



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0004466
(43) 공개일자 2010년01월13일

(51) Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/20 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0064654

(22) 출원일자 2008년07월04일

심사청구일자 2008년07월04일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

남문석

인천광역시 중구 신흥동3가 인하대학병원 내분비
내과

김억천

강원도 원주시 우산동 222-9

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

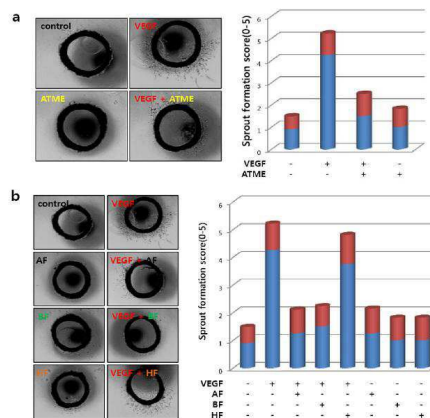
(54) 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 산겨릅나무(*Acer tegmentosum Maxim.*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하고 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor; 이하 'VEGF' 라 함)에 대하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 억제하고, VEGF에 대한 혈관내피 세포증식을 억제하고, VEGF에 의한 혈관내피 세포이동을 강하게 억제하고, VEGF에 대한 혈관내피세포의 분화를 억제하고, VEGF에 의한 대동맥 sprouting 을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 확인하였다.

본 발명에 따른 산겨릅나무(*Acer tegmentosum Maxim.*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 과도한 신생혈관 형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료에 사용될 수 있을 뿐 아니라 암세포가 분비하는 VEGF 및 신생혈관 형성으로 인한 종양을 괴사시키고 암세포의 전이를 중지시켜 항암 치료용으로 사용가능한 것이다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

산겨릅나무(*Acer tegmentosum Maxim.*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하고 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor)에 대하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무는 잎 또는 잔가지를 사용하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물은 물을 산겨릅나무 중량대비 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 동결 건조하여 수득되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물은 물을 산겨릅나무 중량대비 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 n-헥산, 클로포포름 또는 n-부탄올 중 선택된 1종으로 추출하여 수득되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 분획물은 물을 산겨릅나무 중량대비 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 n-헥산, 클로포포름, n-부탄올을 순차적으로 사용하여 추출한 다음 잔류물을 동결 건조하여 수득되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 대한 혈관내피 세포증식을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 혈관내피 세포이동을 강하게 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 관 형성을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 대동맥 sprouting을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 과도한 신생혈관 형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암세포가 분비하는 VEGF 및 신생혈관 형성으로 인한 종양을 괴사시키고 암세포의 전이를 중지시켜 항암 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 산겨릅나무(*Acer tegmentosum Maxim.*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하고 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor; 이하 'VEGF' 라 함)에 대하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 VEGF에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 억제하고, VEGF에 대한 혈관내피 세포증식을 억제하고, VEGF에 의한 혈관내피 세포이동을 강하게 억제하고, VEGF에 대한 혈관내피 세포의 분화를 억제하고, VEGF에 의한 대동맥 sprouting을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 사망원인 1위인 암에 대한 항암치료는 수술요법, 화학요법(chemotherapy), 방사선요법이 있다. 수술요법은 종양을 외과적 방법으로 제거하는 것이고, 화학요법은 약물을 이용하는 것이며 방사선요법은 X선, 코발트, 라듐 및 그 밖의 원료에서 나오는 고에너지의 방사선을 사용하여 악성 종양세포를 죽이는 방법이다. 그동안 암을 극복하기위한 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.
- <3> 그러므로 최근에는 정상세포에는 피해를 덜 줄수 있는 새로운 연구 방법들이 시도되고 있는데, 면역요법, 유전자치료, 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.
- <4> 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 크기이상의 성장을 하기위해 필요로하는 새로운 혈관형성을 차단하는 신생혈관형성 억제제(Angiogenesis inhibitor), 암세포의 예정된 세포사멸을 유도하여 세포증식을 차단하는 새로운 세포사멸 유도제(Apoptosis stimulator)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 발견에 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 단계이며, 임상실험이 진행되지 않고 있으나 향후 5년 이내에는 혈관신생억제 신약이 시판 가능할 것으로 예상된다. 오늘날 물질특허를 비롯한 지적소유권의 보호가 강력히 요구되는 세계적인 추세속에서 국내 천연자원으로부터의 약리활성 물질의 개발에 관한 연구는 절실하다고 할 수 있으며, 선진국과 국제경쟁력을 높이기 위해서도 신규 약리활성 물질의 개발에 대한 자체기술력의 확보가 무엇보다도 중요하다 할 수 있겠다.
- <5> 혈관신생(angiogenesis)이란 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 만들어지는 것을 뜻한다. 정상적인 생리조건에서는 거의 일어나지 않는 엄격히 조절되는 현상이나 수정난 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 없다(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 가능성이 있다. 둘째, 기존의 항암 화학요법은 암세포가 빠르게 성장하는 특징을 이용하여 치료하기 때문에 비교적 세포주기가 빠른 골수세포, 위장관계세포에 독성을 나타내는 반면 신생혈관형성 억제제는 장기투여해도 비교적 적은 부작용을 나타낼 수 있다는 점이다. 뿐만아니라 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 수백개의 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 발현형차이와 각각의 종양 주위의 미세환경과 서로 다른 혈관 성장인자들의 분포가 다르기 때문으로 생각된다. 따라서, 혈관성장인자의 발현, 혈관내피세포의 다양성, 암 조직 주위의 미세환경 등은 혈관성장 억제제를 통한 암의 치료에 중요한 영향을 미치게 된다.

