



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0168243
(43) 공개일자 2022년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/10 (2022.01) A23L 19/10 (2016.01)
A23L 5/10 (2016.01) A61K 31/12 (2006.01)
A61K 36/9068 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A23L 19/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0077699

(22) 출원일자 2021년06월15일

심사청구일자 2021년06월15일

(71) 출원인

주식회사 제넨셀

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 301호
(영덕동, 유타워)

(72) 발명자

강세찬

경기도 성남시 분당구 정자로 143, 정든마을 우성
아파트 402동 301호

정용준

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120 301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

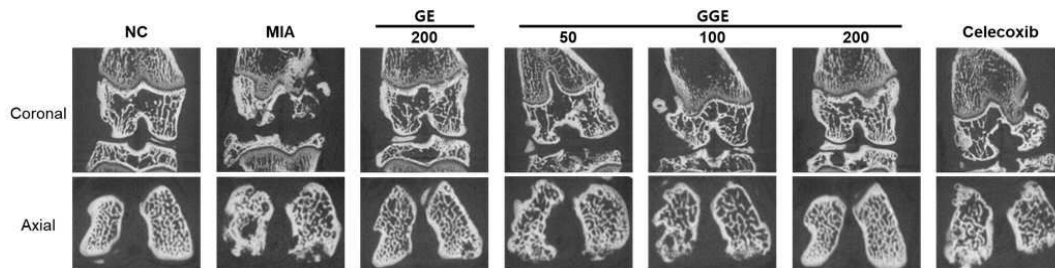
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 증숙생강 추출물 또는 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 증숙생강 추출물 또는 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 증숙생강 추출물 또는 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온은 염증성 사이토카인 발현 억제, 연골 조직 회복, 연골 생성, 또는 연골 분해 억제 효과를 나타내며, 염증성 사이토카인 및 MMP 생성에 관여하는 I- κ B 또는 NF- κ B 단백질의 발현을 억제하는 바, 퇴행성 관절염을 예방, 개선, 또는 치료하기 위한 기능성 식품 조성물, 약학적 조성물 등에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류

A23L 5/13 (2016.08)
A61K 31/12 (2013.01)
A61K 36/9068 (2013.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2300/10 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

김태우

경기도 안산시 상록구 광덕4로 460, 511동 901호(사동, 푸른마을5단지)

박재현

서울특별시 서초구 사임당로19길 10, 101동 504호(서초동, 서초현대아파트)

전혜린

서울특별시 용산구 독서당로 34길 22, 2동 402호

박대원

서울특별시 강북구 삼양로 111길 32

양윤정

경기도 여주시 점동면 안말2길 53-17

김은정

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 2077번길 33 기흥효성해링턴플레이스 103동 1801호

김인혜

경기도 안양시 동안구 부림로55

강동호

서울특별시 마포구 광성로6길 16 (신수동)

이영근

경기도 수원시 영통구 영통로90번길 4-27, 늘푸른벽산아파트 109동 2003호

권정은

경기도 수원시 영통구 반달로 76, 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545022567
과제번호	317071033SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명	발효생강을 이용한 체지방 조절 등 기능성 제품개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	[주관기관] 경희대학교 산학협력단(국제캠퍼스)/[협동기관] 주식회사 제넨셀
연구기간	2017.11.15 ~ 2021.01.14

명세서

청구범위

청구항 1

증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식품 조성물은 건강기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 증숙생강 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토니트릴, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 증숙생강 추출물은 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione), 6-진저롤(6-gingerol), 8-진저롤(8-gingerol), 10-진저롤(10-gingerol), 6-쇼가올(6-shogaol), 6-파라돌(6-paradol), 8-파라돌(8-paradol), 1-데하이드로-8-진저다이온(1-dehydro-8-gingerdione), 및 이들의 식품학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 1-데하이드로-6-진저다이온은 증숙생강 추출물의 건조중량 대비 0.001 중량% 내지 10 중량%의 용량으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 인터루킨-1베타(IL-1 β), 종양괴사인자 알파(TNF- α), 인터페론 감마(IFN- γ), 및 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 연골 조직 회복, 연골 생성, 또는 연골 분해 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 I- κ B 또는 핵 인자(NF)- κ B 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 증숙생강 추출물은 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione), 6-진저롤(6-gingerol), 8-진저롤(8-gingerol), 10-진저롤(10-gingerol), 6-쇼가올(6-shogaol), 6-파라돌(6-paradol), 8-파라돌(8-paradol), 1-데하이드로-8-진저다이온(1-dehydro-8-gingerdione), 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

하기 단계를 포함하는, 증숙생강 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물의 제조방법:

- (a) 생강을 세척하고 85 내지 105 °C에서 1 내지 3시간 동안 증숙시키는 단계;
- (b) 증숙된 생강을 40 내지 60 °C에서 30 내지 50시간 건조하는 단계;
- (c) 상기 건조시킨 증숙생강을 용매에 넣고 75 내지 95 °C에서 10 내지 20시간 동안 추출하는 단계;
- (d) 상기 추출한 증숙생강을 여과하고 10 내지 65 °C의 온도에서 감압농축하는 단계; 및
- (e) 상기 감압농축한 증숙생강 추출물을 여과하고 분무건조 하여 증숙생강 추출 분말을 제조하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 증숙생강 추출물 또는 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 퇴행성 관절염은 골관절염이라고도 하며, 관절 부위의 물리적 자극을 통하여 콘드로사이트(chondrocyte)와 관절막(synovial fluid)에서 발현되는 사이토카인과 연골 분해 효소에 의해 관절 내 연골이 지속적으로 분해, 손상되어 관절면의 운동기능이 소실되고 불안정성이 유발되는 상태를 칭한다. 퇴행성 관절염은 65세 이상의 연령에서의 유병률이 남성에서 약 60%이고 여성에서 약 70%인 가장 일반적인 형태의 관절염이다. 퇴행성 관절염을 위한 현재의 치료 선택지는 제한적이며, 이들은 단순 진통제, 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID) 또는 관절내(IA) 주사 글루코코르티코이드 및 하이알루론산(HA) 제제에 의한 대증적 치료를 포함한다. 비약리학적 척도는 신체 운동 및 체중 손실부터 관절 세척액, 및 궁극적으로는 외과적 관절 대체에 이르기까지의 범위이다.
- [0004] 관절염 치료에 많이 사용하는 이부프로펜, 아스피린, 인도메타신 등의 비스테로이드성 소염진통제(Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 속효성의 장점은 있으나 위장관 손상을 유발하여 장기간 사용에 제약이 있다. 또한, 관절 건강과 관련한 개별인정형 및 고시형 소재는 22개이고 대부분 중국, 인도 등 해외에서 원재료를 수입하거나 해외에서 개발된 소재를 수입해서 판매하고 있으며 국내산 원재료를 활용한 관절 건강 기능성 소재 개발이 필요한 실정이다.
- [0005] 한편, 생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과에 속하는 여러해살이 열대식물로, 전 세계에 약 47속 1,400여 종이 있고, 주로 인도와 말레이군도 등 열대에 분포하고 고대부터 아시아의 따뜻한 지역에서 재배되었으나 현재는 주로 열대와 온대 지역의 고온지대에서 재배되고 국내는 생강속의 양하, 꽃생강속의 꽃생강, 꽃양하속의 꽃양하가 남부지방에 자생하고 있다.
- [0006] 생강은 국내에 식용 가능한 식품으로 등재되어 있고 미국, 유럽 등의 해외에서도 오래전부터 식용해온 소재로서, 주요성분으로는 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 6-paradol, 8-paradol, 1-dehydro-6-gingerdione, 및 1-dehydro-8-gingerdione 등이 있다. 식품원료로는 뿌리줄기(건강), 뿌리, 줄기, 잎을 식용 가능함이 식품공전에 등재되어 있으며, GLP 기관에서 단회독성(설치류 및 비설치류), 유전독성 3종(복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험) 및 13주 반복독성(설치류) 시험을 수행하여 안전성을 확인한 바 있다.
- [0007] 동의보감 등 한방에서 뿌리줄기 말린 것을 약재로 사용하였으며, 이는 감기로 인한 오한, 발열, 두통, 구토, 해수, 가래를 치료하고, 식중독으로 인한 복통, 설사 등의 증상에 응용되었다. 또한, 생강 추출물은 항산화, 항염, 뇌신경 보호, 위장관 불편함 개선 등에 대한 활성이 보고된 바 있으며, 생강의 주성분인 gingerol 및 shogaol은 항염, 항산화, 항암, 항균, 신경보호 효능 외에 당뇨, 혈압 및 콜레스테롤 저하 등 대사증후군에 효과가 있음이 보고되어 있다.
- [0008] 본 발명자들은 생강을 증숙시켜 얻은 증숙생강 추출물을 이용하여 여러 가지 생리활성을 분석함으로써, 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료에 대한 천연물 유래 기능성 소재로서의 개발을 시도하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1895950호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 기존 관절염 치료제의 부작용을 개선하고, 뛰어난 퇴행성 관절염 개선 효과를 나타내는 소재의 개발을 위해 연구한 결과, 일반적으로 인삼을 홍삼으로 만드는 과정에 포함되는 방법으로서, 인체에 유익한 성분을 생성하고 흡수율을 개선하며 장기간 보존이 가능하도록 하는 증숙 과정을 생강에 적용하여, 증숙생강 추출물을 제조하고 이의 퇴행성 관절염 개선 효과를 확인하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 이에, 본 발명의 목적은 증숙생강 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 증숙생강 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 증숙생강 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 식품 조성물은 건강기능성 식품 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 증숙생강 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토니트릴, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 용매로 추출되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 증숙생강 추출물은 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione), 6-진저롤(6-gingerol), 8-진저롤(8-gingerol), 10-진저롤(10-gingerol), 6-쇼가올(6-shogaol), 6-파라돌(6-paradol), 8-파라돌(8-paradol), 1-데하이드로-8-진저다이온(1-dehydro-8-gingerdione), 이들의 식품학적으로 허용 가능한 염, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 1-데하이드로-6-진저다이온은 증숙생강 추출물의 건조중량 대비 0.001 중량% 내지 10 중량%의 용량으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , 및 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 연골 조직 회복, 연골 생성, 또는 연골 분해 억제 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 I- κ B 또는 핵 인자(NF)- κ B 단백질의 발현을 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료 방법을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 조성물의 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료 용도를 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 이의 식품학적으로 허용 가능한 염; 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료에 이용되는 약제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 증숙생강 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다:

[0031] (a) 생강을 세척하고 85 내지 105 °C에서 1 내지 3시간 동안 증숙시키는 단계;

[0032] (b) 증숙된 생강을 40 내지 60 °C에서 30 내지 50시간 건조하는 단계;

- [0033] (c) 상기 건조시킨 증숙생강을 용매에 넣고 75 내지 95 ℃에서 10 내지 20시간 동안 추출하는 단계;
- [0034] (d) 상기 추출한 증숙생강을 여과하고 10 내지 65 ℃의 온도에서 감압농축하는 단계; 및
- [0035] (e) 상기 감압농축한 증숙생강 추출물을 여과하고 분무건조 하여 증숙생강 추출 분말을 제조하는 단계.

발명의 효과

- [0037] 본 발명에 따른 증숙생강 추출물 또는 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이는 염증성 사이토카인 발현 억제, 연골 조직 회복, 연골 생성, 또는 연골 분해 억제 효과를 나타내며, 염증성 사이토카인 및 MMP 생성에 관여하는 I- κ B 또는 NF- κ B 단백질의 발현을 억제하는 바, 퇴행성 관절염을 예방, 개선, 또는 치료하기 위한 기능성 식품 조성물, 약학적 조성물 등에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 생강 추출물과 증숙생강 추출물의 1-데하이드로-6-진저다이의 변화를 나타낸 도면이다.
- 도 2a는 본 발명의 일 구현예에 따른 증숙생강 추출물의 처리에 의한 세포독성(좌측 도면) 및 NO 생성 억제 효과(우측 도면)를 확인한 도면이다.
- 도 2b는 본 발명의 일 구현예에 따른 증숙생강 추출물의 유효성분들의 처리에 의한 세포독성을 확인한 도면이다.
- 도 2c는 본 발명의 일 구현예에 따른 증숙생강 추출물의 유효성분들의 처리에 의한 NO 생성 변화를 확인한 도면이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 구현예에 따른 증숙생강 추출물 및 1-데하이드로-6-진저다이에 의한 IL-1 β 의 mRNA 발현 변화를 확인한 도면이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 구현예에 따른 증숙생강 추출물 및 1-데하이드로-6-진저다이에 의한 IL-1 β 의 단백질 발현 변화를 확인한 도면이다.
- 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델 유도 및 증숙생강 추출물 투여 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 5a는 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델에서 증숙생강 추출물의 투여에 의한 연골 조직 구조 변화를 Micro-CT 이미지로 확인한 도면이다.
- 도 5b는 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델에서 증숙생강 추출물의 투여에 의한 연골 조직의 형태학적 지표를 정량화하여 나타낸 도면이다.
- 도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델의 혈액에서 증숙생강 추출물의 투여에 의한 IL-1 β , TNF- α , 및 PGE₂의 발현 변화를 확인한 도면이다.
- 도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 증숙생강 추출물의 투여에 의한 IL-1 β , IFN- γ , 및 TNF- α 의 발현 변화를 확인한 도면이다.
- 도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 증숙생강 추출물의 투여에 의한 TIMP1, TIMP2, MMP-9, 및 COL-2의 발현 변화를 확인한 도면이다.
- 도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 증숙생강 추출물의 투여에 의한 I- κ B 및 NF- κ B 단백질의 발현 변화를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명의 일 실시예에서는 생강을 증숙 처리하여 증숙생강 추출물을 제조하였다(실시예 1 참조).
- [0041] 본 발명의 다른 실시예에서는 증숙생강 추출물로부터 분리된 6-쇼가올(6-shogaol), 6-진저롤(6-gingerol), 및

1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione) 중 특히 1-데하이드로-6-진저다이온의 함량이 생강 추출물에 비해 크게 증가함을 확인하여, 1-데하이드로-6-진저다이온을 지표성분으로 설정하였다(실시예 2 참조).

[0042] 본 발명의 일 실험예에서는 *in vitro* 상에서 증숙생강 추출물 및 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온이 낮은 세포독성을 나타내고, 높은 NO 생성 및 IL-1 β 발현 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다(실험예 1 참조).

[0043] 본 발명의 다른 실험예에서는 MIA(Mono-iodoacetate)로 유도한 퇴행성 관절염 동물 모델의 혈액 또는 연골 조직에서 증숙생강 추출물이 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키고, 연골 조직 회복, 연골 생성, 및 연골 분해 억제 활성을 나타내며, 연골에서 퇴행성 관절염 진행에 따라 염증성 사이토카인 및 MMP 생성에 관여하는 I- κ B 및 NF- κ B 단백질의 발현을 감소시키는 효과를 나타내는 것을 확인하였다(실험예 2 참조).

[0045] 이에, 본 발명은 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명에 있어서, “증숙”이란 일반적으로 열 처리를 통하여 찌서 익히는 과정을 말하는 것으로서, 일정한 온도에서 습열한 공기를 제공하여 숙성하는 방법으로, 인삼을 홍삼으로 제조하는 데에 많이 사용되고 있다. 증숙은 장기보관 및 유통을 목적으로 하는 가열처리 방법 중 하나로, 한방에서는 수치(修治)라 하여 한약재의 가열 처리를 통해 독성을 낮추고 부작용을 최소화하여 치료효과를 높이며, 가공이나 절편에 편리하게 사용하고자 하는 방법의 하나로 사용하여 왔다.

