



(51) 국제특허분류:

A61K 36/84 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2016/012643

(22) 국제출원일:

2016년 11월 4일 (04.11.2016)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0146477 2016년 11월 4일 (04.11.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사한국전통의학연구소 (KOREA BIO MEDICAL SCIENCE INSTITUTE CO., LTD) [KR/KR]; 36618 경상북도 안동시 풍산읍 산업단지2길 5, 2층, Gyeongsangbuk-do (KR). 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222 (반포동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 황성연 (HWANG, Sung-Yeoun); 21684 인천시 남동구 아람대로1503번길 21, 1001-601 (논현동, 에코메트로10단지한화꿈에그린아파트), Incheon (KR). 윤승규 (YOON, Seung-Kew); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 20동 1105호 (서초동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 김정

희 (KIM, Jung-Hee); 06511 서울시 서초구 잠원로 37-48 204동 1102호 (잠원동, 신반포 한신 아파트), Seoul (KR).

(74) 대리인: 두호특허법인 (DOOHO IP LAW FIRM); 06628 서울시 서초구 강남대로 51길 1, 7층 (서초동, 대현블루타워), 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, DJ, 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, 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.

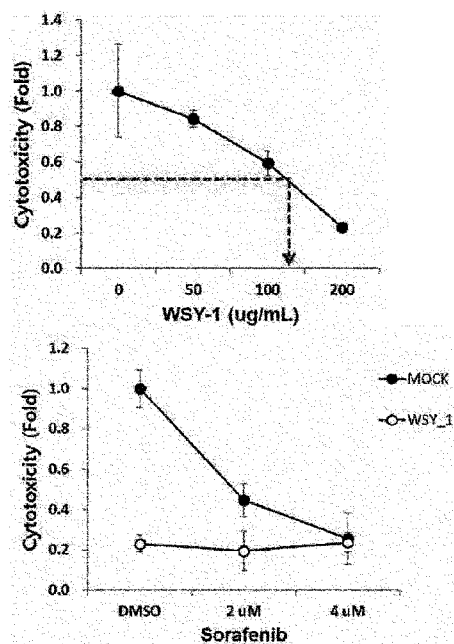
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF LIVER CANCER AND HEALTH FUNCTIONAL FOOD

(54) 발명의 명칭: 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for prevention or treatment of liver cancer and a health functional food and, specifically, to a pharmaceutical composition for prevention or treatment of liver cancer and a health functional food, wherein the pharmaceutical composition and the health functional food are capable of exhibiting an anticancer effect on liver cancer or liver cancer having antibiotic resistance by comprising an extract of *Nardostachys jatamansi*.

(57) 요약서: 본 발명은 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 감송향 추출물을 포함함으로써, 간암 또는 항생제에 내성을 갖는 간암에 항암 효과를 나타낼 수 있는, 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품

기술분야

- [1] 본 발명은 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 국내 사망률 1위에 해당하는 질병으로 2009년 통계청 자료에 따르면 한국 전체 사망자의 3대 사망 원인은 암, 뇌혈관 질환, 심장 질환으로 전체 사망원인의 약 50%를 차지 할 정도로 암으로 인한 죽음은 사회적으로 심각한 문제가 되고 있다. 또한, OECD 국가 중 우리나라는 간암 발생률 1위로서 2011년 전체 사망자 중 27.8%가 암으로 사망하였고 이중 폐암은 22.2%로 1위, 간암은 15.3%로 2위를 기록하였다. 최근 간암에 대한 치료법(간 절제술, 간이식 및 항암요법 등)이 괄목할만하게 발전하고 있음에도 불구하고 간암의 5년 생존율은 췌장암, 폐암에 이어 세 번째로 낮은 것으로 보고되고 있고, 상대 생존율 변화를 보면 26.7%의 증가 추세를 보이고 있지만 수술 후 5년 내 재발률이 70% 이상으로 보고되고 있어 난치성 암으로 분류되고 있다.
- [3] 초기 간암의 경우 절제술이 최선의 치료법으로 사용되고 있으며, 간암(nodule 3개 이하 3 cm 이하)의 경우에는 stage에 따라 초기에는 간이식을 하고 중기에는 경동맥 화학 색전술(transarterial chemoembolization, TACE)이 사용되고 있으며 말기에는 전신 항암 요법이 간암의 치료법으로 사용되고 있다.
- [4] 경동맥 화학 색전술에 실패 하거나, vascular invasion이 있는 경우 전신 항암 요법을 사용하게 되는데 현재 소라페닙(Sorafenib) (Nexaba)이 유일하게 사용되고 있다. 소라페닙은 multikinase inhibitor로서 경구 투여 하였을 때, 위약 복용군에 비하여 약 3개월 정도 밖에 생명을 연장시키지 못하는 것으로 알려져 있으며 주된 부작용으로는 설사, 피로, 체감소, 수족 증후군이 나타나는 것으로 보고됨. 소라페닙은 임상 2상에서 137명의 환자 중 약 5% 이하에서만 부분적인 반응을 보였으며, 최근에는 소라페닙에 대한 내성 환자 또한 보고되면서 간암의 치료에 있어서 소라페닙을 대체하거나 소라페닙 내성을 억제해줄 보조적인 약물 혹은 간암에서 다방면으로 활용 가능한 효과적이고 새로운 약물이 절실히 필요한 실정이다.
- [5] 한편, 감송향(Nardostachys jatamansi, NJ)은 위통, 위장경련, 흉복장만, 신경성 위장병, 구토, 두통, 각기 등에 사용되고, 강장제, 자극제 및 항경련제로 광범위하게 사용되었을 뿐 아니라, 간질, 병적 흥분, 심계 항진 및 경련을 치료하는데도 사용되어 왔다. 그러나, 감송향이 간암 치료 효과를 갖는다는 보고는 아직까지 없다.

- [6] 본 발명자들은 감송향에 대한 생약 연구를 하던 중, 감송향 추출물이 간암 치료에 효과를 갖는다는 것을 최초로 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 간암 치료 및 예방 효과를 갖는 조성물 및 건강기능식품의 제공을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [8] 1. 감송향 추출물을 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물.
[9] 2. 위 1에 있어서, 상기 간암은 소라페닙(sorafenib)에 내성이 있는 간암인, 조성물.
[10] 3. 위 1에 있어서, 상기 감송향 추출물은 유기용매 추출물 또는 열수 추출물인, 조성물.
[11] 4. 위 1에 있어서, 상기 감송향 추출물은 에탄올 추출물인, 조성물.
[12] 5. 감송향 추출물을 포함하는 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
[13] 6. 위 5에 있어서, 상기 간암은 소라페닙에 내성이 있는 간암인, 건강기능식품.
[14] 7. 위 5에 있어서, 상기 감송향 추출물은 유기용매 추출물 또는 열수 추출물인, 조성물.
[15] 8. 위 5에 있어서, 상기 감송향 추출물은 에탄올 추출물인, 조성물.

발명의 효과

- [16] 본 발명의 감송향 추출물을 포함하는 조성물 및 건강기능식품은 간암 및/또는 항암제에 내성이 있는 간암에 대하여 항암 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 Huh7 세포에서 천연물 추출물과 소라페닙과의 효능을 MTT assay를 통해 비교한 것이다
[18] 도 2는 SRH 세포에서의 천연물 추출물의 효능을 MTT assay를 통해 나타낸 것이다.
[19] 도 3 내지 4는 HCCLM3에 소라페닙을 처리한 경우의 효과를 나타낸 것이다.
[20] 도 5는 HCCLM3에 감송향 추출물 및 담죽엽 추출물을 처리한 경우의 효과를 나타낸 것이다.
[21] 도 6은 Huh7 세포에 여과된 감송향 추출물을 처리한 경우의 효과를 나타낸 것이다.
[22] 도 7은 In vivo efficacy test를 위한 동물 모델링-1을 간략히 나타낸 것이다.
[23] 도 8 내지 10은 Balb/c nu/nu mouse에 HCCLM3를 투여한 간세포암 모델링-1의 결과를 나타낸 것이다.
[24] 도 11는 Balb/c nu/nu mouse에 HCCLM3를 투여한 간세포암 모델링-1에서의 Liver weight/Body weight을 나타낸 것이다.
[25] 도 12는 Balb/c nu/nu mouse에 HCCLM3를 투여한 간세포암 모델링-1에서의

혈청을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[26] 도 13는 FL83b 세포주에 감송향 추출물을 처리한 효과를 나타낸 것이다.

[27] 도 14는 In vivo efficacy test를 위한 동물 모델링-2를 간략히 나타낸 것이다.

[28] 도 15 내지 16은 C57/BL6 마우스에 Hepa1-6을 투여한 간세포암 모델링 결과를 나타낸 것이다.

[29] 도 17는 C57/BL6 마우스에 Hepa1-6을투여한 간세포암 모델링에서의 Liver weight/Body weight을 나타낸 것이다.

[30] 도 18은 감송향 추출물 처리 후 signaling pathway의 변화를 western blot을 통해 나타낸 것이다.

[31] 도 19은 감송향 추출물 처리에 의한 ERK 활성 저해 모식도를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[32] 본 발명은 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 감송향 추출물을 포함함으로써, 간암 및/또는 항생제에 내성을 갖는 간암에 항암 효과를 나타낼 수 있는, 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

[33] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[34] 본 발명의 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물은 감송향 추출물을 포함한다.

[35] "추출물(extract)"은 천연물로부터 분리된 활성성분을 의미한다. 추출물은 물, 유기용매, 또는 이의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할 수 있으며, 추출액, 이의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 그리고, 물이나 유기용매 등으로 추출한 후, 추출물에 대하여 현탁 시킨 후, 헥산, 클로로포름, 부탄올, 에틸아세테이트 등을 사용하여 분획시켜 얻은 물질도 본 발명의 추출물의 범주에 포함된다.

[36] "예방"이란 조성물 및/또는 건강기능식품의 투여로 간암 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[37] "치료" 또는 "개선"이란 본원 조성물 및/또는 건강기능식품의 투여로 대사 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[38] 간암에는 간세포암, 담관암, 맥관육종 등이 있으며, 간에서 발생되지 않더라도 간 이외의 장기에서 발생하여 간으로 전이해온 전이암도 포함된다.

[39] 간암은 항암제에 내성을 갖는 간암일 수 있으며, 바람직하게는 소라페닙에 내성을 갖는 간암일 수 있다.

[40] 또한, 간암은 진행성 간암일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 진행단계에 구분 없이 적용 가능하다.

[41] 감송향(Nardostachysjatamansi, NJ)은 마타리과의 여러해살이 감송 또는 동속

식물의 뿌리줄기 및/또는 뿌리를 말하며, 감송, 고미치, 향송 등으로 불린다.

- [42] 감송향 추출물은 감송향의 어느 부위에서도 가능하지만, 바람직하게는 뿌리로부터 추출되는 것이 바람직하다. 그리고 추출용액은 물 또는 유기용매로 추출하여 얻을 수 있는데, 유기용매로는 저급 알콜, 아세톤, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트, 헥산 등을 예시할 수 있다. 저급알콜로는 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 예시할 수 있으며, 에탄올이 바람직하다.
- [43] 물을 사용하는 경우, 감송향 건조물 또는 분말에 1 내지 20 배, 바람직하게는 5 내지 15 배, 더욱 바람직하게는 10 배의 물을 첨가하고 80 내지 100°C의 온도에서 1 내지 24시간, 바람직하게는 2 내지 6시간, 더욱 바람직하게는 2시간 동안 추출한 후 여과하여 감송향 뿌리의 열수 추출물을 제조할 수 있다. 유기용매 추출물의 경우, 감송향 1 내지 20 배, 바람직하게는 5 내지 15 배, 더욱 바람직하게는 10 배의 유기용매를 첨가하고, 실온(20 내지 30°C) 또는 가온 상태에서 10 내지 100시간, 바람직하게는 15 내지 40시간, 더욱 바람직하게는 24시간 동안 추출한 후 여과하여 감압 농축하여 제조될 수 있다. 상기 추출방법들에서 추출 공정은 필요에 따라 2회 이상 반복하여 실시할 수 있으며, 여과 후 얻어진 추출물을 동결 건조, 분무건조 또는 감압 건조시켜 분말 형태로 만들 수도 있다.
- [44] 본 발명의 조성물에는 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 활성 성분을 수송하는 역할을 하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매와 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 운반체(vehicle)를 의미한다. 본 발명의 조성물은 감송향 추출물과 함께 추가로 약학적으로 허용되는 1종 이상의 담체를 첨가하여 약제로 제조할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용 가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체로는 식염수, 완충 식염수, 물, 글리세롤 및 에탄올 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [45] 본 발명의 조성물을 약제화하기 위한 제제는 임상 투여시에 경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 경구를 위한 액상제제에는 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.
- [46] 또한, 본 발명의 조성물에 추가될 수 있는 생약제는 약학적으로 허용되는

임의의 생약제일 수 있으며, 예를 들면, 고본(Angelicae tenuissimae Radix), 천마(Gastrodiae Rhizoma), 시호(Bupleuri Radix), 당귀(Angelicae gigantis Radix), 도인(Persicae Semen), 계지(Cinnamomi Ramulus), 대황(Rhei Rhizoma), 감초(Glycyrrhizae Radix), 천궁(Cnidii Rhizoma), 진피(Aurantii nobilis Pericarpium), 택사(Alismatis Rhizoma), 황련(Coptidis Rhizoma), 황금(Scutellariae Radix), 복령(Hoelen), 작약(Paeoniae Radix), 백출(Atractylodis Rhizoma alba), 황백(Phellodendri Cortex), 치자(Gardeniae Fructus), 반하(Pinelliae Tuber), 조구동(Uncaria Ramulus et Uncus), 지실(Ponciri Fructus), 인삼(Gingseng), 맥문동(Liriodis Tuber), 원지(Polygalae Radix), 석창포(Acori graminei Rhizoma), 창출(Atractylodis Rhizoma alba), 감국(Chrysanthemi Flos), 방풍(Ledebouriellae Radix), 생강(Zingiberis Rhizoma crudus), 망초(Natrii sulfas), 대조(Zizyphi Fructus), 단삼(Salviae Radix), 목단피(Moutan Radicis Cortex), 지황(Rehmanniae Radix), 박하(Menthae Herba), 산약(Dioscoreae Rhizoma), 저령(Polyporus), 하수오(Polygonum multiflori Radix), 구자(Allii tuberosi Semen), 결명자(Cassiae Semen), 구기자(Lycii Fructus), 독활(Araliae cordatae Radix), 두충(Eucommiae Cortex), 백화사설초(Hedyotis Herba), 삼백초(Saururus Herba), 인진(Artemisia capillaris Herba), 지모(Anemarrhenae Rhizoma), 홍화(Carthami Flos), 황기(Astragali Radix), 석송자(Lycopodium), 은행잎(Ginkgonis Folium), 황정(Polygonati Rhizoma), 연자육(Nelumbinis Semen), 용골(Fossilia ossis Mastodi), 지골피(Lycii radicis Cortex), 우슬(Achyranthis Radix), 숙지황(Rehmanniae Radix preparata), 흑임자(Perillae Semen), 백자인(Thujae Semen), 맥아(Hordei Fructus germinatus), 토사자(Cuscutae Semen), 파극천(Morindae Radix), 해송(Pini koraiensis Radix) 등을 단독으로 또는 배합하여 사용할 수 있다.

