



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월29일
(11) 등록번호 10-1872950
(24) 등록일자 2018년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/78 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/30 (2006.01)
A61K 36/536 (2006.01) A61K 36/539 (2006.01)
A61K 36/752 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/78 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0042001

(22) 출원일자 2017년03월31일

심사청구일자 2017년03월31일

(56) 선행기술조사문헌

논문(Biomedicine & Pharmacotherapy 87, pp.
741-754, 2017.01.19*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

김형기

경기도 용인시 수지구 성북2로 126, 314동 1702
호(성북동, 성동마을 엘지빌리지3차)

전희영

인천광역시 부평구 경원대로 1269, 102동 1102호
(산곡동, 현대아파트)

박양호

서울특별시 서초구 방배로28길 63, 305호(방배동,
롯데캐슬포레스트)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 10 항

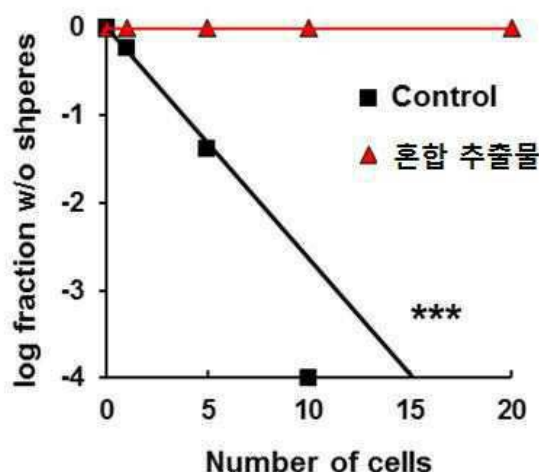
심사관 : 김범수

(54) 발명의 명칭 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 조성물

(57) 요약

본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 조성물 및 뇌종양 예방, 개선, 치료 또는 전이 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물은 뇌종양 줄기세포의 성장 억제 효과를 가지며, 특히 세포 주기상 세포 사멸과 관련된 G0 구간을 조절하여 뇌종양 줄기세포의 사멸을 촉진하는 우수한 효과를 가지는 바 뇌종양 전이 억제제, 치료제, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다. 더욱이 본 발명의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물은 기존의 항암제 및 암치료 방법과 함께 사용되어 우수한 뇌종양 예방, 치료 및 전이 억제 효과를 가지는 바 뇌종양 치료보조제로도 활용될 수 있다.

대표도 - 도6a



(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)

A61K 36/30 (2013.01)

A61K 36/536 (2013.01)

A61K 36/539 (2013.01)

A61K 36/752 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011077

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21_동물바이오신약장기개발

연구과제명 신경종양과 알츠하이머 유전자 발현 시스템과 핵치환용 형질전환 체세포주 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혼합 추출물은 물, C₁-C₄ 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 혼합 추출물은

- (1) 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 칭량하여 혼합물을 제조하는 단계; 및
- (2) 상기 혼합물을 물, C₁-C₄ 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출하는 단계;를 통해 수득되는 것인, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (1) 단계는 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 전체 혼합물 100 중량부에 대하여 각각 15~25 중량부, 15~25 중량부, 13~23 중량부, 13~23 중량부, 10~18 중량부 및 3~10 중량부로 칭량하여 혼합하는 것을 특징으로 하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 뇌종양은 역형성 성상세포종(anaplastic astrocytomas), 교모세포종(glioblastomas), 수막종(meningiomas), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 신경초종(schwannomas), 중추신경계 임파종(CNS lymphoma), 희소돌기아교세포종(oligodendrogliomas), 상의세포종(ependymomas), 저등급 성상세포종(low-grade astrocytomas), 수모세포종(medulloblastomas), 성상세포종 종양(astrocytic tumors), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic astrocytoma), 미만성 성상세포종(diffuse astrocytomas), 다형성 황색성상세포종(pleomorphic xanthoastrocytomas), 상의하 거대세포 성상세포종(subependymal giant cell astrocytomas), 역형성 희소돌기아교세포종(anaplastic oligodendrogliomas), 희소돌기성상세포종(oligoastrocytomas), 역형성 희소돌기성상세포종(anaplastic oligoastrocytomas), 점액성 유두상 상의세포종(myxopapillary ependymomas), 상의하세포종(subependymomas), 뇌실상의세포종(ependymomas), 역형성 뇌실상의세포종(anaplastic ependymomas), 아스트로블라스토마(astroblastomas), 제3뇌실의 척삭모양 신경아교종(chordoid gliomas of the third ventricle), 대뇌 신경교종증(gliomatosis cerebris), 글랜글리오사이토마스(gliangliocytomas), 결합조직생성 유아 성상세포종(desmoplastic infantile astrocytomas), 결합조직생성 유아신경절교종(desmoplastic infantile gangliogliomas), 태생기발육부전 신경상피종(dysembryoplastic neuroepithelial tumors), 중심성 신경세포종

(central neurocytomas), 소뇌지방신경세포종(cerebellar liponeurocytomas), 부신경절종(parangliomas), 상의모세포종(ependyoblastomas), 천막위 원시신경외배엽성 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 맥락막총 유두종(choroids plexus papilloma), 송과체세포종(pineocytomas), 피네오블라스토마(pineoblastomas), 중등도 분화형의 솔방울샘 실질 종양(pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation), 혈관주위세포종(hemangiopericytomas), 안장영역의 종양(tumors of the sellar region), 두개인두종(craniopharyngioma), 혈관모세포종(capillary hemangioblastoma), 및 일차성 중추신경계 임파종(primary CNS lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물.

청구항 6

삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학 조성물.

청구항 8

삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 개선 또는 전이 억제용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 치료 보조제.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 뇌종양 치료 보조제는 뇌수술, 방사선 치료법 및 화학치료법으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 뇌종양 치료법을 보조하는 것인, 뇌종양 치료 보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 조성물 및 뇌종양 예방, 개선, 치료 또는 전이 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 현재 전 세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로서, 암 발생 연령은 점차 낮아지고 있는 반면 평균 수명은 점차 연장되어가고 있어 암 발생률은 더욱 증가할 것으로 전망된다. 국립 암센터 (National Cancer Center)에서 제공하는 2013년 통계 자료에 따르면(국립 암센터, 통계로 본 암 현황(Cancer Facts & Figures 2013), p 18, 2013.), 2010년 암 등록 통계과에 등록된 우리나라 암 발생 환자는 모두 202,053 명이며, 2015년에는 약 27 만여 명에 달할 것으로 추정된다.

[0004] 암 중에서도 뇌종양은 두개골 내에 생기는 모든 종양을 지칭하는 것으로, 지난 30여년간 치료에 의한 생존율의

항상이 미미한 대표적 난치성 암으로서 방사선 치료와 다양한 항암제를 이용하여 항암 치료를 병행하는 치료법을 기본으로 하는 고형암과는 달리, 항암치료에 사용되는 항암제로 TMZ(temozolomide)만이 존재하여 그 치료법이 제한적이다. 이는 뇌에 혈액뇌관문(blood brain barrier; BBB)이 존재하여 분자 크기가 큰 항암제가 통과할 수 없어 일반적으로 적용되는 일반 고형암에서 적용되는 항암제를 뇌종양 치료에 곧바로 사용할 수 없기 때문이다.

[0005] 한편, 1997년 백혈병에서 암 줄기세포가 처음 분리된 이후, 유방암 줄기세포, 뇌종양 줄기세포, 결장암 줄기세포 등 암 줄기세포의 분리 및 동정에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 연구 결과, 암 줄기세포는 정상 줄기세포의 특징인 자가재생능, 다분화능, 세포증식능력과 함께 암세포의 특징인 염색체 및 유전자 변형, 종양 형성, 분화된 암세포의 생성 및 높은 항암제 저항성을 나타낸다고 보고되고 있다.

[0006] 또한, 암 줄기세포가 기존 항암제에 저항성이 있는 이유는 일반 암세포에 비해 세포손상복구 신호기전이 잘 구축되어 있고, 다양한 항암 효과를 가진 화학약품을 빠른 시간 내에 세포 밖으로 배출하는데 관여하는 ABC 공수송체 유전자의 기능이 활성화되어 있기 때문인 것으로 보고되고 있다.