<6> 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 VEGF는 혈관형성 촉진인자, angiostatin(O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al., Cell. 1994,21; 79:315-328)과 endostatin(O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al., Cell. 1997, 24; 88(2):277-285)은 혈관형성 억제인자로 가장 많이 알려져 있다.

<7> 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 거의 모든 세포에서 분비되며, 종양의 침투성과 깊은 관계가 있다(Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD et al., Cancer Res. 1995, 55(18):3964-3968). VEGF 수용체는 혈관 내피세포에 일반적으로 존재하지만 신경세포, Kaposi's sarcoma, 조혈모세포 등에서 발현되며, VEGFR-1(flt-1), VEGFR-2(Kdr/flk-1), VEGFR-3(flt-4) 등 3종류가 있다. VEGF가 결합되면 수용체 tyrosine 잔기의 인산화와 함께 수용체 이중화(dimerization)작용으로 신호가 전달된다. VEGFR-1은 내피세포의 이동, VEGFR-2는 내피세포의 성장과 혈액유출 효과에 관여한다. 직접적인 혈관형성인자 외에도 비특이적 인자들인 aFGF, bFGF, TGF, EGF, PDGF, platelet-derived endothelial cell growth factor, angiogenin, IL-8, MIP, PF4, GRO 등이 혈관 형성에 관여한다(Moore BB, Arenberg DA, Addison CL et al., J Lab Clin Med. 1998, 132(2):97-103). 또한, VEGF의 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, Davis DW, Liu W et al., Cancer Res. 1999, 59(21):5412-5416). 이외에도 혈관내피세포의 고사를 유도하는 기전, 혈관형성 촉진인자나 내피세포의 생존인자들을 조절하는 간접인자들의 작용 억제, 체내에 존재하는 신생혈관 억제제의 활성을 증가시키는 방법들에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

<8> 구체적으로, 산겨릅나무의 성분이나 생리활성에 대한 연구는 catechin 분리 및 DPPH에 대한 항산화(Hong BK, Kim JK, Kim H, Lee JW, Yu CH, Kim MJ, 2006. Proc. of Soc. Korean Med. Crop. Sci. 14:632-633), 페놀계 배당체 분리(Hur JM, Yang EJ, Choi SH, Song KS, 2006, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49:149-152), 암세포 성장 억제 효과(Shin IC, Sa JH, Kim TW, Park KY, Jeong KJ, Lee TW, Han KS, Shim TH, Oh HS, 2005, Rep. Inst. Health & Environ. 16:39-45), 암세포에 대한 세포독성(Park KM, Yang MC, Lee KH, Kim KR, Choi SU, Lee KR, 2006, Arch. Pharm. Res. 29(12):1086-1090) 등이 있다. 산겨릅나무(*Acer tegmentosum* Maxim.)는 깊은 계곡에 산기슭에 자라는 단풍나무과 낙엽활엽 소교목으로서 민간에서는 산겨릅나무, 벌나무, 산청목, 봉목, 청해척, 청해자, 색수피, 참겨릅나무 등의 다양한 이름으로 부르며, 주로 잎과 잔가지 그리고 나무껍질을 이용한다.

<9> 그러나, 본 발명에 사용된 산겨릅나무 추출물의 신생혈관형성 억제 효과 및 그 기전에 관한 보고는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> 이에 본 발명자들은 소종과 외상출혈 치료에 사용되며, 주로 간암, 간경화 등의 간 질환 치료제로 사용되어온 산겨릅나무 추출물의 신생혈관형성 억제 활성을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<11> 즉, 본 발명의 목적은 산겨릅나무 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물이 VEGF에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 억제하고, VEGF에 대한 혈관내피 세포증식을 억제하고, VEGF에 의한 혈관내피 세포이동을 강하게 억제하고, VEGF에 의한 대동맥 sprouting을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 확인하고, 이를 바탕으로 하는 약학적 조성물을 제공하려는데 있다.

