

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 12 월 26 일 (26.12.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/262943 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/7048 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/008504

(22) 국제출원일:

2024 년 6 월 20 일 (20.06.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0080304 2023 년 6 월 22 일 (22.06.2023) KR

(71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR]; 49315 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR).

(72) 발명자: 안복련 (AHN, Mok-Ryeon); 46537 부산광역시 북구 금곡대로 240, 102동 2004호, Busan (KR). 박정은 (KWAK, Jeong-Eun); 47336 부산광역시 부산진구 대학로46번길 33-8, Busan (KR). 백지윤 (BAEK, Ji-Yoon); 44917 울산광역시 울주군 범서읍 관문로 607-25, Ulsan (KR).

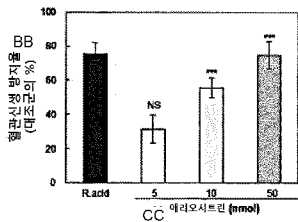
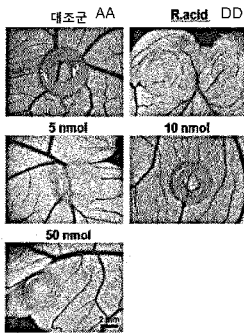
(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ANGIOGENESIS-RELATED DISEASES COMPRISING ERIOCITRIN AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 에리오시트린을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Control
BB ... Anti-angiogenic rate (% of control)
CC ... Eriocitrin (nmol)
DD ... R.acid

(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising eriocitrin as an active ingredient. The composition was confirmed to have the effects of inhibiting canalization and cell migration and increasing the apoptosis of HUVECs. It was also confirmed that the chick chorioallantoic membrane (CAM) has the effect of inhibiting capillary formation in an in vivo model. Therefore, the composition can be effectively used for preventing, treating or ameliorating angiogenesis-related diseases by inhibiting angiogenesis, due to having the effects.

(57) 요약서: 본 발명은 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물의 관강 형성 및 세포 이동 억제 효과, HUVECs의 아폽토시스 증가 효과를 확인하였다. 또한, in vivo 모델에서 계용모막(chick chorioallantoic membrane, CAM) 모세혈관 형성 저해 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 조성물은 상기 효과를 가짐으로써 혈관신생을 억제하여 혈관신생 관련 질환의 예방, 치료 또는 개선에 효과적으로 사용될 수 있다.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 에리오시트린을 유효성분으로 포함 하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은, 플라바논(flavanone)의 한 종류인 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 항혈관신생 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하며, 일반적으로 조직의 성장, 재생 및 회복에 필요한 중요한 생리적 과정의 일환으로 작용하며, 비정상적인 혈관신생은 다양한 질환과 관련이 있다.
- [3] 이러한 혈관신생은 혈관신생 인자의 자극에 반응하여 혈관 주피세포의 이탈, 단백질 분해효소에 의한 기저막 파괴, 혈관신생을 유도하는 신호 분자의 활성화 등을 통해 혈관내피세포의 이동과 증식이 유도됨에 따라 새로운 혈관을 형성하게 된다. 이러한 과정은 일련의 순차적인 단계를 통해 일어난다.
- [4] 인체 내 혈관신생이 정상적으로 일어나는 것은 배아의 발생, 조직재생 및 상처 치료, 주기적인 여성의 생식기 계통 변화인 황체가 발달할 때이며, 이러한 경우에 엄격히 조절되어 진행된다. 반면에 과도한 혈관신생과 관련있는 질환으로는 당뇨병성 망막증, 노인성 퇴화반, 조숙아의 망막증 및 신생혈관 생성 녹내장으로 구성되는 안과 질환, 건선 등과 같은 피부질환이며, 그 중 가장 심각한 질환으로는 고형암이 있다.
- [5] 종양(tumor)은 혈관신생을 통하여 성장과 증식에 필요한 영양과 산소를 공급 받는다. 암 환자가 사망하는 주원인은 전이이며, 혈관신생은 암세포가 혈액순환 계로 들어가는 기회를 제공함으로써 암세포가 전이되도록 유도한다. 따라서 암의 전이와 성장을 막기 위해서는 혈관신생을 억제하는 것이 근원적인 치료방법이 될 수 있다. 혈관신생의 억제는 약물 내성을 유발할 가능성이 적으므로 종양을 통제하는 가장 유망한 방법으로 간주됨에 따라 혈관신생 억제 효과를 나타내는 신규 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 필요성 또한 지속적으로 강조되고 있다.
- [6] 종양의 혈관신생은 종양세포로부터 분비된 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 기초 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)와 같은 성장인자에 의해 개시되며, 그 이후 혈관벽의 붕괴, 혈관 내피세포의 이동과 증식, 관강 형성 등의 과정을 거쳐 이루어진다.
- [7] 혈관신생 억제의 주요 메커니즘 중의 하나는 혈관 내피세포의 아폽토시스(apoptosis)를 유도하는 것이다. 아폽토시스는 조직의 항상성 유지뿐만 아니라 감염체에 대한 방어 수단으로 필수적이며, 이 과정의 결함은 면역결핍 질환, 염증성 질환, 암의 발병과 진행의 중요한 원인이 된다는 점이다. 이에 따라 혈관 내피

세포에서의 아포토시스 발생은 항혈관신생 효과를 나타낼 수 있으며, 세포의 아포토시스 조절을 통하여 치료제와 치료법을 개발하고자 하는 노력이 계속되어 오고 있다.

