



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0145434  
(43) 공개일자 2016년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/20 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/20 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0082115

(22) 출원일자 2015년06월10일

심사청구일자 2015년06월10일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김욱

서울특별시 서초구 서초중앙로 188, C-709

김용균

경기도 구리시 장자대로37번길 20, 201동 503호

쿠마르, 수닐

경상북도 안동시 논골길 37-4, 208호

(74) 대리인

한양특허법인

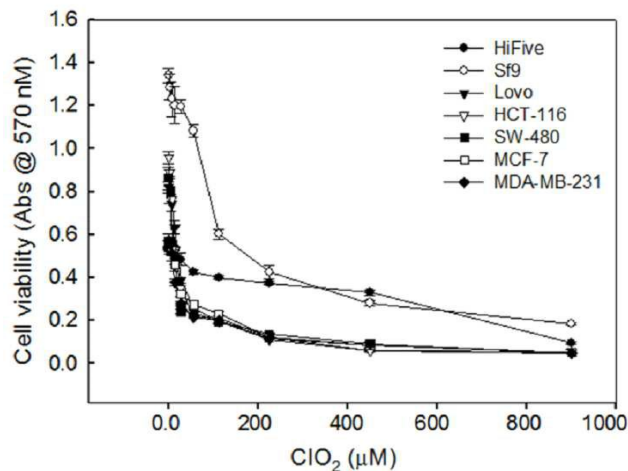
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 암 치료용 약학 조성물

### (57) 요약

본 발명은, 이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 9/48** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 114063-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 저곡해충 방제를 위한 이산화염소 현장 이용기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.09.25 ~ 2017.09.24

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 유방암, 대장암, 폐암, 자궁경부암, 위암, 및 간암 중에서 선택된 하나 이상의 암인, 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 암은 유방암 또는 대장암인, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에서,

상기 암치료는 이산화염소에 의한 활성산소의 발생 증가에 기인한 것인, 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

정제, 발포성 정제, 캡슐제, 과립제, 산제, 서방성 정제, 서방성 캡슐제, 정맥 내 및 근육 내 주사용 앰플제 형태의 주사제, 현탁액 및 좌제 중 하나 이상의 제형인, 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 암 치료용 약학 조성물에 대한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 이산화염소( $\text{ClO}_2$ )는 염소의 산화물 가운데 일종으로 음용수의 소독 처리 및 표백제로 널리 사용되고 있다. 특별히 이산화염소는 일반 소독제로 사용되는 염소와 달리 암을 유발하는 trihalomethane을 생성하지 않아 비교적 안전하며, 물에 대한 용해도가 높고, 액상 및 기체 상태의 제제화가 가능하여 여러 용도의 소독제로 사용 가능성을 넓히고 있다.

[0003] 이산화염소는 병원성 세균 및 바이러스에 대해 넓은 항생능력을 보이고 있다. 즉, 이산화염소는 식품 오염 병원 세균류, 구강 오염세균류, 음용수 오염세균류 및 일반 식기 오염세균류에 대해서 우수한 항생능력을 보였다. 특별히 여러 항생제에 대해서 내성을 보이는 세균류에 대해서 이산화염소는 기존의 차아염소산나트륨( $\text{NaClO}$ )에 비해 탁월한 항생능력을 나타냈다.

[0004] 다양한 병과 해충에 대해서 항생 효과를 보이는 이산화염소의 작용기작은 아직 정확히 규명되고 있지 않으며, 이산화염소가 인체의 암세포에 대해서 세포독성이 있는 지에 대한 연구도 이루어지지 않고 있다.

[0005] 한편, 대한민국 공개특허 제 2001-0029166호 등에는 이산화염소의 펄프 표백 방법에 대한 발명이 기재있으나, 이산화염소의 암세포에 대한 영향에 관한 연구는 전무한 실정이다.

