(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0047495
(43) 공개일자 2019년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9066 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/22 (2006.01) *A61K 36/537* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/9066 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0141445
(22) 출원일자 2017년10월27일
심사청구일자 2017년10월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
류봉하
경기도 성남시 분당구 내정로165번길 35, 529동 301호(수내동, 양지마을한양아파트)
최혁재
서울특별시 강남구 선릉로 221, 207동 1204호(도곡동, 도곡렉슬아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

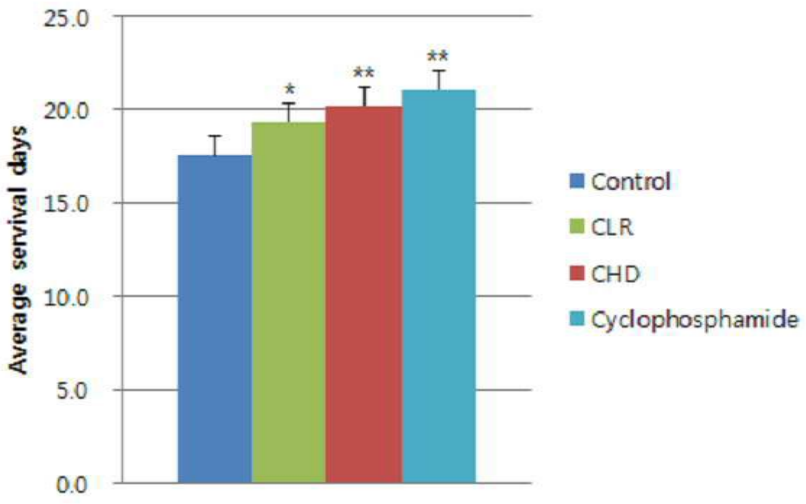
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **혼합 생약 추출물을 포함하는 항암용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예는 울금 추출물, 칠피 추출물, 및 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/22 (2013.01)
A61K 36/537 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
(72) 발명자
윤성우
서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 109동 2801호(대치동, 래미안 대치 팰리스(1단지))
김은진
서울특별시 동대문구 제기로 131, 102동 104호(청량리동, 한신아파트)
오현아
서울특별시 동대문구 경희대로1길 30(회기동)
정원용
서울특별시 송파구 가락로5길 3-81, 1동 402호(석촌동, 포레스트빌)
김진성
서울특별시 서초구 신반포로 270, 103동 1102호(반포동, 반포자이아파트)
류한성
서울특별시 용산구 녹사평대로 245, 2동 802호(용산동2가, 한신아파트)
박소연
서울특별시 동대문구 사가정로 65, 302동 1002호(전농동, 래미안크레시티아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

울금 추출물, 칠피 추출물, 및 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 울금 추출물 300 내지 700 중량부, 상기 칠피 추출물 30 내지 70 중량부, 및 상기 단삼 추출물 5 내지 15 중량부를 포함하는 항암용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 울금 추출물 및 단삼 추출물은 에탄올 추출물인 항암용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 칠피 추출물은 열수 추출물인 항암용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 항암용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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.

[0003] 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 상이하다.

[0004] 최근 의학의 빠른 발전과 더불어 수술, 방사선 요법 및 화학 요법을 통해 여러 형태의 암 치료법이 다양하게 이루어지고 있음에도 불구하고, 여전히 많은 암 환자들이 암세포의 완전한 제거와 전이 방지에 대한 어려움을 겪고 있다.

[0005] 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 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 본 발명자들은 신규한 항암제를 개발하기 위한 노력을 계속한 결과, 울금, 칠피, 및 단삼을 포함하는 혼합 생약재 추출물이 정상 세포의 생장에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 생약재 추출물을 포함하는 생체 안전성 및 암 억제 활성이 우수한 항암용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 측면에 따르면, 울금 추출물, 칠피 추출물, 및 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물이 제공된다.

[0009] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 상기 울금 추출물 300 내지 700 중량부, 상기 칠피 추출물 30 내지 70 중량부, 및 상기 단삼 추출물 5 내지 15 중량부를 포함할 수 있다.

[0010] 일 실시예에 있어서, 상기 울금 추출물 및 단삼 추출물은 에탄올 추출물일 수 있다.

[0011] 일 실시예에 있어서, 상기 칠피 추출물은 열수 추출물일 수 있다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품이 제공된다.

[0015] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 상기 항암용 조성물은 암의 성장을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라, 천연 생약재에서 유래하므로 인체에 대한 부작용을 야기하지 않는다.

[0017] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 Sarcoma-180 암세포를 주입하여 복강암을 유발시키고 4주 후까지 생존일을 측정한 것이다(*p < 0.05, **p < 0.01 versus the control group).

도 2는 Sarcoma-180 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 4주 후 종양의 무게를 측정한 것이다(*p < 0.05, **p < 0.01 versus the control group).

도 3은 LLC 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 3주간 고형암의 크기를 측정한 것이다(**p < 0.01, ***p < 0.001 versus the control group).

도 4는 LLC 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 3주 후 종양 무게를 측정한 것이다(*p < 0.05, ***p < 0.001 versus the control group).

도 5는 SNU-601 cell을 주입하여 고형암을 유발시키고 6주간 고형암의 크기를 측정한 것이다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 versus the control group).

도 6은 SNU-601 cell을 주입하여 고형암을 유발시키고 6주 후 종양 무게를 측정한 것이다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 versus the control group).

도 7은 B16-F10 cell을 주입하고 18일 후 적출된 폐의 종양개수를 육안으로 관찰한 것이다.

도 8은 Sarcoma-180 암세포를 주입하여 복강암을 유발시킨 실험군에서 염증성 사이토카인을 측정한 것이다(#p < 0.05 versus normal group; *p < 0.05 versus the control group).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0020] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0021] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0022] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0023] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 일 측면에 따르면, 울금 추출물, 칠피 추출물, 및 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물이 제공된다.

[0025] 상기 "암", "종양" 또는 "악성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 백혈병, 모세포종 및 육종을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니며, 예컨대 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0026] 상기 “유효성분으로 포함하는”은 항암 효과를 나타낼 수 있는, 예컨대, 암 세포의 사멸을 유도하거나 암 세포의 증식을 저해하는 정도의 유효량을 함유하는 것을 의미할 수 있다.

[0027] 상기 “추출물”은 용매와 추출 원료를 특정 조건하에서 접촉시킴으로써 추출 원료에 함유된 유효성분을 분리해낸 것으로, 상기 추출물은 생약재에 함유된 다양한 유효성분을 포함할 수 있다.

