(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 3 월 29 일 (29.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/056772 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/28 (2006.01) *A61K 9/16* (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/010532

(22) 국제출원일: 2017 년 9 월 25 일 (25.09.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0122267 2016 년 9 월 23 일 (23.09.2016) KR

(71) 출원인: 한국 한의학 연구원 **(KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE)** [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **이진무 (YI, Jin-Mu)**; 28170 충청북도 청주시 흥덕구 강내면 사인2길 56-5, Chungcheongbuk-do (KR). **방옥선 (BANG, Ok-Sun)**; 34033 대전시 유성구 배울2로 134, 103동 103호, Daejeon (KR). **김진희 (KIM, Jin Hee)**; 34069 대전시 유성구 반석동로 33, 503동 1103호, Daejeon (KR). **김노수 (KIM, No Soo)**; 34053 대전시 유성구 전민로 71, 113동 801호, Daejeon (KR). **이유진 (LEE, You Jin)**; 34679 대전시 동구 신기로 103, 401호, Daejeon (KR). **김영아 (KIM, Young-Ah)**; 41965 대구시 중구 명륜로12길 66, A동 503호, Daegu (KR).

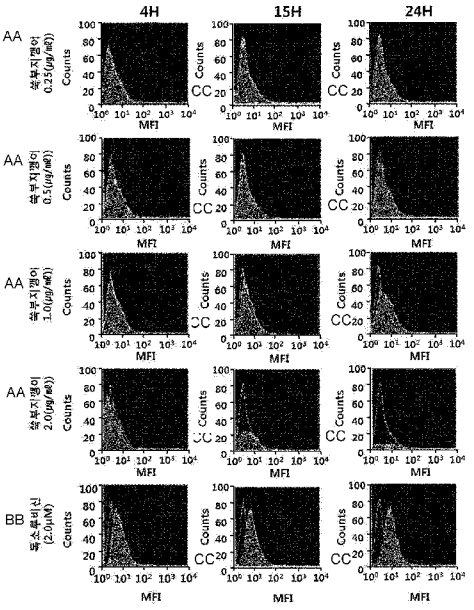
(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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,

(54) **Title:** ANTITUMOR COMPOSITION OR ANTITUMOR IMMUNITY-INDUCING COMPOSITION COMPRISING *ERYSIMUM* SP. EXTRACT AS EFFECTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭:** 쑥부지깽이 속 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물



AA ... *Erysimum* sp
BB ... Doxorubicin
CC ... Counts

(57) **Abstract:** The present invention relates to an antitumor composition or antitumor immunity-inducing composition comprising an *Erysimum* sp. extract as an effective ingredient. In the present invention, it is particularly found that *Erysimum cheiranthoides* and *Erysimum macilentum* extracts not only have anticancer activity against various carcinomas but also increase calreticulin (CRT) expression and ATP release on a cancer cell surface. Accordingly, the present invention ascertains that cancer cells killed by an *Erysimum* sp. extract act as an antigen and activate dendritic cells to induce antitumor immunity.

(57) **요약서:** 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 쑥부지깽이(*Erysimum cheiranthoides*) 및 가는쑥부지깽이(*Erysimum macilentum*) 추출물이 다양한 암종에 대한 항암활성이 있을 뿐만 아니라, 암세포 표면에서의 Calreticulin(CRT) 의 발현 및 ATP 방출을 증가시킨다는 것을 확인함으로써, 쑥부지깽이 속 추출물에 의해 사멸된 암세포가 항원으로 작용하여 수지상 세포를 활성화하여 항종양 면역작용을 유도하는 것을 확인하였다.

WO 2018/056772 A1

[다음 쪽 계속]

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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 쑥부지깽이 속 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 우리의 몸은 아주 작은 세포들로 이루어져 있으며, 스스로 증식 또는 사멸하거나 유전적 이상이 있는 비정상 세포들을 면역감시체계(immune surveillance)를 통해 제거함으로써 몸의 항상성을 유지한다.

[3] 하지만 많은 유전자의 이상이 중첩되었을 경우 세포는 증식과 사멸을 유지하는 항상성을 잃고 비정상적인 세포 증식이 유도되어 암으로 발전한다. 따라서 암은 유전자의 이상이 중첩되어 면역세포에 의한 사멸을 회피함으로써 발생되는 면역학적 질환이며, 오랜 시간 동안 이상이 중첩되어 발생되는 만성적인 질환이라고 할 수 있다. 암은 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)로 구분되어지는데, 양성종양은 비교적 성장속도가 느리고 종양의 원발생 부위에서 다른 조직으로 이동되는 전이(metastasis)가 일어나지 않는 반면에 악성종양은 원발부를 떠나 다른 조직으로 침윤되어 빠르게 성장하는 특징을 가짐으로써 생명을 위협하며 사망에 이르게 할 수 있다. 이러한 암은 국내 사망원인 1~2위를 차지하고 있으며, 국내 50대, 60대 사망자의 30%가 암으로 죽어가고 있다. 이러한 암의 치료에는 일반적으로 외과적 수술, 방사선 요법, 화학 요법이 가장 많이 활용되고 있다. 그 중 화학적 요법으로서의 항암제 개발은 다양한 시도가 많았지만, 현재까지 진정한 치료제로서의 항암제는 개발되지 않은 상태이고, 보조 치료제 혹은 단기간의 생명연장을 돕는 정도에 불과한 상태이다.

[4] 화학요법으로 사용되는 항암제는 암세포의 대사경로에 개입하여 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나, 핵산 전구체의 합성을 방해하고, 세포의 분열을 저해함으로써 세포에 대한 세포독성을 나타낸다. 그러나 현재의 항암제는 암에 대한 특이적 선택성이 없어서 치료 효과와 독성효과가 동시에 나타나는 특성을 보이며, 항암제 투여로 인한 독성은 골수 파괴로 인한 백혈구, 혈소판, 적혈구 등의 혈구 감소증, 모낭 세포 파괴로 인한 탈모증상, 난소와 고환에 대한 부작용으로 월경불순 및 남성불임의 원인, 소화기의 점막 세포 파괴로 인한 부작용으로 구내염, 오심구토 및 음식 연하장애와 소화 장애, 설사증상, 세뇨관 괴사에 의한 신장 독성, 신경계 장애로 발생하는 말초 신경염과 쇠약감, 혈관 통증 및 발진 등의 혈관장애, 피부 및 손발톱 변색 등의 다양한 부작용이 나타난다. 이에, 항암제에 의한 부작용을

최소화하면서 항암치료 효과를 상승시킬 수 있는 약제의 개발이 절실한 상황이다.