## 선행기술문헌

## 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 2001-0029166호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0009] 본 발명의 이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물은 유방암이나 대장암 등의 암에 대하여 높은 독성을 나타내는 효과를 가지며, 이에 따라 우수한 암치료 및 예방 효과가 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은, 이산화염소( $\text{ClO}_2$ )에 대한 암세포주의 민감성을 나타낸다. 컨트롤은 두개의 곤충 세포주 Sf9 및 High Five ("HiFive")이다. 처리군은 유방암 세포주인 MCF-7 및 MDA-MB-231, 대장암 세포주인 Lovo, HCT-116, SW-480를 포함한다. 세포 생장은 MTT 분석으로 측정되었으며, 각 처리는 반복 당 8회 (8 wells) 측정하였으며, 2회 반복하였다.

도 2는, 암세포주에 대한 이산화염소( $\text{ClO}_2$ )의  $\text{IC}_{50}$  (Median inhibition concentrations)을 나타낸다. 컨트롤은 두개의 곤충 세포주 Sf9 및 High Five ("HiFive")이다. 처리군은 유방암 세포주인 MCF-7 및 MDA-MB-231, 대장암 세포주인 Lovo, HCT-116, SW-480를 포함한다. 세포 생장은 MTT 분석으로 측정되었으며,  $\text{IC}_{50}$ 는 Graphpad Prism 5.00.288 program (<http://whatpulse.org/app/graphpad-prism-5-00-288>)을 사용한 MTT 분석으로부터 수득된 흡광값(absorbance values)에 근거하여 계산되었다.

도 3은, 이산화염소( $\text{ClO}_2$ )  $3.9 \times 10^{-6} \text{ M}$  처리시 암세포주에 대한 비타민 E의 영향을 나타낸다. 컨트롤은 두개의 곤충 세포주 Sf9 및 High Five ("HiFive")이다. 처리군은 유방암 세포주인 MCF-7 및 MDA-MB-231, 대장암 세포주인 Lovo, HCT-116, SW-480를 포함한다. 세포 생장은 MTT 분석으로 측정되었으며, 각 처리는 반복 당 8회 (8 wells) 측정하였으며, 2회 반복하였다.

도 4는 암세포주에 이산화염소( $\text{ClO}_2$ ) 처리시의 활성산소(reactive oxygen species: ROS) 생성의 상향 조절 효과를 나타낸다. 컨트롤은 두개의 곤충 세포주 Sf9 및 High Five ("HiFive")이다. 처리군은 유방암 세포주인 MCF-7 및 MDA-MB-231, 대장암 세포주인 Lovo, HCT-116, SW-480를 포함한다. 세포 내의 ROS는 DCFH-DA에서 형광성 DCF로 산화되었다.

도 4a는 DCF 양과 RFU(relative fluorescence unit)의 직선 관계를 나타내며,

도 4b는 비타민 E 존재/부존재시 이산화염소의 처리에 따른 ROS 양의 변화를 나타낸다. 각 처리는 3회 반복하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은, 이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 암 치료 또는 암 예방 방법에 대한 것이다.

