



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 36/88 (2006.01) A61P 5/30 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년12월05일 10-0623333 2006년09월05일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2000-7008724	(65) 공개번호	10-2001-0040829
(22) 출원일자	2000년08월10일	(43) 공개일자	2001년05월15일
심사청구일자	2004년01월16일		
번역문 제출일자	2000년08월10일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1999/001860	(87) 국제공개번호	WO 1999/47149
국제출원일자	1999년03월19일	국제공개일자	1999년09월23일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 엔 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장                      19812204.7                      1998년03월19일                      독일(DE)

(73) 특허권자                      비오노리카 악티엔게젤샤프트  
독일 데-92318 노이마르크트 케르셴슈타이너스트라세 11-15

(72) 발명자                      부트케볼프강  
독일데-37120보벤텐도매네8

    야리후베르투스  
독일데-37249노이-아이헨베르크암바서투름5

    크리스토펬폴커  
독일데-92318노이마르크트길스트라세13

슈팽글러바바라  
독일데-92318노이마르크트카를-슈피에러-스트라세16

포프미카엘  
독일데-91207라우프바인베르크스트라세3

(74) 대리인                    최규팔  
                                      이은선

**심사관 : 여호섭**

전체 청구항 수 : 총 5 항

**(54) 향자궁성 효과가 없는 에스트로겐-유사 기관-선택적의약으로서의 붓꽃 식물, 시미시푸가 라세모사의 추출물 및 텍토리게닌의 용도**

**(57) 요약**

붓꽃 식물, 시미시푸가 라세모사의 추출물 및 텍토리게닌의 향자궁성 효과가 없는 에스트로겐-형 기관선택적 의약으로서의 용도

본 발명은 붓꽃과 식물 및 시미시푸가 라세모사의 추출물 및 텍토리게닌의 심혈관계 질병, 특히, 죽상경화증, 골다공증 및 갱년기 장애의 치료 및/또는 예방용, 특히, 열감의 예방 또는 경감용 에스트로겐-형 기관선택적 의약으로서의 용도에 관한 것이다. 향자궁성 효과는 사실상 관찰되지 않았다.

**대표도**

도 2

**특허청구의 범위**

**청구항 1.**

향자궁성(uterotrophic) 효과가 없거나 거의 무시할만한, 죽상경화증 및 골다공증으로 이루어진 군으로부터 선택된 에스트로겐 결핍 상태를 치료 또는 예방하기 위한 범부채(Belamcanda chinensis) 추출물.

**청구항 2.**

삭제

**청구항 3.**

향자궁성 효과가 없거나 거의 무시할만한, 죽상경화증 및 골다공증으로 이루어진 군으로부터 선택된 에스트로겐 결핍 상태를 치료 또는 예방하기 위한 시미시푸가 라세모사(Cimicifuga racemosa)의 추출물.

**청구항 4.**

항자궁성 효과가 없거나 거의 무시할만한, 죽상경화증 및 골다공증으로 이루어진 군으로부터 선택된 에스트로겐 결핍 상태를 치료 또는 예방하기 위한 유효량의 텍토리게닌을 포함하는 범부채(*Belamcanda chinensis*) 또는 시미시푸가 라세모사(*Cimicifuga racemosa*) 추출물.

**청구항 5.**

삭제

**청구항 6.**

삭제

**청구항 7.**

삭제

**청구항 8.**

항자궁성 효과가 없거나 거의 무시할만한, 죽상경화증, 골다공증 및 갱년기 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 에스트로겐 결핍 상태를 치료 또는 예방하기 위한, 유효성분으로서 텍토리게닌을 포함하는 조성물.

**청구항 9.**

제 8 항에 있어서, 갱년기 장애가 열감을 포함하는 조성물.

**청구항 10.**

삭제

**청구항 11.**

삭제

**청구항 12.**

삭제

**청구항 13.**

삭제

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 제 1 항에 따른 붓꽃과 식물(*Iridaceae*)의 추출물 및 시미시푸가 라세모사(*Cimicifuga racemosa*)의 추출물의 에스트로겐-형 기관선택적 의약으로서의 용도 및 제 8 항에 따른 의약으로서의 텍토리게닌 및/또는 텍토리게닌 배당체에 관한 것이다.

난소에서 형성되는 17-β-에스트라디올(이하에서 에스트라디올이 언급될 때마다 이것은 항상 생리학적 17-β-에스트라디올을 칭한다)[또한, 이하에서 E2 로 칭한다]은 일반적으로 유기체 내에서 증식-촉진 효과가 있다. 여성 주기 조절과는 별도로, 이것은 또한 뼈의 대사에 항상성의 영향을 미치고 혈관 내피에서 죽상반(atherotic plaque)의 형성을 예방한다.

