침을 빠르게 360도 회전시키면서 빼내고 피부 표면을 관찰하여 종양의 위치를 확인한 후에 동물의 좌측 후지 절개부위를 약 1 주일간 포비돈 요오드 액 (Lot No.: 1005, Dongin-dang Pharm Co., Ltd., Korea)으로 소독하였다.

[139] <1-5> 종양의 성장억제 평가

[140] <1-5-1> 종양의 부피 측정

[141] 관찰기간 동안 주 2 회 (화, 금), 캘리퍼스 (caliper)를 사용하여 종양의 장축 (maximum length, L)과 단축 (perpendicular width, W)을 측정하고, 다음의 계산식에 대입하여 종양의 부피 (tumor volume, TV)를 계산하였다.

[142] $TV(mm^3) = L(mm) \times W^2(mm^2) \times 1/2$

[143] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군 분리 시 측정된 값으로 설정하였다.

[144] <1-5-2> 종양의 적출 및 중량 측정

[145] 관찰기간 종료일에 동물을 isoflurane (ASJ9AE, Choongwae Pharma Corp., Korea)으로 흡입 마취시킨 후, 개체별로 종양을 적출하여 중량을 측정하였다.

[146] <1-6> 자료의 통계처리

[147] 실험에서 얻어진 체중, 종양의 부피, 종양의 중량은 SAS (Version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다.

[148] Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준 : 0.05). 등분산성인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA) 를 실시 (유의수준 : 0.05)하여, 유의성이 관찰되면 음성대조군에 대한 각 시험군의 유의성을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였고 (유의수준: 단측 0.05 및 0.01), 등분산성이 기각된 경우에는 Kruskal-wallis test를 실시 (유의수준 : 0.05)하여, 유의성이 관찰되면 음성대조군에 대한 각 시험군의 유의성을 확인하기 위해

Steel's test의 다중검정을 실시하였다.

[149] <2> 실험 결과

[150] 결과를 도 9 내지 도 11에 나타내었다.

[151] 체중 측정에서 50 mg/kg 용량의 시험물질투여군은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 200 및 500 mg/kg 용량의 시험물질투여군은 투여 후 28 일째에 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가되었다. 2 mg/kg 용량의 양성대조군은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 감소되는 경향을 나타냈다.

[152] 종양의 부피에서 50, 200 및 500 mg/kg 용량의 시험물질투여군 및 2 mg/kg 용량의 양성대조군은 투여 후 7 ~ 28 일째에 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 억제되었다.

[153] 종양의 중량 측정에서, 50, 200 및 500 mg/kg 용량의 시험물질투여군 및 2 mg/kg 용량의 양성대조군은 음성대조군과 비교하여 유의하게 작게 나타났다.

[154] 조직병리학적 검사 결과에서, 50, 200 및 500 mg/kg 용량의 시험물질투여군은 종양이 생착되어 있는 개체의 종양의 괴사(necrosis)정도가 음성대조군과 비교하여 비슷하게 관찰되었으나, 대부분의 개체에서 종양이 소실되어 전체적인 평가는 실시할 수 없었다. 세포자멸사도 종양이 대부분 소실되었고 적출된 종양에서도 괴사가 발생되어 음성대조군과 비교평가 할 수 없었다.

[155] 결론적으로 누드마우스에 이식된 인체 유래의 간암 세포주인 SK-HEP-1에 대한 항암 시험에서, 시험물질인 AAM-EA는 50, 200 및 500 mg/kg 용량에서 종양의 성장을 억제하는 효과가 뚜렷한 것으로 판단된다.

[156] <실험예 4> AAM-EA의 누드마우스에 이식된 HepG-2에 대한 항암 활성 실험

[157] <1> 실험 방법

[158] <1-1> 투여 방법 및 투여 횟수

[159] 시험물질의 투여는 경구투여용 존대를 부착한 일회용주사기를 이용하여 1 일 1 회, 4 주간, 총 28 회 위내에 강제 투여하였다.

[160] 양성대조물질의 투여는 일회용 주사기(26G, 1 mL, Doowon meditec. Corp., Korea)를 이용하여 주 2 회, 4 주간, 총 8 회 복강에 투여하였다.

[161] <1-2> 군 구성 및 투여 용량

[162] 군 구성은 아래의 [표 6]과 같다.

[163] 표 6

[Table 6]

군		투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)
G1	음성대조군	0	10	10 (1101 ~ 1110)
G2	시험물질투여군 1	20	10	10 (1201 ~ 1210)
G3	시험물질투여군 2	80	10	10 (1301 ~ 1310)
G4	시험물질투여군 3	200	10	10 (1401 ~ 1410)
G5	양성대조물질투여군	2	10	10 (1501 ~ 1510)

[164] <1-2-2> 투여 용량의 설정

[165] 시험물질의 투여용량은 20, 80 및 200 mg/kg 으로 설정하였으며 양성대조물질의 투여용량은 2 mg/kg 으로 설정하였다. 음성대조군은 부형제인 주사용수를 투여하였다. 음성대조군, 시험물질투여군 및 양성대조군의 투여액량은 10 mL/kg으로 설정하고, 개체별 투여액량은 투여 일에 가깝게 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

[166] <1-3> 관찰 및 체중 측정

[167] <1-3-1> 일반증상 관찰

[168] 관찰기간 동안 매일 1회 외관, 행동 및 배설물 등의 일반증상을 관찰하고, 사망동물을 확인하였다.

[169] <1-3-2> 체중측정

[170] 체중은 투여개시일부터 주 2 회 (화, 금), 투여 전에 측정하였다.