[0007] 따라서, 기존의 항암치료방법으로 치료할 경우 암세포의 사멸에도 항암요법에 저항성을 보이는 암 줄기세포가 재발의 원인이 되어 근원적인 암 치료가 어려운 실정이다. 따라서 암 줄기세포를 표적하는 항암제 개발을 위하여 다양한 방향으로의 접근을 시도하고 있다. 이때 암 줄기세포의 변화 양상을 확인하기 위해서는 암 줄기세포를 다른 암세포나 일반 줄기세포와 구분할 수 있는 바이오마커를 예컨대 CD133(prominin-1 또는 AC133), CD44, NESTIN 등을 활용할 수 있다. 상기 CD44는 다양한 암에서 암 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 바이오마커이고, NESTIN은 신경상피 줄기세포에서 특이적으로 발견되는 신경줄기세포의 표지로 이용되는 바이오마커이다.

[0008] 따라서 본 발명자들은 암세포만을 표적하며 혈액뇌관문을 통과하여 뇌에서 작용할 수 없는 기존의 항암제의 한계를 넘어, 암세포의 재발과 전이를 막고 뇌종양을 근본적으로 치료하기 위하여 뇌종양 줄기세포를 표적하여 제거하는 항암제의 개발이 필요함을 인지하고 실험을 진행하던 중 천연물인 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물이 뇌종양 줄기세포를 특이적으로 억제하여 뇌종양의 예방, 치료 및 전이 억제 효과를 가짐을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 공개특허공보 제10-2016-0105616호

(특허문헌 0002) KR 공개특허공보 제10-2015-0136001호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 목적은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 개선, 치료 또는 전이 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 치료 보조제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0017] 또한, 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 개선 또는 전이 억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 치료 보조제를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물은 뇌종양 줄기세포의 성장 억제 효과를 가지며, 특히 세포 주기상 세포 사멸과 관계된 G0 구간을 조절하여 뇌종양 줄기세포의 사멸을 촉진하는 우수한 효과를 가지는 바 뇌종양 전이 억제제, 치료제, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다. 더욱이 본 발명의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물은 기존의 항암제 및 암치료 방법과 함께 사용되어 우수한 뇌종양 예방, 치료 및 전이 억제 효과를 가지는 바 뇌종양 치료보조제로도 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 MTS 분석을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 2는 세포 성장 관찰을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 세포 주기 분석을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 사멸 촉진 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 4는 사멸된 세포 분석을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 사멸 촉진 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다. 보다 구체적으로 도 4a는 PI 및 Annexin-V 염색을 수행한 결과를 나타내는 도이고, 도 4b는 상기 도 4a 결과에 따른 세포 사멸 비율을 그래프로 나타낸 도이다.
- 도 5는 줄기세포 마커의 발현 변화 분석을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포능 억제 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 6은 한계 희석 검정(limiting dilution assay)을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포능 억제 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다. 구체적으로 도 6a는 한계 희석 검정으로 생성된 튜머스피어의 수를 그래프로 나타낸 도이고, 도 6b는 실험 14일차에 관찰되는 튜머스피어의 외관을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 H&E 염색을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 개선 및 재발 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 8은 면역화학염색을 통해 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 개선 및 재발 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다. 구체적으로 도 8a는 면역화학염색을 통해 실험 조직을 촬영한 결과를 나타낸 도이고, 도 8b는 상기 도 8a에 의한 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, '삼백초'는 학명이 *Saururus chinensis* (Lour.) Baill.으로, 제주도와 지리산 일부지역에서 나는 다년생 초본 식물이다. 다 자라면 50~100 cm가 되며, 5~15 cm의 길이, 0.3~0.8 cm 폭의 긴 타원형의 잎이 어긋나게 나는 것이 특징이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, '황금'은 학명이 *Scutellaria baicalensis* Georgi인 풀밭에 자라는 식물로 바람직하게는 식물의 부위 중 뿌리만을 지칭한다. 한국, 중국, 몽골 및 시베리아 동부 등지에서 분포하며, 다 자라면 높이가

20~60 cm가 되는 것이 특징이다.

- [0028] 본 발명에 있어서, '하고초'는 학명이 *Prunella vulgaris* Linne으로, 바람직하게는 어린 잎(꽃이삭) 부위만을 지칭한다. 물이 잘 빠지고 반 그늘진 곳이나 양지쪽에서 잘 자라며, 우리나라 곳곳에 분포하고 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, '자근'은 지치(학명: *Lithospermum officinale* L. var. *erythrorhizon* Maxim.)의 건조된 뿌리를 지칭한다. 지치의 생약 뿌리는 다 자라면 10~15 cm까지 자라며 겉껍질은 짙은 자홍색을 띠고 벗겨지기 쉽다.
- [0030] 본 발명에 있어서, '청피'는 귤나무인 *Citrus unshiu* Markovich 또는 귤(橘) *Citrus reticulata* Blanco(운향과 Rutaceae)의 덜 익은 열매껍질을 지칭한다. 5~6월에 낙과를 수집하여 말린 것을 개청피라하고, 7~8월에 미성숙한 열매를 채취하여 그 열매껍질을 위에서부터 네 개로 가르고 밑에는 자르지 않은 채 그대로 둔 것을 사화청피라 하며, 상기 개청피는 비정품에 속한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, '쇠비름'은 학명이 *Portulaca oleracea* L.으로, 낮은 산과 들에서 자라는 1년생 초본이다. 다 자라면 약 30 cm까지 자라며, 열매는 타원형이고, 종자는 검은 빛 도는 원형이다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 추출물은 당업계에 공지된 추출, 분리 및 분획하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출, 분리 및 분획하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 다양한 추출 용매와 추출 방법에 따라 추출될 수 있다는 것이 특징이다. 특히 본 발명에서 정의된 '혼합 추출물'은 적절한 용매를 이용하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름의 혼합물의 추출 처리에 의해 얻어지는 것이며, 예를 들어 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함하며, 그 중에서도 극성용매 가용 추출물인 것이 바람직하다.
- [0033] 더욱이 상기 극성용매 가용 추출물은 물 또는 유기용매, 예를 들어 상기 용매로는 물, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등의 탄소수 1 내지 4의 알코올 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합한 것일 수 있고, 바람직하게는 물(water)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 보다 구체적으로 본 발명에 있어서, 상기 혼합 추출물은 (1) 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 칭량하여 혼합물을 만드는 단계; 및 (2) 상기 혼합물을 물, C1-C4 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출하는 단계;를 통해 수득되는 것, 즉 칭량된 천연물을 한 곳에 모아 한 번에 추출된 것이나, 이에 제한되는 것은 아니고 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 혼합하여 제조한 추출물로서 버종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸 효과를 나타내는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0035] 상기 (1) 단계는 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 전체 혼합물 100 중량부에 대하여 각각 15~25 중량부, 15~25 중량부, 13~23 중량부, 13~23 중량부, 10~18 중량부 및 3~10 중량부로 칭량하여 혼합하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 (1) 단계의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름의 칭량시 사용하는 부위로는 어린 잎, 잎, 줄기, 뿌리, 열매 등 어느 것을 사용하여도 좋으나, 바람직하게는 자체로 뿌리 부위를 지칭하는 자근과 껍질을 지칭하는 청피를 제외한 나머진 삼백초, 황금, 하고초는 각각 줄기, 뿌리, 어린잎을 사용하고, 쇠비름은 어린잎, 줄기 또는 이의 혼합부위를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 혼합 추출물의 추출 온도는 90~110 ℃인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 95~100 ℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 추출방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법이 사용될 수 있으며, 특히 열수추출법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0038] 상기와 같이 물 또는 유기용매를 이용하여 추출물을 얻은 이후에는 당업계에서 알려진 통상의 방법으로 상온에서 냉침, 가열 및 여과하여 액상물을 얻을 수 있으며, 또는 추가로 용매를 증발, 분무건조 또는 동결건조할 수도 있다. 아울러, 상기와 같이 추출된 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수도 있다.
- [0039] 또한 본 발명에 있어서, 상기 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획으로도 얻을 수 있다.

