

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 18일 (18.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/200261 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/481 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 36/232 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005116
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 11일 (11.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0066573 2013년 6월 11일 (11.06.2013) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 고성규 (KO, Seong Gyu); 135-906 서울시 강남구 압구정로 347, 26동 501호, Seoul (KR). 조성국 (CHO, Sung Gook); 482-741 경기도 양주시 고덕로 159, 203동 405호, Gyeonggi-do (KR). 최윤경 (CHOI, Youn Kyung); 690-162 제주도 제주시 아연로 113-11 나동 502호, Jeju-do (KR). 임희선 (YIM, Hee Sun); 448-502 경기도 용인시 수지구 동천로 449번길 10-5, Gyeonggi-do (KR).

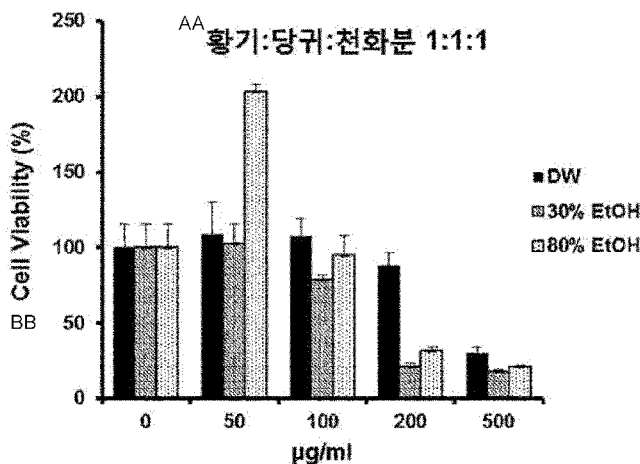
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, 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, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: ANTICANCER COMPOSITION CONTAINING MIXED HERBAL MEDICINE EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물



AA ... Astragalus membranaceus:Angelica gigas:Trichosanthes kirilowii 1:1:1
BB ... Cell Viability (%)

(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing, as an active ingredient, a mixed extract of Astragalus membranaceus, Angelica gigas, and Trichosanthes kirilowii, for preventing or treating cancer. The mixed extract of Astragalus membranaceus, Angelica gigas, and Trichosanthes kirilowii according to the present invention does not impact normal cell growth, while having an anticancer effect which specifically inhibits the proliferation of cancer cells, and an excellent effect of inhibiting metastasis of cancer cells, and thus can be useful in preventing or treating cancer and supplementing cancer treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 정상 세포의 성장에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포에만 특이적으로 증식을 억제하는 항암 효과를 가지고 있으며, 암 세포 전이를 억제하는 우수한 효과를 가지고 있어, 암의 예방 또는 치료, 및 항암 치료 보조에 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10 만 명 이상이 진단되고, 약 6 만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암 세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.
- [3] 한편, 황기(*Astragalus membranaceus*)는 쌍떡잎식물 장미목 콩과의 여러해살이풀로, 한국, 일본, 만주, 중국 북동부, 시베리아 동부 등지에 분포한다. 흔히 약초로서 재배하며, 한방에서는 가을에 채취하여 노두와 잔뿌리를 제거하고 햇빛에 말린 것을 한약재의 황기라 하고, 껍질을 벗기지 않고 그대로 쓰는 것이 약효가 더 좋다고 알려져 있다. 강장, 지한, 이뇨, 소종 등의 효능이 있어 신체 허약, 피로 권태, 식은땀 등에 처방한다.
- [4] 당귀(*Angelica gigas*)는 미나리과에 속하는 다년생 풀인 당귀의 뿌리를 말린 것으로, 맛은 달고 매우며 성질은 따뜻하다. 당귀의 효능에는 피가 부족할 때 피를 생성해주는 보혈작용이 있으며, 당귀는 관상동맥의 혈류량을 촉진시키고, 적혈구 생성을 왕성하게 한다.
- [5] 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Maximowicz)은 호노과(박과, *Cucurbitaceae*)에 속한 다년생 하늘타리 또는 노랑하늘타리의 피층을 벗긴 뿌리를 말한다. 냄새가 없고 맛은 쓰고 시며 성질은 차다. 열로 인해 진액이 손상되었을 때 소갈증, 중기, 농을 치료한다. 주로 폐와 위의 열을 내리며 진액을 만들어 갈증을 해소하고 신체를 윤택하게 한다.
- [6] 상기한 바와 같이, 황기, 당귀 또는 천화분의 다양한 약리 효과가 알려져 있지만, 이들의 혼합 추출물의 항암 효과에 대해서는 전혀 밝혀진 바가 없으며, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.
- [7] 이에 본 발명자들은 신규한 항암제를 개발하기 위한 노력을 계속한 결과, 황기,

당귀 및 천화분의 혼합 추출물이 정상 세포의 성장에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포에만 특이적으로 증식을 억제하고, 암 세포 전이를 억제하는 우수한 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [11] 또한 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [12] 또한 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 약학적 조성물을 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 정상 세포의 성장에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포에만 특이적으로 증식을 억제하는 항암 효과를 가지고 있으며, 암 세포 전이를 억제하는 우수한 효과를 가지고 있어, 암의 예방 또는 치료 및 항암 치료 보조에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 추출 용매에 따라 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분=1:1:1)이 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [16] 도 2는 추출 용매에 따라 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분=3:1:1)이 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [17] 도 3은 추출 용매에 따라 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1)이 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [18] 도 4는 추출 용매에 따라 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분:인삼=3:1:1:1)이 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [19] 도 5는 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분=1:1:1)이 다양한 종류의 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [20] 도 6은 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분=3:1:1)이 다양한 종류의 암

- 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [21] 도 7은 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1)이 다양한 종류의 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [22] 도 8은 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분:인삼=3:1:1:1)이 다양한 종류의 암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [23] 도 9는 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분=1:1:1)이 다양한 종류의 유방암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [24] 도 10은 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분=3:1:1)이 다양한 종류의 유방암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [25] 도 11은 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1)이 다양한 종류의 유방암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [26] 도 12는 본 발명의 혼합 추출물 (황기:당귀:천화분:인삼=3:1:1:1)이 다양한 종류의 유방암 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [27] 도 13은 본 발명의 혼합 추출물이 정상 세포 (RIE cell)의 증식에 미치는 영향을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.
- [28] 도 14는 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)의 전이에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [29] 도 15는 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)의 침윤에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [30] 도 16은 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)의 부착 의존성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [31] 도 17은 전이성 유방암 동물 모델에서 본 발명의 혼합 추출물이 실험 기간 동안 마우스의 체중 변화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [32] 도 18 및 도 19는 전이성 유방암 동물 모델에서 본 발명의 혼합 추출물이 실험 기간 동안 암 조직의 크기 변화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [33] 도 20은 전이성 유방암 동물 모델의 암 조직의 H&E 염색 결과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 21은 전이성 유방암 동물 모델의 암 조직의 항-CD-31 염색 결과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 22는 전이성 유방암 동물 모델에서 본 발명의 혼합 추출물이 암 전이에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [36] 도 23 및 도 24는 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)의 신호 전달 체계에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [37] 도 25는 본 발명의 혼합 추출물이 293 T 세포에서 STAT3 전사인자 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [38] 도 26은 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)에서 STAT3 전사인자 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- [39] 도 27은 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)에서

STAT3의 핵 내 이동에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

[40] 도 28은 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)에서 IL-6의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

[41] 도 29는 본 발명의 혼합 추출물이 전이성 유방암 세포 (MDA-MB-231)에서 IL-6 프로모터 및 STAT3의 결합에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

[42] 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[43] 또한 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.

[44] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

[45]

[46] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[47] 본 발명의 조성물에서 유효성분인 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 하기와 같은 방법으로 수득될 수 있다.

[48] 먼저, 황기, 당귀 및 천화분을 물로 세척하여 이물질을 제거한다. 황기, 당귀 및 천화분은 재배한 것 또는 시판되는 것 등을 제한없이 사용할 수 있다. 상기 황기, 당귀 및 천화분을 혼합한 후, 10~30배 부피의 용매를 가하여 완전히 침지되도록 한다. 상기 생약재의 혼합 비율은 바람직하게는 황기:당귀:천화분=0.5~5:1:1의 중량비이다. 추출 방법은 실온에서 함침하거나 가온할 수 있다. 상기 추출 용매는 이에 제한되지 않으나, 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올이고, 보다 바람직하게는 20 내지 40%(v/v) 에탄올이다. 상기 추출물을 여과 및 감압 농축하여 최종 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 수득한다.

[49] 상기 혼합 추출물은 인삼 추출물을 더 포함할 수 있으며, 인삼을 더 포함할 경우의 생약재의 혼합 비율은 바람직하게는 황기:당귀:천화분:인삼=0.5~5:1:1:1의 중량비이다.

[50] 본 발명에 따른 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 정상 세포의 성장에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포에만 특이적으로 증식을 억제하는 항암 효과를 가지고 있으며, 암 세포 전이를 억제하는 우수한 효과를 가지고 있어, 암의 예방 또는 치료, 및 항암 치료 보조에 유용하게 이용될 수 있다.

[51] 상기 암은 일반적인 암 질환을 포함하며, 바람직하게는 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암,

뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종을 포함하며, 보다 바람직하게는 유방암이며, 보다 더 바람직하게는 전이성 유방암이다.

[52]

[53] 본 발명의 조성물은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물과 함께 항암 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[54]

본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[55]

본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[56]

본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 혼합 추출물은 1일 1 mg/kg 내지 10000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어

투여할 수도 있다.

- [57] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [58] 본 발명의 조성물은 암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [59]
- [60] 본 발명에서, 건강기능식품이란 질병의 예방 또는 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [61] 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 암의 예방 또는 개선, 및 항암 치료 보조를 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 원료에 대하여 15 중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [62] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [63] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [64] 상기 외에 본 발명의 조성물은 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제

등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[65]

[66] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[67]

[68] 실시예 1. 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물의 제조

[69] 황기 (*Astragalus membranaceus*, Am), 당귀 (*Angelica gigas*, Ag), 및 천화분 (*Trichosanthes kirilowii* Maximowicz, Tk)을 각각 (1) 1:1:1 또는 (2) 3:1:1의 중량비 (w/w)로 혼합한 후 추출기에 넣고, 8~10배의 물, 30% (v/v) 에탄올 또는 80% 에탄올을 각각 넣은 후, 2~3시간 동안 추출하였다. 상기 추출액을 여과하고 여액을 감압 농축한 후, 건조하여 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (물 추출물, 30% 에탄올 추출물, 80% 에탄올 추출물)을 수득하였다 (1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물의 평균 수득률 약 35.5%, 3:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물의 평균 수득률 약 29.85%).

[70]

[71] 실시예 2. 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물의 제조

[72] 황기, 당귀, 천화분 및 인삼을 각각 (1) 1:1:1:1 또는 (2) 3:1:1:1의 중량비 (w/w)로 혼합한 후 추출기에 넣고, 8~10배의 물, 30% 에탄올 또는 80% 에탄올을 각각 넣은 후, 2~3시간 동안 추출하였다. 상기 추출액을 여과하고 여액을 감압 농축한 후, 건조하여 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물 (물 추출물, 30% 에탄올 추출물, 80% 에탄올 추출물)을 수득하였다 (1:1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물의 평균 수득률 약 28%, 3:1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물의 평균 수득률 약 24.24%).

