(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0057866
(43) 공개일자 2022년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/889 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/889 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0142960
(22) 출원일자 2020년10월30일
심사청구일자 2020년10월30일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김봉이
서울특별시 강동구 진황도로47길 43, 701호(길동)
박문여
서울특별시 강서구 공항대로58나길 71, 301호(등촌동)
조용민
서울특별시 강서구 등촌로13가길 16(등촌동)
(74) 대리인
위병갑

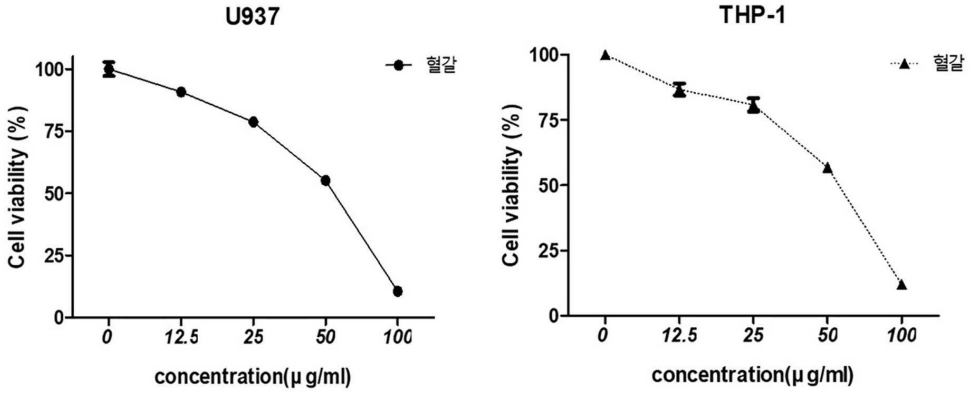
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **혈갈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 혈갈(Draconis sanguis) 추출물을 포함하는 혈액암(blood cancer)의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 혈갈 추출물은 혈액암 세포에서 소포체-스트레스 반응을 유발하여 세포사멸을 유도함으로써 암세포의 증식을 억제 및 이의 사멸을 야기하므로, 혈갈 추출물을 포함하는 조성물을 혈액암 예방, 치료 또는 개선 용도로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345322203
과제번호 NRF-2020R1I1A2066868
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 보호연구지원사업
연구과제명 한약물의 장내 미생물 조절을 통한 췌장암 억제 연구
기 여 율 45/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465031726
과제번호 HF20C0116
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 한의약혁신기술개발사업
연구과제명 BK002 (우슬, 왕불류행)와 enzalutamide 및 abiraterone acetate 복합투여의 거세 저항성 전립선암에서 상승적 항암효과 및 기전연구
기 여 율 45/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2020.08.03 ~ 2021.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711119405
과제번호 2020R1A5A2019413
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기초의과학분야(MRC)
연구과제명 한약물 재해석 암 연구 센터
기 여 율 10/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2020.05.31 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

혈갈(Draconis sanguis) 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암(blood cancer)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 혈액암은 다발성 골수종(multiple myeloma) 또는 백혈병인 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물은 혈액암의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스로 인한 세포사멸을 유도하는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 추출물은 PARP(Poly ADP ribose polymerase) 절단을 증가시키고, CHOP(C/EBP homologous protein) 발현을 증가시킴으로서 세포사멸과 소포체-스트레스를 증가시키는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 다발성 골수종 세포 또는 백혈병 세포의 생존율을 억제 또는 감소시키는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

혈갈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암의 항암 보조제.