[0047] 본 발명에 있어서, “추출물”은 상기 증숙생강의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 증숙생강 추출물은 건조 분말 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 상기 증숙생강의 추출물에 있어서, 상기 증숙생강을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 증숙생강을 추출하는 데에 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 있어서 상기 증숙생강 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, *n*-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토니트릴, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 용매로 추출될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 에탄올을 용매로 사용하여 추출할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 에탄올을 용매로 사용하여 증숙생강을 추출할 경우, 예컨대 10 % 내지 100 % 에탄올, 10 % 내지 90 % 에탄올, 10 % 내지 80 % 에탄올, 10 % 내지 70 % 에탄올, 20 % 내지 90 % 에탄올, 20 % 내지 80 % 에탄올, 20 % 내지 70 % 에탄올, 30 % 내지 90 % 에탄올, 30 % 내지 80 % 에탄올, 30 % 내지 70 % 에탄올, 40 % 내지 90 % 에탄올, 40 % 내지 80 % 에탄올, 40 % 내지 70 % 에탄올, 50 % 내지 90 % 에탄올, 50 % 내지 80 % 에탄올, 50 % 내지 70 % 에탄올, 60 % 내지 90 % 에탄올, 60 % 내지 80 % 에탄올, 60 % 내지 70 % 에탄올, 65 % 내지 75 % 에탄올, 또는 70 % 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 제조된 추출물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 감압 농축기, 건조는 분무건조, 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

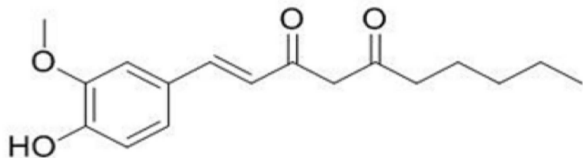
[0052] 본 발명에 있어서, “퇴행성 관절염”이란 뼈의 관절면을 감싸고 있는 관절 연골이 마모되어 연골 밑의 뼈가 노출되고, 관절 주변의 활액막에 염증이 생겨서 통증과 변형이 발생하는 질환이며, 흔히 골관절염(osteoarthritis)이라고도 불리우며 관절 질환 중에서 가장 많이 발생하는 질환이다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 증숙생강 추출물은 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione), 6-진저롤(6-

gingerol), 8-진저롤(8-gingerol), 10-진저롤(10-gingerol), 6-쇼가올(6-shogaol), 6-파라돌(6-paradol), 8-파라돌(8-paradol), 1-데하이드로-8-진저다이온(1-dehydro-8-gingerdione), 이들의 식품학적으로 허용 가능한 염, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명에 있어서, “데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione)”은 분자식 $C_{17}H_{22}O_4$ 의 화합물로서, 하기 화학식 1의 구조를 갖는 페놀화합물의 일종이며, 분자량은 290.4이다(CAS No. 76060-35-0). 본 발명에 있어서, 상기 1-데하이드로-6-진저다이온은 증숙생강으로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에서 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질을 사용할 수 있다.

[0055] [화학식 1]



[0056]

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 1-데하이드로-6-진저다이온은 증숙생강 추출물의 지표성분으로서, 이의 함량은 증숙생강 추출물의 건조중량 대비 0.001 중량% 이상일 수 있고, 예컨대 0.001 중량% 내지 10 중량%, 0.001 중량% 내지 5 중량%, 0.001 중량% 내지 3 중량%, 0.001 중량% 내지 1 중량%, 0.001 중량% 내지 0.5 중량%, 0.001 중량% 내지 0.3 중량%, 0.005 중량% 내지 10 중량%, 0.005 중량% 내지 5 중량%, 0.005 중량% 내지 3 중량%, 0.005 중량% 내지 1 중량%, 0.005 중량% 내지 0.5 중량%, 0.005 중량% 내지 0.3 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량%, 0.01 중량% 내지 5 중량%, 0.01 중량% 내지 3 중량%, 0.01 중량% 내지 1 중량%, 0.01 중량% 내지 0.5 중량%, 0.01 중량% 내지 0.3 중량%, 0.1 중량% 내지 10 중량%, 0.1 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 3 중량%, 0.1 중량% 내지 1 중량%, 0.1 중량% 내지 0.5 중량%, 0.1 중량% 내지 0.2 중량%, 0.1 중량% 내지 0.15 중량%, 또는 0.118 중량%의 용량으로 증숙생강 추출물에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명에 있어서, “지표성분”이란 원료 중에 함유되어 있는 화학적으로 규명된 성분 중에서 품질관리의 목적으로 정한 성분을 말하며, 생약을 확인하는데 기준이 되는 물질이다.

[0059] 본 발명에 있어서, “식품학적으로 허용 가능한 염”이란 식품학적으로 허용되는 유기산, 무기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.

[0060] 본 발명에 있어서, “식품”이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능성 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.

[0061] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능성 식품 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 “건강기능성 식품(functional food)”이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하며, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 분말, 액제, 편상(flake), 페이스트, 시럽제, 젤, 젤리, 바(bar), 또는 필름 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[0063] 본 발명에 있어서, 상기 증숙생강 추출물; 이로부터 분리한 1-데하이드로-6-진저다이온; 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염은 식품 조성물에 유효성분으로 포함될 수 있다.

[0064] 본 발명에 있어서, “유효성분”은 직접 또는 간접으로 그 성분 자체가 가지고 있는 약리작용이 제제의 효능·효과로 기대되는 물질 또는 물질군으로서, 그 성분이 전체 조성물의 건조중량에 대하여 1 중량% 이상 포함될 수 있으며, 예컨대 10 중량% 내지 100 중량%, 20 중량% 내지 100 중량%, 30 중량% 내지 100 중량%, 40 중량% 내지 100 중량%, 50 중량% 내지 100 중량%, 60 중량% 내지 100 중량%, 70 중량% 내지 100 중량%, 80 중량% 내지 100 중량%, 90 중량% 내지 100 중량%, 10 중량% 내지 80 중량%, 20 중량% 내지 80 중량%, 30 중량% 내지 80 중량%, 40 중량% 내지 80 중량%, 50 중량% 내지 80 중량%, 60 중량% 내지 80 중량%, 또는 70 중량% 내지 80 중량% 포함되어 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0065] 본 발명의 증숙생강 추출물; 이로부터 분리한 1-데하이드로-6-진저다이온; 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 증숙생강 추출물; 이로부터 분리한 1-데하이드로-6-진저다이온; 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0066] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0067] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.
- [0068] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0069] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0070] 본 발명에 있어서, “약학적으로 허용 가능한 염”이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 이의 식품학적으로 허용 가능한 염; 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료에 이용되는 약제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0074] 본 발명에서 “예방”이란 퇴행성 관절염의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 퇴행성 관절염과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 퇴행성 관절염과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0075] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0076] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제,

유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0078] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0079] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0082] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약

염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설포실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기계 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기계(TG-95, MA, 57)와 같은 기계가 사용될 수 있다.