[47] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.

[48] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 투여 대상에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[49] 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.

[50] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴,

폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 조성물은 항응집제, 윤향제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[51] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 젤제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다.

[52] 본 발명의 제제는 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다. 특정 대상에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 대상의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 전술한 사항을 고려하여 결정할 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 감송향 추출물의 건조 중량 기준으로 0.0001 내지 500mg/kg, 바람직하게는 50~300mg/kg, 더욱 바람직하게는 100 내지 200mg/kg의 양, 보다 더 바람직하게는 100mg/kg을 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[53] 본 발명의 조성물은 또한 투약 단위의 제형들을 포함한다. 제형은 개별 투약 형태, 예를 들면 정제, 피복 정제, 캡슐제, 환제, 좌약 및 앰플제로 존재하고, 약제 중 유효 화합물의 함량은 개별 투약량의 분율 또는 배수에 해당한다. 투약 단위는, 예를 들면 개별 투여량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투여량은 바람직하게는 유효 화합물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

[54] 필요에 따라, 본 발명의 조성물은 담죽엽 추출물을 더 포함할 수 있다.

[55] 상기 담죽엽 추출물은 감송향 추출물과 다른 메커니즘에 의존하여 간암 세포의 사멸을 유도하므로, 본 발명의 조성물에 담죽엽 추출물을 더 포함함으로써 간암의 예방 또는 치료 효과를 증가시킬 수 있다.

[56] 본 발명의 조성물은 간암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용하거나, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[57] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 대상은 이러한 질환이 발생할 수 있는 임의의 동물일 수 있으며, 상기 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[58] 또한, 본 발명은 감송향 추출물을 포함하는 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [59] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 건강기능식품은 담죽엽 추출물을 더 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 건강기능식품은 상기 추출물을 포함한 음료 (알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류 (예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품 (예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등일 수 있다.
- [61] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.
- [62] 본 발명의 건강기능식품에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제(치즈, 초콜렛 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.
- [63] 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [64] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜렛 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [65] 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘, 미네랄 오일 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 상술한 제형 내 유효성분으로서의 본 발명의 건강기능식품의 함량은 사용 형태

및 목적, 사용자 상태, 증상의 종류 및 경증 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [67] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [68] **실시예**
- [69] 하기 실시예 및 도면에 기재된 WSY-0은 유백피 추출물, WSY-1은 감송향 추출물, WSY-3은 담죽엽 추출물, WSY-37은 사상자 추출물을 나타내는 것이다.
- [70] 유백피 추출물 (WSY-0), 감송향 추출물 (WSY-1), 담죽엽 추출물 (WSY-3) 및 사상자 추출물 (WSY-37)의 제조
- [71] 일반적인 구입처(Omni Herb, Seoul, Korea)에서 구입한 유백피, 감송향, 담죽엽 및 사상자를 음지 및 실온에서 5일간 건조하고 분쇄하였다. 상기 분쇄된 유백피, 감송향, 담죽엽 및 사상자를 각각 별도로 원물 무게의 10배의 증류수로 약 2시간 동안 열수 추출하였다.
- [72] 또한, 상기 분쇄된 유백피, 감송향, 담죽엽 및 사상자를 각각 별도로 원물 무게의 10배의 에탄올로 약 24시간 정도 추출하였다.
- [73] **MTT assay**
- [74] 유백피 추출물 (WSY-0), 감송향 추출물 (WSY-1), 담죽엽 추출물 (WSY-3) 또는 사상자 추출물 (WSY-37)의 대상 세포 또는 마우스에 대한 처리에 따른 간암세포 증식 억제 효능을 MTT assay를 통해 검증하고 유효 농도를 결정하였다.
- [75] **Annexin V & PI staining**
- [76] 유백피 추출물 (WSY-0), 감송향 추출물 (WSY-1), 담죽엽 추출물 (WSY-3) 또는 사상자 추출물 (WSY-37) 처리 시, 간암세포주의 증식 억제 경로가 apoptosis 과정인지 세포 독성에 의한 necrosis 과정인지를 검증하고자 Annexin V & PI staining를 실시하였다.
- [77] **간세포암 소동물 모델 확립**
- [78] 소동물 모델에 간세포암을 유도하는 방법은 DEN과 같은 chemical을 주입하는 방법과 간세포암 세포를 직접 주입하는 방법이 있다. DEN을 처리하는 경우, 실험적으로 간편하기는 하지만 암 형성에 많은 기간(약 50주)이 소요되는 단점이 있어, 천연물 추출물의 in vivo 항암 효과를 단기간에 효율적으로 검증하기 위하여 간세포암을 마우스의 간에 직접 주입하는 orthotopic implantation model를 실시하였다.
- [79] Orthotopic implantation model은 Huh7또는 HCCLM3와 같은 간세포암 세포주들을 마우스의 간문맥 또는 간엽 (liver lobe)에 직접적으로 주입함으로써 간 조직에 암이 형성되도록 유도하는 방법으로 암형성에 소요되는 기간은 대략 8주 정도로 DEN보다 소요되는 기간이 짧아 적절하다.
- [80] 유백피 추출물 (WSY-0), 감송향 추출물 (WSY-1), 담죽엽 추출물 (WSY-3) 또는 사상자 추출물 (WSY-37)의 간세포암의 형성 및 이에 대한 억제 효능을 liver

gross, H&E staining 및 혈청 (serum) 분석을 통해 검증하고자 하였다.

[81] 천연물 추출물의 기전 연구

[82] 천연물 추출물의 항암효과 및 기전 구체화를 위해 tumorigenesis의 대표적인 signaling pathway에 관여하는 단백질들의 발현 및 인산화 여부를 Western blot을 통해 검증하였다.

[83] 결과 및 고찰

[84] 선별된 천연물 추출물의 apoptosis/necrosis 유도 검증

[85] 4종의 천연물(WSY-0, WSY-1, WSY-3, 및 WSY-37)에 대한 in vitro 간세포암 증식 억제능을 MTT assay를 통해 검증하였으며 그 결과는 다음과 같았다.

[86] 4종의 천연물에 대하여 각각 열수 추출과 에탄올 추출을 통해 총 8종의 추출물을 제조하였고, 5종의 간암세포주 (Huh7, HepG2, Hep3B, PLC/PRF5, 및 SK-hep1)에서 in vitro 간암 증식 억제능을 확인하였다.

[87] 결과적으로 열수 추출보다는 에탄올 추출을 통해 얻어진 물질들이 in vitro 간암 증식 억제능이 높은 것을 확인하였으며, WSY-37를 제외한 3종의 에탄올 추출물 200 µg/mL 처리 시 HepG2 세포를 제외한 4종의 간암 세포주에서 세포 증식 억제능을 나타낸 것을 확인하였다.

[88] 표 1은 유백피 추출물 (A), 감송향 추출물 (B), 및 담죽엽 추출물 (C)을 200 µg/mL 농도로 처리 시 항암효과를 비교한 것이다.

[89] [표1]

	HepG2	Huh-7	Hep3B	PLC/PRF5	SK-hep1
A: WSY-0	—	37%	40%	40%	38%
B: WSY-1	—	62%	52%	42%	58%
C: WSY-3	—	50%	50%	50%	37%

[90] 위의 선행 연구 결과를 근거로, WSY-37을 제외한 3종의 에탄올 추출물 (WSY-0, WSY-1, 및 WSY-3)에 대하여 apoptosis/necrosis 유도 유무를 Annexin V/PI staining을 통해 확인하였다.

[91] WSY-0을 처리한 경우, Annexin V/PI staining을 통해 확인되는 간세포암에 대한 세포사멸 유도가 확인되지 않았다.

[92] WSY-1을 처리한 경우, 24시간 처리 후, 100 µg/mL 처리 시 60% 이상, 200 µg/mL 처리 시 90% 이상, 세포 사멸이 유도됨을 발견하였고, 또한 50%이상이 apoptosis로 유도되는 것을 발견하였다.

[93] WSY-3을 처리의 경우, 농도에 의존적으로 necrosis가 유도됨을 발견하였고, 특히, 200µg/mL 처리 시 세포의 90% 이상에서 necrosis가 유도됨을 발견하였다.

[94] WSY-1 에탄올 추출물 및 WSY-3 에탄올 추출물이 간세포암에 세포사멸을 유도할 수 있는 것을 발견하였으며, WSY-1은 apoptosis 의존적으로 cytotoxicity를 나타내는 반면, WSY-3은 necrosis에 의존적으로 cytotoxicity를 나타내는 것을 발견하였다.

[95] 천연물 추출물과 소라페닙과의 효능 비교

- [96] Huh7세포에 소라페닙을 48시간 처리하는 경우, 2 μ M 처리 시 약 60%, 4 μ M 처리 시 약 80% 세포 사멸이 유도되는 것으로 확인되었다. (도 1 참조)
- [97] WSY-1 200 μ g/mL을 처리하는 경우 약 80% 세포 사멸이 유도됨을 확인할 수 있었으며, 이는 소라페닙 4 μ M 처리한 효과와 유사하였다.
- [98] 본 실험 결과를 통하여, Huh7 세포에서 WSY-1 200 μ g/mL는 소라페닙 4 μ M 처리한 경우와 유사한 수준으로 간세포암의 세포사멸을 유발할 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [99] 소라페닙 내성 Huh7 세포 주 (SRH)에서 천연물 추출물의 효과 검증
- [100] Huh7 세포주 유래 소라페닙 내성 세포주 (SRH)에서 WSY-1의 효능을 검증하고자 하였다.
- [101] 천연물 추출물을 0 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 및 200 μ g/mL를 처리하고 48 시간 후에 MTT assay를 실시하였다.
- [102] Huh7 세포에 처리 한 경우에 비하여 항암 효과가 다소 약하게 나타났으나, 200 μ g/mL 처리 시 처리된 세포의 50% 이상에서 세포사멸이 유도되는 것으로 확인되었다. (도 2 참조)
- [103] **Hyper-metastatic HCC cell line (HCCLM3)**에서 천연물 추출물의 효과 검증
- [104] HCCLM3세포는 소라페닙 내성 세포주 (SRH)에서와 유사하게 16 μ M 소라페닙 48 시간 동안 처리한 후에도 50% 이하로 세포 사멸 효과가 나타났다. (도 3 내지 4 참조)
- [105] HCCLM3세포에 WSY1 또는 WSY-3 에탄올 추출물을 처리하여 세포 사멸 효과를 확인함으로써 소라페닙에 민감성이 다른 세포주에 대한 천연물 추출물의 in vitro 항암효과를 확인하고자 하였다.
- [106] HCCLM3세포에 WSY-1 또는 WSY-3를 처리한 경우, 200 μ g/mL 농도에서 WSY-3에 의한 세포 사멸효과는 관찰되지 않았으나, WSY-1 처리하였 때 약 50%의 세포 사멸 효과가 관찰되었다. (도 5 참조)
- [107] 본 실험 결과를 통하여 WSY-1의 경우, 소라페닙-내성 Huh7 세포뿐만 아니라 hyper-metastatic HCC 세포주인 HCCLM3에 대해서도 in vitro 항암 효능이 있음을 확인할 수 있었다.
- [108] 위 실험 결과들에 근거하여, 4종의 천연물 추출물 중 WSY-1의 in vitro 항암 효과가 가장 우수하였으며, 이에 따라 WSY-1을 in vivo efficacy 실험 대상으로 선정하였다.
- [109] **Balb/c nude nude** 마우스 (Balb/c nu/nu mouse)와 HCCLM3 세포주를 이용한 1차 in vivo efficacy 검증
- [110] 천연물 추출물의 간세포암에 대한 in vivo 항암 효력 검증을 위하여 최적의 간세포암 소동물 모델을 구축하고자 하였으며, 마우스의 간에 직접적으로 간세포암을 주입하는 orthotopic implantation 방법을 적용하였다.
- [111] Balb/c nude nude 마우스에 2×10^6 HCCLM3cells을 간문맥을 통해 직접 간에 주입하여 간세포암을 유도하고 WSY-1 또는 소라페닙을 투여하여 항암 효과를

검증하고자 하였다.