[5] 한편, 쑥부지깽이 속 (*Erysimum* sp.)의 가는쑥부지깽이(*Erysimum* macilentum)는 한국 중부 및 이북 지방의 집 주변이나 숲속 길에서 자생하는 식물이다. 높이 30~50cm까지 자라며, 줄기는 누운 털이 나 있고, 잎은 끝이 뾰족하고 별 모양의 털이 있다. 잎자루는 없으며, 5~6월에 노란색의 꽃이 총상 꽃차례로 달린다. 집 주변이나 숲속 길가, 풀밭 등 마르고 햇볕이 따뜻한 곳에서 볼 수 있다. 식물 전체에 강심배당체와 플라보노이드가 있어 강심작용을 한다.

[6] 또한, 쑥부지깽이(*Erysimum cheilanthoides* L.)는 2년초로 높이 30~80㎝이고 잎은 선상 피침형 또는 피침형으로, 길이 4~6㎝, 너비 6~8㎜이며, 엽병은 없거나 짧고 가장자리는 밋밋하거나 작은 톱니가 있으며 양면에 2~4갈래로 갈라지는 털이 있다. 꽃은 5~8월에 황색으로 피고 줄기 끝에 총상화서로 달리며, 소화경은 5~7㎜이다. 꽃받침 조각은 장타원형, 꽃잎은 4개로 쐐기 모양, 수술은 6개 중 4개가 길고 과실은 장각(長角)으로 직립하며 둔한 네모가 지고 종자는 장타원형이다.

[7] 쑥부지깽이 관련 기술로는 한국등록특허 제1565232호에 부지깽이 추출물을 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있고, 중국공개특허 제104474327호에는 쑥부지깽이와 동속 이종인 *Erysimum* diffusum을 포함하는 한약재를 유효성분으로 하는 폐암 치료용 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물을 제공하고, 쑥부지깽이 및 가는쑥부지깽이 추출물의 암세포 사멸효과가 있다는 것과, 사멸된 암세포가 항원으로 작용하여 수지상 세포를 활성화하여 항종양 면역작용(antitumor immune response)을 유도한다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 약학 조성물을 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[11] 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는

항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 조성물에 관한 것으로, 항암 활성뿐만 아니라 항종양 면역유도 효과가 있으므로, 암의 치료뿐만 아니라 암의 재발을 억제할 수 있는 것이므로 암치료 또는 개선에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1은 본 발명의 쑥부지깽이 에탄올 추출물을 처리한 세포 표면에서 발현된 칼레티큘린(Calreticulin)의 발현량을 확인한 MFI(mean fluorescence intensity)이다.

[13] 도 2는 본 발명의 쑥부지깽이 에탄올 추출물을 처리한 후, 15시간 및 24시간 후의 ATP 방출량을 확인한 결과이다. Control은 쑥부지깽이 에탄올 추출물을 처리하지 않은 것이다.

[14] 도 3은 본 발명의 쑥부지깽이 추출물을 이용한 백신을 투여한 동물모델에서의 항종양 면역유도 여부를 확인한 결과이다.

[15] 도 4는 본 발명의 쑥부지깽이 추출물에 의한 자연살해 세포의 활성화를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[16] 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 약학 조성물에 관한 것이다.

[17] 상기 쑥부지깽이 속 추출물은 쑥부지깽이 또는 가는쑥부지깽이 추출물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 쑥부지깽이 종자 추출물 또는 가는쑥부지깽이 종자 추출물이지만 이에 한정하지 않는다.

[18] 상기 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[19] 1) 쑥부쟁이 속 식물에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[20] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[21] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하여 추출물을 제조하는 단계.

[22] 상기 단계 1)에서 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 에탄올 추출물이고, 더욱더 바람직하게는 80%(v/v) 에탄올 추출물이지만 이에 한정하지 않는다.

[23] 상기 제조방법에 있어서, 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 식물의 추출은 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파추출 등 당업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 식물 부피의 1~20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 3~10배 첨가하는 것이다. 추출온도는 20~50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10~100시간인 것이 바람직하며, 24~96시간이 더욱 바람직하고, 72시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는

진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[24] 상기 암은 간암, 신장암, 전립선암, 위암, 백혈병, 흑색종, 유방암, 난소암, 폐암, 대장암 및 섬유육종(fibrosarcoma) 중에서 선택된 어느 하나의 암인 것이 바람직하지만, 이에 한정하는 것은 아니며, 진단 가능한 암이라면 제한하지 않는다.

[25] 본 발명에서 ICD(immunogenic cell death)는 안트라싸이클린(anthracycline) 계열, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 보테조밉(bortezomib) 또는 독소루비신(doxorubicin) 등의 일부 항암제에 의해 유도되는 세포 사멸을 의미하는 것으로, 이러한 방식으로 사멸한 암세포가 항원으로 작용하여 수지상세포(Dendritic cell)를 활성화하여 항종양 면역작용(antitumor immune response)을 유도한다. 따라서 ICD가 유도된 암세포는 DAMPs(Damage-associated molecular patterns)로 통칭되는 ICD 특이적인 표지자를 발현하거나 세포 밖으로 배출하는 특징이 있다. 이와 같은 ICD 특이적인 표지자로는 1) 칼레티큘린(Calreticulin, CRT) 발현, 2) ATP 배출 또는 3) HMGB1 배출이 알려져 있다.

[26] 즉, 세포 표면에 칼레티큘린의 발현량의 증가는 사멸된 암세포가 항원으로 작용함으로써, 면역이 유도된 것으로 암의 재발을 줄여줄 수 있는 것이다.

[27] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전 시럽 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부 외용으로 사용한다.

