(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월07일
(11) 등록번호 10-1865356
(24) 등록일자 2018년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/47 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0002568
(22) 출원일자 2017년01월06일
심사청구일자 2017년01월06일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110011968 A*
KR1020160126204 A*
Woo Jung Kim et al, 'Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Rapid Secondary-Metabolite Profiling of Marine Pseudoalteromonas sp. M2', Mar. Drugs, 2016, Vol.14, No.24, 1-11*
KR1020170007704 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
이준식
광주광역시 서구 풍암1로 53, 제105동 206호(풍암동, 현대삼환아파트)
(74) 대리인
특허법인아이엠

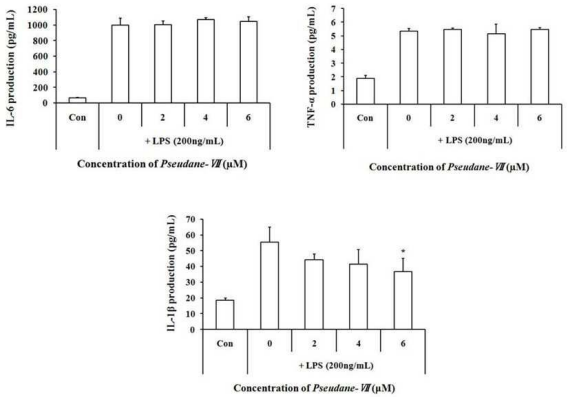
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 홍수민

(54) 발명의 명칭 **슈단-Ⅶ을 유효성분으로 포함하는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물**

(57) 요 약

본 발명은 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물인 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ)를 유효성분으로 포함하는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 8/4926 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525006134(201404492)
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 해양바이오 지역특화 선도기술 개발
연구과제명 해조류 유래 식/의약 소재 개발
기 여 율 1/2
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2016.08.01 ~ 2017.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711036851(2014R1A1A1008053)
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 FoxO6에 의한 수지상세포 분화 및 T 세포 활성조절 기전 연구
기 여 율 1/2
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

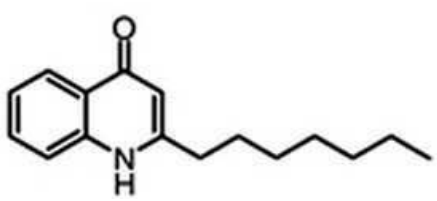
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 데,

[화학식 1]



상기 슈단-Ⅶ은 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물이고, JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF-κB의 활성화를 억제하여 NO 및 전염증성 사이토카인인 IL-1β의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

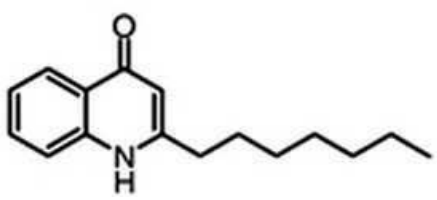
제 1 항에 있어서,

상기 슈단-Ⅶ이 6μM이하로 포함되는 것을 특징으로 하는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함함으로써 JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF-κB의 활성화를 억제하여 NO 및 전염증성 사이토카인인 IL-1β의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항염증 효과를 갖는 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 5

삭제

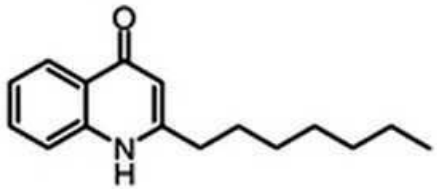
청구항 6

삭제

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함함으로써 JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF-κB의 활성화를 억제하여 NO 및 전염증성 사이토카인인 IL-1β의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항염증 효과를 갖는 화장료조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물인 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ)을 유효성분으로 포함하는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증반응은 체내에서 조직손상이나 미생물 감염 등과 같은 자극에 대한 선천면역 반응으로 기능을 정상적으로 회복하기 위한 필수적인 반응이다. 이러한 염증반응에 관여하는 세포 중 대식세포는 LPS에 반응하여 toll-like receptor- 4(TLR-4)에 자극하게 되며 mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)를 활성화한다. 활성화된 MAPK, NF-κB는 interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-1β과 같은 전염증성 사이토카인을 생성하거나 inducible nitric oxide synthase(i-NOS), cyclooxygenase(COX-2)과 같은 효소의 발현으로 nitric oxide(NO)와 같은 다양한 염증성 분자들을 생성하게 된다.

