



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0118405
(43) 공개일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/718 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/718 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0045964
(22) 출원일자 2015년04월01일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
김택중
서울특별시 광진구 독성로40길 64-4, 401호 (자양동, 해비치빌)
김억천
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 미래관 416호 (매지리, 연세대학교)
김서호
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 미래관 416호 (매지리, 연세대학교)
(74) 대리인
특허법인미주

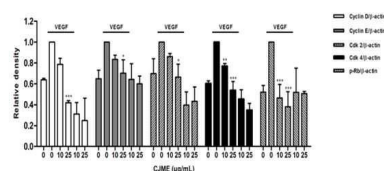
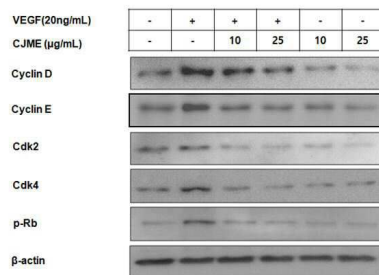
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 황련 (*Coptis japonica* Makino) 수추출물을 유효성분으로 포함하고 혈관내피 성장인자에 대하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 황련 수추출물은 VEGF에 의한 세포주기 진행을 억제하고 G1기에서 정지하게 하여, VEGF에 대한 혈관내피세포의 증식을 억제하며, VEGF에 의한 혈관내피세포의 이동을 억제하고, VEGF에 의한 대동맥 주변으로의 미세혈관 발아(sprouting)를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내므로, 신생혈관 형성으로 인한 당뇨병성 망막증, 녹내장 등과 같은 안구 질환 및 암 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 2236/331 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711015864

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수기관유치

연구과제명 Fraunhofer IZFP-Yonsei BME Joint Research Center 유치사업

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교(원주캠퍼스)

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

황련 (*Coptis japonica* Makino) 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 황련 수추출물은 온수 추출물인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 당뇨병성 망막증, 신생혈관성 녹내장, 후수정체 섬유증식증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 궤양, 원추 박막, 황반 변성, 쇼그렌 증후군, 근시 안과 종양, 각막이식 거부반응, 이상 창상 유합, 트라코마(trachoma), 골질환, 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염, 폐혈증성 관절염, 혈관종(hemangiomas), 섬유성 혈관종(angiofibroma), 건선(psoriasis), 화농성 육아종(pyogenic granuloma), 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절 손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 과열증, 염증성 장질환, 치근막 질환, 동맥경화증, 재협착증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부 노화, 갑상선 과증식, 그레이브스 병(Grave's disease), 암 발생(cancer development), 암 침윤 및 암 전이(cancer metastasis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 췌장암, 신장암, 육종, 중피종, 기형암종, 별아교세포종, 흑색종, 혈관종 및 아교모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 황련 수추출물은 혈관내피세포증식인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포주기 진행을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 황련 수추출물은 혈관내피세포증식인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관내피 세포증식을 억제하거나, 혈관내피 세포이동을 억제하거나, 관 형성을 억제하거나, 또는 대동맥으로부터 미세혈관 발아(sprouting)를 억제함으로써 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 7

황련 (*Coptis japonica* Makino) 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 황련 수추출물은 온수 추출물인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 식품 조성물은 당뇨병성 망막증, 신생혈관성 녹내장, 후수정체 섬유증식증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 궤양, 원추 박막, 황반 변성, 쇼그렌 증후군, 근시 안과 종양, 각막이식 거부반응, 이상 창상 유합, 트라코마(trachoma), 골질환, 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염, 패혈증성 관절염, 혈관종(hemangiomas), 섬유성 혈관종(angiofibroma), 건선(psoriasis), 화농성 육아종(pyogenic granuloma), 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절 손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열증, 염증성 장질환, 치근막 질환, 동맥경화증, 재협착증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부 노화, 갑상선 과증식, 그레이브스 병(Grave's disease), 암 발생(cancer development), 암 침윤 및 암 전이(cancer metastasis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 완화용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 췌장암, 신장암, 육종, 중피종, 기형암종, 별아교세포종, 흑색종, 혈관종 및 아교모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 황련 수추출물은 혈관내피세포증식인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포주기 진행을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 황련 수추출물은 혈관내피세포증식인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관내피 세포증식을 억제하거나, 혈관내피 세포이동을 억제하거나, 관 형성을 억제하거나, 또는 대동맥으로부터 미세혈관 발아(sprouting)를 억제함으로써 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 13

- (a) 황련(*Coptis japonica* Makino)에 황련 중량의 2배 이상의 물을 가하고 추출하는 단계; 및
 - (b) 상기 추출물을 여과하고 건조시키는 단계를 포함하는,
- 신생혈관형성 억제용 황련 수추출물의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