- [112] In vivo 항암 효과 검증에 앞서, 천연물 추출물의 투여 경로를 결정하기 위하여, 증류수 (distilled water)에 용해시킨 WSY-1과 WSY-3를 0.4 μ m filter로 여과 (filtration) 시킨 후 세포 사멸 효과를 재확인해 보았다. WSY-1의 경우, 여과 전에 비하여 여과 후에 간암세포에 대한 세포 사멸 효과가 감소되는 것으로 나타났다. (도 6 참조)
- [113] 즉, WSY-1 투여 시 여과 단계를 거치게 되면 항암 효과가 감소될 것으로 생각되므로 WSY-1을 생체 적합 용액에 용해시킨 후, 여과 없이 동물에 투여하기 위해서 경구투여 경로를 통해 투여를 하기로 하였다.
- [114] 기존의 천연물 추출물 논문들에 근거하여 WSY-1의 투여 용량 및 투여 횟수는 100 mpk (체중 kg 당 1mg)로 매일 투여하는 것으로 결정하였다.
- [115] 상기 언급한 내용에 근거하여 WSY-1에 대한 in vivo 항암 효력 검증 실험을 수행하였다.
- [116] 6주령 Balb/c nude nude 마우스에 2×10^6 HCCLM3cells을 간문맥을 통해 간으로 직접 주입하였다. 1주일 후에 간세포암을 유도한 마우스들을 무작위로 그룹으로 나누었으며, WSY-1과 소라페닙을 투여하였다. WSY-1은 100 mpk, 소라페닙은 30 mpk로 8주 동안 매일 (daily) 경구 투여하였다. (도 7 참조)
- [117] HCCLM3를 투여하지 않은 마우스들은 음성대조군 (negative control)으로 사용하고, 정상 마우스 (normal mouse)에 WSY-1을 100 mpk로 매일 (daily) 투여하는 실험군을 설정하여 WSY-1의 in vivo toxicity를 확인하고자 하였다. 8주 후, 상기 마우스들을 희생 (sacrifice)하여 항암 효과를 분석하였다. (도 8 내지 10 참조)
- [118] 동일 모델에서 liver weight/body weight을 분석한 결과, HCCLM3를 투여한 마우스와 대비하여 HCCLM3를 투여한 후 소라페닙을 투여한 마우스들에게서 liver weight/body weight의 수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. (도 11 참조)
- [119] 동일 모델에서 혈청 내의 ALT(Alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수준을 분석하였다.
- [120] AST는 GOT(glutamic oxalacetic transaminase)로 더 잘 알려져 있다. 간세포 이외에 심장, 신장, 뇌, 근육 등에도 존재하는 효소로, 이러한 세포들이 손상을 받는 경우 농도가 증가한다. ALT는 GPT(glutamic pyruvate transaminase)로 더 잘 알려져 있다. 주로 간세포 안에 존재하는 효소로, 간세포가 손상을 받는 경우 농도가 증가한다.
- [121] ALT 및 AST 수치는 간 기능의 저하 여부를 확인할 수 있는 혈액 검사상의 수치를 의미한다.
- [122] WSY-1을 100 mpk로 매일 투여한 마우스에서의 혈청 내 ALT 수준이 정상 마우스의 수준과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로부터, WSY-1의 경구 투여는 간 기능에 유해한 영향을 끼치지 않을 것으로 예상된다. (도 12 참조)
- [123] 정상 마우스 hepatocyte 세포주인 FL83b에 WSY-1과 WSY-3를 처리 후, MTT

- assay를 수행한 결과 세포 사멸이 유도되는 것을 확인한 바 있다. (도 13 참조)
- [124] 이에 따라, WSY-1이 *in vivo* toxicity가 우려되었으나, 8주 동안 WSY-1을 100 mpk로 매일 경구 투여한 마우스의 혈청 내 ALT 및 AST 수준이 정상 마우스와 비교하여 큰 변화가 없는 것으로 보아 해당 투여 용량 및 투여 횟수는 간에 대한 toxicity를 유발하지 않을 것으로 보인다.
- [125] 1차 *in vivo* anti-cancer efficacy 실험 결과, WSY-1을 100 mpk로 매일 경구 투여하는 경우 간에 대한 toxicity를 유발하지 않을 것으로 보이며, 본 실험 결과를 바탕으로 2차 *in vivo* anti-cancer efficacy 실험을 진행하였다.
- [126] **C57/BL6와 Hepa1-6 세포주를 이용 한 2차 *in vivo* efficacy 검증**
- [127] WSY-1의 *in vivo* efficacy 검증을 위한 최적의 모델을 구축하기 위하여 다양한 모델링을 시도하였으며 이중 C57/BL6 마우스에 Hepa1-6 세포주를 간문맥으로 투여하는 경우 효과적으로 간세포암이 형성됨을 확인하였다. 1×10^6 cells을 투여하는 경우 3주 경과 후 대부분의 마우스가 종양 (tumor) 형성으로 인해 폐사하는 것으로 관찰되었다. (도 14 참조)
- [128] 본 연구에서는 1차 *in vivo* efficacy 검증 실험과 예비 실험 결과를 바탕으로 다음과 같은 실험 조건을 설정하여 2차 검증 실험을 수행하였다.
- [129] 마우스 종: C57/BL6
- [130] 투여하는 세포/투여 경로: 5×10^5 Hepa1-6-GFPcells/간문맥
- [131] 투여 용량/투여 경로/투여 빈도: WSY-1 100 mpk, 소라페닙 30 mpk/ 경구투여/매일
- [132] 6주령 C57/BL6 마우스에 간문맥으로 5×10^5 Hepa1-6GFPcells을 투여하였다. 3일 후 무작위로 그룹핑하여 WSY-1과 소라페닙을 3주 동안 투여하였다.
- [133] 실험군의 n수는 다음과 같다.
- [134] 정상 마우스: n=5
- [135] 정상 마우스 + 100 mpk WSY-1: n=10
- [136] Hepa1-6 + mock: n= 13
- [137] Hepa1-6 + 100 mpk WSY-1: n=13
- [138] Hepa1-6 + 30 mpk 소라페닙: n= 13
- [139] 3주의 투여 기간 동안, 다음과 같은 실험군에서 종양 형성으로 인한 폐사가 유도되었으며, 투여 종료 후, 생존한 마우스들을 희생시켜 항암 효과를 분석하였다.
- [140] Hepa1-6 + mock: 13 마리 중 5 마리 폐사
- [141] Hepa1-6 + 100 mpk WSY-1: 13 마리 중 6마리 폐사
- [142] Hepa1-6 + 30 mpk 소라페닙: 13 마리 중 4마리 폐사
- [143] 투여 종료 후, 적출한 liver gross에 대한 육안 소견은 다음과 같다. (도 15 내지 16)
- [144] 정상 마우스의 간과 비교하여 정상 마우스에 WSY-1을 투여한 실험군은 특이적 차이점이 관찰되지 않았다.

- [145] Hepa1-6 + mock 실험군의 경우, 8마리에서 모두 종양이 형성되어 있는 것이 관찰되었다. 이 중 6마리는 과도하게 종양이 형성되어 있는 것이 관찰되었다.
- [146] Hepa1-6 + 100 mpk WSY-1 실험군의 경우, 생존한 7마리에서 육안으로 확인되는 종양은 관찰되지 않았다.
- [147] Hepa1-6 + 30 mpk 소라페닙 실험군의 경우, 생존한 9마리 중 2마리에서만 육안으로 확인 가능한 종양이 관찰되고 나머지 7마리에서는 관찰되지 않았다.
- [148] 동일 모델에서 liver weight/body weight을 분석한 결과, 정상 마우스 대비하여 Hepa1-6 세포를 주입한 마우스에서 수치가 의미있게 증가하였다. 반면 Hepa1-6 세포를 주입한 마우스 대비하여 Hepa1-6 세포 주입 후, WSY-1 또는 소라페닙을 투여한 마우스들에서는 수치가 의미있게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. (도 17 참조)
- [149] Liver gross 관찰 및 liver weight/body weight 분석을 통하여 WSY-1을 투여한 마우스의 경우, 현재 간암의 유일한 표적 치료제인 소라페닙을 투여한 마우스들과 비교할만한 수준으로 종양 형성이 억제된 것으로 관찰되었다.
- [150] 본 실험 결과를 토대로 간세포암 모델에서 WSY-1 투여 시, 간세포암 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며 WSY-1의 에탄올 추출물에 해당 유효 성분이 포함되어 있음을 예측할 수 있다.
- [151] **WSY-1의 항암 메카니즘 분석**
- [152] WSY-1의 항암 효과와 관련된 메카니즘 분석을 위하여 western blot을 수행하였다. Huh7 세포에 100 ug/mL 농도의 WSY-1을 24 처리 한 후, tumorigenesis에 관여하는 단백질의 발현 수준 및 인산화 여부를 관찰하였다. (도 18 참조)
- [153] tumorigenesis에서 활성화되는 MAPK signaling pathway을 분석해본 결과, ERK의 phosphorylation이 WSY-1 처리에 의하여 현저히 감소하는 것이 확인되었으며, p38의 phosphorylation도 감소되는 경향을 보였다. JNK의 phosphorylation은 일어나지 않은 것으로 나타났으며, ERK의 downstream target 유전자인 cyclinD1의 발현은 감소되는 것으로 확인되었다. MMP2의 발현 수준에 변화는 없었으나, WSY-1 처리가 AKT 활성화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. (도 19 참조)
- [154] 위 실험 결과를 바탕으로, WSY-1의 항암 효과는 ERK 활성 저해를 통해 주로 이루어지는 것으로 예상되며, 구체적으로는 ERK 활성 저해에 따라 pro-proliferation 성향의 단백질들의 발현이 저해되는 것으로 예상된다.
- [155] **결론**
- [156] **In vitro efficacy 검증 측면**
- [157] 본 연구의 수행을 통하여 4종의 천연물(WSY-0, WSY-1, WSY-3, 및 WSY-37) 중, WSY-1과 WSY-3이 다양한 in vitro assay에서 간세포암 증식 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다.
- [158] WSY-3은 necrosis 의존적인 세포사멸을 유도하는 반면, WSY-1은 apoptosis

의존적으로 세포사멸을 유도하는 것으로 확인되었다.

- [159] 특히 200 $\mu\text{g/mL}$ WSY-1 처리 시, 다양한 간세포암 세포주뿐만 아니라, 소라페닙-내성 Huh7 세포 또는 heper-metastatic HCC 세포인 HCCLM3에서도 증식 억제 효과가 확인되었다.

[160] **In vivo efficacy** 검증 측면

- [161] In vivo efficacy test를 위하여 적합한 간세포암 모델을 구축하였으며 적절한 투여 용량, 투여 빈도 및 투여 방법을 설정하여 WSY-1의 in vivo 항암 효과를 확인하였다. WSY-1을 100 mpk로 매일 경구 투여할 경우, 투여하지 않은 실험군에 비하여 간세포암 형성 정도가 현저하게 감소됨을 확인하였다.

[162] **Mechanism** 검증 측면

- [163] WSY-1의 항암 효과는 ERK 활성 저해를 통해 이루어지는 것으로 예상되며, 구체적으로 ERK 활성 저해에 따라 pro-proliferation 성향의 단백질들의 발현이 저해되는 것으로 예상된다.

