(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045089
(43) 공개일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/481 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/232 (2006.01) *A61K 36/428* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/481 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0016503
(22) 출원일자 2016년02월12일
심사청구일자 2016년02월12일
(30) 우선권주장
1020150144142 2015년10월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고성규
서울 강남구 도곡로 404 롯데캐슬리베아파트 101동 702동
조성국
서울특별시 광진구 아차산로 549 1009동 2102호 (광장동,현대파크빌아파트)
최형심
경기도 의정부시 회룡로 105번길 37 신원아파트 103동 1709호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 6 항

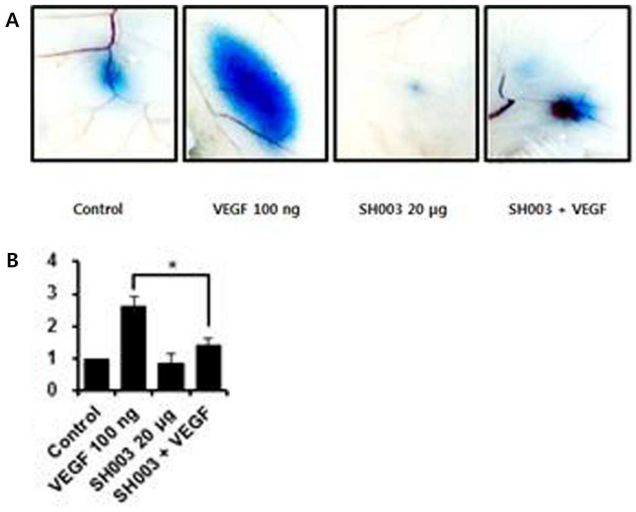
(54) 발명의 명칭 **혼합 생약 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 혈관 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 혈관내피세포에는 독성을 나타내지 않지만, 혈관내피세포에 의한 혈관생성을 억제하는 효과를 가지고 있으므로, 정상 세포에 독성을 나타내는 등의 다른 부작용 없이 혈관 증식성 질환의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 36/232 (2013.01)
A61K 36/428 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 혼합물은 황기, 당귀 및 천화분을 1 내지 5 : 1 내지 5 : 1 내지 5의 중량비로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출물은 신생혈관생성(angiogenesis)을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 혈관 증식성 질환은 복부비만, 각막염, 각막변성, 망막염, 황반변성, 당뇨성 망막증, 녹내장, 류마티스성 관절염 및 척추관절증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것인, 조성물.

청구항 6

황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 혈관 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리 몸의 모든 세포는 혈관으로부터 산소와 영양분을 공급받고 노폐물을 제거하기 때문에 미세혈관은 우리 몸의 구석구석에 그물망처럼 퍼져 있다. 혈관의 가장 안쪽은 내피세포(endothelial cell)로 이루어져 있으며, 이러한 내피세포의 3차원적인 배열에 의거하여 혈관이 생성된다.

[0003] 혈관성 질환은 상기 내피세포의 비정상적 행동에 의해 발생하게 되는데, 혈관의 과도한 생성 또는 혈관 생성의 과도한 억제가 그 원인이 된다. 혈관이 과도하게 생성되는 혈관 증식성 질환으로는 암, 당뇨성 망막증, 건선, 류마티스성 관절염, 만성 염증 등의 질환이 알려져 있고, 반대로 혈관 생성 억제성 질환으로는 심근경색, 뇌경색 등의 허혈 또는 외상 등으로 인하여 손상된 조직의 재생지연 증상 등을 들 수 있다.

[0004] 상술한 바와 같이, 혈관의 생성은 다양한 질환의 원인이 된다는 보고가 발표됨에 따라, 신생혈관생성을 억제하는 기작은 다양한 치료제의 타겟이 되고 있다. 현재 사용되는 신생혈관생성의 억제제는 특정한 혈관 형성촉진인자의 활성을 감소시키거나, 혈관내피세포의 성장을 억제시켜 고사를 유도하거나, 또는 혈관형성 촉진인자나 내피세포 생존인자들을 조절하는 간접인자들의 작용을 억제하는 등의 방법을 이용하고 있다. 그러나, 이러한 혈관생성 치료제는 상처 치료, 또는 심장이나 신장 기능에 영향을 미치는 등의 많은 부작용을 가지고 있어, 부작용 없는 혈관성 질환의 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0005] 한편, 황기(*Astragalus membranaceus*)는 쌍떡잎식물 장미목 콩과의 여러해살이풀로, 한국, 일본, 만주, 중국 북동부, 시베리아 동부 등지에 분포한다. 흔히 약초로서 재배하며, 한방에서는 가을에 채취하여 노두와 잔뿌리를 제거하고 햇빛에 말린 것을 한약재의 황기라 하고, 껍질을 벗기지 않고 그대로 쓰는 것이 약효가 더 좋다고 알려져 있다. 강장, 지한, 이뇨, 소종 등의 효능이 있어 신체 허약, 피로 권태, 식은땀 등에 처방한다. 또한, 황기 추출물이 혈관내피세포의 Tie2를 활성화시킴으로써 혈관신생을 억제하고, 혈관을 성숙화, 정상화 및 안정화시키는 효과가 있음이 보고된 바 있다(한국 공개특허 10-2014-0009278).

[0006] 당귀(*Angelica gigas*)는 미나리과에 속하는 다년생 풀인 당귀의 뿌리를 말린 것으로, 맛은 달고 매우며 성질은 따뜻하다. 당귀의 효능에는 피가 부족할 때 피를 생성해주는 보혈작용이 있으며, 당귀는 관상동맥의 혈류량을 촉진시키고, 적혈구 생성을 왕성하게 한다. 또한, 참당귀 뿌리 50% 에탄올 추출물이 대동맥 평활근 세포의 증식을 억제함으로써 혈관평활근세포의 이상 증식에 의해 직접적으로 발생되는 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증 등의 치료에 사용될 수 있음이 보고된 바 있다(한국 공개특허 10-2010-0047544).