청구항 8

혈갈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

약학적으로 유효한 양의 혈갈 추출물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 투여하여 혈액암을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 10

실험관 내에서(*in vitro*) 혈갈 추출물을 혈액암 세포에 처리하여 PARP 절단 및 CHOP의 발현을 증가시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈갈(Draconis sanguis) 추출물을 포함하는 혈액암(blood cancer)의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 소포체 스트레스(endoplasmic reticulum stress; ER stress)란 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말한다. 구체적으로, ER에서는 오접힘 단백질(misfolding protein), 과발현 단백질들이 ER의 내강에 있는 샤페론 Bip/Grp78(ER transmembrans receptor protein)에 결합하면서 UPR(Unfoded Protein Response) 기전이 개시가 된다. 정상 시에는 활성을 하고 있지 않다가, 오접힘 단백질 및 과발현 단백질과의 결합으로 수용체에서 분리가 되고, 이어서 PERK(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)가 세포질에서 자가인산화하여 활성화가 되고, 단백질합성을 약화시키기 위해 mRNA의 결합하는 개시인자인 elf2 인자를 음성 조절(negative feedbeck)하여 인산화 조절을 하게 된다. 이러한 과정에서 세포주기의 G1 phase가 억제가 되고, ER 스트레스에서 가장 중요한 CHOP(CCAAT/-enhancer-binding protein homologuous protein; C/EBP homologous protein)을 발현하게 한다. 이어서 mitochodrial damage에 의해 세포사멸과 관련된 PARP의 절단이 유발되게 한다. 가장 중요한 CHOP은 ROS(reactive oxygen species)를 생성하게 된다.

[0003] 한편, 인간의 몸을 구성하고 있는 가장 작은 단위를 세포(cell)이라 부르는데 정상적인 세포는 세포 내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하며 세포수의 균형을 유지한다. 어떤 원인으로 세포가 손상을 받은 경우, 치료를 받아 정상 세포로 역할을 하거나 회복이 안된 경우 스스로 사멸하게 된다. 그러나 여러 가지 이유로 인해 세포의 유전자에 변화가 일어나면 비정상적으로 세포가 변하여 불완전하게 성숙하고, 세포주기가 조절되지 않아 세포분열을 계속하는데 이를 암(cancer)이라 정의한다.

[0004] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생한다. 2016년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 2014년에 우리나라에서는 217,057건의 암이 발생했는데, 그 중 다발성골수종(C90)은 1,396건으로 전체 암 발생의 0.6%를 차지 하는 질병으로써 발병시 완치가 어려운 질병 중 하나이다.

[0005] 다발성 골수종은 백혈병, 림프종과 함께 대표적인 혈액종양으로 B림프구의 성숙형태인 형질세포가 증식하는 혈액암이다. 평균 65세 이상의 고령에서 발병하며, 비교적 동양인에서는 낮은 발병율을 보이며, 1980년대 우리나라 발병율은 연간 100명이내로 매우 낮았다. 그러나 급속한 산업화에 따른 공해, 환경호르몬에 노출증가, 고령화로 인해 다발성 골수종 환자는 지속적으로 증가하고 있다. 지난 20년간 다른 암종의 발생률은 5배의 증가에 머물렀으나, 다발성 골수종의 경우, 약 30배 이상의 발생 증가를 보이고 있다.

[0006] 이러한 다발성 골수종의 치료는 멜팔란과 프레드니존을 이용한 표준화학요법 (MP요법), 65세 이하의 환자에 적용되는 고용량 화학요법 및 조혈모세포 이식요법, 기존치료에 반응하지 않는 불응암이나 재발된 골수종에 대한 표적치료가 있다. 그러나 현재 사용되는 약물들에 내성암 및 불응암이 발생하여 다발성 골수종으로 인한 사망률은 매우 높다. 특히 최근 2차 약제로 FDA 승인을 얻은 표적치료제인 벨케이드(bortezomib)가 치료불응암 및 재발암에 효과가 높은 것으로 보고되었으나, 전체반응율은 35%, 완전관해율은 10%로 미미한 실정이며, 이미 이 약물의 내성암이 보고되고 있다. 따라서, 이러한 다발성 골수종의 치료불응이나 재발암을 효과적으로 치료하여 다발성 골수종 환자의 생존율을 획기적으로 증가시킬 수 있는 치료요법의 개발이 필요하다.