[171] <1-4> 종양의 이식

[172] "Attachment. Succeeding generations on transplanted tumor in nude mice

(주)바이오톡스텍, Study No.: B10999)"에서 형성된 종양괴를 약 3×3×3 mm³의 절편을 만들었다. 동물을 Isoflurane 으로 흡입 마취시킨 후 동물의 좌측 후지 전측방 부위를 약 4 mm 정도 절개하고 투관침(trocar)의 끝에 종양 조각을 올린 후, 투관침을 좌측 후지 절개 부위로 관통시켜 좌측 전지 근처의 등 부위까지 밀어 넣었다. 다음 투관침을 빠르게 360도 회전시키면서 빼내고 피부 표면을 관찰하여 종양의 위치를 확인한 후에 동물의 좌측 후지 절개부위를 약 1 주일간 포비돈 요오드 액 (Lot No.: 1005, Dongin-dang Pharm Co., Ltd., Korea)으로 소독하였다.

[173] <1-5> 종양의 성장 억제 평가

[174] <1-5-1> 종양의 부피 측정

[175] 관찰기간 동안 주 2 회 (화, 금), 캘리퍼스(caliper)를 사용하여 종양의 장축(maximum length, L)과 단축(perpendicular width, W)을 측정하고, 다음의 계산식에 대입하여 종양의 부피(tumor volume, TV)를 계산하였다.

- [176] $TV(mm^3) = L(mm) \times W^2(mm^2) \times 1/2$
- [177] 각 개체의 투여 전의 종양의 부피는 군분리 시 측정된 값으로 설정하였다.
- [178] <1-5-2> 종양의 적출 및 중량 측정
- [179] 관찰기간 종료일에 동물을 isoflurane (ASJ9AE, Choongwae Pharma Corp., Korea)으로 흡입 마취시킨 후, 개체별로 종양을 적출하여 중량을 측정하였다.
- [180] <1-6> 자료의 통계처리
- [181] 실험에서 얻어진 체중, 종양의 부피, 종양의 중량은 SAS (Version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다.
- [182] Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준 : 0.05). 등분산성인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA) 를 실시 (유의수준 : 0.05)하여, 유의성이 관찰되면 음성대조군에 대한 각 시험군의 유의성을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였고 (유의수준: 단측 0.05 및 0.01), 등분산성이 기각된 경우에는 Kruskal-wallis test를 실시 (유의수준 : 0.05)하여, 유의성이 관찰되면 음성대조군에 대한 각 시험군의 유의성을 확인하기 위해 Steel's test의 다중검정을 실시하였다.
- [183] <2> 실험 결과
- [184] 실험 결과는 도 12 내지 도 14에 나타내었다.
- [185] 체중 측정 결과, 20 및 80 mg/kg 용량의 시험물질투여군에서는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않았다. 200 mg/kg 용량의 시험물질투여군에서 투여 후 14 ~ 21 일째에 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가되었다. 2 mg/kg 용량의 양성대조군에서 투여 후 18 ~ 28 일째에 음성대조군과 비교하여 유의하게 감소되었다.
- [186] 종양의 부피 측정 결과, 20 mg/kg 용량의 시험물질투여군에서 투여 후 11 및 18 ~ 25 일째에, 80 및 200 mg/kg 용량의 시험물질투여군 및 2 mg/kg 용량의 양성대조군에서 투여 후 11 ~ 28 일째에 음성대조군과 비교하여 유의하게 억제되었다.
- [187] 종양의 중량 측정 결과, 20 mg/kg 용량의 시험물질투여군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 80 및 200 mg/kg 용량의 시험물질투여군 및 2 mg/kg 용량의 양성대조군에서 음성대조군과 비교하여 유의하게 작게 나타났다.
- [188] 조직병리학적 검사 결과에서, 20, 80 및 200 mg/kg 용량의 시험물질투여군 및 2 mg/kg 용량의 양성대조군에서 종양의 괴사(necrosis), 세포자멸사 (apoptosis)의 정도 및 세포자멸사 (apoptosis)를 계수한 결과가 음성대조군과 비교하여 유사한 경향으로 나타났다.
- [189] 결론적으로 누드마우스에 이식된 인체 유래의 간암 세포주인 HepG2 에 대한 항암 시험에서, 시험물질인 AAM-EA 는 80 및 200 mg/kg 용량에서 종양의 성장을 억제하는 효과가 뚜렷한 것으로 판단된다.
- [190] <실험예 5> 세복수초에서 분리한 유효물질의 MTT 방법에 의한 SK-Hep-1

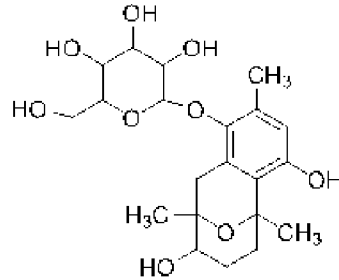
세포 증식 억제 활성 실험

- [191] 상기 <실험예 1>과 동일한 방법으로 세복수초에서 분리한 유효물질의 SK-Hep-1 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가하였다.
- [192] 실험 결과를 도 15에 나타내었는데, 세복수초에 분리한 유효물질은 농도의존적으로 SK-Hep-1 세포의 증식을 억제함을 보여준다.
- [193]

청구범위

[청구항 1] 세복수초 추출물, 아래의 <화학식 1>의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물.