과제 해결수단

<12> 본 발명에서는 산겨릅나무(*Acer tegmentosum Maxim.*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하고 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor)에 대하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 약학적 조성물을 제공하는 것을 일 특징으로 한다.

<13> 또한, 상기 산겨릅나무는 잎과 잔가지를 약제로 사용하는 것을 특징으로 한다.

<14> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물은 물을 산겨릅나무 중량대비 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 동결 건조하여 수득되는 것을 특징으로 한다.

<15> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물은 물을 산겨릅나무 중량대비 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 n-헥산, 클로포포름 또는 n-부탄을 중 선택된 1종으로 추출하여 수득되는 것을 특징으로 한다.

<16> 또한, 상기 산겨릅나무 분획물은 물을 산겨릅나무 중량대비 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 n-헥산, 클로포포름, n-부탄을 순차적으로 사용하여 추출한 다음 잔류물을 동결 건조하여 수득되는 것을 특징으로 한다.

<17> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 ERK (extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

<18> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 대한 혈관내피 세포증식을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

<19> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 혈관내피 세포이동을 강하게 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 한다.

<20> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 관 형성을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

<21> 또한, 상기 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 VEGF에 의한 대동맥 sprouting을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

<22> 나아가, 상기 조성물은 과도한 신생혈관 형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료에 사용되는 것을 특징으로 한다.

<23> 나아가, 상기 조성물은 암세포가 분비하는 VEGF 및 신생혈관 형성으로 인한 종양을 괴사시키고 암세포의 전이를 중지시켜 항암 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.

<24> 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

<25> 본 발명의 기술적 핵심은 신생혈관 형성(angiogenesis)을 촉진하거나 또는 모세혈관(capillaries)을 형성하는 혈관 내피세포(endothelial cells)를 증식하는 인자인 혈관내피세포 성장인자를 억제하거나 차단하는데 있다.

<26> 이를 위하여, 산겨릅나무(*Acer tegmentosum Maxim.*) 추출물 또는 분획물을 우선 준비한다. 이때 상기

산겨릅나무는 고산지대에 자라며 잘 발견되지 않으며 주로 잎과 수피 및 잔가지를 약제로 사용하고 있으나 수피 채취는 나무를 죽이므로 잎과 잔가지를 약제로 사용하면 충분하다.

<27> 상기 산겨릅나무 중량 대비 물을 3.75-10배 중량 범위로 가하고 100℃에서 4시간동안 진탕 추출후 여과하고 동결 건조하여 추출물을 수득할 수 있다. 구체적으로는 산겨릅나무 4kg에 물 15-18 liter를 가하여 달이거나 혹은 산겨릅나무 1kg에 물 10 liter로 달이면 추출 효율을 감안할 때 바람직한 것으로, 상기 함량 미만이거나 초과하면 효율 측면 측면에서 볼 때 바람직하지 않다.

<28> 또한, 산겨릅나무 중량대비 물을 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-100℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 n-헥산, 클로포포름 또는 n-부탄올 중 선택된 1종으로 추출하여 추출물을 수득할 수 있다.

<29> 나아가, 산겨릅나무 중량대비 물을 3.75-10배 중량 범위로 가하고 95-105℃에서 3-4시간동안 진탕 추출후 여과하고 n-헥산, 클로포포름, n-부탄올을 순차적으로 사용하여 추출한 다음 잔류물을 동결 건조하여 분획물을 수득할 수 있다.

<30> 이와 같이 하여 얻어진 산겨릅나무 추출물 또는 분획물은 하기 실시예에서도 규명된 바와 같이, 다음과 같은 작용 효과를 갖는다.

<31> 첫째, VEGF에 의한 ERK(extracellular signal regulated kinase)의 인산화를 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는다(실시예 3 참조)

<32> 둘째, VEGF에 대한 혈관내피 세포증식을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는다(실시예 4 참조)

<33> 셋째, VEGF에 의한 혈관내피 세포이동을 강하게 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는다(실시예 5 참조)

<34> 넷째, VEGF에 의한 관형성을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는다(실시예 6 참조)

<35> 다섯째, VEGF에 의한 대동맥 sprouting을 억제하여 신생혈관형성 억제 활성을 갖는다(실시예 7 참조).

<36> 한편, 상기와 같이 추출된 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 통상적인 방법으로, 투여방법, 투여형태 및 치료목적에 따라 상기 유효성분을 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 혼합하여 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시켜 사용하는 것이 바람직하다. 이때 상기 산겨릅나무 추출물은 전체 조성물의 총 중량 기준으로 0.1~99 중량%, 바람직하게는 1-50중량%, 보다 바람직하게는 5-30중량% 범위내로 사용하는 것이 좋다.

