



등록특허 10-2175436



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월06일

(11) 등록번호 10-2175436

(24) 등록일자 2020년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/074 (2010.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 36/258 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0607 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0104690

(22) 출원일자 2018년09월03일

심사청구일자 2018년09월03일

(65) 공개번호 10-2020-0026572

(43) 공개일자 2020년03월11일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050117787 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 5 항

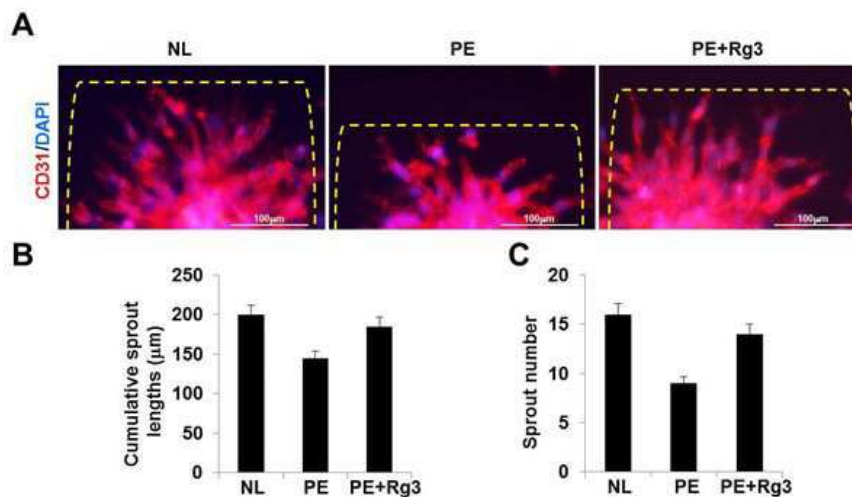
심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 **홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 제대혈 줄기세포의 기능회복, 태반혈관형성 촉진, 및 임신 중독증 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 홍삼 추출물, 특히 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 제대혈 줄기세포의 기능회복, 태반혈관형성 촉진, 및 임신 중독증 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 임신중독증 산모에서 태반혈관형성 촉진 효과가 현저하므로, 의학 및 보건 분야에서 크게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)

A61P 15/00 (2018.01)

C12N 2500/76 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130079227 A

KR1020160084003 A

KR1020160141986 A*

JP2013509401 A

JP2017501975 A

KR1020070032435 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 제대혈 유래 줄기세포의 분화 촉진용 조성물로서,
상기 제대혈 유래 줄기 세포는 임신중독증 산모 유래인 것이며,
상기 분화는 혈관 내피 세포로의 분화인 것인, 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 제대혈 유래 줄기 세포의 기능 회복용 조성물로서,
상기 세포는 제대혈 유래 혈관 줄기 세포이고,
상기 세포는 임신중독증 산모 유래인 것이며,
상기 세포의 기능은 세포 증식능, 세포 이동능, 세포 부착능, 세포 분화능, 상처 치유능, 또는 혈관 형성능인
것인, 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 임신중독증 예방 또는 치료용 약학조성물로서,
상기 임신중독증은 태반이 형성되는 과정에서 혈류 공급 제한에 의해 발생하는 것인, 약학조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 임신중독증 예방 또는 개선용 식품조성물로서,
상기 임신중독증은 태반이 형성되는 과정에서 혈류 공급 제한에 의해 발생하는 것인, 식품조성물.

청구항 12

진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 임신중독증 예방 또는 개선용 화장료조성물로서,
상기 임신중독증은 태반이 형성되는 과정에서 혈류 공급 제한에 의해 발생하는 것인, 화장료조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 제대혈 줄기세포의 기능회복, 태반혈관형성 촉진, 및 임신 중독증 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 만혼과 노산의 영향으로 고위험 임신부가 늘면서 임신중독증도 크게 증가하고 있다. 임신중독증은 임산부 사망 원인 1위로, 일반적으로 산모의 2~7%가 걸리는 것으로 알려져 있다. 매년 전 세계 임신부 7만6000명과 태아 50만 명이 임신중독으로 사망하며, 한국 건강보험심사평가원에 따르면 한국에서 2014년 임신중독증을 진료받은 만 35세 이상 산모는 4년전보다 33.4% 증가했다. 한국 보건복지부에 따르면 임신 중독증이란 "임신 20주 이상 임산부에게 여러 가지 원인으로 인해 나타나는 고혈압, 부종, 단백뇨 등의 증상"을 의미하며, 또한 임신 중독증을 겪는 임신부는 전신경련, 혈액 응고 등 증상이 주로 나타나고 태아에게는 발육부전, 조산 등이 나타난다. 임신중독증은 태반이 형성되는 과정에서 혈류 공급이 제한되는 것이 주요 발생 원인이다. 따라서, 임신중독증의 예방 및 치료를 위해 임신 초중기의 원활한 태반혈관형성이 매우 중요하다고 할 것이다.