- [8] 한편, 에리오시트린은 종래 피부재생 효과, 주름개선 효과 및 항염증 효과에 대해 알려진 바 있으나 혈관신생 억제효과에 대하여는 알려진 바 없다.
- [9] 이에 본 발명자들은 에리오시트린이 혈관신생을 억제할 수 있는 효능을 발견하여, 상기 화합물을 혈관신생 억제에 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

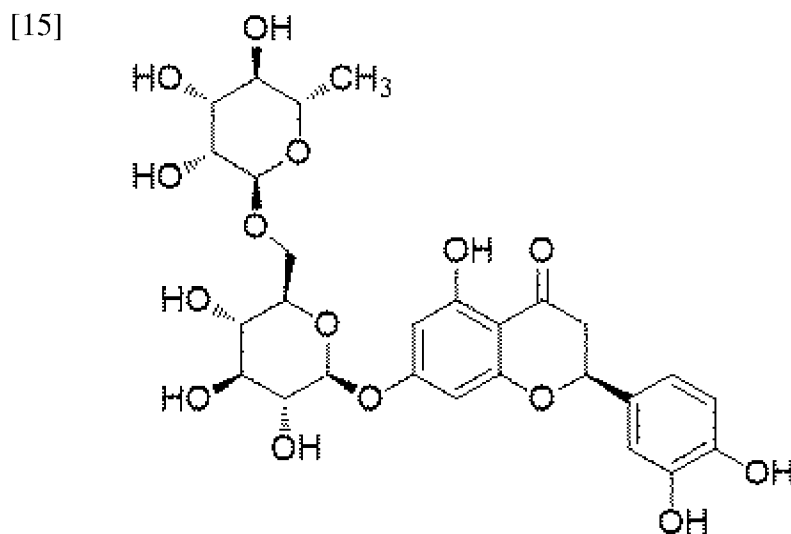
기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치료방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 화학식 1로 표시되는 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[14] [화학식 1]



- [16] 상기 화학식 1의 IUPAC 명칭은 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Cas No. 13463-28-0)이다.

[17] 또한, 본 발명은 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[19] 본 발명의 에리오시트린은 혈관신생 관련 질환에 있어서, HUVECs 세포 내 관강 형성(tube formation) 억제, 세포의 이동(migration) 감소, 세포사멸(apoptosis) 유도 효과를 가지며, in vivo 에서도 혈관신생을 억제하는 효과를 가지는 바, 혈관신생과 관련된 질환의 예방 및 치료효과를 가짐을 확인하였다.

[20] 따라서, 본 발명의 조성물은 항혈관신생 조성물로 효과적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 HUVEC 세포에 본 발명의 에리오시트린을 농도별로 처리하여, 세포 생존율에 대한 영향을 확인한 도이다.

[22] 도 2는 HUVEC 세포에 본 발명의 에리오시트린을 농도별로 처리하여, 관강 형성 억제 활성을 확인한 도이다.

[23] 도 3은 HUVEC 세포에 본 발명의 에리오시트린을 농도별로 처리하여, 세포의 이동 억제 효과를 확인한 도이다.

[24] 도 4는 HUVEC 세포에 본 발명의 에리오시트린을 농도별로 처리하여, 아폽토시스 발생을 확인한 도이다.

[25] 도 5는 병아리 배아 융모막에 본 발명의 에리오시트린을 농도별로 처리하여, in vivo 혈관신생 억제 효과를 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 이하, 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[27] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[28] 본 발명에서 어떤 구성요소를 “포함”한다는 것은, 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

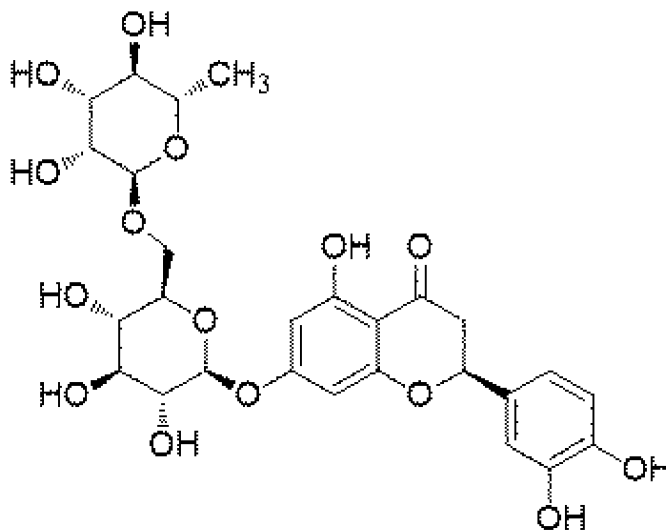
[29] 본 발명은 에리오시트린을 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 혈관신생 관련 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[30] 본 발명의 “에리오시트린”은 천연 플라보노이드 화합물의 일종으로, 주로 레몬의 껍질, 페퍼민트, 시트러스 계열 과일에 존재하며, 최근 들어 항산화 및 항염 효능이 가지고 있다는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[31] 상기 에리오시트린은 하기 화학식 1로 표시될 수 있고, 하기 화학식의 IUPAC명은 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranoside(Cas No. 13463-28-0)일 수 있다.