[0007] 한편, 혈갈(Draconis Sanguis)은 중국에서 많이 사용되는 약재로 대부분 외상(trauma), 염증(inflammation), 부인병(gynecopathy), 알레르기성 피부염(allergic dermatitis)에 관한 연구가 주로 되었고 항암에 관해서는 거의 보고된 바가 없다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 다발성 골수종, 백혈병 등의 혈액암을 예방하고 치료할 수 있는 부작용이 적은 천연물을 찾고자 연구노력하던 중, 혈액암 세포에서 혈갈이 소포체-스트레스를 유발하여 효과적으로 세포사멸시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2050639호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 혈액암(blood cancer)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 혈액암의 항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 혈액암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 혈액암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 실험관 내에서(in vitro) PARP 절단 및 CHOP의 발현을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0016] 본 발명은 혈갈(Draconis sanguis) 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암(blood cancer)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 혈갈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암의 항암 보조제를 제공한다.

[0018] 나아가, 본 발명은 혈갈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 더 나아가, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 혈갈 추출물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 투여하여 혈액암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0020] 더 나아가, 본 발명은 실험관 내에서(in vitro) 혈갈 추출물을 혈액암 세포에 처리하여 PARP 절단 및 CHOP의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 혈갈(Draconis sanguis) 추출물은 혈액암(blood cancer) 세포에서 소포체-스트레스 반응을 유발하여 세포사멸을 유도함으로써 암세포의 증식을 억제 및 이의 사멸을 야기하므로, 혈갈 추출물을 포함하는 조성물을 혈액암 예방, 치료 또는 개선 용도로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 혈갈 추출물 처리에 의한 혈액암 세포주 U937와 THP-1의 세포 생존율을 확인한 도이다.

도 2는 혈갈 추출물 처리에 의한 혈액암 세포주 U937와 THP-1에서의 세포사멸 및 소포체-스트레스 관련 단백질들의 발현 정도를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] **혈액암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

[0026] 본 발명은 혈갈(Draconis sanguis) 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암(blood cancer)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에서, 상기 '혈갈(血竭, Draconis Sanguis)'은 기린갈(麒麟竭) *Daemonorops draco B*lume의 열매에서 삼출된 수지를 가열 압착하여 만든 덩어리를 의미한다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물(extract)"은 생약을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출 처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물일 수 있다. 상기 추출물은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 혈갈 추출물은 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획함으로써 제조할 수 있다. 상기 추출용매는 이에 제한되지 않으나, 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 또한, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에서는 상기 용매로서 100% 에탄올을 이용하여 추출한 뒤 감압 농축하여 혈갈 추출물을 제조하였다. 이때, 혈갈 분말 중량 기준 8 내지 12배 부피에 해당하는 양의 100% 에탄올을 혼합하여 2시간 이상, 바람직하게는 2 내지 10시간 추출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 일 구현예에서, 상기 암은 백혈병, 다발성 골수종, 림프종, 위암, 폐암, 간암, 유방암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 다발성 골수종(multiple myeloma) 또는 백혈병인 것일 수 있고, 다발성 골수종인 것이 더욱 바람직하다.

[0036] 일 구현예에서, 상기 혈액암의 예방 또는 치료의 효과기전에는 암세포의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스로 인한 세포사멸에 의해 달성될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "세포사멸"은 아폽토시스 또는 세포자멸사라고도 하며, 일종의 계획된 세포 죽음(programmed cell death; PCD)으로서, 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램에 의해 비정상 세포, 손상된 세포, 노화된 세포가 스스로 자살해 사멸함으로써 전체적인 신체 건강을 유지하도록 하는 메커니즘이다.

[0038] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 추출물은 혈액암의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스로 인한 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 추출물은 PARP(Poly ADP ribose polymerase) 절단을 증가시키고, CHOP(C/EBP homologous protein) 발현을 증가시킴으로서 세포사멸과 소포체-스트레스를 증가시키는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 다발성 골수종 세포 또는 백혈병 세포의 생존율을 억제 또는 감소시키는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에서는 본 발명의 혈갈 추출물이 다발성 골수종 세포주인 U937 및 THP-1 세포에서 PARP 절단을 증가시키고 GADD153/CHOP 발현을 증가시키는 것을 확인하였고, 이에 따라 상기 U937 및 THP-1 세포의 소포체-스트레스 증가시킴으로써 세포사멸을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하였다(실험예 1 내지 3 참조).

