



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0002068
(43) 공개일자 2016년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/54 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0080821

(22) 출원일자 2014년06월30일

심사청구일자 2014년06월30일

(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

김혜진

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 미래관 416호

(74) 대리인

특허법인미주, 김보민

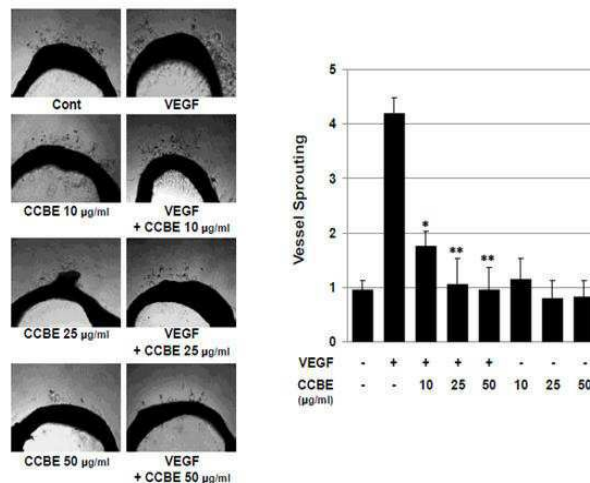
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 육계 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것으로, 육계 냉수 추출물은 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의해 유도된 혈관내피세포의 증식·이동·침습·관형성, 세포내 신호전달 단백질의 인산화, 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinase)의 활성, 및 대동맥 발아를 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 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711001372

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수기관유치

연구과제명 Fraunhofer IZFP-Yonsei BME Joint Research Center 유치사업

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교(원주캠퍼스)

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 100 ug/ml 미만의 농도로 약학 조성물 중에 포함되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 0.5 내지 50 ug/ml 의 농도로 약학 조성물 중에 포함되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 4

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 증양, 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 치료용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 당뇨병성 망막증; 또는

신생혈관형성으로 인한 암 발생, 암 침윤 또는 암 전이의 예방 또는 치료용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 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 7

제1항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase), p38 또는 혈관내피세포 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

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

청구항 9

육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 100 ug/ml 미만의 농도로 식품 조성물 중에 포함되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 0.5 내지 50 ug/ml의 농도로 식품 조성물 중에 포함되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 12

제9항에 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 수조탈락 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 13

제9항에 있어서,

상기 식품 조성물은 당뇨병성 망막증; 또는

신생혈관형성으로 인한 암 발생, 암 침윤 또는 암 전이의 예방 또는 완화용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 14

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 15

제9항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase), p38 또는 혈관내피세포 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관내피 세포증식을 억제하거나, 혈관내피 세포이동을 억제하거나, 관 형성을 억제하거나, 또는 대동맥 발아(sprouting)를 억제함으로써 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물.

청구항 17

(a) 육계(*Cinnamomum cassia*)에 육계 중량의 2배 이상의 냉수를 가하여 추출하고 여과하는 단계; 및

(b) 상기 추출물을 건조시키는 단계를 포함하는,

신생혈관형성 억제용 육계 냉수 추출물의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

단계(a)에서 추출 및 여과 과정을 2회 이상 반복하여 수행하는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 육계 냉수 추출물의 제조방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

냉수의 온도가 20 ℃ 이하인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 육계 냉수 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포의 신호조절 인산화효소(extracellular signal regulated kinase, ERK), p38, 및 혈관내피 성장인자 수용체 2의 인산화 및 기질금속단백효소의 활성을 억제하고, 세포증식, 세포이동, 침습, 관형성, 및 대동맥 발아(sprouting)를 억제하여 신생혈관 형성 억제활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사망원인 1위인 암에 대한 항암치료는 수술요법, 화학요법(chemotherapy), 방사선요법이 있다. 그동안 암을 극복하기 위한 많은 노력으로 예전에 비해 암환자의 생존기간이 많이 연장되었으나, 전통적인 항암치료는 부작용과 고통으로 인하여 많은 경우 원활한 치료효과를 기대할 수 없어 암은 여전히 두려움의 대상이 되고 있다. 그러므로 최근에는 정상세포에는 피해를 덜 줄 수 있는 새로운 연구 방법들이 시도되고 있는데, 면역요법, 유전자 치료, 내성억제, 신생혈관억제제, 화학적 암예방제 등 생물학적 요법제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 부작용이 적은 천연물(natural products)로부터 새로운 항암물질을 개발하려는 연구가 다양한 분야에서 활발히 진행되고 있다.

[0003] 최근 개발된 표적항암제로 인하여 암환자들이 새로운 희망을 갖게 됐다. 표적항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하고 정상세포에는 영향을 미치지 않는 새로운 개념의 항암제로서, 암세포의 생성 및 증식에 관여하는 신호전달경로를 억제하는 신호전달 억제제(Signal transduction inhibitor), 암세포가 일정한 크기 이상의 성장을 하기 위해 필요로 하는 새로운 혈관형성을 차단하는 신생혈관형성 억제제(Angiogenesis inhibitor), 암세포의 예정된 세포사멸을 유도하여 세포증식을 차단하는 새로운 세포사멸 유도제(Apoptosis inducer) 등에서 가장 활발한 연구가 이루어지고 있다. 한편, 암은 매우 복잡한 경로로 발전하기 때문에 표적인자만을 선택적으로 억제하여서는 효율적인 암세포의 성장을 막을 수 없기 때문에, 최근에는 더 많은 경로를 차단하는 보다 우수한 효능을 갖는 새로운 다중표적항암제(Multi targeted anticancer agents) 개발이 다양하게 이루어지고 있다. 특히, 핵심적인 발암 경로의 차단과 암세포의 신생혈관생성을 동시에 차단하여 기존 항암제에 실패한 암환자에서도 우수한 효능을 갖고 부작용을 줄일 수 있는 다중표적항암제 개발이 활발히 진행되고 있다. 이러한 항암제 개발을 위해 미국은 National Cancer Institute (NCI)를 설립하여 천연물로부터의 항암 대량검색법을 개발하고 세계각지로부터 다양한 천연자원을 수집하여 항암검색을 실시해 오고 있다. 특히 일본은 신생혈관형성 억제제의 개발 및 발전에 투자하여 현재에는 그동안 개발한 여러 약제가 신생혈관형성에 관여하는 질병에 대한 효과를 보기위해 임상실험을 수행하고 있다. 국내에 있어서도 80년대부터 천연물로부터 유용한 항암물질을 개발하려는 많은 노력이 진행되었으나 아직 초보적인 단계이다. 오늘날 물질특허를 비롯한 지식소유권의 보호가 강력히 요구되는 세계적인 추세 속에서 국내 천연자원으로부터의 약리활성 물질의 개발에 관한 연구는 절실하다고 할 수 있으며, 선진국과 국제경쟁력을 높이기 위해서도 신규 약리활성 물질의 개발에 대한 자체기술력의 확보가 무엇보다도 중요하다고 할 수 있겠다.

