(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0040622
(43) 공개일자 2020년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/25 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/047 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/25 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0120764
(22) 출원일자 2018년10월10일
심사청구일자 2018년10월10일

(71) 출원인
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
(72) 발명자
김영란
광주광역시 남구 용대로74번길 11-1, 골든뜨레빌 102-202
박정업
광주광역시 북구 양산제로 110 연제주공 104동 208호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

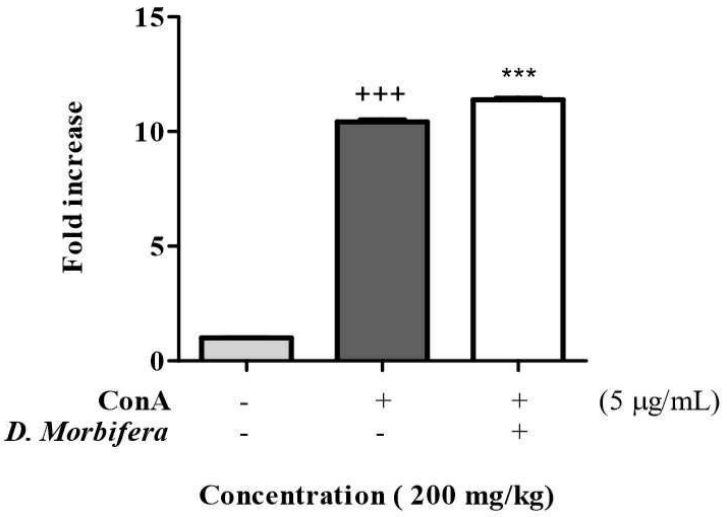
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **황칠나무 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 면역 활성성분을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 추출물, 분획물 및 이로부터 분리된 면역 활성성분은 비장세포의 증식능 및 IL-2, IFN-r 사이토카인의 생산을 증가시킨다. 특히, 에틸아세테이트 분획물은 $CD4^+$ T세포와 EL-4 T세포 증식 효과가 있다. 또한, 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 DMW-2 단일 성분은 IL-2 사이토카인 생산을 크게 증가시키고, T세포 증식에 관여하는 전사인자 IL-2, IL-4, NF-AT, AP-1, NF-kB 활성화 효과가 매우 우수하다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/047 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
(72) 발명자
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 인스빌리벨라 801-302
양서영
대전광역시 유성구 대학로 45, 705호
김선오
광주광역시 북구 양일로 52 대주 2차 201동 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 114024-03
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 전남대학교 산학협력단
연구사업명 농림부, 고부가가치 식품기술개발사업
연구과제명 황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기 개선 건강기능식품 원료 소재화 (Study to develop the product-specific functional food for anti-andropause using Dendropanax morbifera LEV.)
기 여 율 1/1
주관기관 (주) 새롬
연구기간 2014.08.01 ~ 2017.07.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 황칠나무잎 추출물은 물 및 탄소수 1 내지 3의 저급알코올로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 용매를 추출용매로 하는 것인, 면역조절 또는 면역증강용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 황칠나무잎 물 추출물 또는 알코올 추출물로부터, 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제하여 수득한 에틸아세테이트 추출 분획물을 포함하는 것인, 면역조절 또는 면역증강용 조성물.

청구항 4

(10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 ((10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol) 또는 이의 염(salts)을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것인, 면역조절 또는 면역증강용 조성물.

청구항 6

제 1 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것인, 면역조절 또는 면역증강용 조성물.

청구항 7

황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 항종양 면역성(antitumor immunity) 증진용 조성물.

청구항 8

황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 항암 조성물.

청구항 9

(10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 ((10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol) 또는 이의 염(salts)을 포함하는 항종양 면역성(antitumor immunity) 증진용 조성물.

청구항 10

(10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 ((10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol) 또는 이의 염(salts)을 포함하는 항암 조성물.

청구항 11

제 8 항 또는 제 10 항에 있어서, 상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암인 것인 조성물.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 화합물의 분리방법:

(a) 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera Lev. leaf*)을 극성용매로 추출하는 단계;

(b) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제하여 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득하는 단계; 및

(c) 에틸아세테이트 추출 분획물을 정제하여 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올을 수득하는 단계.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 극성용매는 물 및 탄소수 1 내지 3의 저급알코올로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 용매인 것인, 분리방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 다음과 같이 실시되는 것인, 분리방법:

(b-1) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 비극성 용매에 가용한 추출물만을 포함하는, 추출 분획물을 분리하여 제거하는 단계; 및

(b-2) 단계 (b-1)의 추출 분획물을 분리하고 남은 황칠나무잎 추출물로부터

에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 포함하는 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황칠나무 추출물을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 황칠나무잎 추출물로부터 분리된 활성성분인 DMW-2 또는 이들의 염(salts)을 유효성분으로 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 인체는 외부의 병원체 침입이 일어나면 이를 식별하고 제거하려는 면역작용을 통하여 몸을 보호하며 항상성을 유지하게 된다. 면역반응은 활성화된 면역세포가 항원에 대하여 일으키는 일련의 반응으로, 면역계는 감염 시 감염의 인지 및 체액성, 세포성 반응을 통하여 병원균을 제거하는 역할을 담당하며, 면역계가 제 기능

을 못할 때 감염성 질환뿐만 아니라 여러 질병들을 유도하게 된다.

[0003] 면역이란 항원에 대해 숙주를 방어하여 항원을 제거함으로써 자기방어를 하는 것으로 크게는 선천 면역과 후천 면역으로 구분된다. 선천 면역은 항원에 대한 비특이적인 반응으로 대식세포(macrophage), 자연살해세포(NK cell), 보체(complement) 등이 관여하여 면역반응을 일으킨다. 후천 면역은 처음 침입한 항원을 기억하여 다시 항원이 침입하게 되면 특이적으로 면역반응을 일으켜 항원을 제거하는 역할을 한다. 후천 면역은 체액성 면역과 세포성 면역으로 나누어지는데 체액 면역은 B 림프구가 관여하여 항원을 인지한 후, 항체를 분비하여 면역반응을 일으킨다. 세포성 면역은 흉선에서 유래한 T 림프구가 항원을 인지하여 사이토카인을 분비하거나 대식세포를 활성화시켜 면역반응을 유도한다.

[0004] 특히, T 세포에 의한 면역반응은 항원을 인식한 T 세포의 TCR 복합체(complex)와 또 다른 신호로부터 초기 신호가 세포 내로 전달된다. 이러한 신호의 전달 과정은 PKC 활성인자(activator)와 이오노포어(ionophore)의 작용으로 나타나서, T cell의 세포질 내에 Ca^{++} 이온을 증가시키게 된다. 또한, 여러 가지 단백질의 인산화(phosphorylation)과정을 거쳐 결국에는 그 신호가 핵에 전달된다. 이렇게 세포막에서 핵으로 전달된 초기 신호는 핵에서 T 세포의 증식과 분화에 필요한 여러가지 유전자의 발현으로 나타난다. 이러한 과정을 전사의 활성화(transcriptional activation)라고 하며, T세포 증식에 가장 큰 역할을 하는 NF-AT, NF-kB 및 AP-1의 전사가 일어난다. 또한, IL-2 사이토카인과 IL-2 수용체 유전자의 전사가 나타나게 된다. 이를 통하여, 새로운 사이토카인이 분비되어 T 세포의 증식과 분화가 이루어지게 된다. T 세포의 활성은 IL-2의 합성으로 연결되며, 분비된 IL-2는 T 세포의 증식을 유도한다. IL-2 는 T 세포 성장인자로서 T세포, B세포, 자연살해세포 등 면역세포를 활성화 시켜서 면역반응을 나타낸다. IL-2는 T 세포 표면에 존재하는 IL-2R에 결합하여 다양한 세포 내 반응을 유도한다. IL-2가 T 세포의 IL-2R와 결합하게 되면 T 세포의 분화가 일어나고 IFN-r (interferon-gamma)와 TNF (tumor necrosis factor)와 같은 사이토카인들이 유리되어 면역반응에 영향을 주게 된다. 또한 단핵구(monocyte)에서 IL-1, IL-6, TNF 분비를 증가시킨다.

[0005] 그러나 이러한 면역기능이 저하되면 체내 사이토카인의 불균형, T/B세포의 증식 불균형 등의 원인으로 면역 조절에 장애가 발생한다. 이로써 천식, 비염, 알러지성 비염, 아토피성 피부염, 과민성 피부염, 감기, 만성피로 등 다양한 면역질환이 발생할 수 있다. 따라서 인체의 면역반응은 균형 및 조절이 정상적으로 이루어져야 건강을 유지할 수 있으므로 면역 조절은 치료보다 예방이 더욱 중요하다. 그러나 현재 시판되고 있는 치료제는 예방을 위하여 복용하기에는 부작용의 가능성이 있는 면역증강제이기 때문에, 면역기능 장애를 예방 및 치료할 수 있는 물질이 필요하다.

[0006] 이를 위하여, 부작용이 적은 천연물로부터 면역 활성을 조절할 수 있는 성분을 찾고 이를 이용하여 면역 활성을 조절할 수 있는 제제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 대한민국 공개특허 제 10-2015-0051174 호에는 느릅나무 수피의 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물이 공개되어있고, 대한민국 등록특허 제 10-1536652 호에는 울금 추출물을 포함하는 면역증강용 조성물이 개시되어 있다.