- [0015] 본 발명자는, 암세포가 일반세포에 비하여 10배 이상의 이산화염소 감수성을 나타냄을 실험적으로 확인하였으며, 이는 활성산소 발생 증가에 기인한 것임을 역시 확인하였다. 이에, 이산화염소를 암세포의 치료나 예방의 새로운 용도로 적용이 가능함을 도출하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 본 발명에서 치료 또는 예방의 대상이 되는 상기 암은 유방암, 대장암, 폐암, 자궁경부암, 위암, 및 간암 중에서 선택된 하나 이상의 암일 수 있으며 이에 제한되지는 않으나, 유방암이나 대장암인 것이 바람직하다.
- [0018] 또한, 상기 암치료는 이산화염소에 의한 활성산소의 발생 증가에 기인한 것이다.
- [0019] 본 발명의 이산화염소를 포함하는 암치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 암 치료 또는 암 예방 방법은, 인간 또는 동물 또는 곤충에 적용할 수 있으며, 적용 대상에 따라, 이산화염소의 물성을 고려하여 적합한 투여 방법 및 제형으로 활용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 통상으로 허용되는 부형제, 보조제, 희석제, 등장화제, 보존제, 활탁제, 용해보조제와 함께 약제학적으로 통상으로 허용되는 약학적 제제형태로 제제화할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 활성성분인 이산화염소를 기준으로 성인에게 1 $\mu$ g/kg/일 내지 400mg/kg/일 투여할 수 있으며, 질병의 심각 정도에 따라 증감할 수 있다.
- [0025] 상기 약학적 조성물은 정제, 발포성 정제, 캡슐제, 과립제, 산제, 서방성 정제, 서방성 캡슐제(단독 및 복합 단위 제제), 정맥 내 및 근육 내 주사용 앰플제 형태의 주사제, 현탁액, 좌제, 또는 기타 적합한 약제학적 형태로 투여할 수 있다.
- [0027] 상기 약학적 조성물을 함유하는 약제학적 제제를 제조하기 위해서, 활성 화합물은 생리학적으로 내성이 있는 부형제 및/또는 희석제 및/또는 보조제와 함께 바람직한 방식으로 지시된 양으로 제형화된다.
- [0029] 이하에서, 본 발명을 실시예에 기초하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 하기에 개시되는 본 발명의 실시 형태는 본 발명의 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위는 이들의 실시 형태에 한정되지 않는다. 본 발명의 범위는 특허청구범위에 표시되었고, 더욱이 특허청구범위 기록과 균등한 의미 및 범위 내에서의 모든 변경을 포함한다.
- [0031] **참조예:**
- [0033] **(1) 세포배양**
- [0035] 대조군 세포로서 두 종류의 곤충 세포를 이용하였다. Sf9 세포주(IPLB-Sf21-AE)는 *Spodoptera frugiperda*의 번데기 난소 조직에서 유래되었으며, 5% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) 및 antibiotic-antimycotic 복합제 (Cat. No. 15240-062, Gibco, Grand Island, NY, USA)를 첨가한 TC100 곤충세포배양액(Cat. No. LM505-01, Hyclone, Daegu, Korea)에서 배양되었다. High Five 세포주(BTI-TN-5B1-4)는 *Trichoplusia ni*에서 기원하였으며 Express Five<sup>®</sup> SFM (Cat. No. 10486-025, Gibco) 배양액으로 증식시켰다. 두 세포는 모두 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Cat. No. 156340, Nunc, , Roskilde, Denmark)를 이용하여 28℃ 조건에서 증식되었다.
- [0036] 암 세포주로서 MCF-7 (Korean Cell Line Bank (KCLB) No. 30022)과 MDA-MB-231 (KCLB No. 30026)은 인체 유방

암 유래이다. 반면에 LoVo (KCLB No. 10229), HCT-116 (KCLB No. 10247), SW-480 (KCLB No. 10228)은 모두 대장암 유래이다. 이들 세포들은 모두 10% FBS와 항생제(100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 (1:1, v/v)를 이용하여 배양하였다. 세포배양은 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Cat. No. 156499, Nunc)를 이용하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 이뤄졌다.

## [0038] (2) 이산화염소

본 연구에 이용된 이산화염소는 800 ppm의 저장 용액이었다. 이 시약은 푸르고팜(한국)에서 제공되었다.

## [0042] (3) 세포활성분석

세포활성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Cat. No. M-2128, Sigma-Aldrich Korea, Korea) 염색약을 이용하여 분석되었다. 처리될 세포 10,000 개/50  $\mu$ L를 96 well plate 각각에 분주하였다. 이산화염소는 각 세포 배양액으로 10<sup>-9</sup> - 10<sup>-3</sup> M로 희석하였으며, 각각 100  $\mu$ L의 용량으로 세포 현탁액에 첨가 후 28°C에서 48 h 처리하였다. 이후 20  $\mu$ L의 MTT (5 mg/mL)를 첨가하여 28°C에서 5 h 처리하였다. 이후 다시 70  $\mu$ L의 25% sodium dodecyl sulfate (pH 2.0)를 첨가한 후 상온에서 16-18 h 방치하여 형성된 formagen을 용해시켰다. 이후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## [0046] (4) 활성산소(reactive oxygen species: ROS) 분석법