[164] **종합**

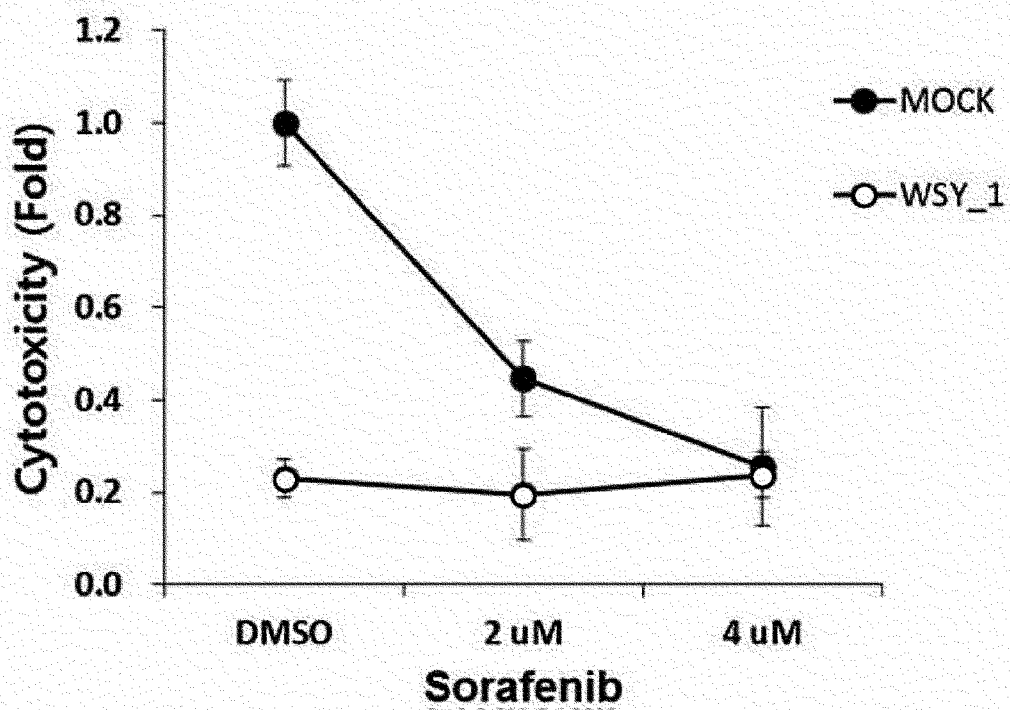
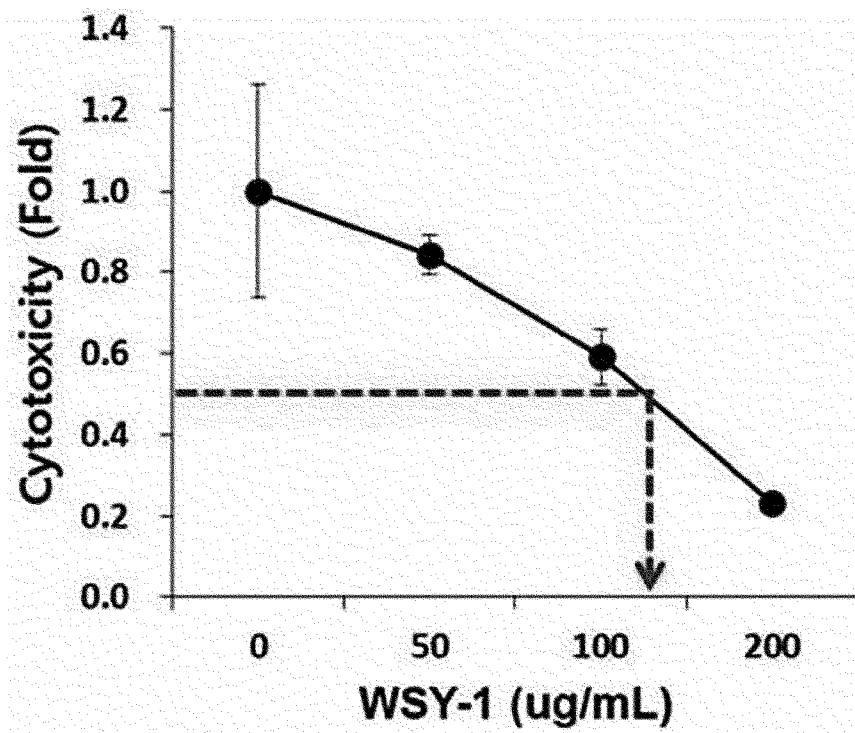
- [165] 상기 실험을 통하여 감송향 추출물의 in vitro 및 in vivo 간세포암 억제 효능을 확인할 수 있었으며, 특히, 소라페닙에 내성을 가진 간세포암에도 효과를 항암 효과를 갖는 것으로 나타났다. 또한 이러한 항암 효과가 MAPK signaling pathway의 ERK의 활성 억제를 통해 비롯되는 것을 확인하였다.

- [166] 따라서, 감송향 추출물을 포함하는 조성물은 간암에 항암효과를 가질 수 있고, 특히, 항암제인 소라페닙에 내성을 가진 간암에 항암효과를 가질 수 있다.

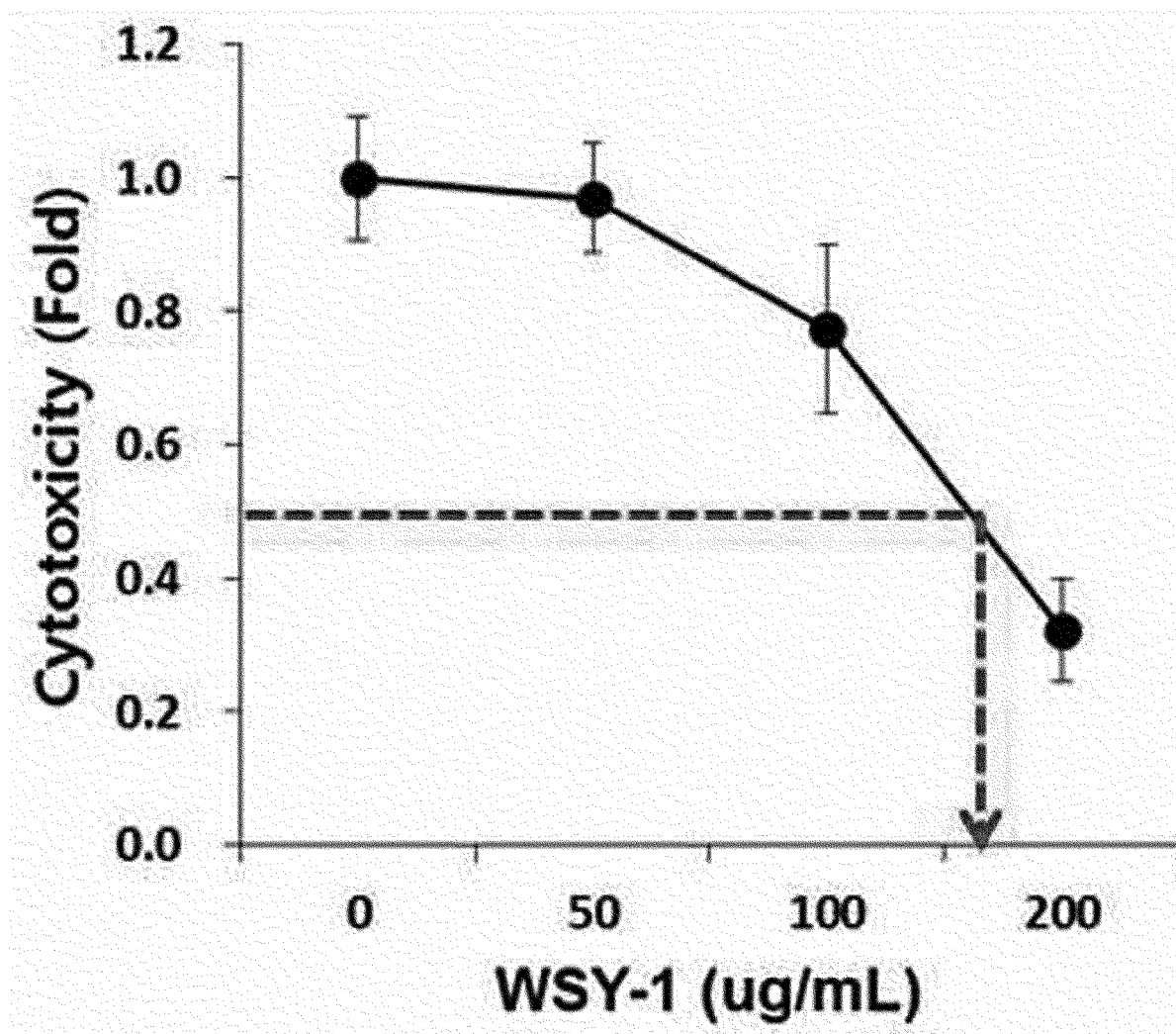
청구범위

- [청구항 1] 감송향 추출물을 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 의약 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 간암은 소라페닙(sorafenib)에 내성이 있는 간암인, 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 감송향 추출물은 유기용매 추출물 또는 열수 추출물인, 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 감송향 추출물은 에탄올 추출물인, 조성물.
- [청구항 5] 감송향 추출물을 포함하는 간암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 간암은 소라페닙(sorafenib)에 내성이 있는 간암인, 건강기능식품.
- [청구항 7] 청구항 5에 있어서, 상기 감송향 추출물은 유기용매 추출물 또는 열수 추출물인, 건강기능식품.
- [청구항 8] 청구항 5에 있어서, 상기 감송향 추출물은 에탄올 추출물인, 건강기능식품.

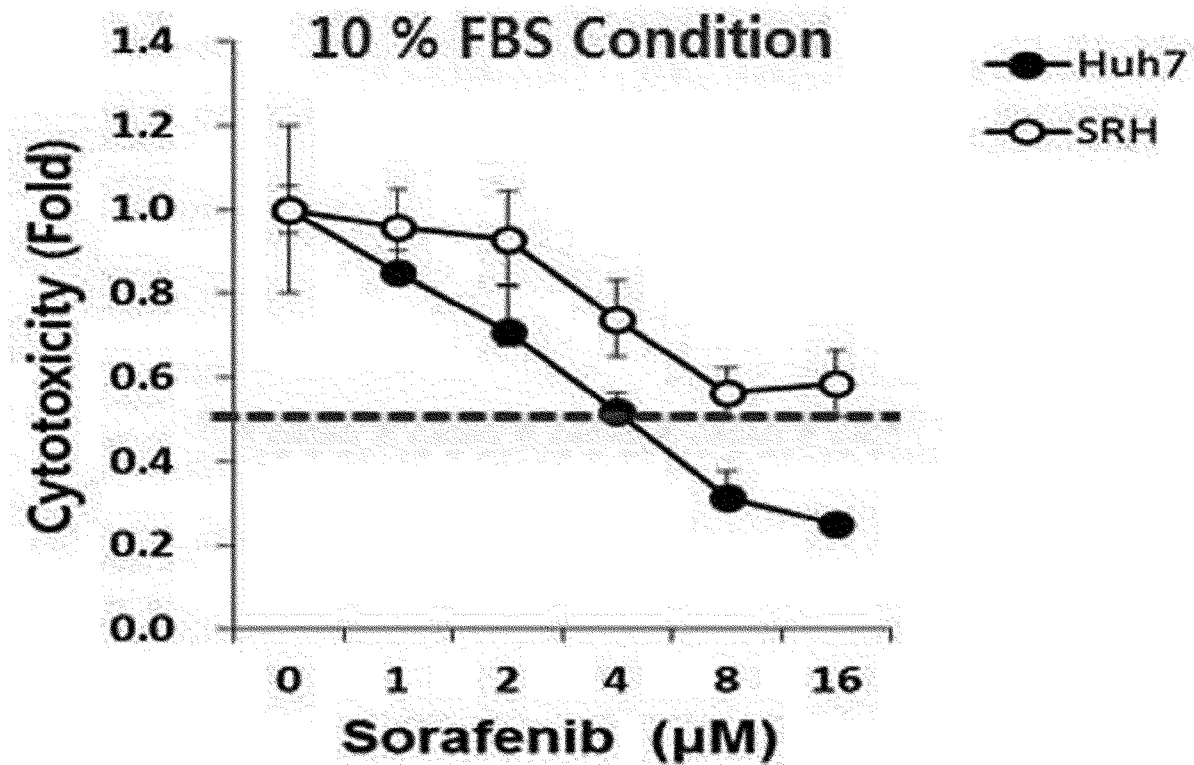
[도1]



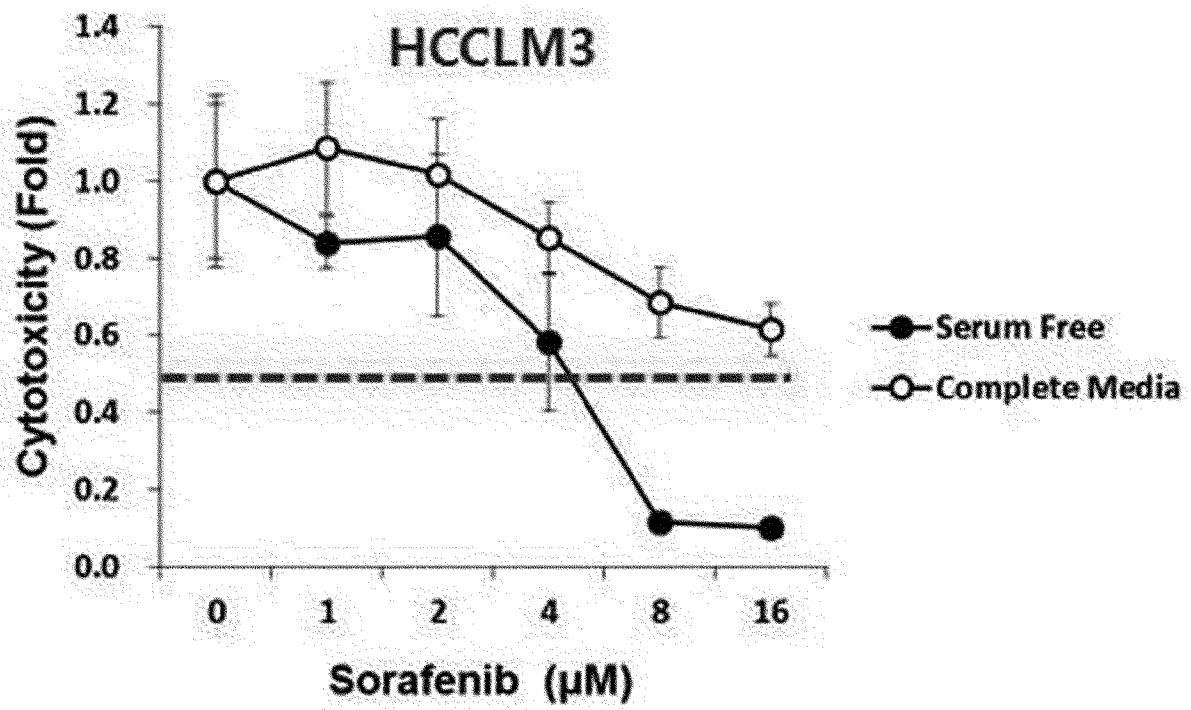
[도2]



