



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0050990
(43) 공개일자 2023년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/268 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)

A23L 33/105 (2016.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/268 (2013.01)

A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2021-0134449

(22) 출원일자 2021년10월08일

심사청구일자 2021년10월08일

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

권학철

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

권재영

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

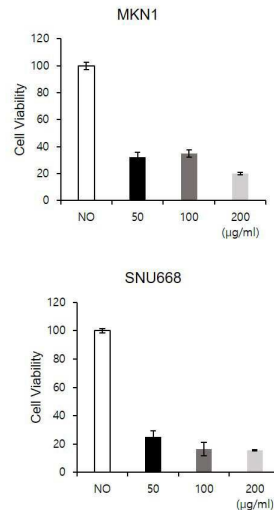
(54) 발명의 명칭 개죽도리풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 개죽도리풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

일 양상에 따르면 따르면, 개죽도리풀 추출물은 미만형 위암을 포함하는 다양한 암종에 대해 우수한 항암 효능을 갖는 바, 상기 추출물을 유효성분으로 하여 효과가 우수한 암 치료제를 개발할 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

김성환

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

이정환

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

차진욱

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

황호성

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

김원규

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

권유진

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

조수연

강원도 강릉시 사임당로 679(대전동)

이택주

경기도 용인시 처인구 백암면 한택로 2

강정화

경기도 용인시 처인구 백암면 한택로 2

이완희

경기도 용인시 처인구 백암면 한택로 2

김현기

경기도 고양시 덕양구 도래울1로 80, 708동 2101호(도내동, 고양 원흥 동일스위트)

명세서

청구범위

청구항 1

개족도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 거제말기 (*Rubus longisepalus var. tozawai (Nakai) T.B.Lee*) 추출물 또는 이의 분획물을 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 뷰탄올, 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 아세톤, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르, 및 디클로로메탄로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 감압고온 추출, 열탕 추출, 환류 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 상온 추출, 초음파 추출, 증기 추출 및 분획 추출로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 방법으로 추출한 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 췌장암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 대장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 암은 미만형 위암인 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

개족도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

개족도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 개족도리풀 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 현대의학의 발달에도 불구하고 암은 인간의 질병 중 아직까지도 치료하기 어려운 질병 중 하나다. 암이라 함은 비정상적인 세포가 모여 이루어진 조직으로 한 개 이상의 조직에서 발생해서 다른 조직으로 퍼져나간다. 현재 알려진 암의 종류만 100여 개 이상이 알려져 있다. 암의 주된 발생 원인은 유전적 및 환경적인 요인에 의한 유전자 돌연변이로 알려져 있는데 유전적 요인의 경우 부모에게 물려받은 변이 유전자에 의한 것이며, 환경적 요인의 경우 흡연이나 비만, 방사선, UV, 스트레스, 환경오염 등에 의한 것이 있다.
- [0003] 2015년 국립암센터 통계상 우리나라 남녀 전체에서 가장 많이 발생한 암은 위암으로서, 암의 발생률은 연령대가 높을수록 상승하지만 서구화된 식습관과 운동부족 등으로 젊은 층의 암 발생률도 갈수록 높아지고 있다. 특히 위암은 특히 30~60대 남성이 걸린 암종 중 1위, 동일 연령대 여성이 걸린 암종 중에서는 갑상선, 유방암에 이어 3위로 나타나 젊은 층도 경계해야 하는 질환이다. 위암은 형태에 따라 장형과 미만형으로 분류되는데, 장형은 암세포가 한 곳에 모여 덩어리로 자라는 형태인 반면 미만형은 깨알같이 작은 암세포가 위벽을 파고들면서 넓게 퍼져 자라는 형태다. 이러한 미만형 위암은 여성환자가 더 많으며 악성도가 높고 진행 속도가 빠른 것이 특징이다.
- [0004] '미만형 위암'은 전체 위암 환자 약 35~40%에 달하는 것으로 집계되며, 40대 미만 젊은 층에서 호발 하는데다 전술한 것과 같이 발생 과정에서 염증을 동반하지 않고 점막하로 침윤하며 자라기 때문에 림프 전이의 위험이 높아 예후가 나쁜 것으로 나타난다.
- [0005] 현재까지 암 환자를 대상으로 한 치료 방법에는 외과 수술(Operation), 화학 요법(Chemotherapy), 방사선 요법(Radiotherapy), 표적 치료(Target therapy), 호르몬 요법 및 면역 요법 등이 있다. 가장 확실한 근치적 수단인 외과 수술은 병소(즉, 암)를 제거하는 치료 방법으로서 초기 암의 경우에는 외과 수술만으로도 완치가 가능하지만, 중기 이후 암이나 접근이 어려운 장기의 경우에는 외과 수술을 이용하는 것 자체가 불가능하다는 단점이 있다. 수술이 불가능한 경우 대부분은 약물 및 방사선 치료를 하게 되는데 화학 요법이나 방사선 치료 또는 이의 병행 치료는 공통적으로 유리 라디칼을 생성시켜 표적 암세포를 제거하는 것으로 이들은 특이성이 낮기 때문에 조혈 세포나 면역 세포 등 빠르게 분열 및 증식하는 특성을 가진 정상 세포도 손상시킨다. 따라서 구토증세, 식욕감퇴, 구내염, 설사, 변비, 발열, 감염증, 백혈구감소증, 혈소판 감소증, 빈혈, 복통, 신장 독성, 간 독성, 심장 독성, 말초신경 독성, 중추신경 독성, 근육 통증, 뼈 통증, 골수 억제 등의 부작용을 유발한다. 이러한 부작용을 최소화하기 위해 특정 돌연변이 단백질 등의 표적을 인식하여 암을 억제하는 표적 치료가 존재하나 표적 치료가 가능한 암종은 매우 제한적이다. 또한 최근에는 면역 세포의 활성화를 유도하여 암 세포를 제거하는 면역 치료가 각광받고 있으나 현실적으로 면역 치료에 반응을 보이는 환자군은 전체 암환자의 10% 내외이며, 그나마도 비싼 가격과 약물 반응성 예측 마커가 부재하여 적극적 치료 수단으로 활용이 어려운 실정이다.
- [0006] 한편, 천연물 유래의 항암제(예를 들면 paclitaxel, vinblastine, camptothecin 등)의 개발은 효과적인 암 환자 치료에 중요한 역할을 해왔다. 천연물질에서 활성성분을 추출하여 의약품으로 개발하는 방식으로 천연물 약제는 오랜 기간 항암제의 원천 소재로 사용됐다. 현재까지도 임상에서 빈번하게 활용되고 있는 대부분의 세포독성항암제는 천연물에서 유래하거나 천연물의 특정 성분을 변형한 것들로 천연물 기반 항암제 개발은 항암제 개발 역사에 있어 핵심적 역할을 수행해왔다. 최근에는 항암제 부작용 및 내성의 발생을 극복하고 항암제의 다양성을 확보하기 위하여 식물, 해양 생물, 미생물 등 다양한 천연물 자원이 항암제 소재로 개발되는 등 그 중요성이 다시 한 번 주목받고 있다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 천연물인 개죽도리풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 제작하여 부작용이 적어 장기간 사용이 가능하면서도, 미만형 위암에 대한 항암 효능이 우수한 암 치료용 조성물을 제조하여 위와 같은 문제점을 해결하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 일 양상은 개죽도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 다른 양상은 개죽도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0010] 또 다른 양상은 개죽도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암