단계(a)에서 물은 온수이고, 12시간 이상 추출하는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 황련 수추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 황련(*Coptis japonica* Makino) 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 신생혈관 형성에 관련된 혈관내피세포의 이동, 관(tube) 형성, 대동맥으로부터의 미세혈관 발아(sprouting), 세포주기 등을 억제할 수 있는 황련의 수추출물에 관한 것으로, 이를 신생혈관 형성 억제제로 유용하게 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0002] 혈관 신생의 경우에는 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하며, 혈관 신생의 경우 태아의 발달(fetal development), 상처의 치유(wound healing), 여성의 생식주기에서 정상적으로 나타난다.(Folkman J, J. Biol. Chem., 267, 10931-10934, 1992) 이러한 정상적인 혈관신생의 과정에서는 혈관신생 억제제와 촉진제의 균형이 나타나지만 균형이 깨지면 비정상적으로 혈관신생이 나타나게 된다. 혈관신생이 정상범위 이상으로 나타나게 되면 암세포의 성장과 전이, 류마티스성 관절염, 당뇨병 실명증, 황반변성 등의 망막 질환 등을 일으킬 수 있다.
- [0003] 암은 국내 사망원인의 1위로, 다양한 원인으로부터 발암인자의 활성화로 정상적인 세포가 불규칙하게 세포분열을 함으로써 빠른 속도의 증식을 보인다. 증식 후에는 혈관, 림프 등을 통해서 다른 기관으로의 전이와 침투를 보이게 된다. 이러한 암세포는 원인이나 진행 기전이 완전히 밝혀지지 않아 인류의 건강을 여전히 위협하는 요소가 되고 있다.
- [0004] 암치료의 방법에는 물리적 수술요법, 화학요법, 방사선 요법 등으로 나뉜다. 수술요법은 암을 조직으로부터 직접 제거하는 방법으로 가장 보편적인 방법이나, 세포레벨에서 주변으로 전이하는 과정 등을 통제할 수 없다는 단점이 있다. 이를 보조하기 위해서 화학요법, 방사선 요법을 동반하여 치료를 하는데, 이러한 요법들은 생존율이나 수술의 효과를 더욱 높인다는 점이 있으나, 주변의 정상적인 세포에도 영향을 주어 사멸을 유도하는 부작용을 대부분이 초래한다. 따라서 암세포를 제거하는데 보다 효율적이고 안전성이 보장되는 치료법이 요구되고 있는데, 수술요법, 화학요법, 방사선 요법 이외에 대한 치료법으로 신생혈관 억제제에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다. 기존의 암 치료제는 정상세포와 다르게 빠른 세포분열과 증식을 하는 암세포의 특성을 이용하였기 때문에 정상적으로 빠른 성장주기를 나타내는 다른 정상세포들을 동시에 사멸유도를 하는 부작용을 나타내었다. 이와 다르게 혈관신생 억제제는 암세포에 산소와 영양분을 공급하는 혈관만을 혈관 내부를 통해서 차단하는 것이기 때문에 정상세포에 영향을 주는 부작용을 최소화하였고, 그러나 암세포의 사멸을 유도하는 효과는 기존의 암세포와 비슷하게 나타난다는 점에서 혈관신생 억제제는 새로운 치료제로서 각광받고 있다.
- [0005] 기존의 혈관으로부터 세포 주변으로 새로운 혈관이 형성됨으로써 암세포에게 지속적인 산소와 영양분을 공급한다. 또한, 이러한 혈관들은 암세포가 다른 기관으로 전이되는 경로가 되기도 한다. 혈관신생은 암으로부터의 신생혈관형성 유도 인자에 의해서 나타나며, 유도 인자가 혈관의 내피세포의 수용체가 결합을 하면서 신생혈관형성 과정이 시작된다. 자극된 내피 세포는 성장하면서 단백질 가수분해 효소인 MMP를 분비하는데 이것이 기저막(basement membrane)의 분해를 유도하여 내피세포가 신생혈관형성 유도 인자가 나오는 곳으로 이동할 수 있게 한다. 내피세포들이 이동한 후에는 서로 연결되어 스프라우트(sprout)가 생기고 이러한 내피세포들의 만곡이 일

어나면 루멘이 형성된다. 마지막으로 스프라우트(sprout)의 끝이 서로 연결되면 루프가 형성되고 이곳을 통해 혈액이 흐르면 혈관이 완성된다.

- [0006] 신생혈관이 정상세포가 아닌 암세포의 주변으로 생기게 되면 산소와 영양분을 정상세포에 충분히 공급하지 못하게 되는데, 이는 면역세포의 활성화도 떨어뜨리게 되므로 암세포의 성장속도는 점점 빠르게 유도한다. 그러므로 이러한 신생혈관 형성은 억제제와 촉진제의 균형으로 조절되어지는데, 이들의 균형이 무너질 때 혈관신생과 관련된 질병들의 원인이 된다. 이렇게 신생혈관이 암세포 성장과 전이에 중요한 원인으로 작용한다는 점에서 암의 치료에 매우 유용하게 쓰일 수 있다는 점이 밝혀져 혈관신생 억제제에 대한 많은 연구가 되고 있다.
- [0007] 신생혈관 억제제로서 많이 알려진 것들은 대부분이 화학합성 물질로써, 목표로 하는 조직이나 암세포에 상대적으로 정확하게 작용할 수 있다는 장점이 있으나, 화합물에 따르는 정상세포의 파괴, 내성 등의 부작용이 대부분 동반된다는 점에서 장기간 환자에게 투여할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 대표적인 항암제인 아바스틴(avastin)의 경우 출혈, 호중구 감소, 위장관 천공 등의 부작용뿐만 아니라 높은 치료비를 부담해야 한다는 점에서 이러한 단점을 보완해 줄 치료제의 개발이 시급하다. 천연물을 이용한 신생혈관 억제제의 경우에는 섭취나 피부 외용제로 사용 시 기존의 항암제와 거의 동일한 효과를 낼 뿐만 아니라, 저비용, 그리고 낮은 부작용을 나타낸다는 점에서 좋은 치료제로 주목받고 있다.
- [0008] 이 실험에서 사용한 황련(*Coptis japonica* Makino)의 경우에는 기존의 연구에서는 황련의 뿌리의 리그난(lignan) 성분의 항염증효과 (Cho JY, Kim AR, Park MH, Planta. Med., 67, 312-326, 2001)가 보고되어 있다.
- [0009] 또한, 한국특허등록 10-0616067호에는 황련 추출물을 포함하는 채장암 예방 조성물이 개시되어 있으며, 보다 구체적으로 황련으로부터 열수, 유기용매, 발효, 초임계유체, 여과, 수증기증류, 마이크로웨이브, 온침을 통해 추출한 추출물을 이용한 암 예방 조성물이 개시되어 있다.
- [0010] 다만 상기 문헌에는 황련 추출물이 채장암 세포에 대하여 세포를 사멸시키며, PARP (Poly adp-ribose polymerase)의 분해를 촉진하며, 세포를 사멸시키는 ROS (Reactivity oxygen species)를 촉진하는 효능이 있다는 점이 개시되어 있을 뿐 신생혈관형성을 억제할 수 있는 효과를 나타낼 수 있다는 점에 대하여 전혀 개시하고 있지 않다. 즉, 현재까지 본 발명에 사용된 황련 수추출물의 신생혈관형성 억제 효과 및 그 기전에 관한 보고는 없다.
- [0011] 이에 본 발명자들은 황련 수추출물의 신생혈관형성 억제 활성을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국특허등록 10-0616067호