[0028] 상기 “울금(鬱金, *Curcuma aromatica Salisb.*)”은 다년생 숙근성 초본식물로서 생강과 식물인 강황, 울금, 아출의 덩이뿌리(塊根)이다.

[0029] 상기 울금은 항약(생약)대사전에 의하면 지질대사작용(동물실험)에 영향을 주며, 주동맥 및 관상동맥의 내막 반괴의 형성, 지질의 침적을 감소시킬 수 있고 함유된 정유는 담즙의 분비와 배설을 촉진하는 작용이 있어 담낭을 수축시킴으로써 이담작용을 가지며 사상결석을 용해하므로 담석증에 쓰인다고 알려져 있다. 또한 중약대사전에 의하면 맛은 맵고 쓰며 성질은 한하고 독이 없으며 기의 순환을 촉진하고 울결된 것을 풀며 혈을 량하게 하고 어혈을 없애는 효능이 있다. 상기 울금은 흉복협륵의 제통, 실심전광, 열병신혼, 토혈, 비출혈, 혈뇨, 혈림, 여

자의 대상월경, 황달을 치료한다고 알려져 있다.

[0030] 상기 "칠피(*Rhus verniciflua Stokes*)" 옻나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 옻나무의 수피이다. 상기 옻나무는 중국, 일본 등 동북아시아에서 많이 자라는 낙엽활엽수교목으로 이의 수피(bark)인 칠피로부터는 현재까지, 칼콘(chalcone), 플라보노이드 등의 페놀성화합물이 분리 및 보고되어 있고, 그 생리 활성으로는 근래에 칠피 추출물 또는 이로부터 분리된 페놀성화합물들의 항암, 항염증, 항산화, 간세포보호활성, 항-아폽토시스, 면역조절활성 등이 보고된 바 있다.

[0031] 상기 "단삼(danshen, *Salvia miltiorrhiza Bunge*)"은 꿀풀과(*Labiatae*)에 속하는 다년생식물로, 활혈거어(活血祛瘀), 양혈소종(凉血消腫)시키는 효능이 있어 한방에서 부인의 생리불순, 생리통, 산후복통 및 어혈성의 심복부동통, 타박상의 치료와 불면증, 피부발진 등의 약재로 쓰인다.

[0032] 상기 단삼의 주요 화학성분으로는 탄시논(tanshinone) Ⅰ, ⅡA, ⅡB 등을 포함하는 디터펜(diterpene) 화합물과, 살비안산 A(salvianic acid A), 프로토카테큐익 알데히드(protocatechuic aldehyde), 살비아놀산 B(salvianolicacid B) 등을 포함하는 페놀 화합물(phenolic compound), 그 외에 바이칼린(baicaline), β-시토스테롤(β-sitosterol), 우솔릭산(ursolic acid), 비타민 E(vitamin E)와 타닌(tannin) 등이 알려져 있으며, 상기 단삼의 생리활성으로는 항균, 항산화, 항암, 항돌연변이 활성 등이 알려진 바 있다.

[0033] 예컨대 상기 생약 추출물은 상기 각 생약재를 물로 수세한 후 건조시키고 잘게 분쇄하여, 각 원료 중량의 5 내지 20배에 달하는 부피의 용매로 약 2시간 내지 5시간 동안 환류 순환 추출, 가압 추출, 초음파 추출 등의 통상적인 방법으로 추출하고 여과함으로써 제조될 수 있다. 또한, 상기 추출물은 감압 증류 또는 동결 건조 등과 같은 추가적인 공정에 의해 분말 상태로 수득될 수 있다.

[0034] 한편, 상기 추출물은 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 추출물은 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획물을 포함할 수 있다.

[0035] 상기 추출 공정에 있어서 용매의 종류는 특별히 한정되지 않으며 필요에 따라 다양한 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출은 상기 용매를 사용하여 냉침, 온침, 가열 등 당해 기술 분야의 통상적인 방법이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 상기 울금 추출물 및 단삼 추출물은 에탄올 추출물일 수 있고, 상기 칠피 추출물은 열수 추출물일 수 있다.

[0036] 상기 원료에 포함된 유효성분은 용매의 극성에 따라 추출 비율이 상이해질 수 있으므로, 상기 원료에 함유된 항암 활성을 나타내는 유효성분의 함량을 극대화 하기 위해 추출 용매의 특성을 달리할 수 있다.

[0037] 본 발명자들은 수천례에 이르는 임상 치료를 바탕으로 탁월한 항암 효과가 구현될 수 있는 최적화된 용매를 적용하였다. 특히, 물과 에탄올은 상기 생약재에 함유된 생리 활성 물질의 추출에 있어서 선택성이 우수하므로 상기 용매에 의해 최적의 항암 효과가 구현될 수 있다.

[0038] 물과 에탄올은 극성이 상이하여, 각 극성에 따라 추출되는 유효성분이 상이할 수 있으므로 최적의 항암 효과가 구현될 수 있도록 상기 에탄올의 농도를 적절히 제어할 수 있다.

[0039] 다만, 상기 에탄올은 농도가 90%(v/v) 초과이면 적정한 수율이 구현되지 않을 수 있고, 농도가 60%%(v/v) 미만이면 항암 효과를 나타내는 유효 성분이 충분하게 추출되지 않을 수 있다.

[0040] 상기 조성물은 상기 울금 추출물 300 내지 700 중량부, 상기 칠피 추출물 30 내지 70 중량부, 및 상기 단삼 추출물 5 내지 15 중량부를 포함할 수 있다.

[0041] 상기 혼합 추출물은 원료 혼합 비율의 편차가 큰 경우 각 추출물의 유효성분에서 유래한 항암 효과가 적절하게 구현되지 않을 수 있으므로, 작업 환경 및 최종 산물의 품질을 고려하여 혼합비율을 적절하게 제어할 수 있다.

[0042] 본 발명자들은 임상의 결과를 토대로 상기 추출물의 최적 혼합 비율을 도출하였으며, 상기 범위 내에서 상기 조성물의 항암 활성이 극대화될 수 있다.

[0043] 또한, 상기 울금 추출물, 칠피 추출물, 및 단삼 추출물은 조성물 전체 중량에 대하여 1.0 내지 10.0 중량% 함유될 수 있다.

[0044] 상기 추출물은 함량이 0.1 중량% 미만이면 기대하는 효과를 얻기 어려울 수 있으며, 10.0 중량%를 초과이면 경

제성이 과도하게 저하되거나 적용된 제품 본연의 품질이 구현되지 않을 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.