[28] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에

있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 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. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[29] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 쑥부지깽이 속(Erysimum sp.) 추출물의 양을 기준으로 0.01~2,000mg/kg이고, 바람직하게는 30~500mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50~300mg/kg이며, 하루 1~6회 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[30] 또한, 본 발명은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 건강기능식품에 관한 것이다.

[31] 상기 쑥부지깽이 속 추출물은 쑥부지깽이 또는 가는쑥부지깽이 추출물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 쑥부지깽이 종자 추출물 또는 가는쑥부지깽이 종자 추출물이지만 이에 한정하지 않는다.

[32] 상기 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[33] 1) 쑥부쟁이 속 식물에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[34] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[35] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하여 추출물을 제조하는 단계.

[36] 상기 단계 1)에서 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 에탄올 추출물이고, 더욱더 바람직하게는 80%(v/v) 에탄올 추출물이지만 이에 한정하지 않는다.

[37] 상기 제조방법에 있어서, 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 식물의 추출은 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파추출 등 당업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 식물 부피의 1~20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 3~10배 첨가하는 것이다. 추출온도는 20~50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10~100시간인 것이 바람직하며, 24~96시간이 더욱 바람직하고, 72시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지

않는다. 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[38] 상기 암은 간암, 신장암, 전립선암, 위암, 백혈병, 흑색종, 유방암, 난소암, 폐암, 대장암 또는 섬유육종(fibrosarcoma) 중에서 선택된 어느 하나의 암인 것이 바람직하지만, 이에 한정하는 것은 아니며, 진단 가능한 암이라면 제한하지 않는다.

[39] 본 발명에서 ICD(immunogenic cell death)는 안트라싸이클린(anthracycline) 계열, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 보테조밉(bortezomib) 또는 독소루비신(doxorubicin) 등의 일부 항암제에 의해 유도되는 세포 사멸을 의미하는 것으로, 이러한 방식으로 사멸한 암세포가 항원으로 작용하여 수지상세포(Dendritic cell)를 활성화하여 항종양 면역작용(antitumor immune response)을 유도한다. 따라서 ICD가 유도된 암세포는 DAMPs(Damage-associated molecular patterns)로 통칭되는 ICD 특이적인 표지자를 발현하거나 세포 밖으로 배출하는 특징이 있다. 이와 같은 ICD 특이적인 표지자로는 1) 칼레티큘린(Calreticulin, CRT) 발현, 2) ATP 배출 또는 3) HMGB1 배출이 알려져 있다. 즉, 세포 표면에 칼레티큘린의 발현량의 증가는 사멸된 암세포가 항원으로 작용함으로써, 면역이 유도된 것으로 암의 재발을 줄여줄 수 있는 것이다.

[40] 본 발명의 건강식품은 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 쑥부지깽이 속(Erysimum sp.) 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 조성물을 포함하는 건강 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다.

[41] 본 발명의 건강식품은 상기 유효성분 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 더 함유할 수 있다. 그 밖에 과일주스 또는 야채 음료의

제조를 위한 과육을 더 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01~2 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[42]

[43] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[44]

[45] **실시예** 1. 쑥부지깽이 추출물의 제조

[46] 본 발명의 쑥부지깽이(*Erysimum cheiranthoides*)와 가는쑥부지깽이(*Erysimum* macilentum)의 종자 추출물을 제조하기 위하여, 2016년 6월~7월경 전남 구례와 충북 단양에서 각각 채집하여 한국한의학연구원 한약표준표본관에서 감정하였으며, 자연 건조 후 시료로 사용하였다.

[47] 삼각플라스크에 분쇄된 시료 10.0g 과 80%(v/v) 에탄올을 넣어 혼합한 후, 초음파 추출(Branson 5210)을 1시간씩 총 2회 반복 추출하였다. 추출된 추출물을 종이여과지(Whatman No.2)와 진공펌프(vauum pump, GAST)를 사용하여 감압 여과하였다. 여과된 추출물을 회전농축기(Rotary Evaporator, EYELA)를 이용하여 감압 농축하였으며, 농축된 추출물을 진공건조(vacuum dry oven, WiseVen) 또는 동결건조(Freeze Dryer, IlshinBioBase)한 후, 막자사발로 균질화하여 쑥부지깽이와 가는쑥부지깽이의 80%(v/v) 에탄올 추출물을 수득하였다.

[48] 수득된 쑥부지깽이와 가는쑥부지깽이의 80%(v/v) 에탄올 추출물은 실험 전까지 밀봉 플라스틱 용기에 담아 4℃ 저온 냉장고에 보관하였다.

[49]

[50] **실시예** 2. 암세포에 대한 세포독성 시험

[51] **1) 인간 암세포의 배양**

[52] 본 발명의 쑥부지깽이 추출물의 항암효과를 확인하기 위한 실시예에 사용될 암세포는 10%(v/v)의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 100unit/㎖의 페니실린(penicillin), 100㎍/㎖의 스트렙토마이신(streptomycin)이 함유된 DMEM 또는 RPMI1640 성장 배지를 사용하여 37℃, 5%(v/v) CO_2로 유지되는 배양기에서 100㎜ 세포 배양 디쉬에 배양하여 추후 생체 외(*in vitro*) 실험에 사용하였다.

[53]

[54] **2) 암세포에 대한 세포 독성 시험**

[55] 암세포주를 배양한 후, 각각의 세포를 96웰 배양 디쉬에 웰당 2.5~5×10^3개의 세포로 분주하였다. 24시간 후에 순차적으로 희석된 쑥부지깽이 및 가는쑥부지깽이 에탄올 추출물(0~100㎍/㎖)과 옥살리플라틴(0~100㎍/㎖)을

각각 처리하였다. vehicle로서 PBS를 처리한 세포군을 사용하였으며, 처리 48시간 후에 Ez-Cytox 세포생존률 측정 키트를 사용하여 세포생존률을 측정하였다. IC_{50} 값은 SoftMax Pro 6.2.2(Molecular device)를 이용하여 분석하였다.

[56]

[57] 그 결과 하기 표 1에 개시한 바와 같이, 다양한 암종에서 낮은 농도에서 암세포독성이 있다는 것을 확인하였다.

