



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045088
(43) 공개일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/232 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A61K 36/26 (2006.01) A61K 36/484 (2006.01)

A61K 36/54 (2006.01) A61K 36/65 (2006.01)

A61K 36/754 (2006.01) A61K 36/9068 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/232 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0016499

(22) 출원일자 2016년02월12일

심사청구일자 2016년02월12일

(30) 우선권주장

1020150144141 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 7 항

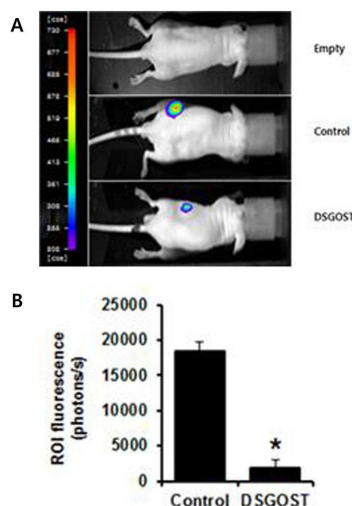
(54) 발명의 명칭 당귀사역가오수유생강탕을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 신생혈관생성 억제용 조성물 및 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 혈관 내피세포에는 독성을 나타내지 않지만, 종양 주변의 혈관내피세포에 의한 혈관생성을 억제함으로써 종양형성을 억제하는 효과를 가지고 있으므로, 암세포 이외의 정상 세포에 독성을 나타내는 등의 다른 부작용 없이 암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 36/26 (2013.01)

A61K 36/484 (2013.01)

A61K 36/54 (2013.01)

A61K 36/65 (2013.01)

A61K 36/754 (2013.01)

A61K 36/9068 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합비는 3 내지 9 : 3 내지 9 : 3 내지 9 : 3 : 2 : 2 내지 6 : 5 : 2 : 4의 중량비인 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암은 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 암은 췌장암인 것인, 약학 조성물.

청구항 6

당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신생혈관생성 억제용 조성물.

청구항 7

당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 신생혈관생성 억제용 조성물 및 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

우리 몸의 모든 세포는 혈관에서 산소와 영양분을 공급받고 노폐물이 제거된다. 암세포 또한 혈관으로부터 영양분을 공급받는데, 암세포는 매우 급속히 성장하기 때문에 매우 많은 양의 양분을 필요로 하여, 비정상적이고 과도하게 혈관 증식을 하게 된다. 암의 성장과 전이는 신생혈관생성 의존적임에 따라 신생혈관생성 억제 치료법은 고형암(solid tumor)의 새로운 치료제가 될 수 있을 것이라는 가설이 제안된 이후(Folkman J., N Engl J Med.,

1971 Nov 18;285(21):1182-6), 새로운 개념의 암 치료제를 개발하기 위해 많은 연구가 진행되었다. 즉, 암세포의 성장에는 새로이 생기는 혈관이 필수적이므로, 혈관 형성 억제 인자를 사용하여 혈관이 새롭게 형성되는 과정을 봉쇄함으로써 암의 성장을 억제함과 동시에 암 전이의 루트를 차단하는 것이다.

- [0003] 혈관의 가장 안쪽은 내피세포(endothelial cell)로 이루어져 있으며, 이러한 내피세포의 3차원적인 배열에 의거하여 혈관이 생성된다. 체내에서의 혈관 신생은 태아기에 비해 성인이 되면서 크게 줄어들지만, 성인에서의 혈관 신생은 많은 질환의 진행과 치료에 중요한 역할을 한다. 예를 들면 암, 당뇨병 망막증, 건선, 류마티스성 관절염, 만성 염증의 경우에는 혈관 생성 억제제가, 반대로 심근경색, 폐양, 뇌경색, 상처치유의 지연 등의 경우에는 혈관 생성 증가가 필요하다.
- [0004] 한편, 당귀사역가오수유생강탕은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 생약 추출물로서, 주로 냉증에 효과적이라고 알려져 있으며, 이와 관련하여 말초 냉증(BMC Complement Altern Med. 2015 Apr 2;15:105.) 또는 추위나 심리적 변화로 인해 손가락이나 발가락 혈관에 허혈 발작이 생기고 피부 색조가 변하는 질환인 레이노 증후군(Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:549307)을 개선하는 효과가 있다고 알려져 있다.
- [0005] 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.
- [0006] 계지(*Cinnamomi cassia Blume*)는 녹나무과에 속하며 육계나무의 어린가지를 사용해 만든 약재로, 특이한 향기가 있고 껍질부분은 더욱 진하며 약성은 맵고 달며 따뜻하다. 계지는 초기 감기에 피부의 땀구멍을 열어 땀을 내며, 어깨와 등의 통증, 사지 관절의 동통을 완화시켜 주며 기혈의 순환을 촉진 시키고 양기부족을 치료한다.
- [0007] 작약(*Paeonia lactiflora Pallas* (Paeoniaceae))은 미나리아재비과에 속하며 내한성이 강하고 향기가 강한 품종이 많다. 뿌리를 약재로 사용하며 약성은 차고, 맛은 시고 쓰다. 주로 진통, 복통, 월경통, 무월경, 토혈, 빈혈, 타박상 등에 쓰인다.
- [0008] 목통(*Akebia quinata var. polyphylla Nak.*)은 으름덩굴과에 속하며 주피를 제거한 줄기를 말하며, 냄새가 거의 없고 맛은 쓰고 성질은 차다. 목통은 방광의 습열로 인한 신우신염, 방광염, 요도염으로 복수가 찰 때, 심화로 입안에 발진이 날 때, 가슴앓이, 소변이 붉을 때, 마비동통에 사용한다.
- [0009] 세신(*Asarum sieboldii var. seoulense Nakai*)은 쥐방울덩굴과에 속하며 족두리풀의 뿌리를 건조시킨 약재로 특이한 냄새가 있고 혀를 약간 마비시키며 맛은 맵고 성질은 따뜻하다. 세신은 풍한습 두통, 사지마비동통, 복통, 외감성 두통, 오한, 발열, 전신통, 해수, 천식, 가래가 많은 증상, 축농증, 중풍 등에 쓰인다.
- [0010] 감초(*Glycyrrhiza uralensis Fischer* (Leguminosae))는 콩과로 뿌리와 줄기 일부를 껍질이 붙은 채로, 또는 껍질을 벗겨서 사용하며 특이한 냄새가 나며 맛은 달다. 감초는 모든 약의 독성을 조화시켜서 약효가 잘 나타나게 하며 장부의 한열과 사기를 다스리고 모든 혈액의 소통을 잘 시키며 근육과 뼈를 튼튼히 한다.
- [0011] 대조(*Zizyphus jujuba var. inermis Rehder*)는 갈매나무과로 잘 익은 열매를 약재로 이용하며, 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 달고 성질은 평하다. 대조는 간 보호 작용, 이질, 복통, 잘 놀라면서 가슴이 두근거리는 데, 히스테리 마른기침, 입이 마르는 데 등에 쓰이고 약재의 독성을 줄이는 효능을 지닌다.
- [0012] 오수유(*Evodia rutaecarpa var. bodinieri Huang*)는 운향과에 속하며 열매를 약재로 이용하며, 독이 있고 매운 맛이 있다. 만성습진과 피부염에는 분말로 만들어 환부에 붙이면 염증을 제거하고 신생조직의 재생력을 촉진시키며, 건위, 구충, 해독 및 이뇨제로 사용한다.
- [0013] 생강(*Zingiber officinale Rosc.*)은 생강과로 뿌리를 식용과 약용으로 이용하며, 덩어리 모양이고 황색이며 매운맛과 향긋한 냄새가 있다. 생강은 감기로 인한 오한, 발열, 두통, 구토, 해수, 가래를 치료하며 식중독으로 인한 복통, 설사, 복만에도 효과가 있다.
- [0014] 상술한 바와 같이 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강은 그의 다양한 약리 효과가 알려져 있으나, 이들의 혼합 추출물인 당귀사역가오수유생강탕의 항암 효과에 대해서는 밝혀진 바 없으며, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.
- [0015] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 신규한 항암제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물이 종양 주변의 혈관내피세포에 의한 혈관생

