(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0066786
(43) 공개일자 2009년06월24일

(51) Int. Cl.
A61K 36/31 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0134481
(22) 출원일자 2007년12월20일
심사청구일자 2007년12월20일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
김성훈
서울 강남구 도곡동 타워팰리스 E동 2405호
이연희
서울 강남구 신사동 626 현대맨션 11동 201호
(74) 대리인
노재철

전체 청구항 수 : 총 2 항

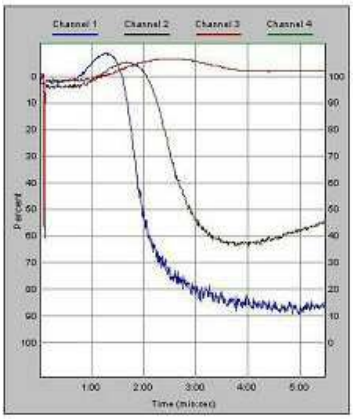
(54) 배무채 추출물을 함유하는 혈전억제제

(57) 요 약

본 발명은 배무채(xBrassicoraphanus) 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 억제제에 관한 것이다.

특히, 본 발명에 의한 배무채 추출물은 콜라겐으로 유발한 혈소판 응집 시험과 폐색전을 유발한 흰쥐의 동물 실험에서 혈전에 관여하는 프로스타글란딘과 트롬복산의 발현량을 측정한 실험에서 혈전 억제 효과를 나타낼 뿐만 아니라 부작용이 없어 혈전 등 심혈관계 질환과 관련된 질환의 예방 및 치료를 목적으로 기존의 치료제에 대체 또는 병용하여 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20050301034437
부처명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린21사업
연구과제명	배추로부터 유용물질의 분리와 기능성 신소재개발연구
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2003년 03월 01일 ~ 2007년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

배무채(xBrassicoraphanus) 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 억제제.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 배무채 추출물을 100 mg/kg 내지 200 mg/kg 투여하는 것을 특징으로 하는 혈전 억제제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 배무채(xBrassicoraphanus) 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 억제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 혈액은 정상적인 혈관 안에서는 액체 상태로 있어야 하고, 혈관의 상처부위에서는 빨리 응고하여 손상된 혈관으로부터의 혈액손실을 중단케 하여 항상성을 유지해야 한다. 정상 상태에서는 혈관 내 혈전(血栓:thrombus)이 생기면 혈전 용해작용이 활성화되어 유동성을 회복하게 되며, 혈전이 생기는 것과 혈전이 생기는 것을 막는 기전의 균형이 여러 요인으로 인해 깨지게 되어 정상 지혈기전의 병리적 현상으로 나타나는 것을 혈전증(血栓症:thrombosis)이라고 한다. 혈전증은 혈액이 생체의 심혈관계 내에서 응고된 덩어리를 형성하는 것을 말하며, 그 혈액응고 덩어리를 혈전(血栓: thrombus)이라 한다.

<3> 큰 혈관이 파열되든가 또는 손상을 받았을 때 혈액이 자발적으로 응고하는 현상은 더 이상의 출혈을 방지하여 생명을 구하는 중요한 과정이다. 그러나 파열되지 않은 심맥관계내 혈전의 형성은 생명을 위협할 수도 있다. 즉, 파열되지 않은 심맥관계내에 혈전이 생기면 혈류감소 또는 차단으로 장기나 조직에 허혈성 손상을 유발하고, 혈전의 일부 또는 전부가 떨어져 나와 그 부서진 혈전이 색전(塞栓症:embolism)을 유발한다.

<4> 색전(塞栓)이란 맥관(脈管:혈관이나 림프관을 통칭)을 폐색하는 덩어리를 통칭하는 용어로서, 혈전 또는 외부로부터 유입된 이물질이 맥관을 막아 혈액이나 림프액의 흐름을 막고 있는 것을 말한다. 색전은 혈행을 따라 움직여서 다른 장소로 운반되고, 결국은 혈관의 일부를 막을 수 있는데 이렇게 색전에 의해서 혈관이 막히는 증상이 색전증(塞栓症:embolism)이라 한다.

