



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0029755
(43) 공개일자 2017년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/605 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/605 (2013.01)

A61K 31/05 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0126727

(22) 출원일자 2015년09월08일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

한국산업기술대학교산학협력단

경기도 시흥시 산기대학로 237 (정왕동, 한국산업기술대학교)

(72) 발명자

임영희

서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호 (홍제동, 한양아파트)

이지윤

서울특별시 종로구 종로66길 28, 907호 (송인동, 종로중흥S클래스)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 11 항

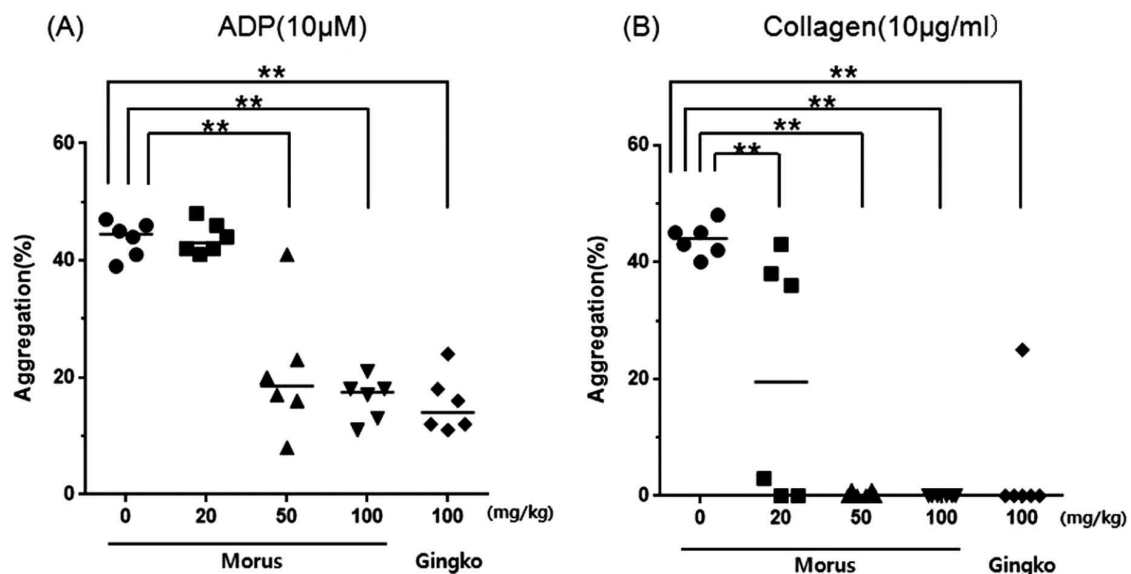
(54) 발명의 명칭 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제

(57) 요약

본 발명은 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제에 관한 것이다.

본 발명에 따른 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제는 천연물로부터 추출된 물질을 사용하기 때문에 부작용 없이 혈소판 응집을 억제함으로써 혈전 생성을 억제하게 된다. 특히 장기간 또는 다량으로 사용하여도 혈전 이외에 다른 단백질을 분해하지 않아 혈관벽이나 혈액내 다른 단백질을 분해함으로써 나타나는 부작용(예: 출혈 지연의 문제)이 없고, 경구 투여에 의해서도 혈전 생성 억제 효과를 충분히 달성하는 것이 가능하다. 특히 이러한 효과는 기존에 존재하던 혈전 생성 억제제의 부작용을 크게 개선한 것이다. 또한 천연물에서 유래하면서 혈전 생성 억제 효과를 갖는 물질을 보다 다양화시켰다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

(72) 발명자

김정근

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 118동 802호 (봉천동, 관악푸르지오1단지아파트)

김기현

서울특별시 마포구 동교로50길 30, 302호 (연남동, 화랑빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313028-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 노인성 만성질환(혈액순환, 고지혈·혈압, 당뇨 등) 완화를 위한 복합식품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.20 ~ 2016.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은 혈소판 응집을 저해하여 혈전 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 상지 추출물은 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol), 레스베라트롤(resveratrol), 퀘세틴(quercetin) 및 멀베로사이드 A(mulberroside A)를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 상지 추출물은 옥시레스베라트롤 65-70 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트롤 2.5-3.0 $\mu\text{g/g}$, 퀘세틴 7.5-8.0 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A 40-45 $\mu\text{g/g}$ 를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1-80 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 혈전성 질환은 심근경색증, 뇌졸중, 말초동맥질환, 혈전성 정맥염, 혈전성 혈소판감소성 자반증, 정맥혈전증, 동맥색전증, 혈전성 외치질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 7

상지 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 생성 억제제.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 혈전 생성 억제제는 in vitro 상에서 혈소판 응집을 저해하는 것을 특징으로 하는 혈전 생성 억제제.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 상기 추출물은 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol), 레스베라트롤(resveratrol), 퀘세틴(quercetin) 및 멀베로사이드 A(mulberroside A)를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈전 생성 억제제.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 상기 추출물은 옥시레스베라트롤 65-70 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트롤 2.5-3.0 $\mu\text{g/g}$, 퀘세틴 7.5-8.0 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A 40-45 $\mu\text{g/g}$ 로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈전 생성 억제제.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 상기 추출물은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1-80 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 혈전 생성 억제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뽕나무는 식물분류학상 *Morus alba* L. 로 표시되는 교목식물이다. 뽕나무 (Mulberry)는 열매(桑子), 잎(桑葉), 가지(桑枝), 뿌리껍질(桑白皮)부터 뽕나무에 기생하는 겨우살이(桑寄生), 상황버섯(桑黃), 누에(白蠶), 동충하초(冬蟲夏草)에 이르기까지 하나도 버릴게 없는 신목으로 알려져 있다. 또한 ‘동의보감’ 및 ‘본초강목’에는 고혈압과 동맥경화, 중풍을 비롯해 각기에 의한 부종, 신경통과 관절염, 감기의 기침과 가래 등에 효과가 있고, 자양강장 효과도 있는 것으로 적혀있다. 이러한 뽕나무의 쓰임새를 보다 구체적으로 살펴보면, 잎은 상엽이라 하여 누에를 기르거나 약용하며, 열매는 상자(桑子) 또는 오디라고 하며, 뿌리껍질은 상백피(桑白皮)라 하여 해열·진해·이뇨제·소중에 쓴다. 특히 상지(桑枝)는 주로 봄에 잎이 나기 전에 가는 가지를 잘라 햇볕에 말린 것으로서, 피부 조습과 미백, 이뇨작용, 항염증작용, 항산화, 항노화, 항균작용, 진해, 진통, 해열작용 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 한편, 이러한 상엽, 상심자, 상백피, 상지는 뽕나무에서 유래되는 것이기는 하나, 각각의 구성 성분과 그 함량은 차이가 있다. 특히 상지는 옥시레스베라트롤을 주요 구성 성분으로 하면서 거의 대부분 비배당체로 존재한다. 반면에 상백피에서는 상지에서보다 옥시레스베라트롤의 함량이 현저히 떨어지며, 상엽이나 오디에서는 옥시레스베라트롤이 거의 존재하지 않는다.

