(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0124565
(43) 공개일자 2010년11월29일

(51) Int. Cl.
A61K 35/32 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0043640
(22) 출원일자 2009년05월19일
심사청구일자 2009년05월19일

(71) 출원인
농업회사법인 제주마산업 주식회사
제주특별자치도 제주시 애월읍 유수암리 1176
재단법인 제주테크노파크
제주특별자치도 제주시 아라일동 4-8
(72) 발명자
강대평
제주특별자치도 제주시 연동 2315-3 제일아파트 가동 106호
박수영
제주특별자치도 제주시 오등동 1653-1 영도그린빌라 C/308
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태웅

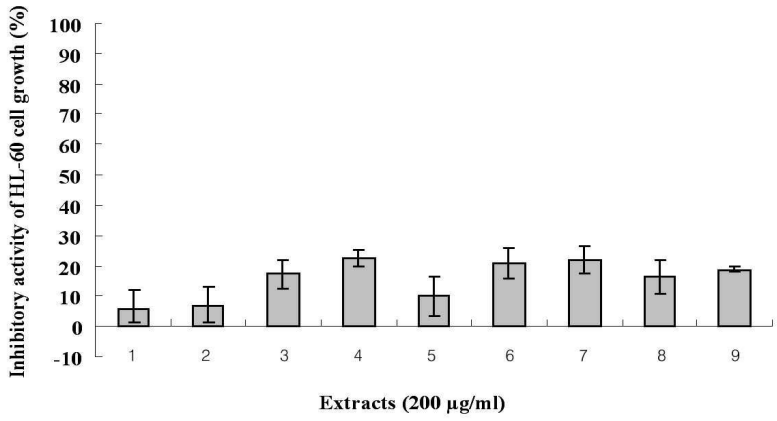
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 항암제 조성물

(57) 요 약

본 발명은 항암제 조성물에 관한 것으로 구체적으로 말뼈 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강호정

제주특별자치도 제주시 노형동 노형뜨란채아파트 211동 703호

김동희

제주특별자치도 제주시 도남동 800번지 도남1차 e편한세상 107동 503호

오승현

제주특별자치도 제주시 연동 대림아파트 101동 1204호

강은수

제주특별자치도 서귀포시 하효동 336-2

변지언

제주특별자치도 제주시 해안동 2344번지 제일 일출빌리지 102동 408호

함영민

제주특별자치도 서귀포시 강정동 178번지 현대2차 아파트 205동 105호

윤원종

제주특별자치도 제주시 노형동 1047-10

김길남

제주특별자치도 제주시 연동 290-2 학산맨션 403호

양원혁

제주특별자치도 제주시 일도2동 1010-5

특허청구의 범위

청구항 1

말뼈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암 개선제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 말뼈 추출물은 말뼈를 물, 증류수, 탄소수 5 이하의 알칸올, n-헥산을 포함한 탄소수 5 내지 8의 n-알칸, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 얻어진 것을 특징으로 하는 혈액암 개선제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 말뼈 추출물은 물, 증류수, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 얻어진 것을 특징으로 하는 혈액암 개선제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 말뼈 추출물은 말뼈를 40% 내지 70% 에탄올 수용액으로 추출하여 얻어진 것을 특징으로 하는 혈액암 개선제 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 혈액암 개선제 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 혈액암 개선제 조성물.

청구항 7

아래의 추출물 중 하나를 유효성분으로 포함하는 간암 개선제 조성물.

(Ⅰ) 말뼈의 열수 추출물을 플라보자임(flavourzyme)으로 가수분해하여 얻어진 추출물;

(Ⅱ) 말뼈의 열수 추출물을 프로마텍스(protamex)로 가수분해하여 얻어진 추추물; 및

(Ⅲ) 말뼈의 열수 추출물을 뉴트라제(neutrase) 및 알칼라제(alcalase)로 가수분해하여 얻어진 추출물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 간암 개선제 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 간암 개선제 조성물.

청구항 10

말뼈를 40% 내지 70% 에탄올 수용액에 침지시켜 얻어진 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장암 개선제 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 대장암 개선제 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 대장암 개선제 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항암제 조성물에 관한 것으로 구체적으로는 말뼈 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암이란 일반적으로 인체 조직을 이루고 있는 세포의 주기에 이상이 생겨 세포가 정상적으로 분화하지 않고 성장을 조절할 수 없이 커진 것 중 악성인 것을 말한다.

[0003] 암은 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생하는데, 환경이나 음식물 속에 포함된 발암 물질에 의해 세포 돌연변이가 일어나고 이러한 세포들이 발암 물질의 계속적인 자극을 받으면서 비정상적인 증식을 계속하여 암 조직을 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 암을 치료하기 위한 항암제의 연구 방법에는 암세포에 대한 직접적인 세포 독성 물질을 탐색하는 방법, 생체의 면역 능력을 조절하는 물질을 탐색하는 방법, 암세포의 전이를 억제하는 물질을 탐색하는 방법, 최근에 주목되고 있는 혈관신생을 억제하는 물질을 탐색하는 방법 등이 있다.

[0005] 현재 사용되고 있는 항암제들은 효소 제제나 백신 등의 생물학적 제제, 화학 합성 의약품, 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는데, 이 중 효소, 백신 등의 생물학적 제제는 실용 단계에 있는 상태는 아니며, 화학 합성 의약품은 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고(Gillman., et al., Maxwell Macmillan. , 18, pp 1202, 1986), 독성에 의한 부작용이 다양하게 나타나기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있다(Chung., et

al., J. Wonkwang Medical Sci. , 3 , pp 13-34, 1987).

[0006] 근래에는 세포 배양 기술이 급격히 발달함에 따라 각종 세포를 배양한 후, 여러 독성 물질을 투여함으로써 이들의 세포 독성에 대한 기전을 세포 수준에서 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 높이기 위하여 천연물을 이용한 항암제의 개발이 지속적으로 시도되고 있다.