<5> 사고를 당한 경우를 제외하고 돌연사의 이유는 대부분 심혈관질환 때문이다. 전 세계 사망원인 가운데 심혈관질환이 차지하는 비율은 30%로 가장 높다. 예전에는 심혈관질환으로 급사한 경우 '심장마비'로 통틀어 말했지만 요즘은 증상의 원인에 따라 세분해서 부른다. 가장 치명적인 질환들은 피를 보내는 혈관이 막혀 일어난다.

<6> 심장에는 심장 자신의 세포에 산소와 양분을 공급하기 위해 관상동맥이라는 혈관이 존재한다. 심혈관질환 중 가장 위험한 '급성 심근경색'은 심장에 피를 공급하는 관상동맥이 '혈전'에 의해 막혀 심장 세포가 죽는 병이다. 급성 심근경색이 일어난 지 2시간이 지나면 심장 세포가 산소 공급을 받지 못해 죽기 시작하고 심장이 멈춰 사망에 이르게 된다.

<7> '협심증'은 심근경색과 비슷하지만 정도가 약한 증상이다. 심장 세포가 죽을 정도는 아니지만 관상동맥에 혈액공급이 원활하지 못해 심장 근육에 통증이 발생한다. 협심증은 주로 몸을 움직이다가 심장에 무리가 가면 발생한다. 따라서 운동할 때 통증이 오면 협심증, 쉴 때 오면 심근경색일 가능성이 높다.

<8> '뇌중풍(뇌졸중)'도 심근경색이나 협심증과 같이 혈관이 막혀 발생한다. 단, 뇌중풍은 심장이 아니라 뇌에 혈액을 공급하는 뇌혈관의 일부가 막혀 발생한다.

<9> '부정맥'은 심장의 정상 리듬이 깨진 상태를 말한다. '정'한대로 '맥'이 뛰지 않는다고 해서 부정맥이라 부른다. 이때 심장은 분당 60~100회보다 빨리 뛰거나 천천히 뛰고, 뛰는 속도가 불규칙하게 되기도 한다. 부정맥은 외부에서 전기 자극을 가해 인위적으로 심장을 '재부팅'해 치료한다.

<10> 심장의 구조가 잘못돼 있어도 병이 생긴다. 심장판막증은 심장에서 혈액이 일정한 방향으로 흐르도록 해주는 판

막에 문제가 생긴 병이다. 피가 역류하기 때문에 심장에 무리가 가서 붓게 된다.

<11> 심실중격결손은 심장의 각 부분을 구분하는 칸막이에 구멍이 뚫린 경우다. 심실 벽에 구멍이 뚫리면 깨끗한 피와 더러운 피가 섞인다. 피가 제 기능을 발휘하지 못하게 되는 것이다. 이 병은 선천적으로 발생하기 때문에 유아기에 발견해서 수술로 치료해야 한다.

<12> 따라서, 심혈관계 질환으로 인한 사망율 감소를 위해서는 혈전 및 색전을 억제하는 기능을 가지면서도 기존의 약물들이 가지는 부작용을 최소화할 수 있는 건강기능 식품 및 치료제에 대응하는 것이 요구되어 왔다.

<13> 대한민국 특허 제408087호에는 불가사리 에틸아세테이트 추출물을 유효성분으로 포함하는 항혈전 작용을 갖는 약학 조성물이 공지되어 있으며, 대한민국 특허 제392175호에는 송이버섯 균사체 배양에서 생성되고, N-말단의 아미노산이 ATVQGGDAYYINNSA이며, 분자량이 26.5KDa이고, 피브린 용해능을 갖는 혈전용해효소가 공지되어 있다.

<14> 한편, 대한민국 특허 제492518호에는 배추 “전승”을 모친으로 하고, 무 “백경”을 부친으로 하여 교배하여 얻은 배무채(x*Brassicaraphanus*)가 공지되어 있다.