<37> 그리고 상기 담체가 희석제로 사용되는 경우에는 염수, 완충제, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 링거액, 락토즈, 수크로즈, 칼슘 실리케이트, 메틸 셀룰로오스 및 에탄올로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1종 이상의 담체를 사용하여 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제, 과립제, 현탁제, 유제와 같은 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제와 같은 단위 투여형 또는 수회투여형 제제로 제조하고, 이를 심혈관계 질환 치료 및 예방제로 사용할 수 있다. 다만, 본 발명의 담체가 상기의 담체로 한정되는 것은 아니다. 그리고 이때 비경구 투여는 경구 이외에 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강, 흡입 등을 통해 약제의 투여를 의미한다.

<38> 또한, 상기 제형에 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함하여 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 제형화할 수 있다.

<39> 본 발명의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배성율, 약제혼합 및 질환의 중증도에 따라 변화될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 10 내지 2000mg/kg으로, 바람직하게는 100내지 1000mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다.

<40> 구체적으로, 본 발명의 조성물은 필요에 따라, 경구제제 타입, 좌제 타입, 외용제 타입, 혹은 멸균 주사제 타입으로 제형화되는 것이 바람직하며, 특히 경구제제 타입으로는 산제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 시럽, 건조시럽, 환제 혹은 에어로졸 타입 등을 포함할 수 있다.

<41> 특히, 본 발명의 산겨릅나무 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

<42> 따라서, 본 발명에서 밝혀진 산겨릅나무 추출물의 신생혈관형성 억제 효과는 생체내에서 신생혈관형성을 요구하는 비정상적으로 증식된 세포와 관련된 질환, 일예를 들어 과도한 신생혈관 형성으로 인한 당뇨병성 망막증,

또는 각종 종양 등에 항암제로서 적용가능한 것이다.

효 과

<43> 산술한 바와 같이, 산겨릅나무 추출물의 신생혈관형성 억제 효과는 생체내에서 신생혈관형성을 요구하는 비정상적으로 증식된 세포와 관련된 질환, 일례를 들어 과도한 신생혈관 형상으로 인한 당뇨병성 망막증, 또는 각종 종양 등에 항암제로서 매우 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<44> <재료>

<45> 산겨릅나무: 잔가지를 2006년 가을 강원도 도계에서 채취하여 말린 후 사용하였다.

<46> <실시예 1: 산겨릅나무 잔가지 추출물의 추출방법>

<47> 170g의 마른 산겨릅나무 잔가지에 1.5 liter의 물을 넣어 4시간 달여서 0.22 μ m 여과기로 여과하여 추출물을 얻었다. 이중 1.1 liter는 동결건조하여 3g의 추출물 가루를 얻었고 나머지 400 ml는 분획물을 얻는데 사용하였다. 먼저 동량의 n-hexane으로 하루동안 추출하여 hexane fraction(22 mg)을 얻은 후, 동량의 chloroform으로 하루동안 추출하여 chloroform fraction(738 mg)을 얻었다. 그다음으로 동량의 n-butanol으로 하루동안 추출하여 butanol fraction(319 mg)을 얻고, 추출하고 남은 나머지를 동결건조하여 aqueous fraction(240 mg)을 얻었다.

<48> 산겨릅나무 추출물과 aqueous fraction은 3차증류수, hexane fraction과 butanol fraction은 DMSO를 각각 용매로 하여 실험에 사용하였다(도 1 참조).

<49> <실시예 2: 산겨릅나무 추출물과 분획물의 세포독성 조사>

<50> 본 실시예에서는 실시예 1에서 얻어진 산겨릅나무 추출물과 그 분획물이 인간 태줄정맥혈관내피세포에 독성이 있는지를 MTT 세포 생존능력 분석방법으로 조사하였다.

<51> 이를 위해 먼저, 혈관내피세포(HUVECs)를 20% FBS(Hyclone), heparin(5 unit/ml), bFGF(3 ng/ml), 100 ng/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.

<52> 상기에서 배양된 HUVECs 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 24-웰 플레이트에 분주하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 산겨릅나무 추출물(50, 100, 200, 500, 1000 μ g/ml)과 그 분획물(0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 μ g/ml)을 다양한 농도로 각 웰에 처리한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간, 48시간 동안 배양하였다.

<53> 배양이 완료된 후, 배지가 있는 상태에서 각 웰에 5mg/ml의 MTT 시약을 20 μ l/100ml의 농도로 첨가하고 배양기에서 2시간 배양하였다. 2시간 후, 배양액을 제거하고 각 웰에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 μ l씩 첨가하고, 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포생존능력을 분석하였다.

<54> 이때, 세포생존능력은 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 처리하지 않은 대조군의 세포생존능력을 100%로 하고 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

<55> 실험 결과, 산겨릅나무 추출물과 그 분획물의 처리 농도가 증가할수록 세포생존능력이 감소하는 것으로 나타났다(도 2a,b 참조).

<56> 한편, 이하 모든 실험은 세포독성이 없는 농도에서 수행하였다.