[0007] 예부터 황칠나무(*Dendropanax morbifera Lev.*)는 두릅 나무과 (오갈피나무과) 황칠나무속이다. 한국 특산종으로서 전라남도 바닷가와 및 제주도의 바닷가와 섬의 그늘지고 습한 활엽수림 또는 산비탈의 관목림 속에 자라는 늘 푸른 큰기 나무이다. 잎은 표면에 털이 없고 매끈하며 어긋나고 달걀형 또는 타원형으로 잎몸이 전혀 갈라지지 않거나 3-5갈래로 손가락처럼 깊게 갈라지는 것도 있다. 우리나라의 황칠 나무의 분포도를 보면 제주도, 전남 완도, 대흑산도, 거문도 등 바닷가 일대에서 많이 자라고 있다. 황칠의 속명인 덴드로파낙스(*Dendropanax*)는 그리스어의 덴드로(dendro, 나무)와 파낙스(panax, 전지전능한 약)의 합성어이다. 황칠나무의 학명인 덴드로파낙스 모비페라는 만병통치나무라는 뜻을 가지고 있으며 나무 인삼이라고 불리우기도 한다. 또한 황칠이라는 이름은 황칠나무껍질에 상처를 내면 노란색의 액체가 마치 옻나무의 옻칠처럼 나온다고 하여 붙여진 이름이며 황칠은 공예품을 만드는 과정에서 표면을 가공하거나 색을 칠할 때 사용하고, 황제의 옷인 곤룡포, 나전칠기, 고려 불상 외 각종 가구 및 금속 등에 다양하게 사용되어져 왔다. 한국 본초 도감에 따르면 황칠나무의 뿌리와 줄기는 맛이 달고 성질은 따뜻하며 거풍습과 황혈맥 등에 효능이 있다.

[0008] 또한 최근 연구에 따르면 황칠과 황칠 속 단일 성분이 항균, 항암, 고지혈증, 항혈전 항염증 효과 및 항산화 효과 등의 약리효과가 밝혀지면서 더욱 관심을 가지고 많은 소재로 이용되고 있다. 황칠의 면역증강효과와 관련하여, 대한민국 공개특허 제10-2015-0144061호에서는 황칠나무 줄기 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 개시하고 있다. 그러나 황칠나무 속 단일 성분들의 면역조절효과에 대해서는 정확히 보고된 바가 없다.

[0009] 황칠나무 분획물 및 황칠나무 속 단일성분이 후천 면역에 관련되는 T 세포의 증식에 도움을 주고 면역 활성을

증가 시킨다는 연구 결과는 미미한 실정이다. 이에 본 발명자는 황칠나무가 T 세포의 증식을 통하여 면역 작용을 활성화시켜 면역 증강에 도움이 되는지 확인하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 면역조절 또는 면역증강을 위한 식물-유래의 면역 활성화 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 황칠나무잎 추출물, 또는 황칠나무잎 추출물로부터 분리된 활성물질인 DMW-2를 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 개발하게 되었다.

[0011] 본 발명자들은 황칠나무 잎 추출물과 추출물에서 분리한 에틸아세테이트 분획물이 T 세포의 증식 활성화, T 세포 증식에 관여하는 전사인자 NF-AT, AP-1, NF-kB 증가 및 IL-2 사이토카인 생산 증가 효과로서, 면역조절 또는 면역증강에 매우 유효하다는 것을 발견하였다.

[0012] 한편, 상기 에틸아세테이트 분획물로부터 분리된 화합물인 DMW-2 ((10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올)는 T 세포 증식 활성화는 시키지 않지만, IL-2 사이토카인 생산을 크게 증가시켰다. 또한, T 세포 증식에 관여하는 전사인자 IL-2, IL-4, NF-AT, AP-1, NF-kB 활성화 효과가 매우 뛰어났다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 항종양 면역성(antitumor immunity) 증진용 조성물 또는 항암 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 화합물의 분리 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태는, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명자들은 면역조절 또는 면역증강을 위한 식물-유래의 면역 활성화 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 황칠나무잎 추출물, 또는 황칠나무잎 추출물로부터 분리된 활성물질인 DMW-2를 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 개발하게 되었다.

[0018] 본 발명자들은 황칠나무잎 추출물과 이 추출물에서 분리한 에틸아세테이트 분획물이 T 세포의 증식 활성화, T 세포 증식에 관여하는 전사인자 NF-AT, AP-1, NF-kB 증가 및 IL-2 사이토카인 생산 증가 효과로서, 면역조절 또는 면역증강에 매우 유효하다는 것을 발견하였다.

[0019] 한편, 상기 에틸아세테이트 분획물로부터 분리된 면역증강 활성 물질은 다음과 같다.

[0020] DMW-2: (10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol; (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올.

[0021] DMW-2 는 T 세포 증식을 활성화 시키지 않지만, IL-2 사이토카인 생산을 크게 증가시켰다. 또한 T 세포 증식에 관여하는 전사인자 IL-2, IL-4, NF-AT, AP-1, NF-kB 활성화 효과가 매우 뛰어났다.

[0023] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0024] 본 발명의 황칠나무잎 추출물은 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera Lev. leaf*)을 건조 및 세절한 후, 추출용매로서 극성 용매 (예를 들어, 증류수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등)를 가하여, 80℃-120℃로 가열하여 추출할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 2-8시간 동안 80℃-120℃로 가열하여 추출할 수 있다.

[0025] 본 발명의 추출방법에서 사용되는 극성 용매는, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethyl-formamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 극성 용매는 물 및 탄소수 1 내지 3의 저급알코올로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 용매이다. 본 발명의 다른 구현에에 따르면, 상기 극

성용매는 물, 메탄올 또는 에탄올이다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 황칠나무잎에 극성용매를 가하여 90℃-110℃에서 3-5시간동안 추출할 수 있다.

[0027] 본 발명의 특정 구현에에 따르면, 황칠나무잎에 극성용매를 가하여 95℃-105℃에서 3-5시간동안 추출할 수 있다.

[0028] 본 발명의 특정 구현에에 따르면, 황칠나무잎에 극성용매를 가하여 95℃-105℃에서 4시간동안 추출할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 황칠나무 잎 추출시, 열수 추출법, 환류추출법, 상온 추출법 또는 초음파 추출법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 열수추출법 또는 환류추출법을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 황칠나무 잎을 증류수로 추출하여, 여과, 감압 농축, 및 건조하였다.

[0031] 한편, 본 발명의 조성물은 황칠나무잎 물 추출물 또는 알코올 추출물로부터, 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제하여 수득한 에틸아세테이트 추출 분획물을 포함할 수 있다.

[0032] 예를 들어, 황칠나무잎 물 추출물 또는 알코올 추출물 중량의 약 0.001 내지 100배, 바람직하게는 1 내지 50배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

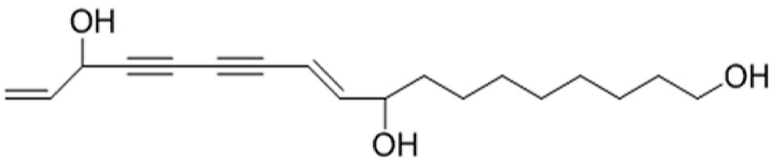
[0033] 이어, 부탄올, 물 등의 극성용매에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0034] 본 발명자들은 EL-4 T 세포 증식능 반응성 측정 실험을 통하여, 황칠나무잎 물추출물 및 5가지의 분획물(헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물)이 T 세포 증식을 활성화시키는 것을 확인하였다. 그 중에서 에틸아세테이트 분획물이 $CD4^+$ T세포와 EL-4 T세포 증식에 매우 뛰어난 것을 확인하였다.

[0035] 본 발명의 조성물은 황칠나무잎 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로서 실시될 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 양태는, 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물 또는 이의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물에 관한 것이다:

[0038] [화학식 1]

[0039] 

.

[0041] 상술한 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 화학식 1의 화합물은 T 세포 증식을 활성화 시키지 않았지만, IL-2 사이토카인 생산을 크게 증가시켰다. 또한 T 세포 증식에 관여하는 전사인자 IL-2, IL-4, NF-AT, AP-1, NF-kB 활성화 효과가 매우 뛰어났다. 이를 바탕으로 상기 본 발명의 조성물은 화학식 1의 화합물을 포함하는 면역 조절 또는 면역증강용 조성물로 사용할 수 있다.

[0042] 화학식 1의 화합물명은 다음과 같다:

[0043] DMW-2: (10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol; (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올.

[0044] 본 발명의 조성물에 포함된 상기 화합물 또는 이의 염(salts)의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 또는 이의 염(salts)을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로서 실시될 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 황칠나무잎 추출물, 이의 분획물, 분획물로부터 분리된 화학식 1의 화합물 또는 이의 염(salts)의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본

발명의 조성물에 포함된 황칠나무잎 추출물, 이의 분획물 또는 화합물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 화합물은 그 자체 또는 염(salts)의 형태, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으 로는 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산은 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산 및 아스파르트산 등을 포함하며 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 포함하며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 조성물에 포함된 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올은, 천연식물재료인 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)로부터 분리한 화합물이다. 황칠나무잎은 오랫동안 식용 및 민간약으로 사용되어 왔던 것이므로 이로부터 분리된 본 발명의 화합물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없을 것으로 예상할 수 있다. 따라서, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 또는 이의 염(salts)은 의약품 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.

[0050] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0051] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0052] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-10000 ㎎/㎏이다.

[0053] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 식품 조성물일 수 있다.

[0055] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우에는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[0056] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물, 에틸아세테이트 분획물, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 또는 이의 염(salts)뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 추출물 또는 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 다른 양태는, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물을 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 면역조절 또는 면역증강 방법에 관한 것이다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태는, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 및 이의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 조성물을 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 면역조절 또는 면역증강 방법에 관한 것이다.

