



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0026491
(43) 공개일자 2015년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/37 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0105424

(22) 출원일자 2013년09월03일

심사청구일자 2013년09월03일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

안동현

부산 남구 분포로 113, 203동 2202호 (용호동, 엘지메트로시티아파트)

김민지

부산광역시 기장군 일광면 이천10길 37 가화일관 타워 102동 2002호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

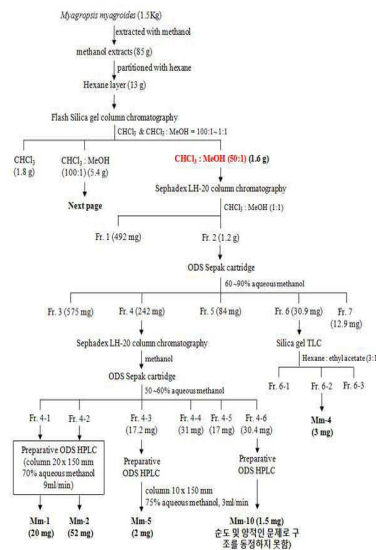
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 모자반크로마놀 b는 생체내 부작용이 적고, 염증 매개인자인 일산화질소의 생성을 억제하며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과가 우수하므로, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강보경

경남 창원시 마산합포구 산호북1길 15, 102동 208호 (산호동, 삼성타운)

김꽃봉우리

부산 사하구 다대로 37, 7동 313호 (괴정동, 금호맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A6A1028677

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 해산식물 유래 항노화 소재 개발 및 분자 작용 메커니즘

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

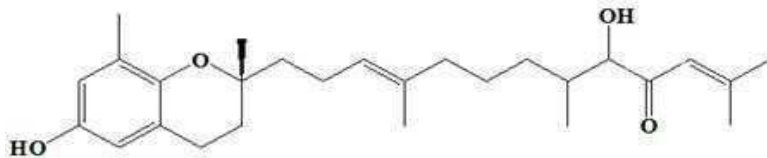
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



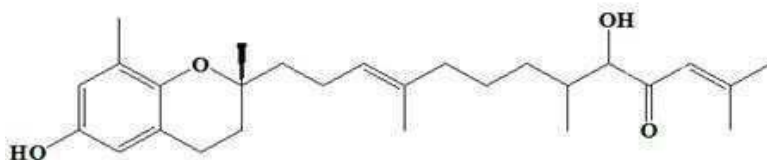
청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 정맥두염, 위염, 비염, 결막염, 천식, 기관지염, 피부염, 아토피성 피부염, 염증성 장질환, 염증성 간질환, 염증성 혈관질환, 염증성 류마티스성 관절염, 재발협착증, 건선, 다발성 경화증 및 염증성 폐질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 질환인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

최근 평균 수명의 연장과 함께 산업 환경의 변화로 전형적인 우리나라 식문화가 변화하면서 암, 당뇨병, 고혈압, 비만 및 혈관성 질환 등의 생활습관성 질환이 차지하는 비율이 매년 증가하고 있다. 이와 더불어, 면역조절

장애로 인해 유발된 염증이 지속되면서, 이로 인해 유발되는 염증성 질환의 발병률 또한 최근 10년 사이에 급증하고 있는 실정이다. 이에 많은 염증 치료제가 개발되어 사용되고 있으나, 이러한 약물들은 피부 위축, 성장 지연, 면역력 약화 등의 적지 않은 부작용을 유발하고, 다양한 염증 기전에 복합적으로 작용하지 못한다는 단점이 있다. 따라서, 이러한 단점을 보완하고 좀 더 근본적으로 염증을 치료할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

- [0003] 한편, 염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전으로, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 히스타민, 세로토닌, 브라디키닌, 프로스타글란딘, HETE(hydroxyeicosatetraenoic acid), 류코트리엔과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증이 유발되는 것으로 알려져 있다. 염증 및 면역 반응에서 대식세포는 활성화를 통해 일산화질소(NO), 프로스타글란딘 E₂(PGE₂) 및 염증성 사이토카인 등을 분비한다. 이러한 대식세포의 활성화 작용에 관여하는 LPS(lipopolysaccharide)는 그람 음성균의 세포벽 구성성분 중의 하나이며 내독소로 잘 알려져 있는 외부인자이다. LPS는 특히, RAW 264.7 세포와 같은 대식세포나 단핵세포에서 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6(interleukin-6), IL-1 β (interleukin-1 beta)와 같은 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 분비함으로써, 염증을 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 최근, 천연물로부터 분리 및 정제된 물질이 다른 유기합성물에 비해 독성이 적어 장기간 섭취하여도 안전하다는 보고가 있어, 이를 이용하여 치료제를 개발하고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있으나, 아직 그 결과는 미미한 실정이다.
- [0005] 한편, 모자반크로마놀(mojabanchromanol)은 모자반으로부터 분리 및 정제된 활성물질로서, 항산화 효과, 뼈 건강 개선 및 뼈 강화 효과, 골질환의 예방 또는 치료 효과, 칼슘 흡수 증진 효과 등이 우수한 것으로 알려져 있다.
- [0006] 상기한 바와 같이, 모자반크로마놀의 다양한 약리 효과가 알려져 있으나, 항염증 효과에 관해서는 아직 알려지지 않았으며, 이에 대한 연구도 미미한 실정이다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 염증을 억제하는 효과가 우수한 천연물 유래 물질에 관해 연구하던 중, 모자반크로마놀 b가 생체내 부작용이 적고, 염증 매개인자인 일산화질소의 생성을 억제하며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과가 우수함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 모자반크로마놀 b는 생체내 부작용이 적고, 염증 매개인자인 일산화질소의 생성을 억제하며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과가 우수하므로, 염증성 질환

환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013]

도 1은 본 발명의 외톨개모자반 추출물의 제조과정 및 모자반크로마놀 b의 분리 및 정제 과정에 대한 모식도를 나타낸 도이다.

도 2는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물 처리시 NO 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 3은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물 처리시 IL-6 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 4는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물 처리시 TNF- α 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 5는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물 처리시 IL-1 β 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 6은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 본 발명의 외톨개모자반 추출물의 세포독성을 나타낸 도이다.

도 7은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물 처리시 각 용매 분획물에 대한 IL-6 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 8은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물 처리시 각 용매 분획물에 대한 TNF- α 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 9는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 n-헥산 분획물 처리시 IL-6 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 10은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 n-헥산 분획물 처리시 TNF- α 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 11은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물을 TLC로 분획하여 수득한 분획물 처리시 IL-6 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 12는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물을 TLC로 분획하여 수득한 분획물 처리시 TNF- α 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 13은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물의 HPLC 분획물 처리시 IL-6 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 14는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명의 외톨개모자반 추출물의 HPLC 분획물 처리시 TNF- α 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 15는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b 처리시 NO 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 16은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b 처리시 IL-6 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 17은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b 처리시 TNF- α 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

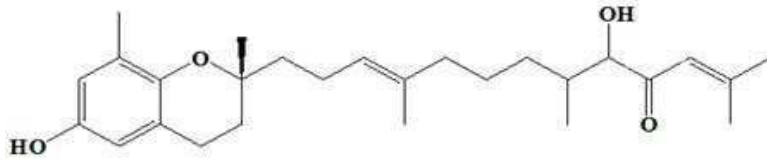
도 18은 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b 처리시 IL-1 β 생성 억제 정도를 나타낸 도이다.