[58]

[59] [표1]

본 발명의 쑥부지깽이 에탄올 추출물의 암세포에 대한 IC_{50} 값(㎍/㎖)

암종	세포주	가는쑥부지깽이(*Erysimum* maciletum)	쑥부지깽이(*Erysimum* cheilanthoides)	옥살리플라틴
간암(liver cancer)	PLC/PRF/5	0.32±0.02	0.27±0.01	18.46±0.29
신장암(renal cancer)	ACHN	0.26±0.01	0.20±0.00	5.43±0.89
신장암(renal cancer)	Caki-1	1.67±0.14	1.19±0.09	14.91±1.46
전립선암(prostate cancer)	PC-3	0.35±0.02	0.26±0.00	19.17±0.62
전립선암(prostate cancer)	DU-145	0.34±0.01	0.24±0.01	13.10±0.72
위암(stomach cancer)	AGS	0.68±0.03	0.55±0.03	2.01±0.08
위암(stomach cancer)	SNU-1	0.27±0.01	0.20±0.01	0.77±0.07
백혈병(leukemia)	K-562	0.60±0.08	0.36±0.01	11.07±0.47
유방암(breast cancer)	MDA-MB-468	1.63±0.03	1.44±0.12	3.54±0.33
난소암(ovarian cancer)	SK-OV-3	1.97±0.13	1.63±0.12	14.49±0.24
대장암(colon cancer)	COLO205	2.10±0.06	1.51±0.03	4.43±0.24
흑색종(Melanoma)	SK-MEL-28	3.19±0.01	2.01±0.06	9.64±0.15
폐암(lung cancer)	A549	0.43±0.01	0.24±0.00	2.91±0.09
폐암(lung cancer)	NCI-H460	0.50±0.03	0.32±0.05	4.00±0.53
폐암(lung cancer)	NCI-H226	1.73±0.12	0.98±0.02	2.66±1.69
섬유육종(fibrosarcoma)	HT-1080	0.68±0.05	0.48±0.03	2.91±0.09

[60]

[61] **실시예** 3. 쑥부지깽이 추출물의 항종양 면역 유도 확인

[62] 인간폐암세포주인 A549 세포주를 ATCC로부터 구입하였으며, 상기 A549세포주를 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에서 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[63] 60mm 세포배양 디쉬에 5×10^3개의 A549 세포를 깔고 24시간 동안 배양하였다. 각 플레이트에 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0㎍/㎖의 쑥부지깽이 추출물을 처리한 후, 4, 15 및 24시간 배양하였으며, 양성대조군으로, ICD(immunogenic cell death)를 유발하는 것으로 알려져 있는 2μM의 독소루비신(doxorubicin)을 사용하였다.

[64] 4, 15 및 24시간째 마다 트립신(trypsin)을 이용하여 세포를 플레이트에서 떼어내고, 빙-냉(ice-cold) PBS로 세척하였다. PBS에 용해시킨 4% 파라포름알데히드로 15분간 세포를 고정하였다. PBS에 용해시킨 1%의 BSA 용액으로 30분간 블로킹한 후, Calreticulin 항체(in 1% BSA-PBS)와 세포를 2시간 동안 반응시켰다. 이후, PBS로 세척하고 FITC-conjugated 2차 항체와 세포를 1시간 동안 반응시키고 다시 PBS로 세척하여 유세포 분석(Flow cytometric analysis)으로 칼레티큘린(calreticulin)의 세포 표면 발현 정도를 MFI(mean fluorescent intensity)를 이용하여 측정하였다.

[65] 그 결과, 도 1 및 표 2에 개시한 바와 같이 본 발명의 쑥부지깽이 에탄올 추출물을 처리하고 15시간 후 및 24시간 후 세포 표면에서 칼레티큘린(calreticulin)의 발현이 증진된 것을 확인할 수 있었다.

[66] 또한, 본 발명의 쑥부지깽이 에탄올 추출물 및 양성대조군인 독소루비신을 A549 인간폐암세포주에 15시간 및 24시간 동안 처리한 후, 세포배양 상등액을 수득하여 ICD의 대표적인 표지자인 ATP 방출량을 Fluorometric & Colorimetric ATP Quantitation Kit(Promokine)로 측정한 결과, 쑥부지깽이 에탄올 추출물 처리 15시간 이후부터 ATP 배출량이 증가함을 확인할 수 있었다(도 2)

[67] [표2]

세포 표면에 발현된 CRT(calreticulin) 발현량(MFI)

시간	**Control**	**쑥부지깽이**				**독소루비신**
	무처리	**0.25㎍/㎖**	**0.5㎍/㎖**	**1.0㎍/㎖**	**2.0㎍/㎖**	**2.0μM**
4	**4.38±0.11**	**4.24±0.08**	**4.41±0.12**	**4.60±0.03**	**3.93±0.64**	**6.68±0.15**
15	**4.64±0.06**	**5.13±0.05**	**4.62±0.04**	**5.25±0.02**	**6.93±0.09**	**7.63±0.05**
24	**4.28±0.01**	**5.04±0.02**	**4.95±0.08**	**5.27±0.08**	**8.15±0.08**	**9.77±0.04**

[68]

[69] **실시예** 4. 면역원성을 일으키는 세포사멸(immunogenic cell death; ICD) 분석

[70] 면역원성을 일으키는 세포사멸(immunogenic cell death; ICD)은 일부 항암제 계열(anthracycline 계, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 보르테조밉(bortezomib) 등)에 의해 유도되는 세포사멸의 한 방식으로, 사멸한 dying/dead 암세포가 항원으로 작용하여 수지상 세포를 활성화하여 항종양을 유도하는 것이다. ICD가 유도된 암세포는 DAMPs(damage-associated molecular patterns)로 통칭하는 ICD 특이적인 표지자를 세포 표면에 발현하거나 세포 밖으로 배출시킨다. 대표적인 ICD 표지자의 일례로는 칼레티쿨린(calreticulin, CRT)의 세포 표면에서의 발현, ATP

배출, HMGB1 배출이 알려져 있다.

