(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0138121
(43) 공개일자 2020년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/53 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/73* (2006.01)
A61K 36/756 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/53 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2020-0164696(분할)
(22) 출원일자 2020년11월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-0016297
원출원일자 2019년02월12일
심사청구일자 2019년02월12일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고성규
서울특별시 강남구 압구정로 401 한양아파트 51동 606호
김일환
서울특별시 동작구 보라매로5가길 24 101동 1503호(신대방동, 보라매나산스위트)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 10 항

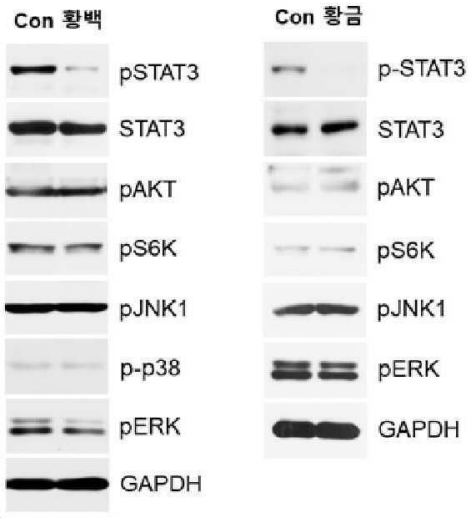
(54) 발명의 명칭 **한약 추출물을 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황금, 황백 또는 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 황금, 황백 또는 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학적조성물, 식품 조성물, 사료 조성물 및 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

본 발명의 황금, 황백 또는 복분자는 우수한 교모세포종 치료 효과를 나타내므로, 약학적조성물 또는 식품에 유효성분으로 포함되어 교모세포종의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/73 (2013.01)
A61K 36/756 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 교모세포종의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출물인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출물은 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량%를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종의 예방 또는 치료 방법.

청구항 7

황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 교모세포종의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 교모세포종의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 9

황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함

하는 시험관 내(*in vitro*) Axl 발현 저해용 조성물.

청구항 10

황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 처리하는 단계를 포함하는 Axl 발현 저해방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황금, 황백 또는 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 황금, 황백 또는 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 사료 조성물 및 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 교모세포종(GBM, glioblastoma multiforme)은 원발성 뇌암 가운데 WHO분류 4등급의 가장 악성도가 높은 신경교종(glioma)을 지칭하며 예후도 매우 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 교모세포종 환자에 대한 표준 치료법은 외과적 절제술, 방사선치료, 및 테모졸로마이드(temozolomide)를 이용한 화학요법이지만, 평균 생존율이 14개월에 불과하여 더욱 효과적인 치료법이 필요한 실정이다.

[0004] Axl 수용체 타이로신 인산화효소는 TAM(Tyro3-Axl-Mertk)수용체 군에 속하며 최근 새롭게 암 치료 표적단백질로 관심을 받고 있다. 단백질 구조는 두 개의 immunoglobulin like(Ig) 도메인과 두 개의 fibronectin III 도메인이 세포 밖으로 노출되어 있으며, 단일패스 transmembrane 도메인과 세포 안쪽으로 타이로신 인산화 도메인으로 구성되어 있다. Growth arrest-specific gene6(GAS6) 및 Protein S(PROS1)가 Axl수용체에 결합하여 활성화를 유도하는 리간드로 알려져 있다.

[0005] 임상적으로는, 정상조직에 비교하여 원발성 및 전이암에서 Axl 발현량이 높으며 Axl 발현이 높을수록 폐암, 췌장암, 신장암, 대장암, 간암, 식도암, 교모세포종 등에서 예후가 좋지 않은 것으로 보고되었다. 또한, Axl은 화학요법, 면역요법, 및 분자표적 항암제에 대한 내재적 및 획득적 내성 유도에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 시스플라틴 내성 난소암에서 Axl mRNA가 두 배 이상 높게 발현되어 있다는 연구결과가 처음 보고된 이후로, 유방암, 대장암, 및 폐암 등에서 Axl의 발현과 항암제 내성 간에 상관관계가 있음이 밝혀졌다. 최근에는 Epidermal growth factor(EGF) 수용체에 변이가 있는 비소세포폐암에서 EGFR 표적 항암제인 엘로티닙(erlotinib)에 대한 항암제 내성 기작으로 Axl의 과발현이 원인이라는 사실이 밝혀졌다.