도 19는 LPS로 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b의 세포독성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b(mojabanchromanol b)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

화학식 1



[0015]

[0016] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다

[0017] 이하 본 발명에 관하여 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명의 조성물에서 유효성분인 모자반크로마놀 b는 통상적인 추출 방법에 의해 얻을 수 있고, 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있으며, 통상적인 유기합성적인 방법을 이용하여 제조하여 얻을 수도 있다. 통상적인 추출 방법으로는 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0019] 본 발명에서는 모자반크로마놀 b를 하기와 같은 단계를 거쳐 수득한다.

[0020] 먼저, 외톨개모자반을 세척하고 동결건조시킨 다음, 분쇄시켜 -10 내지 30℃의 온도에서 저장한다. 건조 분쇄된 외톨개모자반을 유기용매로 추출한 후, 이를 감압농축하고 동결건조시켜 분말 형태의 외톨개모자반 추출물을 얻는다. 이때, 유기용매는 C₁~C₄의 알코올, 물, 또는 이들의 혼합용매를 포함할 수 있다. 상기 C₁~C₄의 알코올은 메탄올 또는 에탄올이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 이후, 외톨개모자반 추출물에 증류수를 가하여 현탁시킨 후, n-헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)로 순차 분획하여 각 용매 분획물을 얻는다. 이들 중 항염증 활성이 가장 우수한 n-헥산 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column chromatography); 세파덱스 LH-20 칼럼 크로마토 그래피(Sephadex LH-20 column chromatography); 얇은 박막 크로마토그래피(TLC, Thin Layer chromatography); 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High performance liquid chromatography);를 수행하여 단일물질인 모자반크로마놀 b를 분리하여 얻는다.

[0022] 본 발명의 모자반크로마놀 b는 생체내 부작용이 적고, 염증 매개인자인 일산화질소의 생성을 억제하며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과가 우수하므로, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0023] 상기 염증성 질환은 정맥두염, 위염, 비염, 결막염, 천식, 기관지염, 피부염, 아토피성 피부염, 염증성 장질환, 염증성 간질환, 염증성 혈관질환, 염증성 류마티스성 관절염, 재발협착증, 건선, 다발성 경화증 및 염증성 폐질환 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 조성물은 모자반크로마놀 b와 함께 염증성 질환의 예방 또는 치료의 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조

성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 모자반크로마놀 b는 1일 1 mg/ kg 내지 10000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0029] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명에서, "건강기능식품"이란, 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.

[0031] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 모자반크로마놀 b를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 모자반크로마놀 b를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 모자반크로마놀 b는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0032] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0033] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0034] 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, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택

되는 것이 일반적이다.

이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1. 외톨개모자반으로부터 모자반크로마놀 b의 분리]

1. 외톨개모자반 추출물의 제조

외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)을 부산 송정에서 2011년도에 채취하여 담수로 깨끗이 씻은 다음, 동결 건조하여 잘게 분쇄시킨 후 -20°C 에서 저장하였다. 건조 분쇄된 외톨개모자반을 메탄올(methanol)로 추출하여 외톨개모자반 메탄올 추출물을 얻었다. 외톨개모자반 메탄올 추출물을 감압농축하여 메탄올을 제거하고, 동결건조시켜, 분말형태의 외톨개모자반 추출물을 얻었다. 건조된 외톨개모자반 추출물 시료는 4°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 외톨개모자반 추출물로부터 모자반크로마놀 b의 분리

2-1. 용매별 계통 분획

상기 1에서 얻은 외톨개모자반 메탄올 추출물을 농축하여 메탄올을 제거한 후, 극성이 낮은 용매에서 높은 용매 순으로 순차적으로 분획하였다. 즉, 외톨개모자반 메탄올 추출물에 증류수를 가하여 현탁시킨 후, 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)로 순차 분획하여 각각의 용매 분획물을 얻었다. 비극성 용매의 경우, 황산 마그네슘(magnesium sulfate)을 첨가하여 용매층의 수분을 제거하였다. 각 용매 분획물을 농축하여 무게를 측정하였다. 본 발명의 외톨개모자반의 제조과정 및 모자반크로마놀 b의 분리 및 정제 과정에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타낸 바와 같이, 분획후 헥산 분획물이 13 g, 클로로포름 분획물이 11 g, 에틸아세테이트 분획물이 0.5 g, 부탄올 분획물이 4.4 g으로 얻어졌다.

2-2. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column chromatography)

상기 1에서 얻은 외톨개모자반의 메탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 분획한 후, 함염증 활성이 가장 우수한 헥산 분획물을 감압농축하였다. 농축된 헥산 분획물은 클로로포름 및 클로로포름-메탄올(100:1~1:1, 단계적, v/v)을 용출용매로 이용하여 프래쉬 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(flash silica gel column chromatography)를 수행하였으며, 클로로포름-메탄올 분획물에서 함염증 활성이 우수하게 나타남을 확인하였다.

2-3. 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피(Sephadex LH-20 column chromatography)

상기 2-2에서 함염증 활성이 우수한 클로로포름-메탄올(chloroform-methanol) (50:1, v/v) 분획물을 농축한 후, 클로로포름-메탄올(1:1, v/v)을 용출용매로 이용하여 세파덱스(Sephadex) LH-20 칼럼 크로마토 그래피(column chromatography)를 수행하였다.

2-4. 얇은 박막 크로마토그래피(TLC, Thin Layer chromatography)

상기 2-3에서 세파덱스 LH-20 칼럼 크로마토그래피를 수행한 후, 수득된 용출물을 실리카 겔 TLC(헥산-에틸아세테이트 = 2:1, v/v) 분석을 통해 두 개의 분획, 즉 튜브(tube) 7~15(Fr. 1) 및 튜브 16~24(Fr. 2)로 나누었다. Fr. 2를 60~90% 수분을 함유한/아쿠아 메탄올(aqueous methanol)을 용출용매로 이용하여 ODS 세파 카트리지(Sepak cartridge)를 이용한 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과, Fr. 3, Fr. 4, Fr. 5, Fr. 6, Fr. 7의 분

획물을 확보하였다.

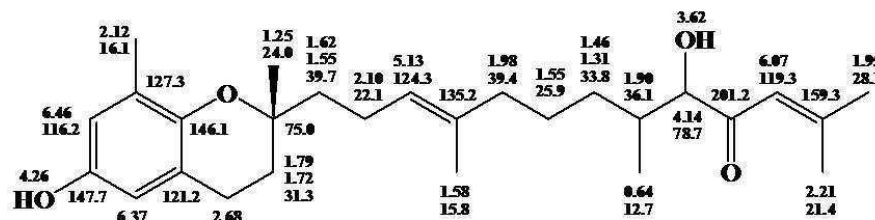
2-5. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High performance liquid chromatography)

상기 2-4에서 수득된 각 분획물을 HPLC 분석(ODS 칼럼 i.d. 4.6 x 150 mm, 50→100% 아쿠아 메탄올 구배(aqueous methanol gradient), 1 ml/분)하여 여섯 개의 분획(Fr. 4-1, Fr. 4-2, Fr. 4-3, Fr. 4-4, Fr. 4-5, Fr. 4-6)으로 나누었다. 최종적으로 Fr. 4-3을 분취용 HPLC(ODS column, i.d. 10 x 150 mm, 75% 아쿠아 메탄올, 3 ml/분)로 분취하여 보존 시간(retention time) 38분 대의 Mm-5 (2 mg)를 정제하였다.