[0007] 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Maximowicz)은 호노과(박과, Cucurbitaceae)에 속한 다년생 하눌타리 또는 노랑하눌타리의 피층을 벗긴 뿌리를 말한다. 냄새가 없고 맛은 쓰고 시며 성질은 차다. 열로 인해 진액이 손상되었을 때 소갈증, 종기, 농을 치료한다. 주로 폐와 위의 열을 내리며 진액을 만들어 갈증을 해소하고 신체를 윤택하게 한다.

[0008] 상술한 바와 같이 황기, 당귀 및 천화분은 그의 다양한 약리 효과가 알려져 있으나, 이들 혼합 추출물의 혈관성 질환에 대한 효과는 밝혀진 바 없으며, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.

[0009] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 혈관 증식성 질환의 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 황기, 당귀 및 천화분의 생약 추출물이 정상 혈관내피세포에는 독성을 나타내지 않으면서 혈관내피세포에 의한 혈관생성만을 억제하는 우수한 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 용어, "황기"란, 학명 '*Astragalus membranaceus*'으로 일컬어지는 식물; "당귀"란, 학명 '*Angelica gigas*'로 일컬어지는 식물; 및 "천화분"이란, 학명 '*Trichosanthes kirilowii* Maximowicz'으로 일컬어지는 식물을 각각 의미한다.

[0015] 본 발명에서, 상기 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 "SH003"과 동일한 의미로 사용되어 혼용될 수 있으며, 상기 혼합 추출물의 혈관생성억제 활성은 지금까지 전혀 알려진 바 없으며, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[0016] 본 발명에서 상기 황기, 당귀 및 천화분은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 용매는 에탄올일 수 있고, 보다 구체적으로 20 내지 40%(v/v) 에탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명에서, 황기, 당귀 및 천화분의 혼합물은 황기, 당귀 및 천화분을 1 내지 7 : 1 내지 7 : 1 내지 7의 중

량비, 구체적으로 1 내지 6 : 1 내지 6 : 1 내지 6의 중량비, 더욱 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5 : 1 내지 5의 중량비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 용어, "추출물"이란, 황기, 당귀 및 천화분의 혼합물을 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0020] 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물에 있어서, 상기 혼합물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 혼합물을 추출하는 데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 알코올을 용매로 사용하는 경우에는 구체적으로 탄소수 1 내지 4의 알코올을 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 상기 추출물은 구체적으로 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, "혈관 증식성 질환"이란, 혈관의 증식이 원인이 되어 발생하는 질환을 의미하는데, 신생혈관생성을 억제한다는 점에서 신생혈관질환(angiogenic disease)과 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 용어, "신생혈관생성(angiogenesis)"이란, 기존에 존재하던 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 생리학적 과정을 의미하며, 본 발명에서 "혈관생성"과 동일한 의미로 사용되어 혼용될 수 있다.

[0025] 상기 혈관 증식성 질환은 새로운 혈관의 생성이 가속화되는 증상을 나타내는 질환을 통칭하여 나타내는데, 일예로서, 새로운 지방세포의 과다한 생성과 생성된 지방세포내의 혈관 생성이 촉진되어 발병되는 복부비만 등의 다양한 비만질환; 각막 등의 안구조직에 과다한 혈관이 생성되어 발병되는 각막염, 각막변성, 황반변성, 당뇨성 망막증, 녹내장 등의 안질환; 연골조직내에 비정상적으로 혈관이 생성되어 발병되는 류마티스성 관절염, 척추관절증 등의 척추질환; 및 혈관 증식인자를 과도하게 분비하여 성장하는 암주위로 혈관을 만들어 암세포 성장에 필요한 산소와 양분을 공급받을 뿐 아니라, 이 혈관을 통해 암세포를 다른 기관으로 전이시키게 되는 악성 종양 질환 등을 들 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 마우스의 귀 또는 등 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 검증하여, 마우스의 귀 피부 내 신생혈관생성을 억제함을 확인하였는 바, 본 발명에서 제공하는 약학 조성물이 복부비만과 같이 피하지방의 축적시에 비정상적인 혈관신생이 유도되는 질환에 대하여도 예방 또는 치료효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0026] 본 발명의 용어, "예방"이란, 상기 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 혈관증식성 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명의 용어, "치료"란, 상기 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 혈관 증식성 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물의 신생혈관생성 억제 효과를 확인하기 위하여 혈관내피세포에 상기 추출물을 처리한 결과, 혈관내피세포의 이동, 튜브 형성 및 세포 침윤을 억제함을 확인하였고, 마우스의 귀 또는 등 피부에서 신생혈관생성을 억제함을 확인하였다(도 2 내지 5, 및 도 8 내지 9).

[0029] 또 다른 일 실시예에서, 혼합 생약 추출물을 구성하는 황기, 당귀 및 천화분을 각각 5:1:1, 1:5:1 또는 1:1:5의 중량비로 포함하는 추출물 또한 신생혈관생성 억제 활성에 대하여 1:1:1의 중량비로 포함하는 추출물과 동일한 효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 10). 이는, 각 구성성분의 중량비를 변경하여 제조된 혼합 생약 추출물도 HUVEC의 이동뿐만 아니라, HUVEC의 튜브 형성, HUVEC의 침윤 및 in vivo 동물 모델의 신생혈관생성을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0030] 따라서, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 신생혈관의 생성을 억제하는 효과를 가지므로, 상기 신생혈관에 의하여 발병되는 질환인 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0031] 상기 목적을 해결하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 혈관 증식성 질환이 발병될

가능성이 있거나 또는 발병이 의심되는, 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 상기 추출물을 포함하는 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명의 용어 "개체"란, 혈관 증식성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 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. 예를 들면, 상기 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 유효성분으로 1일 0.01 내지 500 ㎎/㎏으로, 구체적으로 10 내지 100 ㎎/㎏의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.001 내지 50% 중량 백분율로 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0036] 본 발명의 혈관 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0039] 상기 목적을 해결하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 추출물 및 혈관 증식성 질환의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0040] 본 발명의 용어 "개선"이란 상기 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0041] 본 발명의 상기 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0042] 구체적으로, 상기 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이

스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0043] 또한, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 그 밖에 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0044] 상기 식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안정처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의해 판정한다.