[73]

[74] 실험예 1. 추출 용매에 따라 본 발명의 혼합 추출물이 암 세포의 성장에 미치는 영향 검증

[75] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 혼합 추출물이 추출 용매에 따라 암 세포의 성장에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 종래 공지된 방법에 따라 MTT 어세이를 수행하였다. 암 세포주는 MDA-MB-231 유방암 세포주를 이용하였다.

[76]

보다 구체적으로, 96웰 플레이트에서 배양한 MDA-MB-231 유방암 세포주에 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물, 또는 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물을 다양한 농도 (50~500 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후,

48 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 그 후 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 각각의 세포에 처리하고 4시간 동안 더 배양한 후, 상층액을 제거하고 100 µl의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하였다. 최종적으로 590 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 아무 물질도 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. 그 결과를 도 1 내지 도 4에 나타내었다.

[77] 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 30 % 에탄올을 추출 용매로 이용한 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물이 다른 용매 추출물에 비해 우수한 암 세포의 성장을 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[78] 또한, 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 30 % 에탄올을 추출 용매로 이용한 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물이 다른 용매 추출물에 비해 우수한 암 세포의 성장을 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[79] 따라서 상기 결과를 바탕으로 이하 실험에서는 30% 에탄올 추출물을 이용하였다.

[80]

[81] **실험예 2. 본 발명의 혼합 추출물이 다양한 암 세포의 성장에 미치는 영향 검증**

[82] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 혼합 추출물이 다양한 암 세포의 성장에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 MTT 어세이를 수행하였다. 암 세포주는 췌장암 세포주인 Panc-28, 비소세포성 폐암 세포주인 H460, 방광암 세포주인 Ku-7, 뇌종양 교모세포주인 U87, 두경부암 세포주인 HN5, 자궁경부암 세포주인 HeLa, 만성골수백혈병 세포주인 KBM5 및 K562, 갑상선암 세포주인 SNU80 및 SNU790, 피부암 세포주인 B16F1을 이용하였다. 그 결과를 도 5 내지 도 8에 나타내었다.

[83] 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 농도에 따라 다양한 암 세포의 성장을 억제하는 우수한 항암 효과를 보임을 확인하였다.

[84] 또한, 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 황기, 당귀 및 천화분과 함께 인삼을 더 포함하는 혼합 추출물 역시 농도에 따라 다양한 암 세포의 성장을 억제하는 우수한 항암 효과를 보임을 확인하였다.

[85]

[86] **실험예 3. 본 발명의 혼합 추출물이 다양한 유방암 세포의 성장에 미치는 영향 검증**

[87] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 혼합 추출물이 유방암 세포의 성장에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 MTT 어세이를 수행하였다. 유방암 세포주는 MCF-7 (hormone-positive), T47D (hormone-positive), SKBR-3 (HER-2-positive), BT-20 (TNBC, non-invasive), 및 MDA-MB-231 (TNBC, highly metastatic) 등 총 5가지 세포주를 이용하였다. 그 결과를 도 9 내지 도 12에 나타내었다.

- [88] 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 농도에 따라 각기 다른 유방암 세포주의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 특히, 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물은 500 µg/ml의 농도에서 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 성장을 현저하게 억제하는 효과를 보임을 확인하였다.
- [89] 또한, 도 11 및 도 12에 나타낸 바와 같이, 황기, 당귀 및 천화분과 함께 인삼을 더 포함하는 혼합 추출물 역시 농도에 따라 각기 다른 유방암 세포주의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [90]
- [91] **실험예 4. 본 발명의 혼합 추출물이 정상 세포의 성장에 미치는 영향 검증**
- [92] 상기 실험예 2 및 3을 통해 확인한 본 발명의 혼합 추출물의 세포 성장 억제 효과가 암 세포 특이적인지를 확인하기 위하여, 정상 세포주인 RIEs (Rat normal intestinal epithelial cells)를 이용하여 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [93] 도 13에 나타낸 바와 같이, 황기, 당귀 또는 천화분의 단독 추출물이 정상 세포인 RIEs 세포의 성장을 억제하는데 반해, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물과 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물은 정상 세포인 RIEs의 성장에는 어떠한 영향도 미치지 않았다. 상기 결과를 통해 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 단독 추출물이 가지고 있는 부정적인 효과를 개선하여 암 세포에만 특이적으로 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [94]
- [95] **실험예 5. 본 발명의 혼합 추출물이 유방암 세포의 전이에 미치는 영향 검증**
- [96] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 혼합 추출물이 유방암 세포의 전이에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 종래 공지된 방법에 따라 스크레칭 어세이를 수행하였다. 보다 구체적으로, 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 6 웰 플레이트에 심은 후, 세포를 긁어 세포 간 간격이 생기게 하였다. 상기 세포에 50 µg/ml농도의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물), 또는 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물)을 처리한 후, 24시간 동안 배양하고, 이동한 세포의 수를 측정하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.
- [97] 도 14에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 세포 이동 (migration)을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히, 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물이 다른 추출물에 비해 보다 우수한 효과를 보임을 확인하였다.
- [98]
- [99] **실험예 6. 본 발명의 혼합 추출물이 유방암 세포의 침윤에 미치는 영향 검증**
- [100] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 혼합 추출물이 유방암 세포의 침윤에 미치는

영향을 검증하기 위하여, 종래 공지된 방법에 따라 침윤 (invasion) 어세이를 수행하였다. 보다 구체적으로, 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 매트릭셀 (matrigel)이 미리 코팅된 위쪽 챔버에서 배양한 후, 50 µg/ml 농도의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물), 또는 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물)을 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 침윤된 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 그 수를 측정하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.

- [101] 도 15에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 세포 침윤을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히, 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물이 다른 추출물에 비해 보다 우수한 효과를 보임을 확인하였다.

[102]

- [103] **실험예 7. 본 발명의 혼합 추출물이 유방암 세포의 부착 의존성에 미치는 영향 검증**

- [104] 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 혼합 추출물이 유방암 세포의 부착 의존성에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 종래 공지된 방법에 따라 부착-비의존성 (anchorage-independent) 어세이를 수행하였다. 보다 구체적으로, 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 소프트 아가 플레이트에 배양한 후, 500 µg/ml 농도의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물), 또는 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물)을 이틀 간격으로 처리하고, 총 15일 동안 배양하였다. 15일째 되는 날, 세포를 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후, 광학현미경을 이용하여 콜로니 숫자를 측정하였다. 그 결과를 도 16에 나타내었다.

- [105] 도 16에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 비부착 증식을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히, 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물이 다른 추출물에 비해 보다 우수한 효과를 보임을 확인하였다.

[106]

- [107] **실험예 8. 동물 모델에서 본 발명의 혼합 추출물의 항암 활성 검증**

- [108] 상기 실시예 1에서 제조한 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물이 전이성 유방암 동물 모델에서 항암 활성을 보이는지 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 실험 동물로 6주령의 누드 (Nu/Nu) 마우스 (Oriental Science)를 이용하였으며, 각 마우스에 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 1×10^6 의 수로 피하 주사하였다. 암 크기가 50 mm³이 되었을 때, 각 마우스를 랜덤하게 그룹을 나눈 후, 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물), 또는 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물)을

500 mg/kg의 농도로 32일간 매일 경구 투여하였다. 대조군의 경우 음수를 경구투여 하였다. 체중 및 암의 크기는 1 주일에 3회 측정하였다. 실험 종료 후, 각 마우스를 희생시키고 암을 포함하는 조직을 분리한 후, 4% 포름알데히드로 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀에 포매한 후, 조직학적 관찰을 위해 일부는 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색하였으며, 다른 일부는 항-CD31 (Abcam, Cambridge, UK) 항체를 이용하여 면역조직화학 (Immunohistochemistry)을 수행하였다. 또한, 폐 전이 (metastasis)를 확인하기 위하여, 폐의 전이성 콜로니 수를 측정하였다. 그 결과를 각각 도 17 내지 도 22에 나타내었다.

- [109] 도 17에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물과 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물은 실험 기간 동안 마우스의 체중에는 영향을 미치지 않았으며, 이를 통해 본 발명의 혼합 추출물이 생체 내 부작용이 없는 안전한 물질임을 확인하였다.
- [110] 도 18 및 도 19에 나타낸 바와 같이, 대조군의 암 크기가 1300 mm³일 때, 황기, 당귀, 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물을 투여한 군의 암 크기는 150 mm³이고, 3:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물을 투여한 군의 암 크기는 500 mm³임을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 우수한 항암 효과를 가지고 있으며, 특히 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물이 보다 우수한 항암 효과를 보임을 확인하였다.
- [111] 도 20에 나타낸 바와 같이, 암 조직의 H&E 염색 결과, 대조군에 비해 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 투여한 군에서 암 코호트 (tumor cohort)가 잘 분화되어 있음을 확인하였다.
- [112] 도 21에 나타낸 바와 같이, 암 조직을 항-CD-31 항체로 염색하여 암 신생혈관 (angiogenesis)을 분석한 결과, 대조군에 비해 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 투여한 군에서 암 혈관의 수가 감소함을 확인하였다. 상기 결과를 통해 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 암 신생혈관을 억제하는 우수한 항암 효과를 가지고 있으며, 특히 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물이 보다 우수한 효과를 보임을 확인하였다.
- [113] 도 22에 나타낸 바와 같이, 폐의 전이성 콜로니 수를 확인한 결과, 대조군에 비해 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 투여한 군에서 폐 전이 암 군집의 수가 현저하게 감소함을 확인하였다. 특히, 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물은 약 100%에 이르는 강력한 암 전이 억제 효과를 나타내었다.
- [114]
- [115] **실험예 9. 본 발명의 혼합 추출물이 유방암 세포에서 세포 내 신호 전달 체계에 미치는 영향 검증**
- [116] 상기 실험예 3 내지 8에서 확인한 본 발명의 혼합 추출물의 유방암에 대한 항암 효과가 어떠한 신호 전달 과정을 통해 야기되는 것인지를 검증하기 위하여,

하기와 같은 실험을 수행하였다.

[117]

[118] **9-1. 웨스턴 블랏 분석**

[119] 종래 공지된 방법에 따라 웨스턴 블랏을 수행하였다. 보다 구체적으로, 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물)을 50 µg/ml 또는 500 µg/ml의 농도로 15분간 처리하였다(SH003 : 황기, 당귀 및 천화분을 1:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물, SH004 : 황기, 당귀 및 천화분을 3:1:1의 중량비로 혼합한 혼합 추출물). RIPA 완충액을 이용하여 세포로부터 단백질을 분리한 후, p-EGFR, EGFR, p-STAT3, STAT3, p-JAK1, p-JAK2, p-AKT, AKT 항체 (이상 Danvers, MA, USA), p-SRC, SRC, p-ERK1/2, ERK1/2 또는 튜블린 항체 (이상 Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 이를 통해 세포 내에서 발현되는 각 단백질의 양을 비교하였다. 전이성 유방암 세포주인 MDA-MB-231은 EGFR 유전자의 과발현 또는 돌연변이로 인해 EGFR에 의한 세포 내 신호기전이 매우 활성화 되어있다고 알려져 있다. 그 결과를 도 23 및 도 24에 나타내었다.