[0004] 한편, 홍삼은 한약의 일종으로, 인삼(두릅나무과 Araliaceae)의 뿌리를 쥔 것이다. 인삼의 유효성분들은 인삼의 종류, 뿌리 부위, 수확 년생, 수확 시기, 제조방법에 따라 현저한 차이가 있어, 일반적으로 인삼과 홍삼을 구분하여 별개의 약제로 취급한다. 홍삼의 유효성분은 Rg1, Rb1, Rb2, Rh2, Rg3 등 34여종에 달하며, 성분 각각의 효과가 상이하다. 예를 들면, 한국 등록특허 제 KR 101539574 B1에는 “진세노사이드 Rg1에 의한 망막 재생 효과”가 기재되어 있고, 한국 공개특허 제 KR 2015-0099043 A에는 “Rg2 강화 홍삼의 골다골증 개선 효과”가 기재되어 있다.

[0005] 본 발명은 상기의 홍삼 성분, 특히 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 제대혈 줄기세포의 기능회복, 태반혈관형성 촉진, 및 임신 중독증 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 임신중독증 산모에서 혈관 줄기세포의 혈관 형성 기능을 향상시키고, 태반혈관형성 촉진 효과가 현저하므로, 의학 및 보건 분야에서

크게 이용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 제대혈 줄기세포의 기능회복, 태반혈관형성 촉진, 및 임신 중독증 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0012] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0013] 본 발명의 일 구체예에서 “홍삼”이란, 한약의 일종으로, 인삼(두릅나무과 Araliaceae)의 뿌리를 쥔 것이다. 인삼의 유효성분들은 인삼의 종류, 뿌리 부위, 수확 년생, 수확 시기, 제조방법에 따라 현저한 차이가 있어, 일반적으로 인삼과 홍삼을 구분하여 별개의 약재로 취급한다. 의약품으로 이용시, 홍삼은 정량할 때 환산한 건조물에 대하여 진세노사이드 Rg1(C₄₂H₇₂O₁₄: 801.01) 0.10% 이상, 및 진세노사이드 Rb1(C₅₄H₉₂O₂₃: 1109.29) 0.20% 이상을 함유하는 것을 기준으로 한다(대한약전 참고). 상기의 Rg1 이외에, 홍삼의 진세노사이드는 RB2, RH2, RG3 등 34여종에 달하며, 성분 각각의 효과가 상이하다. 예를 들면, 한국 등록특허 제 KR 101539574 B1에는 “진세노사이드 Rg1에 의한 망막 재생 효과”가 기재되어 있고, 한국 공개특허 제 KR 2015-0099043 A에는 “Rg2 강화 홍삼의 골다골증 개선 효과”가 기재되어 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 홍삼의 유효성분은 홍삼 자체로서도 가능하나, 보다 바람직하게는 진세노사이드 Rg3이다. 종래에 진세노사이드 Rg3는 매우 강력한 혈관신생억제제로서 항암효과가 우수하다고 알려져 있었다(Biochem Pharmacol. 2006 Aug 14;72(4):437-45. Epub 2006 May 12. PubMed PMID: 16793023 참조). 그러나 본 발명자들은 종래의 학계 보고에 대하여 각고의 노력을 기울인 결과, 진세노사이드 Rg3가 모든 혈관 형성을 억제하는 것이 아니며, 제대혈 줄기세포에 있어서는 태반혈관형성을 촉진하고, 제대혈내 혈관 줄기세포의 기능을 회복시킨다는 것을 증명하였다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서 “임신중독증”이란, “임신 20주 이상 임산부에게 여러 가지 원인으로 인해 나타나는 고혈압, 부종, 단백뇨 등의 증상”을 의미하며, 또한 임신 중독증을 겪는 임산부는 전신경련, 혈액 응고 등 증상이 주로 나타나고 태아에게는 발육부전, 조산 등이 나타난다. 임산부 사망 원인 1위로, 일반적으로 산모의 2~7%가 걸리는 것으로 알려져 있다. 매년 전 세계 임산부 7만6000명과 태아 50만 명이 임신중독으로 사망하며, 한국 건강보험심사평가원에 따르면 한국에서 2014년 임신중독증을 진료받은 만 35세 이상 산모는 4년전보다 33.4% 증가했다. 태반이 형성되는 과정에서 혈류 공급이 제한되는 것이 임신중독증의 주요 발생 원인으로 지목되고 있으므로, 임신중독증의 예방 및 치료를 위해 임신 초기기의 원활한 태반혈관형성이 매우 중요하다.
- [0017] 본 발명의 홍삼 성분, 특히 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 조성물은 제대혈 줄기세포의 태반혈관형성을 촉진하는 기능이 있으므로, 임신중독증 산모의 체내에서 저하된 태반혈관형성을 정상적으로 회복시킴으로써 임신중독증의 예방 또는 치료 용도로써 크게 이용될 것으로 기대된다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에서 “제대혈 혈관 줄기세포”란, 태반과 제대(cord blood)에 존재하는 줄기세포의 일종으