[32] [화학식 1]

[33]



[34] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjutant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술 분야에 알려진 것이라면 그 종류에 상관없이 사용할 수 있다.

[35] 본 발명에 따른 약학 조성물은 당해 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼합시킨 형태로 제조될 수 있다. 상기 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함하며, 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[36] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사 용액의 형태로 사용될 수 있다.

[37] 본 발명의 약학 조성물을 제제화할 경우, 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수

있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되며, 일반적으로 사용되는 희석제 이외에 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등 여러 가지 부형제가 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [38] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [39] 본 발명은 본 발명에 따른 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [40] 본 발명에서 사용하는 용어 “식품”이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 포함하는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 통상적으로 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함한다.
- [41] 본 발명의 식품조성물은 유효성분인 에리오시트린을 포함하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당 등의 단당류; 말토오스, 수크로오스 등의 이당류; 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 통상적인 당; 및 자일리톨, 에리스리톨 등의 당알코올을 포함하며, 상기 향미제는 타우마틴 등의 천연 향미제; 스테비아 추출물; 및 사카린, 아스파탐 등의 합성 향미제를 포함한다.
- [42] 본 발명의 식품조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화될 수 있고, 이에 따라 기능성 식품으로 이용되거나 각종 식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 음료류, 초코렛, 과자류, 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [43] 또한, 상기 식품조성물은 유효성분 외에 영양제, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 탄산화제 등을 포함할 수 있다.
- [44] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 건강기능식품에 관한 법률 제 18445호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 보건용도 등에 유용한 효과를 얻기 위해 섭취하는 것을 말한다.

- [45] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따른 규격 및 기준에 의해 판정한다.
- [46] 본 발명의 건강기능성 식품 조성물은 액상, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 환 등의 형태로 제조 또는 가공될 수 있다.
- [47] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 에리오시트린은 관상 형성을 억제할 수 있다.
- [48] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 에리오시트린은 세포 이동 억제 활성을 나타낼 수 있다.
- [49] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 에리오시트린은 미세혈관 생성억제 효능 및 모세혈관 생성억제 효능을 나타낼 수 있다.
- [50] 본 발명에서 사용하는 용어 “혈관신생 관련 질환”은 당뇨병성 망막증, 노인성 퇴화반, 조숙아 망막증, 신생혈관생성 녹내장, 각막 이식 거부, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 자궁내막증, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 종양, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 적응증, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캐스크래치적응증, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 혈관형성-의존성 암, 양성 종양, 염증성 적응증 및 신경퇴행성 적응증으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 당뇨병성 망막증, 노인성 퇴화반, 조숙아의 망막증, 신생혈관생성 녹내장으로 구성되는 안과 질환 및 종양일 수 있으며, 더 바람직하게는 종양일 수 있다.

[51]

발명의 실시를 위한 형태

- [52] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- [53] 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일뿐, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[54]

[55] <실시예 1> 에리오시트린 시료 준비 및 세포독성 분석

[56] <1-1> 에리오시트린 시료 준비

- [57] 본 발명에서 사용한 시약인, 에리오시트린(eriocitrin)은 시그마사에서 구입하여 사용하였다. 에리오시트린은 다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 용해시키고, 최종농도 25, 50, 100, 200 μM 이 되도록 하여 시료를 준비하였다.

[58]

[59] <1-2> 에리오시트린의 세포독성 평가

- [60] 에리오시트린의 세포독성을 평가하기 위하여, 10% FBS와 1% Glutamine이 첨가된 MCDB-104 배지를 이용하여 HUVECs를 1×10^4 cells/ml로 조절 후 96 well

plate에 접종하고, 실시예 1-1의 에리오시트린 시료를 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 실온에서 4시간 반응시킨 후 Cell counting kit-8(CCK-8)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 도 1과 같이, 본 발명의 에리오시트린에 의한 세포독성은 없음을 확인하였다.