[0007] 본 발명은 말뼈 추출물의 암세포 증식 억제 활성에 기초하여 완성된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 말뼈 추출물을 이용한 항암제 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 기타의 목적이나 구체적인 양태 등은 이하에서 제시될 것이다.

과제 해결수단

[0010] 일 측면에 있어서, 본 발명은 말뼈 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액암 개선제 조성물에 관한 것이다.

[0011] 아래의 실시예 및 실험예는 말뼈 다양한 추출물이 혈액암 세포주 HL-60에 대한 세포 증식 억제 활성을 가짐을 보여주고 있다. 즉 말뼈의 열수 추출물, 그 열수 추출물의 에탄올 수용액 추출물 또는 에탄올 추출물, 그 열수 추출물의 효소 추출물, 말뼈의 물, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매 추출물, 그리고 말뼈의 효소 추출물 모두 활성의 차이가 있지만 모두 혈액암 세포주에 대한 세포 증식 억제 활성을 가짐을 보여준다. 특히 말뼈의 40% 에탄올 수용액 추출물과 70% 에탄올 수용액 추출물의 경우 각각 75% 및 85% 정도의 세포 증식 억제 활성을 보이고 있다.

[0012] 이러한 실험 결과에 기초할 때, 본 발명의 혈액암 조성물은 추출 방법이나 추출 용매를 불문하고 말뼈 추출물을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.

[0013] 바람직하게는 상기 말뼈 추출물은 말뼈를 40% 내지 70% 에탄올 수용액에 침지시켜 추출하여 얻어진 것을 의미한다.

[0014] 본 명세서에서, "개선"이란 혈액암이 가지는 병리적 증상의 개선, 치료 및 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 포함하는 의미이다.

[0015] 또 본 명세서에서, "추출물"은 추출 대상으로서 말뼈를 사용하고 추출 용매로서 물, 증류수, 에탄올을 포함한 탄소수 5 이하의 알칸올, n-헥산을 포함한 탄소수 5 내지 8의 n-알칸, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 것을 의미한다.

[0016] 여기서 추출 방법은 열수, 가온, 냉침, 초음파 방사, 교반, 단백질 분해 효소에 의한 가수 분해, 또는 이들을 혼합한 방법 등 임의의 방법이 사용될 수 있다.

[0017] 상기 단백질 분해 효소는 기능상 엔도펩티다제 및 엑소펩티다제 모두 사용될 수 있으며, 아래의 실시예에 사용된 것 이외에도 브로멜라인(bromelain), 파파인(papaine), 뉴트라제(neutrase), 코지자임(kojizyme), 펩신(Pepsin), 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin) 등 시중에 유통되는 임의의 것이 사용될 수 있다.

[0018] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0019] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 아래의 추출물 중 하나를 유효성분으로 포함하는 간암 개선제 조성물에 관한 것이다.

[0020] (Ⅰ) 말뼈의 열수 추출물을 플라보자임(flavourzyme)으로 가수분해하여 얻어진 추출물;

[0021] (Ⅱ) 말뼈의 열수 추출물을 프로마텍스(protamex)로 가수분해하여 얻어진 추추물; 및

[0022] (Ⅲ) 말뼈의 열수 추출물을 뉴트라제(neutrase) 및 알칼라제(alcalase)로 가수분해하여 얻어진 추출물.

[0023] 아래의 실시예 및 실험예에서 확인할 수 있듯이, 상기 세 가지 말뼈 추출물은 간암 세포주 HepG-2에 대해 세포 증식 억제 활성을 보이는 추출물들이다. 바람직하게는 상기 각 추출물은 아래의 실시예의 추출 조건에서 얻어진 추출물을 말한다.

[0024] 본 발명의 간암 개선제 조성물에 있어서, 개선의 의미 및 유효성분의 의미는 전술한 바와 같다.

[0025] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 말뼈를 40% 내지 70% 에탄올 수용액에 침지시켜 얻어진 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장암 개선제 조성물에 관한 것이다.

[0026] 아래의 실험예는 아래의 실시예에서 얻어진 말뼈의 다양한 추출물 중 대부분은 대장암 세포주인 HT-29의 증식 억제 활성이 없으나 유독 말뼈의 40% 에탄올 수용액 추출물 및 70% 에탄올 수용액 추출물의 경우 각각 35% 및 40% 정도의 세포 증식 억제 활성을 보이고 있다.

[0027] 본 발명의 대장암 개선제 조성물에서, 상기 추출물은 바람직하게는 아래의 실시예의 추출 조건 및 방법으로 얻어진 추출물을 말한다.

[0028] 본 발명의 대장암 조성물에 있어서, 상기 개선의 의미 및 유효성분의 의미에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0029] 본 발명의 항암제 조성물(즉 혈액암 개선제 조성물, 간암 개선제 조성물 또는 대장암 개선제 조성물을 말함; 이하 같음)은 그 유효성분인 말뼈 추출물을 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 의도하는 항암 활성을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게서, 대장암, 간암 또는 혈액암의 개선, 치료, 또는 이러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[0030] 본 발명의 항암제 조성물은 그 유효성분인 말뼈 추출물을 포함하는 이외에, 항암 활성을 상승·보강할 수 있도록 항암 활성이 있다고 알려진 공지의 화합물, 천연 추출물 등을 포함할 수 있다.

[0031] 그러한 화합물, 천연 추출물로서 예컨대 대장암 개선 활성이 있는 이중 치환 피라졸로벤조디아제핀(WO 2006/040036), 대한민국 특허 제844366호가 개시하는 해조류 추출물 등이나, 간암 개선 활성이 있는 도세탁셀(WO 2001/15675), 알릴티오피리다진 유도체(대한민국 특허 제446103호) 등을 들 수 있다.