- [0040] 즉, 본 발명에서 사용되는 혼합 추출물은 추출 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출물 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이며, 이에 따라 추출된 상기 혼합 추출물은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 종합하여 제조한 추출물로 단독 천연물 추출물로부터 얻을 수 없는 현저한 시너지 효과, 특히 뇌종양 줄기세포 성장 억제 또는 사멸 효과를 얻을 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 본 발명에 있어서, '뇌종양'은 두개골 내에 생기는 모든 종양을 말하며, 뇌와 뇌 주변 구조물에서 발생하는 모든 종양을 포함한다. 뇌의 경우 혈액뇌장벽(BBB)이 존재하는 바, 뇌종양 치료제는 일반 고혈압에서 사용되는 치료제와 차이가 있으며, 치료 방법이 다양하지 않아 악성 뇌종양 발병 후 초기에 많은 환자가 사망하는 것으로 알려져 있다.
- [0042] 구체적으로 본 발명에 있어서, 상기 뇌종양은 역형성 성상세포종(anaplastic astrocytomas), 교모세포종(glioblastomas), 수막종(meningiomas), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 신경초종(schwannomas), 중추신경계 임파종(CNS lymphoma), 희소돌기아교세포종(oligodendrogliomas), 상의세포종(ependymomas), 저등급 성상세포종(low-grade astrocytomas), 수모세포종(medulloblastomas), 성상세포종 종양(astrocytic tumors), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic astrocytoma), 미만성 성상세포종(diffuse astrocytomas), 다형성 황색성상세포종(pleomorphic xanthoastrocytomas), 상의하 거대세포 성상세포종(subependymal giant cell astrocytomas), 역형성 희소돌기아교세포종(anaplastic oligodendrogliomas), 희소돌기성상세포종(oligoastrocytomas), 역형성 희소돌기성상세포종(anaplastic oligoastrocytomas), 점액성 유두상 상의세포종(myxopapillary ependymomas), 상의하세포종(subependymomas), 뇌실상의세포종(ependymomas), 역형성 뇌실상의세포종(anaplastic ependymomas), 아스트로블라스토마(astroblastomas), 제3뇌실의 척삭모양 신경아교종(chordoid gliomas of the third ventricle), 대뇌 신경교종증(gliomatosis cerebris), 글랜글리오사이토마스(gliangliocytomas), 결합조직생성 유아 성상세포종(desmoplastic infantile astrocytomas), 결합조직생성 유아신경절교종(desmoplastic infantile gangliogliomas), 태생기발육부전 신경상피종(dysembryoplastic neuroepithelial tumors), 중심성 신경세포종(central neurocytomas), 소뇌지방신경세포종(cerebellar liponeurocytomas), 부신신경절종(parangliomas), 상의모세포종(ependymblastomas), 천막위 원시신경외배엽성 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 맥락막총 유두종(choroids plexus papilloma), 송과체세포종(pineocytomas), 피네오블라스토마(pineoblastomas), 중등도 분화형의 솔방울샘 실질 종양(pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation), 혈관주위세포종(hemangiopericytomas), 안장영역의 종양(tumors of the sellar region), 두개인두종(craniopharyngioma), 혈관모세포종(capillary hemangioblastoma), 또는 일차성 중추신경계 임파종(primary CNS lymphoma)일 수 있으며, 바람직하게는 교모세포종(glioblastomas)이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 암 줄기세포의 일종인 '뇌종양 줄기세포'는 뇌종양의 성장 및 전이에 중요한 세포로, 미분화 상태를 유지하는 능력, 자기재생 및 분화능력을 통하여 종양의 발생시킨다. 아울러, 다른 집단과 구별되어 새로운 종양을 발생시키므로 암 내 소량으로 존재하나 암의 재발과 전이의 원인이 되므로, 뇌종양 치료의 핵심 표적이다. 본 발명은 정상 세포를 죽이지 않으면서, 뇌종양 줄기세포의 성장 억제 또는 사멸만을 특이적으로 촉진하기 위한 혼합 추출물에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성구산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 실제 임상 투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 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, 광물유 등이 있다.

- [0046] 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0047] 상기 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 비경구투여는 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0048] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0049] 용어 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 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 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서 사용되는 용어 '투여'는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 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.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 뇌종양 줄기세포의 억제 또는 사멸을 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0054] 또한, 일례로 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 줄기세포 성장 억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [0056] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 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 제조시에 본 발명의 조성물은 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.
- [0058] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 예로는 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계된 식품을 모두 포함한다.

- [0059] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 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.
- [0061] 또한, 일례로 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 치료 또는 전이 억제용 약학 조성물을 제공한다.
- [0062] 또 다른 예로 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 예방, 개선 또는 전이 억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0063] 또 다른 예로 본 발명은 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 치료 보조제를 제공한다.
- [0064] 본 발명에 있어서, '예방'은 조성물의 투여에 의해 뇌종양을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0065] 본 발명에 있어서, '개선'은 조성물의 투여에 의해 뇌종양에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0066] 본 발명에 있어서, '치료'는 조성물의 투여에 의해 뇌종양을 낮게 하는 행위를 모두 의미한다.
- [0067] 본 발명에 있어서, '전이'는 악성 종양인 뇌종양이 진행됨에 따라 뇌로부터 폐(lung)나 위(stomach)와 같은 다른 조직으로 퍼져나가는 상태를 지칭한다.
- [0068] 본 발명에 있어서, '뇌종양 치료 보조제'란 당업계에서 일반적으로 사용되는 뇌종양 치료법의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 혼합 추출물을 사용함으로써 함께 사용하는 뇌종양 치료법의 효과를 증진시킬 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 뇌종양 보조제와 함께 사용될 수 있는 뇌종양 치료법의 종류는 뇌수술, 방사선 치료법, 항암제를 이용한 화학치료법 등을 모두 포함하며, 상기에 개시한 치료법 중 2종 이상을 복합적으로 수행하는 치료법일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 뇌종양 치료법은 바람직하게는 동시화학방사선치료법(CCRT; concurrent chemoradiotherapy) 또는 뇌수술 및 CCRT의 복합 치료법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 아울러, 상기 뇌종양 치료법은 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 뇌종양 치료법 선택 시 고려하는 일반적인 원칙하에 선택될 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 본 발명의 혼합 추출물은 뇌종양 줄기세포를 특이적으로 타겟하여, 뇌종양을 예방, 개선, 치료하는 효과뿐만 아니라 우수한 뇌종양이 전이 또는 재발 억제하는 효과를 가지고 있다. 따라서, 본 발명의 혼합 추출물은 뇌종양의 예방, 개선, 치료 및 전이 억제 효과에 따른 뇌종양 치료제 등으로 활용할 수 있으며, 동시에 뇌종양 치료법의 항암 효과의 효율을 높이기 위한 항암 보조용 의약품으로도 다양하게 활용될 수 있다.
- [0073] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0075] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 실험예 및 제조예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예, 실험예 및 제조예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0077] **실시예 1. 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 제조**
- [0078] 식품공전 등에서 정하는 기준 및 규격에 적합한 원료만을 선별하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름을 하기 표 1에 개시한 비율로 혼합한 혼합 추출물을 제조하였다. 먼저 전자 저울을 이용하여 모든 원료를 배합 비율에 맞춰 칭량하였으며, 칭량을 마친 각 재료들을 혼합하여 광목천에 담아 추출기에 담았다. 이 후 8배수의 추출수를 투입하고, 95 내지 100 ℃의 온도로 10 내지 14시간 동안 추출하여 본 발명의 혼합 추출물을 제조하였다. 상기 제조된 혼합 추출물은 필터로 여과를 수행한 후 교반탱크로 이송하였으며, 농축기를 사용하여 10

브릭스(brix)의 당도가 되도록 농축하여 농축액으로 만들었다.