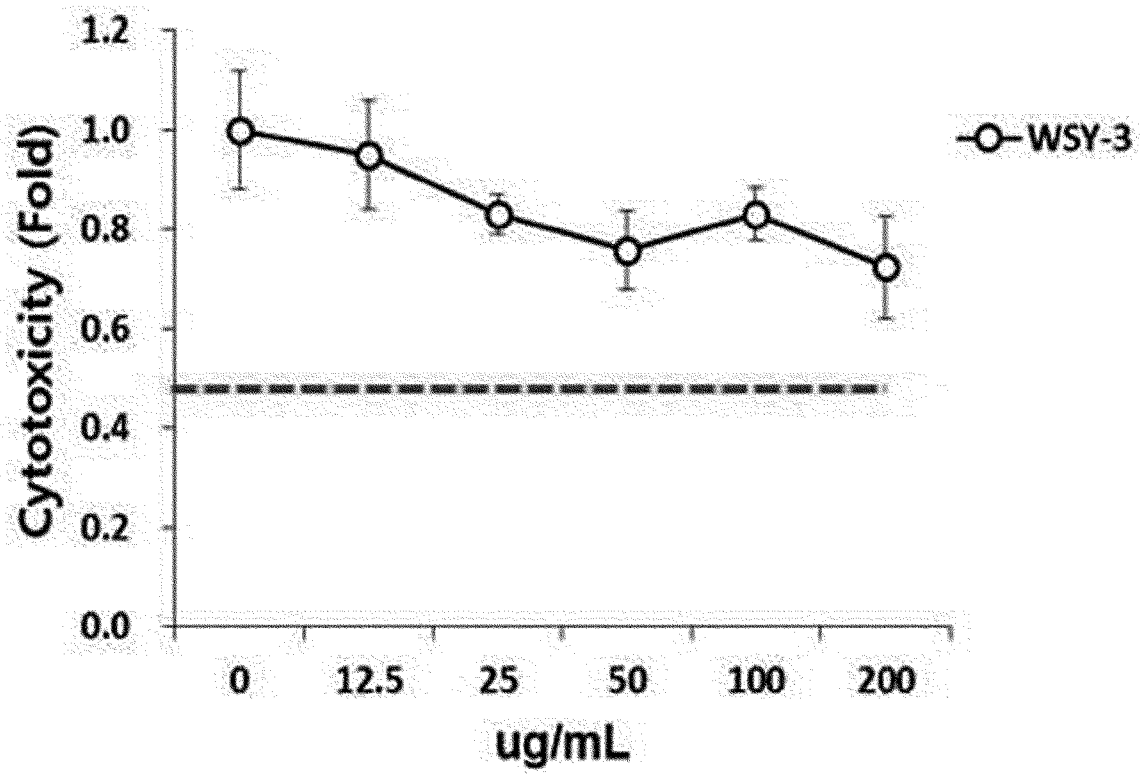
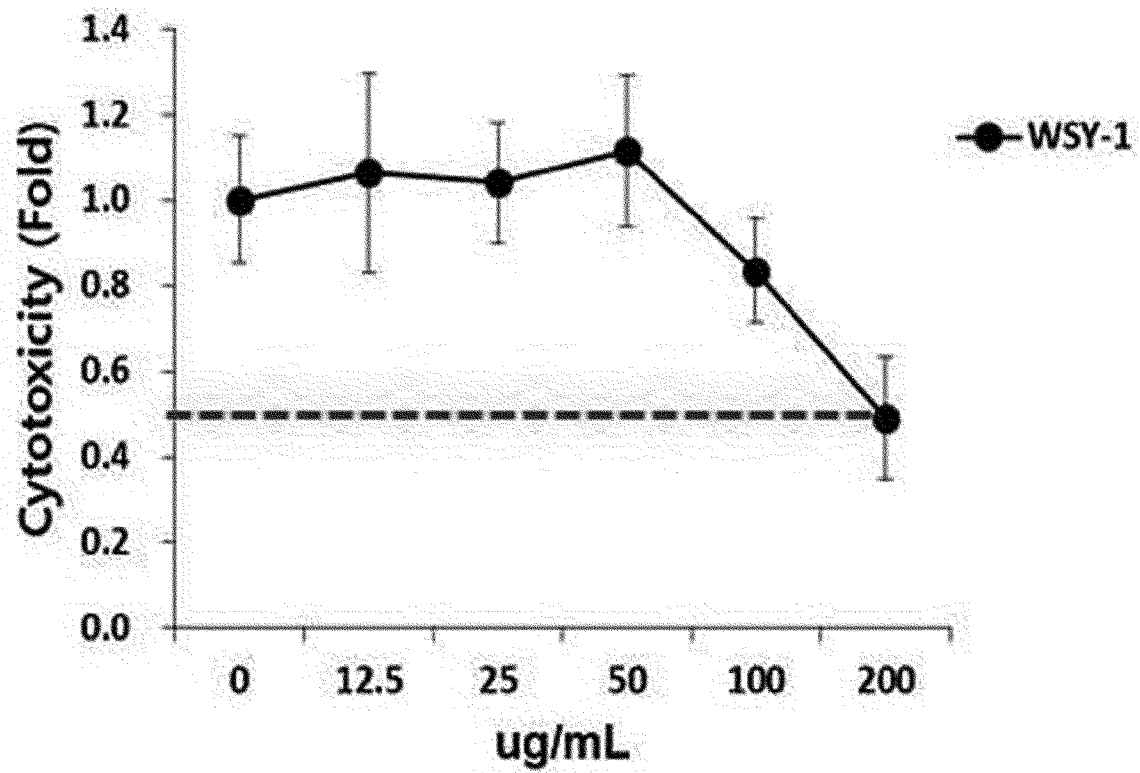
[도3]



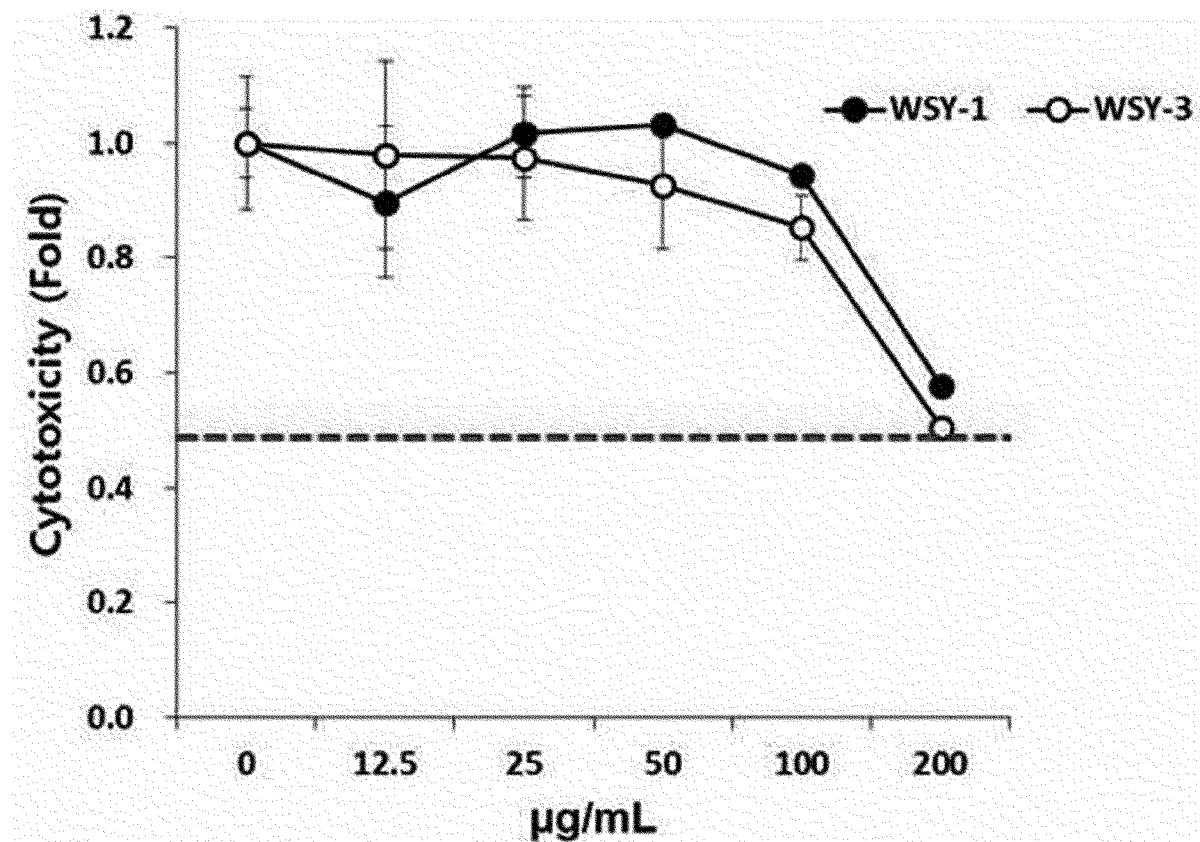
[도4]



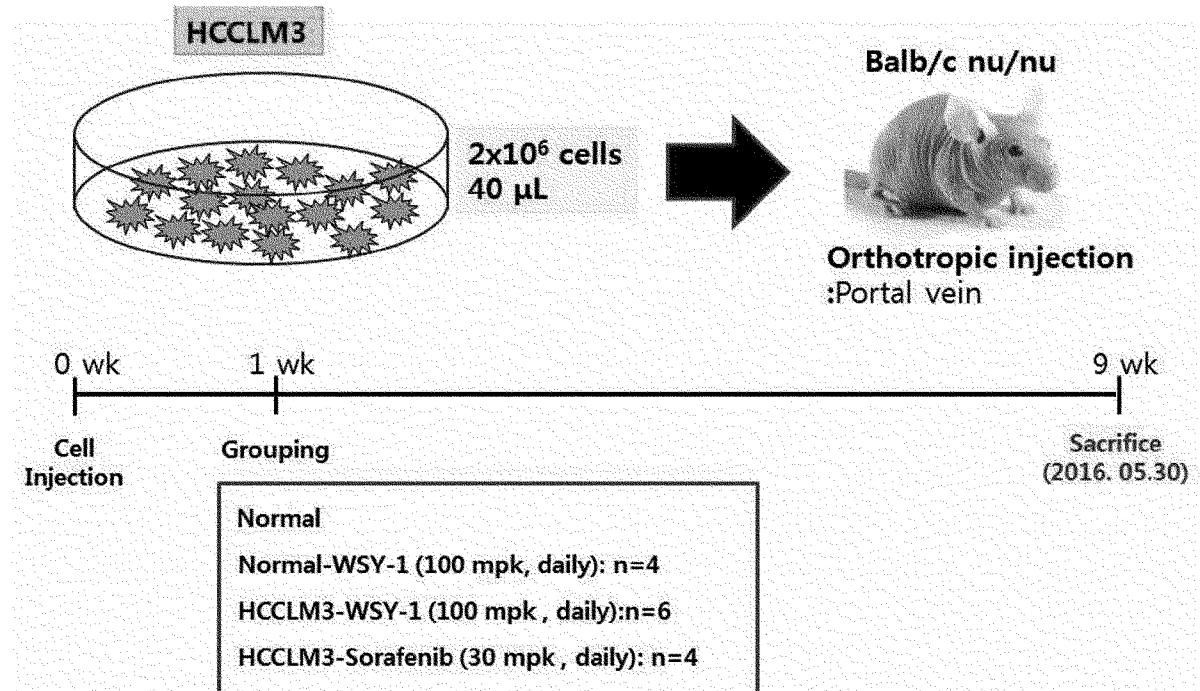
[도5]



[도6]

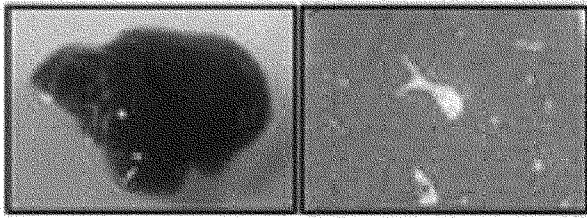


[도7]



[도8]

Normal



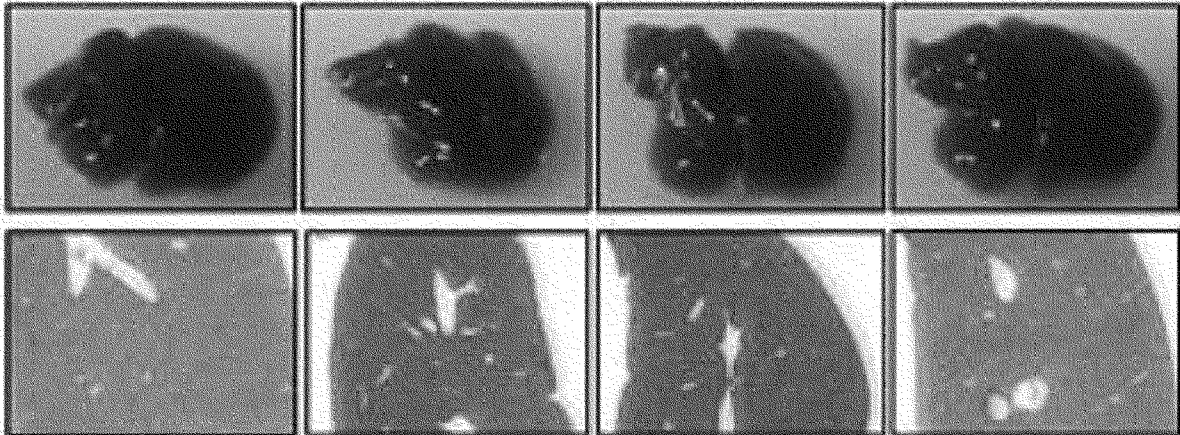
Normal-WSY-1

#1

#2

#3

#4



[도9]