[61]

[62] <실시예 2> 에리오시트린의 혈관신생 질환에 대한 효과 분석

[63] <2-1> 에리오시트린의 관강 형성 억제 효과 확인

[64] 에리오시트린의 관강 형성 억제 효과를 확인하기 위하여, 24 well plate에 배양액이 포함된 collagen gel을 분주한 후 30분 이상 배양하였다. 이후 HUVECs를 1.2×10^5 cells/ml로 접종하고 추가로 collagen gel을 분주한 후 실시예 1-1의 시료가 포함된 배양액을 첨가하여 배양하였다. 세포의 형태학적 변화 및 관강의 형성 정도는 현미경(Leica DMI8)으로 가시화하고 200배 확대하여 촬영하였다. 또한 관강 형성 결과는 image J 프로그램을 이용하여 생성된 관의 픽셀 수를 정량화하여 분석하였다.

[65] 이를 통해 도 2와 같이, 대조군과 에리오시트린의 관강 형성 정도를 비교하였으며, 최종 농도 200 μ M에서 관강 형성 억제 효능이 가장 뛰어남을 확인하였다. 또한 에리오시트린 첨가 결과, 농도의존적(25, 50, 100, 200 μ M)으로 관강 형성 억제 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[66]

[67] <2-2> 에리오시트린의 세포 이동 억제 효과 확인

[68] 세포의 이동은 혈관신생 과정에서 필수적인 단계인 바, wound healing assay를 이용하여 에리오시트린의 첨가에 따른 세포 이동 억제 효과를 확인하였다. 0.1% gelatin으로 코팅된 24 well plate에 HUVECs를 1.3×10^5 cells/ml 접종한 후 인위적으로 스크래치를 내고, 실시예 1-1의 시료가 포함된 MCDB-104 배양액을 첨가한 후 24시간 배양하였다. 세포의 이동은 현미경(Leica DMI8)으로 촬영한 후 image J 프로그램을 이용하여 세포의 수를 계수하였다.

[69] 이를 통해 도 3과 같이, 농도의존적(25, 50, 100, 200 μ M)으로 세포 이동 억제 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[70]

[71] <2-3> 에리오시트린의 HUVECs 아폽토시스 증가 효과 확인 (AO/EB staining)

[72] 에리오시트린의 아폽토시스 증가 효과를 확인하기 위하여, HUVECs를 24 well plate에 3.0×10^4 cells/ml 접종한 후 24시간 배양 및 세척하고, 실시예 1-1의 시료가 포함된 MCDB-104 배양액을 농도별로 첨가하였다. 음성대조군으로는 배양액만 첨가하여 배양하였으며, 양성대조군으로는 H_2O_2 (50 μ M)를 첨가하고 4% paraformaldehyde를 이용하여 1시간 고정을 시행하였다. 이후 아크리딘 오렌지(acridine orange, AO, 50 μ g/mL)와 에티듐 브로마이드(ethidium bromide, EB, 50 μ g/

mL)을 혼합하여 HUVECs를 염색하였으며, 형광현미경(Leica DMI8, Germany)을 이용하여 아포토시스 진행정도를 확인하여 이의 결과를 도 4에 나타내었다.

[73] 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 에리오시트린의 첨가량이 증가함에 따라 농도의존적(25, 50, 100, 200 μ M)으로 HUVECs의 아포토시스가 증가하는 것을 확인하였다.

[74]

