(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0101535
(43) 공개일자 2016년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0024297
(22) 출원일자 2015년02월17일
심사청구일자 2015년02월17일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
주식회사 장생도라지
경상남도 진주시 금곡면 정자천로15번길 5
(72) 발명자
정혜광
대전광역시 유성구 반석서로 98(반석동, 반석마을 6단지아파트) 609동 1102호
진순우
대전광역시 유성구 문화원로 123(봉명동, 봉명시티빌) 1동 707호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

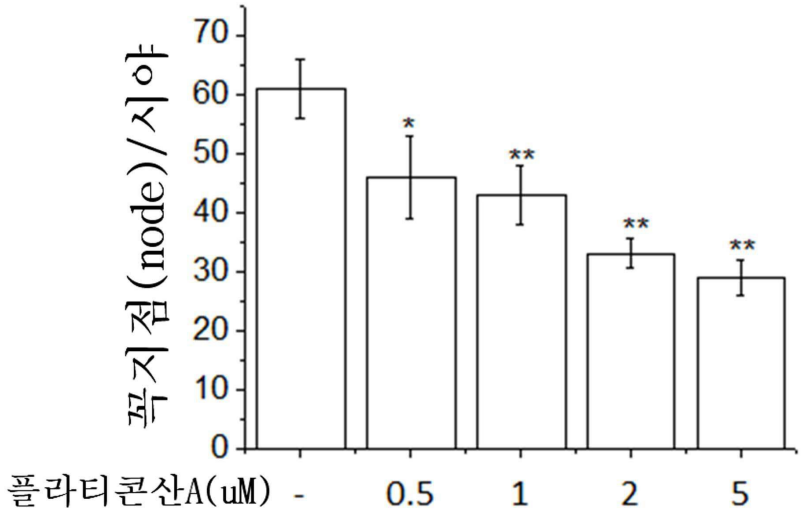
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(Angiogenesis) 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 혈관신생과 관련된 세포 이동 및 튜브 형성 억제하는 활성이 우수하고, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생을 농도 의존적으로 억제하므로, 혈관신생 억제, 및 혈관신생이 비정상적으로 조절되는 암전이를 포함하는 다양한 질환의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

정영철

경상남도 진주시 초장로 14번길 27(초전동, 진주초전푸르지오 1단지) 101동 1702호

이영춘

경상남도 진주시 도동천로 120(상대동, 상대한보아파트) 104동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 113039-2
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 기술사업화지원사업
연구과제명 장생도라지를 주원료로 하는 고령화 대응 노인성질환 예방 및 개선용 건강기능식품의 산업화
기 여 율 50/100
주관기관 (주)장생도라지
연구기간 2013.12.04 ~ 2015.12.03이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0093815
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소사업
연구과제명 심혈관계 질환 치료제 개발 기반연구
기 여 율 50/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명 세 서

청구범위

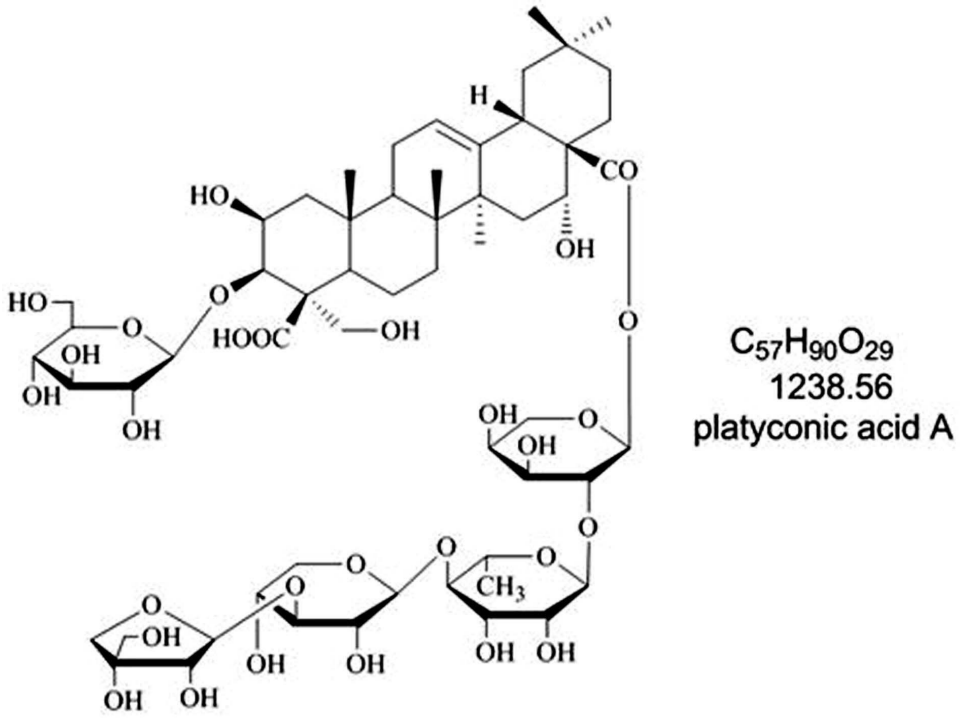
청구항 1

도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(Angiogenesis) 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 플라티콘산 A는 하기 [화학식 1]로 기재되는 화합물은 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 혈관신생에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 질환은 혈관종, 혈관섬유종, 관절염, 당뇨병성 망막증(diabetic retionpathy), 조숙아의 망막증, 신생혈관성 녹내장, 신생혈관에 의한 각막질환, 퇴화반/황반변성(macular degeneration), 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유증식증, 과립성 결막염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 건선, 지루성 피부염 및 여드름으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 세포 이동 및 혈관내피세포 분화에 의한 튜브 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 혈관신생을 억제하여 암 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 암은 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물.