<화학식 1>



[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 세복수초 추출물은 세복수초를 물, 에탄올 또는 물과 에탄올의 혼합용매에 침지시켜 얻어진 추출물인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 세복수초 추출물은 세복수초를 물, 에탄올 또는 물과 에탄올의 혼합용매에 침지시켜 얻어진 추출물을 물에 현탁시키고, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 분획하였을 때 얻어지는 디클로로메탄층의 분획 추출물, 에틸아세테이트층 분획 추출물 또는 부탄올층의 분획 추출물인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 세복수초 추출물은 세복수초를 물, 에탄올 또는 물과 에탄올의 혼합용매에 침지시켜 얻어진 추출물을 물에 현탁시키고, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층 분획 추출물인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 항암 활성은 폐암, 위암, 대장암, 유방암 또는 간암에 대한 항암 활성인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 항암 활성은 간암에 대한 항암 활성인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

[청구항 8]

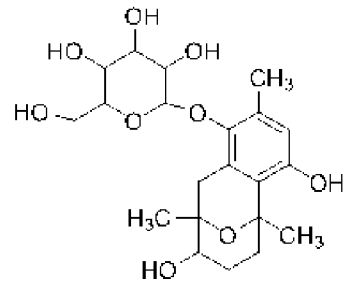
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

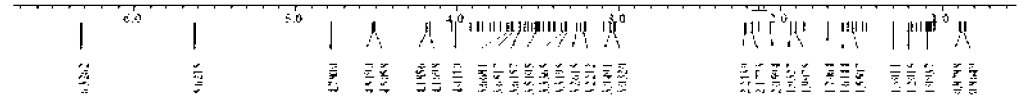
[청구항 9]

아래의 <화학식 1>의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염.

<화학식 1>



[Fig. 1]



[Fig. 2]

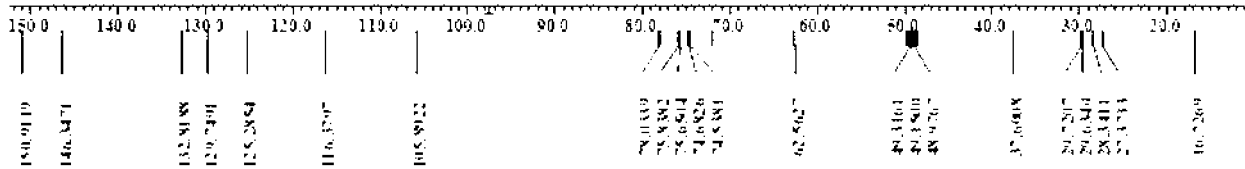


FIG. 3

¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR Data for new Compound(in MeOH-*d*₄)

Position	δ ¹ H	δ ¹³ C
1 CH ₂	3.69(s), 2.3(s)	29.6
2 C		74.5
3 CH	3.44(overlap)	75.5
4 CH ₂	1.57(d, J=12.0), 1.16(m)	28.3
5 CH ₂	2.02(d, J=12.5), 1.63(t, J=13.0)	37.6
6 C		74.4
7 C		125.2
8 C		132.8
9 C		146.3
10 C		129.7
11 CH	6.41(s)	116.3
12 C		150.9
13 CH ₃	1.28(s)	29.7
14 CH ₃	1.70(s)	27.3
15 CH ₃	2.26(s)	16.7
1' CH	4.60(d, J=7.5)	105.8
2' CH	3.51(m)	75.7
3' CH	3.40(overlap)	78.1
4' CH	3.34(m)	72.0
5' CH	3.13(t, J=8)	78.0
6' CH	3.75(d, J=10.5), 3.61(m)	62.5

[Fig. 4]