[0043] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란 본 발명의 혈갈을 포함하는 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 방법들을 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0045] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 혈갈 추출물의 약학적으로 허용 가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Effect of Sanguis Draconis on Perforator Flap Survival in Rats, Yang Zhang et al., Molecules, 2016)에 기술되어있다.

[0046] 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 혈갈 추출물 이외에 공지된 항암제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다. 다른 치료에는 화학요법, 방사선치료, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기-세포 대체치료, 다른 생물학적 치료, 면역치료 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 항암제의 예시에는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agents)로 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부칠(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부술판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin); 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)로 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토크산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C) 및 블레오마이신(bleomycin); 및 식물 알카로이드(plant alkaloids)로 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan) 및 이리도테칸(iridotecan) 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **혈액암을 예방 또는 치료하는 방법**

[0053] 일 측면에서, 본 발명은 혈갈 추출물을 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈액암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0054] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환들을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0055] 일 측면에서, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 혈갈 추출물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 투여하여 혈액암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 혈갈 추출물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 혈액암 세포의 생존율을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0057] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 혈갈 추출물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 혈액암 세포의 생존율을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자(또는 개체)에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함됨. 본 발명의 약학적 조성물은 활성물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이 있다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물발육을 저지하기 위한 보존제 (예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0061] **혈액암의 항암보조제**

[0062] 일 측면에서, 본 발명은 혈갈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암의 항암보조제에 관한 것이다.

[0063] 본 발명의 혈갈 추출물은 화학적 항암 약물(항암제) 등과 함께 투여함으로써, 암세포의 사멸 효과를 통해 종래의 항암제의 암치료 효과를 증가시킬 수 있다. 병용 투여는 상기 항암제와 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다.

[0065] **혈액암의 예방 또는 개선용 식품 조성물**

[0066] 일 측면에서, 본 발명은 혈갈 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0067] 본 발명의 조성물을 식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 혈갈 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제

의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가 능하며, 상기 제조 시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 항암제의 효과를 증진 시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0070] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 혈갈 추출물을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0072] **실험관 내에서 PARP 절단 및 CHOP의 발현을 증가시키는 방법**

[0073] 일 측면에서, 본 발명은 실험관 내에서(*in vitro*) 혈갈 추출물을 혈액암 세포에 처리하여 PARP 절단 및 CHOP의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0074] 본 발명의 혈갈 추출물은 시험관(*in vitro*)내에서 혈액암 세포주에 처리시 PARP 절단 증가, GADD153/CHOP의 발현을 증가시켜 혈액암 세포의 소포체 스트레스 유발을 통한 세포사멸을 유도할 수 있다.

[0075] 상기 혈액암 세포주는 다발성 골수종 또는 백혈병 세포주인 U937 또는 THP-1 세포주인 것일 수 있다.

[0077] 본 발명의 혈갈 추출물은 천연 식물을 원료로 하므로 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 사용할 경우에도 일반적인 합성 화합물에 비하여 부작용이 덜할 수 있으므로, 안전하게 약학적 조성물 및 건강기능식품에 포함되어 유용하게 사용될 수 있다.

[0079] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0081] **<실시예 1> 혈갈 추출물의 제조**

[0082] 100% 에탄올로 혈갈을 추출한 뒤 감압 농축하여 혈갈 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0083] 구체적으로, 혈갈을 약원 한약방에서 구입하여, 혈갈 분말 200g을 기준으로 100% 에탄올 2000mL를 혼합하여 3시간 동안 용매 추출을 진행하였다. 추출액을 여과한 다음 감압 농축하여 혈갈 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0085] **<실험예 1> 생체 외 세포주 모델 제작**

[0086] 혈액암 세포주인 U937세포주, THP-1 (한국세포주은행) 50㎕를 96웰-플레이트에 1×10^4세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 배지에서, 37℃의 5% CO2인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다. 세포들은 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 배지에서 37℃의 5% CO_2인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다.

[0088] **<실험예 2> 혈갈 추출물의 혈액암에 대한 세포 사멸 효과 확인**

[0089] 혈갈 추출물의 혈액암에 대한 항암 활성을 확인하고자, 혈액암 세포주 U937, THP-1 세포에 본 발명의 혈갈 추출물을 처리하고 세포 독성을 확인하였다.