[0046] 상기 "예방"은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 상기 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 개체 내 암세포의 성장이 억제되거나 암세포가 사멸하는 현상을 의미할 수 있다.

[0047] 상기 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.

[0048] 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 전신 또는 국소 투여될 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.

[0049] 상기 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0051] 경구 투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있고, 상기 고형제제는 상기 화합물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0052] 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있고, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0053] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0054] 상기 조성물은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 약학적으로 유효한 양이 투여될 수 있으며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0055] 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제, 예컨대 항암제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있고, 단일 또는 다중 투여될 수 있다.

[0056] 상기 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin), 메토트렉세이트(methotrexate)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하

며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0058] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 상이해질 수 있으며, 적합한 총 1 일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1 회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0059] 상기 조성물은 암의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용 가능하다. 예컨대, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 및 인간 등 어느 개체에나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법 이라면 제한 없이 포함한다.

[0060] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품이 제공된다.

[0061] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.

[0062] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의 약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다.

[0063] 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.

[0064] 상기 건강기능식품은 탈모증의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.

[0065] 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 목적으로 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.

[0066] 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0067] 상기 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질캅셀제는 통상의 경질캅셀에 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질캅셀제는 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0068] 상기 환 형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0069] 상기 과립형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0070] 또한, 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 본 발명의 기재내용에 기초하여 각 구성의 종류, 도입 비율 등을 변화시켜 적용할 수 있을 것이며, 상기 변형에도 불구하고 동등한 기술적 효과가 구현되는 경우라면, 본 발명의 기술적 사상에 포괄된다고 할 것이다.

[0072] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물이 제공된다.

[0073] 상기 "항암 보조제"는 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제를 의미한다. 예컨대, 상기 항암 보조제는 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있다.

[0074] 다른 예로서, 농도의존적인 항암활성을 나타내는 제제를 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 항암 보조제로서 사용할 수 있다. 상기 항암 보조제는 처리농도에 따라 항암제 또는 항암 보조제로서 사용할 수 있으며, 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않는 처리농도 범위에서 항암 보조제로 사용할 수 있다.

[0075] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0076] **실시예 1**

[0077] 울금 500g을 80%(v/v) 에탄올로 2시간 환류 추출하고 농축하여 동결 건조물로 46.0g을 수득하였다(CLR, 수율 9.20%).

[0078] 칠피 700g을 180 ℃에서 1시간 동안 수치한 후, 증류수(DW)로 2 시간 추출 및 농축하여 동결 건조물로 24.0g을 수득하였다(RRVS, 수율 3.41%).

[0079] 단삼 200g을 80%(v/v) 에탄올로 2시간 환류 추출하고 농축하여 동결 건조물로 45.0g을 수득하였다(SMB, 수율 22.5%).

[0080] CLR, RRVS 및 SMB를 50:5:1의 중량비로 혼합한 울금칠피단삼 혼합 추출물을 CHD으로 명명하였다.

[0081] **실시예 2**

[0082] 실시예 1과 동일한 방법으로 제조하되 각 생약재를 증류수(DW)로 열수 추출하였다.

[0083] **실시예 3**

[0084] 실시예 1과 동일한 방법으로 제조하되 각 생약재를 80%(v/v) 에탄올로 환류 추출하였다.

[0085] **비교예**

[0086] 하기 생약 추출물을 비교예로 설정하였다. 추출물의 제조 방법은 실시예 1 내지 3과 동일하게 하였다.

표 1

[0087] [함량(중량비)]

구분	비교예						
	1	2	3	4	5	6	7
울금 에탄올 추출물	150	-	-	75	-	75	50
칠피 열수 추출물	-	150	-	75	75	-	50
단삼 에탄올 추출물	-	-	150	-	75	75	50

[0088] **실험 방법**

[0089] ***암세포주 배양***

[0090] 대장암세포인 LoVo, 유방암세포인 MCF-7, 간암세포인 HepG2, 위암세포인 AGS, 비소세포성폐암세포인 A549, 소세포성폐암세포인 NCI-H69, 백혈병 세포인 HL-60, 복강암세포인 Sarcoma 180 은 한국 세포주 은행에서 분양을 받았다.

[0091] HepG2는 10% FBS(Gibco, U.S.A.)와 1% penicillin-streptomycin(Gibco, U.S.A.)을 첨가한 MEM 배지(gibco, U.S.A.)에서, 이 외의 세포는 10% FBS 와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 배지(Gibco, U.S.A.)에서 37℃, 5% CO_2 농도의 incubator에 배양하였다.

[0092] 폐암세포인 LL/2는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM배지(ATCC, U.S.A.)에서 37 ℃, 5% CO_2 농도의 incubator에 배양하였다.

[0093] ***암세포주에 대한 독성 측정***

[0094] 세포 독성 측정 실험은 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)의 환원정도를 측

정하는 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다.

[0095] 각 세포주를 96 well plate에 2 x 10^4 cells/well로 seeding 하였으며 24시간 배양한 후, 시료를 0.1 내지 1 mg/mL 농도로 처리하였다.

[0096] 48시간 동안 배양한 후, 각 well에 1 mg/mL의 MTT 용액(Sigma, U.S.A.)을 25 μL/mL씩 첨가하여, 37℃, 5% CO_2 농도의 incubator에서 4시간 동안 배양하였다.

[0097] 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 50 μL/mL씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0098] 부유세포인 NCI-H69와 HL-60은 위와 동일한 방법으로 시료를 처리하였으며, EZ-cytox kit(Daeillab Service Co., LTD, Korea)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0099] ***실험동물***

[0100] 실험동물은 6주령 된 웅성 C57BL/6, Balb/c mouse, Balb/c nude mouse(중앙실험동물, 서울) 또는 ICR male mouse, S.D rat(영바이오, 성남)을 사용하였으며, 온도 22±2 ℃, 습도 60±10%, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 반입 후 7일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

[0101] 실험동물의 관리와 유지 및 모든 실험은 경희의료원 실험동물윤리위원회의 승인 하에 실시되었다.

[0102] ***Sarcoma-180으로 유도한 복강암 모델***

[0103] 복강암을 유발하기 위하여 ICR mouse의 복강에 0.1 mL(1.0 × 10^6 cells/mouse)의 sarcoma-180 세포 부유액을 주사하였다.

[0104] 복강 내 암세포를 이식하고 24시간이 경과한 후부터 4주간 연속적으로 생리식염수 또는 실험약을 경구로 투여하였다.

