



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월15일
(11) 등록번호 10-2000714
(24) 등록일자 2019년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)
A61K 36/23 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A23L 33/125 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0027634
(22) 출원일자 2019년03월11일
심사청구일자 2019년03월11일
(56) 선행기술조사문헌
Phytochemistry, 27(11), 3439-3448, 1988.
J. Pharm. and Biomed. Analysis, 131, 391-399,
2016.
KR101893738 B1

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002
호(진월동, 대주아파트)
(74) 대리인
리앤목록특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

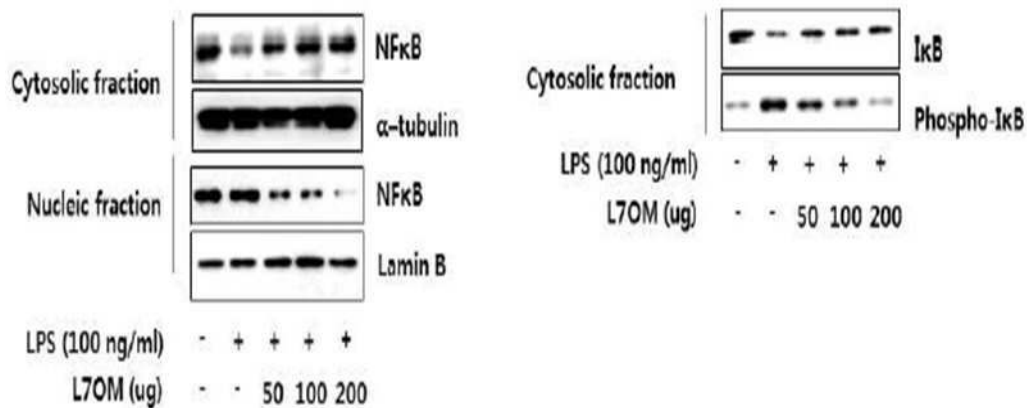
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 전호 및 유래 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 유효성분으로 포함하는 관절염 및 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 출원은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 유효성분으로 하는 자가면역질환 또는 관절염의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물, 자가면역질환 또는 관절염의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물, 및 관절건강의 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 36/23 (2013.01)

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 37/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545016682

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 국내산 약용 작물(전호잎 및 붉은토끼풀)을 이용한 퇴행성관절염 개선 식의약 소재 및 제
품개발

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) (luteolin 7-O-(6"-malonylglucoside)) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 전호 (*Anthriscus sylvestris Hoffmann*)의 잎의 추출물로부터 분리된 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 전염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 COX-2, 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂ : PGE₂), INOS, Nitric Oxide(NO), MAPKs 및 IκB 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하는 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 NF-κB의 핵내 전이를 억제하는 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 자가면역질환은 크론병, 궤양성 대장염, 베체트병, 전신 홍반성 루푸스, 쇼그렌증후군, 중증근무력증, 경피증, 결절성 다발동맥염, 갑상선기능저하증, 건선 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 MMP-3 또는 MMP-13의 발현을 억제하는 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 피부 외용제, 주사제, 또는 경구제인 것인, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 9

루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 관절염은 류마티스성 관절염 또는 퇴행성 관절염인 것인, 관절염의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 11

루테올린 7-0-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 자가면역질환은 크론병, 궤양성 대장염, 베체트병, 전신 홍반성 루푸스, 쇼그렌증후군, 중증근무력증, 경피증, 결절성 다발동맥염, 갑상선기능저하증, 건선 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것인, 자가면역질환의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 13

루테올린 7-0-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 관절 건강의 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 14

루테올린 7-0-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 관절염은 류마티스성 관절염 또는 퇴행성 관절염인 것인, 관절염의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 전호 및 유래 루테올린 7-0-(6"-말로닐글루코사이드)를 유효성분으로 포함하는 관절염 및 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 관절염은 관절에 염증 및 통증이 발생되어 생기는 질환으로서, 퇴행성 관절염(osteoarthritis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 통풍, 건성 관절염이 있으며 관절염 환자의 95%가 퇴행성 관절염을 앓고 있다.

[0003] 퇴행성관절염(degenerative arthritis)은 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화에 의하여 심각한 통증을 유발하는 질환으로서, 골관절염(osteoarthritis)이라고도 한다.

[0004] 류마티스 관절염은 면역체계에 이상이 생겨 자기 자신을 공격 대상으로 인식해 자신의 몸을 공격하는 자가면역 질환이다.

[0005] 일반적으로 류마티스 관절염은 관절 활막(synovial membrane) 조직에 염증이 발생하여 대식세포, 수상세포 및 T 림프구, B 림프구 등이 활막 조직으로 이동하고, 그 결과 관절액(synovial fluid)이 증가하여 관절이 부으면서 통증이 나타나게 된다. 염증이 지속되면서 염증성 활막조직이 증생(hyperplasia)하게 되면 뼈와 연골을 파괴하여 관절 구조가 변형되고 운동 장애가 발생된다.

[0006] 퇴행성 관절염은 관절 운동에 필요한 관절 조직이 노화에 의하여 손상되는 질환이다. 관절의 변화는 관절 연골이 퇴행성 변화를 일으켜 탄력성이 없어지고 균열과 세열화가 일어난다. 연골이 파괴됨에 따라 관절은 모양이 변하고, 뼈의 관절면 부위는 두꺼워져서 골극을 형성하게 된다. 이와 같이 중심부에서는 연골이 소실되고 가장자리에서는 골극이 생기므로 관절면이 고르지 못하게 되어 정상보다 힘을 많이 받는 부위와 적게 받는 부위가 생기게 되므로 악순환이 형성되어 병적 과정이 계속되어 관절 연골이 퇴행 되면서 극심한 통증을 유발한다.

[0007] 이와 같이 관절염 예방 및 치료제로 최근 각광을 받고 있는 천연물 소재는 대부분 추출물을 이용하여 제품화하고 있다. 정확한 작용기전이 밝혀져 있지 않으나, 대부분 경구제로서 복용이 용이하고 장기간 복용을 할 수 있어 그 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 현재까지 개발되고 있는 소재로는 관절액과 성분이 유사한 히알루론산을 주사하거나 건강보조식품으로 글루코사민, 콘드로이틴을 함께 복용하기도 하며, 생약등의 소재로 동의보감 등의 기성 한약서에 사용되고 있는 천연물을 이용하여 개발하고 있다.

