



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0048916  
(43) 공개일자 2021년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)  
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 9/00 (2006.01)  
A61Q 90/00 (2009.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0133186

(22) 출원일자 2019년10월24일

심사청구일자 2019년10월24일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

김택중

강원도 원주시 흥업면 분지동1길 46-11

이진호

서울특별시 동대문구 약령사로 154, 4동 1313호(청량리동, 미주아파트)

(74) 대리인

김보정

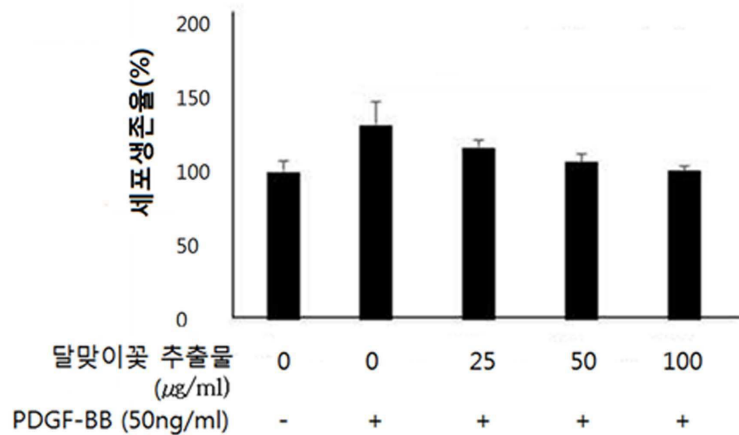
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 달맞이꽃 추출물이 세포 내 AKT 활성화 억제 및 MAPK 활성화 억제를 경유하여 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 확인하였으므로, 상기 달맞이꽃 추출물은 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A61K 8/9789** (2017.08)

**A61P 9/00** (2018.01)

**A61Q 90/00** (2013.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/326** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 달맞이꽃 추출물은 5 내지 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈소판 유래 증식인자로부터 유도된 질환인 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 달맞이꽃 추출물은 물 또는 유기용매로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 추출되는 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃의 꽃, 잎, 가지, 줄기, 뿌리, 열매 및 씨앗 껍질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 추출물로 이루어지는 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃 줄기의 추출물로 이루어지는 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 달맞이꽃 추출물은 0.0001 내지 100 중량%가 포함되는 것을 특징으로 하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 11

달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 외용제.

#### 청구항 12

달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 화장품.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 혈관평활근세포 증식 억제 활성을 가지고 있어 혈관평활근세포의 이상 증식으로 인한 질환의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있는 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 심혈관계 질환은 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 선천성 심장질환, 심근경색증, 협심증 등의 심장질환과 동맥경화, 뇌졸중, 말초혈관 질환 등의 혈관질환을 포함하는 질환으로서 광범위하게 허혈성 심혈관 질환이라 한다. 이 질환들은 다양한 연령층에서 발생하며 적기에 치료하지 않으면 심각한 후유증과 더불어 사망에 이르게 할 수 있다.

[0004] 서구화된 식생활 및 생활습관의 변화로 인하여 최근 심혈관계 질환의 발병률 및 그로 인한 사망률이 계속 급증하는 추세이나 아직까지는 이를 치료하기 위한 효과적인 치료제는 개발되지 못하고 있는 실정이다.

[0005] 현재 관상동맥질환에 대한 치료법으로 약물요법, 유전자 치료법, 경치적 관상동맥 성형술 및 스텐트 삽입술(PTCA: percutaneous transluminal coronary angioplasty and stenting), 그리고 외과적으로 수술하는 관상동

맥우회술(CABG: coronary artery bypass graft)의 재관류 요법(revascularization therapy)이 시행중이다.

[0006] 그러나 재관류 요법을 시행한 후에도 지속적으로 약물을 투여해야 하며 관상동맥 질환이 재발할 수 있는 가능성도 있다.

[0007] 특히, 경피적 관동맥 성형술(PTCA)은 혈관성 질환의 관상동맥경화 환자들에 대한 치료법으로서 1977년 이래 널리 실시되고 있으며(Gurentzig, Lancet, 4263, 1978), 효율성이 높은 치료법임에도 불구하고 수술 후, 3-6 개월 후에는 약 40% 가량의 환자들에 있어서 재협착(restenosis)이 일어난다는 문제점이 있다 (Ryan et al., J. Am. Coll. Cardiol., 22, 2033-2054, 1993). PTCA후의 재협착의 발생기전은 기구(balloon)에 의해 손상된 혈관내피 세포, 활성화된 혈소판 또는 대식세포로부터 여러 가지의 사이토카인이 생성, 분비되면서 혈관, 평활근 세포의 유주 및 증식이 촉진되고 이에 따라 세포외간질(ECM: extracellular matrix)의 생성 및 분비가 촉진되어 혈관내막의 비후를 일으켜 재협착으로 발전하게 된다고 알려져 있다(Godfried et al., Am. Heart J., 129, 203-210, 1995).