[0045] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀롤로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0046] 이때, 상기 식품 조성물을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 구체적으로 식품 100 중량%에 0.01 내지 10 중량% 포함되도록 첨가할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분을 포함하는 생약 추출물이 혈관내피세포에는 독성을 나타내지 않지만, 혈관내피세포에 의한 혈관생성을 억제하는 효과를 가지고 있으므로, 정상 세포에 독성을 나타내는 등의 다른 부작용 없이 혈관 증식성 질환의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명의 생약 추출물(SH003)을 구성하고 있는 생약 목록을 나타낸 표이다. 본 발명의 생약 추출물은 황기, 당귀 및 천화분을 포함하고 있다.

도 2는 본 발명의 SH003이 혈관내피성장인자(VEGF)에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 생장에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 SH003이 VEGF에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 이동성(migration)에 미치는 영향을 나타내는데, A는 HUVEC의 세포 이동을 보여주는 이미지이고, B는 이동한 HUVEC의 수를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 SH003이 VEGF에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 혈관 생성 능력에 미치는 영향을 나타내는데, A는 HUVEC가 형성한 튜브를 보여주는 이미지이고, B는 HUVEC가 형성한 튜브의 수를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 SH003이 VEGF에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 침윤성(invasion)에 미치는 영향을 나타내는데, A는 매트리겔(matrigel)을 침윤한 HUVEC를 보여주는 이미지이고, B는 상기 매트리겔을 침윤한 HUVEC의 수를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 SH003이 혈관내피세포 HUVEC 내 신생혈관생성 관련 신호 기전에 미치는 영향을 나타낸 이미지로서, A는 NF-κB 신호전달 관련 단백질의 인산화 정도를 보여주는 이미지이고, B는 STAT3 신호전달 관련 단백질의 인산화 정도를 보여주는 이미지이다.

도 7은 본 발명의 SH003이 혈관내피세포 HUVEC 내 종양신생혈관 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 이미지로서, A는 VEGF 50 ng/㎖ 및 SH003 20 ㎍/㎖을 시간별로 처리한 결과를 나타내며, B는 SH003를 농도별로 처리한 결과를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 SH003이 마우스의 귀 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 나타내는데, A는 신생혈관을 에반스 블루를 이용하여 염색한 이미지이고, B는 상기 염색된 에반스 블루의 양을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 본 발명의 SH003이 마우스의 등 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 나타내는데, A는 신생혈관을 에반스 블루(evans blue)를 이용하여 염색한 이미지이고, B는 상기 염색된 에반스 블루의 양을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 본 발명의 SH003를 구성하는 황기, 당귀 또는 천화분의 혼합비를 달리하여 제조한 추출물이 VEGF에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 이동성에 미치는 영향을 나타내는 이미지 및 그래프로서, A는 HUVEC의 세포 이동을 보여주는 이미지이고, B는 이동한 HUVEC의 수를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **제조예 1. 혼합 생약 추출물의 제조**

[0051] 도 1에 나타낸 바와 같이, 황기 1g, 당귀(當歸) 1g 및 천화분(天花粉) 1g을 이용하여 혼합 생약 추출물을 제조하였다.

[0052] 본 발명의 조성물에서 유효성분인 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 하기와 같은 방법으로 수득될 수 있다.

[0053] 먼저, 황기, 당귀 및 천화분을 물로 세척하여 이물질을 제거하였다. 이후, 상기 황기, 당귀 및 천화분을 혼합한 후, 20배 부피의 30%(v/v) 에탄올을 가하여 완전히 침지하였다. 상기 추출물을 여과 및 감압 농축하여 최종 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물을 수득하였다.

[0054] **실시예 1. 혈관내피세포의 생장에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0055] 본 발명의 혼합 생약 추출물(SH003)이 혈관내피세포의 생장에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor; VEGF)와 혼합 생약 추출물을 처리하였다.

[0056] 구체적으로, 96-웰 플레이트(96-well plates)에서 배양한 혈관내피 세포주인 HUVEC에 50 ng/㎖의 VEGF와 5 내지 50 ㎍/㎖의 혼합 생약 추출물을 처리한 후, 24시간 동안 37℃, 5% CO_2조건에서 배양하였다. 그 후, MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 각각의 세포에 처리하고 2시간 동안 더 배양한 후, 상층액을 제거하고 100 ㎕의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하였다. 최종적으로 590nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 어떠한 물질도 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, SH003의 농도가 높아지더라도 세포의 생존능은 감소하지 않았고, 이를 통해 본 발명의 혼합 생약 추출물은 농도에 상관없이 혈관내피세포의 생장에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0058] **실시예 2. 혈관내피세포의 이동성(migration)에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0059] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 혈관내피세포의 이동성에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 스크래칭 어세이(scratching assay)를 수행하였다.

[0060] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC을 12-웰 플레이트에서 배양한 후, 세포를 긁어 내어 세포 사이에 간격을 만들었다. 상기 세포에 50 ng/㎖의 VEGF와 10 내지 50 ㎍/㎖의 혼합 생약 추출물을 처리하여 9.5 시간 동안 배양한 후, 이동한 세포의 수를 측정하였다.

[0061] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, SH003의 농도가 높아질수록 이동한 세포의 수가 감소하였고, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 혈관내피 세포주인 HUVEC의 세포 이동을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0062] **실시예 3. 혈관내피세포의 혈관 생성에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0063] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 혈관내피세포의 혈관 생성에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 튜브 형성(tube formation) 어세이를 수행하였다.