[0006] Axl이 거의 모든 암종에서 암세포 성장 및 항암제 내성에 매우 중요한 역할을 함이 최근의 연구의 결과로 증명됨에 따라 Axl을 표적으로 하는 항암제가 개발되어 이에 대한 임상실험이 활발히 시행되고 있다. Axl 저해제가 암세포 사멸을 유도하는 사실과 PARP 저해제 및 PI3K 저해제 대한 항암제 내성을 극복할 수 있는 방법으로 Axl 저해가 효과적임이 밝혀졌다.

[0007] 이와 같이 지난 10년 동안의 연구결과를 통해 암 연구에 있어서 Axl의 중요성이 크게 부각되고 특히, 최근에는 Axl 저해제가 교모세포종의 성장 및 침윤, 전이를 억제한다는 연구결과가 꾸준히 발표되고 있으나, Axl 표적 천연물 항암제의 개발은 전무한 상태이다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 Axl을 표적으로 Axl 발현을 저해하여 교모세포종의 성장을 억제하는 한약재를 발굴하고자 예의 연구노력한 결과, 황금, 황백 및 복분자가 교모세포종 억제에 대한 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시 양태는 황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 용어, "황금(Scutellaria baicalensis)"은 꿀풀과에 속하는 여러해살이 초본식물인 황금(Scutellaria baicalensis GEORGE)의 뿌리로 만든 약재를 지칭한다. 상기 황금은 일반적으로 산지의 풀밭에서 자라고 여러 대가 나와 포기로 자라고 털이 있으며 가지가 갈라진다. 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다. 한방에서 뿌리는 해열·이뇨·지사·이담 및 소염제로 사용된다. 한편, 상기 황금에 함유된 플라보노이드의 일종인 바이칼린은 항산화, 항암, 항염증의 효과를 가진다고 알려져 있다.

[0017] 본 발명의 용어, "황백(Phellodendron amurense Ruprecht)"은 약재로 사용되는 황벽나무의 껍질을 지칭하는 것으로, 황경피라고도 불리운다. 낙엽활엽 교목으로 높이 10m 정도로 자라는데, 껍질에는 코르크가 발달했으며 속껍질은 황색이다. 우리나라에서는 제주·전남 지역을 제외한 전지역에 고르게 분포하고, 잡목 숲 또는 산속의 계곡에서 생장한다. 상기 황백은 하지 전후에 나무줄기에서 껍질을 벗겨내어 조피(粗皮:거친 껍질)를 제거하거나 썰어서 햇볕에 말려 약재로 사용된다. 상기 황백은 혈당저하 작용을 하며, 폐렴쌍구균, 인형결핵균, 포도상구균 등의 발육 및 종양세포의 번식을 저지시키고, 살균작용을 하는 것으로 알려져 있다.

[0018] 본 발명의 용어, "복분자(Rubus coreanus)"는 장미과(Rosaceae)에 속하며 중국이 원산지로 알려져 있으며 우리나라에는 제주도 및 남부지역이 주요산지로 알려져 있다. 복분자는 초여름에 검붉은 열매를 수확하여 식용으로 활용하고 있으며 예로부터 한방에서는 강장제, 강정제 및 간을 보호하는 요약으로 귀한 약재로 알려져 왔으며, 신체 허약, 양위, 유정 및 유뇨 등에 실용된다고 알려져 있다.

[0019] 본 발명의 용어, "추출물"은 어떤 물질을 추출 처리하여 얻어지는 물질을 의미하는 것으로, 구체적으로 상기 본 발명의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나, 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0020] 상시 추출물은 황금, 황백 또는 복분자 단독 추출물일 수 있으며, 황금, 황백 및 복분자로 이루어진 군에서 선택된 둘 이상의 복합 추출물 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는, 황금 및 황백 추출물; 황백 및 복분자 추출물; 황금 및 복분자 추출물; 또는 황금, 황백 및 복분자 추출물; 일 수 있다.

[0021] 상기 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출물 추출 방법의 비제한적인 예로는, 용매 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 추출물에 사용되는 추출용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 추출용매는 열수일 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그

룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0024] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 교모세포종을 억제하는 효과를 나타낼 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법 및 이의 조합 등이 될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 증류수, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 바람직하게는 C1 내지 C4의 알코올을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 교모세포종의 성장을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 교모세포종의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물에 포함된 황금, 황백 또는 복분자 추출물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 80 중량%, 0.0001 내지 50 중량%, 보다 구체적으로 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다.