<15> 상기 배무채(x*Brassicaraphanus*)는 배추와 무의 염색체를 모두 가지고 있고, 90일 이상 재배하면 배추와 같이 통이 앉으며 속잎이 노랗고 소형무 정도 비대한 뿌리를 가지는 특성이 있다. '배무채'는 저온 장일에서 꽃눈이 형성되고 고온 장일에서 추대되므로 봄과 여름에는 성숙식물체 재배가 어려우나 열무와 같이 이용할 경우 재배가 가능하여 무가온 시설이나 노지에서는 겨울을 제외한 연중재배가 가능하다. 또한 '배무채'의 맛은 무, 배추와 다른 매운 맛이 나며 김치를 담그면 중륵 부분에 수분함량이 많아 시원하면서 아삭아삭하여 김치재료로 사용이 가능하다고 알려져 있다.

<16> 본 발명자들은 배추와 무의 자연교잡종인 배무채의 유용성을 연구하던 중에 배무채(xBrassicoraphanus) 에탄올 추출물에서 혈전을 억제하여 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 효능을 갖고 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<17> 본 발명은 배추와 무의 자연교잡종인 배무채(xBrassicoraphanus) 추출물을 유효성분으로 함유하는 신규한 의약적 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<18> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 배무채(xBrassicoraphanus) 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 억제제를 제공한다.

<19> 특히, 본 발명에 의한 배무채 추출물은 트롬복산 발현 억제 및 글리코프로테인 발현 억제할 수 있으며, 부작용이 없어 혈전 등 심혈관계 질환과 관련된 질환의 예방 및 치료를 목적으로 기존의 치료제에 대체 또는 병용하여 사용할 수 있다.

<20> 본 발명은 배무채를 에탄올로 추출한 다음 추출액을 감압 농축하고 동결 건조하여 배무채 추출 분말을 얻을 수 있다.

<21> Thromboxane B_2는 콜라겐류에 의한 혈소판의 응집으로 혈전반응이 일어날 때 분비되는 단백질로 몹시 불안정한 물질이지만 dehydro form 인 thromboxane A_2를 정량함으로써 Thromboxane B_2 (TxB_2) 의 양을 가늠할 수 있다. 본 발명에 의한 배무채 추출물은 100% 응집억제능력을 보여 혈전 억제에 유효한 효과가 있음을 알 수 있을 뿐만 아니라, 트롬복산 발현 억제작용 시험에서 매우 효능이 뛰어난 것으로 확인되었다.

<22> 또한, 정상적인 혈소판은 혈소판 표면에 글리코프로테인Ⅱb/Ⅲa (glycoprotein Ⅱb/Ⅲa)가 있어서 피브리노겐 또는 Von Willebrand Factor(VWF)와 교차 결합하여 상해가 있는 부위나 콜라겐(collagen)과 같은 강력한 antagonists 들에 의해 혈소판 응고가 일어나게 된다. 본 발명은 배무채가 글리코프로테인 Ⅱb/Ⅲa 의 receptor를 무력화시키므로써 글리코프로테인 발현 억제 작용이 있음을 알 수 있다.

<23> 따라서, 본 발명에 의한 배무채 추출물은 부작용이 없어 혈전 억제를 필요로 하는 심혈관계 질환의 예방 및 치료를 목적으로 기존의 치료제에 대체 또는 병용하여 사용할 수 있으며, 특히 혈소판 응집 억제 작용, 트롬복산

발현의 억제 작용 및 글리코프로테인 발현을 억제하여, 혈전 억제제로 유용하다.

<24> 본 발명에 의한 배무채 추출물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 가장 바람직한 투여 경로는 경구투여이다. 또한, 제제화할 경우에는 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

<25> 더불어, 본 발명에 따른 혈전 억제제의 투여량 또는 복용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 구체적인 구성 약물의 복용량은 성인 기준으로 100 mg/kg 내지 200 mg/kg을 1회 내지 수회에 나누어 복용하는 것이 바람직하다.

효 과

<26> 상술한 바와 같이, 본 발명의 배무채 에탄올 추출물은 혈소판 응집 억제, 트롬복산 발현 억제 및 글리코프로테인 발현 억제 작용을 나타내어 심혈관계 질환의 예방 및 치료제인 혈전 억제제로 유용하게 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다. 단, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<28> **<실시예 1> 배무채 추출물의 제조**

<29> 배무채 30g을 에탄올 40ℓ에 넣어 2회 에탄올 추출한 다음 추출액을 감압 농축하고 동결 건조하여 배무채 추출분말을 얻었다(yield: 14 %).