[0008] 그러나 이러한 천연물 소재의 약용 성분이 효과를 발휘하는 기작과 범위는 아직 구명되고 있지 않아 이러한 약용 성분을 특정하지 못하고 있다. 이에 그 약리 기전을 구명하고, 약용 성분을 특정하여 약학적 적용범위를 확대하는 것이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0840723호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2005-0084724호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) (luteolin 7-O-(6"-malonylglucoside)) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 관절 건강의 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0015] 일 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) (luteolin 7-O-(6"-malonylglucoside)) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염 및 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 명세서에서 사용된 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 관절염 및 자가면역질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0017] 본 명세서에서 사용된 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 관절염 및 자가면역질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0018] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한"은 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점 또는 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체(예: 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며 건전한 의학적 판단의 범주 이내인 조성물을 의미한다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이

드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만텔레이트를 포함할 수 있다.

[0020] 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0021] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 일 구체예에서 상기 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 전호(*Anthriscus sylvestris Hoffmann*)의 잎의 추출물로부터 분리된 것일 수 있다. 전호는 다년생 초본으로 높이는 70-100cm 정도이며 개화기는 5~6월에 꽃이 피고 흰색이며 5~12개의 꽃 이삭가지가 있으며, 결실기는 7-8월이다. 뿌리는 방추형으로 길이는 3-10cm, 지름은 7-15cm로 겉은 흑갈색이고 껍인 면은 회백색이며 맛이 조금 쓴 것이 특징이다.

[0024] 상기 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)는 전호 추출물 또는 분획물로부터 분리된 것일 수 있다. 전호 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다. 통상의 식물 추출법은 열수추출법을 포함한 열 추출법, 냉침 추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있다. 통상의 추출기기는 초음파 분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다. 추출물의 분획 시에 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 회전 증발기를 이용하여 감압 농축될 수 있으며, 상기 건조는 동결건조법으로 수행될 수 있다.

[0025] 상기 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "자가면역질환(autoimmune disease)"은 자가 면역계의 혼란으로 인해 나타나는 모든 질병을 의미한다. 정상적인 화학 물질과 신체의 일부 세포들에 대해 면역계가 잘못된 반응을 일으킬 수 있는데, 면역세포가 건강한 자신의 세포를 해롭게 보고 그들을 공격할 수 있다. 자가면역은 특정 자가항원과 반응하는 CD4 도움 T 세포(CD4 helper T cell)의 발달 또는 활성화에 의해 유발된다고 여겨진다. 또한, 감염성 미생물, 박테리아 DNA 및 바이러스의 생성물인 지질다당류(Lipopolysaccharide : LPS)와 같은 면역반응의 보조제 역할을 하는 물질도 원인이 될 수 있다. 이들은 대식세포(macrophage)의 자연면역 및 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 자극하고 MHC(major histocompatibility complex) 항원, B7-2 및 OX40L과 같은 공동 자극 분자의 발현을 증가시켜 면역 반응을 향상시키기 위해 대식세포 또는 수지상세포(dendritic cell) 표면의 Toll-유사 수용체 (Toll-like receptor : TLR)들에 결합한다. 이러한 반응은 일반적으로 후천성 면역을 유도하지만, 잠재적 인자가 반응 T 세포를 자극할 수 있다.

[0026] 일 구체예에서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 대식세포의 전염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 자가면역질

환을 예방 내지 치료할 수 있다. 전염증성 사이토카인은 LPS에 의해 유도되는 신호전달물질로, IL-1 β , 종양괴사인자(tumor necrosis factor α : TNF- α) 및 IL-6일 수 있다. 이외에도 전염증성 사이토카인은 RANTES, IL-17, IL-23, CCL-1, MCP-5 또는 CXCL2일 수 있다. 상기 사이토카인들은 주로 활성화된 대식세포에 의해 생산되어, 염증 반응의 상향조절에 관여할 수 있다. 전염증성 사이토카인은 세포 신호전달에 중요하며, 전신 염증을 촉진할 수 있다.

[0027] 일 구체예에서 상기 조성물은 개체에 투여되어 COX-2, 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂ : PGE₂), INOS, Nitric Oxide(NO), MAPKs 및 I κ B 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제하여 자가면역 질환을 예방 내지 치료할 수 있다.

[0028] 상기 PGE₂는 프로스탄산 골격을 가지는 일련의 생리 활성 물질인 프로스타글란딘(prostaglandin : PG)의 한 종류로, 아라키돈산(Arachidonic acid)에서 생합성 되는 에이코사노이드의 하나로 다양하고 생리 활성을 갖을 수 있다. 프로스타글란딘에는 PGA, PGB, PGC, PGD₂, PGE₁, PGE₂, PGF₂ α , PGG, PGH₂, PGI₂, 및 PGJ이 있을 수 있고, 이 중 PGE₂는 일반적으로 염증의 초기 단계에서 국소적인 혈관 확장 및 호중구, 대식세포 및 비만세포의 활성화를 촉진하는 염증 활성의 매개체 역할을 할 수 있는데, EP 수용체의 종류에 따라 EP 1, EP 2, EP 3, 및 EP 4가 존재할 수 있다. 구체적으로, PGE₂의 EP1 특수형은 평활근 수축작용, EP 2는 말초 혈관 확장 작용, EP 3는 발열, 통각 전달 작용, EP 4는 뼈-신생, 골-흡수 작용 등의 역할을 할 수 있다. 구체적으로 상기 PGE₂는 phospholipase A₂의 효소작용에 의해 막 인지질(membrane phospholipid)로부터 arachidonic acid가 만들어지는 것으로 시작될 수 있다. Arachidonic acid는 효소작용에 의해 prostaglandin G₂가 되고 다시 불안정한 대사산물인 prostaglandin H₂가 되는데, 이 두 과정은 cyclooxygenase (COX)에 의해 촉진될 수 있다. COX는 COX-1과 COX-2를 포함하는 두 종류 이상의 isoenzyme이 존재하는데 이 중 COX-2는 염증 등의 자극에 의해 발현되며 따라서 COX-2에 의해 생성된 PG는 염증반응과 세포 증식에 관여할 수 있다. COX에 의해 생성된 PGH₂는 불안정한 중간 대사 산물로 세포의 종류나 자극에 따라 다양한 프로스타노이드 합성 효소(prostanoid synthase)들에 의해 PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF₂ α , thromboxane A₂ (TXA₂) 등으로 대사 된다. PGH₂에서 PGE₂로의 대사에 관여하는 PGE synthase(PGES)에는 현재까지 cytosolic PGES (cPGES), microsomal PGES-1 (mPGES-1), mPGES-2 등 세 종류의 isoform이 알려져 있는데, 이 중 mPGES-1은 LPS와 같은 염증성 자극, IL-1 β , TNF α 와 같은 전염증성 사이토카인 및 Nitric Oxide(NO)에 의해 발현이 증가되며 COX-2와 기능적으로 밀접하게 연계되어 PGE₂의 생성에 관여한다.