청구항 9

도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 질환은 혈관종, 혈관섬유종, 관절염, 당뇨병성 망막증, 조숙아의 망막증, 신생혈관성 녹내장, 신생혈관에 의한 각막질환, 퇴화반/황반변성, 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유증식증, 과립성 결막염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 건선, 지루성 피부염 및 여드름으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(Angiogenesis) 억제용 약학적 조성물, 및 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하며, 상처치유와 염증반응과 같은 정상적인 인체 방어 및 생리적 현상과 초기 발생과정에 있어서 아주 중요한 역할을 한다. 이러한 혈관신생은 단백질 분해효소에 의한 혈관 기저막의 분해, 혈관벽을 형성하는 혈관내피세포의 이동, 증식 및 혈관내피세포 분화에 의한 튜브(맥관)의 형성으로 혈관이 재구성되어 새로운 모세혈관이 생성되는 단계를 포함하는 일련의 순차적인 단계를 통해 일어난다.

[0005] 또한, 혈관이 신생되는 과정은 다양한 음성 및 양성 조절인자들에 의해 엄격히 조절되고 있는데(Folkman and Cotran., Int. Rev. Exp. Patho., 16, 207~248, 1976), 이러한 혈관신생이 정상적으로 조절되지 못하면 암, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증 등 여러 가지 질환들이 야기된다. 특히, 비정상적인 혈관신생은 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있는데, 첫째로는 종양의 성장과 증식에 필요한 영양과 산소를 공급하는 역할을 하며, 둘째로는 종양까지 침투한 신생 모세혈관들은 전이하는 암세포가 혈액순환계로 들어갈 수 있는 기회를 제공하여 암세포가 온 몸에 퍼져 전이가 되도록 하는 역할을 한다.

[0007] 따라서 혈관신생의 기전에 대한 연구 및 이를 억제할 수 있는 물질의 개발은 암을 포함하는 여러 질환의 예방 및 치료에 있어서 중요한 관심의 초점이 되고 있으며, 최근에는 동물의 암 모델과 인간의 임상실험에서 종양의 혈관신생 저해는 종양의 성장과 발달을 효과적으로 저해할 수 있고 환자의 생명을 연장할 수 있다는 사실이 증명되면서 혈관신생 억제제의 개발에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.

[0009] 또한, 이러한 혈관신생 억제제는 항암 치료법에 있어서 특히 각광을 받고 있는데 이러한 이유로는 첫째, 혈관신생 억제제는 모든 고형성 종양에서 공통적으로 사용할 수 있고, 둘째, 기존의 항암 화학요법은 암 세포가 빠르게 성장하는 특징을 이용하여 치료하기 때문에 비교적 세포주기가 빠른 골수세포 및 위장관계 세포에 독성 작용을 나타내는 반면, 혈관신생 억제제는 장기 투여하여도 비교적 부작용이 적다는 장점이 있고, 셋째, 하나의 혈관세포는 수백 개의 암세포에 영양분과 산소를 공급하기 때문에 하나의 혈관세포 억제를 통해 많은 암세포를 억제할 수 있으며, 넷째, 기존의 항암 요법의 경우에는 항암제가 혈관 밖으로 유출되어 암세포에 영향을 나타내는 반면, 혈관신생 억제제는 직접적으로 혈관 내피세포에 접촉하여 작용함으로써 약물 전달을 용이하게 할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문이다.

[0011] 한편, 현재까지 개발된 혈관신생 억제제로는 약 200 여종이 보고되어 있는데, 이러한 혈관신생 억제제로는 특정 혈관 형성 촉진인자의 활성을 감소시키는 기전, 혈관내피세포의 성장억제 또는 고사를 유도하는 기전, 혈관형성 촉진인자나 내피세포 생존인자를 조절하는 간접인자들의 작용을 억제하는 기전 및 체내에 존재하는 혈관신생 억제제들의 활성을 증가시키는 기전에 역할을 하는 4가지로 크게 분류할 수 있고, 특히 안지오스타틴(angiostatin), 엔도스타틴(endostatin), PK5, 프로트롬빈 크링글 2(prothrombin kringle 2)과 같은 혈관형성 억제제들이 잘 알려져 있다(O'Relly, M.S. 등 Cell., 79, 315~328, 1994; Lee. T.H., Biol. Che., 273, 28805~28812, 1998). 다만, 기존에 이미 다양한 혈관신생 억제제가 알려져 있더라도, 상기 억제제는 우수한 활성을 오랜 시간 동안 유지하기 어려우며, 약학적 특성이 낮고 쉽게 변성될 수 있는 문제점이 있어, 새로운 신생혈관 억제 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0013] 한편, 신생혈관 억제제에 관한 특허 문헌으로써, 대한민국 공개특허 제10-2005-0097494호에는 혈관신생, 세포이동, 세포침투 및 증식을 억제하는 펩타이드가 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제0274172호에는 혈관신생을 억제하는 펩타이드가 개시되어 있으며, 대한민국 등록특허 제1326728호에는 혈관신생을 억제하는 벤프로페린 유도체를 개시하고 있을 뿐, 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)의 혈관신생 억제효과에 대해서는 알려진 바 없다.