<30> **<제제예 1> 액제의 제조**

<31> 상기 실시예 1에서 제조된 배무채 추출물의 건조 분말을 DMSO와 인산생리식염수의 비율을 1:1로 하여 희석하여 액제를 제조하였다.

<32> **<실험예 1> 혈소판 응집 억제능 측정**

<33> 혈소판 응집 억제능은 Platelet Aggregometer(Whole Blood Lumi-ionized calcium aggregometer, Chrono-Log Co. USA)를 이용한 탁도측정법으로 정하였다. PRP 400 ㎕ 를 취하여 먼저 37℃ 에서 3분간 incubation 한 후 50 ㎕ 의 sample을 가한다. 2 분후 50 ㎕ 의 혈소판 응집촉진물질로 자극하여 응집을 유도하였다. 응집반응을 5분간 측정한 후, 최대 응집점을 잡아 억제되는 정도를 계산하였다. 응집이 측정되는 동안 교반은 1,000 rpm이 되도록 하고, 혈소판 응집촉진물질로는 Collagen (Chrono-Log co., 2 ㎍/ml)을 사용했다. Inhibition은 다음의 식을 이용하여 구했다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Control aggregation

B: Sample aggregation

<34>

<35> 항혈전 효과는 aggregometer를 이용하여 콜라겐 처리(channel1, blue) 후 혈소판응집이 일어나는 것을 대조군으로 하여 배무채 에탄올층을 처리한 실험군을 백분율로 계산한 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1로부터 배무채는 25㎍/mℓ의 농도에서는 유의성이 없었으며, 50 ㎍/mℓ 에서는 45%, 100㎍/mℓ 이상에서 100% 응집억제능을 보임으로써 배무채 에탄올 추출물의 농도에 비례하여 유의하게 혈소판 응집억제가 일어남을 확인할 수 있다.

<36> **<실험예 2> 글리코프로테인 발현 억제능 측정**

<37> 정상적인 혈소판은 혈소판 표면에 글리코프로테인 ⅡbⅢa(glycoprotein ⅡbⅢa)이 있어서 피브리노겐 또는 Von Willebrand Factor(VWF)와 교차 결합하여 상해가 있는 부위나 콜라겐(collagen)과 같은 강력한 antagonists 들에 의해 혈소판 응고가 일어나게 된다. 이 실험은 배무채의 에탄올층이 글리코프로테인 ⅡbⅢa의 receptor를 무력화시키는지 여부를 판가름하기 위한 것이며 antibody 로는 PAC-1/FITC (Becton-Dickenson, San Jose, CA, USA)을 사용하여 FACScan을 실시하였고, 정상적인 혈소판, 콜라겐 첨가시 및 콜라겐 첨가 후 배무채 추출물 25㎍/mℓ, 50㎍/mℓ, 100㎍/mℓ, 200㎍/mℓ 투여한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 M1은 돌기가

형성되지 않은 정상적인 platelet 의 백분율을 뜻하며 M2 는 돌기가 형성되어 receptor 가 activation 된 상태를 의미한다.

<38> 정상적인 혈소판에 콜라겐을 첨가하면 글리코프로테인 리셉터가 활성화되는데 그것을 형광면역 염색하여 활성화된 것은 백분율로 나타낼 수 있는데, 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 정상상태의 혈소판에는 2.3%만 나타났고, 여기에 콜라겐을 첨가 하였을때 33.8% 까지 글리코프로테인의 receptor 가 활성화되지만, 배무채 추출물을 첨가하므로써 M2의 FITC binding 수치가 25 ㎍/㎖ 에서 22.3%, 50 ㎍/㎖ 에서 21.1%, 200 ㎍/㎖에서 19.6% 까지 감소하는 것을 보여주고 있어 배무채 추출물은 글리코프로테인 발현 억제 작용을 가짐을 알 수 있다.

<39> **<실험예 3> 트롬복산 발현 억제능 측정**

<40> 3×10^{8}/㎖ 개의 platelet 400 ㎕를 취하여 각각의 샘플들을 농도별 처리하고 3분 이상 37℃ incubator에서 교반하면서 incubation 하였다. Collagen을 2 ㎍/㎖ 을 섞은 다음 5 분간 37℃ incubator에서 교반하면서 incubation하고 상등액만 따로 채취하여 Thromboxane A_2를 정량했다. TxA_2 의 양은 Cayman(Ann Arbor, USA)의 EIA kit를 사용하였으며 사용자 방법에 준하여 실험하였다.