[0029] 또한, iNOS는 Nitric oxide synthase 중의 한 종류로 보통 때는 발현되어 있지 않다가 전염증성 사이토카인이나 LPS 등의 자극이 있으면 전사조절에 의해 발현될 수 있다. 발현된 iNOS는 일단 발현되면 많은 양의 NO를 오랫동안 생성할 수 있다. iNOS는 대식세포, 간세포, 과골세포, 수지상세포, 성상세포, 상피세포 등에 발현될 수 있다. iNOS에서 생성된 NO는 주로 면역반응 조절 및 세포독성에 관여한다. 대식세포활성에서 NO가 생성되며 이 NO가 종양세포, 림프구, 미생물 등에 세포독성을 나타내는 것이 대표적인 예이다. 일 실시예에 따르면, 대식세포에 LPS를 첨가할 경우, iNOS와 NO의 발현이 증가할 수 있는데, 일 양상에 따른 조성물은 iNOS의 발현을 억제함으로써, NO의 생성을 감소시켜 염증 반응을 억제할 수 있다.

[0030] 일 실시예에 따르면, 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 대식세포의 전염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 염증과 관련한 NO, iNOS, 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂ : PGE₂) 및 PGE₂를 생성하는데 관여하는 효소인 시클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2: COX-2)의 발현 또는 생성을 억제할 수 있다. 따라서, 일 실시예에 따른 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 염증반응을 억제할 수 있고, 이에 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물의 유효 물질로 사용될 수 있다.

[0031] 또한, 일 구체예에서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 NF- κ B의 핵내 전이를 억제하는 것일 수 있다. NF- κ B는 염증반응 조절, 면역체계 조절, 세포 고사, 세포 증식, 상피세포의 분화 등에 관여하는 단백질군이다. 그 종류에는 p50, p52, RelA(p65), RelB, c-Rel, 및 v-Rel로 구성된다. NF- κ B 단백질들은 모두 Rel-homology domain(RHD)을 공통적으로 가지고 있는데 이들은 이합체 형성, 특정 DNA와의 결합, I κ B 단백질과의 반응에 관여한다. 대부분의 세포에 있어서 NF- κ B 단백질 이합체는 NF- κ B 활성화를 억제하는 I κ B(inhibitor κ B) 단백질과 결합하여 세포질 내에서 비활성화 상태로 존재하며, NF- κ B 단백질과 I κ B 단백질의 결합은 NF- κ B 단백질에 존재하는 RHD에 의하여 일어난다. I κ B 단백질의 종류로는 I κ B α , I κ B β , I κ B γ 가 있는데 이중 I κ B α 가 가장 중요한 역할을 수행한다. NF- κ B의 활성화 경로는 NF- κ B 단백질 이합체가 TNF 수용체(TNFR)나 Toll-like 수용체(TLR), IL-1 수용체(IL-1R) 등을 통하여 세포가 자극되면 I κ B의 인산화가 활성화되고, 인산화된 I κ B는 NF- κ B 이합체

로부터 분리될 수 있다. IκB가 분리된 NF-κB 이합체는 핵막을 통과하여 핵내로 전이하고 전사 RNA(mRNA)를 생성하여 여러 가지 키모카인, 사이토카인, ICAM-1, VCAM-1, endothelial leu-kocyte adhesion molecule-1(ELAM), 2 차적인 염증매개 효소와 세포고사 억제 효소를 코드화(encoding)하는 유전자 전사를 활성화시켜 염증을 악화시킬 수 있다. 따라서, 일 실시예에 따르면, 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)을 포함하는 상기 약학적 조성물은 IκB의 인산화 활성을 억제함으로써, NF-κB의 핵내 전이를 억제하여 염증 반응을 억제할 수 있다. 이에 상기 조성물은 자가면역질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0032] 상기 MAPKs는 세포외 자극을 세포막에서부터 세포내 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달 경로일 수 있다. MAPK는 성장 호르몬, 사이토카인, 스트레스(stress) 등의 수용체로부터 활성화된 신호를 세포 내로 전달하여 세포의 증식, 분화, 사멸 등 다양한 기능을 담당할 수 있다. MAPK는 ERK (the extracellular signal-activated kinases), JNK (the c-JUN N-terminal kinase), 및 p38 MAPK 세 가지로 분류를 할 수가 있는데, ERK는 성장 호르몬의 신호전달에 주로 관여하며 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 담당한다. 반면에 stress kinase로 분류되는 p38 MAPK와 JNK는 세포외부의 스트레스 자극에 의해 활성화되며 염증반응, 세포사멸 등을 매개할 수 있다. 일 실시예에 따른 상기 조성물은 MAPKs의 활성을 억제함에 따라, 염증 반응을 억제할 수 있다.

[0033] 일 구체예에서, 상기 자가면역질환은 크론병, 궤양성 대장염, 베체트병, 전신 홍반성 루푸스, 쇼그렌증후군, 중증근무력증, 경피증, 결절성 다발동맥염, 갑상선기능저하증, 건선 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것일 수 있다.

[0034] 일 양상에 따른 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 유효성분으로 하는 약학적 조성물은 연골세포에서 연골기질분해 효소(matrix metalloproteinase : MMP)의 발현을 억제할 수 있다. 연골세포(chondrocytes)는 발생 과정에서 간충직 세포(mesenchymal cell)로부터 분화하여 연골조직(cartilage)을 형성하는데, 연골조직은 연골 세포(chondrocyte)와 연골기질분자(extracellular matrix : ECM)만으로 구성된 조직으로서, 연골세포에 의한 지속적인 ECM 합성과 분해를 통해 조직의 항상성이 유지될 수 있다. 그런데, 전염증성 사이토카인 IL-1β과 TNF-α의 증가는 MMP, 구체적으로 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, 및 MMP-13를 활성화시킬 수 있고, 이에 따라, 발현된 MMP는 연골에서 세포외 기질을 구성하는 물질인 콜라겐과 프로테오글라이칸 등을 직접적으로 분해할 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 개체에 투여되어 MMP의 발현을 억제하여, 퇴행성관절염 예방 또는 치료할 수 있다.

[0035] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 주사제로서 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 예를 들어, 피하(즉, 피부 외용제) 또는 경구(즉, 경구제) 투여일 수 있다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 일 구체예에 있어서 상기 조성물은 피부 외용제, 주사제, 또는 경구제인 것일 수 있다.

[0036] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] 상기 약학 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 하루에 체중 1 kg 당 0.1 내지 500 mg의 범위 내일 수 있고, 매일 또는 격일로 투여 되거나, 1일 1 내지 5회의 범위 내로 나누어 투여될 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 그 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0038] 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 관절염은 관절의 손상을 수반하는 질환으로, 여러 가지 원인에 의해 관절에 염증이 생긴 것을 의미하는데, 관절은 움직임을 부드럽게 하면서 충격을 흡수할 수 있도록 연골, 관절, 활막, 인대, 힘줄, 근육 등으로 구성되어 있다. 관절염은 관절의 다양한 부위 및 신체의 거의 모든 관절에서 발생할 수 있다. 구체적으로, 발생 부위에는

슬관절, 고관절, 어깨 관절, 팔꿈치 관절, 손가락 관절, 발가락 관절 등이 있을 수 있다.