[0032] 본 발명의 항암제 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.

[0033] 본 발명의 항암제 조성물은 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효물질인 말뼈 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀젼, 캡슐, 시럽 등), 비경구형 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액), 국소형 제형(용액, 크림, 연고, 겔, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.

[0035] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응가능한 이상의 독성(충분히 낮은 독성)을 지니지 않는다는 의미이다.

[0036] 약제학적으로 허용되는 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 전분(예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 등), 셀룰로오스, 그것의 유도체(예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 등) 맥아, 젤라틴, 탈크, 고체 윤활제(예컨대 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 등), 황산 칼슘, 식물성 기름(예컨대 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유 등), 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린 등), 알긴산, 유화제(예컨대 TWEENS), 습윤제(예컨대 라우릴 황산 나트륨), 착색제, 풍미제, 정제화제, 안정화제, 항산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.

[0037] 부형제도 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 본 발명의 약제학적 조성물이 수성 현탁제로 제조될 경우에 적합한 부형제로서는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드로프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.

[0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 경우에 따라서는 국소적으로 투여될 수

있다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.

[0040] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로서 파악할 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 조성물은 껌류, 비타민 복합제, 건강 보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있다.

[0042] 본 발명의 식품 조성물에는 유효성분인 말뼈 추출물이 포함되는 것 이외에, 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 감미제, 사과, 레몬, 감귤 등의 과일이나 녹차잎, 둥굴레, 대잎 등의 차류에서 얻어진 풍미제, 카테킨, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤 등의 생리활성 성분, 칼슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물 등의 미네랄 등이 또한 첨가될 수 있다.

[0043] 또한 향미나 기호성을 향상시키고 다른 기능성(예컨대 관절염 또는 골다공증 예방)을 추가하기 위하여 한약재가 추가될 수 있는데, 추가될 수 있는 한약재로서는 두충 추출물, 속단 추출물, 녹용 추출물, 홍화인 추출물, 토사자 추출물, 숙지황 추출물, 별갑 추출물, 산수유 추출물, 구기자 추출물, 감초 추출물, 당귀 추출물, 갈근 추출물, 강진향 추출물, 합환피 추출물, 산두근 추출물, 괴화 추출물, 고삼 추출물 등이 예시될 수 있다.

[0044]

효 과

[0045] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 말뼈 추출물을 유효성분으로 하는 항암제 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물은 혈액암, 간암 및 대장암에 대하여 적응증을 가지며, 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로 응용되어 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 본 발명은 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0047] **<실시예> 말뼈 추출물 제조**

[0048] <실시예 1> 말뼈 추출물의 제조예 1

[0049] 실험에 사용된 말뼈는 제주산 말(馬)로서 제주지역 말고기 유통업체를 통해 구입하였다. 말뼈 분쇄는 가공분쇄기를 통해 5 ㎜ 정도로 분쇄하여 말뼈분말 12 kg을 얻었으며, 이를 열풍건조기에서 1차 건조 시킨 후 냉동보관하면서 본 실험에 사용하였다.

[0050] 상기 말뼈 분말 5 kg을 50L의 물에 넣고 열수추출기(HD-A80)를 이용하여 105℃의 조건에서 24시간 끓여 추출한 후 동결건조 후 분말화하여 말뼈 추출물을 제조하고, 그 추출물을 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0051] <실시예 2> 말뼈 추출물의 제조예 2

[0052] 상기 <실시예 1>에서 얻어진 말뼈 분말 열수 추출물 50g을 1L의 40% 에탄올에 침지시켜 24시간 동안 상온에서 교반하면서 추출한 후 와트만 종이 여과지 (Whatman No. 2)로 여과하여 그 여액을 감압·농축시켜 말뼈 추출물을 제조하고, 그 추출물을 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0053] <실시예 3> 말뼈 추출물의 제조예 3

[0054] 상기 <실시예 2>과 동일하게 말뼈 추출물을 제조하되, 다만 추출 용매는 40% 에탄올이 아니라 70% 에탄올을 사용하였다.

[0055] <실시예 4> 말뼈 추출물의 제조예 4

[0056] 상기 <실시예 2>과 동일하게 말뼈 추출물을 제조하되, 다만 추출 용매는 40% 에탄올이 아니라 100% 에탄올을 사용하였다.

[0057] <실시예 5~9> 말뼈 추출물의 제조예 5~9

[0058] 상기 <실시예 1>에서 얻어진 말뼈 분말 열수추출물 50g을 1L의 물에 넣고 호모게나이저로 동질화 작업을 한 후 노보자임사(Novozyme Co.)의 4종류의 단백질 분해 효소, 즉 Alcalase(실시예 5), Neutrase(실시예 6), Flavourzyme(실시예 7), Protamex(실시예 8) 및 Neutrase와 Alcalase의 1:1(중량) 혼합물(실시예 9)을 기질에 대해 5%가 되도록 첨가하여 아래의 <표 1>과 같은 조건으로 맞춘 후 24시간 동안 가수분해시켰다. 그 후 반응액을 100℃에서 약 15분간 가열하여 효소 반응을 중지시키고 와트만 종이여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 그 여액을 동결·건조하여 효소 추출물을 제조한 후, 그 추출물을 실험하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0059] **[표 1]**

[0060] 말뼈 추출물 제조에 사용한 효소 특성 및 추출 조건

Enzyme	Optimum condition		Enzyme charateristics
	pH	Temperature (℃)	
Protamex (P)	6.0	40	Hydrolysis of food proteins
Neutrase (N)	6.0	50	Containing both endoprotease and exopeptidase activities
Flavourzyme (F)	7.0	50	Exopeptidase activities
Alcalase (A)	8.0	50	A endoprotease
Neutrase(N)+ Alcalase(A)	7.0	50	

[0061]