폐경기 동안, 에스트라디올 농도의 저하가 난소 기능의 정지로 인하여 일어난다. 이것은 증식 과정의 약화를 야기하고, 시상하부에서 GnRH 임펄스 발생기(impulse generator)의 증강된 활성을 야기한다(성선자극호르몬-유리호르몬

(gonadotropin-releasing hormone) 임펄스 발생기는 시상하부의 타이머로서, 말하자면, 박동성의 LH 분비의 시간을 조절하면서 스테로이드가 크기 및 빈도를 좌우한다). 갱년기 여성에게 있어서, 야기되는 자극된 LH 분비는 불편하게 느껴지는 이른바 "열감(hot flush)"을 일으킨다.

혈액 중에 충분히 높은 농도의 에스트라디올이 없는 경우, 파골세포(osteoclast)의 활성 및 이에 따른 뼈 물질의 파괴가 현저하고, 뼈 손상의 위험의 증가가 수반한다. 동시에 혈관계에서 반점(plaque) 형성의 위험이 장기간 존재하고 이에 따른 경색의 위험이 증가한다.

**배경기술**

시미시푸가 라세모사 및 벨람칸다 시넨시스(Belamcanda sinensis)의 추출물은 모두 폐경기 전후 및 폐경기 후의 장애를 경감시킬 수 있는 대중적인 의약으로부터 알려져 있다. 지금까지 이것은 두 약용 식물의 추출물이 인체의 다양한 기관, 특히 뇌, 난소, 뼈, 혈관계에 대한 에스트로겐-형 효과를 그의 모든 양성 효과와 함께 나타낸다는 사실을 통하여 설명되어 왔다. 자궁, 질, 유방 조직 및 간에 대한 에스트로겐-형 효과는 불리할 수 있다. 그러나, 바람직하지 않은 것은 지금까지 에스트로겐 결핍의 경우, 기관선택적 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있는 이들 약용 식물로부터의 의약이 종래 기술에서는 이용되지 않았다는 것이다.

따라서, 종래 기술의 이러한 진술로부터 출발하여, 본 발명의 목적은 자궁에 대한 효과가 없거나 거의 미미한, 기관선택적인 에스트로겐-형 효과를 갖는 식물 의약을 제공하는 것이다.

**발명의 상세한 설명**

이러한 목적은 붓꽃과 식물의 추출물의 용도에 관한 제 1 항의 특징을 통하여, 제 3 항에 따른 시미시푸가 라세모사의 추출물의 용도를 통하여 독립적으로 이루어졌다. 상기 목적은 또한 제 8 항에 따른 텍토리게닌 및/또는 그의 배당체에 기초한 의약에 관한 제 2 항의 특징에 의하여 이루어졌다.

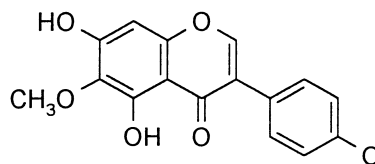
또다른 독립적인 해결은 제 11 항에 따른, 텍토리게닌 및/또는 텍토리게닌 배당체를 포함하거나 텍토리게닌 및/또는 텍토리게닌 배당체가 풍부한 식물 추출물에 의하여 나타내어진다.

놀랍게도 시험관내 및 생체내 실험에서 붓꽃과 식물, 특히 벨람칸다 시넨시스 및 시미시푸가 라세모사로부터 유기 용매를 사용하거나 초임계의 CO<sub>2</sub> 를 사용하여 생성된 추출물이 기관선택적으로 중추신경계, 뼈 및 혈관계에 작용하고, 자궁에 대한 효과-이른바 "항자궁성(uterotropic) 효과" 는 존재하지 않는다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따라 사용된 추출물은 골다공증의 선택적 치료 및/또는 예방을 위한 기(既)-제제화된(ready-formulated) 의약의 제조에 적합하다.

또한, 이들은 심혈관 질병, 특히 죽상경화증의 선택적 치료 및/또는 예방을 위한 기(既)-제제화된 의약의 제조에 적합하다.

또한, 이들은 폐경기 전후 및 폐경기 후의 정신자율신경계(psycho-vegetative) 장애, 예를 들어, 열감의 선택적 치료 및/또는 예방을 위한 기(既)-제제화된 의약의 제조에 적합하다.