예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 양상은 개족도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 명세서에서의 용어 "개족도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*)"은 쥐방울덩굴과(*Aristolochiaceae*)에 속하는 여러해살이풀로서, 5~6월에 개화하며, 한국의 제주, 전남 및 경남 지역에 분포하는 것으로 알려져 있다. 땅속줄기는 뿌듯한 절과 짧은 절간이 있으며 직경 3~4mm이다. 수염뿌리는 절간에서 발달하고, 직경 약 1mm이며 특히 땅속줄기의 말단 부위에서 많이 발생한다. 잎은 2장이 어긋나고 낙엽성이며, 잎몸은 넓은 심장형으로 두껍고, 어두운 녹색으로 뿌듯한 흰색 반점이 표면에 있으며, 길이 7~8cm, 폭 6~7cm이다. 이 종은 한국 고유종으로 잎이 보다 두껍고, 잎몸의 앞면에 흰색의 무늬가 있는 점에서 무늬가 없는 족도리풀, 털족도리풀과 다르다.
- [0013] 본 명세서에서의 용어 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 또는 이들의 혼합물 등 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.
- [0014] 상기 추출물은 상기 해당 식물의 천연, 잡종 또는 변종 식물로부터 추출될 수 있고, 식물 조직 배양물로부터도 추출이 가능하다.
- [0015] 상기 추출물의 추출 용매는 양성자성 극성 용매 또는 비양성자성 극성 및 비극성 용매일 수 있다. 상기 양성자성 극성 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 또는 부탄올일 수 있다. 상기 비양성자성 극성 용매는 디클로로메탄, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭시드, 아세톤, 2-부탄올, 또는 헥사메틸포스포르아미드일 수 있다. 상기 비극성 용매는 펜탄, 헥산, 클로로포름, 또는 디에틸에테르일 수 있다. 상기 비극성 용매는 벤젠이 제외된다. 상기 용매는 C1-C6의 알콜, C3-C10의 에스테르, 예를 들면, C3-C10의 아세테이트, C3-C10의 케톤, C1-C6의 비치환 또는 할로젠화 탄화수소, C2-C10 고리에테르, 이들의 혼합물 또는 상기 용매 중 하나 이상과 물의 혼합물일 수 있다. 상기 용매는 에탄올, 프로판올, 아세토니트릴, 에틸아세테이트, 아세톤, 2-부탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 이들의 혼합물, 또는 상기 용매 중 하나 이상과 물의 혼합물인 것일 수 있다. 상기 탄화수소는 알칸, 알켄, 또는 알킬일 수 있다.
- [0016] 상기 추출물은 물; 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 부탄올(buthanol) 등의 C1 내지 C4의 저급 알코올; 글리세린 (glycerine), 부틸렌글리콜 (butylene glycol), 프로필렌글리콜 (propylene glycol) 등의 다가 알코올; 및 메틸아세테이트(methyl acetate), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 아세톤 (acetone), 벤젠(bezene), 헥산(hexane), 디에틸에테르(diethyl ether), 디클로로메탄(dichloromethane) 등의 탄화수소계 용매로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.
- [0017] 상기 개족도리풀 추출물은 헥산 및 부탄올로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출한 것일 수 있으며, 구체적으로 부탄올을 용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [0018] 상기 추출물은 감압고온 추출, 열탕 추출, 환류 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 상온 추출, 초음파 추출, 증기 추출 및 분획 추출로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 방법으로 추출한 것일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서의 용어 "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0020] 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이들의 조합 등이 있다.
- [0021] 상기 분획물을 얻는 데 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매는 물; 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 부탄올(buthanol) 등의 C1 내지 C4의 저급 알코올; 글리세린 (glycerine), 부틸렌글리콜 (butylene glycol),

프로필렌글리콜(propylene glycol) 등의 다가 알코올; 및 메틸아세테이트(methyl acetate), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 아세톤(acetone), 벤젠(benzene), 헥산(hexane), 디에틸에테르(diethyl ether), 디클로로메탄(dichloromethane) 등의 탄화수소계 용매로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 용매를 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 상기 약학적 조성물은 거제딸기 (*Rubus longisepalus* var. *tozawai* (Nakai) T.B.Lee) 추출물 또는 이의 분획물을 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 거제딸기 헥산 추출물을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0023] 본 명세서에서의 용어 "거제딸기 (*Rubus longisepalus* var. *tozawai* (Nakai) T.B.Lee)"는 바닷가 산기슭에 자생하는 낙엽성 활엽관목으로서, 4월에 개화하고, 6월경에 열매가 노랗게 익으며, 전라남도 여수시, 경상남도 거제시, 진해시, 통영시, 및 제주도 서귀포시 일대에 분포하는 것으로 알려져 있다. 잎은 흔히 3개로 갈라지며 가장자리에 잔 톱니가 있고 어긋나게 달리며, 맥도딸기와 닮았으나 잎자루에 잔털과 잔가시가 있으며 꽃받침 조각이 짧아 구별된다.

[0024] 본 명세서에서의 용어 "암"은 신체 조직의 조절되지 않는 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 종양, 또는 종양을 형성하는 병을 의미한다. 상기 암은 위암(장형 위암, 미만형 위암), 간암, 폐암, 췌장암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 대장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으며, 구체적으로 미만형 위암일 수 있다.

[0025] 본 명세서에서의 용어 "미만형 위암"은 위암의 한 유형으로서, 위 점막 아래로 침윤하며 자라는 암으로 덩어리 지지 않고, 작은 암세포가 위 전체에 퍼짐으로서 발병할 수 있다. 위암은 조직학적 분류 방법으로 장형 및 미만형으로 나눌 수 있으며, 암이 점막 표면에서 덩어리 형태로 자라고 증식속도가 느린 장형에 비해, 미만형은 전이가 빨라 진단 시 대부분 3~4기로 악화된 경우가 많다. 일반적으로 위암은 임상적, 병리학적으로 고령의 남성에서 흔히 발생하고 헬리코박터 파일로리 감염과 깊은 역학적 상관관계를 가지고 있으나, 미만형 위암은 비교적 여성, 젊은층에서 우위를 보이고 있고, 발생원인이 불명확하며, 장형 위암보다 항암 치료 결과도 좋지 못한 것으로 알려져 있다.