[71] 본 실시예 4에서는 가는 쑥부지갱이 추출물에 의한 항종양 면역 유도 여부를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[72] C57BL/6 마우스(male)를 (주)오리엔트바이오에서 구입하여, 일주일 동안 한국한의학연구원 실험동물연구센터에서 순화하였다. 각각의 실험군 당 15마리씩 분리한 후, 각 마우스의 오른쪽 허벅지(right flank)에 세포사멸이 유도된 LL/2(LLC1) mouse lewis 폐암 세포(lung carcinoma cell)을 피하주사하였다(표 3).

[73] 시스플라틴(cisplatin)은 ICD를 유도하지 않는 항암제이며, 독소루비신(doxorubicin)은 ICD를 유도하는 항암제로, 양성대조군이다.

[74] 일주일 후, 각 마우스의 왼쪽 허벅지에 1×10^4개의 exponetially growing LL/2 mouse lewis 폐암 세포(lung carcinoma cell)를 피하주사하였다. 5주 동안, 주 2회 각 군별 종양의 발생 및 성장 유무를 관찰하였다.

[75] [표3]

그룹별 암백신 처리 조건

그룹	암백신 처리(오른쪽 허벅지)	암세포 주입(왼쪽 허벅지, 1×10^4 cells/mouse)
음성대조군	×	○
양성대조군	doxorubicin treated LL/2 cells(5μM, Dox, 48h)	○
CDDP	cisplatin treated LL/2 cells(5μM, cisplatin, 48h)	○
CDDP+쑥부지갱이	cisplatin/가는쑥부지깽이 co-treated LL/2 cells(5μM, cisplatin, 5㎍/㎖ 가는 쑥부지깽이, 48h)	○

[76]

[77] 종양 주입 후, 각 군별 종양발생 여부를 확인한 결과, 면역유도를 하지 않은 음성 대조군과 종양면역을 유도하지 않는 것으로 알려져 있는 시스플라틴(Cisplatin)을 이용한 백신 투여군의 경우, 종양 주입 후, 2주 후부터 일부 개체에서 종양이 발생하여 실험 종료일인 36일 후에 15마리 중 13마리에서 종양이 발생하였다.

[78] 이와 대비하여 종양면역을 유도하는 것으로 알려져 있는 독소루비신(doxorubicin)을 이용한 백신 투여군과 가는쑥부지깽이 추출물 및 시스플라틴을 이용한 백신 투여군(CRC#516+시스플라틴)의 경우, 개체별 종양의 발생을 지연시켰을 뿐 아니라, 최종적으로 7~8마리에서만 종양이 발생하였다(도 3 및 표 4). 이와 같은 결과로부터, 가는쑥부지깽이 추출물의 처리로 세포사멸이 유도된 암세포가 실험 동물의 체내에서 암세포에 대한 면역

반응을 유도하였다는 것을 알 수 있었다.

[79] [표4]

그룹별 종양 발생율

그룹	종양 발생율(발생동물 수/총 동물 수)
대조군(Control)	86.7%(13/15)
시스플라틴으로 사멸 유도된 LL2 세포 주입군(cisplatin)	86.7%(13/15)
독소루비신으로 사멸 유도된 L2 세포 주입군(doxorubicin)	4.7%(7/5)
가는쑥부지깽이와 시스플라틴으로 사멸 유도된 LL2 세포 주입군(CRC#516+시스플라틴)	53.3(8/15)

[80]

[81] **실시예** 5. 가는쑥부지깽이 추출물에 의한 자연살해 세포(NK-cell)의 활성화 확인

[82] 가는쑥부지깽이 추출물에 의한 생물체 내의 면역반응 활성 여부를 확인하기 위하여 약물의 면역반응 활성도를 측정하는데 널리 사용되는 자연살해 세포 활성화 실험을 수행하였다. 실험동물의 비장 세포 내에 존재하는 자연살해 세포에 가는쑥부지깽이 추출물을 처리한 후, 배양하여 자연살해 세포를 활성화한 후, 표적 세포인 YAC-1과 함께 배양하여 표적세포의 사멸율(%)을 측정하였다.

[83] 실험동물(C57BL/6 마우스)로부터 비장을 적출하여 무균 HBSS(Hank's Balanced salt solution)이 담긴 용기에 넣고 70㎛의 셀스트레이너(cell strainer)와 3㎖ 주사기의 플런저(plunger)를 이용하여 단일 세포 현탁액을 제조하였다. HBSS를 이용하여 2회 세척한 후, RPMI 배양액으로 세포를 5×10^6 cells/㎖로 조절하여 0.1, 1, 10, 100㎍/㎖의 가는쑥부지깽이 추출물을 처리한 후 48시간 배양하였다.

[84] 48시간 후, 7-AAD/CFSE cell-mediated cytotoxicity 어세이 키트(Cayman Chemical, Ann Arbor, Mi, USA)의 프로토콜에 따라 green fluorescent dye(CFSE)로 염색된 YAC-1 세포와 12.5(효능세포):1(표적세포)의 비율로 혼합하여 4시간 배양하였다. 혼합된 세포를 수거하여 HBSS로 세척하고 7-AAD로 사멸된 세포를 염색한 후, 유세포분석기를 이용하여, 표적 세포의 사멸율(%)을 측정하였다.

[85] 그 결과 도 4에 개시한 바와 같이, 본 발명의 가는쑥부지깽이 추출물이 자연살해 세포를 활성화시켰으며, 특히 100㎍/㎖의 가는쑥부지깽이 추출물을 처리한 경우 현저한 효과가 있는 것으로 나타났다.

[86]

[87]

청구범위

[청구항 1] 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 약학 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 쑥부지깽이 속 추출물은 쑥부지깽이 종자 추출물 또는 가는쑥부지깽이 종자 추출물인 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 약학 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 쑥부지깽이 속 추출물의 용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 약학 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 종양은 간암, 신장암, 전립선암, 위암, 백혈병, 흑색종, 유방암, 난소암, 폐암, 대장암 또는 섬유육종(fibrosarcoma)인 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역유도용 약학 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역유도용 약학 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역유도용 약학 조성물.

[청구항 7] 쑥부지깽이 속(*Erysimum* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 건강기능식품.