[0008] 정상적인 상태의 혈관 평활근세포는 증식을 하지 않지만, 스텐트 시술 등을 통하여 내피세포의 증막이 손상되면서 여러 단계의 신호전달을 거쳐 혈관 평활근세포의 분열, 이동 및 증식이 유발된다. 혈관 평활근세포 증식의 기전으로는 정상적인 내피세포의 손상에 의한 증식억제인자의 제거와 증식유발인자의 활성화, 혈관평활근세포 표면의 수용체를 통한 증식유발신호의 전달, 혈관 평활근세포의 핵 내로 전달된 증식유발신호에 의한 세포 주기의 변화 등을 들 수 있다(Min-Cheol Song et al., Mol Cell Biochem., 360, 103-109, 2012). 정상적인 내피세포는 혈관 평활근세포의 증식을 억제하는 물질을 분비하는데, 내피세포가 손상되면 이들의 분비가 억제되고, 활성화된 혈소판에서 분비되는 혈소판 유래 성장인자 (Platelet derived growth factor), 혈장 중에 포함되어 있는 여러 사이토카인 (cytokine)등에 의해 혈관 평활근세포의 증식이 유발된다고 알려져 있다.

[0009] 현재까지는 항 혈소판제, 항 응고제, 콜레스테롤 생합성 저해제, 항 알레르기제 등을 이용하여 재협착을 예방해 보려는 시도가 이루어지고 있으며(Lefkovits et al., Progr. Cardiovas. Dis., 40, 141-158, 1997), 최근에는 생선유(fish oil), 비타민 C 및 비타민E 등과 같은 천연물 유래 성분의 재협착 예방 작용에 대한 연구가 이루어지고 있다. 하지만 이들 약제는 임상에서는 아직 충분한 결과를 얻지 못한 실정이다.

[0010] 이 외에도 텍솔(Herdege et al., Zeitschrift fur Kardiologie, 89, 390-397, 1999), 헤파린, EPA 및 에스트로겐 등이 혈관 재협착 억제제로서 연구 개발 중에 있으나, 이 역시 뚜렷한 실효를 거두지 못하는 실정이다. 그러나, 대한민국 특허등록 제10-478671호에는 클로트리마졸을 유효성분으로 포함하는 혈관 재협착 예방 및 치료용 약학 조성물이 개시되어 있으며, 대한민국 특허등록 제10-516026호에는 3'-디옥시아데노신(3'-deoxyadenosine)을 유효성분으로 하는 혈관 재협착 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제10-2001-110793호에는 Rho 키나아제 저해활성을 갖는 화합물을 유효성분으로 하는 혈관협착증의 예방 및 치료제가 개시되어 있다.

[0011] 또한, 대한민국 공개특허 제10-2003-46314호에는 항트롬빈을 유효성분으로 하는 이식 혈관병, 재협착증, 인-스텐트 재협착증(in-stent restenosis) 및 폐 고혈압과 같은 혈관 이상 증식성 질환의 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제10-2005-23249호에는 레티노이드 및 레티노이드 작용 조절제를 유효성분으로 하는 혈관 내 스텐트를 사용한 경피적 관상동맥 혈관형성술 후의 혈관재협착 및/또는 재폐색 등 혈관성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약 조성물이 개시되어 있으며, 대한민국 공개특허 제10-2005-43183호에는 커쿠민(curcumin)을 포함하는 혈관 재협착 예방 및 치료용 약학조성물이 개시되어 있다.

[0012] 그러나, 이러한 혈관 재협착 억제제는 혈관 재협착을 방지하는 것 이외의, 상처재생억제, 혈관손상, 간독성, 신장손상 및 혈소판응집억제에 의한 출혈량 증가 등의 다양한 부작용을 나타내었기 때문에, 사람에게 대하여 안전성이 입증된 다양한 천연물로부터 유래된 혈관 재협착을 억제할 수 있는 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 별다른 연구성과가 보고되지 않고 있는 실정이다. 따라서, 안전하면서도 효과적으로 혈관 재협착을 억제할 수 있는 물질을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

[0014] 한편, 달맞이꽃은 쌍떡잎식물 도금양목 바늘꽃과의 두해살이풀로서 남아메리카 원산으로 북아메리카, 한국, 일본, 중국 등에서 귀화식물로 분포하고 있으며 약용으로 사용하는 달맞이꽃은 각 국가별로 서로 약간 다른 식물을 사용하고 있는데, 한국에서 흔히 쓰는 약용 달맞이꽃은 *Oenothera odorata*, *Oenothera biennis*, *Oenothera brevipes* 등이 있는데 이들은 효능과 약성이 서로 조금씩 다르지만 약용으로 구별없이 혼용하고 있다.

[0015] 달맞이꽃은 한방에서 뿌리를 월견초(月見草)라는 약재로 쓰는데, 감기로 열이 높고 인후염이 있을 때 물에 넣고

달여서 복용하고, 종자를 월견자(月見子)라고 하여 고지혈증에 사용한다.