[120] 도 23 및 도 24에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 처리한 전이성 유방암 세포주에서 EGFR 및 이의 하위 신호기전인 SRC, AKT의 인산화가 억제되고, 암의 발달 및 전이에 관여한다고 알려진 STAT3의 인산화가 억제됨을 확인하였다.

[121]

[122] **9-2. STAT3 전사인자 활성화에 미치는 영향 분석**

[123] 본 발명의 혼합 추출물이 STAT3 전사인자 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[124] 293 T 세포에 STAT3-luc 리포터 플라스미드(pSTAT3-luc)와 함께 constitutively active STAT3 (CA-STAT3) 또는 STAT3 siRNA를 트랜스펙션한 후, 48시간 동안 배양하였다. 그 후 각 세포에 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물, 1:1:1의 중량비로 혼합, SH003)을 500 ug/ml의 농도로 처리하고, 24시간 동안 더 배양하였다. 각 세포 내에서 STAT3의 전사 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 25에 나타내었다.

[125] 도 25에 나타낸 바와 같이, 293 T 세포에서 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물에 의해 STAT3의 전사 활성이 억제됨을 확인하였다(* p<0.05).

[126]

[127] 또한, STAT3가 비정상적으로 활성화되어 있는 MDA-MB-231 세포에 pSTAT3-luc 및 STAT3 siRNA를 트랜스펙션한 후, 48시간 동안 배양하였다. 그 후 각 세포에 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물, 1:1:1의 중량비로 혼합, SH003)을 500 ug/ml의 농도로 처리하고, 24시간 동안 더 배양하였다. 각 세포 내에서 STAT3의 전사 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 26에 나타내었다.

[128] 도 26에 나타난 바와 같이, MDA-MB-231 세포에서 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물에 의해 STAT3의 전사활성이 유의하게 억제됨을 확인하였다(* $p < 0.05$).

[129]

[130] **9-3. STAT3 핵 내 이동에 미치는 영향 분석**

[131] 본 발명의 혼합 추출물이 STAT3 핵 내 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 활성화된 STAT3(pSTAT3)는 세포 내 핵으로 이동하여 전사 활성 기능을 한다고 알려져 있다.

[132] MDA-MB-231 세포에 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물, 1:1:1의 중량비로 혼합, SH003)을 500 ug/ml의 농도로 6 시간 동안 처리한 후, 각 세포를 4% 포르말데히드로 15분간 고정하였다. 그 후 0.1% 트리톤 X-100으로 세포막 흡수를 촉진하고, BSA로 비특이 항원항체결합을 막은 후, pStat3 항체 (Cell Signaling) 및 TORRO-3 (Invitrogen)로 각 한 시간 및 5분동안 염색한 후, 공초점현미경(Zeiss)을 이용하여 40x 배율에서 관찰하였다. 그 결과 도 27에 나타내었다.

[133] 도 27에 나타난 바와 같이, STAT3는 세포질에서만 관찰되었으며, 이를 통해 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물이 STAT3의 핵 내 이동을 억제함을 확인하였다.

[134]

[135] **9-4. IL-6 발현에 미치는 영향 분석**

[136] 본 발명의 혼합 추출물이 IL-6 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[137] MDA-MB-231 세포에 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물, 1:1:1의 중량비로 혼합, SH003)을 500 ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후, real-time PCR을 통해 IL-6 mRNA 발현 정도를 측정하였으며, ELISA를 통해 세포 밖으로 분비된 IL-6 단백질 발현 정도를 측정하였다. 그 결과를 도 28에 나타내었다.

[138] 도 28에 나타난 바와 같이, MDA-MB-231 세포에서 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 처리에 의해 사이토카인의 일종인 IL-6의 mRNA 발현이 억제되며, 세포 외 IL-6의 양이 감소됨을 확인하였다(* $p < 0.05$).

[139]

[140] 또한, MDA-MB-231 세포에 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 (30 % 에탄올 추출물, 1:1:1의 중량비로 혼합, SH003)을 500 ug/ml의 농도로 6시간 동안 처리한 후, IL-6 프로모터에 결합한 STAT3의 양을 EpiSeeker ChIP kit (Abcam)을 이용한 염색질 면역침전분석(chromatin immunoprecipitation assay)을 통해 측정하였다. 보다 구체적으로, MDA-MB-231 세포에 SH003을 3시간 처리한 후, 0.75% 포르말데히드로 고정하였다. 이후 초음파 분쇄를 통해 DNA 가닥을 나눈 후, STAT3 항체 (Cell Signaling)를 이용하여, 이를 침전한 후 real time PCR을

수행하였다. STAT3가 결합하는 DNA 부위는 -143bp에서 +48bp로
 5'-GTTGTGTCTTGCCATGCTAAAG-3'과
 5'-AGAATGAGCCTCAGACATCTCC-3'의 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 그
 결과를 도 29에 나타내었다.

[141] 도 29에 나타낸 바와 같이, MDA-MB-231 세포에서 황기, 당귀 및 천화분의
 혼합 추출물 처리에 의해 IL-6 프로모터에 결합한 STAT3의 양이 유의하게
 감소함을 확인하였다(* $p < 0.05$).

[142]

[143] 이하 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을
 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[144]

[145] 제제예 1. 약학적 조성물의 제조

[146] 1-1. 산제의 제조

[147] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 20 mg

[148] 유당 100 mg

[149] 탈크 10 mg

[150] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[151]

[152] 1-2. 정제의 제조

[153] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 10 mg

[154] 옥수수전분 100 mg

[155] 유당 100 mg

[156] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[157] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를
 제조한다.

[158]

[159] 1-3. 캡슐제의 제조

[160] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 10 mg

[161] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[162] 락토오스 14.8 mg

[163] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[164] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에
 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[165]

[166] 1-4. 주사제의 제조

[167] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 10 mg

[168] 만니톨 180 mg

[169] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[170] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[171] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[172]

[173] **1-5. 액제의 제조**

[174] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 20 mg

[175] 이성화당 10 g

[176] 만니톨 5 g

[177] 정제수 . 적량

[178] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[179]

[180] **제제예 2. 식품 조성물의 제조**

[181] **2-1. 건강식품의 제조**

[182] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 100 mg

[183] 비타민 혼합물 적량

[184] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[185] 비타민 E 1.0 mg

[186] 비타민 B1 0.13 mg

[187] 비타민 B2 0.15 mg

[188] 비타민 B6 0.5 mg

[189] 비타민 B12 0.2 μg

[190] 비타민 C 10 mg

[191] 비오틴 10 μg

[192] 니코틴산아미드 1.7 mg

[193] 엽산 50 μg

[194] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[195] 무기질 혼합물 적량

[196] 황산제1철 1.75 mg

[197] 산화아연 0.82 mg

[198] 탄산마그네슘 25.3 mg

[199] 제1인산칼륨 15 mg

[200] 제2인산칼슘 55 mg

[201] 구연산칼륨 90 mg

[202] 탄산칼슘 100 mg

[203] 염화마그네슘 24.8 mg

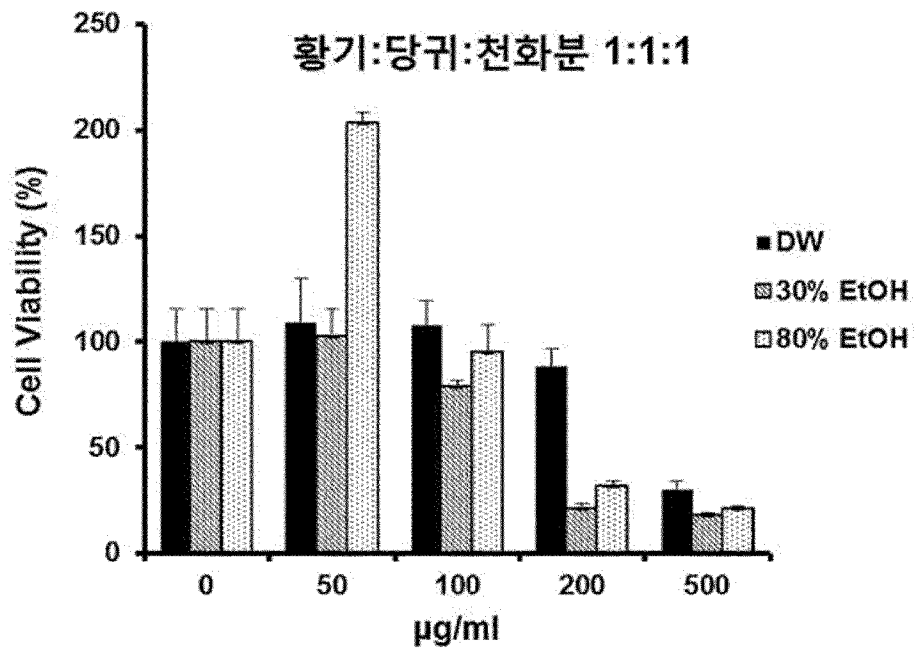
- [204] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [205]
- [206] **2-2. 건강음료의 제조**
- [207] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물 100 mg
- [208] 비타민 C 15 g
- [209] 비타민 E(분말) 100 g
- [210] 젖산철 19.75 g
- [211] 산화아연 3.5 g
- [212] 니코틴산아미드 3.5 g
- [213] 비타민 A 0.2 g
- [214] 비타민 B1 0.25 g
- [215] 비타민 B2 0.3 g
- [216] 물 정량
- [217] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 °C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 21 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [218] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

청구범위

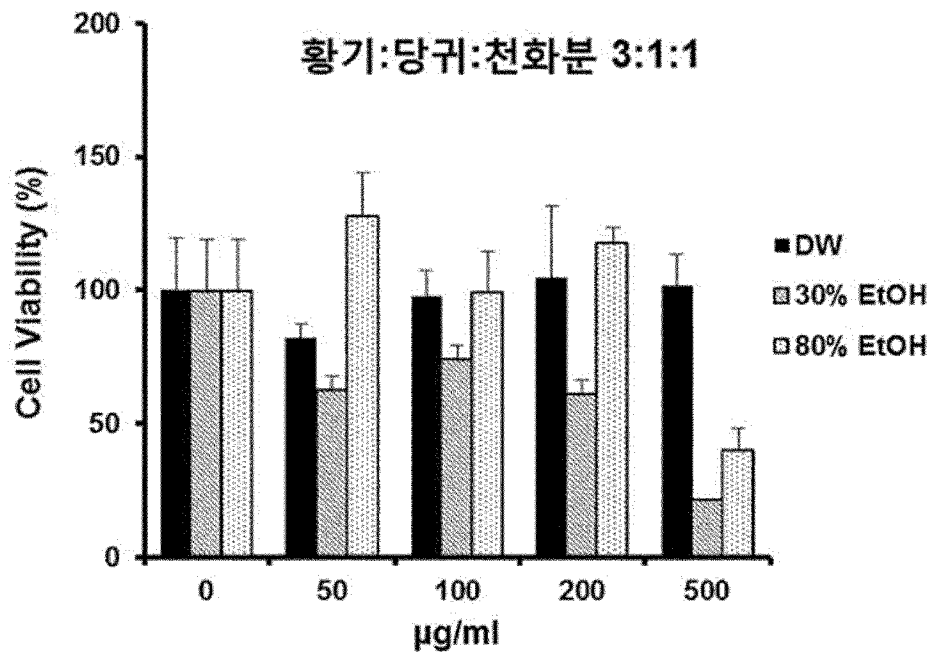
- [청구항 1] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 4의 알코올은 20 내지 40% (v/v)의 에탄올인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 황기:당귀:천화분=0.5~5:1:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 인삼 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물은 황기:당귀:천화분:인삼=0.5~5:1:1:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 유방암은 전이성 유방암인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 황기:당귀:천화분=0.5~5:1:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로

- 하는, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 인삼 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 황기, 당귀, 천화분 및 인삼의 혼합 추출물은 황기:당귀:천화분:인삼=0.5~5:1:1:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 14] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 치료 보조용 식품 조성물.