[0030] 보다 구체적으로, 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 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, 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락틱액시드(Poly Lactic Acid), 폴리-L-락틱액시드(poly-L-lactic acid), 광물유 등을 들 수 있다.

[0031] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 담체의 형태로는 각종 부정형의 담체, 마이크로 스피어, 나노파이버 등을 포함할 수 있다.

[0032] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0033] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0034] 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0035] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 실시 양태는 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 교모세포종의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0037] 이때, 상기 "약학적 조성물", "예방" 및 "치료"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 교모세포종의 예방 또는 치료 효과를 나타내므로, 이를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 본 발명의 방법은 교모세포종의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 상기 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[0040] 본 발명의 용어, "개체"는 교모세포종이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미하고, 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명의 또 다른 실시 양태는 황금, 황백 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 교모세포종의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0042] 이때, 상기 용어 “황금”, “황백”, “복분자”, “추출물”, “분획물” 및 “예방”의 정의는 상기에서 서술한 바와 같다.

[0043] 본 발명의 용어, "개선"은 상기 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 본 발명에 따른 황금, 황백 또는 복분자 추출물은 우수한 교모세포종 억제 효과를 나타내므로, 교모세포종의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 포함될 수 있으며, 상기 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 교모세포종의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 등의 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함하며, 본 발명의 황금 또는 황백을 포함할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 황금, 황백 또는 복분자는 그대로 첨가되거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 방부제, 살균제, 산화방지제, 착색제, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 향료, 팽창제, 강화제, 유화제, 증점제, 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0049] 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 교모세포종의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0050] 본 발명의 황금, 황백 또는 복분자는 교모세포종의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 식품조성물에 다양한 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 실시 양태는 황금, 황백, 및 복분자로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 교모세포종의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0052] 이때, 상기 용어 “황금”, “황백”, “복분자”, “추출물”, “분획물”, “예방” 및 “개선”의 정의는 상기에서 서술한 바와 같다.

[0053] 본 발명에 따른 황금, 황백 또는 복분자는 우수한 교모세포종 치료 효과를 나타내므로, 교모세포종의 예방 또는 개선을 목적으로 사료 조성물에 포함될 수 있으며, 상기 사료 조성물은 동물이 일상적으로 섭취하는 것이 가능

하기 때문에 교모세포종의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.

[0054] 본 발명의 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.

[0055] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 황금, 황백 또는 복분자는 우수한 교모세포종 치료 효과를 나타내므로, 약학적 조성물 또는 식품에 유효성분으로 포함되어 교모세포종의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 교모세포종인 U87MG와 U373MG 세포에 shRNA를 통해 Axl 유전자를 손실시켜, Axl이 교모세포종 성장에 미치는 영향을 MTT 분석을 통해 비교한 그래프이다.

도 2는 Axl 유전자가 손실된 교모세포종 U87MG와 U373MG에서 어떠한 메카니즘이 억제되어 교모세포종의 성장이 저해되었는지 웨스턴 블랏팅을 통해 분석한 그래프이다.

도 3은 Axl을 억제할 수 있는 한약재를 찾기 위해 26종의 한약제제 물 추출물을 교모세포종인 U87MG에 24시간 처리한 뒤, 웨스턴 블랏팅을 통해 Axl과 GAPDH의 발현양을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 Axl을 억제하는 효과를 보인 황백 추출물을 교모세포종인 U87MG에 48시간 동안 처리하여, 상기 세포의 성장을 비료한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 Axl을 억제하는 효과를 보인 황금 추출물을 교모세포종인 U87MG에 48시간 동안 처리하여, 상기 세포의 성장을 비료한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 교모세포종의 성장을 억제하는 효과를 보인 황금과 황백이 어떠한 메카니즘을 억제하여 교모세포종의 성장을 저해하였는지 웨스턴 블랏팅을 통해 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0062] **실시예 1: 한약재 추출물 준비**

[0064] 본 발명에서 사용한 한약재 추출물은 한풍제약으로부터 제공 받았으며 한약재 원료시험 규정을 준수하였다. 추출법은 30% 주정에서 추출한 후 감압농축기를 이용하여 주정을 모두 제거한 후 동결 건조하여 추출 분말을 분리하였다. 얻은 분말은 3차 증류수에 200mg/ml로 녹여 사용하였다.