[0016] 한국등록특허 제10-0829083호에서는 생리활성을 갖는 애기달맞이 추출물이 개시되어 있고, 한국공개특허 제10-1994-0000050호에서는 달맞이꽃 종자유를 함유하는 음료의 제조방법 및 그 조성물이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-1584431호에서는 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 미소중력하 또는 신경손상으로 인한 근위축 예방 또는 치료용 약학 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제10-1499457호에는 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축 예방 또는 개선용 식품 및 약학조성물이 있으나, 본 발명에서와 같이 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

[0018] 따라서, 본 발명자들은 부작용이 없고 안전성이 높으며, 평활근세포 이상 증식으로 인한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 천연 소재를 개발하기 위해 노력한 결과, 달맞이꽃 추출물이 세포 내 AKT 활성화 억제 및 MAPK 활성화 억제를 경유하여 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 확인하였다. 이에, 상기 달맞이꽃 추출물이 평활근세포 증식 억제 활성을 가지고 있어 혈관평활근세포의 이상 증식으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물 또는 기능성 소재로 사용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0020] 본 발명의 목적은 혈관평활근세포 증식 억제 활성을 가지고 있어 혈관평활근세포의 이상 증식으로 인한 질환의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있는 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 목적은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 의해 달성된다.

[0023] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 5 내지 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 함유되는 것으로 한다.

[0024] 본 발명의 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈소판 유래 증식인자로부터 유도된 질환인 것으로 한다.

[0025] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것으로 한다.

[0026] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 물 또는 유기용매로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 추출되는 것으로 한다.

[0027] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것으로 한다.

[0028] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃의 꽃, 잎, 가지, 줄기, 뿌리, 열매 및 씨앗 껍질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 추출물로 이루어지는 것으로 한다.

[0029] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃 줄기의 추출물로 이루어지는 것으로 한다.

[0030] 또한, 본 발명의 목적은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 건강기능식품 조성물을 제공함에 의해서도 달성될 수 있다.

- [0031] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 0.0001 내지 100 중량%가 포함되는 것으로 한다.
- [0032] 본 발명의 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈소판 유래 증식인자로부터 유도된 질환인 것으로 한다.
- [0033] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것으로 한다.
- [0034] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 물 또는 유기용매로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 추출되는 것으로 한다.
- [0035] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것으로 한다.
- [0036] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃의 꽃, 잎, 가지, 줄기, 뿌리, 열매 및 씨앗 껍질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 추출물로 이루어지는 것으로 한다.
- [0037] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃 줄기의 추출물로 이루어지는 것으로 한다.
- [0038] 또한, 본 발명의 목적은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 외용제를 제공함에 의해서도 달성될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 목적은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 화장품을 제공함에 의해서도 달성될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 혈관평활근세포 증식 억제 활성을 가진 달맞이꽃 추출물이 유효성분으로 포함되어 평활근세포의 이상 증식으로 인한 질환의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있는 탁월한 효과를 나타낸다.

### 도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 본 발명의 실시예 1을 통해 제조된 달맞이꽃(*Oenothera biennis*) 추출물의 세포독성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1을 통해 제조된 달맞이꽃 추출물의 농도별 혈관평활근세포 증식 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 1을 통해 제조된 달맞이꽃 줄기 추출물의 MAPK 세포신호 전달 경로 중 ERK 1/2, p38 MAPK, JNK 단백질의 활성 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 1을 통해 제조된 달맞이꽃 줄기 추출물의 AKT 세포신호 전달 경로 중 PLC 및 AKT 단백질의 활성 억제 효과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하에는, 본 발명의 바람직한 실시예와 각 성분의 물성을 상세하게 설명하되, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 발명을 용이하게 실시할 수 있을 정도로 상세하게 설명하기 위한 것이지, 이로 인해 본 발명의 기술적인 사상 및 범주가 한정되는 것을 의미하지는 않는다.

- [0046] 본 발명에서 용어 "혈관 평활근 세포(vascular smooth muscle cell, VSMC)"는 혈관 벽의 평활근을 구성하는 세



포를 의미한다.