[0090] 상기 실험예 1에서 배양한 세포주 U937, THP-1 세포에 상기 실시예 1에서 제조한 혈갈 추출물을 0, 25, 50, 100, 200, 400㎍/ml의 농도로 각각 50㎕씩 처리하였다. 혈액암 세포주 U937, THP-1에 세포 독성을 96웰-플레이트에 1×10^4 세포/웰이 되도록 분주하였다. 상기 혈갈 추출물을 처리한 U937 및 THP-1 세포들을 24시간 인큐베이션 한 후 세포에 EZ-Cytox 시약 (DoGen)을 10㎕ 처리하고 암상태에서 30분 내지 4시간 동안 인큐베이션한 뒤, 마이크로플, 레이트 리더기 (Bio-rad Model 680)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 확인하였다.

[0091] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, U937 및 THP-1 세포에서 혈갈 추출물의 농도 의존적으로 독성을 나타내었다.

[0093] **<실험예 3> 혈갈 추출물 처리에 의한 혈액암 세포주의 세포사멸 및 소포체스트레스 유발 효과 확인**

[0094] 혈갈 추출물이 혈액암에서의 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포사멸 진행 시 절단되는 것으로 알려진 PARP (Poly ADP ribose polymerase)와 DNA 손상을 유도하고 소포체 스트레스를 유발하여 세포사멸의 중요한 인자로 알려진 CHOP(C/EBP homologous protein)의 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다.

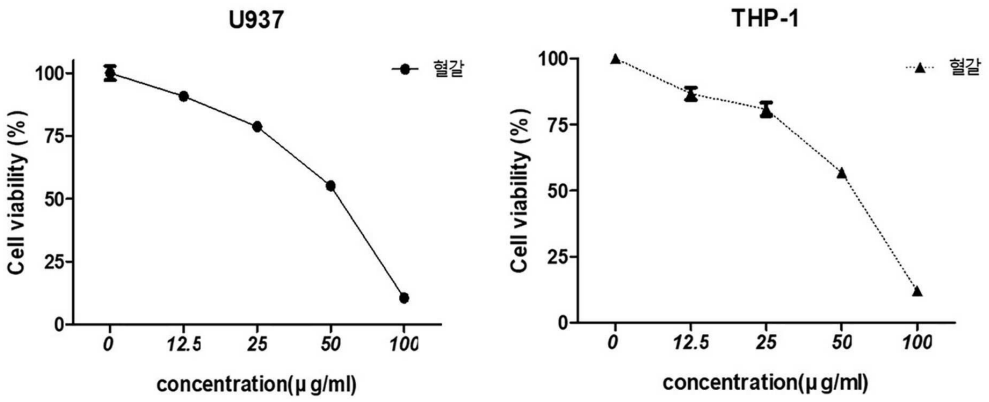
[0095] 구체적으로, 혈액암 세포주인 U937, THP-1 세포주들에서 상기 실시예 1에서 제조한 혈갈 추출물을 0, 15. 30㎍/ml로 각각 처리하고 24시간 동안 37℃의 5% CO_2인큐베이터로 인큐베이션 하였다. 그 후, 세포를 수집하여 PBS로 워싱하고, 세포 파쇄 버퍼 RIPA (20mM Tris-HCL (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM NaEDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium pyrpphophate, 1mM beta-glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4 및 1㎍/ml leupeptin (Cell signaling))를 첨가하여 30분간 4℃에서 세포를 파쇄하였다. 세포파쇄물을 12000rpm 4℃에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거한 후, RC DC™ Protein Assay Kit II(protein assay kit) (Bio-rad, USA)를 사용하여 단백질을 정량하여 시료별(혈갈 추출물 0, 15, 30㎍/ml 처리군들)로 동일한 단백질의 양이 포함되도록 조절하였다. 준비된 단백질 시료에 5×로딩 다이를 넣고 5분 동안 100℃로 가열하여 단백질을 변성시켰다. 그 후 8~10% SDS-PAGE 젤에 시료를 로딩하여 100V로 2시간 30분 동안 전기영동을 수행하였으며, 젤 위에서 분리된 단백질들을 300mA로 2시간 동안 트랜스퍼하였다. 단백질이 트랜스퍼 된 멤브레인을 5% 스킴 밀크가 포함된 TBST (tris buffered saline, pH 7.5) 용액으로 상온에서 30분 동안 블로킹한 뒤 1차 항체 항-PARP (Cell signaling) 및 항-GADD153/CHOP (Santa cruz)를 각각 1:1000 및 1:500으로 희석하여 블로킹한 멤브레인에 넣어서 안티바디들이 단백질의 특이적인 위치에 부착하도록 4℃에서 오버나잇 반응시켰다. 다음날 멤브레인을 TBST로 2회 세정한 뒤 horseradish peroxidase가 결합된 항-rabbit IgG를 1:10,000으로 희석하여 상온에서 멤브레인과 1시간 동안 반응시킨 다음 TBST로 2회 세정하였다. 세정한 멤브레인을 chemiluminescent reagent와 1분 동안 반응시키고 필름에 감광하여 단백질 밴드를 가시화하였다.