[75] <실시예 3> 에리오시트린의 **in vivo** 모세혈관 형성 저해 효과 확인

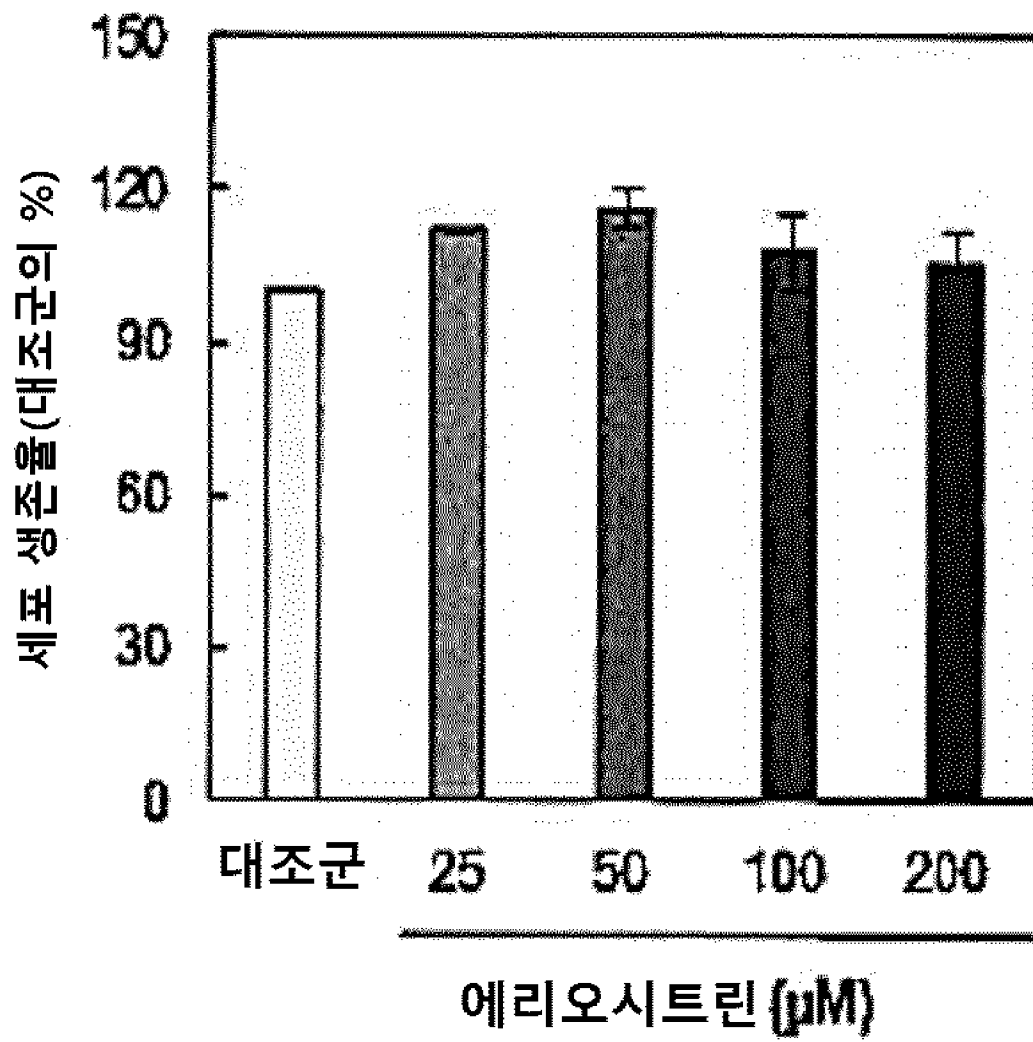
[76] 에리오시트린이 생체 조건에서의 신생혈관 억제효과를 확인하기 위하여, *in vivo* 모델을 이용한 CAM 모세혈관 형성의 저해 정도를 관찰하였다. 유정란을 37°C incubator에서 5일간 보온·보관한 후 난백과 노른자낭을 제거하고, 이후 39°C incubator에서 24시간 보온·보관하였다. 다음날 양성대조군인 레티노산(retinoic acid, 5 nmol/g)과 에리오시트린을 농도별로(5, 10, 50 nmol/g) 주입하여 보온·보관한 후 혈관을 시각화하여 혈관신생 여부를 확인하였다.

[77] 이를 통해 도 5와 같이, 본 발명의 에리오시트린의 50 nmol/g 첨가의 경우, 양성대조군인 레티노산과 유사한 미세혈관의 억제 효과를 나타내었으며, 농도의존적(5, 10, 50 nmol/g)으로 모세혈관 생성억제 효과가 높게 나타나는 것을 확인하였다.

청구범위

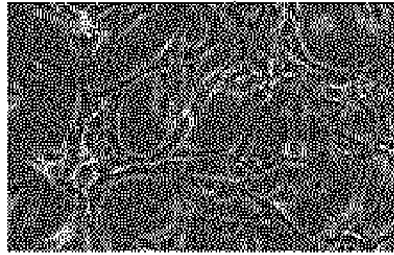
- [청구항 1] 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 당뇨병성 망막증, 노인성 퇴화반, 조숙아 망막증, 신생혈관생성 녹내장, 각막 이식 거부, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 자궁내막증, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 적응증, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치적응증, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 혈관형성-의존성 암, 양성 종양, 염증성 적응증 및 신경퇴행성 적응증으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상인 것인 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 당뇨병성 망막증, 노인성 퇴화반, 조숙아 망막증, 및 신생혈관생성 녹내장으로 구성되는 안과 질환군으로부터 선택된 하나 이상인 것인 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 종양인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 인체 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)의 이동 및 관강 형성을 억제하여 혈관신생 관련 질환을 예방 또는 치료하는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 인체 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)내 아포토시스를 유도하여 혈관신생 관련 질환을 예방 또는 치료하는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 7] 에리오시트린(eriocitrin)을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.

[도1]

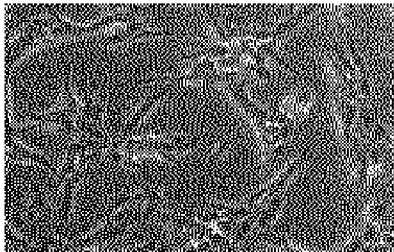


[도2]

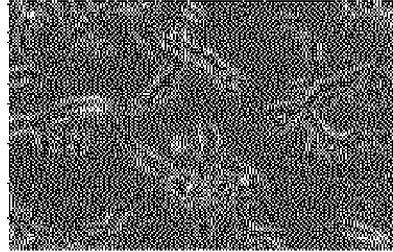
대조군

에리오시트린(μM)