<57> <실시예 3: 산겨릅나무 추출물과 그분획물의 VEGF에 대한 세포신호전달(ERK 인산화) 조사>

<58> 혈관내피세포를 60 mm plate에 분주한 후 다음날에 6시간 혈청기아(serum starvation)를 주었다. VEGF를 처리하기 30분 전에 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 처리하였다.

<59> 상기 VEGF를 처리한 후 30분 뒤에 RIPA 버퍼[12mM EDTA, 137mM NaCl, 20mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM Na₃VO₄(Sigma-Aldrich, USA) 10mM NaF(Sigma), 1mM PMSF(Sigma), 1% Triton X-100, 10% 글리세롤, 프로테아제

억제 카테일(Roche, Germany)]를 이용하여 세포를 용해(lysis)하였다.

<60> 용해된 세포를 1.5ml 튜브에 넣고 피펫팅한 다음, 얼음위에서 20분간 방치하였다. 이를 14000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 BCA 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, Illinois)를 사용하여 각각의 샘플 농도를 결정하고 전기영동(SDS-PAGE)하였다.

<61> 상기 분리된 단백질을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 즉, 샘플의 전기영동이 끝나면 젤에서 폴리비닐리덴 플루오라이드 멤브레인(Polyvinylidene Fluoride membrane, Pall Corporation)으로 단백질을 트랜스퍼 한 후, 상기 멤브레인을 상온에서 2시간동안 5% DifcoTM Skim Milk 용액(Becton, Dickinson and Company, USA)으로 블럭킹(blocking) 하고, 1차 항체를 처리하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다.

<62> 상기 1차 항체로는 세포증식과 이동 관련 신호 기전들에 대한 항체인 항-ERK 항체, 항-p-ERK 항체를 셀 시그널링 테크놀로지사(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)로부터 구입하여 사용하였다. 일차 항체와의 반응이 완료되면 약 15분 동안 세척하고 다시 45분간 2차 항체를 처리하여 반응시켰다.

<63> 반응 후 30분 이상 충분히 세척한 후 ECL 검출 키트(Santa Cruz Biotechnology)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

<64> 실험 결과, VEGF에 의해 유도된 ERK의 인산화가 산겨릅나무 추출물(도 3a)과 Aqueous fraction과 butanol fraction(도 3b)에 의해 저해되는 것을 볼 수 있다.

<65> <실시예 4: VEGF에 의한 세포증식에 미치는 산겨릅나무 추출물과 분획물의 영향조사>

<66> 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 배양한 혈관 내피 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 12 well 플레이트에 분주하였다. 6시간 정도의 혈청 기아(serum starvation)를 준 후, 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 전 처리하고 VEGF를 처리하였다.

<67> 처리한 지 24시간 뒤에, 배지가 있는 상태에서 각 웰에 5mg/ml의 MTT 시약을 $20 \mu\text{l}/100\text{ml}$ 의 농도로 첨가하고 배양기에서 2시간 배양하였다. 2시간 후, 배양액을 제거하고 각 웰에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 $150 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고, 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포증식을 분석하였다. 이때, 세포증식은 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 처리하지 않은 대조군의 세포증식을 100%로 하고 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

<68> 실험 결과, 산겨릅나무 추출물이 VEGF에 의한 혈관 내피 세포의 증식을 억제하(도 4a)며 분획물 중에서는 aqueous fraction과 butanol fraction이 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다(도 4b).

<69> <실시예 5: VEGF에 의한 세포이동에 미치는 산겨릅나무 추출물과 분획물의 영향조사>

<70> 먼저 transwell insert의 아래 면을 gelatin으로 코팅한 후 그 안에 1×10^5 개의 혈관 내피 세포와 VEGF, 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 넣고 4시간 배양한 후에 배양이 끝나면 well의 내면을 면봉 등으로 닦아서 이동하지 않은 세포들을 제거하였다.

<71> 아래쪽으로 이동한 세포의 수는 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 200배 현미경 시야에서 계수하여 처리하지 않은 군과 비교한다. 처리하지 않은 대조군의 세포이동을 100%로 하고 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다.

<72> 실험 결과, 산겨릅나무 추출물이 VEGF에 의한 혈관 내피 세포의 이동을 억제하였으며(도 5a), 분획물은 저해 효과를 보이지 않았다(도 5b).

<73> <실시예 6: VEGF에 의한 관형성(tube formation)에 미치는 산겨릅나무 추출물과 분획물의 영향조사>

<74> 24 well plate에 matrigel을 $200 \mu\text{l}$ 를 코팅한 후 37°C 에서 30분간 배양하였다. 배양된 혈관내피세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 코팅된 24 well plate에 분주하였다. 세포의 분주 전 VEGF와 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 처리하고, 분주후 20시간 뒤에 현미경으로 관형성을 관찰한다. 이 실험은 1% FBS M199 배지를 사용하여 수행하였다.