[0004] 혈관신생(angiogenesis)이란 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 만들어지는 것을 뜻한다. 정상적인 생리조건에서는 거의 일어나지 않는 엄격히 조절되는 현상이나 수정란 발생과정에서 배아가 발달될 때와 성인의 경우 상처가 치유될 때 그리고 여성의 생식주기에서 생식기계통의 변화 등에서 일어난다. 성인의 경우 모세혈관의 내피세포는 상대적으로 잘 분열하지 않으며 분열속도는 보통 수개월 내지 수년이다. 혈관신생은 여러 종류의 세포와 수용성 인자 및 세포외 기질(extracellular matrix) 성분과의 상호작용에 의한 복잡한 과정으로 일어나며 아직 그 작용기작은 완전히 규명되어 있지 않다. 신생혈관형성 억제제의 새로운 항암치료법으로서의 장점은 첫째, 신생혈관 작용(angiogenesis)은 원발성 혹은 전이성 종양에서 필수적이며, 암조직은 신생혈관에 의한 영양분과 산소 공급이 없으면 1 ~ 2 mm³ 이상 성장 할 수 없다는 점이다(Folkman J, Semin. Cancer Biol. 1992, 3:65-71). 신생혈관작용이 일어나는 동안 원발성(primary)암세포가 혈관내로 유입되어 다른 장소로 이동하여 전이(metastasis)암을 형성하게 된다. 따라서 신생혈관형성 억제제는 모든 고형성 종양(solid tumor)에서 공통적으로 사용될 수 있다는 가능성을 가진다. 둘째, 기존의 항암 화학요법은 암세포가 빠르게 성장하는 특징을 이용하

여 치료하기 때문에 비교적 세포주기가 빠른 골수세포, 위장관계세포에 대해 독성을 나타내는 반면 신생혈관형성 억제제는 장기투여해도 비교적 적은 부작용을 나타낼 수 있다는 점이다. 뿐만 아니라 항암 화학요법은 형질이 변형된 암세포를 치료목표로 하기 때문에 새로운 내성을 나타낼 수 있지만, 신생혈관형성 억제제는 정상혈관세포가 치료의 대상이라는 점에서 내성을 나타낼 가능성이 적다. 셋째, 하나의 혈관세포는 수백 개의 암세포에 영양분과 산소를 공급하기 때문에 하나의 혈관세포의 억제를 통해서 많은 암세포를 억제하는 효과적인 치료 방법이 될 수 있다. 마지막으로 항암제 전달 방법에 있어서 기존의 항암 항암요법의 경우 항암제가 혈관 밖으로 유출되어 암세포에 영향을 나타내는 반면 혈관성장 억제제는 직접 혈관 내피세포에 접촉하여 작용하므로 약물 전달이 용이하다는 점이다. 동물실험에서 억제 효과를 나타내었던 항암제들이 임상실험에서는 뚜렷한 효과를 나타내지 못한 경우가 많았다. 이는 암 조직마다 혈관내피세포의 발현형 차이와 각각의 종양 주위의 미세 환경과 서로 다른 혈관 성장인자들의 분포가 다르기 때문으로 생각된다. 따라서 혈관성장인자의 발현, 혈관내피세포의 다양성, 암 조직 주위의 미세 환경 등은 혈관성장 억제제를 통한 암의 치료에 중요한 영향을 미치게 된다.

[0005]

암조직에서 지금까지 밝혀진 일반적인 혈관신생 과정을 살펴보면, 먼저 혈관신생은 암세포에서 분비되는 혈관신생 유도인자(angiogenic factor)에 의해 시작된다. 이 유도인자는 혈관내피세포의 수용체와 결합하여 내피세포를 자극하게 되고 자극된 내피세포는 성장(proliferation), 침투(invasion), 이동(migration)과 분화(differentiation) 그리고 모세혈관형성 등 다양하고 복잡한 일련의 과정을 시작한다. 내피세포의 침투, 이동에는 조직 분해효소의 활성화 등이 필요하며 이는 암세포의 침투과정과 매우 유사하다. 혈관형성과정을 조절하는 많은 촉진인자와 억제인자들이 보고되었는데 그중에서도 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 혈관형성 촉진인자로, 안지오스타틴(angiotatin)(O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al., Cell. 1994,21; 79:315-328)과 엔도스타틴(endostatin)(O'Reilly MS et al., Cell. 1997, 24; 88(2):277-285)은 혈관형성 억제인자로 가장 많이 알려져 있다.

[0006]

혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 거의 모든 세포에서 분비되며, 종양의 침투성과 깊은 관계가 있다(Takahashi Y et al., Cancer Res. 1995, 55(18):3964-3968). 혈관내피세포 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)는 혈관 내피세포에 일반적으로 존재하지만 신경세포, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 조혈모세포 등에서 발현되며, 혈관내피세포 성장인자 수용체-1(VEGFR-1 (flt-1)), 혈관내피세포 성장인자 수용체-2(VEGFR-2 (Kdr/flk-1)), 혈관내피세포 성장인자 수용체-3(VEGFR-3 (flt-4)) 등 3종류가 있다. 혈관내피세포 성장인자가 결합되면 수용체 티로신(tyrosine) 잔기의 인산화와 함께 수용체 이중화(dimerization)작용으로 신호가 전달된다. 혈관내피세포 성장인자 수용체-1(VEGFR-1)은 내피세포의 이동, 혈관내피세포 성장인자 수용체-2(VEGFR-2)는 내피세포의 성장과 혈액유통 효과에 관여한다. 직접적인 혈관형성인자 외에도 비특이적 인자들인 산성 섬유아세포 증식인자(acidic fibroblast growth factor, aFGF), 염기성 섬유아세포 증식인자(basic fibroblast growth factor, bFGF), 형질전환 성장인자(transformation growth factor, TGF), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 혈소판-유래 증식인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 혈소판-유래 내피세포 성장인자(platelet-derived endothelial cell growth factor), 안지오제닌(angiotenin), 인터류킨-8(interleukin-8, IL-8), 대식세포 염증단백질(macrophage inflammatory protein, MIP), 혈소판인자4(platelet factor, PF4), 성장-관련 암유전자(growth-related oncogene, GRO) 등이 혈관 형성에 관여한다(Moore BB et al., J Lab Clin Med. 1998, 132(2):97-103). 또한, 혈관내피세포 성장인자의 발현 및 작용기전에 대한 연구와 함께 이를 조절하는 상위의 신호전달 과정을 저해함으로써 신생혈관형성을 억제할 수 있는 것에 대한 연구가 활발하다. 혈관 형성촉진인자의 활성을 감소시키는 VEGF 수용체에 대한 항체나 수용체 인산화 억제제는 대장암의 간 전이(metastasis)를 억제하는 효과를 나타내었으며, 이는 간에 형성된 암 조직의 혈관의 감소에 기인되었다(Shaheen RM, et al., Cancer Res. 1999, 59(21):5412-5416). 이외에도 혈관내피세포의 고사를 유도하는 기전, 혈관형성 촉진인자나 내피세포의 생존인자들을 조절하는 간접인자들의 작용 억제, 및 체내에 존재하는 신생혈관 억제제의 활성을 증가시키는 방법들에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