- [0047] 또한, 본 발명에서 용어 "혈관 평활근 세포 이상 증식성 질환(VSMC hyper-proliferativedisorder)"이란 혈관 평활근 세포의 과도한 증식에 기인하여 발생하는 질환 또는 질병을 의미한다.
- [0048] 또한, 본 발명에서 "혈관평활근세포 이상 증식성 질환"은 예를 들어, 혈관평활근세포의 이상 증식에 의해 직접적으로 발생하는 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증 뿐만 아니라, 혈관협착증 또는 동맥경화증에 의해 이차적으로 유발되는 심혈관계 질환인 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중, 말초혈관협착증 등을 포함하며, 바람직하게는, 본 발명에 따른 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 의해 예방 또는 치료 되는 혈관평활근세포 이상 증식성 질환은 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 혈관재협착증 또는 혈관협착증이다.
- [0049] 아테롬성 동맥경화증은 동맥의 내층에 지방 물질이 침착되거나 섬유화 (fibrosis)되어 있는 질환이며, 혈관의 재협착증(restenosis)은 혈관벽이 손상(traumatization)된 후 혈관 통로가 좁혀지는 질환이다. 동맥경화 진행과 스텐트 삽입술 후에 발생하는 혈관 재협착증은 혈관평활근 세포의 증식, 이동 그리고 세포외 기질(extracellular matrix)의 분비 등에 기인한다고 알려지고 있다 (Circulation, 1997, 95, 1998-2002; J.Clin. Invest. 1997, 99, 2814-2816; Cardiovasc. Res. 2002, 54, 499-502). 이에, 동맥경화의 진행과 혈관 재협착의 방지를 위해 혈관평활근 세포의 증식을 억제하는 약물에 대한 연구가 널리 진행되고 있으며, 현재 몇 가지 약물이 환자의 치료에 사용되고 있다(J. Am. Coll. Cardiol., 2002, 39, 183-193). 따라서, 혈관평활근 세포의 증식을 매우 효율적으로 억제하는 달맞이꽃 추출물은 혈관평활근세포 이상 증식성 질환의 치료에 매우 유효하다는 것을 알 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명에서 용어 "예방" 은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 (i) 질환 또는 질병의 발전의 억제; (ii) 질환 또는 질병의 경감; 및 (iii) 질환 또는 질병의 제거를 의미한다.
- [0052] 본 발명은 달맞이꽃(*Oenothera biennis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명의 유효성분인 달맞이꽃 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:
- [0054] 1) 달맞이꽃에 추출용매를 가하여 추출하는 단계; 및
- [0055] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계.
- [0056] 본 발명에서, 상기 단계 1)의 달맞이꽃은 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다. 또한, 상기 달맞이꽃은 달맞이꽃의 꽃, 잎, 가지, 줄기, 뿌리, 열매 및 씨앗 껍질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 부위를 사용하는 것이 바람직하고, 줄기를 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0057] 본 발명에서 상기 단계 1)의 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하는 것이 바람직하며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것이 더욱 바람직하다. 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 에탄올일 수 있다. 추출방법으로는 초음파추출, 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 세척하고 잘 건조된 달맞이꽃 분량의 1 내지 15배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 2 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출시간은 1 내지 72시간이 바람직하며, 2 내지 48시간이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 아울러 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0058] 또한, 본 발명의 달맞이꽃 추출물은 상기 추출용매를 이용하여 추출된 1차 추출물을 극성이 다른 추출용매를 이용하여 다시 분획한 분획물을 포함하는데, 예를 들어, 달맞이꽃 추출물은 달맞이꽃에 함유된 유효성분을 탄소수 1 내지 5의 알코올로 추출한 후에, 에테르, 벤젠, 헥산 등의 극성이 다른 용매로 다시 분획한 분획물일 수



있다.

- [0059] 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하며, 각 용매 추출물을 제조할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0060] 상기와 같은 과정을 통해 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나, 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있고, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서, 상기 달맞이꽃 추출물은 5 내지 500  $\mu\text{g/ml}$ , 구체적으로 10 내지 400  $\mu\text{g/ml}$ , 보다 구체적으로 15 내지 300  $\mu\text{g/ml}$ , 보다 더 구체적으로 20 내지 200  $\mu\text{g/ml}$ , 보다 더 구체적으로 25 내지 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈소판 유래 증식인자로부터 유도된 질환으로, 더욱 상세하게는 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상이다.
- [0063] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 달맞이꽃 추출물이 세포 내 AKT 활성화 억제 및 MAPK 활성화 억제를 경유하여 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 확인하였으므로, 상기 추출물은 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 달맞이꽃 추출물과 같은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 담체는 약제학적으로 허용되는 성분의 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0067] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있는데, 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0069] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학 분야에서 통상적으로 사용되는 담체 및 비히클을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄염 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이소나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스 또는 양모지 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0071] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제, 주사제 또는 활성 화합물의 서방출제형의 제제형태일 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 약학분야에서 통상 사용되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0074] 본 발명에서, 상기 달맞이꽃 추출물 0.0001 내지 100 중량%가 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0075] 또한, 상기 달맞이꽃 추출물의 추출방법 및 추출대상과 평활근세포 이상 증식성 질환의 종류는 상기 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 기재된 내용과 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고, 이하에서는 건강기능식품의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [0076] 한편, 본 발명자들은 달맞이꽃 추출물이 세포 내 AKT 활성화 억제 및 MAPK 활성화 억제를 경유하여 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 확인하였으므로, 상기 추출물은 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물의 유효성분으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 건강기능식품은 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0079] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0080] 본 발명에 따른 추출물의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0081] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기추출물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0082] 상기 외에 본 발명의 식품은 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0084] 또한, 본 발명은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 외용제를 제공한다.
- [0085] 아울러, 본 발명은 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환 개선용 화장품을 제

공한다.