[0015] 도라지(길경, *Platycodon grandiflorum* A. DC)는 배농, 거담, 기관지염, 천식 등의 호흡기계 질환에 사용되어온 생약재로서, 도라지가 배합되어 있는 한방 처방의 수가 동의보감에 273건, 방약합편에 49건에 이를 정도로 다양한 약리작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 도라지의 주요 약리성분은 트리테르펜계 사포닌

(triterpenoid saponins)이며, 이 약리성분은 동물실험을 통하여 진해, 거담작용, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 급만성 염증에 대한 항염증작용, 항궤양 및 위액분비 억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용 등이 있는 것으로 밝혀져 있다(Meshi T, Sato Y., Chem. Pharm. Bull., 20, p.2079, 1972 ; Tada A, Kaneiwa Y, Shoji J, Shibata S., Chem. Pharm. Bull., 23, p.2965, 1975). 이외에도 도라지의 열수 및 에탄올 추출물은 곰팡이의 아프라톡신을 억제하며, 이눌린 분획은 식균작용과 고형암 및 복수암에 대한 강력한 항종양효능이 있고, 40% 도라지 엑기스는 알코올흡수 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다(Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Sakai S, Ueno I., Mycopathologia, 66, p.161, 1979 ; Naga, T., Matsuda, H., Makata, K., Namba and Kubo, M., Shoyakugaku Zasshi, 40, p.378, 1986 ; Nagao, T., Matsuda, H., Nambo, K. and Kubo, M., Shoyakugaku Zasshi, 40, p.367, 1986 ; JP 소60-89427, 1985; JP 평3-264534 1991). 또한 도라지는 식품첨가제, 진정제, 성인병 등의 치료제로 전통적으로 사용되어 왔다(Lee, 1973).

[0016] 도라지 유래 사포닌의 다양한 효과에 대해서는 알려져 있지만, 혈관신생 억제와 관계된 효과는 아직 보고된 바 없다.

[0018] 이에, 본 발명자들은 혈관신생 억제 활성을 갖는 물질을 찾기 위해 노력한 결과, 인간 혈관내피세포인 HUVE 세포(Human Umbilical Vein Endothelial cell)에 도라지 사포닌 및 플라티콘산 A를 처리한 결과, 세포 이동 및 튜브 형성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였고, 계태자 융모요막 분석으로 혈관신생 억제를 확인한 결과, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생이 플라티콘산 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인함으로써, 상기 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 혈관신생 억제용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명의 목적은 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(angiogenesis) 억제용 약학적 조성물, 및 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(angiogenesis) 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 아울러, 본 발명은 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)은 혈관신생(angiogenesis)과 관련된 세포 이동 및 튜브 형성 억제하는 활성이 우수하고, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생을 농도 의존적으로 억제하므로, 혈관신생 억제, 및 혈관신생이 비정상적으로 조절되는 암전이를 포함하는 다양한 질환의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin)의 튜브 형성 억제 효과를 현미경으로 관찰한 도이다.

도 2는 도라지 사포닌의 튜브 형성 억제 효과를 현미경으로 관찰하여 꼭지점(node) 수를 계수하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 3은 플라티콘산 A(platyconic acid A)의 세포이동 억제 효과를 현미경으로 관찰한 도이다.

도 4는 플라티콘산 A의 세포이동 억제 효과를 현미경으로 관찰하여 세포 수를 계수하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 5는 플라티콘산 A의 튜브 형성 억제 효과를 현미경으로 관찰한 도이다.

도 6은 플라티콘산 A의 튜브 형성 억제 효과를 현미경으로 관찰하여 꼭지점(node) 수를 계수하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 7은 플라티콘산 A의 혈관신생 억제 효과를 계태자 융모요막 분석을 실시하여 현미경으로 관찰한 도이다:

VEGF: 혈관내피성장인자;

SU11248: 혈관내피성장인자 억제물질, 양성대조군; 및

PCA: 플라티콘산 A.

도 8은 플라티콘산 A의 혈관신생 억제 효과를 혈관 가지의 수를 측정하여 그래프로 나타낸 도이다:

VEGF: 혈관내피성장인자; 및

SU11248: 혈관내피성장인자 억제물질, 양성대조군.

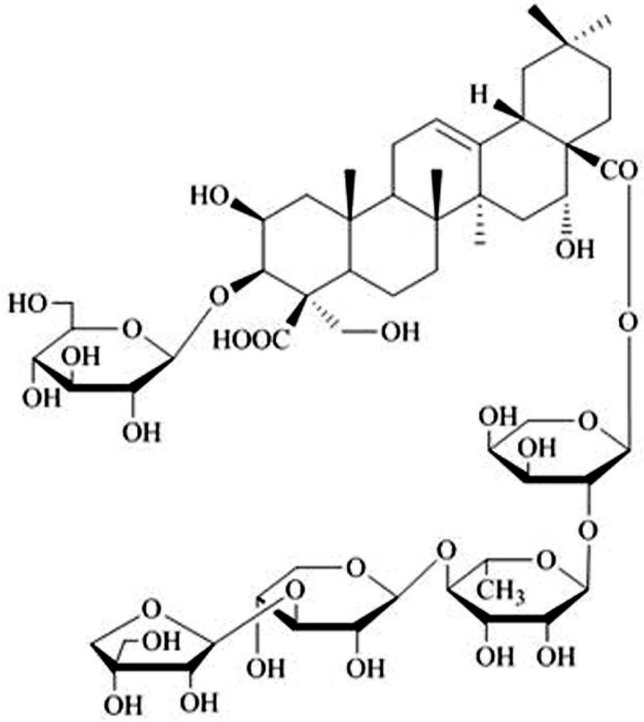
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명은 도라지 사포닌(*platycodon grandiflorum* saponin) 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A(platyconic acid A)를 유효성분으로 함유하는 혈관신생(angiogenesis) 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 플라티콘산 A는 하기 [화학식 1]로 기재되는 화합물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

화학식 1



[0034]

[0035] 상기 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 세포 이동 및 혈관내피세포 분화에 의한 튜브 형성을 억제를 통해 혈관신생 억제 효과를 나타내는 것이 바람직하다.