[0105] 양성대조군으로는 cyclophosphamide를 10 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 복강 내에 암세포를 이식한 이후부터 4주간 생존 여부를 관찰하였으며, 하기 공식에 준해 수명연장백분율을 산출하였다.

[0106] 수명연장백분율(%) = 실험군의 평균수명(일) - 대조군의 평균수명(일) / 대조군의 평균수명(일) x 100

[0107] ***Sarcoma-180으로 유도한 고형암 모델***

[0108] 고형암을 유발하기 위하여 ICR mouse의 서혜부에 0.3 mL(2.0 × 10^7 cells/mouse)의 sarcoma-180 세포 부유액을 주사하였다.

[0109] 암세포를 이식하고 24시간이 경과한 후부터 4주간 연속적으로 생리식염수 또는 실험약을 경구로 투여하였다.

[0110] 양성대조군으로는 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 서혜부 내에 암세포를 이식한 이후부터 4주 후 생성된 고형암을 적출하여 무게를 측정하였으며 종양 성장저지능은 다음과 같이 산출하였다.

[0111] 종양 성장 저지능(%) = 대조군의 고형암 무게(g) - 실험군의 고형암 무게(g) / 대조군의 고형암 무게(g) × 100

[0112] **LLC 유도 고형암 모델**

[0113] LLC(Lewis lung cancer cell)를 이용하여 고형암을 유발하기 위하여 C57BL/6 mouse의 배부에 0.1 mL(1.5 × 10^6 cells/mouse)의 LLC를 피하 주사하였다.

[0114] 암세포를 이식하고 24시간이 경과한 후부터 3주간 연속적으로 생리식염수 또는 실험약을 경구로 투여하였고 양성 대조군으로는 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다.

[0115] 3주간 주 2회 종양의 크기를 측정하였고 실험 종료시 고형암을 적출하여 무게를 측정하였다. 종양 성장저지능은 다음과 같이 산출하였다.

[0116] 종양 성장 저지능(%) = 대조군의 고형암 무게(g) - 실험군의 고형암 무게(g) / 대조군의 고형암 무게(g) ×100

[0117] ***SNU-601로 유도한 위암 모델***

[0118] SNU-601 cell을 이용하여 고형암을 유발하기 위하여 Balb/c nude mouse의 배부에 0.1 mL(1.0×10^7 cells/mouse)의 SNU-601 cell을 피하 주사하였다.

[0119] 암세포를 이식하고 24시간이 경과한 후부터 6주간 연속적으로 생리식염수 또는 실험약을 경구로 투여하였고 양성대조군으로는 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 6주간 주 2회 종양의 크기를 측정하였고 실험 종료시 고형암을 적출하여 무게를 측정하였다. 종양 성장저지능은 다음과 같이 산출하였다.

[0120] 종양 성장 저지능(%) = 대조군의 고형암 무게(g) - 실험군의 고형암 무게(g) / 대조군의 고형암 무게(g) × 100

[0121] ***흑색종으로 유도한 폐암 전이 모델***

[0122] Melanoma cell을 이용하여 전이암을 유발하기 위하여 C57BL/6 mouse의 꼬리 정맥에 0.1 ml(6.0×10^5 cells/mouse)의 B16-F10 cell을 투여하였다.

[0123] 암세포를 투여하고, 24시간이 경과한 후부터 18일간 연속적으로 생리식염수 또는 실험약을 경구로 투여하였다. 양성대조군으로는 cyclophosphamide를 20 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 18일 후 부검하여 폐를 적출하고, 종양개수를 육안으로 관찰하여 비교하였다.

[0124] ***Azoxymethane으로 유도한 대장암 모델***

[0125] Balb/c mouse에 대장암을 유발하기 위하여 azoxymethane을 25 mg/kg의 용량으로 복강주사하였다.

[0126] Azoxymethane 투여 2주 후 dextran sulfate sodium(DSS) 2%를 1주간 음수로 투여시킨 다음, 2주간 휴식기, 다시 1주간 DSS를 음수로 투여시킨 후 2주간 휴식기를 가지는 방법으로 실시하였다.

[0127] 실험약은 azoxymethane 투여 2주 후부터 경구 투여하였으며, 총 8주간의 시험기간이 종료된 후 실험동물을 부검하였다.

[0128] 마우스의 대장은 항문에서 회맹부(ilocecal junction)까지 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지의 길이를 자로 측정하였고 무게를 측정하였다. 종양개수는 육안으로 관찰하여 비교하였다.

[0129] ***Diethylnitrosamine으로 유도한 간암모델***

[0130] S.D rat에 간암을 유발하기 위하여 diethylnitrosamine(MO, U.S.A.) 50mg/kg을 0.9% 식염수 2 ml에 용해하여 1주 간격으로 12회 복강주사 하였다. 실험약은 diethylnitrosamine 복강주사 후 투여하여 총 8주간 투여하였다.

[0131] 실험 종료 후 간을 채취하여 육안으로 종양의 개수를 세어 비교하였고 혈액을 채취하여 GOT, GPT, ALP 등의 인자를 측정하였다.

[0132] ***Sarcoma-180으로 유도한 고형암 모델에서 면역인자의 측정***

[0133] 고형암을 유발시키기 위하여 ICR mouse의 서혜부에 0.3 mL(2.0×107 cells/mouse)의 sarcoma-180 세포 부유액을 주사하였다.

[0134] 암세포 이식 후, 24시간이 경과한 후부터 4주간 연속적으로 생리식염수 또는 실험약을 경구로 투여하였다.

[0135] 서혜부 내에 암세포를 이식한 이후부터 4주 후 심장으로부터 혈액을 채취하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 혈청을 취하여 본 실험에 사용하였다. 혈청의 분석은 IFN-γ, IL-2 및 IL-4 ELISA kit(Thermo Fisher Scientific, U.S.A)를 사용하여 측정하였다.

[0136] ***통계적 검증***

[0137] 본 실험에서 얻은 결과는 평균(mean) ± 표준오차(S.E.M)로 표시하였으며, 유의성을 검정하기 위하여 One-way ANOVA test를 시행하였다.

[0138] 사후 검증으로 Dunnett's test를 사용하여 비교하였으며, 통계학적인 유의 수준은 $p < 0.05$로 하였다.