로 비교적 증식능력이 큰 미분화 조혈줄기세포를 의미한다. 줄기세포 배양 기술이 미비하던 종래에는 혈관 기능 연구를 위해 인간 태줄 정맥 내피 세포(Human umbilical vein endothelial cells; HUVEC)를 많이 이용하였으나, HUVEC은 정맥 내피세포로서 편평상피 계열이고, 이미 분화가 완료되어 미분화 조혈줄기세포로서의 기능을 수행하지 못한다는 점에서 본 발명의 제대혈 혈관 줄기세포와 구별된다.

[0020] 제대혈 혈관 줄기세포는 태반의 혈관형성 및 태아의 혈관형성에 기여하므로, 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 형성 기능이 저하되면 태아의 혈관 발달이 정상적으로 이루어 지지 않고, 이는 태아의 출생 후에도 다양한 혈관 질환을 야기한다. 따라서 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 형성 기능이 저하된 임신중독증 산모로부터 출생한 아이의 경우, 성인이 되어서도 혈관 관련 질환이 높은 것으로 보고되고 있다.

[0021] 본 발명의 홍삼 성분, 특히 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신중독증 산모유래 태아의 저하된 제대혈내 혈관 줄기세포의 기능을 정상적으로 회복시킴으로서 태아의 출생 후 발생 가능한 혈관성 질환을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

[0023] 한편, 본 발명의 일 구체예에서 "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 임신중독증, 더 나아가서는 태반혈관형성이 저하되어 발생하는 질환, 더 나아가서는 혈관 형성이 저하되어 발생하는 질환, 더 나아가서는 혈관 및 순환계를 구성하는 세포의 기능 저하로 발생하는 질환으로 인해 야기된 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 일 구체예에서 "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 임신중독증, 더 나아가서는 태반혈관형성이 저하되어 발생하는 질환, 더 나아가서는 혈관 형성이 저하되어 발생하는 질환, 더 나아가서는 혈관 및 순환계를 구성하는 세포의 기능 저하로 발생하는 질환으로 인해 야기된 증상이 호전되거나, 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구체예에서 "약학 조성물"은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제, 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0029] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제, 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.

[0031] 본 발명에서 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내, 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합, 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로, 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 10g/kg 또는 0.001 내지

10g/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구체예에서 “식품 조성물”이란, 본 발명에서 목적으로 하는 적응증의 예방 또는 개선을 위해 다양하게 이용되는 것으로서, 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 기존의 식품용 섭취물로부터 개량되어 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 100%의 비율로 첨가할 수 있다. 여기서, 상기 식품조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다. 그 외 본 발명의 식품조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성풍미제 및 천연풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 통상적으로 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 100 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 일 구체예에서 “화장료 조성물”이란, 미용 목적으로 화장료에 포함되는 조성물이다. 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 화장료조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제(화장용), 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누(비의료용), 크림비누, 페이스워시, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 향산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다. 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다. 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸알콜, 옥틸도데칸올, 올레일알콜, 판텐올, 라놀린알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다. 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 향산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.