[0007]

당뇨병성 망막증은 망막 저산소증 및 허혈로 인한 신생혈관 형성이 주된 원인이 되어 발병하는 질병으로, 여러 요인들이 관여하게 되는데, 특히 신생혈관형성인자이자 혈관투과성인자로 알려진 신생혈관형성인자(VEGF)가 가장 중요한 역할을 담당하고 있다. 아직까지 당뇨병성 망막증을 예방하거나 그 진행을 억제하는데 효과가 입증된 약물은 없으나 많은 망막증 발생기전 중 신생혈관형성에 관여하는 여러 성장인자에 대한 억제제 개발이 주목받고 있다. 최근에 아바스틴(Avastin, bevacizu Mab)과 같은 항신생혈관형성인자가 당뇨망막병증을 줄인다는 보고가 있다 (Avery R.L., 2006, Ophthalmology, 113:363-72; Spaide R.F., 2006, Retina, 26:275-8; Iturralde D., 2006, Retina, 26:279-84). 그러나 이 또한 부작용이 있어 지금은 부작용이 없는 천연물로부터 항신생혈관

형성인자와 같은 물질을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

- [0008] 육계(*Cinnamomum cassia*)는 주로 쌍떡잎식물에 속하는 미나리아재비목 녹나무과의 상록활엽교목으로 원산지는 중국이고, 스리랑카, 인도차이나, 한국(제주)에 분포하며 산지에서 높이 약 8 m까지 자라는 육계나무(계피나무) 가지, 껍질의 약용 이름이다.
- [0009] 육계의 성분이나 생리활성에 대한 연구는 항염증 작용(Hong CH et al., J Ethnopharmacol. 2002, 83(1-2):153-9; Yu T et al., J Ethnopharmacol. 2012, 31:139(2):566-73; Li TJ et al., J Pharmacol Sci. 2007, 105(1):34-40), 항당뇨 효과(Boaduo NK et al., Pharm Biol. 2014, 52(6):756-61; Han Y et al., Pharm Biol. 2013, 51(8):961-7), 감염방지 효과(Yeh CF et al., J Ethnopharmacol. 2013, 147(2):321-6), 항산화 작용(Hwa JS et al., J Ethnopharmacol. 2012, 139(2):605-15), 항위궤양 작용(Jung J et al., Yakugaku Zasshi. 2011, 131(7):1103-10), 항섬유화 작용(Lim CS et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2010, 74(3):477-83), 멜라닌 합성저해 작용(Kong YH et al., Biol Pharm Bull. 2008, 31(5):946-8), 뼈형성 촉진 작용(Lee KH et al., Phytother Res. 2006, 20(11):952-60), 항생작용(Ooi LS et al., Am J Chin Med. 2006, 34(3):511-22) 등이 있다.
- [0010] 육계(*Cinnamomum cassia*)의 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 추출물이 단백질 인산화효소 C(Protein kinase C, PKC), 혈관내피세포 성장인자 수용체 1(VEGFR1), 및 혈관내피세포 성장인자 수용체 2(VEGFR2)의 발현을 저해하고, 유사분열물질-활성화단백질인산화효소(mitogen-activated protein kinase, MAPK(ERK1/2)) 및 AKT의 인산화를 저해한다는 점 및 상기 추출물이 제브라피시(zebrafish) 배아의 척추절간혈관에서 혈관 발생을 현저히 억제하며 이러한 효과는 정상 맥관구조에서는 나타나지 않고 신생혈관형성 과정에서 새로운 혈관 형성 시에만 나타난다는 연구결과(Rishipal R. Bansode et al., Food Science & Nutrition. 2013, 1(1):74782)가 알려져 있다.
- [0011] 또한 신나모뎀 제일라니쿰(*Cinnamomum zeylanicum*) 추출물이 정제된 혈관내피세포 성장인자 수용체 2(VEGFR2)의 인산화 활성을 저해하고 유사분열물질-활성화단백질인산화효소(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 및 Stat3 매개 신호경로를 저해한다는 점이 알려져 있다(Jianming Lu et al., Carcinogenesis. 2010, 31(3):4817488).
- [0012] 한편 한국등록특허 제213,897호에는 육계(*Cinnamomum cassia*) 유기용매 추출물의 2-하이드록시 신남알데하이드 성분이 신생혈관 유도를 저해한다는 점 및 상기 성분의 유도체가 더 높은 활성으로 신생혈관유도를 저해하기 때문에 암전이 억제제로써 또한 당뇨병 망막증 또는 각막이식시 발생하는 신생혈관형성에 의한 실명을 예방 및 치료하기 위한 약제로써 사용될 수 있다는 점이 개시되어 있다.
- [0013] 그러나 이들 문헌에서는 DMSO, 유기용매 추출물을 사용하고 있어 용매 잔존 시 인체에 유해할 뿐만 아니라 제조 단가의 상승으로 산업화에 제약이 있다는 문제가 있다.
- [0014] 또한 신남알데하이드 유도체는 계피를 클로로포름과 아세톤의 혼합액으로 추출하고, 상기 추출액을 농축하여 수산화나트륨 용액으로 추출하고, 염기층을 산성화시킨 후 메틸렌클로라이드로 재추출하고, 상기 메틸렌클로라이드 추출액을 농축하여 실리카겔 크로마토그래피 및 고속 액체 크로마토그래피로 정제하는 단계를 거쳐 분리되는 성분으로 분리과정이 매우 복잡하다는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제213,897호

비특허문헌

- [0016] (비특허문헌 0001) FolkmanJ, Semin. Cancer Biol. 1992, 3:65-71
- (비특허문헌 0002) O'Reilly MS et al., Cell. 1994,21; 79:315-328.
- (비특허문헌 0003) O'Reilly MS et al., Cell. 1997, 24; 88(2):277-285.