[0139] **실험 결과**

[0140] ***암세포 독성에 대한 효과***

[0141] 실시예 및 비교예의 암세포 증식 억제 효과를 알아보기 위해 대장암세포인 LoVo, 유방암세포인 MCF-7, 간암세포인 HepG2, 위암세포인 AGS, 비소세포성폐암세포인 A549, 소세포성폐암세포인 NCI-H69, 백혈병 세포인 HL-60, 복

강암세포인 Sarcoma 180, 폐암세포인 LL/2을 대상으로 MTT assay를 실시하였다.

표 2

[0142] (IC50, mg/mL)

구분	실시예			비교예						
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7
LoVo	<0.10	<0.10	<0.10	0.11	0.16	0.14	0.16	0.14	0.21	<0.10
MCF-7	0.25	0.29	0.30	0.34	0.37	0.35	0.41	0.36	0.33	0.30
HepG2	0.50	0.43	0.55	0.55	0.57	0.61	0.59	0.57	0.63	0.59
AGS	0.16	0.19	0.26	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.28
A549	0.32	0.45	0.39	0.44	0.48	0.51	0.54	0.49	0.41	0.49
NCI-H69	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.13	0.14	0.13	0.13	0.11	<0.10
HL-60	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.11	0.13	<0.10	<0.10	0.12	<0.10
Sarcoma 180	0.18	0.27	0.34	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.26
LL/2	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.11	0.13	0.14	0.11	0.12	<0.10

[0143] 비교예 1(CLR) 1 mg/mL 이하 농도에서 위의 모든 암세포주에 대해 50% 이상의 암세포 증식 억제 효과가 있었으며, 실시예 1(CHD)은 암세포 중에서 특히 NCI-H69, HL-60 및 LL/2 세포에 대해 IC50 값이 0.10 mg/mL 이하로 강한 억제 효과를 나타냈다.

[0144] 실시예 1(CHD)은 1 mg/mL 이하 농도에서 위의 모든 암세포주에 대해 50% 이상의 암세포 증식 억제 효과가 있었으며, 특히 LoVo, NCI-H69, HL-60 및 LL/2 세포에 대해 IC50 값이 0.10 mg/mL 이하로 강한 억제 활성을 나타냈다.

[0145] ***Sarcoma-180으로 유도한 복강암에 대한 억제효과***

[0146] 실시예 및 비교예의 Sarcoma-180 암세포에 대한 항암효과를 측정하였다. 실험동물의 복강에 Sarcoma-180 암세포를 주입하여 복강암을 유발시키고 4주 후까지 생존여부를 측정하였다(도 1).

[0147] 생리식염수를 투여한 대조군은 평균 17.6일에 폐사하였으나, 비교예 1(CLR) 투여군은 평균 19.3일에 폐사하였고 실시예 1(CHD) 투여군은 평균 20.2일에 폐사하여 대조군에 비하여 생존일수가 유의적으로 상승하였으며 각각 10.1, 15.1%의 수명연장효과를 나타내었다.

[0148] ***Sarcoma-180으로 유도한 고형암 성장 억제효과***

[0149] Sarcoma-180 암세포에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 mouse 서혜부에 Sarcoma-180 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 4주 후 종양의 무게를 측정하였다(도 2).

[0150] Sarcoma-180으로 유도한 고형암 모델에서 대조군의 고형암 무게는 평균 8.0g이었으나, 비교예 1(CLR)여군의 고형암 무게는 평균 5.5g, 실시예 1(CHD) 투여군의 고형암 무게는 평균 4.5g으로 대조군에 비하여 유의적으로 고형암의 무게가 감소하였으며 각 31.6%, 44.5%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다.

[0151] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군에서는 평균 2.9g으로서 약 63.8%의 종양성장저지효과가 관찰되었다.

[0152] ***LLC로 유도한 고형암 성장 억제효과***

[0153] 실시예 및 비교예의 고형암 성장 억제 효과를 측정하기 위하여 실험동물의의 배부에 LLC 암세포를 주입하여 고형암을 유발시키고 3주간 고형암의 크기를 측정하고(도 3), 실험 종료시 종양 무게를 측정하였다(도 4).

[0154] 생리식염수를 투여한 대조군의 고형암 크기는 평균 6.9cm^3였으나, 비교예 1(CLR) 1g/kg을 투여군의 고형암 크기는 평균 5.6cm^3로 대조군에 비하여 고형암의 크기가 감소하는 경향을 보였다.

[0155] 실시예 1(CHD) 1g/kg 투여군의 고형암 크기는 4.1cm^3로 유의적인 감소가 확인되었으며 약 41.3%의 종양성장저지효과를 나타내었다.

[0156] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군에서의 고형암 크기는 평균 2.7cm^3으로 대조군에 비하여 약 61.5% 감소하였다.

[0157] 생리식염수를 투여한 대조군의 고형암 무게는 평균 5.1g이었으나, 비교예 1(CLR) 1g/kg 투여군의 고형암 무게는 평균 4.2g으로 고형암의 무게가 감소하는 경향을 보였다.

[0158] 실시예 1(CHD) 1g/kg 투여군의 고형암 무게는 평균 3.5g으로 대조군에 비하여 유의적으로 고형암의 무게가 감소하였으며 약 30.5%의 종양성장저지효과를 나타내었다. 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군에서의 고형암 무게는 평균 2.1g으로 대조군에 비하여 약 58.5%의 종양성장저지효과를 나타내었다.

[0159] ***SNU-601로 유도한 위암 성장 억제효과***

[0160] 실시예 및 비교예의 SNU-601 암세포에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 실험동물의 배부에 SNU-601 cell을 주입하여 고형암을 유발시키고 6주간 고형암의 크기를 측정하고(도 5), 실험 종료시 종양 무게를 측정하였다(도 6).

[0161] 생리식염수를 투여한 대조군의 고형암 크기는 평균 2.6cm^3이었으나, 비교예 1(CLR) 1g/kg 투여군의 고형암 크기는 평균 1.8 cm^3, 실시예 1(CHD) 1g/kg 투여군의 고형암 크기는 1.3cm^3로 대조군에 비하여 고형암의 크기가 각 28.9, 48.6% 감소하였다.

[0162] 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군에서는 평균 0.2cm^3으로서 약 90.7%의 종양 성장 저지효과가 관찰되었다.

[0163] 생리식염수를 투여한 대조군의 고형암 무게는 평균 2.2g이었으나, 비교예 1(CLR) 1g/kg 투여군의 고형암 무게는 평균 1.1g, 실시예 1(CHD) 1g/kg 투여군의 고형암 무게는 평균 0.7g으로 대조군에 비하여 고형암의 무게가 각 52.4, 70.7% 감소하였다. 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군에서는 평균 0.1g으로서 약 95.4%의 종양성장저지효과가 관찰되었다.