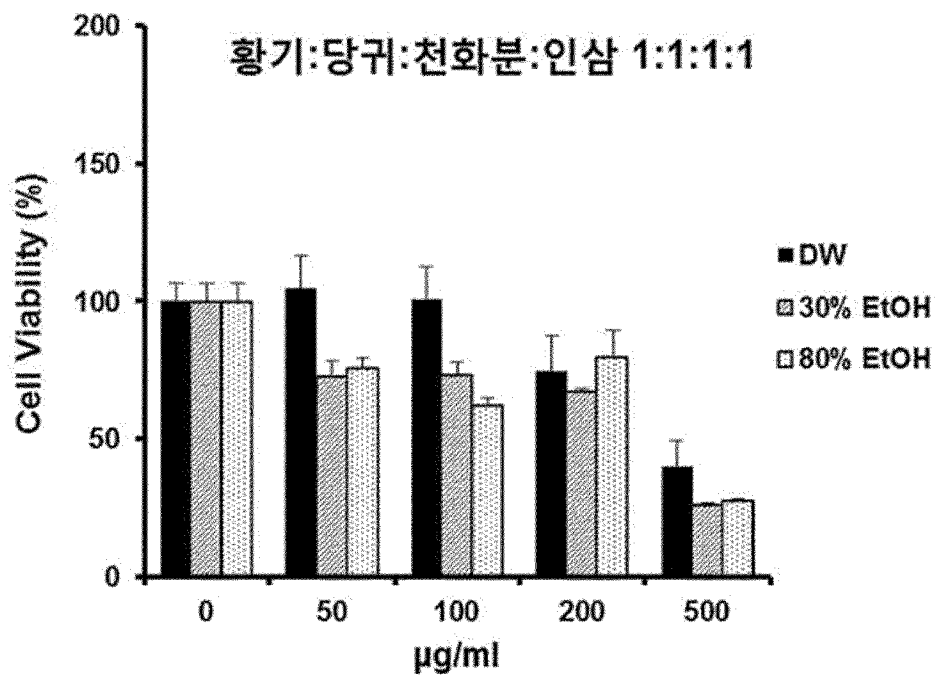
[Fig. 1]



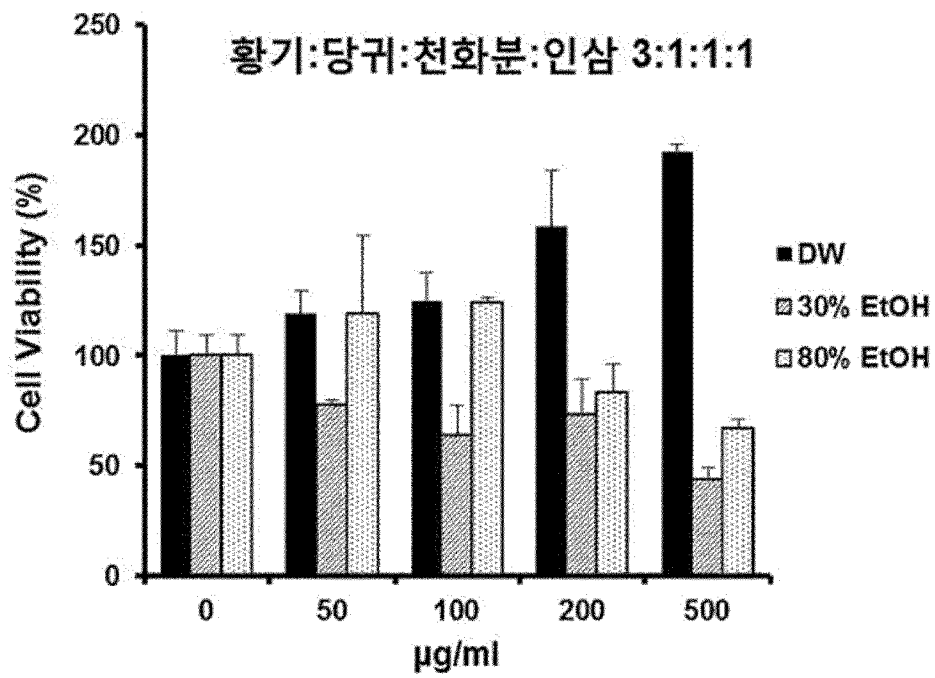
[Fig. 2]

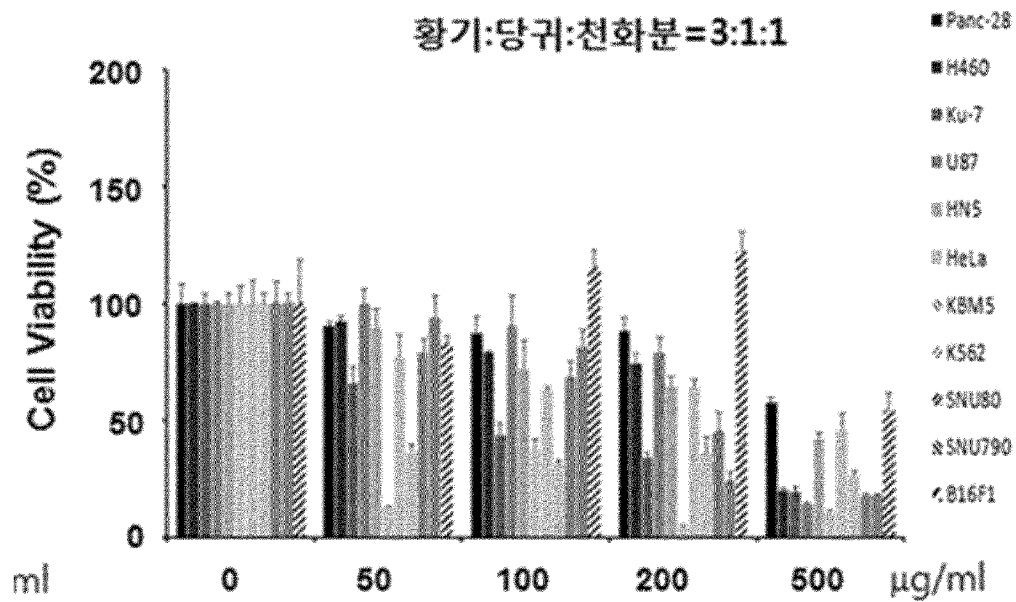


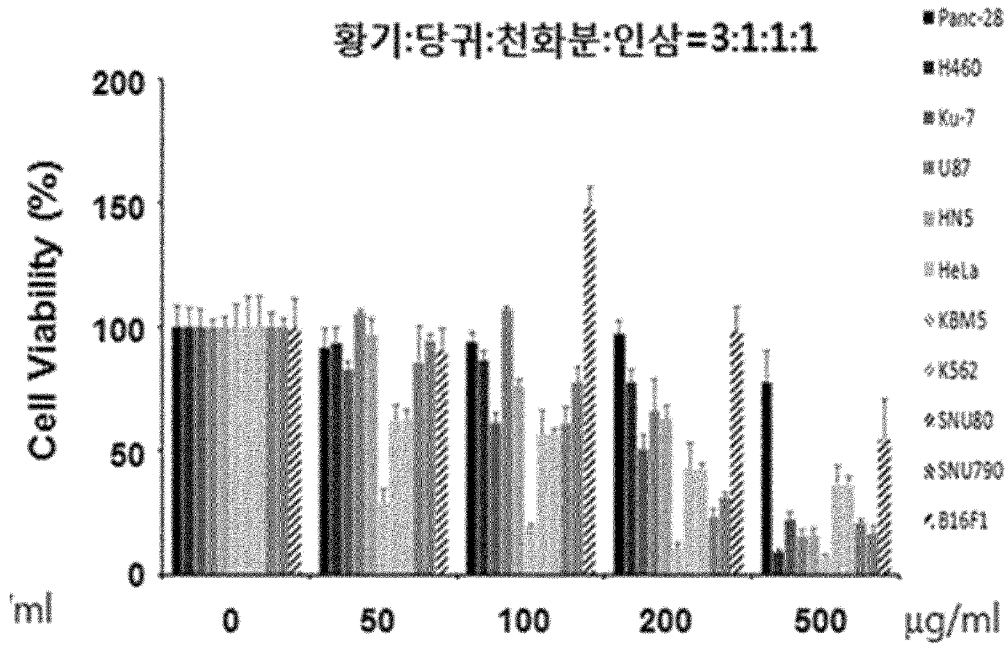
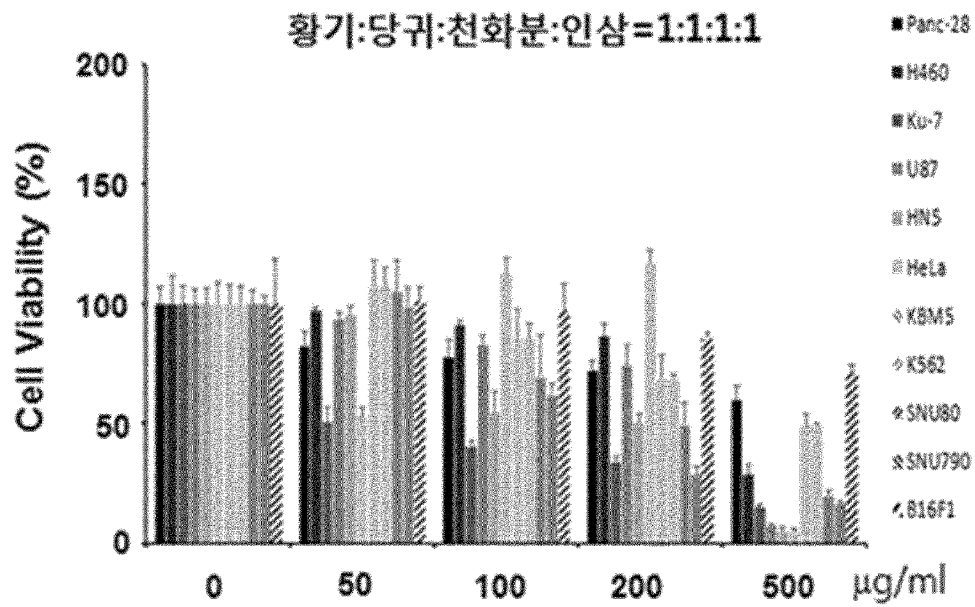
[Fig. 3]