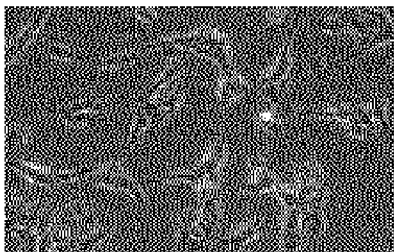
25



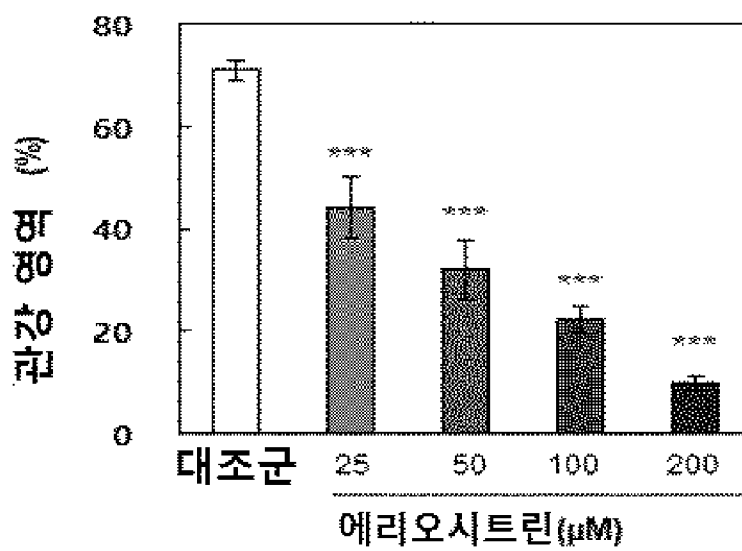
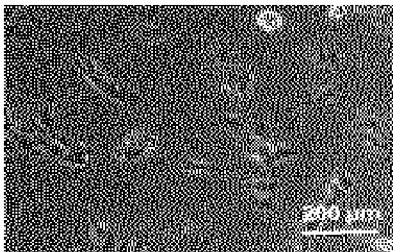
50



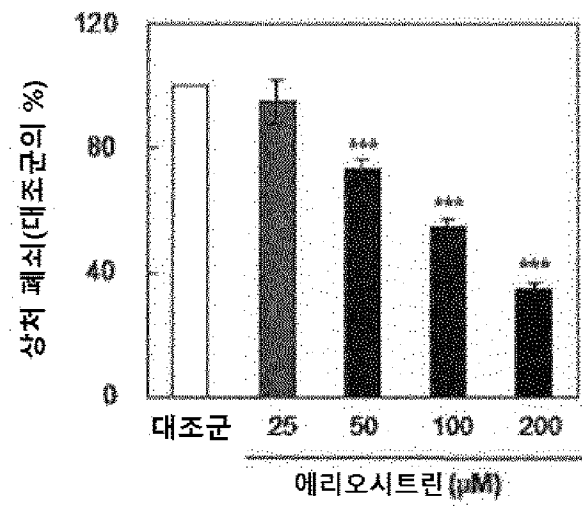
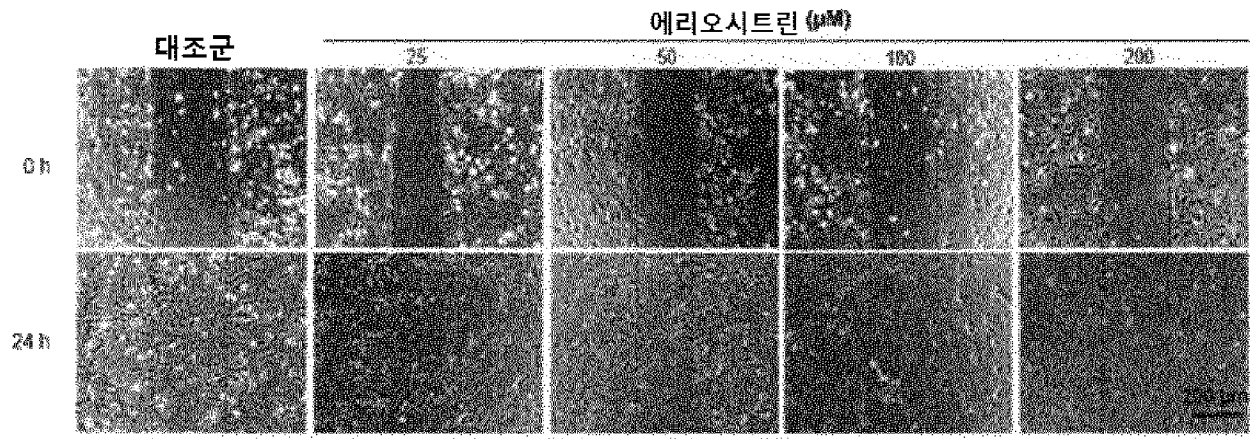
100