[0003] NO는 당뇨병, 류마티스 관절염, 죽상동맥경화증과 같은 질병에서 중요한 역할을 한다.(Wiklund, Iversen et al. 1999 Park, Jeon et al. 2012 Frangogiannis 2015). NO는 다양한 염증성 모델에서 주로 대식세포의 iNOS를 통하여 합성된다. 또한, iNOS는 LPS를 포함한 염증반응 자극으로부터 유도되며, 대식세포의 염증반응 동안에 NO의 생산이 과도하게 나타난다.(Evans 1995 Zhou, Shin et al. 2008 Jung, Kim et al. 2010 Park, Kim et al. 2010 Chun, Choi et al. 2012). 따라서, NO와 전염증사이토카인의 생산의 감소는 염증반응의 효과적인 억제 전략으로써 제시된다.(Hoffmann and Baltimore 2006 Kawai and Akira 2006 Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006 Cha, Moon et al. 2009 Ben, Yu et al. 2012 Kyriakis and Avruch 2012).

[0004] 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ)은 항바이러스 활성을 갖는 해조류에서 융합성 성장을 하는 해양 박테리아인 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물이며, 기존에 보고된 연구에 의하면 pseudane-Ⅶ이 멜라닌 합성을 억제하는 활성을 갖는다는 것 외에 다른 기전은 아직 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물인 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ)의 새로운 용도를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 슈단-Ⅶ 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하여 다양한 염증 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물, 건강기능식품, 화장료조성물

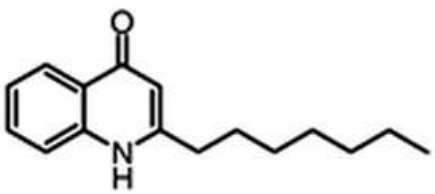
등을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] [화학식 1]

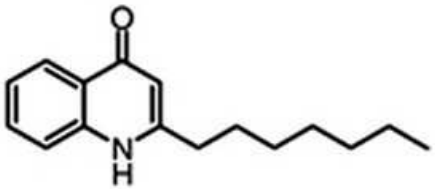
[0010] 

[0011] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 슈단-Ⅶ은 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물이다.

[0012] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 슈단-Ⅶ이 6㎛M이하로 포함된다.

[0013] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항염증 효과를 갖는 건강기능식품을 제공한다.

[0014] [화학식 1]

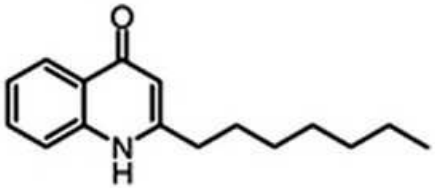
[0015] 

[0016] 또한, 본 발명은 상술된 어느 하나의 약학적 조성물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 염증성질환 치료방법을 제공한다.

[0017] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 염증성질환은 호흡기계 염증성 질환, 류마티스성 관절염, 골관절염, 퇴행성관절염, 다발성 관절염, 급성염증, 알러지성 염증, 피부질환 중 하나 이상이다.

[0018] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항염증 효과를 갖는 화장료조성물을 제공한다.

[0019] [화학식 1]

[0020] 

발명의 효과

[0021] 본 발명의 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 대식세포에서 ERK, JNK, 및 P38 MAPK 인산화 경로를 억제함으로써 LPS에 유도된 NO의 생산과 전염증성인자 사이토카인의 발현을 감소시키는 효능을 가지므로, 이를 이용하여 다양한 염증성 증상을 완화하기 위한 항염증성 특성을 갖는 약학조성물, 기능성 식품소

재 및 기능성 화장품소재로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 슈단-Ⅶ이 처리된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)의 MTT assay 상 세포생존성 결과 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따른 슈단-Ⅶ이 처리된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 LPS에 의해 유도된 NO 생산 억제효과를 나타낸 결과그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 슈단-Ⅶ이 처리된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 LPS에 의해 유도된 염증성 유전자 mRNA의 발현 억제효과를 나타낸 결과사진이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 슈단-Ⅶ이 처리된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 LPS에 의해 유도된 사이토카인 생산 억제효과를 나타낸 결과그래프이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 따른 슈단-Ⅶ이 처리된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 LPS에 의해 유도된 ERK, JNK, 그리고 P38의 인산화 억제효과 및 i-NOS 단백질 발현을 억제효과를 나타낸 결과사진이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 따른 슈단-Ⅶ이 처리된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 NF-κB의 활성화 억제효과를 나타낸 결과사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어는 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어를 선택하였으나, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있는데 이 경우에는 단순한 용어의 명칭이 아닌 발명의 상세한 설명 부분에 기재되거나 사용된 의미를 고려하여 그 의미가 파악되어야 할 것이다.