[0060] 본 명세서에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상(subject)에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명의 피부 색소침착 치료, 억제 또는 개선용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.

[0061] 본 명세서에서 용어 "대상(subject)"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0062] 본 발명의 다른 양태는, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 항종양 면역성(antitumor immunity) 증진용 조성물에 관한 것이다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태는, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 ((10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol) 또는 이의 염(salts)을 포함하는 항종양 면역성(antitumor immunity) 증진용 조성물에 관한 것이다.

[0064] 본 발명의 추출물, 분획물 및 이로부터 분리된 면역 활성성분은 비장세포의 증식능 및 IL-2, IFN-γ 사이토카인의 생산을 증가시킨다. 특히, 에틸아세테이트 분획물은 $CD4^+$ T세포와 EL-4 T세포 증식 효과가 있다. 또한, 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 DMW-2 단일 성분은 IL-2 사이토카인 생산을 크게 증가시키고, T세포 증식에 관여하는 전사인자 IL-2, IL-4, NF-AT, AP-1, NF-kB 활성화 효과가 매우 우수하였다.

[0065] IL-2 는 T 세포 성장인자로서 T 세포, B 세포, 자연살상세포(NK cells), 또는 림포카인-활성 살상 세포(lymphokine-activated killer cells)와 같은 면역세포를 활성화시켜 면역증강 및 항암효과를 나타낸다.

[0066] 본 발명의 다른 양태는, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

[0067] 본 발명의 또 다른 양태는, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 ((10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol) 또는 이의 염(salts)을 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

[0068] 상기 암은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 신장암, 배수성암(polyploid carcinoma), 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암을 포함한다.

[0069] 본 발명의 항종양 면역성 증진용 또는 항암 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 종양 내(intratumorally) 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0070] 본 발명의 항종양 면역성 증진용 또는 항암 조성물은 상술한 본 발명의 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물 또는 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 ((10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol)을 이용하는 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0072] 본 발명의 또다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 화합물의 분리방법에 관한 것이다:

[0073] (a) 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)을 극성용매로 추출하는 단계;

[0074] (b) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제하여 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득하는 단계; 및

[0075] (c) 에틸아세테이트 추출 분획물을 정제하여 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올을 수득하는 단계.

[0076] 이하, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 화합물의 분리방법에 대하여 상세히 설명한다.

[0077] 단계 (a): 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)의 추출물 제조

[0078] 우선, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)에 극성용매를 가하여 추출한다.

[0079] 황칠나무잎 추출물을 수득하는 방법은 상술한 바와 같다.

[0080] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 극성용매는 물 또는 탄소수 1 내지 3의저가 알코올이다.

[0081] 본 발명의 특정 구현에에 따르면, 황칠나무잎에 물 또는 메탄올을 가하여 80℃-120℃로 가열하여 추출물을 수득할 수 있다.

[0082] 단계 (b): 에틸아세테이트 추출 분획물 제조

[0083] 이어, 상기 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제함으로써, 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득한다.

[0084] 본 발명의 일 구현예에 따르면 황칠나무잎 추출물 중량의 약 0.001 내지 100배, 바람직하게는 1 내지 70배, 더욱 바람직하게는 50배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 등의 비극성 용매를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0085] 본 발명의 분리방법에서 사용되는 비극성 용매는, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토나이트릴, 메틸아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비극성 용매는 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 디클로로메탄이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 단계 (b)에서는 비극성 유기용매로서 (i) 헥산, 클로로포름, 및 에틸아세테이트를 순차적으로 이용하여 분배 분획물을 수득하거나; 또는 (ii) 디클로로메탄 및 에틸아세테이트를 순차적으로 이용하여 분배 분획물을 수득한다.

[0086] 한편, 비극성 용매를 이용한 분획물을 수득한 이후 남은 황칠나무잎 추출물로부터, 극성용매(예를 들어, 부탄올, 물 등)에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0087] 본 발명의 분리방법에서 사용되는 극성 용매는, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethyl-formamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 극성 용매는 물 또는 알코올이다. 본 발명의 특정 구현에에 따르면, 황칠나무잎 추출물에 부탄올을 가한 후 부탄올층과 수층의 분획물을 수득하였다.

[0088] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 다음과 같이 실시될 수 있다:

[0089] (b-1) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 비극성 용매에 가용한 추출물만을 포함하는, 추출 분획물을 분리하여 제거하는 단계; 및

[0090] (b-2) 단계 (b-1)의 추출 분획물을 분리하고 남은 황칠나무잎 추출물로부터

[0091] 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 포함하는 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득하는 단계.

[0093] 단계 (c): (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 정제

[0094] 이어, 단계 (b)에서 수득한 에틸아세테이트 추출 분획물을 정제하여 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올을 얻는다.

[0095] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 정제단계 (c)에서는 공지된 다양한 정제방법을 이용할 수 있으며, 예컨대 컬럼

크로마토그래피 및 박층크로마토그래피를 이용할 수 있다.

[0096] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 에틸아세테이트 추출 분획물을 컬럼에 로딩한 후, 비극성용매-극성용매의 용매 구배(gradient)를 이용하여 컬럼 크로마토그래피 정제를 실시할 수 있다.

[0097] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 클로로포름-메탄올의 용매 구배를 이용하여 정제된 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수 있다.

[0098] 상기 정제된 에틸아세테이트 분획물은 비극성 용매를 이동상으로 컬럼 크로마토그래피를 반복수행함으로써 화합물 DMW-2를 분리할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 정제된 에틸아세테이트 분획물을 실리카겔 및 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복수행하여, 화합물 DMW-2를 분리하였다.

[0099] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 비극성 유기용매로서 헥산-아세톤을 이용할 수 있다.

[0100] 한편, 상기 정제된 에틸아세테이트 분획물은 극성 용매를 이동상으로 컬럼 크로마토그래피를 반복수행함으로써 화합물 DMW-1 (methyl(10E)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoate)을 분리할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 정제된 에틸아세테이트 분획물을 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복수행하여, 화합물 DMW-1을 분리하였다.

[0101] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 극성 유기용매로서 메탄올-물을 이용할 수 있다.

[0102] 단계 (c)에서 이용가능한 극성 용매 또는 비극성 용매는 상술한 바와 같다.

발명의 효과

[0103] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0104] 본 발명은 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 면역 활성성분을 포함하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

[0105] 본 발명의 추출물, 분획물 및 이로부터 분리된 면역 활성성분은 비장세포의 증식능 및 IL-2, IFN-γ 사이토카인의 생산을 증가시킨다.

[0106] 특히, 에틸아세테이트 분획물은 $CD4^+$ T세포와 EL-4 T세포 증식 효과가 있다. 또한, 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 DMW-2 단일 성분은 IL-2 사이토카인 생산을 크게 증가시키고, T세포 증식에 관여하는 전사인자 IL-2, IL-4, NF-AT, AP-1, NF-kB 활성화 효과가 매우 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1은 황칠나무 잎 추출물을 3주간 투여한 후 마우스 비장 내 T 세포의 증식능에 미치는 영향과 IL-2 및 IFN-γ 사이토카인 생성 정도를 나타낸다.

도 2a는 황칠나무 잎 추출물 및 분획물이 EL-4 T 세포 증식능에 미치는 영향을 나타낸다.

도 2b-2c는 각각 황칠나무 잎 추출물 및 분획물이 비장세포 또는 마우스 $CD4^+$ T 세포의 증식능에 미치는 영향을 나타낸다.

W-Ex: 황칠나무 잎 추출물

W-Hex: 황칠나무 잎 추출물로부터 수득한 n-헥산 분획물

W-CH: 황칠나무 잎 추출물로부터 수득한 클로로포름 분획물

W-EA: 황칠나무 잎 추출물로부터 수득한 에틸아세테이트 분획물

W-Bu: 황칠나무 잎 추출물로부터 수득한 n-부탄올 분획물

W-W: W-Hex, W-CH, W-EA, 및 W-Bu을 제외한 수층 분획물

도 3a는 황칠나무 잎 추출물(W-Ex) 및 에틸아세테이트 분획물(W-EA) 속 단일성분인 DMW-2의 구조를 나타낸다.

도 3b-3c는 황칠나무 잎 추출물 W-Ex) 및 에틸아세테이트 분획물(W-EA) 속 단일성분인 DMW-2의 LC/MS/MS 분석결과를 나타낸다.

도 4a는 황칠나무 잎 추출물(W-Ex), 에틸아세테이트 분획물(W-EA), 및 황칠나무 잎 추출물 속 단일성분인 DMW-2가 T 세포 증식능에 미치는 영향을 나타낸다.

도 4b-4c는 황칠나무 잎 추출물(W-Ex), 에틸아세테이트 분획물(W-EA), 및 황칠나무 잎 추출물 속 단일성분인 DMW-2가 T 세포의 IL-2 및 IFN-γ 사이토카인 생성수준에 미치는 영향을 나타낸다.

도 5a-5e는 황칠나무 잎 추출물 속 단일성분이 T 세포에 관여하는 전사인자 NF-AT, AP-1, NF-kB와 IL-2, 및 IL-4 활성화에 미치는 영향을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0109] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0111] **실시예 1: 황칠나무잎 추출물의 제조**

[0112] 황칠나무 잎은 대한민국 전라남도 장흥 원산지로부터 구매하여 사용하였다. 건조된 황칠나무 잎 1 kg에 증류수 10 L를 가하여 100℃에서 가열하여 1회 추출을 행한 후, 여과지로 여과하고 감압 농축(~ 40℃, 670 mmHg) 하였다. 감압 농축한 황칠나무 잎 추출물을 동결 건조하여 -20℃에서 보관하였다 (이하, "W-Ex"라 함).