[0064] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC을 매트리겔(matrigel)이 미리 코팅된 위쪽 챔버(upper chamber)에서 배양한 후, 50 ng/㎖의 VEGF와 10 내지 50 ㎍/㎖의 혼합 생약 추출물 처리하여 6시간 동안 배양한 후, 형성된 튜브 수를 측정하였다.

[0065] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, SH003의 농도가 높아질수록 혈관내피세포에 의하여 형성된 튜브의 수가 감소하였고, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 혈관내피 세포주인 HUVEC의 튜브 형성 능력을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0066] **실시예 4. 혈관내피세포의 침윤(invasion)에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0067] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 혈관내피세포의 침윤에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 침윤 어세이(invasion assay)를 수행하였다.

[0068] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC을 매트리겔(matrigel)이 미리 코팅된 위쪽 챔버(chamber)에서 배양한 후, 50 ng/㎖의 VEGF와 10 내지 50 ㎍/㎖의 혼합 생약 추출물 처리하여 7일 동안 배양하였다. 이후, 침윤된 세포를 크리스탈 바이올렛(cristal violet)으로 염색하였고, 그 수를 측정하였다.

[0069] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, SH003의 농도가 높아질수록 침윤한 세포의 수가 감소하였고, 이를 통해 본 발명의 혼합 생약 추출물은 혈관내피 세포주인 HUVEC의 세포 침윤을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0070] **실시예 5. 혈관내피세포 내 신생혈관형성 신호 전달 기전에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0071] **실시예 5-1. NF-κB 신호 전달 기전에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0072] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 혈관내피세포 내 신생혈관형성 기전과 관련된NF-κB 신호 전달 기전에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 단백질 발현 어세이를 수행하였다.

[0073] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 VEGF 50 ng/㎖와 SH003 20 ㎍/㎖을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 세척하여 단백질을 얻어 전기영동한 후, p-IKKα/β, IKKα, p-IκBα, IκBα, p-NF-κB, NF-κB 또는 α-tubulin 항체를 이용하여 세포 내에서 발현되는 단백질의 양을 비교하였다.

[0074] 그 결과, 도 6의 A에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 혈관내피세포 내 신생혈관형성 기전에 관련하는 NF-κB의 인산화를 억제함을 확인하였다.

[0075] **실시예 5-2. STAT3 신호 전달 기전에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0076] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 혈관내피세포 내 신생혈관형성 기전과 관련된 STAT3 신호 전달 기전에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 단백질 발현 어세이를 수행하였다.

[0077] 구체적으로, 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 전기영동한 후, p-STAT3, STAT3 또는 α-tubulin 항체를 이용하여 세포 내에서 발현되는 단백질의 양을 비교하였다.

[0078] 그 결과, 도 6의 B에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 혈관내피세포 내 신생혈관형성 기전에 관련하는 STAT3의 인산화를 억제함을 확인하였다.

[0079] **실시예 6. 혈관내피세포 내 신생혈관형성 관련 유전자의 발현에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0080] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 혈관내피세포 내 신생혈관생성과 관련된 유전자(MMP-9, Bcl-2, Cyclin D1 및 Cox-2)의 발현에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 단백질 발현 어세이를 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 VEGF 50 ng/㎖와 혼합 생약 추출물 20 ㎍/㎖을 처리하여 4 내지 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 세척하여 단백질을 얻어 전기영동한 후, MMP-9, Bcl-2, Cyclin D1, Cox-2 또는 α-tubulin 항체를 이용하여 세포 내에서 발현되는 단백질의 양을 비교하였다.

[0082] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 MMP-9 단백질 발현을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[0083] **실시예 7. 인비보(in vivo) 동물 모델에서 신생혈관생성에 대한 혼합 생약 추출물의 영향 분석**

[0084] 본 발명의 혼합 생약 추출물이 마우스의 귀 또는 등 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 에반스 블루(evans blue) 어세이를 수행하였다.

[0085] 구체적으로, 마우스의 귀 또는 등 피부 혈관에 VEGF 50 ng/㎖와 SH003 20 ㎍/㎖을 처리하였고, 30분 후, 에반스 블루를 주입하였다. 마우스를 희생시켜 귀 또는 등 조직을 분리하여 사진을 촬영하였고, 이후, 포름아마이드(formamide)에 24시간 동안 담가 귀 또는 등 조직에서 빠져 나온 에반스 블루 용액을 측정하였다.

[0086] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 SH003을 처리한 그룹에서는 VEGF를 처리한 그룹에 비하여 에반스 블루로 염색된 정도가 감소하였고, 이를 통해 SH003은 마우스의 귀 피부 내 신생혈관생성을 억제함을 확인하였다. 또한, 도 9에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 SH003을 처리한 그룹에서는 VEGF를 처리한 그룹에 비하여 에반스 블루로 염색된 정도가 감소하였고, 이를 통해 상기 혼합 생약 추출물은 마우스의 등 피하 내 신생혈관생성을 억제함을 확인하였다.

[0087] 상기 결과를 통해, 본 발명의 황기, 당귀 및 천화분의 혼합 추출물은 신생혈관생성 억제에 우수한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0088] **실시예 8. 혼합 생약 추출물의 혼합 비율에 따른 혈관내피세포의 이동성 분석**

[0089] 가장 우수한 신생혈관생성 억제 효과를 나타내는 황기, 당귀 및 천화분의 비율을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0090] 구체적으로, 황기, 당귀 및 천화분을 각각 5:1:1, 1:5:1 또는 1:1:5의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물을 추가로 제조하였다. 이후, 상기 실시예 2에 따른 방법으로 각 추출물들을 이용한 스크래칭 어세이를 수행하였다.