[0026] 본 명세서에서의 용어 "치료"는, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 암 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 명세서에서의 용어 "예방"은, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 암 질환 또는 질환의 발병 가능성이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 상기 개족도리폴 추출물은 암세포의 세포사멸을 유도하거나 및/또는 암세포의 세포증식을 억제하는 등의 암세포 성장 억제 효능을 가지며, 이를 통해 암 질환을 효과적으로 치료/개선하거나 예방할 수 있다.

[0029] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 여기서 "약학적으로 허용되는"의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다. 상기 약학적 조성물에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 락토스, 텍스트로스, 말토 텍스트린, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 글리세롤, 에탄올, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0030] 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0031] 상기 약학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.
- [0032] 상기 약학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화될 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 기제로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌 글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등이 사용될 수 있다.
- [0033] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학 적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하 며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명 의 약학적 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 암 질환에 대한 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 성분과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0034] 상기 약학적 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으 로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 성 인 1인당 약 0.1mg 내지 약 1,000 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 100 mg/kg로 투여할 수 있고, 본원의 조 성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있 다. 상기 투여량 또는 투여횟수는 어떠한 면으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0035] 다른 양상은 상기 암 치료 또는 예방용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 또는 예방 방 법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.
- [0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체"는 암 질환이 발병되거나 발병할 위험이 있는 개, 고양이, 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류, 파충류, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있으며, 상기 개체는 인간을 제외 하는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 주사제, 수액제(링겔), 캡슐제, 환제, 정제, 좌제 또는 패치의 형태로 제형화되어 투여할 수 있다. 상기 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다.
- [0038] 상기 약학적 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투 여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투 여 될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 제형화되지 않은 형태로도 투여할 수 있고, 위산에 의하여 상기 약학 조성물의 유효성분이 변성 또는 분해될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해 로부터 보호되도록 제형화된 형태 또는 경구용 패치형태로 구강내에 투여할 수도 있다. 또한, 상기 조성물은 활 성 물질이 표적세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0039] 또 다른 양상은 개족도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암

예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.

- [0040] 본 명세서에서의 용어 "개선"은, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 암 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0041] 본 명세서에서의 용어 "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0042] 상기 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 상기 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품 조성물은 암 질환의 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0043] 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서의 용어 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0045] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강 보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강 보조 식품의 용어는 혼용될 수 있다. 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [0046] 상기 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 암 질환의 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0047] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신 (niacin), 비오틴 (biotin), 폴레이트 (folate), 판토텐산 (panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제 (소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제 (표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제 (부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제 (타르색소 등), 발색제 (아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제 (아황산나트륨), 조미료 (MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료 (dulcin, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료 (바닐린, 락톤류 등), 팽창제 (명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 감기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물 (food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 식품 조성물은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0050] 상기 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노

사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.

[0051] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0052] 상기 식품 조성물은 암 질환의 개선 또는 예방 효과를 나타낼 수 있다면 본 발명의 추출물을 다양한 중량%로 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 추출물을 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 또 다른 양상은 개죽도리풀 (*Asarum maculatum Nakai*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.

[0054] 본 명세서에서의 용어 "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다.

[0055] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0056] 상기 사료 조성물은 제제에 따라 암 질환 개선 또는 예방을 위해 첨가 가능한 공지의 첨가물을 더 포함할 수 있다. 상기 사료 조성물은 고농축액, 분말 또는 과립 형태일 수 있다. 상기 사료 조성물은 동물의 식이 요구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 더 포함할 수 있다. 상기 사료 조성물은 동물 사료에 첨지, 분무, 또는 혼합으로 첨가하여 사용될 수 있다.

[0057] 상기 사료 조성물은 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 나타내는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 탄산수소소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0058] 상기 사료 조성물은 포유류, 가금류를 포함하는 다수의 동물 식이 즉, 사료 및 음용수에 적용할 수 있다.

[0059] 상기 사료 조성물은 사료에 첨가되는 물질 (즉, 사료 첨가제), 사료 원료 또는 개체에 급여되는 사료 자체를 모두 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0060] 일 양상에 따르면 따르면, 개죽도리풀 추출물은 미만형 위암을 포함하는 다양한 암종에 대해 우수한 항암 효과를 갖는 바, 상기 추출물을 유효성분으로 하여 효과가 우수한 암 치료제를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 미만형 위암 세포주 선별을 위한 상피간엽이행 관련 마커의 발현수준을 측정한 도면이다.

도 2는 미만형 위암 치료제 후보 유효물질을 선별하기 위한 1차 스크리닝 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 미만형 위암 치료제 후보 유효물질을 선별하기 위한 2차 스크리닝 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 미만형 위암 치료제 후보 유효물질을 선별하기 위한 3차 스크리닝 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 개작도리폴 용매별 추출물의 미만형 위암 세포주에 대한 세포 성장 억제능을 확인한 도면이다.

도 6은 개작도리폴 용매별 추출물의 정상 세포주에 대한 세포 생존 저해능을 확인한 도면이다.

도 7은 개작도리폴 뷰탄을 추출물의 농도별 미만형 위암 세포주에 대한 세포 성장 억제능을 확인한 도면이다.

도 8은 개작도리폴 뷰탄을 추출물의 농도별 정상 세포주에 대한 세포 생존 저해능을 확인한 도면이다.

도 9는 개작도리폴 뷰탄을 추출물의 농도별 미만형 위암 환자 유래 오가노이드 코호트에 대한 세포 성장 억제능을 확인한 도면이다.

도 10은 개작도리폴 뷰탄을 추출물의 농도별 정상 오가노이드에 대한 세포 생존 저해능을 확인한 도면이다.

도 11은 개작도리폴 뷰탄을 추출물 및 세신 용매별 추출물의 미만형 위암 세포주에 대한 세포 성장 억제능을 확인한 도면이다.

도 12는 개작도리폴 뷰탄을 추출물의 다양한 암종에 대한 세포 성장 억제능을 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 실시예 1: 미만형 위암 세포 모델 확립

[0065] 미만형 위암 치료제 유효물질을 스크리닝 하기 위한 미만형 위암 세포 모델을 확립하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0066] 구체적으로, 미만형 위암 세포주를 선별하기 위해, 11종의 위암 세포주(Hs746T, MKN1, SNU1, SNU-668, MKN28, MKN74, NCI-N87, SNU-601, SNU719, SNU-1967)의 상피간엽이행(Epithelial-mesenchymal transition) 정도를 측정하고자 하였다. 이를 위해, 상기 세포들을 배양한 후, 상피간엽이행 정도를 확인할 수 있는 8종의 마커(CDH1, Claudin-7, GRHL2, EpCAM, Vimentin, ZEB1, SLUG, Fibronectin)의 mRNA 발현 수준을 확인하였다(도 1).

[0067] 그 결과, CDH1, Claudin-7, GRHL2 및 EpCAM의 발현 수준이 낮으면서, Vimentin, ZEB1, SLUG 및 Fibronectin의 발현 수준이 높은 세포주 중 MKN1 및 SNU668을 미만형 위암 세포주로 선정하였다. 이하의 실시예에서는 상기 세포주를 통해 미만형 위암 치료물질을 스크리닝하였다.