[0066] **실시예 2: 악성교모세포종 세포 배양**

[0067] 본 발명에서 사용한 U87MG 교모세포종과 HEK293T (Human embryonic kidney cells 293T)은 한국세포주은행(서울대 의대 암연구소 소재)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. U87MG와 HEK293T 세포는 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)에 10% FBS (Fetal Bovine Serum) 및 1% 항생제(P/S, Penicillin and Streptomycin)을

첨가한 세포배양액을 이용하여 37℃의 온도와 5%의 CO_2가 유지되는 세포배양기안에서 배양 유지하였다.

[0069] **실시예 3: Axl 소실에 의한 악성교모세포종 성장의 억제**

[0070] Axl은 거의 모든 암종에서 암세포 성장 및 항암제 내성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기에, Axl 발현 소실이 뇌암세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Axl 발현을 소실시켜 확인하였다.

[0071] 보다 구체적으로, 서로 다른 두 개의 Axl shRNA (#2, #4)를 발현하는 바이러스를 lentiviral shRNA를 이용하여 U87MG 및 U373MG세포에 감염시켜 Axl의 발현을 소실시켰다. 감염된 U87MG 및 U373MG세포는 5일 후에 $5x10^4$개의 개수로 96웰 플레이트에 접종하고, 48시간동안 세포를 배양한 후 MTT 분석을 실시하였다.

[0072] $1x10^6$ml 개수의 HEK293T를 6well plate에 plating한 다음날 1μg 의 pLKO.1/shNS 혹은 pLKO.1/shAxl, 0.75μg psPAX2(packaging plasmid), 및 0.25 μg pDM2.G(envelope plasmid)를 Lipofectamine 3000 reagent를 이용, 리포좀 매개 유전자 이입방법을 통하여 세포 안으로 전달하였다. 유전자이입 후 각각 2일과 3일이 되는 시점에 2ml의 세포배양액을 모은 후 0.4 μm syringe filter를 이용하여 필터링하여 세포에 감염시켰다.

[0073] 감염된 세포는 5일간 배양 후, 0.5 mg/ml MTT 시약을 200μl씩 분주하고 37℃에서 2시간동안 추가 배양하였다. 이후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 200μl씩 각 웰에 분주하여 형성된 포르마잔을 모두 녹인 후 ELISA 리더기를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 1에서 보듯이, Axl 발현이 소실된 U87MG 및 U373MG 세포에서 대조군 세포에 비교하여 shAxl #2, shAxl #4에서 모두 50 % 이하의 세포성장율을 보였다.

[0075] 이를 통해, Axl의 발현이 악성교모세포종의 성장에 있어서도 매우 중요한 역할을 하는 단백질임을 알 수가 있었다.

[0077] **실시예 4: Axl 소실에 의한 악성교모세포종 성장의 세포 신호전달체계 변화**

[0078] Axl 소실이 어떠한 세포신호경로를 통하여 악성교모세포종의 성장을 억제하는지를 살펴보기 위하여 ERK, p38, JNK1, AKT, S6K 및 STAT3의 발현을 분석하였다.

[0079] 보다 구체적으로, ERK, p38, JNK1, AKT, S6K 및 STAT3는 암세포 성장과 밀접한 관련이 있는 대표적인 신호전달체계이다. 따라서 상기 Axl이 소실된 U87MG 및 U373MG 세포에서 ERK, p38, JNK1, AKT, S6K 및 STAT3의 활성을 나타내는 각 단백질의 인산화정도를 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인하였다.

[0080] 상기 U87MG 및 U373MG를 PBS로 세척하고 RIPA buffer(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50mM Tris(pH8.0), 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na3PO4, 1μg/mL aprotinin, leupeptin, pepstatin)를 사용하여 용해하고 13,000xg로 20분간 원심분리를 통해 단백질을 분리하였다.

[0081] 동량의 단백질 20μg을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 다음, Trans-blot unit를 사용하여 분리된 단백질을 니트로섬유소막(nitrocellulose membrane;NC)에 전이(transfer)하였다. 단백질이 전이된 막은 5% 무지방 탈지분유(0.1% Tween-20을 함유한 Tris buffered saline: TBS-T)로 실온에서 1시간 블락킹하고, 1:1000의 농도로 희석한 1차 항체는 4℃에서 16시간 반응시켰다. PBS에 세척과정을 거친 후 2차 항체를 1:5,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 세척과정을 거친 후 Pierce ECL Western Blotting Substrate를 막에 도포한 후 암실에서 필름과 반응시켜 밴드를 확인하였다.