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) Cho JY, Kim AR, Park MH, Planta. Med., 67, 312-326, 2001

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 황련 수추출물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공함으로써, 상기 과제를 해결하였다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 황련 수추출물은 신생혈관형성을 억제하는 효과를 나타낸다. 따라서 생체 내에서 신생혈관형성을 요구하는 비정상적으로 증식된 세포와 관련된 질환, 예를 들어 과도한 신생혈관 형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료제 또는 각종 종양 등의 치료제로서 매우 유용하여 신생혈관형성 억제용 약학 조성물, 식품 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 세포독성에 관한 실험으로써 MTT 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 세포증식 분석 방법의 결과를 도시한 도면이다.

도 3은 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 세포이동 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

도 4는 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 혈관형성 분석 방법의 결과를 도시한 도면이다.

도 5는 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 쥐 대동맥으로부터의 미세혈관 발아(Sprouting) 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

도 6은 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 세포주기에 관련 단백질의 웨스턴 블롯(Western blot) 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

도 7은 발명의 일 실시예로서 황련 수추출물의 세포주기를 유세포분석기 (Flow cytometry)를 이용한 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 양태에서, 상기 수추출물은 온수 추출물일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 양태에서, 상기 황련은 건조된 황련을 말한다.

[0023] 본 발명의 일 양태에서, 상기 수추출물은 황련의 2배 중량의 온수를 가하여 12시간 이상 추출할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약학적 조성물은 당뇨병성 망막증, 신생혈관성 녹내장, 후수정체 섬유증식증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 궤양, 원추 박막, 황반 변성, 쇼그렌 증후군, 근시 안과 종양, 각막이식 거부반응, 이상 창상 유합, 트라코마(trachoma), 골질환, 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염, 폐혈증성 관절염, 혈관종(hemangiomas), 섬유성 혈관종(angiofibroma), 건선(psoriasis), 화농성 육아종(pyogenic granuloma), 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절 손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열증, 염증성 장질환, 치근막 질환, 동맥경화증, 재협착증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부 노화, 갑상선 과증식, 그레이브스 병(Graves disease), 암 발생(cancer development), 암 침윤 및 암 전이(cancer metastasis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료목적으로 활용될 수 있다.

[0025] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는

충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0026] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0027] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 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, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 1 내지 200 mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg으로 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 신생혈관형성 억제 효과를 나타내는 다른 치료제 또는 다른 압 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 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.
- [0030] 본 발명에서 용어, "개체"란 신생혈관형성 억제 활성을 통해 예방 또는 치료할 수 있는 질환이 이미 발병되었거나, 발병될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0031] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명은 황련 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 식품 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 양태에서, 황련의 수추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 식품 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 일 양태에서, 상기 황련은 건조된 황련을 말한다.
- [0035] 본 발명의 일 양태에서, 상기 추출물은 황련의 2배 중량의 온수를 가하여 12시간 이상 추출할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 양태에서, 상기 식품 조성물은 당뇨병성 망막증, 신생혈관성 녹내장, 후수정체 섬유증, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 궤양, 원추 박막, 황반 변성, 쇼그렌 증후군, 근시 안과 증양, 각막이식 거부반응, 이상 창상 유합, 트라코마(trachoma), 골질환, 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염, 폐혈증성 관절염, 혈관종(hemangiomas), 섬유성 혈관종(angiofibroma), 건선(psoriasis), 화농성 육아종(pyogenic granuloma), 단백뇨증, 복대동맥류 질환, 외상성 관절 손상에 따른 퇴행성 연골손실, 신경계 수초탈락 질환, 간경변, 신사구체 질환, 배태막의 미성숙 파열증, 염증성 장질환, 치근막 질환, 동맥경화증, 재협착증, 중추신경계의 염증질환, 알츠하이머 질환, 피부 노화, 갑상선 과증식, 그레이브스 병(Graves disease), 암 발생(cancer development), 암 침윤 및 암 전이(cancer metastasis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환의 예방, 완화 또는 개선 목적으로 활용될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 식품은, 황련 수추출물, 보다 구체적으로는 온수 추출물을 포함하되, 적절한 식품보조첨가제가

포함될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 양태에서, 상기 식품은 건강기능식품일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강 기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트 산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에서 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 신생혈관형성 억제 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0041] 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명에 따른 황련 수추출물은 원료 조성물 중 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 5 ~ 10중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[0042] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명의 건강식품에는 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유될 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0044] 적용예 1: 과다한 신생혈관형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료