[0069] 실시예 2: 미만형 위암 치료제 유효물질 스크리닝

[0070] 다양한 천연물에서 미만형 위암 치료제 유효물질을 스크리닝하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0071] 천연물 추출물 시료 처리에 따른 세포 성장 억제능을 평가하기 위해 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) 어세이를 수행하였다. 구체적으로, 각 세포는 5000개씩 96-웰 플레이트에 시딩한 후 하루동안 배양하였으며, 이후 실험군에 시료를 농도별로 처리한 후 72시간 동안 배양하고 50 μ L의 MTT (2 mg/mL) 염료를 추가하였다. 이후, 4시간 동안 추가로 인큐베이션을 수행하고, 배지 제거 및 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide)를 각 웰에 넣어 20분 동안 염료를 녹여준 후, 490nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포 생존 정도를 분석하였다.

[0072] 먼저, 1차 스크리닝을 위해, 상기 실시예 1에서 선정한 미만형 위암 세포주인 MKN1에 63종의 천연물질 추출물 시료를 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였으며, 100ug/ml의 농도로 처리 시 50% 이상의 세포 성장 억제 활성을 나타내는 시료를 1차로 선별하였다. 그 결과, 총 63종의 시료 중 19종의 시료가 MKN1에 대해 50% 이상의 세포 성장 억제 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 상기 19종의 시료를 1차로 선정하였다(도 2).

[0073] 다음으로, 2차 스크리닝을 위해, 상기 실시예 1에서 선정한 미만형 위암 세포주인 SNU668에 1차로 선정된 19종의 천연물질 추출물 시료를 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였으며, 100ug/ml의 농도로 처리 시 50% 이상의 세포 성장 억제 활성을 나타내는 시료를 1차로 선별하였다. 그 결과, 총 19종의 시료 중 14종의 시료가 SNU668에 대해 50% 이상의 세포 성장 억제 활성을 나타

내는 것을 확인하였으며, 상기 14종의 시료를 2차로 선정하였다(도 3).

[0074] 다음으로, 정상 세포 독성 여부를 기반으로 3차 스크리닝을 위해, 정상 세포주인 HEK293에 2차로 선정된 14종의 천연물질 추출물 시료를 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 정상세포에 대한 생존 저해능을 확인하였으며, 100ug/ml의 농도로 처리 시 45-50% 미만의 정상세포 생존 저해능 활성을 나타내는 시료를 3차로 선별하였다. 그 결과, 총 14종의 시료 중 7종의 시료가 HEK293에 대해 45-50% 미만의 정상세포 생존 저해 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 정상 세포주에 대한 독성이 낮은 상기 7종의 시료를 3차로 선정하였다(도 4).

[0075] 또한, 상기 미만형 위암 세포주인 MKN1 및 SNU668의 억제 활성 및 정상 세포주에 대한 세포 독성 결과 등을 종합적으로 고려하여, 상기 7종의 시료 중 거제팔기 [*Rubus longisepalus* var. *tozawai* (Nakai) T.B.Lee] 추출물 및 개죽도리풀 (*Asarum maculatum* Nakai) 추출물을 미만형 위암 치료제 후보 유효물질로서 최종적으로 선별하였다.

[0077] 실시예 3: 개죽도리풀 추출물의 항암 효능 평가

[0078] 상기 실시예 2에서 미만형 위암 치료제 후보 유효물질로 선정한 개죽도리풀 추출물의 항암 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0080] 3.1 개죽도리풀 추출물 제조

[0081] 다양한 용매를 이용하여 개죽도리풀 추출물을 제조하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0082] 구체적으로, 개죽도리풀 (*Asarum maculatum* Nakai) 식물체 전체를 2020년 8월 한택식물원에서 채집하여 7일 동안 온풍 (30 °C) 건조하여 350 g의 건조된 식물체를 얻었다. 그 후, 상기 건조된 식물체를 분쇄하여 추출용기에 넣고 70 % 에탄올/물 3.5 L를 가한 후 상온에서 흔들어 교반하여 7일 동안 추출하고 상기 혼합물을 0.34 mm의 필터 두께를 가지는 왓만(whatman) 종이 여과지와 유리 깔대기를 사용하여 중력 여과하는 과정을 2회 반복('추출-여과' 2 회)하여, 여과된 추출액을 수득하였다. 상기 여과된 추출액을 둥근 플라스크로 옮겨 감압 농축기에 넣고 감압 하에 35 °C에서 용매를 완전히 증발시켜 농축하여 개죽도리풀 에탄올 추출물 45.9 g을 수득하였다 (수율 13.1%).

[0083] 다음으로, 상기 에탄올 추출물 45.9 g을 물 300 mL에 현탁시킨 후, *n*-헥산 450 mL을 가하고 상온에서 흔들어 교반하여 2시간씩 3회에 걸쳐 분획을 실시한 후, 감압 농축기에 넣고 감압 하에 35 °C에서 용매를 완전히 증발시켜 농축하여 *n*-헥산 분획추출물 6.7 g을 수득하였다.

[0084] 상기 분획 후 남은 물은 수포화된 *n*-부탄올 450 mL을 가하고 상온에서 흔들어 교반하여 2시간씩 3회에 걸쳐 분획을 실시한 후, 감압 농축기에 넣고 감압 하에 35 °C에서 용매를 완전히 증발시켜 농축하여 *n*-부탄올 분획추출물 16.9 g을 수득하였고, 상기 분획 후 남은 물은 동결 건조하여 물 분획추출물 21.7 g을 수득하였다.

[0086] 3.2 추출 용매별 미만형 위암 치료 효능 및 세포 독성 평가

[0087] 상기 실시예 3.1에서 제조한 용매별 개죽도리풀 추출물의 미만형 위암 치료 효능 및 정상세포 독성을 평가하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0088] 먼저, 미만형 위암에 대한 항암 효능을 평가하기 위해, 상기 실시예 1에서 선정한 미만형 위암 세포주인 MKN1 및 SNU668에 용매별 개죽도리풀 추출물을 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다. 그 결과, 헥산 및 부탄올 추출물의 경우 상기 2종의 미만형 위암 세포주에 대한 항암 효능을 나타냈으며, 특히 부탄올 추출물이 우수한 항암 효능을 나타내는 것을 확인하였다(도 5).

[0089] 다음으로, 상기에서 우수한 항암 효능을 확인한 헥산 및 부탄올 추출물의 정상 세포주에 대한 세포 독성을 평가하기 위해, 정상 세포주인 HEK293에 용매별 개죽도리풀 추출물을 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다. 그 결과, 헥산 추출물에 비해 부탄올 추출물에서 현저히 낮은 정상세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다(도 6).