[0036] 혈관신생이 정상적으로 조절되지 못하면 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증 등 여러 가지 질환들이 야기되므로, 상기 혈관신생 억제용 약학적 조성물은 혈관종, 혈관섬유종, 관절염, 당뇨병성 망막증(diabetic retionpathy), 조숙아의 망막증, 신생혈관성 녹내장, 신생혈관에 의한 각막질환, 퇴화반/황반변성(macular degeneration), 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유증식증, 과립성 결막염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 건선, 지루성 피부염 및 여드름으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 혈관신생에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 도라지 사포닌 및 플라티콘산 A의 세포이동 및 튜브 형성 억제 효과를 확인하기 위하여, 인간 혈관내피세포인 HUVE 세포(Human Umbilical Vein Endothelial cell)에 도라지 사포닌 또는 플라티콘산 A를 처리한 결과, 세포 이동(도 3 및 도 4 참조) 및 튜브 형성(도 1 및 도 2, 도 5 및 도 6 참조)을 농도 의존적으로 억제하는 것을 하고, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생을 플라티콘산 A를 처리한 경우, 유의적인 억제활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 7 내지 도 8 참조).

[0039] 따라서, 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 혈관신생과 관련된 세포 이동 및 튜브 형성 억제하는 활성이 우수하고, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생을 농도 의존적으로 억제하므로, 혈관신생 억제용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명은 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 상기 화학식 1로 표시되는 플라티콘산 A 뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0042] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 플라티콘산 A는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르

복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0044] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1로 표시되는 플라티콘산 A를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출 된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0046] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0048] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0049] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 플라티콘산 A에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0050] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0051] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 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. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0054] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내

지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0056] 또한, 본 발명은 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0057] 상기 암은 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하다.

[0058] 아울러, 비정상적인 혈관신생은 종양의 성장과 증식에 필요한 영양과 산소를 공급하고, 암세포가 혈액순환계로 들어갈 수 있는 기회를 제공하여 암세포가 온몸에 퍼져 전이가 되도록 하는 역할을 하므로, 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 혈관신생과 관련된 세포 이동 및 튜브 형성 억제하는 활성이 우수하고, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생을 농도 의존적으로 억제하므로, 암 치료 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

[0060] 아울러, 본 발명은 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A를 유효성분으로 함유하는 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0061] 상기 건강기능식품은 혈관종, 혈관섬유종, 관절염, 당뇨병성 망막증(diabetic retionpathy), 조숙아의 망막증, 신생혈관성 녹내장, 신생혈관에 의한 각막질환, 퇴화반/황반변성(macular degeneration), 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유증식증, 과립성 결막염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 건선, 지루성 피부염 및 여드름으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 혈관신생에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선에 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A는 혈관신생과 관련된 세포 이동 및 튜브 형성을 억제하는 활성이 우수하고, 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생을 농도 의존적으로 억제하므로, 혈관신생 관련질환 예방 및 개선용 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A가 상기와 같은 혈관신생 관련질환 예방 및 개선을 위해 이용되기 위해서는, 식품학 또는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는 음료, 환, 과립, 정제 또는 캅셀 형태이다.

[0065] 본 발명의 건강기능식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로 제조되는 경우에는 본 발명의 도라지 사포닌 및 이로부터 분리된 플라티콘산 A 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0066] 본 발명에 따른 건강기능식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은 혈관신생 관련질환 예방 및 개선을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강기능식품을 섭취함으로써 혈관신생 관련질환 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.

[0068] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0069] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] **<실시예 1> 세포 배양**

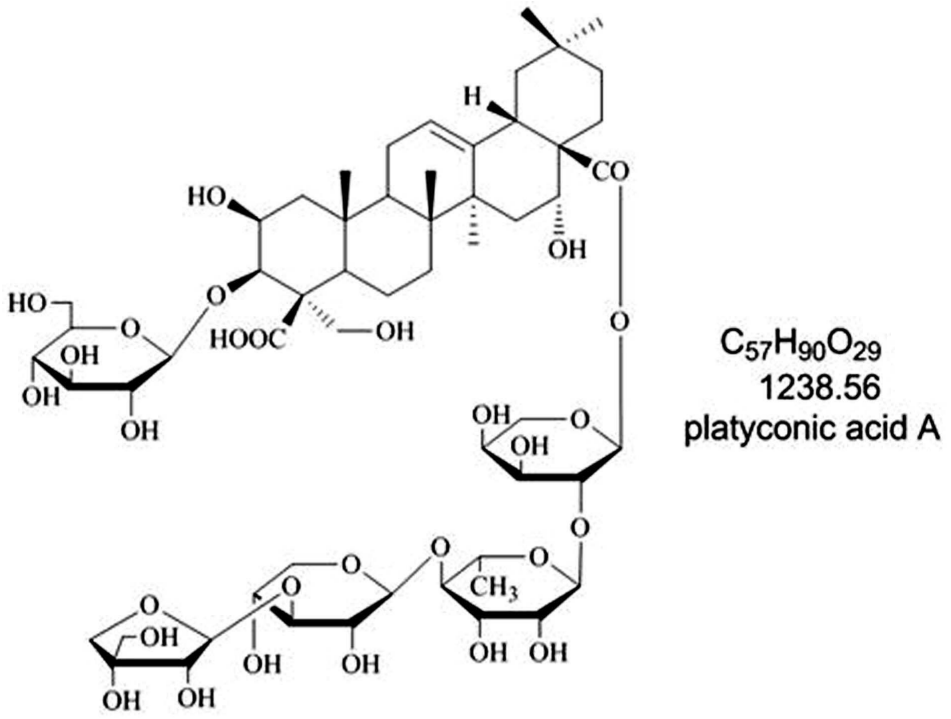
[0072] 인간 혈관내피세포인 HUVE 세포(Human Umbilical Vein Endothelial cell)는 (주)이노파마스크린으로부터 구입하였고, 혈관내피세포 배양배지인 EGM-2 (Endothelial Growth Medium-2)는 론자사(Lonza)에서 구입하였다. HUVE 세포는 EGM-2 배지를 사용하여 37℃의 5% CO_2 습윤 배양기에서 배양하였다.