[0038] 본 발명의 일 구체예에서, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 제대혈 유래 줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공하고, 상기 홍삼 추출물은 진세노사이드 Rg3인 것인 제대혈 유래 줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공하며, 상기 분화는 순환기계통 세포로의 분화인 것인 제대혈 유래 줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명의 다른 구체예에서, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 제대혈 유래 혈관 줄기 세포의 기능 회복용 조성물을 제공하고, 상기 홍삼 추출물은 진세노사이드 Rg3인 것인 제대혈 유래 혈관 줄기 세포의 기능 회복용 조성물을 제공하며, 상기 세포의 기능은 세포 증식능, 세포 이동능, 세포 부착능, 세포 분화능, 상처 치유능, 또는 혈관 형성능인 것인 제대혈 유래 혈관 줄기 세포의 기능 회복용 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 태반혈관형성 촉진용 조성물을 제공하고, 상기 홍삼 추출물은 진세노사이드 Rg3인 것인 태반혈관형성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 임신중독증 예방 또는 치료용 약학조성물

을 제공하고, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 임신중독증 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하며, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 임신중독증 예방 또는 개선용 화장료조성물을 제공하며, 상기 홍삼 추출물은 진세노사이드 Rg3인 것인 약학조성물, 식품조성물, 또는 화장료조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하며, 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 예방 또는 개선용 화장료조성물을 제공하며, 상기 홍삼 추출물은 진세노사이드 Rg3인 것인 약학조성물, 식품조성물, 또는 화장료조성물을 제공한다.

[0048] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0050] 본 발명은 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 제대혈 줄기세포의 기능회복, 태반혈관형성 촉진, 및 임신 중독증 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 임신중독증, 더 나아가서는 태반혈관형성이 저하되어 발생하는 질환, 더 나아가서는 혈관 형성이 저하되어 발생하는 질환, 더 나아가서는 혈관 및 순환계를 구성하는 세포의 기능 저하로 발생하는 질환의 예방 또는 치료 효과가 현저하므로, 의학 및 보건 분야에서 크게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 이동성 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 부착능 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 혈관 형성능 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 혈관 형성능 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 분화능 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 상처치유능 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 3D 혈관 형성능 회복 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 제대혈 유래 줄기세포와 HUVEC(탯줄 정맥 혈관 내피세포)에서의 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 효과 비교 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055] 제대혈 줄기세포의 분리 및 배양 방법

[0056] 37-41주의 임신 산모로부터 출산 직후 탯줄내의 제대혈(~50ml)을 수득하였다. 수득한 제대혈을 3000rpm 에서 15분간 원심분리하여 단핵구 세포층을 분리하고, 분리된 세포를 Biocoll(Biochrom, Berlin, Germany)에 올리고 400g 에서 35분간 원심분리하여 밀도 구배로 적혈구를 제거하였다. 이후 상층액의 단핵세포 층을 수득하여, anti-CD133/C-kit double positive 와 Lin-negative 한 세포를 마이크로비즈를 이용하여 분리하였다. 상기의 방법으로 분리된 세포를 제대혈 혈관 줄기세포라 명명하였다. 분리된 제대혈 줄기세포는 피브로넥틴(fibronectin) 코팅된 6웰 배양접시에 파종한 후, EGM-2 배양액(Clonetics, Cell Systems; containing fetal bovine serum, human VEGF-A, human fibroblast growth factor-B, human epidermal growth factor, IGF1, and

ascorbic acid in appropriate amounts)을 이용하여 이틀에 한번씩 배양액을 교체해 주며 배양하였다.

[0058] **실시예 1: 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 이동성 회복**

[0059] 정상(NL) 및 임신중독증(PE) 산모유래 제대혈에서 분리, 분화된 혈관 내피 줄기 세포의 이동성을 분석하기 위해 트랜스웰 이동 분석법(transwell migration assay)을 수행하였다. 10 mg/ml 피브로넥틴을 이중챔버(boyden chamber)의 외측 멤브레인에 코팅한 후, 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 1×10^5 세포 농도로 이중챔버(boyden chamber)의 내측 멤브레인에 파종하였다. 24시간 후, 헤마토실린&에오진 염색하여 이중챔버(boyden chamber)의 외측 멤브레인으로 이동한 제대혈 줄기세포를 현미경으로 확인하였다(도 1A). 이동한 세포의 수는 계수하여 그래프로 나타내었다(도 1B). 그 결과 정상에 비해 임신중독증 산모의 제대혈 유래 혈관내피 줄기세포의 이동성이 현저히 감소함을 확인하였으며, 이러한 감소 효과는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 회복됨을 확인하였다(도 1).

[0061] **실시예 2: 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 부착능 회복**

[0062] 정상(NL) 및 임신중독증(PE) 산모유래 제대혈에서 분리, 분화된 혈관 내피 줄기 세포의 부착능을 비교 분석하기 위해 세포 부착능 분석(cell adhesion assay)을 수행하였다. 96웰 배양접시에 10 mg/ml 피브로넥틴을 코팅한 후, 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 1×10^5 세포 농도로 파종하였다. 30분 후 PBS로 배양액 및 부착되지 못한 세포를 제거하고, 배양접시에 부착된 제대혈 줄기세포를 헤마토실린&에오진 염색하여 현미경으로 확인하였다(도 2A). 부착된 세포의 수는 계수하여 그래프로 나타내었다(도 2B). 그 결과 정상에 비해 임신중독증 산모의 제대혈 유래 혈관내피 줄기세포의 부착능이 현저히 감소함을 확인하였으며, 이러한 감소 효과는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 회복됨을 확인하였다(도 2).