[0090] 상기 결과를 토대로, 미만형 위암에 대한 세포 사멸 효과가 우수하면서 정상 세포에 대한 세포 독성은 낮은 개

족도리풀 부탄올 추출물이 용매별 추출물 중 현저히 우수한 항암 효능을 갖는 것을 알 수 있다.

[0092] 3.3 개족도리풀 부탄올 추출물의 세포 모델에서 미만형 위암 치료 효능 및 세포 독성 평가 - 세포 모델

[0093] 상기 실시예 3.2에서 우수한 효능을 확인한 개족도리풀 부탄올 추출물의 미만형 위암 치료 효능 및 세포 독성을 세포 모델에서 평가하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0094] 먼저, 미만형 위암에 대한 항암 효능을 평가하기 위해, 상기 실시예 1에서 선정한 미만형 위암 세포주인 MKN1 및 SNU668에 개족도리풀 부탄올 추출물을 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다. 그 결과, 개족도리풀 추출물은 저농도인 50ug/ml 정도에서도 미만형 위암 세포의 성장을 강력히 억제할 수 있음을 확인하였다(도 7).

[0095] 다음으로, 정상 세포주에 대한 세포 독성을 평가하기 위해, 정상 신장 유래 세포인 HEK293 및 정상 위 상피 유래 세포인 HFE-145에 개족도리풀 부탄올 추출물을 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다. 그 결과, 개족도리풀 추출물은 고농도인 100ug/ml 정도에서도 세포 생존능을 크게 저해하지 않아, 정상 세포에 대한 독성은 낮은 것을 확인하였다(도 8).

[0096] 상기 결과를 토대로, 개족도리풀 부탄올 추출물은 미만형 위암에 대한 항암 효능이 우수하면서 정상 세포에 대한 세포 독성은 낮다는 것을 알 수 있다.

[0098] 3.4 개족도리풀 부탄올 추출물의 세포 모델에서 미만형 위암 치료 효능 및 세포 독성 평가 - 오가노이드 모델

[0099] 상기 실시예 3.2에서 우수한 효능을 확인한 개족도리풀 부탄올 추출물의 미만형 위암 치료 효능 및 세포 독성을 오가노이드 모델에서 평가하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0100] 먼저, 미만형 위암 오가노이드 및 정상 위 오가노이드를 제작하기 위해, 수술 절제를 통해 얻은 미만형 위암 환자 및 정상인의 위 조직을 DPBS (without Ca^{2+} 및 Mg^{2+})로 워싱한 후 잘게 조각내고, 조각난 조직은 스트리핑 (stripping) 버퍼 [HBSS (Hank's balanced salt solution), 에틸렌다이아민테트라아세트산 (5 mmol/L), HEPES (25 mmol/L), 10% FCS(fetal calf serum)로 구성]로 10분간 37 °C 조건으로 반응시켰다. 이후 조직 조각들은 신선한 스트리핑 버퍼로 바뀌주고 5분간 추가 반응시켰다. 조직은 HBSS으로 워싱해준 후 배양버퍼 [RPMI 배지+ 콜라게나아제 (1.5 mg/mL) + 히알루로니다제 (20 µg/mL)]를 넣어주고 37 °C 30분간 반응시켰다. 이후 20 mL DPBS로 희석시켜주고 70-µm 사이즈 필터로 필터링하여 암세포를 수득하였다. 수득한 세포는 원심분리하여 침전시키고 마트리젤로 희석하여 시딩한 후 위암 오가노이드 배지를 추가하여 배양함으로서 미만형 위암 오가노이드를 제작하였다.

[0101] 다음으로, 미만형 위암 오가노이드에 대한 항암 효능을 평가하기 위해, 17명의 미만형 위암 환자의 암조직으로부터 제작한 오가노이드 라이브러리에 개족도리풀 부탄올 추출물을 농도별로 (0.5ug/ml, 5ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다. 그 결과, 개족도리풀 추출물은 저농도인 5ug/ml 정도에서도 17명 환자의 미만형 위암 오가노이드 모두에서 우수한 억제능을 보였으며, 50ug/ml 이상의 농도에서는 암세포 대부분을 사멸시킬 수 있음을 확인하였다 (도 9).

[0102] 다음으로, 정상 위 오가노이드에 대한 세포 독성을 평가하기 위해, 정상인의 위 조직으로부터 제작한 오가노이드 라이브러리에 개족도리풀 부탄올 추출물을 농도별로 (0.5ug/ml, 5ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 정상세포 생존 저해능을 확인하였다. 그 결과, 개족도리풀 추출물은 50ug/ml 농도에서 80% 정도의 세포 생존능 보였는 바, 정상 조직에 대한 독성은 암조직에 비해 현저히 낮은 것을 확인하였다(도 10).

[0103] 상기 결과를 토대로, 개족도리풀 부탄올 추출물은 미만형 위암에 대한 항암 효능이 우수하면서 정상 조직에 대한 세포 독성은 낮다는 것을 알 수 있다.

[0105] 3.5 개족도리풀 추출물 및 타 족도리풀속 추출물의 항암 효능 비교

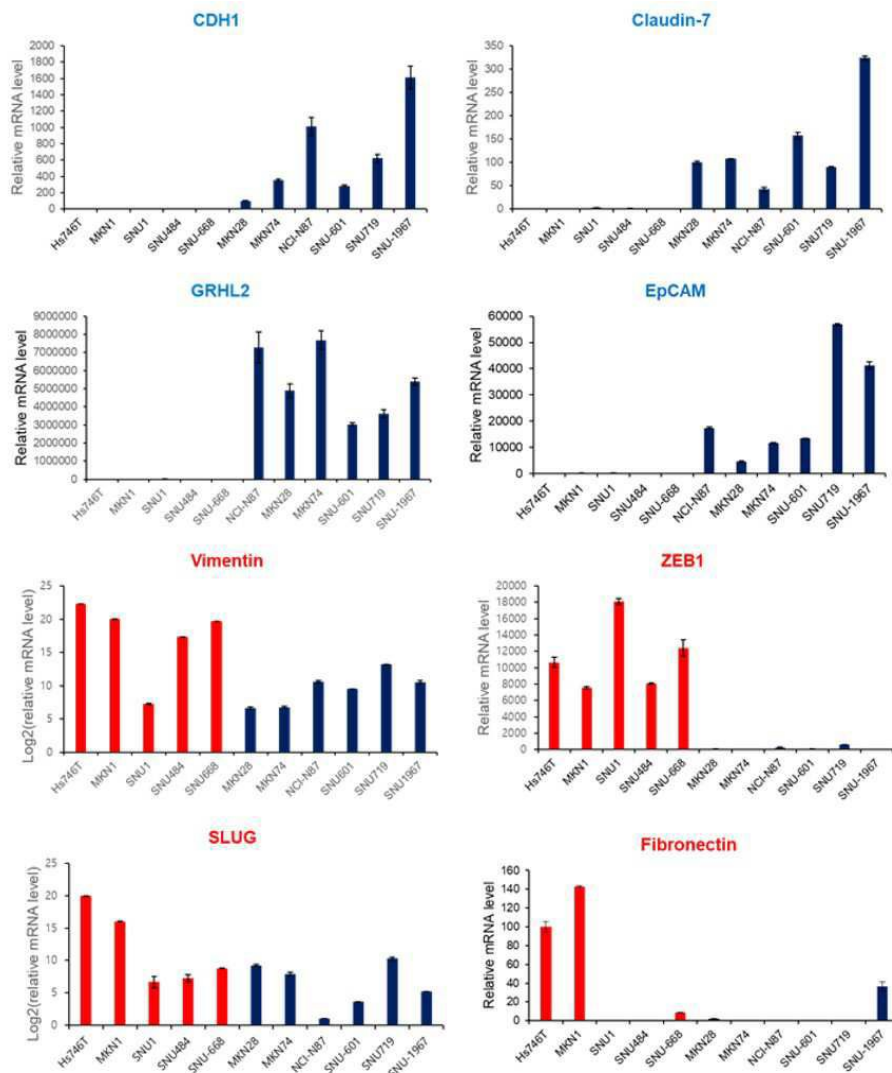
[0107] 개족도리풀 추출물의 항암 효능을 타 족도리풀 속인 세신 (*Asarum heterotropoides* var. *seoulense* (Nakai)