성을 억제하고, 이에 따라 암세포의 성장을 억제하는 우수한 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 신생혈관생성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 용어, "당귀"란, 학명 '*Angelica gigas*'로 일컬어지는 식물; "계지"란, 학명 '*Cinnamomi cassia* Blume'로 일컬어지는 식물; "작약"이란, 학명 '*Paeonia lactiflora* Pallas (Paeoniaceae)'로 일컬어지는 식물; "목통"이란, 학명 '*Akebia quinata* var. *polyphylla* Nak.'로 일컬어지는 식물; "세신"이란, 학명 '*Asarum sieboldii* var. *seoulense* Nakai'로 일컬어지는 식물; "감초"란 학명 '*Glycyrrhiza uralensis* Fischer (Leguminosae)'로 일컬어지는 식물; "대조"란, 학명 '*Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder'로 일컬어지는 식물; "오수유"란, 학명 '*Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri* Huang'로 일컬어지는 식물; 및 "생강"은 학명 '*Zingiber officinale* Rosc.'로 일컬어지는 식물을 각각 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 상기 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명에서 제공하는 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물이 나타내는 항암 활성은 지금까지 전혀 알려진 바 없으며, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다. 본 발명자는 상기 추출물의 예시로서 당귀사역가오수유생강탕을 사용하였다.
- [0023] 본 발명의 용어, "당귀사역가오수유생강탕(Danggui-Sayuk-Ga-Osuyu-Saenggang-Tang)"이란, 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강으로 이루어진 혼합물을 열수 추출한 후, 고형성분을 제거한 액상추출물을 의미하는데, 이때 상기 당귀사역가오수유생강탕을 구성하는 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강은 2 내지 10 : 2 내지 10 : 2 내지 10 : 2 내지 4 : 1 내지 3 : 1 내지 7 : 4 내지 6 : 1 내지 3 : 3 내지 5의 중량비로 혼합될 수 있고, 구체적으로 3 내지 9 : 3 내지 9 : 3 내지 9 : 3 : 2 : 2 내지 6 : 5 : 2 : 4의 중량비로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강을 음건하여 세절한 것을 상기 중량비로 혼합한 후, 그 중량의 약 1 내지 20배, 구체적으로 약 9 내지 11배 부피의 물로 50℃ 내지 150℃, 구체적으로 90℃ 내지 110℃의 추출 온도에서 약 1시간 내지 4시간, 구체적으로 1시간 내지 3시간 동안 열수 추출의 방법으로 추출물을 수득한 후, 상기 추출물을 여과하여 고형성분을 제거함으로써 액상추출물인 당귀사역가오수유생강탕을 수득하였다.
- [0025] 본 발명에서, "당귀사역탕가미방" 또는 "DSGOST"과 동일한 의미로 사용되어 혼용될 수 있다. 상기 당귀사역가오수유생강탕의 혈관생성억제 활성 및 종양형성억제 활성은 지금까지 전혀 알려져 있지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.
- [0026] 본 발명의 용어, "추출물"이란, 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합물을 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 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.

- [0027] 본 발명의 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합물의 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.
- [0028] 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.
- [0029] 본 발명의 용어, "분획물"이란, 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 본 발명의 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합물을 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 구체적으로 탄소수 1 내지 4의 알코올을 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 상기 추출물 또는 분획물은 구체적으로 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 용어, "암"이란, 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 종양, 또는 종양을 형성하는 병을 의미한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 암은 본 발명에서 제공하는 당귀사역가오수유생강탕에 의하여 증상이 완화, 경감, 개선 또는 치료될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적인 예로, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으며, 더욱 구체적으로 췌장암일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 용어, "예방"이란, 상기 당귀사역가오수유생강탕을 포함하는 조성물의 투여로 암을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 용어, "치료"란, 상기 당귀사역가오수유생강탕을 포함하는 조성물의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강을 각각 3:3:3:3:2:2:5:2:4의 중량비로 혼합한 혼합물을 100℃에서 2시간 동안 물로 열수 추출한 후, 여과하여 감압 농축하고, 건조함으로써 이들의 혼합 추출물(당귀사역가오수유생강탕)의 분말을 제조하였다(제조예 1).
- [0038] 다른 실시예에서, 상기 당귀사역가오수유생강탕의 신생혈관생성 억제 효과를 확인하기 위하여 혈관내피세포에 상기 당귀사역가오수유생강탕을 처리한 결과, 혈관내피세포의 이동, 튜브 형성 및 세포 침윤을 억제함을 확인하였고, 마우스의 귀 또는 등에서 신생혈관생성을 억제함을 확인하였다(도 2 내지 5, 및 도 9 내지 10). 나아가, 당귀사역가오수유생강탕의 신생혈관생성 억제 효과를 통한 항암 효과를 평가하기 위하여 췌장암을 갖는 마우스에 당귀사역가오수유생강탕을 투여한 결과, 암 조직의 성장이 억제됨을 확인하였다(도 12 내지 13).
- [0039] 또 다른 실시예에서, 당귀사역가오수유생강탕을 구성하는 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강을 각각 9:3:3:3:2:2:5:2:4, 3:9:3:3:2:2:5:2:4, 3:3:9:3:2:2:5:2:4 또는 3:3:3:3:2:6:5:2:4의 중량비로 포함하는 추출물 또한 신생혈관생성 억제 활성화에 대하여 3:3:3:3:2:2:5:2:4의 중량비로 포함하는 추출물과 동일한 효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 17). 이는, 각 구성성분의 중량비를 변경하여 제조된 당귀사역가오수유생강탕도 신생혈관생성을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 인비트로 및 인비보 동물 모델에서 항암 효과를 나타

낼 수 있음을 시사하는 것이다.

- [0040] 따라서, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 암의 성장에 필요한 영양분을 공급받기 위한 수단인 신생혈관의 생성을 억제함으로써 암의 성장을 억제하는 효과를 가지므로, 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0041] 상기 목적을 해결하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 암이 발병되거나 또는 암이 발병될 것으로 예상되는, 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 상기 약학 조성물을 도입하는 것을 의미한다.
- [0043] 본 발명의 용어 "개체"란, 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 암을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 구체적인 예로, 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적으로 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, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 혼합 추출물은 유효성분으로 1일 0.01 내지 500 mg/kg으로, 구체적으로 10 내지 100 mg/kg의 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 혼합 추출물을 0.001 내지 50% 중량 백분율로 포함할 수 있다.
- [0045] 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.
- [0046] 본 발명의 암의 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, 텍스트로즈, 수크로즈, 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.
- [0047] 본 발명의 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 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 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 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.
- [0049] 상기 목적을 해결하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 혼합 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 신생혈관생성 억제용 조성물을 제공한다. 이때, 상기 혼합 추출물 및 분획물의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0050] 본 발명의 용어, "신생혈관생성(angiogenesis)"이란, 기존에 존재하던 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 생

리학적 과정을 의미하며, 본 발명에서는 새로운 혈관을 생성한다는 점에서 "혈관생성"과 동일한 의미로 사용되어 혼용될 수 있다. 상기 신생혈관생성이 과다한 경우에는 이러한 혈관증식으로 인하여 다양한 질환이 발생할 수 있으며, 이처럼 과다한 신생혈관생성이 나타내는 경우, 혈관 증식성 질환이 유발될 수 있으며, 이러한 혈관 증식성 질환은 상기 신생혈관생성 억제용 조성물에 의하여 예방 또는 치료될 수 있다.