2-6. 모자반크로마놀 b의 동정

Fr. 4-3을 분취용 HPLC(ODS 칼럼, i.d. 10 ×150 mm, 75% 아쿠아 메탄올, 3 ml/분)로 분취하여 보존시간 38분 대의 모자반크로마놀 b (Mojabanchromanol b) (2 mg)를 정제하였다. 정제된 화합물을 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼 분석하여 하기와 같은 구조식을 갖는 모자반크로마놀 b로 규명하였다.

[구조식]



산화질소(NO)의 농도는 질산나트륨(sodium nitrite; NaNO_2)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다. 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0062] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 외톨개모자반 추출물이 NO 생성을 농도의존적으로 억제하였음을 확인하였다.

[0063] 따라서, 본 발명의 외톨개모자반 추출물은 염증 매개인자인 일산화질소의 생성을 억제하므로, 염증을 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

[0064] 3. 염증성 사이토카인 생성 억제활성 측정

[0065] 본 발명의 외톨개모자반 추출물의 염증성 사이토카인 생성 억제활성을 알아보기 위해, 상기 1에서 준비된 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발시킨 뒤, 상기 상기 실시예 1의 2에서 분리된 1의 1에서 얻은 외톨개모자반 추출물을 농도별로 처리하여 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현을 측정하였다.

[0066] 구체적으로는, 마이크로플레이트에 RAW 264.7 세포의 상층액을 넣고, ELISA-키트 (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 먼저, ELISA 마이크로플레이트에 항-마우스(anti-mouse) TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 항체(mAntibody)를 분주하여 코팅(coating)시키고, 10% FBS 용액으로 차단(blocking)하였다. 배양액을 넣고 바이오티닐화된 항-마우스(biotinylated anti-mouse) TNF- α , IL-6 단클론항체(monoclonal antibody; mAb)와 스트렙타비딘-홀스래디쉬 결합된 과산화효소(streptavidin-horseradish peroxidase conjugate)를 첨가하였다. IL-1 β 의 경우, 바이오티닐화된 항-마우스 IL-1 β 를 첨가하고 1시간 동안 반응시킨 후, 스트렙타비딘-홀스래디쉬 결합된 과산화효소를 첨가하여 30분 동안 반응시켰다. 그 후, OPD 용액을 첨가하여 암반응 시키고 마이크로플레이트 리더기(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이의 결과를 도 3 내지 5에 나타내었다.

[0067] 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 외톨개모자반 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 농도의존적으로 억제하였음을 확인하였다.

[0068] 따라서, 본 발명의 외톨개모자반 추출물은 염증성 사이토카인의 생성을 농도의존적으로 유의하게 억제하므로, 염증을 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

[0069] [실험예 2. 외톨개모자반 추출물의 세포 안정성 측정]

[0070] 본 발명의 외톨개모자반 추출물의 세포 안정성을 알아보기 위하여, 상기 실험예 1에서 준비된 RAW 264.7 세포에 상기 실시예 1의 2에서 분리된 1의 1에서 얻은 외톨개모자반 추출물을 처리한 다음, 세포독성 평가를 종래 공지된 MTT 분석법에 따라 수행하였다.

[0071] 구체적으로는, RAW 264.7 세포를 1×10^6 세포/ml 농도로 배양한 후, PBS 및 배양액을 첨가하여 37℃의 온도, 5% CO_2 의 배양기에서 재배양하였다. 본 배양시 MTT(thiazol blue tetrazolium bromide, 5 mg/ml) 시약을 첨가하여 2시간 동안 배양하면서 포르마잔 크리스탈(fomazan crystal) 형성을 유도하였다. 이를 4℃의 온도, 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. RAW 264.7 세포의 증식률을 하기 수식식 1을 이용하여 산출하였으며, 이의 결과를 도 6에 나타내었다.

수식식 1

$$\text{증식률(Proliferation Index)}(\%) = (\text{실험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

[0072]

[0073] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 외톨개모자반 추출물은 모든 농도에서 세포독성을 보이지 않음을 확인하였

다.

[0074] 따라서, 본 발명의 외톨개모자반 추출물은 세포독성이 없으므로, 부작용이 없거나 적은 항염증용 의약품 또는 식품 제제로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였으며, 상기 실험예 1에서 확인된 항염증 효과는 세포독성과는 무관한 외톨개모자반의 약리효과임을 알 수 있다.

[실험예 3. 외톨개모자반 추출물 유래 물질의 항염증 효과 측정]

[0076] 본 발명의 외톨개모자반 추출물에서 항염증 활성을 나타내는 물질을 분리 및 동정하기 위하여, 하기와 같은 과정을 수행하였다.

1. 외톨개모자반 용매 분획물의 항염증 효과 측정

[0078] 상기 상기 실시예 1의 2에서 분리된 1의 1에서 얻은 외톨개모자반 메탄올 추출물을 용매간의 극성차를 이용하여 *n*-헥산(*n*-hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 및 물 용매별로 계통분획하여 순차적으로 분획물을 얻었다. 수득된 각 분획물을 LPS로 염증을 유발시킨 RAW 264.7 세포에 50, 100g/mL의 농도로 처리한 후, IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 이의 결과를 도 7 및 8에 나타내었다.

[0079] 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, 상기 분획물 중 *n*-헥산 분획물이 다른 분획물에 비해 IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 현저하게 억제하였음을 확인하였다.

2. 외톨개모자반 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 분획물의 항염증 활성

[0081] 상기 1에서 가장 우수한 항염증 활성을 보인 *n*-헥산 (*n*-hexane) 분획물을 클로로포름 및 메탄올의 혼합용매(각 용매가 100:1, 50:1, 20:1, 5:1, 1:1의 비율로 혼합된 용매)로 각각 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 분획물을 얻었다. 수득된 각 분획물을 LPS로 염증을 유발시킨 RAW 264.7 세포에 50, 100g/mL의 농도로 각각 처리한 후, IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 이의 결과를 도 9 및 10에 나타내었다.

[0082] 도 9 및 10에 나타난 바와 같이, 클로로포름 및 메탄올이 50:1로 혼합된 용매로 수행한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 분획물이 다른 분획물에 비해 IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 현저하게 억제하였음을 확인하였다.

3. 외톨개모자반 얇은 박막 크로마토그래피 분획물의 항염증 활성

[0084] 상기 2에서 가장 우수한 항염증 활성을 보인, 클로로포름 및 메탄올이 50:1로 혼합된 용매를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 수득된 분획물에 대한 박막 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과, 6개의 분획물을 수득하였다. 수득된 각 분획물을 LPS로 염증을 유발시킨 RAW 264.7 세포에 50, 100g/mL의 농도로 각각 처리한 후, IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 이의 결과를 도 11 및 12에 나타내었다.

[0085] 도 11 및 12에 나타난 바와 같이, 상기 TLC 4번 분획물이 다른 분획물에 비해 IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 현저하게 억제하였음을 확인하였다.