[0082] 그 결과, 도 2에서 보듯이, U87MG과 U373MG 세포에서 동일하게 Axl 소실에 의해 STAT3의 활성만이 감소하였으며 다른 신호전달체계는 변화가 없음을 알 수 있었다.

[0083] 이를 통해, Axl 소실은 STAT3의 활성을 감소시켜 교모세포종의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

[0085] **실시예 5: Axl 단백질 발현양을 감소시키는 한약재 스크리닝**

[0086] 상기 과정을 통해 교모세포종의 Axl 발현 감소가 교모세포종의 성장을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 Axl 발현을 감소시키는 한약재를 찾기 위하여, 26개 종류의 한약제제 물 추출물을 대표적인 악성교모세포종인 U87MG

세포주에 처리하고 웨스턴 블랏팅을 통해 Axl 발현양을 확인하였다.

[0087] 보다 구체적으로, 한약제제 물 추출물은 각각 500㎍/ml의 농도로 24시간동안 처리하였다. 한약제제의 추출, 세포 배양 및 웨스턴 블랏팅 방법은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0088] 그 결과, 도 3에서 보듯이, 복분자, 천화분, 황금, 또는 황백을 처리하였을 때 단백질 밴드의 두께가 줄어드는 것을 확인하였다.

[0089] 이를 통해, 복분자, 천화분, 황금 또는 황백이 Axl의 발현을 억제하고 감소시켜 교모세포종을 치료할 수 있는 한약재가 될 수 있음을 확인하였다.

[0091] **실시예 6: 황백, 황금 추출물의 악성교모세포종 성장억제 효과**

[0092] Axl 발현소실 능력이 검증된 한약재 추출물 중 황백 또는 황금 추출물이 악성교모세포종 세포 성장에 어떠한 역할을 미치는지 살펴보기 위해 상기 추출물을 세포배양액에 포함하고 U87MG 세포를 배양하여 MTT 분석을 실시하였다.

[0093] 보다 구체적으로, U87MG 세포를 96웰 플레이트에 $5x10^4$/ml 개수로 접종한 후, 다음날 황백 추출물을 500㎍/ml의 농도로 48시간동안 처리하고, 황금 추출물은 20 내지 1000㎍/ml의 농도로 처리하였다. 본 발명에서 사용된 한약제제의 추출 방법, 세포 배양 방법, MTT 분석 방법은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0094] 그 결과, 도 4에서 보듯이, 500㎍/ml의 황백 추출물을 포함하는 세포배양액에 키운 U87MG세포는 추출물을 포함하지 않은 대조군과 비교하여 약 65%의 세포성장율을 보였으며, 도 5에서 보듯이, 황금 추출물은 1000㎍/ml에서 대조군과 비교하여 약 30%의 세포성장율을 보였다.

[0095] 이를 통해, 황금 또는 황백 추출물이 U87MG세포의 Axl의 발현억제 및 교모세포종 성장억제능이 있음을 확인하였다.

[0097] **실시예 7: 황백, 황금 추출물에 의한 교모세포종의 세포 신호전달체계 변화**

[0098] 상기 과정을 통해 Axl이 소실된 교모세포종은 STAT3의 신호전달체계의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 황백, 황금 추출물은 어떠한 세포신호경로를 통하여 암세포의 성장을 억제하는지 웨스턴 블랏팅을 통해 확인하였다.

[0099] 보다 구체적으로, 500㎍/ml 농도의 황금 또는 황백추출물을 U87MG세포에 48시간동안 처리한 후, 상기 ERK, p38, JNK1, AKT, S6K 및 STAT3의 활성을 나타내는 각 단백질의 인산화정도를 웨스턴블랏팅을 통해 확인하였으며 사용된 웨스턴 블랏팅 방법은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0100] 그 결과, 도 6에서 보듯이, 500㎍/ml 농도의 황백, 황금 추출물을 48시간 동안 처리하자, U87MG세포의 다른 신호전달체계에는 변화가 없었지만, STAT3의 활성이 급격하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0101] 이를 통해, 황백 또는 황금 추출물이 STAT3 활성을 감소시켜 교모세포종의 성장을 억제하는 것을 확인하였고, 이는 바이러스 감염을 통한 활성 억제와 유사한 효과를 보이는 것을 확인하였다.