- (비특허문헌 0004) Takahashi Y et al., Cancer Res. 1995, 55(18):3964-3968.
- (비특허문헌 0005) Moore BB et al., J Lab Clin Med. 1998, 132(2):97-103.
- (비특허문헌 0006) Shaheen RM et al., Cancer Res. 1999, 59(21):5412-5416.
- (비특허문헌 0007) Avery R.L., 2006, Ophthalmology, 113:363-72.
- (비특허문헌 0008) Spaide R.F., 2006, Retina, 26:275-8.
- (비특허문헌 0009) Iturralde D., 2006, Retina, 26:279-84
- (비특허문헌 0010) Yeh CF et al., J Ethnopharmacol. 2013, 147(2):321-6
- (비특허문헌 0011) Hwa JS et al., J Ethnopharmacol. 2012, 139(2):605-15
- (비특허문헌 0012) Jung J et al., Yakugaku Zasshi. 2011, 131(7):1103-10
- (비특허문헌 0013) Lim CS et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2010, 74(3):477-83
- (비특허문헌 0014) Kong YH et al., Biol Pharm Bull. 2008, 31(5):946-8
- (비특허문헌 0015) Lee KH et al., Phytother Res. 2006, 20(11):952-60
- (비특허문헌 0016) Ooi LS et al., Am J Chin Med. 2006, 34(3):511-22
- (비특허문헌 0017) Rishipal R. Bansode et al., Food Science & Nutrition. 2013, 1(1):74?82
- (비특허문헌 0018) Jianming Lu et al., Carcinogenesis. 2010, 31(3):481?488

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017]

본 발명의 목적은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물의 신생혈관형성 억제 활성을 입증하여 육계 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 식품 조성물, 및 육계 냉수 추출물의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0018]

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하며, 상기 조성물은 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의해 유도된 혈관내피 세포의 증식·이동·침습·관형성, 세포내 신호전달 단백질의 인산화, 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinase)의 활성, 및 대동맥 발아를 억제함으로써 신생혈관형성을 효과적으로 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0019]

본 발명은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 육계 냉수 추출물은 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

[0020]

도 1은 본 발명의 일 실험예로서 육계 냉수 추출물의 세포독성에 관한 실험으로써 엠티티(MTT) 분석에 의한 결

과를 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실험예로서 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포증식에 육계 냉수 추출물이 미치는 영향에 대한 실험결과를 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실험예로서 육계 냉수 추출물의 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 대한 세포신호전달(세포외 신호조절 인산화효소(extracellular signal regulated kinase, ERK), p38, 및 혈관내피 성장인자 수용체 2의 인산화)에 관한 실험으로써 웨스턴 블롯(Western blot) 분석에 의한 결과를 도시한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실험예로서 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포이동에 육계 냉수 추출물이 미치는 영향에 대한 실험결과를 도시한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실험예로서 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포침식에 육계 냉수 추출물이 미치는 영향에 대한 실험결과를 도시한 것이다.

도 6는 본 발명의 일 실험예로서 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinase)의 활성화에 육계 냉수 추출물이 미치는 영향에 대한 실험결과를 도시한 것이다.

도 7는 본 발명의 일 실험예로서 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 관형성(tube formation)에 육계 냉수 추출물이 미치는 영향에 대한 실험결과를 도시한 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실험예로서 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 쥐 대동맥 발아(sprouting)에 육계 냉수 추출물이 미치는 영향에 대한 실험결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약학 조성물 중 육계 냉수 추출물의 농도는 100 ug/ml 미만 보다 더 구체적으로 0.5 내지 50 ug/ml 인 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 양태에서, 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 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(Grave's disease), 암 발생(cancer development), 암 침윤 및 암 전이(cancer metastasis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용으로 활용 될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약학 조성물은 보다 특정적으로 당뇨병성 망막증 또는 신생혈관형성으로 인한 암 발생, 암 침윤 또는 암 전이의 예방 또는 치료용으로 활용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 양태에서, 상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 췌장암, 신장암, 육종, 중피종, 기형암종, 별아교세포종, 흑색종, 혈관종 및 아교모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 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 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 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. 비경구

투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 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.

[0028] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0029] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적인 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.

[0030] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 신생혈관형성 억제 효과를 나타내는 다른 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.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0033] 본 발명의 일 양태에서, 상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase), p38 또는 혈관내피세포 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것이다.

[0034] 본 발명의 일 양태에서, 상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관내피 세포증식을 억제하거나, 혈관내피 세포이동을 억제하거나, 관 형성을 억제하거나, 또는 대동맥 발아(sprouting)를 억제함으로써 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것이다.

[0035] 본 발명은 육계(*Cinnamomum cassia*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관형성 억제용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0036] 본 발명의 일 양태에서, 상기 식품 중 육계 냉수 추출물의 농도는 100 ug/ml 미만 보다 더 구체적으로 0.5 내지 50 ug/ml 인 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 양태에서, 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 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(Grave's disease), 암 발생(cancer development), 암 침윤 및 암 전이(cancer metastasis)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 완화용으로 활용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 일 양태에서, 상기 식품 조성물은 보다 특정적으로 당뇨병성 망막증 또는 신생혈관형성으로 인한 암

발생, 암 침윤 또는 암 전이의 예방 또는 완화용으로 활용될 수 있다.

- [0039] 본 발명의 일 양태에서, 상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 췌장암, 신장암, 육종, 증피종, 기형암종, 별아교세포종, 흑색종, 혈관종 및 아교모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 일 양태에서, 상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase), p38 또는 혈관내피세포 성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것이다.
- [0041] 본 발명의 일 양태에서, 상기 육계 냉수 추출물은 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관내피 세포증식을 억제하거나, 혈관내피 세포이동을 억제하거나, 관 형성을 억제하거나, 또는 대동맥 발아(sprouting)를 억제함으로써 신생혈관형성 억제 활성을 나타내는 것이다.
- [0042] 본 발명에 따른 식품은, 육계 냉수 추출물을 포함하되 적절한 식품보조첨가제가 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 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, 펙트산 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.
- [0044] 본 발명의 일 양태에서, 상기 식품은 건강기능식품일 수 있다.
- [0045] 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.
- [0046] 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명에 따른 육계 냉수 추출물은 원료 조성물 중 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 5 ~ 10 중량%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.
- [0047] 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.
- [0048] 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 g당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0049] 본 발명은 또한 (a) 육계(*Cinnamomum cassia*)에 육계 중량의 2배 이상의 냉수를 가하여 추출하고 여과하는 단계; 및 (b) 상기 추출물을 건조시키는 단계를 포함하는 신생혈관형성 억제용 육계 냉수 추출물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계(a)에서 추출 및 여과 과정을 2회 이상 반복하여 수행할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계(a)에서 냉수의 온도는 20 °C 이하일 수 있다.

[0052] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계(a)에서 육계는 24시간 이상 건조시킨 것일 수 있다.