ROS 정량 분석은 OxiSelect Intracellular ROS Assay Kit (Cat. No. STA-342, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 서로 다른 배양 세포를 인산완충용액(phosphate buffered saline: PBS)으로 2 회 (1,000 rpm, 10 분) 세척한 후 각 세포배양액으로 희석한 1x 2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (20x DCFH-DA stock, Part No. 234201)를 1 mL 첨가하여 28°C에서 60 분 동안 반응시켰다. 이후 세포를 상기의 방법으로 2회 PBS로 세척한 후 동일한 세포밀도(10,000 개 세포)를 각 튜브에 분주하였다. 이후 상등액을 제거하고 각 세포 배양액으로 희석된 이산화염소(0-200 ppm) 용액(250  $\mu$ L/well)을 첨가하고 28°C에서 90분간 반응시켰다. 반응된 세포들을 PBS로 2 회 세척하고 250  $\mu$ L의 세포 배양액으로 현탁시켰다. 동일한 부피(250  $\mu$ L)의 2x Cell Lysis Buffer (Part No. 234203)를 첨가하고 상온에서 5 분간 반응시켰다. 각 150  $\mu$ L의 세포 분해물을 96 well plate (Cat. No. 167008, Nunc) 로 옮기고 480 nm 입사광과 530 nm 출력광 조건에서 형광을 측정하였다. 이 형광 수치가 형성된 ROS와 상관관계를 나타내는 지를 확인하기 위해 2', 7' -dichlorofluorescein (DCF) 표준액(1 mM, Cat. No. 234202)을 세포 배양액으로 희석하여 0-10  $\mu$ M의 농도로 만들고, 각 75  $\mu$ L의 DCF 표준용액을 동일한 세포밀도(10,000 개 세포)를 갖는 각 96 well에 처리하고 28°C에서 20 분간 반응시키고 상기의 방법으로 나타나는 형광 수치를 측정하였다.

## [0050] (5) 이산화염소 세포독성에 대한 항산화제 비타민 E 효과 분석

비타민 E ( $\alpha$ -tocopherol, Cat. No. 258024, Sigma-Aldrich Korea)를 dimethyl sulfoxide로 저장용액을 만들고, 이를 다시 각 세포 배양액으로 희석하였다. 각 반응 용액은 50  $\mu$ L의 세포현탁액(10,000 개 세포), 50  $\mu$ L의 이산화염소(최종농도: 3.9 x 10<sup>-6</sup> M), 그리고 50  $\mu$ L의 비타민 E 용액으로 구성되었고 28°C에서 48 시간 처리하였다. 이후 MTT 분석법을 이용하여 세포 활성을 분석하였다.