[0103] 결론적으로, 본 발명은 교모세포종의 Axl을 표적으로 하는 한약재를 발굴하여 교모세포종에 대한 천연물항암제를 제시하였다. Axl이 암세포의 성장에 중요한 역할을 하며 Axl 저해제를 처리할 경우 암세포의 성장을 감소시킨다는 기존의 연구결과를 바탕으로, Axl을 소실시켰을 경우 교모세포종의 성장에 어떤 영향을 미치는지 살펴본 결과, lentiviral shRNA에 의한 Axl의 소실이 U87MG와 U373MG의 성장을 50% 이하로 저해하였으며, 이를 통해 Axl이 교모세포종의 성장에도 중요한 역할을 한다는 사실을 확인하였다.

[0104] 또한, 황백, 황금 또는 복분자 추출물이 Axl 단백질의 발현을 감소시켜 교모세포종을 치료할 수 있는 가능성을 제시하였으며, 그 중에서도 황백 또는 황금 추출물이 세포주에서 암세포의 성장을 저해하였으며, Axl단백질의 발현을 감소시킴으로 STAT3의 활성을 저해하여 궁극적으로는 교모세포종의 성장을 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

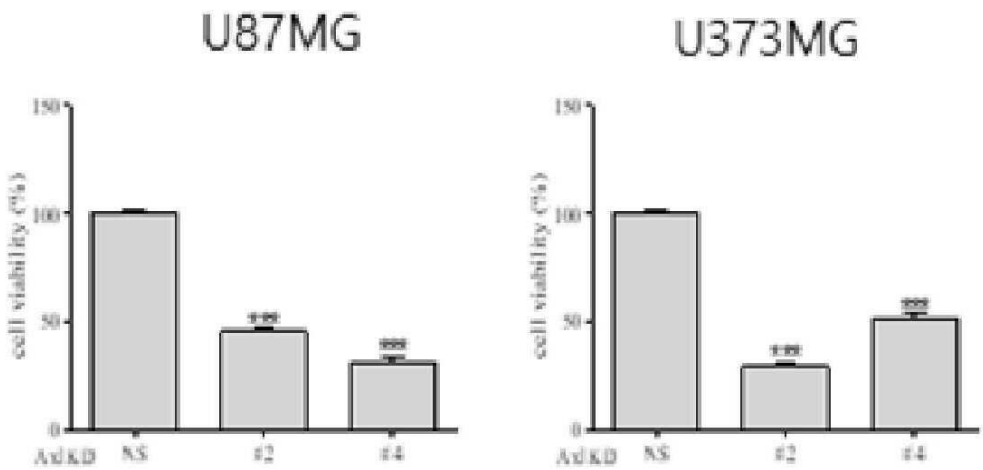
[0105] 이를 통해 황백, 황금 또는 복분자 추출물이 교모세포종 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 뿐 아니라 교모세포

종 치료에 있어서 Axl이 신규의 효율적인 표적이 될 수 있음을 시사하였다.