[0053] **[적용예]**

[0054] **적용예 1: 과다한 신생혈관형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료**

[0055] 우리나라 유병률이 10%에 달하는 당뇨병은 전세계적으로 중요한 성인병 중의 하나로서, 현재 2억4천만명이 넘었고 2025년에는 3억8천만명으로 증가할 것이라고 2009년 미국의사협회(JAMA)에서 발표하였다. 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. 당뇨망막병증은 만성 망막 저산소증 및 허혈, 혈관 투과성(vascular permeability)의 증가로 유리체 출혈 유도 및 결국 황반부종 혹은 신생혈관이 형성되어 증식성 당뇨병성 망막증으로 진행된다(Aiello L.P., 1998, Diabetes Care, 21:143-156). 이런 과정에는 여러 요인들이 관여하게 되는데, 특히 신생혈관형성인자이자 혈관투과성인자로 알려진 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 가장 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 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 안되는 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 견인 망막박리를 초래하여 심각한 시력 저하를 초래한다. 초기내지 중기의 변화들이 중심부 망막을 침범하지 않는 경우 전혀 시력이 저하되지 않고 말기까지 진행되어 발견되는 경우가 있다. 따라서 본 발명의 육계 냉수 추출물의 신생혈관형성 억제 효과는 당뇨병성 망막증의 치료에 효과적이다.

[0056] **적용예 2: 종양(암)**

[0057] 종양의 성장은 암세포가 그들의 조직덩어리에 작은 혈관을 증식시키는 신생혈관형성능력이 강화될 때에만 발생한다. 암세포는 신생혈관형성(angiogenesis)을 촉진하거나 또는 모세혈관(capillaries)을 형성하는 혈관내피세포(endothelial cells)를 증식하는 요소, 즉 혈관내피세포 성장인자(VEGF)를 분비함으로써 작은 혈관의 증식을 촉진한다. 만일 이들 신생혈관 형성에 필요한 요소들이 억제되거나 차단된다면, 종양은 산소와 영양부족 상태가 되며, 암세포가 만들어낸 독성물질 속에서 괴사하게 되며, 다른 기관에 전이 될 수 없다. 따라서 본 발명의 육계 추출물의 신생혈관형성 억제 효과는 암세포의 성장과 전이를 막아 암 치료에 효과적이다.

[0058] 이하, 하기 실시예, 실험예 및 제제예를 통하여 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명하고자 한다. 다만 이는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것이지, 본 발명의 권리범위를 이로 한정하려는 의도는 아니다.

[0059] **[실시예]**

[0060] **실시예 1: 육계 냉수 추출물의 제조**

[0061] 24시간 동안 마른 육계 증량대비 5배의 냉수를 가하여 진탕추출하고 여과하는 것을 3번 반복하였다. 추출물을 모아서 40℃ 증발 농축기로 농축하여 동결 건조하여 육계 냉수 추출물을 수득하였다.

[0062] **[실험예]**

[0063] **실험예 1: 육계 냉수 추출물의 세포독성 실험**

[0064] 실시예 1에서 얻어진 육계 냉수 추출물(CCBE)이 인간 태줄정맥혈관내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)에 독성이 있는지를 엠티티(MTT) 세포 생존능력 분석방법으로 조사하였다.

[0065] 이를 위해 먼저, 혈관내피세포(HUVECs)를 20% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)(Gibco), 헤파린(heparin)(5 unit/ml), 염기성 섬유아세포 증식인자(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)(3 ng/ml), 100

unit/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 첨가한 M199 배지에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 모든 실험에서 세포의 생존율은 95% 이상으로 유지시켰다.

[0066] 상기에서 배양된 혈관내피세포(HUVECs)를 5×10^4 cells/well의 농도로 12-웰 플레이트에 분주하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 육계 냉수 추출물(1, 5, 10, 25, 50, 100 μ g/ml)을 다양한 농도로 각 웰에 처리한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0067] 배양이 완료된 후, 배지가 있는 상태에서 각 웰에 5 mg/ml의 엠티티(MTT) 시약을 100 μ l/ml의 농도로 첨가하고 배양기에서 4시간 배양하였다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 각 웰에 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 150 μ l씩 첨가하고, 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존능력을 분석하였다.

[0068] 이때, 세포생존능력은 육계 냉수 추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포 생존능력을 100%로 하고 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

[0069] 실험 결과, 육계 냉수 추출물의 처리 농도가 증가할수록 세포생존능력이 감소하는 것으로 나타났다(도 1).

[0070] 따라서 이하 모든 실험은 세포독성이 없는 농도에서 수행하였다.

[0071] **실험예 2: 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포증식에 미치는 육계 냉수 추출물의 영향**

[0072] 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, 육계 냉수 추출물을 전처리하고 혈관내피세포 성장인자를 20 ng/ml 처리하였다.

[0073] 처리한지 24시간 뒤에, 세포계수기를 이용하여 세포의 개수를 측정하였다.

[0074] 실험 결과, 육계 냉수 추출물이 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관 내피 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다(도 2).

[0075] **실험예 3: 육계 냉수 추출물의 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 대한 세포신호전달(세포의 신호조절 인산화효소(extracellular signal regulated kinase, ERK), p38, 및 혈관내피 성장인자 수용체 2의 인산화) 실험**

[0076] 혈관내피세포를 60 mm 플레이트에 분주한 후 다음날에 6시간 혈청기아(serum starvation)를 주었다. 혈관내피세포 성장인자 20 ng/ml를 처리하기 40분 전에 육계 냉수 추출물을 처리하였다.

[0077] 상기 혈관내피세포 성장인자(20 ng/ml)를 처리한 후 10분 뒤에 방사선면역분석법(Radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 버퍼(buffer)[12 mM EDTA, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM Na₃VO₄(Sigma-Aldrich, USA) 10 mM NaF(Sigma), 1 mM PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride)(Sigma), 1% 트리톤(Triton X-100), 10% 글리세롤, 프로테아제 억제 카테일(Roche, Germany)]를 이용하여 세포를 용해(lysis)하였다.

[0078] 용해된 세포를 1.5 ml 튜브에 넣고 피펫팅한 다음, 얼음위에서 20분간 방치하였다. 이를 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 바이신코닉 산(Bicinchoninic Acid, BCA) 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, Illinois)를 사용하여 각각의 샘플 농도를 결정하고 전기영동(SDS-PAGE)하였다.

[0079] 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 2시간동안 3% 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA) 용액(Amresco, USA)으로 블로킹(blocking)하고, 1차 항체를 처리하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 1차 항체로는 세포사 관련 신호 기전들에 대한 항체인 항-ERK 항체, 항-p-ERK 항체, 항-p38 항체, 항-p-p38 항체, 항-VEGF 수용체 2 항체, 및 항-p-VEGF 수용체 2 항체를 셀 시그널링 테크놀로지사(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)로

부터 구입하여 사용하였다. 일차 항체와의 반응이 완료되면 약 15분 동안 세척하고 다시 45분간 2차 항체를 처리하여 반응시켰다.

[0080] 반응 후 30분 이상 충분히 세척한 후 전기화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 검출 키트(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여 밴드를 확인하였다.