- [0040] 일 구체예에 있어서, 상기 관절염은 퇴행성 관절염 또는 류마티스 관절염인 것일 수 있다. 퇴행성 관절염은 한 개 또는 두개의 관절이 강직과 함께 쑺시는 듯한 동반 통증이 나타나며, 장기화 되면 관절 주변에 골의 과잉 형성 및 관절의 변형 등을 초래하는 질환으로 골관절염(osteoarthritis)이라고도 칭할 수 있다. 퇴행성 관절염이 유발되는 기전으로는 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하고 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등과 같은 효소의 분비가 증가 되어 관절 연골의 손상을 유발한다. 류마티스 관절염은 다발성 관절염을 특징으로 하는 염증성 질환으로서, 자가면역질환의 대표적인 질병이다. 증상을 살펴보면, 관절 활막(synovial membrane) 조직에 염증이 발생하여 대식세포, 수상세포 및 T 림프구, B 림프구 등이 활막 조직으로 이동하고, 그 결과 관절액(synovial fluid)이 증가하여 관절이 부으면서 통증이 나타나게 된다. 염증이 지속되면서 염증성 활막조직이 증생(hyperplasia)하게 되면 뼈와 연골을 파괴하여 관절 구조가 변형되고 운동 장애가 발생된다. 류마티스 관절염에서도 TNF- α , IL-1 β 등의 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하여 MMPs의 분비가 증가됨으로써, 관절연골을 구성하는 콜라겐(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan)을 파괴되어 관절 연골이 손상되는 것일 수 있다.
- [0041] 일 실시예에 따르면, 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드)을 포함하는 약학적 조성물은 대식세포 또는 연골세포의 전염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 염증과 관련한 NO, iNOS, 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2: PGE2) 및 PGE2를 생성하는데 관여하는 효소인 시클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2: COX-2)의 발현 또는 생성을 억제시킬 수 있다. 또한, MAPKs 활성을 억제하고, I κ B의 인산화 활성을 억제하여 NF- κ B의 핵내 전이를 억제할 수 있다. 그리고, 연골 기질 분해효소인 MMP의 발현을 억제할 수 있어, 이에 관절염의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물의 유효 물질로 사용될 수 있다.
- [0042] 상기 약학적 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [0043] 또 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0044] 일 구체예에 있어서, 상기 자가면역질환은 크론병, 궤양성 대장염, 베체트병, 전신 홍반성 루푸스, 쇼그렌증후군, 중증근무력증, 경피증, 결절성 다발동맥염, 갑상선기능저하증, 건선 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것일 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 사용된 용어, "개선"은 비정상적인 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 건강 기능성 식품 조성물은 자가면역질환의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서 사용된 용어, "염"은 식품학적으로 허용 가능한 염을 의미하며, 이들 염은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0047] 상기 식품 조성물은 유효성분을 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 60 중량% 이하, 바람직하게는 40 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 추가되는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0049] 상기 외에도, 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선

택될 수 있다.

- [0050] 상기 식품 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [0051] 또 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 관절 건강의 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 식품 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [0053] 또 다른 양상은 루테올린 7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0054] 일 구체예에 있어서, 상기 관절염은 퇴행성 관절염 또는 류마티스 관절염인 것일 수 있다.
- [0055] 상기 식품 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 청구된 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [0056] 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

발명의 효과

- [0057] 일 양상에 따른 조성물은, 전염증성 사이토카인과 염증과 관련한 인자들의 발현을 감소시켜 자가면역질환 또는 관절염의 증상을 예방 또는 치료할 수 있는 바, 기존의 치료제를 대체할 수 있는 유효 물질로 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 전호의 앞으로부터 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드) (Luteolin 7-O-(6''-malonylglucoside))을 HPLC-ESI-TOF/MS를 사용하여 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 NO 및 iNOS의 생성 억제 효과를 나타낸 그래프 및 이를 촬영한 사진이다.
- 도 4는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 사이토카인 생성 억제 결과를 촬영한 사진이다.
- 도 5는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 PGE2의 생성 억제 결과를 나타낸 그래프 및 COX-2 생성 억제 결과를 촬영한 사진이다.
- 도 6은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 SD 랫트 초대 배양 연골세포에 대한 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 SD 랫트 초대 배양 연골세포에 대한 iNOS 및 COX-2의 생성 억제 결과를 촬영한 사진이다.
- 도 8은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 SD 랫트 초대 배양 연골세포에 대한 MMP-3 및 MMP-13 생성 억제 결과를 촬영한 사진이다.
- 도 9는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 SD 랫트 초대 배양 연골세포에 대한 MAPKs (ERK1/2, p38 및 JNK)의 생성 억제 결과를 촬영한 사진이다.
- 도 10은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 SD 랫트 초대 배양 연골세포에 대한 NF κ B의 핵내 전이 억제 및 I κ B의 세포질 내 인산화 억제 결과를 촬영한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **실시예 1. 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 분리**

[0061] 본 실시예에서는 전호의 것으로부터 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드) (Luteolin 7-O-(6''-malonylglucoside))을 분리하고자 하였다.

[0062] 우선, 말린 전호 잎에 정제수를 40배수 주입하여 95~100 ℃에서 2~4 시간 동안 열수 추출을 1회 실시하였다. 상기 열수 추출물을 25 μm의 필터로 여과하여 여과액을 수득하였고, 60℃ 에서 감압 농축 및 동결 건조하여 건조엑스를 생성하였다. 이후에 50% 메탄올(methanol, MeOH)을 이용하여 건조엑스를 일정 농도로 용해하고 상온에서 10분 동안 교반한 다음 20℃에서 3,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 취한 후 여과 필터(PTFE, 0.45um)으로 여과한 여액(filtrate)을 표 1과 같이 상세조건으로 설정된 분취용 액체크로마토그래피(preparative liquid chromatography, prep-LC)을 이용하여 상기 건조엑스로부터 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 분리 및 정제하였다.

[0063] 분리정제용 컬럼은 shim-pack PREP-ODS (20 mm i.d. × 250 mm L., shimadzu, japan)을 사용하였다. 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/D.W.(A)와 0.1% TFA/acetonitrile (ACN) (B)으로 기울기용리(gradient elution) 조건으로 유량은 12 mL/min으로 하였다. 기울기 용리의 상세조건은 초기 2분 동안 이동상 (B)를 20%로 유지하고 이후 30분까지 45%으로 이동상 (B)의 조성을 증가시켜 각 성분을 분리한 다음 30.1분에 이동상 (B)를 95%으로 급격히 증가시켜 35분까지 유지하여 컬럼을 세척한 후 45분까지 이동상 (B)를 20%으로 유지하여 기울기용리의 초기조건으로 설정하였다. 컬럼 온도는 40℃를 유지하고 시료는 1,000 uL를 주입하였으며 자외선 흡수 파장 320 nm에서 검출하였다. 시료 주입 후 16.20분에서 16.65분까지 컬럼에서 분리되어 용출되는 분획물을 수득하였다.