표 1

순번	재료	배합비율(중량%)	사용 부위
1	삼백초	21.13	줄기
2	황금	21.13	뿌리
3	하고초	18.3	어린잎
4	자근	18.3	뿌리
5	귤(청피)	14.09	열매껍질
6	쇠비름	7.05	어린잎, 줄기
합계	-	100	

실험예 1. 뇌종양 줄기세포주를 이용한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 우수한 뇌종양 줄기세포 성장 억제 및 사멸 효과 확인

1-1. 뇌종양 줄기세포주 및 정상성상세포주 배양

뇌종양 줄기세포주를 이용한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 우수한 뇌종양 줄기세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 뇌종양 환자 유래 줄기세포인 MD13 처리군을 실험군으로 하고, 정상 성상세포인 ASCR 처리군을 대조군으로 하여 실험을 수행하였다. 먼저, MD13은 당시 오하이오 주립대학 교수인 이치로 나카노 교수(Ichiro Nakano MD, PhD)로부터 공급받았으며, 이 후 1%의 항미생물제(apenicillin/streptomycin, Lonza, Basel, Switzerland), 0.04%의 B27(Invitrogen, MA, USA), 표피성장인자(epidermal growth factor, 20 ng/mL; R&D Systems, MN, USA) 및 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor, 20 ng/mL; R&D Systems)가 포함된 뉴로베이살 배지(neurobasal medium, Invitrogen, CA, USA) 배양액에서 37℃, 5% CO₂조건으로 배양하였다.

한편, ASCR은 국립암센터로부터 공급받았으며, 이 후 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum; Biotechnics Research, CA, USA), 1%의 항미생물제(apenicillin/streptomycin, Lonza, Basel, Switzerland) 및 2 mM의 L-글루타민(Lonza)이 포함된 돌베코의 수정 이글 배지(DMEM) 배양액에서 37℃, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 이때, MD13과 배양 조건을 맞추기 위하여 실험 수행 12시간 전에 ASCR을 MD13과 동일한 배양액에서 배양을 거친 후 실험을 수행하였다.

1-2. MTS 분석을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 성장 억제 효과 확인

MTS 분석을 통하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 줄기세포 세포 생존율 억제 능력 및 IC₅₀을 측정하였다. 상기 혼합 추출물은 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 건조시켜 분말 상태로 제조한 후 상기 분말을 PBS에 녹여 7 종류의 농도, 즉 0, 50, 100, 200, 300, 500 및 1000 µg/mL로 만든 것을 실험에 사용하였다.

먼저, 실험예 1-1에서 배양한 ASCR 및 MD13 세포를 96 웰 플레이트(SPL, Korea)에 웰 당 3,000 세포 농도가 되도록 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 후 상기 7종류의 농도의 혼합 추출물을 농도별로 처리하고, 3일 동안 배양하였다. 그리고 나서 상기 배양된 ASCR 및 MD13 세포에 Ez-Cytox 키트(DOGEN, Seoul, Korea)의 분석 시약을 웰 당 10 µL 씩 넣고 4시간 반응시킨 후, PowerWaveXS microplate-reader(Bio-Tek Instruments Inc., VT, USA) 기기를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다. 각 실험군 간의 유의한 발현량 차이는 two-tailed Student's t-test로 분석하였으며, 각 수치는 mean ± SEM으로 표현하였다.

도 1에 나타난 바와 같이, 정상 성상세포인 ASCR 세포에 대해서는 IC₅₀ 농도가 3884 µg/mL로, 1000 µg/mL 농도 이상의 혼합 추출물을 처리한 경우에 미약하게나마 세포 성장 억제 효과가 나타남을 확인하였다. 반면, 뇌종양 줄기세포인 MD13에 대해서는 IC₅₀ 농도는 594.9 µg/mL로, 보다 낮은 농도인 200 µg/mL 농도 이상의 혼합 추출물을 처리한 경우에도 우수한 세포 성장 억제 효과가 나타남을 확인하였다. 이는 본 발명의 혼합 추출물이 뇌종양 줄기세포에 대하여 특이적으로 우수한 세포 성장 억제 효과를 가짐을 나타낸다.

- [0091] 이하에서는 일반 세포에는 영향을 미치지 않고, 뇌종양 세포에 영향을 미치는 농도인 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 혼합 추출물을 이용하여 실험을 진행하였다.
- [0093] **1-3. 세포 성장 관찰을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 성장 억제 효과 확인**
- [0094] 실시간으로 세포 사진을 찍어 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 줄기세포 세포 생존율 억제 효과를 확인하였다.
- [0095] 구체적으로, 실험에 1-1에서 배양한 ASCR 및 MD13 세포를 96 웰 플레이트(SPL, Korea)에 웰 당 3,000 세포 농도가 되도록 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 후 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 동안 건조시켜 분말 상태로 제조한 후, 상기 분말을 PBS에 녹여 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 조절하고 이를 상기 세포에 처리한 후, Incucyte Zoom(Essen Instruments, MI, USA) 기기 안에서 72시간 동안 배양하였다. 배양하는 동안 2시간 간격으로 세포 사진을 촬영하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2의 스케일바는 300 μm 를 나타낸다.
- [0096] 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 정상세포인 ASCR에서는 세포수에 큰 변화 없이 정상적으로 세포가 성장하였음을 확인하였으나, 뇌종양 줄기세포인 MD13에서는 세포가 정상적으로 자라지 못하였는바, 이는 본 발명의 혼합 추출물에 의하여 세포의 성장이 억제됨을 나타낸다.
- [0098] **1-4. 세포 주기 분석을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 사멸 촉진 효과 확인**
- [0099] 세포 주기를 분석하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 줄기세포 세포 사멸 촉진 효과를 확인하였다. 먼저, 상기 실험예 1-1에서 배양한 MD13 세포를 웰 당 2.5×10^6 세포 농도가 되도록 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 건조시켜 분말 상태로 제조한 후, 상기 분말을 PBS에 녹여 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 조절하고 이를 상기 세포에 처리한 후, 72시간 동안 배양하였다. 이 후 0.25%의 트립신-EDTA를 이용하여 세포를 분리한 후 상기 세포를 120 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 침전시켰으며, 이를 차가운 PBS로 세척하였다. 다시 상기 세포를 120 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 분리하고 차가운 70% 에탄올로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 고정하였으며, 고정된 세포는 PBS로 세척하였다. 이 후 상기 세포에 PI(propidium iodide)와 RNaseA를 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 반응시켰으며, 반응된 세포에 대하여 형광이용세포분류기(fluorescence-activated cell sorting; FACS Verse, BD Bioscience)를 이용하여 세포 주기 분석을 수행하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다. 각 실험군 간의 유의한 발현량 차이는 two-tailed Student's t-test로 분석하였으며, 각 수치는 mean $\pm$ SEM으로 표현하였다. (P<0.001; ***)
- [0100] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 혼합 추출물을 처리하였을 때 유의적으로 세포 주기상 차이가 발생하는 구간은 G0, G1, S, G2/M기의 세포주기 구간 중 G0 구간임을 확인하였다. 세포주기의 G0 구간은 세포가 죽었을 때 증가하는 구간으로 상기 실험 결과는 본 발명의 혼합 추출물이 세포 주기 조절보다는 세포 사멸 조절과 관련이 있음을 나타낸다.
- [0102] **1-5. 사멸된 세포 분석을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포 사멸 촉진 효과 확인**
- [0103] 세포 염색, 즉 세포괴사 또는 사멸을 나타내는 PI 및 Annexin-V를 이용하여 사멸된 세포 분석을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 줄기세포 세포 사멸 촉진 효과를 확인하였다. 먼저, 상기 실험예 1-1에서 배양한 MD13 세포를 웰 당 2.5×10^6 세포 농도가 되도록 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 건조시켜 분말 상태로 제조한 후 상기 분말을 PBS에 녹여 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 조절하고 이를 상기 세포에 처리한 후, 72시간 동안 배양하였다. 이 후 0.25%의 트립신-EDTA를 이용하여 세포를 분리한 후 상기 세포를 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 침전시켰으며, 이를 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 그리고 나서 상기 세포에 염색제인 5 μL Annexin-V-FITC(BD Bioscience, MA, USA) 및 100 μL PI(BD Bioscience)를 넣고 상온에서 15분간 반응시킨 후, 반응된 세포에 대하여 형광이용세포분류기를 이용하여 형광 분석을 수행하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 각 실험군 간의 유의한 발현량 차이는 two-tailed Student's t-test로 분석하였으며, 각 수치는 mean $\pm$ SEM으로 표현하였다. (P<0.01; **)

[0104] 도 4a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 혼합 추출물을 처리하였을 때 세포 괴사를 나타내는 PI 양성 세포의 비율이 1.55%에서 4.87%로 증가함을 확인하였고, 세포사멸 초기단계에 있는 Annexin-V 양성 세포의 비율은 2.47%에서 4.79%로 증가, 세포사멸 말기 단계에 있는 Annexin-V 양성 및 PI 양성 세포의 비율은 5.35%에서 15.04%로 증가하는 것을 확인하였다.