Kitag.) 추출물과 비교하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

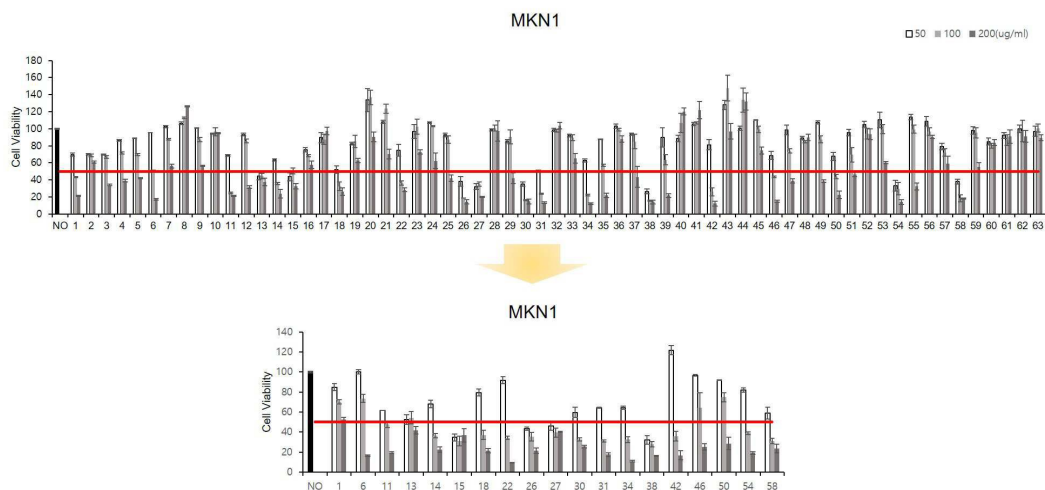
- [0108] 먼저, 서울족도리풀 (*Asarum heterotropoides* var. *seoulense* (Nakai) Kitag.) 식물체의 뿌리와 뿌리 줄기를 2015년 11월 경북 대구에서 채집하여 건조하여 75 g의 건조된 식물체를 얻었다. 그 후, 상기 건조된 식물체를 분쇄하여 추출용기에 넣고 100% 에탄올 750 mL을 가한 후 2시간 동안 환류 추출하고 상기 혼합물을 0.34 mm의 필터를 두께를 가지는 왓만(whatman) 종이 여과지와 유리 깔대기를 사용하여 중력 여과하는 과정을 2회 반복('추출-여과' 2 회)하여, 여과된 추출액을 수득하였다. 상기 여과된 추출액을 둥근 플라스크로 옮겨 감압 농축기에 넣고 감압 하에 35 ℃에서 용매를 완전히 증발시켜 농축하여 서울족도리풀 에탄올 추출물 11.7 g(이하 '세신'라고 함)을 수득하였다(수율 15.6%). 또한, 세신 뷰탄올 추출물 및 물 추출물은 상기 개족도리풀 추출물 제조방법과 동일한 방법으로 수득하였다.
- [0109] 다음으로, 미만형 위암 세포주인 MKN1 및 SNU668에 개족도리풀 뷰탄올 추출물 및 세신 추출물을 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다.
- [0110] 그 결과, 다양한 용매의 세신 추출물과 비교하여 개족도리풀 뷰탄올 추출물이 현저히 우수한 미만형 위암 성장 억제능을 갖는 것을 확인하였다 (도 11).
- [0111] 따라서, 상기 결과를 토대로 개족도리풀 추출물이 다른 족도리풀 속 식물보다 우수한 미만형 위암 항암 효능이 있음을 알 수 있다.
- [0113] 3.6 개족도리풀 추출물의 다양한 암종에 대한 항암 효능 평가
- [0114] 개족도리풀 추출물이 미만형 위암 외의 다른 암종에 대해서도 항암 효능을 나타내는 지 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0115] 구체적으로, 장형 위암 세포주(MKN28, MKN74), 자궁 경부암 세포주(HeLa), 간암 세포주(Hep3B) 및 대장암 세포주(SW480)에 개족도리풀 뷰탄올 추출물을 농도별로 (50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml) 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포 성장 억제능을 확인하였다.
- [0116] 그 결과, 개족도리풀 추출물은 다른 장기 유래 여러 암종에서도 우수한 억제능을 보였으며, 장형 위암과 전술한 미만형 위암에 대한 개족도리풀 추출물의 암성장 억제능을 비교해보면, 개족도리풀 추출물은 위암의 경우 장형보다는 미만형에 특이적으로 우수한 항암 효능을 보임을 확인하였다(도 12).
- [0117] 상기 결과를 토대로, 개족도리풀 추출물은 다양한 암종에 대해 항암 효능을 가지고 있으며, 특히 미만형 위암에 대한 항암 효능이 보다 우수한 것을 알 수 있다.
- [0119] 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.