표 1

장 치	분취용 액체크로마토그래피		
컬 럼	- C18 컬럼 (ODS와 동등 이상의 것) - 사용컬럼 : Shim-pack PREP-ODS, 20 mm i.d. × 250 mm L., shimadzu, japan)		
유 량	12 mL/min		
검출파장	Ultraviolet (UV) 320 nm		
시료주입량	1,000 uL		
이동상 조 성	시간(분)	이동상 혼합비율	
		(A)0.1% TFA/DW	(B)0.1% TFA/ACN
	2.0	80	20
	30.0	55	45
	30.1	5	95
	35.0	5	95
	35.1	80	20
	45.0	Stop	

[0064]

[0065] 상기 prep-LC 조작으로 수득한 분획물을 동결건조하여 밝은 노랑색(bright yellow)을 띠는 건조물을 확보하였다.

[0066] 고분해능 액체크로마토그래피-질량분석기(high resolution UPLC-ESI-TOF/MS)를 이용하여 하기 표 2과 같이 상세 조건으로 설정하여 상기 prep-LC로부터 수득한 분리분획물의 성분을 동정하였다.

[0067] 분리분획물의 질량분석을 위한 시료 도입 및 분석을 위해 초고속 액체크로마토그래피 (ultra performance liquid chromatography, Nexera LC-30A, shimadzu japan) 시스템을 이용하였으며 UPLC 컬럼은 capcell core C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm L., shiseido, japan)을 사용하였고 이동상은 분취용 액체크로마토그래피와 동일한 조성으로 하였으며, 총 분석시간은 55분으로 이동상 (B)의 조성을 초기 2.0분간 10%로 유지하고, 35분까지 50%, 40분까지 95%까지 증가시킨 다음 45분까지 유지하였으며 이후 50분까지 10%으로 유지하여 초기조건으로 안정화시켰다. 컬럼온도는 40 ℃, 이동상 유량은 0.2 mL/min을 유지하였으며 시료는 5 uL를 주입하였으며 자외선 흡수 파장 320 nm에서 컬럼에 의해 분리된 피크 (peak)을 모니터링하고 질량분석기로 분석하였다.

[0068] 질량 분석은 하이브리드형 질량분석기인 비행시간형 결합 이온트랩 질량분석기(Ion trap coupled Time of

flight, LCMS-IT-TOF[®], Shimadzu, Japan)을 이용하여 전기분무화 이온화(electrospray ionization, ESI)의 positive ion mode 조건하에서 분석하였다. ESI capillary의 전압은 4.5 kV, nebulizing gas(N₂)와 drying gas는 각각 1.5 L/min과 150 kPa로 설정하였다. CDL과 block heater는 200℃로 설정하였고, 데이터 수집 시간은 0.3 min (event time 300 msec, repeat 3, ion accumulation 10 msec)으로 하였으며 질량분석 범위는 m/z 100-1,000으로 설정하였다. 질량 분석 결과는 shimadzu사의 LCMS Solution(ver. 3.60)과 accurate mass calculator 전용 소프트웨어인 formula predictor(ver. 1.2)를 활용하여 해석하였으며, TOF(time of flight) 질량 분석기는 주기적인 tune 실행으로 ±0.005 Da 이하의 질량 정확도(mass accuracy)를 유지하면서 본 실험을 수행하였다.

표 2

UPLC	Nexera LC-30A, Shimadzu, Japan	LC/MS	Hybrid LCMS, Shimadzu, Japan	LCMS-IT-TOF																							
컬럼	Capcell core C18 2.1 mm i.d. × 150 mm L., (shiseido, japan)	질량 분석기	Ion trap coupled time of flight (IT-TOF/MS)																								
컬럼온도	40℃	이온화 방식	Electrospray ionization (ESI), +4.5kV																								
유량	0.2 mL/min	이온수 수집	10 msec (loop time 0.3 sec, event time 300 msec, repeat 3)																								
검출파장	UV @ 320 nm	질량 범위	m/z 100 - 1,000																								
이동상	<table><tr><th rowspan="2">시간(분)</th><th colspan="2">이동상 혼합비율</th></tr><tr><th>(A)0.1% TFA/DW</th><th>(B)0.1% TFA/ACN</th></tr><tr><td>2.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>35.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>40.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>45.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>45.1</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>50.0</td><td colspan="2">Stop</td></tr></table>				시간(분)	이동상 혼합비율		(A)0.1% TFA/DW	(B)0.1% TFA/ACN	2.0	90	10	35.0	50	50	40.0	5	95	45.0	5	95	45.1	90	10	50.0	Stop	
	시간(분)	이동상 혼합비율																									
		(A)0.1% TFA/DW	(B)0.1% TFA/ACN																								
	2.0	90	10																								
	35.0	50	50																								
	40.0	5	95																								
	45.0	5	95																								
	45.1	90	10																								
50.0	Stop																										

[0069]

[0070]

Prep-LC를 이용한 전호 잎 추출 건조엑스의 분획분리물에 대해 UPLC-ESI-TOF/MS 분석한 UPLC 크로마토그램 확인 결과 단일 피크로서 순도 98.2%의 단일 성분으로 확인되었다. 이를 전호 잎 추출 건조엑스와 비교 분석한 결과 동일 머무름 시간 (retention time, t_R)에서 동일 peak으로 확인되었다. UPLC에서 의해 분리된 단일 피크에 대해 ESI(+)-TOF/MS로 도입하여 분석한 질량 스펙트럼 (mass spectrum)은 536.105 m/z, [M+H]⁺와 287.056 m/z, [(M-C₉H₁₂O₈)+H]⁺의 MS fragment ion이 확인되었다(표 3). 이를 질량 분석한 결과 결과 도 1에 나타낸 바와 같이, flavone glycosides의 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드 (luteolin-7-O-(6"-malonylglucoside, C₂₄H₂₂O₁₄, 534.1010 g·mol⁻¹)으로 동정되었으며 전호 잎 유래 신규 화합물로 확인되었다.