[0024] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.

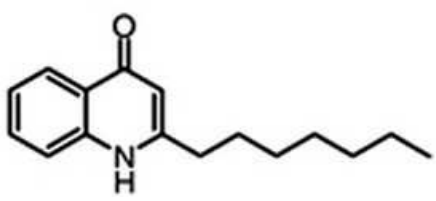
[0025] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.

[0026] 본 발명의 기술적 특징은 *pseudoalteromonas* sp. M2로부터 생산된 이차 대사산물인 슈단-Ⅶ이 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF-κB의 활성화를 억제하여 NO와 전염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 효능을 갖는다는 점에서 착안된 것으로 슈단-Ⅶ의 새로운 용도인 항염증 활성을 이용하여 다양한 염증질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 염증질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물, 건강기능식품, 화장료조성물을 제공하는 것이다.

[0027] 즉, 염증은 외부 감염으로부터 반응하는 중요한 선천성 면역반응으로, 대식세포는 주요한 면역세포이며 염증과 조직 재생에 결정적인 역할을 하지만, 지나친 대식세포주가 국소부위로 지나치게 유입되거나 순환할 경우 섬유증, 죽상동맥경화증, 암과 같은 심각한 염증성 질환의 원인이 되는데, 본 발명에서는 LPS에 의해 활성화된 ERK, JNK, p38를 포함한 MAPK의 인산화와 NF-κB의 활성화를 억제하는 것을 통해 전염증성 매개자들의 발현을 슈단-Ⅶ이 저해하는 것을 증명함으로써 슈단-Ⅶ의 강력한 항염증성을 확인했기 때문이다.

[0028] 따라서, 본 발명의 염증 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 항염증 효과를 갖는 건강기능식품 또는 화장료조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 슈단-Ⅶ(pseudane-Ⅶ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함한다.

[0029] [화학식 1]

[0030] 

[0031] 상술된 바와 같이 슈단-Ⅶ 및 이의 약학적으로 허용가능한 염이 대식세포에서 ERK, JNK, 그리고 P38 MAPK 인산

화 경로를 억제함으로써 LPS에 유도된 NO의 생산과 전염증성인자 사이토카인의 발현을 감소시키기 때문이다.

[0032] 그 결과 본 발명의 치료방법은 상술된 약학조성물을 인간을 제외한 포유류의 염증 치료를 위해 경구 또는 비경구적으로 투여하는 단계를 포함하여 염증질환을 치료할 수 있다. 여기서, 염증질환은 호흡기계 염증성 질환, 류마티스성 관절염, 골관절염, 퇴행성관절염, 다발성 관절염, 급성염증, 알러지성 염증, 피부질환 중 하나 이상일 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 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, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 실시예

[0035] *Pseudoalteromonas sp.*M2 균주를 4L의 marine broth2216 (MB:Difco)배지에 접종하여, 22도에서 48시간 동안 진탕배양기에서 배양하였다. 균주배양은 4번 반복하여 전체 16L를 배양하였다. 이차 대사산물인 슈단-Ⅶ (pseudane-Ⅶ)을 얻기 위하여, 세포배양액을 30분동안 20000g로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 모아서 동일한 양의 에틸아세테이트를 처리하고 300 rpm으로 15분 동안 JEIO TECH RS-1 recipro shaker를 사용해 교반하였다. 에틸아세테이트층(상층)은 Speed-Vac를 사용해 진공에서 건조한 것이고 추출물(슈단-Ⅶ 포함)은 50% 메탄올로 희석되었다. 각 추출물은 Water AutoPurification system (QDa detector와 gradient A (0.1% 포름산) 와 B (acetonitrile)를 이용하는 Xbridege prep C18 Columm(19*250 mm, 5um))에서 high-pressure liquid chromatography (HPLC)를 이용해 25mL/min의 유속으로 통해 정제되어 슈단-Ⅶ을 얻었다. 초기의 gradient 조건으로 (90% A/ 10% B)이 2.8분, 43분에 B가 65%, 5분동안 유지하고 45분에 A가 0%로 감소되는 조건으로 사용하였다.

[0036] 실험예 1

[0037] 1. 세포배양

[0038] RAW 264.7 마우스의 대식세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구매했다. RAW 264.7 세포는 37℃, 이산화탄소 5%의 조건에서 10% FBS,200 IU/ml penicillin, 200 g/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 이용하여 배양하였다. 실시예에서 분리된 슈단-Ⅶ은 DMSO:EtOH=1:9비율로 농도 20mM으로 환원되고, DMEM에 용해했다(최종 DMSO 농도 0.003%, EtOH 농도 0.027% v/v). Pseudane-Ⅶ을 처리하지 않은 대조군은 DMSO와 EtOH 용매를 사용했다.