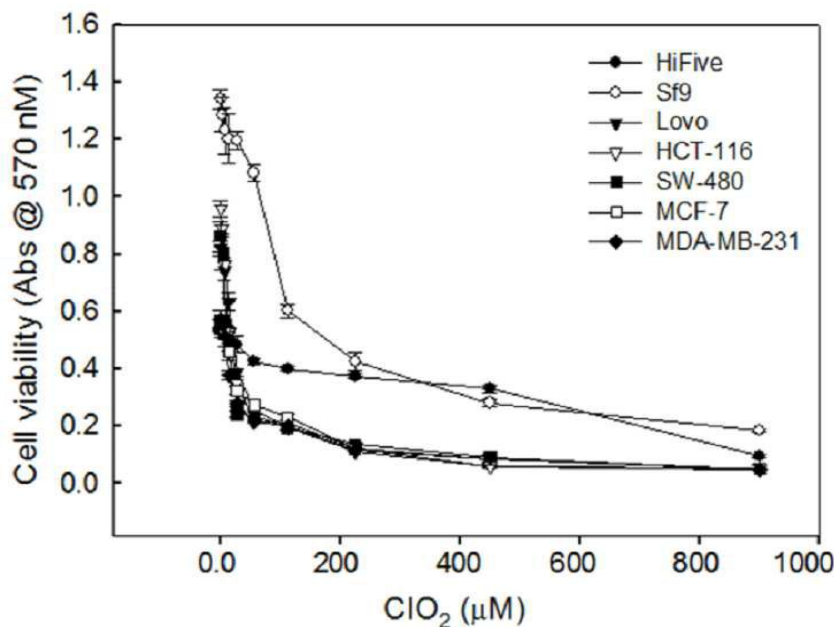
[0054] 실시예 1: 이산화염소의 암세포에 대한 세포독성

[0056] 인체 유방암 세포주 2 종과 대장암 3종에 대한 이산화염소의 세포독성이 분석되었다(도 1). 이산화염소의 노출 농도가 증가함에 따라 이들 암세포의 활성이 낮아졌다. 대조군으로 곤충 세포의 경우도 이산화염소에 대한 감수성을 나타냈다. 그러나 대조군에 비해 암세포주들은 현격하게 높은 감수성을 보였다. 이산화염소에 대한 중앙억제약량(IC<sub>50</sub>)을 산출하였다(도 2). 암세포주들은 약 10 ppm 이하의 IC<sub>50</sub>를 보인 반면, 대조 세포군들은 모두 100 ppm 이상을 나타냈다. 즉, 암세포주들은 일반 세포에 비해 이산화염소에 대해 10 배 이상의 감수성을 나타내는 것으로 판명되었다.

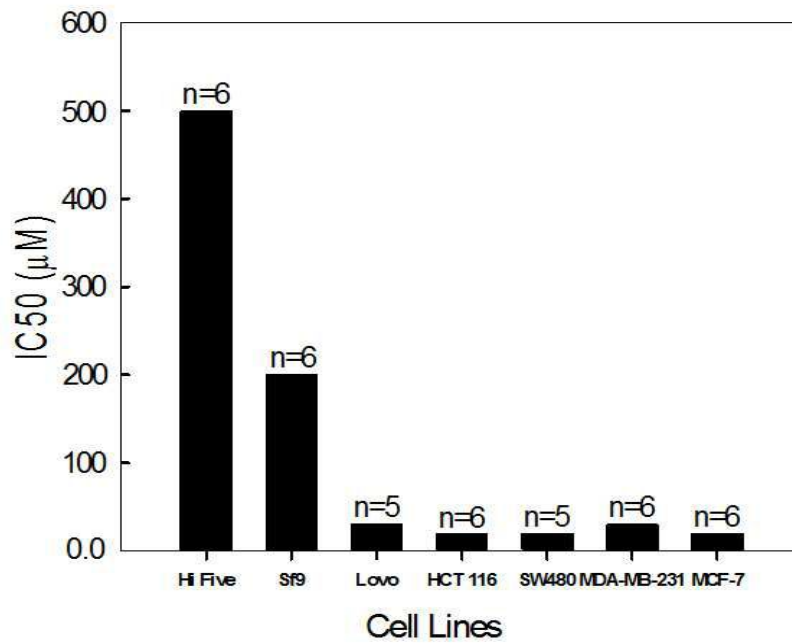
[0058] 암세포주들의 이산화염소에 대한 감수성 원인을 규명하기 위해 세포내 활성산소의 세포독성 효과를 분석하였다. 우선 항산화제인 비타민 E를 이들 세포들에 처리한 결과 이산화염소에 기인된 세포독성이 둔화되었다(도 3). 이는 이산화염소에 기인된 암세포주에 대한 세포독성이 활성산소에 기인되었다는 것을 의미하였고, 이를 증명하기 위해 이산화염소 처리에 따른 세포내 활성산소 함량을 변화를 분석하였다(도 4). 이산화염소에 노출되기 전에 이들 세포들 사이에는 세포내 활성산소량에 차이를 나타냈다. 암세포주들은 모두 대조세포군에 비해 높은 활성산소를 지니고 있었다. 여기에 이산화염소를 노출시킨 결과 활성산소의 발생량은 크게 증가하였고, 대조구에 비해 암세포주들은 모두 현격하게 높은 활성산소량을 발생시켰다.