[0074] **<실시예 2> 도라지 사포닌 및 플라티콘산 A(platyconic acid A)의 준비**

[0075] (주)장생도라지로부터 구입한 도라지 지하부를 수분의 함량이 5% 이하가 되도록 건조하고 이를 분쇄한 후, 도라지 분말 0.25kg에 증류수 4ℓ를 가하여 90 내지 95℃에서 5시간 동안 2회 열수추출한 후 여과하고 이를 동결 건조하여 도라지 추출물 99.5 g을 수득하였다(수득율: 39.8% 이하). 수득한 도라지 추출물을 증류수에 녹여 여과한 여액을 HP-20(Diaion사 제품) 컬럼에 통과시켰다. 이때 당 성분을 제외한 HP-20 컬럼에 흡착된 유기물 성분들을 당 성분이 용출되지 않을 때까지 충분히 물로 씻어준 후 나머지는 100% 메탄올로 탈착시켜 물과 메탄올에 용해되는 성분으로 각각 분리하였다. 메탄올에 용출된 성분들(조사포닌 분획물)은 메탄올을 감압농축시키고 나머지를 다시 소량의 메탄올에 녹여 충분히 저어주면서 에틸에테르를 가하여 침전이 형성되도록 하고 이를 여과하고 건조시켜 조사포닌 분획물(약 2.3g)을 얻었다.

[0076] 얻은 조사포닌 분획물로부터 추가 HPLC 과정을 통해 플라티콘산 A를 분리 정제하였다. 분석은 HPLC 장치로 Futecs NS-3000*i* system(Futecs,한국), 컬럼으로는 OptimaPak 컬럼(4.6×250 mm, 5 μm, 100 A, RStech) 및 검출기로는 ELSD(Softa, USA)를 사용하였다. 시료는 Futecs NS-3000*i* system를 이용하여 분석하였고, 이동상은 50 mM 암모늄아세테이트, 아세토니트릴, 메탄올을 사용하였고, 다음과 같은 조건으로 기울기 용매흘림(gradient flow) 방법으로 대상물질인 플라티콘산 A를 분석하였다. 용매 A는 암모늄아세테이트 : 아세토니트릴 : 메탄올 = 85 : 10 : 5, 용매 B는 암모늄아세테이트 : 아세토니트릴 : 메탄올 = 55 : 40 : 5로 하고, 용매 B의 비율을 0%에서 15%(5분), 38%(28분), 40%(33분), 43%(53분), 60%(63분), 100%(71분)로 순차적으로 조절하였다. 이때, 시료의 주입량 및 유속은 20 ㎕와 0.8 ml/분으로 조정하였고, 3회 반복 실시하였다. 플라티콘산 A의 검출은 ELSD 검출기를 이용하였으며, 이때 건조가스는 질소를 사용하였으며 유속 및 온도는 1.5 L/분 및 70℃로 설정하여 하기 화학식 1의 구조식을 갖는 플라티콘산 A를 정량하였다.

[0077] [화학식 1]

[0078] 

[0080] **<실시예 3> 도라지 사포닌의 혈관신생 관련 튜브형성 억제 효과 확인**

[0081] HUVE 세포에서 도라지 사포닌의 혈관신생 억제 효과를 확인하기 위하여, 혈관신생과 관련된 튜브 형성(tube formation) 억제 효과를 확인하였다.

[0082] 구체적으로, 마트리겔(matrigel)과 배지를 1:1로 섞어 96 웰(well) 플레이트(plate)에 넣고 37℃에서 1시간 동안 코팅한 후, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 배양한 인간 혈관내피세포인 HUVE 세포를 1×10^5개의 농도로 계대 배양한 후, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 준비한 도라지 사포닌을 농도별(0, 1, 2, 4 ㎍/㎖)로 처리하고 10시간 후, 튜브 형성을 현미경 관찰을 통하여 확인하였고, 튜브 꼭지점(node)의 수를 계수하였다.

[0083] 그 결과 도 1 내지 도 2에 나타낸 바와 같이, 도라지 사포닌을 처리하지않은대조군과 비교하여 도라지 사포닌을 처리한 군에서 튜브 형성이 억제되며, 도라지 사포닌을 처리한 농도에 따라 농도 의존적으로 튜브 형성이 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 2).

[0085] **<실시예 4> 플라티콘산 A의 세포이동 억제 효과 확인**

[0086] 플라티콘산 A의 혈관신생 억제효과를 확인하기 위하여, HUVE 세포에서 플라티콘산 A의 세포이동 억제 효과를 확인하였다.

[0087] 구체적으로, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 배양한 인간 혈관내피세포인 HUVE 세포를 48 웰(well) 플레이트(plate)에 계대 배양한 후, 멸균된 파이펫 팁(pipette tip)을 사용하여 팁 끝으로 세포를 약간 제거(상처, wounding)한 후, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 준비한 플라티콘산 A를 농도별(0, 0.5, 1, 2, 5 uM)로 처리하고 6시간 후, 세포가 제거된 빈 공간에 이동한 세포를 현미경을 통해 관찰하였다.