[0062] <실시예 10~13> 말뼈 추출물의 제조예 10~13

[0063] 말뼈 분말 500g을 10L의 물(실시예 10), 10L의 40% 에탄올(실시예 11), 10L의 70% 에탄올(실시예 12) 및 10L의 100% 에탄올(실시예 13)에 침지시키고 24시간 동안 상온에서 교반하면서 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 그 여액을 감압·농축시켜 말뼈 추출물을 제조하고, 그 추출물을 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0064] <실시예 14~18> 말뼈 추출물의 제조예 13~16

[0065] 말뼈 분말 500g을 10L의 물에 넣고 호모게나이저로 동질화 작업을 한 후 노보자임사(Novozyme Co.)의 4종류의 단백질 분해 효소, 즉 Alcalase(실시예 14), Neutrase(실시예 15), Flavourzyme(실시예 16), Protamex(실시예 17) 및 Neutrase와 Alcalase의 1:1(중량) 혼합물(실시예 18)을 기질에 대해 5%가 되도록 첨가하여 상기 <표 1>과 같은 조건으로 맞춘 후 24시간 동안 가수분해시켰다. 그 후 반응액을 100℃에서 약 15분간 가열하여 효소 반응을 중지시키고 와트만 종이여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 그 여액을 동결·건조하여 효소 추출물을 제조한 후, 그 추출물을 실험하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0066] 한편 상기 각 실시예의 추출 수율을 아래의 <표 2>에 나타내었다.

[0067] **[표 2]**

[0068] 추출 방법에 따른 추출 수율

구분	추출방법	시료	조건	수율(%)
실시예 1	열수추출	말뼈분말	105℃, 24h.	26.0
실시예 2	용매추출	열수추출물 (Hot water)	40%ethanol	89.2
실시예 3			70%ethanol	46.6
실시예 4			100%ethanol	1.0
실시예 10		말뼈분말	0%ethanol(물)	2.1
실시예 11			40%ethanol	2.3
실시예 12			70%ethanol	3.2
실시예 13			100%ethanol	21.4
실시예 5	효소추출	열수추출물 (Hot water)	A	98.0
실시예 6			N	98.4
실시예 7			F	98.2
실시예 8			P	98.0
실시예 9			N+A	97.3
실시예 14		말뼈분말	A	13.6
실시예 15			N	13.5
실시예 16			F	12.5
실시예 17			P	14.3
실시예 18			N+A	16.8

[0069] Protamex (P), Neutrase (N), Flavourzyme (F), Alcalase (A),

[0070] **<실험예> 말뼈 추출물의 항암 활성 평가**

[0071] <실험예 1> 세포 배양

[0072] 본 실험을 위하여 급성 전골수성 백혈병 환자에서 유래한 혈액암 세포주 HL-60, 대장암 세포주인 HT-29, 및 간암 세포주 HepG-2를 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 100units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum(FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한 번씩 시행하여 세포를 배양하였다.

[0073] <실험예 2> 암세포 증식 억제 효과(Cytotoxicity) 측정

[0074] 상기 각 실시예 추출물의 암세포에 대한 증식 억제 효과를 MTT assay법(Carmichael et al., 1987)을 이용하여 평가하였다.

[0075] 상기의 각 세포($2.0\sim5.0\times10^4$/mL)를 96 well plate의 well에 넣고, 상기 각 실시예의 추출물의 시료를 200㎍/mℓ의 농도가 되로록 첨가하여 이를 3일간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) 100㎍을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. 배양한 Plate를

1,000rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA) 150㎕를 가하여 MTT 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Bio-TEK instrumenis. Inc., Winooski Vermont, WI, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(시료를 첨가하지 아니한 경우)의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식 억제 정도를 조사하였다.

[0076] 그 결과를 <도 1 내지 6>에 나타내었다. <도 1 및 2>는 상기 각 실시예의 말뼈 추출물의 혈액암 세포주인 HL-60에 대한 세포 증식 억제 정도를 그래프로 나타낸 것이고, <도 3 및 4>는 상기 각 실시예의 말뼈 추출물의 간암 세포주인 HepG-2에 대한 세포 증식 억제 정도를 그래프로 나타낸 것이며, <도 5 및 6>은 상기 각 실시예의 말뼈 추출물의 대장암 세포주인 HT-29에 대한 세포 증식 억제 정도를 그래프로 나타낸 것이다.

[0077] <도 1 및 2>를 참조하여 보면, 상기 각 실시예의 추출물이 활성의 차이는 있지만 전반적으로 혈액암 세포주인 HL-60에 대한 세포 증식 억제 활성을 보여준다. 특히 말뼈의 물 추출물(실시예 10), 40% 에탄올 추출물(실시예 11) 및 70% 에탄올 추출물(실시예 12)의 경우가 가장 활성이 높다.

[0078] 말뼈 추출물의 간암 세포주인 HepG-2에 대한 세포 증식 억제 정도는 <도 3 및 4>에서 확인할 수 있듯이 실시예의 추출물이 대체로 활성을 보이지 않으나, 열수 추출물의 Flavourzyme 추출물(실시예 7)과 Protamex 추출물(실시예 8), Neutrase와 Alcalase의 혼합 추출물(실시예 9)이 활성을 보이고 있다.

[0079] 마지막으로 대장암 세포주인 HT-29에 대한 세포 증식 억제 활성을 보면, 말뼈 열수 추출물 유래 추출물과 말뼈의 효소 추출물의 경우는 전반적으로 낮은 활성을 보이거나 활성을 보이지 않고 있으나 말뼈의 물 추출물(실시예 10)과 40% 에탄올 추출물(실시예 11) 및 70% 에탄올 추출물(실시예 12)이 대체로 높은 활성을 보이고 있다.

[0080] 상기 실험은 3번 반복 실험 결과를 MEAN±SD로 나타낸 것이다.