- [0086] 본 발명에서, 상기 달맞이꽃 추출물의 추출방법 및 추출대상과 평활근세포 이상 증식성 질환의 종류는 상기 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 기재된 내용과 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고, 이하에서는 외용제 및化粧품의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [0087] 한편, 본 발명자들은 달맞이꽃 추출물이 세포 내 AKT 활성화 억제 및 MAPK 활성화 억제를 경유하여 혈관평활근세포의 증식을 억제함을 확인하였으므로, 상기 추출물은 평활근세포 이상 증식성 질환의 개선용 외용제 또는化粧품 조성물의 유효성분으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0089] 본 발명의 외용제 또는化粧품 조성물에 포함되는 성분은 상기 유효성분 이외에 외용제 또는化粧품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0090] 본 발명의 유효성분을 제제화 하기 위해서는 상법에 따라서 실시하면 용이하게 제제화할 수 있으며 계면활성제, 부형제, 착색료, 향신료, 보존제, 안정제, 완충제, 현탁제, 기타 상용화하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유클렌징, 오일, 분말파운데이션, 유탁액파운데이션, 왁스파운데이션, 팩, 마사지크림 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질알코올, 벤질벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜오일, 글리세롤지방족에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의지방산에스테르가 있다.
- [0094] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴알코올, 폴리옥시에틸렌소르비톨에스테르 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성셀룰로오스, 알루미늄메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘실리케이트 또는 폴리아מיד 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로 히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0097] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0098] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0100] <실시예 1> 달맞이꽃(*Oenothera biennis*) 추출물의 제조
- [0101] 달맞이꽃(*Oenothera biennis*) 줄기 50g에 질량농도가 99%인 에탄올 150 ml을 첨가하고 150 rpm으로 48시간 동안 추출반응을 진행하고 여과한 후에, 감압농축 및 동결건조하여 달맞이꽃 줄기 추출물을 제조하였다.
- [0103] <실험예 1> 세포 배양
- [0104] 혈관평활근세포(Vascular smooth muscle cells)는 ATCC(American type culture collection)에서 구입하여, 10% FBS(fetal bovin serum)와 1 mM의 비필수아미노산, 50 µg/ml의 페니실린, 그리고 50 µg/ml의 스트렙토마이신

을 함유한 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea)에서 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 가습한 대기조건하에 유지, 배양하였다.

#### [0106] <실험예 2> 달맞이꽃 추출물의 세포독성 평가

[0107] 상기 <실시예 1>에서 제조한 달맞이꽃 추출물의 세포독성을 MTT assay 분석법을 이용하여 평가하였다.

[0108] 구체적으로, 상기 <실험예 1>에 개시된 방법으로 혈관평활근세포가 배양된 75cm<sup>2</sup> 플라스틱 플라스크에서 배지액을 제거하고, CMF-PBS(calcium magnesium free-phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후, 0.25% 트립신/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 세포 배양액으로 중화하고 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 남은 세포의 펠렛(pellet)에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복 흡입하여 단일세포 부유액을 만든 후 트립판 블루(trypan blue)를 세포 부유액과 9:1의 중량부로 혼합하여 광학현미경 상에서 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 정량하였다. 상기 정량한 혈관평활근세포를 24-웰 플레이트에  $5 \times 10^4$  cells/웰이 되도록 분주하였다. 이를 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양한 후, 상기 <실시예 1>에서 제조한 달맞이꽃 추출물을 0, 100 µg/ml 농도로 각각 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포생존율을 50 µl의 5 mg/ml MTT solution을 첨가하고, 세포를 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 얻어진 formazan crystals을 150 µl의 DMSO에 용해시키고, 96-웰 플레이트로 옮겨서 Victor™ X3 multilabel reader(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0109] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 달맞이꽃 추출물을 첨가하지 않았을 경우를 100%의 생존율로 정하였을 때, 달맞이꽃 추출물을 첨가한 첨가군에서도 이를 첨가하지 않은 군과 비슷한 생존율을 보이는 것을 확인하였다.

[0110] 상기 결과를 통해 본 발명의 달맞이꽃 추출물은 혈관평활근세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

#### [0112] <실험예 3> 달맞이꽃 추출물의 평활근세포 이상 증식 억제 효과 확인

##### [0113] <3-1> 평활근세포 이상 증식 유도된 혈관평활근세포에서 달맞이꽃 추출물의 세포증식 억제 효과 확인

[0114] 달맞이꽃 추출물이 평활근세포 이상 증식이 유도된 평활근세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 달맞이꽃 추출물을 혈관평활근세포에 처리하고 혈관평활근세포의 증식을 촉진하는 성장인자로 평활근세포 이상 증식을 유도한 후 세포증식률을 MTT assay 분석법을 이용하여 확인하였다.