[0039] 2. 세포독성능 평가

[0040] 세포독성은 MTT 비색실험으로 측정했다. RAW 264.7 대식세포주($2*10^4$ cells/well)를 96-well 세포배양용 플레이트에 배양한 후 농도별로 슈단-Ⅶ (0~6㎛M)을 처리한 뒤, 37℃에서 24시간 동안 배양했다. 배양 후 배지에 포함된 슈단-Ⅶ을 제거하고, 0.5mg/ml의 MTT 용액을 넣어준다. 37℃에서 4시간 동안 배양 후 MTT 용액을 제거한 뒤

formazan이 생성된 것을 확인 후 DMSO와 에탄올을 1:1로 섞은 것을 이용하여 생성된 formazan을 녹인다. formazan 용액의 흡광도를 ELISA microplate reader를 이용해 570nm에서 측정한다. 실험 결과는 대조군(0.003% DMSO, 0.027% EtOH)에 대한 살아있는 세포의 수를 퍼센트로 비교하여 분석한 결과값은 Mean(평균)±S.D(표준편차)로 나타낸다. 실험결과의 유의성은 p value <0.05 수준에서 비교하였다.

[0041] 이와 같이 대식세포주에 대한 슈단-Ⅶ의 세포독성은 MTT assay를 사용하여 확인하였는데, 도 1에 도시된 바와 같이 6μM까지 세포에 대한 독성을 가지지 않는 것으로 확인되었다.

[0042] 실험예 2

[0043] 슈단-Ⅶ이 염증 매개 인자인 NO의 생산을 조절하는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 슈단-Ⅶ을 처리한 후 NO 생성수준을 LPS에 의해 자극된 대식세포주에서 측정했고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0044] RAW 264.7 대식세포 주($5*10^4$ cells/well)를 세포배양용 96-well plate에 배양하여 다양한 농도의 슈단-Ⅶ(0~6μM)을 2시간동안 전 처리한 후, LPS를 처리하거나 처리하지 않은 샘플을 22시간동안 37℃, 5% CO2 incubator에서 배양한다. 배양 후, 배지와 동량의 Griess 시약을 1:1로 혼합하여 실온에서 15분간 배양한다. 15분후 ELISA 마이크로 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 대식세포주에 슈단-Ⅶ을 전 처리 하고 2시간 후 LPS (200 ng/ml)로 자극시켰다. (**p<0.01 vs LPS 단독 처리군)

[0045] 도 2에 도시된 바와 같이 LPS는 대조군과 비교하여 NO의 생산이 증가한 반면, 슈단-Ⅶ를 농도별로(0~6μM) 처리하였을 때 4, 6μM에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였다(p<0.05)

[0046] 이러한 결과는 슈단-Ⅶ의 독성이 없는 농도(2~6μM)에서 LPS에 의해 자극된 대식세포로부터 생산된 NO가 억제된다는 것을 알 수 있다. 이와 같이 슈단-Ⅶ이 대식세포에서 LPS에 유도된 NO의 생산을 억제 한다는 결과는 슈단-Ⅶ이 항염증성을 갖는 것을 보여준다. NO는 생체 내에서 염증 지표인자로 제시되는 활성분자로서, NO 대사산물들 또는 iNOS의 발현을 통해 생성 될 수 있는데, 염증부위에서 활성화된 대식세포에 의해 발생되는 NO는 외부의 병원균에 대하여 세포독성 활성을 가지고 있으며, 과도한 NO의 생산은 만성염증반응과 다양한 염증성 질환에 연관이 있기 때문이다.

[0047] 실험예 3

[0048] 슈단-Ⅶ이 NO를 생성하는 효소인 i-NOS의 발현을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, 하기와 같이 슈단-Ⅶ을 처리한 후 LPS에 의해 자극된 대식세포주에서 역전사중합연쇄반응으로 i-NOS의 mRNA의 발현을 측정했고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0049] 배양용 배지를 이용하여 RAW 264.7 세포주를 $1*10^6$ cells/well의 수로 6-well plate에 배양하였다. 배양된 세포를 다양한 농도의 슈단-Ⅶ(0 ~ 6μM)로 2시간동안 처리 후, LPS를 처리한 뒤에 6시간동안 배양한 다음, 슈단-Ⅶ이 처리된 세포를 원심분리기를 이용해 모은 뒤, TRI 시약을 이용하여 제품 실험방법을 따라 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여, 0.1μg 전체 RNA, oligo dT, M-MLV RTase, dNTP 그리고 반응용 완충용액과 함께 혼합하여 합성하였다. i-NOS의 mRNA량을 측정하기 위하여, 표적 유전자에 대한 primer를 제작하여 사용하였고, e-Taq DNA 중합효소 키트와 primer를 사용해 Gene Atlas G02 gradient thermal cycler system (Astec Fukuoka, Japan)기기를 이용해 cDNA를 증폭시켰다. PCR 반응물은 형광염색제와 UV transilluminator로 확인했다.