[0051] 상기 혈관 증식성 질환은 새로운 혈관의 생성이 가속화되는 증상을 나타내는 질환을 통칭하여 나타내는데, 일 예로서, 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 등의 안질환; 연골조직내에 비정상적으로 혈관이 생성되어 발병되는 류마티스성 관절염, 척추관절증 등의 척추질환 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 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0052] 상기 목적을 해결하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 혼합 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 혼합 추출물, 분획물 및 암의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0053] 본 발명의 용어 "개선"이란 본 발명의 혼합 추출물 또는 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0054] 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.

[0055] 구체적으로, 상기 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0056] 또한, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(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.

[0057] 상기 식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의해 판정한다.

[0058] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0059] 이때, 상기 식품 조성물을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 혼합 추출물 또는 그의 분획물은 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

[0060] 본 발명의 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강의 혼합 추출물 또는 이의 분획물은 혈관 내피세포에는 독성을 나타내지 않지만, 종양 주변의 혈관내피세포에 의한 혈관생성을 억제함으로써 종양형성을 억제하는 효과를 가지고 있으므로, 암세포 이외의 정상 세포에 독성을 나타내는 등의 다른 부작용 없이 암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕(DSGOST)을 구성하고 있는 생약 목록을 나타낸 표이다.

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

도 3은 본 발명의 DSGOST가 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 DSGOST가 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 DSGOST가 VEGF에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 침윤성(invasion)에 미치는 영향을 나타내는데, A는 매트릭셀(matrigel)을 침윤한 HUVEC를 보여주는 이미지이고, B는 상기 매트릭셀을 침윤한 HUVEC의 수를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 DSGOST가 혈관내피세포 HUVEC 내 신생혈관생성 관련 신호 기전에 미치는 영향을 나타낸 이미지이다.

도 7은 본 발명의 DSGOST가 혈관내피세포 HUVEC 내 신생혈관생성 관련 NF- κ B 신호 기전에 미치는 영향을 나타내는데, A는 NF- κ B 유전자의 조절을 확인하기 위해 수행한 리포터 유전자(luciferase) 어세이의 결과를 나타내는 그래프이고, B는 NF- κ B 신호전달 관련 단백질의 인산화 정도를 보여주는 이미지이다.

도 8은 본 발명의 DSGOST가 혈관내피세포 HUVEC 내 종양신생혈관 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 이미지로서, A는 VEGF 50 ng/ml 및 DSGOST 100 μ g/ml을 시간별로 처리한 결과를 나타내며, B는 DSGOST를 농도별로 처리한 결과를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 DSGOST가 마우스의 귀 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 나타내는데, A는 신생혈관을 에반스 블루를 이용하여 염색한 이미지이고, B는 상기 염색된 에반스 블루의 양을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 본 발명의 DSGOST가 마우스의 등 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 나타내는데, A는 신생혈관을 에반스 블루(evans blue)를 이용하여 염색한 이미지이고, B는 상기 염색된 에반스 블루의 양을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 본 발명의 DSGOST가 사람의 채장암세포 Pacn-28의 생존능에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 DSGOST가 채장암 동물 모델에서 실험기간 동안 암 조직의 성장에 미치는 영향을 나타낸다. 채장암 동물 모델은 형광을 발현하는 채장암 세포주 Panc-28-luc를 주사하여 제작하였는데, A는 마우스 내에 존재하는 채장암 세포주 Panc-28-luc가 발현하는 형광을 보여주는 이미지이며, 암 조직의 크기는 형광의 크기 및 세기에 비례한다. 또한, B는 상기 형광의 세기를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 본 발명의 DSGOST가 채장암 동물 모델에서 실험기간 동안 암 조직의 크기 변화에 미치는 영향을 나타내는데, A는 실험이 종료된 이후에 마우스에서 분리한 암 조직을 보여주는 이미지이고, B는 실험기간 동안 측정된 암의 크기 변화를 나타내는 그래프이다.

도 14는 본 발명의 DSGOST가 채장암 동물 모델에서 실험기간 동안 마우스의 체중 변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 15는 채장암 동물 모델의 암 조직의 병리 변화를 관찰한 결과를 나타낸 이미지이다.

도 16은 채장암 동물 모델의 암 조직 내 형성된 신생혈관 수를 항-CD-31 염색 결과를 바탕으로 나타낸 그래프이다.

도 17은 본 발명의 DSGOST를 구성하는 성분 중에서, 당귀, 계지, 작약 또는 감초의 혼합비를 달리하여 제조한 추출물이 VEGF에 의한 혈관내피세포 HUVEC의 이동성에 미치는 영향을 나타내는 이미지 및 그래프로써, A는 HUVEC의 세포 이동을 보여주는 이미지이고, B는 이동한 HUVEC의 수를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 제조예 1. 당귀사역가오수유생강탕의 제조

[0064] 도 1에 나타난 바와 같이, 당귀(當歸), 계지(桂枝), 작약(芍藥), 목통(木通), 세신(細辛), 감초(甘草), 대조(大棗), 오수유(吳茱萸) 및 생강(生薑)을 이용하여 당귀사역가오수유생강탕(Danggui-Sayuk-Ga-Osuyu-Saenggang-

Tang, DSGOST)을 제조하였다.

- [0065] 구체적으로, 당귀의 뿌리 1g, 계지의 피층(cortex) 1g, 작약의 뿌리 1g, 목통의 뿌리 1g, 세신 0.67g, 감초 0.67g, 대조 1.67g, 오수유의 열매 0.67g 및 생강의 뿌리 1.33g의 혼합물을 가루로 만들고, 100℃에서 10배의 물로 2시간 동안 추출하였다. 그 후, 추출물을 필터로 거르고, 감압 농축하고 건조하여 당귀사역가오수유생강탕의 분말을 제조하였다.
- [0066] **실시예 1. 신생혈관생성에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0067] **실시예 1-1. 혈관내피세포의 성장에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0068] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포의 성장에 미치는 영향을 검증하기 위하여 혈관내피세포에 혈관내피성장인자 및 당귀사역가오수유생강탕을 처리하였다.
- [0069] 구체적으로, 96-웰 플레이트(96-well plates)에서 배양한 혈관내피 세포주인 HUVEC에 50 ng/ml의 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor; VEGF)와 50 내지 200 μ g/ml의 당귀사역가오수유생강탕(Danggui-Sayuk-Ga-Osuyu-Saenggang-Tang; DSGOST)을 처리하였고, 24시간 동안 37℃, 5% CO₂조건에서 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 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하였다. 최종적으로 590nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 아무 물질도 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.
- [0070] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 농도에 관계없이 혈관내피세포의 성장에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
- [0071] **실시예 1-2. 혈관내피세포의 이동성(migration)에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0072] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포의 이동성에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 스크래칭 어세이(scratching assay)를 수행하였다.
- [0073] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC을 12-웰 플레이트에서 배양한 후, 세포를 긁어내어 세포 사이에 간격을 만들었다. 상기 세포에 50 ng/ml의 VEGF와 50 내지 200 μ g/ml의 DSGOST를 처리하여 9.5 시간 동안 배양한 후, 이동한 세포의 수를 측정하였다.
- [0074] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 혈관내피 세포주인 HUVEC의 세포 이동을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0075] **실시예 1-3. 혈관내피세포의 혈관 생성에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0076] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포의 혈관 생성에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 튜브 형성(tube formation) 어세이를 수행하였다.
- [0077] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC을 매트릭셀(matrigel)이 미리 코팅된 위쪽 챔버(upper chamber)에서 배양한 후, 50 ng/ml의 VEGF와 50 내지 200 μ g/ml의 DSGOST를 처리하여 6시간 동안 배양한 후, 형성된 튜브 수를 측정하였다.
- [0078] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 혈관내피 세포주인 HUVEC의 튜브 형성능력을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0079] **실시예 1-4. 혈관내피세포의 침윤(invasion)에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0080] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포의 침윤에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 침윤 에세이를 수행하였다.
- [0081] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC을 매트릭셀(matrigel)이 미리 코팅된 위쪽 챔버에서 배양한 후, 50 ng/ml의 VEGF와 50 내지 200 μ g/ml의 DSGOST를 처리하여 7일 동안 배양하였다. 이후, 침윤된 세포를 크리스탈 바이올렛(cristal violet)으로 염색하였고, 그 수를 측정하였다.
- [0082] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 혈관내피 세포주인 HUVEC의 세포 침윤을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0083] **실시예 1-5. 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 신호 기전에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0084] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 신호 기전에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 단

백질 발현 에세이를 수행하였다.