[0105] 아울러 상기 도 4a값을 종합적으로 표현한 그래프를 나타내는 도 4b에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 혼합 추출물을 처리하였을 때 사멸하는 세포의 비율이 9.37%에서 24.7%로 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 혼합 추출물이 뇌종양 줄기세포의 사멸에 유의적인 효과를 가짐을 나타낸다.

[0107] **1-6. 줄기세포 마커의 발현 변화 분석을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포능 억제 효과 확인**

[0108] 정량적인 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 통한 줄기세포 마커인 CD44 및 NESTIN의 발현 변화 분석을 수행하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 줄기세포능 억제 효과를 확인하였다. 먼저, 상기 실험에 1-1에서 배양한 MD13 세포를 웰 당 2.5×10^6 세포 농도가 되도록 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 동안 건조시켜 분말 상태로 제조한 후 상기 분말을 PBS에 녹여 300 μ g/mL의 농도로 조절하고, 이를 매일(실험군 D300) 또는 72시간(실험군 T300)마다 상기 세포에 처리하는 것을 7일 동안 반복 수행하였다. 대조군에는 상기 혼합 추출물 대신 PBS를 처리하였다.

[0109] 이 후 qRT-PCR을 수행하기 위하여 상기 세포로부터 QIAzol 용해 시약(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 1 μ g의 RNA를 추출한 후 DNase 활성을 제거하였고, DNase 활성이 제거된 RNA에 RevertAid First Strand cDNA 합성키트(Thermo Scientific, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Premix Ex Taq and CFX096(Bio-Rad, CA, USA) 및 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다. 상기 결과값은 18S rRNA를 기준으로 정규화하였으며, 각 실험군 간의 유의한 발현량 차이는 two-tailed Student's t-test로 분석하고, 각 수치는 mean $\pm$ SEM으로 표현하였다. ($P < 0.01$; **)

표 2

유전자 이름	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
18S rRNA	CAGCCACCCGAGATTGAGCA	TAGTAGCGACGGGCGGTGTG
CD44	AGAAGGTGTGGGCAGAAGAA	AAATGCACCATTTCTGAGA
NESTIN	AGAGGGAGGACAAAGTCCCT	CACTTCCTCAGACTGCTCCA

[0111] 도 5에 나타난 바와 같이, D300 및 T300 실험군 모두에서 줄기세포를 나타내는 마커로 알려진 CD44 및 NESTIN의 발현 수치가 혼합 추출물에 의하여 유의적으로 감소함을 확인하였다. 이는 본 발명의 혼합 추출물이 줄기세포능을 감소시킴을 나타낸다.

[0113] **1-7. 한계 희석 검정(limiting dilution assay)을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 줄기세포능 억제 효과 확인**

[0114] 한계 희석 검정, 즉 튜머스피어(tumorsphere) 관찰을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 줄기세포능 억제 효과를 확인하였다. 먼저, 상기 실험에 1-1에서 배양한 MD13 세포를 웰 당 20개, 10개, 5개 및 2개가 들어가도록 96 웰 플레이트(SPL, Korea)에 넣고, 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 동안 건조시켜 분말 상태로 제조한 후 상기 분말을 PBS에 녹여 300 μ g/mL의 농도로 조절하고 이를 72시간마다 상기 세포에 처리하는 것을 14일 동안 반복 수행하였다. 이 때 대조군에는 상기 혼합 추출물 대신 PBS를 처리하였다. 그 결과 생성된 튜머스피어의 수를 세어 도 6a에 그래프로 나타내었고, 실험 14일차에 관찰되는 튜머스피어의 외관을 도 6b에 나타내었다. 각 실험군 간의 유의한 발현량 차이는 two-tailed Student's t-test로 분석하였으며, 각 수치는 mean $\pm$ SEM으로 표현하였다. ($P < 0.001$; ***) 한편, 상기 튜머스피어의 수를 통해 확인할 수 있는 줄기세포의 빈도를 ELDA(<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>)를 통해 계산하였다.

[0115] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 혼합 추출물을 처리하였을 때 줄기세포 성장에 의해 나타나는 튜머스피어가 쉽게 생성되지 않고, 실험 마지막 날인 14일차에는 튜머스피어가 생성되지 않았음을 확인하였다. 더욱이 ELDA를 통해 계산한 줄기세포의 빈도를 확인한 결과, 대조군에서는 3.71개 중 1개의 비율, 즉 약 0.27%의 빈도

로 뇌종양 줄기세포가 존재하였으나, 본 발명의 혼합 추출물을 처리한 경우 뇌종양 줄기세포의 빈도수가 0에 수렴함을 확인하였다. 이는 본 발명의 혼합 추출물이 뇌종양 줄기세포의 성장을 억제 또는 이를 사멸시켜, 줄기세포능을 억제함을 나타낸다.

[0116]

실험예 2. 뇌종양 모델 마우스를 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 개선 및 재발 효과 확인

[0118]

2-1. 생존률 관찰을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 개선 및 재발 방지 효과 확인

[0119]

2-1-1. 뇌종양 모델 마우스 확립

[0120]

림폰과 졸레틸을 이용하여 4주령 암컷 BALB/C nu/nu 면역결핍 마우스(㈜ 오리엔트바이오 사)를 마취시켰다. 마취된 마우스를 움직이지 못하도록 수술 기계에 고정시키고, 이 후 브레그마를 기준으로 오른쪽으로 2 mm, 앞으로 0.5 mm, 깊이 3 mm 위치에 드릴을 이용하여 구멍을 뚫고, 주사기를 이용하여 MD13 3 μ L를 주입하였다. 상기 주입한 MD13은 PBS를 이용하여 상기 실험예 1-1에서 배양한 MD13 세포를 100 개/3 μ L 비율로 희석한 것을 사용하였다. 상기 일련의 과정을 통하여 제조한 총 24마리의 뇌종양 모델 마우스를 확립하였다.

[0122]

2-1-2. 생존률 관찰을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 개선 및 재발 방지 효과 확인

[0123]

생존률 관찰을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 개선 및 재발 방지 효과를 확인하였고, 이를 위해 상기 실험예 2-1-1을 통해 구축한 총 24 마리의 뇌종양 모델 마우스를 i) 상기 혼합 추출물 처리군 5마리, ii) 동시화학방사선치료(concurrent chemoradiotherapy; CCRT) 처리군 6마리, iii) 상기 혼합 추출물 및 동시화학방사선치료(CCRT-혼합 추출물) 처리군 6마리, iv) PBS 처리한 대조군(control) 7마리를 총 4개의 군으로 나누어 실험을 수행하였다.

[0124]

구체적으로 혼합 추출물 처리군에 대해서는, 실시예 1에서 제조한 농축액을 동결건조기에 넣어 48시간 건조시켜 분말 상태로 제조한 후 상기 분말을 PBS에 녹여 1 g/mL의 농도로 제조한 혼합 추출물을 사용하였으며, 이를 뇌종양 모델 마우스에 매일 100 μ L씩 구강 투여하였다. 한편, 동시화학방사선치료 처리군은 BL 437C(CIS Bio-International, Codolet, France) 기기를 이용하여 뇌종양 모델 마우스를 2 Gy씩 방사선에 노출시키고 항암제(Temozolomide, 10 mg/kg, Sigma)를 섞어 구강투여하는 방식으로 실험을 수행하였으며, 이를 실험예 2-1-1의 MD13을 주입하여 확립한 뇌종양 모델 마우스에 상기 MD13을 주입한 후 10일부터 하루에 1회씩 4일 동안 반복 수행하였다. 각 실험군 간의 유의한 발현량 차이는 two-tailed Student's t-test로 분석하였으며, 각 수치는 mean $\pm$ SEM으로 표현하였다. ($P < 0.01$; **)

[0125]

실험 결과, 대조군(생존시간 21.714일)에 비하여 본 발명의 혼합 추출물 처리(생존시간 24일)에 의해 생존시간이 다소 증가한 것을 확인하였고, 동시에 상기 혼합 추출물 처리와 함께 동시화학방사선치료(생존시간 38.833일)를 수행하는 경우 생존시간이 현저하게 증가함을 확인하였다. 특히 55일간의 실험 동안, 일정 기간 경과 후 모든 실험 마우스가 죽은 것과 달리, 혼합 추출물 처리 및 동시화학방사선치료를 수행하는 경우 일정 기간이 경과하여도 대부분의 실험 마우스가 생존함을 확인하였다. 이는 본 발명의 혼합 추출물이 뇌종양 개선 효과를 가짐과 동시에, 다른 뇌종양 치료 방법과 함께 사용되어 현저한 뇌종양 개선 및 재발 방지 효과를 가짐을 나타낸다.