4. 외톨개모자반 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분획물의 항염증 활성

[0087] 상기 3에서 가장 우수한 항염증 활성을 보인 TLC 4번 분획물에 대한 HPLC를 수행하였으며, 그 결과 6개의 피크(peak)를 얻었다. 각 피크(peak)를 분획물로 얻어 LPS로 염증을 유발시킨 RAW 264.7 세포에 50, 100g/mL의 농도로 처리한 후, IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 이의 결과를 도 13 및 14에 나타내었다.

[0088] 도 13 및 14에 나타난 바와 같이, 상기 피크 분획물 중 4-3번 분획물이 다른 분획물에 비해 IL-6 및 TNF- α 사이토카인의 분비량을 현저하게 억제하였음을 확인하였다.

[실험예 4. 모자반크로마놀 b의 항염증 효과 측정]

1. 일산화질소 생성 억제활성 측정

상기 실험예 1에서 준비된 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발한 후, 상기 상기 실시예 1의 2에서 분리된 1의 2에서 분리된 단일물질 모자반크로마놀 b(Mojabanchromanol b)를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 첨가하여 염증 매개인자인 일산화질소(NO) 생성 억제활성을 측정하였다. NO 생성 억제활성 측정은 상기 실험예 1의 2에 기재된 방법과 동일하게 수행하였으며, 이의 결과를 도 15에 나타내었다.

도 15에 나타난 바와 같이, 본 발명의 모자반크로마놀 b가 NO 생성을 농도의존적으로 억제하였음을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 모자반크로마놀 b는 염증 매개인자인 일산화질소의 생성을 억제하므로, 염증을 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

2. 염증성 사이토카인 생성 억제활성 측정

본 발명의 모자반크로마놀 b의 염증성 사이토카인 생성 억제활성을 알아보기 위해, 상기 실험예 1에서 준비된 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 후, 상기 상기 실시예 1의 2에서 분리된 1의 2에서 분리된 모자반크로마놀 b를 첨가한 다음, 생성되는 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 사이토카인의 측정은 상기 실험예 1의 3에 기재된 방법과 동일하게 수행하였으며, 이의 결과를 도 16 내지 18에 나타내었다.

도 16 내지 18에 나타난 바와 같이, 본 발명의 모자반크로마놀 b는 생성된 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 사이토카인 분비량을 현저히 감소시킨 것을 확인하였다. 특히, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 IL-6의 분비가 완전히 억제되었음을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 모자반크로마놀 b는 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 억제시키는 효과가 우수하므로, 염증을 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

[실험예 5. 모자반크로마놀 b의 세포 안정성 측정]

본 발명의 모자반크로마놀 b의 세포 안정성을 알아보기 위하여, 상기 실험예 1에서 준비된 RAW 264.7 세포에 상기 실시예 1의 2에서 분리된 모자반크로마놀 b를 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 처리한 다음, MTT 분석법을 이용하여 세포독성 평가를 수행하였다. 상기 MTT 분석법은 상기 실험예 2에 기재된 방법과 동일하게 수행하였으며, 이의 결과를 도 19에 나타내었다.

도 19에 나타난 바와 같이, 본 발명의 모자반크로마놀 b는 모든 농도에서 세포독성이 측정되지 않았다.

따라서, 본 발명의 모자반크로마놀 b는 세포독성이 없으므로, 부작용이 없거나 적은 항염증용 의약품 또는 식품 제제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 상기 실험예 4에서 확인된 모자반크로마놀 b의 항염증 효과는 세포독성과는 무관한 모자반크로마놀 b의 약리효과임을 알 수 있다.

최종적으로 외톨개모자반 추출물로부터 분리된 모자반크로마놀 b는 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않으면서 염증을 억제할 수 있는 화합물임을 확인하였다.

이하 본 발명의 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[제제예 1. 약학적 제제의 제조]

1. 산제의 제조

[0106]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	20 mg
[0107]	유당	100 mg
[0108]	탈크	10 mg
[0109]	상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.	
[0110]	<u>2. 정제의 제조</u>	
[0111]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	10 mg
[0112]	옥수수전분	100 mg
[0113]	유당	100 mg
[0114]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0115]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	
[0116]	<u>3. 캡슐제의 제조</u>	
[0117]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	10 mg
[0118]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0119]	락토오스	14.8 mg
[0120]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0121]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0122]	<u>4. 주사제의 제조</u>	
[0123]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	10 mg
[0124]	만니톨	180 mg
[0125]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0126]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg
[0127]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0128]	<u>5. 액제의 제조</u>	
[0129]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	20 mg
[0130]	이성화당	10 g
[0131]	만니톨	5 g
[0132]	정제수	적량
[0133]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0134]	[제제예 2. 식품 제제의 제조]	

[0135]	<u>1. 건강식품의 제조</u>	
[0136]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	100 mg
[0137]	비타민 혼합물	적량
[0138]	비타민 A 아세테이트	70 g
[0139]	비타민 E	1.0 mg
[0140]	비타민 B1	0.13 mg
[0141]	비타민 B2	0.15 mg
[0142]	비타민 B6	0.5 mg
[0143]	비타민 B12	0.2 g
[0144]	비타민 C	10 mg
[0145]	비오틴	10 g
[0146]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0147]	엽산	50 g
[0148]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0149]	무기질 혼합물	적량
[0150]	황산제1철	1.75 mg
[0151]	산화아연	0.82 mg
[0152]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0153]	제1인산칼륨	15 mg
[0154]	제2인산칼슘	55 mg
[0155]	구연산칼륨	90 mg
[0156]	탄산칼슘	100 mg
[0157]	염화마그네슘	24.8 mg
[0158]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0159]	<u>2. 건강음료의 제조</u>	
[0160]	화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b	100 mg
[0161]	비타민 C	15 g
[0162]	비타민 E(분말)	100 g
[0163]	젖산철	19.75 g
[0164]	산화아연	3.5 g
[0165]	니코틴산아미드	3.5 g
[0166]	비타민 A	0.2 g