[0050] 도 3에 도시된 바와 같이 슈단-Ⅶ를 2시간 전 처리 한 후 대식세포 주에 LPS로 6시간 동안 자극을 준 결과, LPS에 의해 자극된 대식세포에서 i-NOS의 발현이 증가하였으며 슈단-Ⅶ는 증가한 i-NOS의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰음을 알 수 있다. 이러한 결과는 슈단-Ⅶ이 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제할 수 있는 항염증 활성을 갖는다는 것을 보여준다.

[0051] 실험예 4

[0052] 슈단-Ⅶ이 LPS에 자극된 RAW 264.7에 의해 생성된 cytokine의 생산을 감소시키는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 슈단-Ⅶ을 처리한 후 LPS에 의해 자극된 대식세포주에서 사이토카인 생성량을 측정했고 그 결과를 도

4에 나타내었다.

[0053] 슈단-Ⅶ을 농도별로(0~6μM) 2시간동안 전 처리한 후, 200ng/ml의 LPS로 RAW 264.7 대식세포 주를 자극하여 22시간동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양한다. 이 후 배양액을 회수하여 TNF-α, IL-6, IL-1β를 ELISA kit(Biolegend, CA, USA)를 이용하여 사이토카인 생성량을 ELISA 마이크로 microplate reader로 450nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

[0054] 도 4에 도시된 바와 같이, LPS에 의해 자극된 대식세포로부터 생산된 TNF-α, IL-6은 슈단-Ⅶ의 전 처리에 의한 억제효과가 관찰되지 않았다. 반면, IL-1β는 슈단-Ⅶ의 전처리에 의해 유의성 있게 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 슈단-Ⅶ는 LPS에 의해 자극된 대식세포로부터 생산된 inflammatory cytokine인 TNF-α, IL-6의 생산을 억제하는 효과가 없는 반면, IL-1β의 생성은 슈단-Ⅶ에 의해 억제되어 항염증 활성을 유도하는 것을 알 수 있다.

[0055] 실험예 5

[0056] p38, JNK, ERK 같은 MAPK는 세포의 성장, 분열, 스트레스 그리고 사이토카인에 의한 세포반응의 조절 등에 중요한 역할을 하며, 전사요소의 활성을 통하여 염증 매개자를 조절하는 신호전달 경로에 관여한다. 염증 매개자에 대한 슈단-Ⅶ의 억제 효과의 분자기전을 확인하기 위하여, 대식세포에서 LPS에 유도된 MAPK 인산화 수준을 다음과 같이 단백질 검출 분석을 통해 확인하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0057] RAW 264.7 대식세포 주($3*10^6$ cells/dish, $8*10^6$ cells/dish)를 100mm culture dish에 배양하고, serum free media (DMEM)로 4시간 동안 starvation한 후 세포에 pseudane-Ⅶ(6μM)을 2시간 동안 처리한 후, 차가운 PBS를 이용해 2번 씻어낸 뒤, RIPA buffer(150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50mM Tris (pH 8.0), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2g/mL leupeptin, 1g/mL pepstatin, 1mM sodium orthovanadate, and 100mM sodium fluoride)를 이용하여 4℃에서 30분 동안 용해한 후, 용해된 세포를 원심분리기에서 4℃, 14,000xg로 15분간 원심분리를 하고, 핵과 세포질 분리는 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent를 사용하여 protocol에 따라 분리했다(Thermo Scientific, IL, USA). 세포 용해액으로부터 얻은 단백질을 BCA assay kit를 사용하여 정량하여 동량의 단백질 샘플은 10% SDS-PAGE을 통해 분리하고 PVDF membrane에 옮긴 후 실온에서 5% 탈지분유용액과 2% BSA에 1시간 30분 동안 반응시킨다. 반응 후, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1:2000으로 희석하고 사용하여 하루 동안 반응시킨다. HRP로 결합된 rabbit, mouse 항체를 (Santa Cruze Biotechnology) 2차 항체를 1:5000으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 밴드검출은 화학발광반응(ECL)법을 이용하여 x-ray 필름을 노출시켜 확인하였다.