[0114] **실시예 2: 황칠나무잎 물추출물로부터 극성용매 및 비극성용매 가용 분획물의 제조**

[0115] 2-1. 황칠나무잎 물추출물로부터 n-헥산 분획물의 제조

[0116] 실시예 1에서 얻은 황칠나무잎 물추출물(W-Ex) 20 g을 증류수 1 L에 현탁 (suspension) 시켰다. 이후, 현탁액을 분획깔때기에 넣고 n-헥산 1 L를 가하여 잘 흔들어 준 후 분획추출을 하였다. 약 12시간 후에 n-헥산 분획 추출된 상등액을 취하여 n-헥산 분획물을 얻었다 (이하, "W-Hex"라 함). 분획 과정은 2회 반복하였고, 이후 상등액을 모두 감압 농축하고, 동결 건조하여 533 mg을 얻었다.

[0117] 2-2. 황칠나무잎 물추출물로부터 클로로포름 분획물의 제조

[0118] 실시예 2-1 에서 n-헥산층을 분리하고 남은 황칠나무잎 물추출물 현탁액에 클로로포름 1 L를 넣어준 후 잘 흔들어 분획 추출을 하였다. 약 12시간 후에 클로로포름 분획 추출물을 얻었다 (이하, "W-CH"라 함). 분획 과정은 3회 반복하였고, 이후 분획물을 모두 감압 농축하고, 동결 건조하여 62.2 mg을 얻었다.

[0119] 2-3. 황칠나무잎 물추출물로부터 에틸아세테이트 분획물의 제조

[0120] 실시예 2-2 에서 클로로포름 층을 분리하고 남은 황칠나무잎 물추출물 현탁액에 에틸아세테이트 1 L를 넣어준 후 잘 흔들어 분획 추출을 하였다. 약 12시간 후에 에틸아세테이트 분획 추출물을 얻었다 (이하, "W-EA"라 함). 분획 과정은 3회 반복하였고, 이후 분획물을 모두 감압 농축하고, 동결 건조하여 350 mg을 얻었다.

[0121] 2-4. 황칠나무잎 물추출물로부터 n-부탄올 분획물의 제조

[0122] 실시예 2-3 에서 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 황칠나무잎 물추출물 현탁액에 n-부탄올 1 L를 넣어준 후 잘 흔들어 분획 추출을 하였다. 약 12시간 후에 n-부탄올 분획 추출물을 얻었다 (이하, "W-Bu"라 함). 분획 과정은 2회 반복하였고, 이후 분획물과 남은 수층은 모두 감압 농축하고, 동결 건조하여 n-부탄올층 2.08 g, 수층 13 g을 얻었다.

[0124] **실시예 3: 화합물의 분리**

[0125] 건조하여 세절된 황칠나무잎(*Dendropanax Morbifera Leveille leaf*) 3.0 kg을 100% 메탄올 10 L로 3시간동안 3회 환류 추출하였다. 이어 추출물을 여과하여 얻은 추출액을 감압농축하여 메탄올 엑스 470 g을 수득하였다.

[0126] 수득한 메탄올엑스 470 g에 증류수 2 L 및 디클로로메탄 2 L를 가하고 진탕하여 디클로로메탄층(A)과 수층(B)으

로 분획하였다. 이후, 디클로로메탄층을 감압농축하여 디클로로메탄 분획물 159 g을 수득하였다.

[0127] 상기 분획된 수층 (B) 2 L 에 에틸아세테이트 2 L를 가하고 진탕하여 에틸아세테이트층과 수층(C)으로 나눈 다음, 에틸아세테이트층을 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물 21 g을 수득하였다.

[0128] 상기 분획된 수층 (B) 2 L 에 부탄올 2 L를 가하고 진탕하여 부탄올층과 수층으로 나눈 다음, 부탄올층과 수층을 각각 감압농축하여 부탄올 분획물 56 g 및 수가용성 분획물 145 g을 수득하였다.

[0129] 상기 수득한 에틸아세테이트 분획물을 실리카겔 컬럼에 로딩한 후, 클로로포름과 메탄올을 이동상으로 하여 용매 구배 (클로로포름-메탄올; 1:0, 60:1, 30:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:1)로 용출하여 10 개의 에틸아세테이트 분획물 (EA1 ~ EA10)을 얻었다.

[0130] 얻어진 EA3 분획 900 mg을 실리카겔 컬럼에 로딩한 후, 헥산과 에틸아세테이트를 이동상으로 하여 용매 구배 (헥산-에틸아세테이트; 3:1 ~ 1:6)로 기울기 용리하여 8 개의 분획물 (EA3A ~ EA3H)을 얻었다.

[0131] 얻어진 EA3C 분획 70 mg을 MeOH-물 (3:1) 로 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복 수행하여 5.3 mg의 화합물 DMW-1을 수득하였다.

[0132] 얻어진 EA3D 분획 238 mg을 n-헥산-아세톤 (1:1) 으로 실리카겔 및 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복수행하여 6.2 mg의 화합물 DMW-2를 수득하였다.

[0134] **실시예 4: 화합물 DMW-1과 DMW-2의 구조 분석**

[0135] 상기 실시예 3에서 수득한 화합물 DMW-1의 HR-MS 스펙트럼 (Agilent 6530 accurate mass QTOF LC/MS)을 측정하여($[M^+NH_4]^+$ m/z 336.2167, calcd for 336.2175), $C_{19}H_{26}O_4$의 분자식을 추정하였다. ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HMBC, HSQC 및 COSY 스펙트럼을 통해서 화합물 DMW-1은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 확인되었다. DMW-1은 폴리아세틸렌계 신규화합물인 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트로 규명하였다.

[0136] 화합물 DMW-2의 HR-MS 스펙트럼을 측정하여($[M^+HCOO]^-$ m/z 335.1872, calcd for 335.1858), $C_{18}H_{26}O_3$의 분자식을 추정하였다. ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HMBC, HSQC 및 COSY 스펙트럼을 통해서 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 즉 프루티코트리올(fruticotriol)인 것으로 규명하였다.

[0137] 하기 표 1에 화합물 DMW-1과 DMW-2의 물성치를 나타내었다.

표 1

[0138]

-	-	화합물 1	-	화합물 2
위치	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	176.0	-	63.0	3.56, t (6.7)
2	34.8	2.34, t (7.5)	33.7	1.59*, m
3	26.0	1.62, m	26.9	1.37*, m
4	30.4	1.35*, m	30.7	1.37*, m
5	30.3	1.35*, m	30.6	1.37*, m
6	30.1	1.35*, m	30.5	1.37*, m
7	26.3	1.43*, m	26.4	1.54*, m
8	37.8	1.51, dt (11.7, 3.6)	37.8	1.53*, m
9	72.4	4.13, dtd (7.2, 5.7, 1.6)	72.5	4.14, m
10	151.9	6.34, dd (15.9, 5.7)	151.9	6.34, dd (15.9, 5.6)
11	108.4	5.79, ddd (15.9, 1.6, 0.9)	108.4	5.79, ddd (15.9, 1.6, 0.8)
12	78.0	-	78.0	-
13	74.0	-	74.0	-
14	70.6	-	70.6	-
15	82.2	-	82.2	-
16	64.0	4.96, dd (5.4, 1.1)	64.0	4.93, dd (5.5, 1.1)
17	138.1	5.94, ddd (17.1, 10.2, 5.4)	138.1	5.95, ddd (17.0, 10.2, 5.5)

18	116.6	5.42, d (17.1)5.22, d (10.2)	116.6	5.43, d (17.1) 5.22, d (10.2)
OCH_3	52.0	3.67, s	-	-

[0139] * 신호가 중첩됨.

[0141] **실시예 5: 실험동물 및 사육조건**

[0142] 본 발명에서는 5주령과 7주령의 자성 BALB/c 마우스를 다물 사이언스에서 구입하여, 1일간 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험동물실의 환경은 표준적인 사육조건으로서 온도는 23±3℃, 습도는 40-60%, 명암 주기는 12시간으로 유지되며, 실험동물전용사료와 음수는 제한 없이 공급하였다. 본 발명의 모든 동물실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

[0144] **실시예 6: 황칠나무 물 추출물의 세포성 면역반응에 대한 효과**

[0145] 3 주간 황칠나무 물 추출물을 주기적으로 투여한 후 면역 증진효과를 나타내는지 조사하기 위하여 T 세포에 의한 세포성 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실시예에서는 5주령의 자성 BALB/c 마우스 10마리를 다물 사이언스에서 구입하여, 1일간 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험동물 및 사육조건은 앞에서 언급한 실시예 3 과 동일하다.

[0146] 본 발명에서는 황칠나무 잎 물추출물을 주기적으로 투여하였을 때 면역 증진효과를 나타내는지 조사하기 위하여, 마우스 비장 내 T 세포의 세포성 면역반응을 조사하였다. 본 실험은 정상대조군, 황칠나무 잎 추출물 200 mg/kg 투여군으로 2개 군으로 구성하였으며 군 당 5마리씩 실험을 진행하였다. 모든 식이와 음수는 자유 공급하였다. 실험은 총 3주 동안 진행되었으며, 3주 뒤에 희생시켰다. 황칠나무 잎 추출물은 3주 동안 매일 복강내 주사하였다.