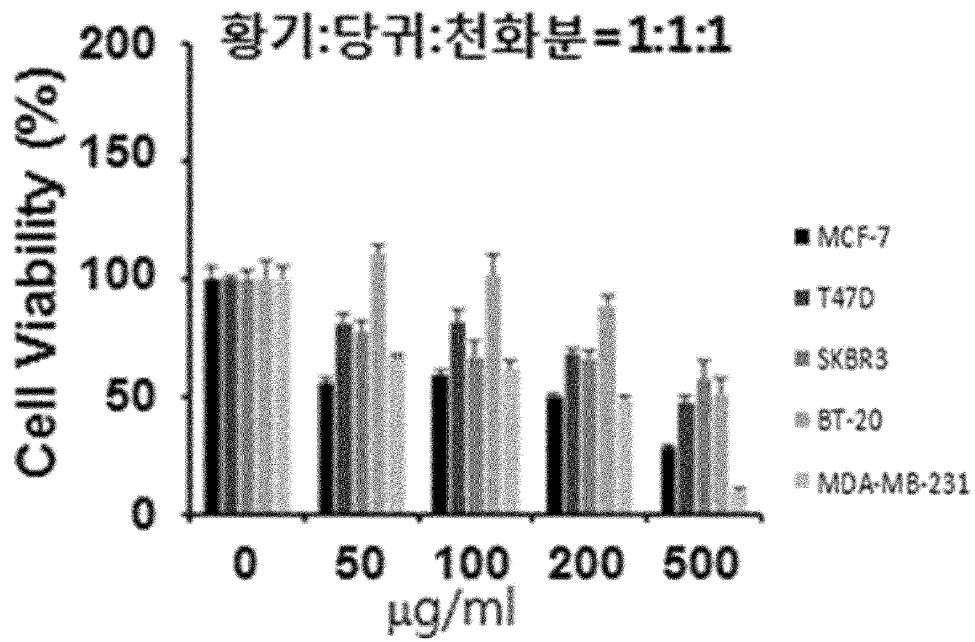
[Fig. 4]



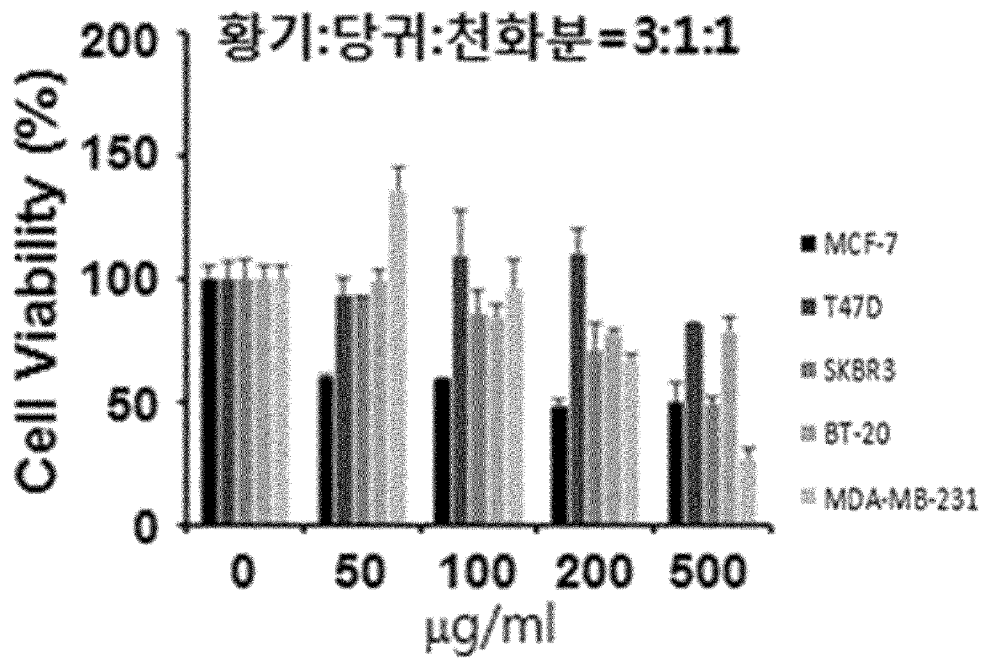




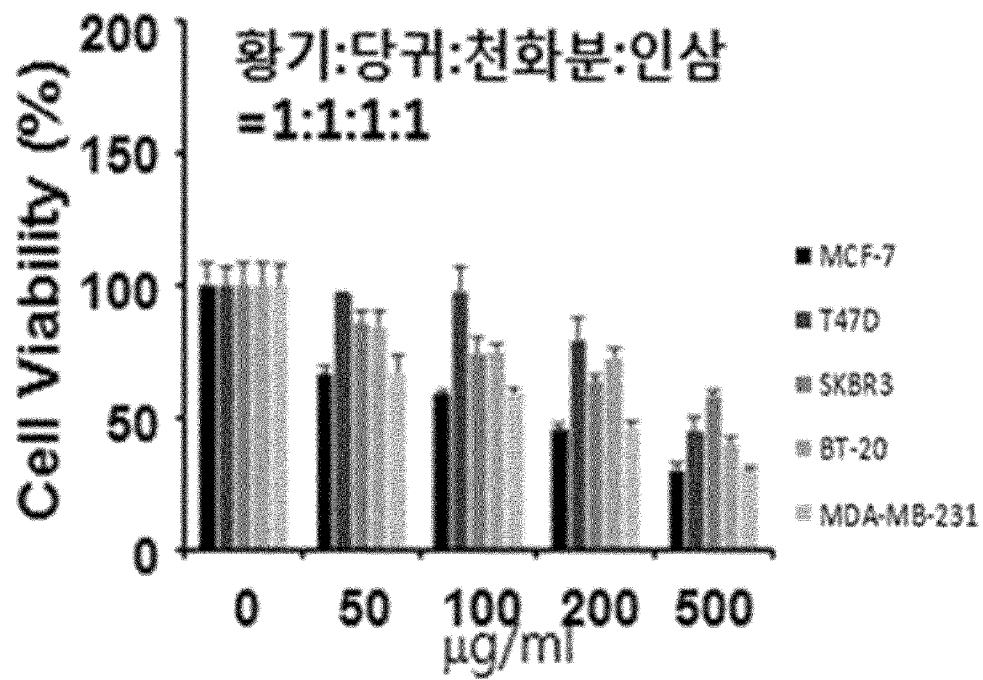
[Fig. 9]



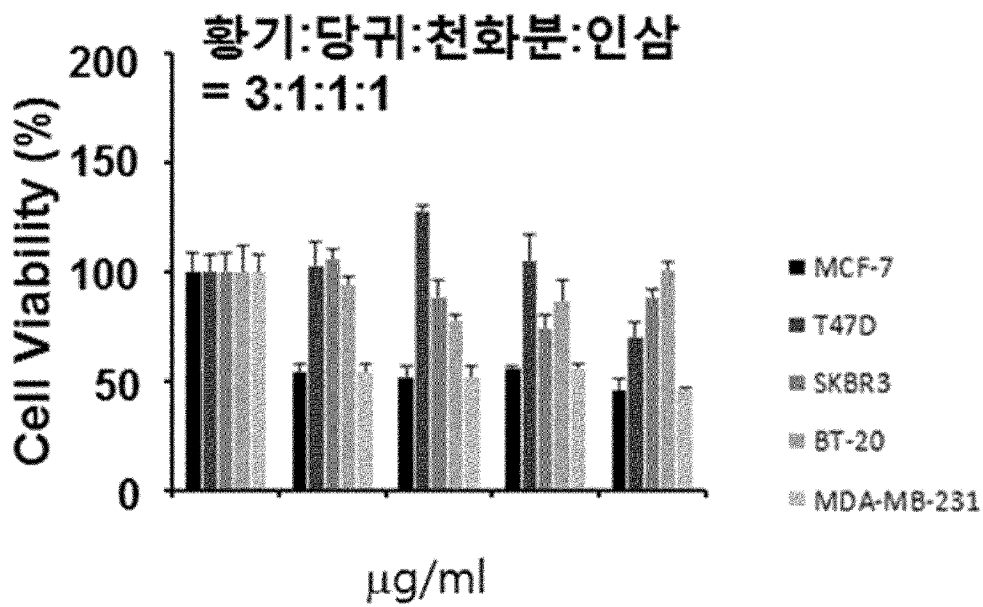
[Fig. 10]



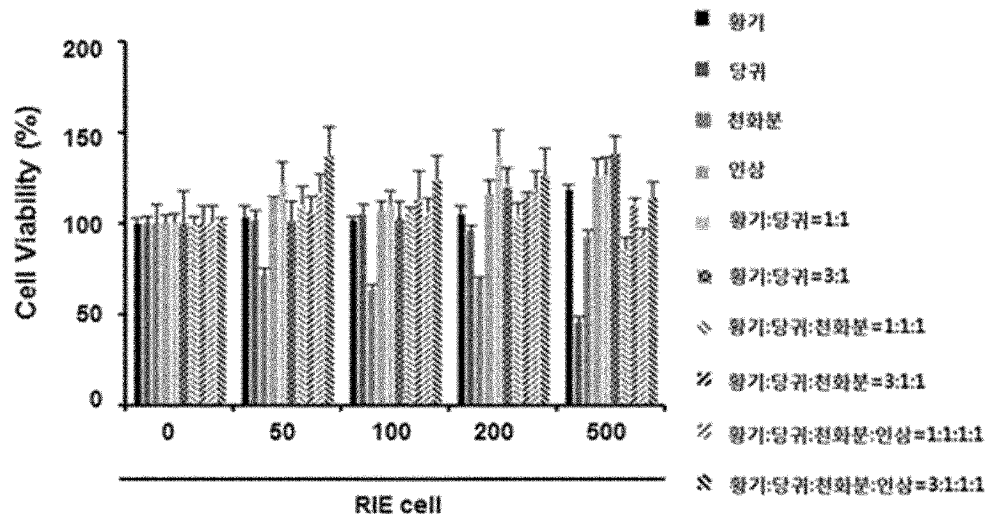
[Fig. 11]



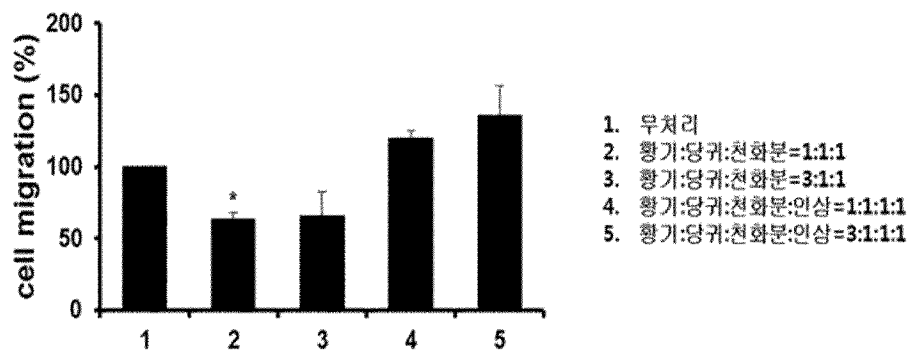
[Fig. 12]