도면

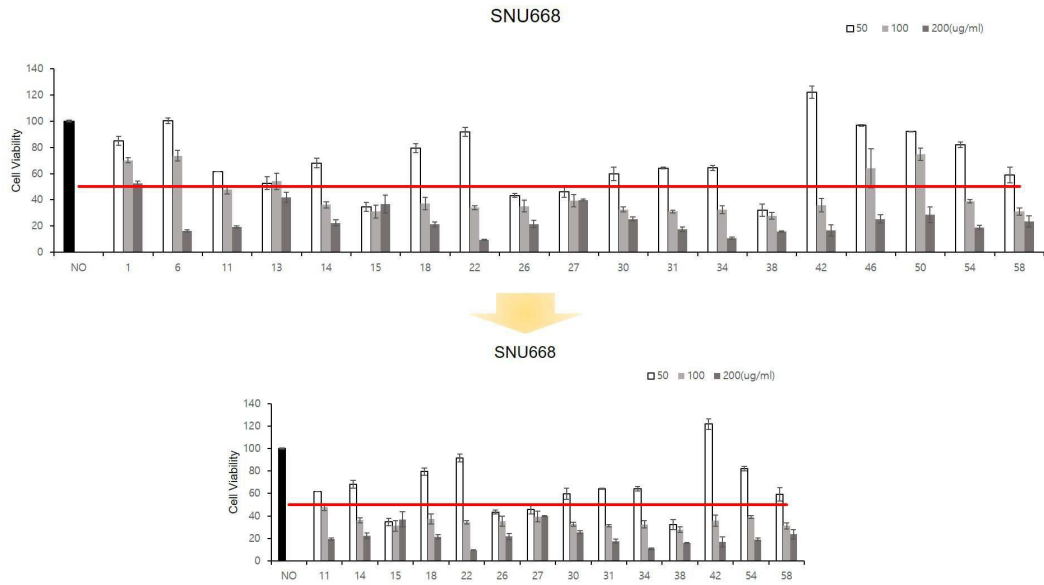
도면1



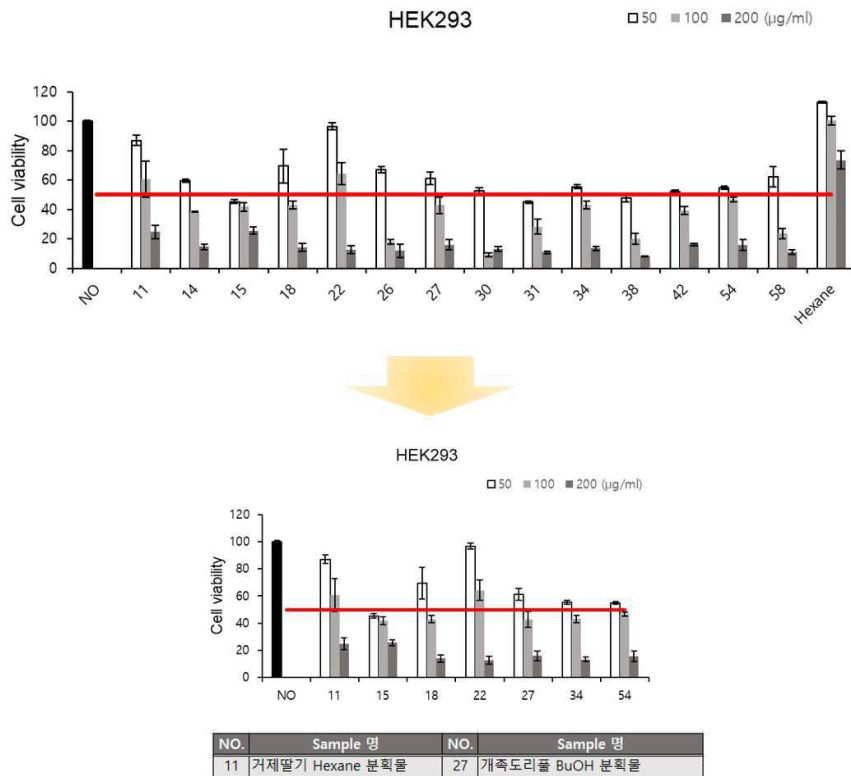
도면2



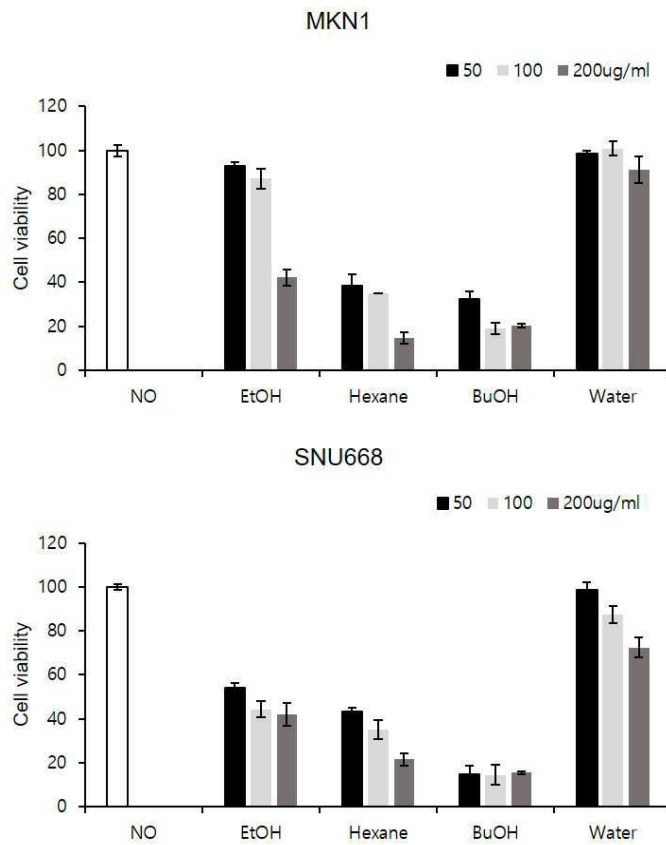
도면3



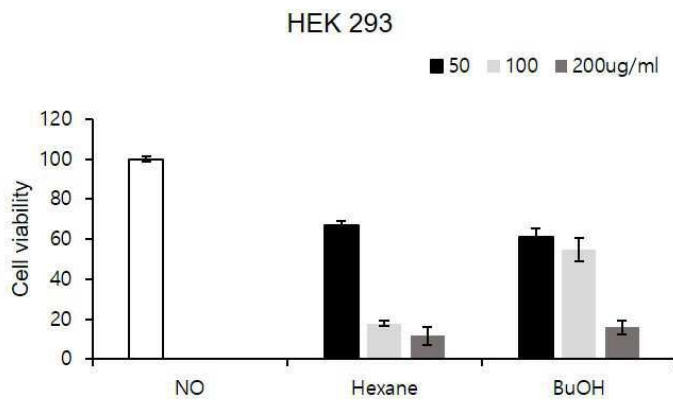
도면4



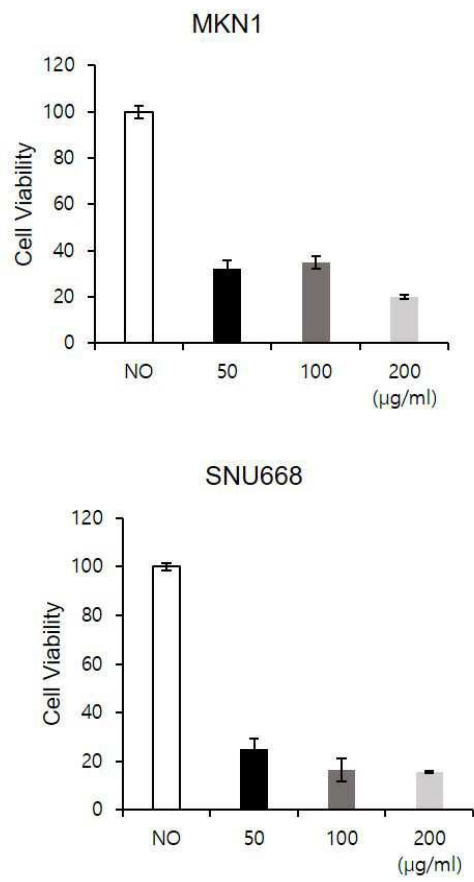