[0147] 3 주째에 마우스 비장을 적출하여, 멸균된 페트리 디쉬에 상기 비장 조직을 옮기고, 50 μm 세포 스트레이너(cell strainer)를 이용하여 비장을 갈아 조직으로부터 세포를 분리하였다. 모든 내용물을 15 mL 튜브에 옮기고 RPMI 배지로 가득 채운 후, 1200 RPM에서 5분간 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거한 펠렛에 적혈구 용해버퍼(red blood cell lysis buffer)를 1 마리당 3 mL씩 넣고 잘 섞어서 적혈구를 용혈시킨 뒤, 1500 RPM에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 펠렛을 PBS로 2회 세척한 후, RPMI 배지에 부유시켜 비장세포를 분리하였다.

[0148] 분리된 비장세포를 2 X 10^6 cells/mL로 24 웰 플레이트에, 0.5 X 10^5 cells/mL로 96 웰 플레이트에 분주하고 ConA (5 μg/mL)을 48시간 동안 처리하였다. 그 후에 96 웰 플레이트의 경우 MTT시약을 처리하여 세포의 증식능을 확인하였고, 24 웰 플레이트에서는 상등액을 취한 후, 상등액을 R&D system ELISA 키트 (Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0149] 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 황칠나무 잎 추출물 200 mg/kg 투여군에서 정상 대조군보다 세포의 증식능이 현저하게 증가된 것을 확인하였다. 또한 도 1b와 도 1c에서 보는 바와 같이, 대조군에 비해 황칠나무 잎 추출물 200 mg/kg을 처리한 군에서 IL-2, IFN-r이 현저하게 증가하였다.

[0150]

[0151] **실시예 7: 실험동물의 비장세포 및 $CD4^+$ T세포의 분리 및 증식능 확인**

[0152] 7-1. 마우스 비장으로부터 비장세포의 분리

[0153] 동물에서 비장세포 배양 및 T세포의 증식능을 확인하기 위하여, 동물에서 분리한 비장은 PBS로 세척한 후 50 μm 세포 스트레이너 (BD Falcon, San Diego, CA, USA)를 사용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 단일 세포 부유액을 10% FBS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 0.1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 RPMI-1640 (Welgene, Daegu, Korea)으로 세척 후 적혈구 용해버퍼로 적혈구를 용혈시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 웰 플레이트에 각 웰당 1 X 10^6 cells/mL을 150 μL씩 분주하였다.

[0154] 7-2. 마우스 비장 및 림프절에서 $CD4^+$ T세포의 분리

[0155] 동물에서 $CD4^+$ T 세포 배양 및 T세포의 증식능을 확인하기 위하여, 동물에서 분리한 비장 및 림프절을 분리하여 PBS로 세척한 후 50 μm 세포 스트레이너 (BD Falcon, San Diego, CA, USA)를 사용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 단일 세포 부유액을 10% FBX (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 0.1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 RPMI-1640(Welgene, Daegu, Korea)으로 세척 후 적혈구 용해버퍼로 적혈구를 용혈시켜 부유액을 만들었다. 부유액을 $CD4^+$ 비드(bead)를 이용하여 $CD4^+$ T세포를 분리하였다.

[0156] 분리한 T 세포는 미리 $CD3^+$ 항체와 $CD28^+$ 항체가 코팅된 96 웰 플레이트에 각 웰 당 $1x10^7$ cells/mL을 150 μL씩 분주하고 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양이 끝난 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하여 4시간 동안 배양시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0157] 7-3. 비장세포 및 $CD4^+$ T세포의 증식능 확인

[0158] T세포의 증식능을 측정을 위하여 비장세포에 콘카나발린 A (concanavalin A, ConA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 μg/mL을 처리한 후, 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 또한 $CD3^+$와 $CD28^+$이 코팅된 96 웰 플레이트에 $CD4^+$ T 세포를 분주하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, MTT를 처리하여 4시간 동안 배양시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0159] 그 결과, 황칠나무 잎 에틸아세테이트층의 분획물이 다른 세포에는 증식효과가 나타나지 않으나 T 세포에 특이적으로 증식효과가 매우 우수한 것으로 나타났다 (도 2b, 도 2c). 또한, 단일 성분인 DMW-2는 T 세포의 증식에는 크게 효과가 없는 것으로 확인하였다 (도 4a).

[0161] **실시예 8: 황칠나무 잎 물 추출물 내 단일성분인 DMW-2의 LC/MS/MS 분석**

[0162] 황칠나무 잎 물 추출물과 에틸아세테이트 분획물 내 DMW-2의 함량을 확인하기 위하여 LC/MS/MS 분석을 진행하였다. 다음과 같은 조건으로 LC/MS/MS 분석하였으며 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0163] 1. MS 조건: Turbo Ion Spray MRM scan type DMW-2 m/z 273.213/55.1 Spray voltage 5500V, 온도 500℃, positive mode, CG 20, GS1 60, GS2 60.

[0164] 2. LC 조건:

[0165] 1) 컬럼: Gemini C18 5 μm, 50 mm X 2.0 mm Gemini C18(4.0 mm X 2.0 mm) 가드 카트리지, 2) 컬럼 오븐: 40℃, 3) Autosampler: 15℃, 4) 이동상 - A: 물, 0.1 % 포름산 B: 아세토니트릴, 0.1% 포름산, 5) Gradient: 1-4분 15-60% B, 5분 60% B, 5.1분 15% B, 6) 유속: 0.3 mL/min, 7) 주입량: 10 μL

[0167] **실험예 1: ELISA를 이용한 IL-2, IFN-γ 사이토카인 농도 측정**

[0168] T 세포 성장에 관련된 IL-2, IFN-γ 사이토카인을 R&D system ELISA 키트 (Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다. 앞서 마우스에서 분리한 비장세포 부유액을 48 웰 플레이트에 각 웰 당 $5 X 10^6$ cells/mL을 500 μL씩 분주하였다. 이후 황칠나무 물추출물(W-Ex: 100 μg/mL), 에틸아세테이트 분획물(W-EA: 10 μg/mL), DMW-2 (1 μM 또는 3 μM)를 각각 농도별로 처리한 후 72 시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액(배양액)을 1200 RPM, 15분 동안 원심분리한 후 다시 상층액만 취하여 실험을 진행하였다.

[0169] 황칠나무 물추출물과 에틸아세테이트 분획물을 처리한 경우 IL-2 와 IFN-γ 사이토카인 생산 증가효과가 매우 뛰어났다. 또한 단일성분인 DMW-2는 IL-2 사이토카인 생산 증가 효과가 상당히 좋았으며 또한 저농도에서 IFN-γ의 생산을 증가시켰다 (도 4b 및 도 4c).

[0171] **실험예 2: 리포터어세이를 이용한 T 세포에 관여하는 NF-AT, NF-kB, 및 AP-1 인자와 IL-2, IL-4 전사인자 확인**

[0172] 마우스(Mus musculus) 림프종 세포인 EL-4 세포주를 6 웰 플레이트에 5 X 10^5 cells/well로 분주한 후, 각각의 리포터(reporter) 4 μg을 리포펙타민 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 형질주입(transfection)하고 48시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

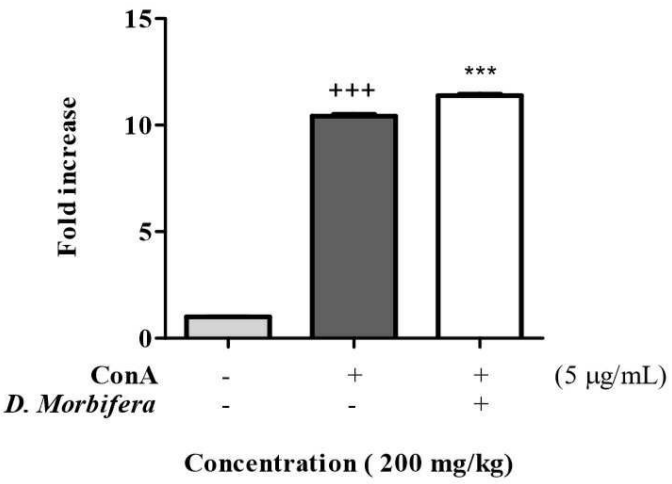
[0173] 그 다음 황칠나무 물추출물(W-Ex: 100 μg/mL), 에틸아세테이트 분획물(W-EA: 10 μg/mL), DMW-2 (1 μM 또는 3 μM)를 각각 처리하였다. 4시간 뒤에 PMA/Io을 처리하고 24시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 24시간 후에 플레이트를 1200 RPM, 15분 동안 원심분리한 후 용해시켜, 루시퍼라아제 리포터 시스템(Promega)을 이용하여 루미노미터를 사용하여 측정하였다.

[0174] 그 결과, 황칠나무 물 추출물과 에틸아세테이트 분획물 처리군에서, NF-AT, AP-1 전사인자 발현 증가효과가 나타났고, NF-kB에는 큰 효과가 나타나지 않았다 (도 5b-5d). 또한, IL-2 전사 레벨에서도 증가효과를 나타내었다 (도 5a).

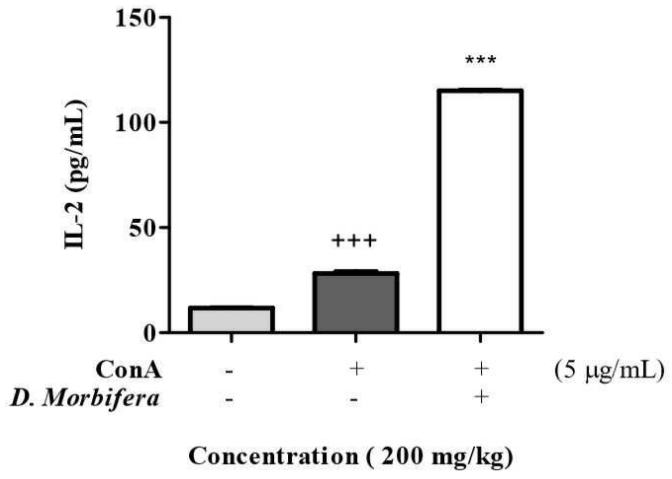
[0175] 한편, 단일 성분인 DMW-2는 NF-AT, NF-kB, AP-1의 전사인자 발현을 상당히 증가시켰다 (도 5b-5d). 또한, DMW-2 저농도(1 μM) 처리시 IL-2 및 IL-4 전사레벨을 상당히 증가시켰다(도 5a 및 5e).