[0058] 도 5에 도시된 바와 같이, 5분, 15분 동안 LPS에 의해 자극된 대식세포에서 JNK, p38, ERK의 인산화가 증가된 반면, 슈단-Ⅶ이 LPS에 의해 유도된 JNK, p38, ERK의 인산화를 억제하였음을 알 수 있다. 따라서, 상기 실험결과는 슈단-Ⅶ을 전 처리하게 되면 JNK, ERK 그리고 p38의 활성을 감소시키는 결과가 얻어지는 것을 보여준다.

[0059] 실험예 6

[0060] NF-κB는 염증성 사이토카인 및 i-NOS의 발현을 조절하는 등 다양한 분자의 세포 내 합성을 조절하는 전사인자이므로, 슈단-Ⅶ의 항염증 활성이 NF-κB의 활성화를 억제함으로써 일어난 것인지를 확인하기 위하여 슈단-Ⅶ을 전 처리하고, 30분, 60분, 120분 동안 대식세포에서 LPS에 유도된 MAPK 인산화 수준을 단백질 검출 분석을 통해 확인하고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0061] NF-κB는 염증 반응뿐만 아니라 다양한 면역 반응 및 종양 형성, 자가 면역질환에 관여하여 중요한 역할을 하게 된다. NF-κB는 Ⅰκ-Bα와 결합한 불활성 상태로 세포질에 존재하게 되는데 LPS와 같은 외부 자극이 받게 되면 Ⅰκ-Bα가 인산화를 통해 NF-κB와 분해하게 되고 분리된 NF-κB는 핵 내로 이동하여 NO 및 전염증성 사이토카인의 생산에 관여한다.

[0062] 도 6에 나타난 바와 같이, 세포질에서 p65의 인산화가 증가한 반면, 핵에서는 p65의 인산화가 감소하였다. 이는 슈단-Ⅶ을 전 처리하였을 때 NF-κB의 활성화에 따른 핵으로의 이동을 억제한다는 것을 보여주고 있다.

[0063] 이러한 결과는 LPS에 의해 유도된 대식세포에서 전염증성 사이토카인 생산에 대한 슈단-Ⅶ의 억제 효과가 JNK,

p38, ERK 그리고 NF-κB 신호전달 경로를 매개로 하여 일어난다는 것을 나타낸다할 것이다.

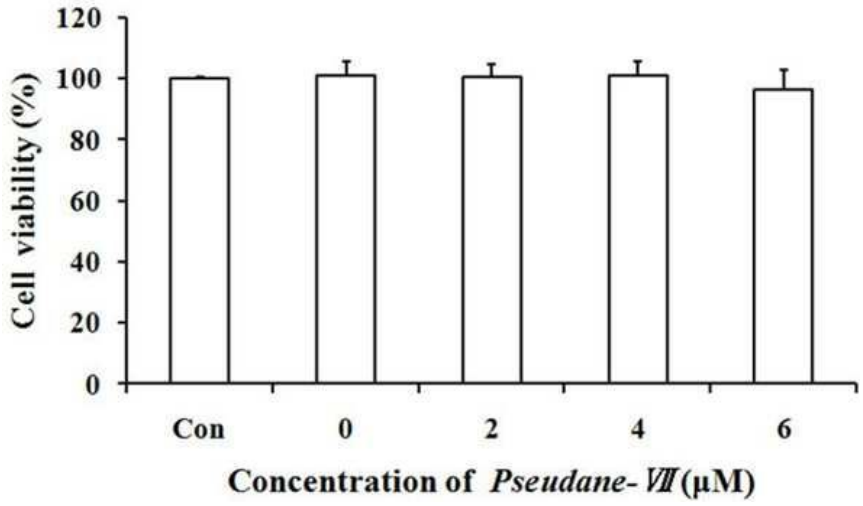
[0064] 이상의 실험결과들을 통해 본 발명에서는 슈단-Ⅶ이 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF-κB의 활성화를 억제하여 NO와 전염증성 사이토카인 특히 IL-1β를 억제함을 증명하였다.