[0045] 당뇨병에 의한 실명은 25세 이후에 발생하는 실명의 가장 흔한 원인이 된다. 당뇨병환자들에게서 흔히 나타나는 눈의 질환으로는 결막염, 백내장, 녹내장, 안근마비, 시신경병증 등 눈의 다양한 조직에 합병증이 발생하지만 실명의 가장 중요한 원인은 역시 망막병증이다. 망막병증의 유병률은 당뇨병을 앓은 유병기간과 밀접한 관계가 있다. 제 1형 당뇨병환자의 경우 유병기간 5년 이하에서 약 15%, 15년 이상에서 95% 이상에서 망막병증이 발생하고, 제 2형 당뇨병환자의 경우 유병기간 5년 이하에서 약 30%, 15년 이상에서 약 80%에서 망막병증이 발생한다. 이외에도 만성 고혈당증, 고혈압, 임신, 사춘기, 신장질환, 고지혈증 등이 망막병증의 발생과 진행에 영향을 끼친다. 당뇨망막병증은 망막의 병변이 망막내부에 국한되어 있는 비증식성 망막병증과 망막으로부터 신생혈관조직이 유리체강 내부로 자라 들어가는 증식성 망막병증으로 구분된다. 초기에는 가벼운 정맥 확장과 혈관벽이 탄력을 잃으면서 파리처럼 부풀어 오르는 미세혈관류가 발생하고, 좀 더 진행하면 혈관 투과성이 증가하면서 혈액 성분이 빠져나와서 망막이 붓고, 출혈이나 삼출물이 생긴다. 모세혈관이 막히면 혈액순환이 안 되는 부위가 늘어나고 망막내부에서 신생혈관이 자라나기 시작한다. 이러한 변화들이 망막의 중심부를 침범하게 되면 시력이 저하된다. 좀 더 진행하면 망막이나 시신경 유두, 홍채 등에 신생혈관이 자라나게 되는 증식성 망막병증으로 발전되고, 갑작스런 유리체 출혈이나 건인 망막박리를 초래하여 심각한 시력 저하를 초래한다. 초기 내지 중기의 변화들이 중심부 망막을 침범하지 않는 경우 전혀 시력이 저하되지 않고 말기까지 진행되어 발견되는 경우가 있다. 따라서 본 발명의 황련 수추출물의 신생혈관형성 억제 효과는 당뇨병성 망막증의 치료에 효과적이다.

[0046] **적용예 2: 종양(암)**

[0047] 종양은 암세포가 그들의 조직덩어리에 작은 혈관을 증식시키는 능력이 강화될 때에만 발생한다. 암세포는 신생 혈관 형성(Angiogenesis)을 촉진하거나 또는 모세혈관(capillaries)을 형성하는 혈관 내피세포(endothelial cells)를 증식하는 요소, 즉 혈관내피세포 성장인자(VEGF)를 분비함으로써 작은 혈관을 증식시키는 능력을 강화한다. 만일 이들 신생혈관 형성(Angiogenesis)요소들이 억제되거나 차단된다면, 종양은 산소와 영양부족 상태가 되며, 암세포가 만들어낸 독성물질 속에서 괴사하게 된다. 종양덩어리로부터 떨어져 나온 암세포는 만일 신생혈관 형성(Angiogenesis)을 유도하는 요소의 분비능력을 상실하거나 신생혈관 형성을 막으면 다른 기관에 전이 될 수 없다. 따라서 본 발명의 황련 수추출물의 신생혈관형성 억제 효과는 암세포의 성장과 전이를 막아 암 치료에 효과적이다.

[0048] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1 : 황련 수추출물의 제조**

[0050] 황련 중량대비 2배 중량의 온수를 가하고 12시간 동안 추출 후 여과하고 동결 건조하여 황련 수추출물을 수득하였다.

[0051] **실시예 2 : 황련 수추출물의 제조**

[0052] 황련 중량대비 3배 중량의 온수를 가하고 12시간 동안 추출 후 여과하고 동결 건조하여 황련 수추출물을 수득하였다.

[0053] **실시예 3 : 황련 수추출물의 제조**

[0054] 황련 중량대비 4배 중량의 온수를 가하고 12시간 동안 추출 후 여과하고 동결 건조하여 황련 수추출물을 수득하였다.

[0055] **실시예 4 : 황련 추출물(CJME)의 제조**

[0056] 황련 중량대비 5배 중량의 온수를 가하고 12시간 동안 추출 후 여과하고 동결 건조하여 황련 수추출물을 수득하였다.

[0057] **실험예 1 : 황련 수추출물의 세포독성 실험**

[0058] 실시예 1에서 얻어진 황련 추출물(CJME)이 인간 탯줄 정맥 혈관 내피세포에 독성이 있는지를 MTT 세포 생존능력 분석방법으로 조사하였다.

[0059] 이를 위해 먼저, 혈관내피세포(HUVECs)를 20% FBS(Hyclone), 헤파린(5 unit/ml), bFGF(3 ng/ml), 100 unit/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 M199 배지에 접종하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 모든 실험에서 세포의 생존율은 95% 이상으로 유지시켰다.

[0060] 상기에서 배양된 HUVECs 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 12 웰 플레이트에 분주하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 황련 수추출물(1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml)을 다양한 농도로 각 웰에 처리한 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0061] 배양이 완료된 후, 배지가 있는 상태에서 각 웰에 5 mg/ml의 MTT 시약을 100 µL의 농도로 첨가하고 배양기에서 2시간 배양하였다. 2시간 후, 배양액을 제거하고 각 웰에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 µL씩 첨가하고, 스

펙트로포토미터(spectrophotometer)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포생존능력을 분석하였다.

[0062] 이때, 세포생존능력은 황련 수추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포생존능력을 100%로 하고 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

[0063] 실험 결과, 황련 수추출물의 처리 농도가 증가할수록 세포생존능력이 감소하는 것으로 나타났다 (도 1).

[0064] 그래서 이하 모든 실험은 세포독성이 없는 농도에서 수행하였다.

[0065] 실험예 2 : VEGF에 의한 세포증식에 미치는 황련 수추출물의 영향 실험

[0066] 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 배양한 혈관 내피 세포를 4×10^4 cells/well의 농도로 12 웰 플레이트에 분주하였다. 6시간 정도의 혈청 기아(serum starvation)를 준 후, 황련 수추출물을 전처리하고 20 ng/ml의 VEGF를 처리하였다.