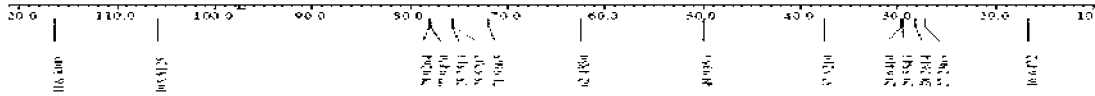
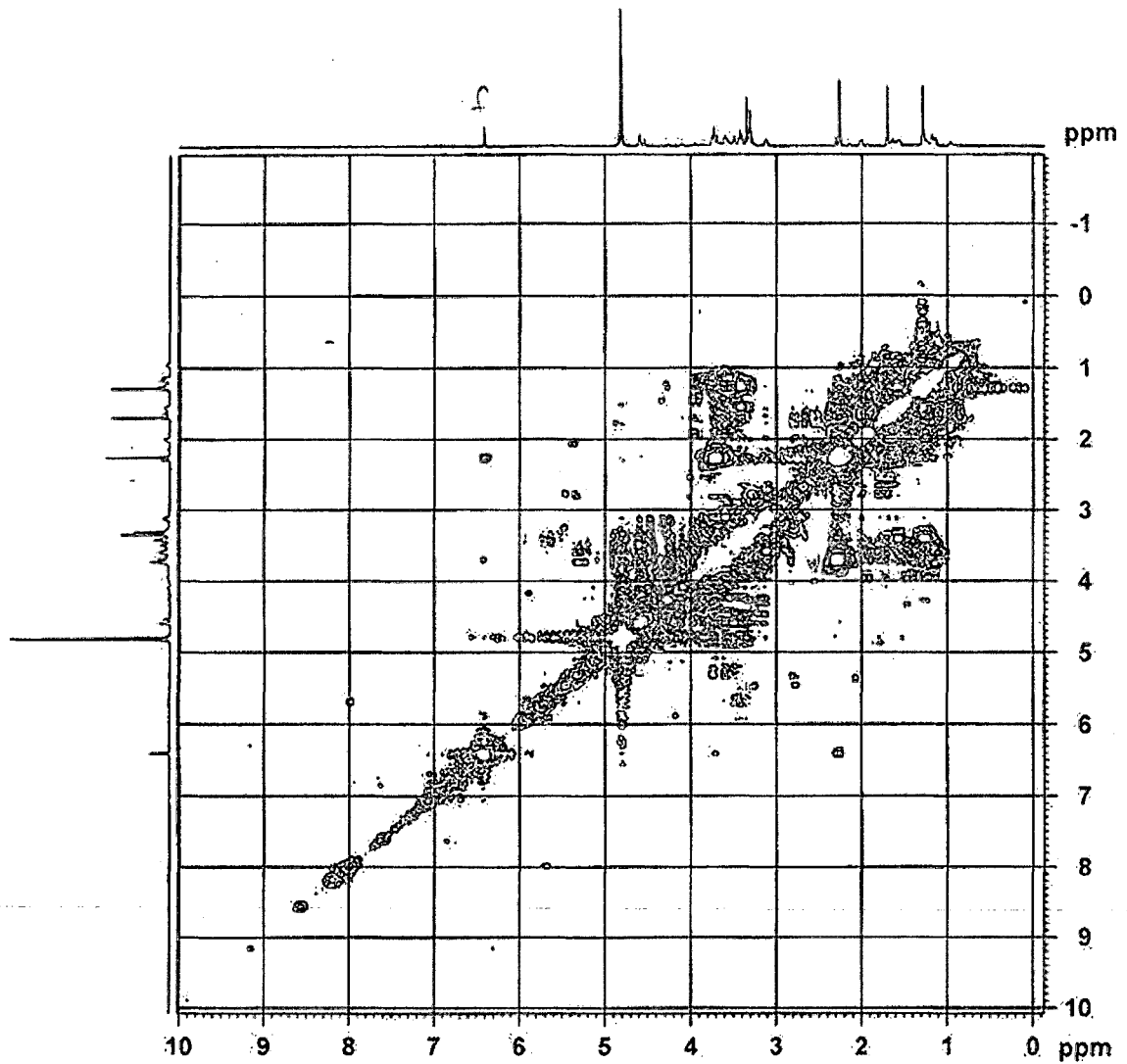
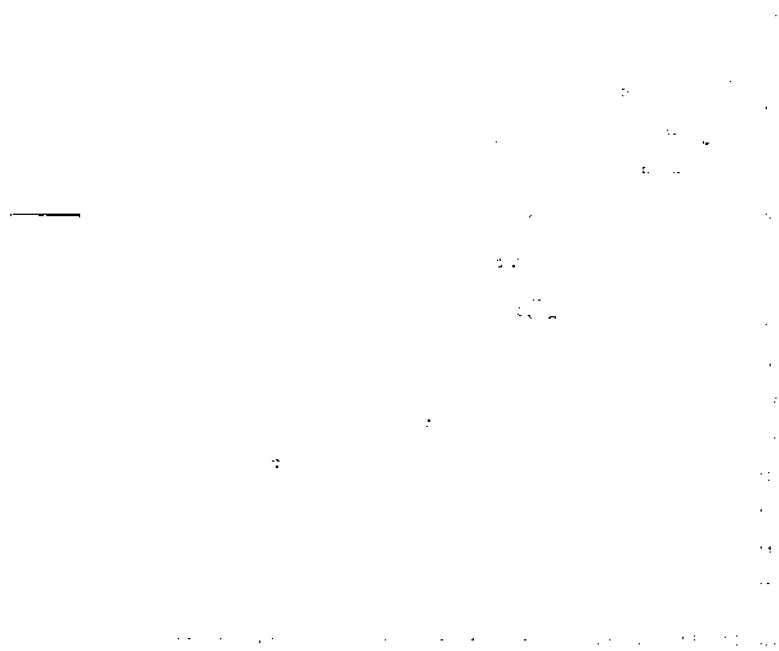


FIG. 5



[Fig. 6]



[Fig. 7]