[0064] **실시예 3: 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 혈관 형성능 회복**

[0065] 정상(NL) 및 임신중독증(PE) 산모유래 제대혈에서 분리, 분화된 혈관 내피 줄기 세포의 혈관 형성능을 비교 분석하기 위해 매트릭셀을 이용한 혈관 형성능 분석(tube formation assay)을 수행하였다. 250mL의 매트릭셀을 24 웰 배양접시에 코팅한 후, 37° C CO₂ 배양기에서 30분간 중합시켜준비하였다. 이후 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 1.2×10^5 세포 농도로 매트릭셀 코팅된 배양접시에 파종하고, 24시간 동안 관찰하며 혈관 형성능을 분석하였다. 형성된 혈관은 현미경 하에서 사진 촬영하고(Adobe PhotoshopVR)(도 3A), 이미지 분석 시스템(ImageJ software)으로 정량화하여 그래프로 나타내었다(도 3B). 그 결과 정상에 비해 임신중독증 산모의 제대혈 유래 혈관내피 줄기세포의 혈관 형성능이 현저히 감소함을 확인하였으며, 이러한 감소 효과는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 회복됨을 확인하였다(도 3).

[0067] **실시예 4: 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 혈관 투과성 회복**

[0068] 정상(NL) 및 임신중독증(PE) 산모유래 제대혈에서 분리, 분화된 혈관 내피 줄기 세포의 혈관 투과성을 세포 투과성 조절 단백질인 VE-카데린(VE-Cadherin)을 이용하여 비교 분석하였다. 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 35mm 배양접시에 파종한 후, 세포가 배양접시에서 밀도 100%가 될 때까지 배양하였다. 이후 세포를 3.7% 파라포름알데하이드 용액으로 15분간 고정하고, 0.1% Triton X-100 용액으로 15분간 투과(permeabilization)시킨 후, anti-VE 카데린 항체 및 형광 2차 항체를 이용하여 세포-세포 접합부위에 존재하는 VE 카데린 단백질을 염색하였다. 이를 형광 현미경으로 분석하였다. 그 결과 정상에 비해 임신중독증 산모의 제대혈 유래 혈관내피 줄기세포에서 세포와 세포 사이의 VE-카데린의 염색이 현저히 감소함을 확인하였으며, 이러한 감소 효과는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 회복됨을 확인하였다(도 4A).

[0069] 또한 투과성 분석을 위해 트랜스웰을 이용한 FITC-덱스트란 유동 분석(FITC-dextran flux assay)을 수행하였다. 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 12 트랜스웰(12 well Transwell filter)의 내측 챔버에 파종하고, 세포가 배양접시 내 밀도 100%가 될 때까지 배양한 후, 1 mg/ml FITC-덱스트란을 탑 챔버에 첨가하였다. 시간이 흐름에 따라 하층의 배양액(50ml)을 수득하여 형광계(fluorometer, FluorStar Optima, BMG Labtech, excitation 485nm, emission 520nm)로 형광 물질의 양을 분석하였다. 그 결과, 정상에 비해 임신중독

증 산모의 혈관줄기세포의 투과성이 증가하였으며 이러한 효과는 홍삼 특이성분인 Rg3에 의해 회복됨을 확인하였다(도 4B).

[0071] **실시예 5: 홍삼 특이성분인 Rg3 에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 분화능 회복**

[0072] 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 10 mg/ml 피브로넥틴이 코팅된 6웰 배양접시에 파종한 후, EGM-2 배양액으로 배양하여 세포의 분화능을 분석하였다. PE+Rg3 세포의 경우, 산모로부터 분리 후 3일부터 Rg3를 처리하였다. 각 시료에서 혈관 줄기세포가 최초로 혈관내피세포로 분화된 날짜를 확인하고, 분화된 세포의 집락(colony) 수는 최초로 분화된 시기에 보여지는 웰당 집락의 수를 계수하였다. 그결과, 정상에 비해 임신 중독증 산모유래 혈관 줄기세포의 분화속도가 느리며, 집락 수 또한 감소되었다. 이러한 임신중독증 산모의 혈관 줄기세포의 분화능 감소 효과는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 현저히 회복됨을 확인하였다(도 5).