[0067] 처리한 지 24시간 뒤에, 세포계수기를 이용하여 세포의 개수를 측정하였다.

[0068] 실험 결과, 황련 수추출물이 VEGF에 의한 혈관 내피 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다(도 2).

[0069] 실험예 3 : VEGF에 의한 세포이동에 미치는 황련 수추출물의 영향 실험

[0070] 먼저 트랜스웰 인서트(transwell insert)의 아래 면을 젤라틴(gelatin)으로 코팅한 후 그 안에 1×10^5 개의 혈관 내피 세포와 VEGF(20 ng/ml), 황련 수추출물을 넣고 4시간 배양한 후에 배양이 끝나면 웰의 내면을 면봉등으로 닦아서 이동하지 않은 세포들을 제거하였다.

[0071] 아래쪽으로 이동한 세포의 수는 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하여 200배 현미경 시야에서 계수하여 처리하지 않은 군과 비교하였다. 처리하지 않은 대조군의 세포이동을 100%로 하고 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

[0072] 실험 결과, 황련 수추출물이 VEGF에 의한 혈관 내피 세포의 이동을 억제하였다(도 3).

[0073] 실험예 4: VEGF에 의한 관형성(tube formation)에 미치는 황련 수추출물의 영향 실험

[0074] 12 웰 플레이트에 매트릭젤(matrigel)을 200 μ L 코팅한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양된 혈관내피세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 코팅된 24 웰 플레이트에 분주하였다. 세포의 분주 전 VEGF (20 ng/ml)와 황련 수추출물을 처리하고, 분주 후 20시간 뒤에 현미경으로 관형성을 관찰하였다. 이 실험은 1% FBS M199 배지를 사용하여 수행하였다.

[0075] 실험결과, VEGF에 의해 유도되는 관형성이 황련 수추출물에 의해 저해되는 것을 확인 할 수 있었다(도 4).

[0076] 실험예 5: VEGF에 의한 쥐 대동맥 발아(sprouting)에 미치는 황련 수추출물의 영향 실험

[0077] 96 웰 플레이트에 40 μ L 매트릭젤(matrigel)을 코팅하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 7 주령 된 SD 레트의 대동맥을 적출하고 PBS로 혈관을 깨끗이 씻은 후, 대동맥 주위에 붙어있는 가는 혈관을 모두 떼어내었다. 피와 가는 혈관이 제거된 대동맥을 1 mm 정도의 두께로 자른 다음 매트릭젤(matrigel)이 코팅된 96 웰 플레이트 위에 올려놓고 그 위에 다시 한 번 30 μ L 매트릭젤(matrigel)을 넣어서 37°C에서 30분간 배양하였다. 매트릭젤(matrigel)로 둘러싸여 굳어진 동맥위에 VEGF(20 ng/ml)와 황련 수추출물이 들어있는 배지를 넣었다. 일주일후 현미경으로 발아(sprouting) 개수를 관찰하였다.

[0078] 실험 결과, 황련 수추출물이 VEGF에 의한 쥐 대동맥의 발아(sprouting)를 억제하는 것으로 나타났다(도 5).

[0079] 실험예 6 : 황련 수추출물의 VEGF에 의한 세포주기 진행 억제 효과

- [0080] 100 mm 디쉬에 1×10^6 cells을 배양한 후, 6시간의 혈청 기아(serum starvation)을 주었다. 황련 수추출물을 농도별로 처리하고 40분 후, 20 ng/ml의 VEGF를 처리하고 20시간 동안 인큐베이션(incubation)하였다. 세포는 트립신(Trypsin)을 이용하여 수득하고, 70% 에탄올로 세포를 1일 동안 고정시켰다. 고정시킨 세포는 PBS로 세척 후에 10 μ g/ml 알엔에이즈 에이(RNase A)와 50 μ g/ml의 피아이 염색용액(PI staining solution)을 넣어 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 유세포분석기를 이용하여 샘플 당 10,000 세포를 측정하였다.
- [0081] 실험 결과, 황련 수추출물이 VEGF에 의한 세포주기 진행을 억제하는 것으로 나타났다(도 6).
- [0082] **실험예 7 : 황련 수추출물의 VEGF에 의한 세포주기 진행 관련 단백질의 발현 억제 효과.**
- [0083] 혈관내피세포를 60 mm 플레이트에 분주한 후 다음날에 6시간 혈청기아(serum starvation)를 주었다. 황련 수추출물을 40분간 처리 한 후, 20 ng/ml의 VEGF를 처리하였다.
- [0084] 상기 VEGF(20 ng/ml)를 처리한 후 10분 뒤에 프로프랩 (RRO-PREP protein extraction solution)과 프로테아제 억제 혼합 각테일을 이용하여 세포를 용해(lysis) 하였다.
- [0085] 용해된 세포를 1.5 ml 튜브에 넣고 볼텍싱(vortexing)한 다음, 얼음 위에서 1시간 방치하였다. 이를 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 Bradford 실험을 통해 각각의 샘플 농도를 결정하고 전기영동(SDS-PAGE)하였다.
- [0086] 상기 분리된 단백질을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 즉, 샘플의 전기영동이 끝나면 젤에서 폴리비닐리덴 플루오라이드 멤브레인(Polyvinylidene Fluoride membrane, Pall Corporation)으로 단백질을 트랜스퍼한 후, 상기 멤브레인을 상온에서 1시간동안 5% 스킵밀크 용액(Difco-BD, USA)으로 블럭킹(blocking) 하고, 1차 항체를 처리하여 4℃에서 12시간 보관. 상기 1차 항체로는 세포주기 중 G1기 관련 단백질인 항-Cyclin E 항체, 항-Cdk2 항체, 항-Cdk4 항체와 항-p-Rb 항체를 셀 시그널링 테크놀로지사(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)에서 구입하였고, 항-Cyclin D-항체는 산타크루스 바이오테크놀로지사(Santa cruz Biotechnology, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.
- [0087] 일차 항체와의 반응이 완료되면 약 15분 동안 세척하고 다시 5시간 2차 항체를 처리하여 반응시켰다.
- [0088] 반응 후 15분 이상 충분히 세척한 후 ECL 검출 키트(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여 밴드를 확인하였다.
- [0089] 실험 결과, VEGF에 의해 유도된 Cyclin D, Cyclin E, Cdk2, Cdk4, p-Rb의 발현량이 황련 수추출물에 의해 저해되는 것을 볼 수 있었다.(도 7)