또한, 벨람칸다 시넨시스로부터 단리된 텍토리게닌 성분이 본질적으로 전체 추출물과 동일한 효과를 발휘함이 밝혀졌다:



텍토리게닌

또한, 이 성분은 벨람칸다 시넨시스 이외에 다른 붓꽃과 식물, 예를 들어, 아이리스 게르마니카(Iris germanica), I. 텍토룸(tectorum), I. 일리리카 (illyrica), I. 디코토마(dichotoma)에서도 발견된다.

분류학적으로 말하면, 벨람칸다 시넨시스는 다음과 같이 분류된다:

목 릴리알레스(Liliales)

과 붓꽃과

속 벨람칸다

종 벨람칸다 시넨시스 (레만(Leman)) DC. = 파르단투스(Pardanthus) 시넨시스(chinensis) (L.) 케르-고올러(Ker-Gawler), 및 익시아(Ixia) 시넨시스 L. (=게밍지아(Gemmingia) 시넨시스 (L.) O. 쿤체(Kuntze))

바람직하게는 식물의 근경, 줄기, 잎 및/또는 꽃잎이 추출물의 제조를 위해 사용된다.

벨람칸다 시넨시스 및 그의 성분의 기초적 식물화학적 기술은 논문[Ms. A. Nenninger:(LMU Muenchen, 1997) 제목: "Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Belamcanda sinensis, einer Arzneipflanze der TCM und anderer Irisarten"]에 주어져 있다.

본 발명의 의약과 함께 시미시푸가 라세모사, 벨람칸다 시넨시스 및 다른 붓꽃과 식물로부터의 의약 및 텍토리게닌-기초 의약은 뼈, 심혈관계 및 뇌에서 충분한 에스트로젠 수용체 효현제(agonist)로서 작용하는 것으로서 처음으로 이용가능한 것이다.

본 발명의 또다른 유리한 점 및 특징은 하기 실험 데이터의 기술 및 도면에 의해 명확해진다:

도 1 : 시미시푸가 라세모사의 유기 및 수성 상의 비교. 대표적인 에스트로젠 수용체-리간드 결합 분석의 치환(displacement) 그래프. 출발 용액의 농도는 17.66mg/ml 이고, 이어서, 1:2, 1:4 등으로 희석하여 1:64 까지 희석하였다;

도 2 : 벨람칸다 시넨시스 추출물, E2 및 담체의 정맥내 주사 이전 및 2시간 후의 혈청 LH. 벨람칸다 시넨시스 추출물은 E2 와 같이 상승된 혈청 LH 농도를 저하시키는 유사한 능력을 갖는다;

도 3 : 난소절제된 래트에서 7 일 피하 처리 후의 시미시푸가 라세모사 및 E2 의 자궁 무게(도 3a) 및 LH 혈중 농도(도 3b) 에 대한 효과; (평균치 + SEM, n = 8, \* = 담체로서 크레모포에 대한 p < 0.05);

도 3a) 자궁 무게;

도 3b) 혈중 LH 농도;

도 4a) 난소절제된 래트에서 7 일 피하 처리 후의 시미시푸가 라세모사 및 E2 의 시상하부의 시신경교차전 부위에서의 E2-수용체 α를 위한 mRNA 의 발현에 대한 효과; (평균치 + SEM, n = 8, \* = 담체로서 크레모포에 대한 p < 0.05);

도 4b) 난소절제된 래트에서 7 일의 피하 투여 후 자궁에서 IGF1 및 C3 를 위한 mRNA 의 발현; 및

도 4c) 난소절제된 래트에서 7 일의 피하 투여 후 뼈에서 콜라겐 1(Coll 1) 및 오스테오칼신(osteocalcin) 을 위한 mRNA 의 발현.

## 실시예

시미시푸가 라세모사 및 벨람칸다 시넨시스의 에스트로젠 효과에 대한 실험 입증

선택적 에스트로젠 효과를 일련의 다양한 복합도의 시험 시스템 과정 중의 단계에서 나타내었다.

### 1. 시험관내 실험

#### 1.1 시미시푸가 라세모사에 대한 시험관내 실험

17-β-에스트라디올(=E2) 에 대한 항체에 의한 에스트로젠-형 구조 성분의 인식을 시험관내에서 나타내었다.

시미시푸가 라세모사 추출물을 잔사가 남도록 증발시켰다. 디클로로메탄 및 물 사이의 상 분배에 의하여, 상이한 극성을 갖는 물질을 풍부하게 하였다. 돼지 자궁으로부터의 에스트로겐 수용체에 대한 두 상의 성분의 결합능을 시험관내에서 측정하였다. 돼지 자궁으로부터의 시토솔(cytosol) 에스트로겐 수용체를 표준 방법에 따라 분리하고 리간드 치환 실험으로 사용하였다.