[0003] 한편, 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어 정상적인 상태에서는 출혈이나 혈전에 의해 흐름이 방해 받지 않는다. 하지만 다양한 원인에 의해 혈관벽이 손상을 받게 되면 이러한 평형상태가 깨지고 혈액 중의 혈소판이 점착, 활성화, 응집됨으로써, 혈액 응고계를 활성화하여 급속하게 혈전을 형성하게

된다. 이러한 혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생할 수 있어 생명이 되면 매우 위험하다. 최근 우리나라에서도 식생활의 선진화, 서구화가 됨에 따라 심혈관계질환으로 사망하는 인구수가 점차 증가추세에 있다. 약물요법에는 현재 아스피린, 디피리다몰, 티클로피딘 등의 혈소판응집 억제제와 스트렙토키나아제(streptokinase, SK), 유로키나아제(urokinase, UK), 아미노카프로익산(aminocaproic acid) 등의 혈전용해제 및 헤파린, 와파린, 디큐마롤 등의 항응고제가 보편적으로 사용되고 있다. 하지만 생체 내에 혈전용해제를 지속적으로 투여하게 되면, 과량으로 생성된 플라스민에 대한 면역반응으로 혈전 용해 작용이 점차 감소하게 된다. 그리하여 이러한 약품들은 유로키나아제를 제외하고는 경구투여가 불가능하다는 단점이 있다. 또한, 일반적으로는 피브린만을 용해시키는 선택적인 용해작용이라기보다 다른 단백질도 분해하는 넓은 범위의 단백질 분해효소의 성질을 가지는 것이 대부분이다. 이러한 성질을 가지는 단백질 분해효소를 혈전증 치료의 목적으로 장기간 또는 다량으로 사용할 경우에는 혈관벽이나 혈액 성분 등 다른 단백질을 함께 용해하기 때문에 매우 심각한 부작용(예: 출혈 지연의 문제)이 나타날 수 있으므로, 이같은 부작용을 최소화하기 위하여 천연물에서 유래되어 혈전용해 활성을 갖는 물질을 개발하려는 연구와 노력이 절실한 실정이다.

[0004] 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 공개특허 제10-2015-0026695호(특허문헌 1)가 개시되어 있으며, 상기 특허문헌 1에는 상엽 알코올추출물을 유효성분으로 포함하는 혈전성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대하여 개시되어 있을 뿐, 뽕나무의 다른 부위로부터의 추출물에 의한 혈전성 질환의 치료 효과에 관하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않으며, 혈액 응고 지연에 의한 출혈 지연의 부작용을 해결하는 내용에 대하여도 전혀 언급된바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허 제10-2015-0026695호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 혈소판 응집을 저해함으로써 혈전 생성을 억제하는 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제를 발견하는 것이다. 특히 천연물로부터 부작용 없이 상기 혈소판 응집을 저해 및 혈전 생성을 억제 효과를 달성하는 물질을 발견하는 것이 목적이다.

과제의 해결 수단

[0007] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물은 상기 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 혈전 생성 억제제는 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 것이다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제는 천연물로부터 추출된 물질을 사용하기 때문에 부작용 없이 혈소판 응집을 억제함으로써 혈전 생성을 억제하게 된다. 특히 장기간 또는 다량으로 사용하여도 혈전 이외에 다른 단백질을 분해하지 않아 혈관벽이나 혈액내 다른 단백질을 분해함으로써 나타나는 부작용(예: 출혈 지연의 문제)이 없고, 경구 투여에 의해서도 혈전 생성 억제 효과를 충분히 달성하는 것이 가능하다. 특히 이러한 효과는 기존에 존재하던 혈전 생성 억제제의 부작용을 크게 개선한 것이다. 또한

천연물에서 유래하면서 혈전 생성 억제 효과를 갖는 물질을 보다 다양화시켰다.

도면의 간단한 설명

[0010]

도 1은 뽕 나무의 각 부위별 추출물을 가지고 HPLC 분석을 실시한 결과를 나타내는 것이다.

도 2는 실시예에 따른 상지 추출물의 세포 독성 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 3은 항혈전 활성 실험에서 실시예에 따른 상지 추출물 등을 투입한 시험동물의 체중 변화를 나타내는 것이다.

도 4는 실시예에 따른 상지 추출물의 항혈전 활성 시험 결과를 나타내는 것이다.

도 5는 혈소판 응집 억제 시험에서 실시예에 따른 상지 추출물 등을 투입한 시험동물의 체중 변화를 나타내는 것이다.

도 6은 실시예에 따른 상지 추출물의 혈소판 응집 억제 시험 결과를 나타내는 것이다.

도 7은 실시예에 따른 상지 추출물의 혈액 응고 억제 시험 결과를 나타내는 것이다.

도 8은 실시예에 따른 상지 추출물의 출혈지연시간 측정 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

이에 본 발명자들은 천연물에서 유래하여 부작용 없이 혈소판 응집을 억제함으로써 혈전 생성을 억제하는 물질을 발견하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제를 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0012]

구체적으로 본 발명에 따른 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물은 상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 것이다.

[0013]

본 발명에 따른 상지 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물은 천연물로부터 유래한 상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하고, 상지 상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 혈소판 응집을 저해하는 작용을 수행함으로써 혈전 생성을 억제하게 된다.