[0090] **< 제조예 >**

[0091] 제조예 1. 산제의 제조

- | | | |
|--------|---------|--------|
| [0092] | 황련 수추출물 | 10 mg |
| [0093] | 수크로스 | 100 mg |
| [0094] | 탈크 | 10 mg |
- [0095] 상기 성분들을 분말화하여 혼합한 후 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0096] 제조예 2. 정제의 제조

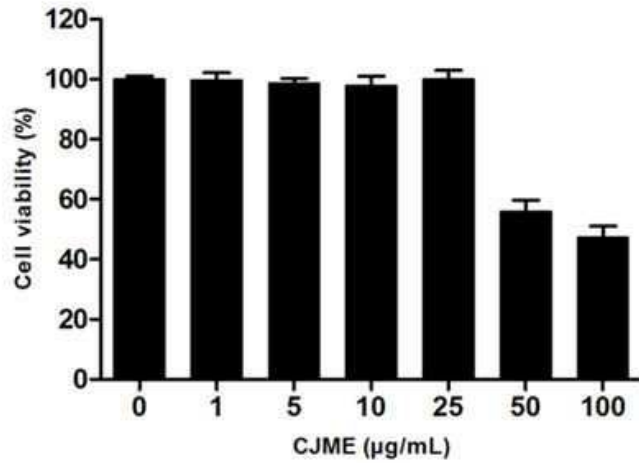
- | | | |
|--------|------------|--------|
| [0097] | 황련 수추출물 | 10 mg |
| [0098] | 전분 | 100 mg |
| [0099] | 수크로스 | 100 mg |
| [0100] | 스테아린산 마그네슘 | 2 mg |

- [0101] 통상의 정제의 제조방법에 따라 상기 성분들을 혼합한 후 이를 타정하여 정제를 제조한다.
- [0102] 제조예 3. 캡셀제의 제조
- [0103] 황련 수추출물 10 mg
- [0104] 결정성 셀룰로오즈 3 mg
- [0105] 락토오즈 15 mg
- [0106] 스테아린산 마그네슘 1 mg
- [0107] 통상의 캡셀제의 제조방법에 따라 상기 성분들을 혼합한 후 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조한다.
- [0108] 제조예 4. 과립제의 제조
- [0109] 황련 수추출물 10 mg
- [0110] 대두 추출물 50 mg
- [0111] 포도당 200 mg
- [0112] 전분 500 mg
- [0113] 상기 성분들을 혼합한 후 30% 에탄올 100 mL를 첨가하여 60℃에서 건조시켜 과립을 형성한 후 포에 충전하여 과립제를 제조한다.
- [0114] 제조예 5. 환제의 제조
- [0115] 황련 수추출물 20 mg
- [0116] 유당 1,500 mg
- [0117] 글리세린 1,500 mg
- [0118] 전분 980 mg
- [0119] 상기 성분들을 혼합한 후 통상의 환제의 제조방법에 따라 1환 당 4g이 되도록 제조한다.
- [0120] 제조예 6. 주사제의 제조
- [0121] 황련 수추출물 10 mg
- [0122] 만니톨 180 mg
- [0123] 주사용 멸균 증류수 2,780 mg
- [0124] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 30 mg
- [0125] 통상의 주사제 제조방법에 따라 1 앰플당 3 mL가 되도록 상기 성분을 혼합하여 제조한다. .
- [0126] 제조예 7. 액제의 제조
- [0127] 황련 수추출물 10 mg
- [0128] 이성화당 10,000 mg
- [0129] 만니톨 5,000 mg
- [0130] 정제수 적량

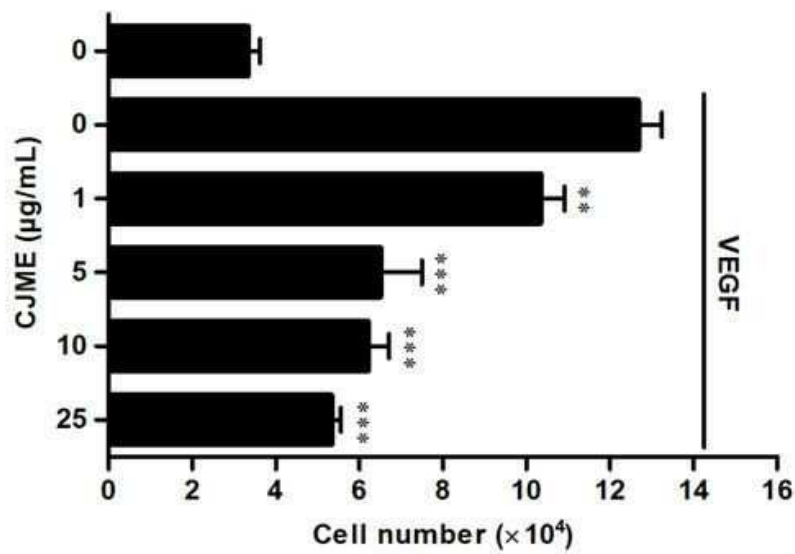
[0131] 통상의 액제 제조방법에 따라 정제수에 상기 성분을 용해시키고, 적절한 양을 가한 다음 병에 충전하여 멸균시켜 제조한다.