[0081] <실험예 3> 혈액암 세포주 HL-60의 증식 억제 효과에 대한 추가 실험

[0082] 상기 <실험예 2>에서 실시예의 추출물이 전반적으로 활성을 보이는 것으로 확인된 혈액암 세포주 HL-60에 대해서 말뼈 열수 추출물의 40% 에탄올 추출물(실시예 2), 말뼈 열수 추출물의 70% 에탄올 추출물(실시예 3), 말뼈의 40% 에탄올 추출물(실시예 11) 및 말뼈의 70% 에탄올 추출물(실시예 12)에 대해서 농도에 따른 HL-60 세포 증식 억제 활성을 살펴보았다. 실험은 상기 <실험예 2>와 동일한 방식으로 이루어졌으며, 결과는 <도 7>에 나타내었다.

[0083] <도 7>를 참조하여 보면, 시료로 사용된 모든 추출물이 농도 의존적으로 HL-60 세포 증식을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0084] <실험예 4> 혈액암 세포주의 HL-60 세포핵의 형태학적 변화 측정

[0085] 혈액암 세포주의 HL-60 세포 증식 억제 활성이 높게 나타난 말뼈의 70% 에탄올 추출물(실시예 12)을 대상으로 세포 독성 효과에 의한 세포 증식 억제 작용이 아포토시스(apoptosis) 유도에 의한 것인지 그 기전을 알아보기 위하여, 아포토시스의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 형태학적 변화((Morphological changes)를 관찰하였다. HL-60 세포(3.5×10^5/mL)에 말뼈의 70% 에탄올 추출물(실시예 12)를 농도별로 처리하여 배양이 끝나기 30분전에 DNA에 특이적으로 결합하는 생체 형광 염색액인 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 DNA를 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. 비교를 위하여 세포 증식 억제 활성이 가장 낮은 말뼈 열수 추출물(실시예 1)에 대해서 상기와 동일한 실험을 하였다.

[0086] 결과를 <도 8>에 나타내었는데, 정상세포(control)들(대조군)의 핵들의 형태는 정상적인 둥근 형태이나 말뼈의 70% 에탄올 추출물에서는 농도가 높아질수록 세포의 크기가 축소되며, 핵의 모양이 불규칙하고 부분적인 핵의 응집현상을 관찰할 수 있었다. 말뼈 열수 추출물의 경우는 대조군과 거의 유사한 형태를 보이고 있다.

[0087] 아포토시스 기전에 대하여는 확실하게 증명된 바는 없지만 세포질 내 칼슘치가 증가되어 칼슘 의존성 엔도뉴클레아제(endonuclease)가 활성화되어 핵 내 DNA 분절이 일어나며, 트랜스글루타미나제(transglutaminase)가 활성화되어 세포질 내 단백질의 cross-linking이 일어나면서 세포질 농축이 일어나고 수액이 세포 밖으로 빠져나가면서 apoptotic bodies를 형성하는 것으로(Wyllie, 1992; Fesus 등, 1991; Fesus 등, 1989) 알려져 있다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1 및 2는 말뼈 추출물의 혈액암 세포주인 HL-60에 대한 세포 증식 억제 정도를 그래프로 나타낸 것이다. 그래프의 1 내지 18은 실시예 1 내지 18의 각 추출물을 의미한다.

[0089] 도 3 및 4는 말뼈 추출물의 간암 세포주인 HepG-2에 대한 세포 증식 억제 정도를 그래프로 나타낸 것이다. 그래프의 1 내지 18은 실시예 1 내지 18의 각 추출물을 의미한다.

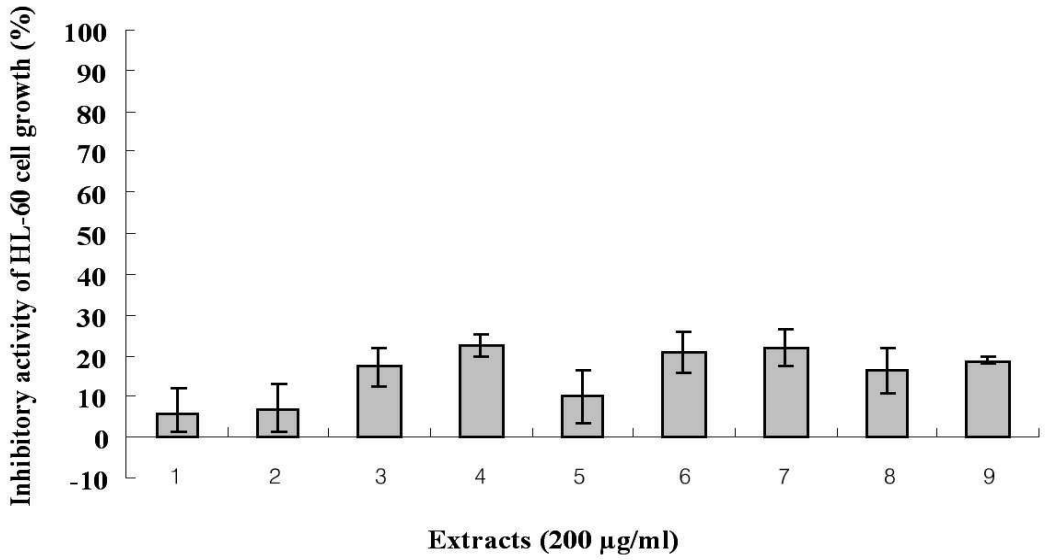
[0090] 도 5 및 6은 말뼈 추출물의 대장암 세포주인 HT-29에 대한 세포 증식 억제 정도를 그래프로 나타낸 것이다. 그래프의 1 내지 18은 실시예 1 내지 18의 각 추출물을 의미한다.