[0115] 구체적으로, 상기 <실험예 2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 상기 <실시예 1>에서 제조한 달맞이꽃 추출물을 0, 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 상기 <실험예 1>에서 배양한 혈관평활근세포에 무혈청 배지와 희석하여 처리한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 전체부피를 500 µl로 조절하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 배양하였다. 그 다음, 혈관평활근세포의 증식 이상을 유도하기 위하여 새로운 배양배지에 혈관평활근세포의 증식을 촉진하는 성장인자로 PDGF-BB(platelet-derived growth factor-BB, Simga)를 50 ng/ml 농도가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 <실험예 2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 MTT assay 분석법을 수행하였다.

[0116] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, PDGF-BB를 처리한 경우 혈관평활근세포의 증식이 촉진됨을 확인하였다. 반면, 달맞이꽃 추출물을 함께 처리한 경우 혈관평활근세포의 증식이 현저히 감소함을 확인하였다. 또한, 달맞이꽃 추출물의 농도가 증가됨에 따라 농도 의존적으로 혈관평활근세포의 증식이 감소함을 확인하였다.

[0117] 상기 결과를 통해 본 발명의 달맞이꽃 추출물은 농도 의존적으로 평활근세포 이상 증식에 대한 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

##### [0119] <3-2> 달맞이꽃 추출물의 MAPK 세포신호 전달 경로를 통한 평활근세포 이상증식 억제 효과 확인

[0120] 혈관평활근 세포의 증식에서 ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화가 중요하게 작용함이 잘 알려져 있다. 이에, 평활근세포 이상 증식이 유도된 평활근세포에서 달맞이꽃 추출물이 MAPK 세포신호 전달 경로에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 달맞이꽃 추출물을 혈관평활근세포에 처리하고 혈관평활근세포의 증식을 촉진하는 성장인자로 평활근세포 이상 증식을 유도한 후 ERK 1/2와 p38 MAPK 활성을 Western blot 분석법을 이용하여 확인하였다.



- [0121] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 상기 <실시에 1>에서 제조한 달맞이꽃 추출물을 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 상기 <실험예 1>에서 배양한 혈관평활근세포에 처리한 후, PDGF-BB를 첨가하여 혈관평활근세포의 증식 이상을 유도하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하고, protease inhibitor cocktail, 2mM PMSF 및 1mM sodium orthovanadate가 첨가된 RIPA lysis buffer(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 용해시켰다. 용해물을 스캐핑하여 회수하고, 세포를 아이스에서 15분 동안 인큐베이션하고, 상등액을 얻기 위하여 샘플을  $10,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 원심분리하였다. 단백질을 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 결정하였다. 각 샘플당 동일량의 단백질을 로딩하고, SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 다음, PVDF 막(Polyvinylidene fluoride membranes)에 이동시켰다. 상기 막은 1시간 동안 5% skim milk와 0.1% Tween 20이 포함된 Tris-buffered saline을 이용하여 블로킹하고, 1차 항체로 항-ERK 1/2 항체, 항-p-ERK 1/2 항체, 항-p38 항체, 항-p-p38 항체, 항-JNK/SAPK 항체, 항-p-JNK/SAPK 항체 각각과  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 반응시킨 다음, HRP(horse radish peroxidase)-컨쥬게이트된 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후, Chemiluminescence Western Blot Detection System(BioSpectrum®600 Imaging System, CA, USA)를 이용하여 단백질의 발현 변화를 확인하였다.
- [0122] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, PDGF-BB를 처리한 경우 MAPK 세포신호 전달 경로 중 ERK 1/2, p38 MAPK, JNK 단백질의 인산화가 증가함을 확인하였다. 반면, 달맞이꽃 추출물을 함께 처리한 경우 ERK 1/2, p38 MAPK, JNK 단백질의 인산화가 현저히 감소함을 확인하였다. 또한, 달맞이꽃 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 ERK 1/2, p38 MAPK, JNK 단백질의 인산화가 감소함을 확인하였다.
- [0123] 상기 결과를 통해 본 발명의 달맞이꽃 추출물은 농도 의존적으로 MAPK 세포신호 전달 경로 중 ERK 1/2, p38 MAPK, JNK 단백질의 활성을 저해하여 평활근세포 이상 증식에 대한 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.
- [0125] **<3-3> 달맞이꽃 추출물의 AKT 세포신호 전달 경로를 통한 평활근세포 이상증식 억제 효과 확인**
- [0126] 혈관평활근 세포의 증식에서 AKT 활성화 또한 중요하게 작용함이 잘 알려져 있다. 이에, 평활근세포 이상 증식이 유도된 평활근세포에서 달맞이꽃 추출물이 AKT 세포신호 전달 경로에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 달맞이꽃 추출물을 혈관평활근세포에 처리하고 혈관평활근세포의 증식을 촉진하는 성장인자로 평활근세포 이상 증식을 유도한 후 PLC 및 AKT 활성을 Western blot 분석법을 이용하여 확인하였다.
- [0127] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 상기 <실시에 1>에서 제조한 달맞이꽃 추출물을 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 상기 <실험예 1>에서 배양한 혈관평활근세포에 처리한 후, PDGF-BB를 첨가하여 혈관평활근세포의 증식 이상을 유도하였다. 그 다음, 상기 실험예 <3-2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 Western blot 분석법을 수행하였다. 이 때 1차 항체로 항-AKT 항체 및 항-p-AKT 항체, 항-PLC 항체, 항-p-PLC 항체를 사용하였다.
- [0128] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, PDGF-BB를 처리한 경우 AKT 세포신호 전달 경로 중 PLC 및 AKT 단백질의 인산화가 증가함을 확인하였다. 반면, 달맞이꽃 추출물을 함께 처리한 경우 PLC 및 AKT 단백질의 인산화가 현저히 감소함을 확인하였다. 또한, 달맞이꽃 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 PLC 및 AKT 단백질의 인산화가 감소함을 확인하였다.
- [0129] 상기 결과를 통해 본 발명의 달맞이꽃 추출물은 농도 의존적으로 AKT 세포신호 전달 경로 중 PLC 및 AKT 단백질의 활성을 저해하여 평활근세포 이상 증식에 대한 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.
- [0131] 따라서, 상기 결과들을 통해 본 발명에 따른 달맞이꽃 추출물이 세포 내 AKT 활성화 억제 및 MAPK 활성화 억제를 경유하여 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 확인하였으므로, 상기 추출물은 평활근세포의 이상 증식으로 인한 질환의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0133] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.
- [0135] **<제조예 1> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조**