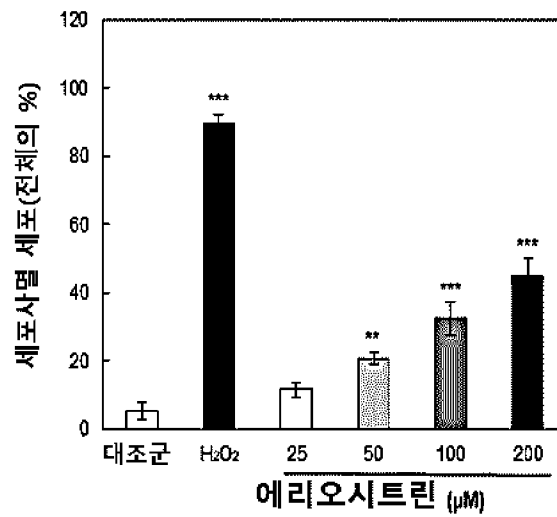
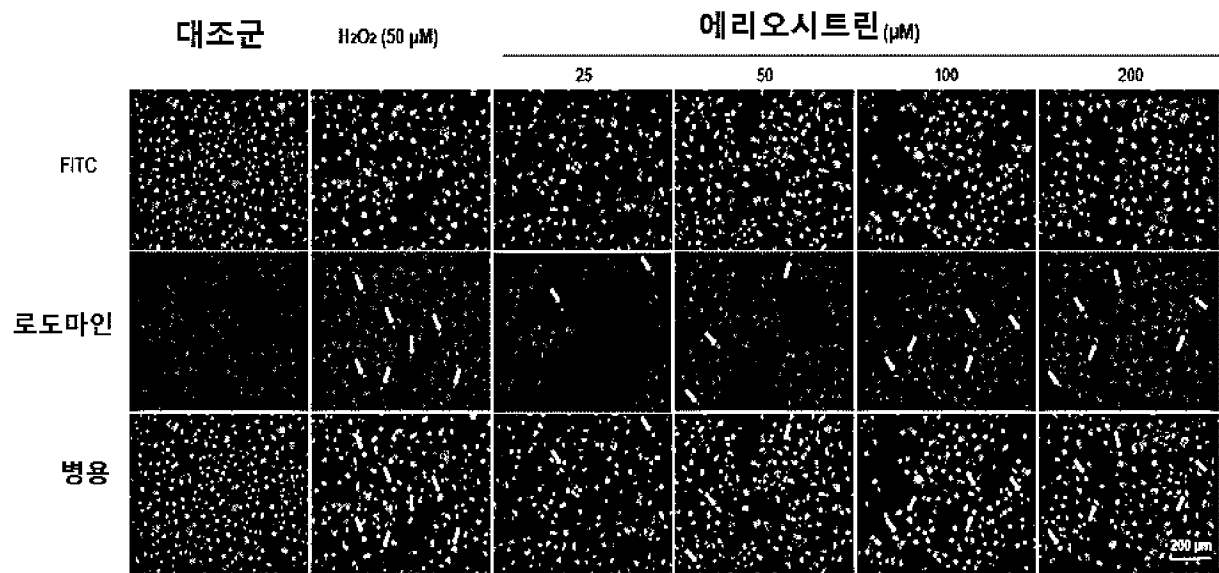
200