[0086] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0087] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0089] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0090] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0091] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0092] 본 발명에 있어서, 증숙생강 추출물; 이로부터 분리된 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione); 이의 식품학적으로 허용 가능한 염; 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하루에 200 내지 600 mg, 250 내지 600 mg, 300 내지 600 mg, 350 내지 600 mg, 400 내지 600 mg, 450 내지 600 mg, 200 내지 550 mg, 200 내지 500 mg, 250 내지 550 mg, 250 내지 500 mg, 300 내지 550 mg, 300 내지 500 mg, 350 내지 550 mg, 350 내지 500 mg, 400 내지 550 mg, 400 내지 500 mg, 450 내지 550 mg, 450 내지 500 mg, 또는 480 mg의 용량으로, 6 내지 18주, 6 내지 16주, 6 내지 14주, 8 내지 18주, 8 내지 16주, 8 내지 14주, 10 내지 18주, 10 내지 16주, 10 내지 14주, 또는 12주 동안 개체에 투여할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0093] 본 발명에 있어서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0094] 본 발명에 있어서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0095] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 증숙생강 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다:
- [0096] (a) 생강을 세척하고 85 내지 105 ℃에서 1 내지 3시간 동안 증숙시키는 단계;
- [0097] (b) 증숙된 생강을 40 내지 60 ℃에서 30 내지 50시간 건조하는 단계;
- [0098] (c) 상기 건조시킨 증숙생강을 용매에 넣고 75 내지 95 ℃에서 10 내지 20시간 동안 추출하는 단계;
- [0099] (d) 상기 추출한 증숙생강을 여과하고 10 내지 65 ℃의 온도에서 감압농축하는 단계; 및
- [0100] (e) 상기 감압농축한 증숙생강 추출물을 여과하고 분무건조 하여 증숙생강 추출 분말을 제조하는 단계.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서의 증숙은 85 내지 105 ℃, 90 내지 105 ℃, 95 내지 100 ℃, 또는 97 ℃에서 1 내지 3시간, 1 내지 2.5시간, 1.5 내지 3시간, 1.5 내지 2.5시간, 또는 2시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서의 건조는 30시간 이상 수행할 수 있으며, 예컨대 40 내지 60 ℃, 45 내지 60 ℃, 45 내지 55 ℃, 또는 50 ℃에서 30 내지 50시간, 30 내지 45시간, 30 내지 40시간, 또는 30 내지 35시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계에서의 추출은 75 내지 95 ℃, 75 내지 90 ℃, 80 내지 95 ℃, 80 내지 90 ℃, 또는 85 ℃에서 10 내지 20시간, 10 내지 17시간, 12 내지 20시간, 12 내지 17시간, 또는 15시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계에서의 감압농축은 65 ℃ 이하의 온도에서 수행될 수 있으며, 예컨대 10 내지 65 ℃, 20 내지 65 ℃, 30 내지 65 ℃, 40 내지 65 ℃, 50 내지 65 ℃, 또는 60 내지 65 ℃에서 수행될 수 있고, 20 brix 이상, 예컨대 20 내지 100 brix, 20 내지 80 brix, 20 내지 60 brix, 또는 20 내지 40 brix가 되도록 감압농축할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계는 감압농축한 증숙생강 추출물을 여과한 후에 증숙생강 추출물 및 탄수화물을 1:0.5 내지 2, 1:0.5 내지 1.5, 1:0.5 내지 1, 1:1 내지 2, 1:1 내지 1.5, 또는 1:1의 건조중량비로 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 탄수화물은 텍스트린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계는 증숙생강 추출물 및 탄수화물의 혼합물을 80 내지 100 ℃, 85 내지 100 ℃, 80 내지 95 ℃, 85 내지 95 ℃, 또는 90 ℃에서 10 내지 20분, 10 내지 17분, 12 내지 17분, 또는 15분 동안 살균하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계에서 분무건조는 입구(inlet) 온도가 180 내지 200 ℃, 180 내지 195 ℃, 185 내지 200 ℃, 185 내지 195 ℃, 또는 190 ℃, 출구(outlet) 온도가 80 내지 100 ℃, 80 내지 95 ℃, 85 내지 100 ℃, 85 내지 95 ℃, 또는 90 ℃인 건조기에서 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0109] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0111] **[실시예]**

[0112] **실시예 1. 증숙생강 추출물 제조**

[0113] **1-1. 증숙생강 제조**

[0114] 생생강을 구입하여 이의 뿌리줄기 부위를 사용하였으며, 정제수로 5~7분 동안 세척한 후, 세척된 생강을 증숙기에 넣고 97 ℃에서 2시간 동안 증숙시켰다. 그런 다음, 증숙된 생강을 건조기에 넣고 50 ℃에서 30시간 이상 건조하여 증숙생강을 제조하였다.

[0116] **1-2. 증숙생강 추출물 제조**

[0117] 상기 실시예 1-1에서 제조한 증숙생강 원재료에 70 % 주정(에탄올)을 15배 가하여 85 ℃에서 15시간 추출하였다. 그런 다음, 이를 여과한 후 65 ℃ 이하의 저온에서 20 brix 이상이 되도록 감압농축하고 이를 다시 여과하였다. 그리고 나서, 증숙생강농축액을 덱스트린과 혼합하고 90 ℃에서 15분 동안 살균한 후, 입구(inlet) 온도 190 ℃, 출구(outlet) 온도 90 ℃의 건조기에서 분무건조하여 증숙생강 추출분말을 제조하였다.

[0118] 상기와 같은 증숙생강 추출 분말의 제조 과정 및 조건을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수량(kg)
원재료	증숙생강	4.656	65kg
↓			
추출	70%주정 15배수, 85℃, 15시간유지	2.156	970kg
↓			
여과	-	2.073	970kg
↓			
농축	저온(65℃이하) 감압농축 20brix 이상	2.111	35kg
↓			
여과	-	2.130	35kg
↓			
혼합	추출물 (고형분100%):50% 덱스트린 50%	1.147	42kg
↓			
살균	90℃ 15분간	1.147	42kg
↓			
분무건조(SD)	Inlet 190℃, outlet 90℃	1.140	11.3kg
↓			
포장	포장	1.140	11.3kg

[0119]

[0121] **실시예 2. 증숙생강 추출물로부터 화합물 분리**

[0122] 상기 실시예 1에서 제조한 증숙생강 추출물로부터 *n*-헥산과 증류수를 활용하여 용매 계통분획을 수행하였다. 수득한 *n*-헥산 분획물로부터 SiO₂, ODS, Sephadex LH-20 등 다양한 레진을 활용하여 오픈컬럼 크로마토그래피를 반복 수행함으로써 주요성분인 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione), 6-진저롤(6-gingerol), 8-진저롤(8-gingerol), 10-진저롤(10-gingerol), 6-쇼가올(6-shogaol), 6-파라돌(6-paradol), 8-파라돌(8-paradol), 및 1-데하이드로-8-진저다이온(1-dehydro-8-gingerdione)을 수득하였다.

[0123] 또한, 하기 조건과 같이 증숙생강 추출물에 대하여 액체 크로마토그래피(High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) 분석을 수행하였다.

[0124] 증숙생강 추출물과 생강 추출물을 80 % 메탄올로 녹여 10,000 ppm의 용액으로 제조한 후, 0.22 μm 멤브레인 필터(Woongki Science Co., Ltd., 서울, 한국)로 정제하여 샘플을 제조하였다. 분석에 사용된 HPLC는 Agilent Technologies 1260 series를 사용하였으며, 분석용 컬럼으로 Cadenza CD-C18(3 μm, 250 × 4.6 mm)를 사용하였다. 이 때 측정 파장은 370 nm로 하였으며, 시료주입량은 10 μL, 용매 용출 속도는 0.4 mL/min로, 분석 용매로는 포름산(formic acid)이 0.1 % 함유된 물 (A) 및 아세토니트릴(acetonitrile) (B)을 사용하였으며, 용매의

조성을 다음과 같이 변화시켜 60분간 관측을 진행하였다.

[0125] (B) 기준, 30 % (0 min) → 30 % (5 min) → 55 % (10 min) → 55 % (13 min) → 80 % (20 min) → 80 % (23 min) → 100 % (30 min) → 100 % (60 min).

[0126] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 증숙생강 추출물과 생강 추출물을 비교했을 때, 특징적으로 1-데하이드로-6-진저다이온(1-dehydro-6-gingerdione)의 함량이 크게 증가함을 확인하여, 1-데하이드로-6-진저다이온을 지표성분으로 설정하였다. 증숙생강 속 지표성분인 1-데하이드로-6-진저다이온의 함량을 확인하기 위하여, 표준품을 활용해 검량곡선을 작성하였으며, 작성된 검량곡선을 토대로 증숙생강 추출물에 대하여 1-데하이드로-6-진저다이온이 1.18 mg/g 함유되어 있음을 확인하였다. 생강 추출물에 대한 1-데하이드로-6-진저다이온 함량은 0.54 mg/g이었다.

[0128] [실험예]

[0129] 실험예 1. In vitro 상에서 항염증 효과 확인

[0130] 1-1. 세포생존율 및 NO 생성 억제 효과 확인

[0131] 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 생강 추출물(GE), 증숙생강 추출물(GGE), 및 증숙생강의 유효성분들을 이용하여 세포생존율 및 NO 생성 억제 효과를 확인하였다.