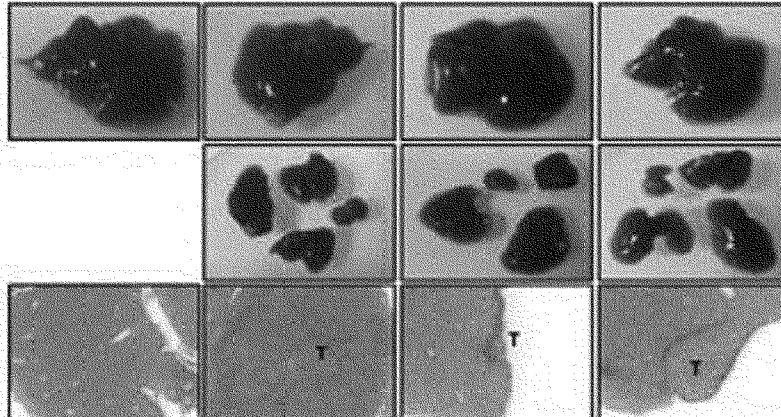
HCCLM3

#1

#2

#3

#4



HCCLM3-WSY-1

#1

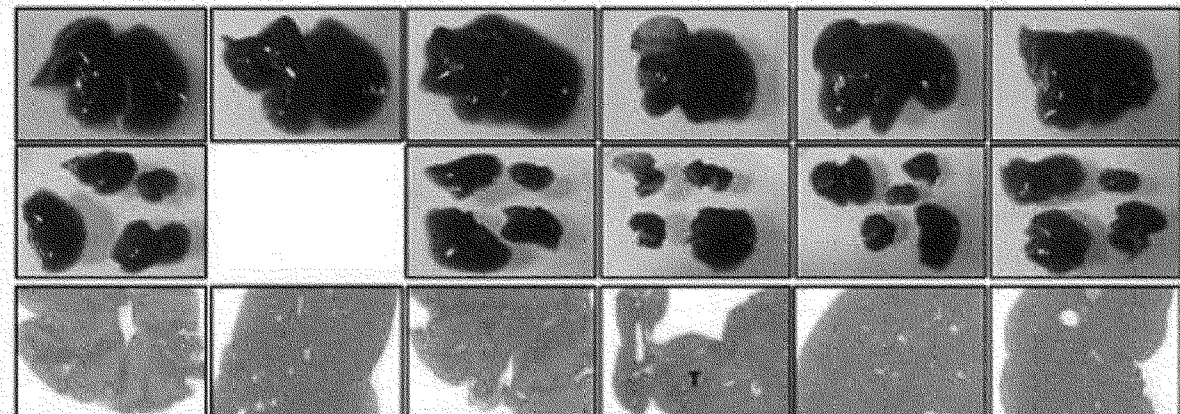
#2

#3

#4

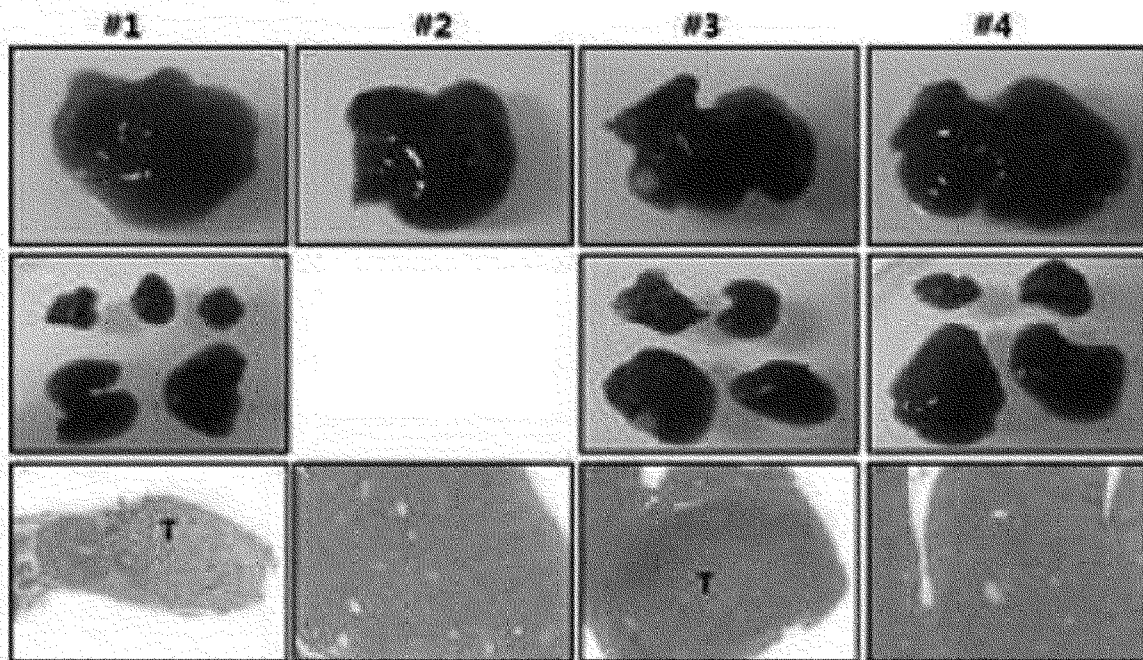
#5

#6

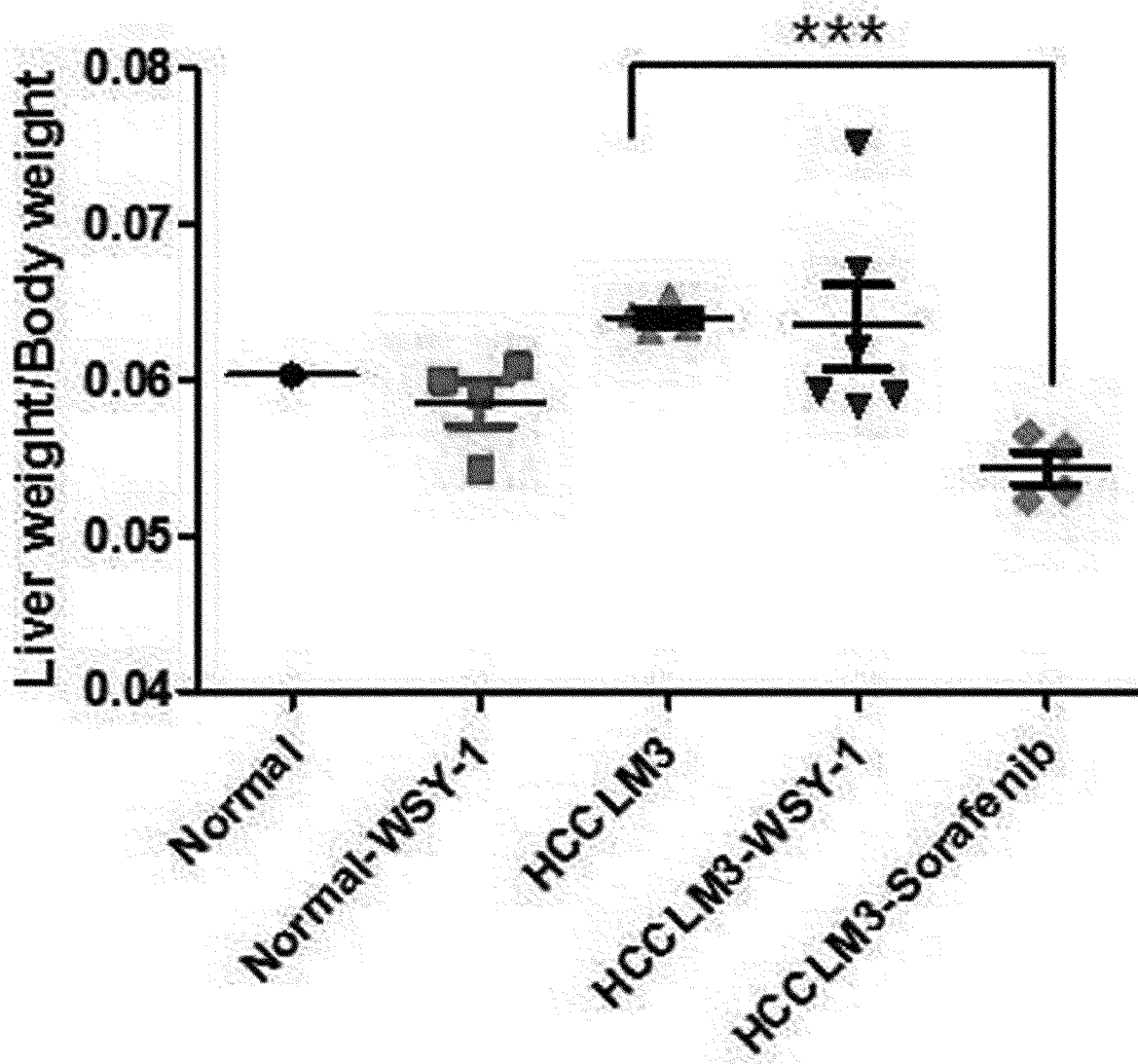


[도10]