도면

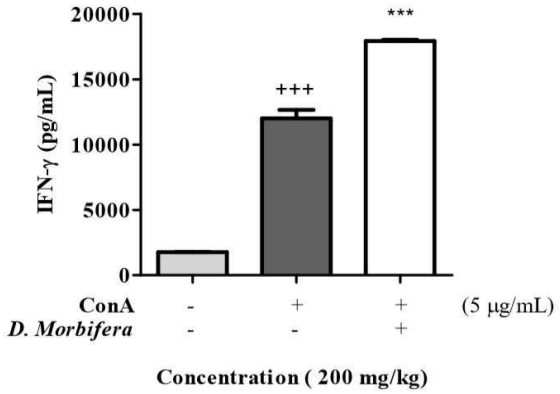
도면1a



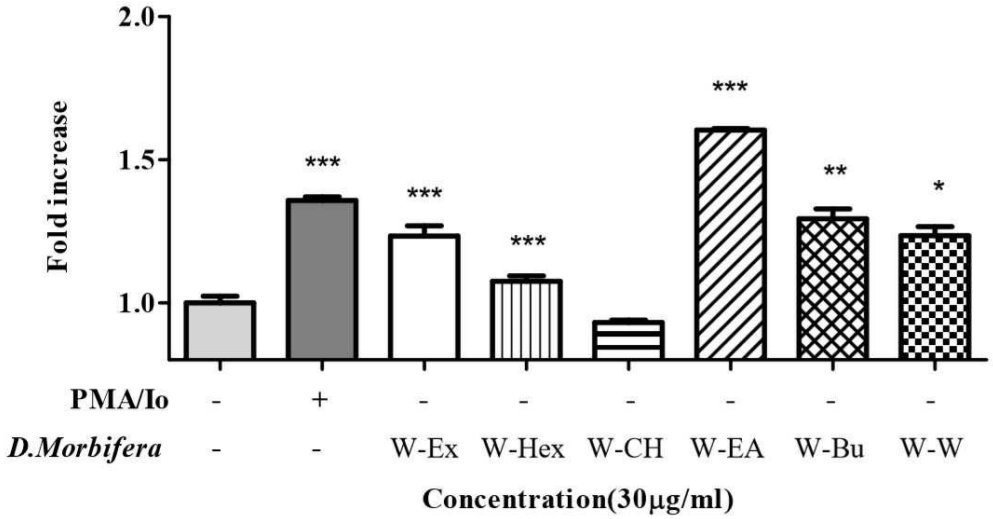
도면1b



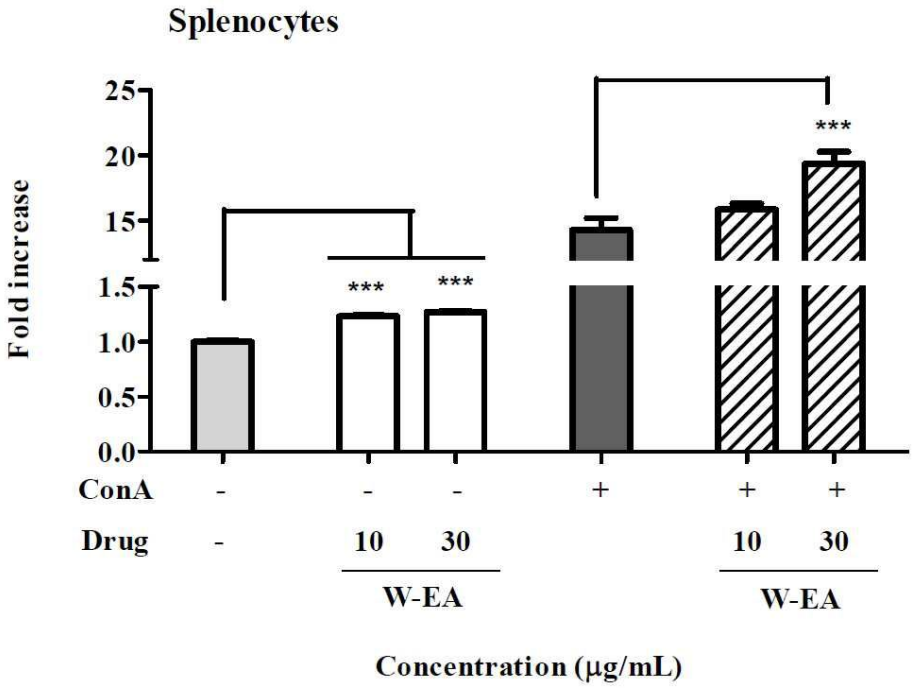
도면1c


20000
15000
10000
5000
0
IFN-γ (pg/mL)
+++
***
ConA - + + (5 μg/mL)
D. Morbifera - - +
Concentration (200 mg/kg)

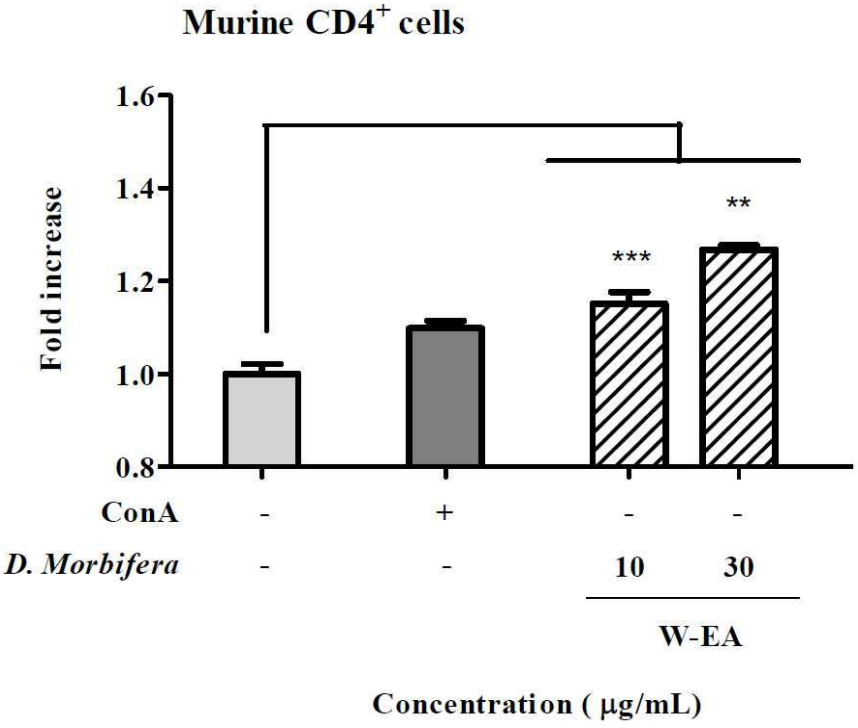
도면2a


2.0
1.5
1.0
Fold increase
***
***
***
***
**
*
PMA/Io - + - - - - - -
D.Morbifera - - W-Ex W-Hex W-CH W-EA W-Bu W-W
Concentration(30μg/ml)

도면2b

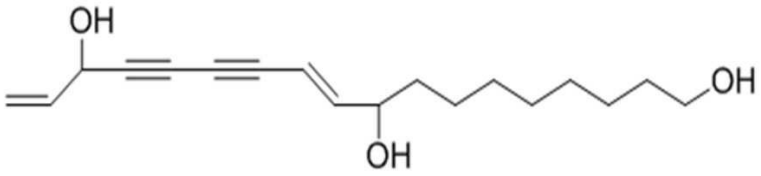

Splenocytes
Fold increase
25
20
15
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
ConA - - - + + +
Drug - 10 30 10 30
W-EA
W-EA
Concentration (μg/mL)

도면2c

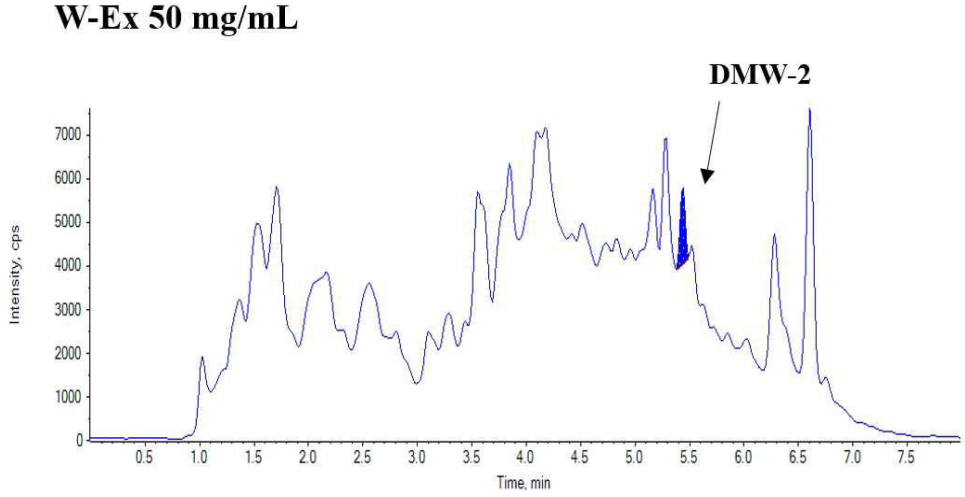

Murine CD4+ cells
Fold increase
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
***
**
ConA - + - -
D. Morbifera - - 10 30
W-EA
Concentration (μg/mL)