[0127]

2-2. H&E 염색을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 개선 및 재발 효과 확인

[0128]

뇌종양 모델 마우스의 조직 내 H&E 염색을 통하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 개선 및 재발 효과, 특히 뇌종양 크기 변화를 통한 뇌종양 개선 및 재발 효과를 확인하였다. 구체적으로, 상기 실험예 2-1-2의 뇌종양 모델 마우스의 뇌를 적출하고, 4%의 파라포름알데하이드를 이용하여 상기 뇌를 고정하여 파라핀 블록을 만든 후 4 μ m 두께로 잘랐으며, 이를 슬라이드 글라스에 붙여 염색을 진행하였다. 염색은 자일렌 및 에탄올을 이용하여 상기 파라핀 블록을 충분히 수화시킨 후 수행하였으며, 이 후의 염색 과정은 이 기술 분야에서 통상적으로 행해지는 방식으로 수행하였다. 상기 방식을 통해 염색이 완료된 조직은 자일렌을 이용하여 마운팅시켰고, 마운팅된 조직은 Epifluorescence and Brightfield 현미경(Axiomager M1, Carl Zeiss, MA, USA)을 이용하여 관찰한 후, 촬영하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다. 도

7의 스케일바는 500 μm 를 나타낸다.

[0129] 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 본 발명의 혼합 추출물 처리에 의해 뇌종양 크기가 감소한 것을 확인하였고, 동시에 상기 혼합 추출물 처리에 동시화학방사선치료를 수행하는 경우 현저하게 뇌종양 크기가 감소한 것을 확인하였다. 아울러, 상기 실험에 2-1-2에서 혼합 추출물 처리와 동시화학방사선치료를 동시에 수행한 실험군 중 51일차에도 살아남은 마우스에 대하여 수행한 H&E 조직 염색 결과, 뇌종양이 존재하지 않음을 확인하였다. 이는 상기 실험에 2-1-2과 함께 본 발명의 혼합 추출물이 뇌종양 개선 효과를 가짐과 동시에, 다른 뇌종양 치료 방법과 함께 사용되어 현저한 뇌종양 개선 및 재발 방지 효과를 가짐을 나타낸다.

[0131] **2-3. 면역화학염색을 통한 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물의 뇌종양 개선 및 재발 효과 확인**

[0132] 뇌종양 모델 마우스의 조직 내 면역화학염색을 통하여 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물에 의한 뇌종양 개선 및 재발 효과, 특히 뇌종양 특이적 마커의 발현 변화를 통한 뇌종양 개선 및 재발 효과를 확인하였다.

[0133] 구체적으로, 상기 실험에 2-1-2의 뇌종양 모델 마우스의 뇌를 적출하고, 4%의 파라포름알데하이드를 이용하여 상기 뇌를 고정하여 파라핀 블록을 만든 후 4 μm 두께로 잘랐으며, 이를 슬라이드 글라스에 붙여 염색을 진행하였다. 염색은 자일렌 및 에탄올을 이용하여 상기 파라핀 블록을 충분히 수화시킨 후 수행하였으며, 이 후의 염색 과정은 이 기술 분야에서 통상적으로 행해지는 방식으로 수행하였으며, 실험에 사용한 1차 항체 및 2차 항체는 하기 표 3에 나타내었다. 상기 방식을 통해 염색이 완료된 조직은 자일렌을 이용하여 마운팅시켰고, 마운팅된 조직은 Epifluorescence and Brightfield 현미경(Axioimager M1, Carl Zeiss, MA, USA)을 이용하여 관찰한 후, 촬영하였으며, 이는 도 8a에 나타내었다. 아울러, 상기 촬영한 이미지는 MetaMorph 소프트웨어(Molecular Devices, CA, USA)를 통하여 정량화하였으며, 이는 도 8b에 나타내었다. 도 8a의 스케일바는 50 μm 를 나타낸다.

표 3

종류	이름	특징	출처
1차 항체	KI67	세포성장 마커	NCL-Ki67p, Leica Biosystems, UK
	cleaved Caspase 3	세포사멸 마커	9661, Cell Signaling, MA, USA
	CD15	줄기세포 마커	559045, BD Biosciences, CA, USA
	CD44	줄기세포 마커	sc-7297, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
2차 항체	biotin이 결합된 항체		Vector Laboratories, CA, USA

[0135] 도 8에 나타난 바와 같이, 뇌종양 모델 마우스에 본 발명의 혼합 추출물 단독 또는 복합 처리군에서 세포 성장 마커인 KI67은 발현은 감소하고, 세포 사멸 마커인 cleaved CASP3의 발현이 증가함을 확인하였다. 한편, 대조군인 PBS 처리군 및 내적 대조군인 동시화학방사선치료 처리군의 경우와 달리, 본 발명의 혼합 추출물을 단독 또는 복합으로 처리한 실험군에서 줄기세포 마커가 현저하게 감소함을 확인하였다. 더욱이 동시화학방사선치료 처리군에서 뇌종양이 재발한 경우에는 오히려 PBS 처리군에 비하여 C44 및 CD15의 발현이 보다 증가하였음을 확인하였다. 상기와 같은 실험 결과는 본 발명의 혼합 추출물은 뇌종양 개선 효과를 가지고 있으며, 특히 이는 뇌종양의 억제, 재발 등과 관련이 있는 뇌종양 줄기세포의 성장 억제 및 사멸 촉진 효과에 의한 것임을 나타낸다.

[0137] 상기 모든 생체 내(*in vivo*) 실험은 고려대학교의 표준 프로토콜에 따라 진행되었으며, 해당 실험 절차들은 고려대학교의 기관감사위원회에 따라 진행되었다.

[0139] 종합적으로, 본 발명의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물은 뇌종양 줄기세포의 성장 억제 효과를 가지며, 특히 세포 주기상 세포 사멸과 관계된 G0 구간을 조절하여 뇌종양 줄기세포의 사멸을 촉진 효과를 가지는 바 뇌종양 전이 억제제, 치료제, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다. 더욱이 본 발명의 삼백초, 황금, 하고초, 자근, 청피 및 쇠비름 혼합 추출물은 기존의 항암제 및 암치료 방법과 함께 사용되어 우수한 뇌종양 예방, 치료 및 전이 억제 효과를 가지는 바 뇌종양 치료보조제로도 활용될 수 있다.

[0141] 이하 본 발명의 혼합 추출물을 포함하는 약학 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아니고 단지 이를 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0143] 제제예 1. 약학적 제제의 제조

[0144] 1. 산제의 제조

[0145]	혼합 추출물	20 mg
[0146]	유당	100 mg
[0147]	탈크	10 mg

[0148] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조할 수 있다.

[0150] 2. 정제의 제조

[0151]	혼합 추출물	10 mg
[0152]	옥수수전분	100 mg
[0153]	유당	100 mg
[0154]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0155] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조할 수 있다.

[0157] 3. 캡슐제의 제조

[0158]	혼합 추출물	10 mg
[0159]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0160]	락토오스	14.8 mg
[0161]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0162] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조할 수 있다.

[0164] 4. 주사제의 제조

[0165]	혼합 추출물	10 mg
[0166]	만니톨	180 mg
[0167]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0168]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg

[0169] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조할 수 있다.