<75> 실험결과, VEGF에 의해 유도되는 관형성이 산겨릅나무 추출물에 의해 저해되는 것을 확인할 수 있으며(도 6a), 분획물 중에서는 aqueous fraction과 butanol fraction이 관 형성을 저해하는 것으로 나타났다(도 6b)

참조).

<76> <실시예 7: VEGF에 의한 쥐 대동맥 sprouting에 미치는 산겨릅나무 추출물과 분획물의 영향조사>

<77> 24 well plate에 200 μ l matrigel을 코팅하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 8 주령된 SD rat의 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 matrigel이 코팅된 24 well plate위에 올려놓고 그위에 다시 한번 50 μ l matrigel을 넣어서 37°C에서 30분간 배양하였다. Matrigel로 둘러싸여 굳어진 동맥 위에 VEGF와 산겨릅나무 추출물과 분획물이 들어있는 배지를 넣었다. 일주일 후 현미경으로 sprouting 개수를 관찰하였다.

<78> 실험 결과, 산겨릅나무 추출물(도 7a)과 분획물 중 aqueous fraction과 butanol fraction이 VEGF에 의한 쥐 대동맥의 sprouting을 억제하는 것으로 나타났다(도 7b 참조).

<79> <적용예 1: 과다한 신생혈관형성으로 인한 당뇨병성 망막증 치료>

<80> 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.

<81> 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. 당뇨병망막병증은 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, 좀더 진행하면 혈관 투과성이 증가하면서 혈액 성분이 빠져나와서 망막이 붓고, 출혈이나 삼출물이 생긴다. 모세혈관이 막히면 혈액순환이 안 되는 부위가 늘어나고 망막내부에서 신생혈관이 자라나기 시작한다.

<82> 이러한 변화들이 망막의 중심부를 침범하게 되면 시력이 저하된다. 좀더 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.

<83> 이같은 당뇨병성 망막증의 치료에 상술한 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 적용하면 신생혈관형성 억제 효과를 확인할 수 있었다.

<84> <적용예 2: 종양(암)>

<85> 종양은 암세포가 그들의 조직덩어리에 작은 혈관을 증식시키는 능력이 강화될 때에만 발생한다. 암세포는 신생혈관 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.

<86> 이같은 암세포의 성장과 전이를 막는 암 치료에 상술한 산겨릅나무 추출물과 그 분획물을 적용하면 탁월한 효과를 확인할 수 있었다.

<87> 하기의 상기 약학적 제제의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<88> 제제예 1. 주사제제의 제조

<89> 생약 추출물.....1.0mg

<90> 소듐 메타비설파이트.....5.0mg

- <91> 메틴파라벤.....0.8mg
- <92> 프로필파라벤.....0.1mg
- <93> 주사용 멸균증류수.....적량
- <94> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 2ml로 한 후, 2ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.
- <95> 제제예2. 정제의 제조
- <96> 생약 추출물.....20mg
- <97> 유당.....100mg
- <98> 진분.....100mg
- <99> 스테아린산 마그네슘.....정량
- <100> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조 방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- <101> 제제예 3. 캡슐의 제조
- <102> 생약 추출물..... 10mg
- <103> 유당..... 50mg
- <104> 진분..... 50mg
- <105> 탈크..... 2mg
- <106> 스테아린산마그네슘..... 적량
- <107> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- <108> 제제예 4. 액제의 제조
- <109> 생약 추출물..... 100mg
- <110> 설탕..... 20g
- <111> 이성화당..... 20g
- <112> 레몬향..... 적량
- <113> 정제수를 가하여 전체..... 100ml
- <114> 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100ml의 갈색병에 충전하고 멸균시켜서 액제를 제조한다.

산업이용 가능성

- <115> 이상 살펴본 바와 같이, 산겨릅나무 추출물과 그 분획물은 VEGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 신생혈관형성을 억제하는 효과가 있다. 따라서, 산겨릅나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 생체내 신생혈관형성 억제에 의해 예방 또는 치료가 가능한 당뇨병성 망막병증, 각종 종양, 각종 암 등의 예방 또는 치료제로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <116> 도 1은 본 발명에 따른 산겨릅나무 추출물과 분획물을 수득하기 위한 공정 흐름도이다.
- <117> 도 2는 본 발명의 일 실시예로서 산겨릅나무 추출물과 분획물의 세포독성에 관한 실험으로써 MTT 분석 방법의 결과를 도시한 도면이다.
- <118> 도 3은 본 발명의 일 실시예로서 산겨릅나무 추출물과 분획물의 VEGF에 대한 세포신호전달에 관한

Western blot 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

<119> 도 4는 본 발명의 일 실시예로서 산겨릅나무 추출물과 분획물의 세포증식 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