도면3a

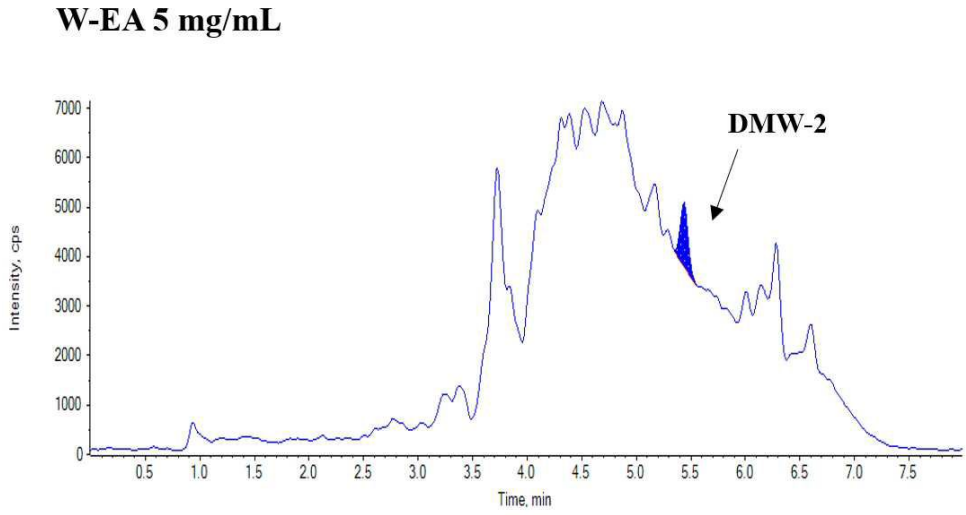
DMW-2 (MW: 290.1882)



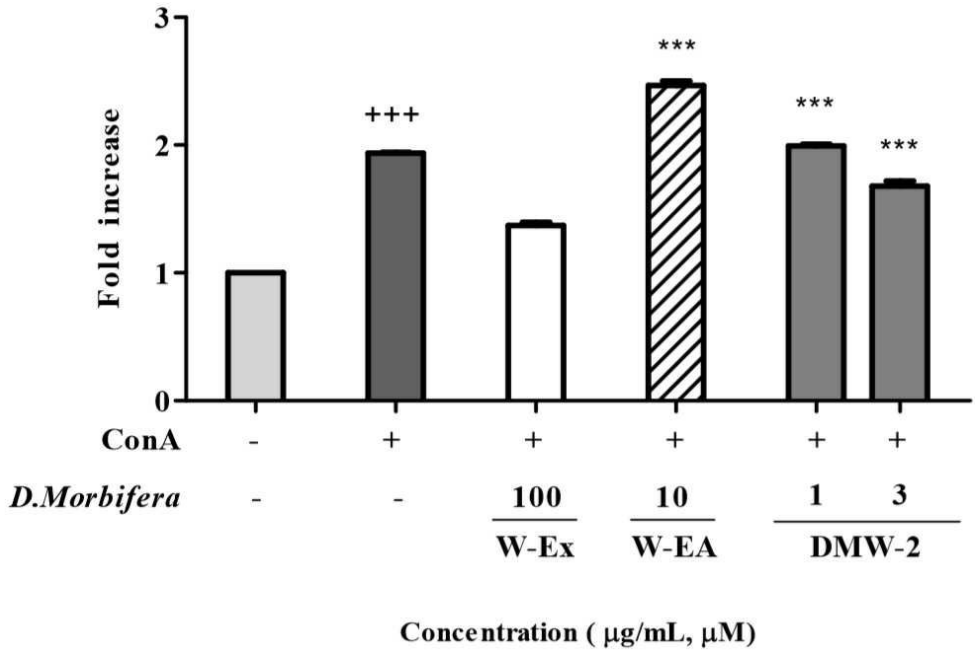
도면3b



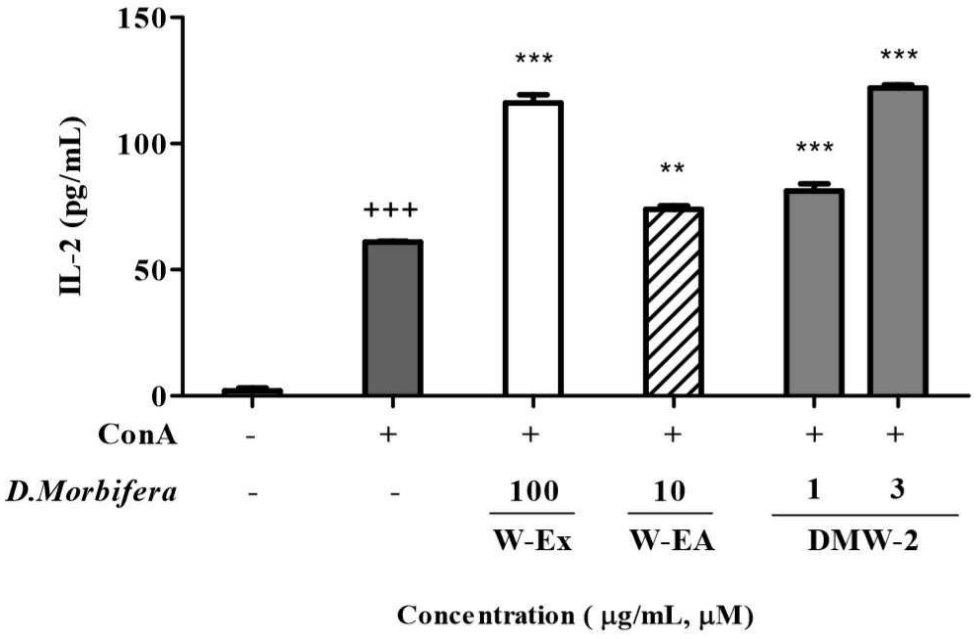
도면3c



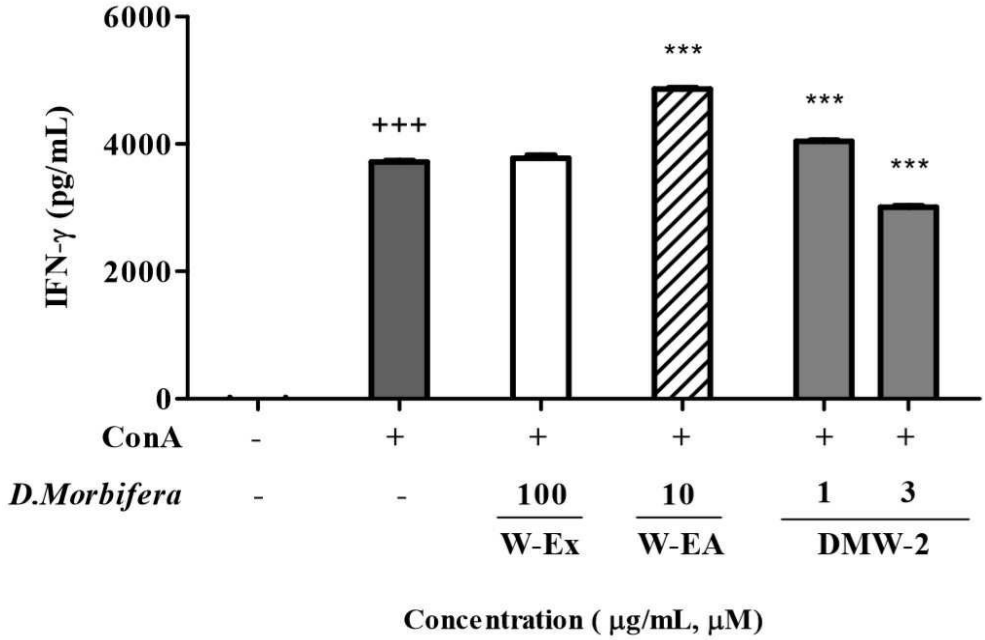
도면4a


Fold increase
3
2
1
0
+++
***
***
***
ConA - + + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1 3
W-Ex
W-EA
DMW-2
Concentration (μg/mL, μM)

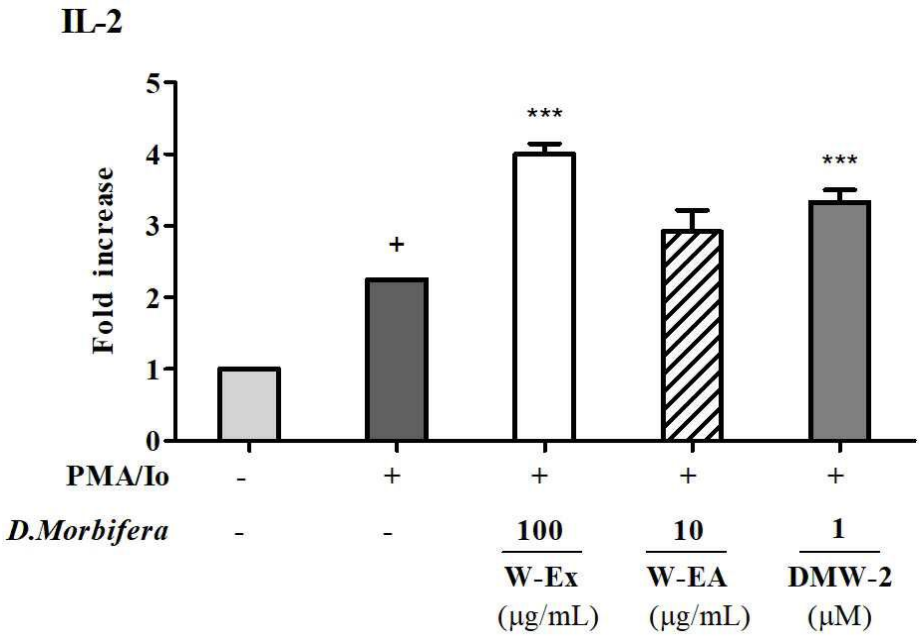
도면4b


IL-2 (pg/mL)
150
100
50
0
+++
***
**
***
***
ConA - + + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1 3
W-Ex
W-EA
DMW-2
Concentration (μg/mL, μM)