[0132] 세포생존율은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 확인하였다. 생존세포는 MTT를 포르마잔(formazan)으로 전화하는 것을 이용하여 흡광도를 측정하는 것으로, RAW 264.7 세포를 96 웰-플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 접종한 후 37 °C, 5 % CO₂ 조건의 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하고, 생강 추출물(GE) 및 증숙생강 추출물(GGE)을 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하였고, 증숙생강의 유효성분들은 1.3, 2.5, 5, 10, 20 µg/mL 농도로 처리하고, 24시간 동안 배양한 후 5 mg/mL MTT 용액을 10 µL씩 첨가하고 이를 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 배지 상층액을 제거하고 DMSO 100 µL를 넣어 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0133] NO 생성 억제 효과의 확인을 위해, RAW 264.7 세포를 96 웰-플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 접종한 후 37 °C, 5 % CO₂ 조건의 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하고, 염증 유도를 위하여 LPS(lipopolysaccharide)를 1 µg/mL의 농도로 2시간 전처리한 다음, 증숙생강 추출물을 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하였고, 증숙생강의 유효성분들은 1.3, 2.5, 5, 10, 20 µg/mL 농도로 처리하여, 24시간 동안 배양한 후 상층액을 새로운 96 웰-플레이트에 50 µL 옮기고, 그리아스 시약(Griess reagent)을 50 µL 첨가하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0134] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 증숙생강 추출물의 경우 생강 추출물에 비해 세포독성이 낮고(좌측 도면), LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다(우측 도면).

[0135] 또한, 도 2b 및 2c에 나타난 바와 같이, 증숙생강의 유효성분들 중에서도 특히 지표성분인 1-데하이드로-6-진저다이온은 낮은 세포독성을 나타내면서(도 2b) 농도의존적으로 높은 NO 생성 억제 효과(도 2c)를 나타내는 것을 확인하였다.

[0137] 1-2. IL-1β 발현 억제 효과 확인

[0138] RAW 264.7 세포에서 증숙생강 추출물(GGE) 및 증숙생강의 유효성분인 1-데하이드로-6-진저다이온(6-GD) 처리에 의한 인터루킨-1베타(IL-1β)의 mRNA 및 단백질 발현을 확인하였다.

[0139] 구체적으로, RAW 264.7 세포를 6 웰-플레이트에 1×10^4 세포/웰로 접종한 후 LPS를 1 µg/mL의 농도로 2시간 전처리하고, 증숙생강 추출물을 농도별(50, 100, 200 µg/mL)로 24시간 동안 처리하였다. 총 RNA는 TRIzol 용액을 이용하여 추출하였으며, Nanodrop을 통해 RNA를 정량한 후 동량의 RNA를 cDNA 합성 키트(Takara, Japan)를 이용하여 cDNA로 합성한 후 qRT-PCR(quantitative real time-PCR)을 진행하였다.

[0140] 실험에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Gene	Primer sequences	서열번호
IL-1 β	5' -GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3' (sense)	1
	5' -ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3' (antisense)	2
β -actin	5' -CGTGAAAAGATGACCAGAT-3' (sense)	3
	5' -ACCCTCATAGATGGCACA-3' (antisense)	4

또한, 인터루킨-1 베타(IL-1 β)의 단백질 발현 확인을 위해, RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하였으며, 동량의 단백질을 12 % SDS-PAGE로 전기영동한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 이동(transfer)시켰다. 그 후 5 % 스킵 밀크(skim milk)로 상온에서 1시간동안 블로킹(blocking)을 진행한 후 IL-1 β 에 대한 1차 항체(Invitrogen, USA)를 4° C에서 하룻동안 반응시키고, 효소, 방사선 물질, 또는 형광물질 등이 부착된 2차 항체(HRP-conjugated rabbit, Cell Signaling, USA)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 Lumi-Pico 시약으로 단백질을 검출하였다.

그 결과, 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 증숙생강 추출물 또는 1-데하이드로-6-진저다이온 처리에 의해 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 mRNA(도 3a) 및 단백질(도 3b) 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

실험예 2. 퇴행성 관절염 동물 모델에서의 효과 확인

2-1. 퇴행성 관절염 동물 모델 유도 및 증숙생강 추출물 투여

5주령의 Wistar 래트의 관절강에 MIA(Mono-iodoacetate) 50 μ L(3 mg/kg)를 2주간 투여하여 퇴행성 관절염을 유도하였다.

그런 다음, 6주간 생강 추출물(200 mg/kg), 증숙생강 추출물(50, 100, 200 mg/kg) 및 양성대조군(PC)으로 셀레콕시브(10 mg/kg, celecoxib)를 경구투여하고, Micro-CT 분석, 혈액 및 관절연골에서 관절 구조 및 염증마커 분석을 실시하였다.

상기와 같은 퇴행성 관절염 동물 모델 유도 및 증숙생강 추출물 투여 과정은 도 4에 도식화하여 나타내었다.

2-2. Micro-CT 분석

상기 실험예 2-1의 MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델을 이용하여 관절 조직의 구조 변화 확인을 위해 Micro-CT 촬영 및 분석을 실시하였다.

그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 정상군(NC)에 비하여 MIA 유도군은 연골 조직이 파괴되어 퇴행성 관절염이 유도된 것을 확인하였으며, 생강 추출물(GE), 증숙생강 추출물(GGE) 및 PC(celecoxib) 투여군은 정상군 수준으로 연골 조직이 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 도 5b에 나타난 바와 같이, 골 표면적(bone surface, BS), 골 표면 밀도(bone surface density, BS/TV), 및 골소주 수(trabecular number, Tb.N)는 MIA에 의해 증가하였으나, 생강 추출물 및 증숙생강 추출물 투여에 의해 감소하는 것을 확인하였으며, 골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th)는 MIA에 의해 감소하였으나, 생강 추출물 및 증숙생강 추출물 투여에 의해 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 생강 추출물에 비해 증숙생강 추출물 투여군에서 더 뛰어난 연골 조직 회복 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

2-3. 퇴행성 관절염 동물 모델의 혈액에서 염증성 사이토카인 발현 확인

상기 실험예 2-1의 MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 혈액에서 염증성 사이토카인의 발현을 확인하였다.

구체적으로, MIA 유도 퇴행성 관절염 동물에 6주간 생강 추출물 및 증숙생강 추출물을 투여하고 부검 전 절식 후 복대 정맥에서 혈액을 채취하였고, 4 °C, 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈중 염증성 사이토카인의 함량을 측정하기 위해 IL-1 β , TNF- α , PGE₂의 함량을 키트(R&D system, 미국)에 구성된 물

품으로 제조사의 실험방법에 맞춰 반응시킨 뒤 측정하였다.

[0160] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 혈액에서 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α , 및 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)의 발현은 증숙생강 추출물의 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 이때 증숙생강 추출물 처리 시 생강 추출물을 처리한 경우에 비해 염증성 사이토카인의 발현 감소 효과가 더 높은 것을 알 수 있었다.

[0162] 2-4. 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 염증성 사이토카인 발현 확인

[0163] 상기 실험에 2-1의 MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 염증성 사이토카인의 발현을 확인하였다.

[0164] 구체적으로, 실험동물의 무릎 관절 연골조직을 채취하고, TRIzol 시약을 이용하여 RNA를 추출한 후, Nanodrop을 통해 RNA를 정량하고 동량의 RNA 를 cDNA 합성 키트(Takara, Japan)를 이용하여 cDNA로 합성한 후, qRT-PCR을 진행하였다.

[0165] 실험에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Gene	Primer sequences	서열번호
IL-1 β	5'-CACCTCTCAAGCAGACAGCACCTC-3' (sense)	5
	5'-GGGTTCATGGTGAAGTCAAC-3' (antisense)	6
TNF- α	5'-TCGTCTACTACTCCTCAGAGCCC-3' (sense)	7
	5'-ACTTCAGCGTCTCGTGTGTT-3' (antisense)	8
IFN- γ	5'-GCAAAGGACGGTAACACGAA-3' (sense)	9
	5'-ATGGCCTGGTTGTGTCTTTCAAGA-3' (antisense)	10
β -actin	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGAT-3' (sense)	11
	5'-ACCCTCATAGATGGGCACA-3' (antisense)	12

[0168] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IFN- γ , 및 TNF- α 의 발현이 증숙생강 추출물의 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 특히 IL-1 β 및 TNF- α 의 경우 생강 추출물을 처리한 경우에 비해 발현 감소 효과가 더 높은 것을 알 수 있었다.

[0170] 2-5. 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 연골 분해 억제 및 생성 효과 확인

[0171] MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 연골 구성성분인 콜라겐과 젤라틴 등을 분해하는 MMPs(Matrix metalloproteinases), 상기 MMPs의 작용을 억제하는 TIMP(issue inhibitor of metalloproteinases), 및 연골 조직의 생성에 관여하는 COL-2(collagen type II)의 발현을 확인하였다.