[0014]

한편, 상지는 뽕나무의 어린 가지에서 유래한 것으로서, 뽕나무의 잎에서 유래하는 상엽이나 뽕나무의 뿌리로부터 유래하는 상백피나 뽕나무의 열매로부터 유래하는 오디와는 그 주요 성분이 전혀 다르다. 구체적으로 상지 또는 상지 추출물은 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)을 주요 성분으로 하여 레스베라트롤(resveratrol), 퀘세틴(quercetin) 및 멀베로사이드 A(mulberroside A)를 구성 성분으로 하며, 상지 추출물의 경우 옥시레스베라트롤 65-70 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트롤 2.5-3.0 $\mu\text{g/g}$, 퀘세틴 7.5-8.0 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A 40-45 $\mu\text{g/g}$ 를 포함하게 된다. 반면에 상엽 추출물은 옥시레스베라트롤이 거의 존재하지 않으면서 멀베로사이드 A가 50-55 $\mu\text{g/g}$, 클로로겐산(chlorogenic acid) 160-170 $\mu\text{g/g}$ 및 퀘세틴-3-베타-글루코시드(quercetin-3- β -glucoside) 100-110 $\mu\text{g/g}$ 이 포함되어 있어 상지 추출물과는 그 주요 성분 및 구성 성분이 다를 뿐만 아니라, 구체적인 함량의 수준도 다르다. 또한 상백피 추출물의 경우에는 옥시레스베라트롤이 존재하기는 하나, 옥시레스베라트롤이 10-20 $\mu\text{g/g}$, 멀베로사이드 A가 30-40 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트롤이 3-8 $\mu\text{g/g}$ 및 캠페롤이 45-50 $\mu\text{g/g}$ 로 함유되어 있어, 그 전체적인 구성 성분 및 함량의 수준이 상지와는 완전히 다르다. 이러한 점은 오디의 경우도 다르지 않는데, 오디의 경우 퀘세틴-3-G가 30-40 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A가 35-45 $\mu\text{g/g}$ 로 포함되어 전체적인 구성 성분 및 함량의 수준이 상지와는 현저히 다르다. 그러므로 상지, 상엽, 상백피, 오디는 모두 뽕나무에서 유래한다 하더라도, 그 구체적인 효능의 종류나 효능의 수준은 모두 다를 수밖에 없다. 그러므로 본 발명에 따른 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물은 상지 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하기 때문에 상엽, 상백피, 오디에서 추출되는 물질과 구체적인 약리효과나 약리효과가 달성되는 수준이 상이할 수 있다. 또한 상지 상엽, 상백피 또는 오디에서 추출되는 물질은 본 발명에 따른 상지 추출과는 구성 성분이 상이하며, 이들 이외에 상지 상지 추출물이 혈소판 응집을 저해하여 혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물로의 약리효과를 달성함은 본 발명자들에 의해 신규로 발견된 것이다. 한편, 바람직하게는 본 발명에 따른 상지 추출물은 상엽 추출물, 오디 추출물, 상백피 추출물에 비하여 혈전 생성 억제 효과가 1.5-2 배 또는 그 이상으로 우수할 수 있

다.

- [0015] 한편, 뽕나무로부터 상기 상기 추출물을 분리하여 수득하는 방법은 당업계에 공지된 모든 방법이 이에 해당할 수 있으며, 바람직한 상기 추출물의 추출 방법은 탄소수 1-4의 알코올, 물, 또는 이들의 혼합물로 이루어지는 주정 또는 열수 추출물의 추출 방법이 이에 해당할 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 약학 조성물은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 바람직하게는 상기 상기 추출물에 대하여 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염의 일실시예로서 상기 상기 추출물의 용해도를 증가시키기 위한 것이라면 모두 이에 해당할 수 있고, 바람직한 일실시예에 산부가염이 해당 될 수도 있다.
- [0017] 한편, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않아야 한다. 또한 상기 약학적으로 허용 가능한 염의 제조에 사용될 수 있는 유리산은 무기산과 유기산으로 나눌 수 있다. 무기산은 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 브롬산 등이 사용될 수 있다. 유기산은 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 글루탐산 등이 사용될 수 있다. 유기염기부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기는 트리스(히드록시메틸)메틸아민, 디시클로헥실아민 등이다. 아미노산부가염 제조에 사용될 수 있는 아미노산은 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산이다. 또한 본 발명에 따른 상기 추출물은 약학적으로 허용 가능한 염뿐 만 아니라 모든 수화물 그리고 용매화물도 포함할 수 있다. 상기 수화물 또는 용매화물은 상기 상기 추출물을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 1,4-디옥산과 같은 물과 섞일 수 있는 용매에 녹인 다음에 유리산 또는 유기염기를 가한 후에 결정화되거나 또는 재결정화될 수 있다. 그러한 경우, 용매화물(특히 수화물)이 형성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 추출물로서 동결건조와 같은 방법으로 제조 가능한 다양한 양의 물 함유 화합물 이외에 수화물을 비롯한 화학 양론적 용매화물도 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 상기 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은, 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1-80 중량부로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 20-60 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 상기 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 1 중량부 미만으로 포함되는 경우에는 본 발명에서 달성하려는 혈소판 응집 저해로 인한 혈전 생성 억제 효과를 충분히 발현시키기 어려워 바람직하지 않으며, 상기 상기 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 80 중량부를 초과하는 경우에는 약학적인 응용 제품으로 제조하기 위한 나머지 물질들의 함량을 제한할 수 있어 바람직하지 않다.
- [0019] 한편, 상기 혈전 생성으로 인한 질병에 대한 치료 또는 예방용 약학 조성물의 투여 방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 바람직하게는 동맥 또는 정맥 내로 투입하거나, 피하로, 직장으로, 비강으로, 임의의 다른 비경구로도 투입될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동맥 또는 정맥 내로 투입하거나 경구 투여하거나 또는 근육 세포에 직접 투입하는 것이 바람직하다.
- [0020] 또한 상기 조성물로부터 선택되는 투여 수준은 화합물의 활성, 투여 경로, 치료되는 병태의 중증도 및 치료되는 환자의 병태 및 이전 병력에 따라 것이다. 그러나 원하는 치료 효과의 달성을 위해 요구되는 것보다 낮은 수준의 화합물의 용량에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 서서히 증가시키는 것은 당업계의 지식 내에 있으며, 바람직한 투여량은 나이, 성별, 체형, 체중에 따라 결정될 수 있다. 상기 조성물은 약제학상 허용 가능한 제약 제제로 제제화 되기 전에 추가로 가공될 수 있으며, 바람직하게는 더 작은 입자들로 분쇄 또는 연마될 수 있다. 또한 상기 조성물은 병태 및 치료되는 환자에 따라 달라질 것이지만, 이는 비-독창적으로 결정할 수 있다.
- [0021] 또한 상기 약학 조성물로 인해 치료 또는 예방되는 혈전성 질환은 심근경색증, 뇌졸중, 말초동맥질환, 혈전성 정맥염, 혈전성 혈소판감소성 자반증, 정맥혈전증, 동맥색전증, 혈전성 외치질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 혈전 생성 억제제는 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 것이다.
- [0023] 본 발명에 따른 혈전 생성 억제제는 in vivo 또는 in vitro 상에서 모두 혈소판 응집을 저해하는 것이 가능하나, 본 발명에서는 본 발명의 또 다른 특징에 따른 상기 약학 조성물 이외의 것으로서 바람직하게는 in vitro 상에서 혈소판 응집을 저해하여 혈전 생성을 억제하게 된다.