[0091] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 황기, 당귀 및 천화분을 각각 5:1:1, 1:5:1 또는 1:1:5의 중량비로 포함하는 혼합물의 추출물은 1:1:1의 중량비로 포함하는 추출물과 유사하거나 더 우수한 정도로 혈관내피세포인 HUVEC의 세포 이동을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0092] 상기 결과를 통해, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 황기, 당귀 및 천화분을 5:1:1, 1:5:1 또는 1:1:5의 중량비로 포함하여도 1:1:1의 중량비로 포함하는 추출물과 동일한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는, 각 구성성분의 중량비를 변경하여 제조된 혼합 생약 추출물도 HUVEC의 이동뿐만 아니라, HUVEC의 튜브 형성, HUVEC의 침윤 및 in vivo 동물 모델의 신생혈관생성을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

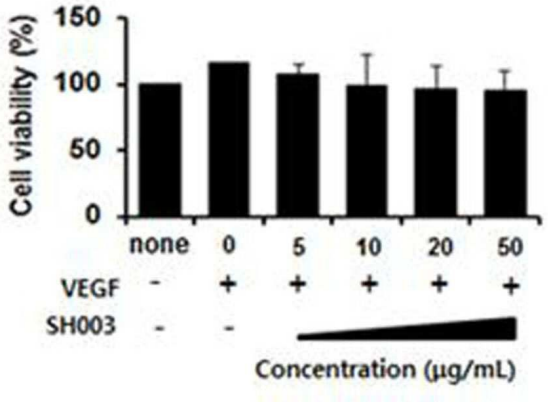
[0093] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

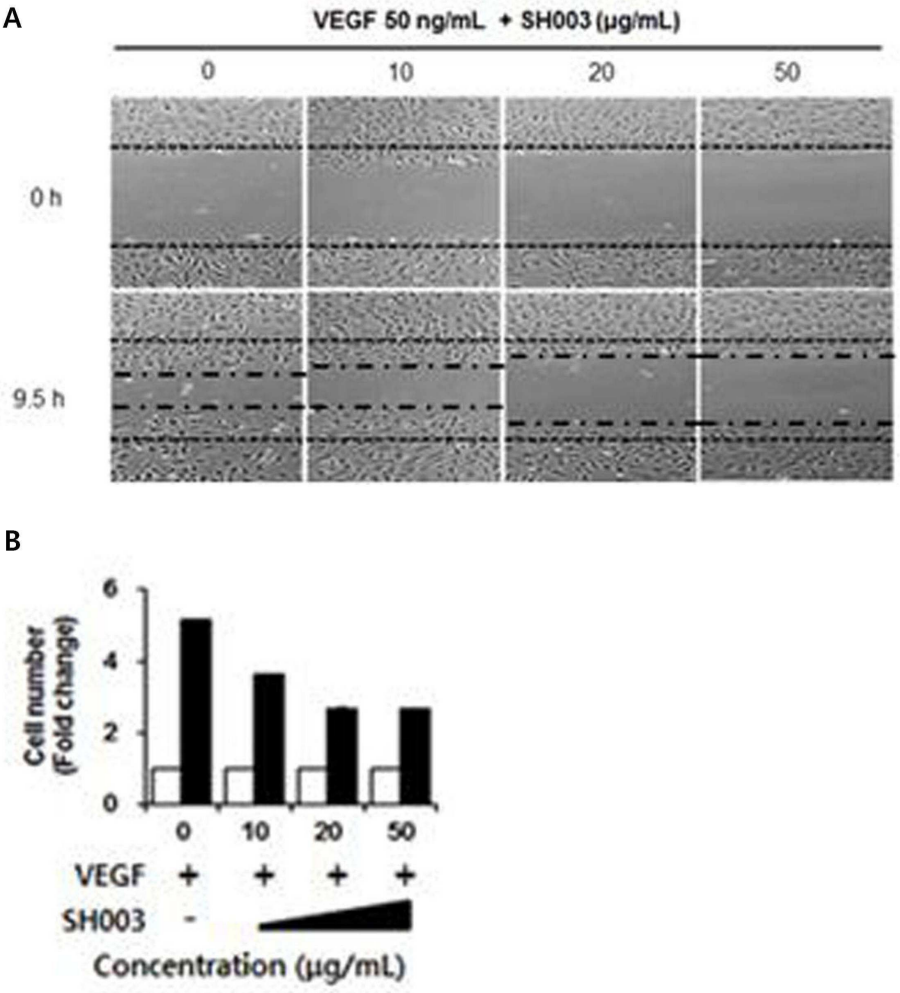
도면1

Korean name	Scientific name	Latin name
黃芪	*Angelica membranaaceus*	Astragali Radix
當歸	*Angelica gigas*	Angelicae Gigantis Radix
天花粉	*Trichosanthes Kirilowii* Maximowicz	Trichosanthis Fructus