본 실험에서 예를 들어 시미시푸가 라세모사로부터의 에스트로겐-형 구조가 추출물로부터 유기 용매에 의하여 추출될 수 있으므로, 이들이 전혀 친수성이 아니라 친유성임이 밝혀졌다. 유기 추출 상에 존재하는 물질은 수성 상에 남아있는 물질 보다 항체에 약 10배 더 강하게 결합한다.

두 상의 차이는 에스트라디올 수용체 결합 분석에서 훨씬 크다. 에스트라디올과의 결합 물질의 유사성은 에스트라디올 수용체와의 선택적-경쟁적-상호작용이 무세포 표본에서 일어나기에 충분히 높을 것임이 틀림없다. 이러한 시험 시스템 내부에서, 수성 상은 활성을 갖지 않는 반면, 유기 상은 수용체에 매우 강하게 결합한다.

결과를 도 1에 나타내었다.

## 1.2 시험관내 벨람칸다 시넨시스

벨람칸다 시넨시스의 추출물이 또한 17- $\beta$ -에스트라디올에 대한 항체에 의하여 인식되는 성분을 갖고 있으며, 17- $\beta$ -에스트라디올 수용체에 결합한다는 것이 다른 연구로부터 알려져 있다(참고 : Nenninger loc. cit). 그러나, 놀랍게도 본 발명의 발명자들은 이러한 추출물이 상이한 기관계에 대하여 상이한 에스트로겐 효과를 가지며, 특히, 향자궁성 효과가 없음을 밝혀냈다.

## 2. 생체내 실험 : 난소절제된 래트에 대한 에스트로겐 효과의 입증

수용체 E2 에 대한 결합은 매우 선택적이다; 그러나, 세포내에서의 이후의 진행이 촉진되는지 억제되는지, 즉, 물질이 효현제인지 길항제인지 말하는 것은 불가능하다. 이러한 특성은 오직 적합한 세포 시스템 내에서 또는 전체 동물에서 결정될 수 있다.

난소절제된 래트는 내인성 에스트라디올 생성이 저하되는 폐경기 후 여성에 대한 인식 모델이다. 17- $\beta$ -에스트라디올 또는 에스트로겐-형 효과를 갖는 물질을 외부에서 공급한 결과, 치료 동물에서 에스트로겐-민감성 해부학적-형태학적 파라미터의 복원(restoration), 예를 들어, 자궁 무게의 증가 및 각질화 세포, 즉, 질 내피세포에서의 반점(plaque) 내피세포의 발생 또는 호르몬 변화, 예를 들어, 혈중 LH 농도의 저하가 일어난다.

이하에서 기술하는 모든 실험은 240 내지 280g 의 체중을 지닌 난소절제된 스프라그-돌리(Sprague-Dawley)(=ovx)래트로 수행하였다.

### 2.1 벨람칸다 시넨시스의 단일 투여

벨람칸다 시넨시스 추출물의 에스트라디올-형 효과의 효과 시작은 매우 빨리 일어난다. 담체, 에스트라디올 및 벨람칸다 시넨시스 추출물을 난소절제된 래트에 단일 정맥내 투여한 직후, 박동성이 E2 및 벨람칸다 시넨시스 하에서 모두 멈추었다. 의약의 가치 개발에 있어서, 이전의 수치와의 비교 및 크레모포-처리 대조 동물과의 비교에서 모두 혈청 LH 농도의 유의한 억제가 결과로서 나타난다. 크레모포는 폴리에톡실화 피마자유 유도체 기제의 유화제이다.

결과를 도 2 에 나타내었다.

벨람칸다 시넨시스 추출물의 주사 후 6시간에 동물의 자궁에서 자궁 VEGF, IGF1 및 C3 유전자의 발현은 대조군과 비교할 때 변하지 않았으나, 에스트라디올 주사는 상기 3 개의 에스트로겐-조절 단백질의 유전자 발현의 명확한 증가를 일으켰다. 구성적으로 발현되는 CCO 유전자는 이들 치료 중 어느 하나로부터도 유의하게 영향을 받지 않았다.

이러한 발견은 벨람칸다 시넨시스 성분이 시상하부의 에스트로겐-수용성 구조에 있는 GnRH 펄스 발생기의 억제를 야기시키고, 따라서, 에스트로겐-효현 효과를 가짐을 나타낸다. 따라서, 뇌하수체 LH 분비는 벨람칸다 시넨시스의 성분 및 에

스트라디올 모두에 의하여 유의하게 억제된다. 에스트라디올과 대조적으로, 벨람칸다 시넨시스 성분은 항자궁성 효과가 없다. 에스트라디올은 유의하게 VEGF, IGF1 및 C3 유전자의 발현을 유의하게 상승적으로 조절하며 이는 벨람칸다 시넨시스 하에서는 관찰되지 않는 효과이다.