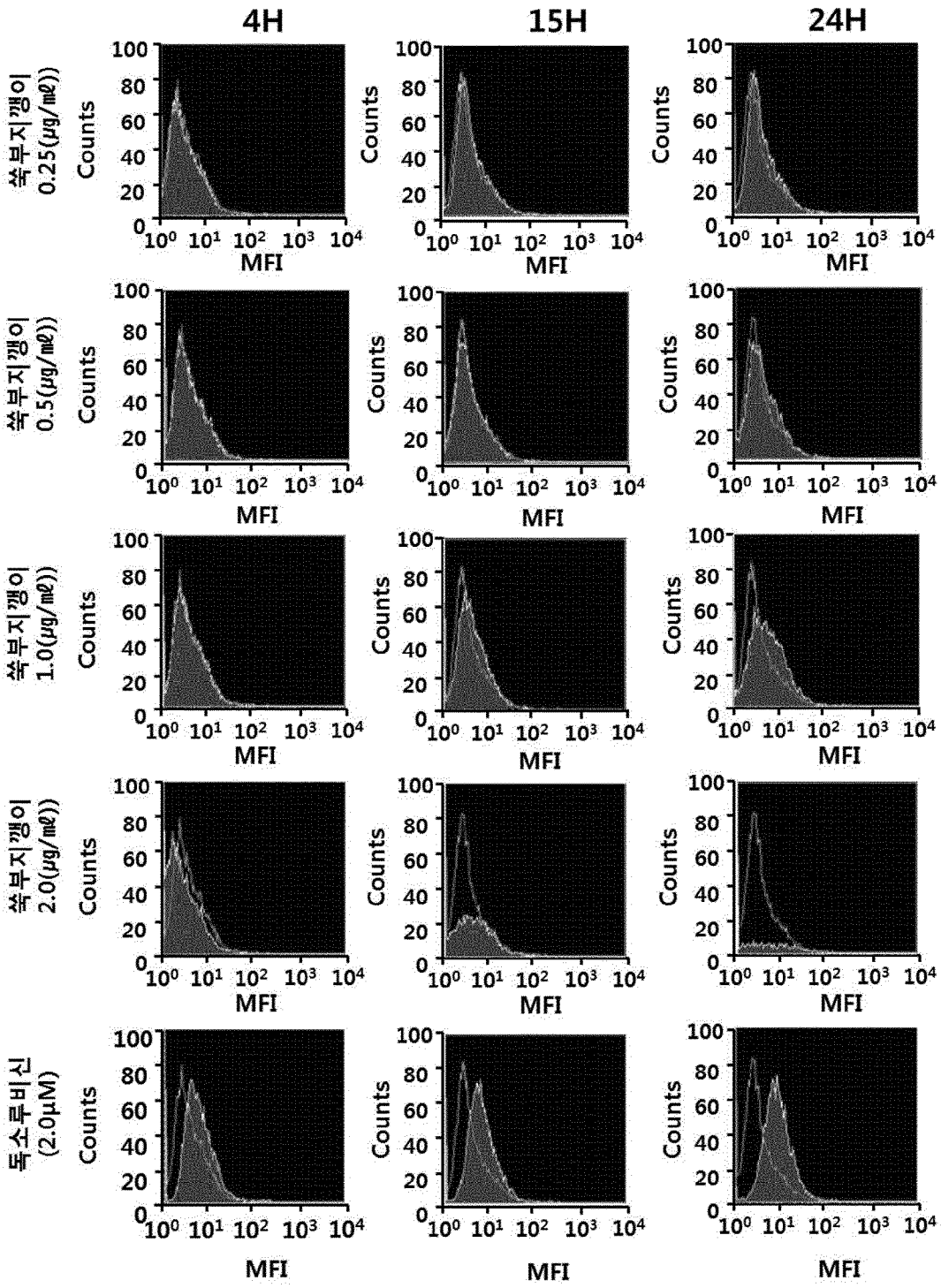
[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 쑥부지깽이 속 추출물은 쑥부지깽이 종자 추출물 또는 가는쑥부지깽이 종자 추출물인 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 건강기능식품.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 쑥부지깽이 속 추출물의 용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역작용 유도용 건강기능식품.

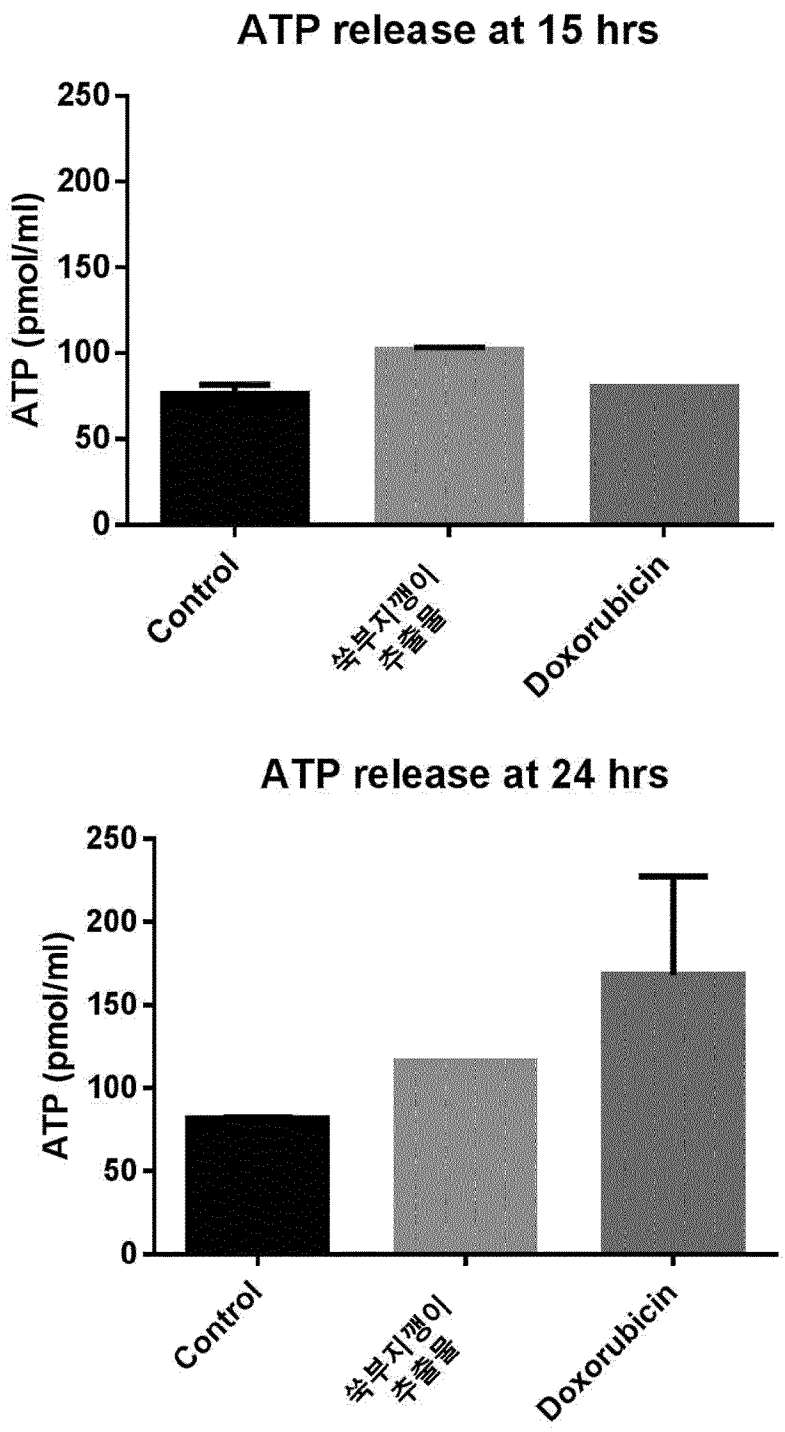
[청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 종양은 간암, 신장암, 전립선암, 위암, 백혈병, 흑색종, 유방암, 난소암, 폐암, 대장암 또는 섬유육종(fibrosarcoma)인 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역유도용 건강기능식품.