[0081] 실험 결과, 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의해 유도된 세포의 신호조절 인산화효소(extracellular signal regulated kinase, ERK), p38, 및 혈관내피 성장인자 수용체 2의 인산화가 육계 냉수 추출물에 의해 저해되는 것으로 나타났다(도 3).

[0082] **실험예 4: 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포이동에 미치는 육계 냉수 추출물의 영향 실험**

[0083] 먼저 트랜스웰 인서트(transwell insert)의 아래 면을 젤라틴(gelatin)으로 코팅한 후 그 안에 1×10^5 개의 혈관내피 세포와 육계 냉수 추출물을 넣고 아래 부분(chamber)에는 혈관내피세포 성장인자 20 ng/ml를 넣은 후, 4시간 배양한 다음 배양을 끝낸 후에 웰(well)의 내면을 면봉 등으로 닦아서 이동하지 않은 세포들을 제거하였다.

[0084] 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.

[0085] 실험 결과, 육계 냉수 추출물이 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관 내피세포의 이동을 억제하는 것으로 나타났다(도 4).

[0086] **실험예 5: 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 세포침습 (invasion)에 미치는 육계 냉수 추출물의 영향 실험**

[0087] 트랜스웰 인서트(transwell insert)의 윗면을 매트릭젤(matrigel)로 코팅한 후 그 안에 1×10^5 개의 혈관 내피 세포와 육계 냉수 추출물을 넣고 아래 부분(chamber)에는 혈관내피세포 성장인자 20 ng/ml를 넣은 후, 24시간 배양한 다음 배양을 끝낸 후에 웰(well)의 내면을 면봉 등으로 닦아서 이동하지 않은 세포들을 제거하였다.

[0088] 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.

[0089] 실험 결과, 육계 냉수 추출물이 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관 내피 세포의 침습을 억제하는 것으로 나타났다(도 5).

[0090] **실험예 6: 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloprotease, MMP)에 미치는 육계 냉수 추출물의 영향 실험**

[0091] 육계 추출물과 혈관내피세포 성장인자를 처리한 세포 배양액과 처리하지 않은 세포 배양액을 4 °C에서 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리후, 0.2% 젤라틴이 첨가된 겔을 이용하여 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하였다. 그 후, 2.5% 트리톤(Triton X-100)용액으로 30분 동안 2번 씻어주고 배양버퍼 (incubation buffer)에서 3시간 또는 12시간 배양한 후, 0.25% 쿠마씨 브릴리언트 청색(Coomassie Brilliant Blue) R250 용액으로 기질금속단백질 분해효소의 활성을 관찰하였다. 피엠에이(phorbol myristate acetate, PMA) (40 ng/ml)를 양성 대조군(positive control)을 위하여 사용하였다.

[0092] 실험 결과, 육계 냉수 추출물이 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 혈관 내피 세포의 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloprotease, MMP)의 활성을 억제하는 것으로 나타났다(도 6).

[0093] **실험예 7: 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 관형성(tube formation)에 미치는 육계 냉수 추출물의 영향 실험**

[0094] 24-웰 플레이트에 200 μ l 매트릭젤(matrigel)을 코팅한 후 37 °C에서 30분간 배양하였다. 배양된 혈관내피세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 코팅된 24-웰 플레이트에 분주하였다. 세포의 분주 전 혈관내피세포 성장인자(20 ng/ml)와 육계 냉수 추출물을 처리하고, 분주 후 20시간 뒤에 현미경으로 관형성을 관찰하였다. 이 실험은 1% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS) M199 배지를 사용하여 수행하였다.

[0095] 실험결과, 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의해 유도되는 관형성(tube formation)이 육계 냉수 추출물에 의해 저해되는 것으로 나타났다(도 7).

[0096] **실험예 8: 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 쥐 대동맥 발아(sprouting)에 미치는 육계 냉수 추출물의 영향 실험**

[0097] 24-웰 플레이트에 120 μ l 매트릭젤(matrigel)을 코팅한 후 37 °C에서 30분간 배양하였다. 7 주령된 쥐(SD rat)의 대동맥을 적출하고 인산완충 식염수(Phosphate buffer saline, PBS)로 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 24-웰 플레이트 위에 올려놓고 그 위에 다시 한 번 50 μ l 매트릭젤(matrigel)을 넣어서 37 °C에서 30분간 배양하였다. 매트릭젤(matrigel)로 둘러싸여 굳어진 동맥위에 혈관내피세포 성장인자(20 ng/ml)와 육계 냉수 추출물이 들어있는 배지를 넣었다. 일주일후 현미경으로 발아(sprouting) 개수를 관찰하였다.

[0098] 실험 결과, 육계 냉수 추출물이 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 의한 쥐 대동맥의 발아(sprouting)를 억제하는 것으로 나타났다(도 8).

[0099] **[제제예]**

[0100] **제제예 1. 산제의 제조**

[0101] 육계 냉수 추출물..... 10 mg

[0102]수크로스..... 100 mg

[0103]탈크..... 10 mg

[0104]상기 성분들을 분말화하여 혼합한 후 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0105] **제제예2. 정제의 제조**

[0106]육계 냉수 추출물..... 20 mg

[0107]유당..... 100 mg

[0108]전분..... 100 mg

[0109]스테아린산 마그네슘..... 정량

[0110]상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조 방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0111] **제제예 3. 캡슐의 제조**

[0112]육계 냉수 추출물..... 10 mg

[0113]유당..... 50 mg

[0114]전분..... 50 mg

- [0115] 탈크..... 2 mg
- [0116] 스테아린산마그네슘..... 적량
- [0117] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0118] **제제예 4. 과립제의 제조**
- [0119] 육계 냉수 추출물..... 10 mg
- [0120] 대두 추출물..... 50 mg
- [0121] 포도당..... 200 mg
- [0122] 전분..... 500 mg
- [0123] 상기 성분들을 혼합한 후 30% 에탄올 100 mL를 첨가하여 60 ℃에서 건조시켜 과립을 형성한 후 포에 충전하여 과립제를 제조한다.
- [0124] **제제예 5. 환제의 제조**
- [0125] 육계 냉수 추출물..... 20 mg
- [0126] 유당..... 1,500 mg
- [0127] 글리세린..... 1,500 mg
- [0128] 전분..... 980 mg
- [0129] 상기 성분들을 혼합한 후 통상의 환제의 제조방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조한다.
- [0130] **제제예 6. 액제의 제조**
- [0131] 육계 냉수 추출물..... 100 mg
- [0132] 설탕..... 20 g
- [0133] 이성화당..... 20 g
- [0134] 레몬향..... 적량
- [0135] 정제수를 가하여 전체..... 100 ml
- [0136] 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100 ml의 갈색병에 충전하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.
- [0137] **제제예 7. 주사제제의 제조**
- [0138] 육계 냉수 추출물..... 1.0 mg
- [0139] 소듐 메타비설파이트..... 0.5 mg
- [0140] 메틴파라벤..... 0.8 mg
- [0141] 프로필파라벤..... 0.1 mg
- [0142] 주사용 멸균증류수..... 적량
- [0143] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 3 ml로 한 후, 3 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.