- [0024] 한편, 상기 상기 추출물은 옥시레스베라트를, 레스베라트를, 케세틴 및 멀베로사이드 A를 포함하며, 더욱 구체적으로는 옥시레스베라트를 65-70 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트를 2.5-3.0 $\mu\text{g/g}$, 케세틴 7.5-8.0 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A 40-45 $\mu\text{g/g}$ 를 포함할 수 있다.
- [0025] 또한 상기 상기 추출물은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1-80 중량부로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0026] 또한 상기 상기 추출물은 10-300 mg/kg로 함유되는 것이 혈소판 응집의 저해 효과를 유의하게 달성할 수 있어 바람직하다.
- [0027] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] **실시예**
- [0029] 상기 추출물이 혈행 개선에 도움이 되는지 확인하기 위해 앞서 혈소판에 대한 독성시험을 실시하였고, 시험동물에 21일간 물질을 투여한 후 항혈전시험, 혈소판 및 혈액응고 억제 시험을 수행하였다.
- [0030] (1) 재료 및 실험동물
- [0031] 실험에 사용할 상기 주정 추출분말의 제조는 잘게 잘린 상기 1,000 g을 증류수로 깨끗하게 세척한 후, 80 % 주정용 에탄올 8,000 mL를 첨가하여 초음파 세척기(H0429115, Hwashin Instrument Co.)에서 48 시간 추출하였다. 추출이 끝난 주정추출물은 GFC 여과지(Cat No. 1822-047, Whatman®)를 이용하여 감압 여과 후 감압 증류기(N-1000, Eyela)를 사용하여 약 500 mL까지 감압농축 하였다. 농축된 추출물은 80 $^{\circ}\text{C}$ 초저온냉동고(DF8520, Ilshin Lab Co.)에서 동결 후, 동결건조기(FD8512, Ilshin Lab Co.)를 사용하여 48 시간 동안 건조하였다.
- [0032] 양성대조군으로 사용한 은행나무 추출물은 GNC(Pittsburgh, PA, USA)의 Ginkgo Biloba를 이용하였다. 실험동물은 5 주령 수컷 Spague-Dewley (SD) rat은 (주)대한바이오링크에서 구입하였고, 7 주령 수컷 SD rat과 8 주령 ICR mouse는 (주)코아텍에서 구입하여 1 주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육장의 실내 온도는 20-24 $^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 45.0-55.0 %, 조도는 200-300 Lux로 12 시간 명암주기가 되도록 조절하였다. 체중 측정은 시험물질 투여 개시 전에 측정하고 시험물질 투여 후 주 2 회 측정하였다.
- [0033] (2) 세포독성시험
- [0034] 세포막의 손상으로 인한 세포내의 Lactate dehydrogenase(LDH) 유리를 혈소판 손상의 지표로 이용하였다. 200-250 g인 8 주령 수컷 SD rat의 복대정맥에서 혈액을 얻어 항응고제 3.8 % Sodium citrate 처리를 한 후, 950 rpm으로 10 분간 원심분리하여 platelet rich plasma(PRP)를 분리하고, 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP는 혈구계수기(MELET SCHLOESING Laboratories, Osny, France)를 이용하여 혈소판의 수를 계수하고 PPP로 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 가 되도록 희석하고, 2 시간 이내에 사용하였다. 희석한 PRP에 0.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml의 농도로 물질을 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분 동안 incubation 후, 1 분 동안 10,000 g에서 원심분리 하였다. 원심분리한 상등액 50 μl 를 tris-EDTA buffer(56 mM Tris base, 5.6 mM EDTA, pH 7.4)에 β -NADH (sigma)를 0.17 mM로 녹인 용액 1.8 ml에 가한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분 동안 incubation 하였다. 여기에 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 미리 incubation 해 놓은 14 mM pyruvate (sigma) 용액 100 μl 를 가하고, 즉시 340 nm의 파장에서 흡광도 감소율을 측정하였다. 세포로부터 유리된 LDH의 백분율은 0.5 % Triton X-100을 처리하여 모든 혈소판이 죽었을 때를 100 %로 기준하여 환산하였다.
- [0035] (3) 항혈전 활성 시험
- [0036] 180-200 g인 6 주령 수컷 SD rat을 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 3 개 시험물질 투여군과 용매대조군 및

은행잎추출물(100 mg/kg)의 양성대조군으로 설정하였다. 각 군당 6 마리씩 구성하여 투여시 체중을 측정하고 10 ml/kg으로 환산하여, 매 1 회, 21 일간 경구 투여하였다. 시험물질 마지막 경구투여 45 분 후에 Isoflurane(Piramal, PA, USA)로 흡입마취하고 목을 절개하여 경동맥을 노출시킨다. 시험물질 투여 60 분 후에 70 % FeCl₃를 적신 2 mm의 Whatman No.1 filter paper를 경동맥에 올려놓고 혈류측정기(Omegawave, Tokyo, Japan)를 이용하여 혈류를 측정하였다. 10 분 후 Whatman filter paper를 제거하고 50 분 동안 (총 60 분) 혈류량을 기록하였다. 처음 혈류량의 10 %가 되었을 때를 경동맥 폐색이 일어난 것으로 판단하였다.