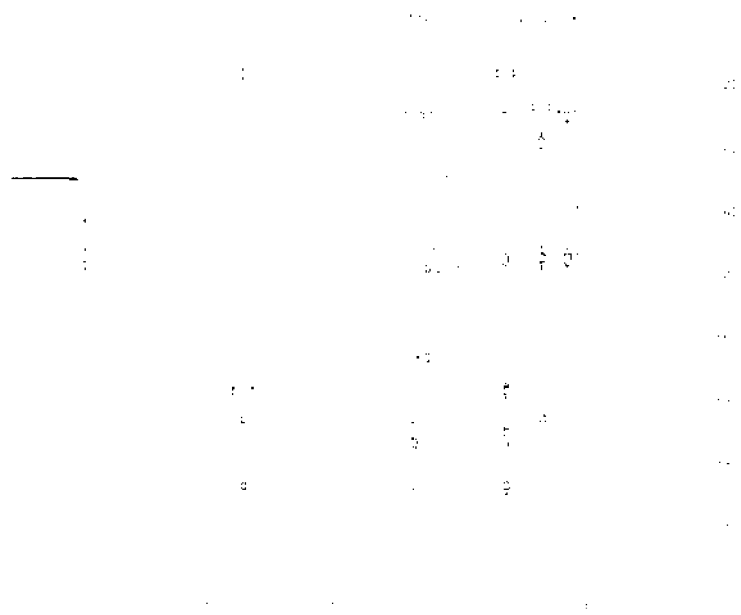


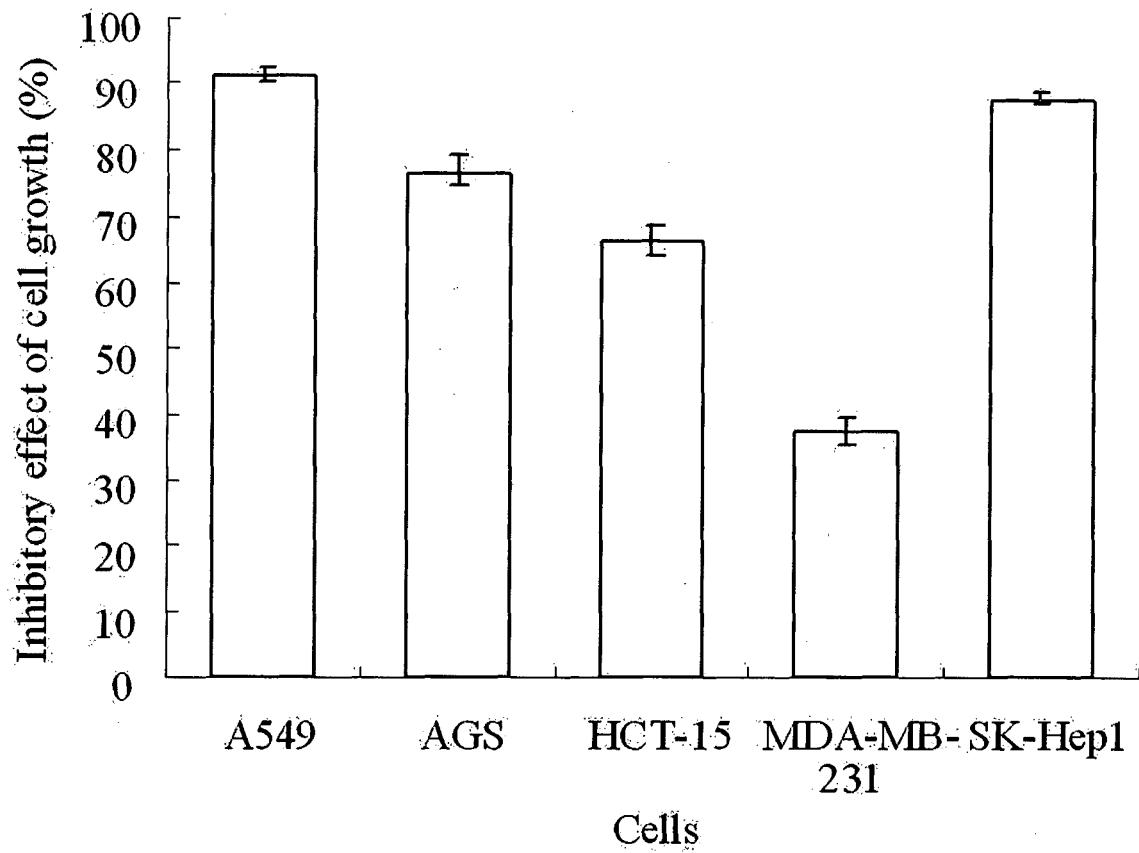
FIG. 8

FIG. 9