[0074] **실시예 6: 홍삼 특이성분인 Rg3 에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 상처치유능 회복**

[0075] 줄기세포의 상처치유능을 비교 분석하기 위해 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 1×10^5 세포 농도로 6웰 배양접시에 파종한 후, 48시간 배양하였다. 이후 마이크로팁(microtip)을 이용하여 스크레이프로 상처를 유도하고, 0시간, 및 16시간에 현미경으로 혈관 줄기세포의 이동거리를 측정하여 상처 치유 정도를 정량하였다. 그 결과 정상에 비해 임신 중독증 산모유래 혈관 줄기세포의 상처치유능이 감소해 있음을 확인하였고, 이러한 임신중독증 산모의 혈관 줄기세포의 상처치유능 감소는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 현저히 회복됨을 확인하였다(도 6).

[0077] **실시예 7: 홍삼 특이성분인 Rg3 에 의한 임신중독증 산모 유래 제대혈내 혈관 줄기세포의 3D 혈관 형성능 회복**

[0078] 정상(NL) 및 임신중독증(PE) 산모유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기 세포의 혈관 형성능을 비교분석 하기 위해 3차원 발아 분석(3-Dimentional sprouting assay)을 수행하였다. 3000개의 정상 산모유래 제대혈 줄기세포(NL), 임신중독증 산모유래 제대혈 줄기세포(PE), 또는 임신중독증 줄기세포에 Rg3(5mg/ml)를 24시간 전부터 처리한 혈관 줄기세포(PE+Rg3)를 0.8% 아가로스로 코팅된 96웰 원형 배양접시에 배양하고, 24시간 후 구(speroid)를 형성한 세포들을 20% 매트릭셀-피브린 겔(20% matrigel-containing 3 mg/ml fibrinogen, 2 U/ml thrombin, and 200mg/ml aprotinin)에 이전하여 파종하고, 48시간 추가 배양하였다. 이후 구형 세포를 3.7% 파라포름알데하이드 용액으로 고정하고, anti-CD31 단클론항체로 염색하여, 형광현미경으로 세포로부터 맹출된 발(sprouting)의 개수와 길이를 측정하여 분석하였다. 그 결과 정상에 비해 임신 중독증 산모유래 혈관 줄기세포의 3차원 발아(3D sprouting) 혈관 형성능이 감소함을 확인하였고, 이러한 임신중독증 산모의 혈관 줄기세포의 혈관 형성능 감소는 홍삼 특이 성분인 Rg3에 의해 현저히 회복됨을 확인하였다(도 7).

[0080] **실시예 8: 제대혈 유래 줄기세포와 HUVEC(탯줄 정맥 혈관 내피세포)에서의 홍삼 특이성분인 Rg3에 의한 효과 비교 분석**

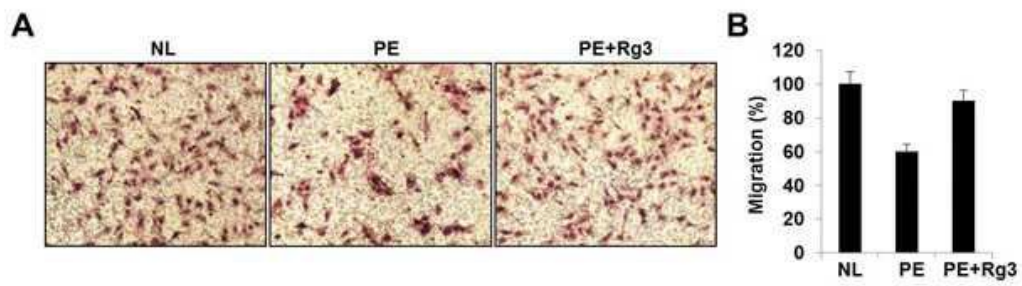
[0081] 제대혈 유래 줄기세포와 탯줄 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 Rg3에 의한 효과를 비교 분석하기 위해, 두 세포에 각각 Rg3(5mg/ml)를 24시간 처리한 후, 동일한 조건하에서 세포의 이동성과 부착능을 분석하였다. 그 결과 HUVEC에 비해 제대혈 유래 혈관 줄기세포에서 Rg3에 대한 효과가 더 강하게 나타남을 확인하였다(도 8).