[0091] 도 7은 말뼈 열수 추출물의 40% 에탄올 추출물, 말뼈 열수 추출물의 70% 에탄올 추출물, 말뼈의 40% 에탄올 추출물 및 말뼈의 70% 에탄올 추출물의 농도에 따른 혈액암 세포주 HL-60 세포 증식 억제 활성을 그래프로 나타낸 것이다.

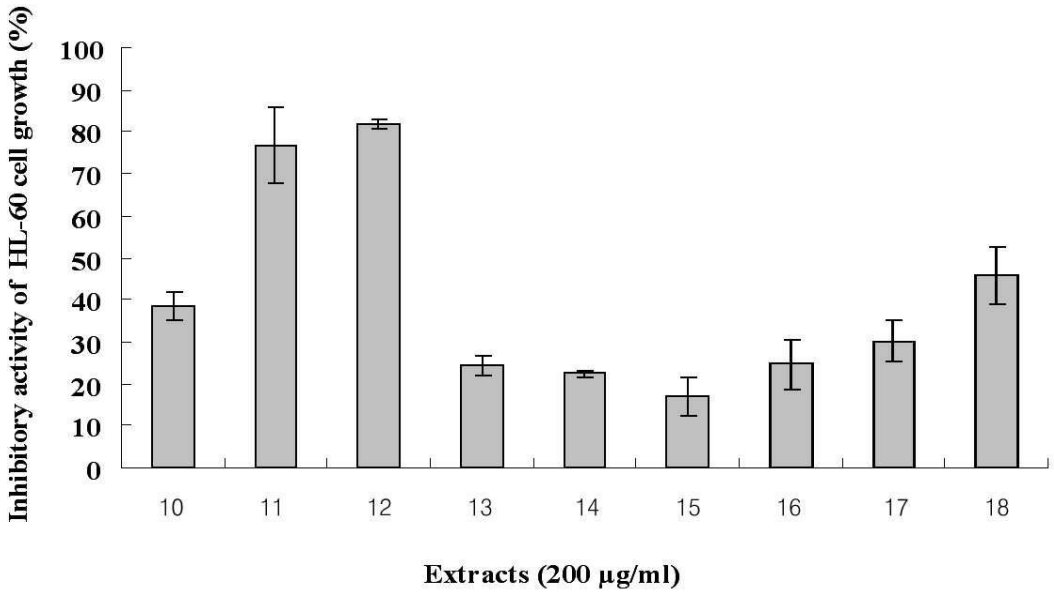
[0092] 도 8은 말뼈의 70% 에탄올 추출물을 처리한 혈액암 세포주 HL-60을 생체 형광 염색액으로 염색하고 형광현미경으로 촬영한 사진이다.