[0037] (4) 혈소판 응집 억제 시험

[0038] 180-200 g인 6 주령 수컷 SD rat을 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 3 개 시험물질 투여군과 용매대조군 및 은행잎추출물(100 mg/kg)의 양성대조군으로 설정하였다. 각 군당 6 마리씩 구성하여 투여시 체중을 측정하고 10 ml/kg으로 환산하여, 매 1 회, 21 일간 경구 투여하였다. 시험물질 경구투여 1 시간 후에 시험동물의 복대정맥에서 혈액 9 ml를 채취하고 항응고제 3.8 % Sodium citrate 1 ml를 처리하였다. 950 rpm으로 10 분간 원심분리하여 PRP) 분리하고, 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 PPP) 얻었다. PRP는 혈구계수기를 이용하여 혈소판의 수를 계수하고 PPP로 3×10^8 /ml가 되도록 희석하였다. 혈소판 응집은 Chrono-Log aggregometer(Chrono-Log, Havertown, USA)를 사용하여 측정하였다. 정량된 혈소판을 cuvette에 넣고 37 °C에서 10 분간 incubation한 후 1200 rpm으로 교반하면서 baseline이 안정화되면 혈소판 응집촉진물질인 adenisine diphosphate(ADP)와 Collagen을 넣고 반응하여 10 분간 응집률을 측정하였다.

[0039] (5) 혈액 응고 억제 시험

[0040] 혈액응고에 대한 효과를 평가하고자 prothrombin time(PT)과 plasma-activated partial thromboplastin time(aPTT)을 자동혈액응고분석기 ACL100(Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)로 측정하였다. PPP를 37°C에서 7 분간 incubation 하여 50 μ l PPP와 PT reagent(RecombiPlasTin 2G, Instrumentation Laboratory) 100 μ l을 섞어 응고까지의 시간을 측정하였다. APTT 또한 혈장과 시료를 섞어 37 °C에서 7 분간 incubation하여 혈장 50 μ l에 APTT reagent(SynthASil, Instrumentation Laboratory) 53 μ l를 첨가한 후 CaCl₂ 50 μ l를 넣어 응고까지의 시간을 측정하였다.

[0041] (6) 출혈지연시간 측정

[0042] 30-35 g의 수컷 ICR mouse를 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 3 개 시험물질 투여군과 용매대조군 및 aspirin(50 mg/kg)의 양성대조군으로 설정하였고, 시료를 경구투여 하였다. 2 시간 후 에테르로 마취하여 37 °C로 체온을 유지시키고 꼬리를 끝에서 3 mm 자른 후 식염수가 들어있는 투명한 15 ml tube에 꼬리 끝을 넣고 관찰하였다. 혈액이 퍼지는 것을 확인하고 혈액이 더 이상 퍼지지 않고 출혈이 멈춘 시간을 측정하였다.

[0043] (7) 자료의 통계처리

[0044] One-way analysis of variation(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 용매대조군과 유의한 차이가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test를 실시하였다(*p<0.05).

[0045] 실험예

[0046] <실험예 1: 뽕나무 부위별 성분 분석>

[0047] 뽕나무의 각 부위별 추출물의 함량을 분석하였다. 각 부위별 추출물의 추출 방법은 상기 실시예에서 상기 주정 추출물의 추출 방법과 동일한 방법을 사용하였다. 그리고 이들 각 부위별 추출물의 구성 성분의 분석은 HPLC를 이용하였다.

[0048] 또한 이러한 HPLC의 분석 조건 및 결과는 하기 도 1로 나타내었다. 하기 도 1에서 (a)는 상업 추출물이며, (b)

는 오디 추출물, (c)는 상백피 추출물, (d)는 상지 추출물의 성분 분석 결과이다.

[0049] 하기 도 1에서 확인할 수 있는 바와 마찬가지로 상지 추출물의 경우에는 옥시레스베라트를 67.9 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트를 2.8 $\mu\text{g/g}$, 퀘세틴 7.7 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A 43.4 $\mu\text{g/g}$ 를 포함하게 된다(바람직하게는 옥시레스베라트를 65-70 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트를 2.5-3.0 $\mu\text{g/g}$, 퀘세틴 7.5-8.0 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A 40-45 $\mu\text{g/g}$). 반면에 상엽 추출물은 옥시레스베라트류가 거의 존재하지 않으면서 멀베로사이드 A가 53.2 $\mu\text{g/g}$, 클로로겐산(chlorogenic acid) 166.8 $\mu\text{g/g}$, 퀘세틴-3-베타-글루코시드(quercetin-3- β -glucoside) 104.5 $\mu\text{g/g}$ 이 포함(바람직하게는 멀베로사이드 A가 50-55 $\mu\text{g/g}$, 클로로겐산(chlorogenic acid) 160-170 $\mu\text{g/g}$ 및 퀘세틴-3-베타-글루코시드(quercetin-3- β -glucoside) 100-110 $\mu\text{g/g}$)되어 있어 상지 추출물과는 그 주요 성분 및 구성 성분이 다를 뿐만 아니라, 구체적인 함량의 수준도 다르다. 또한 상백피 추출물의 경우에는 옥시레스베라트류가 16.7 $\mu\text{g/g}$, 멀베로사이드 A가 35.4 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트류가 5.5 $\mu\text{g/g}$, 캠페롤이 47.1 $\mu\text{g/g}$ 로 함유(바람직하게는 옥시레스베라트류가 10-20 $\mu\text{g/g}$, 멀베로사이드 A가 30-40 $\mu\text{g/g}$, 레스베라트류가 3-8 $\mu\text{g/g}$ 및 캠페롤이 45-50 $\mu\text{g/g}$)되어 있어, 그 전체적인 구성 성분 및 함량의 수준의 상지와는 완전히 다르다. 또한 오디의 경우 퀘세틴-3-G가 35.0 $\mu\text{g/g}$, 멀베로사이드 A가 41.7 $\mu\text{g/g}$ 로 포함(바람직하게는 퀘세틴-3-G가 30-40 $\mu\text{g/g}$ 및 멀베로사이드 A가 35-45 $\mu\text{g/g}$)되어 전체적인 구성 성분 및 함량의 수준이 상지와는 현저히 다르다. 그러므로 상지, 상엽, 상백피, 오디는 모두 뽕나무에서 유래한다 하더라도, 그 구성 성분 및 이들의 함량이 다를 수 있다.