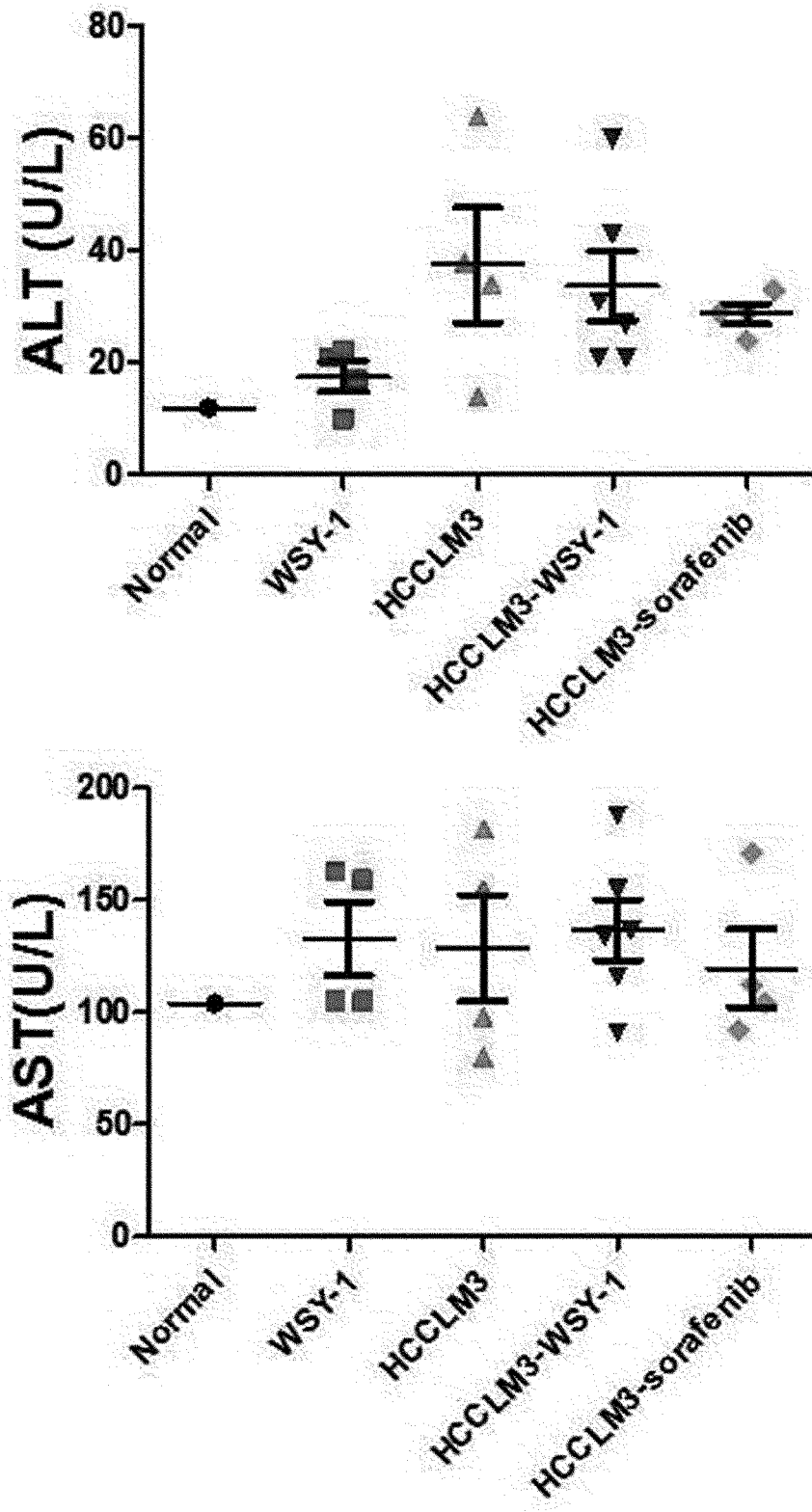
HCCLM3-Sorafenib



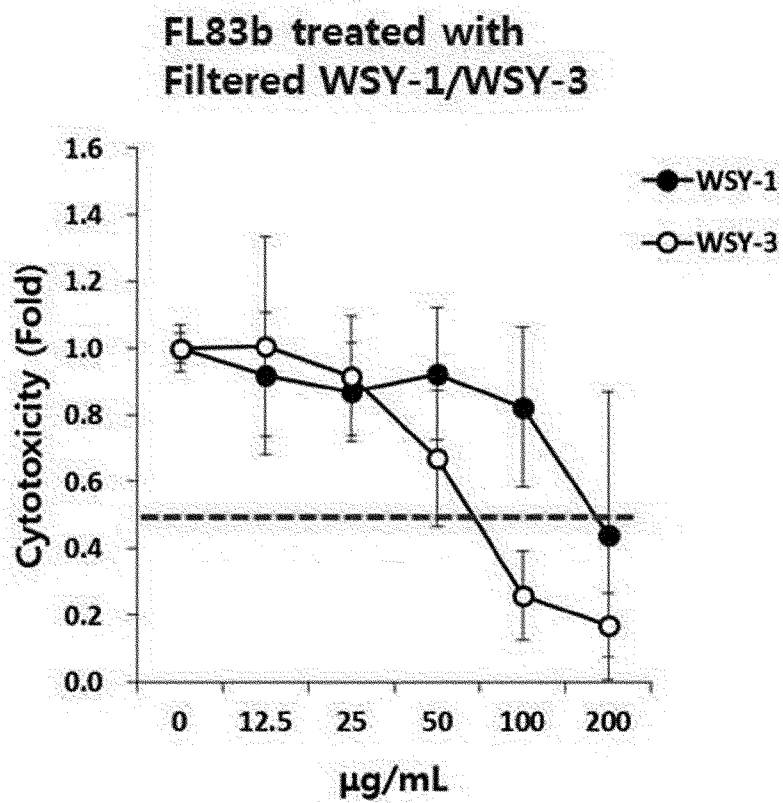
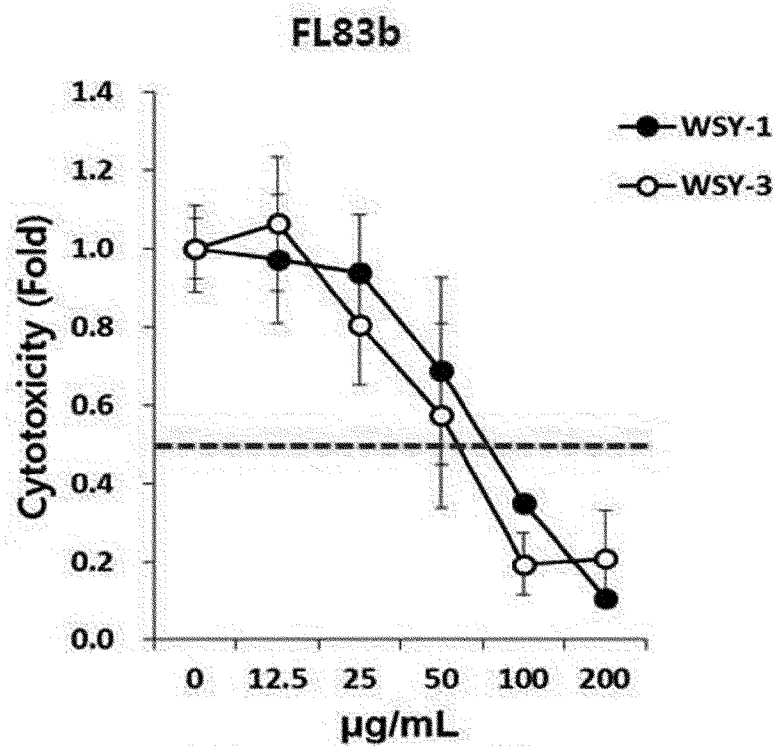
[도11]



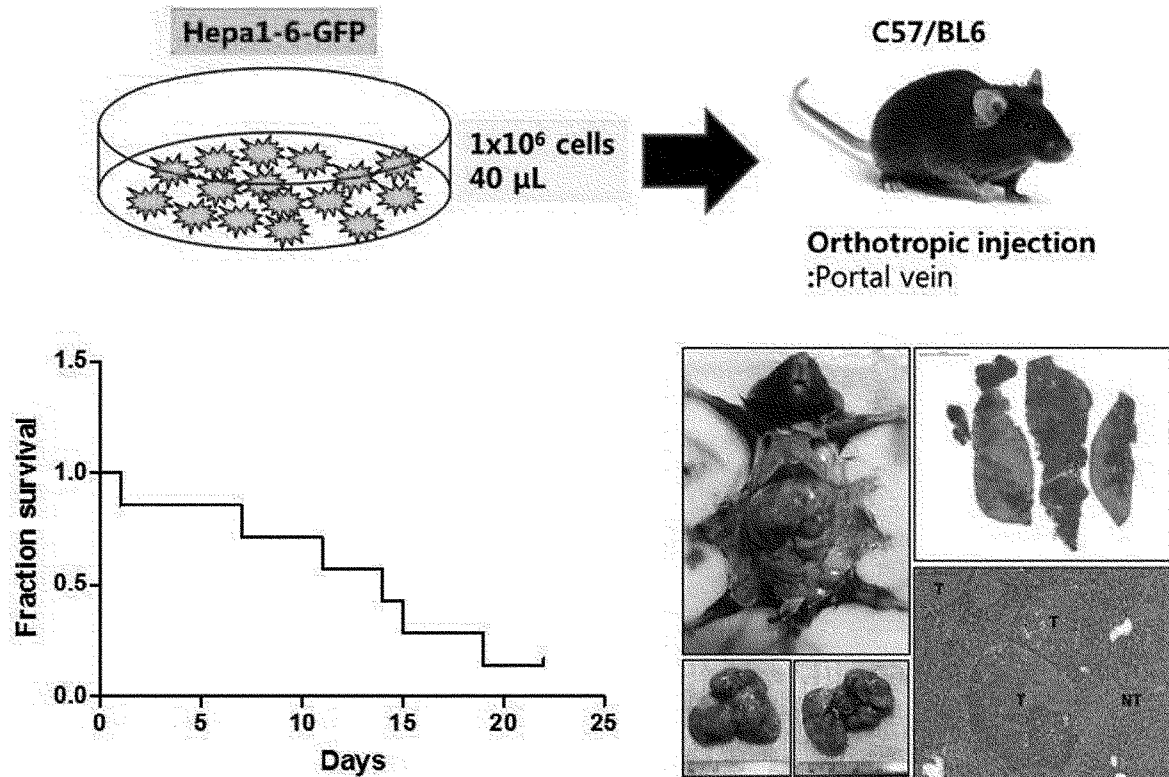
[도12]



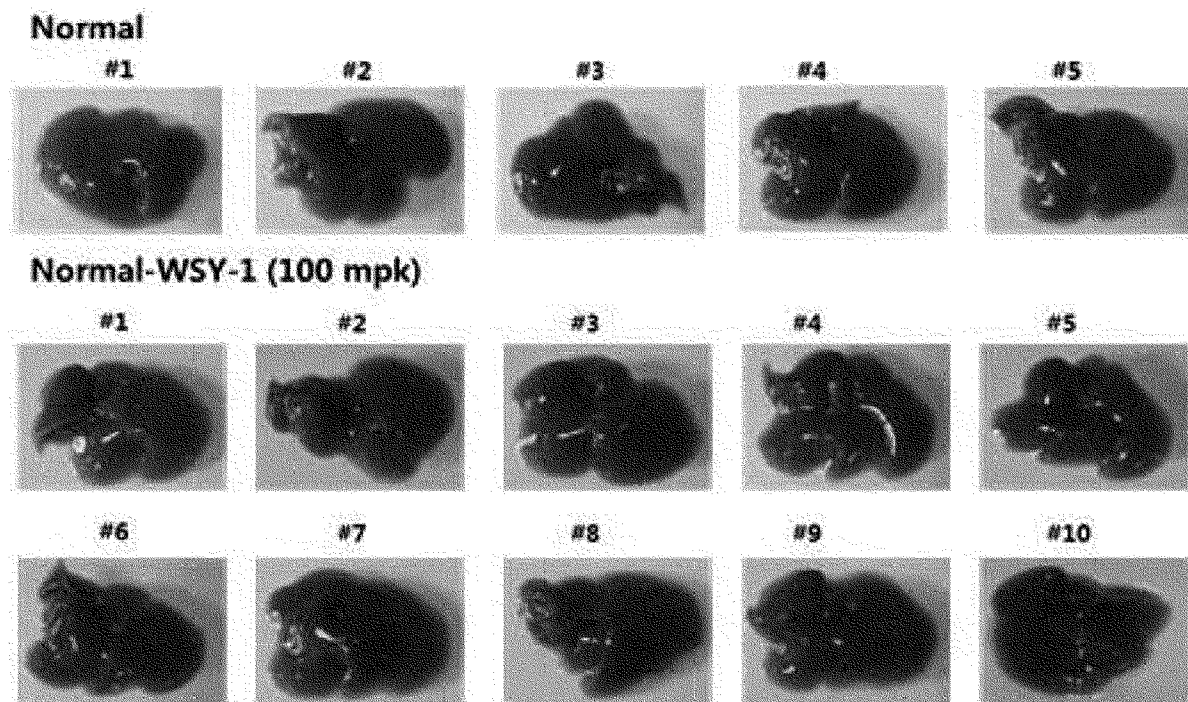
[도13]



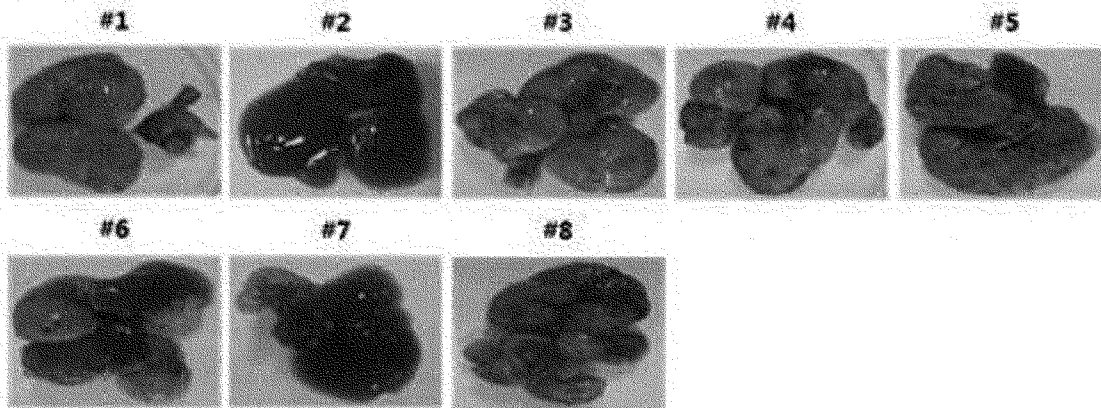
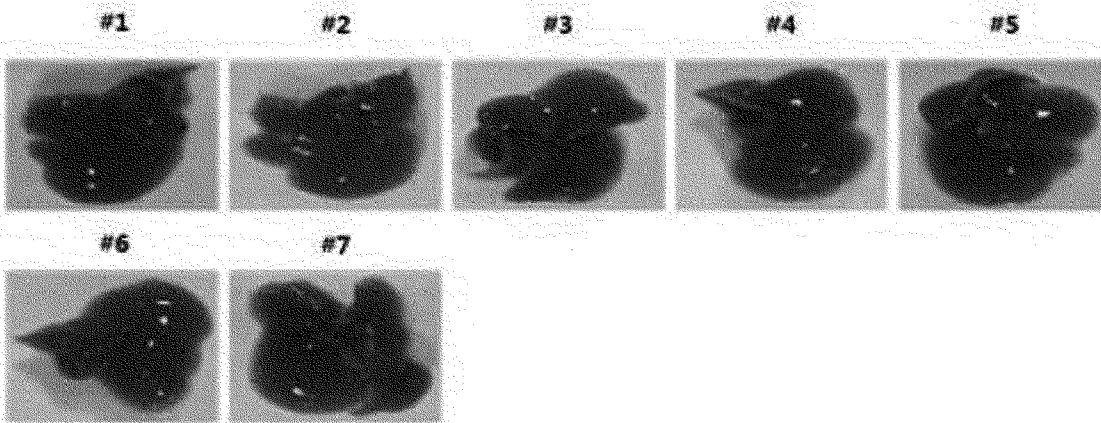
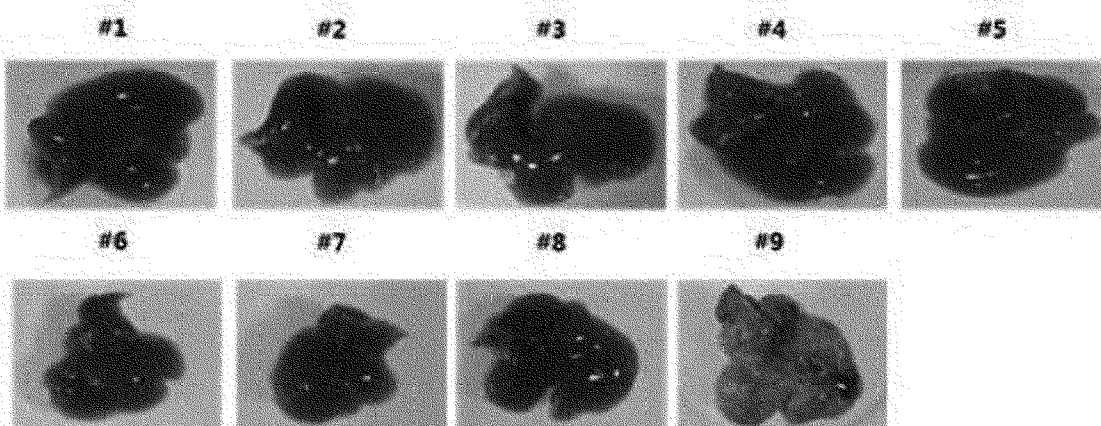
[도14]