[청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 항종양 또는 항종양 면역유도용 건강기능 식품.

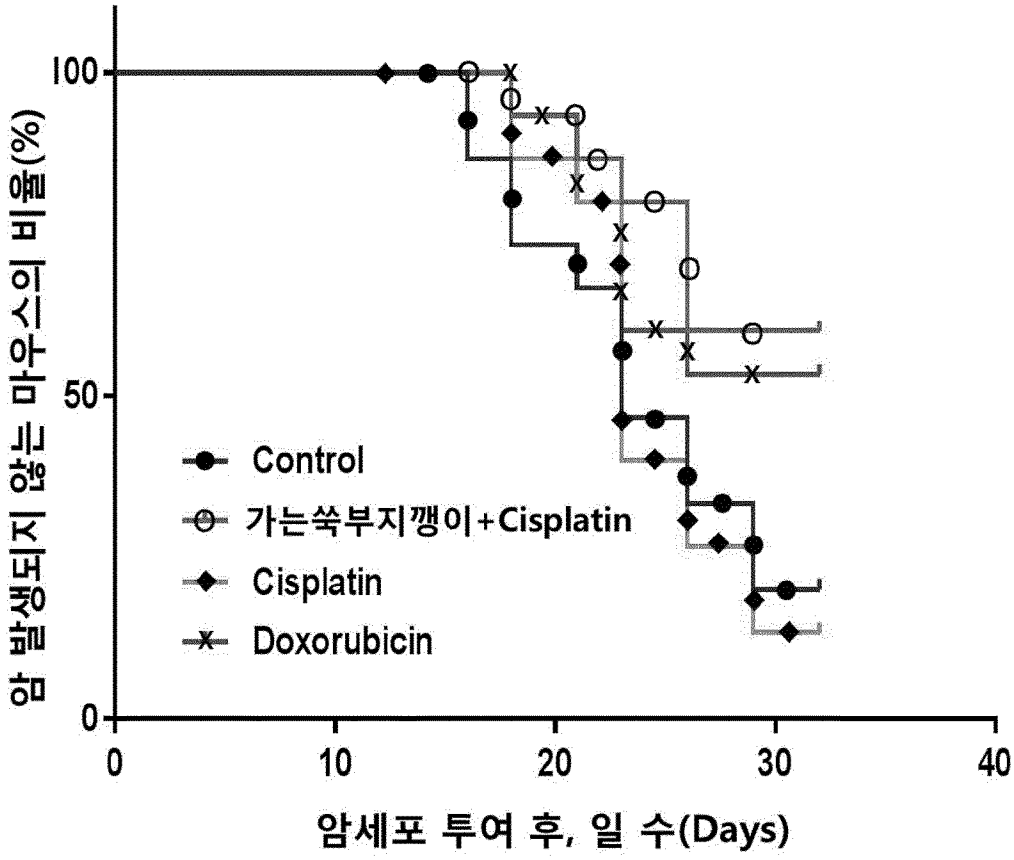
[도1]


4H
15H
24H
쑥부지갱이 0.25(μg/㎖))
쑥부지갱이 0.5(μg/㎖))
쑥부지갱이 1.0(μg/㎖))
쑥부지갱이 2.0(μg/㎖))
독소루비신 (2.0μM)
Counts
MFI
0
20
40
60
80
100
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