[0050] <실험예 2: 세포독성시험>

[0051] 상지 추출물의 혈소판에 대한 세포독성을 평가하기 위해 혈소판의 LDH 유리 정도를 지표로 이용하였다. 혈소판에 상지 추출물을 농도별로 가한 후 LDH 유리 정도를 측정한 결과, 0.5 mg/ml(6.5 $\pm$ 4.8 %), 1.25 mg/ml(12.9 $\pm$ 3.5 %), 2.5 mg/ml(9.9 $\pm$ 3.5 %)에서 모두 대조군(9.9 $\pm$ 2.4 %)과 비교하였을 때, 유의적인 LDH 유출이 없었다(도 2). 이때 대조군과 비교하였을 때 $p < 0.05$ 정도로 차이를 보이는 경우를 유의성 있는 LDH 유출로 보고자 하였으며, 하기 도 2에 의하면 0.5 mg/ml(6.5 $\pm$ 4.8 %), 1.25 mg/ml(12.9 $\pm$ 3.5), 2.5 mg/ml(9.9 $\pm$ 3.5 %)에서 모두 이 정도의 차이가 없어 유의한 LDH 유출은 없었던 것으로 확인된 것이다. 이렇게 유의한 LDH 유출이 없는 결과를 통해 상지 추출물은 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] <실험예 3: 항혈전 활성 시험>

[0053] 1) 실험기간 중 시험동물의 체중 변화

[0054] 시험기간 중 용매대조군(ME 0)과 시험물질(상지 추출물) 및 양성대조군(GE 100)을 투여한 시험동물의 체중은 차이를 보이지 않았다(도 3 및 표 1).

표 1

Dose (mg/kg)		상지 추출물				은행잎 추출물
		20	50	100	100	100
Day	0	197.8 $\pm$ 6.5	197.9 $\pm$ 4.7	191.7 $\pm$ 9.8	197.0 $\pm$ 6.6	196.3 $\pm$ 3.4
	3	210.2 $\pm$ 6.3	206.3 $\pm$ 7.2	209.0 $\pm$ 6.0	212.3 $\pm$ 6.8	210.0 $\pm$ 2.4
	7	240.2 $\pm$ 10.0	236.8 $\pm$ 6.9	232.9 $\pm$ 8.6	241.2 $\pm$ 5.8	240.7 $\pm$ 4.5
	10	260.4 $\pm$ 11.3	255.8 $\pm$ 8.4	252.7 $\pm$ 7.5	259.4 $\pm$ 5.9	259.4 $\pm$ 9.6
	14	286.0 $\pm$ 11.7	280.9 $\pm$ 10.3	279.7 $\pm$ 9.0	284.8 $\pm$ 10.5	287.0 $\pm$ 11.8
	17	304.3 $\pm$ 12.6	295.8 $\pm$ 10.4	295.4 $\pm$ 9.3	302.1 $\pm$ 10.4	301.4 $\pm$ 16.3
	21	325.8 $\pm$ 11.1	318.7 $\pm$ 11.5	319.9 $\pm$ 9.9	325.8 $\pm$ 15.5	325.4 $\pm$ 18.0

The values are mean $\pm$ SE, N=6

[0055]

[0056] 2) 항혈전 활성 시험

[0057] 상지추출물을 시험동물에 21 일간 경구투여 후 경동맥에 70 % FeCl₃를 10 분간 처리하여 인위적으로 혈전을 유

발하고 시험물질이 혈류의 흐름에 미치는 영향을 60 분 동안 평가하였다. 혈관이 폐쇄되는 시점은 FeCl_3 를 처리하기 전 혈류량을 기준으로 10 % 이하가 되는 시간을 기준으로 하였다. 용매대조군의 혈관 폐색이 일어나는 시간은 18.7 ± 6.1 min이었고 시험물질 20 mg/kg 투여군은 37.3 ± 14.9 min으로 증가되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 시험물질(상지 추출물) 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군은 각각 54.2 ± 14.1 , 54.3 ± 14.0 min으로 혈관 폐색이 지연되었으며, 유의성의 기준으로 삼은 $p < 0.05$ 에 대하여 통계적인 유의성을 보였다. 양성대조군으로 사용된 은행잎추출물 또한 41.5 ± 16.8 min으로 용매대조군에 비해 통계적으로 유의하게 혈관 폐색시간이 지연되었다(도 4, 표 2). 이러한 결과를 통해 상지 추출물의 경우 상기 기준에 의한 통계적 유의성을 보일 정도로 항혈전 활성이 우수한 것임을 확인하였다.

표 2

Dose (mg/kg)	상지 추출물				은행잎 추출물
	0	20	50	100	100
Occlusion time(min)	18.7 ± 6.1	37.3 ± 14.9	$54.2 \pm 14.1^{**}$	$54.3 \pm 14.0^{**}$	$41.5 \pm 16.8^*$

The values are mean $\pm$ SE. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N=6).

<실험예 4: 혈소판 응집 억제 시험>

1) 실험기간 중 시험동물의 체중 변화

실험기간 중 용매대조군(ME 0)과 시험물질 및 양성대조군(GE 100)을 투여한 시험동물의 체중은 유의한 차이를 보이지 않았다(도 5, 표 3).

표 3

Dose (mg/kg)	상지 추출물				은행잎 추출물
	20	50	100	100	100
Day	0	3	7	10	14
	198.3 ± 5.5	200.5 ± 7.0	202.7 ± 6.9	201.8 ± 7.2	203.5 ± 7.5
	213.0 ± 5.9	214.9 ± 7.4	217.5 ± 7.5	216.8 ± 7.8	218.2 ± 7.8
	241.5 ± 7.8	240.8 ± 9.7	247.3 ± 9.5	241.7 ± 12.3	244.5 ± 7.2
	261.1 ± 8.7	261.1 ± 11.8	268.5 ± 13.8	262.6 ± 14.8	266.8 ± 7.7
	283.4 ± 13.4	283.7 ± 15.7	291.9 ± 19.7	284.2 ± 19.6	287.2 ± 8.9
	299.3 ± 14.5	297.3 ± 19.2	308.5 ± 22.1	298.1 ± 22.2	302.1 ± 10.8
	316.2 ± 16.3	313.0 ± 20.2	324.9 ± 29.5	317.4 ± 25.0	316.9 ± 10.7

The values are mean $\pm$ SE, N=6

2) 혈소판 응집 억제 시험

상지 추출물을 시험동물에 21 일간 경구투여 후 채취한 혈액에서 혈소판을 분리하여 agonist인 ADP와 Collagen으로 반응하여 혈소판 응집률을 aggregometer로 측정하였다. 용매대조군의 ADP에 대한 응집률은 43.7 ± 3.1 %이고 시험물질(상지 추출물) 20 mg/kg 투여군의 응집률은 43.8 ± 2.7 %로 차이가 없었다. 시험물질 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군에서는 각각 20.8 ± 11.1 %, 16.3 ± 3.7 %로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 양성대조군으로 사용된 은행잎추출물 또한 15.5 ± 5.0 %로 통계적으로 유의하게 감소하였다.