[0164] ***흑색종으로 유도한 폐암 전이 억제효과***

[0165] 실시예 및 비교예의 암 전이 억제효과를 측정하기 위하여 실험동물의 꼬리 정맥에 B16-F10 cell을 주입하였고, 18일 후 폐를 적출하고 종양개수를 육안으로 관찰하였다(도 7).

[0166] 생리식염수를 투여한 대조군의 종양의 개수는 92.2개 였으나, 비교예 1(CLR) 투여군의 종양개수는 74.2개, 실시예 1(CHD) 투여군의 종양개수는 64.2개로 대조군에 비하여 종양개수가 각 19.5, 30.4% 유의적으로 감소하였다. 양성대조군인 cyclophosphamide를 투여한 군에서는 평균 49.2개로서 약 46.7%의 항종양 효과가 관찰되었다.

[0167] ***Azoxymethane으로 유도한 대장암 성장 억제효과***

[0168] 실시예 및 비교예의 azoxymethane으로 유도한 대장암에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 실험동물의 복강에 azoxymethane을 주입하여 대장암을 유발시키고 8주 후 대장의 길이, 무게 및 종양개수를 육안으로 측정하였다(표 3).

[0169] 대장 내 종양 발생 개수를 비교해 보았을 때 종양 개수는 대조군에서 평균 7.1개였으며 비교예 1(CLR) 투여군에서 평균 6.0개, 실시예 1(CHD) 투여군에서 평균 5.4개로 유의적인 감소가 확인되었다.

[0170] 양성대조군인 fluorouracil을 투여한 군에서는 평균 4.9개가 관찰되었다. 대장의 무게와 길이를 측정하였을 때 무게는 차이가 없었으나 대조군의 대장 길이가 짧아졌으며, 비교예 1(CLR) 및 실시예 1(CHD) 투여에 의해 유의적으로 개선되었다.

표 3

[0171]

구분	체중(g)	대장 무게(g)	대장 길이(cm)	종양개수
Normal	25.0±0.7	0.43±0.006	8.7±0.16	-
Control	24.2±0.6	0.44±0.017	7.1±0.30$^{\#\#}$	7.4±0.6
실시예 1(CHD)	24.9±0.4	0.42±0.016	8.2±0.31*	5.4±0.7*
실시예 2	24.9±0.4	0.41±0.016	8.1±0.31*	5.6±0.7*

실시예 3	24.9±0.4	0.42±0.016	8.2±0.31*	5.5±0.7*
비교예 1(CLR)	24.5±0.4	0.41±0.018	8.0±0.24*	6.0±0.4*
비교예 2	24.4±0.4	0.41±0.018	7.9±0.24*	6.1±0.4*
비교예 3	24.3±0.4	0.41±0.018	7.8±0.24*	6.1±0.4*
비교예 4	24.4±0.4	0.40±0.018	7.9±0.24*	6.2±0.4*
비교예 5	24.5±0.4	0.39±0.018	7.7±0.24*	6.1±0.4*
비교예 6	24.6±0.4	0.40±0.017	7.9±0.24*	6.1±0.4*
비교예 7	24.6±0.4	0.41±0.016	8.1±0.31*	5.8±0.4*
Fluorouracil	24.3±0.3	0.43±0.022	8.3±0.20*	4.9±0.7*

[0172] (##p < 0.01 versus normal group; *p < 0.05 versus control group)

[0173] ***Diethylnitrosamine으로 유도한 간암 성장 억제효과***

[0174] 실시예 및 비교예의 diethylnitrosamine로 유도한 간암에 대한 항암효과를 측정하였다(표 4). 대조군의 종양 개수는 평균 10.3개로 확인되었고 비교예 1(CLR) 투여군에서 종양개수는 7.2개로 감소하는 경향을 보였으며, 실시예 1(CHD) 투여군에서 종양개수는 4.8개로 유의적인 감소가 확인되었다.

[0175] GOT, GPT, ALP 모두 대조군에서 유의적으로 상승하였으며 비교예 1(CLR) 및 실시예 1(CHD)의 투여가 이를 유의적으로 감소시켰다.

표 4

[0176]

구분	GOT(U/L)	GPT(U/L)	ALP(U/L)	종양개수
Normal	140±34.5	61±3.1	490±21.8	-
Control	315±20.8#	107±14.3#	799±21.8#	10.3±2.2#
실시예 1(CHD)	207±35.1*	67±4.0*	499±23.4*	4.8±0.8*
실시예 2	208±35.1*	69±4.0*	507±23.4*	5.2±0.8*
실시예 3	209±35.1*	70±4.0*	502±23.4*	5.3±0.8*
비교예 1(CLR)	221±19.6*	82±3.8*	542±36.9*	7.2±1.1
비교예 2	223±19.6*	81±3.8*	545±36.9*	7.4±1.1
비교예 3	221±19.6*	83±3.8*	544±36.9*	7.3±1.1
비교예 4	222±19.6*	79±3.8*	541±36.9*	7.5±1.1
비교예 5	221±19.6*	84±3.8*	543±36.9*	7.4±1.1
비교예 6	218±19.6*	85±3.8*	546±36.9*	7.1±1.1
비교예 7	216±19.6*	72±3.8*	510±36.9*	6.3±1.0
Cyclophosphamide	196±19.3*	61±6.3*	457±25.8*	2.8±1.5*

[0177] (#p < 0.05 versus normal group; *p < 0.05 versus control group)

[0178] ***면역에 미치는 효과 측정***

[0179] 실시예 및 비교예의 시료가 면역에 미치는 영향을 평가하기 위해 대표적 cytokine인 IFN-γ, IL-2 및 IL-4를 측정하였다(도 8).

[0180] Sarcoma-180으로 유도한 고형암에 의해 대조군에서의 IFN-γ 수치가 유의하게 감소하였고 비교예 1(CLR)의 투여

군에 의해 이러한 현상이 개선되었다.

[0181] 실시예 1(CHD) 투여군에서는 대조군에 비하여 유의적으로 IFN-γ 수치가 상승하였으며 20.2%의 개선 효과를 보였다.

[0182] IL-2 측정 결과, 대조군에서 IL-2 수치가 유의하게 감소하였으나 실시예 1(CHD) 투여군에서 IL-2 수치가 유의적으로 상승하는 것을 확인하였으며 약 34.2%의 개선 효과를 나타내었다.