표 3

Peak #	t _R (min)	ESI(+)-TOF/MS result					Identification	
		Ion	Measured mass (m/z)	Theoretical mass (m/z)	Error (mDa)	Predicted formula	Compound	Molecular weight (g·Mol ⁻¹)
1	14.96	[M+H] ⁺	535.1025	535.1082	-5.7	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	luteolin-7-O-(6"-malonylglucoside	534.1010
		[(M-C ₉ H ₁₂ O ₈)+H] ⁺	287.0529	287.0550	-2.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₈		

[0071]

실험예 1. 마우스 RAW264.7 대식세포에서 세포독성 확인

[0072]

본 실험예에서는 상기 실시예 1.에서 분리된 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 RAW264.7 대식세포에 대한 세포독성 정도를 측정하고자 하였다.

[0073]

- [0074] 우선, 마우스의 RAW264.7 대식세포를 12 well plate에 5×10^5 세포를 24시간 배양 후 상기 전호 및 건조엑스에서 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 다양한 농도(0, 12.5, 25, 50, 100 및 200 ug/ml)로 24시간 처리한 후 MTT 용액을 사용하여 세포독성 실험을 수행하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0075] 도 2에서 나타난 바와 같이, 마우스 RAW264.7 대식세포에 전호 및 추출물에서 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 농도별로 처리하여 MTT 기법을 수행하여 세포독성을 확인한 결과 200 ug까지도 세포독성이 없음을 확인하였다. 이는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 안전성을 갖춰 개체에 투여될 수 있는 성분임을 나타낸다.
- [0076] **실험예 2. NO (nitrite oxide) 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 억제 효과**
- [0077] 본 실험예에서는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 염증반응과 조직 손상에 관련하는 NO 및 NO를 형성하는 효소인 iNOS의 생성 및 발현을 대식세포에서 억제할 수 있는지를 확인하고자 하였다.
- [0078] 대식세포에서 NO의 생성은 iNOS의 발현과 연관성이 있고, LPS와 같은 그람(gram) 음성균의 세포벽 물질이나 사이토카인(cytokine)에 자극을 받아 유도된다. 본 실험예는 LPS(0.2 ug/ml)를 처리한 마우스 RAW264.7 대식세포에서 건조엑스에서 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 각각의 농도(100, 250, 500 ug/ml)로 처리한 후, NO 함량은 24시간 후에 상층액을 모아 그리스(griess) 시약으로 10분간 반응시킨 후 ELISA 검출기를 사용하여 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. iNOS는, LPS(200 ng/ml)만 첨가한 군에서 생성된 nitrite 양을 100%로 하여 시료가 첨가된 경우에 측정된 흡광도를 환산하여 표기하였다. protein lysis buffer를 사용하여 total 단백질을 분리하여 iNOS 단백질의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 3a 및 3b에 나타내었다.
- [0079] 도 3a에 나타난 바와 같이, NO는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 또한 도 3b에 나타난 바와 같이, 각각의 단백질을 분리하여 iNOS의 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 확인한 결과, iNOS는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 농도 의존적으로 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)이 항염증 효과가 있음을 나타낸다.
- [0080] **실험예 3. 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 발현 억제 효과**
- [0081] 본 실험예에서는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 자가면역 염증질환에 관련된 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6를 억제할 수 있는지 알아보하고자 하였다.
- [0082] 마우스 RAW264.7 대식세포에 LPS(0.2 ug/ml)를 처리한 후, 실시예 1의 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 다양한 농도(100, 250, 500 ug/ml)로 첨가하고, 24시간 후 각각의 세포에서 protein lysis buffer를 사용하여 총 단백질을 분리하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 단백질을 발현 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.
- [0083] 도 4에 나타난 바와 같이, 발현 변화를 확인한 결과 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 농도 의존적으로, 전염증성 사이토카인의 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)이 여러 자가면역 질환의 증상을 치료할 수 있음을 나타낸다.
- [0084] **실험예 4. 프로스타글란딘 E2 생성 억제 및 COX-2 발현 억제 확인**
- [0085] 본 실험예에서는 대식세포에서 염증관련인자인 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2 :PGE2) 및 이를 생성하는데 관여하는 효소인 시클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2: COX-2)의 발현을 측정하고자 하였다.
- [0086] 우선, 마우스 RAW264.7 대식세포에서 LPS로 염증을 유도한 후 건조엑스에서 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 첨가하고, 24 시간 후 세포배양액을 수집하여 PGE2 ELISA assay를 사용하여 PGE2 생성 억제를 확인하였고, 각각의 세포를 모아 protein lysis buffer를 사용하여 총 단백질을 분리하여 COX-2 단백질을 발현 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.
- [0087] 도 5의 (A)에 나타난 바와 같이, PGE2의 생성은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 또한 (B)에 나타난 바와 같이, 각각의 단백질을 분리하여 COX-2의 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯을 수행하여 확인한 결과 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드) 200 ug에서 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 항염효과가 있음을 나타낸다.
- [0088] **실험예 5. SD 랫트 유래 초대 배양 연골세포에서 세포독성 확인**
- [0089] 본 실험예에서는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)이 개체의 연골세포를 파괴하는지를 알아보하고자

하였다.

[0090] 우선, 랫트 뒷다리 연골에서 분리한 초대배양 연골세포에 전호 및 추출물에서 분리한 루테올린-7-O-말로닐글루코사이드를 농도별로 처리하여 MTT 기법을 수행하여 세포독성을 확인하였다. 그 결과 도 6에서 나타난 바와 같이, 800ug 까지 세포독성이 없음을 확인하였다.

[0091] **실험예 6. SD 랫트 유래 초대 배양 연골세포에서 염증 억제 효과**

[0092] 본 실험예에서는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)이 랫트의 연골세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 iNOS와 COX-2와 같은 염증 유도인자의 발현을 억제할 수 있는지를 확인하였다.

[0093] 우선, 건조엑스에서 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 각각의 농도(100, 250, 500 ug/ml)로 랫트 유래 초대배양 연골세포에 첨가한 후, 1 시간 후 IL-1 β (20 ng/ml)을 처리하고 24시간 후 세포 배양액을 수집하고 protein lysis buffer를 사용하여 총 단백질을 분리하여 SDS-PAGE 단백질 전기영동 후 western blot 분석을 수행하여 iNOS 단백질 및 COX-2의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0094] 도 7에 나타난 바와 같이, iNOS와 COX-2 단백질 발현은 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)의 농도 의존적으로 현저하게 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 관절연골의 염증매개 인자의 발현을 감소시킴으로서 관절염 치료 및 예방에 도움을 줄 수 있음을 제시하고 있다.

[0095] **실험예 7. 관절연골 분해효소 MMP-3, MMP-13 발현 억제 효과**

[0096] 본 실험예에서는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 관절연골 분해효소인 MMP-13을 SD 초대 연골 배양세포에서 그 발현을 억제할 수 있는지를 확인하고자 하였다.