용매대조군의 Collagen에 대한 응집률은 43.8 ± 2.8 %이고 시험물질 20 mg/kg 투여군의 응집률은 20.0 ± 21.0 %로 기준으로 삼은 용매대조군에 대해 유의성이 $p < 0.05$ 에 대하여 통계적으로 유의하게 감소하였고, 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군은 0.3 ± 0.5 %, 0.0 ± 0.0 %로 응집반응이 일어나지 않았다. 양성대조군 은행잎 추출물의 응집률은 4.2 ± 10.2 %로 통계적으로 유의한 감소를 보였다(도 6, 표 4). 이러한 결과를 통하여 상지 추출물의 혈소판 응집 억제 효과를 확인할 수 있었다.

[0066] <실험예 5: 혈액 응고 억제 시험>

[0067] 상지 추출물을 시험동물에 21 일간 경구투여 후 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(aPTT)를 측정하여 시험물질(상지 추출물)이 혈액응고에 미치는 영향을 평가하였다. 용매대조군의 PT는 9.3 ± 0.4 sec이고 모든 시험물질 투여군에서 유의성이 없었다. aPTT는 용매대조군에 비하여 시험물질 투여군에서 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 양성대조군인 은행잎 추출물 투여군에서는 PT, aPTT 모두 용매대조군에 대해 $p < 0.05$ 로 통계적으로 유의하게 응고 시간이 지연되었다(도 7, 표 5). 이러한 결과를 통해 은행잎 추출물에서는 혈액 응고가 지연되는 부작용이 있음을 확인한 반면, 상지 추출물의 경우 용매대조군과 유의한 차이가 없어 혈소판 응집 저해 효과로 인해 혈액 응고가 지연되는 부작용이 없음을 확인하였다. 또한 이러한 결과는 본 발명에 따른 상지 추출물이 혈전 생성 억제 효과를 달성하면서도, 혈액 내 다른 단백질을 분해하거나 혈관벽을 손상시키는 부작용을 발생시키지 않음을 확인한 것이다.

표 5

Dose (mg/kg)	상지 추출물				은행잎 추출물
	0	20	50	100	100
PT	9.3 ± 0.4	9.8 ± 0.4	9.9 ± 0.7	10.2 ± 1.1	$10.4 \pm 0.5^*$
aPTT	36.2 ± 2.2	39.2 ± 2.5	42.3 ± 4.7	42.7 ± 5.8	$44.1 \pm 5.5^*$

The values are mean $\pm$ SE. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (* $p < 0.05$, N=6).

[0068]

[0069] <실험예 6: 출혈지연시간 측정>

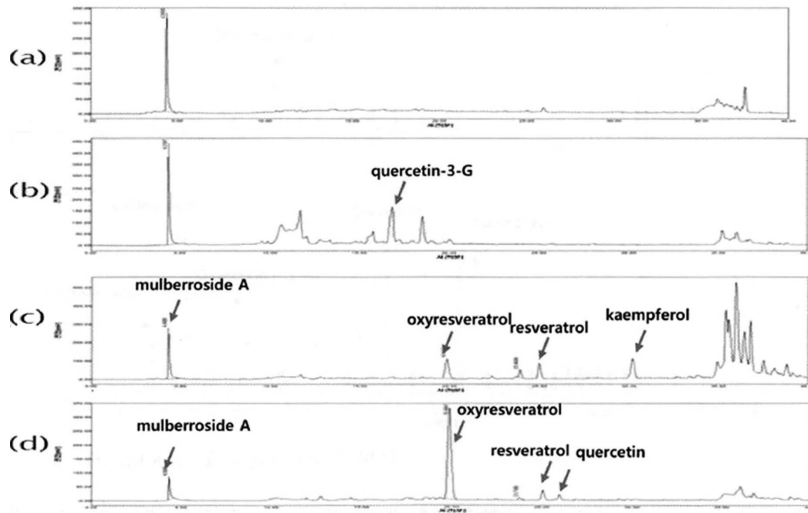
[0070] 상지 추출물의 항혈소판 효과가 혈액응고 지연시간에 영향을 주는지 알아보기 위해 tail bleeding time을 평가한 결과 대조군(66.2 ± 4.96 초)와 마찬가지로 20 mg/kg(76.7 ± 18.15 초), 50 mg/kg(65.2 ± 9.35 초), 100 mg/kg(71.8 ± 13.39 초)로 출혈지연반응이 나타나지 않았으므로 출혈지연에 대한 부작용은 없음을 확인할 수 있었다. 반면에 양성 대조군인 aspirin(50 mg/kg)은 193.2 ± 16.24 초로 유의하게 증가하여 부작용이 있음을 확인하였다(도 8).