- [0085] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 VEGF 50 ng/ml와 DSGOST 100 μ g/ml을 처리하여 30 내지 120분 동안 배양하였다. 배양된 세포를 세척하여 단백질을 얻어 전기영동한 후, p-VEGFR2 (Y1175), p-VEGFR2 (Y1214), VEGFR2, p-FAK (T397), p-SRC (T416), p-SRC (T527), SRC, p-ERK1/2, ERK1/2, p-AKT (S473), AKT, p-JNK, JNK, p-IKK α/β , IKK α , p-I κ B α , I κ B α , p-NF- κ B, NF- κ B 또는 α -tubulin 항체를 이용하여 세포 내에서 발현되는 단백질의 양을 비교하였다.
- [0086] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 신호에 관여하는 VEGFR2, FAK, SRC, AKT 및 NF- κ B의 인산화를 억제함을 확인하였다.
- [0087] **실시예 1-6. 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 NF- κ B 신호 기전에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0088] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포 내 종양신생혈관 기전 관련 NF- κ B 신호 전달 기전에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 리포터유전자(reporter gene, luciferase) 어세이와 NF- κ B 신호 전달 단백질 발현 어세이를 수행하였다.
- [0089] 구체적으로, 리포터유전자 어세이를 위하여, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 NF- κ B-luc이 결합된 플라스미드(plasmid)를 트랜스펙션(transfection)한 후, VEGF 50 ng/ml와 DSGOST 100 μ g/ml을 처리하였다. 15시간 후, 상등액을 모아 Dual-Luciferase Reporter 어세이를 이용하여 NF- κ B 유전자의 발현 조절을 관찰하였다. NF- κ B 신호 전달 단백질 발현 어세이를 위하여, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 VEGF 50ng/ml 및/또는 DSGOST 100 μ g/ml을 처리하였고, 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 세척하여 단백질을 얻어 전기영동한 후, p-IKK α/β , IKK α , p-I κ B α , I κ B α , p-NF- κ B, NF- κ B 또는 α -tubulin 항체를 이용하여 세포 내에서 발현되는 단백질의 양을 비교하였다.
- [0090] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 혈관내피세포 내 신생혈관생성에 관여하는 유전자인 NF- κ B의 발현을 억제하고, 상기 신생혈관생성 신호 기전에 관여하는 단백질의 인산화를 억제함을 확인하였다.
- [0091] **실시예 1-7. 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 유전자의 발현에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0092] 당귀사역가오수유생강탕이 혈관내피세포 내 신생혈관생성과 관련된 유전자 (MMP-9, Bcl-2, Cyclin D1 및 Cox-2)의 발현에 미치는 영향을 검증하기 위하여, 단백질 발현 어세이를 수행하였다.
- [0093] 구체적으로, 혈관내피 세포주인 HUVEC에 VEGF 50 ng/ml와 DSGOST 100 μ g/ml을 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.
- [0094] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 혈관내피세포 내 신생혈관생성 관련 MMP-9 단백질 발현을 현저하게 억제함을 확인하였다.
- [0095] **실시예 1-8. 인비보(in vivo) 동물 모델에서 신생혈관생성에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0096] 당귀사역가오수유생강탕이 마우스의 귀 또는 등 피부 내 신생혈관생성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 에반스 블루(evans blue) 어세이를 수행하였다.
- [0097] 구체적으로, 마우스의 귀 또는 등 피부 혈관에 VEGF 50 ng/ml와 DSGOST 100 μ g/ml을 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 빠져나온 에반스 블루 용액을 측정하였다.
- [0098] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 마우스의 귀 피부 내 신생혈관생성을 억제함을 확인하였다.
- [0099] 또한, 도 10에 나타난 바와 같이, 상기 당귀사역가오수유생강탕은 마우스의 등 피하 내 신생혈관생성을 억제함을 확인하였다.
- [0100] **실시예 2. 인비트로(in vitro)에서 당귀사역가오수유생강탕의 항암 활성 분석**
- [0101] 당귀사역가오수유생강탕이 인간 췌장암세포 생장에 미치는 영향을 검증하기 위하여 췌장암세포에 당귀사역가오수유생강탕을 처리하였다.

- [0102] 구체적으로, 96-웰 플레이트에서 배양한 췌장암 세포주 Panc-28에 당귀사역가오수유생강탕을 50 내지 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 다양한 농도로 처리한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 그 후 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 각각의 세포에 처리하여 2시간 동안 더 배양한 후, 상층액을 제거하고 100 μl 의 DMSO를 첨가하였다. 최종적으로 590nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 아무 물질도 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.
- [0103] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 농도에 관계없이 췌장암세포의 성장에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
- [0104] **실시예 3. 인비보(in vivo) 동물 모델에서 당귀사역가오수유생강탕의 항암 활성 분석**
- [0105] **실시예 3-1. 암 조직의 성장에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0106] 당귀사역가오수유생강탕이 췌장암 동물 모델에서 항암 활성을 보이는지 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0107] 5주령의 누드(Nu/Nu) 마우스(Oriental Science)에 췌장암 세포주인 Panc-28-luc을 1×10^6 의 수로 피하 주사하였다. 임의로 상기 마우스를 그룹 지은 후, 당귀사역가오수유생강탕을 20 mg/kg의 농도로 49일간 주 3회 경구 투여하였다. 대조군의 경우, 음수(water)를 경구 투여하였다. 체중 및 암의 크기는 1주일에 3회 측정하였다. 암의 성장을 관찰하기 위하여, 주 1 내지 2회 형광 물질(luciferin)을 주입하여 그 발현 정도를 측정하였으며, 암의 크기를 캘리퍼(callipers)로 측정하여 관찰하였다.
- [0108] 그 결과, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 실험기간 동안 췌장암 성장을 억제하는 효과를 보임을 확인하였고(도 12), 물을 먹인 대조군보다 암 조직의 성장을 억제함을 확인하였다(도 13).
- [0109] 또한, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 실험기간 동안 마우스의 체중에는 영향을 미치지 않음을 확인하였고, 이를 통해 생체 내 부작용이 없이 안전한 물질임을 알 수 있었다(도 14).
- [0110] **실시예 3-2. 암 조직의 괴사 및 신생혈관 생성 관련 단백질 발현에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0111] 상기 실시예 10-1에서 확인한 당귀사역가오수유생강탕의 항암활성이 신생혈관생성을 억제함으로써 나타내는 것인지 확인하기 위하여, 암 조직의 및 신생혈관 생성 관련 단백질 발현에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석을 분석하였다.
- [0112] 구체적으로, 상기 실시예 10-1에서 수행한 실험이 종료된 후, 마우스를 희생시켜 암 조직을 분리하였고, 상기 분리한 암 조직을 4% 포름알데히드로 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀에 포매(embedding)한 후, 조직학적 관찰을 위해 일부는 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였으며, 다른 일부는 항-Ki67, 항-CD31, 항-p-VEGFR2(Y1175), 항-MMP-9 및 항-cleaved caspase-3 항체를 이용하여 면역조직화학(immunohistochemistry)을 수행하였다. 또한, 신생혈관생성 억제를 확인하기 위하여, 항-CD31에 염색된 혈관 수를 측정하였다.
- [0113] H&E 염색 결과에서 분홍색은 염증 반응을 일으키는 세포의 괴사를 의미하는 것인데, 암 조직의 H&E 염색 결과, 대조군에 비해 당귀사역가오수유생강탕을 투여한 군에서 분홍색으로 염색된 정도가 줄어들음을 확인함으로써 염증 반응 등을 일으키는 세포의 괴사가 감소되어 있음을 확인하였다. 또한, 갈색을 나타내는 항-Ki67 항체로 염색하여 암 조직의 성장을 분석한 결과, 대조군에 비해 당귀사역가오수유생강탕을 투여한 군에서 갈색으로 염색된 정도가 줄어들음을 확인함으로써 암의 성장이 감소함을 확인하였다(도 15).
- [0114] 갈색을 나타내는 항-CD31, 항-pVEGFR2(Y1175) 및 항-MMP-9 항체로 염색하여 관찰한 결과, 대조군에 비해 당귀사역가오수유생강탕을 투여한 군에서 갈색으로 염색된 정도가 줄어들음을 확인함으로써 상기 단백질의 발현이 감소함을 확인하였다.
- [0115] 반면, 염증을 유도하지 않는 세포의 죽음인 세포자살을 관찰할 수 있는 항-cleaved caspase 3 항체로 염색하여 관찰한 결과, 대조군에 비해 당귀사역가오수유생강탕을 투여한 군에서는 상기 항체에 의하여 더욱 갈색으로 염색됨을 확인함으로써 그 발현양이 증가함을 확인하였다(도 15). 이를 통해, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 신생혈관생성 관련 단백질 발현은 억제하면서 세포자살은 증가시킴을 확인하였다.
- [0116] **실시예 3-3. 암 조직 내 신생혈관생성에 대한 당귀사역가오수유생강탕의 영향 분석**
- [0117] 상기 실시예 3-1에서 확인한 당귀사역가오수유생강탕의 항암활성이 신생혈관생성을 억제함으로써 나타내는 것인지 확인하기 위하여, 상기 실시예 10-2에서 확인한 암 조직을 항-CD-31 항체로 염색하여 혈관 수를 측정하였다.