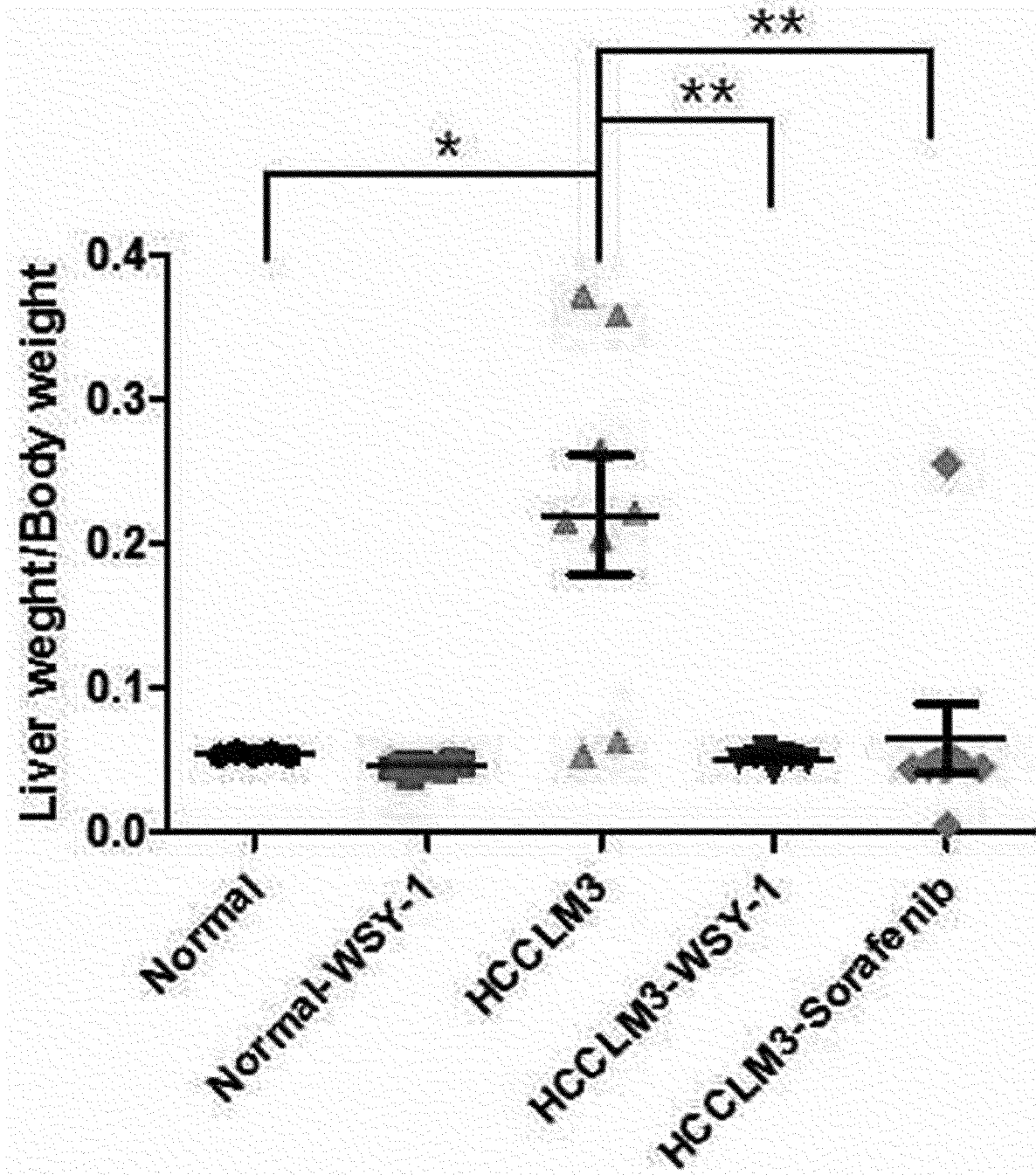
[도15]



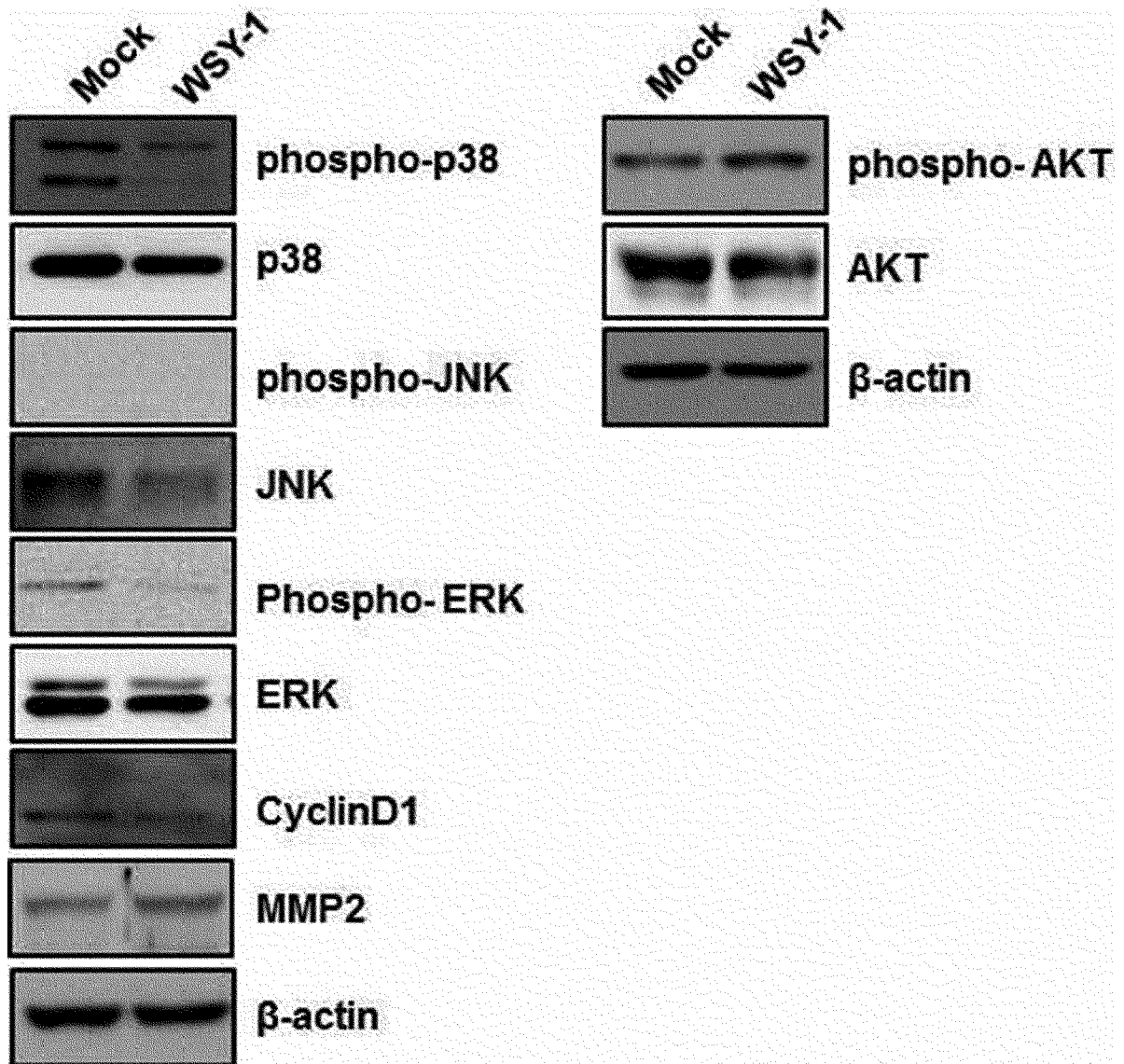
[도16]

Hepa1-6**Hepa1-6-WSY-1 (100 mpk)****Hepa1-6-Sorafenib (30 mpk)**

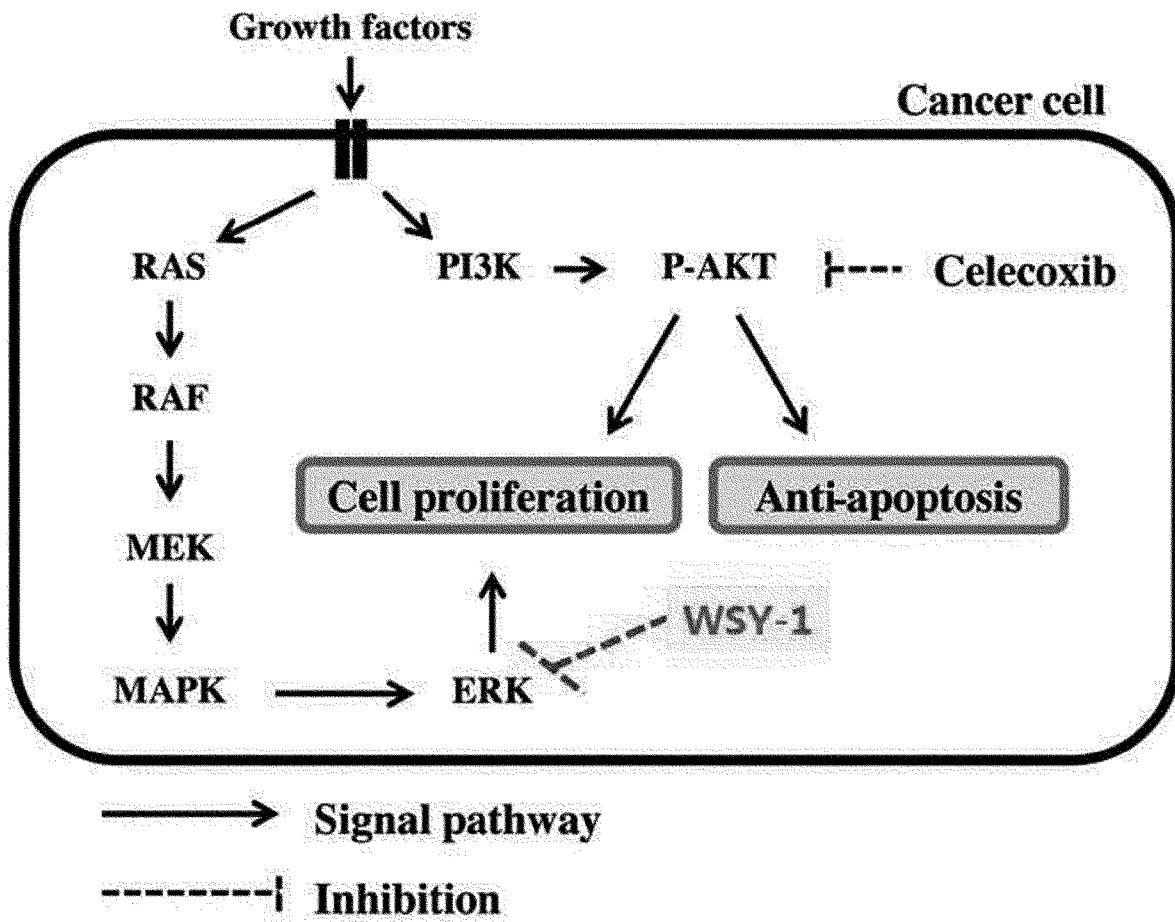
[도17]



[도18]



[도19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/012643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/84(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)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 36/84; A61K 36/185; A61P 1/18; A61K 9/12; A61K 8/97; A23L 33/105

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: Nardostachysjatamansi, liver cancer, spikenard, anticancer, ethanol, extraction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAETUNG, A. et al., "Cytotoxic Activity of Thai Medicinal Plants for Cancer Treatment", Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2005, vol. 27, suppl. 2, pages 469-478 See abstract; page 471; tables 2-3; and figure 1.	1-8
X	CHAUDHARY, S. et al., "Evaluation of Antioxidant and Anticancer Activity of Extract and Fractions of Nardostachys Jatamansi DC in Breast Carcinoma", BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, vol. 15, thesis no. 50, inner pages 1-13 See abstract; pages 3, 8-9; tables 4-5; and figure 2.	1-8
X	KR 10-2014-0092995 A (KEMIMEDI CO., LTD. et al.) 25 July 2014 See abstract; claims 1-7; and paragraphs [0064]-[0070].	1-8
X	KR 10-2012-0111106 A (KEMIMEDI CO., LTD. et al.) 10 October 2012 See abstract; claims 1-7; and paragraphs [0054]-[0057].	1-8
A	CN 101468048 A (ZHEJIANG ZHENG FANG PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 01 July 2009 See the entire document.	1-8



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

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JULY 2017 (10.07.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/012643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0092995 A	25/07/2014	KR 10-1500582 B1	10/03/2015
KR 10-2012-0111106 A	10/10/2012	WO 2012-134250 A2 WO 2012-134250 A3	04/10/2012 07/03/2013
CN 101468048 A	01/07/2009	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/84(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/84; A61K 36/185; A61P 1/18; A61K 9/12; A61K 8/97; A23L 33/105

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: 감송향, 간암, 스파이크나드, 향암, 에탄올, 추출

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SAETUNG, A. 등, 'Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment' Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2005년, 27권, 부록 2, 페이지 469-478 초록; 페이지 471; 표 2-3; 및 도면 1 참조.	1-8
X	CHAUDHARY, S. 등, 'Evaluation of antioxidant and anticancer activity of extract and fractions of Nardostachys jatamansi DC in breast carcinoma' BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015년, 15권, 논문번호 50, 내부페이지 1-13 초록; 페이지 3, 8-9; 표 4-5; 및 도면 2 참조.	1-8
X	KR 10-2014-0092995 A (주식회사한국전통의학연구소 등) 2014.07.25 요약; 청구항 1-7; 및 단락 [0064]-[0070] 참조.	1-8
X	KR 10-2012-0111106 A (주식회사한국전통의학연구소 등) 2012.10.10 요약; 청구항 1-7; 및 단락 [0054]-[0057] 참조.	1-8
A	CN 101468048 A (ZHEJIANG ZHENGFANG PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 2009.07.01 전체 문헌 참조.	1-8

☐ 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

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0092995 A	2014/07/25	KR 10-1500582 B1	2015/03/10
KR 10-2012-0111106 A	2012/10/10	WO 2012-134250 A2	2012/10/04
		WO 2012-134250 A3	2013/03/07
CN 101468048 A	2009/07/01	없음	