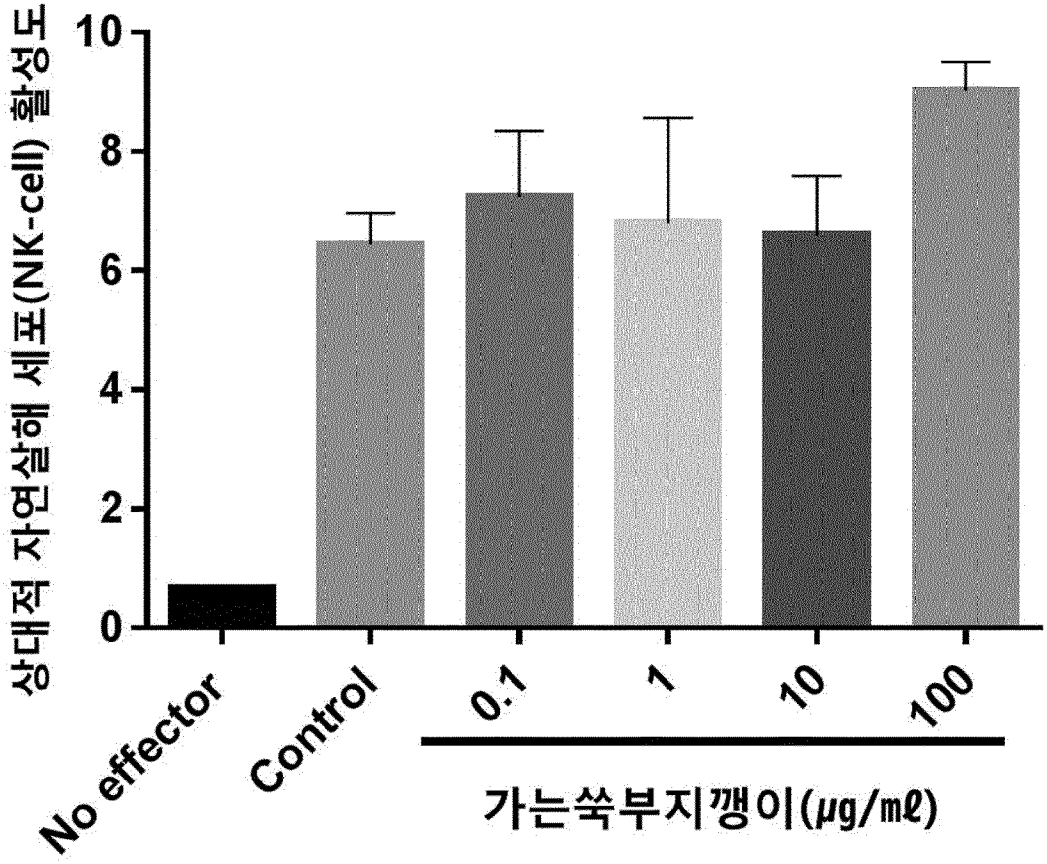
[도2]


ATP release at 15 hrs
ATP (pmol/ml)
250
200
150
100
50
0
Control
속부지갱이 추출물
Doxorubicin
ATP release at 24 hrs
ATP (pmol/ml)
250
200
150
100
50
0
Control
속부지갱이 추출물
Doxorubicin

[도3]


암 발생되지 않는 마우스의 비율(%)
100
50
0
0
10
20
30
40
암세포 투여 후, 일 수(Days)
Control
가는쑥부지깽이+Cisplatin
Cisplatin
Doxorubicin

[도4]


상대적 자연살해 세포(NK-cell) 활성도
10
8
6
4
2
0
No effector
Control
0.1
1
10
100
가는쑥부지깽이(μg/mℓ)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/010532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/28(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 9/48(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/28; A61K 31/7034; A61P 35/00; A61P 1/16; A61K 36/899; A23L 33/105; A61K 9/48; A61K 9/16; A61K 9/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Erysimum cheilanthoides L., Erysimum, antitumor, liver cancer, renal cancer, prostate cancer, stomach cancer, leukemia, melanoma, breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, colon cancer, fibrosarcoma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAI, S.-X. et al., "In Silico Identification of Anti Cancer Compounds and Plants from Traditional Chinese Medicine Database", Scientific Reports, May 2016, vol. 6, docuement no. 25462, pages 1-9 See pages 1-9; and table 1.	1-3,5-9,11
Y		4,10
Y	CN 104474327 A (WEI, J.) 01 April 2015 See abstract; and claim 1.	4,10
A	KR 10-2015-0084488 A (GYEONGSANGBUK-DO PROVINCE(FOREST RESOURCES DEVELOPMENT INSTITUTE OF GYEONGSANGBUK-DO)) 22 July 2015 See claim 1.	1-11
A	KR 10-2013-0057145 A (NAMDO PROVINCIAL COLLEGE INDUSTRIAL & EDUCATIONAL COOPERATION CORPS) 31 May 2013 See claim 1.	1-11
A	KR 10-2015-0135036 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 02 December 2015 See claim 2.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 JANUARY 2018 (19.01.2018)	**19 JANUARY 2018 (19.01.2018)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/010532

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104474327 A	01/04/2015	NONE	
KR 10-2015-0084488 A	22/07/2015	KR 10-1565232 B1	02/11/2015
KR 10-2013-0057145 A	31/05/2013	NONE	
KR 10-2015-0135036 A	02/12/2015	KR 10-1611851 B1	14/04/2016
		KR 10-1611853 B1	14/04/2016
		KR 10-2016-0010884 A	28/01/2016

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/010532

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/28(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 9/48(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/28; A61K 31/7034; A61P 35/00; A61P 1/16; A61K 36/899; A23L 33/105; A61K 9/48; A61K 9/16; A61K 9/20

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 쑥부지깽이, Erysimum, 항종양, 간암, 신장암, 전립선암, 위암, 백혈병, 흑색종, 유방암, 난소암, 폐암, 대장암, 섬유육종

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	DAI, S.-X. 등, "In silico identification of anti cancer compounds and plants from traditional Chinese medicine database", Scientific Reports, 2016.05, 6권, 문헌번호 25462, 페이지 1-9 페이지 1-9; 및 표 1 참조.	1-3,5-9,11
Y		4,10
Y	CN 104474327 A (WEI, J.) 2015.04.01 요약; 및 청구항 1 참조.	4,10
A	KR 10-2015-0084488 A (경상북도(관련부서:경상북도산림자원개발원)) 2015.07.22 청구항 1 참조.	1-11
A	KR 10-2013-0057145 A (전남도립대학교산학협력단) 2013.05.31 청구항 1 참조.	1-11
A	KR 10-2015-0135036 A (한국과학기술연구원) 2015.12.02 청구항 2 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2018년 01월 19일 (19.01.2018)	2018년 01월 19일 (19.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/010532

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 104474327 A	2015/04/01	없음	
KR 10-2015-0084488 A	2015/07/22	KR 10-1565232 B1	2015/11/02
KR 10-2013-0057145 A	2013/05/31	없음	
KR 10-2015-0135036 A	2015/12/02	KR 10-1611851 B1 KR 10-1611853 B1 KR 10-2016-0010884 A	2016/04/14 2016/04/14 2016/01/28