구체적으로, 항-CD31 항체의 염색은 갈색을 나타내며, 항-CD-31에 염색된 갈색을 띄는 혈관을 광학현미경을 통해 직접 눈으로 섀프로써 측정하였다.

[0118] 그 결과, 대조군에 비해 당귀사역가오수유생강탕을 투여한 군에서 암 조직의 혈관 수가 감소함을 확인하였다(도 16).

[0119] 상기 결과를 통해, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 신생혈관생성 억제제를 통한 암세포 생장 억제에 우수한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0120] 실시예 4. 당귀사역가오수유생강탕의 혼합 비율에 따른 혈관내피세포의 이동성 분석

[0121] 가장 우수한 신생혈관생성 억제 효과를 나타내는 당귀사역가오수유생강탕의 최적의 혼합 비율을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0122] 구체적으로, 당귀사역가오수유생강탕을 구성하는 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강을 각각 9:3:3:3:2:2:5:2:4, 3:9:3:3:2:2:5:2:4, 3:3:9:3:2:2:5:2:4 또는 3:3:3:3:2:6:5:2:4의 중량비로 포함하는 각각의 당귀사역가오수유생강탕을 추가로 제조하였다. 이후, 상기 실시예 1-2에 따른 방법으로 혼합비를 달리한 각 당귀사역가오수유생강탕을 이용하여 스크래칭 어세이를 수행하였다.

[0123] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 당귀, 계지, 작약 또는 감초의 비율을 달리한 당귀사역가오수유생강탕은 이를 처리하지 않은 음성대조군에 비하여 우수한 세포이동 억제 활성을 나타냄을 확인하였고, 상기 구성성분들을 3:3:3:3:2:2:5:2:4의 중량비로 포함하는 추출물과 유사한 정도로 혈관내피세포인 HUVEC의 세포 이동을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0124] 상기 결과를 통해, 본 발명의 당귀사역가오수유생강탕은 당귀, 계지, 작약, 목통, 세신, 감초, 대조, 오수유 및 생강을 각각 9:3:3:3:2:2:5:2:4, 3:9:3:3:2:2:5:2:4, 3:3:9:3:2:2:5:2:4 또는 3:3:3:3:2:6:5:2:4의 중량비로 포함하여도 3:3:3:3:2:2:5:2:4의 중량비로 포함하는 추출물과 동일한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는, 각 구성성분의 중량비를 변경하여 제조된 당귀사역가오수유생강탕도 신생혈관생성을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 인비트로 및 인비보 동물 모델에서 항암 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

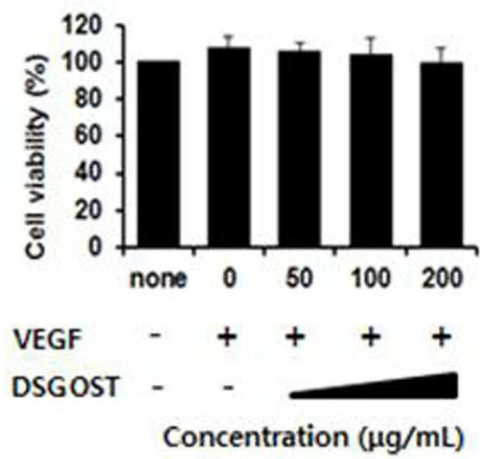
[0125] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