벨람칸다 시넨시스 추출물의 정맥내 주사의 효과에 대한 급성 실험의 수행

실험 진행일에 24마리의 래트(즉, 8마리/군)에 경정맥 카테터(catheter)를 에테르 마취하에 이식하였다. 실험일에 6 개의 혈액 샘플을 10 분 간격으로 취하였다. 6개의 샘플 채취 후 즉시, 등장성 NaCl 1ml 중의 62.5mg 의 벨람칸다 시넨시스 추출물 또는 10 $\mu$ g의 17- $\beta$ -에스트라디올(E2) 또는 용매(5%) 크레모포를 각각 정맥내 투여하고, 혈액 샘플을 추가로 10 분 간격으로 2시간 채취하였다. 정맥내 투여 후 6시간에, 동물을 처사시키고, 혈액을 채취하고, 자궁을 제거하고, 무게를 달고, 액체 질소에 급속 냉동시켰다.

## 2.2 텍토리게닌의 1회 투여

텍토리게닌의 단일 투여 후, 혈중 LH 농도에 대한 영향의 시간에 따른 전개 및 에스트라디올-형 면역활성을 측정하였다. E2-RIA 의 도움으로 측정된, 동물의 혈중 텍토리게닌 농도는 20분 후, 약 100pg 당량의 에스트라디올에 대응한다.

텍토리게닌은 신속한 LH 감소를 유발한다. 정맥내 투여 후 60분 이내에 텍토리게닌 하에 이루어진 LH 감소의 동역학(kinetics)은 에스트라디올 중 하나에 정확히 대응하지만 이후, 추가의 감소는 나타나지 않았고, 다시 점차 증가되었다.

수행 : 실험 시작 24 시간 전에 함스 및 오제다(Harms and Ojeda)의 방법 [Harms PG; Ojeda SR: A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. J. Appl. Physiol. (1974) 36: 391-392]에 따라 난소절제된 래트에 에테르 마취 하에 외부 경정맥 카테터를 놓았다. 관의 말단을 목의 피부 포켓(pocket)에 위치시켰다. 혈액 샘플을 취하는 동안 동물과 접촉하지 않도록 하기 위하여 카테터를 실리콘 관의 도움으로 연장하였다. 카테터 및 관을 50 IU 헤파린/ml 함유 링거 액으로 세척하였다.

100 $\mu$ l의 혈액 샘플 각각을 동물로부터 10분 간격으로 빼내고, 회수된 부피를 링거/헤파린 용액으로 대체하였다. 6번째 샘플 이후, 각각의 1.0ml 시험 용액을 정맥내에 적용시켰다. 시험 용액으로서 2% 크레모포(=담체 용액), 텍토리게닌 7mg/ml 담체, 17- $\beta$ -에스트라디올 10 $\mu$ g/ml 담체가 사용되었다. 혈액을 추가로 140분간 10분 간격으로 채취하였다.

이렇게 수득한 혈액 샘플을 10 $\mu$ l 헤파린-용액(5000 IU/ml, Liquemin) 함유 0.5ml 에펜도르프(Eppendorf) 반응 용기에 충전하고, 10분간 10000 \* g 에서 원심분리하고, 방사성면역분석을 수행할 때까지 혈장을 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

LH 및 프로락틴을 위한 RIAs 는 항혈청에 기초하고, 조희 및 요오드화 표본은 NIH(미국 메릴랜드 베테스다(Bethesda))로부터 얻었다. 에스트라디올 및 교차-반응성 이소플라본의 농도를 DPC 바드 나우하임(Bad Nauheim)으로부터 입수한 RIA 의 도움으로 측정하였다.

## 2.3 7일 투여 후 벨람칸다 시넨시스 추출물의 효과

전체 무게, 자궁 무게, 호르몬 농도, 및 자궁 및 뼈의 유전자 활성화에 대한 에스트라디올, 벨람칸다 시넨시스 추출물 및 담체의 반복 투여 효과를 자궁절제된 래트에 대해서 7 일간 매일 피하(s.c.) 투여 후 검사하였다.

크레모포- 및 벨람칸다 시넨시스- 처리 동물의 평균 체중은 다르지 않았으나, E2-처리 동물은 유의하게 더 가벼웠다. 크레모포 및 벨람칸다 시넨시스로 처리한 동물의 자궁 무게도 유의하게 다르지 않았으나, E2-치료는 자궁 무게가 3배 이상이었다.