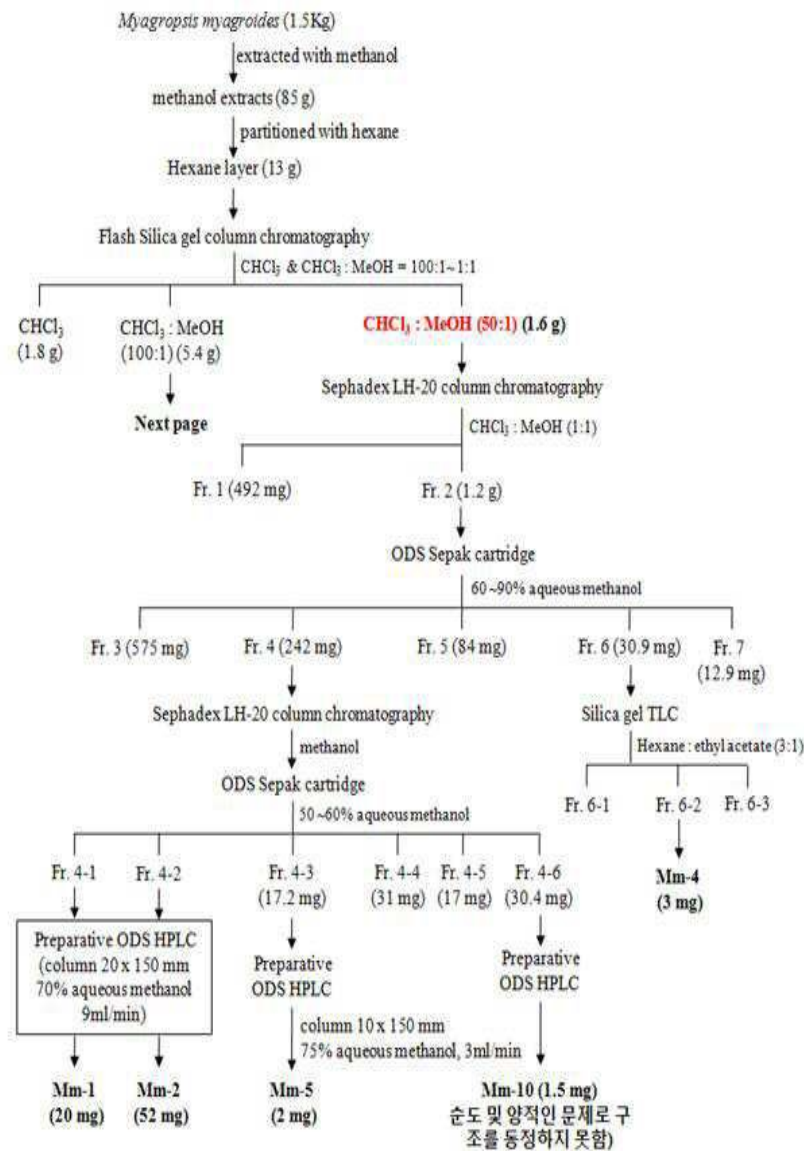
[0167]	비타민 B1	0.25 g
[0168]	비타민 B2	0.3g
[0169]	물	정량

[0170] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

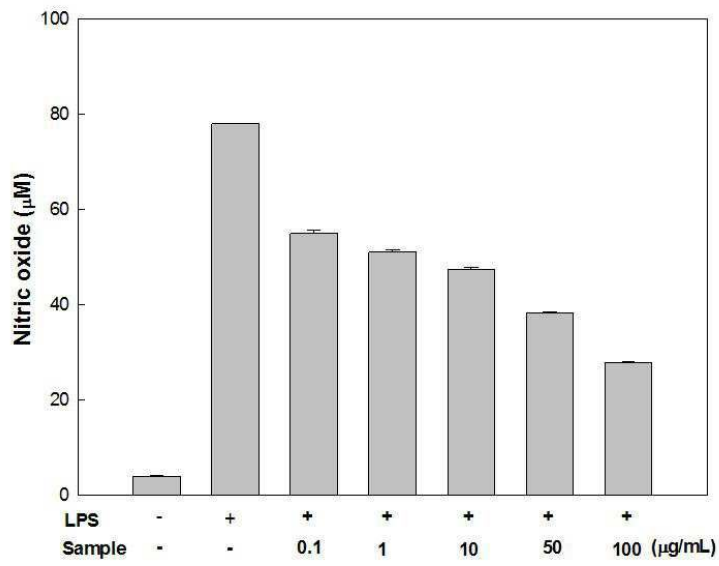
[0171] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