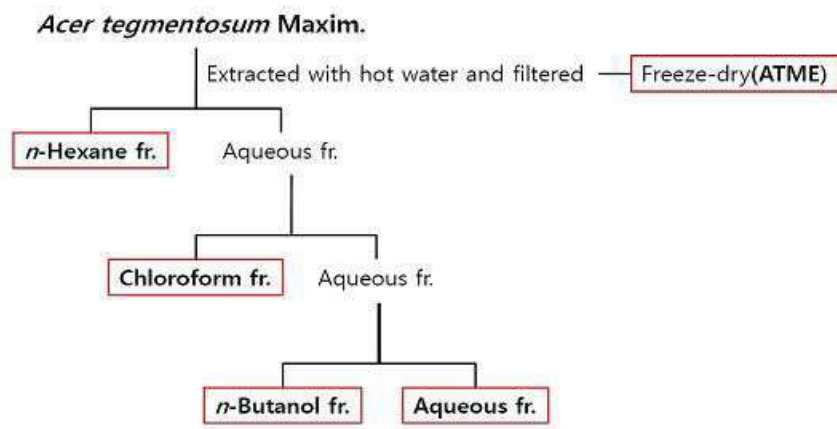
<120> 도 5는 본 발명의 일 실시예로서 산겨릅나무 추출물과 분획물의 세포이동 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

<121> 도 6은 본 발명의 일 실시예로서 산겨릅나무 추출물과 분획물의 형성 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

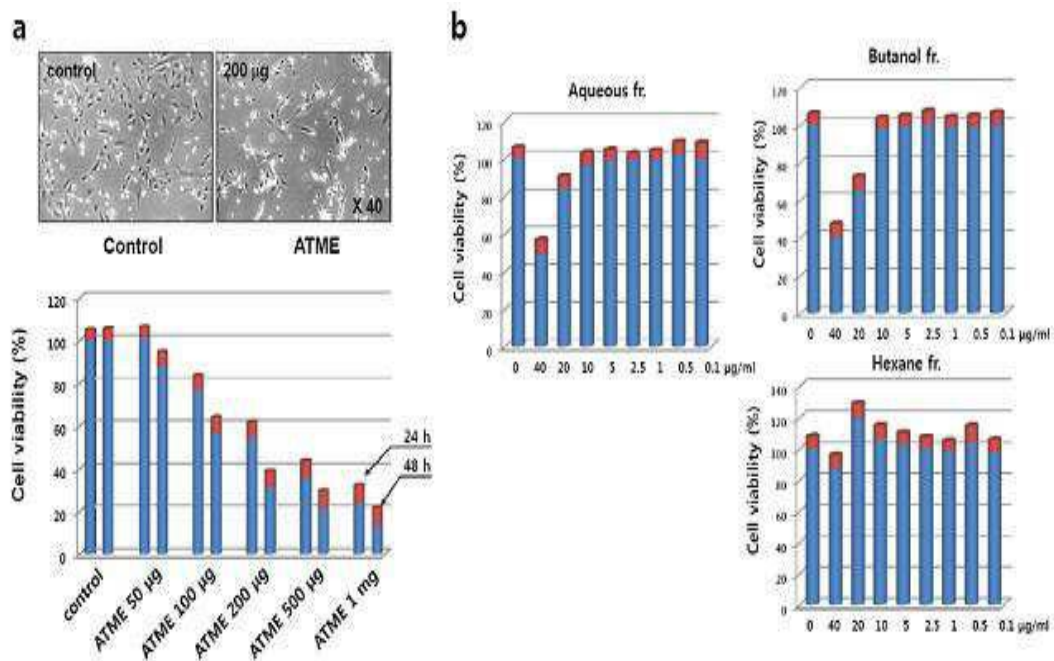
<122> 도 7은 본 발명의 일 실시예로서 산겨릅나무 추출물과 분획물의 쥐 대동맥 sprouting 분석방법의 결과를 도시한 도면이다.