[0088] 그 결과 도 3 내지 도 4에 나타낸 바와 같이, 플라티콘산 A를 처리하지 않은 경우에는 세포가 제거된 빈 공간으로 세포가 이동하였고, 이동세포 수도 많은 것을 확인하였으며, 플라티콘산 A를 처리한 경우에는 농도 의존적으로 처리 농도에 따라 이동세포 수가 적은 것을 확인하였다(도 3 내지 도 4).

[0090] **<실시예 5> 플라티콘산 A의 혈관신생 관련 튜브형성 억제 효과 확인**

[0091] HUVE 세포에서 플라티콘산 A의 혈관신생 억제 효과를 확인하기 위하여, 혈관신생과 관련된 튜브 형성 억제 효과를 확인하였다.

[0092] 구체적으로, 마트리겔(matrigel)과 배지를 1:1로 섞어 96 웰(well) 플레이트(plate)에 넣고 37℃에서 1시간 동안 코팅한 후, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 배양한 인간 혈관내피세포인 HUVE 세포를 1×10^5개의 농도로 계대 배양한 후, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 준비한 플라티콘산 A를 농도별(0, 0.5, 1, 2, 5 uM)로 처리하고 10시간 후, 튜브 형성을 현미경 관찰을 통하여 확인하였고, 튜브 꼭지점(node)의 수를 계수하였다.

[0093] 그 결과 도 5 내지 도 6에 나타낸 바와 같이, 플라티콘산 A를 처리하지않은 대조군과 비교하여 플라티콘산 A를 처리한 군에서 튜브 형성이 억제되며, 플라티콘산 A를 처리한 농도에 따라 농도 의존적으로 튜브 형성이 억제되는 것을 확인하였다(도 5 내지 도 6).

[0095] **<실시예 6> 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생에 대한 플라티콘산 A의 효과 확인**

[0096] 생체 내(in vivo)에서 혈관신생 억제 효과를 확인하기 위해, 계태자 융모요막 분석(Chorioallantoic membrane assay, CAM assay)를 실시하였다(Thapa et al, 2008).

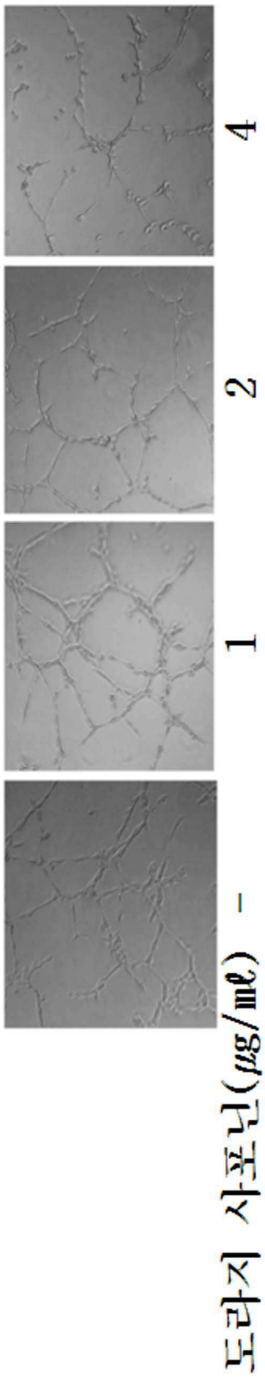
[0097] 구체적으로, 닭의 유정란을 온도 37℃, 상대습도 55%를 유지해주면서 배양시켜 10일째에 유정란의 평평한 부분에 약 1 ㎟ 크기의 창(window)을 만들었다. 그 다음, 와트만 필터 디스크(whatman filter disk #1, whatman사, 미국)에 코티존 아세테이트(cortisone acetate) 3 ㎎/㎖ 처리하여 건조시킨 후, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 20 ng/CAM의 농도로 적셔두었다. 만들어 둔 창을 통해 필터 디스크를 혈관 위에 얹고, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 준비한 플라티콘산 A를 인산완충용액(PBS)으로 희석하여 각 0, 0.5, 2 uM/CAM의 농도로 처리하였다. 양성대조군으로 혈관내피성장인자 억제물질인 SU11248(Sigma aldrich)를 1 uM의 농도로 사용하였다. 플라티콘산 A 또는 SU11248 처리 72시간 뒤, 필터 디스크가 얹힌 CAM 부분을 떼어내어 인산완충용액을 이용하여 씻어준 후, 광학현미경(Leica, Wetzlar, 독일)을 이용

하여 관찰하였으며, 창의 동일한 영역의 이미지를 촬영하여 혈관 가지의 개수를 측정하였다.

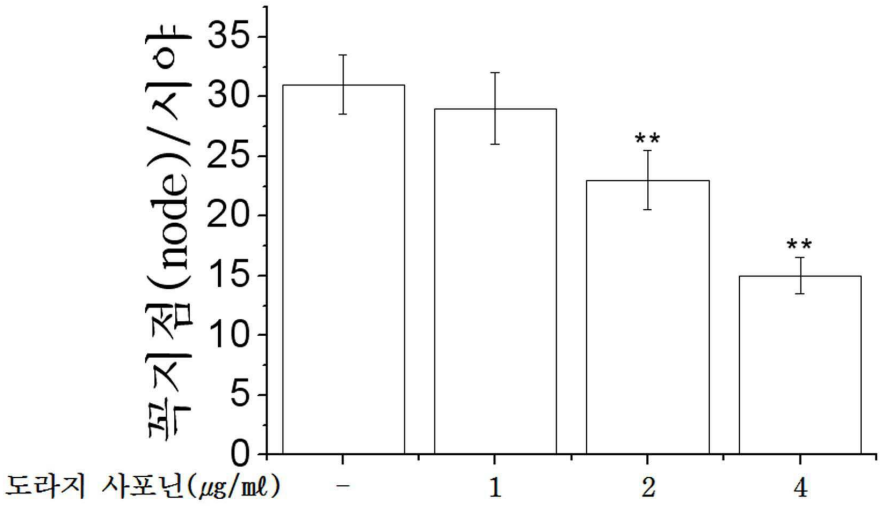
[0098] 그 결과 도 7 내지 도 8에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 혈관내피성장인자로 유도된 혈관신생이 플라티콘산 A 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 7 내지 도 8).