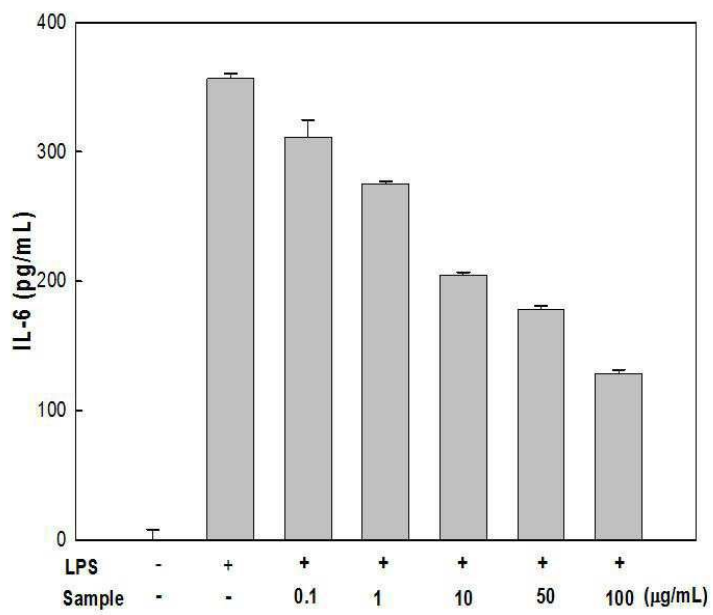
도면1



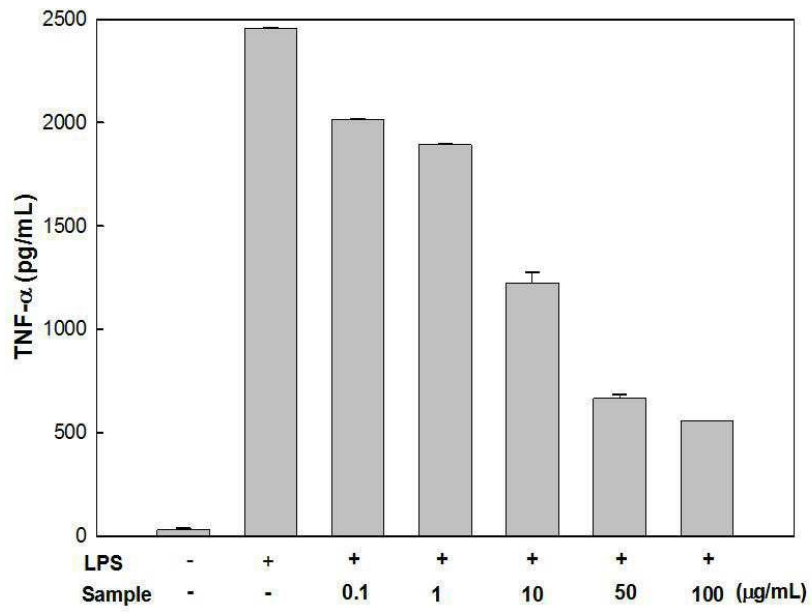
도면2



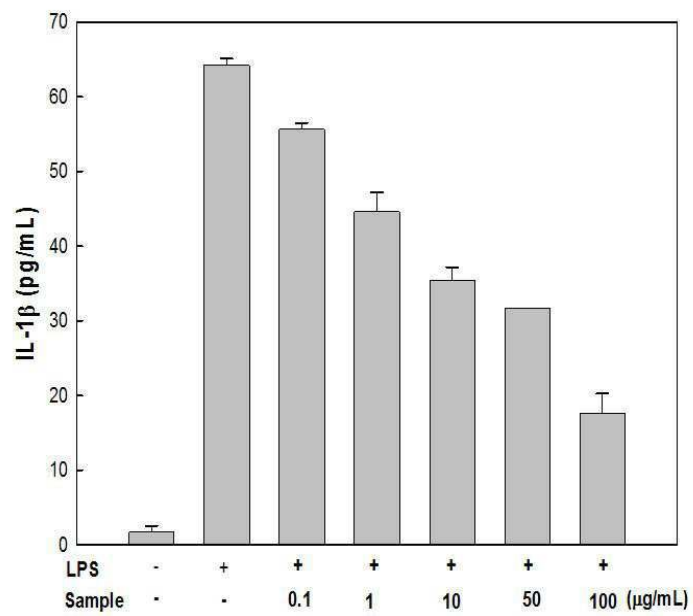
도면3



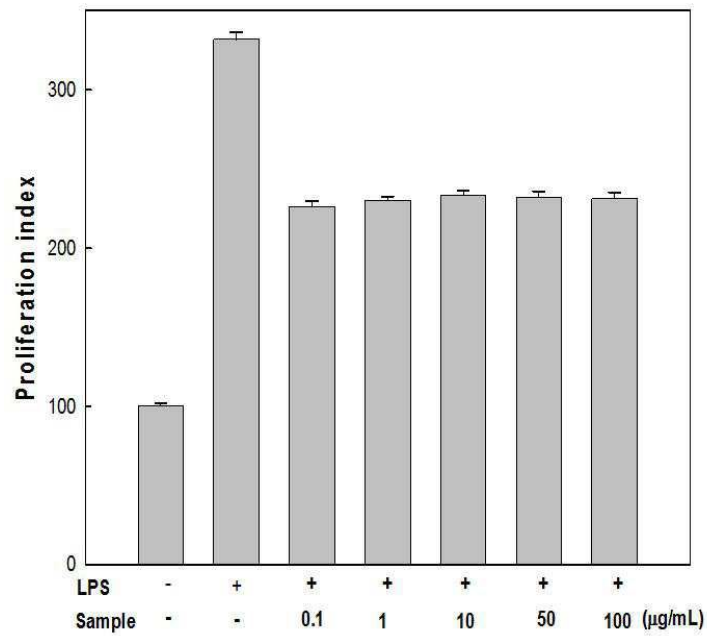
도면4



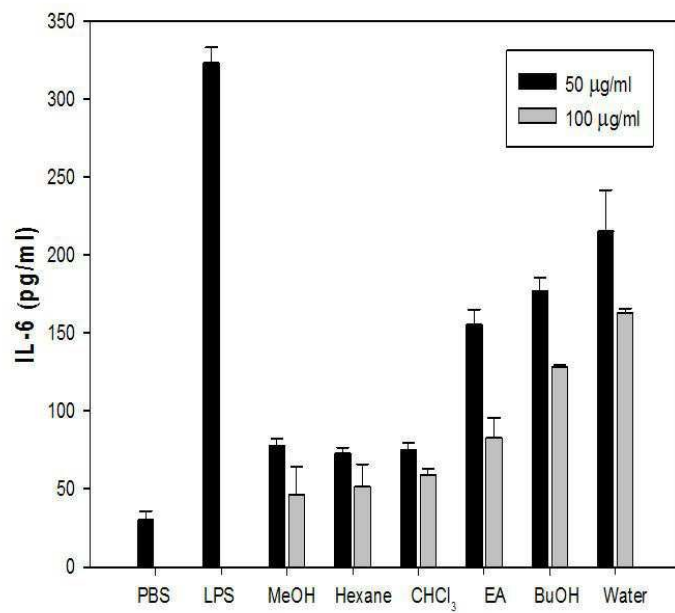
도면5



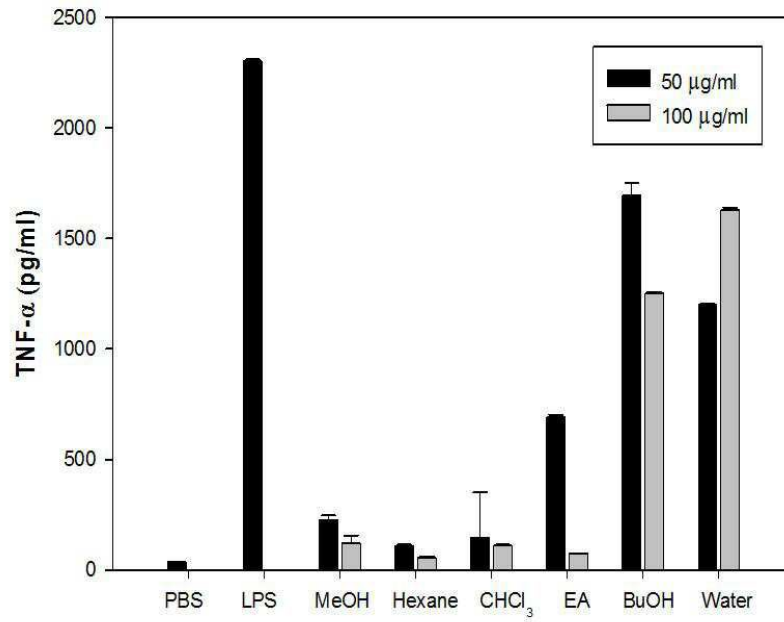