벨람칸다 시넨시스-처리 동물의 혈청 LH 농도는 약간, 그러나, 크레모포 대조군과 비교할 경우 유의하게 감소하였고; 에스트라디올을 통한 감소는 더 현저하였다.

자궁 mRNA 추출물에서, 에스트라디올은 1주일 처리 후 VEGF 의 유전자 발현을 대조군 값의 149% 까지 유의하게 증가시켰다. 벨람칸다 시넨시스 추출물 하에서, 발현은 조금 증가되었으나, 유의할 만한 것은 아니다. 사이토크롬 C 산화효소(= CCO)에 대한 비 에스트로겐-조절 구성적 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

대퇴골 머리의 추출물에서, 콜라겐-1A1, 오스테오칼신, IGF1 및 TFGβ-mRNA 발현을 측정하였다. 벨람칸다 시넨시스 뿐만 아니라 에스트라디올도 모든 4 개의 유전자 발현을 유의하게 억제하였고, 구성적 CCO 유전자에 대한 영향은 없었다.

에스트라디올 및 벨람칸다의 상이한 효과는 7일 치료 후 매우 명백해진다. 벨람칸다 시넨시스 추출물은 GnRH 임펄스 발생기를 억제함으로써 뇌하수체 LH 분비 및 뼈에서 4개의 에스트로겐-조절 유전자의 유전자 발현에 에스트라디올-효현적 영향을 미친다. 대조적으로 자궁에는 에스트로겐성 효과가 없다: 벨람칸다 시넨시스 추출물은 자궁 무게 또는 에스트로겐-조절 VEGF 유전자에 영향을 미치지 않는다. 대조적으로 에스트라디올은 자궁의 확대 및 VEGF 유전자의 활성화를 일으킨다.

7일간 매일 피하 주사의 효과에 대한 아급성 시험의 수행:

시험군 당 각각 8 마리(모두 24마리)에 매일 오전 8:00 및 9:00 사이에 62.5mg 의 벨람칸다 시넨시스 추출물 및 10μg 의 에스트라디올 또는 용매(크레모포 5%, 1ml)를 각각 피하 주사하였다. 최종 투여 후 6시간에, 동물을 처사시키고, 각 동물로부터 대동맥, 자궁 및 왼쪽 대퇴부 머리를 제거하고, 세척하고, 액체 질소로 냉동시켰다.

혈액 샘플에서 LH 및 에스트라디올 면역반응성을 측정하였다.

## 2.4 시미시푸가 라세모사의 반복 투여

빨라도 난소제거 후 14일에, 동물에 각각의 시험 물질을 62.5mg의 시미시푸가 라세모사/래트 또는 8μg의 에스트라디올/래트의 용량으로 7일의 기간 이상 매일 아침 1회 피하 주사하였다. 두 물질을 5% 크레모포에 용해시키고, 대조군 동물은 담체만 투여하였다.

동물 처사 후, mRNA-회복을 위하여 뇌, 자궁 및 대퇴부를 준비하였다. 동물의 혈중 LH 농도를 RIA 로 측정하였다. 상기 기관에서의 에스트로겐-조절 유전자의 발현을 반(semi)-정량 RT-PCR 로 측정하였다.

에스트라디올-처리 동물의 자궁은 기본적으로 평균치가 다르지 않은 시미시푸가 라세모사 및 담체 처리 동물의 자궁 무게의 3배 이상이었다. 이것은 시미시푸가 라세모사 성분이 동물의 자궁에 영향을 미치지 않음을 의미한다. 또한, 이것은 질에도 해당되는 것으로, 시미시푸가 라세모사 및 담체로 처리한 동물에서 내피세포 조직의 각질화가 일어나지 않았으며, 에스트라디올-치료 동물과 매우 대조적이다.

담체-처리 동물의 LH 농도는 여전히 높지만, 그러나, 에스트라디올 및 시미시푸가 라세모사는 모두 유의하게 저하시켰다.

결과는 도 3a) 및 도 3b) 에 나타내었다.

**[표 1]**  
자궁 무게(습기)

	크레모포[대조군]	시미시푸가 라세모사	E2
동물 수	8	8	8
평균치 [mg]	185.6	192.3	702.1
SD	18.81	22.53	194.97
SEM	6.65	7.97	68.92

**[표 2]**  
혈중 LH 농도

	크레모포[대조군]	시미시푸가 라세모사	E2
--	-----------	------------	----

동물 수	8	8	8
평균치 [ng/ml]	16.9	12.5	7.83
SD	3.99	3.4	5.57
SEM	1.41	1.2	1.97

에스트로겐 효과의 또다른 표지로서, 에스트로겐-유도가능한 단백질의 mRNA 의 활성화를 측정하였다. 여기에서 측정된 것은 자궁으로부터의, 뼈 조직(대퇴부)로부터의 및 시상하부의 시신경교차전 부위로부터의 조직이다.