<41> Thromboxane B_2는 콜라겐류에 의한 혈소판의 응집으로 혈전반응이 일어날 때 분비되는 단백질로 몹시 불안정한 물질이지만 dehydro form 인 thromboxane A_2를 정량함으로써 Thromboxane B_2 (TxB_2) 의 양을 가늠할 수 있다. 그러므로 본 발명에서는 Cayman (Ann Arbor, USA) 사의 TxB_2 EIA kit를 사용하여 사용자 매뉴얼에 맞추어 Thromboxane B_2 (TxB_2) 의 양을 정량하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<42> 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 의한 배무채 추출물은 혈소판 응집시 발생하는 단백질인 트롬복산을 감소시킴을 확인할 수 있다.

<43> **<실험예 4> 폐색전 억제 측정**

<44> 에피네프린을 마우스의 미정맥에 주사하면 폐색전으로 즉사하거나 경추아래 마비가 오게 되는 마우스의 수를 세어 시료들의 폐경색 억제율을 계산한다.

<45> 본 발명에서는 Pulmonary embolism은 ICR 마우스의 꼬리 미정맥에 에피네프린 112mg을 주사하고 폐색전으로 즉사하거나 경추아래 마비가 온 쥐들의 수를 세어 시료들의 폐경색 억제율을 계산하는 방법으로 실시하였다. 실험동물은 대한바이오링크사로부터 분양받아 본 대학 동물실에서 일정한 조건(온도 : 20± 1℃ , 습도 : 55± 3 %, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주간 적응시킨 체중 19 ± 1.8 g 의 balb/c female mouse를 이용하였다. 각각의 샘플들을 5 mg/Kg로 경구 투여한 다음 90분후 antagonist로 epinephrine 10mM 100 ㎕를 꼬리 미정맥에 주사하였다. 정맥 주사 후 혈액응고로 인한 폐색전으로 사망하는 마리수 또는 뒷다리의 마비가 오는 마리수를 재고 다음과 같은 공식으로 생존율을 계산하여 표 1에 나타내었다.

$$\text{Survival (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 전체 실험한 마리수

B: 죽거나 뒷다리 마비가 온 쥐의 마리수

<46>

표 1

	농도 (mg/mouse)	죽거나 뒷다리 마비가 온 쥐의 마리수 / 실험한 마리수	생존율 (%)
대조군	112	10/11	9.1
배무채 추출물	25	9/20	45.5
	50	11/21	54.5
	100	9/22	59.1
	200	8/21	66.7

<47>

<48> 표 1 에서 알 수 있는 바와 같이, 폐색전 억제는 배무채 농도에 비례하여 각각 45.5 %, 54.5 %, 59.1 %, 66.7 % 로 생존율이 늘어나는 것을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

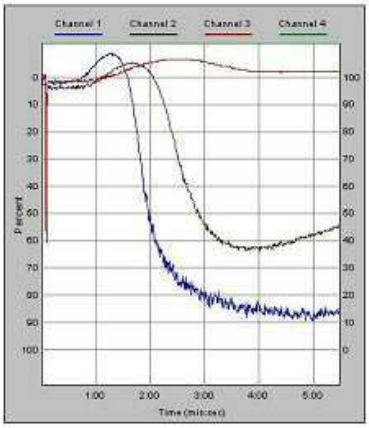
<49> 도 1은 배무채 에탄올 추출물의 혈소판 응집 저해효과 그래프이며,

<50> 도 2는 정상상태, (b) 콜라겐 첨가시 및 (c), (d), (e) 및 (f)는 콜라겐 첨가후 배무채 에탄올 추출물 각각 25㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 200㎍/㎖ 투여에 의한 글리코프로테인 리셉터의 발현을 억제하는 유세포분석을 나타낸 것이고,

<51> 도 3은 배무채 에탄올 추출물이 트롬복산의 발현을 억제하는 그래프이다.