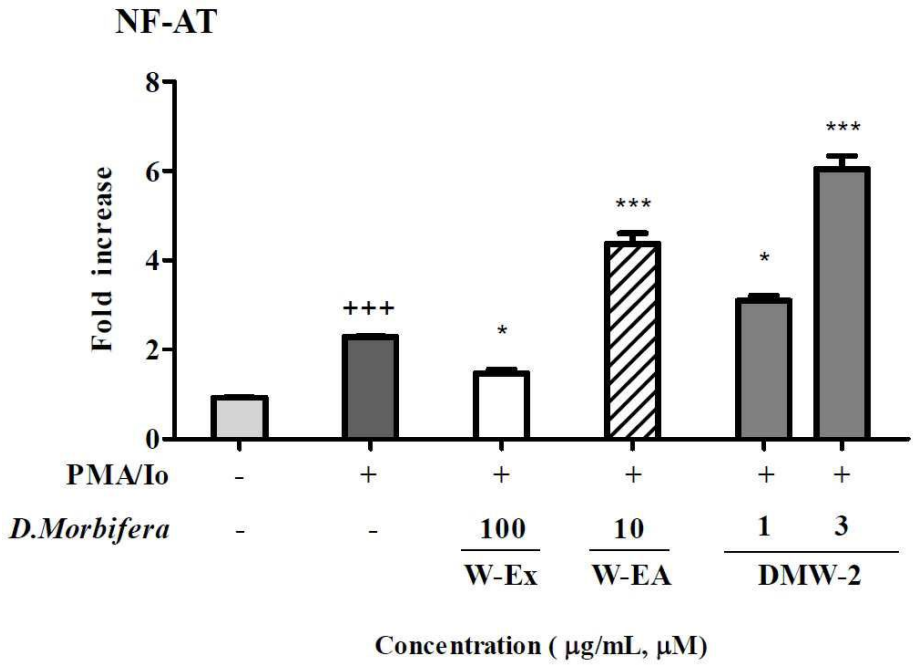
도면4c


6000
4000
2000
0
IFN-γ (pg/mL)
+++
***
***
***
ConA - + + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1 3
W-Ex
W-EA
DMW-2
Concentration (μg/mL, μM)

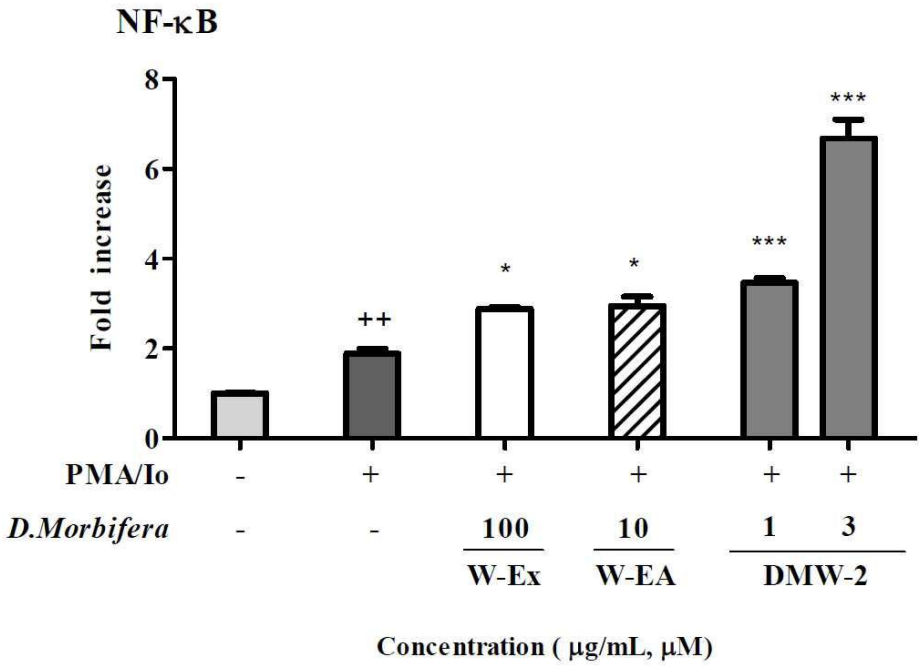
도면5a


IL-2
5
4
3
2
1
0
Fold increase
***
+
***
PMA/Io - + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1
W-Ex
(μg/mL)
W-EA
(μg/mL)
DMW-2
(μM)

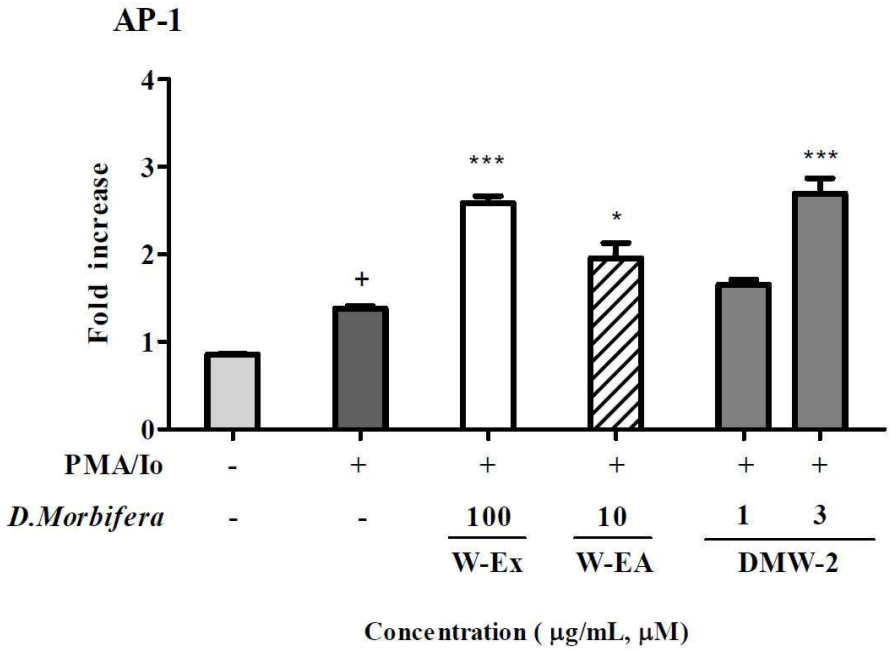
도면5b


NF-AT
Fold increase
8
6
4
2
0
+++
*
***
*
***
PMA/Io - + + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1 3
W-Ex W-EA DMW-2
Concentration (μg/mL, μM)

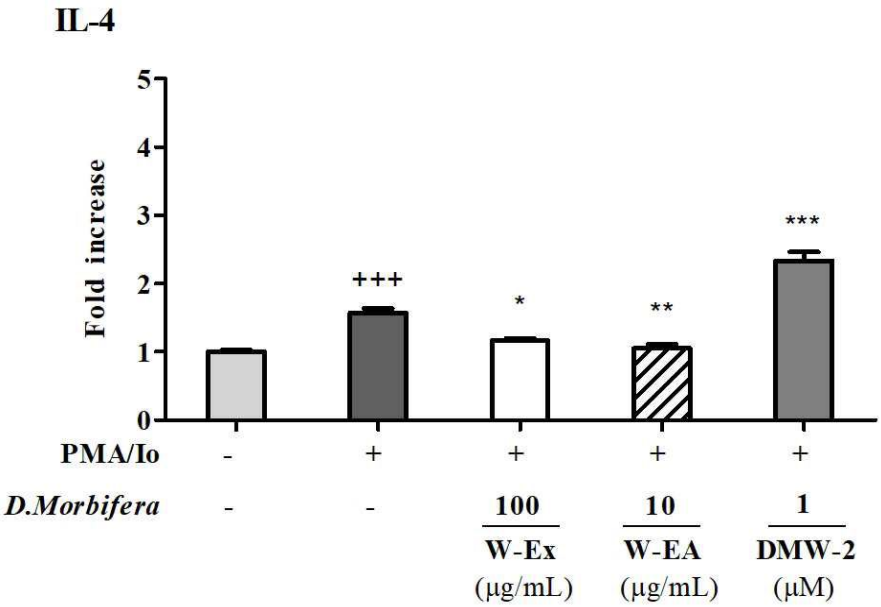
도면5c


NF-κB
Fold increase
8
6
4
2
0
++
*
*
***
***
PMA/Io - + + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1 3
W-Ex W-EA DMW-2
Concentration (μg/mL, μM)

도면5d


AP-1
Fold increase
4
3
2
1
0
***
+
*
***
PMA/Io - + + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1 3
W-Ex W-EA DMW-2
Concentration (μg/mL, μM)

도면5e


IL-4
Fold increase
5
4
3
2
1
0
+++
*
**
***
PMA/Io - + + + +
D.Morbifera - - 100 10 1
W-Ex W-EA DMW-2
(μg/mL) (μg/mL) (μM)