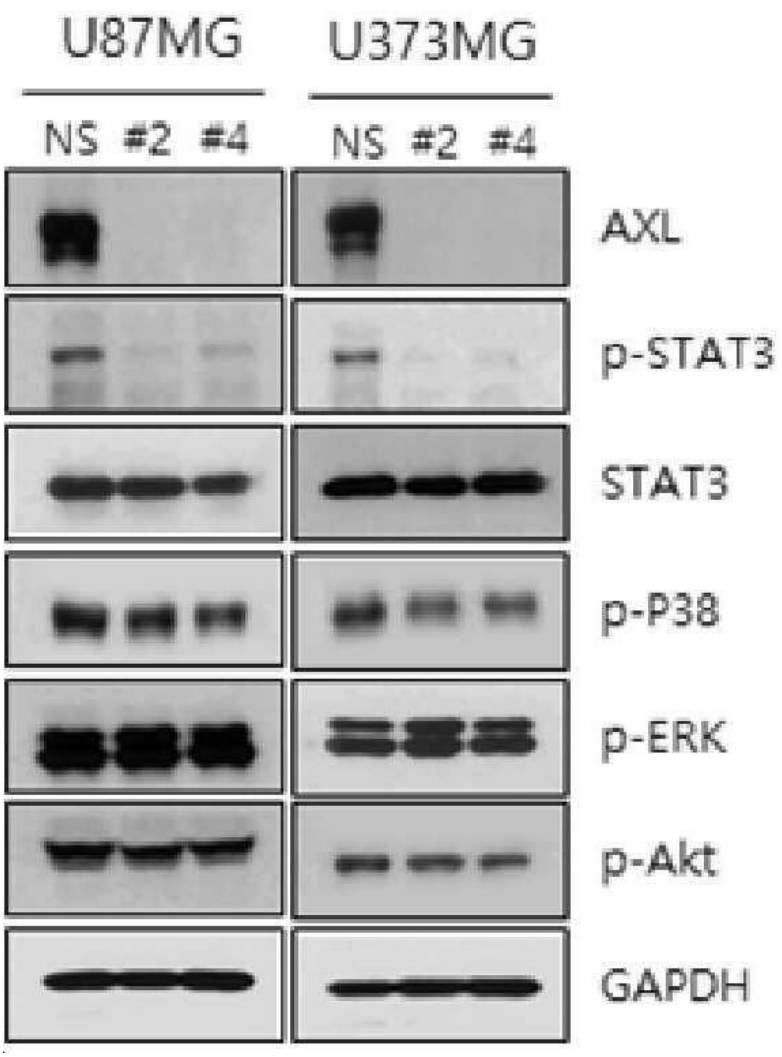
[0107] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