[0096] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 혈갈 추출물의 농도에 의존적으로 PARP의 절단이 증가함을 확인하였다. 또한 혈갈 추출물에 의해 CHOP의 발현이 증가하여 소포체-스트레스가 증가함으로써, 혈갈 추출물이 혈액암의 세포사멸을 농도 의존적으로 효과적으로 유발할 수 있음을 확인하였다.

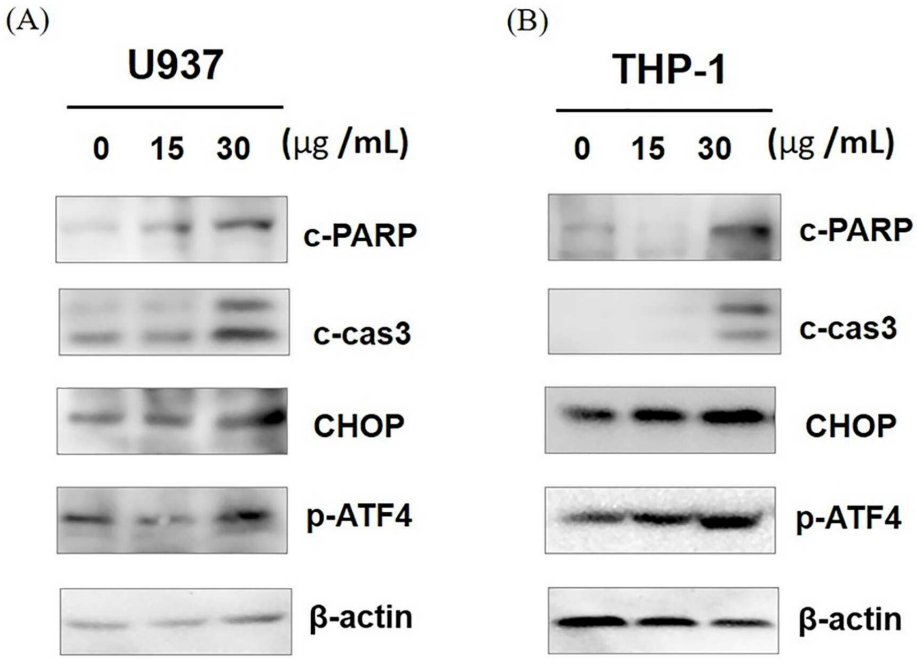
[0098] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1


U937
혈갈
Cell viability (%)
100
75
50
25
0
0
12.5
25
50
100
concentration(μg/ml)
THP-1
혈갈
Cell viability (%)
100
75
50
25
0
0
12.5
25
50
100
concentration(μg/ml)

도면2


(A)
U937
0 15 30 (μg /mL)
c-PARP
c-cas3
CHOP
p-ATF4
β-actin
(B)
THP-1
0 15 30 (μg /mL)
c-PARP
c-cas3
CHOP
p-ATF4
β-actin