도면

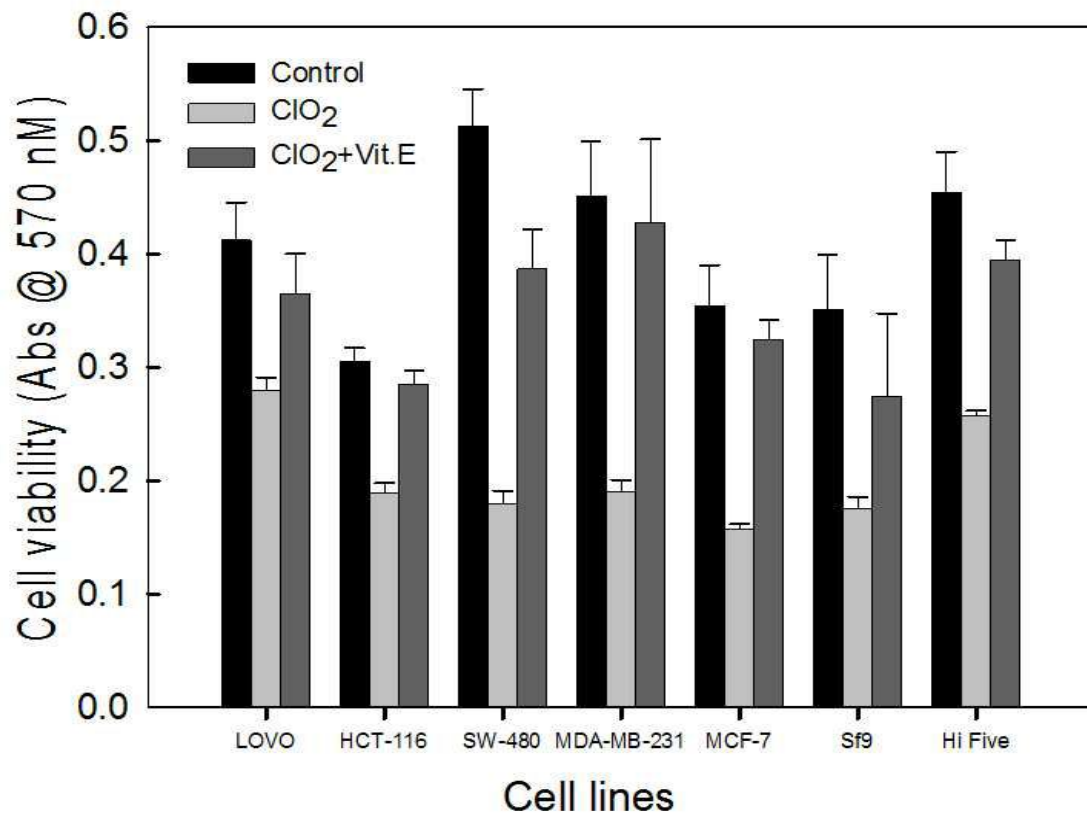
도면1



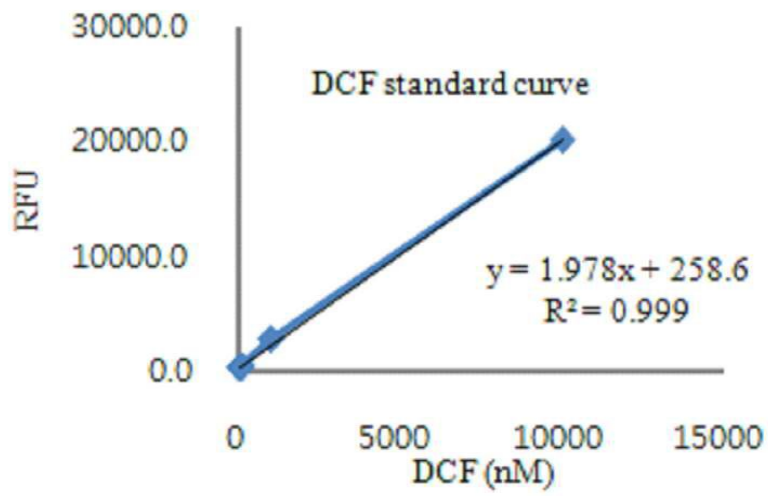
도면2



도면3



도면4a



도면4b