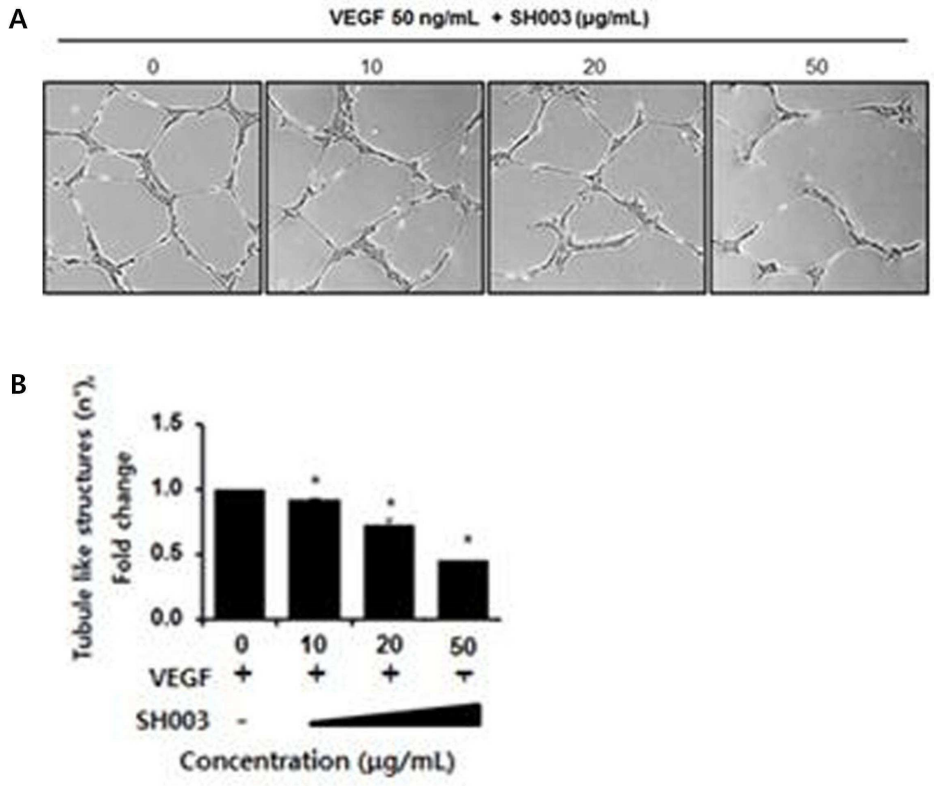
도면2



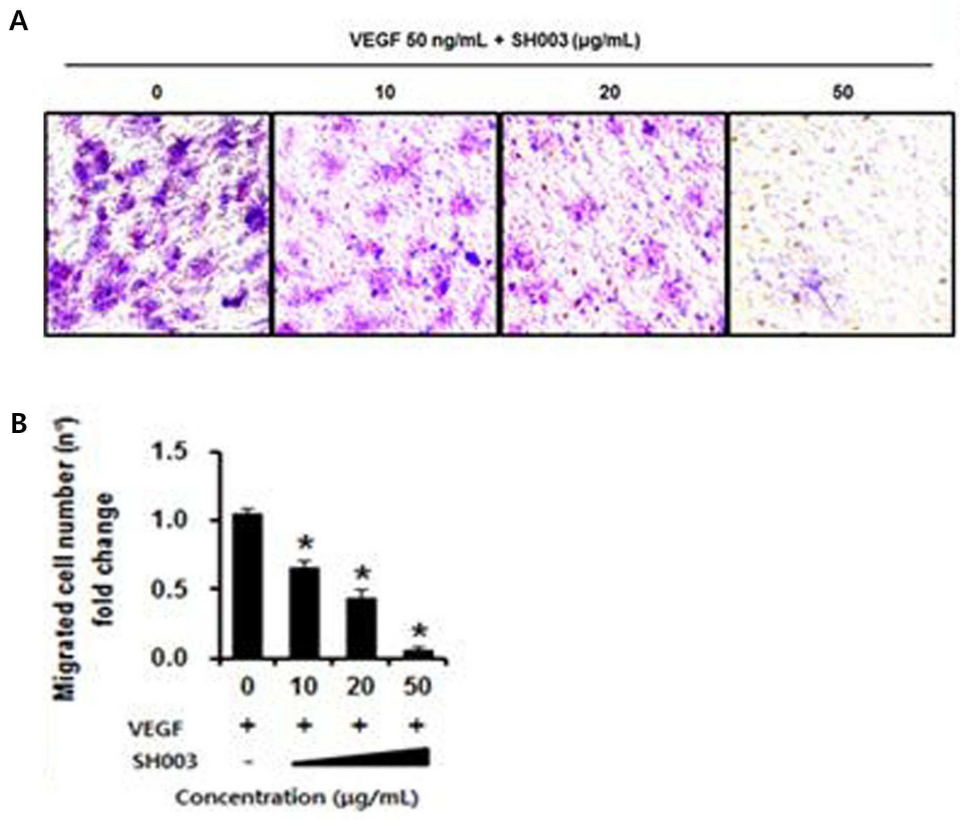
도면3


A
VEGF 50 ng/mL + SH003 (μg/mL)
0
10
20
50
0 h
9.5 h
B
Cell number (Fold change)
6
4
2
0
0
10
20
50
VEGF + + + +
SH003 -
Concentration (μg/mL)