[0065] 따라서, 본 발명의 슈단-Ⅶ 또는 그의 약학적으로 허용되는 염이 강력한 항염증성을 가지므로 이들이 염증질환 예방 및 증상 개선을 위한 새로운 약학조성물은 물론 기능성 식품 소재 또는 화장료 소재로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

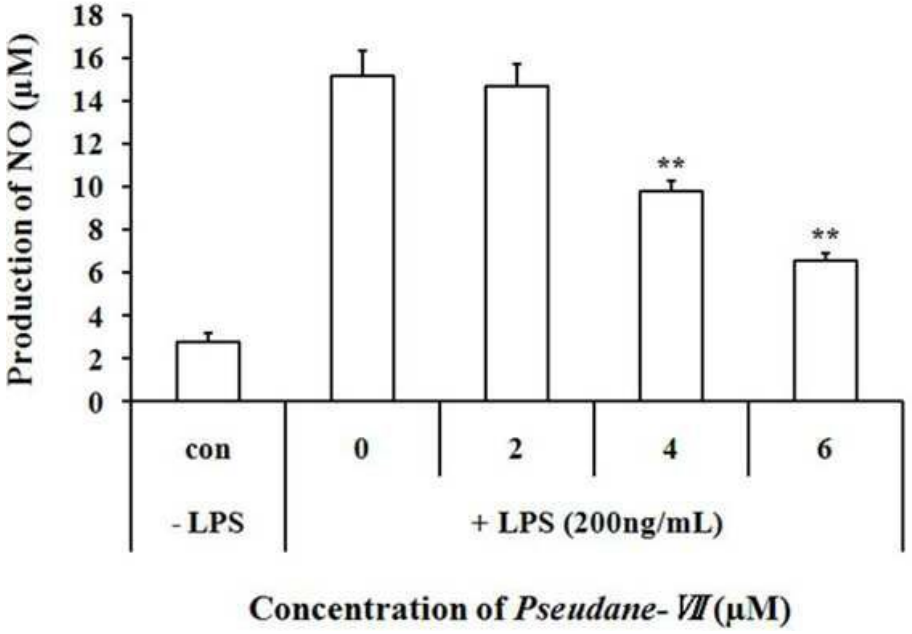
[0066] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