[0097] 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 각각의 농도(100, 250, 500 ug/ml)로 랫트 유래 초대배양 연골세포에 첨가하고, 1 시간 후 IL-1 β (20 ng/ml)을 처리하였다. 24시간 후 각 세포를 수집하고 protein lysis buffer를 사용하여 총 단백질을 분리하여 웨스턴 블롯을 통해 MMP-13 단백질 발현 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0098] 도 8에 나타난 바와 같이, 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 처리한 군에서 연골 세포외기질 분해효소로 알려져 있는 MMP-13의 단백질 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 관절연골을 구성하는 세포외기질 분해효소를 억제함으로써 관절염 치료 및 예방에 도움을 줄 수 있음을 제시하고 있다.

[0099] **실험예 8. SD 랫트 초대배양 연골세포에서 MAPKs 인산화 억제 효과**

[0100] 본 실험예에서는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 SD 랫트의 초대배양 연골세포에서 염증과 관련한 염증 관련 세포 기전으로 알려져 있는 MAPKs (ERK1/2, p38 및 JNK)의 인산화를 억제할 수 있는 확인하고자 하였다.

[0101] 우선, 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 각각의 농도(100, 250, 500 ug/ml)로 랫트 유래 초대배양 연골세포에 첨가하고, 1 시간 뒤 IL-1 β (20 ng/ml)을 첨가하였다. 그리고 24시간 후 각 세포를 수집하여 protein lysis buffer를 사용하여 총 단백질을 분리한 후 웨스턴 블롯을 통해 MAPKs 인산화 억제 여부를 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[0102] 도 9에 나타난 바와 같이, 인산화 발현을 확인한 결과 IL-1 β (20 ng/ml)로 염증 반응을 유도하여 증가된 MAPKs (ERK1/2, JNK, p38)의 인산화가 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 첨가한 후에 현저하게 감소됨을 확인하였다. 이는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)이 연골세포의 염증 치료에 효과가 있음을 나타낸다.

[0103] **실험예 9. SD 랫트 초대배양 연골세포 내 NF- κ B 억제 및 I κ B 인산화 억제**

[0104] 본 실험예는 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 SD 랫트의 초대배양 연골세포에서 염증 관련 세포 기전으로 알려져 있는 NF- κ B의 핵내 전이 억제 및 I κ B의 세포질 내 인산화 활성 억제 효과를 확인하고자 하였다.

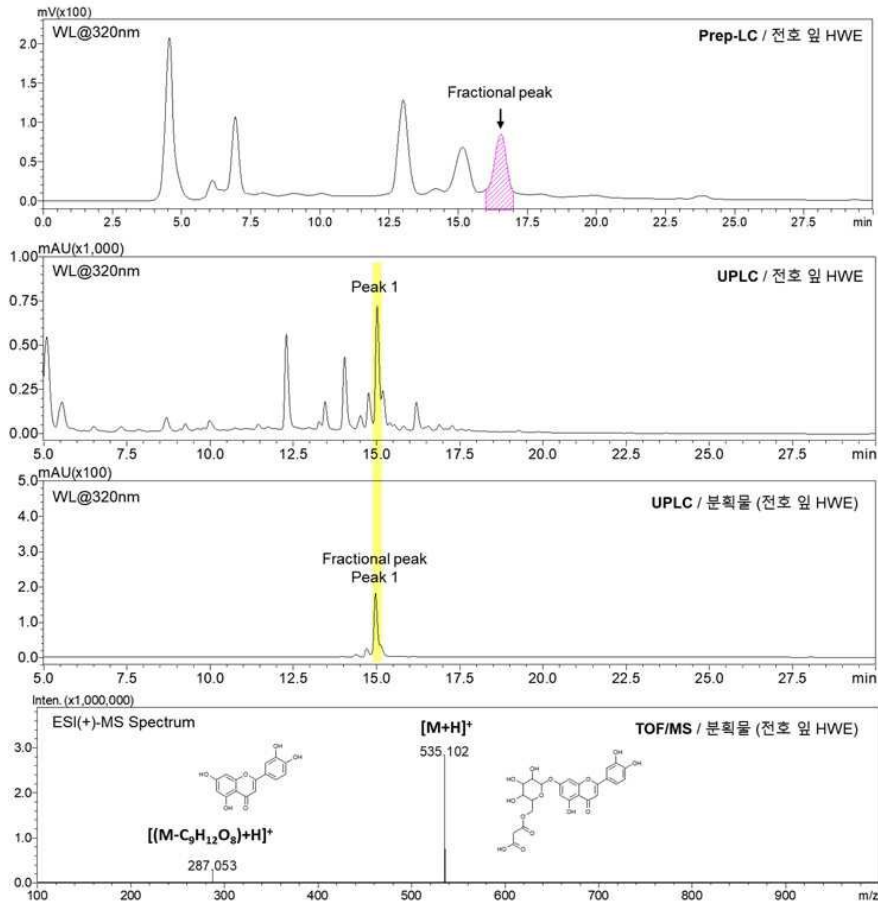
[0105] 우선, 건조엑스에서 분리한 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 각각의 농도(100, 250, 500 ug/ml)로 랫트 유래 초대배양 연골세포에 첨가하고, 1시간 뒤 IL-1 β (20 ng/ml)을 첨가하였다. 그리고 24시간 후 세포를 수집하여 protein lysis buffer를 사용하여 총 단백질을 분리하고, NF- κ B의 핵내 이동 억제 및 I κ B의 인산화 활성 억제를 확인하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0106] 도 10에 나타난 바와 같이, 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)를 처리한 세포 NF- κ B의 핵내 이동이 현저

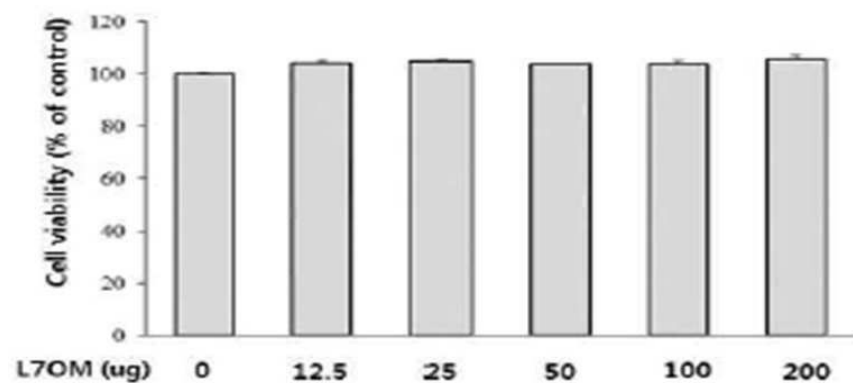
하게 억제됨을 확인하였고, 또한 세포질 내에서 NF- κ B 결합하는 I κ B의 인산화 활성이 현저하게 감소됨을 확인하였다. 이는 관절염의 발생의 바이오마커라 할 수 있는 NF- κ B의 핵내 전이 활성을 감소시키는 것으로, 루테올린-7-O-(6"-말로닐글루코사이드)가 관절염에 효과가 있음을 나타낸다.