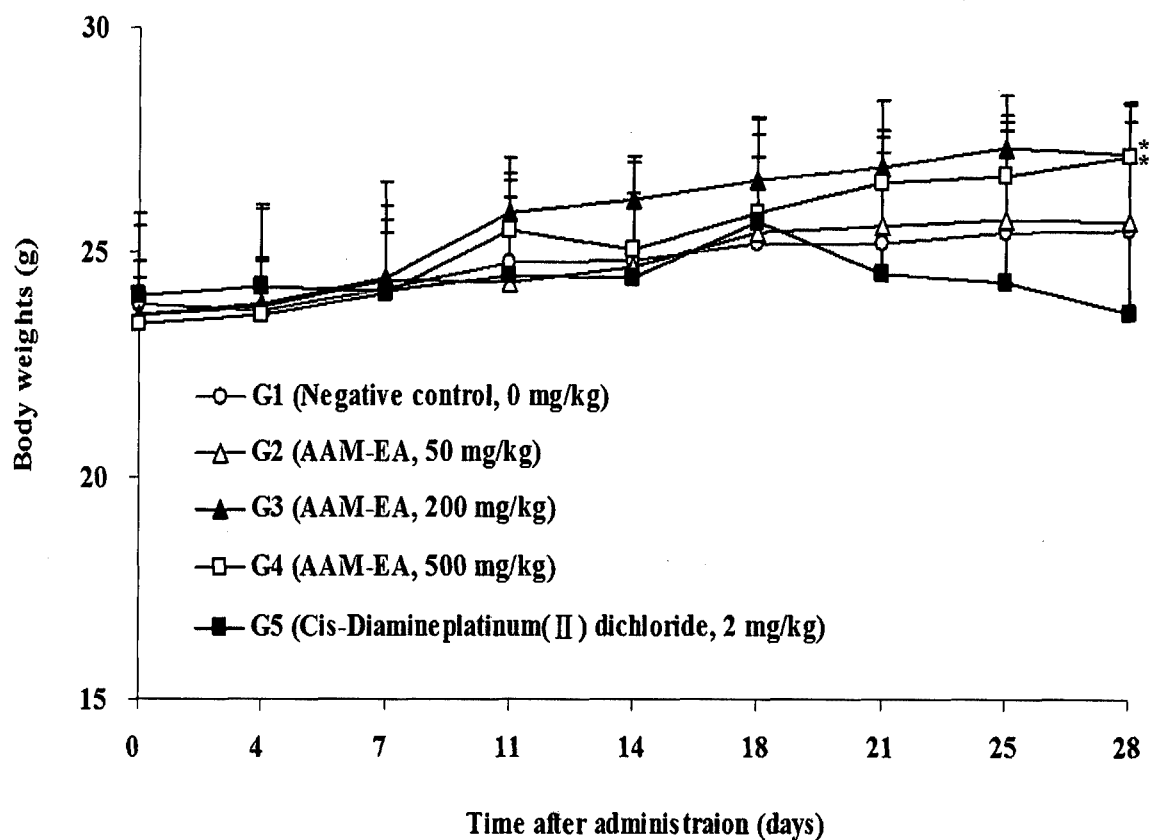


FIG. 10

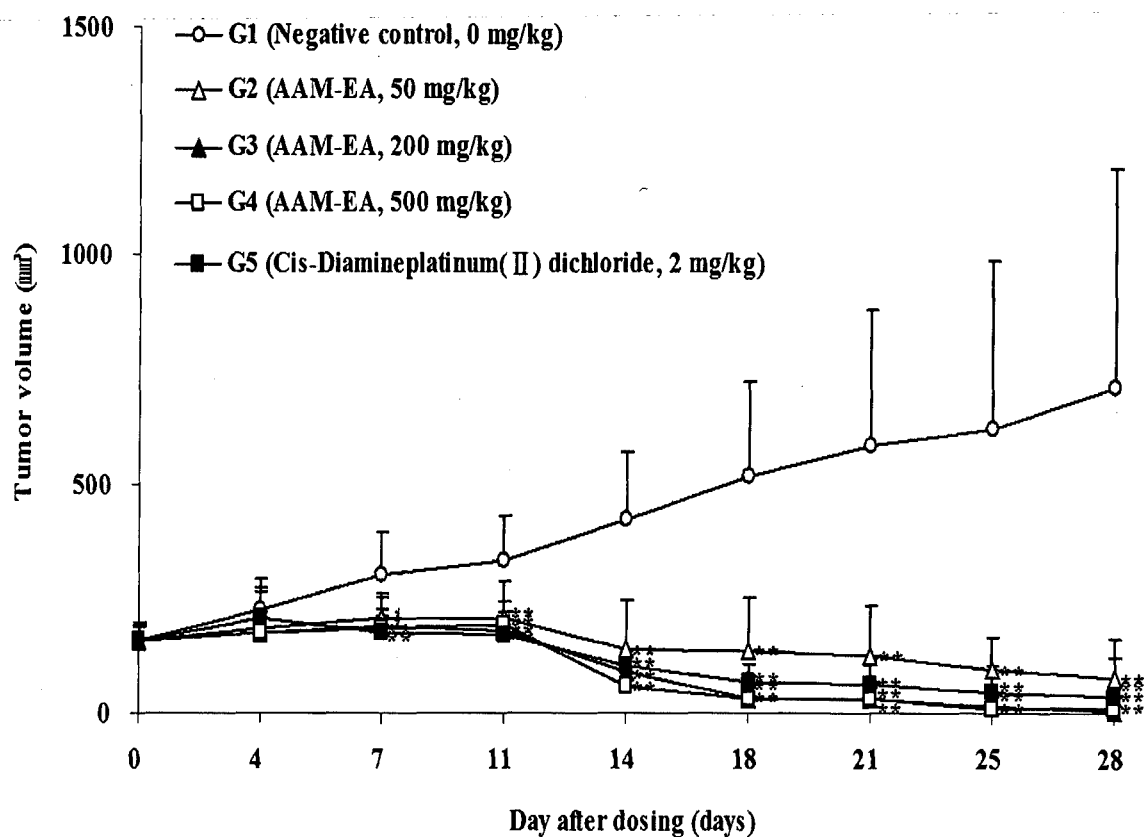


FIG. 11