도면

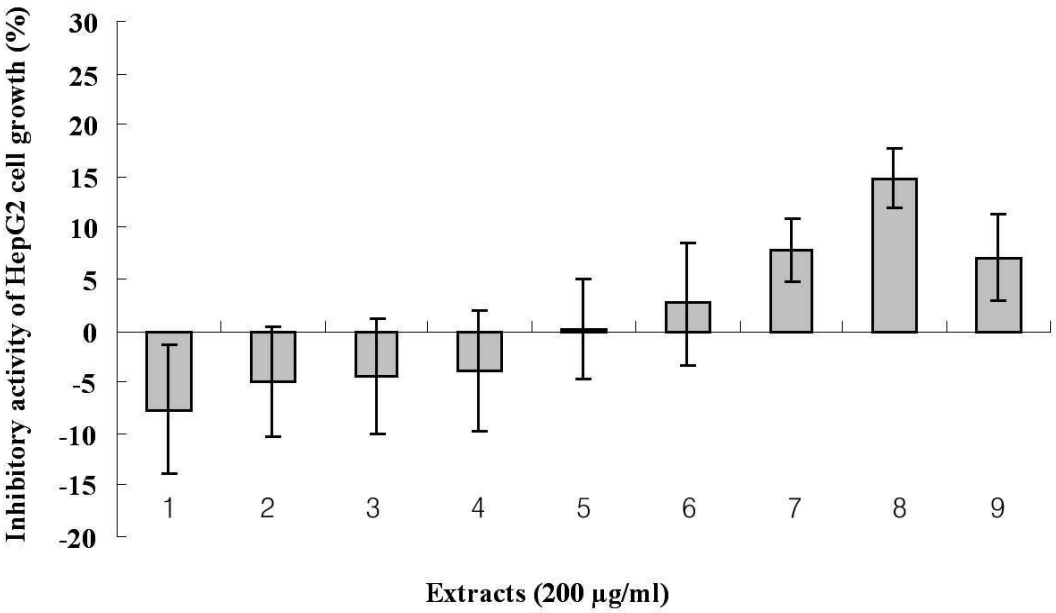
도면1



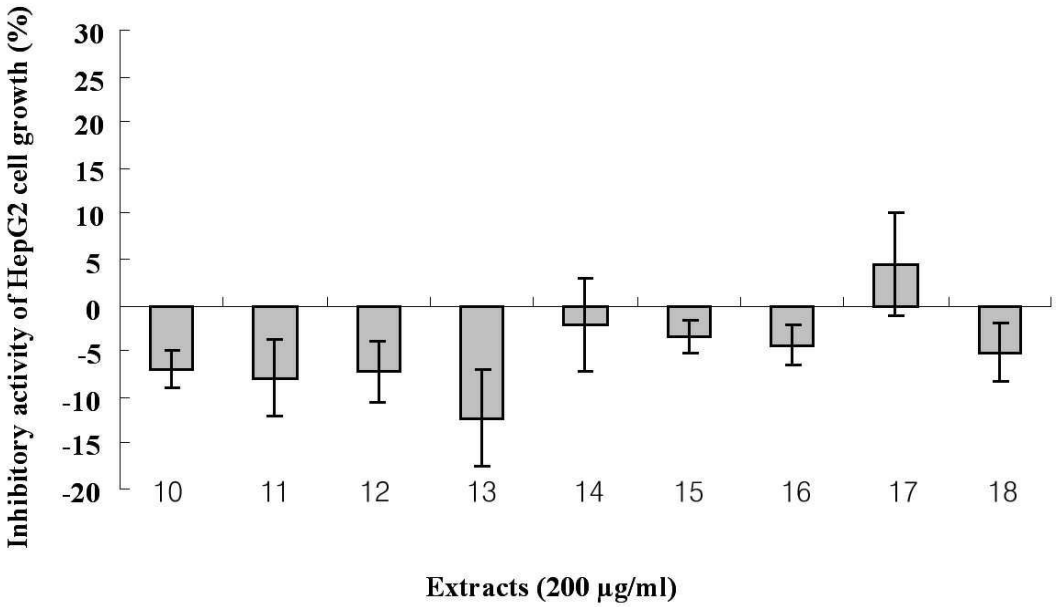
도면2


Inhibitory activity of HL-60 cell growth (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
11
12
13
14
15
16
17
18
Extracts (200 μg/ml)

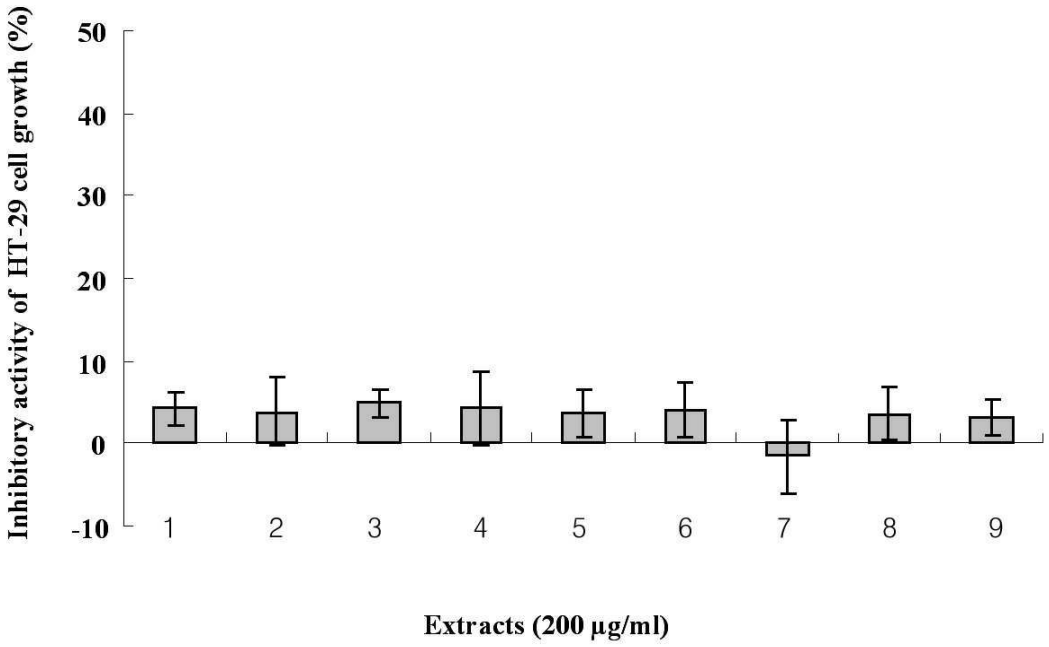
도면3


Inhibitory activity of HepG2 cell growth (%)
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Extracts (200 μg/ml)

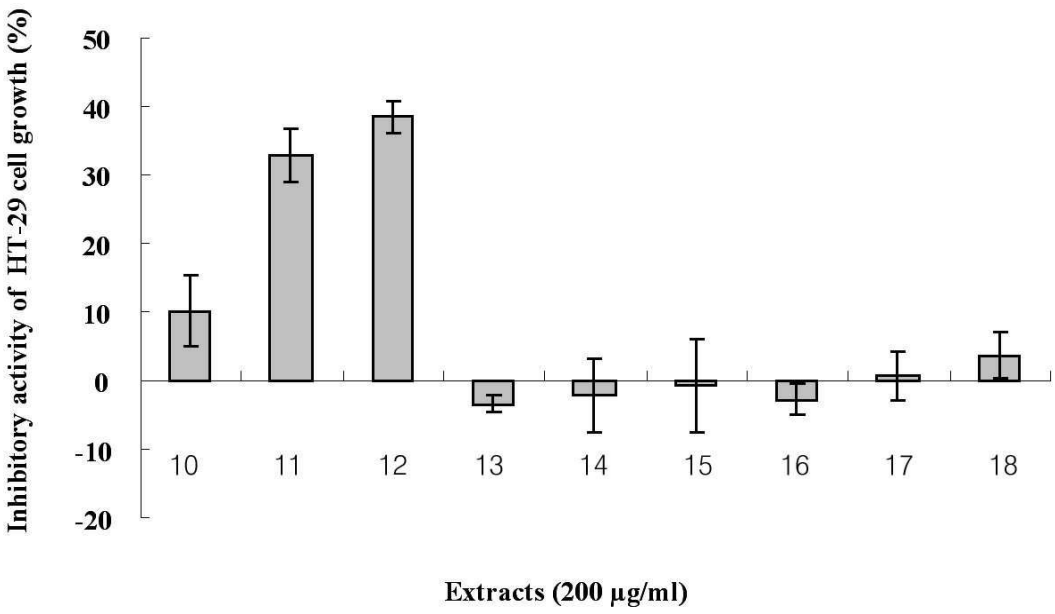
도면4


Inhibitory activity of HepG2 cell growth (%)
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
10
11
12
13
14
15
16
17
18
Extracts (200 μg/ml)