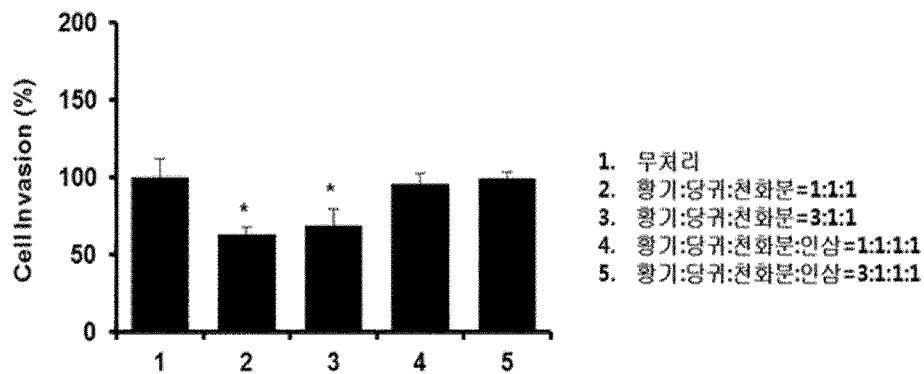
[Fig. 13]



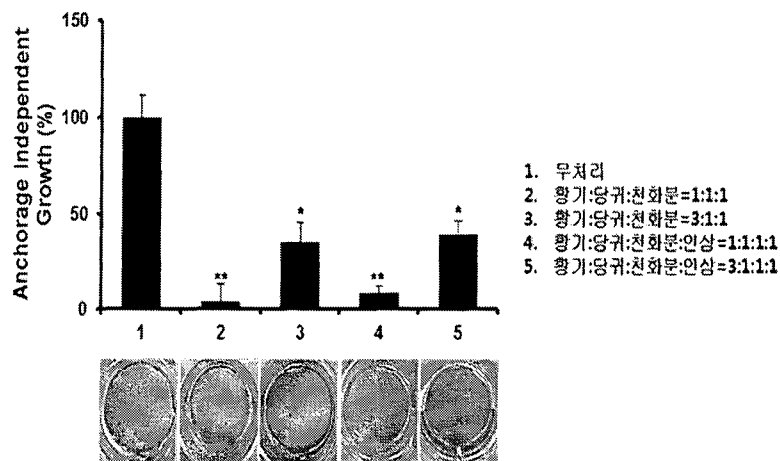
[Fig. 14]



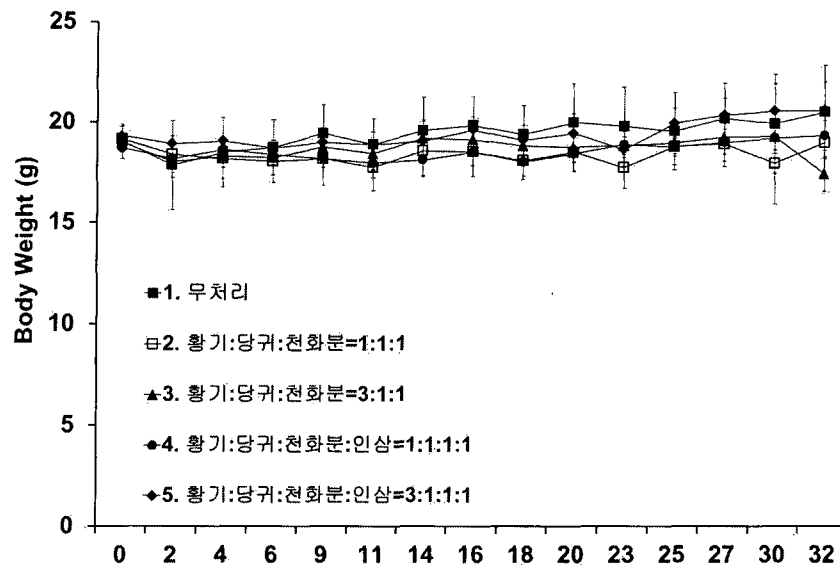
[Fig. 15]



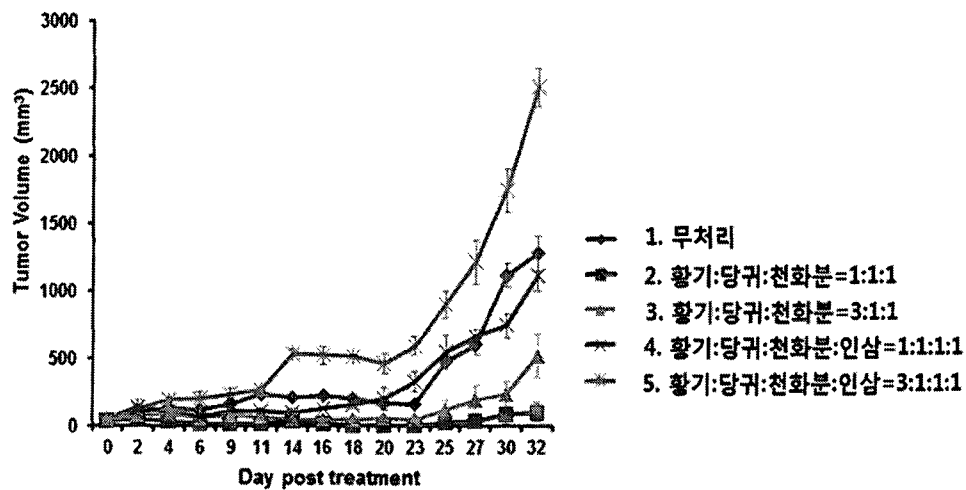
[Fig. 16]



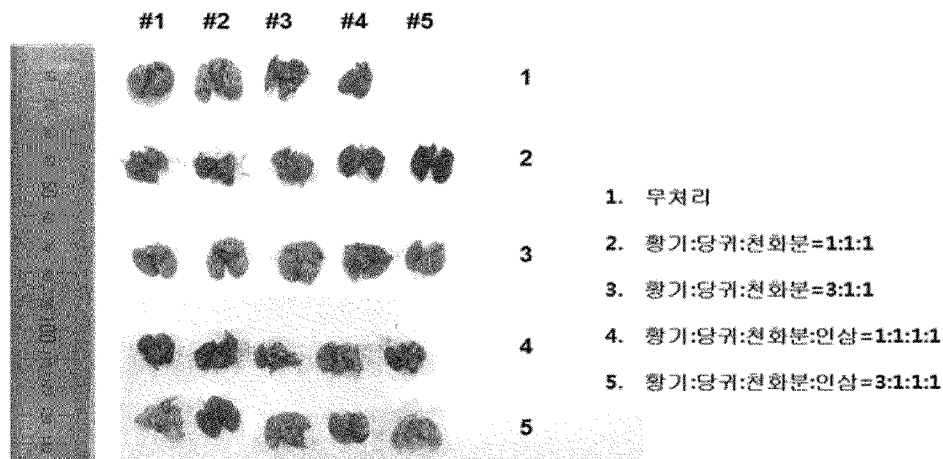
[Fig. 17]



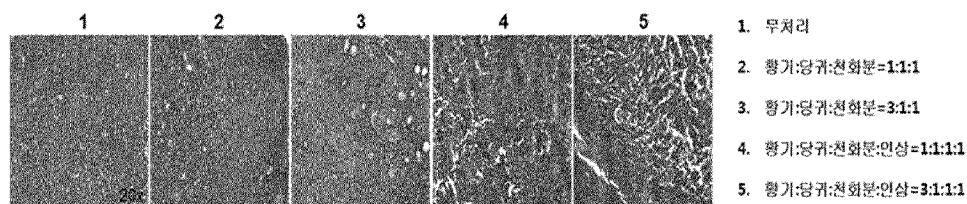
[Fig. 18]



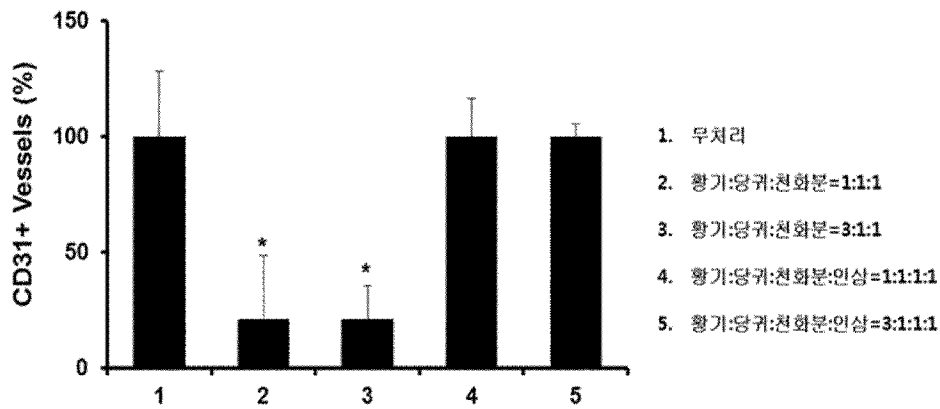
[Fig. 19]



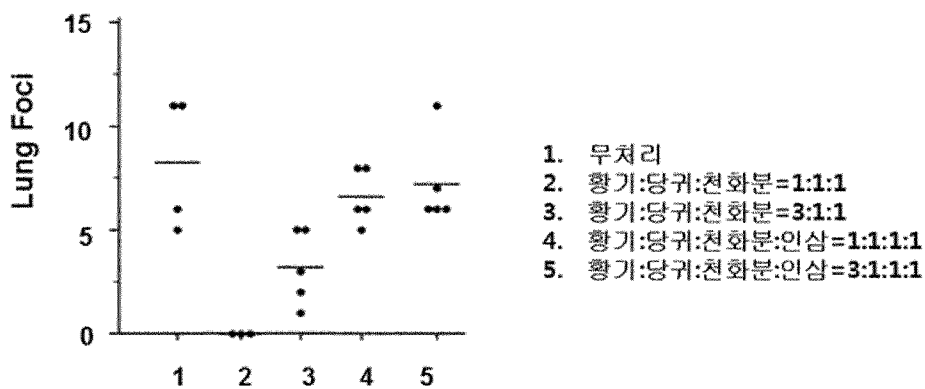
[Fig. 20]



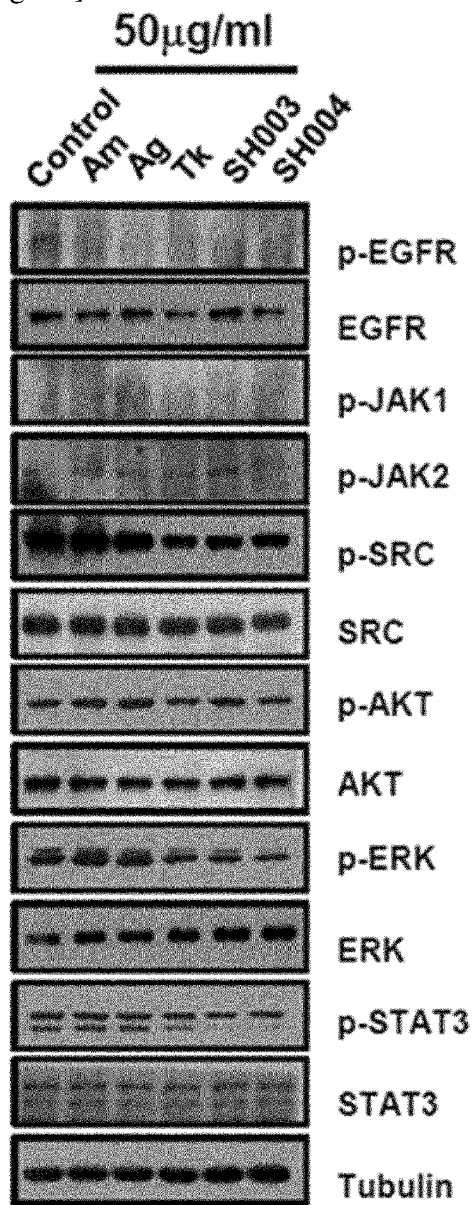
[Fig. 21]