도면6



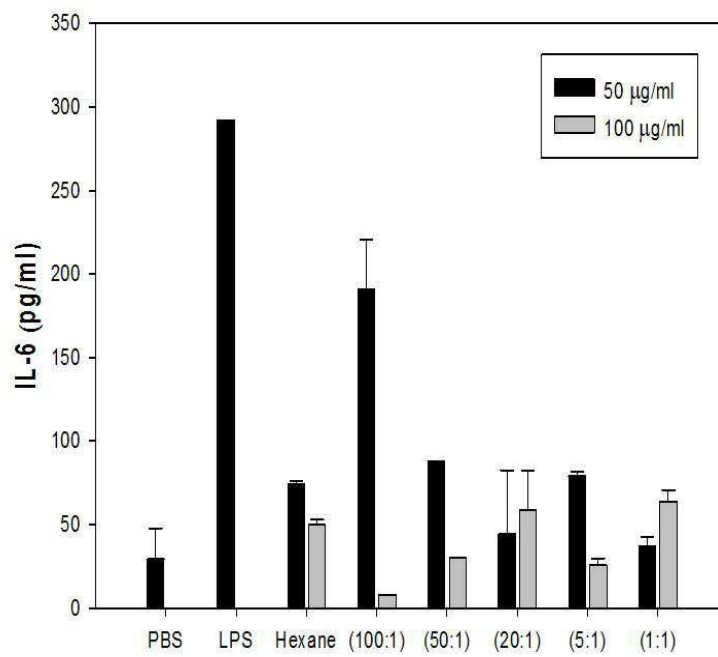
도면7



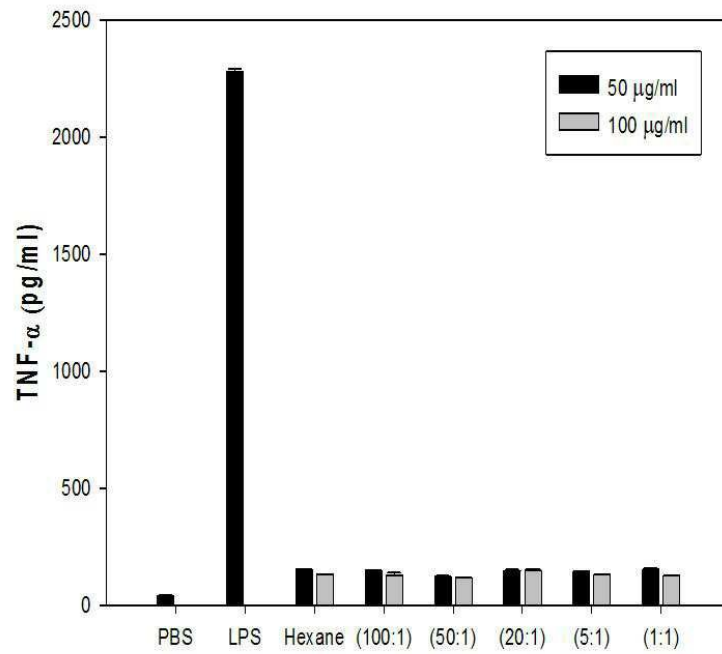
도면8



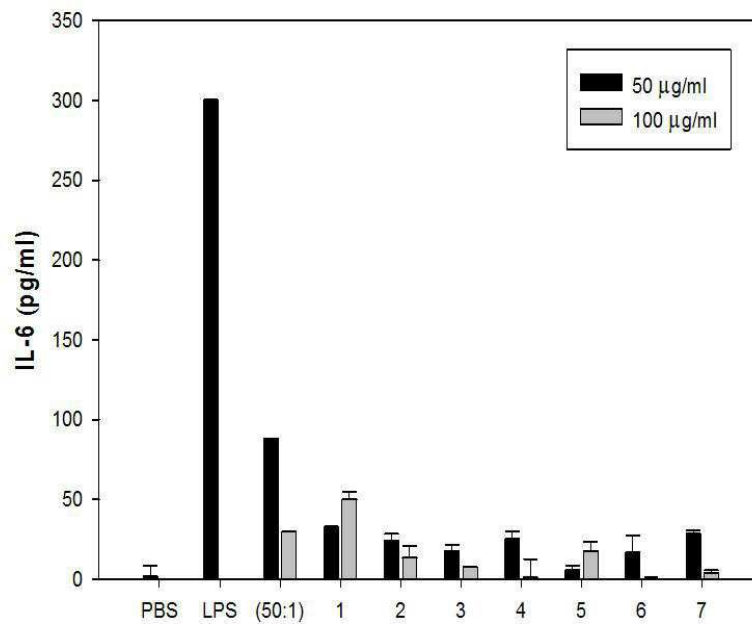
도면9



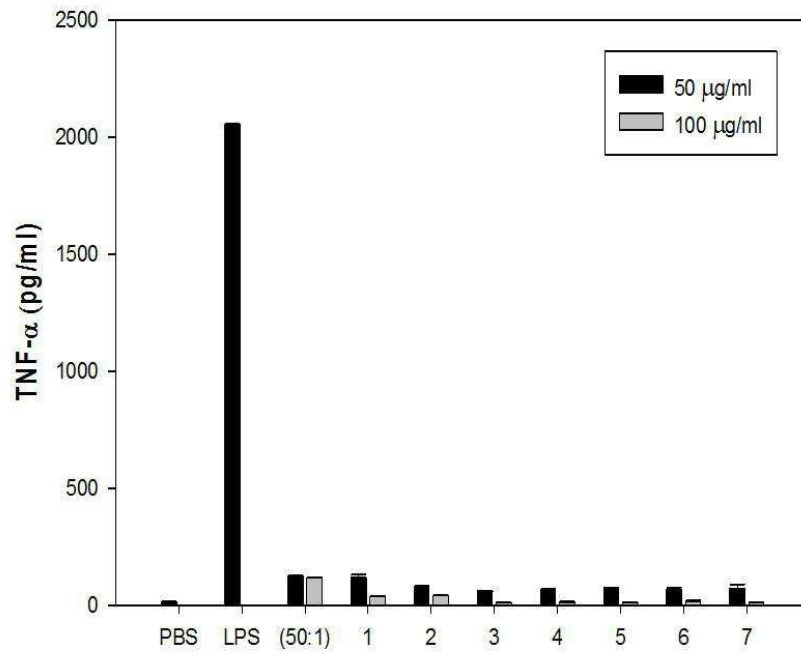
도면10



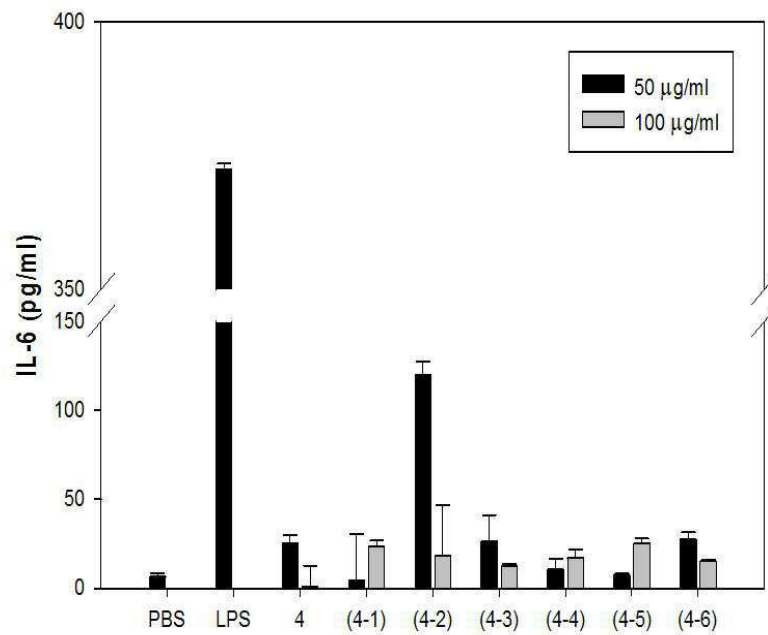
도면11