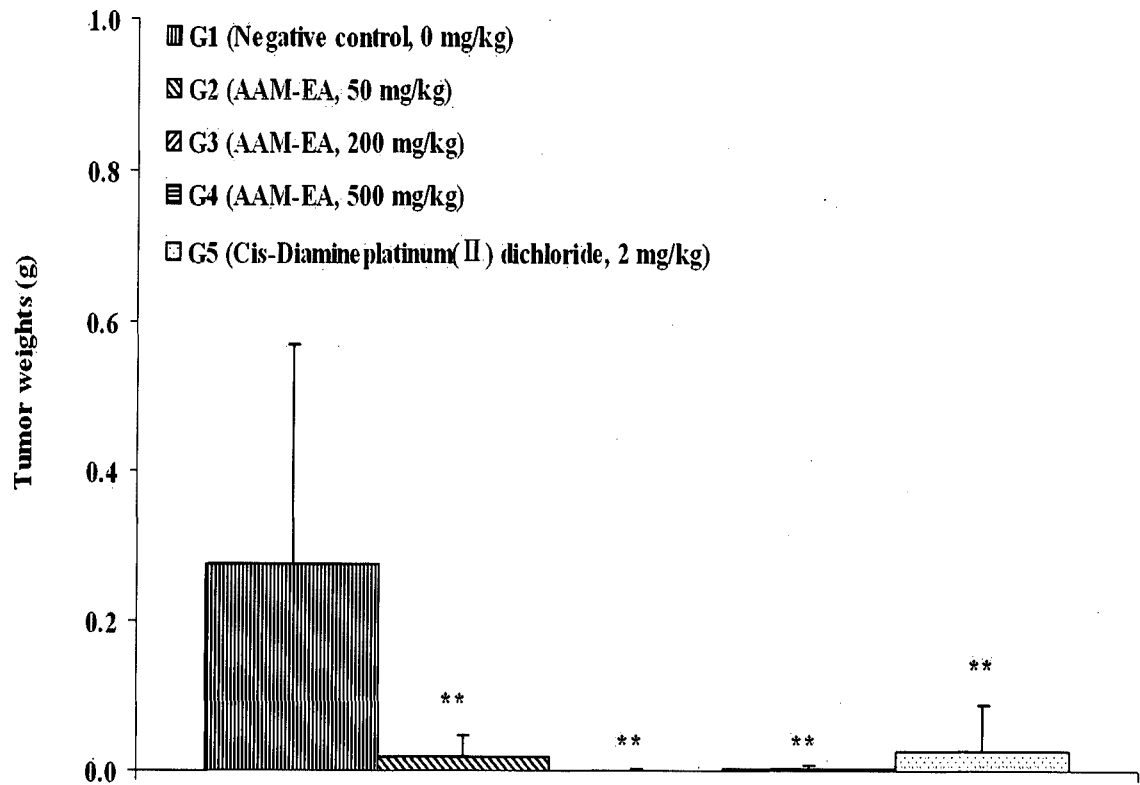


FIG. 12

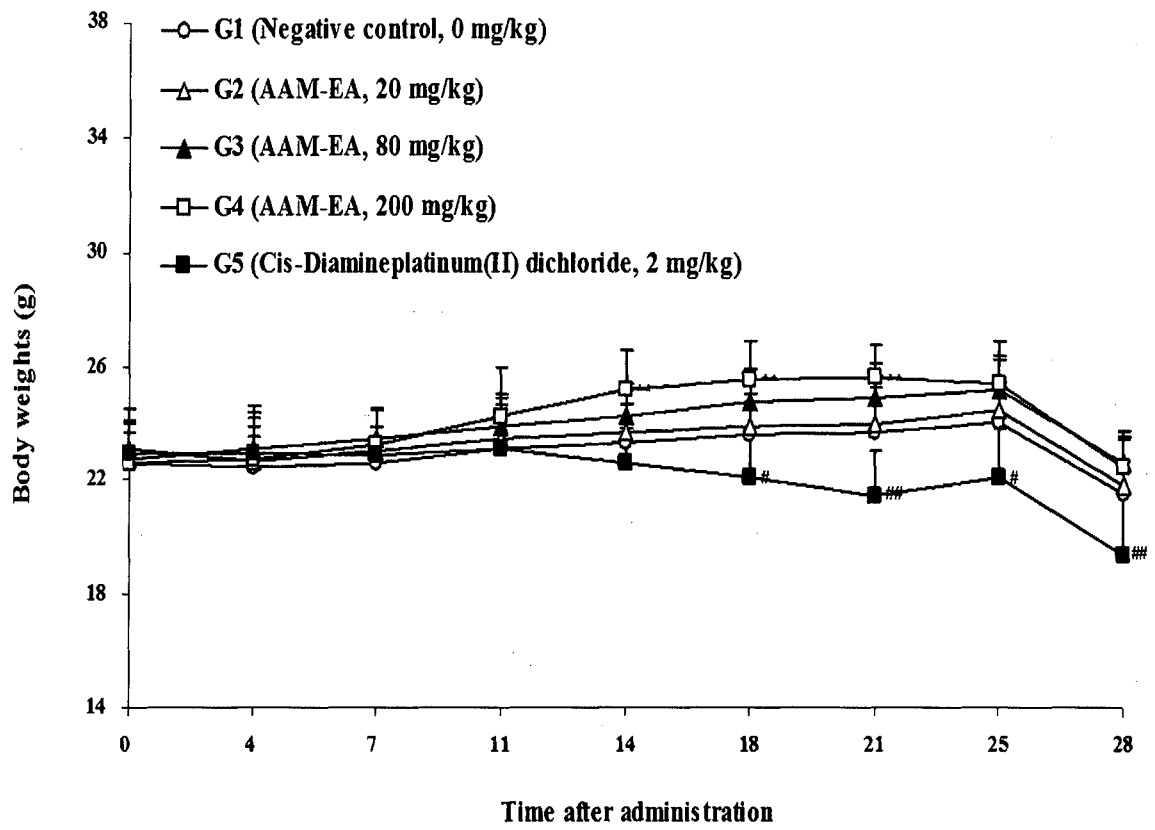


FIG. 13