도면

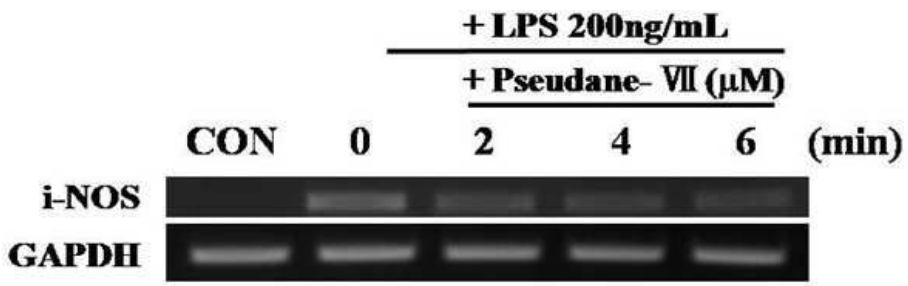
도면1



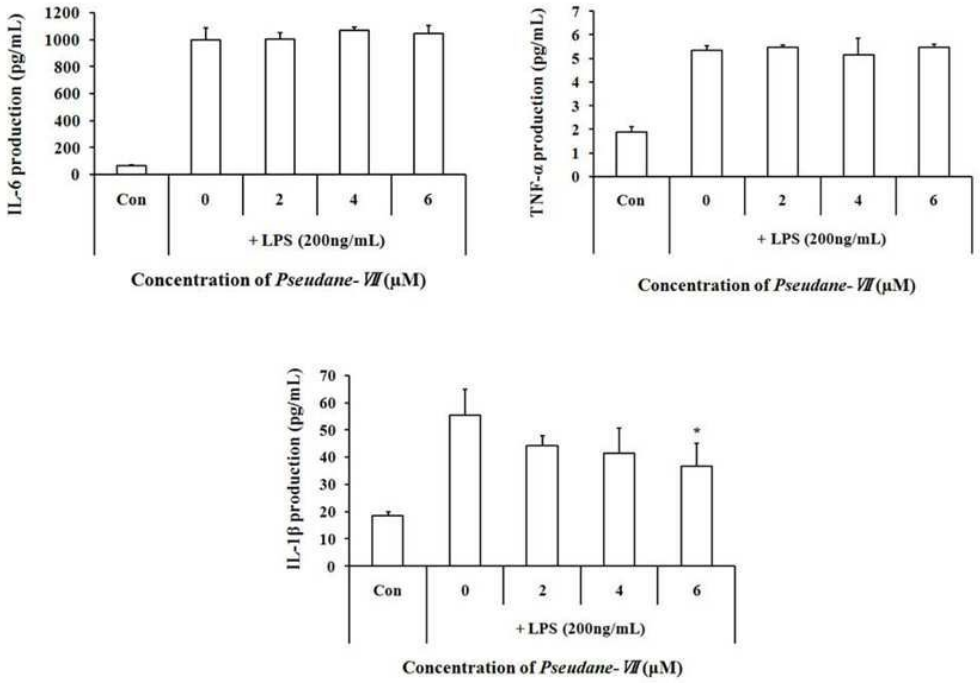
도면2


Production of NO (μM)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
**
con
0
2
4
6
- LPS
+ LPS (200ng/mL)
Concentration of Pseudane- Ⅶ (μM)

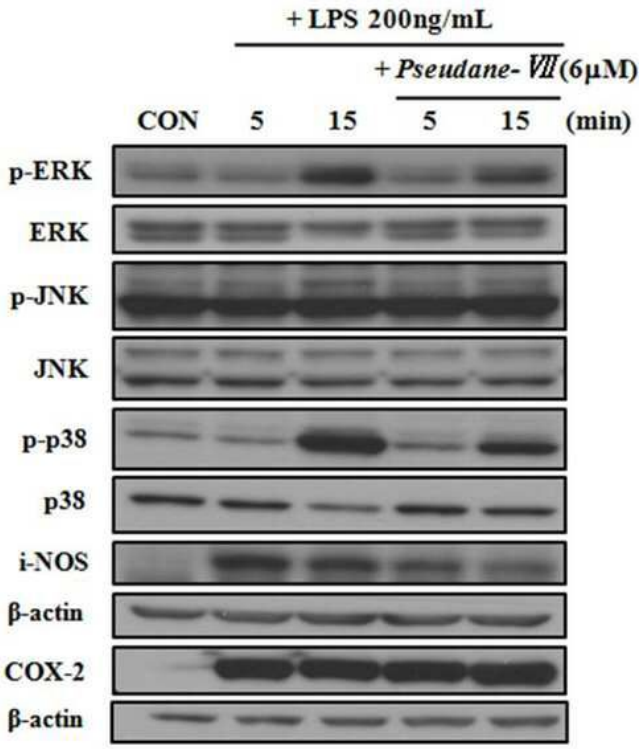
도면3


+ LPS 200ng/mL
+ Pseudane- Ⅶ (μM)
CON
0
2
4
6
(min)
i-NOS
GAPDH

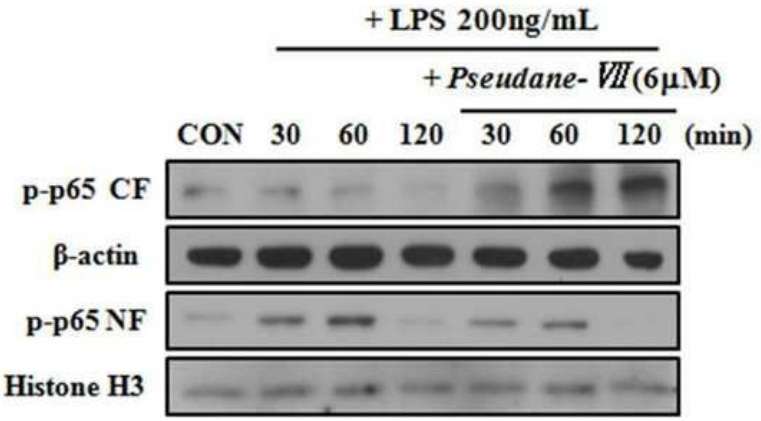
도면4


IL-6 production (pg/mL)
1200
1000
800
600
400
200
0
Con
0
2
4
6
+ LPS (200ng/mL)
Concentration of Pseudane-Ⅶ (μM)
TNF-α production (pg/mL)
7
6
5
4
3
2
1
0
Con
0
2
4
6
+ LPS (200ng/mL)
Concentration of Pseudane-Ⅶ (μM)
IL-1β production (pg/mL)
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Con
0
2
4
6
+ LPS (200ng/mL)
Concentration of Pseudane-Ⅶ (μM)

도면5


+ LPS 200ng/mL
+ Pseudane-Ⅶ (6μM)
CON
5
15
5
15
(min)
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-p38
p38
i-NOS
β-actin
COX-2
β-actin

도면6


+LPS 200ng/mL
+Pseudane-Ⅶ(6μM)
CON 30 60 120 30 60 120 (min)
p-p65 CF
β-actin
p-p65 NF
Histone H3