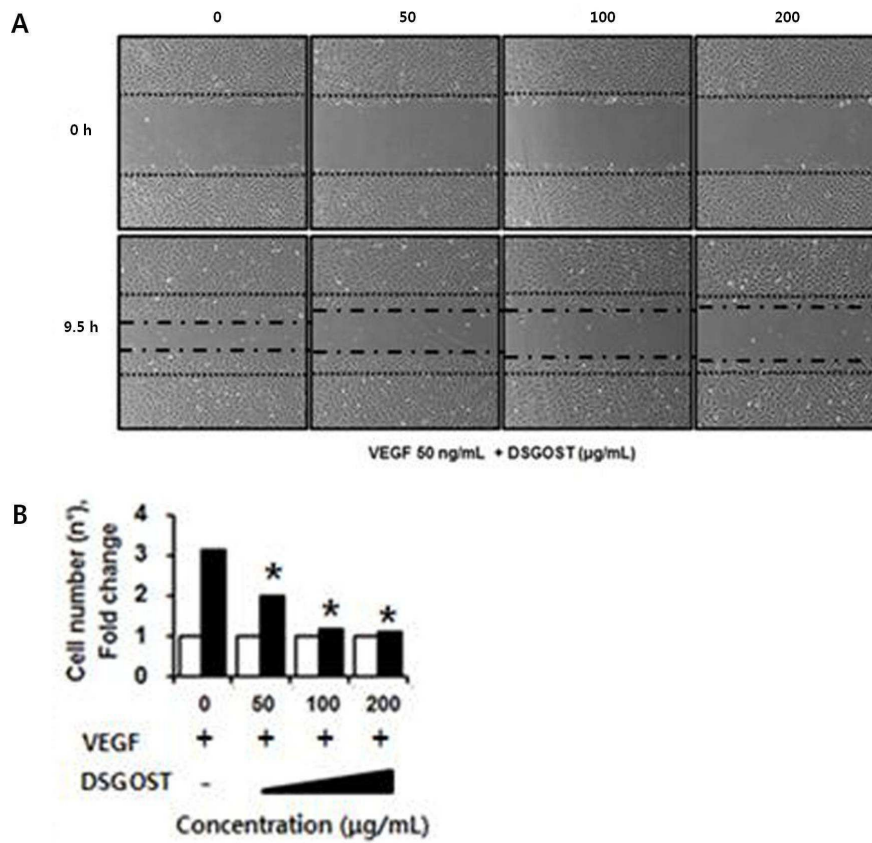
도면1

Korean name	Scientific name	Latin name	Amount (g)
當歸	<i>Angelica gigas</i>	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	1.00
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	1.00
芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas (Paeoniaceae)	<i>Paeoniae Radix</i>	1.00
木通	<i>Akebia quinata</i> var. <i>polyphylla</i> Nak.	<i>Akebiae Caulis</i>	1.00
細辛	<i>Asarum sieboldii</i> var. <i>seoulense</i> Nakai	<i>Asari Herba Cum Radix</i>	0.67
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer (Leguminosae)	<i>Glycyrrhiza Radix</i>	0.67
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	<i>Jujubae Fructus</i>	1.67
吳茱萸	<i>Evodia rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i> Huang	<i>Evodiae Fructus</i>	0.67
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	<i>Zingiberis Rhizoma Praeparata</i>	1.33