도면

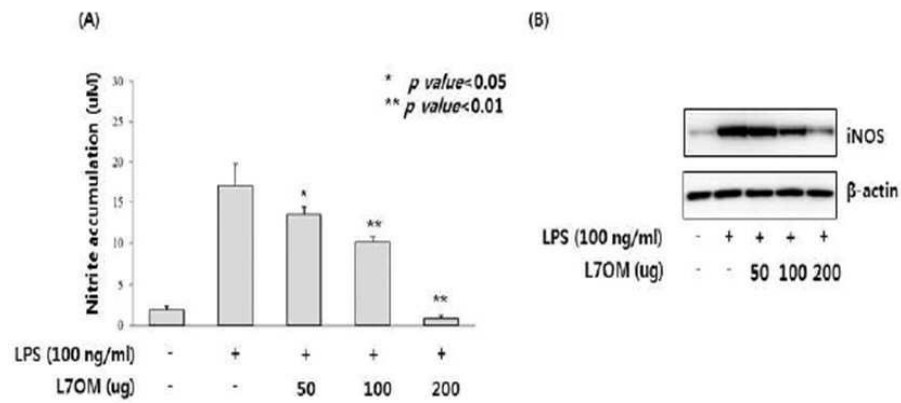
도면1



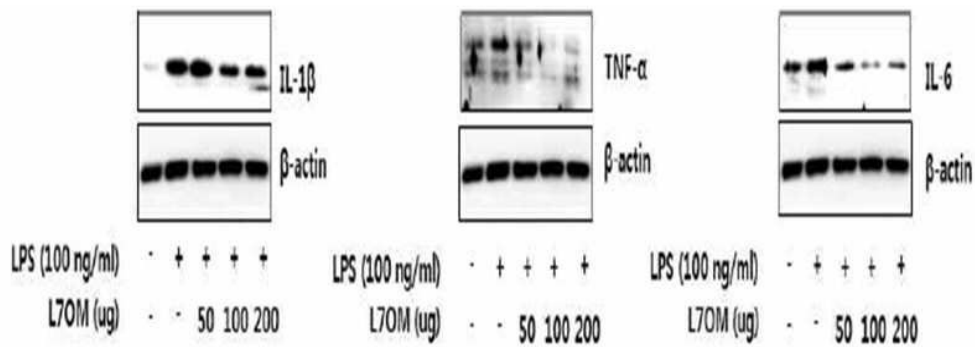
도면2



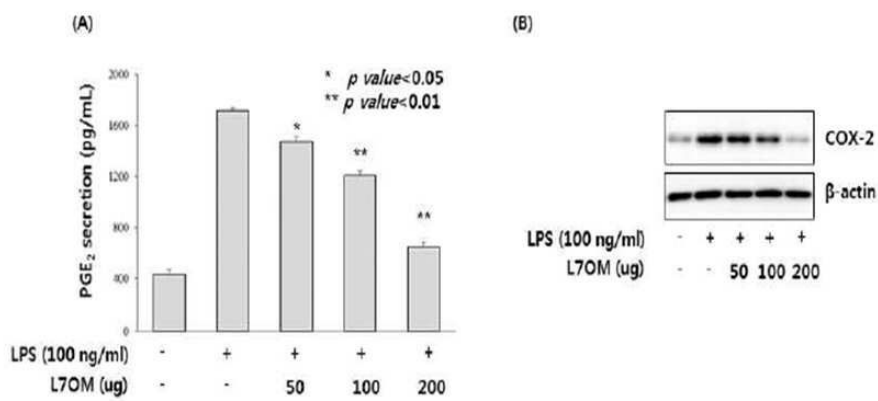
도면3



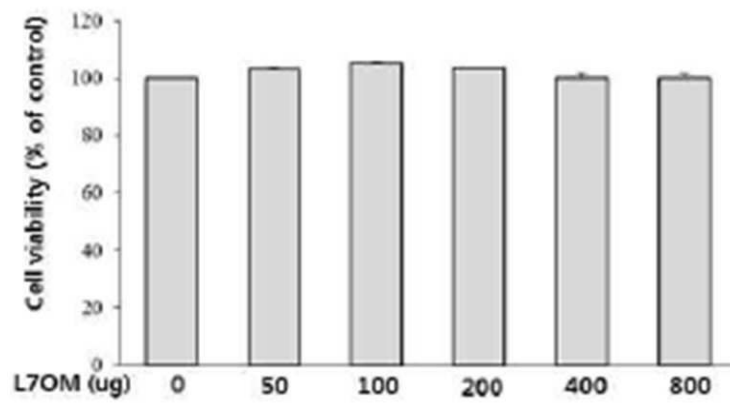
도면4



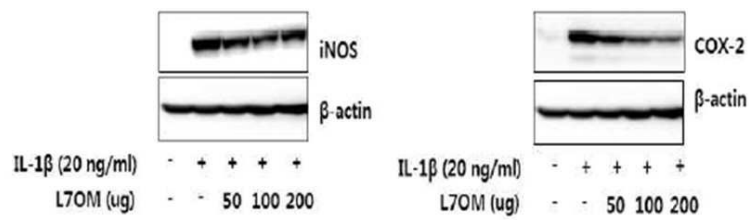
도면5



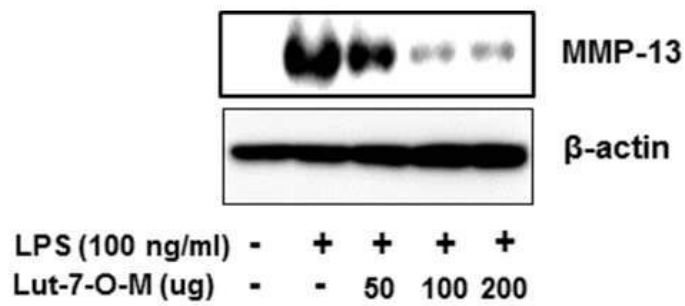
도면6



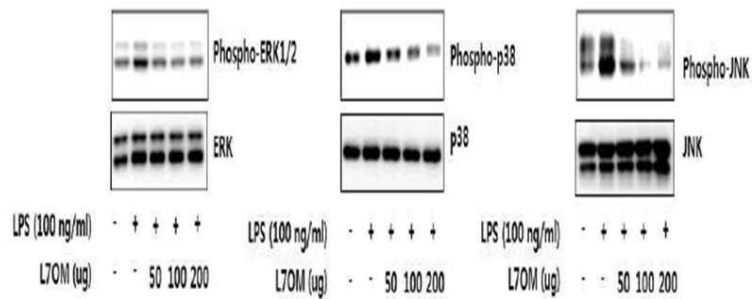
도면7



도면8



도면9



도면10