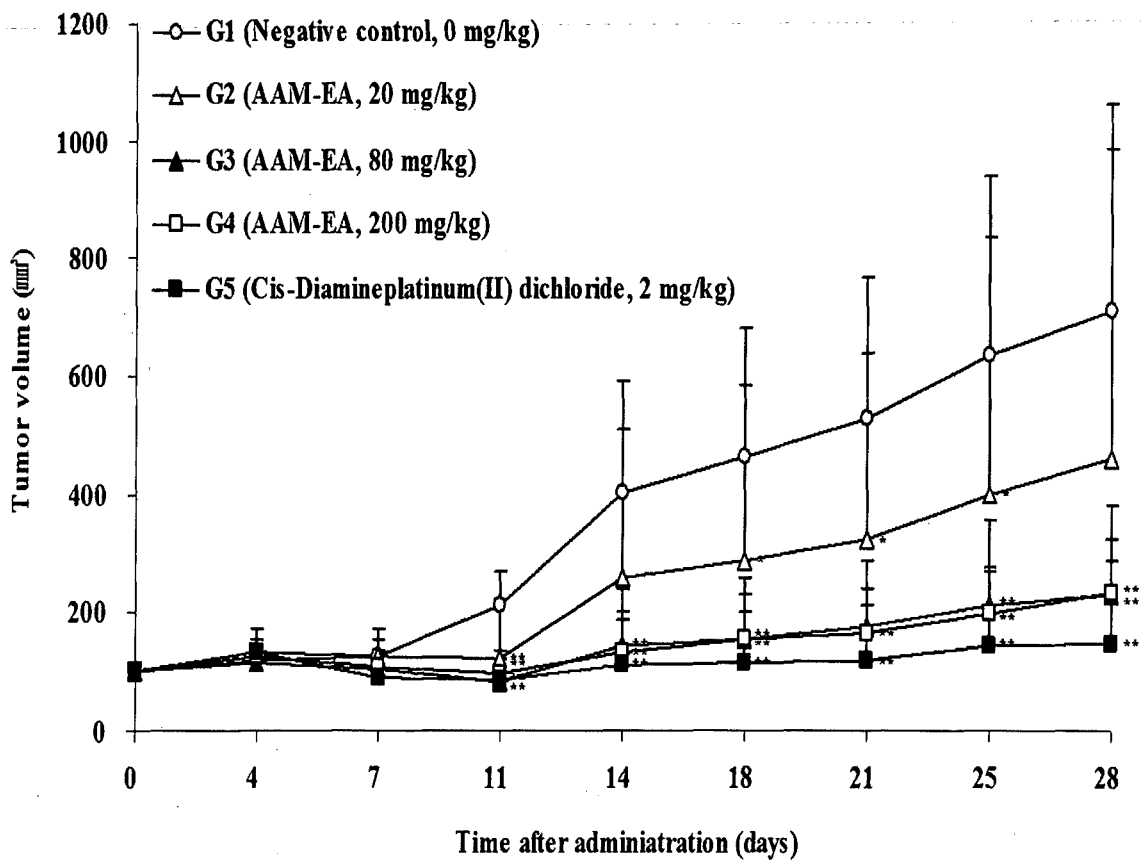
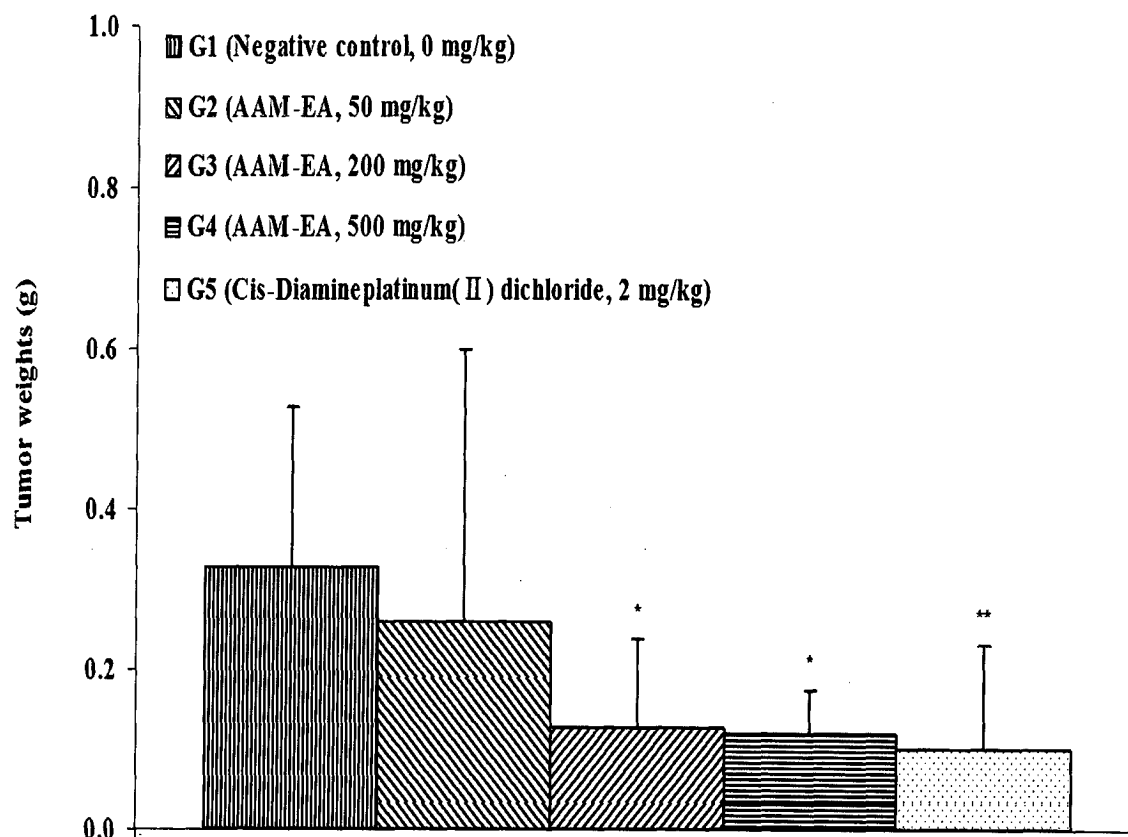


FIG. 14

[Fig. 15]