도면

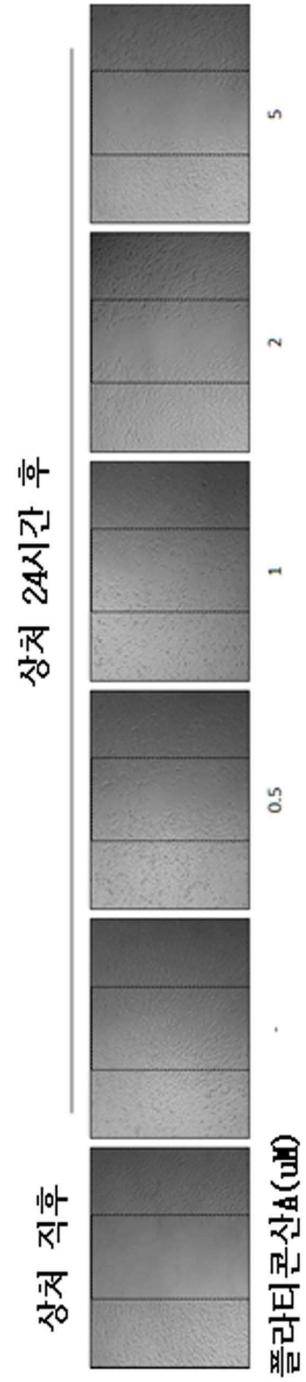
도면1



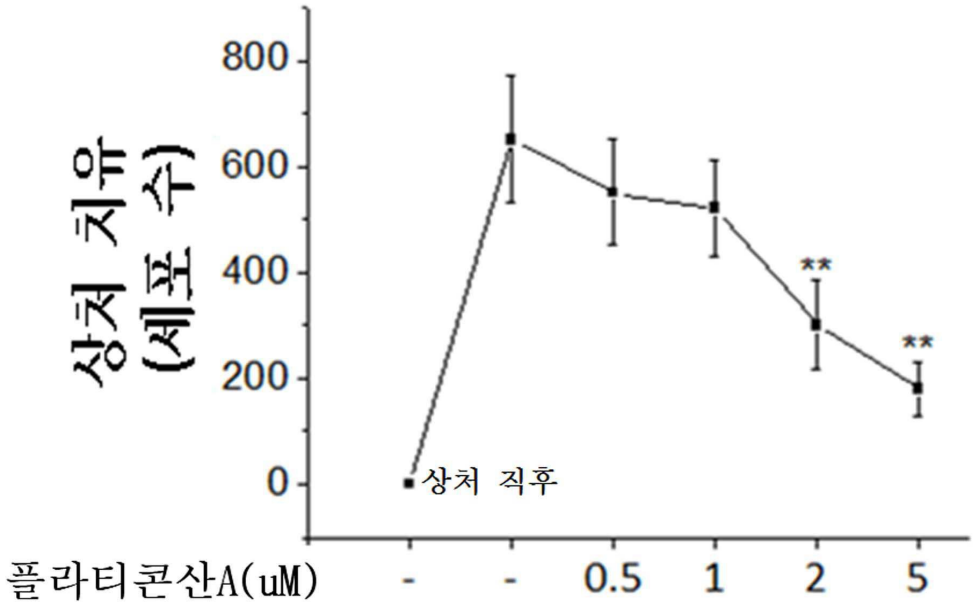
도면2



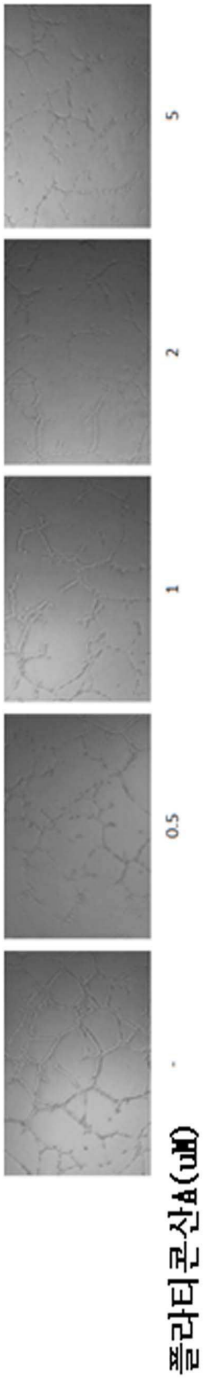
도면3



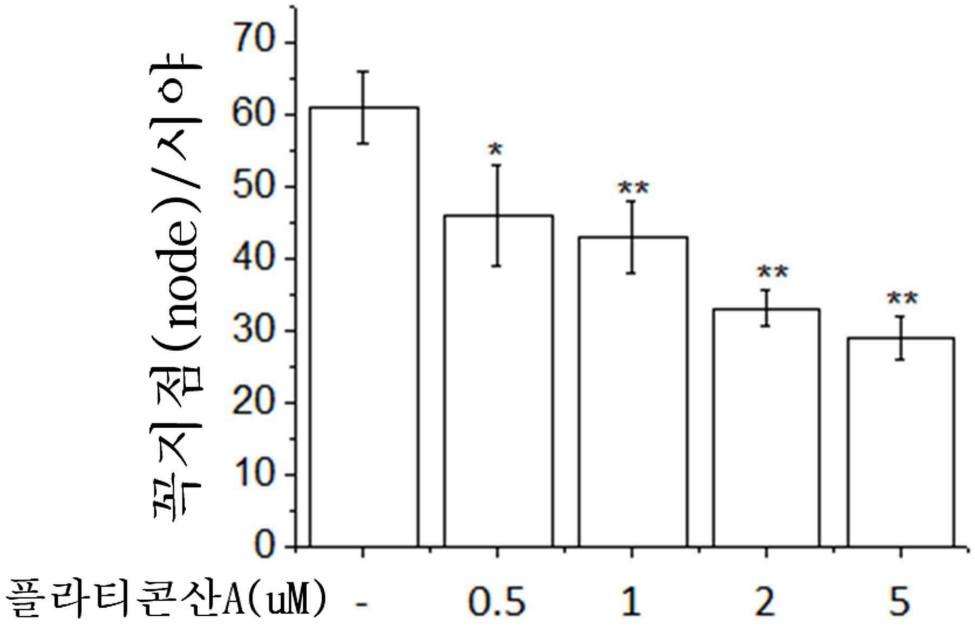
도면4