[0172] 구체적으로, 퇴행성 관절염 동물 모델의 관절 연골에서 연골분해 억제 및 연골 생성 효과를 확인하기 위하여, 상기 실험에 2-4와 동일한 방법으로 실험동물의 연골조직에서 TRIzol 시약을 이용하여 RNA를 추출하고 Nanodrop을 통해 RNA를 정량한 후, 동량의 RNA 를 cDNA 합성 키트(Takara, Japan)를 이용하여 cDNA로 합성한 다음, qRT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 확인하였다.

[0173] 실험에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Gene	Primer sequences	서열번호
MMP-9	5'-AGCCGGGAACGTATCTGGA-3' (sense)	13
	5'-TGGAAGTACACGCCAGAAG-3' (antisense)	14
TIMP-1	5'-CATCTCTGGCCTCTGGCATC-3' (sense)	15
	5'-CATAACGCTGGTATAAGGTGGTCTC-3' (antisense)	16
TIMP-2	5'-CTGTGACCCAGTCCATCCAGAG-3' (sense)	17

	5'-GACACGCTTAGCATCACCCAGA-3' (antisense)	18
COL2	5'-CTGAGGGCTCCAGAACATC-3' (sense)	19
	5'-TTCGTCCAGGTAGGCAATGC-3' (antisense)	20
β -actin	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGAT-3' (sense)	11
	5'-ACCCTCATAGATGGGCACA-3' (antisense)	12

[0176] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 생강 추출물에 비해 증숙생강 추출물을 처리하였을 때 높은 TIMP1 및 TIMP2의 발현 증가, MMP-9의 발현 감소 효과를 확인하였을 뿐만 아니라, COL-2의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0177] 이로부터, 본 발명에 따른 증숙생강 추출물은 퇴행성 관절염에서 연골의 분해 억제 및 연골 생성 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0179] 2-6. 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 I- κ B 및 NF- κ B 발현 확인

[0180] MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 퇴행성 관절염 진행에 따라 염증성 사이토카인 및 MMP 생성에 관여하는 I- κ B 및 NF- κ B 단백질의 발현을 확인하였다.

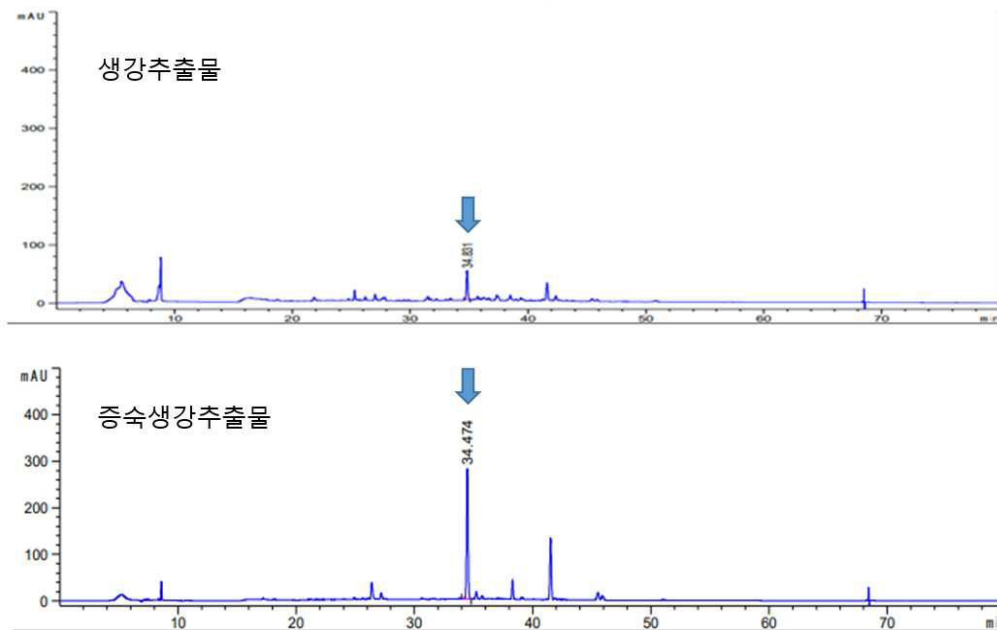
[0181] 구체적으로, I κ B 및 NF- κ B의 발현 확인을 위해 RIPA 버퍼를 이용하여 실험동물의 연골조직에서 단백질을 추출하였으며, 동량의 단백질을 12 % SDS-PAGE로 전기영동한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 이동(transfer)시켰다. 그 후 5 % 스킴 밀크(skim milk)로 상온에서 1시간동안 블로킹(blocking)을 진행한 후, phospho-I κ B(Santa Cruz, USA), I κ B(Santa Cruz, USA), phospho-NF- κ B(Cell Signaling, USA), 및 NF- κ B(Cell Signaling, USA)에 대한 1차 항체를 4 °C에서 하룻동안 반응시키고, 효소, 방사선 물질, 또는 형광물질 등이 부착된 2차 항체(HRP-conjugated rabbit 또는 mouse, Cell Signaling, USA)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 Lumi-Pico 시약으로 단백질을 검출하고 정량화하였다.

[0182] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, MIA 유도 퇴행성 관절염 동물 모델의 연골에서 생강 추출물에 비해 증숙생강 추출물을 처리하였을 때 I- κ B 및 NF- κ B의 단백질 발현이 더 유의적으로 감소함을 확인하였으며, 이로부터 본 발명에 따른 증숙생강 추출물은 NF- κ B 감소에 의한 항염증 작용으로 인해 퇴행성 관절염 개선 효과를 나타낼 수 있었다.

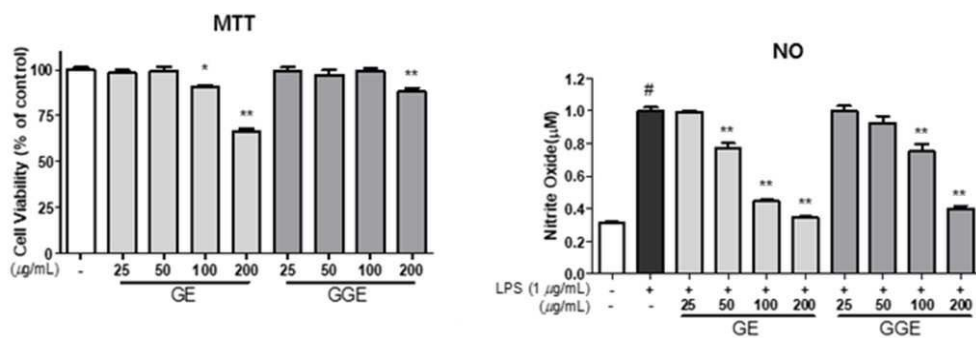
[0184] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