시상하부에서, 시미시푸가 라세모사 및 E2 모두 에스트로겐 수용체 α에 대한 mRNA 의 발현을 자극한다(도 4a). 또한, 뼈 조직에서, 시미시푸가 라세모사는 에스트로겐처럼 행동하고, 에스트라디올과 유사하게 뼈-특이적 콜라겐 1 및 오스테오칼신 유전자에 대한 mRNA 의 발현을 감소시킨다(도 4b).

대조적으로, 시미시푸가 라세모사는 자궁에서의 에스트로겐-조절 유전자에 대한 효과가 관찰되지 않았다. 단지 에스트라디올이 IGF1 및 보체 인자 C3 에 대한 mRNA 를 증가시켰다(도 4c).

이러한 발견은 시미시푸가 라세모사로부터의 성분이 선택적으로 단일 기관에 작용함을 증명한다: 추출물이 시상하부(E2 수용체 α의 발현, LH 의 유리)에서 에스트로겐성으로 작용하고, 콜라겐 1 및 오스테오칼신에 대한 유전자의 발현에 의하여 입증된 바와 같이 뼈에 작용한다. 그러나, 에스트라디올과 달리, 시미시푸가 라세모사는 자궁 무게, 및 IGF1 및 C3 유전자의 발현에 대한 효과가 없는 바와 같이 자궁에 대한 효과가 없다.

시험관내 및 생체내에서 수행한 실험에 의하여, 시미시푸가 라세모사 및 벨람칸다 시넨시스 추출물이 에스트로겐 효과를 발휘함을 증명할 수 있다. 놀랍게도 상기 언급한 약의 추출물이 중추신경계, 뼈 및 혈관에 대하여 기관선택적으로 작용하지만 자궁에는 작용하지 않고, 따라서, 자궁내막에 대한 부정적 영향없이 에스트로겐 결핍의 예방 및 치료에 우수하게 적합함이 밝혀졌다.

벨람칸다에 함유된 텍토리게닌이 동일한 효과를 달성하였다.

따라서, 에스트로겐-형 효과를 갖지만 향자궁성 효과가 없는 의약이 처음으로 이용가능해졌다.

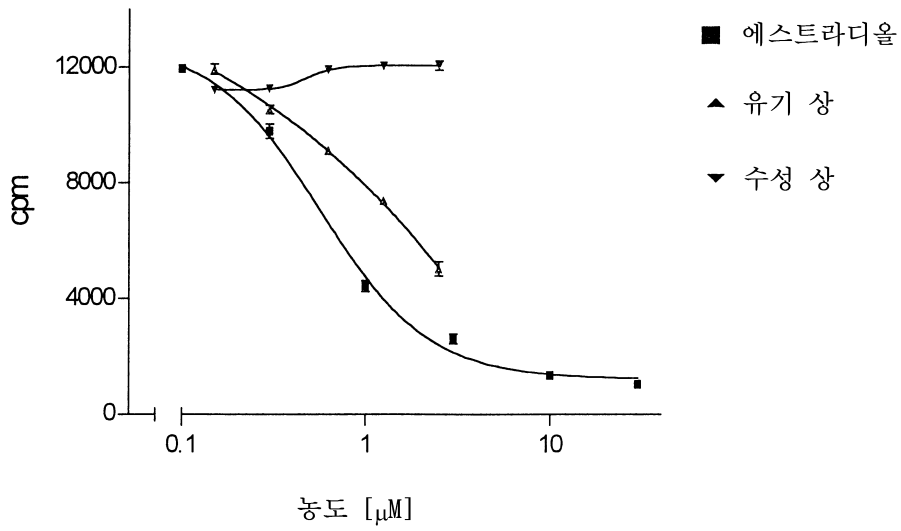
유사한 의약이 심혈관 질병, 특히 죽상경화증, 골다공증, 및 폐경기 전후 및 폐경기 후의 정신자율신경계 장애, 예를 들어, 열감의 치료 및/또는 예방을 위하여 사용될 수 있다.

투여 형태 중, 경구, 정맥내 및 피하 투여가 바람직하다.