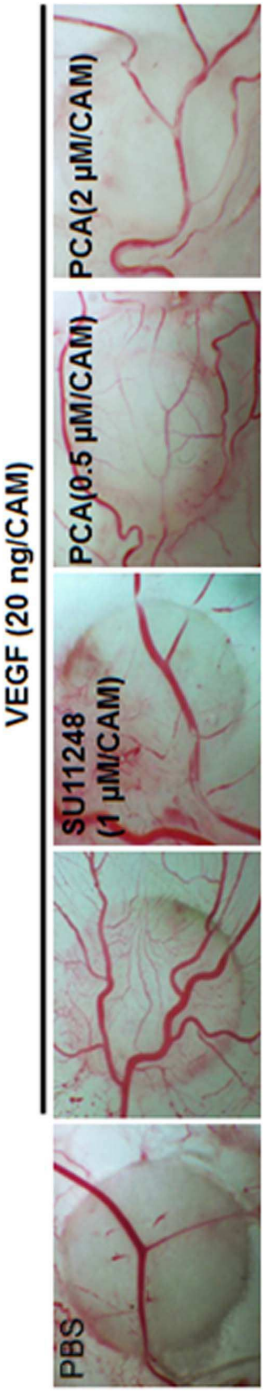
도면5



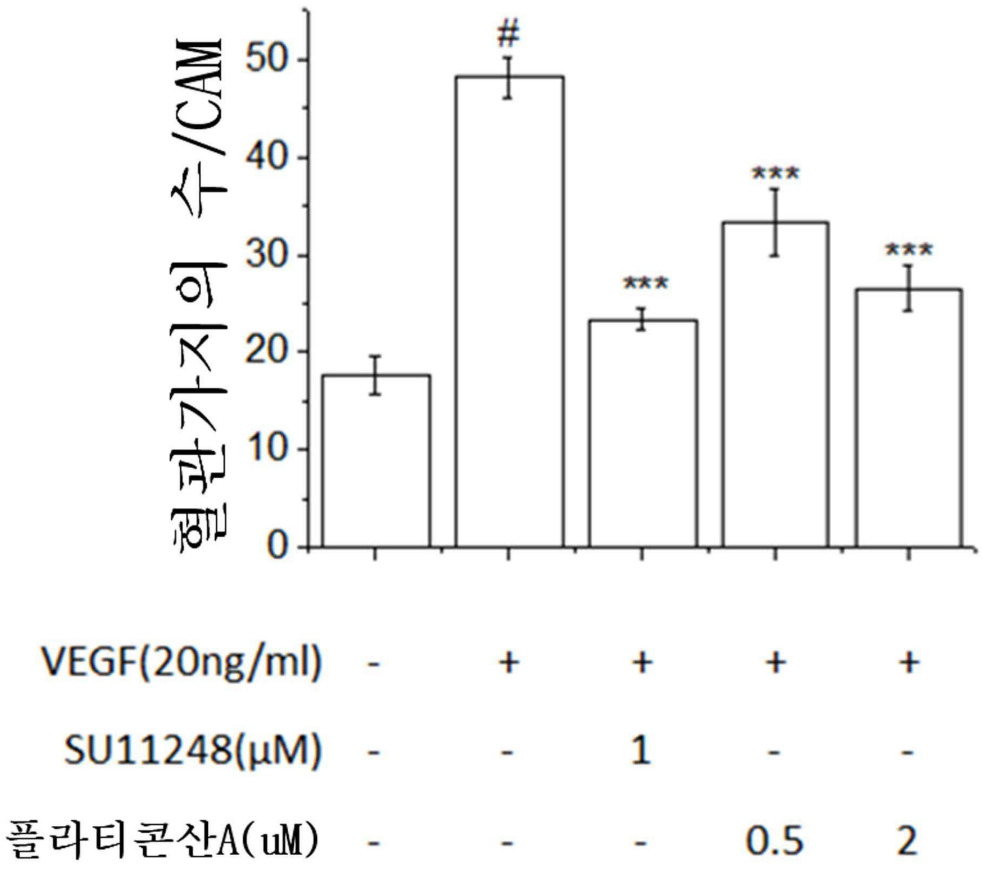
도면6



도면7



도면8


혈관가지의 수/CAM
0
10
20
30
40
50
#
***
***
***
VEGF(20ng/ml) - + + + +
SU11248(μM) - - 1 - -
플라티콘산A(uM) - - - 0.5 2