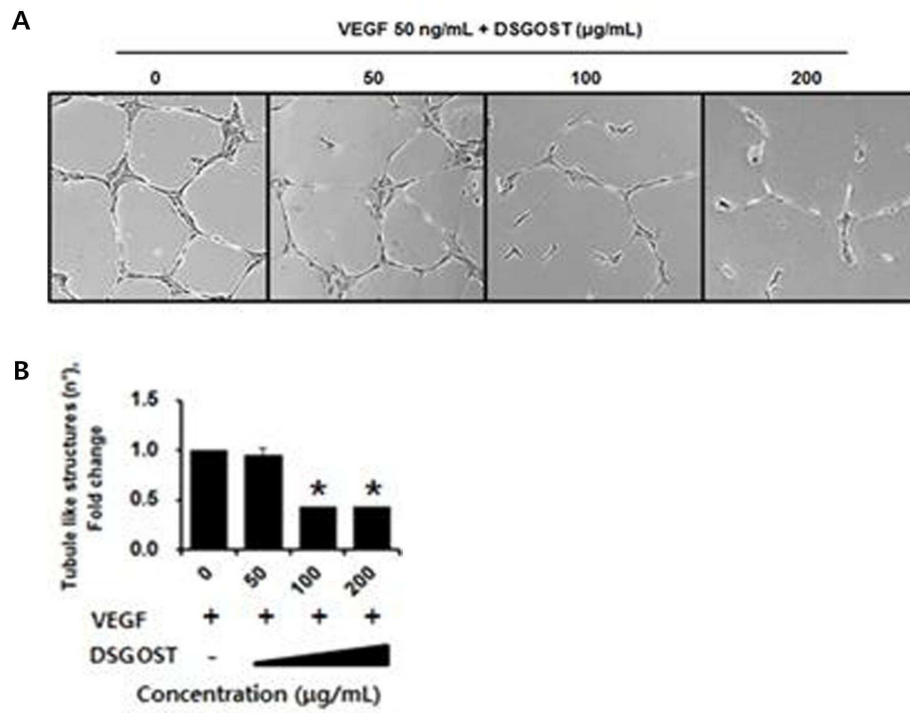
도면2



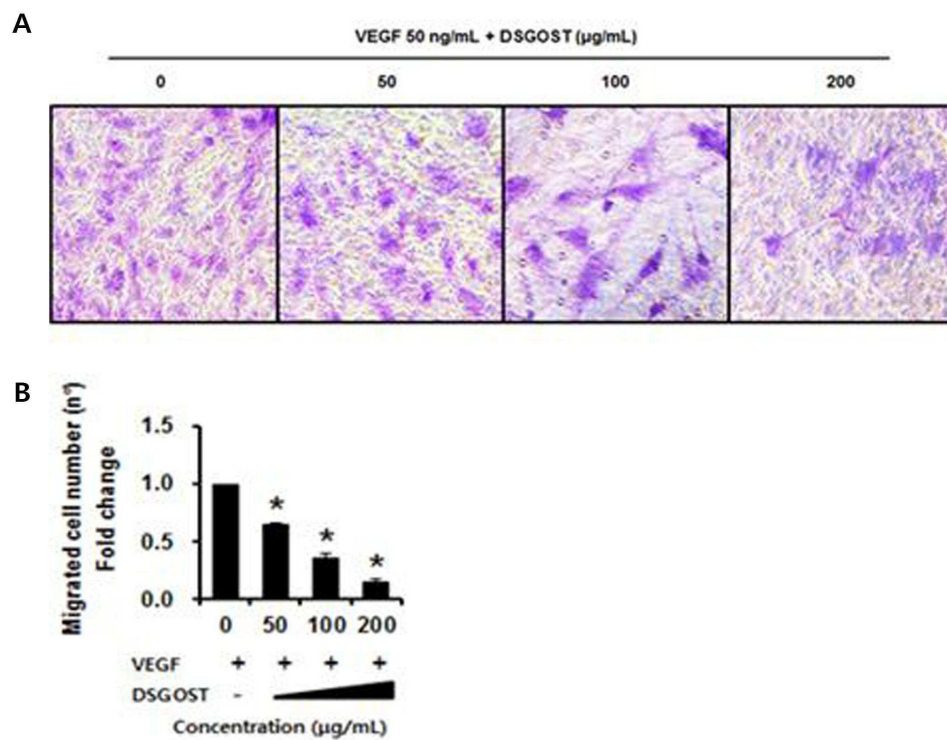
도면3



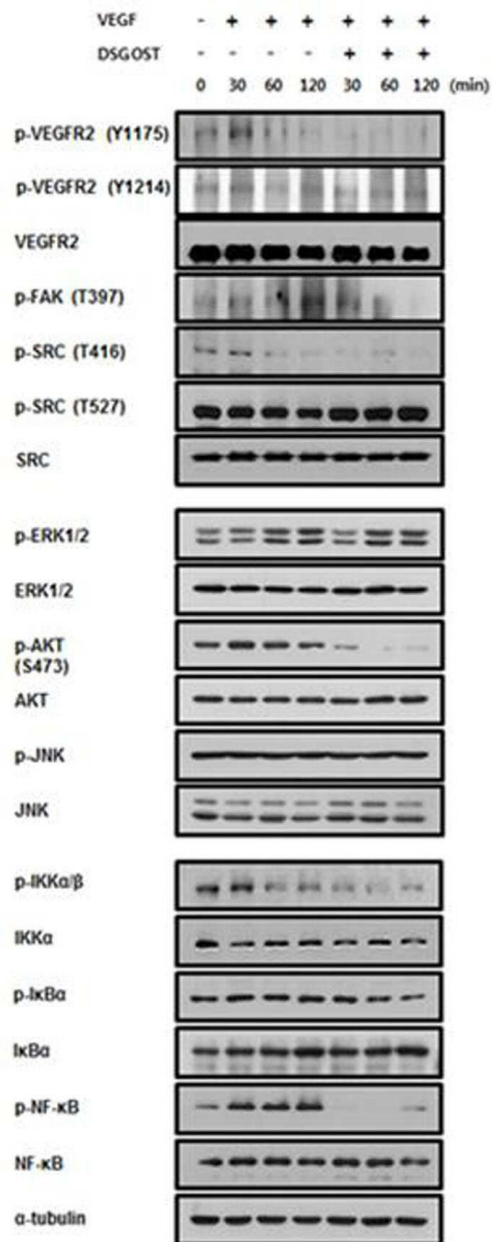
도면4



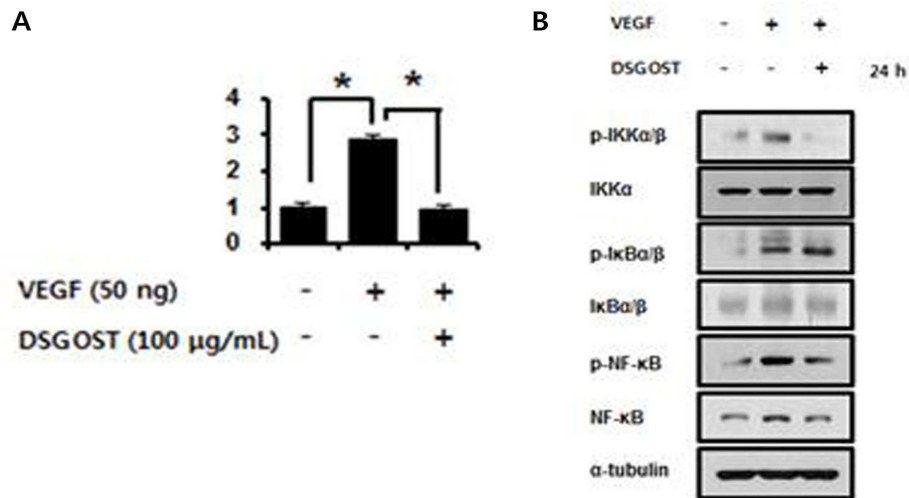
도면5



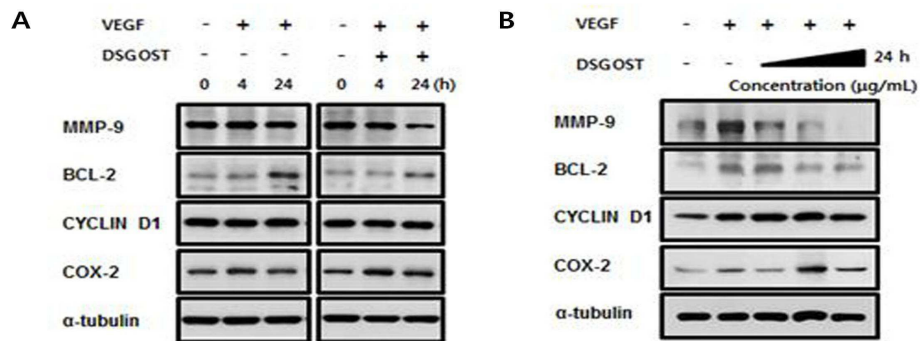
도면6



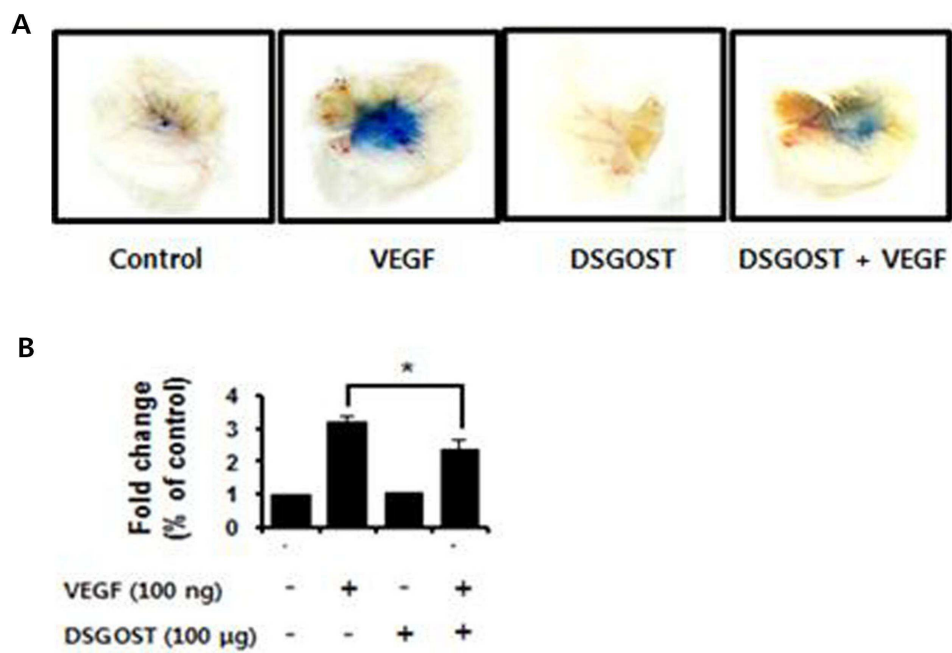
도면7



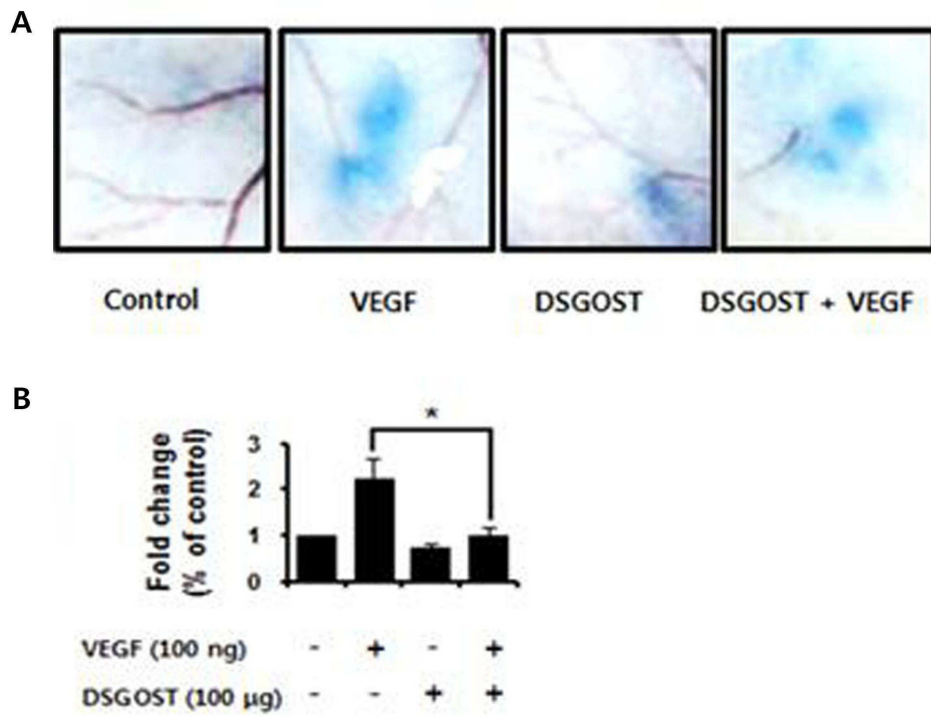