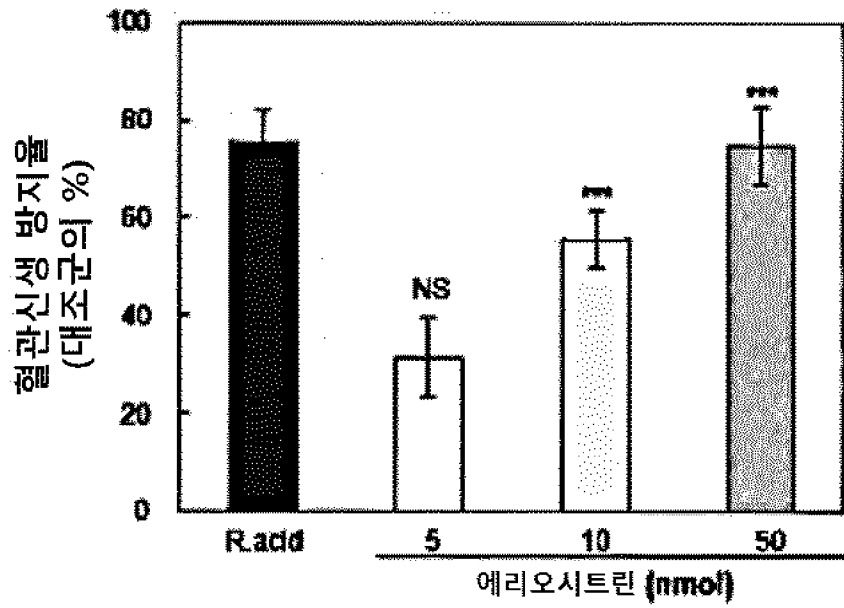
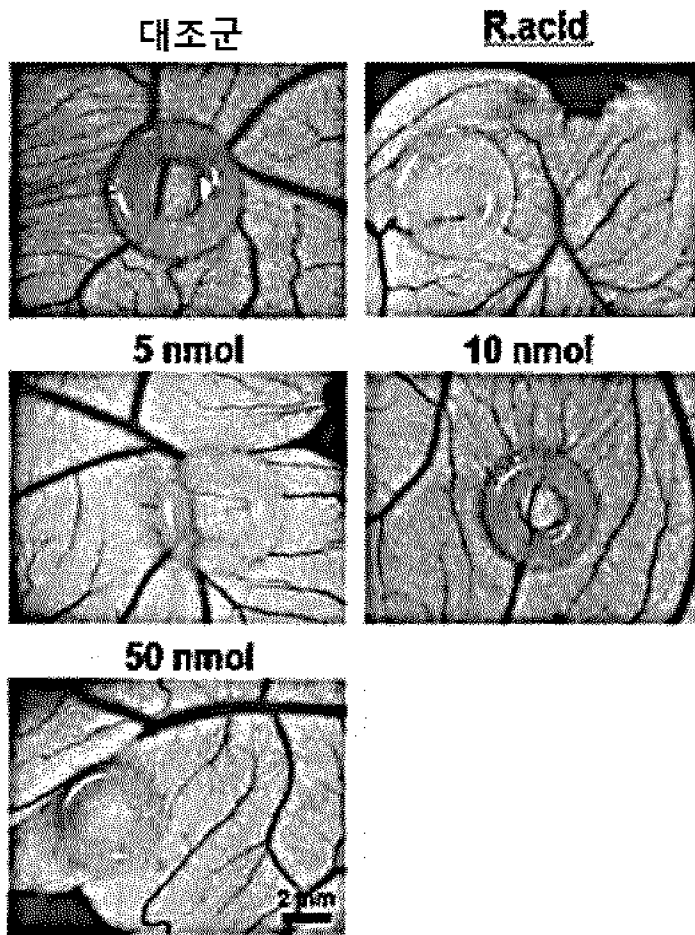
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/008504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/7048(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/7048(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 31/05(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 36/75(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 에리오시트린(eriocitrin), 항-혈관신생(anti-angiogenic), 종양(tumor), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2001-199881 A (POKKA CORP. et al.) 24 July 2001 (2001-07-24) See paragraph [0001]; and claim 1.	1-2,4,7 3,5-6
X	YAO, Liangliang et al. Eriocitrin: A review of pharmacological effects. Biomedicine & Pharmacotherapy. 18 August 2022 (Online), vol. 154, 113563, pp. 1-9. See abstract; pages 2-5; and table 2.	1-2,4
A	JP 2009-013080 A (POKKA CORP.) 22 January 2009 (2009-01-22) See entire document.	1-7
A	TALIB, Wamidh H. Consumption of garlic and lemon aqueous extracts combination reduces tumor burden by angiogenesis inhibition, apoptosis induction, and immune system modulation. Nutrition. July 2017, vols. 43-44, pp. 89-97. See entire document.	1-7
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 October 2024		Date of mailing of the international search report 14 October 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BUCOLO, Claudio et al. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. Biochemical Pharmacology. 30 March 2012 (Online), vol. 84, pp. 88-92. See entire document.	1-7
PX	BAEK, Ji-Yoon et al. Eriocitrin Inhibits Angiogenesis by Targeting VEGFR2-Mediated PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathways. Nutrients. 08 April 2024, vol. 16, 1091, pp. 1-17. See abstract; and pages 5-6 and 14-16.	1-2,4-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/008504

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/008504

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2001-199881	A	24 July 2001	None	
JP	2009-013080	A	22 January 2009	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/7048(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/7048(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 31/05(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 36/75(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 에리오시트린(eriocitrin), 항-혈관신생(anti-angiogenic), 종양(tumor), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	JP 2001-199881 A (POKKA CORP. 등) 2001.07.24 단락 [0001]; 및 청구항 1 참조.	1-2,4,7 3,5-6
X	YAO, LIANGLIANG 등, "Eriocitrin: A review of pharmacological effects", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022.08.18(Online), 154권, 113563, 페이지 1-9 요약; 페이지 2-5; 및 표 2 참조.	1-2,4
A	JP 2009-013080 A (POKKA CORP.) 2009.01.22 전체 문헌 참조.	1-7
A	TALIB, WAMIDH H., "Consumption of garlic and lemon aqueous extracts combination reduces tumor burden by angiogenesis inhibition, apoptosis induction, and immune system modulation", Nutrition, 2017.07, 43-44권, 페이지 89-97 전체 문헌 참조.	1-7
A	BUCOLO, CLAUDIO 등, "Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats", Biochemical Pharmacology, 2012.03.30(Online), 84권, 페이지 88-92 전체 문헌 참조.	1-7
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년10월10일(10.10.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년10월14일(14.10.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	BAEK, JI-YOON 등, “Eriocitrin Inhibits Angiogenesis by Targeting VEGFR2-Mediated PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathways”, Nutrients, 2024.04.08, 16권, 1091, 페이지 1-17 요약; 및 페이지 5-6, 14-16 참조.	1-2,4-7

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- ☒ 청구항: 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 8은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
- ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2001-199881 A	2001/07/24	없음	
JP 2009-013080 A	2009/01/22	없음	