도면

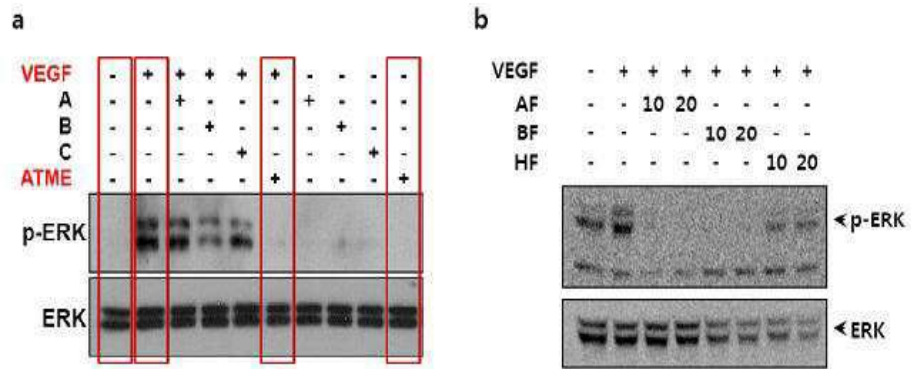
도면1



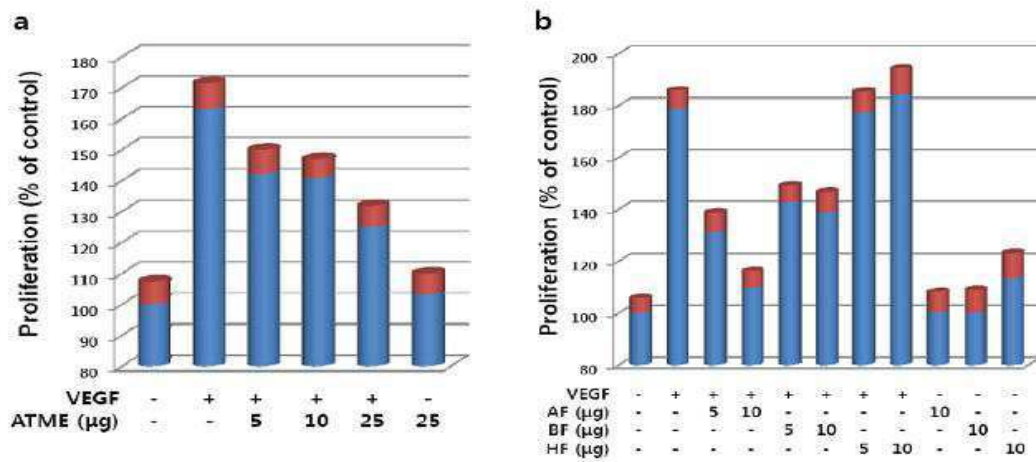
도면2



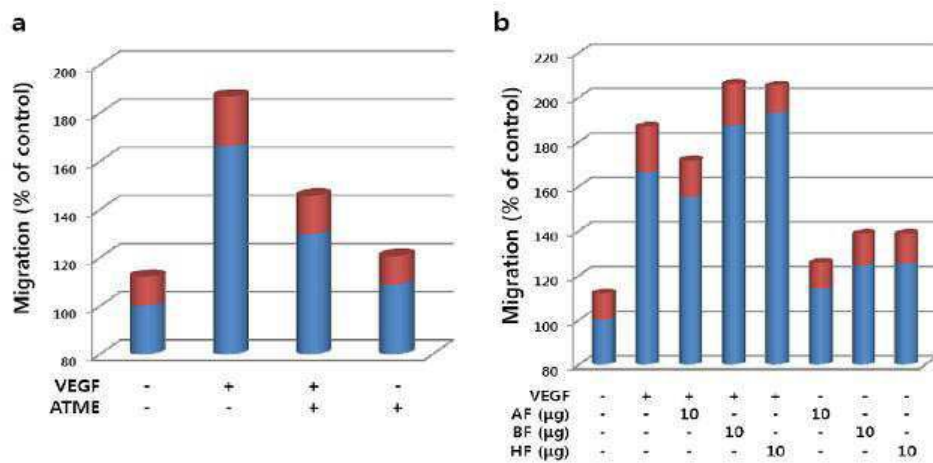
도면3



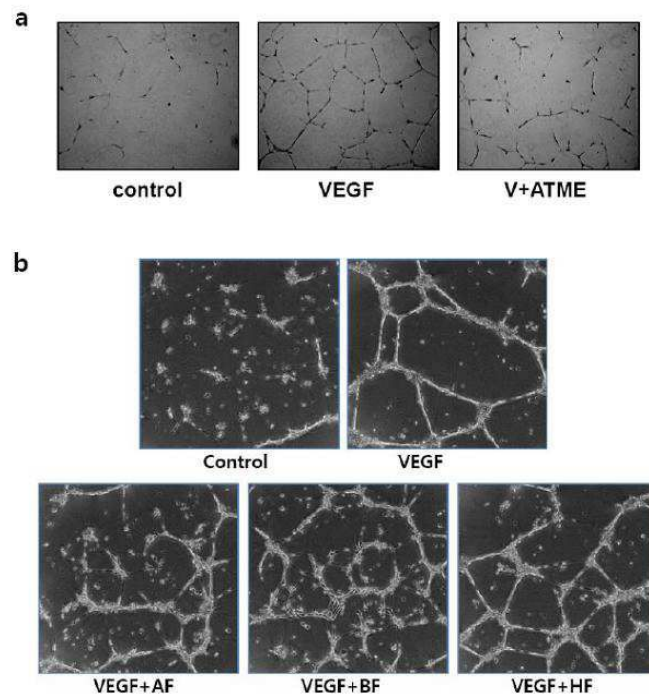
도면4



도면5



도면6



도면7