**도면**

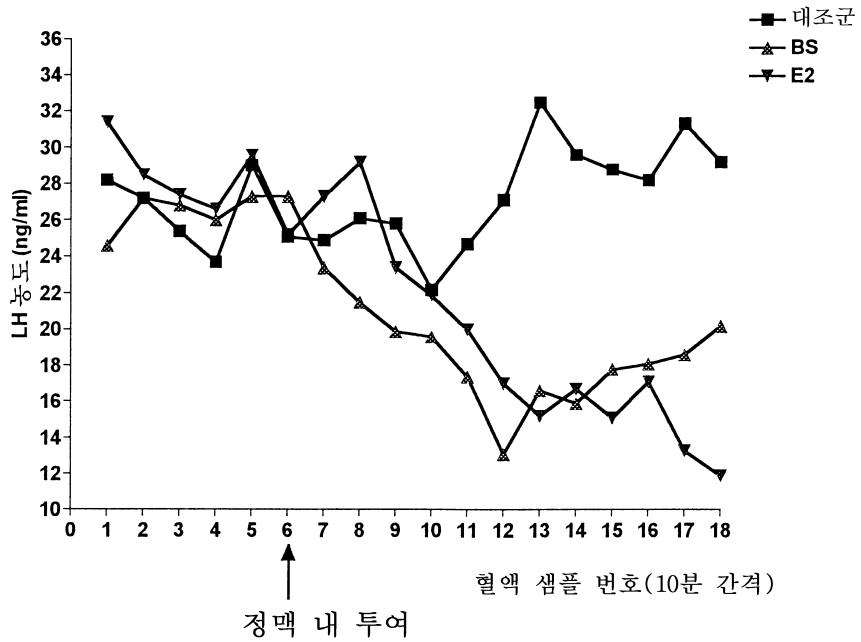
도면1

수성 및 유기 상 CR,  
E2 수용체

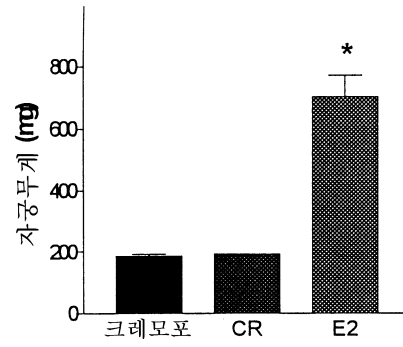


도면2

벨람칸다 s. 의 정맥내 투여

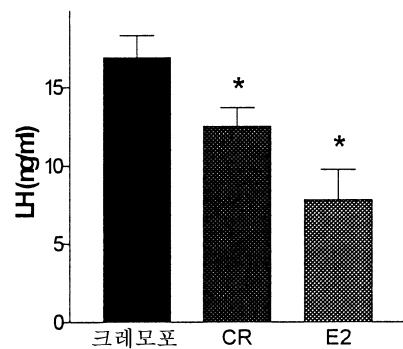


도면3a



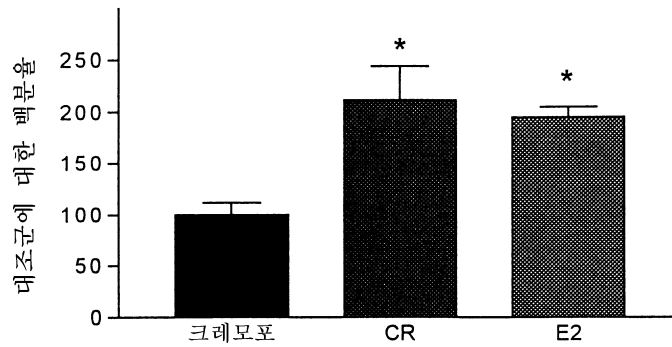
3a) 자궁무게

도면3b

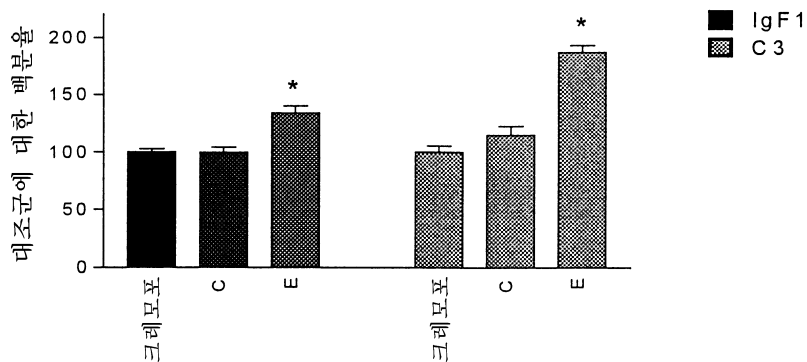


3b) 혈중 LH 농도

도면4a



도면4b



도면4c