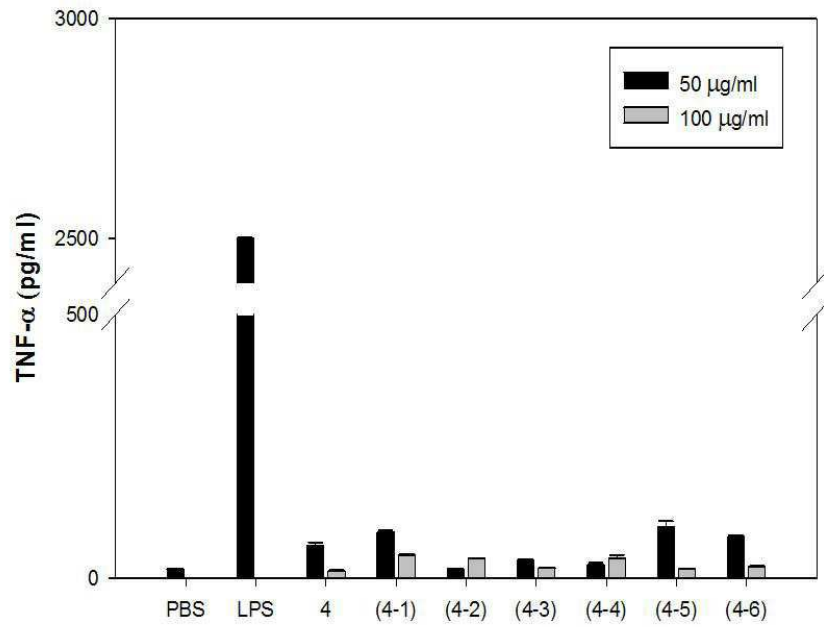
도면12



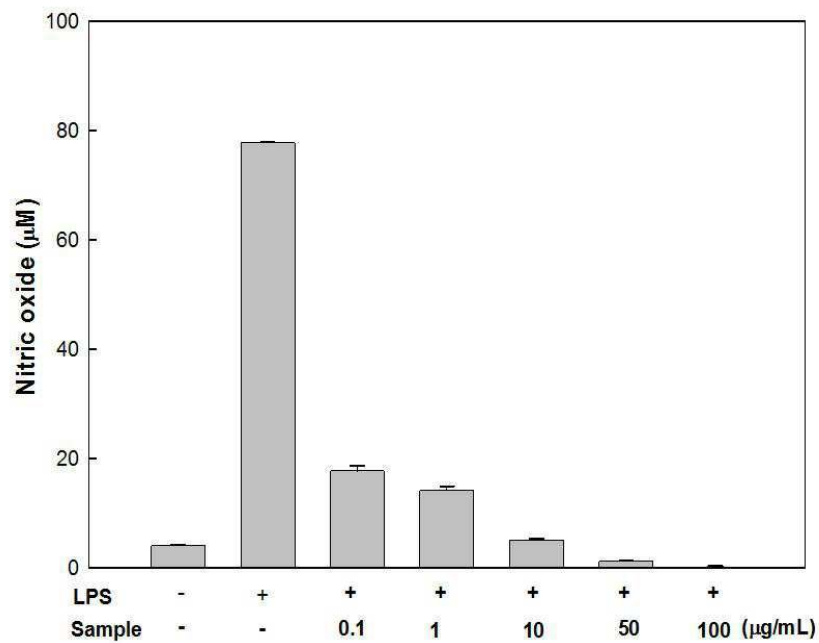
도면13



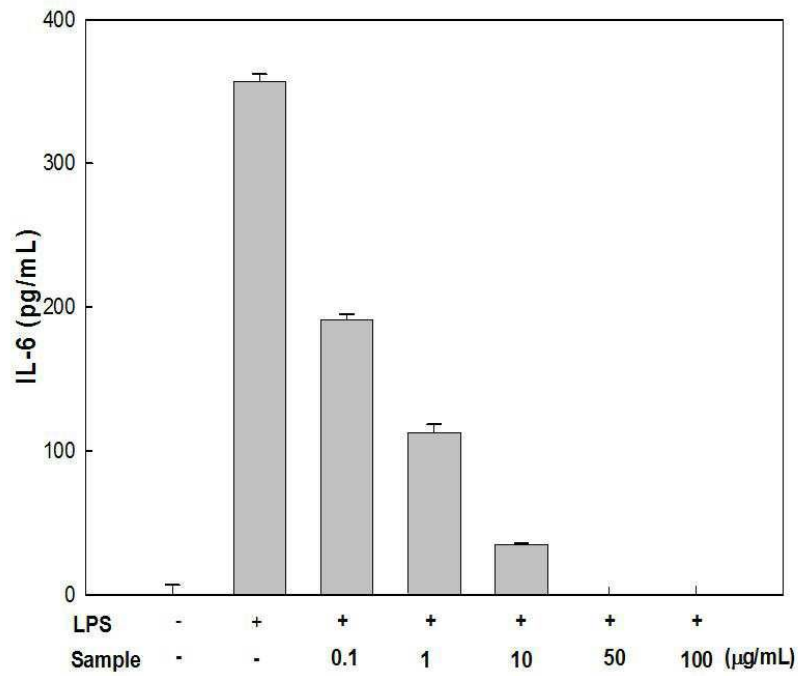
도면14



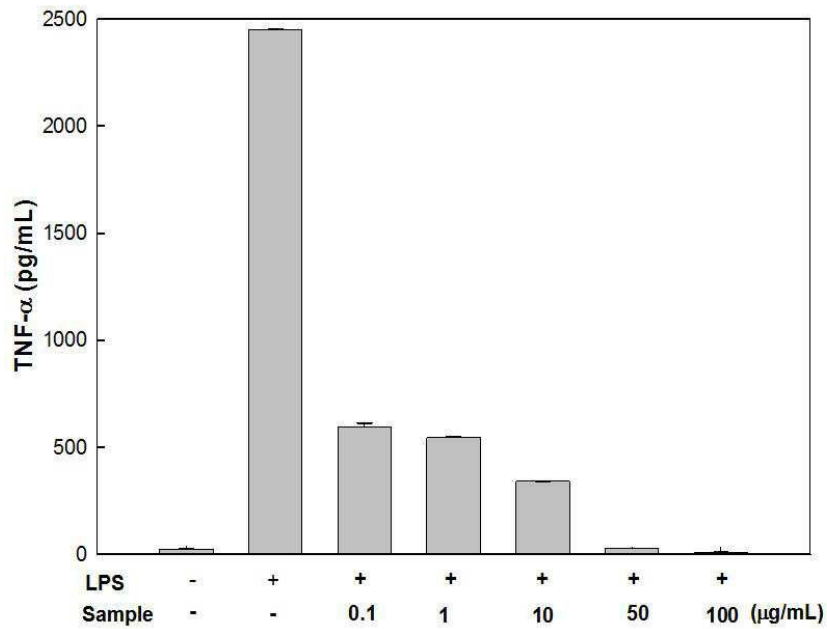
도면15



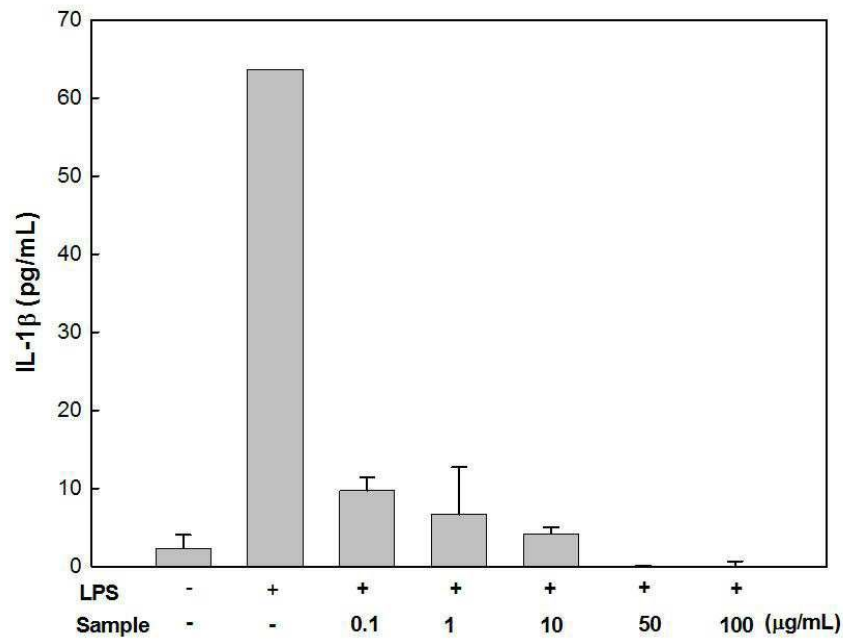
도면16



도면17



도면18



도면19