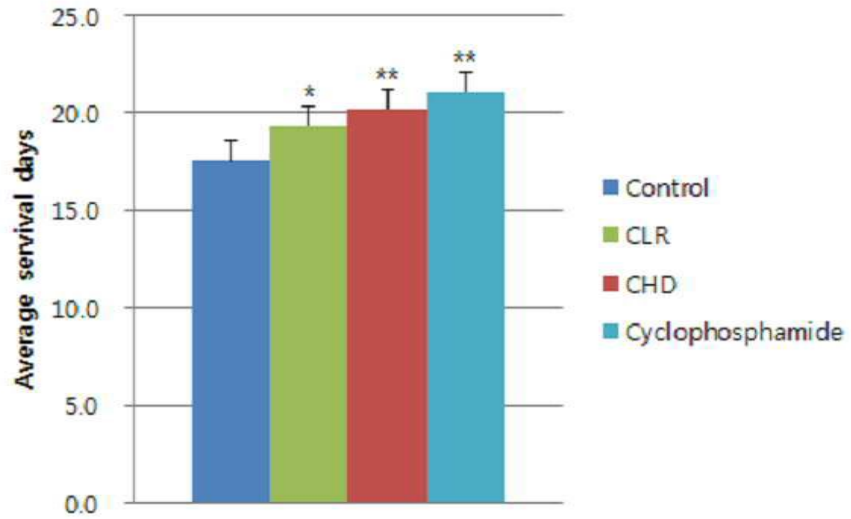
[0183] 또한, IL-4 수치 역시 대조군에서 유의적으로 감소하였고 실시예 1(CHD)의 투여에 의해 유의적으로 개선되었다(약 43.0%).

[0184] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

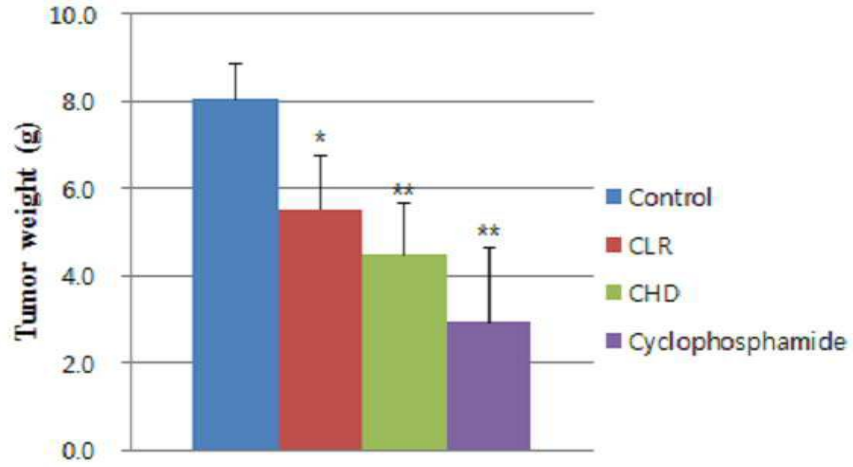
[0185] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

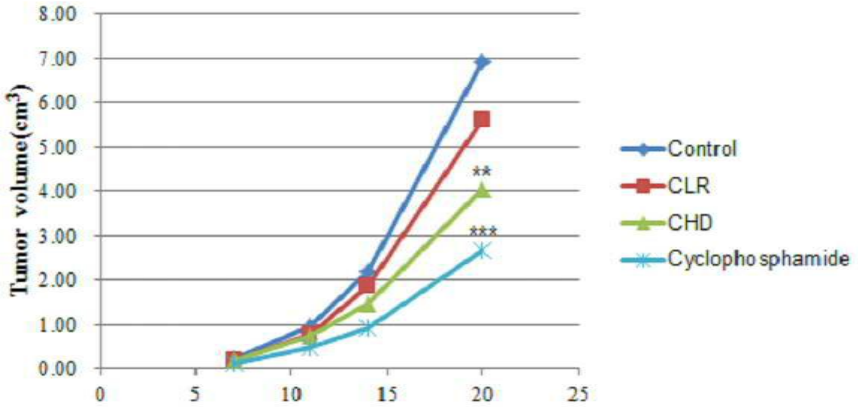
도면1



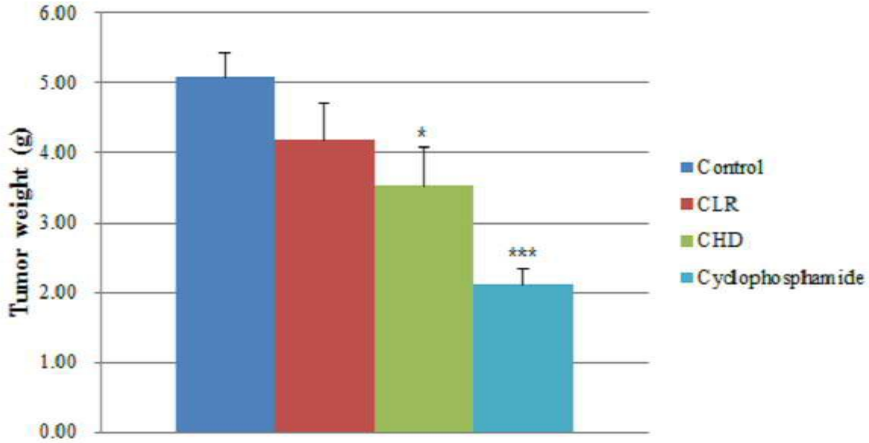
도면2


10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Tumor weight (g)
*
**
**
Control
CLR
CHD
Cyclophosphamide

도면3

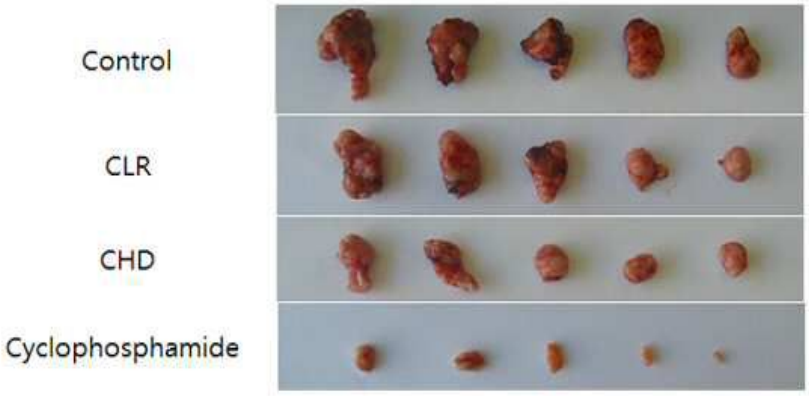

8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Tumor volume(cm3)
0
5
10
15
20
25
**
***
Control
CLR
CHD
Cyclopho sphamide