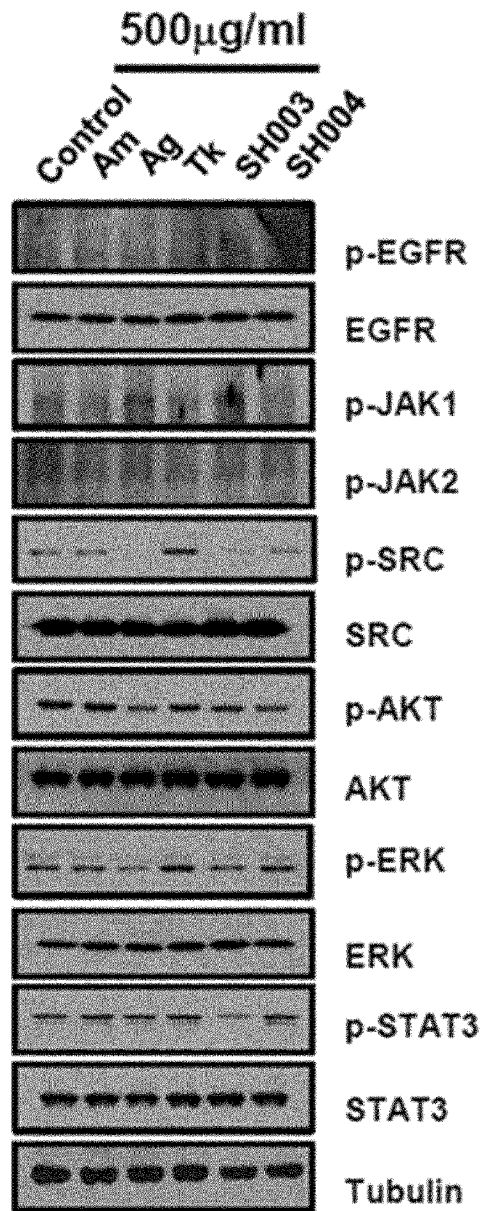
[Fig. 22]



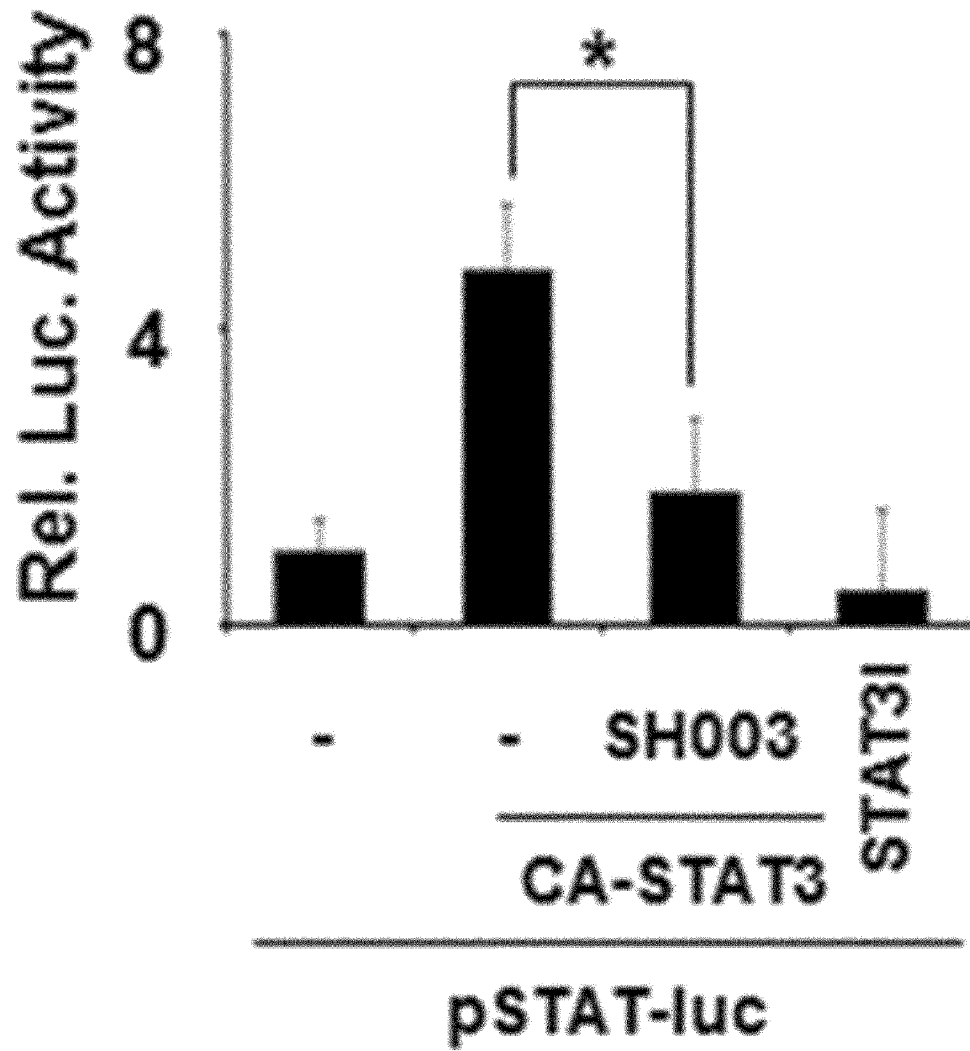
[Fig. 23]



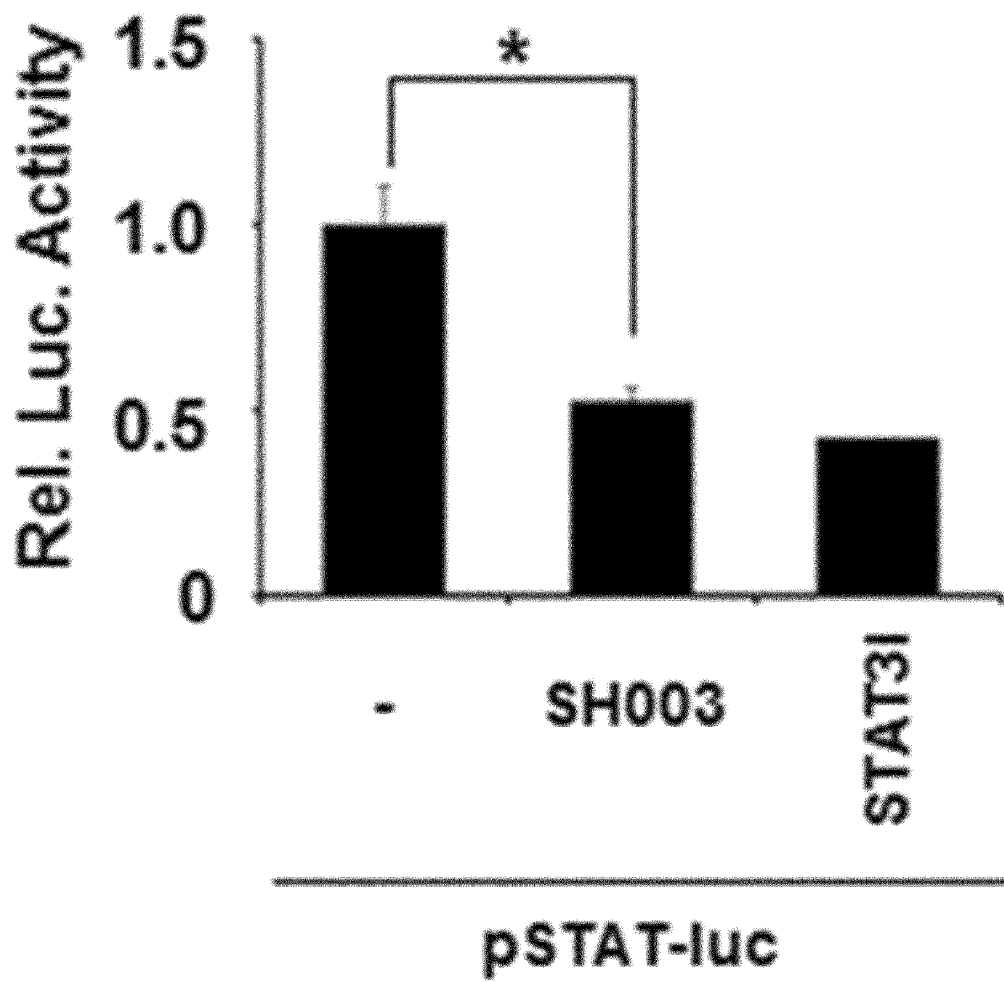
[Fig. 24]



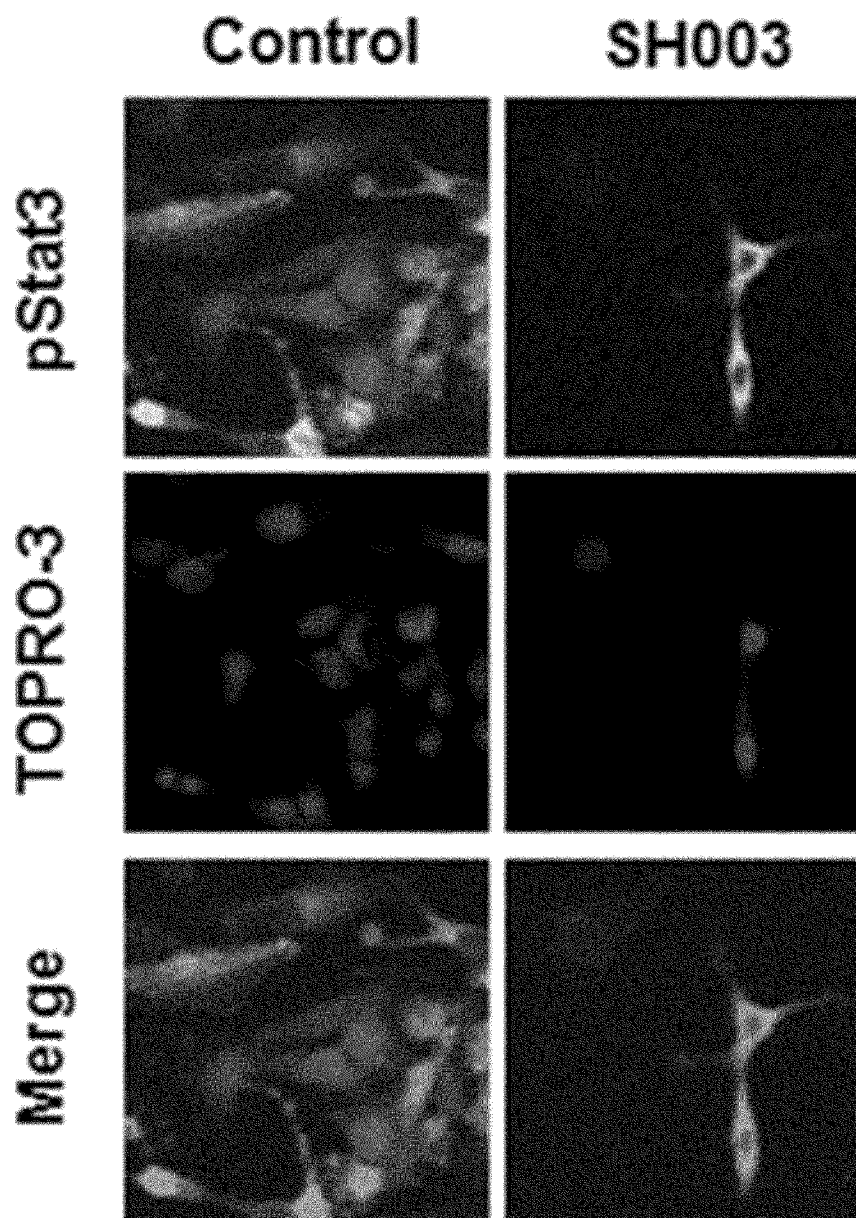
[Fig. 25]