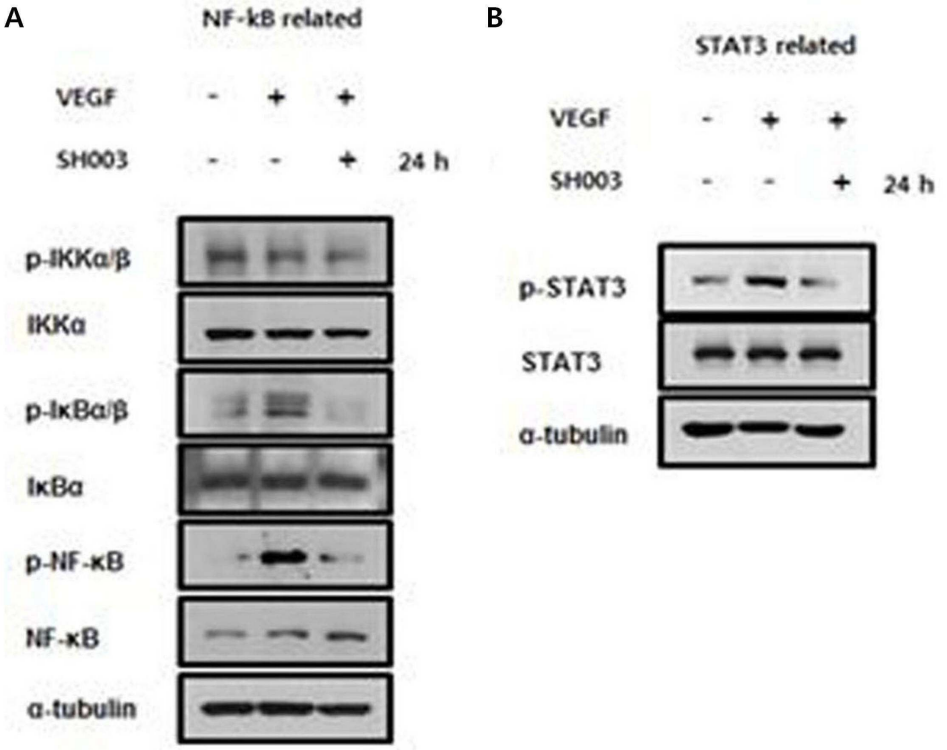
도면4


A
VEGF 50 ng/mL + SH003 (μg/mL)
0
10
20
50
B
Tubule like structures (n°), Fold change
1.5
1.0
0.5
0.0
0
10
20
50
VEGF + + + +
SH003 -
Concentration (μg/mL)

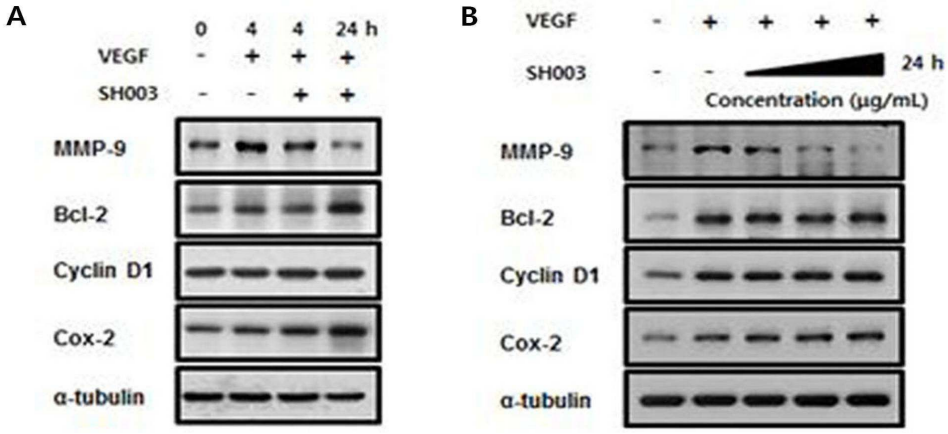
도면5


A
VEGF 50 ng/mL + SH003 (μg/mL)
0
10
20
50
B
Migrated cell number (n°) fold change
1.5
1.0
0.5
0.0
0
10
20
50
VEGF + + + +
SH003 -
Concentration (μg/mL)

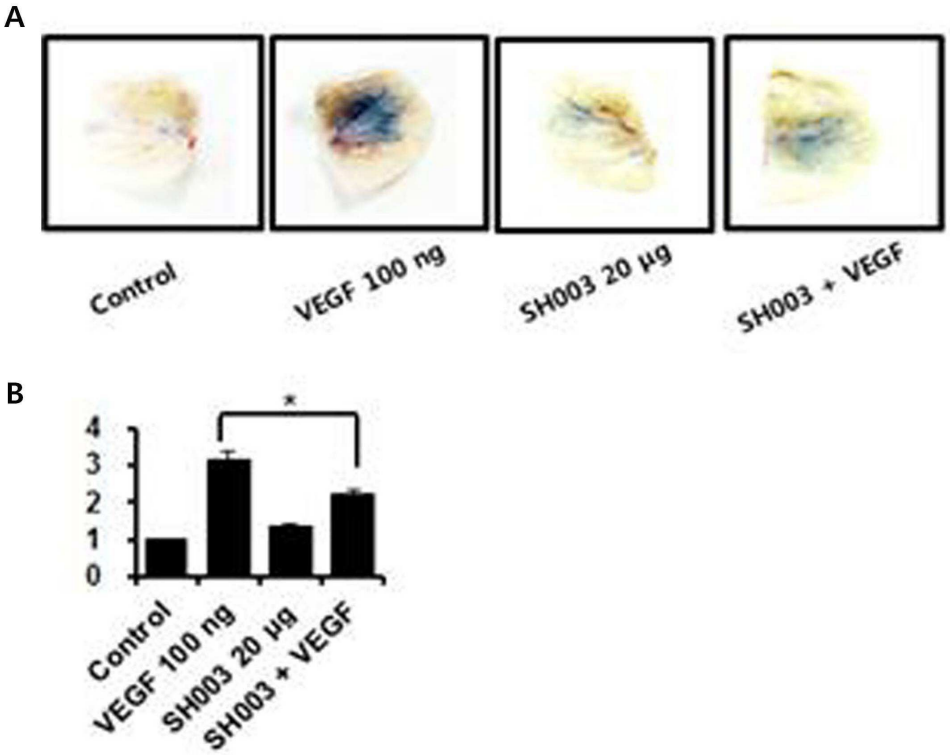
도면6


A
NF-kB related
VEGF - + +
SH003 - - + 24 h
p-IKKα/β
IKKα
p-IκBα/β
IκBα
p-NF-κB
NF-κB
α-tubulin
B
STAT3 related
VEGF - + +
SH003 - - + 24 h
p-STAT3
STAT3
α-tubulin