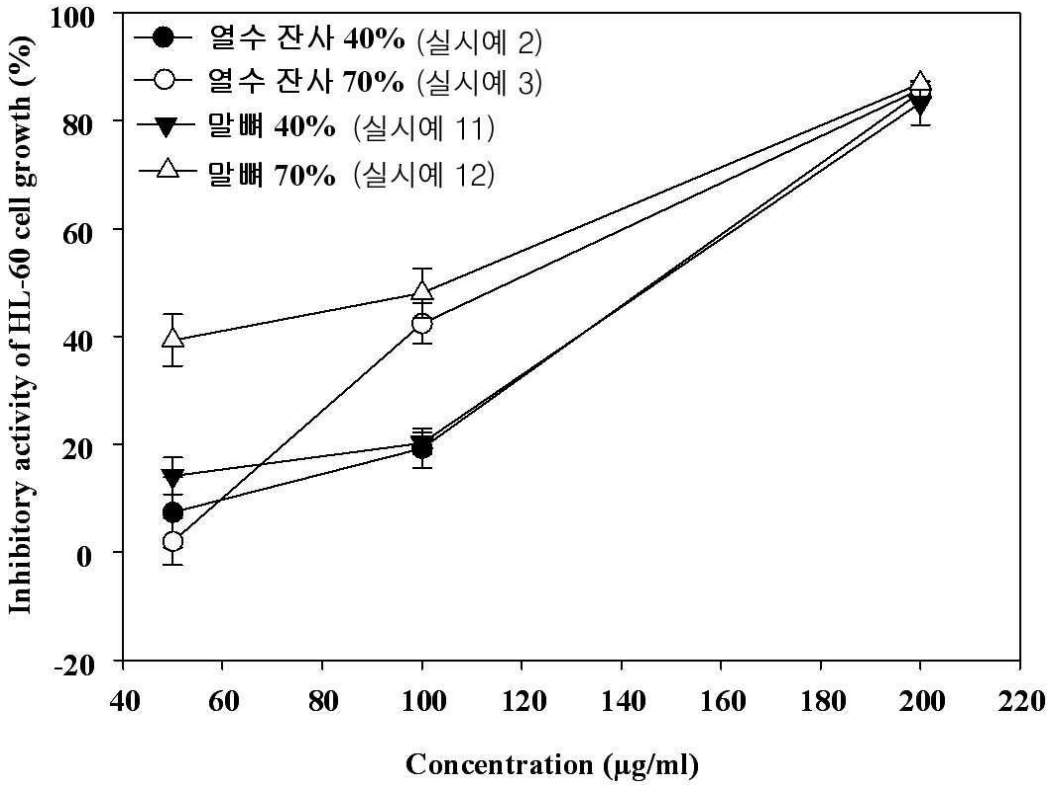
도면5


Inhibitory activity of HT-29 cell growth (%)
50
40
30
20
10
0
-10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Extracts (200 μg/ml)

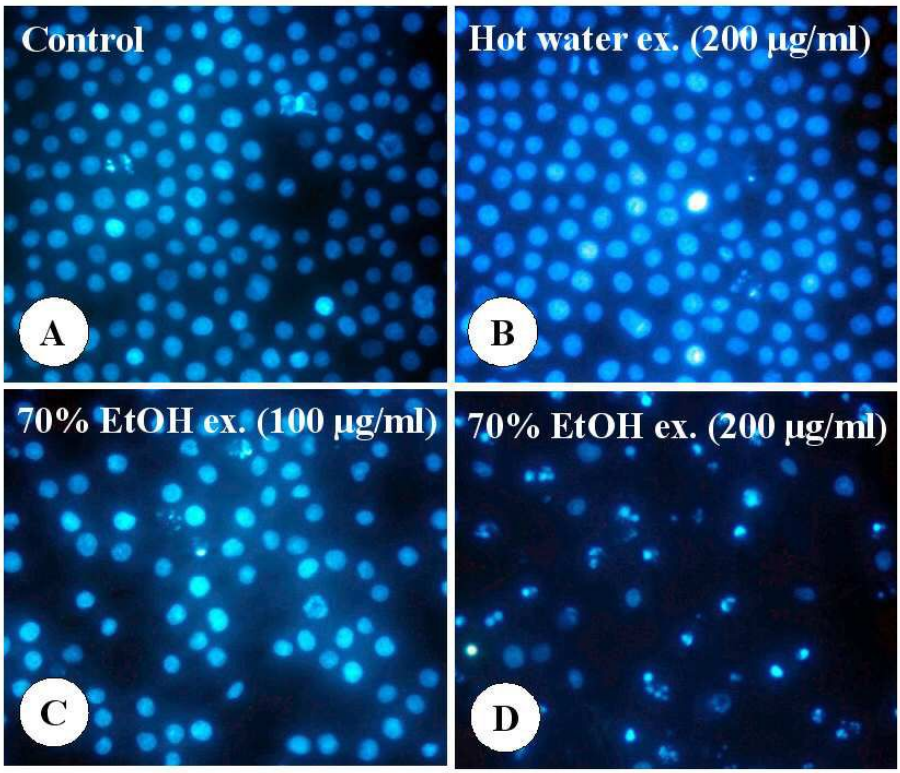
도면6


Inhibitory activity of HT-29 cell growth (%)
50
40
30
20
10
0
-10
-20
10
11
12
13
14
15
16
17
18
Extracts (200 μg/ml)

도면7


Inhibitory activity of HL-60 cell growth (%)
100
80
60
40
20
0
-20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Concentration (μg/ml)
열수 잔사 40% (실시예 2)
열수 잔사 70% (실시예 3)
말뼈 40% (실시예 11)
말뼈 70% (실시예 12)

도면8


Control
A
Hot water ex. (200 μg/ml)
B
70% EtOH ex. (100 μg/ml)
C
70% EtOH ex. (200 μg/ml)
D