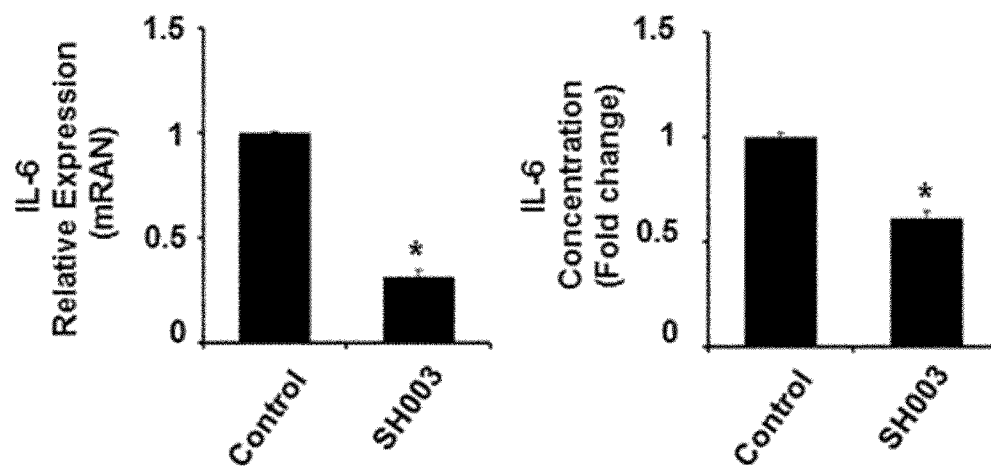
[Fig. 26]



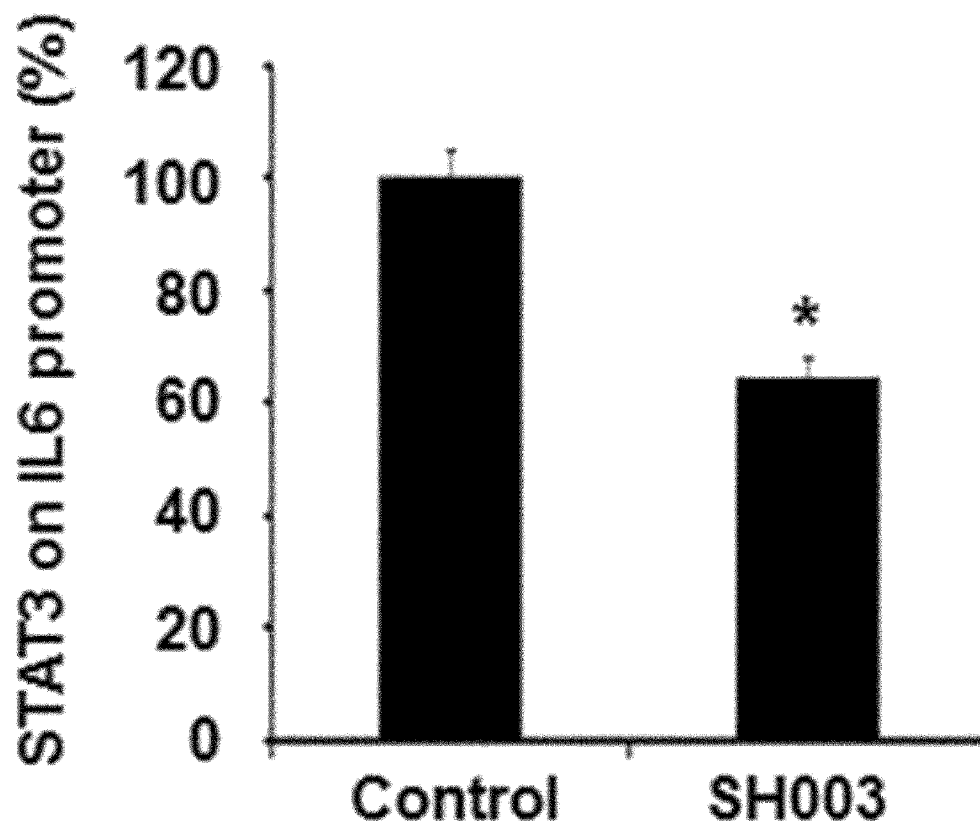
[Fig. 27]



[Fig. 28]



[Fig. 29]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005116**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 36/481(2006.01)i, A61K 36/232(2006.01)i, A61P 35/00(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 36/481; A61P 35/02; A61K 36/428; A61P 35/00; A61K 36/232; A61K 36/258; A61P 35/04

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), Google Scholarship Search & Keywords: Astragalus membranaceus, Angelica gigas, Trichosanthes kirilowii Maximowicz, ginseng, anti-cancer, Astragalus membranaceus, Angelica gigas, Trichosanthes kirilowii, anti-cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2013-0036800 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 15 April 2013 See abstract, page 2 and page 4, line 19; claims 1, 4.	1-15
Y	KR 10-2012-0122404 A (KOREA BIO MEDICAL SCIENCE INSTITUTE CO., LTD et al.) 07 November 2012 See claim 1.	1-15
Y	KR 10-0594353 B1 (MD BIOALPHA CO LTD) 03 July 2006 See claim 1.	5-9,12-13
A	See the entire document.	1-4,10-11,14-15
A	KR 10-2012-0124508 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 14 November 2012 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2011-0049967 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) 13 May 2011 See the entire document.	1-15
A	HEO BUK-GU et al., "Antiproliferative Activity of Korean Wild Vegetables on Different Human Tumor Cell Lines", Plant Foods Hum Nutr, 2009, vol. 64, pp. 257-263. See the entire document.	1-15



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

30 SEPTEMBER 2014 (30.09.2014)

Date of mailing of the international search report

30 SEPTEMBER 2014 (30.09.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0036800 A	15/04/2013	NONE	
KR 10-2012-0122404 A	07/11/2012	NONE	
KR 10-0594353 B1	03/07/2006	AU 2003-231394 A1	12/12/2003
		CA 2486915 A1	04/12/2003
		CA 2486915 C	08/03/2011
		CN 1842341 A	04/10/2006
		CN 1842341 A0	04/10/2006
		CN 1842341 B	08/09/2010
		EP 1507544 A1	23/02/2005
		EP 1507544 A4	18/07/2007
		JP 04861619 B2	25/01/2012
		JP 2005-531576 A	20/10/2005
		JP 2011-093928 A	12/05/2011
		KR 10-0594353 B1	03/07/2006
		KR 10-0605292 B1	12/04/2007
		KR 10-2003-0091665 A	03/12/2003
		KR 10-2003-0091760 A	03/12/2003
		KR 10-2005-0105435 A	04/11/2005
		KR 10-2005-0112071 A	29/11/2005
		US 07901716 B2	08/03/2011
		US 2006-0034951 A1	16/02/2006
		WO 2003-099308 A1	04/12/2003
		WO 2003-099309 A1	04/12/2003
KR 10-2012-0124508 A	14/11/2012	KR 10-1283562 B1	15/07/2013
KR 10-2011-0049967 A	13/05/2011	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/481(2006.01)i, A61K 36/232(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/481; A61P 35/02; A61K 36/428; A61P 35/00; A61K 36/232; A61K 36/258; A61P 35/04

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), 구글 학술검색 & 키워드: 황기, 당귀, 천화분, 인삼, 향암, Astragalus membranaceus, Angelica gigas, Trichosanthes kirilowii, anti-cancer

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2013-0036800 A (경희대학교 산학협력단) 2013.04.15 요약, 페이지 2 및 페이지 4, 라인 19; 청구항 1, 4 참조.	1-15
Y	KR 10-2012-0122404 A (주식회사한국전통의학연구소 외 2명) 2012.11.07 청구항 1 참조.	1-15
Y	KR 10-0594353 B1 (주식회사 엠디바이오알파) 2006.07.03 청구항 1 참조.	5-9,12-13
A	문헌 전체 참조.	1-4,10-11,14-15
A	KR 10-2012-0124508 A (경희대학교 산학협력단) 2012.11.14 문헌 전체 참조.	1-15
A	KR 10-2011-0049967 A (조선대학교산학협력단) 2011.05.13 문헌 전체 참조.	1-15
A	HEO BUK-GU 외 7명, `Antiproliferative Activity of Korean Wild Vegetables on Different Human Tumor Cell Lines`, Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64권, 페이지 2 57-263. 문헌 전체 참조.	1-15



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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 09월 30일 (30.09.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 09월 30일 (30.09.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

고일영

전화번호 +82-42-481-8286



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0036800 A	2013/04/15	없음	
KR 10-2012-0122404 A	2012/11/07	없음	
KR 10-0594353 B1	2006/07/03	AU 2003-231394 A1 CA 2486915 A1 CA 2486915 C CN 1842341 A CN 1842341 A0 CN 1842341 B EP 1507544 A1 EP 1507544 A4 JP 04861619 B2 JP 2005-531576 A JP 2011-093928 A KR 10-0594353 B1 KR 10-0605292 B1 KR 10-2003-0091665 A KR 10-2003-0091760 A KR 10-2005-0105435 A KR 10-2005-0112071 A US 07901716 B2 US 2006-0034951 A1 WO 2003-099308 A1 WO 2003-099309 A1	2003/12/12 2003/12/04 2011/03/08 2006/10/04 2006/10/04 2010/09/08 2005/02/23 2007/07/18 2012/01/25 2005/10/20 2011/05/12 2006/07/03 2007/04/12 2003/12/03 2003/12/03 2005/11/04 2005/11/29 2011/03/08 2006/02/16 2003/12/04 2003/12/04
KR 10-2012-0124508 A	2012/11/14	KR 10-1283562 B1	2013/07/15
KR 10-2011-0049967 A	2011/05/13	없음	