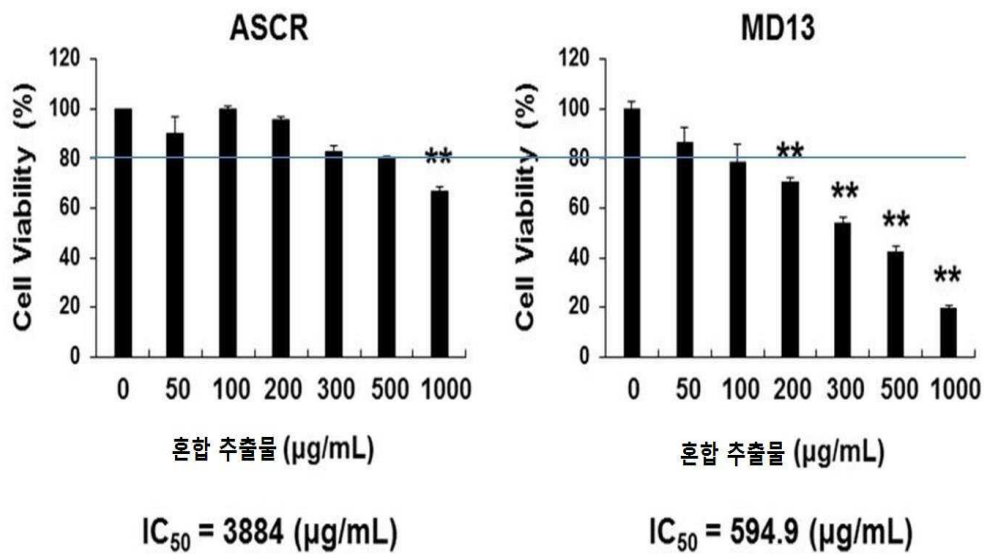
[0171] 5. 액제의 제조

[0172]	혼합 추출물	20 mg
[0173]	이성화당	10 g
[0174]	만니톨	5 g
[0175]	정제수	적량

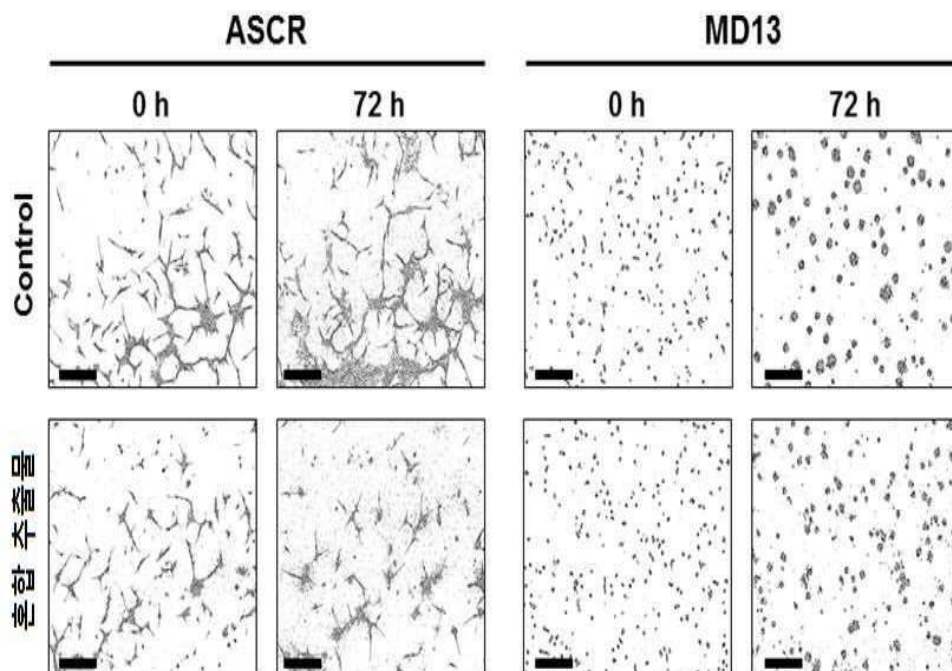
[0176] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 다시 정제수를 가한다. 전체를 정제수로 가한 액제의 약을 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 최종적으로 액제를 제조할 수 있다.