도면

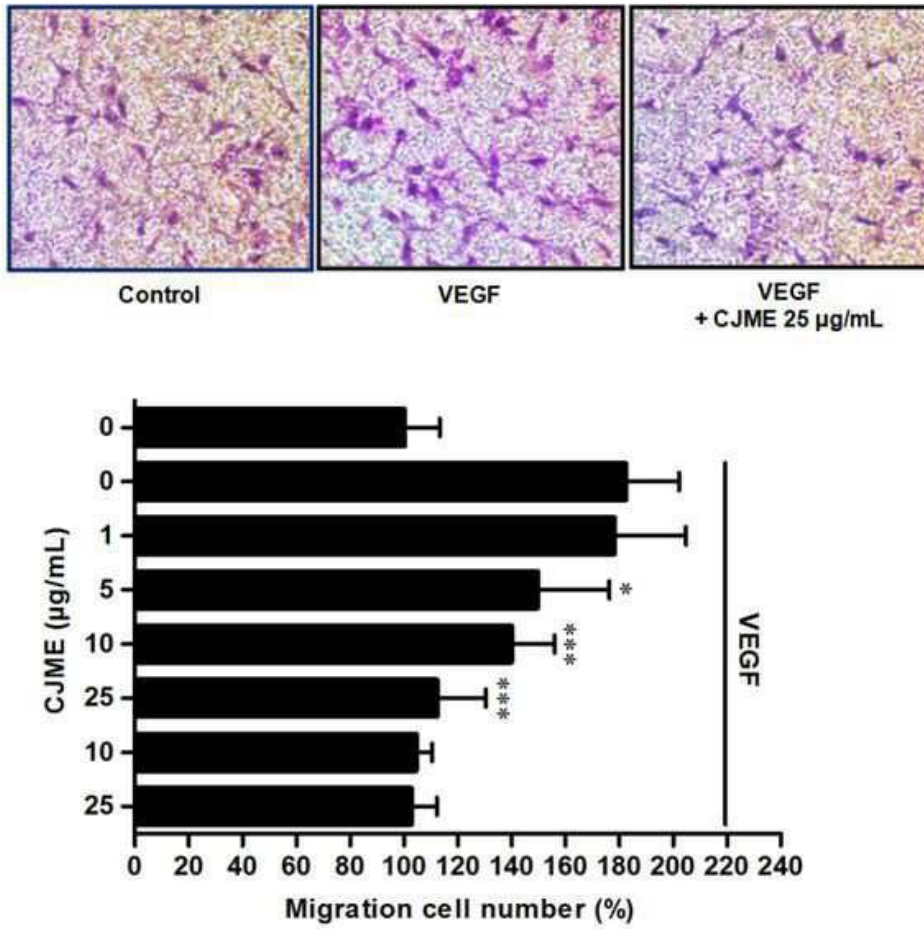
도면1



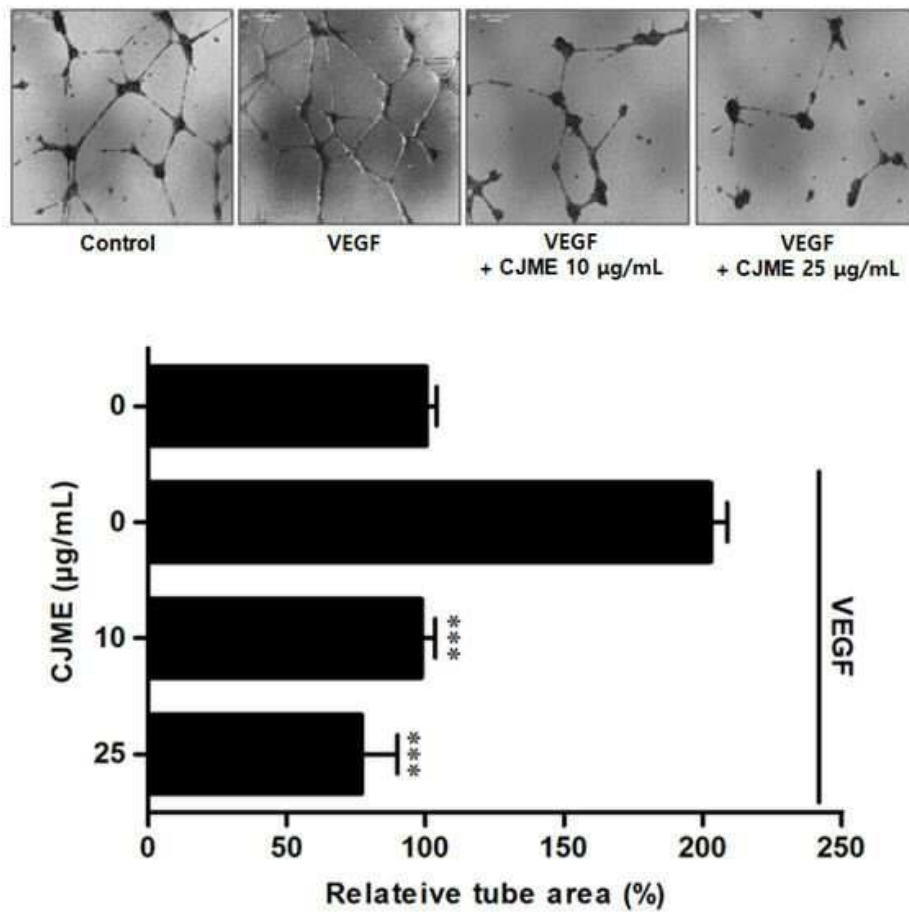
도면2