도면4

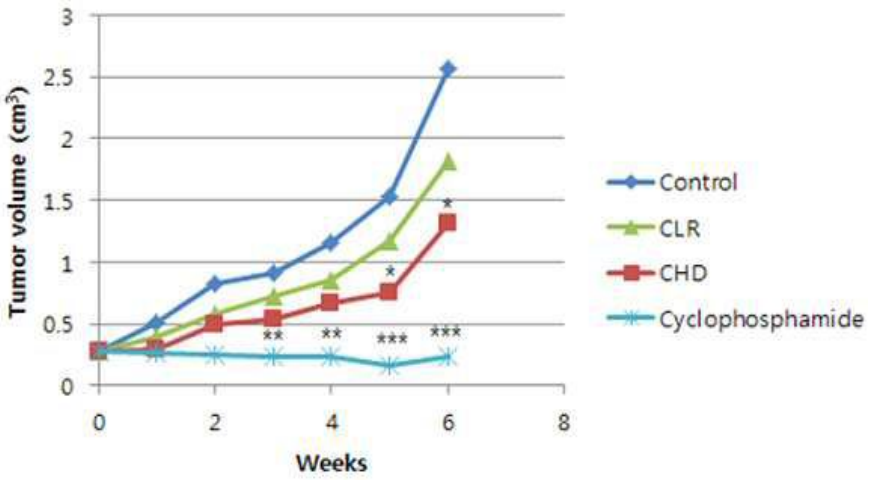

6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Tumor weight (g)
*
***
Control
CLR
CHD
Cyclophosphamide

도면5

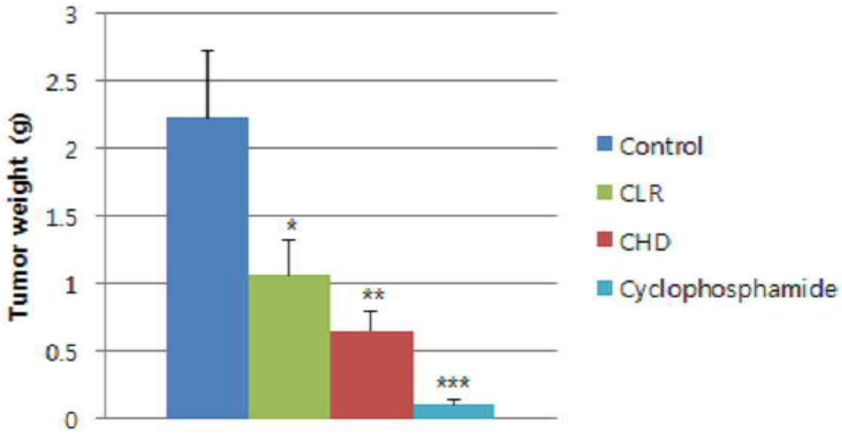
(A)


Control
CLR
CHD
Cyclophosphamide

(B)


Tumor volume (cm³)
Weeks
Control
CLR
CHD
Cyclophosphamide

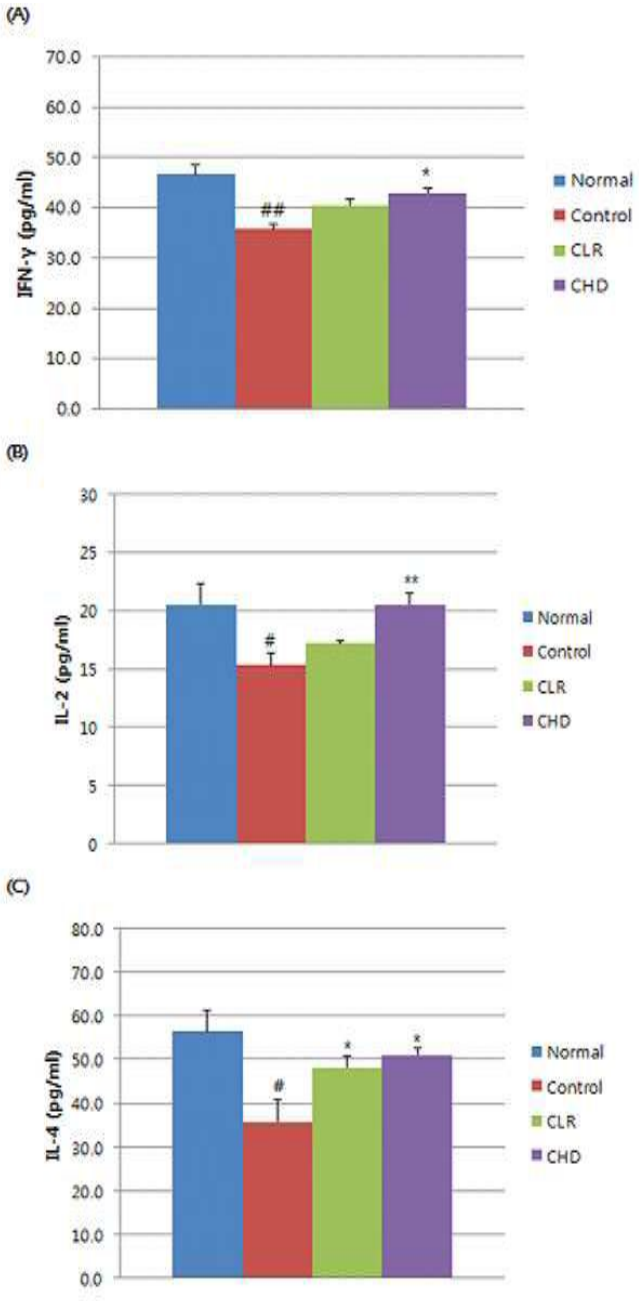
도면6


Tumor weight (g)
Control
CLR
CHD
Cyclophosphamide

도면7


Control
CLR
CHD
Cyclophosphamide

도면8


(A)
IFN-γ (pg/ml)
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
##
*
Normal
Control
CLR
CHD
(B)
IL-2 (pg/ml)
30
25
20
15
10
5
0
#
**
Normal
Control
CLR
CHD
(C)
IL-4 (pg/ml)
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
#
*
*
Normal
Control
CLR
CHD