[0136] <1-1> 산제의 제조

[0137] 본 발명의 추출물 10 mg

[0138] 유당 1 g

[0139] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0141] <1-2> 정제의 제조

[0142] 본 발명의 추출물 0.1 mg

[0143] 옥수수전분 100 mg

[0144] 유 당 100 mg

[0145] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0146] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0148] <1-3> 캡슐제의 제조

[0149] 본 발명의 추출물 0.1 mg

[0150] 옥수수전분 100 mg

[0151] 유 당 100 mg

[0152] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0153] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0155] <1-4> 환의 제조

[0156] 본 발명의 추출물 1 mg

[0157] 유당 1.5 g

[0158] 글리세린 1 g

[0159] 자일리톨 0.5 g

[0160] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0162] <1-5> 과립의 제조

[0163] 본 발명의 추출물 0.15 mg

[0164] 포도당 200 mg

[0165] 전분 600 mg

[0166] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0168] <제조예 2> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조

[0169] <2-1> 밀가루 식품의 제조

[0170] 본 발명의 추출물의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래



커 및 면류를 제조하였다.

[0172] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0173] 본 발명의 추출물의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0175] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0176] 본 발명의 추출물의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0178] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0179] 본 발명의 추출물의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0181] <2-5> 선식의 제조

[0182] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0183] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0184] 본 발명의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0185] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0186] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0187] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0188] 본 발명의 추출물(3 중량부),

[0189] 영지(0.5 중량부),

[0190] 지황(0.5 중량부)

[0192] <제조예 3> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강음료의 제조

[0193] <3-1> 건강음료의 제조

[0194] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 추출물 100 mL를 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0196] <3-2> 야채 주스의 제조

[0197] 본 발명의 추출물 100 mL를 토마토 또는 당근 주스 1,000 mL에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0199] <3-3> 과일 주스의 제조

[0200] 본 발명의 추출물 100 mL를 사과 또는 포도 주스 1,000 mL에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[0202] <제조예 4> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 외용제의 제조

[0203] <4-1> 연고제의 제조

[0204] 본 발명의 추출물을 함유한 연고제를 하기 [표 1]에 기재된 구성에 따라 통상적인 방법으로 제조하였다.

표 1

[0205]

성분	함량(%)
본 발명의 추출물	1.0
글리세린	8.0
부틸렌글리콜	4.0
유동과라핀	15.0
케타글루칸	7.0
카보머	0.1
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	3.0
스쿠알란	1.0
세테아릴 글루코사이드	1.5
소르비탄 스테아레이트	0.4
세테아릴 알코올	1.0
밀납	4.0
방부제	미량
향료	미량
정제수	잔량
	100

[0207] <제조예 5> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물의 제조

[0208] <5-1> 영양화장수(lotion)

[0209] 본 발명의 추출물을 함유한 영양화장수(lotion)을 하기 [표 2]의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

표 2

[0210]

성분	함량(중량%)
본 발명의 추출물	2.0
글리세릴 스테아레이트 SE	1.5
세테아릴알콜	1.5
라놀린	1.5
폴리솔베이트 60	1.3
솔비타스테아레이트	0.5
경화식물유	4.0
광물유	5.0
트리옥타노인	2.0
디메치콘	0.8
초산 토크페롤	0.5
카르복시비닐 폴리머	0.12
글리세린	5.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
소듐히아루로네이트	5.0
트리에탄올아민	0.12
유니사이드-유 13	0.02
향	미량
증류수	잔량
합계	100

[0212] <5-2> 영양크림

[0213] 본 발명의 추출물을 함유한 영양크림을 하기 [표 3]의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