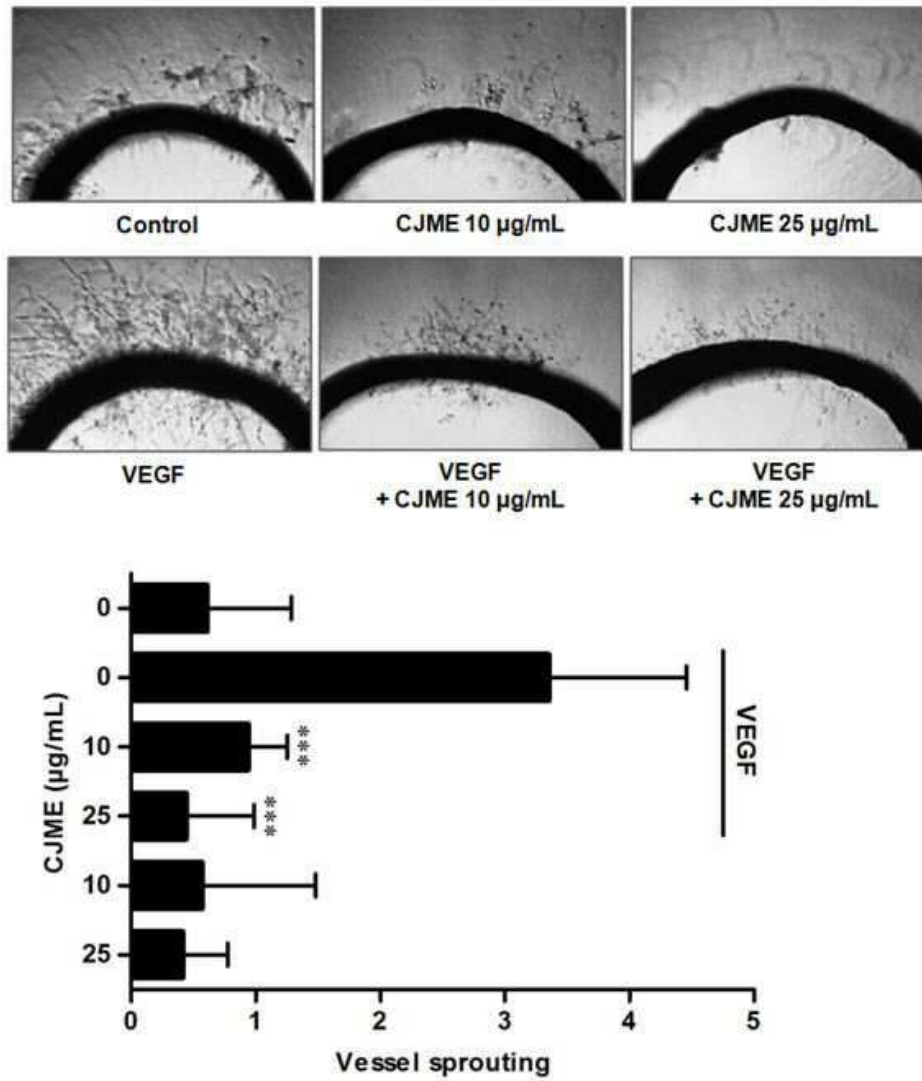
도면3



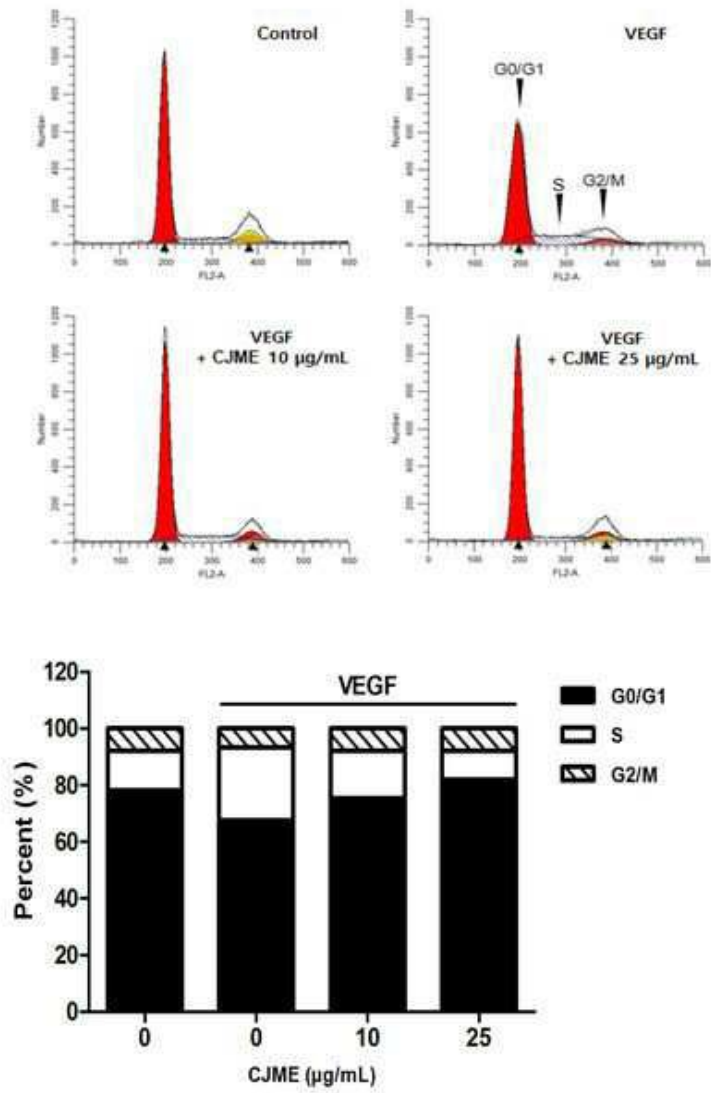
도면4



도면5



도면6



도면7