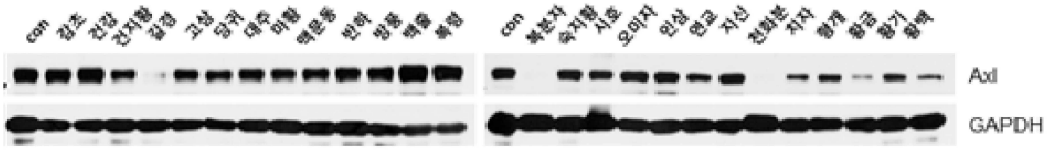
도면1



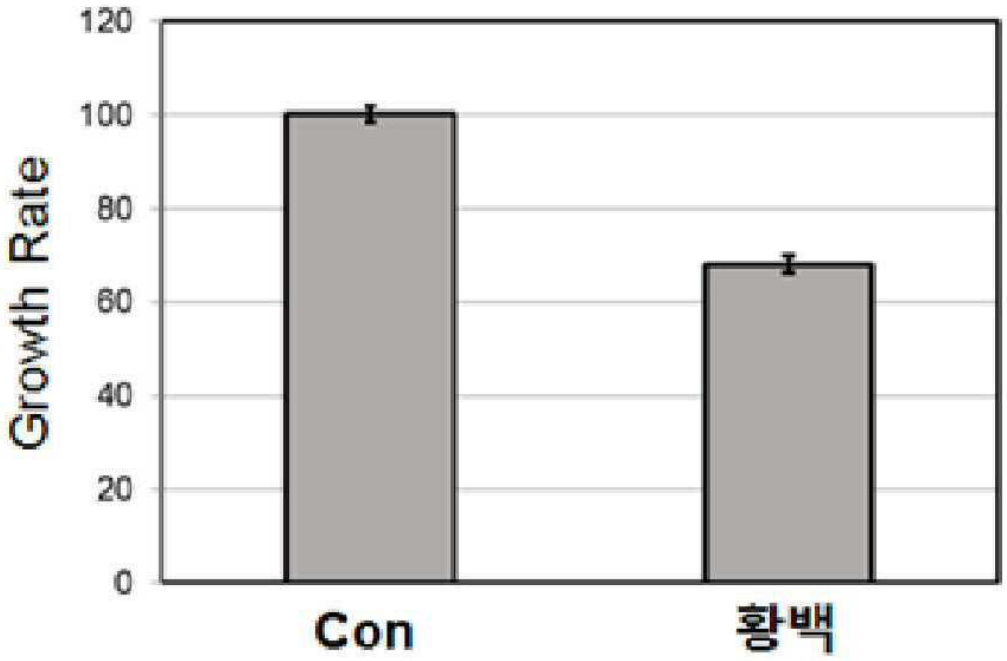
도면2


U87MG
U373MG
NS #2 #4
NS #2 #4
AXL
p-STAT3
STAT3
p-P38
p-ERK
p-Akt
GAPDH

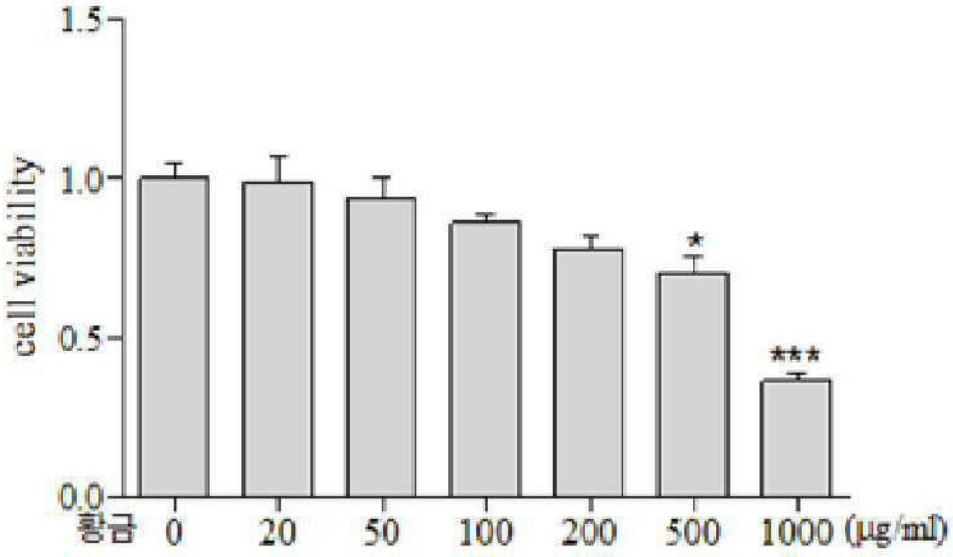
도면3


Axl
GAPDH

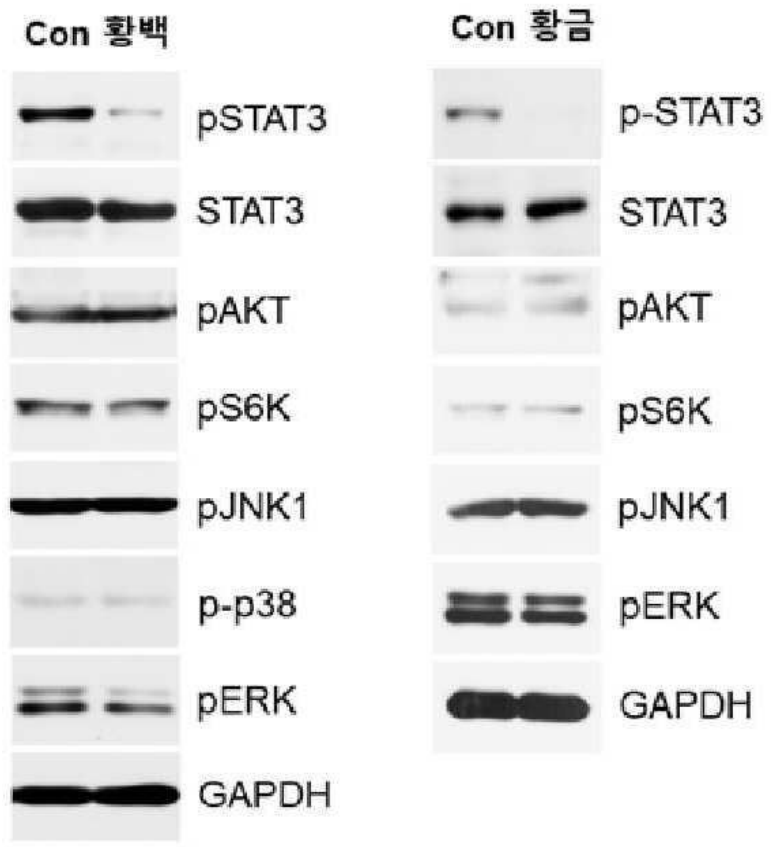
도면4


120
100
80
60
40
20
0
Growth Rate
Con
황백

도면5


1.5
1.0
0.5
0.0
cell viability
*
***
황금 0
20
50
100
200
500
1000 (μg/ml)

도면6


Con 황백
pSTAT3
STAT3
pAKT
pS6K
pJNK1
p-p38
pERK
GAPDH
Con 황금
p-STAT3
STAT3
pAKT
pS6K
pJNK1
pERK
GAPDH