도면5



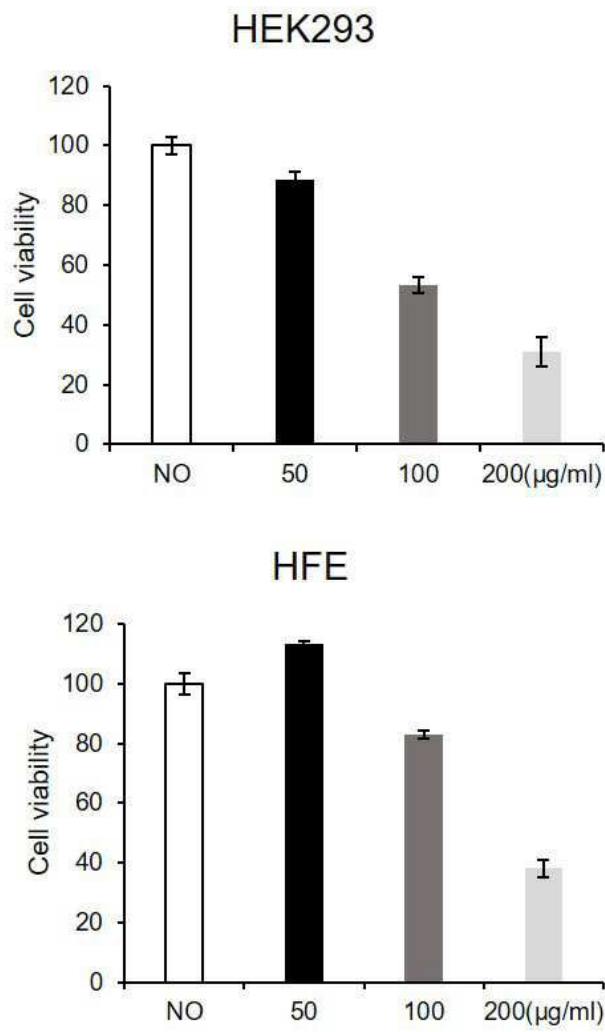
도면6



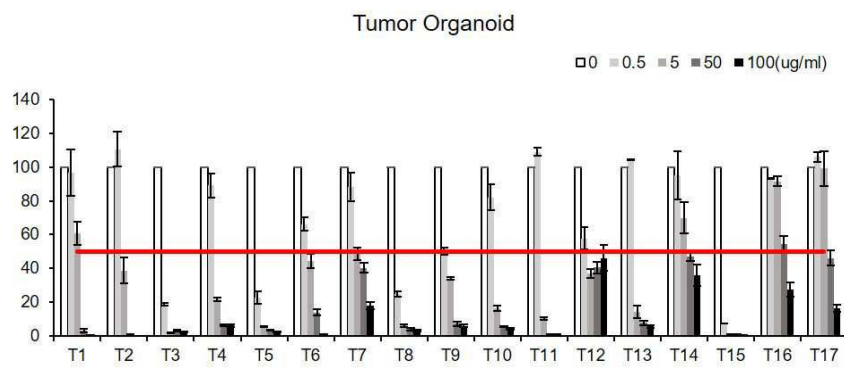
도면7



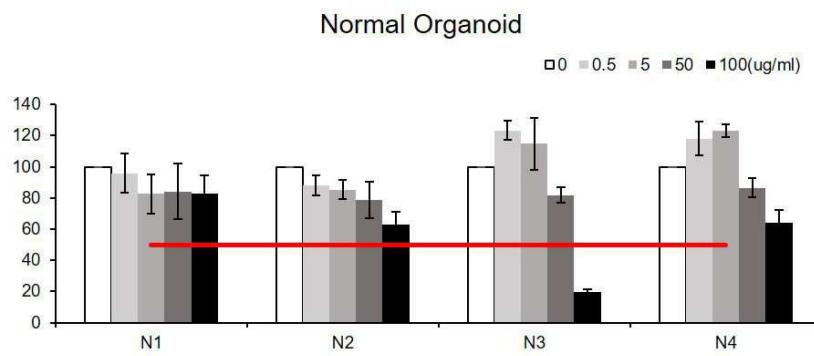
도면8



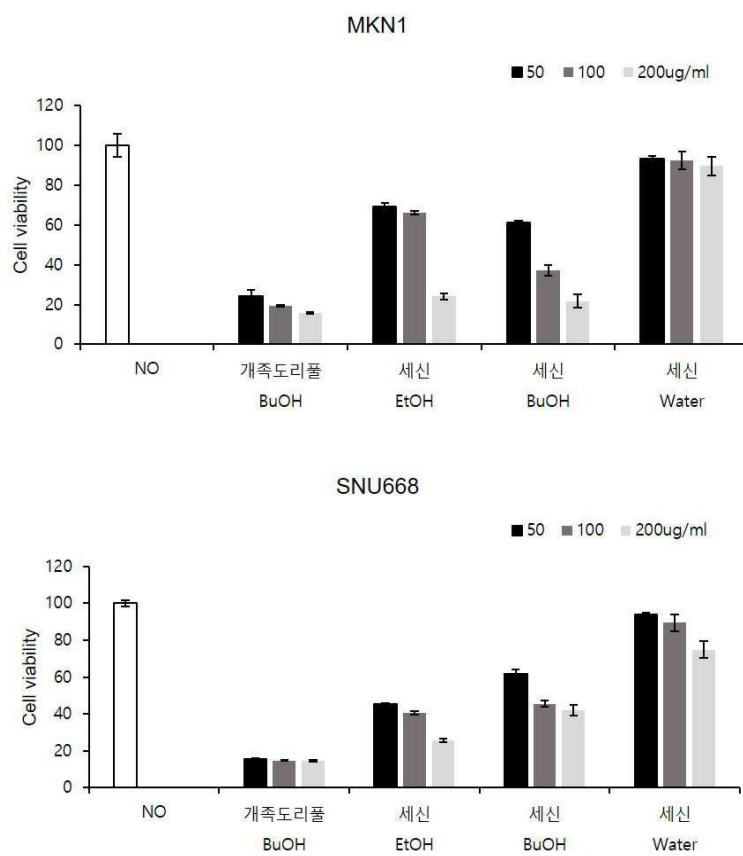
도면9



도면10



도면11



도면12