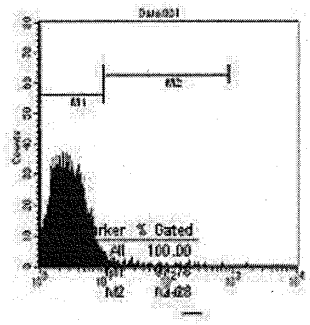
도면

도면1

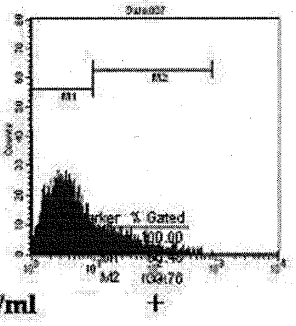


도면2

(a)

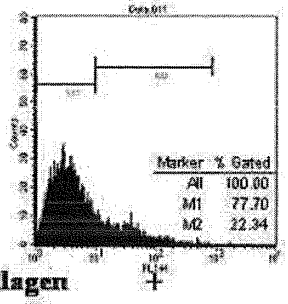


(b)



Collagen 2μg/ml +

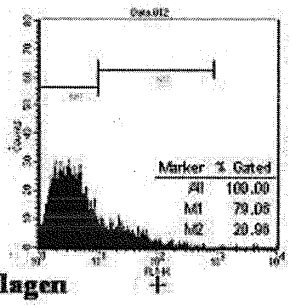
(c)



Collagen +

xBrassico-raphanus 25

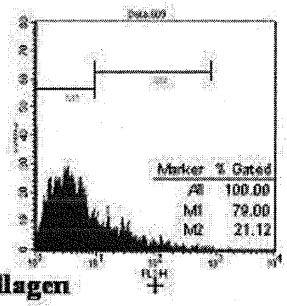
(d)



Collagen +

xBrassico-raphanus 50

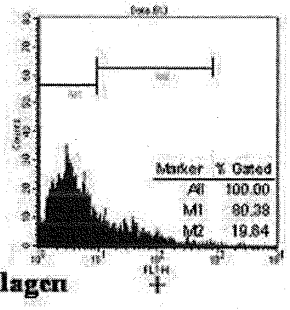
(e)



Collagen +

xBrassico-raphanus 100

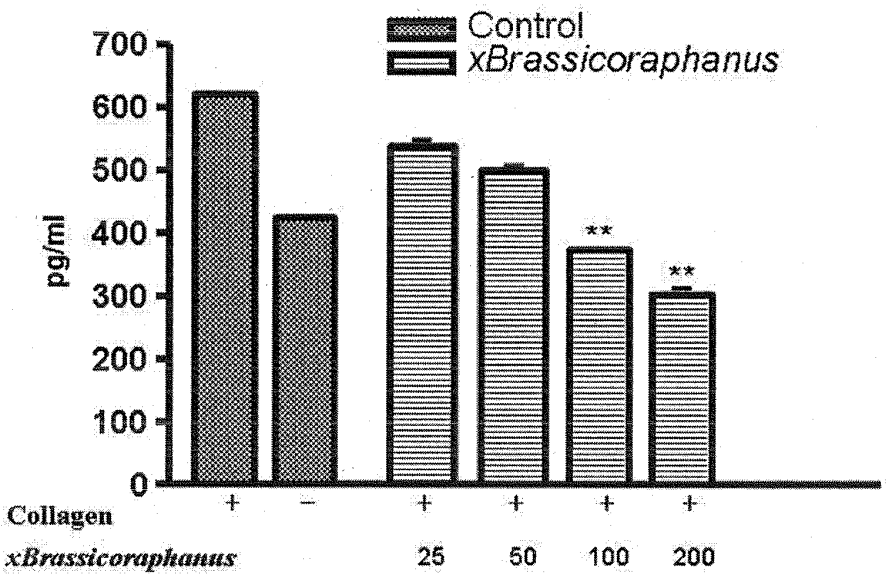
(f)



Collagen +

xBrassico-raphanus 200

도면3


Control
xBrassicoraphanus
700
600
500
400
300
200
100
0
pg/ml
**
**
Collagen
xBrassicoraphanus
+
−
+
+
+
+
25
50
100
200