도면8



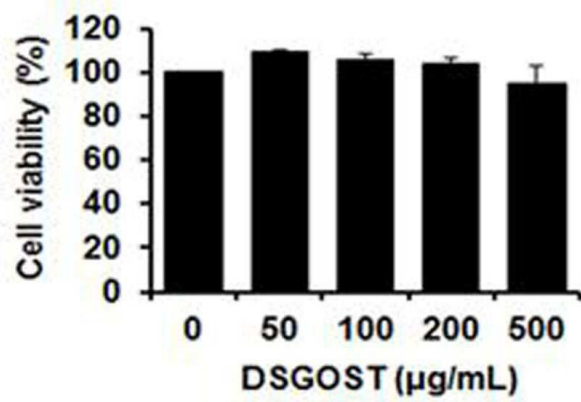
도면9



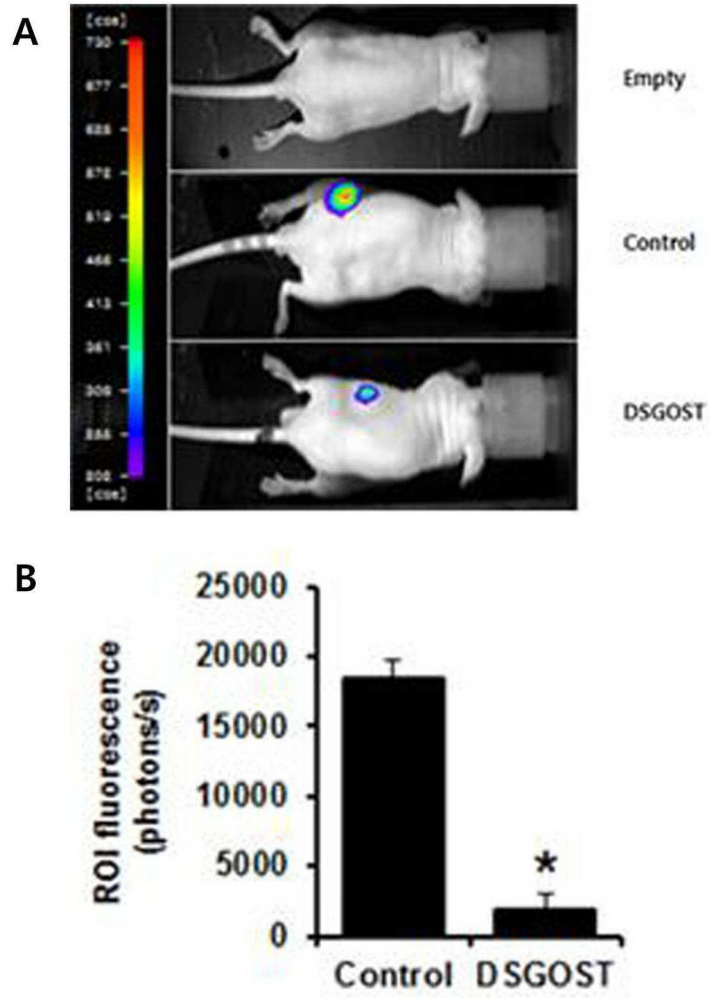
도면10



도면11



도면12

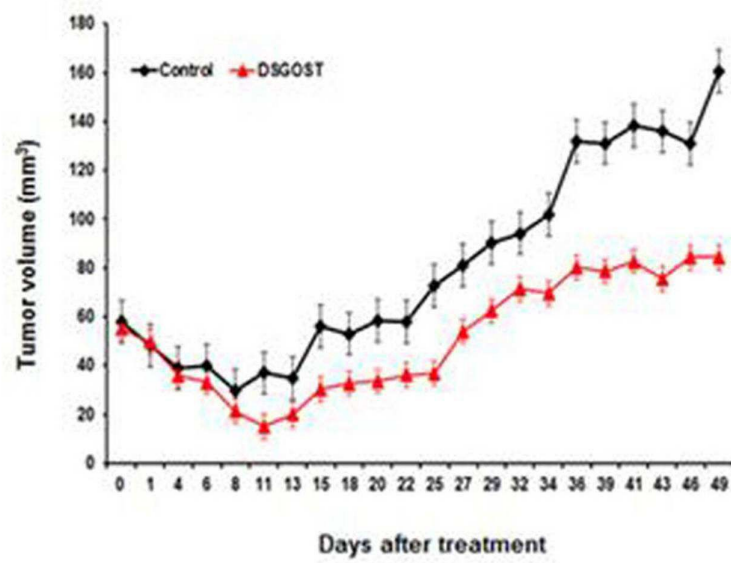


도면13

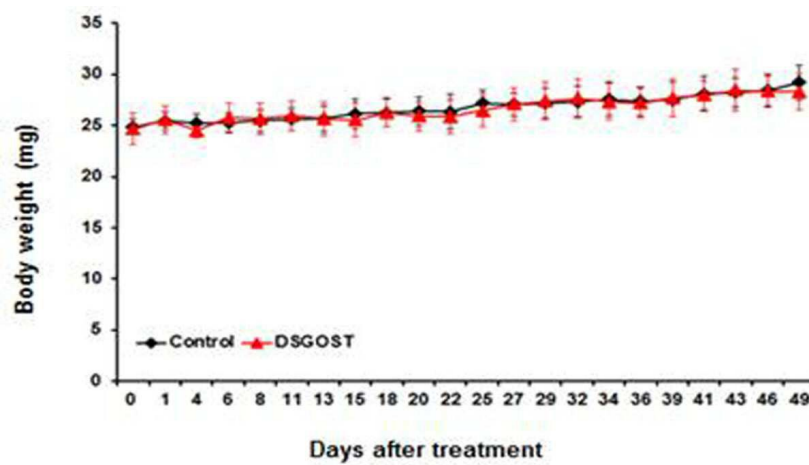
A



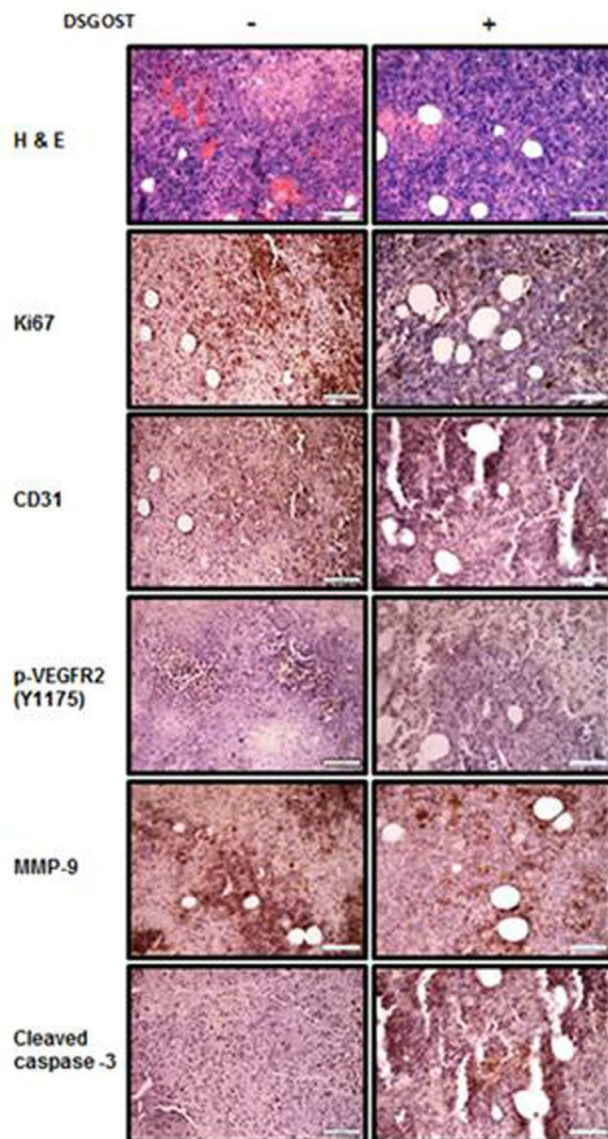
B



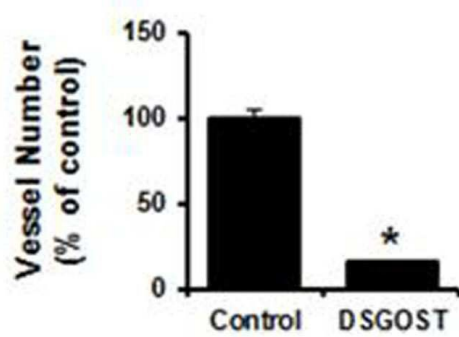
도면14



도면15



도면16



도면17