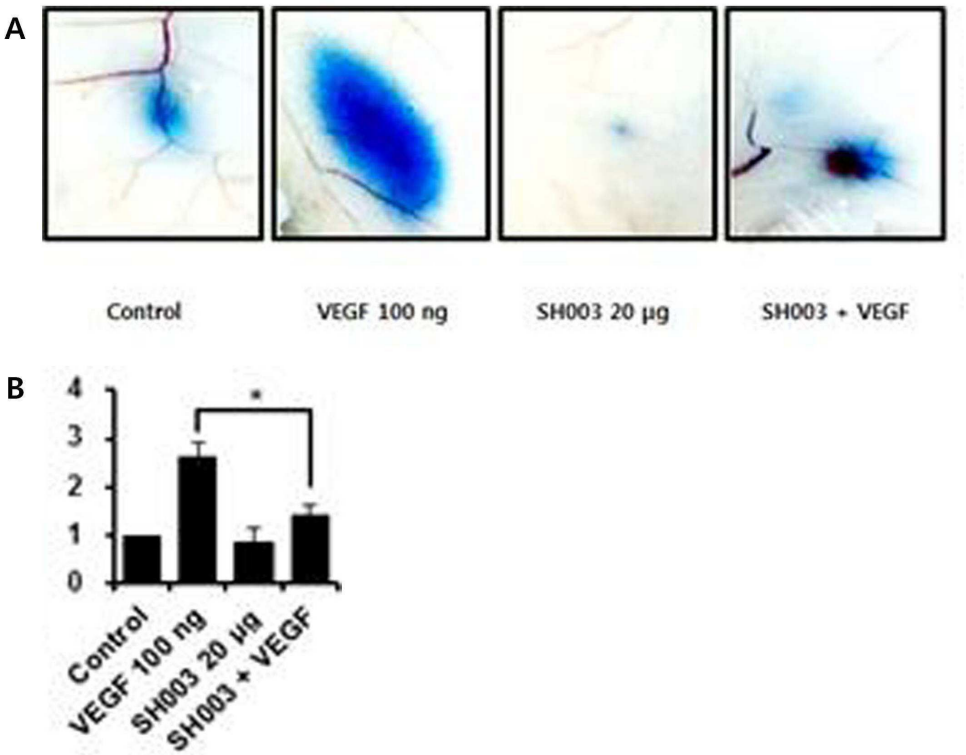
도면7


A
0 4 4 24 h
VEGF - + + +
SH003 - - + +
MMP-9
Bcl-2
Cyclin D1
Cox-2
α-tubulin
B
VEGF - + + + +
SH003 - - 24 h
Concentration (μg/mL)
MMP-9
Bcl-2
Cyclin D1
Cox-2
α-tubulin

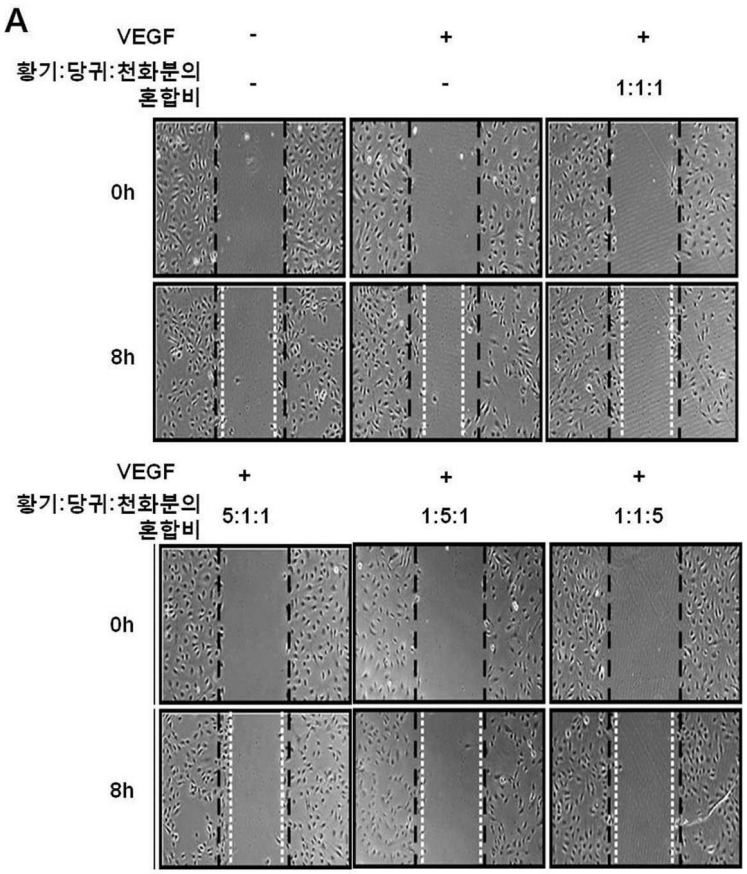
도면8

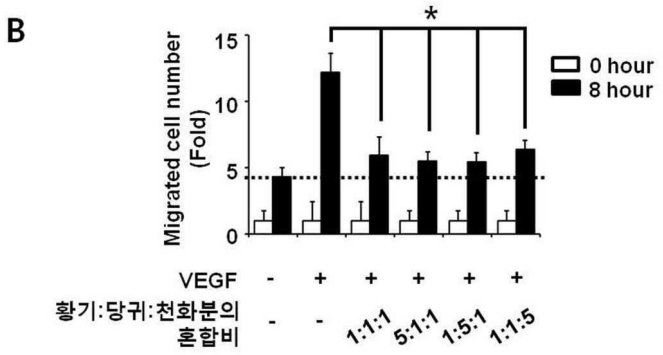

A
Control
VEGF 100 ng
SH003 20 μg
SH003 + VEGF
B
*
4
3
2
1
0
Control
VEGF 100 ng
SH003 20 μg
SH003 + VEGF

도면9


A
Control
VEGF 100 ng
SH003 20 μg
SH003 + VEGF
B
*
4
3
2
1
0
Control
VEGF 100 ng
SH003 20 μg
SH003 + VEGF

도면10


A
VEGF
황기:당귀:천화분의 혼합비
0h
8h
5:1:1
1:5:1
1:1:5


B
Migrated cell number (Fold)
0 hour
8 hour
VEGF
황기:당귀:천화분의 혼합비
1:1:1
5:1:1
1:5:1
1:1:5