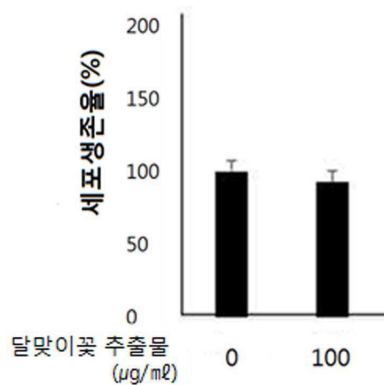
표 3

[0214]

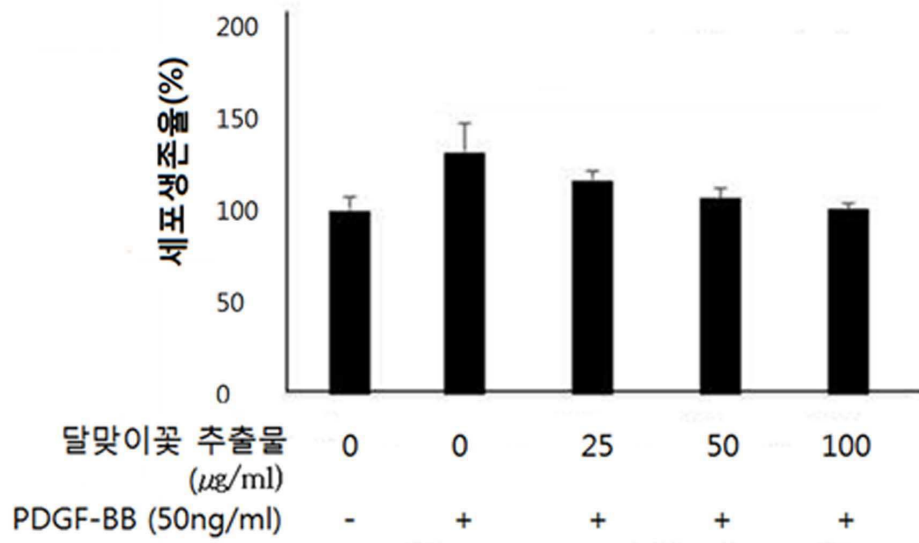
성분	함량(중량%)
본 발명의 추출물	2.0
친유형 모노스테아린산 글리세린	1.5
세테아릴알콜	1.5
스테아린산	1.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비타스테아레이트	0.6
이소스테아릴 이소스테레이트	5.0
스쿠알란	5.0
광물유	35.0
디메치콘	0.5
히드록시에틸셀룰로오스	0.12
글리세린	6.0
트리에탄올아민	0.7
유니사이드-유 13	0.02
향	미량
증류수	잔량
합계	100

도면

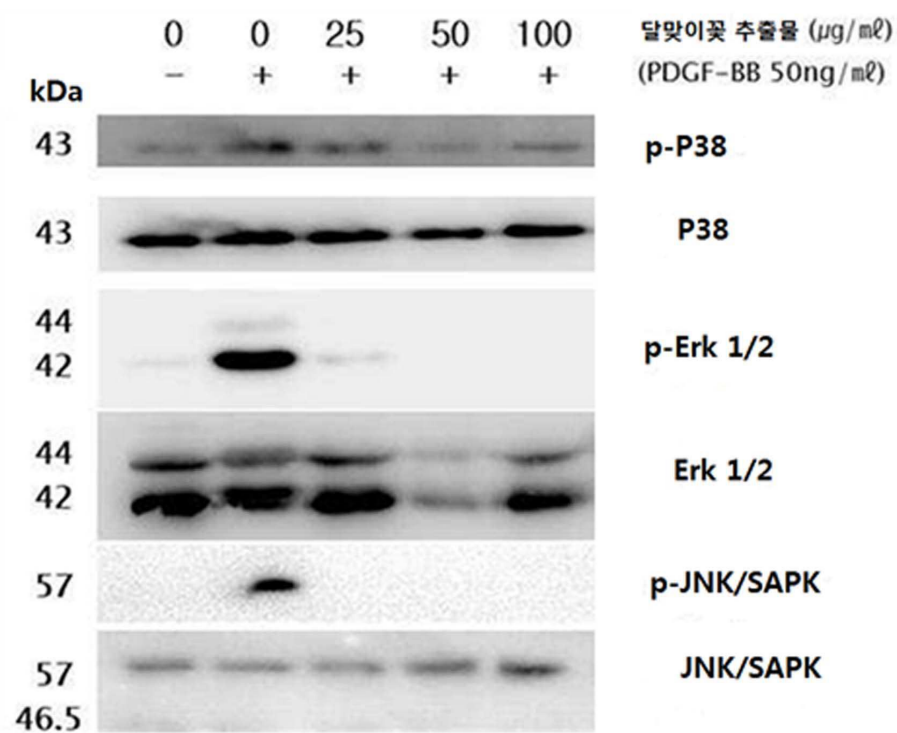
도면1



도면2



도면3



도면4