[0083] 상기 실시예 1 내지 8로부터, 홍삼 특이 성분인 Rg3가 제대혈 유래 줄기세포에서 혈관형성을 위한 세포 기능 회복에 현저한 효과가 있으며, 이로서 본 발명의 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 조성물을 태반혈관형성 저하의 원인으로 발생하는 임신중독증의 예방 또는 치료용 조성물로 사용 가능함을 알 수 있었다.

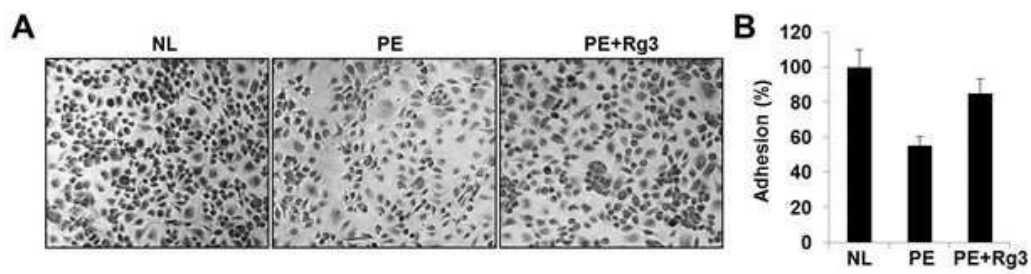
[0085] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