[0144] 제제예 8. 건강 기능 식품의 제조

[0145] 육계 냉수 추출물 20 mg, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5 mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제 1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg을 혼합하여 통상의 건강식품 제조방법에 따라 제조한다.

[0146] 제제예 9. 건강 음료의 제조

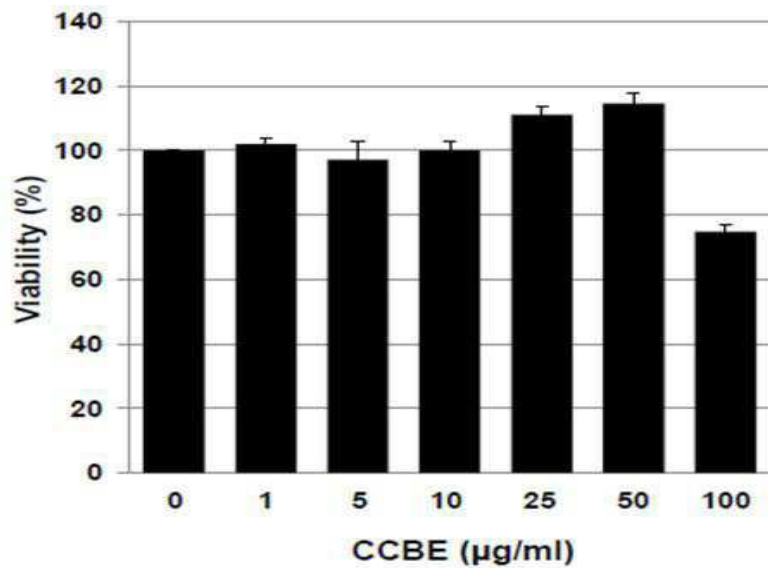
[0147] 육계 냉수 추출물 20 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g, 정제수 적량을 혼합하여 통상의 건강 음료의 제조방법에 따라 제조한다.

[0148] 제제예 10. 과자의 제조

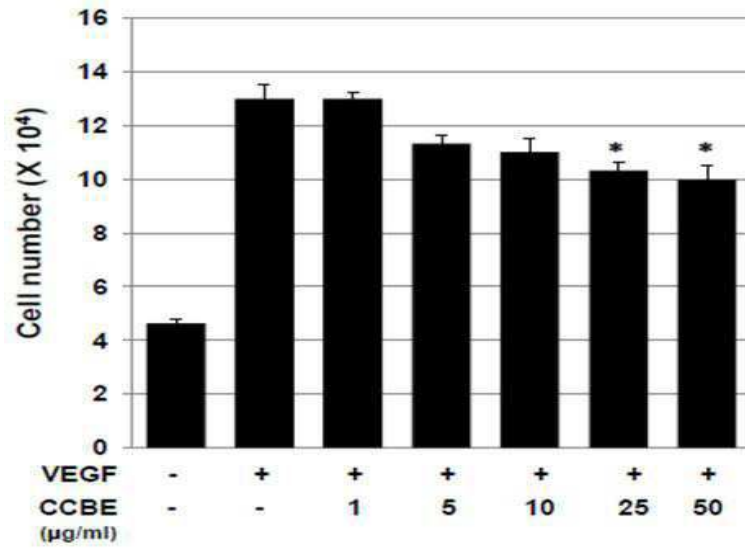
[0149] 본 발명의 육계 냉수 추출물 10 mL을 버터 5 g, 우유 10 mL를 밀가루 100 g에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 쿠키, 크래커 및 스낵류를 제조한다.