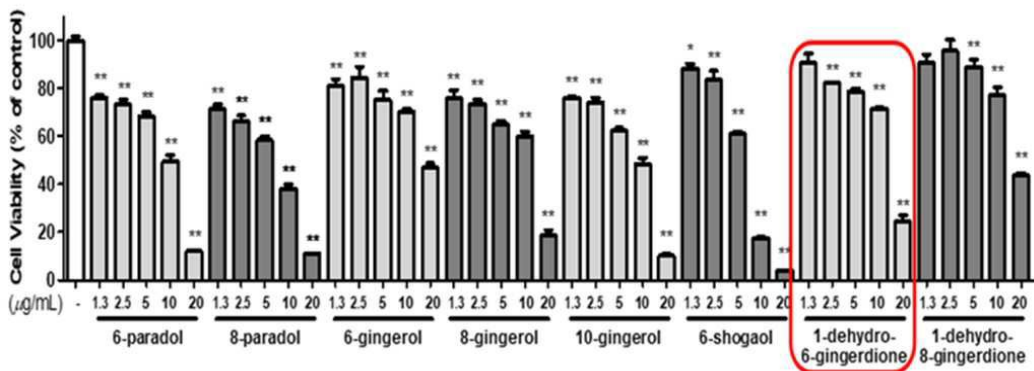
도면1



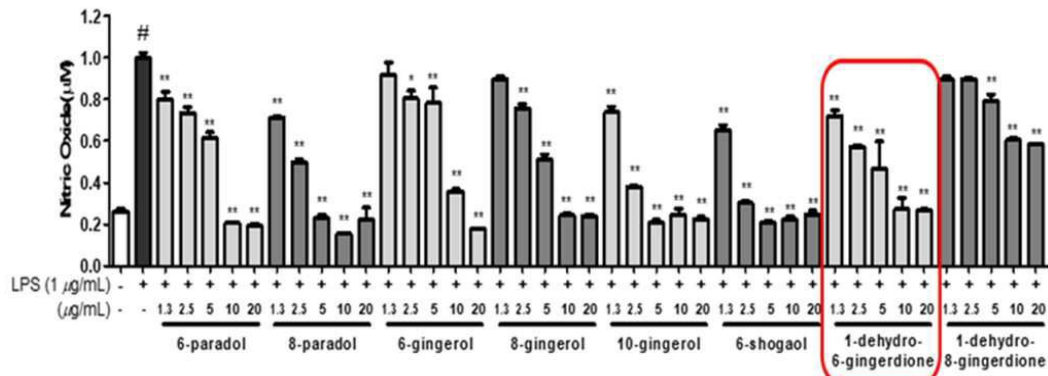
도면2a



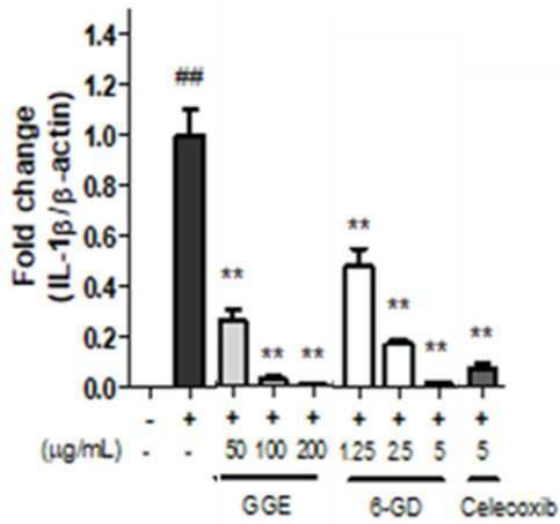
도면2b



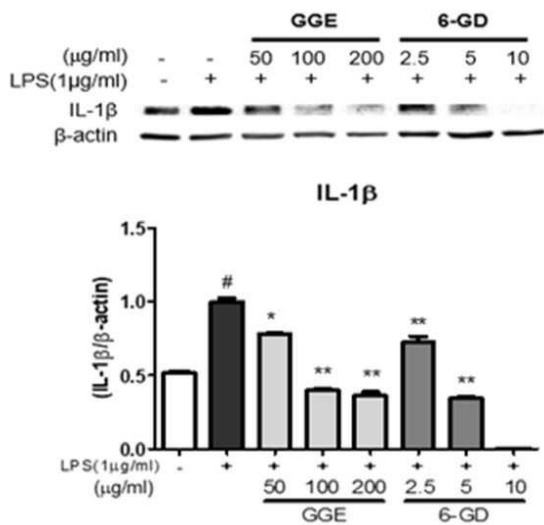
도면2c



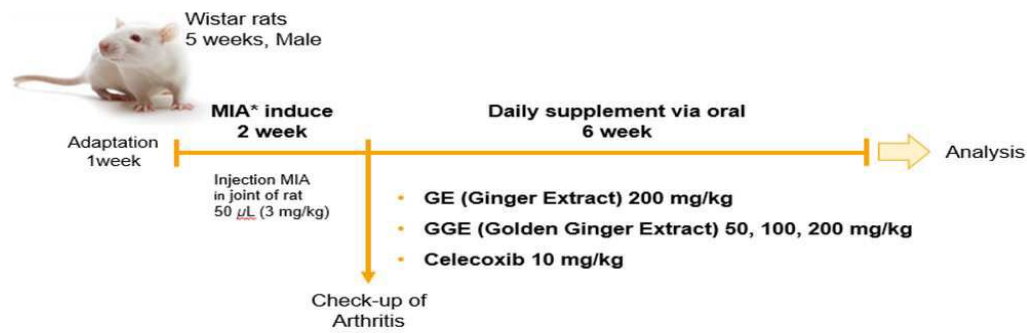
도면3a



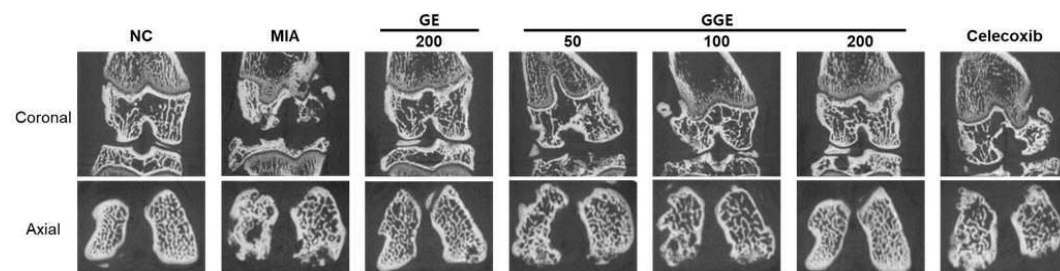
도면3b



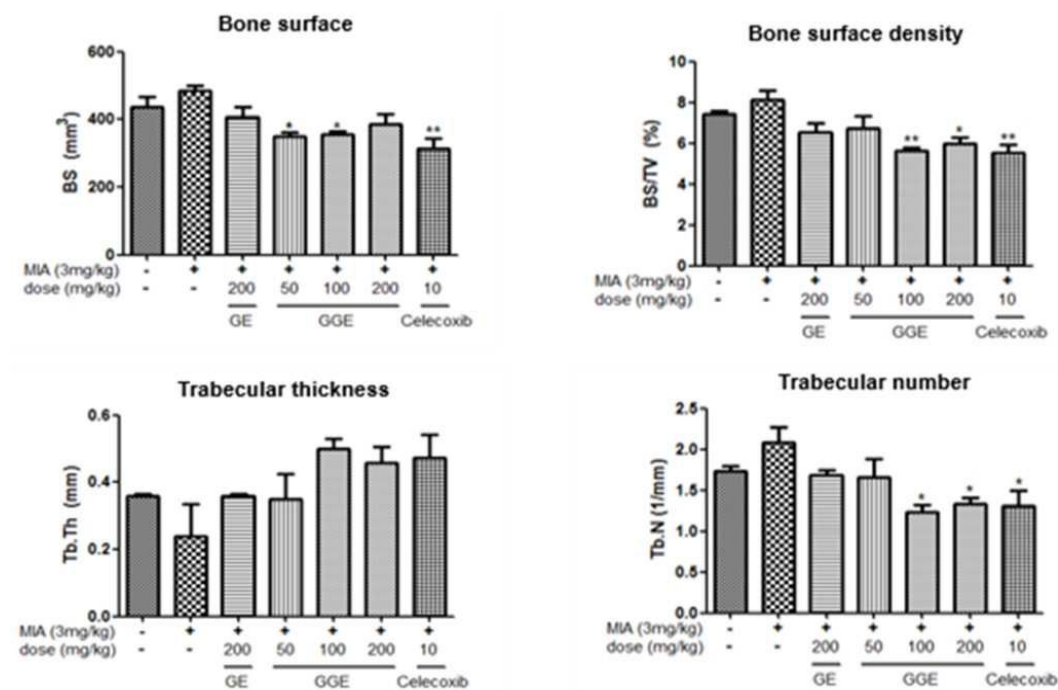
도면4



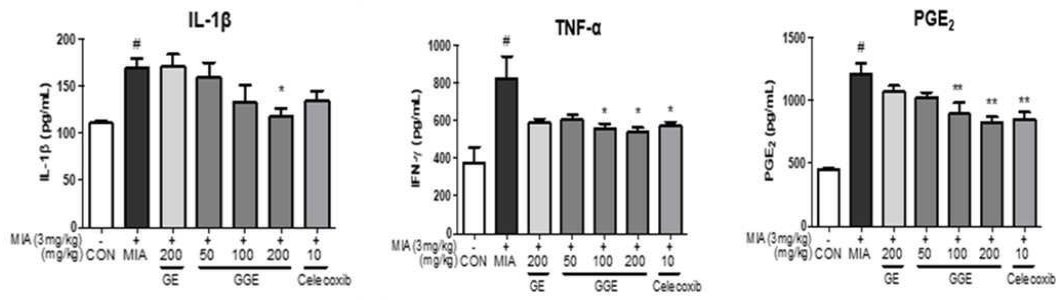
도면5a



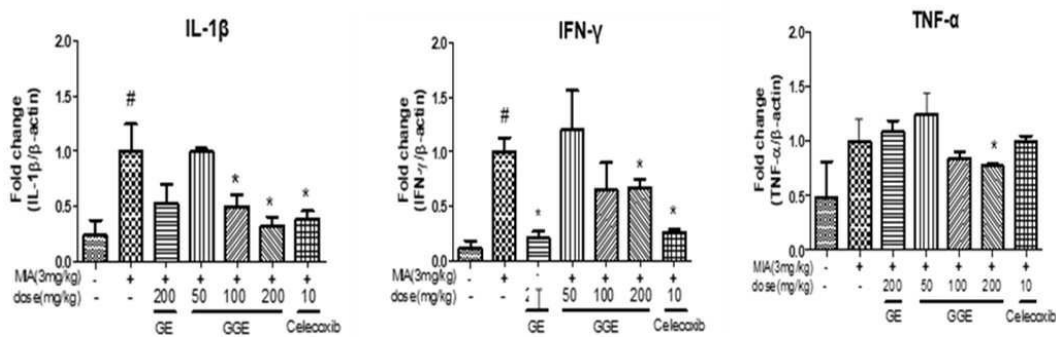
도면5b



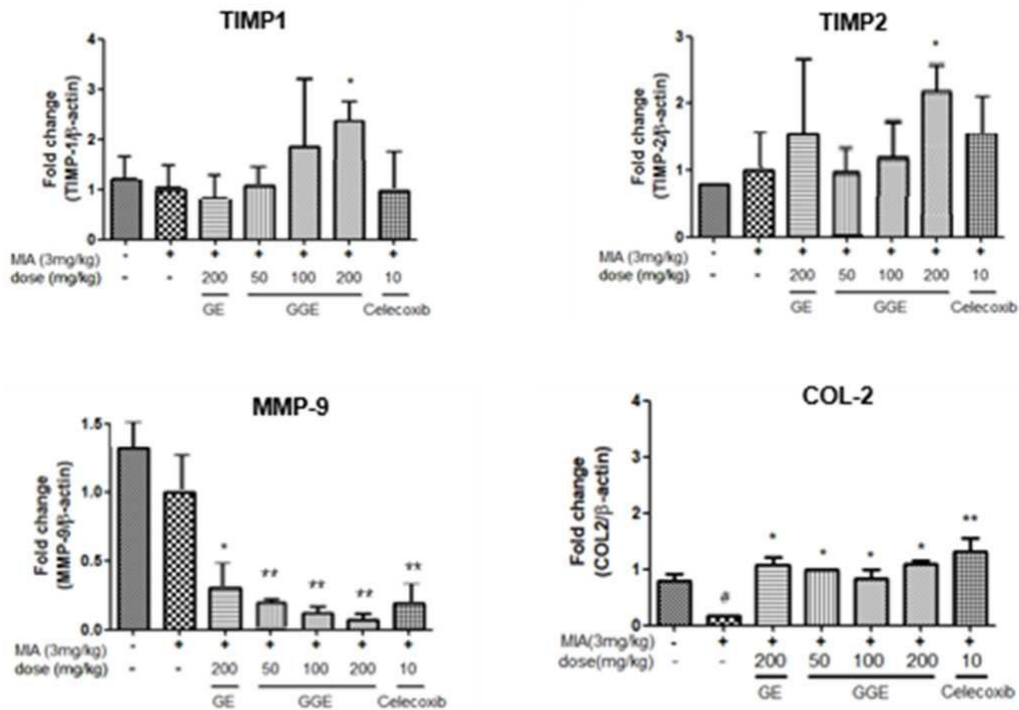
도면6



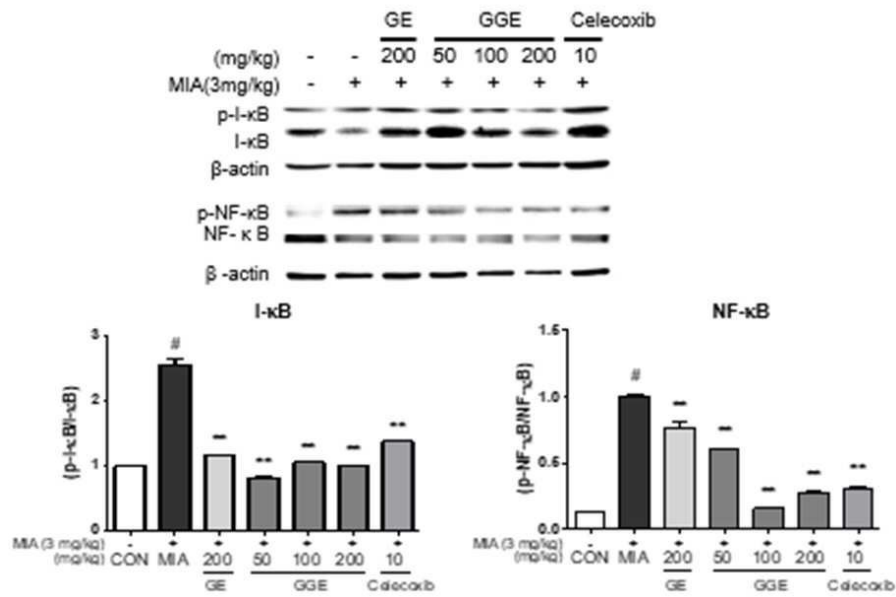
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> GENENCELL INC.
- <120> Composition for preventing, improving, or treating degenerative arthritis comprising steamed ginger extract or 1-dehydro-6-gingerdione isolated therefrom as an active ingredient
- <130> MP21-085
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IL-1beta sense primer
- <400> 1
- gcaactgttc ctgaactcaa ct
- <210>
- > 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IL-1beta antisense primer

<400>	2	
atcttttggg gtcggtcaac t		21
<210>	3	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin sense primer	
<400>	3	
cgtgaaaaga tgaccagat		19
<210>	4	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin antisense primer	
<400>	4	
accctcatag atggcaca		18
<210>	5	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-1beta sense primer	
<400>	5	
cacctctcaa gcagagcaca gcacctc		27
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-1beta antisense primer	
<400>	6	
gggttccatg gtgaagtcaa c		21
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-alpha sense primer