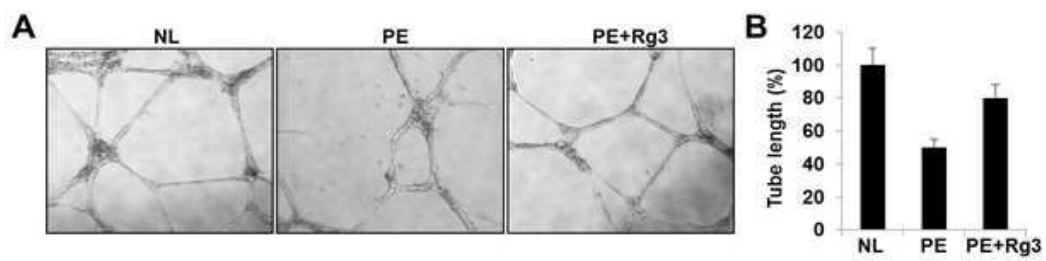
도면1



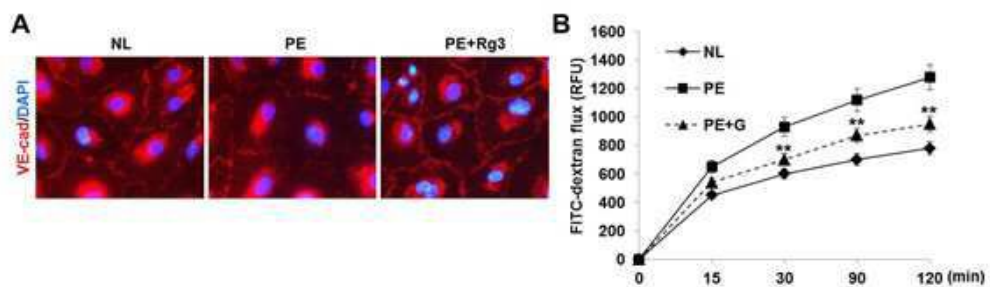
도면2



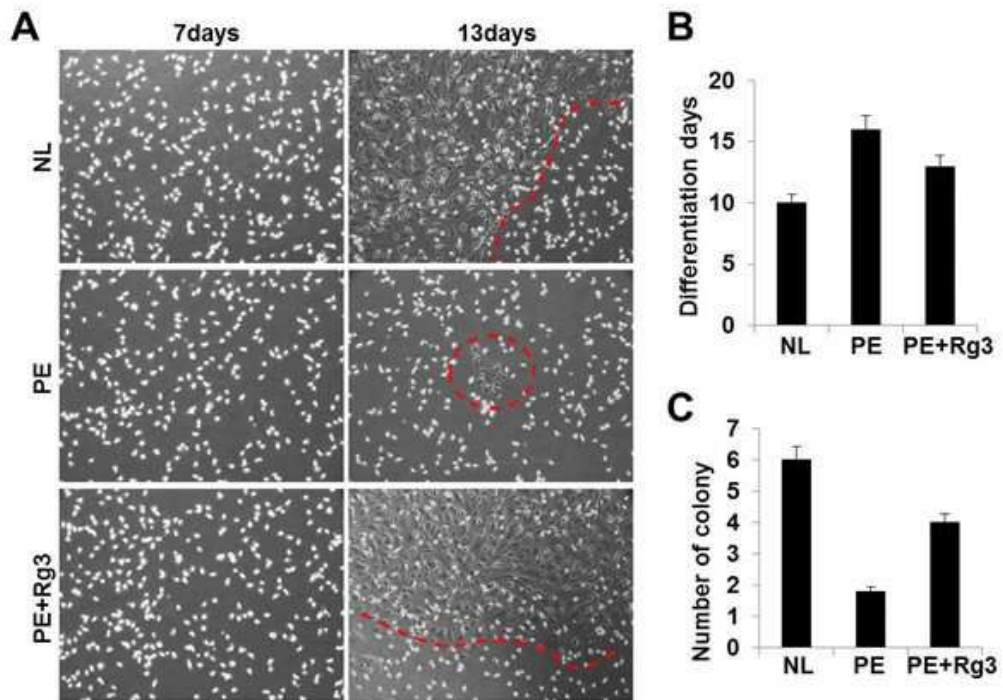
도면3



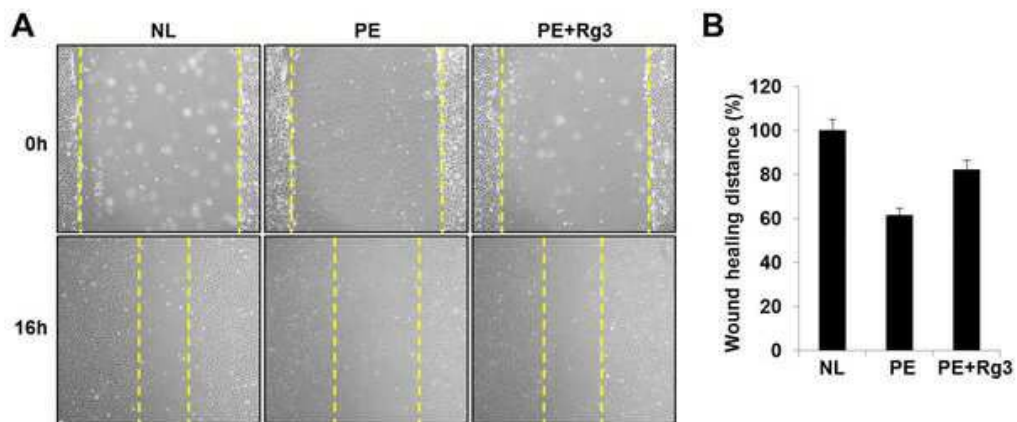
도면4



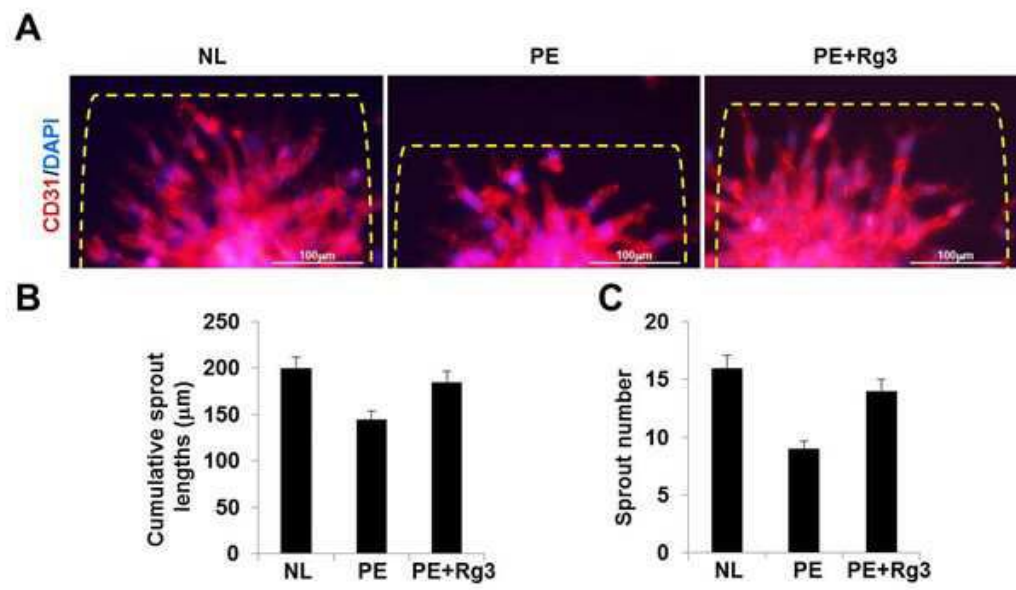
도면5



도면6



도면7



도면8