도면

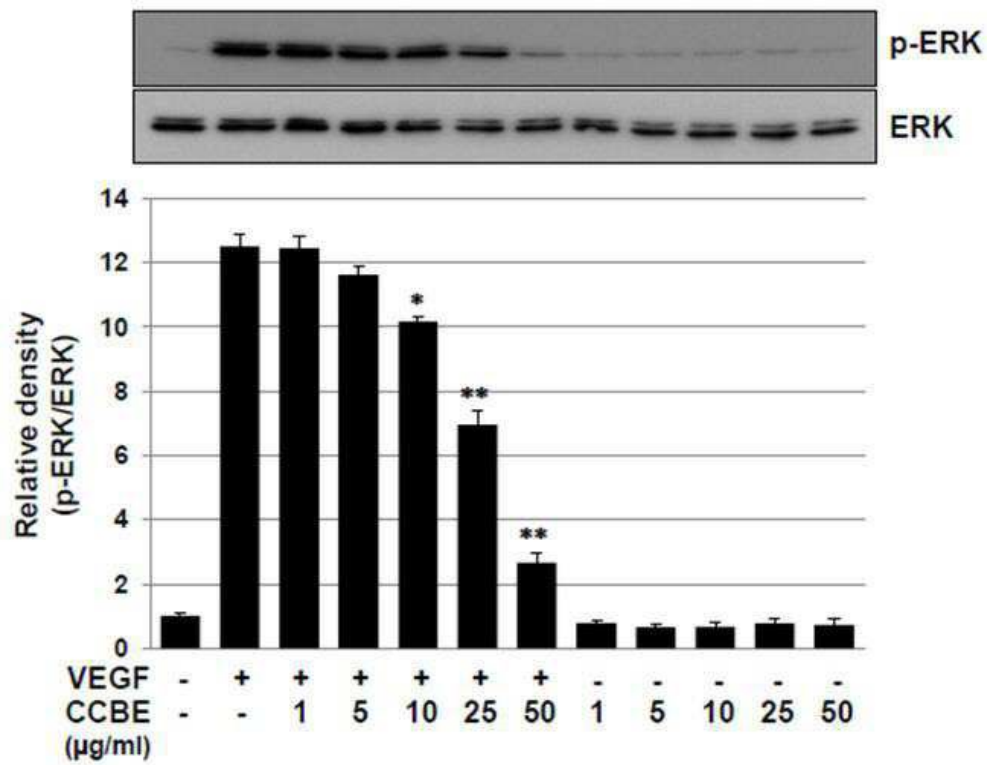
도면1



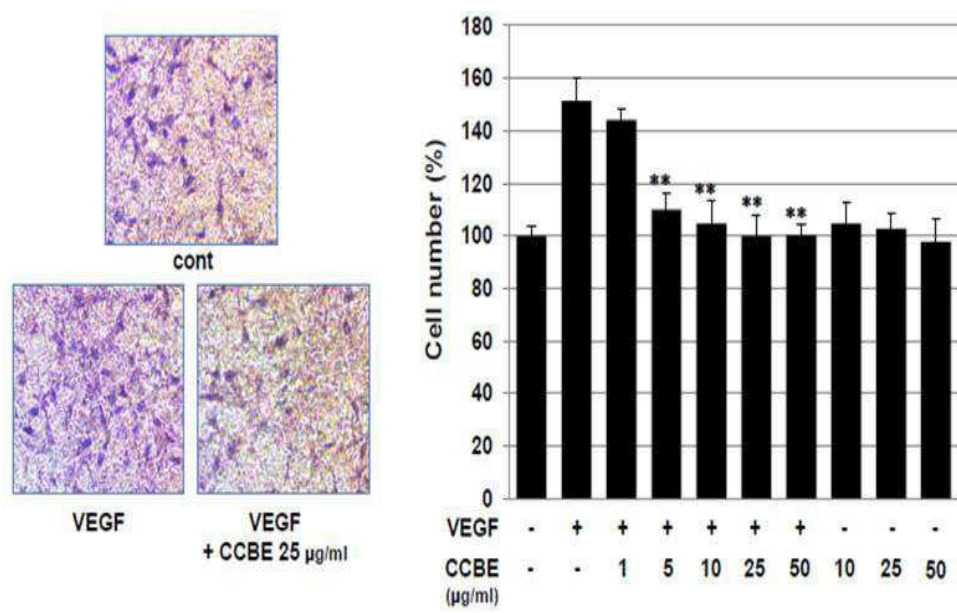
도면2



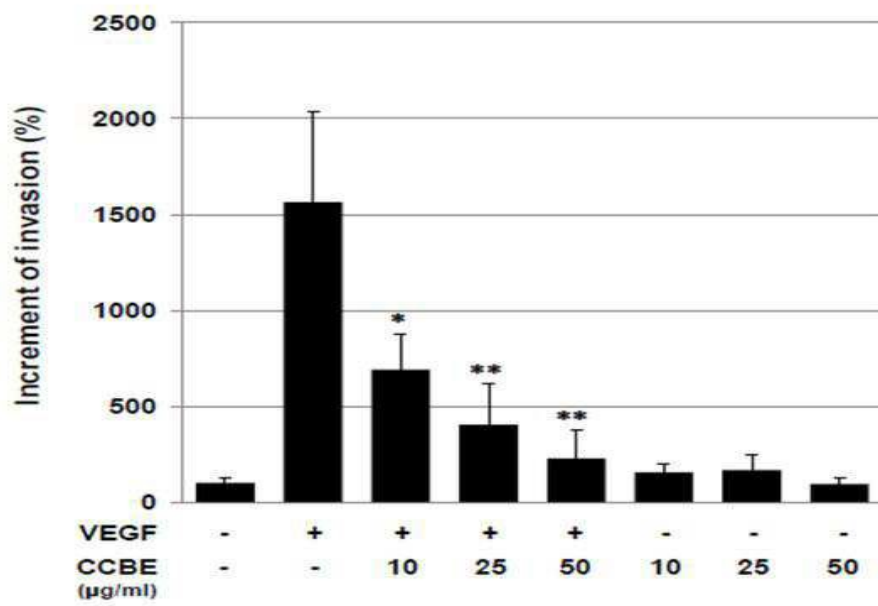
도면3



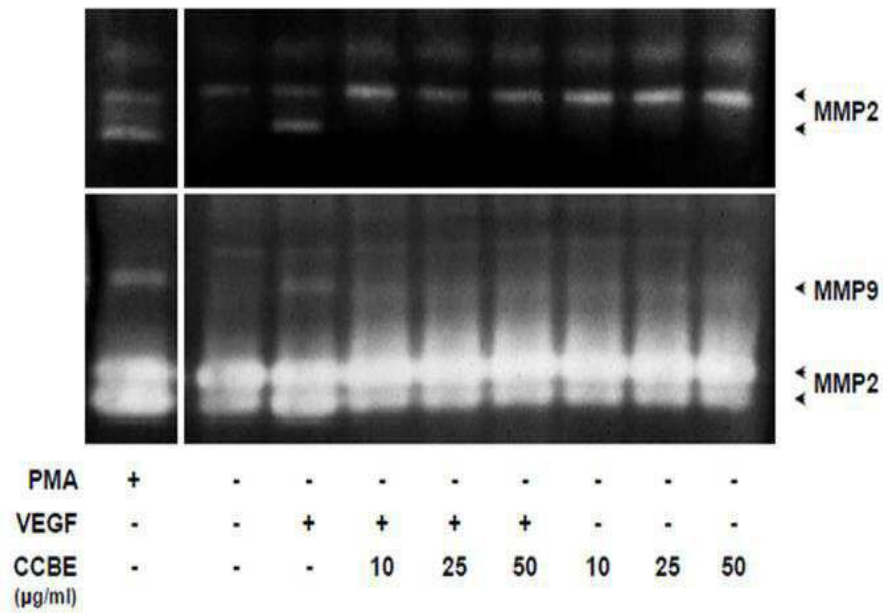
도면4



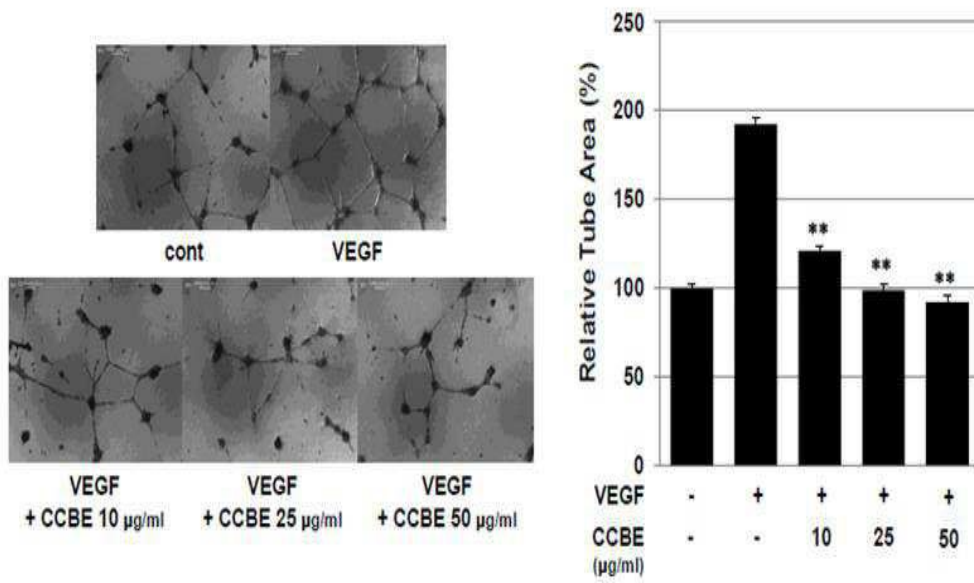
도면5



도면6



도면7



도면8