도면

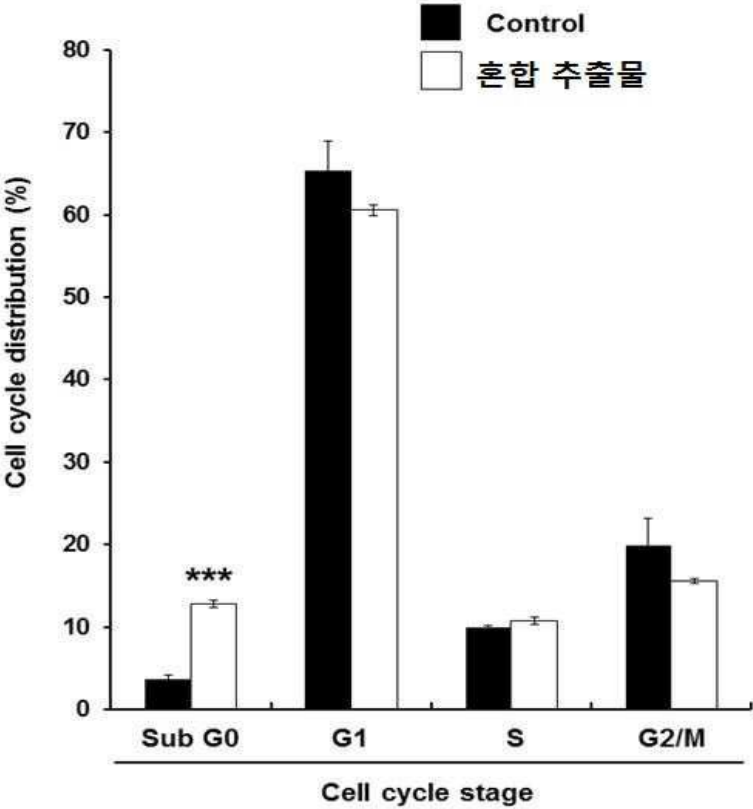
도면1



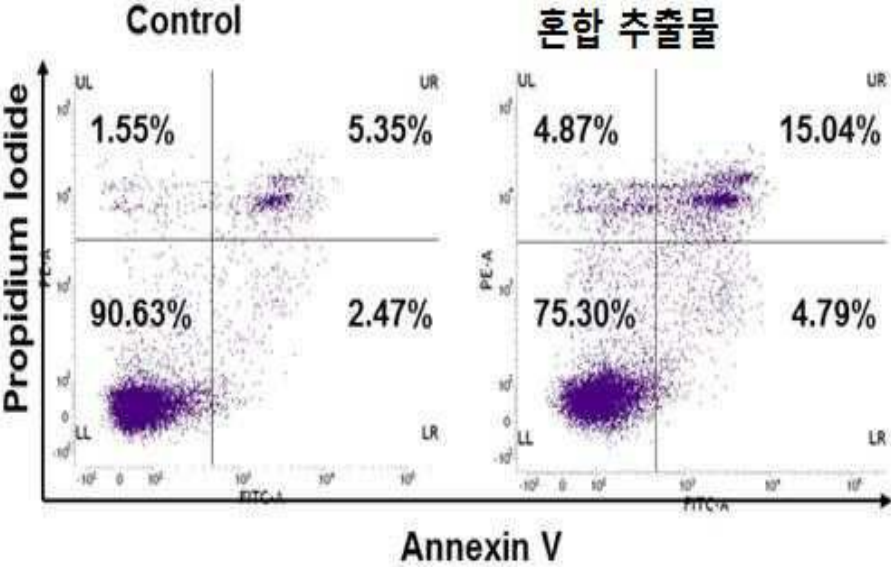
도면2



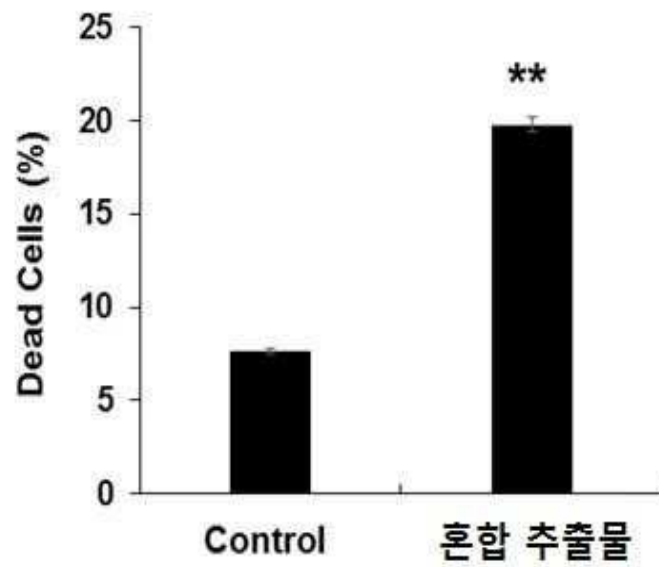
도면3



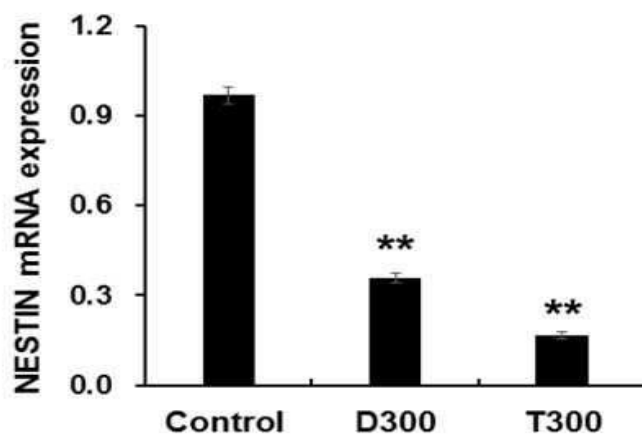
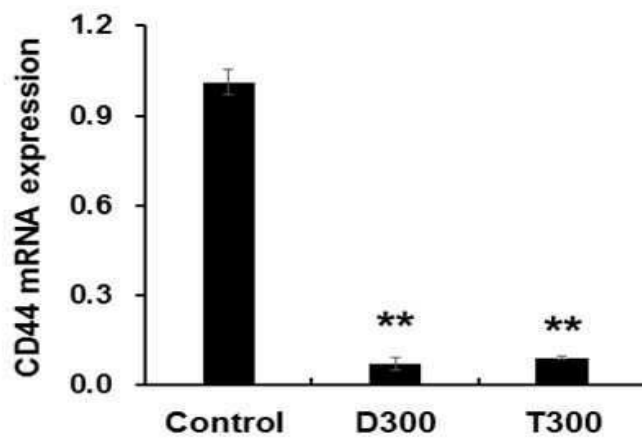
도면4a



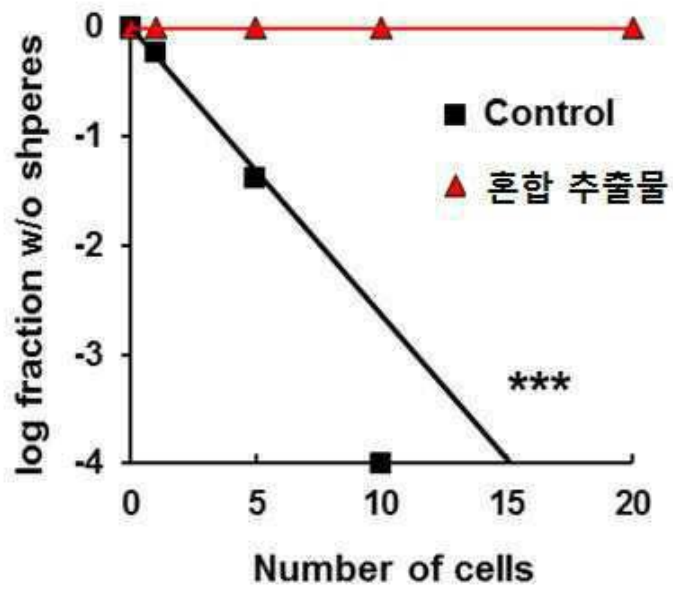
도면4b



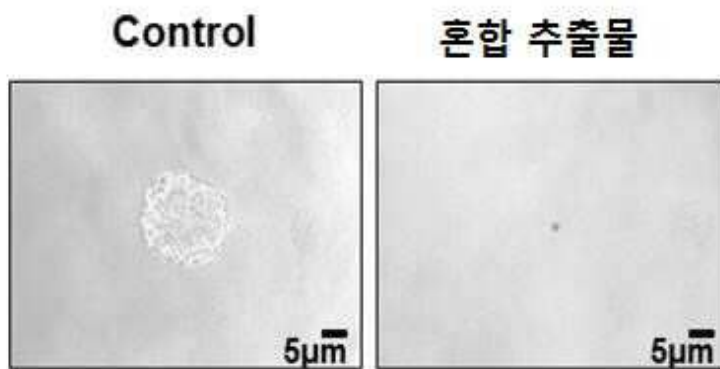
도면5



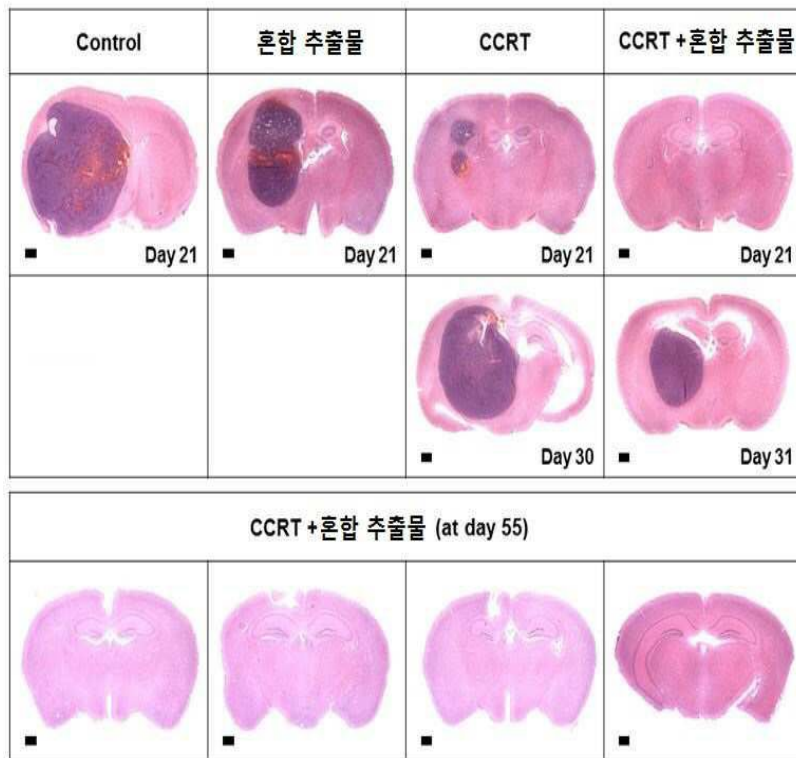
도면6a



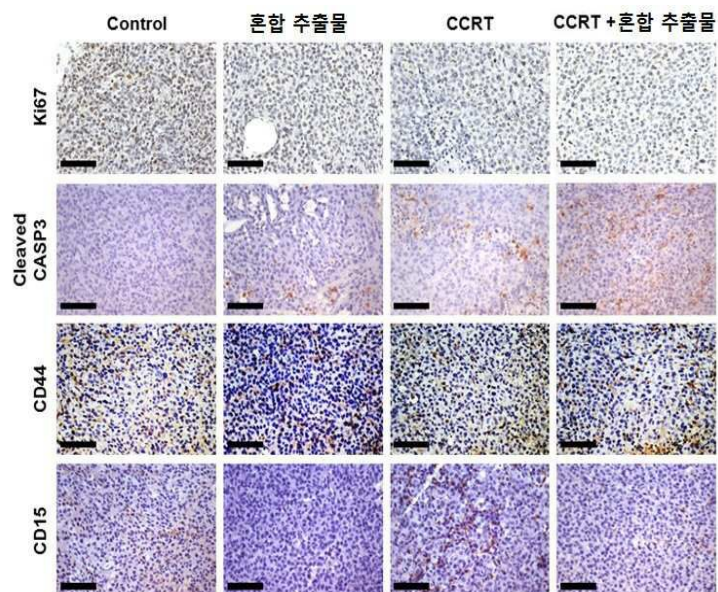
도면6b



도면7



도면8a



도면8b