<400> 7

tcgtctacta ctctcagag ccc 23

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-alpha antisense primer

<400> 8

acttcagcgt ctcgtgtgtt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-gamma sense primer

<400>

> 9

gcaaaggacg gtaacacgaa 20

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-gamma antisense primer

<400> 10

atggcctggt tgttgtcttt caaga 25

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin sense primer

<400> 11

cgtgaaaaga tgaccagat 20

<210> 12

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin antisense primer	
<400>	12	
accctcatag atgggcaca		19
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-9 sense primer	
<400>	13	
agccgggaac gtatctgga		19
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-9 antisense primer	
<		
400>	14	
tggaactca cacgccagaa g		21
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TIMP-1 sense primer	
<400>	15	
catctctggc ctctggcatc		20
<210>	16	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TIMP-1 antisense primer	
<400>	16	
cataacgtg gtataagtg gtctc		25

<210>	17	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TIMP-2 sense primer	
<400>	17	
	ctgtgaccca gtccatccag ag	22
<210>	18	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TIMP-2 antisense primer	
<400>	18	
	gacacgctta gcatcaccca ga	22
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COL2 sense primer	
<400>	19	
	ctgagggtc ccagaacatc	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COL2 antisense primer	
<400>	20	
	ttcgtccagg taggcaatgc	20