[0071] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

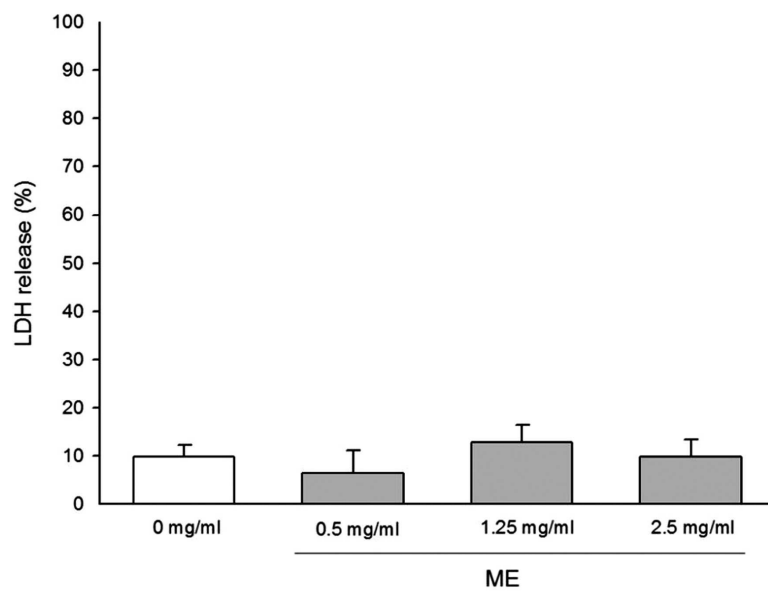
도면

도면1

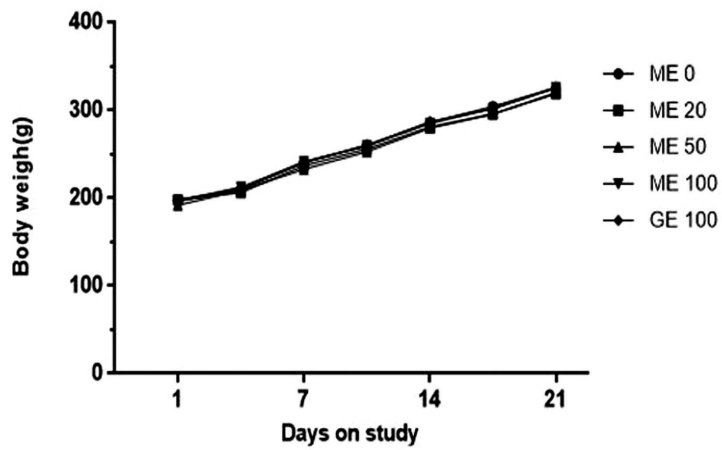
C₁₈(5μm, 250×4.6mm) / 0.7mL/min / 325nm / 30min
 Mobile phase : 10mM H₃PO₄(A) / ACN(B)
 0 ~ 10min : A 90% -> 75% / 10 ~ 30min : A 75% -> 50%



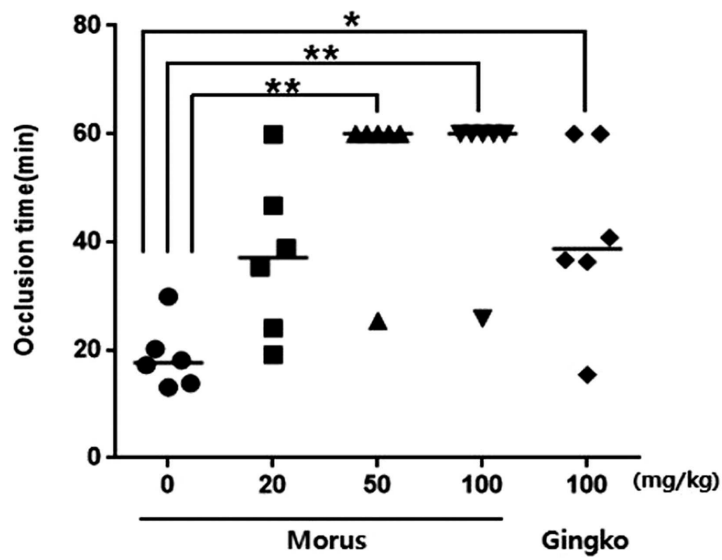
도면2



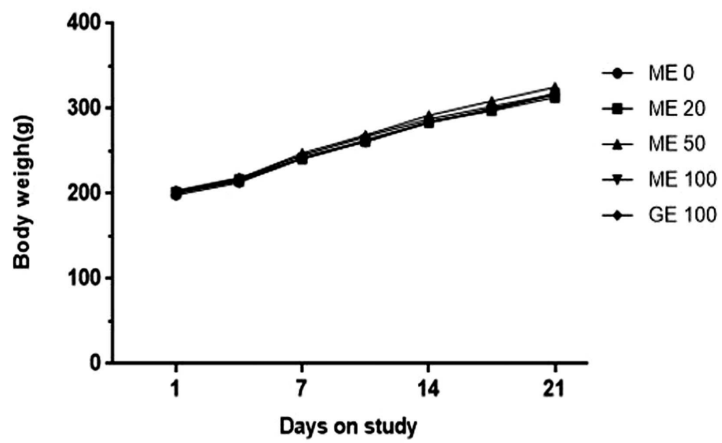
도면3



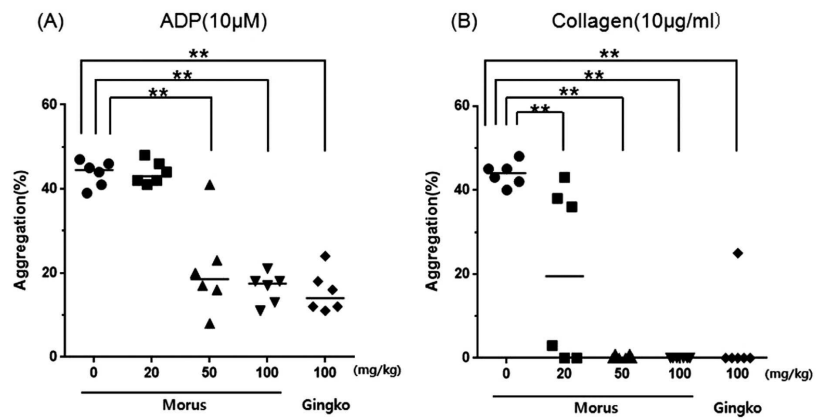
도면4



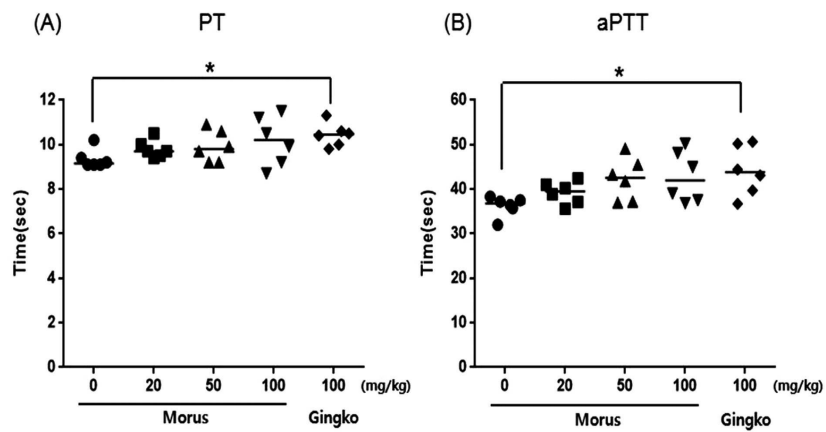
도면5



도면6



도면7



도면8

